

先進生命科学研究所紀要

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

2021 Vol.6



東海大学

先進生命科学研究所

Institute of Advanced Biosciences

Tokai University

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

(Japanese)

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

(English)

東海大学先進生命科学研究紀要

Vol.6 2021

目次

医薬総合研究部門

「Podoplanin と CLEC-2 との相互作用の阻害に基づく抗血栓薬の開発」

渡邊 伸央^{1,2)}、篠崎 よし子³⁾、荻原 早苗³⁾、鈴木 裕祐³⁾、城所 正子^{1,2)}、
平山 令明²⁾、猪口 貞樹^{1,2)}

(¹⁾東海大学医学部救命救急医学、²⁾東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門、³⁾東海大学生命科学統合支援センター)

..... 1

「 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼによる分解に抵抗性を有するグルタチオン誘導体のデザインとその反応性の解析」

金森審子^{1,2)}

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

..... 6

「ヒト免疫環境を構築した NOG 及び NOG-hIL-4-Tg マウス脾臓におけるヒト白血球局在の比較解析」

片野 風^{1,2,3)}、亀谷美恵^{1,3)}

(¹⁾東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、²⁾東京バイオテクノロジー専門学校、
³⁾東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門)

..... 10

「妊娠免疫とがん免疫の類似性と相違点に基づく抗がん剤開発の可能性」

亀谷美恵^{1,2)}

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

..... 14

「ニューラルネットワークによる皮膚ガス組成を用いた癌診断法の開発」

関根 嘉香^{1,2)}、戸高 惣史³⁾、川西 彩⁴⁾、森町 将司⁴⁾、平林 健一^{2,5)}

(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⁾AIREX 株式会社、⁴⁾東海大学医学部内科学系消化器内科学、⁵⁾東海大学医学部基盤診療学系病理診断学)

..... 18

「椎間板細胞製品開発における新規 Tie2 アゴニスト化合物の探索」

酒井大輔^{1,2)}、相馬 葉¹⁾、平山令明²⁾

(¹⁾東海大学医学部外科学系整形外科、²⁾東海大学先進生命科学研究所・医薬総合

研究部門)

..... 22

「SARS-CoV-2 の L452R 変異が細胞性免疫から逃れる分子メカニズムに関する検討」

平山 令明

(東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門)

..... 27

高機能食品研究部門

「熊本県産エゴマ搾り粕の総フェノール含量と抗酸化活性：すりゴマとの比較評価」

小寺友也¹⁾、松原颯汰¹⁾、瀬尾優太¹⁾、森田千紘²⁾、中野祐志¹⁾、本田憲昭¹⁾

伊藤正規¹⁾、阿部淳¹⁻³⁾、安田智子¹⁾、安田伸^{1-3)*}

(¹⁾東海大学農学部、²⁾東海大学大学院農学研究科、³⁾東海大学先進生命科学研究
所・高機能食品研究部門)

..... 31

「納豆菌由来 L-ロイシン脱水素酵素の結晶化および X 線結晶構造解析」

米田 一成^{1,2,3,4)*}、荒木 朋洋^{2,3)}

(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・高機能食品研究部門)

..... 37

「河川に放流されたアユの香りと脂肪酸組成の変化」

吉崎 良¹⁾、春田智美¹⁾、平塚聖一^{1,2,3)}、川嶋直正⁴⁾

(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、
³⁾東海大学海洋研究所アクアカルチャーテクノロジーセンター、⁴⁾静岡県内水面
漁業協同組合連合会)

..... 41

「異なるカロテノイド色素を給餌した場合のスチールヘッドの身質変化」

山下真由¹⁾、山田良希²⁾、平塚聖一^{3,4,5)}、齋藤寛^{3,4)}、秋山信彦^{3,4,5)}

(¹⁾東海大学大学院・海洋学研究科、²⁾東海大学大学院・地球環境科学研究科、
³⁾東海大学・海洋学部、⁴⁾東海大学先進生命科学研究所・高機能性食品研究部
門、⁵⁾東海大学海洋研究所アクアカルチャーテクノロジーセンター)

..... 48

香粧品研究部門

「環状オリゴ糖含有ポリビニルアルコールナノファイバーの創製とにおい分子包接能評価」

竹本 絵里佳¹⁾、窪田 美紗子¹⁾、小口 真一^{2,3)}、伊藤 建^{2,3)}、樋口 昌史^{1,2)}、

岡村 陽介^{1,2)}

(¹⁾東海大学工学部応用化学科、²⁾東海大学先進生命科学研究所・香粧品研究部門、
³⁾東海大学理学部化学科)

..... 60

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

Vol.6 2021

CONTENTS

Pharmaceutical Science

Development of anti-thrombosis drugs based on the inhibition of the interaction between PDPN and CLEC-2

Nobuo Watanabe^{1,2)}, Yoshiko Shinozaki³⁾, Sanae Ogiwara³⁾, Yusuke Suzuki³⁾, Masako Kidokoro^{1,2)},
Noriaki Hirayama²⁾, and Sadaki Inokuchi^{1,2)}

(¹⁾Department of Emergency and Critical Care Medicine, Tokai University School of Medicine, ²⁾Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³⁾Support Center for Medical Research and Education, Tokai University)

..... 1

Design and application of a glutathione derivative which has resistance against degradation by gamma-glutamyltranspeptidase

Akiko Kanamori^{1,2)}

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

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

..... 6

Analysis of human leukocyte localization in NOG- and NOG-hIL-4-Tg spleens reconstructed with human immune environment

Nagi Katano^{1,2,3)} and Yoshie Kametani^{1,3)}

(¹⁾Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, ²⁾Tokyo College of Biotechnology, ³⁾Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 10

The possibility for the development of anticancer drugs based on the similarity and difference between pregnant and cancer immunities

Yoshie Kametani^{1,2)}

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

..... 14

Development of neural network for cancer prediction using human skin gas profiles

Yoshika Sekine^{1,2)}, Michihito Todaka³⁾, Aya Kawanishi⁴⁾, Masashi Morimachi⁴⁾, and Kenichi Hirabayashi^{2,5)}

(¹) Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, ²) Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³) AIREX Inc., ⁴) Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokai University School of Medicine, ⁵) Department of Pathology, Tokai University School of Medicine)

..... 18

Search for novel Tie2 agonist compounds in the development of intervertebral disc cell products

Daisuke Sakai^{1,2}), Hazuki Soma¹), and Noriaki Hirayama²

(¹) Division of Orthopaedic Surgery, School of Medicine Tokai University, ²) Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 22

A Possible Molecular Mechanism of the L452R Variant of SARS-CoV-2 Escaping from the HLA-restricted cellular immunity

Noriaki Hirayama

(Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 27

High Functional Food Science

Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Perilla Pomace Produced in Kumamoto: Comparative Evaluation with Ground Sesame Seeds

Tomoya Koder¹), Sota Matsubara¹), Yuta Seo¹), Chihiro Morita²), Yushi Nakano¹), Kensho Honda¹), Masanori Ito¹), Jun Abe¹⁻³), Tomoko Yasuda¹), and Shin Yasuda¹⁻³*)

(¹) School of Agriculture, Tokai University, ²) Graduate School of Agriculture, Tokai University, ³) Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 31

Crystallization and preliminary structural analysis of L-leucine dehydrogenase from *Bacillus subtilis* subsp. natto BEST195

Kazunari Yoneda^{1,2,3,4}), and Tomohiro Araki^{2,3})

(¹) School of Agriculture, Tokai University, ²) Graduate School of Agriculture, Tokai University, ³) Graduate School of Bioscience, Tokai University, ⁴) Division of High Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 37

Changes in volatile flavor compound and fatty acid composition of stocked ayu

Ryou Yoshizaki¹), Satomi Haruta¹), Seiichi Hiratsuka^{1,2,3}), and Naomasa Kawashima⁴)

(¹) School of Marine Science and technology, Tokai University, ²) Division of High

Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³⁾
Aquaculture technology center, Institute of Oceanic Research and Development, Tokai
University, ⁴⁾ Shizuoka prefectural fresh water fisheries cooperative association)

..... 41

Changes in meat quality of Steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) when fed different carotenoid pigments

Mayu Yamashita¹⁾, Yoshiki Yamada²⁾, Seiichi Hiratsuka^{3,4)}, Hiroshi Saito^{3,4)}, and Nobuhiko Akiyama^{3,4)}

(¹⁾ School of Oceanography, Tokai University Graduate School, ²⁾ School of Earth and Environmental Science, Tokai University Graduate School, ³⁾ School of Marine Science and technology, Tokai University, ⁴⁾ Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ⁵⁾ Aquaculture technology center, Institute of Oceanic Research and Development, Tokai University)

..... 48

Cosmetic Science

Fabrication of Cyclodextrin-loaded Nanofibers Composed of Poly(vinyl alcohol) and Inclusion Ability of Odor Molecules

Erika Takemoto¹⁾, Misako Kubota¹⁾, Shinichi Koguchi^{2,3)}, Takeru Ito^{2,3)}, Masashi Higuchi^{1,2)}, and Yosuke Okamura^{1,2)*}

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

..... 60

Podoplanin と CLEC-2 との相互作用の阻害に基づく抗血栓薬の開発

Development of anti-thrombosis drugs based on the inhibition of the interaction between PDPN and CLEC-2

渡邊 伸央^{1,2)}、篠崎 よし子³⁾、荻原 早苗³⁾、鈴木 雄祐³⁾、城所 正子^{1,2)}、平山 令明²⁾、猪口 貞樹^{1,2)}

東海大学医学部救命救急医学¹⁾、同先進生命科学研究所・医薬総合研究部門²⁾

東海大学メディカルサイエンスカレッジオフィス生命科学統合支援担当³⁾

Nobuo Watanabe^{1,2)}, Yoshiko Shinozaki³⁾, Sanae Ogiwara³⁾, Yusuke Suzuki³⁾, Masako Kidokoro^{1,2)}, Noriaki Hirayama²⁾,
Sadaki Inokuchi^{1,2)}

¹⁾ Department of Emergency and Critical Care Medicine, School of Medicine, Tokai University

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

³⁾ Support Center for Medical Research and Education, Tokai University,

[要旨]

Podoplanin (PDPN) と血小板の CLEC-2 との結合を阻害し、PDPN 惹起による血小板凝集を選択的に阻害し得る新規抗血栓症治療薬の開発を進めている。これらの CLEC-2 阻害化合物の薬効評価に先立ち、本研究ではマウス深部静脈血栓モデルの構築を行い、再現性の高い安定した結果が得られることを確認した。続いて本モデル系での CLEC-2 阻害化合物の薬効評価に着手した。複数の投与経路で試してみたが、現時点では血栓形成抑制効果は見られていない。今後さらに投与溶媒ならびに投与ルートを工夫し、引き続き同モデルで評価を行うとともに、別の病態モデルにおいても薬効評価を行う予定である。

[Abstract]

We have been developing novel anti-platelet agents that inhibit the interaction between platelet receptor CLEC-2 and podoplanin (PDPN). To evaluate the effectiveness of our CLEC-2 inhibitor compounds, we first assessed the suitability of the inferior vena cava (IVC) stenosis model in mice as a thrombosis model for our compounds and validated. We have tested our compounds on this mice model via various administration routes but so far obtained no promising results. We will need to improve drug vehicles and administrative routes as well as analyze anti-thrombosis effects in other thrombosis models.

[Key Words]

tumor metastasis, thrombosis, invasion, platelet aggregation

1. はじめに

Podoplanin (PDPN) は、ある種のガン細胞や炎症時のマクロファージなどに発現誘導される膜タンパク質である。PDPN には血小板活性化ドメインがあり、これが血小板膜上の膜タンパク質である C-type lectin receptor-2 (CLEC-2) に結合して血小板の活性化を誘導する。この結果、血小板は凝集し、血液凝固系を活性化させ血栓形成を導く[1]。末期ガンや重症感染症においては全身の血管に血栓症[播種性血管内凝固症候

群(Disseminated Intravascular Coagulation: DIC)が起こり多臓器障害の原因となるが、PDPN-CLEC2 結合を介した血小板活性化がこの一因として示唆されている[1, 2]。したがって、PDPN と CLEC-2 との結合を阻害できる化合物は、ガン、感染症、炎症に起因する幅広い血栓症に対して治療効果・予防効果が期待できる。我々は *in silico* 化合物ドッキングシミュレーションと、我々が独自に開発した *in vitro* 化合物結合阻害能評価系との連携したスクリーニングにより、これ

まで5種のヒット化合物を得た[3]。その後、ヒト血小板のPDPN惹起凝集に対して最も強い抑制を示した化合物D12に着目し、共通の基本骨格を有し置換基のみが異なる化合物のスクリーニングを行い、新たに10種類のヒット化合物を得た。これらの化合物はいずれもヒト洗浄血小板のPDPN惹起凝集に対し選択的な抑制活性を示した(未掲載)。さらに、ヒト血小板に対してよりも若干抑制効果は弱い、マウスの洗浄血小板において、PDPN依存的な活性化を抑制できることが判明した(図1)。そこでマウス血栓症モデルを用いて我々のCLEC-2阻害剤の薬効評価に着手した。本紀要においてはモデル系の構築ならびにいくつかの候補化合物の結果を報告する。

2. 結果の概要

1) 深部静脈血栓モデルの作成

寝たきり状態や飛行機などで長時間座席に座り続けた場合、血流の滞った深部の静脈で血栓が形成されることがある(後者はエコノミー症候群と呼ばれる)。これが

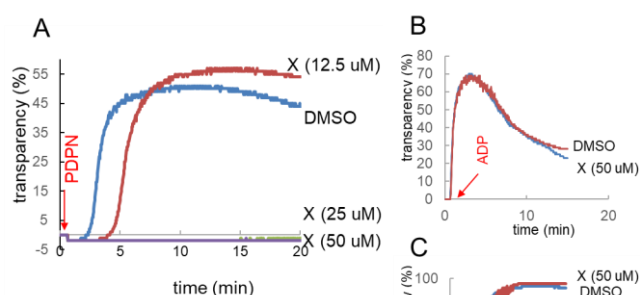


図1 マウス洗浄血小板の凝集に対するCLEC-2阻害剤Xの効果

(A)マウス洗浄血小板(1×10^6 /mL)に予め標記の濃度のCLEC-2阻害化合物Xを添加し5分インキュベートし、続いてPDPN-CHO細胞(2×10^6 /mL)を添加して凝集を惹起した。(B)、(C)においては、50 μ Mの化合物X存在下でそれぞれADP + ヒトフィブリノーゲン (20 μ M + 0.6 mg/mL)、トロンビン(0.5 U/mL)によって凝集惹起を行った。

解離して血流にのった場合、心臓から肺動脈を経由して肺内部の動脈の塞栓をもたらす(肺塞栓症)。

深部静脈血栓の動物モデルとして、外科的に下大静脈(Inferior vena cava, IVC)を狭窄して血栓形成を誘導する方法が広く用いられている(IVC stenosisモデル[4])。この血栓症モデルにおいては、CLEC-2ノックアウトマウスで血栓量低下すること[5]、さらにCLEC-2阻害活性が報告されているコバルト配位ヘマトポルフィリン(Co-hematoporphyrin)の静脈内投与によって血栓量低下することが報告されている[6]。機序としてはIVCの虚血状態に伴う炎症(sterile inflammation)により血管内皮細胞にPDPN発現誘導され、CLEC-2

を介した血小板活性化が血栓形成に関与すると考えられている。そこで、我々のCLEC-2阻害化合物の薬効評価もまず本モデルを用いて行うことにした。以下が作成の手順となる。

①マウスを麻酔下で開腹し、下大静脈(inferior vena cava: IVC)から側方へ分岐するiliolumbar vein等の細血管(以下side branch; 0~4本の個体差あり)をすべて結紮する。見逃して結紮できなかった場合、血栓形成は著しく阻害される。

②左腎静脈直下部分においてIVCと腹大動脈を剥離した小孔から糸を潜らせ、30-G注射針を挟んでIVCを結紮し、その後注射針を除く。この結果90%の狭窄状態になるといわれる[4]。

③ 48時間後に安楽死させ開腹する。血栓の分離に先立って、IVCのside branchの結紮に見落としがないかどうか確認を行う。さらにIVC背部の分岐(以下back branch)の有無も確認する。尚back branchの結紮は事実上不可能である。ただし通常side branchより管径が細く通常見逃しても影響は小さい。検証後、IVCを狭窄部分から下肢分岐部まで切除し、血管内から血栓を押し出し、血栓重量を測定する。

図1に示すように、C57BL/6Nマウスを用いた我々の狭窄条件においても、血管へのPDPN発現、ならびに48時間で20~25 mgの血栓が安定して形成された。

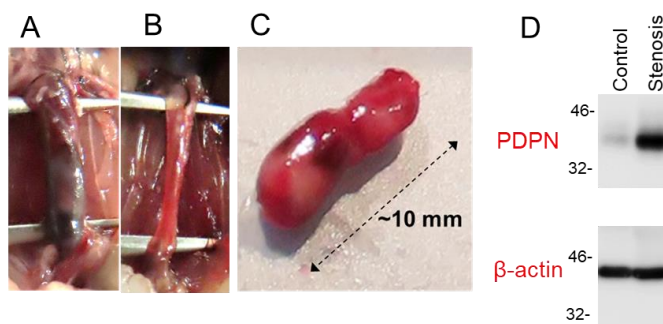


図2 マウス深部静脈血栓モデルの作成

左腎静脈直下のIVCを狭窄した48時間後に血栓を観察した(A)。狭窄部分が何らかの原因で緩んでしまった場合、あるいは側面の分岐を見逃し結紮をできてなかった場合、血栓の形成は起こらない(B)。我々の条件では通常、10 mm、20~25 mgの血栓が安定して生じる。また、未狭窄のIVCではPDPNの発現は見られないが、48時間の狭窄によってPDPNの発現も確認される(D)。

2) 血小板の関与の検証

本モデル系での血栓形成が血小板の活性化依存的かどうかを抗血小板薬 Ticlopidine を用いて検討した(図3)。Ticlopidine は不活性型のプロドラッグであり、肝臓で代謝されて活性型となり、ADP 受容体 P2Y₁₂ を非可逆的に阻害する。Ticlopidine は手術当日、翌日とも各回 30 mg/kg で2回経口投与を行った。結果としては、血栓形成が劇的に抑制された個体と、ほとんど効果が見られない個体とに2極分化した。平均としては血栓抑制傾向が見られたが、統計的有意差は見られなかった。

Ticlopidine の結果の不安定性の原因を探るべく、同化合物を ICR リタイアマウスに2回投与し(採血24時

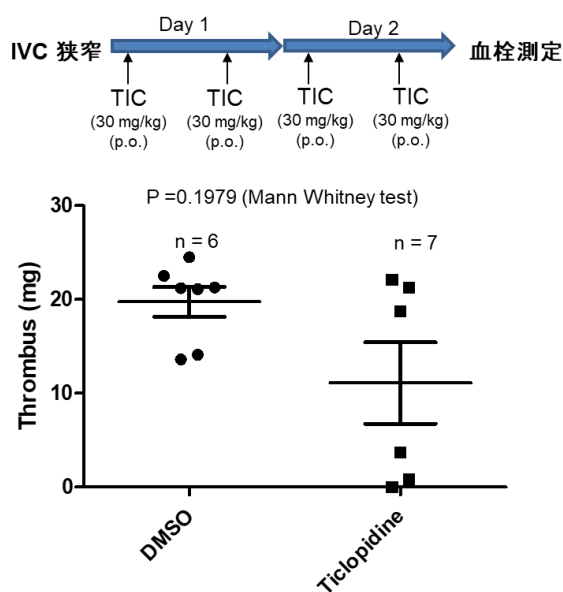


図3 マウス深部静脈血栓モデルに対するTiclopidineの効果
Ticlopidine はDMSOストック溶液をPBSにて懸濁し1日に2回経口投与した(各回30 mg/kg)。1群4匹で行った独立の3回の実験のうち、未結紮のside branchがあった個体を除外した。

間前と14時間前、各回30 mg/kg)、洗浄血小板を調製し凝集能を調べた。ところがこの条件ではADP惹起凝集、collagen惹起凝集とも抑制は30%程度であることが判明した。マウスでの報告は不明であるが、ラットにおいてはTiclopidineの薬効発現遅く、一方Clopidogrelは即効性であることが報告されている[7]。Ticlopidineの薬効発現の遅さが我々の実験でのバラツキの大きさに寄与している可能性が示唆された。そこで即効性のClopidogrelを用いることにした。Clopidogrelは投与4時間でADP惹起凝集がほぼ抑制し、また本血栓症モデルにおいても血栓症を減少させた(未掲載)。これより血小板の活性化抑制剤は我々の病態モデルにおいて抗血栓効果を発揮することが確認できた。

3) 候補化合物の深部静脈血栓モデルでの効果

東海大学先進生命科学研究紀要 第6巻 2022年3月

候補化合物のDMSOストック溶液をPBS希釈した場合、高濃度では完全に溶解せず、不溶性微粒子が混入する懸濁液状態となった。この懸濁液を用い、まず皮下投与によって評価した(30 mg/kg x 4回投与)。図4に3種の化合物(X, Y, Z)それぞれを独立に評価しまとめた結果を示した。候補化合物に抑制傾向は全くみられないため、この投与法は一旦中断することにした。

次に同用量での経口投与を試したが、抑制効果は見られなかった(図5)。続いてマウスでの薬効評価でオーソドックスな腹腔内投与で試した(図6)。しかしこの投与法では、48時間後の解剖時に腹腔内に出血が見られた。IVC狭窄では開腹手術を行っており、縫合部分はステープラーで補強し腹腔をやや圧迫しているため、投与時に注射針による腸管膜の損傷や懸濁状の化合物の粒子による炎症惹起の可能性が考えられた。いずれにせよ腹腔内投与で薬効評価を行うには大幅な改善が必要となる。

4) 候補化合物の深部静脈血栓への影響

化合物の投与によりこれまで血栓量の減少効果は見ら

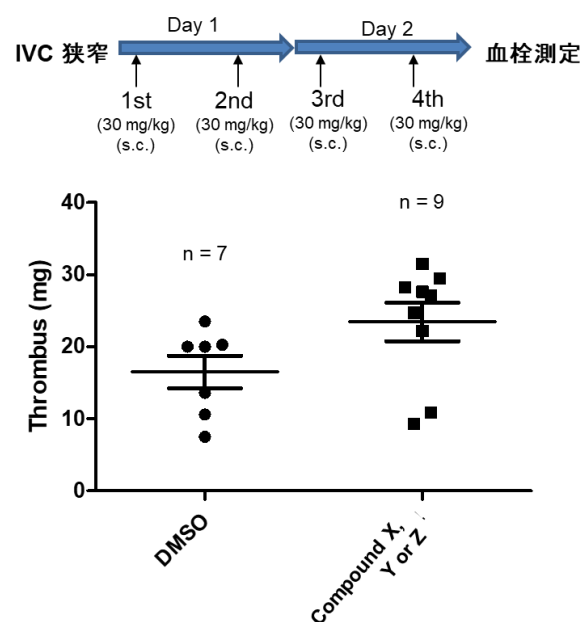


図4 マウス深部静脈血栓モデルに対するCLEC-2阻害化合物の皮下投与の効果

化合物はDMSOストック溶液をPBSにて懸濁し1日に2回皮下投与した(各回30 mg/kg)。1群4匹で行った3種類のCLEC-2阻害化合物(X, Y, Z)の結果をまとめて示した。

れていないが、血栓の形状には肉眼でも違いが見られた。IVC血栓は肉眼で赤色部分と白色部分が入り混じった状態で観察されるが、いずれの投与経路の場合でも、CLEC-2阻害剤投与群では白色部分の割合が減少していた。そこで血栓の違いを透過型電子顕微鏡で観察した(図7)。白色部分はフィブリン様の繊維質であり、

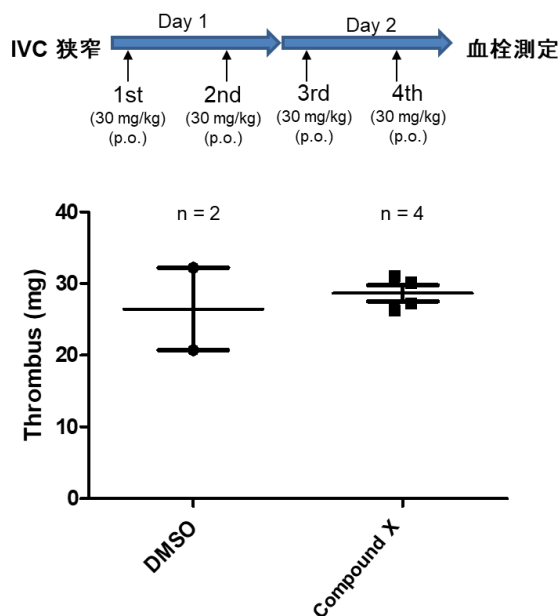


図5 マウス深部静脈血栓モデルに対するCLEC-2阻害化合物Xの経口投与の効果
化合物XはDMSOストック溶液をPBSにて懸濁し1日に2回経口投与した(各回30 mg/kg)。

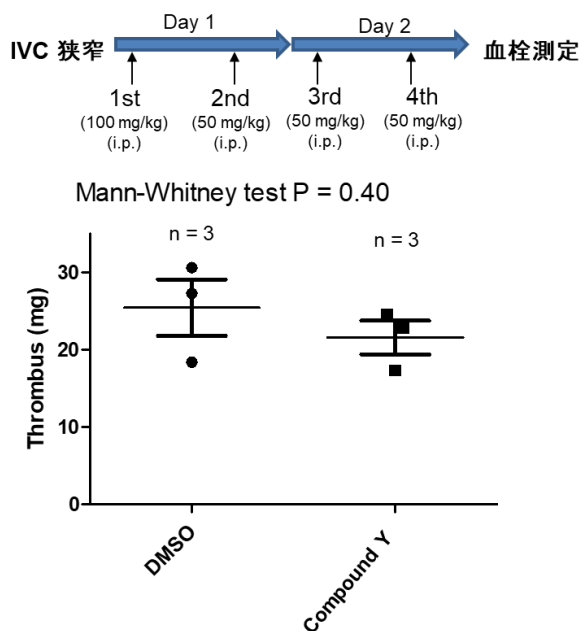


図6 マウス深部静脈血栓モデルに対するCLEC-2阻害化合物Yの腹腔内投与の効果
化合物YはDMSOストック溶液をPBSにて懸濁し1日に2回経口投与した(初回のみ100 mg/kg、2回目以降50 mg/kg)。

赤色部分は赤血球が変性した状態であった。血小板様の粒子の含量はいずれの部分においても低く、またコントロールと化合物投与群で顕著な違いは見られなかった。

3. 考察&展望

今回、IVC 狭窄モデルでは薬効評価を優先した。すなわち化合物の不溶性粒子は生体内で溶解して吸収され

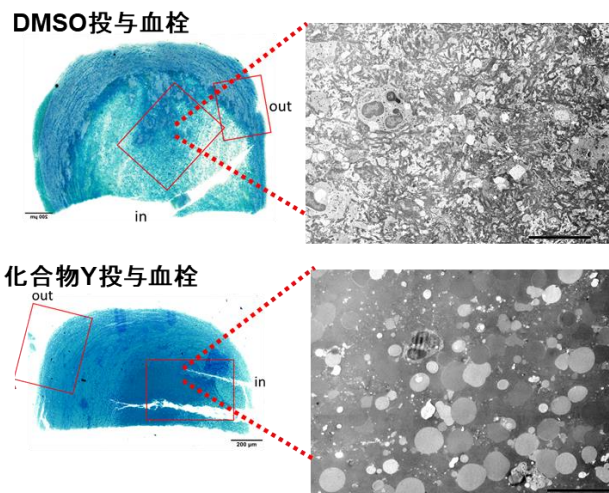


図7 マウス深部静脈血栓に対するCLEC-2阻害化合物の効果

IVC血栓は肉眼で赤色部分と白色部分が入り混じった構造として観察され、CLEC-2阻害剤投与群では多くの場合、白色部分の割合が減少し、赤色部分の割合が増えた。血栓をトルイジンブルー染色後、光学顕微鏡で観察すると白い部分は繊維質、赤い部分は密な構造物として観察される。電子顕微鏡下では白い部分はフィブリン様の繊維構造、赤色部分は主として赤血球の凝集が主要成分となっているようであった。

ることを前提として、懸濁液状態で投与を行った。しかし効果が見られない以上、この前提をしっかりと検証する必要がある。各投与ルートで投与した化合物がどの程度血中に取り込まれているか、さらに血液中濃度の半減期等を明らかにして用量と投与タイミングを最適化する必要がある。また、投与溶媒も工夫し溶解性を高め、静脈内投与への持続投与、飲水投与なども試みる必要があると考える。しかし薬物動態解析(ADME)や製剤化は専門性が高く、学内で行っている研究室はないため、これらを迅速に行うには製薬会社の専門部門との連携が必要とも考える。

これまでのところ、我々の CLEC-2 阻害化合物には IVC 狭窄モデルにおいて血栓重量において抑制効果は見られていない。しかし血栓の形状には違いが現れており、何らかの効果が発揮されている可能性が判明した。今後、この違いをさらに解明を進めて行く予定である。

また、今後は他のモデルでの薬効評価を進めていく必要がある。脳梗塞や心筋梗塞など、動脈硬化のプラーク崩壊が引き金となる血栓症は莫大な患者がおり、世界的な問題である。動脈硬化プラーク内に蓄積したマクロファージは PDPN の発現量が増加していることを鑑みると[2]、我々の CLEC-2 阻害剤は脳梗塞や心筋梗塞に対する予防薬、治療薬としての効果も期待できる。適切な病態モデルを構築し薬効評価を行いたいと

考えている。

現在臨床で用いられている抗血小板薬は ADP 受容体阻害剤(Clopidogrel など)とトロンボキサン A2 (TXA2)産生を抑えるシクロオキシゲナーゼ阻害剤(アスピリンなど)あり、いずれも血小板の連鎖反応的な活性化を抑えるため幅広い適用が可能である。しかしこの反面、いずれも出血リスクを高める欠点が問題となっており、惹起物質に対して選択性の高い薬剤の出現が望まれている[8]。我々の CLEC-2 阻害剤はまさに現在の医療ニーズを満たすものであり、一刻も早く臨床現場へ届けたいものである。

4. 引用文献

- [1] A. Takemoto, K. Miyata, N. Fujita, Platelet-activating factor podoplanin: from discovery to drug development, *Cancer Metastasis Rev*, 36 (2017) 225-234.
- [2] J.R. Hitchcock, C.N. Cook, S. Bobat, E.A. Ross, A. Flores-Langarica, K.L. Lowe, M. Khan, C.C. Dominguez-Medina, S. Lax, M. Carvalho-Gaspar, S. Hubscher, G.E. Rainger, M. Cobbold, C.D. Buckley, T.J. Mitchell, A. Mitchell, N.D. Jones, N. Van Rooijen, D. Kirchhofer, I.R. Henderson, D.H. Adams, S.P. Watson, A.F. Cunningham, Inflammation drives thrombosis after Salmonella infection via CLEC-2 on platelets, *J Clin Invest*, 125 (2015) 4429-4446.
- [3] 渡邊伸央, Podoplanin と CLEC-2 との相互作用の阻害に基づく抗血栓薬の開発, 先進生命科学研究 紀要 2020, 5 (2021) 1-4.
- [4] H. Payne, A. Brill, Stenosis of the Inferior Vena Cava: A Murine Model of Deep Vein Thrombosis, *J Vis Exp*, (2017).
- [5] H. Payne, T. Ponomaryov, S.P. Watson, A. Brill, Mice with a deficiency in CLEC-2 are protected against deep vein thrombosis, *Blood*, 129 (2017) 2013-2020.
- [6] N. Tsukiji, M. Osada, T. Sasaki, T. Shirai, K. Satoh, O. Inoue, N. Umetani, C. Mochizuki, T. Saito, S. Kojima, H. Shinmori, Y. Ozaki, K. Suzuki-Inoue, Cobalt hematoporphyrin inhibits CLEC-2-podoplanin interaction, tumor metastasis, and arterial/venous thrombosis in mice, *Blood Adv*, 2 (2018) 2214-2225.
- [7] A. Sugidachi, F. Asai, T. Ogawa, T. Inoue, H.

Koike, The in vivo pharmacological profile of CS-747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties, *Br J Pharmacol*, 129 (2000) 1439-1446.

[8] N. Mackman, W. Bergmeier, G.A. Stouffer, J.I. Weitz, Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches, *Nat Rev Drug Discov*, 19 (2020) 333-352.

5. 謝辞

本研究を行うにあたりご支援、ご協力くださいました東海大学医学部救命救急医学・中川儀英教授に感謝いたします。また、血小板凝集実験にご協力くださった東海大学附属病院神経内科・小原さおり氏、臨床検査室・和田典子氏ならびに川田勉氏、また電子顕微鏡解析にご協力くださった研究支援センター・福西菜穂子氏ならびに加藤順子氏に感謝いたします。

本研究は東海大学先進生命研助成金(2016-M2)ならびに AMED シーズ A (A369-TS)のサポートによって行われた。

6. その他の業績

第9回 DSANJ Digital Bio Conference 2022 出展

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼによる分解に抵抗性を有する グルタチオン誘導体のデザインとその反応性の解析

Design and application of a glutathione derivative which has resistance against degradation by gamma-glutamyltranspeptidase

金森 審子^{1,2)}

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

Akiko Kanamori^{1,2)}

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

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

[要旨]

生体内の重要な抗酸化分子であるグルタチオンは加齢と共に発現量が低下し、さらに酸化ストレス等により不足するが補給は容易ではない。本研究では、細胞表面や血流中に存在する γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP)による分解を受けない単糖修飾グルタチオン誘導体の調製を試みた。*N*-アセチルグルコサミンを付加した誘導体は γ -GTP 抵抗性を有し、未修飾と同等以上のメラニン生成抑制効果を示した。本修飾法はグルタチオンを用いる治療の効率向上に活用できると期待される。

[Abstract]

Glutathione, an important antioxidant molecule *in vivo*, decreases in expression with age, and is insufficient due to oxidative stress, etc., but replenishment is not easy. In this study, we tried to prepare monosaccharide-modified glutathione derivatives that are not degraded by γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) present on the cell surface and in the bloodstream. Derivatives with *N*-acetylglucosamine had γ -GTP resistance and showed a melanogenesis inhibitory effect equal to or higher than unmodified. This modification method is expected to be utilized for the efficiency improvement of the treatment using glutathione. Additionally we have obtained the result that selenogluthione in which cysteine residue of glutathione is replaced with selenocysteine has much higher antioxidant effects than glutathione, and the modification of this study seems to be applicable to selenogluthione.

[Key Words]

glutathione, selenogluthione, gamma-glutamyltranspeptidase, melanogenesis, oxidative stress

1. はじめに

セレンは必須微量元素であり、生体内では主としてセレノシステイン(Sec)というアミノ酸として存在する。Secは自然界に存在する21番目のアミノ酸であり、システイン(Cys)の硫黄がセレンに置換されている。生体内の中性付近のpHでは、チオール基とセレノール基のpKaの違いに基づき、Secの方がCysよりも明確に反応性が高い[1]。そのため、酸化還元反応に関与する酵素の活性部位に含まれるSecをCysに置換すると酵素活性が著減する例が多数報告されている[2]。

本プロジェクトは、セレンの高い抗酸化力を活用して細胞の酸化ストレス・糖化ストレス抵抗性を向上させ、健康の維持に役立ててQOLを高めることを目的とする。そこで、生体内で最も重要な抗酸化分子であるグルタチオンに着目し、Cys残基をSecに置換して反応性を高めたセレノグルタチオンを調製してその反応性と有益性を検証してきた。しかしながら、グルタチオンを医薬品として用いるには幾つかの障害がある。本研究では、外界から生体内に供給されたグルタチオンの半減期を延長する目的で単糖で修飾したグルタチ

オン誘導体を調製し、酵素による分解への抵抗性と抗酸化分子としての反応性を検討した。

2. 研究の概要

【先行研究による成果】

グルタチオンはL-グルタミン酸(L-Glu)、L-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。L-Cysのチオール基が還元反応に必須であり、還元型GSHと酸化型二量体GSSGの比は生体内で厳密に制御されている。酵素の補酵素として、また、独自で求核性分子として有毒な共役受容体に結合するなど、多様な反応系に関与している。本研究では、L-CysをL-Secに置換したセレノグルタチオン(還元型GSeH、酸化型二量体GSeSeG)をデザインした(図1)。GSeH

	グルタチオン	セレノグルタチオン
還元型	GSH γ-L-Glu-L-Cys-Gly	GSeH γ-L-Glu-L-Sec-Gly
酸化型	GSSG γ-L-Glu-L-Cys-Gly S γ-L-Glu-L-Cys-Gly	GSeSeG γ-L-Glu-L-Sec-Gly Se Se γ-L-Glu-L-Sec-Gly

図1 グルタチオンとセレノグルタチオンの構造

は水溶液中で強い還元性を示し、容易に安定なGSeSeGとなる。我々はこれまでにGSeSeGの効率の良い化学合成法を確立し、その反応性の解析と細胞の酸化および糖化ストレス抵抗性向上への効果の検証に取り組んできた[3-9]。

(1) *in vitro*の実験系

GSeHはGSHが補酵素として寄与する有害化合物無毒化経路で、非酵素的反応により標的分子を無毒化することが示唆された[5, 7]。

GSeSeGはGSSGと同様にグルタチオン還元酵素(GR)の作用を受ける。生成されたGSeHは、

- ① 過酸化水素(H₂O₂)を無毒化するグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)非存在下でH₂O₂濃度を顕著に低下させた。
- ② メチルグリオキサール(MG)を無毒化する経路に必須の老化抑制因子グリオキサラーゼ1(GLO1)非存在下でMG濃度を迅速に低下させた。

糖化ストレスおよびカルボニルストレスの原因物質であるMG濃度が高い状況でGPxが失活する報告があり[10]、細胞の酸化ストレス抵抗性低下につながると考えられる。また、糖尿病患者ではGLO1の発現量低下が報告されており[11,12]、過剰となったMGの弊害が生

じやすい。すなわち、有害となる化合物の無毒化に寄与する酵素の失活や発現量低下が起きる状況下において、糖化および酸化ストレスが相乗効果的に生体に与えるダメージの軽減にGSeSeGの添加が有効である可能性が示唆された。

(2) 培養細胞を用いた実験系

微量のGSeSeGを取り込ませた細胞では、

- ① H₂O₂添加による酸化ストレス、
- ② MG添加によるカルボニルストレス・糖化ストレスに対する細胞の生存率が明確に上昇する結果が得られ、(1) *in vitro*の実験系で示唆されたGSeSeGの有効性が裏づけられた[6,8,9]。

【結果の概要】

これまでに得られた成果をふまえてGSeSeGを医薬品として活用するにあたり、最も障害となるのは、上皮組織の細胞膜上や血流中に存在するγ-グルタミルトランスペプチダーゼ(γ-GTP、γ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)とも呼ばれる)という酵素による加水分解である。γ-GTPはGSHのγ-グルタミル結合を特異的に切断するため、血中GSHの半減期は分単位であると言われている。GSeSeGおよびGSeHもγ-GTPの作用を受ける結果を得ており[13]、GSeSeGは部品であるアミノ酸からの生合成がGSHよりもはるかに困難であるため、加水分解を防ぐ方法を考えるに至った。

まず、モデル分子としてγ-GTPによる分解を受けないGSH誘導体を計算科学を用いてデザインした[14]。γ-GTPが作用するにはGSH上のL-Gluを認識する必要がある。そこで、L-Gluのα炭素のカルボン酸を修飾し、側鎖のカルボン酸とL-Cysのアミノ基の間のγ-グルタミル結合を認識・切断できないように妨害する一方でL-Cysのチオール基が反応性を失わないような誘

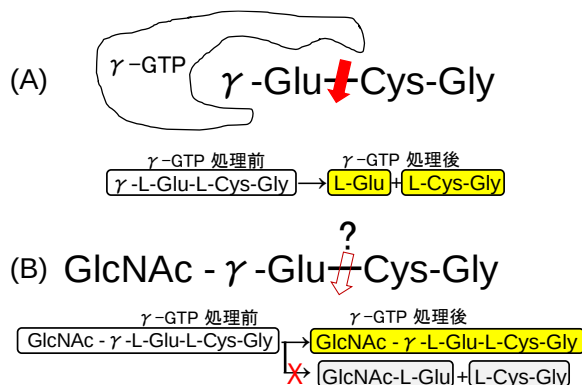


図2 (A) GSH と (B) GlcNAc-GSH の構造と

γ-GTP 処理による分解の有無

図中の赤い矢印はγ-GTPによる切断部位を示す。

GlcNAc-GSHはγ-GTP処理による分解が認められなかった。

導体を想定した。さらに、仮に誘導体が生体内で分解された場合にも毒性を示さず、生体内で再利用可能な修飾基を考案した。

次に、デザインしたGSH誘導体を固相合成法により調製し、その反応性を検討した。すなわち、GSHのL-Gluのカルボキシル基をN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)で修飾したGSH誘導体(GlcNAc-GSH)を化学合成した(図2)。さらに、得られたGlcNAc-GSHについて、(1) γ -GTP抵抗性と(2) チオール基の反応性をGSHと比較した。

(1) γ -GTP抵抗性

まず、両者を γ -GTP で処理した後、反応生成物のチオール基を蛍光ラベルしてHPLCによる組成解析を行った。その結果、GSHは酵素処理により出発物質の濃度が減少する一方、標準のL-Cys-Glyと同じ溶出位置を示すピークが検出され、酵素による分解を受けたことが示された。それに対して、GlcNAc-GSHは出発物質の濃度に減少が認められず、L-Cys-Glyと同じ溶出位置を示すピークが検出されなかったことから、 γ -GTP抵抗性を有することが示された(表1)。

	γ -GTP処理前	γ -GTP処理後
GSH	GSH	Cys-Gly, GSH
GlcNAc-GSH	GlcNAc-GSH	GlcNAc-GSH

表1 γ -GTP 処理前後のチオール化合物の組成

GlcNAc-GSHの酵素処理後にCys-Glyに相当するピークは検出されなかった。

(2) チオール基の反応性

ヒトには黒色のユーメラニン(一般的なメラニン)と黄色のフェオメラニンが存在し、その比率で皮膚や毛髪の色に違いが生じる。その生成過程は、まず、チロシナーゼによってL-チロシンがL-ドーパ、次いでドーパキノンへと代謝された後、Cys または GSH が共存するとフェオメラニンの合成経路へと進み、結果としてメラニンの生成が抑制される [15] (図3)。そこで、GSH と GlcNAc-GSH のメラニン生成抑制効果を *in vitro* の系で比較した。その結果、GlcNAc-GSH は GSH と同等以上の効果を示した (図4)。

3. 展望

〈期待される効果〉

本研究で開発した GlcNAc-GSH は、デザインの目的通りに γ -GTP による加水分解に対して抵抗性を有することが示された。また、メラニン生成を抑制する効

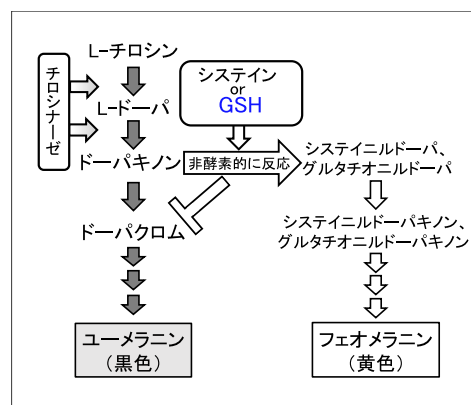


図3 ユーメラニンとフェオメラニンの生成過程
GSHの添加によるユーメラニンの生成抑制が報告されている。

果が認められたことからチオール基の反応性は維持されていると考えられる。次のステップとしては、

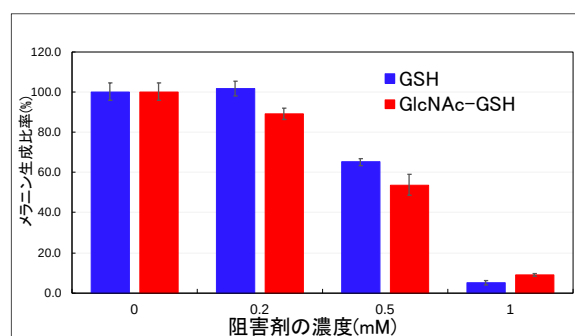


図4 GSHとGlcNAc-GSHのメラニン生成抑制効果
反応時間0分の値を100%として、反応の進行が止まった40分後の比率(%)を表した。

GlcNAc-GSHを黒色メラノーマに添加して取り込ませてメラニン発現量への効果を検討した後、化粧品へ活用を検討する予定である。GSHは日本ですでに医薬品として扱われているが、生体内で短時間で分解されることが難点であり、パーキンソン病の治療や解毒、美白などを目的として行われているグルタチオン点滴療法では、グラム単位のGSHの点滴を定期的に受ける必要がある。将来、本研究の成果を治療の効率向上や患者側の負担低減に活用できれば有意義である。

GSHのL-GluとL-Cys間の結合はL-Gluの側鎖のカルボン酸を介した γ -グルタミル結合と呼ばれるアミド結合であり、一般的なペプチダーゼやプロテアーゼの作用は受けない。そのため、GlcNAcを結合させた単糖修飾グルタチオン誘導体は生体内での加水分解を受ける可能性がかなり低い。当初の目的にしたがってGSeSeGに同様の修飾を加えれば、生体内での分解を低く抑えらえると考えられる。セレンは必須微量元素でありながら使用許容濃度の範囲が狭いため、摂取

量を抑えて効率良く有害物質の無毒化に役立てることが重要である。

他方、 γ -GTP による分解を防ぐ目的のドラッグデリバリーシステム(DDS)としては、リポソームへの封入が挙げられるが、①リポソームに内包する際に要する化合物の量および封入率の問題や ②治療薬として開発する際に、リポソーム調製に必要なリン脂質やコレステロールに含まれる微量な不純物が副作用を招く可能性は無視できず、実用に至るまでのハードルとなると予想される。これに対して単糖修飾グルタチオン誘導体は、遺伝子導入に汎用されている脂質性のキャリア分子に付着させて細胞に取り込ませる手法も活用できると考えている。また、グルタチオンに付加する糖鎖の構造を工夫し、糖鎖受容体発現細胞への取り込み効率を制御できる可能性が期待される。

〈予想される問題点〉

GSH を補酵素として利用する酵素に対する反応性の低下が予想される。すなわち、 γ -GTP と同じ方向から類似した仕組みで GSH を認識する酵素は単糖修飾グルタチオン誘導体を補酵素として利用できず、酵素活性が低下する可能性がある。

以上の考察から、糖修飾グルタチオン誘導体は、GSH が関与する生体内の抗酸化作用のうち、非酵素的反応に効果が認められる可能性が高い。現在、今回解析したメラニン生成抑制以外に、接触皮膚炎原因物質の除去効果についても検証を進めている。

4. 引用文献(学術集会の要旨を含む)

- [1] C. Jacob, et al., Angew. Chem.Int. Ed., 42, 4742-475 (2003)
- [2] L. Johansson, et al., Biochim. Biophys. Acta, 1726, 1-13 (2005)
- [3] S. Shimodaira, Y. Asano, K. Arai and M. Iwaoka, Biochemistry, 56, 5644-5653 (2017)
- [4] S. Shimodaira, K. Arai, M. Iwaoka, A. Kanamori, Bull. Inst. Adv. Biosci. 1, 10-13 (2017)
- [5] S. Yoshida, K. Arai, M. Iwaoka, et al., Angew. Chem. Int. Ed., 50, 2125-2128 (2011)
- [6] A. Kanamori, Bull. Inst. Adv. Biosci. 2, 10-13 (2018)
- [7] A. Kanamori, Bull. Inst. Adv. Biosci. 3, 4-7 (2019)
- [8] A. Kanamori, Bull. Inst. Adv. Biosci. 4, 5-8 (2020)
- [9] A. Kanamori, Bull. Inst. Adv. Biosci. 5, 5-8 (2021)
- [10] S. Suravajjala, et al., Clin. Chim. Acta, 421, 170-176 (2013)
- [11] N.Rabbani et.al., Semin.Cell.Dev.Biol., 22, 309 (2011).

[12] R.Peculis et.al., Gene., 515, 140 (2013).

[13]熊坂実優、今野結女子、下平伸吾、荒井堅太、岩岡道夫、清水佳隆、小島直也、金森審子、第89回日本生化学会大会、2016. 9月、仙台。

[14] S. Aida-Hugaji, D. Nemoto, T. Tetsumoto, A.Kanamori, Molecular design of the glutathione derivatives for avoidance of decomposition by GGT1. Joint 12th EBSA & 10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress, 2019年7月、スペイン、マドリード

[15] Pillaiyar, T., et al., J. Enzyme Inhib. Med Chem., 32, 403-425 (2017)

5. 業績

【学会等発表】

- 1) 岡部 リハナ、江澤 優莉、苫米地 祐輔、金森 審子： γ -グルタミルトランスフェラーゼによる分解に抵抗性を有する単糖修飾グルタチオン誘導体のデザインと応用。第14回日本生化学会大会、2121. 11月、横浜 (WEB開催、ポスター発表)
- 2) 金森 審子、高橋 沙和、大畠 早葵、下平 伸吾、岩岡 道夫：セレノグルタチオンの添加がもたらすグリオキサラーゼ発現抑制細胞の糖化・酸化ストレス抵抗性の回復効果。第44回日本分子生物学会年会、2021. 12月、横浜 (ワークショップ口頭発表およびポスターWEB発表)。
- 3) 岡部 リハナ、江澤 優莉、苫米地 祐輔、金森 審子： γ -グルタミルトランスフェラーゼによる分解に抵抗性を示す単糖修飾グルタチオン誘導体のデザインとその反応生の解析。東海大学マイクロ・ナノ啓発会【Tune】 第14回学術講演会、2022. 2月、平塚 (WEB開催、ショートプレゼンテーション)。
- 4) 金森審子： γ -GTPによる分解を受けないグルタチオン誘導体の開発と応用。東海大学2021年度研究交流会、2022. 3月、平塚 (WEB開催、テーマ別ポスターおよび口頭発表)。

6. 謝辞

本稿を書く機会を与えてくださり、常に的確で温かなご指導をいただいている平山令明先生、共同研究を行わせていただいている理学部化学科の岩岡道夫先生、荒井堅太先生と下平伸吾さん、工学部応用化学科の苫米地 祐輔先生と江澤優莉さん、理系教育センターの日向寺祥子先生、そして本研究を遂行するにあたりご協力いただいた研究室の学生の皆さんに心より感謝いたします。

Analysis of human leukocyte localization in NOG- and NOG-hIL-4-Tg spleens reconstructed with human immune environment

片野 風^{1,2,3)}、亀谷 美恵^{1,3)}

東海大学医学部分子生命科学¹⁾、東京バイオテクノロジー専門学校²⁾、
東海大学先進生命科学研究so・医薬総合研究部門³⁾

Nagi Katano^{1,2,3)}, Yoshie Kametani^{1,3)}

¹⁾Department of Molecular Life Science, Tokai University school of Medicine

²⁾Tokyo College of Biotechnology

³⁾Division of Pharmaceutical Sciences Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

全身でヒト IL-4 を産生する重度免疫不全マウス・NOG-hIL-4-Tg マウスはヒト PBMC 移植により B 細胞の生存維持、IgG へのクラススイッチを誘導する。本研究では、ヒト免疫担当細胞のマウス脾臓への局在を明らかにするため、これらマウスの脾臓組織の免疫組織化学による構造・白血球局在の比較解析を行った。その結果、両マウス脾臓では、共に陽性細胞が多く確認され、白血球がびまん性に存在しており、顕著な濾胞構造が検出されなかった。

[Abstract]

Humanized mouse system, which is established by transplanting human PBMC into NOG-hIL-4-Tg mice can engraft B cells and induce antigen-specific IgM and IgG production. The localization of immune competent cells in this mice has not been reported. We conducted a immunohistochemistry to clarify the localization of human CD45+ leukocytes in the spleen of humanized mice. We found that the CD45+ human cells are localized in the spleen of humanized mouse, and the specific structures such as germinal centers had not seen. The difference between conventional NOG and NOG-hIL-4-Tg was not detected. These results suggest that the specific structure is not constructed in the humanized mice if it is not immunized. Moreover, no differences are observed between them. Our system may help predicting the response of human immune reaction of individual patient.

[Key Words]

NOG-hIL-4-Tg mice, spleen, immunohistochemistry, human CD45+ cells

1. はじめに

公益財団法人 実験動物中央研究所が開発した NOD/Shi-scid,IL-2 γ null(NOG)マウスは、T 細胞・B 細胞・NK 細胞・補体活性の欠損及び樹状細胞・マクロファージの機能不全を有している重度免疫不全マウスであり、ヒト免疫細胞を生着させることでヒトの免疫環境を構築したヒト化マウスとして実験系に用いられる。しかし、移植されたヒト T 細胞がマウス細胞を攻撃する Graft Versus Host Disease(GVHD)を発症し死に至る。また、GVHD

は CD8 陽性 T 細胞が活性化し Th1 環境へ移行するため、マウス体内でヒト B 細胞を維持することができない。

一方、ヒト IL-4 遺伝子を導入した重度免疫不全マウスである NOD.Cg-Prkdcscidil2r γ tmlSug Tg (CMV-IL4)3-2Jic/Jic(NOG-hIL-4-Tg)マウスは全身でヒト IL-4 を産生している。

IL-4 は活性化 CD4 陽性 T 細胞、マスト細胞、NKT 細胞等によって産生され、Th2 細胞の分化、増殖を促進する Th2 サイトカインの一つであり、B 細胞の

生存を維持し、IgM から IgG ヘクラススイッチを誘導する[1]。

移植片対宿主病(Graft versus host disease : GVHD)の原因となる Th1 細胞及びTh17細胞の活性化にはこれらの細胞の分化に関わるサイトカインが豊富となる免疫環境が必要となる [2]。しかし、NOG-hIL-4-Tg マウスが産生しているヒト IL-4 は、Th2 の免疫環境を構築するため、Th1 細胞やキラー T 細胞、Th17 細胞の活性化が抑制され体液性免疫にシフトする[3]。

今までに、我々は NOG-hIL-4-Tg マウスにヒト末梢血単核球(PBMC)を移植後、免疫及び投与の処置を行ったヒト化マウスに、抗原特異的な抗体が産生されること、抗原特異的 B 細胞が抗体産生細胞に分化することを明らかにしてきた[4]。抗原特異的抗体産生が可能であることから、このヒト化マウスには胚中心等の構造が存在する可能性がある。そこでこれからマウスの組織を摘出し、組織化学染色(HC)による解析を行ってきたが、胚中心は観察されず、また、PBMC 移植後の免疫担当細胞の脾臓への局在については明らかではなかった。

そこで、PBMC を移植した NOG-hIL-4-Tg マウスの脾臓組織を抗ヒト CD45 抗体で染色し、PBMC 移植した NOG マウスの脾臓組織との構造・白血球局在の比較解析を行った。

2. 方法

1) ヒト健常者から同意を得て採血をし、得た血液を Ficoll 液 4mL 入れたチューブに上層し比重遠心分離(831G、30min、20°C)を行った。遠心分離した末梢血単核球(PBMC)を回収し、Cord Blood-Washing Buffer (CBWB:5%BSA、0.5M EDTA/PBS)を約 40mL 加え遠心分離(467G、5min、4°C)した。上清を除去し、RBC Lysis buffer(NH₂Cl 4.15g/DW 500mL:Tris-HCl pH7=9:1)を加え、静置し、遠心分離(467G、5min、4°C)した。上清を除去し、CBWB を 10mL 加え懸濁し、細胞数を計測した。

2) NOG-hIL-4-Tg マウスにヒト健常者 PBMC 5×10⁶cells/head を Phosphate Buffered Saline(PBS) 100 μL で懸濁し、全量を尾静脈移植した(29G×1/2)。移植 4 週間後に解剖を行い、肺、肝臓、腎臓、脾臓

を摘出し、免疫組織染色でヒト白血球の局在を解析した。

3) キシレン(5min)、エタノール(3min)で脱パラフィン処理を行った後、流水洗浄(5min)を行い、抗原賦活化処理(97°C、20min)を行った。洗浄(0.01M PBS 5min)を 3 回行い、内因性ペルオキシダーゼ処理(0.3% H₂O₂/メタノール 10min)後、洗浄(0.01M PBS 5min)を 3 回行い、ブロッキング(1% goat serum 30min)、一次抗体(α hCD45、IgG1)を Over Night で反応させた。その後、洗浄(0.01M PBS 5min)を 3 回行い、二次抗体(ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(M) 60min)を反応させ、洗浄 (0.01M PBS 5min) を 3 回 行 い 、DAB(diaminobenzidine)反応させ、流水洗浄(3min)、核染色(ヘマトキシリン)を行い、熱湯(5min)と流水で洗い、エタノール(3min)、キシレン(3min)で脱水、透徹を行い封入した。染色を行った組織を顕微鏡で撮影を行った。

3. 結果と考察

PBMC 移植した無処置の NOG-hIL-4-Tg マウス脾臓(図 1A、図 1B)と NOG マウス脾臓(図 2A、図 2B)のそれぞれの写真を示した。両マウス脾臓では、共に抗 CD45 抗体陽性細胞が多く確認され、白血球がびまん性に存在することが明らかになった。しかし、B 細胞濾胞や胚中心に特徴的な構造の存在は確認することができなかった。

以上の結果、PBMC を移植した NOG-hIL-4-Tg マウスは、NOG マウスと同程度、脾臓にヒト白血球が生着するが、濾胞構造は構築しないことが明らかとなった。

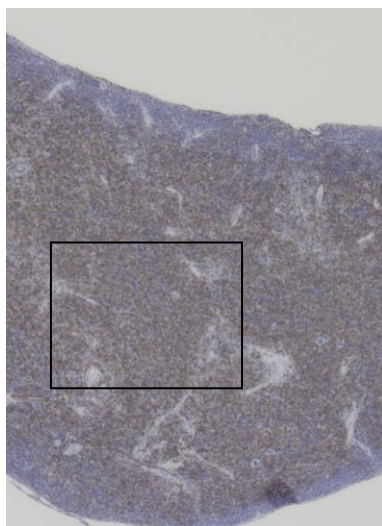


図 1A. NOG-hIL-4-Tg マウス

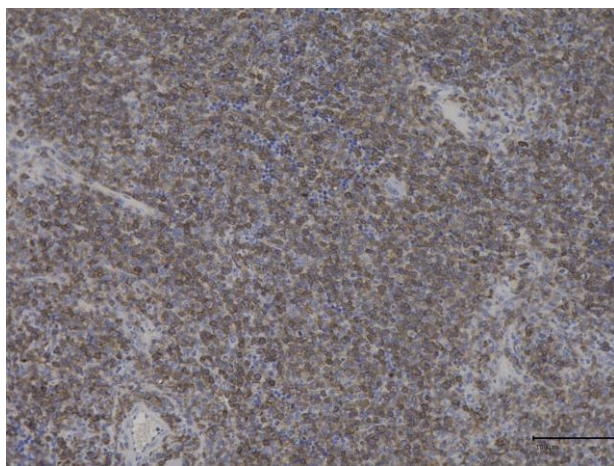


図 1B. NOG-hIL-4-Tg マウス

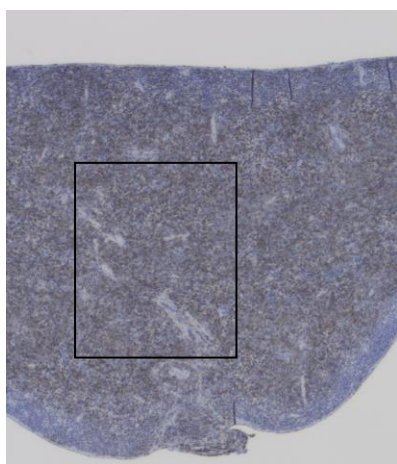


図 2A. NOG マウス

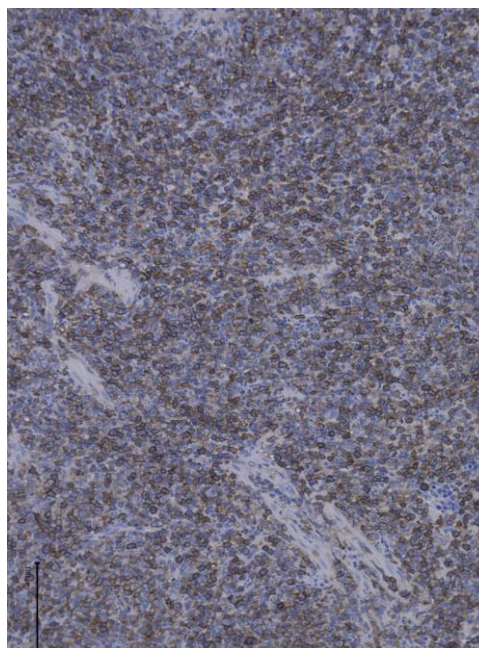


図 2B. NOG マウス

B は A を拡大したもの、撮影は KEYENCE BZ-X710 を使用した。

4. 引用文献

- [1] Clare M Lloyd et al. Sci Immunol.2018.
- [2] Mahasweta Gooptu et al. Front Immunol.2021.
- [3] Yoshie Kametani et al. PLoS One. 2017
- [4] Yusuke Ohno et al. Sci Rep. 2021

5. 業績

【論文発表】

- 1) Y.Goto*, Y.Kametani*, A.Auguste, A.Thuraya, A. LeFormal, S.Izumi, C.Genestie, H.Ishimoto, M.Mikami, A.Leary, Tropomyosin-related kinase B (TrkB) full-length isoform is related to advanced-stage clear cell ovarian cancer (CCOC) *Eur. J Gyneol. Oncol.* **42**, 899-908 (2021)
- 2) 鈴木進悟、亀谷美恵、椎名隆 *HLA-G* 遺伝子の構造、発現および多型性、 *MHC in press*
- 3) Y.Ohno, S.Ohshima, A.Miyamoto, F.Kametani, R.Ito, B.Tsuda, Y.Kasama, S.Nakada, H.Kashiwagi, T.Seki, A.Yasuda, K.Ando, M.Ito, Y.Tokuda, Y.Kametani*, HER2-antigen-specific humoral immune response in breast cancer lymphocytes transplanted in hu-PBL hIL-4 NOG mice .*Scientific Reports*, **11**, 12798.
- 4) N.Imaeda, A.Ando, T.Matsubara, M.Takasu, N.Nishii, A.Miyamoto, S.Ohshima, Yoshie Kametani, Shingo

Suzuki, Takashi Shiina, Tetsushi Ono, Jerzy K. Kulski, and Hitoshi Kitagawa, Stillbirth rates and their association with swine leucocyte antigen class II haplotypes in Microminipigs. *Animal Bioscience Anim Biosci.* **34**,1749-1756 (2021)

【学会等発表】

- 1) 亀谷美恵：コモンマーモセット胎盤と妊娠免疫の特徴。第11回 日本マーモセット研究会大会、2022.1 on line (招待講演)
- 2) 亀谷美恵 他、Her2-antigen-specific humoral immune response in breast cancer lymphocytes transplanted in hu-PBL hIL-4 NOG mice. 第50回 日本免疫学会学術集会、2021.12 仙台
- 3) 清水智香 他、Regulation of human peripheral blood T cell activation by steroid hormones related to pregnancy. 第50回 日本免疫学会学術集会、2021.12 仙台
- 4) Y. Kametani *et al.*: Her2-antigen-specific humoral immune response in breast cancer lymphocytes transplanted in hu-PBL hIL-4 NOG mice. 第80回 日本癌学会学術総会、2021.9 横浜
- 5) 山田壮我 他、妊娠ホルモンによるヒト化マウス免疫系の調節機能解析。第68回 日本実験動物学会総会、2021.5 on line

6. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただきました平山令明先生に心より感謝いたします。

妊娠免疫とがん免疫の類似性と相違点に基づく抗がん剤開発の可能性

The possibility for the development of anticancer drugs based on the similarity and difference between pregnant and cancer immunities

亀谷 美恵^{1,2)}

東海大学・医学部分子生命科学¹⁾、東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門²⁾

Yoshie Kametani¹⁾²⁾

¹⁾Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine

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

[要旨]

がんは突然変異の集積と選択により発生すると考えられている。そのため、抗がん剤開発は各癌腫に個別に対応するものを主体として行われてきた。我々は、胎盤組織とがん組織に発現する遺伝子は非常に多くが共通しており、その性状も類似点が多くあること、また、担がん状態の免疫系と妊娠免疫は他者に対して寛容になるという点で類似していることに着目した。本総説では、両免疫系を比較することにより、その相違点を明らかにし、かつその相違点を利用して抗がん剤が開発できる可能性について解説する。

[Abstract]

Malignant tumor is thought to develop by the accumulation of mutations in the host genome, followed by the selection of the cells bearing the cancer-related mutation. Therefore, newly developing molecular targeting anti-cancer drugs have been developed to recognize or attack specific molecules. It means that each drug targets a limited kind of cancers. We focused on the similarity of placental tissues and cancer tissues, such as the common gene expression in both tissues, and sharing the characteristics such as immune tolerance against non-self-antigen. In this review, we discuss the possibility of anti-cancer drug development, which may attack the common characteristics of most solid cancers, by comparing both cancer and pregnant immune systems. As pregnancy is somewhat healthy condition, the pregnancy-specific molecules may help control the immunity of cancer patients.

[Key Words]

anti-cancer drug, pregnant immunity, cancer immunity, tolerance

1. はじめに

固形がんと胎盤の胎児組織であるトロフォブラストは、非常に多くの遺伝子を共通に発現しており、その性質にも共通点が多い。例えば、増殖、浸潤、血管新生、免疫抑制は、両者が持つ典型的な特徴である。しかし、妊娠におけるトロフォブラストの子宮内膜・脱着膜への浸潤は、高度に調節されており、子宮筋層の中でトロフォブラストの浸潤は停止し、制御を逸した増殖は生じない。また、10ヶ月後には全てのトロフォブラストは排出され、あるいはアポトーシスにより死

滅し、母体に残留することはない。また、妊娠中、妊婦は極端に全身性に免疫機能が低下することではなく、一般的な感染症に対しては、防御機能を維持している。このようにがんによく似た性質を持つトロフォブラストに対し、高度に調節された増殖・浸潤・免疫抑制を行うためには、妊娠に特有の機構が働いていることが推測される。そのため、免疫抑制や浸潤抑制に関わる妊娠関連分子を特定し、それらをもとに抗がん剤を開発すれば、がん組織の浸潤性の調節、免疫抑制の調節が可能となる、新たな抗がん剤開発の概念をもつことができる可能性がある。

この抗がん剤の大きな特徴は、現在大きな潮流となっている、癌組織の遺伝子解析による突然変異の同定とそれに対応する個別化医療という考え方ではなく、遺伝子変異が多様であるにもかかわらず、胎盤と共通の性質を持つ癌という組織に対し、共通に適用可能な治療法の確立を目指しているという点である。

本総説では、その点について議論したいと考える。

2. 結果の概要

1) 血漿中の妊娠関連タンパク質

妊娠時は、担癌状態とは異なる妊娠関連タンパク質が産生される。妊娠関連タンパク質は大きく2つに分類できる。ひとつは母子境界で免疫抑制機能を発揮するタンパク質であり、もう一つは体内を循環する血漿中の妊娠関連タンパク質である。母子境界では、トロフォブラストが FASL や PD-L1、HLA-G などアポトーシスを誘導する分子や免疫系を疲弊させる分子を発現している。中でも PD-L1 は抗がん剤の標的として近年有名な免疫チェックポイント分子であり、リンパ球を疲弊させることが知られている。また、HLA-G は浸潤性のトロフォブラストである *extravillous trophoblast* (EVT) に発現するため、マーカーとして汎用される[1]。古典的 class I HLA と異なり、これらの非古典的 class I HLA は免疫系を抑制する。FASL は活性化リンパ球が発現する FAS と結合し、アポトーシスを誘導する。これらの分子は絨毛管腔に流入する母体のリンパ球がアロである胎児のトロフォブラストを認識して拒絶しないように免疫抑制を行なっている。また、これらのトロフォブラストが発現する分子は多くの癌細胞で発現が認められており、現在抗がん剤の標的分子となっているものも多い。これらについては多くの研究、総説があり、ここでは割愛する[2]。

一方、血漿中の妊娠関連タンパク質については、表 1 に示した。これらのタンパク質については、今まであまり焦点が当てられていない。しかし我々は、これら全身性に存在する妊娠関連タンパク質には、がんの転移を制御する重要な分子が存在するのではないかと考えている。ヒトでは、妊娠初期から中期、後期にかけて最も大きく動く妊娠関連タンパク質は *pregnancy-zone protein* (PZP) であり、妊娠時、数 10 倍まで濃度が上昇する妊婦もいる。しかし、そのレベルには個人差がある。我々は、この分子のオーソログが、進化的に浸潤性胎盤の形成を開始する新世界ザルであるコモンマーモセットにおいても、妊娠末梢血中

で高濃度となることを明らかにした[3]。

PZP は、非常に特徴的なプロテアーゼインヒビターであり、プロテアーゼによって、BAIT 領域という特徴的な領域を切断されると、構造が変化し、プロテアーゼを包み込んでその活性を抑制する[4]。切断により機能を発揮する点で、補体に関連した分子と位置付けられている。胎盤局所でも絨毛管腔血中には存在し、おそらくトロフォブラストの浸潤の抑制に寄与していることが示唆される。また、全身に分布することで、胎盤から漏れ出たトロフォブラストが、他の組織に浸潤するのを抑制している可能性もある。近年は、PZP はアルツハイマー病との関連性も指摘されており、今後の研究によっては、創薬の対象となる可能性がある。

我々のプロテーム解析により、他にも数種類のプロテアーゼインヒビターに変化が観察された。これらは *matrix metalloprotease* (MMP) の阻害などに機能し、組織への細胞浸潤や炎症誘導を抑制する可能性があり、抗がん作用を持つ機能分子としてノミネート可能であると考えられる。今回、微小なタンパク質についての解析は行なっていないが、他にも検出限界を上げることにより、妊娠時のみに増加する重要な分子を同定できる可能性がある。

2) 血漿中の妊娠関連ホルモン

血漿中の妊娠関連タンパク質とは対照的に、血漿中の妊娠関連ホルモン動態については非常に詳細が解析されている。これは個人差によらず、非常に特徴的な濃度の推移を呈することと、妊娠の可否が直結するためである。その一方で、エストロゲン、プロゲステロン、グルコルチコイドなどのステロイドホルモンは、その機能が多岐にわたるため、実際にどのような機能を果たしているかを包括的に理解するのが困難である。例えば、プロゲステロンは、婦人科系では抗がん剤としても利用されるが、乳がんの分野では、エストロゲンと協働で腫瘍の進展に機能するとの報告がある[5,6]。これらのステロイドはその受容体を共有するとの報告もあり、類似の機能を果たしていると考えることが一般的である。例えばプロゲステロンとグルコルチコイドは共に免疫系を抑制するので、同一の受容体を認識するのではないかと考えられている[7]。

我々は、健常者及び乳がん患者末梢血単核球(PBMC)を次世代重度免疫不全マウスであるNOG-hIL-4-Tgマウス[8]に移植し、そのリンパ球のグルコルチコイド受容体(GR)の発現をrealtime-rtPCRにて解析した。その結

果、乳がん患者、特にホルモン受容体陽性のルミナルAあるいはルミナルBの患者では、GRの発現が有意に増加していることを明らかにした[9]。これらの事実は、グルココルチコイドのシグナルが、がんの進展になんらかの作用を及ぼしている可能性を示唆している。エストロゲン・テストステロンなどの性ホルモンについては拮抗阻害剤などが抗がん剤として汎用されているが、グルココルチコイドはむしろ免疫チェック

ポイント阻害剤の副作用軽減や、癌患者の緩和ケア等で汎用されている。しかし、グルココルチコイドは免疫機能を低減させてがんの進展を亢進する可能性があり、その代替となる優れた低分子化合物の開発が待たれる。妊娠関連分子・ホルモンにこれを制御可能な物質がないかを探索していくことが重要と考えられる。

表1 妊娠時血漿中で産生亢進する液性分子

	分子名	NF-κB活性	炎症性サイトカイン産生	MMP産生(浸潤)	免疫細胞アポトーシス誘導	EMT	エネルギー代謝	血管新生	シャペロン	プロテアーゼインヒビター
ステロイドホルモン	Progesterone(P4)	抑制	抑制	抑制		抑制		抑制		
	Oestradiol(E2)		抑制				脂肪蓄積	亢進		
	GC(COR)	抑制	抑制	MMP8のみ亢進・炎症抑制	亢進	亢進				
ペプチドホルモン	HCG	抑制	抑制	亢進						
	Kisspeptin			抑制				抑制		
	Leptin	亢進	亢進	亢進	HLA-G発現亢進	亢進	エネルギー調節	亢進		
	Resistin	亢進	亢進	亢進			糖のuptake亢進	亢進		
	Adiponectin	亢進		亢進	Siglec10発現亢進		脂質代謝亢進	亢進		
	PP13		亢進		亢進					
	Acivin PAPP-A			亢進 亢進		亢進				
血漿タンパク質	A2M								(+)	(+)
	PZP								(+)	(+)
	PSG		抑制					亢進		

3) 妊娠免疫モデル動物作成

このように、妊娠免疫とがん免疫を比較することは、非常に重要な知見を我々に与えてくれると考えられる。その一方で、この比較解析には大きな障壁がある。それは、胎盤という臓器の進化のスピードが非常に速く、妊娠免疫に関連する分子の発現が霊長類の中でも大きく変化していることである。

齧歯類の胎盤は、霊長類と異なり、ほとんどトロフォブラストによる浸潤性がない。また、最も下等なサルである原猿でも脱落膜への浸潤性は観察されない。我々は、新世界ザルであるコモンマーモセット胎盤が浸潤性であることを報告しているが、その浸潤のレベルは旧世界ザル、類人猿、ヒトに至る進化の過程でより深くなっている。さらに、プロゲステロンなど妊娠ホルモンの動態なども種によって大きく異なる。先に述べたように、新世界ザルでさえ、妊娠関連タンパク質の代表であるPZPではなく、オーソログのA2ML1を発現しているのである。

また、浸潤性のみならず、胎盤組織は内在性レトロウイルスの発現やそれに伴う細胞融合を含み、かつ大量

のプロゲステロンを産生するためにミトコンドリアまで変化するという劇的な変化を遂げる臓器である。そのため、個別のヒトの胎盤自身も必ずしも同一の突然変異、遺伝子発現をしているとは限らないのである。

免疫系そのものも進化の速度が速く、ヒトとマウスでは異なる点も多い。そのため、最も汎用される齧歯類では、ヒトの妊娠免疫を真に理解する実験系を組むことはできないのである。また、抗がん剤の開発でも、マウスでは有効であったが、ヒトでは有効性が確認されないという現象が山積している。

我々は、ヒト胎盤そのものをマウスに作成することは現時点ではできないが、免疫系のみについてはヒト免疫担当細胞を用いた *in vivo* 解析が可能なヒト化マウスモデルを利用している。特に、我々が開発したNOG-hIL-4-Tgは、ヒト末梢血単核球を移植しても移植片対宿主病を発症せず、T細胞のみならずB細胞も生着するマウスである。我々は、このマウスに健常者および乳癌患者の血液より調製したPBMCを移植し、その免疫環境をある程度再現できることを報告した[10]。これらのマウスを用いることにより、妊婦と癌患

者の免疫系、免疫応答が抗がん作用に及ぼす影響を解析することが可能と考えられる。また、in vitro 培養したトロフォブラストを移植することにより、妊娠免疫をある程度再構築できる可能性もある。

3. 展望

現段階では、特定の妊娠関連分子が実際に抗がん剤として有効であるとの事実はなかなか得られないが、妊娠免疫に関連する分子、がん免疫に関連する分子の詳細を比較解析し、妊娠関連分子の機能を利用して抗がん剤を探索することは、理に適っていると考える。しかしその有効性を確認するためには、同時に動物モデルの開発も必須であり、今後、両者を並行して行うことが重要である。もしそれが達成できれば、より患者QOLの高い、多くのがんに有効な抗がん剤の開発が可能となると考える。

4. 引用文献

- [1] J.M. Martin-Villa et al., *Front Immunol.* **13**,796054
- [2] L. Xu et al. *Front Immunol* **12**,642392
- [3] H. Kashiwagi et al., *Scientific Reports*, **10**,5088(2020)
- [4] P.E. Jensen and T. Stigbrand, *Eur J Biochem.* **210**:1071-1077(1992)
- [5] TH. Truong and CA. Lange, *Endocrinol.* **159**, 3897-3907 (2018)
- [6] F. Mauvais-Jarvis et al., *Endocr Rev***16**:bnab041 (2021)
- [7] S. Kunzmann et al., *Reprod Sci* **26**,1062-1070(2019)
- [8] Y. Kametani et al., *PLOS ONE* **12**,e0179239(2017)
- [9] Y. Ohno et al., *Scientific Reports*, **11**,12798(2021)
- [10] T. Seki et al., *Bioscience Trends*, **12**,247(2018)

5. 業績

【論文発表】

- 1) Y.Goto*, Y.Kametani*, A.Auguste, A.Thuraya, A. LeFormal, S.Izumi, C.Genestie, H.Ishimoto, M.Mikami, A.Leary, Tropomyosin-related kinase B (TrkB) full-length isoform is related to advanced-stage clear cell ovarian cancer (CCOC) *Eur. J Gyneol. Oncol.*,**42**,899-908(2021)
- 2) 鈴木進悟、亀谷美恵、椎名隆 *HLA-G* 遺伝子の構造、発現および多型性, *MHC in press*
- 3) Y.Ohno, S.Ohshima, A.Miyamoto, F.Kametani, R.Ito,

B.Tsuda, Y.Kasama, S.Nakada, H.Kashiwagi, T.Seki, A.Yasuda, K.Ando, M.Ito, Y.Tokuda, Y.Kametani*, HER2-antigen-specific humoral immune response in breast cancer lymphocytes transplanted in hu-PBL hIL-4 NOG mice .*Scientific Reports*, **11**, 12798.

- 4) N.Imaeda, A.Ando, T.Matsubara, M.Takasu, N.Nishii, A.Miyamoto, S.Ohshima, Yoshie Kametani, Shingo Suzuki, Takashi Shiina, Tetsushi Ono, Jerzy K. Kulski, and Hitoshi Kitagawa, Stillbirth rates and their association with swine leucocyte antigen class II haplotypes in Microminipigs. *Animal Bioscience Anim Biosci.* **34**,1749-1756 (2021)

【学会等発表】

- 1) 亀谷美恵：コモンマーモセット胎盤と妊娠免疫の特徴。第11回 日本マーモセット研究会大会、2022.1 on line (招待講演)
- 2) 亀谷美恵 他、Her2-antigen-specific humoral immune response in breast cancer lymphocytes transplanted in hu-PBL hIL-4 NOG mice. 第50回 日本免疫学会学術集会、2021.12 仙台
- 3) 清水智香 他、Regulation of human peripheral blood T cell activation by steroid hormones related to pregnancy. 第50回 日本免疫学会学術集会、2021.12 仙台
- 4) Y. Kametani et al.: Her2-antigen-specific humoral immune response in breast cancer lymphocytes transplanted in hu-PBL hIL-4 NOG mice. 第80回 日本癌学会学術総会、2021.9 横浜
- 5) 山田壮我 他、妊娠ホルモンによるヒト化マウス免疫系の調節機能解析。第68回 日本実験動物学会総会、2021.5 on line

6. 謝辞

先進生命研の活動の中で多くのご指導をいただき、かつ本稿の基盤となる仮説構築に重要な示唆をくださり、かつ本稿を書く機会を与えていただきました平山令明先生に心より感謝いたします。

ニューラルネットワークによる皮膚ガス組成を用いた癌診断法の開発

Development of neural network for cancer prediction using human skin gas profiles

関根 嘉香¹⁾²⁾, 戸高 惣史³⁾, 川西 彩⁴⁾, 森町 将司⁴⁾, 平林 健一²⁾⁵⁾

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⁾ AIREX 株式会社, ⁴⁾ 東海大学医学部内科学系消化器内科学, ⁵⁾ 東海大学医学部基盤診療学系病理診断学

Yoshika Sekine¹⁾²⁾, Michihito Todaka³⁾, Aya Kawanishi⁴⁾, Masashi Morimachi⁴⁾, and Kenichi Hirabayashi²⁾⁵⁾

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

³⁾ AIREX Inc. ⁴⁾ Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokai University School of Medicine,

⁵⁾ Department of Pathology, Tokai University School of Medicine

[要旨]

癌患者から放散する生体ガスには特有のにおいがあることが報告されている。そこで本研究では、体臭の原因となる皮膚ガスに着目し、ニューラルネットワークに膵臓癌患者、胃腸系癌患者および健常者の皮膚ガス組成（75 成分の放散フラックス）を学習させ、癌の判別可能性を検討した。構築したニューラルネットワークに評価用皮膚ガス組成を入力した結果、癌患者と健常者を判別できることがわかった。

[Abstract]

Early diagnosis for carcinoma is important for extension of prognosis. However, in the incurable carcinoma cases such as pancreatic cancer, almost of patients are discovered in advanced stage because of difficulty of early diagnosis. This study aims to examine the possibility of early diagnosis for carcinoma on non-invasive basis by investigating trace gases emanating from human skin surface, so-called human skin gas. In this paper, we have applied an artificial neural network to cancer prediction using human skin gas profiles of cancer patients and healthy volunteers, which were obtained by passive flux sampler coupled with gas-chromatography- mass spectrometry (GC-MS) methodology. As a results, the developed neural networks worked for discriminating cancer patients from healthy subjects.

[Key Words]

carcinoma, early diagnosis, body odor, human skin gas, neural network

1. はじめに

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、体臭の原因となる。皮膚ガスは、揮発性の有機・無機化合物であり、エネルギー基質（炭水化物・タンパク質・脂質）の代謝生成物、腸内細菌による分解生成物、吸入曝露・経口摂取された外因性化学物質（外来因子）、皮膚表面における生物学的・化学的な反応生成物などから構成される混合ガスである^{1,2)}。この皮膚ガスは、疾病の状態、疾病の予兆、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、これまで肝障害患者の病態診断³⁾、心理的ストレス診断や睡眠の質のモニタリング³⁾、農薬中毒患者の病態診断⁴⁾、重度熱傷患者の熱傷創の治癒程度の観察⁵⁾等の

臨床研究においてその有用性が示されている。

一方、筆者らは皮膚ガスを検体として用いた非侵襲・非観血的な癌の診断法の開発を意図し、癌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癌患者では違いがあること⁶⁾、また多変量解析（因子分析、判別分析等）により両群を判別できる可能性があること⁷⁾を見出してきた。現在のところ、癌の特異的バイオマーカーは見出されていないため、皮膚ガス組成のパターン認識に基づく判別法が有効と考えられる。

人工知能（Artificial Intelligence, AI）は、人間の脳の構造を工学的にモデル化し、認識、判断、記憶、学習能力等の高度なその働きを、コンピュータ上で実現

させるシステムである。ニューラルネットワーク (Neural Network) は、パターン認識に特化したアルゴリズムであり、データの入力層、中間層および出力層から構成され、脳の神経細胞 (ニューロン) をモデル化したニューロン素子を介して信号が伝達される (図1)^{8,9)}。中間層のニューロン素子は、他のニューロンからの信号を受け取る複数の入力端子と、受け取った信号に応じて自らの興奮の度合いを定めて信号を発信する出力端子を持っており、ニューロンが階層構造で結合していることから階層型ニューラルネットワークと呼ばれている。

本研究では、膵臓癌患者、胃腸系癌患者および健康者の皮膚ガスデータにニューラルネットワークを適用し、皮膚ガス組成のパターン認識に基づく癌の判別可能性について検討したので報告する。

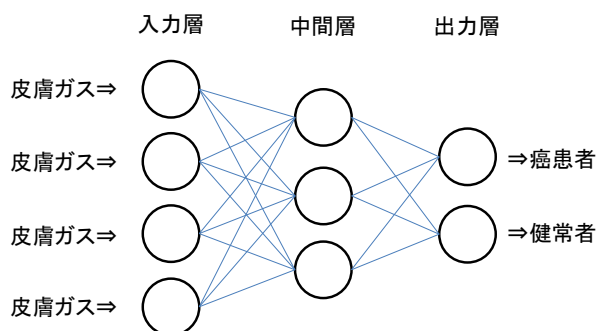


図1 階層型ニューラルネットワークの概念図

2. 方法

1) 皮膚ガスの捕集・分析

本研究では、東海大学医学部付属病院において同意が得られた癌患者から皮膚ガス検体を捕集し、東海大学湘南校舎において皮膚ガスの化学分析を行った。

皮膚ガスの捕集には東海大学湘南校舎で開発されたパッシブ・フラックス・サンプラー (Passive Flux ampler, PFS) 法¹⁰⁾を用いた。PFSは分子拡散の原理を利用してガスを捕集する小形デバイスであり、容器状の本体部、捕集材および止め具で構成されている。PFSの開口部側を前腕部にのせて固定し、この時生じるヘッドスペース内を皮膚ガスが分子拡散して捕集材に捕捉される (図2)。今回、皮膚ガスの捕集部位は、左右いずれかの前腕部とし、捕集時間は患者の状態を見ながら1~2時間を目安とした。

皮膚ガス成分の捕集材からの脱離には、抽出溶媒として二硫化炭素 0.5 mL を用い、内部標準としてトルエ

ン-d8、吉草酸-d9、デカン酸-d2 を添加して試料溶液とした。試料溶液から 0.3 mL 分注し、誘導体化試薬として 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) とトリメチルクロロシラン (TMCS) の 99:1 混合試薬 (Sigma-Aldrich 社製) を 25 μ L 添加し、4 時間静置した。BSTFA-TMCS 混合試薬は、極性官能基を持つ化合物をトリメチルシリル化し、高感度化を図るものである。誘導体化後、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC : 7890B, Agilent Technologies 社製 MS : Q1050GC MkII, 日本電子社製) に導入し、SIM モードで分析を実施した。

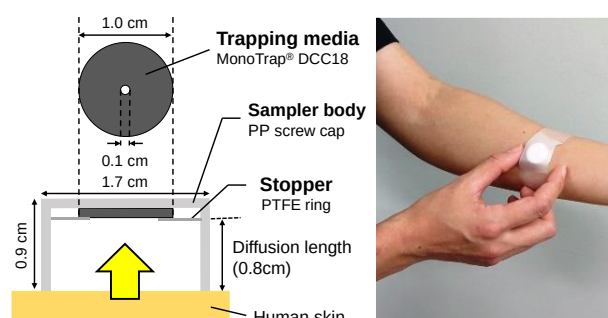


図2 PFSによる前腕部における皮膚ガス捕集

2) 用いたデータおよび解析方法

今回の検討には、膵臓癌患者 20 検体、胃腸系癌患者 7 検体 (胃癌 3 検体、S 状結腸癌 2 検体、大腸癌 1 検体、食道癌 1 検体)、健康者 22 検体の皮膚ガスデータを用いた。皮膚ガスデータは、各検体における 75 成分の放散フラックス ($\text{ng cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) を用いた^注。

ニューラルネットワークの構築には、IBM SPSS Statistics 28 Neural Networks を用いた。解析は次の 3 パターンについて行った。

- ① 膵臓癌患者と健康者の判別：学習データとして膵臓癌患者 17 検体、健康者 19 検体の皮膚ガス組成を入力し、癌の有無を予測する評価データとしてランダムに選択した膵臓癌患者 3 検体、健康者 3 検体の皮膚ガス組成を入力した。学習データとテストデータ (過学習を防ぐため予測誤差の追跡に使用するデータ) の割り当て数は 7:3 とし、アーキテクチャは自動構築とした。
- ② 胃腸系癌患者と健康者の判別：学習・テストデータとして胃腸系癌患者 6 検体、健康者 19 検体の皮膚ガス組成を入力し、癌の有無を予測する評価データとしてランダムに選択した胃腸系癌患者 1 検体、健康者 3 検体の皮膚ガス組成を入力した。計

算条件は①と同様。

- ③ 膵臓癌患者、胃腸系癌患者と健常者の判別：学習・テストデータとして膵臓癌患者 17 検体、胃腸系癌患者 1 検体、健常者 19 検体の皮膚ガス組成を入力し、癌の有無を予測する評価データとしてランダムに選択した膵臓癌患者 3 検体、胃腸系癌患者 1 検体、健常者 3 検体の皮膚ガス組成を入力した。計算条件は①と同様。

3.結果

1) 膵臓癌患者と健常者の判別

癌の有無の判定に用いるダミー変数の値として、膵臓癌患者＝1、健常者＝0 を従属変数、皮膚ガス 75 成分の放散フラックスを共変量（要因ともいう）として入力した結果、中間層は 1 層、6 ユニット、活性化関数は双曲線正接のニューラルネットワークが構築された。癌の有無を予測する評価データに用いた 6 検体の評価結果を表 1 に示す。膵臓癌患者の予測値はいずれも 1 となり、疑似確率 99.9% で正解と判定された。また健常者の予測値はいずれも 0 となり、疑似確率 99.9% で正解と判定された。このことから、構築したニューラルネットワークにより膵臓癌患者と健常者の判別が可能であることがわかった。

表 1 ニューラルネットワークによる膵臓癌患者と健常者の判別予測結果

評価データ	予測値	疑似確率		判定
		癌無し	癌あり	
膵癌患者#1	1	0.001	0.999	正解
膵癌患者#2	1	0	1	正解
膵癌患者#3	1	0.001	0.999	正解
健常者#1	0	0.999	0.001	正解
健常者#2	0	1	0	正解
健常者#3	0	0.999	0.001	正解

2) 胃腸系癌患者と健常者の判別

癌の有無の判定に用いるダミー変数の値として、胃腸系癌患者＝1、健常者＝0 を従属変数、皮膚ガス 75 成分の放散フラックスを共変量として入力した結果、中間層は 1 層、8 ユニット、活性化関数は双曲線正接のニューラルネットワークが構築された。癌の有無を予測する評価データに用いた 4 検体の評価結果を表 2 に示す。胃腸系癌患者の予測値は 1 となり、疑似確率 99.9% で正解と判定された。また健常者の予測値はい

ずれも 0 となり、疑似確率 100% で正解と判定された。このことから、構築したニューラルネットワークにより胃腸系癌患者と健常者の判別が可能であることがわかった。

表 2 ニューラルネットワークによる胃腸系癌患者と健常者の判別予測結果

評価データ	予測値	疑似確率		判定
		癌無し	癌あり	
胃腸癌患者	1	0.001	0.999	正解
健常者#1	0	1	0	正解
健常者#2	0	1	0	正解
健常者#3	0	1	0	正解

3) 膵臓癌患者、胃腸系癌患者と健常者の判別

癌の有無の判定に用いるダミー変数の値として、膵臓癌患者＝1、健常者＝0、胃腸系癌患者＝－1 を従属変数、皮膚ガス 75 成分の放散フラックスを共変量として入力した結果、中間層は 1 層、6 ユニット、活性化関数は双曲線正接のニューラルネットワークが出力された。癌の有無を予測する評価データに用いた 7 検体の評価結果を表 3 に示す。期待値と予測値には乖離が生じ、健常者 #2 と胃腸系癌患者はいずれも予測値が -0.3 となり、判別が出来なかった。

表 3 ニューラルネットワークによる膵臓癌患者、胃腸系癌患者および健常者の判別予測結果

評価データ	期待値	予測値	残差
膵癌患者#1	1	0.5	0.6
膵癌患者#2	1	0.5	0.5
膵癌患者#3	1	0.6	0.4
健常者#1	0	0.0	0.0
健常者#2	0	-0.3	0.3
健常者#3	0	0.2	-0.2
胃腸癌患者	-1	-0.3	-0.7

4.考察

皮膚ガス組成を用いたニューラルネットワークによる癌の判別を 3 パターンで試みた。その結果、膵臓癌患者と健常者の間、胃腸系癌患者と健常者の間での判別は可能であった。特に胃腸系癌患者の学習・テストデータ数は僅か 6 であったにもかかわらず判別できたのは、皮膚ガス組成をパターン認識した場合、癌患者

と健常者では顕著に異なっているためと考えられる。

しかしながら、膵臓癌患者、胃腸系癌患者および健常者を合わせた場合には、判定能力が低下した。これは、今回検体数が少なかったため、胃腸系癌として胃癌、S 状結腸癌、大腸癌および食道癌を1群として取り扱ったことに起因すると考えられ、今後は各症例について検体数を増やして検討する必要がある。一方、ニューラルネットワークの構築過程で、アーキテクチャは自動構成としたが、中間層の数、活性化関数など手動で変化させた場合の影響についても検討したい。

今後はさらに症例数を増やし、癌の有無だけでなく、種別や進行度の診断に寄与する判別方法を検討し、遠隔・在宅でも適用可能な癌の早期診断法の確立を目指していく。

5. 引用文献

- [1] Mochalski P., et al., *J. Chromatogr B*, 959, 62-72(2014)
- [2] Sekine Y., et al., *J. Chromatogr. B*, 1092, 394-401(2018)
- [3] Sekine Y., et al., *J. Jpn Assoc. Odor Environ.*, 48, 410-417 (2017)
- [4] Umezawa K., et al., *Jpn J. Clin. Path.*, 66,949-956(2018)
- [5] Kimura K., et al., *J. Jpn Assoc. Odor Environ.*, 47,421-429(2016)
- [6] 戸高惣史ほか, 臨床環境医学 (2022) 印刷中
- [7] 特願 2020-47021, がんの評価方法, 発明者: 平林健一, 関根嘉香, 川口義明 (2020)
- [8] Mostavi M., et al., *BMC Med. Genomics*. 3(13(Suppl 5)), 44(2020)
- [9] Agrawal S. and Agrawal J., *Procedia Computer Sci.*, 60, 769-774(2015)
- [10] Sekine Y., et al., *J. Skin and Stem Cell*, 6(1), e93392 (2019)

6. 業績

【論文発表】

- 1) 戸高惣史, 平林健一, 川西彩, 森町将司, 関根嘉香: 膵臓癌患者の皮膚から放散する微量生体ガスに関する研究, 臨床環境医学 (2022) 印刷中
- 【学会等発表】
- 1) 戸高惣史, 関根嘉香, 川西彩, 森町将司, 平林健一: 膵臓癌患者の皮膚から放散する微量生体ガスに関する研究, 第 29 回日本臨床環境医学会, 2021.6 オンライン. 本発表により会長賞受賞
- 2) 関根嘉香, 平林健一: いつでもどこでも体のに

おいでがんの診断, イノベーションジャパン
2021~大学見本市 Online, 2021.8

7. 謝辞

研究分担者である東海大学医学部内科学系血液腫瘍内科学・安藤潔教授、小川吉明教授、川田浩志教授、鬼塚真仁准教授、大間知謙講師、町田真一郎講師、豊崎誠子助教、鈴木利貴央講師、扇屋大輔助教、青山泰之助教、原隆二郎助教、東海大学医学部基盤診療学系病理診断学・中村直哉教授、東海大学医学部内科学系消化器内科学・松嶋成志教授、鈴木孝良教授、伊藤裕幸講師、川西彩助教、森町将司助教、東海大学医学部外科学系口腔外科学・加藤久視講師、研究協力者である東海大学医学部基盤診療学系病理診断学・高梨由美実験助手、かわぐち消化器内科・川口義明院長、東海大学健康学部・石井直明先生、東海大学工学部生命化学科・笹川昇教授、東海大学健康学部健康マネジメント学科・安田佳代講師に感謝いたします。

本研究は、東海大学先進生命研究所助成金、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。

※ 解析に用いた 75 成分: プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、2-エチル-1 ヘキサノール、アセトアルデヒド、プロパナール、ブタナール、イソ吉草酸アルデヒド、吉草酸アルデヒド、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナール、ノナナール、デカナール、トランス-2-ヘキセナール、トランス-2-ノネナール、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ吉草酸、吉草酸、ヘキサン酸、ヘプタン酸、オクタン酸、ノナン酸、デカン酸、アセトン、2-ブタノン、2-ペンタノン、2-ヘキサノン、2-ヘプタノン、2-オクタノン、2-ノナノン、2-デカノン、2-ウンデカノン、2-ドデカノン、2-トリデカノン、2-テトラデカノン、2-ペンタデカノン、ジアセチル、アセトイン、6-メチル-5-ヘプテン-2-オン、酢酸エチル、酢酸シス-3-ヘキセニル、ブチルヒドロキシトルエン、ベンズアルデヒド、フェノール、トルエン、エチルベンゼン、m, p-キシレン、o-キシレン、スチレン、p-ジクロロベンゼン、ジェオスミン、インドール、スカトール、 α -ピネン、 β -ピネン、リモネン、メチルメルカプタン、エチルメルカプタン、アリルメチルスルフィド、ジアリルジスルフィド、 γ -ヘキサノラクトン、 γ -ヘプタノラクトン、 γ -オクタノラクトン、 γ -ノナノラクトン、 γ -デカノラクトン、 γ -ウンデカノラクトン、バニリン

椎間板細胞製品開発における新規 Tie2 アゴニスト化合物の探索

Search for novel Tie2 agonist compounds in the development of intervertebral disc cell products

酒井 大輔^{1,2)}, 相馬 葉月¹⁾, 平山 令明²⁾

東海大学医学部外科学系整形外科¹⁾、東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門²⁾

Daisuke Sakai^{1,2)}, Hazuki Soma¹⁾, and Noriaki Hirayama²⁾

¹⁾Department of Orthopaedic Surgery, Surgical Science, Tokai University School of Medicine

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

[要旨]

椎間板変性症による慢性腰痛症は治療法が未だ確立されていない。我々はその治療を標的とした同種再生医療等製品の開発、産業化を目指す中で、髄核細胞に Tie2 が発現することを報告した。Ang-1/Tie2 シグナル伝達経路は癌や敗血症など血管系が重要とされる多くの疾患に関係していると報告されているが、我々は椎間板髄核細胞においても Tie2 アゴニストの探索が椎間板変性を抑制する創薬の標的となることを示し、共同開発企業と *in silico* 創薬による探索に着手した。

[Abstract]

Chronic low back pain caused by intervertebral disc degeneration has yet to be treated. We have reported that Tie2 is expressed in nucleus pulposus cells. The Ang-1/Tie2 signaling pathway has been reported to be involved in many diseases in which the vascular system is important, such as cancer and sepsis. The Ang-1/Tie2 signaling pathway has been reported to be involved in many diseases such as cancer and sepsis. We have shown that the search for Tie2 agonists in nucleus pulposus is also a target for drug discovery. Therefore, we have started to search for Tie2 agonists by *in silico* drug discovery with co-development companies.

[Key Words]

intervertebral disc degeneration, regenerative medicine, Ang1/Tie2 signaling pathway, *in silico*, small molecule

1.はじめに

腰痛は日本国民の多くが抱えており、超高齢化社会である我が国にとって社会的な課題である[1]。腰痛は、一般的に椎間板変性の進行に関連しているとされており、椎間板は全体の約 80%が水分でできており、椎骨にかかる衝撃の吸収、脊柱の前後側屈や回旋運動などを可能とし、全体の強度と安定性を担っている[2]。しかし、人間の身体において最大の無血管臓器とも呼ばれる椎間板に変性が生じると解剖学的異常や退行性変化を引き起こし、椎間板ヘルニアや変性側弯症などの障害を進行させる原因の一つとなる。こうした椎間板変性の病理病態は未だ明確には解明されていない。加齢、外傷、ストレス、喫煙、遺伝的要素など様々な原因が関与されていると考えられ

ており、その進行機序は個々人により異なるのが現実である[2-3]。

椎間板変性に由来する腰痛の治療方法は限られており、理学療法や鎮痛剤などの対症療法、症状が重い場合は脊椎固定術などの外科的介入が検討される[4-6]。しかし、椎間板からくる痛みの原因を特定することは困難である場合が多い為、抜本的治療とは言えず、現存の治療法における限界となっている[7]。腰痛患者に対し痛みを和らげるだけでなく、失われた椎間板組織の機能を回復させる有効な治療法は未だ確立されていない。

我々は血管恒常性維持に重要な Ang1/Tie2 システムの運動器、皮膚の幹細胞維持機構での重要性を見出した。特に腰痛の主因となる椎間板変性において

内在性幹細胞の維持に Tie2 発現は必須であり、その消耗は加齢と変性進行を促す(Sakai D et al. Nat Comm.2012)。また Tie2 リガンド Ang-1 刺激により、現在取り組む同種椎間板細胞製品開発において産業化に耐えうる拡大培養技術を獲得した(6712740)。さらなる効率化に向け低価格な Tie2 アゴニスト開発を目指し、*in silico* 創薬に着手した。

2.結果の概要

1) Ang1/Tie2 経路

アンジオポエチン (Angpt) / Tie2 リガンド受容体システムは 1996 年に内皮血管特異的受容体チロシンキナーゼの 2 番目のクラスとして発見され、Tie2、およびその分泌タンパク質リガンドである Ang-1 は、生理学および病態生理学的条件下で重要な血管新生メディエーターとして同定された[8]。

Tie2 は癌細胞や線維芽細胞、壁細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞など、疾患および正常組織の非内皮細胞においても発現し、Tie2 受容体はアンジオポエチンリガンドを持つ。周皮細胞で発現される Ang-1 によって活性化され、静止状態の EC 表現型の維持に寄与する。胚発生における血管構造に必要なシステムである[9]。

Ang-1/Tie2 システムにおいて Ang-1 と Ang-2 は最も特徴的なアンジオポエチンである。Ang-1 は Tie2 受容体の必須アゴニストとして作用し、自己リン酸化の誘導、血管の安定性やリモデリングなど成熟に重要な役割を果たすことで Tie2 へ結合することが示されており、注目されている[10]。

Ang-1 を介した Tie2 リン酸化は、抗アポトーシス、抗炎症、および抗透過性の効果があり、AKT 依存の FOXO1 調節により血管が生存し、安定する。逆に、共有細胞外 Tie2 結合ドメインへの Ang-2 結合は、Tie2 脱リン酸化をもたらす。

これまでに、さまざまな実験モデルにおける競合的拮抗薬 Ang-1 および Ang-2 の変化の結果としての Tie2 活性化の基本的な役割は実証されてきている[10]。

2) Ang-1/Tie2 システムが関与する病態

我々は、腰痛の主原因となる椎間板変性において髄核細胞に発現する細胞表面マーカーとそ

の機能の関係性を解析し、新たな分化カスケードを提唱した。中でも Tie2 の発現が加齢や変性により急速に減衰することを発見し、外来性 Ang-1 刺激により椎間板の恒常性維持が促され、Tie2 アゴニストの探索が創薬の標的となることを示した[11-12]。さらに、Tie2 が椎間板の老化と変性の高感度マーカーであり、椎間板変性の診断に有用なマーカーになるのではないかと報告し、Tie2/Ang-1 シグナル伝達は髄核細胞の維持と生存に役割を果たしていることが示唆された[11]。

Ang-1/Tie2 システムは、癌、敗血症、糖尿病、動脈硬化症、眼疾患など、血管系が重要な役割を果たす多くの疾患に関係していることが報告されている。

敗血症および急性肺損傷において、Ang-2 は病因的意義があることが示されている[13]。外傷後早期のアンジオポエチンと VEGF の役割について評価したところ、Ang-2 は損傷の重症度と全身性低灌流の両方に比例し、外傷後早期に放出されることが示された。さらに、Ang-2 の血漿レベルは、内皮活性化、凝固異常、および補体カスケードの活性化のマーカーと相関し、高レベルであるとより悪い臨床転帰と関連していることから、Ang-2 が重度の外傷後の内皮活性化と機能不全の直接的なメディエーターのマーカーである可能性があることが示された[13]。

血管新生は、腹部大動脈瘤 (AAA) の発症と進行において Angpts が果たす潜在的な役割を評価した[14]。マウスに Ang-2 アデノウイルス (AdEV) を投与したところ、ブランク病変の大きさにより評価されるアテローム性動脈硬化症の重症度が低下し、AdEV に応答して、アテローム内の酸化 LDL のマーカーが減少した[15]。*In vitro* 研究における HUVEC での関連した研究では、Ang-2 が LDL 酸化形成を減少させ、一酸化窒素 (NO) 依存的に泡沫細胞の形成を引き起こす可能性があることを示唆している。最近、Ang-1 がアペリンの発現を増強することによってアテローム保護特性を持つことを示唆している。また、Ang-1 で刺激した後、アペリンの発現が時間依存的に増加することを示し、これは Ang-1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用い

た *in vivo* においても示されている[16]。

3) 椎間板再生医療へ Tie2/Ang-1 システムの応用

我々は椎間板変性症による慢性腰痛症の治療を標的とした同種再生医療等製品の開発、産業化を目指している。本開発では 10 代の若年者ドナーから得られる少量の椎間板組織から椎間板内の細胞の Tie2 発現を維持したまま拡大培養する必要がある。Ang-1 は多量体を形成する糖タンパク質であることから Tie2 アゴニストの創薬は困難で、上市化した化合物はこれまでにない。可溶性 Ang-1 の添加より Tie2 リン酸化は促せるが、高コスト、臨床使用にリスクもあり、より効率的かつ安価で臨床使用に耐えうる Tie2 アゴニストを求めて共同開発企業と *in silico* 創薬による探索に着手した。Chemical Computing Group 社が配布している 653,214 化合物を対象とし、Ang-1 様の構造を持ち、かつ Tie2 への親和性の高い分子を探索した。

30 化合物の化学構造式および化合物 code の中から、最も親和性の高いヒット化合物を得た。(図 1)

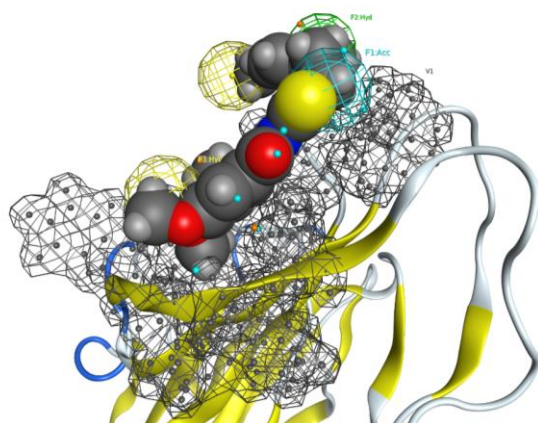


図 1 Tie2 (cartoon) と 新規化合物 (space-filling model) の相互作用

3.展望

本邦において現在、椎間板修復のための細胞療法に関する臨床応用、産業化への道筋は急速に進行している。しかし、これまでいくつかの臨床研究において痛みや障害を軽減するための有益な結果や、胸腰椎の特徴の改善を示唆するデータを提示しているものもあるものの、これらの試験は適切なプラセボ

やシャムコントロールが欠けている為、限界があるとされている[17-18]。

2019 年、本邦にて腰椎椎間板変性症に対する細胞移植の治験が開始された[19-20]。DiscGenics 社が開発した細胞治療製品の安全性と有効性を評価する目的で、第 I / II 相臨床試験が開始され[20-21]、細胞移植療法の可能性として、腰椎椎間板変性症患者の変性した椎間板を修復し、それに伴う腰痛を緩和することが挙げられている。前臨床試験では、明らかな安全性の問題もなく、誘発された椎間板の変性を減少させる効果があることが示されている[22-23]。

様々な動物がモデルとして採用される研究の多くは、細胞移植が椎間板を部分的に修復し、椎間板の高さを維持または回復する事を実証しているが、未だ多くの疑問が残っている。椎間板由来の細胞は大量に入手することが難しく、さらに *in vitro* では細胞の能力を損なうことなく拡大することが難しい。同様に移植する細胞の数も結果に影響することが示されており、犬の研究では低用量の細胞が高用量の細胞よりも優れている可能性が示唆されている一方、ヒトの初期の研究では、細胞数が多いほど結果が向上することが示唆されている[23-25]。これらの未解決である問題に答えるために、細胞治療のさらなる研究と最適化が期待されている。我々は次世代となる同種他家髄核細胞を用いた製品（同種 Tie2 陽性髄核細胞製品）の導入を目指している。本来、腰椎椎間板ヘルニアの手術において破棄する組織より髄核細胞を分離して用いることで、より高い細胞活性を持つ製品の導入が可能である。Tie2 は細胞活性が高いとされており、その発現の多いとされている若年者の患者を対象としている。前述のように、Ang-1/Tie2 経路は椎間板以外の様々な組織において再生力が示されており、髄核細胞においても同様の機能を発揮し、より質の高い製品の開発を目指している[26]。

腰痛患者数、関連する医療、または腰痛の強度がわずかに減少するだけで、社会経済的コストが大幅に削減され、多くの患者に大きなメリットがもたらされる可能性が示唆されている。細胞治療は、椎間板の変性に対処するための有望な手段であるとされ、世界中で様々な臨床試験が行われている。近い将来、これらの製品が整形外科の脊椎外科医のための新し

い治療法の1つとして実現されることを期待している。

4. 引用文献

[1] 厚生労働省 2019 年度:国民生活基礎調査の概要.2020.5.25.

[2] 酒井大輔:椎間板の微小研究:臨床整形外科 第54巻 第2号.2019.02.25.196-199.

[3] 堀北夏未,ほか:再生医療技術を用いた椎間板疾患治療.Jpn J Rehabil Med2019;56:694-697.

[4] Daisuke S,et al:Current status of cellular transplantation as a strategy for intervertebral disc regeneration in Japan.

[5] Ringwalt C,et al:Proescholdbell SK, et al. Differential prescribing of opioid analgesics according to physician specialty for Medicaid patients with chronic noncancer pain diagnoses. Pain Res Manag. 2014;19(4):179-85.

[6] Yoshihara H,et al:National trends in the surgical treatment for lumbar degenerative disc disease: United States, 2000 to 2009. Spine J. 2015;15(2):265-71.

[7] Epstein NE:Adjacent level disease following lumbar spine surgery A review. Surg Neurol Int. 2015;6(Suppl 24):S591-9.

[8] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. Cell. 1996;87(7):1161-1169.

[9] Alexander Lukasz, Philipp Kumpers, Sascha David;Role of Angiopoietin/Tie2 in Critical Illness: Promising Biomarker, Disease Mediator, and Therapeutic Target? Scientifica (Cairo). 2012; 2012: 160174

[10] Martin Teichert, Laura Milde,et al; Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation, Nat Commun. 2017; 8: 16106.

[11] Sakai D et al;Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc, nature communications, 1264 (2012)

[12] Adel Tekari, Samantha C. W. Chan, Daisuke Sakai, Sibylle Grad & Benjamin Gantenbein; Correction to: Angiopoietin-1 receptor Tie2 distinguishes multipotent differentiation capability in bovine coccygeal nucleus pulposus cells, BMC Part of Springer Nature, 31.January 2019,49

[13] Michael T Ganter, et al; Angiopoietin-2, marker and mediator of endothelial activation with prognostic significance early after trauma?,Ann Surg,2008 Feb;247(2):320-6.

[14] Alexandra F. Trollope and Jonathan Golledge; Angiopoietins, abdominal aortic aneurysm and atherosclerosis, Atherosclerosis. 2011 Feb; 214(2): 237-243.

[15] Asif Ahmed, Takeshi Fujisawa et.al; Angiopoietin-2 confers Atheroprotection in apoE-/- mice by inhibiting LDL oxidation via nitric oxide, Circ Res 2009 Jun 19;104(12):1333-6.

[16] Mary M Chen, Euan A Ashley,et al; Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction, Circulation,2003 Sep 23;108(12):1432-9.

[17] Schol J, et al: Cell therapy for intervertebral disc herniation and degenerative disc disease: clinical trials. International orthopaedics. 2019;43(4):1011-25.

[18] 酒井大輔:腰痛に対する再生医療の現状 2018up-date.関節外科。2018;37:1363-1367

[19] 学校法人東海大学新聞編集委員会: 再生医療で腰痛症を治療 .2019. Available at: <http://tokainewspress.com/view.php?d=1735> Accessed on January 28 2020.

[20] US National Library of Medicine - ClinicalTrials.gov ,2017. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03347708> Accessed January 28, 2020.

[21] US National Library of Medicine - ClinicalTrials.gov ,2019. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03955315> Accessed January 28, 2020.

[22] Silverman LI,et al:In vitro and in vivo evaluation of discogenic cells, an investigational cell therapy for disc degeneration. The spine journal : official journal of the North American Spine Society. 2020;20(1):138-49.

[23] Serigano K,et al:Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. J Orthop Res. 2010;28(10):1267-75.

[24] Hiraishi S,et al:Discogenic cell transplantation directly from a cryopreserved state in an induced intervertebral disc degeneration canine model. JOR Spine. 2018;1(2):e1013.

[25] Elabd C,et al:Intra-discal injection of autologous, hypoxic cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in five patients with chronic lower back pain: a

long-term safety and feasibility study. Journal of translational medicine. 2016;14:253.

[26] 相馬葉月, 酒井大輔; 椎間板 椎間板変性に対する再生医療の現状, Orthopaedics (0914-8124)34 巻 10 号 Page229-234(2021.10)

SARS-CoV-2 の L452R 変異が細胞性免疫から逃れる分子メカニズムに関する検討

A Possible Molecular Mechanism of the L452R Variant of SARS-CoV-2 Escaping from the HLA-restricted cellular immunity

平山 令明

東海大学先進生命科学研究so・医薬総合研究部門

Noriaki Hirayama

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

[要旨]

In silico 研究により、SARS-CoV-2 ウイルスのスパイク・タンパク質の受容体結合モチーフにある 10 量体ペプチド NYNYLYRLFR は HLA-A24 の免疫優性エピトープになる可能性があることを予測した。また、この抗原ペプチド、HLA-A24 および T 細胞受容体(TCR)の分子間相互作用シミュレーションを行い、L452R 変異株由来の対応するエピトープ NYNYRYRLFR が HLA-A24 に結合すると、TCR への結合親和性が減弱し、HLA-A24 拘束性の細胞性免疫からこの変異株が逃避する可能性のあることを示した。

[Abstract]

In silico study has demonstrated that the 10-mer peptide of NYNYLYRLFR in the receptor binding motif of SARS-CoV-2 spike protein should be an immunodominant epitope of HLA-A24. The simulations of molecular interactions between the possible antigenic peptide, HLA-A24 and a T cell receptor have revealed the mutated epitope NYNYRYRLFR derived from the naturally occurring L452R might decrease the binding affinity of the epitope-HLA complex to the T cell receptor leading to evasion of the cellular immunity.

[Key Words]

SARS-CoV-2, L452R, HLA-A24, cellular immunity, docking simulations

1. はじめに

新型コロナ・ウイルス(SARS-CoV-2)による全世界の感染者数は 2021 年 10 月時点で、約 2 億 4000 万人であり、死者数は 490 万人余りである。これまで日本国内で最大の感染者数を出した第 5 波の大きな原因として考えられているのが、SARS-CoV-2 のスパイク・タンパク質に L452R 変異が起こったデルタ株と言われている。デルタ株は 2020 年末にインドで出現した「懸念すべき変異株」であり、インドにおける感染爆発の主要な原因とされている。

T 細胞が関与する細胞性免疫は長期免疫記憶上重要であるが、L452R 変異株が HLA-A24 拘束性細胞性免疫から回避することが、最近になり指摘された[1]。日本人にもっとも多いとされている HLA 分子が HLA-A24 で、日本人の約 70%が持っているとき

れることから、L452R 変異株による HLA-A24 拘束性細胞性免疫回避が起こり、感染拡大と共に重症化に繋がる懸念されている。

L452R 変異株による HLA-A24 拘束性細胞性免疫回避の分子メカニズムはまだ実験的には明らかになっていない。そこで、本研究では野生株と L452R 変異株の HLA-A24 との相互作用の分子レベルでの相違および T 細胞受容体(T cell receptor : TCR)との相互作用の変化を理解するために、スパイク・タンパク質の受容体結合ドメイン (receptor binding domain : RBD) から生成してエピトープとなり得るペプチド断片と HLA-A24 の相互作用 (epitope/HLA-A24) さらに epitope/HLA-A24 と TCR との分子間相互作用を *in silico* 解析した。

2. 結果の概要

以下のすべての計算は統合計算化学システム MOE[2]を用いて行った。

2.1. L452R 変異を含むエピトープの特定

HLA A-24 は 10 残基からなるペプチド断片を認識することが多い。そこで本研究では L452 を含む 10 残基からなるペプチドがエピトープになると考えて解析を行うことにした。しかし、RDB において L452 を含む 10 残基ペプチドは 10 通り考えられる。

その内、どのペプチドが HLAA-24 と相互作用する上で重要かを我々が開発したソフトウェア HLABAP[3]で解析した。HLABAP では、X-線結晶構造やホモロジーモデリングで得られた HLA-ペプチド複合体立体構造に基づき、一群の候補ペプチドと対象 HLA 分子との複合体立体構造をまず構築する。次に各複合体について、HLA-ペプチド相互作用の強さを判断する親和性スコアを計算し、高い結合能を持つペプチド候補を定量的に選択する。

この解析では HIV1 由来のエピトープである Nef138-10 ペプチド、HLA A-24 および $\delta/\alpha\beta$ TCR が作る複合体の結晶構造[4](PDB ID: 5XOV)をテンプレートに用いた。結合親和性を判断する指標には結合自由エネルギーに相当する GBVI/WSA_dG(kcal/mol)[5]を用いた。野生株 (L452L)および変異株 L452R についての計算結果を図 1 および図 2 に示す。452 番目の残基を赤字で示した。

図 1. 野生株 L452L

sequence	GBVIWSA_dG(kcal/mol)
SKVGGNYN L	-15.32
KVGGNYN L Y	-17.97
VVGNNYN L YR	-16.10
GGNNYN L YRL	-15.31
GNNNYN L YRLF	-18.08
NNNN L YRLFR	-19.71
YNN L YRLFRK	-19.56
NY L YRLFRKS	-16.86
Y L YRLFRKSN	-18.19
L YRLFRKSNL	-17.67

これらの結果は、野生株においては **NNNYLYRLFR** という配列を持つペプチドが最も強く HLAA-24 に結合するエピトープであることを示唆し、Kiyotani らが bioinformatic の手法で予測したエピトープ[6]とも一致する。即ち、HLA A-24 によって認識される野生株のエピトープは **NNNYLYRLFR** であると考えられる。

図 2. 変異株 L452R

sequence,	GBVIWSA_dG(kcal/mol)
SKVGGNYN R	-16.18
KVGGNYN R Y	-17.62
VVGNNYN R YR	-16.78
GGNNYN R YRL	-14.37
GNNNYN R YRLF	-18.50
NNNN R YRLFR	-19.67
YNN R YRLFRK	-19.01
NY R YRLFRKS	-19.56
Y R YRLFRKSN	-18.03
R YRLFRKSNL	-18.09

変異株 L452R についての結果もやはり同じ領域の **NNNYRYRLFR** という配列を持つペプチドが最も強く HLAA-24 に結合するエピトープであることを示唆する。

従って、HLABAP による解析の結果は、野生株においても変異株 L452R においても共通に **NNNYL(R)YRLFR** 配列が HLAA-24 によって優先的に認識されることは示した。さらに L452 が R に変異することで、変異エピトープの HLAA-24 による認識がごくわずかなではあるが甘くなることが GBVIWSA_dG 値から示唆された。

HLABAP により求められた **NNNYLYRLFR**/HLA A-24 および **NNNYRYRLFR**/HLA A-24 複合体の立体構造を図 3 および図 4 に示す。

2.2. TCR によるエピトープ/HLA A-24 複合体の認識

HLA 分子表面に提示されたエピトープは TCR によって認識される。**NNNYLYRLFR**/HLA A-24 複合体および **NNNYRYRLFR**/HLA A-24 複合体が TCR によってどのように認識されるかをドッキング・シミュレーションにより解析した。ドッキング計算には、ソフトウェア ASEDock[7]を用いた。相互作用

図3. NYNYLYRLFR/HLAA-24 複合体の立体構造

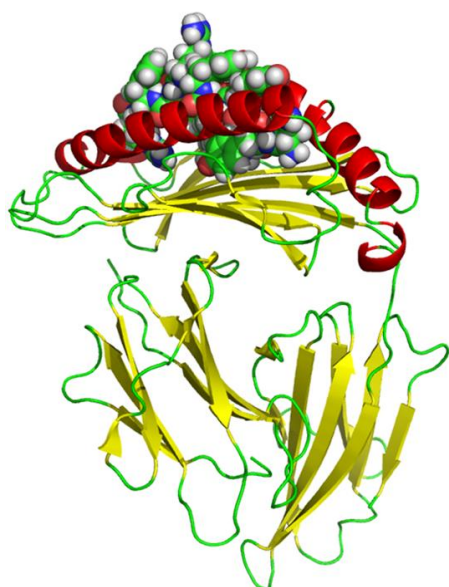
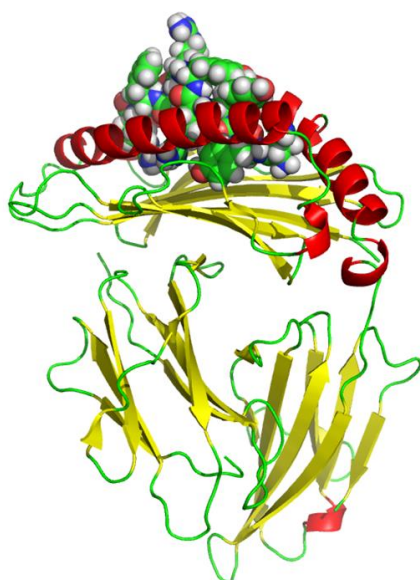


図4. NYNYRYRLFR/HLAA-24 複合体の立体構造

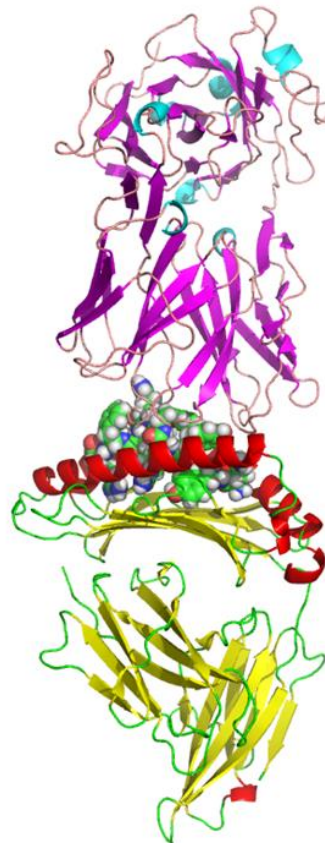


の相手である TCR の立体構造には、上述した結晶構造(PDB ID: 5XOV)中の $\delta/\alpha\beta$ TCR の構造を用いた。相互作用の強さを判断する指標には結合自由エネルギーに相当する GBVI/WSA_dG(kcal/mol)[5]を用いた。

初期構造を root mean square gradient が 0.01 kcal/mol/Å² になるまで最適化した。最適化後の NYNYLYRLFR/HLA A-24/TCR および NYNYRYRLFR/HLA A-24/TCR 複合体の GBVI/WSA_dG 値は各々 -16.48 および -15.15 kcal/mol であり、NYNYRYRLFR に変異すると相互作用は 1.33 kcal/mol 不安定になる。すなわち、

L452R 変異株由来のエピトープ/HLA 複合体に対する TCR の認識能は、少なくとも 1.33 kcal/mol だけ、野生株由来のエピトープに対する認識能よりも低下することをこのシミュレーション結果は示す。

図5.TCR を認識する NYNYLYRLFR/HLAA-24



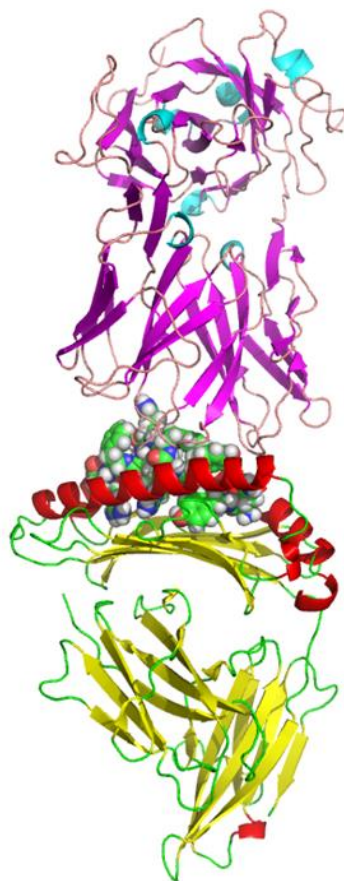
構造最適化した NYNYLYRLFR/HLA A-24/TCR および NYNYRYRLFR/HLAA-24/TCR 複合体の立体構造を各々図5および図6に示す。TCR 分子の α ヘリックスおよび β シートは、各々はシアンおよびマゼンタの色で示す。

図3-6はPyMOL[8]で描いた。

3.考察

本研究は、SARS-CoV-2 ウイルスのスパイク・タンパク質の受容体結合モチーフにある NYNYLYRLFR というアミノ酸配列をもつ 10 量体ペプチドは HLA-A24 の抗原ペプチド結合部位に強く結合し、免疫優性エピトープとして働く可能性のあることを示した。しかし L452R 変異株における対応ペプチド NYNYRYRLFR の HLA-A24 抗原ペプチド結合部位への結合性は若干弱くなることも示した。

図 6. TCR を認識する NYNYRYRLFR/HLA-A24



さらに NYNYRYRLFR/ HLA-A24 複合体と TCR との相互作用は NYNYLYRLFR/ HLA-A24 複合体と TCR との相互作用に比較して有意に減弱することが本研究により推定された。

すなわち、L452R 株は少なくとも HLA-A24 拘束性細胞性免疫を減弱させる可能性が本研究のシミュレーションで示された。

これまで、COVID-19 の世界的なパンデミックの初期において日本人での COVID-19 患者数がなぜ少ないのかが大きな疑問の 1 つだったが、もし HLA A-24 がこのように積極的に細胞性免疫に関与していれば、つまり HLAA-24 による免疫応答で感染拡大を抑制して来たとすれば、日本人における患者数が少なかった理由の 1 部は説明できることになる。共に、L452R の関与が大きいとされる国内での第 5 波において感染者数が増加したことも説明できる。一方、インドにおける爆発的な感染拡大が E484Q および L452R の二重変異株によるのではないかと推測されているが、インド人口における HLA A-24 の保有率は約 35%と言われており、欧州に比べて遥かに高く、L452R による細胞性免疫回避がこの感染

急拡大に関係している可能性も否定できない。

残念ながら、野生株や L452R 株に対する細胞性免疫に関する研究は少なく、本研究で示唆される関連性を確認することは今のところできていないが、SARS-CoV-2 の今後の感染制御や感染後の後遺症対策等を考える上で SARS-CoV-2 に対する細胞性免疫応答に関する研究は重要であると考えられる。

4. 引用文献

- [1] C.Motozono *et al.*, *Cell Host Microbe*, **29**,1124(2021)
- [2] MOE(molecular Operating Environment), 2014.09: Chemical Computing Group: Montreal, Canada (2019).
- [3] R.Kataoka *et al.*, *Chem-Bio.Inf. J.*, **20**, 1(2020).
- [4] Y.Shi *et al.*, *J.Virol.*, **91**, (2017). DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00725-17>
- [5] C.R.Corbeil *et al.*, *J.Comput.-Aided Mol.Des.*, **26**, 775 (2012).
- [6] K.Kiyotani *et al.*, *J. Hum. Genet.*, **65**, 569(2020).
- [7] J.Goto *et al.*, *J.Chem.Inf.Model*, **48**, 583(2008).
- [8] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

5. 謝辞

本研究の過程でソフトウェア HLABAP の機能に関して種々の有用なご助言を頂いた (株) モルシスの片岡良一博士および甘利真司博士に感謝する。

6. その他の業績

【特許】

- [1] 筋線維芽細胞を脱活性化するための Tcf21 タンパク質の部分ペプチド、出願番号:特願 2021-78161、出願日:2021 年 4 月 30 日、出願人:学校法人東海大学、発明者:稲垣 豊、平山令明、柳川享世、安田純平
- [2] フォンヴィルブランド因子と血小板との結合を阻害するための医薬組成物、出願番号:特願 2021-19172、出願日:2021 年 11 月 26 日、出願人:学校法人東海大学、発明者:後藤信哉、平山令明、中山正光、後藤信一

熊本県産エゴマ搾り粕の総フェノール含量と抗酸化活性：すりゴマとの比較評価

Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Perilla Pomace Produced in Kumamoto: Comparative Evaluation with Ground Sesame Seeds

小寺友也¹⁾、松原颯汰¹⁾、瀬尾優太¹⁾、森田千紘²⁾、中野祐志¹⁾、本田憲昭¹⁾、伊藤正規¹⁾、
阿部淳¹⁻³⁾、安田智子¹⁾、安田伸^{1-3)*}

¹⁾ 東海大学農学部、²⁾ 東海大学大学院農学研究科、³⁾ 東海大学先進生命科学研究科高機能食品開発部門

Tomoya Koderai¹⁾, Sota Matsubara¹⁾, Yuta Seo¹⁾, Chihiro Morita²⁾, Yushi Nakano¹⁾, Kensho Honda¹⁾, Masanori Ito¹⁾,
Jun Abe¹⁻³⁾, Tomoko Yasuda¹⁾, and Shin Yasuda^{1-3)*}

¹⁾ School of Agriculture, Tokai University, ²⁾ Graduate School of Agriculture, Tokai University,

³⁾ 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科 高機能食品開発部門）

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

【要旨】

本学では、2020 年に熊本県上益城郡益城町に位置する臨空校舎予定地圃場で、油糧作物であるエゴマを栽培し、産学官連携の一環でエゴマ油の試作製品化を行った。そこで搾油後に廃棄される搾り粕に着目し、総フェノール含量と抗酸化活性を評価した。その結果、エゴマ搾り粕粉末は、比較対象として用いた市販のすりゴマよりも、約 10～12.5 倍高い総フェノール含量とともに、約 20 倍高い抗酸化活性を示した。以上より、エゴマ搾り粕は、すりゴマよりも抗酸化ポリフェノールに富む食材となり得ることが示された。

【Abstract】

In 2020, an oil crop perilla was cultivated at the agricultural test field of scheduled Rinku Campus of Tokai University located at Mashiki-cho, Kamimashiki-gun, Kumamoto in Japan. Therein, a prototype of perilla oil has been produced under a course of project in collaboration with our university, industry, and government. Here, we focused on the by-produced perilla pomace, and determined its total phenolic content and antioxidant activity. The perilla pomace powder showed approximately 10- to 12.5-times higher phenolic content and almost 20-times higher antioxidant activity than those of the commercial ground products from sesame seeds. Collectively, it is suggested that the perilla pomace can be a good food material rich in antioxidant polyphenols than ground sesame products.

【Key Words】

Perilla frutescens, perilla pomace, total phenolic content, antioxidant activity

1. はじめに

エゴマ（荳胡麻、英名：Perilla、学名：*Perilla frutescens* (L.) Britton var. *japonica* Hara）はシソ科シソ属の一年生草本で、草丈 1 m 付近にまで生育する東南アジア（インド、中国中南部）原産の油糧作物である[1-3]。植物学上エゴマはシソ（紫蘇、英名：Perilla、学名 *Perilla frutescens* var. *crispa* Thunb. Deane）と同種であるものの、

シソはエゴマの変種に位置づけられている。わが国ではインド原産のゴマ（胡麻、英名：Sesame、学名：*Sesamum indicum* Linne）よりも歴史的に古くより利用されてきた。エゴマは約 5,000 年前の縄文時代の遺跡からも出土されており、エゴマ種子が炭化したパン状のものの中に混ざれていることから、古代より食されていたと考えられている[1,2]。エゴマには約 46-50%

エゴマ種子には約 50%の油脂がトリグリセリドの形で含まれており、現代ではエゴマ油脂が健康志向食としても見直されるようになってきた[3]。特にエゴマに特徴的な成分としても知られる n-3 系不飽和脂肪酸の α -リノレン酸のはたらきによる動脈硬化予防作用[5]やコレステロール低減作用[6]が報告されており、さらにロズマリン酸やルテオリンなどのポリフェノール成分による認知機能改善効果[7]や抗炎症作用[8]などが期待されている。そのため、工芸作物の区分に位置するエゴマの特産品化が全国各地で図られ、地域ごとに栽培や普及活動、話題作り等が行われている[9]。国内の 2019 年におけるエゴマ子実の年間生産量（収穫量）は 137.9t であり、北海道（33.8t）、福島県（21.6t）、島根県（18.3t）、岩手県（8.1t）、広島県（8.1t）、長野県（6.0t）、山形県（5.3t）の順に生産量が多く、九州圏内ではとくに熊本県（3.0t）が山都町および菊陽町などで栽培に力を入れている[10]。エゴマは多くの地域で在来種が継続的に栽培されていることから、中山間地域の食料生産と国土保全の面でも有用であり、在来作物の持つ多様性、地域の個性、つながりの面からも注目されている[9]。

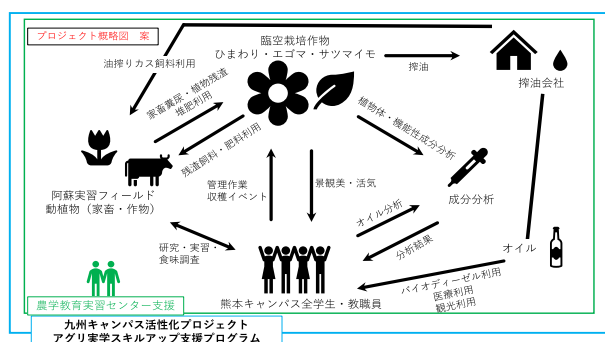


Figure 1. Schematic diagram of the recycling project with sunflower, perilla, and sweet potatoes (*ref.* Agricultural Education and Training Center, Tokai University)

本学では「農ある仲間、土ほぐす福幸プロジェクト」として、2020年に農学教育実習センターが中心となつて、阿蘇実習フィールド（熊本県阿蘇郡南阿蘇村）および臨空校舎予定地（熊本県上益城郡益城町）でヒト・自然・動物が関わり循環することができるよう景観の向上も含めた目的でプロジェクトを開始し、その一環として臨空校舎予定地の圃場で油糧用のヒマワリやエゴマ、サツマイモなどの栽培を開始した（Figure 1）。産学官連携のもと、熊本県南阿蘇村の協力により島根在来のエゴマと栽培技術の提供を受け、さらに県内企業の協力のもと搾油を行った。本プロジェクトでは、熊本地震からの復興の意味も込めて「福幸油」と名付けられたヒマワリ油とエゴマ油の試作製品化を行っている（Figure 2）[11,12]。



Figure 2. Prototype of seed oil products from perilla and sunflower cultivated in this project.

エゴマの搾油時には原料の約4～6割が残渣(搾り粕)として排出される。この残渣は、前述のプロジェクトでは本学の阿蘇実習フィールドで飼育される家畜動物に給餌し、嗜好調査等にも活用されている。エゴマの産地によってはエゴマ搾り粕の粉末が比較的安価で販売されており、和食を中心に様々な料理の材料に利用されている。しかしながら一般的にエゴマ搾り粕の多くは廃棄処理されているのが現状である。

そこで本研究では、搾油時に生じるエゴマ搾り粕の利用価値を見出していくために、本学産のエゴマ種子からの搾り粕の総フェノール含量と抗酸化活性を測定することとした。さらに、エゴマ搾り粕粉末と形状や風味が似ていることから用途を考察していく際の参考とするため、市販の2種類のすりゴマ粉末と比較することとした。

2. 結果の概要

1) 研究材料

本研究で用いた黒種子系のエゴマは、2014 年頃に島根県のエゴマ産地より南阿蘇村が譲り受けたものである。その後、熊本県農業研究センター高原農業研究所（熊本県阿蘇市）において品種の比較栽培試験が行われ、熊本県内の高冷地となる標高 200-500 m 付近の中山間地域でも生育に適することが実証されている[13]。これを本学の農学教育実習センターが譲り受け、2020 年 5 月 22 日に播種をしたうえで、同 7 月 2 日に本学臨空校舎予定地で苗を植え付けて栽培した。同 10 月 8 日に開花を確認し、同 11 月 4 日に収穫を行った。また、収穫後のエゴマ種子の搾油は熊本県内企業（有限会社堀内精油、熊本県八代郡氷川町）により行われた。エゴマ種子はおおよそ 10~15 分間かけて 100~110℃まで加熱し、職人による経験に基づいて焙煎が行われ、その後搾油された。その過程で生じたエゴマ搾り粕の粉末を本実験に使用した（Figure 3）。比較対象に用いた白ゴマと黒ゴマを原料とする市販のすりゴマは、東京都内の製油会社にて煎りあげて国内製造されたものであり、熊本県内の量販店で購入した。



Figure 3. Perilla pomace powder used in this study.

2) 抽出物の調製

エゴマ搾り粕 0.5 g に対してメタノール 20 ml を加えて攪拌を行い、1,800 xg で遠心分離後の上清を得た。残渣に同量のメタノールを加えて再度抽出し、同様に上清を得た。その後、上清を混合してろ過し、ろ液を抽出液とした。これを減圧下で約 25 時間遠心濃縮した。また、比較対象として市販の白ゴマと黒ゴマのすりゴマから同様に抽出を行った。各サンプル 2 本ずつ調製を行った結果、0.5 g ずつ秤量したエゴマ搾り粕、白ゴマおよび黒ゴマより得られた抽出物の収率は、それぞれ 19.4%、13.4%および 16.1%であった（Table 1）。黄色い油状の抽出物が得られ、これを DMSO に再溶解してストック溶液とし、以降の実験に用いた。エゴマ搾り粕より 19.4%の抽出物がメタノールにより回収でき

た本結果は、エゴマ搾り粕となる脱脂エゴマ種子が約 20%の脂質を含むという過去の報告を支持するものであった[14,15]。なお、先行実験としてエゴマ搾り粕 0.5 g から単回抽出を行う際にメタノール量の違い（10, 15, 20, 25, 30 ml）が収率に及ぼす影響を調べたところ、最大 2,000 分間までの遠心濃縮中に、少なくとも 20 ml 以上の液量が必要であることを確認している（data not shown）。

Table 1. Yield of methanol extracts from perilla pomace and ground white sesame and black sesame seed products.

Sample name	Initial weight (g)	Yield			
		Weight (g)	Ave. (g)	Ratio (%)	Ave. (%)
Perilla pomace	0.501	0.097	0.097	19.4	19.4
White sesame	0.500	0.097		19.4	
Black sesame	0.500	0.066	0.067	13.2	13.4
	0.501	0.068		13.6	
	0.501	0.079	0.081	15.8	16.1
	0.504	0.083		16.5	

Data shown represent mean value from two experiments. Ave.; average.

3) エゴマ搾り粕、白ゴマ、黒ゴマの総フェノール含量の比較

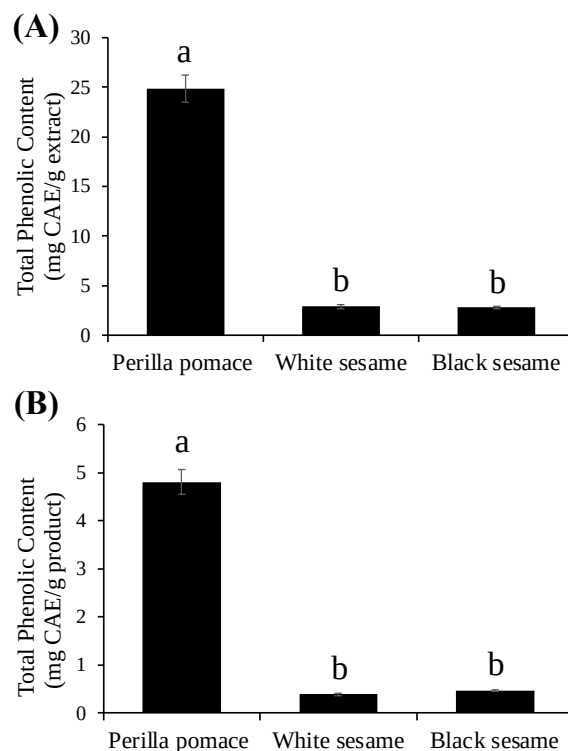


Figure 4. Total phenolic content of the extracts (A) or products (B) of perilla pomace, ground white sesame and black sesame seeds. Data shown represent mean $\pm$ SD from three experiments. Values not sharing a common superscript letter are considered significantly different ($p < 0.05$, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test). CAE: chlorogenic acid equivalent.

試料中の総フェノール含量はフォーリンチオカルト法に基づき、既報に従ってクロロゲン酸相当量として測定した[16,17]。抽出物 1 g 中の総フェノール含量を調べた結果、エゴマ搾り粕で認められた値 24.8 mg は、白ゴマの 2.92 mg と黒ゴマの 2.89 mg よりも約 8.3 倍高かった (Figure 4A)。収率を加味して各サンプル粉碎物 1 g 中の総フェノール含量を算出した結果、エゴマ搾り粕では 4.81 mg の値が得られ、白ゴマの 0.391 mg と黒ゴマの 0.465 mg よりも約 10~12.5 倍高かった (Figure 4B)。国内の在来種および中国種のエゴマ種子中のポリフェノール含量としてそれぞれ 4.431 mg/g (= 443.1 mg/100 g) および 3.784 mg/g (= 378.4 mg/100 g) が報告されている[14]。本研究でエゴマ搾り粕より得られた値 (4.81 mg/g) はこれらの報告値と同程度であった (see Figure 4B)。

4) エゴマ搾り粕、白ゴマ、黒ゴマの抗酸化活性の比較

既報に従って [16,17]、化成品ラジカル種の 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルに対する消去活性を測定した。その結果、エゴマ搾り粕の抽出物では濃度依存的な活性の上昇とともに 157 $\mu\text{g/ml}$ の EC_{50} 値が得られた。一方、白ゴマと黒ゴマの抽出物では、1,500 $\mu\text{g/ml}$ のときそれぞれ最大で 31.1% と 27.1% の活性を示すのみであった。このとき、ポジティブコントロールとして用いた抗酸化剤 trolox の EC_{50} 値は 9.57 $\mu\text{g/ml}$ であった (Figure 5)。

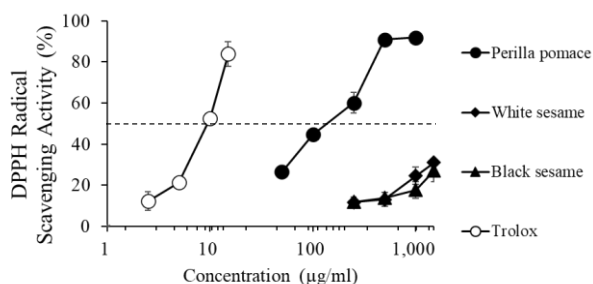


Figure 5. Effect of concentrations of the extracts from perilla pomace, ground white sesame and black sesame seed products, and trolox on the DPPH radical scavenging assay. Data shown represent mean $\pm$ SD from three experiments.

このとき、抽出物 1 g あたりの抗酸化活性を trolox 相当の TE 値で表した結果、エゴマで得られた値 61.6 mg TE は、白ゴマの 4.12 mg TE と黒ゴマの 3.67 mg TE よりも約 15~17 倍高かった (Figure 6A)。さらに、各サンプル粉碎物 1 g あたりの抗酸化活性を同じく TE 値で表した結果、エゴマ搾り粕の値 12.0 mg TE は、白ゴマの 0.552 mg

TE と黒ゴマの 0.590 mg TE よりも約 20 倍高かった (Figure 6B)。

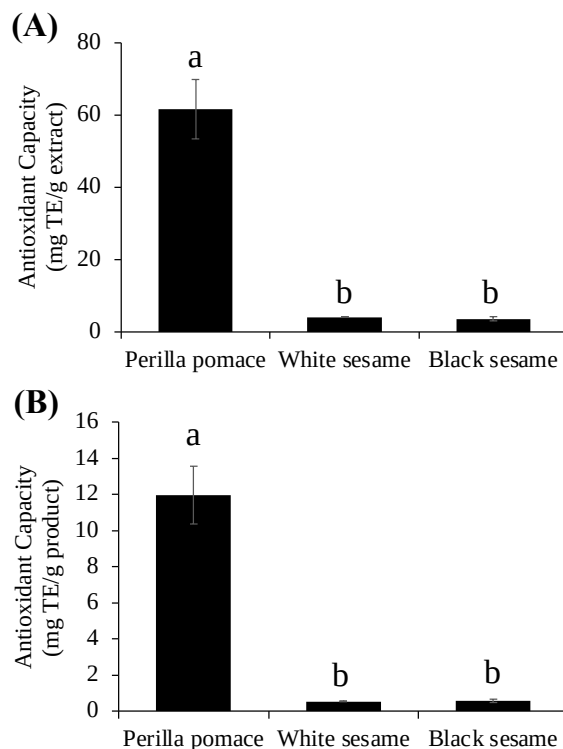


Figure 6. Antioxidant capacity of the extracts (A) or products (B) of perilla pomace and ground white sesame and black sesame seeds on the DPPH radical scavenging assay. Data shown represent mean $\pm$ SD from three experiments. Values not sharing a common superscript letter are considered significantly different ($p < 0.05$, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test). TE: trolox equivalent.

本研究で用いたエゴマ搾り粕はエゴマ種子を 100~110°C 付近で焙煎した上で搾油したものであり、高温加熱されている。比較対象とした市販の黒ゴマと白ゴマのすりゴマも炒りゴマとして加熱処理されていた。そのため、エゴマ搾り粕中のポリフェノールなどの抗酸化成分は比較的熱にも安定で、機能性成分として残存していることが考えられた。炒りエゴマから新規の抗酸化成分が見いだされた報告もあり [18]、エゴマ油の酸化安定性やエゴマの成分と加工利用時の成分変動も考慮することにより [14,19]、風味とともに機能性成分の安定性や効能に及ぼす適切な加熱処理条件についても調べることも重要と考えられる。一方、国内の在来種および中国種のエゴマ種子の DPPH ラジカルに対する抗酸化活性としてそれぞれ 6.58 mg TE/g (= 2,633 mmol TE/100 g) および 4.65 mg TE/g (= 1,858 mmol TE/100 g) が報告されている[14]。本研究でエゴマ搾り粕より得られた値 (12.0 mg TE/g) はこれらの報告値よりも 1.8-2.6 倍ほど高かった (see Figure 6B)。

これまでに、Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 法で評価したエゴマ油の抗酸化活性が、ゴマ油、菜種油ならびにアマニ油よりも高いこと、エゴマを用いた加工食品のすりゴマ、焙煎エゴマならびにエゴマ味噌の抗酸化活性が白ゴマおよび黒ゴマよりも高い傾向にあることが報告されている[20]。したがって、油糧作物のなかでもエゴマ油の抗酸化性が優れるものの、エゴマ搾り粕もまた抗酸化性に富む加工食品の原料となりうることが示唆された。ゴマなどの油糧作物や加工品については保存期間や保存環境によって油脂過酸化物の程度も異なる可能性がある[21]。そのため、過酸化物質等を測定し、抗酸化活性の持続性や有効性についても詳細を検証していく必要があることと考えられる。

エゴマの種子および搾り粕中のフェノール性抗酸化成分として、カフェ酸-3-O-グルコシド、カフェ酸、ルテオリン-7-O-グルコシド、ロズマリン酸-3-O-グルコシド、ロズマリン酸、アピゲニン-7-O-グルコシド、ルテオリン、アピゲニン、キロソエリオール、ロズマリン酸メチルエステルの10種類が認められており、なかでもロズマリン酸、ルテオリン、アピゲニンおよびロズマリン酸-3-O-グルコシドの4つが注目すべき特徴的な成分として報告されている[22]。そこでは、エゴマ種子および搾り粕ともに類似したフェノール性成分の含有パターンを示すものの、とくに上述の4種類の成分は搾り粕のほうが種子よりも約2倍多く含まれている。同様に韓国産のエゴマ種子中のフェノール性抗酸化成分にはカフェ酸を含む6種類が認められており、ここでもロズマリン酸-3-O-グルコシドとロズマリン酸が複数の栽培種間で共通した主要なフェノール性成分である[23]。

また、エゴマ種子に含まれるロズマリン酸やルテオリンはカテキンやクロロゲン酸と同等の活性酸素（スーパーオキシドアニオンラジカル）消去作用を示し、活性酸素消去への寄与が大きい可能性が示されている[15]。酸化剤（*t*-ブチルヒドロペルオキシド）誘発のHepG2ヒト肝臓細胞の酸化肝障害モデルにおいては、エゴマ種子メタノール抽出物が細胞内の抗酸化系酵素の改善を促すことで肝細胞保護作用を有するとの報告がある[24]。

搾油後のエゴマ搾り粕は、脂質が半減する一方で、タンパク質などの成分は種子の1.5倍程度、約30%にまで高濃縮され、さらには約30%の食物繊維を含有する食素材としての特徴を有する[15]。そのため、残存油

脂の酸化変敗への防止策を講じながらも他の食品用途への開発に期待が寄せられる。

エゴマは種子の色から大きく白種と黒種に分けられるものの、品種改良がほとんど行われておらず、多くの地域で在来種が継続的に栽培されてきた[9,25]。現在までに、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（NARO）農業生物資源ジーンバンクに登録のエゴマ全190点のうち、167点が在来種として保存されている[26,27]。エゴマの栽培適地に加えて、搾油量や搾油効率、さらには機能性成分の含量や効能面においては、在来種ごとに多様性が認められるものと考えられる。これまでに、エゴマ新品種「飛系アルプス1号」が2013年に登録公示されており、子実中の機能性成分 α -リノレン酸が安定して高くルテオリンに富む特徴や栽培法が報告されている[28,29]。また、2018年に登録出願し公表中の品種「飛驒小坂おんたけ1号」が「飛系アルプス1号」と同等の α -リノレン酸、ルテオリン、含油率を示すことが報告されている[30,31]。そのため、エゴマ搾り粕の保健機能効果を目指した利用を図るにあたっては、原料となるエゴマ自体の栽培時の生育特性や機能性成分含有量の特徴づけも重要であると考えられる。

3. 展望

以上より、本研究では熊本県内で栽培され生産された、本学産のエゴマ種子からの搾り粕と市販の2種類のすりゴマについて、総フェノール含量と抗酸化活性の測定を行い、エゴマ搾り粕が白ゴマと黒ゴマに比べて高い値を示すことを明らかにした。エゴマ種子やエゴマ搾り粕を用いた製品や特産品の事例では、まず粉末状に一次加工された後に料理や菓子類の原料として、二次加工利用されている現状がある。今後は、本実験で比較対象として用いたすりゴマなどの実用例も参考にしながら、エゴマ搾り粕を用いた製品などを考案することが重要と考える。これにより、食品ロスを減らすとともに本学で生産されるエゴマをより有効活用できるよう、提案していく必要がある。また、国内エゴマの消費のほとんどを輸入に依存している現状があり、特に中山間地域で、生育に適したエゴマの栽培普及やユニークなエゴマ製品の開発と需要拡大に、今後も期待が寄せられる。

4. 参考文献

[1] 堀田満ら編, *世界有用植物辞典*, 株式会社平凡社,

東京, pp.788 (1989)

- [2] 岡田稔監修、和田浩志ら編, *牧野和漢薬草大図鑑*, 株式会社北隆館, p457 (2002)
- [3] 新田みゆき, ルーラル電子図書館 (農文協) 「農業技術大系 作物編」, 7, 基 1-11 (2003)
- [4] e-Stat 政府統計の総合窓口, 政府統計表 油糧生産実績調査 (2021 年 3 月 19 日公表), <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500304&tstat=000001034221&cycl e=7&year=20200&month=0&tclass1=000001138107&tclass2=000001151347&tclass3val=0> (2021.9.10 アクセス)
- [5] E.W. Holy, *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**, 1772-1780 (2011)
- [6] G.M. Wardlaw and J.T. Snook, *Am J Clin Nutr*, **51**, 815-821 (1990)
- [7] I. Orhan, *et al.*, *Food Chem*, **108**, 663-668 (2008)
- [8] N. Aziz, *et al.*, *J Ethnopharmacol*, **225**, 342-358 (2018)
- [9] 松井勤ら, *日作紀*, **87**, 88-92 (2018)
- [10] 公益財団法人日本特産物協会, 2021, 地域特産物 (工芸作物、薬用作物及び和紙原料等) に関する資料 (令和元年産), http://www.jsapa.or.jp/pdf/Acrop_Jpaper/nousakumotuchousar1.pdf (2021.9.10 アクセス)
- [11] 東海大学新聞 (2020.9.1) <https://tokainewspress.com/kumamoto/view.php?d=68> (2021.9.9 アクセス)
- [12] 東海大学新聞 (2021.4.1) <https://tokainewspress.com/view.php?d=2115> (2021.9.10 アクセス)
- [13] 山戸陸也, 熊本県農林水産部, *農業の新しい技術*, No. 725 (2020.6 公開), <https://www.pref.kumamoto.jp/uploaded/attachment/100963.pdf> (2021.9.9 アクセス)
- [14] 広井勝, *特産種苗*, **5**, 34-39 (2009)
- [15] 及川和志ら, *岩手工技セ研究報告*, **16** (2009) http://www2.pref.iwate.jp/~kiri/study/report/2008/pdf/H20_22.pdf (2021.9.10 アクセス)
- [16] 安田伸ら, *東海大学先進生命科学研究紀要*, **3**, 26-30 (2019)
- [17] S. Sugahara, *et al.*, *J Food Sci*, **80**, C2420-C2429 (2015)
- [18] A. Nagatsu, *et al.*, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **43**, 887-889 (1995)
- [19] 吉村幸江と伊藤茂, *愛知農総試研報*, **35**, 103-108

(2003)

- [20] 清水恒, *東北農業研究*, **67**, 45-46 (2014)
- [21] 栗津原宏子, *調理科学*, **13**, 156-161 (1980)
- [22] Z. Guan, *et al.*, *Phytochem Anal*, **25**, 508-513 (2014)
- [23] J.H. Lee, *et al.*, *Food Chem*, **136**, 843-852 (2013)
- [24] S. Noh, *et al.*, *Food Sc Technol Res*, **24**, 583-590 (2018)
- [25] 藤目幸廣, ルーラル電子図書館 (農文協) 「農業技術大系 野菜編」, **11**, 特産野菜 57-59 (2017)
- [26] 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (NARO)、農業生物資源ジェンバンク, https://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php (2021.9.15 アクセス)
- [27] 農作業便利帖, 雑穀・山菜・その他, エゴマ作業大系のポイント (2008.11.12 公開、2019.2 改訂), <https://www.jeinou.com/benri/others/2008/11/120900.html> (2021.9.15 アクセス)
- [28] 袖垣一也ら, *岐阜県中山間農業研究所研究報告*, **9**, 19-24 (2014)
- [29] 袖垣一也, 岐阜県中山間農業研究所, 普及に移す新技術平成24年度, https://www.k-agri.rd.pref.gifu.lg.jp/hukyu/24_hukyu/ego_ma_FukyuCard.pdf (2021.9.15 アクセス)
- [30] 安江隆浩ら, *岐阜県中山間農業研究所研究報告*, **15**, 9-13 (2020)
- [31] 安江隆浩, 岐阜県中山間農業研究所, 普及に移す新技術平成30年度, https://www.k-agri.rd.pref.gifu.lg.jp/hukyu/30_hukyu/H30card02.pdf (2021.9.15 アクセス)

5. 業績

【論文発表】

【学会等発表】

該当なし

6. 謝辞

本研究の一部は、東海大学先進生命科学研究プロジェクト研究の資金援助により実施されています。

納豆菌由来 L-ロイシン脱水素酵素の結晶化およびX線結晶構造解析

Crystallization and preliminary structural analysis of L-leucine dehydrogenase from *Bacillus subtilis* subsp. natto BEST195

米田 一成^{1,2,3,4*}、荒木 朋洋^{2,3}

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科

Kazunari Yoneda^{1,2,3,4}, Tomohiro Arak^{2,3}

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科） e-mail: kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp

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

[要旨]

L-ロイシン脱水素酵素 (LeuDH)は納豆菌が生産する特有の匂い物質である、4-メチル-2-オキソペンタン酸の生産に関わる酵素である。納豆菌である *Bacillus subtilis* subsp. natto BEST195 から LeuDH 遺伝子を見出すと共に、構造機能解析を目的に遺伝子クローニングを行った。LeuDH をコードする遺伝子をクローニングした後、タンパク質発現用ベクターにライゲーションし、大腸菌を用いて LeuDH 遺伝子の発現を行った。その結果、LeuDH 活性を有す酵素の調製が可能であった(比活性; 35.1 U/mg)。酵素の結晶化を行った結果、X線回折実験に適した良質な結晶が得られたため、X線回折実験を行った。その結果、7~11 Å程度の低分解能データの測定ができた。

[Abstract]

L-leucine dehydrogenase (LeuDH) is an enzyme involved in the production of 4-methyl-2-oxopentanoic acid, a peculiar odorant produced by natto *Bacillus*. The LeuDH gene was found in *Bacillus subtilis* subsp. natto BEST195, a natto bacterium, and was cloned for structural and functional analyses. The cloned gene encoding LeuDH was ligated to a protein expression vector, and expressed in *Escherichia coli*. Thus, an enzyme with LeuDH activity (specific activity: 35.1 U/mg) was produced. Upon crystallization, enzyme crystals suitable for X-ray diffraction were obtained. X-ray diffraction results yielded low-resolution data of approximately 7 - 11 Å.

[Key Words]

L- leucine dehydrogenase, Enzyme expression and purification, X-ray crystallography

1. はじめに

LeuDHは補酵素 NAD⁺依存的にL-ロイシンのα位の酸化脱アミノを触媒する酵素 (EC: 1.4.1.9) である[1] (図1)。LeuDHは *Bacillus* 属細菌 (納豆菌) に多く見られ、細胞内において分岐鎖アミノ酸の分解や、芽胞形成に関わると考えられている。LeuDHの酵素反応生成物は4-メチル-2-オキソペンタン酸であり、この短鎖分岐脂肪酸が納豆特有の匂いを生み出すことが知られている[2]。これまでに、納豆特有の匂いを減少させた

新しい納豆の作出を目的に、LeuDHの酵素活性の少ない有用な納豆菌の育種と低臭納豆への利用が行われている[3, 4]。我々は納豆特有の匂い物質を生産する原因酵素であるLeuDHを納豆菌 *Bacillus subtilis* subsp. natto BEST195 から見出すと共にLeuDHの機能解析と結晶構造解析を目的にLeuDHの大腸菌を利用したリコンビナント酵素の大量発現を行った。また、酵素を応用利用するための基礎的研究としてLeuDHの大量発現および、精製と結晶化を行った。

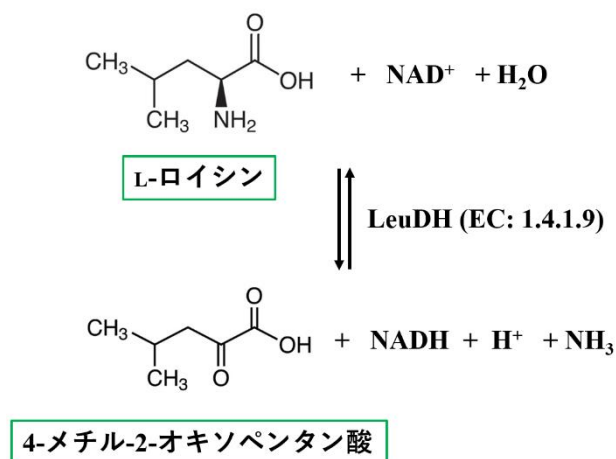


図 1. LeuDH が触媒する脱水素反応

2. 結果の概要

1) *B. subtilis* subsp. *natto* BEST195 由来 LeuDH の発現、精製、結晶化、X 線回折実験

LeuDH の結晶構造解析には、大量の酵素が必要となるので、クローニングを行うことで、目的タンパク質を大量に発現させた。*B. subtilis* subsp. *natto* BEST195 由来 LeuDH の遺伝子をファスマック株式会社に依頼し合成した。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。合成した遺伝子を pET15b 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(pUC/LeuDH) を *Nde* I、*Bam* HI で処理し、アガロースゲル電気泳動した後、LeuDH 遺伝子のバンドを切り出して抽出、精製し、少量の TE バッファーに溶解した。pET15b 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 LeuDH 遺伝子とライゲーションを行うことで pET15b/LeuDH の作製を行った。BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL (Agilent Technologies) 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 150 ml LB 液体培地に植菌し、37°C で 3 時間培養を行った。その後 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM になるように加えて 37°C で 3 時間培養を行うことで LeuDH 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。

SDS-PAGE により *B. subtilis* 由来 LeuDH の発現確認を行ったが、可溶性画分である粗酵素ではなく、不溶性画分に多くの酵素が存在しており、精製することができないことが明らかになった (図 2)。そこで、IPTG を終濃度 1 mM になるように加えてから 20°C で 16 時

間培養を行うように、誘導条件を変更したところ、LeuDH の可溶性画分への発現が可能になった。発現確認のため、SDS-PAGE 後に His-Detect In-Gel Stain で His-tag 染色したところ、粗酵素溶液 (可溶性画分) に LeuDH と予測される約 40 kDa のバンドが観察できた (図 3)。

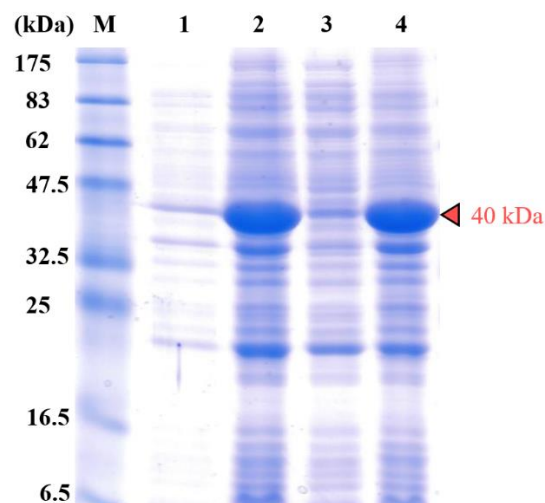


図 2. SDS-PAGE による *B. subtilis* subsp. *natto* BEST195 由来 LeuDH の発現確認。M; 分子量マーカー、1; IPTG(-)、2; 細胞破碎液、3; 粗酵素、4; 不溶性画分。矢印は LeuDH を示している (40 kDa)。

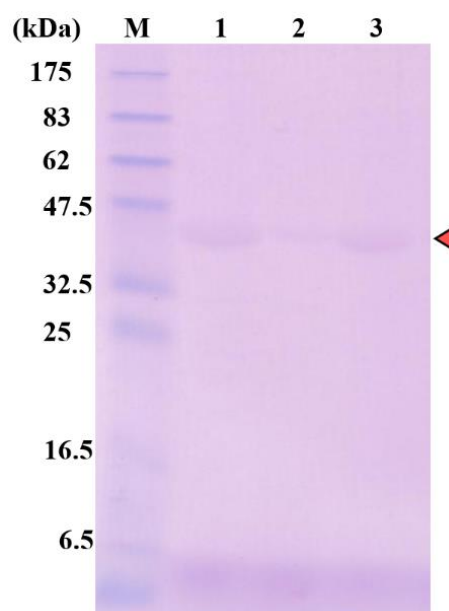


図 3. His-Detect In-Gel Stain による LeuDH の発現確認。M; 分子量マーカー、1; 細胞破碎液、2; 粗酵素、3; 不溶性画分。

上記の誘導条件で得られた粗酵素溶液を Talon コバルトアフィニティーカラムを用いることで LeuDH の精製を行った。平衡化バッファーには 10 mM Tris バッファー (pH 8.0), 500 mM NaCl, 10 mM イミダゾールを用いた。溶出には平衡化バッファーに 300 mM になるようにイミダゾールを添加したバッファーを用い、酵素を単一に精製した (図 4)。

LeuDH 活性の確認には基質である L-ロイシン、補酵素 NAD⁺、PMS 還元型(1-methoxy phenazine methosulfate) および、テトラゾリウム塩 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を用いた紫色のホルマザン色素の生成を視覚的に確認できる活性染色法を用いた。その結果、基質 L-ロイシン存在下でのみ紫色のホルマザンが形成されており、基質(-)では反応が起これないことを確認した (図 5)。

NAD⁺依存性 LeuDH の酵素活性測定 (酸化的脱アミノ反応) は下記の活性測定用反応溶液を用いて行った。すなわち、100 mM グリシン/NaOH (pH 9), 10 mM L-ロイシン、1.25 mM NAD⁺、精製酵素、蒸留水が合計 1 ml になるように調製した。NAD⁺以外の反応溶液を光路長 1 cm のキュベットに入れて混合した後、NAD⁺を添加して波長 340 nm における 1 分間の吸収の増加量 (NADH の増加量)を分光光度計(Hitachi U-2910)を用いて室温で測定した。酵素濃度の測定には Bradford 色素結合法を用い、検量線作成のための標準タンパク質はウシ血清アルブミンを用いた。その結果、比活性 35.1 U/mg、収率 30.1%で 2.42 mg の LeuDH を精製することができた (表 1)。

精製後の酵素は 10 mM Tris バッファー (pH 8.0), 0.2 M NaCl に 4°C で透析を行い、13.8 mg/ml に濃縮を行った。その後、0.5 mM NAD⁺を添加後、結晶化スクリーニング(Crystal Screen, Crystal Screen 2, Wizard 3,4, Index, Cryo1,2; Rigaku)を行った。その結果、35% PEG600, 0.1 M citrate buffer (pH 5.8)の条件で図 6 のような結晶が得られたため、高エネルギー加速器研究機構 (KEK、筑波) の BL-5A ビームラインにおいて LeuDH 結晶の X 線回折実験を行った結果、7~11 Å の低分解能データを測定することができた (図 6)。クライオ条件として 40% PEG600、パラトンオイルを使用した、いずれの条件でもデータの分解能に差は見られなかった。

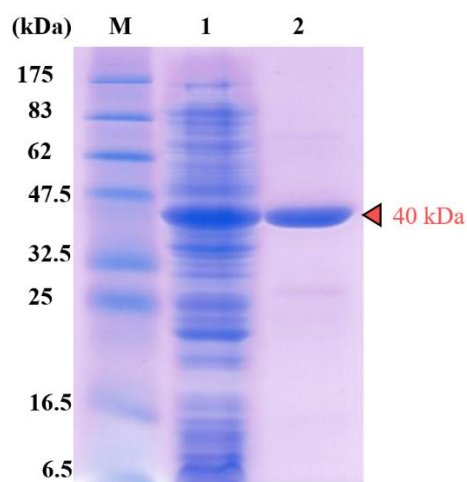


図 4. SDS-PAGE による LeuDH の精製確認。M ; 分子量マーカー、1 ; 素酵素、2 ; Talon 溶出画分 (40 kDa)。

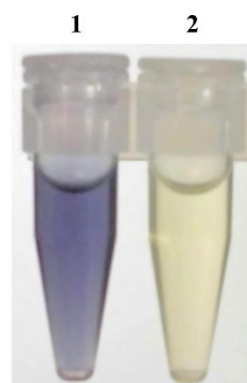


図 5. *B. subtilis* 由来 LeuDH の活性染色。1 ; L-ロイシン (+)、2 ; L-ロイシン(-)。

表 1. LeuDH の精製表

精製段階	総タンパク量 (mg)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
粗酵素	45.2	282.0	6.23	100
Talon	2.42	85.0	35.1	30.1

菌体湿重量 1.7 g

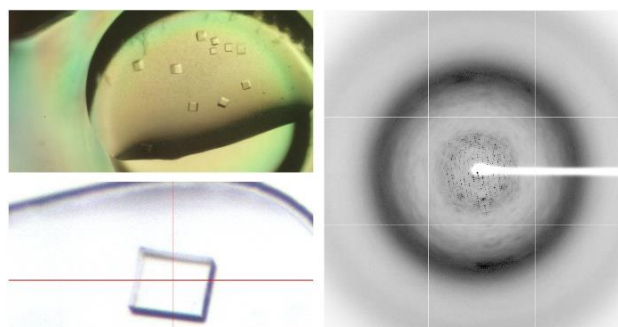


図 6. *B. subtilis* 由来 LeuDH の結晶および X 線回折像

3. 展望

B. subtilis subsp. *natto* BEST195 由来 LeuDH の発現、精製および、結晶化には成功し、低分解能ではあるが反射データが得られた。今後、結晶構造解析を行うために高品質な結晶を作製していく予定である。

4. 引用文献

- [1] Ohshima. T, *et al.*, J. Biol. Chem., **253**, 5719-5725 (1978).
- [2] 左右田健次, 化学と生物, **14**, 379-381 (1976).
- [3] 竹村浩, 生物工学会誌, **82**, 116-117 (2004).
- [4] 竹村浩ほか, 日本食品科学工学会誌, **47**, 773-779 (2000).

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。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 2020G502 で実施されたものです。

河川に放流されたアユの香りと脂肪酸組成の変化

Changes in volatile flavor compound and fatty acid composition of stocked ayu

吉崎 良¹⁾, 春田智美¹⁾, 平塚聖一^{1,2,3)}, 川嶋直正⁴⁾

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

³⁾東海大学海洋研究所アクアカルチャーテクノロジーセンター

⁴⁾静岡県内水面漁業協同組合連合会

Ryou Yoshizaki¹⁾, Satomi Haruta¹⁾, Seiichi Hiratsuka^{1,2,3)} and Naomasa Kawashima⁴⁾

¹⁾ School of Marine Science and technology, Tokai University

²⁾ Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

³⁾ Aquaculture technology center, Institute of Oceanic Research and Development, Tokai University

⁴⁾ Shizuoka prefectural fresh water fisheries cooperative association

【要旨】

河川に放流されたアユの揮発性成分と脂肪酸組成を調べた。放流前の海産および人工種苗は天然に比べて皮の Hexanal と 1-Penten-3-ol が多かった。また、海産および人工種苗は天然に比べて n-3 系脂肪酸の組成比が低く、オレイン酸の組成比が高かった。しかし、放流から 1 ヶ月以降では 3 種類間の揮発性成分量と脂肪酸組成比の差は認められなかった。種苗放流されたアユの香りと脂肪酸組成は放流後 1 ヶ月程度で天然と同レベルになると考えられた。

【Abstract】

The volatile components and fatty acid composition of ayu stocked into rivers were investigated. Before stocking, Hexanal and 1-Penten-3-ol of skin in marine and artificial seedlings were more than those in wild ayu. In addition, marine and artificial seedlings had a lower composition ratio of n-3 fatty acids and a higher composition ratio of oleic acid than wild ayu. However, one month after stocking, no difference was observed in the amount of volatile flavor components and the fatty acid composition ratio among the three type ayu. It was considered that the flavor and fatty acid composition of ayu stocked from the seedlings would be the same level as the wild ayu about one month after stocking.

【Key Words】

ayu, flavor, fatty acid, stocking

1. はじめに

アユ *Plecoglossus altivelis* はサケ目・アユ科に分類される淡水魚で、昔から特徴的なキュウリ

やスイカのような香りが好まれており、「香魚」とも呼ばれている。また、この香りはアユが摂餌する川石に付着した藻類由来であると考

えられている^{1,2)}。しかし、近年では市場の大半を養殖アユが占めており、2020年の岐阜中央卸売市場における天然アユの流通量は養殖アユのわずか9.3%となっている。また、天然アユの平均卸売価格は1kgあたり3,768円であったのに対して養殖アユの平均価格は1kgあたり1,055円であり、天然アユと養殖アユの間には大きな価格差を生じている³⁾。これまでに天然アユと養殖アユの体成分を比較した研究が幾つか報告されており、腹部筋肉の脂質含量は養殖アユで多く⁴⁾、アユ独特の香りは天然アユで強いことなどが明らかになっている¹⁾。また、両者の脂肪酸組成の比較では、C18:3n-3 (α -リノレン酸)は天然アユで多く、C18:1n-9 (オレイン酸)とC18:2n-6 (リノール酸)は養殖アユで多いと報告されており、天然アユでC18:3n-3が多いのはアユの餌である付着珪藻類の脂肪酸組成に由来していると考えられている⁵⁾。

ところで、天然アユと呼ばれているものには春先に海域から遡上したアユだけではなく、種苗センターなどで放流用に飼育され、解禁前に河川に放流されたアユが含まれている。栃木県の利根川水系における天然遡上アユ調査によると、遡上アユの9割以上が放流種苗であった⁶⁾。この河川に限らず、近年では国内の多くの河川において種苗放流魚の割合が増えていると推察される。放流種苗は放流されるまでの一定期間は配合餌料を摂取している。したがって、昔から「香魚」として親しまれてきた天然アユ独特の香りも変化している可能性が考えられる。

本研究では種苗放流されたアユの香りと脂肪酸組成に着目し、放流してからどれくらいの期間を経ることで天然アユと同レベルの香りや脂肪酸組成になるのかを明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2-1. 試料

本実験で用いた試料は以下の3種類とした。すなわち、静岡県浜松市の都田川ダム湖（いなさ湖）での陸封アユ（以下、天然）、駿河湾沿岸にて採取された稚鮎を静岡県内水面漁連鮎種苗センターにて中間育成されたアユ（以下、海産種苗）、鹿児島県鶴田湖産の親魚を静岡県内水面漁連鮎種苗センターにて継代飼育されたアユ（以下、人工種苗）である。これら3種のアユを解禁1ヶ月前の5月（以下、放流時）、解禁直後の6月（以下、放流1ヶ月後）、解禁から2か月後の8月（以下、放流3ヶ月後）に採集した。検体数はそれぞれ、放流前が3種を各10尾、放流1ヶ月後を30尾、放流3ヶ月後を41尾とした。なお、放流後のアユはDNA分析により、3種類のいずれのアユであるかを分類した。

2-2. 試料の調整

頭、鰓、骨を除去した後、内臓、筋肉、皮の3部位に分け、それぞれをホモジナイズした後、分析に供するまで-30℃で保管した。また、右胸鰭はDNA分析に供するため、99.5%エタノールで固定し、その後、数回エタノールを交換しながら十分に脱水してから常温にて保存した。

2-3. 分析方法

DNAは川島ら⁷⁾の方法に従って行った。揮発性成分は内臓と皮を試料として、平塚ら⁸⁾の方法に準じてGC-MSにより分析を行った。脂肪酸組成は筋肉を試料とし、Bligh & Dyer法のHanson & Olley変法⁹⁾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、ヘキササンに溶解した後、GCにより分析した。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、Scheffe 法により有意差検定を行った。

3. 結果

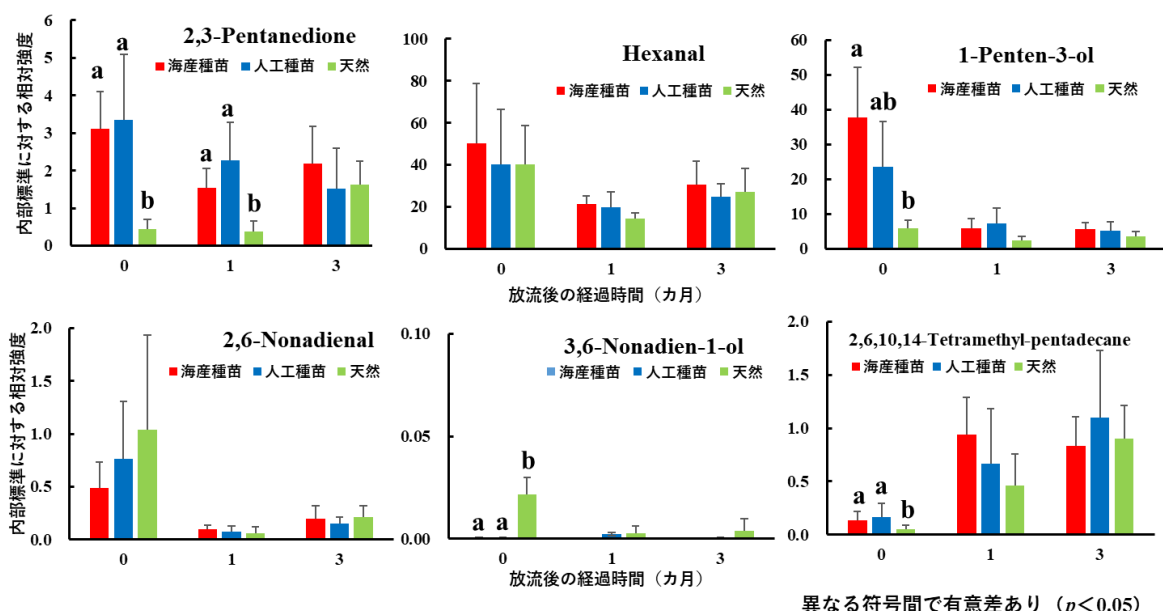
3-1. 放流後に採取したアユの由来判別

放流時のアユの DNA マーカーとの比較により、放流後のアユを判別した。川嶋ら⁷⁾の方法により、人工種苗は海産種苗および天然と容易に判別できた。一方、海産種苗と天然は DNA マーカーでは判別できなかったが、放流時と採取時においてアユの体長に差があったため、体長により判別できる個体のみを判別した。すなわち、放流時の平均体長は海産 12.8cm、天然で 7.4cm、放流 1 ヶ月後の平均体長は海産 16.6cm、天然 11.2cm、放流 3 ヶ月後の平均体長は海産 16.9cm、天然 11.9cm であった。したがって、放流後のアユで体長が海産の最低体長

した。同様に、放流 3 ヶ月後に採取したアユ 41 検体から、海産種苗 8 検体、人工種苗 3 検体、天然 7 検体を判別した。

3-2. アユの内臓の揮発性成分

放流後の経過時間に伴うアユ内臓の主要な揮発性成分量の変化を図 1 に示した。初めに脂質劣化に由来する魚臭成分であり、特に赤身魚での報告が多い^{8,10)}として報告されているケトン類の 2,3-Pentanedione、アルデヒド類の Hexanal、アルコール類の 1-Penten-3-ol について記述する。2,3-Pentanedione は放流時および放流 1 ヶ月後のアユでは海産および人工種苗に比べて天然で有意に少なかったが、放流 3 ヶ月後では 3 種類間に有意差はみられなかった。Hexanal は放流前後において 3 種類間で差はみられなかった。1-Penten-3-ol は放流前のアユでは海産種苗に比べて天然で有意に少なかった。放流 1 ヶ月後および 3 ヶ月後では 3 種類間に有



異なる符号間では有意差あり ($p < 0.05$)

図 1 放流後の経過時間に伴うアユ内臓の揮発性成分量の変化

以下のものは天然と判別した。その結果、放流 1 ヶ月後に採取したアユ 30 検体から、海産種苗 5 検体、人工種苗 7 検体、天然 7 検体を判別

意差はみられなかった。アユのキュウリ臭の香りとして知られている 2,6-Nonadienal²⁾は放流時のアユでは天然で多い傾向がみられたが、放流

1 ヶ月後および3 ヶ月後では3 種類間に差はみられなかった。アユのスイカの香りとして知られている 3,6-Nonadien-1-ol¹²⁾は放流時のアユでは海産および人工種苗に比べて天然で有意に多かったが、放流1 ヶ月後および3 ヶ月後では3 種類間に有意差はみられなかった。人工飼料由来の臭いとの報告がみられる炭化水素類の 2,6,10,14-Tetramethyl-pentadecane¹¹⁾は放流時のアユでは海産および人工種苗に比べて天然で有意に少なく、また、放流1 ヶ月後においても天然で少ない傾向がみられた。一方、放流3 ヶ月後では3 種類間で差はみられなかった。

3-3. アユの皮の揮発性成分

放流後の経過時間に伴うアユ内臓の主要な揮発性成分量の変化を図2に示した。2,3-Pentanedione は放流前のアユでは海産種苗に比べて人工種苗で、さらに人工種苗に比べて天然で有意に少なかったが、放流1 ヶ月後および3 ヶ月後では3 種類間に有意差はみられなかった。Hexanal は放流前のアユでは海産種苗に比べて人工種苗と天然で有意に少なかったが、放

流1 ヶ月後と3 ヶ月後では3 種類間に差はみられなかった。1-Penten-3-ol は放流前のアユでは海産種苗に比べて天然で有意に少なかったが、放流1 ヶ月後および3 ヶ月後では3 種類間に有意差はみられなかった。2,6-Nonadienal は放流前後で3 種類のアユに有意差はみられなかった。3,6-Nonadien-1-ol は放流前のアユでは海産種苗に比べて人工種苗で有意に少なく、さらに人工種苗に比べて天然で有意に少なかった。2,6,10,14-Tetramethyl-pentadecane は放流前のアユでは海産および人工種苗に比べて天然で有意に少なかったが、放流1 ヶ月後および3 ヶ月後では3 種類間で有意差はみられなかった。

3-4. アユの筋肉の脂肪酸組成

放流後の経過時間に伴うアユ筋肉の脂肪酸組成を表1に示した。放流前のアユでは海産および人工種苗に対して天然で組成比が大きく異なっていた。すなわち、C16:0 (パルミチン酸)、C16:1n-7 (パルミトレイン酸)、C18:1n-9 (オレイン酸) および C18:2n-6 (リノール酸) は天然に比べて海産および人工種苗で有意に多く、反

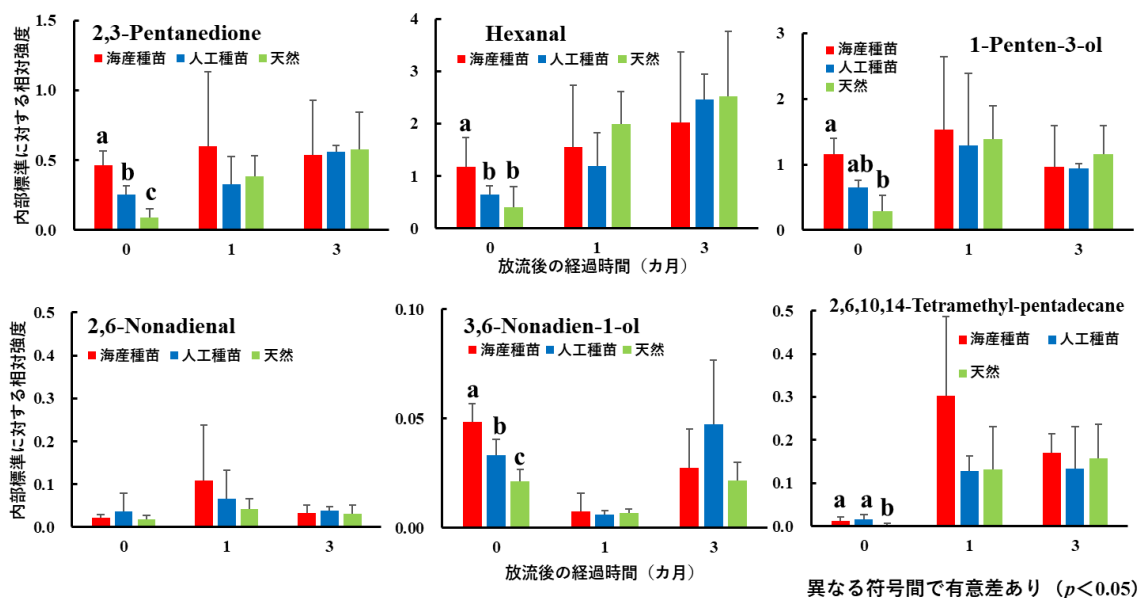


図2 放流後の経過時間に伴うアユ皮の揮発性成分量の変化

対に C18:3n-3 (α -リノレン酸)、C20:4n-6 (アラキドン酸)、C20:5n-3 (エイコサペンタエン酸、EPA) および C22:6n-3 (ドコサヘキサエン酸、DHA) は海産および人工種苗に比べて天然で有意に多かった。放流 1 か月後のアユでは人工種苗に比べて天然で C20:4n-6 が有意に多かったが、これを除けば 3 種類間で組成比の有意な違いはみられなかった。しかしながら、C22:6n-3 は海産および人工種苗に比べて天然で高い傾向がみられた。放流 3 か月後のアユでは主に海産種苗と天然とで組成比が異なる傾向がみられた。すなわち、C18:1n-9 および C18:2n-6 は海産種苗に比べて天然で有意に少なく、反対に C16:1n-7、C20:4n-6 および C20:5n-3 は海産種苗に比べて天然で有意に多かった。

静岡県西部の都田川に放流された海産および人工種苗と、都田川に生息し再生産している天然アユの 3 種類を材料として、皮、内臓の揮発性成分を調べた。その結果、揮発性成分は皮よりも内臓で多く検出され、これは Suyama et al.¹¹⁾と一致していた。また、放流時のアユにおいては、皮、内臓いずれも海産および人工種苗に比べて天然で 2,3-Pentanedione、Hexanal、1-Penten-3-ol が少なかった。これらの成分はいずれも魚臭成分として知られており、特に Hexanal は養殖アユに多く不快魚臭の一つであることが平野ら¹²⁾により報告されている。本研究では種苗センターにて飼育された海産および人工種苗で Hexanal が多い傾向がみられたことから、養殖あるいは放流種苗として飼育されたアユでは天然に比べて不快な魚臭成分が多く

表1 放流前後におけるアユ筋肉の脂肪酸組成

脂肪酸	放流前			放流 1ヶ月後			放流 3ヶ月後		
	海産種苗 (n=10)	人工種苗 (n=10)	天然 (n=10)	海産種苗 (n=5)	人工種苗 (n=7)	天然 (n=7)	海産種苗 (n=8)	人工種苗 (n=3)	天然 (n=7)
C14:0	3.95 ± 0.23 a	4.07 ± 0.29 a	0.84 ± 0.14 b	2.38 ± 0.18	3.49 ± 1.08	2.30 ± 0.75	4.30 ± 0.36	3.70 ± 0.51	4.47 ± 0.63
C15:0	0.25 ± 0.02 a	0.24 ± 0.01 a	2.75 ± 0.83 b	0.43 ± 0.13	0.42 ± 0.16	0.39 ± 0.09	0.50 ± 0.12	0.45 ± 0.05	0.46 ± 0.15
C16:0	34.00 ± 1.21 a	30.89 ± 0.85 b	26.09 ± 1.18 c	26.38 ± 1.74	27.60 ± 1.94	28.52 ± 1.52	31.55 ± 1.56	31.09 ± 0.22	30.03 ± 0.94
C17:0	0.27 ± 0.04 a	0.24 ± 0.01 a	0.58 ± 0.11 b	1.29 ± 0.44	1.03 ± 0.49	1.22 ± 0.39	1.42 ± 0.32	1.34 ± 0.26	1.24 ± 0.28
C18:0	6.21 ± 4.24	3.45 ± 0.13	5.00 ± 0.18	3.64 ± 0.39	3.38 ± 0.54	3.75 ± 0.32	3.07 ± 0.16	2.96 ± 0.19	2.75 ± 0.24
C16:1 n-7	7.24 ± 0.21 a	8.43 ± 1.14 a	1.87 ± 1.02 b	8.36 ± 2.11	9.23 ± 3.81	7.31 ± 2.94	8.35 ± 1.53 a	10.91 ± 2.59 ab	14.05 ± 1.92 b
C17:1 n-8	1.21 ± 0.88	0.46 ± 0.04	0.31 ± 0.04	1.09 ± 0.24	0.93 ± 0.28	1.12 ± 0.36	0.95 ± 0.21	1.17 ± 0.17	1.79 ± 0.49
C18:1 n-9	11.38 ± 5.3 ab	14.57 ± 1.11 a	5.93 ± 0.67 b	3.85 ± 0.70	7.43 ± 4.90	3.77 ± 0.73	5.79 ± 1.37 a	4.87 ± 0.21 a	2.95 ± 0.26 b
C18:1 n-7	2.97 ± 1.30	2.66 ± 0.14	2.70 ± 0.15	2.20 ± 0.31	2.22 ± 0.21	2.20 ± 0.16	1.86 ± 0.14	1.78 ± 0.10	1.74 ± 0.07
C20:1 n-9	0.81 ± 0.07 a	0.88 ± 0.03 a	0.28 ± 0.02 b	0.04 ± 0.09	0.18 ± 0.21	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.17	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C18:2 n-6	5.07 ± 2.67 ab	6.72 ± 0.17 a	3.92 ± 1.15 b	2.48 ± 0.57	3.42 ± 1.17	2.28 ± 0.16	3.93 ± 0.58 a	3.29 ± 0.45 ab	2.94 ± 0.61 b
C18:3 n-3	0.70 ± 0.04 a	0.69 ± 0.03 a	2.41 ± 0.5 b	10.89 ± 2.91	10.16 ± 5.73	10.03 ± 1.07	13.55 ± 2.74	11.91 ± 1.68	9.75 ± 2.69
C18:4 n-3	0.52 ± 0.05	0.51 ± 0.03	0.72 ± 0.28	0.89 ± 0.03	0.72 ± 0.22	0.73 ± 0.24	0.86 ± 0.10	0.70 ± 0.08	0.58 ± 0.13
C20:3 n-6	0.21 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.06	0.26 ± 0.13	0.27 ± 0.05	0.32 ± 0.05	0.32 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.04
C20:4 n-6	0.70 ± 0.09 a	0.67 ± 0.14 a	3.64 ± 0.23 b	1.91 ± 0.24 ab	1.45 ± 0.48 a	2.24 ± 0.23 b	1.22 ± 0.14 a	1.60 ± 0.15 ab	2.15 ± 0.38 b
C20:5 n-3	4.82 ± 0.27 a	4.72 ± 0.45 a	13.51 ± 0.85 b	9.70 ± 1.98	6.74 ± 1.84	8.95 ± 1.00	4.27 ± 0.58 a	5.35 ± 0.91 ab	6.04 ± 0.95 b
C22:4 n-6	0.43 ± 0.07	0.87 ± 0.64	0.48 ± 0.06	0.80 ± 0.90	0.26 ± 0.11	0.31 ± 0.05	0.22 ± 0.09 a	0.39 ± 0.06 ab	0.59 ± 0.19 b
C22:5 n-6	0.22 ± 0.02 a	0.23 ± 0.04 a	1.01 ± 0.15 b	0.06 ± 0.13	0.24 ± 0.19	0.36 ± 0.08	0.16 ± 0.07	0.21 ± 0.04	0.30 ± 0.05
C22:5 n-3	1.86 ± 0.11 a	2.01 ± 0.23 a	3.81 ± 0.26 b	3.87 ± 0.49	2.93 ± 0.82	3.84 ± 0.45	2.32 ± 0.21	2.58 ± 0.28	2.48 ± 0.22
C22:6 n-3	12.54 ± 1.57 a	11.48 ± 2.22 a	17.02 ± 1.66 b	9.50 ± 1.49	9.13 ± 2.75	11.50 ± 2.07	6.30 ± 1.44	6.01 ± 1.08	6.07 ± 0.88
Others	4.33 ± 1.11	6.02 ± 0.61	7.02 ± 1.28	9.72 ± 1.52	8.74 ± 2.74	8.87 ± 1.09	7.54 ± 1.22	7.57 ± 1.32	7.13 ± 0.58
Saturates	44.7 ± 5.37 a	38.9 ± 1.01 ab	35.3 ± 1.62 b	34.1 ± 1.11	35.9 ± 2.05	36.2 ± 1.24	40.8 ± 1.51 a	39.6 ± 0.62 ab	38.9 ± 0.58 b
Monoenes	24.2 ± 2.69 a	27.7 ± 2.14 a	10.9 ± 1.03 b	15.5 ± 1.91	20.1 ± 5.32	14.4 ± 2.84	17.1 ± 2.33	18.9 ± 2.78	20.5 ± 2.20
Polyenes	27.9 ± 2.77 a	29.3 ± 3.07 a	48.1 ± 2.49 b	41.6 ± 2.00	36.3 ± 7.60	41.7 ± 2.79	33.7 ± 2.54	33.2 ± 1.81	32.5 ± 1.41
n-3 / n-6	3.15 ± 0.71 ab	2.25 ± 1.19 a	3.98 ± 1.21 b	5.91 ± 1.99	5.34 ± 1.89	6.49 ± 1.56	4.78 ± 3.62	4.53 ± 2.59	4.02 ± 2.87

異なる符号間で有意差があることを示す ($p < 0.05$)

4. 考察

4-1. 揮発性成分

なると推察された。

キュウリ様臭である 2,6-Nonadienal は、内臓において放流種苗よりも天然で多い傾向がみられ

た。一方、スイカ様臭である 3,6-Nonadien-1-ol は内臓では放流種苗よりも天然で多かったが、皮では天然よりも放流種苗の方が多かった。2,6-Nonadienal は、C18:3n-3 からリポキシゲナーゼの作用によって生合成されること¹³⁾、また、その際には 3,6-Nonadien-1-ol を経由すること¹⁴⁾が報告されている。一方、章ら¹⁵⁾はアユの皮から抽出した粗酵素液を各種のポリエン酸と反応させて生成物を調べた結果、EPA と DHA を基質とした際に天然アユでは 2,6-Nonadienal を多く、養殖アユでは 3,6-Nonadien-1-ol を多く生成し、これが天然アユと養殖アユの香りの差に起因している可能性を推察している。本研究で 3,6-Nonadien-1-ol は内臓では放流種苗よりも天然で多かったことから、養殖あるいは種苗生産されたアユの皮では 3,6-Nonadien-1-ol を生成しやすいと推察された。放流 1 ヶ月後には 3 種類のアユの揮発性成分で有意差がみられなくなったことから、人工種苗は天然と同程度の品質に変化したと考えられた。

4-2. 脂肪酸組成

放流時のアユでは海産および人工種苗と天然とで組成比が大きく異なっており、天然に比べて放流された 2 種類の種苗で一価不飽和脂肪酸が多く、多価不飽和脂肪酸が少なかった。これは人工飼料に多く含まれている C18:1n-9 がアユの筋肉の脂肪酸組成に反映された結果と考えられた。多価不飽和脂肪酸の 1 種である C18:3n-3 は川石に付着している藻類の主要脂肪酸であることが知られている^{5,16)}。したがって、河川に生息するアユの筋肉中の C18:3n-3 比を調べることで付着藻類をどの程度摂取したかを判断することが可能である。平野ら⁵⁾は栃木県那珂川に生息する天然アユの C18:3n-3 比は 9~10%で

あったと報告している。一方、山澤ら¹⁶⁾はアユが生息していない河川を占有し、人工飼料で飼育された種苗をその河川に放流して筋肉の脂肪酸組成を調査している。その結果、放流種苗の C18:3n-3 比は 0.7%と極めて少ないこと、放流アユの C18:3n-3 比が 10%を超え、天然アユのそれと同等になるには放流後 2 ヶ月を要したことを報告している。本研究においては、放流前のアユの C18:3n-3 比は 2 種類の放流種苗で 0.7%であったのに対し、天然では 2.4%と有意に多かった。しかし、天然アユの C18:3n-3 比が 2.4%と少ないことから、解禁前に河川に生息していた天然アユは付着藻類の摂取状況が良くなかったと考えられた。また、C20:5n-3 比と C22:6n-3 比が高かったことから、藻類以外に水生生物を摂取していたことが示唆された。一方、放流から 1 ヶ月経った解禁直後では、3 種類のアユの C18:3n-3 はいずれも 10%を超えており 3 種類間に差はみられなかった。したがって、種苗放流されたアユは放流から 1 ヶ月程度で天然アユと同等の脂肪酸組成になると考えられた。山澤ら¹⁶⁾の調査よりも本研究の方が放流後に天然と同等になるまでの期間が短かったのは、アユの餌になる藻類の繁茂状況の違いなどが考えられた。

5. 引用文献

- [1] T. Hirano, CH. Zhang, A. Morishita, T. Suzuki : Identification of volatile compounds in ayu fish and its feeds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 547-557(1992).
- [2] 平野敏行, CH. Zhang : 淡水魚の香気. 化学と生物, 31, 426-428(1993).
- [3] 岐阜市中央卸売市場年報 : 令和 2 年度水産物部編水産物部種類別取扱高(2020).
- [4] 平野敏行, 中村秀男, 須山三千三 : 天然お

- よび養殖アユの品質に関する化学的研究-II
一般成分の季節変化. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46, 75-78(1980).
- [5] 平野 敏行, 須山 三千三: 天然および養殖アユの脂質の脂肪酸組成とその季節変化. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 49, 1459-1464(1983).
- [6] 高木優也, 酒井忠幸: 利根川水系アユ遡上調査. 栃木県水産試験場研究報告, 61, 38-39(2018).
- [7] 川嶋尚正, 鈴木邦弘: 興津川に遡上する天然アユと鶴田ダム湖由来人工種苗の遺伝的特徴とその識別. 静岡県水産技術研究所研究報告, 46, 79-84(2014).
- [8] 平塚聖一, 青島秀治, 小泉鏡子, 加藤登: カツオ血合肉の貯蔵中における揮発性成分の変化. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 77, 1089-1094(2011).
- [9] Hanson SWF, Olley J. Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *J. Biochem.*, 89, 101-102(1963).
- [10] N. Ganeko, M. Shoda, I. Hirohara, A. Bhadra, T. Ishida, H. Masuda, H. Takamura, T. Matoba: Analysis of volatile flavor compounds of sardine by solid phase micro extraction. *J. Food Sci.*, 73, S83-88(2008).
- [11] M. Suyama, T. Hirano, S. Yamazaki: Odor of ayu and its volatile components. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51, 287-294(1985).
- [12] 平野敏行, 森下昭寿, 鈴木健, 白井隆明: ヘッドスペース吸着法によるアユのにおいとその成分. 昭和 63 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 144(1988).
- [13] 五十嵐修, 金田尚志, 福場博保, 美濃 真編: 過酸化脂質と栄養. 光生館, 東京, 225-255(1986).
- [14] 榊原 英公, 林 和夫: 魚臭の分析. 日本油化学会誌, 38, 848-855(1989).
- [15] 章 超樺, 白井 隆明, 鈴木 健, 平野 敏行: 天然および養殖アユのリポキシゲナーゼ様酵素と香気成分の生成について. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 959-964(1992).
- [16] 山澤広之, 桑田知宣, 山澤和子, 寺嶋昌代, 野澤義則: 放流アユの脂肪酸組成の変動からみた放流適期. 日本食品科学工学会誌, 61, 139-143(2014).

6. その他の業績

【学会等発表】

平塚聖一・吉崎 良・春田智美・: 2021 年 11 月 17 日, 種苗放流されたアユの揮発性成分と脂肪酸組成. 令和 3 年度水産利用関係研究開発推進会議資源利用研究会, 26-27.

異なるカロテノイド色素を給餌した場合のスチールヘッドの身質変化

Changes in meat quality of Steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) when fed different carotenoid pigments

山下真由¹⁾, 山田良希²⁾, 平塚聖一^{3,4,5)}, 齋藤寛^{3,4)}, 秋山信彦^{3,4,5)}

¹⁾東海大学大学院・海洋学研究科, ²⁾東海大学大学院・地球環境科学研究科,

³⁾東海大学・海洋学部, ⁴⁾東海大学先進生命科学研究所・高機能性食品研究部門,

⁵⁾東海大学海洋研究所アクアカルチャーテクノロジーセンター

Mayu Yamashita¹⁾, Yoshiki Yamada²⁾, Seiichi Hiratsuka^{3,4)}, Hiroshi Saito^{3,4)} and Nobuhiko Akiyama^{3,4)}

¹⁾ School of Oceanography, Tokai University Graduate School

²⁾ School of Earth and Environmental Science, Tokai University Graduate School

³⁾ School of Marine Science and technology, Tokai University

⁴⁾ Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

⁵⁾ Aquaculture technology center, Institute of Oceanic Research and Development, Tokai University

【要旨】

地下海水を用いた陸上養殖で、ニジマスの降海型であるスチールヘッドに与える飼料中のカロテノイド色素の種類や添加量と身色との関係を調べた。スチールヘッドにアスタキサンチン 100 ppm を含む飼料またはアスタキサンチン 50 ppm, カンタキサンチン 50 ppm を含む飼料を与えた場合の筋肉の総カロテノイド量と色差を比較した結果、アスタキサンチンを高濃度で添加した飼料を与えた方が筋肉の総カロテノイド量が高く、筋肉の色調は赤と黄が強くなった。

【Abstract】

The relationship between the amount and type of carotenoid pigments added to the diets fed to Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a demersal form of Steelhead, and body color was investigated in land-based aquaculture using groundwater. The total carotenoid content and color difference in muscle of steelhead fed diets containing 100 ppm astaxanthin or diets containing 50 ppm astaxanthin and 50 ppm canthaxanthin were compared, and the results showed that the total carotenoid content in muscle of steelhead fed diets containing high concentrations of astaxanthin was greater than that of steelhead fed diets containing low concentrations of astaxanthin. The total carotenoid content of the muscle was greater in the diet with higher concentration of astaxanthin, and the color tone was more red and yellow.

【Key Words】

underground seawater, aquaculture on land, steelhead, carotenoid, astaxanthin

1. はじめに

静岡県静岡市三保地区内で採水される地下海水の水温は、18～19℃であり、年間を通して0.5℃程度の変化しかない¹⁾。また、塩分が約33 psu, pHが約7.3と一定である²⁾。さらに、曝気前の地下海水は溶存酸素量が約0.8 mg/Lであるため²⁾、好気性の細菌及び生物が皆無であり、極めて清浄である。これらの利点を利用して、これまでヒラメ *Paralichthys olivaceus* やクロマグロ *Thunnus orientalis*, アワビ類などの水産生物の陸上養殖に関する研究が行われてきた。国内におけるサケマス類の海面養殖は、夏季の海水温上昇により、海水での飼育期間が限定されてしまうが、水温が周年を通して一定である三保地区内で取水可能な地下海水を利用することで、通年の陸上養殖の可能性が考えられる。そこで、地下海水を利用したサケマス類の陸上養殖が注目されている。

サケマス類を海水で飼育すると、海水適応のために脳下垂体から成長ホルモンが分泌されるため、短期間で大型化することが知られている。さらに、淡水と比較して、海水で育てられた場合に旨味成分であるアミノ酸総量が高いことが報告されている³⁾。国内市場では、海水で飼育されたニジマスは、トラウトサーモンという名称で販売され、タイセイヨウサケ、通称アトランティックサーモンと並んで生食用や切り身としての需要が高まっている。日本国内では、国内漁撈、養殖及び海外からの輸入を合わせて、年間約40万トンのサケマス類が流通しているが、このうち約56%がノルウェーやチリなどの海外からの輸入に頼っている^{4,5)}。海外から輸入されたサケマス類は、突発的な魚病の発生や為替変動と不況などの影響で、世界市場における供給と価格は短期でも大幅な動きが

あった⁶⁾。そのため、国内でのサケマス類の生産の向上が求められている。

地下海水には酸素が含まれていないため、十分に曝気処理を行い、飼育水中の溶存酸素量を上げてから飼育をしなければならないが、寄生虫のリスクがなく、凍結殺菌しなくても、生食用として安全な商品を提供できるという利点も備えている。

サケマス類の身の紅色は主にカロテノイド系色素のアスタキサンチンで、カンタキサンチンも微量存在している。天然のサケマス類は、オキアミなどのカロテノイド色素を含む甲殻類を捕食することで、魚肉の紅色を保っている⁷⁾。そのため、養殖サケマス類については、飼料にアスタキサンチン及びカンタキサンチンを添加して魚肉の着色を補っている。その添加量は農林水産省令に定められており、飼料1 t中アスタキサンチン100 g以下、カンタキサンチン80 g以下とされている。そのため、限られたカロテノイド量の中で、サケマス類の色揚げ飼料を作製する必要がある。そこで、本研究では、飼料に含まれるカロテノイド色素の違いや配合量と身色との関係を調べた。

2. 実験方法

2-1. 異なるカロテノイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の成長比較

2020年11月17日に直径1 m, 高さ約1.25 m (容積約1 kL)の円形FRP水槽2槽に、トラウトロッジ社—林養魚場経由で入手したスチールヘッドを25個体ずつ収容し、実験を開始するまでS=34 psuの地下海水をかけ流して飼育した。この時のスチールヘッドの体重の平均値と標準誤差は、 300.2 ± 8.6 g (n=50)であった。水槽中心で底面から約10 cmの位置にエアストーン3個を吊るして通気した。溶存酸素

量を 10 mg/L 以上に維持するために、マグネットポンプ (RMD-401, レイシー) で飼育水を循環させ、酸素ガス発生装置 (オージネーター 601, 近畿酸素株式会社) で発生させた高濃度酸素をファインバブル発生器 (FB-S15AI, 株式会社坂本技研) で溶解させ、溶存酸素量約 10 mg/L に設定した。

色素の添加量については、飼料安全法に従い上限値とした。飼料条件は、アスタキサンチン 100 ppm を含む飼料 (以下, アスタ 100) を与えた場合、アスタキサンチン 50 ppm とカンタキサンチン 50 ppm を含む飼料 (以下, アスタ 50 カンタ 50) を与えた場合の 2 条件とした。飼料試験の作製を日本農産工業株式会社に依頼した。飼料の形態は沈降性のエクストルーデッドペレット (EP) とした。

実験開始時, 30, 60 日後に各水槽から 5 個体ずつ取り出し、頭部殴打し気絶させ、体長、体重測定後、鰓弓を切断し、鰓の赤味が薄くなるまで海水中で出血させた。カロテノイド量測定までの間、密封容器に入れ、 -80°C で冷凍保存した。

毎日 9 時と 15 時にデジタル塩分計 (EC300A, YSI), DO 計 (ProODO, YSI) を

用いて水温, 塩分, DO を測定し、水質測定後に各試験飼料を飽食量給餌した。なお、飽食給餌については、投与した餌が、摂餌されずに水面または水底に残った状態が続いたことを目安とした。これを 15 分後に再び行い、摂餌しなくなったところで飽食給餌とした。給餌後に、排水バルブを開くことで一時的に排水量を増加させ、排泄物を排出した。

測定によって得られた値から、下記の計算式を用いて、増重量, 補正飼料効率を算出した。

$$\text{補正飼料効率 (\%)} = \frac{\text{補正増重量 (g)}^{\ast 1}}{\text{総摂餌量 (g)}} \times 100$$

$\ast 1$ 補正増重量 (g) = 増重量 $\ast 2$ (g) + 斃死個体の全重量 (g)

$\ast 2$ 増重量 (g) = 終了時全重量 (g) - 開始時全重量 (g)

(飼料効率全漁連補正法)

2-2. 筋肉の色差

背鰭起点から垂直に切断し、頭部側の身と尾部側の身に分けた。また、それらを垂直に 2 等分し、背骨に沿うように切断し、酒本⁸⁾に従

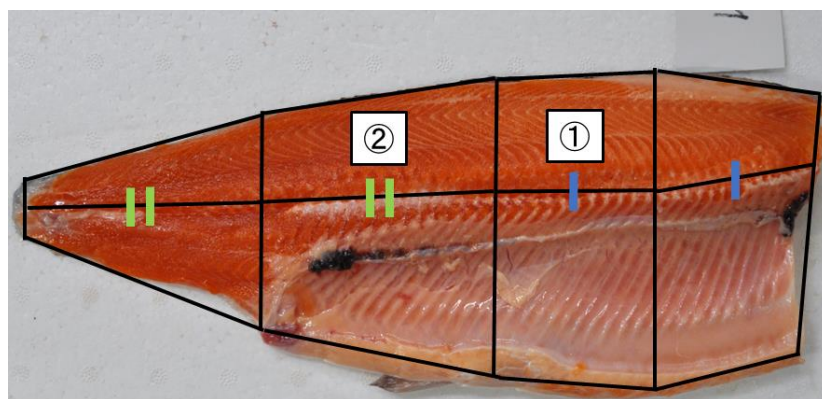


図1. 色差分析, カロテノイド量の測定に使用した部位
 ① : 鰓蓋後部から背鰭起点までを2等分した長さ
 ② : 背鰭起点から脊椎骨末端までを2等分した長さ

い、筋肉に蓄積した色素量の数値が安定している 8 個の部位に切り分け、分析した。左半身の頭部側の身の中で、背鰭起点側のうち背側の部位である図 1-①、尾部側の身の中で、背鰭起点側のうち背側の部位である図 1-②の色差分析し、カロテノイド量を測定した。

分光測色計 (CM-2500d, コニカミノルタ株式会社) で筋肉の色差を測定した。測定径 8mm, 色調は L*, a*, b*モードで測定した。L*は明度, a*, b*は色度を表し, a*は (+) 方向が赤, (-) 方向が緑, b*は (+) 方向が黄, (-) 方向が青を意味する。色差を 3 回測定し、平均値を色差とした。

2-3. 筋肉中カロテノイド量

ミンチにした試料 1g をガラス遠沈管に精秤し、アセトンを適量入れながら攪拌し、10mL に定容した。これを 3,000rpm で 15 分間遠心分離し、上清を 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過したものを分析用試料溶液として以下の分析に供した。

総カロテノイド量: 分光光度計にて 478nm の吸光度を測定し、吸光係数 2,200 (濃度 1%, 光路長 1cm) を用いて総カロテノイド量を算出した。

アスタキサンチンおよびカンタキサンチン: HPLC により定量した。HPLC の分析条件は以下のとおりである。

装置; 島津高速液体クロマトグラフ LC-20AD
検出器; 島津 SPD-10A

カラム; GL サイエンス Inertsil ODS-SP 5 μ m
4.6×150mm

カラム温度; 40°C 検出波長; 478nm

流速; 1ml/min. 注入量; 2 μ L

3. 結果

3-1. 異なるカロテノイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の成長比較

異なるカロテノイド配合飼料をスチールヘッドに与えた結果、実験期間中の水温は、アスタ 100 飼料を与えた水槽で 16.2~20.2°C, アスタ 50 カンタ 50 飼料を与えた水槽で 17.0~19.9°C であった。溶存酸素量と酸素飽和度の平均と標準偏差については、アスタ 100 飼料を与えた水槽で 10.2±1.5 mg/L, 133.7±19.6%, アスタ 50 カンタ 50 飼料を与えた水槽で 10.5±1.9 mg/L, 136.2±29.7%であった (図 2)。

斃死数については、実験期間中に、アスタ 100 飼料を与えた水槽で 5 個体、アスタ 50 カンタ 50 飼料を与えた水槽で 3 個体であり、飼料条件に関係なく、生残率は 85%以上であった。

体重の平均値については、実験開始時に、アスタ 100 飼料を与えた水槽で 297.8±9.8 g (n=25), アスタ 50 カンタ 50 飼料を与えた水槽で 302.5±14.0 g (n=25) であり、試験飼料を給餌してから 60 日後に、アスタ 100 飼料を与えた水槽で 923.6±65.6 g (n=15), アスタ 50 カンタ 50 飼料を与えた水槽で 715.7±86.3 g (n=17) となり、個体差が大きく、飼料のカロテノイド配合量の違いによる差は見られなかった (t-test, $p>0.05$)。

補正飼料効率については、アスタ 100 飼料を与えた場合で 89.3%とアスタ 50 カンタ 50 飼料を与えた場合の 78.7%より高かった (表 1)。

3-2. 筋肉の色差

筋肉の色差の平均値については、部位①における L*は、実験開始時に 39.9±0.6 (n=5) で、試験飼料を給餌してから 30, 60 日後に、アスタ 100 飼料を与えた水槽で 37.3±0.8, 38.4±0.7 (n=5), アスタ 50 カンタ 50 飼料を与え

た水槽で、 37.7 ± 0.8 , 37.1 ± 0.9 ($n=5$) といずれの試験飼料を与えた場合でも、試験飼料を給餌してから 30 日後にかけて低下した。しかし、試験飼料を給餌してから 30 日後から 60 日後にかけてアスタ 100 飼料を与えた水槽では上昇する傾向であったが、アスタ 50 カンタ 50 飼料を与えた水槽では低下する傾向であった。こ

れに対して、部位②では、実験開始時に 38.0 ± 0.5 ($n=5$) で、試験飼料を給餌してから 30, 60 日後に、アスタ 100 飼料を与えた水槽で 34.9 ± 1.2 , 35.5 ± 0.9 ($n=5$)、アスタ 50 カンタ 50 飼料を与えた水槽で、 33.6 ± 0.4 , 33.6 ± 0.8 ($n=5$) と部位①同様に、実験開始時から試験飼料を給餌してから 30 日後にかけて低下した

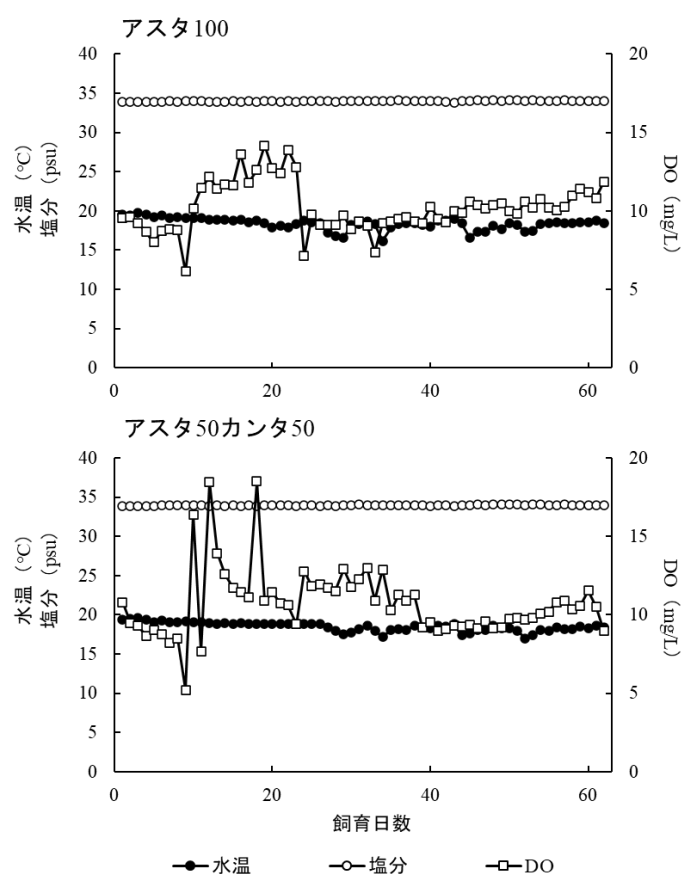


図2. 異なるカロテナイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の水質変化

表1. 異なるカロテナイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の60日間の飼育成績

試験区	アスタ100	アスタ50カンタ50
実験開始時平均体重 (g)	297.8 ± 9.8 ($n=25$)	302.5 ± 14.0 ($n=25$)
実験終了時平均体重 (g)	923.6 ± 65.6 ($n=15$)	715.7 ± 86.3 ($n=17$)
生残率 (%)	80	88
増重量 (g)	11047.1	8614
給餌量 (g)	12370.5	10944.1
補正飼料効率 (%)	89.3	78.7

(平均値±標準誤差)

が、試験飼料を給餌してから30日後から60日後にかけて変化は見られなかった(図3)。アスタ100飼料を与えた水槽で部位①におけるa*は、実験開始時に 0.6 ± 0.3 (n=5)で、試験飼料を給餌してから30、60日後に、 11.5 ± 1.2 , 14.5 ± 0.3 (n=5)であり、b*は、実験開始時に 0.8 ± 0.3 (n=5)で、試験飼料を給餌してから30、60日後に、 7.9 ± 0.9 , 10.2 ± 0.4 (n=5)であり、部位②におけるa*は、実験開始時に 2.2 ± 0.4 (n=5)で、試験飼料を給餌してから30、60日後に、 11.0 ± 0.9 , 14.6 ± 0.3 (n=5)であり、b*は、実験開始時に 2.4 ± 0.4 (n=5)で、試験飼料を給餌してから30、60日後に、 6.0 ± 0.4 , 9.4 ± 0.3 (n=5)といずれの部位であっても、飼育日数の経過に伴い、a*、b*いずれも上昇する傾向があった。これに対して、アスタ50カンタ50飼料を与えた水槽で部位①におけるa*は、試験飼料を給餌してから30、60日後に、 10.4 ± 0.6 , 12.4 ± 0.6 (n=5)、b*は試験飼料を給餌してから30、60日後に、 $7.1 \pm$

0.7 , 8.5 ± 0.6 (n=5)であった。部位②におけるa*は、試験飼料を給餌してから30、60日後に、 12.1 ± 0.3 , 11.8 ± 0.2 (n=5)、b*は、試験飼料を給餌してから30、60日後に、 7.1 ± 0.4 , 6.9 ± 0.4 (n=5)であった。部位①ではa*、b*いずれも、実験開始時から試験飼料を給餌してから60日後にかけて上昇する傾向があったが、部位②ではa*、b*いずれも実験開始時から試験飼料を給餌してから30日後にかけて上昇し、60日後にかけて変化は見られなかった(図4)。

3-3. 筋肉中カロテノイド量

筋肉中のカロテノイド量の平均値については、実験開始時にアスタキサンチン 0.7 ± 0.1 ppm (n=5)、カンタキサンチンは検出されなかった。試験飼料を給餌してから30、60日後に、アスタ100飼料を与えた水槽でアスタキサンチン $5.9 \sim 23.2$ ppm、カンタキサンチンは検出されなかった。アスタ50カンタ50飼料を与

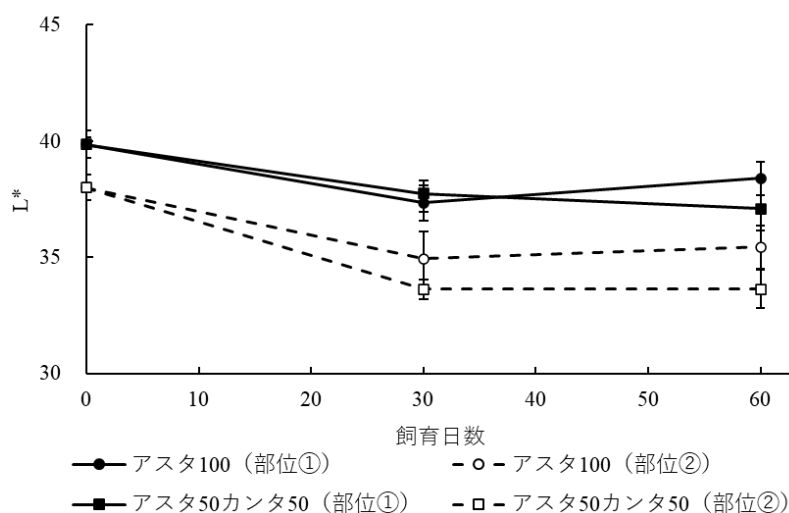


図3. 異なるカロテノイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の筋肉のL*の平均値

エラーバー：標準誤差 (n=5)

アスタ100：アスタキサンチン100 ppm

アスタ50カンタ50：アスタキサンチン50 ppm, カンタキサンチン50 ppm

えた水槽では、アスタキサンチン 7.0~10.7 ppm, カンタキサンチン 4.7~7.3 ppm といずれの試験飼料を与えた場合でも、飼育日数の経過に伴い、増加する傾向があった。また、筋肉中のアスタキサンチン量とカンタキサンチン量の合計を総カロテノイド量とした場合、カンタキサンチンの量が総カロテノイド量に占める割合は、アスタ 50 カンタ 50 飼料を与えた水槽で、30 日後に $38.7 \pm 1.1\%$ 、60 日後に $40.5 \pm 0.9\%$ と低く、アスタキサンチンと比較して蓄積量が少ない傾向であった (図 5)。

総カロテノイド量と L^* 、 a^* 、 b^* の関係を比較すると、 L^* は総カロテノイド量が増加しても増減は見られず、30~40 であった (相関分析, $r=0.5349$, $n=25$, 図 6)。 a^* は総カロテノイド量が増加すると上昇する傾向が見られた (相関分析, $r=0.9651$, $n=25$, 図 7), b^* も同様に、総カロテノイド量が増加すると上昇する傾向が見られた (相関分析, $r=0.9187$, $n=25$, 図 8)。

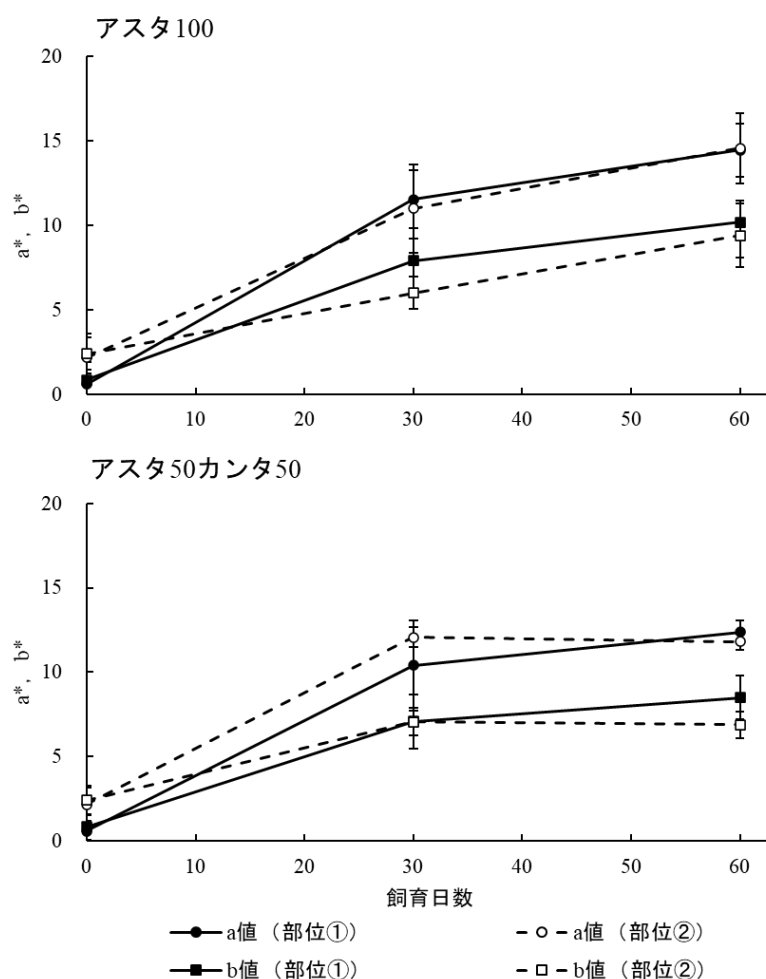


図4. 異なるカロテノイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の筋肉の a^* 、 b^* の平均値

エラーバー：標準誤差 (n=5)

アスタ100：アスタキサンチン100 ppm

アスタ50カンタ50：アスタキサンチン50 ppm, カンタキサンチン50 ppm

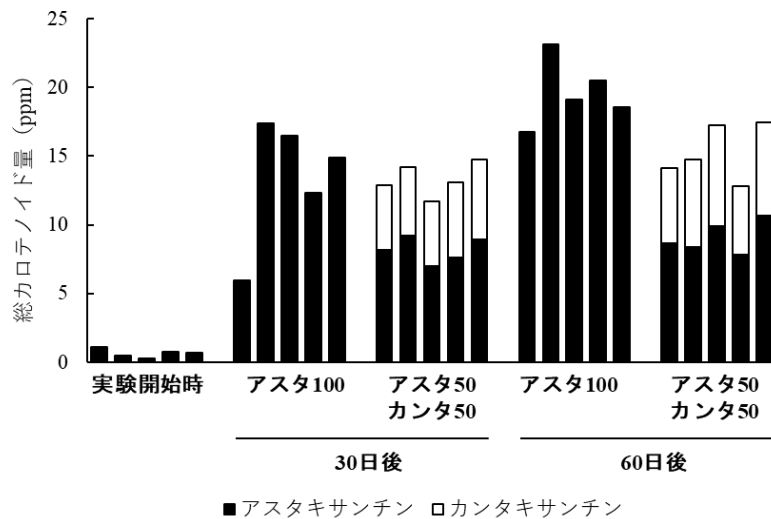


図5. 異なるカロテノイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の筋肉の総カロテノイド量

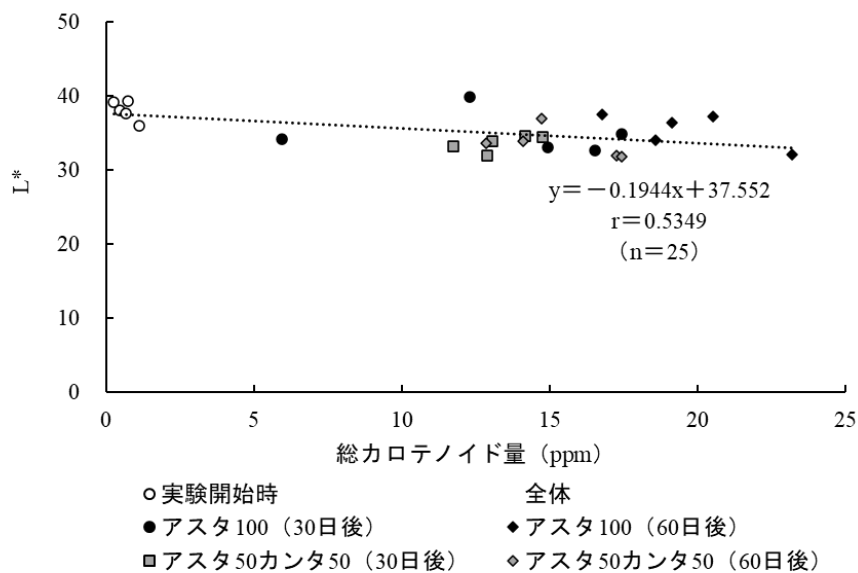


図6. 異なるカロテノイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の筋肉の総カロテノイド量とL*との関係

エラーバー：標準誤差 (n=5)

アスタ100：アスタキサンチン100 ppm

アスタ50カンタ50：アスタキサンチン50 ppm, カンタキサンチン50 ppm

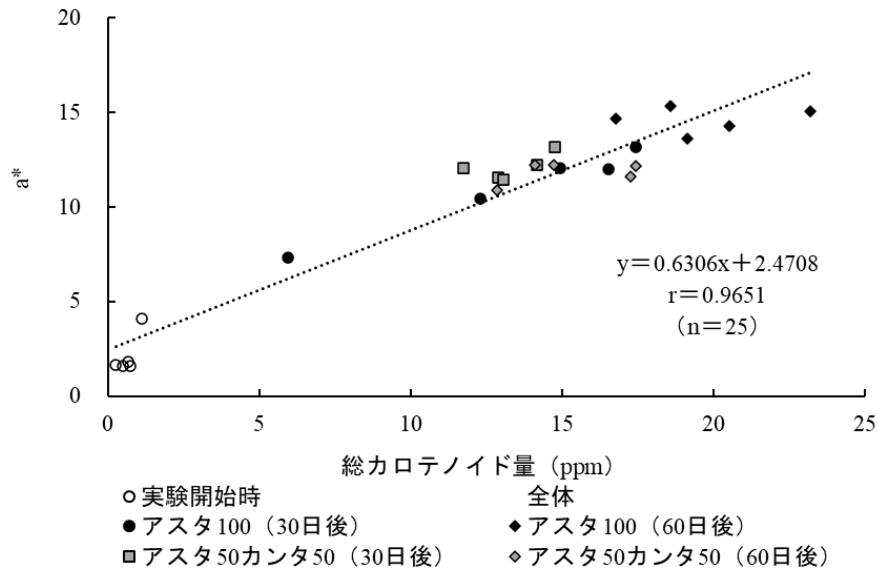


図7. 異なるカロテノイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の筋肉の総カロテノイド量と a^* との関係

エラーバー：標準誤差 (n=5)

アスタ100：アスタキサンチン100 ppm

アスタ50カンタ50：アスタキサンチン50 ppm, カンタキサンチン50 ppm

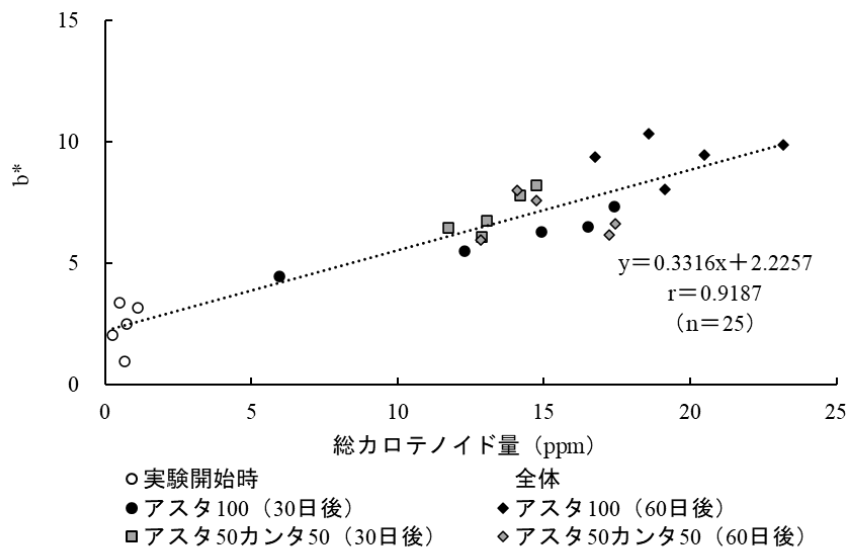


図8. 異なるカロテノイド配合飼料をスチールヘッドに与えた場合の筋肉の総カロテノイド量と b^* との関係

エラーバー：標準誤差 (n=5)

アスタ100：アスタキサンチン100 ppm

アスタ50カンタ50：アスタキサンチン50 ppm, カンタキサンチン50 ppm

4. 考察

体重の平均値が 300.2 g のスチールヘッドに アスタキサンチンを 100 ppm 含む飼料とアスタキサンチン 50 ppm, カンタキサンチン 50 ppm を含む飼料の異なるカロテノイド配合飼料を与え 60 日間飼育した場合, 筋肉の総カロテノイド量はアスタキサンチンを 100 ppm 含む飼料を与えた方が多かった. また, アスタキサンチン 50 ppm, カンタキサンチン 50 ppm を含む飼料を与えた場合, 等量の色素を添加したにも関わらず, アスタキサンチンの蓄積割合はカンタキサンチンと比較して高かった. 酒本はニジマスに色素量が 50 ppm となるように, 合成アスタキサンチンあるいは合成カンタキサンチンを添加した飼料を与えた場合, 経時的に背肉の総カロテノイド量は高くなるが, 両色素で明確な違いは認められなかったことを報告している⁹⁾.

G. I. Page・S. J. Davies はニジマスに色素量が約 50 ppm となるようにアスタキサンチンあるいはカンタキサンチンを添加した飼料を与え, 10 週間飼育した場合, 筋肉の総カロテノイド量に差は見られなかったことを報告している¹⁰⁾.

本実験では, 等量のアスタキサンチンとカンタキサンチンを配合した場合, アスタキサンチンの方が蓄積量は多かったが, 過去の知見では, 各色素を単独で配合した場合, 蓄積量に差は見られなかった. このことから, アスタキサンチン及びカンタキサンチンの配合割合で筋肉への色素蓄積量が異なることが考えられる. 筋肉の色差について, アスタキサンチン 100 ppm を含む飼料を与えた場合, $L^*32.1\sim41.1$, $a^*13.5\sim15.4$, $b^*8.0\sim11.5$ であったことに対して, アスタキサンチン 50 ppm, カンタキサンチン 50 ppm を含む飼料を与えた場合, $L^*31.2\sim40.6$, $a^*10.2\sim13.8$, $b^*6.0\sim10.3$ であり, L^* については大きな差は見られなかったが, a^* , b^* いずれ

もアスタキサンチン 100 ppm を含む飼料を与えた方が高かった. a^* は (+) 側では数字が大きい程, 赤の度合いが大きく, (-) 側では数字が小さい程, 緑の度合いが強いことを示す. b^* は (+) 側では黄色の度合い, (-) 側では青の度合いを示す¹¹⁾. 今回の実験では, アスタキサンチン 50 ppm, カンタキサンチン 50 ppm を含む飼料と比較して, アスタキサンチン 100 ppm を含む飼料を与えた方が, 筋肉の色調は赤と黄が強くなることが考えられる. アスタキサンチン, カンタキサンチンはいずれも脂溶性のカロテノイドであるが, カンタキサンチンはアスタキサンチンと比較して食用油に難溶である¹²⁾. 食用油は主に植物性の油であり, 本実験で使用了飼料に含まれる脂質の魚油は, 植物油同様に不飽和脂肪酸の割合が高く, 常温で液体の物質である. 魚油は高度不飽和脂肪酸であり, アスタキサンチン及びカンタキサンチンの溶解度に関する知見はないが, 食用油同様, アスタキサンチンの方が溶けやすい可能性があると考えられる. B. Bjerkeng らは飼料中の脂質配合量はアスタキサンチンの保持率に大きく関係しており, 保持率は脂質配合量の増加に伴い大きくなることを報告している¹³⁾. Lg Buttle らはニジマス体内でのカンタキサンチンの保持率はアスタキサンチンと比較して劣ることを報告している¹⁴⁾. 本実験では, 飼料の脂質配合量が 20%と比較的高いものを使用したため, カンタキサンチンと比較してアスタキサンチンの方が効率良く吸収された可能性が考えられる. これより, スチールヘッドの身質改善については, 脂質配合量が高く, アスタキサンチンを高濃度で添加した飼料を用いることで筋肉の色調は赤と黄が強くなることが明らかになった.

5. 引用文献

- 1) 秋山信彦 (2019) : 陸上養殖の最新動向. 遠藤雅人 (編), シーエムシー出版, 東京, 159-165
- 2) 江端弘樹・佐藤義夫・福江正治・畠田智・榎田和彦 (2006) : 地下海水を陸上養殖に利用する可能性と問題点ならびに対応策. 日本海水学会誌, 60 巻, 110-118
- 3) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会 (2015) : 日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂). アミノ酸成分表編, 全国官報販売協働組合, 東京, 120-159
- 4) 大臣官房国際部国際経済課 (2017) : 平成 29 年農林水産物輸出入概況. 農林水産省, 東京
- 5) 大臣官房政策課食料安全保障室 (2017) : 平成 29 年度食料需給表. 農林水産省, 東京
- 6) 佐野雅昭 (2018) : 種別・形態別サケ類商材の特徴と「ジャパンスーモン」創出に向けた課題. 養殖ビジネス 4 月号, 55 (5), 8-13
- 7) 鈴木敬子, 貞升友紀, 平田恵子, 嶋村保洋, 船山恵市, 小川仁志, 伊藤弘一, 石本琢磨, 道端伸行 (2006) : 養殖サケ・マス類のカロテノイド系色素及び酸化防止剤の分布. 東京都健康安全研究センター研究年報 (57), 219-222
- 8) 酒本秀一 (2015) : ニジマスの肉色改善— 2. New Food Industry, 57 (12), 52-61
- 9) 酒本 秀一 (2015) : ニジマスの肉色改善—1. New Food Industry, 57 (9), 39-51
- 10) G. I. Page・S. J. Davies (2006) : Tissue astaxanthin and canthaxanthin distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Comparative

Biochemistry and physiology. Part A,

Molecular & Integrative Physiology, 27, 125-132

- 11) 酒本秀一 (2014) : マダイの体色改善— 1. New Food Industry, 56 (6), 67-78
- 12) 厚生労働省 (2012) : カンタキサンチン指定のための検討報告書. 厚生労働省
- 13) B. Bjerkeng・S. Refstie・K. T. Fjalestad・T. Storebakken・M. Rødbotten・A. J. Roem (1997) : Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. Aquaculture, Volume157, 30, 297-309
- 14) Lg Buttle・Vo Crampton・Pd Williams (2001) The effect of feed pigment type on flesh pigment deposition and colour in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture Research, 32, 103-111

6. その他の業績

【学会発表】

- 1) 山下真由・山田良希・高橋亮平・佐藤豊・大森道生・渡邊将介・磯部圭汰・秋山信彦 : 2021 年 9 月 15 日, 高酸素条件下でのスチールヘッドの海水馴致. 令和 3 年度日本水産学会秋季大会 P11.
- 2) 山田良希・山下真由・高橋亮平・佐藤豊・大森道生・小島大・福岡紘人・平塚聖一・齋藤寛・秋山信彦 : 2021 年 9 月 14 日, 飼料中のカテキン, 脂質, カロテノイド含有量とスチールヘッドの身質との関係. 令和 3 年度日本水産学会秋季大会 P7
- 3) 山田良希・菅原楓・佐藤光・山下真由・高崎大智・秋山信彦 : 2019 年 9 月 9 日, スチールヘッドの海水適応能および海水馴致可能

サイズの検討. 令和元年度日本水産学会秋季大会 P17.

7. 謝辞

本研究を行うにあたり多大なるご支援を賜りました日建リース工業株式会社ならびに日本農産工業株式会社の皆様に深く感謝申し上げます。

環状オリゴ糖含有ポリビニルアルコールナノファイバーの創製とにおい分子包接能評価

Fabrication of Cyclodextrin-loaded Nanofibers Composed of Poly(vinyl alcohol) and Inclusion Ability of Odor Molecules

竹本 絵里佳¹, 窪田 美紗子¹, 小口 真一^{2,3}, 伊藤 建^{2,3}, 樋口 昌史^{1,2}, 岡村 陽介^{1,2*}

¹ 東海大学工学部応用化学学科, ² 東海大学先進生命科学研究so・香粧品研究部門, ³ 東海大学理学部化学学科

Erika Takemoto¹, Misako Kubota¹, Shinichi Koguchi^{2,3}, Takeru Ito^{2,3}, Masashi Higuchi^{1,2} and Yosuke Okamura^{1,2*}

¹ Department of Applied Chemistry, School of Engineering, ² Division of Cosmetic Science, Institute of Advanced Biosciences,

³ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University.

[要旨]

本研究では、環状オリゴ糖を含有したポリビニルアルコール (PVA) からなるナノファイバーを電界紡糸法で創製し、そのにおい分子包接能を検証した。ナノファイバーの加熱圧縮とグルタルアルデヒド架橋工程を組み合わせることでナノファイバーの比表面積を向上でき、かつ耐水性を付与することに成功した。におい分子モデル (*trans*-2-ノネナール) の包接能を評価したところ、環状オリゴ糖を含有させた効果は発現しなかったものの、PVA ナノファイバーの比表面積の向上により、*trans*-2-ノネナールを十分吸着できることを明らかにした。

[Abstract]

We herein propose electrospun nanofibers composed of poly(vinyl alcohol) (PVA) containing cyclodextrins (CDs) and evaluate their inclusion abilities of odor molecules (e.g. *trans*-2-nonenal). In fact, CDs-loaded PVA nanofibers were successfully fabricated by a combination process of hot-pressing and crosslinking with glutaraldehyde. Their inclusion abilities of *trans*-2-nonenal was sufficient in comparison with non-crosslinked nanofibers as a control. Unfortunately, the effect of CDs loaded into the PVA nanofibers was not expressed.

[Key Words]

nanofiber, polyvinyl alcohol, cyclic oligosaccharide, *trans*-2-nonenal

1. はじめに

「におい」は我々の日常生活に密接に関わっている。これまで数多くの嗅覚受容体が同定されており^[1]、におい分子濃度が pM-nM レベルであっても嗅覚受容体を介して高感度に検知される^[2]。従って、においがそのヒトの第一印象を決定するといっても過言ではない。最近、体臭などの不快なにおいを消し、好みの香りを肌に塗布する香粧品が市場を賑わしている。しかし、いずれも液状・粉末状で肌に塗布したり噴霧する用法のため、有効成分は汗等で流れてしまうほか、揮発性の高いにおい分子は消臭・芳香能の持続性が不足している課題が残されている。最近、加齢臭の原因物質 (*trans*-2-ノネナール) の発生部位は、うなじ・額・上腕部などに限定されていることも報告され^[3]、全身に消臭剤を施す必要はないと考えられる。

電界紡糸法によって紡糸される高分子ナノファイバーは調製法が簡便であり、繊維の細さ故の高い比表面積を活かした環境・医療分野への応用が期待されている^[4]。他

方、環状オリゴ糖は、D-グルコースが α -1,4 グリコシド結合によって環状構造を形成しており、水溶性化合物ではあるが、環内部の疎水領域に疎水性分子を包接できることが知られている^[5]。

本研究では、環状オリゴ糖を含有したポリビニルアルコール (PVA) からなるナノファイバーを創製し、におい分子包接能を付与した新規消臭剤としての可能性を検証することを目的とする。

2. 結果の概要

1) 環状オリゴ糖含有 PVA ナノファイバーの調製

シリコンウェハ (30 × 30 mm²) 上に水溶性かつ耐熱性を有する高分子水溶液 (100 mg/mL) を滴下後、スピニング (4000 rpm, 60 s, MS-A 100, ミカサ社製)、犠牲膜とした。PVA 水溶液 (重合度: 1500, 10 wt%, 4 mL) に環状オリゴ糖 (β -CD or γ -CD, 67 μ M) をそれぞれ添加し、犠牲膜を塗布したシリコンウェハをターゲットとして 1 分間紡

糸した (NANON-03, メック社製, ノズル径: 27G, ノズルターゲット間距離: 150 mm, 送り速度: 1.0 mL/h, 印加電圧: 30kV)。次いで、得られた CD 含有 PVA ナノファイバーを小型熱プレス機 (AH-2003, アズワン社製) にて加熱圧縮 (80°C, 40 MPa, 5 min) した。ナノファイバーを角シャーレ (容量 216 mL) に入れ、別容器に添加したグルタルアルデヒド水溶液 (GA: 25%, 350 μ L, 酸性雰囲気下) と直接触れないように静置 (25°C, 24 h) し、気相中にて架橋させた。

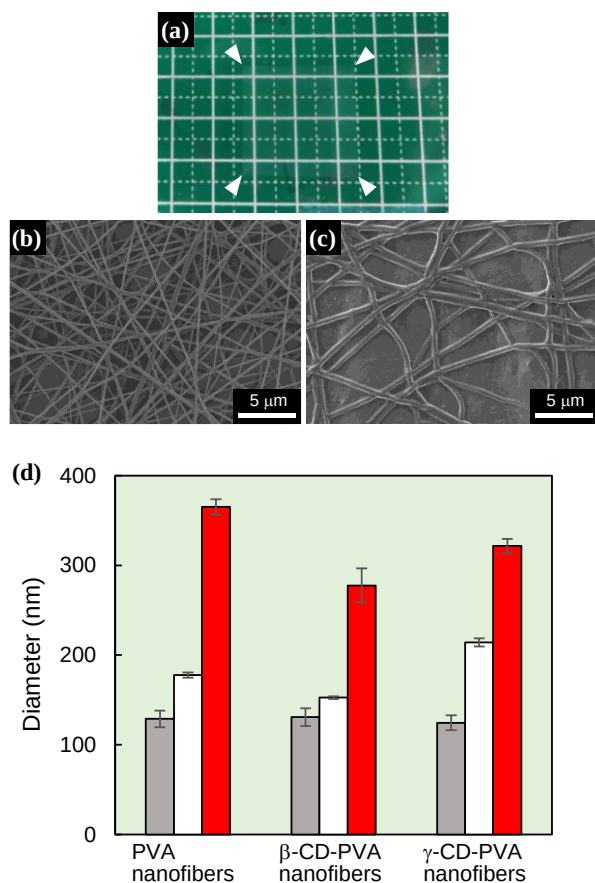


図 1 (a) 水中で剥離した PVA ナノファイバー (加熱圧縮/GA 架橋工程あり) の写真, (b) PVA ナノファイバー (GA 架橋工程のみ) の電子顕微鏡写真, (c) PVA ナノファイバー (加熱圧縮/GA 架橋工程あり) の電子顕微鏡写真, (d) PVA ナノファイバーのファイバー径と加熱圧縮/GA 架橋工程の関係 (灰色カラム: 加熱圧縮/GA 架橋工程なし, 白色カラム: GA 架橋工程のみ, 赤色カラム: 加熱圧縮/GA 架橋工程あり)

加熱圧縮後、GA 架橋工程を経た PVA ナノファイバーをシリコンウェハごと水中に浸漬させたところ、瞬時に犠牲膜が溶解し、基板と同サイズで透明性の高い PVA ナノファイバーが得られた (図 1(a))。純水で洗浄後、走査型電子顕微鏡にて観察したところ、ファイバーの形状を維持していたことから (図 1(c))、GA 架橋が十分進行し、水に不溶化したと考えられる。また、加熱圧縮工程を経ない PVA ナノファイバー (図 1(b)) と比較して、ファイバー径が優位に増大していた。

PVA ナノファイバーのファイバー径と加熱圧縮/架橋工程の関係を図 1(d) に示す。紡糸直後のファイバー径は、環状オリゴ糖 (β -CD or γ -CD) の有無に関わらず、約 130 nm であった (灰色カラム)。ただし、このままでは架橋していないため純水で溶解してしまう。GA 架橋を施すとファイバー径は約 150-220 nm となり、架橋工程により約 20-70 nm 増大するとともに、水に不溶な構造体に変化した (白色カラム)。さらに、加熱圧縮を経て GA 架橋を施すと、ファイバー径はさらに増大した (約 280-370 nm)

(赤色カラム)。従って、GA 架橋によって水に不溶な構造体になるとともに、加熱圧縮工程を組み合わせることにより比表面積 (g/m^2) の向上に繋がる知見を得た。

2) におい分子包接能評価

trans-2-ノネナールをにおい分子モデルとした。プラスチック容器 (245 mL) に、1) の方法で得た一連のナノファイバーと *trans*-2-ノネナール (200 μ L) を接触しないように入れて密閉し、静置 (rt, 2 h) した。各種ナノファイバーをアセトン (4 mL) に浸漬させ、吸着した *trans*-2-ノネナールを抽出後、ガスクロマトグラフィー分析 (GC-8APF, 島津製作所社製) に供した。このとき、ファイバーの単位重量当たりに対する *trans*-2-ノネナールの吸着量を算出した。

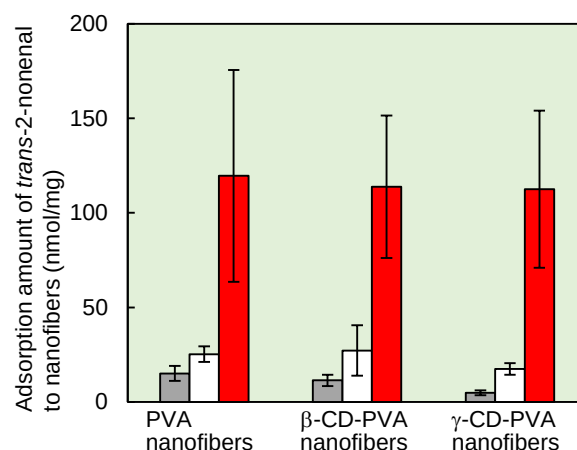


図 2 環状オリゴ糖含有 PVA ナノファイバーの *trans*-2-ノネナールの吸着量。 (灰色カラム: 加熱圧縮/GA 架橋工程なし, 白色カラム: GA 架橋工程のみ, 赤色カラム: 加熱圧縮/GA 架橋工程あり)

その結果を図 2 に示す。残念ながら、PVA ナノファイバーに環状オリゴ糖 (β -CD or γ -CD) を含有させても、*trans*-2-ノネナールの吸着量に差異はなかった。しかし、GA 未架橋体 (灰色カラム) と比較して、GA 架橋工程を経ると *trans*-2-ノネナールの吸着量は 1.5~3 倍向上した (白色カラム)。さらに、加熱圧縮後に GA 架橋工程を経ると、吸着量は 4~7 倍と顕著に向上した (赤色カラ

ム)。この結果から、ファイバーの形状変化によって、比表面積が向上し吸着量が増加したことが示唆された。また、各ファイバーの *trans*-2-Nonenal の吸着量は、うなじ単位面積あたりの発生量 (約 7.8 pmol/cm²)^[3] を優位に上回っており、消臭剤として十分機能する可能性が示唆された。

3. 展望

環状オリゴ糖を含有した PVA ナノファイバーを調製した。加熱圧縮と GA 架橋工程を組み合わせることでナノファイバーの比表面積を向上でき、かつ耐水性を付与することに成功した。今回、環状オリゴ糖を含有させた効果は発現しなかったものの、PVA ナノファイバーの比表面積の向上により、*trans*-2-ノネナールを十分吸着できることを明らかにした。今後、環状オリゴ糖の意義を再検証するとともに、新たな戦略を進める計画である。

4. 引用文献

- [1] Touhara, K. *et al. Neuroscience* **254**, 45 (2013).
- [2] Kaupp, U.B. *et al. Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 188 (2010).
- [3] K. Kimura *et al. J. Chromatogr. B.* **1028**, 181 (2016).
- [4] S. Thakkar *et al. Eur. J. Pharm. Sci.* **107**, 148 (2017).
- [5] G. Crini. *Chem. Rev.* **114**, 10940 (2014).

5. その他の業績

【学会等発表】

- 1) 藤田 峻平, 土屋 笙子, 中川 篤, 岡村 陽介. 装着感のない生体適合性ナノ薄膜の創製とにおい分子包接能評価. 高分子学会関東支部第 5 回神奈川地区講演会 (2021.12.10, オンライン)
- 2) 岩松 宏徳, 浅羽 建汰, 布山 忠裕, 杉崎 健人, 竹本 絵里佳, 窪田 美紗子, 岡村 陽介. Fabrication of Crosslinked Nanofibers and Their Inclusion Ability of Odor Molecules. 第 31 回日本 MRS 年次大会 (2021.12.14, オンライン)
- 3) 藤田 峻平, 土屋 笙子, 中川 篤, 岡村 陽介. 装着感のない生体適合性ナノ薄膜の創製とにおい分子包接能評価. 東海大学マイクロ・ナノ啓発会 (Tμne) 第 14 回学術講演会 (2022.2.26, オンライン)
- 4) 岩松 宏徳, 浅羽 建汰, 布山 忠裕, 杉崎 健人, 竹本 絵里佳, 窪田 美紗子, 岡村 陽介. ボロン酸架橋キトサンナノファイバーの創製とにおい分子包接能評価. 東海大学マイクロ・ナノ啓発会 (Tμne) 第 14 回学術講演会 (2022.2.26, オンライン)
- 5) 坂井 亜由美, 岩松 宏徳, 岡村 陽介. 加齢臭予防を東海大学先進生命科学研究紀要 第 6 巻 2022 年 3 月

指向した抗酸化剤含侵デュアル架橋ゲル薄膜の創製
東海大学マイクロ・ナノ啓発会 (Tμne) 第 14 回学術講演会 (2022.2.26, オンライン)

6. 謝辞

本研究の一部は、先進生命科学研究所の助成 (課題番号: 2016-C1)、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団 2020 年度コスメトロジー研究助成 (J-20-4) により行われた。記して謝意を表する。

東海大学
先進生命科学研究所 紀要編集委員会

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

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

東海大学先進生命科学研究所紀要

2022 年 3 月 31 日 発行

発行者 東海大学先進生命科学研究所

住所 神奈川県平塚市北金目 4-1-1

電話 0463-58-1211（代表）
