

Z74-E720

2(1)

2006.1



1200600311514

国立国会

18.03.14

図書館

Vol.2(1)
JANUARY
2006

FOOD FUNCTION



ISFF

INTERNATIONAL SOCIETY
OF FOOD FUNCTION

折のの。

α -リボ酸の抗肥満作用および美容機能

下田博司, 杉下朋子

オリザ油化株式会社

要 旨

α -リボ酸の食品としての機能性を調べる目的で、抗肥満作用および美容効果の評価を行った。抗肥満作用の *in vitro* 評価において、 α -リボ酸は筋芽細胞 (L6) の増殖作用 (1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) や脂肪細胞 (3T3-L1) の分化抑制作用 (1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示した。また、マウスを用いた継続摂取試験 (24日間) において、 α -リボ酸 (0.05, 0.1%) は筋組織の増加作用を示した。さらに運動を併用 (13日間) することで体重増加の抑制が認められた。一方、美容機能においては、B16メラノーマ細胞のメラニン生成抑制作用 (25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) や線維芽細胞 (NB1RGB) の増殖促進作用 (1~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示すとともに、褐色モルモット紫外線誘発色素沈着モデルにおいて、経口投与 (25または50 mg/kg, 13日間) により色素斑の明度上昇が認められた。以上の結果より、 α -リボ酸は筋肉組織の増加や脂肪細胞の分化抑制に基づく抗肥満作用と、メラニン生成抑制や線維芽細胞増殖による美容機能を有することが明らかになった。

はじめに

近年の規制緩和に伴い、コエンザイム Q10 や塩化カルニチンをはじめとする合成化合物の、食品への使用承認が進みつつある。従来医薬品として使用されてきた α -リボ酸は、2004年6月から食品への使用が可能になった含硫黄化合物で、化学合成により製造される。生体内ではミトコンドリアに存在し、グルコースを出発物質とする一連のエネルギー産生経路において、解糖系から生じたピルビン酸をアセチル CoA に変換するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体に対して補酵素として作用する。ごく最近、 α -リボ酸の新機能として、著名な科学雑誌である「Nature Medicine」に、食欲抑制と褐色脂肪細胞脱共役タンパク発現に基づく抗肥満作用を有することが、韓国の研究者により発表された。¹⁾ またこの他、筋肉の構成成分であるクレアチンを補給し、²⁾ 筋組織を正常に保つ働きを有する。一方、 α -リボ酸はミトコンドリア内で還元体として存在し、その強い抗酸化作用により、活性酸素が関与する心疾患や高血糖に対して改善効果を示す。 α -リボ酸の生体内抗酸化作用は、皮膚内のメラニンや活性酸素の生成を抑制しうることも十分に予想され、内外美容を訴求した美容

食品への配合も期待できる。これら α -リボ酸の食品への応用を鑑み、肥満予防や美容の観点から α -リボ酸の種々機能性評価を行った。

実験方法

1 実験動物および細胞

ddY系マウス (雄, 5週齢) および褐色モルモット (雄, 4週齢) は、チャールズリバー社より購入し、固形飼料 (それぞれ MF および RC-4, オリエンタル酵母) および水道水を自由摂取させて予備飼育した。ラット骨格筋由来筋芽細胞株 L6 (JCRB9081), マウス脂肪細胞株 3T3-L1 (IFO50416), B16メラノーマ (JCRB0202) は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。ヒト新生児皮膚線維芽細胞 NB1RGB (RCB0222) は、理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。

2 試薬類

MEM 培地, D-MEM 培地, ウシ胎児血清, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), インスリン, デキサメタゾン, イソブチルメチルキサンチンおよびテオフィリンは、Sigma 社の製品を用いた。ペニシリン・ストレプトマイシン

混合液は Gibco-BRL 社を、GPDH 活性測定キットは、プライマリーセル社の製品を使用した。ジメチルスルホキシド (DMSO)、カルシウム・マグネシウム不含リン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] は、和光純薬工業の製品を使用した。

3 抗肥満作用の評価

1) 筋芽細胞増殖試験

L6 細胞を D-MEM 培地 [ウシ胎児血清 (10%)、ペニシリン G (100 unit/mL) およびストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 含有] にサスペンド (5×10^4 個/mL) し、96 穴プレートに 100 μL ずつ播種した。細胞定着後、DMSO に溶解した種々濃度の α -リボ酸を添加して 24 時間培養した。次いで培地を交換し、PBS (-) に溶解した MTT (5 mg/mL) 10 μL を加えて 4 時間培養した後、0.04 M 塩酸/イソプロパノール混液 (100 μL) を加えて細胞を超音波で破碎した。この破碎液についてマイクロプレートを用いて 560 nm における吸光度を測定し、細胞増殖の指標とした。

2) 筋組織重量に与える影響の検討

マウスに、 α -リボ酸 (0.05 および 0.1%) を混餌した飼料 (MF, オリエンタル酵母) を 24 日間自由摂取させた後、両後肢のヒラメ筋を摘出し、重量を測定した。

3) 脂肪細胞分化誘導試験

3T3-L1 細胞 (5×10^4 個/mL) を、D-MEM 培地 [ウシ胎児血清 (10%)、ペニシリン G (100 unit/mL) およびストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 含有] 中で 2 日間培養後、インスリン (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、デキサメタゾン (0.25 μM)、イソブチルメチルキサンチン (0.5 mM) および各種濃度の α -リボ酸を含む培地に交換して分化を誘導した。2 日後に、DMSO に溶解した α -リボ酸およびインスリン (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む培地に交換し、1 日おきに培地交換をしながら、計 7 日間培養した。培養終了後、細胞の形態を鏡検下で観察した。

4) グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH) 阻害試験

分化後の 3T3-L1 細胞を PBS (-) 中で破碎した lysate を酵素源とした。細胞破碎液 (50 μL)、DMSO に溶解した α -リボ酸 (8 μL) および GPDH 活性測定キットに付属の基質液 (750 μL) を混合し、340 nm における吸光度の変化を測定した。その後、添付文書に記載の式から酵素活性を算出した。

5) 体重増加に与える影響の検討

マウスに、 α -リボ酸 (0.1%) を混餌した飼料 (MF) を 13 日間自由摂取させ、体重変化を測定した。運動負荷は、回転ケージ (MK-770M, 室町機械) を用いて、10 分間の運動 (5 rpm/分) を 1 日 1 回行った。

4 美容機能

1) メラノーマ細胞におけるメラニン生成試験

B16 細胞を 2 mM テオフィリン含有 MEM 培地 [ウシ胎児血清 (10%)、ペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 含有] にサスペンド (5×10^4 個/mL) し、24 穴プレートに 500 μL ずつ播種した。 α -リボ酸溶液 (55 μL) を添加して 3 日間培養後、培地を除去し、PBS (-) 300 μL を加えて細胞を超音波破碎した。破碎液を 96 穴プレートに回収し、吸光度 (測定波長: 415 nm, 参照波長: 700 nm) を測定した。

2) 褐色モルモット紫外線照射色素沈着試験

α -リボ酸を、紫外線照射開始 (0 日目) の 2 日前 (-2 日目) から、褐色モルモットに経口投与した後、0 日目から 3 日目まで計 4 回、紫外線照射機 (ソーラーシュミレーター, ウシオ電機) を用いて、紫外線 (UV-B, 2000 mJ/cm²) を剃毛した背部に照射した。 α -リボ酸は紫外線照射期間も含めて、-2 日目から 10 日目まで経口投与した。照射前 (0 日目) と照射後 8 及び 10 日目に、紫外線照射部の明度 (L* 値) を分光色差計 (日本電色工業株式会社製) を用いて測定した。

3) 線維芽細胞増殖試験

NBIRGB 細胞を α -MEM 培地 (10% ウシ胎児血清, 100 units/mL ペニシリン, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン含有) にサスペンド (2×10^5 個/mL) し、96 穴プレートに 100 μL ずつ播種した。各種濃度に調製した α -リボ酸溶液 (10 μL) を添加して 2 日間培養後、細胞の増殖度を MTT アッセイにより評価した。

4) ヒト皮膚三次元培養系における作用評価

ヒト皮膚再構築モデル (TESTSKIN: 東洋紡績製) を用いて評価を行った。 α -リボ酸を含有する専用培地を真皮層側に添加し、3 日ごとに培地交換をしながら計 6 日間培養を行った。その後、メンブレンを採取して中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、常法に従って鏡検用標本を作製した。

結果

1 抗肥満作用

1) 筋芽細胞の増殖及び筋組織重量に及ぼす作用

筋肉細胞の一種である L6 細胞の培養系に対して α -リボ酸を添加し、24 時間培養後の細胞の増殖を調べた結果、用量依存性は認められなかったが、 α -リボ酸は 1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、L6 細胞に対する増殖促進作用を示した (図 1)。一方、*in vivo* において、マウスに対して α -リボ酸を配合した飼料 (0.05 および 0.1%) を 24 日間摂取させ、後肢の筋肉であるヒラメ筋の重量を測定したところ、緩やかな筋肉重量の増加作用が認められた (図 2)。これらの結果から、 α -リボ酸は筋肉細胞に

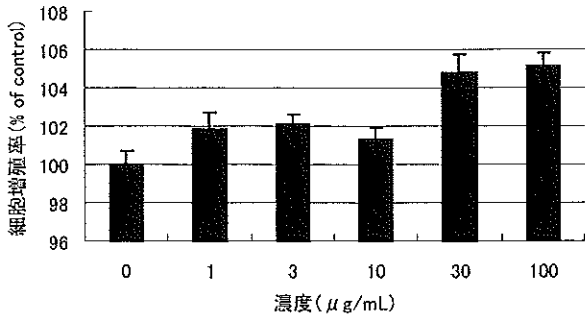


図1 α-リポ酸の筋芽細胞 (L6) 増殖作用 (平均値±S.E., n=6)

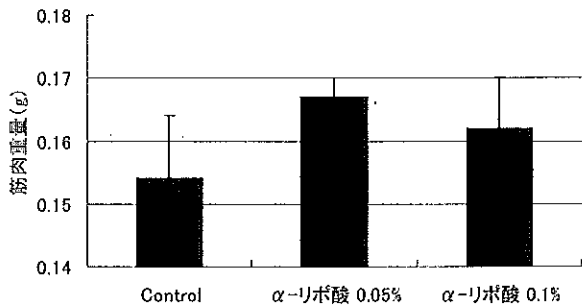


図2 α-リポ酸継続摂取時のマウスヒラメ筋重量に及ぼす作用 (平均値±S.E., n=6)

対する増殖促進作用を有することが示唆された。

2) 脂肪蓄積および体重増加に及ぼす作用

分化誘導後の3T3-L1脂肪細胞を、インスリンとα-リポ酸の共存下で培養し、細胞形態を観察した結果、図3に示すように細胞サイズと内包油滴の縮小が観察された。脂肪細胞の中には、インスリンの作用によって取り込まれたグルコースを、トリグリセリドに変換する酵素であるグリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GPDH)が存在する。前述の3T3-L1脂肪細胞から調製した粗GPDHに対するα-リポ酸の阻害活性を調べたところ、高濃度(1000 μg/mL)において阻害活性が認められた(図4)。一方、α-リポ酸をマウスに13日間自由摂取させ、さらに運動負荷を併用した際の体重増加に及ぼす作用を検討した。その結果、図5に示すように、α-リポ酸(0.1%)の摂取のみでは、体重増加の抑制は軽微であったが、運動を併用することにより、体重増加は顕著に抑制された。

2 美容機能

1) メラニン生成抑制作用

B16メラノーマをα-リポ酸(25~100 μg/mL)の共存下で培養した結果、濃度依存的なメラニン生成抑制作用が認められた(図6)。次に、実験項に記したプロトコルにしたがって褐色モルモットにα-リポ酸(1, 5および25 mg/kg)を継続投与した後、紫外線照射により色素沈着を背部に惹起した。その結果、図7に示すように、紫外線照射開始から8日目および10日目にお

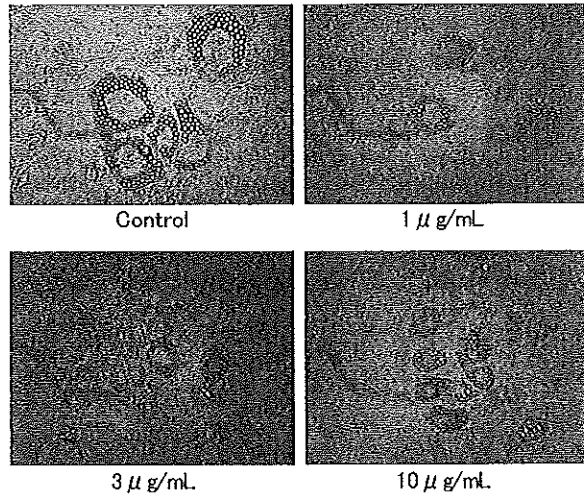


図3 α-リポ酸の脂肪細胞(3T3-L1)分化に及ぼす作用

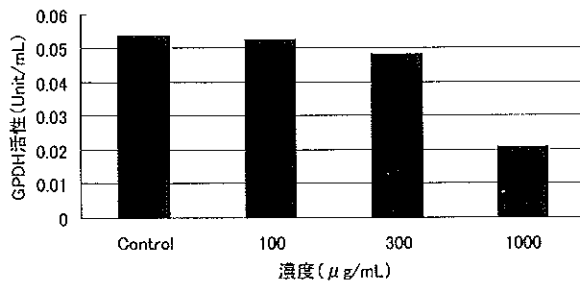


図4 α-リポ酸の脂肪細胞由来GPDHに対する作用 (n=2-3)

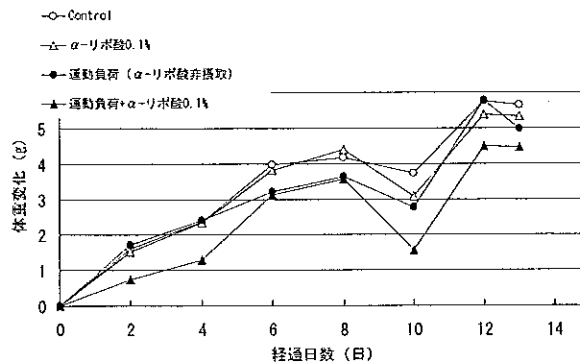


図5 α-リポ酸のマウスの体重増加に及ぼす作用

るコントロール群(α-リポ酸0 mg/kg)の照射部位の明度は、照射前(0日目)と比較して明らかに低下した。これに対し、α-リポ酸(25および50 mg/kg)投与群の照射部位では、明度の上昇が観察された。この結果は、色素の沈着が抑制されていることを表しており、α-リポ酸は*in vitro*のみならず*in vivo*においても、経口投与でメラニン生成抑制作用を示すことが明らかになった。

2) 皮膚細胞に対する作用

α-リポ酸の線維芽細胞の増殖に及ぼす作用を、ヒ

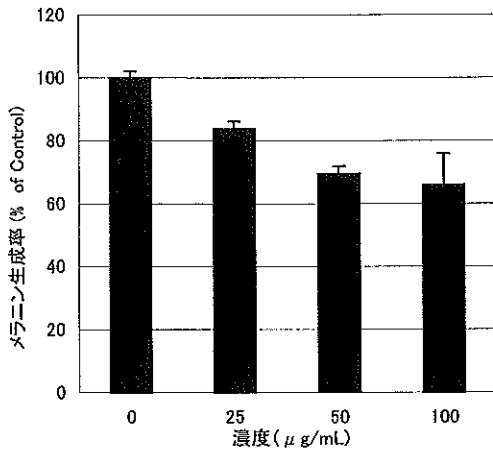


図6 α -リボ酸のメラノーマ細胞 (B16) 増殖に及ぼす作用 (平均値±S.E., n=6)

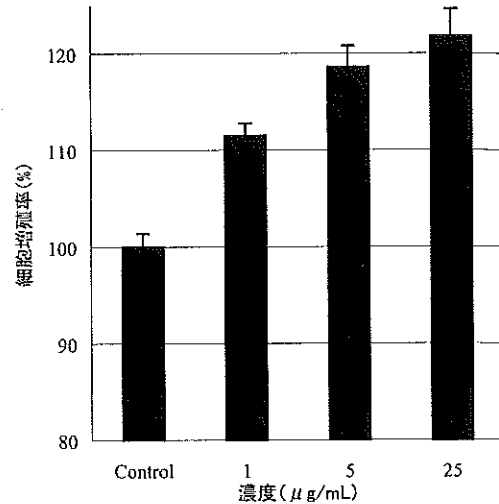


図8 α -リボ酸のNB1RGB線維芽細胞増殖作用 (平均値±S.E., n=6)

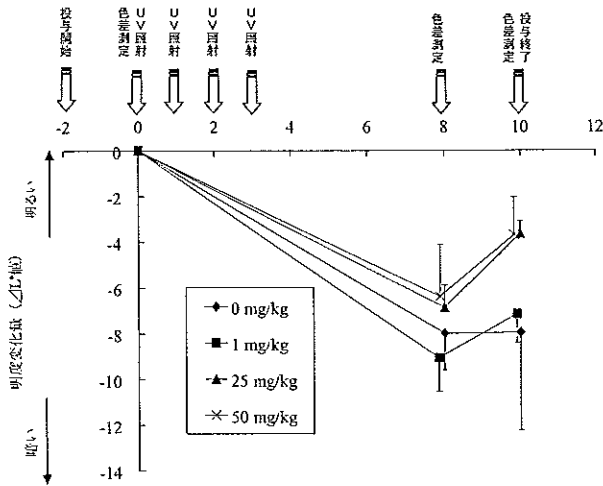


図7 α -リボ酸の褐色モルモットにおける紫外線誘発色素沈着抑制作用 (平均値±SD, n=3)

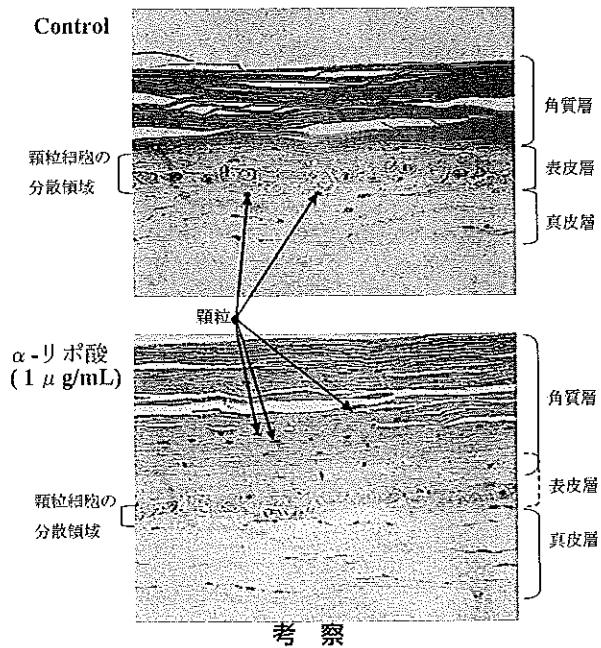


図9 α -リボ酸処理後の疑似皮膚細胞三次元培養像 (×400倍)

ト新生児線維芽細胞であるNB1RGBを用いて検討した。試験の結果、図8に示すように α -リボ酸は、低濃度(1~25 $\mu\text{g/mL}$)で線維芽細胞の増殖を促進する事が明らかになった。最後に、疑似皮膚モデルである皮膚細胞三次元培養キットを用いて、皮膚のターンオーバーにおよぼす作用を評価した。中央部の表皮層において、Controlの顆粒含有細胞が上下に分散して顆粒層領域が不明瞭であるのに対し、 α -リボ酸(1 $\mu\text{g/mL}$)処理細胞では、顆粒含有細胞がほぼ一層で整然と扁平上にならんでおり、表皮層が薄くなっているのが観察された(図9)。また、 α -リボ酸処理細胞において、表皮層の顆粒(青い粒)が角質層に浸潤し、角質層との境界域が不明瞭になってきている像が観察された。この知見は、表皮層で生まれた細胞が上層へ移行するのが促進され、皮膚の代謝サイクルが充進している可能性を示唆するものと考えられる。

著者らは、新規食品素材の α -リボ酸についての機能性評価を行った。その結果、抗肥満作用においては、筋芽細胞の増殖促進作用と脂肪細胞の分化抑制作用を有することを見出した。 α -リボ酸の3T3-L1分化抑制作用は、すでにCho K. J.ら³⁾が報告しているが、著者らの試験成績においては、より低濃度で形態変化が認められた。さらにまた、マウスに継続摂取させた試験においても、ヒラメ筋重量の増加や体重の減少傾向が認められた。 α -リボ酸の抗肥満作用は、食欲中枢の抑制やエネルギー消費の活性化に基づく^{1,4)}ことが明らかにされているが、著者らが見出した作用機序も関与しているものと考えられる。

一方、抗酸化物質として知られる α -リボ酸は、⁵⁾美容機能の評価において、*in vitro*および*in vivo*双方で、メラニン生成抑制作用を示した。さらに α -リボ酸は、

線維芽細胞の増殖作用や、ヒト皮膚細胞三次元培養系においてターンオーバーを示唆する形態変化を示した。これらの結果より、 α -リポ酸は美容機能を有し、近い将来、化粧品への配合も進むものと考えられる。

参考文献

- 1) Kim M. S., Park J. Y., Namkoong C., Jang P. G., Ryu J. W., Song H. S., Yun J. Y., Namgoong I. S., Ha J., Park I. S., Lee I. K., Viollet B., Youn J. H., Lee H. K., Lee K. U. Anti-obesity effects of α -lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 10, 727-733 (2004).
- 2) Burke D. G., Chilibeck P. D., Parise G., Tarnopolsky M. A., Candow D. G. Effect of α -lipoic acid combined with creatine monohydrate on human skeletal muscle creatine and phosphagen concentration. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 13, 294-302 (2003).
- 3) Cho K. J., Moon H. E., Moini H., Packer L., Yoon D. Y., Chung A. S. α -lipoic acid inhibits adipocyte differentiation by regulating pro-adipogenic transcription factors *via* mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 278, 34823-34833 (2003).
- 4) Dicter N., Madar Z., Tirosh O. α -lipoic acid inhibits glycogen synthesis in rat soleus muscle *via* its oxidative activity and the uncoupling of mitochondria. *J. Nutr.* 132, 3001-3006 (2002).
- 5) Moini H., Packer L., Saris N. E. Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 84-90 (2002).