環境・資源循環型リグニン素材の開発
健康系リグニン素材

関 範雄[*1]、原 英彰[*2]

Design of Ecological and Flowed-Reusable Materials from Lignin
Lignin-based Materials Adapted to Maintaining One's Health

Norio SEKI [*1], Hideaki HARA [*2]

タケから誘導・分離したリグノフェノールをカルボキシメチル（CM）化した。この水溶性 CM 化リグノフェノール誘導体（CM-LPD）は、小胞体ストレスによる細胞死（アポトーシス）に対して、高い抑制作用を示し、細胞に小胞体ストレスを与える虚血様環境下において、10μM の添加濃度でアポトーシスを 90%以上抑制した。さらに、マウスの眼に小胞体ストレスを与え、CM-LPD を直接投与した結果、網膜神経節細胞数および網膜内網状層厚の減少を抑制し、網膜視神経細胞の保護効果が認められた。

1．緒言

自然界におけるリグニン

生物界・自然界では植物は、生産者として太陽の光をエネルギー源として二酸化炭素と水から光合成を行う。炭水化物（デンプンやセルロース）を作り、さらに、窒素や各種ミネラルを組み合わせて、タンパク質や脂肪などを作り出す。植物によって作られるこれら栄養は、第一次消費者である草食動物によって利用され、草食動物を次の第二次、三次…消費者の動物が利用する。最終的に生物の死骸やフンなどは、細菌、菌類などの分解者によって分解され、生物を構成していた有機物は、無機物と水と二酸化炭素まで分解され、ふたたび生産者に利用される日まで自然の中を循環する。このような物質循環が自然界には食物連鎖として存在している。生物間では捕食、被食の関係の中で、生物は種を維持するためにお互い共生しなければならない。共生できなければ、バランスが崩れ、自然淘汰される。

植物、特に高度に進化した高等植物は、必ず炭水化物とリグニンの成分から構成され、これら成分は植物としての形状を維持するためには必要不可欠な成分である。一般的には、前述の食物連鎖のとおり植物の炭水化物やタンパク質、その他微量有機成分は栄養素として利用される。リグニンは食物連鎖には関係のない物質として、植物の形状維持のための物質としてのみ植物から生産され、リグニンは食物連鎖の消費者にとって重要な物質であるとは考えられていない。一方、最も進化している高等植物に必ず30%程度もリグニンが含まれることは、植物を捕食する動物にとって望ましいことではなく、リグニンは植物から排除されるべき物質であること、さらに生物界での共生関係を考えると、リグニンを有する植物は自然淘汰されなければならないと考えられる。しかし、実際の自然界では全くの逆でリグニンを含む植物が繁栄を誇っている。つまり、植物を食料とする動物にとって、リグニンが植物に含まれなければならない重要な理由があると考えることができる。

我々は植物に含まれる炭水化物が動物にとってエネルギー源、栄養源であるならば、リグニンは健康維持、体調管理をする重要な機能があるのではないかと仮定した。そして、相分離変換システムによって得られ、天然リグニンの分子構造を高度に保持するリグノフェノールに関し、我々はその水溶性誘導体の様々な生理活性機能を開発してきた。近年では、動物の細胞死（アポトーシス）

[*1] 産業技術センター紙研究部
[*2] 岐阜薬科大学薬科学科生体機能解析学大講座

を保護する機能を見出している[1, 2]。

視神経細胞のアポトーシス

プログラム化細胞死の一形態であるアポトーシスは、眼疾患における病態に関与することが解明されつつある。例えば、虚血−再灌流による網膜障害[3]、網膜剥離[4]、網膜色素変性症[5, 6]、網膜光障害[7]、緑内障[8, 9]などは、いずれも網膜神経細胞の一つである網膜神経節細胞(RGC)のアポトーシスが関与していると報告されている。つまり視機能障害の原因は多様であるが、結果的に視機能障害は視覚情報ネットワークを構成している神経細胞のアポトーシスによる可能性が高いといえる。そして、網膜神経細胞に対して保護効果を有する物質は、各種の網膜疾患や眼疾患の予防や治療に有用であることが期待される。

本研究では、健康系リグニン素材として水溶性CM化リグノフェノールの細胞死保護機能に注目し、視神経細胞に対する機能について検討を行った。

2．実験

2.1 健康系リグニン素材（水溶性リグノフェノール）

2.1.1 材料

タケ（*Phyllostachys bambiusoides*）粉末を用いた。

リグニンに導入するフェノール誘導体として、p-クレゾール、バニリンを用いた。

2.1.2 リグノフェノールの調製

相分離変換システム（Two Step Process -Process II-）を応用した[10]。タケ試料の含有リグニン量に対してC_9単位当たり2 mol倍量のリグニン導入フェノール誘導体をエタノールに溶解した。このエタノール溶液をタケ粉末試料に加え、室温で徐々にエタノールを揮発、乾燥させ、フェノール誘導体収着試料を調製した。その後、この収着試料に68%硫酸（4 ml/g粉末試料）を加えた。所定時間撹拌終了後、反応系を大過剰の水に投入、水に投入後の硫酸濃度は5%程度まで低下させた。その時生じる不溶解沈殿物を遠心分離にて分離した。分離した不溶解沈殿物に含まれる硫酸および未反応のフェノール誘導体を取り除くため水で洗浄、遠心分離を繰り返した。その後、この沈殿物を凍結乾燥した。この沈殿乾燥物からリグノフェノールを抽出するため、乾燥物に抽出溶融機溶媒を加え、一昼夜撹拌、不溶解物を遠心分離にて取り除いた後、抽出溶液をエバポレータにて濃縮した。抽出溶液は大過剰のジエチルエーテルに滴下され、その不溶解沈殿物を遠心分離、洗浄し、五酸化二リン上で減圧乾燥後、各種リグノフェノールを得た。なお、フェノール化合物の導入量はＮＭＲ解析により測定し、p-クレゾール、バニリンを導入したリグノフェノールをそれぞれPLD-Cre、PLD-Vanとした。

2.1.3 水溶性リグノフェノールの調製

相分離変換システムによって得られたリグノフェノールをその水溶性誘導体へと変換するため、カルボキシメチル (CM) 化を行った。CM化処理には関らの方法[11]を応用し、水溶性CM化リグノフェノール（CM-LPD）を得た。なお、カルボキシメチル基量はNMR解析及び水酸化テトラ-n-ブチルアンモニウムを用いた非水系電位差滴定により算出し、p-クレゾール、バニリン導入リグノフェノールのCM化誘導体をそれぞれCM-PLD-Cre、CM-PLD-Vanとした。

2.2 健康系リグニン素材の機能

2.2.1 低酸素・低グルコース（OGD）誘導性の虚血様細胞死に対する作用

コラーゲンコートされた24ウェルプレート上にPC12細胞を2×10^5細胞／ウェルとなるように播種し、10%ウマ血清と5%牛胎児血清を含有させたダルベッコ変法イーグル基礎培地にて2日間培養した。培養2日後、虚血様細胞死を誘導するため、低酸素・低グルコース(OGD)処理を行った。OGD処理としては、グルコースを含有しないダルベッコ変法イーグル基礎培地（溶媒）に培地を交換し、あるいは、培地をCM-LPD（1 μM、3 μM、10 μM、30 μM）添加のグルコースを含有しないダルベッコ変法イーグル基礎培地に交換し、その後、低酸素処理として雰囲気を94% N_2、5% CO_2、1% O_2 条件に変更し、4時間培養した。OGD処理後、1 g/l グルコース、1 % 牛胎児血清になるようにグルコースおよび牛胎児血清を培地に加え，18時間培養（37 ℃、5% CO_2）した。その後、レサズリン還元法により細胞の生存率を算出した。すなわち、培地にレサズリン溶液を加え、1時間インキュベートし、この各群の蛍光強度を測定（励起波長560 ｎｍ、蛍光波長590 ｎｍ）した。濃青色のレサズリンは生存細胞によって還元されピンク色の蛍光を発するレゾルフィンに変換されるため、蛍光強度が生存細胞数に相関する。OGD処理を全く行なわなかったコントロールの蛍光強度を細胞生存率（100 %）として、各群の蛍光強度との差から対照群に対する各群の生存率を算出した。

2.2.2 Tunicamycin誘導細胞死に対する作用

コラーゲンコートされた96ウェルプレート上にPC12細胞を2×10^5細胞／ウェルとなるように播種

し、10 % ウマ血清と5 % 牛胎児血清を含有させたダルベッコ変法イーグル基礎培地にて2日間培養した。培養2日後、培地を1%牛胎児血清を含有させたダルベッコ変法イーグル基礎培地（溶媒）に交換し、あるいは、培地をCM-LPD（1 μM、3 μM、10 μM、30μM）添加の1%牛胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル基礎培地に交換した。培地交換の1時間後、培地中のTunicamycin濃度が2 μg/mlになるようにリン酸緩衝食塩水（0.1 % ジメチルスルホキシド含有）で希釈しながらTunicamycinを投与し、24時間培養（37 ℃、5% CO_2）し、Tunicamycin処理を行った。その後、レサズリン還元法により細胞の生死判定を行った。Tunicamycin処理を全く行なわなかったコントロールを細胞生存率（100 %）として、それぞれの生存率を算出した。

2.2.3 NMDA投与による網膜障害モデルマウスに対する作用

ddy系雄性マウス（体重；36ー39g、日本ＳＬＣ（株））に小動物用麻酔器（笑気ガス70 %、酸素ガス30 % 環境下）を使い、イソフルランにて麻酔（麻酔導入時；2 % イソフルラン、麻酔維持時；1 % イソフルラン）を行った。その後、10 mM　N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）を含有する生理食塩水（NMDA溶媒）を注射針にてマウス硝子体内に投与　（NMDA投与量；2 nmol/eye）し、または、NMDA投与と同時にCM-LPD含有生理食塩液をマウス硝子体内に投与（NMDA投与量；2 nmol/eye、CM-LPD投与量；0.01 nmol/eyeまたは0.1 nmol/eye）し、網膜障害モデルマウスを調製した。なお、網膜障害モデルマウスには抗炎症の目的でNMDA投与直後にレボフロキサシン点眼液（参天製薬株式会社）を点眼した。NMDA投与7日後に組織学的解析のために、マウスの眼を頸椎脱臼後に摘出した。摘出後、それぞれの眼に固定液である4 % パラホルムアルデヒド溶液を硝子体内投与し、その溶液に4 ℃下で少なくとも24時間以上浸した。パラフィン包埋、薄切し、ヘマトキシリン–エオジンで染色した病理組織切片6枚（4 μm厚）を作製した。網膜神経障害を評価するサンプルは、片眼につき視神経乳頭部が入るように採取した6枚の切片のうち無作為に3枚の切片を選択し、組織学的解析に用いた。選択した切片について、視神経乳頭から375 μmー625 μm間の網膜の写真撮影を行い、網膜における網膜神経節細胞　（RGC）　の数および内網状層（IPL）の厚さを計測し、組織学的解析を行った。

3．結果と考察

3.1 リグノフェノールおよびCMリグノフェノールの特性

タケ由来PLD-CreおよびPLD-Vanの重量平均分子量はそれぞれ7200、5050であり、それぞれにおけるクレゾールおよびバニリン導入量は28wt%、29wt%であった。PLD-Cre、PLD-Vanから誘導されたCM化水溶性誘導体の重量平均分子量およびカルボキシメチル基量は、CM-PLD-Creが5330、11.6wt%、CM-PLD-Vanが4500、20wt%であった。

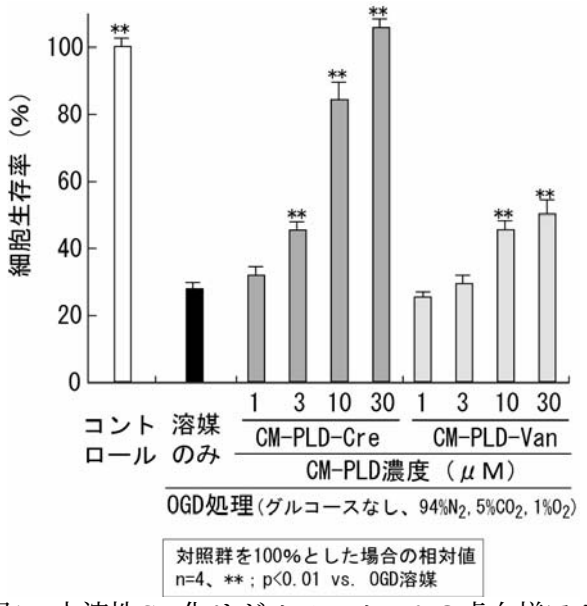

図1　水溶性CM化リグノフェノールの虚血様アポトーシスに対する抑制作用

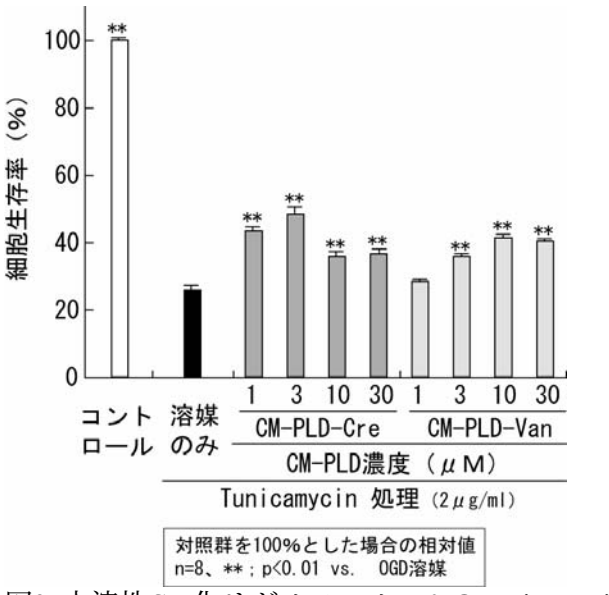

図2 水溶性CM化リグノフェノールのTunicamycin誘導アポトーシスに対する抑制作用

3.2 健康系リグニン素材の機能

3.2.1 低酸素・低グルコース誘導性虚血様細胞死に対する作用

細胞に酸素や栄養の供給が不足すると、細胞内の小器官である小胞体が異常を起こし、細胞死（アポトーシス）に至る。網膜神経細胞がアポトーシスに至ると視神経障害が引き起こされる。そこで低酸素・低グルコース（OGD）誘導から起こる小胞体ストレスによる（虚血様）アポトーシスに対するCM-PLDの作用を検討した結果（図１）、CM-PLDは虚血様アポトーシスに対して濃度依存的に顕著に抑制した。特に、クレゾールを導入したリグノフェノールから誘導した水溶性CM-PLD-Creは10μMの添加濃度でアポトーシスを90%以上抑制し、30μMではほぼ完全にアポトーシスを抑制した。

3.2.2 Tunicamycin誘導細胞死に対する作用

Tunicamycinは、ヌクレオシド系抗生物質でN-アセチルグルコサミンと類似した構造を有するため、糖供与体ウリジン２リン酸-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) からN-アセチルグルコサミンの転移酵素（ポリペプチド転移酵素あるいはO-GlcNAc転移酵素 (OGT)）やUDP-GlcNAcと結合し、酵素活性を阻害する。これにより、細胞の小胞体に異常タンパク質が過剰に蓄積され小胞体ストレスが惹起され、アポトーシスが誘発される。網膜障害は、このような小胞体ストレス誘導によっても引き起こされることが知られていることから、Tunicamycinによって誘発されるアポトーシスに対するCM-PLDの作用を検討した。その結果、図２に示すように、CM-PLDが存在することにより細胞死を約50%抑制した。CM-PLDは、OGD誘導性の虚血様アポトーシスの場合のような極めて高い抑制作用は示さなかったが、Tunicamycin誘導アポトーシスに対して有意な抑制効果を示した。

3.2.3 ＮＭＤＡ投与による網膜障害モデルマウスに対する作用

Ｎ-メチル-Ｄ-アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）は、神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体のひとつであるＮＭＤＡ受容体に結合することにより細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度を上昇させアポトーシスを引き起こさせる。正常眼圧緑内障発症メカニズムでは、その下流においてＮＭＤＡ受容体が関与していることから、アメリカではＮＭＤＡの拮抗剤（メマンチン）が正常眼圧緑内障の臨床試験段階にある。そこで、マウスの硝子体にＮＭＤＡを直接投与してin vivo網膜障害モデルマウスを調製し、また、CM-PLDを硝子体内に直接投与することによる網膜細胞に対する作用を検討した。

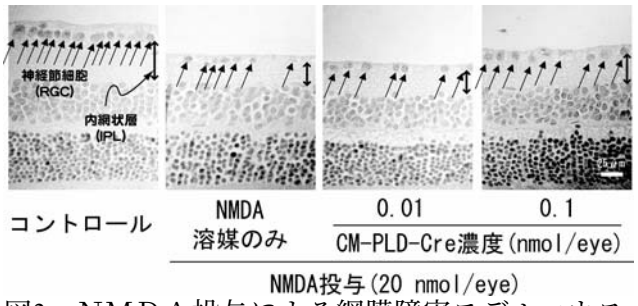

図3　ＮＭＤＡ投与による網膜障害モデルマウス網膜断片の神経組織像

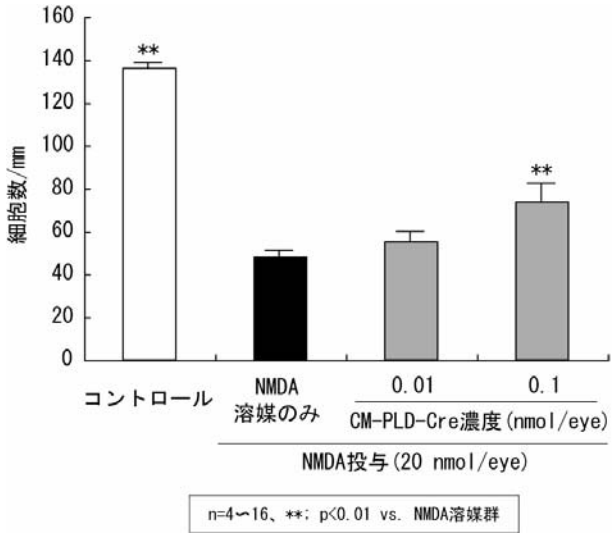

図4　水溶性CM化リグノフェノールの網膜神経節細胞の数に及ぼす影響

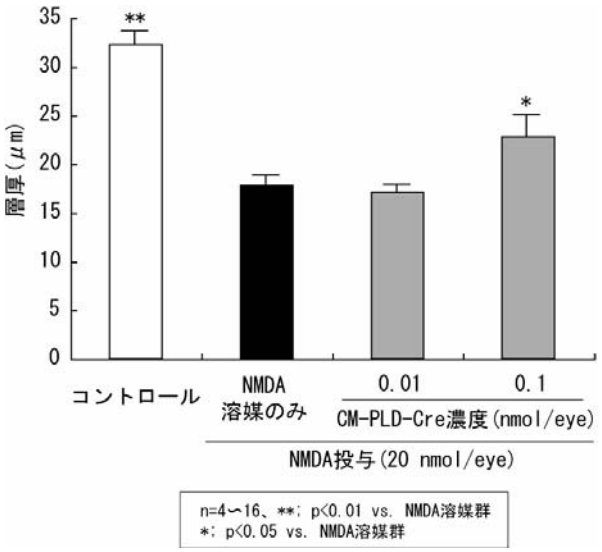

図5　水溶性CM化リグノフェノールの網膜内網状層の厚さに及ぼす影響

典型的な網膜断片の神経組織像をそれぞれ図3に示すように、CM-PLDの硝子体内投与によって網膜神経細胞は顕著に保護されたことが確認できる。また、コントロールと比較して、ＮＭＤＡを硝子体内に投与したマウスの網膜神経節細胞層中の神経節細胞（RGC）の数（図4）は、130.4±0.9(mm^{-1})から46.0±1.6(mm^{-1})に約65％減少し、内網状層（IPL）の厚さ（図5）は、32.8±2.0(μm)から18.0±1.0(μm)に約45%菲薄化した。一方、ＮＭＤＡの硝子体内への投与に加え、CM-PLD（0.1 nmol/eye）を投与した場合、RGCの数は70.2±8.1(mm^{-1})になり、IPLの厚さは22.9±2.3(μm)になり、それぞれ約46%減少し、約30%菲薄した。以上のことからも、CM-PLDの投与によって有意な網膜神経細胞保護作用が認められた。

4．まとめ

タケリグニンから誘導した水溶性のCM-LPDは、OGD誘導による虚血様状態での小胞体ストレスやTunicamycin誘導による小胞体ストレスから引き起こされる細胞のアポトーシスを、細胞レベルで、顕著に抑制した。CM-LPD-Creは、OGD誘導アポトーシスを30μMの投与でほぼ完全にアポトーシスを抑制した。

アポトーシスを引き起こす因子には、小胞体ストレスの他に、活性酸素などによる酸化ストレスなどがある。しかし、酸化ストレスによるアポトーシスを抑制するTololoxやEdaravoneなどの抗酸化剤は、Tunicamycin誘発細胞死に対してカルシウム拮抗剤などは効果を示さないこと[12)]からも、アポトーシスを誘発する因子によってアポトーシス抑制メカニズムは異なる。CM-LPDについては、活性酸素などによる酸化ストレスによるアポトーシスの抑制効果も確認されており、各種のアポトーシスに有効なユニークな抑制機能であった。

さらに、CM-LPDは*in vivo*網膜障害モデルマウスに対して、そのマウス網膜の組織学的解析から網膜神経節細胞や内網状層を有意に保護することが認められ、緑内障や網膜疾患などの眼疾患に対する予防剤や治療剤として有効である可能性が期待される。

文献

1) Seki, N., Ito, K., Hara, T. and Funaoka, M.：*Trans. Material Res. Soc. J.*, 29, 5, 2471-2474 (2004).
2) 特願2003-030053
3) Lam, T. T., Fu, J., Hrynewycz. M., Tso, M. O.,：*J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 11, 253-259 (1995).
4) Chang, C. J., Lai, W. W., Edward, D. P., Tso M. O.：*Arc. Ophthalmol.*, 113, 880-886 (1995) .
5) Portera, C. C., Sung C. H., Nathans J,, Adler R.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 974-978 (1994).
6) Tso, M. O., Zhang, C., Abler. A. S., Chang, C. J., Wong, F., Chang, G. Q., Lam. T. T.：*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35, 2693-2699 (1994).
7) Naash, M. L., Peachey, N. S., Li, Z. Y., Gryczan, C. C., Goto, Y., Blanks, J., Milam, A. H., Ripps, H.：*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37, 775-782 (1996).
8) Quigley, H. A., Nickells, R. W., Kerrigan, L. A., Pease, M. E., Thibault, D. J., Zack, D. J.：*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36, 774-786, (1995).
9) Garcia, V. E., Shareef, S., Walsh, J., Sharma, S. C.：*Exp. Eye Res.*, 61, 33-44 (1995).
10) Funaoka, M.， Matsubara, M.， Seki, N., Fukatsu, S. ： *Biotechnol. Bioeng.* 46，545-552 (1995).
11) 関範雄、伊藤国億、原敏夫、舩岡正光：岐阜県生活技術研究所研究報告，No.5，pp.26-33，2003.
12) 嶋澤雅光：第2回岐阜脳科学研究会講演要旨集，pp.12-25，2005.