

学位論文

各種シクロデキストリン包接によるピペリンの溶解性・腸管収縮性に関する 特性変更のための基礎的研究

恵沢 敏成

胡椒は世界で広く使用されている香辛料であり、世界の需要は年間 2%、供給は 8-10%増加することが International Papper Community にて予想されている。ピペリン (PP) は胡椒の主要な辛味成分である腸管収縮調節機能に深く関与している可能性が報告されており、下剤や止瀉薬、機能的胃腸障害に対する治療としての利用が期待される大変興味深い食品成分である。

PP はメチレンジオキシフェニル基、ペンタジエン鎖、第 3 級アミド基 ピペリジン環を有する難水溶性のアミド化合物である。PP の腸管収縮調節作用は治療薬などへの利用価値が高いが、難水溶性であることが制限となる可能性がある。そこで、機能的賦形剤として比較的毒性が少なく、難水溶性薬物の溶解性向上や味のマスキングなどに利用されるシクロデキストリン (CD) に着目した。

CD は D-グルコピラノースが α -1, 4 グリコシド結合した環状多糖類である。グルコースのユニット数 (6-8) に応じて、 α -シクロデキストリン (α CD)、 β -シクロデキストリン (β CD) および γ -シクロデキストリン (γ CD) に分類される。CD の環の入口付近と外側は親水性であるのに対して、空洞内は疎水性を示すため、ゲスト化合物を CD 空洞内に包接することによる溶解性の向上が、下剤や止瀉薬、機能的胃腸障害に対する治療としての利用に期待できる。

本研究では、PP の溶解性・腸管収縮応答性が CD を用いて適切に改善可能であるかを評価し、医薬品への応用のために基礎的研究を実施した。なお、本研究における固体状態の複合体については「包接複合体」、溶液中での複合体については「包接化合物」として区別して表わすこととする。

第 1 章：混合粉碎法および共沈法による PP/CDs 包接複合体の物理化学的特性

第 1 章では、PP と種々 CD での包接複合体形成の検証および包接複合体から生じた包接化合物の溶解性および溶液中の状態について確認した。

PP と CD をモル比 2/1、1/1、1/2 および 1/3 で秤量し、Vortex Mixer を用いて 1 分間混合したものを物理的混合物 (PM) とした。さらに、PM をアルミナセルに充填後、振動型ロッドミルを用いて 60 分間粉碎したものを混合粉碎物 (GM) とした。共沈物 (CP) は PP を溶解させたアセトン溶液 (0.11 mol/mL) 5 mL を蒸留水に溶解した種々 CD 溶液 (0.11 mmol/mL) 5 mL に滴下した後、60°C で 1 時間攪拌することにより、包接複合体を得た。

物性評価により GM では PP/ α CD=1/2、PP/ β CD=1/1、PP/ γ CD=1/1、CP では PP/ α CD=1/2、PP/ γ CD=1/1 のモル比で包接複合体を形成することが明らかとなった。溶液状態の評価において、各種 GM および CP から生じた包接化合物は、PP 分子中のメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖部分が CD 空洞内の H-3, 5, 6 位と分子間相互作用を示していることが NMR 測定により明らかとなった。蒸留水、溶出試験第 1 液 (pH1.2) および空腹時人工腸液 (pH6.5) への CP から生じた包接化合物は GM と比較して高い溶解性を維持していることが確認された。CP は GM と比較して、CD が PP の芳香環およびペンタジエン鎖を密接に包接することで、PP の共役系に影響を及ぼし、間接的にアミド基の運動性を顕著に抑制する特徴を示した。これらの相互作用の違いは、溶液状態において、包接複合体から包接化合物へ生じる非

平衡状態に影響し、PPの溶出性に影響する可能性があると考えられた。さらに、FaSSIF溶液 (pH6.5) において、CPの包接化合物から遊離したPPは高次ミセル凝集体を形成せず、タウロコール酸/レシチンまたはタウロコール酸に取り込まれることで、溶解性の向上および維持に寄与した可能性が示唆された。これらの結果から、消化管環境がpH1.2あるいはpH6.5の条件下においても、CPから生じた包接化合物はPP単独およびGMと比較して、腸管収縮調節作用を示す部位まで溶解性を維持できる可能性があり、第1章の目的であるPPの溶解性向上に繋がったため、腸管収縮調節作用としての医療分野への応用が期待された。

第2章：PP/CD 混合粉砕物の味覚応答性の評価

PPの辛味は治療薬への制限となる可能性がある。そのため第2章では、PPの味覚応答性がCDによりどう影響するのかを客観的に評価することが可能な電子味覚システムを用いた。電子味覚システムを用いた結果、PPの電子味覚センサー応答性は濃度依存的な関係を示した。各種GMから生じた包接化合物のセンサー応答性はPPの溶解性改善効果には依存せず、PPとCD間で形成される包接化合物の安定度定数の値と関係が認められた。GM (PP/ α CD) およびGM (PP/ β CD) の安定度定数は比較的高く、PPのセンサー応答特性と類似していた。一方、PP/ γ CD包接化合物は、PP/ α CDおよびPP/ β CDと比較して解離しやすい特徴があるため、PP単独として存在する量が溶液中で多くなることで、PPのセンサー応答性と類似することが予想された。しかし、PPと異なるセンサー応答性が観測されたため、包接化合物の味覚センサー応答性は、PPの量に起因するものではなく、各包接化合物自体の味覚応答特性もしくは包接化合物と共存している遊離型PPの分子状態の変化が関係している可能性が示唆された。

第3章：PP/CD 包接複合体を用いた腸管収縮性の評価

PPの腸管収縮調節作用は、下剤や止瀉薬、機能的胃腸障害に対する治療としての利用が期待されている。そのため第3章では、PPの薬理的な作用がCDによってどのような変化を示すのかを確認することにした。CD併用によるPP濃度は 2.0×10^{-5} Mとした。CPおよびGM PP/ α CD包接複合体およびGM PP/ β CD包接複合体を用いることで、カルバコールによる回腸収縮作用に対して、顕著な抑制効果が確認された。これら回腸収縮抑制作用は競合阻害および非競合阻害として観測され、PPの単独併用とは異なる包接化合物特有の薬理的な作用が関わっていると考えられた。CPとGMから生じた包接化合物はPP濃度 2.0×10^{-5} M以上の溶解性を示すことが確認される。これらの結果から、各種PP/CD包接複合体のうち、GMおよびCPにより調製されたPP/ α CD包接複合体は、止瀉薬や機能的胃腸障害に対する治療薬としての利用が期待された。

総括

本研究において、GMおよびCPにより、PP/CDs包接複合体の調製に成功し、調製方法や用いるCDによってPPとの相互作用の違いが明らかとなった。各種包接化合物の中で、PP/ α CDは生体関連培体中への溶解性が高く、PPの溶解性をコントロールすることが可能となった。さらに、PP/ α CDはPP単独とは異なる腸管収縮抑制作用を示した。よって、第1章から3章を通じて、各種包接化合物はPPとは異なる新規化合物として働いている可能性があるため、安全性や毒性に対して評価する必要性はあるが、止瀉薬や機能的胃腸障害に対する治療薬としての利用が期待された。

Thesis abstract

Basic study for the characteristic changes to solubility and intestinal contractile responsiveness of piperine included with various cyclodextrins.

Toshinari Ezawa

Pepper is one of the most widely used spices in the world, and according to the International Paper Community, global demand for pepper is expected to increase by 2% annually, and supply is expected to increase by 8-10%. Piperine, the main pungent ingredient in pepper, has been reported to be deeply involved in regulation of intestinal contraction, which is a very interesting food ingredient that is expected to be used as a laxative, antidiarrheal, and treatment for functional gastrointestinal disorders.

PP is a poorly water-soluble amide compound with a methylenedioxyphenyl group, a pentadiene chain, a tertiary amide, and a piperidine. The intestinal contraction-regulating effect of PP is highly useful. However, it shows low water solubility and can be an obstacle in therapeutic agents. Therefore, cyclodextrin (CD) was used as a functional excipient. It has relatively low toxicity and is used for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and masking the taste.

CDs are cyclic polysaccharides of D-glucopyranose linked by α -1,4 glycoside bonds. CDs are classified as α -, β -, and γ -CD according to the number of D-glucopyranose units (6 to 8). CDs structure forms a central, hydrophobic cavity due to the ether groups located inside it, while the outer ring is hydrophilic. CD can be expected as a treatment for laxatives, antidiarrheals, and functional gastrointestinal disorders by including a guest compound in cavities to improve solubility.

In this study, the solubility and intestinal contractile response of the PP was evaluated whether it is possible improve with CD. it was carried out basic research for application as pharmaceuticals. The complex was represented as a "inclusion complex" in the solid state and as a "inclusion compound" in the liquid state.

Chapter 1: Physicochemical properties of PP/CDs inclusion complexes by ground mixture and coprecipitate methods.

The first chapter examined whether inclusion complexes were formed between PP and CDs and confirmed the solubility of inclusion compounds and physicochemical state in solution. Physical mixtures (PMs) of PP/CDs with molar ratios of 2/1, 1/1, 1/2 were prepared using a vortex mixer for 1 min. Ground mixtures (GMs) of PP/CDs in the same ratios were prepared by grinding the respective PMs (1.0 g) for 60 min using a vibration rod mill with an alumina holder. A coprecipitate (CP) was prepared by dropwise addition of 5 mL of an acetone solution of PP (0.11 mmol/mL) to 5 mL of an aqueous solution of CDs (0.11 mmol/mL).

According to physicochemical evaluation, a GM PP/ α CD (molar ratio = 1/2), a GM PP/ β CD (molar ratio = 1/1), GM PP/ γ CD (molar ratio = 1/1), a CP PP/ α CD (molar ratio = 1/2) and CP PP/ γ CD (molar ratio = 1/1) formed an inclusion complex. As a result of ^1H - ^1H 2D-NOESY NMR measurement, the inclusion compounds of various GMs and CPs showed intermolecular interactions between the methylenedioxyphenyl group and pentadiene chain and the H-3, 5 and 6 protons located inside the CD. The CP inclusion compound was confirmed high solubility compared with GM in distilled water, 1st fluid for dissolution test (pH 1.2) and fasted state simulated intestinal fluid (FaSSIF, pH6.5). CP has the aromatic rings and pentadiene chain part of PP deeply included inside the CD compared with GM. This result showed the characteristic of affecting the conjugated system of PP and indirectly suppressing the motility

of the amide group. The solubility of PP was suggested to be influenced by the non-equilibrium state that occurs from the inclusion complex to the inclusion compound due to the difference interaction. Furthermore, in the FaSSIF solution (pH 6.5), PP liberated from the CP inclusion compound was encapsulated in the taurocholic acid/lecithin or taurocholic acid without forming higher-order micelle aggregates, which contributed to the improvement of solubility. From these results, under conditions where the gastrointestinal environment is pH1.2 or pH6.5, CP inclusion compounds was expected to maintain solubility up to the part that regulates intestinal contraction as compared with PP and GM. As the purpose of Chapter 1, since the solubility of PP was improved, it is expected to be applied to the medical field by the regulation of intestinal contraction effect.

Chapter 2: Evaluation of taste responsiveness of PP/CD ground mixtures

The pungent taste of PP may limit therapeutic agents. The second chapter objectively evaluated whether taste responsiveness is affected by CD. PP showed a correlation with the responsiveness of the taste sensor in a concentration-dependent manner. Taste sensor response of the various GM inclusion compound is not dependent on the solubility of the PP, correlation between the value of the stability constant of the inclusion compounds formed between PP and CD were observed. GM (PP/ α CD) and GM (PP/ β CD) indicated high stability constants and similar to the characteristic taste sensor response of PP. On the other hand, PP/ γ CD exhibits a property that the inclusion compound is more easily dissociated than PP/ α CD and PP/ β CD. It was expected that the increase in free PP would resemble the taste sensor of PP. However, PP/ γ CD inclusion compound showed different sensor responses compared to PP. Therefore, the taste sensor responsiveness of inclusion compounds is not due to the presence of free PP but is related to the taste response characteristics of each inclusion compound or the molecular state of free PP coexisting with the inclusion compound.

Chapter 3: Evaluation of intestinal contractility using PP/CD inclusion complex

PP is expected to be used as a laxative, an antidiarrheal, and a therapeutic agent for functional gastrointestinal disorders. The third chapter evaluated whether pharmacological function of PP is affected by CD. PP alone, PMs, GMs, and CPs were used at 2.0×10^{-5} M PP. The intestinal contraction test confirmed that CP PP/ α CD, GM PP/ α CD and GM PP/ β CD inclusion compounds confirmed a significant inhibitory effect on the ileal contractile effect of carbachol via competitive and non-competitive inhibitions. PP/CD inclusion compounds have a unique pharmacological function that is different from PP alone. The solubility of the CP PP/ α CD, GM PP/ α CD and GM PP/ β CD inclusion compounds was higher than the PP concentration of 2.0×10^{-5} M that suppressed the intestinal contractile response. Therefore, GM (PP/ α CD = 1/2) and CP (PP/ α CD) are expected to be applied as an antidiarrheal and therapeutic agent for functional gastrointestinal disorders.

Conclusions

In this study, preparation of PP/CDs inclusion complex using GM and CP method was successful and it became clear that the difference in intermolecular interaction with PP was caused by preparation methods and CD. The PP/ α CD inclusion compound indicated high solubility in bio-relevant media, and it has become possible to control the solubility of PP. In addition, the inclusion compounds confirmed a unique pharmacological function that is different from PP alone. Therefore, throughout Chapters 1 to 3, each inclusion compounds may act as a novel compound different from PP. Although it is necessary to investigate the safety and toxicity, it is expected to be used as an antidiarrheal and a therapeutic agent for functional gastrointestinal disorders.

論文審査の結果の要旨

胡椒は、コショウ科コショウ (*Piper nigrum*) を加工することにより製される香辛料で、辛味成分のペペリン (Piperine: PP) を 6~9% と多く含有している。生体に対する胡椒の作用は PP の薬理作用によるとの報告が多くある。PP の作用としては、例えば、高脂肪食摂取ラットの体脂肪蓄積抑制作用、クルクミンに対する消化管吸収促進作用、抗炎症作用、monoamine oxidase (MAO) 阻害作用など多様な報告がなされているが、腸管に対しては、ムスカリン性の腸管収縮作用と、オピオイド μ 受容体活性化や Ca^{2+} チャンネル遮断作用などによる腸管弛緩作用の両方を有することが特徴的である。この腸管収縮および弛緩作用を適切に引き出すことができれば、PP は、下剤や止瀉薬、機能的胃腸障害に対する治療薬として利用できる可能性がある。

恵沢敏成氏は、この PP の可能性を高めることを志向し、そのための課題と考えられる PP の溶解性の改善、味覚刺激の緩和化、消化管に対する薬理学的特性の理解の 3 つを選択し、製剤添加物であるシクロデキストリン (CD) を利用して、それらの課題に取り組んだ。その成果は、「各種シクロデキストリン包接によるペペリンの溶解性・腸管収縮応答性に関する特性変更のための基礎的研究」としてまとめられている。以下にその内容を要約する。

第 1 章においては、PP の溶解性の改善を目指し、 α CD、 β CD、 γ CD の 3 種の CD を用い、また、固体の包接複合体を得る方法として、物質に機械的エネルギーを加えるメカノケミカル反応を利用した混合粉碎法 (GM) とゲスト分子を水溶性の有機溶媒に溶解させた後、水に溶解させた CD と混合することで沈殿物を得る共沈法 (CP) の 2 種を採用し、それらの比較を行なっている。溶液中での溶解度相図を利用した解析により、形成される溶液中の包接化合物の包接モル比は $PP/\alpha CD=1/2$ 、 $PP/\beta CD=1/1$ 、 $PP/\gamma CD=1/1$ であると推察している。一方、調製された固体の包接複合体の包接モル比を NMR を用いて解析し、GM を用いたもので、 $PP/\alpha CD=1/2$ 、 $PP/\beta CD=1/1$ 、 $PP/\gamma CD=1/1$ 、CP を用いたもので $PP/\alpha CD=1/2$ 、 $PP/\gamma CD=1/1$ のモル比であることを確認している。PP の溶解性は、いずれの包接複合体固体を適用した場合でも向上した。しかし、適用初期の PP の溶解速度と溶解平衡に達した後の PP 濃度は、用いた CD の種類と複合体の調製方法の違いで大きく異なった。溶液中に存在する包接化合物中での相互作用は、CD の種類だけでなく、複合体の調製方法の違いでも異なることを 2 次元 NMR を用いて示し、溶解平衡に達した後の PP 濃度の違いには、用いた CD の環状サイズと複合体の調製方法の違いに応じて CD 分子中に位置する PP の包接様式が多様であることが関係していると考察している。また、固体蛍光測定や近赤外線測定を用いて固体包接複合体中での PP の分子挙動を解析し、さらに X 線回折測定を用いて固体包接複合体の結晶構造の比較を行なっている。それらの結果から、GM では機械的エネルギーが加えられることでアモルファスとなり、CD 同士の水素結合が切断されているのに対して、CP では水溶液中での反応であることから水素結合が安定に生じやすい傾向があり、この固体の状態の違いと溶液中での相互作用の違いの両方が、CD の種類だけでなく、複合体の調製方法の違いでも、包接複合体固体を適用した場合の PP の溶解プロファイルにおいて多様な変化が生じる理由であると考察している。

上述の考察を確認し、さらに理解を深めるために、PP のペペリジン環をピロリジンやシクロヘキサンに置換した新規 PP 誘導体を用いて、GM により得た包接複合体固体について、固体蛍光測定や近赤外線

分光測定などの各種機器分析法を適用して分析している。PP と PP 誘導体に共通する構造のメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖による共役系はアミド置換基と密接に関係しており、直接 CD がアミド基に相互作用を示さなくても、平面構造であるメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖が包接されることで、アミド基と間接的な相互作用を示す特徴を確認している。この間接的な相互作用の α CD、 β CD、 γ CD での違いが、包接様式に影響する主要な要因の1つであると考察している。

加えて第1章では、生体関連媒体における各種包接複合体を適用した場合での PP の溶解性を評価している。その結果、タウロコール酸やレシチンなどの可溶化剤との高次ミセル凝集体形成も、PP の溶解性に影響することを明らかにしている。

第2章では、各種包接複合体を用いた場合での味覚センサー応答性を比較している。第1章の結果から、溶液中に存在する包接化合物の構造は、CD の種類だけでなく、複合体の調製方法の違いでも異なることを示しており、そのことがセンサー応答性に影響することを、また、CD の種類で包接化合物の安定度定数も異なるので、包接化合物と遊離の PP の存在比も味覚の特徴と関係することを予測している。その検討の結果として、味覚センサーの応答パターンは、PP 単独時と大きく異なるが、CD の利用による溶解性の変化とは関係しないことを示している。味覚センサーの応答パターンには、PP と CD との包接様式の違いが関わっており、また、PP/ γ CD が PP/ α CD および PP/ β CD と比較して解離しやすい特徴を有し、味覚センサーの応答パターンにおいても PP/ γ CD が特徴的であることから、包接化合物と遊離の PP の存在比も味覚センサーの応答パターンに影響することを明らかにした。

第3章では、第1章に示した溶液中における包接化合物の構造の違いが、薬理作用にも影響するかを検証するため腸管収縮試験を行っている。包接化合物に薬理作用がない場合には、遊離の PP の存在濃度において薬理作用の違いを説明可能になるが、結果は異なり、包接化合物は PP 単独とは異なる薬理作用を有することを示した。

以上、CD を用いることで、PP の特性を修飾可能であることを示している。CD により PP の溶解性が改善される事実は、CD の有効性を示す結果であるが、包接化合物自体に薬理作用が認められたということから、CD を製剤添加物と扱うことはできない。従って、CD を用いて調製した包接複合体は、止瀉薬や機能性胃腸障害に対する治療薬としての利用が期待されるが、生じる包接化合物が新規化合物であると考え、安全性の評価など丁寧に行っていくべきことを指摘している。

これらの実験は、論理的に計画され、また実施されており、研究倫理における問題も指摘されない。その研究成果は、投稿論文として公表されており、博士（薬学）の学位を与えるに十分なものである。従って、論文審査結果を合格と判断する。