先進生命科学研究所紀要

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

2024 Vol.9



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所紀要

Vol. 9 2024

目次

藍染めに関わる *Bacillus smithii* 由来インジゴ還元酵素/NADH 複合体の X 線結晶構造解析 米田一成^{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)

.....1

ヒトミエローマ細胞株における Progesterone 受容体 PGRMC1/2 の発現

三川ヒメリ¹、河嶌玲菜²、尾上潮音¹、鈴木利貴央³、亀谷美恵^{1,4)} 椎名隆^{1,4)} (¹⁾ 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学領域、²⁾ 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、³⁾ 東海大学医学部内科学系血液腫瘍内 科学、⁴⁾ 東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門)

ヒト皮膚から放散するエチルメルカプタンの全身分布

関根嘉香^{1,2)}、長野琴未¹⁾、大坂智実³⁾、佐藤大輔³⁾、河内丈³⁾、戸髙惣史⁴⁾ (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、³⁾ 東海大学大学院理学 研究科、⁴⁾AIREX 株式会社技術研究所)

.....9

.....5

自発的想起/思考を開始させる内因性トリガーの神経実体の検討

相澤心優¹⁾、倉重宏樹^{1,2)}

(1) 東海大学情報通信学部、2) 東海大学先進生命科学研究所)

.....13

新規ホスホロアミダイド試薬を用いたイノシトール7リン酸の合成

澁谷優我¹⁾、小口真一^{1,2)}

(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)

.....19

三保松サバの品質評価

橫澤駿¹⁾、平野功海¹⁾、平塚聖一^{1,2)}

(¹⁾ 東海大学海洋学部、²⁾ 東海大学先進生命科学研究所・高機能食品研究部門)

.....24

火山灰が河川水の水質に与える影響

豊島誠也^{1,3)}、大場武²⁾、沼波望³⁾

(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)

味覚制御を指向した生体適合性ナノ薄膜の創製と物性

谷神絃太¹⁾、芝燿汰¹⁾、平口和真²⁾、小口真一^{3,4,5)}、伊藤 建^{3,5)}、樋口昌史^{1,2,4,5)}、岡 村陽介^{1,2,4,5)}

(¹⁾ 東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、²⁾ 東海大学工学部応用化学科、³⁾ 東海大学理学部化学科、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)

.....34

細胞質で想定されるセレノグルタチオンのリサイクル機構とその意義の解析

金森審子 1,2)

(¹⁾ 東海大学工学部生物工学科、²⁾ 東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門) ………38

NOG-hIL-4-Tg マウスへの腫瘍生着とプロゲステロン感受性の関連性解析

星野優希¹⁾、大島志乃¹⁾、山田壮我¹⁾、尾上潮音¹⁾、三川ヒメリ¹⁾、津田万里²⁾、安 田敦³⁾、伊藤亮治⁴⁾、亀谷美恵^{1,2,5)}、椎名隆^{1,5)}

(¹⁾ 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学領域、²⁾ 東海大学医学部専門診療学系緩和医療科学、³⁾ 東海大学医学部内科学系腎内分泌代謝内科、⁴⁾ 公益財団法人実中研、
 ⁵⁾ 東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門)

.....42



Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

Vol. 9 2024

CONTENTS

X-ray crystallographic analysis of the NADH complex structure of FMN-NADH dependent indigo reductase from *Bacillus smithii* involved in indigo dyeing

Kazunari Yoneda^{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

Expression of Pgrmc1/2, a membrane progesterone receptor on human myeloma cell lines

Himeri Mikawa¹⁾, Reina Kawashima²⁾, Shion Onoue¹⁾, Rikio Suzuki³⁾, Yoshie Kametani^{1,4)}, and Takashi Shiina^{1,4)}

(¹⁾ Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine, ²⁾ Department of Life Science Support, Research Innovation Center, University Hospitals Sector, Tokai University, ³⁾ Department of Hematology/Oncology, Tokai University School of Medicine, ⁴⁾ Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....5

Whole-body distribution of ethyl mercaptan emanating from human skin surface

Yoshika Sekine^{1,2)}, Kotomi Nagano¹⁾, Tomomi Osaka³⁾, Daisuke Sato³⁾, Joe Kochi³⁾, and Michihito Todaka⁴⁾

(¹⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, ²⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³⁾Course of Chemistry, Graduate School of Science, Tokai University, ⁴⁾R&D laboratory, AIREX Inc.)

.....9

Exploring the neural basis of endogenous triggers to initiate spontaneous recall and thoughts

Miyu Aizawa¹⁾ and Hiroki Kurashige^{1,2)}

(¹⁾ School of Information and Telecommunication Engineering, Tokai University, ²⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....13

Synthesis of inositol 7-phosphate using a novel phosphoramidite reagent

Yuga Shibuya¹⁾ and Shinichi Koguchi ^{1,2)} (¹⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ²⁾Department of Chemistry, Tokai University)

.....19

Quality evaluation of Miho-matsu mackerel

Shun Yokosawa¹), Isami Hirano¹), and Seiichi Hiratsuka^{1,2}) (¹) School of Marine Science and Technology, Tokai University, ²) Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....24

Impact of volcanic ash on river water quality

Seiya Toyoshima^{1,3)}, Takeshi Ohba²⁾, and Nozomi Numanami³⁾ (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)

......30

Fabrication and characterization of biocompatible nanosheets for taste control

Genta Yagami¹⁾, Yota Shiba¹⁾, Kazuma Hiraguchi²⁾, Shinichi Koguchi^{3,4,5)}, Takeru Ito^{3,5)}, Masashi Higuchi^{1,2,4,5)}, and Yosuke Okamura^{1,2,4,5)}

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

Analysis of the recycling mechanism of selenoglutathione assumed in the cytoplasm and its significance

Akiko Kanamori^{1,2)}

(¹⁾ Department of Bioengineering, School of Engineering, Tokai University, ²⁾ Division of Medicines and Drug Discovery, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

Analysis of the progesterone sensitivity of cancer cell lines and the engraftment ability to NOG-hIL-4-Tg mouse

Yuki Hoshino¹⁾, Shino Oshima¹⁾,Soga Yamada¹⁾,Shion Onoue¹⁾,Himeri Mikawa¹⁾, Banri Tsuda²⁾, Atsushi Yasuda³⁾, Ryoji Ito⁴⁾, Yoshie Kametani^{1,2,5)}, and Takashi Shiina^{1,5)} (¹⁾ Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine, ²⁾ Department of Palliative Medicine, Tokai University School of Medicine, ³⁾ Department of Internal Medicine, Division of Nephrology, Endocrinology, and Metabolism, Tokai University School of Medicine and Life Science, ⁵⁾ Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....42

iv



藍染めに関わる Bacillus smithii 由来インジゴ還元酵素/NADH 複合体の
X 線結晶構造解析

X-ray Crystallographic Analysis of the NADH Complex Structure of FMN-NADH Dependent Indigo Reductase from *Bacillus smithii* Involved in Indigo Dyeing

米田 一成 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}, Tomohiro Arak^{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]

インジゴ還元酵素は、藍染めの工程で作用する FMN-NADH 依存性の還元酵素である。藍染めに関わる酵素の生化学的な解明を目的に、本研究では *Bacillus smithii* 由来インジゴ還元酵素の結晶化および、NADH 酵素複合体の X 線結晶構造解析を行った。結晶化の結果、2.2 M 硫酸アンモニウムを沈殿剤とした条件で針状結晶が得られた。0.7 mM の NADH を含むクライオバッファーを使用し、1.83 Å の高分解能データを測定することができた。構造解析の結果、酵素の活性中心に結合している補酵素 FMN のイソアロキサジン環とNADH のニコチンアミド環がスタッキングするような構造であることが明らかになった。NADH の一部の構造および、NADH の結合に関与する約 20 残基のアミノ酸の電子密度が不明瞭であった。そのため、全構造決定には至らなかったが、活性中心に結合している補酵素 FMN と電子供与体として働く NADH との相互作用を初めて明らかにすることができた。

[Abstract]

The indigo-reducing enzyme is an FMN-NADH-dependent reductase involved in the indigo dyeing process. To biochemically elucidate the enzymes associated with indigo dyeing, this study focused on the crystallization of the indigo-reducing enzyme from *Bacillus smithii* and the X-ray crystal structure analysis of its NADH-bound enzyme complex. Crystallization experiments yielded needle-shaped crystals under conditions using 2.2 M ammonium sulfate as a precipitant. High-resolution data at 1.83 Å were successfully collected using a cryo-buffer containing 0.7 mM NADH. Structural analysis revealed that the isoalloxazine ring of the coenzyme FMN, bound at the enzyme's active site, stacks with the nicotinamide ring of NADH. Although the electron density for part of the NADH structure and around 20 amino acid residues involved in NADH binding was unclear, the study successfully revealed the interaction between FMN and NADH for the first time.

[Key Words]

Indigo dyeing, Indigo reductase, NADH complex structure, FMN, X-ray crystallography

1.はじめに

藍染めは日本の伝統な染色技法であり、藍の葉を堆 肥状にした「すくも」を発酵還元(藍建発酵)するこ とにより繊維を染色する方法である。「すくも」に含 まれるインジゴ(藍色の色素)は水に不溶であるため そのまま繊維を染めることはできない。そこで、藍建 て発酵の工程では常温性の好アルカリ性菌由来のイン ジゴ還元酵素によってインジゴが還元されることによ り、水溶性のロイコインジゴ(黄色)に変化する。こ の酵素反応により「すくも」のインジゴは水に溶け、 繊維を染色することが可能となる。繊維を染色液に漬 け込み、ロイコインジゴを吸着させた後に引き上げて、 空気(O)にさらし空気酸化させることでロイコイン ジゴはインジゴに酸化され、繊維中で美しい青色に発 色する。本研究では藍染めのインジゴ還元反応に関与 する好アルカリ性細菌由来のインジゴ還元酵素の機能 と構造解析を目的にNADH複合体酵素の結晶化及びX 線結晶構造解析を行った。

これまでに我々は、*B. smithii* 由来 FMN-NADH 依存 性インジゴ還元酵素の様々な酵素化学的機能を明らか にしてきた [1-3]。本酵素は FMN(フラビンモノヌク レオチド)を補酵素とする酵素であり、NADH(ニコ チンアミドアデニンジヌクレオチド)を電子供与体と して、インジゴを還元する酵素反応機構がすでに明ら かになっている(図1)。本酵素は電子供与体である基 質 NADH ともう一つの基質であるインジゴ(電子受容 体)は酵素の同一の基質結合部位に結合することがす でに分かっている。

これまでに*B. smithii* 由来インジゴ還元酵素とNADH、 NADH 類似化合物、インジゴやインジゴ類似化合物と の複合体の結晶化および、結晶構造解析を行ってきた。 しかし、酵素の基質結合部位が広いためか、基質とイ ンジゴ還元酵素との複合体構造の解明には至っていな い。本研究ではインジゴ還元酵素の基質認識機構を明 らかにするためにインジゴ還元酵素のNADH 複合体構 造の解析を行った。



図 1. B. smithii 由来 FMN-NADH 依存性インジゴ還元 酵素の反応機構 (Ping-Pong Bi-Bi 機構)

2. 結果の概要

B. smithii 由来 FMN-NADH 依存性インジゴ還元酵素の 発現、精製、結晶化、X 線回折実験

B. smithii 由来 FMN-NADH 依存性インジゴ還元酵素 の結晶構造解析には、大量の酵素が必要であるため、 以前報告した方法により、大腸菌を用いてリコンビナ ント酵素を大量に発現させた [2]。精製した酵素を SDS-PAGE に供した結果、予想される分子量約 23 kDa にメインバンドを確認することができた(図 2A、レー ン 3)。また、精製後の酵素は FMN を結合しているた め、淡い黄色であった(図 2B)。精製後の酵素の吸収 スペクトル(300 nm~600 nm)を分光光度計でを測定 した結果、380 nm および、460 nm にピークが観察され た(図 3)。これらのデータから、精製したインジゴ還 元酵素が FMN 結合酵素の特徴と一致することを確認 することができた。



図 2. (A) SDS-PAGE による *B. smithii* 由来インジゴ還元 酵素の精製結果。M;分子量マーカー、1;粗酵素、2; Talon スルー、3;Talon 溶出。矢印はインジゴ還元酵素。 (B) 精製後の *B. smithii* 由来インジゴ還元酵素



図 3. *B. smithii* 由来インジゴ還元酵素の吸収スペクトルの測定結果 (1.2 mg/ml)

精製後の酵素を、40.8 mg/ml に濃縮を行い、結晶化 スクリーニング(Crystal Screen、Crystal Screen2; Hampton Research)を 20℃で行った。その結果、2.2 M の硫酸ア ンモニウムを沈殿剤とする条件(Crystal Screen 1-32) で図 4A のような黄色い針状結晶が得られたため、筑波 の高エネルギー加速器研究機構(KEK)の BL-1A ビー ムラインにおいてインジゴ還元酵素/NADH 複合体結 晶の X 線回折実験を行った。測定用の溶媒には 2.2 M の硫酸アンモニウム(沈殿剤)、30% v/v エチレングリ コール(抗凍結剤; クライオ)、0.7 mM NADH(基質) を含むクライオバッファーを使用した。X 線回折デー タの処理には XDS を用いた(表 1)。その結果、1.83 Å 分解能の高分解能データを測定することができた(図 4B)。

すでに構造を明らかにしている B. smithii 由来 FMN-NADH 依存性インジゴ還元酵素の結晶構造 (PDB code; 6JXN) をサーチモデルとして分子置換を行ったと ころ、補酵素 FMN の周辺に水分子以外の大きな電子密 度が観測された。得られた電子密度にNADH をアサイ ンした結果、NADH のニコチンアミド環が FMN のイ ソアロキサジン環に平行にスタッキングする形でアサ インすることができた(図5)。また、ニコチンアミド リボースおよび、2つのリン酸基に相当する電子密度も ある程度明瞭であったため、NADH 分子をアサインす ることができた。しかし、NADH のアデニンリボース および、アデニンについては、電子密度が不明瞭であ ったため、正確にアサインできなかった。NADH のニ コチンアミド環のC4位(電子供与部位)とFMNのイ ソアロキサジン環のN5位(電子受容部位)との距離は 3.62 Å であった。また、NADH の結合に関与すると考 えられる活性部位周辺の約 20 アミノ酸残基 (Asp52~Ala74) はフレキシビリティーが高いためか、 電子密度が観察できず、アサインすることができてい ない。そのため R 値 (R= 0.27325) および、FreeR 値 (FreeR=0.32957) が収束せず、完全な構造決定には至

3.展望

っていないのが現状である。

藍染めに関与する B. smithii 由来インジゴ還元酵素と NADH(基質;電子供与体)との複合体の初期構造を 初めて決定することができた。しかし、NADHの一部 の構造や NADH 結合部位周辺の約 20 アミノ酸残基 (Asp52~Ala74)の電子密度が観測できていないため、 構造解析できない状態である。今後さらに高分解能で 高品質なデータが測定できる品質の良い結晶を作製し ていく予定である。



図 4. (A) B. smithii 由来インジゴ還元酵素/NADH 複合体 の針状結晶。空間群 P6,22。(B) B. smithii 由来インジゴ 還元酵素/NADH 複合体結晶の X 線回折像

表 1. インジゴ還元酵素/NADH 複合体結晶のデータ 測定条件

ビームライン	KEK BL-1A
波長	1.0180 Å
1枚当たりの回転範囲	0.25°
トータルフレーム	720
結晶から検出器までの距離	120.8 mm
測定温度	100 K
1 枚当たりの X 線照射時間	0.1 sec
クライオ条件	30% v/v エチレングリコール
空間群	P6122
格子定数	<i>a</i> = 86.3690 Å, <i>b</i> =86.3690 Å
	<i>c</i> = 146.0350 Å,
	$\alpha = \beta = 90.000^\circ, \gamma = 120.000^\circ$
分解能範囲	48.68 - 1.83 Å
(外側のシェル)	(1.87 - 1.83 Å)



図 5. B. smithii 由来インジゴ還元酵素の基質結合部位 周辺の電子密度と NADH の結合構造

4.引用文献

Yoneda K, *et al.*, FEBS Open Bio. **11**, 1981-1986 (2021).
 Yoneda K, *et al.*, Int J Biol Macromol. **164**, 3259-3267 (2020).

[3] 米田一成, 櫻庭春彦, 大島敏久, 化学と生物. 61, 9-11 (2023).

5.謝辞

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。本研究は公益財団法 人 日本応用酵素協会(Japan Foundation for Applied Enzymology)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、X 線回折実験を 行うにあたり、高エネルギー加速器研究機構のビーム ラインスタッフの皆様に感謝します。本研究課題に関 する放射光実験は、放射光共同利用実験採択課題番号 2024G502 で実施されたものです。



ヒトミエローマ細胞株における Progesterone 受容体 PGRMC1/2 の発現

Expression of Pgrmc1/2, a membrane progesterone receptor on human myeloma cell lines

¹三川 ヒメリ・²河嶌 玲菜・¹尾上 潮音、³鈴木 利貴央^{1,4}亀谷 美恵・^{1,4}椎名 隆 ¹東海大学医学部基礎医学系分子生命科学領域 ²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 ³東海大学医学部内科学系血液腫瘍内科学 ⁴東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門 ¹Himeri Mikawa, ²Reina Kawashima, ¹Shion Onoue, ³Rikio Suzuki, ^{1,4}Yoshie Kametani, ^{1,4}Takashi Shiina ¹Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine, ²Department of Life Science Support, Research Innovation Center, University Hospitals Sector, Tokai University

³Department of Hematology/Oncology, Tokai University School of Medicine, ⁴Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University,

[要旨]

プロゲステロン(P4)は高濃度で様々な腫瘍株の増殖抑制と免疫リモデリングを行う。また、P4をリポソームに封入した Lipo-P4 は、P4 の約 10 倍の効果を示す。本研究ではミエローマ(MC)細胞株における P4 受容体の発現と P4・Lipo-P4 による抗腫瘍効果の関連性を検討した。その結果、MC 細胞株には膜受容体 PGRMC1 及び PGRMC2 が発現しており、核受容体は発現していなかった。また、両膜受容体の発現量と腫瘍株の P4 耐性との間で強い 正の相関が示された。以上の結果、MC における P4 及び Lipo-P4 の作用は PGRMC1 あるいは PGRMC2 を介 する可能性が示された。

[Abstract]

Progesterone (P4) suppresses the proliferation of various cancer cell lines and remodels immune function in a high concentration. When P4 is encapsulated in the liposome (Lipo-P4), it functions in a ten-times higher efficiency. In this study, we analyzed the expression of various P4 receptors and evaluated the relationship of the mRNA expression level and anti-cancer effect using three myeloma cell (MC) lines. All the MC lines expressed membrane receptor PGRMC1 and PGRMC2 but not nuclear receptors. Relative mRNA amount of PGRMC1/PGRMC2 and the viability was highly correlated. These results suggest that the function of P4 and Lipo-P4 is mediated by PGRMC1 and PGRMC2.

[Key Words]

プロゲステロン、ミエローマ、PGRMC1/2、リアルタイム PCR、抗腫瘍効果

難治性の血液がんであるミエローマでは、プロテア ソーム阻害薬や免疫調節薬、デキサメタゾンなどのス テロイドといった抗がん剤が適用されるが、ほとんど の患者に副作用が観察される。一方、我々を含め、複 数の研究グループは、多様な腫瘍細胞株に対し、デキ サメタゾンとは異なるステロイドであるプロゲステロ ン(P4)が、高濃度で抗腫瘍効果を示すことを報告して いる [1,2]。我々はさらに、P4 をリポソームに封入す ると、さらに抗腫瘍効果が10倍程度に亢進することも 明らかにした [3]。この結果より、これらの腫瘍細胞株 は、膜に封入された P4の P4 受容体への結合を介して 細胞死のシグナルを受容している可能性がある。P4は デキサメタゾンと比較して、血液がん以外のがんでも 抗がん作用がある一方で免疫抑制は軽微であり、多臓 器への副作用が弱いことが推察されるため [4]、高濃度 P4 ががんのみにアポトーシスを誘導するのであれば、 抗がん剤候補の一つとなることも可能であると考えら れる。

一方、P4 は妊娠時胎盤から大量に産生される妊娠関 連ステロイドホルモンである。P4 の作用は多岐に渡り、 その作用を誘導するシグナル伝達には、大別して 3 種 類の P4 受容体が関与する。1 種類は古典的核受容体 (nPRs)であり、残りの 2 種類は非古典的膜受容体 (PGRMCs および mPRs/PAQRs) である。nPRs と mPRs は生殖細胞系列に発現が確認される一方で、 PGRMCs は、非生殖細胞系列にも多く発現し、その機 能が異なることが示唆されている [5]。

mPRs が nPRs と共役して様々な作用を誘導するの に対し、PGRMC1 は、進化的にも非常に古い分子で あり、より独立した機能を持ち、生体内での役割が多 岐にわたっていることが知られている [6]。特に、 PGRMC1 はがんと関連した AKT 経路、ミトコンドリ アに関連したエネルギー代謝、Ca²⁺ influx など、細胞 の生存や増殖に関わる主要なシグナル伝達と密接に関 わる[7]。そのため、ミエローマ細胞の生存についても、 PGRMCs が関与することが推察された。

そこで、我々は nPR を対照として、PGRMC1/2 の ミエローマ細胞株における発現と、P4 に対する耐性が 関連するかについて明らかにすることを試みた。

2.方法

1) 培地作成

RPMI1640 Medium (Nissui Co. Ltd. Tokyo Japan) に Fetal bovine serum (FBS) (Sigma Aldrich, Missouri, USA)を最終濃度 10%となるように添加した。また、ペニシリンGカリウム (Meiji Seika, Tokyo, Japan) を最終濃度 100 unit/ml となるように添加し、さらに、硫酸ストレプトマイシン (Meiji Seika) を最終濃度 0.1 mg/ml となるように 添加してこの培地を用いた。

2) 腫瘍細胞の培養

ミエローマ株は RPMI8226, U266(東海大学医学部 血液内科より分与)および Karpas707H(Dr. Karpus より分与)の3種類を用いた。RPMI8226, U266、お よび Karpas707H は 10%非働化子ウシ血清及び抗生 剤を含む RPMI1640 培地を用いて 1.0×10⁴ cells/well で 48 well plate に捲き込み、37℃5% CO₂存在下で培 養したのち、指定された日に細胞数を計測した。 Lipo-P4 はリポソームに P4 を封入したもの、 Lipo-Emp は P4 を封入しないリポソームを示す。P4, Lipo-P4, Lipo-Emp は以前の 報告に準じて調製した [4]。

3) リアルタイム PCR

ミエローマ株は上記と同様に培養し、回収したのち、 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添加して 溶解し、-80℃にて保存し、常法にて RNA を抽出、 NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) にて濃度を測定したのち品質 をアガロースゲル電気泳動し、ゲル撮影装置により 撮影した。抽出した RNA のうち 1mg について High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, CA, USA) を用いて cDNA を合 成した。これらの cDNA を用いて、P4 受容体の mRNA をリアルタイム PCR で定量した。サンプルは cDNA 合成した DNA を 10、20、40、80 倍希釈して使用し た。プライマーはnPR, PGRMC1, PGRMC2, GAPDH それぞれについて TaqMan プローブ (Thermo Fisher Scientific Co. Ltd., MA, USA) を用いた。 96well プレートを使用し液量 10µL で、 QuantStudioTM3 で測定した。run mode は Fast、 95℃20 秒→95℃ 1 秒、60℃20 秒/40 サイクルで行 った。reporter は Fluorescein amidite (FAM)で測

定した。 **3. 結果**

1) P4の抗腫瘍効果

P4 および Lipo-P4 の添加実験の結果、Lipo-P4 はす べての細胞株について、P4 より高い増殖抑制効果を示 した。また、Lipo-Emp については、すべての細胞株 で 0μM 添加とほとんど変わらない細胞数を示し、 Lipo-P4 の増殖抑制効果の増強は、P4 自身の効果であ ることが示された。一方、RPMI8226 および U266 に 関しては、200μM P4 あるいは 20μM Lipo-P4 添加後 3 日でほとんどの細胞は死滅したが、Karpas707H は、 P4 濃度が 200μM あるいは Lipo-P4 20μM でも生存率 が高く、P4 耐性が高いことが示された(図 1)。

以上の結果、P4はリポソームに封入することで一定 の抗腫瘍効果を示すが、ミエローマ細胞株には、P4耐 性の高いものと低いものが存在することが明らかとな



った。

図1 P4のミエローマ細胞株に対する抗腫瘍効果

上段: U266 (day 5),中段: RPMI8226 (day 3),下段: Karpas707H (day 7)のそれぞれの細胞株の細胞数の 結果を示す。P4 0~200µM 添加、Lipo-P4 0~20µM 添 加、および Lipo-P4 に相当する空リポソーム添加のそ れぞれの群における細胞数を示す。解析日は異なるが、 すべての細胞株が104以上となる日数を検討した。

2) nPR および PGRMC1/2 の発現

次に、これらの細胞が発現する P4 受容体を、リアル タイム PCR 法を用いて解析した。まず、抽出された RNA の品質を確認した。図2 に示す通り、RNA はほ とんどタンパク質及びフェノールの混入がなく、2 つ のリボソーマル RNA のバンドもクリアに検出された ことから、リアルタイム PCR のサンプルとして問題な いことが明らかとなった。PGRMC1 は Karpas707H で最も高く、RPMI8226, U266の順番で小さくなった。 PGRMC2 に関しては、RPMI8226, U266の順番は逆 転した。一方、nPR の発現は観察されなかった(図2)。 これらの結果、ミエローマ細胞株では、PGRMC1 お よび PGRMC2 が発現する一方で、nPR は発現しない こと、PGRMC1 および PGRMC2 の発現は





Karpas707H で最も高いことが明らかとなった。

図2 腫瘍株 RNA を用いた P4 受容体の発現量解析 上段左:精製 RNA の吸光度,上段右:精製した RNA の電気泳動パターン、下段:リアルタイム PCR による P4 受容体の相対的 RNA 発現量の比較。GAPDH を元 に換算した相対量で比較を行なっている。nPR は dark green で示されているが、発現していないため、棒グ ラフで示されていない。

3) P4 耐性と PGRMCs の発現の関連性

次に、ミエローマ細胞株に対する P4 および Lipo-P4 の抗腫瘍効果と PGRMC1 および PGRMC2 の発現に

関連性があるかについて確認するため、PGRMC1、 PGRMC2の発現量の相関関係の散布図を作成し、相 関係数を算出した。

その結果、3 点ではあるものの、PGRMC1 と PGRMC2 の発現については y=1.5474x-0.0011、 R²=0.7801 となり、非常に高い相関が確認された。

また、生存率との相関を解析したところ、PGRMC1、 PGRMC2 ともに発現量が生存率と強い相関を持ち、 特に PGRMC2 とは強い相関が示された(図 3)。



図3 P4 受容体の発現と生存率の関係

上段: PGRMC1 と PGRMC2 の発現の散布図。中段: PGRMC1 と生存率の散布図。下段: PGRMC2 と生存 率の散布図。それぞれ R²および近似式を示した。上段 の図の縦軸はGAPGH を対照とした PGRMC1 の相対 的な RNA 量を示し、横軸は PGRMC2 の相対的な RNA 量を示す。中段、下段の図の縦軸は GAPGH を 対照 とした相対的な PGRMC1(中段)あるいは PGRMC2(下段)の RNA 量を示し、横軸は図 1 におけ る Lipo-P4 20µM 添加培養後の最終計測日の細胞数/ Lipo-Emp 20µM 添加培養後の最終計測日の細胞数/ より算出した P4 耐性を示す。

3. 考察

今回、P4 あるいは Lipo-P4 による、ミエローマ細胞 株に対する抗腫瘍効果には、細胞株による違いがある ことが明らかとなった。また、この抗腫瘍効果のレベ ルと P4 膜受容体である PGRMC1 及び同一ファミリ ーの PGRMC2 の発現には、高い負の相関があること が示された。PGRMC1/2 は腫瘍の生存、増殖に寄与す ることが報告されており[7]、P4 による抗腫瘍効果は、 これらの分子の発現の亢進によって阻害される可能性 が高いと考えられる。PGRMC1/2 の発現は、肺がんな どでは高く、前立腺がんでは低いことが報告されてい る。そのため、P4 による治療はこれらの分子の発現量 に依存する可能性がある。また、さらに効率の良いデ リバリーシステムを考案することで、P4 の抗がん剤と しての可能性が広がることが期待される。

4. 引用文献

[1] H. Kashiwagi, et al., *Front Immunol*, **13**, 1000728 (2022).

[2] J. J. Kim, et al., Endocr Rev, 34, 130 (2013).

[3] T. Seki, et al., *Biochem Biophys rep*, **38**, 101710 (2024).

[4] Y. Kametani, et al., *Front Immunol*, **14**, 1173728 (2024).

[5] J. Aikareth, et al., *Membranes (Basel)*, **13**, 260 (2023).

[6] M.A. Cahill, Biosci Trends, 11, 179 (2023).

[7] J.K. Pru, Endocrinology 163, bqac078 (2023).

5.謝辞

本研究を行うにあたり、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飯田 様に感謝いたします。



ヒト皮膚から放散するエチルメルカプタンの全身分布

Whole-body distribution of ethyl mercaptan emanating from human skin surface

関根 嘉香^{1,2)},長野 琴末¹⁾、大坂 智実³⁾,佐藤 大輔³⁾,河内 丈³⁾,戸髙 惣史⁴⁾ 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,³⁾東海大学大学院理学研究科, ⁴⁾AIREX 株式会社技術研究所

Yoshika Sekine^{1,2}, Kotomi Nagano¹, Tomomi Osaka³, Daisuke Sato³, Joe Kochi³ and Michihito Todaka⁴,
 ¹ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, ² Institute of Advanced Biosciences, Tokai University,
 ³ Course of Chemistry, Graduate School of Science, Tokai University, ⁴ R&D laboratory, AIREX Inc.

[要旨]

ヒト皮膚表面から放散する微量生体ガスは皮膚ガスと呼ばれ、現在までに800種類以上の無機・有機化合物が同定されている。エチルメルカプタン(エタンチオール)は特有の臭気を有する揮発性硫黄化合物の一つであり、膵臓癌患者の体臭に強く影響する成分である。エチルメルカプタンは内因性の皮膚ガス成分であり、全身から放散すると考えられるが、その詳細については解明されていなかった。そこで本研究では、健常被験者10名を対象に、パッシブ・フラックス・サンプラー法により全身14部位においてエチルメルカプタンを同時捕集し、放散フラックスの全身分布を求めた。その結果、エチルメルカプタンの放散フラックスは、臀部および頭部で比較的低く、その他の部位では顕著な差は見られなかった。また男性被験者の方が女性被験者に比べて放散フラックスが高い傾向が見られた。

[Abstract]

Trace gases emanating from skin surface are referred to as skin gases, and more than 800 types of inorganic and organic compounds have been identified to date. Ethyl mercaptan (ethanethiol) is one of the volatile sulfur compounds with a characteristic unpleasant odor and is a component that strongly contributes to the body odor of pancreatic cancer patients. Although ethyl mercaptan is an endogenous skin gas component that is potentially released from the entire body surface, its details had not been elucidated. This study aimed to grasp the whole-body distribution of the dermal emission flux by measuring ethyl mercaptan at 14 body sites simultaneously in 10 healthy subjects using the passive flux sampler method. The results showed that the dermal emission flux of ethyl mercaptan was relatively low in the buttock and head, and no significant difference was observed in other parts of the body. In addition, male subjects tended to have higher emission flux than female subjects.

[Key Words]

Human skin gas, Ethyl mercaptan, Dermal emission, Odor, Cancer patient

1.はじめに

皮膚ガスは、体表面から放散される揮発性物質であ り、エネルギー基質(炭水化物、タンパク質、脂質) の代謝生成物、外来因子(吸入・経口摂取された外因 性化学物質)、皮膚表面における生物的・化学的な反 応生成物などから構成され、現在までに 800 種類以上 の有機・無機化合物が同定されている[1-3]。皮膚ガス を放散経路で分類すると、①血液由来、②皮膚腺由来、 ③表面反応由来に大別できる[1,2]。この皮膚ガスは、 疾病の予兆、疾病の状態、疾病の治癒程度を反映する バイオマーカーとしての利用可能性があり、筆者らは 皮膚ガスを検体として用いた非侵襲・非観血的ながん の診断法の開発を意図し、がん患者の皮膚ガス検体の 採取とガスクロマトグラフ/質量分析法による分析を行 い、皮膚ガス組成には健常者とがん患者では違いがあ ること [4]、また多変量解析により両群を判別できる可

能性 [5]を見出してきた。

エチルメルカプタン (CAS No. 75-08-1) はエタンチ オールとも呼ばれ、揮発性硫黄化合物 (Volatile Sulfur Compounds, VSCs)の一つである。嗅覚閾値が低く、 腐ったタマネギ臭を有するため、ガス漏れを検知する ための付臭剤に用いられることがある。生体内では主 として含硫黄アミノ酸の代謝過程で生じると考えられ ている[6]。先に膵臓癌患者を対象に臭気閾値が知られ ている皮膚ガス 52 成分の放散量を調べた結果、エチル メルカプタンが膵臓癌患者の体臭に最も寄与すること、 Odor quotient(拡散濃度と嗅覚閾値の比)は、健常者 の約3倍になることを見出した[7]。エチルメルカプタ ンは内因性の皮膚ガス成分であり、その放散量は全身 の血管や汗腺等の分布に関連し、体の部位によって異 なると考えられる。しかしながらその詳細はこれまで 未解明であった。そこで本研究では、健常被験者10名 を対象に、パッシブ・フラックス・サンプラー法によ り全身14部位においてエチルメルカプタンを同時捕集 し、放散フラックスの全身分布を求めたので報告する。

2. 方法

1) 被験者試験

研究の目的・個人情報の取扱い等について説明して 同意が得られた健常被験者 10 名(男性 5 名、女性 5 名、年齢:21~22歳)を被験者とした。日常生活にお けるエチルメルカプタンの放散量を調べることを目的 としたので、試験当日の食事や行動は普段通りとし、 ただし化粧品および制汗剤の使用は控えてもらった。

皮膚ガスの捕集には、揮発性有機化合物測定用パッ シブ・フラックス・サンプラー(passive flux sampler, PFS)法を用いた[2,8]。PFS は皮膚ガスを受動的に捕集 する小型デバイスであり、被験者の体表面 14 部位に、 PFS (ジーエルサイエンス社製 MonoTrap® SG DCC18)を同時に設置し、サージカルテープで固定し た (Fig.1)。捕集部位は、蔵澄らの体表区分[9]を参考 に、全身を14 部位(頭部、頸部、胸部、腋窩部、腹部、 背部、腰部、上腕部、前腕部、手掌部、臀部、大腿部、 下腿部および足部)に区分した (Fig.2)。足部は通気 性を保つためにサンダル履きとした。捕集時間は1時 間とし、捕集中は安静とした。

捕集後、既報 [4,8] と同様に捕集材からエチルメル カプタンを二硫化炭素 0.50 mL に超音波抽出し、ガス クロマトグラフ/四重極質量分析計(GC: 7890B, Agilent Technologies 社製, MS:Q1050GC 日本電子 社製)に導入し、SIM モードで分析を実施した。部位 i における捕集量 Wi(ng)、PFS の捕集面積 $S(cm^2)$ およ び捕集時間 t (h)から、①式を用いて捕集部位 i におけ る放散フラックス $E_i(ng cm^2 h^1)$ を算出した。

$$E_i = W_i / (S_i) \qquad \cdots)$$

2) 統計解析

エチルメルカプタン放散フラックスの部位間比較の 統計解析にはJMP®14.2.0のWilcoxon多重比較検定を 用い、有意水準は5%とした。



Fig.1 Schematic view of the passive flux sampler for the collection of ethyl mercaptan emanating from skin surface.



●: PFS設置箇所(全14ヶ所)

Fig.2 Illustration of 14 body regions referred to the classification by Kurazumi et al. [9] and sampling positions by the PFS in this study.



Fig. 3 Comparison of dermal emission flux of ethyl mercaptan emanating from 14 sampling positions of ten healthy subjects. (n = 10 for all, n = 5 for female and n = 5 for male subjects).

3. 結果および考察

健常被験者 10 名の全身 14 部位において皮膚から放 散するエチルメルカプタンをPFS法により測定した結 果、140 検体中 129 検体からエチルメルカプタンが検 出され、全検体の放散フラックス平均値は 4.6 ng cm² $h^{1}(n=140)$ であった。エチルメルカプタンの検出率は 足部(100%) >腋窩部=腹部=前腕部(90%) >頸 部=胸部=上腕部=大腿部=下腿部(80%) >背部= 腰部=手掌部(70%) >臀部(60%) >頭部(50%) となり、部位により異なった。

Fig.3a)に全被験者における各部位のエチルメルカプ タン放散フラックスの測定結果を示す。部位毎の平均 値(図中×)は、下腿部の 8.2 ng cm⁻² h⁻¹が最も高く なり、次いで前腕部および腋窩部の 6.3 ng cm⁻² h⁻¹ と なり、最も低いのが頭部の 1.8 ng cm⁻² h⁻¹であった。 現在筆者らの研究プロジェクトでは、癌患者および健 常者の前腕部から皮膚ガスを捕集し、皮膚ガスによる 癌の評価法の検討を行っているが、エチルメルカプタ ンンの検出率の高さ、比較的高い放散フラックスを考 慮すると、前腕部は捕集部位として妥当であることが わかる。一方、部位間の有意差検定を行ったところ、 足部一頭部、腋窩部一頭部、下腿部一頭部、臀部一前 腕部、臀部一腋窩部、臀部一下腿部、臀部一足部の間 で有意差が認められた (*p*<0.05)。すなわち、頭部お よび臀部の放散フラックスは、他の部位に比べて相対 的に低いものの、その他の部位の放散フラックスには 顕著な差がないと言える。

Fig.3 b) は女性被験者のみ、Fig.3 c)は男性被験者の みに層別して図示したものである。個人間のばらつき に対して検体数が少ないため、性差については有意差

を認めることはできなかったが、臀部と大腿部を除き、 男性被験者の方が高い傾向が見られた。エチルメルカ プタンは、食事等によって摂取された含硫黄アミノ酸 の代謝生成物と考えられ、このような内因性の化学物 質は主として血液由来で放散される。血液由来とは、 血中の成分が直接揮発して皮膚表面から放散されるル ートであり、血流が多いほど血液由来の皮膚ガス成分 の放散量が増加すると考えられる。一般に有酸素運動 によって発達した筋肉(遅筋)はその収縮に伴い血流 が増加し[10, 11]、また男性の方が女性に比べて筋肉量 は多いことから、エチルメルカプタンの放散量には、 筋肉量の差が反映されている可能性が示唆された。

皮膚ガス放散量の全身分布については、アンモニア [12]および酢酸[13]の報告例がある。アンモニアは主と して血液由来の皮膚ガス成分であるが、身体的・精神 的負荷によって放散量が変化すること、また足底部へ の体重負荷が影響することから、足部において顕著に 高い放散フラックスを示す。一方、酢酸は汗腺由来の 皮膚ガスであり、放散フラックスの全身分布は発汗量 の全身分布と一致する。エチルメルカプタンの全身分 布は、頭部や臀部を除き部位間差は顕著ではなく、こ れらのことから皮膚ガスの全身分布は物質によって異 なることが示唆された。一方、各部位の放散フラック ス(ng cm⁻² h⁻¹)に表面積(cm²)を乗じて総和を求めるこ とにより、一人当たりの全身放散量(ng h1)を推定する ことができる[12,13]。この全身放散量は、皮膚ガスが 体臭や室内臭気、屋外空気質にどの程度寄与するかを 推定するのに有用な基礎資料となる。

4. 結言

皮膚ガスは体表面から放散する極微量成分であり、 その実態は未解明な部分が多い。PFS はユビキタスな 皮膚ガス捕集器具であり、本法の特徴を利用してエチ ルメルカプタン以外の皮膚ガス放散量の全身分布につ いても明らかにしていきたい。またこのような基礎的 知見は、皮膚ガスを生体情報として活用する際の基盤 となることから、極めて重要な研究課題である。

5.引用文献

- [1] Mitra A. et al., Metabolites, 12(9) 824 (2022)
- [2] Sekine Y., Oikawa D., Skin-derived biofluid sampling for analytical approaches. In: Comprehensive Sampling and Sample Preparation (Soylak M. Ed.), 2nd edition, Elsevier, pp.1-21 (2025)
- [3] Mochalski P., et al., J. Chromatogr. B, 959, 62-70(2014)
- [4] 戸髙惣史ほか, 臨床環境医学, 30(1), 7-16(2022)
- [5] 特許第 7464918 号,皮膚ガス解析方法,発明者:平 林健一,関根嘉香,川口義明(2024)
- [6] Canellakis E. S., Tarvar H., Arch. Biochem. Biophys., 42(2), 446-455 (1953)
- [7] 関根嘉香ほか,東海大学先進生命科学研究所紀要,7,44-48 (2024)
- [8] Sekine Y., et al., *Sci. Rep.*, 13,9471(2023)
- [9] 藏澄美仁ほか,日本生気象学会雑誌,31(1),5-29 (1994)
- [10]河野かおりほか, 獨協医科大学看護学部紀要,13, 41-47(2019)
- [11] Jorfeldt L., Wahren J., Clin. Sci., 41, 459-473(1971)
- [12] Furukawa S., et al., J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 1053, 60-64 (2017)
- [13] 関根嘉香ほか、フレグランスジャーナル、46(9)、 19-25(2018)

6.謝辞

本研究は、東海大学先進生命科学研究所助成金、 JSPS 科研費 JP21K06518 により実施されたものです。 ここに記して感謝いたします。また本研究に貴重な ご助言を頂いた東海大学医学部消化器内科学・加川 建弘先生、川西彩先生、森町将司先生、富山大学学 術研究部医学系病理診断学講座・平林健一先生に記 して感謝申し上げます。

7. 倫理的配慮

本研究は、東海大学湘南校舎「人を対象とする研 究」倫理委員会の承認を得て実施した。



自発的想起/思考を開始させる内因性トリガーの神経実体の検討

Exploring the neural basis of endogenous triggers to initiate spontaneous recall and thoughts

相澤心優1), 倉重宏樹1,2)

¹東海大学情報通信学部,²東海大学先進生命科学研究所 Miyu Aizawa¹⁾, Hiroki Kurashige^{1,2)} ¹School of Information and Telecommunication Engineering, Tokai University ²Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

想起は何らかの外的事象に促されて起こることもあるが、これといったきっかけがなくとも起こる.このような自発的想起は日常によくある現象であり、何らかの内因性の脳活動にトリガーされて生じると考えられる.本研究では、想起を検出できるように訓練したデューダを安静時機能的 MRI データに適用し、その機序を探った.その結果、想起の約4秒前にまず外側後頭皮質で活動が生じ、そこからデフォルトモードネットワークに伝播するかたちで想起が進行するメカニズムが示唆された.

[Abstract]

Recollection can occur without any external trigger. Such spontaneous recall is considered to emerge triggered by endogenous activity in the brain. In this study, we aimed to identify its neural mechanism. First, we applied a decoder trained to detect ongoing spontaneous recall to resting-state functional magnetic resonance imaging (fMRI) data and obtained its output time series. We considered this as a marker for the occurrence of spontaneous recall. We then shifted this time series backwards and identified the neural signals associated with them. The result suggested a mechanism for spontaneous recall in which activity first occurs in the lateral occipital cortex about four seconds before recall, and then this propagates to the angular gyrus, which is part of the default mode network, and finally reaches the center of the default mode network, resulting in spontaneous recall.

[Key Words]

human brain, fMRI, spontaneous recall, spontaneous thoughts, brain decoding

1.はじめに

記憶の想起や思考はどうやって始まるのだろうか? これらは何らかの外的事象に促されて起こることもあ るが,これといったきっかけがなくとも起こる.この ような自発的想起/思考は日常によくある現象である. 実験室においては,認知的負荷が少ないタスクに従事 している人々は,一般的にいつの間にか自発的想起/思 考を始める[1].より日常的な文脈においても,スマー トフォンアプリを利用した経験サンプリング調査から, 人は日常の46.9%もの時間において、「いま・ここ」以 外のものに心を向けていることが示されている[2]. こ のような自発的想起/思考は何らかの内因性の脳活動に トリガーされて生じると考えられる.しかしその背後 にある機構は未知である.

記憶の神経科学実験は一般に何らかの記憶想起を課 題に含むが、多くの場合、それは実験者が与えるキュ ーで誘導される.思考の神経基盤を調べる実験におい ても同様である.しかしながら内因性トリガーによる

想起や思考の研究も進んできている. とりわけ,機能 的 MRI (fMRI) 計測に思考サンプリング法や思考発 話法を組み合わせたアプローチ,あるいは機械学習の 方法を応用し,fMRI 信号から意識内容をデコードする アプローチによって,その神経基盤が徐々に明らかに なりつつある[3-5]. しかし,そこで調べられているの は「いま進行中の想起」の神経実体であることには注 意が必要である. つまり,その想起がいかなる神経活 動に由来して始まったかという「想起を開始させる内 因性トリガー」の神経実体を調べたものではない.

これに対し、Suらは、思考発話法で得られた発話デ ータからトピックや思考のカテゴリーの変化を同定し、 その際に生じている神経活動を調べるアプローチを取 った [6]. その結果、トピックや思考カテゴリーの境界 でデフォルトモードネットワークが強く活動している ことが示された. したがって、自発的想起や思考はデ フォルトモードネットワークの活動に駆動されて開始 するのかもしれない.

しかしこのアプローチには問題もある.まず思考発 話法はそれ自体が思考を変容させてしまう.また発話 の境界は新たなテーマの発話の開始であると同時にこ れまでのテーマの発話の終了でもあるので,神経活動 にそのどちらが反映されているかを区別できない.さ らに発話の境界を思考の境界とみなしてよいかどうか も不明である.発話の変化は思考の変化に遅れて生じ るはずであり,発話の境界の前には「思考は切り替わ っているが発話は切り替わっていない期間」がある. 思考発話法ではこの曖昧さがあるがゆえに思考や想起 の切り替わりを明確に同定することができず,さらに 発話の境界はこのデュアルタスクの状態から解放され た瞬間でもあるので,見出された脳活動はその反映で ある可能性もある.

そこで本研究では、想起を検出できるように訓練し たfMRI デコーダを用いるアプローチによって、想起 のきっかけとなる内因性神経活動トリガーを同定する ことを試みた.具体的には、自発的思考および想起の 主要成分である"自己関連的思考/想起"の出現を検出 できるように訓練したデコーダを安静時 fMRI に適用 し、まずこの信号を得た.そしてそれを過去方向に数 秒間時間シフトさせたものを説明変数にした一般線形 モデル解析を行った.つまり自己関連的自発思考/想起 がおこるよりも数秒前に、脳活動に何が生じていたか を調べた.その結果、まずシフトなしの信号および1.44 秒シフトさせた信号に対しては、先行研究と同様にデ フォルトモードネットワークの活動増加が示された. さらに 4.32 秒シフトさせた信号に対しては、中次の視 覚処理を担う外側後頭皮質の活動増加が示された.

最後に本論文のまとめとして、本研究の結果と先行 研究の知見を合わせ、自発的想起の神経基盤の全体像 についての仮説を提案する.

2. 方法

1) データ

本研究では Human Connectome Project (HCP) デ ータベース[7]に登録されている安静時 fMRI のデータ セットを対象に解析を行った. HCP はライセンス等の 定めなく自由に使用できるオープンデータベースであ る. 安静時 fMRI データは HCP 1200 Subjects Data Release より 9 人分を無作為に選んだ. また, fMRI デ ータの前処理に用いるために, そのそれぞれの参加者 に対応する構造MRI (T1強調MRI) データも同データ ベースより取得した. また, 自己関連的思考/想起を検 出するためのデコーダとして, 文献[5]の補遺として Kim ら が 公 開 し て い る も の (https://zenodo.org/records/10039369)を用いた.

2) 前処理

HCP データベースより得た機能的および構造的 MRI データに対し, Kim らのデコーダ[5]を適用可能 にするように SPM12 (Welcome Trust Centre for Human Neuroimaging, England, UK) を用いた前処 理を行った. 処理のステップはスライスタイミング補 正,頭部モーション補正,構造的 MRI の機能的 MRI へのレジストレーション, セグメンテーション, 標準 化, 平滑化である. とくに, Kim らの処理に合わせる べく,標準化は SPM 標準の 2mm 等方ボクセル Montreal Neurological Institute (MNI) 標準脳に対 して行った. また平滑化の full width at half-maximum (FWHM) は 5mm とした. その後, 以上の処理を行った後の fMRI 信号に対し、長時間的 なトレンドを除去するために、5次のバターワースフ ィルタを用いて 0.009Hz のハイパスフィルタをかけた. これは Python モジュールである SciPy の関数を用い て実装した. こうして得られた前処理済みデータを以 下で説明するデコーディング解析の対象とした.

3) ブレインデコーディングと一般線形モデル解析

Kim らは主成分回帰によって fMRI 信号から自己関 連性および情動価を予測するブレインデューダモデル を公開している[5]. 今回はこのうち自己関連性の予測 モデルを用いて解析を行った.これを上述の前処理を 行った安静時 fMRI 信号に適用し,スキャン時点ごと



図1予測信号変数(左上),1.44秒時間シフト変数(下),4.32秒時間シフト変数(右上)に対して有意に関係する ボクセルクラスター.予測信号変数の図中の番号は表1右端に示したボクセルクラスターの番号に対応する.それ 以外の図は各々一つのボクセルクラスターに対応しているため,番号付けは割愛した.詳細は本文を参照のこと.

の自己関連性思考/想起の予測信号を得た.

この信号そのものと,これを過去方向に1.44秒,2.88 秒,4.32秒,5.76秒,7.20秒シフトさせたもの,さら に頭部モーション補正から得られた並進と回転を合わ せた6次元のモーション成分を説明変数に入れ,fMRI 信号を被説明変数とした1^{st-level} (i.e.,個人レベル) の一般線形モデル解析を行った.なお HCP の fMRI スキャンの繰り返し時間 (TR) は0.72 秒であるため, 上記は1 スキャンおきのシフトということである.

以上の処理によって得られた参加者ごとの t 値マッ プを全員分合わせ、2^{nd-}level(i.e.,集団レベル)の SnPM 解析[8,9]を行い、family-wise error rate (FWE) を制御する多重比較補正のもと、予測信号およびその 時間シフト変数に対して 0.05%水準で有意に連関して いるボクセルクラスターを同定した.

3. 結果

予測信号に有意に関係していたボクセルクラスター として, 左小脳, 左楔前部, 左島皮質, 左および右頭 頂間溝, 左前部帯状回吻側部, 右舌状回, 左弁蓋部, 右上頭頂小葉, 左中側頭回, 左前頭極, 右運動前野, 右紡錘状回、左後中心回、左三角部が見出された(図 1左上および表1). 左前頭極のクラスターは一部に内 側前頭前皮質を含んでいた. この結果において特に注 目すべきは、楔前部と内側前頭前皮質、前部帯状回吻 側部というデフォルトモードネットワーク[10,11]の中 心的構成脳領域が含まれていたことである. しかしな がら、これは意外性のある結果ではない. Kim らの先 行研究では、自己関連的自発思考/想起に最も関連の深 い部位としてデフォルトモードネットワークが同定さ れており、ゆえにデコーダはその活動を検出するもの となっていると考えられる.したがって、その設計法 から、デコーダの出力はデフォルトモードネットワー ク活動によく相関するはずであり、この結果はそれが 検出されたに過ぎない.一方で、本来出るべき結果が 実際に今回の手続きでも出ているということではある ため、これは手法が期待通りに働いていることの証左 になる.

表1クラスターレベルの有意差検定の結果. 有意となったボクセルクラスターの属する脳部位と各クラスターにおいてt値がピークを示したMNI座標を提示している. p値はFWEを制御する多重比較補正を適用済み. 右端の番号は図1図中で示したボクセルクラスターの番号に対応している.

Region	х	У	Z	p-value (corrected)	_
prediction signal (non-shifted)					-
left cerebellum VIIb	-26	-74	-54	0.0293	-
left precuneous	-2	-52	40	0.0059	1
left insula	-40	14	-14	0.0293	2
right intra-parietal sulcus	28	-56	40	0.0391	
left anterior cingulate gyrus	-6	42	6	0.0391	3
right lingual gyrus	10	-62	-2	0.0137	4
left pars opercularis	-52	0	2	0.0293	5
right superior parietal lobule	6	-48	76	0.0117	6
left middle temporal gyrus	-62	-20	-10	0.0293	7
left frontal pole	-24	60	16	0.0293	8
right premotor cortex	26	-8	72	0.0313	9
right fusiform cortex	40	-58	-20	0.0313	10
right premotor cortex	2	6	56	0.0332	11
left postcentral gyrus	-44	-28	44	0.0293	
left pars triangularis	-44	28	18	0.0293	
left intra-parietal sulcus	-28	-52	38	0.0391	_
signal shifted by 1.44 sec					_
left superior parietal lobule	-2	-54	72	0.0293	_
right inferior parietal lobule	52	-64	20	0.0254	
right premotor cortex	26	-24	64	0.0293	
signal shifted by 4.32 sec					_
right lateral occipital cortex	52	-66	-10	0.0137	

さらに、予測信号を 1.44 秒時間シフトした変数と 4.32 秒時間シフトした変数に対しても、有意に関係し ているボクセルクラスターが見出された(図1下・右 上および表1).1.44 秒シフトの変数については左上頭 頂小葉、右下頭頂小葉、右運動前野に有意なクラスタ ーがあった.とくに注目すべきは右下頭頂小葉クラス ターである.これはデフォルトモードネットワークを 構成する角回[10,11]に一部が被っていた.一方で、予 測信号そのものに関係していた楔前部・内側前頭前皮 質・前部帯状回吻側部のクラスターは、今回は見出さ れておらず、したがって、角回の活動はこれらの領域 の活動に時間的に先行していると言え、角回からデフ オルトモードネットワークの中心領域への因果的な繋 がりが示唆される.

4.32 秒シフトの変数については、右外側後頭皮質下

東海大学先進生命科学研究所紀要 第9巻 2025年3月

部に有意に関連するクラスターが見られた.外側後頭 皮質下部はオブジェクト知覚や顔認識に重要な役割を 果たす高次視覚処理の中枢領域である[12].これが自発 的想起/思考の発生から見て最も過去の時点に見出され たクラスターであることから,外側後頭皮質下部の活 動からデフォルトモードネットワークの活動への因果 的な繋がりが示唆される.

4.考察とまとめ

本研究では自発的思考や想起を開始させる内因性の トリガーの神経実体を調べた.まず,進行中の自発的 思考/想起を検出するブレインデコーダを安静時 fMRI データに適用し,自発的思考/想起が起きている期間を その予測信号として推定した.そして,それを過去方 向に時間シフトしたものを説明変数に入れた一般線形



図2 本研究と先行研究の結果から示唆される自発的想起/思考の神経メカニズム(左)と視覚刺激駆動の想起/思考 の神経メカニズム(右)についての仮説.本研究の結果から、自発的想起/思考は外側後頭皮質に生じた自発活動を トリガーとし、それがデフォルトモードネットワークの一部である角回に伝わり、そこからさらにデフォルトモー ドネットワークの中枢である楔前部や内側前頭前皮質に伝わって生じることが示唆される(図のデフォルトモード ネットワーク中のノードは、後方からそれぞれ角回、楔前部、内側前頭前皮質に対応している).先行研究の結果 から、その後、内側前頭前皮質の活動は海馬の活動を駆動し、さらに海馬と外側後頭皮質を含む腹側視覚経路の間 に反復的な活動が起こることが示唆される.一方、視覚刺激駆動の想起/思考においては外側後頭皮質の活動は視覚 刺激によって生じるが、それ以降の過程は自発的想起/思考のものと同様である.

モデルを用い,自発的想起/思考の内因性トリガーの神 経実体の同定を試みた.オープンデータの解析による 検討ではあるが,以下に説明するように,妥当性のあ る結果が得られた.今後はこれを仮説とした実験的検 証を行うことで,自発的思考/想起を開始させる内因性 トリガーの神経実体の同定を進めうる.

1) 自発的思考/想起の神経メカニズムの示唆

本研究で得られた結果のうちの主なものを発生の時 系列順にまとめると,まず自発的思考/想起の4.32秒前 に外側後頭皮質が働き,次いで1.44秒前に角回を含む 下頭頂小葉が働き,それから自発的思考/想起が生じて いるタイミングで楔前部・内側前頭前皮質・前部帯状 回吻側部が働くといったものになる.ここから,自発 的思考/想起の内因性トリガーおよびそこから生じる思 考/想起の神経実体について,次の仮説が得られる:「自 発的想起/思考の内因性トリガーはまず外側後頭皮質に 生じ,デフォルトモードネットワークの一部である角 回を活性化する.これがさらにデフォルトモードネッ トワークの中枢を活性化させることで,自発的想起/思 考が生じる」.

さらに、以上の本研究から得られた示唆に先行研究 の知見を合わせ、以下では自発的想起/思考の全脳的な メカニズムについての仮説的なスケッチを与えること を試みる(図2).まず、マルチボクセルパターン分析 や拡散 MRI を用いた先行研究により、デフォルトモー ドネットワークを構成する楔前部・内側前頭前皮質・ 角回から記憶内容が検出可能であることや,記憶形成 後にそこに記憶を反映した変化が起こることが示され ている[13-17].すなわち,これらの領域に記憶が貯蔵 されていると考えられる.また海馬も記憶を貯蔵する 部位であると考えられているが,自伝的記憶を対象に した fMRI 実験により,内側前頭前皮質から海馬への 入力がその想起に役割を果たすことが示唆されている [18].この内側前頭前皮質が先行し,それに海馬が引き 続くという図式は,近似記憶でも遠隔記憶でも同様に 示されている.また脳時図を用いた実験により,想起 においては海馬と腹側視覚経路のあいだを往復する活 動が生じることが示されている[19].

腹側視覚経路には先述の外側後頭皮質が含まれるため、本研究での発見と先行研究からの知見をまとめると、図2左図のようになる.一方で、感覚刺激に駆動されて生じる想起/思考は、その感覚刺激が視覚刺激であると仮定すれば図2右図のようになる.視覚刺激は、一般には初期段階の視覚処理を経て外側後頭皮質に入力する.あとは自発的想起/思考の場合と同じである.

したがって、本研究で得られた仮説を一言で言えば、 自発的想起/思考とは「途中から開始した感覚刺激駆動 の想起/思考」であると言うものである.

2) 制限と今後の展開

本研究で用いた手法の最大の制限は、fMRI で測定される blood oxygen level-dependent (BOLD) 信号の減 衰時定数の長さから来る.これは典型的に数秒間とい

う長さであるため、必然的に本研究で用いた説明変数 同士には相関があることになる.本研究の目標は「進 行中の想起」の神経実体を同定することではなく、「想 起のきっかけ」の神経実体を同定することであった.

「進行中の想起」に対応する脳活動は、デコーダから 得られた予測信号に最もよく相関する.したがって、

一般線形モデルの説明変数にこれを含めていることで、 「進行中の想起」に対応する脳活動は理想的には除去 されるはずである.しかしそれでも除去できていない 成分はあると思われ、時間シフトした信号に対して同 定されたボクセルクラスターにもこれが反映されてし まっている可能性はある.

一方で自発的想起/思考」であるとする本研究から得られた 激駆動の想起/思考」であるとする本研究から得られた 仮説は、リユースできる神経回路はリユースするとい うニューラルリユース理論[20]から考えても妥当性が 高い.この仮説は経頭蓋磁気刺激法などを用いて外側 後頭皮質に摂動を加える実験により、直接的な検証が できる.したがって、この検証は今後まず行うべきも のと言える.また今回の検討はオープンデータを用い たものであったたため、データの取得に際する実験条 件が必ずしも今回の研究目的にフィットしていたわけ ではない.よって、今回の目的によりチューンした実 験を実施し、検討を行うことで、本研究で得られた知 見をより強固にしていくことも、今後の重要な方向で ある.

4. 引用文献

M. F. Mason, et al., *Science*, **315**, 393 (2007).
 M. A. Killingsworth, & D. T. Gilbert, *Science*, **330**, 932, (2010)

- [3] K. Christoff, et al., PNAS, 106, 8719 (2009).
- [4] H. X. Li, et al., NeuroImage, 265, 119775 (2023).
- [5] H. J. Kim, et al., PNAS, 121, e2401959121 (2024).
- [6] H. Su, et al., *bioRxiv*, 2024.10.02.616300 (2024).
- [7] D. C. van Essen, et al., NeuroImage, 80, 62 (2013).

[8] T. E. Nichols, & A. P. Holmes, *Hum. Brain Mapp.*, **15**, 1 (2002).

[9] A. M. Winkler, et al., NeuroImage, 92, 381 (2014).

[10] R. L. Buckner, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1124, 1 (2008).

[11] V. Menon, Neuron, 111, 2469 (2023).

[12] K. Grill-Spector, et al., *Vis. Res.*, **41**, 1409 (2001)

- [13] A. Tompary, & L. Davachi, Neuron, 96, 228 (2017)
- [14] S. Audrain, & M. P. McAndrews, Nat. Commun., 13,

東海大学先進生命科学研究所紀要 第9巻 2025年3月

5795 (2022)

- [15] H. M. Bonnici, et al., J. Neurosci., 32, 16982 (2012).
- [16] S. Brodt, et al., PNAS, 113, 13251 (2016).

[17] S. Brodt, et al., Science, 362, 1045 (2018).

[18] C. McCormick, et al., *Cereb. Cortex*, **30**, 5972 (2020).

[19] N. Dijkstra, et al., *ELife*, 9, e53588 (2020).

[20] M. L. Anderson, Behav. Brain Sci., 33, 245 (2010).

5.謝辞

本研究の一部は,文部科学省科学研究費補助金基盤 研究(C)(21K07264)の支援を受けた. 新規ホスホロアミダイド試薬を用いたイノシトール7リン酸の合成



Synthesis of Inositol 7-Phosphate Using a Novel Phosphoramidite Reagent

澁谷 優我^{*1)}、小口 真一^{1),2)}

東海大学先進生命科学研究所*1)、東海大学理学部化学科2)

Yuga Shibuya^{* 1)} and Shinichi Koguchi^{1), 2)}

Institute of Advanced Biosciences, Tokai University^{*1)}, Department of Chemistry, Tokai University²⁾

[要旨]

イノシトール7リン酸は精神疾患との関連性から注目を集めている化合物である。イノシトール7リン 酸の主な入手手段は化学合成であるが、これまでに大スケールでの合成は達成されていない。そこで、本 研究ではイノシトール7リン酸の効率的かつ大スケールでの合成を可能とする合成経路の開発を検討した。 その結果、シアノエチル基を有するホスホロアミダイト試薬を駆使することで目的のイノシトール7リン 酸が高純度で得られたほか、比較的大スケールでの合成も可能とした。

[Abstract]

Inositol 7-phosphate has garnered significant attention due to its potential association with psychiatric disorders. The primary method for obtaining inositol 7-phosphate is chemical synthesis; however, large-scale synthesis has not yet been realized. In this study, we aimed to develop a synthetic route that enables efficient large-scale production of inositol 7-phosphate. By using phosphoramidite reagents bearing cyanoethyl groups, we successfully obtained the target compound with high purity and established a method for its synthesis on a relatively large scale.

[Key Words]

myo-Inositol, Phosphorylation, Inositol phosphates, Phosphoramidite

1.はじめに

イノシトールリン酸は、生体内に広く存在し、多様 な生物活性を持つ分子であり、さまざまな生命現象を 引き起こすことが知られている印。東海大学医学部内科 学系神経内科の研究グループは、イノシトール 6 リン 酸 (IP6)、イノシトール7リン酸 (IP7)、および IP6 を IP7にリン酸化する酵素であるイノシトール6リン酸キ ナーゼ (IP6K) と神経変性疾患との関連を研究してき た。特に IP6K は中枢神経系に多く存在し、ハンチント ン病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)において活性が上 昇し、神経細胞死を促進することを明らかにしている。 また、同研究グループは生体内の IP6 や IP7 を定量的に 測定する手法を確立し、従来の方法では測定が困難で あった脳内や腸管に IP7 が存在することを示した^[2]。こ うした知見を背景に、IP7の定量と精神疾患との関連に 関する研究が精力的に進められている。しかし、研究 には高純度かつ比較的多量のIP7 が必要であるものの、 本化合物は市販されておらず、現時点での入手は極め て困難である。これまでに IP7 の合成法に関する報告 はあるものの、リン化合物の不安定性などの課題から、 高純度かつ大スケールに対応できる合成法は確立され ていない¹³。この様な背景の下、本研究ではこの生体内 で重要な働きを担う IP7 の効率的かつ大スケールでの 合成を可能とする合成法の開発を検討した。

2.結果の概要

1) 前駆体の合成

myo-イノシトール 1 リン酸の前駆体である 6,8,9-tris((4-methoxybenzyl)oxy)-3-phenyl-2,4-dioxabicylo[3,3,1]nonan-7-ol (3) (以下 TPDN)の合成を試みた。

myo-イノシトール(1)の DMF 溶液にオルト安息香酸 トリメチルと(+)-10-カンファースルホン酸を加え 150℃で3.5 時間攪拌した。

その後、反応溶液を 0°C に冷却し水素化ナトリウム と *p*-メトキシベンジルクロリドを加え、室温まで昇温 し一晩攪拌を行った。反応終了後、分液と再結晶を行 いイノシトール上の水酸基がすべて保護された化合物 (2)を収率64%で得た (Scheme 1)。



Schemel イノシトール上水酸基の保護

次に、化合物(2)に対し水素化ジイソブチルアルミニ ウム(DIBAL-H)による位置選択的な還元反応を行った。 窒素雰囲気下化合物(2)の塩化メチレン溶液を-78℃ に冷却し DIBAL-H を加えた。その後反応溶液を-20℃ まで緩やかに昇温し、1.5時間攪拌を行った。TLC によ って基質の消失を確認した後、抽出とシリカゲルカラ ムクロマトグラフィーにより目的中間体である TPDN(3)を収率77%で得た (Scheme 2)。



Scheme2 TPDN(3)の合成

2) ホスホロアミダイト試薬の合成

3塩化リンとアミン、アルコールを用いたホスホロア ミダイト試薬の合成を検討した (Scheme 3)。



Scheme 3 N,N-ジイソプロピルジクロロホスフィンアミンの合成

3 塩化リンの THF 溶液に *N,N-ジイソプロピルエチル* アミン (DIEA)を加え、窒素雰囲気下 0℃でジイソプ ロピルアミンを滴下した。滴下後、反応溶液を 40℃ま で昇温し 2 時間攪拌をさせた。P³¹NMR により基質の 消失を確認した後、精製を行わず次の反応に用いた。

基質となるアルコールの THF 溶液に、トリエチルア ミンを加え、別途調整した N,N-ジイソプロピルジクロ ロホスフィンアミン溶液を窒素雰囲気下 0℃で滴下し 東海大学先進生命科学研究所紀要 第9巻 2025年3月

た。その後、室温で一晩攪拌させた後、抽出とシリカ ゲルカラムクロマトグラフィーにより目的物を得た (Scheme4)。



Scheme 4 対称ホスホロアミダイト試薬の合成

上記の手法により、性質の異なる2種類の対称ホス ホロアミダイト試薬を合成した。

更に、置換基の異なる非対称のホスホロアミダイト 試薬の合成も試みた。3塩化リンに対し1等量のベンジ ルアルコールを反応させることでベンジルジクロロホ スファイトを合成した(Scheme5)。



Scheme 5 ベンジルジクロロホスファイトの合成

その後は対称ホスホロアミダイト試薬と同様の経路 によってアミン、アルコールを反応させることで、ベ ンジル基、2-シアノエチル基をそれぞれ有する非対称 ホスホロアミダイト試薬を合成した(Scheme 6)。



Scheme 6 非対称ホスホロアミダイト試薬の合成

3) イノシトール1 リン酸の合成

前駆体である TPDN(3) へのリン酸エステルの導入及 び、開環反応による種々のイノシトール1リン酸(4)の 合成を検討した。ホスホロアミダイト試薬としては、 調整した3種類のホスホロアミダイト試薬に加え、比 較的試薬の入手が容易であるジベンジル-N,N-ジイソプ ロピルホスホロアミダイトを用いた。

TPDN(3)のアセトニトリル溶液に 4,5-ジシアノイミ ダゾールを加え、窒素雰囲気下でホスホロアミダイト 試薬を反応させた。その後、tert-ブチルヒドロペルオキ シドを用いて亜リン酸エステルを酸化し、トリフルオ ロ酢酸を用い開環反応まで進行させ目的物を得た。ま た、得られたイノシトール1リン酸(4)は再結晶操作に よって単離した。それぞれのホスホロアミダイト試薬 を用いた際の収率を以下に示す(Table 1)。

РМВО		он	^{1-Pr} N ⁻¹ p 1) 4,5-Dicyanolir MeCN 2) t-BuOOH 3)TFA/CH ₂ Cl ₂	-Pr nidazole, ⊢ 9:1 ⊢ R		он ′он
-	Entry		R ¹	R ²	Yield	
	1	4a	Bn	Bn	94%	
	2	4b	Bn	2-Cyanoethy	I 76%	
	3	4c	2-Cyanoethyl	2-Cyanoethy	83%	
	4	4d	LevB	LevB	63%	

Table1 種々のイノシトール1 リン酸(4)の合成検討

LevB 基を有するホスホロアミダイト試薬との反応 では、反応後多くの副生成物も確認され、単離収率は 中程度であった(Entry4)。一方、他の置換基を有する ホスホロアミダイト試薬との反応ではいずれも高収率 で目的のイノシトール1リン酸を得た(Entry1,2,3)。

また、Entryl の生成物であるベンジル基を有するイ ノシトール 1 リン酸(4a)においては単結晶X線構造解 析により詳細な構造も明らかとなった。(Fig. 1, Table 2)



Fig.1 イノシトール1 リン酸(4a)の結晶構造

Table 2 イ	ノシトール1	リン酸(4a	の結晶パラ	メータ
-----------	--------	--------	-------	-----

crystal system	monoclinic
space group	$P12_1/c1$
<i>a</i> (Å)	18.6725(2)
<i>b</i> (Å)	6.90900(1)
<i>c</i> (Å)	16.1627(2)
a(deg)	90
β (deg)	103.3370(1)
γ(deg)	90
$V(Å^3)$	2028.89(5)
Ζ	4
$R_{\rm l}({\rm I} > 2\sigma({\rm I}))$	3.89
$wR_2(all)$	10.99

4) イノシトール6 リン酸の合成

イノシトール1リン酸4b,4c,4dを基質としてイノシ トール6リン酸(5)の合成を検討した。イノシトール1 リン酸(4)のアセトニトリル溶液に対し1-テトラゾール を加え、窒素雰囲気下でジベンジル-*N,N*-ジイソプロピ ルホスホロアミダイトを反応させた。その後、メタク ロロ過安息香酸を用いて酸化を行い目的物であるイノ シトール6リン酸(5)を得た。それぞれの収率を以下に 示す (Table 3)。

Table 3 種々のイノシトール6 リン酸(5)の合成検討



イノシトール 6 リン酸(**5**a)および (**5**b)においては比 較的良好な収率で反応が進行した。一方で LevB 基を有 するリン酸エステルが導入されたイノシトール 6 リン 酸(**5**c)においては収率 30%と低収率であった。

5) イノシトール7リン酸の合成

イノシトール5位のリン酸エステルのみを脱保護し、 続いてホスホロアミダイト試薬を反応させることによ りポリリン酸の形成を試みた。ここでは、2-シアノエ チル基、LevB 基の脱保護条件の違いから二通りの経路 について検討を行った。

イノシトール6リン酸(5c)においては、ヒドラジン酢酸を脱保護剤として用いる手法を検討した。イノシト ール6リン酸(5c)のメタノール溶液にヒドラジン酢酸塩を加え常温で一晩反応させた。反応後溶媒を留去、 再度アセトニトリルに溶解しジベンジル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイトを用いたリン酸化反応を行った(Scheme 7)。



Scheme 7 イノシトール6 リン酸(5c)を基質とした反応

東海大学先進生命科学研究所紀要 第9巻 2025年3月

結果、目的のポリリン酸の生成は確認できたが、目 的物(6a)の収率は 29%であった。また、シリカゲルカ ラムクロマトグラフィーを用いた精製を検討したが H¹ 及び P³¹NMR より夾雑物が多く確認された。

イノシトール6リン酸(5a)および(5b)においては、ト リエチルアミン、N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフル オロアセトアミド(BSTFA)による脱保護の検討を行 った。イノシトール6リン酸(5a)もしくは(5b)のアセト ニトリル溶液に窒素雰囲気下、常温でトリエチルアミ ン、BSTFAを加え30分撹拌した。撹拌後TLCで基質 の消失を確認し、塩酸を加えてさらに室温で30分攪拌 させた。ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留 去後、ろ過によるトリエチルアミン塩酸塩の除去をし た後、塩化メチレンに溶解させジベンジル-N,N-ジイソ プロピルホスホロアミダイトを用いたリン酸化反応を 行った(Scheme 8)。



Scheme 8 イノシトール 6 リン酸(5a)及び(5b)を基質と した反応

イノシトール5位のリン酸エステル部位がどちらも 2-シアノエチル基であるイノシトール6リン酸(5a)にお いては、良好に反応が進行し目的物の収率は75%と高 収率であった。また、H¹及びP³¹NMRより目的物は比 較的高純度であることも確認された。一方で、イノシ トール5位に非対称のリン酸エステルを導入したイノ シトール6リン酸(5b)においては、ベンジル基の立体障 害による要因のため反応が進行せず目的のポリリン酸 の生成は確認されなかった。

以上の結果から、本化合物のポリリン酸の形成にお いてはイノシトール 6 リン酸(5a)を基質として用いる ことが望ましいことが明らかとなった。

得られた保護基を有するイノシトール 7 リン酸(6a)

は最終的にすべての保護基を脱離させることで本研究 の最終目的物であるイノシトール7リン酸(7)を得るこ ととした。脱保護にはパラジウム触媒を用いた水素添 加反応を用いた。イノシトール7リン酸(6a)のメタノー ル/水混合溶液へパラジウム/炭素を加え、水素雰囲 気下、常温、加圧条件下で二時間攪拌させた。反応後、 ろ過によりパラジウム/炭素を除去し、イオン交換を 行うことで、ナトリウム塩状態のイノシトール7リン 酸(7)を得た

 $(\text{Scheme } 9)_{\circ}$



Scheme 9 イノシトール7 リン酸(7)の合成

反応は良好に進行し94%と高収率で目的化合物を得た。イノシトールを出発原料とした本合成ルートの全収率は20%と大変高い値を示した。イノシトール7リン酸(7)は、H¹及び P³¹NMR、MS 等を用い先行研究の値と比較し目的物であることを確認した。

さらに、本実験は比較的大スケールでの合成も可能 であり、一度の合成で100 mg程度のイノシトール7リ ン酸が得られる優れた反応系であることも明らかとし た。

3.要約

イノシトールを出発物質とし数段階の反応を経てイ ノシトール7リン酸の合成を試みた (Scheme 10)。種々 のホスホロアミダイト試薬を用いることで、中間体と なる種々のリン酸エステルを有するイノシトール1リ ン酸の合成に成功した。更にイノシトール5位に2-シ アノエチル基を有するリン酸エステルが導入された中 間体を用いることで高い純度のイノシトール7リン酸 を得た。全収

率は20%であり、一度の合成で100mg程度のイノシト ール7リン酸が得られる優れた反応系であることを明 らかとした。

4. 引用文献

R. F. Irvine, M. J. Schell, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 327(2001).

[2] M. Ito, et al., J. Biol. Chem., 299, 102928(2023).

[3] (a)I. Pavlovic, et al., *Nature Communications*, 7, 10622(2016)

(b)R. Bhandari, et al., PNAS, 104, 15305(2007).



Scheme 10 イノシトール7リン酸の合成経路



三保松サバの品質評価

Quality evaluation of Miho-matsu mackerel

駿¹⁾•平野功海¹⁾•平塚聖一^{1,2)} 構濹 1) 東海大学海洋学部,2) 東海大学先進生命科学研究所·高機能性食品研究部門

Shun Yokosawa¹⁾, Isami Hirano¹⁾, and Seiichi Hiratsuka^{1,2)} 1) School of Marine Science and Technology, Tokai University 2) Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

静岡市三保地区の地下海水で養殖された三保松サバの品質を天然および養殖サバと比較した。三保 松サバの脂質含量は25.7%であり3種のサバの中で最も多かった。鮮度指標であるK値は3種のサバの 中で最も低く、筋肉の破断荷重も3種のサバの中で最も低かった。また、赤身魚の主要な臭い成分で あるアルデヒドとアルコールは天然サバよりも三保松サバで少なかった。三保松サバは脂ののりが良 く、身質が柔らかいことに加えて、鮮度が良く魚臭が少ない特徴を有していることが明らかとなった。

[Abstract]

The quality of Miho-matsu mackerel cultivated in underground seawater from the Miho region in Shizuoka city was compared with wild and farmed mackerel. The lipid content of Miho-matsu mackerel was 25.7%, the highest of the three mackerel groups. The K value, an index of freshness, was the lowest of the three mackerel groups, and the muscle breaking load was also the lowest of the three mackerel groups. In addition, aldehydes and alcohol, which are the main odorous components of red meat fish, were less in Miho-matsu mackerel than in wild mackerel. It has been considered that Miho-matsu mackerel has a good amount of fat, soft flesh, and is also characterized by good freshness and little fishy odor.

[Key Words]

Branding, Mackerel, Miho, Quality evaluation, Underground seawater

1. はじめに

我が国の海面漁業生産量は減少傾向が続いている。 2023年の海面漁業生産量は282万3千トンであり、こ れは10年前の76%に相当する。一方、海面養殖生産 量は横ばいとなっている。2023年の海面養殖生産量は 84万9千トンであり、これは漁業・養殖業の合計生産 量の約29%となっている[1]。今後も海面漁業生産量の 増加は難しい現状では国民への水産物の供給源として 海面養殖業は重要と考えられる。

このような状況の中、近年、養殖サバのブランド化 が増加し始め、その数は20程度に上ると推定される[2]。 「三保松サバ」は静岡県静岡市清水区の三保地区にて 地下海水を用いて陸上養殖されている。地下海水は寄

生虫などの生物が少なく、豊富なミネラル分が含まれ ていることが特徴であり、現在、静岡県内の料理店で 提供され始めている。

本研究では三保松サバのブランド化を目指し、三保 松サバの品質を天然サバおよび養殖サバと比較するこ とにより、三保松サバの品質の特徴を明らかにするこ とを目的とした。

2. 方法

1) 試料

本実験では 2024 年7月に入手した表1に示した 3 種類のマサバ Scomber japoni、を用いた。すなわち、 静岡市三保地区にて地下海水で陸上養殖されている三

保松サバ、長崎県産の養殖マサバおよび兵庫県淡路島 産の天然マサバを5尾ずつ用いた。三保松サバと養殖 サバは水揚げ後に首折り処理を行い、天然サバは水氷 中で締めた。これらは発泡スチロール内で氷蔵された 状態で研究室に搬入された。入手後、直ちに物性測定 を行うとともに5℃で貯蔵しながら0,1,2日後に分析 用試料のサンプリングを行った。

表1 供試魚の概要

	尾又長(cm)	体重(g)	致死方法
天然サバ	$42.1~\pm~1.6$	$787.0~\pm~31$	氷水漬け
養殖サバ	$33.1~\pm~2.9$	361.4 ± 46.1	首折り
三保松サバ	$32.4~\pm~0.5$	401.4 ± 49.5	首折り

6) 分析方法

一般成分:常法[3]により行った。脂肪酸組成:Bligh &Dyer法のHanson&Olley変法[4]に従って抽出した 脂質を、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、GCにより分析した。破断荷重:(株)山 電のレオメーターTPU-2Lにより測定した。K値:JAS 法[5]に従って 5%過塩素酸溶液にて抽出後、HPLCに て分析した。揮発性成分:バイアル瓶にサンプル 1.0g と内部標準(40ppm シクロヘキサノール)75µ1と蒸 留水 1mlを加え、70℃で 20分間 SPME 用ファイバー により揮発性成分の吸着を行った。その後、GC-MS 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)を使用して、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

表2に3種サバの一般成分を示した。水分とタンパ ク質は天然サバが最も多く、次いで養殖サバとなり、 三保松サバは最も少なかった。一方、脂質は三保松サ バが25.7%と最も多く、次いで養殖サバの18.1%であ り、天然サバは5.2%と最も少なかった。

表 2	サバ	3	種の	一般	成分
- VC		~	IE - 2	/1/	1-2023

				(%)
	水分	タンパク質	脂質	灰分
天然サバ	$72.2~\pm~2.3$	$20.6~\pm~1.1$	$5.2~\pm~2.5$	$2.0~\pm~1.0$
養殖サバ	$61.1~\pm~5.7$	$18.5~\pm~1.2$	$18.1~\pm~6.1$	$2.3~\pm~1.0$
三保松サバ	$55.5~\pm~8.3$	$16.7~\pm~1.8$	$25.7~\pm~9.5$	$1.7~\pm~0.6$

表3に3種サバの脂肪酸組成を示した。3種サバいず れも主要な脂肪酸はC16:0 (パルミチン酸)、C18:1 n-9 (オレイン酸)、C22:6 n-3 (DHA) であった。C16:0 比は養殖サバが最も高く、C18:1 n-9 比は三保松サバが 最も高かった。また、養殖サバと三保松サバでは天然 サバに比べてC18:2 n-6 (リノール酸) 比が高かった。 不飽和度別にみると、天然サバでは多価不飽和脂肪酸 比が最も高く、養殖サバと三保松サバでは一価不飽和 脂肪酸比が最も高かった。なお、全ての脂質をトリグ リセライド (TG) とし、TG にエステル結合している 3 つの脂肪酸全てを主要な構成脂肪酸である C18:1 n-9 と仮定して、筋肉中の各種推定脂肪酸絶対量 (g/100g) を脂質量×0.96×脂肪酸組成比の計算式に より算出した。その結果、EPA と DHA の推定含有量 は三保松サバが最も多く、次いで養殖サバであり、天

図1に3種サバ筋肉の破断荷重を示した。天然サバ および養殖サバに比べて三保松サバは有意に低い値で あった。

然サバが最も少なかった。





図2に5℃貯蔵中における3種サバのK値変化を示した。貯蔵開始時から2日後まで天然サバおよび養殖サバに比べて三保松サバのK値は有意に低い値であった。 表4に5℃貯蔵2日後における3種サバの揮発性成 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4成分、炭化水素類6成分、ケトン 類2成分

が同定された。アルデヒド類では Hexanal と Nonanal が多く検出され、これらを含む4成分で養殖 サバと三保松サバに比べて天然サバで有意に高い値で あった。アルコール類では1-Octen-3-ol が多く検出さ れ、これを含む3成分において養殖サバと三保松サバ に比べて天然サバで有意に高い値であった。炭化水素 類ではPentadecaneとHeptadecaneが多く検出され、 Heptadecaneは三保松サバに比べて天然サバで有意に 高い値であった。ケトン類は2成分いずれも養殖サバ と三保松サバに比べて天然サバで有意に高い値であっ た。

					Wt %
脂肪酸	天然サバ		養殖サバ		三保サバ
C14:0	$3.35~\pm~0.72$		$2.13~\pm~0.19$		$2.05~\pm~0.19$
C15:0	$0.86~\pm~0.13$		$0.33~\pm~0.05$		$0.25~\pm~0.06$
C16:0(パルミチン酸)	$17.70~\pm~1.20$	а	$19.45~\pm~0.53$	b	17.72 ± 9.78 a
C17:0	$0.99~\pm~0.17$	a	$0.47~\pm~0.08$	b	$0.39~\pm~0.03~~b$
C18:0(ステアリン酸)	$5.90~\pm~0.52$		$4.49~\pm~0.98$		$4.11 ~\pm~ 2.54$
C20:0	$0.60~\pm~0.11$		$0.34~\pm~0.05$		$0.35~\pm~0.05$
C16:1 n-7	$3.16~\pm~0.71$		$3.16~\pm~0.20$		$3.20~\pm~0.10$
C17:1 n-8	$1.71~\pm~2.67$		$0.56~\pm~0.19$		$0.40~\pm~0.03$
C18:1 n-9(オレイン酸)	$17.18~\pm~1.31$	а	$29.02~\pm~1.38$	b	$34.62~\pm~3.86~c$
C18:1 n-7	$3.74~\pm~0.37$		$3.33~\pm~0.13$		$3.70~\pm~0.42$
C20:1 n-11	$0.38~\pm~0.17$		$0.82~\pm~0.19$		$1.27~\pm~0.43$
C20:1 n-9	$1.90~\pm~0.53$		$1.90~\pm~0.23$		$2.40~\pm~0.70$
C22:1 n-11	$0.74~\pm~0.05$		$1.34~\pm~0.49$		$1.43~\pm~0.34$
C22:1 n-9	$1.39~\pm~0.34$		$0.43~\pm~0.03$		$0.56~\pm~0.11$
C16:2 n-4	$1.16~\pm~0.23$		$0.63~\pm~0.10$		$0.46~\pm~0.04$
C18:2 n-6(リノール酸)	$2.65~\pm~1.44$	а	$8.14~\pm~1.30$	b	$6.61~\pm~1.47~~c$
C18:3 n-3(a-リノレン酸)	$0.63\ \pm\ 0.07$	а	$1.09~\pm~0.23$	b	$0.67~\pm~0.05~a$
C18:4 n-3	$0.53\ \pm\ 0.09$		$0.62~\pm~0.18$		$0.46~\pm~0.05$
C20:2 n-6	$0.35~\pm~0.08$		$0.38~\pm~0.10$		$0.32~\pm~0.06$
C20:4 n-6	$1.60~\pm~0.24$		$0.89~\pm~0.15$		$0.60~\pm~0.22$
C20:3 n-3	$0.15~\pm~0.03$		$0.15~\pm~0.03$		$0.13~\pm~0.07$
C20:4 n-3	$0.63\ \pm\ 0.11$		$0.45~\pm~0.07$		$0.50~\pm~0.14$
C20:5 n-3 (EPA)	$6.21 \ \pm \ 1.21$	а	$3.90~\pm~0.76$	b	$3.95~\pm~0.63~~b$
C22:5 n-6	$0.88~\pm~0.24$		$0.48~\pm~0.11$		$0.30~\pm~0.11$
C22:5 n-3	$2.43~\pm~0.68$		$1.28~\pm~0.61$		$1.63~\pm~0.26$
C22:6 n-3 (DHA)	$18.09~\pm~1.51$	а	$9.46~\pm~1.77$	b	$6.97~\pm~1.25~~b$
その他	$5.09~\pm~1.68$		$4.78~\pm~1.40$		$4.95~\pm~1.25$
飽和脂肪酸	$29.40~\pm~1.68$		$27.21~\pm~0.95$		24.87 ± 8.05
一価不飽和脂肪酸	$30.20~\pm~0.79$	а	40.56 ± 1.12	b	$47.57~\pm~5.62~~c$
多価不飽和脂肪酸	35.31 ± 1.42	a	27.45 ± 1.84	b	$22.61~\pm~3.38~~c$
n-3/n-6	$5.57~\pm~1.64$		$1.75~\pm~0.48$		$1.86~\pm~0.20$
EPA含有量 (g/100g)	$0.31~\pm~0.14$	а	$0.68~\pm~0.21$	b	$0.97~\pm~0.34~~b$
DHA含有量 (g/100g)	$0.90~\pm~0.40$	а	$1.64~\pm~0.52$	b	$1.72~\pm~0.60~~b$
			* 異符号間で	「有	意差あり(<i>p</i> < 0.05)

表3 サバ3種の脂肪酸組成

表4	サバ	3種におけ	3!	5°C貯蔵2	日後の	揮発性成分量
----	----	-------	----	--------	-----	--------

	天然サバ		養殖サバ		三保松サバ	
Aldehyde						
Pentanal	0.025 ± 0.014		0.007 ± 0.004		0.004 ± 0.001	
Hexanal	0.684 ± 0.280	а	0.041 ± 0.030	b	0.039 ± 0.016	b
Heptanal	0.097 ± 0.080	а	0.011 ± 0.009	b	0.008 ± 0.005	b
Octanal	0.276 ± 0.132	а	0.017 ± 0.007	b	0.014 ± 0.002	b
Nonanal	0.586 ± 0.393	а	0.002 ± 0.002	b	0.002 ± 0.002	b
Alcohol						
1-Octen-3-ol	1.246 ± 0.481	а	0.043 ± 0.035	b	0.034 ± 0.028	b
1-Penten-3-ol	0.327 ± 0.121	а	0.030 ± 0.024	b	0.040 ± 0.030	b
1-Hexanol	0.056 ± 0.033		0.018 ± 0.014		0.068 ± 0.081	
1-Heptanol	0.092 ± 0.040	а	0.038 ± 0.045	b	0.014 ± 0.006	b
Hydrocarbon						
n-Hexane	0.085 ± 0.091		0.079 ± 0.042		0.032 ± 0.016	
Heptane	0.011 ± 0.010		0.004 ± 0.002		0.003 ± 0.002	
Octane	0.035 ± 0.025		0.006 ± 0.003		0.009 ± 0.003	
Decane	0.012 ± 0.007		0.010 ± 0.005		0.012 ± 0.007	
Pentadecane	0.126 ± 0.110		0.200 ± 0.147		0.087 ± 0.052	
Heptadecane	0.134 ± 0.069	а	0.070 ± 0.033	ab	0.026 ± 0.015	b
Ketone						
2.3-Pentandione	0.075 ± 0.040	а	0.018 ± 0.009	b	0.019 ± 0.012	b
2.3-Octanedione	0.252 ± 0.154	а	0.027 ± 0.015	b	0.026 ± 0.017	b
Total aldehyde	1.668 ± 0.774	а	0.062 ± 0.035	b	0.067 ± 0.019	b
Total alcohol	1.784 ± 0.674	а	0.104 ± 0.083	b	0.156 ± 0.144	b
Total hydrocarbon	0.450 ± 0.169	а	0.296 ± 0.139	ab	0.169 ± 0.044	b
Total ketone	0.327 ± 0.177	а	0.037 ± 0.018	b	0.045 ± 0.028	b

4. 考察

本研究は国内でブランド化が進んでいる養殖サバに おいて静岡県静岡市三保地区で生産され始めた三保松 サバ

のブランド化を図るため、天然サバ及び養殖サバとの 比較を行い、三保松サバの優位性を見出すことを目的 とした。

1) 一般成分

水産物の品質評価の一つに脂ののりが挙げられる。 回遊魚であるサバ類は魚体の大きさおよび漁獲時期に よって脂質含量は大きく異なることが知られている [6,7]。本研究で用いたマサバは天然サバが 787g、養殖 サバが 361g、三保松サバが 401g であり、天然サバが 養殖2種のサバよりも大きかった。吉満ら[6]は千葉県 銚子漁港に水揚げされたマサバの脂質含量を長期に亘 って調べており、平均体重 630~650g の大型マサバの 脂質含量は 9~12 月に 15%以上になるが、1 月以降減 少し、7 月が最も脂質含量が少なく 4%であったことを 報告している。また、五十川ら[7]は高知県土佐清水港 に水揚げされたゴマサバ Scomber australasicus の脂 質含量を経月的に調査しており、700~770g のゴマサ バにおいては1 月が最大値を示し、それは 5.84%であ った。

* 異符号間で有意差あり(p < 0.05)

本研究で用いた天然マサバは7月に水揚げされてお

り、最も脂質含量が低い時期に水揚げされたマサバで あると考えられ、脂質含量は 5.2%であったことから、 上記の報告と同様の結果であった。一方、養殖サバの 脂質含量は18.1%と多かったことから、天然サバの脂 ののらない時期に脂ののったサバを消費者に提供でき ることが養殖サバの利点であると考えられた。また、 三保松サバの脂質含量は25.7%と養殖サバよりもさら に多かったことから、天然サバの脂ののらない時期に 最も脂が多くのったサバを提供できることが三保松サ バの大きな特長と考えられた。

2) 脂肪酸組成

魚類の脂質に生活習慣病の予防効果がある n-3 系脂 肪酸である C20:5 n-3(EPA)と C22:6 n-3(DHA)が高含 有されていることが報告されている[8,9]。夏季に五 島・対馬周辺海域で漁獲されたマサバでは C20:5 n-3(EPA)比が 4.8~6.5%、C22:6 n-3 比が 11.3~ 15.0%[10]、また、10 月に千葉県千倉港に水揚げされ たマサバではC20:5 n-3比が10.1%、C22:6 n-3比が 12.9%であった[11]。本研究結果では天然サバの C20:5 n-3比が 6.2%、C22:6 n-3比が 18.1%であったことか ら、夏季に五島・対馬周辺海域で漁獲されたマサバと 近い値であった。また、C18:2n-6 (リノール酸) 比は 天然サバに比べて養殖サバと三保松サバで高かった理 由は人工飼料の影響であると考えられた。C20:5 n-3 比および C22:6 n-3 比は天然サバに比べて養殖サバと 三保松サバで低かったが、脂質含量に基づいて算出し た筋肉中のC20:5 n-3 とC22:6 n-3の推定量は三保松 サバが3種のサバの中では最も多かったことから、三 保松サバを食することで生活習慣病の予防効果が期待 されると考えられた。

3) 破断荷重

畑江ら[12]はマダイ、ヒラメ、ハマチの養殖魚と天然 魚の物性を比較し、養殖魚は天然魚よりも身質が柔ら かいことを報告している。しかし、近年、養殖技術の 進歩により養殖魚の身質は天然魚に近いものとなって きた。本研究結果では天然サバと養殖サバに比べて三 保松サバで破断荷重が有意に低かったことから、三保 松サバの身質は柔らかいと考えられた。これは脂質含 量が多いことが原因の一つであると推察された。

4) K值

K値は生体エネルギーであるATPの分解生成物量か ら算出される魚介類の生きの良さを示す指標である [13]。 死後、 ATP (アデノシン 5'-三リン酸) は ADP (ア デノシン5'-二リン酸)、AMP(アデノシン5'-ーリン酸)、 IMP (イノシン酸)、HxR (イノシン)、Hx (ヒポキサ

ンチン)へと酵素分解される。これらの生成量から、 K (int(%) = (HxR + Hx)/(ATP + ADP + AMP + IMP + HxR)+Hx) ×100 で求められる。K 値の上昇速度は魚種に よって大きく異なり[14]、マサバ等の回遊魚は一般にK 値上速度が速いと考えられている。本研究結果では三 保松サバが天然サバおよび養殖サバに比べて 5℃貯蔵 中のK値が低い値であった。致死方法の違いが死後硬 直の進行や ATP 代謝に寄与しており、首折り処理は延 髄刺殺処理と同様にK値上昇を抑制できることが報告 されている[15]。また、延髄刺殺処理されたマサバを氷 蔵した場合の2日後のK値は5~10%であることが報 告されている[16,17]。

本研究では最もK値が低い三保松サバで5℃貯蔵2日 後の K 値が 17%であった。この値は貯蔵温度が氷蔵よ りやや高い 5℃の条件であったことを考慮すると妥当 な値であると考えられた。また、養殖サバと天然サバ ではK値上昇速度に大きな差はないと考えられた。三 保松サバが天然サバおよび養殖サバに比べてK値が低 く推移したのは、天然サバと養殖サバは水揚げ地が静 岡から離れているため大学に搬入されるまでに三保松 サバよりも1日程度の時間差があったためと考えられ た。

5) 揮発性成分

サバ類やイワシ類などの赤身魚の主要な魚臭成分は 脂質劣化に由来するカルボニル化合物であることが報 告されている[18]。本研究においてもサバの揮発性成分 としてアルデヒド類とアルコール類が多く検出された。 また、天然サバは養殖サバと三保松サバよりも揮発性 成分量が多かった。この理由としては二重結合を多く 持っている多価不飽和脂肪酸の組成比が高かったこと が考えられた。

以上の結果から、三保松サバは脂ののりが良く、身 質が柔らかいことに加えて、鮮度が良くて魚臭が少な い特徴を有していることが明らかになった。

5. 引用文献

[1] 農林水産省: 令和5年魚種別漁獲量. 漁業養殖 業生産統計, 東京,(2024).

[2] 横山拓也: 全国サバ養殖フォーラム. Nippon Suisan Gakkaishi, 87(1), 62-62 (2021).

[3] 片岡榮子, 古庄 律, 安原 義: 食品の一般成分 分析. 食品化学実験「第二版」, 地人書館, 東京, 77-108 (2003).

[4] Hanson SWF, Olley J. Application of the Bligh and

Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *J. Biochem.*, 89, 101-102 (1963).

- [5] 日本農林規格(JAS0023): 魚類の鮮度(K 値)試験 方法―高速液体クロマトグラフ法. 農林水産省, 東京 (2022).
- [6] 吉満友野, 加藤正人, 小林正三: 調子漁港に水 揚げされたマサバにおける脂質含量の季節 変動と生殖腺の発達との関係性. Nippon Suisan Gakkaishi, 84(6), 1017-1024 (2018).
- [7] 五十川章子、山岡耕作、森岡克司:清水さばの脂質
 含量と生体形質の季節変動—旬の解明の一考察—.
 Nippon Suisan Gakkaishi, 74(2), 207-212 (2008).
- [8] 鈴木平光,和田 俊: EPA 及び DHA の代謝と機能. 油化学, 37(10), 9-15 (1988).
- [9] 齋藤洋昭:海洋生物とn-3 高度不飽和脂肪酸. 化学 と生物, 34(2), 107-113 (1996).
- [10] 上田正:マサバ脂質の脂肪酸組成の変動とそれに 関与する因子—1 脂肪酸組成率に対する季節、体 調および脂質含量の影響. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries, 42(4), 479-484 (1976).
- [11] 滝口明秀, 網仲仁: 塩蔵さばの塩漬処理および貯蔵中における脂質劣化と自己消化. Nippon Suisan Gakkaishi, 56(4), 613-618 (1990).

- [12] 畑江敬子,李敬姫,土屋隆英,島田淳子:養殖魚と 天然魚のテクスチャー特性について. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(2), 363-368 (1989).
- [13] Saito T, Arai K, Matsuyoshi M : A new method for estimating the freshness of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 24, 749-750 (1958).
- [14] 小関聡美,北上誠一,加藤登,新井健一:魚介類の 死後硬直と鮮度(K値)の変化.「海―自然と文化」 東海大学紀要海洋学部,4,31-46 (2006).
- [15] 望月聡,前野久美子, 乗田嘉子:首折りによって致 死させたマアジ筋肉の死後変化. Nippon Suisan Gakkaishi, 63(3), 396-399 (1997).
- [16] 望月聡, 佐藤安岐子:マサバおよびマルアジ筋肉の死後変化に対する致死条件の影響. Nippon Suisan Gakkaishi, 62(3), 453-457 (1996).
- [17] 望月聡,上野洋子,佐藤公一,桶田宣英:マサバ筋 肉の死後変化に及ぼす致死後の貯蔵温度の影響. Nippon Suisan Gakkaishi, 65(3), 495-500 (1999).
- [18] Ganeko N, Shoda M, Hirohara I, Bhadra A, Ishida T, Matsuda H, Takamura H, Matoda T : Analysis of volatile flavor compounds of sardine by solid phase microextraction. *Journal of Food Science*, 73(1), S83-88 (2008).



火山灰が河川水の水質に与える影響

Impact of volcanic ash on river water quality

豊島誠也^{1,3)},大場武²⁾,沼波望³⁾

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

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

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

*連絡先:豊島誠也(東海大学先進生命科学研究所)e-mail: <u>toyoshima.seiya.k@tokai.ac.jp</u> *Corresponding author: Seiya Toyoshima (Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

[要旨]

火山噴火により地表に堆積した火山灰が河川水の水質に与える影響を評価するために、鹿児島県の桜島 火山周辺で河川水を採取し、その化学組成を分析した。その結果、主に桜島火山に近接し東方に位置する 河川水に SO4² 濃度が高い傾向が明らかとなった。この傾向は、地表に堆積した火山灰の表面に付着してい た水溶性成分が河川に溶出したことが原因であると推測される。

[Abstract]

In order to evaluate the impact of volcanic ash on the quality of river water, we collected river water around Sakurajima volcano in Kagoshima Prefecture and analyzed its chemical composition. As a result, we found that the $SO_4^{2^-}$ concentration tends to be high mainly in river water located close to and to the east of Sakurajima volcano. This tendency is presumably caused by the deposition of volcanic ash on the ground surface and the elution of water-soluble components attached to the surface of volcanic ash particles.

[Key Words] Volcanic ash, River water, Water soluble components, sulfate

1.はじめに

富士山は噴火のポテンシャルを秘めている活火山で あり,来るべき噴火は,首都圏の生活環境に対する脅 威である。噴火に伴う生活環境への最大の影響は,噴 火により広範にまき散らされる火山灰によりもたらさ れる。噴火により放出される火山灰の堆積は首都圏の 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]。有史の記録では,富士山は9世紀か ら毎世紀当たり,数回の噴火を繰り返してきた。11世 紀から15世紀の間には約350年間の噴火休止期間があ った。富士山の最後の噴火は1707年宝永噴火で,その 際に関東一帯に火山灰が堆積した。宝永噴火から現在 (2025年)まで,すでに318年が経過しており,次の 富士山噴火に備える必要がある[2]。本研究は河川水の 水質に対する火山灰の影響を評価することを目的とす る。首都圏において,殆どの水道水は,河川から取水 し浄水場で浄化されて住民,医療機関,工場等に供給 されている(Fig.1)。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 (Fe, As, Se, Hg, Pb等)が付着している。これらの 成分は殆どが水溶性であり,地表に堆積した火山灰粒 子が降雨を受けると成分は溶出し,河川に流れ込み, 浄水場に混入する(Fig.1)。これらの溶出成分のいく つかは高濃度の場合,人体に有害であり,その影響を 評価する必要がある。本研究では,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で

研究を実施した。本論文では河川水に含まれる陰イオンに注目し、火山灰の影響を調べた。



Fig.1. Schematic diagram of the impact of water-soluble components of volcanic ash on river water quality

2. 方法

2.1. 試料の採取と現場観測

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。Fig.2に採取地点を示す。



Fig. 2. River water sampling locations (P1 \sim P22, black circles). The blue curves indicate the rivers.

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、引き上げることにより河 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。 0.45µm孔径のシリ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。0.45µm 孔径のシリ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。

2.2. 試料水の分析

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 Cl⁻および SO4²の濃度を測定した。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, HCO₃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

Table 1 に試料水の温度, pH, Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃-濃度 を示す。P6は例外的に高い水温(24.2℃)を示した。 P6 を除いた試料の水温の平均値は15.4℃であった。P6 を除いた試料で水温の最低値は12.7℃ (P10) 最高値は 20.5°C (P4) であった。pH の平均値は, 7.2 であった。 最低値は6.7 (P1), 最高値は7.5 (P10) であった。P2, P6, P21 を除く試料の Cl⁻濃度は 0.5mmol/L 以下であっ た。P21 と P2 が、それぞれ 3.94mmol/L、1.04mmol/L と高い濃度を示した。P6 は例外的に高い濃度 (27.1mmo1/L) を示した。P6, P12, P15, P21 を除く 試料の SO₄²濃度は, 0.25 mmol/L 以下であった。P12, P15, P21 はそれぞれ, 0.32, 0.28, 0.32 mmol/L と高 い濃度を示した。P6 は例外的に 1.65 mmol/L と高い濃 度を示した。P4, P6, P8 を除く試料の HCO3 濃度は, 0.75 mmo1/L 以下であった。P4, P6, P8 はそれぞれ, 1.00, 1.24, 0.94 mmol/L と高い濃度を示した。

4. 考察

河川水に含まれる陰イオン成分の形成過程を推定す るために, Fig.3にモルベースのSO4²⁻-H2O-Cl⁻三成分 比を示した。Fig.3には, 桜島火山から放出された火山 灰に付着する水溶性成分 (Ash) [4] と標準的な海水 (SW) [5]のSO4²⁻/Cl⁻モル比が表示されている。



Fig. 3. $SO_4^{2-}-H_2O-C1^-$ ternary diagram (molar basis)

河川水の多くの試料は、S042とH20を結ぶ辺と並行に 分布している。P6, P21, P2 などはこの分布から外れ, 海水の組成に近づくように分布していることから、P6, P21, P2 などの河川水には海水の混入があったと推定さ れる。S042-とH20の辺と並行に分布する試料の組成は、 S04²⁻と C1⁻の濃度がそれぞれ, 0.05, 0.10 (mmo1/L)よ りも低い仮想的な局地天水(LMW)と火山灰付着水溶性 成分 (Ash) の混合により説明され得る。河川水試料に 含まれる SQ42の起源として火山灰付着水溶性成分と海 水が挙げられる。各試料に含まれる SO4-について海水 による寄与を取り除くために以下の操作を行った。す なわち, P10を例にすると, P10とSWを通る直線(L) を描き, S04²⁻-H₂0の辺との交点を求める。Fig.3では この交点は〇で表示されている。この交点の位置に相 当する SO₄²濃度を Cor-SO₄²と定義し Table 1 に記載し た。P10 の場合, SO₄²濃度は, 0.118 (mol/L)であり, Cor-SO42~濃度はこれよりも若干低い 0.095 (mmo1/L)と なった。Cor-SO42をP6とP21以外の試料について求め, Table 1 に示した。P6 と P21 については、海水の混合 の影響が強く、分析値の誤差が拡大して Cor-SO₄²に反 映されるので計算結果は省略した。Cor-SO4²は火山灰 の影響を示す指標と考えられる。Fig.4 に Cor-SO42の 濃度分布を示した。



Fig. 4. Distribution of Cor-SO₄²⁻ concentration

桜島火山に近く東方に位置する河川水に高濃度の Cor−S0₄²が検出された。桜島火山に近いほど火山灰は 厚く堆積していると考えられるので,Fig.4に見られる 分布は火山灰の河川水に対する影響の強度に対応して いると考えられる。しかしながら,高濃度の Cor−S0₄² が検出されているP12に隣接するP11やP13のCor−S0₄² は低濃度であった。このことは、河川水の溶存成分に 対する火山灰の影響は、河川周辺の火山灰の堆積量だ けでは決まらないことを示唆する。たとえば、河川水 の流量などが溶存成分に影響する可能性が考えられる。

5. 結論

本研究では、火山灰による河川水成分に対する影響 を調査するために桜島火山の周辺に位置する22の河川 で河川水を採取し、陰イオン成分について分析した。 その結果、河川水のCI⁻とSO₄²には火山灰から溶出した 成分と、海水の影響が見いだされた。比較的海水の影 響が少ない河川水について、海水に含まれるSO₄²⁻の影 響を取り除いたSO₄²⁻ (Cor-SO₄²⁻) 濃度を推定した。桜 島火山に近く、東方に位置する河川水は高い Cor-SO₄²⁻ 濃度が検出された。桜島火山の周辺地域において、地 表に堆積した火山灰が河川水の成分に影響を与えてい る可能性は高いと推定される。

6. 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,<u>https://www.bousai.go.jp/kazan/</u> <u>kouikikouhaiworking/</u> index.html (2025 年 2 月閲

覧)

[2] 宮地直道 (2007) 過去1万1000 年間の富士火山 の噴火史と噴出率、噴火規模の推移.富士火山.山 梨県環境科学研究所, p79-95

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

[4] 平林順一,野上健治, 撹上勇介,井口正人,味 喜大介 (2008) 桜島火山の活動と火山ガス組成およ び土壌からの二酸化炭素ガスの拡散放出.第10回桜 島火山の集中総合観測 p149-163. 京都大学防災研究 所附属火山活動研究センター [5] 松尾禎士 (1989) 地球化学. 講談社サイエンテ ィフィック, p240-241

7. 謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP23K04350 の助成を受けました。ここに記して感謝いたします。

Table 1. River water samples along the shore of Kagoshima bay

Sample	Date	Temp.	рН	Cl⁻	SO4 ²⁻	HCO3-	Cor-SO42-
	yy/mm/dd	°C		mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L
p-1	2024/3/27	18.5	6.7	0.175	0.068	0.620	0.059
p-2	2024/3/27	16.8	7.0	1.039	0.106	0.440	0.053
p-3	2024/3/27	18.5	7.1	0.173	0.081	0.480	0.072
p-4	2024/3/27	20.5	7.1	0.205	0.121	1.000	0.110
p-5	2024/3/27	18.7	7.2	0.301	0.210	0.720	0.194
р-6	2024/3/27	24.2	6.8	27.097	1.652	1.240	
p-7	2024/3/27	16.3	7.5	0.129	0.080	0.640	0.073
p-8	2024/3/27	15.5	7.4	0.199	0.103	0.940	0.093
p-9	2024/3/28	12.9	7.2	0.136	0.123	0.680	0.116
p-10	2024/3/28	12.7	7.5	0.456	0.118	0.640	0.095
p-11	2024/3/28	12.9	7.4	0.120	0.104	0.320	0.098
p-12	2024/3/28	13.2	7.5	0.129	0.324	0.560	0.317
p-13	2024/3/28	12.8	7.2	0.112	0.104	0.240	0.098
p-14	2024/3/28	13.1	7.1	0.127	0.130	0.240	0.124
p-15	2024/3/28	15.5	7.3	0.235	0.281	0.400	0.269
p-16	2024/3/28	14.7	7.2	0.165	0.199	0.360	0.191
p-17	2024/3/28	14.6	7.1	0.145	0.152	0.320	0.145
p-18	2024/3/28	14.0	6.8	0.188	0.091	0.200	0.081
p-19	2024/3/28	14.9	7.2	0.165	0.123	0.320	0.114
p-20	2024/3/28	14.9	7.0	0.180	0.108	0.320	0.098
p-21	2024/3/28	15.8	7.1	3.945	0.321	0.320	
p-22	2024/3/28	16.2	7.3	0.273	0.082	0.640	0.068



味覚制御を指向した生体適合性ナノ薄膜の創製と物性

Fabrication and Characterization of Biocompatible Nanosheets for Taste Control

谷神 絃太¹, 芝 燿汰¹, 平口 和真², 小口 真一^{3,4,5}, 伊藤 建^{3,5}, 樋口 昌史^{1,2,4,5}, 岡村 陽介^{1,2,4,5}* ¹東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻,²東海大学工学部応用化学科,³東海大学理学部化学科, 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

> Genta Yagami¹, Yota Shiba¹, Kazuma Hiraguchi², Shinichi Koguchi^{3,4,5}, Takeru Ito^{3,5}, Masashi Higuchi^{1,2,4,5} and Yosuke Okamura^{1,2,4,5}*

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

[要旨]

本研究では、生体適合性を有するポリ-L-乳酸(PLLA)からなるナノ薄膜を創製し、苦味の味覚制御バリ ア層として機能するか否かを検証した。その結果、適度な接着性を有しかつ破断しにくい160-340 nm 程度 の膜厚を有する PLLA ナノ薄膜は、苦味分子モデルのキニーネの透過を抑制できることを実証した。また、 接着性の低い厚めの PLLA ナノ薄膜であっても、ポリ酢酸ビニルを付与した2層構造に設計することでそ の接着性を向上でき、キニーネの透過を抑制できる仕組みを実証した。

[Abstract]

In this study, we propose a freestanding biocompatible nanosheet composed of poly(L-lactic acid) (PLLA) and investigate whether it acts as a barrier layer for a taste control (bitterness). The obtained PLLA nanosheets with a thickness of 160-340 nm can inhibit the penetration of quinine as a bitter-taste model. In addition, even a thicker PLLA nanosheet with low adhesiveness can be designed as a two-layer structure with a poly(vinyl acetate) to improve its adhesiveness and inhibit quinine permeation.

[Key Words] Polymer nanosheet, Taste control, Barrier layer, Quinine

1. はじめに

味覚は、経口摂取した食物に応じて味を認識する化 学感覚であり、栄養素の認知や危険性の察知を担う重 要な生命機能である。例えば、塩味・甘味・旨味は好 んで摂取する傾向にある反面、苦味や酸味は毒や腐敗 など有害なシグナルとして認識される。従って、乳幼 児が苦味や酸味の強いものを口にした時、吐き出して しまうのは自己防衛本能による極めて自然な行為であ ると理解できる。そのため、味覚に敏感な乳幼児は苦 味の強い薬剤の服用が困難¹¹であり、それを緩和する用 法があれば、正確な用量を投薬できる可能性がある。

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^[24]。興味 深いことに、100 nm 程度の膜厚にすると、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 ず物理吸着のみで種々の生体界面に貼付できる他、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、舌に貼付することを想定した生体適合 性を有するポリ-L-乳酸(PLLA)からなるナノ薄膜を創 製し、苦味の味覚制御バリア層として機能するか否か を検証する。また、PLLA ナノ薄膜の組織接着性を向 上するための試みも紹介する。ここでは、苦味分子の 標準モデルとして、抗マラリア薬であるキニーネを選 定した。

2. 結果の概要

1) PLLA ナノ薄膜の創製

SiO₂ 基板 (20×20 mm²) 上にポリビニルアルコール (PVA) 水溶液 (10 mg/mL) をスピンコート (4,000 pm, 20 s) し犠牲層とした。次いで、PLLA (10-50 mg/mL) 溶液をスピンコート (4,000 pm, 20 s)し、PLLA ナノ薄 膜を成膜した。得られた基板を純水中に浸漬させたと ころ、犠牲層である PVA が瞬時に溶解し、基板の形状 を維持した状態で自己支持性のある PLLA ナノ薄膜が 得られた (図 1A)。この時、ナノ薄膜の膜厚は、スピ ンコート時の PLLA の溶液濃度で任意に制御できるこ とも確認した (図 1B)。また、得られたナノ薄膜は肌 などの生体界面に貼付することも可能であり、透明で 目立たず装着感すらないことも特筆すべき点である。



図 1 (A) 水面に浮かぶ自己支持性 PLLA ナノ薄膜の写真. (B) PLLA ナノ薄膜の膜厚と PLLA 溶液濃度の関係 (N=9, Mean ± S.D).

2) PLLAナノ薄膜のキニーネ透過試験

キニーネ塩酸塩二水和物 (富士フィルム和光純薬社 製)を苦味分子モデルとし、PLLA ナノ薄膜の苦味分 子の透過抑制能を評価した。まず、多孔質ポリカーボ ネートメンブレン (Transwell[®], ポアサイズ: 8 μ mφ) に、 1)で調製した膜厚の異なる PLLA ナノ薄膜 (膜厚: 68-644 nm)を貼付した (図 2A)。得られた Transwell[®]を純 水 (1 mL) で満たした 24 ウェルプレートにセットし、 キニーネ水溶液 (3 mM, 300 μ L)を Transwell[®]内部に滴 下、恒温槽内 (37 °C) に静置した。その後、経時的 (0-30 min) に外水相を採取 (50 μ L)し、石英製 96 ウェルプ レートに添加し、マイクロプレートリーダ (SH-9000Lab, コロナ電気社製) にての吸光度 (キニーネの最大吸収 波長: λ_{max} 235 nm)を測定した。この時、ナノ薄膜を貼 付しない群を放出率 100%と設定し、予め作成した検量 線に外挿して放出率を算出した。



図 2 (A) Transwell[®]を用いた PLLA ナノ薄膜のキニーネ透過試験の模式図. (B) 異なる膜厚の PLLA ナノ薄膜に対するキニーネの透過率. (〇) 膜厚: *ca*. 68 nm, (△) 膜厚: *ca*. 166 nm, (□) 膜厚: *ca*. 342 nm, (◇) 膜厚: *ca*. 533 nm, (×) 膜厚: *ca*. 644 nm (N = 5-6, Mean ± S.E).

得られた結果を図2Bに示す。膜厚68 nmのナノ薄膜の場合、10分経過後からキニーネの透過率が上昇した (図2B○)。これは、ナノ薄膜の薄さゆえの強度不足

により、外水相を採取する際にナノ薄膜が破断したた めと考えられる。166 nm, 342 nm の膜厚を有するナノ 薄膜では、30 分経過後もキニーネの透過を完全に抑制 した(図 2B \triangle , □)。これは、膜厚の上昇によりナノ 薄膜の強度が向上し破断せずに保たれたことに加えて、 親水性のキニーネは疎水性の PLLA ナノ薄膜を透過で きず、バリア層として機能したためと考えられる。し かし、533 nm 以上のナノ薄膜では、キニーネは確実に 透過していた(図 2B \diamond , ×)。ナノ薄膜が厚くなればそ の強度はより向上するため破断しにくいはずである。 今回、ナノ薄膜を物理吸着で Transwell[®]に貼付している が、厚くなりすぎたためにナノ薄膜特有の接着性が低 下し、その隙間から漏出したためと考えられる。



図 3 (A) ナノ薄膜用スクラッチ試験機を用いた接着性評価の 概略図. (B) PLLA ナノ薄膜表面をスクラッチした写真. (C) PLLA ナノ薄膜の膜厚と接着強度の関係 (N=3, Mean±S.D).

そこで、ナノ薄膜の膜厚と接着性の関係を検証すべ く、ナノ薄膜用スクラッチ試験機を用いて、PLLA ナ ノ薄膜の接着強度を測定した(図 3A)。具体的には、 PLLA ナノ薄膜を SiO₂基板に貼付後、スクラッチ試験 機 (ダイヤモンド圧子の曲率半径: 25 µm, スクラッチ 速度: 10 µm/s, 振幅: 50 µm, 印加荷重速度: 0.25 mN/s, 測定時間: 60 s) にて臨界剥離荷重値を測定した(図3B)。 この時、測定した荷重値を PLA ナノ薄膜の膜厚で補 正して接着強度を算出した。PLLA ナノ薄膜の膜厚が 500 nm 以上の場合、接着強度は 0.18±0.01×10⁵ N/m と 低値を示した(図3C)。しかし、350 nm 程度の膜厚か ら徐々に接着強度は上昇し始め(0.35±0.03×10⁵ N/m)、 さらなる膜厚の低下とともに接着強度は顕著に増大し た(膜厚 *ca*. 60 nm の接着強度: $1.5 \pm 0.15 \times 10^5$ N/m)。 この結果は、500 nm 以上の厚いナノ薄膜の場合、 Transwell[®]との接着性が低下しキニーネが漏出したと いう考察を裏付ける結果である。

以上の結果より、適度な接着性を有しかつ破断しに くい160-340 nm 程度の膜厚を有する PLLA ナノ薄膜は、 キニーネの透過を抑制できることを実証した。これは、 舌にナノ薄膜を貼付した際、苦味を感知させないバリ ア層として機能することが期待できる成果である。

3) PLLAナノ薄膜の組織接着性の向上

2)の試験により、膜厚が 500 nm 以上の PLLA ナノ薄 膜は、界面接着性が低下することが分かった。しかし、 厚い薄膜のほうが薬剤の拡散距離が長くなるため、キ ニーネの透過抑制能は高くなることが期待できる。そ こで、厚い PLLA ナノ薄膜に組織接着層を付与した 2 層構造のナノ薄膜の調製法を検討した。ここでは、組 織接着層として、チューインガムベースに用いられる ポリ酢酸ビニル (PVAc) に着目した。PVAc のガラス 転移温度 (T_g) は約 30 °C である。この T_g に起因して、 ガムは室温で硬く、口の中(体温付近)で軟化してべ たつく性質が発現する。

具体的な調製法を以下に示す。まず、SiO₂ 基板(20× 20 mm²) 上に PVA 水溶液(10 mg/mL)をスピンコー ト(4,000 rpm, 20 s)し犠牲層とした。次いで、PLLA 溶液(40,50 mg/mL)をスピンコート(4,000 rpm, 20 s) し、PLLA ナノ薄膜を成膜した。さらに、PVAc(60 mg/mL)溶液を滴下後、スピンコート(4,000 rpm, 20 s) することで PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜を調製した。得ら れた基板を純水中に浸漬させたところ、犠牲層である PVA が瞬時に溶解し、基板の形状を維持した状態で自 己支持性のある PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜(40 mg/mL PLLA/60 mg/mL PVAc の膜厚: 801 ± 18 nm, 50 mg/mL PLLA/60 mg/mL PVAc の膜厚: 1099 ± 23 nm)が得られ た。



図 4(A) Transwell[®]を用いたPLLA-PVAc 複合ナノ薄膜のキニー ネ透過試験の模式図. (B) PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜 (40 mg/mL PLLA/60 mg/mL PVAc) に対するキニーネの透過率 (\diamond : PLLA ナノ薄膜のみ,図 2 (\diamond)と同じ、 \bigstar : PLLA 側から貼付した PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜, \bigoplus : PVAc 側から貼付した PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜 (C) PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜 (50 mg/mL PLLA/60 mg/mL PVAc) に対するキニーネの透過率 (\diamond : PLLA ナノ薄膜のみ,図2 (×)と同じ、 \bigstar : PLLA 側から貼付した PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜, \bigoplus : PVAc 側から貼付した PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜, \bigoplus : PLLA 側から貼付した PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜, (N=5-6, Mean±SE).

2)と同様の方法に従い、PLLA-PVAc ナノ薄膜を Transwell[®]に貼付した(図 4A)。この時、Transwell[®]に 対してPLLA側(図 4A (ii))あるいはPVAc側(図 4A (iii)) から貼付した群でキニーネの放出率を検証した。また、 PLLAナノ薄膜のみの群(図 4A (i))を比較対照とした。 図 4B に PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜 (40 mg/mL PLLA/60 mg/mL PVAc の膜厚: 801 ± 18 nm)のキニーネ放出率の結果を示す。Transwell[®]に対して PLLA 側から貼付した場合、PLLA ナノ薄膜のみの群(図 4B \diamond)と比較してキニーネの透過は抑制されたものの、完全抑制には至らなかった(図 4B \blacktriangle)。これは、PVAc 層の付与により膜厚が増加したため透過を抑制する傾向はみられたものの、PLLA 自体に接着性はなく、Transwell[®]との隙間から漏出したためと考えられる。

そこで、Transwell[®]に対して PVAc 側から貼付したと ころ、30 分経過後もキニーネの透過を完全に抑制した (図 4B \bullet)。これは、恒温槽内(37 °C)で PVAc 層が 軟化して Transwell[®]に密着したためと考えられる。さら に、より分厚くなった PLLA-PVAc 複合ナノ薄膜(50 mg/mL PLLA/60 mg/mL PVAc の膜厚: 1099±23 nm)で も同様の効果を示した(図 4C)。

以上、接着性の低い厚めのPLLAナノ薄膜であって も、PVAcを付与した2層構造に設計することでその 接着性を向上でき、キニーネの透過を抑制できる仕組 みを実証した。

3. 展望

本研究では、舌に貼付することを想定した生体適合 性を有する PLLA からなるナノ薄膜を創製し、苦味の 味覚制御バリア層として機能するか否かを検証するこ とを目的とした。その結果、適度な接着性を有しかつ 破断しにくい 160-340 nm 程度の膜厚を有する PLLA ナ ノ薄膜は、苦味分子モデルのキニーネの透過を抑制で きることを実証した。また、接着性の低い厚めの PLLA ナノ薄膜であっても、PVAc を付与した 2 層構造に設 計することでその接着性を向上でき、キニーネの透過 を抑制できる仕組みを実証した。これらの成果は、舌 にナノ薄膜を貼付した際、苦味を感知させないバリア 層として機能することが期待できる。

4. 引用文献

[1] 志村 二三夫 他. 解剖生理学 人体の構造と機能, 羊土社, pp. 209 - 210 (2014).

[2] Y. Okamura et al. Adv. Mater. 21, 4388 (2009).

[3] Y. Okamura et al. Adv. Mater. 25, 545 (2013).

[4] T. Komachi *et al. J. Biomed. Mater. Res. B* 105, 1747 (2017).

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。記して謝意を表する。



細胞質で想定されるセレノグルタチオンのリサイクル機構とその意義の解析

Analysis of the recycling mechanism of selenoglutathione assumed in the cytoplasm and its significance

金森 審子1,2) 東海大学工学部生物工学科¹⁾,東海大学先進生命科学研究所·医薬総合研究部門²⁾ Akiko Kanamori^{1,2)} ¹⁾Department of Bioengineering, School of Engineering, Tokai University ²⁾Division of Medicines and Drug Discovery, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

細胞質は、還元型グルタチオン(GSH)が高濃度で維持された還元環境下にある。我々は先に、酸化型セレノグル タチオン(GSeSeG)を細胞に添加した場合、細胞質でグルタチオン還元酵素の作用と GSH の非酵素的反応を受けて還 元型(GSeH)が生成される機構を発見した。同機構はGSeH のリサイクル機構として機能している。今回、細胞質での GSeH のリサイクル機構がメチルグリオキサールの濃度低下に非常に大きく貢献する可能性が示唆された。GSeH リサ イクルは、他の酸化ストレス原因分子の無毒化にも有効と考えられる。

[Abstract]

The cytoplasm is in a reducing environment in which a high concentration of reduced glutathione (GSH) is maintained. We previously discovered the mechanism by which the reduced form (GSeH) is generated in the cytoplasm by the action of glutathione reductase and the non-enzymatic reaction of GSH when oxidized selenoglutathione (GSeSeG) is added to cells. The system functions as a recycling mechanism for GSeH. In this study, it was suggested that the mechanism of GSeH recycling in the cytoplasm may contribute significantly to the reduction of methylglyoxal concentrations. GSeH recycling may also be effective in detoxifying other oxidative stress-causing molecules.

[Key Words]

glutathione, selenoglutathione, non-enzymatic reaction, cytoplasm, recycle system

1. はじめに

細胞は日常的に酸化ストレスを受けており、原因物 質の無毒化や有害物質の解毒によってダメージを回避 している。グルタチオンは、細胞の生存に不可欠な抗 酸化分子であり、酸化ストレスの軽減や解毒作用に寄 与している(表1)。還元型(GSH)と酸化型二量体

(GSSG) として存在し、その比率は常に調整されて いる。細胞質では通常 GSH と GSSG の比率が 100:1 と言われ、0.5~10 mM という高濃度の GSH が存在す る還元環境下にある。しかしながら、老化による生成 量の低下や高い酸化ストレスが原因で GSH が不足す る場合がある。

GSH はグルタミン酸 (L-Glu)、システイン(L-Cys)、 グリシン (Gly)から成るトリペプチドである。我々は GSH の抗酸化力を高める目的で、GSH の L-Cys をセ

表1	還元型グルタチオン(GSH)の機能

GSHの機能	酸化ストレスの 軽減	糖化・カルボニル ストレスの軽減	有害物質の解毒
関与する酵素	GPx (glutathione peroxidase)	GLO1 (glyoxalase 1)	GST (glutathione S- transferase)
無毒化する対象	過酸化水素 (H ₂ O ₂) 脂質ヒドロペル オキシド	メチルグリオキ サール(MG)	1-クロロ-2,4- ジニトロベンゼン (CDNB)等

レノシステイン(L-Sec)に置換したセレノグルタチオン の利用を発案した。セレノグルタチオンは、還元型 (GSeH)が高い反応性を有する一方、酸化型二量体 (GSeSeG)は非常に安定な化合物であり、自然界には存 在しないが、GSSG から GSH を生成させるグルタチ オンレダクターゼ (GR) によって GSeSeG から GSeH が生成されることが報告されている[1,2]。すなわち、 細胞に GSeSeG を添加した場合、細胞質で GR の作用

を受けて GSeH が生成されると考えられる。生体内の 中性付近の pH では GSeH は GSH よりも高い還元力 を示すため、GSH よりも高い抗酸化力を発揮すると期 待される。

先行研究では、微量の GSeSeG の添加が細胞の酸化 および糖化ストレス抵抗性を向上させ、生存率が上昇 する結果が得られた[3]。細胞内で生じた GSeH による 効果と考えられる。想定される反応機構を検討したと ころ、GSeH が非酵素的反応によって、迅速に過酸化 水素 (H₂O₂) やメチルグリオキサール (MG)の濃度 低下を促進することが示された。他方、十分量の GSH 共存下では、非酵素的反応によって GSeSeG から GSeH が生成されることを新規に見出した。培地への 1 μ M GSeSeG の添加が 1 mM H₂O₂に対する細胞生 存率を向上させる結果を得ており、細胞質で『GR の 酵素反応+GSH による非酵素的な反応』によって GSeH が非常に効率良くリサイクルされて機能するこ とが示唆された[3] (表 2, 図 1)。

表2 グルタチオンとセレノグルタチオンの反応性

分子種	無毒化対象物質の 濃度低下	酸化型二量体から 還元型単量体生成に 至る経路
グルタチオン(GSH) γ-Glu-Cys-Gly	GPx, GLO1, GST等の 酵素作用が必要であり、 非酵素的反応の進行 は緩慢である	グルタチオンレダク ターゼ(GR) による酵 素反応
セレノグルタチオン (GSeH) γ -Glu- <mark>Sec</mark> -Gly	迅速な非酵素的反応 が進行する	GRによる酵素反応と 共存するGSHによる 非酵素的反応



図1 細胞質で想定される GSeH のリサイクル経路 ① GR による酵素反応 (→) と共存する十分量の GSH による非酵素 的反応 (→)の両経路によって、細胞に取り込まれた GSeSeG から 繰り返し GSeH が生成されると考えられる。

今回、細胞質でのGSeHリサイクル機構とその意義 をさらに解明するため、MG 濃度低下に対するGSeH の効果をGSH 共存下と非共存下で比較・検討した。

2. 結果の概要

【方法・結果】MG は、糖化ストレスの原因物質である AGEs (Advanced Glycation End-products, 終末糖 化産物)の前駆体であると共に、様々な機能性分子を 変性・失活させるカルボニルストレスをもたらすこと



図2 グリオキサラーゼシステム (A) GSH による MG の無毒化経路 (B) GSeH を用いた場合に想定される MG の無毒化経路

でも知られる。元来、細胞に存在する MG の無毒化経 路として、グリオキサラーゼシステムがあげられる。 この経路では、グリオキサラーゼ1(GLO1)により GSH が MG に結合し、反応中間体として S-D-ラクト イルグルタチオン(SLG)が生成される。SLG はグリオ キサラーゼ2(GLO2)の作用を受けて加水分解されて 乳酸となるとともに GSH が再生されて繰り返し利用 される(図2(A))。反応は、GSH と MG が非酵素的に 反応してGLO1の基質となるヘミアセタール体が形成 されてスタートする [4,5]。先行研究では、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。GSH と MG の反応は可逆性 に富むため、形成されたヘミチオアセタールは容易に 出発物質に戻るためと考えられる。他方、GLO1 非存 在下で GSeH と MG を反応させた場合は迅速に MG 濃 度が低下し、一定時間を経過後も濃度の上昇は認めら れなかった[3]。したがって、GSeH と MG から形成さ

れると推測されるヘミセレノアセタールは安定であり、 反応は不可逆的であると考えられる(図2(B))。反応生 成物の解析・同定は現在、進行中である。

今回、細胞質で想定される GSeH のリサイクル機構 を再構築したモデル環境下で、GSeH による MG 濃度 低下に GSH の共存が及ぼす影響を以下のように検討 した。すなわち、

- (1) 50~300 µM GSeSeG を GR 処理して生成させた GSeHにGLO1 非存在下で300 µM MG を反応させ、 MG 濃度の経時変化を 0.5 h, 2 h, 5 h, 24h 後に調べ た。その際、反応の GSeSeG 濃度依存性の有無を検 討した。
- (2) 細胞質をモデルとした濃度(2 mM)の GSH の共存 の有無が(1)に与える影響を検討した。

その結果、(1) MG の濃度は GR 処理した GSeSeG の濃 度依存的に迅速に低下し、効果は GR 処理に必要な NADPH が枯渇するまで持続した。(2) GSeSeG の濃度 が 300 µM の場合、2 mM GSH 共存下の方が MG 濃度 低下の初速度が低かった。しかし、NADPH が枯渇す る反応 2 h 後あたりから GSH 共存下の方が非共存下よ りも MG 濃度低下速度が高くなり、反応 24 h 後でも MG 濃度低下効果は緩やかに認められた[6-8] (図3)。





(A) GSH 非共存下、(B) 2 mM GSH 共存下 2 mM GSH 共存下の 300 µM GSSG,反応時間 0 hの MG 濃度を 100 %として示した。

【考察】

細胞質では、GSH が抗酸化反応後に GSSG となった 場合、GR の酵素作用を受けて再度 GSH となり、リサ イクルされて還元環境が維持されている。GSeSeG が細 胞に取り込まれた場合、GSSG と同様に GR の酵素作 用を受けるが、GR の反応性は GSeSeG に対してよりも

東海大学先進生命科学研究所紀要 第9巻 2025年3月

本来の基質である GSSG に対して高い[2]。そのため、 先行研究で認められたような 1 µM GSeSeG の添加が 1 mM H₂O₂ に対する細胞の生存率を向上させるため のリサイクルは、GR の酵素作用のみでは到底不十分 と思われた。さらに、空気と接触している溶液には、 大気中の酸素分子が溶存酸素として溶け込んでいる。 GSeH は、溶存酸素の還元に消費され、水と GSeSeG が生成される。

溶存酸素との反応: 4GSeH + $O_2 \rightarrow 2$ GSeSeG + H_2O したがって、mM オーダーの GSH が存在する細胞質 の還元環境下で GSeSeG から非酵素的反応によって GSeH が生成されるリサイクル機構 (図1)が極めて効 率よく機能していると考えられる。



図4 細胞質で想定される GSeH のリサイクル経路 ② GRによる酵素反応 (→) と共存する十分量の GSHによる非酵素的反応 (→)の両経路によって、GSeSeG から繰り返し GSeH が生成されるが、一 部は GSH と反応して GSeSG となる。 GSeSG が GR の酵素反応を受け て再度 GSeH と GSH が生成されるバイパス経路の存在が想定される。

しかしながら、2 mM GSH の共存の有無が GSeH に よる MG 濃度低下に及ぼす影響を検討した際、GSeSeG の濃度が 300 μ M の場合、GSH 共存下の方が MG 濃度 低下の初速度が低かった(図3)。生成された GSeH の 一部が GSH と反応して GSeSG が生じ、その分 GSeH の濃度が低下したためと考えられる(図4)。GSeSG は GR の酵素作用を受けて GSeH + GSH が生成され ることを確認しており、細胞質の GSeH のリサイクル 経路は当初想定していたもの(図1)よりも複雑であ ることが示唆された。

GSeH は非常に反応性に富むため、必要以上に濃度 が高くなると不要な還元反応が進行し、細胞質内で支 障が生じる可能性がある。そのような懸念に対して、 一旦 GSeSG を生成させて GSeH の濃度を制御し、必 要に応じて GSeH + GSH に戻す、一種のバイパス経路 の存在は有意義であると言える。

ところで、グリオキサラーゼシステムは、GLO1 お よびGLO2の両酵素の作用によりMG1分子が無毒化 されて乳酸となる過程でGSH1分子がリサイクルさ れる反応機構である(図2)。したがって理論上、50 μM

GSeSeG から 100 µM GSeH が生成された場合、1 サ イクルあたり MG 濃度低下は 100 µM (300 µM の 1/3, 33.3 %)と計算される。しかしながら、GLO1 および GLO2 非存在下にもかかわらず、2 mM GSH 共存下 で反応時間 5 h 後に、50 µM GSeSeG 溶液では 300 μMMGの72 %,216μM のMG濃度低下が認められ た(図3)。一方、GSH 非共存下では、同じ反応時間 で 48 %, 144 µM の MG 濃度低下にとどまった。した がって、2 mM GSH の共存によって 24%, 72 µM の MG 濃度低下が増加したことになる。この時、2 mM GSH 共存下で 300 µM GSSG 溶液では生じた MG 濃 度低下は4%、12μMであり、その低下分を2mM GSH による効果として差し引いても、反応時間5h 後 に 50 µM GSeSeG 溶液では GSH 共存下で約 68 %、 204 µM の MG 濃度低下が認められたことになる。そ のため、204 µM と 144 µM の差、60 µM の MG 濃 度低下 が GSH 共存による非酵素的反応で生じた GSeH に由来すると考えられる (図 1.4) が、どちらの 値も計算上の最大値である 100 µM よりも MG 濃度低 下が進んだことを示している。現在、GSeH と MG の 反応生成物の詳細な解析・同定を進めており、新たな 反応系の発見が期待され、MG 濃度低下を含めた酸化 ストレス軽減の効率化への応用が見込まれる。

3.展望

GSeSeG は非常に安定で保存や運搬が容易であるため、GSeH を医薬品として用いる場合のプロドラッグとして細胞に添加、あるいは生体に投与するのに適している。これまで、細胞質で高濃度に維持されている GSH が GSeSeG や GSeH の反応性に及ぼす影響についての考察は十分とは言えなかったが、本研究で得られた成果により、新しい可能性が開けた。

新たに得られた知見を踏まえて、GSeSeGを細胞に取り込ませた場合に進行する反応について

(1) GRとGSH が GSeH の生成・抗酸化作用に及ぼす影響と(I) GSeH の無毒化対象が MG 以外の場合の(I) の効果を解析することにより、GSeH のリサイクル経路の反応機構と意義を詳細に解明し、GSeSeG の医薬品としての活用に応用できると考えられる。

我々は GSeSeG の効率の良い化学合成法を樹立済み である。培養細胞を用いた系と動物実験系によって、 GSeSeG の医薬品としての価値の検証をさらに進めて いく予定である。

- [1] S. Yoshida, K. Arai, M. Iwaoka, *et al., Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 2125-2128 (2011)
- [2] J. Beld et al., Biochemistry, 46, 5382-5390 (2007).
- [3] A. Kanamori, M. Iwaoka, et al., Pharmaceuticals, 17, 1049. https://doi.org/10.3390/ph17081049 (2024)
- [4] R. J. Holewinski and D.J. Creighton, *Bioorg. Med. Chem.* 22, 3301–3308 (2014)
- [5] K.M. Kim, et al., Exp. Cell. Res. 318, 152-159 (2012)
- [6] 金森審子、陳 詩文、江川菜々、山崎須弥子、岩岡 道夫、第97回日本生化学会大会 講演要旨(2024)、 横浜、「還元型セレノグルタチオンの新規な効率的 生成機構が酸化および糖化ストレス原因物質の無 毒化へ及ぼす効果の解析」
- [7] 金森審子、陳 詩文、江川菜々、山崎須弥子、岩岡 道夫、第43回日本糖質学会年会 講演要旨 (2024)、 東京、「還元型セレノグルタチオンの新規生成機構 の解析と糖化ストレス原因物質無毒化への応用」
- [8] 陳 詩文、江川菜々、山崎須弥子、岩岡道夫、金森 審子、第 34 回日本メイラード学会年会講演要旨 (2024)、仙台、「還元型セレノグルタチオンの酵素 的および非酵素的生成機構を活用したメチルグリ オキサールの無毒化反応の調節」

5.謝辞

共同研究者の理学部化学科の岩岡 道夫先生、研究室の 学生の皆さん、機器分析にご協力いただいた東海大学・ 技術共同管理室皆さん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所助成金を受け て実施したものです。

4.引用文献



NOG-hIL-4-Tg マウスへの腫瘍生着とプロゲステロン感受性の関連性解析

Analysis of the progesterone sensitivity of cancer cell lines and the engraftment ability to NOG-hIL-4-Tg mouse.

星野優希¹,大島志乃¹,山田壮我¹,尾上潮音¹,三川ヒメリ¹,津田万里²,安田敦³,伊藤亮治⁴,亀谷美恵^{1,2,5},椎名隆^{1,5} ¹東海大学医学部基礎医学系分子生命科学領域,²東海大学医学部専門診療学系緩和医療科学 ³東海大学医学部内科学系腎内分泌代謝内科,⁴公益財団法人実中研

⁵東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門

Yuki Hoshino¹, Shino Oshima¹, Soga Yamada¹, Shion Onoue¹, Himeri Mikawa¹, Banri Tsuda², Atsushi Yasuda³, Ryoji Ito⁴, Yoshie Kametani^{1,2,5}, Takashi Shiina^{1,5}

¹Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine,

² Department of Palliative Medicine, Tokai University School of Medicine

³Department of Internal Medicine, Division of Nephrology, Endocrinology, and Metabolism, Tokai University School of Medicine, ⁴Central Institute for Experimental Medicine and Life Science

⁵Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University,

[要旨]

我々は、抗がん作用評価法確立を目的とし、ヒト化マウスを用いた担がんマウスモデルの作製を試みている。本研究において、各種生殖系腫瘍細胞株をマウスに移植し腫瘍径の継時的測定を行ったところ、前立腺がん株である LNCap のみ生着しなかった。そこで女性ホルモンのプロゲステロン (P4)存在下で様々な細胞株を培養した結果、LNCap は低濃度のP4 であっても増殖が抑制された。P4 は種々のステロイドホルモン前駆体であるため、LNCap の生着不全は、これらのホルモン感受性と関連する可能性が示唆された。

[Abstract]

To establish an evaluation method of *in vivo* anti-cancer effect in the human immune environment, we are creating tumor-bearing mouse models using NOG-hIL-4-Tg mice, a second generation immune-deficient mouse strain. In this study, we transplanted various tumor cell lines derived from reproductive organs into NOG-hIL-4-Tg mice subcutaneously, and measured the tumor diameter over time. As a result, all the cell lines except LNcap, a prostate cancer cell line, developed a tumor mass within 4 weeks after the transplantation. Therefore, we cultured these cell lines in the presence of the steroid hormone progesterone (P4), because P4 is a precursor of various sex hormones. LNCap did not proliferate in the presence of 2 μ M P4, while the growth of other cell lines was maintained up to the 20 μ M P4. Collectively, the cancer cell lines survived in the NOG-hIL-4-Tg, suggesting that the mouse is useful as the tumor-bearing mouse model, while LNCap implantation needs some improvement of transplantation protocol.

[Key Words] プロゲステロン、腫瘍細胞株、NOG-hIL-4-Tg、生着能、ホルモン感受性

1.はじめに

乳がん、前立腺がん、卵巣がんなど、生殖関連臓 がん 器のがんには、ステロイド感受性がんと非感受性の され 東海大学先進生命科学研究所紀要 第9巻 2025年3月

がんが存在する。ステロイドホルモン感受性のがん は、抗がん剤としてアンタゴニストを用いることで がんの制御が可能となり、予後が良い傾向があると されているが、副作用の問題や、完治が見込めない などの問題がある[1]。一方、非感受性のがんには、 抗がん剤耐性の高い、高悪性度のがんが多い。我々 は、これら生殖関連臓器の腫瘍に対する抗がん剤開 発のために、担がんヒト化マウスモデルの作製を目 指している[2]。

我々は、NOG-hIL-4-Tg という、ヒト末梢血単核 球(PBMC)を移植することによってヒトT細胞の みならずB細胞を効率よく生着させるマウスを開発 した [3]。そして、このマウスにトリプルネガティ ブ乳がんの細胞株を移植する担癌ヒト化マウスを作 製し、様々な抗体製剤に対する反応性をマウスで確 認することに成功した [4]。そこで、同様の方法で、 様々な生殖器関連腫瘍を移植し、抗がん剤の効能を 調べる系の確立を目指すこととした。

そのため、これら生殖器関連腫瘍株をマウスに移 植し、経時的に腫瘍径を測定して生着能を確認する こと、*in vitro* でステロイドホルモン感受性を計測 し、両者に関連性があるかを明らかにすることを目 的とした。

2.方法

4) NOG-IL-4Tg マウスのタイピング

本研究では、樹立された NOG-hIL-4-Tg 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 レーター及び IVC で繁殖及び飼育した。出生6週後 に PCR 及び ELISA にてヒト IL-4 のタイピングを 行い、その中の血漿中ヒト IL-4 濃度 100 pg/ml 以上 のマウスを実験に使用した。

5) 腫瘍細胞株移植及び腫瘍径測定

樹立されたNOG-hIL-4-Tgを7週齢になるまで飼 育し前立腺がん株 (PC3, LNCap)、卵巣明細胞がん 株 (ES2,RMG-1, HUOCA),乳がん細胞株 (MDA-MB231)を2×10⁶cells/head右背側部に移植 し移植から1週間後右背側部に目視で腫瘍が確認出 来たマウスから2日おきに腫瘍径の計測を行った。 マウスを逆手で保定し、利き手にノギスを持ってマ ウスの身体に対して垂直方向と平行方向で腫瘍の端 から端を軽く当てるように計測した。腫瘍体積は、 長径 x 短径 x 短径 x 1/2 で、求めた。計測結果を 統計処理にて腫瘍増大曲線を作成してマウスへの生 着を比較した。 腫瘍細胞株移植から ES2, PC3 は Day28、RMG-1 および HUOCA は Day35、MDA-MB231 および LNCap は Day42 でそれぞれ解剖を行い、臓器を摘 出した。プロピレングリコールで 20%に希釈したイ ソフルランで麻酔をかけ、開胸して心採血を行った。 その後に腫瘍、肺、肝臓、脾臓を摘出した。腫瘍は 摘出した状態のまま、肺は葉ごとに分け、肝臓はカ ミソリを用いて左側左葉を 5 mm ほどにカットし、 脾臓は切り取った状態のままマイルドホルム(マイ ルドホルム[®] 10N 10% Formalin Natural Buffer Solution, Deodorized 133-10311)に室温で一晩固 定し、東海大学医学部生命科学統合支援センターに てパラフィン包埋、薄切 (2.25~2.5 µm)、HE 染色 を行った。

7) 培地作製

RPMI1640 Medium (Nissui Co. Tokyo, Japan)、 Hams F12 (HyClone)、DMEM High Glucose (FUJIFILM Wako, Chemikal Co. Osaka, Japan)、 DMEM Low Glucose (FUJIFILM Wako Chemikal Co.)、および Leibovitzs L-15 Medium (FUJIFILM Wako Chemikal Co.) に Fetal bovine serum (FBS) (Sigma Aldrich, Missouri,USA) を最 終濃度 10%となるように添加した。また、ペニシリ ンGカリウム (Meiji Seika, Tokyo, Japan) を最終 濃度 100 unit/ml となるように添加し、さらに硫酸 ストレプトマイシン (Meiji Seika) を最終濃度 0.1 mg/ml となるように添加した。

8) 腫瘍細胞の培養

前立腺がん株 (PC3, LNCap)、絨毛がん株 (JEG3,BeWo)、卵巣明細胞がん株 (RMG-1,HUOCA)、乳がん株 (MDA-MB231) およ びミエローマ株 (Karpus707H)、腎臓細胞株 (HEK293)の9種類を用いた。LNCap および Karpus707H は RPMI1640 培地、PC3、 BeWo,RMG-1 および HUOCA は Hams F12 培地、 HEK293 は DMEM High Glucose 培地、JEG3 は DMEM Low Glucose 培地、MDA-MB231 は Leibovitzs L-15 Medium 培地を用い、 2.5×10^4 cells/well で 6 well plate に播種し Progesterone Water Soluble (SIGMA Lot#SLCF8995)を 0 μ M、 2μ M、 20 μ M あるいは 200 μ M 添加した後、37°C、 5% CO₂存在下で培養し、継時的に細胞数を計測し た。

6) 臓器摘出

3.結果

1) 腫瘍体積の比較

図1に示す通り、移植した腫瘍株のうちLNCap 以外の株は6週までに全て生着が確認された。ES2、 PC3 および HUOCA は長径が20 mm 以上となり、 腫瘍増大が顕著に現れた為、早期解剖を行った。 RMG-1,MDA-MB231 は腫瘍径が20 mm 未満であ ったが、RMG-1 はマウスの状態悪化により5週で 安楽死させた。LNCap は6週まで全く生着が確認 出来なかった。

これらの腫瘍組織をHE染色し、構造を確認した ところ、すべての細胞株で、腫瘍細胞が凝集し腫瘍 の増殖とともに内部の壊死が観察された。特に ES2,PC3では顕著であった(図2)。



図 1. NOG-hIL-4-Tg に移植した腫瘍細胞株の腫瘍増大曲線

縦軸:腫瘍体積 (mm3), 横軸:腫瘍計測期間 (週数), 各 腫瘍については、ピンク:ES2, 茶色:RMG-1, 青: MDA-MB231(2), 緑:PC3, 赤:LNCap, 黄:HUOCA である。

2) 腫瘍細胞株に対する P4 の増殖抑制効果

LNCapのNOG-hIL-4-Tgへの生着が確認できな かったため、体内ステロイド環境が関連する可能性 を考えた。ステロイドホルモンとしては、エストロ ゲン、プロゲステロン (P4) などの女性ホルモンが 拮抗作用を誘導すると考えられるが、すべてのステ ロイドホルモンの前駆体である P4 を用い、*in vitro* で感受性の評価を行った。腫瘍細胞株を 2.5 × 10⁴ cells/well で播種し 0 μ M、2 μ M、20 μ M および 200 μ M の P4 存在下で培養すると、図 3 に示すように、 LNCap では 2 μ M ですでに有意な増殖抑制効果が 見られ、20 μ M ではほとんど増殖しなかった。

一方、他の全ての細胞株では、2 μM の P4 濃度 で P4 の効果がほとんど検出されなかったが、妊娠 東海大学先進生命科学研究所紀要 第9巻 2025 年 3 月

時の胎盤における生理的濃度の約 10 倍である 200 µM 存在下では有意な増殖抑制効果が見られた。非 生殖系腫瘍株である Karpus707H や腎細胞株であ る HEK293 でも同様の結果が示され、生殖系細胞 株に限らず高濃度では P4 による増殖抑制効果があ ることが明らかとなった。



図 2. NOG-hIL-4-Tg に生着した代表的な腫瘍塊の染色像 A: ES2, B: HUOCA, C: MDA-MB231, D: PC3, E: RMG-1。倍率 x4, HE 染色。

3.考察

本研究により、NOG-hIL-4-Tgマウスにはさまざ まな生殖関連臓器由来の癌細胞株が生着することが 明らかになった。これにより、このマウスがこれら のがん腫のヒト免疫系再構築モデルとして有用であ る可能性が示された。

一方、我々が *in vitro*において前立腺癌の PC3 及 びLNCap を各種濃度の P4 存在下で培養した結果、 PC3 では 200 µM の P4 存在下で増殖抑制が見られ たが LNCap では 2 µM 存在下でほとんど増殖が抑 制された。*in vivo*では PC3 はマウス皮下に生着し て増殖したが、LNCap は生着せず、増殖しなかっ た。前立腺がんの多くは、男性ホルモン (アンドロ ゲン) であるテストステロン産生量に関連している [5]。また、前立腺がん細胞株の中でも PC3 より LNCap の方がアンドロゲン受容体を高発現し、ア ンドロゲン感受性が高い傾向にある[6]。ホルモン感 受性が高い LNCap はプロゲステロンや、これから 派生する他のエストロゲン・テストステロンなどの



図3 腫瘍細胞株に対する P4 の増殖抑制効果

各腫瘍細胞株は 0~200 μM 濃度のプロゲステロン存在下で培養し、経時的に細胞数を計測した。黒実線:コントロール、灰色実線:2μM P4, 黒破線:20μM P4, 灰色破線:200μM P4。横軸は日数を示す。

性ホルモンに対して感受性が高く、増殖、生着しな かったと考えられる。

過去にはLNCapについては*in vivo*の研究も報告 されているが[7]、この細胞株は現在において*in vivo* でほとんど用いられないことから、NOG-hIL-4-Tg のような重度免疫不全マウスでも生着が困難であり、 他の免疫不全マウスでも同様のことことが予想され る。そのため、LNCap のような腫瘍に関しては、 他の腫瘍株とは異なる*in vivo*の系を立ち上げる必 要があると考えられる。

また、このような生着能の差が、どのような分子 機構によるのかを明らかにすることが、今後の課題 である。

4.引用文献

A. Boye et al., *Biomed Pharmacother*, 180:117473
 (2024)

[2] Y. Kametani, et al., *Front Mol Biosci*, **11**, 1447315 (2024).

[3] Y.Kametani et al., *PLos One*, **12**, e0179239 (2017)

[4] Y. Kametani, et al., *Front Immunol*, **14**, 1173728 (2023).

[5] C.P. Chuu et al., *J Biomed Sci*, **18**:63 (2011)

[6] X.B. Shi et al., *Prostate*, **60**: 257-271 (2004)

[7] H.E. Zhau et al., *Cancer*, 88(12 Suppl):2995-3001(2000)

5.謝辞

本研究を行うにあたり、マウスタイピングやフロー 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 学統合支援室の皆様に感謝いたします。