

α -リポ酸誘導体の新素材開発

緒方 一美*¹ 阪上 享宏*²

Abstract : For further study of biogenic SH compound, we have investigated synthesis of α -lipoic acid (thioctic acid) derivatives which is more stable and powerful than α -lipoic acid. Firstly, N-lipoyl-amino acid was obtained by a coupling of α -lipoic acid and amino acid, using a mixed anhydride method. Secondly, stable zinc chelate compounds, N-(dihydrolipoyl)-amino acid zinc complex compounds was successfully synthesized and maintains reduction after the result that N-lipoyl-amino acid was reduced with zinc/ acetic acid respectively.

Sodium N-(dihydrolipoly)-L-histidinate zinc complex (INCI name; Sodium Zinc Histidine Dithiooctanamide) was chosen to be developed after screening of those zinc chelate compounds. Study found several factors from this new chelate compound, such as elimination activity of lipid peroxide and active oxygen without oxidation in atmospheric oxygen, tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity. Sodium Zinc Histidine Dithiooctanamide of lipoic acid derivative will be the one of the greatest cosmetic materials for the next generation.

Whitening effect, elimination activity of oxygen radical and wrinkle prevention are the major effects of the α -lipoic acid derivative.

Key words : α -lipoic acid derivative, sodium zinc histidine dithiooctanamide, zinc chelate, alpha-lipoic acid, dihydrolipoic acid, anti-aging, oxygen radical, tyrosinase, melanin, wrinkles, cosmetics

1. はじめに

α -リポ酸 (チオクト酸) はミトコンドリア内に存在する補酵素で抗酸化能を有し、活性酸素、酸化ストレスによる種々の病態の治療, 例えば糖尿病, 動脈硬化症, 白内障などの治療薬として注目されている^{1, 2)}。 α -リポ酸には還元作用はないが, 細胞内では一部還元型のジヒドロリポ酸に転換されて酸化されたビタミンCやビタミンEラジカルを還元型に戻すという強い還元力を示すことや^{3, 4)}, 金属とキレート化合物をつくることから水銀中毒の解毒が明らかにされている⁵⁾。また, メラニン産生抑制に関して, ジヒドロリポ酸がドーパキノンと結合してメラニン産生を抑制すること⁶⁾, 並びに, 長波長紫

外線 (UVA) によっても起こるジヒドロキシインドールの重合によるメラニン化が α -リポ酸やリポイルアミノ酸によって強く抑制されることが, 佐藤ら⁷⁾によって報告されている。このように α -リポ酸は化粧品として期待されている化合物であるが, 製剤面で酸化, 重合, 脱硫反応など経時的に不安定要素がある。

α -リポ酸は遊離酸の状態では水に不溶であるが, 亜硫酸ナトリウムを加えると2個あるS原子がSHとS-SO₃Naとなり中性付近でも溶解性があがり安定性もよくなることがわかった⁸⁾。

著者らは更に, ラジカル消去剤を目標に α -リポ酸誘導体を求めて合成を検討した。まず, N-リポイルアミノ酸の合成を進めるに当たって, α -リポ酸とアミノ酸の縮

*"Research and development of Lipoic acid derivatives."

*¹ Kazumi Ogata (Oga Research, Inc., 有限会社オガリサーチ—560-0085 大阪府豊中市上新田4-8 B-701)

*² Takahiro Sakaue (Senju Pharmaceutical Co. Ltd., 千寿製薬株式会社—541-0046 大阪市中央区平野町2-5-8)

*¹ (写真左) 1960年東京薬科大学薬学部卒業, 同年千寿製薬㈱研究所入社, 同社常務取締役を経て, 現在(株)オガリサーチ代表取締役。

*² (写真右) 1983年大阪薬科大学薬学部卒業, 同年千寿製薬(株)伊丹研究所入社, 岡山大学薬学部にて薬学博士号を取得, 現在同社ファーマコヴィジランス部所属。

合は既に酸クロライド法⁹⁾によって試みられているが、反応中にリポ酸のポリマー化などでその収率は悪い。そこで、 α -リポ酸とアミノ酸を混合酸無水物法でN-リポイルアミノ酸を収率よく得ることが出来た。つぎに、これらを亜鉛と酢酸で還元すると、還元性を維持しながらS-S間に亜鉛がキレート化された6員環の安定な新規のN-(ジヒドロリポイル)-アミノ酸亜鉛錯体(別名:N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)-アミノ酸亜鉛錯体)を得ることが出来た。これらの化合物には活性酸素(フリーラジカル)消去, チロシナーゼ活性阻害, メラニン産生抑制, エラスターゼ活性阻害作用, 並びにメラニン消去作用があり, また還元性・抗酸化作用を有しながら空気中の酸素に酸化されず水溶液でも安定であることが特徴であると云える¹⁰⁾。

これらの化合物中, N-(ジヒドロリポイル)-L-アスパラギン酸亜鉛, およびN-(ジヒドロリポイル)-2-アミノエタンスルホン酸亜鉛錯体ナトリウムのESR(電子スピン共鳴)測定では-OHラジカルを消去し, キサンチンオキシダーゼ活性をも阻害するが, 特にNOおよびONOO⁻に対する消去活性が強く, 過剰なNO/ONOO⁻による細胞障害予防効果が期待されている¹¹⁾。また, 美白に関する最近のTsuji-Naitoらの報告によると¹²⁾, N-(ジヒドロリポイル)-L-ヒスチジン亜鉛錯体ナトリウムはコウジ酸など, 他のチロシナーゼ活性阻害剤よりも強いチロシナーゼ活性阻害効果を示し, ドーバキノンと積極的に結合して, メラニン前駆物質のドーバクロム, 並びにメラニン産生を抑制するメカニズムを化学的に解明している。

今回, 著者らが合成したりポ酸誘導体並びにその中からラジカル消去, チロシナーゼ活性阻害, 並びにメラニン産生抑制作用の強いN-(ジヒドロリポイル)-L-ヒスチジン亜鉛錯体化合物を選び, 既に美白成分として好評の高いコウジ酸と比較検討したので合わせて報告する。

2. N-(ジヒドロリポイル)-アミノ酸亜鉛錯体の一般的な合成法

N-(ジヒドロリポイル)-アミノ酸亜鉛錯体

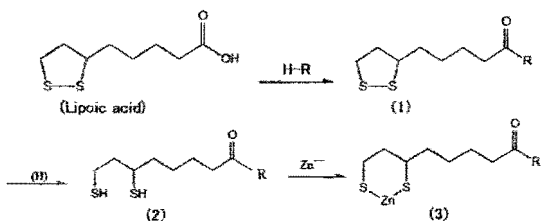


図1 合成チャート (R: アミノ酸を示す)

の一般的な合成法は, 下記に示した図1のチャートに従って合成した。

まず, α -リポ酸とアミノ酸を混合酸無水物法によって縮合させて, N-リポイルアミノ酸(1)とし, つぎに, これらを亜鉛/酢酸で還元すると, 還元体のN-(ジヒドロリポイル)-アミノ酸(2)を経由して, N-(ジヒドロリポイル)-アミノ酸亜鉛錯体(3)を得ることが出来た。さらに, これを必要に応じて水酸化ナトリウムで中和して水溶性のナトリウム塩とした。

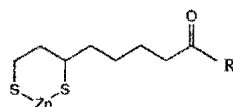
2-1. N-リポイルアミノ酸

α -リポ酸4.2g (0.02モル) およびトリエチルアミン2.4g (0.023モル) をアセトニトリル40mLに溶かして, 攪拌下-5℃に冷却して置き, これにクロロ炭酸エチル2.4g (0.022モル) を徐々に滴下させ, 滴下終了20分後, これにメタノール(または水溶液)約50mLに水酸化ナトリウム1.0~2.0gを溶かし, さらに, アミノ酸約0.023モルを加えて溶かしたものを一挙に加えて30分間攪拌し, さらに, 室温に戻して約1時間攪拌させる。続いて減圧下, 溶媒を留去させ, N-リポイルアミノ酸のナトリウム塩を50~70%の収率で得た。但し, N-リポイルリジンの合成はリジン銅錯体として反応を行った。

2-2. N-(ジヒドロリポイル)-アミノ酸亜鉛錯体ナトリウム塩

つぎに, 上記で得た化合物に60%酢酸水溶液50mLおよび亜鉛末2.5gを加えて50℃で1~5時間加熱攪拌させた後, 未反応の亜鉛を濾別後, 濾液を濃縮させ, 水(またはメタノール)を加えて析出した結晶を濾取し, 水またはエタノールで洗って乾燥させる。さらに, 必要に応じてナトリウム塩にするには, これを水に懸濁させて置き, 水酸化ナトリウムでpH9~10にして溶かし, 適度に濃縮させ, エタノールを加えて析出した結晶を濾取, これを適当な溶媒, 例えば, 水/エタノールから再結晶させることにより, N-(ジヒドロリポイル)-アミノ酸亜鉛錯体ナトリウム塩を得ることが出来た。以下, 合成した主な化合物を表1に示す。

一般式:



2-3. N-(ジヒドロリポイル)-L-ヒスチジン亜鉛錯体ナトリウム

上記で合成したN-(ジヒドロリポイル)-アミノ酸亜鉛錯体化合物の中からN-(ジヒドロリポイル)-L-ヒスチジン亜鉛錯体ナトリウム(以下, DHL-His.ZnNaと略)を選び開発した。

その物理的性状を次に示す。

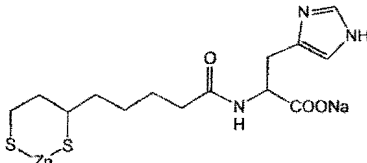
表1 リポ酸誘導体亜鉛コンプレックス化合物
(R:水酸基, アミノ酸またはその塩)

R	mp	Rf (TLC)
OH エタノールアミン塩	137~139°	0.88
グリシンNa	297° (分解)	0.61*
L-アラニンNa	290° (分解)	0.78
L-セリンNa	285° (分解)	0.54
レスレオニンNa	260° (分解)	0.60
L-メチオニンNa	260° (分解)	0.81
L-システイン	280° (分解)	0.71*
L-ヒドロキシプロリンNa	300° 以上	0.66
L-ノルロイシンNa	295° (分解)	0.90
L-フェニルアラニンNa	270° (分解)	0.82
L-ヒスチジンNa	300° 以上	0.43
L-アスパラギン酸Na	300° 以上	0.53*
β -アラニンNa	295° (分解)	0.83
γ -アミノ酪酸Na	295° (分解)	0.71*
6-アミノヘキサン酸Na	297° (分解)	0.84*
トランサミンNa	297° (分解)	0.81
アントラニル酸Na	300° 以上	0.88
D-ベニシラミンNa	280° (分解)	0.80
アミノエタンスルホン酸Na	293° (分解)	0.51
L-リジン (ϵ -アミノ結合)	295° (分解)	0.47

Rf (n-ブタノール:酢酸:水=4:1:2),

*Rf (クロロホルム:メタノール:水=5:4:1)

構造式:



分子式: $C_{14}H_{20}O_3N_3NaZn$ (MW: 430.84)

化学名: N-(6,8-Dimercaptooctanoyl)-L-histidine zinc complex sodium salt (別名, Sodium N-(dihydro-lipoyl)-L-histidinate zinc complex)

[INCI名] Sodium Zinc Histidine Dithiooctanamide

【表示名】ヒスチジンジチオオクタナミド (Na/亜鉛)

本化合物は白色粉末結晶で水によく溶け、アルコール、アセトン、エーテルには殆んど溶けない。mp. 300°以上、TLCでのRf=0.43 (n-ブタノール:酢酸:水=4:1:2)。IR (cm⁻¹); 1595, 1400, 1267, 1111付近に吸収を認める。

また、定量法は還元性を有することから、ヨウ素滴定法による酸化・還元法を応用した。

3. チロシナーゼ活性阻害, メラニン産生抑制およびラジカル消去作用

美白剤の開発に当たって色素沈着のメカニズムに沿った評価をすることが必要である。メラニン産生は皮膚が紫外線 (UV) を浴びると皮膚中にフリーラジカルが発生してメラノサイトが活性化され、その結果、メラノサイト内の酵素チロシナーゼの働きが活発になり、チロシンがドーパへ、さらにドーパキノンと酸化される。さらに、ロイコドーパクロムとドーパクロムを経由してジヒドロキシインドール化合物となり、やがて重合されてメラニン色素が生成されるメカニズムであるが、その律速酵素であるチロシナーゼ活性を阻害することでメラニン色素形成が抑えられると考えられている。

さらに、色素形成能が高く増殖能も良好なメラノーマ細胞を用いてメラニン産生に対する効果を確認することにより、色素細胞全体のメラニン産生系の影響を評価することができる。そこで、上記で合成した DHL-His.ZnNa をマッシュルーム由来のチロシナーゼ酵素を用いてチロシナーゼ活性阻害作用、並びにマウス由来の B16-F0 メラノーマ細胞を用いてメラニン産生抑制作用をそれぞれ評価した。

また、ラジカルは生体内の細胞や組織に様々な障害をもたらすが、皮膚の老化、シワの原因もまた活性酸素、酸化ストレスによるものとされている。そのため DHL-His.ZnNa のラジカル消去作用についても評価した。

試験方法

(1) チロシナーゼ活性阻害作用¹³⁾

試験物質である DHL-His.ZnNa またはリポ酸 1.0mL にチロシナーゼ (マッシュルーム由来) 液 0.1mL (100units) および 1/15M リン酸緩衝液 (pH6.8) 0.9mL を加え、37℃ 10 分間インキュベートした。基質として 0.03% L-DOPA 溶液を 1.0mL 加え、37℃ で 5 分間反応を行った後、475nm における吸光度 (D₁) を測定した。コントロールとして精製水を加え同様の測定を行い、吸光度 (D₂) を測定した。阻害率は以下の方法により計算した。

$$\text{阻害率 (\%)} = (D_2 - D_1) / D_2 \times 100$$

(2) メラニン産生抑制作用¹⁴⁾

大日本製薬より購入のマウス由来 B16-F0 メラノーマ細胞株を実験に用いた。60mm のシャーレに 20 万個の細胞を播種し、糖合成阻害剤の D-Glucosamine Hydrochloride を 0.1% 加えた培地 (D-MEM + 10% FBS) で 5 日間培養し、メラニン合成を停止させ白色化した。5 日間培養後に細胞を PBS (-) で洗浄して D-Glucosamine Hydrochloride を除去した後、phospho-

diesterase 阻害剤であるTheophylline 2 mM (250倍濃縮液/D.W.)を加えて細胞内のcAMPを増加させることによりチロシナーゼの生合成の回復を促進した。これと同時に試験物質 (250倍濃縮液/PBS) を添加した。Theophyllineおよび試験物質添加3日後に細胞をトリプシンにより回収した。細胞ペレットを1 mLのPBS (-)に懸濁させ、このうち0.1mLを細胞数計測に、残りの0.9mLをメラニン量測定に用いた。メラニン量の測定は細胞ペレットを5%トリクロロ酢酸、エタノール/ジエチルエーテル (3:1)、ジエチルエーテルで一回ずつ洗浄し風乾した後、2N-NaOH 1 mLを加えて溶解させ、420nmにおける吸光度を測定してメラニン量を標準品による検量線より求めた。試験物質としては α -リボ酸、リボ酸誘導体、コウジ酸およびアルブチンを用いた。

(3) ラジカル消去作用¹⁵⁾

0.1Mの酢酸緩衝液 (pH5.5) 1 mLにエタノール 1 mLおよび0.5mM α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (以下, DPPH) エタノール溶液0.5mLを加えて全量を2.5mLとし、試験物質の添加30分後に517nmの吸光度の減少を測定した。試験物質であるDHL-His.ZnNaは酢酸緩衝液に、 α -リボ酸はエタノールに溶解して添加した。

4. 結果および考察

リボ酸誘導体DHL-His.ZnNaのチロシナーゼ活性阻害率を表2に示した。チロシナーゼ活性阻害作用は基質であるドーパをチロシナーゼ酵素液に入れたときの反応物であるドーパクロムの産生量を指標に検討した。 α -リボ酸にチロシナーゼ活性阻害作用はなかったが、DHL-His.ZnNaはチロシナーゼ活性を強く抑制し、そのIC₅₀は2.18 μ Mであった。

表3はメラニン産生抑制作用をB16-F0メラノーマ細胞を用いて、 α -リボ酸およびリボ酸誘導体それぞれ100 μ M濃度と、陽性対照として1000 μ Mのコウジ酸またはアルブチンをメラニン産生系への影響を比較検討した。その結果、亜鉛キレート化合物はリボ酸やリポイルアミノ酸よりもメラニン産生抑制率が比較的高く、コウ

表2 チロシナーゼ阻害作用

試験物質	最終濃度 (μ M)	チロシナーゼ阻害率 (%)
DHL-His.ZnNa	10	98.9
	3	74.4
	1	7.0
α -リボ酸	10	-4.7

表3 メラニン産生抑制作用 (マウス由来B16-F0メラノーマ細胞)

試験物質	メラニン量 (%)	(S.D.)
無添加 (コントロール)	100.0	17.2
リボ酸誘導体または α -リボ酸 (以下, 100 μ M)		
リポイル- β -アラニンNa	56.8	12.2
リポイルアミノヘキサ酸Na	74.9	17.4
リポイルフェニルアラニンNa	63.6	5.9
リポイルアミノエタンスルホン酸Na	73.0	7.5
リポイルシステインNa	85.0	5.7
DHL-Znエタノールアミン	28.1	7.0
DHL- β -アラニンZnNa	29.5	11.6
DHL-アミノヘキサ酸ZnNa	27.9	2.7
DHL-フェニルアラニンZnNa	39.6	4.3
DHL-アミノエタンスルホン酸ZnNa	30.2	8.2
DHL-アントラニル酸ZnNa	47.0	22.9
DHL-メチオニンZnNa	52.6	5.8
DHL- γ -アミノ酪酸ZnNa	29.4	2.1
DHL-His.ZnNa	30.8	0.2
α -リボ酸	49.7	11.8
コウジ酸 1000 μ M	74.1	4.0
アルブチン 1000 μ M	79.2	15.2

但し, DHLはジヒドロリポイル, またはジヒドロリボ酸を示す。

ジ酸やアルブチンに比べてかなり高いと感じられた。

図2は上記と同様にメラニン産生抑制作用をDHL-His.ZnNaおよび α -リボ酸を濃度ごとにコウジ酸を対照に検討した。その結果, コントロール (6.94 \pm 1.24 μ g) に比べ, DHL-His.ZnNaおよび α -リボ酸処理した細胞では用量依存的にメラニン量は減少した。従って, メラニン量 (μ g/1 \times 10⁶ cells) は300 μ MのDHL-His.ZnNaで1.05 \pm 0.01 μ g, α -リボ酸では1.83 \pm 0.43 μ g, 並びに10mMのコウジ酸では1.87 \pm 0.28 μ gであった。以上のことから, 300 μ MのDHL-His.ZnNaは無処理のノー

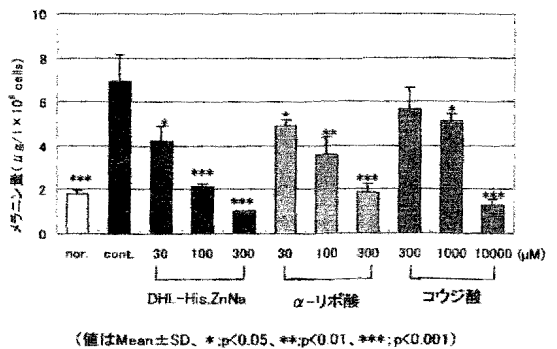


図2 メラニン産生抑制作用 (マウス由来B16-F0メラノーマ細胞)

表4 DPPHラジカル消去作用

試験物質	最終濃度 (μ M)	ラジカル 消去率 (%)
DHL-His.ZnNa	100	84.31
	30	55.18
	10	18.35
α -リボ酸	100	-0.47

マル ($1.77 \pm 0.22 \mu$ g) と比較しても同程度またはそれ以下であったことは全くメラニン化が進んでいないことを意味し注目するところである。

また、 α -リボ酸はDPPHラジカル消去やチロシナーゼ活性阻害作用が見られないにも拘わらずメラニン産生抑制作用があることは α -リボ酸が細胞内で還元型のジヒドロリボ酸に変換されたものと考えられた。DHL-His.ZnNaのメラニン産生抑制作用はB16-F0メラノーマ細胞では濃度的に見て、美白に有効性の高いコウジ酸よりもかなり強いと考えられた。

表4はラジカル消去率を示したものである。ラジカル消去作用はDPPHを用いて、どの程度フリーラジカルが不活化するかを吸光度の減少を指標に検討した。 α -リボ酸にはDPPHラジカル消去作用は認められなかったが、DHL-His.ZnNaは還元作用もあることからラジカルを強く消去した。

5. おわりに

著者らは生体のSH系化合物を求めて α -リボ酸誘導体の合成を検討した。その結果、 α -リボ酸とアミノ酸を混合酸無水物法により収率よく結合させた。次に、このN-リポイルアミノ酸を亜鉛/酢酸で還元性した結果、安定性のよいリボ酸誘導体亜鉛キレート化合物のN-(ジヒドロリポイル)-アミノ酸亜鉛コンプレックス化合物を合成することができた。その中から開発された、低刺激性

で安定な水溶性化合物のDHL-His.ZnNaは、活性酸素(フリーラジカル)を強く消去させ、また、美白化粧品素材として必須であるチロシナーゼ活性阻害作用、並びにコウジ酸を対照に、B16-F0メラノーマ細胞を用いてメラニン産生抑制作用が強いことも確認された。このことから、このリボ酸誘導体のDHL-His.ZnNa【表示名：ヒスチジンジチオオクタナミド (Na/亜鉛)】は美白作用、並びにラジカル消去作用が強く、次世代の化粧品素材として有望な化合物であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Stevens M.J. et al., *Diabetes*, **49**(6), 1006~1015 (2000)
- 2) Sun L, Zhang J.S., *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, **40**(3), 193~196 (2004)
- 3) Biewenga G.P. et al., *Gen Pharmacol*, **29**(3), 315~331 (1997)
- 4) Kagan V.E. et al., *Biochem. Pharmacol*, **44**(8), 1637~1649 (1992)
- 5) Patrick L., *Altern Med Rev*, **7**(6), 456~471 (2002)
- 6) Tsuji-Naito K. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 15~20 (2006)
- 7) 佐藤繁 他, 公開特許公報 2006-022066
- 8) 緒方一美, 公開特許公報 2005-002096
- 9) 小原正郎 他, 特許公報 昭42-1286
- 10) 緒方一美 他, 国際公開 WO 2002/076935 Al and WO 2004/024139 Al
- 11) Noda Y. et al., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*, **113**, 114, 133~147 (2003)
- 12) Tsuji-Naito K. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 1967~1975 (2007)
- 13) 西村隆久 他, 薬学雑誌, **115**, 626~632 (1995)
- 14) 芋川玄爾, *Fragrance Journal*, 臨時増刊 No.14, 71~91 (1995)
- 15) 福沢健治 他, 脂質過酸化実験法, 79, 1990