先進生命科学研究所紀要

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

2019　Vol.4

東海大学

先進生命科学研究所

Institute of Advanced Biosciences

Tokai University

http://www.u-tokai.ac.jp/about/research/institutions/advanced_biosciences_research/

(Japanese)

http://www.u-tokai.ac.jp/english/research/list.html

(English)

東海大学先進生命科学研究所紀要

Vol.4　2019

目次

医薬総合研究部門

「**Podoplanin と CLEC-2 との相互作用の阻害に基づくガン転移阻害薬の開発**」

渡邊伸央 [1,2]、城所正子 [1,2]、平山令明 [2]、猪口貞樹 [1,2]、斉藤　剛 [1,2]

([1]東海大学医学部救命救急医学、[2]東海大学先進生命科学研究所)

・・・・・・・・・・1

「**セレノグルタチオンの取り込みによる細胞の酸化および糖化ストレス抵抗性の向上**」

金森審子 [1,2]

([1]東海大学工学部生命化学科、[2]東海大学先進生命科学研究所)

・・・・・・・・・・5

「***新*規ブタモノクローナル抗体によるブタ MHC クラスⅠタンパク質発現の解析**」

大島　志乃 [1]、安藤　麻子 [1]、亀谷　美恵 [1, 2]

([1]東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、[2]東海大学先進生命科学研究所)

・・・・・・・・・・9

「**線虫及び質量分析計を用いた癌の匂い物質の解明と早期診断法の開発**」

戸髙惣史 [1]、関根　嘉香 [1,2]、平林　健一 [2,3]

([1]東海大学大学院理学研究科化学専攻、[2]東海大学先進生命科学研究所、[1]東海大学医学部基盤診療学系病理診断学)

・・・・・・・・・14

「**椎間板変性における IL-17 の役割の解析と新規 IL-17 阻害剤の探索**
－IL-17 関連疾患における IL-17 阻害療法への応用へ向けて－」

酒井大輔 [1,3]、隅山香織 [2,3]、平山令明 [3]

([1]東海大学医学部外科学系整形外科学, [2]東海大学医学部基礎医学系生体構造機能学、[3]東海大学先進生命科学研究所)

・・・・・・・・・19

「***HLA-DQ*06:02* が関与するルミラコキシブの特異体質性肝障害発現の分子メカニズムに関する研究**」

磯貝秀人 [1]、平山令明 [2]

([1]東海大学医学部・基礎医学系、[2]東海大学先進生命科学研究所)

・・・・・・・・・23

高機能食品研究部門

「加熱加圧処理が熊本県阿蘇郡南阿蘇村産マコモタケの抗酸化活性に及ぼす影響」
安田伸[1,2]、安田智子[1]、本田憲昭[1]
([1]東海大学農学部、[2]東海大学先進生命科学研究所)
・・・・・・・・・28

「モウセンゴケ属食虫植物 *Drosera adelae* 由来キチナーゼ遺伝子のクローニング、発現系の構築および機能解析」
米田 一成[1,2,3,4]、髙山 駿[2]、荒木 朋洋[1,2,3]、星 良和[1,2,3,4]
([1]東海大学農学部、[2]東海大学大学院農学研究科、[3]東海大学大学院生物科学研究科、[4]東海大学先進生命科学研究所)
・・・・・・・・・33

「陸上養殖サーモンへのカテキン添加飼料の効果―三保サーモン開発を目指して―」
山田良希[1]、高橋渓一[2]、平塚聖一[2,3]、秋山信彦[2,3]、齋藤寛[2,3]
([1]東海大学大学院海洋学研究科、[2]東海大学海洋学部、[3]東海大学先進生命科学研究所)
・・・・・・・・・37

「刺身のかたさ測定方法に関する検討」
新居田祐介[1]、後関雄斗[2]、深沢あかね[2]、藤沢朋子[2]、関野龍太[1]、
田中昭彦[3]、後藤慶一[1,2,4]
([1]東海大学大学院海洋学研究科、[2]東海大学海洋学部、[3]東海大学清水教養教育センター、[4]東海大学先進生命科学研究所高機能食品研究部門)
・・・・・・・・・44

「ヒトデ由来セレブロシドのリポソーム製剤化と線虫への投与」
山崎素未[1]、笹川昇[1,2,3]、清水佳隆[1,2,3]
([1]東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、[2]東海大学工学部生命化学科、[3]東海大学先進生命科学研究所)
・・・・・・・・・50

「アスタキサンチン摂取が運動後の疲労度と筋損傷に与える影響 ～本学陸上競技部駅伝選手を対象とした検討 ～」
西﨑 泰弘[1,2,3]、岸本 憲明[1,2,3]、山田 千積[1,2,3]、菊地 恵観子[1,2,3]、山鹿 由莉[2,3]、尾形 珠恵[2,3]、 峰 明奈[2,3]、 後田 奈々[2,3]、本江 信子[4]、 平島 梨夏[4]、 富永久美[4]、両角 速[5]
([1]東海大学先進生命科学研究所、[2] 東海大学医学部基盤診療学系健康管理学、[3]東海大学医学部付属東京病院健診センター、[4] アスタリール株式会社研究開発部、[5] 東海大学体育学部競技スポーツ学科
・・・・・・・・・54

香粧品研究部門

「リボン状マイクロファイバーの創製とにおい分子包接能評価」
Paopinij Kitikunanont[1], Pinyo Mekwatanakarn[1], 樋口 昌史[1,2,3], 伊藤 建[3,4], 小口 真一[3,4], 岡村 陽介[1,2,3]
([1]東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、[2]東海大学工学部応用化学科、[3]東海大学先進生命科学研究所香粧品研究部門、[4]東海大学理学部化学科)
・・・・・・・・・59

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

Vol.4 2019

CONTENTS

Pharmaceutical Science

Development of anti-metastasis drugs that can inhibit the interaction between podoplanin and CLEC-2

Nobuo Watanabe[1,2], Masako Kidokoro[1,2], Noriaki Hirayama[2], Sadaki Inokuchi[1,2] and Takeshi Saitou[1,2]

([1]Department of Emergency and Critical Care Medicine, Tokai University School of Medicine, [2] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · · **1**

Enhancement of cellular resistance to both oxidative and glycation stress by incorporation of selenoglutathione

Akiko Kanamori[1,2]

([1] Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University, [2] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · · **5**

Analysis of swine MHC class I protein expression by a newly prepared monoclonal antibody

Shino Ohshima[1], Asako Ando[1], and Yoshie Kametani[1,2]

([1] Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, [2] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · · **9**

Investigation of Scent Substances and Development of Early Diagnosis for Carcinoma Using *Caenorhabditis Elegans* Scent Detection and Mass Spectrograph

Michihito Todaka[1], Yoshika Sekine[1,2], and Kenichi Hirabayashi[2,3]

([1] Graduate School of Science, Tokai University, [2] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, [3] Department of Pathology, School of Medicine, Tokai University)

· · · · · · · · · **14**

Effects of IL-17A on intervertebral disc degeneration and the investigation of the new small-molecule: IL-17A inhibitor for treating the IL-17 -related disease

Daisuke Sakai[1,3], Kaori Suyama ,[2,3], and Noriaki Hirayama[3]

([1] Division of Orthopaedic Surgery School of Medicine Tokai University, [2] Division of Cellular Biology and Anatomy School of Medicine Tokai University, [3] Institute of

Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · · 19

Study on the possible molecular mechanism of the idiosyncratic lumiracoxib-induced hepatotoxicity associated with *HLA-DQ*06:02*

Hideto Isogai[1)] and Noriaki Hirayama[2)]

([1)] Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine ,

[2)] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · · 23

High Functional Food Science

Effect of Heat Processing with Pressure on Antioxidant Activity of Makomotake Cultivated at Minamiaso, Aso, Kumamoto in Japan

Shin Yasuda[1,2)], Tomoko Yasuda[1)], and Kensho Honda[1)]

([1)]School of Agriculture, Tokai University, [2)] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · · 28

Gene cloning, overexpression and characterization of chitinase from *Drosera adelae*

Kazunari Yoneda[1,2,3,4)], Hayato Takayama[2)], Tomohiro Araki[1,2,3)], and Yoshikazu Hoshi[1,2,3,4)]

([1)] School of Agriculture, Tokai University, [2)] Graduate School of Agriculture, Tokai University, [3)] Graduate School of Bioscience, Tokai University, [4)] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · 33

Effect of Catechin for on land cultivated *Oncorhynchus mykiss*: Development of Miho salmon

Yoshiki Yamada [1)], Keiichi Takahashi [2)], Seiichi Hiratsuka[2,3)], Nobuhiko Akiyama[2,3)], and Hiroshi Saito[2,3)]

([1)]Course of Oceanography, Graduate School of Oceanography, Tokai University, [2)]School of Marine Science and Technology, Tokai University, [3)] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · · 37

Investigation on the measurement method of the hardness of sashimi

Yusuke Niida[1)], Yuto Goseki[2)], Akane Fukazawa[2)], Tomoko Fujisawa[2)], Ryota Sekino[1)], Akihiko Tanaka[2, 3)], and Keiichi Goto[1, 2, 4)]

([1)] Graduate school of Oceanology, Tokai University, [2)] School of Marine Science and Technology, Tokai University, [3)] Liberal Arts Education Center, Shimizu Campus, Tokai University, [4)] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · · 44

Formulation of liposomes containing cerebrosides derived from starfish and their administration to *Caenorhabditis elegans*

Motomi Yamazaki[1)], Noboru Sasagawa[1,2,3)], Yoshitaka Shimizu[1,2,3)]

([1)] Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University,

[2)] Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University,

[3)] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

· · · · · · · · · **50**

Effects of astaxanthin on post-training fatigue and muscle damage in top rank long distance relay runners

Yasuhiro Nishizaki[1,2,3)], Noriaki Kishimoto[1,2,3)], Chizumi Yamada[1,2,3)], Emiko Kikuchi[1,2,3)], Yuri Yamaga[2,3)], Tamae Ogata[2,3)],Akina Ogata[2,3)], Akina Mine[2,3)], Nana Urata[2,3)], Nobuko Hongo[4)], Rika Hirashima[4)], Kumi Tominaga[4)], and Hayashi Morozumi[5)]

([1)] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, [2)] Department of Clinical Health Science, School of Medicine, Tokai University, [3)] Health Screening Center, Tokai University Tokyo Hospital, [4)] AstaReal Co. Ltd., [5)] Department of Competitive Sports. School of Physical Education, Tokai University)

· · · · · · · · · **54**

Cosmetic Science

Fabrication of Ribbon-Shaped Microfibers and Inclusion Ability of Odor Molecules

Paopinij Kitikunanont[1)], Pinyo Mekwatanakarn[1)], Masashi Higuchi[1,2,3)], Takeru Ito[3,4)], Shinichi Koguchi[3,4)], and Yosuke Okamura[1,2,3)]

([1)] Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, [2)] Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Tokai University, [3)] Division of Cosmetic Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, [4)] Department of Chemistry, School of Science, Tokai University)

· · · · · · · · · **59**

Podoplanin と CLEC-2 との相互作用の阻害に基づくガン転移阻害薬の開発

Development of anti-metastasis drugs that can inhibit the interaction between podoplanin and CLEC-2

東海大学医学部救命救急医学[1)]、東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門[2)]
渡邊　伸央[1,2)]、城所　正子[1,2)]、平山　令明[2)]、猪口　貞樹[1,2)]、斉藤　剛[1,2)]
Nobuo Watanabe[1,2)], Msasako Kidokoro[1,2)], Noriaki Hirayama[2)], Sadaki Inokuchi[1,2)], Takeshi Saitou[1,2)]

[1)]*Department of Emergency and Critical Care Medicine, Tokai University School of Medicine*
[2)]*Division of Pharmaceutical Sciences*、*Institute of Advanced Biosciences, Tokai University*

［要旨］
ガン細胞膜上の podoplanin と血小板の CLEC-2 との相互作用の阻害は、ガンの転移・浸潤、ならびにガンによる血栓症を防ぐことが期待できる。我々はドッキング・シミュレーションより、既知の化合物の中から、これらの 2 タンパク質間の結合を阻害し得る化合物を選別した。また、候補化合物の結合阻害活性を効率よく測定できるプルダウン評価系を確立し、候補化合物の阻害能を実験的に検証した。この in silico と in vitro の評価系の組み合わせにより、我々は podoplanin と CLEC-2 との結合を阻害し得るヒット化合物を数個得た。

［**Abstract**］
Inhibition of the interaction between podoplanin on tumor cell surface and CLEC-2 on platelet is expected to impair tumor metastasis and invasions as well as tumor-associated thrombosis. Using molecular docking simulation, we selected candidate compounds that can potentially abrogate the interaction of the two molecules. We also established a slot blot and pull-down-based screening assay system for such inhibitor compounds. Through repeated cycles of the *in silico* selection and *in vitro* verification, we have successfully identified a couple of compounds that could inhibit interaction between podoplanin and CLEC-2.

［**Key Words**］
Tumor metastasis, Invasion, Binding assay, Platelet aggregation

1. はじめに

ガンは我が国において死亡率の上位に位置するが、これは再発や転移による場合が大きい。podoplanin は、リンパ管内皮や腎臓 podocyte に恒常的に発現する膜タンパク質である。しかし幾つかのガン組織においては、podoplanin の発現亢進が見られる。我々は食道ガン患者において、podoplanin の発現レベルが切除手術後の再発・転移・生命予後と強く相関することを示した[1]。同様の結果は、他の組織のガンにおいても報告されている。実験的にも、podoplanin を過剰発現させたガン細胞は、マウス転移モデルにおいて高率に転移

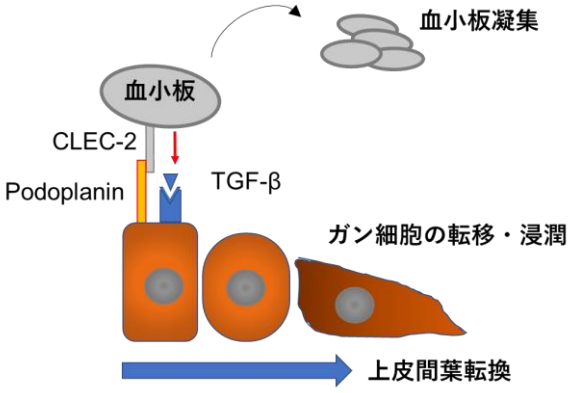


図 1　血小板による転移浸潤ならびに血栓症発症の機序

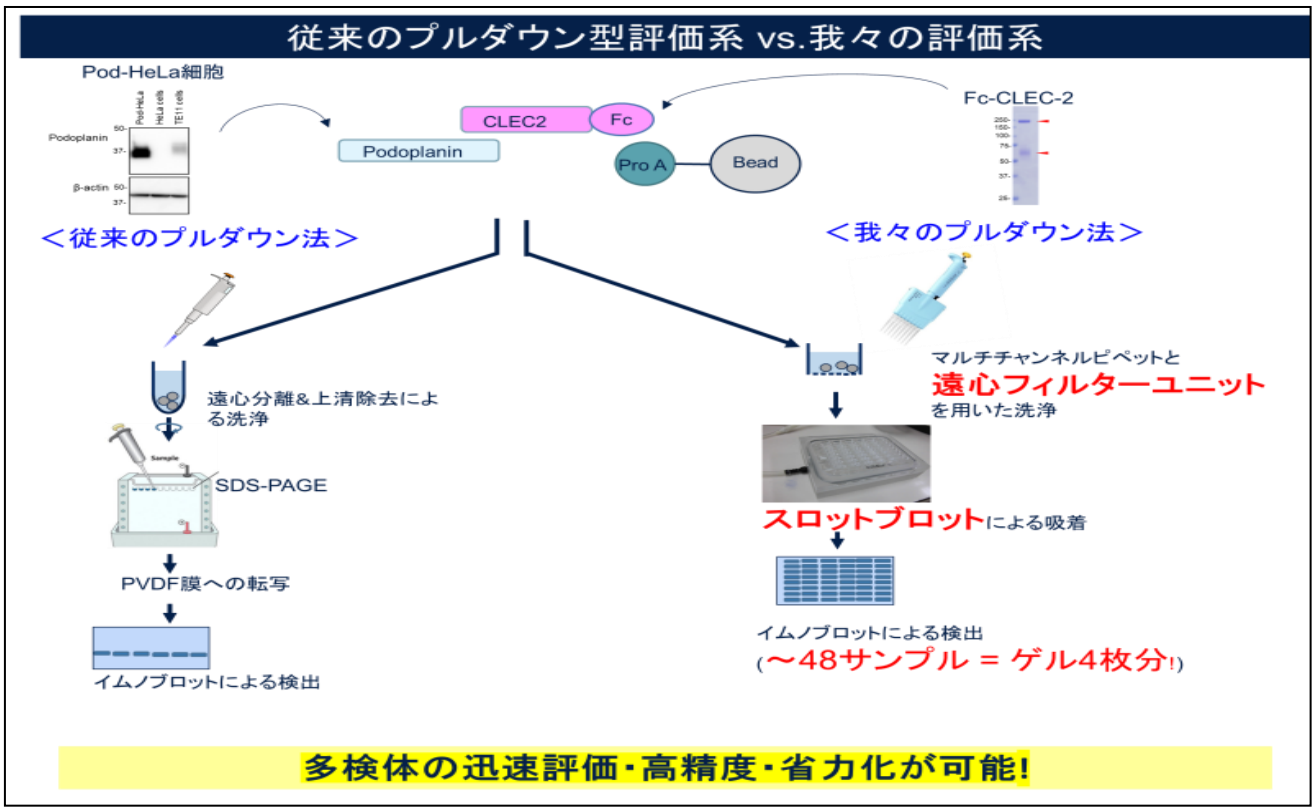


図 2　スロット・ブロットを利用した CLEC-2 と podoplanin の結合阻害化合物選択のためのプルダウンアッセイ系

を起こすことが示され、podoplanin はガンの悪性度マーカーとして位置づけられている。この機序としては、現在以下のようなスキームが考えられている(図 1)。

podoplanin の血小板活性化ドメインが、血小板膜上の膜タンパク質である C-type lectin receptor-2 (CLEC-2)に結合して血小板の活性化・凝集を誘導する。活性化された血小板からは TGF-β等の生理活性分子が放出され、これがガン細胞に作用して上皮間葉転換を誘導する。この結果、ガン細胞は柔軟性と運動性を獲得し、原発巣から他の組織への転移・浸潤が可能となる [2]。このため podoplanin と CLEC-2 との結合阻害はガンの転移浸潤に対する標的として注目を集めている。さらに podoplanin と CLEC-2 との結合阻害はガンの転移浸潤防止だけでなく、ガンや炎症に伴う凝固障害の緩和効果も期待される。しかし現在、このような作用機序を持つ医薬分子は世の中にない。

そこで我々は podoplanin と CLEC-2 との結合阻害能を有する化合物の取得を試みた。

2. 結果の概要

1) スロット・ブロットによる迅速プルダウン評価系の構築

イムノグロブリン Fc 領域融合 CLEC-2 と、podoplanin 過剰発現 HeLa 細胞ライゼートを用いて、Fc-CLEC-2 によって podoplanin を捕捉するプルダウン評価系を構築した(図 2)。ここに被験化合物を共存させ、podoplanin の沈降が抑制された場合、その化合物は CLEC-2 と podoplanin との結合を阻害している可能性が考えられる。

従来、この種のプルダウン系では、CLEC-2 に結合した podoplanin と遊離したままの podoplanin とを、遠心分離と上清除去を繰り返して洗浄して除く必要がある。また、CLEC-2 と podoplanin 複合体は SDS ゲル電気泳動で分離して、ウエスタンブロットによって検出するのが一般的である。しかしこのような方法では、多数の薬の候補化合物の評価には不向きである。そこで我々は、未結合ポドプラニンの洗浄操作のために遠心フィルターユニットを採用し、またスロット・ブロット法を組み込み、一度に 48 サンプルを評価できる迅速な評価系を構築した。これにより、例えば 100 個の化合物を評価する場合、従来の同様な方法であれば結果を得るまで 1 週間を要するが、本系を用いれば

1 日で結果を得ることも可能となった。

2) ドッキング・シュミレーションとの併用による候補化合物の取得

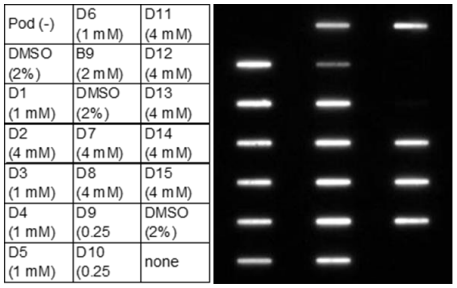
共同研究者の平山らは長年、低分子化合物とタンパク質とのドッキング・シュミレーション法の開発を行ってきた。この方法を用いて podoplanin または CLEC-2 のいずれかに結合し、双方の結合を阻害できる可能性のある化合物を入手し、それらを我々が開発した in vitro プルダウン評価系で評価した。得られた実験結果は第 2 ラウンドの in silico スクリーニングへフィードバックして候補化合物を絞り込み、プルダウンアッセイで検証した。このようなサイクルで第 3 ラウンドの評価まで行った。これまでの結果、合計 150 個の in silico 選抜化合物から 55 化合物を入手し、実験的に評価した結果、3 つの化合物(B9、D12、D13)に CLEC-2 と podoplanin との結合を阻害できることが判明した(図 3)。

3) *ヒット化合物の細胞レベルでの CLEC-2 と podoplanin の結合阻害能の評価*

これまで得られた 3 化合物に実際に血小板刺激によるガン細胞の上皮間葉転換を抑制できるかどうか、ヒト食道扁平上皮癌細胞株 TE11 細胞の培養系を用いて検討した(図 4)。血小板との共培養によって TE11 細胞には間葉系のマーカーである vimentin の発現が誘導された。抗 podoplanin 抗体 NZ-1 を添加し、podoplanin と CLEC-2 との結合を阻害した場合、vimentin の発現は半減した。一方、2) で得られたヒット化合物を添加した場合にも、いずれの化合物にも vimentin の発現抑制効果が見られた。

3. 展望

本研究によって、CLEC-2 と podoplanin との結合を阻害できる 3 つのヒット化合物が得られた。また細胞レベルでも上皮間葉転換に対する抑制効果が見られた。現時点での阻害濃度は高く、これらの化合物自体で転移阻害剤として開発を行うのは難しいと考えられる。しかし、この 3 つの化合物をもとに、さらに高次の in silico + in vitro の評価ラウンドを重ねることで、さらに活性の高い化合物の獲得ができるものと思われる。また今後、血小板凝集やマウスにおける転移モデルに対する効果なども調べ、医薬品候補としてさらに評価を行っていきたいと考えている。



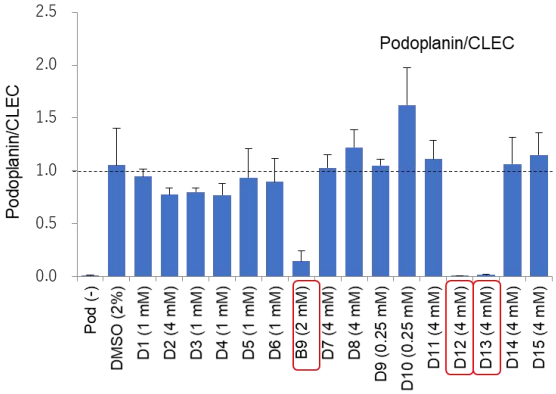


図 3　披検化合物の CLEC-2 と podoplanin の結合阻害能の評価

上段はスロット・ブロットの結果を示し、下段のグラフはスロットの強度を示す。

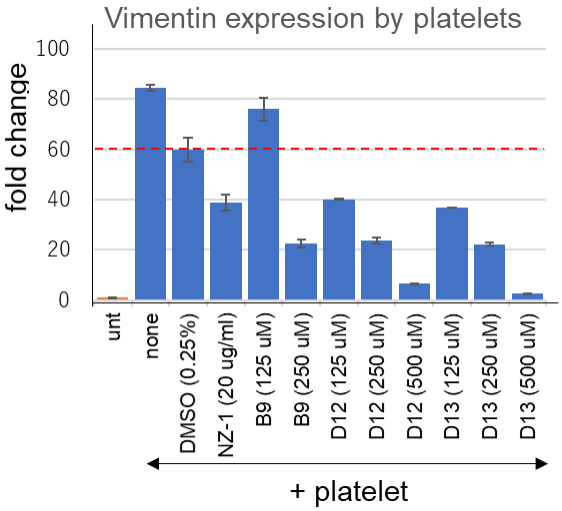


図 4　血小板による TE11 細胞の vimentin 発現に対する候補化合物の効果

TE11 細胞をヒット化合物存在下で血小板と 18 時間共培養した。Vimentin の発現はリアルタイム PCR にて測定した。NZ-1 は podoplanin に対する中和抗体である。

4. 引用文献

[1]　Tanaka M, Kijima H, Shimada H, Makuuchi H, Ozawa S, et al. (2015) Expression of podoplanin and vimentin is correlated with prognosis in esophageal

squamous cell carcinoma. Mol Med Rep 12: 4029-4036.

[2] Takemoto A, Miyata K, Fujita N (2017) Platelet-activating factor podoplanin: from discovery to drug development. Cancer Metastasis Rev 36: 225-234.

5. 業績

【論文発表】

1）Watanabe N, Kidokoro M, Suzuki Y, Tanaka M, Inoue S, Tsukamoto H, Hirayama N, Hsieh PW4, Tseng CP , Nakagawa Y, Inokuchi S "A pull-down and slot blot-based screening system for inhibitor compounds of the podoplanin-CLEC-2 interaction" ***PLOS ONE,*** 14(9):e0222331. doi: 10.1371/journal.pone.0222331. (2019)

6. 謝辞

本研究を行うにあたり種々の技術支援くださいました東海大学・生命科学統合支援センター、塚本秀雄博士、岡田義則博士、佐々木亜由美氏に感謝いたします。

セレノグルタチオンの取り込みによる細胞の酸化および糖化ストレス抵抗性の向上

Enhancement of cellular resistance to both oxidative and glycation stress by incorporation of selenoglutathione

金森 審子[1, 2)]

東海大学工学部生命化学科[1)], 東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門[2)]

Akiko Kanamori[1,2)]

1) Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University

2) Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

［要旨］

酸化ストレスや**糖化ストレス**が日常的に細胞に与えるダメージが蓄積され、老化を促進する。生体内の主要な抗酸化分子である**グルタチオン**は、細胞に元来備わっている、上記ストレスの原因物質を無毒化する機構に深く関与している。本研究では、硫黄をセレンに変換した**セレノグルタチオン**を細胞に添加し、両ストレスに対する抵抗性の向上を試みた。その結果、微量のセレノグルタチオンを取り込ませた細胞は、両ストレスによる負荷に抗して生存率が上昇し、その効果が一定期間保持された。適応摂取量の範囲が狭いセレン含有分子の活用に向けて有益な情報と言える。

［**Abstract**］

We receive various damage derived from“oxidative stress” and “glycation stress” every day and those accumulation leads to acceleration of aging. **Glutathione,** one of the main antioxidant molecules *in vivo*, contributes to the systems to control the concentration and detoxification of the substances causing above stress. In this study, we examined the effects of **selenoglutathione**, which contains the essential trace element selenium instead of sulfur in glutathione molecule, on acquirement of resistance to both oxidative and glycation stress by addition of the compound into culture medium. Improvement of cell viability against hydrogen peroxide (H_2O_2) was observed even after treatment of cells with **methylglyoxal** which is well known as a precursor molecule of advanced glycation end products (AGEs) and toxic for cells. It was also suggested that the effect of incorporated selenoglutathione on cell viability is kept for at least a few days. These results are expected to be useful information for practical use of selenoglutathione as selenium containing molecules have only small proper range for ingestion.

［**Key Words**］

glutathione, selenoglutathione, oxidative stress, glycation stress, methylglyoxal

1. はじめに

グルタチオンは主要な抗酸化分子の一つである。生体内レドックス環境の維持に関与する酵素等の機能性分子の活性調節に携わって、活性酸素の無毒化や求電子的な有害化合物の解毒に重要な役割を果たしており、細胞に生じる酸化ストレスや糖化ストレスの軽減に寄与している（図１参照）。

還元型グルタチオン(GSH)は、L-グルタミン酸、L-システイン、グリシンから成るトリペプチド（γ-Glu-Cys-Gly）であり、Cys 残基が有するチオール基を利用して標的分子を還元する。細胞への

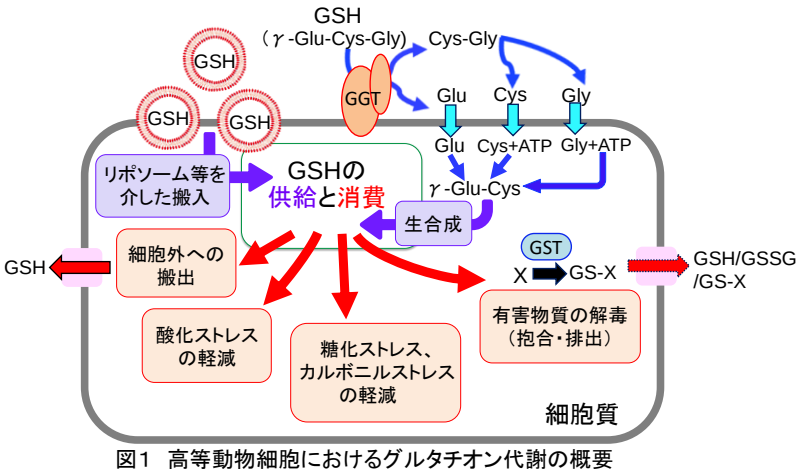


図１　高等動物細胞におけるグルタチオン代謝の概要
GGT：γ-glutamyltransferase
GST：glutathione S-transferase
GS-X：glutathione S-conjugates

GSH の供給は主として細胞質での生合成に由来する。

細胞外に搬出された場合は、細胞膜や血流中に存在するγ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)の作用に始まる分解過程を受け、生じたアミノ酸が細胞に取り込まれて再びGSH の生合成に使用される割合が高く、効率が良いとは言い難い[1,2]。そのため、細胞外から GSH を供給する場合は、リポソーム等に封入して分解を防ぐ必要があり、治療薬やサプリメントの成分として用いられている例があるが、投与法等の改善が求められている。

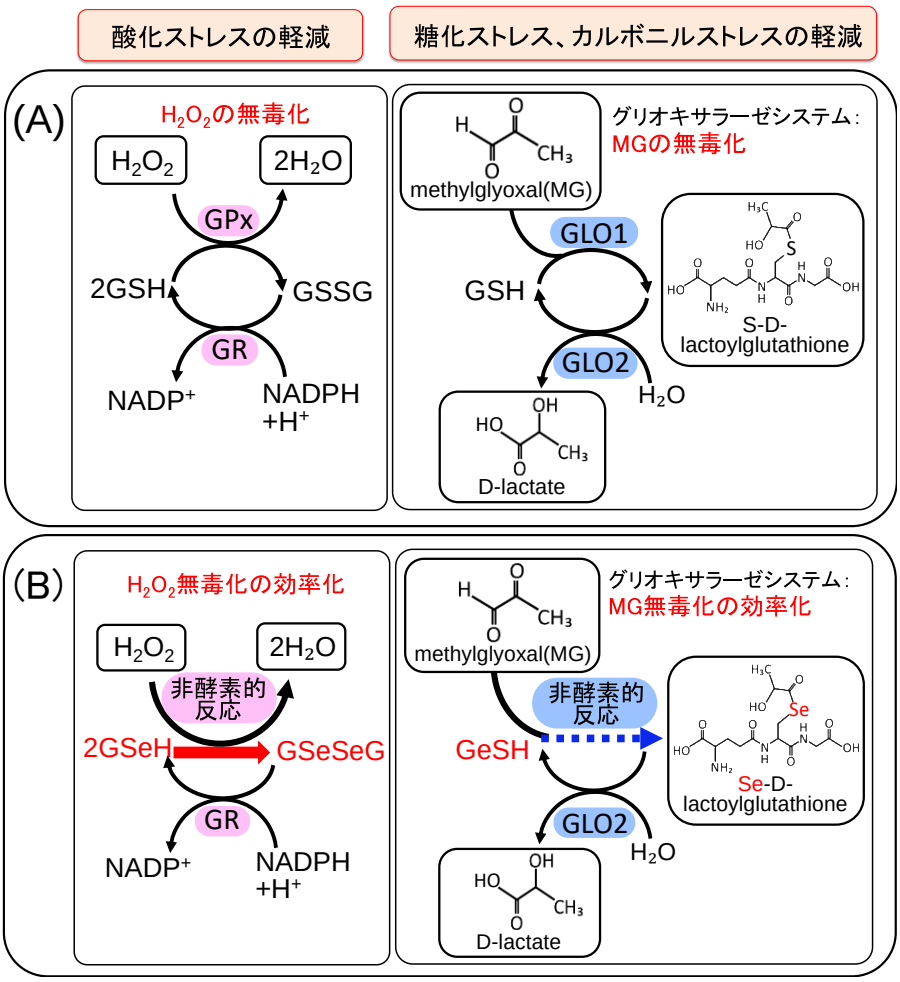


図2 ストレス原因物質の無毒化と還元型グルタチオンの再生機構
(A 細胞に元来備わっている反応系
(B) GSeSeG を取り込ませた細胞で新規に生じると予想される反応系
GPx：glutathione peroxidase, GR：glutathione reductase, GLO1: glyoxalase 1, GLO2: glyoxalase 2

2. 研究の概要

細胞質では、元来、酸化ストレスと糖化ストレスの原因物質をGSH を利用して無毒化する系が機能している（図２参照）。酸化ストレスをもたらす**過酸化水素(H_2O_2)**の無毒化経路では、二量体である**酸化型グルタチオン(GSSG)**が生じ、グルタチオン還元酵素（GR）の作用を受けて GSH が再生される。他方、糖化ストレスの原因物質である AGEs(Advanced Glycation End-products, 終末糖化産物)の前駆体であり、また、反応性が高いため様々な機能性分子を変性・失活させる**カルボニルストレス**をもたらすことでも知られる**メチルグリオキサール(MG)** [3] の無毒化経路として、**グリオキサラーゼシステム**があげられる。この経路では、グリオキサラーゼ1(GLO1)により、GSH は MG に結合して中間産物である S-D-ラクトイルグルタチオンが生成され、さらにグリオキサラーゼ2(GLO2)の作用を受けて加水分解され、GSH が再生される。

本研究では、グルタチオンの Cys 残基を L-セレノシステイン(Sec)に変換した**セレノグルタチオン**を利用して細胞のストレス抵抗性を向上させることを目的としている。生体内環境下の pH では、Sec は Cys に較べて格段に高い還元力を有するため、GSH に比べて**還元型セレノグルタチオン(GSeH)**によるストレス原因物質の無毒化効率の向上が期待される。すでに先行研究により、*in vitro* の系で GSeH が非酵素的反応で迅速に H_2O_2 および MG レベルを低下させる結果を得ている [4-6]。他方、**酸化型セレノグルタチオン(GSeSeG)**が GR の作用を受けて GSeH が生成されることも確認されている [4]。GSeH は反応性が高いため、水溶液中では容易に溶存酸素と反応して GSeSeG となるが、細胞に取り込まれた際には、細胞質で GR の働きにより GSeH が生じると推定される。実際に GSeSeG を培地に添加して細胞に取り込ませた後に H_2O_2 による酸化ストレスを加えると、生存率が上昇した結果を得ている[6,7]。これに対して GSeSeG の約 100 倍高濃度でも GSSG を取り込ませた場合は、効果が認められなかっ

た。すなわち、細胞質で GR によって GSeH が生じ、細胞の酸化ストレス抵抗性を向上させるという仮説の正当性を支持する結果が得られた。そこで、GSeSeG の培地への添加により、MG に対する抵抗性が向上するかを検討した。

3. 結果の概要

まず、細胞を一様な密度に増殖させた後、培地に μM オーダーの GSeSeG を添加して一晩処理し、細胞に取り込ませた。2 日目に培地を mM オーダーの MG を添加したものと交換して一晩処理し、さらに 3 日目に mM オーダーの H_2O_2 を添加したものと交換してさらに一晩処理した（図３参照）。4 日目に新しい培地に交換した後に細胞の生存率を調べた。

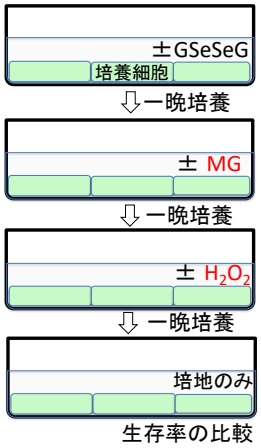


図3 GSeSeG 取り込みの有無が細胞のストレス抵抗性に及ぼす影響の解析法
1 日目：サブコンフレント状態の細胞に±GSeSeG の培地を加えて一晩培養
2日目：培地を除去し、±MG で一晩培養
3日目：培地を除去し、±H_2O_2で一晩培養
4日目：新しい培地を加えて生存率の解析

その結果、1 日目の GSeSeG の添加の有無により、MG および H_2O_2 に対する細胞の抵抗性に顕著な差が認められた[8-10]。生存率は、添加した GSeSeG 濃度依存的に上昇したが、与えられた負荷の値に反比例して低下した。得られた結果の概要を以下にまとめた。

(1) 細胞内で GR によって GSeSeG が還元されて生じる GSeH は、活性酸素のみならずカルボニル化合物の無毒化に有効であると考えられる。

(2) 細胞に GSeSeG を取り込ませた後、培地から GSeSeG を除去した状態で MG、続けて H_2O_2 による負荷をかけたが、生存率向上の効果が持続した。したがって、外からの補給なしで、細胞内に存在する GSeSeG の絶対量よりも高い負荷に抵抗する効果が継続されていることになる。GSeSeG が細胞外に搬出されたり分解された比率は極めて低く、細胞質で還元酵素である GR の作用を受けて GSeSeG ⇄ 2GSeH という系が循環したと推測される。

(3) 添加 GSeSeG 濃度依存的に細胞の生存率が増加した。すなわち、セレンの毒性が問題にならない濃度範囲でのセレン含有化合物の抗酸化・糖化効果の意義が示唆された。

4. 展望

必須微量元素セレンは、生体内では主に Sec の構成成分として存在する。Sec は 21 番目のアミノ酸であり、Cys の硫黄原子がセレン原子に置換された構造をもつ。Sec は多くの酸化還元酵素の活性部位で機能しており、Cys に変換されると比活性が著減する報告が多い。例えばグルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）では、活性部位の Sec を Cys に、変換すると活性が 1/1000 に低下するという報告がある[11]。同族であるが、セレンの方が硫黄よりも高周期元素であるため、反応性が高い。

本研究では、生体内の主要な抗酸化分子である GSH の Cys を Sec に置き換えて反応性を向上させた GSeH に着目し、セレンの高い抗酸化能を活用して細胞の生存率の向上を目標としている。得られた成果を細胞内レドックス環境の迅速かつ恒常的な改善に活用し、最終的には疾病の予防や治療につなげることを目的とする。

セレンは必須微量元素でありながら使用許容濃度の範囲が狭いため、できるだけ少量で標的細胞のみに的確に運ばれ、機能することが期待される。今回、細胞に取り込まれた GSeSeG が一定期間、細胞質に保持されで継続的に機能する可能性が示唆された。これは、セレン含有化合物の必要以上な摂取を避ける上で有益な情報であると考えている。治療薬にはさらに安全性が望まれる。標的細胞に特異的に摂取されるナノリポソームに GSeSeG を封入して投与する手法は、セレンの高い抗酸化能を活かし、かつ、分解を防止した安全な治療薬の開発の布石になると期待され、さらに改善と解析を進める予定である。

セレンを含む治療薬としてはエブセレンが GPx を模してデザインされたが、水に不溶で扱いにくく、国内では治療薬として承認されていない。それに対して、GSeSeG は安定な化合物であり、高い水溶性を示すため、取り扱いが容易である。また、GSeH,GSeSeG は、生来体内に豊富に存在する GSH,GSSG の硫黄をセレンに置換した構造であるため、拒絶反応が起こりにくいと考えられる。*in vitro* の実験系と培養細胞を用いた系で条件検討を進めた後に、動物実験の実施に進みたいと考えている。

5. 引用文献（関連学会発表等を含む）

[1] A. K. Bachhawat *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830,** 3154-3164 (2013)
[2] R. Franco, *et al.*, *Arch. Physiol. Biochem*, **113**, 224-258 (2007)
[3] S. Suravajjala, *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, **421**, 170-176 (2013)
[4] S. Yoshida, K. Arai, M. Iwaoka, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50** , 2125-2128 (2011)
[5] A. Kanamori, *Bull. Inst. Adv. Biosci.* **3,** 4-7 (2019)
[6] 熊坂実優、下平伸吾、岩岡道夫、金森審子 ：セレノグルタチオン封入リポソーム添加による細胞の酸化ストレス抵抗性の向上、第91回日本生化学会大会、2018年9月、京都。
[7] A. Kanamori, *Bull. Inst. Adv. Biosci.* **2,** 10-13 (2018)
[8] 金森 審子、高橋 沙和、大畠 早葵、熊坂 実優、下平 伸吾、岩岡 道夫 ：糖化及び酸化ストレス制御へのセレノグルタチオンの活用、第 5 回 日本セレン研究会、2019 年 7 月、東京
[9]金森 審子、高橋 沙和、大畠 早葵、熊坂 実優、下平 伸吾、岩岡 道夫 ：セレノグルタチオン添加による細胞の糖化および酸化ストレス抵抗性の向上、第 38 回日本糖質学会年会、2019 年 8 月、名古屋
[10]金森 審子、高橋 沙和、大畠 早葵、熊坂 実優、下平 伸吾、岩岡 道夫 ：セレノグルタチオンの高い抗酸化力による細胞の糖化および酸化ストレス抵抗性の向上 第 92 回 日本生化学会大会、2019 年 9 月、横浜
[11] L. Johansson, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1726**, 1-13 (2005)

6. その他の業績

【学会等発表】

[1] Shoko Aida-Hugaji, Daiki Nemoto, Tomoaki Tetsumoto, Akiko Kanamori
Molecular design of the glutathione derivatives for avoidance of decomposition by GGT1
Joint 12th EBSA & 10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress, 2019年7月、スペイン、マドリード。

7. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただき、常に的確で温かなご指導を賜っている平山令明先生、共同研究を行わせていただいている理学部化学科、岩岡道夫先生、荒井堅太先生と下平伸吾さん、本研究を遂行するにあたりご協力いただいた研究室の学生の皆さんに心より感謝いたします。

新規ブタモノクローナル抗体によるブタ MHC クラスⅠタンパク質発現の解析

Analysis of swine MHC class I protein expression by a newly prepared monoclonal antibody

大島　志乃[1]、安藤　麻子[1]、亀谷　美恵[1,2]
[1]東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
[2]東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門
Shino Ohshima[1], Asako Ando[1], Yoshie Kametani[1,2]
[1]Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine
[2]Division of Pharmaceutical Sciences Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

［要旨］
主要組織適合性抗原(MHC)の発現調節は様々な病態と関連する重要な機構である。本研究では、我々が作製したブタ古典的 MHC クラスⅠ分子(SLA)アレルエピトープを識別可能なモノクローナル抗体を用いて、MHC 固定ブタのみならず各種のブタ系統についてアリル特異的な発現が検出可能か検討した。その結果、我々の SLA クラスⅠモノクローナル抗体を用いることにより、実験動物系統であるマイクロミニピッグのみならず、様々な系統のブタ SLA クラス Ⅰタンパク質の発現量を検出可能なことが明らかになった。

［**Abstract**］
The regulation of Major Histocompatibility Complex (MHC) expression is an important mechanism closely related to various diseases. In this study, we used a monoclonal antibody prepared against swine leukocyte antigen I (SLA-1), which can distinguish an allele-specific epitope, to detect not only SLA-defined Microminipigs but also other swine strains' SLA class I. As a result, the protein expression of SLA-1 allele on the white blood cells was detectable for representative four swine strains.

［**Key Words**］
Swine, swine leukocyte antigen, monoclonal antibody, allele specific epitope

1. はじめに

主要組織適合性抗原(MHC)の発現調節は移植後の様々な病態と関連する重要な機構である。これに関連した移植免疫研究はブタにおいて積極的に行われて来た[1]。一方、MHC 発現は感染症とも関連しており、何らかの感染による免疫活性化によりリンパ球において発現が上昇する[2]。感染症の有無はこのような MHC 発現の解析により、ある程度予測することができる。

マイクロミニピッグは実験・研究用の超小型ブタであり、7 か月齢で体重 10 kg 程度とビーグルと同じサイズである。取扱いが容易であり、飼育経費や実験経費が安価である[3-5]。しかも SLA が固定されているため、免疫応答を比較するためには MHC の違いを考慮しなくても良い優れた系統である[6]。

しかし、ブタ MHC クラスⅠ抗体は、市販品が１種類あるものの、ブタ特異的ではなく、ヒトや他の動物にも交差する抗体であった。そこで我々は、ブタ古典的クラスⅠ分子(SLA)アレルのエピトープを識別可能なブタ特異的なモノクローナル抗体（X2F6）を作製し、MHC 固定マイクロミニピッグを用いてアレル特異的なブタ クラスⅠ発現動態の解析を行ってきた。その結果、得られた X2F6 抗体はマイクロミニピッグの SLA クラスⅠハプロタイプ（表 1）に存在する２つのエピトープを識別するブタ特異的な抗体であることが明らかとなった[7]。しかし、ブタのハプロタイプは、系統によってさまざまであり、他の系統でもこれが利用可能かについては現在まで明らかでない。そこで本研究では、この抗体が他の系統の SLA も認識可能かについて解析した。

2. 実験

１）ブタ MHC(SLA)クラスⅠに対するモノクローナル抗体

ブタモノクローナル抗体は我々が作製したハイブリドーマより精製して用いた[7]。オリエンタル酵母か

ら購入したICR nu/nuマウスにプリスタンを投与し、７週間後に抗体産生ハイブリドーマ3×10^6個を腹腔内投与し、腹水を得た。Hi Trap Protein G HP Columns (GE Healthcare)にBinding Bufferを通してカラム内を洗浄したのち、１mLの腹水を１×PBSで10倍希釈したものを通した。その後、Binding Bufferを通し、Protein Gに結合しなかった親和性の低い抗体などを取り除いた。抗体溶出後すぐに中性溶液にさせるため、Elution Buffer 1mL を中和できる量のNeutralizing Bufferを３本のチューブに分注し、Elution Buffer を1mLずつ通し、そのチューブに回収した。回収した抗体溶液についてそれぞれ、280 nmでタンパク量を測定し、濃度が高い２本の溶液をそれぞれ透析チューブに入れ、4℃の１×PBSで一晩透析した。透析後、280 nmでタンパク量を測定した。その後、50%グリセロール含有溶液になるようにグリセロールを添加し、−20℃で保存した。

２）抗体の特性解析

陽性コントロールとして、HEK293を親株とし、古典的クラスⅠ遺伝子であるSLA-1、SLA-2、SLA-3、非古典的クラスⅠ遺伝子であるSLA-6を導入したトランスフェクタントを作製し、市販抗体（PT85A）とX2F6抗体で染色を行った。トランスフェクタントは蛍光色素としてmVenusを含むコンストラクトを用い、Neon® Transfection System (Invitrogen)を用いて1400V 10ms 3pulesの条件で遺伝子導入した。遺伝子導入48時間後に細胞を回収し、mVenusの発現をフローサイトメトリーを用いて確認した。染色はそれぞれのトランスフェクタントにX2F6抗体またはPT85A抗体を反応させたのち、二次抗体としてanti-mouse IgG APC (BioLegend)を用いて染色し、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。

３）X2F6抗体を用いたマイクロミニピッグ以外のブタ（家畜ブタ）のPBMC染色

X2F6抗体は、マイクロミニピッグに対しての反応性を解析し、ハプロタイプにより染色パターンが異なることが明らかになっている。そこで、ここではマイクロミニピッグを陽性対照として、マイクロミニピッグ以外の種のブタとして大ヨークシャー種、ランドレース種、デュロック種、金華豚の４品種、それぞれ２個体ずつの末梢血を用いて反応性を確認した。ブタのハプロタイプはブタ血液からRNAを抽出し、RT-PCR産物を得たのち、それぞれのハプロタイプを構成する古典的クラスⅠ遺伝子のアレル特異的なプライマーを用いるSSP法（sequence-specific PCR）により確定した。ブタPBMCはリンフォプレップを用いて比重遠心分離を行い、単核球画分を採取した。RBC Lysis Bufferにより赤血球を溶血させ、PBMCを得た。このPBMCにX2F6抗体またはPT85A抗体を反応させたのち、二次抗体としてanti-mouse IgG2a FITC(AbD serotec)を用いて染色し、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。

３．結果と考察

１）作製したSLA クラスⅠ抗体(X2F6)の特異性解析

以前報告したように、PT85Aはヒトとも交差する抗体のため、HEK293を含め、すべてのトランスフェクタントを認識するが、X2F6モノクローナル抗体はSLA-1トランスフェクタントのみを認識し、X2F6はヒト、マーモセットのPBMCを認識せず、ブタのPBMCのみを認識することを確認した[7]。

２）マイクロミニピッグ以外のブタ（家畜ブタ）のPBMCに対するX2F6抗体の反応性

古典的ブタMHC(SLA) クラスⅠ発現遺伝子のSLA-1は、アレルグループ22個、アレル数は90個の存在が判明している[8] (https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/SLA/)。今回採血を行った大ヨークシャー種は、SLA固定ブタであるマイクロミニピッグと同様にSLA-1*12:01,*13:01を持ち、デュロック種と金華豚は共にSLA-1*04:01を持っていたが、ランドレース種は異なるアリルを持っていた。

X2F6抗体はマイクロミニピッグのみならず、家畜ブタである４品種のPBMCも認識することができた（図1)。SLA-1*04:01をホモにもつデュロック種のPBMCは先述の論文[7]と同様にX2F6抗体に対して中程度の反応を示し、SLA-1*04:01のみならず、金華豚のように別のSLA-1アレルの遺伝子が入っている場合、それぞれで反応性が異なることが明らかとなった。SLA-1*12:01, *13:01を持つ大ヨークシャー種は、SLA-1*04:01を持つデュロック種と金華豚よりも高い反応性を示し、SLA-1*15:01, *14:02を持つラ

ンドレース種も高い反応性を示した。これらの結果、X2F6 抗体との反応は、ハプロタイプに依存する傾向があることが示された。本モノクローナル抗体は、ブタの品種にかかわらず、アレル特異的な染色パターンを検出可能であることが明らかとなった。

マイクロミニピッグ集団の保有するSLAアレルタイプとハプロタイプ[6]

Haplotype (Hp-)	class I		
class I	*SLA-1*	*SLA-3*	*SLA-2*
10.0	*05:01	*08:01	*03:02
35.0	*12:01, *13:01	*05:02	*10:01
16.0	*04:01	*06:02	*09:01
17.0	*08:04	*03:05	*06:03
43.0	*11:04	*04:01	*04:02:02

表１．マイクロミニピッグ集団の保有するクラスＩの SLA アレルタイプとハプロタイプを表に示す。
赤枠で囲った SLA-1*04:01 アレル遺伝子を用いて X2F6 抗体を作製した。

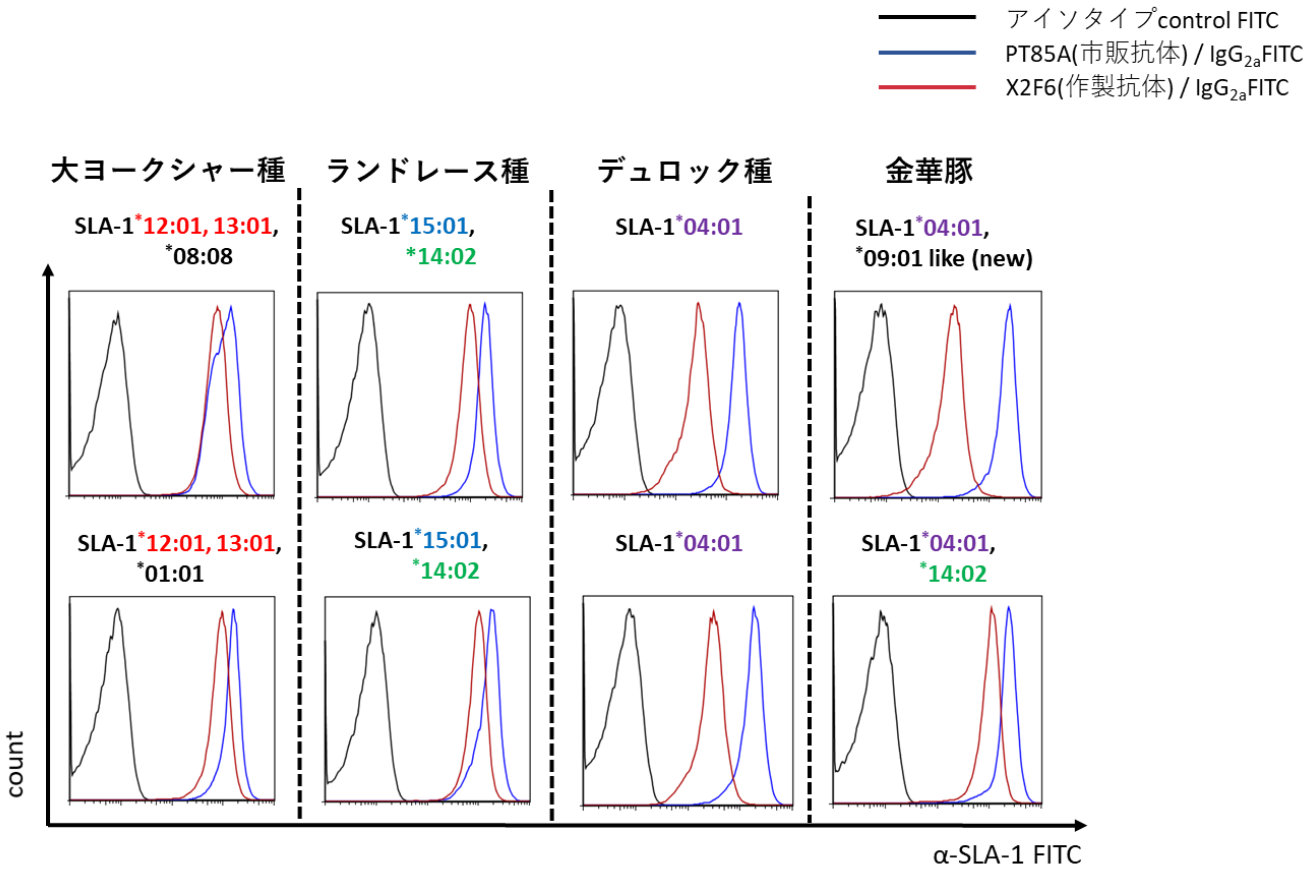


図. 1 パネルは左から大ヨークシャー種、ランドレース種、デュロック種、金華豚の 4 品種の PBMC のフローサイトメトリーパターンを示す。SLA の各ハプロタイプはそれぞれ異なるカラーでパネルの上に示している。上下段のパネルは同一系統の異なるブタの PBMC を示す。横軸にフローサイトメトリーで得られた SLA クラスＩの発現レベルを、縦軸は細胞数を示している。
黒線はアイソタイプコントロールを、水色は市販の PT85A 抗体、赤線は作製した X2F6 抗体を示し、それぞれのブタのアレルを図中に示した。

3. 展望

X2F6抗体はブタ特異的であることに加え、SLAクラスⅠハプロタイプにより染色強度が異なるため、様々な品種のブタで、移植研究に用いることが可能であると考えられる。

4. 引用文献

[1] M.M.Swindle *et al., Veterinary Pathology,* **49**,344 (2012)

[2] D.O.Freedman *et al., Journal of Immunology,* **142**,653 (1989)

[3] N.Kaneko *et al., Journal of Pharmacological Sciences,* **115,**112 (2011)

[4] M.Takasu et al., *Laboratory Animals,* **49,**65 (2015)

[5] T.Matsubara et al., *Asian-Australasian Journal of Animal Science,* **31,**163 (2018)

[6] A.Ando *et al., Animal Genetics,* **45,**791 (2015).

[7] Y.Kametani *et al., PLoS One,* **11,** e0164995 (2016)

[8] S.E.Hammer *et al., Annual Review of Animal Biosciences,* **8 ,** 14.1 (2020)

5. 業績

【論文発表】

1) Hirofumi Kashiwagi, Hitoshi Ishimoto, Shun-ichiro Izumi, Toshiro Seki, Rihito Kinami, Asako Otomo, Kazumi Takahashi, Fuyuki Kametani, Noriaki Hirayama, Erika Sasaki, Takashi Shiina, Kou Sakabe, Mikio Mikami, Yoshie Kametani*. Human PZP and common marmoset A2ML1 as pregnancy related proteins. Scientific Reports, *in press* (2020)

2) Yoshie Kametani*, Yusuke Ohno, Shino Ohshima, Banri Tsuda, Atsushi Yasuda, Toshiro Seki, Ryoji Ito, Yutaka Tokuda. Humanized Mice as an Effective Evaluation System for Peptide Vaccines and Immune Checkpoint Inhibitors. 2019 International Journal of Molecular Sciences, *20*(24), 6337 (2019)

3) Yoshiyuki Manabe, Kazuya Kabayama, Taku Aiga, Asuka Miyamoto, Shino Ohshima, Yoshie Kametani. Koichi Fukase*. Syntheses and functional studies of self-adjuvanting anti-HER2 cancer vaccines. Qi Feng, Chemistry an Asian Journal. 14(23):4268-4273 (2019)

4) Asako Ando, Noriaki Imaeda, Tatsuya Matsubara, Masaki Takasu, Asuka Miyamoto, Shino Oshima, Naohito Nishii, Yoshie Kametani, Takashi Shiina, Jerzy K. Kulski, Hitoshi Kitagawa*. Genetic association between swine leukocyte antigen class II haplotypes and reproduction traits in Microminipigs. Cells, 8; E783 doi: 10.3390/cells8080783. (2019)

【学会等発表】

1) Shino Ohshima, Tatsuya Matsubara, Hitoshi Kitagawa, Asako Ando, Yoshie Kametani. CD4. A and CD4. B recognizing monoclonal antibody can detect Th activation condition of Microminipigs. 第48回日本免疫学会学術集会 2019. 12 浜松

2) Mao Suzuki, Shino Ohshima, Eisaku Yoshihara, Satomi Asai, Hayato Miyachi, Yoshie Kametani. Development of new antibacterial monoclonal antibodies against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. 第48回日本免疫学会学術集会 2019. 12 浜松

3) Yusuke Ohno, Tomoka Shimizu, Hirofumi Kashiwagi, Yumiko Goto, Toshiro Seki, Ryoji Ito, Hitoshi Ishimoto, Yoshie Kametani. Progesterone effects on pregnant humoral immunity using humanized mice. 第14回国際生殖免疫学会 2019. 11 奈良

4) 松原達也、吉田亮佑、今枝紀明、亀谷美恵、 矢原芳博、大場恵典、北川均、安藤麻子 マイクロミニピッグにおけるSLAハプロタイプとCD4遺伝子多型の免疫学的特徴 第28回日本組織適合性学会大会 2019. 9 名古屋

5) 清水智香、大木廉太郎、大野裕介、關敏郎、和泉俊一郎、亀谷美恵 グルココルチコイドおよびプロゲステロンのリンパ球活性化に対する影響の比較解析 日本下垂体研究会第34回学術集会 2019. 8 出雲

6) 大野裕介、大木廉太郎、大島志乃、津田万里、關敏郎、伊藤亮治、亀谷美恵 NOG-hIL-4-Tgマウスを用いた乳がん患者免疫応答とグルココルチコイドの関連性解析 日本下垂体研究会第34回学術集会 2019. 8 出雲

7) 中田俊輔、大木廉太朗、宮本あすか、伊藤亮治、津田万里、亀谷美恵 乳癌新規ペプチドワクチン開発のためのヒト化マウスモデル 第66回日本実験動物学会総会 2019. 5 福岡

8) 大島志乃、北川均、松原達也、安藤麻子、亀谷美恵　CD4亜型マイクロミニピッグのT細胞活性化にともなうSLAクラスI 分子発現の動態解析　第66回日本実験動物学会総会　2019.5 福岡

9) 大野裕介、宮本あすか、清水智香、柏木寛史、伊藤亮治、關敏郎、亀谷美恵　ヒト化マウスNOGマウスを用いたヒト妊娠免疫の解析　第66回日本実験動物学会総会　2019.5　福岡

6. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただきました平山令明先生に心より感謝いたします。

線虫及び質量分析計を用いた癌の匂い物質の解明と早期診断法の開発

Investigation of Scent Substances and Development of Early Diagnosis for Carcinoma Using Caenorhabditis Elegans Scent Detection and Mass Spectrograph

戸髙　惣史[1)]、関根　嘉香[1,2)]、平林　健一[2,3)]
[1)]東海大学大学院理学研究科化学専攻
[2)]東海大学先進生命科学研究所、[3)] 東海大学医学部基盤診療学系病理診断学
Michihito Todaka [1)], Yoshika Sekine [1,2)], Kenichi Hirabayashi [2),3)]
1) Graduate School of Science, Tokai University
2) Institute of Advanced Biosciences, Tokai University
3) Department of Pathology, School of Medicine, Tokai University

［要旨］

癌の早期発見は患者の生命予後を延ばす上で重要であるが、膵癌などの難治癌では早期診断が困難なために進行癌で発見され、治療に難渋する場合がある。本研究では、尿検体を用いて線虫 ***Caenorhabditis elegans*** の嗅覚による癌に対する走性行動、または尿および皮膚ガス中の匂い物質をガスクロマトグラフー質量分析計（**GC-MS**）により解明することで癌早期発見が可能であるかを検討する。患者にとって侵襲のない尿検体または皮膚ガス検体を用いて、癌の匂い物質が解明できれば、健診などで応用が可能である。今回は、昨年度に引き続き皮膚ガスに着目し、皮膚ガスパターンによるがん判定方法の検討を行い、さらに **GC-MS** の分析方法を改善して分析対象数を増やすことが出来たので報告する。

［**Abstract**］

Early diagnosis for carcinoma is important for extension of prognosis. However, in the incurable carcinoma cases such as pancreatic cancer, almost of patients are discovered in advanced stage because of difficulty of early diagnosis. This study aimed to examine the possibility of early diagnosis for carcinoma on non-invasive basis by investigation of scent substances using *Caenorhabditis Elegans* and Gas-chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) for urine and skin gas. If possible, scent substances can be used for early diagnosis in healthy examination. In this paper, feasibility of cancer detection was discussed by using emission pattern of the skin gas and discrimination analysis. Furthermore, number of target skin gases was increased by improving the analytical procedure and condition of GC-MS.

［**Key Words**］

scent substance, carcinoma, *Caenorhabditis Elegans*, GC-MS, early diagnosis, human skin gas

1. はじめに

現在、癌は主として血液検査、各種画像検査、組織細胞検査などにより診断されている。癌の早期発見は患者予後につながるが、早期発見の困難な腫瘍も少なくない。例えば、胆膵癌の早期発見は困難であり、進行癌で発見される場合がほとんどであり、難治癌の代表である。また口腔癌・消化管癌（食道癌、胃癌、大腸癌）の診断に関しても、非侵襲的で簡便な検査による早期診断が望まれている。

線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)は、体長 1 mm 余りの非寄生性の生物であり、嗅覚受容体を約 1200 種（犬と同等）有する。近年、線虫が癌患者の尿に集まることが報告され[1)]、新たな癌の早期診断法として期待されている。また、尿、呼気、腸内ガス等は血液に代わる生体サンプルとしての利用が期待されているが、近年ヒト皮膚表面から放散される微量な生体ガス（皮膚ガス）の存在が明らかになり、ヒトの身体的・精神的状態、疾病の有無、生活環境や生活行為との関連が

わかってきた[2]。そこで本研究では、生体サンプルとして尿および皮膚ガスに着目し、線虫の嗅覚による癌に対する走性行動、または尿および皮膚ガス中の匂い物質の分析・解析により、胆膵癌・口腔癌・消化管癌等の早期発見が可能であるかを検討することとした。

本報では、東海大学医学部付属病院において癌患者の皮膚ガス検体を採取し、ガスクロマトグラフー質量分析計（GC-MS）により匂い物質の分析を行い、癌患者と健常者の皮膚ガスの成分組成（皮膚ガスパターン）に着目して癌の判別が可能かを検討し、さらにGC-MSの分析条件を改善し、分析対象とする皮膚ガス成分数を増やすことが出来たので報告する。

2. 結果の概要

1） 皮膚ガスパターンによる癌判定の検討

本研究では、東海大学医学部付属病院において同意が得られた癌患者から皮膚ガス検体を捕集し、東海大学湘南校舎において匂い物質の化学分析を行った。捕集した検体は施設間の移動を伴うため、匂い物質の捕集法には、迅速性、簡便性、安定性が求められる。そこで皮膚ガスの捕集には東海大学湘南校舎で開発されたパッシブ・フラックス・サンプラー（PFS）法[3]を用いた（図1）。PFSは分子拡散の原理を利用してガスを捕集する小形デバイスであり、容器状の本体部、捕集材および止め具で構成されている。PFS の開口部側を前腕部にのせて固定する。この時生じるヘッドスペース内を皮膚ガスが分子拡散して捕集材に捕捉される。

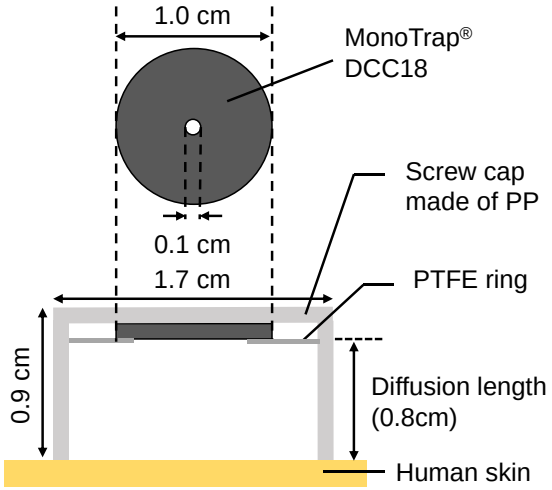


図１　皮膚ガス測定用 PFS の構成図

皮膚ガスの捕集部位は、左右いずれかの前腕部とし（図２）、捕集時間は患者の状態を見ながら 1～2 時間を目安とした（検体毎に正確な捕集時間を記録）。皮膚ガス検体はこれまで48検体を採取することができ、その内訳は、大腸癌5検体、胃癌7検体、膵癌26検体、舌癌・口唇癌4検体、肝臓癌1検体、S状結腸癌2検体、食道癌1検体、その他（癌以外）2検体であった。

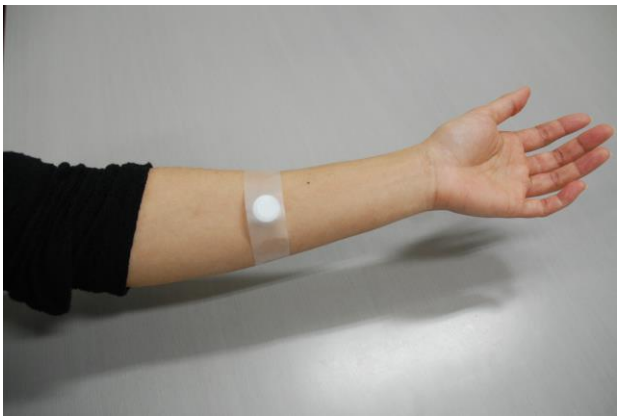


図２　PFS による左前腕部における皮膚ガス捕集

皮膚ガス成分の分析にはガスクロマトグラフ-質量分析装置（GC 装置；アジレント・テクノロジー社製6890N，MS 装置；日本電子社製 Q1000GCMkⅡ）を用いた。2018 年 6 月までは、加熱脱離法を用いて捕集した皮膚ガス成分を GC-MS 装置に導入し、51 成分について定量分析を行った。2018 年 7 月以降は後述するようにヘリウムガスの世界的供給不足により、溶媒脱離法への切替および分析条件の変更を強いられた。そこで、2018 年 6 月までに分析した癌患者 13 検体（膵癌：7 名、大腸癌：3 名、胃癌：2 名、舌癌：1 名）および健常者 25 検体の皮膚ガスパターンを用いて、癌の判定方法について検討した。

昨年度の報告に記したように、癌患者および健常者の皮膚ガスパターンには相違が見られた[4]。そこで、癌患者および健常者の皮膚ガスパターンをもとに判別分析を行った。判別分析は、個体群をある基準によって二つの集団に分ける手法であり、あらかじめ取得した癌患者と健常者の皮膚ガスパターンを入力し、両群を分けるときの境界線になる判別関数を求める。次に判別関数に各群の皮膚ガスパターンを入力すると判別得点が得られ、その得点から両群を分けることができる。解析ソフトには IBM SPSS ver.23 を使用し、皮膚ガスとして 40 成分（全被験者データにおいて欠損値のないもの）を代入した。図 3 に得られた判別得点のヒストグラムを示す。癌患者群の判別得点は、-8.13±1.05

（n=13）、健常者群の判別得点は 4.24±0.972（n=25）となり、癌患者群と健常者群を得られた判別得点の正負により有意に判別することができた（有意水準α＝0.01）。

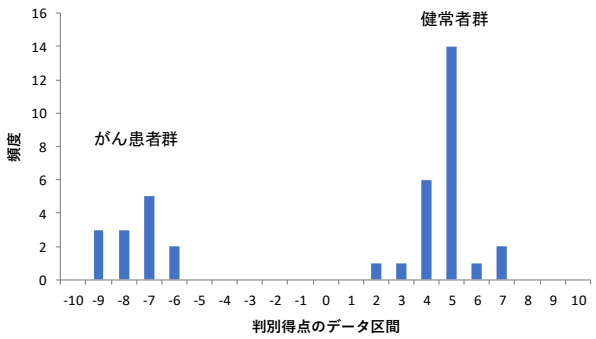


図 3　皮膚ガスパターンを用いた判別分析による癌患者群および健常者群の判別

このアルゴリズムによれば、判別得点の算出に用いた判別関数に、評価対象者の皮膚ガスパターンを代入することにより、その対象者が癌に罹患しているかを判別することが可能になる。

2）GC-MS 分析条件の改良

本研究の開始当初は、PFS で捕集した皮膚ガスは加熱脱離法により GC-MS 装置に導入し、51 成分について定量していた。しかしながら、2018 年春頃から加熱脱離時のキャリアーガスとして使用するヘリウムガスの供給が世界的に逼迫し、長期にわたって供給不足になることが判明したことから、溶媒脱離法に変更を余儀なくされた。またこれまで分析対象としていた 51 成分の中には、臨床的意義が不明確なものも含まれていたため、最新の皮膚ガス研究の動向を鑑み、分析対象物質を見直し、新たな分析条件を確立することとした。

表 1　溶媒脱離法における GC-MS 分析条件

分析機器	GC；アジレント・テクノロジー社製　7890B MS；日本電子社製　Q1050GCMkⅡ
カラム	DB-IMS　0.25 mm I.D.×30 m　df=0.25 μm
カラム温度	50℃(hold 8 min)－120℃(6℃/min) －280℃(20℃/min)－280℃(hold 2 min)
キャリアー	ヘリウム（1.0 mL/min）
検出器	イオン化電流　50 μA，イオン化エネルギー 70 eV，イオン源温度　280℃
注入口	温度：280℃ 注入法：スプリット 35：1

その結果、捕集剤からの皮膚ガス成分の脱離には、ジクロロメタン 0.5 mL を用い、内部標準物質としてトルエン-d8 を添加して試料を調製し、GC-MS 装置に導入することとした。GC-MS の分析条件を表 1 に示す。また図 4 にはこの条件による分析例（膵癌：1 検体）を示す。この分析条件を用いることにより、79 成分の同時分析が可能になり、従来の 51 成分から大幅に成分数を増やすことができた。

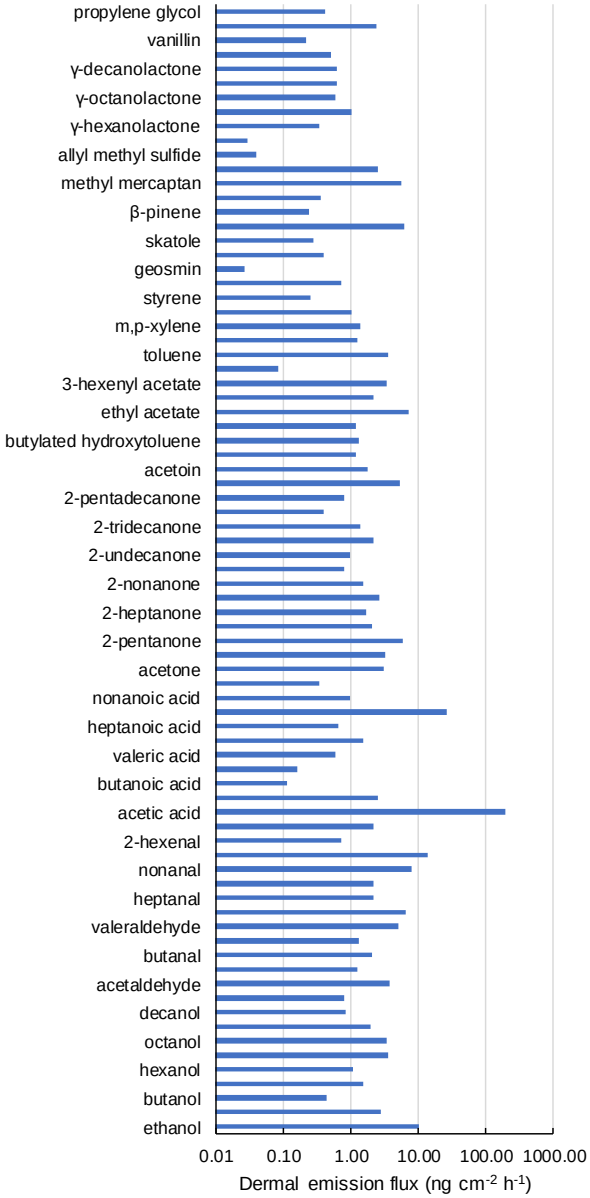


図 4　溶媒脱離 GC-MS 法による皮膚ガス分析例

3. 考察

皮膚ガスは、体表面から放散される揮発性の有機・無機化合物であり、エネルギー基質（炭水化物、タン

パク質、脂質）等の代謝生成物、腸内細菌による分解生成物、吸入・経口摂取された外因性化学物質（外来因子）、皮膚表面における生物的・化学的な反応生成物などから構成される混合ガスである。癌患者の皮膚ガスパターンには、疾病（癌）の影響を反映するもの、入院環境を反映するもの、個人差を反映するものなどが複合して影響していると考えられるが、健常者とは異なるパターンを示し、判別分析法による判別可能性が見いだされた。皮膚ガスパターンの判別アルゴリズムとして重回帰分析等の多変量解析が利用できる可能性ある。また近年急速に応用が広まっている機械学習に基づく人工知能（AI）も有用と考えられる。一方、ヘリウムガスの供給不足を端緒に、皮膚ガス分析法を改良し、79 成分の同時分析が可能になった。この中に、培養した癌細胞から特異的に放散すると報告されているペンタデカノン[5] も含めることができた。今後健常者データを蓄積し、さらなる比較検討を行う予定である。

4. 引用文献

[1] T. Hirotsu *et al.*, *PLoS One*. 2015; 10:e0118699. doi: 10.1371/journal.pone.0118699. eCollection 2015. PMID: 25760772

[2] 関根嘉香ほか,におい・かおり環境学会誌, 48(6), 410 (2017)

[3] K. Kimura, Y. Sekine *et al.*, *J. Chromatogr. B*, 1028, 181 (2016)

[4] 戸髙惣史ほか, 東海大学先進生命科学研究所紀要, 第 3 巻（2020）https://www.u-tokai.ac.jp/about/research/institutions/advanced_biosciences_research/kiyou/index/pdf/2018/03_4.pdf

[5] D. K. Lee *et al.*, *Proc. of 7th EuChems Chemistry Congress*, PL63 (2018)

５．謝辞

研究分担者・協力者である東海大学健康学部健康マネジメント学科・石井直明教授、同・安田佳代講師、東海大学医学部内科学系消化器内科学・松嶋成志教授、同・鈴木孝良教授、同・川嶌洋平助教、同・羽田野敦子助教、同・中原史雄助教、同・川西彩助教、同・森町将司大学院生、東海大学医学部基盤診療学系病理診断学・中村直哉教授、同・高梨由美実験助手、東海大学工学部生命化学科・笹川昇教授、東海大学医学部外科学系口腔外科学・加藤久視講師、かわぐち消化器内科・川口義明先生に感謝いたします。

6. その他の業績

【論文発表】

1) Sato S, Sekine Y, Kakumu Y, Hiramoto T, Measurement of diallyl disulfide and allyl methyl sulfide emanating from human skin surface and influence of ingestion of grilled garlic, *Sci Rep*. 10(465),1-9(2020)
2) Sekine Y, Nikaido N, Sato S., Todaka M, Oikawa D, Measurement of toluene emanating from the surface of human skin in relation to toluene inhalation", *J. Skin and Stem Cell*. 6(1), e93392(2019)
3) Sasaki N, Hirabayashi K, Michishita M, et al. Ganglioside GM2, highly expressed in the MIA PaCa-2 pancreatic ductal adenocarcinoma cell line, is correlated with growth, invasion, and advanced stage. *Sci Rep*. 9:19369 (2019).
4) Hirabayashi K, Kawanishi A, Morimachi M, et al. Histological and immunohistochemical analyses of splenic epidermoid cysts. *Annals of diagnostic pathology*. 41:51-6 (2019).
5) Hirabayashi K, Tajiri T, Bosch DE, et al. Loss of nectin-3 expression as a marker of tumor aggressiveness in pancreatic neuroendocrine tumor. *Pathol Int*. 70:84-91 (2020).

【学会等発表】

1) 戸髙惣史, 関根嘉香, 平林健一：発がん患者の皮膚から放散する微量生体ガスに関する研究, KISTEC Innovation Hub 2019, 2019.10 海老名 ＊本発表によりポスター賞受賞
2) 平林 健一 才荷 翼, 川嶌 洋平, 他. 膵 EUS-FNA の精度向上を目指して 膵腫瘍の molecular cytopathology と EUS-FNA 検体を用いた分子学的解析の展望. 第 58 回日本臨床細胞学会秋期大会 2019. 11 岡山
3) 平林 健一, 高梨 由美, 川西 彩, 森町 将司, 中村 直哉. 膵神経内分泌腫瘍における miR185-5p による somatostatin analogue 作用増強効果の検討. 第 108 回日本病理学会総会 2019. 5 東京.

【特許出願】

1) 皮膚ガスパターンによる癌判定方法（発明者：平林健一、関根嘉香、戸髙惣史、川口義明、出願人：学校法人東海大学，かわぐち消化器内科）2020.3

椎間板変性における IL-17 の役割の解析と新規 IL-17 阻害剤の探索
－IL-17 関連疾患における IL-17 阻害療法への応用へ向けて－
Effects of IL-17A on intervertebral disc degeneration and the investigation of the new small-molecule IL-17A inhibitor for treating the IL-17 -related disease

酒井　大輔[1,3], 隅山　香織[2,3],平山　令明[3]
[1]東海大学医学部外科学系整形外科学, [2]東海大学医学部基礎医学系生体構造機能学、[3]東海大学先進生命科学研究所
Daisuke Sakai ,[1,3], Kaori Suyama [2,3], Noriaki Hirayama [3]
[1]Division of Orthopaedic Surgery School of Medicine Tokai University, [2] Division of Cellular Biology and Anatomy School of Medicine Tokai University, [3] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

［要旨］
IL-17 family は多様な炎症反応や疾患に関与する。本研究は、IL-17A が椎間板変性に関連する因子の発現を促進する現象を確認し、また、*in Silico* 解析にて IL-17A 受容体と IL-17A の結合を阻害する構造を有する低分子化合物を探索し、その一部の作用を評価した。これらの IL-17A 阻害剤候補化合物は、椎間板髄核細胞における椎間板変性促進因子の発現を抑制し、さらに乾癬モデル動物の皮膚病変における表皮の異常肥厚の改善効果を呈したため、有効な IL-17A 活性阻害剤と成り得る可能性を示唆した。

［**Abstract**］
IL-17 cytokine family mediate the induction of many inflammatory responses and relate some diseases. This study showed that IL-17A promoted the expression of the factors which lead degeneration of intervertebral discs (IVD). Next, we identified four small-molecule inhibitors that accessed the IL-17A-binding site region of IL-17A receptor by using in silico analysis and evaluated their effects. These four compounds suppressed augmentation of IVD degeneration factors. Additionally, one of these compounds revealed the improvement effect of the epidermal abnormal keratinocyte proliferation of the psoriasis model mouse. These results showed that the small-molecule inhibitor of IL-17A could be useful for pharmacotherapy of IL-17 related-diseases.

［**Key Words**］
intervertebral disc, Interleukin 17, small-molecule inhibitor, Psoriasis

1. はじめに

腰痛は患者の Quality of life (QOL) を下げるのみならず社会生産性を低下させ医療費増加にも深く関与する。本邦における腰痛の生涯有病率は約 83% [1] とされ、厚生労働省による業務上疾病発生状況等調査（休業 4 日以上）では腰痛の件数が最も高い。

腰痛の要因として重要となるのが椎間板の変性である。脊椎の椎間板は脊椎椎体の間に存在し、中心部の髄核とこれを取り巻く線維輪から成る無血管の器官であり、衝撃を吸収し脊椎可動性を保持する役割を有する。加齢や物理的外力等の様々なストレスに曝された椎間板組織では、IL-1β、IL-6、TNFα を中心としたサイトカインが上昇して様々な細胞内シグナル経路を活性化することにより変性を進行させ、椎間板ヘルニア、変形性腰椎症等の腰痛を伴う疾患を惹き起こす [2]。

近年、IL-17 も変性椎間板で増加するサイトカインとして新たに注目されるようになった [3]。IL-17 は A～F の 6 つの family を有し、このうち IL-17A は MAP-キナーゼ経路や NF-κB 等を活性化して多様な炎症反応に関与していると報告されている [4]。

また、IL-17A を主体とした IL-17 の関与が報告されている疾患は、乾癬、関節リウマチ、強直性脊椎炎、多発性硬化症、等、多岐にわたる。

現在、IL-17 阻害薬として臨床現場で実際に使用されている薬剤は、いずれも 2015 年以降に認可された新しい抗体製剤（生物学的製剤）である。これら生物学的

製剤の問題点としては、高分子タンパク質製剤であることから投与法が血管内への注射に限定され経口薬や外用薬としての使用が困難であること、また、製造コストが高いことから医療費が高額になることが挙げられている。さらに、生物学的製剤による重篤な副作用としては免疫作用低下による日和見感染がしばしば問題となっている。

これらに対し、低分子化合物の利点としては 1,低分子のため水溶性に優れることから多様な投与方法が選択可能、2, 生物学的製剤より製造コストが安価であるといった点が挙げられる。

そこで我々はこれまで、①椎間板髄核細胞における IL-17A の作用の評価、②椎間板髄核細胞に対する新規低分子 IL-17A 阻害剤の作用の評価、③IL-17 関連疾患である乾癬の皮膚病変に対する新規低分子IL-17A阻害剤の作用の評価、以上の3点を目的として研究を行い、新規IL-17A阻害剤候補化合物の治療薬としての可能性を探ってきた。

2.結果の概要

1) ラット椎間板髄核細胞における IL-17A の作用の評価

ラット椎間板より採取した髄核細胞（NP 細胞）を生体内における椎間板の環境と近似した 1%の低酸素条件で培養し、IL-17A の作用、及び、IL-17A 活性を抑制した場合の反応をリアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法、プロモーターアッセイ法で評価した。

その結果、IL-17A 刺激により、IL-6、COX-2、MMP-3、MMP-13 の発現が無処置群と比較して有意に増加した[5]（n=3~4, p<0.05）

2）ヒト変性椎間板組織における IL-17A 発現の評価

ヒト変性椎間板から採取した組織の評価では、術前の MRI 画像診断において Pfirrmann 分類 grade3 以上の髄核組織での IL-17A 染色陽性髄核細胞が、grade1,2 の髄核組織と比較して有意に増加していることを確認した[5]（n=5,p<0.05）。

3) 新規低分子 IL-17A 阻害剤候補化合物の作用評価

#3-1. *In Silico* 解析を用いた新規低分子 IL-17A 阻害剤の探索

IL-17A タンパク質の立体構造を X 線解析して、その受容体結合部分に結合可能な化合物の立体構造を予測し、さらにその予測された構造の結合シミュレーションをコンピューター上で行なった。これらにより得られた情報を用いてIL-17A結合阻害剤として適した化合物、すなわち候補化合物を医薬品低分子化合物データベースの中から探索し、4 種類の低分子化合物；STK630921 (STK), PB203263256 (PB), Z92151850 (Z9251), P2000N-53454 (P2000）を IL-17A 結合阻害剤候補化合物として評価した。

#3-2. ラット椎間板髄核細胞に対する新規 IL-17A 阻害剤の作用

上記4個のIL-17A結合阻害剤候補化合物50μg/mlを、IL-17A50ng/ml と共にラット NP 細胞に 24 時間投与した結果、４つの IL-17A 阻害剤全てが IL-6, COX-2, MMP-3、MMP-13 の mRNA 発現を有意に抑制することを確認した（図 1. n=3~5,*p<0.05）[5]。

さらに、細胞内で IL-17A が作用しているシグナル経路である Mitogen-Activated Protein Kinase（MAPK）に対する IL-17A 阻害剤の効果を評価した。

上記の 4 つの IL-17A 阻害剤候補化合物群の中で、IL-17A 受容体との最も高い結合親和力を有すると予測された STK50μg/ml を、IL-17A50ng/ml と共に NP 細胞に投与した。投与 30 分後には、STK 投与群で IL-17A による p38 のリン酸化が有意に抑制された（図 2. n=3,*p<0.05）[5]。従って、STK は MAPK 経路の p38 活性化を抑制している可能性が示唆された。

図.1

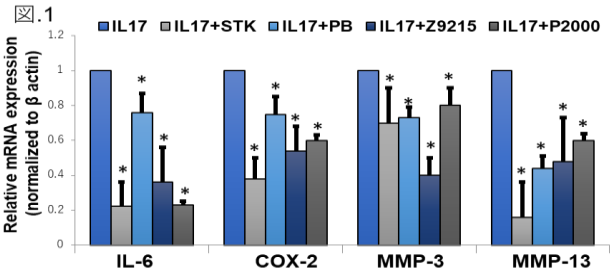
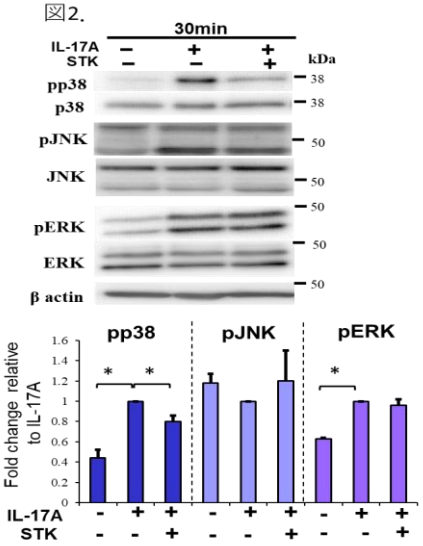


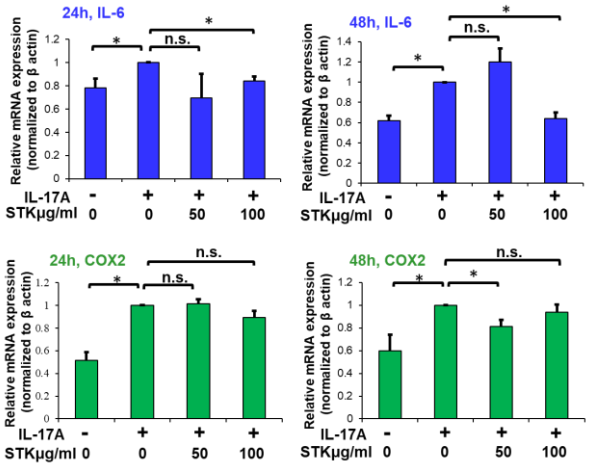
図2.



#3-3. ヒト椎間板髄核細胞に対する新規 IL-17A 阻害剤 STK630921(STK)の効果

ラット NP 細胞を用いた上記の実験結果を基に、ヒト椎間板髄核（NP）細胞に対する STK の効果を検討した。50ng/ml の IL-17A を投与したヒト NP 細胞において、IL-6 の mRNA 発現は STK100μg/ml 投与から 24～48 時間後に、COX2 の mRNA 発現は STK100μg/ml 投与 48 時間後に、それぞれ IL-17A 単独投与群と比較して有意に抑制された（図 3. n=4, *p<0.05）[5]。

図3.

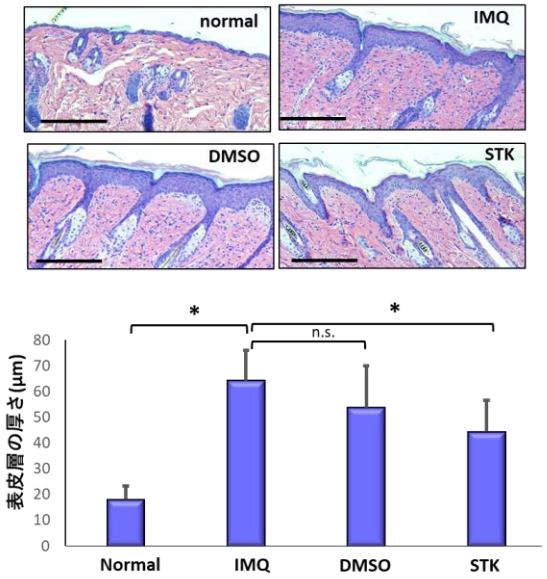


#3-4. 新規 IL-17A 阻害剤化合物 STK630921 の IL-17 関連疾患に対する作用の評価

椎間板変性疾患以外の代表的な IL-17 関連疾患である、乾癬に対する新規 IL-17A 阻害剤の作用を検討した。

Imiquimod（IMQ）誘発乾癬モデルマウスを作成し、STK を外用薬として投与し評価した。マウスの皮膚に IMQ を塗布して皮膚症状を誘発させた患部に STK1mg を 5 日間塗布すると、乾癬皮膚の典型的な病理所見である表皮の異常肥厚が有意に改善することを、皮膚組織のヘマトキシリン・エオジン染色で確認した（図 4; n=3,*p<0.05, scale bar 200μm ）。

図4



3. 展望

これまでの結果から IL-17A は椎間板変性を促進する因子[6-10]の発現に関与し、且つ、我々が見出した低分子化 IL-17A 阻害剤候補合物はこれらの因子の発現を抑制する作用を有する可能性が示唆された。

さらに、我々が見出した低分子化 IL-17A 阻害剤候補合物の一つは IL-17 関連疾患である乾癬の皮膚病変に対して有効である可能性を示唆した。

乾癬の皮膚においては、IL-17 が角化細胞に作用して異常に増殖させ、乾癬の表皮肥厚を形成する[11-13]。活性化された角化細胞は各種サイトカインやケモカインを放出して炎症反応を増悪させる[11-13]。

現行の乾癬に対する治療法としては生物学的製剤である IL-17 阻害剤が適応となっており[14]、一定の効果を示しているが、高分子タンパク質製剤であることから投与経路が注射薬に限定されており、外用薬のように皮膚等の局所の病変部に直接投与して IL-17 を阻害する薬剤は未だ臨床応用までは至っていない。他の乾癬治療薬としては、ステロイド剤や免疫抑制剤等も使用されているが、生物学的製剤を含めたこれら既存の薬剤は免疫力低下による感染症が副作用としてしばしば問題となっている。以上の現状から乾癬の主要症状となる皮膚の病態を制御可能な新規薬剤の開発は重要である。我々が研究対象としている低分子阻害剤化合物は、高分子タンパク質製剤と比較して水溶性に優れ、

さらに*in Silico*創薬を用いて化合物のIL-17受容体結合親和力や溶解度、作用持続時間、等の性質を条件に応じて設計することにより副作用の軽減が期待できると考えられ、皮膚疾患に対する新しい外用薬としての大きな可能性を有している。

今後、さらに他の候補化合物の作用を詳細に評価し、治療薬としての応用に耐えうる化合物の選定が重要と考えられる。

4. 引用文献

[1] 松平ら，日本職業・災害医学会会誌．63, 329-336, (2015)

[2] Risbud et al., Nat Rev Rheumatol., 10, 44-56, (2014)

[3] Shamji, et al., Arthritis Rheum., 62, 1974-1982, (2010)

[4] Gu et al., Cytokine, 64, 477-485, (2013)

[5] Suyama et al, J Cell Mol Med. 22, 5539-5551, (2018)

[6] Rand et al., Spine 22, 2598-2601, (1997)

[7] Patel, K. P. et al., Spine 32, 2596-2603, (2007)

[8] Phillips, K. L. et al., Arthritis research & therapy 15, R213, (2013)

[9] Weiler et al., Eur Spine J., 11, 308-320, (2002)

[10] Wang et al., Am J Pathol., 184, 2560-2572 (2014)

[11] 清水宏. あたらしい皮膚科学. 283-284, 中山書店. 第3版. (2018)

[12] Martin et al., J Invest Dermatol. 133, 17-26, (2013)

[13] Lowes et al., Annu Rev Immunol. 32, 227-255, (2014)

[14] Mease et al., Curr Opin Rheumatol. 27, 127-133, (2015)

5. 業績

【学会等発表】

1) 隅山香織、酒井大輔、平山令明、坂部貢、渡辺雅彦. In Silico 創薬による新規低分子 IL-17A 阻害剤を用いた椎間板変性治療の可能性. 第34 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2019.10. 横浜.

2) 隅山香織、酒井大輔、平山令明、坂部貢、渡辺雅彦. 新規低分子 IL-17A 阻害剤による椎間板変性治療法の可能性を評価する. 第 48 回日本脊椎脊髄病学会. 2019.4. 横浜.

*HLA-DQ*06:02* が関与するルミラコキシブの特異体質性肝障害発現の分子メカニズムに関する研究

*Study on the possible molecular mechanism of the idiosyncratic lumiracoxib-induced hepatotoxicity associated with HLA-DQ*06:02*

磯貝　秀人 [1)]、平山　令明 [2)]

[1)] 東海大学医学部・基礎医学系、[2)]東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門

Hideto Isogai[1)] and Noriaki Hirayama[2)]

[1)] Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine

2) Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

ルミラコキシブ（LMX）は選択的なシクロオキシゲナーゼ-2 の阻害剤であり、変形性関節症や急性疼痛に有効であるにも関わらず、その特異体質性薬物性肝障害(idiosyncratic drug-induced liver injury: DILI)により、現在使用されていない。この特異体質性薬物毒性は *HLA-DQ*06:02* の発現と密接に関係することが知られている。しかしながら、どのような分子機構で DILI が発症するのかは現在でも不明である。本研究では、LMX およびその予想代謝物と *HLA-DQ*06:02* との分子間相互作用を *in silico* で求め、DILI 発症の可能な分子メカニズムを推定した。

[Abstract]

Lumiracoxib (LMX), a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, has been shown to be useful for symptomatic treatment of osteoarthritis and acute pain. In spite of its efficacy, concern over idiosyncratic drug-induced liver injury (DILI) has led to market withdrawal of LMX in drug markets worldwide. A genome-wide association study has shown that DILI induced by LMX is associated with *HLA-DQ*06:02*. It is supposed that binding of LMX or its metabolites to *HLA-DQ*06:02* should lead to the onset of DILI. In this study, we have undertaken docking simulations of the interactions between these molecules to understand molecular mechanisms of DILI caused by LMX.

[Key Words]

idiosyncratic drug-induced liver injury, lumiracoxib, *HLA-DQ*06:02*, docking simulations

1.　はじめに

DILI は多くの薬物の開発断念さらには市販後の販売中止の理由として最も頻度の高い副作用である[1]。DILI を起こす大部分の薬物は前臨床の動物モデルでは肝障害の兆候を示さず、臨床治験においてもヒトでの肝障害を見出すことは容易ではない。従って、この副作用が表面化するのは市販後になってからであり、多くの患者がその副作用に曝された後であることが多い。副作用による患者の苦痛そして販売中止による経済的損失を考慮すると、DILI による社会的負担は相当に大きく、可能なかぎり早期に DILI の危険を知ることが強く求められている。

一方近年になり、DILI の多くがヒト白血球抗原（human leucocyte antigen: HLA）の特定のアリルと相関することが明らかにされ、特定の HLA アリルと薬物との相互作用に関する研究が数多く行われている。例えば、DILI を示す抗 HIV 治療薬の一つであるアバカビルは、クラス I に属する HLA である *HLA-B*57:01*（肝機能障害の遺伝子マーカー）と直接的に結合することが X 線解析で解明され[2]、HLA と薬物分子との直接的な相互作用が副作用発現上重要であることが明らかになった。現在までの所、クラス II の HLA が薬物とこのような直接的な相互作用をするという実験結果は報告されていない。しかし、クラス II の HLA も同様の分子メ

カニズムで薬物と相互作用し、副作用を起こすと推定される。

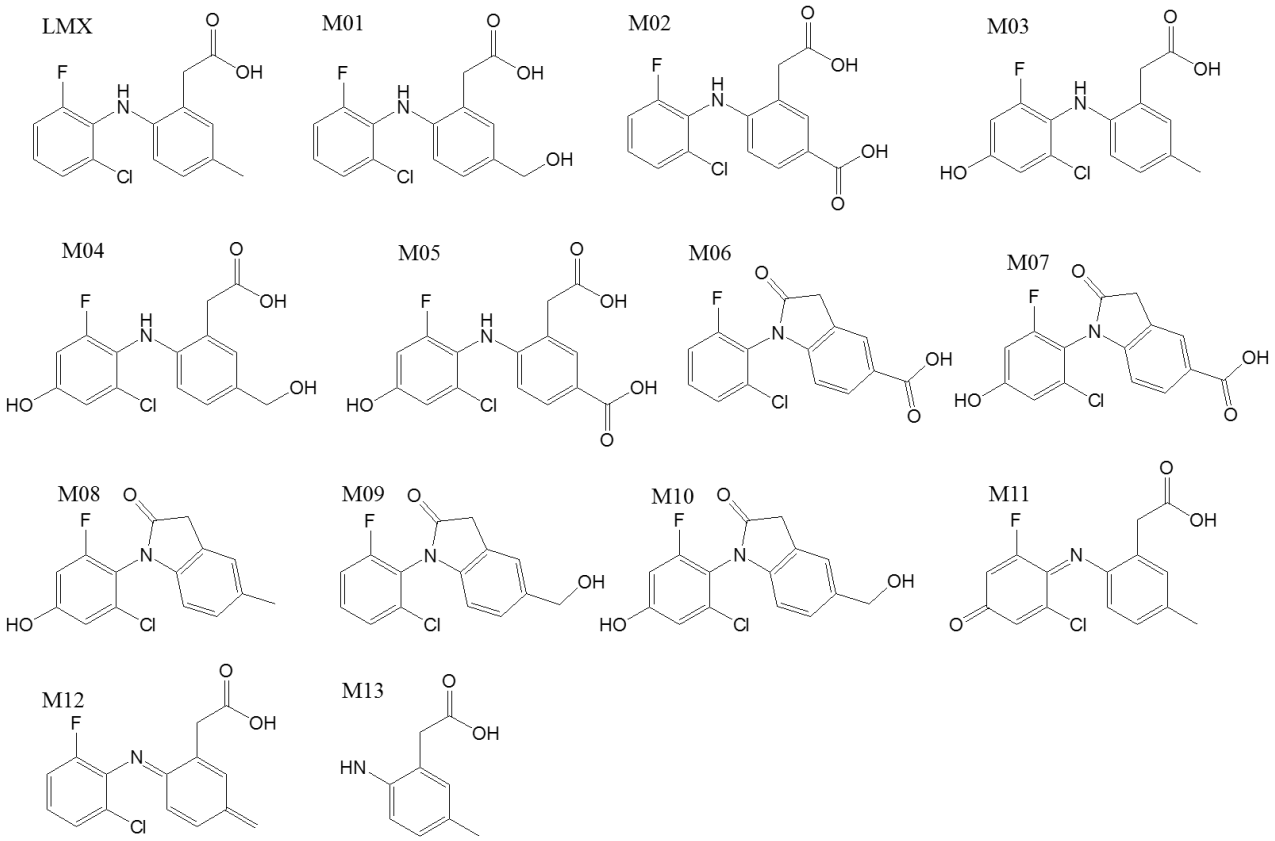
LMX（図１）は選択的なシクロオキシゲナーゼ-2 の阻害剤であり、変形性関節症や急性疼痛に効果を示す[3]。しかし、その DILI が問題となり、世界の医薬品市場から撤退した[4]。LMX の DILI に関連する HLA として *HLA-DQ*06:02* が報告されている（オッズ比 6.9）[4]。LMX の主な代謝物には少なくとも 13 種類の化合物が考えられる[5,6]（図１）。

本研究では、LMX およびその予想代謝物 13 化合物と *HLA-DQ*06:02* とのドッキング・シミュレーションを行い、これらの化合物が *HLA-DQ*06:02* とどのように相互作用するか、また LMX の DILI はどの化合物に起因する可能性が高いかについて検討した。

Bank[8]で公開されている *DQ*06:02* の結晶構造(PDB ID: 1UVQ)を用いた。結晶構造に含まれる構造上の問題点の修正や水素原子付加は MOE に搭載されている Protein Preparation 機能を用いて行った。

ドッキング・シミュレーションには、ソフトウェア ASEDock[9]を用いた。このソフトウェアは、標的分子であるタンパク質表面の窪みの形状を偽原子でモデル化し、それに適合する低分子の立体構造と標的分子上の位置を高速に計算する。計算は４段階で実行される。第１は、低分子分子が結合する部位の表現である。多くの場合、低分子はタンパク質表面の窪みまたはポケットに結合する。これらの部位を、統合計算化学システムである MOE に搭載されている Alpha Site Finder 機能により、アルファ球の集合として表現する。第２は、低分子が取り得る可能な立体配座の発生である。

図１. LMX およびその代謝物の化学構造



２.結果の概要

以下の全ての計算は統合化学計算システム MOE[7]を用いて行った。

2-1）ドッキング・シミュレーション

*DQ*06:02* の立体構造の初期構造は Protein Data

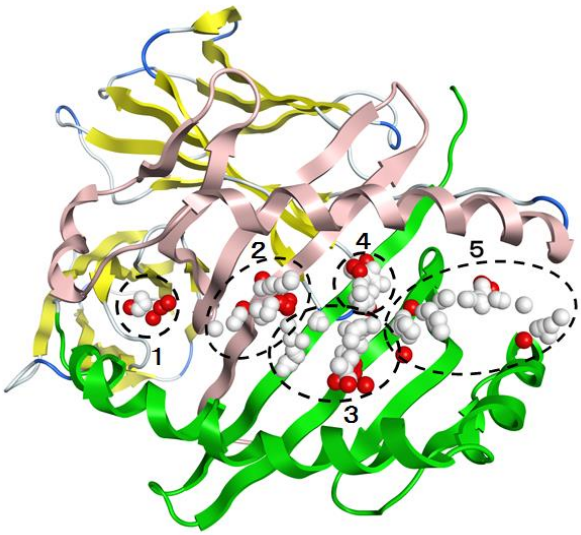
本研究では、分子をフラグメントに分割し、フラグメント毎に配座解析を行い、それらを組合せて分子配座を発生する手法を用いて立体配座を生成した。第３は、低分子のドッキングである。その為には、アルファ球で表現された部位を偽原子として考え、低分子の原子と重ね合わせを行う。その際、低分子が侵入できない

タンパク質原子が占める空間を排除体積として扱うASE モデルを考える。重なり具合を、ASE モデルと低分子の原子間距離のガウス関数で評価して ASE スコアとした。即ち、低分子原子がポケット内の偽原子と重なるとスコアが良くなる。低分子の各立体配座との重ね合わせは、まず剛体のままで行う。第４は、先に得られた重ね合わせの良い配座を用い、タンパク質との相互作用をポテンシャル関数で表現し、それを最適化することにより、低分子の最適な構造と位置およびHLA 分子の最適な構造を求める。本研究では、タンパク質のバックボーン原子は固定し、タンパク質中の他の原子と低分子の原子はすべて自由に動かす条件で、構造の最適化を行った。溶媒効果は Born 近似で行い、ポテンシャル関数には Amber 10:EHT[10]を用いた。最適構造の評価を行う関数には GBVI/WSA_dG[11]を用いた。

2-2) 結果

Alpha Site Finder 機能を用いて *DQ*06:02* の抗原ペプチド結合溝を探索すると、低分子化合物が結合し得る部位は**図２**に示すように、5 箇所見出された。*DQ*06:02* のα鎖をピンクで、β鎖を緑で示した。**図１**に示す 14 化合物のこれら 5 箇所全てに対する結合親和性をドッキング・シミュレーションで検討した。

図２．抗原ペプチド結合溝において LMX およびその代謝物が結合できる部位（点線で示す）



各化合物が最も安定に結合する結合サイトとそのドッキング計算で得られた GBVI/WSA_dG 値は次のようである。括弧内の最初の数字が**図２**の結合サイトで、２番目の数字が GBVI/WSA_dG 値（kcal/mol）を示す。LMX(4: -5.560), M01(4: -5.793), M02(4: -5.732), M03(4: -5.931), M04(4: -6.209), M05(4: -6.115), M06(3: -5.659), M07(4: -5.829), M08(4: -5.736), M09(4: -6.313), M10(4: -6.087), M11(4: -5.569), M12(5: -5.4850), M13(5: -4.452)。

図３．*DQ*06:02* に結合する M09

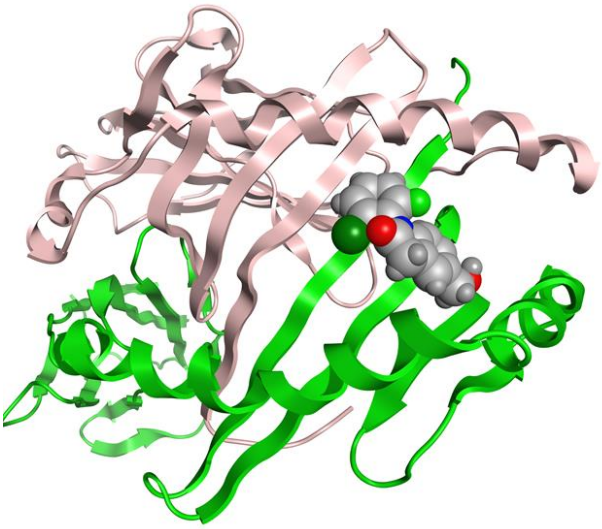
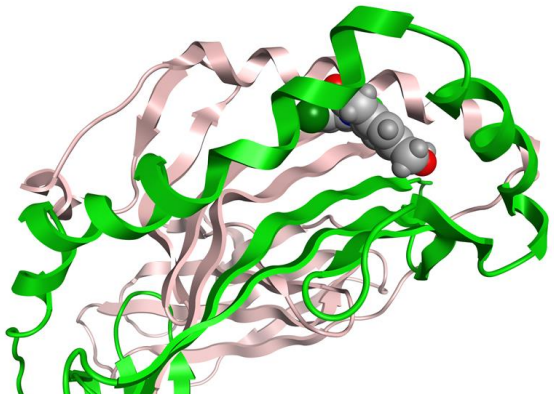


図４．図３を側面から見た図



LMX を含め 11 化合物はサイト４に最も強く結合することが示された。一方、サイト 5 に最も強く結合する化合物は２化合物ある。さらにサイト 3 に結合する化合物が１化合物ある。14 化合物中、最も結合力の強い化合物はサイト４に結合する M09 であり、逆に最も結合力の弱い化合物はサイト５に結合する M13 である。**図３**に M09 が結合する様子を示した。M09 は空間充填分子モデルで示した（C、N、O、F および Cl 原子を灰色、青、赤、明るい緑および暗い緑で各々示す）。**図２**との比較から分かるように、LMX は実際にはサイト４からサイト５にまたがる領域に結合する。

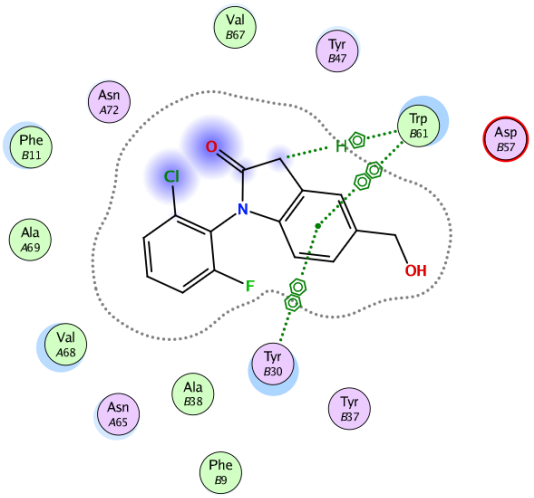
図３の構造を側面から見た様子を**図４**に示す。M09

が抗原ペプチド結合溝の深い位置に結合することが分かる。

３．考察

LMX より強く *DQ*06:02* に結合する代謝物は 11 種類もある。すなわち、*DQ*06:02* との相互作用が引き金となって DILI 発症につながる場合、LMX 自身ではなく代謝物の役割が非常に大きいことを本研究結果は示した。中でも代謝物 M09 は強く結合することから、M09 の影響は最も大きいと推定される。また、M04、M05 および M10 のように、M09 に続いて小さな GBVI/WSA_dG 値を示す代謝物が複数体内で生成される場合、これら複数の代謝物と *DQ*06:02* との相互作用が相乗的に働き、重篤な DILI につながる可能性も否定できない。既に LMX は市場から撤退しているが、本研究により得られた知見を基に、*DQ*06:02* との相互作用を抑えた新規化合物の分子設計は可能であろう。

図５. M09 と相互作用する *DQ*06:02* のアミノ酸残基



さて、LMX は関節リューマチ（RA）に効果のあることが報告されている[12]。また、RA では ACPA(anti-citrullinated protein/peptide antibody)が特異的に上昇することが報告されている[13]。このような RA の遺伝危険因子として、HLA-DR のβ鎖と HLA-DQ のα およびβ鎖が知られており、これらは強い連鎖不平衡にある[14]。Heems らは、HLA-DQ の抗原ペプチドに含まれるコア配列 DERAA と HLA-DQ８との相互作用を分子モデリングで推定した[14]。このモデルは AA 配列部分とβTyr30 およびβTrp61 がその相互作用に重要な役割を果たすことを示す。一方、図５に示すように、LMX の代謝物 M09 はこれら２残基と強い相互作用をする。このことは、LMX が抵抗性アリル様の働きをすることを示唆するものである。これまで LMX の作用機作は COX-2 との相互作用と考えられて来たが、図５は LMX による抗関節リューマチ活性には、素因 HLA である *HLA-DQ* の抑制効果も含まれている可能性を示唆する。

残念ながら LMX は市場から消えてしまったが、今回の研究結果は LMX の化学構造を一部改変することで、DILI を軽減し、かつ抗関節リューマチ活性を持たせた化合物が創製できる可能性をも示唆した。例えば、1-クロロ-5-フルオロフェニル基部を別の原子団に変換することで、抗関節リューマチ活性を維持しながら、DILI 発症につながる T 細胞受容体への結合を減弱ないし消失させることが可能かも知れない。

4.引用文献

[1] J.R.Senior, *Clin. Liver Dis.*,**11**, 505 (2007.

[2] P.T.Illing *et al.*, *Nature*, **486**, 554 (2012).

[3] B.Bannwarth *et al.*, *Expert Opin.Pharmacother.*,**8,** 1551 (2007).

[4] J.B.Singer *et al.*, *Nat.Genet.*, **42**,711 (2010).

[5] J.B. Mangold *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 566(2004).

[6] P.Kang *et al.*, *Chem.Res.Toxicol.*, **22**, 106(2009).

[7] MOE(molecular Operating Environment), 2014.09: Chemical Computing Group: Montreal, Canada, (2014).

[8] F.C.Bernstein *et al.*, *J.Mol.Biol.*, **112**, 535(1977).

[9] J.Goto *et al.*, *J.Chem.Inf.Model*, **48**, 583(2008).

[10] D.A.Case *et al.*, AMBER 12, University of California, San Francisco (2012).

[11] C.R.Corbeil *et al.*, *J.Comput.-Aided Mol.Des.*, **26**, 775 (2012).

[12] P. Geusens *et al.*, *Int.J.Clin.Pract.*, **58**,1033(2004).

[13] A.Gerard *et al.*, *Arthritis Rheum.*, **43,** 155 (2000).

[14] J.van Heems *et al.*, *Nat. Commun.* **6**:6681 doi: 10.1038/ncomms7681 (2015).

5.その他の業績

【論文発表】

(1)N.Watanabe, M.Kidokoro, Y.Suzuki, M.Tanaka, S.Inoue, H.Tsukamoto, N.Hirayama, P.-W.Hsieh, C.-P.Tseng, Y.Nakagawa, and S. Inokuchi (**2019**) “A pull-down and slot blot-based screening system for inhibitor compounds of the podoplanin-CLEC-2 interaction,” *PLOS ONE,*

14(9):e0222331.[https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222331]

(2)R.Nakamura, T.Ozeki, N.Hirayama, A.Sekine, T. Yamashita, Y.Mashimo, Y.Mizukawa, T.Shiohara, H. Watanabe, H.Sueki, K.Ogawa, H.Asada, N.Kaniwa, E. Tsukagoshi, K.Matsunaga, H.Niihara, Y.Yamaguchi, M. Aihara, T.Mushiroda, Y.Saito, and E.Morita (**2020**) ”Association of *HLA-A*11:01* with sulfonamide-related severe cutaneous adverse reactions in Japanese patients,” *J.Invest.Dermatol.*,**140**, *in press*. [https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.12.025 (Published online: January 22, 2020)]

(3)R.Kataoka, S.Amari, T.Ikegami, and N.Hirayama (**2020**) “HLA-BAP : HLA Class I-Binding Antigenic Peptide Predictor,” *Chem-Bio.Inf.J.*, **20**, 1. [https://doi.org/10.1273/cbij.20.1]

(4)H.Kashiwagi, H. Ishimoto, S. Izumi, T. Seki, R. Kinami, A. Otomo, K. Takahashi, F. Kametani, N. Hirayama, E. Sasaki, T. Shiina, K. Sakabe, M. Mikami, Y. Kametani (**2020**) “Human PZP and common marmoset A2ML1 as pregnancy related proteins,” *Scientific Reports*, *in press*.

加熱加圧処理が熊本県阿蘇郡南阿蘇村産マコモタケの抗酸化活性に及ぼす影響

Effect of Heat Processing with Pressure on Antioxidant Activity of Makomotake Cultivated at Minamiaso, Aso, Kumamoto in Japan

安田伸[1,2)*]、安田智子[1)]、本田憲昭[1)]
[1)]東海大学農学部、[2)]東海大学先進生命科学研究所

Shin Yasuda[1,2)], Tomoko Yasuda[1)], and Kensho Honda[1)]*
[1)]School of Agriculture, Tokai University, [2)]Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

*連絡先：安田伸（東海大学先進生命科学研究所　高機能食品開発部門）
**Corresponding author: Shin Yasuda (Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)*

［要旨］

マコモタケはイネ科の水生植物マコモ（***Zizania latifolia***）に黒穂菌（***Ustilago esculenta***）が寄生し出穂せず変性肥大化した部位で、これを食用とする。我々は、熊本県阿蘇郡南阿蘇村で **2018** 年に収穫されたマコモ品種青殻のマコモタケを加熱加圧処理し、熱水抽出後の抗酸化活性および総ポリフェノール含量を調べた。マコモタケを **105**℃、**20** 分間または **115**℃、**20** 分間加熱加圧処理した結果、抗酸化活性にはそれぞれ生の **1.34** 倍と **1.54** 倍の高値が認められた。マコモタケを **115**℃、**20** 分間加熱加圧後の総ポリフェノール含量は生の **1.17** 倍の値を示した。以上より、加熱加圧処理条件によってはマコモタケの抗酸化活性に影響を与える可能性が示された。

[Abstract]

Makomotake is an edible swollen part of the aquatic plant Manchurian wild rice (*Zizania latifolia*) without heading due to the infection by *Ustilago esculenta*. We investigated the antioxidant activity and total polyphenol content (TPC) of Makomotake of a wild rice cultivar Aogara, grown at Minamiaso, Aso, Kumamoto, Japan, in 2018. After heat processing with pressure at 105°C for 20 min and at 115°C for 20 min, antioxidant activities of the Makomotake respectively were 1.34- and 1.54-fold higher than that of the raw material. TPC of the Makomotake heated with pressure at 115°C for 20 min was 1.17-fold higher than the raw one. Collectively, the antioxidant activity of the Makomotake may be affected by choosing condition(s) of the heating process with pressure.

[Key Words]

Makomotake, *Zizania latifolia*, heat processing with pressure, antioxidant capacity, polyphenol

1. はじめに

マコモタケはイネ科マコモ属のマコモ（真菰）（英名：Manchurian wild rice、学名：*Zizania latifolia*）に黒穂菌（*Ustilago esculenta*）が寄生し、地上茎が変性肥大化した部位を指す。日本には 12～13 世紀の交易時代に南西諸島へ導入され、日本や中国、アジアの一部の地域ではこれを食用とする**[1]**。マコモタケは缶詰、冷凍食品、油炒め、煮物などに利用されるものの、日本に分布する在来種のマコモは菌が寄生しにくく肥大しにくいものが多いため、それほど流通しておらず稀少食材でもある**[1,2]**。マコモの根（菰根）、果実（菰米）は伝統的な中国医薬（中医薬）として消化不良、止渇、心臓病、利尿に用いられてきた**[1]**。近年、食用とするマコモタケの保健機能についての研究報告も散見されるようになり、部分精製した抽出物や単離成分を用いた抗炎症作用**[3]**、免疫増強作用**[4]**、抗酸化作用**[4]**、破骨細胞の分化・増殖抑制作用**[5]**が実証されてきている。

わが国で栽培されているマコモには、9 月中旬よりマ

コモタケを産生する早生種（一点紅、千葉早生、石川早生）とこれより収穫の遅い晩生種（青殻、白皮など）がある**[2]**。和歌山県農業試験場では、8 種類の異なるマコモの系統（千葉早生、石川、あずみ、一点紅、青殻、赤茎、赤変、白皮）を用いて栽培試験が行われ、優良系統が選定されてきた**[6,7]**。熊本県内では 2009 年頃にはすでに宇城、芦北地域にて特産化を目的にマコモタケが試作導入され定着が図られてきた**[8]**。熊本県では、農業振興の面からも熊本の人や風土とのかかわりが強い野菜の中から選定した「伝統野菜・特産野菜」を「くまもとふるさと野菜」としており**[9]**、マコモタケも特産野菜の 1 つに含まれる**[8]**。熊本県阿蘇郡南阿蘇村に農学教育実習センター（旧阿蘇キャンパス）を保有する本学においても、マコモ 3 品種（あずみ、一点紅、青殻）を用いて栽培試験を行っており、可食部となるマコモタケの抗酸化活性などの評価を行ってきた**[10]**。しかしながら、機能性に富む農産物の生産や加工品の開発が求められる中、生鮮農産物の抗酸化活性については広く報告されているものの、加工処理による影響については報告例が少ない。機能性研究や食品開発を行うにあたり、現状では栽培地や品種名が明らかなマコモとマコモタケを用いているケースは限定的である。

近年、我々は加熱処理が農産物や食材中の成分と機能性に及ぼす影響に着目した研究を行っている。ヤーコン葉部の抗酸化活性やポリフェノール含量は、加熱処理により大きく向上しうること**[11,12]**、キクイモの葉部および塊茎部の抗酸化活性や塊茎部に特有の機能性成分であるイヌリンが加熱処理の条件により変動しうることを報告してきた**[13]**。

本研究では、熊本県阿蘇郡南阿蘇村で栽培され 2018 年秋に収穫された青殻品種のマコモ由来の新鮮なマコモタケを、小型高温高圧調理機により異なる条件で加熱加圧処理し、加工処理が抗酸化活性および総ポリフェノール含量に及ぼす影響を調べることとした。

2. 結果の概要

1） 試料の調製

熊本県阿蘇郡南阿蘇村で栽培され 2018 年秋期（9～10 月）に収穫された可食部位である新鮮なマコモタケをレトルトパウチ包装し、小型高温高圧調理機（達人窯、FCS-KM76、パナソニック）を用いて加熱加圧処理されたものを実験に用いた。これらは南阿蘇オーガニック株式会社（熊本県阿蘇郡南阿蘇村）より提供された。即ち、マコモタケの非加熱の生鮮品、105℃、20 分間または 115℃、20 分間加熱加圧処理された 3 種類を本研究で用いた。

生または加熱加圧処理後に凍結乾燥を行い、ミルミキサーで約 10 秒間破砕して乾燥粉末を得た。以前に報告した抽出法に従い**[13]**、それぞれの凍結乾燥粉末 0.4 g を 5 ml の MilliQ 水とともに 80℃で 20 分間熱水抽出し、室温まで冷却後に、4,000 rpm (2,620 x*g*)、15℃で 20 分間遠心後の上清を回収した。残渣を同条件で熱水により 2 回再抽出し、合計 3 回分の抽出後の遠心上清を混合した。これをミリポア社の Sterile Millex®-HA, 0.45 μm を用いてフィルター濾過し、熱水抽出物として以降の実験に使用した。

2） 抗酸化活性の測定

筆者らの既報に従って**[13]**、加熱加圧処理したマコモタケの 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカルに対する消去活性を測定した。このとき、Trolox を標準抗酸化剤の陽性対照として使用し、サンプルの抗酸化活性を TEAC 値（Trolox equivalent antioxidant capacity、Trolox 相当の抗酸化力の換算値）として算出した。その結果、マコモタケ乾燥重量 1 g あたり 40.0 μg (= 0.160 μmol)の Trolox 相当の TE 値が得られた（**Figure 1**）。

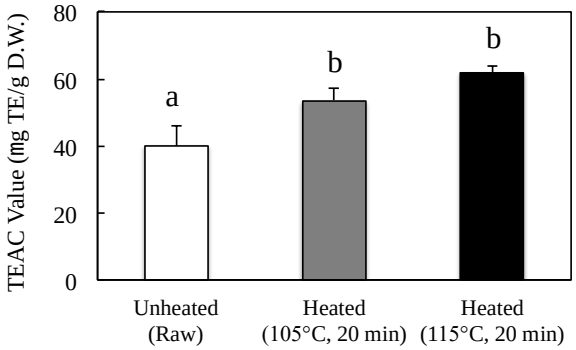


Figure 1. Effect of heat processing with pressure on the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Makomotake, from a wild rice cultivar Aogara, grown at Minamiaso, Aso, Kumamoto in Japan. Data shown represent mean ± S.D. from four experiments. DPPH radical scavenging assay was performed to obtain TEAC values with Trolox as the standard sample. Tukey-Kramer's test was conducted for the multiple comparison and values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at $P < 0.05$. TE; Trolox equivalent, D.W.; dry weight.

マコモタケを 105℃、20 分間加熱加圧した際には 53.4 μg TE (= 0.214 μmol TE)、115°C、20 分間加熱加圧した際に 61.7 μg TE (= 0.247 μmol TE)の抗酸化活性が得ら

れ、加熱加圧後にはそれぞれ生の 1.34 倍と 1.54 倍の有意な高値が認められた。参考までに、先行実験では 2018 年 8 月に採取され温風乾燥させたマコモ葉部のうち葉身および葉鞘部位の抗酸化活性として、乾燥重量 1 g あたり 228 μg TE (=912 μmol TE)と 138 μg TE (=552 μmol TE)が得られており、部位によって抗酸化活性は大きく異なることを確認している。

本研究で認められたマコモタケの加熱加圧処理による抗酸化活性向上の原因については不明な部分も残る。我々は、同様な加熱加圧処理によりキクイモの塊茎部の抗酸化活性もまた上昇することを報告してきた**[13]**。これまでに、加熱調理加工中にアスコルビン酸と抗酸化力の低下が起こるものの、スクロースやグルコース添加により保護が可能なこと、150 ℃以上の高温ではカラメル化が示唆される抗酸化力の上昇が報告されている**[14]**。さらに、複数の野菜類を沸騰水中で 40 秒間加熱調理するだけでほとんどの場合抗酸化活性が軽減するものの、キク科の植物を含むいくつかの農産物では抗酸化活性が上昇する場合もあることが報告されており**[15,16]**、加熱加圧処理中の抗酸化成分の特定、安定性や挙動についても詳しく調べる必要がある。沸騰水中での加熱調理の場合、レンコンは茹でる時間が長くなるにつれて抗酸化活性が低下し、ゆで汁中の抗酸化活性が上昇する**[15]**。このことは、食材からゆで汁中への抗酸化成分の移行が原因として挙げられる。本研究では大量の沸騰水を利用することなく食材のみをレトルトパウチ包装して加熱加圧処理をしており、食材中の抗酸化力や抗酸化成分などを煮汁中に損失することなくまるごと利用できる点でメリットがあると思われる。マコモ葉部に含まれる抗酸化成分にはフェノール酸類やプロシアニジンや配糖体を含むフラボノイド類が報告されており**[17,18]**、可食部となるマコモタケからはマコモチン、マコモチンドリン異性体のほか抗酸化活性を有する水溶性多糖類が報告されている**[4, 19]**.

3) 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール含量はフォーリンチオカルト法に基づき、筆者らの既報に従ってクロロゲン酸相当量として分光学的に定量した**[13]**。その結果、マコモタケ乾燥重量 1 g あたり 7.63 mg の総ポリフェノールが含まれており、105℃、20 分間加熱加圧した際には 7.48 mg、115°C、20 分間加熱加圧した際には 8.89 mg が得られ、115°C 加熱加圧後には生の 1.17 倍の値を示した（**Figure 2**）。参考までに、先行実験では 2018 年 8 月に採取され温風乾燥させたマコモ葉部のうち葉身および葉鞘部位の総ポリフェノール含量として、乾燥重量 1 g あたり 18.4 μg と 8.29 μg が得られており、部位によってポリフェノール含量もまた大きく異なることをここでも確認している。葉部を用いた加熱による影響についてはここでは検討していないものの、マコモタケ収穫後の残渣となりうる葉部分についても利用を推進するための研究が今後必要と思われる。

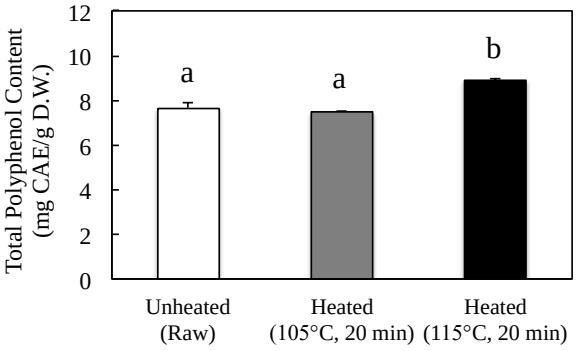


Figure 2. Effect of heat processing with pressure on the amount of total polyphenol content in Makomotake, from a wild rice cultivar Aogara, grown at Minamiaso, Aso, Kumamoto in Japan. Data shown represent mean ± S.D. from four experiments. Tukey-Kramer's test was conducted for the multiple comparison and values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at $P < 0.05$. CAE; chlorogenic acid equivalent, D.W.; dry weight.

これまでに我々はヤーコン葉部の加熱処理が抽出後のポリフェノール含量の向上をもたらし、一部の抗酸化成分が抗酸化活性の上昇に寄与することを明らかにしてきた[**11,12**]。また、キクイモの葉部および塊茎部の抗酸化活性や塊茎部似特有の機能性成分であるイヌリンが加熱加圧処理条件によっては、酢漬けにした酸性下で変動しうることを報告してきた**[13]**。マコモタケ可食部の抗酸化活性やポリフェノール含量は、葉部と比べても決して高い値とは言えないものの、少なからず加熱加圧処理がこれらに及ぼす影響を本研究で明らかにした。とくに加熱加圧によるレトルト食品の製造では、食材や組織の軟化を引き起こしやすいことが挙げられる。したがって、今回認められた加熱処理後のマコモタケにおける総ポリフェノール含量の微増には、加熱加圧による抽出効率の向上なども考えられる。

高圧処理もまた農産物であるタマネギの抗酸化活性の向上に有効であることが報告されている**[14]**。また、生トマトとパプリカピューレを用いた鍋用スープの開発では、異なる加熱加圧条件（115～120℃、15 分～40

分、F 値（4 以上が殺菌の目安）5.3～7.8）において総ポリフェノール含量と抗酸化活性は変わらないものの、β-カロテンの変動が認められている**[21]**。一方、発芽落花生を用いた焙煎、蒸煮、レトルトの加熱処理ではいずれにおいてもポリフェノール量、総ポリフェノール量、抗酸化活性が減少する**[22]**。ハスカップを用いた食品の加工開発では、100℃までの異なる温度で果汁を30 分間加熱しても抗酸化活性が低下することはないもの、120℃、30 分間加熱（レトルト加熱）後には過酸化脂質の分解の制御ができなくなる**[23]**。したがって、抗酸化機能や抗酸化成分を富化できる食品の加工や開発をするためには、食材ごとに食品加工処理による影響を調査する必要がある。マコモタケもまた加熱加圧処理条件によっては付加価値を有する食材となり得るかもしれない。

本研究では、熊本県阿蘇郡南阿蘇村で栽培ならびに収穫されたマコモ品種青殻の可食部位であるマコモタケを異なる条件で加熱加圧処理し、熱水抽出後の抗酸化活性および総ポリフェノール含量を調べた。マコモタケを 105℃、20 分間または 115℃、20 分間加熱加圧した結果、それぞれ生の 1.34 倍、1.54 倍の高値が認められることを明らかにした。さらに、マコモタケの総ポリフェノール含量は 115℃、20 分間加熱加圧後に生の 1.17 倍の値を示した。以上より、加熱加圧処理条件によってはマコモタケの抗酸化活性を保持または強化する可能性が見出された。

3. 展望

本研究で認められたマコモ品種青殻のマコモタケの加熱加圧処理による抗酸化活性向上の原因については現時点では明らかになっていない。そのため、今後は加熱加圧処理がマコモタケやマコモの葉部などの各部位のポリフェノール類や他の抗酸化成分の抽出効率や成分の安定性に及ぼす影響などについても比較して調べる必要がある。我々は、これからも保健機能に注目した食品開発を行うためにも、加工処理条件の検証と各工程における成分分析、抗酸化活性以外の機能性評価を実施し、熊本県南阿蘇村の農業の活性化に寄与したい。

4. 引用文献

[1] 佐竹元吉ら編著, 健康・機能性食品の基原植物事典, 中央法規出版株式会社, 東京、pp.708 (2016)

[2] 三枝正彦, *日作東北支部報*, **59**, 45-46 (2016)

[3] 堀部寛治ら, *松本歯学*, **42**, 10-15 (2016)

[4] N. Yan, *et al.*, *Molecules*, **23**, 1561 (2018), doi:10.3390/molecules23071561

[5] H. Kawagishi, *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 2800-2802

[6] 川村和史ら, *和歌山県農林水研報*, **4,** 1-9 (2016)

[7] 和歌山県農業試験場, *農林水産業競争力アップ技術開発：マコモの特性と栽培*, (2015), https://www.jeinou.com/technology/2015/05/18/094500.html（2020.2.10 アクセス）

[8] 熊本県農林水産部, *まこもたけ*, (2009), https://www.pref.kumamoto.jp/kiji_1253.html（2020.2.23 アクセス）

[9] 熊本県農林水産部, *くまもとふるさと野菜*, (2009), https://www.pref.kumamoto.jp/hpkiji/pub/List.aspx?c_id=3&class_set_id=1&class_id=1290（2020.2.23 アクセス）

[10] 仲川侑希ら, *東海大農紀要*, **34**, 13-17 (2015)

[11] 上田裕人ら, *東海大学先進生命科学研究所紀要*, **2**, 29-34 (2018)

[12] Ueda *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **83**, 2288-2297 (2019)

[13] 安田伸ら, *東海大先進生命研紀要*, **3**, 26-30 (2019)

[14] 北尾悟, *大阪樟蔭女子大学研究紀要*, **1**, 232 (2011)

[15] 池羽智子と鹿島恭子, *茨城県農業総合センター園芸研究所研究報告*, **14**, 27-33 (2006)

[16] 久保田朗と山下純隆, *福岡県農業総合試験場研究報告*, **19**, 81-84 (2000)

[17] M.-J., Chu, *et al.*, *Molecules*, **23**, 2782 (2018), doi:10.3390/molecules23112782

[18] M.-J., Chu, *et al.*, *Molecules*, **24**, 1681 (2019), doi:10.3390/molecules24091681

[19] M. Wang, *et al.*, *Int J Biol Macromol*, **95**, 809-817 (2017)

[20] 上野茂昭と君塚道史, *冷凍*, **89**, 488-494 (2014)

[21] 晦日房和ら, *長崎県工業技術センター研究報告*, **43**, 55-58 (2013)

[22] 藤枝正之ら, *千葉県産業支援技術研究所研究報告*, **16**, 3-7 (2018)

[23] 田中常雄ら, *北海道立食品加工研究センター平成 9 年度事業報告*, 71-72 (1998)

5. 業績

【論文発表】

【学会等発表】

該当なし

6. 謝辞

本研究は、主に南阿蘇オーガニック株式会社（熊本県阿蘇郡南阿蘇村）の「南阿蘇　田んぼを畑にする応援プロジェクト」における分析委託、ならびに一部で東海大学総合研究機構プロジェクト研究、総合農学研究所プロジェクト研究、および先進生命科学研究所プロジェクト研究の資金援助により実施されています。

モウセンゴケ属食虫植物 *Drosera adelae* 由来キチナーゼ遺伝子のクローニング、発現系の構築および機能解析

Gene cloning, overexpression and characterization of chitinase from *Drosera adelae*

米田 一成[1,2,3,4*]、髙山 駿[2]、荒木 朋洋[1,2,3]、星 良和[1,2,3,4]

[1] 東海大学農学部、[2] 東海大学大学院農学研究科、[3] 東海大学大学院生物科学研究科、[4] 東海大学先進生命科学研究所

Kazunari Yoneda[1,2,3,4], Hayato Takayama[2], Tomohiro Araki[1,2,3], Yoshikazu Hoshi[1,2,3,4]

[1]School of Agriculture, Tokai University, [2]Graduate School of Agriculture, Tokai University, [3]Graduate School of Bioscience, Tokai University, [4]Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

**連絡先：米田一成（東海大学先進生命科学研究所） e-mail: kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp*

**Corresponding author: Kazunari Yoneda (Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)*

［要旨］

モウセンゴケ属の食虫植物である *Drosera adelae* の消化酵素であるキチナーゼの機能・構造解析を目的に遺伝子クローニングを行った。ゲノム情報から *D. adelae* 由来キチナーゼを検索したところ、クラス I キチナーゼに分類される GH19 キチナーゼを見出した。N 末端の 20 アミノ酸残基はシグナルペプチドのため、Met^{1}-Ala^{20} のアミノ酸残基を除去した配列(Gln^{21}-Ser^{321})をコードする遺伝子を合成した。その後、タンパク質発現ベクターにライゲーションし、大腸菌を用いて遺伝子の発現を行った。その結果、pCold ProS2 および、pCold TF ベクターを用いることでキチナーゼ活性を有す酵素の発現が可能になることを明らかにした。

［**Abstract**］

Gene cloning was performed for the analyses of the enzymological characterization and 3D structure determination of chitinase from *Drosera adelae*. When we searched for chitinase homologous gene from *D. adelae* genomic information, we found a GH19 chitinase gene classified as a class I chitinase. Since the N-terminal 20 amino acid residues are signal peptides, a gene encoding a sequence (Gln^{21}-Ser^{321}) from which the amino acid residues of Met^{1}-Ala^{20} were removed, was synthesized. Thereafter, the synthesized chitinase gene was ligated to several protein expression vectors, and the genes were overexpressed using *Escherichia coli*. As a result, we found that the pCold ProS2/chitinase and the pCold TF/chitinase vectors enable overexpression of an enzyme having chitinase activity.

［**Key Words**］

Class I chitinase, Gene cloning, Enzyme expression and purification, *Drosera adelae*

1. はじめに

キチナーゼ(Chitinase; EC 3.2.1.14)は N-アセチル-D-グルコサミンが β-1,4 結合したホモポリマーであるキチンを加水分解する糖質加水分解酵素である。本酵素の生体内での役割は多岐にわたり、キチンを持つ甲殻類や昆虫においては脱皮や成長に、またカビにおいては細胞分裂に関与する。一方、キチンを持たない生物においては、甲殻類の殻病菌ではキチンの分解利用に、植物においては細菌からの感染防御（自己防御）の役割を担う Pathogenesis Related Protein (PR タンパク質)の一種であると考えられている**[1-4]**。キチナーゼの基礎的研究の意義としては生物間の相互作用や進化的位置付けに重要であり、応用研的な研究として抗菌性タンパク質や有用糖質の合成への利用が挙げられる。

キチナーゼは細菌感染から植物を守る“病害抵抗性酵素”として知られているが、食虫植物では病害抵抗性酵素が変化し“昆虫消化用酵素”として利用されている非常に珍しい例である。 食虫植物由来のキチナーゼの機能や構造は未だに未解明な部分が多いことから、本研究の対象とした。

モウセンゴケ属食虫植物は近年ゲノム解読が行われるだけでなく**[5]**、モウセンゴケの抽出液中に抗アレルギー効果のある化合物も見出されていることから注目されている植物である**[6]**。*Drosera adelae*（ドロセラ・アデラエ）は、モウセンゴケ属の食虫植物であり、幅広く長い葉に粘毛を密生し、その粘毛で昆虫を捕獲し、粘毛に含まれるキチナーゼで昆虫の外骨格のキチンを消化する。この消化酵素であるキチナーゼをクローニングするために、ゲノム情報から *D. adelae* 由来キチナーゼを検索したところ、N 末端にキチン結合ドメインを有し、クラス I キチナーゼに分類される GH19 キチナーゼ(BAW35424.1)を見出した。本酵素は 321 アミノ酸残基で構成されている約 35 kDa の酵素である。

キチナーゼは触媒ドメインの構造により糖質加水分解酵素ファミリー18 (GH18) および 19 (GH19) の 2 つに分類されている。さらに植物キチナーゼは、一次構造の相同性から大きく 5 つのクラスに分類されることがすでに明らかになっている**[7-9]**。そこで、類似構造を有すと予測されるイネ由来のクラス I キチナーゼの情報**[10]**に基づいて本酵素のシグナルペプチド、キチン結合ドメイン、触媒ドメイン、触媒残基、SS 結合の位置の予測を行った（図 1）。その結果、触媒残基は Glu154, Glu176 であり、予測される SS 結合は Cys23-Cys38、Cys32-Cys44、Cys37-Cys51、Cys55-Cys59、Cys101-Cys163、Cys175-Cys183、Cys282-Cys314 であった（図 1）。

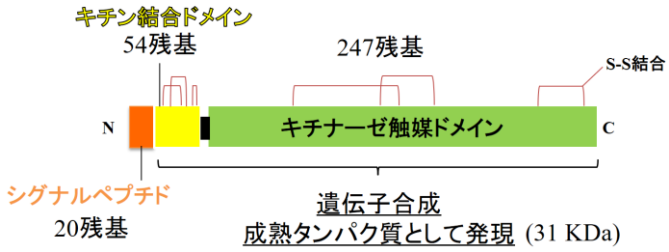


図 1. *D. adelae* 由来キチナーゼのドメイン構造の概要。

2. 結果の概要

1） *D. adelae* 由来キチナーゼ遺伝子のクローニング

キチナーゼの機能・構造解析には、大量の酵素が必要となるので、クローニングを行うことで、目的タンパク質を大量に発現させた。*D. adelae* 由来キチナーゼの N 末端の 20 アミノ酸残基はシグナルペプチドのため、Met^{1}-Ala^{20} のアミノ酸残基を除去した配列（Gln^{21}-Ser^{321}）をコードする遺伝子をファスマックバイオ研究支援事業部に依頼し合成した。また、人工合成遺伝子は大腸菌のコドンに最適化を行うと共に、5'末端に *Nde* I サイトを、3'末端に *Bam* HI サイトを付加した。合成した遺伝子は表 1 に示した pET 系ベクター（4 種）および pCold 系ベクター（4 種）にライゲーションを行った。すなわち、人工合成遺伝子(pUC/Chitinase)を *Nde* I、*Bam* HI で処理し、アガロースゲル電気泳動した後、キチナーゼ遺伝子のバンドを切り出して抽出、精製し、少量の TE バッファーに溶解した。pET 系および pCold 系ベクターも同じ制限酵素で処理し、16℃、16 時間インキュベートしキチナーゼ遺伝子とライゲーションを行った。反応には Ligation high (TOYOBO) を使用した。

2） *D. adelae* 由来キチナーゼの発現、精製

SHuffle T7 Express Competent *E. coli* (New England Biolabs) を形質転換した後に得られたコロニーを白金耳で掻き取り、50 μg/ml アンピシリン含有の 100 ml LB 液体培地に植菌し、37℃で 6 時間培養を行った。その後 IPTG を終濃度 1 mM になるように加えてキチナーゼの発現誘導を行った。pCold 系ベクターは 15℃、16 時間培養し、pET 系ベクターは 20℃、16 時間培養を行うことによりキチナーゼの発現誘導を行った。培養後の菌体を遠心分離により回収し、菌体をソニケーションすることにより細胞破砕を行った。その後の遠心上清を粗酵素溶液とした。キチナーゼの精製には Talon コバルトアフィニティーカラムを用い、溶出には 300 mM イミダゾールを用いた。精製後の酵素は 10 mM Tris/HCl バッファーpH 8.0 で透析を行い、酵素活性の確認を行った。

表 1 に示した 8 種類のベクターを使用してキチナーゼの発現を行った結果、ほとんどのベクターで発現が確認できなかったが、pET32a（チオレドキシン融合タンパク質）、pCold ProS2（ProS2 融合タンパク質）、pCold TF（トリガーファクター；TF 融合タンパク質）で発現が確認できた（表 1）。いずれも N 末端に可溶性タンパク質のタグが付いた酵素でのみ発現が可能であった。特に、従来の大腸菌発現系では発現が困難なタンパク質や不溶化するタンパク質も可溶性発現が可能になるベクターとして開発された pCold ベクター（タカラバイオ）を使用することで**[11]**、pET ベクターでは難しかった可溶性画分への発現だけでなく、キチナーゼの精製にも成功している（図 2、レーン 3,6）。融合タンパク質として発現させているため、キチナーゼの本来の分子量とは異なる値で検出されている（ProS2 タグ 23 kDa+キチナーゼ 31 kDa = 54 kDa、

TF タグ 48 kDa+キチナーゼ 31 kDa = 79 kDa)。

pCold ProS2/キチナーゼは精製に成功したが（図 2、レーン 3)、pCold TF/キチナーゼの場合、Talon アフィニティーカラムのスルーに多くのキチナーゼが流れるだけでなく溶出にも多くの夾雑タンパク質が含まれており、効率的に精製できないことも明らかになった (図 2、レーン 5, 6)。

表 1. キチナーゼ遺伝子の発現に使用したプラスミドと可溶性画分への発現、精製、活性の有無の確認。

使用したプラスミド	キチナーゼの発現	可溶性画分の発現	精製、キチナーゼ活性の検出
pCold ProS2	◎	◎	◎
pCold TF	◎	◎	○
pCold I	×	×	×
pCold IV	×	×	×
pET32a	◎	×	×
pET15b	×	×	×
pET11a	×	×	×
pET22b	×	×	×

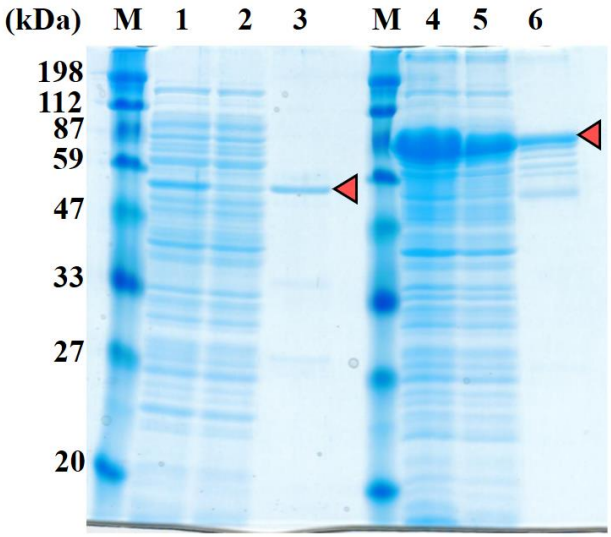


図 2. SDS-PAGE によるキチナーゼの発現、精製の確認。M；分子量マーカー、1；pCold ProS2/キチナーゼの粗酵素、2；pCold ProS2/キチナーゼの Talon スルー、3；pCold ProS2/キチナーゼの Talon 溶出 (54 kDa)、4；pCold TF/キチナーゼの粗酵素、5；pCold TF/キチナーゼの Talon スルー、6；pCold TF/キチナーゼの Talon 溶出 (79 kDa)。矢印は精製後のキチナーゼを示している。

3) Native-PAGE を用いたキチナーゼ活性染色

0.05%エチレングリコールキチン（水溶性キチン；基質, Wako）を含むポリアクリルアミドゲルを調製し、精製酵素を用いて電気泳動を行った。泳動後のゲルを 10 mM Tris/HCl バッファーpH 8.0 に 30 分間浸した。その後、ゲルをキチン特異的蛍光染色試薬（0.01%カルコフロールホワイト, Sigma）で 10 分間染色し、蒸留水で 10 分間脱色を行い、トランスイルミネーター (365 nm) を用いてキチナーゼ活性のバンド確認を行った。

pCold ProS2、pCold TF で発現・精製した酵素を用いたキチナーゼ活性染色の結果、キチナーゼによりキチンが分解された部分のみ暗いバンドとして検出できており、活性を検出することに成功している（図 3)。次に、キチナーゼの総活性、比活性を算出するために分光光度計を用いたキチナーゼ活性測定を行うと共に、Bradford 法を用いたタンパク質定量を行った。

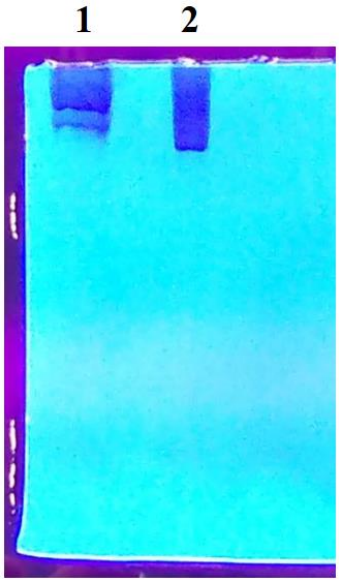


図 3. Native-PAGE によるキチナーゼの活性染色。1；pCold ProS2/キチナーゼ、2；pCold TF/キチナーゼ。

4) キチナーゼ活性測定

Schales 変法を用いてキチナーゼ活性を定量的に測定した。水溶性基質であるエチレングリコールキチンの分解によって生成する還元糖を定量し、キチナーゼ活性を測定した。すなわち、0.1%エチレングリコールキチン、10 mM Tris/HCl バッファーpH 8.0 に精製酵素を加え、37℃で 30 分間酵素反応を行った。反応終了後、直ちに氷冷し、発色試薬 (0.5 M 炭酸ナトリウム、0.05% フェリシアン化カリウム）を加え、10 分間煮沸した。煮沸後氷冷し、波長 420 nm の吸光度を測定した。1 U は Δ420/h と定義した。

最終的に精製した 2 種のキチナーゼの総タンパク質量、総活性、比活性は表 2 の通りであった。

表 2. キチナーゼの総タンパク質量および、活性値。

	総タンパク質量 (mg)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)
pCold ProS2	2.34	1.270	0.542
pCold TF	3.45	0.648	0.187

食虫植物由来キチナーゼは発現が非常に難しく、その理由として、SS 結合を酵素分子内に多く持つことが原因と予測される。本研究で使用した、大腸菌 SHuffle T7 は大腸菌細胞内で SS 結合を正しく形成させ、正しいフォールディングを有したタンパク質を発現させることができるコンピテントセルである。このコンピテントセルと、pCold ProS2、pCold TF ベクターを組み合わせることでキチナーゼを効率的に発現させることができることを見出した。

3. 展望

今後、モウセンゴケ属食虫植物 *D. adelae* 由来キチナーゼの酵素化学的性質の解析や結晶構造解析を行うために酵素の量産を行うと共に、ProS2 タグをトロンビンなどのプロテアーゼで切断処理し、純粋なキチナーゼのみを精製する必要があると考えられる。また、精製後にも多くの夾雑タンパク質が含まれていた pCold TF/キチナーゼの場合、キチンカラムなどを用いてさらに精製を行う必要があると考えられる。

4. 引用文献

[1] A.S. Sahai, M.S. Manocha, FEMS Microbiology Reviews, **11**, 317-338 (1993).

[2] L.C. van Loon, Plant Mol. Biol., **4**, 111-116 (1985).

[3] H. Shinshi, *et al.*, Plant Molecular Biology, **14,** 357-368 (1990).

[4] A. Stintzi, *et al.*, Biochimie, **75,** 687-706 (1993).

[5] K. Fukushima, *et al.*, Nature Ecology & Evolution, **1,** 0059 (2017).

[6] D.H. Paper, *et al.*, Phytother Res., **19**, 323-326 (2005).

[7] T. Araki, T. Torikata, Biosci. Biotechnol. Biochem., **59**, 336-338 (1993).

[8] L.S. Melchers, *et al.*, Plant J., **5,** 469-480 (1994).

[9] M.D. Andersen, *et al.*, Biochem J., **322,** 815-822 (1997).

[10] Y. Kezuka, *et al.*, Proteins, **78**, 2295-2305 (2010).

[11] H. Kobayashi, *et al.*, Appl Environ Microbiol., **75,** 5356-5362 (2009).

5. 業績

【論文発表】

該当なし

【学会等発表】

1) 星良和：モウセンゴケの抗アレルギー効果に関する研究。2019 年度 東海大学 研究交流会、2019.11 湘南校舎 17 号館 2 階ネクサスホール

6. 謝辞

本研究は先進生命科学研究所プロジェクト研究および、総合農学研究所プロジェクト研究の資金援助によって行われたものであり、ここに記して感謝いたします。

陸上養殖サーモンへのカテキン添加飼料の効果
―三保サーモン開発を目指して―

Effect of Catechin for on land cultivated *Oncorhynchus mykiss.*
－Development of Miho salmon－

山田良希[1)]、高橋渓一[2)]、平塚聖一[2,3)]、秋山信彦[2,3)]、齋藤寛[2,3)]

1）東海大学大学院・海洋学研究科，2）東海大学・海洋学部，

3）東海大学先進生命科学研究所・高機能性食品研究部門

Yoshiki Yamada[1)], Keiichi Takahashi[2)], Seiichi Hiratsuka[2,3)], Nobuhiko Akiyama[2,3)] and Hiroshi Saito[2,3)]

1） Course of Oceanography, Graduate School of Oceanography, Tokai University

2） School of Marine Science and technology, Tokai University

3）Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

地下海水を用いた陸上養殖で、ニジマスの一種であるスチールヘッドの海水への馴致とアスタキサンチン添加餌料に対するカテキン添加効果を調べた。カテキン添加区では、平均体重が低く、脂質量も低くなった。一方、アスタキサンチン量は高くなり、K 値は低くなった。カテキンの餌料への添加により、身質の脂分は減少し、赤みが強くなり、さらに鮮度の維持が可能になった。

[Abstract]

The land cultivation of Steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) using underground sea-water is going to establish. Effect of catechin for land cultivated *Oncorhynchus mykiss* was measured. By the addition of catechin to normal feed, average weight and fatty contents were lower level than normal feed. On the other hand, astaxanthin showed higher concentration and K-value showed lower level than normal feed. So, the addition of catechin to normal feed, fatty contents were low level and red colure of meet will strong and then freshness will keep for 5 days than normal feed.

[Key Words]

on land cultivation, *Oncorhynchus mykiss*, astaxanthin, fatty acid

1. はじめに

日本において寿司ネタをはじめとした、サーモンの生食はとても馴染み深い。近年、東南アジア、ヨーロッパ、中国、アメリカにおいてもサーモンの生食が進み、世界のサーモンの消費、そして需要が高まっている。それに伴って世界のサーモン生産量の養殖の割合が天然を上回って急激に上昇している[1)]。この

ような状況の中、静岡県三保半島では地下海水を取水することができ、それを利用してカワハギなどの海産魚の養殖が行われてきた。地下海水は年間を通して水温が一定（17℃から19℃）であるためサーモンの養殖にも利用できると考えられる。

サーモンの身の紅色は主にカロテノイド系色素のアスタキサンチンであり、天然のサケマス類は、これらの色素を主に餌から摂取している[2)]。そのため養殖のサーモンには飼料にアスタキサンチンを添加して魚肉の紅色を補っている。

一方、養殖魚においては飼育飼料の研究が多くなされており、味やにおいなど、品質の向上を期待して様々なものを飼料に添加した報告が数多く見られる。養殖ブリではその飼育飼料にオリーブ葉や柑橘類を添加することで血合肉の褐変を抑制、また脂質の過酸化を抑制する効果があることが報告されている[3-4)]。その添加物の一つにカテキンが挙げられる。カテキンの生理効果については抗酸化効果があり[5)]、魚皮に存在する脂質過酸化抑制効果も明らかになっている[6)]。養殖魚に関しては、河野らの研究[7)]で養殖ブリとアユの飼料にカテキンを含んだ茶殻を添加することで魚肉中の余分な脂質が抑制されたことが明らかとなっている。これは養殖のサーモンにおいても同様の効果が期待できるが、養殖サーモンへのカテキン効果の研究は乏しい。

以上のことから、アスタキサンチン添加による養殖サーモンの鮮度変化の特徴を明らかにし、さらにカテキンの添加が養殖サーモンの品質に与える効果を明らかにすることを目的として本実験を行った。

2. 実験方法

2-1 スチールヘッドに対するカテキン添加効果

直径4 mのシート製円形水槽2槽に海水馴致したスチールヘッドを81個体（1個体あたり195.5 g、全重量からの計算値）と80個体（1個体あたり194.6 g）を収容した。飼育水として三保飼育施設で取水した地下海水を用い、約48 L/minで掛け流して飼育した。 アスタキサンチンを含んだ市販のマス飼料（ますEP紅油添 6P，日本農産工業株式会社）を通常飼料とした。この通常飼料に、餌重量当たり0.15%のカテキン（茶カテキン粉末　超高濃度、Qualselect）を蒸留水に溶かして、ボトルスプレーで噴霧し、60℃に設定した乾燥機（DK600、ヤマト科学株式会社）で1時間乾燥させたものをカテキン飼料とした。

実験開始時、実験開始1ヶ月後ではそれぞれの水槽から20個体を取り出し、5000倍希釈したFA100で麻酔し、体長と体重を測定した。残りの個体については、水槽から取り出し、海水を入れた100 L容ダイライト容器をはかりに乗せ、風袋消去を行った後に5個体ずつ、重量のみを測定した。全重量と個体数から1個体あたりの体重を算出した。また，この測定後にハンドリングが原因と思われる斃死個体が多くみられたため、2ヶ月後では身質の分析を行う6個体のみ取り上げて体長と体重を測定し。3ヶ月後では5個体のみを取り上げて測定した。実験開始時、実験開始1ヶ月後、2ヶ月後では、可食部の脂質含量、アスタキサンチン量およびK値を調べた。

2-2 脂質分析

全脂質の抽出はBligh and Dyer法の

Hanson and olley 変法[8]に従って行った。
脂質量は下記の式により求めた。
脂質量(%)＝$(W_1 - W_0)/V \times 10/W_2 \times 100$
W_0：ナス型フラスコの質量(g)、W_1：ナス型フラスコ＋脂質の質量(g)
W_2：試料の質量(g)、V：ナス型フラスコへ移した量(ml)

2-3　アスタキサンチン分析

アスタキサンチン量の測定は金光らの方法[9]に準じて行った。初めに粉砕した普通肉2gをねじ口試験管に取り、それに薬さじ4～5杯の硫酸ナトリウム(無水)を添加し、薬さじでかき混ぜ十分に脱水した。その後アセトンを8ml入れ、遠心分離機M201-IVD(SAKUMA)を用い、遠心分離した後、上澄みを50ml容メスフラスコに移した。この作業を2～3回、目視で色が確認できなくなるまで繰り返した。その後アセトンによりメスアップし、メンブランフィルターによってろ過した後、吸光光度計V-630(Jasco)を用いて波長477nmで吸光度を測定した。アスタキサンチン量は下記の式より求めた。

アスタキサンチン量(ppm)=

$$\text{sampleABS} \times \frac{1}{2200} \times 0.01 \times 50 \times 1000 \times \frac{1}{\text{sample weight(g)}} \times 1000$$

2-4　K値分析

ATP関連化合物の測定は以下の手順で行った。初めに試験魚の背部普通肉1.5gを遠沈管にとり、5%過塩素酸を15ml添加しガラス棒で15分間ホモジナイズした後、5MKOHを2.7ml添加した。その後遠心分離機M201-IVD(SAKUMA)を用いて4℃、3000rpm、15分の条件で遠心分離した。遠心分離した試料の上清を試験管に2ml取り、K_2HPO_4を4ml添加した。その後試料溶液をメンブランフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフィー(GL science)を用いて測定した。測定条件は、カラム：InterSustain AQ-C18、移動相：0.1MK_2HPO_4(pH7.0)、カラム温度：40℃、流速：1.0ml/min、注入量：1.0μl、及び検出波長：UV260nmとした。
K値は下記の式より求めた。

$$\text{K値(\%)} = \frac{\text{HxR+Hx}}{\text{ATP+ADP+AMP+IMP+HxR+Hx}} \times 100$$

3. 結果

3-1　スチールヘッドに対するカテキン添加効果

スチールヘッドにカテキン添加飼料を与えて海水飼育した結果、午前10時の室温は11.4~32.5℃であったのに対して、水温は17.1~19.2℃とほぼ一定で、高温期でもスチールヘッドの海水飼育が可能だった（図1）。

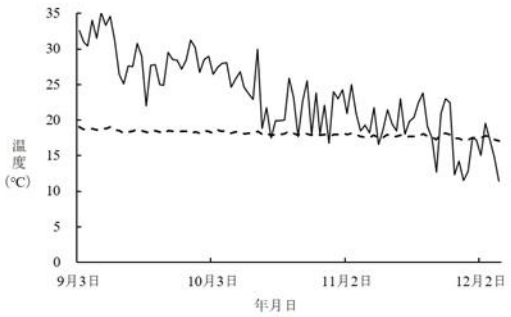


図1　実験期間中の室内気温と水温（通常飼料水槽，午前10時）

—— 室温　- - - 水温

生残数では各試験飼料を給餌し始めて1ヶ月後までに、通常飼料を与えた場合で56個体が生残し、カテキン添加飼料を与えた場合では62個体が生残した。この時、いずれの

条件も 1~7 日目に 14~19 個体と斃死数が多かった。また 1 ヶ月後の測定から 7 日後までに通常飼料を与えた場合で 7 個体、カテキン添加飼料を与えた場合で 13 個体が斃死した。一方、分析に用いる個体を取り上げるのみとし、全体の体長と体重を測定しなかった 2 ヶ月後と 3 ヶ月後では、それぞれ測定 7 日後までにカテキン添加飼料で 1 個体のみ斃死した。実験終了時の生残数はそれぞれ 30、28 個体だった（図 2）.

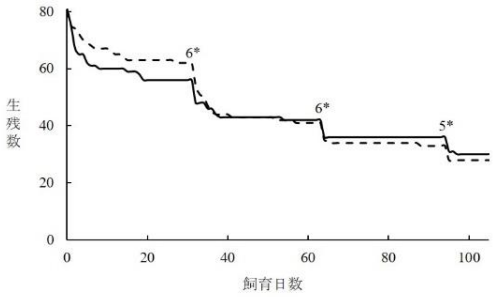


図2　実験期間中の生残数

通常飼料　　カテキン添加飼料

*：分析のために取り上げた個体数

それぞれの飼料条件で飼育した結果、通常飼料を与えた場合では実験開始時に 1 個体あたり 195.5g（全重量からの計算値）であったのが実験終了時には体重の平均値と標準偏差は 795.2±180.8 g（n=30）と 100 日間の給餌で約 4 倍の重量に成長した。カテキン添加飼料を与えた場合では 1 個体あたり 194.6 g（全重量からの計算値）から、実験終了時に体重の平均値と標準偏差は 670.5±231.9 g（n=28）と増重した。実験終了時の平均体重は、カテキン添加飼料を与えた場合より、通常飼料を与えた場合で高くなった（U 検定，$p<0.05$）。また、飼料効率は 76.5%と 71.5%、日間給餌率は 1.57%と 1.53%で飼料条件間に差は無かった（表 1）。

表1　スチールヘッドを通常飼料お上びカテキン添加飼料を与えて飼育した場合の飼育成績

		通常飼料	カテキン添加飼料
実験開始時	日付	2019年9月3日	
	個体数	81	80
	平均体重（g）	195.5	194.6
実験終了時	日付	2019年12月16日	
	給餌日数	100	
	個体数	30	28
	平均体重（g）	795.2±180.8*	670.5±231.9*
飼育成績	生残率（%）	37.0	35.0
	補正飼料効率（%）	76.5	71.5
	日間給餌率（%）	1.57	1.53

平均値±標準偏差

*有意差あり（U検定，$p<0.05$）

3-2　脂質分析

脂質含量では、実験開始時に平均 5.5%であり、2 ヶ月後にかけて通常飼料を与えた場合で 4.4 %、カテキン添加飼料 3.9%と減少傾向にあったが、飼料条件間で差はなかった（U 検定，図 3）.

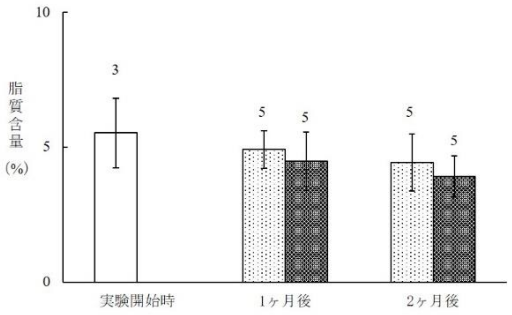


図3　各試験飼料を与えて飼育した場合の脂質含量

通常飼料　　カテキン添加飼料

エラーバーは標準誤差を示す

エラーバー上の数字：分析に用いた個体数

3-3　アスタキサンチン分析

アスタキサンチン量では、実験開始時に 4.7±1.6 ppm であり、2 ヶ月後にかけて最大 15.3±1.1 ppm と上昇したが、飼料条件間に差は無かった（U 検定，図 4）。

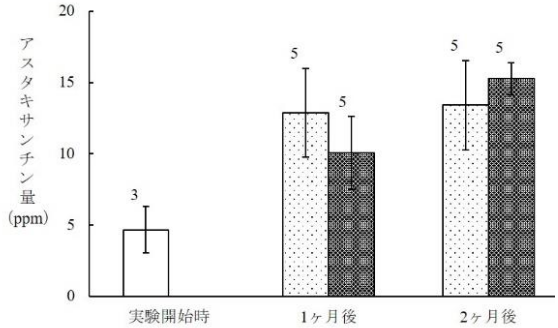


図4　各試験飼料を与えて飼育した場合のアスタキサンチン量

通常飼料　カテキン添加飼料

エラーバーは標準誤差を示す

エラーバー上の数字：分析に用いた個体数

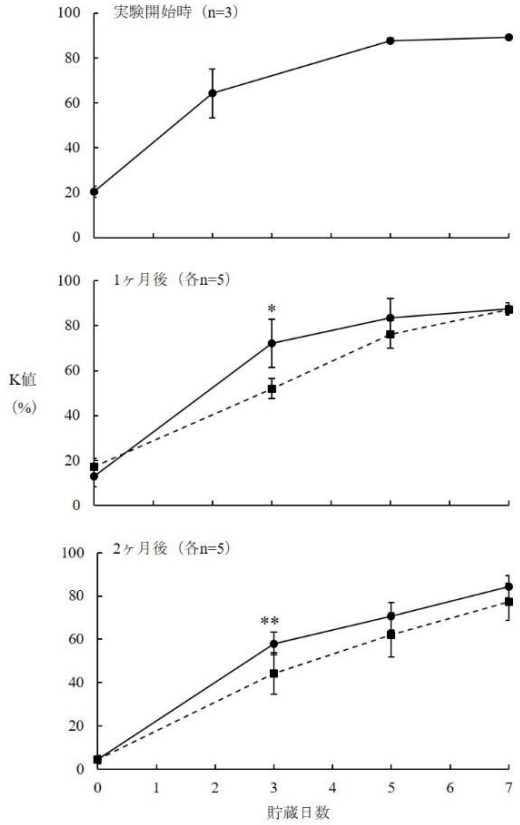


図5　各試験飼料を与えたスチールヘッドの貯蔵日数とK値

エラーバーは標準誤差を示す

*有意差あり（U検定，p<0.01）

**有意差あり（U検定，p<0.05）

—●— 通常飼料　- -■- - カテキン添加飼料

3-4　K 値分析

K 値については 1 ヶ月後の取り上げ個体で、貯蔵 0 日目では通常飼料を与えた場合で 12.8±4.6%、カテキン添加飼料を与えた場合で 17.1±3.7%と差は無かった（U 検定，図 5）。一方、貯蔵 3 日目において通常飼料の 72.1±10.8%に対して、カテキン添加飼料で 52.0±4.5%と有意に低かった（U 検定，$p<0.01$）。貯蔵 5、7 日ではいずれも約 77～87 %まで上昇したが、飼料条件で差は無かった。2 ヶ月後の取り上げ個体でも同様に、貯蔵 3 日目のみ、通常飼料の 57.9±5.3%に対して、カテキン添加飼料で 44.1±9.5%と有意に低かった（U 検定，$p<0.05$，図 5）。

4.　考察

今回の実験では養殖サーモンの飼料にカテキンを添加したことで魚肉中の脂質量が少ない結果であったことから、サーモンにおいてもブリやアユと同様、カテキンが養殖魚独特の脂質過多を抑制する効果があることが期待された。

コントロールとカテキン区で最も差が見られたのは K 値であった。いずれの添加期間においてもカテキン区のほうが K 値が低い結果であり、その差は特に貯蔵 3、5 日後で大きかった。これらのことから、カテキンは貯蔵 5 日までのサーモン魚肉の K 値上昇を抑制することが分かった。

一般的に魚類の死後、筋肉中の ATP は各段階を経て Hx まで分解され、その段階ごとにそれぞれ特有の酵素が関与している。そしてこの一連の分解の中で IMP の分解は最も遅いため、貯蔵初期には IMP が蓄積することが知られている[10]。サーモンではこの IMP の蓄積が他魚種と比べると特に早く、貯蔵 0 日後以降 IMP 量が増えることはなく、低下していく一方であった。しかし今回の実験では貯蔵 3、5 日後においてカテキン区のほうがこの IMP の低下が抑制されていた。大泉は魚類の IMP 分解酵素の活性を NaCl の添加や温度によって抑制できることを報告しており[11]、カテキンにも IMP の分解に関与する酵素(5'-nucleotidase や phosphomonoesterase)の活性を抑制し、IMP の分解を抑える効果があることが考えられた。また、IMP は魚肉中に関して重要なうま味成分の一つであることが知られている[11]。

カテキン添加 1 ヶ月目、2 ヶ月目のどちらにおいても脂質量、K 値、IMP 量には二つの試験区間で同様の差が見られた。このことから、1 ヶ月間飼料へカテキンを添加して飼育することで十分にカテキンによる効果が見られると考えられた。したがって、成長の目的として幼魚の頃から継続的に飼料へカテキンを添加するのではなく、出荷の約 1 ヶ月前から飼料へ添加することが現実的であると考えられた。

以上の結果から、養殖サーモンの飼育飼料へカテキンを添加することは養殖魚独特の過度な脂っぽさを抑制し、貯蔵 5 日までの魚肉の鮮度、うま味を保持し、品質の向上につながることが分かった。しかし、今回の実験ではカテキンがどの程度の量身に蓄積したかは不明であったため、今後はサーモンの身へのカテキンの蓄積量を検討し、飼料への最適なカテキン添加量を見出すことが必要である。

5. 引用文献

1)グローバル化する養殖産業と日本の状況～ノルウェー・チリに見るサーモン養殖の産業化と三陸ギンザケ養殖業復興への道筋～、日本政策投資銀行 (2014)

2)眞岡孝至：カロテノイドの多様な生理作用、食品・臨床栄養、2、1-3 (2007)

3)大山憲一・栩野元秀・植田豊・竹森弘征・多田武夫：養殖ブリの血合筋の褐変抑制に及ぼすオリーブ葉粉末添加飼料の投与効果、水産増殖、58(2)、279-287 (2010)

4)深田陽久：柑橘類を用いた新しい養殖ブリ(香るブリ)の開発、日水誌、81(5)、796-798 (2015)

5)松崎妙子・原征彦：茶葉カテキン類の抗酸化作用について、農化、59(2)、129-134 (1985)

6) Satoshi Mori, Kaori Tokuori, Yasushi Endo, Kenshiro Fujimoto：Prooxidant Activities in Fish Skin Extracts and Effects of Some Antioxidants and Inhibitors on Their Activities、Fisheries Science、65(2)、269-273 (1999)

7)河野迪子・古川清・提坂裕子・仲川清隆・藤本健四郎：ブリおよびアユ養殖飼料への緑茶抽出物および茶殻の添加効果、日本食品科学工学会誌、47(12)、932-937 (2000)

8) Hanson,SWF and Olley,J Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to

tissue homogenates,J.Biochem,89,101-102 (1963)
9) 金光庸俊・青江弘：サケ、マス類のカロチノイド色素の研究- I　筋肉色素の同定、日水誌、24(3)、209-215 (1958)
10)内山均・江平重男：核酸関連物質から見た魚類鮮度変化学研究の現状、日水誌、36、977-992 (1970)
11)大泉徹：魚肉中のイノシン酸分解酵素活性と塩漬魚肉の乾燥中に起こるイノシン酸の分解速度に及ぼす食塩の影響、福井県立大学海洋生物資源学部海洋生物資源学科 (2010)

6. その他の業績

【学会発表】

1)2019 年度水産学会秋季大会（2019 年 9 月） 4 件発表

2)2019 年度水産学会春季大会（2020 年 3 月）2 件発表

【論文発表】

1）秋山信彦他　飼料に浸透した塩類によるアオリイカ幼生の摂餌行動への影響と化学受容細胞の確認　水産増殖　67(3)，225 - 232(2019)

7. 謝辞

本稿を書く機会を与えてくださり、いつも温かな叱咤激励をいただいている平山令明先生に感謝申し上げます。

刺身のかたさ測定方法に関する検討
Investigation on the measurement method of the hardness of sashimi

新居田祐介[1)]、後関雄斗[2)]、深沢あかね[2)]、藤沢朋子[2)]、関野龍太[1)]、田中昭彦[3)]、後藤慶一[1,2,4)]
1)東海大学大学院海洋学研究科，2)東海大学海洋学部，3)東海大学清水教養教育センター，
4)東海大学先進生命科学研究所高機能食品研究部門
Yusuke Niida[1)], Yuto Goseki[2)], Akane Fukazawa[2)], Tomoko Fujisawa[2)], Ryota Sekino[1)], Akihiko Tanaka[2,3)], and Keiichi Goto[1,2,4)]
1) Graduate school of Oceanology, Tokai University
2) School of Marine Science and Technology, Tokai University
3) Liberal Arts Education Center, Shimizu Campus, Tokai University
4) Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

［要旨］
刺身のおいしさを評価するうえで、食感は重要な項目である。しかし、刺身の食感の標準的な測定方法はない。そこで、刺身の平均的な食感の特性を把握する方法について検討した。まず、刺身中の筋の有無が食感（かたさ）の測定に影響することを確認し、筋の影響を均等に受けるよう、刺身２枚を用い、１枚は縦３ヶ所、もう１枚は横３ヶ所でかたさ荷重の測定を行った。その結果、測定値のばらつきが多く、測定回数が不十分であると考えられた。そこで、１枚の刺身サイズで測定痕の相互影響を受けない最大数６ヶ所に設定し、チョウザメ刺身２枚を用いて、１枚は縦６ヶ所、もう１枚は横６ヶ所のかたさ荷重の測定を行った。得られた値と官能評価結果の相関を確認したところ、相関は見られなかったが、正の傾きは見られたため、この方法で刺身のかたさの平均的な値を得ることができると考えられた。

［**Abstract**］
The texture is an important item in the evaluation of sashimi. However, there is no standard method for measuring the texture of sashimi. Therefore, in order to evaluate the characteristics of sashimi, we studied to obtain average value for the hardness of sashimi. First, we tested in order to confirm the influence of the sashimi fiber on the hardness. Next, the hardness load was measured at three vertical positions against fiber with one sashimi and three horizontal positions with another sashimi. As a result, the number of measurement was not enough to obtain average value because of excess variation. So the number of measurement was increased up to six times which was the biggest number that the sashimi was deformed. Then, using a sturgeon sashimi, the hardness load was measured at 6 vertical positions with one sashimi and 6 horizontal positions with another sashimi. As a result, there was no clear correlation between the hardness (representative value) obtained by the above method and the sensory evaluation result. However, a positive slope was recognized in the regression line, and it was considered that this method of obtaining average value of the hardness load can be applied to sashimi.

[Key Words]
Sashimi, Texture, Hardness

1.　はじめに

近年、食品は多様化の一途をたどり、市場には様々な食品群において類似した製品が多数存在する。この状況下、類似した製品の特徴（違い）を分かりやすく消費者に伝えるため、あるいは品質管理や製品開発を効果的に進めるため、味や感覚、食品成分といった指標に基づくマッピング技術が活用されつつある。この技術を用いることで消費者は製品の特徴を容易に把握できるようになり、また企業は一定の品質を維持しやすく、あるいは特徴を狙って製品開発ができるようになる。このような取り組みは嗜好品や酒、出汁などでおこなわれている［1～3］。魚類においては、NMR メ

タボロミクス解析と定量型官能評価の手法を組み合わせ、脂質に着目した養殖マグロの品質管理への応用例が知られている［4］。脂質などの呈味に関連してくる成分は魚類の食味を評価するうえで重要であるが、テクスチャーも魚類の評価において重要な項目として挙げられる。このテクスチャーの測定方法に関しては、マグロおよびブリ類魚肉のフィレに対して、レオメーターを用いプランジャー形状と鮮度低下に伴う物性値変化の検討などで検討されている［5，6］。また、天然魚および養殖魚のテクスチャーの違いについて検討、ハマチ、カツオ等の魚肉を用いてテクスチャーに関する官能検査および機器測定の相関関係を検討している［7，8］。

我々は、魚類の最も基本的な料理である刺身に着目し、消費者目線で様々な魚種の刺身の特徴を客観的にマッピングするための検討を行っている［9］。具体的には、刺身の色、香り、テクスチャー、味の官能および物理化学的なデータに基づく分析図の作成であるが、その評価項目の一つであるかたさに関し、消費者が口にする一般的なサイズで、刺身のかたさの平均的な値を得るための検討を行ったので報告する。

2.　材料と方法

1)　供試魚およびサンプル調製

メバチマグロ刺身（3 検体）、マダイ刺身（1 検体）（両刺身ともサイズ：約 28mm×60mm、厚さ約 6～8mm）、およびスズキ刺身（1 検体）（サイズ：約 20mm×65mm、厚さ約 7mm）は市内食品スーパーの河岸の市（静岡県静岡市清水区島崎町 149）で試験当日に購入した（全て平造り：柵から切り出した平行六面体である）。刺身は 10℃の冷蔵庫で 30 分間保管したものを試験に供した。チョウザメは（株）トヨネフィッシュファーマーズで養殖した 5 個体（68.5～83.0cm）を生き締め、血抜き後、ビニール袋に入れて 4℃の冷蔵庫で保管した。経時的（0～4 日後）に 1 個体を冷蔵庫から取り出し、三枚におろして皮を除去後、刺身（平造り）を調製し（サイズ:約 25mm×70mm、厚さ約 5mm）、10℃の冷蔵庫に 30 分保管後、官能評価、機器分析に供した。なお、チョウザメ刺身の調製は著者らの指示に従い、調理師免許を持つ作業者（愛知県北設楽郡豊根村、レストランみどり調理責任者）が実施した。

2)　使用機器

かたさ荷重（N）の測定に卓上型物性測定器（山電社製 TPU-2DL、最大測定値 20N）とデータ解析に TPU 解析ソフト（山電社製 TPU-A2　Ver.2.2）を使用した。かたさ荷重は、刺身に力を加えた時、刺身からの抵抗が最大になる点をかたさ荷重と定義した（図 1）。プランジャーは歯で刺身を噛む際のテクスチャー測定を目的とするため、テフロン樹脂製楔型プランジャー（破断面サイズ：幅 10mm×厚さ 1mm）を使用し、測定条件としてクリアランス値は 0.1mm、降下速度は 2.5mm/秒に設定した。

3)　官能評価

官能評価は、チョウザメを 4℃で 0～4 日間保管後に調製した刺身を用いて行った（期間中 9:30～10:30 の時間帯で、総計 5 回実施）。評価は毎日 5 人の一般成人が行い、一人あたり 3 枚の刺身を用いた。口に入れて咀嚼した際の食感を「硬い」と「柔らかい」を両極に、

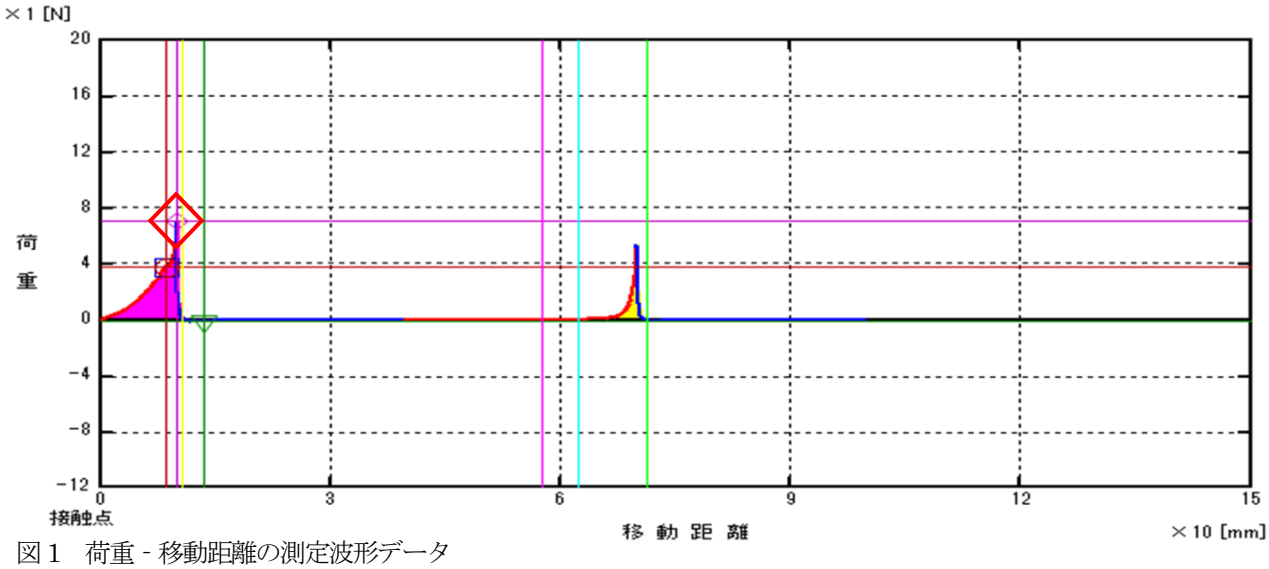


図 1　荷重 - 移動距離の測定波形データ
（注）◇：かたさ荷重ポイント測定

主観的に 7 段階で評価した。咀嚼の際に特別な指示をせず、普段と変わらないように咀嚼してもらった。

4) 測定値の統計処理

刺身の筋の有無がかたさ荷重（N）に与える影響の検討では、プランジャーの降下が筋に直角の場合と筋に触れなかった場合で測定したかたさ荷重について、t 検定を用いて有意差を確認した。t 検定は自由度＝4 および有意水準＝0.05 の条件で行った。次に測定されたかたさ荷重の値のばらつき具合を確認するため、メバチマグロ刺身およびスズキ刺身のかたさ荷重の変動係数を求めた。変動係数は標準偏差を平均で割ることによって得た。かたさ荷重測定値は Smirnov-Grubbs 検定を用いて外れ値の除去を行った。Smirnov-Grubbs 検定において、外れ値が検出されなくなるまで繰り返し行い、最終的な値を用いて平均を算出した。測定値と官能評価の結果に対して、データ数（n＝5）が少ないため無相関の検定を行った。ここでの t 検定は自由度＝3 および有意水準＝0.05 の条件で行った。

3. 結果および考察

刺身にある筋は食感に大きく影響すると推察される。その影響を確認するため、メバチマグロの刺身を用い、筋に対して直角にプランジャーを降下させる場合と（筋アリ）、筋に全くプランジャーが触れない場合で（筋ナシ）、かたさ荷重を測定した。それぞれ 5 枚の刺身について各 1 ヶ所測定を行った（図 2）。なお、筋に対して直角の場合で、1 ヶ所が測定限界値 20N 以上となって測定値が得られなかったため、4 回の測定の平均値で比較した。その結果を表 1 に示した。筋に触れなかった場合の平均値（n＝5）は 5.56N（範囲：5.10～6.10）で、筋に直角の場合の平均値（n＝4）は 12.93N（範囲：12.20～13.90）であった。その差は 7.37N で、筋の有無で 2 倍ほどの違いがあった。筋に触れなかった場合と、筋に直角の場合の結果を用いて t 検定を行ったところ、両データ間に有意差があると判断された（T(3)＝17.85、有意水準 0.05）。そのため、かたさ荷重に筋の有無は大きく影響することが示唆された。

次に、調査対象とする刺身の平均的なかたさ荷重を得るため、筋の影響をできるだけ均等に受けるよう、各 2 枚のメバチマグロとスズキの刺身を用い、1 枚は縦 3 ヶ所、もう 1 枚は横 3 ヵ所のかたさ荷重を測定した（図 3）。その結果を表 2 に示した。メバチマグロでは比較的安定した結果が得られたが（平均：4.72N、範囲：4.01～5.11N）、スズキにおいてはメバチマグロよりバラツキが確認された（平均：3.70N、範囲：2.75～5.14N）。それぞれの値の変動係数を求めたところ、メバチマグロ刺身は 0.08 で、スズキ刺身は 0.26 であった。この結果から両検体間でばらつき具合に差があることが分かった。そのため、安定的に刺身の代表的なかたさ荷重を得るには、2 枚の刺身を用いた総計 6 ヶ所の平均では不十分で、より多くのデータを取得する必要があると考えられた。

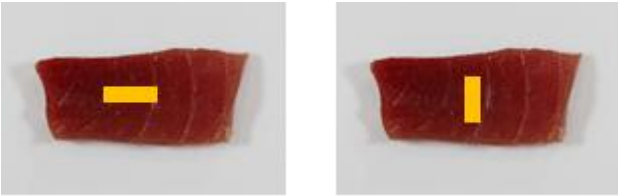


図 2　メバチマグロ刺身における物性測定箇所
左：筋に直角にプランジャーを入れた場合
右：筋に平行にプランジャーを入れた場合

表 1　メバチマグロ刺身を用いた筋の有無におけるかたさ荷重測定結果

	1	2	3	4	5	平均
筋ナシ	6.10	5.30	5.60	5.10	5.70	5.56
筋アリ	13.90	13.10	12.20	12.50	-	12.93

（単位：N）

-：測定限界値を超えたため測定値無し

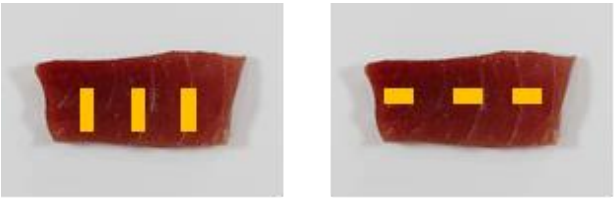


図 3　メバチマグロ刺身における物性測定箇所（直角：3 回、平行：3 回）
左：筋に直角にプランジャーを入れた場合
右：筋に平行にプランジャーを入れた場合
（注）スズキ刺身も同様に測定

そこで、一般的な刺身のサイズで隣接するプランジャー痕の影響を受けないと考えられる最大数として、1 枚は縦 6 ヶ所、もう 1 枚は横 2 列×3 ヶ所について、メバチマグロおよびマダイの刺身を用いてかたさ荷重を測定した（図 4）。その結果を表 3 に示した。いずれの魚種でもバラツキが確認され、また平均と顕著な乖離を示す部位も認められた。そこで、特異的な値を除去するため、得られた値の判別に Smirnov-Grubbs 検

定（有意水準=0.05）を用いた。その結果、メバチマグロにおいては部位特異的と判断される値はなかった。一方、マダイにおいては部位特異的と判断される値があった。部位特異的と判断される値がなくなるまでSmirnov-Grubbs 検定を繰り返した結果、メバチマグロのかたさ荷重の平均値（n=12）は5.51N（範囲：2.15～7.43N）、マダイのかたさ荷重の平均値（n=11）は2.27N（範囲：0.98～3.29N）となった。

図 4　メバチマグロ刺身における物性測定箇所（直角：6 回、平行：6 回）
左：筋に直角にプランジャーを入れた場合
右：筋に平行にプランジャーを入れた場合
（注）マダイ刺身も同様に測定

表3　メバチマグロ刺身およびマダイ刺身を用いた12回のかたさ荷重測定結果

No.	メバチマグロ	マダイ
1	5.27	2.58
2	4.78	2.57
3	7.43	3.28
4	2.15	8.02※
5	2.34	2.52
6	2.71	2.48
7	5.98	1.31
8	9.43	0.98
9	8.84	2.63
10	6.29	1.24
11	5.8	3.29
12	5.14	2.12
平均	5.51	2.75 2.27※※

（単位：N）

※：Smirnov-Grubbs 検定で除去された値
※※：Smirnov-Grubbs 検定後の平均値
（注）No.1～6 は筋に直角にプランジャーを入れて測定した結果、No.7～12 は筋に平行にプランジャーを入れて測定した結果を示す。

表 4　チョウザメ刺身の官能評価結果

保管日数	食感（かたさ）
0 日目	5.2
1 日目	4.6
2 日目	3.6
3 日目	4.6
4 日目	2.6

（注）数値は 5 人評価の平均値

上述の物性測定方法が官能評価と相関があるかを調べるため、チョウザメの刺身を用い、かたさ荷重の測定ならびに官能評価を実施した。その結果を表 4、表 5 および図 5 に示した。官能評価の結果、最も硬いと評価されたのが 0 日目（5.2）で、最も柔らかいと評価されたのが 4 日目（2.6）で、個体差はあるが、徐々にコラーゲンの分解で柔らかくなる傾向が確認できた。得られたかたさ荷重の値について、Smirnov-Grubbs 検定を用いて部位特異的な値の除去を行ったところ、チョウザメ刺身の 0 日目のかたさ荷重の平均値（n=12）は 15.19N（範囲：10.19～20.00N）、1 日目の平均値（n=11）は 16.31N（範囲：13.09～20.00N）、2 日目の平均値（n=11）は 6.84N（範囲：4.52～8.77N）、3 日目の平均値（n=10）は 9.10N（範囲：7.53～11.44N）、4 日目の平均値（n=12）は 7.78N（範囲：3.48～13.44N）となった。これらの値を用いて、物性測定値と官能評価の結果の相関を調べたところ、測定値と官能評価の結果との間に正の相関が見られた（相関係数 R2=0.53）（図 5）。n=5 ではデータ数が少ないため自由度が低く、相関を論じるのにふさわしくない可能性も考えられた。そのため、無相関の検定を行ったところ、測定値と官能評価の結果は無相関であると分かったが（p=0.15）、回帰直線には正の傾きが見られた。

今回の検討では魚の最も基本的な喫食方法である刺身を用いて物性測定方法の検討を行った。チョウザメ刺身を用いての検討の結果、官能評価の結果と物性測定のかたさ荷重の散布図から得られた回帰直線は正の傾きであった。以上のことから、刺身 2 枚を用いて、縦6ヶ所、横2×3ヶ所のかたさ荷重の測定を行った後、Smirnov-Grubbs 検定を行うことで、かたさ荷重の平均的な値を得ることができると考えられた。

今回、赤身魚と白身魚を用いてかたさ荷重の測定法を決定したが、かたさ荷重以外の物性値も差別化に寄与していることも考えられるため、今後、別の指標も検討に加える必要もある。

表5　チョウザメ刺身を用いた12回のかたさ荷重測定結果

No.	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目
1	17.53	16.90	8.71	7.53	13.44
2	12.60	8.54※	8.41	11.44	11.67
3	11.59	17.89	6.63	11.40	9.77
4	10.18	20.00	4.52	9.08	12.34
5	19.35	20.00	8.77	15.10※	7.52
6	14.10	20.00	7.09	9.86	7.53
7	16.72	13.22	5.42	7.71	6.06
8	18.67	13.09	7.36	7.85	6.96
9	10.19	13.78	12.16※	9.42	6.21
10	16.76	11.18	4.03	8.47	3.88
11	14.56	17.54	6.25	8.22	3.48
12	20.00	15.79	8.05	13.27※	4.51
平均	15.19	15.66/16.31※※	7.28/6.84※※	9.95/9.10※※	7.78

（単位：N）

※：Smirnov-Grubbs 検定で除去された値

※※：Smirnov-Grubbs 検定後の平均値

（注）No.1～6 は筋に直角にプランジャーを入れて測定した結果、No.7～12 は筋に平行にプランジャーを入れて測定した結果を示す。

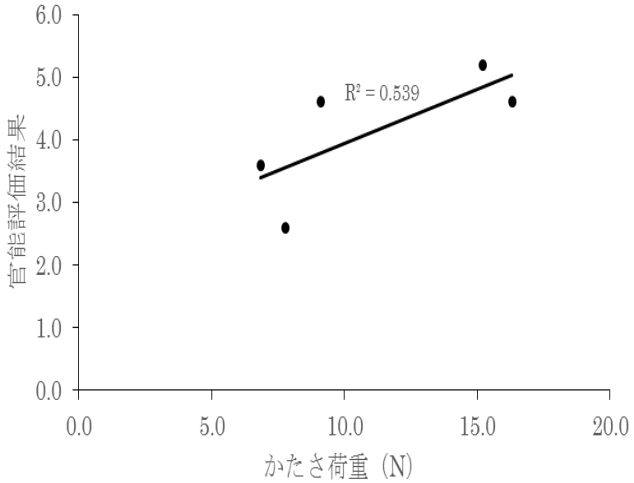


図5　チョウザメ刺身のかたさ荷重と官能評価結果の相関図

4.　引用文献

［1］宇都宮仁・磯谷敦子・岩田博・中野成美清酒の官能評価分析における香味に関する品質評価余語及び標準見本、酒類総合研究所報告、178、p45-52（2006）.

［2］有冨菜穂子・東雅子・岸幹也・加太希哉・國枝里美魚節だしおよび煮干だしの官能評価用語の収集と整理、日本官能評価学会誌、14-1、p34-39（2010）.

［3］代野敦子、紅茶キャラクターホイールの作成と紅茶特徴の可視化、におい・かおり環境学会誌、45-5、p344-350（2014）.

［4］河原崎正、貴食品分野におけるメタボリック・プロファイリングの活用－NMR・MS を用いた包括的な食品成分分析－、化学と生物、55-8、p538-546（2017）.

［5］畑江敬子・松本美鈴・島田淳子・山中英明・渡部終五・橋本周久、日水誌、56、p1521-1525（1990）.

［6］岡崎恵美子・白井一茂・木宮隆・出下由美子・大村裕治、マグロおよび数種のブリ類魚肉のテクスチャー測定について、水産技術、1(2)、p1-12（2009）.

［7］　中山照雄・木全智裕・大井淳史、官能検査と機器測定から見た生および加熱魚肉のテクスチャー、日本食品工業学会誌、37-12、p998-996（1990）.

［8］畑江敬子・李敬姫・土屋隆英・島田淳子、養殖魚と天然魚のテクスチャー特性について、日本水産学会誌　55-2、p363-368（1989）.

［9］関野龍太・影山侑吏香・後藤慶一、魚の刺身の特徴を客観的に可視化するための官能評価用語の選定（刺身キャラクターホイールの作成）、東海大学先進生命科学研究所紀要、2、p44-48（2017）.

5. 業績

【論文発表】

該当なし

【学会等発表】

1）新居田祐介、小林恵太郎、保坂洋斗．パッと見て分かる！魚の美味しさーカツオの刺身を用いた客観的可視化へのアプローチー．第 8 回サイエンスインカレ、2019．東京

2）新居田祐介、保坂洋人、小林恵太郎、田中昭彦、後藤慶一．カツオ刺身を用いた客観的可視化に関する検討．第 66 回食品科学工学会、2019.9．北海道

3）新居田祐介、田中昭彦、後藤慶一．可視化で蘇るか？失われつつある鰹の文化．2019 年度シーズ＆ニーズビジネスマッチング研究発表会．2019.9．静岡（奨励賞）

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、チョウザメを提供してくださった（株）トヨネフィッシュファーマーズ様、および官能評価に協力して頂いた豊根村の皆様に深く感謝申し上げます。

ヒトデ由来セレブロシドのリポソーム製剤化と線虫への投与
Formulation of liposomes containing cerebrosides derived from starfish and their administration to *Caenorhabditis elegans*

山崎　素未[1)]、笹川　昇[1,2,3)]、清水　佳隆[1,2,3)]
[1] 東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、[2] 東海大学工学部生命化学科、[3] 東海大学先進生命科学研究所
Motomi Yamazaki[1)], Noboru Sasagawa[1,2,3)], Yoshitaka Shimizu[1,2,3)]
[1]Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University
[2]Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University
[3]Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

セレブロシドはグルコースあるいはガラクトース残基を有するモノグリコシルセラミドであり、植物由来のセレブロシドが機能性化粧品や機能性食品の添加物として利用されている。一方、水産副生物として毎年大量に廃棄されているヒトデは植物原料に比べて高い比率でセレブロシドを含むことが知られており、セレブロシドの供給原料として有望である。我々はヒトデ由来セレブロシドの新たな利用用途を探索するため、セレブロシドが生体に与える影響を線虫を用いて解析することを計画している。本研究では、ヒトデ由来セレブロシドからリポソームの調製を試みると共に、セレブロシドをリポソーム剤型で線虫に投与することの妥当性を確認するため、蛍光マーカーを組み込んだリポソームを線虫に投与して、線虫によるリポソームの取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

[Abstract]

Cerebrosides are monoglycosylceramides that possess glucose or galactose residues. Although cerebrosides extracted from plants are used as additives in cosmetics and foods, the proportion of cerebrosides in starfish is higher than that in any plant material, which makes starfish a promising feedstock of cerebrosides. To explore new applications of cerebrosides derived from starfish, we investigated their effects on living organisms by administering them to *Caenorhabditis elegans*. In this study, we tested whether liposomes containing starfish-derived cerebrosides can be formulated. Further, to investigate the efficacy of the liposome formulation of cerebrosides, we administered liposomes incorporated with fluorescent markers to nematodes and observed their uptake using a confocal laser microscope.

[Key Words]

Liposome, Cerebroside, Glucosylceramide, Starfish *Asterias amurensis, C. elegans*

1. はじめに

スフィンゴ糖脂質の一種であるセレブロシドはセラミドの1-ヒドロキシ残基に単糖が結合した化合物である。そのなかでも、単糖がグルコースであるものをグルコシルセラミド（GlcCer）という。GlcCerはアトピー性皮膚炎の緩和、がん悪液質の緩和、大腸がんの抑制などの種々の生理作用に加え、ストレス潰瘍抑制や鎮痛などの中枢神経抑制作用を有することも知られている（1, 2, 3）。

キヒトデ（*Asterias amurensis*）は、ヒトデ網マヒトデ目マヒトデ科に属する棘皮動物であり、日本では九州以北の沿岸に広く生息している（4）。とくに生息数が多い北海道では、ホタテ養殖において食害を与えるため、害獣として毎年1万トン以上駆除されている（1）。その一方で、ヒトデはその内臓や卵巣のGlcCer含有率が高いことが報告されている（1, 5）。

現在、化粧品材料としてセレブロシドが使用されているが、そのほとんどは植物から抽出されたものである。以前は、牛脳由来のセレブロシドが使用されていたが、2000年代初頭に発生したBSE問題によって使用が断たれ、以降は植物性に切り替わっている。しかし、植物性のセレブロシドは含有量が非常に低く、また高価であるという問題点を有している。したがって、GlcCerの含有率が高

く、その大半が廃棄物となっているヒトデは、GlcCerの供給原料として有望であると考えられる。また、セレブロシドは、その炭化水素鎖の長さや、二重結合の数によって、構造にバリエーションがあり（5）、その構造によって作用が異なることも報告されている（6）。

我々は、ヒトデ由来セレブロシドの生理的作用解析にあたり、モデル生物として線虫 *Caenorhabditis elegans*（*C. elegans*）の利用を計画している。*C. elegans*は体長約1 mmの非寄生性の土壌生物である。体細胞数は雌雄同体が959個、雄が1,031個と少ないものの、神経系、消化管、筋肉や生殖巣など多様な組織を有している。すでに全ゲノム配列が解読されているほか、蛍光を導入した場合、体が透明なことから切片等にする必要なくそのまま検鏡できるため、観察が行いやすいという利点を有している。さらに、およそ3日で成虫となり、寿命は約3週間と生活環が短いことから、老化・寿命への影響の検討にも用いられている（7, 8）。

ヒトデから抽出・精製されたGlcCerは水に難溶であるため、そのままでは線虫による各種バイオアッセイへの適用が難しい。そこで、リポソーム製剤化によって水分散液とすれば、簡便に線虫に経口投与できると考えた。リポソームは、脂質二重膜を持つ球状の閉鎖小胞であり、1964年 Banghamらにより初めて報告された（9）。リポソームは内部に薬剤を封入できることや、その構成成分が生体成分であるため毒性や抗原性が低く生体内で代謝可能であることから、ドラッグデリバリーシステム（DDS）のキャリアとして利用されており、さらなる応用が期待されている（10）。

本研究では、ヒトデ由来GlcCerから脂質粒子懸濁液を調製して各種の検討を行なった。まず、ヒトデ由来GlcCerを主成分として脂質二重膜構造を持つリポソームが調製できることを確認するため、透過型電子顕微鏡での検鏡により評価した。また、調製したリポソームを加温して、加温の前後で粒子径分布を測定し、平均粒子径の変化から粒子としての安定性を検討した。さらに、リポソームの脂質膜とリポソームの内水層にそれぞれ蛍光波長の異なるマーカー物質を包埋した二重蛍光標識リポソームを調製して、線虫を飼育する寒天培地に滴下することで、線虫がリポソームを取り込むかどうかを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2. 実験

リポソームの調製

キヒトデから単離されたグルコシルセラミド（GlcCer）とジパルミトイルホスファチジルグリセロールナトリウム（DPPG）から、脂質膜組成比を GlcCer : DPPG=20 : 1（w/w）とし、グルコシルセラミドリポソーム（GlcCer-Lipo）をバンガム法によって調製した。10mL のナシ型フラスコにエタノールに溶解した GlcCer 13 mg、クロロホルム/メタノール（2 : 1, v/v）に溶解した DPPG 0.65 mg、エタノール 1 mL を加え入れた。ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去、脂質フィルムを形成させた。このフラスコに 10%トレハロース（w/v）を 400 μL 加え入れ、60°Cのウォーターバス中で 1 分間保温した後、ボルテックスミキサーで激しく振盪することで脂質フィルムを水和懸濁し、リポソーム（GlcCer-Lipo）を調製した。さらに、エクストルーダーを用いてサイズ調整をした。45°Cに設定した恒温水循環装置を接続したエクストルーダーに孔径 400 nm のポリカーボネート膜をセットし、リポソームを 4 回加圧ろ過、つづけて孔径 80 nm で 10 回加圧ろ過した。

リポソームの粒子径と安定性

エクストルーダーでサイズ調整した GlcCer-Lipo の一部を分取し、50°Cウォーターバス中で 20 分間加温した。加温したリポソームおよび未加温リポソームをそれぞれ動的光散乱式粒径分布測定装置（HORIBA, LB-550）で粒子径分布を測定した。

透過型電子顕微鏡による検鏡

調製した GlcCer-Lipo はネガティブ染色法により、TEM で検鏡した。GlcCer-Lipo をカーボン支持 Cu グリッド（400 メッシュ）に吸着させ、2%リンタングステン酸溶液で 10 秒間染色した。このグリッドを TEM（JEM-1400Plus, JEOL Ltd.）により、加速電圧 100 kV で観察した。

線虫の培養

線虫 *C. elegans* は野生型 N2 株を用いた。大腸菌 *Escherichia coli*（OP50 ウラシル要求株）を培養した NGM-agar もしくは NGM lite-agar プレート上で、20°Cインキュベーター内で飼育した。プレート上の大腸菌が無くなる、もしくは線虫が過密になるまえに、ワームピッカーで新たなプレートに数匹移すことで、維持・継代した。

寒天培地上での線虫へのリポソーム投与

グルコシルセラミドを蛍光標識化した

Glucosylsphingosine-BODIPY（GlcSph-BODIPY）を脂質膜中に組み込み、内水相にはDextran, Cascade Blue（Dex-CB）を封入した二重蛍光標識GlcCer-Lipoを調製した（GlcCer：DPPG：GlcSph-BODIPY＝20：1：0.05（w/w/w））。このリポソームを大腸菌塗布NGM-Lite agarプレート上に10 μL滴下し、プレートを傾けることで、リポソームを寒天培地上に広げた。そこにワームピッカーで線虫（adult）を移し、2時間自由摂食させた。その後、体表についたリポソームを落とすため、30分程度、大腸菌を塗布していないNGM-Lite agarプレート上で自由に這わせた。

共焦点レーザー顕微鏡での検鏡

顕微鏡での観察のため、agarパッドを作成した。詳細には、スライドグラスの上に、加熱溶解した3% agarを約100 μL滴下し、素早くカバーガラスを重ねて平らにした後、1M-アジ化ナトリウム10 μLを滴下した。このagarパッドに線虫をのせ、カバーガラスをかけて共焦点レーザー顕微鏡（Olympus, FV1000）で観察した。

3. 結果および展望

水に難溶であるグルコシルセラミドは、そのままでは線虫に投与することが困難である。一般に水に難溶である物質を線虫に与える際の方法としては、ジメチルスルホキシド（DMSO）などの有機溶媒によって溶解させるといった手法が挙げられる。しかし、DMSO自体が線虫の寿命に影響を及ぼすことが報告されており、線虫による各種バイオアッセイを行う際の試験物質可溶化溶媒として DMSO を用いることは望ましくないとされている（11）。そこで、本研究ではグルコシルセラミドをリポソーム製剤（GlcCer-Lipo）とすることで、線虫への投与が可能な水分散液とした。

本研究ではグルコシルセラミドを主原料としてバンガム法とエクストルーダーによる粒子径調整によりGlcCer-Lipoを調製した。粒子径分布測定の結果、GlcCer-Lipoは約90 nmの平均粒子径で、単分散の分布を示した（図1-A）。このGlcCer-Lipoは50℃のウォーターバス中で20分加温しても粒子径に変化はなく、約90 nmの平均粒子径で単分散の状態を維持した（図1-B）。このことから GlcCer-Lipo は比較的高い粒子としての安定性を有していることが確認された。また、TEMによる検鏡の結果でも、粒子径は約90～100 nmで粒子は比較的均一であり、数層の脂質膜構造と内部に水相を持つことが確認された（図2）。これらのことから、本研究で調製したヒトデ由来セレブロシドを主原料としたリポソームは、水溶性化

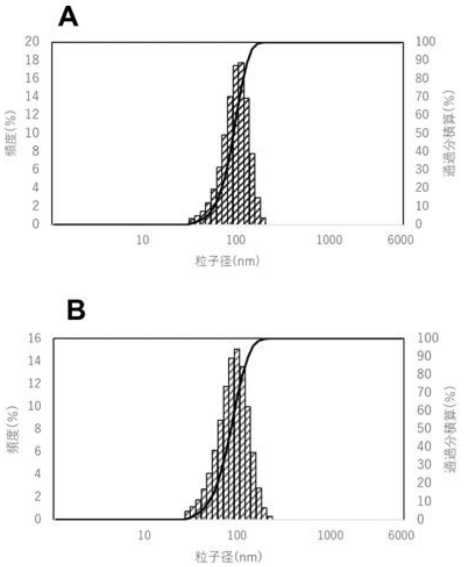


図1. GlcCer-Lipoの粒子径分布
A：未加温、B：加温処理後

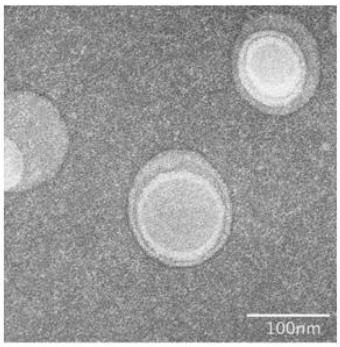


図2. GlcCer-Lipoの電子顕微鏡像

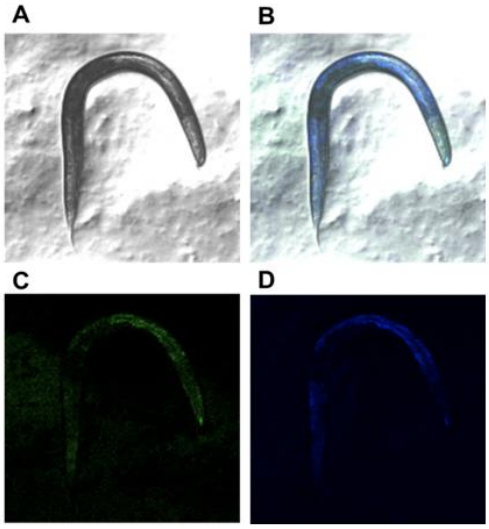


図3. 蛍光標識GlcCer-Lipoを投与した線虫
A：明視野、B：マージ像、C：GlcSph-BODIPY、D：Dex-CB

合物のドラッグキャリアとしての利用にも適していると考えられた。

寒天培地上で蛍光標識リポソームを投与した線虫を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像を図 3 に示す。脂質膜マーカーによる蛍光、および内水相マーカーによる蛍光が消化管で観察されたことから、線虫はリポソームを経口摂取することが確認された。このことから、水に難溶である GlcCer をリポソーム製剤化し、寒天培地上に滴下することで、GlcCer の線虫への経口投与が可能であり、セレブロシドが有する種々の生理的作用の解析が線虫を用いて実施できることが確認された。また、GlcCer 以外の化合物でもリポソーム製剤化することで線虫へ経口投与でき、DMSO 等の可溶化溶媒の影響を排除したバイオアッセイが可能であり、リポソームはこれらの研究用ツールとして非常に有用であると考えられた。

今後、ヒトデ由来セレブロシドが線虫の寿命に与える影響を解析すると共に、セレブロシドを投与した線虫における遺伝子発現などの解析を進め、セレブロシドの持つ生理作用の一端を明らかとしていく予定である。

4. 引用文献

[1] A. K. M. AzadShahl, M. Kinoshita, H. Kurihara, M. Ohnishi, K. Takahashi, Glycosylceramides Obtain from the Starfish *Asterias amurensis* Lütken, Journal of Oleo Science, 57(9):477-84 (2008).

[2] 山崎幹夫，武藤昌図，鈴木重紀，奥山恵美，中枢神経系薬，特開昭 60−224628.

[3] S. Usuki, N. Tamura, S. Sakai, T. Tamura, K. Mukai, Y. Igarashi, Chemoenzymatically prepared konjac ceramide inhibits NGF-induced neurite outgrowth by a semaphorin 3A-like action, Biochemistry and Biophysics Reports, 5:160-167 (2016).

[4] 本川達雄： ヒトデ学ー棘皮動物のミラクルワールドー，東海大学出版（2001）.

[5] R. Yamaguchi, Y. Kanie, O. Kanie, Y. Shimizu, A unique structura distribution pattern discovered for the cerebrosides from starfish *Asterias amurensis*, Carbohydrate Research, 473:115-122 (2019).

[6] E. Okuyama, M. Yamazaki, The Principles of Tetragonia tetragonoides having Anti-ulcerogenic Activity. II. Isolation and Structure of Cerebrosides, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 31 (7) 2209-2219 (1983).

[7] 小原雄治： 線虫 ：1000 細胞のシンフォニー，共立出版(1997).

[8] 三谷昌平： 線虫ラボマニュアル，シュプリンガー・フェアラーク東京（2003）.

[9] A. D. Bangham, R. W. Horne, Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, Journal of Molecular Biology, Volume 8, Issue 5, Pages 660-668 (1964).

[10] 秋吉一成，辻井薫：リポソーム応用の新展開～人工細胞の開発に向けて～，株式会社エヌ・ティー・エス（2005）.

[11] Wang X. , Wang X. , Li L. , Wang D. , Lifespan extension in Caenorhabditis elegans by DMSO is dependent on *sir-2.1* and *daf-16*., Biochemical and Biophysical Research Communications, 1; 400(4): 613-8 (2010).

5. 本研究に関連する業績

【論文発表】

該当無し

【学会発表】

1) 宮下宙、石渡雅大、清水佳隆：経口投与したセレブロシドリポソームの消化管吸収に関する検討、第 6 回 FCCA シンポジウム、2019 年 08 月.
2) 髙橋祐太、石渡雅大、田鎖美佳、清水佳隆：グルコシルセラミドから調製したリポソームの細胞内移行、第 6 回 FCCA シンポジウム、2019 年 08 月.
3) 宮下宙、千葉朋希、清水佳隆：ビタミン C 封入リポソームを経口投与したマウスにおける小腸パイエル板の遺伝子発現解析、東海大学マイクロ・ナノ啓発会 （Tμne） 第 7 回学術講演会、2020 年 2 月.
4) 桑原智晴、石渡雅大、清水佳隆: 経口投与リポソームの消化管吸収と動態の検討、東海大学マイクロ・ナノ啓発会 （Tμne） 第 7 回学術講演会、2020 年 2 月.
5) 髙橋祐太，石渡雅大，望月友理香，清水佳隆：グルコシルセラミドから調製したリポソームの皮膚線維芽細胞による取り込み、東海大学マイクロ・ナノ啓発会 （Tμne） 第 7 回学術講演会、2020 年 2 月.

6. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただいた平山令明先生に感謝申し上げます。また、本研究の一部は東海大学先進生命研究所プロジェクトの資金援助により実施されたものであり、ここに記して感謝いたします。

アスタキサンチン摂取が運動後の疲労度と筋損傷に与える影響
～ 本学陸上競技部駅伝選手を対象とした検討 ～
Effects of astaxanthin on post-training fatigue and muscle damage in top rank long distance relay runners

西﨑 泰弘[1,2,3], 岸本 憲明[1,2,3],山田 千積[1,2,3], 菊地 恵観子[1,2,3],
山鹿 由莉[2,3],尾形 珠恵[2,3], 峰 明奈[2,3], 後田 奈々[2,3],
本江 信子[4], 平島 梨夏[4], 富永 久美[4],両角 速[5]

1. 東海大学先進生命科学研究所
2. 東海大学医学部基盤診療学系健康管理学
3. 東海大学医学部付属東京病院健診センター
4. アスタリール株式会社研究開発部
5. 東海大学体育学部競技スポーツ学科

Yasuhiro NISHIZAKI[1,2,3], Noriaki KISHIMOTO[1,2,3], Chizumi YAMADA[1,2,3],
Emiko KIKUCHI[1,2,3], Yuri YAMAGA[2,3], Tamae OGATA[2,3], Akina OGATA[2,3], Akina MINE[2,3],
Nana URATA[2,3], Nobuko HONGO[4], Rika HIRASHIMA[4], Kumi TOMINAGA[4], Hayashi MOROZUMI[5]

1) Institute of Advanced Biosciences, Tokai University
2) Department of Clinical Health Science, School of Medicine, Tokai University
3) Health Screening Center, Tokai University Tokyo Hospital
4) AstaReal Co. Ltd.
5) Department of Competitive Sports. School of Physical Education, Tokai University

［要旨］

アスタキサンチン摂取が筋損傷と疲労度に与える影響について検討する目的で、東海大学駅伝部に所属する 1～3 年生男子学生 30 名を対象に、試験群はアスタキサンチンカプセル 1 日 12mg、対照群はプラセボを各 8 週間服用させた。疲労度はアンケート調査で、筋損傷は CK、AST、LDH により計測し、摂取前と 4、8 週後における前後ならび群間比較と相関分析を行った。その結果、アスタキサンチンによる疲労度の軽減効果と筋肉の損傷抑制効果が明らかに示された。

[Abstract]

In order to investigate the effects of astaxanthin intake on muscle damage and fatigue, we conducted a study on 30 male students belonging to Tokai University competitive long distance relay run club (Ekiden-bu). The test group received twice a day of totally 12 mg of astaxanthin and the control group received placebo for 8 weeks. The degree of fatigue was examined by a questionnaire survey. Muscle damage was examined by blood sampling for CK, AST, and LDH. Changes before and after 4 and 8 weeks were compared between the astaxanthin group and the placebo group, and correlation analysis was performed. As a result, the effect of reducing the degree of fatigue and the effect of suppressing muscle damage by astaxanthin were clearly shown.

[Key Words]

astaxanthin,top athletes, long distance relay runners, post-training fatigue, muscle damage

1. **はじめに**

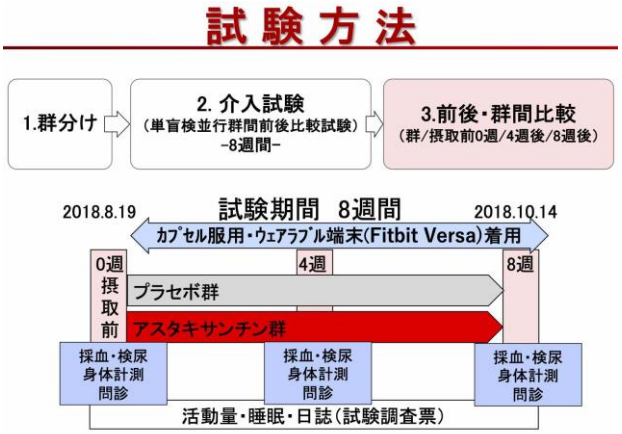
サケやエビなどの甲殻類などに含まれる赤橙色のカロテノイドであるアスタキサンチンは、抗酸化および抗炎症作用を有し[1]、健康食品として広く研究と流通がなされている。これまでに持久力向上や筋肉損傷軽減など、アスリートでの有用性を期待させる複数の効果が報告されているが[2,3]、トップアスリートにおける検討は十分ではなかった。

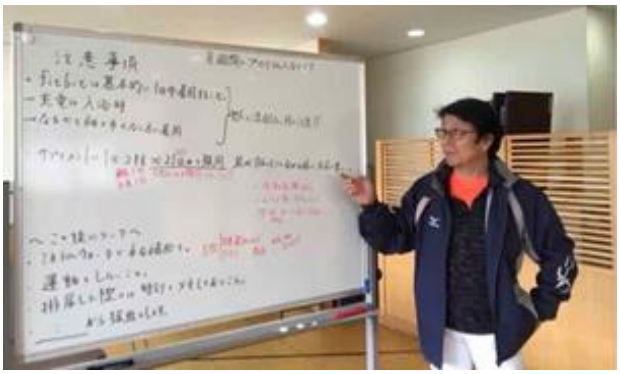
2. **目的**

本研究では、大学陸上競技界トップチームに所属する長距離選手を対象に、アスタキサンチン摂取が選手に与える影響について問診票の結果を検討した。

3. **方法**

試験参加に書面にて同意した東海大学陸上競技部の中長距離ブロック(駅伝部)に所属する1～3年生の男子学生30名を対象として、5,000メートル走のタイムが等しくなるよう2群に分けた。試験群にはアスタキサンチンカプセルを1日2回(各1粒、アスタキサンチン量として計12mg)、対照群にはアスタキサンチンを含まないプラセボカプセルを各8週間服用させた。服用率、バイタルサイン、ウェアラブル端末による活動量、採尿、採血を行うとともに、摂取前、4週および8週後における、問診票(5段階回答)での体調に関する11の質問について、回答を1～5に点数化し、前後比較にはフリードマン・ダン検定、群間比較にはマンホイットニーのU検定を行った。

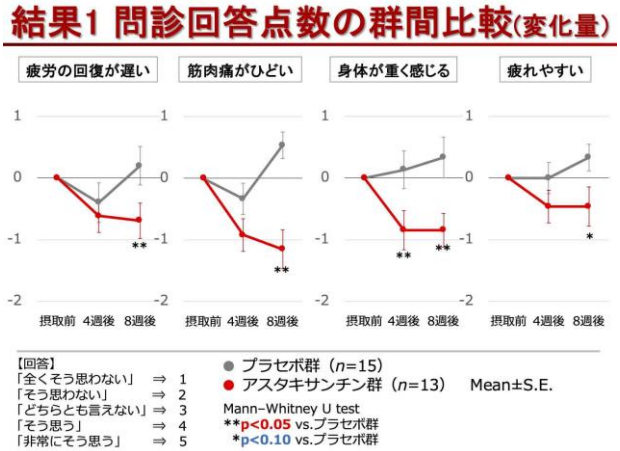




選手を対象とした説明会の風景

4. **結果の概要**

被検者30名中2名が脱落し、対照群(プラセボ群)15名、試験群(アスタキサンチン群)13名での比較となった。



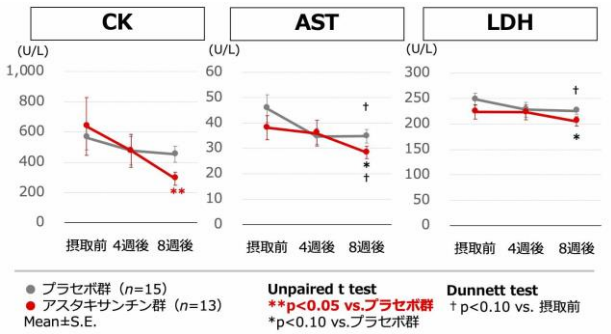
結果1:問診結果における群間比較

プラセボ群に比較してアスタキサンチン群で「疲労の回復が遅い」「筋肉痛がひどい」「身体が重く感じる」は有意に低く、「疲れやすい」は低い傾向にあった。

結果2 筋原性酵素の群間比較

	試験食	n	実測値			0wとの比較 (※1)		プラセボ群との比較 (※2)		
			摂取前 (0w)	摂取4週後 (4w)	摂取8週後 (8w)	4w	8w	0w	4w	8w
			平均値 ± SD	平均値 ± SD	平均値 ± SD	p値	p値	p値	p値	p値
CK (U/L)	ﾌﾟﾗｾﾎﾞ	15	561.9 ± 309.9	475.3 ± 361.4	452.7 ± 204.5	0.698	0.283	0.724	1.000	0.028
	ｱｽﾀｷｻﾝﾁﾝ	13	636.5 ± 689.8	475.3 ± 393.1	290.7 ± 156.0	0.625	0.159			
AST (U/L)	ﾌﾟﾗｾﾎﾞ	15	45.7 ± 21.2	34.7 ± 12.1	34.8 ± 10.3	0.128	0.089	0.317	0.819	0.091
	ｱｽﾀｷｻﾝﾁﾝ	13	38.2 ± 17.2	36.0 ± 18.2	28.4 ± 8.8	0.819	0.073			
LDH (U/L)	ﾌﾟﾗｾﾎﾞ	15	248.5 ± 46.2	227.9 ± 56.5	225.4 ± 24.3	0.301	0.060	0.186	0.804	0.073
	ｱｽﾀｷｻﾝﾁﾝ	13	223.7 ± 50.5	222.7 ± 52.0	204.9 ± 33.4	0.996	0.362			

(※1) Dunnett test (※2) Unpaired t test $p < 0.05$, $p < 0.10$



結果2：筋原性酵素の摂取前と8週後の前後比較および群間比較

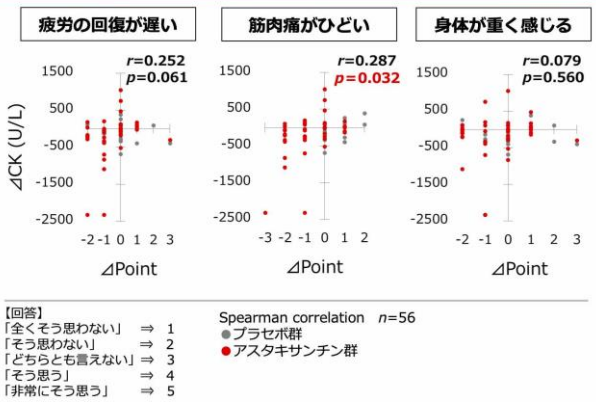
CK: クレアチンキナーゼ、AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、LDH: 乳酸脱水素酵素

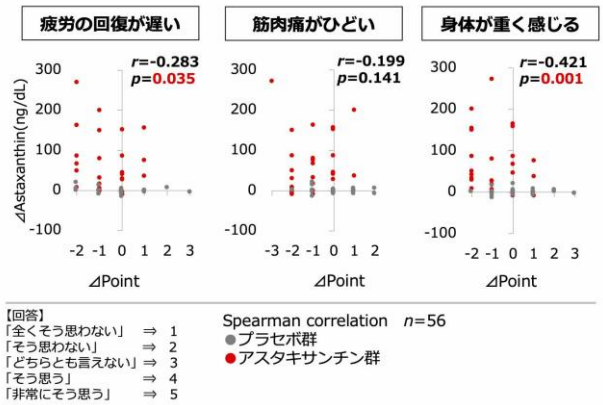
① CK は、アスタキサンチン群で有意に低値を示した。

② AST は、両群共に低下傾向であり、アスタキサンチン群の方が低値を示す傾向にあった。

③ LDH は、プラセボ群のみ低下傾向であったが、群間比較ではアスタキサンチン群の方が低値を示す傾向にあった。

結果3 問診回答点数とCKの相関(変化量)





結果3：問診回答点数と CK の相関

① 「筋肉痛がひどい」の問診に対して、CK と有意な正の相関が認められた。

② 「疲労の回復が遅い」「身体が重く感じる」の問診に対して、血中アスタキサンチン濃度と有意な負の相関が認められた。

5. 結論

① アスタキサンチン群は、プラセボ群に比較して「疲労の回復が遅い」「筋肉痛がひどい」「身体が重く感じる」と回答した選手は少なく、アスタキサンチン摂取が疲労回復に寄与する可能性が示された。

② アスタキサンチン群は、プラセボ群に比較して筋肉痛の有意な改善が得られ、CK も有意に低かったことから、

③ アスタキサンチン摂取は運動による筋肉損傷を軽減することが示された。

④ 血中アスタキサンチン濃度の高い人ほど「疲労の回復が 遅い」「身体が重く感じる」と感じている選手は少なく、血中アスタキサンチン濃度を高めることで疲労回復につながる可能性が示された。

4. 引用文献

[1] Djordjevic B et al. J Sports Med Phys Fitness, 52,382 (2012)

[2] Baralic et al. Evid Based Complement Alternat Med, 2015,783761(2015). doi: 10.1155/2015/783761

[3] Díaz AC, et.al. J Agric Food Chem. 62(51), 12326 (2014)

6. 業績

【論文発表】

1) S.Kojima, N.Watanabe N, S.Takashimizu, K.Anzai, S.Tsuda, H. Ito, J Nagata, Ichikawa H, Shiraishi K, Y,Nishizaki. Effects of changes in drinking habits on lifestyle-related diseases. Health Evaluation and Promotion, 46(4), 431-437 (2019)

【学会等発表】

<国際学会:シンポジウム>

1) Y. Nishizaki. The anti-aging health check-up system: A new concept-based health evaluation and promotion focused on progressing super-ageing society in Japan. The 11th International Association of Gerontology and Geriatrics Asia/Oceania Regional Congress, International Symposium.Taipei, October 23-27 2019.

<国際学会:一般演題>

1) Y.Nishizaki, N.Urata, T.Shibata, E.Kikuchi, C.Yamada, S.Takashimizu, A.Kubo, N.Kishimoto, N.Ishii. Influence on atherosclerosis risks caused by BMI changes. 第60回日本人間ドック学会総会(国際セッション).岡山, 2019 年7月 26 日

<国内学会:シンポジウム>

1) 西﨑泰弘: 超高齢社会に最適な健診とそのありかたについて. 第 30 回日本医学会総会 2019 中部. 名古屋, 2019 年 4 月 27 日
2) 西﨑泰弘、茂出木成幸、菊池真大、菊地恵観子、高清水眞二、後田奈々、山田千積、岸本憲明、久保明、石井直明:消化器諸器官におけるアンチエイジングについて. 第 19 回日本抗加齢医学会総会. 横浜, 2019 年 6 月 14 日
3) 西﨑泰弘、高清水眞二、菊池真大、鈴木秀和、塩澤宏和、茂出木成幸、山田千積、岸本憲明:本邦におけるがん検診の現状と問題点. 日本総合健診医学会第 48 回大会. 東京, 2020 年 2 月 7 日

＜国内学会:一般演題＞

1) 山田千積、後田奈々、奥野智織、小田夏奈江、久保明、岸本憲明、木村守次、豊田雅夫、西﨑泰弘:抗酸化ビタミンと糖尿病との関連－東海大学東京病院抗加齢ドック受診者における検討－. 第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会. 仙台, 2019 年 5 月 25 日
2) 菊地恵観子、山鹿由莉、尾形珠恵、峰明奈、後田奈々、富永久美、本江信子、平島梨夏、岸本憲明、両角速、西﨑泰弘: 大学陸上競技部の長距離選手を対象としたアスタキサンチンの効果に関する検討. 第 19 回日本抗加齢医学会総会. 横浜, 2019 年 6 月 15 日
3) 山鹿由莉、菊地恵観子、尾形珠恵、富永久美、本江信子、平島梨夏、後田奈々、高清水眞二、岸本憲明、両角速、西﨑泰弘: アスタキサンチンサプリメントの筋原性マーカー抑制効果について～東海大学駅伝部男子学生での検討. 日本スポーツ栄養学会 第6回大会. 東京, 2019 年 8 月 25 日
4) 菊地恵観子、山鹿由莉、尾形珠恵、峰明奈、後田奈々、富永久美、本江信子、平島梨夏、岸本憲明、両角速、西﨑泰弘: アスタキサンチン介入が運動後の筋損傷と疲労度に与える影響について～大学陸上競技部長距離選手を対象とした検討. 第 15 回 アスタキサンチン研究会. 札幌, 2019 年 9 月 20 日
5) 青木雄大、菊池真大、岸本憲明、吉田和敬、相澤宏一、菅原大行、西﨑泰弘: ブロッコリースプラウト抽出物が睡眠に与える影響の探索. 第 41 回日本臨床栄養学会総会・第40回日本臨床栄養協会総会 第17回大連合大会. 名古屋, 2019 年 10 月 26 日
6) 平島梨夏、本江信子、富永久美、菊地恵観子、山鹿由莉、尾形珠恵、峰明奈、後田奈々、岸本憲明、西﨑泰弘: アスタキサンチン摂取が長距離陸上選手の高地トレーニングに及ぼす効果～大学駅伝選手における検討. 第 30 回日本臨床スポーツ医学会学術集会. 横浜, 2019 年 11 月 16 日
7) 岸本憲明、後田奈々、陰山康成、行松伸成、峰明奈、山田千積、高清水眞二、護山健悟、椎名豊、西﨑泰弘:LDL コレステロール 100mg/ml 未満における包括的動脈硬化リスク評価と推定 LDL 粒子サイズの関係性について検討. 日本総合健診医学会第 48 回大会. 東京, 2020 年 2 月 7 日
8) 菊地恵観子、大庭陽子、千坂なぎ、菅原理代、佐藤聖子、西﨑泰弘、石垣洋子、森山紀之: 大豆製品摂取が健康診断結果に与える影響. 日本総合健診医学会第 48 回大会. 東京, 2020 年 2 月 7 日
9) 増田由美、岸本憲明、護山健悟、後田奈々、峰明奈、奥野智織、山田千積、高清水眞二、久保明、西﨑泰弘:女性における HDL コレステロール値と睡眠の関係. 日本総合健診医学会第48回大会. 東京, 2020年 2 月 7 日
10) 後田奈々、岸本憲明、柴田健雄、行松伸成、陰山康成、峰明奈、山田千積、高清水眞二、椎名豊、西﨑泰弘:肥満者における BMI 低下が生活習慣病関連諸因子に与える影響について. 日本総合健診医学会第 48 回大会. 東京, 2020 年 2 月 7 日

11) 山田千積、後田奈々、峰明奈、行松伸成、奥野智織、増田由美、高清水眞二、岸本憲明、田中清、西﨑泰弘：血中ホモシステイン濃度とビタミン B 栄養状態、筋力、体組成との関係. 日本総合健診医学会第 48 回大会. 東京, 2020 年 2 月 7 日
12) 奥野智織、山田千積、行松伸成、後田奈々、茂出木成幸、久保明、護山健悟、高清水眞二、岸本憲明、西﨑泰弘：抗加齢ドック受診者における血清ホモシステインと動脈硬化に関する検討. 日本総合健診医学会第 48 回大会. 東京, 2020 年 2 月 7 日
13) 護山健悟、岸本憲明、椎名豊、後田奈々、増田由美、小田夏奈江、山田千積、高清水眞二、久保明、西﨑泰弘：オレイン酸・ステアリン酸比とインスリン抵抗性の関係. 日本総合健診医学会第 48 回大会. 東京, 2020 年 2 月 7 日
14) 山鹿由莉、菊地恵観子、尾形珠恵、後田奈々、奥野智織、行松伸成、山田千積、高清水眞二、岸本憲明、西﨑泰弘:腕時計 Fitbit と各種タイプ別歩数計の比較検討～活動量の相同性と運動指導における注意点. 日本総合健診医学会第 48 回大会. 東京, 2020 年 2 月 8 日
15) 高清水眞二、橋本みな美、後田奈々、山田千積、行松伸成、岸本憲明、仁科良、椎名豊、西﨑泰弘：当院健診受信者における嚢胞性膵疾患の検討. 日本総合健診医学会第 48 回大会. 東京, 2020 年 2 月 8 日

＜特別講演・招待講演・教育講演＞

1) 西﨑泰弘：サプリメントと内科系治療薬の意外な関係. 2019 年度 NR・サプリメントアドバイザーレベルアップセミナー. 東京, 2019 年 6 月 30 日
2) 西﨑泰弘：本邦における「がんけんしん」の現状と課題. 厚木医師会学術講演会. 神奈川, 2019 年 7 月 11 日
3) 西﨑泰弘：人生 100 年時代の予防医療. 東海大学同窓会京都支部講演会：京都, 2019 年 5 月 26 日
4) 西﨑泰弘：人生 100 年時代の予防医療～サクセスフルエイジングを目指して～. 第 17 回医療検査センター期末報告会：東京, 2019 年 4 月 18 日
5) 西﨑泰弘：人生 100 年時代の予防医学. 株式会社ゾネシステムズ第 16 回安全大会：東京, 2019 年 7 月 6 日
6) 西﨑泰弘：高齢期をいきいきと過ごすには. いきいき健康講座：神奈川, 2019 年 9 月 9 日
7) 西﨑泰弘：働く女性のための美しい姿勢作りと歩き方. 三井不動産ビルマネジメントセミナー：東京, 2019 年 10 月 31 日
8) 西﨑泰弘：人生 100 年時代の予防医療～健やかで豊かに年齢(とし)を重ねる秘訣とは～. 港区介護フェスティバル：東京, 2019 年 11 月 13 日
9) 西﨑泰弘：人生 100 年時代の予防医療～健やかで豊かに年齢(とし)を重ねる秘訣とは～. 港区介護フェスティバル：東京, 2019 年 11 月 13 日
10) 西﨑泰弘：超高齢社会における問題点：サルコペニア・ロコモ・フレイル予防の重要性. 健康長寿セミナー（抗加齢講演会）. 東京(日本橋), 2019 年 11 月 9 日
11) 西﨑泰弘：天然アスタキサンチンのさまざまな優れた効果. 日本総合健診医学会第 48 回大会. ランチョンセミナー6. 東京, 2020 年 2 月 8 日

7. 謝辞

研究費のご支援と本稿執筆の機会を与えて下さいました平山令明先生に心より感謝申し上げます。今回の共同研究の機会をお与え下さいました、本学田中誠一名誉教授とアスタリール（株）西田光徳会長に深謝申し上げます。本研究の遂行にあたり多大なる援助をいただきました、特定非営利活動法人 健康長寿研究教育センターの一野谷陽一副理事長をはじめとする社員の方々、さらに東海大学医学部大学院医学研究科ライフケアセンターの先生方に厚く御礼申し上げます。

リボン状マイクロファイバーの創製とにおい分子包接能評価

Fabrication of Ribbon-Shaped Microfibers and Inclusion Ability of Odor Molecules

Paopinij Kitikunanont[1], Pinyo Mekwatanakarn[1], 樋口 昌史[1-3], 伊藤 建[3,4], 小口 真一[3,4], 岡村 陽介[1-3]*
[1] 東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻, [2] 東海大学工学部応用化学科
[3] 東海大学先進生命科学研究所・香粧品部門, [4] 東海大学理学部化学科
*Paopinij Kitikunanont[1], Pinyo Mekwatanakarn[1], Masashi Higuchi[1-3], Takeru Ito[3,4], Shinichi Koguchi[3,4], and Yosuke Okamura[1-3]**
[1]Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, [2] Department of Applied Chemistry, School of Engineering, [3]Division of Cosmetic Science, Institute of Advanced Biosciences, [4]Department of Chemistry, School of Science, Tokai University.

［要旨］
日常生活において「におい」は密接に関与しており、生活空間のにおいを制御することは、生活の質の向上に繋がると考えられる。本研究では、におい分子を包接するシクロデキストリン(CD)を担持させたリボン状マイクロファイバーを創製した。特に、電界紡糸法でポリマー溶液を紡糸する際、溶媒の表面張力や沸点を考慮することでファイバーの形状をリボン状に制御できることを見出した。におい分子としてリナロールを選定し、CD 担持ファイバーへの包接能を評価したところ、CD 未担持体と比較して有意に包接されることを実証した。

［Abstract］
Fragrance products have been paid attention to improvement of quality of life. However, their effect is often insufficient due to short-term evaporation of odor molecules. In this study, we fabricate ribbon-shaped microfibers composed of polystyrene carrying cyclodextrin (CD), which can be adsorbed odor molecules. Their inclusion ability of linalool was significantly increased compared to control microfibers without CD.

［Key Words］
ribbon-shaped microfibers, cyclodextrin, linalool

1. はじめに

「におい」は我々の日常生活に密接に関わっている。「におい」によって気分が落ち着く、あるいは不快な悪臭が人体に影響を及ぼすなど、「におい」は生活の質(QOL) の向上を狙う上で重要な因子のひとつといえる。近年、「におい」を制御するために、芳香・消臭能を有する香粧品が市場で多く出回っているが、におい成分は揮発性が高い他、汗などで有効成分が流れてしまうため効果の持続性が課題となっている。

高分子ファイバーは、繊維の細さゆえに発現する高い比表面積を活かして環境や医療分野への応用が期待されているマテリアルのひとつである[1]。他方、シクロデキストリン (CD) は、D-グルコースが α-1,4 グリコシド結合によって結合し環状構造をとった環状オリゴ糖であり、におい分子を包接するためのキャリアとしての利用が多く報告されている[2]。

本研究では、両材料の特性を有する CD を担体したマイクロファイバーを創製し、におい分子包接能を付与した香粧品としての可能性を検証することを目的とした。特に、ここでは、ファイバーの形状に注目し、リボンのような面をもつ構造にすることで、皮膚などへの接着性の向上を狙う。

2. 結果の概要

1) リボン状マイクロファイバーの創製

電界紡糸法には NANON-03 (メック社製) を用いた(図 1 (a))。ポリスチレン (PS, M_W: 260 kDa, 30 wt%, Acros Organics 製) の DMF 溶液 (4 mL) あるいは THF 溶液 (4 mL) をシリンジ (ノズル径 27G) に注入し、アルミホイルをターゲットとして 1 分間紡糸した (ノズル-ターゲット間距離: 150 mm, 溶液送り速度: 1.0 mL/h, 印加電圧: 30 kV)。得られたファイバーを走型査電子顕微鏡 (FE-SEM S-4800, 日立ハイテクノロジーズ社製) にて観察し、繊維径を測定した。

上述の条件で PS の DMF 溶液を紡糸したところ、不織布様に回収できた。その表面を電顕観察したところ、シ

リンダー状の均一なマイクロファイバーであり、平均繊維径は約 4.8 μm と算出された (図 1 (b))。得られたファイバーは多孔質な表面を有していた。他方、溶媒を THF に変更して紡糸したところ、同様に不織布様に回収できた。電顕観察したところ、幅 8.2 μm、厚さ約 2.2 μm のリボン状に変形したファイバーが得られた (図 1 (c))。これは、THF の表面張力は DMF と比較して低いため、ノズルから噴射された直後の溶液はシリンダー状を維持できずにリボン状に変形するとともに、沸点が低いため瞬時に揮発してリボン状で固化したためと考えられ、既報の理論[3]を支持するものであった。したがって、溶媒の表面張力や沸点を考慮することでリボン状のマイクロファイバーを調製できることを見出した。

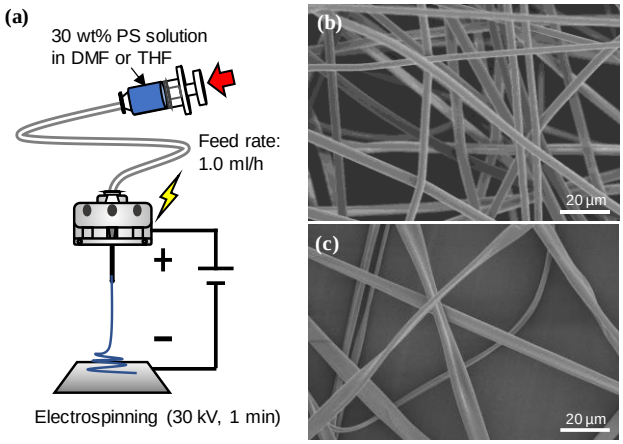


図 1 電界紡糸法を用いた PS マイクロファイバーの調製.
(a) 電界紡糸装置の概略図. (b) PS の DMF 溶液を紡糸した際の電子顕微鏡写真. (c) PS の THF 溶液を紡糸した際の電子顕微鏡写真.

2) におい分子包接能評価

得られたリボン状マイクロファイバー (*ca.* 20 × 20 mm) をβ-CD 水溶液 (15 mg/mL, 4 mL) に浸漬させた後、乾燥操作 (70 ºC, 1 h) を経て物理吸着させた。におい分子として、ラベンダーの香気主成分であるリナロール (シグマ・アルドリッチ社製) を選定した。密閉容器 (容量 350 mL) 中にリナロール (100 μL) とファイバーを入れて密封し、静置 (r.t., 18 h) した。その後、ファイバーを回収し、アセトン (50 μL) にてファイバーごと溶解させた後、エタノール (50 μL) にて PS とβ-CD を析出させた。遠心分離にて上清を回収し、ガスクロマトグラフィー (GC, GC-8A, 島津製作所製) 分析に供し、リナロールの包接量を定量した。

その結果、β-CD 担持リボン状マイクロファイバーのリナロール包接量は 199 nmol/mg と算出され、β-CD 未担持体 (36 nmol/mg)と比較して、有意に包接されていた。これは、ファイバー表面に吸着させたβ-CD によりリナロールが包接されたことを示唆している。以上より、におい分子を包接できるβ-CD 担持リボン状マイクロファイバーの創製に成功した。

3. 展望

今回、におい分子を包接できるβ-CD 担持リボン状マイクロファイバーの調製に成功した。今後、皮膚への接着性評価やハンドリングの向上等を狙う計画にある。

4. 引用文献

[1] S. Thakkar *et al. Eur. J. Pharm. Sci.* **107**, 148 (2017).
[2] G. Crini. *Chem. Rev.* **114**, 10940 (2014).
[3] S. Koombhongse *et al. J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **39**, 2598 (2001).

5. その他の業績

【学会等発表】

1) 岡村 陽介, 土屋 笙子, 竹本 絵里佳, 窪田 美紗子, 浅羽 建太, 松本 拓也, 中川 篤. におい分子の揮発を制御する“貼るナノ構造体”の創製とその機能. 第 68 回高分子学会年次大会 (2019.5.29, 大阪国際会議場)
2) 浅羽 建汰, 坪井 亮, K. Sitthirat, 伊藤 早也香, 樋口 昌史, 岡村 陽介. ナノ粒子担持ナノファイバーの創製とにおい分子包接能評価. 東海大学マイクロ・ナノ啓発会 (Tμne) 第 11 回学術講演会 (2019.8.24, 東海大学札幌キャンパス)
3) 浅羽 建汰, 坪井 亮, K. Sitthirat, 伊藤 早也香, 樋口 昌史, 岡村 陽介. Fabrication of Nanofibers Carrying Nanoparticles and Their Evaluation on Inclusion Ability of Odor Molecules. 第 29 回日本 MRS 年次大会 (2019.11.28, 横浜)
4) P. Kitikunanont, P. Mekwatanakarn, Y. Okamura. Fabrication of Ribbon-Shaped Nanofibers Composed of Polystyrene for Odor Absorption. 第 29 回日本 MRS 年次大会 (2019.11.28, 横浜)

【受賞】

1) ベストポスター賞. 浅羽 建汰. 東海大学マイクロ・ナノ啓発会 (Tμne) 第 11 回学術講演会 (2019.8.24, 東海大学札幌キャンパス)

6. 謝辞

本研究の一部は、先進生命科学研究所の助成（課題番号 : 2016-C1）、日本学術振興会科学研究費基盤研究(C) (17K01392)により行われた。記して謝意を表する。

東海大学
先進生命科学研究所 紀要編集委員会

委員長	平山　令明	先進生命科学研究所　教授
委員	齋藤　寛	先進生命科学研究所　教授
委員	岡村　陽介	先進生命科学研究所　准教授

本紀要の全ての掲載情報は、著作権者の許諾なしに、著作物の全部または一部を無断で複写複製（コピー）することは、著作権法上での例外を除き、禁じられています。

東海大学先進生命科学研究所紀要

2020 年 3 月 31 日　発行

発行者　東海大学先進生命科学研究所

住所　神奈川県平塚市北金目 4−1−1

電話　0463-58-1211（代表）