

## 《和 文》

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	高橋 誠
題 目	秋ウコンエキスのリポソーム化による食品機能の向上に関する研究 (Studies on the improvements in food functionality of Ukon ( <i>Curcuma longa</i> L.) extract by liposome encapsulation)

秋ウコン(*Curcuma longa* L.)の根茎は治療薬としてインドおよびアジア諸国で広く用いられている。特に、秋ウコン中のポリフェノールで、重要な脂溶性成分のひとつであるクルクミンは、伝統的医薬品として効果的であると報告されている。しかし、クルクミンは難水溶性で、消化液に対して安定性が低いためその生体利用率は低い。こういった問題の解決方法のひとつに、レシチンリポソームによるカプセル化が考えられる。そこで本研究では、異なった方法および条件で、3種類の食品用レシチン(大豆レシチン、SLP-WHITE および SLP-PC70;卵黄レシチン、PL-30S)、秋ウコンエキスおよびクルクミンを用いてリポソームを調製し、それぞれのリポソームの物性や食品機能性を調べた。

はじめに、バンガム法で3種類の食品用レシチンを用いてリポソームを調製し、それぞれの物性を保持効率の測定および共焦点レーザー顕微鏡(CLSM) 観察で調べた。その結果、保持効率に関しては3種類のリポソームに大きな差を認めなかったが、CLSM 観察では、SLP-WHITE を用いたリポソームが最も粒子径が小さいことが示された。さらに、このリポソームは少なくとも30日間は良好な分散を維持していた。これらの結果から、良好な分散性を示す安定なリポソームの調製に SLP-WHITE が最適であることが示唆された。

次に、SLP-WHITE を用いて、様々な条件下、メカノケミカル法で秋ウコンエキスをカプセル化したリポソーム(LUE)を調製し、その物理化学的、生化学的特性を調べた。ホモジナイザー処理の場合、LUE の粒子径はエキス濃度が10 から2.5 wt%に従って減少したが、570 nm 以下には至らなかった。そこで、LUEをマイクロフルイダイザー処理したところ、5 wt%以下のエキス濃度で調製したLUEでは、少なくとも14日間は良好な分散を維持していた。5 wt%のエキス濃度で調製したLUEの粒子径は、20 MPaの処理圧力に比べて100 MPaのほうが小さく、その大きさは180 nm 以下に減少した。最適な条件下で調製したLUEを電子顕微鏡観察したところ、粒子径が100 nm 程度の一枚膜リポソームであることを確認した。

このLUEの消化液に対する耐性を調べたところ、未カプセル化エキスと比較して、クルクミンの残存率が2倍以上あることが確認された。さらに、LUEの食品機能性を調べるために、四塩化炭素を用いて誘導した肝障害マウスの肝障害抑制効果を検討したところ、エキスのみを33mg/kg 経口投与した場合に比べて、エキス量で10 mg/kg のLUEを投与した群で、より大きな血清中ASTおよびALTの抑制作用を認めた。

さらに、LECの肝障害抑制賦活のメカニズムを明らかにするために、クルクミンのみをカプセル化したリポソーム(LEC)のラットにおける腸管吸収への影響を調べた。その結果、クルクミン経口投与群の血漿中クルクミン濃度に比べて、LEC投与群のほうが有意に上昇していた。興味深いことに、血漿中のクルクミン濃度は対応した血漿中の抗酸化活性と相関しており、クルクミンのカプセル化は血漿の抗酸化活性やその食品機能性に対して大きく影響を与えることが示唆された。

我々は、食品機能性が賦活されたLUEの効率的な調製方法を開発した。本研究は、フードデリバリー機能を持ったリポソームの開発において、新しい手段を切り開くと考える。

## 学位論文要旨

氏名	Makoto TAKAHASHI
題目	Studies on the improvements in food functionality of Ukon ( <i>Curcuma longa</i> L.) extract by liposome encapsulation (秋ウコンエキスのリポソーム化による食品機能の向上に関する研究)

The rhizome of *Curcuma longa* L. (Ukon) is widely used for therapeutic purposes in India and other Asian countries. Especially, curcumin, which is polyphenol and one of the most important lipidic ingredients in Ukon, has been reported to be effective as a traditional remedy. However, curcumin has suffered from low bioavailability due to its low water-solubility and low stability against gastrointestinal fluids. One of the appropriate breakthroughs toward solving their problems is the use of liposomes which are microcapsules prepared from lecithins. In this study, we prepared liposomes using three types of edible lecithins (soybean lecithins, SLP-WHITE and SLP-PC70, and egg yolk lecithin, SL-30S), Ukon extract and curcumin under different techniques and conditions, and investigated their physicochemical characteristics and food functionalities.

Firstly, liposomes were prepared from three types of commercially available lecithins by the Bangham method, and their physicochemical properties were examined by using the measurements of trapping efficiency and a confocal laser scanning microscopy (CLSM). There was little difference in the trapping efficiency among the three types of liposomes. CLSM observation showed the particle size of liposomes prepared from SLP-WHITE is significantly smaller than that prepared from other lecithins. In addition, the liposomal solution remained well dispersed for at least 30 days. These results indicated that SLP-WHITE is the most appropriate for the preparation of stable liposomes with well dispersed.

Secondly, liposomes encapsulating Ukon extract (LUE) with SLP-WHITE were prepared by the mechanochemical method under different conditions, and were physicochemically and biochemically characterized. After a homogenization, the size of LUE decreased with decreasing the extract concentrations from 10 to 2.5 wt%, but did not decrease below 570 nm. LUE were thus subjected to microfluidization. The LUE solutions obtained from less than 5 wt % of the extract remained well dispersed for at least 14 days. With 5 wt % of the extract, the size of LUE obtained at 100 MPa was smaller than that obtained at 20 MPa, and reached below 180 nm. Under optimal conditions, resulting LUE was confirmed to be small unilamellar vesicles with a diameter of approximately 100 nm by freeze-fracture electron microscopy.

When used for treating simulated gastric and intestinal fluids, LUE obtained by microfluidization showed a 2-fold higher residual rate of curcumin than the uncapsuled extract itself. The bioactivity of LUE was further examined for its suppressive effect on carbon tetrachloride-induced liver injury by using mice. Orally administrated LUE at a dose of 10 mg/kg as the extract had a much higher suppressive effect on the serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels, compared to the uncapsuled extract at a dose of 33 mg/kg.

Moreover, in order to clarify the suppressive effect by LUE, the intestinal absorption of liposomes encapsulating curcumin (LEC) on rats was investigated. After LEC administration, the plasma level of curcumin significantly increased compared to the uncapsuled curcumin administration. Interestingly, the plasma levels of curcumin were significantly correlated to the plasma antioxidant activities.

We developed an efficient preparation method for LUE which is likely to enhance its food functionality. This study would also open new avenues for the development of liposomes in food delivery systems.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	高橋 誠
審査委員	主査 琉球大学 教授 和田 浩二
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
	副査 琉球大学 准教授 玉城 一
審査協力者	産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門 バイオ・ケミカル材料グループ長 北本 大
題 目	秋ウコンエキスのリポソーム化による食品機能の向上に関する研究 (Studies on the improvements in food functionality of Ukon ( <i>Curcuma longa</i> L.) extract by liposome encapsulation)
<p>秋ウコン (<i>Curcuma longa</i> L.) の根茎は肝保護作用をはじめ、抗腫瘍性、抗酸化性及び抗炎症効果等の種々の薬理作用を有することから、治療薬としてインド及びアジア諸国で広く用いられている。しかしながら、秋ウコン中の重要な食品機能成分のひとつであるクルクミンは、消化液に対する安定性や消化管吸収が低いためにその生体利用率は必ずしも高いとはいえない。このような問題の解決方法のひとつに、レシチンリポソームによるカプセル化が考えられる。本研究では、秋ウコンエキス及びクルクミンを用いてリポソームを調製し、それぞれのリポソームの物性や食品機能性を明らかにした。得られた研究成果の概要は次の通りである。</p> <p>まずバンガム法で3種類の食品用レシチン(大豆レシチン、SLP-WHITE及びSLP-PC70; 卵黄レシチン、PL-30S)及び秋ウコンエキスをを用いてリポソームを調製し、それぞれの物性を、保持効率の測定ならびに共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察で調べた。その結果、保持効率に関して大きな差はなかったが、CLSM観察ではSLP-WHITEを用いたリポソームが最も粒子径が小さいことがわかった。また本リポソームは少なくとも30日間は良</p>	

好な分散を維持しており、リポソームの調製に SLP-WHITE が最適であることを明らかにした。

次に、SLP-WHITE を用いてメカノケミカル法で秋ウコンエキスをカプセル化したリポソーム (LUE) を調製し、その物理化学的ならびに生化学的特性を調べた。ホモジナイザー処理の場合、LUE の粒子径はエキス濃度に従って減少したものの、570nm 以下には至らなかった。これに対して超高圧ホモジナイザーにより、5 wt% 以下のエキス濃度で調製した LUE の粒子径は、20MPa の処理圧力に比べて 100MPa のほうが小さく、その大きさは 180nm 以下に減少し、少なくとも 14 日間は良好な分散を維持した。最適な条件下で調製した LUE を電子顕微鏡観察した結果、粒子径が 100nm 程度の一枚膜リポソームであることを確認した。

一方 LUE の消化液に対する耐性は、未カプセル化エキスと比較して内包されたクルクミンの残存率が 2 倍以上あることが確認された。LUE の食品機能性を調べるために、四塩化炭素を用いて誘導した肝障害マウスの肝障害抑制効果を検討した結果、エキスのみを 33mg/kg 経口投与した群に比べて、エキス量で 10mg/kg の LUE を投与した群で、より大きな血清中 AST 及び ALT の抑制作用を認めた。

さらに、LUE の肝障害抑制賦活のメカニズムを明らかにするために、クルクミンをカプセル化したリポソーム (LEC) のラットにおける腸管吸収への影響を調べた。その結果、クルクミン経口投与群の血漿中クルクミン濃度に比べて、LEC 投与群のほうが有意に上昇すること及び血漿中のクルクミン濃度は、対応する群の血漿中の抗酸化活性と相関しており、クルクミンのカプセル化は血漿の抗酸化活性やその食品機能性に対して大きく影響を与えることを明らかにした。

以上のように、本研究では LUE の量産技術を確立するとともに、得られた LUE の安定性、内包された秋ウコンエキス及びクルクミンの機能性の維持等について明らかにした。すなわち、本研究で調製した LUE は安定にクルクミンを腸管までデリバリーできること、経口摂取により肝障害抑制効果が賦活化すること及び生体でのクルクミンの吸収率が向上することを明らかにした。特に秋ウコンエキスを内包したリポソームの量産方法としては初めての報告であり、本研究成果はリポソームの食品分野への応用を加速し、より高機能な食品・サプリメントの開発に対して多くの知見を提供できることから、審査員一同、本論文が博士（農学）の学位論文として十分価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	高橋 誠
審査委員	主査 琉球大学 教授 和田 浩二
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
	副査 琉球大学 准教授 玉城 一
審査協力者	産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門 バイオ・ケミカル材料グループ長 北本 大
実施年月日	平成 20 年 8 月 8 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;">(口答)・筆答</span>	
<p>主査、副査及び審査協力者は、平成20年8月8日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について口答により試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分な学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者  
氏名

高橋 誠

[質問1] リポソームの安定性試験を30日間行っていますが、リポソームを実用化する場合に、30日間では短すぎませんか？

[回答1] 食品用レシチンを使用した場合では30日間以上の安定性は確認できませんでした。したがって実用化方法としては、調製したリポソームの粉末化が挙げられます。粉末化したリポソームを再水和させて使用することで実用的な安定性を維持することを検討しています。

[質問2] リポソームの粉末化方法を教えてください。

[回答2] 調製したリポソームに賦形剤(デキストリン等)を加え、噴霧乾燥法や凍結乾燥法によって粉末化します。実際に調製したリポソームの固形量に対して半量のデキストリンの添加で、噴霧乾燥法及び凍結乾燥法によって粉末化が可能です。また、再水和した場合でも一枚膜リポソームに還元されることを確認しています。

[質問3] リン脂質の肝障害抑制効果の機序を教えてください。

[回答3] コリンが欠乏するとコリンを含むリン脂質が合成されず、肝臓で作られた脂肪を肝臓外へ移送できなくなり肝障害を誘発するという報告があります。したがってリン脂質を摂取することで欠乏したコリンを補い、脂質代謝を改善することで肝障害を抑制することが考えられます。

[質問4] 秋ウコンエキスをカプセル化したリポソーム(LUE)の平均粒子径(200nm)に比べて、クルクミンをカプセル化したリポソーム(LEC)の平均粒子径(263nm)が大きいのはなぜでしょうか？

[回答4] クルクミンは脂溶性成分なので、リポソームの脂質膜中に取り込まれます。したがって、LUEに比べてLECに内包されたクルクミン量が多くなるため、脂質膜の曲率がより低くなることが予想され、LUEに比べてLECの平均粒子径が大きくなったと考えられます。

[質問5] 使用した秋ウコンエキスはどれくらい濃縮して使用しているのですか？また、エキスの粘性はLUEの調製に影響はないのでしょうか？

[回答5] 秋ウコンエキスは熱水及び50%エタノールで抽出した後に、固形量で10wt%まで濃縮してLUEの調製に使用しています。調製したエキスに対して等量のレシチン溶液を加えた場合(最終エキス濃度:5wt%)では、特にLUEの調製に粘性は影響しませんが、最終エキス濃度が10wt%では顕著な粘性の上昇が認められ、この場合はLUEの調製は困難になります。

[質問6] クルクミンとホスファチジルコリン(PC)の親和性について教えてください。またクルクミンとPC以外のリン脂質の親和性に差があるのでしょうか？

[回答6] リン脂質の疎水性はグリセロールに結合した脂肪酸によって決定されるので、クルクミンとPCの親和性及びその他のリン脂質との親和性は脂肪酸組成が同じであればクルクミンとの親和性はあまり変わらないと考えられます。しかし、各リン

脂質の HLB 値は異なるため、各リン脂質によるクルクミンの水分散性は異なることが予想されます。この場合、HLB 値がより高い PC が最もクルクミンを分散すると考えられます。

[質問 7] 小腸上皮細胞内へ取り込まれたクルクミン及び LEC の代謝形態を教えてください。

[回答 7] 通常、クルクミンは小腸上皮細胞内に取り込まれた後はそのすべてがグルクロン酸及び硫酸によって抱合化され、門脈を通り、肝臓に運ばれます。したがって、LEC の場合でも小腸上皮細胞内に取り込まれたクルクミンの大部分は同様な代謝形態、代謝経路をとると考えられますが、クルクミンの小腸上皮細胞内への取り込み量が多いため、抱合化を逃れた一部のクルクミンがカイロミクロンに取り込まれ、リンパに入り、鎖骨下静脈に流れることが予想されます。そのため LEC の摂取では、血液中に抱合化クルクミン以外に遊離型のクルクミンも存在すると考えられます。

[質問 8] リポソーム化による脂溶性物質の過剰吸収について副作用は問題ないのですか？

[回答 8] 脂溶性物質は組織に蓄積し易いため、過剰吸収による副作用が予想されます。しかし、本研究における急性肝障害抑制試験の LUE の投与量について、マウスによる急性毒性試験で安全性を確認しています。

[質問 9] LUE の肝障害抑制効果について、LUE 投与群の AST 及び ALT 値が 500 I. U. にまで低下しているが、500 I. U. ではまだ値が高すぎませんか？

[回答 9] 本研究では対照群に比べて LUE 投与群では有意に AST 及び ALT 値の低下を認めたため、秋ウコンエキスのリポソーム化は肝障害抑制の賦活効果に寄与すると考えられます。したがって、四塩化炭素の投与量をコントロールし、急性肝障害の度合いが低い場合は、LUE 投与によって AST 及び ALT 値を十分正常値レベルまで改善できると考えられます。