

平成20年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「NASH 予防効果を持った新醗酵ウコンの独創的発酵技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成21年 3月

委託者 内閣府沖縄総合事務局
委託先 株式会社琉球バイオリソース開発

目次

第 1 章 研究開発概要	1
1. 研究開発の背景、研究目的および目標	1
2. 研究体制	2
3. 成果概要	4
(1) 酵母培養条件の検討	4
(2) パイロットプラントでの検討	4
(3) テトラヒドロクルクミン変換酵素の同定	4
(4) 細胞、実験動物およびヒトでの NASH 予防効果の検討	5
4. 当該プロジェクト連絡窓口	5
第 2 章 本論	6
1. テトラヒドロクルクミン生成能向上のための発酵条件検討とパイロットプラントレベルでの試作	6
1) 目的	6
2) 結果	6
3) まとめ	10
2. テトラヒドロクルクミン変換酵素の同定	11
1) 目的	11
2) 結果	11
3) まとめ	13
3. 細胞、実験動物およびヒトでの NASH 予防効果の検討	13
3.1 肝癌細胞を用いた酸化ストレスに対する影響	13
1) 目的	13
2) 結果	14
3.2 NASH モデルマウスを用いた THU1 の効果に関する検討	15
1) 目的	15
2) 方法	15
3) 結果	16
4) まとめ	19
3.3 ヒト臨床試験	20
1) 目的	20
2) 方法	20
3) 結果	22
3) まとめ	24
第 3 章 総括	25
参考文献	26
専門用語の解説【注】	27

第 1 章 研究開発概要

1. 研究開発の背景、研究目的および目標

ウコンは近年、沖縄の食文化が注目されるのにもない、全国的に認知されている植物である。このウコン中に含まれているクルクミン^{注1)}という物質は、胆汁分泌促進作用^{注2)}や乳がん^{1、2)}・皮膚がんの抑制³⁾、酸化ストレス⁴⁾を軽減する作用があることが報告されているが、クルクミンは摂取後、体内で吸収される際にテトラヒドロクルクミン (THU1)^{注3)}に変化し、これがクルクミンよりも酸化ストレスの軽減作用が強いことが報告されている⁵⁾。これまでの研究において、日本大学、協和発酵バイオ(株)、琉球大学とコンソーシアムの体制を組み、微生物による発酵とサイクロデキストリン包接化法^{注4)}を融合させた応用技術により、THU1 を含有した醗酵ウコンのパイロットプラントレベルでの製造方法を確立し、ラットを使った急性^{注5)}および亜急性毒性試験^{注6)}において、その安全性を確認してきた。さらに、パイロットプラントレベルにて微生物の培養から、そこで得られた菌体をウコンと反応させて、最終的に THU1 含有醗酵ウコンを製造する技術を確認してきた。しかし、この技術を使って製造した試作品では、製造毎の THU1 含有量にばらつきがみられ、一定の有効成分を保持させることが難しい。また、製造時に微生物の培養をしなければならないことから、製造に必要な微生物量を得るためにかなりの時間を要する。

そこで本研究開発では、製造方法効率化のため、従来の発酵法よりも効率よく THU1 変換能を有する製造方法を確立し、動物やヒトにおける NASH への予防効果を確認することで、エビデンスのある高付加価値化原料としての供給を目指す。現在の製造方法の効率化をはかるため、従来の発酵方法よりも効率よく THU1 変換能を有する発酵方法および THU1 含有醗酵ウコン製造方法 (パイロットプラントレベル) の検討を(株)琉球バイオリソース開発で実施した。日本大学生物資源科学部では、クルクミンから THU1 への変換酵素同定およびその変換メカニズム解明を行った。クルクミン変換酵素についてはアミノ酸配列レベルで

の同定を目指した。さらに、細胞、実験動物およびヒトにおける機能性評価を琉球大学医学部にて行った。

2. 研究体制

本プロジェクトにおいては、Fig.1 に示すように管理法人と2つの機関を組織し、研究開発を行った。また Table.1 に研究開発担当者およびアドバイザーの一覧を示す。

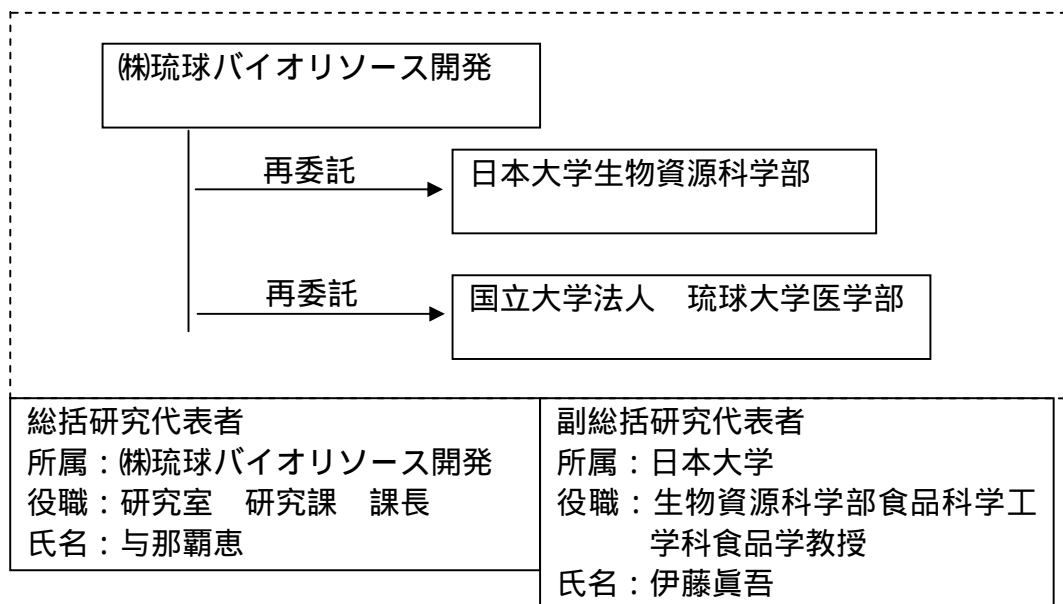


Fig. 1 研究組織

Table.1 研究開発担当者一覧表

氏名	所属	役職	担当
与那覇 恵	(株)琉球バイオリソース開発 研究室	研究課長	総括研究代表者
有銘 興博	〃	主任	
徳田 早紀	〃		
仲宗根 勝美	(株)琉球バイオリソース開発 製造課	工場長	
小浜 瑞樹	〃	主任	
伊藤眞吾	日本大学生物資源科学部食品科学工 学科食品学研究室	教授	副総括研究代表者
竹永章生		助教授	
鳥居泰好		講師	
山城 剛	国立大学法人 琉球大学大学院医学 研究科感染症制御学講座分子病態 感染症分野（第一内科）	講師	
大澤俊彦	国立大学法人名古屋大学大学院生命 農学研究科応用分子生命科学専攻食 品機能科学研究室	教授	アドバイザー
山元一弘	協和発酵バイオ(株)ヘルスケア商品開 発センター	ヘルスケア 商品開発営 業部長	アドバイザー
酒井 康		主任研究員	

3 . 成果概要

本研究では、(1) 酵母培養条件の検討、(2) パイロットプラントでの試作、(3) テトラヒドロクルクミン変換酵素の同定、(4) 細胞、実験動物およびヒトでの NASH 予防効果の検討を実施した

(1) 酵母培養条件の検討

これまで使用してきた YM 培地^{注7)}では、コスト高が懸念される。本研究において YM 培地に替わるものとして、糖蜜^{注8)}および硫酸アンモニウム^{注9)}の使用を検討してきており、パイロットプラントレベルでの培養の最適条件(糖蜜濃度、培養日数)の検討を実施した。その結果、最適な培養条件を設定でき、この設定条件にて培養した場合、必要な培養日数は約4～5日間であることが確認できた。

(2) パイロットプラントでの検討

パイロットプラントにおける製造方法の検討を実施した。その結果、THU1 含量は0.08%で、目標値の1%をクリアするためには濃縮工程を取り入れる必要がある。そのため、合成吸着剤である HP-20^{注10)}を用い検討を実施した。その結果、合成吸着剤である HP-20 を用いることで、THU1 およびクルクミン含量を約6%まで高めることが可能となった。今後はパイロットプラントレベルでの濃縮工程について検討を実施する必要がある。

(3) テトラヒドロクルクミン変換酵素の同定

酵母 *D.hansenii* PRISCA 株^{注11)}の菌体破碎により粗酵素液^{注12)}を回収し、クルクミン還元活性^{注13)}を検討した。その結果、酵母の有するクルクミン還元活性が水溶性タンパク画分^{注14)}にあることを確認した。また、クルクミン還元活性の亢進した酵母の取得に関しては、軟寒天重層法^{注15)}を用い、短波長の紫外線を照射し変異株の選抜を実施した。その結果、親株の1.4～2倍の THU1 産生量をもつ変異株4株を選抜した。

(4) 細胞、実験動物およびヒトでの NASH 予防効果の検討

本研究開発では、細胞、実験動物およびヒトにおける非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)^{注16)} に対する予防効果の検討を実施した。まず、肝癌細胞由来培養細胞^{注17)} を用い、クルクミンおよび THU1 の抗酸化作用^{注18)} を検討した。その結果、過酸化水素 (H₂O₂) による細胞障害^{注19)} を抑制することが確認でき、その効果はクルクミンおよび THU1 とともに同程度であった。

続いて、NASH モデルマウスにおける THU1 投与の評価を行った。その結果、NASH モデルマウスにおいて THU1 投与により有意に ALT 値^{注20)} の低下が確認でき、肝組織における炎症反応の改善所見が認められ、NASH に対する予防効果が確認出来た。さらに、非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD)^{注21)} 患者を対象に、THU1 含有醗酵ウコン粒およびプラセボ粒^{注22)} 投与試験を実施した。その結果、THU1 含有醗酵ウコンを摂取した場合に、摂取 4 週間後から体重、AST^{注23)} および ALT の減少が確認でき、AST および ALT に関しては摂取 24 週間後まで持続し、正常値まで低下した。さらに、腹部超音波検査^{注24)} において脂肪肝の軽減も確認できた。一方、安全性については、有害事象は認められなかったことから安全性に問題はないと言える。

以上の結果より、THU1 含有醗酵ウコンの NASH を含む NAFLD への応用が期待できると考える。

4. 当該プロジェクト連絡窓口

株式会社琉球バイオリソース開発

研究課 与那覇 恵

沖縄県うるま市字州崎 5-1 TTC 内

TEL(098)982-1106 FAX(098)982-1193

第 2 章 本論

1 テトラヒドロクルクミン生成能向上のための発酵条件検討とパイロットプラントレベルでの試作

(担当：(株)琉球バイオリソース開発)

1) 目的

テトラヒドロクルクミン (THU1) 生成能向上を目的とし、パイロットプラントでの酵母培養および発酵条件の検討を実施した。

2) 結果

)パイロットプラントでの酵母培養条件の検討

これまでラボレベルで酵母培養を行う際には、YM 培地を使用していたが、この培地をパイロットプラントレベルで使用するとコスト高が懸念される。そこで、安価な代替培地として糖蜜および硫酸アンモニウムを使用した培地を検討した。その結果、新たに使用した糖蜜および硫酸アンモニウム培地では、酵母の生育が早いことが確認出来た。これにより、これまでコスト高であった YM 培地に代わり、糖蜜および硫酸アンモニウム培地を使用することで、培養期間の短縮が可能となり低コスト化が可能となった。

)パイロットプラントレベルでの製造検討

ア)スプレードライでの試作

本研究開発において新たにパイロットプラントに設置した、スプレードライを使用し粉末化の検討を実施した。これまでは、水分量が多く乾燥を行うには、水分を除去し粉末を乾燥する必要があった。水分を除去した場合、除去した部

分にも有効成分であるクルクミンおよび THU1 が含有されていることより、発酵液体を全て乾燥する必要があり、そのために液体を粉末化するスプレードライが必要であった。スプレードライによる粉末化の検討を行った結果、Fig.2 に示すように、THU1 含有醗酵ウコン粉末を得ることが出来た。



Fig. 2 THU1含有醗酵ウコンスプレードライ粉末

イ) 発酵条件の検討

パイロットプラントレベルにおける THU1 含有醗酵ウコンの製造方法の検討を実施した。反応時にサイクロデキストリン-クルクミン包接物^{注 25)}を作成するが、その反応時の回転数をあげない方がより THU1 生成能が高いことをこれまでのラボレベルでの検討で確認している。そこで、パイロットプラントにおいて反応時の回転数の確認を実施した。その結果、ラボレベルと同様、回転数が低い方が THU1 生成量が高いことが確認できた (Fig.3)。

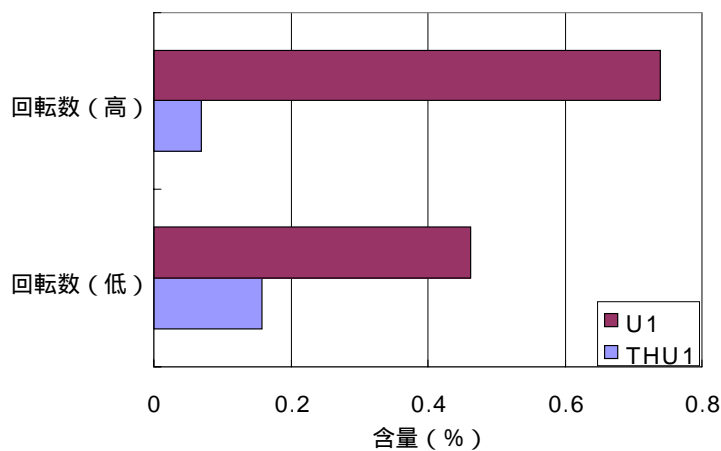


Fig.3 サイクロデキストリン-クルクミン包接物作成時の回転数の影響

続いて、最適条件において培養した酵母を用い、パイロットプラントでの反応時間の検討を実施した。その結果、48 時間反応の場合では、クルクミン含量が低下しているにも係わらず、THU1 含量は蓄積されておらず、クルクミンの分解が進んでいることが示唆され、反応時間は 24 ~ 30 時間が最適であることが確認できた。

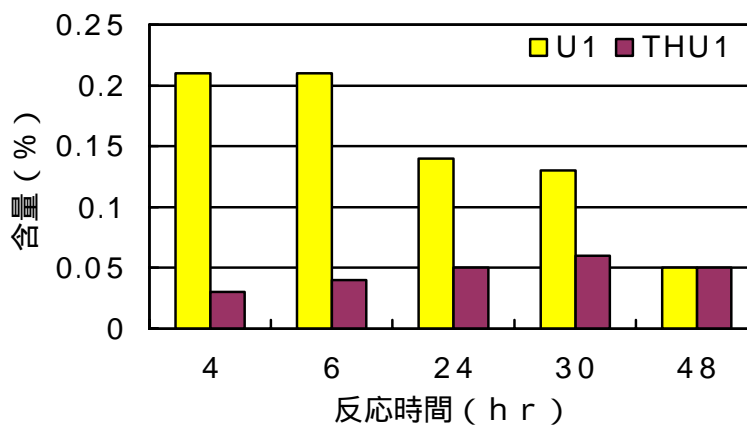


Fig.4 発酵反応時間の検討結果

ウ) 合成吸着剤 HP-20 を用いた濃縮の検討

従来法^{注 26)}と本研究開発において導入したスプレードライ法^{注 27)}との乾物中の酵母、サイクロデキストリン (CD) および醗酵ウコン含量の比較を Table.2 に示す。

Table.2 従来法とスプレードライ法における各成分含量

	従来法 (%)	スプレードライ法 (%)
醗酵ウコン	90%	17.5%
CD	0.9%	66.7%
酵母	9%	15%

サイクロデキストリンと包接物を作成して反応を行うスプレードライ法は、従来法に比べ、THU1 生成効率は高いが、サイクロデキストリン含量が多いことが懸念され、最終製品中の THU1 含量を高めるためには、サイクロデキストリンを除去する必要があると考え、合成吸着剤である HP-20 を用い濃縮の検討を行った。合成吸着剤 HP-20 とは、球状の樹脂でその表面に無数の細かな穴があいており、その穴の中に成分を吸着することで目的とする成分を分離できるもので、工業的にも植物エキス中のポリフェノールの濃縮等にも用いられている。本研究開発において製造したスプレードライ粉末には Table2 に示した通り、サイクロデキストリン含量が多いが、合成吸着剤 HP-20 にて処理をすると、サイクロデキストリンは吸着されず、クルクミンおよび THU1 は吸着されるため、サイクロデキストリンの除去が可能であると考えられたため、まずラボレベルでの検討を実施した。その結果、HP-20 樹脂を用いることで、クルクミンおよび THU1 含量が約 6%に高まり、濃縮を行うことが可能であると考えられる。今後はパイロットプラントレベルにおいてスケールアップした際の検討を実施する必要があるが、濃縮することにより THU1 含量を高めることが可

能である。

3) まとめ

これまで酵母培養に関してはコスト高が懸念され、本研究開発において、安価な培地を使用した酵母の培養、酵母培養日数の短縮化の検討を実施してきた。その結果、高価な YM 培地に代わり、安価な糖蜜培地を使用したパイロットプラントレベルでの酵母培養方法が確立できた。従来の方法では、THU1 含有醗酵ウコンを製造する際に必要な酵母 30L を得るために、約 1 ヶ月から 1 ヶ月半を必要としており、さらに培養した酵母を必要量得るため、冷蔵保存する必要があったが保存中の酵母劣化も懸念された。しかし、本研究開発において確立したスプレードライ法では、THU1 含有醗酵ウコンを製造する際に必要な酵母 4.5L を培養するためには、約 1 週間から 10 日の期間で得られ、少量ずつを作成してスプレードライ乾燥粉末を蓄積していくことで効率化が図れると考える。コストに関しては、YM 培地を使用した場合原料コストとしては約 16,000 円/kgであったのに対し、糖蜜培地を使用した場合は約 4,000 円/kg と約 1/4 に削減できた。本研究開発では、酵母培養の短縮とコスト削減を目的としていたが、酵母培養の期間は約 1/3 に、コストも約 1/4 に削減できたため目的はクリアできたものとする。

一方、スプレードライ法では、従来の方法に比べ THU1 変換効率が高いがサイクロデキストリンの使用量が多いため、THU1 含量を高めるためにはサイクロデキストリンの除去が必要である。そこで、合成吸着剤である HP-20 を用いサイクロデキストリンの除去かつ THU1 の濃縮の検討を行った。その結果、サイクロデキストリンを除去でき、クルクミンおよび THU1 含量を約 6%に高めることが可能となった。当初、THU1 含量の目標を 1%と設定していたが、濃縮工程を取り入れることで約 6%に高めることが可能であり、目標値はクリアできたと考えるが、濃縮工程に関してはラボレベルでの検討のみであるため、今後は事業化に向け、パイロットプラントレベルでのスケールアップした場合

の検討を行う必要があると考える。

本研究開発において、THU1 含有醗酵ウコンの製造技術の高度化を目的として実施してきたが、製造技術の高度化については確立できたと考える。

2. テトラヒドロクルクミン変換酵素の同定

(担当：日本大学生物資源科学部)

1) 目的

本研究開発ではクルクミン還元反応の酵素的特性^{注28)}とクルクミン還元産物の微生物生産^{注29)}について検討を行った。

2) 結果

) 酵母およびブタ小腸上皮からの酵素同定

酵母 *D. hansenii* の菌体破碎により粗酵素液を回収し、クルクミン還元活性を検討した。その結果、粗酵素液および水溶性画分にクルクミン還元活性を確認し、酵母の有するクルクミン還元活性が水溶性タンパクであることが示唆された。

また、これまでにクルクミン還元活性を確認している、ブタ小腸上皮からのクルクミン還元酵素の精製を試みており、粗酵素液から硫酸沈殿^{注30)}、ゲル濾過^{注31)}、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動^{注32)}、二次元電気泳動^{注33)}を行い、ゲルからの切り出しによって活性のあるタンパク質を回収した。このタンパクのN末端^{注34)}からのアミノ酸配列^{注35)}を「V/H/S/F/P/T/L」と決定した (Table.3)。

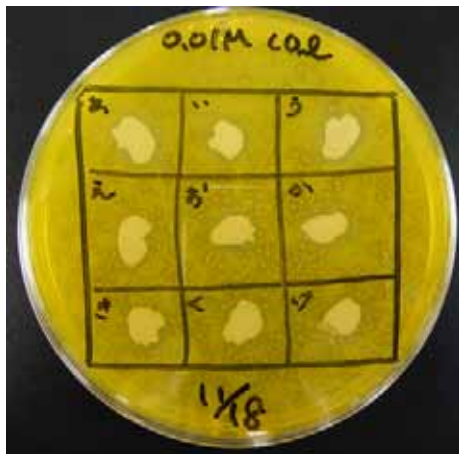
Table.3 アミノ酸配列のホモロジ 検索

N末端からのアミノ酸	1	2	3	4	5	6	7
第一候補	V	H	S	F	P	T	L
第二候補	Y	L	I	P	N	A	—

) クルクミン還元活性の亢進した酵母 *D. hansenii* 変異株の取得

酵母 *D.hansenii* PRISCA 株に短波長の紫外線を照射し、遺伝子変異^{注 36)}を誘発した後にクルクミン色素の色調喪失を指標として目的変異株のスクリーニングを行った。酵母の選択は軟寒天重層法を用い、酵母コロニー周辺に観察される無色域 (Halo) の面積を一次スクリーニングの指標とした (Fig.5)。

選抜された各クローンは EB 培地^{注 37)}により液体培養し、クルクミン還元活性を定量的に評価した。重層培養観察を数度行った結果から四株の候補を選抜し、液体培養で評価したところ、0.5 時間までの間に急速にクルクミンを消費し、並行して THU1 が蓄積することを認めた。各変異株の産生する THU1 量は 1.5 時間後に親株の 1.4 倍から 2 倍に到達した。培養時間の経過に伴い親株と変異株の差は縮小していくことから、THU1 分解系^{注 38)}には差がなく、クルクミン還元能力の差が生じていると推察された。



軟寒天重層直後



ハ口形成の例

Fig.5 軟寒天重層直後の酵母コロニーおよびハ口形成の例

3) まとめ

本研究開発により、NASH 予防効果が期待されるクルクミン還元産物の工業的生産を目指す技術的基盤をより強固なものにする事ができた。とくに、上記の通りクルクミン還元活性の亢進したと思われる変異株を取得したことにより、クルクミン還元物の効率的な生産の可能性を示した。

3. 細胞、実験動物およびヒトでの NASH 予防効果の検討

(担当：琉球大学医学部)

3.1 肝癌細胞を用いた酸化ストレスに対する影響

1) 目的

肥満を基礎に生じる非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) において、酸化ストレスがその発症機序のひとつとして重要な役割を演じていることが明らかとなっている⁵⁾。健康食品として広

く使用されているウコンの主成分であるクルクミンの抗酸化作用は知られているが、その代謝産物であるテトラヒドロクルクミン (THU1) はより強力な抗酸化作用を持つことが報告されており⁶⁾、同成分を含んだ食品摂取により NASH が改善することが期待される。

そこで、本研究開発において肝癌細胞由来培養細胞を用い、酸化ストレスに対する THU1 の効果について検討を行った。

2) 結果

肝癌細胞由来培養細胞 Huh7 に対して、 H_2O_2 の及ぼす影響^{注 19)}を検討した結果、細胞 Huh7 に対して、 H_2O_2 は濃度依存的に細胞障害を与えた (Fig.6)。 H_2O_2 10mM で約 40%の細胞が死細胞化した。

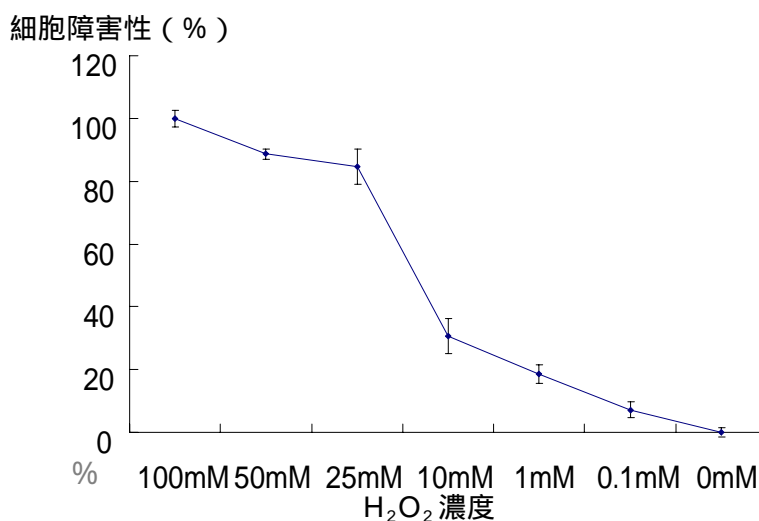


Fig.6 H_2O_2 による細胞障害作用 (Huh7)

そこで、 H_2O_2 10mM の同条件においてクルクミン、THU1 が H_2O_2 の及ぼす酸化ストレスにおいて抗酸化作用を有するのか検討した結果、クルクミンおよび THU1 は濃度依存的に H_2O_2 に対する抗酸化作用を認めた (Fig.7)。しかし、そ

の作用に両物質間の有意な差は認められなかった。

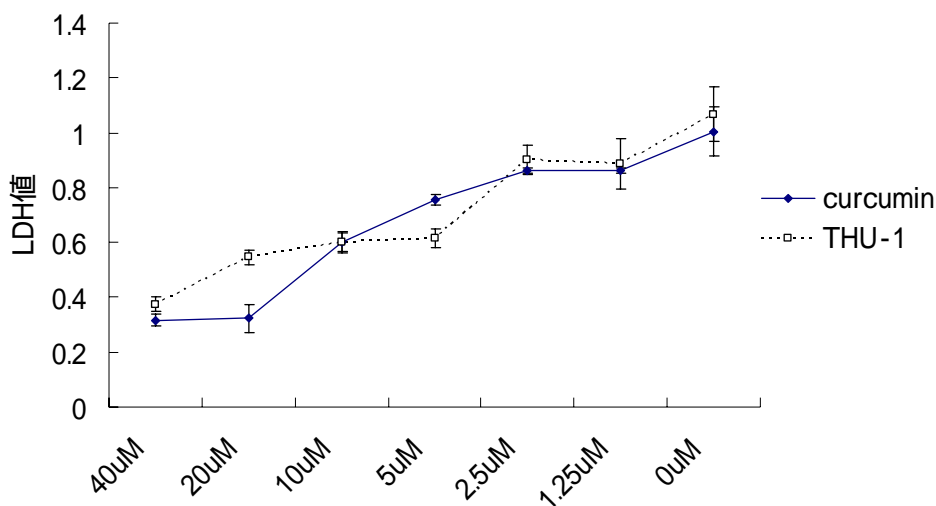


Fig.7 クルクミン、テトラヒドロクルクミンによる抗酸化作用

3.2 NASH モデルマウスを用いた THU1 の効果に関する検討

1) 目的

NASH モデルマウスを用い THU1 の効果について明らかにすることを目的とした。

2) 方法

生後6週、Male C57Bl/6J mice 75 匹を計 5 群 (それぞれ n=5) にわけ、下記の飼料で 6、12 および 24 週間飼育し NASH に対する予防効果を検討した。

standard chow : Control 群

athergenic and high-fat diet : High fat 群

athergenic and high-fat diet +THU1 (0.01%): THU1 Low 群

athergenic and high-fat diet +THU1 (0.05%): THU1 High 群
athergenic and high-fat diet +Vitamin E (0.01%): Vitamin E 群

3) 結果

6、12 および 24 週間飼育後解剖を行い、解剖直前に体重を測定。また解剖時に肝臓を摘出し肝重量を測定。血液についてはキットを用い ALT、AST の測定を実施した。

統計処理は、Student s *t*-test^{注39)}を用い行い、それぞれの週で2群間比較^{注40)}をおこなった。($p < 0.05$ を有意差あり^{注41)}とする。)

) 体重(g)

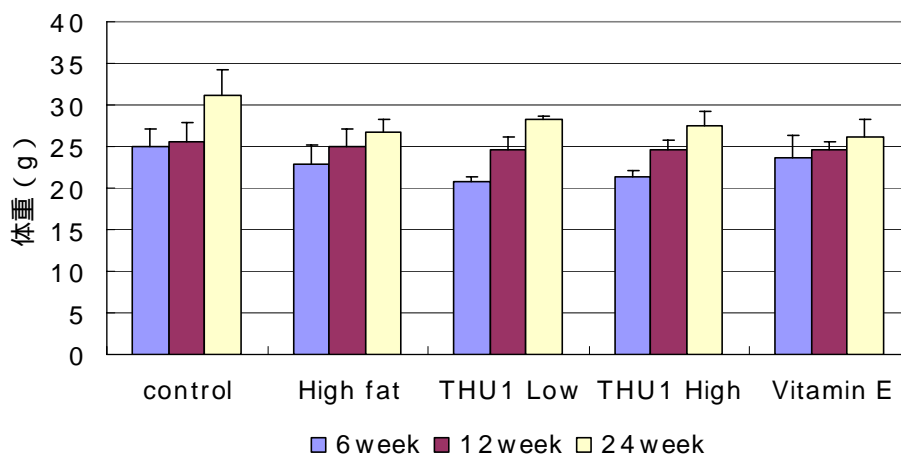


Fig.8 各群における体重変化

12 週目では Control 群を除いて、各群での明らかな有意差は認められなかった。

) 肝重量(g)、マクロ写真(一部)同縮尺

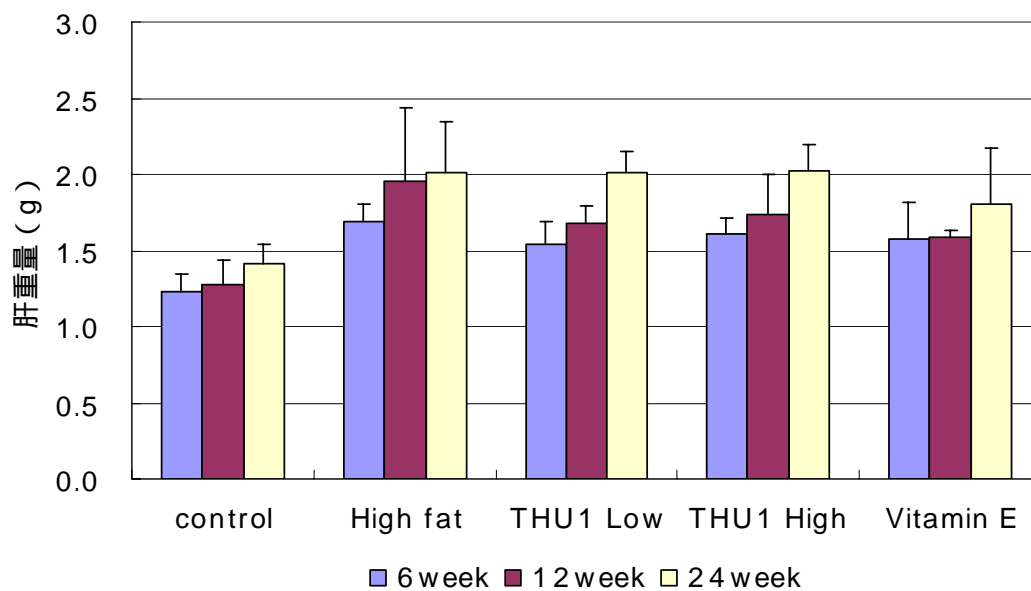


Fig.9 各群における肝重量変化



Control 群 (6w) High fat 群 (6w)

Fig.10 肝臓所見写真

Control 群と High fat 群では有意差をもって肝重量^{注42)}の増加が認められた。

) 血液検査結果

血液中 ALT および AST 測定結果を以下に示す。

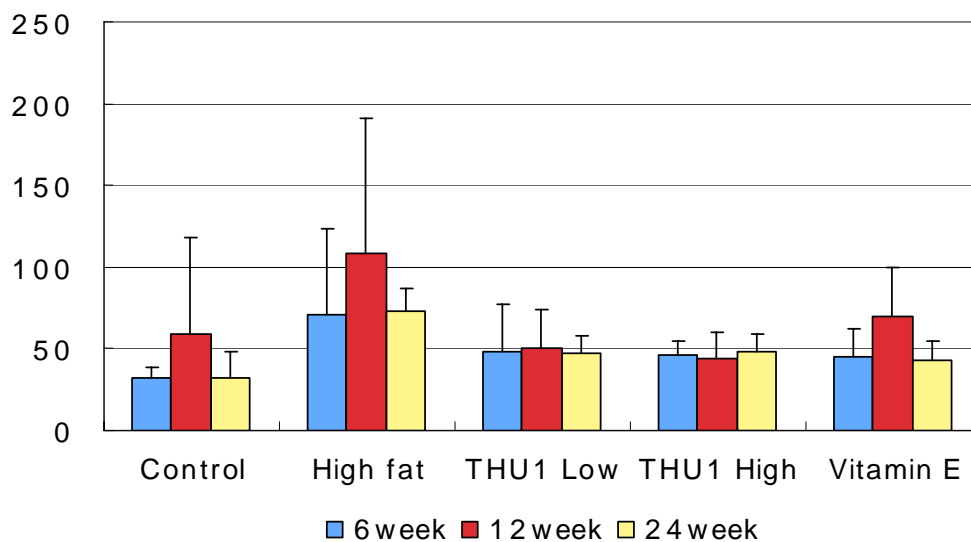


Fig.11 alanine aminotransferase (ALT) 値測定結果

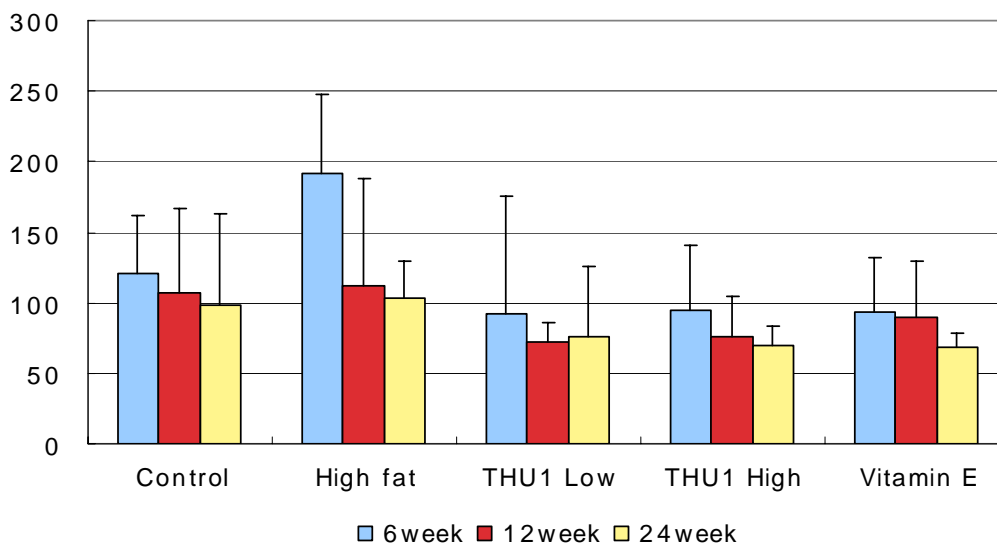


Fig.12 aspartic aminotransferase (AST) 値測定結果

High fat 群では Control 群と比して、ALT 値の有意な上昇認め、THU1 群、

Vitamin E 群は高脂肪食による ALT 値上昇を有意差をもって同程度抑制するが、THU1 の投与量による効果の差は認められなかった。AST 値については群間で明らかな有意差は認められなかった。

4) まとめ

今回使用した実験モデルは血液検査所見 (ALT 値の上昇、またマクロ (肝腫大) ミクロ (炎症細胞の浸潤、肝細胞の脂肪化、間質の線維化) の肝組織所見において、NASH と類似した病態を示した。NASH では臨床的に血清 ALT 値が病態を表すパラメーターとして用いられているが、THU1 投与により有意に ALT 値の改善、また肝組織における炎症反応の改善所見を認め、その効果は Vitamin E と同様であった。

肝細胞への脂肪の沈着をファーストヒットとし、酸化ストレスが加わることによるセカンドヒットとするセカンドヒット説が NASH の有力な発症機序とされている⁵⁾。抗酸化作用を有する Vitamin E は臨床的に NASH 症例に使用されており、その有効性が報告されている^{7, 8)}。今回使用した THU1 は *in vitro* の実験において Vitamin E より強い抗酸化作用を示すことが報告されていたが、*in vivo* において同様な効果を示す報告は少なく、今回の NASH 実験モデルに対する結果により、Vitamin E と同様に NASH 症例へ臨床的に使用した場合の効果の有する可能性が示唆された。

これまで報告されてきた NASH モデル動物は特定の遺伝子の欠損を伴っていることや特定の栄養素を抜いているなどの点で実際の NASH とは大きく異なると考えられる。なぜなら、NASH の患者はある特定の遺伝子が関与していることは明らかでなく、また偏った食事が原因で発症するわけではないからである。今回使用したモデルは高カロリー食投与のみで通常のマウスに肝炎が発症し、また結果で示したように Vitamin E が効果を示す点で実際の NASH と似た点が多く、体重の増加が認められない点が問題点として残るものの、発症機序や

治療薬を開発するためのモデルとして有用であると考えられる。

今回の結果は THU1 含有食品が実際の NASH の予防、もしくは治療効果を有する可能性を示唆するものである。THU1 含有食品はすでに健康食品として使用されているウコンを原料とするため、安全、かつ比較的 low コストで生産することが可能であり、今後肥満者の増加とともに、臨床的に大きな問題となりえる NASH に対して有用な食品となりえると考えられた。また、酸化ストレスで生じるとされる疾患は多数存在し、NASH 以外への応用も検討される必要があると考える。

3.3 ヒト臨床試験

1) 目的

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) のヒトを対象に、「THU1 含有醗酵ウコン」を長期摂取したときの効果を確認する。

2) 方法

NAFLD と診断された被験者に、THU1 含有醗酵ウコン 粒およびプラセボ粒を 6 ヶ月間摂取してもらい、摂取前、摂取期間中および摂取終了後に Table.4 に示す項目について検査を行い、安全性、有用性、有効性を評価した。

Table.4 検査項目

	スクリーニング	試験期間				試験終了後
	前観察	0 週目	4 週目	12 週目	24 週目	後観察
HBs 抗原						
HCV 抗体						
抗核抗体						

抗ミトコンドリア抗体						
IgG						
IgM						
D-Bil						
ChE						
TG						
T-Chol						
HDL						
LDL						
ALT						
LDH						
ALP						
-GTP						
T-Bil						
AST						
Alb						
FBS						
空腹時インスリン						
HbA1c						
フェリチン						
ヒアルロン酸						
型コラーゲン						
P-III-P						
TNF-						
レプチン						
アディポネクチン						
TGF-						
BUN						
クレアチニン						
総胆汁酸						
高感度 CRP						
血液一般						
尿一般						

3) 結果

) 血液検査

有効性の評価項目として ALP^{注43)}、AST、ALT 及び LDH^{注44)}等の肝機能関連項目への被験品の影響、そして体脂肪率減少効果と合わせたアディポネクチン^{注45)}への影響、さらに安全性評価としての生化学的検査、血液学検査及び尿検査への影響を含めて、各検査値の推移をウコン群とプラセボ群別に前観察、0 週目、4 週目、12 週目、24 週目及び後観察を平均値 ± 標準偏差にて集計した。また、0 週目の平均評点を基に、前観察、4 週目、12 週目、24 週目及び後観察までを比較した。その結果、ウコン群において AST の 4 週目 ($p < 0.05$)、ALT の 4 週目と 24 週目 ($p < 0.01$)、 γ -GTP の 4 週目 ($p < 0.001$)、LDL-Cho の 24 週目 ($p < 0.05$) で有意に低下した。プラセボ群の変動は、総ビリルビン^{注46)}の前観察と後観察 ($p < 0.05$)、AST の前観察 ($p < 0.05$)、ALT の前観察 ($p < 0.05$) で有意に上昇した。ALP の 4 週目、24 週目及び後観察 ($p < 0.05$) で有意に低下した。免疫学的検査、血液学検査、血中アディポネクチン、レジスチン^{注47)}、MCP-1^{注48)}、尿検査値において摂取前後およびウコン群、プラセボ群において有意な変動は見られなかった。

) 腹部超音波

有効性の評価項目として、0 週目と 24 週目に腹部超音波を実施した。脂肪肝 (fatty liver) の程度を陰性 (-)、軽度 (mild)、中等度 (moderate)、重度 (severe) の 4 段階で評価した。

その結果、ウコン群は、重度から中軽度が 1 名、中等度から軽度が 2 名、軽度から症状なしが 1 名の改善が認められた。プラセボ群は、軽度から症状なしが 1 名の改善が認められた。

) 安全性の評価

安全性評価の結果を Table.5 にそれぞれ示した。被験品に関する有害事象は認められなかった。

Table.5 安全性の評価

	ウコン群	プラセボ群
安全	6/11 (55%)	9/11 (82%)
ほぼ安全	5/11 (45%)	2/11 (18%)
安全性に問題あり	0/11 (0%)	0/11 (0%)
安全ではない	0/11 (0%)	0/11 (0%)

) 有効性の評価

有効性の評価の結果を Table.6 に示した。有効性について、「極めて有効」、「有効」、「やや有効」、「無効」の4段階で評価した。「極めて有効」、「有効」、「やや有効」を合わせて有効性と評価したウコン群の割合は82%で、プラセボ群は45%であった。

Table.6 有効性の評価

	ウコン群	プラセボ群
極めて有効	4/11 (36%)	0/11 (0%)
有効	1/11 (9%)	1/11 (9%)
やや有効	4/11 (36%)	4/11 (36%)
無効	2/11 (18%)	6/11 (55%)

有用度の評価の結果を Table.7 に示した。有用度について、「極めて有用」、「有用」、「やや有用」、「有用なし」の4段階で評価した。「極めて有用」、「有用」、「やや有用」を合わせて有用度と評価したウコン群の割合は82%で、プラセボ群は45%であった。

Table.7 有用度

	ウコン群	プラセボ群
極めて有用	4/11 (36%)	0/11 (0%)
有用	1/11 (9%)	1/11 (9%)
やや有用	4/11 (36%)	4/11 (36%)
有用なし	2/11 (18%)	6/11 (55%)

3) まとめ

当該試験は、NAFLD の人を対象に、「THU1 含有醗酵ウコン」を長期摂取したときの効果を確認するために実施した。

効果については、「THU1 含有醗酵ウコン」を摂取した際、摂取 4 週間後から体重が減少し、摂取 24 週間後まで持続した。それに伴い、BMI、体脂肪、ウエスト径も減少した。また、肝機能関連項目である AST と ALT も摂取 4 週間後から減少し、摂取 24 週間後まで持続し、正常域^{注 20、23)}まで低下した。腹部超音波では、ウコン群の 4 名に対し、脂肪肝の軽減も認められた。ウコン中に含まれるクルクミンは、胆汁分泌促進作用を有するなどの報告がある。また、クルクミンは体内に摂取されると、消化管内から吸収される際、テトラヒドロクルクミン (THU1) という物質に代謝される。その代謝物はクルクミンより強い酸化ストレス軽減作用を有することが報告されており、当該試験で認められた改善効果は THU1 によるものと考えられる。

有効性および有用性に関しては約 80% の評価であり、THU1 含有醗酵ウコンは NAFLD に対して改善効果があると示唆された。また、安全性については、被験品に関する有害事象は認められなかったことから、安全性に問題はないと考える。

以上の結果から、「THU1 含有醗酵ウコン」は NASH を含む NAFLD への応用が期待できると考える。

第 3 章 総括

本研究開発では、THU1 含有醗酵ウコンの製造技術を確立し、動物やヒトにおける NASH 予防効果の確認を行うことを目的として実施した。その結果、(株)琉球バイオリソース開発において検討した製造技術に関しては、従来の方法より短縮化および低コスト化が可能となった。しかし、THU1 含量を更に高めるためには、サイクロデキストリンを除去し濃縮を行う必要があり、事業化を行うにはその点の検討を実施する必要がある。一方、日本大学にて、THU1 生成量の亢進した酵母を紫外線照射により取得することが出来たことで、THU1 生成の効率化が図られると期待できる。

また、機能性に関しては、琉球大学医学部において非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 予防効果を確認することを目的とし、細胞、実験動物およびヒトでの評価を実施した。その結果、NAFLD を含む NASH に対する予防効果が確認でき、機能性を有した原料としての供給が今後可能になったと考える。

参考文献

- 1) H. Inano et al., Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma-ray. *Carcinogenesis*, **20**, 1011 ~ 1018, 1999
- 2) H. Inano et al., Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, **21**, 1836 ~ 1841, 2000
- 3) M-T. Huang et al., Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid , caffeic acid , and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, **48**, 5941 ~ 5946, 1988
- 4) Y. Sugiyama et al., Involvement of the β -diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharmacol*, **52**, 519 ~ 525, 1996
- 5) Day CP et al., Steatohepatitis : atale of two “ hits” ?, *Gastroenterology*, **114**, 842 ~ 845, 1998
- 6) M. Naito et al., The protective effects of tetrahydrocurcumin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *J Atheroscler Thromb*, **9**, 243 ~ 250, 2002
- 7) Harrison SA. et al., Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*, **98**, 2485 ~ 2490, 2003
- 8) T Hasegawa. et al., Plasma transforming growth factor-beta 1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis : a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*, **15**, 1667 ~ 1672, 1992

専門用語の解説【注】

- 1) ウコンに含まれる黄色の色素成分。抗ガン作用、抗酸化活性、抗炎症作用などが知られている。
- 2) 胆汁は肝臓で生成される黄褐色の液体。食べ物の中に含まれる脂肪の消化吸収に必要。クルクミンにはこの胆汁の分泌を促進する働きがあることが知られている。
- 3) クルクミンが体内で吸収される際に、腸内にて変換された物質。クルクミンよりも抗酸化作用などが強いことが報告されている。
- 4) サイクロデキストリンはグルコースが環状につながった構造をしており、この環状の中に色々な物質を取り込む作用がある。本研究開発では、水に溶けないクルクミンをサイクロデキストリンの中に取り込ませて酵母と反応しやすいようにしている。
- 5) ラットやマウスを用い、物質の急性毒性を調べる試験。ある一定量を投与し14日間観察し、毒性や致死量を調べる試験
- 6) ラットやマウスを用い、連続的に物質を投与し90日間観察し毒性を調べる試験
- 7) イーストアンドモールド培地の略。酵母や糸状菌の培養に用いられている。
- 8) 精製糖廃糖蜜。砂糖を精製する時に発生する、糖分以外の成分を含んだ粘性がある黒褐色の液体。
- 9) 代表的な窒素肥料の1つで、本研究開発では窒素源として培地に添加して使用している。
- 10) 表面にたくさんの穴があいた球状の樹脂で、色々な物質をこの穴に吸着する性質を持っている。本研究開発では、クルクミンおよびテトラヒドロクルクミンを吸着させ、濃縮するために用いている。
- 11) ソーセージなどの食肉加工の香味付けに利用されている酵母。本研究開発では、本酵母のクルクミンからテトラヒドロクルクミンへ変換する働きを利用

している。

12) 分画を行う前の精製していない酵素液

13) クルクミンをテトラヒドロクルクミンに変換する酵素

14) 分画を行い、より水溶性の高い性質を持つタンパクとして分けた部分

15) 半固形状の寒天培地と通常の酵母培養用の培地を重ねて重層を作成する方法。

本研究開発では、クルクミンを含有した軟寒天培地と酵母を培養した培地を重層化して培養し、酵母が生育することでクルクミンが退色することを利用して

16) 1998年ごろから報告されるようになってきた肝炎で、飲酒をしていないのに
も係わらず、アルコールによる脂肪肝炎と似た症状を示す。肥満が原因で引
き起こされると言われており、病状が進むと肝硬変から肝臓まで進む症例。

17) 肝臓がん由来の培養細胞

18) 酸化を抑える働き。食品の酸化防止剤として利用されている。また、ヒト体
内での疾病予防効果を示すことが知られている。

19) 過酸化水素は、漂白剤、殺菌剤として利用されている薬剤で、酸化力が非常
に強い活性酸素の一種。大量に発生した場合は細胞に対して毒性を示すため、
本研究開発では、過酸化水素が細胞に与える毒性をクルクミンおよびテトラ
ヒドロクルクミンがどのくらい抑えるのかを検討した。

20) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの略。GOT ともいい肝機能障害
の程度を評価する数値。正常値は 10 ~ 40。

21) 非アルコール性脂肪肝炎を含む肝臓疾患を指す。

22) 偽薬のことを指し、本物の薬のように外見は代わりはないが、薬としての成
分は全く入っていないもの

23) アラントランスアミナーゼの略。GPT ともいい GOT と共に肝機能障害
の程度を評価する際に用いられる数値。正常値は 5 ~ 40。

24) 超音波を用い内臓の状態を検査する方法。本研究開発では、脂肪肝の程度を

評価している。

- 25) サイクロデキストリンの中にクルクミンを取り込ませたもので、水溶性を高めより酵母と反応しやすくしている。
- 26) サイクロデキストリンと醗酵ウコンと水を混ぜ合わせ、その後で酵母と共に培養する方法。
- 27) 水とエタノールと醗酵ウコンを混ぜあわせて、醗酵ウコン溶液を作成したのちサイクロデキストリンと混ぜ合わせ、その後酵母と共に培養する方法。
- 28) クルクミン還元酵素の特性を示す。
- 29) 本研究開発では、酵母に紫外線をあて遺伝子変異を引き起こした酵母を取得することを指す。
- 30) タンパク質を分離・精製する際に用いる方法で、高濃度の塩類溶液にはタンパク質が溶解しない性質を利用しており、塩類濃度を変え分離していく。
- 31) 試料の分子サイズの違いにより分離していく方法。
- 32) タンパク質や DNA を分離・精製する際に用いる方法で、分子量の違いによる分離が行える。
- 33) タンパク質の分離・精製に用いる方法で、2 段階の電気泳動によりタンパク質を 2 次元的に分離することができる。
- 34) タンパク質はいくつかのアミノ酸が結合しているが、アミノ酸のアミノ基側を指し、アミノ基末端とも言われる。
- 35) タンパク質を構成しているアミノ酸組成のことを指す。
- 36) 遺伝子の構造の変化
- 37) リステリア増菌ブイヨン培地の略
- 38) テトラヒドロクルクミンの分解。クルクミンからテトラヒドロクルクミンに変換され、さらに分解が進むとジヒドロフェルラ酸になることが報告されている。
- 39) t 検定。統計学的検定法の一つで 2 群間の平均値の差を比較する

- 40) 2つの集団の差を比較
- 41) 5%の水準で2つの集団の間に差がある
- 42) 統計学的に肝臓重量に差がある
- 43) アルカリフォスファターゼの略。臨床検査で肝機能の指標の一つとして用いられている。
- 44) 乳酸脱水素酵素の略。臨床検査で肝機能の指標の一つとして用いられている。
- 45) 脂肪細胞から分泌される物質で、インスリン感受性を高めたり、脂肪を燃焼させたりといった効果があることが知られている。
- 46) 胆汁に含まれる色素のことで臨床検査項目の一つ。肝機能の指標
- 47) 脂肪細胞から分泌される物質で、インスリンの抵抗性を引き起こし高血糖の原因となるといわれている。
- 48) 体内の炎症性部位から分泌されるタンパク質で、慢性関節リウマチ、腎炎などの慢性炎症性疾患、粥状動脈硬化症において関与しているといわれている。