

R- α 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

Summary : R(+)-alpha-lipoic acid (RALA) is one of the cofactors in the mitochondria and plays a central role in the energy metabolism. RALA is vulnerable to physical stimuli and it is difficult to use RALA as a pharma- and nutraceutical purposes in the pure form. In our past study, we have reported the stabilization of RALA through the complex formation with cyclodextrins (CDs). According to our *in vivo* studies (rat studies) the absorption of RALA in the CD complex formation was higher than that of free RALA. In this paper, we show the physic-chemical properties, which include DSC, SEM analysis, XRD, FT-IR, Raman spectrum analysis of RALA and its CD complexes, and then we evaluate the stability and solubility of RALA/CD complex (RALA-CD) aiming to suggest the plausible absorption mechanism of RALA-CD.

From the results of stability test and the calculated yield, it was revealed that RALA- γ CD was the most suitable for food use. Furthermore, we evaluate the safety of RALA- γ CD *in vivo* and *in vitro* study. RALA- γ CD showed no toxicity in the acute study, Ames test and the chronic study. As a result, we confirmed the RALA- γ CD is stable and suitable for food. And the solubility test indicates that protein (albumin) in the simulated mucus solution enhanced the solubility of RALA. Further, RALA-CD complex was more soluble than RALA itself. At the same time, we examined pH of the sample solution and it was shown that albumin played the buffer action and kept pH rather higher than without albumin. Our results show that γ -CD complexation enhances its solubility and provides a possibility to show its own functionality of RALA as a pharma- or nutraceutical purposes.

1. 緒言

α リポ酸(ALA)は細胞内のミトコンドリア内に存在し、エネルギー産生において重要な5つの補酵素(コエンザイム)の一つとして作用する物質である。また、 α リポ酸はそれ自身が強い抗酸化力を有し、生体内でその還元型であるジヒドロリポ酸(DHLA)と共役することによってグルタチオンなどその他の抗酸化物質を再生させることによって、生体の恒常性を保つ働きを担っている(図1)。 α リポ酸にはR(+型)とS(-型)の光学異性体が存在するが、生体内ではR(+)- α リポ酸(RALA)のみが腸内細菌などにより生合成されている。一般的な工業製造工程においてはR(+型)とその副生成物であるS(-型)を等量ずつ含むラセミ体となる。技術的にはR(+型)をラセミ体から単離することが可能であるが、ラセミ体に対してR(+型)は極めて不安定であり、R(+型)の遊離酸を安定に配合した食品の製造(飲料、サプリメント)はこれまで困難であった。

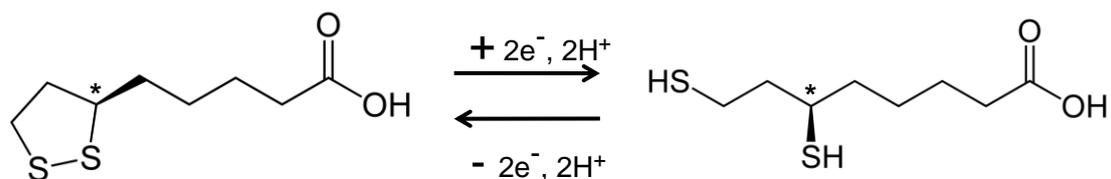


図1. RALAとR-DHLAの化学構造.

そこで我々は、環状のオリゴ糖であるシクロデキストリン（CD）を用いて RALA の酸や熱に対する安定性を向上させることを目的とし、R(+)- α リポ酸-シクロデキストリン（RALA-CD）包接複合体を作製した。CD はグルコース分子が α -1,4 グリコシド結合で環状に連なった化合物で、グルコース単位が 6, 7, 8 個のものをそれぞれ α -CD, β -CD, γ -CD と呼んでいる。CD は図 2 に示すようなバケツ構造を有しており、外部は親水性を、内部は疎水性を示し、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包接作用を有している。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 α -CD や γ -CD は β -CD に比べて、各々約 8 倍、約 13 倍高い。また、 α -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、 γ -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。本研究では作製した RALA-CD 包接複合体の物理化学的特性を評価し、更に食品に応用することを前提として、RALA-CD 包接複合体の安定性、溶解性、安全性について評価した。

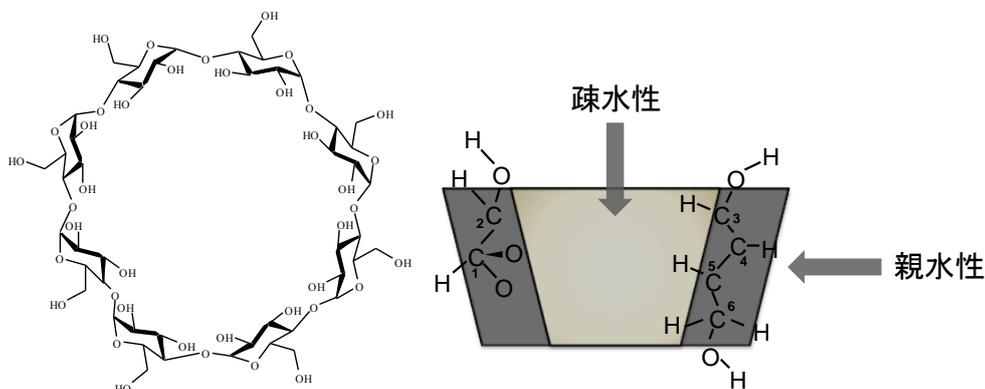


図 2. γ -CD の環状構造（左）と横から見た模式図（右）

2. 実験と結果

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、 β -CD と γ -CD がほぼ 100% であった。物性評価からは、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- α CD 包接複合体では層状の、RALA- β CD 包接複合体では菱形の、RALA- γ CD 包接複合体では柱状の粒子が観察された（図 3）。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^{1),2)}。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（消失する）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

率に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することが示唆された。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^{3)・4)}は、RALA と α -CD 及び β -CD の包接複合体の単結晶 X 線構造解析を行い、其々、RALA : α -CD = 2 : 3、RALA : β -CD = 2 : 2 であると推察している。また、 α -CD 及び β -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、 γ -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、 α -CD 及び β -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 の包接複合体は単結晶ではないが、顕微ラマンや FT-IR の測定結果からも得られた包接複合体中には inclusion complex が含まれている可能性が高い。



図3. RALA-CD 包接複合体の SEM 写真（左から、 α 、 β 、 γ -CD、5000 倍）

次に我々は得られた RALA-CD 包接複合体の安定性試験を行った。70°C 飽和水蒸気圧下で 48 時間まで保存した後の残存率を求めた結果、未包接の RALA では残存率 35% 程度であったが、RALA- α CD 及び RALA- γ CD 包接複合体では残存率ほぼ 100% と非常に高い安定性を示した。収率と熱安定性の結果から、食品への応用には γ -CD が非常に適していることを我々は既に報告している^{1)・2)}。また、RALA- γ CD 包接複合体の酸安定性についても確認し、胃酸と同じ pH1.2、37°C の溶液中で 1 時間攪拌した後の残存率がほぼ 100% という結果を得た。一方、未包接の RALA では酸性水溶液中でポリマー化し（写真 1）残存率 43% であった。



写真1. 酸性水溶液中でポリマー化したRALA（左）と均一に分散したRALA- γ CD包接複合体

次に本研究ではRALA-CD包接体の溶解性に関する実験を行った。内田らはラットを用いた吸収性評価において、 γ -CD包接によりRALAの吸収量が増大すること、また吸収が非常に速く胃から吸収される可能性があることを見出している⁴⁾。本研究では、CD包接による吸収性向上のメカニズムを解明することを目的として、人工胃液、人工胃粘液および人工腸液に対するRALA- γ CD包接複合体の溶解性について詳細に検討したのでその結果について報告する。実験では、各サンプルを人工胃液、人工胃粘液あるいは人工腸液に添加し、超音波にて20分間分散させた後に0.45 μ mのタンパク質除去フィルターで処理し、各溶液中に溶解したALAをHPLCにより定量した。このとき、各サンプル溶液のpHを同時に測定した。結果、人工胃液に対しては、CD包接化することで未包接のRALAに比べて溶解度が上昇する傾向が観察されたが統計的に有意ではなかった。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対しては、CD包接化することにより未包接のRALAに比べて有意に溶解度が上昇した（図4）。我々は更に詳細に検討した結果、アルブミンの緩衝作用がRALAの溶解度に寄与することを見出した。人工腸液に対しては、未包接のRALAに対するRALA- γ CD包接複合体の有効性は示されなかったが、どちらもよく溶解することが確認された。これらの溶解性に関する実験結果から、RALA- γ CD包接複合体を経口摂取すると、胃酸に対して安定でポリマー化することなく胃液や粘液、腸液によく溶解し、吸収されやすいことが期待できる。一方、未包接のRALAでは胃酸でポリマー化するため吸収されにくいと推察される。また、S(-)型及びラセミ体のALAと γ -CDの包接複合体についても同様の溶解性試験を行ったので本論文中に合わせて報告している。

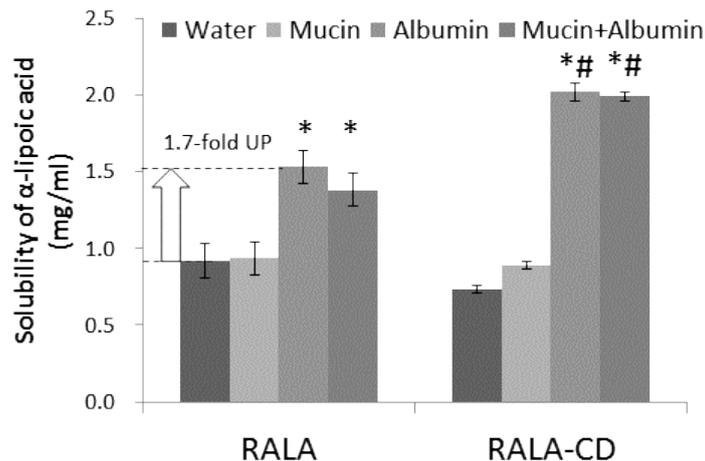


図4. 人工胃粘液中にRALAもしくはRALA- γ CD包接複合体を加えた時のALA溶解度 (* $p < 0.01$ Albumin or Mucin+Albumin v.s. Water or Mucin, # $p < 0.01$ RALA-CD v.s. RALA, Tukey-Kramer's test)

我々はさらに、食品への応用を目的とした安全性についても評価した。2000mg/kgの用量でマウスを用いた単回投与による急性毒性試験の結果、RALA- γ CD包接複合体の雌雄ともにいずれの投与群においても、14日間の観察期間中に死亡例および異常は認められなかった。従って、RALA- γ CD包接複合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。

微生物を用いた変異原性試験 (Ames test) では、ネズミチフス菌 TA100, TA1535, TA98, TA1537 及び大腸菌 WP2 uvrA を使用してRALA- γ CD包接複合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。従って、RALA- γ CD包接複合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。

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では、5週齢の雄の Crl:CD (SD) ラットに AIN-93G 配合 (VB1(+), VB1含有量: 0.6mg/100g) もしくは AIN-93G 配合ビタミンB1調整飼料 (VB1(-), VB1含有量: 0.025mg/100g) と各 α リポ酸-CD包接複合体入りの餌を各群 (表1) に1ヶ月間自由摂取させ、体重と摂餌量を測定した。その結果、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- γ CD (S(-)- α リポ酸- γ CD包接複合体) 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- γ CD (ラセミ体の α リポ酸- γ CD包接複合体) 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- γ CDもしくはRALA- γ 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。また、VB1(+)群の餌の摂取量は試験期間中徐々に増加したが、RALA- γ 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- γ CDを摂取したVB1(-)ラットの餌消費量はDL-ALA- γ 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- γ CD もしくは RALA- γ CD を摂取した VB1(-) ラットの餌消費量は DL-ALA- γ 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- γ 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- γ 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。これらの結果は、 α リポ酸の各エナンチオマーの差が観察された点で大変興味深い。

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

表1. 各試験群の匹数と餌中の α リポ酸配合量

3. 結論

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た。また、作製した R- α リポ酸-シクロデキストリン包接複合体の物理化学的特性を評価した結果から、得られた包接複合体は、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た。顕微ラマンや FT-IR の測定結果から、得られた包接複合体中には inclusion complex が含まれている可能性が高いと予想される。溶解性試験の結果からは RALA- γ CD 包接複合体の吸収性が示され、*in vivo* と *in vitro* の試験から RALA- γ CD 包接複合体の安全性が示された。以上の結果から、RALA- γ CD 包接複合体を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であることが示された。

4. 参考文献

- 1) 生田 直子 他, 第29回シクロデキストリンシンポジウム 講演要旨集, 182-183 (2012).
- 2) Ikuta N. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 3639-3655 (2013).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 内田 涼大 他, 日本薬剤学会第27年会 講演要旨集, 243 (2012).

平成26年2月3日

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

R- α リボ酸-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

2. 論文提出者 (1) 所属 物質科学 専攻 エコサイクルシステム 講座

(2) 氏名 生田 直子

3. 審査結果の要旨（600～650字）

提出学位論文について第1回論文審査会（予備審査）を平成25年12月25日に開催し、審査の基本方針を決定した。それに基づいて平成26年2月3日に開催した公聴会での口頭発表および質疑応答の結果を踏まえ、その後開催した第2回論文審査委員会において下記の通り決定した。本論文は補酵素として機能するリボ酸を安定化する方法を開発する目的で、シクロデキストリンによる包接を行なったものである。固体状態においては包接されたリボ酸が熱や光等の物理的刺激に対して高い安定性を示す事をHPLC解析により明らかにした。更に固相状態の物理化学的性質を明らかにするためにSEM、DSC、XRD、顕微ラマン、顕微IRなどの手法を駆使し、固相状態の解析を試みた。そうした成果の一部はすでに国際学術誌に掲載されている。また、包接されたリボ酸の生体への安全性は、DDSやサプリメントなどの応用分野に展開していく上で極めて重要な問題であるが、本論文提出者は動物実験を通して包接状態の安全性（急性毒性）を明らかにし、そうした成果も論文としてまとめている。これらの研究を通して得られた成果は環状糖として研究されてきたシクロデキストリンの包接状態の基礎的な研究に新たな知見を与えるものであると同時に、水溶性のシクロデキストリン類を巧みに使い分ける事により、幅広い応用的な用とが達成できる可能性を示したものであり、超分子化学研究の発展に大きく貢献出来るものである。よって、これらの成果は博士（工学）の学位を与えるに十分なものであると判定した。

4. 審査結果 (1) 判定（いずれかに○印） 合格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博士（工学）