

先進生命科学研究所紀要

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

2025 Vol.10



東海大学

先進生命科学研究所

Institute of Advanced Biosciences

Tokai University



<https://www.u-tokai.ac.jp/education-research/research-centers/institute-of-advanced-biosciences/kiyou/>



東海大学先進生命科学研究so紀要

Vol. 10 2025

目次

モウセンゴケ属食虫植物 <i>Drosera rotundifolia</i> 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発現 米田一成 ^{1,2,3,4)} 、成瀬佑樹 ²⁾ 、水津友作 ¹⁾ 、星良和 ^{1,2,3,4)} 、荒木朋洋 ^{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so)1
安静時における若年者の皮膚表面から放散されるイソ吉草酸の部位別分布 佐藤大輔 ¹⁾ 、関根嘉香 ^{1,2)} 、大坂智実 ¹⁾ 、細見晟浩 ¹⁾ 、戸高惣史 ³⁾ (¹⁾ 東海大学大学院理学研究科、 ²⁾ 東海大学先進生命科学研究so、 ³⁾ AIREX 株式会社 技術研究所)6
ニンニク摂取後のジアリルジスルフィドおよびアリルメチルスルフィドの皮膚放散動態 に関する解析 大坂智実 ¹⁾ 、関根嘉香 ^{1,2)} (¹⁾ 東海大学大学院理学研究科、 ²⁾ 東海大学先進生命科学研究so)12
脂肪酸組成の異なる魚油から生成される魚臭成分 中野愛冬 ¹⁾ 、平塚聖一 ^{1,2)} (¹⁾ 東海大学大学院海洋学研究科、 ²⁾ 東海大学先進生命科学研究so・高機能性食品研 究部門)17
PBL-NOG-hPZP マウスにおける xenogenic GVHD 関連炎症の解析 田部洪輔 ¹⁾ 、大野裕介 ^{2,3)} 、柏木寛史 ¹⁾ 、大岩一平 ¹⁾ 、中嶋理恵 ¹⁾ 、石本人士 ¹⁾ 、伊藤 亮治 ²⁾ 、椎名隆 ^{3,4)} 、亀谷美恵 ^{2,3,4)} (¹⁾ 東海大学医学部産婦人科学、 ²⁾ 公益財団法人実中研、 ³⁾ 東海大学医学部基礎医学 系分子生命科学、 ⁴⁾ 東海大学先進生命科学研究so)22

(総説) ヒルガオ科植物由来樹脂配糖体による HL-60 に対する細胞毒性およびリパーゼ阻害作用

西川大貴^{1,2)}、小野政輝^{1,3)}、安田伸^{1,2,3,4)}

(¹⁾ 東海大学大学院生物科学研究科、²⁾ 東海大学総合農学研究所、³⁾ 東海大学農学部食生命科学科、⁴⁾ 東海大学先進生命科学研究所・高機能食品開発部門)

……………27

(総説) 小胞体内で織り成されるジスルフィド結合形成ネットワーク：協同的酵素機構とその模倣によるタンパク質生産効率向上の可能性

岩本駿平¹⁾、荒井 堅太^{1,2)}

(¹⁾ 東海大学大学院理学研究科、²⁾ 東海大学先進生命科学研究所)

……………32

光応答性保護基を有するホスホロアミダイト試薬の合成とリン酸化・光脱保護挙動の検討

小林晴香¹⁾、小口真一^{1,2)}

(¹⁾ 東海大学理学部化学科、²⁾ 東海大学先進生命科学研究所)

……………38

深層 AI 生成動画を用いた EEG 脳活動への非侵襲介入法：対照学習型動画処理オートエンコーダを用いた検討

倉重宏樹^{1,2,3)}、永田栄一郎^{3,4)}

(¹⁾ 東海大学情報通信学部、²⁾ 東海大学情報技術センター、³⁾ 東海大学先進生命科学研究所、⁴⁾ 東海大学医学部脳神経内科)

……………47

加齢臭予防を指向した抗酸化剤含侵ゲルナノ薄膜の創製と機能評価

坂井亜由美¹⁾、岩松宏徳¹⁾、小口真一^{2,4,5)}、伊藤建^{2,5)}、樋口昌史^{1,3,4,5)}、岡村陽介^{1,3,4,5)}

(¹⁾ 東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、²⁾ 東海大学理学部化学科、³⁾ 東海大学工学部応用化学科、⁴⁾ 東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター、⁵⁾ 東海大学先進生命科学研究所・感覚機能研究部門)

……………53

NOG-hIL-4-Tg マウスに生着した免疫細胞に対する Silibinin の効果の解析

宮澤麻里子¹⁾、大島志乃²⁾、田部洪輔¹⁾、廣田綾子³⁾、星野優希²⁾、岩尾佳代子⁴⁾、

田中幸恵⁴⁾、飯田裕美⁴⁾、東瀬戸美咲⁴⁾、馬淵智生³⁾、石本人士¹⁾、椎名隆^{2,5)}、亀谷美恵^{2,5)}

(¹⁾ 東海大学医学部専門診療学系産婦人科学、²⁾ 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、³⁾ 東海大学医学部専門診療学系皮膚科学、⁴⁾ 東海大学医学部附属病院研究イノベーションセンター 生命科学統合支援室、⁵⁾ 東海大学先進生命科学研究所)

……………56

還元型セレノグルタチオンはグリオキサラーゼ 1 様の触媒活性を有する金森審子^{1,2,3)}、陳詩文²⁾(1) 東海大学工学部生物工学科、²⁾ 東海大学大学院工学研究科、³⁾ 東海大学先進生命科学研究所)

……………62

多変量解析による桜島火山周辺河川水の特徴豊島誠也^{1,3)}、大場武²⁾、沼波望²⁾(1) 東海大学先進生命科学研究所、²⁾ 東海大学理学部化学科、³⁾ 東海大学総合理工学研究科総合理工学専攻)

……………67

磁気共鳴画像化法と 2 光子顕微鏡画像のテクスチャ解析によるマウス脳内の Neurofluid 動態の定量評価村山敬太^{1,2)}、小林勇登³⁾、八ツ代論^{4,5)}、黒田輝^{1,2,3,5)}(1) 東海大学大学院総合理工学研究科総合理工学専攻、²⁾ 東海大学先進生命科学研究所、³⁾ 東海大学大学院工学研究科電気電子工学専攻、⁴⁾ Bioview 株式会社、⁵⁾ 東海大学情報理工学部情報科学科)

……………72



Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

Vol. 10 2025

CONTENTS

Cloning and Heterologous Expression of a Chitinase Gene from the Carnivorous Plant <i>Drosera rotundifolia</i> Kazunari Yoneda ^{1,2,3,4} , Yuki Naruse ² , Yusaku Suizu ¹ , Yoshikazu Hoshi ^{1,2,3,4} , and Tomohiro Araki ^{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)1
Regional Distribution of Isovaleric Acid Released from Skin Surface of Young Humans at Rest Daisuke Sato ¹ , Yoshika Sekine ^{1,2} , Tomomi Osaka ¹ , Akihiro Hosomi ¹ , and Michihito Todaka ³ (¹ Course of Chemistry, Graduate School of Science, Tokai University, ² Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³ R&D laboratory, AIREX Inc.)6
Kinetics of Dermal Emissions of Diallyl Disulfide and Allyl Methyl Sulfide After Ingestion of Grilled Garlic Tomomi Osaka ¹ and Yoshika Sekine ^{1,2} (¹ Graduate School of Science, Tokai University, ² Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)12
Fishy Odor Compounds Generated from Fish Oils with Different Fatty Acid Composition Mafuyu Nakano ¹ and Seiichi Hiratsuka ^{1,2} (¹ Graduate School of Oceanography, Tokai University, ² Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)17
Analysis of xenogeneic GVHD-related inflammation in PBL-NOG-hPZP mouse Kosuke Tabe ¹ , Yusuke Ohno ^{2,3} , Hirofumi Kashiwagi ¹ , Ippei Ohiwa ¹ , Rie Nakajima ¹ , Hitoshi Ishimoto ¹ , Ryoji Ito ² , Takashi Shiin ^{3,4} , and Yoshie Kametani ^{2,3,4} (¹ Department of Gynecology, Tokai University School of Medicine, ² Central Institute for Experimental Medicine and Life Science (CIEM), ³ Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, ⁴ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)22

(Review) Cytotoxicity against HL-60 Cells and Lipase Inhibiting Activity by Resin Glycosides from Convolvulaceae Plants

Hiroataka Nishikawa^{1,2)}, Masateru Ono^{1,3)}, and Shin Yasuda^{1,2,3,4)}

(¹) Graduate School of Bioscience, Tokai University, (²) Research Institute of Agriculture, Tokai University, (³) Department of Food and Life Sciences, School of Agriculture, Tokai University, (⁴) Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....27

(Review) Disulfide Bond Formation Networks in the Endoplasmic Reticulum: Cooperative Enzymatic Mechanisms and Their Mimicry for Improving Protein Production Efficiency

Shunpei Iwamoto¹⁾ and Kenta Arai^{1,2)}

(¹) Graduate School of Science, Tokai University, (²) Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....32

Synthesis of Photolabile Protecting Group-Bearing Phosphoramidite Reagents and Investigation of Their Phosphorylation and Photodeprotection Behavior

Haruka Kobayashi¹⁾ and Shinichi Koguchi^{1,2)}

(¹) Department of Chemistry, Tokai University, (²) Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....38

Non-invasive intervention method for EEG brain activity using deep AI-generated video: using a video processing autoencoder pretrained via contrastive learning

Hiroki Kurashige^{1,2,3)} and Nagata Eiichiro^{3,4)}

(¹) School of Information Telecommunication Engineering, Tokai University, (²) Research & Information Center (TRIC), Tokai University, (³) Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, (⁴) Department of Neurology, School of Medicine, Tokai University)

.....47

Fabrication and Evaluation of Biocompatible Gel Nanosheets Containing Antioxidants for Preventing Aged-Related Body Odor

Ayumi Sakai¹⁾, Hironori Iwamatsu¹⁾, Shinichi Koguchi^{2,4,5)}, Takeru Ito^{2,5)},

Masashi Higuchi^{1,3,4,5)}, and Yosuke Okamura^{1,3,4,5)}

(¹) Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, (²) Department of Chemistry, School of Science, (³) Department of Applied Chemistry, School of Engineering,

(⁴) Micro/Nano Technology Center, (⁵) Division of Sensory Function, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....53

Silibinin effects on immune cell engrafted in NOG-hIL-4Tg mouse

Mariko Miyazawa¹⁾, Shino Oshima²⁾, Kousuke Tabe¹⁾, Ayako Hirota³⁾, Yuki Hoshino²⁾, Kayoko Iwao⁴⁾, Sachie Tanaka⁴⁾, Yumi Iida⁴⁾, Misaki Higashiseto⁴⁾, Tomotaka Mabuchi³⁾, Hitoshi Ishimoto¹⁾, Takashi Shina^{2,5)}, and Yoshie Kametani^{2,5)}

(¹⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, Tokai University School of Medicine, ²⁾ Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine, ³⁾ Department of Dermatology, Tokai University School of Medicine, ⁴⁾ Department of Life Science Support, Tokai University, ⁵⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....56

Reduced selenogluthathione has glyoxalase 1-like catalytic activity

Akiko Kanamori^{1,2)} and Shiwen Chen²⁾

(¹⁾ Department of Bioengineering, School of Engineering, Tokai University, ²⁾ Graduate School of Engineering, Tokai University, ³⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....62

Characteristics of river water around Sakurajima volcano estimated by multivariate analysis

Seiya Toyoshima^{1,3)}, Takeshi Ohba²⁾, and Nozomi Numanami²⁾

(¹⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ²⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, ³⁾ Course of Science and Technology, Graduate School of Science and Technology, Tokai University)

.....67

Quantitative evaluation of neurofluid dynamics in the mouse brain via texture analysis between magnetic resonance imaging and two-photon microscopy

Keita Murayama^{1,2)}, Yuto Kobayashi³⁾, Satoshi Yatsushiro⁴⁾, and Kagayaki Kuroda^{1,2,3,4)}

(¹⁾ Course of Science and Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Tokai University, ²⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³⁾ Course of Electrical and Electronic Engineering, Graduate School of Engineering, Tokai University, ⁴⁾ Bioview, Inc., ⁵⁾ Department of Human and Information Science, School of Information Science and Technology, Tokai University)

.....72



モウセンゴケ属食虫植物 *Drosera rotundifolia* 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発現

Cloning and Heterologous Expression of a Chitinase Gene from the Carnivorous Plant *Drosera rotundifolia*

米田 一成^{1,2,3,4*}、成瀬 佑樹²、水津 友作¹、星 良和^{1,2,3,4}、荒木 朋洋^{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}, Yuki Naruse², Yusaku Suizu¹, Yoshikazu Hoshi^{1,2,3,4}, Tomohiro Araki^{2,3,4}

¹School of Agriculture, Tokai University, ²Graduate School of Agriculture, Tokai University, ³Graduate School of Bioscience, Tokai University, ⁴Institute 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@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 rotundifolia* 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. rotundifolia* 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、Met¹-Ala²⁰ のアミノ酸残基を除去した配列(Val²¹-Ser³²⁵)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、大腸菌および、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いて遺伝子の発現を行った。その結果、*P. pastoris* を用いることで、僅かではあるが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]

To investigate the function and structure of the digestive enzyme chitinase from the insectivorous plant *Drosera rotundifolia* (sundew), we conducted gene cloning. From the genomic information, we identified a GH19 chitinase classified as a class I chitinase derived from *D. rotundifolia*. Since the N-terminal 20 amino acid residues correspond to a signal peptide, we synthesized a gene encoding the sequence from Val21 to Ser325, excluding the Met1-Ala20 region. The gene was then ligated into a protein expression vector and expressed in *Escherichia coli* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. As a result, we demonstrated that expression in *P. pastoris* enabled the production of an enzyme with detectable, albeit low, chitinase activity.

[Key Words]

Chitinase, Gene cloning, Enzyme expression, Carnivorous sundew plant, *Drosera rotundifolia*

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。本酵素は多様な生物に存在し、甲殻類や昆虫では脱皮や成長、真菌では細胞分裂に関与することが報告されている。一方、キチンを持たない生物においてもキチナーゼは重要な役割を果たしており、甲殻類の殻病菌ではキチ

ン資化に利用され、植物では病害応答性タンパク質 (Pathogenesis-Related Protein, PR タンパク質) の一種として微生物感染に対する防御機構に関与することが知られている[1]。このように、キチナーゼは基礎研究においては生物間相互作用や進化の理解に資する酵素であり、応用研究においては抗菌性タンパク質としての利用や有用オリゴ糖の生産に寄与し得ることから、その研究の意義は大きい。一般的にキチナーゼは「病害

抵抗性酵素」として植物防御に関与するが、食虫植物においては、この酵素が機能転換し「昆虫消化用酵素」として利用されるという非常に稀な事例が存在する。食虫植物由来キチナーゼの機能や構造に関しては未解明な点が多く残されており、これを明らかにすることは進化的観点および応用的観点の両面から重要である。

モウセンゴケ属 (*Drosera*) の食虫植物は、近年ゲノム解読が進められているだけでなく[2]、抽出物中から抗アレルギー活性を有する化合物が見出されていることから[3]、学術的および応用的に注目を集めている。中でも *Drosera rotundifolia* は、スプーン状の葉に密生する粘毛によって昆虫を捕獲し、粘毛から分泌されるキチナーゼによって昆虫外骨格の主要成分であるキチンを分解する。

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. rotundifolia* 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(AMM76171.1)を見出した。本酵素は 325 アミノ酸残基で構成されている約 32 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[4]。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[5]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 Glu149, Glu171 であり、アミノ酸配列から予測される SS 結合は 7 つであった (図 1)。

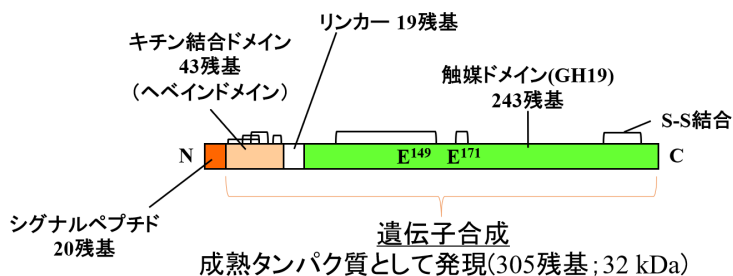


図 1. *D. rotundifolia* 由来キチナーゼのドメイン構造の概要。Proton donor として機能すると予測される触媒残基 Glu149(グルタミン酸; E149)および、水分子の求核性を高めるために機能する触媒残基 Glu171(E171)を示した。

2. 結果の概要

1) *D. rotundifolia* 由来キチナーゼ遺伝子のクローニング 1 (大腸菌における細胞内発現用)

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腸菌を宿主細胞に用いて大量に発現させた。*D. rotundifolia* 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、Met¹-Ala²⁰のアミノ酸残基を除去した配列 (Val²¹-Ser³²⁵) をコードする遺伝子を Azenta Life Sciences に依頼し合成した (表 1)。また、人工合成遺伝子は 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 pET22b ベクターおよび pCold I、pCold IV、pCold ProS2 ベクターにライゲーションを行った。すなわち、人工合成遺伝子(pUC57/Chitinase)を *Nde* I、*Bam* HI で処理し、アガロースゲル電気泳動した後、*D. rotundifolia* 由来キチナーゼ遺伝子のバンド(930 bp)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 および pCold ベクターも同じ制限酵素で処理し、16°C、16 時間インキュベートし *D. rotundifolia* 由来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。大腸菌の形質転換は塩化カルシウムで処理したコンピテントセルを用いて、ヒートショック法で行った。

2) *D. rotundifolia* 由来キチナーゼ遺伝子のクローニング 2 (酵母における分泌発現用)

食虫植物のキチナーゼは本来細胞外の酵素であり、*D. rotundifolia* 由来キチナーゼは S-S 結合 (ジスルフィド結合) を 7 つ有していることから、大腸菌の菌体内での発現ではなく、細胞外に分泌発現する酵母発現系が酵素の生産に適しているという報告があるため[6]、酵母発現用ベクター pPIC9K にクローニングを行った。すなわち、人工合成遺伝子を鋳型 DNA として、フォワードプライマー ; GAATTCGTTCAATGCGGTAGCGAAGTTGGC (下線部は *Eco* RI サイト)および、リバープライマー ; GCGGCCGCTTAGCTAAACGGGCGCTGGTTG (下線部は *Not* I サイト)を使用して、PCR で増幅することで、制限酵素サイトを *D. rotundifolia* 由来キチナーゼ遺伝子に付加した。その後、*Eco* RI、*Not* I 処理し、アガロースゲル電気泳動し、上記と同様の方法で pPIC9K ベクターにライゲーションを行った。PCR 後の塩基配列の確認は、東海大学 生命科学統合支援センターの核酸部

門に依頼分析を行った。また、酵母の形質転換は pPIC9K/キチナーゼベクターを *Sal*I で直鎖状に切断後、LiOAc 法 (酢酸リチウム法) を用いて行った。

表 1. *D. rotundifolia* キチナーゼの塩基配列

<i>D. rotundifolia</i> endochitinase (AMM76171.1)	
1	CAT ATG GTT CAA TGC GGT AGC GAA GTT GGC GGT GCG
37	CTG TGC CCG AAT GGT CTG TGC TGC AGC AAA TAC GGT
73	TAC TGC GGC ACG ACG AGT GCG TAC TGT GGT CCG GGT
109	TGC CAG AGC CAG TGT GGT GGC AGC AGC CCA CCA CCA
145	GCG CCA CCA AGT CCA ACG CCA AGC CCG CCA AGT CCA
181	AGC GGT GGT GGT GAC GTT AGC AGT ATC ATC ACC AGC
217	CAG ATC TTT AAC CAG ATG CTG CTG CAC CGC AAT GAT
253	AAC GCG TGC CCG GCG AAC GGC TTT TAC AGC TAC CAA
289	GCC TTT CTG GAT GCG GCG CGC AAA TTT AGT GGC TTT
325	GGC ACC ACC GGC GAC ATT AAC ACC CGT AAA AAG GAG
361	CTG GCG GCG TTT TTC GGT CAG ACC AGT CAT GAA ACG
397	ACG GGT GGT TGG CCA ACG GCG CCA GAT GGC CCG TAC
433	GCG TGG GGC TAC TGC TTC AAG CAA GAA CAA GGC AAT
469	CCG GGC GAC CAT TGC GTG CAG AGC AGT AGC TAC CCG
505	TGT GCG CCG GGC AAG AAG TAC TAC GGT CGC GGC CCG
541	ATC CAG ATC AGC TAC AAC TAC AAC TAC GGC CAG TGC
577	GGC GCG GCG ATC AAT CAG CCA CTG CTG AGC AAC CCG
613	GAT CTG GTG GCG AGC AAT GCC GGT GTT AGC TTT GAG
649	ACC GCC ATC TGG TTC TGG ATG ACC CCA CAA GGC AGC
685	AAA CCA AGC TGT CAC GCC GTT GCG ACC GGC CAA TGG
721	ACC CCA AGT GCG GCC GAT CAA GCG GCC GGT CGT GTT
757	CCG GGC TAT GGC GTG ATC ACC AAC ATC ATC AAT GGC
793	GGC GTT GAG TGC GGT AAA GGT ACC GTT CCG CAA GTT
829	GCC GAT CGC ATC GGC TTC TAC CAG CGC TAC TGC AGC
865	ATC GTT GGT ATC AGC CCG GGC GGC AAT CTG GAC TGC
901	TAC AAC CAG CGC CCG TTT AGC TAA <u>GGA</u> <u>TCC</u>

制限酵素サイトを下線で、開始・終始コドンに太字で示した。

3) 大腸菌を用いた *D. rotundifolia* 由来キチナーゼの発現

大腸菌 BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL 株および、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°C で 6 時間培養を行った。その後、pET22b ベクターの場合は、IPTG を終濃度 1 mM になるように加えて 37°C で 3 時間の発現誘導を行った。

pCold 系ベクターの場合、15°C、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碎を行った。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。

pET22b ベクターおよび pCold I、pCold IV、pCold ProS2 ベクターを使用した場合、発現が確認できたのが、pCold I ベクターであった (図 2)。しかし、Talon アフィニティーカラムの溶出画分のバンドが薄く (図 2、レーン 4,5,9,10)、酵素が僅かしか得られないことが明らかになった。また、0.1 mM *p*-Nitrophenyl Penta-*N*-acetyl-chitopentaoside ; pNp-(GlcNAc)₅ と 0.1 M 酢酸バッファー pH 5.5 を用いて、キチナーゼの活性測定を 405 nm で行ったが、活性の検出はできなかった。また、pCold I 以外のベクターで発現させた場合には酵素の発現は全く確認できなかった。

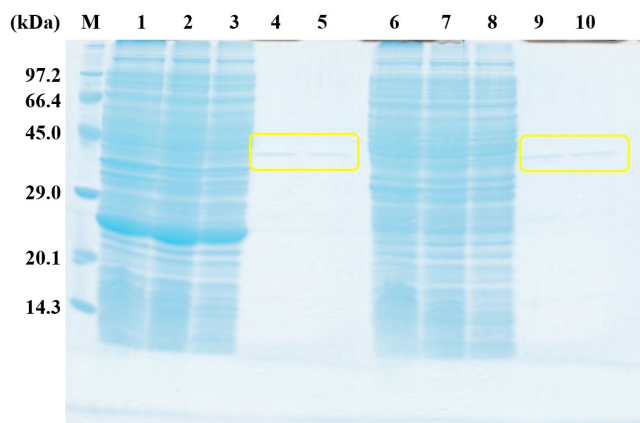


図 2. SDS-PAGE による pCold I/キチナーゼの発現、精製の確認。M ; 分子量マーカー、1,6 ; キチナーゼの細胞破碎溶液、2,7 ; キチナーゼの粗酵素、3,8 ; キチナーゼの Talon スルー、4,5,9,10 ; キチナーゼの Talon 溶出画分。黄色の枠は精製後のキチナーゼを示している。1~5 番は大腸菌 BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL 株を使用した発現結果。6~10 番は大腸菌 SHuffle T7 株を使用した発現結果。

4) 酵母を用いた *D. rotundifolia* 由来キチナーゼの小スケール発現

形質転換後の酵母 (*Pichia pastoris* GS115 株) を MD 寒天培地 (選択培地) にプレーティングし培養することで、

形質転換体のスクリーニングを行った。さらに G418 抵抗性 (0.3-1.8 mg/mL)によるスクリーニングを行うことで、高発現株の取得を行った。10 個の酵母のコロニーをそれぞれ 1 mL BMGY 培地 (Buffered Glycerol-complex Medium)が入った滅菌済み試験管に植菌し、30°C、24 時間培養した。その後集菌し、菌体を 2 mL BMMY 培地 (Buffered Methanol-complex Medium) に植え継ぎ、3 日間培養を行った。3 日間の培養中は 24 時間ごとにメタノールを最終濃度 1%になるように添加することで、キチナーゼの発現を誘導した。

少スケールで酵母を培養した後、集菌を行い、上清の BMMY 培地をそのまま SDS-PAGE に供したところ、キチナーゼと予測されるバンドが得られた (図 3)。レーン 3 の一部に筋状のバンドが認められるが、本サンプルは酵母培養上清を用いているため、SDS-PAGE のウェルに酵母菌体が混入した可能性が考えられる (図 3)。

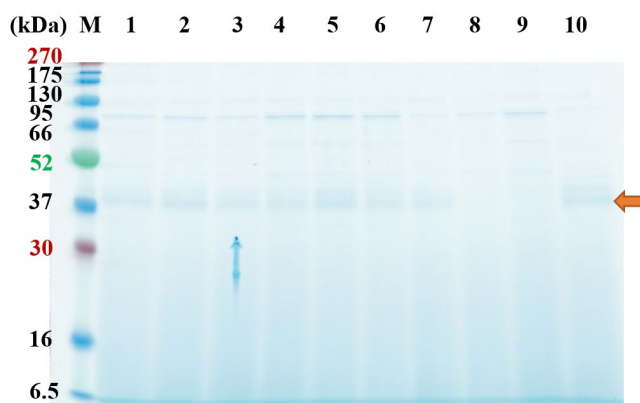


図 3. SDS-PAGE による酵母発現系で得られたキチナーゼの素酵素。矢印がキチナーゼと予測されるバンド。M ; 分子量マーカー、1~10 ; 1 番~10 番のキチナーゼの素酵素。

5) Native-PAGE を用いたキチナーゼ活性染色

少量培養で最も酵素が発現していた 10 番の素酵素を用いてキチナーゼの活性染色を行った。すなわち、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。

酵母培養上清 (BMMY 培地) に含まれるキチナーゼを用いた活性染色の結果、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、キチナーゼ活性を検出することに成功している (図 4)。



図 4. Native-PAGE によるキチナーゼの活性染色。分離ゲル上端の暗い部分がキチナーゼによる活性バンド。

3. 展望

今後、モウセンゴケ属食虫植物 *D. rotundifolia* 由来キチナーゼの酵素化学的性質を明らかにするためには、酵母 *P. pastoris* を用いた大量培養 (1 L~10 L) を行い、さらにキチンカラムを用いてキチナーゼを高純度に精製する必要がある。また、結晶構造解析に向けた結晶化には約 10 mg の高純度酵素が必要となることから、培養スケールの拡大が必要である。

4. 引用文献

- [1] A.S. Sahai, M.S. Manocha, FEMS Microbiology Reviews, **11**, 317-338 (1993).
- [2] K. Fukushima, *et al.*, Nature Ecology & Evolution, **1**, 0059 (2017).
- [3] D.H. Paper, *et al.*, Phytother Res., **19**, 323-326 (2005).
- [4] T. Araki, T. Torikata, Biosci. Biotechnol. Biochem., **59**, 336-338 (1993).
- [5] Y. Kezuka, *et al.*, Proteins, **78**, 2295-2305 (2010).
- [6] K. Yoneda, *et al.*, FEBS Open Bio, **15**, 1930-1944 (2025).

5. 謝辞

本研究は公益財団法人 前川報恩会 学術研究助成、明治アニマルヘルス株式会社 産学連携共同研究および

び、先進生命科学研究所プロジェクト研究の資金援助
によって行われたものであり、ここに記して感謝いた
します。また、本研究を実施するにあたり、貴重なご
意見や様々なご支援を頂きました大阪工業大学 工学
部 生命工学科 大島 敏久教授、香川大学 農学部 応用
生物科学科 櫻庭 春彦教授に感謝いたします。



Regional Distribution of Isovaleric Acid Released from Skin Surface of Young Humans at Rest

安静時における若年者の皮膚表面から放散される イソ吉草酸の部位別分布

Daisuke Sato¹⁾, Yoshika Sekine^{1,2)}, Tomomi Osaka¹⁾, Akihiro Hosomi¹⁾, and Michihito Todaka³⁾,

¹⁾Course of Chemistry, Graduate School of Science, Tokai University,

²⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³⁾R&D laboratory, AIREX Inc.

佐藤 大輔¹⁾, 関根 嘉香^{1,2)}, 大坂 智実¹⁾, 細見 晟浩¹⁾, 戸高 惣史³⁾

1) 東海大学大学院理学研究科, 2) 東海大学先進生命科学研究所, 3) AIREX 株式会社技術研究所

[Abstract]

Isovaleric acid is a malodorous compound produced by the metabolism of leucine in sweat by *Staphylococcus epidermidis* and is responsible for sweat odor following perspiration induced by exercise or heat stress. In contrast, perspiration from eccrine sweat glands occurs continuously even at rest, mainly due to insensible perspiration; therefore, isovaleric acid is thought to be continuously emitted from the skin surface. In this study, isovaleric acid released from the skin surface of twelve healthy young subjects (6 males and 6 females, aged 21–23 years) at rest was measured using a passive flux sampler coupled with gas chromatography–mass spectrometry, and its regional distribution was examined. The dermal emission fluxes at 14 body sites exhibited large inter-individual variability, and no clear relationships with resting sweat rate or sex were observed. To explore the factors contributing to inter-individual variability, factor analysis was performed, revealing at least five distinct regional distribution patterns. These results suggest that isovaleric acid is emitted even under resting conditions and that clothing and posture may influence its regional emission from the skin surface.

[要旨]

イソ吉草酸は、汗中のロイシンが *Staphylococcus epidermidis* によって代謝されて生成される悪臭物質であり、運動や暑熱ストレスによって生じる発汗後の汗臭の原因となる。一方、エクリン汗腺からの発汗は、不感蒸泄を主因として安静時であっても継続的に生じるため、イソ吉草酸は皮膚表面から常時放散されていると考えられる。本研究では、パッシブフラックスサンプラー-ガスクロマトグラフィー/質量分析法を用い、安静時における12名の健常若年者（男女各6名、21-23歳）の皮膚表面から放散されるイソ吉草酸を測定し、部位別分布を検討した。体表面14部位における皮膚放散フラックスは大きな個人間差を示し、安静時の発汗量との関係性、性差は認められなかった。個人間差の要因を探るため、因子分析を行った結果、少なくとも5つの異なる部位別分布パターンが検出された。これらの結果は、安静時においてもイソ吉草酸は放散され、服装や姿勢が部位別放散量に影響する可能性を示唆した。

[Key Words]

Human skin gas, Isovaleric acid, Dermal emission flux, Sweat, Factor analysis

1. Introduction

Isovaleric acid (3-methylbutanoic acid) is known as one of the

substances responsible for sweat odor [1,2]. Sweat secreted from eccrine sweat glands is almost odorless; however, when sweat is

left on the skin, *Staphylococcus epidermidis*, a resident species of the normal cutaneous microbial flora, degrades leucine present in sweat to produce isovalerate [2]. Because the skin surface is normally weakly acidic, isovalerate is released from the skin surface as volatile isovaleric acid [3]. Isovaleric acid has an unpleasant odor described as a “pungent, sweet-and-sour smell” and an extremely low odor detection threshold of 0.0001 ppm; in Japan, it is designated as a specified offensive odor substance under relevant regulations [4]. In addition, since *Staphylococcus epidermidis* prefers moist environments, isovaleric acid is a major cause of foot odor when the inside of shoes becomes humid [2]. For these reasons, isovaleric acid can be used as a marker of sweat odor associated with eccrine sweat secretion [5].

Perspiration from eccrine sweat glands occurs continuously even at rest, mainly due to insensible perspiration, and isovaleric acid is therefore thought to be continuously emitted from skin surface. However, given the non-uniform distribution of eccrine sweat glands and variations in skin surface moisture across different body regions, the quantity of isovaleric acid emitted is presumed to show regional difference. Previous studies have quantified regional and whole-body dermal emissions of skin gases such as ammonia [6], acetic acid [7], and volatile sulfur compounds [8]; however, data on isovaleric acid remain limited. Therefore, the present study aims to elucidate the whole-body distribution of isovaleric acid released from the human skin surface.

2. Methods

1) Subject Test

The subject test was conducted during the daytime between late April and early May in a laboratory at Tokai University. Twelve healthy young volunteers (6 males and 6 females, aged 21–23 years) were recruited. Multi-point measurements of skin-derived isovaleric acid were performed using a passive flux sampler (PFS; MonoTrap® SG DCC18, GL Sciences, Tokyo, Japan) in conjunction with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), as described in our previous study [8].

Fourteen PFSs were simultaneously deployed on the skin surface at 14 sampling sites on each subject for 1 h, as shown in Figure 1. The sampling sites were selected with reference to the surface anatomical regions classified by Kurazumi et al. [9], including the head, neck, chest, axilla, abdomen, back, lower back, upper arms, forearms,

hands, buttocks, thighs, lower legs, and feet. The room temperature was approximately 293 K, and the relative humidity was approximately 53%. During sampling, all subjects wore short-sleeved shirts and skirts or long trousers and removed their shoes. They remained relaxed and quiet to minimize excessive sweating. The skin surface was not specially treated prior to sampling.

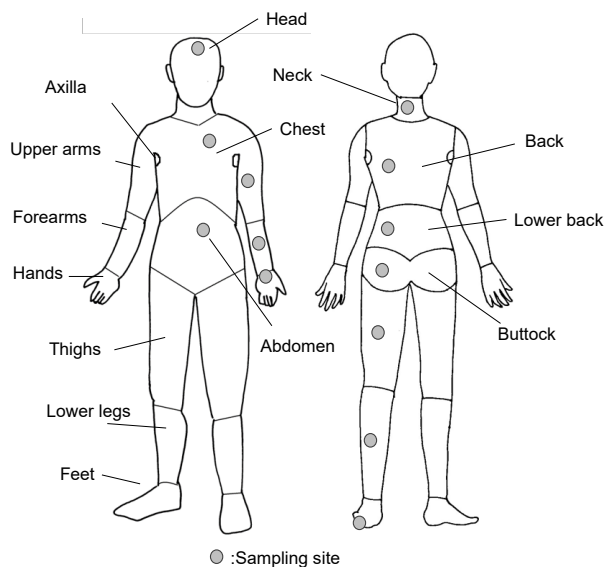


Figure 1. Illustration of 14 body regions referred to the anatomical classification by Kurazumi et al. [9] and sampling sites by the PFS in this study.

After sampling, the trapped isovalerate was eluted into 0.50 mL of carbon disulfide (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) by ultrasonic extraction for 30 min. Chromatographic analysis of the extracts was performed using a gas chromatograph (Model 7890B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with a mass selective detector (JMS-Q1050GC MkII, JEOL, Tokyo, Japan). Further instrumental conditions are provided in our previous publication [8].

The dermal emission flux of isovaleric acid at a sampling site, E_i ($\text{ng cm}^{-2} \text{h}^{-1}$), was calculated as:

$$E_i = W_i / (S t) \quad (1)$$

Where W_i is the collection amount of isovaleric acid (ng) at sampling site i , S is an effective cross-section of the trapping media (0.594 cm^2) and t is a sampling duration (1.0 h). The limit of detection (LOD) was determined

using a signal-to-noise ratio (S/N) of 3, calculated from the areas obtained from the standard solution and Equation (1) and resulted in $0.014 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Since the dermal emission fluxes of isovaleric acid are very low, values above the LOD were adopted, while those below the LOD were treated as zero in this study.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Shonan Campus, Tokai University, Japan (No. 23048, 24012). Written informed consent has been obtained from the subjects to publish this paper.

2) Statistical analysis

IBM SPSS statistics 25 was used to perform the statistical analyses. Differences in the dermal emission flux among sampling sites were analysed using Analysis of variance (ANOVA). Unless indicated otherwise, statistical significance was set at $p < 0.05$. Exploratory factor analysis (EFA) was conducted to identify the underlying factor structure of the measured dermal emission fluxes of isovaleric acid at 14 sampling sites. The analysis was based on the correlation matrix of the variables. Prior to the analysis, the suitability of the data for factor analysis was assessed using the Kaiser–Meyer–Olkin (KMO) measure of sampling adequacy and Bartlett’s test of sphericity. Factors were extracted using the maximum likelihood method and rotated using the varimax rotation to improve interpretability. The number of factors was determined based on eigenvalues greater than 1.0 and inspection of the scree plot. Variables with factor loadings of 0.40 or greater were considered to be meaningfully associated with a given factor.

3. Results and Discussions

The measured dermal emission fluxes of isovaleric acid were generally very low. Of the total 168 samples analyzed, isovaleric acid was detected in 90 samples, corresponding to a detection rate of 54%. Figure 2 shows the detection rates by body region. The highest detection rate was observed at the lower back, followed by the chest, abdomen, and upper arms. In contrast, the lowest detection rate was observed for the hands.

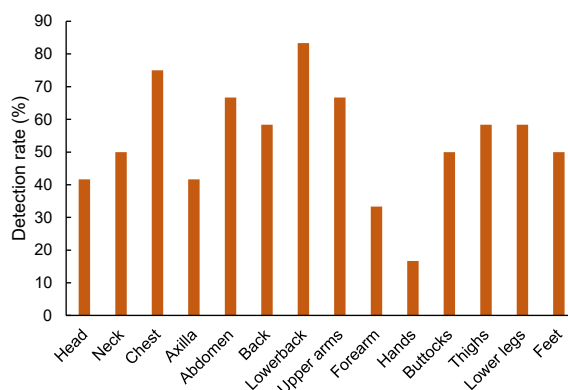


Figure 2. Detection rate of the dermal emission of isovaleric acid at 14 body regions of 12 young healthy subjects.

Figure 3 presents a comparison of dermal emission fluxes among the sampling sites using box plots. The “x” symbol denotes the arithmetic mean calculated for all subjects ($n = 12$). The emission flux at each site exhibited extremely large inter-individual variability, with several outliers present. However, the outlier values were not attributable to any specific subject. ANOVA indicated that no significant differences were observed in the dermal emission fluxes of isovaleric acid among the different body regions.

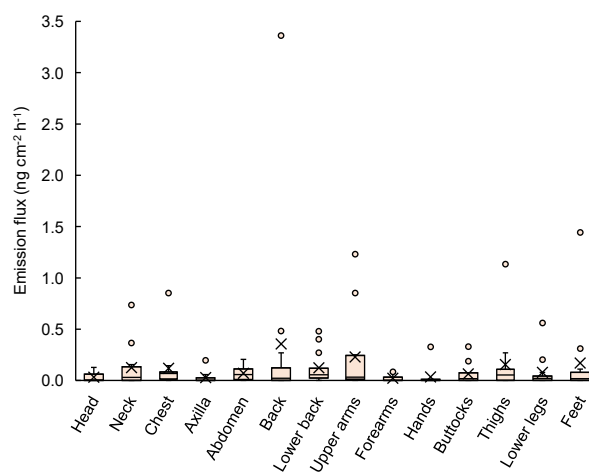


Figure 3. Comparison of the dermal emission flux of isovaleric acid emanating from 14 body regions of 12 young healthy subjects.

Regional sweat distribution in young male subjects at rest has been reported by Taylor and Machado-Moreira [10] and Coull et al. [11]. With respect to acetic acid,

regional variations in the dermal emission flux of acetic acid were shown to correlate well with those of sweat flux [7]. However, in the case of isovaleric acid in the present study, neither the mean nor the median regional dermal emission flux showed a correlation with sweat flux as shown in Figure 4, and no sex-related differences were observed.

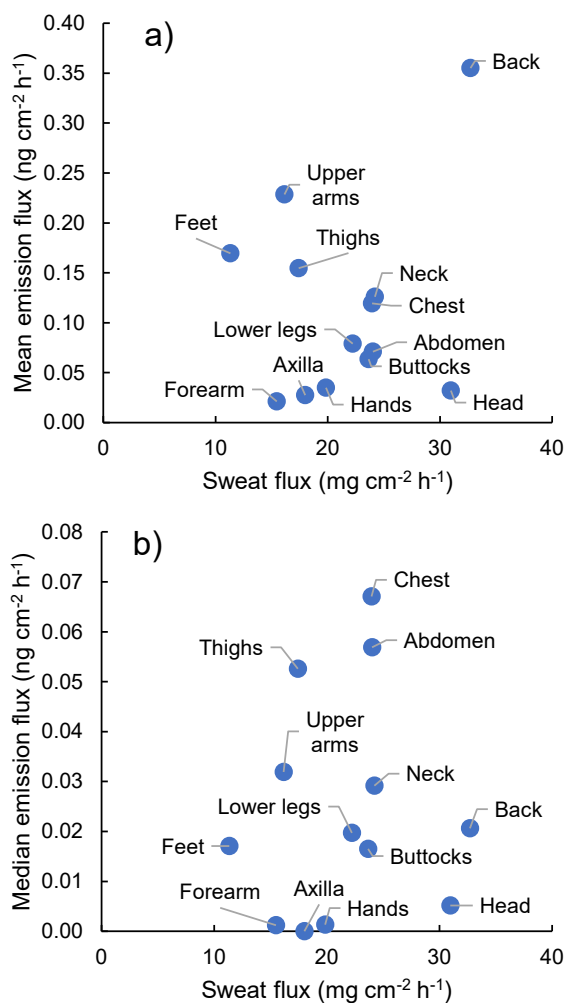


Figure 4. Plots of the regional emission fluxes of isovaleric acid from 12 young healthy subjects at rest against typical sweat fluxes at each anatomical region reported by Taylor and Machado-Moreira [10]. (a) Mean and (b) median regional emission fluxes. Note: The lower back was excluded due to a lack of available sweat flux.

Therefore, to explore the factors contributing to inter-individual variability, exploratory factor analysis (EFA) was performed, and five factors were extracted.

Table 1 shows the factor loadings for each subject for the respective factors. In addition, the factor scores of the five extracted factors are presented in Figure 5.

Table 1. Factor loadings for 12 young healthy subjects for the five factors extracted by EFA. Values showing strong associations are highlighted in light blue.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
Female 1	0.41	0.38	-0.38	-0.29	0.31
Female 2	0.96	-0.07	-0.01	0.01	0.00
Female 3	0.04	0.29	-0.30	0.79	0.19
Female 4	0.87	0.04	-0.01	0.08	0.06
Female 5	-0.25	-0.68	-0.17	-0.33	0.19
Female 6	0.09	0.18	0.92	-0.14	0.01
Male 1	-0.38	0.37	-0.01	0.40	0.47
Male 2	-0.09	0.88	-0.10	-0.14	-0.06
Male 3	-0.12	-0.10	0.86	-0.12	0.20
Male 4	-0.17	0.17	-0.15	-0.06	-0.87
Male 5	0.05	-0.11	-0.05	0.91	0.02
Male 6	-0.16	0.52	0.13	0.18	0.43

Factor 1 exhibited markedly higher emission fluxes at the back, followed by the chest, neck, and legs. Moreover, three female subjects showed strong associations with this factor. Although the exact reason for this pattern remains unclear, one possible explanation for the markedly elevated values at the back may be related to the type of chair used by the subjects during sampling. The chairs used by the subjects included both chairs with and without backrests. For subjects who selected (or were recommended to use by other participants) chairs with backrests, sweating at the back may have been promoted, resulting in this characteristic pattern of dermal emission flux.

Factor 2 showed relatively high values at the chest and thighs, while markedly low values were observed at the forearms. Male subjects showed strong positive associations with this factor, whereas female subjects exhibited strong negative associations. This pattern is presumed to be influenced by clothing, specifically the wearing of trousers and short-sleeved shirts.

Factor 3 exhibited a pattern in which emission fluxes were higher at the feet, axilla, and back—body regions where moist conditions are likely to occur and skin microbiota are most abundant in such moist areas [12]. No clear sex-related differences were observed.

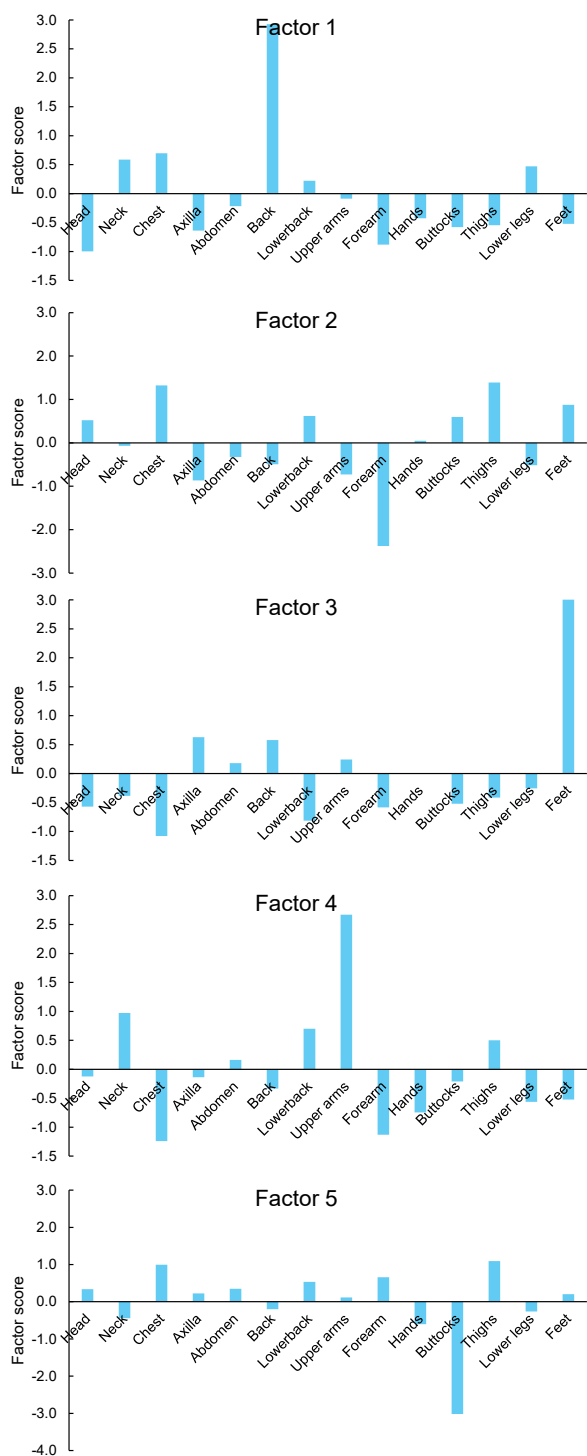


Figure 5. Factor scores of the five extracted factors (representing distinct patterns in the relative magnitude of regional dermal emission fluxes of isovaleric acid).

Factor 4 showed higher emission fluxes at the upper arms and lower values at the forearms and chest. This pattern is considered to be attributable to the wearing of short-sleeved shirts, reflecting differences in the degree

of contact between the shirt fabric and the arms or chest.

Factor 5 was characterized by markedly low emission fluxes at the buttock. Two male subjects showed strong positive associations with this factor, while one male subject showed a strong negative association; however, the underlying reason for this pattern remains unclear at present.

Taken together, these results suggest that even under resting conditions, dermal emissions of isovaleric acid exhibit at least five distinct regional distribution patterns, as observed in a relatively small cohort of 12 subjects. The findings indicate that factors such as clothing and posture during measurement may also influence the regional emission of isovaleric acid from the skin surface. The present experimental results provide fundamental data for the use of isovaleric acid as a marker of sweat odor, and future studies should investigate the emission behavior of isovaleric acid after thermally and/or psychologically induced sweating.

4. Conclusion

This study aimed to elucidate the regional distribution of isovaleric acid released from the skin surface of twelve healthy young subjects at rest. The emission flux at each sampling site exhibited extremely large inter-individual variability. Analysis of regional differences using factor analysis revealed the presence of at least five distinct distribution patterns. These results indicate that, under resting conditions without excessive sweating, factors such as clothing and posture during measurement may influence the regional emission of isovaleric acid from the skin surface.

5. References

- [1] 関根嘉香, 皮膚ガスのはなし - 体臭は心と体のメッセージ, 朝倉書店, pp.46-50(2024).
- [2] K. Ara, et al., *Can. J. Microbiol.*, **52**(4), 357 (2006).
- [3] M. Finnegan, et al., *Sens. Bio-Sens. Res.*, **35**, 100473 (2022).
- [4] 倉橋隆ほか, においとかおりの本, 日刊工業新聞社, p.113(2011).
- [5] Y. Sekine, et al., *Clean Tech.*, **27**(12), 68(2017).
- [6] S. Furukawa, et al., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1053 (2017).

- [7] Y. Sekine, et al., *Frag. J.*, **47**(9), 19(2018).
- [8] T. Osaka et al., *Atmosphere*, **16**, 1331(2025).
- [9] Y. Kurazumi, *Jpn. J. Biometeorol.*, **31**, 5(1994).
- [10] N. A. Taylor, C. A. Machado-Moreira CA, *Extrem. Physiol. Med.*, **2**,1 (2013)
- [11] N. A. Coull et al., *Eur. J. Appl. Physiol.*, **121**, 109 (2021)
- [12] E. A. Grice, J.A. Segre, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**(4), 244(2011).

6. Conflicts of interest

Authors declare no conflict of interest.

7. Acknowledgement

This study was supported by Institute of Advanced Biosciences, Tokai University (Project No.2023-07). Authors awfully thank participants for this study.



Kinetics of Dermal Emissions of Diallyl Disulfide and Allyl Methyl Sulfide After Ingestion of Grilled Garlic

ニンニク摂取後のジアリルジスルフィドおよびアリルメチルスルフィドの皮膚放散動態に関する解析

Tomomi Osaka¹⁾ and Yoshika Sekine^{1,2)}

¹⁾Graduate School of Science, Tokai University, ²⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

大坂智実¹⁾, 関根嘉香^{1,2)}

¹⁾東海大学大学院理学研究科, ²⁾東海大学先進生命科学研究所

[Abstract]

The body odor caused by the ingestion of garlic is known to persist for several hours to days. However, there have been no reports of kinetic analyses of the temporal changes in dermal emissions of garlic-derived skin gases, diallyl disulfide (DADS) and allyl methyl sulfide (AMS). The present study aims to describe the kinetics of the dermal emission fluxes of DADS and AMS and to estimate their half-lives using previously published data [Sato et al., *Sci. Rep.*, 2020]. The dermal emission fluxes of DADS and AMS exhibited a typical biphasic decay pattern characterized by a rapid initial decrease (α phase), followed by a slower decline (β phase). The half-lives of DADS and AMS were estimated to be longer than 8 h during the slower decay phase, which is dominated by metabolic processes in the liver. These results indicate that the long half-lives are significant factors affecting the persistence of garlic-related body odor after ingestion.

[要旨]

ニンニクの摂取によって生じる体臭は、数時間から数日にわたって持続することが知られている。しかしながら、ニンニク由来の皮膚ガスであるジアリルジスルフィド (diallyl disulfide : DADS) およびアリルメチルスルフィド (allyl methyl sulfide : AMS) の皮膚放散量の経時変化について、速度論的に解析した報告はこれまでになかった。本研究では、既報のデータ [Sato et al., *Scientific Reports*, 2020] を用いて、DADS および AMS の皮膚放散フラックスの動態を解析し、それらの半減期を推定することを目的とした。DADS および AMS の皮膚放散フラックスは、急速な初期減少 (α 相) に続いて緩やかな減少 (β 相) を示す典型的な二相性の減衰挙動を示した。肝臓における代謝過程が支配的となる β 相において、DADS および AMS の半減期はいずれも 8 時間を超えると推定された。これらの長い半減期が、ニンニク摂取後の体臭が長時間持続する要因の一つであると示唆された。

[Key Words]

Human skin gas, Garlic odor, half-life, metabolism, dermal emission

1. Introduction

Garlic itself has an imperceptible odor; however, once chopped or crushed, its natural constituent alliin is converted to allicin through an enzyme-mediated process catalyzed by alliinase [1]. Allicin serves as a precursor to several volatile sulfur compounds (VSCs), including diallyl disulfide (DADS) and allyl methyl sulfide (AMS),

which are responsible for the characteristic body odor after ingestion of garlic [2]. The garlic odor is known to persist for several hours to days [3-5]. However, there have been no reports of kinetic analyses of the decay of dermal emissions of DADS and AMS, and the half-lives of these skin-derived VSCs have not been determined.

The uptake, distribution, and elimination of ingested

chemical substances are generally described using pharmacokinetic or toxicokinetic models, mostly based on measurements of blood concentrations. However, highly volatile VSCs such as DADS and AMS readily volatilize from the bloodstream and are easily emitted through the skin surface [6]. In our previous study [2], we clarified the temporal changes in the dermal emission fluxes of DADS and AMS following the ingestion of grilled garlic. The present study aims to describe the kinetics of the dermal emission fluxes of DADS and AMS and to estimate their half-lives using previously published data.

2. Method

1) Materials

Reagent-grade diallyl disulfide (DADS) and allyl methyl sulfide (AMS) were purchased from commercial suppliers (Fujifilm Wako Pure Chemical, Japan). Methanol was obtained from Kanto Chemicals (Japan). Garlic was purchased from a local supermarket and grilled in aluminum foil prior to ingestion, as described previously.

2) Passive flux sampling of human skin gases

Human skin gases were collected using a passive flux sampler (PFS). Briefly, the sampler (MonoTrap®, SG DCC18; GL Sciences, Japan) was placed directly on the skin surface to form a headspace, allowing volatile compounds emitted from the skin to be collected by diffusion onto the trapping medium (Figure 1). Detailed descriptions of the sampler design and trapping mechanism have been reported elsewhere [6,7]. During sampling, the device was gently fixed to the skin surface without any pretreatment of the skin.



Figure 1 Sampling of human skin gases using the PFS at a forearm of volunteer.

3) Sampling procedure and GC–MS analysis

Sampling was performed on healthy male volunteers,

and skin gas samples were collected for either 0.5 or 1.0 h. After sampling, the trapping medium was transferred to a glass vial and analyzed using a thermal desorption - gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS) system, as previously described. Thermal desorption was conducted at 120 °C using a STRAP headspace sampler (JEOL, Japan), and analytes were introduced into a JMS-Q1000GC MkII GC–MS system (JEOL, Japan).

Volatile compounds were separated on an InertCap® Pure-Wax capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness; GL Sciences, Japan) with helium as the carrier gas (1.0 mL min⁻¹). DADS and AMS were detected in selected ion monitoring mode at $m/z = 41$ and 73, respectively. Further instrumental conditions are provided in the original publication.

4) Calculation of dermal emission flux

The emission flux of DADS and AMS from the skin surface was calculated according to Eq. (1);

$$E = W / (S t) \quad \text{Eq.(1)}$$

where E is the emission flux (μg cm⁻² h⁻¹), W is the amount of compound collected (μg), S is the effective cross-sectional area of the trapping medium (0.594 cm²), and t is the sampling duration (h). Procedure blanks were omitted because no target compounds were detected in blank measurements.

5) Volunteer experiments and dataset used for reanalysis

The present study reanalyzed data obtained from the previously conducted volunteer experiment investigating dermal emissions of VSCs after ingestion of the grilled garlic. Three healthy male volunteers (A–C; ages 24–31) ingested approximately 45 g of grilled garlic, and temporal changes in DADS and AMS emission fluxes were measured at the non-dominant forearm before and after ingestion according to sampling schedule as shown in Figure 2.

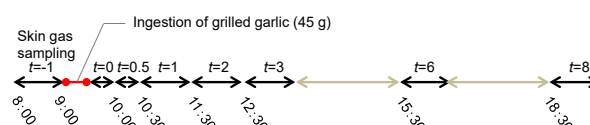


Figure 2 Sampling schedule of human skin gases before and after ingestion of grilled garlic [2].

No additional experiments were conducted for the present study; all analyses were based on previously acquired datasets. The previous study was performed in accordance with the guidelines laid out in the Declaration of Helsinki and was conducted with the approval of the Institutional Review Board, Shonan Campus, Tokai University, Japan (No. 16182). Written informed consent was obtained from all participants

6) Kinetic calculations

The dermal emission fluxes of DADS and AMS were converted to semilogarithmic plots versus time, in order to resolve the curves into a linear initial phase of slope α and a linear terminal slope β [8]. The half-lives for two phases were calculated by linear regression of the log-linear time curve of the dermal emission fluxes within each interval with the latter or former phases subtracted [8], following Eq.(2);

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad \text{Eq.(2)}$$

where $t_{1/2}$ is a half-life and k is a decay rate constant derived from the linear regression analysis.

3. Results and discussions

Figure 3a shows the time course of the emission flux of DADS from three volunteers before and after ingestion of 45 g of grilled garlic. The time points on the x-axis indicate the start times of sampling after ingestion (see Figure 2). The initial emission flux of DADS ($t = -1$ h) was $0.072 \pm 0.024 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($n = 3$). During the first sampling period ($t = 0$ h), the emission flux increased markedly, reaching a maximum of $4.8 \pm 0.44 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, which reflects the uptake of DADS from garlic. Thereafter, the emission flux decreased to approximately $0.4 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ at $t = 2$ h and remained at this level.

Focusing on the decay phase, the time course after the peak was converted into a semilogarithmic plot versus time, as shown in Figure 3b. The dermal emission flux of DADS exhibited a typical biphasic decay pattern, characterized by a rapid initial decrease (α phase), followed by a slower decline beginning approximately 2 h after ingestion (β phase).

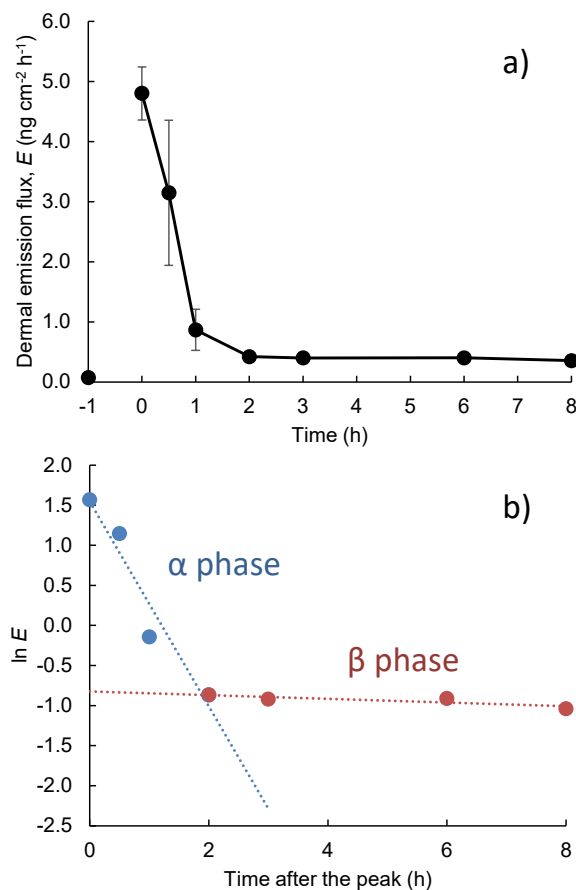


Figure 3 Temporal changes in the dermal emission flux of DADS before and after ingestion of approx. 45 g of grilled garlic measured at the forearm of three healthy volunteers. Modified citation from ref. [2], CC BY 4.0.

Figure 4 illustrates the possible formation of metabolic pathways of DADS and AMS from alliin [9-14]. Alliin, which is produced from alliin, is an unstable compound and rapidly undergoes spontaneous decomposition *in vivo* to form organosulfur compounds such as DADS and allyl mercaptan. These compounds are absorbed through the gastrointestinal tract and distributed to tissues such as the liver via systemic blood circulation. During this distribution process, they are rapidly emitted from the skin; therefore, the rapid decrease in dermal emission flux is considered to reflect the rapid decline in blood concentration (α phase). Meanwhile, DADS is metabolized in the liver to allyl mercaptan through reactions involving glutathione and cysteine. Because dermal emission also occurs during this metabolic process, a slower decay phase (β phase) is observed. The decay rate

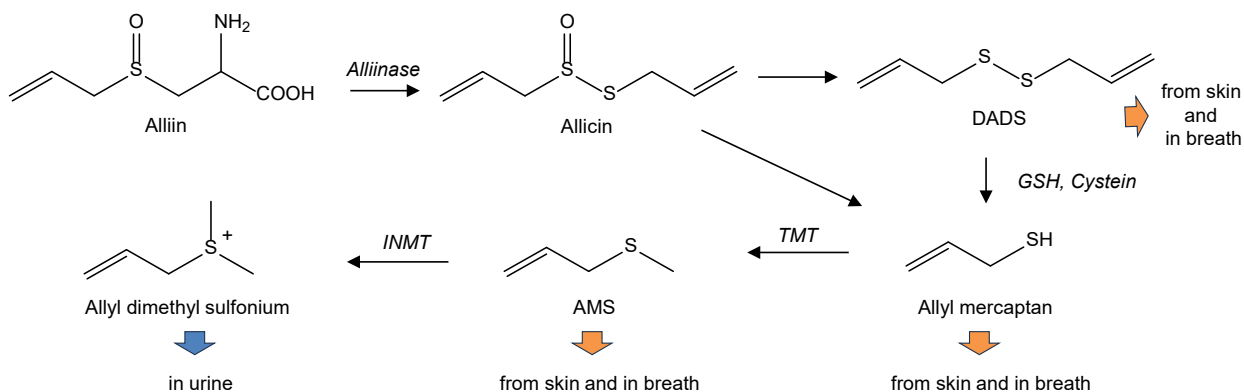


Figure 4 Possible formation and metabolic pathway of DADS and AMS in a body based on ref. [9-14] and excretion routes. Abbreviations: GSH, glutathione; TMT, thiol S-methyltransferase; INMT, Indole ethylamine N-methyltransferase.

constants and half-lives for the two phases were obtained from linear regression analysis of the log-linear time curves of dermal emission fluxes within each interval. As shown in Table 1, the half-lives were calculated to be 0.54 h for the α phase and 32 h for the β phase.

Table 1 Calculated decay rate constants and half-lives for the dermal emissions of DADA and AMS described by a biphasic decay pattern.

	Decay rate constant (/h)		Half-life (h)	
	α phase	β phase	α phase	β phase
DADS	1.3	0.022	0.54	32
AMS	1.9	0.038	0.37	18

In contrast, the time course of the dermal emission flux of AMS differed from that of DADS but was consistent among all volunteers (Figure 5a). The initial emission flux of AMS ($t = -1$ h) was $0.022 \pm 0.001 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($n = 3$), which is approximately one third of that of DADS. After ingestion of grilled garlic, the emission flux of AMS reached its maximum at $t = 0.5$ h, with a value of $2.9 \pm 0.10 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, and then decreased to approximately $0.3 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. This time course differed from that of DADS, which peaked at $t = 0$ h, indicating a peak shift in the dermal emission flux of AMS. This delay is attributed to the fact that AMS is formed from precursor compounds such as allicin, DADS, and allyl mercaptan (Table 1). Focusing on the decay phase, the time course after the peak was converted into a semilogarithmic plot versus time, as shown in Figure 5b. The dermal emission flux of AMS also exhibited a typical biphasic degradation pattern,

and the decay rate constants and half-lives for the two phases were calculated, as summarized in Table 1. The half-lives of dermal emission for AMS were calculated to be 0.37 h for the α phase and 18 h for the β phase.

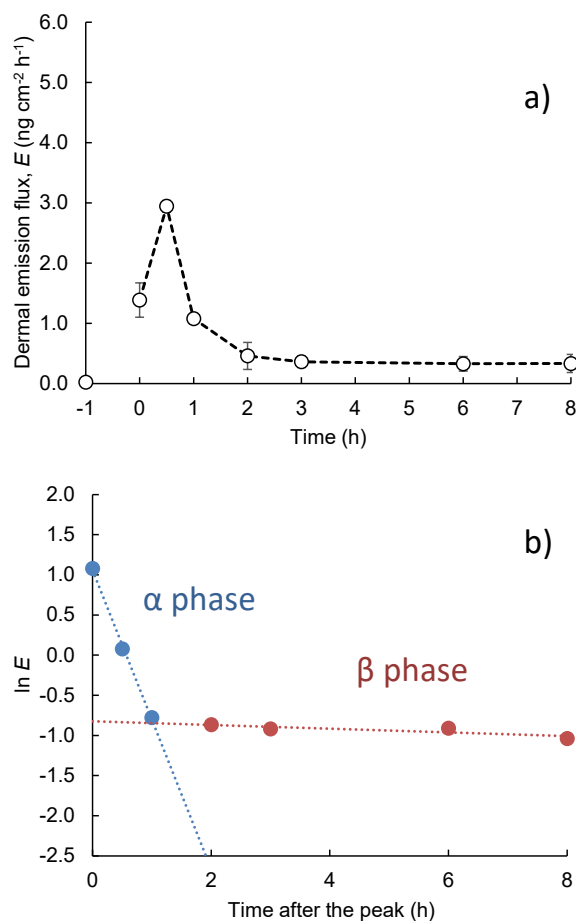


Figure 5 Temporal changes in the dermal emission flux of AMS before and after ingestion of approx. 45 g of grilled garlic measured at the forearm of three healthy volunteers. Modified citation from ref. [2], CC BY 4.0.

It should be noted that the estimated half-lives of DADS

and AMS in the β phase may be subject to uncertainty, as they exceeded the 8 h measurement period of the subject test; nevertheless, the results indicate that the half-lives are at least 8 h or longer.

DADS and AMS are responsible for the characteristic body odor observed after garlic ingestion. The persistence of garlic-related body odor after ingestion can be attributed not only to the amount of garlic consumed and the extent of allicin formation (which depends on the method of garlic preparation), but also to the metabolic rates of DADS and AMS in the liver. In particular, the long half-lives during the β phase contribute significantly to the prolonged duration of garlic body odor.

4. Conclusion

Based on the kinetic analysis of the temporal changes in dermal emission fluxes of DADS and AMS after ingestion of grilled garlic, their half-lives were estimated using previously published data. The results showed that the long half-lives during the slower decay phase (β phase) of both VSCs are significant factors affecting the persistence of garlic-related body odor after ingestion.

5. References

- [1] M. S. Nadeem, et al., *Antioxidants*, **11**, 87(2021).
- [2] S. Sato, Y. Sekine, et al., *Sci. Rep.*, **10**, 465(2020).
- [3] H. W. Haggard, et al., *J. Am. Med. Assoc.*, **104**, 2160 (1935).
- [4] T. Minami, et al., *J. Food Sci.*, **54**, 763(1989).
- [5] J. Taucher, et al., *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3778(1996).
- [6] Y. Sekine and D. Oikawa, Skin-derived biofluid sampling for analytical approaches, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation (Second Edition, M. Soylak ed.)*, Academic Press, 70-90 (2025)
- [7] K. Kimura, Y. Sekine, et al., *J. Chromatogr. B*, **1028**, 181 (2016).
- [8] A. A. Falk, et al., *Scand. J. Work Environ. Health*, **16**, 372 (1990).
- [9] M. Iciek, M., et al., *Environ. Molecul. Mut.*, **50**, 247 (2009).
- [10] R. Mirondo and S. Barringer, *J. Food Sci.*, **18**, C2425 (2016).
- [11] L. Y. Sheen, et al., *Food Chem Toxicol.*, **37**,1139 (1999).

[12] C. Teyssier, et al., *Drug Metabolism and Disposition*, **27**, 835 (1999).

[13] L. Steiner. et al., *J. Agri. Food Chem.*, **73**, 9128 (2025).

[14] T. Hiramoto et al., *Appl. Sci.*, **14**, 9631(2024).

6. Conflicts of interest

Authors declare no conflict of interest.

7. Acknowledgement

This study was supported by Institute of Advanced Biosciences, Tokai University (Project No.2023-07). Authors thank Mizuki Fukui, Tokai University; Seiya Sato, Tokai University; Michihito Todaka, AIREX Inc. for their kind support in this study.

脂肪酸組成の異なる魚油から生成される魚臭成分

Fishy Odor Compounds Generated from Fish Oils with Different Fatty Acid Composition

中野 愛冬¹⁾, 平塚 聖一^{1,2)}

¹⁾東海大学大学院海洋学研究所, ²⁾東海大学先進生命科学研究所・高機能性食品研究部門

Mafuyu Nakano¹⁾, Seiichi Hiratsuka^{1,2)}

¹⁾Graduate School of Oceanography, Tokai University, ²⁾Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

脂肪酸組成の異なる3魚種(マサバ、マグロ、マダイ)から抽出した魚油とマサバ血液を用いた魚臭生成モデル実験により、魚臭生成への脂肪酸の関与を検討した。各種魚油とマサバ血液の反応が進むにつれ多価不飽和脂肪酸の残存率が低下し、揮発性成分量の増加が見られた。また、マサバ魚油区では1-Penten-3-ol、マグロ魚油区では1-Octen-3-ol、マダイ魚油区ではHexanalと各種魚油ごとに生成した魚臭成分に特徴が見られ、それらは魚油の脂肪酸組成に影響されると考えられた。

[Abstract]

Fishy odor generation was investigated using a model system consisting of fish oils extracted from three fish species with different fatty acid composition (Mackerel, Tuna, Red sea bream) and mackerel blood. As the reaction progressed, the residual ratios of polyunsaturated fatty acids decreased, while the amounts of volatile compounds increased. Characteristic odor compounds were generated depending on the fish oil used: 1-Penten-3-ol in mackerel oil, 1-Octen-3-ol in tuna oil, and Hexanal in red sea bream oil. These differences in odor compounds were influenced by fatty acid composition of the fish oils.

[Key Words]

Fatty acid composition, Volatile compounds, Fishy odor, Lipid oxidation

1. はじめに

魚類に多く含まれるEPA(エイコサペンタエン酸)やDHA(ドコサヘキサエン酸)などの多価不飽和脂肪酸には、心血管系疾患予防効果や脳の発達促進、視覚機能の向上など様々な健康効果が報告されており[1]、消費者にとって魚食は健康に良いと認識されている。しかし、近年の国内における魚介類の1人あたりの消費量は、平成13年をピークに減少を続け、平成21年には肉類の消費量が魚介類を上回った[2]。魚介類の消費量が低迷するいわゆる「魚離れ」が進行する要因の1つに、調理や喫食時における生臭く不快な魚臭が挙げられる[3]。魚介類は畜肉類に比べて非常に品質劣化が早く、死後直ちに脂質の酸化が進み、特に赤身魚で脂質の酸化が進むと次第に臭いが強くなること

が報告されている[4]。また、多価不飽和脂肪酸をはじめとした脂質の酸化には、魚肉中に含まれるミオグロビンやヘモグロビンなどのヘム鉄が関与し[5]、脱血処理によりカツオ魚肉の魚臭を低減させることができた事例も報告されている[6]。

そこで本研究では、脂肪酸組成の異なる3魚種から抽出した魚油とマサバ血液を用い、魚臭生成のモデル実験により、魚臭成分の生成への脂肪酸の関与を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

1) 試料

本実験では、マサバ、マグロ類およびマダイの3種の魚油とマサバの心臓より採取した血液を用いた。マサバ魚油は、2022年9月に入手した三陸

沖で漁獲された冷凍マサバ *Scomber japonicus* から、マダイ魚油は 2022 年 11 月にスーパーで購入した養殖マダイ *Pagrus major* 頭部（あら）から煮取り法で抽出した魚油を、マグロ類魚油においては市販品（株式会社焼津ミール）を使用した。

2) バイアル試料の作成と分析方法

揮発性成分：10 mL スクリューキャップバイアル瓶に 10mM リン酸緩衝液(pH 6.0) 1025 μ L,各種魚油 75 μ L,マサバ血液 100 μ L,50mM デオキシコール酸ナトリウム 200 μ L を混合し、室温 25°Cにて 0,1,2,3,4 時間反応させた後-30°Cで保存した。作成したバイアル試料に内部標準(40ppm シクロヘキサノール) 75 μ L を加え、生じたヘッドスペースガスを 80°Cで 20 分間 SPME 用ファイバーを用いて捕集した後、GC-MS にて分析した。

脂肪酸組成：揮発性成分と同様に混合し作成したバイアル試料を Bligh&Dyer 法の Hanson&Olley 変法[7]に従い脂質を抽出し、抽出した脂質に内部標準 (2mg/mL ノナデカン酸メチル) 250 μ L を加え、三フッ化ホウ素メタノールを用いてメチルエステル化した後、GC にて分析した。得られたデータをエクセル統計ソフト(Bell curve) を使用し一元配置分散分析を行い、Tukey 法により有意差検定を行った。

3. 結果

Table 1 に使用した 3 魚種の魚油の脂肪酸組成を示した。マサバ魚油では、C20:5 n-3 (EPA) 比が、マグロ魚油では C22:6 n-3 (DHA) 比が、マダ

イ魚油では C18:1 n-9 (オレイン酸) 比と C18:2 n-6(リノール酸)比が他魚種よりも有意に高かった。飽和脂肪酸比と一価不飽和脂肪酸比はマダイ魚油が最も高く、多価不飽和脂肪酸比はマグロ魚油が最も高かった。

Table 1 Fatty acid composition of each fish oil (wt%).

	Mackerel	Tuna	Red sea bream
C14:0	3.91 \pm 0.15 a	3.07 \pm 0.09 b	2.98 \pm 0.06 b
C16:0	19.37 \pm 0.50 a	18.96 \pm 0.30 a	21.01 \pm 0.25 b
C16:1 n-7	4.40 \pm 0.18 a	4.97 \pm 0.10 b	5.31 \pm 0.09 c
C16:2 n-4	1.12 \pm 0.40 a	1.16 \pm 0.19 a	0.62 \pm 0.02 b
C17:1 n-8	0.46 \pm 0.03	1.11 \pm 0.64	0.47 \pm 0.03
C18:0	4.45 \pm 0.12 a	4.84 \pm 0.09 b	5.26 \pm 0.08 c
C18:1 n-9	21.92 \pm 0.61 a	17.45 \pm 0.36 b	25.15 \pm 0.24 c
C18:1 n-7	4.04 \pm 0.13 a	2.66 \pm 0.07 b	3.22 \pm 0.07 c
C18:2 n-6	1.12 \pm 0.03 a	1.17 \pm 0.01 a	10.68 \pm 0.13 b
C18:3 n-3	0.63 \pm 0.03 a	0.58 \pm 0.02 a	1.22 \pm 0.23 b
C18:4 n-3	1.86 \pm 0.03 a	0.94 \pm 0.03 b	0.71 \pm 0.26 b
C20:1 n-11	2.62 \pm 0.08 a	2.38 \pm 0.05 b	1.80 \pm 0.04 c
C20:1 n-9	0.34 \pm 0.01 a	ND \pm ND	0.33 \pm 0.02 a
C20:4 n-6	0.80 \pm 0.21 a	1.55 \pm 0.03 b	0.68 \pm 0.03 a
C20:4 n-3	0.89 \pm 0.04 a	0.62 \pm 0.03 b	0.64 \pm 0.04 b
C20:5 n-3	7.90 \pm 0.33 a	7.03 \pm 0.26 b	3.74 \pm 0.08 c
C22:1 n-11	2.65 \pm 0.09 a	1.35 \pm 0.06 b	1.28 \pm 0.23 b
C22:1 n-9	0.79 \pm 0.06 a	0.38 \pm 0.02 b	0.51 \pm 0.17 b
C22:5 n-6	0.34 \pm 0.04 a	1.04 \pm 0.04 b	0.52 \pm 0.26 a
C22:5 n-3	2.02 \pm 0.48	1.80 \pm 0.40	1.91 \pm 0.09
C22:6 n-3	13.90 \pm 1.20 a	21.61 \pm 0.82 b	8.17 \pm 0.27 c
others	4.48 \pm 1.03	5.35 \pm 0.86	3.80 \pm 0.88
saturates	27.73 \pm 0.75 a	26.87 \pm 0.47 a	29.24 \pm 0.36 b
monoenes	37.21 \pm 0.96 a	30.29 \pm 0.40 b	38.06 \pm 0.56 a
polyenes	30.58 \pm 1.62 a	37.49 \pm 0.99 b	28.89 \pm 0.26 a

Values are mean \pm S.D.(n=5).

Letters a,b and c indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparison test) between the data for the component.

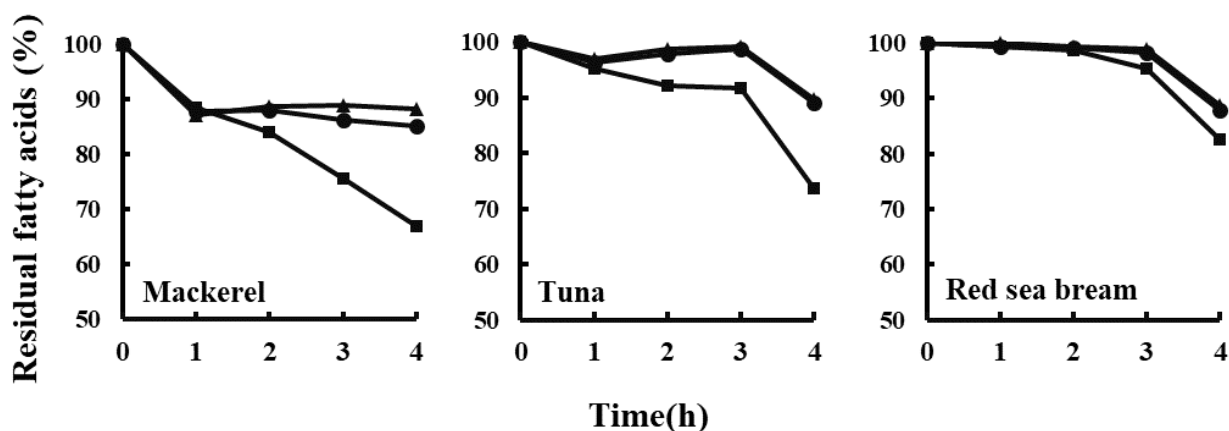


Fig.1 Residual percentage (%) of each fatty acids relative to time 0 after mixing each fish oil with mackerel blood.

●:Saturates ▲:Monoenes ■:Polyenes

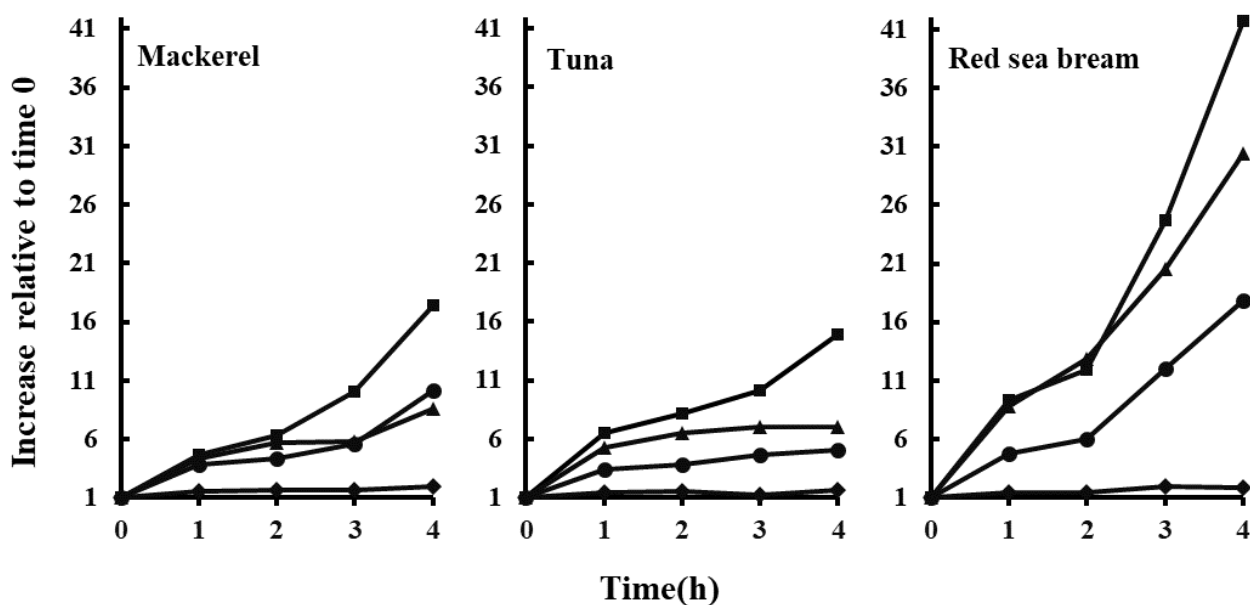


Fig.2 Increase in major volatile compounds relative to time 0 after mixing each fish oil with mackerel blood.

■:Total aldehyde ▲:Total alcohol ●:Total ketone ◆:Total hydrocarbon

Table 2 Amounts of volatile compounds produced after mixing each fish oil with mackerel blood for 4h at 25°C.

	Mackerel	Tuna	Red sea bream
Aldehydes(5)			
Pentanal	0.053 ± 0.004 a	0.064 ± 0.008 a	0.091 ± 0.021 b
Hexanal	0.822 ± 0.178 a	1.105 ± 0.150 a	2.462 ± 0.741 b
Heptanal	0.233 ± 0.044 ab	0.311 ± 0.028 a	0.213 ± 0.068 b
Octanal	0.260 ± 0.071 a	0.510 ± 0.168 b	0.260 ± 0.062 a
Nonanal	1.530 ± 0.415	1.532 ± 0.535	1.409 ± 0.272
Alcohols(5)			
1-Penten-3-ol	4.149 ± 1.200 a	3.326 ± 0.797 ab	1.875 ± 0.475 b
2-Penten-1-ol,(E)-	0.075 ± 0.021 ab	0.092 ± 0.031 a	0.038 ± 0.012 b
2-Penten-1-ol,(Z)-	0.592 ± 0.184 a	0.546 ± 0.080 a	0.212 ± 0.050 b
1-Octen-3-ol	3.360 ± 0.594 a	6.658 ± 1.030 b	4.960 ± 1.109 ab
2-Octen-1-ol,(E)-	0.208 ± 0.049 a	0.515 ± 0.068 b	0.236 ± 0.056 a
Ketones(2)			
1-Penten-3-one	0.122 ± 0.043	0.117 ± 0.027	0.072 ± 0.018
2,3-Pentanedione	0.725 ± 0.103	0.466 ± 0.040	0.637 ± 0.218
Hydrocarbons(5)			
Decane	0.049 ± 0.015	0.063 ± 0.011	0.048 ± 0.016
Tetradecane	0.160 ± 0.054 a	0.431 ± 0.140 b	0.071 ± 0.008 a
Pentadecane	2.580 ± 0.964 a	11.994 ± 2.759 b	0.749 ± 0.192 a
Hexadecane	0.026 ± 0.005 a	0.127 ± 0.031 b	0.013 ± 0.002 a
Heptadecane	0.200 ± 0.059 a	1.254 ± 0.237 b	0.190 ± 0.034 a
Total aldehydes	2.898 ± 0.689	3.520 ± 0.774	4.435 ± 1.067
Total alcohols	8.384 ± 1.864 ab	11.136 ± 1.888 a	7.321 ± 1.634 b
Total ketones	0.847 ± 0.095	0.583 ± 0.053	0.709 ± 0.233
Total hydrocarbons	3.014 ± 1.094 a	13.871 ± 3.006 b	1.072 ± 0.227 a

Values are mean±S.D.(n=5). Letters a and b indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparison test) between the data for the component.

Fig.1に緩衝液中でマサバ血液と各種魚油を反応させたときの経過時間ごとの各脂肪酸残存率を示した。脂肪酸残存率は反応直後(0h)の脂肪酸含量(mg/g)を100%として算出した。いずれの魚油を用いた反応実験においても、反応4時間後には多価不飽和脂肪酸は大きく減少し、残存率は低下した。飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸においても時間経過により残存率の低下が見られたが、多価不飽和脂肪酸よりも緩やかであった。

Fig.2に緩衝液中でマサバ血液と各種魚油を反応させたときの経過時間ごとの各揮発性成分増加度を示した。揮発性成分増加度は、反応直後(0h)の揮発性成分量を1として算出した。なお、揮発性成分量は内部標準に対する各成分の相対強度とした。3魚種とも、アルデヒド類、アルコール類、ケトン類において経過時間とともに増加が見られ、アルデヒド類が最も顕著であった。炭化水素類はあまり増加が見られなかった。

Table 2に緩衝液中でマサバ血液と各種魚油を25°Cで4時間反応させた時の揮発性成分量を示した。なお、図中の数字は内部標準に対する各種成分の相対強度を示している。アルデヒド類5成分、アルコール類5成分、ケトン類2成分、炭化水素類5成分が同定された。マサバ魚油区では他の2区よりもケトン類が最も多く検出され、揮発性成分ごとに見ると1-Penten-3-olが多く検出された。マグロ魚油区では、他の2区よりもアルコール類と炭化水素類が多く検出され、1-Octen-3-olとPentadecaneが多く検出された。マダイ魚油区では、他の2区よりもアルデヒド類が多く検出され、Hexanalが多く検出された。

4. 考察

本研究は、脂肪酸組成の異なる3種類の魚油とマサバ血液を用いたモデル実験により、魚臭生成への脂肪酸の関与を明らかにすることを目的とした。

高村[8]は、赤身魚の魚臭成分には脂質分解により生成されたアルデヒド類やアルコール類などのカルボニル化合物が関与していると報告している。多価不飽和脂肪酸は二重結合が多いために酸化されやすく、それにより生成されたヒドロペルオキ

シドはさらに分解され、アルデヒド類をはじめとしたカルボニル化合物やアルコール類、炭化水素類などの低分子化合物を生じる。そして、I.Peinadoら[9]は魚油を加熱することでEPAやDHAの分解が進み、Hexanalや2,4-heptadienal(E,E)などのアルデヒド類を生成すると報告している。よって、各種魚油とマサバ血液の反応が進むにつれ多価不飽和脂肪酸の残存率が低下し、揮発性成分量が増加した理由は、マサバ血液と各種魚油の混合により脂質の分解が進行し、魚臭成分が生成されたことが原因であると考えられた。

遠藤ら[10]はC20:5 n-3(EPA)を含有するトリアシルグリセリン(TG)の自動酸化により、1-Penten-3-olなどのアルコール類や、1-butanalなどのアルデヒド類が生成されると報告している。今回使用した魚油は煮取り法で抽出したものであり、大部分がTGで構成された魚油であると考えられることから、マサバ魚油を用いた反応実験において1-Penten-3-olが多く検出されたのは、マサバ魚油がC20:5 n-3を豊富に含んでいたことによると考えられた。

また、マグロ魚油区では1-Octen-3-olが多く検出された。Zenan ZHANGら[11]はC22:6 n-3(DHA)を7割程含む藻類油を常温保存し酸化させると、C22:6 n-3の分解とともにアルコール類やケトン類、アルデヒド類が生成され、その主要成分は1-Octen-3-olや2,4-heptadienal(E,E)であったと報告している。そのため、本実験においてC22:6 n-3比の高いマグロ魚油区で1-Octen-3-olが多く検出されたと考えられた。

そして、マダイ魚油は他魚種に比べてC18:1 n-9(オレイン酸)比とC18:2 n-6(リノール酸)比が高く、Hexanalが多く検出された。C18:1 n-9比とC18:2 n-6比が高かった理由は、養殖試料の影響であると考えられた[12]。そして、大豆油などに含まれるC18:2 n-6は大豆リポキシゲナーゼなどの働きにより分解され、Hexanalを生成することが報告されており[13]、C18:2 n-6比の高いマダイ魚油を用いた反応実験においてHexanalが多く検出されたのはこれが理由であると考えられた。

以上の結果から、魚臭の生成は脂肪酸組成の違いに大きく影響されると考えられた。

5. 引用文献

- [1] 鈴木平光, 魚油の健康機能, 日本油化学会誌, 48(10), 1017-1024 (1999).
- [2] 水産庁, 令和元年度, 水産白書 (2019).
- [3] マルハニチロ, 魚食に関する調査 2020 (2020).
- [4] 宮崎泰幸, 河邊真也, 臼井将勝, 魚介類のにおいとオフフレーバー, におい・かおり環境学会誌, 51(3), 194-200 (2020).
- [5] Oshima T, Wada S, Kozumi C. Influences of Heme Pigment, Non-Heme Iron, and Nitrite on Lipid Oxidation in Cooked Mackerel Meat. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(12), 2165-2171 (1988).
- [6] 平塚聖一, 羽田好孝, 小泉鏡子, 脱血処理がカツオの臭い成分に及ぼす影響, 日本水産学会誌, 82(1), 28-32 (2016).
- [7] Hanson SWF, Olley J. Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *J. Biochem.*, 89, 101-102 (1963).
- [8] 高村仁知, 食品中の脂質の酸化生成物による風味変化, オレオサイエンス, 7(6), 231-235 (2007).
- [9] I.Peinado, W.Miles, G.Koutsidis. Odour characteristics of seafood flavor formulations produced with fish by-products incorporating EPA, DHA and fish oil. *Food Chemistry*, 212, 612-619 (2016).
- [10] 遠藤泰志, 青柳貴子, 藤本健四郎, エイコサペンタエン酸の自動酸化により生ずる揮発性成分に及ぼすトリアシルグリセリン構造の影響, 日本油化学会誌, 47(9), 873-878 (1998).
- [11] Zenan ZHANG, Jun LIU, Xueyan HUANG, Xueqing ZHU, Shuaixiang JIN, Ruinan YANG, Xiang MA, Cong SUN, Yanlan BI. Oxidation Behavior of Docosahexaenoic Acid-Enriched Algal Oil and Its Oil-in-Water Emulsion. *Food Chemistry*, 46(13), 41-53 (2025).
- [12] 高嶋康晴, 脂肪酸分析によるマダいの養殖魚判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, 39, 7-14 (2015).
- [13] 藪内精三, 発芽大麦穀粒中のリノール酸ヒドロペルオキシドイソメラーゼ系によるリノール酸からのヘキサナールの生成, 日本農芸化学会誌, 52(9), 417-425 (1978).



PBL-NOG-hPZP マウスにおける xenogeneic GVHD 関連炎症の解析

Analysis of xenogeneic GVHD-related inflammation in PBL-NOG-hPZP mouse

田部洪輔¹⁾, 大野裕介^{2,3)}, 柏木寛史¹⁾, 大岩一平¹⁾, 中嶋理恵¹⁾, 石本人士¹⁾, 伊藤亮治²⁾, 椎名隆^{3,4)},
亀谷美恵^{2,3,4)}

¹⁾東海大学医学部産婦人科学, ²⁾公益財団法人実中研, ³⁾東海大学医学部基礎医学系分子生命科学,
⁴⁾東海大学先進生命科学研究所

*Kosuke Tabe¹⁾, Yusuke Ohno^{2,3)}, Hirofumi Kashiwagi¹⁾, Ipppei Ohiwa¹⁾, Rie Nakajima¹⁾, Hitoshi Ishimoto¹⁾, Ryoji Ito²⁾
Takashi Shiin^{3,4)}, Yoshie Kametani^{2,3,4)}**

*¹⁾Department of Gynecology, Tokai University School of Medicine, ²⁾Central Institute for Experimental Medicine and
Life Science (CIEM), ³⁾Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, ⁴⁾Institute of
Advanced Biosciences, Tokai University*

[要旨]

Pregnancy zone protein (PZP)は妊娠時の血漿中濃度が非妊娠時の100倍程度まで上昇する妊娠関連蛋白質であり、多様なプロテアーゼに対する阻害機能を持つ。本研究では、ヒトPZPを全身で発現する重度免疫不全NOGマウス(NOG-hPZP Tg)を作成し、これにヒト末梢血単核球(PBMC)を移植した異種移植の系でPZP発現亢進が異種移植によるgraft-versus-host disease (GVHD)を制御可能か検討した。NOG-hPZP Tgと littermate の間で、自然交配の産仔数に差はなかった。また、生着したヒトT細胞・B細胞及びそのサブセットの割合、体重減少の動態にも有意な差は検出されなかったが、細胞障害性T細胞の疲弊を抑制する可能性が示唆された。また、免疫組織染色を行い、PZPを発現することにより、ヒトPBMCを移植したのちの肺胞組織へのリンパ球の浸潤や肝実質へのリンパ球浸潤に特に差がないことを明らかにした。以上の結果、PZPの高発現は、異種移植片による免疫プロファイル変化に関しては抑制する傾向がなく、体重変動も同等であることから、本マウスにおけるヒトPZP産生亢進は異種移植後のヒトリンパ球によるGVHDを有意に抑制しないことが示唆された。

[Abstract]

Pregnancy zone protein (PZP) is a unique protease inhibitor involved in the pregnancy-related proteins whose expression increases during human pregnancy. In this study, we established a severely immunodeficient NOG mice which systemically expresses human PZP and examined if PZP regulates xenogeneic graft-versus-host disease using the NOG-hPZP Tg mice transplanted with human peripheral blood mononuclear cells (PBL-NOG-hPZP Tg). As a result, the fertility of NOG-hPZP Tg mice was not largely changed. PBL-NOG-hPZP Tg mice possessed comparable number of human T cells and B cells, together with the levels of activation and exhaustion of these cells and plasma immunoglobulin levels. Immunohistochemistry revealed that the infiltration of lymphocytes into lung and liver tissues was not significantly decreased. These results suggest that human PZP did not regulate immunity in the xenogeneic reaction in the xenogeneic GVHD condition in the humanized mouse.

[Key Words]

NOG mouse, pregnancy zone protein, graft-versus-host disease, lymphocyte

1. はじめに

Pregnancy zone protein (PZP)は、エストロゲンにより産生亢進する妊娠関連蛋白質であり、妊娠時の血漿中濃度が非妊娠時の数倍から100倍程度まで上昇し得る[1]。PZPは $\alpha 2$ マクログロブリンファミリーに属するタンパク質であり、複数のプロテアーゼに対するプロテアーゼインヒビターであると考えられている[2]。この分子はベイト領域というユニークな構造をプロテアーゼに切断させ、その際にプロテアーゼを包摂してその機能を抑制することが報告されている[3]。ベイト領域は様々なプロテアーゼによる切断を許容する配列を持ち、これを介してプロテアーゼ活性を阻害し、妊娠時に生じうるアロに対する炎症をコントロールすることが示唆されている。我々は、進化の過程で胎盤が浸潤性を獲得した新世界ザルのコモンマーモセットでは、血液中のPZPは妊娠中に増加しないが、同一ファミリーに属するA2ML1という分子が増加していることを明らかにした[4]。そしてヒトPZPとマーモセットA2ML1の両者は相同性の高いベイト領域配列を持ち、プロテアーゼインヒビターとして共通の機能を持つと推察された。ヒトを含む霊長類では、胎盤の浸潤能が進化的に亢進しており、それに関連してアロに対する抗原特異的な免疫反応の制御の重要性が増している[5]。そこで我々は、ヒトPZPが他者を認識して誘導される免疫応答を調節するかを明らかにするために、重度免疫不全NOGマウスにヒトPZPを発現させたNOG-hPZP Tgを確立した。そしてこのマウスにヒトPBMCを移植して、ヒト免疫系再構築マウス[6]を作成し、異種リンパ球移植によりGVHDを誘導して、PZPの高発現がGVHDを抑制することができるかを検討した。

2. 方法

1) 倫理審査承認

本研究における全ての動物実験は、CIEM動物実験委員会(承認番号:17026)の承認を得て、CIEMのガイドラインに従って実施された。また、ヒト細胞を用いた全ての実験は、CIEM倫理委員会(承認番号:19-11)の承認を得て、同ガイドラインに準拠して実施された。

2) 臨床検体

本研究に使用したヒト血液検体は、実中研においてインフォームドコンセントを取得した後、医師により健康状態が確認された健常者から提供を受けた。

3) NOG-hPZP Tg

ヒトPZP遺伝子をCAGプロモーター下に組み込み、Tgベクターを作製した。作製したssDNAをNOGマウスの前期核胚にマイクロインジェクションした。得られたファウンダーマウスをNOGマウスと戻し交配し、NOG-hPZP Tgマウスを樹立した。

4) 質量分析

マウス血漿をトリプシン消化後、還元・乾燥し、0.1%トリフルオロ酢酸に再溶解した。サンプルはUltiMate 3000 HPLCシステムを用いて逆相LC分離を行い、溶出したペプチドをQ Exactive質量分析計で測定した。データ解析およびラベルフリー定量は Scaffoldを用い、SwissProtデータベースを用いて同定した。

5) ヒトPBMCの調製

ヒト健常者2名から同意を得て採血を実施し、得られた血液をそれぞれFicoll液15mL入れた50mL tubeに上層し比重遠心分離(800 G, 20 min, 20°C)を行った。遠心分離されたヒトPBMC画分を回収し、PBSを40 mL加え遠心分離(1450 G, 5 min, 4°C)した。上清を除去し、RBC Lysis buffer(BD Pharm Lyse)を加えて静置し、遠心分離(1450 G, 5min, 4°C)した。上清を除去し、PBSを10 mL加え懸濁し、細胞数を計測した。一部についてはフローサイトメトリーによりリンパ球のプロファイルを解析した。PBMCのうち 5.0×10^6 cells/headをPBS 100 μ Lで懸濁し、全量をNOG-hPZP Tgの尾静脈中に移植した(29 G)。

6) フローサイトメトリー

脾臓をスライドガラスでホモジェナイズした後、メッシュを通して細胞を回収した。遠心分離(1450 G, 5min, 4°C)して上清を除去し、RBC Lysis bufferを加えて静置し、遠心分離(1450 G, 5min, 4°C)した。上清を除去し、PBSを10 mL加え懸濁し、細胞数を計測した。計測した脾臓細胞のうち 5×10^5 cellsを分注し、遠心分離(1450 G, 5 min, 4°C)し、上清を除去した。フローサイトメトリーで用いた抗体を[表 1-for FCM]に示した。各蛍光標識抗体を入れたのち遮光して15分4°C静置し、PBSを加え遠心分離(1450 G, 5 min, 4°C)した。上清を除去し、PBSを100 μ L加え懸濁し、メッシュを通して細胞を回収した。その後、BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson and Company, NJ, USA)で測定し、解析はFlowjo (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)を用いて行った。

7) 免疫組織化学染色

IHC で用いた抗体を[表 1-for IHC]に示した。キシレン(5min×3 回)でパラフィンを除去し、特級エタノール(3min×4 回)で組織の再水和を行った。流水(5min)でエタノールを除き、ヒストファイン 抗原賦活化液 pH9 を用いた抗原賦活化処理(120°C、20min)を行った。洗浄(0.01M PBS 3min×3 回)後、内因性ペルオキシダーゼ処理(0.3% H₂O₂/メタノール 10min)を行った。洗浄(0.01M PBS 5min×3 回)後、ブロッキング(1% normal goat serum を組織に添加して湿潤下で 30min)を行い、一次抗体を組織に添加して湿潤下で 60min 反応させた。洗浄(0.01M PBS 5min×3 回)後、HRP 標識二次抗体を組織に添加して湿潤下で 30min 反応させた。洗浄(0.01M PBS 5min×3 回)後、DAB(3,3'-Diaminobenzidine)による発色を行い、流水(3min)で DAB を除き、ヘマトキシリンで核染色を行った。核染色後、色出し(熱湯 5min)を行い、特級エタノール(3min×4 回)で組織の脱水を行い、キシレン(3min×3 回)で透徹を行った。切片をマリノール封入剤で封入して室温で一晩乾燥し、顕微鏡(KEYENCE BZ-X710)で撮影を行った。

3. 結果

マウス産仔数と PZP タンパク質発現の関連性

Tg と non-Tg の産仔数について検討したところ、IVF の仮親はそれぞれ 1 回目 4 匹、2 回目 5 匹を出産した。通常 NOG では IVF での出産は 40-50% であることから、Tg より non-Tg の方が自然高配と IVF の両方でやや多く、IVF 効率がやや低いが、大きな差はないという結果になった。食殺数は 1 回目 3 匹、2 回目 5 匹で通常レベルであることから、ヒト PZP が産仔数に与える影響はほとんどないことが明らかとなった。

また、これらのマウスのうち、移植効率の高かった Exp1 および Exp3 のマウスにおける相対的ヒト PZP 濃度を LS-MS で解析した。その結果、PZP の発現と週令および性別には相関がなく、全ての個体間で平均すると PZP(+)個体(182.6±29.95)では PZP(-)個体(4.311±1.04 ; バックグラウンド)に対して相対値 180 程度となり、高エストロゲン環境下で生じる PZP の亢進量に匹敵することが明らかとなった。一方、マウス PZP については、濃度の平均値は PZP(+)個体(136.61±17.51)、PZP(-)個体(120.98±13.64) とヒト PZP 陰性マウスでやや低いものの、統計的な有意差はな

く、ヒト PZP による影響は、ほとんど受けないことが示唆された(表 1)。

これらのマウスを用いて、以降の実験を行った。

表 1 NOG-hPZP Tg マウスにおける PZP 発現量

Weeks	Human PZP			Mouse PZP		
	2w	4w	5w	2w	4w	5w
Tg	203.84	202.6	200.55	126.88	147.95	144.19
	142.87	145.03	245.49	144.11	154.39	102.16
non-Tg	3.3892	4.7759	4.8578	123.14	118.44	102.01
	2.7513	ND	ND	140.31	ND	ND

体重の推移とリンパ球プロファイルの変化

NOG-hPZP Tg と littermate のマウスについて、ヒト PBMC 移植により発症が予想される GVHD による体重の変化を解析した。実験は 3 回行われ、Exp1 では 7 週、Exp2 では 8 週、Exp3 では 14 週のマウスをそれぞれ使用した。Exp2 の実験では、最終週のフローサイトメトリーの結果、7/8 のマウスの PBMC 生着能が低かったため(0-10%)、Exp1 と Exp3 のみ解析した。

NOG-hPZP Tg マウスとその Littermate の雌雄の体重の推移を移植後 4 週間計測した結果を、Exp1(0-4W 雄 n=2 Tg, 雄 n=1 non-Tg)および Exp3(0-2W 雄 n=1、雌 n=1 Tg, 雄 n=1、雌 n=1 non-Tg、0-4W 雄 n=1、雌 n=1 Tg, 雄 n=1、雌 n=1 non-Tg)のデータで比較した。



図 1. PBL-NOG-hPZP Tg における体重変化

Exp1 は雄のみ、Exp3 は雌雄それぞれ 4 匹づつを使用した。青; Tg, 橙; non-Tg. 縦軸は体重、それぞれの線は各個体の体重変化を示す。

その結果、統計的処理を行うことはできなかったが、7-8 週のマウス(Exp1)では NOG-hPZP Tg は、PBMC 移植後 2 週間目まで体重は増加傾向にあり、non-Tg の方が、やや体重が重い傾向が示された。その後、体重は減少に転じた。一方、14 週のマウスでは、雌雄ともに non-Tg で体重が重い傾向は示されず 2 週目以降に体重が減少する傾向は同様に検出された。(図 1)

次に、移植後の経時的なヒト PBMC 再構築について、末梢血中のヒトリンパ球の推移を解析し、その傾向を

確認した(図 2A,B,C,D,E)。こちらも Exp1 および Exp3 のデータのみを元に換算し、性差がないため雌雄のデータはまとめて示した。移植後 4-5 週まで、末梢血中のヒト白血球の割合は増加傾向にあり、non-Tg と Tg で、ほとんど差がないことが明らかになった。また、2 週目以降、ヒト白血球の 99%以上が T 細胞となる一方、B 細胞は移植後 3 週間の間にほとんどなくなり、Tg(+)と Tg(-)の間でその傾向にはほとんど差はなかった。また、5 週間の間に末梢血中のヒト CD4T 細胞とヒト CD8T 細胞の割合は Tg と non-Tg の間で特定の傾向は観察されなかった。

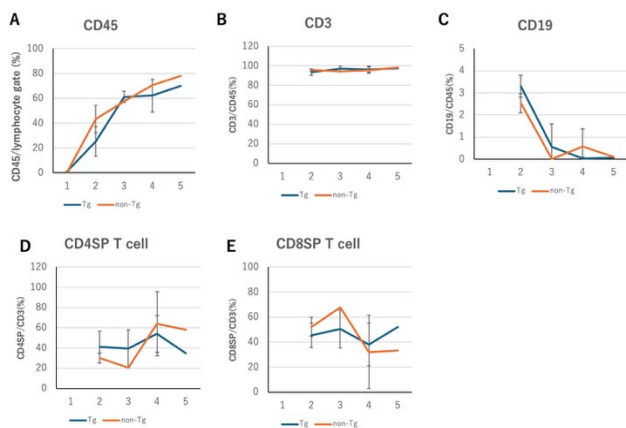


図 2. PBL-NOG-hPZP Tg におけるリンパ球サブセットの経時的変化

A. 脾臓細胞をリンパ球ゲートにて解析した細胞中のヒト CD45(白血球マーカー)陽性細胞の割合。B. ヒト CD45+細胞中の CD3(T 細胞マーカー)陽性細胞の割合。C. ヒト CD45+細胞中の CD19(B 細胞マーカー)陽性細胞の割合。D. ヒト CD3+細胞中の CD4(ヘルパー T 細胞マーカー)single positive 細胞の割合。E. CD3+細胞中の CD8(細胞障害性 T 細胞マーカー)single positive 細胞の割合。青; Tg, 橙, non-Tg を示す。Student's *t*-test を行ったが、有意差は示されなかった。

以上の結果、今回の Tg(+)とその littermate の解析からは、NOG マウスにおけるヒト PZP の発現は、GVHD による体重の減少を抑制することではなく、経時的な末梢血中のリンパ球サブセットの割合の変化にも大きく影響しない可能性が示された。

NOG-hPZP Tg リンパ組織に生着したヒトリンパ球の活性化とサイトカイン産生

PBMC 移植後 5 週(Exp1)あるいは 4 週(Exp3)でマウスより脾臓を採取し、フローサイトメトリーにより、生着したヒトリンパ球の活性化プロファイルを解析した。

その代表的なフローサイトメトリーの結果を図 3 に示した。

脾臓中のヒト細胞については Exp1, Exp3 の各個体ともに、細胞障害性 T 細胞の CD25 の発現レベル(MFI)は、Tg(+)脾臓で低くなる傾向が観察された。

次に、CD4T 細胞の Treg 分化について解析した。まず、CD4T 細胞のうち、CD25(+)細胞は相当数が検出されたが、これらにおいて、Treg のマーカーである Foxp3 の発現はほとんど検出されず、Treg の分化は促進していないことが明らかとなった。(図 4)

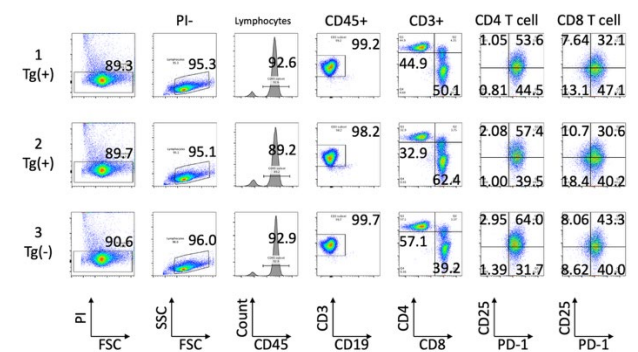


図 3. PBL-NOG-hPZP Tg 脾臓における T 細胞の活性化及び疲弊

Exp1 の 3 匹のマウスのフローサイトメトリーのパターンを示す。上 2 段は Tg, 下段は non-Tg である。左パネルから、それぞれゲートをかいた細胞群の解析を行った。CD45;CD45+細胞ゲート、CD3+;CD45+CD3+ゲート、CD4T cell;CD45+CD3+CD4+ゲート、CD8 T cell;CD45+CD3+CD8+ゲートを示す。パネル内の数字は各画分のパーセンテージを示す。CD25(活性化マーカー)、PD-1(疲弊マーカー)。

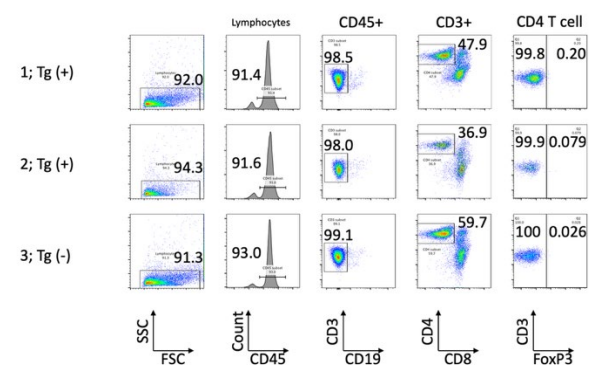


図 4. PBL-NOG-hPZP Tg 脾臓における Treg 細胞の分化

Exp-1 に用いた 3 匹のマウスのフローサイトメトリーのパターンを示す。上 2 段は Tg, 下段は non-Tg である。左パネルから、それぞれゲートをかいた細胞群の解析を行った。CD45;CD45+細胞ゲート、CD3+;CD45+CD3+ゲート、CD4T cell;CD45+CD3+CD4+ゲートを示す。パネル内の数字は各画分のパーセンテージを示す。Foxp3(Treg マーカー)。

以上の結果より、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞は、ほとんどが Treg 細胞ではなく、活性化 T 細胞であることから、PZP は T 細胞機能を抑制しないこと、細胞障害性 T 細胞については疲弊を亢進しない可能性が示唆された。

マウス組織の炎症像

最後に、免疫組織染色により、非リンパ組織（肺、腎臓、副腎、肝臓）の炎症像を確認した。図 5 に、非リンパ組織である肺の組織像を示した。気管支や肺胞には多くのヒト細胞の局在が観察され、Tg(+)と Tg(-)で大きな差は検出されなかった。また、肝臓でもヒト細胞の局在に大きな差は検出されなかった(データ未発表)。

これらの結果からも、PZP は GVHD を含む炎症を抑制することはできいことが明らかとなった。

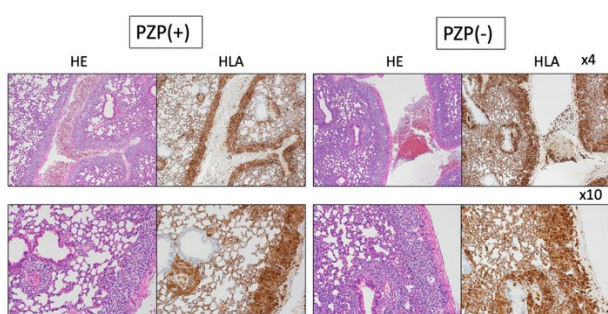


図 5. PBL-NOG-hPZP における肺の組織像

Exp-1 の 2 匹のマウスの組織染色の代表的なパターンを示す。左は Tg, 右は non-Tg である。冗談は気管支周辺部、下段は主に肺胞を示す。PZP(-)と比較して同程度に気管支へのヒト細胞集積や肺胞の形状の変容が観察される。

4. 考察

PZP は、妊娠時産生量が増加し、セミアロである胎児を受容するいわゆる妊娠免疫において、妊婦の免疫調節に関わることが知られている[7]。しかし、その分子機構の詳細は明らかになっておらず、PZP と免疫系の関連性については、あまり研究が進んでいない。PZP はユニークな方法でプロテアーゼを PZP 分子内に包埋するという機構を用いて、特殊なプロテアーゼ阻害剤として機能する。MMP などのプロテアーゼは炎症誘導とともに動員され、組織を破壊して免疫細胞の浸潤を可能にすることが知られているが[8]、PZP のベイト領域を切断すると、PZP に取り込まれてその活性は

低下することが予想される。それにより、炎症細胞の組織内流入は阻害され、炎症は抑制されることを我々は予測した。

しかし、今回の NOG-hPZP Tg 免疫ヒト化マウスの結果からは、PZP の過剰発現は、異種移植による GVHD が誘導する体重減少や炎症を抑制することはなく、むしろ細胞の疲弊を抑制し、免疫系の活性化を維持する可能性が示唆された。

Finch らは、PZP が好中球から放出され、気道感染において NETosis と関係することを明らかにしている[9]。PZP はこの時プロテアーゼを阻害し、プロテアーゼによる組織破壊と NET の機密性の低下を回避するなどむしろ自然免疫系に寄与する可能性もある。一方、さまざまなプロテアーゼの阻害をすることから、特に血中で線溶系のセリンプロテアーゼ・プラスミンなどを抑制し、血圧上昇、腎障害を誘導する可能性がある。事実、PZP は腎臓疾患との関連性も指摘されている[10]。このように、ヒト化マウスにおける PZP 高発現は獲得免疫系を大きく変化させることはないが、他の機能に対する影響は、長期的あるいは環境変化によっては生じる可能性がある。

今後、ヒト化マウスにおいてヒト PZP がどのような役割を果たすかについて明らかにするために、本マウスは有用であると考えられる。

5. 引用文献

- [1] H. Bohn, et al., *Arch Gynecol Obstet.*, **236**, 67 (1984).
- [2] F. Van Leuven, et al., *Clin Chim Acta*, **343**, 179 (1982)
- [3] L. Sottrup-Jensen, et al., *J Biol Chem.*, **264**, 11539 (1989)
- [4] H. Kashiwagi, et al. *Sci Rep.*, **10**, 5088 (2020)
- [5] A.M. Carter, et al., *Nat Rev Genet.*, **13**, 163 (2012)
- [6] Y. Kametani, et al., *Int J Mol Sci.* **20**, 6337 (2019)
- [7] L. Fialová, et al., *Clin Chim Acta.*, **343**, 179 (2004)
- [8] W.C. Parks, et al., *Nature Reviews Immunology* **4**, 617 (2004)
- [9] S. Finch, et al., *Am J Respir Crit Care Med.*, **200**, 992 (2019)
- [10] W-L. Chen, et al., *J Clin Med.*, **12**, 5894 (2023)

6. 謝辞

本研究は、科学研究費補助金(21K16823)および東海大学医学部研究助成金・先進生命科学研究費により行われた。

(総説)ヒルガオ科植物由来樹脂配糖体による HL-60 に対する細胞毒性
およびリパーゼ阻害作用

(Review) Cytotoxicity against HL-60 Cells and Lipase Inhibiting Activity
by Resin Glycosides from Convolvulaceae Plants

西川大貴^{1,2)}、小野政輝^{1,3)}、安田伸¹⁻⁴⁾

¹東海大学大学院生物科学研究科、²東海大学総合農学研究所、³東海大学農学部食生命科学科

⁴東海大学先進生命科学研究所・高機能食品開発部門

Hirota Nishikawa^{1,2)}, Masateru Ono^{1,3)}, Shin Yasuda¹⁻⁴⁾*

¹⁾ Graduate School of Bioscience, Tokai University, ²⁾ Research Institute of Agriculture, Tokai University;

³⁾ Department of Food and Life Sciences, School of Agriculture, Tokai University;

⁴⁾ Division of Functional Food Science, 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） E-mail: shin.yasuda@tokai.ac.jp

*Corresponding author: Shin Yasuda (Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

[要旨]

樹脂配糖体は、ケンゴシ等の瀉下生薬などに含まれるヒルガオ科植物特有の成分で複雑な構造を有するグリコリピッドである。近年、その単離と構造決定に関する研究ならびに、個々の分子レベルで生物活性を評価するための研究が、精力的に行われるようになってきた。本稿では、HL-60 前骨髄性白血病細胞株に対する細胞毒性と、ブタ膵リパーゼに対する *in vitro* 阻害活性および *in silico* ドッキング解析を行った我々の近年の研究成果を紹介する。

[Abstract]

Resin glycosides are characteristic constituents of plants in the family Convolvulaceae and are found in traditional laxative herbal medicines such as Pharbitidis Semen (kengoshi). Recently, research has focused on the isolation, structural elucidation, and evaluation of the biological activities of individual resin glycoside molecules. Here, we present our recent findings on the cytotoxicity of resin glycosides toward HL-60 human promyelocytic leukemia cells, their *in vitro* inhibiting activity against porcine pancreatic lipase, and *in silico* docking analyses.

[Key Words]

resin glycoside, *Ipomoea*, jalapin, convolvulin, cytotoxicity, lipase inhibition

1. はじめに

1-1) 樹脂配糖体とは

樹脂配糖体は、Pharbitidis Semen (*Ipomoea nil* Choisy アサガオの種子)、Rhizoma Jalapae (*I. purga* (Wender) Hayne の根)、Orizabae Jalap Tuber (*I. orizabensis* (Pelletan) の塊茎)などに含まれるヒルガオ科植物特有の成分である[1,2]。樹脂配糖体は、サツマイモの可食部の塊根切断面における粘着性の白色の乳液中にも含まれている。化学的には、有機酸、オキシ脂肪酸、および単糖類から構成されるグリコリピッドで複雑な構造を有している[1,2]。その特徴となる構造は、アルカリ加水分解で生成するオキシ脂肪酸のオリゴ配糖体(配糖酸)と、

糖部のヒドロキシル基が数種の有機酸によって部分的にアシル化されたもの(アシル化配糖酸)が複数重合した高分子量のオリゴマーと考えられてきた[1,2]。樹脂配糖体の化学的研究は19世紀半ばにヨーロッパで始められ、Mayer によって、樹脂配糖体がエーテル可溶性のヤラピン(jalapin)と不溶性のコンボルブリン(convolvulin)に大別されると報告されていたが[3]、現在では、大環状ラクトン構造を有するヤラピнтаイプと、遊離カルボキシ基を持つアシル化配糖酸などのコンボルブリンタイプに大別される[2]。樹脂配糖体をアルカリ加水分解、さらに酸加水分解して得られる構成成分の研究が精力的に行われ、2-methylbutyric acid、

(E)-2-methylbut-2-enoic (tiglic acid)、isovaleric acid、isobutyric acid、2-methyl-3-hydroxybutyric (nilic acid)などの有機酸、11-hydroxytetradecanoic (convolvulinolic) acid、jalapinolic acid (11-hydroxyhexadecanoic acid)、ipurolic acid (3,11-dihydroxytetradecanoic acid)などのオキシ脂肪酸、および glucose、rhamnose などの単糖類が構成成分として見い出されている[2]。また、アルカリ加水分解のみで得られる配糖酸はカルボン酸フリーのため分離が困難であり、配糖酸のメチルエステル体等の誘導体として、単離構造決定が行われることが多い[4,5]。樹脂配糖体は、構造が複雑であることより、その単離と構造決定に加えて、想定される生物活性を個々の分子レベルで評価するための研究は、近年注目されて精力的に行われるようになってきた。

1-2) 樹脂配糖体の生物活性研究

我々の研究グループは、樹脂配糖体の生物活性研究の一環として、ルコウアサガオ (*Quamoclit* × *multifida*)[6]、ハマヒルガオ(*C. soldanella*)[7]、コヒルガオ(*C. hederacea*)由来樹脂配糖体[8,9]が HL-60 ヒト前骨髄性白血病細胞に対して細胞毒性を示すことを報告してきた。また、ハマヒルガオ[10]、ハリアサガオ(*I. muricata*)由来樹脂配糖体[4]が抗ヘルペスウイルス活性を有することについても報告を行っている。また、他の研究グループにおいても、数種のヒルガオ科植物由来の樹脂配糖体の多機能として、がん細胞に対する細胞毒性作用[11-13]、抗ウイルス活性[14]、抗炎症作用[15]などが報告されている。さらに、消化酵素に関して、*I. batata* の茎葉部由来の樹脂配糖体抽出物[16]、*I. aquatica* 樹脂配糖体抽出物[17]によるリパーゼ阻害作用、ならびに、ヒルガオ科植物由来の様々な樹脂配糖体による α -グルコシダーゼ阻害作用[18,19]、および *I. cairica* 由来樹脂配糖体による α -グルコシダーゼ阻害作用[20]があり、一方でチロシンホスファターゼ 1B 阻害作用[21]が、近年報告されている。

1-3) 研究目的

樹脂配糖体の想定される生物活性を分子レベルで評価するための研究は、未だ途上にある。そのため、消化管での消化吸収やがん細胞に及ぼす樹脂配糖体の包括的な研究は、未だ不明な部分が多く残る。したがって、消化酵素阻害や細胞毒性に対して、個々の樹脂配糖体がどのような活性を發揮するかを体系的に検証する必要がある。

2. 結果の概要

2-1) HL-60 ヒト前骨髄性白血病細胞株に対する細胞毒性

HL-60 細胞は、急性前骨髄球性白血病患者に由来して樹立されたヒト骨髄系白血病細胞株であり、浮遊培養下で連続増殖することが知られている[22,23]。天然物からガンの化学予防剤や化学療法剤を発見するための有効かつ有用なモデルとして報告例があるため、選択した[24]。

Table 1 Cytotoxicity against HL-60 cells by genuine resin glycosides and related compounds from the genus *Ipomoea*.

Plant Name	Compound Name	M.W.	IC ₅₀ (μ M)	Ref
<i>I. alba</i>	Ipoalbin I	1,020	10.0 \pm 3.5	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin II	992	7.76 \pm 0.07	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin III	908	125 \pm 2	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin IV	990	3.91 \pm 0.04	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin V	1,002	8.05 \pm 0.26	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin VI	974	3.97 \pm 0.06	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin VII	974	7.53 \pm 0.12	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin VIII	1,018	17.8 \pm 0.3	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin IX	1,006	18.7 \pm 0.5	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin X	1,008	18.0 \pm 0.1	[25]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XI	892	18.9 \pm 0.6	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XII	878	39.5 \pm 1.0	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XIII	978	6.93 \pm 0.40	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XIV	978	19.4 \pm 1.1	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XV	1,008	27.1 \pm 5.5	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XVI	1,008	31.1 \pm 3.4	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XVII	978	6.84 \pm 0.37	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XVIII	762	40.8 \pm 2.3	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XIX	762	67.9 \pm 0.5	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XX	804	18.0 \pm 1.8	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XXI	1,002	6.28 \pm 1.18	[26]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XXII	952	15.5 \pm 0.4	[27]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XXIII	952	17.7 \pm 0.2	[27]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XXIV	950	36.9 \pm 1.9	[27]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XXV	926	131 \pm 5	[27]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XXVI	1,154	19.3 \pm 0.8	[27]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XXVII	1,066	19.4 \pm 0.3	[27]
<i>I. alba</i>	Ipoalbin XXVIII	1,136	32.1 \pm 0.7	[27]
<i>I. alba</i>	DC-2b	910	54.5 \pm 4.7	[27]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin I	1,598	27.8 \pm 1.1	[28]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin V	1,308	N. T.	[29]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin VI	1,336	N. T.	[29]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin VII	1,336	44.5 \pm 1.3	[29]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin VIII	1,320	>200	[29]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin IX	1,174	>200	[29]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin X	1,174	>200	[29]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin XII	1,368	N. T.	[29]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin XIII	1,336	56.4 \pm 1.1	[28]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin XIV	1,350	79.3 \pm 1.9	[28]
<i>I. lacunosa</i>	Lacunosin XV	2,060	21.4 \pm 0.2	[28]
<i>I. lacunosa</i>	Operculin VIII	1,336	N. T.	[29]
<i>I. lacunosa</i>	Simonin IV	1,320	N. T.	[29]
<i>I. muricata</i>	Muricatic acid C	856	187 \pm 6	[4]
<i>I. muricata</i>	Muricatic acid C methyl ester	870	25.8 \pm 4.1	[4]
<i>I. muricata</i>	Muricatin I	1,006	3.94 \pm 0.25	[4]
<i>I. muricata</i>	Muricatin II	992	8.47 \pm 0.32	[4]
<i>I. muricata</i>	Muricatin V	922	15.1 \pm 2.5	[30]
<i>I. muricata</i>	Muricatin VI	922	13.9 \pm 4.4	[30]
<i>I. muricata</i>	Muricatin VII	1,022	6.49 \pm 0.96	[4]
<i>I. muricata</i>	Muricatin IX	938	9.66 \pm 0.27	[30]
<i>I. muricata</i>	Muricatin X	938	13.5 \pm 0.04	[4]
<i>I. muricata</i>	Muricatin XI	938	41.2 \pm 1.0	[4]
<i>I. muricata</i>	Muricatin XIV	776	7.80 \pm 0.18	[4]
<i>I. muricata</i>	Muricatin XV	1,022	6.81 \pm 0.59	[4]
<i>I. muricata</i>	Muricatin XX	922	8.59 \pm 0.54	[4]
<i>Quamoclit</i> × <i>multifida</i>	Multifidin III	1,154	3.46 \pm 0.14	[6]
<i>Quamoclit</i> × <i>multifida</i>	Multifidin IV	1,154	14.7 \pm 1.2	[6]
<i>Quamoclit</i> × <i>multifida</i>	Multifidin VII	1,348	137 \pm 8	[6]
<i>Quamoclit</i> × <i>multifida</i>	Operculin XIII	1,182	10.9 \pm 1.4	[6]
<i>Quamoclit</i> × <i>multifida</i>	QM-10	1,498	66.7 \pm 0.2	[6]
<i>Quamoclit</i> × <i>multifida</i>	QM-12	1,598	223 \pm 4	[6]
<i>Quamoclit</i> × <i>multifida</i>	Quamoclinic acid B methyl ester	348	>300	[6]

M.W.; Molecular weight, IC₅₀; half maximal inhibitory concentration, N.T.; non toxic.

Table 2 Cytotoxicity against HL-60 cells by genuine resin glycosides and related compounds from the genus *Calystegia*.

Plant Name	Compound Name	M.W.	IC ₅₀ (μM)	Ref.
<i>C. hederacea</i>	Calyhedric acid A	1,050	>300	[7]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin II	1,646	6.46±0.37	[8]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin III	1,644	6.31±0.57	[8]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin IV	1,806	9.80±2.62	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin V	1,806	8.05±0.21	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin VII	1,808	7.50±0.72	[9]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin VIII	1,808	8.53±0.39	[9]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin X	1,662	8.43±0.88	[9]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XI	1,808	20.5±2.6	[32]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XII	1,808	13.6±1.0	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XV	1,792	17.7±8.8	[32]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XVII	1,482	12.7±0.8	[33]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XVIII	1,482	6.40±0.49	[33]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XIX	1,484	7.41±0.29	[33]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XX	1,484	14.2±4.3	[33]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXI	1,630	11.4±4.0	[33]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXII	1,628	14.1±8.4	[33]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXIII	1,630	20.2±7.5	[33]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXIV	1,646	>50	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXV	1,646	12.9±2.8	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXVI	1,644	8.19±0.04	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXVII	1,806	6.01±0.28	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXVIII	1,804	13.3±0.3	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXIX	1,808	9.73±0.70	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXX	1,804	6.96±2.10	[31]
<i>C. hederacea</i>	Calyhedrin XXXI	1,840	14.4±0.1	[31]
<i>C. japonica</i>	Calyjaponic acid A methyl ester	918	>200	[5]
<i>C. japonica</i>	Calyjaponin I	1,640	4.56±0.20	[34]
<i>C. japonica</i>	Calyjaponin II	1,540	7.60±0.14	[34]
<i>C. japonica</i>	Calyjaponin III	1,526	46.8±1.2	[34]
<i>C. japonica</i>	Calyjaponin IV	1,540	3.93±0.06	[34]
<i>C. soldanella</i>	Calsolic acid A	1,050	>300	[7]
<i>C. soldanella</i>	Calsolin II	1,382	13.3±1.6	[7]
<i>C. soldanella</i>	Calsolin III	1,382	12.6±2.7	[7]
<i>C. soldanella</i>	Calsolin VIII	1,528	14.5±3.1	[7]
<i>C. soldanella</i>	Calsolin IX	1,528	5.75±1.01	[7]
<i>C. soldanella</i>	Calsolin XIV	1,544	6.56±0.93	[7]
<i>C. soldanella</i>	Calsolin XVI	1,560	69.8±9.5	[7]

M.W.; Molecular weight, IC₅₀; half maximal inhibitory concentration.

これまでに、我々の研究グループが 2019-2026 年の間に報告した樹脂配糖体、配糖酸および配糖酸メチルエステル体の全 100 種類の細胞毒性について、Table 1 に主として *Ipomoea* 属由来を含む 62 種、Table 2 に *Calystegia* 属由来 38 種の化合物をまとめた。

多くの樹脂配糖体は μM オーダーの細胞毒性を有していた。特に、ヤラピンである樹脂配糖体の muricatin I[4]、ipoalbin IV- ipoalbin VI[25]、calsolin IX[7]などは IC₅₀ 4-7 μM と高い活性を示した。これらの結果は、大環状ラクトン構造を持つヤラピンが強い細胞毒性を有していることを支持している。しかしながら、ヤラピンでも有機酸の dodecanoic acid を有している lacunosin V や operculin VIII は最大濃度 200 μM で処理しても毒性を示さない場合がある[28]。

一方、配糖酸である muricatic acid C[4]や calsolic acid A[7] などは IC₅₀ が 200-300 μM 以上の弱い活性を示した。以前に報告されている細胞毒性[35]や抗ウイルス作用[4,10]などの他の生物活性において、配糖酸およびメチルエステル体の活性が弱いという事例と類似した結果が本研究でも得られている。しかしながら、定量的

な構造活性相関を議論するためには、構造的に類似した化合物を用いた継続的な研究が必要である。

現状では抗がん剤治療にはさまざまな副作用が懸念されている。そのため、樹脂配糖体に注目した天然物由来成分による細胞毒性の情報は有益である。

現在、樹脂配糖体成分による HepG2 細胞や A549 細胞などのさまざまなヒト由来がん細胞に対する細胞毒性が報告され、総説としてまとめられている[36,37]。樹脂配糖体を抗がん剤として利用するためには、正常細胞に対する毒性や異なるがん細胞に対する選択的な細胞毒性の有無や強弱を詳細に調べていく必要がある。そのため、樹脂配糖体を天然由来シズ化合物として利用開発するために、機能発現と細胞致死作用の更なるメカニズム解明が必要である。また、我々は *I. alba* 由来樹脂配糖体について HL-60 細胞での細胞毒性を報告している[25-27]。一方、同植物から得られる別の樹脂配糖体である albinosides について MCF-7 細胞を用いた先行研究では、薬剤排出ポンプである P-glycoprotein 活性阻害が近年、複数報告されている[38-40]。我々が報告してきた化合物が多剤耐性株に及ぼす影響や毒性発現の作用機序を評価・解明することが、次なる研究課題として重要である。

2-2) ハリアサガオ由来樹脂配糖体によるブタ隣リパーゼに対する *in vitro* 阻害活性および *in silico* 解析

これまでに、サツマイモ茎葉部由来の樹脂配糖体抽出物、*I. aquatica* 樹脂配糖体抽出物によるリパーゼ阻害作用[16,17]、ならびに、α-グルコシダーゼ阻害作用[18,19]が報告されている。そこで我々の研究グループでは、ハリアサガオ種子由来の樹脂配糖体画分(IMRG Fr.)とケンゴシ由来の樹脂配糖体である pharbitin が、*in vitro* で複数の消化酵素(α-glucosidase、α-amylase および lipase)に対して阻害作用を示すかどうかを調べた[41]。次に、ハリアサガオ種子由来の 3 つの真性樹脂配糖体および 1 つのメチルエステル体がリパーゼを阻害するか調べた。*In vitro* リパーゼ阻害活性試験にはブタ隣リパーゼを用いたため、次にブタ(PDB ID: 1ETH)とヒト(PDB ID: 1LPB)由来の両リパーゼを用いて、これら 4 化合物の *in silico* 解析を行った(Figure 1)。

そこでは、ハリアサガオ種子由来の IMRG Fr.およびアサガオ種子由来の pharbitin が、α-アミラーゼや α-グルコシダーゼに対してではなく、リパーゼ選択的な阻害活性を有することを、*in vitro* で明らかにした。さらに、ハリアサガオ種子由来の 3 種類の真性樹脂配糖体、

すなわち muricatin V, VI, IX, ならびに IX の配糖酸のメチルエステル体である muricatic acid C methyl ester がリパーゼ阻害活性を有することを見出した (Figure 2)。そこでは、大環状構造を持つ muricatin V, VI および IX が、muricatic acid C methyl ester よりも強い活性を示した。

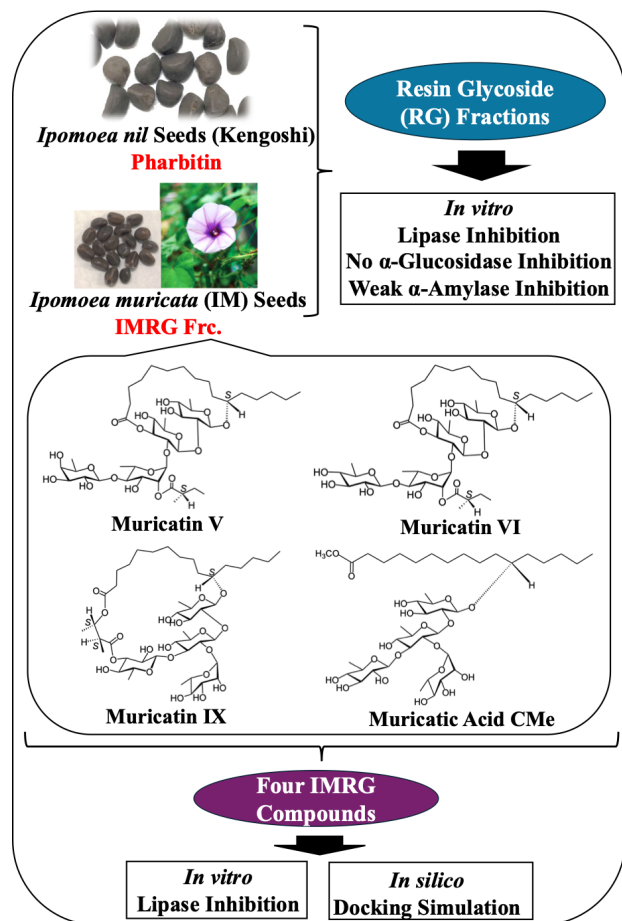


Figure 1. Inhibitory effects of resin glycosides from *Ipomoea muricata* and pharbitin on digestive enzymes (see [41]).

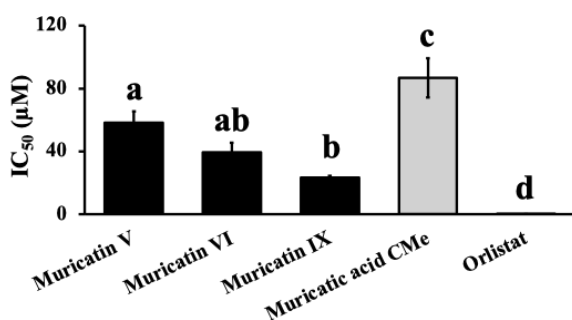


Figure 2. IC₅₀ values of four compounds from *I. muricata* and orlistat on the lipase inhibition assay. The data shown represent the mean ± S.D. from three experiments. Orlistat was used as a positive control. Me; methyl ester, IC₅₀; half maximal inhibitory concentration (see [41]).

ブタおよびヒトのリパーゼと 4 化合物の *in silico* による解析では、基質である *p*-nitrophenyl laurate よりこれら 4 化合物が高い結合親和性を有することを示した [41]。そのため、ブタ膵リパーゼから得られた阻害効果がヒト膵リパーゼでも同様に得られる可能性があり、樹脂配糖体をリパーゼ阻害薬としてヒトの健康面で利用できることが期待された。ただし、本研究は *in vitro* および *in silico* 評価に限定されていた点に留意すべきである。*In vitro* リパーゼ阻害活性試験には、発色性代替基質が使用されたため、樹脂配糖体が *in vitro* および *in vivo* において、酵素によるトリグリセリド加水分解を直接阻害し、脂質代謝に影響を与えるか否かの解明を行う必要がある。分子量が大きく両親媒性を持つ性質から、樹脂配糖体の腸管吸収とバイオアベイラビリティについても精査が必要である。

ブタ膵リパーゼに対する *in vitro* 阻害活性および *in silico* 解析において、将来的には、樹脂配糖体をベースとした新規な抗肥満薬や緩下剤などの開発と利用を目指し、*in vitro* から *in vivo* に向けて、化合物の腸管内での活性と安定性、構造活性相関の検証、実証実験などのさらなる研究を進める必要がある。

3. まとめと展望

樹脂配糖体の単離と構造決定、そしてその潜在的な生物学的活性のさらなる評価が近年注目され、精力的に行われるようになってきたものの、未だそれらの生物活性に関する研究は少ない。

本稿では、我々の研究グループによって近年行われた HL-60 前骨髄性白血病細胞株に対する樹脂配糖体の成分レベルでの包括的な細胞毒性と、さらに一部の樹脂配糖体でのブタ膵リパーゼに対する *in vitro* 阻害活性および *in silico* 解析の結果を紹介した。そこでは、大環状構造を持つヤラピンは配糖酸やメチルエステル体よりも強い活性を示す傾向にあった。

これらの成果は、ヒトでの瀉下作用、抗腫瘍作用、抗肥満作用などに有益なヒルガオ科植物由来樹脂配糖体をシーズとした成分剤の利用と開発に向け、基礎的な知見を与えるものである。

4. 引用文献

- [1] R. Pereda-Miranda *et al.*, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products Vol.92. New York (NY): Springer. pp.77-153 (2010)
- [2] M. Ono, *J Nat Med*, **71**, 591-604 (2017)

- [3] W. Mayer, *Justus Liebig's Ann Chem*, **95**, 129-176 (1852)
- [4] M. Ono et al., *J Nat Med*, **78**, 525-536 (2024)
- [5] K. Uemura et al., *J Nat Med*, **77**, 284-297 (2023)
- [6] M. Ono et al., *J Nat Med*, **73**, 11-22 (2019)
- [7] M. Ono et al., *J Nat Med*, **74**, 200-211 (2020)
- [8] M. Ono et al., *Phytochemistry*, **190**, 112888 (2021) doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112888>
- [9] M. Ono et al., *Nat Prod Res*, (2021) doi: 14786419.2021.2005593.
- [10] M. Ono et al., *Chem Pharm Bull*, **62**, 839-844 (2014)
- [11] S. Cruz-Morales et al., *J Nat Prod*, **79**, 3093-3104 (2016)
- [12] B.Y. Fan et al., *J Nat Prod*, **77**, 2264-2272 (2014)
- [13] B.Y. Fan et al., *J Funct Foods*, **19**, 141-154 (2015)
- [14] S. O'Keefe et al., *J Cell Sci*, **134**, (2021) doi: 10.1242/jcs.257758.
- [15] K. Yoshikawa et al., *J Nat Prod*, **73**, 1763-1766 (2010)
- [16] J.Y.H. Toy et al., *Food Res Int*, **159**, (2022) doi: 10.1016/j.foodres.2022.111552.
- [17] J.Y.H. Toy et al., *Food Funct*, **13**, 5353-5364 (2022) doi: 10.1039/D2FO00555G
- [18] D. Rosas-Ramírez et al., *Phytochemistry*, **148**, 39-47 (2018)
- [19] D. Rosas-Ramírez et al., *Rev Bras Farmacogn*, **30**, 336-345 (2020)
- [20] J.T. Pan et al., *Molecules*, **20**, 6601-6610 (2015)
- [21] S.P. Guo et al., *Biomolecules*, **15**, 1465 (2025) doi: 10.3390/biom15101465
- [22] S.J Collins et al., *Nature*, **270**, 347-349 (1977)
- [23] S.J Collins, *Blood*, **54**, 713-733 (1979)
- [24] F. Yu et al., *J Pharm Pharmacol*, **60**, 253-259 (2008)
- [25] N. Misuda et al., *J Nat Med*, **79**, 341-356 (2025)
- [26] M. Ono et al., *Fitoterapia*, 106787 (2025) doi: 10.1016/j.fitote.2025.106787
- [27] M. Ono et al., *Carbohydr Res*, 109845 (2026) doi: j.carres.2026.109845.
- [28] M. Ono et al., *Chem Pharm Bull*, **75**, 1075-1083 (2025)
- [29] M. Ono et al., *Chem Pharm Bull*, **73**, 547-558 (2025)
- [30] M. Ono et al., *Nat Prod Res*, **38**, 423-432 (2024)
- [31] M. Ono et al., *J Nat Med*, **79**, 845-862 (2025)
- [32] M. Ono et al., *J Nat Med*, **77**, 774-791 (2023)
- [33] M. Ono et al., *Carbohydr Res*, **535**, (2024) doi: j.carres.2023.108993.
- [34] M. Ono et al., *Fitoterapia*, 107009 (2025) doi: 10.1016/j.fitote.2025.107009
- [35] B.Y. Fan et al., *J Nat Prod*, **82**, 1593-1598 (2019)
- [36] B.Y. Fan et al., *Med Res Rev*, **42**, 2025-2066 (2022)
- [37] R. Maharani et al., *Molecules*, **27**, 8161 (2022)
- [38] S. Cruz-Morales et al., *J Nat Prod*, **75**, 1603-1611 (2012)
- [39] S. Cruz-Morales et al., *J Nat Prod*, **79**, 3093-3104 (2016)
- [40] J. Castañeda-Gómez et al., *Rev Bras Farmacogn*, **27**, 434-439 (2017)
- [41] H. Nishikawa et al., *Nat Prod Res*, 1-8 (2025) doi: 10.1080/14786419.2025.2495162.

5. 謝辞

本研究の一部は、バイオテクノロジー研究推進会ならびに一般財団法人ウエルシーズからの研究助成により実施されたものです。



<総説>小胞体内で織り成されるジスルフィド結合形成ネットワーク： 協同的酵素機構とその模倣によるタンパク質生産効率向上の可能性

(Review) Disulfide Bond Formation Networks in the Endoplasmic Reticulum: Cooperative Enzymatic Mechanisms and Their Mimicry for Improving Protein Production Efficiency

岩本 駿平¹⁾, 荒井 堅太^{1,2)}

¹⁾東海大学大学院理学研究科, ²⁾東海大学先進生命科学研究所

Shunpei Iwamoto¹⁾, Kenta Arai^{1,2)}

¹⁾ Graduate School of Science, Tokai University, ²⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

小胞体 (ER) は、分泌タンパク質や膜タンパク質の酸化的フォールディングが進行する主要な反応場であり、複数のジスルフィド (SS) 結合を正確に形成・再編成する高度に制御された分子機構を有している。ER 内の SS 結合形成は、Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリー酵素、酸化酵素 Ero1、過酸化還元酵素 Prx4 などが連携した「SS 結合形成ネットワーク」によって制御されている。これらの酵素群は、酸化的フォールディングの進行段階に応じて役割分担し、SS 結合導入、異性化、酵素の再酸化を協調的に進行させることで、効率的な酸化的フォールディングを実現している。本総説では、ER 内における SS 結合形成の分子基盤と、電子移動リレーを介した協同的酵素機構について概説するとともに、これらのネットワーク構造を人工的に模倣する試みを紹介する。

[Abstract]

The endoplasmic reticulum (ER) serves as the primary compartment for oxidative protein folding of secretory and membrane proteins and contains highly regulated molecular machinery that enables the accurate formation and rearrangement of multiple disulfide (SS) bonds. In the ER, SS bond formation is controlled by a cooperative “SS formation network” composed of protein disulfide isomerase (PDI) family enzymes, the oxidase Ero1, and the peroxidase Prx4. These enzymes function in a division-of-labor manner depending on the stage of oxidative folding, thereby coordinating SS bond introduction, isomerization, and enzyme reoxidation to achieve efficient protein maturation. In this review, we summarize the molecular basis of SS bond formation in the ER, with particular emphasis on cooperative enzymatic mechanisms mediated by electron relay networks. We further introduce recent attempts to artificially mimic these network structures, highlighting emerging strategies for reconstructing ER-like oxidative folding systems.

[Key Words]

Enzyme model, Protein disulfide isomerase, Selenium, Protein folding, Endoplasmic reticulum

1. はじめに

遺伝情報に基づいて合成されるポリペプチド鎖は、翻訳後に適切な立体構造へと折り畳まれることで、初めて機能的なタンパク質として成熟する。この「フォールディング」過程は、生命活動の根幹を

支える極めて精緻な分子プロセスである。分泌タンパク質や膜タンパク質の多くは、複数のジスルフィド (SS) 結合をその分子内に有しており、新生ポリペプチド鎖のフォールディングに連動する正確な SS 結合形成がそれらの機能発現に不可欠

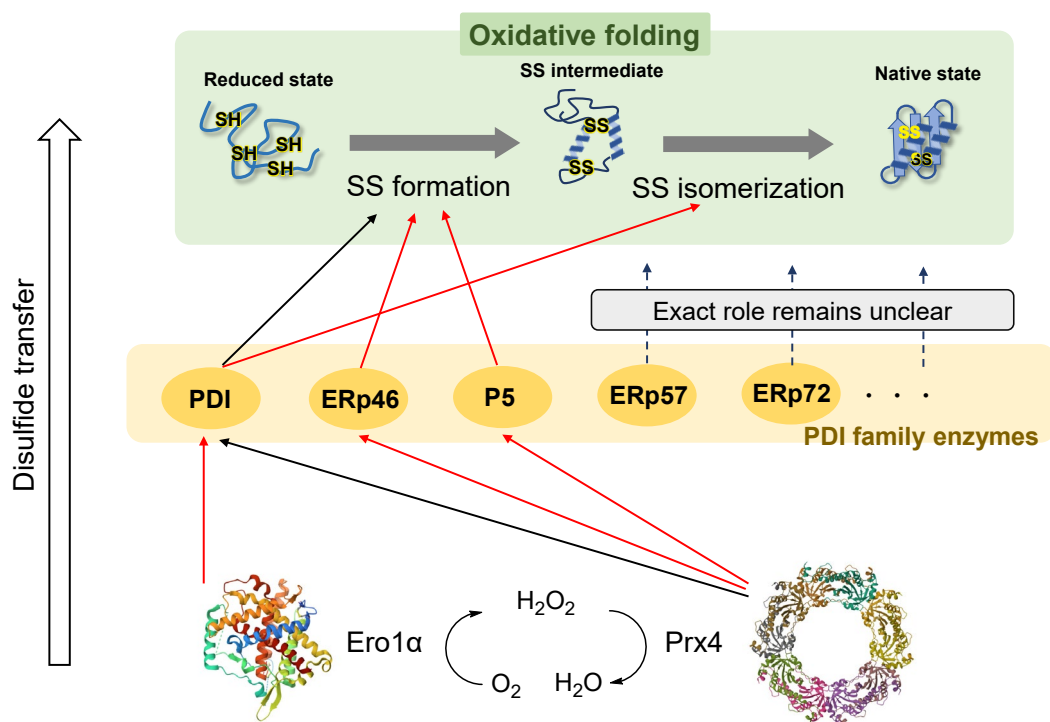


Fig. 1 哺乳類小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) における酸化的タンパク質フォールディングを促進するジスルフィド結合形成ネットワークのモデル図。本図は文献 9 および文献 10 を参考に再構成したものである。赤矢印は主要な寄与経路 (major contribution) を、黒矢印は副次的な寄与経路 (minor contribution) をそれぞれ示している。示したタンパク質立体構造は、Ero1 α (PDB ID: 3AHQ) および Prx4 (PDB ID: 2PN8) に対応する。

である (Fig. 1) [1]。

SS 結合は、システイン残基間に形成される共有結合であり、タンパク質の立体構造安定化において中心的な役割を果たす。一見すると単純な二電子酸化反応に見えるが、タンパク質のフォールディング過程では、ペプチドコンフォメーションの変化、チオール酸化 (SS 形成)、さらに SS 結合の組み換え (SS 異性化) が、可逆的かつ競合的に進行する極めて複雑な化学プロセスとなる。この一連の反応は「酸化的フォールディング[2]」と総称され、細胞内におけるタンパク質成熟のみならず、試験管内での人工的タンパク質合成においても不可欠な工程である (Fig. 1)。細胞内では、誤ったフォールディングが機能喪失にとどまらず、凝集や分解を引き起こし、ひいては糖尿病や神経変性疾患などの原因となることが示唆されている [3-5]。一方、試験管内におけるフォールディング不全は、合成タンパク質の生産効率を著しく低下させる主要な要因となる [6,7]。

真核細胞においては、このような高難度の酸化的フォールディングが主に行われる場が小胞体 (ER) であり、タンパク質の構造形成を精密に制

御するための高度に組織化された分子機構が進化的に獲得されてきた。Protein Disulfide Isomerase (PDI) をはじめとする多様なフォールディング促進酵素群が存在し、SS 結合の形成、切断、架け替えを協動的に制御している [8]。

長年にわたる研究の蓄積により、ER 内の酸化的フォールディングは、単一酵素による逐次的反応ではなく、PDI ファミリー、酸化酵素、過酸化還元酵素が連携して機能する「SS 結合形成ネットワーク」として理解されつつある (Fig. 1) [9,10]。このネットワークでは、酵素による SS 結合の形成、酵素への電子の受け渡し、基質タンパク質の一時的捕捉など、様々な事象が動的に統合されており、単純な反応速度論では記述できない協動的メカニズムが成立している。すなわち、ER は単なる反応容器ではなく、フォールディングを効率化する高度に設計された反応場として機能していると捉えることができる。

本総説では、まず小胞体内における SS 結合形成の分子基盤と協動的酵素メカニズムについて概説する。次に、これらの知見を基に、ER の SS 結合形成ネットワークを「模倣」する試みとして、低

分子化合物を用いた人工フォールディングシステムに関する近年の研究動向を紹介する。最終的に、これらの人工系がタンパク質生産効率の向上にどのように貢献し得るかについて展望し、今後の研究の方向性を議論する。

2. PDI ファミリーによる SS 結合形成制御

ER 内における酸化フォールディングの中核を担うのが、PDI である (Fig. 2a) [11-13]。PDI は、CGHC レドックスモチーフを有するチオレドキシ (Trx) 様ドメインから構成され、CGHC モチーフを介したチオール-ジスルフィド交換反応により、基質タンパク質に新規 SS 結合を導入する (Fig. 2b, 赤矢印)。さらに PDI は、誤って形成された SS 結合の組み換えを促進することで、正しい結合パターンへの到達を助ける (Fig. 2b, 青矢印)。このように、PDI は酸化反応と構造補正を同時に担うことで、フォールディングの速度と正確性を高めている。

近年、ER 内には PDI 以外にも 20 種類を超える PDI ファミリー酵素が存在し、それぞれが異なる役割を担っていることが明らかになってきた。なかでも ERp46 は、新生ポリペプチド鎖への迅速な SS 結合導入に特化した酵素として注目されている [14] (Fig. 1)。ERp46 は、CGHC モチーフを有する三つの Trx 様ドメインから構成され、それらはフレキシブルなリンカーポリペプチド鎖によって連結されている。この高い構造柔軟性により、ERp46 は立体構造が未形成な新生鎖ポリペプチドを低選択的に認識し、無作為かつ迅速に SS 結合を導入することで、初期フォールディング段階の加速を担っていると考えられている。

一方、PDI は、4 つの Trx 様ドメインがタンデムに連結された構造をとり、全体として U 字型の立体構造を形成する。この構造により、PDI は分子内部に疎水性キャビティを有しており、フォールディング過程において一時的に蓄積する構造未成熟な基質タンパク質を選択的に認識・捕捉することが可能である。すなわち、PDI は翻訳の進行に伴って十分に伸長したポリペプチド鎖に対して比較的持続的に結合し、誤って形成された SS 結合の異性化や全体構造の最適化を担う役割に特化していると考えられている (Fig. 1)。

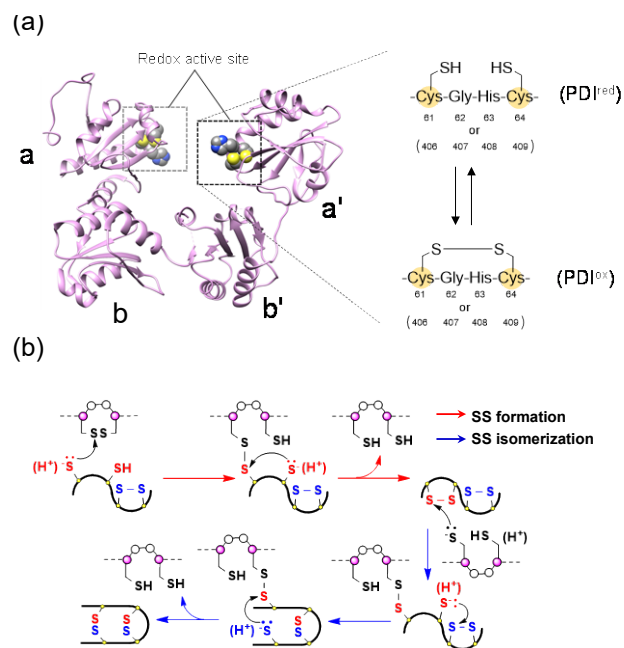


Fig. 2 Protein disulfide isomerase (PDI). (a) PDI の三次元構造およびレドックス活性部位 (PDB ID: 4EKZ)。 (b) 酸化タンパク質フォールディング過程における PDI レドックス活性部位の触媒機構。

さらに近年、PDI は基質タンパク質の捕捉過程において、過渡的に対面型のホモ二量体を形成することが明らかとなってきた [15]。この二量体化により、疎水性キャビティが拡張・安定化され、構造未成熟な基質タンパク質を包み込むように保持することが可能となる。こうした持続的かつ安定な相互作用様式は、基質タンパク質の凝集を抑制しつつ、誤って形成された SS 結合の効率的な再配置を促進する点で重要である。すなわち、この特性が、PDI がフォールディング後期において分子シャペロン様酵素として機能する基盤となっている。

このように、PDI ファミリー酵素は機能的に分類化されており、フォールディングの進行段階に応じて異なる酵素が協調的に作用することで、複雑な SS 結合パターンを有するタンパク質であっても高効率に機能性構造体へと導いている。

3. SS 形成過程における電子移動ネットワーク

ER 内は、タンパク質中のシステイン残基が SS 結合を形成する反応場として、サイトゾルとは異なる酸化還元環境が維持されている。特に、酸化型グルタチオン (GSSG) の濃度はサイトゾルと比較

して顕著に高く、報告されている GSH:GSSG 比の違いから推定すると、ER 内の GSSG 濃度はサイトゾルよりも数十倍から約 100 倍程度高い可能性がある^[16]。この酸化的環境により、チオール基から SS 結合への平衡は酸化側へと強く偏り、SS 結合形成が熱力学的に有利な条件が整えられている。

このような環境下において、PDI ファミリーに属する酵素群が新生ポリペプチド鎖に SS 結合を導入する役割を担う。PDI は、ERp46 ほど迅速ではないものの、構造未成熟な新生ポリペプチド鎖と相互作用し、SS 結合形成を触媒することができる。この反応過程において、PDI 自身は電子を受け取り還元型へと変換されるため、継続的な触媒活性の維持には再酸化機構が不可欠である。

PDI の再酸化は、GSSG だけでなく、フラビン依存性酸化酵素である Ero1 によって担われている (Fig. 3)^[17]。Ero1 は分子状酸素を最終電子受容体として PDI を酸化し、その過程で過酸化水素を副生成物として生じる。生じた過酸化水素は、酸化ストレスの原因となり得るが、小胞体内ではペルオキシレドキシシン 4 (Prx4) がこれを還元することで、酸化還元恒常性が維持されている^[18]。

さらに、Prx4 は過酸化水素の解毒にとどまらず、酸化された状態から PDI ファミリー分子を再酸化し得ることが示されている (Fig. 1)。特に、SS 導入過程で還元型となった ERp46 を Prx4 が再酸化する経路が提案されており、ERp46 が連続的に新生ポリペプチド鎖へ SS 結合を導入するための酸化力供給系として機能する可能性がある^[19]。すなわち、小胞体内では、Ero1-PDI 系に加えて、過酸化水素を介した Prx4-ERp46 系が並走し、多段階の電子移動リレーによって SS 結合形成反応と活性酸素制御が協調的に進行していると考えられる。

一方で、Ero1 や Prx4 が PDI や ERp46 以外の PDI ファミリー酵素をどの程度基質として酸化しているのかについては、現時点では十分に解明されていない。多数存在する PDI ファミリー酵素がどのように電子移動ネットワークへ組み込まれ、それぞれの機能を発揮しているのかは、今後の重要な研究課題である。

4. SS 形成ネットワークの人工的模倣の可能性

ER 内における SS 結合形成は、単一の酵素反応ではなく、複数の酸化還元酵素が役割分担しながら

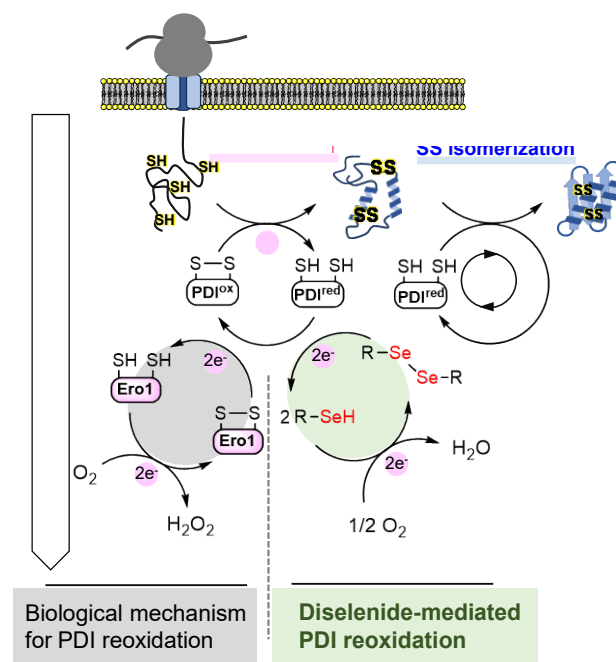


Fig. 3. Ero1 (灰色) ならびに Ero1 活性を模倣する人工ジセレンド (Se-Se) 触媒 (緑色) によって構築される電子移動リレー系の模式図。

機能するネットワークとして成立している。このような電子移動リレー型ネットワークの理解とその人工的模倣は、PDI ファミリーが本来有する能力を、細胞内のみならず試験管内反応系においても十分に引き出すための新たな戦略となり得る。

我々はこれまでに、環状ジセレンド化合物を用いた酸化的 SS 結合形成反応を報告しており、この系は Ero1 の機能を模倣する人工酸化触媒として位置づけることができる^[19]。本系においては、SS 結合形成反応を触媒した結果として還元型となった PDI が、環状ジセレンドによって再酸化され、PDI 中の SS 結合が再形成される。これに伴い生成したジセレンオール体は、分子状酸素を最終電子受容体として自発的に再酸化され、元のジセレンド構造へと回帰する (Fig. 3)。

この一連の電子移動過程は、Ero1 を起点とする小胞体内 SS 形成ネットワークにおける電子リレー機構と高い類似性を有しており、人工分子系においても「基質—酵素—分子状酸素」を結ぶ循環型ネットワークが成立していると考えられる。すなわち、人工分子によって電子の流れそのものを設計することで、SS 結合形成反応を持続的かつ効率的に駆動することが可能となる。

一方、PDI ファミリーの人工ミミック設計の観点からは、SS 結合形成と SS 結合異性化という異なる機能を、複数の分子に役割分担させる戦略が有効であると考えられる。具体的には、(i) チオール基の pK_a 制御による反応性の調整、(ii) レドックスポテンシャルの精密制御による酸化力の規定、(iii) 基質タンパク質との相互作用様式、すなわち構造認識能の付与といった要素を組み合わせることで、PDI ファミリーが担う機能分化を人工的に再現することが可能となる。

近年、このような概念に基づいて設計されたシクロデキストリン (cyclodextrin, CD) を基盤とするレドックス分子が、新たな酸化的フォールディング試薬として注目を集めている。村岡らは、CD の疎水性空間を利用した「曖昧な基質認識」により、構造未成熟な基質タンパク質を低選択的に捕捉しつつ、迅速な SS 結合形成を可能とする人工分子系を報告している^[20]。このアプローチは、ERp46 に代表される「短時間結合・高速 SS 導入」という生体内の戦略を、低分子系において機能的に再現したものと捉えることができる。

4. 将来の展望

本総説では、小胞体内において機能する SS 結合形成ネットワークに着目し、PDI ファミリー酵素、Ero1、Prx4 といった酸化還元因子が、電子移動リレーを介して協調的に作用する分子機構について概説した。これらの知見は、SS 結合形成が単一酵素反応ではなく、空間的・時間的に制御されたネットワーク反応として成立していることを示しており、「電子の流れ」や「反応場」を設計単位とする新たなフォールディング制御の視点を提示している。

この概念は、人工分子を用いた SS 形成反応系の構築においても重要な指針となる。CD 接合型レドックス分子や環状ジセレニド化合物に代表される人工系は、SS 形成、SS 異性化、酵素再酸化を分担させることで、生体内 SS 形成ネットワークを機能的に模倣し得ることを示している。今後は、SH 基の pK_a やレドックスポテンシャルの精密制御、基質タンパク質との相互作用様式の高度化を通じて、より洗練された人工 SS 形成ネットワークの構築が可能になると考えられる。

将来的には、こうした人工的 SS 形成反応場を、

試験管内タンパク質生産や難フォールディング性タンパク質の構造形成制御へと応用することが期待される。さらに、機能不全に陥った小胞体内の関連酵素を補完・代替する人工触媒として機能することで、タンパク質のミスフォールディングやそれに起因する疾患に対する予防・治療戦略の基盤となり得る。

以上のように、小胞体に学んだ SS 結合形成ネットワークの理解とその人工的再構築は、生命現象の模倣という基礎学術にとどまらず、試験管内および細胞内におけるタンパク質機能発現を人工的に制御するという新たなタンパク質科学の展開へとつながるものである。今後、有機化学・材料科学・生物学が融合した学際的研究の進展により、SS 結合形成ネットワークを基盤とするタンパク質生産技術のさらなる高度化が期待される。

5. 引用文献

- [1] M. J. Feige et al., Disulfide Bonds in Protein Folding and Stability. In *Oxidative Folding of Proteins: Basic Principles, Cellular Regulation and Engineering*, ed., M. J. Feige; Royal Society of Chemistry; pp. 1–33 (2018).
- [2] M. Narayan, et al., *Acc. Chem. Res.*, **33**, 805–812 (2000).
- [3] A. Mukherjee, et al., *Trends Mol. Med.*, **21**, 439–449 (2015).
- [4] C. Ridler, *Nat. Rev. Neurol.*, **13**, 128–128 (2017).
- [5] C. Soto, *Nat. Neurosci.*, **21**, 1332–1340 (2018).
- [6] L. Buscajoni, et al., *Biotechnol. Adv.*, **61**, 108050 (2022).
- [7] M. Rahban, et al., *RSC Adv.*, **13**, 35947–35963 (2023).
- [8] M. Matsusaki, et al., *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1864**, 129338 (2020).
- [9] Y. Sato, et al., *FEBS J.*, **279**, 2262–2271 (2012).
- [10] Y. Sato, et al., *Sci. Rep.*, **3**, 2456 (2013).
- [11] B. Wilkinson, et al., *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1699**, 35–44 (2004).
- [12] C. W. Gruber, et al., *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 455–464 (2006).
- [13] F. Hatahet, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 2807–2850 (2009).
- [14] C. Hirayama, et al., *iScience*, **24**, 102296 (2021).
- [15] M. Okumura, et al., *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 499–509 (2019).
- [16] B. M. Dixon, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 963–972 (2008).

[17] K. Araki, et al., *J. Biol. Chem.*, **286**, 32705–32712 (2011).

[18] J. T. Tavender, et al., *EMBO J.*, **29**, 4185–4197 (2010).

[19] R. Mikami, et al., *ChemBioChem*, **26**, e202400739 (2025).

[20] K. Suzuki, et al., *Chem. Sci.*, **15**, 12676–12685 (2024).

6. 謝辞

本研究は、日本学術振興会・科学研究費助成事業・基盤研究（C）（課題番号：23K04933）の助成を受けて実施された。

利益相反：開示すべき利益相反はありません。



光応答性保護基を有するホスホロアミダイト試薬の合成とリン酸化・ 光脱保護挙動の検討

Synthesis of Photolabile Protecting Group-Bearing Phosphoramidite Reagents and Investigation of Their Phosphorylation and Photodeprotection Behavior

小林 晴香¹⁾, 小口 真一^{1,2)}

¹⁾東海大学理学部化学科, ²⁾東海大学先進生命科学研究所

Haruka Kobayashi¹⁾, Shinichi Koguchi^{1,2)}

¹⁾Department of Chemistry, Tokai University, ²⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

光応答性保護基は、波長選択的に反応を制御でき、かつ温和な条件下で脱保護が可能であることから、副生成物の生成や副反応を抑制できる有用な手法として注目されている。本研究では、光応答性保護基を有する4種類のホスホロアミダイト試薬を新たに合成し、これらを用いてシクロヘキサノールのリン酸化を行った。さらに、得られたリン酸化生成物について光脱保護挙動を詳細に検討し、各保護基の反応特性を比較評価した。

[Abstract]

Photolabile protecting groups offer wavelength-selective reaction control and enable deprotection under mild conditions, reducing byproduct formation and undesired side reactions. Here, we report the synthesis of four amidite reagents bearing photolabile protecting groups and their application to the phosphorylation of cyclohexanol. The photolysis of the resulting phosphate esters was systematically studied, revealing clear differences in reactivity and deprotection efficiency among the protecting groups.

[Key Words]

Photolabile protecting group, Phosphorylation, Phosphoramidite

1. はじめに

光分解性保護基は、光照射によって選択的に脱離可能な保護基であり、化学合成および生化学研究の分野で広く利用されている。一般的な保護基が酸・塩基・還元剤などの化学的条件によって除去されるのに対し、光分解性保護基は特定波長の光照射のみで脱保護が進行するため、試薬添加や反応条件の大幅な変更を伴うことなく、温和な条件下で時間的・空間的に精密に制御された反応操作を可能にする。この特性は、複雑な分子環境下においても選択的な官能基変換を実現できる点で有用であり、光による反応開始や機能性分子の活性化、生体内における局所的な化学反応の誘導、さらには時間依存的な生理

活性物質の放出など、多岐にわたる応用が進められている¹⁾。

代表的な光分解性保護基としては、2-ニトロベンジル (NB) 基およびその誘導体が知られている。2-ニトロベンジル系保護基は合成の容易さと高い汎用性から広く利用されている一方で、長波長光に対する光反応効率が十分でないことや、生成する副生成物に毒性の懸念があることが課題として指摘されている²⁾。これらの課題を克服するため、NB 基に代わる新規光分解性保護基の開発が精力的に進められてきた。例えば、2-(2-ニトロフェニル)プロピル (Npp) 基は NB 基と比較して長波長域で高い光反応効率を示し、比較的速やかな脱保護が可能である

ことが報告されている¹³⁾。また、7-ジエチルアミノクマリン-4-イルメチル (DEACM) 基は可視光照射下で脱保護が進行し、毒性副生成物を生じにくいという利点を有することから、生体関連研究への応用が期待されている。

一方、ホスホロアミダイト試薬は、温和な条件下でアルコールなどの求核剤と効率よく反応し、高い選択性と収率でリン酸エステルを導入できることから、リン酸化合物の合成において有用な手法として広く利用されている。特に、光分解性保護基を組み込んだホスホロアミダイト試薬を用いることで、リン酸部位に光応答性を付与したリン酸エステルを効率的に構築することができる。こうして得られたリン酸エステルは、特定波長の光照射によって選択的に脱保護され、リン酸を発生させることが可能であり、外部刺激によって機能を制御できる光応答性分子ツールとしての展開が期待される。

以上の背景を踏まえ、本研究では、2-ニトロベンジル (NB) 基、5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル (DMNB) 基、2-(2-ニトロフェニル)プロピル (Npp) 基、および7-ジエチルアミノクマリン-4-イルメチル (DEACM) 基の4種類の光分解性保護基に着目した。これらの保護基を有するホスホロアミダイト試薬を設計・合成し、アルコールとのリン酸化反応を通じて光脱保護可能なリン酸エステルを調製した。さらに、得られた生成物に対して光照射実験を行い、各保護基の脱保護挙動および反応特性を系統的に評価することで、光応答性リン酸化試薬としての有用性を明らかにすることを目的とした。

2. 結果

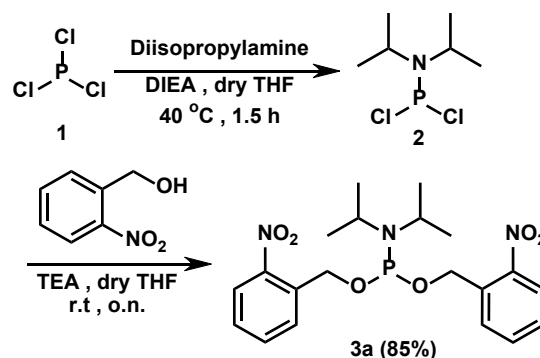
1) ホスホロアミダイト試薬の合成

本論文では三塩化リンを出発原料としアミン及び、アルコールを付加させることにより、ホスホロアミダイト試薬の合成を試みた。三塩化リンは非常に反応性の高い試薬であることから、反応温度及び試薬の滴下速度のコントロールが合成の鍵となった。更に目的化合物は光に鋭敏であるため、反応及び精製は暗所にて行い、更にホスホロアミダイト自体は酸性条件下では分解するため、カラムクロマトグラ

フィーの展開溶媒には塩基性のトリエチルアミンを添加した溶媒を使用した。以下、各ホスホロアミダイト試薬合成の詳細について記す。

・ニトロベンジル基 (NB 基) を有するホスホロアミダイト試薬の合成

三塩化リンの脱水 THF 溶液を窒素雰囲気下、0 °C に冷却し、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミンを加えた後、ジイソプロピルアミンを滴下した。滴下完了後、反応混合物を 40 °C に昇温して 1.5 時間攪拌し、³¹P NMR により出発物質の消失を確認した。ついで反応混合物を再び窒素雰囲気下、0 °C に冷却し、トリエチルアミンおよび2-ニトロベンジルアルコールの脱水 THF 溶液を滴下した後、室温で一晩攪拌した。反応の進行は TLC により追跡し、目的物の生成を確認した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて 5 分間攪拌し反応を停止した。有機層を分離後、水層を有機溶媒で抽出し、合わせた有機層を乾燥、ろ過、濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、目的物 3a を得た (Scheme 1)。

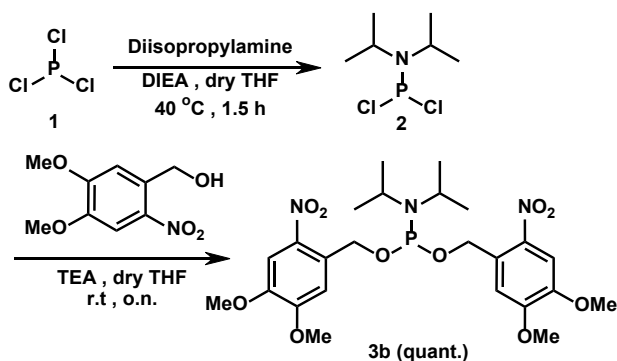


Scheme 1. NB 基を有するホスホロアミダイト試薬の合成

・ジメトキシニトロベンジル基 (DMNB 基) を有するホスホロアミダイト試薬の合成

三塩化リンの脱水 THF 溶液を窒素雰囲気下、0 °C に冷却し、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミンを加えた後、ジイソプロピルアミンを滴下した。反応混合物を 40 °C に昇温して 1.5 時間攪拌し、³¹P NMR により出発物質の消失を確認した。ついで窒素雰囲気下、0 °C に再冷却し、トリエチルアミンおよび4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルアルコールの脱水 THF 溶液を滴下し、室温で一晩攪拌した。本反応はアルコールの溶解性が低く反応性の低下が観測されたため、溶媒量を増加させて反応を行った。反応の

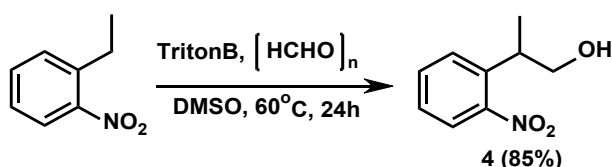
進行を TLC で確認後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて 5 分間攪拌した。カラムクロマトグラフィーによる精製が困難であったため、生成した固体をろ取り、水を加えて攪拌後、水層をクロロホルムで抽出した。得られた有機層を処理して、目的物 3b を得た (Scheme 2)。



Scheme 2. DMNB 基を有するホスホロアミダイト試薬の合成

・ニトロフェニルプロピル基 (Npp 基) を有するホスホロアミダイト試薬の合成

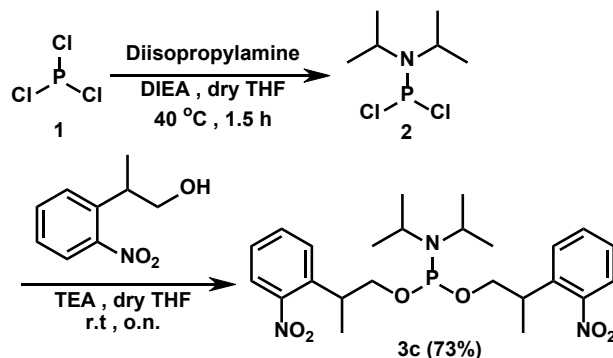
本アミダイト合成に必要な 2-(2-ニトロフェニル)プロパン-1-オールは市販入手が困難であったため、先行文献に従い 1 段階で合成した^[4]。2-エチルニトロベンゼンの DMSO 溶液にパラホルムアルデヒドおよびベンジルトリメチルアンモニウムヒドロキシドを加え、塩化カルシウム管を有するフラスコを用いて暗所、60 °C で一晩攪拌した。反応の進行を TLC で確認後、1 M 塩酸を加えて 5 分間攪拌し、有機溶媒を用い抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行い、目的物 4 を得た (Scheme 3)。



Scheme 3. 化合物 4 の合成

次に本アルコールを用いてアミダイト合成を行った。三塩化リンの脱水 THF 溶液を窒素雰囲気下、0 °C に冷却し *N,N*-Diisopropylethylamine を加え、その後 Diisopropylamine を滴下した。滴下後、反応溶

液を 40 °C まで昇温し 1.5 時間攪拌し ³¹P-NMR により基質の消失を確認した。その後、本反応混合物を窒素雰囲気下、0 °C に冷却し Triethylamine とアルコール(4)の THF 溶液を滴下し、室温で一晩攪拌した。TLC で目的物の生成を確認した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、室温で 5 分攪拌させた。抽出とカラムクロマトグラフィーにより精製し、目的物(3c)を得た (Scheme 4)。

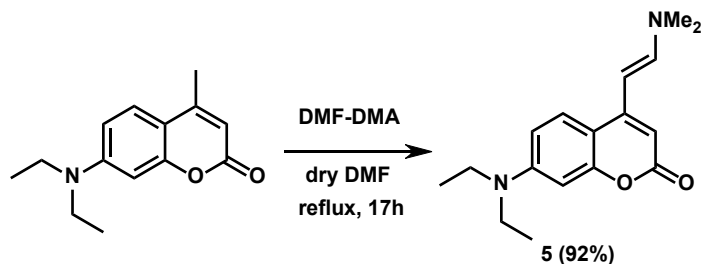


Scheme 4. Npp 基を有するホスホロアミダイト試薬の合成

・7-ジエチルアミノクマリン-4-イルメチル (DEACM 基) を有するホスホロアミダイト試薬の合成

本アミダイト合成に必要な 7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one は入手困難であったため先行文献に従って 3 段階で合成した^[5] (Scheme 5-7)。

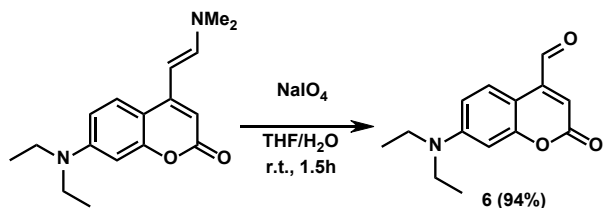
7-Diethylamino-4-methylcoumarin の脱水 DMF 溶液に *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal 加えて塩化カルシウム管を有するフラスコを用いて、暗所で 17 時間加熱還流した。TLC で目的物の生成を確認した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、室温で 5 分攪拌させた。抽出、Cyclohexane を用いて結晶化を行い、目的物(5)を得た (Scheme 5)。



Scheme 5. 化合物 5 の合成

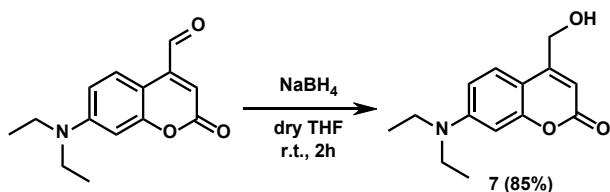
続いて、化合物 5 を THF/水 (1:1) の混合溶媒に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウムをゆっくり添加し

た後、暗所、室温で 1.5 時間攪拌した。反応の進行を TLC で確認後、生成した沈殿をろ去し、抽出およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、目的物 6 を得た (Scheme 6)。



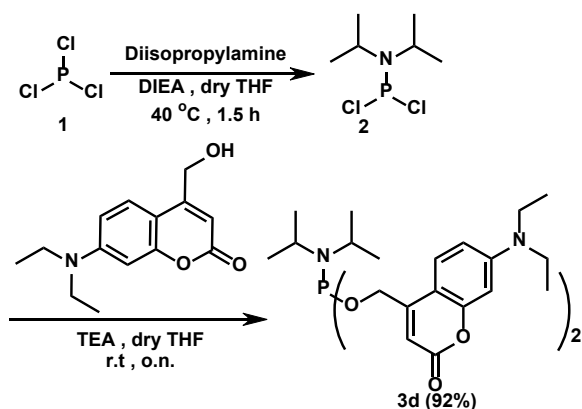
Scheme 6. 化合物 6 の合成

化合物 6 の脱水 THF 溶液を窒素雰囲気下、0 °C に冷却し、水素化ホウ素ナトリウムを添加した後、暗所、室温で 2 時間攪拌した。反応の進行を TLC で確認後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて 10 分間攪拌し、反応を停止させた。ついで抽出およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、目的物 7 を得た (Scheme 7)。



Scheme 7. 化合物 7 の合成

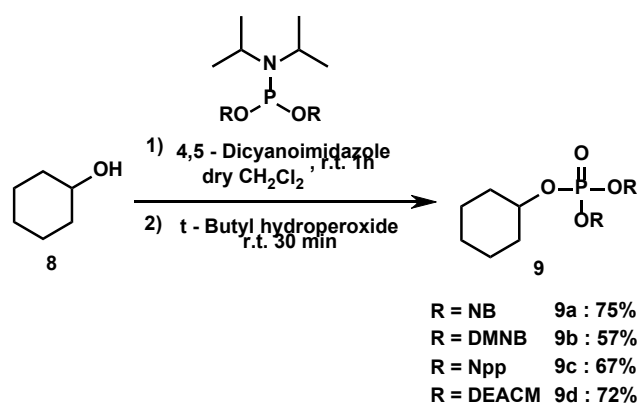
三塩化リンの脱水 THF 溶液を窒素雰囲気下で 0 °C に冷却し、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン添加後、ジイソプロピルアミンを滴下した。40 °C に昇温して 1.5 時間攪拌し、³¹P NMR で出発物質の消失を確認した。続いて再び 0 °C に冷却し、トリエチルアミンおよびアルコール 7 の THF 溶液を滴下して室温で一晩攪拌した。TLC で反応完結を確認後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、抽出とシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物 3d を得た (Scheme 8)。



Scheme 8. DEACM 基を有するホスホロアミダイト試薬の合成

3) リン酸エステルの合成

シクロヘキサノールと 4 種類の光応答性ホスホロアミダイト試薬を用いたリン酸エステルの合成を検討した。シクロヘキサノールの脱水ジクロロメタン溶液を窒素雰囲気下、0 °C に冷却し、ホスホロアミダイト試薬を添加した後、活性化剤として 4,5-ジシアノイミダゾールを加えた。0 °C で 1 時間攪拌し、³¹P NMR により出発物質の消失を確認した。ついで *tert*-ブチルヒドロペルオキシドを加えて 30 分間攪拌し、生成した亜リン酸エステルを酸化した。反応後、抽出およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりリン酸エステルを単離・精製した (Scheme 9)。

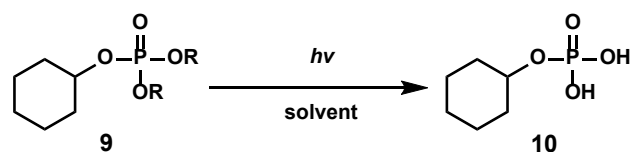


Scheme 9. リン酸エステルの合成

4) 脱保護の検討

合成した 4 種類のリン酸エステルについて、光脱保護条件を系統的に検討した。各リン酸エステルの重 DMSO (DMSO-*d*₆) 溶液に対し、異なる波長の光を照射して反応を行った。さらに、溶媒の影響を評価するため、水を含む条件についても検討した。

調製した溶液は石英製 NMR チューブに封入し、チューブ側面から光を照射して反応を進行させた。これは、一般的なパイレックス製 NMR チューブでは短波長紫外光の透過率が低く、試料への光照射が十分に行えないためである。反応後、³¹P NMR 測定により生成物の収率を算出し、各条件における光脱保護挙動を比較評価した (Scheme 10)。



Scheme 10. リン酸エステルの脱保護

・NB 基を有するリン酸エステルの脱保護

NB 基を有するリン酸エステルを脱保護した際の収率を以下に示す (Figure 1)。

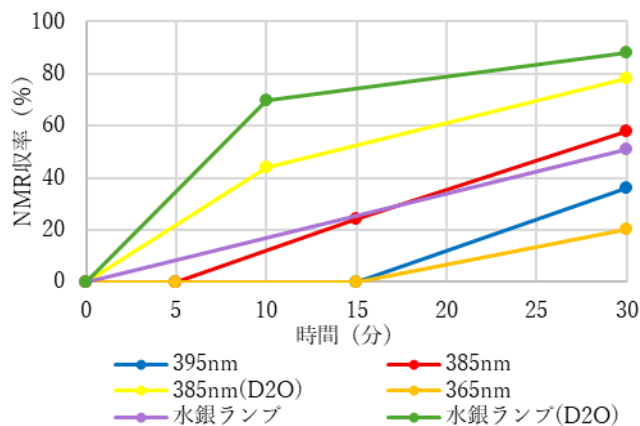


Figure 1. NB 基を有するリン酸エステルの脱保護

溶媒としてDMSO を用い、30 分間光照射を行った場合の脱保護反応の収率を比較した。波長 385 nm の光照射では収率 58%、水銀ランプ照射では 51%となり、いずれの条件においても脱保護は中程度の進行にとどまった。一方、波長 395 nm では収率 36%、波長 365 nm では 20%であり、これらの波長では脱保護効率は低いことが示された。

これに対し、水を含む条件下で同様に 30 分間光照射を行ったところ、脱保護反応は著しく向上した。波長 385 nm では収率 78%、水銀ランプ照射では 88%に達し、水系溶媒が脱保護反応の進行を促進することが明らかとなった。

・DMNB 基を有するリン酸エステルの脱保護

DMNB 基を有するリン酸エステルを脱保護した際の収率を以下に示す (Figure 2)。

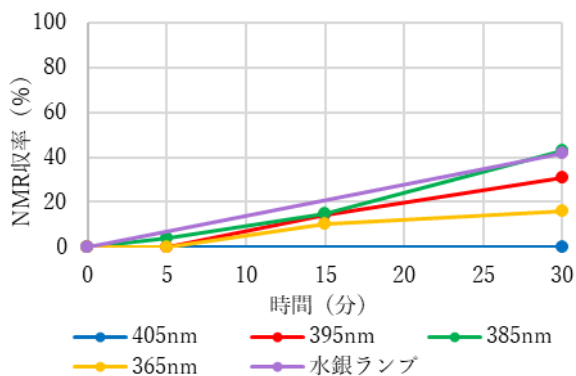


Figure 2. DMNB 基を有するリン酸エステルの脱保護

溶媒として DMSO を用い、30 分間光照射を行った場合、波長 385 nm では収率 43%、水銀ランプ照射では 42%であった。これらの値はNB 型と比較してすべての波長域で低く、本条件では脱保護反応は十分には進行しなかった。

さらに、溶媒を水系条件に変更して同様の光照射を行ったが、収率の顕著な向上は認められず、溶媒の変更による脱保護効率の改善は見られなかった。

・Npp 基を有するリン酸エステルの脱保護

Npp 基を有するリン酸エステルを脱保護した際の収率を以下に示す (Figure 3)。

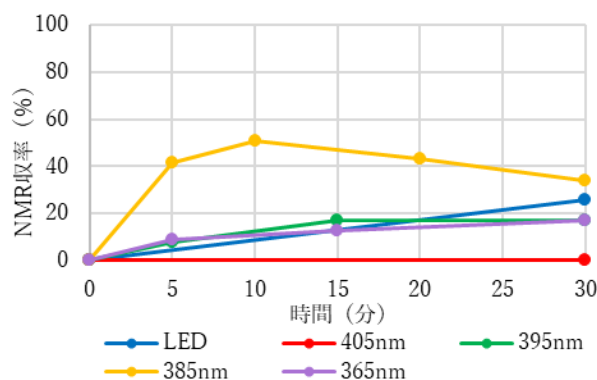


Figure 3. Npp 基を有するリン酸エステルの脱保護

溶媒として DMSO を用い、波長 385 nm の光を照射したところ、10 分の照射で 51%の脱保護が認められた。しかし、さらに照射を継続すると、目的物の光分解に伴う副生成物の生成が観測され、30 分後には収率が 34%まで低下した。他の波長においても、照射時間の延長に伴い副生成物の生成が確認され、高収率での脱保護は達成されなかった。

・DEACM 基を有するリン酸エステルの脱保護

DEACM 基を有するリン酸エステルを脱保護した際の収率を以下に示す (Figure 4)。

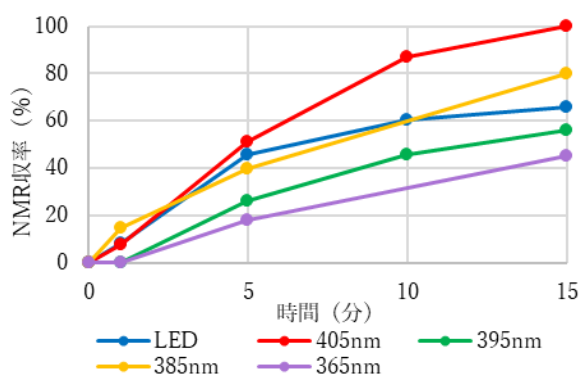


Figure 4. DEACM 基を有するリン酸エステルの脱保護

溶媒として DMSO を用い光照射を行ったところ、波長 385 nm では 15 分で 80% の脱保護が進行した。さらに、波長 405 nm の光を用いた場合には、同じく 15 分の照射で脱保護がほぼ定量的に進行した。これらの結果は、他の 3 種類のリン酸エステルと比較して、本化合物がより長波長の光に対して高い応答性を示し、短時間で効率的に脱保護されることを示している。

一方、溶媒を水系条件に変更して同様の光照射を行った場合には、DMNB 型と同様に収率の顕著な向上は認められなかった。

3. 要約

光応答性保護基である NB 基、DMNB 基、Npp 基、DEACM 基を有する 4 種類のホスホロアミダイト試薬合成と、これらの試薬を用いたシクロヘキサノールのリン酸化に成功した。合成した 4 種類のリン酸エステルを用いて光応答性保護基の脱保護条件を検討した (Table 1)。

Table 1 光応答性保護基を有するリン酸エステルの脱保護条件

Entry	R	solvent	light	time	yield
1	NB	D ₂ O	mercury lamp	30min	88%
2	DMNB	DMSO	UV (385 nm)	30min	43%
3	Npp	DMSO	UV (385 nm)	10min	51%
4	DEACM	DMSO	UV (405 nm)	15min	100%

NB 基、DMNB 基、Npp 基、および DEACM 基を有する各種リン酸エステルの光脱保護挙動を比較検

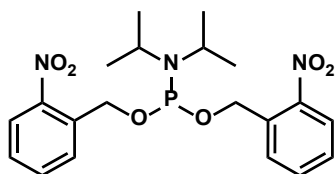
討した。その結果、NB 基を有するリン酸エステルは水中で水銀ランプを 30 分照射することで良好に脱保護が進行し、88% の高収率で目的物を与えた。DMNB 基を有するリン酸エステルでは、DMSO 中で波長 385 nm の光を 30 分照射した条件が最も高い反応性を示したものの、収率は 43% にとどまり、高効率な脱保護には至らなかった。Npp 基を有するリン酸エステルは同様の条件下で 10 分後に 51% の脱保護が確認されたが、反応の進行に伴い目的物の分解が生じ、30 分後には収率が 34% へと低下した。一方、DEACM 基を有するリン酸エステルは、DMSO 中で波長 405 nm の光を照射することで、15 分という短時間で完全な脱保護が達成された。以上より、DEACM 基は他の保護基と比較して、より長波長の光に対して高い反応性を示し、迅速かつ効率的な光脱保護を可能にする有用な保護基であることが明らかとなった。

4. 実験項

1) Bis(2-nitrobenzyl) diisopropylphosphoramidite (3a) の合成

窒素雰囲気下、乾燥した三口フラスコに無水 THF を加え、Phosphorus trichloride (1.0 equiv.) を溶解した。氷冷下、N,N-Diisopropylamine (1.0 equiv.) および Diisopropylamine (2.0 equiv.) をそれぞれシリンジを用いて滴下し、その後 40 ° C のオイルバス中で 1.5 h 加熱攪拌した。³¹P NMR により化合物(2)の生成を確認し、精製することなく次工程に用いた。

窒素雰囲気下、乾燥した三口フラスコに得られた化合物(2)を加え、氷冷下、Triethylamine (2.2 equiv.) をシリンジで滴下した。続いて、滴下漏斗を用いて無水 THF に溶解した 2-Nitrobenzyl alcohol (2.1 equiv.) を 1 h かけて加え、暗所、室温で一晩攪拌した。TLC により反応の完結を確認後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて 5 min 攪拌した。水層を酢酸エチルで 3 回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水 MgSO₄ で乾燥した。乾燥剤を濾別し、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィー (Hexane/EtOAc, 95:5, 2.5% TEA 含有) で精製し、目的物(3a)を白色固体として得た (3.68 g, 85%)。

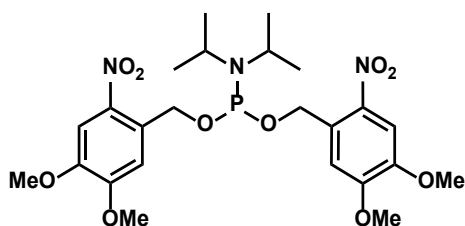


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.87 (m, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 5.16 (m, 4H), 3.73 (dsept, $J_{\text{PH}} = 9.8$, $J = 6.2$ Hz, 2H), 1.25 (dd, $J_{\text{PH}} = 6.2$, $J = 6.2$ Hz, 12H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 146.8, 136.1, 133.8, 128.5, 127.8, 124.7, 62.5 (d, $J_{\text{CP}} = 20.9$ Hz), 43.4 (d, $J_{\text{CP}} = 12.6$ Hz), 24.7 (d, $J_{\text{CP}} = 7.2$ Hz); ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 148.9

2) Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl) diisopropyl phosphoramidite (3b)の合成

窒素雰囲気下、乾燥した三口フラスコに無水 THF を加え、Phosphorus trichloride (1) (1.0 equiv.) を溶解した。氷浴下、*N,N*-diisopropylamine (1.0 equiv.) および diisopropylamine (2.0 equiv.) の順に、シリンジを用いてゆっくり滴下した。反応混合物を 40 °C に設定したオイルバス中で 1.5 h 攪拌した後、 ^{31}P NMR により化合物(2)の生成を確認した。得られた反応混合物は精製することなく、そのまま次工程に用いた。

窒素雰囲気下、乾燥した三口フラスコに得られた化合物(2)を加え、氷浴下でシリンジを用いて 1 秒間に 1 滴ずつ Triethylamine (2.2equiv.)を加えた。その後、滴下漏斗を用いて脱水 THF に溶解した (4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methanol (2.1equiv.)を 1 時間かけて加え、室温で一晩攪拌させた。TLC で目的物の生成を確認した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、室温で 5 分攪拌させた後、濾過を用いて固体を回収した。得られた固体に、蒸留水を加えて 15 分攪拌させた後、水層を CHCl_3 を用いて抽出を行い、得られた有機層を MgSO_4 で乾燥した。乾燥後、ろ過を行い、エバポレーターで溶媒を留去し、目的物(3b) (7.56g, 113%)を薄黄色固体として得た。



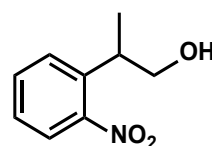
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (s, 2H), 7.41 (s,

2H), 5.22 (m, 4H), 4.12 (s, 6H), 3.98 (s, 6H), 3.79 (dsept, $J_{\text{PH}} = 9.8$, $J = 6.2$ Hz, 2H), 1.28 (dd, $J_{\text{PH}} = 6.2$, $J = 6.2$ Hz, 12H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 154.1, 147.7, 138.9, 131.9, 109.4, 108.0, 62.7 (d, $J_{\text{CP}} = 19.5$ Hz), 43.6 (d, $J_{\text{CP}} = 12.6$ Hz), 56.5 (d, $J_{\text{CP}} = 3.4$ Hz), 24.9 (d, $J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz); ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 147.3

3) 2-(2-Nitrophenyl)propan-1-ol (4)の合成

窒素雰囲気下、乾燥した三口フラスコに脱水 THF と Phosphorus Trichloride(1)(1.0equiv.)を加えて溶解させた。氷浴下で *N,N*-Diisopropylamine (1.0equiv.)、Diisopropylamine (2.0equiv.)の順でそれぞれシリンジを用いて 1 秒間に 1 滴ずつ加えた後、40°Cに設定したオイルバスで 1.5 時間加熱攪拌させた。 ^{31}P -NMR を用いて化合物(2)の生成を確認し、精製は行わず、次の反応に用いた。

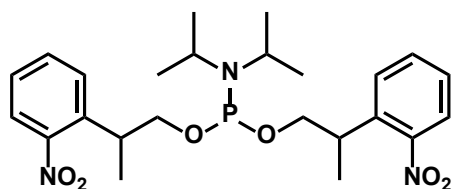
2-Ethyl nitrobenzene (1.0equiv.)を DMSO に溶解させ、Paraformaldehyde (1.0equiv.)、Benzyl trimethyl ammonium Hydroxide (0.08equiv.)を加え、塩化カルシウム間を有するフラスコを用いて 60°Cに設定したオイルバスで、暗所で一晩加熱攪拌させた。TLC で目的物の生成を確認した後、1M の塩酸を加えて 5 分間攪拌させ、水層を EtOAc で 3 回抽出した。合わせた有機層飽和食塩水で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥をおこなった。乾燥後、ろ過を行い、エバポレーターで溶媒を留去し、粗生成物をカラムクロマトグラフィー (Hexane/EtOAc, 80:20)を用いて精製し、目的物(4) (2.58g, 85%)を褐色液体として得た。



4) bis(2-(2-nitrophenyl)propyl) diisopropylphosphoramidite (3c)の合成

窒素雰囲気下、乾燥した三口フラスコに脱水 THF と Phosphorus Trichloride(1) (1.0 equiv.) を加えて溶解させた。氷浴下で *N,N*-Diisopropylethylamine (1.0 equiv.)、Diisopropylamine (2.0 equiv.) の順で、それぞれシリンジを用いて 1 秒間に 1 滴ずつ加えた後、40 °C に設定したオイルバスで 1.5 時間加熱攪拌させた。 ^{31}P -NMR を用いて化合物(2)の生成を確認し、精製は行わず次の反応に用いた。

窒素雰囲気下、乾燥した三ツロフラスコに得られた化合物(2)を加え、氷浴下で Triethylamine (2.2 equiv.) をシリンジを用いて1秒間に1滴ずつ加えた。その後、滴下漏斗を用いて脱水 THF に溶解させた 2-(2-nitrophenyl)propan-1-ol (2.1 equiv.) を1時間かけて滴下し、室温で一晩攪拌させた。TLC で目的物の生成を確認した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて5分間攪拌させ、水層を EtOAc で3回抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ で乾燥を行った。乾燥後、ろ過を行い、エバポレーターで溶媒を留去した。粗生成物をカラムクロマトグラフィー (Hexane in 2.5% TEA) を用いて精製し、目的物(3c) (3.57 g, 73%) を薄褐色液体として得た。



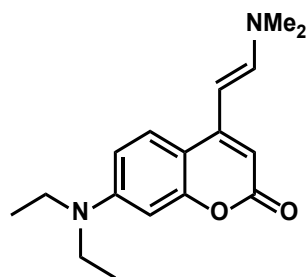
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.72–7.69 (m, 2H), 7.52–7.47 (m, 2H), 7.40–7.30 (m, 4H), 3.60 (m, 4H), 1.57 (m, 2H), 1.29 (m, 12H), 1.01 (m, 6H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 150.7, 138.6, 132.3, 129.0, 127.0, 123.9, 67.4 (m), 43.0, 35.4, 24.6, 18.1; ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 146.6,

5) (E)-7-(Diethylamino)-4-[2-(dimethylamino)vinyl]-2H-chromen-2-one (5)の合成

窒素雰囲気下、乾燥した三ツロフラスコに脱水 THF と Phosphors Trichloride(1) (1.0 equiv.) を加えて溶解させた。氷浴下で *N,N*-Diisopropylamine (1.0 equiv.), Diisopropylamine (2.0 equiv.) の順で、それぞれシリンジを用いて1秒間に1滴ずつ加えた後、40 °Cに設定したオイルバスで1.5時間加熱攪拌させた。³¹P-NMR を用いて化合物(2)の生成を確認し、精製は行わず次の反応に用いた。

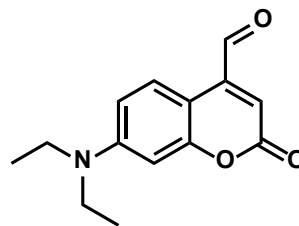
7-Diethylamino-4-methylcoumarin (1.0 equiv.) を脱水 DMF に溶解させ、*N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal (2.0 equiv.) を加え、塩化カルシウム管を装着して暗所で17時間加熱還流した。TLC で目的物の生成を確認した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて5分間攪拌させ、水層を CHCl₃ で2回抽出した。合わせた有機層を MgSO₄ で乾燥し、ろ過後、エバポレーターで溶媒を留去した。得られた粗生成

物を少量の CHCl₃ に溶解させ、Cyclohexane を加えて再結晶を行い、冷所で一晩静置した。生成した結晶を吸引ろ過により回収し、溶媒を留去して目的物(5) (5.70 g, 92%) を褐色固体として得た。



6) 7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde(6)の合成

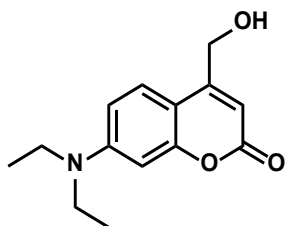
THF:水=1:1 の混合溶液に化合物(5)を加えて溶解させた後、Sodium Periodate (1.0equiv.)をゆっくり加え、暗所、室温下で1.5時間攪拌させた。TLC で目的物の生成を確認した後、生成した白色沈殿物を自然濾過により除去し、水層を EtOAc で2回抽出した。続いて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、水層を EtOAc で2回抽出し、合わせた有機層を MgSO₄ で乾燥した。乾燥後、ろ過を行い、エバポレーターで溶媒を留去し、粗生成物をカラムクロマトグラフィー (Hexane/EtOAc, 80:20) を用いて精製し、目的物(6) (0.81g, 94%)を赤色液体として得た。



7) 7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one(7)の合成

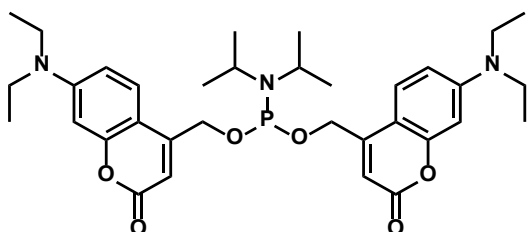
窒素雰囲気下、乾燥した三ツロフラスコに化合物(6) (1.0 equiv.)を加え、脱水 THF に溶解させた。氷浴下で Sodium Borohydride (2.0 equiv.)を加え、暗所、室温で2時間攪拌させた。TLC で目的物の生成を確認した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて10分間攪拌させ、水層を CHCl₃ で2回抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ で乾燥を行った。乾燥後、ろ過を行い、エバポレーターで溶媒を留去し、粗生成物をカラムクロマトグラフィー (CHCl₃) を用いて精製し、目的物(7) (1.63

g, 85%) を黄色固体として得た。



8) Bis-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite (3d)の合成

窒素雰囲気下、乾燥した三ツロフラスコに得られた化合物(2)を加えた。氷浴下で Triethylamine (2.2 equiv.)をシリンジを用いて1秒間に1滴ずつ加えた後、脱水 THF に溶解させた 7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one (2.1 equiv.)を滴下漏斗を用いて30分かけて加え、室温で一晩攪拌させた。TLCで目的物の生成を確認した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて5分間攪拌させ、水層を EtOAc で3回抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄で乾燥を行った。乾燥後、ろ過を行い、エバポレーターで溶媒を留去し、粗生成物をカラムクロマトグラフィー (Hexane/EtOAc in 2.5% TEA, 75:25) を用いて精製し、目的物(3d) (2.90 g, 92%) を薄褐色液体として得た。



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (d, *J*=10Hz, 2H) 6.55 (d, *J*=10Hz, 2H) 6.50 (s, 2H) 6.25 (s, 2H), 4.76(m, 4H), 3.73(m, 2H), 3.41(m, 8H), 1.23(m, 24H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 162.4, 156.3, 152.7, 152.6, 150.6, 124.6, 108.6, 106.4, 97.9, 61.8, 44.9, 43.7, 24.9, 12.6; ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 147.3.

9) リン酸エステルの合成

窒素雰囲気下、乾燥した三ツロフラスコに cyclohexanol を加え、脱水 CH₂Cl₂に溶解させた。ホスホロアミダイト試薬を加えた後、氷浴下で 4,5-Dicyanoimidazole (1.3 equiv.)を加え、暗所、室

温で1時間攪拌させた。³¹P-NMRにより基質の消失を確認した後、tert-Butyl hydroperoxide (70% in water) (3 equiv.)を脱水 CH₂Cl₂に溶解させて加え、室温で30分間攪拌させた。TLCで目的物の生成を確認した後、水層を CHCl₃で2回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄で乾燥を行った。乾燥後、ろ過を行い、エバポレーターで溶媒を留去し、粗生成物をカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を得た。

5. 引用文献

- [1] A. Patchornik; B.Amit, R. B. Woodward, J. Am. Chem. Soc. 1970, 92, 6333
- [2] A. M. Gurney; H.A Lester, Physiol. Rev., 1987, 67, 583
- [3] G Wang, et al., RCS Adv., 5, 28345(2015).
- [4] Gang Wang et al., RSC Adv., 2015, 5, 28344–28348
- [5] L.-M. Herzig et al., Phys.Chem.Chem.Phys., 2017, 19, 14835-14844



深層 AI 生成動画を用いた EEG 脳活動への非侵襲介入法： 対照学習型動画処理オートエンコーダを用いた検討

Non-invasive intervention method for EEG brain activity using deep AI-generated video: using a video processing autoencoder pretrained via contrastive learning

倉重 宏樹^{1,2,3)}, 永田 栄一郎^{3,4)}

¹⁾東海大学情報通信学部, ²⁾東海大学情報技術センター, ³⁾東海大学先進生命科学研究所, ⁴⁾東海大学医学部脳神経内科

Hiroki Kurashige^{1,2,3)}, Nagata Eiichiro^{3,4)}

¹⁾School of Information Telecommunication Engineering, Tokai University, ²⁾Research & Information Center (TRIC), Tokai University, ³⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ⁴⁾Department of Neurology, School of Medicine, Tokai University

[要旨]

脳と深層ニューラルネットワークには機能的対応性がある。これを活用することで、深層ニューラルネットワークは脳のシミュレータとして働きうる。この考えに添い、本研究ではオートエンコーダ型の動画処理深層ニューラルネットワークのエンコーダ部と脳活動を対応させ、それに基づいてデコーダ部への入力を設計することで、特定の脳活動を誘導する動画を生成するシステムを構築した。EEG 実験を用い、この動画の提示が期待される脳活動を誘導しうることを示した。

[Abstract]

There is a functional correspondence between the brain and deep neural networks. By leveraging this, deep neural networks can potentially serve as simulators of the brain. In line with this idea, this study constructed a system that generates videos designed to induce specific brain activity by aligning brain activity with the encoder of an autoencoder-based deep neural network for video processing, and then designing the input to the decoder based on that alignment. Using EEG experiments, we showed that presenting the videos generated by this method can elicit the expected brain activity.

[Key Words]

Deep neural networks, Generative artificial intelligence, Electroencephalography, Non-invasive intervention

1. はじめに

近年の AI 技術の基盤である深層ニューラルネットワークは、そもそも人や動物の神経回路網を模倣するように開発されてきた[1,2]。個々の計算ユニットは脳や神経系のニューロンをヒントに、シナプス入力の統合を積和計算で、スパイク発生を閾値型の活性化関数で表現してモデリングされる。また画像処理でよく使われる畳み込みニューラルネットワークは、大脳皮質視覚野の階層的処

理のモデルに起源を持つ[3]。

しかしながら、近年、脳と深層ニューラルネットワークにはそれ以上の類似性があることが認識されてきた[4,5]。すなわち機能的類似性である。これは簡単に言えば、同じ感覚刺激を脳と深層ニューラルネットワークに提示したとき、同じように応答するということである。ここで同じように応答するとは、両者の応答をシンプルな変換で対応づけることができる[6]、もしくは複数の刺激へ

の応答パターン間の相関性が両者で類似すると言ったことである[7].

これはさまざまなモダリティの刺激や測定法によって確かめられている. とくに, 我々は以前の研究において, 音声付き自然動画を感覚刺激とし, **Electroencephalography (EEG)** で測定した脳活動応答と深層ニューラルネットワークの応答の対応を調べた[8,9]. それにより, 自然動画処理ニューラルネットワークは **EEG** の高周波帯域の活動と対応が強く, 自然音声処理ニューラルネットワークは低周波帯域の活動と対応が強いことが示された.

このように脳と深層ニューラルネットワークにより対応があるということは, それを利用して深層ニューラルネットワークを脳のシミュレータとして使うということである. すなわち, ある刺激に対する脳の活動応答を, 実際にそれを人や動物に提示せずとも予測ができる. これを利用すれば, ある特定の脳活動をターゲットとし, それを起こすのに最適化された刺激の設計が可能となる. これは将来的には新たな脳活動・脳機能への非侵襲介入法へとつながりうる. この方法において, 一度脳と深層ニューラルネットワークを対応づけてしまえば, あとはターゲット脳活動の賦活に最適化された感覚刺激を提示する機器さえあれば介入が可能となるので, 従来の方法に比べて格段に簡易となる.

深層ニューラルネットワークを脳シミュレータとして用い, 特定の脳活動をターゲットとしてその賦活に最適化した刺激を設計する試みは, サルやマウスにおいていくらか成功をしている[10,11]. また, 人における関連する研究として, 機能的 **MRI** で測定した言語野の活動について, それを促進したり抑制したりする言語刺激を, 深層ニューラルネットワーク応答に基づいて大規模コーパスから選抜する試みがある[12]. これは刺激を生成したわけではないが, 現在の大規模言語モデルを用いれば類似したコーパスを作ることが可能であるため, 実質的に上記と同じ枠組みによる最適刺激の設計であると言える.

一方, この先行研究は言語刺激で言語野を刺激するという保守的な実験デザインであったため, この枠組みのポテンシャルを十分に示せていると

は言い難い. そこで本研究ではより自由度の高い動画刺激によって, ターゲットとする脳活動へ介入することが可能かどうかを確かめた (図 1). 具体的には, まず音声付き自然動画を視聴中の参加者から **EEG** を計測し, それと事前学習済みオートエンコーダ型深層ニューラルネットワークの潜在変数を線形変換によって対応させた. その後, 先の変換に基づいて, ある脳活動を抑制することが期待される動画を生成する潜在変数を設計した. そして, その潜在変数から生成された動画刺激を実際に参加者に提示し, これが狙った脳活動抑制を誘導できるかを確かめた.

2. 方法

1) 参加者

2 名の日本語を母語とする健康成人を対象とした (両名とも女性, 年齢: 20 歳-21 歳). 全員が正常視力あるいは正常範囲の矯正視力, および正常聴力を持っていた. スペイン語およびロシア語の学習経験はなかった. 本研究はヘルシンキ宣言を遵守し, 東海大学「人を対象とする研究」倫理委員会で承認を受けたプロトコルのもと実施された. 実験前に各参加者に書面と口頭による説明を行い, 手書きによるインフォームドコンセントを得た.

5) 自然動画刺激実験

実在する 3 本のスペイン語および 1 本のロシア語のドキュメンタリー動画を視聴し, 同時に **EEG** 脳活動を測定する実験を行った. 実験は防音暗室にて行われた. 音声の大きさは参加者ごとに動画に没入できるレベルに設定した. この実験では参加者は単に動画を視聴するだけであり, 行動応答は求められなかった. ドキュメンタリー動画は, 動画共有サイト **Vimeo** (<https://vimeo.com/>) からダウンロードしたものをそのまま使用した. 動画のテーマと長さは, 「王室の警護」18 分 5 秒 (スペイン語), 「開発をめぐる企業と地元住民の対立」21 分 21 秒 (スペイン語), 「環境保全と漁業の問題」16 分 53 秒 (スペイン語), 「戦争」23 分 41 秒 (ロシア語) であった.

6) EEG 計測と前処理

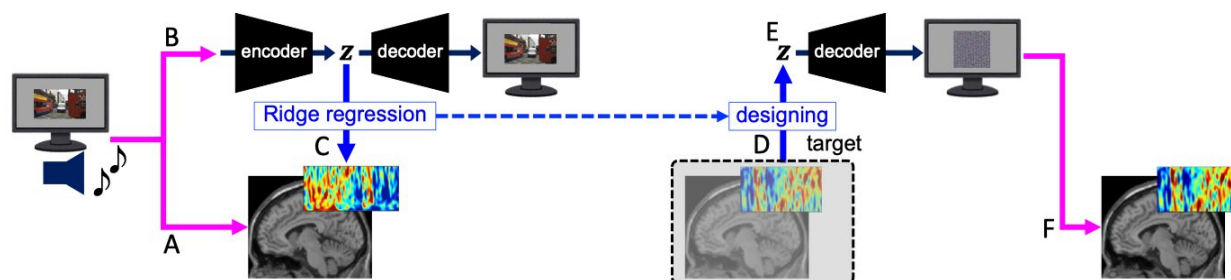


図1 提案法の処理フロー. (A)動画刺激を EEG 計測中の人に提示し、脳活動応答を測定する. (B)同じ動画刺激をオートエンコーダ型動画処理深層ニューラルネットワーク CAV-MAE に入力し、そのエンコーダ部応答 (つまり潜在変数 Z) を得る. (C)このエンコーダ部応答を説明変数、EEG パワースペクトル密度を従属変数とし、その対応関係の変換をリッジ回帰によって推定する. (D)誘導したいターゲット脳活動を定める. (E)先に求めた変換に基づいてターゲット脳活動を効率的に誘導する Z を求め、それをデコーダ部に入力して動画を生成する. (F)生成した動画を人に提示し、ターゲット脳活動が誘導されるかを見る.

EEG データは 32ch Polymate V (ミユキ技研, 日本)を用いて計測された. 電極は'Fp1', 'Fp2', 'F3', 'F4', 'C3', 'C4', 'P3', 'P4', 'O1', 'O2', 'F7', 'F8', 'T3', 'T4', 'T5', 'T6', 'Fz', 'Cz', 'Pz', 'AFz', 'FC5', 'FC6', 'FC1', 'FC2', 'CP1', 'CP2', 'CP5', 'CP6', 'PO3', 'PO4'に配置された. 計測データはサードパーティの MATLAB (MathWorks, U.S.) ツールボックスである EEGLAB[13]を用いて前処理をした. 具体的には 1Hz のハイパスフィルターを適用後, 50Hz ラインノイズを除去し, さらに ICA を用いて同定されたアーチファクト成分を削除し, 平均への再基準化を行なった.

7) CAV-MAE による動画処理

本研究では Contrastive Audio-Visual Masked Auto-Encoder (CAV-MAE) と呼ばれる自然動画処理深層ニューラルネットワーク[14]と EEG 脳活動を対応づけ, さらにそれを利用してあるターゲット脳活動を誘導するための動画刺激を生成した. CAV-MAE はその名の通り, 入力を低次元の潜在変数に圧縮するエンコーダ部と潜在変数から元の入力を復元するデコーダ部からなるオートエンコーダ型ニューラルネットワークである. CAV-MAE ではエンコーダ部もデコーダ部も Transformer アーキテクチャを採用している. 本研究ではマスク再構成および音と映像の対応づけによる対照学習型事前学習が済んだモデルを利用した. 詳細については原論文を参照のこと.

CAV-MAE をドキュメンタリー動画に適用することで, 対応する潜在変数を得た. 具体的には, 11 秒間の時間窓を各動画の開始 10 秒後から終了

まで 1 秒単位で移動させ, 得られたクリップ (各 11 秒) のセットを CAV-MAE のエンコーダへの入力とした. それにより 14×14 個の画像トークンパッチ特徴量と 64×8 個の音声トークンパッチ特徴量 (各 768 次元) を得た. 以降これを CAV-MAE 特徴量と呼ぶこととする.

8) ターゲット脳活動の選定

ターゲット脳活動として, 左前頭電極である F3 と左頭頂電極である P3 の 40Hz 周波数のパワースペクトル密度値を設定した.

先行研究において, 40Hz 周波数帯の脳活動への介入には, 認知症の治療等, 医療上重要な意味があることが示唆されている[15]. そこで本研究でも 40Hz 周波数の活動への介入を選択した. なお, 本研究の手法はまだ基礎的な検討を重ねている段階であり, 現状の条件では, 日常で体験する視覚刺激以上の効果を及ぼすことはほぼない. したがって医療的な効果はないことを注記しておく. しかしながら将来的に医療への応用を行うことを見据えて, 40Hz 周波数脳活動への介入を検討したということである.

また, 脳活動への介入実験においては背外側前頭前野を対象とすることが多く[16,17], その理由から F3 を対象電極とした. またこの領域は頭頂領域と協調し, 前頭頭頂ネットワークを作っていることが知られている[18]. そのため, P3 も対象とした.

9) CAV-MAE 特徴量と EEG 脳活動の対応づけ

CAV-MAE 特徴量を説明変数とし, EEG 信号か

ら抽出した 40Hz パワースペクトル密度値 (dB) を従属変数としたリッジ回帰を行った。これは各参加者、各電極、各トークンパッチ、およびクリップ区間から均等に 10 個サンプリングしたパワースペクトル密度の各点について、それぞれ実行した。リッジ回帰の正則化パラメータはクロスバリデーション法により定めた。以上により CAV-MAE 特微量と EEG 脳活動の線形変換による対応づけを得た。

10) ターゲット脳活動を誘導する動画の生成

先述の通り、本研究では 40Hz パワースペクトル密度値をターゲットとした。とくにそれを抑制することを目指して潜在変数ベクトルの設計を行った。なお事前学習時と同様にエンコーダ部とデコーダ部をそのまま繋げるならば、潜在変数ベクトルとは CAV-MAE 特微量である。今回はデコーダ部を取り出して使うため、潜在変数ベクトルと呼ぶ。

リッジ回帰で求めた線形変換が理論通りに働くならば、潜在変数ベクトルの長さが一定という仮定のもとで、これを回帰係数ベクトルの方向に一致させたときにパワースペクトル密度値が最大になると予想される。しかしながら、今回の研究の設定ではパワースペクトル密度の数値は一般にマイナスを取る。つまり潜在変数ベクトルと回帰係数のベクトルは逆行しているということである。回帰係数ベクトルに方向を一致させた潜在変数ベクトルはこれを破ることになる。高周波数の脳活動は一般の自然刺激に対する応答や注意を反映するが[19,20]、この潜在変数ベクトルのもとではそのような範囲を外れた刺激が生成されうる。この提示はむしろパワースペクトル密度値を下げるのが期待される。今回はこの考えのもと、回帰係数ベクトルに方向を一致させた潜在変数ベクトルをデコーダ部への入力とし、これによって生成された動画が実際に 40Hz パワースペクトル密度値を抑えるかどうかを調べた。一方、それを反転させた潜在変数ベクトルは少なくとも先の条件を破らないものであるので、これをデコーダ部への入力として生成した動画をその比較対象とした（統計的機械学習の用語で言えば、out-of-distribution の画像と within-distribution の画像の比較とな

る）。この設計については考察でも詳しく述べる。

潜在変数ベクトルの設計に関する技術的詳細を説明する。まず回帰係数ベクトルと潜在変数ベクトルはそもそも一般的な長さがかけ離れている可能性がある。そこで回帰係数ベクトルからデコーダ部への入力である潜在変数ベクトルを作成するにあたって、その長さが CAV-MAE 特微量の平均値の 2 倍となるようにスケールリングを行った。加えて、CAV-MAE は決定論的な手法であるため、同じ潜在変数ベクトルからは同じ動画しか生成されない。そこで、動画にバリエーションをつけることを目的として、スケールリング後のベクトルに平均が 1、標準偏差が 0.1 のガウス分布からサンプリングした乱数を乗じ、それをデコーダ部への入力とした。

計算量の問題から、CAV-MAE では秒あたりのフレーム数を 10 枚とした動画を生成した。それを FILM 法[21]を用いた補間により 30 枚/秒としたものを EEG 計測時に最終的に提示する動画とした。

11) ターゲット脳活動を誘導する動画の提示実験および解析

自然動画刺激実験と同じ参加者を対象に、上記の方法で作成した動画を提示しつつ EEG 計測を行った。動画は、F3 と P3 のそれぞれの電極について、40Hz パワースペクトル密度の抑制をターゲットとして上記の方法によって作成した。したがって、回帰係数ベクトルに対する方向の順・逆 2 条件とどちらの電極のデータに基づいたかという 2 条件があるため、2×2 要因実験として実施された。参加者には各条件につき 50 個、合計で 200 個の動画を提示した。技術的な問題から、動画は音声のない無音のものを用いた。各動画の長さは 9 秒で、各動画提示のあいだに 2 秒間の空白区間が設けられた。参加者はこの空白区間にて今見た動画が好きだったか否かをキー押しによって答えることを求められた。これは参加者の注意状態を保つためだけのものであり、解析対象とはしなかった。

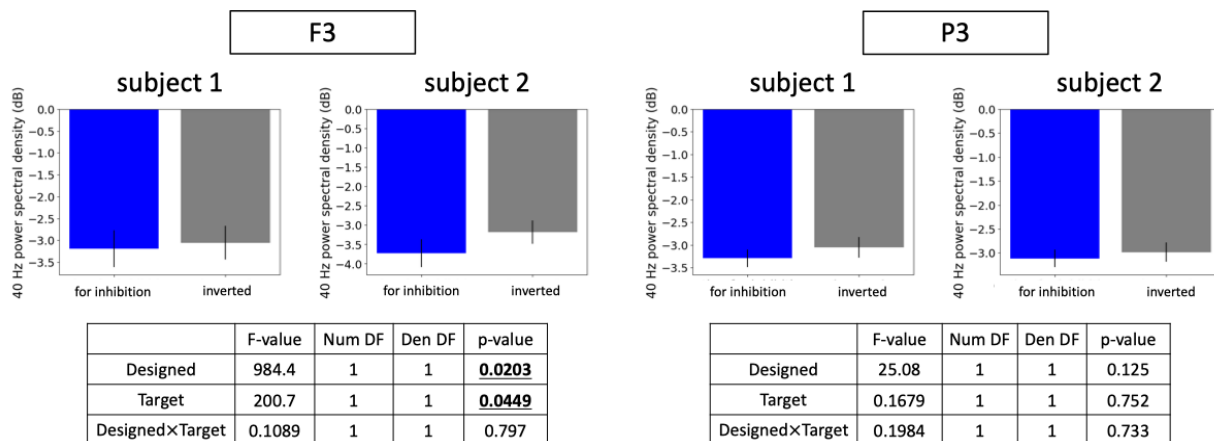


図2 提案手法による40Hzパワースペクトル密度の抑制誘導。(左)F3電極の結果. 抑制誘導のために設計した潜在変数から作った動画の提示下では, 比較対象の動画に比して, 有意なパワースペクトル密度の低下が見られた。(右)P3電極の結果. P3電極ではF3のような有意差は認められなかった.

得られた EEG データは先述した自然動画提示実験と同様に前処理をし, さらに 40Hz パワースペクトル密度を算出した. これを従属変数とし, 先述した潜在変数ベクトルの方向 (回帰係数ベクトルに対して順・逆) および電極位置 (F3・P3) について, 2×2 要因の二元配置分散分析による統計検定を行った.

3. 結果

ターゲット脳活動として, 左前頭電極である F3 と左頭頂電極である P3 の 40Hz 周波数帯域パワースペクトル密度を設定した. このもとで提案手法を用いてこの脳活動を抑制する動画を生成し, 参加者に提示してその EEG 応答を調べた (図2). その結果, F3 電極において, 抑制誘導のために設計した潜在変数から作った動画の提示下での 40Hz パワースペクトル密度応答が, 比較対象のものに比べて有意に小さかった. またターゲットとする電極の選択について, 有意な主効果が見られた. それに対し, P3 電極の応答においてはそのような有意差は見られなかった.

4. 考察

本研究ではオートエンコーダ型深層ニューラルネットワークの一種である CAV-MAE について, そのエンコーダ部と EEG 脳活動を対応させ, それに基づいて特定の脳活動を誘導する動画をデコーダ部に生成させるシステムを構築した. とくに F3 において, ターゲットに定めた脳活動が誘導され

た. したがって, 本研究の結果は, 脳と対応づけた深層ニューラルネットワークを脳のシミュレータとして用い, その上で狙った脳活動を誘導する動画を作成し, それを提示して介入を行うという枠組みの有効性を一定程度支持するものである.

一方, 実際に見られた脳活動の介入の効果は統計的には有意であったが小さく, 医療等の実社会的な課題に応用するには精度の向上が必須である.

本研究では, 回帰係数ベクトルに方向が一致する潜在変数ベクトルから生成した画像を, 一般的な視覚刺激で期待される高周波数脳活動応答の誘導を破りうるものと考えた. ここからそれを脳活動の抑制を誘導するものとみなして実験における提示と解析を行った. その比較対象として, その方向を反転させた潜在変数ベクトルから生成した動画を用いた. しかしながら, そもそも構築方法からこの“反転ベクトル”は脳活動を促進するものではない. “反転ベクトル”の方向を 0 度とし, 回帰係数ベクトルの方向を 180 度としたとき, おそらく脳活動を促進する潜在変数ベクトルは 0 度から 90 度のどこかにあると考えられる. したがってこれを探ることは, 本手法の精度向上につながりうる.

そもそも今回の手法は, 脳と深層ニューラルネットワークの対応を示した数々の先行研究に沿うかたちでデザインされていた. これらは「線形的手法」によって「深層ニューラルネットワークの応答から脳活動を予測する」という形式を取る. これを逸脱し, 非線形手法 (実際のパワー

スペクトル密度値の分布形状を考慮した事前の非線形変換を含む)を用いること, および脳活動から深層ニューラルネットワークワーク応答を予測するモデリングを活用することも, 精度の向上につながると思われる。

総じて, 本研究は深層ニューラルネットワーク脳シミュレータを活用した脳活動への非侵襲的介入という方向の有望性を示すものであるとともに, 精度向上のために今後進むべき方向性も示すものである。

5. 引用文献

- [1] W. S. McCulloch, & W. Pitts, *Bull. Math. Biophys.*, **5**, 115 (1943).
- [2] F. Rosenblatt, *Psychol. Rev.*, **65**, 386 (1958).
- [3] K. Fukushima, *Biol. Cybern.*, **36**, 193 (1980).
- [4] G. W. Lindsay, *J. Cogn. Neurosci.*, **33**, 2017, (2021).
- [5] A. Saxe, et al., *Nat. Rev. Neurosci.*, **22**, 55 (2021).
- [6] D. L. K. Yamins, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 8619 (2014).
- [7] R. M. Cichy, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 27755 (2016).
- [8] H. Kurashige, & J. Kaneko, *ICIIBMS.*, **7**, 200 (2022).
- [9] H. Kurashige, & J. Kaneko, *ICAIIIC.*, 372 (2025).
- [10] P. Bashivan, et al., *Science*, **364**, eaav9436 (2019).
- [11] E. Y. Walker et al., *Nat. Neurosci.*, **22**, 2060, (2019).
- [12] G. Tuckute et al., *Nat. Hum. Behav.*, **8**, 544 (2024).
- [13] A. Delorme, & S. Makeig, *J. Neurosci. Methods*, **134**, 9 (2004).
- [14] Y. Gong, et al., *ICLR.*, (2023).
- [15] A. J. Martorell, et al., *Cell*, **177**, 256, (2019).
- [16] J. Dedoncker, et al., *Brain Stimul.*, **9**, 501 (2016).
- [17] R. L. Kan, et al., *Lancet Psychiatry*, **10**, 252 (2023).
- [18] S. Marek, & N. U. Dosenbach, *Dialogues Clin. Neurosci.*, **20**, 133 (2018).
- [19] A. Keil, et al., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **25**, 527, (2001).
- [20] J. Kamiński, et al., *Int. J. Psychophysiol.*, **85**, 125, (2012).

[21] F. Reda, et al., *ECCV.*, 250 (2022).

6. 謝辞

本研究の一部は, 日本神経回路学会 30 周年記念研究助成金の支援を受けて実施された。

Fabrication and Evaluation of Biocompatible Gel Nanosheets Containing Antioxidants for Preventing Aged-Related Body Odor

¹東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻, ²東海大学理学部化学科, ³東海大学工学部応用化学科,
⁴東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター, ⁵東海大学先進生命科学研究所・感覚機能研究部門
坂井 亜由美¹, 岩松 宏徳¹, 小口 真一^{2,4,5}, 伊藤 建^{2,5}, 樋口 昌史^{1,3,4,5}, 岡村 陽介^{1,3,4,5*}

¹ Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, ² Department of Chemistry, School of Science, ³ Department of Applied Chemistry, School of Engineering, ⁴ Micro/Nano Technology Center; ⁵ Division of Sensory Function, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University.

Ayumi Sakai¹, Hironori Iwamatsu¹, Shinichi Koguchi^{2,4,5}, Takeru Ito^{2,5},
Masashi Higuchi^{1,3,4,5} and Yosuke Okamura^{1,3,4,5*}

[要旨]

本研究では、抗酸化剤 (L-アスコルビン酸: ASA) を含侵させた生体適合性ゲルナノ薄膜を創製し、加齢臭の元から絶つ仕組みを提案する。具体的には、アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) とポリビニルアルコール (PVA) からなるデュアル架橋型ゲルナノ薄膜を設計し、ASA 担持層としての可能性を探る。その結果、Alg/PVA からなるゲルナノ薄膜の創製に成功した。得られたナノ薄膜は透明性を有しており、Alg 濃度により膜厚を任意に制御可能であった。ASA を Alg/PVA ゲルナノ薄膜上に添加するだけで ASA を含侵できることを実証した。さらに、加齢臭発生系の構築に成功し、ASA-Alg/PVA ゲルナノ薄膜は *trans*-2-nonenal の発生を抑制できるナノ材料であることを明らかにした。

[Abstract]

In this study, we propose a biocompatible gel nanosheet impregnated with an antioxidant (L-ascorbic acid: ASA) to target the underlying cause of age-related body odor. Specifically, a dual cross-linked gel nanofilm composed of sodium alginate (Na-Alg) and poly(vinyl alcohol) (PVA) is designed and evaluated as an ASA-loading layer. As a result, we successfully developed an Alg/PVA gel nanosheet. The obtained nanosheet exhibited high transparency, and its thickness could be controlled by adjusting the Alg concentration. We also demonstrated that ASA could be effectively impregnated into the Alg/PVA gel nanosheet simply by adding ASA onto the nanosheet surface. Furthermore, a model system for age-related odor generation was successfully established and the ASA-loaded Alg/PVA gel nanosheets effectively suppressed the formation of *trans*-2-nonenal, indicating its potential as a functional nanomaterial for preventing age-related body odor.

[Key Words]

Polymer nanosheet, Antioxidants, Age-related body odor, *trans*-2-Nonenal

1. はじめに

加齢臭の原因物質は *trans*-2-nonenal (不飽和アルデヒド) であり、皮脂に含まれる ω -7 一価不飽和脂肪酸 (パルミトレイン酸等) が過酸化脂質や皮膚常在菌により酸化分解されることで発生する^[1]。近年、*trans*-2-nonenal が肌にダメージを与えることも報告されている^[2]。他方、抗酸化剤は自らが電子供与体となる化合物群であり、活性酸素やラジカルの消去する機能や、過酸化物の還元と分解機能を有する^[3]。

これまで我々は、厚みをナノ寸法に制御した生体適合

性高分子からなるナノ薄膜を提案してきた^[4]。興味深いことに、ナノ薄膜のナノ厚特有の柔軟性と平滑性ゆえに、貼りたい界面の凹凸に追従しながら面接触吸着でき、極めて高い接着性が発現することを見出してきた。したがって、接着剤を使用せず物理吸着のみで肌に貼付できる他、透明なため貼っても視認できず貼った本人は装着感すらないことも特筆すべき点である。

本研究では、抗酸化剤 (L-アスコルビン酸: ASA) を含侵させたデュアル架橋型生体適合性ゲルナノ薄膜を創製し、加齢臭の元から絶つ仕組みを提案する。具体的には、

アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) とポリビニルアルコール (PVA) からなるデュアル架橋型ゲルナノ薄膜 (ASA-Alg/PVA ナノ薄膜) を設計し、ASA 担持層としての可能性を探る。

2. 結果の概要

1) ASA-Alg/PVA ナノ薄膜の創製

SiO₂ 基板 (2×2 cm²) 上に、犠牲膜として酢酸セルロース溶液 (40 mg/mL) を滴下、スピコート (4,000 rpm, 20 s) した。次いで、Na-Alg/PVA 水溶液 (Na-Alg/PVA = 10/2.5 mg/mL or 20/5 mg/mL) をスピコート (4,000 rpm, 60 s) した。1,4-フェニレンジボロン酸溶液 (30 mM) に浸漬・架橋 (rt., 3 h) し、洗浄した。続いて、塩化カルシウム水溶液 (2 wt%) に浸漬・架橋 (rt., 3 h) し、蒸留水で洗浄して Alg/PVA ゲルナノ薄膜を調製した。さらに、得られたナノ薄膜に ASA 水溶液 (0.01-1 M, 900 μL) を滴下・静置 (rt., 1 h, 遮光下) し、Alg/PVA ゲルナノ薄膜に ASA を含侵させた。最後に、基板ごとアセトンに浸漬して犠牲膜を溶解し、ASA 含侵 Alg/PVA ゲルナノ薄膜を剥離・回収した。また、Alg/PVA ゲルナノ薄膜に対する ASA 担持を間接的に実証するために、水溶性モデル蛍光試薬のローダミン B 水溶液 (1 mM, 900 μL) を滴下・静置 (rt., 1 h, 遮光下) し、含侵させた。犠牲膜を溶解して、ゲルナノ薄膜をカバーガラスに回収し、共焦点レーザー顕微鏡 (A1R+, ニコン社製, 倍率: ×10) にて観察した。

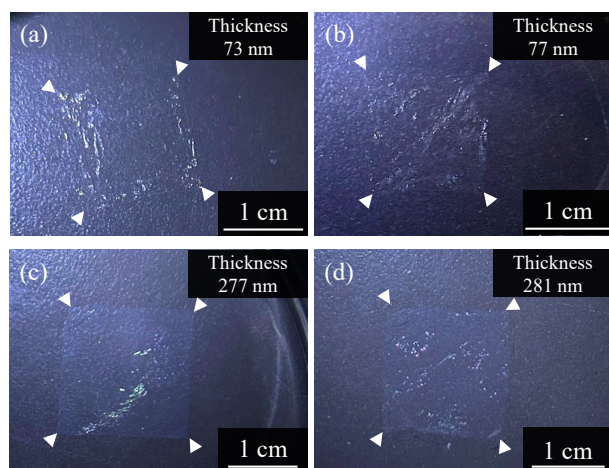


Fig. 1 Macroscopic images of freestanding ASA-Alg/PVA nanosheets at the ASA concentration of (a, c) 10 mM and (b, d) 1 M. (Nanosheets were prepared at the Na-Alg/PVA concentrations of (a, b) 10/2.5 mg/mL and (c, d) 20/5 mg/mL, respectively.)

得られたゲルナノ薄膜は、収縮することなく基板の形状を維持していた。ASA を含侵させたところ、100 nm 以下のゲルナノ薄膜では透明性を維持していた (Fig. 1a, b)。

東海大学先進生命科学研究紀要 第 10 巻 2026 年 3 月

一方、100 nm 以上のナノ薄膜でも低濃度の ASA を含侵させた場合は透明性を有していたが (Fig. 1c)、高濃度の場合はわずかに白濁していた (Fig. 1d)。また、水溶性モデル蛍光試薬のローダミン B を担持させたところ、ゲルナノ薄膜内部にまで含侵されていたことから、この白濁化は ASA 担持に起因するものと示唆された (Fig. 2)。

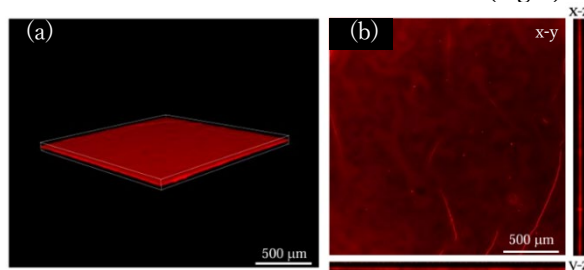


Fig. 2 Confocal images of Rhodamine B-loaded Alg/PVA nanosheet adhered on the coverslip. (a) and (b) show 3-D and projection images, respectively.

2) ASA 担持量の定量

モリブデン酸アンモニウム水溶液 (4%)、リン酸二水素カリウム水溶液 (0.2%)、硫酸 (2.5 M) を体積比 (3 : 1 : 5) で混合した溶液をモリブデンブルー発色試薬とした。マクロチューブに前項 1) にて調製した ASA 含侵ゲルナノ薄膜と蒸留水 (500 μL) を加え攪拌 (1 min) したのち、静置 (5°C, 3 h, 遮光下) し、ASA を溶出させた。次いで、モリブデンブルー発色試薬 (500 μL) を加え、ウォーターバス (40°C, 20 min) で発色させた。その後、紫外・可視分光光度計にて波長 880 nm の吸光度を測定し担持量を測定した。

その結果、ASA の含侵濃度の上昇に伴い、ASA 担持量は増加した。また、ゲルナノ薄膜の膜厚の上昇によっても ASA の担持量は増加していた (Fig. 3)。さらに、PVA 単独からなるナノ薄膜の ASA 担持量と比較したところ、Alg/PVA ゲルナノ薄膜のそれには至らなかったことから、ASA の担持には Alg ゲル層が有効であることが示唆された。以上より、Alg/PVA ゲルナノ薄膜への ASA の担持量は、含侵する際の濃度により制御可能であることが明らかにした。

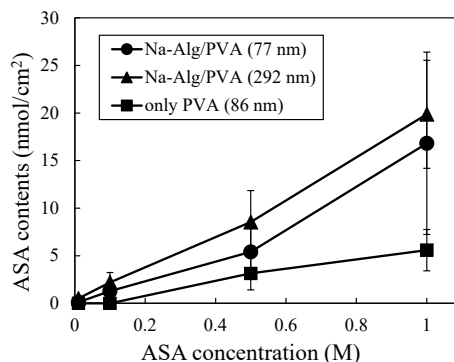


Fig. 3 ASA contents loaded into Alg/PVA or PVA nanosheets.

3) 加齢臭発生評価系の構築

加齢臭発生系として、パルミトレイン酸 (POA, 39.3 μmol) にラジカル発生源として *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP, 2.3 μmol) をアセトン (500 μL) 中に溶解・混合し、静置 (37°C, 1-7 days) した。経時的にサンプルを回収しガスクロマトグラフィー測定 (ジーエルサイエンス社製, GC3220, 気化室温度: 250°C, カラムオーブン温度: 150°C, FID 検出器: 250°C, キャリアガス: N_2) に供し、検量線より *trans*-2-nonenal の発生量を算出した。この時、TBHP を添加しない系 (POA のみ: 39.3 μmol) を比較対照とした。

POA のみをガスクロマトグラフィー分析に供したところ、試料調製直後から *trans*-2-nonenal が検出されたが、その後は増加する傾向は示さなかった (Fig. 4●, 調製直後の値で補正)。これは、試料調製操作により POA がわずかに酸化分解したためと考えられる。そこで、POA にラジカル発生源となる過酸化化物 (TBHP) を添加したところ、*trans*-2-nonenal が経時的に増加した (Fig. 4▲)。これは、TBHP により POA の酸化分解が促進されたことにより *trans*-2-nonenal が発生したと考えられ、加齢臭発生の評価系の構築に成功したと判断した。

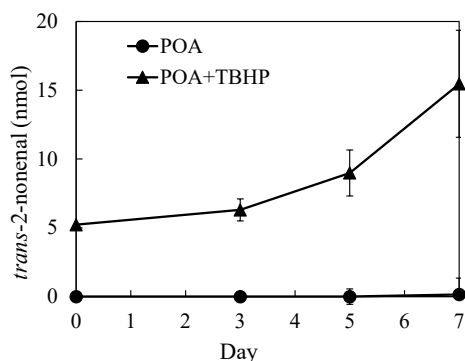


Fig. 4 The generation amount of *trans*-2-nonenal in the aged-related body odor generation system.

4) ASA-Alg/PVA ナノ薄膜の加齢臭発生抑制能評価

前項 3)に記載した加齢臭発生系に、ASA-Alg/PVA ゲルナノ薄膜 (Na-Alg/PVA = 20/5 mg/mL, ASA: 1 M) と蒸留水 (10-20 μL) を加え、静置 (37°C, 3 day) した。また、ASA 含浸 Alg/PVA ゲルナノ薄膜に含有されている ASA とほぼ同量の ASA 水溶液 (80 nmol, 10-20 μL) を加齢臭発生系に加え上記と同様に静置した。その後、前項 3)と同様の条件にてガスクロマトグラフィーにて測定し、*trans*-2-nonenal 量を算出した。

加齢臭発生系に ASA-Alg/PVA ゲルナノ薄膜を添加したところ、未添加系 (control) と比較して *trans*-2-nonenal の発生量を効果的に抑制した (Fig. 5)。この効果は、抗酸化能のある ASA 水溶液を添加した系に匹敵していた。これは、ゲルナノ薄膜に担持させた ASA が加齢臭発生系内

に拡散し、POA の酸化分解を抑制したためと考えられる。しかし、ASA 水溶液の 20 μL のみ *trans*-2-nonenal が増加した。ASA は水溶液では不安定であり酸化型 ASA となる。従って、蒸留水の添加量が多すぎると ASA の酸化が促進され *trans*-2-nonenal が増加したことに起因すると考えられる。蒸留水 20 μL を添加した際のゲルナノ薄膜系でもわずかに *trans*-2-nonenal が増加したのは同様の理由であると示唆された。以上の結果より、ASA 含浸 Alg/PVA ゲルナノ薄膜は、*trans*-2-nonenal の発生を抑制し得るナノ材料であることを明らかにした。

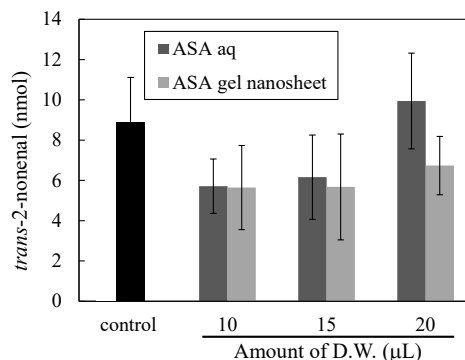


Fig. 5 Inhibitory effects of ASA-Alg/PVA nanosheets or ASA solution in generation system of *trans*-2-nonenal 3 days after POA oxidation by TBHP. The abbreviation "D.W." on the x-axis denotes distilled water.

3. 展望

本研究では、抗酸化剤 (ASA) を含浸させたデュアル架橋型生体適合性ゲルナノ薄膜を創製し、加齢臭の元から絶つ仕組みを提案した。その結果、Alg/PVA からなるゲルナノ薄膜の創製に成功した。得られたナノ薄膜は透明性を有しており、Alg 濃度により膜厚を任意に制御可能であった。ASA を Alg/PVA ゲルナノ薄膜上に添加するだけで ASA を含浸できることを実証した。また、添加する ASA 濃度により ASA 担持量を制御することが可能であった。さらに、加齢臭発生系の構築に成功し、ASA-Alg/PVA ゲルナノ薄膜は *trans*-2-nonenal の発生を抑制できるナノ材料であることを明らかにした。

4. 引用文献

- [1] S. Haze *et al.* *J. Invest. Dermatol.* **116**, 520-524 (2001).
- [2] S. Nakanishi *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **548**, 1-6 (2021).
- [3] 宮澤 陽夫 他. *日本油化学会誌* **47** (10), p.1073-1082 (1998).
- [4] Y. Okamura *et al.* *Adv. Mater.* **21**, 4388-4392 (2009).

5. 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: 2023-06) により行われた。記して謝意を表す。



NOG-hIL-4-Tg マウスに生着した免疫細胞に対する Silibinin の効果の解析

Silibinin effects on immune cell engrafted in NOG-hIL-4-Tg mouse

宮澤 麻里子¹⁾、大島 志乃²⁾、田部 洪輔¹⁾、廣田 綾子³⁾、星野 優希²⁾、岩尾 佳代子⁴⁾、
田中 幸恵⁴⁾、飯田 裕美⁴⁾、東瀬戸 美咲⁴⁾、馬淵 智生³⁾、石本 人士¹⁾、椎名 隆^{2,5)}、亀谷 美恵^{2,5)}
¹⁾東海大学医学部専門診療学系産婦人科学、²⁾東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、
³⁾東海大学医学部専門診療学系皮膚科学、
⁴⁾東海大学医学部付属病院 研究イノベーションセンター 生命科学統合支援室、
⁵⁾東海大学先進生命科学研究所

Mariko Miyazawa¹⁾, Shino Oshima²⁾, Kousuke Tabe¹⁾, Ayako Hirota³⁾, Yuki Hoshino²⁾, Kayoko Iwao⁴⁾, Sachie Tanaka⁴⁾, Yumi Iida⁴⁾,
Misaki Higashiseto⁴⁾, Tomotaka Mabuchi³⁾, Hitoshi Ishimoto¹⁾, Takashi Shina^{2,5)}, Yoshie Kametani^{2,5)}
¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Tokai University School of Medicine, ²⁾Department of Molecular Life
Sciences, Tokai University School of Medicine, ³⁾Department of Dermatology, Tokai University School of Medicine,
⁴⁾Department of Life Science Support, Tokai University, ⁵⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

Silibinin (SLB)はフラボノリグナン混合物であり、抗がん作用と共に免疫系による調節作用が報告されている生薬である。我々は、*in vitro* で SLB が卵巣明細胞がんに対して抗腫瘍効果を示すことに加え、ヒト免疫関連分子の発現調節も行うことを示唆する結果を得た。そこで、本研究では *in vivo* で SLB が免疫系に与える影響を明らかにすることを目的とした。ヒト IL-4 を発現する重度免疫不全 NOG-hIL-4-Tg マウスにヒト末梢血単核球移植と同時に卵巣明細胞がん株 ES-2 を移植し、SLB を経口投与したのちフローサイトメトリーで免疫細胞プロファイルを検討した。その結果 SLB は、*in vivo* において担がん状態でもヒト T 細胞分化を促進し、増殖能および分化能の高い幹細胞様メモリー T 細胞を増加させることが示された。以上の結果より、SLB は T 細胞の潜在的反応性を向上させることにより抗腫瘍免疫を亢進する可能性が示唆された。

[Abstract]

Silibinin (SLB) is a flavonolignan compound mixture derived from milk thistle that has been reported to exert anticancer effects as well as immunomodulatory activity. In our previous *in vitro* study, we observed that SLB exhibited antitumor effects against ovarian clear cell carcinoma and also suggested a regulatory effect on the expression of human immune-related molecules. Therefore, the present study aimed to investigate the effects of SLB on the immune system *in vivo*. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the ovarian clear cell carcinoma cell line ES-2 were simultaneously transplanted into severely immunodeficient NOG-hIL-4-Tg mice. SLB was administered orally, and immune cell profiles were analyzed by flow cytometry. The results showed that SLB enhanced the differentiation of human T cells *in vivo*, even under tumor-bearing conditions, and increased the proportion of stem cell-like memory T cells with high proliferative and differentiation potential. These findings suggest that SLB may enhance antitumor immunity by improving the intrinsic responsiveness of T cells.

[Key Words]

Silibinin、卵巣明細胞がん、幹細胞様メモリー T 細胞、NOG-hIL-4-Tg、経口投与

1. はじめに

抗がん剤には、天然物、特に植物由来のものが多く含まれる[1]。中でもフラボノイドは植物由来の代表的なファイトケミカルであり、ポリフェノール構造を基本とする。これらの化合物は、抗酸化作用、抗炎症作用、化学予防作用を持つことが広く知られており、がんにおける血管新生と転移の阻害を介して抗がん作用を発揮する[2,3]。Silibinin (SLB) は、ミルクシスル (Silybum marianum L)の種子に含まれるフラボノイドのサブクラスであるフラボノリグナン混合物で、約2000年にわたり肝臓疾患の治療に用いられてきた生薬であるが、抗がん作用も報告されている[4-6]。

我々は、日本で特にその発生頻度が高い、難治性のがんである卵巣明細胞がんの性状を解析してきた[7]。そしてその過程で、*in vitro*で明細胞がん株3種におけるSLBの細胞増殖抑制効果を検証し、500 μ Mの高濃度では3種全てでSLBに抗腫瘍効果があることを確認した(論文投稿準備中)。しかし、同一濃度でヒトPBMCsの活性化によるサイトカイン産生機能を解析したところ、解析した12種類すべてのサイトカインの発現が検出限界値以下にまで抑制された(データ未発表)。この結果からSLBは、明らかな抗腫瘍効果を示す濃度では、リンパ球のサイトカイン産生抑制など、正常細胞への毒性を示す可能性が示唆された。

一方、卵巣明細胞がんは、子宮内膜症という子宮外で内膜細胞増殖を示す疾患と密接に関連しており、内膜症環境ががん発生母地となる可能性が指摘されている。そこで我々は、子宮内膜症から卵巣明細胞がんへの移行を長期的に抑制するためには、高い毒性を持つ抗がん剤投与ではなく、卵巣がんを排除しうる免疫系を活性化することが、卵巣明細胞がん予防につながると考えた。

そこで本研究では、我々が開発した、ヒト末梢血単核球 (human Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMCs) を移植してヒトT細胞およびB細胞を効率よく生着させるヒト化マウス、NOG-hIL-4-Tgマウス[8-10]を用いて、SLBの経口投与で免疫系を活性化することができるかについて検討した。

2. 材料と方法

2-1. 倫理的承認

本研究は、ヘルシンキ宣言およびヒト被験者保護のために必要な日本の連邦規則のガイドラインに従って実施された。研究プロトコルは、東海大学臨床研究審査委員会(21R277-004H / 21R277-005H)および実験動物中央研究所

(08-01)の承認を得た。すべての被験者から書面によるインフォームドコンセントを得た。すべての動物実験は、東海大学動物実験規定に準拠し、東海大学医学部動物実験委員会(250208 / 241061 II / 組22-011-27R3)および実験動物中央研究所(20045)の承認を得た。本研究はARRIVEガイドラインに準拠して実施された。

2-2. ヒト末梢血単核球(PBMC; human peripheral blood mononuclear cells)の調製

悪性腫瘍の既往歴のない健康なドナーから、末梢血サンプル(約30ml)を、ヘパリンを含むVacutainer ACDチューブ(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)に採取した。サンプルは直ちに10mlのFicoll-Paque PLUS (Cytiva, London, UK)に重層し、密度勾配遠心分離(500 \times g, 20 $^{\circ}$ C, 30分)で分離し、PBSで洗浄した(300 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 5分)。これらのPBMCsを調製後、直ちにマウス個体へ移植した。

2-3. 経口投与用SLBの調製

SLBは、Silibinin (S0417-10G, Sigma-Aldrich)を購入して実験に使用した。マウスの体重は平均的な20gとし、60mg/ml/kgの濃度になるようにSLBを滅菌水に懸濁した。

2-4. 細胞培養

ヒト卵巣明細胞がん細胞株ES-2を、10% FCS、Streptomycin (0.1 mg/mL)とPenicillin (1 U/mL) (Meiji Seikaファルマ株式会社, 東京, 日本)を添加したMcCoy's5A培地 (SH30200.01, グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社, 東京, 日本)で37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂条件下で培養した。

2-5. NOG-hIL-4-TgマウスへのPBMCsおよびES-2移植

本研究では、NOG-hIL-4-Tgマウスを東海大学医学部伊勢原キャンパス1号館9階901室アイソレーターおよび個別換気ケージシステムで繁殖・飼育した。出生6週間後に耳介組織からDNAを抽出し、ヒトIL-4のGenotyping解析を行った。陽性個体についてはヒトIL-4タンパク質濃度をHuman IL-4 ELISA Set BD OptEIA Kit (BD biosciences社)を用いて測定し、211.8~1064.1 pg/mlのヒトIL-4を産生するマウスを使用マウスとして決定した(表1)。

8~9週齢で、ヒトPBMCsを5 \times 10⁶cells/headで尾静脈より移植し、ヒト免疫系を立ち上げた。翌日、5 \times 10⁶cells/headでES-2を右背側部に皮下移植した(図1A)。

PBMCドナー	SLB	雌雄	IL-4(pg/mL)	SPL細胞数
ドナー1	—	♀	368.4	4.11x10 ⁷
	+	♂	292.3	1.35x10 ⁸
ドナー2	—	♀	211.8	9.07x10 ⁶
	+	♀	314.7	8.63x10 ⁷
	+	♀	370.0	2.24x10 ⁸
	—	♂	609.5	4.50x10 ⁸
ドナー3	+	♂	540.3	6.56x10 ⁷
	+	♂	653.0	5.35x10 ⁷
	—	♂	1064.1	1.46x10 ⁸
	—	♂	981.9	3.77x10 ⁷

表 1. 対象としたマウス

研究対象としたマウスの一覧を、用いたドナー、処置、雌雄、発現するIL-4の濃度、脾臓細胞数と共に示す。3名の健康なドナーの新鮮PBMCsを用いて、コントロール群・SLB投与群共に5匹ずつ(雄3匹雌2匹)、合計10匹のマウスを用いた。

2-6. ES-2移植NOG-hIL-4-TgマウスへのSLB経口投与および体重と腫瘍体積の測定

ヒトPBMCsとES-2を移植した翌日より、60mg/ml/kgの濃度のSLB経口投与を開始し、3日に一度、合計9回、ES-2移植後約5週間まで行った。SLB投与群のマウスには、1.2mg/150μl滅菌水/headで、コントロール群のマウスには150μl滅菌水/headで経口投与を行った。各個体、毎回投与直前に体重測定と皮下腫瘍体積の測定を行った。腫瘍体積は、長径x短径x短径x1/2で求め、1週間毎の平均腫瘍体積を算出した。投与期間終了後、マウスを安楽死させた後解剖し、脾臓より細胞懸濁液を調製し、ヒト免疫細胞をフローサイトメトリーで解析した。

2-7. フローサイトメトリー解析

蛍光色素標識抗ヒトモノクローナル抗体(mAb)を用いて、ドナーPBMCsおよびマウス脾臓サンプル中のヒト免疫細胞を同定した。細胞を蛍光標識マウス抗ヒトmAbと4℃で15分間インキュベートし、1%(w/v)BSA(Sigma-Aldrich)を含むPBSで洗浄し、BD LSRFortessa™セルアナライザー(BD Biosciences、ニュージャージー州、米国)を用いて解析した。白血球はヒトCD45発現に基づいてゲートした。ヒト特異的マーカーは、CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD95, CD127, CCR7, PD-1, PD-L1, PIを用いた。データはFlowJo v10.10.0(Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイクス、米国)を用いて解析した。

2-8. 統計解析

データは平均±標準偏差として表示した。2群間の比較には両側Student *t*検定を用いた。統計解析はMicrosoft Excel(Microsoft® Excel® 2016 MSO)にて行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 結果

3-1. 投与期間中のマウスの体重の推移

PBMCs、ES-2を移植、翌日からSLB経口投与を開始し、ES-2移植後約5週間まで体重を計測した。各個体の体重計測はSLB投与直前に行い、マウスの体重変化を図1B, Cに示した。全期間において、体重は雄の方が重かった。雌においてはSLB投与群がコントロール群よりも元々重い傾向があり、これが持続したが、雄についてはSLB投与の有無で投与開始時から最終投与まで体重に差はなかった。ドナーにより用いた雌雄の数が異なるため、ドナー間の相違は解析できなかった。

以上の結果、本実験におけるSLB投与量では明らかな体重の差は生じないことが示唆された。

3-2. 皮下腫瘍体積の推移

SLBがES-2細胞株に対し、抗腫瘍効果を持つのかを*in vivo*で検証するため、SLB投与時にES-2の腫瘍体積を計測した(図1D)。

ES-2移植2週間後には、対象の10匹中9匹について腫瘍細胞の生着が確認された。残りの1匹については3週間後に生着が確認された。コントロール群、SLB投与群共に時間経過に従って腫瘍は増大し、コントロール群とSLB投与群の間で腫瘍体積に有意な差は検出されなかった。雌雄間を比較すると、雄の方が全期間に渡って腫瘍体積は小さい傾向にあった。

以上の結果、本実験におけるSLB投与量では、SLBはES-2に対し、有意な抗腫瘍効果がないことが示唆された。

3-3. 脾臓リンパ球のプロファイル解析

3-1, 2の結果から、抗腫瘍効果は持たないが、毒性が低い条件が構築されたので、次に、脾臓に生着したヒトCD45陽性細胞であるヒト白血球細胞がどのような種類のリンパ球を含むかを解析した(図2A, 3A)。全ての個体において、脾臓に生着したCD45陽性細胞(ヒト白血球)の割合は5%を超えていた(data not shown)。SLB投与により、T細胞、中でもCD8陽性の細胞障害性T細胞が増加し、CD19陽性B細胞及びCD4陽性ヘルパーT細胞が

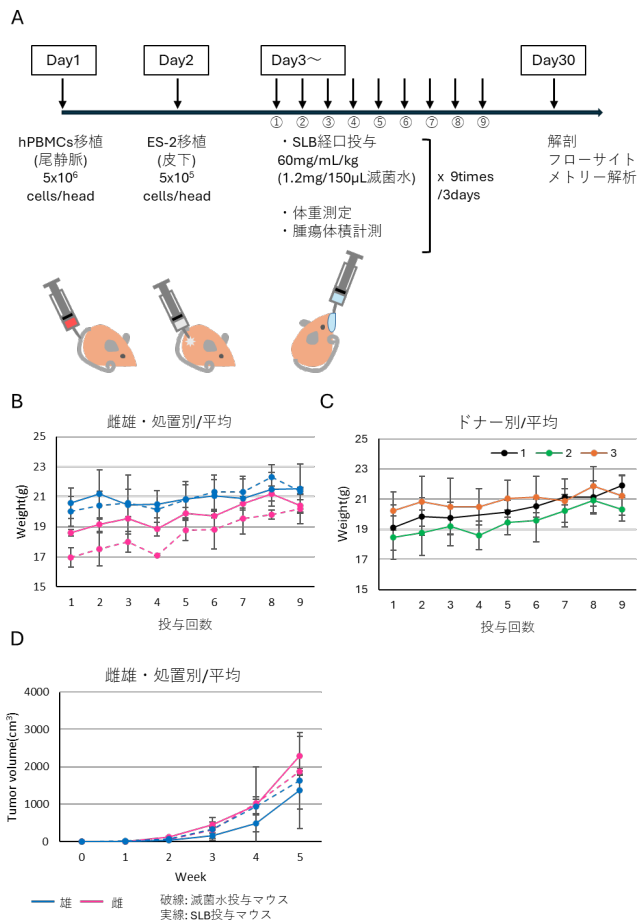


図 1. SLB 経口投与によるヒト化マウスの抗腫瘍効果

A. 実験プロトコル, B. 雌雄・処置別マウス個体の体重推移, C. ドナー別マウス個体の体重推移: SLB 投与毎日のマウスの体重の推移を示す。縦軸: 体重(g), 横軸: SLB 投与回数。左のグラフ: 雌雄・処置別の平均値を示し、水色線が雄、ピンク色線が雌、破線がコントロール群(滅菌水投与)、実践が SLB 投与群を表す。水色破線/実践(雄): 各 n=3、ピンク色破線/実践(雌): 各 n=2。右のグラフ: ドナー別の平均値を示し、黒色線はドナー1(n=2)、緑線はドナー2(n=4)、オレンジ線はドナー3(n=4)の PBMCs を投与したマウスの体重平均値。D. 雌雄・処置別腫瘍体積の推移: マウス皮下腫瘍の、1 週間毎の平均体積の推移を示す。縦軸: 腫瘍体積(cm³)、横軸: ES-2 移植後の期間を 1 週間毎示す。水色線が雄、ピンク色線が雌、破線がコントロール群(滅菌水投与)、実践が SLB 投与群を表す。水色破線/実践(雄): 各 n=3、ピンク色破線/実践(雌): 各 n=2。

減少する傾向が示された (図 2B)。また、CD25+PD-1⁻ T 細胞を前期活性化 T 細胞、CD25+PD-1⁺ 細胞を後期活性化細胞と定義し比較したところ、前期活性化細胞の割合は SLB の刺激で変化しなかったが、CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞の後期活性化細胞の割合は SLB 添加で減少する傾向にあった (図 2C)。

さらに T 細胞を各分化段階マーカーで染色し、フローサイトメトリーで解析したのち図 3A の様に展開して分

類し、比較した (図 3B)。分類は、① CD45RA⁺CD62L⁺: ナイブ T 細胞+Tscm 細胞、② CD45RA⁻CD62L⁺: セントラルメモリー T 細胞、③ CD45RA⁻CD62L⁻: エフェクターメモリー T 細胞、④ CD45RA⁺CD62L⁻: レジデント T 細胞とした。SLB 添加によるそれぞれの割合の変化を図 3B に示した。CD45RA⁺CD62L⁺細胞は CD4⁺および CD8⁺T 細胞両者において SLB 投与群で減少傾向であった。

一方、CD45RA⁺CD62L⁺細胞は、ナイブ T 細胞 (CD95⁻)と最もメモリー細胞としての分化段階の早い幹細胞様メモリー T 細胞 (CD95⁺; Tscm)を含む。そのため、このゲート内の細胞を CD95 の発現の有無で分類し比較した。Tscm の割合は、CD4⁺T 細胞では有意に増加、CD8⁺T 細胞では増加傾向であった (図 3C)。セントラルメモリー T 細胞は、主として末梢リンパ組織内に局在する Tscm の次にメモリー細胞として分化段階の早い細胞であり、SLB により増加する傾向が観察された (図 3B, C)。

以上の結果から、本実験における SLB 投与量では、SLB は *in vivo* において T 細胞のメモリー細胞分化に影響し、特に Tscm を増加させることが示唆された。

4. 考察

本研究では、ヒト化マウスにおける SLB の免疫細胞に対する作用を検証した。その結果、60mg/ml/kg の濃度での SLB 経口投与により、T 細胞の分化が促進され、Tscm が増加することが明らかとなった。

今回の経口投与量では、SLB は ES-2 に対し有意な抗腫瘍効果は示さなかった。このことから、この条件下で SLB は腫瘍に対し、細胞毒性を示さなかったと考えられる。また、体重は全身状態を反映する指標の一つであるが、本研究では、SLB 投与による有意な体重の増減は認められず、正常細胞にも顕著な毒性は生じていないと考えられた。

一方、明らかな腫瘍の増大傾向を示すことはないが抗腫瘍効果は検出されないという SLB 投与量で、脾臓細胞に生着したヒト T 細胞は SLB により増加傾向となり、活性化 T 細胞の割合は低下傾向となった。しかし、幹細胞様メモリー T 細胞 (Tscm) の割合は有意に増加した。Tscm は最も分化段階の早いメモリー T 細胞であり、増殖能、活性化能を高く維持している。そのため、これが増加することは、現時点で強い抗腫瘍効果を示すことはないが、長期的には内在的な免疫機能を高めることが予想される。そのため、この機構を用いれば、内膜症からのがん化を防ぐことの一翼を担うのではないかと考えられる。

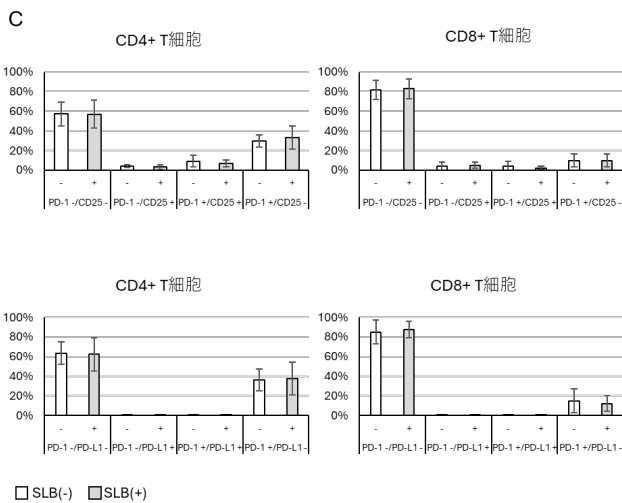
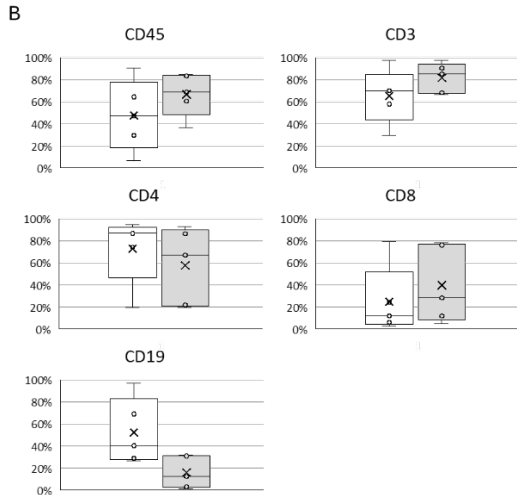
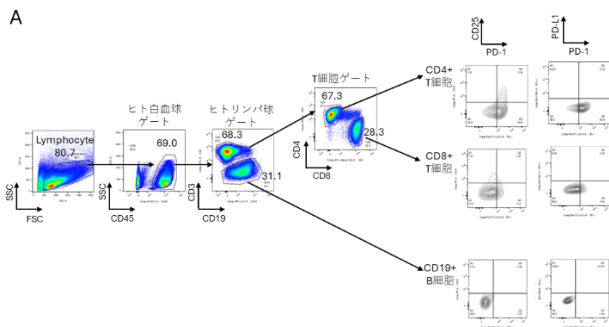


図 2. SLB 経口投与マウス脾臓ヒトリンパ球の活性化・疲弊

A. フローサイトメトリーによる解析ストラテジー: ゲーティングデザインを、代表的な 1 例で示す。B. SLB 投与と各リンパ球の割合の比較: A の通りに脾臓細胞を解析したリンパ球のプロファイルの割合をパーセンテージ(縦軸)で示す。C. SLB 投与と T 細胞の活性化・疲弊の比較: 脾臓細胞中の CD4+ヘルパーおよび CD8+T 細胞における、疲弊細胞と活性化細胞の割合を示す。縦軸: 割合を表すパーセンテージ、横軸: -/+は SLB 投与の有無を表す。左から休止期(PD-1(-)/PD-L1(-)), 活性化(PD-1(-)/PD-L1(+)), 活性化/疲弊(PD-1(+)/PD-L1(+)), 疲弊 T 細胞(PD-1(+)/PD-L1(-))。白色バーはコントロール群(n=5)、灰色バーは SLB 投与群(n=5)。

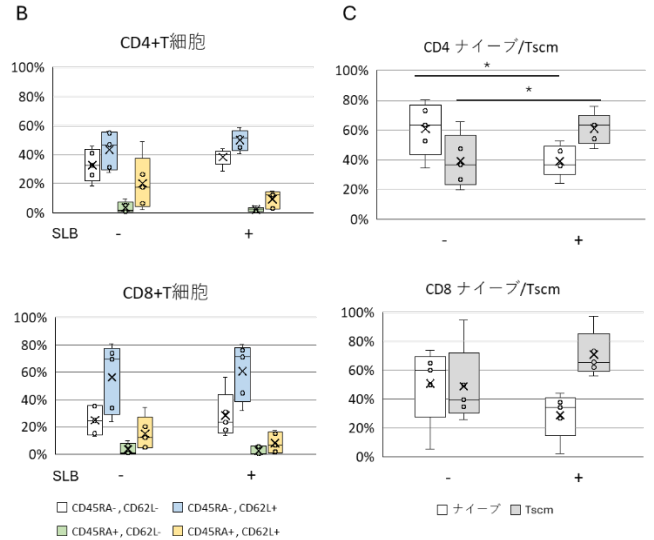
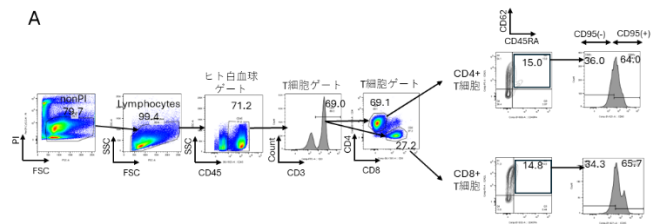


図 3. SLB 経口投与マウス脾臓ヒトリンパ球の分化

A. フローサイトメトリーによる解析ストラテジー: T 細胞のゲーティングデザインを、代表的な 1 例で示す。B. SLB 投与と各リンパ球の分化ステージの比較: CD4+ヘルパーおよび CD8+T 細胞における T 細胞の分化を示す。C. SLB 投与と T 細胞の活性化・疲弊の比較: CD45RA+/CD62L+細胞における Tscm の割合を示す。コントロール群(SLB-と表記): n=5、SLB 投与群(SLB+と表記): n=5。白色バーはコントロール群(n=5)、灰色バーは SLB 投与群(n=5)。縦軸: 各 T 細胞の割合を表すパーセンテージ、横軸: -/+は SLB 投与の有無を表す。

一方、Li らは、フラボノイドがパクリタキセルと相乗効果を発揮し、活性化 CD8+ T 細胞のマーカーである IFN- γ とグランザイム B のレベルを上昇させることで、マウスの腫瘍量を軽減することを実証した[11]。フラボノイドによる免疫環境の調整は、従来の治療法に対する感受性を高めると同時に、免疫抑制の再誘導を防ぐことが報告されている[11-13]。これらの事実は、SLB というフラボノイドが抗腫瘍免疫の潜在能力を維持する Tscm を増加させるという我々の結果と矛盾しない。抗がん剤投与で放出された腫瘍抗原による免疫系の刺激が、Tscm の存在により強い腫瘍免疫を持続的に構築すると予想されるためである。

腫瘍に関しては、SLB 投与に関わらず雄の腫瘍体積が小さい傾向があった。マウス皮下腫瘍モデルにおける雌

雄差については、これまでの報告では腫瘍の生着率、発育速度、免疫応答において有意な差を示すことが報告されている。生殖系以外のがん移植腫瘍モデルマウスでは、雄マウスの方が雌マウスよりも皮下腫瘍が早く、大きく成長する傾向があることが報告されている[14,15]。一方、今回の結果では、雄マウスの方が、腫瘍が小さくなる傾向が示され、非生殖系腫瘍とは逆の結果となった。我々が対象としたのは婦人科生殖器系のがんであり、男性ホルモンであるテストステロンが抗腫瘍効果を亢進した可能性も否めない。しかし、これまで我々が行った NOG-hIL-4-Tg マウスへの乳がん細胞株の担癌モデルを用いた実験では、皮下腫瘍体積や抗腫瘍効果および免疫細胞への作用について明らかな雌雄差は認めなかった[9]。本実験において、性別が実験結果に影響を及ぼすか、また、その原因はアンドロゲンという男性ホルモンにあるのかは、今後対象匹数を重ねて検証していく必要があると考えた。

本研究では、SLB が T 細胞のポテンシャルを向上させる可能性が示唆された。まだ実験に供されるマウス数が十分ではないため、今後はマウスの数を増やして至適投与量を決定し、より詳細な免疫系の活性化能を解析する必要がある。本実験で用いた SLB 経口投与の量を調節することにより、子宮内膜症からの卵巣がん発生を抑制するための継続的な治療法が開発できる可能性もあると考えられる。

5. 引用文献

- [1] F. Majolo, et al., *Phytochemistry Letters*, **31**, 196 (2019).
- [2] D. M. Kopustinskiene, et al., *Nutrients*, **12**, 457 (2020).
- [3] D. F. Brit, et al., *Pharmacol. Ther.*, **90**, 157 (2001).
- [4] P. Tiwari, et al., *Cancer Res. Front.*, **1**, 303 (2015).
- [5] P.P. Ray, et al., *Front. Pharmacol.*, **15**, 1349745 (2024).
- [6] E. Roca, et al., *Oncotarget*, **15**, 345 (2024).
- [7] M. Miyazawa, et al., *Pathol. Int.*, **59**, 19 (2009).
- [8] Y. Kametani et al., *PLoS One*, **12**, e0179239 (2017).
- [9] Y. Kametani et al., *Front. Immunol.*, **14**, 1173728 (2023).
- [10] Y. Kametani et al., *Front. Immunol.*, **16**, 1670682 (2025).
- [11] C Li, et al., *Sci. Rep.*, **13**, 13728, (2023).
- [12] S Han, et al., *Theranostics*, **11**, 2892, (2021).
- [13] R Wang, et al., *Pharmacol. Res.*, **199**, 107032, (2024).
- [14] A L Mueller, et al., *Immunity*, **7**, 1150, (2022).
- [15] P P Dakup, et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, **69**, 2157, (2020).

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、マウスタイピングや経口投与、また、フローサイトメトリーの技術支援をいただきました、東海大学医学部附属病院 研究イノベーションセンター 生命科学統合支援室の皆様にご感謝いたします。

本研究は、科学研究費補助金 (21K16823)および東海大学医学部研究助成金・先進生命科学研究費により行われました。



還元型セレノグルタチオンはグリオキサラーゼ 1 様の触媒活性を有する

Reduced selenogluthathione has glyoxalase 1-like catalytic activity

金森 審子^{1,2,3)}, 陳 詩文²⁾

¹⁾東海大学工学部生物工学科, ²⁾東海大学大学院工学研究科, ³⁾東海大学先進生命科学研究科

Akiko Kanamori^{1,2)}, Shiwen Chen²⁾

¹⁾Department of Bioengineering, School of Engineering, Tokai University, ²⁾Graduate School of Engineering, Tokai University,

³⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

メチルグリオキサール (MG) は終末糖化産物(AGEs)の前駆体であるとともに、カルボニルストレスの原因物質である。生体には生来、MG を無毒化するグリオキサラーゼシステムが存在し、主要な抗酸化分子である還元型グルタチオン(GSH)を利用してMGをD-乳酸へと変換する。その律速段階はグリオキサラーゼ 1 (GLO 1) による S-lactoylglutathione (SLG)の生成反応であり、GLO 1 の発現量低下や活性低下と疾病との関連が報告されている。我々は先に、還元型セレノグルタチオン (GSeH) が非酵素的反応によってMG濃度低下を促進し、十分量のGSH共存下では効果がより長時間継続される結果を得た。今回、GSH共存下における反応生成物のESI(+)-TOF-MS解析によりSLGの生成が確認され、GSeHがGLO 1 様の触媒活性を有することを新規に発見した。GSeHは細胞質でGLO 1 の機能を代替する治療薬としての活用が期待される。

[Abstract]

Methylglyoxal (MG) is a precursor to advanced glycation products (AGEs) and a causative agent of carbonyl stress. Living organisms are born with glyoxalase system, which detoxifies MG by conversion MG into D-lactate using reduced glutathione (GSH), a major antioxidant molecule. The speed limiting stage is the production of S-lactoylglutathione (SLG) by glyoxalase 1 (GLO 1), and it has been reported that the decrease in expression and activity of GLO 1 cause disease. We previously showed that reduced selenogluthathione (GSeH) promotes MG concentration decline by non-enzymatic manner, and the effect lasts longer in the presence of sufficient amounts of GSH. In this study, the formation of SLG was confirmed by ESI(+)-TOF-MS analysis of the reaction products in the presence of GSH, and it was newly discovered that GSeH has GLO 1-like catalytic activity. GSeH is expected to be used as a therapeutic agent to replace the function of GLO 1 in the cytoplasm.

[Key Words]

methylglyoxal, selenogluthathione, glyoxalase 1, S-lactoylglutathione, non-enzymatic reaction

1. はじめに

グルタチオンは生体内酸化還元反応の制御に不可欠な抗酸化分子であり、様々なストレス原因物質の無毒化機構に寄与している。還元型(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。GSHと酸化型(GSSG)の比率は厳密に維持されており、細胞質はGSHとGSSGの濃度比は100:1、GSH濃度が0.5~10mM程度に保たれた還元環境下にある。しかし、酸

化ストレスが高い状態が続くとGSHが枯渇して、レドックス環境の維持に支障が生じる。

セレノグルタチオンは、グルタチオンのCys残基をセレノシステイン (Sec) に置換した構造を有し、還元型 (GSeH)と酸化型 (GSeSeG)が存在する。GSeH (γ -Glu-Sec-Gly)はセレノール基に由来する高い還元力を有し、GSHよりも抗酸化力が高いが不安定である。一方、GSeSeGは非常に安定かつ水溶性に富むなど扱いが容易なため、治療薬としてはGSeSeGの投与を想定して細胞内環境下での反応機構と効果を検証し

た。先行研究では GSeSeG の化学合成法を確立し、 μM 程度という低濃度の GSeSeG の添加が細胞の酸化ストレス抵抗性を向上させる結果を得た[1]。細胞質で生じた GSeH による抗酸化効果に由来すると考えられる。従来、細胞質ではグルタチオンと同様にグルタチオン還元酵素 (GR) の作用を受けて GSeSeG から GSeH が生成されると推測されたが、最近、新規な生成機構を発見した。細胞質に則した十分量の GSH 共存下では、非酵素的反応によって GSeSeG から GSeH が生成される機構である (図 1(A)) [1]。したがって、細胞質では、GR による酵素作用と十分量の GSH による非酵素的反応という二つの GSeH/GSeSeG リサイクル機構が並立して効率良く機能することが強く示唆された。

我々はさらに、糖化ストレス・カルボニルストレス原因物質であるメチルグリオキサール (MG) の濃度低下における GSeH の効果を GSH 共存下と非共存下の 2 つの条件下で比較・検討した。その結果、GSH 共存下の方が非共存下よりも MG 濃度低下が長時間持続され、非酵素的反応によって生成された GSeH による効果と考えられた[2]。

他方、空気と接触している水溶液には大気中の酸素分子が溶存酸素として溶け込んでおり、下記の様な反応によって一部の GSeH は溶存酸素の還元消費されて水と GSeSeG が生成されたと考えられる。また、一部は GSH と反応して GSeSG が生成された後、GR の作用を受けて再度 GSeH と GSH が生成されるとい

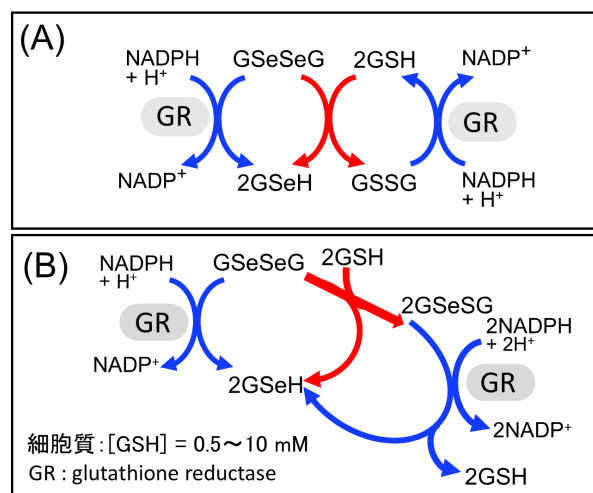
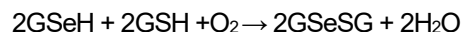


図 2 糖化ストレス原因物質の生成機構
メイラード反応は前期、中期、後期から成る。まず、アミノ酸のアミノ基と還元糖のホルミル基の非酵素的反応で始まり、複雑な経路を経て AGEs (Advanced Glycation End Products, 終末糖化産物) という老化促進物質が生成される。AGEs は、糖尿病、認知症、白内障、がん、高血圧、動脈硬化症など種々の疾病との関連が報告されている。

うバイパス経路の存在が示唆された (図 1(B)) [2]。

想定される溶存酸素と GSeH, GSH の反応:



本研究では、GSH 共存下での GSeH と MG の反応生成物の組成解析を行い、新規に GSeH の有する酵素様触媒活性を見出したので報告する。

2. 結果の概要

【方法・結果】

MG は、超高齢化社会で喫緊に対応が求められる種々の疾病の原因物質である AGEs (Advanced Glycation End Products, 終末糖化産物) の前駆体であるとともに 2 つのカルボニル基を有する反応性の高い分子であり、それ自身がカルボニルストレスの原因物質である (図 2)。

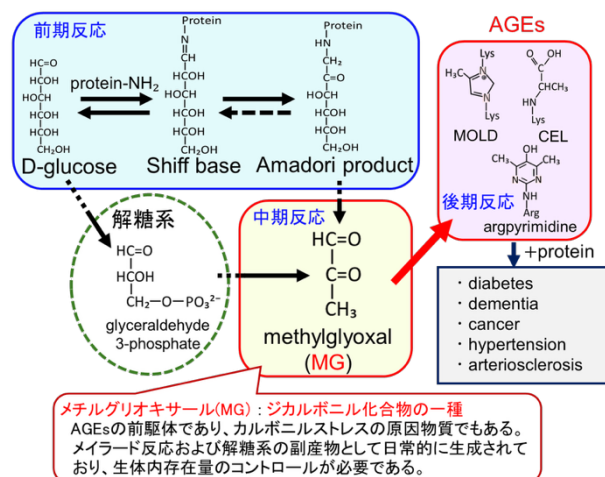


図 2 糖化ストレス原因物質の生成機構

メイラード反応は前期、中期、後期から成る。まず、アミノ酸のアミノ基と還元糖のホルミル基の非酵素的反応で始まり、複雑な経路を経て AGEs (Advanced Glycation End Products, 終末糖化産物) という老化促進物質が生成される。AGEs は、糖尿病、認知症、白内障、がん、高血圧、動脈硬化症など種々の疾病との関連が報告されている。

生体内では、MG は解糖系の副産物として日常的に生成されており、細胞内の濃度を低く保つための主な機構としてグリオキサラーゼシステムが以下のように機能している (図 3(A))。

まず、MG と GSH から非酵素的にヘミチオアセタール体が生成されるが、反応は可逆的であり、グリオキサラーゼ 1 (GLO 1) 非存在下では、次の反応の進行は緩やかである。先行研究でも、GLO1 非存在下で GSH と MG を反応させた場合、MG 濃度の低下は進行が非常に遅かった[1]。

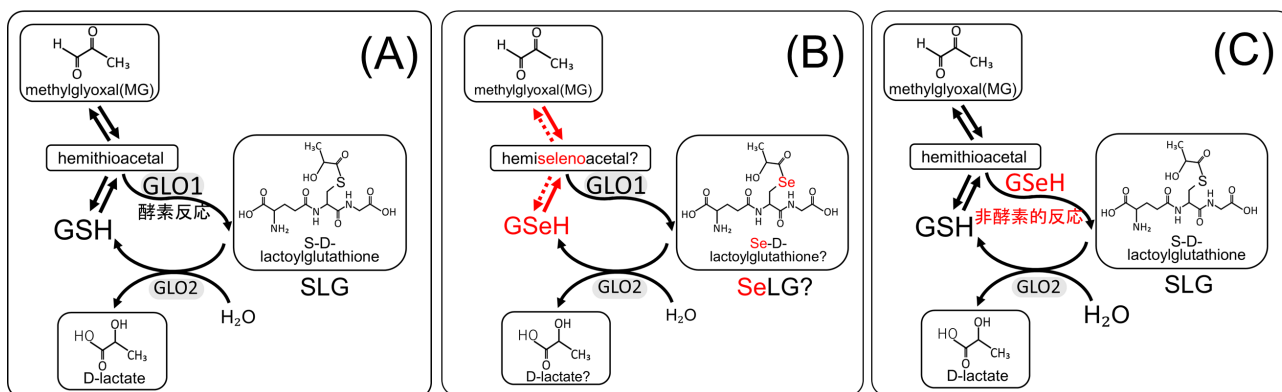


図3 グリオキサーゼシステム(A)と GSeH の寄与が想定される反応機構(B,C)

(A) GLO1 の酵素作用により SLG が生成される、(B) GSeH 自体が MG と反応して非酵素的反応により SeLG が生成される、
(C) GSeH の有する GLO 1 に則した触媒活性による非酵素的反応を介して SLG が生成される反応機構

一方、GLO 1 共存下では、その酵素反応によってヘミチオアセタール体から S-lactoylglutathione (SLG) が生成された後、グリオキサーゼ 2 (GLO 2) の酵素作用によって SLG が D-乳酸と GSH に加水分解されて一巡し、GSH は繰り返しリサイクルされる反応機構である。

GLO 1 非存在下で GSeH と MG を反応させた場合は、GSH 共存の有無に関わらず迅速に MG 濃度が低下し、反応は非可逆的と考えられた [1]。その際、GSH 非共存下では、GSeH 自体と MG が非酵素的に反応してヘミセレンオアセタール体を経て Se-lactoylglutathione (SeLG) が生成された可能性を想定したが (図 3 (B))、反応生成物の単離が困難であった。

今回、GLO 1 非存在下かつ十分量の GSH 共存下で GSeH と MG を反応させた場合の反応生成物の単離・同定を進めた結果、GSeH が GLO 1 の酵素活性に則した触媒活性 (図 3 (C)) を有することを新規に発見した [3]。

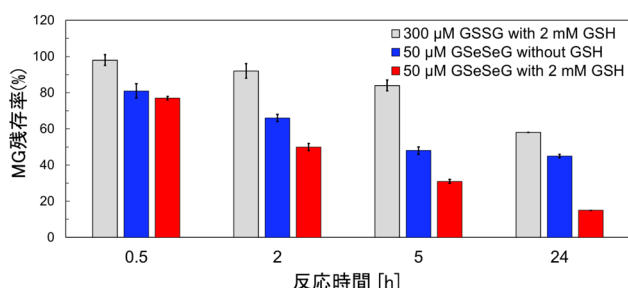


図4 GR 処理した 50 μM GSeSeG と 300 μM MG との反応に 2 mM GSH の共存が与える影響の解析
GLO 1 非存在下で反応させ、MG 濃度の経時変化を測定した。
2 mM GSH 共存下で GR 処理した 300 μM GSSG を反応させた場合の反応時間 0 h の MG 濃度を MG 残存率 100% として計算した。

まず、GLO1 非存在下で 2 mM GSH 共存下または非共存下で 50 μM GSeSeG を GR 処理し、生成された GSeH に 300 μM MG を反応させ、MG 濃度の経時変化を調べた (図 4)。その結果、MG 濃度低下は 2 mM GSH 共存下の方が長く続き、24 h 反応後の MG 残存率は 15% まで低下して、計算上、約 250 μM の MG が減少した。GR の酵素反応と十分量の GSH による非酵素的反応の両反応によって繰り返し生成された GSeH による効果であると考えられる。

一方、GSH 非共存下では 5 h 反応後に MG 残存率は

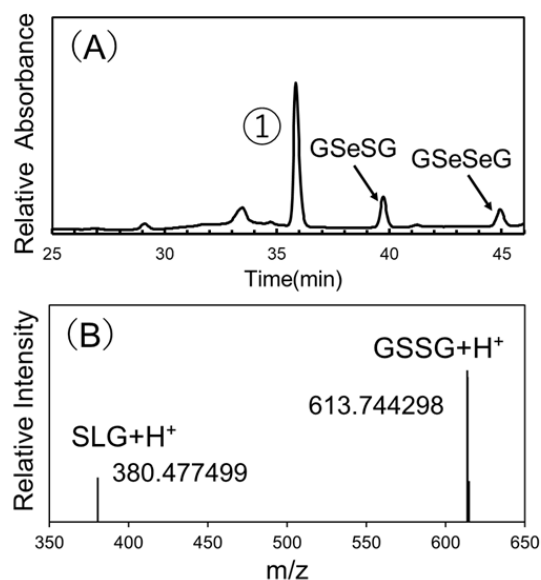


図5 GSeH の GLO 1 様触媒活性の解析

(A) GLO1 非存在下かつ 2 mM GSH 共存下で 50 μM GSeSeG を GR 処理し、300 μM MG と 24 h 反応させた溶液中の反応生成物の HPLC による組成解析。210 nm における吸光度の測定により検出した。GSeSG および GSeSeG は標準物質の溶出位置と一致した。
(B) (A) の①のピークに含まれる分子の ESI(+)-TOF-MS 解析。SLG および GSSG と推定された。

48% まで低下した後に著しく減速し、24 h 反応後の残存率は45%であった。生成されたGSeHは溶存酸素との反応で容易にGSeSeGに戻るが、GRの補酵素であるNADPHが枯渇するまでは繰り返し GSeH が生成されてMGと反応したと考えられる。コントロールとして 2 mM GSH 共存下でGR処理した300 μ M GSSG、すなわち合計2.6 mM GSHと300 μ M MGの反応は緩やかに進行し、24 h 反応後の残存率は58%であった。これらの結果は文献[2]とほぼ同程度であり、高い再現性が示された。

次に、GLO 1非存在下かつ2 mM GSH共存下で50 μ M GSeSeGをGR処理して生成されたGSeHに300 μ M MGを反応させ、24 h反応後の生成物の組成をHPLCで解析した。その結果、メインピーク①と2本の小ピークが検出され、後者は溶出位置からGSeSeGおよびGSeSeGと推定された (図5(A))。これらの結果は図1(B)の反応式を支持するものである。

さらに図5(A)のピーク①を回収して凍結乾燥で濃縮し、ESI(+)-TOF-MSの測定により構造解析を進めたところ、SLGとGSSGが検出された (図5(B))。したがって、GSeHの有するGLO 1に則した触媒活性によってSLGが生成されたことが示され、図3(C)で想定した反応機構の存在が確認された。

【考察】

今回、GSeHのSLG生成触媒活性を見出したが、以下のような点をさらに検討する必要がある。

- (1) GSeHによって生成されるSLGの検出量がMGの減少量よりも少なかった。
- (2) 図5でHPLCのピーク①中に検出されたGSSGの生成機構が不明である。

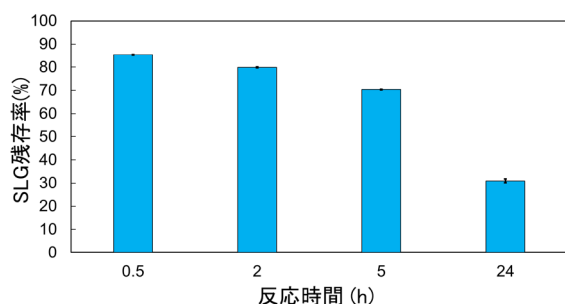


図6 SLGの非酵素的加水分解の検証

市販のSLGを0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解し、GLO2非存在下、37°Cで保存した。SLGの加水分解によって生成されるGSHの濃度の経時変化を調べ、SLG残存率を逆算した。SLG残存率は、反応時間0 hのSLG量を100%として計算した。

SLG検出量が想定よりも低かったことについては、下記の様な仮説を立てている。SLGはグリオキサラーゼシステムにおいてGLO 2の酵素作用によってGSHとD-乳酸に加水分解される。しかしながら並行して、中性から弱アルカリ性のpHでは、非酵素的にSLGの加水分解が進むことが報告されており[4]、実際にそのような結果が得られた (図6)。

すなわち、pH 7.4の水溶液中では、GLO 2非存在下でも37°C、24 h後にはSLGの残存率は31%であり、約70%がGSHとD-乳酸に加水分解されたと考えられた。したがって、上記の反応液中に検出されたSLGの量がMG減少量よりも低かったのは、非酵素的に加水分解されたためと考えられる。同様に、GSH非存在下でGSeHをMGと反応させた場合にSeLGと想定される生成物の単離が困難だったのは、反応液中で進行した加水分解に由来した可能性がある。

他方、図5(A)のピーク①中に検出されたGSSGの由来については、GSeHによって反応性が高められたGSHが酸化されたものと考えられるが、GSeHによってGSHの反応性が向上する機構についてはさらなる解析を必要とする。

3. 展望

MG無毒化機構であるグリオキサラーゼシステムの律速段階はSLGの生成反応である。GLO 1は、SLG生成を促進する重要な酵素であるが、糖尿病患者で発現量低下が報告されている。糖尿病のような高血糖状態はMGが蓄積しやすく、MGによる抗酸化酵素の失活によって細胞内の酸化ストレスが高くなる、という負の連鎖になる。これに対して、高血糖条件下のマウス腎臓糸球体由来の細胞株にGLO 1を過剰発現させると酸化ストレスやAGEsの蓄積が低下し、アポトーシスが抑制されたという報告がある[5]。GLO 1を過剰発現させる代わりにGLO 1様の触媒活性を有するGSeHを働かせることで同様な効果が期待できる。

今回新たに得られた知見を踏まえて、高血糖条件下でGSeSeGを投与し、細胞質で生成されたGSeHがGLO 1様の触媒活性を発揮した際の効果を解析する予定である。細胞質ではGSeHが効率良くリサイクルされるため、添加するGSeSeGの量をセレンの摂取許容範囲内に抑えられると考えられ、GSH/GSeSeGの医薬品としての活用が高まると期待される。

4. 引用文献

- [1] A. Kanamori, M. Iwaoka, et al., *Pharmaceuticals*, **17**, 1049 (2024)
- [2] 金森審子 東海大学先進生命科学研究so紀要, **9**, 38-41(2025)
- [3] 陳 詩文、岩岡道夫、金森審子、第35回日本メイラー
ド学会年会講演要旨 (2025)、弘前、「還元型セレノグ
ルタチオンによるグリオキサラーゼ1様活性の解
析」
- [4] M.D.Opfermann, et al., *Nature Chemical Biology* **21**,
1397-1407 (2025)
- [5] K.M. Kim, et al., *Exp. Cell. Res.* **318**, 152-159 (2012)

5. 謝辞

共同研究者の東海大学理学部化学科の岩岡 道夫先生、
機器分析にご協力いただいた東海大学技術共同管理室
の皆さんと蟹江 善美博士に心より感謝いたします。

本研究は、東海大学先進生命科学研究so助成金を受け
て実施したものです。



多変量解析による桜島火山周辺河川水の特徴

Characteristics of river water around Sakurajima volcano estimated by multivariate analysis

豊島誠也^{1,3)}, 大場武²⁾, 沼波望²⁾

¹⁾東海大学先進生命科学研究所, ²⁾東海大学理学部化学科, ³⁾東海大学総合理工学研究科総合理工学専攻

Seiya Toyoshima,^{1,3)} Takeshi Ohba,²⁾ Nozomi Numanami²⁾

¹⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ²⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University,

³⁾ Course of Science and Technology, Graduate School of Science and Technology, Tokai University,

*連絡先: 豊島誠也 (東海大学先進生命科学研究所) e-mail: toyoshima.seiya.k@tokai.ac.jp

*Corresponding author: Seiya Toyoshima (Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

[要旨]

頻繁に火山灰を放出している桜島火山周辺の河川水を採取・分析し、河川水流域に堆積した火山灰の影響を評価した。化学組成に対し主成分分析を行い、第1主成分は河川流域における人為的な活動、第2主成分は火山灰の溶出成分、第3主成分はAsの挙動を反映していると推定された。火山灰に起源する有害な金属イオンの影響は見出されなかった。

[Abstract]

River water around Sakurajima volcano, which frequently emits volcanic ash, was collected and analyzed to assess the impact of volcanic ash deposited in the river basin. Principal component analysis was performed on the chemical composition, and it was estimated that the first principal component reflects human activity in the river basin, the second principal component reflects the eluted components of volcanic ash, and the third principal component reflects the behavior of As. No influence of harmful metal ions originating from volcanic ash was found.

[Key Words]

Volcanic ash, River water, Principal component analysis

1. はじめに

日本列島には数多くの火山が分布し、富士山もその内の一つである。富士山は有史では数回の噴火が記録されている。大規模な噴火として864年から866年に起きた貞観噴火と、1707年に起きた宝永噴火が挙げられる。宝永噴火は16日間続き、関東一帯に火山灰が堆積した。宝永噴火と同規模の噴火が現在起きた場合、火山灰の降灰によって電力・水道・ガス・交通・通信などの首都圏のインフラストラクチャーに甚大な被害をもたらすと想定されている[1]。首都圏の上水道は相模川、多摩川、利根川などの河川を主な水源としている。火山灰粒子の表面には、マグマに起源する陰イオン (F, Cl, SO₄²⁻) や、

金属イオンが付着しており、その中にはFe, As, Se, Hg, Pb等の有害金属も含まれる可能性がある。これらの成分のほとんどは水溶性であり、降雨により火山灰から河川水に溶出する。溶出した成分のいくつかは人体の健康に影響を及ぼす(図1)。本研究では火山灰による河川水組成の影響を評価するため、現在火山灰の影響を受けている河川水として桜島火山に近接する河川水を対象に研究を実施した。本論文では、河川水の化学組成を分析して得られた結果より、多変量解析の一手法である主成分分析を用いて河川水の特徴を考察した。

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences, Vol.10, March 2026

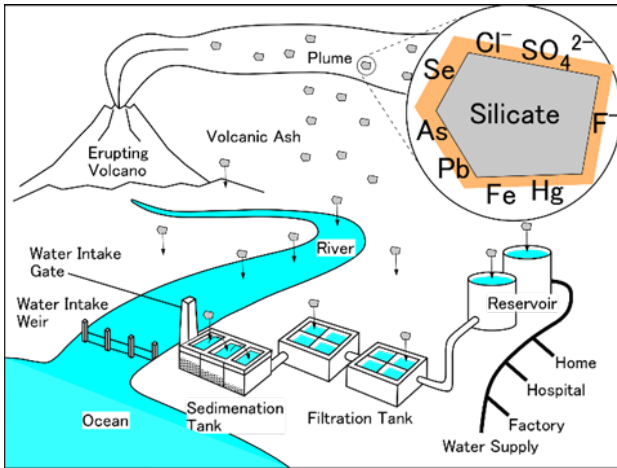


図1 火山灰の溶出成分が河川水質に与える影響の模式図 [2]

2. 採取・分析方法

桜島火山の周辺に位置する 22 の河川において河川水を採取した。図2に採取地点を示す。

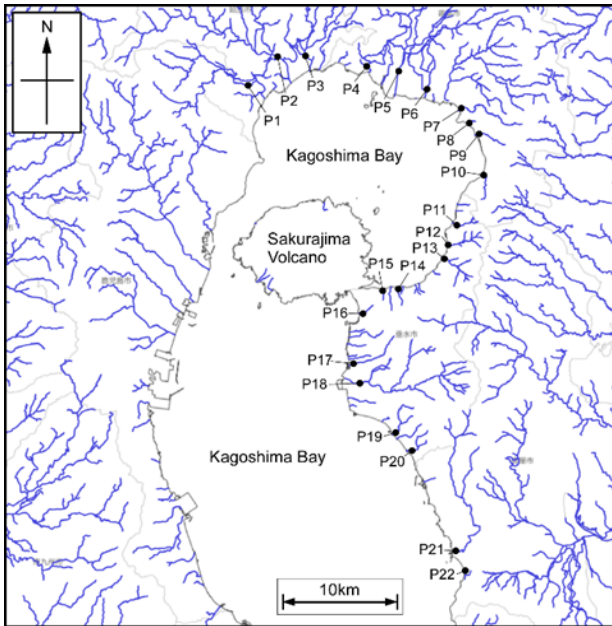


図2 鹿児島河川水の採取地点 [2]

P1 から P8 までの試料は、2024 年 3 月 27 日に採取された。P9 から P22 までの試料は、2024 年 3 月 28 日に採取された。河川をまたぐ橋の上からロープに結び付けたバケツを河川に落とし、引き上げるにより河川水を採取した。バケツを引き上げた直後に熱電対温度計で採取した河川水の温度を測定した。何の処理を行わない河川水(生水)を 250ml のポリ瓶に保存した。0.45 μ m 孔径のシンジフィルターで河川水をろ過し、100ml のポリ瓶に「ろ過水」として保存した。0.45 μ m 孔径のシンジフィルターでろ過した河川水 90ml に 5ml の 20%硝酸溶液

を添加し「酸添加ろ過水」として 100ml のポリ瓶に保存した。

各試料を採取した日の夜に pH メータを用いて生水の pH を測定した。東海大学湘南キャンパス理学部化学科の研究室においてろ過水を適宜、純水で希釈しイオンクロマトグラフ (Dionex ICS-900) により陰イオン、誘導結合プラズマ質量分析(Thermo Science iCAP-Q)と気象研究所のマイクロ波プラズマ原子発光分光(MP-AES 4210)によりの陽イオン濃度、気象研究所のキャピティリングダウン分光分析器(PICARRO L2140-i)で水素・酸素同位体比の分析を行った。濃度が既知の 0.02N の希硫酸水溶液を用いて生水を滴定することにより生水のアルカリ度を求め、 HCO_3^- の濃度を計算した[3]。滴定の際に指示薬としてブロモクレゾールグリーン-メチルレッド・エタノール溶液を用いた。

3. 結果・考察

各河川水の化学組成を表 1 に示す。得られた河川水の化学成分と安定同位体比に対し、主成分分析 (PCA) を行った。PCA は、多次元の相関する量的変数、情報をできる限り保持したまま、少数のお互いに相関しない主成分 (PC1, PC2, PC3 . . .) に要約・圧縮する。複雑な多次元データを 2~3 次元に簡略化することが可能である。既存の研究 [2]では、本研究で用いた試料について、 $\text{H}_2\text{O}-\text{SO}_4^{2-}-\text{Cl}^-$ の三成分図による解析で、複数の試料 (P2, P6, P10, P21) に海水の混入を認めた。本論文では河川水に固有な特徴に着目するため、海水の影響を受けている P2, P6, P10, P21 のデータを除いて PCA を行った。

各主成分における化学組成、安定同位体比の因子負荷量を図 3 に示す。第 1 主成分(PC1)は pH, F, SO_4^{2-} , Al, Ba, As, Cd 以外の化学組成と安定同位体比は、絶対値 0.5 以上の正の因子負荷量を示した。第 2 主成分(PC2)では、Cd, Hg は正の因子負荷量、pH, F, SO_4^{2-} , Ca は負の因子負荷量を示した。第 3 主成分(PC3)では、Ba が正の因子負荷量、F, As, Cd は負の因子負荷量を示した。

図 4 と図 5 では、固有ベクトルと各試料の主成分得点を図示されている。固有ベクトルは、各変数の主成分に対する寄与の度合いをベクトルとして示している。主成分得点は各試料が主成分軸上でどの位置にあるかを示している。PC1 得点と PC2 得点、PC3 得点は正負広く分布していた。既存の研究[2]により火山灰の影響を受けていると推定される P5, P12, P15, P6 の河川水に着目した。これらの河川水の PC1 得点は主に正に分布していた。PC2 得点はすべて負に分布していた。PC3 得点は P12 以

外の河川水が大きく負に分布していた。

図3, 4, 5から、それぞれの主成分の意味を推定する。PC1 は水素・酸素同位体比が因子負荷量において強い正の値をしている。図6に示されるように、P22以外の北緯31.70°より高い地域の河川水に高い同位体比がみられる。今回の調査地域で緯度の高い地域は平野で人口が多い地域であり、農業等の人為的な活動が盛んである。例えば、肥料はNO₃⁻とKを含む。田畑があれば流域に肥料成分が流れ込み、河川水のNO₃⁻とK濃度が上昇すると考えられる。実際にPC1ではNO₃⁻とKに正に強い因子負荷量が見られる(図3)。以上の考察により、PC1は人為的な活動を反映していると考えられる。PC2ではSO₄²⁻とFが絶対値0.6以上の強い負の因子負荷量を示しており、PC2と大きく関係している。SO₄²⁻は既存の研究[2]で火山灰に起源する成分と認識されているので、PC2は火山灰の影響を示していると考えられる。図4の主成分得点においても、桜島火山灰の影響を強く受けている河川水は負に分布していることから、PC2は火山灰と関係していることが示される。陽イオンについては、強い因子負荷量を示す成分がない。火山灰に起源する陽イオンは本研究で分析した河川水には検出されなかったと考えられる。FはSO₄²⁻との相関係数は0.76と高く、SO₄²⁻と同様に火山灰に起源する成分であると考えられる。PC3ではPC1とPC2と異なり、Baに正の因子負荷量、Asに負の因子負荷量が見られる。またpHは正の因子負荷量の絶対値が0.4とBaより低いが、比較的PC3と強い関係がみられる。既存の研究[4]では、河川水のpHとAs濃度の間に負の相関が観測されている。この相関は、pHが上昇すると溶存しているAsがFeやAlと結合して共沈し、河川水から失われることで説明されている。AsとpHの相関係数は、-0.48であり、既存の研究[4]と同様な関係を示すことから、PC3は河川水におけるAsの挙動を反映していると推定される。

4. 結論

本研究では、桜島火山の周辺で河川水を採取・分析し主成分分析を行うことにより、河川水の特徴を考察した。その結果、PC1は人為的な活動、PC2は火山灰の溶出成分、PC3はAsの挙動を反映していると推定された。火山灰により影響を受けている成分としてSO₄²⁻、Fが推定された。火山灰から影響を受けている金属イオンは見出されなかった。

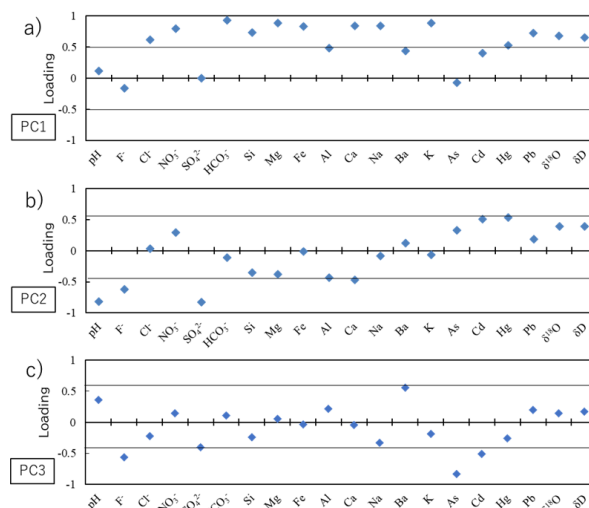


図3 a)第1主成分(PC1)、b)第2主成分(PC2)、c)第3主成分(PC3)の因子負荷量

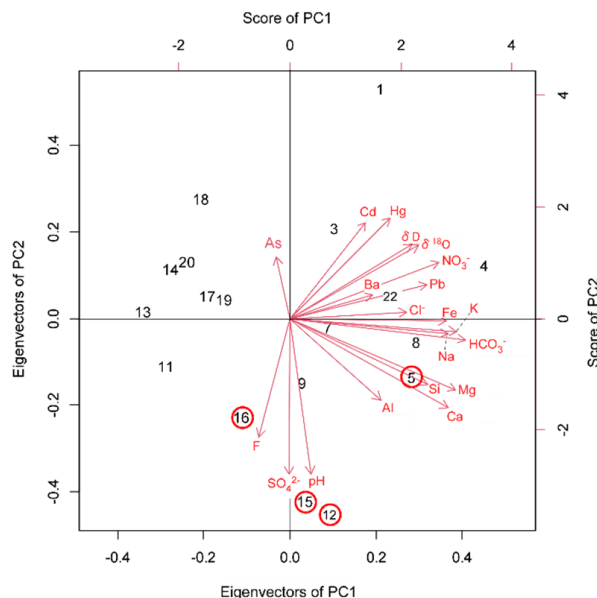


図4 PC1とPC2の固有ベクトルと主成分得点。赤い丸は桜島火山灰の影響を強く受けている河川水を示している

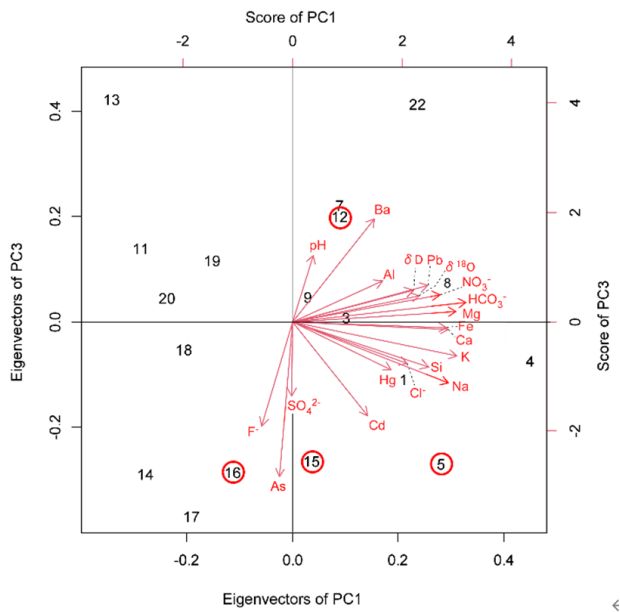


図5 PC1 と PC3 の固有ベクトルと主成分得点。赤い丸は桜島火山灰の影響を強く受けている河川水を示している

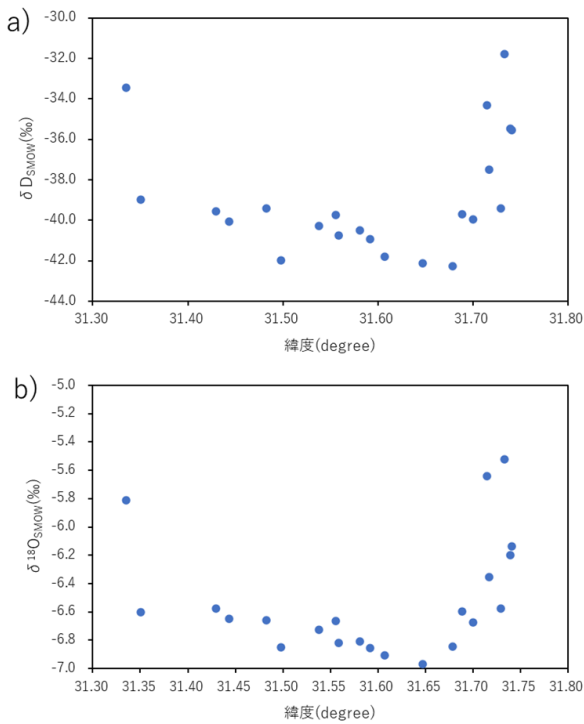


図6 河川水採取地点の緯度と a)水素及び b)酸素安定同位体比の関係

5. 引用文献

[1] 内閣府. 大規模噴火時の広域降灰対策検討ワーキンググループ,
<https://www.bousai.go.jp/kazan/kouikikouhaiworking/index.ht>

ml (2026年2月閲覧)

[2] 豊島誠也, 大場武, 沼波望 (2025) 東海大学先進生命科学研究所紀要 第9巻, p30-33

[3] 本島公司, 益子安, 甘露寺泰雄 (1973) 地下水・温泉の分析. 講談社, p110-111

[4] 小村智香, 濱武英, 一ノ瀬裕稀, 久保田富次郎 (2021) 水環境学会誌 44巻2号, p43-50

6. 謝辞

本研究はJSPS 科研費 JP23K04350 の助成を受けました。河川水分析にあたり気象庁気象研究所の谷口無我博士にご協力いただきました。ここに記して感謝いたします。

表 1 桜島火山周辺の河川水化学組成

採取地点	pH	F ⁻ mg/L	Cl ⁻ mg/L	NO ₃ ⁻ mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	HCO ₃ ⁻ mg/L	Si mg/L	Mg mg/L	Fe mg/L	Al mg/L	Ca mg/L	Na mg/L	Ba mg/L	K mg/L	As mg/L	Cd mg/L	Hg mg/L	Pb mg/L	δ ¹⁸ O ‰	δD ‰
p-1	6.7	0.065	6.20	2.22	6.55	37.8	23.4	2.01	0.039	0.012	8.25	8.61	0.033	2.47	1.27×10 ⁻³	1.11×10 ⁻⁵	3.65×10 ⁻³	1.25×10 ⁻⁴	-6.4	-37.5
p-2	7.0	0.084	36.83	0.00	10.17	26.8	14.0	3.27	0.037	0.027	5.33	22.17	0.027	2.27	6.95×10 ⁻⁴	2.29×10 ⁻⁵	2.10×10 ⁻³	1.63×10 ⁻⁴	-6.2	-35.5
p-3	7.1	0.111	6.12	3.14	7.74	29.3	18.3	1.93	0.032	0.019	8.22	7.69	0.009	2.32	1.05×10 ⁻³	3.65×10 ⁻⁶	1.24×10 ⁻³	6.41×10 ⁻⁵	-6.1	-35.5
p-4	7.1	0.126	7.28	5.99	11.60	61.0	24.3	4.08	0.261	0.030	13.22	9.69	0.015	3.80	1.21×10 ⁻³	7.20×10 ⁻⁶	1.00×10 ⁻³	1.26×10 ⁻⁴	-5.5	-31.8
p-5	7.2	0.137	10.66	4.10	20.13	43.9	26.4	3.53	0.031	0.027	11.20	12.81	0.066	3.53	2.42×10 ⁻³	3.61×10 ⁻⁶	1.11×10 ⁻³	5.56×10 ⁻⁵	-6.6	-39.4
p-6	6.8	0.000	960.61	15.51	158.66	75.6	28.3	70.73	0.532	0.004	62.90	565.69	0.079	25.67	2.66×10 ⁻⁴	1.14×10 ⁻⁵	4.87×10 ⁻³	3.19×10 ⁻⁵	-5.6	-34.3
p-7	7.5	0.070	4.59	3.43	7.64	39.0	26.8	2.44	0.015	0.017	8.80	7.37	0.009	3.34	5.76×10 ⁻⁴	2.58×10 ⁻⁶	6.56×10 ⁻⁴	7.24×10 ⁻⁵	-6.7	-39.9
p-8	7.4	0.091	7.06	2.38	9.88	57.3	31.8	3.55	0.247	0.007	12.79	9.61	0.113	3.44	5.00×10 ⁻⁴	5.59×10 ⁻⁶	6.35×10 ⁻⁴	8.49×10 ⁻⁵	-6.6	-39.7
p-9	7.2	0.108	4.83	1.75	11.81	41.5	24.1	3.34	0.041	0.009	9.71	7.27	0.011	2.28	6.11×10 ⁻⁴	2.29×10 ⁻⁶	5.57×10 ⁻⁴	4.92×10 ⁻⁵	-6.8	-42.3
p-10	7.5	0.095	16.16	3.89	11.34	39.0	19.3	2.46	0.103	0.005	13.01	11.48	0.010	2.17	9.14×10 ⁻⁴	2.58×10 ⁻⁶	5.28×10 ⁻⁴	4.85×10 ⁻⁵	-7.0	-42.1
p-11	7.4	0.126	4.26	0.69	10.04	19.5	17.8	1.60	0.001	0.004	6.47	5.74	0.006	1.40	5.01×10 ⁻⁴	1.28×10 ⁻⁶	4.88×10 ⁻⁴	3.61×10 ⁻⁵	-6.9	-41.8
p-12	7.5	0.115	4.56	0.95	31.08	34.2	18.2	3.47	0.105	0.199	14.65	6.19	0.006	1.84	2.32×10 ⁻⁴	2.66×10 ⁻⁶	4.52×10 ⁻⁴	1.18×10 ⁻⁴	-6.9	-40.9
p-13	7.2	0.104	3.96	0.18	9.99	14.6	12.2	1.17	0.004	0.018	5.11	4.69	0.158	0.90	2.37×10 ⁻⁴	1.81×10 ⁻⁶	4.56×10 ⁻⁴	4.21×10 ⁻⁵	-6.8	-40.5
p-14	7.1	0.144	4.50	0.27	12.50	14.6	15.8	1.24	0.023	0.006	5.32	5.63	0.003	1.21	2.36×10 ⁻³	8.43×10 ⁻⁶	4.54×10 ⁻⁴	3.81×10 ⁻⁵	-6.8	-40.7
p-15	7.3	0.206	8.33	0.31	26.96	24.4	32.6	2.44	0.015	0.027	10.30	9.99	0.006	2.61	5.05×10 ⁻⁴	2.52×10 ⁻⁶	4.77×10 ⁻⁴	3.42×10 ⁻⁵	-6.7	-39.7
p-16	7.2	0.188	5.85	0.19	19.13	22.0	24.0	1.92	0.017	0.013	8.43	7.27	0.003	1.92	8.75×10 ⁻⁴	4.22×10 ⁻⁶	4.75×10 ⁻⁴	3.25×10 ⁻⁵	-6.7	-40.3
p-17	7.1	0.128	5.13	1.18	14.64	19.5	15.6	1.81	0.009	0.007	7.46	6.42	0.003	1.39	7.97×10 ⁻³	5.57×10 ⁻⁶	5.17×10 ⁻⁴	3.41×10 ⁻⁵	-6.8	-42.0
p-18	6.8	0.091	6.67	1.00	8.72	12.2	13.0	1.21	0.021	0.010	4.66	6.40	0.004	1.92	1.08×10 ⁻³	3.01×10 ⁻⁶	5.14×10 ⁻⁴	3.88×10 ⁻⁵	-6.7	-39.4
p-19	7.2	0.100	5.86	0.00	11.77	19.5	14.2	1.63	0.009	0.012	6.53	6.60	0.022	1.24	6.53×10 ⁻⁴	3.68×10 ⁻⁶	3.83×10 ⁻⁴	4.86×10 ⁻⁵	-6.6	-40.1
p-20	7.0	0.092	6.37	0.58	10.33	19.5	13.8	1.53	0.003	0.005	5.21	6.46	0.004	1.32	6.35×10 ⁻⁴	2.65×10 ⁻⁶	3.96×10 ⁻⁴	3.53×10 ⁻⁵	-6.6	-39.6
p-21	7.1	0.041	139.84	1.82	30.81	19.5	15.4	11.66	0.005	0.007	8.10	84.87	0.005	5.00	1.44×10 ⁻³	2.94×10 ⁻⁶	5.55×10 ⁻⁴	3.25×10 ⁻⁵	-6.6	-39.0
p-22	7.3	0.090	9.66	4.00	7.88	39.0	20.2	3.33	0.074	0.029	9.22	8.51	0.184	2.03	1.39×10 ⁻⁴	3.43×10 ⁻⁶	3.61×10 ⁻⁴	4.38×10 ⁻⁵	-5.8	-33.4



磁気共鳴画像化法と2光子顕微鏡画像のテクスチャ解析によるマウス脳内の Neurofluid 動態の定量評価

Quantitative evaluation of neurofluid dynamics in the mouse brain via texture analysis between magnetic resonance imaging and two-photon microscopy

村山 敬太^{1,2)}, 小林 勇登³⁾, 八ツ代 論^{4,5)}, 黒田 輝^{1,2,3,5)}

¹⁾ 東海大学大学院総合理工学研究科総合理工学専攻, ²⁾ 東海大学先進生命科学研究科, ³⁾ 東海大学大学院工学研究科電気電子工学専攻, ⁴⁾ Bioview 株式会社, ⁵⁾ 東海大学情報理工学部情報科学科

Keita Murayama^{1,2)}, Yuto Kobayashi³⁾, Satoshi Yatsushiro⁴⁾, Kagayaki Kuroda^{1,2,3,4)}

¹⁾ Course of Science and Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Tokai University, ²⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³⁾ Course of Electrical and Electronic Engineering, Graduate School of Engineering, Tokai University, ⁴⁾ Bioview, Inc., ⁵⁾ Department of Human and Information Science, School of Information Science and Technology, Tokai University

[要旨]

脳実質内における neurofluid は神経老廃物の浄化機能を担っており、その動きは数 $\mu\text{m/s}$ 程度の非常に遅いものとされている。磁気共鳴画像化法の一つである Q-space Imaging (QSI) による速度測定によって、マウス脳内で $10 \mu\text{m/s}$ 以下の水分子の動きを捉えたが、それが neurofluid 動態であるかどうかの検証が必要であった。本研究では、得られた速度分布の空間的な特徴が血管ネットワークと視覚的な類似性を有することに着目した。この関連性を検証するためには実際の血管分布画像と定量的に比較する必要不可欠である。しかし、一般に2光子顕微鏡などで撮像される高精細な血管分布画像とでは、空間分解能や物理量などが異なるため、直接的な定量比較が困難である。そこで絶対的なスケールに依存しない比較手法として、Gray Level Co-occurrence Matrix (GLCM) を用いたテクスチャ解析を検討した。GLCM における4つの特徴量 (Contrast, Correlation, Energy, Homogeneity) を算出することにより、広視野2光子顕微鏡による血管分布の最大値投影像と速度分布像の類似性を求めた。毛細血管を含む血管画像では、速度分布との各特徴量の誤差率が最大20~25%に達した。一方でモルフォロジー処理により微小血管を除去し、直径約 $10 \mu\text{m}$ よりも太い主要な血管のみを抽出した画像では、特に Contrast ならびに Correlation において速度分布と良く一致し、誤差率が概ね5%未満に低減された。これらの結果は、これまでに得られた速度分布が脳実質内の neurofluid 動態そのものであることを直ちに示すものではない。しかしながら、本研究により QSI による速度画像が、毛細血管よりも太い血管のネットワークと高い空間的類似性を持つことが定量的に示された。

[Abstract]

Neurofluid motion in the brain parenchyma plays the role of neural waste clearance. The motion is thought to be extremely slow of the order of several $\mu\text{m/s}$. Velocity measurements using Q-space imaging (QSI), one of the techniques of magnetic resonance imaging (MRI), captured the motion of water molecules under $10 \mu\text{m/s}$ in the mouse brain. However, there was no clear evidence that this movement was due to the neurofluid activity. In this study, we focused on the visual similarity between the spatial characteristics of the QSI velocity distribution and the vascular network. To verify this relationship, a quantitative comparison with actual vascular images was necessary. However, because MRI and wide-field two-photon microscopy used for vascular imaging have fundamentally different spatial resolutions and acquired physical quantities, direct comparison is difficult. Therefore, we introduced a scale-independent comparative approach combining morphological processing and Gray Level Co-occurrence Matrix (GLCM) texture analysis. In vascular images containing all capillaries, the error rates of

the four GLCM metrics (Contrast, Correlation, Energy, Homogeneity) compared to the velocity distribution reached 20~25%. On the other hand, when microvessels were removed using morphological processing to extract only major large vessels (larger than approximately 10 μm in diameter), the distributions showed strong agreement, particularly in Contrast and Correlation, with error rates dramatically reduced to less than 5%. These results do not immediately indicate that the obtained velocity distribution represents the neurofluid dynamics within the brain parenchyma itself. However, this study quantitatively demonstrated that QSI velocity images exhibit high spatial similarity to the network of blood vessels larger than capillaries.

[Key Words]

Neurofluid, MRI, QSI, GLCM

1. はじめに

アルツハイマー性認知症は脳内におけるアミロイド β やタウなどの神経老廃物に対する浄化系の能力低下と関連する可能性が指摘されている。浄化系の機序としてグリンパティックシステム仮説 (Glymphatic system) が提唱されている。この仮説では動脈の血管周囲腔 (Perivascular space, PVS) から脳実質内へと流入する脳脊髄液 (Cerebrospinal fluid, CSF) が間質液 (Interstitial fluid, ISF) と混ざり合いながら灌流し、神経老廃物とともに静脈の血管周囲腔へと流れ、頸部リンパ節から脳外へと排出されると考えられている^{1,2}。近年では、これらの脳内に存在する水は総称され Neurofluid と呼ばれている。さらに、脳実質内での Neurofluid の動きは数 $\mu\text{m/s}$ 程度と非常に遅いものだとされている^{3,4}。また、この一連の Neurofluid と神経老廃物の移動には、血管周囲を覆う足突起にアクアポリン4 (AQP4) を発現するアストロサイトが重要な役割を果たしていると指摘されている⁵。

Neurofluid の動態を非侵襲的に可視化するために、磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) の Q 空間画像化法 (Q-space imaging, QSI) による水分子の速度測定法が検討されてきた^{6,7}。しかしながら、これまでの研究では得られた水分子の動きが Neurofluid 動態のものであるかどうかは検証されていない。一方で、QSI から得られた速度分布は、脳血管のネットワーク構造と視覚的に類似したマダラ模様のような特徴的な空間パターンを有していることが確認された。この類似性を定量的に証明するためには、実際の血管分布との比較が不可欠である。しかし、一般的に2光子顕微鏡などから得られる高分解能の血管分布画像は、空間分解能や取得する物理量が全く異なるため、直接的な比較評価

が困難であるという問題がある。また、近年では MRI 画像に対する画像特徴量の網羅的解析 (Radiomics) が PVS の定量的評価や、神経変性疾患の予測などに広く用いられている^{8,9}。しかし、これまでの研究は、主に病変の形態的特徴などを用いた単一モダリティ内での評価や診断補助に留まっている。

そこで本研究では、この速度分布が持つ特有の「テクスチャ」に着目し、絶対的なピクセル値やスケールに依存せず、画像の空間的な類似性を定量評価する GLCM (Gray Level Co-occurrence Matrix) を用いた。モダリティおよび空間分解能の異なる速度分布と血管分布の関連性を紐付けるための新たな比較アプローチとして、GLCM によるテクスチャ解析の有用性の検証を行った。

2. 原理

2.1 QSI

QSI は MRI の拡散強調画像 (Diffusion Weighted Imaging, DWI) に基づいている。撮像には MPG (Motion Probing Gradient) と呼ばれる一対の傾斜磁場を利用する。この傾斜磁場の強度と印加時間ならびに印加時間間隔によって、拡散に伴うボクセル内における横磁化ベクトルの分散が生じる。QSI では変位に対する波数 q を定義し、MPG の振幅を変化させた複数の信号強度を次式に基づいて求める¹⁰。

$$S = S_0 \cdot \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 D (\Delta - \delta/3)) \quad (1)$$

$$q = \gamma g \delta / 2\pi \quad (2)$$

ここに、 S_0 は MPG をかけないときの信号強度、 γ はプロトンの磁気回転比 [MHz/T]、 g は MPG 強度

[mT/m], δ は MPG 印加時間 [s], Δ は MPG の印加時間間隔 [s] である。D は拡散係数 [mm²/s] であり、この値が大きいほど拡散による磁化ベクトルの分散が大きく、信号強度が低下する。q に対する信号強度を描いた曲線は q 空間と呼ばれる。この空間を逆フーリエ変換することによって変位の確率密度関数 (Probability Distribution Function, PDF) を求める。自由拡散において PDF はガウス型であり、横軸は変位、縦軸はその変位を有する確率を表す。関数のピーク位置は平均変位を示す。平均変位がゼロでない場合 PDF はガウス型から歪むと共にピーク位置が 0 からシフトする。このシフト量を MPG の印加時間間隔 Δ で除することにより、ボクセル内の平均速度を求めることができる。このような計算を画像内の全てのボクセルについて行うことによりマウス脳において、図 1 に示すような数 $\mu\text{m/s}$ 程度の水分子の動きを捉えることができる。

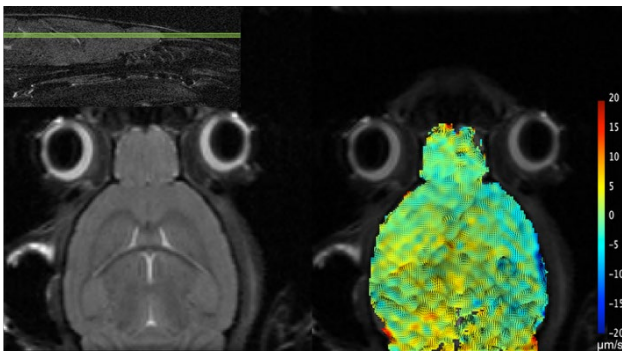


図 1 マウス脳矢状面内の緑枠における水平断面の T2 強調画像 (左図) と QSI により得られた 3D 速度分布 (右図)。速度分布は解剖学的な位置関係を明示するため同一スライスの T2 強調画像上に重畳されている。面内速度は矢印 (3 ピクセル分の長さが 10 $\mu\text{m/s}$)、面外速度はカラーで示されている。血流を除外するために、 $\pm 20\mu\text{m/s}$ で閾値処理を行った。独特な斑状パターンが見られる。

2.2 GLCM

GLCM は画像内のピクセルが持つ輝度値 (Gray level) の空間的な配置や規則性を統計的に評価する手法である。ある画像において、特定の輝度値 i を持つピクセルと、そこから任意の距離および角度の位置にある輝度値 j を持つピクセルのペアが出現する同時確率を $P(i, j)$ として、図 2 に示されるような行列を構築する。

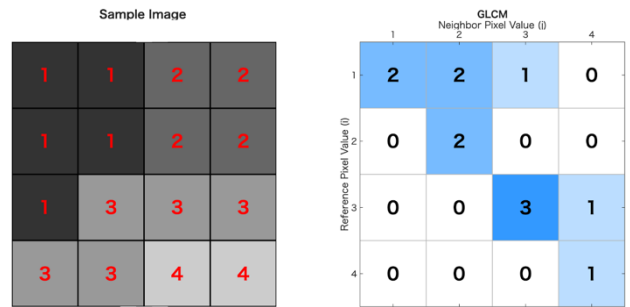


図 2 1~4 の輝度値を持つ 4x4 のサンプル画像 (左図) とサンプル画像から算出された GLCM (右図)。基準ピクセル (i) に対して右方向 (距離 1 ピクセル) に隣接するピクセル (j) の輝度値の同時生起確率 (頻度) をカウントした例を示している。例えば、輝度値 1 の右隣に輝度値 2 が配置されているペアは画像内に 2 箇所存在するため、GLCM において (1, 2) の値は 2 となる。

さらに空間的類似性を多角的に評価するため、正規化された GLCM から以下の代表的な特徴量を算出できる¹¹。

- 1) Contrast

$$\sum_{i,j} (i - j)^2 P(i, j) \quad (3)$$

- 2) Correlation

$$\sum_{i,j} \frac{(i - \mu_i)(j - \mu_j) P(i, j)}{\sigma_i \sigma_j} \quad (4)$$

ここで μ と σ は、それぞれ GLCM の行と列から算出される平均と標準偏差を表す。

- 3) Energy

$$\sum_{i,j} P(i, j)^2 \quad (5)$$

- 4) Homogeneity

$$\sum_{i,j} \frac{P(i, j)}{1 + (i - j)^2} \quad (6)$$

Contrast は局所的な輝度値の変動量、Correlation はピクセルペア間の輝度値の線形依存性、Energy は値が大きいほど特定の輝度ペアが支配的であることを、Homogeneity は対角成分 ($i = j$) への集中度および画像の滑らかさを示している。これらの特徴量は、絶対的なピクセル値ではなく隣接関係を評価するため、スケールの異なる画像間でも空間的なパターンを統計量として定量比較が可能である。

3. 方法

本研究における MRI 撮像および広視野 2 光子顕微鏡による血管撮像は、それぞれ独立した異なるマウス個体群を用いて実施した。また、一連の QSI 解析ならびに画像処理、GLCM 特徴量の算出は、すべて MATLAB2025a を用いて実行した。

3.1 MRI による撮像

9.4T の小動物用の縦型 MRI を用いた。イソフルラン吸入による全身麻酔下にて ICL マウス (N=3) を専用クレイドルに固定し、プローブ内に挿入した。麻酔管理のために呼吸を圧力センサーで、心拍を ECG によりモニターした。体温低下を防ぐために、恒温循環槽によって高温水を循環させたチューブを臀部付近に沿わせて配置した。撮像に際して、広視野 2 光子顕微鏡によって取得される脳表層付近の血管画像と解剖学的な位置を大まかに合わせるため、大脳皮質の表層付近が含まれるようにスライス位置を設定した。この設定に基づき、マウス脳の水平断面を 3D echo-planner stimulated echo imaging (3D-STE-EPI) により撮像した。撮像パラメータは次の通りである: τ , 1 ms; Δ , 1000 ms; MPG 強度, -293.58~293.58 mT/m (73.39 mT/m 間隔で 9 回印加); MPG 印加軸, 3 軸 ($\pm x, \pm y, \pm z$ 軸); TE, 14.92 ms; TR, 8000 ms; segments, 6; FOV, 20 × 20 mm²; スライス厚, 0.6 mm; 撮像時間, 8 時間 (1 個体)。

3.2 広視野 2 光子顕微鏡による撮像

脳の血管分布を可視化するため、広視野 2 光子顕微鏡による撮像を行った。実験には C57BL/6J マウスを用いた。マウスをイソフルランによる麻酔下で定位脳固定装置に固定し、頭皮切開を行ったのち、ドリルを用いて、頭蓋窓を作成した。血管を蛍光標識するため、Rhodamine B で標識されたデキストラン (Invitrogen™ Dextran, Rhodamine B, 70,000 MW) を投与した。蛍光の励起および取得波長は 570/590 nm とした。撮像パラメータは次の通りである: FOV, 2.5 × 2.0 mm; 取得深度, 脳表面付近から ~600 μ m までの範囲を対象とし, 30 μ m ステップで計 21 スライス; フレームレート, 2.5 Hz; タイムラプス条件, 1 ボリュームあたり 50 フレーム (4 分間) の連続撮像を行い, 1 分間の待機時間を挟む 300 秒間隔で計 12 回 (1 時間)。

3.3 画像処理

異なる画像間を定量的に比較するため、血管画像に対して画像処理を行い、条件の異なる 3 種類の画像を作成した。取得した広視野 2 光子顕微鏡の深度画像に対して、Maximum Intensity Projection (MIP) 処理を適用した (条件 A)。マウス脳において、Neurofluid の動態が推定される主要な血管網を抽出し、速度分布との関連性を評価するために MIP 画像に対してモルフォロジー演算のオープニング処理を適用した。この処理より、定義した構造体のサイズよりも細い血管を除去することができ、構造体より太い血管は形状を保ったまま残存する。本研究では血管の抽出スケールによる特徴量の変化を比較するため、円盤状の構造体で、半径を 3 ピクセル (条件 B) ならびに 5 ピクセル (条件 C) に設定をし、2 段階のフィルタリング処理を行った。それぞれの画像が異なる個体から取得されているため、同一脳におけるピクセル単位の厳密な画像レジストレーションを適用することはできない。この解剖学的差異を補正するため、本手法では標準的なマウス脳アトラスを空間的なリファレンスとして用い、解剖学的指標に基づくマニュアルでの位置推定を行った。広視野 2 光子顕微鏡において頭蓋窓を作成した座標に解剖学的に合致するスライスを、MRI の T2 強調画像群の中から視覚的に選択した。その選択した T2 強調画像における脳の解剖学的構造を参照し、広視野 2 光子顕微鏡の FOV に相当する関心領域 (ROI) を速度画像上に手動にて設定した。ここで、両画像間の空間分解能を一致させる手法として、低分解能 (25 × 20) である速度画像を広視野 2 光子顕微鏡の高分解能 (2000 × 2000) へ合わせることも考えられる。しかし、この手法ではデータの 9 割近くを数学的に補間することになり、元の測定データからの大きな乖離や偽のテクスチャを生む懸念がある。そのため本研究では測定データの信頼性を保つべく、高解像度の血管画像を速度画像に合わせてリサイズする手法を採用した。この上で、血管画像と速度画像のデータとしてのピクセルサイズを揃え、GLCM 解析の入力画像とした。

さらに、画像のリサイズに伴う平滑化やオープニング処理そのものが擬似的な空間相関を生んでいないことを確認するため、対照実験を行なった。図 3 に示すような、マウス脳とは無関係な非生体画像 (一般的な料理画像および人物画像) を用意し、血管画像と同一の解像度へのダウンスケールおよび構造要素サイズ 5 のオープニング

処理を適用した。これらの対照画像についても同様に GLCM 解析を行い、速度分布群との特徴量誤差率を比較評価した。

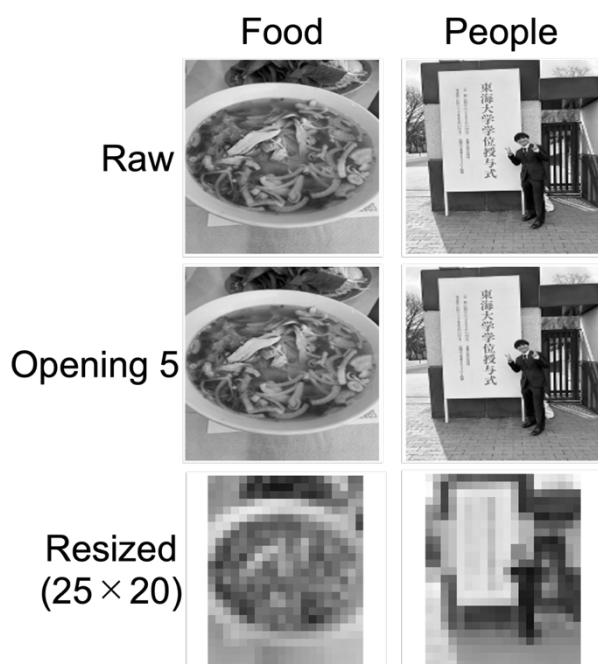


図 3 対照実験に用いた非生体画像 (Food, People) の処理過程. 上段は元画像 (Raw), 中段は血管画像と同一条件の構造要素サイズ 5 のオープニング処理を適用した画像, 下段は速度分布と空間分解能を合わせるためのダウンスケール (25×20 ピクセル) 後の画像を示している. これらの最終的なリサイズ画像を用いて、速度分布との GLCM 特徴量の比較検証を行った。

3. 結果

図 4 は MRI の Q 空間画像化法により得られたマウス脳の色速度分布と、広視野 2 光子顕微鏡により取得された血管分布画像の一例を示している。速度分布画像は、解剖学的な位置関係を把握しやすいよう同一スライスの T2 強調画像上に重畳されており、血流などの速い成分を排除して neurofluid の微小な動態を捉えるため、20 $\mu\text{m/s}$ 以上の速度を閾値処理により除外している。QSI から得られた速度分布を視覚的に観察すると、均一な分布ではなく、水分子の速度 (1~10 $\mu\text{m/s}$) の強弱が入り交じった特徴的なマダラ模様の空間パターンを形成している。この空間パターンは、血管ネットワークと視覚的な類似性を有している。

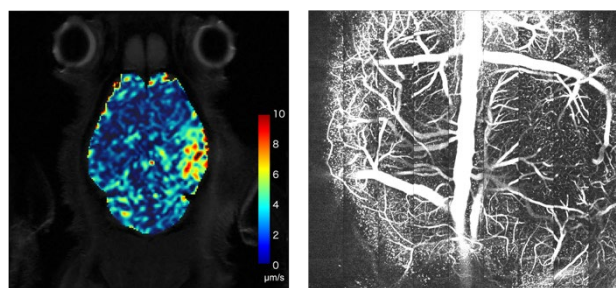


図 4 MRI の Q 空間画像化法 (QSI) により算出された速度分布画像 (左図) と広視野 2 光子顕微鏡により測定されたマウス脳表層付近の血管分布画像 (右図) の一例. 速度分布において、水分子の速度の大きさがカラーマップで示され、解剖学的な位置関係を明示するため同一スライスの T2 強調画像上に重畳されている。また、血流を除外するために $\sim 20 \mu\text{m/s}$ までで閾値処理を行った。

図 5 は血管画像 (条件 A, B, C) および 3 個体のマウス速度画像から算出された各 GLCM 特徴量 (Contrast, Correlation, Energy, Homogeneity) を正規化した推移と、各血管画像とマウス速度画像群との間の誤差率の推移を示している。横軸はピクセル間のオフセット距離 (1~5 ピクセル) である。MIP 処理のみされた血管画像である Vessels_A は、すべての特徴量において速度画像の推移から乖離する傾向を示した。これに対し、モルフォロジー処理により微小血管を除去するにつれて、血管画像の特徴量カーブは速度画像のカーブへと接近した。Vessels_C では、特に Contrast および Correlation において、推移がほぼ完全に重なる結果となった。さらに、血管画像と速度画像群との特徴量の誤差率の結果では特徴量によって、その改善度に明確な違いが見られた。局所的な変動と線形性を表す特徴量である Contrast と Correlation では Vessels_A において最大 20~25% 程度の高い誤差率を示したが、Vessels_C においては、すべてのオフセット距離において誤差率が概ね 5% 未満に収まり、高い空間的類似性が示された。画像の均一性を表す特徴量である Energy, Homogeneity では Vessels_A において最大 25~30% の高い誤差率を示した。Vessels_C へと処理を進めると全体的な乖離は少し縮小したが、オフセット距離が 2 ピクセル付近において依然として 15~20% 程度の誤差率のピークが残存する結果となった。

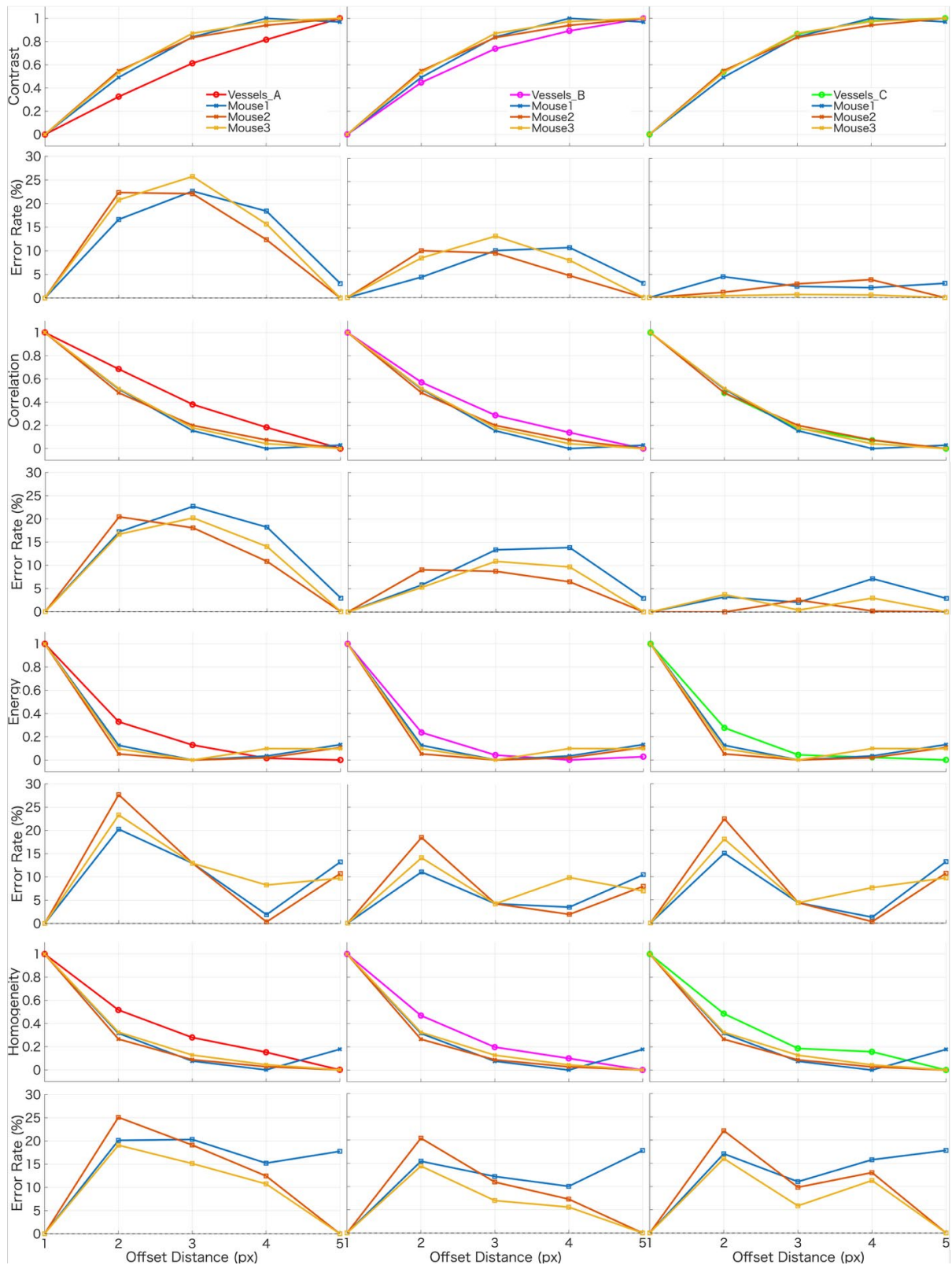


図 5 処理条件の異なる血管画像と、3 個体の速度分布 (mouse 1-3) における 4 つの GLCM 特徴量の比較。各列は血管画像の処理条件を示しており、左列は MIP 画像 (vessels_A : 赤線)、中央列はオープニング処理 (構造体サイズが 3) をした画像 (vessels_B : マゼンタ線)、右列はオープニング処理 (構造体サイズが 5) により最も多く毛細血管を除去した画像 (vessels_C : 緑線) を表す。行は算出した 4 つの特徴量 (Contrast, Correlation, Energy, Homogeneity) を順に示す。各特徴量のグラフは最大・最小値により正規化された特徴量の推移および血管画像と各マウス速度分布の誤差率の推移を示す。また、各グラフの横軸は全て GLCM のオフセット距離 (ピクセル, px) を示す。

さらに、オープニング処理による空間的類似性の向上を定量的に評価するため、各血管抽出条件と速度画像群との各特徴量の誤差率[%](オフセット距離1~5ピクセルの平均)を表1に示す。毛細血管をすべて含む Vessels_A では、Contrast および Correlation の平均誤差率がそれぞれ 12.0%, 10.8% であった。これに対し、微小血管を除去した Vessels_C では、それぞれ 1.5%, 1.7%へと顕著に低下した。この結果は、オープニング処理によって血管像と速度分布の空間的類似性が劇的に向上したことを定量的に裏付けるものである。

表 1 マウス (3 個体) の平均誤差率[%] (Mean ± SD) を示す。オープニング処理を進め微小血管を除去した Vessels_C において、Contrast および Correlation の誤差率が顕著小さくなり、空間的類似性が向上していることが確認できる。

	Contrast	Correlation	Energy	Homogeneity
Vessels_A	12.0 ± 0.6	10.8 ± 1.3	10.3 ± 0.6	11.7 ± 2.9
Vessels_B	5.5 ± 0.6	5.7 ± 1.3	6.4 ± 0.6	8.1 ± 2.9
Vessels_C	1.5 ± 1.1	1.7 ± 1.3	7.4 ± 0.6	9.3 ± 2.9

図6は画像処理に起因する擬似相関の可能性を検証した対照実験の結果を示す。微小血管を除去した血管画像 (Vessels_C) では Contrast および Correlation の平均誤差率が 2%未満という極めて高い一致を示したのに対し、対照画像 (Food, People) においては同処理を適用しても誤差率が約 5~12%にとどまり、明確な類似性は認められなかった。

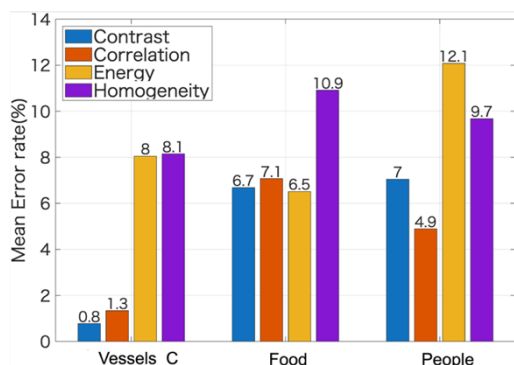


図 6 血管画像 (Vessels_C) および対照画像 (Food, People) における速度分布群 (Mouse 1-3) との特徴量誤差率の比較。血管画像でのみ誤差率が極めて低く、対象画像では同様の画像処理を施しても高い類似性は得られなかった。

4. 考察

モルフォロジー処理により微細な毛細血管を除去した主要血管網では Contrast および Correlation において、画像間の誤差率が 5%未満へと劇的に低下した。この結果は、GLCM がスケールの異なる画像間の空間的パターンの類似性を定量的に結びつけるための、ロバストなアプローチであることを示している。また、これらの特徴量において、主要血管網と速度分布が極めて高い空間的相関を示した結果は、マウス脳内における血管の構造的や配置パターンが Neurofluid 動態と思われる水分子の速度の強弱パターンと空間的に同期していることを表すと考えられ、脳実質内における Neurofluid が毛細血管網よりも比較的太い主要血管に依存していることを示唆している。一方で、Energy や Homogeneity においては主要血管網を抽出しても一定の誤差 (15~20%程度) が残存することが明らかになった。これら二つの特徴量に誤差が残存した理由として、モダリティ間のバックグラウンドの違いに起因すると考えられる。広視野 2 光子顕微鏡による画像では血管のみを抽出したコントラストの高い構造であるのに対し、MRI の QSI による速度画像には主要な流れ以外の測定上のノイズなどが重畳している。そのため、画像全体の「均一さ」や「平坦さ」を評価する指標では、この背景情報の差が誤差として顕在化したと考えられる。また、対照画像を用いた検証結果から、解像度のダウンスケールに伴う人為的な平滑化が擬似的な相関を生んでいる可能性は低いと考えられる。無関係な画像パターンでは高い類似性が得られなかったことから、本手法を用いた GLCM 解析が単なる解像度の低下によるボケを評価しているのではなく、速度分布と血管ネットワークという特有の空間的構造を特異的に捉えていると考えられる。

5. 結論

GLCM によるテクスチャ解析により、QSI によって得た速度分布の画像と血管床の画像に空間的類似性があることが示された。これは、脳実質内の水分子の運動範囲と血管床の構造に関係があることを示唆するものである。しかし、今回の結果が QSI によって得た速度分布が脳実質内の neurofluid 動態を反映していることを直ちに示すものではないことには注意を要する。

6. 今後の展望

得られている速度分布が neurofluid 由来のものであるかどうかをさらに追求する必要がある。このために、心拍動性や呼吸性の組織移動の影響をシミュレーションなどによって評価すること、QSI の撮像時間を短縮して、速度の空間分布の時間変化や再現性を検証することが不可欠である。また、MRI ならびに広視野 2 光子顕微鏡において、同一マウス個体群での測定を行なっていく予定である。

7. 引用文献

1. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med.* 2012;4(147):147ra11.
2. Ray LA, Heys JJ. Fluid flow and mass transport in brain tissue. *Fluids.* 2019;4(4):196.
3. Ray L, Iliff JJ, Heys JJ. Analysis of convective and diffusive transport in the brain interstitium. *Fluids Barriers CNS.* 2019;16(1):6.
4. Bohr T, Hjorth PG, Holst SC. The glymphatic system: Current understanding and modeling. *iScience.* 2022;29:104987.
5. Oshio K. What is the “glymphatic system?”. *Magn Reson Med Sci.* 2023;22(1):137.
6. Yatsushiro S, Murayama K, Kobayashi Y, et al. Investigation of Feasibility of Measurement of Neurofluid Movement by Propagator Analysis based on Q-space Imaging. *Proc Intl Soc Magn Reson Med.* 2024;32:0798.
7. Murayama K, Kobayashi Y, Yatsushiro S, et al. Visualization of Neurofluids Movement in Mouse Brain Parenchyma by Q-space imaging. *Proc Intl Soc Magn Reson Med.* 2025;33:4739.
8. Li L, Wu J, Li B, Hua R, Shi F, Chen L, et al. Handcrafted MRI radiomics of enlarged perivascular spaces and machine learning predict cognitive impairment and sleep

disturbance in young adults. *Sci Rep.* 2026;16:5177.

9. Ma W, Wang X, Wu R. Imaging of enlarged perivascular spaces in Alzheimer's disease with MRI techniques. *Radiol Sci.* 2024;3(1):50-62.
10. Westin CF, Knutsson H, Pasternak O, Szczepankiewicz F, Ozarslan E, van Westen D, et al. Q-space trajectory imaging for multidimensional diffusion MRI of the human brain. *Neuroimage.* 2016; 135:345-62.
11. Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural features for image classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern.* 1973; SMC-3(6):610-621.

8. 謝辞

本研究を実施するにあたり、広視野 2 光子顕微鏡によるマウス脳血管測定のための技術支援をいただきました国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子神経マッピング制御チームの田桑弘之先生ならびにチームメンバーの皆様に深く感謝申し上げます。

本研究は日本学術振興会 (JSPS) 科研費 22K12789 の助成を受けたものです。