

<平成23年度助成>

微細化クルクミンの腸肝循環を介した有効性 および安全性に関する酵素科学的実証

齋藤 博

(日本薬科大学)

【はじめに】

ウコン (turmeric) に含まれる黄色色素として知られるクルクミン (curcumin) は、ウコンに含まれる3種のクルクミノイドであるクルクミン (curcumin)、デメトキシクルクミン (demethoxycurcumin)、ビスデメトキシクルクミン (bisdemethoxycurcumin) のうち最も含有量の多いポリフェノールであり、特にカレー粉に含まれるスパイスの1つとしてその知名度は高い。それぞれのクルクミノイドの存在比率はクルクミンが70-75%、ジメトキシクルクミンが15-20%、ビスジメトキシクルクミンが3%であり、クルクミンがクルクミノイドの大半を占める¹⁾。クルクミンの生理機能として二日酔い対策や肝機能向上が挙げられる²⁾が、これらの生理機能についての国民間における認識度は非常に高く、またその安全性への信頼も厚いため、飲酒前にエキスドリンクとしてクルクミンを摂取する人も多い。クルクミンはウコンの種類によりその含有量が大きく異なり、秋ウコン (所謂ウコン) は、春ウコン、紫ウコンに比べクルクミンの含有量が多い。クルクミンの含有量として春ウコンがおよそ0.3%であるのに対し、秋ウコンは3.6%である³⁾。また東南アジア諸国には、インドネシア原産でクルクミンの含有量が多く薬効が強い変種があり、現地名のクニッツ (別名クスリウコン) という呼び名で日本でも流通している。クルクミンの作用については、現在までに、抗酸化作用を中心とした多くの研究から、その多様性効果が明

らかとされてきた。特に、転写因子である NF- κ B の分解抑制による COX-2 活性阻害作用は、種々の癌細胞の増殖抑制ならびに腫瘍血管新生抑制に関与し、今後の臨床応用が期待されている⁴⁾。また、これら抗腫瘍効果には一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の関与も明らかとされており、近年では、抗悪性腫瘍薬とクルクミンの併用による相乗効果など、抗悪性腫瘍効果に関する報告が中心となりつつある⁵⁾。しかし、クルクミンがこれらの作用を発現するためには血中のクルクミン濃度が数十~数百 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になる必要がある。一方、最も一般的なクルクミンの摂取方法である経口摂取では数グラムのウコンの長期間摂取でも、その血中濃度は数百 ng/mL 程度であり、有効血中濃度の1000分の1程度にしかない。これは、クルクミンが水に対して難溶性であるため、経口摂取時に比較的大きい凝集塊を形成することによる。そこで、本研究では、クルクミンの分散性、吸収性の向上を目的とし、クルクミンを微細化した微細化クルクミンを用い種々の検討を行った。また、クルクミンのもつ抗悪性腫瘍効果を主要な3種のクルクミノイドを用いて検討を行った。以下に報告する。

【方 法】

1. 微細化クルクミンの調製

微細化クルクミンは、従来のクルクミン粉末を研磨破碎することによりその粒径をおよそ100分の1にまで微細化したクルクミンである。ハウス食品株式会社ソマテックセンターより譲渡された。

2. 実験動物

クルクミンの腸管循環に関する検討には7週齢SD (Sprague-Dawley) ラットを用いた。

反転腸管の調製には、4週齢の体重400–450gの雄性 Hartley 系モルモットを用いた。

ラットならびにモルモットの飼育室は、20～24℃に維持し、照明は12時間周期で行った。動物実験は原則的に日本薬理学会推奨の実験動物取り扱い指針および日本薬科大学動物倫理委員会の規定に基づいて行った。

3. KRPB液の調製

KRPB液(1ℓ)の組成は次の通りである。りん酸二水素ナトリウム(1.1998g)、リン酸水素二ナトリウム(1.4196g)、塩化ナトリウム(7.5972g)、塩化カリウム(0.3728g)、塩化マグネシウム六水和物(0.2582g)、D(+)-グルコース(0.9008g)。それぞれの溶質を正確に量り取った後、超純水に溶解させ最終的に1リットルになるように調製した。溶質が完全に溶けたことを確認した後、塩化カルシウムを0.1054g加え完全に溶解し、KRPB液とした。

4. 反転腸管の調製

血液混入の防止のためにコルク板、アルミホイル、キムタオルを敷いた。その上にモルモットをペントバルビタールNa(モルモットの体重100gあたりペントバルビタールNa 1mLを腹腔内投与)により深麻酔させた。次いで、モルモットを仰向けにさせ意識が無くなったことを確認した後、頸動脈を切断し脱血後、開腹した。

胃の内容物を流出させないため胃幽門部と十二指腸との間をタコ糸で結び切断した。その後、腸掴み用のピンセットを用い腸管を傷つけないように慎重に脂肪、腸間膜、血管を取り除きながら小腸を取り出した。得られた小腸は使用直前までKRPB液に浸し、腸管膜を保護した。次いで、空腸・回腸をおよそ6cmに切断し、腸管を反転させ、一端をタコ糸で縛りKRPB液を1.5ml加えサック

状に縛った。なお、反転腸管法にはデイスプーサブルプラスチックピペットの先を斜めに削ったものを使用した。すなわち、切り取った腸管の端の部分を斜めに削ったピペットに被せるようにつけ、ピンセットで腸管を固定したままゆるやかにオートピペットで吸引し、腸管を反転させた。

5. 反転腸管へのクルクミン処理方法

内液(KRPB液)を封入した反転腸管は、調製後直ちにばっ気している外液(クルクミンもしくは微細化クルクミンを100–1000 μ g含有する20mlのKRPB溶液)中に吊るし、37℃で2時間のインキュベーションを行った。次いで、インキュベーション後、直ちに腸管を取り出しKRPB液(10mL)で洗浄し、外液およびその洗浄液をキムワイプでふき取った。次いで、18Gの注射針を用いて内液を取りだし、15mLのチューブに分取し、3,500rpm、5min、4℃にて遠心分離を行った。得られた上清およそ1mLを500 μ Lチューブ4本に250 μ mLずつ分注した。試料はHPLC分析を行うまでの間、–80℃で冷凍保存した。

6. HPLCによる分析

HPLC分析は、SLC-20A、DGU-20A₃、SCL-10A vp、SPD-20A、C-R8Aから成るシステムにより行った。分析カラムはPEGASIL C₁₈カラム(5 μ m, 4.6 x 150mm)、移動相として50%アセトニトリル/水、測定波長は420nmとした。カラム温度は40℃、流速は1mL/minとした。分析を行う際、内液は200 μ L、外液は25 μ L、標品として用いたクルクミノイドは標準液(2 μ g/mL)50 μ Lを1回の分析に用いた。

7. 主要クルクミノイドの抗腫瘍細胞効果の検討

主要クルクミノイドの抗腫瘍細胞効果は、ATCCより購入したClone 9細胞(CRL-1439: 4週齢オスのラット肝上皮細胞由来のがん細胞)を用いて検討した。すなわち、3種類のクルクミノイド標品をDMSOに溶解し、ストック溶液を調製した後、0～100 μ g/mLとなるよう

に培地に添加し、17時間の培養後、MTTアッセイにより細胞の生存率を測定した。培養液として Penicillin-Streptomycin Solution (sigma) ならびに 10% FBS (Fetal bovine serum) を含む NUTRIENT MIXTURE F-12 HAM (sigma) を用い、37℃、5% CO₂ 条件下、コラーゲン Type I コートディッシュ (100mm, IWAKI) もしくはコラーゲン Type I コートマイクロプレート (96穴, IWAKI) を用いて培養した。

【結 果】

1. クルクミンの腸管循環

経口投与 (Fig. 1A) においては投与後 12 時間で血中の ³H-Curcumin 濃度の減少が緩やかになった。また、静脈内投与 (Fig. 1B) では投与後 5 時間で ³H-Curcumin の著しい濃度増大が認められ、その増加曲線は経口投与時のものと類似していた。

2. クルクミンを微細化することによる腸管吸収効率への影響

従来品のクルクミンは KRPB 液に溶けにくいためインキュベーション中、溶け切れなかったクルクミンが溶液表面にて凝集してしまった。溶液の

色もほぼ無色であり溶解性が悪いことが伺えた。その結果、従来品のクルクミンを用いた検討において、2 時間のインキュベーション後の内液中からクルクミンを検出することはできなかった。一方、微細化処理を行ったクルクミンを用いた検討において、微細化クルクミンは KRPB 液に効率良く分散・溶解し、外液の色もクルクミンの持つ黄色となった。また、外液にクルクミン量として 500 μg ならびに 1000 μg 添加し、2 時間インキュベーションした後の内液クルクミン濃度を測定したところ、それぞれ少量ではあるがクルクミンが検出された (Table 1)。外液に 100 μg の微細化クルクミンを添加した結果、内液からクルクミンは検出されなかった。

Table 1 微細化によるクルクミノイド吸収率の変化

添加量 (μg)	従来品	微細化クルクミン
	吸収率 (%)	
100	n.d.	n.d.
500	n.d.	1.79±0.12
1000	n.d.	1.34±0.09

n.d. : 0.01%以下

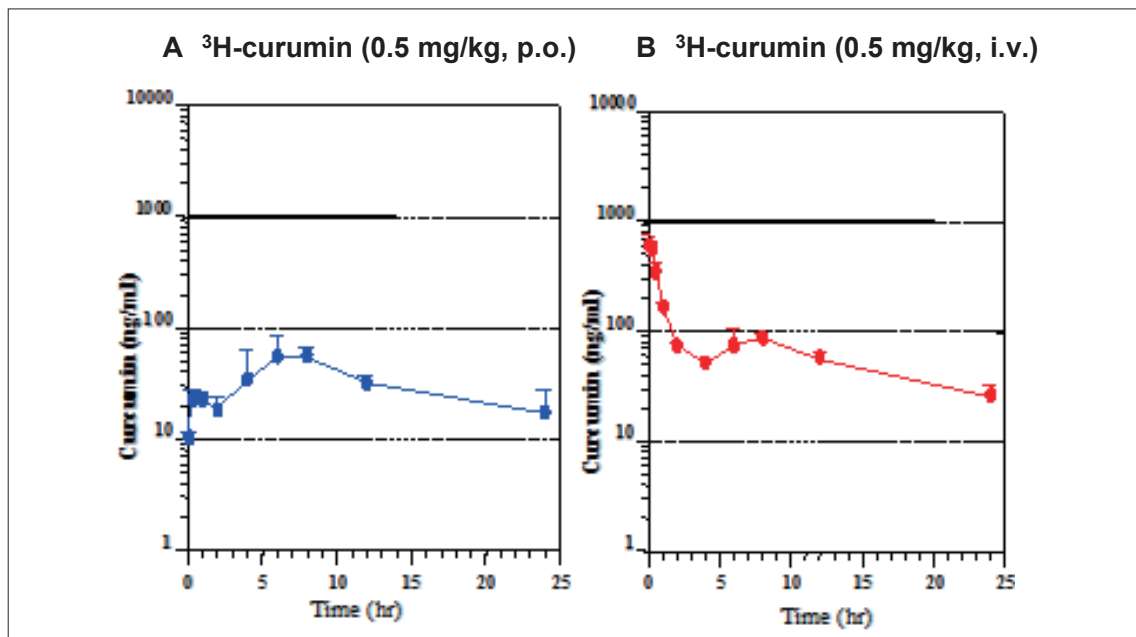


Fig. 1 ³H-curcumin を用いた腸管循環の検討

3. クルクミノイドの腸管吸収

同一個体より摘出した空腸と回腸を用い、3種のクルクミノイド標品の吸収性を検討した結果、空腸ならびに回腸の双方において、クルクミノイド含有 KRPB 液中でのインキュベーション時間依存的に内液中のクルクミノイド濃度の増大が認められた (Fig. 2)。また、3種のクルクミノイドのうち、クルクミンが最も吸収量が多く、120分インキュベーション後の内液中クルクミン濃度を比較したところ空腸と回腸における吸収量に有意な差が認められた。なお、他のクルクミノイドについても空腸と回腸の間におよそ 1.7 倍程度の差が認められ、クルクミノイドは空腸よりむしろ回腸で効率よく吸収される結果となった。

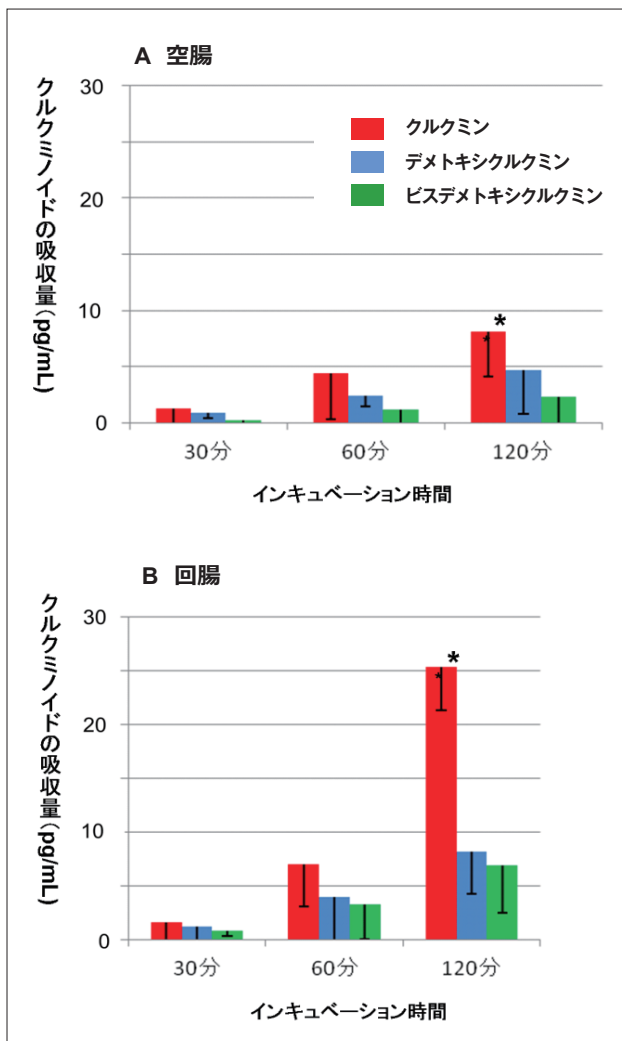


Fig. 2 主要クルクミノイドの空腸ならびに回腸における吸収量の比較 * $p < 0.05$

4. 主要なクルクミノイドの抗腫瘍活性の検討

主要3種のクルクミノイド標品を用い、培養細胞の細胞生存率を検討した結果、クルクミン、デメトキシクルクミン、ビスデメトキシクルクミンはそれぞれ $15 \mu\text{g/mL}$, $26 \mu\text{g/mL}$, $27 \mu\text{g/mL}$ の LC_{50} 値を示し、クルクミンの LC_{50} 値は他のクルクミノイドに比べおよそ 1.8 倍低値となった。また興味深いことに、どのクルクミノイドにおいても $10 \mu\text{g/mL}$ 以下の低濃度域においては顕著に細胞生存率が増大した。すなわち、細胞の増殖が活性化される結果となった (Fig. 3)。

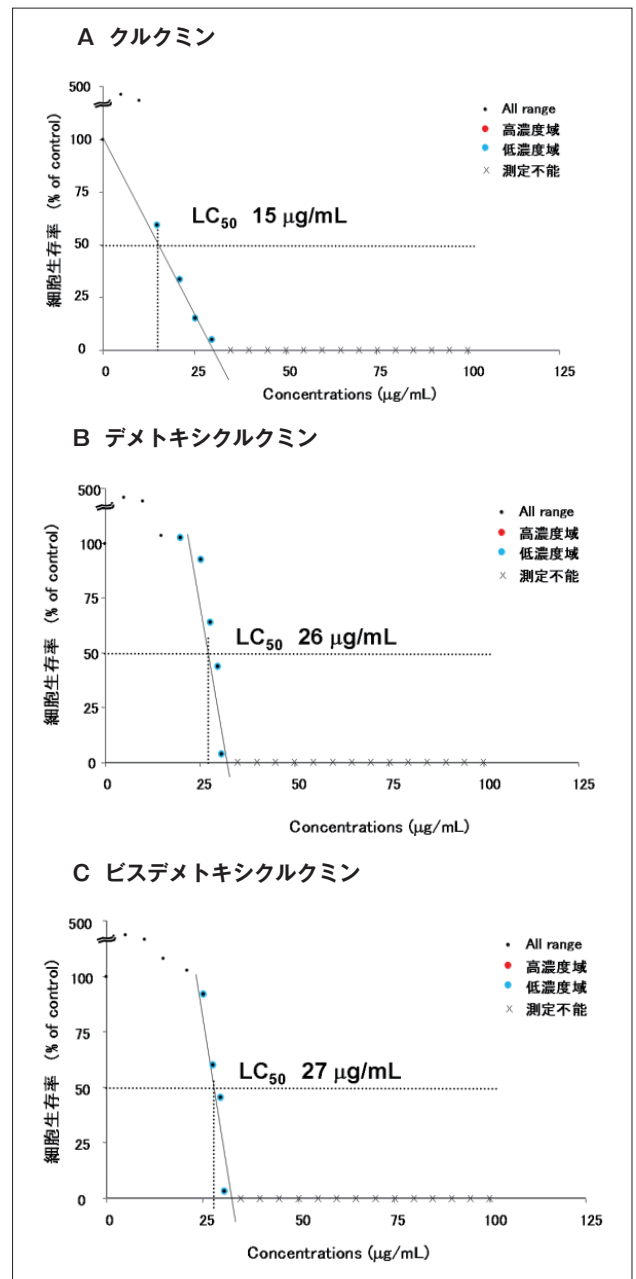


Fig. 3 主要クルクミノイドの抗腫瘍効果の検討

【考 察】

クルクミンはテトラヒドロクルクミンへ代謝されることが知られており、このテトラヒドロクルクミンの抗酸化作用はクルクミンよりも強いことが報告されている⁶⁾。また、クルクミンならびにテトラヒドロクルクミンのグルクロン酸抱合酵素による代謝経路も知られており⁷⁾ 生体内におけるこれら代謝物の影響についての検討も行われている。今回私たちの³H-Curcuminを用いた検討からもクルクミンは明らかに腸管循環の影響を受け、その結果、血中濃度に大きな影響を与えていることがわかる。クルクミンの主たる摂取経路は経口摂取であり、静脈内に投与されることはないが、今後クルクミンを製剤化していくためには静脈内投与時における血中クルクミン濃度の時間依存的変化を考えなくてはならない。また、本研究ではクルクミンを微細化することにより分散性ならびに溶解性が向上させることができた。その結果、クルクミンの吸収量が増大し、従来品に比べより大きい効果が期待できる結果となった。クルクミンを経口で摂取する条件ではたとえ微細化したとしても、クルクミンの血中濃度が著しく増大することはないと考えられる。しかし、本研究で得られた培養細胞へのLC₅₀値から推察すると、微細化やナノ化により溶解性が高められたクルクミンを一度に大量に摂取することにより高濃度のクルクミンに腸管内膜がさらされ、何らかの影響が出る可能性が示唆される。本研究における反転腸管を用いた検討では、クルクミンを1000 μ g/mL含有する外液中で2時間のインキュベーションを行うことにより、腸管内膜の柔毛組織がクルクミンを含有しない外液中でインキュベーションした反転腸管と比較して明らかにダメージを受けていることが観察された。微細化したクルクミンは高分散性であるため、従来のクルクミンに比べ凝集性が低い。そのため、相対的な表面積量が

大きくなり、微細化クルクミンを油分の多く含まれる食事と同時に摂取した場合、より高濃度のクルクミンが腸管内膜に接する可能性が出てくる。一般的に食事などで消化管内に入った食物は腸内に6時間程度滞留すると考えられている。すなわち、微細化したクルクミンを摂取すると、摂取状況によっては腸管内膜が高濃度のクルクミンに長時間さらされることになる。そのため、微細化クルクミンを摂取する際は、その摂取量についても詳細な検討が必要であると考えられる。

今回の結果は過去のクルクミンの抗腫瘍作用に関する報告を支持するものであった。今までの多くの報告より、クルクミンの経口摂取による吸収量は著しく低く、クルクミンの持つ抗腫瘍効果を発現する濃度には到達しないことが知られている。しかしながら、本研究のLC₅₀値から、およそ15 μ g/mLの濃度にコントロールしたクルクミン溶液は腫瘍細胞に対して致命的な影響を及ぼすことが期待できる。すなわち、腫瘍細胞に致命的影響を与え、正常細胞に影響を与えないクルクミン濃度を定めることができれば、消化管系の癌に対してクルクミン処理がある程度の治療効果を示すかもしれない。また、クルクミンの定期的な摂取が消化管系の癌に対して予防的な効果を示すことも期待できる。今後は、クルクミンもしくはクルクミン類似物質を用い、クルクミンの抗腫瘍薬もしくは予防薬としての可能性を検討していきたい。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団およびその関係者の皆さま、また、微細化クルクミンをご提供いただきましたハウス食品株式会社ソマテックセンターおよび関係者様の皆さまに心より感謝致します。

文 献

- 24995-25000 (1995)
- 1) 酒井重男：食品工業、42(4) 62-73 (1999)
 - 2) Rajakrishnan, V., Jayadeep, A., Arun, O.S., *et al.*, *J Nutr Biochem*, 11 509-514 (2000)
 - 3) 松尾健、豊田安基江、金森久幸、他、広島県保健環境センター研究報告, 10 7-13 (2002)
 - 4) Singh, S. and Aggarwal, .B.B., *J. Biol. Chem.* 270(42)
 - 5) Bisht, S. *et. al*, *Mol Cancer Ther.*, Aug; 9(8) 2255-64 (2010)
 - 6) Pan, M-H., Huang, T-M., Lin, J-K. *Drug Metab Dispos.*, 27(4) 486-494 (1999)
 - 7) S. Padhye *et. al*, *Mini Rev Med Chem.*, May; 10(5) 372-387 (2010)

Enzymatic approach on the validity and the safety through the enterohepatic circulation of refinement curcumin

Hiroshi Saito

Department of Clinical Pharmacy, Nihon Pharmaceutical University

Abstract

In this study, we use refinement curcumin which demonstrates remarkably higher dispersant and solubility compared to free curcumin in aqueous solution. Curcuminoids, curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin are a yellow polyphenol extracted from the rhizome of turmeric (*Curcuma longa*). A large volume of published reports has established about curcumin as an antioxidant. However, there are few reports about the effects of each curcuminoids on our health.

Curcumin is known by people widely as a safe ingredient in food. On the other hand, there is also a report about cytotoxicity. Our results suggested that refinement curcumin, high dispersant and solubility, may have preventive influence on a gastrointestinal tract, especially, gastrointestinal tumors by its cytotoxicity. Even if it takes in curcumin by taking orally, blood concentration does not increase, but the gastrointestinal concentration becomes high. Refinement curcumin can reach high concentration because of higher dispersant, so refinement curcumin may show some effect on a gastrointestinal tract. Furthermore, we investigated the efficacy of three curcuminoids on cell survivals. Curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin affected on the cell survivals, respectively. IC_{50} values for curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, were 15, 26 and 27 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Generally, blood concentration will not increase to these IC_{50} values, even if it takes curcumin by taking orally. However, refinement curcumin has a possibility of increasing blood concentration to effective blood concentration.

Our results suggested that curcuminoids, especially refinement curcumin have possibility as an antitumor agent or as a preventive agent toward gastrointestinal tumors.