

博士論文

フコキサンチンの乳化製剤化と
その利用性

Emulsification of fucoxanthin and
its bioavailability

岩手大学大学院 連合農学研究科

生物資源科学専攻 (岩手大学)

熊谷 弘太

2018年 9月

目次

第1章 緒論	－5
第2章 保存安定性に優れたフコキサンチン乳化粉末の作製 および乳化粉末の保存安定性の評価	
第1節 目的	－12
第2節 安定なフコキサンチン乳化粉末作製に向けた検討	
実験1 フコキサンチンに適した乳化剤のスクリーニング	－13
1-1. 方法	
1-1-1. 乳化液の作製	
1-1-2. 作製した乳化液の乳化安定性評価	
1-2. 結果	
1-3. 考察	
実験2 フコキサンチンに適した乳化剤の組み合わせ検討	－16
2-1. 方法	
2-1-1. 乳化液の作製	
2-1-2. 作製した乳化液の評価	
2-1-3. 濁度の測定	
2-1-4. エマルションの粒子径の測定	
2-1-5. フコキサンチン含量の測定	
2-2. 結果および考察	
実験3 フコキサンチンに適した乳化剤の組み合わせ比率検討	－20
3-1. 方法	
3-1-1. 乳化液の作製	

3-1-2. 作製した乳化液の評価	
3-1-3. 濁度の測定	
3-1-4. エマルションの粒子径の測定	
3-1-5. フコキサンチン含量の測定	
3-2. 結果および考察	
実験 4 フコキサンチンに適した抗酸化剤の検討	— 22
4-1. 方法	
4-1-1. 乳化粉末の作製	
4-1-2. 作製した乳化粉末の評価	
4-1-3. フコキサンチン含量の測定	
4-2. 結果および考察	
実験 5 フコキサンチンに適した安定化剤の検討	— 25
5-1. 方法	
5-1-1. 乳化粉末の作製	
5-1-2. 作製した乳化粉末の評価	
5-1-3. フコキサンチン含量の測定	
5-2. 結果および考察	
実験 6 フコキサンチンに適した安定化剤の比率検討	— 28
6-1. 方法	
6-1-1. 乳化粉末の作製	
6-1-2. 作製した乳化粉末の評価	
6-1-3. フコキサンチン含量の測定	
6-2. 結果および考察	
実験 7 フコキサンチンに適した賦形剤の検討	— 30
7-1. 方法	

7-1-1. 乳化粉末の作製	
7-1-2. 作製した乳化粉末の評価	
7-1-3. フコキサンチン含量の測定	
7-2. 結果および考察	
実験 8 フコキサンチン 1.1%含有乳化粉末の作製 および保存安定性の評価	- 33
8-1. 方法	
8-1-1. 乳化粉末の作製	
8-1-2. 乳化粉末の粒子径の測定	
8-1-3. エマルションの粒子径の測定	
8-1-4. フコキサンチン含量の測定	
8-1-5. 保存安定性評価	
8-1-6. 統計解析	
8-2. 結果	
8-3. 考察	
第 3 章 ラットにおけるフコキサンチン乳化粉末摂取による フコキサンチン代謝物の体内動態の検討	
第 1 節 目的	- 41
第 2 節 フコキサンチン代謝物体内動態確認試験	- 42
1. 実験方法	
1-1. 動物実験	
1-2. 血漿中、組織中のフコキサンチノール濃度の測定	
1-3. 統計解析	

2. 結果	
2-1. 血漿中のフコキシサンチノール濃度の推移	
2-2. 肝臓中のフコキシサンチノール濃度の推移	
2-3. 腓腹筋中のフコキシサンチノール濃度の推移	
2-4. 腎臓中のフコキシサンチノール濃度の推移	
3. 考察	
第4章 総合考察	—57
要約	—63
謝辞	—66
引用文献	—67

第1章 緒論

我が国の65歳以上の高齢者人口は3,459万人となっており、総人口に占める割合（高齢化率）は27.3%となっている。今後、総人口は減少に転じることが推測されている中でも、高齢化率は上昇をし続ける見込みとなっており、2036年には33.3%、2065年には38.4%まで達し、国民の約2.6人に1人が65歳以上の高齢者となる社会が到来すると推計されている〔1〕。こうした中で、将来に必要な労働力人口が減少することが懸念されており、働く意欲のある高齢者が、長年培ってきた知識や経験を生かし、年齢に関わりなく活躍し続けることができる「生涯現役社会」を実現することがますます重要になっている〔2〕。しかしながら、働く意欲に加えて、働くことができる身体状態を維持できていなければ、「生涯現役社会」は実現できない。そのため、高齢になっても心身ともに健康を維持すること、すなわち「健康寿命を延伸すること」が大変重要である。健康を維持する方法・取組みは様々なものが存在しているが、その中で健康に寄与する機能性食品のニーズは年々高まってきており、特定保健用食品やポリフェノール・ビタミンやアミノ酸等を含むサプリメントなどに対する人々の関心は高く、食品成分の重要性が多くの人々に広く認識されてきている。最近では特定保健用食品、栄養機能食品とは異なる新しい制度である「機能性表示食品制度」も制定され、これらの市場規模は1兆円を超える巨大なものとなっている〔3〕（図1-1）。

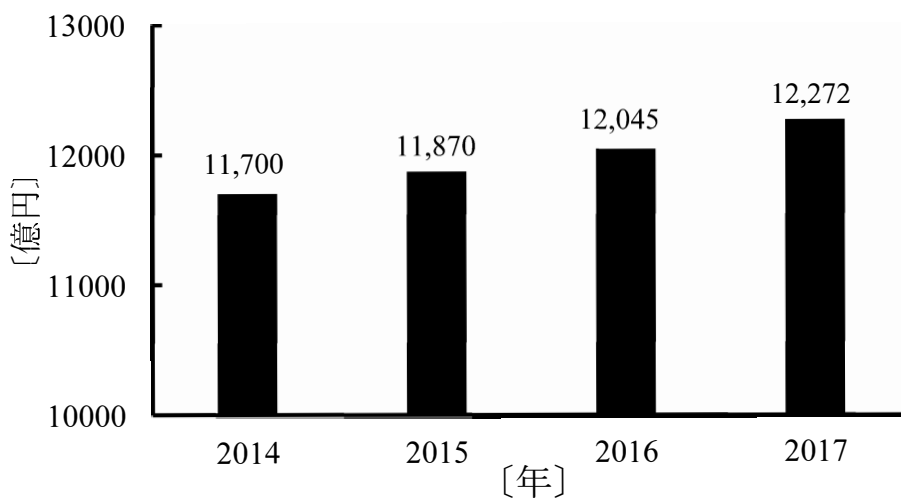


図 1-1 機能性食品市場の推移

機能性表示食品制度は 2015 年 4 月に制定されて以降、着実に市場規模を拡大しており、2015 年が 446 億円だったのに対し、2017 年は 1649 億円にまで伸長する見込みである [4] (図 1-2)。

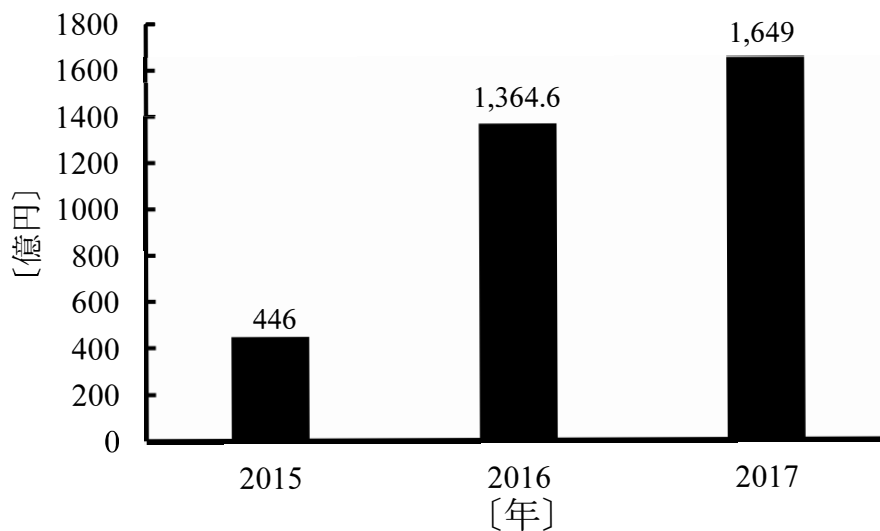


図 1-2 機能性表示食品の市場規模

健康機能性を有する食品成分は数多くあるが、カテキンやアントシアニンのようなポリフェノールは多くの研究がなされており、特定保健用食品としても販売されている。ポリフェノールと同様に健康機能性のある成分としてカロチノイドも広く知られている。カロチノイドは植物および微生物によってのみ生合成される主に炭素数 40 の長鎖化合物であり、黄色~赤色を呈する天然色素の一群である (図 1-3)。代表的なものとして、 α -カロチン、 β -カロチン、リコピン、アスタキサンチン、ルテインなどが挙げられ、抗がん作用 [5、6]、LDL コレステロール低下作用 [7、8]、加齢性黄斑変性リスク低減効果 [9]、美肌作用 [10] など、様々な領域で多数の有用性が報告されている。近年、特に注目されてきているカロチノイドとして、ワカメやコンブなどの褐藻類のみに微量に含まれるフコキサンチンが挙げられる。フコキサンチンはアレンやエポキシドなど独特の構造を持つ物質であり、動物に投与すると、その大部分が吸収時にフコキサンチノールへと代謝され、その後、肝臓などでアマロウシアキサンチン A へと変換されることが明らかとなっている [11] (図 1-4)。

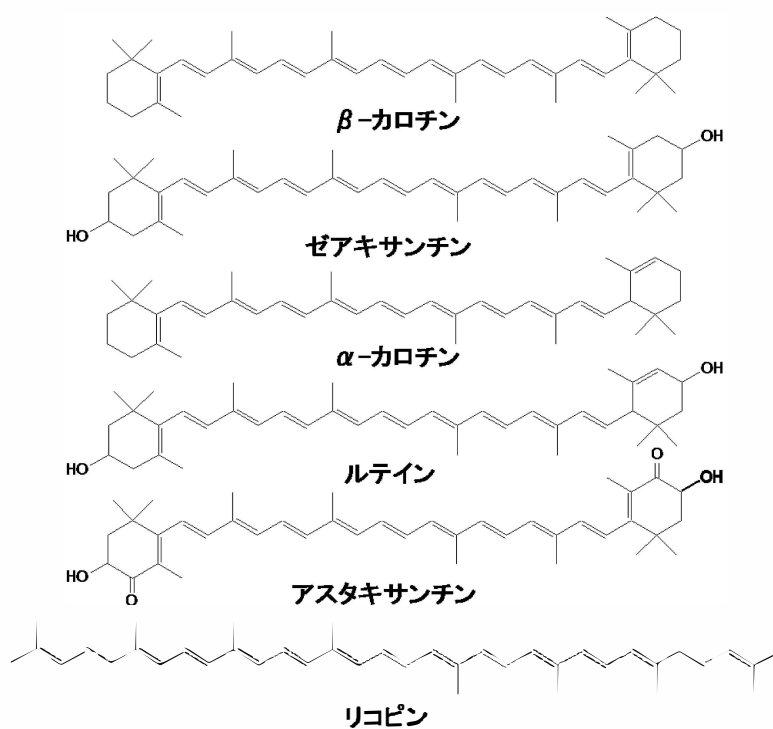


図 1-3 代表的なカロチノイドの構造

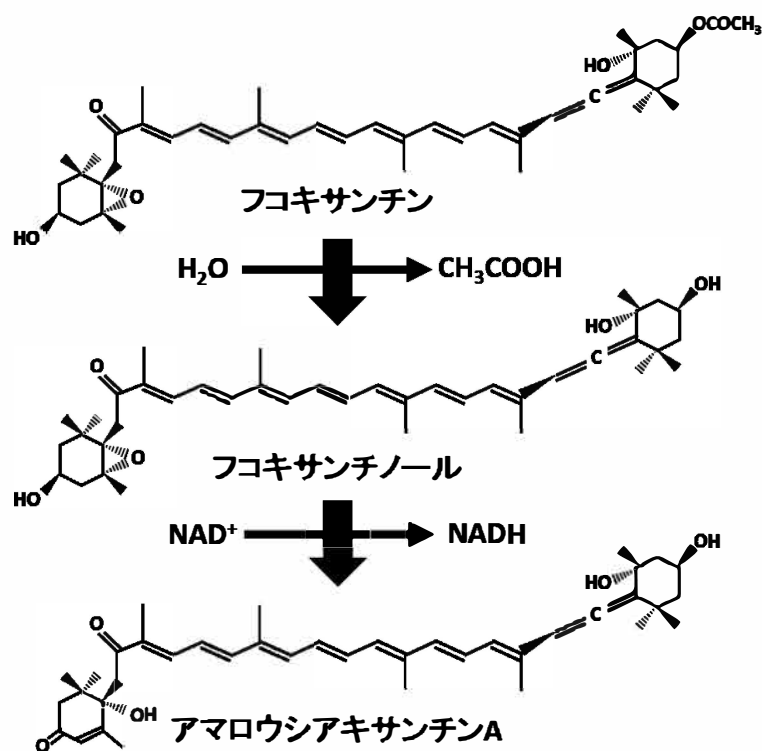


図 1-4 フコキサントシンとフコキサントシン代謝物の構造

これまでにフコキサンチンには抗酸化作用〔12、13〕、抗ガン作用〔14、15〕、抗糖尿病作用〔16、17〕、ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 合成促進活性作用〔18〕、抗肥満作用〔19〕などを有していることが明らかとなっており、特に抗肥満作用については、通常、褐色脂肪組織 (brown adipose tissue、BAT) 以外では発現しない uncoupling protein 1 (UCP1) を白色脂肪組織 (white adipose tissue、WAT) において発現誘導することが明らかとなっている〔20-22〕。これは他の食品素材ではほとんど知られていない作用であることから、フコキサンチンは非常に独自性の高い成分であると言える。近年ではヒトでの有効性を検討した報告もされてきており、Li ら〔23〕は、Body mass index (BMI) の高い (23.0~40.0 kg/m²) 健常人にフコキサンチンを 2.0 mg もしくは 4.0 mg、3 ヶ月摂取させることによって、プラセボ摂取群と比較して有意に体重が減少することを明らかにしている。また、Abidov ら〔24〕は、糖尿病ではない肥満女性にフコキサンチンを 2.4 mg 摂取させたところ、体重の減少、胴囲の減少、体脂肪・肝脂肪の減少が示されたことを報告している。このような有効性報告に加え、フコキサンチンを含有したサプリメントなども販売されてきていることから、その注目度の高さが伺える。

一方で、フコキサンチンは食品原料として販売する上でいくつかの課題を有している。フコキサンチンは主にオイル状原料として販売されているため、機能性食品においては錠剤や飲料には使用できず、ほとんどがソフトカプセル形態に限られている。また、フコキサンチンは安定性に乏しく、熱、空気、光、または酸性曝露によって容易に分解することが知られており〔25、26〕、製品の賞味期限を設定する上で、長期間の品質担保は難しいのが現状である。さらに、一般的にカロチノイドの消化・吸収性は低く、摂取してからカロチノイドが小腸に吸収されるまでには様々な要因が影響することが知られている〔27〕。カロチノイドなどの脂溶性成分は、胆汁によるミセル化、小腸内で

のリパーゼによる加水分解を経て小腸上皮から吸収されるが、胆汁の分泌は食事によって刺激される。不飽和脂肪酸である DHA をラットに摂取させた実験では、食餌摂取時の場合と比較して、絶食時の場合は DHA の最大血中濃度 (Cmax) が低値を示すことが報告されていることから [28]、効率良く脂溶性成分を体内に吸収させるにはサプリメント摂取前に食事を摂ることが望ましい。しかし、サプリメントは通常、摂取タイミングを指定していないため、摂取タイミングによっては、カロチノイドなどの脂溶性成分は効率よく体内に吸収されない場合があり、期待する効果が得られにくくなることが懸念される。

このような課題を解決する方法の一つとして、乳化製剤化技術の利用がある。オイル状原料に対して乳化剤を用いて乳化し、賦形剤などの添加で粉末化することによって、錠剤や飲料への配合が可能となる。また、乳化することにより、油溶成分の水への分散性や保存安定性が改善することが報告されていることから [29]、フコキサンチンについても、フコキサンチンに適した乳化剤、安定化剤、抗酸化剤などを選定することにより、保存安定性に優れた乳化粉末を見出せる可能性がある。

乳化剤 (界面活性剤) とは、水と油のような本来混じり合わないものの境界面で働いて、均一な状態を作る作用を持つものを指し、特に食品に使用できる乳化剤は食品用乳化剤と呼ばれている。食品用乳化剤にはモノグリセリド、有機酸モノグリセリド (酢酸モノグリセリドなど)、ポリグリセリンエステル、ショ糖エステル、ソルビタンエステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、レシチンなどがあり [30]、目的の脂溶性成分の特性に合わせて選定される。乳化剤は界面での吸着や配列による様々な界面活性作用を示す。界面活性作用は乳化作用の他に湿潤作用、浸透作用、分散作用、可溶化作用、起泡作用、消泡作用、洗浄作用などが挙げられる。体内吸収性については、カロチノ

イドの一種であるルテインでは、乳化剤としてホスファチジルコリンを用いて乳化することによって、絶食時でも効率よく体内に吸収できることが報告されており [31]、また、フコキサンチンについてもリゾホスファチジルコリンを用いて混合ミセルに可溶化することによって、マウスにおいてフコキサンチン代謝物が血中や肝臓などの組織中から検出されることが明らかとなっている [11]。このようにフコキサンチン原料についても乳化処理を施すことによって、体内への吸収性の向上が期待できる。

そこで本研究では、保存安定性に優れたフコキサンチン乳化粉末を作製し、その乳化粉末を摂取した際に体内への吸収性が向上するかどうかについて検討することとした。

第2章では、保存安定性に優れたフコキサンチン乳化粉末の作製を目指し、処方検討および作製した乳化粉末の保存安定性の評価を実施した。

第3章では、作製したフコキサンチン乳化粉末を用いて、ラットにおけるフコキサンチン代謝物の体内動態の検討を実施した。

第2章 保存安定性に優れたフコキサンチン乳化粉末の 作製および乳化粉末の保存安定性の評価

第1節 目的

フコキサンチンはワカメやコンブなどの褐藻類のみに微量に含まれる非プロビタミンA類のカロチノイドの一種であり、アレンやエポキシドなど独特の構造を持つ物質である。これまでフコキサンチンの生理機能性の報告は多岐に渡っており、抗酸化作用〔12、13〕、抗ガン作用〔14、15〕、抗糖尿病作用〔16、17〕、DHA合成促進活性作用〔18〕、抗肥満作用〔19〕などを有していることが明らかとなっている。近年ではヒトでの有効性を検討した報告もされてきており、またフコキサンチンを含有したサプリメントなどが販売されてきていることから、その注目度の高さが伺える。

一方で、フコキサンチンは食品原料として販売する上でいくつかの課題を有している。フコキサンチンは主にオイル状原料として販売されているため、機能性食品においては錠剤や飲料には使用できず、ほとんどがソフトカプセル形態に限られている。また、フコキサンチンは安定性に乏しく、熱、空気、光、または酸性曝露によって容易に分解することが知られており〔25、26〕、製品の賞味期限を設定する上で、長期間の品質担保は難しいのが現状である。このような汎用性の低さ、製品寿命の短さを改善することができればさらなる市場拡大が見込める。このような課題を解決する方法の一つとして、乳化製剤化技術がある。油溶成分に乳化処理を施すことによって水への分散性や保存安定性が改善することが報告されていることから〔29〕、フコキサンチンについても、フコキサンチンに適した乳化剤、安定化剤、抗酸化剤などを選定することにより、保存安定性に優れた乳化粉末を見出せる可能性がある。

そこで本章では、保存安定性に優れたフコキサンチン乳化粉末を作製する

ことを目的とし、以下の実験を実施した。

実験 1 ではフコキサンチンに適した乳化剤のスクリーニングを実施した。
実験 2 ではフコキサンチンに適した乳化剤の組み合わせ検討を実施した。実験 3 ではフコキサンチンに適した乳化剤の組み合わせ比率検討を実施した。
実験 4 ではフコキサンチンに適した抗酸化剤の検討を実施した。実験 5 ではフコキサンチンに適した安定化剤の検討を実施した。実験 6 ではフコキサンチンに適した安定化剤の比率検討を実施した。実験 7 ではフコキサンチンに適した賦形剤の検討を実施した。実験 8 ではフコキサンチン 1.1%含有乳化粉末の作製および保存安定性の評価を実施した。

第2節 安定なフコキサンチン乳化粉末作製に向けた検討

実験 1 フコキサンチンに適した乳化剤のスクリーニング

1-1. 方法

1-1-1. 乳化液の作製

蒸留水 150.0 g に表 2-1 に記載の乳化剤 5.0 g、デキストリン（クラスタールデキストリン®、江崎グリコ） 30.0 g、ショ糖 54.0 g を加え溶解させた水溶液に対し、フコキサンチン 1.0%含有オイル（ThinOgen™ フコキサンチンオイル 1%、BGG Japan） 10.0 g とトコフェロール（トコフェロール AT-160、J-オイルミルズ） 1.0 g を 50~60℃で混合した油溶成分を添加し、エースホモジナイザー（日本精機社製）を用いて混合（6,000 rpm、20 分）し乳化液を得た。

表 2-1. フコキサンチン乳化液の作製に使用した乳化剤（実験 1）

番号	成分	製品名	HLB 値	販売会社
1	モノオレイン酸デカグリセリン	リョートーポリグリエステル O-15D	約 13	三菱ケミカルフーズ
2	モノパルミチン酸デカグリセリン	リョートーポリグリエステル P-8D	約 15	三菱ケミカルフーズ
3	モノラウリン酸デカグリセリン	リョートーポリグリエステル L-7D	約 17	三菱ケミカルフーズ
4	モノミリスチン酸デカグリセリン	リョートーポリグリエステル M-7D	約 16	三菱ケミカルフーズ
5	モノオレイン酸デカグリセリン	SY グリスター MO-7S	12.9	阪本薬品
6	モノオレイン酸ヘキサグリセリン	SY グリスター MO-5S	11.6	阪本薬品
7	モノオレイン酸テトラグリセリン	SY グリスター MO-3S	8.8	阪本薬品
8	アラビアガム	アラビックコール SS	-	三栄薬品貿易
9	シヨ糖脂肪酸エステル	リョートーシュガーエステル S-1670	約 16	三菱ケミカルフーズ
10	シヨ糖脂肪酸エステル	DK エステル SS	約 19	第一薬品工業
11	モノオレイン酸デカグリセリン	NIKKOL DECAGLYN 1-OV	12.0	日光ケミカルズ
12	酵素分解レシチン	SLP-ホワイトリゾ	約 12	辻製油
13	モノステアリン酸ソルビタン	サンソフト No.61S	5.0	太陽化学

HLB : Hydrophilic Lipophilic Balance

1-1-2. 作製した乳化液の乳化安定性評価

得られた乳化液を蒸留水にて 40 倍に希釈後、pH を 30%クエン酸溶液にて 3.0 に調整し、90℃、5 分の加熱殺菌後、60℃のインキュベーター内で 5 日間保存した。pH 調整後、加熱殺菌後、および 5 日保存後の各段階において評価を実施した。評価は、目視にて乳化の状態を下記に示す評価に基づいて実施した。

<乳化安定性の評価基準>

- ：結晶析出や濁りを認めず、透明である
- △：濁りが認められた
- ×：ネックリングが発生、または結晶が析出する
- ××：結晶が多く析出する

1-2. 結果

乳化安定性の評価結果を表 2-2 に示した。60°C、5 日保存において、モノラウリン酸デカグリセリンを配合した乳化液、ショ糖脂肪酸エステルを配合した乳化液、および酵素分解レシチンを配合した乳化液の乳化安定性が優れていることが明らかとなった。

表 2-2. 作製した 13 種類の乳化液の乳化安定性結果（実験 1）

乳化剤番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
pH 調整後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
加熱殺菌後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
60°C、5 日保存後	×	×	○	△	×	×	×	××	○	○	××	○	××

1-3. 考察

食品用乳化剤は食品および食品添加物として認可されたものだけが使用することができ、多くの製品が販売されている。その中で目的に合った乳化剤を選択する手段として、乳化剤の HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) 値が有用である。HLB は乳化剤の疎水性と親水性のバランスを表す数値であり、低 HLB の乳化剤は W/O 乳化に適し、中 HLB および高 HLB の乳化剤は O/W 乳化に適している [30]。本検討にて、13 種類の乳化剤のフコキサンチンに対する乳化安定性を評価したところ、モノラウリン酸デカグリセリン、ショ糖脂肪酸エステル、および酵素分解レシチンにおいてフコキサンチンの乳化が安定することが明らかとなった。ポリグリセリン脂肪酸エステルは 8 製品を検討したが、フコキサンチンの乳化が安定したのはモノラウリン酸デカグリセリン（製品名：リョートーポリグリエステル L-7D）のみであった。今回検討したポリグリセリン脂肪酸エステルの中でリョートーポリグリエステル

L-7D が最も HLB 値が高く、約 17 であったことから、高い HLB 値がフコキサンチンの乳化安定化に寄与した可能性が示唆された。一方でリョートーポリグリエステル L-7D と同様に HLB 値が高いリョートーポリグリエステル M-7D (HLB : 約 16) ではフコキサンチンの乳化安定化が不十分であったことから、脂肪酸の炭素鎖の長さの違いによる影響も考えられた。ショ糖脂肪酸エステルは検討した 2 種類では、それぞれ HLB が異なっている (リョートーシュガーエステル S-1670 : 約 16、DK エステル SS : 約 19) が、ともにフコキサンチンの乳化安定性が高かったことから、メーカーや脂肪酸等の種類の違いに関わらず、ショ糖脂肪酸エステル全般とフコキサンチンは相性が良いのではないかと推測する。レシチンについても HLB 値のみではなく、親水基および疎水基の相互作用や立体的配置などのリン脂質の界面化学的性質に依存すると考えられており [32]、SLP-ホワイトリゾの総合的な性質がフコキサンチンの乳化に寄与した可能性が考えられた。

長期的に安定なエマルジョンを形成するためには界面膜を強固にする必要があるが、そのためには乳化剤は単独使用よりも併用とした方が有効であると言われており [33]、これは界面膜に並ぶ乳化剤密度が増すためであると考えられている。したがって、フコキサンチンの乳化安定化についても乳化剤を併用することにより、さらに向上することが期待できる。そこで実験 2 では、本節で見出した乳化剤を用いた組み合わせ検討を行った。

実験 2 フコキサンチンに適した乳化剤の組み合わせ検討

2-1. 方法

2-1-1. 乳化液の作製

蒸留水 150.0 g に表 2-3 に記載の 2 種類の乳化剤をそれぞれ 2.5 g ずつ、デ

キストリン（クラスターデキストリン®、江崎グリコ）30.0 g、ショ糖 54.0 g を加え溶解させた水溶液に対し、フコキサンチン 1.0%含有オイル（ThinOgen™ フコキサンチンオイル 1%、BGG Japan）10.0 g とトコフェロール（トコフェロール AT-160、J-オイルミルズ）1.0 g を 50~60℃で混合した油溶成分を添加し、高速攪拌装置（ラボ・リューション®、プライミクス）を用いて、8,000 rpm の回転数にて 15 分間予備乳化処理を行った。予備乳化が完了した後、高圧乳化機（スターバーストミニ、スギノマシン）にて 70 MPa の圧力にて乳化処理を 3 回行い、乳化液を得た。

表 2-3. フコキサンチン乳化液の処方（実験 2）

原材料名（製品名）	販売会社	配合量（g）		
		処方 1	処方 2	処方 3
フコキサンチン 1.0%オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 1%)	BGG Japan	10.0	10.0	10.0
モノラウリン酸デカグリセリン (リョートーポリグリエステル L-7D)	三菱ケミカルフーズ	2.5	2.5	-
ショ糖脂肪酸エステル (DK エステル SS)	第一工業製薬	2.5	-	2.5
酵素分解レシチン (SLP-ホワイトリゾ)	辻製油	-	2.5	2.5
高度分岐環状デキストリン (クラスターデキストリン®)	江崎グリコ	30.0	30.0	30.0
ショ糖 (上白糖)	パールエース	54.0	54.0	54.0
トコフェロール (トコフェロール AT-160)	J-オイルミルズ	1.0	1.0	1.0
蒸留水		150.0	150.0	150.0
計		250.0	250.0	250.0

2-1-2. 作製した乳化液の評価

得られた乳化液を蒸留水にて 40 倍希釈（2.5%分散液）し、90℃、5 分の加熱殺菌後、60℃のインキュベーター内で 10 日間保存した。加熱殺菌前、加熱殺菌後、5 日保存後、および 10 日保存後の各段階において、濁度、エマルションの粒子径、フコキサンチン含量の測定を行った。

2-1-3. 濁度の測定

作製した 2.5%分散液の濁度は紫外可視分光光度計 (UV-1700、島津製作所) を用いて 660 nm の吸光度を測定した。

2-1-4. エマルションの粒子径の測定

作製した 2.5%分散液中のエマルションの粒子径は粒度測定装置 (マスターサイザー、Malvern) を用いて測定した。

2-1-5. フコキサンチン含量の測定

作製した 2.5%分散液を 80%エタノールに溶解し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供した。カラムは Inertsil ODS-3 (4.6 × 150 mm、ジューエルサイエンス) を用い、カラム温度は 40°C、検出波長は 445 nm とした。移動相の流速は 1.0 mL/min とし、75%アセトニトリル溶液を送液した。

2-2. 結果および考察

処方 1~3 で作製したフコキサンチン乳化液の乳化安定性評価の結果を表 2-4 に示した。処方 1~3 のフコキサンチン乳化液のすべてにおいて、60°C、10 日保存による濁度 (OD660) およびエマルションの粒子径への大きな影響は認められなかった。乳化液中のフコキサンチン含量は、加熱直後のフコキサンチン含量を 100%とした残存率 (%) で示した。処方 2 および処方 3 の乳化液では、60°C、5 日保存の時点でフコキサンチンが検出されず、大きく減衰していることが明らかとなった。一方で、処方 1 の乳化液では、こちらも 60°C 保存によりフコキサンチンが減衰したものの、5 日保存後のフコキサンチン残存率が 21%、10 日保存後のフコキサンチン残存率が 2%という結果となり、処方 2 および処方 3 の乳化液と比較して、フコキサンチンの減衰が緩やかで

あることが示された。以上の結果から、3つの処方全てにおいて、加熱処理および60℃保存による乳化の大きな変化は認められなかったが、処方1の乳化液において、フコキサンチンの減衰抑制の傾向が見られたことから、モノラウリン酸デカグリセリンとシヨ糖脂肪酸エステルがフコキサンチンの酸化抑制効果を生み出している可能性が考えられた。このことから、モノラウリン酸デカグリセリンおよびシヨ糖脂肪酸エステルを組み合わせたフコキサンチンの乳化および安定性の向上に有用であることが推測されるが、本節の結果ではフコキサンチンの保護効果としては十分とは言えない。そこで実験3では選定した乳化剤の配合量を増量し、フコキサンチン乳化液に及ぼす影響について検討することとした。また、併せて乳化剤の組み合わせ比率検討も実施し、フコキサンチンの乳化安定性等が向上するかどうかを検討した。

表 2-4. 作製したフコキサンチン乳化液の乳化安定性評価の結果（実験2）

サンプル	評価項目	加熱前	加熱直後	60℃、 5日保存後	60℃、 10日保存後
処方1	濁度 (OD660)	0.375	0.347	0.361	0.356
	粒子径 (nm)	155.5	187.5	180.4	160.4
	フコキサンチン残存率 (%)	-	100	21	2
処方2	濁度 (OD660)	0.356	0.334	0.355	0.374
	粒子径 (nm)	148.1	140.1	143.3	144.1
	フコキサンチン残存率 (%)	-	100	(n.d.)	(n.d.)
処方3	濁度 (OD660)	0.521	0.482	0.477	0.479
	粒子径 (nm)	166.7	201.6	191.7	162.4
	フコキサンチン残存率 (%)	-	100	(n.d.)	(n.d.)

n.d.: not detectable

実験3 フコキサンチンに適した乳化剤の組み合わせ比率検討

3-1. 方法

3-1-1. 乳化液の作製

2-1-1 と同様の手順にて、表 2-5 に記載の処方 1~3 の乳化液を作製した。

表 2-5. フコキサンチン乳化液の処方 (実験 3)

原材料名 (製品名)	販売会社	配合量 (g)		
		処方 1	処方 2	処方 3
フコキサンチン 1.0%オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 1%)	BGG Japan	10.0	10.0	10.0
モノラウリン酸デカグリセリン (リョートーポリグリエステル L-7D)	三菱ケミカルフーズ	5.0	7.5	2.5
シヨ糖脂肪酸エステル (DK エステル SS)	第一工業製薬	5.0	2.5	7.5
高度分岐環状デキストリン (クラスターデキストリン®)	江崎グリコ	30.0	30.0	30.0
シヨ糖 (上白糖)	パールエース	49.0	49.0	49.0
トコフェロール (トコフェロール AT-160)	J-オイルミルズ	1.0	1.0	1.0
蒸留水		150.0	150.0	150.0
計		250.0	250.0	250.0

3-1-2. 作製した乳化液の評価

2-1-2 と同様の方法にて評価を行った。

3-1-3. 濁度の測定

2-1-3 と同様の方法にて評価を行った。

3-1-4. エマルションの粒子径の測定

2-1-4 と同様の方法にて評価を行った。

3-1-5. フコキサンチン含量の測定

2-1-5 と同様の方法にて評価を行った。

3-2. 結果および考察

処方 1~3 で作製したフコキサンチン乳化液の乳化安定性評価の結果を表 2-6 に示した。処方 1~3 のフコキサンチン乳化液のすべてにおいて、60℃、10 日保存による濁度およびエマルションの粒子径への大きな影響は認められなかった。乳化液中のフコキサンチン含量は、加熱直後のフコキサンチン含量を 100%とした残存率 (%) で示した。実験 2 の結果との比較において、処方 1~3 で作製したフコキサンチン乳化液すべてでフコキサンチンの減衰が抑制されていることから、乳化剤の添加量を増量することにより、フコキサンチンの安定性が向上していることが明らかとなった。しかしながら、処方 1~3 の間で大きな違いは認められなかった。

処方 1 および処方 2 と比較して、処方 3 では濁度およびエマルション粒子径が低値であった。乳化破壊の要因の一つであるクリーミングは、エマルションの内相（分散相）と外相（連続相）間の密度差により、内相の乳化粒子が浮上あるいは沈降して、エマルションが部分的に濃縮される現象であるが、クリーミングを抑制するためにはエマルションの粒子径を小さくすることが効果的であることが知られている [34]。このことから、処方 3 のフコキサンチン乳化液が最も乳化状態が良好であることが示唆されたため、モノラウリン酸デカグリセリン：ショ糖脂肪酸エステル配合比率をそれぞれ 2.5%：7.5%の比率で配合することとした。本節にてフコキサンチンに配合する乳化剤が確定したため、実験 4 では、フコキサンチンに適した抗酸化剤の検討を実施することとした。

表 2-6. 作製したフコキサンチン乳化液の乳化安定性評価の結果 (実験 3)

サンプル	評価項目	加熱前	加熱直後	60℃、 5日保存後	60℃、 10日保存後
処方 1	濁度 (OD660)	0.399	0.370	0.394	0.390
	粒子径 (nm)	168.5	213.3	182.3	180.6
	フコキサンチン残存率 (%)	-	100	37	6
処方 2	濁度 (OD660)	0.340	0.318	0.340	0.340
	粒子径 (nm)	173.3	193.1	183.0	177.1
	フコキサンチン残存率 (%)	-	100	38	6
処方 3	濁度 (OD660)	0.127	0.117	0.136	0.138
	粒子径 (nm)	127.6	127.2	168.6	181.7
	フコキサンチン残存率 (%)	-	100	34	6

実験 4 フコキサンチンに適した抗酸化剤の検討

4-1. 方法

4-1-1. 乳化粉末の作製

2-1-1 と同様の手順にて、表 2-7 に記載の処方 1~5 の水相と油相の混合液を得た。その後、高速攪拌装置 (ラボ・リユーション®、プライミクス) を用いて、8,000 rpm の回転数にて 15 分間予備乳化処理を行った。予備乳化が完了した後、高圧乳化機 (スターバーストミニ、スギノマシン) にて 70 MPa の圧力にて乳化処理を 3 回行い、乳化液を得た。得られた乳化液は、ミニスプレードライヤー (B-290、ビュッヒ) により噴霧乾燥させ、乳化粉末を得た。

表 2-7. フコキサンチン乳化粉末の処方（実験 4）

原材料名（製品名）	販売会社	配合量（g）				
		処方 1	処方 2	処方 3	処方 4	処方 5
フコキサンチン 1.0%オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 1%)	BGG Japan	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
モノラウリン酸デカグリセリン (リョートーポリグリエステル L-7D)	三菱ケミカルフーズ	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
シヨ糖脂肪酸エステル (DK エステル SS)	第一工業製薬	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
高度分岐環状デキストリン (クラスターデキストリン®)	江崎グリコ	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
シヨ糖 (上白糖)	パールエース	49.0	49.0	49.0	49.0	49.0
トコフェロール (トコフェロール AT-160)	J-オイルミルズ	1.0	-	-	0.5	0.5
アスコルビン酸ナトリウム	DSM	-	1.0	-	0.5	-
茶抽出物 (サンフード®水性)	三菱ケミカルフーズ	-	-	1.0	-	0.5
蒸留水		150.0	150.0	150.0	150.0	150.0
計		250.0	250.0	250.0	250.0	250.0

4-1-2. 作製した乳化粉末の評価

得られた乳化粉末をチャック付ポリエチレン袋に入れた後、ヒートシールにて密閉し、60°Cのインキュベーター内で15日間保存した。作製直後、5日保存後、および15日保存後の各段階において、およびフコキサンチン含量の測定を行った。

4-1-3. フコキサンチン含量の測定

2-1-5と同様の方法にて測定を行った。

4-2. 結果および考察

処方 1~5 で作製したフコキサンチン乳化粉末中のフコキサンチン含量の結果を表 2-8 に示した。乳化粉末を作製する際に添加した蒸留水は噴霧乾燥時にほぼ除去されるため、作製したフコキサンチン乳化粉末重量は各処方それぞれで 100g となっている。乳化粉末に配合したフコキサンチン含量は 100

mg/100 g であるが、トコフェロールを配合した処方 1 のフコキサンチン乳化粉末では、60°C、15 日間保存におけるフコキサンチン含量は 31.2 mg/100 g であった。アスコルビン酸ナトリウムを配合した処方 2 および処方 4 のフコキサンチン乳化粉末では、60°C、15 日間保存におけるフコキサンチン含量はそれぞれ 49.9 mg/100 g および 42.7 mg/100 g と処方 1 よりもフコキサンチンの残存量が高かったが、作製直後のフコキサンチン含量が配合量に対し大きく下回っていた。茶抽出物を配合した処方 3 および処方 5 のフコキサンチン乳化粉末においても、作製直後のフコキサンチン含量が配合量に対し下回っており、さらに 60°C、15 日間保存におけるフコキサンチン含量はそれぞれ 1.6 mg/100 g および 4.9 mg/100 g と大きく減衰していることが明らかとなった。アスコルビン酸ナトリウムもしくは茶抽出物の配合により、フコキサンチン乳化粉末のフコキサンチン含量が配合量に対して下回った明確な原因は不明であるが、処方 2 および処方 4 のフコキサンチン乳化粉末作製直後のフコキサンチン含量に対して、保存 5 日後および保存 15 日後のフコキサンチン含量は大きく変化していなかったことから、製造工程中に原因があるものと推測される。アスコルビン酸などのビタミンやカテキンなどのポリフェノール性抗酸化物質はプロオキシダント活性を有していることが知られているが [35]、製造工程中に発生する熱や水の存在により、これらの物質が逆効果を示した可能性が考えられる。以上の結果から、抗酸化物質はトコフェロールを選定することとし、配合量は 1.0% にすることにした。実験 5 では、フコキサンチンに適した安定化剤の検討を実施することとした。

表 2-8. 作製したフコキサンチン乳化粉末中の
フコキサンチン含量 (実験 4)

サンプル	フコキサンチン含量 [mg/100 g]			
	配合量	作製直後	5日保存後	15日保存後
処方 1	100.0	96.9	48.4	31.2
処方 2	100.0	58.8	60.1	49.9
処方 3	100.0	71.2	10.0	1.6
処方 4	100.0	56.0	48.7	42.7
処方 5	100.0	87.4	17.7	4.9

実験 5 フコキサンチンに適した安定化剤の検討

5-1. 方法

5-1-1. 乳化粉末の作製

蒸留水 150.0 g に、モノラウリン酸デカグリセリン (リョートーポリグリエステル L-7D、三菱ケミカルフーズ) 2.5 g、ショ糖脂肪酸エステル (DK エステル SS、第一工業製薬) 7.5 g、表 2-9 に記載の安定化剤 30.0 g、ショ糖 49.0 g を加え溶解させた水溶液に対し、フコキサンチン 1.0% 含有オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 1%、BGG Japan) 10.0 g、とトコフェロール (トコフェロール AT-160、J-オイルミルズ) 1.0 g とを 50~60°C で混合した油溶成分を添加し、水相と油相の混合液を得た。その後、4-1-1 と同様の方法にて乳化粉末を得た。

表 2-9. フコキサンチン乳化粉末の処方（実験 5）

原材料名（製品名）	販売会社	配合量（g）			
		処方 1	処方 2	処方 3	処方 4
フコキサンチン 1.0%オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 1%)	BGG Japan	10.0	10.0	10.0	10.0
モノラウリン酸デカグリセリン (リョートーポリグリエステル L-7D)	三菱化学フーズ	2.5	2.5	2.5	2.5
ショ糖脂肪酸エステル (DK エステル SS)	第一工業製薬	7.5	7.5	7.5	7.5
高度分岐環状デキストリン (クラスターデキストリン®)	江崎グリコ	30.0	-	-	-
アラビアガム (アラビックコール SS)	三栄薬品貿易	-	30.0	-	-
カゼインナトリウム (サンラクト S-3)	太陽化学	-	-	30.0	-
γ-シクロデキストリン (シクロデキストリン γ-100)	塩水港精糖	-	-	-	30.0
ショ糖 (上白糖)	パールエース	49.0	49.0	49.0	49.0
トコフェロール (トコフェロール AT-160)	J-オイルミルズ	1.0	1.0	1.0	1.0
蒸留水		150.0	150.0	150.0	150.0
計		250.0	250.0	250.0	250.0

5-1-2. 作製した乳化粉末の評価

4-1-2 と同様の方法にて評価を行った。

5-1-3. フコキサンチン含量の測定

2-1-5 と同様の方法にて測定を行った。

5-2. 結果および考察

処方 1~4 で作製したフコキサンチン乳化粉末中のフコキサンチン含量の結果を表 2-10 に示した。高度分岐環状デキストリンを配合した処方 1 のフコキサンチン乳化粉末と比較して、処方 2、処方 3、および処方 4 のフコキサンチン乳化粉末では、フコキサンチン含量の減衰を抑制する傾向が認められた。特にγ-シクロデキストリンを配合した処方 4 のサンプルにおける 60℃、15 日

保存後のフコキサンチン残存率は高く、83.2 mg/100 g という結果であった。シクロデキストリンは6~8分子のD-グルコースが、 α -1,4 グリコシド結合によって結合し環状構造をとった環状オリゴ糖の一種であり、結合しているグルコースの数の違いにより、 α -シクロデキストリン (6 個)、 β -シクロデキストリン (7 個)、 γ -シクロデキストリン (8 個) 等の種類が存在する。 γ -シクロデキストリンは α -シクロデキストリンおよび β -シクロデキストリンと比較して溶解度が高いことから(水への溶解度は25°Cにおいて、それぞれ23.2 g/100 mL、14.5 g/100 mL、1.8 g/100 mL)、配合量を幅広く検討することが可能である。また、各シクロデキストリンの内径と包接されるゲスト分子の大きさとの間には対応関係が見られることから [36]、比較的分子量の大きいフコキサンチンにおいては、シクロデキストリンの中では γ -シクロデキストリンが最も適していると推測し、本研究では γ -シクロデキストリンを用いた。シクロデキストリンは環状構造内に疎水性物質を包接することによる保護作用を有しており、 α -シクロデキストリンおよび γ -シクロデキストリンによる β -カロチンの安定化も報告されていることから [29]、フコキサンチンについても γ -シクロデキストリンの包接による保護作用で減衰が抑制されたことが考えられる。アラビアガムおよびカゼインナトリウムについてもフコキサンチンの減衰を抑制する傾向がみられたが、カゼインナトリウムは60°C、15日保管により、乳製品特有の臭いが顕著に発生していたため、本検討の乳化粉末への配合は適していない可能性が高い。以上の結果から、安定化剤はアラビアガムと γ -シクロデキストリンを使用することとし、実験6ではアラビアガムと γ -シクロデキストリンの添加量、および組み合わせ比率検討を行った。

表 2-10. 作製したフコキサンチン乳化粉末中のフコキサンチン含量(実験 5)

サンプル	フコキサンチン含量 [mg/100 g]			
	配合量	初発	5 日保存後	15 日保存後
処方 1	100.0	96.9	48.4	31.2
処方 2	100.0	104.9	67.3	45.4
処方 3	100.0	98.9	72.1	59.4
処方 4	100.0	107.7	92.2	83.2

実験 6 フコキサンチンに適した安定化剤の比率検討

6-1. 方法

6-1-1. 乳化粉末の作製

表 2-11 に記載の処方を 5-1-1 と同様の手順にて作製し乳化粉末を得た。蒸留水の添加量は乳化液の粘度を考慮し調製した。

表 2-11. フコキサンチン乳化粉末の処方 (実験 6)

原材料名 (製品名)	販売会社	配合量 (g)			
		処方 1	処方 2	処方 3	処方 4
フコキサンチン 1.0%オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 1%)	BGG Japan	10.0	10.0	10.0	10.0
モノラウリン酸デカグリセリン (リョートーポリグリエステル L-7D)	三菱化学フーズ	2.5	2.5	2.5	2.5
シヨ糖脂肪酸エステル (DK エステル SS)	第一工業製薬	7.5	7.5	7.5	7.5
アラビアガム (アラビックコール SS)	三栄薬品貿易	15.0	10.0	15.0	9.0
γ-シクロデキストリン (シクロデキストリン γ-100)	塩水港精糖	15.0	20.0	30.0	36.0
シヨ糖 (上白糖)	パールエース	49.0	49.0	34.0	34.0
トコフェロール (トコフェロール AT-160)	J-オイルミルズ	1.0	1.0	1.0	1.0
蒸留水		150.0	150.0	350.0	350.0
計		250.0	250.0	450.0	450.0

6-1-2. 作製した乳化粉末の評価

得られた乳化粉末をチャック付ポリエチレン袋に入れた後、ヒートシールにて密閉し、60°Cのインキュベーター内で15日間保存した。作製直後および15日保存後の段階において、外観の目視評価を行い、作製直後、5日保存後、および15日保存後の各段階において、およびフコキサンチン含量の測定を行った。

6-1-3. フコキサンチン含量の測定

2-1-5と同様の方法にて測定を行った。

6-2. 結果および考察

処方1~4で作製したフコキサンチン乳化粉末中のフコキサンチン含量の結果およびフコキサンチン乳化粉末の外観をそれぞれ表2-12、図2-1に示した。処方1~4のフコキサンチン乳化粉末すべてにおいて、フコキサンチンの減衰が抑制されていることが明らかとなった。特に処方4のフコキサンチン乳化粉末は処方1~3のサンプルと比較して、60°C、15日保存後のフコキサンチン含量が高値であったことから、アラビアガムと γ -シクロデキストリンの配合比率は9.0%：36.0%が最も適していることが示唆された。また、処方1~3のフコキサンチン乳化粉末は、60°C、15日保存によって固化の進行が認められたが、処方4のフコキサンチン乳化粉末は、処方1~3のサンプルと比較して、固化の進行は抑制傾向であった。以上の結果からアラビアガムと γ -シクロデキストリンの配合比率はそれぞれ9.0%、36.0%とすることとし、実験7では賦形剤の検討を行った。

表 2-12 作製したフコキサンチン乳化粉末中のフコキサンチン含量 (実験 6)

サンプル	フコキサンチン含量 [mg/100 g]			
	配合量	初発	5日保存後	15日保存後
処方1	100.0	100.8	88.2	75.3
処方2	100.0	98.3	86.7	76.7
処方3	100.0	108.2	89.2	76.3
処方4	100.0	117.9	91.9	82.9



図 2-1. 作製したフコキサンチン乳化粉末の外観 (実験 6)

実験 7 フコキサンチンに適した賦形剤の検討

7-1. 方法

7-1-1. 乳化粉末の作製

表 2-13 に記載の処方を 5-1-1 と同様の手順にて作製し乳化粉末を得た。蒸留水の添加量は乳化液の粘度を考慮し調製した。

表 2-13. フコキサンチン乳化粉末の処方（実験 7）

原材料名（製品名）	販売会社	配合量（g）	
		処方 1	処方 2
フコキサンチン 1.0%オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 1%)	BGG Japan	10.0	10.0
モノラウリン酸デカグリセリン (リョートーポリグリエステル L-7D)	三菱化学フーズ	2.5	2.5
シヨ糖脂肪酸エステル (DK エステル SS)	第一工業製菓	7.5	7.5
アラビアガム (アラビックコール SS)	三栄薬品貿易	9.0	9.0
γ -シクロデキストリン (シクロデキストリン γ -100)	塩水港精糖	36.0	36.0
シヨ糖 (上白糖)	パールエース	34.0	-
デキストリン (パインデックス#3)	松谷化学	-	34.0
トコフェロール (トコフェロール AT-160)	J-オイルミルズ	1.0	1.0
蒸留水		150.0	150.0
計		250.0	250.0

7-1-2. 作製した乳化粉末の評価

6-1-2 と同様の方法にて評価を行った。

7-1-3. フコキサンチン含量の測定

2-1-5 と同様の方法にて測定を行った。

7-2. 結果および考察

処方 1 および処方 2 で作製したフコキサンチン乳化粉末中のフコキサンチン含量の結果およびフコキサンチン乳化粉末の外観をそれぞれ表 2-14、図 2-2 に示した。処方 1 および 2 のフコキサンチン乳化粉末の両方において、フコキサンチンの減衰が抑制されていることが示された。処方 1 サンプルと処方 2 サンプルのフコキサンチン含量を作製直後のフコキサンチン含量からの残存率で比較したところ、60°C、15 日保存後のフコキサンチン残存率は処方

1 サンプルが 70.3%、処方 2 サンプルが 82.0%であり、デキストリンを配合した処方のほうがフコキサンチンの安定性が高いことが示唆された。また、乳化粉末の固化の程度は処方 1 のほうが進行している傾向が認められた。以上の結果に加え、機能性食品でもシュガーレスの要望が多い背景〔37〕もあることから、デキストリンを賦形剤として使用することとした。

これまで使用してきたフコキサンチン原料は 1.0%含有オイルであり、乳化粉末 1 g 当たりのフコキサンチン含有量は 1 mg (0.1%) であった。フコキサンチン乳化粉末を機能性食品に配合する量を考慮した場合、乳化粉末中に含まれるフコキサンチン含量は可能な限り多いほうが望ましい。そこで実験 8 ではフコキサンチンを 10%含有したオイルを原料として乳化粉末を作製し、評価を行った。

表 2-14. 作製したフコキサンチン乳化粉末中の
フコキサンチン含量 (実験 7)

サンプル	フコキサンチン含量 [mg/100 g]			
	配合量	初発	5 日保存後	15 日保存後
処方 1	100.0	117.9	91.9	82.9
処方 2	100.0	96.0	88.4	78.8

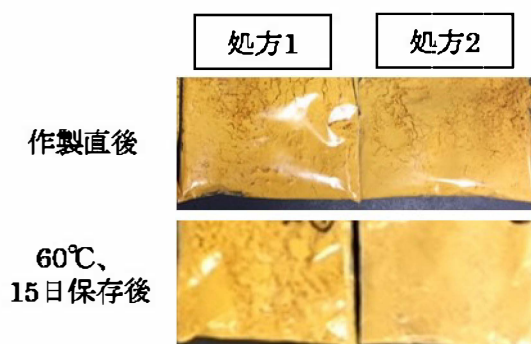


図 2-2. 作製したフコキサンチン乳化粉末の外観 (実験 7)

実験8 フコキサンチン 1.1%含有乳化粉末の作製および保存安定性の評価

8-1. 方法

8-1-1. 乳化粉末の作製

表 2-15 に記載の処方にて乳化粉末を作製した。蒸留水 400.0 g に、モノラウリン酸デカグリセリン（リョートーポリグリエステル L-7D、三菱ケミカルフーズ）2.5 g、ショ糖脂肪酸エステル（DK エステル SS、第一工業製薬）7.5 g、 γ -シクロデキストリン（シクロデキストリン γ -100、塩水港精糖）36.0 g、アラビアガム（アラビックコール SS、三栄薬品貿易）9.0 g、デキストリン（パインデックス#3、松谷化学）23.0g を加え溶解させた水溶液に対し、フコキサンチン 10%含有オイル（ThinOgen™ フコキサンチンオイル 10%、BGG Japan）11.0 g、食用油（パナセート 810S、日油）10.0 g、およびトコフェロール（トコフェロール AT-160、J-オイルミルズ）1.0 g を 50°C で混合した油溶成分を添加し、水相と油相の混合液を得た。その後、高速攪拌装置（ラボ・リユーション®、プライミクス）を用いて、6,000 rpm の回転数にて 20 分間予備乳化処理を行った。予備乳化が完了した後、高圧乳化機（L-01、三和エンジニアリング）にて 50 MPa の圧力にて乳化処理を実施した。最後に、作製したフコキサンチン乳化液を噴霧乾燥機に供し、フコキサンチン乳化粉末を得た。

表 2-15. フコキサンチン乳化粉末の処方（実験 8）

原材料名（製品名）	販売会社	配合量 (g)
フコキサンチン 10%オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 10%)	BGG Japan	11.0
食用油 (パナセート 810S)	日油	10.0
モノラウリン酸デカグリセリン (リョートーポリグリエステル L-7D)	三菱化学フーズ	2.5
シヨ糖脂肪酸エステル (DK エステル SS)	第一工業製薬	7.5
アラビアガム (アラビックコール SS)	三栄薬品貿易	9.0
γ -シクロデキストリン (シクロデキストリン γ -100)	塩水港精糖	36.0
デキストリン (パインデックス#3)	松谷化学	23.0
トコフェロール (トコフェロール AT-160)	J-オイルミルズ	1.0
蒸留水		400.0
計		500.0

8-1-2. 乳化粉末の粒子径の測定

作製したフコキサンチン乳化粉末の粒子径は粒度測定装置（マスターサイザー、Malvern）を用いて測定した。

8-1-3. エマルションの粒子径の測定

2-1-4 と同様の方法にて評価を行った。

8-1-4. フコキサンチン含量の測定

2-1-5 と同様の方法にて測定を行った。

8-1-5. 保存安定性評価

作製したフコキサンチン 1.1%乳化粉末を内装にポリエチレン袋、外装にア

ルミラミネート袋を用いて包装し、ヒートシールにて密封した。これを 40℃ 恒温装置の中で 4 ヶ月間保存し、1 ヶ月毎に乳化粉末中のフコキサンチン含量を評価した。対照として表 2-16 に示す 3 種類のフコキサンチン油を作製した。対照①として、フコキサンチン (Sigma-Aldrich, USA) を中鎖脂肪酸油 (パナセート 810、日油) に溶解し、フコキサンチン含量を 1.1%(w/w)に調製したフコキサンチン油を作製した。その後、プラスチックチューブに分注し、アルミラミネート袋に包装、ヒートシールにて密閉した。対照②として、フコキサンチン 10%含有オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 10%、BGG Japan) を菜種油 (ナカライテスク) に溶解し、フコキサンチン含量を 1.1%(w/w)に調製したフコキサンチン油を作製した。その後、フタ付ガラス瓶に分注し、密閉した。対照③として、フコキサンチン 10%含有オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 10%、BGG Japan) を中鎖脂肪酸油 (パナセート 810、日油) に溶解し、フコキサンチン含量を 1.1%(w/w)に調製したフコキサンチン油を作製した。その後、フタ付ガラス瓶に分注し、密閉した。これらの対照サンプルは乳化粉末と同時に保存を開始した。

表 2-16. フコキサンチン乳化粉末の対照となるフコキサンチン油の処方

原材料名 (製品名)	販売会社	配合比率 (%)		
		対照①	対照②	対照③
フコキサンチン	Sigma-Aldrich	1.1	-	-
フコキサンチン 10%オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 10%)	BGG Japan	-	11.0	11.0
中鎖脂肪酸油 (パナセート 810)	日油	98.9	-	89.0
菜種油	ナカライテスク	-	89.0	-
計		100.0	100.0	100.0

8-1-6. 統計解析

本実験で測定して得られたデータは平均値と標準誤差で示した。異なる群間で有意差があるかどうかを検討するために Graphpad Instat Software Ver.3.0 (USA) を使用し、異なる群間での差を一元配置の分散分析 (ANOVA) を行い、差が認められた場合には Tukey の多重検定を行った。

8-2. 結果

作製したフコキサンチン乳化粉末の外観を図 2-3、フコキサンチン含量、乳化粉末の 50%粒子径およびエマルションの粒子径の結果を表 2-17 に示した。外観は黄橙色の粉末であり、フコキサンチン含量は $1.18 \pm 0.01\%$ 、乳化粉末の 50%粒子径は $26.20 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 、エマルションの粒子径は $626.88 \pm 36.71 \text{ nm}$ であった。また、乳化粉末の保存安定性評価の結果を図 2-4 に示した。結果はフコキサンチンの残存率で示しており、各サンプルの試作直後のフコキサンチン残存率を 100%とした。対照①のフコキサンチン含量は 40°C 、1 ヶ月の保存によって検出限界以下のレベルまで減少し、対照②および対照③のフコキサンチン残存率は保存 1 ヶ月の時点で、それぞれ $98.2 \pm 5.6\%$ 、 $71.8 \pm 1.2\%$ 、保存 2 ヶ月の時点でそれぞれ $83.5 \pm 0.7\%$ 、 $41.3 \pm 3.2\%$ 、保存 3 ヶ月の時点でそれぞれ $73.3 \pm 1.2\%$ 、 $20.2 \pm 4.0\%$ 、保存 4 ヶ月の時点でそれぞれ $59.6 \pm 1.5\%$ 、 $8.4 \pm 3.4\%$ まで低下した。一方でフコキサンチン乳化粉末は保存 1 ヶ月の時点で $95.6 \pm 0.6\%$ 、保存 2 ヶ月の時点で $96.7 \pm 0.4\%$ 、保存 3 ヶ月の時点で $94.3 \pm 0.2\%$ 、保存 4 ヶ月の時点で $90.3 \pm 0.3\%$ であった。フコキサンチン乳化粉末と対照②との比較においては、保存 2 ヶ月目より有意な差が認められ、フコキサンチン乳化粉末と対照③との比較においては、保存 1 ヶ月目より有意な差が認められた。



図 2-3. フコキサンチン乳化粉末の外観（実験 8）

表 2-17. フコキサンチン乳化粉末のフコキサンチン含量、
乳化粉末の 50%粒子径およびエマルションの粒子径の結果（実験 8）

フコキサンチン含量 (%)	乳化粉末の 50%粒子径 (μm)	エマルションの粒子径 (nm)
1.18 ± 0.01	26.20 ± 0.04	626.88 ± 36.71

値は平均 \pm 標準誤差を示す。フコキサンチン含量は $n = 4$ 、乳化粉末の 50%
粒子径は $n = 6$ 、エマルションの粒子径は $n = 5$ である。

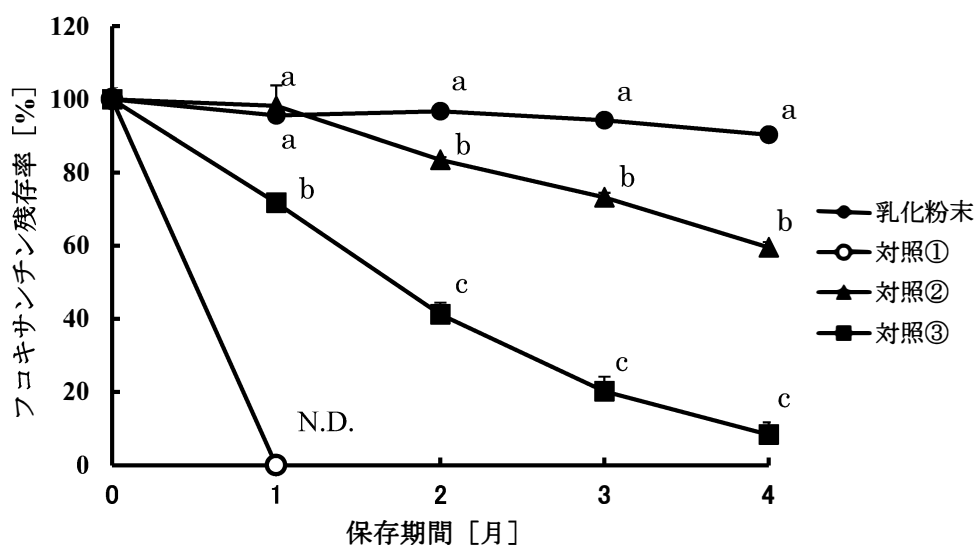


図 2-4. 40°C保存におけるフロキシサンチン乳化粉末
および対照サンプルのフロキシサンチン含量の推移

フロキシサンチン乳化粉末 (●)、対照① (○)、対照② (▲)、対照③ (■) を 40°C恒温装置の中で4ヶ月間保存し、1ヶ月毎に乳化粉末中のフロキシサンチン含量をHPLCにより測定した。対照①は保存1ヶ月の時点で未検出 (N.D.) となったため、保存1ヶ月以降は測定せず。各シンボルは平均値、エラーバーは標準誤差を示す (フロキシサンチン乳化粉末 : n = 4、対照① : n = 4、対照② : n = 4、対照③ : n = 4)。同一の保存期間内において異なる記号間で有意差あり ($p < 0.05$)

8-3. 考察

フロキシサンチンは安定性に乏しく、熱、空気、光、または酸性曝露によって容易に分解することが知られている [25、26]。今回、表 2-15 に示した割合にてフロキシサンチンを含有した乳化粉末を作製し、その保存安定性を評価したところ、40°C、4ヶ月の保存においてもフロキシサンチン含量が90%以上残存していることが明らかとなった。このことから、製品として耐えうる品質

の乳化粉末であることが示された。一方で、対照①~③についてはフコキサンチン含量が大きく低下していた。Haugan ら [38,39] は、フコキサンチンは酸によってオキソニウムイオン化合物、塩基によりイソフコキサンチンやヘミケタール化合物が生成されることを報告している。本研究では、検出されなくなったフコキサンチンがどのような物質に変換されたかは不明であるが、フコキサンチンの分解が促進され検出されなくなったことが考えられる。本研究のフコキサンチン乳化粉末には抗酸化剤としてトコフェロールを添加しており、こちらの寄与もあると考えられる。しかし、根橋ら [40] は、フコキサンチン乳化粉末に配合する賦形剤（アラビアガム、カゼイン Na、デキストリン、 γ -シクロデキストリン）の違いによるフコキサンチン残存率に及ぼす影響について、8種類の乳化粉末を作製して検討した結果、全てのフコキサンチン乳化粉末にトコフェロールを 1.0%配合しているにもかかわらず、60°C、0.5ヶ月の保管後のフコキサンチン残存率は、最低値で 11.8%（カゼイン Na を配合）、最高値で 98.2%（アラビアガムと γ -シクロデキストリンを配合）と大きく差が出たことを報告している。これは、賦形剤の種類や添加量が大きく影響していることを示唆している。さらに彼らは、フコキサンチン乳化粉末に配合する抗酸化剤（トコフェロール、茶抽出物、アスコルビン酸 Na）の違いによるフコキサンチン残存率に及ぼす影響についても検討しており、検討した抗酸化剤の中でトコフェロールが最もフコキサンチン残存率が高値であったが、フコキサンチン残存率としては 29.9%に留まっていることを示した。したがって本研究においてもアラビアガムと γ -シクロデキストリンを使用することが、フコキサンチンの安定性に最も寄与したことが考えられる。

アラビアガムは植物の樹液から得られる高分子多糖類であり、優れた乳化特性や被膜性を有することから、古くから食品、医薬品等に利用されてきている。Anarjan らの報告 [41] ではアスタキサンチンをアラビアガムで乳化

することによって、物理安定性が向上することが示されていることから、フコキサンチンについても同様にアラビアガムの乳化特性により物理安定性が高まった可能性が考えられる。また、 γ -シクロデキストリンについても包接作用により、 ω -3系不飽和脂肪酸トリグリセリド類の酸化に対する安定性を向上させることが報告されているため [42]、アラビアガムと γ -シクロデキストリンを併用することによってさらなる安定性の向上につながったと考えている。

第3章 ラットにおけるフコキサンチン乳化粉末摂取による フコキサンチン代謝物の体内動態の検討

第1節 目的

フコキサンチンなどのカロチノイド類は、一般的に消化・吸収性は低く、摂取してからカロチノイドが小腸に吸収されるまでには、カロチノイドの食品マトリックスからの放出や混合ミセルへの取り込みなど、様々な要因が影響することが知られている [27]。カロチノイドなどの脂溶性成分は、胆汁によるミセル化、小腸内でのリパーゼによる加水分解を経て小腸上皮から吸収されるが、胆汁の分泌は食事によって刺激される。不飽和脂肪酸である DHA をラットに摂取させた実験では、食餌摂取時の場合と比較して、絶食時の場合は DHA の最大血中濃度 (Cmax) が低値を示すことが報告されていることから [28]、効率良く脂溶性成分を体内に吸収させるにはサプリメント摂取前に食事を摂ることが望ましい。しかし、サプリメントは通常、摂取タイミングを指定していないため、摂取タイミングによっては、カロチノイドなどの脂溶性成分は効率よく体内に吸収されない場合があり、期待する効果が得られにくくなることが懸念される。カロチノイドの一種であるルテインでは、乳化剤としてホスファチジルコリンを用いて乳化することによって、絶食時でも効率よく体内に吸収できることが報告されており [31]、また、フコキサンチンについてもリゾホスファチジルコリンを用いて混合ミセルに可溶化することによって、マウスにおいてフコキサンチン代謝物が血中や肝臓などの組織中から検出されることが明らかとなっている [11]。このようにフコキサンチン原料に乳化処理を施すことによって、体内への吸収性の向上が期待できるが、実際に油状態のものと比較検証した報告はない。そこで本章では、フコキサンチン含有油摂取を対照として、第2章で作製したフコキサンチン

1.1%乳化粉末をラットに摂取させることによるフコキサンチン代謝物の体内動態への影響について検討を行った。

第2節 フコキサンチン代謝物体内動態確認試験

1. 実験方法

1-1. 動物実験

【試薬】

- 40 mg/mL ペントバルビタールナトリウム溶液
…ペントバルビタールナトリウム (Sigma-Aldrich, USA) 40 mg にプロピレングリコール (試薬特級、富士フィルム和光純薬) 0.4 mL とエタノール (試薬特級、富士フィルム和光純薬) 0.105 mL を加え溶解し、純水で 1 mL にした。
- 5 mg/mL ブトルファノール溶液
…ブトルファノール酒石酸塩 (富士フィルム和光純薬) 5 mg を生理食塩水で溶解し、生理食塩水で 1 mL にした。
- フコキサンチン油投与液 (FxOil)
…フコキサンチン含量が 33.3%となるように、フコキサンチン 10%含有オイル (ThinOgen™ フコキサンチンオイル 10%、BGG Japan) を食用油 (パナセート 810、日油) に溶解した。
- フコキサンチン乳化粉末投与液 (FxEM)
…フコキサンチン含量が 33.3%となるように、第2章で作製したフコキサンチン 1.1%含有乳化粉末を純水に分散した。

【方法】

本研究における動物実験は、岩手大学および協和発酵バイオ株式会社の動物実験倫理委員会による承認を受け実施した（岩手大学 A201620、協和発酵バイオ株式会社 BKK-1706-00081）。動物は個別のステンレスケージで室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗 12 時間サイクル（6:00-18:00）の環境で自由飲水、自由摂取の条件下で飼育した。7 週齢雄性 Sprague-Dawley 系ラット（日本エスエルシー）を 1 週間の予備飼育後にフコキサンチン油投与群（FxOil 群, $n = 24$ ）とフコキサンチン乳化粉末投与群（FxEM 群, $n = 24$ ）に群分けし、18 時間絶食後に FxOil もしくは FxEM（ともにフコキサンチンとして $1 \text{ mg}/300 \text{ g BW}$ 投与）を $3 \text{ mL}/300 \text{ g BW}$ にて単回強制経口投与した。投与後 1, 2, 4, 6, 12, 24 時間の各時点において、FxOil 群および FxEM 群をそれぞれ 4 匹ずつ、麻酔下（ 40 mg/mL ペントバルビタールナトリウム溶液の腹腔内注射（ 40 mg/kg BW ）及び 5 mg/mL ブトルファノール溶液の皮下注射（ 2 mg/kg BW ）併用）で下大静脈から採血を行い、全採血による安楽死後に肝臓、腓腹筋、腎臓を採取した。血液はヘパリン処理を行った試験管に入れ、 $3,000 \times g$ 、15 分間の遠心分離処理により上清を回収し、血漿を得た。

1-2. 血漿中、組織中のフコキサンチノール濃度の測定

フコキサンチンは消化管内でフコキサンチノールに代謝された後、体内に吸収されることから、フコキサンチノールの濃度からフコキサンチン体内動態を検討した。フコキサンチノールの分析は Hashimoto ら [11] の方法を参考に実施した。

【試薬】

- ・リン酸緩衝生理食塩水（PBS）

- …PBS 粉末 (P5368-10PAK、Sigma-Aldrich, USA) 1 パックを蒸留水に溶解し、1 L にメスアップした。
- ジクロロメタン-メタノール (1:2, v/v) 混液
 - …ジクロロメタン (特級、富士フィルム和光純薬) 30 mL とメタノール (HPLC 用、キシダ化学) 60 mL を混合した。
- 95%メタノール溶液
 - …メタノール (HPLC 用、キシダ化学) 95 mL と蒸留水 5 mL を混合した。
- ジメチルスルホキシド (DMSO) -メタノール (1:1, v/v) 混液
 - …DMSO (特級、富士フィルム和光純薬) 50 mL とメタノール (HPLC 用、キシダ化学) 50 mL を混合した。
- メタノール-0.3%(w/v) 酢酸アンモニウム (pH 3.0) (7:3, v/v)
 - …酢酸アンモニウム (キシダ化学) 1.8 g を秤量後、蒸留水を加え、酢酸 (特級、キシダ化学) にて pH3.0 に調整した。その後、蒸留水にて 600 mL にメスアップし、メタノール (HPLC 用、キシダ化学) を 1400 mL 加え、混合した。
- フコキサンチノール標準液
 - …フコキサンチノール (富士フィルム和光純薬) 1.60 mg を秤量し、95%メタノールに溶解、10 mL にメスアップし、標準原液とした。標準原液を 95%メタノールで 500 倍 (518.75 nM) , 1000 倍 (259.38 nM) , 2000 倍 (129.69 nM) 希釈し、標準液とした。
- アスタキサンチン内部標準液
 - …アスタキサンチン (富士フィルム和光純薬) 2.35 mg を秤量し、クロロホルム (特級、キシダ化学) に溶解、10 mL にメスアップし、標準原液とした。標準原液を 95%メタノールで 100 倍に希釈し、内部標準液

とした。

【方法】

血漿 400 μL に等量の PBS、あるいは肝臓、腓腹筋および腎臓 100 mg に 9 倍量の PBS を添加し、アスタキサンチン内部標準液 10 μL を加えた後、肝臓、腓腹筋および腎臓についてはビーズ粉砕機 ($\mu\text{T-12}$ 、タイテック) を用いてホモジナイズ処理を施し、ホモジネートを得た。上記サンプル 800 μL に蒸留水 600 μL 、ジクロロメタン-メタノール (1:2、 v/v) 混液 1.5 mL を添加した後、3 mL のジクロロメタンを加えてフコキサンチノールを抽出し、遠心分離 (1,870 \times g、15 分間) 後にジクロロメタン層を回収した。回収したジクロロメタン層を減圧乾燥により乾固後、残渣を DMSO-メタノール (1:1、 v/v) 混液に再溶解し、HPLC に供した。カラムは Capcell pak C18 UG120 (250 mm \times 4.6 mm、資生堂) を用い、カラム温度は 35 $^{\circ}\text{C}$ 、検出波長は 450 nm とした。移動相の流速は 1.0 mL/min とし、移動相 A (メタノール-0.3% (w/v) 酢酸アンモニウム (pH 3.0) (7:3, v/v)) と移動相 B (メタノール) を測定開始は移動相 A と移動相 B を 80:20 の割合で送液し、25 分までの間に 0:100 まで移動相 B の割合を増加させ送液した。フコキサンチノール標準液も同様の操作を行った。

投与後 1 時間から 24 時間の間血漿中および組織中のフコキサンチノール濃度の曲線下面積 (x 軸: 時間 [h]、y 軸: フコキサンチノール濃度 [nmol/mL] もしくは nmol/g) を積算により算出し、AUC (1-24h) として表した。

1-3. 統計解析

本実験で測定して得られたデータは平均値と標準誤差で示した。統計解析には Graphpad InStat Software Ver.3.0 (Graphpad Software, Inc., USA) を

使用し、異なる試験試料を投与した 2 群間での差を Unpaired student's t test によって有意差判定を行った。また、同じ試験試料を投与した群間における経時的変化の統計解析については一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、差が認められた場合には Tukey の多重検定を行った。いずれの場合も $p < 0.05$ で有意差があるとした。

2. 結果

2-1. 血漿中のフコキサランチノール濃度の推移

FxOil 群および FxEM 群の血漿中フコキサランチノール濃度の推移、および投与後 1 時間から 24 時間間の血漿中フコキサランチノール濃度の曲線下面積 ($AUC_{(1-24h)}$) を図 3-1 に示した。群内比較において、FxOil 摂取群は投与 6 時間後までは有意なフコキサランチノール濃度の上昇は見られず、投与 12 時間後において最高濃度 ($0.08 \pm 0.02 \text{ nmol/mL}$) に到達した。一方で FxEM 摂取群は投与 2 時間後から漸次的にフコキサランチノール濃度の有意な上昇が見られ、投与 4 時間後において最高濃度 ($0.39 \pm 0.03 \text{ nmol/mL}$) に到達した。FxOil 摂取群と比較して、FxEM 群は投与 2 時間後からフコキサランチノール濃度の有意な高値となっており、有意差は投与 12 時間後まで認められた。 $AUC_{(1-24h)}$ は FxOil 摂取群に対して、FxEM 摂取群で 4.23 倍であった。

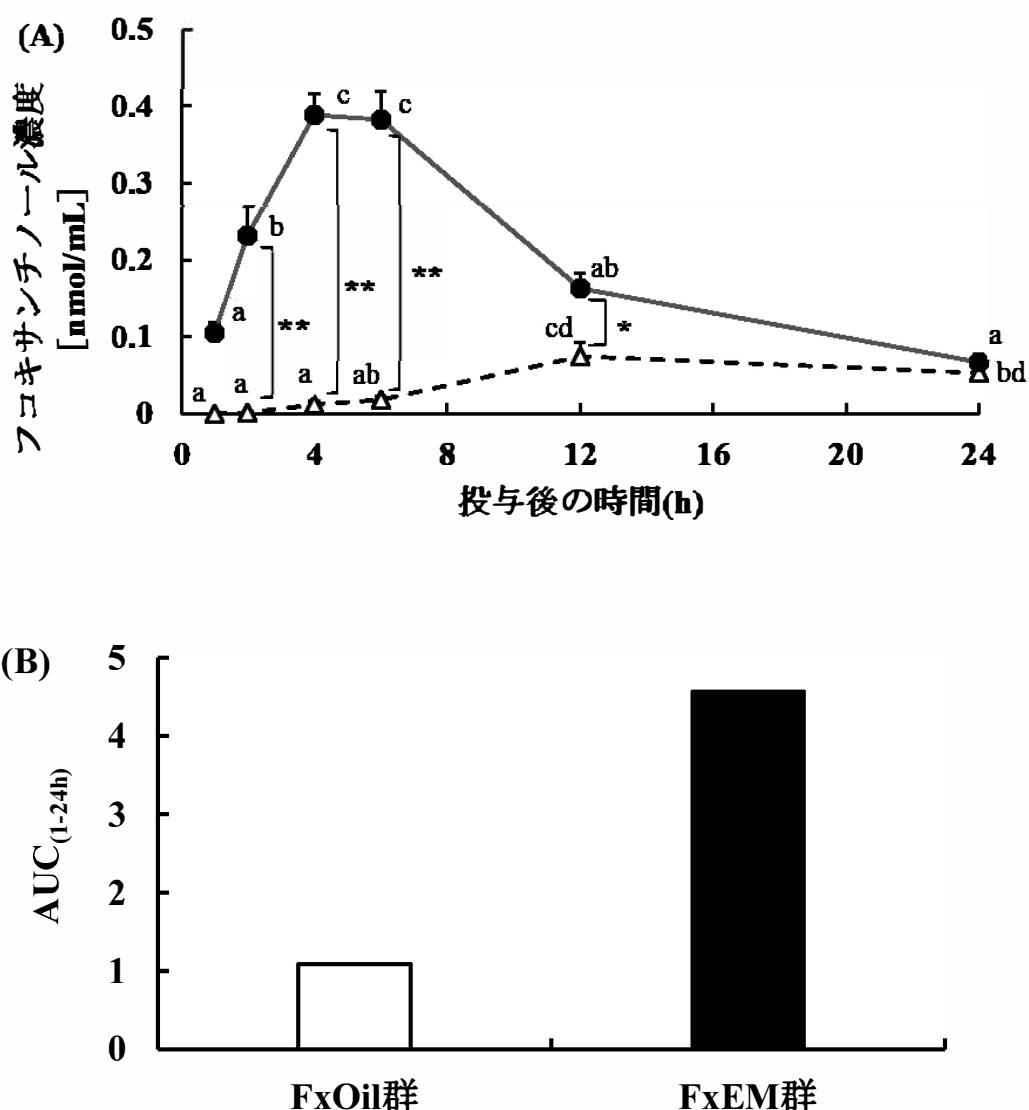


図 3-1. FxOil 摂取群および FxEM 摂取群の血漿中フコキシサンチノール濃度の推移、および血漿中フコキシサンチノール濃度の AUC_(1-24h)

(A) FxOil 摂取群 (△)、および FxEM 摂取群 (●) の血漿中フコキシサンチノール濃度推移を HPLC により測定した。各シンボルは平均値、エラーバーは標準誤差を示す (FxOil 摂取群 : n = 4、FxEM 摂取群 : n = 4)。*は FxOil 摂取群に対して有意差あり (p < 0.05)。**は FxOil 摂取群に対して有意差あり (p < 0.01)。群内において、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。(B) FxOil 摂取群および FxEM 摂取群の血漿中フコキシサンチノール濃度の AUC_(1-24h)を算出した。

2-2. 肝臓中のフコキシサンチノール濃度の推移

FxOil 群および FxEM 群の肝臓中フコキシサンチノール濃度の推移、および投与後 1 時間から 24 時間の間の肝臓中フコキシサンチノール濃度の AUC (1-24h)を図 3-2 に示した。血漿における結果と同様に、群内比較において、FxOil 摂取群は投与 6 時間後までは有意なフコキシサンチノール濃度の上昇は見られず、投与 12 時間後において最高濃度 (0.60 ± 0.09 nmol/g) に到達した。一方で FxEM 摂取群は投与 2 時間後から漸次的にフコキシサンチノール濃度の有意な上昇が見られ、投与 4 時間後において最高濃度 (2.40 ± 0.17 nmol/g) に到達した。FxOil 摂取群と比較して、FxEM 群は投与 1 時間後からフコキシサンチノール濃度の有意な高値となっており、有意差は投与 6 時間後まで認められた。AUC (1-24h)は FxOil 摂取群に対して、FxEM 摂取群で 3.23 倍であった。

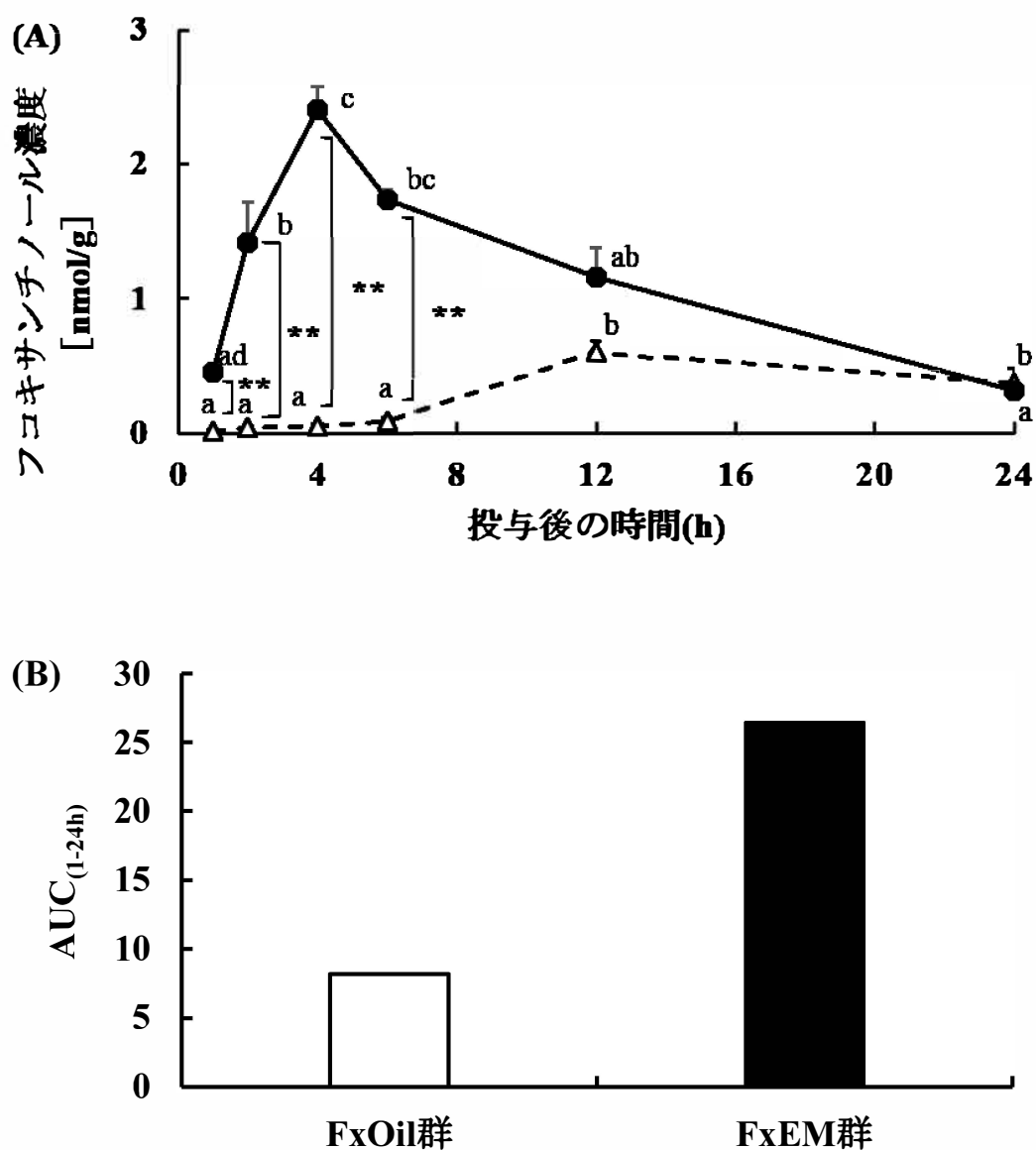


図 3-2. FxOil 摂取群および FxEM 摂取群の肝臓中フコキシサンチノール濃度の推移、肝臓中フコキシサンチノール濃度の AUC_(1-24h)

(A) FxOil 摂取群 (△)、および FxEM 摂取群 (●) の肝臓中フコキシサンチノール濃度推移を HPLC により測定した。各シンボルは平均値、エラーバーは標準誤差を示す (FxOil 摂取群: n=4, FxEM 摂取群: n=4)。**は FxOil 摂取群に対して有意差あり (p<0.01)。群内において、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。(B) FxOil 摂取群および FxEM 摂取群の肝臓中フコキシサンチノール濃度の AUC_(1-24h)を算出した。

2-3. 腓腹筋中のフコキシサンチノール濃度の推移

FxOil 群および FxEM 群の腓腹筋中フコキシサンチノール濃度の推移、および投与後 1 時間から 24 時間の間の腓腹筋中フコキシサンチノール濃度の AUC (1-24h) を図 3-3 に示した。群内比較において、FxOil 摂取群は有意なフコキシサンチノール濃度の上昇は見られなかったが、投与 24 時間後においてフコキシサンチノール濃度が上昇する傾向が見られた (0.27 ± 0.15 nmol/g)。一方で FxEM 摂取群は投与 6 時間後から漸次的にフコキシサンチノール濃度の上昇が見られ、投与 12 時間後において最高濃度 (0.47 ± 0.08 nmol/g) に到達した。FxOil 摂取群と比較して、FxEM 群は投与 2 時間後からフコキシサンチノール濃度の有意な高値となっており、有意差は投与 12 時間後まで認められた。AUC (1-24h) は FxOil 摂取群に対して、FxEM 摂取群で 2.58 倍であった。

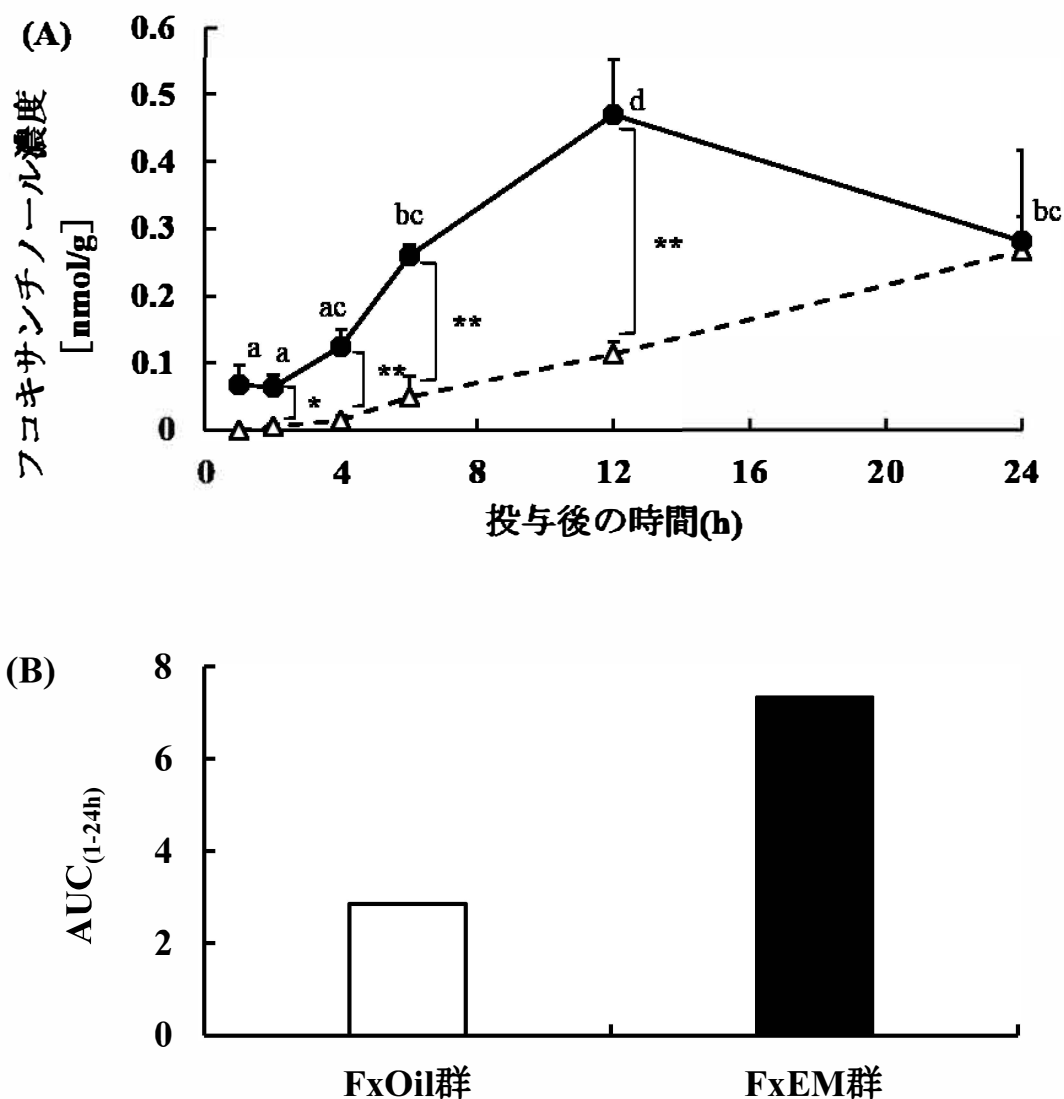


図 3-3. FxOil 摂取群および FxEM 摂取群の腓腹筋中フコキシサンチノール濃度の推移、腓腹筋中フコキシサンチノール濃度の AUC_(1-24h)

(A) FxOil 摂取群 (△)、FxEM 摂取群 (●) およびの腓腹筋中フコキシサンチノール濃度推移を HPLC により測定した。各シンボルは平均値、エラーバーは標準誤差を示す (FxOil 摂取群 : n=4、FxEM 摂取群 : n=4)。*は FxOil 摂取群に対して有意差あり (p < 0.05)。**は FxOil 摂取群に対して有意差あり (p < 0.01)。群内において、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。(B) FxOil 摂取群および FxEM 摂取群の腓腹筋中フコキシサンチノール濃度の AUC_(1-24h)を算出した。

2-4. 腎臓中のフコキサランチノール濃度の推移

FxOil 群および FxEM 群の腎臓中フコキサランチノール濃度の推移、および投与後 1 時間から 24 時間の間の腎臓中フコキサランチノール濃度の AUC (1-24h)を図 3-4 に示した。群内比較において、FxOil 摂取群は投与 12 時間後までは有意なフコキサランチノール濃度の上昇は見られなかったが、投与 24 時間後において最高濃度 (0.56 ± 0.21 nmol/g) に到達した。一方で FxEM 摂取群は投与 4 時間後から漸次的にフコキサランチノール濃度の有意な上昇が見られ、投与 12 時間後において最高濃度 (1.01 ± 0.17 nmol/g) に到達した。FxOil 摂取群と比較して、FxEM 群は投与 1 時間後からフコキサランチノール濃度の有意な高値となっており、有意差は投与 12 時間後まで認められた。AUC (1-24h) は FxOil 摂取群に対して、FxEM 摂取群で 3.11 倍であった。

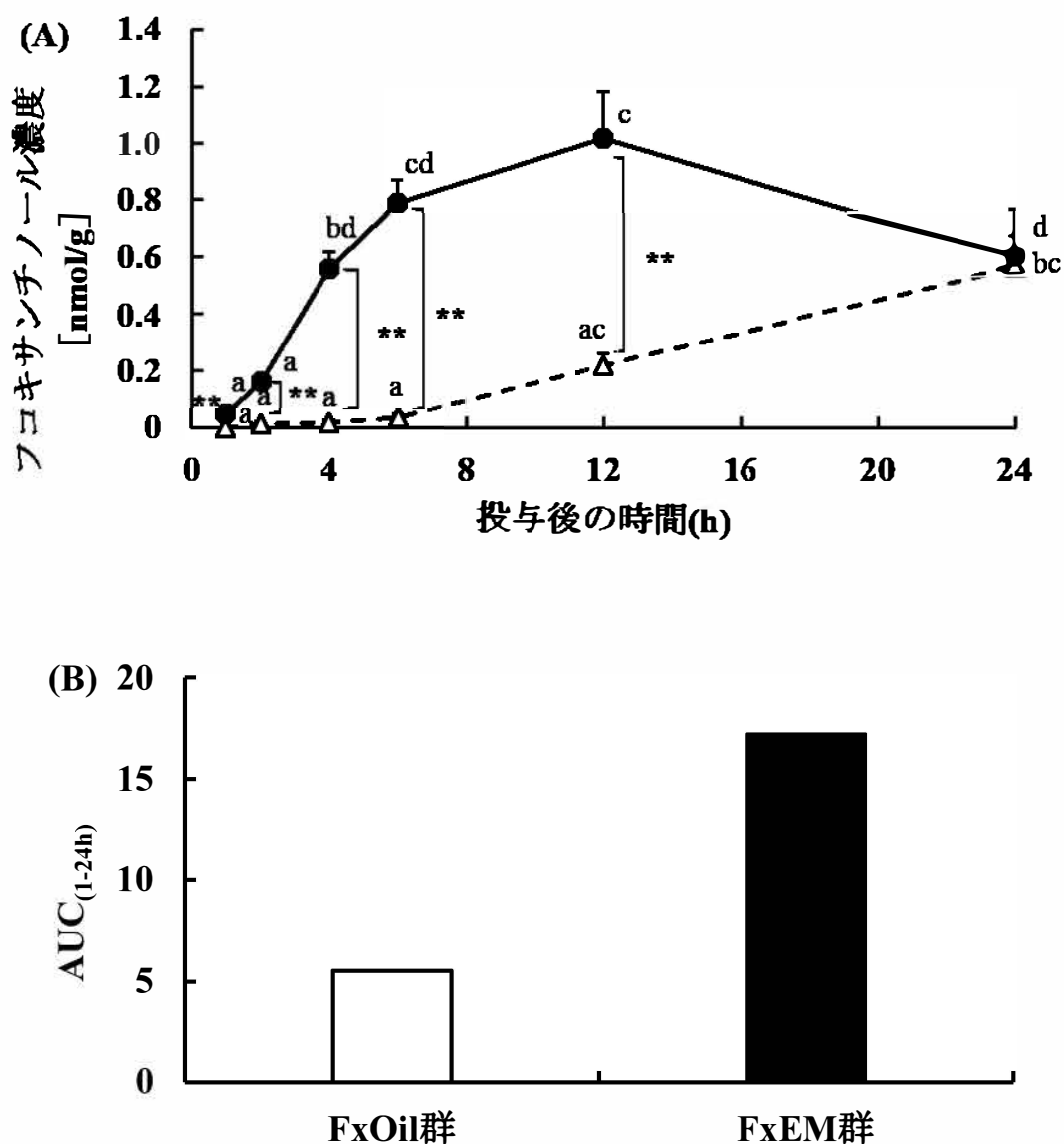


図 3-4. FxOil 摂取群および FxEM 摂取群の腎臓中フコキシサンチノール濃度の推移、腎臓中フコキシサンチノール濃度の AUC_(1-24h)

(A) FxOil 摂取群 (△)、および FxEM 摂取群 (●) の腎臓中フコキシサンチノール濃度推移を HPLC により測定した。各シンボルは平均値、エラーバーは標準誤差を示す (FxOil 摂取群: n=4, FxEM 摂取群: n=4)。**は FxOil 摂取群に対して有意差あり (p<0.01)。群内において、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。(B) FxOil 摂取群および FxEM 摂取群の腎臓中フコキシサンチノール濃度の AUC_(1-24h)を算出した。

3. 考察

本実験では、フコキサンチン油摂取群を対照として、フコキサンチン乳化粉末摂取によってフコキサンチンがどのような体内動態を示すか検討するために、ラットを用いて評価を行った。本実験を行うにあたり、フコキサンチンの安定性が低いという既存報告から、動物実験に使用するフコキサンチン投与サンプルの安定性（すなわち、フコキサンチン投与サンプル調製後からラットへの投与までの安定性）の点、さらサンプル投与後、体内に吸収されるまでの安定性（すなわち、消化管内での安定性）の点について懸念があった。フコキサンチン油は投与前日に調製し、その後投与する2時間前まで4℃にて保管した。その後は室温にて2時間静置し投与を実施した。また、フコキサンチン乳化粉末溶液は投与する2時間前に調製し、調製後は室温にて静置し投与を行った。Zhaoら〔26〕は、褐藻から抽出したフコキサンチン（純度95%）をキャノーラ油に溶解し、フコキサンチン濃度を200 mg/Lに調製したものを空気および光（300 lux）存在下で25℃にて保管したところ、少なくとも1週間はフコキサンチン含量に変化が見られないことを示している。Zhaoらが用いたキャノーラ油にはトコフェロールが含有している可能性があり、そのトコフェロールがフコキサンチンの減衰抑制に寄与したことが考えられる。本実験で使用した食用油（中鎖脂肪酸油）にはトコフェロールなどの抗酸化物質は含まれていないため、より早い段階でフコキサンチンの減衰が始まることも考えられた。しかしながら、図2-4の結果の通り、中鎖脂肪酸油に溶解したフコキサンチンの40℃、1ヶ月時点でのフコキサンチン残存率は約80%であったことから、数時間の室温放置によってフコキサンチンが減衰するとは考えにくい。このことはフコキサンチン乳化粉末溶液でも同様であり、本実験で使用した投与サンプルの安定性（濃度）については問題がなかったと考えている。

FxOil 摂取群において、血漿中および組織中のフコキサンチノール濃度はサンプル投与後すぐには上昇せず、投与 6 時間後あたりから漸次的に上昇することが示された。この結果から、絶食状態においてフコキサンチンを油で溶解したものを投与すると、胆汁分泌が促進されず、体内でのフコキサンチンのミセル化や消化・吸収が進み難くなっており、体内に移行するまでに相当の時間を要することが推測された。一方で FxEM 摂取群においては、血漿中および組織中のフコキサンチノール濃度がサンプル投与 2 時間後から上昇していることが示され、早い段階から体内に移行していることが明らかとなった。坂口ら [28] は、フコキサンチンと同じ脂溶性成分である DHA を乳化剤化することにより、摂食、絶食にかかわらず、高い吸収性を示すことを明らかにしているため、同じ脂溶性成分であるフコキサンチンについても乳化剤化することによって、食事の有無にかかわらず、フコキサンチンは効率良く体内に吸収できると考えられる。

Hashimoto ら [11] の報告では、フコキサンチンを混合ミセルに可溶化したものをマウスに投与することによるフコキサンチン代謝物の体内動態を検討している。その中で血漿と肝臓におけるフコキサンチノール濃度の最高濃度到達時間は投与後 4 時間となっており、今回の動物実験と一致しているが、腎臓での最高濃度到達時間は Hashimoto らの結果は投与後 4 時間であったのに対し、本研究では投与後 12 時間であった点は非常に興味深い。これまで、乳化剤の添加量の違い [31] や乳化剤の種類の違い [43] による吸収性への影響が報告されていることから、乳化剤の種類や添加量に影響している可能性がある。また、エマルションの粒子径の違いによる体内吸収性への影響も報告されており、小川ら [44] は 250 nm の粒子径であるアスタキサンチンのエマルション製剤と比較して、110 nm の粒子径であるエマルション製剤のほうがラットにおけるアスタキサンチンの体内吸収性が高かったことを報告

している。Hashimoto らの作製したフコキサンチン混合ミセルのエマルジョン粒子径の大きさは不明であるが、本研究で用いたフコキサンチン乳化粉末のエマルジョン粒子径との違いが、腎臓における T_{max} の違いに繋がった可能性が考えられ、乳化処理の工夫により吸収効率などを調整できる可能性があるかもしれない。また、今回の結果は骨格筋（腓腹筋）中のフコキサンチノールの動態を示した初めての知見であるが、腓腹筋においてもフコキサンチン乳化粉末の投与によってフコキサンチン代謝物濃度が効率的に上昇することが示された。C57BL/6J マウスにおいてフコキサンチン含有餌摂取による骨格筋中の GLUT4 mRNA の発現上昇や血糖値の低下が報告されている[16]。したがって、フコキサンチン乳化粉末を摂取することでもこれらの因子の変化を介した糖代謝改善が高まるなどの効果が期待できるかもしれない。

本研究では、フコキサンチノールの体内動態について検討を行ったが、フコキサンチノールは肝臓などでさらにアマロウシアキサンチン A へと変換されるため、アマロウシアキサンチン A の動態についても検討することにより、フコキサンチン乳化粉末摂取後のフコキサンチン代謝動態がより詳細に明らかになると考える。アマロウシアキサンチン A は標品が販売されておらず、アマロウシアキサンチン A を含有するホヤなどの海産物から単離と精製を行う必要があるため、入手方法含め、今後検討することは重要である。

第4章 総合考察

本研究では、フコキサンチンは安定性に乏しく、熱、空気、光などの外部要因によって分解しやすいことから、長期間の品質担保を実現するために乳化製剤化技術を用いて、保存安定性に優れたフコキサンチン乳化粉末の作製を行った。また、フコキサンチンをはじめとしたカロチノイド類は消化・吸収性が低く、摂取してからカロチノイドが小腸に吸収されるまでには様々な要因が影響するが、乳化することによって体内への吸収性の向上が期待された。そこで、作製したフコキサンチン乳化粉末を摂取した際に体内への吸収性が向上するかどうかについて、ラットを用いて検討した。

フコキサンチンに適した乳化剤、抗酸化剤、安定化剤、賦形剤の選定、さらに添加量と組み合わせ比率検討を実施し、作製したフコキサンチン乳化粉末は40℃、4ヶ月の保存においてもフコキサンチンが90%以上残存していることが明らかとなった。保存安定性が向上した要因として、抗酸化物質であるトコフェロールの添加、安定化剤である γ -シクロデキストリンおよびアラビアガムの添加が寄与したことが示唆された。特にフコキサンチンの残存率を鑑みると、アラビアガムと γ -シクロデキストリンを使用したことが、フコキサンチンの安定性に最も寄与したと考える。また、乳化安定性については、シヨ糖脂肪酸エステル、およびモノラウリン酸デカグリセリンの2種類の乳化剤を用いることによって向上することが示された。使用したシヨ糖脂肪酸エステル、モノラウリン酸デカグリセリンともにHLB値が高かったため（それぞれ約19、約17）、HLB値が高いほど、フコキサンチンの乳化安定性が高まることが示唆されたが、同様にHLB値が高いモノミリスチン酸デカグリセリン（HLB：約16）ではフコキサンチンの乳化安定化が不十分であったことから、脂肪酸の違いによる影響も考えられた。

本研究におけるフコキサンチン乳化粉末の作製規模は 1 kg 未満であったが、今後、フコキサンチン乳化粉末を製品化するためには、規模の大きい実機での製造効率や製造コストを考慮する必要がある。乳化液を噴霧乾燥させて乳化粉末を得る際、乳化粉末の回収率は 90%を超えていることが望ましいが、それには乾燥粉末の粒度や流動性などが影響する。回収率が下がる要因としては、噴霧乾燥機の乾燥室内の壁面への粉末の付着や製造ラインへの残存などが挙げられるが、本研究で作製したフコキサンチン乳化粉末が実機で製造した際に、どの程度の回収率になるかは今後検討を実施しなければならない。もし、フコキサンチン乳化粉末の回収率が低い場合は、噴霧乾燥の条件（乳化液の供給量、ロータリーアトマイザーの回転数など）を変更の検討や、二酸化ケイ素〔45〕などの加工助剤を添加することにより流動性を改善させる等の検討が必要になるであろう。また、製造効率や製造コストを考える際、噴霧乾燥に供する乳化液中の固形分濃度も大きな要因となってくる。

本研究でフコキサンチン乳化粉末を作製する際の乳化液の固形分濃度は 20%であったが、実機製造の際はより固形分濃度を上げることが望ましい。一例として、噴霧乾燥に供する溶液の水分量が 50%から 60%に増加することにより、生産量が 35%低下することが示されている〔46〕。一方で、固形分濃度を上げる際、配合する各食品素材の水に対する溶解度や乳化装置の能力も考慮する必要がある。本研究で作製したフコキサンチン乳化粉末の成分の中で配合比率が高いものは γ -シクロデキストリンとデキストリンであるが、ともに溶解度は高い物質であるため（ γ -シクロデキストリンの溶解度：23.2 g/100 mL、デキストリンの溶解度：製品のデキストロース当量（DE）などによって異なる）、固形分濃度は 20%以上に調製することは可能である。しかしながら、固形分濃度の上昇に伴い、溶液の粘度も上昇することから、乳化処理工程で影響が出る可能性が考えられる。乳化装置の能力によっては粘度の

高い溶液の処理が不可である可能性が考えられるため、使用する乳化装置の能力に合わせて固形分濃度を調整するか、もしくは高粘度対応の乳化装置の使用を検討するかの対応が必要になってくるだろう。

製品化の際、乳化粉末を充填する包材についても考慮する必要がある。本研究でフコキサンチン乳化粉末の保存安定性を検討した際は、フコキサンチン乳化粉末は内袋としてポリエチレン袋、外袋としてアルミラミネート袋を用いた。アルミラミネート袋の酸素や湿度に対するバリア性は非常に高く〔47〕、保存性に優れた包材であるが、製品コストを考慮すると、より安価な包材を使用することの検討も必要であろう。ポリエチレン袋はアルミラミネート袋よりも安価であるが、バリア性に劣っているため、フコキサンチン乳化粉末製品の外袋としてポリエチレン袋が使用できるかどうかは、保存安定性試験にて評価することが必須であるため、より製品コストの低減が必要である場合は今後検討したいと考えている。

作製したフコキサンチン乳化粉末をラットに摂取させることによるフコキサンチン代謝物の体内動態への影響について検討を行ったところ、**FxOil** 摂取群と比較して、**FxEM** 群ではフコキサンチン代謝物の体内吸収性が向上していることが明らかとなった。**FxOil** 摂取群において、血漿中および組織中のフコキサンチノール濃度はサンプル投与後すぐには上昇せず、投与 6 時間後あたりから漸次的に上昇したから、絶食状態においてフコキサンチンを油で溶解したものを投与すると、胆汁分泌が促進されず、体内でのフコキサンチンのミセル化や消化・吸収が進み難くなっており、体内に移行するまでに相当の時間を要することが推測された。一方で **FxEM** 摂取群においては、血漿中および組織中のフコキサンチノール濃度がサンプル投与 2 時間後から上昇していることが示され、早い段階から体内に移行していることが明らかとなった。このことから、フコキサンチンを乳化粉末化することによって、食

事の有無にかかわらず、フコキサンチンは効率良く体内に吸収できると考えられる。

これまで動物試験やヒト試験におけるフコキサンチンの有用性を示した報告の多くは継続的にフコキサンチンを摂取した結果である。例えば、Liら[23]やAbidovら[24]はフコキサンチン摂取による脂肪燃焼促進作用を見出しているが、有意な効果が現れるまで1ヶ月以上の摂取を要している。また、KK-AyマウスにおけるGLUT4のtranslocation促進作用[16]についても、フコキサンチン混餌食を2週間摂取させたことによる結果である。今回の動物実験において、フコキサンチン乳化粉末を摂取することにより、体内への吸収性が向上していることが明らかとなっているため、フコキサンチン乳化粉末を継続的に摂取した場合の生理機能についても、より早期の顕在化が可能となることが考えられる。さらにこのフコキサンチンの乳化粉末化による吸収性向上は、フコキサンチンの有効量の低減化にも繋がる可能性も考えられる。しかしながら一方で、フコキサンチン乳化粉末の継続摂取によるフコキサンチンもしくはフコキサンチン代謝物の蓄積性や、それに伴う生理作用への影響についての知見はない。これまでに検討されている反復投与毒性試験では、ラットにおいて50 mg/kg BWのフコキサンチン用量にて28日間投与した際、毒性は認められず[48]、またマウスにおいても、1 g/kg BWのフコキサンチン用量にて30日間投与したところ、肝臓、腎臓、脾臓および生殖腺組織内に異常な変化は認められなかった[49]。さらにヒトにおいては、4 mg/日のフコキサンチン用量にて3ヶ月間摂取したところ、血液検査結果に異常は見られなかったことから[23]、フコキサンチンの有効量(約2 mg/1回の摂取量)の2倍程度の摂取量でも安全面には問題がない可能性は高い。しかしながら、フコキサンチン乳化粉末を摂取する場合、どの摂取量までは安全であるかどうかの確認、また、長期保存に伴うフコキサンチンの分解により

生じる生成物の同定、その生成物の安全性の確認などの検討を進めることは実用上重要なことであろう。また、フコキサンチンの生理機能性は脂肪組織をターゲットにした効果が多く報告されているが〔50, 51〕、脂肪組織におけるフコキサン代謝物の動態については未検討であるため、今後検討することは重要である。

将来的にはヒトにおいてフコキサンチン乳化粉末の有用性を示すことが重要となってくるが、その場合、種差による吸収性の違いを考慮して進めなければならない。Asai らの報告〔52〕では、被験者に 6.1 mg のフコキサンチンを含むワカメの油炒めを 1 週間摂取し続けた後、血漿中の濃度を分析したところ、フコキサンチノールが検出されたものの、定量限界以下(1.0 nM)の濃度であったとしている。さらに Hashimoto ら〔53〕は被験者に 31 mg のフコキサンチンを含むコンブ抽出物を経口投与したところ、血中にフコキサンチノールは検出されたものの、アマロウシアキサンチン A は検出されなかったと報告している。このように動物におけるフコキサンチン摂取による体内動態と異なる報告がなされていることから、ヒトにおけるフコキサンチン乳化粉末摂取による有用性を検討する場合は、まずはフコキサンチンもしくはフコキサンチン代謝物の体内動態から評価を行うことが重要である。

フコキサンチンはワカメやコンブなどの褐藻類のみに含まれているが、含有量は微量であり、収穫時期によっても含量が変動する〔54〕(表 4-1 および表 4-2)。また、加工により含有量は大きく減少することから、安定した量を抽出することは難しい。そのため、フコキサンチンを効率良く摂取するためにはサプリメントなどの機能性食品を活用することが重要である。

表 4-1. 食品中のフコキサンチン含有量

食品 (4月~8月採集)	mg/100g 新鮮物
ワカメ	11.1
干しワカメ	8.4
マコンブ	18.7
塩コンブ	2.2
ヒジキ	2.2
乾燥ひじき	検出不可
ホンダワラ	6.5
干しホンダワラ	検出不可

表 4-2. マコンブの季節によるフコキサンチン含有量の変化

採集日	mg/100g 新鮮物
3月9日	5.66
4月13日	21.2
5月18日	21.3
6月10日	19.1

フコキサンチンを配合した機能性食品は、日本のみならず、アメリカやドイツなどでも販売されており、脂肪燃焼促進作用をはじめとした様々な生理作用の認知度が向上してきている。日本でもフコキサンチンの認知度および製品数が増加し、多くの人々の健康に寄与することを期待したい。

高齢社会において、医療の進歩や福祉の充実は重要である。しかし、最も望ましいことは病気にならずに健康的な生活を送ることであり、高齢になっても元気に活動することができれば、再び就業したり、自分の趣味を楽しむなど活動の幅を広げることができる。また高齢者に関わらず、全ての人々が日常生活を健康に過ごすためには日々の食生活に気を付けることはもちろんであるが、機能性食品を取り入れることも大切な要因になると考える。本研究の結果がその一助になれば幸いである。

要約

フコキサンチンはワカメやコンブなどの褐藻類のみに微量に含まれるカロチノイドの一種である。フコキサンチンはアレンやエポキシドなど独特の構造を持つ物質であり、動物に投与すると、その大部分が吸収時にフコキサンチノールへと代謝され、その後、肝臓などでアマロウシアキサンチン A へと変換されることが明らかとなっている。これまでにフコキサンチンには抗酸化作用、抗ガン作用、抗糖尿病作用、ドコサヘキサエン酸（DHA）合成促進活性作用、抗肥満作用などを有していることが報告されており、特に抗肥満作用については、通常、褐色脂肪組織（BAT）以外では発現しない uncoupling protein 1（UCP1）を白色脂肪組織（WAT）において発現誘導するというユニークな作用機序が明らかとなっている。

フコキサンチンは食品原料として販売する上でいくつかの課題を有している。フコキサンチンは主にオイル状原料として販売されているため、機能性食品においては錠剤や飲料には使用できず、ほとんどがソフトカプセル形態に限られている。また、フコキサンチンは安定性に乏しく、熱、空気、光、または酸性曝露によって容易に分解することが知られており、製品の賞味期限を設定する上で、長期間の品質担保は難しいのが現状である。さらに、一般的にカロチノイドの消化・吸収性は低く、摂取してからカロチノイドが小腸に吸収されるまでには様々な要因が影響することが知られている。このような課題を解決する方法の一つとして、乳化製剤化技術の利用がある。オイル状原料に対して乳化剤を用いて乳化し、賦形剤などの添加で粉末化することによって、錠剤や飲料への配合が可能となる。また、乳化することにより、油溶成分の水への分散性や保存安定性が改善することが報告されている。さらにカロチノイドの一種であるルテインを乳化することによって、絶食時でも

効率よく体内に吸収できることが報告されていることから、本研究では、保存安定性に優れたフコキサンチン乳化粉末を作製し、その乳化粉末を摂取した際に体内への吸収性が向上するかどうかについて検討した。

〔第 2 章〕フコキサンチンに適した乳化剤、抗酸化剤、安定化剤、賦形剤のスクリーニングを実施した。その結果、乳化剤としてモノラウリン酸デカグリセリン、ショ糖脂肪酸エステル、抗酸化剤としてトコフェロール、安定化剤としてアラビアガム、 γ -シクロデキストリン、賦形剤としてデキストリンを選抜した。選抜した乳化剤および安定化剤については添加量および組み合わせ比率検討を行い、60℃保存安定性試験において、乳化安定性が高く、かつフコキサンチンが最も残存する配合量および配合比率を選択した。作製したフコキサンチン 1.1%含有乳化粉末の保存安定性を評価したところ、40℃、4ヶ月の保存において、3つの対照群である、フコキサンチン結晶粉末を中鎖脂肪酸油で溶解したフコキサンチン含有油、フコキサンチン 10%含有オイルを菜種油で希釈したフコキサンチン含有油、およびフコキサンチン 10%含有オイルを中鎖脂肪酸油で希釈したフコキサンチン含有油のそれぞれのフコキサンチン残存量は 0%、59.6%、8.4%となったが、フコキサンチン 1.1%含有乳化粉末のフコキサンチン残存量は 90%以上であり、保存安定性に優れた乳化粉末を作製することができた。保存安定性が向上した要因として、抗酸化物質であるトコフェロールの添加、安定化剤である γ -シクロデキストリンおよびアラビアガムの添加が寄与したことが示唆された。特にフコキサンチンの残存率の結果から、アラビアガムと γ -シクロデキストリンを使用したことがフコキサンチンの安定性に最も寄与したと考える。

〔第 3 章〕フコキサンチン乳化粉末を摂取することにより、体内への吸収

性が向上することが考えられたが、実際に油状形態のものと比較検証した報告がなかったため、フコキサンチン含有油摂取を対照として、ラットにおけるフコキサンチン乳化粉末摂取によるフコキサンチン代謝物（フコキサンチノール）の血中および組織中における動態について検討を行った。ラットにフコキサンチン含有油もしくはフコキサンチン乳化粉末を摂取させ、投与後 1、2、4、6、12、24 時間の時点で血漿、肝臓、腎臓、腓腹筋を摘出し、フコキサンチノール濃度を測定した。その結果、フコキサンチン含有油摂取群の血漿中および組織中のフコキサンチノール濃度はサンプル投与後すぐには上昇せず、投与 6 時間後あたりから漸次的に上昇することが示された一方で、フコキサンチン乳化粉末摂取群においては、血漿中および組織中のフコキサンチノール濃度がサンプル投与 2 時間後から顕著に上昇していることが示され、早い段階から体内に移行していることが明らかとなった。特に乳化製剤の投与により骨格筋においてもフコキサンチノール濃度の上昇が認められたので、骨格筋を介した糖代謝の改善なども期待できると考えられる。以上より、フコキサンチン乳化粉末はフコキサンチン含有油より効率良くフコキサンチンが体内に吸収されることが示された。

本研究により、作製したフコキサンチン乳化粉末は、機能性食品の原料として幅広く使用することが可能であり、効率性高く生理作用を発揮できる可能性が強く示唆された。今後は、フコキサンチン乳化粉末の健康機能に対する効果の検証と、製品化に向けた実機製造での適正化検討を行う必要があると考えられる。

謝辞

本研究を計画・遂行するにあたり、細やかにご指導、ご鞭撻を頂きました長澤孝志教授に深く感謝致します。また、的確なご指導やご助言を頂きました伊藤芳明准教授、弘前大学前多隼人准教授、山形大学井上奈穂准教授に心から感謝致します。

博士課程を進めていく上で、様々な援助を下された協和発酵バイオ株式会社の関係者の皆様に感謝致します。

日頃のラットの世話や解剖、実験を手伝って頂いた修士課程、学部生の皆さんに感謝致します。研究室に行ける日が限られていたので本当に助かりました。

本研究のために最も貢献し、犠牲となったラットに深く感謝致します。

最後に、働きながらの通学・実験作業で心身ともに疲弊した時でも、最大限のサポートしてくれた妻に心から感謝致します。

2018年 9月

熊谷 弘太

引用文献

- [1] 平成 29 年度版 高齢社会白書（内閣府）。
- [2] 平成 28 年度版 厚生労働白書.
- [3] 健康産業新聞、2018 年 1 月 9 日発行.
- [4] 矢野経済研究所、2018 年 3 月 9 日プレスリリース.
- [5] Murakoshi M, Nishino H, Satomi Y, Takayasu J, Hasegawa T, Tokuda H, Iwashima A, Okuzumi J, Okabe H, Kitano H. (1992) Potent preventive action of alpha-carotene against carcinogenesis: spontaneous liver carcinogenesis and promoting stage of lung and skin carcinogenesis in mice are suppressed more effectively by alpha-carotene than by beta-carotene. *Cancer Res.* **52** : 6583-6587.
- [6] Okuzumi J, Nishino H, Murakoshi M, Yamane T, Kitao Y, Inagake M, Ohya K, Yoshida M, Takahashi T. (1992) Palm carotene inhibits tumor-promoting activity of bile acids and intestinal carcinogenesis. *Oncology.* **49** : 492-497.
- [7] Lorenz M, Fechner M, Kalkowski J, Fröhlich K, Trautmann A, Böhm V, Liebisch G, Lehneis S, Schmitz G, Ludwig A, Baumann G, Stangl K, Stangl V. (2012) Effects of lycopene on the initial state of atherosclerosis in New Zealand White (NZW) rabbits. *PLoS One.* **7** : e30808.
- [8] Mulkalwar SA, Munjal NS, More UK, More B, Chaudhari AB, Dewda PR. (2012) Effect of purified lycopene on lipid profile, antioxidant enzyme and blood glucose in hyperlipidemic rabbits. *Am J Pharm Tech Res.* **2** : 461-470.

- [9] Liu R, Wang T, Zhang B, Qin L, Wu C, Li Q, Ma L. (2014) Lutein and zeaxanthin supplementation and association with visual function in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **56** : 252-258.
- [10] 塚原 寛樹, 松山 明正, 阿部 哲朗, 許 鳳浩, 太田 富久, 鈴木 信孝. (2016) アスタキサンチン含有飲料の肌におよぼす影響. *日本補完代替医療学会誌* **13** : 57-62.
- [11] Hashimoto T, Ozaki Y, Taminato M, Das SK, Mizuno M, Yoshimura K, Maoka T, Kanazawa K. (2009) The distribution and accumulation of fucoxanthin and its metabolites after oral administration in mice. *Br J Nutr.* **102** : 242-248..
- [12] Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, Miyashita K. (2007) Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J Agric Food Chem.* **55** : 8516-8522.
- [13] Takashima M, Shichiri M, Hagihara Y, Yoshida Y, Niki E. (2012) Capacity of fucoxanthin for scavenging peroxy radicals and inhibition of lipid peroxidation in model systems. *Free Radic Res.* **46** : 1406-1412.
- [14] Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K. (2004) Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPARgamma ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* **1675** : 113-119.
- [15] Wang J, Chen S, Xu S, Yu X, Ma D, Hu X, Cao X. (2012) In vivo induction of apoptosis by fucoxanthin, a marine carotenoid,

- associated with down-regulating STAT3/EGFR signaling in sarcoma 180 (S180) xenografts-bearing mice. *Mar Drugs*. **10** : 2055-2068.
- [16] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Murakami-Funayama K, Miyashita K. (2009) Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Mol Med Rep*. **2** : 897-902.
- [17] Nishikawa S, Hosokawa M, Miyashita K. (2012) Fucoxanthin promotes translocation and induction of glucose transporter 4 in skeletal muscles of diabetic/obese KK-A(y) mice. *Phytomedicine*. **19** : 389-394.
- [18] Tsukui T, Konno K, Hosokawa M, Maeda H, Sashima T, Miyashita K. (2007) Fucoxanthin and fucoxanthinol enhance the amount of docosahexaenoic acid in the liver of KKAY obese/diabetic mice. *J Agric Food Chem*. **55** : 5025-5029.
- [19] Jeon SM, Kim HJ, Woo MN, Lee MK, Shin YC, Park YB, Choi MS. (2010) Fucoxanthin-rich seaweed extract suppresses body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice. *Biotechnol J*. **5** : 961-969.
- [20] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K. (2005) Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. **332** : 392-397..
- [21] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K. (2007) Effect of medium-chain triacylglycerols on anti-obesity effect of fucoxanthin. *J Oleo Sci*. **56** : 615-621.

- [22] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Miyashita K. (2007) Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *J Agric Food Chem.* **55** : 7701-7706.
- [23] Li Y, Iwata T, Sonoda K, Shengquan M. (2015) Focoxanthin supplementation reduces body fat in over weight humans - A randomized, placebo controlled study -. *Jpn Pharmacol Ther.* **43** : 1317-1322.
- [24] Abidov M, Ramazanov Z, Seifulla R, Grachev S. (2010) The effects of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. *Diabetes Obes Metab.* **12** : 72-81.
- [25] Hii SL, Choong PY, Woo KK, Wong CL. (2010) Stability studies of fucoxanthin from *Sargassum Bideri*. *Aust J Basic Appl Sci.* **4** : 4580-4584.
- [26] Zhao D, Kim SM, Pan CH, Chung D. (2014) Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil. *Food Chem.* **145** : 505-513.
- [27] Yonekura L, Nagao A. (2007) Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res.* **51** : 107-115.
- [28] 坂口 博之, 原口 暢之, 小田 由里子, 植田 文教. (2013) 自己乳化型 DHA 製剤の開発. *富士フィルム研究報告.* **58** : 24-27.
- [29] Szente L, Mikuni k, Hashimoto H, Szejtli J. Stabilization and Solubilization of Lipophilic Natural Colorants with Cyclodextrins. (1998) *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition*

- in Chemistry*. **32**: 81-89, 1998.
- [30] 戸田 義郎, 加藤 友治, 門田 則昭. 食品用乳化剤 (1997) -基礎と応用- pp.15-90
- [31] Shanmugam S, Park JH, Kim KS, Piao ZZ, Yong CS, Choi HG, Woo JS (2001) Enhanced bioavailability and retinal accumulation of lutein from self-emulsifying phospholipid suspension (SEPS). *Int J Pharm.* **412** : 99-105.
- [32] Ishii F. (2016) Emulsification Properties of Egg Yolk Lecithin and Various Phospholipids. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **63** : 363-368.
- [33] 竹内 正一郎. (2009) 食品用乳化剤としてのショ糖脂肪酸エステル. 第一工業製薬 社報 **550** : 12-16.
- [34] 鈴木 敏幸. (2004) 乳化の基礎. 色材. **77** : 462-469.
- [35] Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M. (1991) Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **273** : 601-604.
- [36] 上田 晴久. (1992) 製剤開発におけるシクロデキストリン類の有用性. *Proc. Hoshi Univ.* **34** : 1-12.
- [37] 編集部. (2014) シュガーレス・低カロリー食品と素材の市場動向. *食品と開発*. **49** : 58.
- [38] Haugan JA, Liaaen-Jensen S. (1994) Blue Carotenoids. Part 1. Novel Oxonium Ions Derived from Fucoxanthin. *Acta Chem. Scand.* **48** : 68-75.
- [39] Haugan JA, Englert G, Liaaen-Jensen S. (1992) Algal Carotenoids 50. Alkali Lability of Fucoxanthin – Reactions and Products. *Acta*

- Chem. Scand.* **46** : 614-624.
- [40] 根橋 直大, 室町 綾子, 中野 裕一郎 (2017) フコキサンチン含有組成部及びその製造方法. 特許第 6228934 号. 10 月 20 日.
- [41] Anarjan N, Tan CP. (2013) Physico-chemical stability of astaxanthin nanodispersions prepared with polysaccharides as stabilizing agents. *Int J Food Sci Nutr.* **64** : 744-748.
- [42] Sato K, Ishida Y, Ikuta N, Uekaji Y, Nakata D, Terao K. (2013) Stabilization of unstable functional food ingredients by complexation with cyclodextrin. *Oleoscience.* **13** : 123-130.
- [43] Sugawara T, Kushiro M, Zhang H, Nara E, Ono H, Nagao A. (2001) Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells. *J. Nutr.*, **131** : 2921-2927.
- [44] 小川 学, 佐藤 雅男, 鈴木 啓一. (2007) アスタキサンチンナノ乳化物の開発 - 安定性向上と吸収効率向上 -. *富士フィルム研究報告.* **52** : 26-29.
- [45] 太田 琴恵, 豊島 健三. (2003) 製剤における流動化剤の機能発現機構 - 表面構造および濡れ特性の影響 -. *表面科学.* **24** : 608-613.
- [46] 豊田 貞男. (1963) 噴霧乾燥法. *油化学* **12** : 7-15.
- [47] 愛産研食品工業技術センターニュース. 平成 21 年 3 月 24 日発行.
- [48] 嘉手苺崇, 當山 洋, 安元 健. (2008) ワカメ由来精製フコキサンチンの安全性評価. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* **55** : 304-308.
- [49] Beppu F, Niwano Y, Tsukui T, Hosokawa M, Miyashita. (2009) Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin(FX), a marine carotenoid, in mice. *J Toxicol Sci.* **34** : 501-510.
- [50] Chang YH, Chen YL, Huang WC, Liou CJ. (2017) Fucoxanthin

- attenuates fatty acid-induced lipid accumulation in FL83B hepatocytes through regulated Sirt1/AMPK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* **495** : 197-203.
- [51] Seo MJ, Seo YJ, Pan CH, Lee OH, Kim KJ, Lee BY. (2016) Fucoxanthin Suppresses Lipid Accumulation and ROS Production During Differentiation in 3T3-L1 Adipocytes. *Phytother Res.* **30** : 1802-1808.
- [52] Asai A, Yonekura L, Nagao A. (2008) Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans. *Br J Nutr.* **100** : 273-277.
- [53] Hashimoto T, Ozaki Y, Mizuno M, Yoshida M, Nishitani Y, Azuma T, Komoto A, Maoka T, Tanino Y, Kanazawa K. (2012) Pharmacokinetics of fucoxanthinol in human plasma after the oral administration of kombu extract. *Br J Nutr.* **107** : 1566-1569.
- [54] 金沢和樹. (2012) 生体内で有効な機能を発揮する褐藻カロテノイドのフコキサンチン. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* **59** : 49-55.