

<平成19年度>

リポソーム製剤化した香辛料成分によるアンチエイジング効果の検討

小 暮 健太郎 ・ 奥 野 貴 士

(京都薬科大学)

1. はじめに

老化は、誰しも避けることのできない生命現象の一つである。老化の進行メカニズムには諸説あるが、それらの中で活性酸素による「エラーカタストロフィー説」も有力な説として知られている。すなわち、生体内で発生する活性酸素が細胞や結合組織（コラーゲン）等を攻撃（酸化）することで傷害が生じ、それらが蓄積された結果として老化に至る、という説である。活性酸素は、紫外線などを浴びることで皮膚中において産生され、それが皮膚中の細胞やコラーゲンなど細胞外マトリックスに酸化損傷を誘発することで肌の老化が引き起こされると考えられていることはよく知られている。また、細胞中ではミトコンドリアにおいて常に酸素を消費してエネルギー産生（酸化リン酸化反応）が行われているが、この過程の中でも活性酸素が生じ、それがミトコンドリアなどの細胞内小器官や細胞膜の酸化損傷を引き起こすことも知られている。そのため、多くの研究者が生体内の活性酸素を消去することによる抗老化研究に取り組んでいる。これまでも、様々な抗酸化物質を用いた研究がなされているが、特に食物由来の抗酸化物質は、安全が保障されている点において注目されている。

我々もこれまでに様々な天然由来の抗酸化物質による活性酸素消去能力およびその作用メカニズムについて検討を行ってきた^{1~9)}。中でもカレー等の香辛料に含まれる唐辛子由来のカプサイシン

は、ビタミンEよりも強力な抗酸化活性を有しており、その作用メカニズムも興味深いものであることから、我々が注目してきた抗酸化物質である⁴⁾ (図1)。また、ターメリック（うこん）に含まれるクルクミンも、高い抗酸化能を有することが知られており、古くから研究がなされている抗酸化物質である (図1)。そのため、これら香辛料に含まれる抗酸化物質には抗老化作用が期待された。しかしながら、これらの抗酸化物質は脂溶性を有するため、そのままでは水に溶解することは困難である。そこで、我々は脂溶性薬物の製剤化に実際に使用されているリポソームに着目した。リポソームは、生体膜の構成成分であるリン脂質が二分子膜構造をとっている小胞であり、内水相に水溶性薬物を、脂質膜に脂溶性薬物を封入可能である。そのサイズはナノメートル次元であることから、薬物のナノキャリアーとして癌治療などに用いられている。我々は、このような利点を有

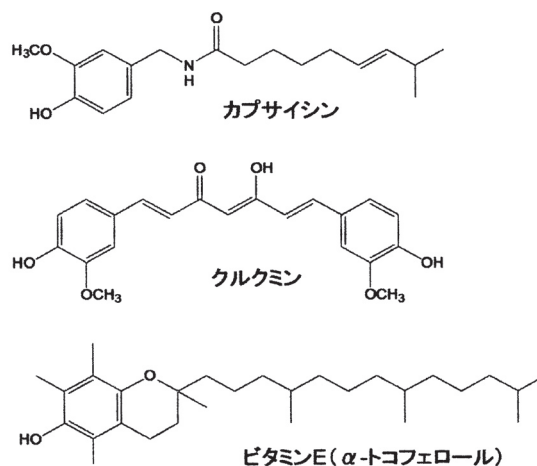


図1 香辛料成分（カプサイシン、クルクミン）及びビタミンEの構造

するリポソームに、香辛料に含まれる抗酸化物質（カプサイシンとクルクミン）を封入することで、生体内の活性酸素を消去し、抗老化効果を誘導できるのではないかと考え、老化モデルマウスを用いて、リポソーム製剤化した香辛料成分の効果を検討した。

2. 実験方法

香辛料成分（カプサイシンおよびターメリック）はエタノールに溶解後、試験管に分取したリン脂質（卵黄ホスファチジルコリン EPC）のクロロフォルム溶液に添加し、窒素ガスを吹き付けることによって香辛料成分含有脂質薄膜を形成した。得られた脂質薄膜に PBS を添加し、超音波槽中で超音波処理することでリポソーム製剤化した。

細胞レベル（in vitro）および生体レベル（in vivo）における活性酸素傷害に対するリポソーム製剤化した香辛料成分の抗酸化効果を検討した。

In vitro 実験では、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を用い、香辛料成分のエタノール溶液およびリポソーム化したものを投与（最終濃度 $300\mu\text{M}$ ）した後、1 時間後に活性酸素として過酸化水素を添加（最終濃度 $600\mu\text{M}$ ）し 24 時間暴露することで細胞傷害を誘導した。その後、WST-1 アッセイ法によって細胞生存率を評価した。

In vivo 実験では、老化モデル動物 Klotho マウス（4 週令）に対して香辛料成分のオリーブ油溶液およびリポソーム製剤化したもの（抗酸化物質量： $0.133\mu\text{mol}$ ）を腹腔内投与（3 日間隔で、4 回）し、一定期間毎に体重を測定するとともに血液採取を行った。採取した血液については過酸化脂質量の定量を行った。また脳の老化の目安となる足跡分析も同時に行った。

3. 結果と考察

3.1 活性酸素による細胞毒性に対するリポソーム製剤化香辛料成分の影響

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞において、活性酸素（過酸化水素）によってもたらされる細胞毒性に対する香辛料成分（カプサイシンおよびクルクミン）のエタノール溶液およびリポソーム製剤化したものの影響を検討した（図 2）。比較として天然の抗酸化物質として広く知られているビタミン E を用いた。HeLa 細胞に過酸化水素を添加すると、約 50% の細胞において細胞死が観察された。この系に、天然抗酸化物質であるビタミン E のエタノール溶液およびリポソーム製剤化したものを添加したが、生存率に変化は認められなかった。すなわち、今回の条件においてビタミン E は活性酸素による細胞傷害に対して保護効果を示すことができないことが示された。また、香辛料成分であるカプサイシンのエタノール溶液およびリポソーム製剤化したものでは、予想に反して細胞の生存率がさらに低下してしまい、細胞毒性を増大させる結果となってしまった。おそらく、今回の系ではカプサイシンが過酸化水素と直接反応することで「プロオキシダント」として作用してしまったために、このような結果となってしまったと思われる。一方、クルクミンをエタノール溶

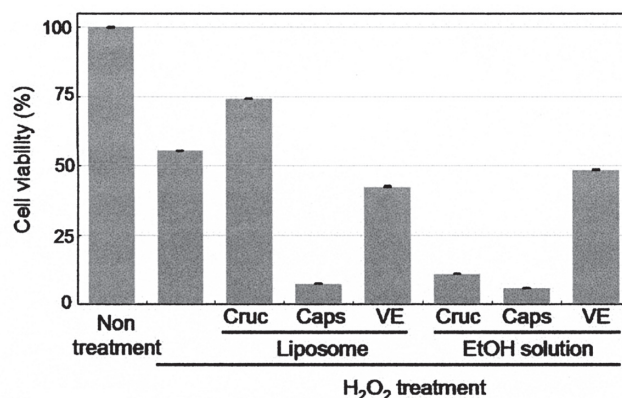


図 2 HeLa 細胞における活性酸素傷害に対する抗酸化物質の影響
Curc：クルクミン，Caps：カプサイシン，VE：ビタミン E

液として添加した系では、カプサイシン同様に細胞毒性を増大させてしまったが、リボソーム製剤化したものでは、唯一生存率を増加させた。このことは、溶液状態で添加した場合にはプロオキシダント作用を示すが、脂質膜に埋め込んだ形（リポソーム化）によってアンチオキシダント（抗酸化物質）として作用し、細胞死に対する保護効果を示したことを意味している。おそらく、リポソーム膜に組み込まれたことで、クルクミンが過酸化水素と直接作用することなく、細胞に取り込まれ、過酸化水素によって誘導される細胞内活性酸素を消去したことで保護効果を示したのではないかと推察される。データには示していないが、さらに過酸化水素量を増大させ、ほとんどの細胞が死滅するような強力な条件においても、リポソーム製剤化クルクミンのみが生存率を向上させた。これらのことから、おなじ香辛料成分ではあっても、カプサイシンは過酸化水素由来の細胞傷害を悪化させるが、リポソーム製剤化したクルクミンは保護効果を示すことが明らかになり、in vivo における老化モデルマウスへの保護効果が期待された。

3.2 老化モデル動物 Klotho マウスに対するリポソーム製剤化香辛料成分の影響

次に、香辛料成分のオリーブ油溶液およびリポソーム製剤化したものを、老化モデル動物として広く用いられている Klotho マウスに腹腔内投与し、その影響を検討した。Klotho マウス（図 3 右）は、4 週令くらいから老化現象が現れ始め、約 8 週令で老衰によって死亡する。写真を見てもわかるように、野生型に比べて体長も小さく、非常に脆弱であるため、薬物を投与するだけで死亡するなど、実験の遂行は困難を極めた。体重変化を追跡したが、すべての投与群において、有意な体重変化は認められなかった（図 4）。ただ、リポソーム化カプサイシン投与群において、刺激に

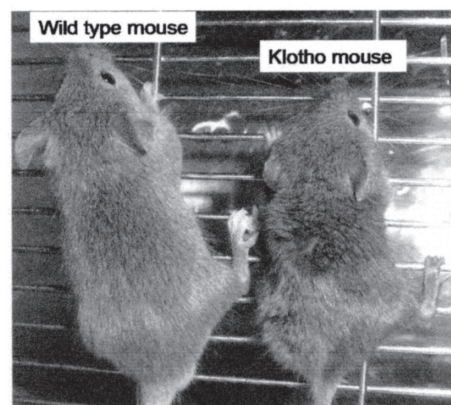


図 3 野生型マウスと Klotho マウス (Klotho/Jcl)

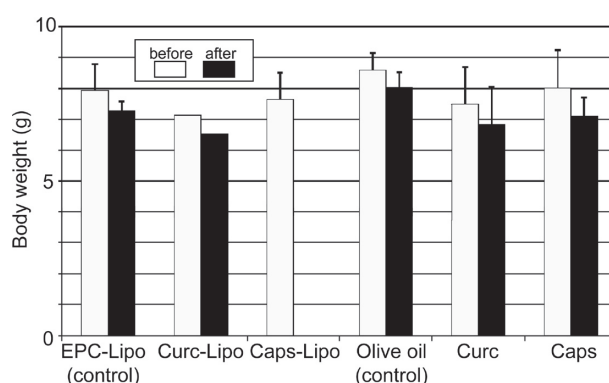


図 4 投与前後における Klotho マウスの体重変化
EPC-Lipo: EPC リポソーム単独, Curc-Lipo: リポソーム製剤化クルクミン, Caps-Lipo: リポソーム製剤化カプサイシン, Curc: クルクミンのオリーブ油溶液, Caps: カプサイシンのオリーブ油溶液

よるためか群の全てのマウスが死亡した。しかし、カプサイシンのオリーブ油溶液、クルクミンのオリーブ油溶液、およびリポソーム化クルクミン投与群では、そのようなことは観察されなかった。また、皮膚老化の指標である皮膚萎縮に対しては、すでに入荷時に老化が始まっていたためもあり、有意な変化は認められなかった（結果は示していない）。

さらに、老化に対する影響を調べるため、足跡測定法を行った（図 5）。この方法では、マウスの足跡における歩幅を計測し、薬物投与前後での変化を調べた。その結果、いずれの系でも投与後、時間経過に伴う老化のために平均歩幅の減少が認められた。クルクミンのオリーブ油溶液投与群およびリポソーム製剤化クルクミン投与群では、歩幅が減少する傾向があったが、大きな差ではない

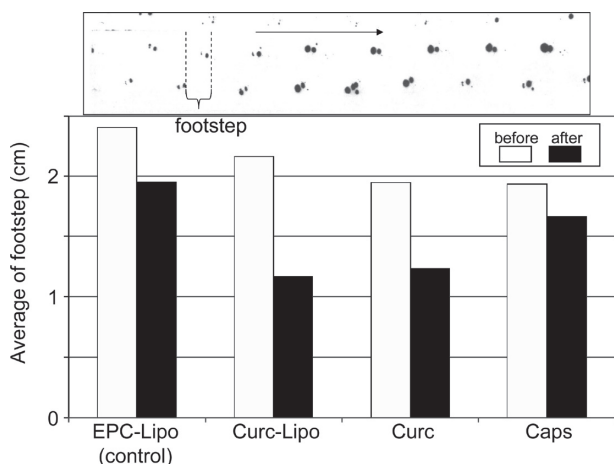


図5 投与前後における Klotho マウスの歩幅変化
上図は実際のマウスの足跡。EPC-Lipo：EPC リポソーム単独，Curc-Lipo：リポソーム製剤化クルクミン，Curc：クルクミンのオリーブ油溶液，Caps：カプサイシンのオリーブ油溶液

と思われる。カプサイシンのオリーブ油溶液投与群においても、時間経過による歩幅の減少はあったが、コントロールと大きな差はなかった。これらのことから、クルクミンおよびカプサイシン投与による脳の老化への抗老化効果は認められないことが明らかとなった。

さらに、当初の仮説のように、リポソーム製剤化した香辛料成分が生体内での活性酸素傷害に対して防御効果を示すか否かを調べるために、投与前後に採取した血漿中の過酸化脂質（活性酸素によって酸化傷害を受けた脂質）量を測定し、その変化量を比較した（図6）。その結果、カプサイ

シンのオリーブ油溶液を投与した群において、10%程度の低下が認められた。さらに、クルクミンのオリーブ油溶液を投与した群では、約25%程度の抑制が認められた。驚くべきことに、クルクミンをリポソーム製剤化したものを投与した群では、約40%もの抑制効果が認められた。この結果は予想を大きく上回るものであり、生体内活性酸素傷害（脂質過酸化反応）に対してクルクミンが高い防御効果を有することを意味している。さらに、リポソーム製剤化することで、オリーブ油溶液よりも高い抑制効果を示したことは、リポソーム膜中に存在することでクルクミンの抗酸化能力が増強されたことを示しており、リポソーム製剤化がクルクミンの効果を高める方法として有効であることが示唆された。この結果は、HeLa細胞（in vitro）における過酸化水素誘導の細胞傷害に対して、リポソーム製剤化クルクミンが保護効果を示した結果と一致するものである。このことから、リポソーム製剤化クルクミンが生体内において生じた活性酸素を消去することで、その産物である過酸化脂質の産生が抑制されたことが示唆される。

カプサイシンとクルクミンは、両者ともに抗酸化物質であり、構造が似ているにもかかわらず、

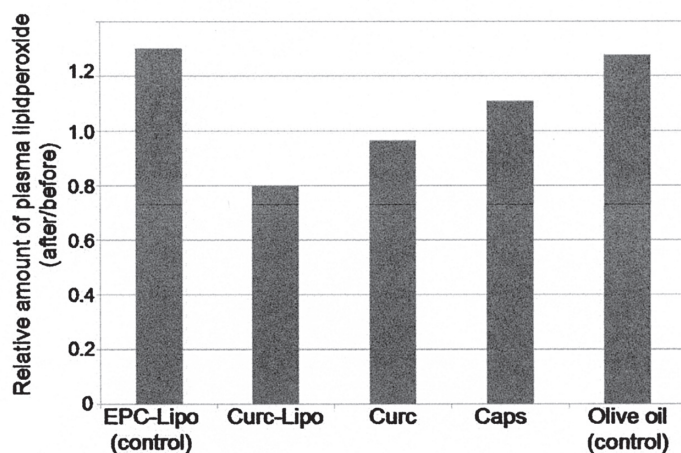


図6 投与前後における血漿中過酸化脂質量の変化
EPC-Lipo：EPC リポソーム単独，Curc-Lipo：リポソーム製剤化クルクミン，Curc：クルクミンのオリーブ油溶液，Caps：カプサイシンのオリーブ油溶液

異なる効果を示したのは興味深い。またクルクミンの場合、リポソーム製剤化したものが、溶液に溶かしたものよりも強力な効果を示したことも興味深い。今後詳細な検討を行うことで、その理由を明らかにできると考えているが、可能性としては、クルクミンが安定なエノール型とケト型との間で互変異性を行うことと、リポソーム膜中に固定されることとに関係があるのではないかと考えている。もしかしたら、リポソーム製剤化によって、活性の高い構造に固定されるため、効率よく活性酸素と反応できるのかもしれない。

図6で測定した血液中の過酸化脂質は、生体内脂質（血液中の脂質や細胞膜など）が活性酸素によって攻撃され生じたものであると考えられ、老化の進行だけでなく、血栓虚血後の血液再還流傷害、動脈硬化症、アルツハイマー病などの重篤な疾患の原因の一つとしても考えられている。そのため、血液中の過酸化脂質量を抑制することができたりリポソーム製剤化クルクミンは、老化の進行遅延だけでなく、様々な疾患の予防にも有効であることが期待される。今回、老化マウスを用いて行った実験において、リポソーム製剤化クルクミン処理群のマウスの様々な臓器を凍結保存しているので、今後これらの臓器における遺伝子発現レベルを解析し、血液中の過酸化脂質量の減少による遺伝子発現変動への影響を評価する予定であり、リポソーム製剤化クルクミンによる効果を分子レベルで明らかにしたいと考えている。

4. おわりに

本研究では、香辛料成分であるカプサイシンおよびクルクミンをリポソーム製剤化し、培養細胞および老化モデル動物における活性酸素に由来する傷害に対する影響を検討した。その結果、クルクミンをリポソーム製剤化したものが、培養細胞における過酸化水素誘導の細胞傷害および老化に

伴う血中過酸化脂質の増加に対して強力な抑制効果を示した。これらの結果から、香辛料成分に含まれるクルクミンは、高い抗酸化効果を有しており、老化や様々な疾患に関与すると考えられる活性酸素や血中過酸化脂質量の抑制に有効であることが示唆された。そのため、香辛料成分をリポソームとして採取することで動脈硬化症やアルツハイマー病の予防につながることが期待される。

謝 辞

本研究は、浦上食品・食文化振興財団の研究助成による支援に基づいており、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。研究遂行に当たっては、平成20年4月より研究室に加わって下さった演進助教、および大学院生（板倉祥子、小笹愛弓、総谷哲也、佐伯健、首藤弘樹、藤岡準平）のご尽力に負うところが大きく、この場を借りて彼らのご尽力に感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Kogure K., Goto S., Abe K., Ohiwa C., Akasu M., Terada H. Potent antiperoxidation activity of the bisbenzylisoquinoline alkaloid cepharanthine: The amine moiety is responsible for its pH-dependent radical scavenge activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1426, 133-142 (1999).
- 2) Chikawa T., Ikata T., Katoh S., Hamada Y., Kogure K., Fukuzawa K. Preventive effects of lecithinized superoxide dismutase and methylprednisolone on spinal cord injury in rats: Transcriptional regulation of inflammatory and neurotrophic genes. *J. Neurotrauma* 18, 93-103 (2001).
- 3) Goto S., Kogure K., Abe K., Kimata Y., Kitahama K., Yamashita E., Terada H. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 251-258 (2001).
- 4) Kogure K., Goto S., Nishimura M., Yasumoto M., Abe K., Ohiwa C., Sassa H., Kusumi T., Terada H. Mechanism of potent antioxidative effect of capsaicin. *Biochim.*

- Biophys. Acta* 1573, 84-92 (2002).
- 5) Kogure K., Tsuchiya K., Abe K., Akasu M., Tamaki T., Fukuzawa K., Terada H. Direct radical scavenging by the bisbenzylisoquinoline alkaloid cepharanthine. *Biochim. Biophys. Acta* 1622, 1-5 (2003).
- 6) Ochi T., Takaishi Y., Kogure K., Yamauti I. Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from capsicum annum. *J. Nat. Prod.* 66, 1094-1096 (2003).
- 7) Suga A., Takaishi Y., Goto S., Munakata T., Yamauchi I., Kogure K. Two lignan dimers from bamboo stems (Phyllostachys edulis). *Phytochemistry* 64, 991-996 (2003).
- 8) Kogure K., Yamauchi I., Tokumura A., Kondou K., Tanaka N., Takaishi Y., Fukuzawa K. Novel antioxidants isolated from Ferula, Inula, Prangos and Rheum plants collected in Uzbekistan. *Phytomedicine* 11, 645-651 (2004).
- 9) Okasaka M., Takaishi Y., Kogure K., Fukuzawa K., Shibata H., Highti T., Honda G., Ito M., Kodzhimatov O.K., Ashurmetov O. Neq stilbene derivatives from Calligonum leucocladum. *J. Nat. Prod.* 67, 1044-1046 (2004).

Effects of antioxidative components of spice, capsaicin and curcumin, incorporated in liposomes on aging

Kentaro Kogure and Takashi Okuno

(Kyoto Pharmaceutical University)

Oxidative damage is considered to be one major factor of aging. Thus, effects of various antioxidants on aging have been investigated by many researchers. In spice, many antioxidative components are contained, especially capsaicin and curcumin are well known as potent antioxidants against various oxidative damages. Based on this, we hypothesized that the antioxidative components of spice, capsaicin and curcumin, can show anti-aging effect by their potent antioxidative properties. However, since capsaicin and curcumin are lipophilic compounds, it is difficult to use as solution. To solve this problem, we considered that capsaicin and curcumin can be incorporated into liposomes. In the present study, we examined the effects of capsaicin and curcumin incorporated in liposomes on cytotoxic damage of cultured cells induced by active oxygen (hydroperoxide). The liposomes containing curcumin inhibited cytotoxic effect of hydroperoxide, although ethanolic solution of curcumin, ethanolic solution of capsaicin and liposomes containing capsaicin did not show any preventive effect. Furthermore, we examined the effects of capsaicin and curcumin incorporated in liposomes on aging of klotho mice, which are known as the model of aging. The liposomes or olive oil solution of capsaicin and curcumin were administered intraperitoneally to 4 weeks old klotho mice. The administrations of the antioxidants did not change their body weight. Length of footstep was also measured as a marker of aging. The liposomes containing curcumin and curcumin solved in olive oil slightly reduced the length of footstep, on the other hand capsaicin did not show any effect. Interestingly, the liposomes containing curcumin markedly decreased the amount of plasma lipidperoxide, which is considered to be related to aging arteriosclerosis and Alzheimer's disease. Curcumin solved in olive oil also decreased plasma lipidperoxide. However, the antioxidative effect of liposomal curcumin is more potent than curcumin solution. Therefore, liposomalization of curcumin, which is antioxidative component of spice, is suggested to be useful for anti-aging.