| 課題番号 | 23 独先 18 |
|---|---|

【様式 5 独創的・先駆的研究】

# 学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕
# 実 績 報 告 書

令和　6 年　4 月 30 日

氏　　名：　松藤　寛
所属・資格：生物資源科学部・　教授
実施研究所：生物資源科学部・先端食機能研究センター

1　研究課題

| 非ベンゼン性有機蛍光物質を利用したスキンケア製品の開発と環境負荷低減技術の確立 |
|---|

2　研究期間

令和　5 年度　～　令和　6 年度

※令和　　年度　～　令和　　年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究組織

研究代表者及び研究分担者

| | 氏　　名 | 部科校・資格 | 役割分担 |
|---|---|---|---|
| 研究代表者 | 松藤　寛 | 生物資源科学部・教授 | 研究総括、非バイオ生産、NAPSFA 精製、定量法の開発、構造評価 |
| 研究分担者 | 岩淵　範之 | 生物資源科学部・准教授 | 安全性確認、廃棄物由来バイオ生産、ゲノム解析全般 |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

連携組織

| 組　織　名 | 役　割　分　担 |
|---|---|
| | |

※**ホームページ等での公開（☑可・□否）**いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。

| 課題番号 | 23 独先 18 |
|---|---|



4　現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として，以下の区分より自己評価を行ってください。
＜区分＞①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：　②　　】・【達成度：　45-50　%】

5　研究目的

我々は、バイオ・非バイオプロセスで低分子リグニン類を開環し、アミン・アミノ酸類と重合させることで、世界初の非ベンゼン性有機蛍光物質(NAPSFA)を生産できることを見出した。本蛍光物質は変異原性が無く、また無刺激物であり、従来品に比べ極めて生体毒性が低いことから、発光や可視化の従来用途に加え、新規用途が期待される有用な次世代化成品である。また、木質や食品バイオマス等を原料としても生産できる可能性があることから、SDGs に貢献した環境負荷低減技術への応用も期待される。本研究では、まず本蛍光物質の紫外線吸収能を利用してスキンケア製品への社会実装を試み、続いて未利用資源を原料とした環境負荷を低減させた生産技術の確立を目指す。

6　研究概要

本 NAPSFA は、植物抽出液や未利用の植物資源、食品廃棄物を資源とした Sustainability を考慮した生産が可能であり、かつ、その生産菌は東日本大震災の生態系のがれきに満ち溢れた海水より単離されたストーリー性があり、セールスポイントは高い。しかし、いまだ未知の部分が多く、有用と考えられるが、知名度が低いため社会実装の実績がない物質である。

それゆえ、以下に示すように、まずは可能な限り早い段階で社会実装し、認知度を上げる必要があることから、第一の目標を「スキンケア製品に配合できる状態にすること」に設定する。すなわち、さらなる安全性として、核遺伝子に影響を及ぼすかどうかの小核試験や染色体異常試験に加え、急性毒性試験や皮膚感作性試験などを実施し、より安全な物質であることを明らかにする。併せて、素材としての物質登録への取り組みや、バイオ生産中のゲノム解析、特に病原性遺伝子を有していないことを明らかにしながら、スキンケア製品への配合や試作を試みる。これは比較的早い段階で到達できるようにし、このようなモデル NAPSFA を廃棄物から調製できるようにするために、「森林および食品廃棄物を原料とした NAPSFA の効率的生産条件の確立」に着手する。廃棄物は複合系なため、微生物の培養条件やバイオ生産条件の最適化、さらに安全性や組成成分の分析を行い、種々の廃棄物を組み合わせながら NAPSFA 生産の最適化や蛍光特性を解析し、モデルデータとの比較を行いながら、これらのスキンケア製品への配合・試作も試みる。また、同時に、さらなる付加価値を高めるため、「NAPSFA の発光メカニズムの学術的解明とマルチカラー化への取り組み」を実施する。既報に基づく凝集化やクラスター化、また硫黄などのヘテロ原子の取り込み導入から発光メカニズムを解析し、青色だけでなく、緑色や黄色や赤色などに発光するマルチカラー化を試みる。

以上、森林廃棄物と食品廃棄物を原料とした NAPSFA を利用したスキンケア製品を試作すること、また廃棄物を効率的に利用したバイオ生産並びに環境負荷低減技術スキームを確立することが本研究の目的である。

| 課題番号 | 23 独先 18 |
|---|---|



## 本研究の目標と実施計画

| 項目 | 担当者 | 具体的な内容 | 2023 前半 | 2023 後半 | 2024 前半 | 2024 後半 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1．スキンケア製品に配合できる状態にすること | | | | | | |
| 安全性の解明 | 松藤・岩淵 | 小核試験・染色体異常試験・急性毒性試験・皮膚感作性試験等の安全性試験 | → | → | → | |
| 物質登録への取り組み | 松藤 | 全成分表示名称(INCI)登録申請のためのバイオ・非バイオNAPSFA物質情報解明 | → | → | → | |
| ゲノム解析 | 岩淵 | 生産プロセス中の遺伝子発現解析・病原性遺伝子の有無解析 | → | → | → | |
| スキンケア製品の配合・試作 | 玉理化学・タイキ | 提供試料による試作と配合の最適化・データのフィードバック | | → | → | → |
| 2．森林および食品廃棄物を原料としたNAPSFAの効率的生産条件の確立 | | | | | | |
| 廃棄物の組み合わせの最適化と解析 | 松藤・岩淵 | NAPSFAの効率的生産の廃棄物の組み合わせ検討と蛍光特性解析 | | → | → | → |
| 廃棄物の組成分析 | 松藤・伊藤園 | 廃棄物の提供、主成分の分析と効率的生産のための廃棄物の簡易精製法の開発 | | → | → | |
| 微生物・バイオ生産の最適化 | 岩淵 | 廃棄物に対する微生物影響とNAPSFAの生産性 | → | → | | |
| 廃棄物の安全性 | きのこセンター | 木材廃棄物の探索・提供と有害金属の分析 | → | → | → | |
| 3．NAPSFAの発光メカニズムの学術的解明とマルチカラー化への取り組み | | | | | | |
| 発光メカニズム解明とマルチカラー化 | 松藤・岩淵 | 既報に基づく凝集化、クラスター化、ヘテロ原子の導入などによるマルチカラー化への試みと発光特性の変化 | → | → | → | → |

| 課題番号 | 23 独先 18 |
|---|---|



7　研究結果（4,000 字以上記入のこと）

7-1　バイオ生産された NAPSFA-B52SYAC の安全性について

表 1 に NAPSFA-B52SYAC のこれまでに得られた安全性試験結果を示す。今年度は、眼刺激性試験と単回投与毒性試験（急性毒性試験）を実施し、どちらも陰性であることが判明した。すなわち、10%水溶液 0.1mL をウサギの眼に点眼したところ、72 時間後においても全く変化なく、一般状態も良好で、「刺激性なし」と判定された。また、2000 mg/kg を SD ラットに単回経口投与し、14 日間観察したところ、一般状態、体重および剖検において影響は全く認められず、単回経口投与したときの最小致死量は 2000 mg/kg を上回ると推定された。動物種によるが、$LD_{50}$（実験動物の半数が致死する量）は、カフェインでは 200 mg/kg 程度、食塩では 3000 mg/kg 程度、砂糖では 29700 mg/kg と言われていることから、バイオ生産された NAPSFA-B52SYAC は食品成分と変わらない程度の安全性（急性経口毒性）を有すると推定された。なお、これらの試験は動物実験委員会の承認を受け実施され、外部委託であることを付記する。

化粧品原料の一般的な安全性試験において、未実施項目はあるものの、実施した試験はいずれも最高投与量でも影響は観察されず、陰性と判定され、バイオ生産された NAPSFA-B52SYAC は、その安全性が極めて高いことが改めて判明した。

**表1．バイオ生産されたNAPSFA-B52SYACの安全性について**

**化粧品原料の一般的な安全性試験**

| 試験種 | 実施結果 ＊すべて外部委託 | |
|---|---|---|
| 単回投与毒性試験 | **陰性** | N-3213<br>(承認番号G240007) |
| 皮膚一次刺激性試験 | **陰性** | N-I752<br>(承認番号K210163) |
| 連続皮膚刺激性試験 | **未実施** | |
| 皮膚感作性試験 | **未実施** | |
| 眼刺激性試験 | **陰性** | N-I827<br>(承認番号K230212) |
| 復帰突然変異試験 | **陰性** | N-T8106<br>(TA1535, TA1537, TA98, TA100, WP2uvrA) |
| 染色体異常試験 | **(未実施)** | |
| 光毒性試験 | **陰性** | N-G401<br>(BALB/3T3 Clone A31細胞) |
| 皮膚光感作性試験 | **未実施** | |
| ラット骨髄を用いた*in vivo*小核試験　（陰性） | | N-M290<br>(承認番号G220174) |

| 課題番号 | 23 独先 18 |
|---|---|



7-2　NAPSFA の定量法の開発と詳細な化学構造解明に向けた取り組みについて

NAPSFA は平均分子量 4.2－7.2 kD とポリマー分子であること、また含水アルコール以外の有機溶媒にはほとんど溶解しないため、これまで分離分析に優れている逆相クロマトグラフィーでの分析は困難であった（図 1 左上）。そのため、NMR 等を用いた構造解析においても、混合物であるために詳細な化学構造を明らかにすることができず、また分光蛍光光度計を用いた不十分な半定量法しか構築できておらず、このことは物質登録の障壁になっていた。

本研究において、様々な HPLC 用カラムを検討したところ、JASCO 社製 J-Pak Vario PAH カラム（5μm, 200 Å, 4.6×250 mm）を用いた逆相クロマトグラフィーにより、NAPSFA の分離分析が可能となり、NAPSFA は複数の蛍光成分からなることが初めて明らかとなった。これにより、NAPSFA の LC 定量法の開発ならびに、精製・単離、構造解明に向けた取り組みが可能となった（図 1 上段）。

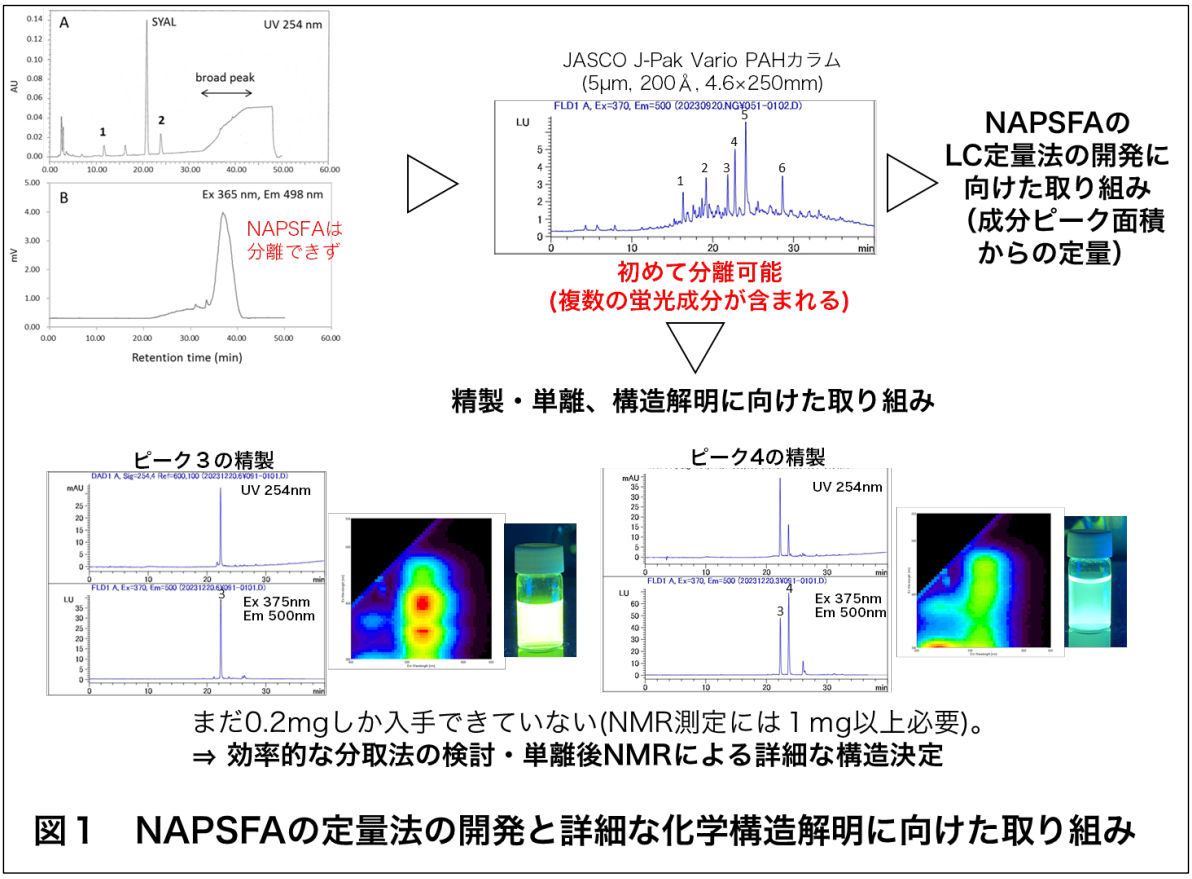



**図１　NAPSFAの定量法の開発と詳細な化学構造解明に向けた取り組み**

一方で、J-Pak Vario PAH カラムは内径が大きな分取カラムが市販されておらず、メーカーに特注品の作製を依頼したが叶わなかった。そのため、上記の分析用カラムでの繰り返し 200 回以上の分取を試みたが、0.2mg 程度しか入手できず、NMR 測定には至らなかった（図 1 下段）。さらに、2023 年秋に Vario PAH カラムの製造が中止になり、目的カラム（Vario PAH）の再購入が困難になる問題も生じた。

〔7　研究結果（つづき）〕

ただ、今まで困難と思われていた NAPSFA の分離がカラム特性（特にポアサイズ）により逆走粗クロマトグラフィーによる分離が可能であることが判明したことから、その特性に基づく検討を行ったところ、Phenomenex 社製 Jupiter C18 カラム（5μm, 300 Å, 4.6×150 mm)もまた分離分析が可能であることが判明した（図 2)。本カラムは分析用だけでなく、分取用カラム（21.2×250mm）も存在し、また UHPLC-MS 用のカラム（Kinetix コアシェルカラム）も同様に NAPSFA を分離できることが判明したことから、今後は分取カラムによる精製・単離（単純計算で 20～25 倍の分取量の向上）ならびに LC-MS による構造解明に向けた取り組み、さらには LC 定量法の開発に向けた取り組みが加速度的に可能となることが期待された。

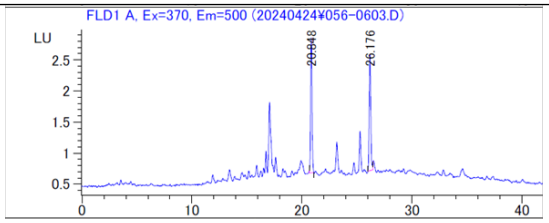


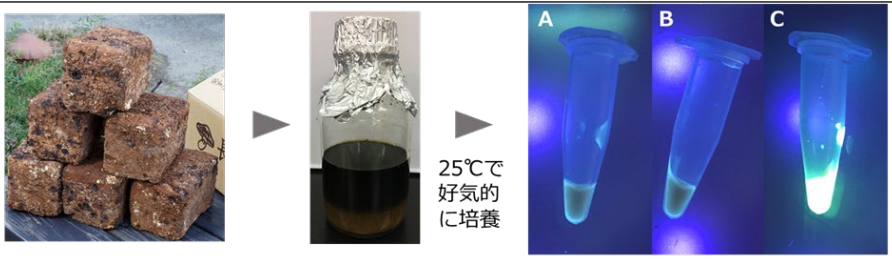

**図２　Jupiter C18カラムを用いた逆相クロマトグラフィー**

7-3　ターゲット物質生産に適した森林廃棄物と食品廃棄物の探索と生産性の効率化

これまでの NAPSFA の生成メカニズムから、森林廃棄物は低分子リグニンの供給源として、食品廃棄物はこれらの相手となるペプチドの供給源としての位置づけとなる。

一方で、実際の実験に着手する前に、キノコ廃菌床の熱水抽出物に数～数十 nmol/L 程度のシリンガ酸やバニリン酸が含まれることが、日本食品科学工学会第 68 回(2021)大会で報告されている。廃菌床は、有効な活用法が求められている森林由来の産業廃棄物であり、熱水抽出でシリンガ酸等が水相中に遊離してくることは、当初想定していた木粉廃棄物や廃茶葉などより低分子リグニン抽出の工程が簡便であることから、廃菌床を第一選択肢して検討することとした。千葉県佐倉市、神奈川県愛甲郡愛川町のキノコ業者、キノコ農家よりシイタケ栽培後の廃菌床を入手し、粉体化した後、10%(w/v)で LB 培地に直接添加し、

オートクレイブにより熱水抽出を試みた。得られた LB 培地を使って、バイオプロセス、非バイオプロセスにより蛍光物質が生産されるか否かを検討したところ、用いたサンプルにより差はあるものの、総じて蛍光物質が生産されることが示唆された（図 3)。




キノコ廃菌床を乾燥、粉末化し、10%(w/v)でLB培地に添加し、オートクレイブした

A, B52株を接種; B, 菌の接種無し;
C, LB+SYACにB25株を接種

**図3. キノコ廃菌床を基質とした蛍光物質の生産**

さらに、市販の牛乳を用い、水で 3 倍に希釈後、酢酸を添加して pH4.6 に調整した。静置後、沈殿物を、メタノール、ジエチルエーテル - メタノール混液(4:1=v/v)、アセトンで順次洗浄し、風乾して粗カゼインを入手した（牛乳 1L から 37.8g)。次いで、市販パンクレアチン酵素を用いて、40℃、6 時間反応させ、粗カゼイン-パンクレアチン分解液を調製した。これを各種芳香族化合物と反応 pH を変化させながら、蛍光発光試験を試みたところ、シリンガ酸との混合（pH10）が最も強い蛍光を示し、これまでとほぼ同等の蛍光物質の生産が可能であることが判明した（図 4)。一方、そのメカニズムはまだ明らかになっていないが、NAPSFA の生産速度（生産効率）には培地の pH（アルカリ化）や低分子リグニンの加熱分解が深くかかわっていることが分かってきている。これらメカニズムを明らかにすることで、効率的な NAPSFA の生産が可能になると予想される。

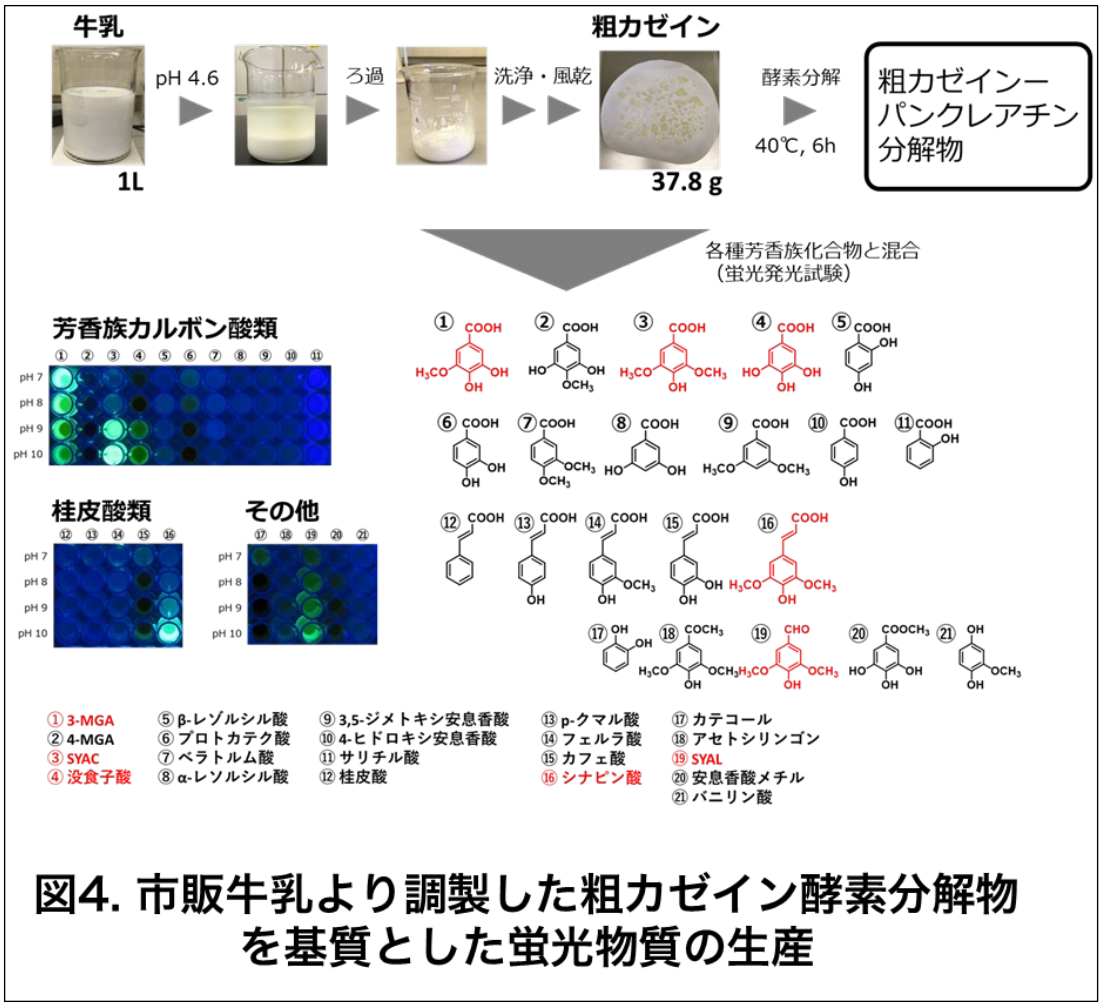



**図4. 市販牛乳より調製した粗カゼイン酵素分解物を基質とした蛍光物質の生産**

7-4　NAPSFA 生産株のゲノム解析

先行研究において、最も機能的で応用利用が可能な NAPSFA は、SYAC を基質として *Pseudomanus* sp. ITH-B-52 株(B-52 株)によるバイオプロセスで生産されたサンプルであることが見出されている。本サンプルは、分子量 7.0 kDa、Ex. 353、Em. 510 のスペクトルを有し、液体／個体両方の状態で蛍光活性を有し、かつ、ある種の金属塩が固体状態で通電することが確認されている。有機蛍光物質において、これらの性質は非常に有効であることから、B-52 をバイオ生産株の第一の候補として、まずは次世代シークエンサーを用いたゲノム解析を行った。

シーケンシングライブラリーの調製は、基本的にメーカーのプロトコールに従って行った。B-52 株のゲノム DNA 200 μg を平均サイズ 300～350 bp にランダムに断片化し、フラグメントを End Prep Enzyme Mix で処理して末端修復、5’ リン酸化および 3’ アデニル化を行い、両端にアダプターを追加した。 次に、アダプターが結合した DNA のサイズ選択を DNA Cleanup により精製し、各サンプルを P5 および P7 プライマーを使用して増幅した。得られた PCR 産物は、Agilent 2100 Bioanalyzer を使用して品質チェックを行った後、illumina Hiseq Xten/Novaseq/MGI2000 システムで配列を決定した。得られた配列は、SSPACE と GapFiller 等で修正され、 Prodigal によりゲノム内のコード遺伝子を検討した。 なお、 tRNA は、tRNAscan-SE を使用して、rRNA は Barrnap を使用して同定された。遺伝子のアノテーションには、National Center for Biotechnology Information (NCBI)、Gene Ontology (GO)、Clusters of Orthologous Groups (COG)などのデータベースを用いて解析した。

その結果、B-52 株のゲノムは、約 4.8 Mb であり、GC 含量は 54.6%であった。ゲノム中には約 4500 の遺伝子が見出され、そのうち Protein-coding genes は約 4400 であり、現在のところ、この中の約 80%が COG で機能分類された。一方で、低分子リグニンの代謝に関する既知の遺伝子は、これらの解析では直接的には見出されなかった。今後、より詳細な解析を行う予定である。

7-5　NAPSFA の社会実装に向けた取り組みについて

さまざまな既製のスキンケア製品に NAPSFA を添加し、蛍光の様子を観察した（図５）。図に示すように、強く蛍光を示すものもあれば、全く蛍光を示さないものも認められた。

現在、薬事法に基づく化粧品の承認許可・表示等の規制（平成 11 年 7 月 19 日）においては、ポジティブリスト化され、またすべての化粧品に配合制限があるもの（6 種類）と化粧品の種類により配合制限があるもの（27 種類）があり、またそれぞれに最大配合量が定められている。また、酸化チタン、酸化亜鉛および酸化セリウムに代表されるような紫外線散乱剤もあり、これらの紫外線防御成分が目的に応じて配合されている。一方で、紫外線吸収剤の配合をできる限り低減させることを目的に、紫外線吸収助剤として、天然物エキスなどが配合されているものもあり、オリザノールや○○エキスと表記されている既製品中の紫外線吸収剤の配合量は少ない可能性がある。しかし、既製品であるため、配合の有無については表示から判断できるが、その配合量については不明である。

結果として、NAPSFA の蛍光が認められた既製品の多くは紫外線吸収剤が未配合のものが多く、紫外線吸収剤は NAPSFA の蛍光を妨害する可能性が示唆された。しかし、紫外線吸収剤を含有してても（表記されていても）蛍光を示すものもあれば、未含有（無表記）で蛍光を示さないものもあり、蛍光に影響を及ぼす成分については更なる検討が必要と考えられた。




**図５．既製スキンケア製品へNAPSFAを添加したときの蛍光の様子**

【成果と今後の予定】

本年度実施した研究の成果により、新たな情報が更新され、それを基に以下に示す科学研究費基盤研究(B)を申請し、採択された（令和 6 年－ 8 年)。

「非ベンゼン性有機蛍光物質の未利用バイオマスからの生産と環境負荷低減技術へ応用」(研究代表者：岩淵範之、研究分担者：松藤寛、土屋雄揮）(24K03122)。

なお、下線は本学術研究助成の研究代表者と研究分担者である。

また、NAPSFA の安全性（急性毒性陰性）が確保されたことから、ステージが進み、次年度においてはさらに薬物動態研究も行うこととし、薬物動態の会社を今後組織化することを計画している。