

先進生命科学研究所紀要

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

2022 Vol.7



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)

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

(English)



東海大学先進生命科学研究所紀要

Vol.7 2022

目次

医薬総合研究部門

- (総説) インスリンスーパーファミリーに属するヒトリラキシン-2 の生理機能と応用
佐藤有里¹⁾、荒井堅太^{1,2)}
(¹⁾ 東海大学理学部化学科、²⁾ 東海大学先進生命科学研究所)
.....1
- 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⁾、加藤順子³⁾、福西菜穂子³⁾、平山令明⁴⁾、
猪口貞樹^{1,2)}
(¹⁾ 東海大学医学部救命救急医学、²⁾ 同先進生命科学研究所・医薬総合研究部門、
³⁾ 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、
⁴⁾ 東海大学総合医学研究所)
.....7
- 単糖修飾グルタチオン誘導体による接触皮膚炎原因物質の濃度低下効果の解析**
金森 審子^{1,2)}
(¹⁾ 東海大学工学部生物工学科、²⁾ 東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門)
.....11
- 担癌ヒト化マウスに生着したリンパ球サブセット及び腫瘍への T 細胞浸潤の個体差**
桐ヶ谷大樹^{1,2)}、亀谷美恵^{1,3)}、椎名隆^{1,3)}
(¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学、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)
.....15

高機能食品研究部門

- (総説) 国産ヤーコンの葉を用いたハーブティーの抗酸化作用
安田伸^{1,2)}、上田裕人^{1,3)}、松田靖^{1,2)}、村田達郎¹⁾
(¹⁾ 東海大学農学部、²⁾ 東海大学先進生命科学研究所・高機能食品開発部門、³⁾ 尚絅
大学生活科学部)
.....23

好熱菌由来ピロリン-5-カルボン酸還元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科)

……………31

静岡県産および輸入サーモンの身質比較

小塩理緒菜¹⁾、吉川航¹⁾、平塚聖一^{1,2,3)}

(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)

……………35

感覚機能研究部門

環状オリゴ糖含有ナノ薄膜の創製とリナロールの包接能評価

浅野目将吾¹⁾、坪井亮²⁾、土屋笙子²⁾、小口真一^{3,4,5)}、伊藤建^{3,4)}、樋口昌史^{1,2,4,5)}、岡村陽介^{1,2,4,5)}

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

……………41

Odor quotient を用いた膀胱癌患者の体臭に寄与する皮膚ガス成分の同定

関根嘉香¹⁾、戸高惣史²⁾、川西彩³⁾、森町将司³⁾、平林健一⁴⁾、加川建弘³⁾

(¹⁾ 東海大学理学部化学科、²⁾ AIREX 株式会社技術研究所、³⁾ 東海大学医学部消化器内科学、⁴⁾ 富山大学学術研究部医学系病理診断学講座)

……………44



Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

Vol.7 2022

CONTENTS

Pharmaceutical Science

(Review) Physiological functions and applications of human relaxin-2 belonging to the insulin superfamily

Yuri Satoh¹⁾ and Kenta Arai^{1,2)}

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

.....1

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⁾, Junko Kato³⁾, Nahoko Fukunishi³⁾, Noriaki Hirayama²⁾, and 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, (⁴⁾ Institute of Medical Sciences, Tokai University)

.....7

Analysis of the effect of monosaccharide-modified glutathione derivative on the concentration reduction of contact dermatitis causative agents

Akiko Kanamori^{1,2)}

(¹⁾ Department of Bioengineering, School of Engineering, Tokai University. (²⁾ Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 11

Individual differences in engrafted lymphocyte subsets and T cell infiltration of tumor-bearing humanized mice in different donors

Daiki Kirigaya^{1,2)}, Yoshie Kametani^{1,3)}, and Takashi Shiina^{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)

.....15

High Functional Food Science

(Review) Antioxidant effects of herbal tea from yacon leaves in JapanShin Yasuda^{1,2)}, Yuto Ueda^{1,3)}, Yasushi Matsuda^{1,2)}, and Tatsuro Murata¹⁾¹⁾ School of Agriculture, Tokai University, ²⁾ Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³⁾ Department of Life Sciences, Shokei University)

.....23

Crystallization and preliminary structural analysis of pyrroline-5-carboxylate reductase from thermophileKazunari Yoneda^{1,2,3,4)} and Tomohiro Arak^{2,3)}¹⁾ School of Agriculture, Tokai University, ²⁾ Graduate School of Agriculture, Tokai University, ³⁾ Graduate School of Bioscience, Tokai University, ⁴⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

.....31

Comparison of meat property of salmon from Shizuoka Prefecture and imported salmonRiona Koshio¹⁾, Wataru Yoshikawa¹⁾, and Seiichi Hiratsuka^{1,2,3)}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)

.....35

Human Sensory Science**Fabrication of cyclodextrin-loaded nanosheets and their inclusion ability of linalool**Shogo Asanome¹⁾, Ryo Tsuboi²⁾, Shoko Tsuchiya²⁾, Shinichi Koguchi^{3,4,5)}, Takeru Ito^{3,4)}, Masashi Higuchi^{1,2,4,5)}, and Yosuke Okamura^{1,2,4,5)}¹⁾ Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Tokai University, ²⁾ Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University, ³⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, ⁴⁾ Division of Cosmetic Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ⁵⁾ Micro/Nano Technology Center, Tokai University)

.....41

Identification of human skin gases responsible for body odor of pancreatic cancer patients using odor quotientYoshika Sekine¹⁾, Michihito Todaka²⁾, Aya Kawanishi³⁾, Masashi Morimachi³⁾, Kenichi Hirabayashi⁴⁾, and Tatehiro Kagawa³⁾¹⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, ²⁾ R&D laboratory, AIREX Inc., ³⁾ Department of Gastroenterology, School of Medicine, Tokai University, ⁴⁾ Department of Diagnostic Pathology, Faculty of Medicine, University of Toyama)

.....44

**(Review) Physiological functions and applications of human relaxin-2
belonging to the insulin superfamily**

佐藤有里¹⁾、荒井堅太^{1,2)}

東海大学理学部化学科¹⁾、東海大学先進生命科学研究所²⁾

Yuri Satoh¹⁾ and Kenta Arai^{1,2)}

¹⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University

²⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

ヒトリラキシニン-2 (HRLx-2) は、異なる2本のポリペプチド鎖 (A鎖・B鎖) がシステイン残基間で形成される2組のジスルフィド結合によってリンクしたヘテロダイマー型のペプチドホルモンである。HRLx-2は、妊娠女性の産道を拡張する本来のホルモン機能に加え、心不全、子宮内膜症、強皮症、不妊症、腎不全、糖尿病などの多様な疾患に対する薬理効果が期待されており、その市場価値は急速に高まっている。この総説では、HRLx-2の構造、機能、治験応用、化学合成に関する近年の研究動向について概説する。

[Abstract]

Human relaxin-2 (HRLx-2) is a heterodimeric peptide hormone, in which two different polypeptide chains (A- and B-chains) are cross-linked by two inter-chain disulfide bonds formed between cysteine residues. In addition to the original hormonogenic function of dilating the birth canal in pregnant women, HRLx-2 has been found to have pharmacological effects on diverse diseases such as heart failure, endometriosis, scleroderma, infertility, renal failure, and diabetes, swiftly increasing the market value of HRLx-2 due to its high expectations for the practical application as a peptide-based formulation. In this review, recent research trends related to the structures, functions, clinical trials, and chemical synthesis of HRLx-2 are outlined.

[Key Words]

peptide hormone, drug discovery, chemical synthesis, protein folding, therapeutic trial

1. 妊娠ホルモン：ヒトリラキシニン-2

ヒトリラキシニン-2 (Human relaxin-2: HRLx-2) は、妊娠女性における産道の拡張や心血管機能と腎機能の適応に寄与するペプチドホルモンである。HRLx-2の研究の歴史は古く、1926年にFrederick L. Hisawによって発見されたことに端を発する[1]。その後、1970~1980年代には、分子生物学やタンパク質科学における基礎研究技術の発展に伴い、構造や機能に関する研究報告がなされた。HRLx-2は、血糖降下作用をもつインスリンとの立体構造の類似性が高いことから、インスリンスーパーファミリーに属する球状タンパク質として分類される (図1)。

マウス Rlx-2 (MRlx-2) 遺伝子をノックアウトしたマウス (MIRKO) や、受容体発現遺伝子をノックアウト

したマウス (LGR7KO) が作成され、出産に及ぼす影響も研究されており、それらは生殖細胞の表現型にコントロールと差がみられることが報告されている[2]。雄では、精巣 (精子とセルトリ細胞) と前立腺でMRlx-2とその受容体であるLGR7の発現が認められる。MIRKOとLGRKOの各々の遺伝子を欠損したモデル動物において、精巣の発育不全や精子幹細胞のアポトーシスが起ることで精子の成熟数が減少し、受精能力はもつものの出生数が顕著に減少する事象が確認された。このことから、男性におけるHRLx-2は、精子の成長と発育に必要であると推察される[2]。一方、雌ではMRlx-2とLGR7共に卵子の発現は低く、子宮内膜や輸卵管、乳腺、胎盤、子宮頸部など、卵子が成熟する周辺組織での発現が認められる[3,4]。ブタ由来のRlx-2をマウスの顆粒膜細胞や卵胞膜細胞に添加することで、

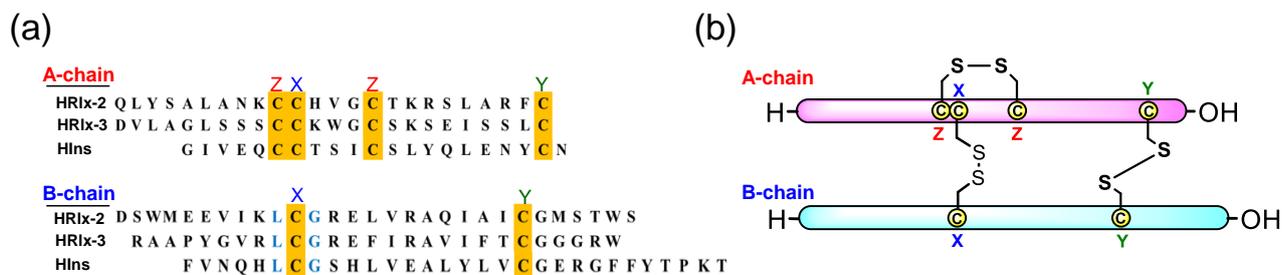


図 1. ヒトのインスリンファミリーの構造。(a) リラキシンとインスリンの構成鎖 (A 鎖・B 鎖) の一次配列。(b) インスリンファミリーのジスルフィド (S-S) 結合トポロジー。

細胞外マトリックスタンパク質のリモデリングに関する酵素群 (メタロプロテアーゼ) の分泌が促進された。すなわち、女性における HRlx-2 は、卵胞形成や排卵・着床時の細胞外マトリックスのリモデリングに重要な役割を担っているものと推察される。このように、インスリンとは全く異なる生理機能を有する。

近年では、上記のような『妊娠ホルモン』としての HRlx-2 の本来の機能に加えて、抗線維化作用、心筋や皮膚への創傷治癒効果、血流量の増大効果、血漿の浸透圧調整作用などが見出されており、多様な疾患治療への応用が期待されている。重要なことに、リラキシンおよびリラキシン受容体は生殖関連細胞だけでなく、男女ともに、脳、心臓、血液、肺、腎臓、肝臓、皮膚、筋肉、骨といった様々な組織細胞に存在することが示唆されている[5-8]。すなわち、性別に依存しない各種疾患への治療応用が可能であると考えられる。

2. 構造および化学的特性

リラキシンは、構造類似性の観点から、分子進化の過程で血糖制御に重要な役割を果たすインスリンから、派生したと推測される。ヒトリラキシン (HRlx) およびヒトインスリン (HIns) の A 鎖と B 鎖のアミノ酸配列を比較すると、互いに相同性は低いが (図 1a)、ジスルフィド (S-S) 結合トポロジーはファミリー間で高い保存性が確認できる (図 1b)。1 組の鎖内 S-S 結合と 2 組の鎖間 SS 結合によって、HIns と HRlx はそれらの三次元構造が維持されている (図 2)。加えて、いずれも A 鎖および B 鎖のそれぞれに 2 つおよび 1 つの α -ヘリックス部位を含んでおり、三次元構造的にも高い類似性が確認できる。しかし、生物学的作用と機能が全く交差していない。これは、それらの発現部位が異なるだけでなく、受容体認識部位における構造モチーフあるいはアミノ酸配列の差異に起因する。HIns では、B 鎖 C 末端におけるターン構造および β ストランド領域

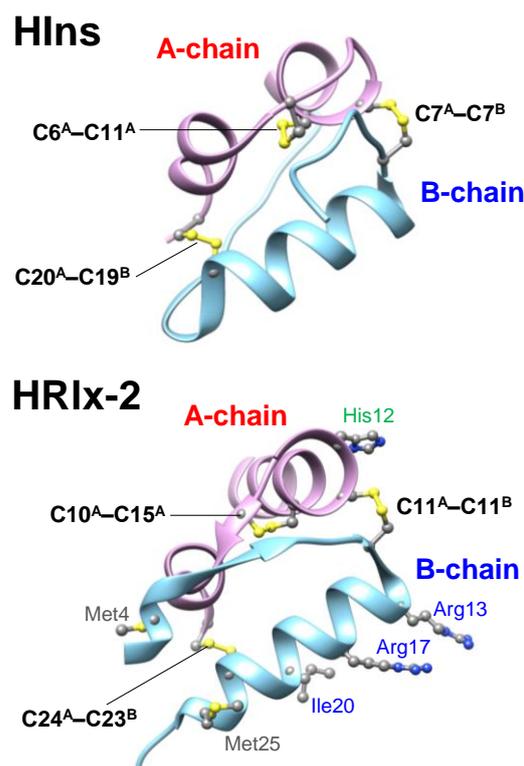


図 2. HIns (PDB; 2bn3) および HRlx-2 (PDB; 6rlx) の三次元立体構造。

が単量体 HIns と受容体の会合において重要である[9]。

一方、HRlx-2 では B 鎖の α -ヘリックス領域における Arg13、Arg17、Ile20 が HRlx-2 の受容体認識において重要であると考えられている[10]。リガンドとして特異的に受容体と結合することにより、細胞内シグナル伝達経路に相違が生じ、結果的に、遺伝子、タンパク質発現、代謝生理の違いとして現れる。

また、HRlx-2 は A 鎖の N 末端領域の α -ヘリックスに存在する溶媒露出した His12 は、pH 依存的な凝集を誘発する鍵アミノ酸として知られ[11]、体内の凝集挙動とタンパク質凝集に起因する神経変性疾患などのミスフォールディング病との関連に高い関心が集まっている。

さらに、HRlx-2 の B 鎖の 4 番目と 25 番目の Met 側

鎖のスルフィドは、pH 非依存的にスルホキッドに酸化されやすく、生理活性の低下を招く。一方で、スルホキッド化によってタンパク質の溶解性を向上させる効果があるものと考えられ、上記で述べたような病原性の不溶解性オリゴマーや凝集体の形成を妨げる役割を担っているかもしれない。

3. リラキシンの生理機能

HRlx-2 は、LGR7 と LGR8 に特異的に会合することができる [12] (図 3)。HRlx-2-LGR7/LGR8 複合体の形成によって細胞内では、セカンドメッセンジャーとして生成する cAMP が種々のタンパク質をリン酸化することで、Ca²⁺-カルモジュリン複合体の発現が抑制され、結果としてミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の酵素活性が低下する。それとともに actomyosin ATPase 活性も低下し、結果的に子宮や産道収縮が緩和される[13-17]。

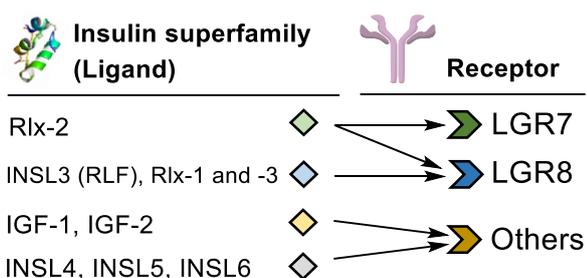


図3. インスリンスーパーファミリーの受容体特異性。INSL、RLF、IGFはそれぞれ、insulin-like、relaxin-like factor、insulin-like growth factorの略。

リラキシンが有する本来の妊娠ホルモンとしての機能に加えていくつかの重要な生理機能も報告されている。子宮頸部を柔らかくするメディエーターとして、Type-I、Type-III、および Type-IV コラーゲンが主に関与することが知られており、HRlx-2 はコラーゲンの線維化、凝集を抑制し、組織に対して高い抗線維化作用を発揮することが知られている[18,19]。吉野らは、HRlx-2 が黄体嚢胞と胎盤で発現すること、その受容体である LGR7 がヒトでは子宮内膜腫においても発現することを確認している[20]。さらに吉野らは、コラーゲンゲルベース細胞収縮アッセイから、HRlx-2 投与による有意なゲル収縮抑制効果を確認した。子宮内膜を移植した子宮内膜症マウスモデルを用い、HRlx-2 を投与した個体群の子宮内膜症様病変面積とコントロール群のそれと比較したところ、子宮内膜の線維化が発症し肥厚している疾患部位において、抗線維化・創傷治癒の促進

(皮膚の癬痕硬縮の抑制)・抗炎症に寄与する効果が観測された。

げっ歯類を用いた動物実験では、ブタ由来の Rlx-1 および HRlx-2 が血管拡張作用や血小板の凝集作用を示した [21]。また、虚血性心疾患モデル動物 (ラット・ブタ・モルモット) において、HRlx-2 投与は再灌流と心筋障害を抑制したとの報告もある[22]。さらに HRlx-2 は、免疫細胞であるマスト細胞、好中球、好酸球の IgE 受容体を介したヒスタミンやロイコトリエン、プロスタグランジンなどを含む顆粒の脱顆粒を抑制する。これにより、炎症性化学物質の放出抑制や細胞内 Ca²⁺濃度上昇および cGMP の濃度上昇を抑制することで、抗炎症効果を発揮するという報告もなされている[23,24]。インスリンが血糖降下作用に特化したホルモン機能を示す一方で、スーパーファミリーである HRlx-2 が、生体の恒常性を維持するための多様な生理機能を潜在的に有することは、インスリンファミリーの分子進化とリラキシンを利用した創薬展開の観点から興味深い。

4. 治験の動向

1990 年代に入ると、リラキシンのペプチド製剤としての利用を目指し、ヒトへの安全性と有効性の検証が始まった[25]。最初に、米国において強皮症患者 20 名に対し、治験第 II 相試験までが実施された。ヒトとブタの皮膚組成や創傷治癒のメカニズムが類似していることから、ブタ由来の Rlx-1 を 25 μg/kg と 100 μg/kg を毎日、6-30 か月に渡って投与し、皮膚硬縮度、栄養障害性の潰瘍の改善、レイノー病の症状などを観察し、改善が認められた。

また、HRlx-2 の受容体は、広範な組織細胞での発現が認められることから、ホルモンとしての多機能性が期待されている (上記参照)。そこで、HRlx-2 (医薬品名; Seleraxin) を用いて、欧州医薬品庁の許認可の下、ノバルティスファーマ主導で心不全患者 6,545 名への Seleraxin 投与の有効性の検証を実施した。呼吸困難発症から 5 日と 180 日時点での死亡率を検討したところ、プラセボ群と比較して有意差が認められず、治験は第 I 相 (2014 年) ならびに第 II 相試験 (2016 年) で終了した。一方で、米国食品医薬品局 (FDA) は HRlx-2 の様々な疾患に対する治験を現在でも積極的に実施している。心不全 (第 II 相完了、第 III 相実施中)、2 型糖尿病 (第 II 相完了、第 III 相移行)、多発性硬化症 (第 I 相完了、第 II 相移行)、子癇前症 (第 I 相中止)、不妊症における卵成熟 (第 I 相完了)、分娩促進 (第 II 相完了)、強

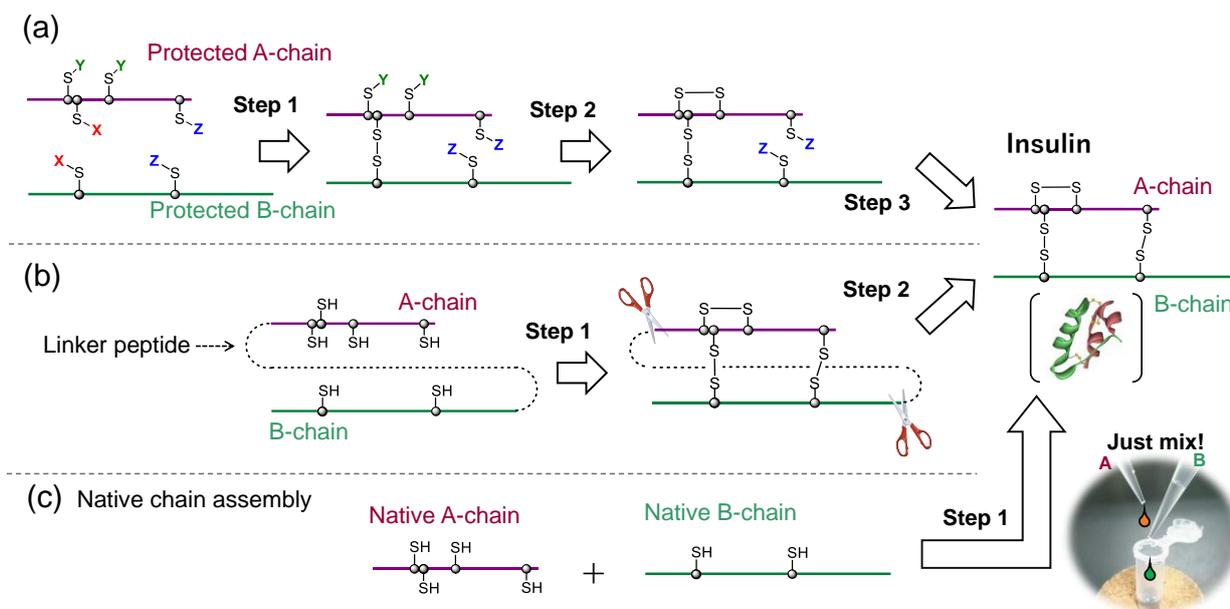


図4. インスリンの化学合成戦略 (a) 多種類の保護基の選択的な脱保護と S-S 結合架橋によるインスリン調製。 (b) プロインスリン様ペプチドの S-S 結合架橋とリンカーペプチドの切除によるインスリン調製。 (c) 天然鎖の直接的な自己組織化 (Native Chain Assembly; NCA) によるインスリンファミリーの調製。

皮症 (第 II 相および第 III 相完了) について治験を実施している。国内でも厚生省の許認可の下、ノバルティスファーマ主導で急性心不全患者を対象に、標準治療に追加した Seleraxin の投与の奏功性を評価する第 III 相試験を実施した。リラキシンがもつペプチド製剤としての安全性と有効性が認められつつあり、創薬分野において高い関心を集めている。

5. 化学分野から見るリラキシン製剤の未来

リラキシンが有するその多様な機能は、様々な疾患の新しい治療戦略の可能性を開拓している。一方、リラキシンの更なる機能開拓においては、大学や公的研究機関における基礎研究の推進と発展も肝要である。しかし、一般試薬として販売されているリラキシンは極めて高額であり (およそ 40 万円/mg)、研究資金に恵まれた一部のグループをのぞき、日本国内での基礎研究の遂行は極めて難しいのが現状である。異なる 2 本のペプチド鎖が 2 組の S-S 結合によってリンクした特徴的な構造を有するインスリンファミリーでは、通常タンパク質合成とは異なる複雑な製造プロセスを経る。その為、生産コストがかかり、結果として市場価格も高くなる。

現在のリラキシンの製造では、インスリン同様、微生物によるタンパク質発現技術を利用しており、A 鎖と B 鎖がリンカー (C-ペプチド) で繋がったプロイン

スリン様前駆体 (プロリラキシン) を酵母や大腸菌を用いて発現させ、S-S 結合を架橋後、C-ペプチドをプロテアーゼによって切除する多段階的な手法が用いられる。しかし、これには大型のバイオリアクター施設を要し、設備投資が莫大である。また、生物の力を利用するため、非天然アミノ酸を導入するなどの人工的な構造改変を行うことは容易ではない [26]。

一方、インスリンやリラキシンの化学合成においては、近代の有機化学的技法の発展に伴い、S 原子上に化学修飾を施した A 鎖と B 鎖を合成し、それらを段階的にはずしながら選択的に S-S 結合を架橋する技法や (図 4a)、リンカーペプチドによって A 鎖と B 鎖が繋がったプロインスリン様ペプチドを合成し、S-S 結合の架橋後にリンカー部位を切除する技法など (図 4b)、様々な化学合成戦略が提案されてきた [26]。しかし、いずれにしても多段階的で複雑な工程を要することから、これらの方法がインスリン製造プラントに応用された例はない。

リラキシンを含むインスリンファミリーの合成において最も理想的な合成法は、無保護状態の A 鎖と B 鎖を合成し、各鎖の自己組織化 (フォールディング) 能力によって互いを直接的にカップリングさせる手法である (図 4c)。このような方法は、インスリン化学合成の歴史におけるごく初期に考案されたが、各鎖内の SS 架橋が優先されてしまう。故に、目的物を高収率で得ることは不可能であると、60 年以上も前に結論付けら

れている。しかし、この紀要の著者らは、あえてこの60年前の合成法に着目しインスリンファミリーの合成研究を推進してきた。我々は、ウシ膵臓インスリンをモデルとして、A鎖とB鎖の二鎖間フォールディングの反応経路を徹底的に解明することで、インスリンの構成鎖を効果的にカップリングさせる条件を特定した[27]。実に60年ぶりの最適条件の更新であった。

重要なことに、この天然鎖の直接的な自己組織化(Native Chain Assembly; NCA)は、インスリンだけではなく、HRIx-2のA鎖とB鎖にも適応可能である[27]。本法は、操作が簡便であるだけでなく、化学合成を基盤としているため、ペプチド鎖の化学修飾も容易である。様々なアナログ製剤候補の調整と迅速なスクリーニングが可能になり、製剤の構造最適化を早期に達成させるポテンシャルを秘めている。今後のリラキシンの製剤化を後押しする強力なツールとなるはずである。

6. まとめと展望

リラキシンは、その多彩な生理機能から様々な疾患に対する治療効果が期待され、製剤化の実現が人類のQOLの向上に直接的に寄与するだろう。一方、治験におけるプラセボ対照試験では、リラキシンの有効性を十分に立証できておらず、製剤化は道半にして足踏み状態が続いている。現状の打破には、薬理効果の強化につながるリラキシンの部分修飾や構造改変が必要であろう。有効な分子デザイン戦略を考案するには、リラキシン(あるいはその受容体)の構造および機能に関して、分子生物学、構造生物学、生化学などにおける更なる基礎研究の発展が必要である。リラキシン化学合成の発展は、様々なニーズに沿ったリラキシンアナログの提供を可能にするだろう。また、リラキシン化学合成基盤を盤石にすることで、リラキシンおよびそのアナログ体をより安価に市場供給することも見込み、関連基礎分野を大いに活性化させるだろう。

最近我々は、インスリンが有するS-S結合の一部をそのセレン原子アナログであるジセレニド(Se-Se)結合へ置換することで、インスリンA鎖とB鎖のカップリング効率を劇的に改善するとともに、生体内での長寿命化をもたらす、持続性インスリン製剤としての応用の可能性を見出した[28]。同様の合成技法は、インスリンスーパーファミリーであるリラキシンにも応用可能であるものと考えられ、合成の効率化、酵素分解耐性の強化はもちろん、セレン原子のユニークな化学

特性に伴う新たな機能発現なども期待される。有機合成化学分野が、リラキシン製剤化を実現する鍵を握っているはずである。

7. 引用文献

- [1] O. D. Sherwood, *Endocr. Rev.*, **25**, 205 (2004).
- [2] C. S. Samuel, *et al.*, *Lab Invest*, **83**, 1055 (2003).
- [3] M. A. M. Krajnc-Franken, *et al.*, *J. Mol. Cell. Biol.*, **24**, 687 (2004).
- [4] L. Zhao, *et al.*, *Endocrinology*, **140**, 445 (1999).
- [5] J. M. Gunnensen, *et al.*, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **110**, 55 (1995).
- [6] R. A. D. Bathgate, *et al.*, *Trends Endocrinol. Metab.*, **14**, 207 (2003).
- [7] R. G. Bennett, *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1041**, 185 (2006).
- [8] M. Sarwar, *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 933 (2017).
- [9] G. Scapin, *et al.*, *Nature*, **556**, 7699 (2018).
- [10] E. E. Büllsbach, *et al.*, *J. Biochem.*, **275**, 35276 (2000).
- [11] M. Khosravi, *et al.*, *J. Biochem.*, **39**, 5876 (2000).
- [12] S. Y. Hsu, *et al.*, *Science*, **295**, 671 (2002).
- [13] B. M. Sanborn, *et al.*, *Exp. Physiol.*, **86**, 223 (2001).
- [14] S. J. Downing, *et al.*, *Reprod. Fertil. Dev.*, **99**, 275 (1993).
- [15] P. Meera, *et al.*, *Am. J. Physiol.*, **269** (2), 312 (1995).
- [16] B. M. Sanborn, *et al.*, *Exp. Physiol.*, **86**, 223 (2001).
- [17] M. Hollingsworth, *et al.*, *Relaxin 2000, Myometrial relaxant action of relaxin*, eds., G. W. Tregear, *et al.*, Broome, Australia, 291 (2000).
- [18] E. N. Unemori, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 10681 (1990).
- [19] R. G. Bennett, *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 867 (2003).
- [20] O. Yoshino, *et al.*, *Biomedicines*, **8**, 467 (2020).
- [21] G. G. Casten, *et al.*, *Int. J. Angiol.*, **11**, 408 (1960).
- [22] E. Masini, *et al.*, *Endocrinology*, **138**, 4713 (1997).
- [23] D. Bani, *et al.*, *Endocrinology*, **138**, 1909 (1997).
- [24] E. Masini, *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 337 (2002).
- [25] M. S. Erikson, *et al.*, *Relaxin 2000, Relaxin clinical trials in systemic sclerosis*, eds., G. W. Tregear, *et al.*, Broome, Australia, 373 (2000).
- [26] J. A. Karas, *et al.*, *Chem. Rev.*, **121**, 4531 (2021).
- [27] K. Arai, *et al.*, *Commun. Chem.*, **1**, Article number: 26, (2018).
- [28] K. Arai, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 5522 (2017).

8. 業績

【学会等発表】

- 1) Y. Satoh, H. Katayama, M. Iwaoka, and K. Arai. Facile Preparation of Type-2 Human Relaxin through Two-Chains Folding Coupled with Interchain Disulfide Formation. WSeS workshop 10th, 2022, Fluminense University, Rio de Janeiro, Brazil.
- 2) Y. Satoh, H. Katayama, M. Iwaoka, and K. Arai. Total Synthesis of Type-2 Human Relaxin via Native Chain Assembly. ICCST 15th, 2022, Florianopolis, Brazil.

9. 謝辞

本研究は、日本私立学校振興・共済事業団 (PMAC) の学術研究振興資金、および東海大学総合研究機構のプロジェクト研究資金より助成を受けて遂行された。

利益相反：開示すべき利益相反はありません。



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⁾、加藤 順子³⁾、福西 菜穂子³⁾、平山 令明⁴⁾、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⁾
東海大学総合医学研究所⁴⁾

Nobuo Watanabe^{1,2)}, Yoshiko Shinozaki³⁾, Sanae Ogiwara³⁾, Junko Kato³⁾, Nahoko Fukunishi³⁾, 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,

⁴⁾Institute of Medical Sciences, Tokai University

[要旨]

我々が発見した、血小板受容体 CLEC-2 の podoplanin (PDPN) 結合部位を塞ぎ、PDPN による血小板活性化を防ぐ一群の化合物の抗血栓作用を、マウス深部静脈血栓モデルで評価した。しかしこの化合物群には抗血栓作用は見られなかった。その原因を探求した結果、これらの化合物群はアルブミン分子上の薬物結合サイト II に特異的に結合することを突き止めた。一方、電子顕微鏡による血小板凝集後の形態観察を行い、本化合物群に属する化合物による凝集抑制は血小板活性化抑制に基づくことを確認した。今後は本化合物群とサイト II との相互作用の詳細を明らかにし、それに基づいて化合物に改変を行い、サイト II への結合性を低下させた改変体を取得して、リード化合物の開発を目指す。

[Abstract]

Using a deep vein thrombosis model in mice, we have assessed the effectiveness of our antiplatelet compounds that fit to the podoplanin (PDPN)-binding pocket of CLEC-2 molecule in platelet, thereby preventing platelet activation by PDPN. However, the compound could not attenuate thrombus formation in this model in any trial. Investigation of the causes of this ineffectiveness revealed that the compound was sequestered by serum albumin in the blood, specifically, on its drug binding site II. Meanwhile an electron microscopic analysis of the platelet morphology confirmed that the compounds inhibits the stage of activation rather than aggregation. In the next stage, we will clarify the in-depth bonding interaction between the compound and the site II, and based on this mechanism, chemical modification will be made to the compounds in order to diminish albumin binding.

[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り、血小板膜上の膜タンパク質受容体である C-type

lectin receptor-2 (CLEC-2) に結合して血小板の活性化を誘導する。このような病的状態で活性化を受けた血小板は凝集し、微小血管を塞ぎ種々の臓器障害を引き起こす[1]。また活性化された血小板は TGF- β などの

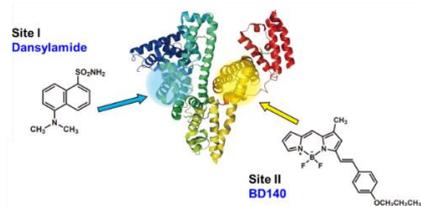
活性化分子を放出し、癌細胞に対して上皮間葉転換を誘導し転移浸潤能を賦与する[2]。

癌の転移阻害と癌関連血栓症治療薬開発を目指し、我々は CLEC-2 分子の PDPN 結合部位に結合し、PDPN による血小板凝集を防ぐ化合物の探索を行った[3]。この結果、共通の基本構造を有する 10 種のヒット化合物を取得した[4]。昨年からこれら化合物のマウスモデルでの薬効評価を開始した[5]。今年度はこの評価を更に進めたが、依然有効性は確認できなかった。そこでこの原因解明を行った。

2. 結果の概要

1) マウス深部静脈血栓モデルにおける化合物持続投与の効果

マウス深部静脈血栓モデルでの血栓形成に対してこれまで、経口投与、皮下投与、腹腔内投与など、異なる投与ルートでの評価を行ったが、化合物に抑制効果は見られていない[5]。この一因として血中からの薬物消失が速いためと考えられた。そこで今回、浸透圧ポンプカプセル(Alzet 2001D)を用いての 2 日間にわたる持続投与を行った。このカプセル内部は水和膨潤樹脂と薬物充填したバックの 2 重構造になっており、樹脂が体液を吸収して膨潤し薬剤バックに圧力をかけ薬物を押し出す仕組みである。被験化合物を充填した Alzet 2001D カプセルを皮下に外科的に埋め込み、腹大静脈を狭窄したマウスに 2 日間にわたり化合物 X の持続投与投与を行った(180 mg/kg/day)。しかしながらこの投与方法によっても血栓抑制作用は見られなかった。



東京化成(株) オンラインカタログより
<https://www.tcichemicals.com/JP/ja/c/10403>

Site I に結合する薬剤: Warfarin, Bilirubin
 Site II に結合する薬剤: Ibuprofen

図1 化合物Xならびに抗血小板薬Cangrelorのアルブミン結合能の測定

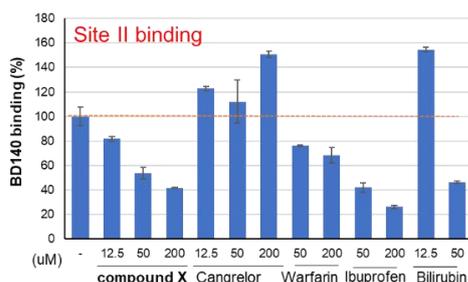
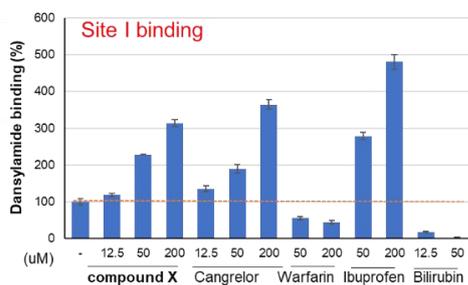
BSA、被験化合物、蛍光プローブをPBS (pH 7.4) 中で混合し、蛍光強度を測定した。それぞれの薬物結合部位に結合することが知られている分子として、サイトIにはWarfarin、Bilirubin、サイトIIにはIbuprofenがある。

<評価条件>

BD140 = 6.25 μM

Dansylamide = 12.5 μM

BSA = 0.625 mg/mL (= 9 μM) in PBS



2) 血漿タンパク質と化合物結合能の評価

マウスモデルで有効性が見られない原因を探った。血中のアルブミンは主要な薬物結合タンパク質であり、低分子薬剤の血中濃度の維持に重要であるが、アルブミンとの結合が強すぎる場合、薬効発揮が抑制される。そこで中性での飽和濃度に相当である 4 mM の化合物 X を、PBS、マウス血漿、または 30 mg/mL (血中アルブミン濃度に相当) のウシ血清アルブミン(BSA)を含む PBS に添加し、10 kDa のカットオフの限外ろ過にてタンパク質と低分子を分離した。PBS では 70% 以上の化合物 X が濾液に回収されたが、マウス血漿からの回収は 15% であった。さらに、30 mg/mL BSA 添加 PBS においても回収は 15% であった。以上の結果から、化合物 X はアルブミンに結合し、この結果薬効発揮が抑制されている可能性が示唆された。

3) アルブミン分子上の化合物結合部位の同定

そこで化合物 X のアルブミン分子上の結合部位の同定を試みた。Dansylamide はアルブミンの薬物結合 site I に結合し蛍光(励起 365 nm、蛍光 480 nm)を呈する。一方、BD140 (4,4-Difluoro-1-methyl-3-(4-propoxystyryl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) は薬物結合 site II に結合し蛍光(励起 365 nm、蛍光 585 nm)を呈する[6]。そこでこれらの蛍光プローブを用い、競合法で化合物が BSA に結合するかどうか検証した(図 1)。化合物 X ならびに、血小板薬としての対照薬 Cangrelor は、見かけ上逆に site I プローブの Dansylamide の蛍光強度を増加させた。したがって化合物 X と Cangrelor は、

Dansylamide を site I の結合部位から排除してはいないと推察される(蛍光上昇は、例えば化合物 X の site II 等への結合により BSA の構造が変化し、site I に結合している Dansylamide の量子収率が上がった可能性がある)。一方、site I に結合することが知られている陽性対照の Warfarin と Bilirubin はいずれも Dansylamide の蛍光を低下させた。すなわち site I への結合により、蛍光プローブの結合を競合阻害した

ことが示唆された。これらのコントラストから、化合物 X は site I へは結合していないと考えられた。

一方、site II プローブの BD140 の結合に対しては、化合物 X に蛍光抑制効果が見られた。同様な抑制効果は site II に結合するとされる Ibuprofen にも見られた。一方の Cangrelor にはこのような抑制効果は見られなかった。

本評価法はいずれの結合 site の場合も、プローブ結合部位と被験薬剤の結合部位が完全に一致していないと競合阻害できない可能性がある。また本評価法は、アルブミンに対する蛍光プローブとの相対的な結合力において、被験化合物が勝っていないと抑制できない。このように本法では種々制限があるが、少なくとも化合物 X は site I には強力には結合せず、site II に対しては Ibuprofen なみに結合することが示唆された。

4) 化合物の作用点の更なる検証

PDPN 惹起による血小板凝集に対する阻害効果が、実際に PDPN 結合阻止による活性化阻害に基づくのか、活性化後の凝集過程の阻害に基づくのかを明らかにするため、電子顕微鏡での形態評価を行った(図 2)。未刺激の血小板は表面が滑らかな円盤型として観察された。PDPN による惹起 20 分後に固定し観察したところ、コントロール(DMSO)では血小板表面から複数の突起が伸展していた。一方、化合物 X とほぼ同等の構造を有する化合物 Z を 50 μ M 添加した場合、突起進展は見られず、ほぼ未刺激の状態と同じ形態であることが判明した。これより、化合物 Z による凝集阻害は、凝集を阻害しているのではなく、活性化自体を阻害していることが明らかとなった。同様の結果は、X など他の

化合物にも見られ、また、ヒト洗浄血小板でも見られた。

3. 考察&展望

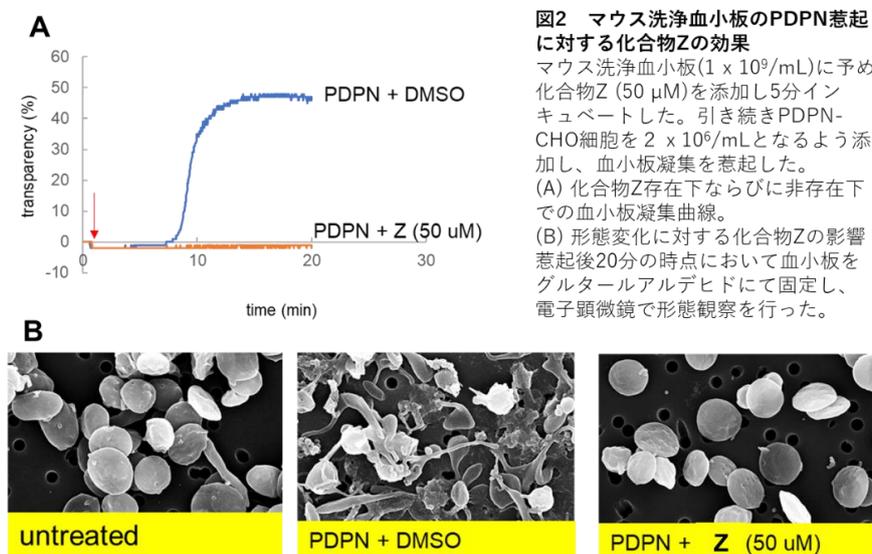
これまでのところ、我々の CLEC-2 阻害化合物には深部静脈血栓モデルにおいて抑制効果は見られていない。本研究によりこの一因がアルブミンの site II との結合による可能性が判明した。これより、今後はアルブミン site II の構成アミノ酸と化合物双方の置換基の化学結合の詳細をバインディングアッセイ等によって明らかにし、化合物に化学修飾を施す方向性が立てられた。

一方、マウスモデルで CLEC-2 阻害化合物を評価する場合、これ以外にも考慮すべき事柄がある。我々の化合物はヒトの CLEC-2 に結合し、この結果、ヒト CLEC-2 とヒト PDPN との結合を阻害できる化合物として選択された[3, 4]。ヒト CLEC-2 とヒト PDPN の親和性は解離定数(Kd)において 20 μ M 程度であるが、マウスの CLEC-2 とマウスの PDPN の親和性は 10-15 nM と報告されており[7]、実に 1000 倍の違いがある。ヒト用に開発を進めている我々の化合物は、マウスのこのような強固なタンパク質-タンパク質結合に対して抑制効果を発揮できない懸念もあり、深部静脈血栓モデルにおいて効果が見られなかった一因である可能性もある。尚、図 2 で示すように、我々の CLEC-2 阻害剤は *in vitro* において PDPN 惹起によるマウス血小板凝集を阻害する。ただしこのマウス血小板凝集阻害能評価系は、ヒト型の PDPN 惹起によるハイブリッド系である。ヒト PDPN とマウス CLEC-2 との親和性は不明である。

一方、近年、ゲノム編集技術によって、ヒト型の

CLEC-2 を発現するマウスが開発された[8]。このようなヒト型マウスを用いた薬効評価が必要になると思われる。

現在、臨床で用いられるアスピリンや ADP 受容体阻害剤のクロピドグレルは幅広い適用が可能である一方、出血リスクを高める欠点があり、惹起物質に対して選択性の高い抗血小板薬の出現が望まれている[9]。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、今後も実用化に向け研究を進めていく必要がある。



4. 引用文献

- [1] K. Suzuki-Inoue, Platelets and cancer-associated thrombosis: focusing on the platelet activation receptor CLEC-2 and podoplanin, *Blood*, 134 (2019) 1912-1918.
- [2] N. Watanabe, M. Kidokoro, M. Tanaka, S. Inoue, T. Tsuji, H. Akatuska, C. Okada, Y. Iida, Y. Okada, Y. Suzuki, T. Sato, T. Yahata, N. Hirayama, Y. Nakagawa, S. Inokuchi, Podoplanin is indispensable for cell motility and platelet-induced epithelial-to-mesenchymal transition-related gene expression in esophagus squamous carcinoma TE11A cells, *Cancer Cell Int*, 20 (2020) 263.
- [3] N. Watanabe, M. Kidokoro, Y. Suzuki, M. Tanaka, S. Inoue, H. Tsukamoto, N. Hirayama, P.W. Hsieh, C.P. Tseng, Y. Nakagawa, S. Inokuchi, A pull-down and slot blot-based screening system for inhibitor compounds of the podoplanin-CLEC-2 interaction, *PLoS One*, 14 (2019) e0222331.
- [4] 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, 先進生命科学研究所紀要 2020, 5 (2021) 1-4.
- [5] 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, 先進生命科学研究所紀要 2021, 6 (2022) 1-4.
- [6] J.C. Er, M. Vendrell, M.K. Tang, D. Zhai, Y.T. Chang, Fluorescent dye cocktail for multiplex drug-site mapping on human serum albumin, *ACS Comb Sci*, 15 (2013) 452-457.
- [7] S.E. Lombard, A.Y. Pollitt, C.E. Hughes, Y. Di, T. McKinnon, A. O'Callaghan C, S.P. Watson, Mouse podoplanin supports adhesion and aggregation of platelets under arterial shear: A novel mechanism of haemostasis, *Platelets*, 29 (2018) 716-722.
- [8] H.C. Brown, S. Beck, S. Navarro, Y. Di, E.M. Soriano Jerez, J. Kaczmarzyk, S.G. Thomas, V. Mirakaj, S.P. Watson, B. Nieswandt, D. Stegner, Antibody-mediated depletion of human CLEC-2 in a novel humanised mouse model, *Blood Adv*, (2022).
- [9] 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付属病院神経内科・小原さおり氏、永田栄一郎教授に感謝いたします。

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

Tanaka K, Tanaka M, Watanabe N, Ito M, Pastan I, Koizumi M, Matsusaka T.

C-type lectin-like receptor (CLEC)-2, the ligand of podoplanin, induces morphological changes in podocytes. *Sci Rep*. 2022 Dec 26;12(1):22356. doi: 10.1038/s41598-022-26456-9.

**Analysis of the effect of monosaccharide-modified glutathione derivative
on the concentration reduction of contact dermatitis causative agents**

金森 審子^{1,2)}

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

Akiko Kanamori^{1,2)}

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

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

[要旨]

防腐剤として化粧品等に汎用されているメチルイソチアゾリノン(MI)およびメチルクロロイソチアゾリノン(MCI)は、接触皮膚炎の誘因となる場合がある。有力な抗酸化分子であるグルタチオン(GSH)添加による炎症鎮静化の報告があるが、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP)による分解により、GSHの外界からの供給は容易ではない。我々は、独自に開発した γ -GTP抵抗性を有する単糖修飾GSH誘導体のMI/MCI濃度低下効果を解析し、治療薬への応用が期待できることを見出した。

[Abstract]

Methylisothiazolinone (MI) and methylchloroisothiazolinone (MCI) are widely used in cosmetics as preservatives, but may induce contact dermatitis. There are reports that the administration of glutathione (GSH), a potent antioxidant molecule *in vivo*, calmed inflammation derived from MI/MCI. However, GSH is not easily supplied from the outside world because it is degraded by γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) present on the cell surface and in the bloodstream. Therefore, we analyzed the reactivity of GlcNAc-GSH, a monosaccharide-modified GSH derivative with γ -GTP resistance developed by us, to MI/MCI, and found that it lowered the MI/MCI concentration in the same way as GSH. It can be expected that GlcNAc-GSH should be applied to therapeutic agents for contact dermatitis.

[Key Words]

glutathione, contact dermatitis, gamma-glutamyltranspeptidase, methylisothiazolinone, methylchloroisothiazolinone

1. はじめに

グルタチオン(γ -Glu-Cys-Gly, GSH)は、生体内で最も有力な抗酸化分子の一つであり、細胞の酸化および糖化ストレス原因物質の無毒化反応に寄与している。そのため、健康状態の維持や老化防止に不可欠であるが、その体内生成量は加齢とともに減少する。高い酸化ストレスによってGSHが枯渇すると補給が必要になるが、外界からの供給は容易ではない。最大の障害は上皮細胞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)」による特異的な加水分解である。

我々は、先に計算科学に基づいて、 γ -GTPに分解さ

れないGSH誘導体を独自にデザインして開発した。すなわち、GSHのL-グルタミン酸にN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)という単糖を1残基付加した単糖修飾GSH誘導体(GlcNAc-GSH)を設計し、化学合成した。先行研究により、GlcNAc-GSHの γ -GTP抵抗性獲得を確認している(表1)。また、GlcNAc-GSHは、GSHの機能発現に不可欠なチオール基の反応性を維持していることも、チオール基検出試薬との反応性やメラニン生成抑制効果を解析することにより確認済みである[1]。したがって、GlcNAc-GSHは生体内で容易に分解されることなく有害物質の無毒化機構で機能すると期待できる。

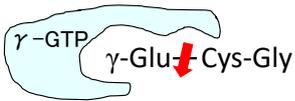
分子種	GSH	GlcNAc-GSH
γ -GTPの作用		GlcNAc- γ -Glu Cys-Gly
γ -GTP処理後	L-Glu, Cys-Gly	GlcNAc-GSH (変化なし)

表1 GSH と GlcNAc-GSH の構造と γ -GTP による分解の有無
GSH 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。図中の矢印は γ -GTP による切断部位を示す。GlcNAc-GSH は γ -GTP によって加水分解されなかった。

今回、接触皮膚炎(かぶれ)の原因物質の除去・無毒化における GlcNAc-GSH の効果について以下のように検討を進めた。

接触皮膚炎は、皮膚が刺激物質やアレルギーの原因物質に触れることで発症する湿疹性の炎症である。検証に用いる炎症原因物質として、GSH による治療効果が報告されているメチルイソチアゾリノン(MI)およびメチルクロロイソチアゾリノン(MCI)を選択し、市販の約 0.35% MI /1.15% MCI の混合液(商標:プロクリン)を使用した(図1)。MI /MCI 混合液は、化粧品やトイレタリー用防腐剤として 15ppm (約 0.1mM)以下で使用が認められているが、規定以下の濃度でも季節や体調・体質によって炎症を生じる場合がある。

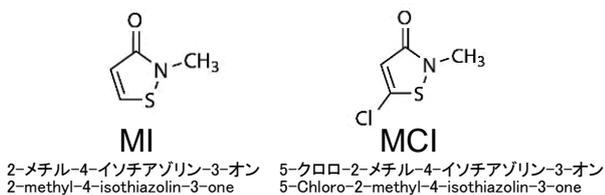


図1 実験に使用した接触皮膚炎原因物質
プロクリン:約 0.35% MI および約 1.15% MCI 含有水溶液

ところで、高濃度の GSH (2%:約 65mM)を含む市販の皮膚軟化剤と 15ppm MI /MCI 混合液を激しく混ぜ合わせると迅速に MI/MCI の濃度が低下することが確認されており[2]、GSH 含有皮膚軟化剤の塗布によって MI /MCI 混合液による炎症の程度が改善された例が報告されている[3]。GSH と MI/MCI は複数の反応生成物を生じることが確認されており、生成物の組成の経時変化は詳細に解析されている[3-6]。本研究は、より効率的な治療法の開発を目的として、先に開発した γ -GTP 抵抗性を有する GlcNAc-GSH の MI /MCI に対する反応性を以下のように検証した。

2. 結果の概要

(1) 280nm における吸光度の測定

東海大学先進生命科学研究紀要 第7巻 2023年3月

プロクリンをリン酸緩衝食塩水(pH 7.4)で希釈して 0.1mM MI/MCI 溶液を調製し、1mM GSH または GlcNAc-GSH 添加が 280nm における吸光度に及ぼす影響を調べた[2]。

その結果、MI /MCI に由来する吸光度は、GSH および GlcNAc-GSH のどちらの共存下でも経時的に減少し、GlcNAc-GSH が GSH と同様に MI /MCI の無毒化に有効である可能性が示唆された(図2)。

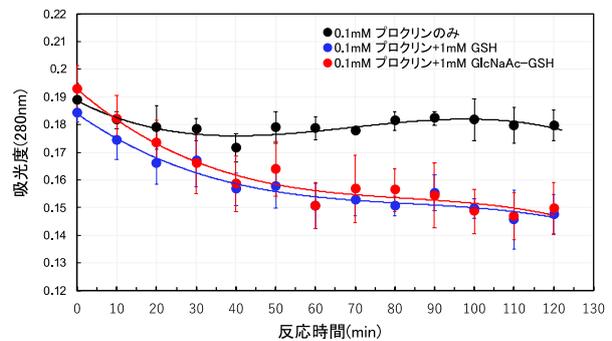


図2 プロクリン+GSH (●) または GlcNAc-GSH (●) 反応溶液の 280nm における吸光度の経時変化
GlcNAc-GSH は GSH と同様に MI /MCI と反応することが示唆された。

(2) UV スペクトルの測定

MI /MCI の検出には、280nm 以外の UV 波長を測定している例も見られる上、UV スペクトルはなだらかなピークとして検出されると報告されている[7]。そこで、検出法の検証の目的で (1)の各反応液の 230nm から 400nm までの UV スペクトルを一定時間ごとに測定した。その結果、0.1mM プロクリン溶液のスペクトルには変化が見られないのに対して、GSH または GlcNAc-GSH の共存下では、反応液の UV スペクトルが短時間で大きく変化することが見出された(図3)。スペクトルのピークは、280nm 付近を境として2つの領域に分かれ、最初に高波長側に大きくシフトした後に短時間で低波長側にシフトし、24h 後には低波長側が主となった。その際、GSH 共存下の方が GlcNAc-GSH 共存下よりもややゆっくりと低波長側へシフトした。

上述のように、GSHとMI/MCIは迅速に反応して多様な生成物を生じることが報告されており、生成物の化学構造や組成の経時変化は詳細に解析されている[3-6]。図3のスペクトルの変化は、生成物の組成変化を反映するものと考えられた。そこで、C18カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、反応液に含まれる化合物の組成解析を試みた。

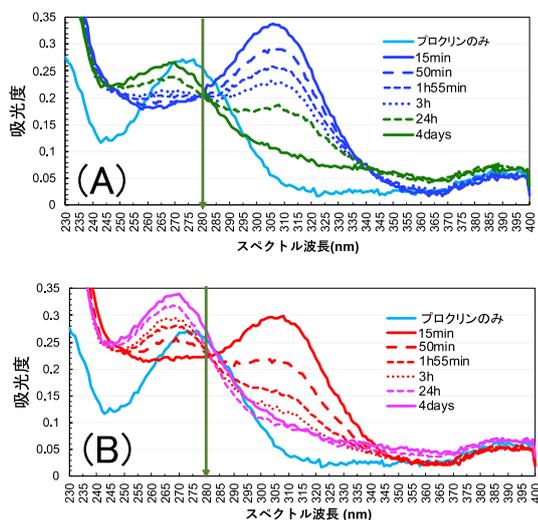


図3 プロクリン+GSH (A) または GlcNAc-GSH (B) 反応溶液のUVスペクトルの経時変化
(A)、(B)ともに短時間での反応生成物の組成変化が示唆された。

(3) HPLC による組成解析

ピークは、280nmにおける吸光度を測定して検出した。まず文献値と照らし合わせた解析により MI および MCI の溶出位置を調べた後、MI/MCI に GSH または GlcNAc-GSH を加えて反応させた溶液で検出されるピークの溶出位置を解析した。その結果、どちらの反応液でも MI または MCI と溶出位置が一致するピークは全く検出されず、(2) UV スペクトルの測定で得られた結果を考慮すると迅速に MI/MCI 濃度が低下したことが示唆された(図4)。また、GSH あるいは GlcNAc-GSH を添加した場合のいずれも、ピ

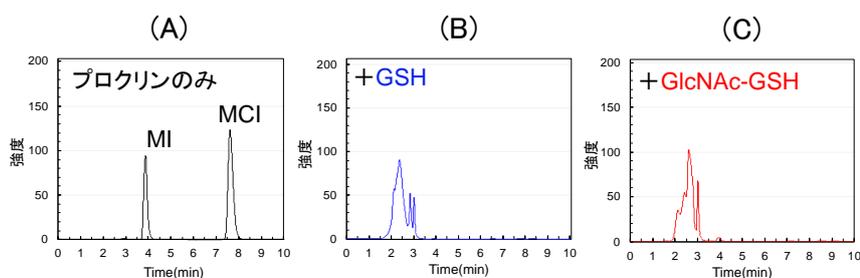


図4 プロクリンのみ (A)、+GSH (B) または +GlcNAc-GSH (C) 溶液のHPLCによる組成解析
(B)、(C)は24h以上経過した後解析した。

ークの形態から反応生成物は複数の分子の混合物であると推定された。今後、反応条件と生成物の組成についてさらに検討を進める予定である。

3. 展望

本研究で独自に開発した GlcNAc-GSH は、 γ -GTP による加水分解に対して抵抗性を有するため、生体内で長時間機能すると推測される。他方、チオール基の反応は維持されているものの、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懸念される。すなわち、 γ -GTP と類似した仕組みで GSH を認識する酵素は、マスキング等の効果により単糖修飾グルタチオン誘導体を補酵素として認識しにくい GlcNAc-GSH を利用することができず酵素活性が低下する可能性がある。しかしながら、MI/MCI の無毒化は非酵素的反応であり、酵素の認識機構を考慮する必要がない。そのため、GlcNAc-GSH は接触皮膚炎の有効な予防・治療薬として機能すると考えられる。したがって、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 MI/MCI の無毒化以外にも非酵素的反応の効率を向上させる可能性が高いわけである。

次のステップとしては、培養細胞を用いる系で GlcNAc-GSH の MI/MCI の無毒化効果を検証する。まず、添加方法の開発が必要になる。通常、GSH のドラッグデリバリーシステム(DDS)においては、 γ -GTP による分解を防ぐため、リポソームへの封入が想定される。リポソームの作製には、化合物の安定性および封入率、さら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による副作用に対する懸念が生じる。これに対して GlcNAc-GSH は、遺伝子導入に汎用されている脂質性キャリア分子に付着させて細胞に取り込ませる手法を活用できると予想している。GlcNAc-GSH をリポソームに封入せずにキャリア分子の表面に露出させていても分解される可能性がほとんどないためである。また、細胞膜の透過性を上げる目的で、グルタチオンを修飾する糖残基の水酸基をアセチル化するなど、分子の疎水性を高めて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。

4. 引用文献

- [1] A. Kanamori, Bull. Inst. Adv. Biosci. 6, 6-9 (2021)
- [2] B. Gruvberger and M. Bruze, Contact. Dermatitis, 38, 261-265 (1998)
- [3] M. Isaksson, Contact Dermatitis. 73: 119-132 (2015)
- [4] R. Alvarez-Sanchez, *et al.*, Bioorg.Med.Chem.Lett., 14, 365-368 (2004)
- [5] J. Mutschler, *et al.*, Toxicology in Vitro, 23 , 439-446 (2009)
- [6] V. Silva, *et al.*, Molecules, 25, 991 (2020)
- [7] L. T. H. Hoa, *et al.*, Int.J.Anal.Chem., 2019, 1851796 (2019)

5. 業績

【学会等発表】

- 1) 金森 審子、岡部 リハナ、山崎 須弥子、江川 菜々、苫米地 祐輔： 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反応性の解析と応用。
第41回日本糖質学会年会、2022.9月、大阪
(ポスター発表)
- 2) 金森 審子、岡部 リハナ、江川 菜々、山崎 須弥子、苫米地 祐輔： 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接触皮膚炎原因物質との反応性の解析。
第95回日本生化学会大会、2022.11月、名古屋
(一般口頭発表およびポスター発表)。
- 3) 江川 菜々、山崎 須弥子、岡部 リハナ、苫米地 祐輔、金森 審子：単糖修飾グルタチオン誘導体の接触皮膚炎原因物質に対する反応性の解析。
GlycoTOKYO 2022 シンポジウム (東京糖鎖研究会主催)、2022.12月、平塚 (WEB開催、ポスター発表：研究室学生 (学部3年次生) が**優秀ポスター賞**を受賞、工学部HPに掲載)。

6. 謝辞

共同研究者の理学部化学科の岩岡 道夫先生、荒井 堅太先生、工学部応用化学科の苫米地 祐輔先生と理系教育センターの日向寺 祥子先生、適切なお助言・ご協力をいただいた平山 令明先生、理学部化学科の小玉 修嗣先生、工学部生物工学科の片山 秀和先生、そして熱心の実験を積み重ねてくれた研究室の学生の皆さんに心より感謝いたします。

Individual differences in engrafted lymphocyte subsets and T cell infiltration of tumor-bearing humanized mice in different donors

桐ヶ谷 大樹¹⁾²⁾、亀谷 美恵¹⁾³⁾、椎名 隆¹⁾³⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学、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

Daiki Kirigaya¹⁾²⁾, Yoshie Kametani¹⁾³⁾, Takashi Shiina¹⁾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 はヒト PBMC 移植により B 細胞の生存維持、抗原特異的 IgG 産生を誘導する。本研究では、ヒト免疫細胞の担癌マウス脾臓への生着及び腫瘍への浸潤に個体差が現れるかを明らかにするために、腫瘍の免疫組織化学染色及びフローサイトメトリーによる脾臓リンパ球プロファイル解析を行った。その結果、個体によって脾臓への生着及び腫瘍への浸潤が異なり、このマウスを用いる事で個別の抗腫瘍効果を評価することができる可能性が示された。

[Abstract]

NOG-hIL-4-Tg, a severely immunodeficient mouse system producing human IL-4 systemically, induces B cell survival and production of antigen specific IgG by transplanting human PBMC and immunizing antigens. In this study, we aimed to clarify the differences of engraftment and tumor infiltration of human immune cells derived from different healthy individuals in tumor-bearing humanized mice using NOG-hIL-4-Tg. We analyzed T cell profiles in the spleen and infiltration into the tumors in these mice. The results showed that spleen engraftment and tumor infiltration were not correlated with the PBMC profile before transplantation and differed among healthy individuals, suggesting that these mice may be used for the evaluation of individual anti-cancer potential.

[Key Words]

NOG-hIL-4-Tg mice, tumor, immunohistochemistry, human CD3⁺ 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)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 PBMC がマウス細胞を攻撃する移植片対宿主病(Graft versus host disease : GVHD)を発症し死に至らしめる。ま

た、GVHD は CD8⁺ T 細胞(細胞傷害性 T 細胞)が活性化し Th1 環境へ移行するため、マウス生体内でヒト B 細胞を維持することができない。

一方、NOG にヒト 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) は、全身でヒト IL-4 を産生する。IL-4 は活性化 CD4⁺ T 細胞 (ヘルパー T 細胞)、マスト細胞、NK T 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 へクラススイッチを誘導する[1]。

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(IFN- γ ・IL-6・TGF- β ・IL-12・IL-17・IL-23)が豊富となる免疫環境が必要となる[2,3,4]。しかし、NOG-hIL-4-Tg が産生しているヒト IL-4 は、Th2 の免疫環境を構築し、Th1 細胞や細胞傷害性T細胞、Th17 細胞の活性化が一部抑制され体液性免疫を誘導する[5]。

そこで、我々は乳がん患者末梢血単核球(PBMC)を NOG-hIL-4-Tg に移植したヒト化マウスの解析を行ってきた[6]。この過程で、このマウスが担癌患者の免疫系をある程度再構築できることが示唆された。そこで、次に Healthy Donor(HD)の PBMC を移植した担癌マウスの作成を試みた。この系を用いて、移植前の PBMC のリンパ球サブセットの割合の個人差をマウス脾臓中のリンパ球サブセットが再現できるのか、腫瘍細胞株移植により形成された腫瘍へのヒトリンパ球浸潤はこの個人差を反映するかを明らかにすることが重要である。

そこで、担癌 NOG-hIL-4-Tg に 4 名の異なる HD 由来の PBMC を移植し、脾臓に生着したヒトリンパ球の割合をフローサイトメトリーで解析し、さらに免疫組織化学染色により腫瘍浸潤 T 細胞の局在解析を行って、上記の個人差の有無を評価した。

2. 方法

1) 培地調製

Leibovitz's L-15 Medium に Fetal bovine serum (FBS)を最終濃度 15%となるように添加した。また、ペニシリン G カリウムを最終濃度 100 unit/ml となるように添加し、さらに、硫酸ストレプトマイシンを最終濃度 0.1 mg/ml となるように添加してこの培地を用いた。

2) 腫瘍細胞移植

上記培地と 75 cm² flask を用いて PD-L1 を高発現する triple-negative 乳がん細胞株 MDA-MB-231 を、37°C CO₂ 0%に設定したインキュベーターで培養した。培養後、培地を捨てて Phosphate Buffered Saline (PBS)で洗浄し、0.5 mM EDTA/PBS で上皮様に張り付いた細胞が球状になるまで 37°C CO₂ 0%に設定したインキュベーターで静置した(3~

5min)。ピペッティングで細胞を完全に剥がし、細胞数を計測した。回収した細胞を遠心分離(467×g、5min、4°C)して上清を除去し、PBS を 10 ml 加えて遠心分離(467×g、5min、4°C)した。上清を除去して PBS 1 ml で懸濁し、5.0×10⁶ cells を 1.5 ml tube に移して遠心分離(2291×g、3min、室温)した。上清を除去して PBS 100 μ l で懸濁し、全量を 7 週齢の NOG-hIL-4-Tg 右背側部に移植した(29G×1/2) (Day0)。

3) ヒト PBMC の精製

腫瘍細胞移植から 2 週間後(Day14)に、ヒト PBMC を移植した。ヒト健常者 4 名から同意を得て採血を実施し、得られた血液をそれぞれ Ficoll 液 4 ml 入れた tube に上層し比重遠心分離(831×g、30min、20°C)を行った。遠心分離されたヒト PBMC 画分を回収し、Cord Blood-Washing Buffer (CBWB:5%BSA、0.5M EDTA/PBS)を約 40 ml 加え遠心分離(467×g、5min、4°C)した。上清を除去し、RBC Lysis buffer(NH₂Cl 4.15g/DW 500ml:Tris-HCl pH7=9:1)を加えて静置し、遠心分離(467×g、5min、4°C)した。上清を除去し、CBWB を 10 ml 加え懸濁し、細胞数を計測した。一部についてはフローサイトメトリーによりリンパ球のプロファイルを解析した。

4) PBMC 移植と臓器摘出

PBMC のうち 5.0×10⁶ cells/head を PBS 100 μ l で懸濁し、全量を尾静脈中に移植した (29G×1/2)。ヒト PBMC 移植後及び 5 日おきに PBS を 500 μ l/匹で腹腔内投与した。ヒト PBMC の移植から 4 週間後(Day42)に解剖を行い、腫瘍・肺・肝臓・脾臓を摘出し、以下のようにフローサイトメトリーによるリンパ球の割合を解析し、免疫組織化学染色 (IHC)でヒト T 細胞の局在解析を行った。

5) フローサイトメトリー

脾臓をスライドガラスでホモジェナイズした後、メッシュを通して細胞を回収した。遠心分離 (467×g、5min、4°C)して上清を除去し、RBC Lysis buffer を加えて静置し、遠心分離(467×g、5min、4°C)した。上清を除去し、CBWB を 10 ml 加え懸濁し、細胞数を計測した。計測した脾臓細胞のうち 5×10⁵ cells を Fisher tube に分注し、遠心分離(1000

表1 フローサイトメトリー及び免疫組織染色に使用した抗体

抗体の種類	Clone	製造販売元	Cat.No.
for FCM			
FITC anti-human CD3	UCHT1	BioLegend	300406
APC anti-human CD4	RPA-T4	BioLegend	300514
Alexa Fluor®700 anti-human CD8	HIT8a	BioLegend	300920
APC/Cy7 anti-human CD19	HIB19	BioLegend	302218
PE anti-human CD25	BC96	BioLegend	302606
Pacific Blue™ anti-human CD45	HI30	BioLegend	304022
PE/Cy7 anti-human CD56	NCAM16.2	BD Bioscience	335791
PerCP/Cy5.5 anti-human CD279 (PD-1)	EH12.2H7	BioLegend	329914
BUV395 anti-human CD274 (PD-L1)	MIH1	BD Bioscience	740320
PI		SIGMA	P4170
For IHC			
anti-human CD3	PS1	NICHIREI BioSciences	413241
anti-human CD4	1F6	NICHIREI BioSciences	413181
anti-human CD8	4B11	Leica Biosystems	NCL-L-CD8-4B11
HRP anti-mouse IgG	Polyclonal	NICHIREI BioSciences	4987780820096

今回の実験で使用したすべての抗体及び Propidium Iodide (PI)の clone 番号及び製造販売元、カタログ番号(Cat No.)を示した。PI は死細胞を同定し解析から排除するために使用した。IHC の二次抗体としては、一次抗体が全てマウスのため、同一のものを用いた。蛍光標識は BD LSRFortessa™ で検出可能な波長のものを選別し、適宜蛍光強度と compensation を調整して最適の解像度を調整した。

×g、5min) し、上清を除去した。フローサイトメトリーで用いた抗体を[表 1-for FCM]に示した。各蛍光標識抗体を入れたのち遮光して静置(15min、4°C)し、アジ化ナトリウム入り PBS を加え、遠心分離 (1000×g 5min)した。上清を除去し、CBWB を 200 µl 加え懸濁し、メッシュを通して細胞を回収した。その後、BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson and Company,NJ,USA)で測定し、解析は Flowjo (Becton,Dickinson and Company,NJ,USA)を用いて行った。

6) IHC

IHC で用いた抗体を[表 1-for IHC]に示した。キシレン(5min×3回)でパラフィンを除去し、特級エタノール(3min×4回)で組織の再水和を行った。流水(5min)でエタノールを除き、ヒストファイン 抗原賦活化液 pH9 を用いた抗原賦活化処理(120°C、20min)を行った。洗浄(0.01M PBS 3min×3回)後、内因性ペルオキシダーゼ処理(0.3% H₂O₂/メタノール 10min)を行った。洗浄(0.01M PBS 5min×3回)後、ブロッキング(1% normal goat serum を組織に

添加して湿潤下で 30min)を行い、一次抗体を組織に添加して湿潤下で 60min 反応させた。洗浄(0.01M PBS 5min×3回)後、HRP 標識二次抗体を組織に添加して湿潤下で 30min 反応させた。洗浄(0.01M PBS 5min×3回)後、DAB(3,3'-Diaminobenzidine)による発色を行い、流水(3min)で DAB を除き、ヘマトキシリンで核染色を行った。核染色後、色出し(熱湯 5min)を行い、特級エタノール(3min×4回)で組織の脱水を行い、キシレン(3min×3回)で透徹を行った。切片をマリノール封入剤で封入して室温で一晩乾燥し、顕微鏡(KEYENCE BZ-X710)で撮影を行った。

3. 結果

1) ヒトリンパ球サブセットの割合

4名のHD 供血者情報及び採取したヒト PBMC のリンパ球プロファイルを[表 2]に示した。男性 2名、女性 2名であるが、特にプロファイルに大きな傾向は検出されなかった。

表2 供血者情報とリンパ球プロファイル

Healthy donor(HD)	年齢(才)	性別	CD45(%)/ Lymphocyte	CD3(%) /CD45	CD19(%) /CD45	CD4(%) /CD3	CD8(%) /CD3
HD1	22	男	96.8	64.9	7.78	77.2	15
HD2	24	女	99.9	81.9	4.27	52	43.9
HD3	27	女	98.8	51.7	4.8	67.4	20.6
HD4	29	男	98.8	63.2	10.8	63.8	28.7

本研究で採血及び血液の使用にご協力いただいた供血者4人の年齢と性別及びリンパ球サブセットの割合を示した。リンパ球プロファイルは、採取したヒトPBMC中のCD45⁺細胞(白血球)、CD3⁺細胞(T細胞)、CD19⁺細胞(B細胞)、CD4⁺細胞(ヘルパーT細胞)、CD8⁺細胞(細胞傷害性T細胞)を各ゲート内の割合(%)で示した。

表3 担癌ヒト化NOG-hIL-4-Tgの脾臓細胞数及び脾臓中のヒトリンパ球プロファイル

マウス番号	Healthy donor(HD)	脾臓細胞数(cells)	CD45(%)/ Lymphocyte	CD3(%) /CD45	CD19(%) /CD45	CD4(%) /CD3	CD8(%) /CD3
mo1	HD1	9.8.E+07	63.9	62	37.9	50	49.9
mo2	HD2	1.7.E+07	4.98	41.4	58.6	86.5	12.4
mo3	HD3	2.0.E+07	12.2	14	84.8	89.6	3.49
mo4	HD4	1.7.E+08	83.9	99.7	0.22	4.93	94.9

使用した各供血者由来の担癌ヒト化マウスの脾臓細胞数及びリンパ球サブセットの割合を示した。リンパ球プロファイルは表1と同様に各ゲート内の割合(%)で示した。

これらのHD由来のPBMCを移植したマウスの脾臓細胞数と脾臓中のヒトリンパ球プロファイルを[表3]に示した。脾臓細胞中のヒト白血球数は、フローサイトメトリーでリンパ球ゲート内の細胞の内、ヒトCD45抗体陽性細胞の割合として算出した。ヒトT細胞はCD45ゲート内の細胞の内、ヒトCD3(T細胞)抗体陽性細胞の割合として算出し、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞の割合は、CD3ゲート内の細胞の内、ヒトT細胞をCD4(ヘルパーT細胞)とCD8(細胞傷害性T細胞)抗体陽性細胞の割合として算出した。HD1移植マウスでは、脾臓に生着したヒトリンパ球のうち62%がT細胞であり、B細胞は37.9%生着していた。HD2・HD3移植マウスでは、B細胞の生着率が高く、生着したT細胞の多くがヘルパーT細胞であった。また、HD3移植マウスでは84.8%がB細胞であった。HD4移植マウスでは、生着したヒトリンパ球の殆どがT細胞であり、その大半が細胞傷害性T細胞であった。このように、ヒトリンパ球の生着率はマウス個体差があり、元の

PBMCの割合との関連性は検出されなかった。

2) 腫瘍へのリンパ球浸潤

腫瘍のanti-human (α h) CD3 \cdot α hCD4 \cdot α hCD8抗体による染色結果を[図1]に示した。HD1・HD2・HD3移植マウスでは、腫瘍組織内に褐色に染色されたCD3陽性細胞の単位面積あたりの数が非常に少なく、ヒトT細胞の浸潤が抑制されていることが示唆された。

また、CD3陽性細胞であるT細胞の多くがCD4陽性細胞であり、ヘルパーT細胞であることが明らかとなった。一方、HD4移植マウスでは、腫瘍組織内にCD3陽性細胞の数が多く、ヒトT細胞の浸潤が亢進していることが観察された。また、その殆どがCD8陽性細胞であり、細胞傷害性T細胞であることが明らかとなった。この染色結果は、移植前のPBMCのリンパ球プロファイルとは関連がなかったが、脾臓に生着したヒトT細胞の割合と関連していた。

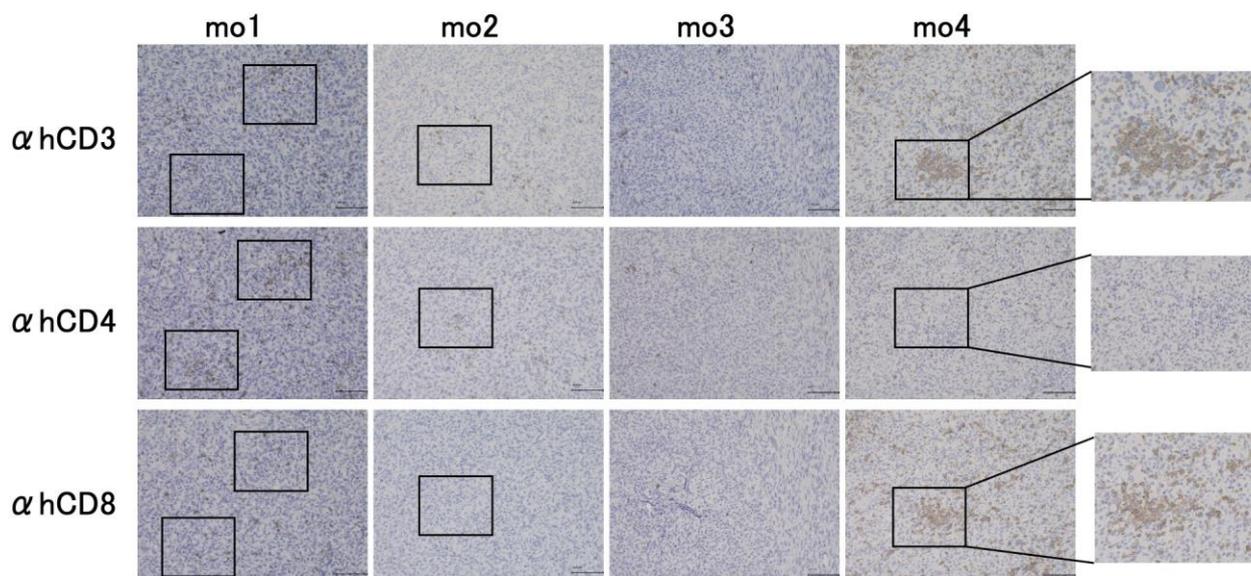


図1 NOG-hIL-4-Tg 腫瘍へのヒト T 細胞浸潤

IHC による腫瘍へのヒト T 細胞局在の解析結果を示した。撮影には KEYENCE BZ-X710 を用いた。写真内の黒線は 100 μ m である。黒線の四角は、 α hCD3 抗体で染色された細胞と α CD4 抗体および α hCD8 抗体で染色された細胞の位置が一致した場所を示している。右端には、さらにこの部分を拡大した写真を示した。輪郭の明確な球状のリンパ球が集積した染色像が観察される。

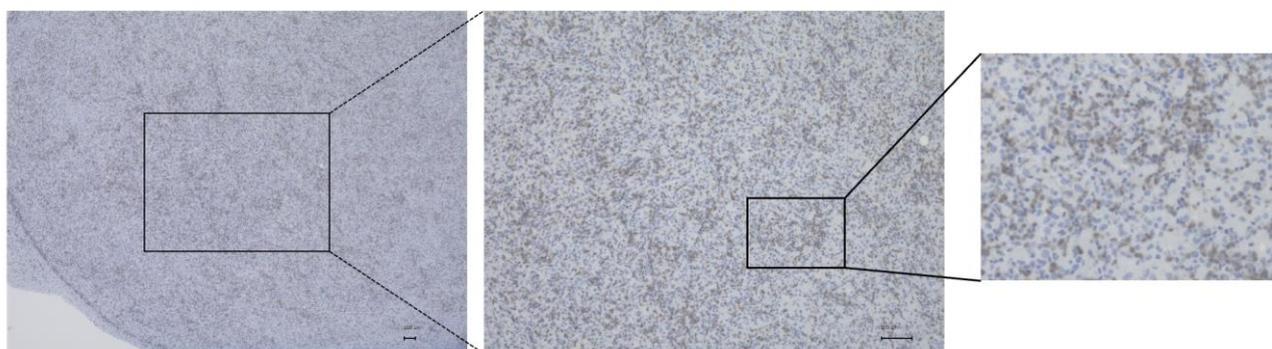


図2 NOG 陰性同腹マウス腫瘍へのヒト T 細胞浸潤

α CD3 抗体を用いた IHC による腫瘍へのヒト T 細胞局在の解析結果を示した。撮影方法は図 1 と同じである。黒線の四角の領域をさらに拡大したのが右側の図である。多くの T 細胞は腫瘍全体にびまん性に存在している。

4. 考察

本研究では、担癌 NOG-hIL-4-Tg に異なる HD 由来のヒト PBMC を移植して、マウス脾臓中のリンパ球サブセットの割合や腫瘍浸潤リンパ球の浸潤の個体差の有無及び元の PBMC のプロファイルと関連性があるかを試みた。

その結果、ヒトリンパ球の生着の割合は個体差があったが、移植前の PBMC の割合と正の相関は見られなかった。HD2 において元の PBMC では T 細胞の割合が高い傾向を示した。しかし、マウス脾臓中では B 細胞の割合の方が高かった。また、HD4 においても PBMC では T 細胞のうち、ヘルパー T 細胞の割合が高かったが、マウス脾臓中では細胞傷害性 T 細胞の割合が高かった。このことから、元の PBMC で T 細胞の割合が高くてもマウス脾臓への生着には影響を及ぼさない可能性が考えられる。今回の結果では、男性の方がヒトリンパ球のマウス脾臓への生着が高い傾向を示した。男性の PBMC はマウスに生着し易い可能性が考えられるが、検体数を重ねて、性差があるかについて明らかにする必要がある。

IHC の結果より、腫瘍への腫瘍浸潤リンパ球の過剰な浸潤はなく、また、腫瘍に浸潤した T 細胞は脾臓に生着したヒト T 細胞の割合の個体差と関連していた。通常 PBMC を移植したヒト化 NOG マウスでは、[図 2]に示したようにヒト T 細胞が瀰漫性に観察される。これはヒト化 NOG マウスでは GVHD が発症するためである。しかし、本マウスでは浸潤が抑制されていた。このことから、本マウスではヒト IL-4 により細胞性免疫が抑制されていると考えられる。

一方、HD4 移植マウスでは、ヒト T 細胞が浸潤しており、その殆どが細胞傷害性 T 細胞であった。HD4 移植マウスでは前述の通り脾臓に細胞傷害性 T 細胞が多く存在していた。これは、担癌状態のマウスに移植したことから、HD4 の PBMC が抗がん剤投与の処置を施さなくても腫瘍に対して免疫応答している可能性が考えられる。

以上の結果から、PBMC のプロファイルとマウスへ移植したのちのリンパ球プロファイルの傾向は関連性がなく、担癌状態で B 細胞が増加する HD 個体と細胞傷害性 T 細胞が増加する HD 個体があること

があきらかとなった。腫瘍浸潤リンパ球の割合は、脾臓の細胞傷害性 T 細胞の割合と相関していた。

この実験系は、個人の免疫系の抗腫瘍効果を評価するための潜在的な一つの方法となり得る可能性が示唆された。

5. 結論

担癌ヒト化 NOG-hIL-4-Tg マウスにおいては、細胞傷害性 T 細胞の割合の亢進と腫瘍組織への浸潤の程度がドナーにより異なることが示された。今後はドナー数を増やして性別や年齢との関連性や抗がん剤の効果について明らかにする予定である。

6. 参考文献

- [1] Type 2 immunity: Expanding our view Clare M Lloyd, Robert J. Snelgrove SCIENCE IMMUNOLOGY 2018 3(25) DOI: 10.1126/sciimmunol.aat1604
- [2] GVHD Prophylaxis 2020 Mahasweta Gooptu, Joseph H Antin Front. Immunol. 12:605726.
- [3] IL-6 阻害薬とバイオマーカー 藤本 穰, 仲 哲治 臨床リウマチ 2020 年 32 巻 4 号 p. 323-330
- [4] ピーター・パーラム 笹月健彦監訳 T 細胞を介する免疫 エッセンシャル免疫学 第 3 版 第 2 刷 メディカル・サイエンス・インターナショナル, 210, 213 (2018)
- [5] NOG-hIL-4-Tg, a new humanized mouse model for producing tumor antigen-specific IgG antibody by peptide vaccination. Yoshie Kametani*, Ikumi Katano, Asuka Miyamoto, Yusuke Kikuchi, Ryoji Ito, Yukari Muguruma, Banri Tsuda, Sonoko Habu, Yutaka Tokuda, Kiyoshi Ando, Mamoru Ito 2017 PLOS ONE 12(6):e0179239.
- [6] HER2-antigen-specific humoral immune response in breast cancer lymphocytes transplanted in hu-PBL hIL-4 NOG mice Yusuke Ohno, Shino Ohshima, Asuka Miyamoto, Fuyuki Kametani, Ryoji Ito, Banri Tsuda, Yukie Kasama, Shunsuke Nakada, Hirofumi Kashiwagi, Toshiro Seki, Atsushi

7. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただきました岩岡道夫先生に深謝申し上げます。

8. 業績

【論文】

1. Genetic association between farrowing rates and swine leukocyte antigen alleles or haplotypes in Microminipigs. Asako Ando, Tatsuya Matsubara, Shingo Suzuki, Noriaki Imaeda, Masaki Takasu, Atsuko Shigenari, Asuka Miyamoto, Shino Ohshima, Yoshie Kametani, Takashi Shiina, Jerzy K. Kulski, Hitoshi Kitagawa* 2022 Cells 11(19):3138. (IF 4.326)

2. High-progesterone environment preserves T cell competency by evading glucocorticoid effects on immune regulation. Hirofumi Kashiwagi, Toshiro Seki, Shino Ohshima, Yusuke Ohno, Tomoka Shimizu, Soga Yamada, Nagi Katano, Yumiko Goto, Atsushi Yasuda, Banri Tsuda, Ryoji Ito, Shun-ichiro Izumi, Hitoshi Ishimoto, Takashi Shiina, Yoshie Kametani*. 2022 Frontiers in Immunology 13:1000728 (IF 8.786)

3. Precise Immunological Evaluation Rationalizes the Design of a Self-Adjuvanting Vaccine Composed of Glycan Antigen, TLR1/2 Ligand, and T-helper Cell Epitope. Tsung-Che Chang, Yoshiyuki Manabe, Keita Ito, Ryuku Yamamoto, Kazuya Kabayama, Shino Ohshima, Yoshie Kametani, Yukari Fujimoto, Chun-Cheng Lin, Koichi Fukase 2022 RSC Advances 12 (29):18985-18993 (IF 3.245)

4. *Coccomyxa* sp.KJ extract affects the fate of T cells stimulated by toxic shock syndrome toxin-1, a superantigen secreted by *Staphylococcus aureus*. Shino Ohshima, Satoko Komatsu, Hirofumi Kashiwagi, Yumiko Goto, Yusuke Ohno, Soga Yamada, Akiko Kanno, Tomoka Shimizu, Toshiro Seki, Atsushi Yasuda, Hitoshi Kuno, Yoshie Kametani* Microbiology and Immunology

【学会発表】

1. *Coccomyxa* sp.KJ extract affects the fate of T cells stimulated by toxic shock syndrome toxin-1, a superantigen secreted by *Staphylococcus aureus* Shino Ohshima, Satoko Komatsu, Hirofumi Kashiwagi, Yumiko Goto, Yusuke Ohno, Soga Yamada, Akiko Kanno, Tomoka Shimizu, Toshiro Seki, Atsushi Yasuda, Hitoshi Kuno, Yoshie Kametani December 8-10, 2022 Cell Symposia (Los Angeles, CA USA)

2. *Coccomyxa* sp. KJ extracts affects the fate of T cell stimulated by toxic shock syndrome toxin-1, a superantigen secreted by *Staphylococcus aureus* Satoko Komatsu, Shino Ohshima, Hirofumi Kashiwagi, Yumiko Goto, Yusuke Ohno, Soga Yamada, Akiko Kanno Tomoka Shimizu, Toshiro Seki, Atsushi Yasuda, Hitoshi Kuno, Yoshie Kametani December 7-9, 2022 The 51st Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (Kumamoto, Kumamoto-Jo Hall)

3. Preparation and Immunological evaluation of lipid nanoparticle-based cancer peptide vaccine Keita Ito, Yoshiyuki Manabe, Kazuya Kaybayama, Shino Ohshima, Yoshie Kametani, Masatoshi Maeki, Manabu Tokeshi, Koichi Fukase October 26-28, 2022 The 59th Japanese Peptide Symposium (Sendai)

4. High-progesterone environment preserves naïve T cell competency by evading glucocorticoid effects on immune regulation. The 6th International Workshop on Humanized Mice (IWHM6) (Short talk) Yoshie Kametani October 22-24, 2022 (Kyoto, Kyoto University Clock Tower Centennia Hall)

5. プロゲステロンとコルチゾールがヒト化マウス抗体産生

機能に与える効果の解析 大島志乃、山田壮我、清水智香、大野裕介、柏木寛史、後藤優美子、關敏郎、亀谷美恵 第36回下垂体研究会学術集会 2022年8月8日～10日(山梨・東海大学山中湖セミナーハウス)

6.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 山田壮我、清水智香、大島志乃、大野裕介、柏木寛史、安田敦、關敏郎、和泉俊一郎、伊藤亮治、亀谷美恵 第36回下垂体研究会学術集会 2022年8月8日～10日(山梨・東海大学山中湖セミナーハウス)

7. 妊娠免疫システムを用いたヒト化マウス体液性免疫評価システムの確立 安田敦、關敏郎、北島夏見、關雅美、亀谷美恵 第36回下垂体研究会学術集会 2022年8月8日～10日(山梨・東海大学山中湖セミナーハウス)

8. リポゾーム封入プロゲステロンによる腫瘍細胞株増殖抑制効果の解析 桐ヶ谷大樹、大島志乃、眞鍋良幸、安田敦、關敏郎、亀谷美恵 第36回下垂体研究会学術集会 2022年8月8日～10日(山梨・東海大学山中湖セミナーハウス)

9. hu-PBL hIL-4 NOG マウスを用いた抗原特異的抗体産生クローン解析 大島志乃、山田壮我、片野凧、鈴木舞桜、亀谷美恵 第69回日本実験動物学会総会 2022年5月18日～20日(仙台・仙台国際センター)

10. ヒト化マウスを用いた免疫チェックポイント抗体の評価 片野凧、桐ヶ谷大樹、山田壮我、大島志乃、關敏郎、亀谷美恵 第69回日本実験動物学会総会 2022年5月18日～20日(仙台・仙台国際センター)

【特許】

特許第7216980号「ブタCD4を認識するモノクローナル抗体」取得および国際特許2件出願、国内特許1件出願



(総説) 国産ヤーコンの葉を用いたハーブティーの抗酸化作用

(Review) Antioxidant effects of herbal tea from yacon leaves in Japan

安田伸^{1,2)}、上田裕人^{1,3)}、松田靖^{1,2)}、村田達郎¹⁾

東海大学農学部¹⁾、東海大学先進生命科学研究所・高機能食品開発部門²⁾、尚絅大学生活科学部³⁾

Shin Yasuda^{1,2)}, Yuto Ueda^{1,3)}, Yasushi Matsuda^{1,2)}, Tatsuro Murata¹⁾*

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

³⁾Department of Life Sciences, Shokei University

*連絡先：安田伸（東海大学先進生命科学研究所 高機能食品開発部門）

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

[要旨]

ヤーコンは南米アンデス地方原産の農作物で、主に塊根を食用とし、わが国でも葉部分が健康志向食としてお茶などに利用されることがある。葉の大部分が塊根収穫時の残渣となるため、未利用資源の活用を図ることが重要である。近年、葉の抗酸化作用や血糖降下作用などが注目されており、本稿では特に、1)ヤーコンの葉を使ったハーブティーの抗酸化作用、2)加熱葉のポリフェノール含量と抗酸化力、3)国産4品種とペルー導入系統の葉の諸性質の検討、4)ヤーコン茶の熱水抽出条件の最適化、についての研究成果を紹介する。

[Abstract]

Yacon is a crop originally from the Andes region of South America, and its tuberous roots are the major edible part. Occasionally, the yacon leaves have been used for herbal tea as a health-conscious food in Japan. Most of the leaves become unused waste during harvesting the roots. Recently, the antioxidative, anti-diabetic, and other health beneficial effects of the leaves have been studied. It is important to consider how to further utilize unused agricultural resources. In this review, we present our efforts: especially on 1) antioxidant effects of herbal tea leaves from yacon, 2) polyphenol contents and antioxidant capacity of the heated yacon leaves, 3) characterization of the leaves from four domestic yacon cultivars and an original Peru line, and 4) optimization of hot-water extraction for yacon herbal tea leaves.

[Key Words]

Yacon, *Smallanthus sonchifolius*, yacon leaves, herbal tea, antioxidant

1. はじめに

ヤーコン (学名: *Smallanthus sonchifolius*) は、南米アンデス高地を原産とするキク科の植物で、主に塊根を食用とする。過去数十年にわたり、ヤーコンは日本、韓国、台湾、海南、フィリピンを含むアジア地域、ニュージーランドを含むオセアニア地域、チェコ共和国を含むヨーロッパに広く普及した[1,2]。日本では1984年にペルー原産のオリジナル系統のいくつか、ニュージーランドを経由して導入された [3,4]。諸説あり、

なかには1985年と記載の文献もある。ジャガイモやトマトなどのよく知られた外来の農作物と比べても導入歴が浅く、現状では日本国内でも地域に限定されたマイナーな作物として栽培が行われている。ヤーコンの食用となる主な部位は、サツマイモのような形状をした塊根部分である (図1)。塊根にはデンプンよりも難消化性のフラクトオリゴ糖が豊富に含まれており[5]、甘みの特徴とする果物あるいは野菜として食されてきた。南米ではヤーコン塊根を用いたシロップ、ジュ-

ス、マーマレードなどの加工食品が販売されている[3,4]。ヤーコンの葉部分は、ハーブティーとして茶葉に加工されており、わが国でも一部の地域や通信販売等で健康志向食として消費されている[6]。しかしながら、ヤーコン地上部の大部分は、塊根収穫時には未利用となることから、付加価値を有する資源としての高度活用に期待が寄せられている[6]。

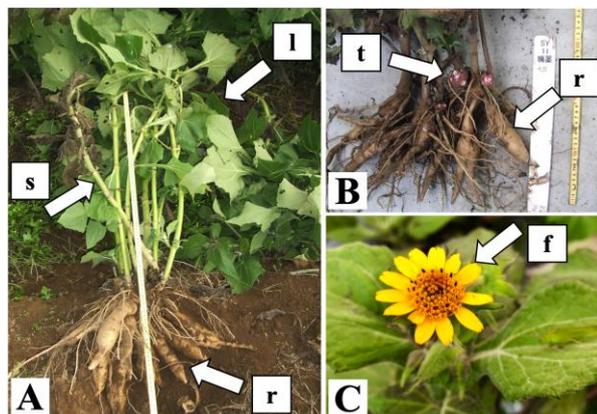


図1. ヤーコンの各部位の名称
A: 収穫時のヤーコン植物体 B: 地下部 C: 花
l; 葉, s; 茎, r; 塊根, t; 塊茎(次年度の種イモ), f; 花

1-1) 日本におけるヤーコンの栽培

日本のヤーコン栽培に適した環境と場所について講じる。日本は四方を海に囲まれた島国であり、大規模農業や都市型生活に適した広大な平地はそれほど多くない。そのため、国土の70%を占める中山間地域が、事実上、多彩な食料や作物の持続的生産に重要な役割を果たしている[7]。例えば、中山間地域は、森林を維持するためにも不可欠であり、植物や動物が生息する半自然環境を提供している。農林水産省もこの中山間地域の維持と持続可能な利用を推進している[8]。

ヤーコンはアンデス地方原産の高地作物のため、中山間地域はヤーコンの生育と栽培に適している。ヤーコンは、北海道から九州に至るまで、冷涼な地域や中山間部で栽培されることが多い[9]。地域特産作物として統計記録のあるうち、2010年には九州地域を含む5県(愛知県、島根県、福岡県、熊本県、鹿児島県)より、年間約79.2 tが生産されている。最近では、2020年の記録がある7道県(北海道、茨城県、山梨県、長野県、愛知県、鳥取県、島根県)だけで、年間約26.7 tの生産量に留まっている[10]。

熊本県にある阿蘇山は日本でも代表的な活火山であり、阿蘇地域は九州の中心に位置する冷涼な高地に位置する。本学には、阿蘇実習フィールド(旧阿蘇キャ
東海大学先進生命科学研究紀要 第7巻 2023年3月

ンパス、熊本県阿蘇郡南阿蘇村)があり、これまでにヤーコン4登録品種(サラダオトメ(系統名SY201)[11-13]、アンデスの雪(SY206)[11,14,15]、サラダオカメ(SY217)[11,15,16]、アンデスの乙女(SY237)[11,17-19])、わが国へ導入時のペルーA群系統の1つ(SY11)[3,4]を栽培維持してきた。

表1. 日本におけるヤーコン4品種とSY11系統

品種名・主要特性、履歴等
サラダオトメ(系統名SY201)[11-13] <ul style="list-style-type: none"> 北海道などの寒地・寒冷地で安定して多収。 塊根の裂開が少なく外観の品質に優れ、塊根の貯蔵性にやや優れる。 ペルー原産系統SY12(形態、収量性ともSY11(後述)と同等)を花粉親、ボリビアからの導入系統SY102を種子親にして交配採取し、発芽個体SY91-1-1が初の人工交配に由来する系統として得られた。ヤーコン農林1号。 2000年公表、2005年に品種登録(第12579号)。
アンデスの雪(SY206)[11,14,15] <ul style="list-style-type: none"> 塊根肉色が白くて美しく貯蔵性に優れる。 多収で裂根の発生が少ない。 CA5073(ペルー原産系統、国際バレイショセンターより導入)を種子親、SY4(在来導入系統、ペルーA群の1クローンでSY11(ペルーA群系統、後述)と同等)を花粉親にして交配し、種子培養法により実生個体9310-3が得られた。個体選抜により育成。ヤーコン農林2号。 2004年公表、2005年品種登録(第13537号)。
サラダオカメ(SY217)[11,15,16] <ul style="list-style-type: none"> 塊根肉色が鮮やかなオレンジ色で糖含量が高く、甘くて食味に優れる。 極めて多収で、塊根の裂開が少ないものの、不整形塊根が多い。 夏季冷涼な北海道・東北地方および西南暖地の高標高地での栽培に適する。 CA5074(国際バレイショセンターより導入)を種子親、SY23(在来導入系統でペルーA群の1クローン)を花粉親にして交配し、種子培養法により実生個体9410-59が得られた。個体選抜により育成。ヤーコン農林3号。 2004年公表、2005年品種登録(第13538号)。
アンデスの乙女(SY237)[11,17-19] <ul style="list-style-type: none"> 可食部である塊根(イモ)数が多く、一つ一つのイモも大きく、高収量性。 イモの表皮は鮮やかな赤紫色で、裂開が起こりにくく、外観形質も優れる。 97C5-56(国際バレイショセンターより導入のSY107とサラダオトメを交配し得られた胚培養実生個体)とSY11(後述)とを交配し、胚培養実生個体から00J4-32が得られた。選抜により育成。 2011年公表、2014年品種登録(第23007号)。
SY11 標準系統 [3,4,13,15] <ul style="list-style-type: none"> 1984年にニュージーランドから導入されたペルーA群の代表的な1クローン。 塊根の収量性や食味が比較的良好で、日本国内では導入当初より普及し、経済的に栽培。 寒・高冷地での栽培には適するものの、温暖地では裂根の発生が多く、長期貯蔵性にやや難あり。 現在では標準系統として栽培試験や交配目的に利用。

なお、SY11 は1984年 にニュージーランド経由で日本に初めて導入されたペルーA 群系統のクローンの1 つであり、現在国内では品種改良や栽培試験時の標準系統として、研究目的に用いられることが多い[3,4]。日本におけるこれらのヤーコン4 品種と SY11 系統の主要特性などを表 1 にまとめた。ヤーコンの茎上に完全に開いている葉のうち、上から2 枚目の葉を指す第2 展開葉は、約10 cm~15 cm の葉長である(図 2)。全体的には大人の手のひらサイズで約20 cm ほどの葉長である。本研究では、最低でも5 株の植物体より第2 展開葉を採取した。

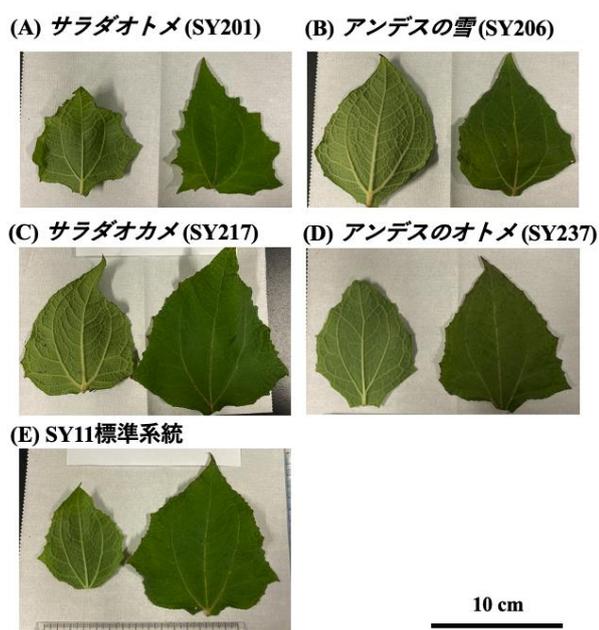
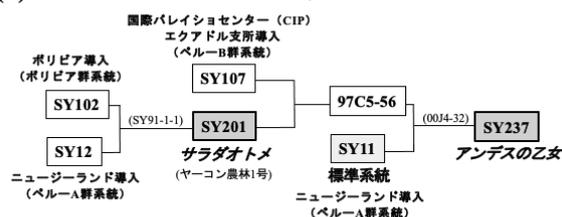


図 2. 日本におけるヤーコン4 品種と SY11 系統の葉の写真。ヤーコンの第2 展開葉を2021 年11 月に採取。

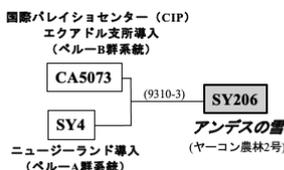
これまでに、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構(農研機構)西日本農業研究センター(近畿中国四国農業研究センター四国研究センター)を中心にヤーコンの育種選抜と品種登録が行われてきた経緯がある[3,4,13,15]。上述の4 品種は、ペルーA 群系統を中心に、ボリビア群系統と国際バレイショセンター(CIP)エクアドル支所から導入したペルーB 群系統、およびそれらをベースに交配して得た系統をもとに、作出されたものである[3,4]。これらの品種の履歴を図 3 にまとめた。かつては農産物が、民間会社や民間交流などを通じて国内へ導入されることがあり、ヤーコンもまた例外ではなかった。しかしながら、現在では、生物の多様性を保全するための国際条約「生物多様性条約」[20]のもと、このような民間交流での農産物の国

外への持ち出しや国内への持ち込みは容易ではない。わが国は、カルタヘナ議定書に基づく同国際ルールを締結し、2003 年に発効している[20]。従って、遺伝資源となる農産物の越境管理が厳格化された昨今では、わが国が現時点で保有しているこれらヤーコンの系統などの貴重な農産資源を引き続き維持管理していくこと、さらには、我が国で作出されたオリジナルのヤーコン品種の高度付加価値化と有効活用が渴望される。

(A) サラダオトメとアンデスの乙女



(B) アンデスの雪



(C) サラダオカメ

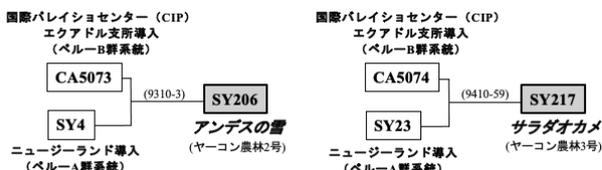


図 3. ヤーコンの各品種と導入系統との関係。サラダオトメとアンデスの乙女 (A)、アンデスの雪 (B)、サラダオカメ (C) (詳細は既報[13,15,19]を参照)。

ヤーコン植物体1 株から得られる塊根の収量は平均して約2-3 kg であり、地上部の収量もまた約2-4 kg と、収穫時に両者の新鮮重量は同程度である[13,15,19]。本学阿蘇実習フィールドでのヤーコン栽培試験においても、同規模の収量結果が得られている[21] (図 4)。

(A) ヤーコン圃場



(B) ヤーコン収穫残渣



図 4. 本学阿蘇実習フィールドにおけるヤーコンの圃場 (A)と収穫残渣 (B; 塊根収穫時のヤーコン地上部)。

九州の熊本県内では、菊池市を中心にヤーコンが栽培されており、塊根が生食用としてのみならず、ヤーコンシロップ、ピクルス、ヤーコンカレー、ヤーコン入りの麺類、アイスクリームなどにも加工され、地元の道の駅や物産館などのマーケットで主に消費されて

いる[6]。ヤーコンの葉部分を用いたヤーコン茶が、健康志向食として市販されるケースがあるものの、収穫時の地上部分を食用として利用される事例は少ない。そのため、ヤーコンの葉部分が価値ある資源として利用されることが期待される[21]。

1-2) 世界で知られるヤーコン

南米では、近年、塊根から作られたヤーコンシロップの健康有益性に関するヒト臨床研究が報告されており、ヤーコンシロップは朝食後の血糖上昇を軽減しうることが実証されている[22]。ニュージーランドでも、近年、持続可能な健康食素材としてヤーコンが総説で紹介されており、健康を目指した食事療法への利用可能性について述べられている[23]。アルゼンチンの研究者らによる2022年の総説では、同じキク科の植物としてキクイモとヤーコンが紹介されており、生産、消費、利用の面、とくに機能性食素材としての効能についてまとめられている[24]。

タイでも、北部の山間部に近い都市チェンマイ近郊では、BUAHIMA (บัวหิมะ、雪蓮果)の名前でヤーコンが栽培されており、現地マーケットで消費されている。ウェブで検索した限りでは、最近、観光客や現地の人々向けのバザールにて、主に塊根を用いたヤーコン料理やヤーコン飲料が楽しめるようである。また、バンコク郊外にある Talaadthai (タラートタイ)はタイの農産物を扱う東南アジア最大級の卸売市場であり、ここでもヤーコンが入手可能とある。ヤーコンを使ったタイ風チキンカレーやタイ料理風ヤーコンスープなど、料理サイトによっては、ヤーコンを使ったタイ料理へのアレンジレシピがウェブ上で紹介されており、近年ではタイ現地でもヤーコンが健康志向食材として認知されつつある。

1-3) 期待されるヤーコン葉の保健機能効果と多機能性

ヤーコンの葉には抗酸化活性[25,26]、ラットにおける血糖上昇抑制作用[27,28]ならびに抗真菌活性[29]などが報告されている。ヤーコンの葉に含まれる主要なポリフェノールとして、クロロゲン酸、カフェ酸およびフェルラ酸[25,26]、没食子酸および *p*-クマル酸[30]などが報告されている。さらに、フラボノイドのルチン、ミリセチン、ケルセチン、アピゲニン、ルテオリンなどがヤーコンの葉に含まれており[30,31]、ヤーコンに特有のポリフェノールとして、ジカフェオイルキナ酸やトリカフェオイルアルトラル酸などが報告されている[32,33]。

熊本に拠点をおく我々もまた、ヤーコンの葉を用いた市販のヤーコン茶の多機能性に関して研究を行ってきた[6]。そこでは、熊本県産のヤーコン茶葉熱水抽出物が、起炎酵素の1つであるリポキシゲナーゼに対して阻害し、活性型マクロファージ細胞の一酸化窒素産生を抑制することにより、抗炎症作用を示すことを報告している[34]。さらに、ヤーコン茶が糖類分解酵素を阻害することを明らかにした[35]。ヤーコンの葉部による抗酸化作用や血糖上昇抑制作用などが注目されていることから、塊根を収穫時に未利用資源となるヤーコンの葉部を、機能性食品素材として確立していくことは重要であると考えられる。

2. 結果の概要

ここでは、特にヤーコン葉を使ったハーブティーの抗酸化作用、加熱葉のポリフェノール含量と抗酸化力、国産4品種とペルー由来の1系統の葉の諸性質の検討、ヤーコン茶の熱水抽出条件の最適化について、主に筆者らが取り組んできた研究成果を紹介する。

2-1) 熊本県産の市販ヤーコン茶の抗酸化作用

一般に、過度の酸化ストレスと過剰な活性酸素種(ROS)は、正常な組織や細胞機能にも悪影響を及ぼし、疾病状態を引き起こす可能性が危惧されている[36]。 O_2^- (スーパーオキシドアニオン)ラジカルは、ROSの1つで、金属イオンの存在下で過酸化水素と反応し、より反応性の高いヒドロキシルラジカルを容易に生成する[37]。この O_2^- は好中球などが免疫応答時に酸化バーストの過程で生じるものであるが[38,39]、過度の O_2^- は、糖尿病、虚血再灌流障害、および慢性心不全などの病因となりうる可能性が指摘されている[40]。ヤーコンならびにその加工食品の機能性研究の一環として、筆者らは抗酸化作用に注目し、特に O_2^- ラジカル産生系に及ぼす熊本県産の市販ヤーコン茶の影響を調べた。その結果、ヤーコン茶が熱水抽出時に収量が高く、ポリフェノール含量や抽出効率も良好であること、抗酸化活性にも優れることを明らかにした[41](図5)。

さらにヤーコン茶熱水抽出物に着目し、 O_2^- ラジカルに対して特異的なフリーラジカル消去作用を示すことを、顆粒球用好中球細胞モデルを含む複数の評価系を用いて明らかにした。

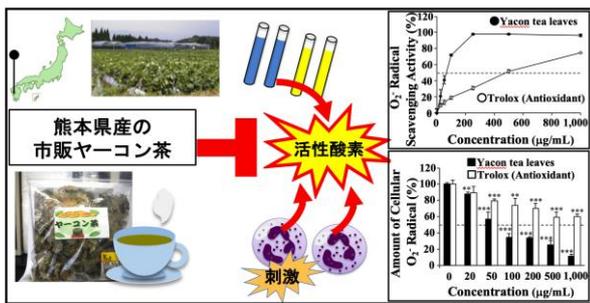


図 5. 熊本県産の市販ヤーコン茶の抗酸化作用[41]を一部改変).

2-2) ヤーコン加熱葉のポリフェノール含量と抗酸化力

加熱処理により、野菜中の有効成分が損なわれたり化学組成に変化が生じる可能性がある。しかしながら、ヤーコンの葉に含まれるポリフェノールなどの有効成分の安定性とその機能に及ぼす食品加工の影響についての報告例は限定的であり[42]、不明な部分も多い。そこで、阿蘇実習フィールドで栽培されたヤーコンの葉を採集して凍結乾燥およびお茶にするための温度条件160°Cで加熱後に、ポリフェノール含量と抗酸化作用にどのような変化が生じるのか調査した。その結果、加熱したヤーコン葉は、非加熱葉と比較してより高いポリフェノール含量とより高い抗酸化作用を示すこと、そこではカフェ酸含量の増加が伴うことを明らかにした[43](図 6)。したがって、本条件においては、加熱処理がヤーコンの葉の活性成分に実際に影響を与え、それにより抗酸化作用を増強する可能性が示された。

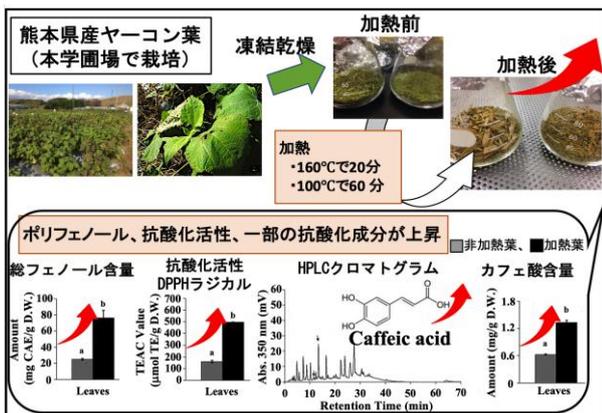


図 6. ヤーコン加熱葉のポリフェノール含量と抗酸化力[43]を一部改変).

2-3) 国産(熊本県産)4 品種とペルー系統のヤーコンの葉の諸性質の検討

植物原料のポリフェノール含量と機能性は、加工時のみならず、品種や収穫時期によっても変化する可能性がある。東日本で栽培され、収穫されたヤーコンで

は、品種によっては塊根のポリフェノール含量に差が認められている[32]。しかしながら、数年にわたって栽培されたヤーコン品種の、とくに葉の部分における機能的な違いについては不明な部分も残る。そこで、本学阿蘇実習フィールドで栽培する 4 登録品種とわが国へ導入時のペルーA 群系統の1つ (SY11)を用いて、ヤーコンの葉のポリフェノール含量、抗酸化活性、および糖類分解酵素阻害活性に注目し、4年以上にわたる調査を行った。葉は2013年、2015年、2016年、2017年の異なる年において収穫時期にあたる11月に採取したものを使用した。ヤーコン 4 品種と対照となる SY11の各々の葉抽出物より得られた測定データを用いて、比較分析と多変量解析を行った。その結果、年次変動幅がやや大きいものの、各々のヤーコン品種の機能的な類似性と相違性を視覚的にも明らかにすることができた[44](図 7)。なかでもアンデスの乙女 (SY237)が、抗酸化活性などの機能面で優れた品種となり得ることを明らかにした。

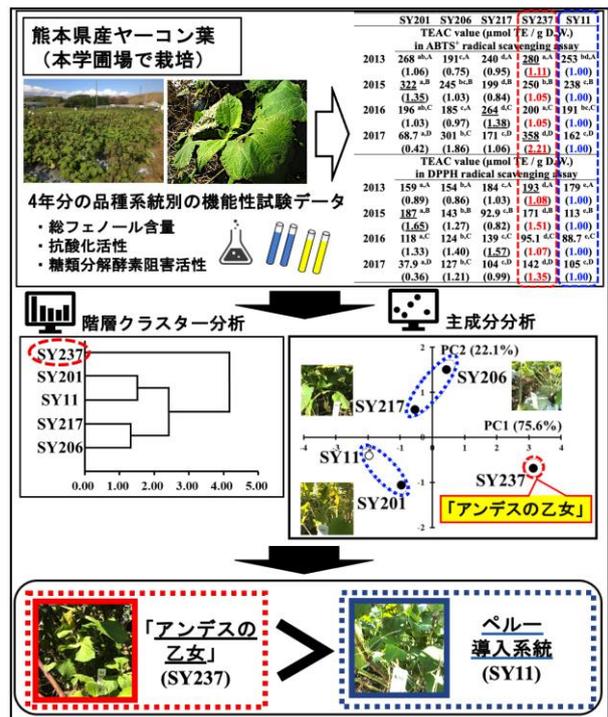


図 7. 熊本県産ヤーコン葉(本学園場で栽培)の 4 品種とペルー導入系統)を用いた研究データの多変量解析[44]を一部改変).

2-4) ヤーコン茶の熱水抽出条件の最適化

次に、熊本県産の市販のヤーコン乾燥茶葉を用いて、飲用時の熱水温度や浸漬時間を条件とした実用的な抽出を行い、ポリフェノール含量や抗酸化活性の測定を行った。本研究では、中心複合計画 (Central Composite

Design, CCD)を用いた応答曲面計画法 (Response Surface Methodology, RSM)により、最適抽出条件を調査した。本 RSM-CCD 法はプロセス最適化を目的としたものであり[45]、Design-Expert ソフトウェアによるプログラムの実験設計モデルに従った。浸漬温度 (75.0 – 96.0°C)と時間 (2.0 - 5.5 分)をやや狭い範囲に指定して抽出条件を定め、合計 13 の熱水抽出条件を設計してサンプル調製を行った。熱水 50 mL に対してヤーコン乾燥茶葉(1 g)を 2% w/v となるように熱水抽出を行い、各種試験に供した。その結果、RSM-CCD 法により算出された多項式モデルと得られた「望ましき (desirability)」の値に基づき、飲用時を想定したヤーコン茶の熱水抽出条件における最適条件を得ることができた[46] (図 8)。より高い抗酸化活性とポリフェノール含量を得るためには、89.3°C で 2.5 分間の熱水抽出が最適条件となりうることを明らかにした。

一方、糖尿病や消化器系、腎疾患などを患う人々を対象とした民間伝承薬としてヤーコンが活用されることもあり、安全性を調べる必要がある。最近では、毒性学の観点より、ヤーコンの葉を 2% w/v となるよう熱水で浸漬抽出した際に、1 日あたり 250 mL までは安全に摂取できると報告されている[47]。通常の飲用を想定した我々のここでの実験条件は、熱水に対して乾燥茶葉が 2% となるように抽出を行っているため、安全性に問題がない範囲であると思われる。



図 8. 熊本県産市販ヤーコン茶葉の最適熱水抽出条件の検討[46]を一部改変。

3. まとめと展望

以上より、本稿では、熊本に拠点をおく筆者らがヤーコンの葉のポリフェノールと抗酸化作用に注目して東海大学先進生命科学研究紀要 第 7 巻 2023 年 3 月

近年行ってきた研究の一端を紹介した。そこでは、1) 熊本産の市販ヤーコン茶葉が、とくに活性酸素種の一つである O_2 をラジカルに対して、特異的な抗酸化作用を示すこと、2) 加熱処理により、ヤーコンの葉の抗酸化力が高まる可能性があること、3) ヤーコンの品種アンデスの乙女 (SY237) は、標準系統として用いたペルー系統 SY11 よりも抗酸化活性等に優れた国産品種となり得ることを明らかにし、4) 飲用時を想定したヤーコン茶の熱水抽出時における抗酸化作用などの機能面で最適抽出条件を見出すことができた。

ヤーコンの葉の抗酸化作用や機能面に注目したこれらの研究成果は、葉部分を健康に有益な食材として確立し、有効利用を図るうえで、先駆的な知見を与えるものである。さらに、葉において優れた保健機能効果を有する国産ヤーコン品種の系統選抜や品種改良を推進するうえで、有益な見解を与えるものと期待される。しかしながら、加熱処理によりヤーコンの葉中の成分変化や抗酸化活性の向上が認められたことから、今後は、企図する保健機能や成分を効率よく提供しうる加工処理法や処理条件を検証していく必要がある。わが国で品種登録された農作物の付加価値を見出し、持続的に生産、加工、利用していくことは重要である。さらに、ヤーコン各品種間や新たな作出系統間での効能の差異やアドバンテージを検証していくことも望まれる。

4. 参考文献

- [1] I. Ojansivu, *et al.*, *Trends Food Sci Technol.*, **22**, 40-46 (2011)
- [2] S. Gurungs, *et al.*, *Int J Genet*, **10**, 401-404 (2018)
- [3] 杉浦誠, *近中四農研資*, **12**, 1-27 (2016)
- [4] 杉浦誠と矢野孝喜, *近中四農研資*, **12**, 29-38 (2016)
- [5] D. Campos *et al.*, *Food Chem*, **135**, 1592-1599 (2012)
- [6] 上田裕人ら, *Bio 九州*, **224**, 9-14 (2019)
- [7] 農林水産省, 中山間地域等について, https://www.maff.go.jp/j/nousin/tyusan/siharai_seido/about/cyusan/. (2022.11.1 アクセス)
- [8] 農林水産省, 中山間地域の整備, https://www.maff.go.jp/j/nousin/sekkei/nn/n_nouson/sankan/. (2022.11.1 アクセス)
- [9] 公益財団法人日本農産特産物協会ウェブサイト、特産農産物に関する生産情報調査結果(平成 24 年), http://www.jsapa.or.jp/pdf/Acrop_Jpaper/nousakumotuc_housah22.pdf. (2022.11.1 アクセス)
- [10] 公益財団法人日本農産特産物協会ウェブサイト、

地域特産作物(工芸作物、薬用作物および和紙原料等)に関する資料(令和2年産), http://www.jsapa.or.jp/pdf/Acrop_Jpaper/nousakumotuc_housar2.pdf. (2022.11.1 アクセス)

- [11] 農研機構, ヤーコン種(*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Rob.) の品種一覧, <https://www.naro.go.jp/collab/breed/0300/0314/index.html>. (2022.11.1 アクセス)
- [12] 農研機構 品種詳細 サラダオトメ, <https://www.naro.go.jp/collab/breed/0300/0314/001504.html>. (2022.11.1 アクセス)
- [13] 杉浦誠ら, *近中四農研報*, **6**, 1-13 (2007)
- [14] 農研機構 品種詳細 アンデスの雪, <https://www.naro.go.jp/collab/breed/0300/0314/001503.html>. (2022.11.1 アクセス)
- [15] 藤野雅丈ら, *近中四農研報*, **7**, 131-143 (2008)
- [16] 農研機構 品種詳細 サラダオカメ, <https://www.naro.go.jp/collab/breed/0300/0314/001502.html>. (2022.11.1 アクセス)
- [17] 農研機構 品種詳細 アンデスの乙女, <https://www.naro.go.jp/collab/breed/0300/0314/012899.html>. (2022.11.1 アクセス)
- [18] 農研機構 プレスリリース 多収で外観形質の優れたヤーコン新品種「アンデスの乙女」(2011) https://www.naro.go.jp/publicity_report/press/laboratory/warc/017989.html. (2022.11.1 アクセス)
- [19] 杉浦誠ら, *近中四農研報*, **13**, 59-69 (2014)
- [20] 外務省 ODA と地球規模の課題 カルタヘナ議定書(生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書) (2017) <https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/kankyo/jyoyaku/cartagena.html>. (2022.11.2 アクセス)
- [21] 椛田聖孝ら, *九州東海大農紀要*, **25**, 9-14 (2006)
- [22] L.S. Adriano *et al.*, *Food Res Int*, **126**, 108682 (2019) doi: 10.1016/j.foodres.2019.108682
- [23] M.R. Yan *et al.*, *Nutrients*, **11**, 2632 (2019) doi: 10.3390/nu11112632
- [24] D.B. Gabriela *et al.*, *J Appl Biotechnol Bioeng*, **9**, 41-47 (2022) doi: 10.15406/jabb.2022.09.00283
- [25] K. Valentova *et al.*, *J Agric Food Chem*, **53**, 5577-5582 (2005)
- [26] K. Valentova *et al.*, *J Agric Food Chem*, **54**, 1347-1352 (2006)
- [27] M.J. Aybar *et al.*, *J Ethnopharmacol*, **74**, 125-132 (2001)
- [28] S. Baroni *et al.*, *Asian Pac J Trop Med*, **9**, 432-436

(2016)

- [29] F. Lin *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 2154-2159 (2003)
- [30] E.F. de Andrade *et al.*, *Ind Crops Prod*, **62**, 499-506 (2014)
- [31] D. Russo *et al.*, *Nat Prod Res*, **29**, 1673-1677 (2015)
- [32] 竹中真紀子ら, *日本食品科学工学会誌*, **58**, 537-541 (2011)
- [33] 寺田澄男ら, *薬学雑誌*, **126**, 665-669 (2006)
- [34] 上田裕人ら, *東海大学紀要農学部*, **36**, 37-43 (2017)
- [35] 上田裕人ら, *東海大学先進生命科学研究紀要*, **1**, 33-37 (2017)
- [36] M. Gutowski and S. Kowalczyk, *Acta Biochim Pol*, **60**, 1-16 (2013)
- [37] M. Valko *et al.*, *Curr Med Chem*, **12**, 1161-1208 (2005)
- [38] T. Utsumi *et al.*, *Arch Biochem Biophys*, **294**, 271-278 (1992).
- [39] H. Shintani, *Pharm Anal Acta*, **4**, 243 (2013)
- [40] P. Pacher *et al.*, *Pharmacol Rev*, **58**, 87-114 (2006)
- [41] S. Sugahara *et al.*, *J Food Sci*, **80**, C2420-C2429 (2015)
- [42] 竹中真紀子ら, *日本食品科学工学会誌*, **53**, 603-611 (2006)
- [43] Y. Ueda *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **83**, 2288-2297 (2019)
- [44] Y. Ueda *et al.*, *JARQ*, **55**, 347-358 (2021)
- [45] A.R. Jambrak, *J Food Process Technol*, **2**, 1-3 (2011)
- [46] Y. Ueda *et al.*, *Food Sci Technol Res*, **25**, 131-139 (2019)
- [47] R.A.M. Szokalo *et al.*, *J Ethnopharmacol*, **257**, 112854 (2020) doi:10.1016/j.jep.2020.112854

5. 業績

【論文発表】(2022年度)

該当なし

【学会等発表】(2022年度)

- 1) 新名健, 小佐井颯大, 上田裕人, 下西悦斗, 森田千紘, 岩本若菜, 松田靖, 村田達郎, 小野政輝, 木下英樹, 安田伸. 系統の異なるヤーコン葉の抗酸化活性、糖類分解酵素阻害活性と多変量解析. 日本農芸化学会 2022年度西日本支部大会(長崎大学、長崎県長崎市) 2022年9月23日.
- 2) Yasuda S, Ueda Y. Antioxidant effects of herbal tea from yacon leaves as a healthy drink in Japan. World Food Series Webinar @Food Industry, KMITL (Bangkok, Thailand, Online Zoom) 2022.8.26. (Seminar speaker, Invited) <https://www.u-tokai.ac.jp/news-campus/200432/>

(2022.8.31 公開、2022.12.24 アクセス)

- 3) 上田裕人, 松田靖, 村田達郎, 星良和, 椛田聖孝, 小野政輝, 木下英樹, 井越敬司, 安田伸. 日本における 4 つの栽培品種とペルー系統のヤーコン葉を用いたポリフェノール含量、抗酸化作用および糖類分解酵素阻害作用の 4 年にわたる調査. 日本農芸化学会西日本支部ほか化学関連支部共催, 第 59 回化学関連支部合同九州大会. (福岡県北九州市、北九州国際会議場) 2022 年 7 月 2 日.

6. 謝辞

本稿は、タイ国モンクット王ラカバン工科大学食産業学部にてオンラインで開催されたワールドフードシリーズウェビナー (2022 年 8 月 26 日) での講演 “Antioxidant Effects of Herbal Tea from Yacon Leaves as a Healthy Drink in Japan” の内容を中心に、一部加筆して取りまとめたものです。

本研究の一部は、文部科学省「地(知)の拠点整備事業」における東海大学 To-Collabo プログラム地域志向教育研究経費「大学推進プロジェクト」、東海大学総合研究機構プロジェクト研究、総合農学研究所プロジェクト研究、および先進生命科学研究プロジェクト研究、の資金援助により実施されています。



好熱菌由来ピロリン-5-カルボン酸還元酵素の結晶化およびX線結晶構造解析

Crystallization and preliminary structural analysis of pyrroline-5-carboxylate reductase from thermophile

米田 一成^{1,2,3,4*}、荒木 朋洋^{2,3)}

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

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

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

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

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

[要旨]

安定性の高いピロリン-5-カルボン酸還元酵素(P5CR)は高収率・高光学純度な L-ピペコリン酸合成法の開発に応用可能な有用酵素である。好熱菌である *Pyrobaculum calidifontis* および、*Sulfolobus tokodaii* から P5CR 遺伝子を見出すと共に、構造機能解析を目的に pET ベクターに遺伝子クローニングを行った。P5CR をコードする遺伝子を PCR で増幅後、タンパク質発現用ベクターにライゲーションし、大腸菌 BL-21 株を用いて P5CR 遺伝子の発現を行った。その結果、NAD⁺依存性 P5CR 活性を有す酵素の調製が可能であった。酵素の結晶化を行った結果、*P. calidifontis* の P5CR で 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、2.86 Å 分解能データの取得ができた。

[Abstract]

The highly stable pyrroline-5-carboxylic acid reductase (P5CR) is a useful enzyme that can be applied to the development of a high-yield, high-optical purity L-pipecolic acid synthesis method. The P5CR gene was found in *P. calidifontis* and *S. tokodaii*, a thermophilic bacterium, and was cloned for structural and functional analyses. The cloned gene encoding P5CR was ligated to a protein expression vector, and expressed in *Escherichia coli*. Thus, an enzyme with P5CR activity was produced. Upon crystallization, enzyme crystals suitable for X-ray diffraction were obtained. X-ray diffraction results yielded approximately 3 Å resolution data.

[Key Words]

Pyrroline-5-carboxylate reductase, L-Pipecolic acid, Thermophile, X-ray crystallography

1. はじめに

酵素は、基質特異性、立体特異性などの特徴を持ち、化学合成のように環境に有害な有機溶媒下の反応でなく温和な条件で反応が進むために産業、医薬の分野で広く利用されている。しかし、酵素の多くは、触媒寿命が短く、酸化還元反応においては NAD⁺などのピリジンヌクレオチド、C-C などが生じる合成酵素反応においては ATP などの高エネルギーリン酸化化合物といった高価な補酵素が必要でありコスト的な問題が生じる。

本研究では高い安定性を有すると予測される好熱菌由来の L-リジン脱水素酵素 (LysDH) および、ピロリン-5-カルボン酸還元酵素 (P5CR) を用いることで、高収率・高光学純度な L-ピペコリン酸 (L-PA) 合成法の開発の基礎を築くことを目的として計画した。超好熱菌から見出した耐熱性 LysDH は我々が世界に先駆けて立体構造を解明した酵素であり、他の既知 LysDH と比較して耐熱性が極めて高いことが分かっている[1,2]。L-PA は、タンパク質の構成成分ではない非タンパク性のアミノ

酸であり、抗癌剤(VX710)、免疫抑制剤(FK506)、鎮痛剤(BRL52537)といった合成医薬品の原料として非常に有用なアミノ酸であることが知られている(図1)。好熱菌由来(*Pyrobaculum calidifontis* および、*Sulfolobus tokodaii*; *Sulfurisphaera tokodaii*)の安定性の高い酵素を使用することで、酵素の弱点である触媒寿命の点で大きな改善策の1つとなると考えられる。

大腸菌由来の P5CR では、本来の基質ではないピロリン-6-カルボン酸 (P6C)の還元を触媒し L-PA を生成するという性質がすでに報告されている[3]。そこで、好熱菌である *P. calidifontis* および、*S. tokodaii* のゲノム情報から P5CR ホモログ遺伝子を探したところ、Pcal_0881 および、STK_06460 が耐熱性 P5CR である可能性が高いことを明らかにした。そこで、好熱菌由来 P5CR と好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 LysDH との共役系による新規 L-PA 合成法を行う方法を考案した(図2)。この共役系において、好熱菌由来の酵素を用いることにより、酵素の弱点である、触媒寿命の点を改善することができると共に、LysDH は NAD⁺を補酵素とし、好熱菌由来 P5CR は NADH を補酵素とするため、NAD⁺をサイクリングすることができ、コストの面でも改善することが期待できる。また、立体特異性の高い酵素を用いることにより光学純度の高い L-PA の合成が可能になると考えられる。

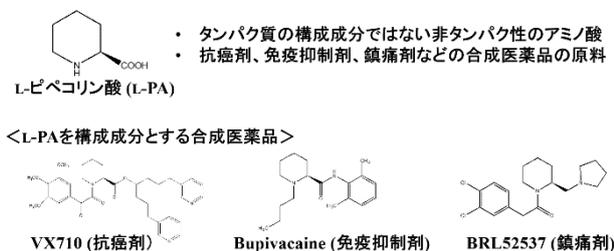


図1. L-ピペコリン酸の特徴と有用性

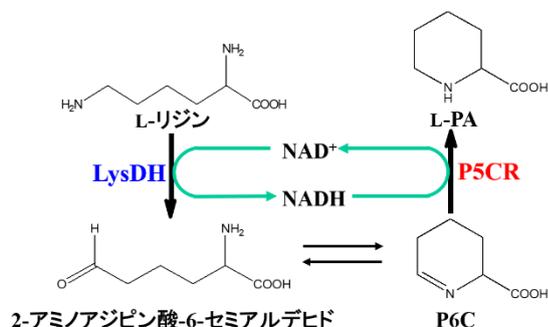


図2. LysDH と P5CR を用いた L-ピペコリン酸の酵素合成法の概要

2. 結果の概要

1) *P. calidifontis* 由来 P5CR の発現、精製、結晶化、X線回折実験

P5CR の結晶構造解析には、大量の酵素が必要となるので、大腸菌を用いた大量発現を行うことで、リコンビナント酵素を大量に発現させた。*P. calidifontis* 由来 P5CR の遺伝子(Pcal_0881)を下記の2種類のプライマー(ファスマック株式会社)を使用し、PCR で増幅した。5'-catatggttgggtaataaggcgtgtaag-3' (下線部は *Nde* I サイト)、5'-ggatccctaggaggtctgtggcgtaattt-3' (下線部は *Bam* HI サイト)。その後、pGEM-T ベクターにライゲーションを行い、ファスマック株式会社の DNA シーケンス解析サービスを利用し、塩基配列の確認を行った後、タンパク質発現ベクターである pET15b ベクターにライゲーションを行った。すなわち、pGEM-T ベクターを *Nde* I、*Bam* HI で処理し、アガロースゲル電気泳動した後、P5CR 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 P5CR 遺伝子とライゲーションを行うことで pET15b/P5CR 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 500 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 P5CR 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。

上記の誘導条件で得られた粗酵素溶液を 100°C、5 時間の熱処理後の遠心上清を Talon コバルトアフィニティーカラムで精製した。平衡化バッファーには 10 mM Tris バッファー (pH 8.0)、500 mM NaCl、5 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3、レーン8)。

精製した酵素を SDS-PAGE に供した後、PVDF 膜に転写し、CBB 染色を行った。その後、バンドを切り出し、N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (Shimadzu PPSQ-51A)を用いて分析を行った。その結果、GSSHHHHHHH であり、1 残基目のメチオニン以外は予測された His-tag 配列が検出された。1 残基目のメチオニン残基は大腸菌の菌体内で切断されたと予測される。

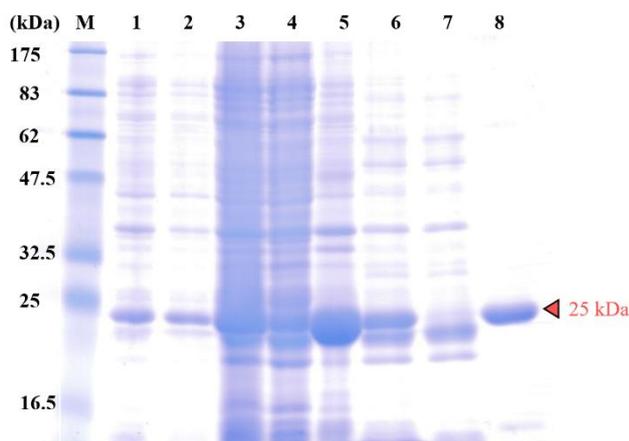


図3. SDS-PAGE による *P. calidifontis* 由来 P5CR の精製結果。M ; 分子量マーカー、1 ; IPTG(-)、2 ; IPTG(+)、3 ; 細胞破碎液、4 ; 粗酵素、5 ; 不溶性画分、6 ; 熱処理後上清、7 ; Talon スルー、8 ; Talon 溶出。矢印は精製 P5CR を示している (25 kDa)。

P5CR 活性の確認には本来の基質である L-プロリン、補酵素 NAD⁺もしくは NADP⁺、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、補酵素 NAD⁺および、NADP⁺存在下で紫色のホルマザンが形成されており、補酵素(-)では反応が起こらないことを確認した (図4)。NADP⁺よりも NAD⁺の方が反応性が高いことが明らかになった。

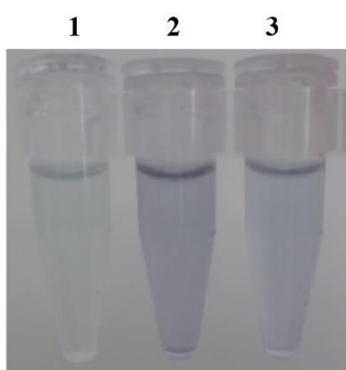


図4. *P. calidifontis* 由来 P5CR の活性染色。1 ; NAD⁺(-), 2 ; NAD⁺(+), NADP⁺(+)。

精製した P5CR が正しくフォールディングしているかを調べるために、円二色性分散計 (日本分光 J-820) を用いてタンパク質の主鎖構造の情報が得られる遠紫外部領域 (200~250 nm) の遠紫外円偏光二色性 (CD)

スペクトル測定を行った。0.9 mg/ml の精製酵素を光路長 0.5 mm の円筒型石英セルに入れ、室温にて遠紫外部の 200 nm から 250 nm におけるスペクトルを測定した。一般的に α ヘリックスは 207 nm, 222 nm 付近に 2 つの負の極大を持ち、 β シートは 216 nm 付近に負の極大を持つことから、本酵素が正しくフォールディングしていると示唆された (図5)。

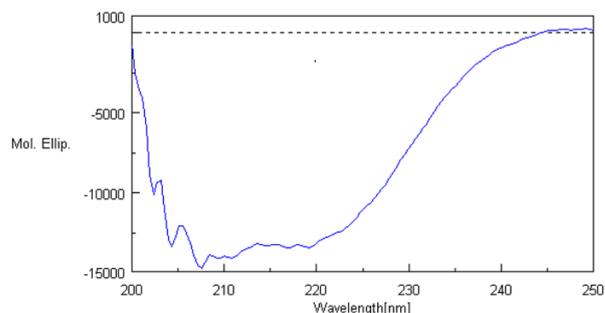


図5. *P. calidifontis* 由来 P5CR の CD スペクトル結果

精製後の酵素は 10 mM Tris バッファー (pH 8.0), 0.2 M NaCl, 5 mM β -メルカプトエタノール に 4°C で透析を行い、6 mg/ml に濃縮を行った。その後、1 mM NAD⁺ を添加後、結晶化スクリーニング(Wizard 3,4, Index, Cryo1,2; Rigaku)を行った。その結果、30% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール (MPD), 0.1 M Tris buffer (pH 8.5), 0.5 M NaCl, 8% PEG 8000 の条件で図6のような単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 P5CR 結晶の X 線回折実験を行った (表1)。その結果、2.86 Å 分解能のデータを測定することができ、空間群 C2 であることが判明した (図6)。

結晶構造解析を行うために、回折実験で得られたデータを HKL2000 でデータ処理後、CCP4i の Molrep を使用し、分子置換を行った。分子置換のサーチモデルには 6LHM.pdb (Structure of human PYCR2、アミノ酸配列の同一性; 31.2%) のモノマー構造 (A チェーン) を使用した。Matthews 係数 (V_M) の値は非対称単位中 6 分子の場合、2.50 Å³/Da であり、P 値は 0.38 であった (溶媒含有量=50.75%)。そのため、分子置換の計算には非対称単位中に 6 分子のモノマー構造になるように設定した。分子置換で得られた解は R 値=0.602、Score=0.343 であった。計算で得られた pdb ファイルを用いて、CCP4i の Refmac5 で構造精密化を行ったが、精密化後の R および、FreeR の値はそれぞれ 0.544、0.549 で精密化が進んでいないため、計算された電子密度にアミノ酸をフィッティングすることができなかった。

表 1. P5CR 結晶のデータ測定結果

ビームライン	BL-5A
波長	1.0000 Å
1枚当たりの回転範囲	1°
トータルフレーム	270°
結晶から検出器までの距離	352.9 mm
測定温度	100 K
1枚当たりのX線照射時間	5 sec
クライオ条件	40% MPD
空間群	C2
格子定数	$a=159.384 \text{ Å}$, $b=110.281 \text{ Å}$ $c=111.595 \text{ Å}$, $\alpha=90.000^\circ$ $\beta=130.236^\circ$, $\gamma=90.000^\circ$
分解能範囲 (外側のシェル)	50-2.86 Å (2.91-2.86 Å)
全反射数	174,167
独立な反射数	34,276
多重度 (外側のシェル)	5.1 (5.2)
完全性 (外側のシェル)	100 (100) %
R_{meas} (外側のシェル)	0.062 (0.368)
$R_{\text{p.i.m.}}$ (外側のシェル)	0.028 (0.162)

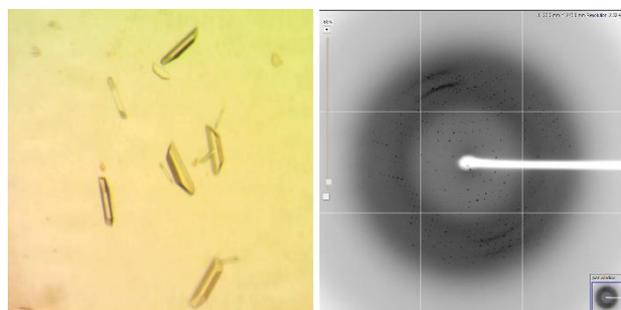


図 6. *P. calidifontis* 由来 P5CR の単結晶および、X 線回折実験結果

2) *S. tokodaii* 由来 P5CR の発現および、精製

S. tokodaii 由来 P5CR (STK_06460) の遺伝子クローニングは *P. calidifontis* 由来 P5CR と同様の方法で行った。すなわち、2 種類のプライマーを使用し、PCR で遺伝子の増幅を行った。5'-catatgagagtaagtataataggagtaggt-3' (下線部は *Nde* I サイト)、5'-ggatccttaatacatattatcatgctctt-3' (下線部は *Bam* HI サイト)。その後、タンパク質発現ベクターである pET11a ベクターにライゲーションを行い酵素の発現および、精製を行った。pET11a ベクターを使用して発現させた酵素は His-tag を有していないために、粗酵素溶液を 70°C、20 分間の熱処理後、遠

心分離を行い Red-Sepharose CL-4B に供することで P5CR の精製を行った (図 7)。また、精製酵素の N 末端アミノ酸配列を 10 残基分析した結果、MRVSIIGVGK であり、予測された N 末端アミノ酸配列であった。

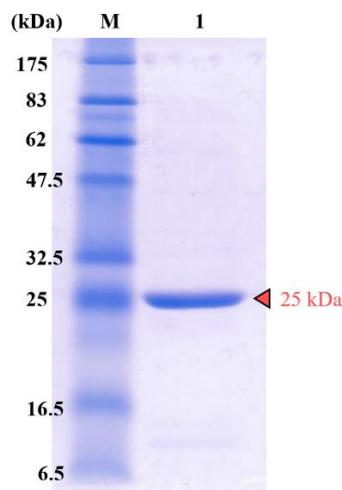


図 7. SDS-PAGE による *S. tokodaii* 由来 P5CR の精製結果。M ; 分子量マーカー、1 ; Red-Sepharose CL-4B 溶出画分 (25 kDa)。

3. 展望

安定性の高い *P. calidifontis* および、*S. tokodaii* 由来 P5CR の発現と精製を行うことができた。また、*P. calidifontis* P5CR では結晶が得られると共に、2.86 Å の反射データを測定することができた。今後、機能・結晶構造解析を行うために活性測定および、さらに高分解能なデータが測定できる高品質な結晶を作製していく予定である。

4. 引用文献

- [1] Heydari M, *et al.*, Appl Environ Microbiol., **70**, 937-42 (2004).
- [2] Yoneda. K, *et al.*, J. Biol. Chem., **285**, 8444-8453 (2010).
- [3] Fujii T, *et al.*, Biosci Biotechnol Biochem., **66**, 622-627 (2002).

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。N 末端アミノ酸配列分析に携わって頂きました千々岩有紀 技術員に感謝を申し上げます。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も感謝します。

静岡県産および輸入サーモンの身質比較

Comparison of meat property of salmon from Shizuoka Prefecture and imported salmon

小塩理緒菜¹⁾・吉川 航¹⁾・平塚聖一^{1,2,3)}

- 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

Riona Koshio¹⁾, Wataru Yoshikawa¹⁾ and Seiichi Hiratsuka^{1,2,3)}

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

[要旨]

静岡県内で養殖されている三保サーモン、紅富士、サクラマスおよびノルウェー産、チリ産の輸入サーモンの身質を比較した。脂質量はノルウェー産が最も多く、三保サーモンが最も少なかった。赤さを示す a^* はノルウェー産とチリ産で高かった。破断荷重は三保サーモンが高く、ノルウェー産とチリ産は低かった。これらの結果から、静岡県産サーモンは適度な脂質量と歯ごたえのある食感、輸入サーモンは色が赤く、脂質量が多くて身が柔らかいと考えられた。

[Abstract]

The meat properties of Miho salmon, Akafuji salmon, and cherry salmon farmed in Shizuoka prefecture, as well as imported Norwegian and Chilean salmon, were compared. The lipid content was the highest in Norwegian salmon and the lowest in Miho salmon. a^* , which indicates redness, was high in Norway and Chile. The breaking load was high for Miho salmon and low for Norwegian and Chilean salmon. These results suggest that the salmon from Shizuoka Prefecture has a moderate amount of fat and a chewy texture, while the imported salmon has a red color, a large amount of fat and a soft texture.

[Key Words]

Salmon, Meat property, Shizuoka, Norway, Chili

1. はじめに

我が国の食用魚介類の一人あたりの年間消費量が2001年以降減少する中、サケの消費量は増加しており2009年以降では魚介類の消費量のうちサケの消費量が最も多くなっている[1]。この背景には従来の加熱用の生鮮切り身から生食用への消費形態の変化が大きく寄与しており[2, 3]、この変化に伴いチリ、ノルウェーからの輸入サーモンの増加と国内各地でのいわゆる「ご当地サーモン」の養殖事業が活発化した。

ところで、市場では一般的にサケは海面で漁獲された大型のもので、マスは内水面で漁獲・養殖された小

型のものとして使い分けられてきたが、本論文では佐野[2]の定義に従い、「サーモン」とは「養殖された生食が可能な大型サケ類のうち、生食あるいは生鮮（解凍）切り身として販売されるもの」と定義する。

今井[4]によると、国内において「ご当地サーモン」と呼ばれているものは100種に及ぶとされている。そのため、乱立状態にあるサーモン市場の中で新たに「ご当地サーモン」を流通させていくには輸入および国内各地のサーモンとの差別化が必要である[5, 6]。静岡県内でも近年、幾つかのご当地サーモンが養殖されており、静岡市の三保地区では地下水を用いて陸上養殖

したサーモンが「三保サーモン」として2020年12月から販売された。また、静岡県富士宮市では2012年から内水面で養殖された大型ニジマスである「紅富士」が販売されている。

本研究では静岡県産サーモンの販路拡大を図るため、静岡県産サーモン3種と輸入サーモン2種の身質を比較した。

2. 方法

1) 試料

本実験で用いた試料は以下の5種類とした。すなわち、静岡県産サーモンとして、静岡市三保地区にて地下海水で陸上養殖されている三保サーモン

Oncorhynchus mykiss およびサクラマス *Oncorhynchus masou*、富士宮市で養殖されている紅富士 *Oncorhynchus mykiss* を4尾ずつ用いた。これらは池揚げ後に活締めし、3枚に卸してからフィレーを真空包装して-30℃で冷凍保管したものを入手した。また、輸入サーモンとして、ノルウェー産のアトランティックサーモン *Salmo salar* とチリ産のトラウトサーモン *Oncorhynchus mykiss* を用いた。これらは市販品を冷凍フィレーで4個体ずつ入手した。全てのサーモンは通常の流通サイズのものを用い、フィレー重量は三保サーモン500g、サクラマス400g、紅富士700g、ノルウェー産1,500g、チリ産1,000gであった。実験に際し、5種類のサーモンを5℃にて14時間かけて解凍してから実験に供した。

2) 分析方法

一般成分：常法[7]により行った。脂肪酸組成：筋肉を試料とし、Bligh&Dyer法のHanson&O'Leary変法

[8]に従って抽出した脂質を、三フッ化ホウ素メタノールを用いてメチルエステル化し、GCにより分析した。遊離アミノ酸：5%スルホサリチル酸溶液にて抽出後、OPA法にてHPLCにより分析した。K値およびイノシン酸量：5%過塩素酸溶液にて抽出後、HPLCにて分析した。色差：ミノルタ社製の色彩色差計によりL*, a*, b*を測定した。破断強度：(株)山電のレオメーターTPU-2Lにより測定した。得られたデータをエクセル統計ソフト(Be11 curve)を使用して、一元配置分散分析を行い、Tukey法により有意差検定を行った。

3. 結果

各種サーモンの物理および化学性状の結果を表1に示した。明るさの指標であるL*値はチリ産が他のサーモンに比べて有意に高かった。赤さの指標であるa*値と黄色さの指標であるb*値はノルウェー産とチリ産が静岡県産の3種のサーモンに比べて有意に高かった。一般成分においてはノルウェー産の水分とタンパク質が三保サーモンより有意に少なかった。脂質は5種のサーモン間で差が顕著であった。すなわち、ノルウェー産が21%と最も多く、次いでチリ産、紅富士、サクラマスとなっており、三保サーモンは9%と最も少なかった。筋肉の破断荷重は移動歪率50~60%にて最大荷重となり(図1)、三保サーモンが最も高く、サクラマス、ノルウェー産およびチリ産が低い値を示した。K値においては三保サーモンとサクラマスが20%以下と低い値であり、ノルウェー産(43%)とチリ産(37%)は高い

表1 各種サーモンの物理および化学性状

	(g/100g)				
	三保サーモン	サクラマス	紅富士	ノルウェー産	チリ産
色 差					
L*	45.38 ± 1.12 a	51.64 ± 3.24 a	48.17 ± 1.33 a	54.18 ± 0.96 ab	58.01 ± 0.87 b
a*	7.10 ± 0.07 a	8.37 ± 0.79 ab	9.88 ± 0.17 b	14.50 ± 0.55 c	14.69 ± 0.65 c
b*	11.74 ± 0.48 a	15.67 ± 0.70 b	15.98 ± 0.92 b	26.48 ± 0.82 c	25.48 ± 1.60 c
一般成分 (g/100g)					
水分	71.26 ± 2.03 a	65.04 ± 2.92 ac	65.84 ± 2.57 a	53.98 ± 1.17 b	63.95 ± 4.98 bc
たんぱく質	22.03 ± 0.51 a	20.08 ± 0.96 ab	21.05 ± 1.50 ab	18.64 ± 1.14 b	19.32 ± 0.90 b
脂 質	9.14 ± 0.36 a	14.60 ± 2.76 b	14.75 ± 0.68 b	21.13 ± 1.81 c	16.48 ± 2.81 b
灰 分	1.46 ± 0.44	1.25 ± 0.32	1.25 ± 0.24	1.05 ± 0.29	1.06 ± 0.17
最大破断荷重 (N)	3.24 ± 0.75 a	2.06 ± 0.69 b	2.60 ± 1.17 ab	2.15 ± 0.42 b	1.74 ± 0.67 b
K 値 (%)	15.73 ± 4.35 a	17.30 ± 5.54 a	30.33 ± 3.81 b	43.13 ± 8.76 c	36.98 ± 4.73 bc
イノシン酸量 (mg/100g)	402.77 ± 45.42 a	371.47 ± 23.64 a	306.01 ± 18.63 b	223.45 ± 31.31 c	227.33 ± 34.65 c

* 異符号間で有意差があることを示す (p < 0.05)

値であった。イノシン酸量は三保サーモンとサクラマスで多く、ノルウェー産とチリ産で少なかった。

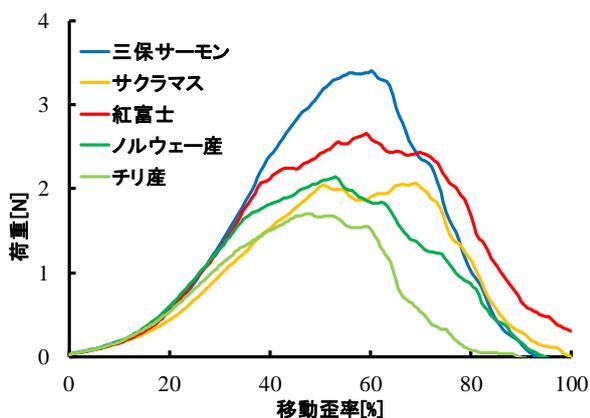


図1 各種サーモンの破断曲線

表2に各種サーモンの脂肪酸組成を示した。サーモンの主要な脂肪酸はC16:0 (パルミチン酸)、C18:1n-9 (オレイン酸)、C18:2n-6 (リノール酸)、C22:6n-3 (DHA、

ドコサヘキサエン酸)であった。C18:1n-9はノルウェー産で最も高かったのに対して、チリ産で顕著に低く輸入サーモン間で差がみられた。C18:2n-6はチリ産で最も高く、紅富士で最も低い値であった。C20:5n-3はチリ産でのみ高い値であった。C22:6n-3は紅富士、三保サーモンで高く、ノルウェー産で最も低かった。

各種サーモンの遊離アミノ酸量を表3に示した。サーモンの主要な遊離アミノ酸類はアンセリン(Ans)、タウリン (Tau)、グリシン (Gly)、ヒスチジン (His)、アラニン (Ala) であり、アンセリン含量が著しく多かった。遊離アミノ酸総量、タウリン量およびアンセリン量はチリ産が他の4種よりも有意に少なかった。

4. 考察

本研究は国内で乱立状態にあるサーモン市場において静岡県産のサーモンの差別化を図るため、輸入サーモンとの身質の比較を行い、静岡県産サーモンの優位性を見出すことを目的とした。

表2 各種サーモンの脂肪酸組成

	(Wt %)				
	三保サーモン	サクラマス	紅富士	ノルウェー産	チリ産
C 14 : 0	2.05 ± 0.08 a	2.10 ± 0.15 a	2.29 ± 0.10 a	2.34 ± 0.04 a	2.90 ± 0.16 b
C 16 : 0	16.94 ± 0.28 a	15.79 ± 0.91 a	19.06 ± 0.19 b	10.84 ± 0.39 c	15.05 ± 1.35 a
C 18 : 0	4.09 ± 0.26 a	3.87 ± 0.06 a	4.49 ± 0.23 b	2.80 ± 0.24 c	3.74 ± 0.44 a
C 16 : 1 n-7	3.58 ± 0.11 a	3.75 ± 0.14 a	6.25 ± 0.58 b	3.56 ± 0.08 a	5.13 ± 0.21 b
C 17 : 1 n-8	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.57 ± 0.14
C 18 : 1 n-9	31.84 ± 0.29 a	32.84 ± 0.43 ab	29.52 ± 0.72 a	36.36 ± 1.76 b	22.30 ± 2.45 c
C 18 : 1 n-7	3.42 ± 0.14 a	3.11 ± 0.05 ab	3.46 ± 0.15 a	3.15 ± 0.02 ab	2.84 ± 0.32 b
C 20 : 1 n-9	1.72 ± 0.48	1.91 ± 0.09	2.32 ± 0.09	2.05 ± 0.25	1.26 ± 0.56
C 22 : 1 n-11	0.34 ± 0.07	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.45 ± 0.16
C 22 : 1 n-9	1.08 ± 0.04	1.13 ± 0.05	1.02 ± 0.02	0.81 ± 0.07	0.62 ± 0.44
C 16 : 2 n-4	0.36 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.06	0.34 ± 0.05	0.67 ± 0.13
C 18 : 2 n-6	12.07 ± 0.15 a	14.23 ± 0.34 a	7.96 ± 0.41 b	12.81 ± 0.23 a	17.09 ± 0.38 c
C 18 : 3 n-3	1.58 ± 0.09	1.95 ± 0.03	1.24 ± 0.14	6.63 ± 0.13	2.65 ± 0.09
C 18 : 4 n-3	0.47 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.43 ± 0.04	0.77 ± 0.04	0.92 ± 0.06
C 20 : 2 n-6	0.69 ± 0.09	0.62 ± 0.02	0.62 ± 0.08	0.70 ± 0.09	0.66 ± 0.05
C 20 : 4 n-6	0.68 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.71 ± 0.06	0.37 ± 0.05	0.58 ± 0.06
C 20 : 4 n-3	0.47 ± 0.06	0.52 ± 0.03	0.45 ± 0.06	1.10 ± 0.61	0.85 ± 0.20
C 20 : 5 n-3	2.57 ± 0.20 ab	2.53 ± 0.17 ab	2.42 ± 0.09 a	2.92 ± 0.17 b	5.38 ± 0.20 c
C 22 : 5 n-3	1.31 ± 0.04	1.93 ± 0.30	1.21 ± 0.08	1.48 ± 0.34	2.10 ± 0.04
C 22 : 6 n-3	9.70 ± 0.80 a	7.70 ± 0.93 ab	10.43 ± 0.24 a	5.14 ± 0.39 b	6.68 ± 0.71 b
others	5.24 ± 0.33	4.68 ± 0.60	5.56 ± 0.72	5.60 ± 1.24	8.53 ± 3.66
Saturates	22.57 ± 0.81	21.07 ± 1.48	25.28 ± 0.94	15.40 ± 0.70	20.72 ± 1.52
Monoenes	42.28 ± 0.76 ab	43.38 ± 0.45 ab	43.29 ± 0.95 ab	46.64 ± 1.77 a	33.17 ± 3.08 b
Polyenes	29.91 ± 0.87 a	30.87 ± 1.08 a	25.87 ± 0.58 a	32.36 ± 0.62 ab	37.58 ± 0.75 b
n-3/n-6	1.20 ± 0.08 a	0.98 ± 0.06 b	1.74 ± 0.08 c	1.30 ± 0.05 a	1.01 ± 0.07 b

* 異符号間で有意差があることを示す($p < 0.05$)

表3 各種サーモンの遊離アミノ酸量

	(mg/100g)									
	三保サーモン		サクラマス		紅富士		ノルウェー産		チリ産	
Asp	1.6 ± 0.2	a	2.9 ± 2.2	a	1.5 ± 1.4	a	5.4 ± 2.8	a	9.6 ± 1.1	b
Thr	8.2 ± 3.0		10.7 ± 1.5		8.9 ± 0.7		16.7 ± 8.4		9.4 ± 0.6	
Ser	11.1 ± 9.7		16.3 ± 13.2		8.1 ± 1.4		13.2 ± 5.5		13.3 ± 1.2	
Glu	13.2 ± 9.7		18.1 ± 9.7		14.3 ± 4.5		24.8 ± 8.9		18.3 ± 5.7	
Gly	87.7 ± 38.7		52.2 ± 35.5		42.1 ± 23.5		23.1 ± 4.7		26.3 ± 6.3	
Ala	49.4 ± 9.5		69.7 ± 38.1		40.0 ± 15.2		37.6 ± 9.1		37.5 ± 4.6	
ILe	1.4 ± 2.4		0.5 ± 1.0		0.0 ± 0.0		5.0 ± 8.7		1.2 ± 2.0	
Leu	5.1 ± 4.7		4.7 ± 6.4		20.4 ± 29.8		11.4 ± 8.2		14.7 ± 10.0	
Tyr	14.0 ± 9.4		11.3 ± 8.8		17.0 ± 10.7		17.6 ± 7.4		12.0 ± 5.1	
Phe	0.0 ± 0.0		2.7 ± 4.6		0.5 ± 0.9		0.9 ± 1.5		1.0 ± 1.7	
Lys	2.9 ± 2.8	a	0.4 ± 0.8	b	5.0 ± 1.6	a	8.1 ± 4.9	c	3.5 ± 0.8	a
His	74.3 ± 24.1	a	63.3 ± 16.9	a	52.1 ± 6.3	a	71.6 ± 22.2	a	30.0 ± 9.4	b
Arg	5.9 ± 8.5		10.3 ± 15.2		5.9 ± 1.2		10.4 ± 8.8		0.8 ± 1.4	
Total	274.8 ± 51.2	a	263.2 ± 90.8	a	216.0 ± 20.4	a	245.7 ± 76.9	a	177.4 ± 3.2	b
Tau	84.8 ± 6.2	a	98.9 ± 47.6	a	79.2 ± 30.7	a	85.4 ± 33.5	a	49.4 ± 7.7	b
Ans	587.5 ± 66.3	a	721.2 ± 159.8	a	554.3 ± 9.0	a	711.7 ± 302.0	a	377.4 ± 88.1	b

* 異符号間で有意差があることを示す (p < 0.05)

1) 外観

秋野ら[9]はサケ・マス類の品質を決める重要な要素の一つは肉色であり、赤みの強いものほど評価が高いと報告している。本研究において赤さの指標であるa*値はチリ産とノルウェー産が他の3種よりも有意に高かった。したがって、外観での評価は静岡県産よりも輸入のサーモンの方が高いと推察された。

2) 脂質量および食感

図6は各種サーモンの破断荷重と脂質量の結果をマッピングしたものである。三保サーモンは破断荷重が大きく脂質量が少ないのに対し、ノルウェー産とチリ産は破断荷重が小さく脂質量が多かった。また、富士宮市のブランドサーモンである紅富士は両者の中間に位置した。小林ら[10]は1993年に輸入サーモンの脂質

量を分析した結果、ノルウェー産のアトランティックサーモンの脂質量は背部筋肉で11~13%、腹部筋肉で17~18%、チリ産のトラウトサーモンの脂質量は背部筋肉で9~11%、腹部筋肉で9~12%であり、ノルウェー産の方が脂質量は多かったと報告している。本研究結果では静岡県産に比べてノルウェー産とチリ産のサーモンで脂質量が多かった。また、輸入サーモンの脂質量はノルウェー産が21%、チリ産が16%であり、チリ産よりもノルウェー産で多く、小林らと同様の結果であった。さらに、油野[11]は青森県周辺海域で漁獲された天然サクラマスの背部筋肉の脂質量は最大値で7.4%であったと報告している。本研究結果では養殖サクラマスの脂質量が平均で14.6%であったことから、部位差を考慮してもサクラマスは天然魚に比べて養殖魚で多いと推察された。近年の脂質と食品の美味しさに関する研究結果により、肉中に脂質が存在することで好ましい味は増強され、好ましくない味は抑制されることが明らかになってきた[12]。また、郡山ら[13]は魚油の添加によりメバチエキスの甘味は増強され、苦味と酸味は抑制されことを報告している。このように魚肉中の脂質量が多いと好ましい味をもたらすことが示唆され、脂質量の多いノルウェー産とチリ産のサーモンは三保サーモンに比べて好まれる味を有している可能性が考えられた。一方で、魚を生で食べる場合には歯ごたえが美味しさに特に重要であると言われている[14]。

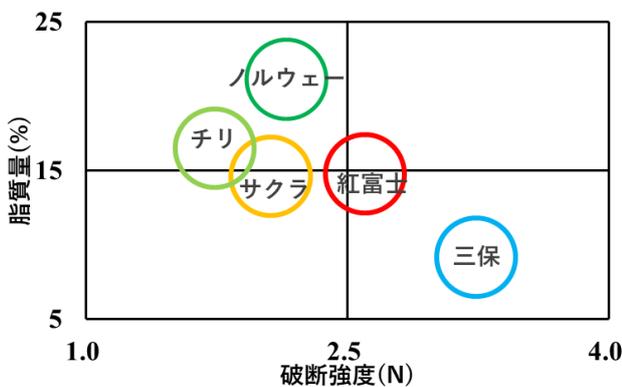


図2 各種サーモンの破断強度と脂質量のマッピング

本研究結果ではノルウェー産は破断強度が最も低く、三保サーモンは最も高かった。したがって、ノルウェー産は歯ごたえを好む消費者には敬遠される可能性も考えられ、さらに、健康を意識する消費者には20%を超える脂質量に抵抗を示す可能性も考えられた。その反対に三保サーモンは適度な脂質と歯ごたえを求める消費者に受け入れられる可能性が考えられた。

3) 呈味性

魚類の鮮度指標としてしばしば用いられているK値は自己消化酵素によるATPの分解物であるHxR(イノシン)とHx(ヒポキサンチン)のATP関連物総量に対する割合を示し、値が低いほど鮮度が良いと判断されている。一方、ATPからHxまでの分解途中で蓄積されるイノシン酸はうま味成分の一つとして知られている[15]。よって、ATPがやや分解しイノシン酸が最も蓄積した状態が最も旨味を感じると考えられている。また、イノシン酸に加えて遊離アミノ酸も呈味に寄与する成分である。本研究の結果では三保サーモンのK値は16%と最も低く、ノルウェー産のK値は43%、チリ産のK値は37%とともに高値であった。また、イノシン酸量は三保サーモンが最も多く、ノルウェー産とチリ産は最も少なかった。さらに、遊離アミノ酸総量はチリ産が他の4種に比べて有意に少なかった。小林ら[10]はノルウェー産のアトランティックサーモンのK値が17~31%、チリ産のトラウトサーモンのK値が16%であり、輸入サーモンは産地により取扱いが異なり鮮度にも差があることを報告している。本研究結果でもノルウェー産のサーモンのK値が高かったことから、輸入サーモンは輸送方法によってK値が上昇する可能性が考えられた。一方、村田ら[16]はサケ科魚類の遊離アミノ酸類を詳細に調査しており、アンセリンが最も多く、それは淡水に比べて海産で多いこと、アンセリンに次いでタウリン、グリシン、アラニンが多いことを報告している。本研究結果でも各種サーモンの遊離アミノ酸類の含量は村田らと同様の傾向であった。また、淡水養殖魚である紅富士のアンセリン量はノルウェー産およびサクラマスよりも少ない傾向がみられたが、チリ産のアンセリン量は紅富士よりさらに少なく、村田らの結果とは一致しなかった。したがって、飼育水の違いが遊離アミノ酸に及ぼす影響については今後さらなる調査が必要と考えられた。

4) 脂肪酸組成

飼料の脂肪酸組成が養殖魚のそれに影響することが知られている。本研究の結果では脳機能改善効果のあ

るDHA(C22:6n-3)は三保サーモンと紅富士で多く、近年うま味に関するとの報告[17]があるオレイン酸(C18:1n-9)はノルウェー産が最も多く、チリ産は他の4種よりもEPA(C20:5n-3)が多いのが特徴であった。紅富士は5種の中でリノール酸(C18:2n-6)が最も少なかったことから魚粉ベースの飼料で飼育されていると推察された。また、佐久間[18]はチリでは魚粉の調達が可能であったことによりサーモン養殖が大きく発展したと報告しており、このことと今回の分析結果でチリ産はEPAが多かったことを考え合わせると、チリ産のサーモンはイワシ類をベースとした飼料で飼育された可能性が高いと推察された。

以上のことから、輸入サーモンの特徴は色が赤く、脂質量が多く、身が柔らかいことであり、脂質のうま味を好む消費者には受け入れられやすいサーモンであると考えられた。一方、静岡県産のサーモンは適度な脂質量と歯ごたえのある食感が特徴であると考えられた。

5. 引用文献

- [1] 水産庁:水産物消費の動向. 水産白書令和3年度版, 一般財団法人農林統計協会, 東京, 39(2022).
- [2] 佐野雅昭:日本におけるサーモン養殖展開の機序、特徴、展望. 地域漁業研究, 59(3), 117-128(2019).
- [3] 山下東子:サケ・サーモンに関する国内外の消費傾向の変化に関する研究. 地域漁業研究, 59(2), 89-96(2019).
- [4] 今井 智:国内のブランドサケマス養殖地図. アクアネット, 23(2), 20(2020).
- [5] 森 優輝, 竹ノ内徳人, 原田幸子, 三浦智恵美, 三浦 猛, 太田 史, 浦崎慎太郎, 岡田孝洋:愛媛県における「ご当地サーモン創出」と地域水産業の活性化. 地域漁業研究, 57(2), 27-39(2017).
- [6] 平塚 匡, 三浦正之:山梨県の新たな地域特産魚「富士の介」の肉質評価. 山梨県水産技術センター事業報告書, 46, 10-19(2019).
- [7] 片岡榮子, 古庄 律, 安原 義:食品の一般成分分析. 食品化学実験「第二版」, 地人書館, 東京, 77-108(2003).
- [8] Hanson SWF, Olley J. Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *J. Biochem.*, 89, 101-102(1963).
- [9] 秋野雅樹, 武田忠明, 今村琢磨:シロザケ肉色の品質評価に関する研究, 北海道水試研報, 72,

31-35(2007).

- [10] 小林正三, 網中 仁, 山口雅子, 滝口明秀: 銚子地区で加工される輸入サケ・マス類の性状について. 千葉水試研報, 51, 85-88(1993).
- [11] 油野 晃: 青森県で漁獲されるサクラマス筋肉の一般成分および遊離アミノ酸組成. 下北ブランド研究開発センター研報, 4, 29-40(2005).
- [12] 西村敏英: 食品のおいしさに寄与する脂質の役割 -香りの保持効果とコク増強効果-. 脂質栄養学, 30(1), 14-24(2021).
- [13] 郡山 剛, 木幡知子, 渡辺勝子, 阿部宏喜: メバチ筋肉の成分組成とその呈味におよぼす脂質の役割. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 66(3), 462-468(2000).
- [14] 畑江敬子: さしみの科学 -おいしさの秘密-, 成山堂書店, 東京, 36-43(2005).
- [15] 小関聡美, 北上誠一, 加藤 登, 新井健一: 魚介類の死後硬直と鮮度 (K 値) の変化. 東海大学紀要海洋学部「海—自然と文化」, 4(2), 31-46(2006).
- [16] 村田裕子, 金庭正樹, 山下由美子, 飯田遥, 横山雅仁: サケ科魚類可食部中の遊離アミノ酸組成. 中央水研報, 11, 65-73(1998).
- [17] 入江正和: 和牛肉における脂肪質と食味性. 日本畜産学会報, 92(1), 1-16(2021).
- [18] 佐久間智子: チリ南部におけるサケ・マス養殖. アジア太平洋資料センター報告書, 1-24(2007).

Fabrication of cyclodextrin-loaded nanosheets and their inclusion ability of linalool

浅野目 将吾¹⁾、坪井 亮²⁾、土屋 笙子²⁾、小口 真一^{3,4,5)}、伊藤 建^{3,4)}、樋口 昌史^{1,2,4,5)}、岡村 陽介^{1,2,4,5)*}
東海大学工学部応用化学学科¹⁾、東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻²⁾、東海大学理学部化学学科³⁾、

東海大学先進生命科学研究所・化粧品部門⁴⁾、東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター⁵⁾

Shogo Asanome¹⁾, Ryo Tsuboi²⁾, Shoko Tsuchiya²⁾, Shinichi Koguchi^{3,4,5)}, Takeru Ito^{3,4)}, Masashi Higuchi^{1,2,4,5)}, and Yosuke Okamura^{1,2,4,5)*}

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

[要旨]

本研究では、環状オリゴ糖 (CDs) を含有したポリビニルアルコール (PVA) からなるナノ薄膜を創製し、そのにおい分子包接能を検証した。犠牲層を塗布したシリコンウェハ上に CD 含有 PVA 水溶液をスピニングした後、グルタルアルデヒドによる気相架橋反応を経て、水に不溶な自己支持性 PVA ナノ薄膜を創製した。におい分子モデル (リナロール) の包接能を評価したところ、CD を含有させた効果は発現しなかったものの、PVA ナノ薄膜の架橋反応により、リナロールの物理吸着能が向上することを明らかにした。

[Abstract]

We herein propose freestanding cyclodextrin (CD)-loaded nanosheets composed of poly(vinyl alcohol) (PVA), and evaluate their inclusion abilities of odor molecules (e.g. linalool). In fact, CD-loaded PVA nanosheets were successfully fabricated by a combination process of spin-coating and gas phase crosslinking with glutaraldehyde. Their inclusion abilities of linalool were sufficient compared to that of non-crosslinked nanosheets as a control. Unfortunately, the effect of CD loaded into the PVA nanosheets was not expressed.

[Key Words]

Nanosheet, Poly(vinyl alcohol), Cyclodextrin, Linalool

1. はじめに

「におい」は人々の日常生活に密接に関わっている。これまで多くの嗅覚受容体が同定されており¹⁾、におい分子の濃度が 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⁾。最近、体臭などの不快なにおいを消し、好みのにおいを肌に塗布する化粧品が市場を賑わしている。しかし、いずれも液体状・粉末状の製品であり、肌に塗布あるいは噴霧する用法である。そのため、揮発性の高いにおい分子は、香りの持続性が不足していたり、特に夏場では有効成分が汗等で流れてしまうなどの課題が残されている。

高分子を膜厚 100 nm 程度のナノ薄膜に加工すると、ナノ厚特有の高い柔軟性と接着性が発現し、物理吸着のみで肌などの界面に貼付可能となる^{3,4)}。また、透明性が高

いため、貼付しても目立たず、装着感すらないことも特筆すべき点である。他方、環状オリゴ糖 (CD) 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た有機化合物である。水溶性ではあるが、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、水溶性高分子であるポリビニルアルコール (PVA) に CD を溶解・含有させたナノ薄膜を創製することを目的とする。特に、におい分子をいったん捕捉してから徐放させることで持続時間の向上を狙った肌貼付型化粧品への応用の可能性を検証する。ここでは、ラベンダー由来のリナロールをにおい分子のモデルとした。

2. 結果の概要

1) CD 含有 PVA ナノ薄膜の調製

シリコンウェハ (20×20 mm²) 上にポリスチレン溶液 (50 mg/mL, M_w : 260 kDa, Acros Organics 社製) を滴下後、スピコートし (4000 rpm, 20 s, MS-A 100, ミカサ社製)、犠牲膜とした。次いで、PVA 水溶液 (10-50 mg/mL, M_w : 22 kDa, 関東化学社製) 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上にスピコート (4000 rpm, 60 s) した。得られたウェハを角シャーレに入れ、別容器に添加したグルタルアルデヒド水溶液 (GA: 25%, 700 μ L, 酸性雰囲気下) と直接触れないように静置 (rt., 24 h) し、気相中にて架橋させた。最後に、ウェハごとグリシン (0.1 M) 水溶液中に浸漬させ、残存しているアルデヒド基を消失させた。

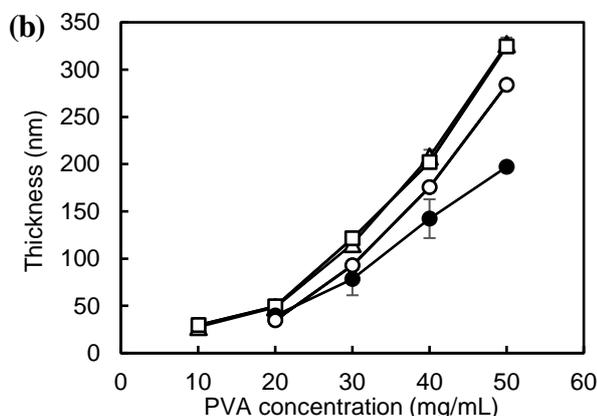
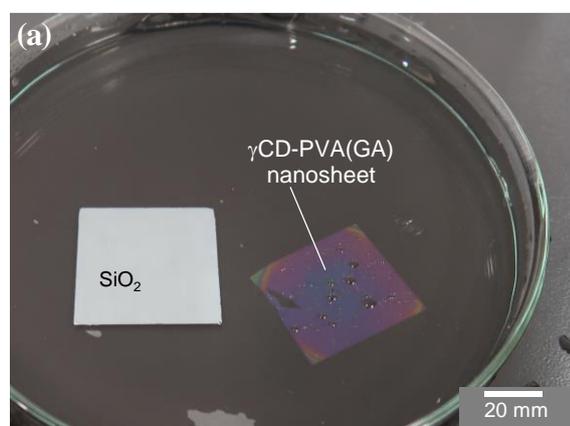


図 1 (a) 水面に浮遊した状態の γ -CD-PVA ナノ薄膜 (GA 架橋) の写真 ([PVA]: 50 mg/mL) . (b) PVA ナノ薄膜の膜厚とスピコート時の PVA 濃度の関係 (●: PVA ナノ薄膜 (GA 未架橋), ○: PVA ナノ薄膜 (GA 架橋), Δ : β -CD-PVA ナノ薄膜 (GA 架橋), \square : γ -CD-PVA ナノ薄膜 (GA 架橋)) .

架橋操作後のウェハをアセトン中に浸漬させたところ、犠牲膜であるポリスチレンが溶解し、ウェハの形状を維持した状態でナノ薄膜を回収できた。剥離した CD 含有 PVA ナノ薄膜を水に置換しても溶解することなく水面に浮遊したナノ薄膜が得られたこと、また、架橋操作を経

ない場合は瞬時に水に溶解したことから、GA 架橋反応が十分進行し、PVA 鎖間の水酸基を介してアセタール結合が形成されたと判断した (図 1a)。

触針式段差計 (Dektak XT, ブルカー社製) を用いて、アセトン中で剥離・回収した一連の PVA ナノ薄膜の膜厚を測定した。GA 未架橋体に関して、PVA 濃度が 10 mg/mL の際は、膜厚が低すぎて剥離時にナノ薄膜が破断してしまい測定には至らなかった。PVA 濃度が 20 mg/mL 以上でナノ薄膜として回収でき、PVA 濃度の上昇に伴い膜厚は増大した (図 1b●)。そこで、GA 架橋を施したところ、未架橋体と比較して膜厚が増大していた (図 1b○)。これは、GA 架橋により PVA の水酸基を介してアセタール結合が PVA 鎖間で形成され拡張したためと考えられる。また、 β -CD あるいは γ -CD を含有させた系ではさらに膜厚は増大していた (図 1b Δ , \square)。以上より、スピコートする際の PVA 水溶液の濃度でナノ薄膜の膜厚は任意に制御でき、架橋操作と環状オリゴ糖の添加によって膜厚が上昇することを明らかにした。

水面に浮いた γ -CD 含有 PVA ナノ薄膜を不織布に回収し、乾燥させた。水で湿らせた肌にもナノ薄膜を接触させたところ、ナノ薄膜は肌に転写されて密着した (図 2)。透明で目立たないことも確認できた。 γ -CD 含有体に限らず、 β -CD 含有体でも同様に貼付できることを確認した。従って、肌に貼付可能なナノ材料として利用できることを実証した。

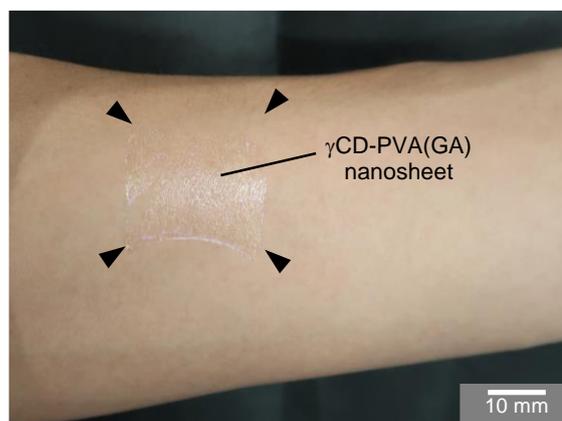


図 2 γ -CD-PVA ナノ薄膜 (GA 架橋) を肌に貼付した様子。

2) におい分子包接能評価

リナロールをにおい分子モデルとした。プラスチック容器に、1)の方法で得た一連のナノ薄膜とリナロール (200 μ L) を接触しないように入れて密閉して充満させ、恒温恒湿下 (24 $^{\circ}$ C, 2 h, RH: 40%) で静置した。ナノ薄膜をアセトン (1 mL) に浸漬させ、吸着したリナロールを抽出後、ガスクロマトグラフィー分析 (GC-8APF, 島津製作所社製, 分離カラム: Shinwasorb-S 80/100, 2.1 mm \times 3.2

mm ID を) に供した。このとき、ナノ薄膜の単位面積当たりに対するリナロールの吸着量を算出した。

その結果を図3に示す。GA 未架橋のPVA ナノ薄膜のリナロールの吸着量は、 $0.89 \pm 0.21 \text{ nmol/cm}^2$ (N=3, Mean \pm S.E.M) と算出された。そこで、ナノ薄膜にGA 架橋を経た場合、リナロールの吸着量の吸着量は約13倍向上した ($12.3 \pm 4.9 \text{ nmol/cm}^2$)。これは、PVA 鎖間に架橋が入ることで膜厚が増大する知見 (図1b) から、PVA 鎖間に空隙が生まれ、結果として比表面積が増大し物理吸着能が向上したためと考えられる。他方、PVA ナノ薄膜に β -CD あるいは γ -CD を含有させた系では、未架橋体と比較してリナロールは有意に吸着していたものの、残念ながら GA 架橋体より減少していた (β -CD 含有 PVA ナノ薄膜: $7.8 \pm 1.6 \text{ nmol/cm}^2$, γ -CD 含有 PVA ナノ薄膜: $7.5 \pm 1.5 \text{ nmol/cm}^2$)。これは、架橋によって生まれた空隙を CD が充填してしまい物理吸着能を阻害したためと考えられる。

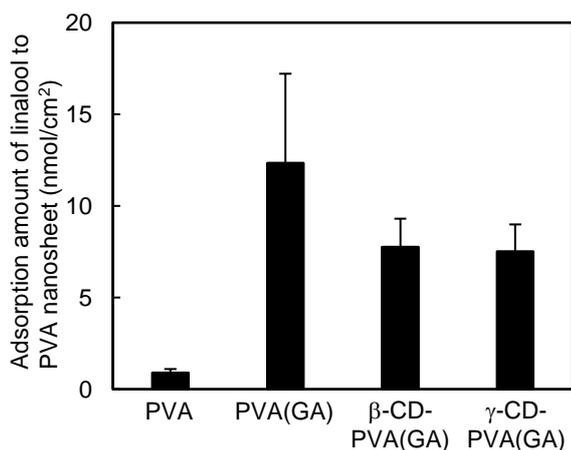


図3 環状オリゴ糖含有 PVA ナノ薄膜のリナロールの吸着量 (N=3, Mean \pm S.E.M) . [測定条件; 注入量: 1 μ L, 気化室温度: 250 $^{\circ}$ C, キャリアガス: N₂ (80 kPa), カラムオープン温度: 150 $^{\circ}$ C, FID 検出器: 250 $^{\circ}$ C, 分離カラム: Shinwasorb-S 80/100, 2.1 mm \times 3.2 mm ID]

3. 展望

グルタルアルデヒド (GA) による気相架橋反応を利用して、水に不溶な CD 含有 PVA ナノ薄膜を創製した。得られたナノ薄膜は自己支持性を有し、肌に貼付可能なナノ材料として利用できることを確認した。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 ナノ薄膜を GA 架橋することで、リナロールの物理吸着能が向上する現象を見出した。今回、CD を溶解した PVA 水溶液を用いてナノ薄膜化を検討したが、CD の意義を再検証するとともに、新たな戦略 (CD の表面修飾) を進める計画である。

4. 参考文献

- [1] Touhara, K. *et al. Neuroscience* **254**, 45 (2013).
- [2] Kaupp, U.B. *et al. Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 188 (2010).
- [3] Y. Okamura *et al. Adv. Mater.* **21**, 4388 (2009).
- [4] Y. Okamura *et al. Adv. Mater.* **25**, 545 (2013).
- [5] G. Crini. *Chem. Rev.* **114**, 10940 (2014).

5. その他の業績

【学会等発表】

- 1) 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. 加齢臭予防を指向したボロン酸架橋キトサンナノファイバーの創製と物性. 高分子学会関東支部第6回神奈川県地区講演会 (2022.7.8, オンライン)
- 2) 藤田 峻平, 土屋 笙子, 中川 篤, 岡村 陽介. におい分子揮発抑制能を有するボロン酸架橋多糖ナノ薄膜の創製と機能評価. 第71回高分子討論会 (2022.9.5-7, 北海道大学)
- 3) 坂井 亜由美, 岩松 宏徳, 岡村 陽介. 加齢臭予防を指向した抗酸化剤含侵デュアル架橋ゲル薄膜の創製と機能評価. 第71回高分子討論会 (2022.9.5-7, 北海道大学)
- 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. Fabrication of Crosslinked Chitosan Nanofibers and Their Adsorption Ability of Aged Body Odor. 第32回日本MRS年次大会 (2022.12.5-7, 産業貿易センタービル)
- 5) 坂井 亜由美, 岩松 宏徳, 岡村 陽介. Fabrication of Dual Cross-Linked Gel Nanosheets Containing Antioxidants for Preventing Aged Body Odor. 第32回日本MRS年次大会 (2022.12.5-7, 産業貿易センタービル)

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。



Odor quotient を用いた膵臓癌患者の体臭に寄与する皮膚ガス成分の同定

Identification of human skin gases responsible for body odor of pancreatic cancer patients using odor quotient

関根 嘉香¹⁾、戸高 惣史²⁾、川西 彩³⁾、森町 将司³⁾、平林 健一⁴⁾、加川建弘³⁾
東海大学理学部化学科¹⁾、AIREX 株式会社技術研究所²⁾、
東海大学医学部消化器内科学³⁾、富山大学学術研究部医学系病理診断学講座⁴⁾
*Yoshika Sekine¹⁾, Michihito Todaka²⁾, Aya Kawanishi³⁾, Masashi Morimachi³⁾, Kenichi Hirabayashi⁴⁾,
and Tatehiro Kagawa³⁾*

¹⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, ²⁾ R&D laboratory, AIREX Inc.

³⁾ Department of Gastroenterology, School of Medicine, Tokai University,

⁴⁾ Department of Diagnostic Pathology, Faculty of Medicine, University of Toyama

[要旨]

癌患者から放散する生体ガスには特有の匂いがあることが報告されている。そこで本研究では、膵臓癌患者および健常者を対象に皮膚ガスの放散フラックスを測定し、嗅覚閾値が報告されている 52 成分について odor quotient を求め、体臭に寄与する成分を同定した。その結果、膵臓癌患者の体臭には主としてエチルメルカプタン、オクタナール、アセトアルデヒドなど 18 成分が寄与し、健常被験者の体臭に寄与の大きいイソ吉草酸アルデヒド、酢酸、ジェオスミンなどの寄与は相対的に低かった。

[Abstract]

Cancer patients is known to have a characteristic body odor comprising of many volatile compounds emanating from human skin surface, known as human skin gases. However, the actual state of the human skin gases that contribute to body odor has been unknown. In this study, we aimed to identify the human skin gases responsible for the body odor of pancreatic cancer patients by measurement of dermal emission fluxes and odor quotients of 52 compounds whose odor threshold values were reported in literature. The results showed ethyl mercaptan, octanal and acetaldehyde were identified as major odorous substances in pancreatic cancer patients, and isovaleraldehyde, acetic acid and geosmin, which were major substances in healthy subjects, contributed little to the body odor of pancreatic cancer patients.

[Key Words]

Carcinoma, Early diagnosis, Body odor, Human skin gas, Odor quotient

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、これまで悪性黒色腫 [3]、アルコール性肝障害 [4]、心理的ストレス反応 [5]、農薬中毒 [6]、重度熱傷 [7] などに関する臨床研究においてその有用性が検討されている。

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 [8]、また多変量解析により両群を判別できる可能性があること [9] を見出してきた。一方、癌患者には特有の体臭が存在することが知られており、イヌや線虫の優れた嗅覚を利用して癌患者を探知する試みがなされている。しかしながら、癌患者の体臭に寄与する皮膚ガス成分の実態は未解明であった。そこで本研究では、膵臓癌患者および健常者を対象に皮膚ガスの放散フラックスを測定し、嗅覚閾値 [10] が報告されている 52 成分について odor quotient [11] を求め、体臭に寄与する成分を同定したので報告する。

2. 方法

1) 皮膚ガスの捕集・分析

本研究では、東海大学医学部附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 Sampler, PFS) 法を用いた。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 1)。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。

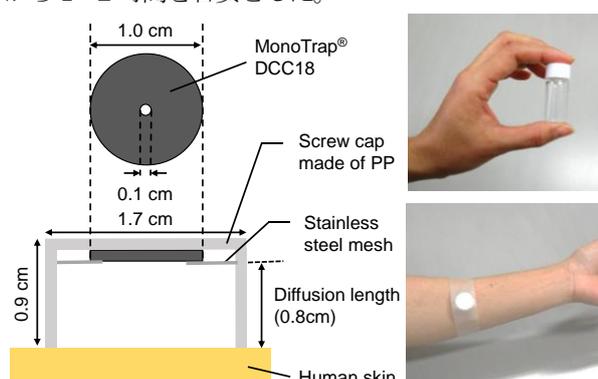


Fig. 1 Human skin gas sampling by PFS

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 日本電子社製) に導入し、SIM モードで分析を実施した。得られた各成分の捕集量 W (ng)、捕集時間 t (h) および捕集部の面積 S (cm^2) から、①式により放散フラックス E ($\text{ng cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) を求めた。

$$E = W/(St) \quad \dots \textcircled{1}$$

2) 用いたデータおよび解析方法

皮膚ガスには性別や年齢依存的に変動する成分があり、また検体に協力頂ける癌患者は高齢者が多いため、今回は 50 代後半から 60 代前半の男性被験者に絞り、膵臓癌患者 3 検体 (A: 56 歳, ステージ III B, B: 61 歳, ステージ IV, C: 62 歳, ステージ IV)、および健常者 3 検体 (D: 55 歳, E: 59 歳, F: 62 歳) 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 52 成分の放散フラックス ($\text{ng cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) を用いた。

嗅覚閾値 (odor threshold) は、ヒトの嗅覚によって感知され得る化学物質濃度の境界値であり、官能試験によって定量される。空気中化学物質を対象とする場合、嗅覚閾値は気中濃度 (ppb, ng/m^3) で表される。そこで、放散フラックスとの比較を容易にするため、皮膚ガス放散源者からの拡散濃度 C (ng/m^3) が嗅覚閾値に相当する放散フラックス E_{OT} ($\text{ng cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) を求めた。拡散濃度の推定には、2 領域ボックスモデルとして汎用される Near-Field Far-Field モデル [12,13] を用い、定常状態を仮定すると拡散濃度 C は②式で表される。

$$C = ES'/(NV) + ES'/(\pi r^2 v) \quad \dots \textcircled{2}$$

環境条件として一般住宅 8 畳間 (容積 $V=32 \text{ m}^3$ 、換気回数 $N=0.5 \text{ h}^{-1}$ 、気流速度 $v=0.06 \text{ m s}^{-1}$) を想定し、放散源者 (体表面積 $S'=16,000 \text{ cm}^2$) は点源と仮定し、半径 $r=0.5 \text{ m}$ の境界線上の拡散濃度 C が嗅覚閾値 OT に等しいとすると、 E_{OT} は③式から推定できる。

$$E_{OT} = OT/(S'/(NV) + S'/(\pi r^2 v)) \quad \dots \textcircled{3}$$

Odor quotient, OQ は、④式から求めることができ、ある皮膚ガス成分が $OQ \geq 1$ を示す場合、その成分は体臭に寄与する可能性があると考えられる。

$$OQ = E/E_{OT} \quad \dots \textcircled{4}$$

3.結果

健常者および膵臓癌患者の皮膚から放散された皮膚ガス 52 成分の放散フラックス E の測定値 (平均値±標準偏差, 変動係数)、嗅覚閾値相当放散フラックス E_{or} の推定値および Odor quotient, OQ の算出値を Appendix に示す。皮膚ガス組成は個人認証への利用可能性が示唆されるほど個人差が大きく[4]、今回の測定結果においても各放散フラックスの変動係数は、健常者群で 24 - 141%、膵臓癌患者群で 16 - 141%となった。そこで、各群 3 名の放散フラックスの平均値を用いて OQ を算出した。全 52 成分の OQ の合計値 (SOQ) を⑤式から求めると、健常者群では 243、膵臓癌患者群では 380 となり、膵臓癌患者群の方が高い値となった。

$$SOQ = \sum OQ \quad \dots \text{⑤}$$

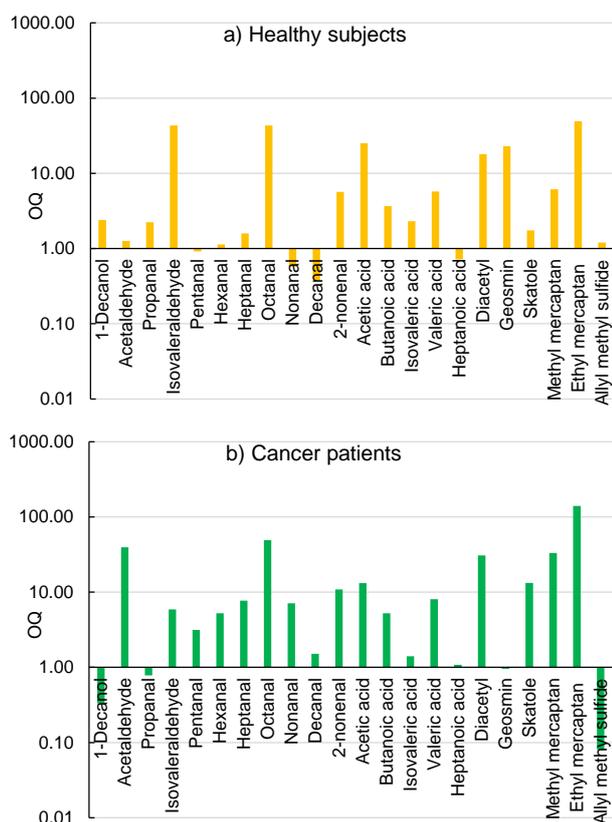


Figure 2 Calculated odor quotients of 22 skin gases emanating from the skin surface of a) healthy subjects (male, age: 55-59, $n=3$) and b) pancreatic cancer patients (male, age: 56-62, $n=3$).

ヒトの嗅覚には、これら皮膚ガス成分の混合臭として検知されるため、 SOQ の大小が必ずしもにおいの強弱を反映するわけではないが、 SOQ に寄与する皮膚

ガス成分が異なれば、においの質に変化が生じる可能性がある。そこで、健常者群および膵臓癌患者群のいずれかにおいて OQ が 1 を超過した 22 成分について、図 2 に OQ を図示した。

健常者群では、エチルメルカプタンの OQ が最も高く、次いでイソ吉草酸アルデヒド、オクタナール、酢酸、ジェオスミンなど 18 成分が体臭に寄与すると推定された。一方、膵臓癌患者群では、エチルメルカプタン、オクタナール、アセトアルデヒド、メチルメルカプタン、ジアセチルなど 18 成分が体臭に寄与すると推定され、膵臓癌患者群の体臭に寄与する皮膚ガス組成は、健常者群とは異なることが示唆された。

4.考察

今回は中高年の男性被験者を対象に、体臭に寄与する皮膚ガス成分の特定を試みた。その結果、いくつかの成分の OQ が両群において異なる傾向を示した。

メチルメルカプタンおよびエチルメルカプタンは、ニラやタマネギに類似した強い刺激臭を有する揮発性硫黄化合物であり、食品等に由来する含硫アミノ酸の代謝中間物と思われる。これらは速やかに分解され、S 原子は硫酸イオンに酸化される[14]。しかしながら何らかの障害により分解が阻害されると、これらは血中から揮発し、皮膚ガスとして排出される可能性がある。膵臓癌患者群におけるメチルメルカプタンの OQ は健常者群の約 5 倍、エチルメルカプタンの OQ は約 3 倍であり、両成分が SOQ に占める割合は健常者群で 20%、膵臓癌患者群で 37% であり、体臭の質の違いに強く関与している可能性が高い。

皮膚から放散される酢酸、イソ吉草酸アルデヒドおよびイソ吉草酸は汗臭の原因物質であり、発汗のバイオマーカーとして知られている。膵臓癌患者群におけるこれら OQ は健常者群よりも低値であり、発汗を伴う運動量が少ないためと思われる。一方、ジェオスミンの OQ は、健常者群で 23 であったのに対して膵臓癌患者群では 0.96 であった。ジェオスミンは環境中の放線菌や真菌に由来し、「雨のにおい」「カビ臭さ」を与える成分である。皮膚ジェオスミンの放散フラックスは、空气中濃度と相関する[15]ことが知られており、両群の OQ の顕著な相違は、皮膚ガス捕集時の室内環境を反映していると考えられる。

Fuchs et al. は、肺がん患者の呼気から C5~C9 アルデヒドが高濃度で検出され、酸化ストレス、腫瘍特異的な組織組成および代謝を反映すると報告している[16]。オクタナール (C8) の OQ には両群において顕

著な違いはないが、ペンタナール (C5)、ヘキサナール (C6)、ヘプタナール (C7)、ノナナール (C9) さらにデカナール (C10) の *OQ* は、いずれも膀胱癌患者群で高値を示した。膀胱癌患者においてもこれらのアルデヒドが体内で過剰産生され、呼気と同様に経血的に皮膚から放散されるとすれば、体臭の変化に寄与するだけでなく、腫瘍組織に由来するバイオマーカーとして利用できる可能性がある。またアセトアルデヒドは、既報[8]で述べた通り、膀胱癌患者において特異的に高い放散フラックスを示し、膀胱癌患者群の体臭に強く関与することが示唆された (*OQ*=39)。癌細胞では嫌気的な糖分解系である解糖系 (乳酸合成系) が好気的条件下においても著しく亢進しており[17]、その代謝物であるアセトアルデヒドは癌細胞に由来する可能性が考えられる。このような低級アルデヒドは、癌の判定における有用なパラメーターになると考えられ、判別アルゴリズムの開発に応用していく。

5. 結言・展望

経験的に癌患者には特有の体臭が存在することは知られていたが、odor quotient を用いた検討により、メルカプタン類、酢酸等の発汗由来成分、C8 以外の C5 ~C10 アルデヒド類などが膀胱癌患者の体臭の変化に関与する可能性が見いだされた。

今後はさらに症例数を増やし、皮膚ガス成分の臨床意義を検討するとともに、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す。

6. 引用文献

- [1] Mitra A. et al., *Metabolites*, 12(9) 824 (2022)
- [2] Sekine Y. et al., *J. Chromatogr. B*, 1092, 394-401(2018)
- [3] D'Amico A. et al., *Skin Res. Technol.*, 14, 226-236(2008)
- [4] Sekine Y. et al., *J. Jpn Assoc. Odor Environ.*, 48, 410-417 (2017)
- [5] Ikeda S. et al., *Results in Chem.*, 4, 100502 (2022)
- [6] Umezawa K. et al., *Jpn J. Clin. Path.*, 66,949-956(2018)
- [7] Kimura K. et al., *J. Jpn Assoc. Odor Environ.*, 47, 421-429(2016)
- [8] 戸高惣史ほか, *臨床環境医学*, 30(1), 7-16(2022)
- [9] 特開 2021-148517, *がんの評価方法*, 発明者: 平林健一, 関根嘉香, 川口義明 (2020)
- [10] 永田好男, 竹内教文: *日環七所報*, 17, 77-89(1990)
- [11] Kim K. H. et al., *Atmos. Environ.*, 42(20), 5061-5070 (2008)

- [12] Ramachandran G., *Occupational Exposure Assessment for Air Contaminants*, Chapter 17, CRC press, pp286-289 (2005)
- [13] 福嶋和真ほか, *クリーンテクノロジー*, 30(9), 35-38 (2020)
- [14] Canellakis E.S., Tarvar H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 42(2), 446-455 (1953)
- [15] 柿島百花ほか, 2022 年室内環境学会学術大会講演要旨集, 72-73 (2022)
- [16] Fuchs P. et al., *Int. J. Cancer*, 126(11):2663-2670(2010)
- [17] Warburg O., *Science*, 123, 309-314 (1956)

7. 業績

戸高惣史, 関根嘉香, 川西彩, 森町将司, 平林健一, 加川建弘: 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評価法の検討, 2022 年室内環境学会学術大会, 2022. 12, 東京, 本発表により大会長奨励賞ポスター賞を受賞

8. 謝辞

共同研究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、豊崎誠子講師、鈴木利貴央講師、青山泰之助教、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、東海大学医学部外科学系口腔外科学・加藤久視講師、かわぐち消化器内科・川口義明院長に感謝いたします。

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。

9. 倫理的配慮

本研究は、東海大学医学部臨床研究審査委員会 (承認番号: 20R011) の承認を得て実施した。

Appendix Dermal emission fluxes and odor quotient of 52 skin gases collected from healthy subjects (male, age:55-59, $n=3$) and pancreatic cancer patients (male, age:56-62, $n=3$)

	Dermal emission flux (ng cm ⁻² h ⁻¹)					Odor quotient	
	Healthy subject	CV(%)	Cancer patient	CV(%)	E_{ot}	Healthy	Cancer
1-Propanol	6.5 ± 3.5	54	1.1 ± 0.80	71	211	0.031	0.005
1-Butanol	3.7 ± 3.2	84	1.4 ± 1.2	83	105	0.036	0.013
1-Pentanol	3.0 ± 2.2	75	1.9 ± 1.8	93	329	0.009	0.006
1-Hexanol	1.6 ± 1.1	67	0.25 ± 0.30	123	23	0.070	0.011
1-Heptanol	1.2 ± 0.76	64	1.6 ± 2.1	127	21	0.057	0.078
1-Octanol	8.5 ± 6.9	81	2.0 ± 2.1	104	13	0.65	0.15
1-Nonanol	3.8 ± 3.8	100	0.86 ± 0.87	101	4.8	0.78	0.18
1-Decanol	11 ± 13	118	1.5 ± 1.8	117	4.5	2.4	0.33
2-ethyl-1-hexanol	0.53 ± 0.73	138	4.7 ± 2.0	43	55	0.010	0.085
Acetaldehyde	3.1 ± 3.9	125	97 ± 134	137	2.5	1.3	39.4
Propanal	4.9 ± 2.5	51	1.7 ± 1.9	112	2.2	2.2	0.78
Butanal	1.2 ± 0.38	32	0.62 ± 0.74	119	1.8	0.65	0.34
Isovaleraldehyde	14 ± 14.3	103	1.9 ± 0.84	44	0.32	43	5.9
Pentanal	1.2 ± 1.1	91	4.1 ± 2.1	50	1.3	0.92	3.1
Hexanal	1.2 ± 1.2	98	5.5 ± 6.6	119	1.0	1.1	5.2
Heptanal	1.2 ± 1.1	93	5.9 ± 3.4	57	0.77	1.6	7.7
Octanal	2.1 ± 1.0	46	2.4 ± 1.5	65	0.05	43	49
Nonanal	1.0 ± 1.3	127	13 ± 10	80	1.8	0.57	7.1
Decanal	0.89 ± 1.1	121	3.5 ± 1.8	50	2.3	0.38	1.5
2-hexenal	0.29 ± 0.2	85	0.27 ± 0.38	141	62	0.005	0.004
2-nonenal	2.4 ± 1.9	82	4.6 ± 2.6	56	0.42	5.7	11
Acetic acid	339 ± 265	78	177 ± 169	96	13	25	13
Propionic acid	0.93 ± 0.4	40	3.2 ± 0.51	16	16	0.059	0.204
Butanoic acid	2.3 ± 1.6	68	3.3 ± 4.0	121	0.63	3.7	5.2
Isovaleric acid	0.69 ± 0.74	107	0.42 ± 0.28	68	0.30	2.3	1.4
Valeric acid	0.81 ± 0.19	24	1.1 ± 0.63	56	0.14	5.7	8.0
Hexanoic acid	0.90 ± 0.35	38	1.5 ± 1.0	64	2.6	0.35	0.59
Heptanoic acid	2.1 ± 1.3	64	3.2 ± 2.0	64	2.9	0.72	1.1
Acetone	4.1 ± 2.6	63	2.2 ± 1.6	71	91059	0.00004	0.00002
2-Butanone	1.5 ± 1.0	64	6.5 ± 2.4	37	1184	0.001	0.006
2-Pentanone	4.4 ± 4.7	106	2.3 ± 0.87	38	90	0.049	0.025
2-Hexanone	1.4 ± 1.4	98	1.6 ± 2.2	133	90	0.016	0.018
2-Heptanone	0.95 ± 0.56	59	0.78 ± 0.53	67	29	0.033	0.027
Diacetyl	2.9 ± 0.68	24	4.95 ± 4.2	85	0.16	18	31
Benzaldehyde	0.52 ± 0.64	123	0.76 ± 0.51	67	2862	0.0002	0.0003
Phenol	0.091 ± 0.05	54	1.5 ± 1.5	102	20	0.0046	0.076
Toluene	0.34 ± 0.46	134	41 ± 54	130	1135	0.0003	0.036
Ethylbenzene	0.38 ± 0.48	125	1.2 ± 1.7	141	674	0.0006	0.002
m,p-Xylene	0.20 ± 0.21	110	1.8 ± 1.8	104	1981	0.0001	0.001
o-Xylene	0.015 ± 0.01	80	1.5 ± 1.3	92	1506	0.00001	0.001
Styrene	0.022 ± 0.01	33	0.92 ± 0.58	63	136	0.0002	0.007
p-Dichlorobenzene	4.2 ± 5.9	141	0.53 ± 0.52	100	82424	0.0001	0.0000
Geosmin	1.0 ± 0.38	38	0.042 ± 0.02	46	0.04	23	0.96
Indole	0.054 ± 0.08	138	0.82 ± 1.1	132	1.3	0.041	0.63
Skatole	0.048 ± 0.06	134	0.36 ± 0.19	51	0.03	1.7	13
α-Pinene	2.7 ± 1.2	44	0.86 ± 0.68	80	92	0.030	0.009
β-Pinene	1.8 ± 2.3	127	0.16 ± 0.14	87	168	0.011	0.001
d-Limonene	1.8 ± 1.4	76	0.24 ± 0.29	118	176	0.010	0.001
Methyl mercaptan	0.77 ± 0.59	76	4.2 ± 5.9	141	0.13	6.2	33
Ethyl mercaptan	0.99 ± 0.66	67	2.8 ± 3.6	129	0.02	49	140
Allyl methyl sulfide	0.55 ± 0.49	88	0.037 ± 0.05	141	0.46	1.2	0.081
Diallyl dimethyl sulfide	1.2 ± 0.84	72	0.08 ± 0.11	137	1.2	0.97	0.064

CV: coefficient of variation