

(別紙様式博 5)

学位論文要旨

学位授与申請者

福永 祥子

題目：トルラ酵母由来グルコシルセラミドのヒト皮膚状態の変化，およびメラノーマ細胞におけるメラニン生成と線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮に対する効果の検討

本研究は，産業廃棄物として処理されていたトルラ酵母残渣から抽出されたグルコシルセラミド (GlcCer) に着目した。安定供給法が確立されたトルラ酵母由来 GlcCer を用いて，経口摂取によるヒト皮膚状態への影響，細胞によるメラニン生成およびコラーゲンゲル収縮作用に関して，ヒト試験の臨床試験から細胞実験による生化学的解析まで行い評価した。

第 1 章 序論

本研究で用いたトルラ酵母 (*Candida utilis*) 抽出物およびトルラ酵母由来 GlcCer は，既製品の製造過程で出る産業廃棄物であるトルラ酵母残渣からの抽出方法が確立されているため，低コストで供給できる。トルラ酵母は，連続発酵システムによって農作物より品質変動が少なく，安定供給が可能である。さらに GlcCer 含有量が 0.15% と比較的高い。トルラ酵母由来 GlcCer は，植物由来の GlcCer には存在しないスフィンゴイド骨格の 9 位にメチル基があるのが特徴である。

セラミドはスフィンゴイド骨格と脂肪酸が結合したスフィンゴ脂質の一種で，GlcCer はセラミドにグルコースが結合した構造である。表皮角質層では，セラミドと水がラメラ構造を作り皮膚の保湿とバリア機能に寄与している。GlcCer はコメ，コムギ，トウモロコシなどから抽出され，化粧品や食品へ利用されている。しかしながら，これらの農作物中の GlcCer 含有量は少量で，コムギで約 0.02% である。

特殊な構造を有し，産業廃棄物から抽出することができるトルラ酵母 GlcCer およびトルラ酵母抽出物の有用性を明らかにするために以下の研究を行った。

第 2 章 トルラ酵母グルコシルセラミド経口摂取のヒトの皮膚に与える影響

トルラ酵母 GlcCer の経口摂取が冬季にヒトの皮膚保湿等に与える影響について検討した。対象者は，成人男女 17 人 (男性 10 人，女性 7 人；平均年齢 43.6±10.3 歳) で，無作為に割り付けを行い，二重盲検クロスオーバー試験を行った。1.8 mg のトルラ酵母 GlcCer (GlcCer 群) またはプラセボ (プラセボ群) を毎日 1 錠ずつ 4 週間摂取し，その

前後での皮膚状態を客観的および主観的指標で測定した。2条件の間に4週間のウォッシュアウト期間を設けた。

GlcCer 群では、客観的評価では保湿効果を示す経皮水分蒸散量 (TEWL) が前腕で減少し ($p=0.02$), とメラニン生成を示す褐色斑点スコアを改善した ($p=0.05$)。また、主観的評価では肌荒れの改善 ($p=0.04$) がみられた。プラセボ群ではシワの客観的評価で悪化が認められた ($p=0.03$) が, GlcCer 群では悪化が抑制される傾向であった ($p=0.10$)。

第3章 トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母グルコシルセラミドのメラニン生成抑制、および植物抽出物との比較

メラニンは紫外線刺激によってチロシンからチロシナーゼ, チロシナーゼ関連タンパク質 1, 2 (tyrosinase-related protein 1, 2; TRP1, 2) の主に3つの酵素により産生される。

本研究では、トルラ酵母 GlcCer およびトルラ酵母抽出物のメラニン生成について検討した。また、植物抽出物 (コメ, トウモロコシ) および植物 GlcCer (コメ, コムギ, トウモロコシ) と比較を行った。実験にはマウスメラノーマ細胞を用い、メラニン量, チロシナーゼ活性を測定した。

トルラ酵母およびトウモロコシ GlcCer (10 $\mu\text{g/ml}$) はメラニン生成率 (82.5%, 67.1%; % of control) とチロシナーゼ活性率 (81.0%, 65.6%; % of control) をともに阻害した。抽出物 (5 $\mu\text{g GlcCer eq./ml}$) 間の比較ではトルラ酵母がもっとも強いメラニン生成抑制を示したが, チロシナーゼ活性抑制効果はコメが最も強かった。

トルラ酵母抽出物がトルラ酵母 GlcCer よりも強いメラニン生成抑制を示したため, GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物で実験を行ったところ, TRP1 タンパク質発現抑制を介したメラニン生成抑制を示すことが明らかとなった。本研究では GlcCer 以外のトルラ酵母抽出物中の有効成分の特定はできなかったが, トルラ酵母抽出物中に複数のメラニン生成抑制を示す成分が存在することが示唆された。

第4章 ヒト線維芽細胞におけるトルラ酵母抽出物の線維芽細胞増殖, コラーゲン産生増加, コラーゲングル収縮作用におよぼす影響

皮膚の弾力性は, 線維芽細胞とコラーゲン線維の3次元ネットワーク構造によってもたらされる。弾力性の低下は, 線維芽細胞数とコラーゲン産生量の減少によって引き起こされ, 結果として皮膚にシワ等が生じる。そこで, 細胞実験にてトルラ酵母 GlcCer がヒト線維芽細胞とコラーゲン産生に及ぼす影響を検討した。さらに線維芽細胞含有3次元コラーゲングルの収縮率にて線維芽細胞とコラーゲン線維の相互作用を評価した。

トルラ酵母抽出物は, 0.5 $\mu\text{g GlcCer 当量 (eq.) /ml}$ 以上で用量依存的に線維芽細胞を増殖させ ($\sim 25 \mu\text{g GlcCer eq./ml}$), 25 $\mu\text{g GlcCer eq./ml}$ でのみコラーゲン量を増加させた。一方, トルラ酵母 GlcCer は, GlcCer 濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ 以上で線維芽細胞を増殖させ, コラーゲン量は 5 $\mu\text{g/ml}$ 以上で増加させた ($\sim 25 \mu\text{g/ml}$)。コラーゲングル収縮は, トルラ酵母

抽出物およびトルラ酵母 GlcCer とともに 5 と 7.5 (それぞれ μg GlcCer eq./ml, $\mu\text{g}/\text{ml}$) のみ有意に収縮し、至適濃度が存在することが示唆された。

第 5 章 総括

本研究は、トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母 GlcCer の皮膚弾における機能性について、ヒト試験での評価から細胞実験での作用機序の検討まで行い、考察した。

第 2 章のヒトの皮膚の保湿等に関する研究では、保湿機能を示す TEWL、メラニン生成を示す褐色斑点、自覚症状の肌荒れが有意に改善された。また、シワについてもプラセボ群と比較して悪化を抑制する傾向を認めた。

第 3 章のメラニン生成抑制に関する研究では、原材料の違いにより効果に差が生じ、先行研究での結果を支持した。また、トルラ酵母 GlcCer はチロシナーゼ活性阻害によってメラニン生成を抑制し、酵母抽出中には GlcCer の他にも活性を有する成分の存在が示唆された。その成分のメラニン生成抑制作用機序は、TRP1 タンパク質発現抑制によるものであった。ヒト試験での褐色斑点改善を認めたが、細胞実験にて作用機序の一部を示したと考える。

第 4 章のコラーゲンゲル収縮に関する研究では、トルラ酵母抽出物中の有効成分は GlcCer であることが示唆された。ヒト試験で得られたシワ悪化を抑制する傾向であった結果の作用機序の一部として、細胞実験での結果が考えられた。

以上の結果から、本研究では産業廃棄物であるトルラ酵母残渣からの抽出物（トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母 GlcCer）の皮膚に対する機能性食品として可能性を見出し、新規の機能性素材として産業的応用が期待できることが示唆された。