

R- $\alpha$  リポ酸-シクロデキストリン包接体の

物理化学的特性と応用に関する研究

(Physico-chemical analysis of R-alpha-lipoic acid/gamma-cyclodextrin complex and its application)

生田 直子

平成26年4月 提出

# 博士論文

R- $\alpha$  リポ酸-シクロデキストリン包接体の

物理化学的特性と応用に関する研究

(Physico-chemical analysis of R-alpha-lipoic acid/gamma-cyclodextrin complex and its application)

金沢大学大学院自然科学研究科

物質科学専攻

エコサイクルシステム

学籍番号 1123132302

氏名 生田 直子

主任指導教員名 松郷 誠一

# R- $\alpha$ リポ酸-シクロデキストリン包接体の物理化学的特性と応用に関する研究

第1章 序論	1
1) $\alpha$ リポ酸とは	1
(1) 歴史的背景	1
(2) R-リポ酸の化学	1
(3) R-リポ酸の生化学	2
(4) R-リポ酸の代謝(吸収性)	4
(5) R-リポ酸と R-ジヒドロリポ酸の抗酸化活性	6
(6) 他の抗酸化物質との反応	7
(7) 細胞内シグナリングとリポ酸	8
(8) リポ酸の抗糖尿作用	12
引用文献	14
第2章 $\alpha$ リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の作製と物性評価	21
1) 背景と目的	21
(1) R-リポ酸の安定化技術	21
(2) シクロデキストリンを利用した安定化	22
2) 実験(結果と考察)	24
2-1) $\alpha$ リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の作製	25
2-2) $\alpha$ リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の物性評価	26
(1) 含有量	26
(2) 収率	29
(3) DSC	31
(4) SEM	34
(5) XRD	37
(6) 粒度分布	39
(7) FT-IR	43
(8) 顕微 IR	47
(9) 顕微ラマン	50
3) 結論	54
引用文献	54
第3章 $\alpha$ リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の安定性	57
1) 背景と目的	57
2) 実験(結果と考察)	57

α リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の安定性	57
(1) 熱安定性	57
(2) 酸安定性	59
(3) 光安定性 — 固相と液相及び R と S の比較	61
(4) 保存安定性 (長期保存) — 固相と液相	68
3) 結論	71
引用文献	72
第4章 α リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の溶解性	73
1) 背景と目的	73
2) 実験	73
(1) 水及び各 pH の緩衝液への溶解性	73
(2) 人工胃液への溶解性	76
(3) 人工胃粘液への溶解性 (溶解度と溶解速度)	79
(4) 人工腸液への溶解性	86
3) 結論	91
引用文献	92
第5章 α リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の安全性評価	93
1) 背景と目的	93
2-1) 単回投与による急性毒性試験	93
1) 実験	93
2) 結果と考察	94
3) 結論	95
2-2) 微生物を用いた変異原性試験	95
1) 実験	95
2) 結果と考察	95
3) 結論	95
2-3) チアミン不足ラットに対する長期投与による安全性試験	98
1) 実験	98
2) 結果と考察	101
3) 結論	103
引用文献	105

謝辞

## 第1章 序論

### 1) $\alpha$ リポ酸とは

#### (1) 歴史的背景

$\alpha$ -リポ酸についての研究は1930年代から始まり、1951年にReedら<sup>1)</sup>により酸化型 $\alpha$ -リポ酸が単離・同定された。単離に至るプロセスは非常に困難であったと思われる。Reedら<sup>2)</sup>は、約10トンのウシの肝臓から数多くの抽出プロセスを経た後に、約30mgの $\alpha$ -リポ酸を結晶として取り出している。この時、同時に $\alpha$ -リポ酸のジチオラン環の硫黄の一つが酸化された形の $\beta$ -リポ酸も得られている。 $\alpha$ -リポ酸は6位に不斉炭素を有するキラル分子であり、天然に存在する $\alpha$ -リポ酸はR体(R-エナンチオマー、R(+)- $\alpha$ -LA、あるいはR-リポ酸)である。(以下、これをR-リポ酸と略す。)R-リポ酸の融点は47、5°Cであり、比旋光度は $[\alpha]_D^{25} = +96.7^\circ$  (ベンゼン中)である<sup>3)</sup>。リポ酸は別名チオクト酸とも呼ばれるが、これはR-リポ酸の基本骨格がオクタン酸であり、分子内に2個の硫黄(チオ)原子がついていることに由来する。アメリカ生化学会がLipoic acidという物質名を採用したため、今日では『リポ酸』という名称がより一般的になっている<sup>4)</sup>。R-リポ酸はエタノール、メタノールなどの有機溶媒には比較的良好に溶けるが<sup>3,5)</sup>、中性の水にはあまり溶けない。しかし、R-リポ酸はカルボン酸構造を有しているため、緩衝液や弱アルカリ性になると水にも比較的良好に溶解するようになる。リポ酸についてはこれまで数多くの研究報告がなされているが、第1章では基本的なリポ酸の生化学と遺伝子発現調整機能、さらに食品に応用する場合に重要となる安定化技術などについて最近のトピックスを含めて概説する。

#### (2) R-リポ酸の化学

R-リポ酸は歪みのかかった1,2-ジチオラン環を分子内に有しているオクタン酸の誘導体である。R-リポ酸のX線構造解析の結果によれば<sup>6)</sup>、S-S結合の長さは2.01オングストロームであり、C-S結合はそれぞれ、1.81、1.85オングストロームである。また、-CSSC-の二面角は直鎖状化合物の場合、90°に近い値を示すのに対し、R-リポ酸においては35°となっており、非常に歪みのかかった構造になっていることがX線結晶構造解析の結果からも裏付けられている。このR-リポ酸の特徴的な構造は当然反応性にも影響を与える。Favaら<sup>7)</sup>はジチオラン環に対するn-ブチルチオール求核反応の二次反応速度定数を求め、歪みをもった1,2-ジチオラン環を有する反応速度定数は直鎖型ジスルフィドの約5000倍大きいことが明らかになった。

また、R-リポ酸の特徴は生体内で二電子還元を受けると、R-ジヒドロリポ酸に変換される点にある。このとき、酸化-還元のプロセスがスムーズに進行することがポイントであるが、変換過程の起こり易さをチオール-ジスルフィドの反応系で検討し、平衡定数 $K_{eq}$ を求めたところ、六員環のものが五員環に比べて約10~30倍(環上の置換基により差がある)環化しやすいことが判明した<sup>8,9)</sup>。

S-S 結合を有する直鎖型化合物は UVA 領域に吸収を示さないのに対し、R-リポ酸(RALA)は歪みを有しているため、330nm 付近に極大吸収を示す。リポ酸は UV 照射(UVA)により速やかに光分解を受け、R-ジヒドロリポ酸(R-DHLA)を含む多くのチオール誘導体を与えることが報告されている<sup>10)</sup>。熱や酸により S-S 結合のラジカル的な環開裂反応が進行して、ポリマー性の化合物を与えることも古くから報告されている<sup>3-5)</sup>。こうしたことを考え合わせると、R-リポ酸の保存は遮光した状態で、なるべく冷暗所にて保存することが好ましい。

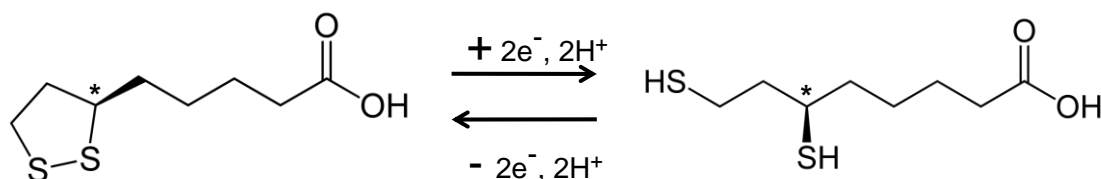


図1. RALA と R-DHLA の化学構造.

### (3) R-リポ酸の生化学

R-リポ酸は生体内では、ミトコンドリアでクエン酸回路に働くデヒドロゲナーゼ複合体(ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体)のジヒドロリポアミドアシルトランスフェラーゼ(略称 E2 酵素)及びグリシン開裂酵素系の H タンパク質の補酵素として働いており、これらタンパク質の特定のリジン残基のε -アミノ基にアミド結合した形で存在している。

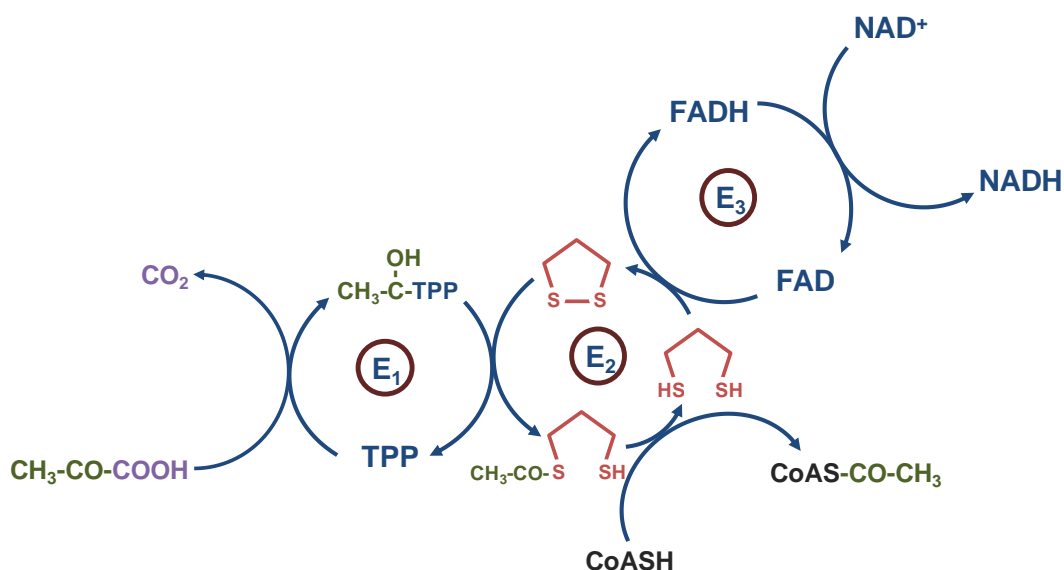


図2. 代謝における RALA の役割

糖の代謝において、解糖系ではグルコースからピルビン酸が生成してくるが、生成したピルビン酸からアセチル CoA が生成する過程はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体により触媒される反応であり、この時に必要な 5 つの補酵素が、4 種のビタミン [TPP(チアミンピロリン酸)、FAD(フラビンアデニンジヌクレオチド)、補酵素 A(パントテン酸、CoA)、NAD(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)] とタンパク結合型 R-リポ酸である。このタンパク結合型 R-リポ酸が欠如すると、糖の代謝が進行しなくなる。ピルビン酸から生成したアセチル CoA はクエン酸回路(TCA サイクル)に入る。このクエン酸回路を回転させるためにはいくつもの酵素が必要であり、その一つがケトグルタル酸デヒドロゲナーゼである。この酵素は前述のピルビン酸デヒドロゲナーゼ同様、5 つの補酵素を必要とし、その一つがタンパク結合型 R-リポ酸である。このように結合型 R-リポ酸はクエン酸回路を回転させるためにも必須である<sup>11)</sup>。

食物から摂取した脂質は体内で分解され、脂肪酸に変換された後に種々の酸化的修飾を受けてエネルギー代謝のシステムに入ってくる。このプロセスにはR-リポ酸は直接関与していないが、生成してくるアセチル CoA は糖の場合と同様に TCA サイクルに入るため、R-リポ酸は間接的に脂肪酸の代謝にも関わっているといえる。

アミノ酸の代謝経路は極めて複雑であり、いくつかのアミノ酸はピルビン酸を経由して代謝され、他のアミノ酸のいくつかは TCA サイクルに入り、電子伝達系へと進んでいく。こうしたことを考え合わせると、R-リポ酸は三大栄養素の代謝の全てに関与していると言っても過言ではないと思われる<sup>11)</sup>。

このような生体内で重要な働きをしている R-リポ酸の生合成経路については、これまでに多くの化学者(生化学者)により取り上げられてきたが未だ不明な点がある。但し、これまでに R-リポ酸の生合成において鍵となる事項が明らかになっている。脂肪酸として用いられるものはオクタン酸であることが 1960 年代から考えられていたが<sup>4)</sup>、オクタン酸から R-リポ酸に変換するためには、オクタン酸の 6 及び 8 位の位置に SH 基が導入される必要がある。C6 位に付いている C-H は、どちらの H 原子が SH と置換されるかにより生成してくるリポ酸の立体化学が異なってくる。(こうした C-H を pro-chiral という。)R-リポ酸の生合成においては、SH 基が R-DHLA となる形で入ってくることになる。生合成経路を確かめるために、<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>H を用いたラベル化実験が行われてきた。カルボン酸部分を <sup>14</sup>C でラベルしたオクタン酸を用い、大腸菌が生育する培地に加え、大腸菌が産生する R-リポ酸に <sup>14</sup>C のラベルが導入されていることが 1976 年に報告された<sup>12)</sup>。更に、C6 位の水素を重水素化したオクタン酸を合成し、これを大腸菌の培地に加えることにより、硫黄原子の導入が H<sub>R</sub> の脱離により進行していることが明らかとなった<sup>13)</sup>。R-リポ酸の硫黄原子の由来は、従

来はシステインのチオール基によるものと考えられてきた<sup>14)</sup>。今から 20 年くらい前に R-リポ酸の合成に関わる酵素が大腸菌から単離された<sup>15)</sup>。この R-リポ酸の合成酵素(LipA)は R-リポ酸の前駆体であるオクタン酸に二個の硫黄原子を立体特異的に導入するものである。LipA は 36kDa のサイズのタンパク質であり、[ Fe-S ] クラスターを形成している。この酵素は他の酵素と協働することにより R-リポ酸を合成するが、R-リポ酸の合成の際に挿入される硫黄原子は LipA の有する Fe-S から提供される。分子レベルでの研究では、このプロセスに S-アデノシルメチオニンと Fe-S クラスターから生じるジオキシアデノシルラジカルが関与していると報告されている<sup>16, 17)</sup>。

R-リポ酸の生合成は主に、大腸菌などの腸内細菌により行われるが<sup>18)</sup>、腸内で生産された R-リポ酸はグリシンやプロリン輸送系と同様なシステムで血流に乗って細胞内に輸送されることが考えられてきた<sup>19, 20)</sup>。この輸送システムは効果的に作動し、細胞内のリポ酸の濃度をかなり高めることができるが、オクタン酸はこの輸送を競争的に阻害すると報告されている<sup>19)</sup>。その後、ミトコンドリアにおいても R-リポ酸の生成が行われているという報告<sup>21, 22)</sup>がなされているが、ミトコンドリア内で作られるリポ酸量が十分なものであるかどうかは現時点では不明である。

#### (4) R-リポ酸の代謝

リポ酸のエナンチオ選択的薬物動態がヒトに対して研究されているにもかかわらず<sup>23-26)</sup> (Hermann ら、1996、1998 年:Hermann and Niebch、1997 年:Keith ら、2012 年)、リポ酸の代謝に関しては十分な検討が行われていない。ラットと *Pseudomonas putida* LP における代謝研究からは、リポ酸は基本的にβ 酸化系により代謝され<sup>27, 28)</sup> (Harrison and McCormick、1974 年: Furr ら、1978 年)、主要な代謝産物は bisnorlipoic acid、tetranorlipoic acid、β -hydroxy-bisnorlipoic acid であると報告されている。健康なボランティアでも経口投与したリポ酸から代謝産物としてジメチル化体、β 酸化された 4,6-bis-methylmercapto-hexanoic acid と 2,4-bismethylmercapto-butanoic acid が同定されている<sup>29)</sup> (Locher ら、1995 年)。一方、R-リポ酸 1g を健康なボランティアへ経口投与後、血漿中にβ 酸化により生成した 3-keto-lipoic acid が検出されている<sup>30)</sup> (Biewenga ら、1997 年)。このような酸化生成物の産生は、チオールスルフォネートやチオールスルフィネートが生成した後、一重項酸素<sup>31)</sup> または次亜塩素酸<sup>32)</sup> が反応した可能性が示唆されるが、リポ酸の生体作用におけるこれら酸化生成物の重要性については未だよく分かっていない。また、種による代謝反応の違いについても未だ十分に解明されていない。

<sup>14</sup>C 標識したリポ酸を使った体内動態研究も行われている<sup>33)</sup>。マウスに対して 30mg/kg、ラットに対して 30mg/kg、イヌに対して 10mg/kg の [<sup>14</sup>C] リポ酸を経口投与し、尿中排泄物を調べた結果、24 時間後に尿中に 80%以上の放射能が排泄されることがわかった(未変化のリポ酸として検



出されたのは、イヌに注射後 0.08 時間(5 分後)のときのみであった。)。その尿中代謝産物を HPLC 分析した結果、種に関わらず多くの代謝産物が生成しており、MS 分析により 12 種類の検出可能な代謝産物が同定され、ミトコンドリアにおける $\beta$ 酸化がリポ酸の代謝において重要な役割を演じていることが明らかになった。代謝産物の分析から、生体に取り込まれたリポ酸の代謝経路は、 $\beta$ 酸化による側鎖のメチレン鎖の酸化の後に 1,2-ジチオラン環が開裂しながらメチル化される経路やリポ酸の側鎖の炭化水素鎖が短くなっていった後に、1,2-ジチオラン環が開環するプロセスなどが進行しながら代謝されていくことがわかった。さらに、イヌでは最も極性の高い代謝産物として同定された 2,4-bismethylmercapto-butanoic acid のジスルホキンドが主要な代謝産物であったことから、特にイヌにおいて生成したメチルスルフィドがさらに酸化されスルホキンドを生成するものと考えられた。さらにマウスではグリシン抱合反応が $\beta$ 酸化と競合する代謝経路であることが示唆された。

また、ヒトに対しても 600mg の非ラベル化されたリポ酸が投与され、ヒトの血漿あるいは尿中の 5 種類のリポ酸の代謝産物が同定されたと報告されている<sup>34)</sup>。

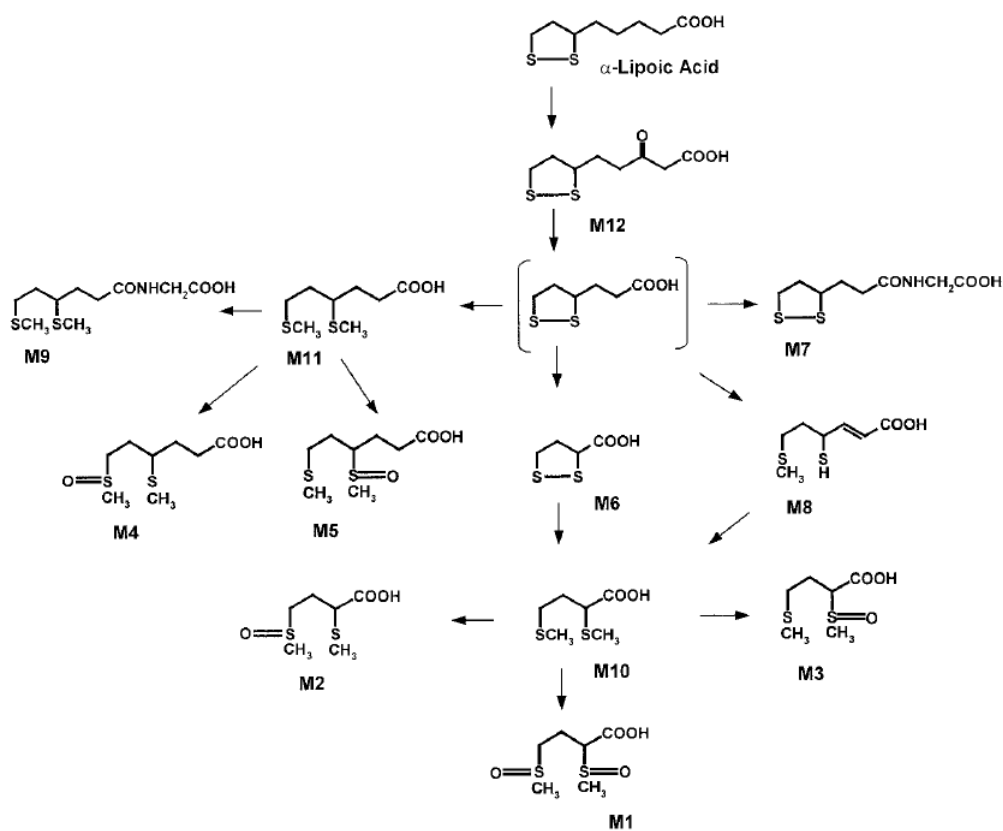


図3.  $\alpha$  リポ酸の代謝経路<sup>33)</sup>

## (5) R-リポ酸とR-ジヒドロリポ酸の抗酸化活性

1959年にRosenbergらは、ビタミンC欠乏のモルモットの壊血病の症状がリポ酸を与えることにより改善されたことや、ビタミンE欠乏食を与えたラットにリポ酸を与えることによりビタミンE欠乏症を予防できることを報告している<sup>35)</sup>。その後、糖尿病性神経障害(diabetic neuropathy)<sup>36)</sup>やいくつかの神経疾患の改善<sup>37, 38)</sup>にリポ酸の投与が効果的であるという報告が行われてきた。これらの疾病とフリーラジカルが関連深いことより、リポ酸の抗酸化活性が注目されるようになった。

R- $\alpha$  リポ酸はその分配係数が約4(油/水)<sup>10)</sup>であることにより油相、水相の両相において、一定以上の割合で分布できる。さらに、R-リポ酸の還元体であるR-ジヒドロリポ酸はジチオール構造であるので、主として水相に存在する。それゆえにR-リポ酸/R-ジヒドロリポ酸の組み合わせると両相にバランスよく分布することが予想できる。R-リポ酸とR-ジヒドロリポ酸は生体内で共役することによって抗酸化活性を発揮し、生体の恒常性を維持している。R-リポ酸とR-ジヒドロリポ酸の個々の活性酸素種に対する消去能はいくつかの総説にまとめられているので、それを参照されたい。R-リポ酸/R-ジヒドロリポ酸の酸化還元電位が $-0.32V$ であり<sup>39)</sup>、酸化型グルタチオン(GSSG)を還元型(GSH)に戻すことができる(GSSG/GSH,  $-0.24V$ )。グルタチオンは生体において多くの機能に関わる重要な生理活性物質であり、特に酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの比率は細胞生理に極めて重要な意味を持つと考えられている。

R-リポ酸は官能基として、カルボン酸基と1, 2ジチオラン環を持っているのに対して、R-ジヒドロリポ酸は分子内に官能基としてカルボン酸と二つのチオール基を有している。これらの官能基は金属イオンと配位する能力がある。実際に、R-ジヒドロリポ酸は二価の鉄( $Fe^{2+}$ )、三価の鉄( $Fe^{3+}$ )と配位し、 $Fe^{3+}$ を $Fe^{2+}$ に還元する能力があると報告されている<sup>40, 41)</sup>。また、R-ジヒドロリポ酸は鉄-フェリチン錯体から鉄を配位して取り除く能力があると考えられている<sup>42, 43)</sup>。また、銅イオンに対するリポ酸の作用についての報告もある<sup>44)</sup>。一般に、生体中に還元型の鉄イオン( $Fe^{2+}$ )量が増えてくると、 $Fe^{2+}$ は生体中に存在する過酸化水素(過酸化物)と反応しヒドロキシルラジカル等の活性酸素を与えることが予想される。その結果、ジヒドロリポ酸は抗酸化物質として働くよりむしろ酸化剤として働く可能性がある。ジヒドロリポ酸の存在下では、ラットの肝マイクロゾームの過酸化反応が促進したという報告がある<sup>45)</sup>。また、ジヒドロリポ酸は他のチオール誘導体同様、銅イオンによるDNA鎖切断反応を促進させることがわかっている<sup>46)</sup>。また、 $Fe^{2+}$ による脂質過酸化反応の系にジヒドロリポ酸を加えると、過酸化反応が促進される一方、この系にビタミンCや酸化型グルタチオンなどを加えると過酸化反応が抑制されることがわかり、ジヒドロリポ酸が存在しない時にはこうした抑制効果が認められなかった<sup>45)</sup>。ジヒドロリポ酸は分子内にチオール基を二個有し

ている。このチオール基は還元力が強い反面、一旦 SH の水素原子がラジカル的に引き抜かれると、チールラジカル(硫黄ラジカル)が生成し、これが酸化反応を促進していくのではないかと考えられる。還元剤である化合物が酸化剤に変化することは必ずしもリポ酸に限った話ではないと思われる。抗酸化剤と呼ばれる化合物一般についても、こうしたことを配慮する必要があるものと思われる。

#### (6) 他の抗酸化物質との反応

抗酸化物質としての能力には、活性酸素と直接的に反応し、それを消去する能力と共に、他の貴重な抗酸化物質に作用してそれを再生させる能力も重要である。例えば、生体膜の脂質過酸化反応を抑制する抗酸化物質としては膜中に存在するビタミン E がある<sup>47)</sup>。ビタミン E は膜中にごく少量しか存在しないが、極めて効果的に細胞膜の過酸化反応を抑制する。この過酸化反応抑制の過程においてビタミン E のフェノール性水酸基は酸化され、トコフェロキシルラジカル(ビタミン E ラジカル)が生成してくるが、このラジカルは他の抗酸化物質(例えばビタミン C)により還元され、ビタミン E が再生される。R-ジヒドロリポ酸もこうした再生に関与していると考えられている<sup>48, 49)</sup>。例えば、R-ジヒドロリポ酸はミクロゾームの脂質過酸化反応を抑制するが、それは反応系内にビタミン E が存在するときだけである<sup>50)</sup>。Bast ら<sup>51)</sup> は、R-ジヒドロリポ酸のビタミン E 再生メカニズムは R-ジヒドロリポ酸が酸化型グルタチオンを還元し(酸化-還元電位 参照)、生成した還元型グルタチオンがトコフェロキシルラジカルと反応し還元することにより、ビタミン E を再生するものと考えた。事実、培養細胞系に R-リポ酸を添加したところ、細胞内のグルタチオン量の著しい増大が認められている<sup>52, 53)</sup>。一方、Kagan ら<sup>54)</sup> は R-ジヒドロリポ酸がビタミン C ラジカルを還元し、これがビタミン E の再生に関与していると報告した。ビタミン C 依存型の R-ジヒドロリポ酸によるビタミン E の再生はヒト LDL<sup>55)</sup> や赤血球細胞<sup>56)</sup> においても観察されている。こうした点を考慮すると、R-リポ酸はそれ自身が強い抗酸化物質として働く役割を担うと同時に種々の抗酸化物質を再生させることに生体における抗酸化活性を維持する役割を担っているものと考えられる。(図2)

生体というある程度定まった器の中で生物は貴重な資源を巧みに再生利用していると言える<sup>57)</sup>。

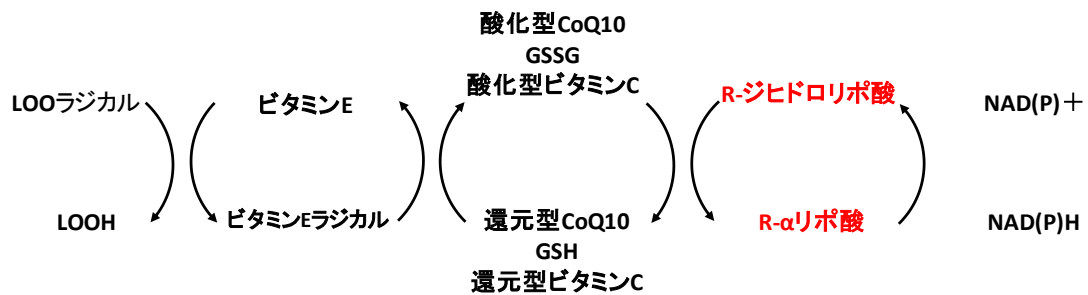


図4. 生体内の抗酸化ネットワーク

## (7) 細胞内シグナリングとリポ酸

### リポ酸の遺伝子発現調整作用

タンパク質に含まれるSH / S-Sの酸化還元反応がタンパク質のコンフォメーション変化に関係し、ひいては酵素などの活性を制御していることはよく知られており、生体のレドックス制御の一つである。一般に炎症やストレス反応に関わる遺伝子が多いが、プロテインキナーゼ C、Ca<sup>2+</sup>-ATPase、コラーゲナーゼ、チロシンキナーゼ、膜受容タンパクなど多岐に渡るタンパク質の機能発現に関わる細胞内シグナリングがレドックス制御を受けていることがわかってきており、細胞の機能発現の基本である細胞内情報伝達系の機能や発癌の過程に重要な役割を果たしている<sup>58, 59)</sup>。NFκB、AP-1、SP-1、NFe2-関連因子(Nrf2)等の転写調節因子はレドックス制御を受ける可能性が高い。R-リポ酸/R-ジヒドロリポ酸はその強い酸化還元特性を通じて細胞のレドックス制御に関わっている。

癌のイニシエーション、プロモーション、浸潤、転移などの発癌の諸過程、炎症、アポトーシスなどに関連する諸遺伝子の発現に関わっている転写制御因子である NFκB は、p50、p52、p65、c-Rel、RelB 等の転写因子のファミリー (Rel/ NFκB タンパクファミリー) に属するタンパク質で、活性化されていない状態では 50kDa (p50) と 65kDa (p65) の分子量を持つサブユニットからなる四量体とその活性制御因子である IκB と結合した形で細胞質に存在している。TNF、IL-1、PMA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、endotoxin、γ 線照射などの炎症を引き起こす刺激があると、IκB キナーゼが活性化され、リン酸化された IκB はユビキチン化により分解される。これがシグナルとなって、NFκB は核内に移行、標的遺伝子のプロモーター部位にあるコンセンサスに結合し、遺伝子発現を起こす<sup>60)</sup>。このように細胞の増殖や炎症に関係する疾病の発症に緊密に関係している NFκB は、各種の発癌剤、腫瘍プロモーター、ガン組織のマイクロ環境 (低酸素、酸性 pH) や殆どの起炎症性物質で活性化されることが知られているが、ビタミン E など種々の抗酸化物質がその抗酸化活性を発揮し NFκB の活性化を抑えることも知られており<sup>61)</sup>、R-リポ酸も色々な系で NFκB の発現を抑える<sup>62-64)</sup>。

NFκ Bと同じようにレドックス制御をうける転写因子にAP-1がある。AP-1はJun、Fos等の前ガン遺伝子ファミリーに属する二量体タンパク質の転写因子で、放射線照射やサイトカイン、ストレスなど様々な刺激により発現が促進される。AP-1の活性は翻訳後制御を受ける、例えば、DNAへの結合は酸化剤存在下、あるいはシステイン残基の還元で増加する。即ち、分子内のSH基酸化還元によるタンパクコンフォメーション変化が結合活性に反映されている。AP-1の結合部位は、collagenase、cytokines (IL-3、IL-8、IL-9、TNF-α、TNF-γ etc)、接着因子、増殖因子などの遺伝子のプロモーター部位にある。Mullerらはラット肝細胞の虚血再還流障害に対するR-リポ酸の保護作用を検討し、R-リポ酸が再還流に伴うNFκ BとAP-1の活性化を抑えると同時にAktのリン酸化を有意に増加することを観察した。PI3キナーゼ/Akt経路の阻害剤であるwortmanninの共存下ではR-リポ酸のその作用が現れないので、再還流損傷のR-リポ酸による防御作用にはPI3キナーゼ/Akt経路が重要な役割を果たしていることが予想される。R-リポ酸はAktを活性化するがアポトーシスを誘導しない点が興味深い<sup>65)</sup>。

近年、リポ酸のピュアなエナンチオマーを用いた細胞試験が多数行われており、リポ酸が細胞内のシグナル伝達のどの部分に作用するのかを検討した事例がいくつか報告されている。リポ酸は様々な経路において神経保護作用を示し、その中心的な役割をリポ酸の強い抗酸化活性が担っているが、そのメカニズムについてR体とS体の作用を区別して調べた事例は未だ十分ではない。Yamadaら<sup>66)</sup>は神経芽細胞種のSH-SY5Y細胞を使い、BSO刺激によるグルタチオンの枯渇に対するリポ酸(R体、S体、ラセミ体)の効果を評価し、いずれのリポ酸もBSO刺激によるグルタチオン枯渇による細胞死を抑制する効果がみられたと報告している。機序としては、BSO刺激によるグルタチオンの枯渇や活性酸素種の生成にリポ酸が直接的に与える影響は比較的小さく、むしろ、HO-1などの抗酸化に関わる遺伝子やNQO1などの発現を促すことがわかったとしている。HO-1は阻害しないがNQO1を阻害する薬剤はリポ酸のBSO刺激に対する保護効果を弱め、また、いずれのタイプのリポ酸も細胞の生存に関わるAktキナーゼを活性化し、PI3Kの阻害剤(LY294002)はリポ酸によるNQO1の上流における調整作用とBSO刺激に対する細胞保護作用の両方を抑えたと報告している。Koriyamaら<sup>67)</sup>は網膜神経細胞のRGC-5細胞を用いて、R-リポ酸がNrf2の核移行を促進することによってHO-1の発現を引き起こすことを観察している。シグナル伝達の下流に着目し、メカニズムについてより詳細に検討した結果、R-リポ酸はAktを活性化し、また、R-リポ酸によって誘発されたHO-1はPI3Kの阻害剤によって抑制された。さらに、R-リポ酸はROSを産生した。ROSの消去剤やNADPH酸化酵素の阻害剤で処理すると、R-リポ酸によるNrf2の核移行やHO-1の活性化が抑制された。これらの結果から、R-リポ酸によるROS産生がKeap1に変化を起し、PI3Kのシグナル伝達系を通してHO-1の発現を促しているのかも

しれないと推察している。更に *in vivo* の試験において、R-リポ酸は HO-1 活性依存のメカニズムを通して細胞死を減らし、視神経損傷によって起こる網膜への 4HNE の蓄積を軽減した。Keap1/Nrf2 シグナリングを通じた HO-1 の誘発により、*in vitro*、*in vivo* 両方において、網膜神経での酸化ストレスに対する R-リポ酸の神経保護作用を示した初めての報告例である。Michikoshi ら<sup>68)</sup> は、2種類のヒト非小細胞肺癌細胞 (PC-9、HCC827) を用いてリポ酸は標的抗がん剤に対する肺がんの感受性を増強するかどうかを調べている。その結果、リポ酸は濃度依存的に PC-9 及び HCC827 細胞に対して増殖抑制効果を示した。また、細胞増殖阻害効果の IC50 を示す濃度は、0.25-0.5mM であった。Michikoshi らが調べた範囲では、2.0mM で最大阻害作用を示し、そのときの細胞数はリポ酸添加時とほぼ同等であったことから、リポ酸は強力な増殖抑制作用を有することが示された。また、リポ酸のエナンチオマーそれぞれの作用についても同時に調べており、R-リポ酸と S-リポ酸では肺癌細胞に対する増殖抑制活性において、ほとんど差はみられなかった、としている。更に、肺癌治療薬とリポ酸を組み合わせた興味深い実験を行っており、上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼを選択的に阻害し、腫瘍の増殖抑制、アポトーシスを誘導する分子標的治療薬の一種である Gefitinib とリポ酸を併用する可能性について示唆している。Gefitinib は EGFR のチロシンキナーゼの ATP 結合部位に競合的に結合することにより EGFR の自己リン酸化を阻害しシグナル伝達を遮断する。この Gefitinib と肺癌細胞で産生される増殖因子である肝細胞増殖因子 (HGF: hepatocyte growth factor) の両方が存在する場合でも、リポ酸の増殖抑制効果がみられた。この作用機序について、リポ酸は、ヒト非小細胞肺癌細胞の分裂に寄与する Met/HGF 受容体を活性化することによりヒト肺癌細胞の増殖を抑制している、と彼らは説明している。

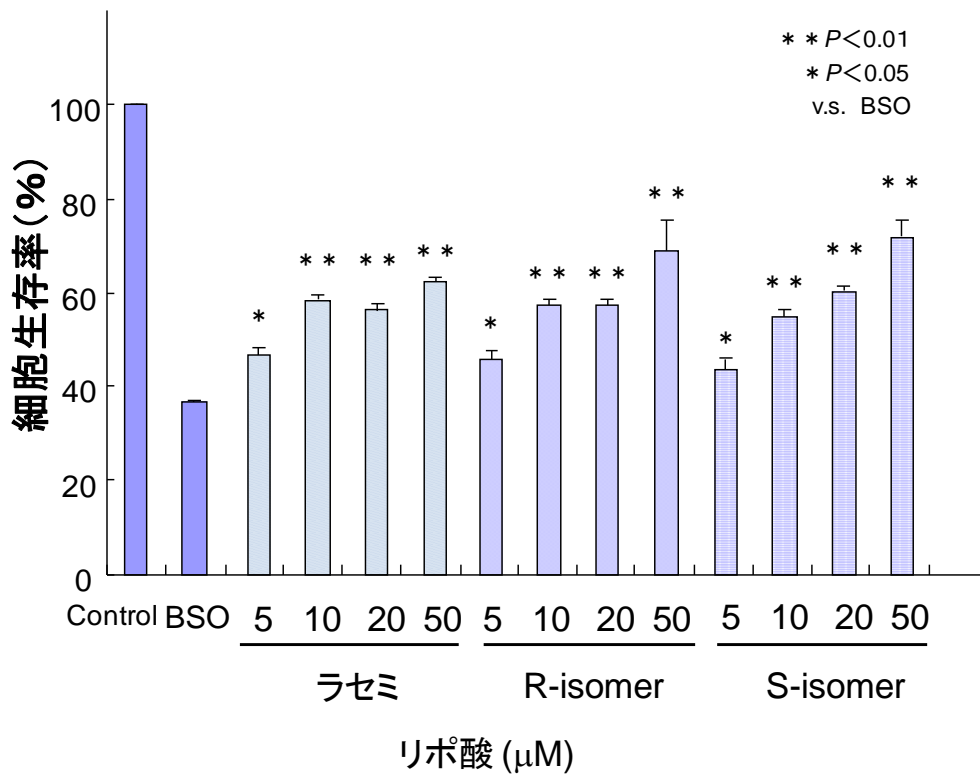


図5. リポ酸の細胞死に対する抑制効果 (Mean±SD)

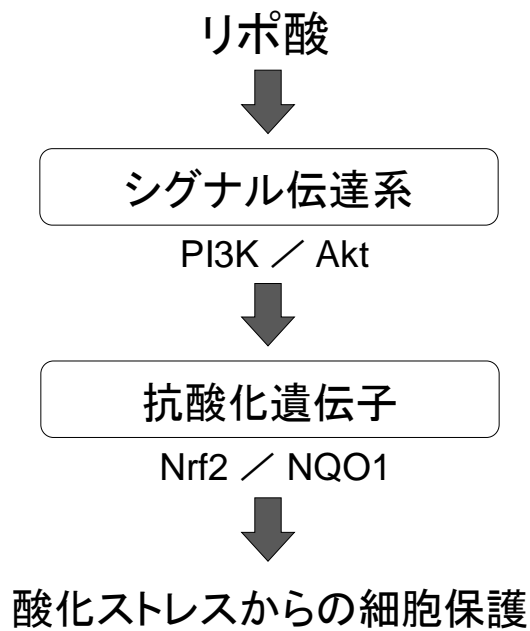


図6. 酸化ストレスに対するリポ酸の保護作用

それ以外にも細胞内シグナリングへの作用を介したリポ酸の生理作用の例として、次に述べるリポ酸の糖尿病治療効果と関連が深いインスリンシグナリング系を通じた血糖値の調整作用や<sup>69-71)</sup>、転写因子 Nrf2 の発現促進や ARE への結合促進によるグルタチオン生合成の鍵となる補酵素であるγ-グルタミルシステインリガーゼ(GCL)の活性化を介した細胞内グルタチオン量の維持<sup>72)</sup>など、いろいろな作用が遺伝子の発現調整を介して行われている。

## (8) リポ酸の抗糖尿作用

リポ酸は古くから糖尿病の合併症の治療に使われてきた医薬品でもあるが、糖尿病における血糖コントロールや糖代謝に対するリポ酸の作用をインスリンシグナリング系との関連で説明する研究も進展してきている<sup>73, 74)</sup>。

糖尿病患者にリポ酸を短期、長期に投与すると、血糖値コントロール、糖代謝の改善が見られるが、この作用はインスリンの作用と類似したものである。インスリンが膜表面の受容体のαサブユニットに結合すると受容体自身が局所的に産生するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるSH基の可逆的な酸化によりタンパク構造の変化が起こり、情報が細胞膜内側にあるベータサブユニットのチロシンキナーゼドメインに伝えられる。その結果、自己リン酸化が起こって受容体が活性化され、インスリンシグナルカスケードが活性化される。受容体のチロシンキナーゼによりインスリン受容体基質ファミリーのタンパクリン酸化が起こり、PI-3キナーゼが活性化され、下流にあるプロテインキナーゼB/Aktが順次活性化され、細胞膜へのグルコース輸送体タンパクであるGLUT4の移動が促進される。即ち、インスリン受容体の自己リン酸化が形質膜へのグルコースの取り込み促進につながるタンパクリン酸化カスケードの始まりになる。活性化された受容体は結合しているホスファターゼにより脱リン酸化されることで活性を失うが、ホスファターゼの活性もそのSH残基の酸化還元で制御される。即ち、鍵となるSHの可逆的な酸化によりインスリン受容体の活性化とホスファターゼによる阻害が制御される。リポ酸がこのインスリンシグナリング系に作用して細胞内へのグルコース取り込みを促進することが、筋肉細胞、脂肪細胞モデルである培養L6 myotubeや3T3-L1 adipocyteを使ったグルコース取り込み実験で示されている。即ち、リポ酸はインスリン受容体とインスリン受容体基質タンパク(IRS-1)のリン酸化を促進し、PI3キナーゼ、Aktの活性化を通じて細胞膜へのGLUT4の移行を促し、2-デオキシグルコースの細胞内への取り込みを促進することが明らかにされた<sup>71)</sup>。リポ酸はこの例のようにインスリンシグナリングカスケードに作用していることが示唆されるが、リポ酸が直接インスリン受容体に作用する証拠は得られていない。

Moiniらは3T3-L1 adipocyteにおけるグルコース取り込みに対するR-リポ酸の作用を更に詳しく検討し、R-リポ酸の作用は酸化型R-リポ酸がインスリン受容体のSHに弱いプロオキシダントとし



て働いて  $H_2O_2$  の作用と同様に受容体を活性化する機構を提案している<sup>75)</sup>。このような考えは adipocyte の還元活性が低いので、取り込まれた R-リポ酸が殆ど酸化型で存在していたこと、還元型の R-ジヒドロリポ酸ではグルコースの細胞内取り込みの促進が見られなかったことなどの観察を基にしたものであるが、脂肪組織で特にリポ酸の作用が期待できるだろう。

骨格筋細胞へのグルコース取り込みの促進は R-リポ酸の摂取と運動を組み合わせると相加的に強化されるという観察があるが、Sengsirisuwan らはさらにその作用を遺伝的肥満高血糖ラット (fa/fa Zucker ラット) の soleus 筋肉細胞を使ってインスリンシグナリングのレベルで解析し、R-リポ酸と運動を組み合わせると 2-デオキシグルコースの取り込みが相加的になること、この取り込みの増加はインスリン受容体基質タンパク (IRS-1) の発現、及びインスリンによる PI-3 キナーゼの p85 サブユニットへの IRS-2 の結合促進によって起きることを明らかにした<sup>69)</sup>。

一方、リポ酸の MAPK 系への作用も報告されている。例えば、Maddux らは GLUT4 を過剰発現させた L6 培養ラット筋細胞系で 2-デオキシグルコースの取り込みに対する酸化ストレスの影響を調べ、酸化ストレスによりグルコースの取り込みが阻害され、同時に細胞内のグルタチオン量が約 50%減少し、ストレス感受性の p38 MAPK の急激な活性化が起きるが、細胞をマイクロモルレベルのリポ酸で処理しておくこととこれらの反応が抑えられることを示し<sup>76)</sup>、Blair らは同じ L6 細胞を  $H_2O_2$  に曝すと p38 MAPK の活性化が起こり、同時にインスリン作用が阻害されることを報告している<sup>77)</sup>。このことは、リポ酸がこの阻害キナーゼの活性化を抑えることで酸化ストレスによるインスリン耐性の出現を抑えたものと考えられ、筋細胞におけるグルコース取り込みにはインスリンシグナル系と MAPK 系のクロストークがある可能性を示すものである。Konrad らはこれらの点をさらに詳細に 3T3-L1 adipocyte と L6 myotube を使って解析し、インスリンやリポ酸によし促進されるグルコースの細胞内への取り込みが p38 MAPK 阻害剤で一部阻害されるが、グルコース輸送体 (GLUT4) の細胞膜への移行はそれらの阻害剤では影響を受けないことなどの観察から、リポ酸の作用は MAPK 系の活性化を通した GLUT4 の活性化と PI3-K/Akt1 の活性化を通した GLUT4 の細胞膜への移行促進の二面的な作用によるものであることを示した<sup>71)</sup>。Wang ら<sup>78)</sup>は C57/BL6 マウスと C2C12 培養細胞を用いて老化に関わる実験を行っている。リポ酸を高年齢のマウスに投与すると、AMPK/PGC-1 $\alpha$  を介したミトコンドリアにおける生合成や機能を高めることによって、骨格筋でのエネルギー代謝が促進されると結論付けている。また、おそらく mTOR のシグナリングを制御することによって骨格筋でのタンパク合成を抑制し体重を減少させたことから、高齢者の糖尿病やインスリン抵抗性に対してもリポ酸の効果が期待できるのではないかと提案している。

## 引用文献

- 1) Reed, L. J., DeBusk, B. G., Gunsalus, I. C., Hornberger, C. S.: Crystalline  $\alpha$ -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science.*, **114**, 93-94 (1951).
- 2) Reed, L. J.: The chemistry and function of lipoic acid. *Adv. Enzymol.*, **18**, 319-347 (1957).
- 3) 長倉三郎、井口洋夫、江沢洋、他: リポ酸. 岩波理化学辞典(第五版). 久保亮五編集. 岩波書店、1450 (1998)
- 4) リポ酸. ビタミン学Ⅱ 水溶性ビタミン. 日本ビタミン学会編. 東京化学同人、601-614 (1980)
- 5) リポ酸. 化学大辞典. 化学大辞典編集委員会編. 共立出版、634 (1987)
- 6) Karle, I. L., Estlin, J. A., Britts, K.: The structure of the twinned crystal of D-L-6-thioctic acid,  $C_8H_{14}O_2S_2$ . *Acta Cryst.*, **22**, 567-573 (1967).
- 7) Fava, A., Iliceto, A., Camera, E.: Kinetics of the Thiol-Disulfide Exchange. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 833-838 (1957).
- 8) Houk, J., Whitesides, G. M.: Structure-reactivity relations for thiol-disulfide interchange. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6825-6836 (1987).
- 9) Singh, R., Whitesides, G. M.: Comparisons of rate constants for thiolate-disulfide interchange in water and in polar aprotic solvents using dynamic proton NMR line shape analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1190-1197 (1990).
- 10) Matsugo, S., Han, D., Tritschler, H. J., et al.: Decomposition of alpha-lipoic acid derivatives by photoirradiation-formation of dihydrolipoic acid from alpha-lipoic acid. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 51-59 (1996).
- 11) 例えば レーニンジャーの新生化学[下] 第5版. 監修/山科郁男・川崎敏祐、編集/中山和久、廣川書店、895-930 (平成22年)
- 12) Parry, R. J., Kunitani, M. G.: Biotin biosynthesis. 1. The incorporation of specifically tritiated dethiobiotin into biotin. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 4024-4026 (1976).
- 13) Parry, R. J., Trainor, D. A.: Biosynthesis of lipoic acid. 2. Stereochemistry of sulfur introduction at C-6 of octanoic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 5243-5244 (1978).
- 14) Dupre, S., Spoto, G., Matarese, R., et al.: Biosynthesis of lipoic acid in the rat: Incorporation of  $^{35}S$ - and  $^{14}C$ -labeled precursors. *Arch. Biochem. Biophys.*, **202**, 361-365 (1980).

- 15) Reed, K. E., Cronan, J. E. Jr.: Lipoic acid metabolism in Escherichia coli: sequencing and functional characterization of the lipA and lipB genes. *J. Bacteriol.*, **175**, 1325-1336 (1993)
- 16) Henshaw, T. F., Cheek, J., Broderick, J. B.: The [4Fe-4S]<sup>1+</sup> Cluster of Pyruvate Formate-Lyase Activating Enzyme Generates the Glycyl Radical on Pyruvate Formate-Lyase: EPR-Detected Single Turnover. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 8331-8332 (2000).
- 17) Cicchillo, R. M., Iwig, D. F., Jones, A. D., et al.: Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *J. Biochemistry*, **43**, 6378-6386 (2004).
- 18) Jordan, S. W., Cronan, J. E. Jr.: Biosynthesis of lipoic acid and posttranslational modification with lipoic acid in Escherichia coli. *Methods Enzymol.*, **279**, 176-183 (1997)
- 19) Leach, F. R.: Lipoic acid transport. *Methods Enzymol.*, **18**, 276-281 (1970).
- 20) Patel, M. S., Smith, R. L.: The evolution of antioxidants in modern medicine. *Hippocrates Verlag Stuttgart*, 65-77 (1994)
- 21) Wada, H., Shintani, D., Ohlrogge, J.: Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1591-1596 (1997).
- 22) Morikawa, T., Yasuo, R., Wada, H.: Do mammalian cells synthesize lipoic acid?: Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. *FEBS Lett.*, **498**, 16-21 (2001)
- 23) Hermann, R., Niebch, G., Borbe, H. O., et al.: Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic  $\alpha$ -lipoic acid formulations in healthy volunteers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **4**, 167-174 (1996).
- 24) Niebch, G., Buchele, B., Blome, J., et al.: Enantioselective high-performance liquid chromatography assay of (+)R- and (-)S - $\alpha$ -lipoic acid in human plasma. *Chirality.*, **9**, 32-36 (1997).
- 25) Hermann, R., Wildgrube, H. J., Ruus, P., et al.: Gastric emptying in patients with insulin dependent diabetes mellitus and bioavailability of thioctic acid-enantiomers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **6**, 27-37 (1998).

- 26) Keith, D. J., Butler, J. A., Bemmer, B., *et al.*: Age and gender dependent bioavailability of R- and R,S- $\alpha$ -lipoic acid: A pilot study. *Pharmacol. Res.*, **66**, 199-206 (2012)
- 27) Harrison, E. H., McCormick, D. B.: The metabolism of dl-(1,6-<sup>14</sup>C) lipoic acid in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 514-522 (1974).
- 28) Furr, H. C., Chang, H. H., McCormick, D. B.: Lipoate metabolism in *Pseudomonas putida* LP: thiol-sulfinates of lipoate and bisnorlipoate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**, 576-583 (1978).
- 29) Loffelhardt, S., Bonaventura, C., Locher, M., *et al.*: Interaction of alpha-lipoic acid enantiomers and homologues with the enzyme components of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 637-646 (1995).
- 30) Biewenga, G. P., Haenen, G. R., Bast, A.: The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.*, **29**, 315-331 (1997).
- 31) Stary, F. E., Jindal, S. J., Murray, R. W.: Oxidation of alpha-lipoic acid. *J. Org. Chem.*, **40**, 58-62 (1975).
- 32) Biewenga, G. P., Bast, A.: Lipoic acid favors thiol-sulfinate formation after hypochlorous acid scavenging: a study with lipoic acid derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 114-120 (1994).
- 33) Schupke, H., Peter, G., Hermann, R., *et al.*: New metabolic pathways of alpha-lipoic acid. *Drug Metabol. Dispos.*, **29**, 855-862 (2001).
- 34) Teichert, J., Preiss, R. J.: High-performance liquid chromatographic assay for alpha-lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. *J. Chromatography B*, **769**, 269-281 (2002).
- 35) Rosenberg, H. R., Culik, R.: Effect of  $\alpha$ -lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 86-93 (1959).
- 36) Jorg, J., Metz, F., Scharafinsky, H.: Drug treatment of diabetic polyneuropathy with alpha-lipoic acid or vitamin B preparations. A clinical and neurophysiologic study. *Nervenartz.*, **59**, 36-44 (1988).
- 37) Altenkirch, H., Stoltenburg-Didinger, G., Wagner, H. M., *et al.*: Effects of lipoic acid in hexacarbon-induced neuropathy. *Neurotoxicol. Treat.*, **12**, 619-622 (1990).
- 38) Prehn, J. H. M., Karkoutly, C., Nuglisch, J., *et al.*: Dihydrolipoate reduces neuronal injury after cerebral ischemia. *J. Cer. Blood Flow Metabol.*, **12**, 78-87 (1992).

- 39) Scott, E. M., Duncan, I. W., Ekstrand, V.: Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **238**, 3928-3939 (1963).
- 40) Bonomi, F., Werth, M. T., Kurtz, Jr. D. M.: Assembly of  $[\text{FeSn}(\text{SR})_4]^{2-}$  (n=2, 4) in aqueous media from iron salts, thiols, and sulfur sulfide, or thiosulfate plus rhodanese. *Inorg. Chem.*, **24**, 4331-4335 (1985).
- 41) Bonomi, F., Pagani, S., Cariati, F., *et al.*: Synthesis and characterization of metal derivatives of dihydrolipoic acid and dihydrolipoamide. *Inorg. Chem. Acta.*, **195**, 109-115 (1992).
- 42) Bonomi, F., Pagani, S.: Removal of ferritin-bound iron by DL-dihydrolipoate and DL-dihydrolipoamide. *Eur. J. Biochem.*, **155**, 295-300 (1986).
- 43) Bonomi, F., Cerioli, A., Pagani, S.: Molecular aspects of the removal of ferritin-bound iron by DL-dihydrolipoate. *Biochem. Biophys. Acta.*, **994**, 180-186 (1989).
- 44) Ou, P., Tritschler, H. J., Wolff, S. P.: Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant?. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 123-126 (1994)
- 45) Bast, A., Haenen, G. R.: Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Acta.*, **963**, 558-561 (1988).
- 46) Reed, C. J., Douglas, K. T.: Single-strand cleavage of DNA by Cu(II) and thiols: a powerful chemical DNA-cleaving system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 1111-1117 (1989).
- 47) Burton, G. W., Ingold, K. U.: Antioxidation of biological molecules 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6472-6477 (1981).
- 48) Sies, H., Eyr, J.: Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 213-219 (1993).
- 49) Packer, L., Kraemer, K., Rimbach, G.: Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, **17**, 888-895 (2001).
- 50) Scholich, H., Murphy, M. E., Sies, H.: Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on alpha-tocopherol. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1001**, 256-261 (1989).
- 51) Bast, A., Haenen, G. R.: Regulation of lipid peroxidation of glutathione and lipoic acid: Involvement of liver microsomal vitamin E free radical reductase. In Antioxidant in

- Therapy and preventive Medicine, Emerit, I., Packer, L., Auclair, C., eds., *Plenum Press, NY*, 111-116 (1990).
- 52) Busse, E., Zimmer, G., Schopohl, B., Kornhuber, B.: Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneimittel-Forschung.*, **42**, 829-831 (1992).
- 53) Han, D., Tritschler, H. J., Packer, L.: Alpha-lipoic acid increases intracellular glutathione in human T-lymphocyte Jurkat cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 258-264 (1995).
- 54) Kagan, V. E., Shredova, A., Serbinova, E. A., *et al.*: Dihydrolipoic acid-a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 1637-1649 (1992).
- 55) Kagan, V. E., Serbinova, E. A., Forte, T., *et al.*: Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J. Lipid Res.*, **33**, 385-397 (1992).
- 56) Constanninescu, A., Han, D., Packer, L.: Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.*, **268**, 10906-10913 (1993).
- 57) Packer, L., Witt, E. H., Tritschler, H. J.: Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.*, **19**, 227-250 (1995).
- 58) 井上正康 編: 活性酸素とシグナル伝達. 講談社 サイエンスフィック、2001 改.
- 59) Bunik, V. I.: 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation. Role of the lipoate residues and thioredoxin. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1036-1042 (2003).
- 60) Aggarwal, B. B.: Nuclear factor-kappa B: the enemy within. *Cancer Cell.*, **6**, 203-208 (2004).
- 61) Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., *et al.*: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.*, **9**, 899-909 (1995).
- 62) Packer, L.:  $\alpha$ -Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF $\kappa$ B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab. Rev.*, **30**, 245-275 (1998).
- 63) Saliou, C., Kitazawa, M., McLaughlin, L., *et al.*: Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 174-183 (1999).

- 64) Zhang, WJ., Frei, B.:  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits TNF-induced NF- $\kappa$ B activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *FASEB J.*, **15**, 2423-2432 (2001).
- 65) Muller, C., Dunshede, F., Koch, E., *et al.*:  $\alpha$ -Lipoic acid preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury of the rat liver via the PI3-kinase/Akt pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **285**, G769-778 (2003).
- 66) Yamada, T., Hashida, K., Takarada-Iemata, M., Matsugo, S., Hori, O.:  $\alpha$ -Lipoic acid (LA) enantiomers protect SH-SY5Y cells against glutathione depletion. *Neurochem. Int.*, **59**, 1003-1009 (2011)
- 67) Koriyama, Y., Nakayama, Y., Matsugo, S., Kato, S.: Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2 – dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cell line. *Brain research*, **1499**, 145–157 (2013).
- 68) Michikoshi, H., Nakamura, T., Sakai, K., Suzuki, Y., Adachi, E., Matsugo, S., Matsumoto, K.:  $\alpha$ -Lipoic acid-induced inhibition of proliferation and met phosphorylation in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.*, **13**, S0304-3835 (2013).
- 69) Saengsirisuwan, V., Peres, FR., Sloniger, JA., *et al.*: Interactions of exercise training and  $\alpha$ -Lipoic acid on insulin signaling in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **287**, E529-536 (2004).
- 70) Yaworsky, K., Somwar, K., Sweeney G., *et al.*: Engagement of the insulin-sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by alpha-lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia.*, **43**, 294-303 (2003).
- 71) Konrad, D., Somwat, K., Sweeney G., *et al.*: The antihyperglycemic drug  $\alpha$ -Lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: Potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes.*, **50**, 1464-1471 (2001).
- 72) Suh, JH., Shenvi, SV., Dixon, BM., *et al.*: Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceed. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 3381-3386 (2004).
- 73) Konard, D.: Utilization of the insulin-signaling network in the metabolic actions of alpha-lipoic acid-reduction or oxidation?. *Antioxid. Redox. Signal.*, **7**, 1032-1039

(2005).

- 74) Moini, H., Packer, L., Saris NE.: Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **182**, 84-90 (2002).
- 75) Moini, H., Tirosh, O., Park, YC., *et al.*: R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem. Biophys.*, **397**, 384-391 (2002).
- 76) Maddux, BA., See, W., Lawrence, JC., *et al.*: Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of  $\alpha$ -Lipoic acid. *Diabetes.*, **50**, 404-410 (2001).
- 77) Blair, AS., Hajdich, E., Litherland, GJ., *et al.*: Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **274**, 36293-36299 (1999).
- 78) Wang, Y., Li, X.:  $\alpha$ -Lipoic acid increases energy expenditure by enhancing adenosine monophosphate activated protein kinase peroxisome. *Metabolism Clinical and Experimental*, **59**, 967-976 (2010).



## 第2章 α リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の作製と物性評価

### 1) 背景と目的

#### (1) R-リポ酸の安定化技術

前述の通り、リポ酸分子は C<sub>6</sub> 炭素原子にキラル中心を持っているので R 体と S 体の2種類の光学異性体が存在するが、生体内では R-リポ酸のみが腸内細菌などにより生合成されている。一方、日本において市販されているリポ酸含有サプリメントや栄養補助食品には R 体と S 体を等量ずつ含むラセミ体が主に使用されている。その理由の一つとして、R-リポ酸の安定性がラセミ体より低いことが挙げられる。R-リポ酸は、空気、熱、光などの物理刺激により容易に分解し、粘着性を有する不溶性ポリマーに変化する。また、このポリマーは摩擦熱、圧縮、低 pH 環境下においても生成する。従って、これらの刺激に耐えうる R-リポ酸の安定化方法の開発は食品分野等において大きな意義をもつものである。

これまでに、R-リポ酸の安定化に取り組んだ事例はいくつか報告されている。例えば、①ナトリウムなどのアルカリ金属イオンやアミノ酸などの塩基性物質と塩を作る方法や、②セレンなどの無機物と誘導体を合成する方法、③キトサンや環状オリゴ糖などの多糖類と複合化させる方法、などがある。①リポ酸-アルカリ或いはアルカリ土類金属塩として作られているものとしては、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、などがあり、現在ナトリウム塩は米国で既に流通しており、サプリメント等の食品にも配合されている。塩基性物質との塩としてはトリス塩(トリスヒドロキシメチルアミノメタン (tris(hydroxymethyl)aminomethane))がよく知られているが、Zhang ら<sup>1)</sup>はリポ酸といくつかのアミノ酸を組み合わせて結晶を作製し、それら複合化した結晶の熱力学的解析を行い、中でも唯一フェニルアラニンがリポ酸と何らかの相互作用を示したと報告している。②リポ酸誘導体としては、リポ酸の S 原子の代わりに同族の Se で二つの S 原子を置き換えたセレン誘導体(1,2-diselenolane-pentanoic acid (SeLA)<sup>2)</sup>)や、R-リポ酸のカルボン酸部分をアミド結合で炭素鎖を伸ばし、末端をジメチルアンモニウム(プラス電荷)として導入した誘導体(LA-plus)<sup>3)</sup>、また、ヒスチジンジチオオクタナミド<sup>4)</sup>などが実際に合成されている。セレン誘導体は O/W 分配係数が高く、油相に多く存在できる。また、LDL の脂質過酸化反応抑制効果がリポ酸そのものよりも高いことが知られている。一方、LA-plus は、T 細胞への取り込み量や T 細胞中での還元反応がリポ酸そのものよりも高いことが知られている。ヒスチジンジチオオクタナミドとは、リポ酸に必須アミノ酸の L-ヒスチジンをカップリングさせ、N-リポイルヒスチジンを経て、亜鉛で還元・キレート化させて合成された安定な化合物で、本化合物は出発原料のα リポ酸よりも抗酸化力が強く安定で、そのナトリウム塩は水溶性を示す。水溶液は低刺激性で還元作用を示すが、空気中の酸素に酸化されず、安定であると言われている。しかしながら、これらの誘導体は医薬品開発という観点からは重要であるが、今のところ食品としての利用は難しい。

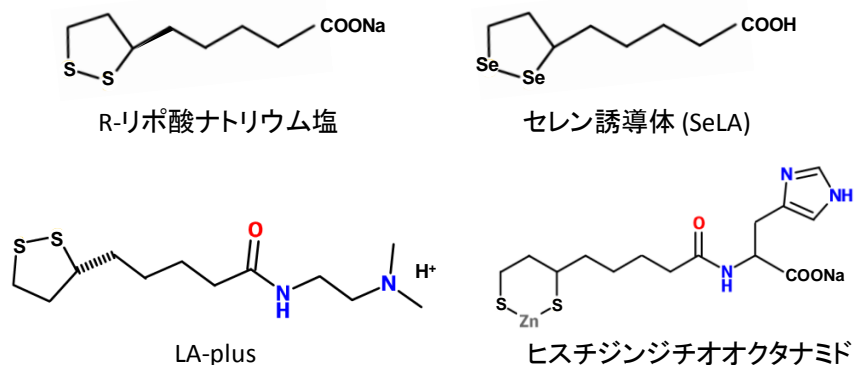


図7. リポ酸ナトリウム塩及び各誘導体の構造

③多糖類を用いた物質の安定化に関して、近年、エビやカニの甲羅から抽出・製造されるキトサンを利用してDNA やヨウ素など様々な物質の安定化が報告されており、同様の技術をリポ酸の安定化にも応用しリポ酸-キトサン複合体が作製された事例がある。リポ酸-キトサン複合体の作製方法は比較的容易で、リポ酸水溶液にキトサンを加えて振とうして沈殿物を得る方法<sup>5)</sup> や、リポ酸水溶液に有機溶媒を加えて溶解させ、噴霧乾燥させる方法<sup>6)</sup> などがある。水溶液中でキトサンと複合化させる方法では、キトサン複合体にすることによりリポ酸そのものよりも熱安定性が向上し、アルカリ水溶液中ではリポ酸-キトサン複合体からリポ酸がリリースされることから、経口摂取した場合、腸管内でリポ酸がリリースされることが予想される。しかしながら、リポ酸-キトサン複合体中のリポ酸含有量が4%とそれほど高くなく、実用面ではまだ改善の余地が残されている。一方、有機溶媒で溶解させてから噴霧乾燥する方法を用いて作製したリポ酸-キトサン複合体では、リポ酸の抗酸化力が複合化前とほぼ同じレベルに維持されている。また、リポ酸-キトサン複合体からのリポ酸の抽出に時間がかかることから、経口摂取した場合、腸管内でのリリースが非常に緩やかであると予想される。

その他の安定化技術として興味深いものとしては、炭酸カルシウムを用いたカプセル化技術でリポ酸を安定化した報告例がある。Nishiura ら<sup>7)</sup>は、この炭酸カルシウムで安定化したリポ酸の粒度分布を測定し、その粒径が10nm程度であると報告している。60°Cにおける安定性は極めて高くほぼ100%であることが示されており、リポ酸以外の物質にも応用できる技術として汎用性があるが、固体粉末中に配合できるリポ酸の量はシクロデキストリンやキトサンを用いる方法よりも低いようだ。

## (2)シクロデキストリンを利用した安定化

本研究ではキトサンと同じく多糖類に分類される環状オリゴ糖の一種であるシクロデキストリン

を用いてリポ酸-シクロデキストリン包接複合体を作製し、その安定性を評価した。背景について以下に述べたい。

シクロデキストリン(以下, CD) は 1891 年には既に発見されていたが 1970 年代に入って初めて日本において工業生産されるようになった。そして, CD が実際に工業的に広く利用されるようになったのはごく最近のことである。1980 年以降, 世界の中でも特に日本を中心として様々な分野で用途開発の検討が始められた。食品・化粧品分野においても同様の傾向にあり, 初期の応用開発例についてはいくつかの文献にまとめられている<sup>8-10)</sup>。しかし, CD の製造および用途開発で日本は先導的な立場にありながら, 欧米と比較すると食品・化粧品分野において未だ CD は一般的な成分として広く認知されているとは言い難い。その最も大きな理由は, かつて $\beta$ -CD のみが安価に大量生産できたため,  $\beta$ -CD のみが経済的に利用可能であるといった見方が日本国内において根強く残っており, 可溶化や分散化, 味覚改善など様々な用途開発において非常に重要な $\alpha$ -CD や $\gamma$ -CD, あるいは, 化学修飾体の利用をためらう研究開発者が未だに多いからだと考えられる。

1980 年代に入り, バイオテクノロジーの進歩は,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD の 3 種の高選択的製造法をもたらした<sup>11)</sup>。そして, 2000 年にはこれら 3 種すべての CD が経済的な手法で製造されるようになった。それまで非常に高価であった $\gamma$ -CD の価格帯も従来の約 100 分の 1 以下まで下がったことで, 食品・化粧品分野において CD の利用頻度は世界的に急増しつつある。また, 現在では CD のヒドロキシ基を化学修飾して水溶性を高めたヒドロキシプロピル化 CD なども工業的に生産され, 家庭用品や化粧品分野での利用が可能になっている<sup>12)</sup>。本章では, 食品・化粧品分野において最近注目されている CD を用いた安定化技術について研究した成果を紹介する。

CD は澱粉類にシクロデキストリン生成酵素(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) を作用させて得られる環状オリゴ糖である。グルコース分子が $\alpha$ -1,4 グリコシド結合で環状に連なった化合物で, 天然にも存在している。グルコース単位が 6, 7, 8 個のものをそれぞれ $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD と呼んでいる。それぞれの CD は特徴を有しており, 室温で 100 mL の水に対する溶解度はそれぞれ 14.5, 1.85, 23.2 g と $\alpha$ -CD や $\gamma$ -CD は $\beta$ -CD に比べて, 各々約 8 倍, 約 13 倍高い。また,  $\alpha$ -CD は消化酵素で分解されないので食物繊維として用いることができ,  $\gamma$ -CD は生体内で単糖にまで分解されるのでエネルギーとして利用することができる。これらの特性から,  $\alpha$ -CD や $\gamma$ -CD の食品・化粧品用途での利用価値は高い。

CD は図 8 に示すようなバケツ構造を有しており, 外部は親水性を, 内部は疎水性を示す非常にユニークな物質である。CD はこの疎水性空洞内にいろいろな分子を包みこむように取りこむ。これを「包接」といい, 内部に分子を取りこんだ状態の CD を「包接体」という。この包接体を形成

する性質(包接作用) は多種多様な用途に利用できる。以下に、その代表的なものを挙げる。

**安定化:** 光, 紫外線, 熱に不安定な物質や, 酸化, 加水分解されやすい物質を包接し安定する。

**徐放:** 練りワサビなどの辛味成分や香料などの有用成分をあらかじめ包接しておき, 徐々に放出する。

**生体利用能(バイオアベイラビリティ) 向上:** 有効成分を包接することで分子間力を断ち切り, 凝集性を改善することにより, 有効成分を分子レベルで効率よく生体内へ移行する。

**マスキング:** カテキンなどの苦味や嫌な臭いなどを改善する。

**水への可溶化・分散化:** 水に溶けにくい物質を水に可溶化, あるいは, 分散化する。

**粉末化:** 気体, 液体を包接して安定な粉末にし, 取扱いを容易にする。

**吸湿性・潮解性防止:** 吸湿性の高い物質の吸湿, 潮解を防止する。

**洗浄効果:** 脂溶性物質を包接化し, 汚れを除去する。

**粘度調整:** 粘度の高い物質を分子レベルで包接することで分子間力を断ち切り, 粘度を下げる。

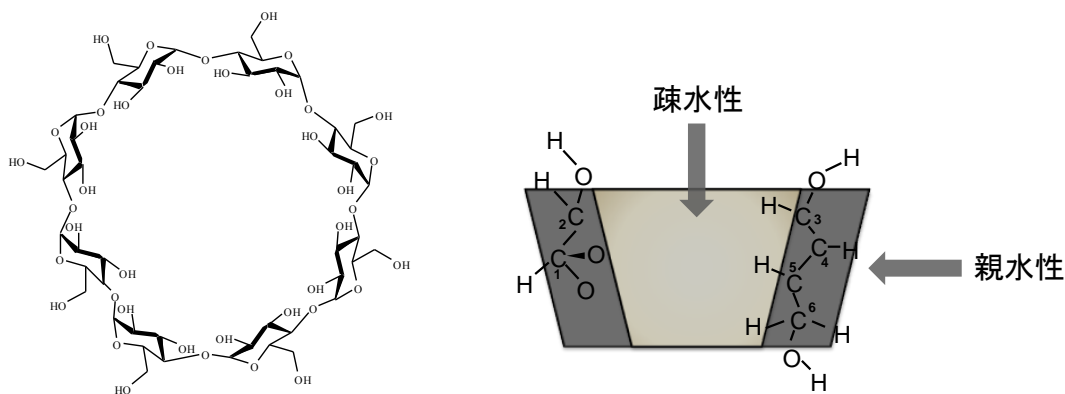


図8.  $\gamma$ -CDの環状構造(左)と横から見た模式図(右)

現在、これらの機能を利用したさまざまな CD を含有する機能性食品や化粧品が現在開発・発売されている。本研究では、シクロデキストリンを用いてリポ酸-シクロデキストリン包接複合体を作製し、その安定性を評価したのでそれを報告する。

## 2) 実験

## 2-1) $\alpha$ リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の作製

### <試薬>

試験にはR(+)- $\alpha$  リポの光学純度が $\%ee=98\%$ 以上のR(+)- $\alpha$  リポ酸ナトリウム塩(Na(RALA)) (株式会社東洋発酵)を使用した。また、シクロデキストリンとしてはドイツワッカーケミー社製の $\alpha$  シクロデキストリン(製品名:CAVAMAX W6F),  $\beta$  シクロデキストリン(製品名:CAVAMAX W7P),  $\gamma$  シクロデキストリン(製品名:CAVAMAX W8F)を使用した。

### <包接体の作製方法>

所定量のイオン交換水にR(+)- $\alpha$  リポ酸ナトリウム塩 5gを溶解させ、R(+)- $\alpha$  リポ酸と $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  各CDの混合モル比が1:1となるように各CDを加え、攪拌機(EYELA(アイラ) NZ-1000 東京理化学器械株式会社)にて十分に攪拌した。攪拌を続けながら、その懸濁液に1mol/l塩酸(和光純薬株式会社) 24mlをゆっくりと添加し、遮光した状態で凡そ18時間攪拌した。塩酸滴下中も含め攪拌終了までの工程において液温は $25^{\circ}\text{C}$ 以下であった。この懸濁液を一晩冷凍庫にて遮光した状態で保管した後、フリーズドライヤー(EYELA(アイラ) FD-1000 東京理化学器械株式会社)を用いて凍結乾燥させると黄白色の粉末状のR(+)- $\alpha$  リポ酸-各CD包接複合体が得られた。(写真1)

<作製の手順と様子>

イオン交換水に $\alpha$ リポ酸Na塩を溶解(写真1)

← CDを添加(写真2)

**RALA:CD=1:1モル**

← 1mol/L 塩酸を滴下(写真3)

遮光して約18時間攪拌(写真4)

凍結乾燥

乳鉢で粉砕



写真1.  $\alpha$  リポ酸-CD包接体作製の様子

また、同様の作製方法にてR(+)- $\alpha$  リポ酸と各CDの混合モル比違いの包接体を作製した。CDの環状構造の大きさを考慮し、R(+)- $\alpha$  リポ酸: $\alpha$ -CD(モル比)=1.5:1及び2:1、 $\beta$ -CDについても同様に、R(+)- $\alpha$  リポ酸: $\beta$ -CD(モル比)=1.5:1及び2:1、また $\gamma$ -CDについては、R(+)- $\alpha$  リポ酸: $\gamma$ -CD(モル比)=1.5:1、2:1、3:1となるように処方値を設定し包接体を作製した。但し、攪拌時間は2時間で十分であることを確かめ、これ以降の包接体作製において攪拌は2時間とした。

## 2-2) $\alpha$ リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の物性評価

### (1) 含有量の確認

R(+)- $\alpha$  リポ酸-各CD包接複合体中のR(+)- $\alpha$  リポ酸の含有量をHPLC(高速液体クロマトグラフィー)にて測定した。測定に用いた装置および分析条件を以下に記す。本実験ではR(+型)とS(-)型とを分離可能なキラルカラムを用いた。標準物質としてはR(+型)とS(-)型を等量ずつ含むラセミ体である、DL- $\alpha$  リポ酸(フルカケミカル社)を用い、得られた標準物質のR(+型)とS(-)型の各ピーク面積を用いて試料中のR(+)- $\alpha$  リポ酸の含有量を計算した。

## 装置

HPLC: LC-2010、島津製作所

カラム: CHIRALPAK AD-RH、Daicel (4.6mm I.D. x 150mm)

## 分析条件

流量: 0.6ml/min

温度: 25°C

検出器: UV 215nm

注入量: 10 $\mu$ l



図9. 標準物質と RALA-CD の HPLC チャート

測定数: n=3 (各サンプル)

保持時間(RT): 38 分 (R- $\alpha$  リポ酸)

ピークの同定: WS の RT(n=5)と各サンプルの RT (n=3)の%RSD<3%

## <結果>

作製した包接体に含まれる R(+)- $\alpha$  リポ酸及び S(-)- $\alpha$  リポ酸を HPLC にて定量した。分析結果を以下の表に記す。

	RALA- $\alpha$ CD	RALA- $\beta$ CD	RALA- $\gamma$ CD	RALA-G2 $\beta$ CD	RALA-isoelatP
<b>formula</b>	15.55%	13.71%	12.29%	11.08%	9.75%
actual-1	11.69%	13.18%	11.87%	7.70%	8.80%
actual-2	11.80%	13.31%	11.79%	7.72%	8.78%
actual-3	11.70%	13.52%	12.00%	7.73%	8.65%
<b>actual-ave</b>	<b>11.7%</b>	<b>13.3%</b>	<b>11.9%</b>	<b>7.7%</b>	<b>8.7%</b>
<b>S.D</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>%RSD</b>	0.51%	1.27%	0.90%	0.19%	0.93%

表1. R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体中の R- $\alpha$  リポ酸の含有量の理論値と実際の分析値

また、同様に S 体についても包接体を作製した。

分析結果を以下に示す。

	SALA- $\alpha$ -CD	SALA- $\beta$ -CD	SALA- $\gamma$ -CD
<b>formula</b>	15.58%	13.94%	12.30%
actual-1	14.61%	13.77%	11.20%
actual-2	14.59%	13.50%	11.32%
actual-3	14.52%	13.71%	11.09%
<b>actual-ave</b>	<b>14.6%</b>	<b>13.7%</b>	<b>11.2%</b>
<b>S.D</b>	0.00	0.00	0.00
<b>%RSD</b>	0.32%	1.05%	1.05%

表2. S(-)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体中の S- $\alpha$  リポ酸の含有量の理論値と実際の分析値

R 体に関しては、混合モル比を変えた包接体を同様に作製し、含有量の確認を行った。

混合モル比を変えた包接体の分析結果は通りである。



	RALA- $\alpha$ CD	RALA- $\beta$ CD	RALA- $\gamma$ CD	RALA- $\gamma$ CD	RALA- $\gamma$ CD
	2:1	2:1	1.5:1	2:1	3:1
<b>formula</b>	27.87%	24.80%	18.47%	22.49%	29.31%
actual-1	23.40%	14.61%	16.73%	22.31%	28.00%
actual-2	23.78%	14.96%	16.63%	18.66%	27.43%
actual-3	23.41%	14.67%	16.53%	-	27.03%
<b>actual-ave</b>	<b>23.5%</b>	<b>14.7%</b>	<b>16.6%</b>	<b>20.5%</b>	<b>27.5%</b>
<b>S.D</b>	0.00	0.00	0.00	-	0.00
<b>%RSD</b>	0.92%	1.27%	0.59%	-	1.78%

表3. 混合モル比違いの R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体中の R- $\alpha$  リポ酸の含有量の理論値と実際の分析値

RALA と  $\beta$ -CD のモル比が 2:1 の包接体では、RALA 含有量 20% を達成できなかった。

## (2) 収率

HPLC を用いて作製した各包接複合体中の R(+)- $\alpha$  リポ酸含有量の確認を行った。処方から計算される理論値に対して、実際に得られた R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体中の R(+)- $\alpha$  リポ酸の含有量の割合を百分率で表し、これを収率として計算した。収率は R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体の製造プロセスが適しているかを検討するための指標とした。

$$\text{収率(\%)} = \frac{\text{実際の}\alpha\text{リポ酸収量}}{\text{理論収量}}$$

## <結果>

HPLC の分析結果と理論上の収量から収率を計算した。結果以下の通りである。

	RALA- $\alpha$ CD	RALA- $\beta$ CD	RALA- $\gamma$ CD	RALA-G2 $\beta$ CD	RALA-isoeleatP
<b>actual-ave</b>	<b>11.7%</b>	<b>13.3%</b>	<b>11.9%</b>	<b>7.7%</b>	<b>8.7%</b>
Recovery-1	75.2%	96.2%	96.6%	69.5%	90.3%
Recovery-2	75.9%	97.1%	95.9%	69.7%	90.0%
Recovery-3	75.2%	98.6%	97.6%	69.7%	88.7%
<b>Recovery</b>	<b>75.4%</b>	<b>97.3%</b>	<b>96.7%</b>	<b>69.6%</b>	<b>89.7%</b>
<b>S.D</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>
<b>%RSD</b>	<b>0.51%</b>	<b>1.27%</b>	<b>0.90%</b>	<b>0.19%</b>	<b>0.93%</b>

表4. R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体の収率の理論値と実際の計算結果

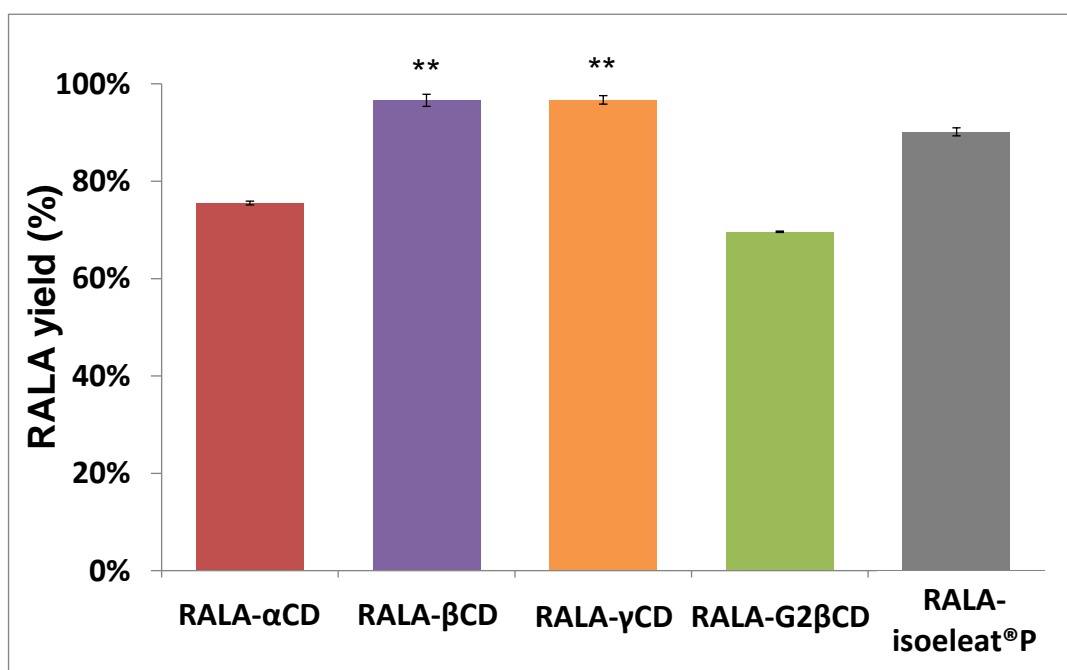


図10. R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体の製造時の収率

R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\beta$  CD (RALA- $\beta$  CD) 及び  $\gamma$  CD 包接複合体では  $\alpha$  CD 包接複合体 (RALA- $\alpha$  CD) に比べて収率が高いことが確認された(図10)。すなわち、R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD 包接複合体では収率 75%、R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\beta$  CD 及び  $\gamma$  CD 包接複合体では、収率 91%であった。 $\beta$  CD 及び  $\gamma$  CD が本包接複合体製造プロセスに最も適していた。

S- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体の計算結果は以下の通りである。

	SALA- $\alpha$ -CD	SALA- $\beta$ -CD	SALA- $\gamma$ -CD
<b>actual-ave</b>	<b>14.6%</b>	<b>13.7%</b>	<b>11.2%</b>
Recovery-1	93.8%	98.8%	91.1%
Recovery-2	93.7%	96.8%	92.0%
Recovery-3	93.2%	98.3%	90.1%
<b>Recovery</b>	<b>93.5%</b>	<b>98.0%</b>	<b>91.1%</b>
<b>S.D</b>	0.00	0.01	0.01
<b>%RSD</b>	0.32%	1.05%	1.05%

表5. S(-)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体の収率の理論値と実際の計算結果

混合モル比を変えた包接体の計算結果は以下の通りである。

	RALA- $\alpha$ CD	RALA- $\beta$ CD	RALA- $\gamma$ CD	RALA- $\gamma$ CD	RALA- $\gamma$ CD
mole ratio	<b>2:1</b>	<b>2:1</b>	<b>1.5:1</b>	<b>2:1</b>	<b>3:1</b>
<b>actual-ave</b>	<b>23.5%</b>	<b>14.7%</b>	<b>16.6%</b>	<b>20.5%</b>	<b>27.5%</b>
Recovery-1	84.0%	58.9%	90.6%	99.2%	95.5%
Recovery-2	85.3%	60.3%	90.0%	83.0%	93.6%
Recovery-3	84.0%	59.2%	89.5%		92.2%
<b>Recovery</b>	<b>84.4%</b>	<b>59.5%</b>	<b>90.0%</b>	<b>91.1%</b>	<b>93.8%</b>
<b>S.D</b>	0.01	0.01	0.01		0.02
<b>%RSD</b>	0.92%	1.27%	0.59%		1.78%

表6. 混合モル比違いの R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体の収率の理論値と実際の計算結果

$\gamma$ -CD を用いた場合、RALA とのモル比を変えた包接体を作製しても、製造工程で RALA がほとんど分解あるいはポリマー化することなく、RALA 含有量20%を達成することができた。

### (3) DSC

包接化されていることを確認するため示差走査熱量分析(DSC)(DSC-60、島津製作所製)にて R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体の DSC 曲線を測定した。以下に測定条件を示す。

測定温度: 30-100°C

昇温速度: 3°C/min

ガス : Air

パン : アルミニウムセル

<結果>

得られた黄白色の R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体について、示差走査熱量分析(DSC)により、DSC 曲線を測定したところ、R(+)- $\alpha$  リポ酸では 50 °C 付近に融解ピークが観察されたが、R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体では $\alpha$  CD、 $\beta$  CD、 $\gamma$  CD いずれについても 30°C~100 °C の範囲ではピークは観察されなかった(図11)。この結果から、R(+)- $\alpha$  リポ酸は各 CD (isoeleat®Pを除く)により完全に包接化されていることが確認された。

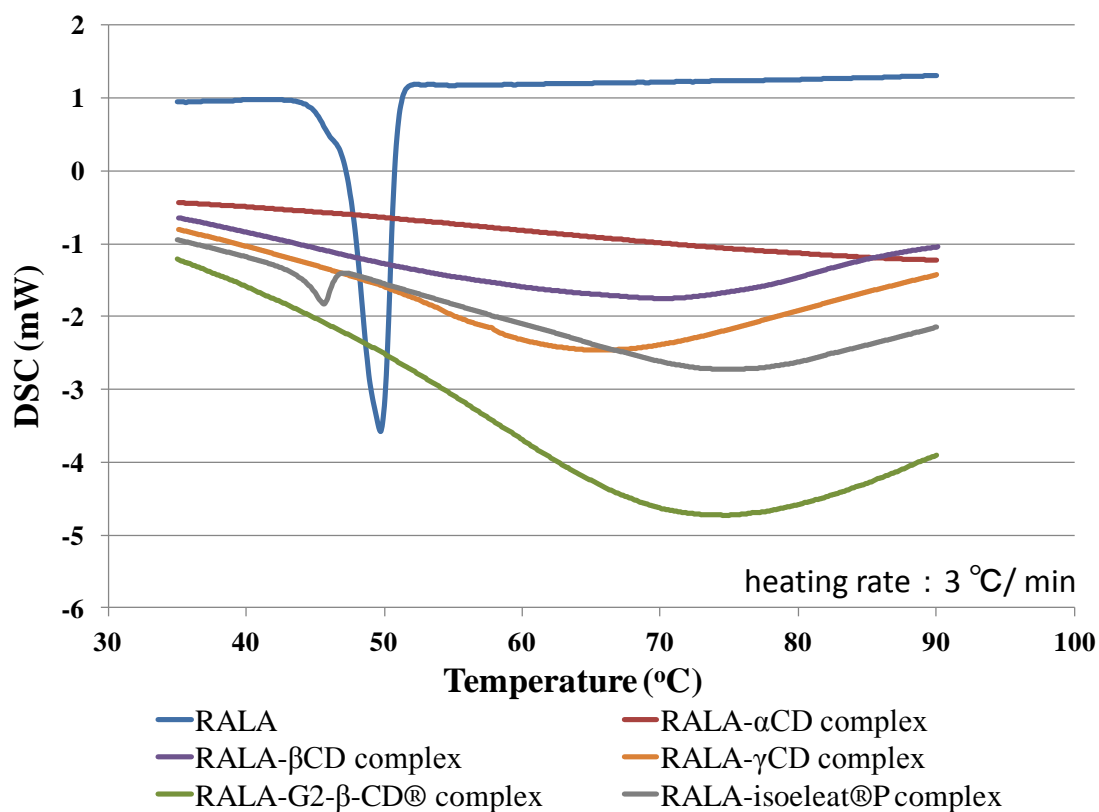


図11. R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体の DSC 分析結果

S- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体の DSC 測定結果を以下に示す。

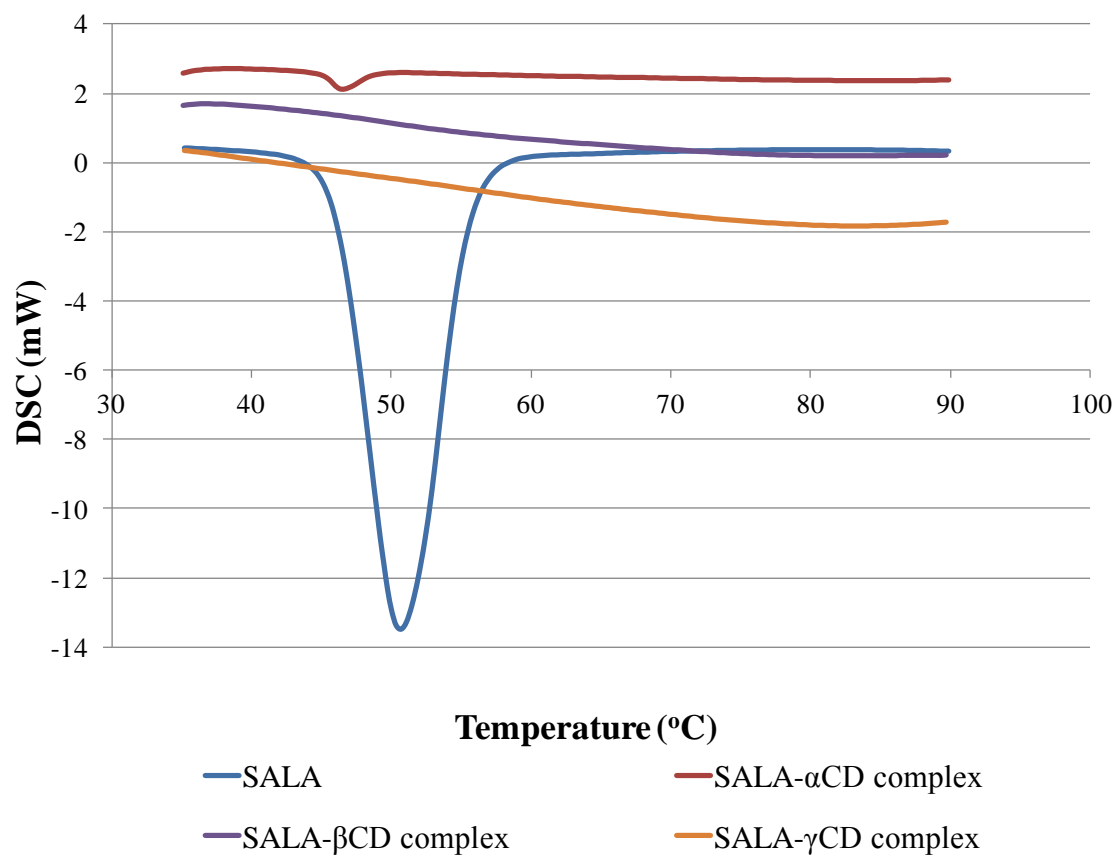


図12. S(-)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体の DSC 分析結果

S- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD 包接体では、未包接のリポ酸が残っていることが示唆された。別のロットでも同様の結果になった。

混合モル比を変えた包接体の分析結果は通りである。

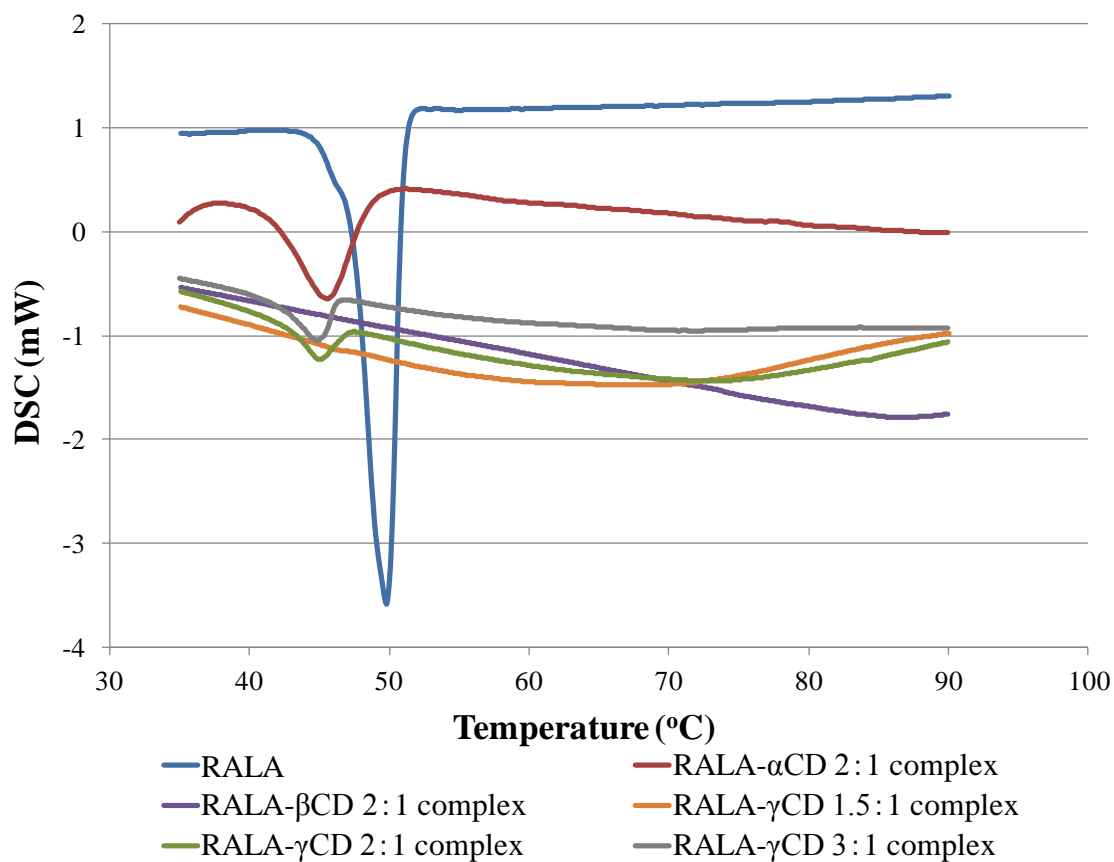


図13. 混合モル比違いのR(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体の DSC 分析結果

$\alpha$  CD1モルでは、2 モルのリポ酸を包接できないことが分かった。また、 $\beta$  CD でも同様の結果であった。一方、 $\gamma$  CD1モルで、1.5 モルのリポ酸を包接できることを示唆する結果となった。但し、2 モル以上のリポ酸を包接することはできないことが分かった。

#### (4) SEM

得られた粒子表面を観察するために、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて分析を行った。

SEM 分析用パラジウム製の試料台に伝導性の接着剤を固定し、その上に R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体を乗せ、金を用いて試料表面を3分間コーティングした。次に、S-4500(日立製作所)を用いて15 kVの条件にてSEM画像を撮影した。各サンプルにつき異なる3か所を任意に選び、選んだ一か所毎に300倍、500倍、1000倍、5000倍の倍率で撮影を行った。即ち、一サンプルにつき合計12枚のSEM写真を撮影した。

<結果>

結果を以下の図14に示す。得られた SEM 写真を観察したところ、R(+)- $\alpha$  リポ酸と各 CD の物理混合物 (physical mixture) では粒子表面にひび割れやしわが観察され、また小さい粒子が大きい粒子の表面に付着している様子からもわかるように、粒子サイズが不均一で、大きな粒子では 50 $\mu$ m 以上のサイズであった。一方、R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体 (complex) では粒子表面が比較的滑らかで小さな粒子が集まっている様子が観察された。また、R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体は包接化に用いた CD の種類によって粒子形状が異なり、 $\alpha$  CD 包接複合体では層状の、 $\beta$  CD 包接複合体では菱形の、 $\gamma$  CD 包接複合体では柱状の粒子が集合している様子が観察された。いずれの CD についても物理混合物に比べて粒子サイズは一様に小さくなっていることが図3から見て取れる。この結果から、R(+)- $\alpha$  リポ酸と各 CD を 1:1 モルの混合比で包接化処理した R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体では R(+)- $\alpha$  リポ酸と各 CD の物理混合物とは異なる形状と表面を有する粒子に変化し、また粒子サイズが小さくなる傾向が SEM 画像の粒度解析結果から明らかになった。

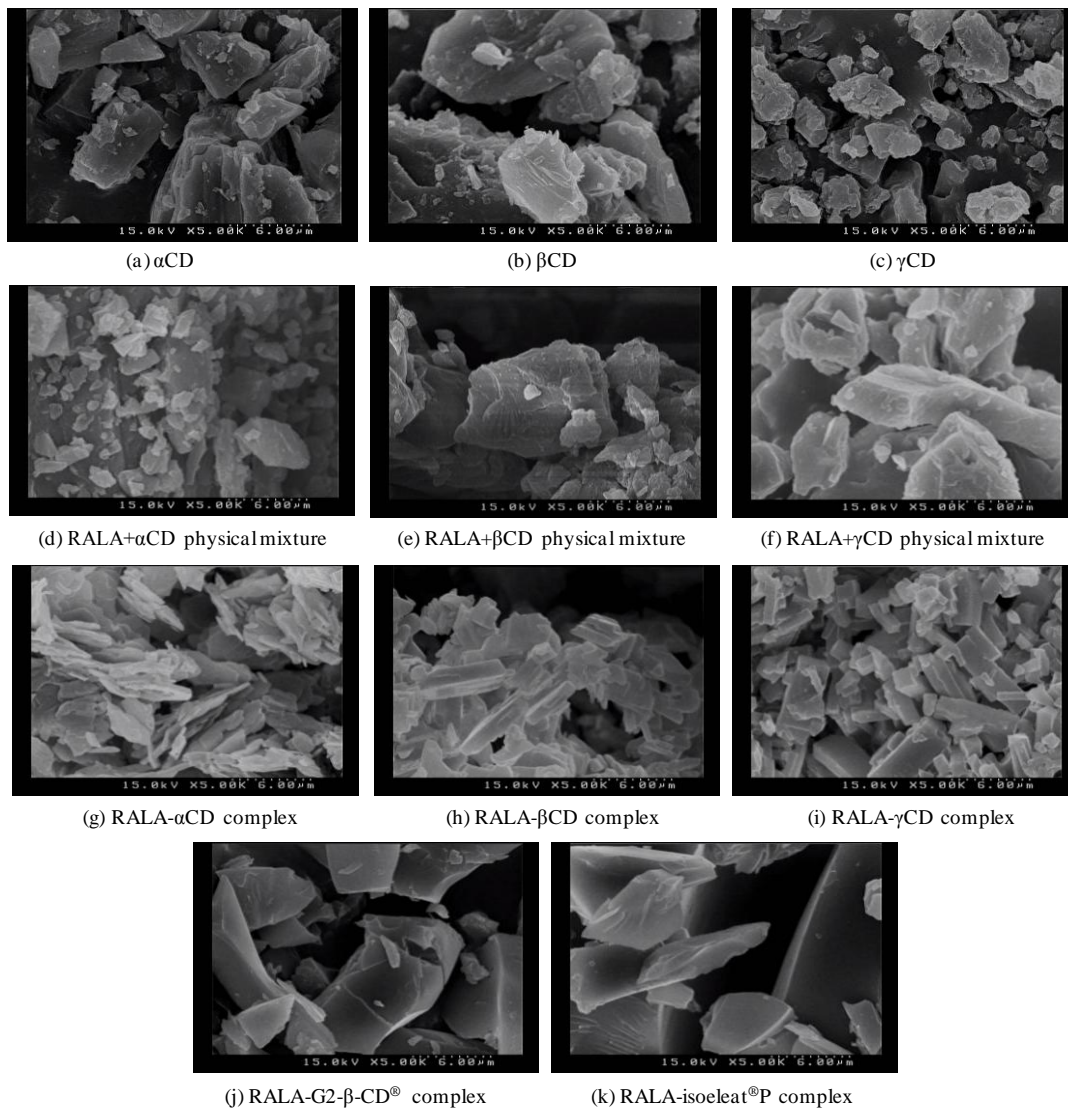


図14. 各 CD 及び R(+)- $\alpha$  リポ酸との物理混合物、R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体の SEM 写真  
 (左列は物理混合物、右列は包接複合体。上から  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  CD。5000 倍)

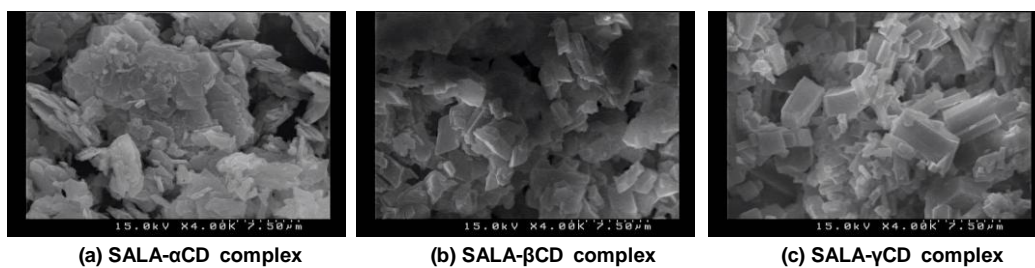


図15. S(-)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体の SEM 写真(4000 倍)



S- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体でも R- $\alpha$  リポ酸と同様に $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CD でそれぞれ特徴的な粒子形状が観察された。 $\alpha$  CD 包接体では層状の、 $\beta$  CD 包接体ではひし形の、 $\gamma$  CD 包接体ではロッド状の粒子がそれぞれ観察された。

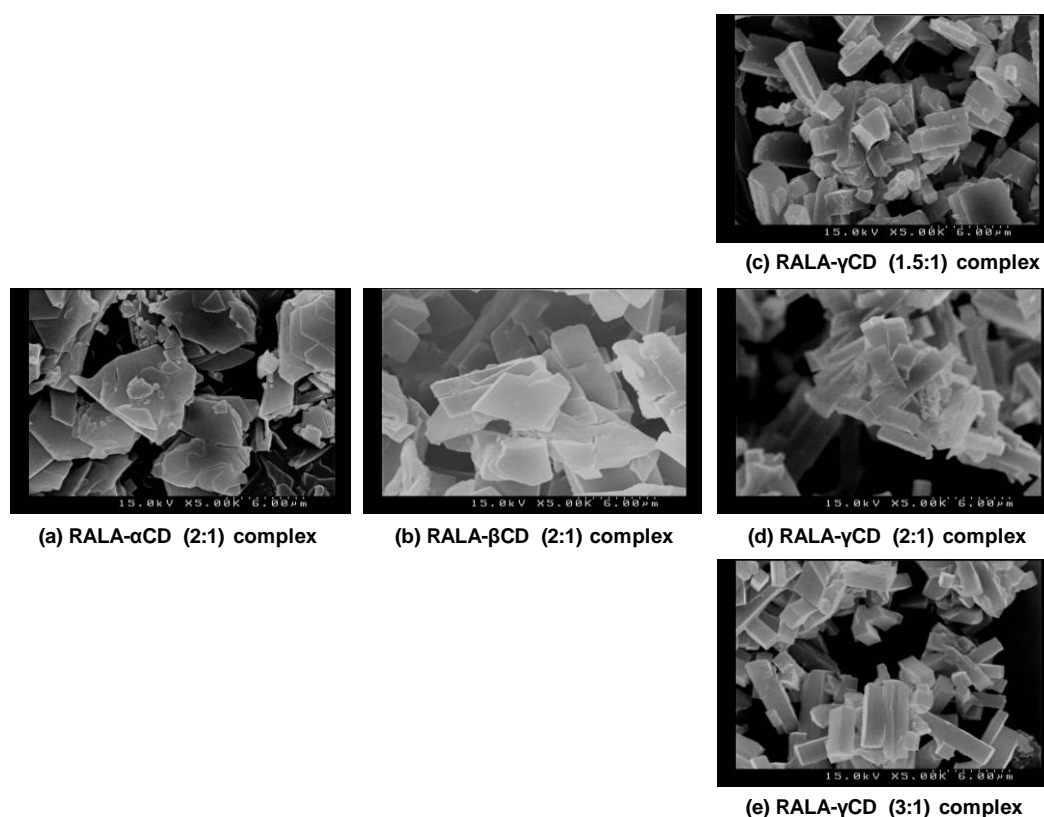


図16. 混合モル比違いの R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体の SEM 写真(5000 倍)

モル比違いの包接体の SEM 写真においても、1:1 モルの包接体と同様に、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  CD それぞれ特徴的な粒子形状を示した。

$\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CD 包接複合体の物性の違いをより詳細に検討するため、以降の実験では混合モル比 1:1 の包接複合体を使用した。

## (5) XRD

得られた粉末の構造に関する情報を得るために粉末 X 線回折装置を用いて X 線回折(XRD)パターンを測定した。測定には Rint 2200(リガク、日本)CuK $\alpha$  線( $\lambda=0.15418\text{nm}$ )を用いた。管電圧は 40 kV、管電流は 40 mA であった。各サンプルをガラス試料板に載せ、 $\theta/2\theta$  法にて  $2\theta$  範囲  $2^\circ\text{--}35^\circ$ 、スキャン速度  $1^\circ/\text{min}$  で測定を行った。

## <結果>

次に、R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体粉末中の結晶情報を得るために X 線回折 (XRD) パターンを Rint 2200 diffractometer (Rigaku, Tokyo, Japan) を用いて測定した。図 17 から分かるように、R(+)- $\alpha$  リポ酸単体では  $2\theta = 17^\circ$ 、 $18.5^\circ$ 、 $21^\circ$ 、 $22^\circ$  付近にシャープなピークが観察される。各 CD はそれぞれ特徴的な XRD パターンを示している。また、各物理混合物 (PM) は CD と R(+)- $\alpha$  リポ酸のパターンを足し合わせたパターンを概ね示している。ところが、R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体 (COM) では R(+)- $\alpha$  リポ酸、CD、それらの物理混合物、いずれとも異なる XRD パターンを示すことが分かった。R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD 包接複合体では物理混合物にはなかった  $2\theta = 19.6^\circ$  ( $d = 4.53$ ) 付近に大きなピークを示した。 $\beta$  CD 包接複合体では物理混合物に比べて強度が低いピークが現れた。また、 $\gamma$  CD 包接複合体では全体的にブロードなパターンを示し、R(+)- $\alpha$  リポ酸単体や物理混合物で観察されたピークは消失した。一般的に、ゲスト分子が CD に包接化されるとゲスト分子単体で現れていたピークが消失したり、異なるピークが現れたり、XRD パターンがゲスト分子そのものや CD そのものとは変化することが知られている。本試験の XRD 測定結果においてもパターン変化が観察されたことから、R(+)- $\alpha$  リポ酸と CD の包接複合体が形成されていることが示唆される。本試験の結果では、 $\alpha$  CD 包接体が最も結晶性が高く、次いで  $\beta$  CD 包接複合体、そして  $\gamma$  CD 包接複合体はアモルファスの特徴を呈するパターンを示していることから、包接複合体形成のプロセスによってこれら物質の結晶性が変化したことが分かる。また、ゲスト分子が同じであっても包接に用いた CD の種類により XRD のパターン変化が異なる結果となった。

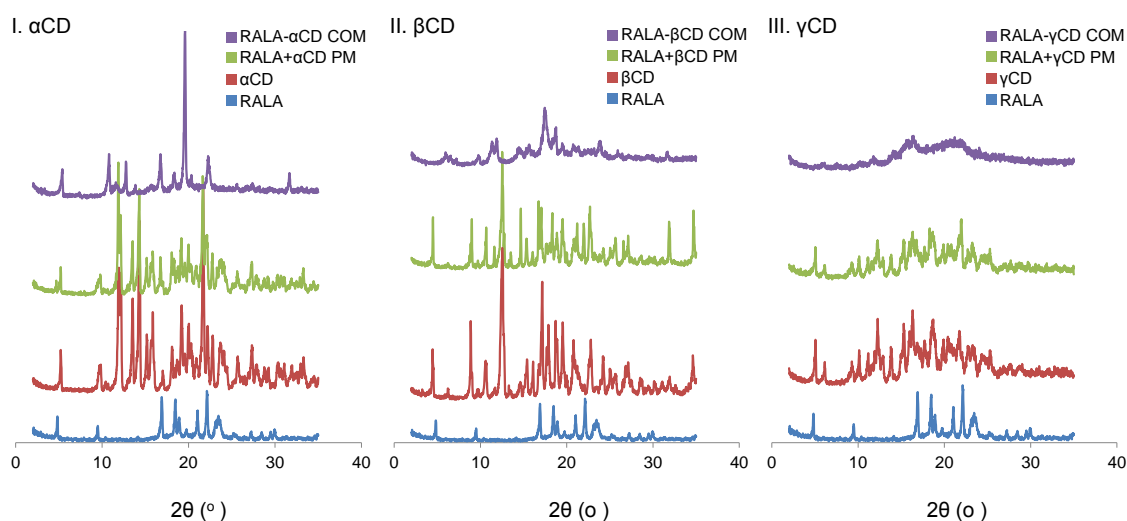


図 17. R- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体の XRD パターン

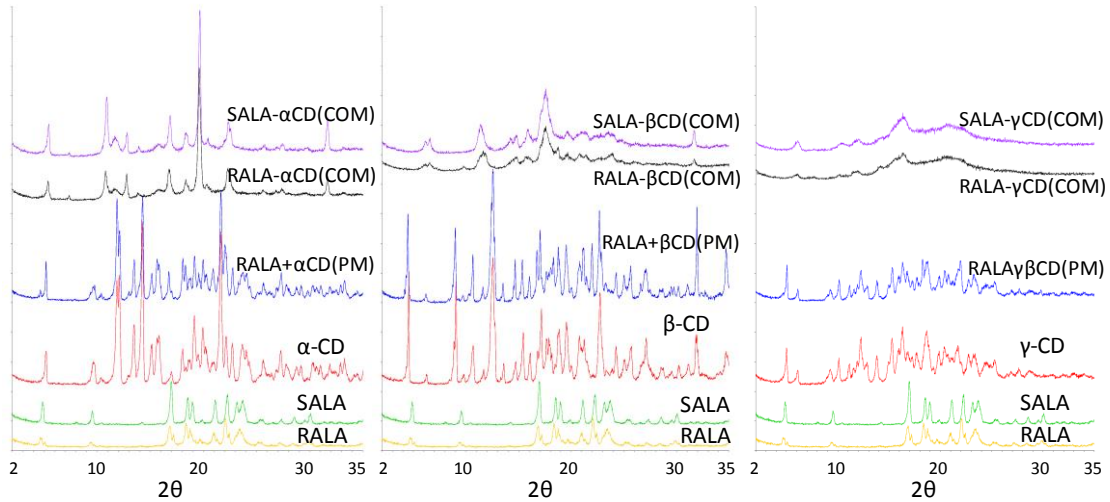


図18. R-及び S-α リポ酸-各 CD 包接複合体の XRD パターン(2θ =2-35 , n=3)

## (6) 粒度分布(レーザードップラー/SEM 写真を用いた粒度解析)

### レーザードップラー法

粒度分布測定装置は LA-920 system (堀場製作所)を使用した。

エタノール 150 ml に固体の CD 粉末を測定に適した範囲(透過率 95%未満)になるまで攪拌しながら徐々に添加し、屈折率 1.30 で粒度分布を測定した。1回の測定が終了する毎に測定部のエタノールを排出し、水を満たして1分間超音波にて洗浄した。その後、排水し、新たにエタノールを入れて次のサンプル測定を行った。測定は各サンプル 3 回実施した。

### <結果>

図19に示すように、α-CD はひとつのピークを示し、その平均メディアン径は 43μ m であった。R(+)-α リポ酸とα-CD の物理混合物も同様に一つのピークを示し、その平均メディアン径は 40μ m であった。これらの結果とは異なり、R(+)-α リポ酸-α CD 包接複合体は二つのピークを示し、その粒径は夫々13μ m と 77μ m であった。

R(+)-α リポ酸-β CD 包接複合体のピークはβ-CD それ自体のピークよりも小さい値を示し、包接することによって粒径は 152μ m から 6μ m へとシフトした。包接による粒度分布の変化はα-CD の場合とは異なるタイプの変化であった。

R(+)-α リポ酸とγ CD の物理混合物では、平均メディアン径が 52μ m の一つのピークを示し、その値はγ-CD それ自体の粒径(55μ m)とほぼ同じ値であった。R(+)-α リポ酸-γ CD 包接複合体では平均メディアン径は 72μ m であった。γ-CD の場合、CD そのものや物理混合物と包接複合体の粒度分布に顕著な違いは観察されなかった。しかしながら、上述の通り、SEM 観察では包

接による明確な表面構造の変化が観察されている。

そこで、R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体と $\gamma$ -CD 及び物理混合物の粒度分布の間に違いがあるかどうかを確かめるために、F 検定および t 検定を実施した。F 検定の結果から、R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体と $\gamma$ -CD もしくは物理混合物の粒度分布には統計的に有意な差はなかった。次に t 検定を行い、その結果、R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体と $\gamma$ -CD もしくは物理混合物の平均メディアン径には有意な違いがあることがわかった。R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体の SEM 写真からは $\gamma$ -CD や物理混合では見られなかった物特徴的なロッド状(柱状)の粒子が観察されたことから、 $\gamma$  CD 包接によって粒子形状や粒度が変化する可能性が示唆された。

レーザードップラー法を用いた粒度分布の測定結果からは、R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体は R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD 包接複合体や R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\beta$  CD 包接複合体とは異なる傾向を示した。 $\alpha$  CD や $\beta$  CD の包接複合体では R(+)- $\alpha$  リポ酸を包接することによって粒度分布が変化した、一方で、 $\gamma$ -CD の場合、包接による粒度分布の変化は一見ないように見えたが平均メディアン径は差があった。これらの結果から、CD 包接化処理は粒子形状や粒度に影響を与えることがわかった。

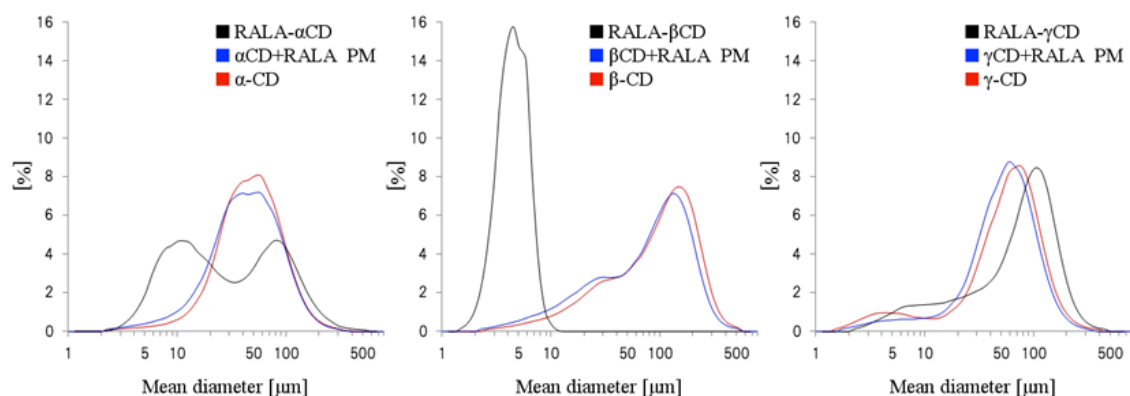


図19. R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体の粒度分布

レーザードップラー法ではエタノール溶媒に粒子を分散させて間接的に粒子径を測定するため、測定するサンプルの溶媒への溶解性が影響する。従って、次にその影響を除外した手法を検討した。

#### SEM 写真を用いた粒度解析法

画像解析ソフトウェア Scandium(OLYMPUS)を用いて(4)で得られた SEM 写真の画像解析を行った。まず初めに、写真上の単位長さをソフトウェアで読み込み、キャリブレーションを行った。次に、画像のコントラストから自動的に粒子を検出させ、検出された粒子を例えば白色で塗りつぶ

した(図20の SEM 写真下)。最後に、塗りつぶされた粒子の面積を計算した。

<解析の一例>

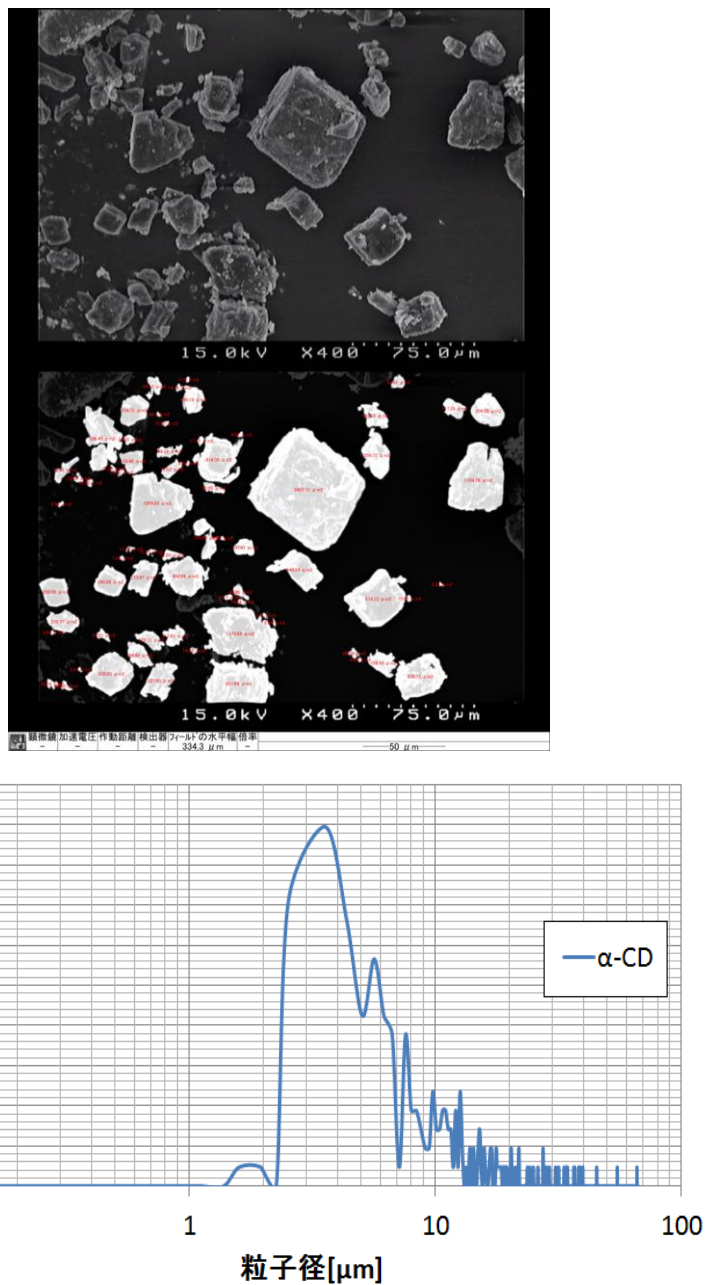


図20. 解析の一例として、α-CD の SEM 写真(上)と投影面積をグラフ化した図(下)

<結果>

SEM 写真をソフトウェアで画像処理することによって得られた粒子の面積をヒストグラムにした。横軸は面積( $\mu\text{m}^2$ )、縦軸は度数  $F(\%)$  である。

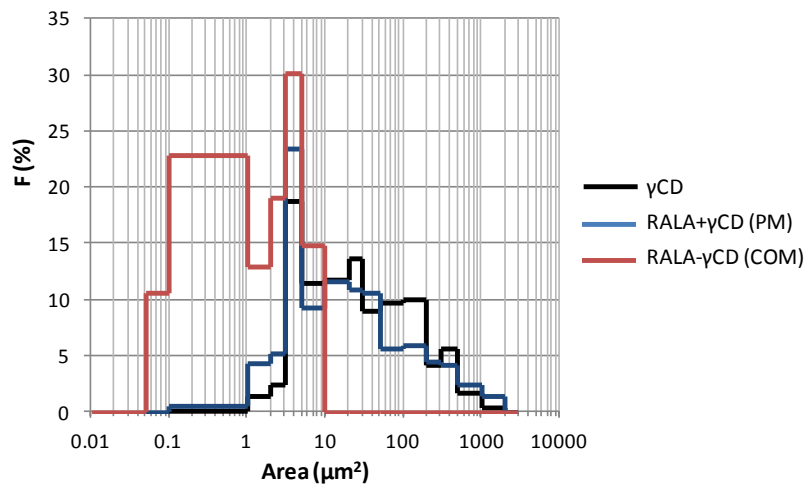
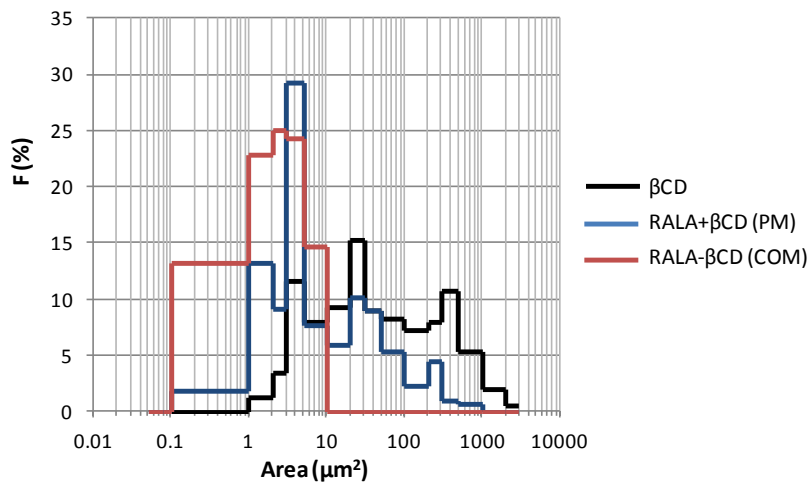
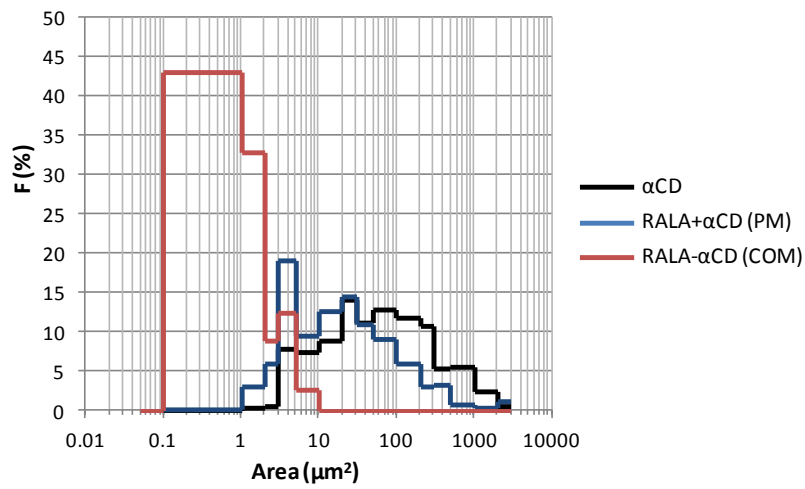


図21. R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体の粒子面積のヒストグラム  
(上から、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  CD)

画像解析の結果から、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  いずれの CD についても包接複合化することによって粒子が小さくなる傾向を示すことがわかった。この結果はレーザードップラー法による粒度計測とは大きな傾向としては一致したが、 $\gamma$ -CD 包接複合体に関しては若干異なる結果となった。

レーザードップラー法では、測定する粒子をエタノール中に添加し分散させたときのレーザーの散乱光を観測して間接的に粒度を算出しているが、SEM 写真による解析では固体の粒子をそのままの状態を観察していることから、粒子の大きさを正確に測定するという観点から数値の信頼性は高い。また、第4章でも議論するが、R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体は $\alpha$  や $\beta$ -CD 包接複合体に比べて水溶性が高く、従ってレーザードップラー法を用いた粒度測定の際にエタノール溶媒中に比較的溶けやすかったため、小さな粒子が観察されにくかったと推察される。

#### (7) FT-IR

R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体の構造を解析することを目的として、赤外線 (IR) 分光法による分析を行った。使用した装置は、FT-IR 720 (堀場製作所) であった。

R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体の粉末 1mg と完全に乾燥させた臭化カリウム (KBr) 100mg を乳鉢で混合し、成形器に入れてプレスし、サンプル錠剤を作製した。

KBr でバックグラウンドを測定し、次いでサンプルの測定を行った。



<結果>

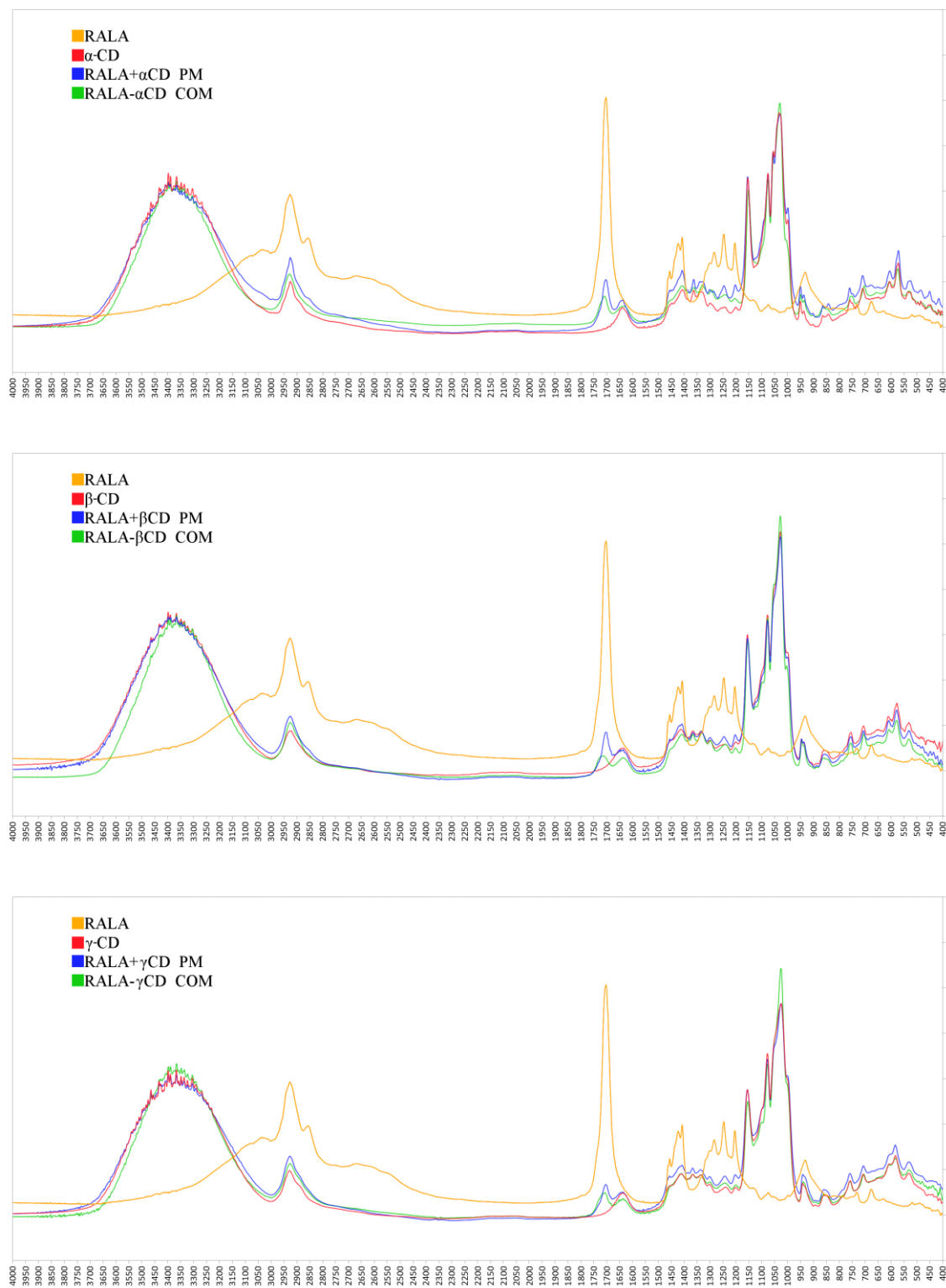


図22. RALA-CD 複合体の赤外線吸収ピーク(4000-400 cm<sup>-1</sup>)  
(上から、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  CD)



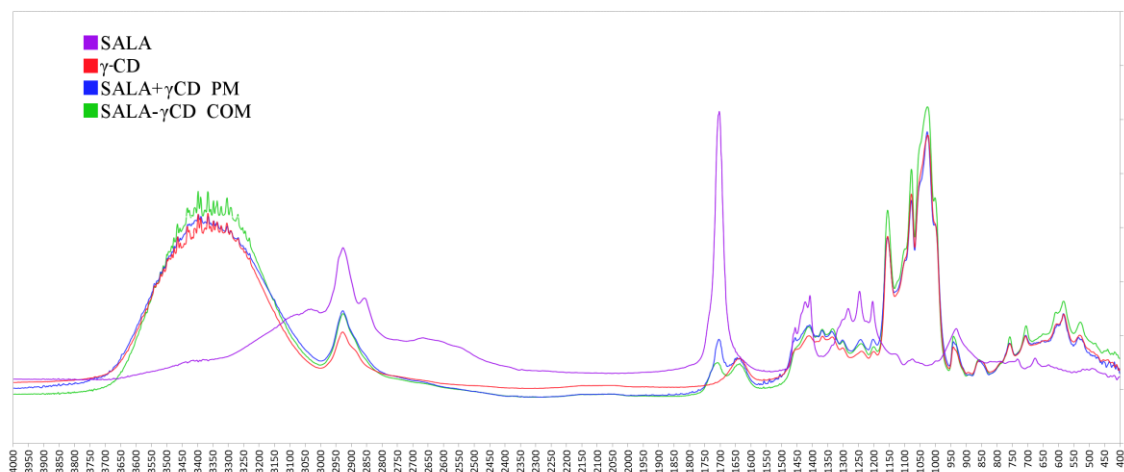
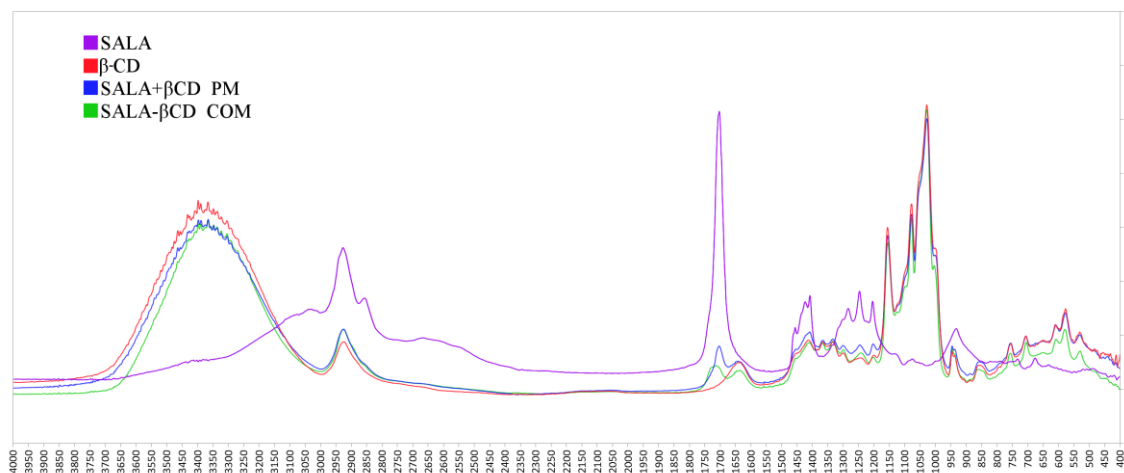
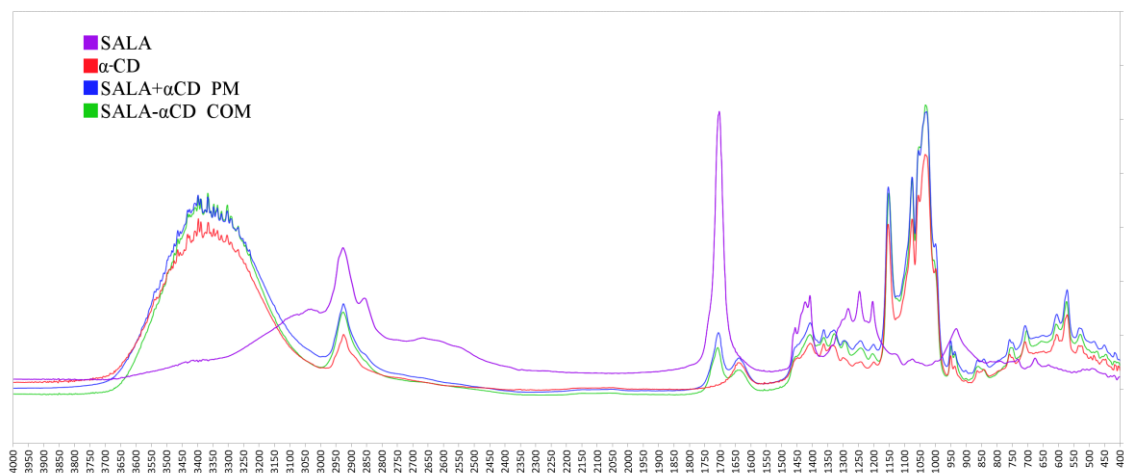


図23. SALA-CD 複合体の赤外線吸収ピーク(4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )  
(上から、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  CD)

IR では、C=O、-OH のように振動によって双極子モーメント(電荷の偏り)が大きい振動モードが強く検出される。

CD 包接されることによってゲスト分子の IR スペクトルがシフトする、あるいは強度が変化するという事例が多く報告されており、IR スペクトル変化によって CD 包接を確認することが可能な場合がある。本研究では先ず、最も一般的なKBr 錠剤法を用いて実験を行い、過去の報告例と比較した。(但し、KBr は非常に吸湿しやすいため、CD 包接体の IR 測定結果に影響を与える恐れがある。)

得られた結果を図22および23に示す。リポ酸の測定結果からは $\alpha$  リポ酸に特徴的なバンド(2929(-CH<sub>2</sub>-); 1704 (C=O); 1248 (OH); 933 (OH) cm<sup>-1</sup>)が観察された。これらの結果は過去の報告例<sup>13)</sup>と一致した。この手法では、 $\alpha$  リポ酸分子のジチオラン環の S-S や C-S バンドは観察できなかった。

CD の IR スペクトルを見ると、3400 cm<sup>-1</sup> 付近にワイドな極大吸収が観察された。これは、分子間水素結合している一級水酸基もしくは分子内で水素結合している二級水酸基の O-H の原子価振動ピークと考えられる<sup>14)</sup>。また、同じく CD の IR スペクトルにおいて 2927 cm<sup>-1</sup> 付近の極大吸収が観察された。これは、C-H や CH または CH<sub>2</sub> の原子価振動に起因する。また、1400–1200 cm<sup>-1</sup> においては一級水酸基および二級水酸基の C-H の変角振動の吸収 ( $\alpha$  -CD: 1410, 1365, 1333, 1301, 1246 cm<sup>-1</sup>、 $\beta$  -CD: 1415, 1367, 1335, 1301, 1246 cm<sup>-1</sup>、 $\gamma$  -CD: 1412, 1369, 1338, 1301, 1242 cm<sup>-1</sup>) が観察され、また、1200–1030 cm<sup>-1</sup> においてはエーテルの C-O および水酸基の原子価振動の吸収バンド ( $\alpha$  -CD: 1078 and 1033 cm<sup>-1</sup>、 $\beta$  -CD: 1080 and 1030 cm<sup>-1</sup>、 $\gamma$  -CD: 1080 and 1026 cm<sup>-1</sup>) が観察された。950–700 cm<sup>-1</sup> の範囲の吸収バンドは C-H の変角振動およびグルコピラノース環のピルス振動に起因するものであると考えられる。

1,800–1,500 cm<sup>-1</sup> の領域に、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  -CD 包接複合体でスペクトル変化の違いが僅かに観察されたが、このスペクトル変化の違いはゲスト分子( $\alpha$  リポ酸)の包接のしかたが異なることを示唆するものと予想される。具体的には、 $\alpha$  リポ酸単体のスペクトルで 1704 cm<sup>-1</sup> に観察される C=O 由来のピークトップは CD に包接されることによって $\alpha$  -CD、 $\beta$  -CD、 $\gamma$  -CD 包接体で其々、1,709 cm<sup>-1</sup>、1,716 cm<sup>-1</sup> and 1,709 cm<sup>-1</sup> に変化した。 $\alpha$  -CD、 $\beta$  -CD、 $\gamma$  -CD 其々単体において 1,641 cm<sup>-1</sup>、1,643 cm<sup>-1</sup> および 1,637 cm<sup>-1</sup> に見られる OH の変角振動のピークは、 $\alpha$  CD 包接体および $\beta$  CD の包接体においては其々 1,635 cm<sup>-1</sup> と 1,637 cm<sup>-1</sup> にシフトしたが、 $\gamma$  CD 包接体においてはシフトしなかった。これらのスペクトル変化から $\alpha$  CD もしくは $\beta$  CD と $\alpha$  リポ酸分子との間に新たな水素結合が形成されたと説明できる可能性はあるが、過去の報告例<sup>15)</sup>からも、この僅かなスペクトル変化について詳細な考察を行うためには、より精度の高い測定が必要である。1700

$\text{cm}^{-1}$  付近に見られる $\alpha$  リポ酸由来の  $\text{C}=\text{O}$  伸縮振動のピークは物理混合物でも観察された。Maeda ら<sup>16)</sup>は、これらのバンドは包接によって高波数側にシフトしたが、物理混合物ではシフトしなかったと報告しており、我々の測定結果も概ね同じ傾向が見られた。これらの結果から、CD 包接体では、 $\alpha$  リポ酸と CD の間に何らかの相互作用が存在していると示唆された。

また、 $\alpha$  リポ酸の R 体と S 体との間でスペクトルに差異は観察されなかった。

## (8) 顕微 IR

次に、R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体の構造を解析することを目的として、KBr 法よりもより直接的に試料の観察ができる顕微 IR による分析を行った。用いた装置は、Nicolet iN 10 MX Infrared Imaging Microscope (Thermo Scientific 社) であった。この装置は、たとえば固体粉末のサンプルを他の添加剤を混合することなく、また、圧力をかけて成型することなくそのままの状態、サンプルを直接観察しながら IR 測定することができるため、本研究の対象となる CD 包接体サンプルの分析には KBr 法よりも適している可能性があると考えた。

### <結果>

包接体の測定結果は図24および25に示す通り、 $3400\text{ cm}^{-1}$ にCD由来のワイドな極大吸収ピークが現れた。 $1716\text{ cm}^{-1}$ のバンドはリポ酸由来の  $\text{C}=\text{O}$  の伸縮振動であり、リポ酸-各 CD 包接体および物理混合物でも観察された。リポ酸の IR スペクトルは図に示す通りいくつか特徴的なピーク、 $2947\text{ (OH)}$ ;  $2874\text{ (-CH}_2\text{-)}$ ;  $1716\text{ (C=O)}$ ;  $1250\text{ (OH)}$ ;  $932\text{ (OH)}\text{ cm}^{-1}$ 、が観察されたが、S-C や S-S 結合に関しては、解析に使用できるピークが観察されなかった。 $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体および物理混合物においても $\alpha$  リポ酸由来の特徴的なバンドが観察された。 $\alpha$  リポ酸単体のスペクトルで  $1716\text{ cm}^{-1}$ に観察される  $\text{C}=\text{O}$  由来のピークトップは CD に包接されることによって $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD 包接体で其々、 $1,708\text{ cm}^{-1}$ 、 $1,732\text{ cm}^{-1}$  and  $1,709\text{ cm}^{-1}$ に変化した。 $\beta$  CD 包接複合体のシフト量が最も大きい点は KBr 錠剤法の FT-IR の結果と一致している。また、 $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD 其々単体において  $1,641\text{ cm}^{-1}$ 、 $1,646\text{ cm}^{-1}$  および  $1,643\text{ cm}^{-1}$ に見られる OH の変角振動のピークは、 $\alpha$  リポ酸を包接することによって其々 $1,636\text{ cm}^{-1}$ 、 $1,646\text{ cm}^{-1}$ 、 $1,646\text{ cm}^{-1}$ になり、 $\beta$  CD 包接体においてはシフトしなかった。これら OH の変角振動のピークの変化は先ほどの KBr 錠剤法と同様に非常にわずかであり、構造を類推できるものではない。本結果では、従来の KBr 錠剤法を用いた FT-IR では観察されず顕微 IR で新たに現れたような新規なバンドはなかった。ピーク位置が若干ずれることはあったが、顕微 IR の測定結果は KBr 錠剤法の FT-IR の測定結果とほぼ一致していた。ただし、顕微 IR のほうが包接化によるスペクトル変化がよりシャープに観察される傾向にあった。

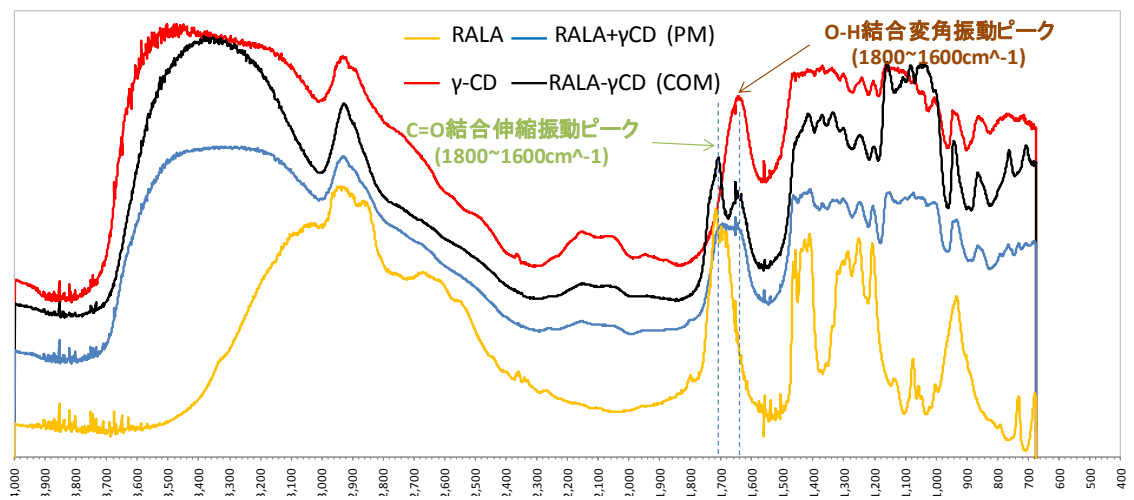
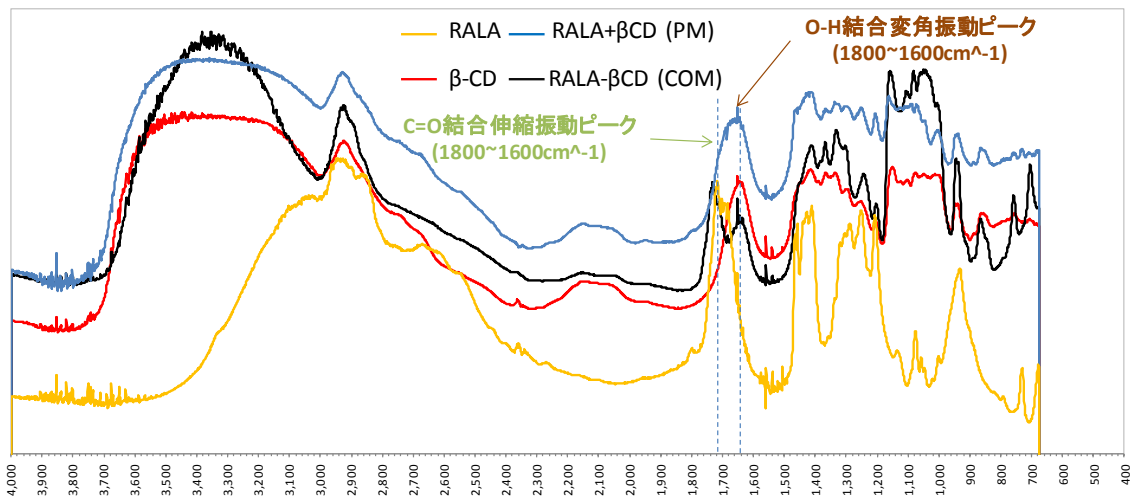
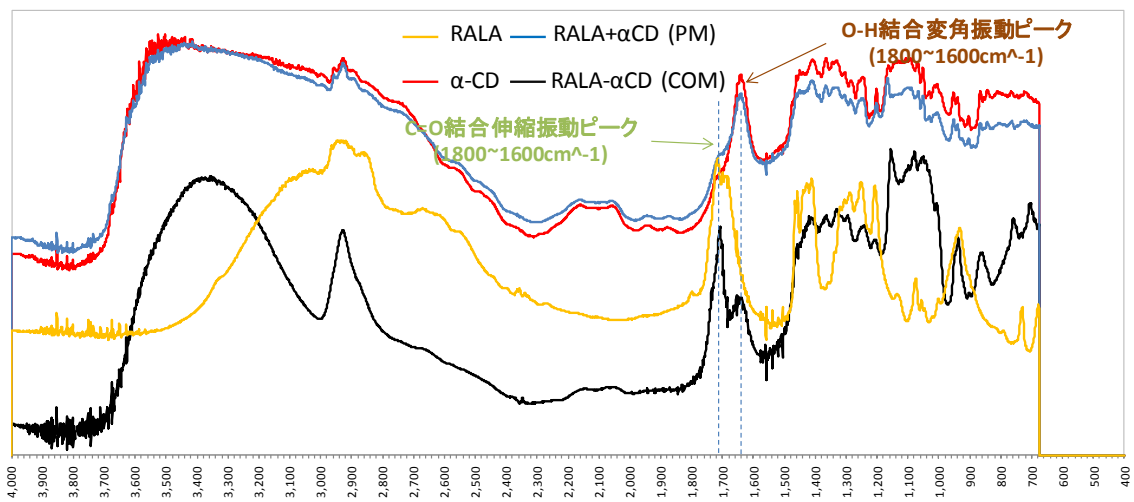


図24. RALA-CD 複合体の顕微赤外線吸収ピーク(4000-400 cm<sup>-1</sup>)  
 (上から、α、β、γ CD)

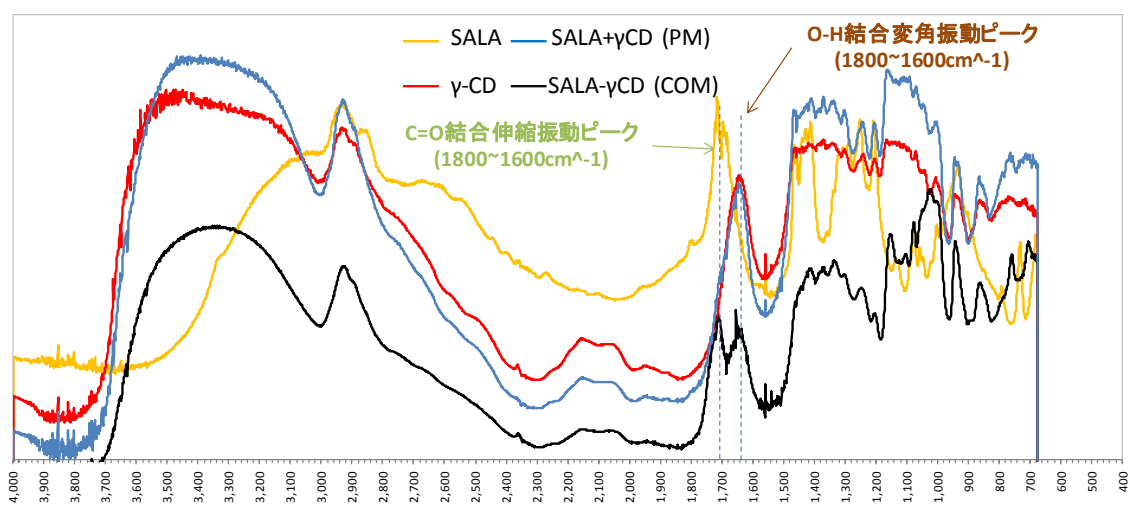
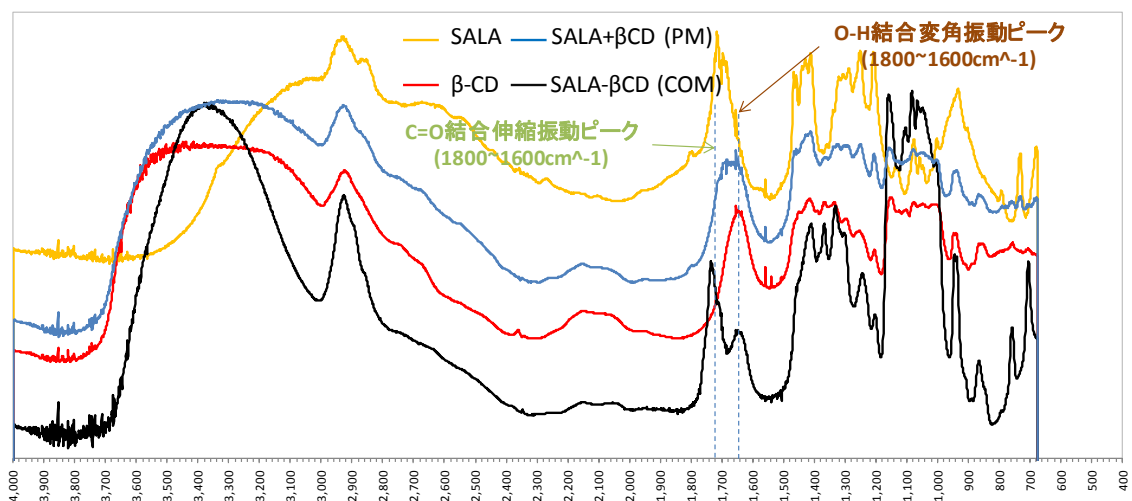
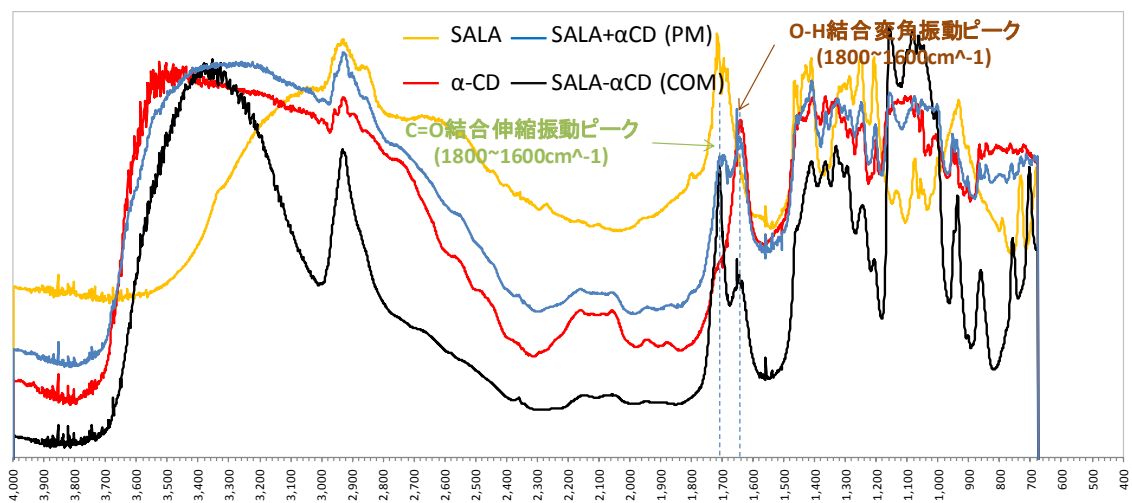
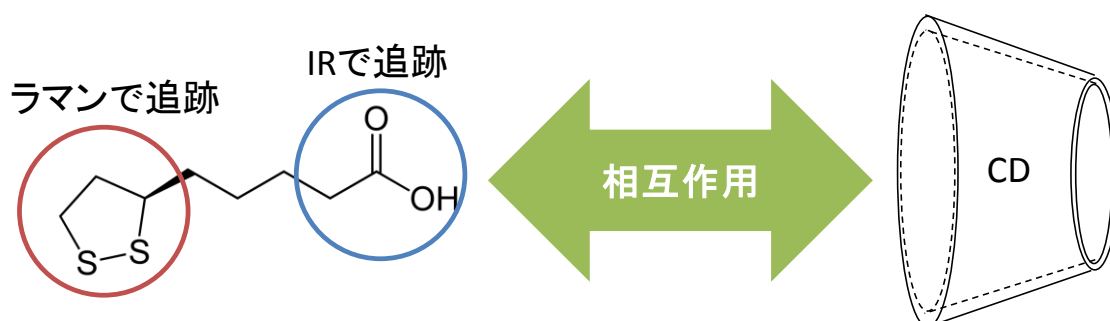


図25. SALA-CD 複合体の顕微赤外線吸収ピーク(4000-400 cm<sup>-1</sup>)  
(上から、α、β、γ CD)

## (9) 顕微ラマン

次に、R(+)- $\alpha$  リポ酸-CD 包接複合体の構造を解析することを目的として、直接的に試料の観察ができる顕微ラマン分光法による分析を行った。

ラマン散乱では、S-S結合のように分子の振動によって分極率(電子雲の体積)が大きく変化する対称性の良い振動モードが検出される。IRとラマンを組み合わせることによって、 $\alpha$  リポ酸の疎水基側と親水基側の両方の分子振動を追跡することが可能になる。本実験では総合的な包接体の構造を解析することを目的とする。



これまでに、いくつかのゲスト分子について、 $\beta$ -CDによる包接の影響についてラマン分光法を用いて調べた事例がある<sup>17, 18)</sup>。本研究においては、IRでは観察が難しかった $1000\text{ cm}^{-1}$ 以下の範囲に着目し、顕微ラマンを用いてラマン散乱を測定した。一般的に $\alpha$  リポ酸は、S-Sの伸縮振動のバンドが $510\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れ、また、C-Sの伸縮振動のバンドが $630\text{-}680\text{ cm}^{-1}$ 付近に二つ現れる。従って、これらのバンドを観察すれば疎水性基( $\alpha$  リポ酸のジチオラン環)の振動について議論することが可能になり、それによって包接構造を予想できると考えられる。

本実験では、装置として、マイクロラマンシステム(LabRAM HR800, HORIBA Jobin Yvon)、 $633\text{ nm}$ のHe-Neレーザー(J100GS-16, Showa Optronics Co., Ltd.)、光学顕微鏡(BX41, Olympus)を用いた。レーザー照射は $100\text{ }\mu\text{m}$ のピンホールを通して焦点を合わせ、50倍のレンズ(MPLN50X, NA = 0.75, Olympus)を使用した。直径 $300\text{ }\mu\text{m}$ のピンホールと幅 $100\text{ }\mu\text{m}$ のスリットを分光計の前に設置し、散乱光を後方散乱されたジオメトリで調整した。測定はサンプル毎に3回、測定する箇所を変えて行った。

<結果と考察>

図26および27に $\alpha$  リポ酸、CD、その物理混合物と包接体の得られたラマンスペクトルを示す。 $\alpha$  リポ酸では、特徴的なS-Sバンド(RALA:511  $\text{cm}^{-1}$ 、SALA:510  $\text{cm}^{-1}$ )とC-Sバンド (RALA:631, 675  $\text{cm}^{-1}$ 、SALA:630, 674  $\text{cm}^{-1}$ )が観察された。測定した $\alpha$  リポ酸のラマンスペクトルにはS体とR体の違いは観察されなかった。また、各CDでは特徴的なglucose ring由来の振動ピーク<sup>19), 20)</sup> ( $\alpha$ CD: 478  $\text{cm}^{-1}$ 、 $\beta$ CD: 475  $\text{cm}^{-1}$ 、 $\gamma$ CD: 474  $\text{cm}^{-1}$ )が観察された。 $\alpha$  リポ酸-各CD包接体では観察したどの位置においても $\alpha$  リポ酸由来のS-S、C-S バンドが消失あるいは非常に小さくなった。一方、物理混合物に関しては、例えば、図27の S- $\alpha$  リポ酸+ $\alpha$  CD PM では、 $\alpha$  リポ酸由来の S-SバンドとC-Sバンドが観察された結果を載せているが、観察するサンプルの場所(レーザーを照射する位置)によってはそれらのバンドが現れない箇所もあった。しかしながら、物理混合物では、いずれのサンプルについても測定する場所を増やせば $\alpha$  リポ酸由来のS-SバンドとC-Sバンドが観察される箇所が存在した。物理混合物は、 $\alpha$  リポ酸分子と各CD分子がモル比1:1となるように乳鉢で混合されているが、重量比に換算すると約10%が $\alpha$  リポ酸、残り約90%がCDであることから、観察したサンプルの測定箇所のうち、多くは $\alpha$  リポ酸由来の S-S、C-S バンドが現れなかったと考えられる。一方、475  $\text{cm}^{-1}$ 付近のCD由来のピークについてはいずれの物理混合物の測定においても観察された。

これらの結果から、 $\alpha$  リポ酸はCDと包接化することによって、ジチオラン環のS-S結合やC-S結合の振動が制約されたためにピークが弱くなったと推察される。 $\alpha$  リポ酸-CD包接体中の $\alpha$  リポ酸の構造はフリーの $\alpha$  リポ酸の状態から大きく変化した可能性が示唆された。

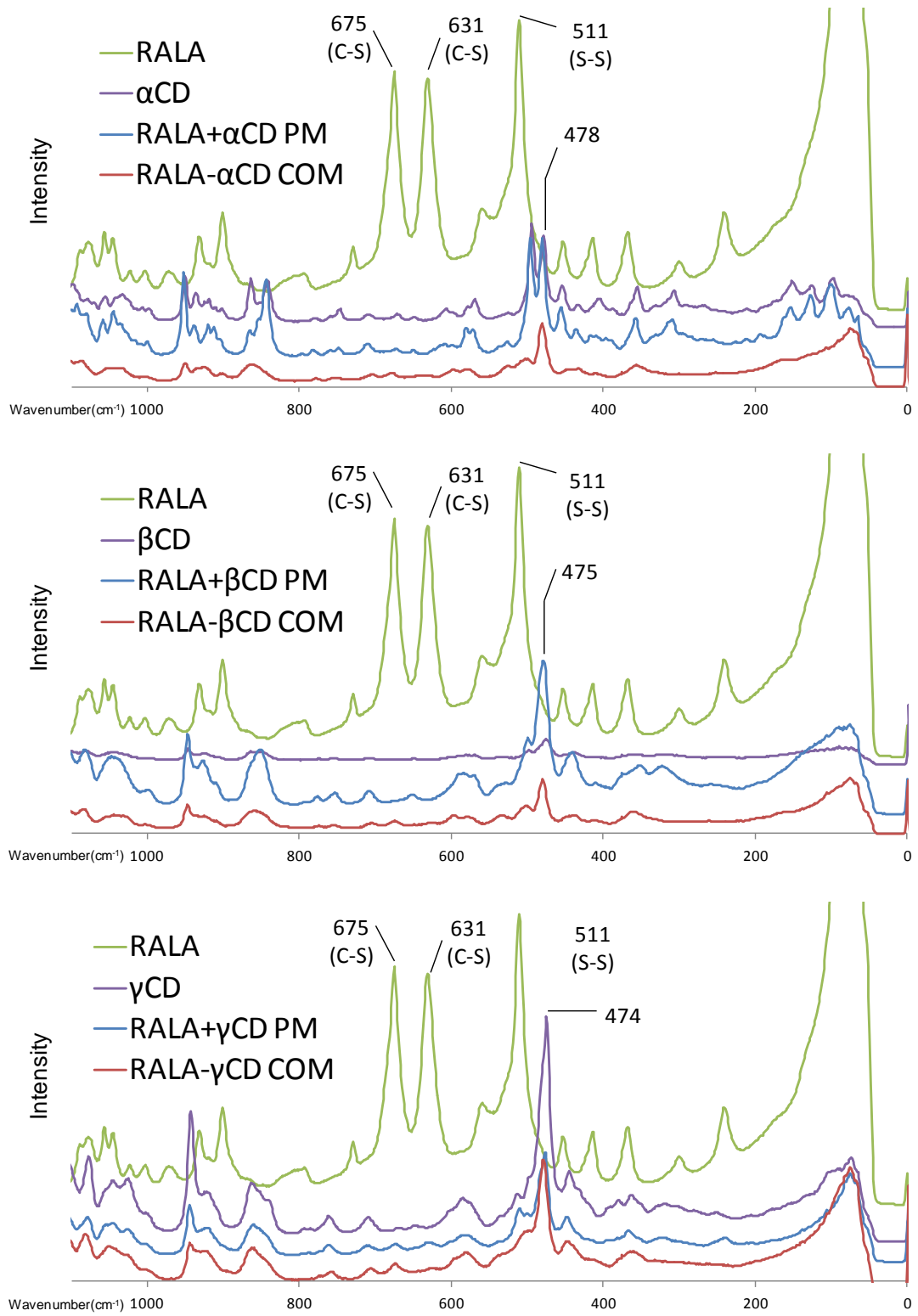


図26. RALA-CD複合体のラマン散乱ピーク(1100-0 cm<sup>-1</sup>)  
(上から、α、β、γ CD)



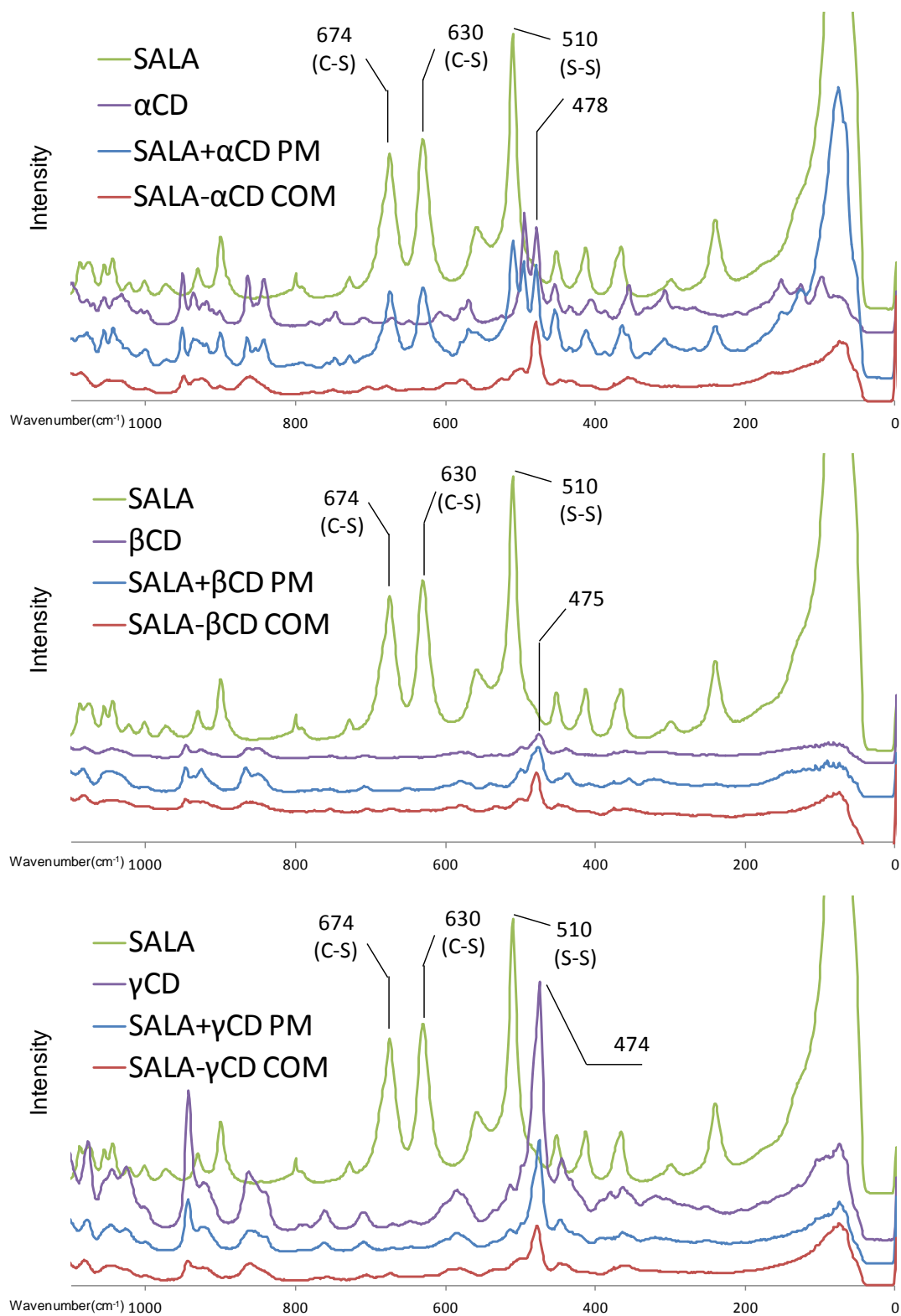


図27. SALA-CD複合体のラマン散乱ピーク(1100-0 cm<sup>-1</sup>)  
(上から、α、β、γ CD)

### 3) 結論

本研究では、RALAと各CDの混合モル比が1:1となるようにイオン交換水に加えて溶解させ、フリーズドライにてRALA-CD包接複合体を作製した。作製したRALA-CD包接複合体を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析し収率を計算した結果、 $\beta$ -CDと $\gamma$ -CDがほぼ100%であった。CD包接化することにより、未包接のRALAに比べて粒子サイズが小さくなり、特徴的な粒子形状を示すことをSEM解析などから確認した。RALA- $\alpha$ -CD包接複合体では層状の、RALA- $\beta$ -CD包接複合体では菱形の、RALA- $\gamma$ -CD包接複合体では柱状の粒子が観察された(図14)。示差走査熱量分析(DSC)では、CD包接することによって、未包接のRALAで観察された50°C付近の融解ピークが消失することを確認している。顕微ラマン測定の結果からは、CD包接化することにより、RALAのS-S結合とC-S結合由来のピーク強度が非常に弱くなることを見出した。ラマン散乱では、S-S結合のように分子の振動によって分極率(電子雲の体積)が大きく変化する対称性の良い振動モードが検出される。従って、CD包接化することにより、RALAのS-S結合とC-S結合の分極率が変化したことが示唆された。FT-IRの測定結果からは、CD包接することによりRALAのC=O結合由来のピーク位置がシフトすること、また、CDの水酸基がわずかにシフトすることを確認した。IRでは、C=O、-OHのように振動によって双極子モーメント(電荷の偏り)が大きい振動モードが強く検出される。従って、CD包接することによりRALAのC=O結合及びCDの水酸基の双極子モーメントがわずかに変化したことが示唆された。これらの結果から、RALA-CD包接複合体はRALAのS-S結合とC-S結合及びC=O結合の部位とCDの水酸基が相互作用した構造をとっていると予測される。小川ら<sup>21), 22)</sup>は、RALAと $\alpha$ -CD及び $\beta$ -CDの包接複合体の単結晶X線構造解析を行い、其々、RALA: $\alpha$ -CD=2:3、RALA: $\beta$ -CD=2:2であると推察している。また、 $\alpha$ -CD及び $\beta$ -CD空洞内のリポ酸にはdisorderがあることが推察されたと報告している。しかしながら、 $\gamma$ -CDに関しては未だ単結晶X線構造解析による構造決定には至っていない。小川らの単結晶構造解析の結果からは、 $\alpha$ -CD及び $\beta$ -CD包接複合体ともにinclusion complexであることが示されており、本研究で作製したRALA:CD=1:1の包接複合体については、顕微ラマンやFT-IRの測定結果からも、inclusion complexが含まれている可能性が非常に高いと結論付ける。

### 引用文献

- 1) Zhang, J., Dang, L., Wei, H.: Thermodynamic analysis of lipoic acid crystallized with additives. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 111, 2063-2068 (2013).
- 2) Matsugo, S., Yana, L. J., Konishi, T., et al.: The Lipoic Acid Analogue 1,2-Diselenolane-3-pentanoic Acid Protects Human Low Density Lipoprotein against Oxidative Modification Mediated by Copper Ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240, 819-824 (1997).
- 3) Sen, C.K., Tirosh, O., Roy, S., et al.: A Positively Charged  $\alpha$ -Lipoic Acid Analogue with

- Increased Cellular Uptake and More Potent Immunomodulatory Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247, 223-228 (1998).
- 4) Kono, Y., Inomata, M., Hagiwara, S., et al.: Antiproliferative effects of a new  $\alpha$ -lipoic acid derivative, DHL-HisZnNa, in HT29 human colon cancer cells in vitro. *S.Expert Opin Ther Targets*. 16(S1), S103-109 (2012).
  - 5) Kofuji, K., Nakamura, M., Isobe, T., et al.: Stabilization of  $\alpha$ -lipoic acid by complex formation with chitosan. *Food Chemistry*, 109, 167-171 (2008).
  - 6) Weerakody, R., Fagan, P., Kosaraju, S. L.: Chitosan microspheres for encapsulation of  $\alpha$ -lipoic acid. *Int. J. Pharm.*, 357, 213-218 (2008).
  - 7) Nishiura, H., Sugimoto, K., Akiyama, K., et al.: A Novel Nano-Capsule of  $\alpha$ -Lipoic Acid as a Template of Core-Shell Structure Constructed by Self-Assembly. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 4(1), 1000155 (2013).
  - 8) D. Duchêne, D. Wouessidjewe and M.-C. Poelman: Dermal uses of cyclodextrins derivatives. in *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives*, D. Duchêne, ed., Edition de Santé, Paris, pp. 449-481 (1991).
  - 9) Ch. Vaution, M. Hutin, F. Glomot and D. Duchene: The use of cyclodextrins in various industries. in *Cyclodextrins and Their Industrial Uses*, D. Duchêne, ed., Editions de Santé, Paris, pp. 297-350 (1987).
  - 10) J. Szejtli: Cyclodextrins in food, cosmetics and toiletries. *Starch/Stärke*, 34, 379-385 (1982).
  - 11) G. Schmid, O.S. Huber and H.J. Eberle: Selective complexing agents for the production of  $\gamma$ -cyclodextrin. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins*, Munich, pp. 87-92 (1988).
  - 12) X. Gao, K. Nishimura, F. Hirayama, H. Arima, K. Uekama, G. Schmid, K. Terao, D. Nakata and H. Fukumi: Enhanced dissolution and oral bioavailability of coenzyme Q10 in dogs obtained by inclusion complexation with  $\gamma$ -cyclodextrin. *Asian J. Pharm. Sci.*, 1, 95-102 (2006).
  - 13) Mari'a A. Moyano Æ Adriana M. Broussalis Æ Adriana I. Segall: Thermal analysis of lipoic acid and evaluation of the compatibility with excipients. *J Therm Anal Calorim* 99:631-637 (2010).
  - 14) Szejtli, J.: Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.*

- 98, 1743-1754 (1998).
- 15 ) Csaba-Pal Racz, Szabolcs Santa, Maria Tomoaia-Cotisel, Gheorghe Borodi, Irina Kacso, Adrian Pirnau, Ioan Bratu: Inclusion of  $\alpha$ -lipoic acid in  $\beta$ -cyclodextrin. Physical–chemical and structural characterization. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 76:193-199 (2013).
- 16 ) H. Maeda, T. Onodera, H. Nakayama: Inclusion complex of  $\alpha$ -lipoic acid and modified cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 68:201-206 (2010).
- 17 ) S. Kasiouli, *et al.*: Resonance Raman Investigation of  $\beta$ -Cyclodextrin-Encapsulated  $\pi$ -Conjugated Polymers. *J. Phys. Chem. B*, 117, 5737–5747 (2013).
- 18 ) VE de Oliveira *et al.*: Carotenoids and  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. *J. Phys. Chem. A*, 115, 8511- 8519 (2011).
- 19 ) W. Li, B. Lu, A. Sheng, F. Yang, Z. Wang: Spectroscopic and theoretical study on inclusion complexation of beta-cyclodextrin with permethrin. *J. Molecular Structure* 981, 194–203 (2010).
- 20 ) We. Li, B. Lu, F. Chen, F. Yang, Z. Wang: Host–guest complex of cypermethrin with  $\beta$ -cyclodextrin: A spectroscopy and theoretical investigation. *J. Molecular Structure* 990, 244–252 (2011).
- 21 ) 小川 法子 他, 第29回シクロデキストリンシンポジウム 講演要旨集, 78-79 (2012).
- 22 ) 小川 法子 他, 第30回シクロデキストリンシンポジウム 講演要旨集, 200-201 (2013).

### 第3章 α リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の安定性

#### 1) 背景と目的

前述(第2章)のとおり、R-リポ酸の安定性はラセミ体より低く、R-α リポ酸は、熱、酸、光などの物理刺激により容易に分解し、粘着性を有する不溶性ポリマーに変化する。従って、これらの物理刺激に耐える R-リポ酸の安定化方法の開発が望まれている。これまでにいくつかの安定化手法が試みられているが、十分な安定性とα リポ酸の含有量(高いほうがよい)を同時に満たした開発事例はない。そこで、本章では、第2章で作製した包接複合体の安定性を評価し、CD 包接化によって R-α リポ酸の熱、酸(低い pH)、光(紫外線)に対する安定性がどのように変化(向上)するかを確かめることを目的に実験を行った。

#### 2) 実験

##### α リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の安定性

##### (1) 熱安定性

R(+)-α リポ酸-各 CD 包接複合体を蓋なしのガラス容器に入れ、25°C(α リポ酸の融点以下)および 70°C(α リポ酸の融点以上)飽和蒸気圧下において 30 分、1 時間、2 時間、5 時間、24 時間、48 時間まで保存した後に各包接複合体中に含まれる R(+)-α リポ酸を HPLC にて定量した。保存前の含有量に対する保存後の含有量の割合を百分率で表しこれを残存率として計算した。

$$\text{残存率(\%)} = \frac{\text{保存後の含有量}}{\text{保存前の含有量}}$$

比較として R(+)-α リポ酸及び R(+)-α リポ酸よりも安定性の高いことが知られている R(+)-α リポ酸ナトリウム塩も同じく測定した。結果は図28に示す通り、R(+)-α リポ酸では 70°C 熱処理後ガラス容器内でポリマー化している様子が観察され、保存 5 時間後の残存率は 33%と低かった。R(+)-α リポ酸ナトリウム塩では 5 時間後の残存率は 87%であったが 48 時間後には 69%まで低下した。R(+)-α リポ酸-α CD 包接複合体及びγ CD 包接複合体ではそれよりも高く、残存率は 100%であった。一方、β CD 包接複合体ではα、γ に比べ残存率は 5 時間後には 96%と若干低く、48 時間後には 69%であった。R(+)-α リポ酸及び R(+)-α リポ酸ナトリウム塩よりも各α CD およびγ CD 包接体の残存率は向上した。示差走査熱量分析(DSC)の測定結果から、R(+)-α リポ酸-各 CD 包接複合体はいずれも包接化されていることを確認しているが(第2章; 図11)、β CD の 70°C 熱処理 48 時間後の残存率はα CD 及びγ CD より有意に低い結果となった。

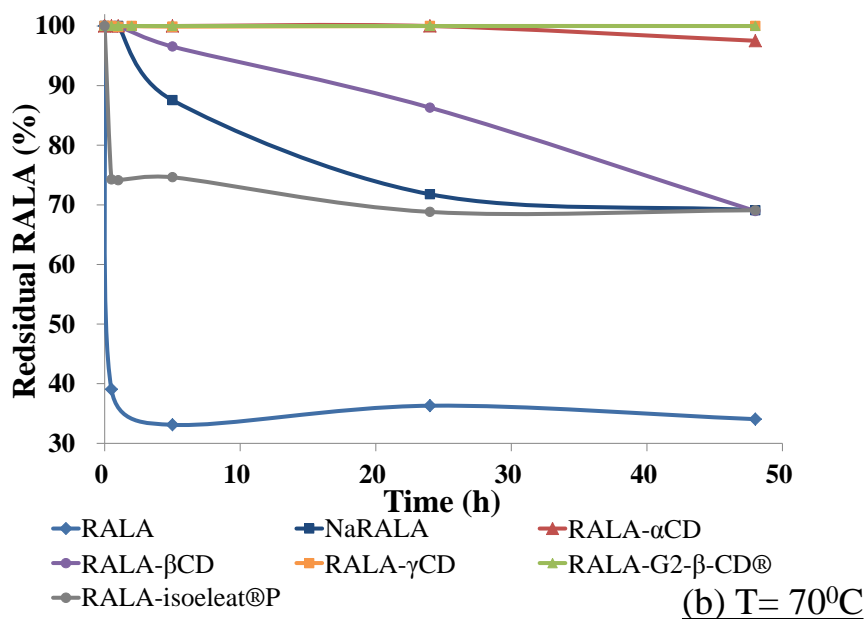
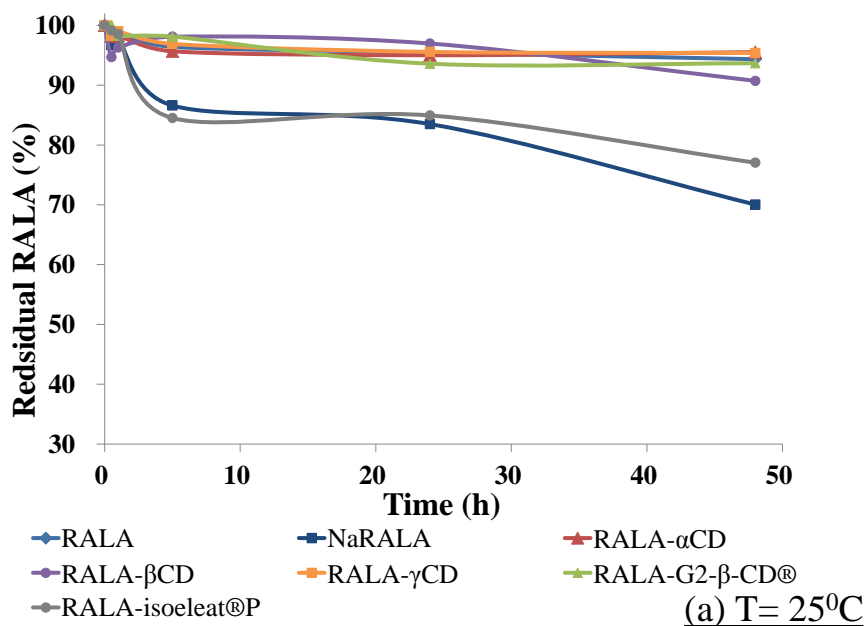


図28. R(+)-α リポ酸-各 CD 包接複合体の熱安定性

(上: 25°C / 飽和水蒸気圧下にて保存、下: 70°C / 飽和水蒸気圧下にて保存)

修飾型のシクロデキストリンを用いた包接体について、R-α リポ酸-isoeleat®P (a mixture of α-, β- and γ-CDs, maltosyl-α-, -β- and -γ-CDs) 包接体は R-α リポ酸ナトリウム塩と同程度の安定性であったが、R-α リポ酸-G2-β-CD® (maltosyl-β-CD) 包接体は 25°C および 70°C 熱処理いずれにおいても 48 時間後の残存率は 95% 以上と非常に高い安定性を示した。

R- $\alpha$  リポ酸-isooleat®P 包接体は DSC の結果 (第 2 章; 図 11) においてもリポ酸の融解ピークが観察されたことから、本実験で作成したその他の包接体と比較しても安定性が劣ることが明らかとなった。反対に、DSC 測定でリポ酸の融解ピークが観察されなかった R- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD、 $\beta$  CD、 $\gamma$  CD、および-G2- $\beta$ -CD®包接体は熱と湿度に暴露された後でも R- $\alpha$  リポ酸やそのナトリウム塩と比較して高い安定性を示した。これらの結果は、 $\alpha$  CD、 $\beta$  CD、 $\gamma$  CD、および-G2- $\beta$ -CD®を用いて包接化することによって熱や湿度に対する安定性が向上することを示唆している。

本実験から得られた結果は、シクロデキストリンを用いてラセミ体の $\alpha$  リポ酸の安定性を改善した過去の報告例<sup>1)</sup>と傾向が一致しているが、我々の実験では、ピュアなエナンチオマーのみを CD 包接化し、その熱と 100%の湿度に対する安定性を向上させた点で発展している。

1,2-ジチオラン環の S-S 結合が開裂することによってリポ酸のポリマー化が進行する<sup>2)</sup>が、CD 包接することによってこの S-S 結合を保護し、安定性を向上させていると推察される。

## (2) 酸安定性

作製した $\alpha$  リポ酸-CD 包接体をサプリメントなどの食品に応用することを考え、本実験では胃酸に対する安定性試験を実施した。

人工胃液 (第 15 改正日本薬局方・製剤試験法・崩壊 (溶質) 試験第 1 液: 0.2% 塩化ナトリウム水溶液、pH 1.2 (塩酸にて調整)) に R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体 (RALA- $\gamma$  CD) 及び比較対象である未包接の R(+)- $\alpha$  リポ酸を懸濁させ、1 分間超音波分散を行い、さらに 37°C の浴槽中で 60 分間攪拌したのちに、希釈溶媒 (5mM リン酸二水素カリウムとアセトニトリルを体積比 1:1 で混合し、リン酸にて pH3.5 に調整) を用いて希釈し、均一になるように溶解させた。各試料溶液に含まれる R(+)- $\alpha$  リポ酸含有量を HPLC にて測定した。人工胃液処理前後の各試料中の R(+)- $\alpha$  リポ酸の含有量を用いて残存率を計算し比較した。

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{人工胃液処理後の含有量}}{\text{人工胃液処理前の含有量}}$$

人工胃液 (第 15 改正日本薬局方・製剤試験法・崩壊 (溶質) 試験第 1 液: 0.2% 塩化ナトリウム水溶液、pH 1.2 (HCl 水溶液にて調整)) に R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体を懸濁させ、1 分間超音波分散を行い、さらに 37°C の浴槽中で 60 分間かき混ぜたのちに、希釈溶媒 (5mM リン酸二水素カリウムとアセトニトリルを体積比 1:1 で混合し、リン酸にて pH3.5 に調整) を用いて希釈し、均一になるように溶解させた。各試料溶液に含まれる R(+)- $\alpha$  リポ酸含有量を HPLC にて測定した。人工胃液処理前の R(+)- $\alpha$  リポ酸含有量を 100% に設定し、処理後の含有量を処理前に対する

百分率で計算しそれを残存率とした。比較として R(+)-リポ酸及び R(+)- $\alpha$  リポ酸ナトリウム塩も同じく測定した。その結果、R(+)- $\alpha$  リポ酸では大きなポリマーが生成し(写真2;左の浮遊物)、残存率は 43%と低い結果となった。また、R(+)- $\alpha$  リポ酸ナトリウム塩では 60%であったが、R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体では目視では大きなポリマーは確認されず、残存率は 100%であった(図29)。このように R(+)- $\alpha$  リポ酸の酸に対する安定性は CD 包接することによって大きく向上することが判明した。



写真2. 人工胃液中でポリマー化した R- $\alpha$  リポ酸(左)と均一に分散した R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体



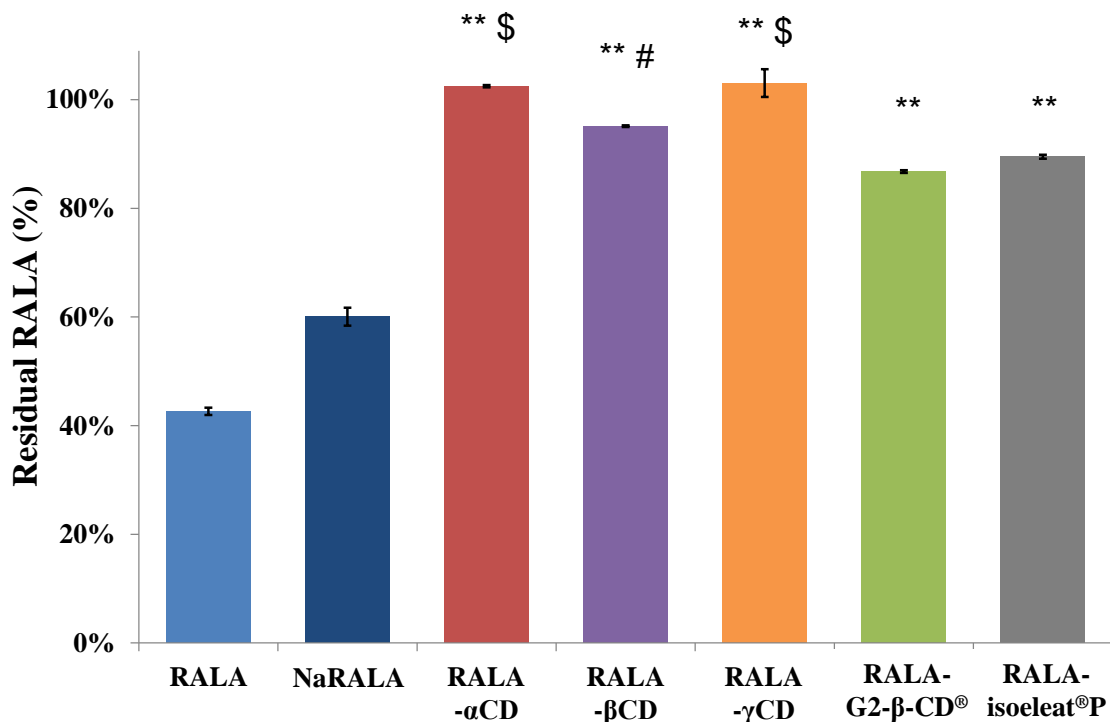


図29. R(+)-α リポ酸-各 CD 包接複合体の酸安定性

\*\*  $p < 0.01$  vs. RALA and NaRALA. \$  $p < 0.01$  vs. RALA-βCD, RALA-G2-β-CD® and RALA-isooleat®P. #  $p < 0.01$  vs. RALA-G2-β-CD® and RALA-isooleat®P. (Dunnett test)

いずれの CD 包接体でも R-α リポ酸およびそのナトリウム塩に比べて有意に残存率が向上した。α、β、γ CD 包接体は isoeleat®P および G2-β-CD® に比べて残存率は有意に高く、また、α および γ CD 包接体は isoeleat®P および G2-β-CD® に加え更に β CD 包接体よりも残存率が有意に高い結果となった。isoeleat®P や G2-β-CD® は水溶性を高かめたシクロデキストリンであるので、人工胃液に対する溶解度が高かったために酸の刺激によってポリマー化しやすくなったためと推察される。

興味深いのは、写真2で示したように、R-α リポ酸単体では人工胃液中でポリマー化してしまうのに対し、CD 包接体では一様に分散したことである。高分散性は腸管内での吸収性に与えるため極めて重要である。また、写真は γ CD 包接体のみであるが、その他の CD 包接体でも同様の結果が観察された。

### (3) 光安定性 — 固相と液相及び R と S の比較

R(+)-α リポ酸-各 CD 包接複合体 (COM) 及び比較対象である未包接の R(+)-α リポ酸 (株式会社東洋発酵) と各 CD の物理混合物 (PM) を透明のガラス容器に入れ、常温常圧下において 5

分、10分、15分間紫外線照射した後に各試料中に含まれる R(+)- $\alpha$  リポ酸を HPLC にて定量した。熱処理前後の各試料中の R(+)- $\alpha$  リポ酸の含有量を用いて残存率を計算し比較した。(固相)

引き続き、R(+)- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接複合体及び比較対象である未包接の R(+)- $\alpha$  リポ酸と各 CD の物理混合物を透明のガラス容器に入れ終濃度が 1mM となるように超純粋に溶解させ、同じく常温常圧下において 5 分、10 分、15 分間紫外線照射した後の各試料中に含まれる R(+)- $\alpha$  リポ酸を HPLC にて定量し残存率を算出した。(液相)

$$\text{残存率(\%)} = \frac{\text{保存後の含有量}}{\text{保存前の含有量}}$$

また、S- $\alpha$  リポ酸とその  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CD 包接体についても同様の実験を行った。

<結果>

固相

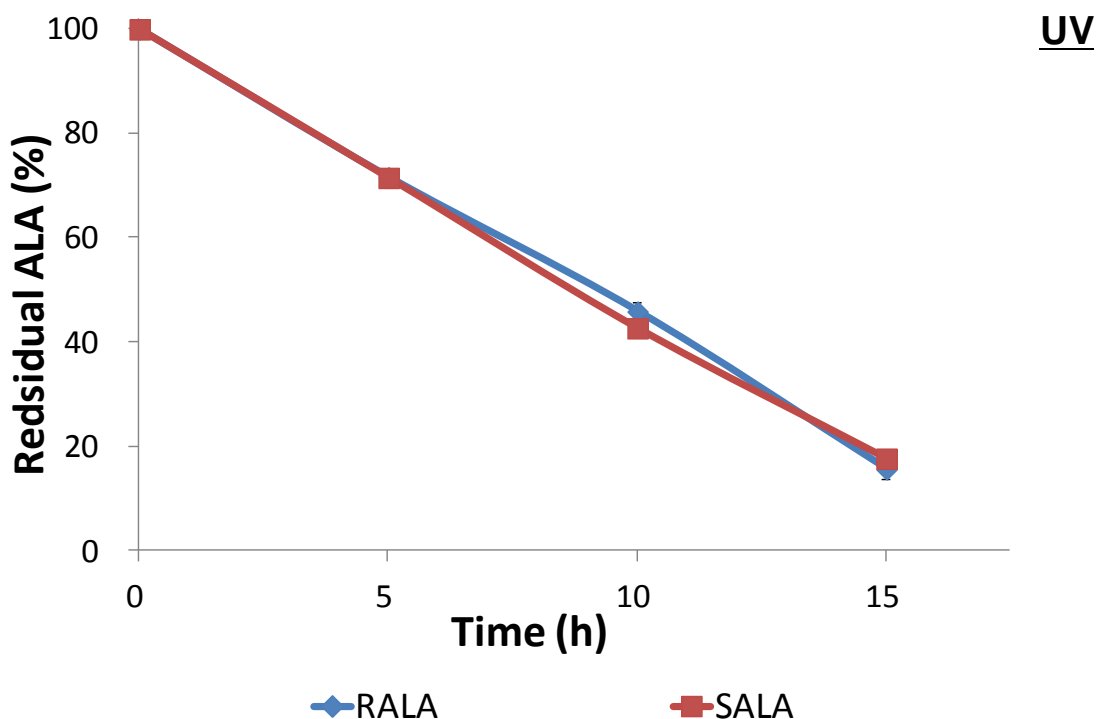


図30-a.  $\alpha$  リポ酸及び各 CD 包接体の固相における紫外線照射に対する安定性 (R および S- $\alpha$  リポ酸)

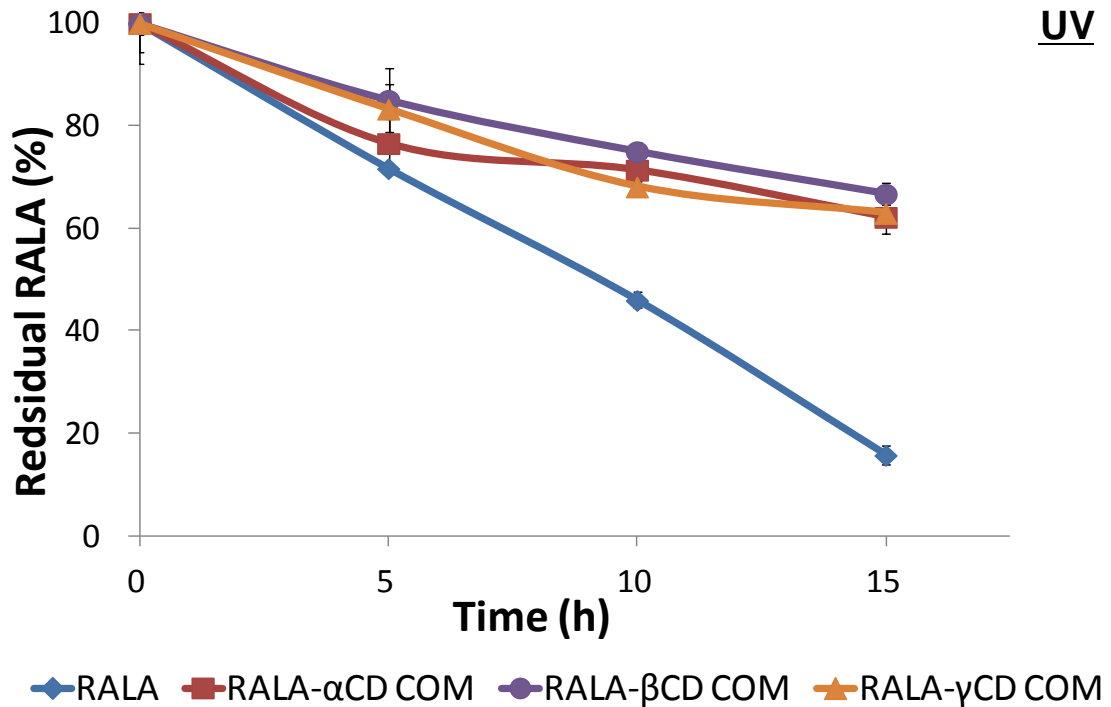
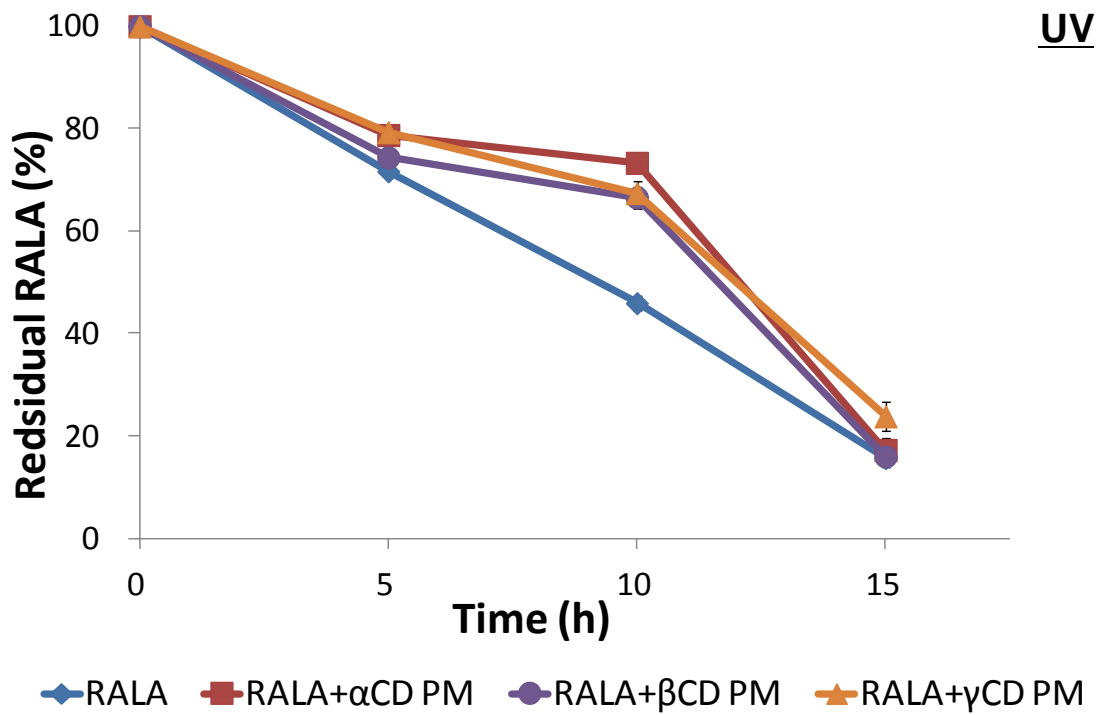


図30-b.  $\alpha$  リポ酸及び各 CD 包接体の固相における紫外線照射に対する安定性  
 (上から、R- $\alpha$  リポ酸と各 CD の物理混合物、R- $\alpha$  リポ酸と各 CD 包接体)

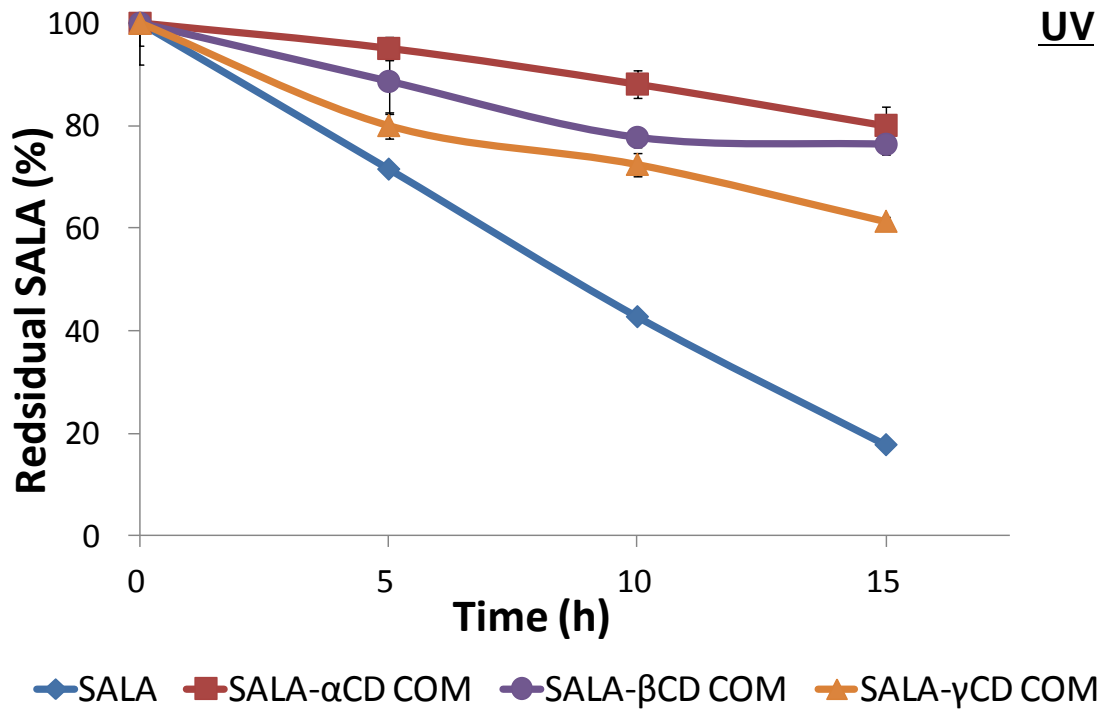
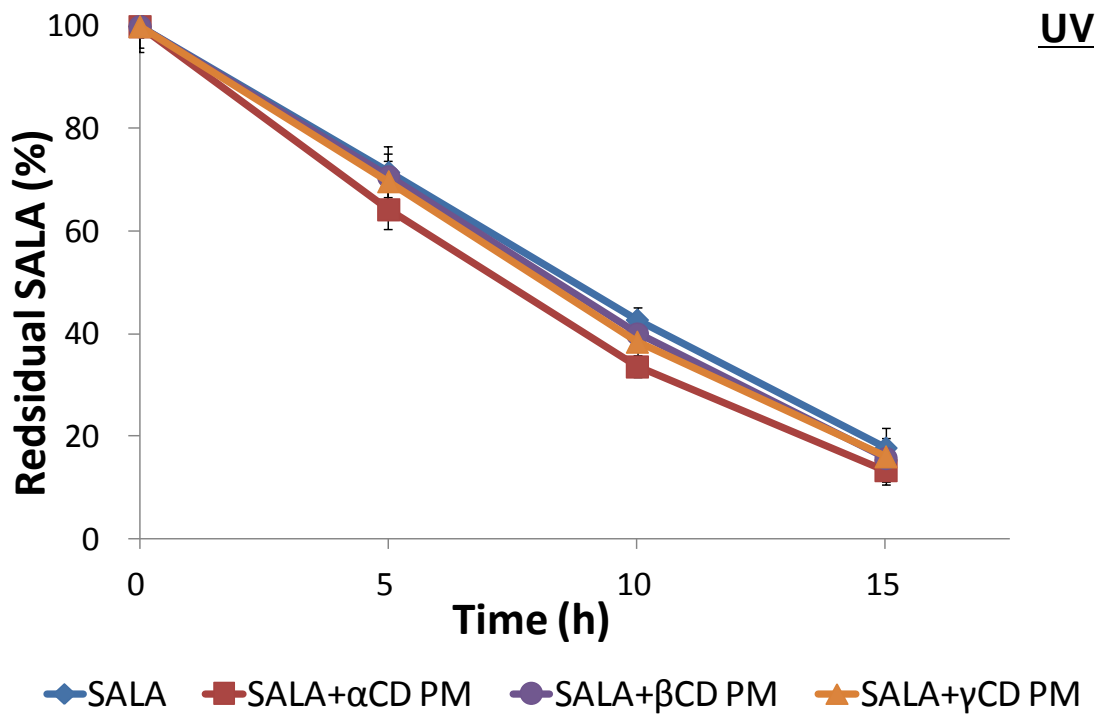


図30-c.  $\alpha$  リポ酸及び各 CD 包接体の固相における紫外線照射に対する安定性  
 (上から、S- $\alpha$  リポ酸と各 CD の物理混合物、S- $\alpha$  リポ酸と各 CD 包接体)

固相に対する紫外線照射試験において、R および S- $\alpha$  リポ酸は照射時間に対して線形的に残存率が低下し、紫外線照射 15 分後の残存率は共に約 20%であった。物理混合物では多少バラつきはあったが、 $\alpha$  リポ酸単体に対する紫外線照射と同様の傾向を示し、紫外線照射 15 分後の残存率は R 体および S 体どちらについても約 20%程度で、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  CD による違い及び R 体と S 体の違いは観察されなかった。

一方、包接体に関しては、R- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接体いずれについても紫外線照射 15 分後の残存率が 60%を超える結果となり、CD 包接化することによって紫外線照射に対する安定性が未包接の R- $\alpha$  リポ酸よりも有意に向上した。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  CD の残存率を比較すると、R- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD 包接体 (62.2%)、R- $\alpha$  リポ酸- $\beta$  CD 包接体 (66.7%)、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体 (62.9%) といずれも同様の値であった。S- $\alpha$  リポ酸-各 CD 包接体の紫外線照射 15 分後の残存率を比較すると、S- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD 包接体 (80.1%) > S- $\alpha$  リポ酸- $\beta$  CD 包接体 (76.4%) > S- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体 (61.4%) の順で紫外線照射に対する安定性が高かった。

### 液相

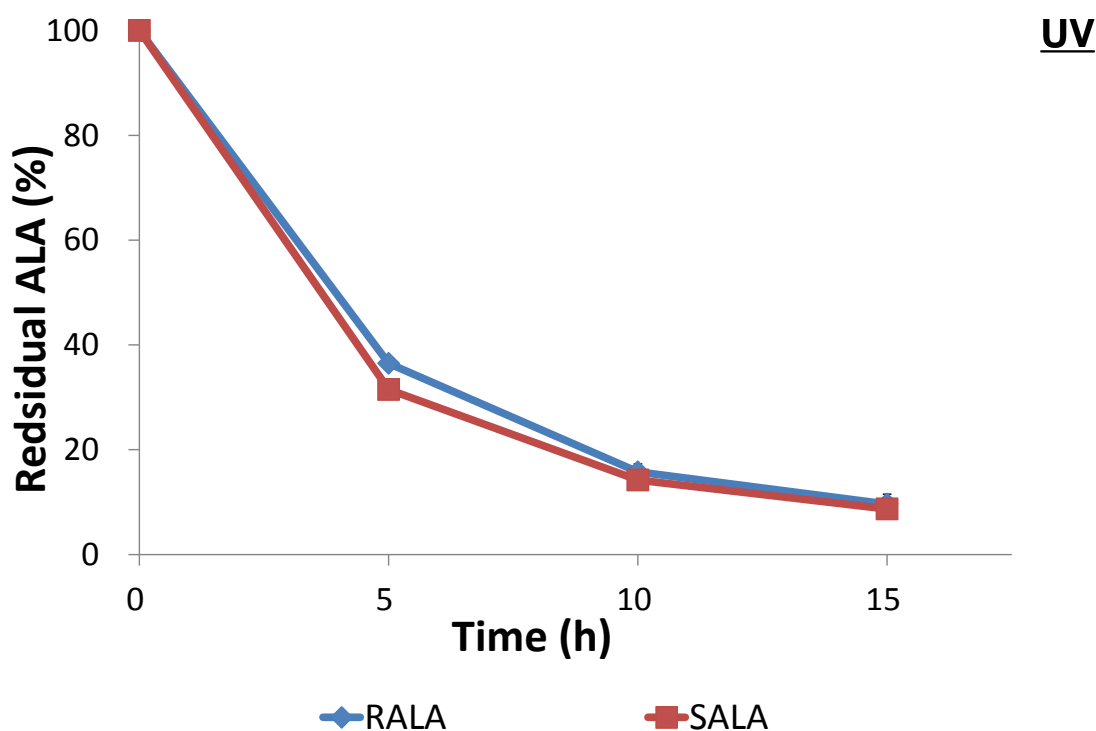


図31-a.  $\alpha$  リポ酸及び各 CD 包接体の液相における紫外線照射に対する安定性  
(上から、R および S- $\alpha$  リポ酸)

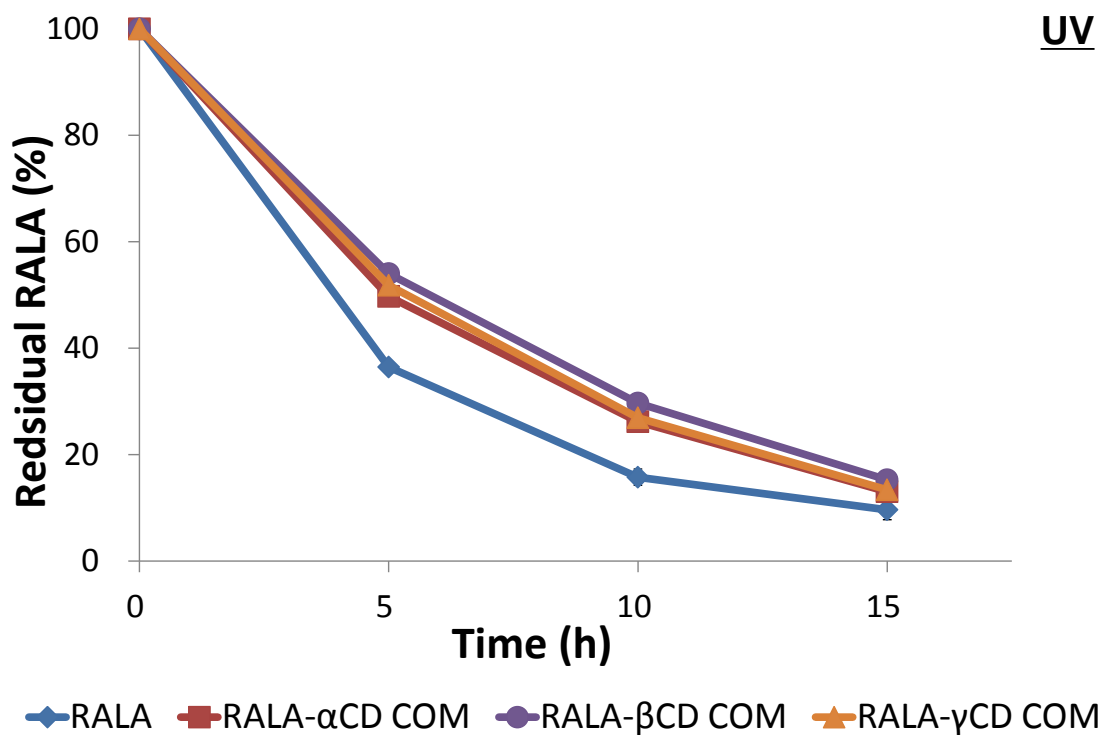
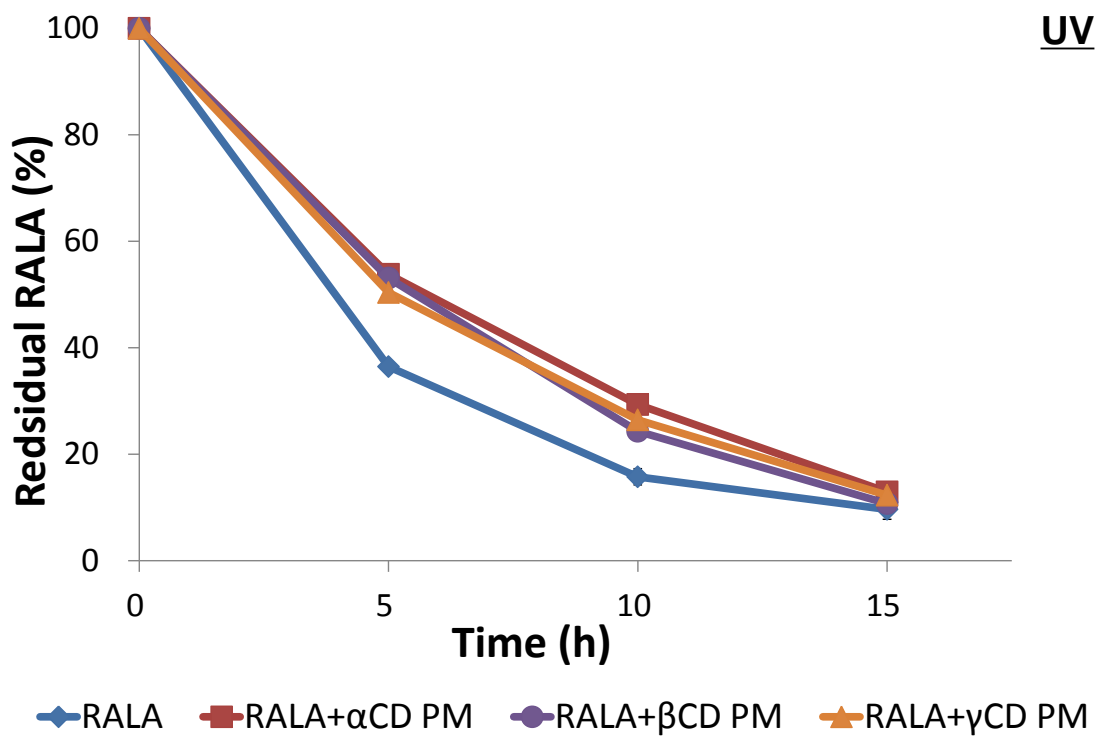


図31.  $\alpha$  リポ酸及び各 CD 包接体の液相における紫外線照射に対する安定性  
 (上から、R- $\alpha$  リポ酸と各 CD の物理混合物、R- $\alpha$  リポ酸と各 CD 包接体)

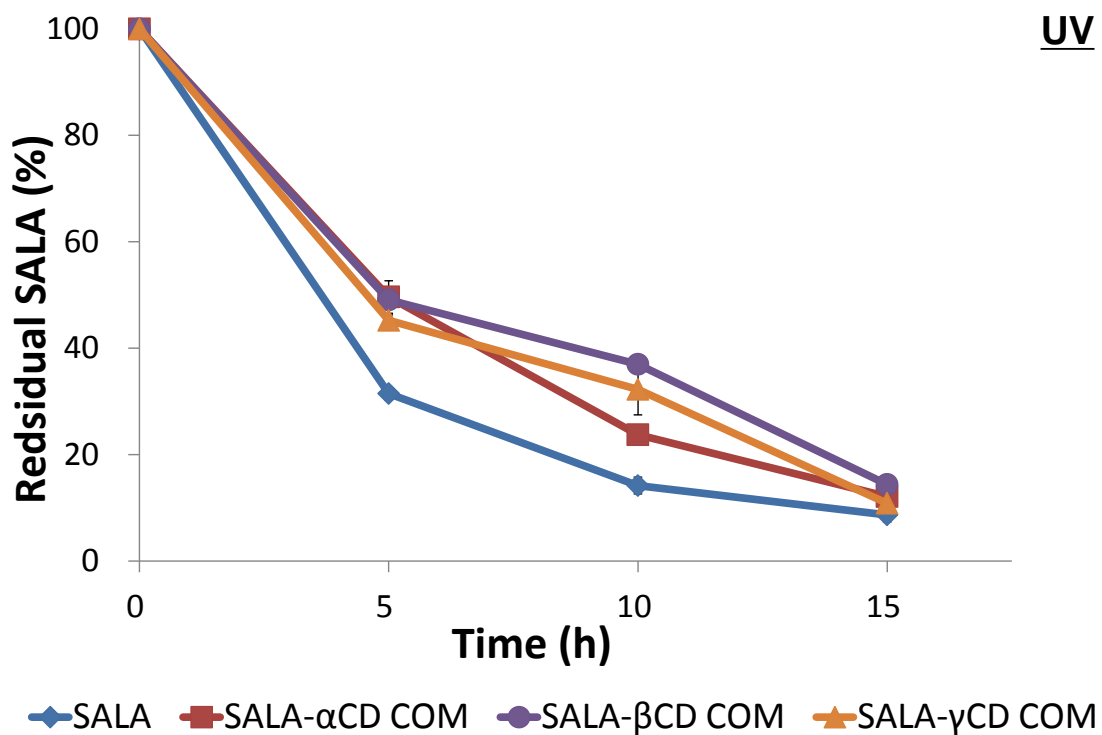
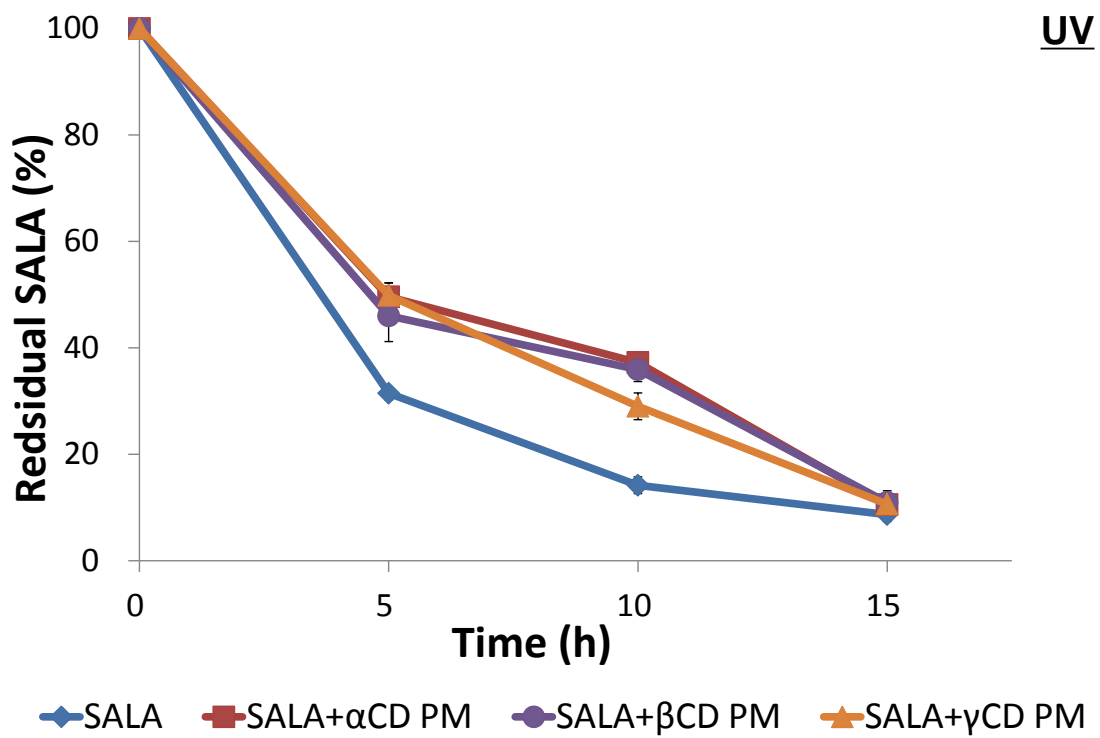


図31-c.  $\alpha$  リポ酸及び各 CD 包接体の液相における紫外線照射に対する安定性  
 (上から、S- $\alpha$  リポ酸と各 CD の物理混合物、S- $\alpha$  リポ酸と各 CD 包接体)

液相に対する紫外線照射試験において、R および S- $\alpha$  リポ酸は照射時間に対して指数関数的に残存率が低下し、紫外線照射 15 分後の残存率は共に約 15%であった。R 体の $\alpha$  リポ酸に関しては、物理混合物でも各 CD 包接体も $\alpha$  リポ酸単体に対する紫外線照射と同様の傾向を示し、紫外線照射 15 分後の残存率は約 15%程度で、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  CD による違いは観察されなかった。

一方、S 体の $\alpha$  リポ酸の物理混合物および CD 包接体についても紫外線照射時間に対して残存率の低下傾向は見られ、紫外線照射 15 分後の残存率は約 20%という結果となった。水相においては、紫外線照射に対する安定性は CD 包接体と未包接の $\alpha$  リポ酸で大差ない結果となった。

$\alpha$  リポ酸の R 体と S 体での紫外線照射に対する安定性の違いは、固相における $\alpha$  CD 包接体のみで観察された。紫外線照射 5 分、10 分、15 分、いずれの時点においても S- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD 包接体のほうが R- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD 包接体よりも $\alpha$  リポ酸の残存率が高かった。まとめると、固相では R、S ともに、 $\alpha$  リポ酸-CD 包接体は未包接の $\alpha$  リポ酸および物理混合物と比較して紫外線照射に対して安定性が向上した。一方、水相では、紫外線照射後の残存率は、物理混合物、包接体ともに未包接の $\alpha$  リポ酸とほぼ同等の値を示した。これらの結果から、水相においては $\alpha$  リポ酸-CD 包接体はある程度水に溶解し、溶解した包接体の一部は包接が外れ、ゲスト分子の $\alpha$  リポ酸がフリーな状態になっているため紫外線照射に対する安定性が向上しないことが示唆された。従って、 $\alpha$  リポ酸-CD 包接体を飲料用途として用いる場合、遮光した状態で保存することが望ましいことがわかった。

#### (4) 保存安定性（長期保存）

##### 固相

R(+)- $\alpha$  リポ酸-シクロデキストリン包接体をサプリメントなどの食品(固体)に応用する場合、長期間の保存安定性が求められる。本実験では、40°C・75%RH(加速試験)条件下で包接体中の R(+)- $\alpha$  リポ酸含有量の経時変化を確認した。

##### <試験方法>

サンプル名: R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\alpha$  CD 包接体、

R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\beta$  CD 包接体、

R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体、

保存条件: チャック付き PE 袋に検体 10g を充填し、さらにこれをアルミ袋に入れて密封して、40°C・75%RH(加速試験)で保存した。

分析方法: 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて光学異性体を分割できるキラルカラムを用



いて定量した。

<装置>

HPLC LC-2010 <Shimadzu>

カラム: CHIRALPAK AD-RH、Daicel (4.6mm I.D. x 150mm)

分析条件: 第2章 2-2) (1) と同じ

<結果>

表7. 40°C・75%RH(加速試験)で保存後の R-α リポ酸-各 CD 包接体中の R-α リポ酸含有量

	initial	1M	2M	3M	4M	6M
RALA-αCD	14.91%	14.50%	14.55%	14.99%	14.79%	14.76%
RALA-βCD	12.84%	12.17%	11.95%	11.80%	11.89%	11.66%
RALA-γCD	11.27%	11.15%	10.63%	10.61%	10.31%	10.67%

以下に、R(+)-α リポ酸残存率を表したグラフを示す。

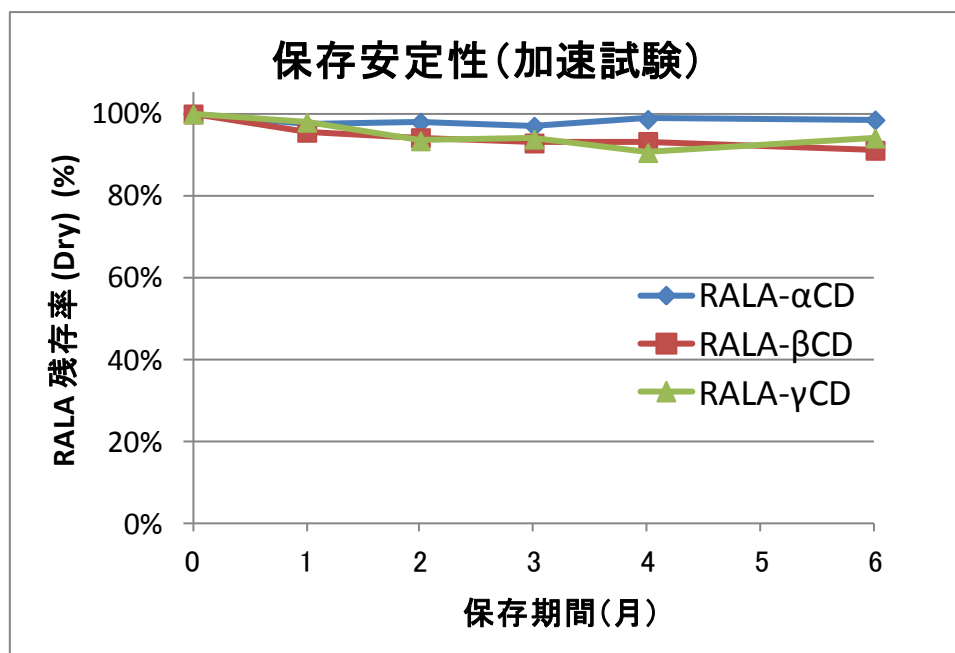


図32. 40°C・75%RH(加速試験)条件下における R-α リポ酸-各 CD 包接体の保存安定性

試験を行った保存 6 ヶ月までは残存率に大きな変化が見られないことが分かった。この結果から、2 年間の賞味期限を保証できることが分かった。

#### (4) 保存安定性 (長期保存) – 液相

R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  シクロデキストリン包接体を飲料などの食品(液体)に応用する場合、長期間の保存安定性が求められる。本実験では、遮光にて 5°C、25°C、40°C条件下で包接体中の R(+)- $\alpha$  リポ酸含有量の経時変化を確認した。また、比較のため 25°Cかつ斜光しない条件下でも同様の試験を行った。

##### <試験方法>

サンプル名: R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体

保存条件: 蓋付きのガラス瓶(遮光もしくは遮光なし)にリポ酸濃度が凡そ 0.5mg/ml になるように検体を充填しイオン交換水を入れて溶解させた。これを 40°C、25°Cもしくは 5°C(冷蔵庫)で保存した。

分析方法: 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて光学異性体を分割できるキラルカラムを用いて定量した。

##### <装置>

HPLC LC-2010 <Shimadzu>

カラム: CHIRALPAK AD-RH、Daicel (4.6mm I.D. x 150mm)

分析条件: 第2章 2-2) (1) と同じ

##### <結果>

表8. 各条件下で保存後の R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体水溶液中の R- $\alpha$  リポ酸濃度 (mg/mL)

	initial	15days	30days	50days	120days	270days
25C amber	0.540	0.550	0.551	0.534	0.541	0.520
40C amber	0.540	0.542	0.538	0.517	0.491	0.405
25C clear	0.540	0.536	0.477	0.400	0.303	0.118
5C amber	0.570	-	0.530	0.553	0.560	0.570

以下に、R(+)- $\alpha$  リポ酸残存率を表したグラフを示す。

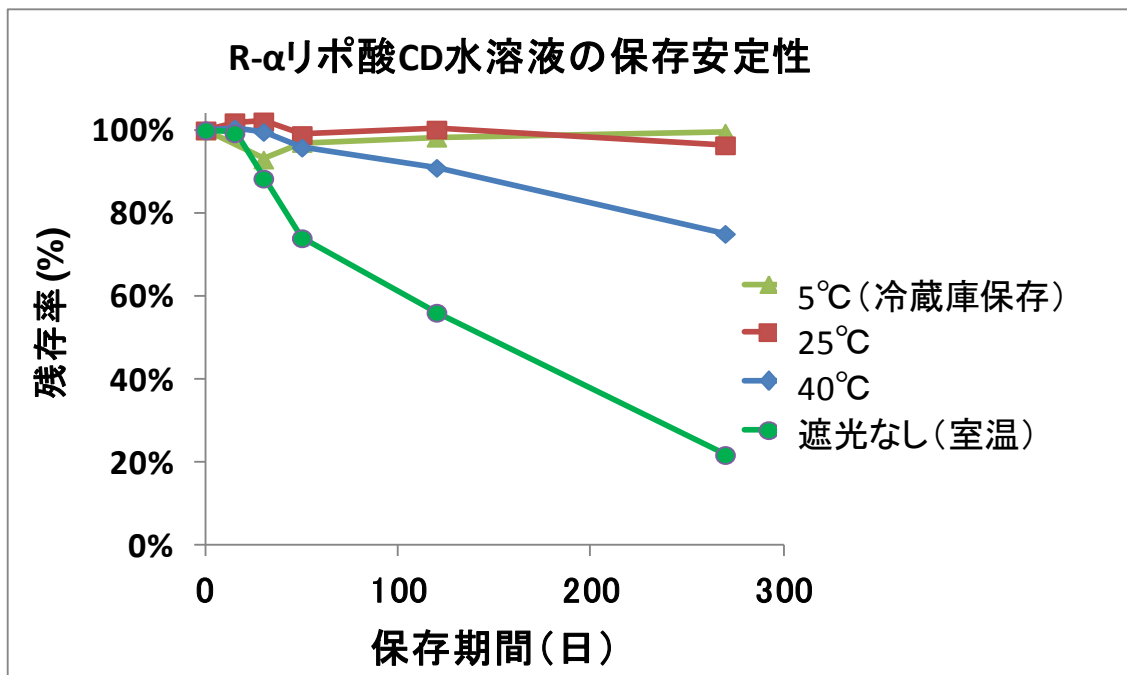


図33. 5°C、25°C、40°C条件下における R-α リポ酸-γ CD 包接体の水溶液中での安定性

遮光した状態では冷蔵庫もしくは室温で保存した場合、試験を行った保存 270 日までは残存率に大きな減少が見られないことが分かった。但し、40°Cで保存した場合、残存率が 75%まで低下することが分かった。また、遮光していなければ室温で 270 日保存後には残存率が 22%にまで低下した。

### 3) 結論

熱および安定性試験の結果から、R-α リポ酸-α CD およびγ CD 包接体の安定性が非常に高く、その残存率は 70°C飽和水蒸気圧下 48 時間熱処理後において、また、37°C、pH1.2 の人工胃液中で 1 時間処理後において、ほぼ 100%であった。第 1 章の収率の結果と合わせて考慮すると、R-α リポ酸を安定化して食品に応用する場合にはγ CD が最も適していることが分かった。また、紫外線照射に対する安定性試験では包接化することによって固相での紫外線照射後の残存率が大きく向上することが分かった。また、安定化の順序は、α CD > β CD > γ CD であったが紫外線照射時間に伴って残存率は減少する傾向が観察された。水相では CD 包接による安定化の効果は見られなかった。これらの結果から、R-α リポ酸-CD 包接体を保存する場合には遮光することが望ましいと考えられる。

R-α リポ酸-CD 包接体を食品に応用する場合には長期の保存安定性が求められるが、固体の

場合、アルミ袋に入れて湿度と光を遮断して状態では 70°Cで 6 カ月保存後も残存率は 90%以上であった。この結果から、賞味期限 2 年を保証できることが分かった。また、液体の場合、遮光条件下では、5°C(冷蔵庫)および 25°C(室温)において保存 270 日後も残存率は 95%以上であった。一方、遮光していなければ室温で 270 日保存後の残存率は 22%であった。これらの結果から、R- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体を食品に応用する場合、固体、液体どちらの場合でも遮光した状態で保存することが望ましい。

#### 引用文献

- 1) Takahashi, H.; Bungo, Y.; Mikuni, K. The aqueous solubility and thermal stability of  $\alpha$ -lipoic acid are enhanced by cyclodextrin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 633-637. (2011).
- 2) Matsugo, S.; Han, D.; Tritschler, H.J.; Packer, L. Decomposition of alpha-lipoic acid derivatives by photoirradiation-formation of dihydrolipoic acid from alpha-lipoic acid. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 38, 51-59. (1996).

## 第4章 $\alpha$ リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の溶解性

### 1) 背景と目的

前述(第1章)の通り、R- $\alpha$  リポ酸はその分配係数が約4(油/水)<sup>1)</sup>であることにより油相、水相の両相において、一定以上の割合で分布できる。また、第2章 1)(2)で記したように、シクロデキストリンはゲスト分子を包接することによって、その物質を可溶化・分散化したり、生体利用能を向上させたりする。R- $\alpha$  リポ酸を食品に応用する場合、経口摂取後に胃を安定に通過し、小腸まで運ばなければならない。我々の研究グループが行っているラットを用いた吸収性に関する実験では、 $\alpha$  リポ酸はメインの吸収部位は小腸ではあるが、胃からも吸収されている可能性が示されている<sup>2)</sup>。また、これまでに、CD 包接化することによってラットにおける経口吸収性が向上することが確認できている。第3章では人工胃液に対する安定性を評価し、CD 包接することによって人工胃液に対する安定性が向上することが分かった。従って、本章では、CD 包接による溶解性の変化について詳細に研究したのでそれを報告する。

### 2) 実験

#### (1) 水及び各 pH の緩衝液への溶解性

##### 水に対する溶解性

超純水 5ml に R- $\alpha$  リポ酸-CD 包接体を 5mg、25mg、50mg、75mg、100mg 加え、37°C の浴槽中にて 1 時間攪拌した後にフィルターろ過し、ろ液中に含まれる $\alpha$  リポ酸を HPLC にて定量した。

分析条件は第2章; 2-2)、(1)に記した条件と同じである。

<結果>

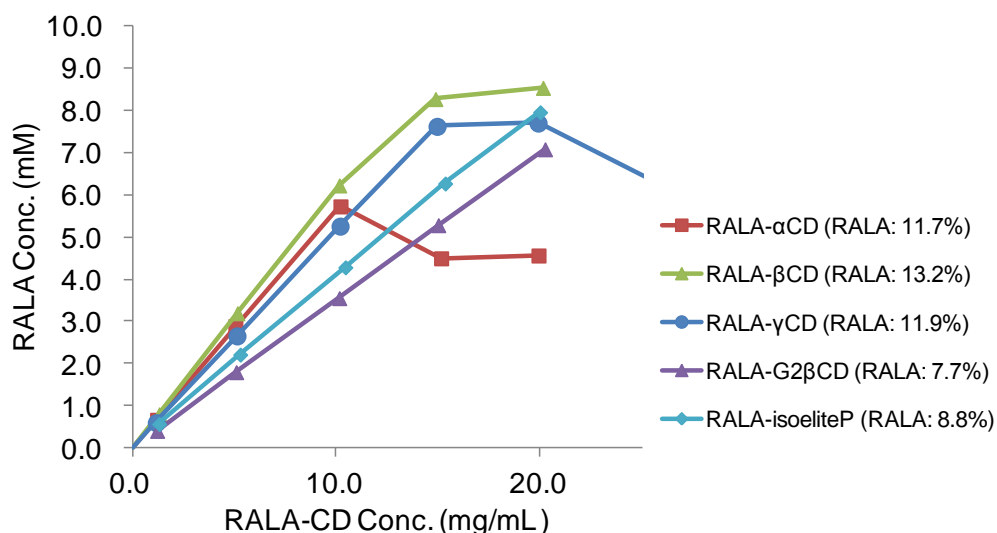


図34. R-α リポ酸-各 CD 包接体(1:1)の水への溶解性

(凡例の括弧内は実験し使用した各包接複合体中の RALA 含有量を示す)

いずれの R-α リポ酸-CD 包接体も添加量に伴い、包接体濃度が 10mg/mL までは直線的に溶解度が上昇したが、R-α リポ酸-α CD 包接体ではそれ以上添加すると溶解度が減少した。R-α リポ酸-β CD および γ CD 包接体では、包接体濃度が 15mg/mL まで直線的に溶解度が上昇したが、それ以上添加しても溶解度は上昇しなかった。また、修飾型の CD である R-α リポ酸-isoeliteP および G2β CD 包接体では水溶性が高く、実験した範囲内では添加量に対して直線的に溶解度が上昇した。

#### pH の緩衝液に対する溶解性

各 pH の緩衝液 5ml に R-α リポ酸-γ CD 包接体 100mg を加え、37°C の浴槽中にて 1 時間攪拌した後にフィルターろ過し、ろ液中に含まれる α リポ酸を HPLC にて定量した。

分析条件は第 2 章; 2-2)、(1) に記した条件と同じである。

<結果>

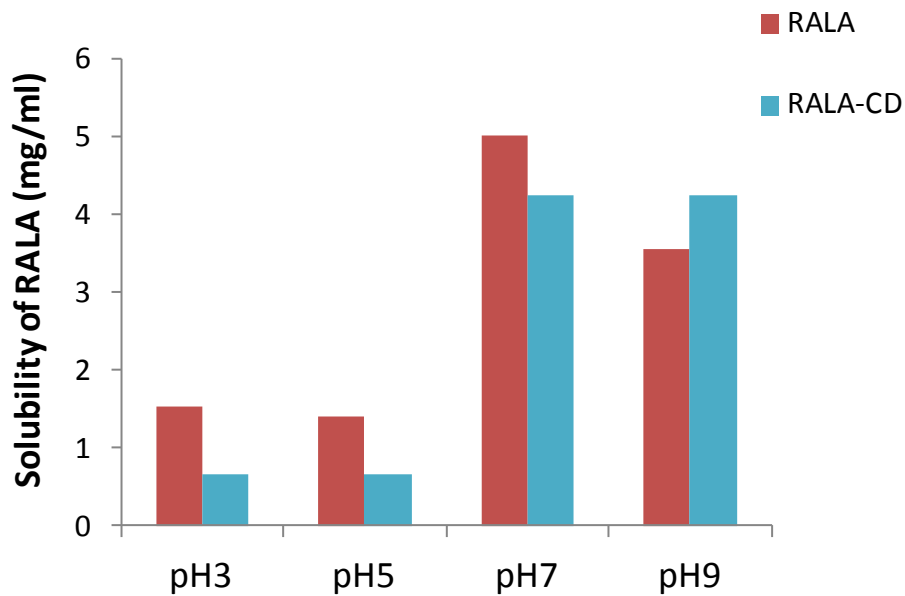


図35. 各 pH の緩衝液に R- $\alpha$  リポ酸もしくは R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD を加えた時の R- $\alpha$  リポ酸の溶解度

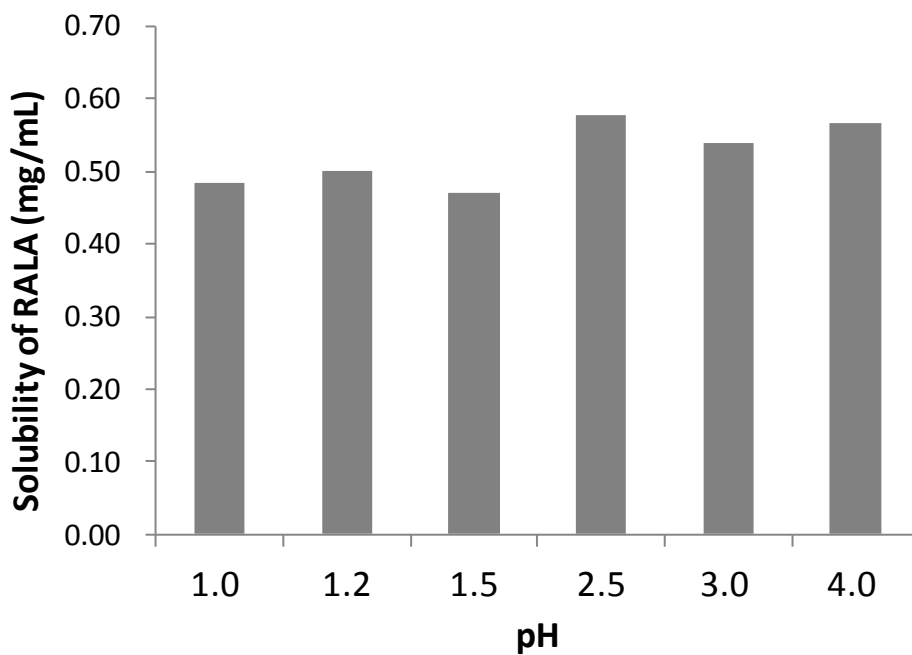


図36. 酸性領域の各 pH の緩衝液に対する R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体の溶解度

$\alpha$  リポ酸は pH7 及び pH9 の緩衝液に対して非常によく溶け、その溶解度は 4~5mg/mL であった。pH3 及び pH5 の緩衝液に対しては、 $\alpha$  リポ酸そのもののほうが包接化するよりも溶解度が高く、

それぞれ 1.5mg/mL、0.5mg/mL であった。酸性領域において詳細に実験を行ったが(図35)、pH1.0~4.0 の範囲では、pH による R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体の溶解度に違いは確認できなかった。

## (2) 人工胃液への溶解性

これまでに $\alpha$  リポ酸は胃からも吸収されていることが分かっていることから、本実験では、胃液の影響を調べることを目的として、pH1.2 の緩衝液及びブタ胃粘膜由来のペプシンを用いて同じく pH1.2 の人工胃液(SGF)を作製し、各溶解液に対する R- $\alpha$  リポ酸及び R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体の溶解度を求めた。

また、ペプシンはキラリティーをもつタンパク質であることから、S 体についても同様の実験を行った。

### <実験>

①および②の溶解液 5ml に R- $\alpha$  リポ酸 5mg もしくは R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 50mg を加え(リポ酸濃度で 1mg/mL に設定)、37°Cの浴槽中にて 1 時間攪拌した後にフィルターろ過し、ろ液中に含まれる  $\alpha$  リポ酸を HPLC にて定量した。

① バッファー (HCl/NaCl: pH1.2, 34mM NaCl)

② 人工胃液 Simulated gastric fluid (SGF), pH1.2, 34mM NaCl containing pepsin.

装置および HPLC の条件は第2章で記した条件と同じである。

### <結果>

R- $\alpha$  リポ酸及び R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体どちらについても、ペプシン含有の人工胃液では同じ pH の緩衝液よりも R- $\alpha$  リポ酸の溶解度が上昇したが、R- $\alpha$  リポ酸と CD 包接体の溶解度に大きな違いは確認できなかった。



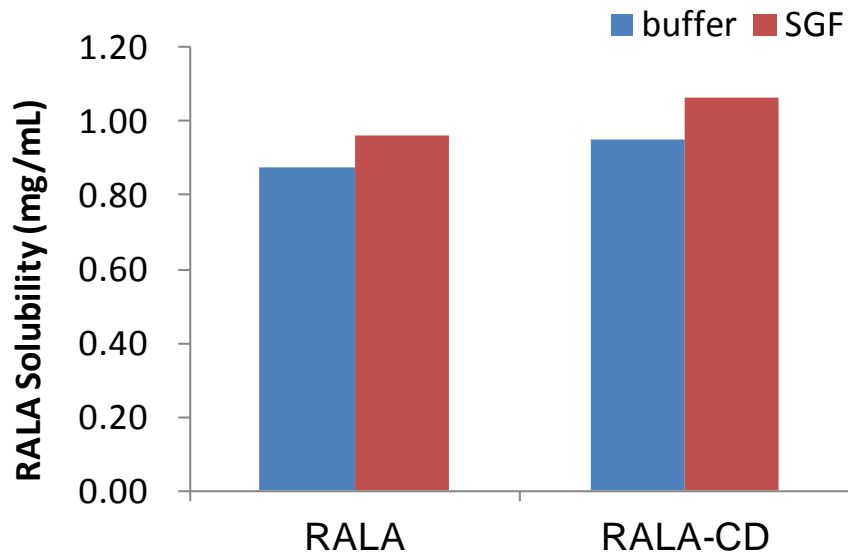


図37. pH1.2の緩衝液(buffer)もしくは消化酵素ペプシンを含んだ人工胃液(SGF)にR- $\alpha$  リポ酸(RALA)もしくはR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体(RALA-CD)を加えた時のRALA溶解度

次に、pH1.2の緩衝液(buffer)もしくは消化酵素ペプシンを含んだ人工胃液(SGF)にラセミ体、S体およびR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体をリポ酸濃度で1mg/mLとなるように加え、37°Cの浴槽中にて1時間攪拌した後にフィルターろ過し、ろ液中に含まれる $\alpha$  リポ酸をHPLCにて定量した。

結果は図38に示すように、ラセミ体、S体およびR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体いずれについても、ペプシン含有の人工胃液では同じpHの緩衝液よりもR- $\alpha$  リポ酸の溶解度が上昇した。ラセミ体- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体については添加した割合に対してほぼ全てのリポ酸が溶解する結果となった。

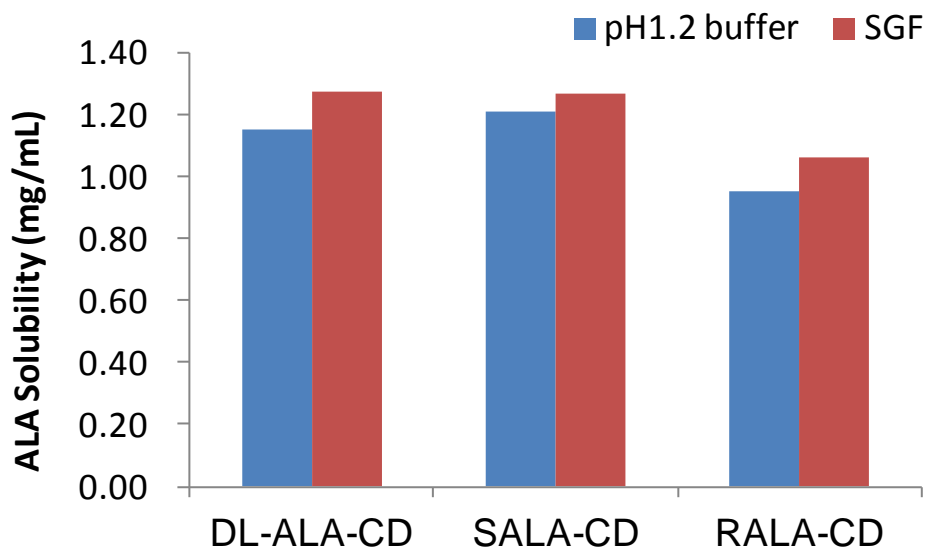


図38. pH1.2の緩衝液(buffer)もしくは消化酵素ペプシンを含んだ人工胃液(SGF)にラセミ(DL-ALA-CD)、S-(SALA-CD)もしくはR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体(RALA-CD)を加えた時の $\alpha$  リポ酸溶解度

先ほどの実験では添加した割合に対してほぼ全てのリポ酸が溶解する結果となったので、添加量を増やし、消化酵素ペプシンを含んだ人工胃液(SGF)にラセミ体、S体およびR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体をリポ酸濃度で1.5mg/mLとなるように加え、37°Cの浴槽中にて1時間攪拌した後、フィルターろ過し、ろ液中に含まれる $\alpha$  リポ酸をHPLCにて定量した。ラセミ体の比較として、R体の $\gamma$  CD包接体とS体の $\gamma$  CD包接体を等量ずつ添加した場合についても同様に溶解度を確認した。

結果は図39に示すようにラセミ体の $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体はR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体に比べて有意に溶解度が高い結果となったが、ラセミ体と同じ割合でR体とS体の包接体を混合したサンプルでは溶解度がラセミよりも低く、SとRの間の値となった。また、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体の人工胃液(SGF)に対する溶解度はSおよびラセミの $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD包接体に比べて有意に低い結果となった。

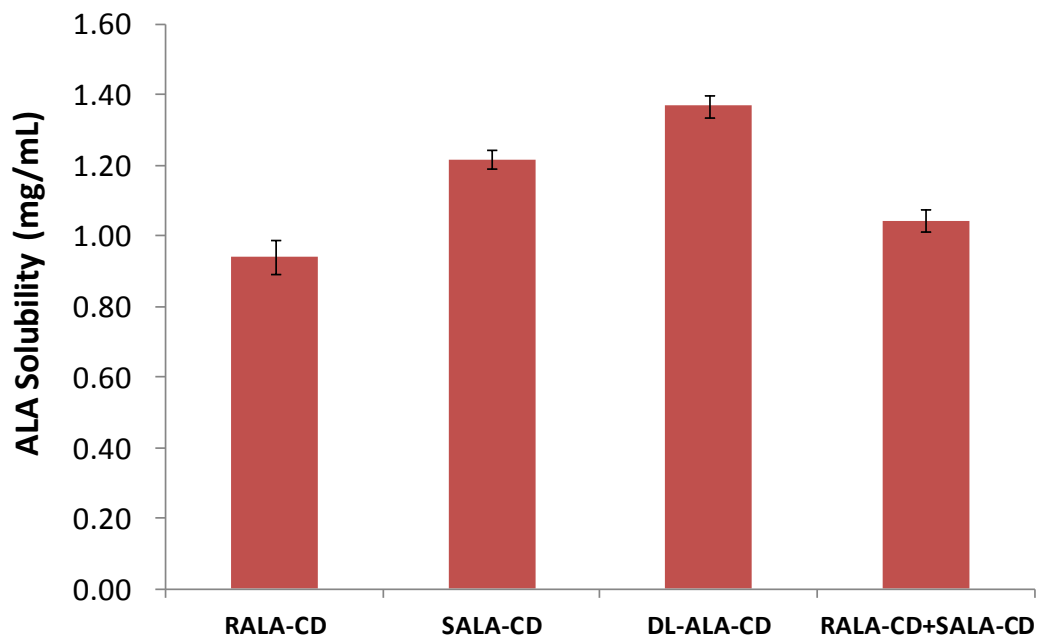


図39. 消化酵素ペプシンを含んだ人工胃液(SGF)にラセミ(DL-ALA-CD)、S-(SALA-CD)もしくは R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体(RALA-CD)を加えた時の $\alpha$  リポ酸溶解度

これらの結果から、ペプシンはキラリティーを認識し、 $\alpha$  リポ酸の溶解度に影響する可能性が示唆された。

### (3) 人工胃粘液への溶解性 (溶解度と溶解速度)

脂溶性のゲスト分子を CD 包接すると、粘液層(ムチン層)での溶解性が向上し吸収性が高まる

<sup>3)</sup> とのメカニズムが提唱されていることから、次に、人工胃粘液に対する溶解度を確認した。

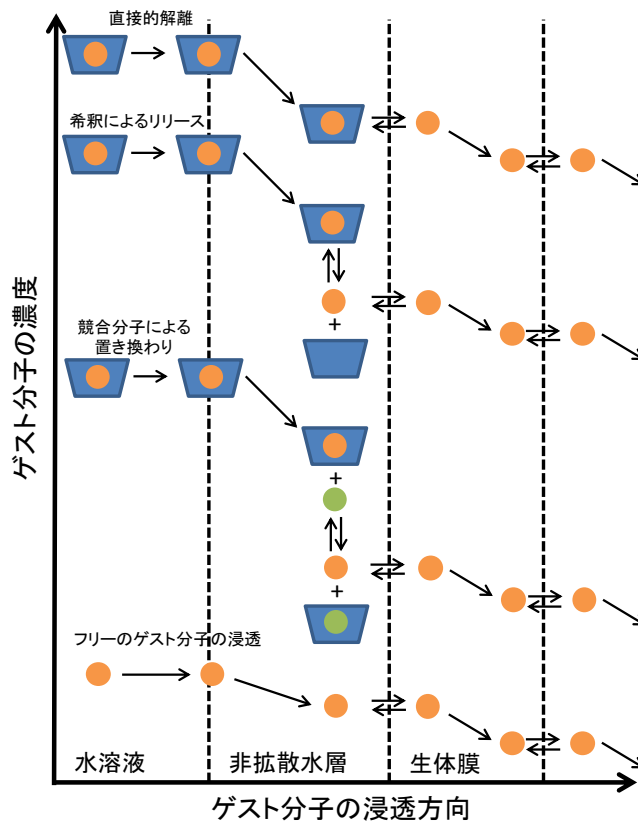


図40. 脂溶性ゲスト分子の CD 包接体が吸収される模式図

\*出典 T. Loftsson / *Pharmazie* 67 (2012) 363 -370、

Drug permeation through biomembranes: cyclodextrins and the unstirred water layer

消化管内の粘液層は水、ムチン、タンパクおよび脂質から構成されている<sup>4)</sup>ことが知られている。そこで、R- $\alpha$  リポ酸 (RALA) と  $\gamma$  CD の配合比が 1:1 (モル比) となるように作製した R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体 (RALA-CD) を水、0.8% ムチン、タンパク質 (5% アルブミン) で構成された人工胃粘液に添加し、超音波にて 20 分間分散させた後に 0.45  $\mu$  m のタンパク質除去フィルターで処理し、人工胃粘液中に溶解した ALA を HPLC により定量した。このとき、各サンプル溶液の pH も同時に測定した。また、遊離の RALA についても同様に溶解度を求め比較した。続いて、人工胃粘液の各構成成分の水溶液に対しても溶解度を求めた。

S 体 (SALA) 及びラセミ体 (DL-ALA) の  $\alpha$  リポ酸と  $\gamma$  CD の包接複合体についても同様の試験を行ったので合わせて報告する。

<結果>

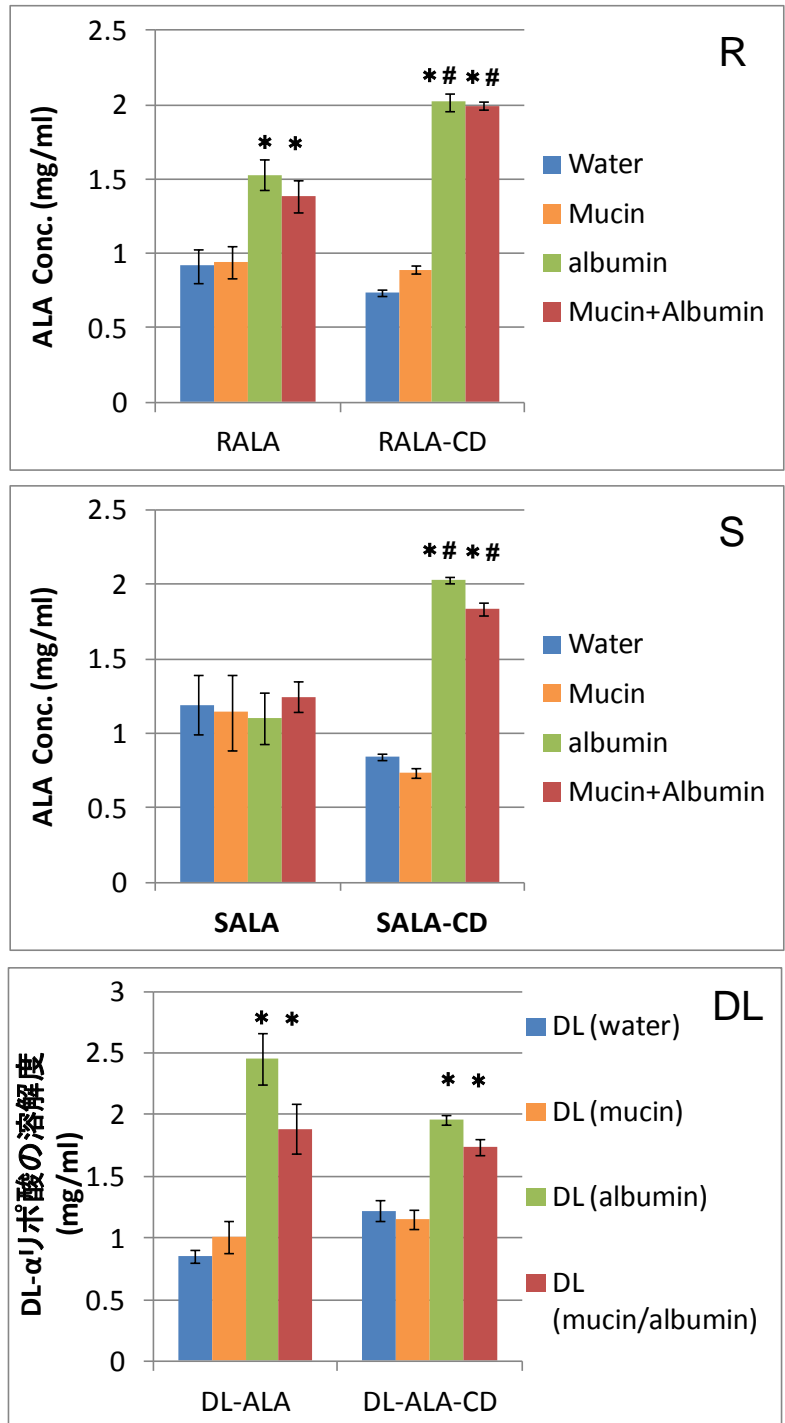


図40. 各成分を含んだ人工胃粘液にリポ酸もしくはリポ酸-CDを加えた時のALA溶解度  
(上から、R、S、ラセミ)

(\* $p < 0.01$  Albumin or Mucin+Albumin v.s. Water or Mucin, #  $p < 0.01$  ALA-CD v.s. ALA, Tukey-Kramer's test)

結果、アルブミンの緩衝作用が RALA の溶解度に寄与することが分かった。アルブミンが存在するとRALAの溶解度が1.7倍に向上することが分かった。また、 $\gamma$  CD包接体では、遊離のRALAに比べて人工胃粘液に対する溶解度が有意に向上した(図40;上)。

一方、SALA の溶解度に対してアルブミンは寄与しなかった。しかしながら、SALA-CD ではアルブミンが存在すると溶解度が2倍以上上昇した。

ラセミ体についてはアルブミンが存在すると溶解度が向上する点に関しては R 体の場合と似た傾向を示したが、CD 包接化することによる溶解度の上昇は観察されなかった。

次にアルブミン濃度の影響を確認した。RALA 10mg もしくは RALA-CD 100mg を各濃度のアルブミン水溶液 5mLに加えて超音波にて20分間攪拌し、0.45 $\mu$  mのフィルターで濾過し、濾液中の $\alpha$ -リポ酸をHPLCで定量した。HPLCの条件は第2章と同じである。

<結果>

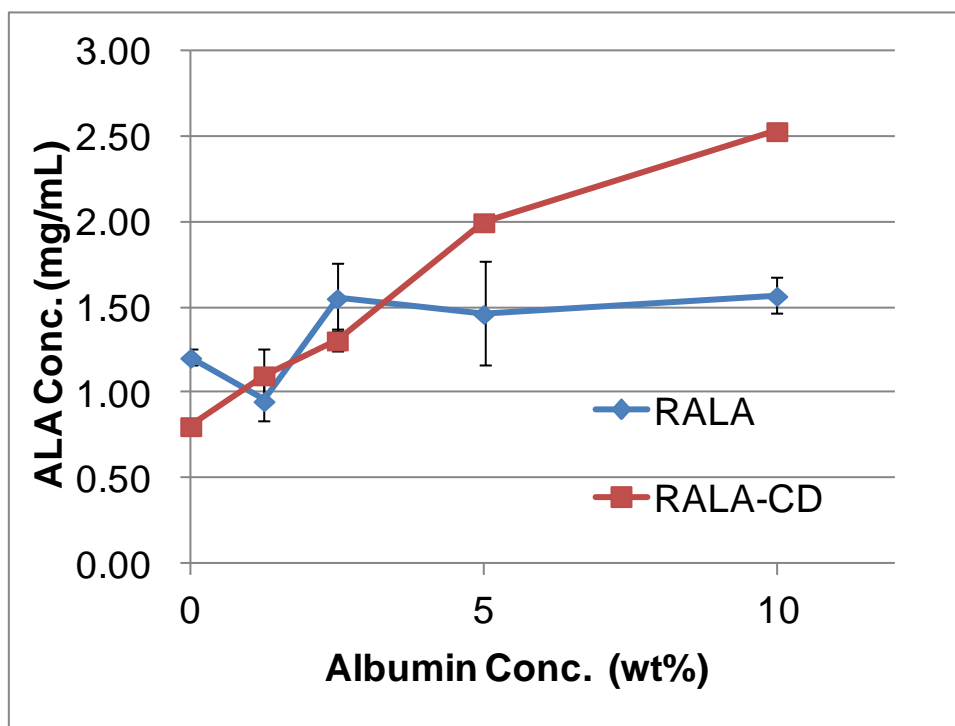


図41. 各濃度のアルブミン水溶液に RALA もしくは RALA-CD を加えた時の RALA 溶解度 (\* $p < 0.01$  RALA-CD v.s. RALA, Tukey-Kramer's test)

	%albumin	ALA (mg/ml)	S.D.
<b>RALA</b>	0	<b>1.21</b>	0.05
	1.25	<b>0.95</b>	0.11
	2.5	<b>1.55</b>	0.20
	5	<b>1.46</b>	0.30
	10	<b>1.57</b>	0.10
<b>RALA-CD</b>	0	<b>0.81</b>	0.01
	1.25	<b>1.10</b>	0.15
	2.5	<b>1.31</b>	0.07
	5	<b>2.00</b>	0.04
	10	<b>2.53</b>	0.01

表9. 濃度のアルブミン水溶液に RALA もしくは RALA-CD を加えた時の RALA 溶解度

RALA-CD では、アルブミン濃度依存的に溶解度が上昇する傾向がみられた。また、アルブミン濃度が5%以上の範囲では、 $\gamma$ -CD 包接体の方が未包接よりも1.37倍~1.61倍高い溶解度を示した。

次に、溶解速度を調べた。ALA 10mg もしくは ALA-CD 100mg を5%アルブミン水溶液 5mLに加えて、超音波にて攪拌し、1分、3分、5分、10分、20分、30分、40分、50分、60分後にサンプリングを行い、0.45 $\mu$ m のフィルターで濾過し、濾液中の $\alpha$ -リポ酸を HPLC で定量した。HPLC の条件はこれまでと同様である。

<結果>

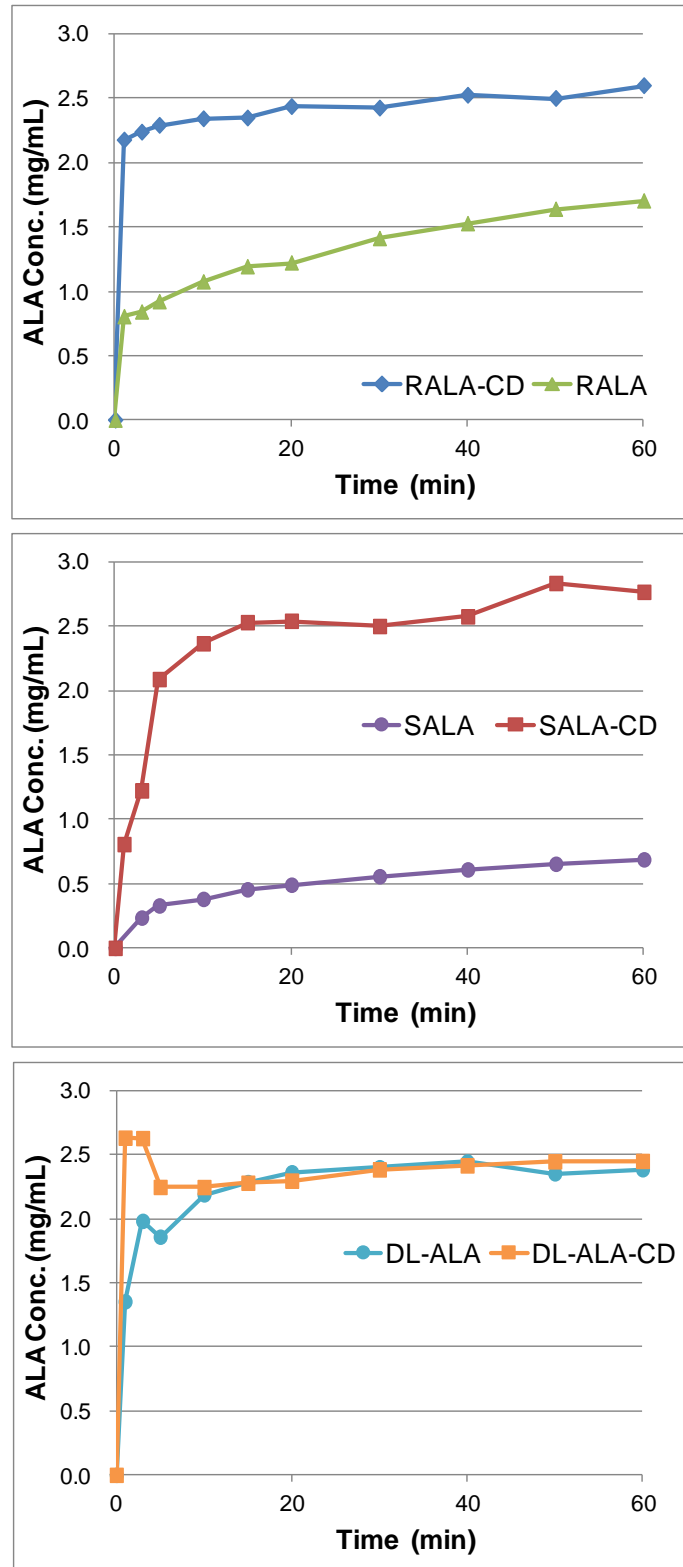


図42. 5%アルブミン水溶液に対する $\alpha$  リポ酸と $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体の溶解度と時間の関係 (上から、R、S、ラセミ)



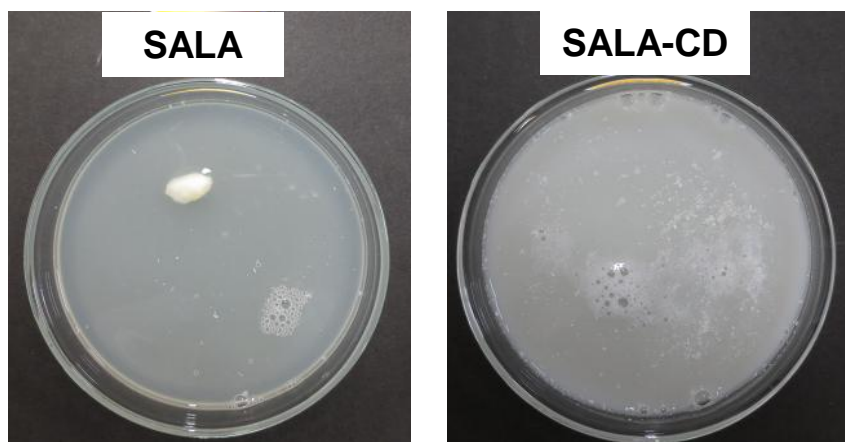


写真3. 5%アルブミン水溶液中でのサンプルの様子  
(左: SALA では大きな凝集物が生成、右: SALA-CD では均一に分散)

CD 包接すると、非常に速く溶解度が上昇した。SALA では攪拌 60 分後も溶解度が低かった。SALA では溶液中でポリマー様の凝集物が生成していた。一方、SALA-CD では凝集物が生成せず、一様に分散していた。RALA では小さな凝集物が観察されたが表面に粘性はなく、薬さじで押すと崩れたことから、弾性を示さなかった。SALA 及び RALA の凝集物について DSC 分析を行った結果(図43)、RALA の凝集物ではリポ酸の融解ピークが現れたが SALA の凝集物ではリポ酸の愉快ピークは現れなかった。また、HPLC を用いて凝集物中のリポ酸を定量した結果、RALA の凝集物中にはリポ酸が 20.15wt%含まれていたが、SALA の凝集物中にはリポ酸はほとんど含まれておらず 0.9wt%という結果であった。これらの結果から、5%アルブミン水溶液中で生成した SALA の凝集物はポリマーであることが推察された。

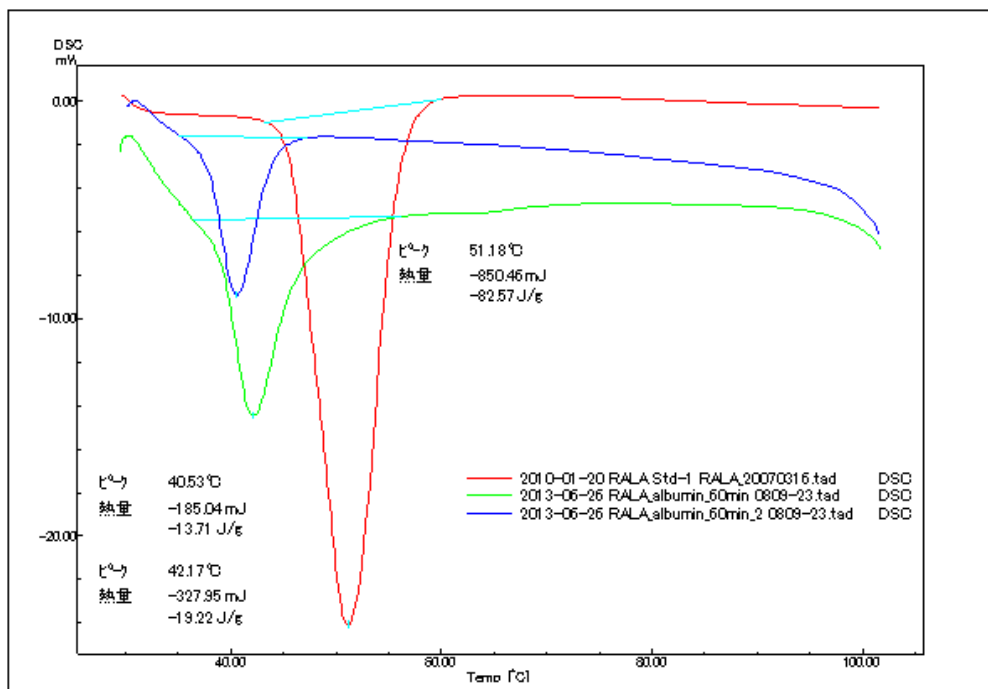


図43. 5%アルブミン水溶液中で生成した $\alpha$  リポ酸の凝集物の DSC 測定結果  
(一例として RALA の融解ピークを示す)

#### (4) 人工腸液への溶解性

##### タウロコール酸水溶液への溶解性

腸管内での脂溶性物質の吸収には胆汁酸が関与している。そこで、まずは胆汁酸の主成分の一つであるタウロコール酸ナトリウム (NaTCA) (和光純薬株式会社) を用い、0%, 0.3%, 1.0%, 2.0%, 3.0%濃度の NaTCA 水溶液 各 5ml に R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体各々200mg ずつを加え、超音波にて5分間分散させた後、その懸濁液を0.25 $\mu$ mのフィルターでろ過し、ろ液中に含まれる R(+)- $\alpha$  リポ酸含有量を HPLC にて測定した。

##### <結果>

R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体の水へ溶解させたときの R(+)- $\alpha$  リポ酸濃度は凡そ 0.7mg/ml であり、NaTCA 水溶液に対しては NaTCA 濃度の増加に従い R(+)- $\alpha$  リポ酸濃度が増大する傾向がみられた。3.0%NaTCA 水溶液では R(+)- $\alpha$  リポ酸濃度は凡そ 1.4mg/ml となり、水への溶解度の約 2 倍となった(図7)。また、NaTCA 水溶液に R(+)- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体を加えて分散させた懸濁液中には大きなポリマーは観察されず、分散状態は均一であった。

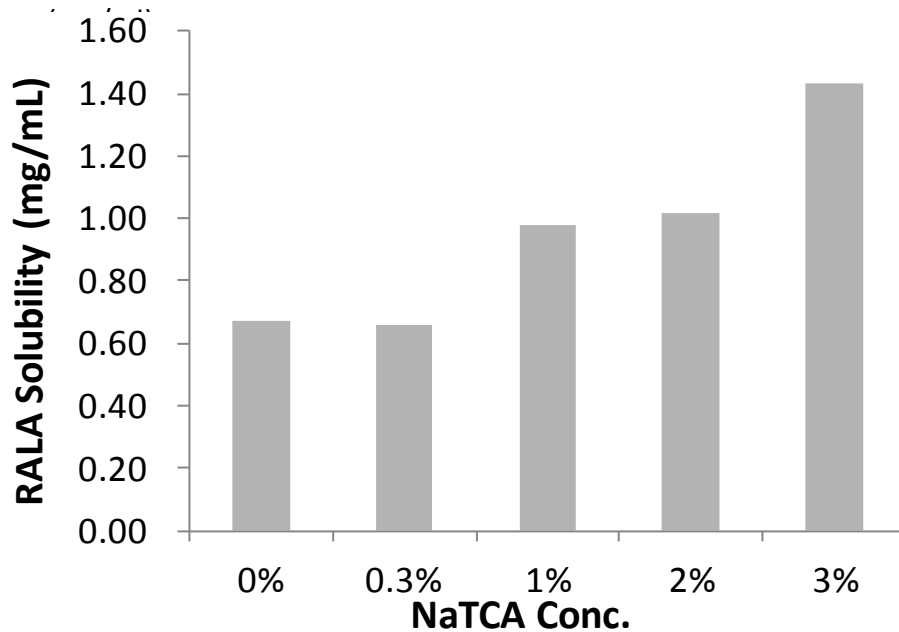


図44. 各濃度のタウロコール酸ナトリウム (NaTCA) 水溶液に対する R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体の溶解度

### 人工腸液への溶解性

腸管内の吸収性を評価するため、食前の人工腸液 (FeSSIF) 及び食後の人工腸液 (FaSSIF) を調整し、各人工腸液に対する溶解度を評価した。以下に人工腸液の調整方法を記す。

<人工腸液の処方> \*単位 mM

FaSSIF	
Sodium taurocholate	3
Egg phosphatidylcholine	0.75
Sodium dihydrogen phosphate	28.66
Sodium hydroxide	~13.8
Sodium chloride	106

食前 (絶食時) (FaSSIF)

FeSSIF	
Sodium taurocholate	15
Egg phosphatidylcholine	3.75
Acetic acid	144
Sodium hydroxide	~101
Sodium chloride	173

食後 (非絶食時) (FeSSIF)

出典<sup>5)</sup>: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **56**, 453-462 (2004).

Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF)				
食前	FaSSIF	mM	g/100mL	MW
	Sodium taurocholate	3	0.161	537.9
	Egg phosphatidylcholine	0.75	0.057	761.6
	Sodium dihydrogen	28.66	0.344	120.0
	Sodium hydroxide (NaOH)	~13.8 (pH6.5)	0.055	40.0
	Sodium chloride (NaCl)	106	0.619	58.4
blank FaSSIF				
	NaOH	Wako特級	~0.552 g	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Wako特級	3.439 g	
	NaCl	Wako特級	6.195 g	
	Water	Milli-Q		
	1N NaOH	Wako容量滴定用	pH6.5に調整	
	total		1000 mL	
Preparation of FaSSIF				
			g/100mL	
①液	sodium taurocholate		0.161	
	blank FaSSIF		25 mL 適量 (全量に対して4分の1)	
	+			
②液	lecithin		0.057	
	methylene chloride		0.6 mL 適量 (レシチンの約10倍量)	

Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF)				
食後	FeSSIF	mM	g/100mL	MW
	Sodium taurocholate	15	0.807	537.9
	Egg phosphatidylcholine	3.75	0.286	761.6
	Acetic acid	144	0.865	60.1
	Sodium hydroxide (NaOH)	~101 (pH5)	0.404	40.0
	Sodium chloride (NaCl)	173	1.011	58.4
blank FeSSIF				
	NaOH	Wako特級	~4.039 g	
	Acetic acid	Wako特級	8.647 g	
	NaCl	Wako特級	10.111 g	
	Water	Milli-Q		
	1N NaOH	Wako容量滴定用	pH5に調整	
	total		1000 mL	
Preparation of FeSSIF				
			g/100mL	
①液	sodium taurocholate		0.807	
	blank FeSSIF		25 mL 適量 (全量に対して4分の1)	
	+			
②液	lecithin		0.286	
	methylene chloride		3 mL 適量 (レシチンの約10倍量)	

予め、ブランクの人工腸液 (タウロコール酸 Na とレシチンを含まない緩衝液)を調製した。FaSSIF (食前)は NaTCA 3mM とレシチン 0.75mM 加え、また、FeSSIF (食後)は NaTCA 15mM、レシチン 3.75mM 加えた。

RALA 30mg もしくは RALA-CD 300mg を人工腸液 5mLに加えて超音波にて 20 分間攪拌し、0.45μ m のフィルターで濾過し、濾液中のα -リボ酸を HPLC で定量した。HPLC の条件は第2章と同じである。

<結果>

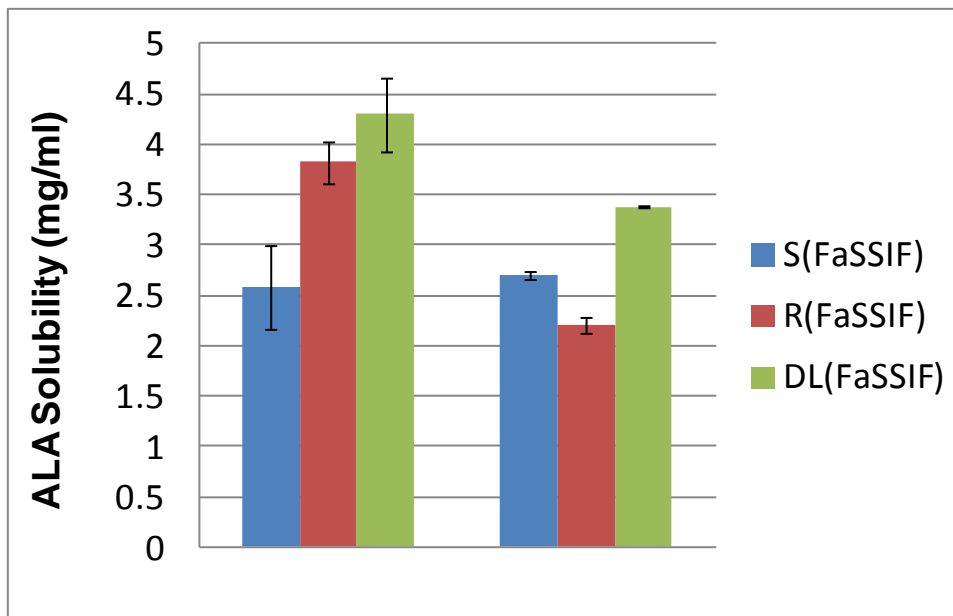


図45. 食前の人工腸液に対するリポ酸およびリポ酸-CDの溶解度(R、S、ラセミ)

(\* $p < 0.01$  RALA or DL-ALA v.s. SALA, #  $p < 0.01$  RALA-CD v.s. SALA-CD, Tukey-Kramer's test)

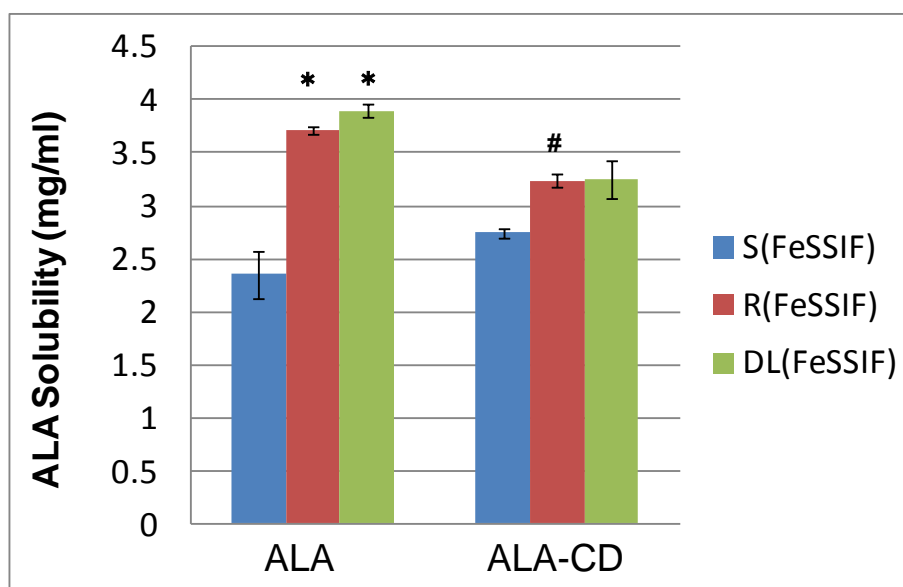


図46. 食後の人工腸液に対するリポ酸およびリポ酸-CDの溶解度(R、S、ラセミ)

(\* $p < 0.01$  RALA or DL-ALA v.s. SALA, #  $p < 0.01$  RALA-CD v.s. SALA-CD, Tukey-Kramer's test)



写真. 人工腸液中の各サンプルの様子

食後の人工腸液には、胆汁酸の成分の一つであるタウロコール酸や脂質を分散させて分解を促すレシチンが含まれる。実験で用いたレシチンは卵由来であるので、タンパク質も微量に含まれている。写真から分かるように、SALA でのみ凝集物が生成した。(人工胃粘液の場合と同じ)この現象はレシチンに含まれるたんぱく質の影響と推察される。

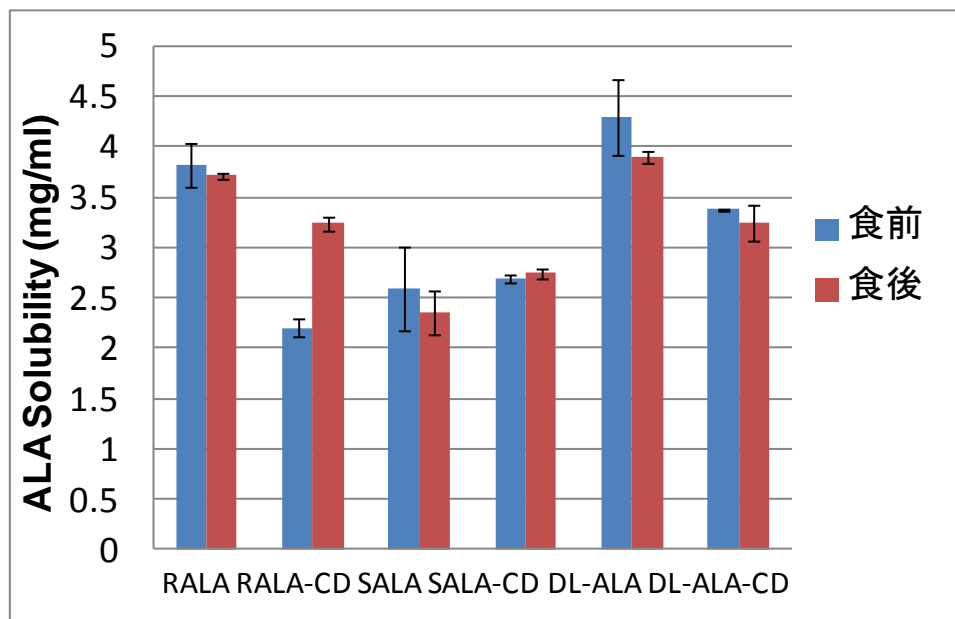


図47. 食前・食後の人工腸液に対するリポ酸およびリポ酸-CD の溶解度(R、S、ラセミ)  
(データは Mean±S.D.)

各サンプル溶液の pH を測った結果は以下の通り。

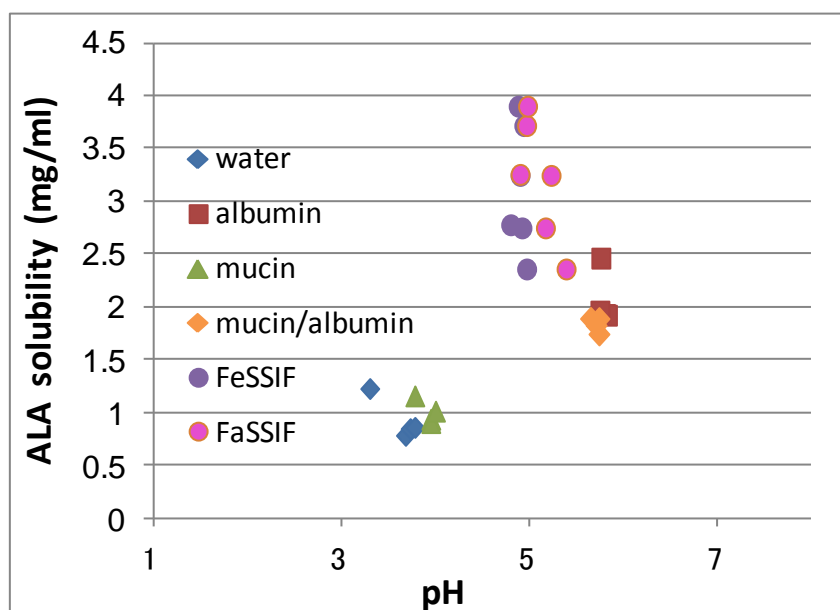


図48. 各溶解液に対するリポ酸およびリポ酸-CD の溶解度と pH の関係

人工胃粘液(ムチン・アルブミン水溶液)に対する溶解度の実験では、アルブミンの緩衝作用による pH コントロールが $\alpha$  リポ酸の溶解性に影響している可能性が示唆されたが、人工腸液に対する溶解度の実験では各サンプル溶液の pH がほとんど変わらなかったことから、本実験では pH とは異なる要因がリポ酸の溶解度に関与していると考えられる。

### 3) 結論

#### 結果のまとめ

##### 1. 各 pH の緩衝液に対する溶解度

酸性領域では、pH による RALA-CD の溶解度に違いは確認できなかった。

アルカリ領域 (pH7、pH9) では、リポ酸の溶解度は高かった。(酸性のときの約 8 倍)

##### 2. 人工胃液に対する溶解度

ペプシンによる RALA と RALA-CD の溶解度に違いは確認できなかった。

##### 3. 人工胃粘液に対する溶解性

アルブミンが RALA-CD の溶解度上昇に寄与していることが示唆された。

また、CD 包接すると、非常に速く溶解度が上昇した。

SALA ではアルブミン存在下でポリマーのような不溶性の凝集物が生成した。

RALA-CD では、アルブミン濃度依存的に溶解度が上昇する傾向がみられた。

また、アルブミン濃度が 5%以上の範囲では、 $\gamma$ -CD 包接体の方が未包接よりも 1.37 倍~1.61 倍高い溶解度を示した。

以上の結果から、次のシクロデキストリン包接がリポ酸の溶解性に与える影響について以下のよ

うに考察できる。

- ① 胃粘液中に存在するアルブミンなどの緩衝作用によりリポ酸の溶解度が上昇する。
- ②  $\gamma$ -CD 包接体では、非拡散水層(粘液層)で均一に分散するため、未包接のリポ酸に比べて溶解度が高い。(CD の凝集防止効果)

結論としては、①、②の作用により、生体膜への移行が促進され、吸収性が向上するのではないかと推察された。

#### 引用文献

- 1) Matsugo, S., Han, D., Tritschler, H. J., et al.: Decomposition of alpha-lipoic acid derivatives by photoirradiation-formation of dihydrolipoic acid from alpha-lipoic acid. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 51-59 (1996).
- 2) 内田涼大ほか、日本薬剤学会第 27 年会 講演要旨集, 243 (2012).
- 3) T. Loftsson: Drug permeation through biomembranes: cyclodextrins and the unstirred water layer. *Pharmazie*, 67 363 -370, (2012).
- 4) W. L. Agneta et al., *Pharm. Res.*, 15; 66-71(1998)
- 5) *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 453-462 (2004).



## 第5章 $\alpha$ リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の安全性評価

### 1) 背景と目的

機能性成分を食品用途として用いる場合、*in vitro* および *in vivo* において毒性を評価することは極めて重要である。シクロデキストリンは様々な機能性物質を安定化したり、その物性を改善したりする目的で食品分野および医薬品分野において広く使用されている。 $\alpha$  リポ酸も広く利用されており、これまでに $\alpha$  リポ酸の毒性に関する研究がいくつか報告されているが[8]、CD によって包接安定化された R- $\alpha$  リポ酸の毒性はこれまでに評価されていない。

本研究では、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体の安全性を確認することを目的として、その毒性を評価した。本実験では、単回投与による急性毒性試験、Ames テスト及びチアミン不足ラットを用いた長期投与による毒性試験を実施した。過去の研究で、猫に対する $\alpha$  リポ酸の毒性はヒトに対する毒性の 10 倍であるとの報告例があるため[9]、我々は *in vivo* の試験において猫ではなくラットを使用した。さらに、本研究では、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体を経口摂取することを前提としているため、長期投与試験においては餌に混合して動物に投与した。長期投与試験において実験条件をチアミン不足に設定した背景については、現代人の食生活では糖質を多く摂る傾向からチアミン不足が懸念されており、様々な疾病にチアミン不足が関与している可能性があることから、 $\alpha$  リポ酸の摂取がチアミン不足とどのように関連するかについて観察するために設定した。

### 2-1) 単回投与による急性毒性試験

#### (1) 実験

本試験は、財団法人 日本食品分析センターで実施した。

#### <実験動物>

5 週齢の ICR 系雌雄マウスを日本エスエルシー株式会社から購入し、約 1 週間の予備飼育を行って一般状態に異常のないことを確認した後、試験に使用した。試験動物はポリカーボネート製ケージに各 5 匹収容し、室温  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、照明時間 12 時間/日に設定した飼育室において飼育した。飼料(マウス、ラット用固型飼料;ラポ MR ストック、日本農産工業株式会社)及び飲料水(水道水)は自由に摂取させた。

#### <試験液の調整>

検体(R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  シクロデキストリン包接体)を注射用水で懸濁し、100mg/mL の試験液を調整した。

### <試験方法>

検体投与用量として 2000mg/kg を投与する試験群及び溶媒対照として注射用水を投与する対照群を設定し、各群につき雌雄それぞれ 5 匹を用いた。

投与前に約 4 時間試験動物を絶食させた。体重を測定した後、試験群には試験液、対照群には注射用水をそれぞれ 20mL/kg の投与用量で胃ゾンデを用いて強制単回経口投与した。

観察期間は 14 日間とし、投与日は頻回、翌日から 1 日 1 回の観察を行った。投与後 7 日及び 14 日に体重を測定し、t-検定により有意水準 5% で群間の比較を行った。観察期間終了時に動物すべてを剖検した。

本試験は、OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 420 (2001)を参考とし、動物の取扱いについては「日本食品分析センター動物実験倫理規程」に従った。

## (2)結果

### 死亡例:

雌雄ともにいずれの投与群においても、観察期間中に死亡例は認められなかった。

### 一般状態:

雌雄ともにいずれの投与群においても、観察期間中に異常は見られなかった。

### 体重変化(表):

投与後 7 日および 14 日の体重測定において、雌雄ともに試験群は対照群と比べ体重値に差は見られなかった。

Sex	Group	Day 0	Day 7	Day 14
Males	RALA-CD	33.0 ± 0.9 (5)	37.5 ± 1.8 (5)	39.5 ± 2.8 (5)
	Control	33.0 ± 1.0 (5)	37.9 ± 1.4 (5)	40.5 ± 2.1 (5)
Females	RALA-CD	26.9 ± 1.1 (5)	28.9 ± 1.4 (5)	30.5 ± 2.0 (5)
	Control	27.1 ± 1.4 (5)	30.4 ± 1.1 (5)	32.7 ± 1.3 (5)

Table 10. Body weights of mice administered RALA-CD or water (control) for 14 days.

Body weight (g): mean ± S.D., (5): animal number

### 剖検所見:

観察期間終了時の剖検では、雌雄ともにすべての試験動物に異常は見られなかった。

### (3) 結論

検体について、マウスを用いた急性経口毒性試験(限度試験)を実施した。検体を 2000mg/kg の用量で単回経口投与した結果、観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった。したがって、検体のマウスにおける単回経口投与による LD50 値は、雌雄ともに 2000mg/kg 以上であるものと考えられた。

## 2-2) 微生物を用いた変異原性試験(Ames)

### (1) 実験

本試験は広栄テクノ株式会社で実施した。

#### <試験条件>

使用菌株：(ネズミチフス菌)TA100, TA1535, TA98, TA1537

(大腸菌)WP2 *uvrA*

試験方法：S9(±)、プレインキュベーション法(37°C、20分)

培養時間：48時間

使用溶媒：DMSO

用量：最高用量 5000µg/plate、公比 4、計 7 用量

プレート数：2プレート/処理

本試験は、労働安全衛生法第五十七条の三第一項の規定に基づく厚生労働大臣の定める基準及び、「労働省化学物質調査課(編):安衛法における変異原性試験-テストガイドラインと GLP、中央労働災害防止協会(1991)」に準じて行われた。

### (2) 結果と考察

ネズミチフス菌 TA100, TA1535, TA98, TA1537 及び大腸菌 WP2 *uvrA* を使用して R-α リポ酸-γ CD 包接体の突然変異誘発能の有無を調査した。その結果、代謝活性化の有無によらず、いずれの菌株においても陰性対照と比較して 2 倍以上の復帰コロニー数の増加は認められなかった。なお、陽性対照はそれぞれの菌株に対して陰性対照の 2 倍以上に復帰変異コロニーを誘発させ、試験が適切に実施されたことを示した。本被験物質の菌に対する生育阻害は認められなかった。

本被験物質の沈殿も認められなかった。

従って、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体は本試験条件下で突然変異誘発能を有しないと判定した。

Metabolic activation	RALA-CD concentration ( µg/plate )	Number of revertant colonies				
		Base substitution type strain			Frameshift type strain	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9mix(-)	Negative control	105/105 (105)	10/ 7 (9)	49/44 (47)	17/24 (21)	12/10 (11)
	1.2	103/ 92 ( 98)	9/9 (9)	58/57 (58)	19/29 (24)	12/11 (12)
	4.9	89/118 (104)	7/7 (7)	62/52 (57)	19/17 (18)	9/14 (12)
	20	99/91 (95)	6/9 (8)	62/54 (58)	23/16 (20)	14/10 (12)
	78	101/123(112)	9/7 (8)	70/57 (64)	16/23 (20)	13/10 (12)
	313	87/99 (93)	9/10 (10)	54/63 (59)	31/24 (28)	11/10 (11)
	1250	93/107 (100)	7/10 (9)	53/52 (53)	16/17 (17)	12/14 (13)
	5000	107/112 (110)	9/9 (9)	63/65 (64)	24/19 (22)	10/15 (13)
S9mix(+)	Negative control	107/92 (100)	10/ 12 (11)	62/66 (64)	24/30 (27)	25/21 (23)
	1.2	119/ 101 ( 110)	11/12 (12)	65/61 (63)	38/26 (32)	21/19 (20)
	4.9	119/138 (129)	9/9 (9)	44/62 (53)	38/38 (38)	27/20 (24)
	20	106/110(108)	7/7 (7)	51/57 (54)	44/30 (37)	24/19 (22)
	78	111/106 (109)	7/12 (10)	67/61 (64)	27/29 (28)	30/26 (28)
	313	112/130 (121)	11/12 (12)	81/68 (75)	31/32 (32)	23/23 (23)
	1250	113/122 (118)	13/9 (11)	46/54 (50)	21/36 (29)	25/26 (26)
	5000	86/102 (94)	5/12 (9)	61/62 (62)	31/127 (29)	20/20 (20)

Table 11. Number of colonies induced RALA-CD in the pre-incubation assay.

\*Data1/data2 (average)

		Number of revertant colonies (colonies/plate)				
		Base substitution type strain			Frameshift type strain	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9mix(-)	Positive control	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	ICR-191
	Concentration ( µg/plate )	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	Number of colonies (colonies/plate)	780/801 (791)	519/513 (516)	231/273 (252)	524/571 (548)	4080/3788 (3934)
S9mix(+)	Positive control	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( µg/plate )	1.0	2.0	10.0	0.5	2.0
	Number of colonies (colonies/plate)	815/727 (771)	286/232 (259)	995/919 (957)	356/326 (341)	154/102 (128)

Table 12. Number of colonies of positive control in the pre-incubation assay.

\*Data1/data2 (average)

Positive controls,

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

ICR-191:6-Chloro-9-[3-(2-chloroethylamino)-propylamino]-2-methoxyacridine dihydrochloride

2-AA: 2-Aminoanthracene

## 2-3)チアミン不足ラットに対する長期投与による安全性試験

### (1)実験

本試験は株式会社イナリサーチに委託し北山ラベス株式会社にて実施した。

#### <実験動物>

日本チャールス・リバー株式会社で生産された4週齢の雄のCrI:CD(SD)ラットを一週間馴化飼育し、5週齢にて実験を行った。

温度 22±3°C、湿度 60±15%、換気回数 12~15回/時間及び照明 12時間(7時~19時)/日に設定した飼育室で動物をステンレス製ケージに個別に入れて飼育した。

馴化飼育期間の飼料は、CRF-1(粉末、オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌器に入れ、自由に摂取させた。投与期間中の飼料は下表に示す。AIN-93G 配合(VB1(+)、VB1 含有量: 0.6mg/100g)及びAIN-93G 配合ビタミンB1 調整飼料(VB1(-)、VB1 含有量: 0.025mg/100g)はオリエンタル酵母工業株式会社から供給された。また、飲料水(水道水)を給水器に入れ、自由に摂取させた。

Composition of 100 g of each experimental diet

Ingredient	VB1(+)	VB1(-)
Casein (Vitamin free)	20	20
L-Cystine	0.3	0.3
Cornstarch	39.7486	39.7486
alpha-cornstarch	13.2	13.2
Sucrose	10	10
Soybean oil	7	7
Cellulose	5	5
AIN93G mineral mixture	3.5	3.5
AIN93 vitamin mixture (VB1+) *	1	-
AIN93 vitamin mixture (VB1-) **	-	1
Choline bitartrate	0.25	0.25
Tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014
Total	100	100

\* For VB1(+) group, VB1 0.6mg/100g diet

\*\* For VB1(-) group, VB1 0.025mg/100g diet

Table 13. Compositions of the experimental diet.

#### <群分け>

Day1(投与開始日)に体重測定を行い、体重の中央値(メディアン)から最も遠い動物を除外し、試験に用いる動物を選別した。各群の平均体重が近似するように各群 8 匹を配分した。

本試験では $\alpha$  リポ酸のエナンチオマーによる差を評価することを目的としており、現在最も一般的に用いられているラセミ体の $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体(DL-ALA-CD)をVB1(+)<sup>1</sup>の餌に混ぜた群をコントロールにして、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体(RALA-CD)、S- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体(SALA-CD)

	Dose group	Animal number	Dose (%ALA in diet)
VB1(+)	DL-ALA-CD	8	0.75 w/w%
VB1(-)	DL-ALA-CD	8	0.75 w/w%
	SALA-CD	8	0.75 w/w%
	RALA-CD	8	0.75 w/w%

Table 14. Test groups

#### <混餌の調製>

7 日分の混餌調製方法を示す。使用する粉末飼料の量は動物の餌摂取量に合わせて適宜調製した。

容積 90L のポリエチレン袋(無色透明、幅 90cm、深さ 100cm、日本サニパック株式会社、以下ポリ袋と略記)に粉末飼料(VB(+))もしくは VB1(-))約 300g 入れた。被験素材を秤量し、粒子が均一に細かくなっていることを確認しながら同ポリ袋に入れた。被験素材が微粒子状になっていない場合は乳鉢で粉碎した。

次に、ポリ袋が風船状になるようにして袋内に空間を確保し、袋の口を二重に結紮した。確保する空間は風船状のポリ袋の深さが 30cm 以上となるようにした。粉末飼料および被験素材がポリ袋内で回転、混合するように 3 分間以上激しく振盪した。

混合飼料の色調が均一になっていることを目視で確認した後、10 分間以上静置した。その後、各群の餌中のリポ酸濃度が 0.75w/w% になるように粉末飼料をポリ袋に追加し調整し、更に 3 分間位上激しく振盪し、混合した。混合飼料の色調が均一になっていることを目視で確認した後、飼育室に静置した。

初回調製分のサンプルを採取し、各飼料サンプル中のリポ酸濃度を HPLC にて分析した。

#### <試験方法>

表に記した通りに群分けし、各群に 0.75w/w% リポ酸含有の餌を自由摂取させ、Day1, 8, 15, 22, 29 の全 5 回の体重測定を行った。また、Day1-8, Day8-15, Day15-22, Day22-29 の全 4 回の摂餌量を測定した。VB1 摂取量及び $\alpha$  リポ酸摂取量は 7 日間の摂餌量測定期間を挟む体重の平均値に基づき体重 1kg あたりの摂取量/1 日を算出した。測定した体重及び摂餌量が正規分布の場



合は Dunnet 検定を、正規分布でない場合は Steel 検定により有意水準 5%で群間の比較を行った。

群分け時における除外動物及び試験操作終了後における生存動物については、ジエチルエーテル麻酔下にて後大静脈・下行大動脈よりの放血安楽死処置を行った。

本試験は、動物の愛護及び管理に関する法律(1973.10.01 制定、2006.06.01 改定)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(2006.04.28 制定)、動物の処分方法に関する指針(1995.07.04 制定、2000.12.01 改正)並びに社団法人日本実験動物協会の実験動物福祉憲章に基づき制定された動物福祉規定(2001.07.01 制定、2009.05.01 改定)に従って適切に実施されることを、試験施設の動物福祉委員会において審査し承認を受けた。

## (2)結果と考察

### <餌中のリポ酸分析>

調整した餌中に含まれる $\alpha$  リポ酸を HPLC にて定量した。分析条件はこれまでと同様である。結果は以下に表に示す通り、処方した通りに配合されていることが確かめられた。

	Dose group	%ALA
VB1(+)	DL-ALA-CD	0.75
VB1(-)	DL-ALA-CD	0.72
	SALA-CD	0.73
	RALA-CD	0.75

Table 15. %ALA in diet.

### <体重>

表 16 に、チアミン十分(VB1(+))もしくはチアミン不足(VB1(-))ラットに DL-ALA-CD, SALA-CD もしくは RALA-CD を4週間摂取させた後の体重を示す。投与開始22日目まではラットの体重に対して副作用はみられなかったが、投与開始29日目には、SALA-CD を摂取したチアミン不足ラットの体重はコントロールである DL-ALA-CD を摂取したチアミン十分ラットの体重よりも有意に低かった。しかしながら、DL-ALA-CD もしくは RALA-CD を摂取させたチアミン不足ラットでは統計的な差はみられなかった。

	Dose group	Body weight (g)				
		Day 0	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29
VB1(+)	DL-ALA-CD	159 ± 1.7 (8)	149 ± 2.8 (8)	171 ± 4.7 (8)	194 ± 7.2 (8)	216 ± 8.1 (8)
VB1(-)	DL-ALA-CD	159 ± 1.4 (8)	148 ± 2.4 (8)	175 ± 4.6 (8)	187 ± 5.6 (8)	187 ± 7.6 (8)
	SALA-CD	159 ± 1.5 (8)	143 ± 2.9 (8)	169 ± 3.8 (8)	175 ± 5.2 (8)	176 ± 7.2 (8)*
	RALA-CD	159 ± 1.5 (8)	146 ± 3.5 (8)	170 ± 5.2 (8)	187 ± 6.2 (8)	190 ± 7.2 (8)

Table 16. Body weights of thiamine (VB1)-sufficient (+) or deficient (-) rats administered ALA-CDs for 4 weeks.

Body weight (g): mean ± S.E., (8): animal number

\* p < 0.05 vs. control (VB1(+)) & DL-ALA-CD (Steel test).

#### <餌の摂取量>

表 17 は各群の餌の消費量を示す。VB1(+)-群の餌の摂取量は試験期間中徐々に増加したが、RALA-CD を除く VB1(-) の各群の餌の摂取量は15日目以降減少傾向にあった。15日目以降、SALA-CD を摂取した VB1(-) ラットの餌消費量は DL-ALA-CD を摂取した VB1(+)-ラット(コントロール)の餌摂取量に比べて有意に少なかった。22日目以降、DL-ALA-CD もしくは RALA-CD を摂取した VB1(-) ラットの餌消費量は DL-ALA-CD を摂取した VB1(+)-ラット(コントロール)の餌摂取量よりも有意に少なかった。しかしながら、RALA-CD を摂取した VB1(-) ラットの餌消費量は22日目までは徐々に増加し、22日目以降減少したが、DL-ALA-CD を摂取した VB1(-) ラットの餌消費量はそれよりも早い15日目から減少した。

チアミン不足に陥ると食事量が大きく減少し、体重減少(成長阻害)を引き起こすと報告されている [14]。これらの試験結果から、SALA-CD の摂取は DL-ALA-CD や RALA-CD の摂取に比べるとより早く餌の摂取量を減少させ、体重減少を引き起こすことが示唆された。これらの結果はリポ酸の各エナンチオマーの差が観察された点が大変興味深い。

	Dose group	Food consumption (g / day)			
		Day 1-8	Day 8-15	Day 15-22	Day 22-29
VB1(+)	DL-ALA-CD	7.8 ± 0.3 (8)	11.6 ± 0.6 (8)	12.7 ± 0.7 (8)	12.9 ± 0.6 (8)
VB1(-)	DL-ALA-CD	7.7 ± 0.2 (8)	12.2 ± 0.5 (8)	11.1 ± 0.3 (8)	8.8 ± 0.5 (8)**
	SALA-CD	7.1 ± 0.3 (8)	11.7 ± 0.4 (8)	9.8 ± 0.4 (8)*	7.9 ± 0.5 (8)**
	RALA-CD	7.1 ± 0.4 (8)	11.1 ± 0.7 (8)	11.4 ± 0.5 (8)	9.0 ± 0.7 (8)**

Table 17. Average daily food consumption for 4 weeks.

Food consumption (g/day): mean ± S.E. , (8): animal number

\* p < 0.05 vs. control (VB1(+) & DL-ALA-CD), \*\* p < 0.01 vs. control (VB1(+) & DL-ALA-CD) (Steel test).

### 3) 結論

R-α リポ酸は非常に強力な抗酸化物質として知られており、また、エネルギー産生において重要な働きを担っている[4]。シクロデキストリンを利用した包接化によって R-α リポ酸を安定化することができ、また、それによってサプリメントなどの食品用途として利用することが可能になった[7]。R-α リポ酸-CD 包接体の急性毒性や変異原性、長期投与による毒性試験を我々が報告するよりも前に(未だ十分ではなかったときに)、我々の研究グループが行った動物試験において R-α リポ酸-CD 包接体が健康増進に有効である結果が先行して出ている[15]。この研究では、高齢の C57BL/6 マウスに R-α リポ酸-γ CD 包接体を混ぜた高脂肪食を与え、高脂肪食のみを与えた群(コントロール群)と比較して有意に基礎代謝が向上することが分かった(図 50)。同時に S-α リポ酸-γ CD 包接体を混ぜた高脂肪食を与えた群についても実験を行ったが、S-α リポ酸-γ CD 包接体投与群ではコントロール群と比較して有意な変化は観察されなかった。動物試験においてこのような有効な結果が得られていることから、経口摂取による毒性を評価し、R-α リポ酸-γ CD 包接体の安全性を確認することは非常に重要である。さらに、天然に存在するのは R 体であるにもかかわらず、商業的に利用されているリポ酸はラセミ体であることから、このようにピュアなエナンチオマーを単離し安定化することは、R 体、S 体各々の生理活性を研究する上でも大変役立つ技術であると考えられる。

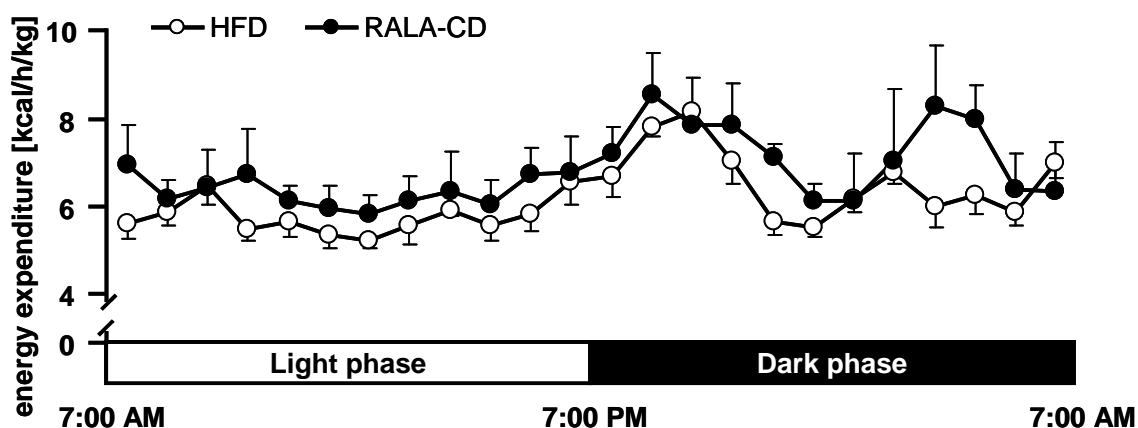


図50. 高脂肪食とR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接複合体を同時に投与したマウスのエネルギー消費量を1時間毎に測定した結果

(カロリメトリーを用いて24時間測定した)

Data are means  $\pm$  SEM (n=4).

	高脂肪食群	R-リポ酸群	R-リポ酸- $\gamma$ CD 包接体群	S-リポ酸- $\gamma$ CD 包接体群
エネルギー消費量-非活動期(明期) (kcal $\cdot$ h $\cdot$ kg $^{-1}$ )	5.76 $\pm$ 0.12	5.83 $\pm$ 0.07	6.53 $\pm$ 0.11*	6.05 $\pm$ 0.12
エネルギー消費量-活動期(暗期) (kcal $\cdot$ h $\cdot$ kg $^{-1}$ )	6.58 $\pm$ 0.24	6.41 $\pm$ 0.11	7.24 $\pm$ 0.25	7.20 $\pm$ 0.20
エネルギー消費量-24時間 (kcal $\cdot$ h $\cdot$ kg $^{-1}$ )	6.17 $\pm$ 0.16	6.12 $\pm$ 0.09	6.79 $\pm$ 0.16*	6.62 $\pm$ 0.16
エサ摂取量-24時間 (g)	2.71 $\pm$ 0.10	3.03 $\pm$ 0.46	2.85 $\pm$ 0.74	3.42 $\pm$ 0.54

All values are means  $\pm$  SEM (n = 4)

\*  $P < 0.05$  compared with HFD.

表18. 高脂肪食とリポ酸を同時に投与したマウスのエネルギー消費量とエサの摂取量<sup>15)</sup>

本章では、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体の経口摂取での安全性を評価した。急性毒性試験では、経口摂取によるLD50が2000 mg/kg bwより多いことが分かった。Ames試験では、本実験条件において、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体は変異原性を有さないことが示された。また、4週間の経口投与試験においては、チアミン不足のラットにR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体を投与した群では、現在一般的に利用されているラセミ体をチアミン十分なラットに投与した群に比べて有意な違いが観察されなかったが、チアミン不足のラットにS- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体投与群では平均体重が有意に

減少した。チアミン不足ラットに対するS- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体の経口投与はR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体やラセミ体の $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体に比べて食事量と体重の減少を加速させる可能性が示唆された。一方、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体はラセミ体の $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体に比べて体重減少を緩和する傾向がみられた。(但し、有意差はなかった。)本実験では、R- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体の毒性はみられなかった。最後に、我々の実験結果はR- $\alpha$  リポ酸- $\gamma$  CD 包接体を経口摂取する場合の安全性を十分にサポートすると結論付ける。

## 引用文献

1. Packer L, Cadenas E. Lipoic acid: Energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 48:26–32.
2. Smith AR, Shenvi SV, Widlanski M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004; 11:1135–1146.
3. Matsugo S, Yan LJ, Konishi T, Youn HD, Lodge JK, Ulrich H, et al. The lipoic acid analogue 1,2-diselenolane-3-pentanoic acid protects human low density lipoprotein against oxidative modification mediated by copper ion. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240:819-824.
4. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 2001; 17:888-895.
5. Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V, et al. (R)- $\alpha$ -lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J* 1999; 13:411-418.
6. Tirosh O, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Packer L. Neuroprotective effects of  $\alpha$ -lipoic acid and its positively charged amide analogue. *Free Rad Biol Med* 1999; 26:1418-1426.
7. Ikuta N, Sugiyama H, Shimosegawa H, Nakane R, Ishida Y, Uekaji Y, et al. Analysis of the enhanced stability of R(+)- $\alpha$ -lipoic acid by the complex formation with cyclodextrins. *Int J Mol Sci* 2013; 14:3639–55.
8. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad Biol Med* 1995; 19:227-250.
9. Hill AS, Werner JA, Rogers QR, O'Neill SL, Christopher MM. Lipoic acid is 10 times more toxic in cats than reported in humans, dogs or rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2004; 88:150-156.

10. Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31:347–364.
11. Gal EM. Reversal of selective toxicity of (-)- $\alpha$ -lipoic acid by thiamine in thiamine-deficient rats. *Nature* 1965; 207:535.
12. Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of alpha-lipoic acid (ALA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2006; 46:29–41.
13. Glatt H. Mutagenicity spectra in Salmonella typhimurium strains of glutathione, L-cysteine and active oxygen species. *Mutagenesis* 1989; 4:221–227.
14. Bâ A. Effects of thiamine deficiency on food intake and body weight increment in adult female and growing rats. *Behav Pharmacol* 2012; 23:575-581.
15. Nikolai S, Huebbe P, Metges CC, Schloesser A, Dose J, Ikuta N, et al. R-a lipoic acid g-cyclodextrin complex increases energy expenditure: A 4-month feeding study in mice. *Nutrition*, 2014 Feb;30(2):228-33..

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始温かいご指導と激励を頂いた金沢大学大学院自然科学研究科 松郷誠一教授並びに和田直樹助教に心より感謝申し上げます。松郷誠一教授には、筆者を生理活性物質研究の道に導いて頂いたことに深く感謝致します。

学位論文審査において、貴重なご助言とご指導を頂いた金沢大学大学院自然科学研究科・清水宣明教授、同 国本浩喜教授、同 高橋憲司教授、同 滝口昇准教授に心より感謝申し上げます。

本研究において、金沢大学理工研究域・自然システム学類・生理活性物質工学研究室卒業生の下瀬川紘さん、中根理恵さん、並びに在学生の田中陽有さん、大坪紋子さん他、研究室の皆さんの熱心な協力を得たことを記すとともに心より感謝申し上げます。

実験において、試験方法や装置の使用法あるいは解析方法について、数多くのご助言・ご指導をいただいた金沢大学大学院自然科学研究科・奥野正幸教授、同・水上知行助教、同・杉山博則博士に心より感謝申し上げます。

研究を実施するための環境を整備して頂き、数多くのご助言、ご指導をいただいた株式会社シクロケム・代表取締役社長 寺尾啓二博士、同 主席研究員 中田大介博士、同 主任研究員 石田善行博士、同 主任研究員 上梶友記子氏、同 主任研究員 古根隆広氏他、神戸研究所の皆さまに心より感謝申し上げます。

本研究において数多くのご指導、ご助言、ご協力をいただいた Christian Albrechts University, Kiel(ドイツ)の Gerald Rimbach 教授、東京理科大学薬学部 廣田孝司教授、愛知学院大学薬学部 小川法子助教他、研究室の皆さまに心より感謝申し上げます。

また、研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後になりますが、神戸で家庭と仕事を両立しながら金沢大学で研究生生活を送ることを快諾し、また応援し、支えてくれた家族に心から感謝します。