

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	The application of carbon stable isotope ratio in clarifying skin moisturizing effect by dietary glucosylceramide
著者(和文)	原口浩幸
Author(English)	Hiroyuki Haraguchi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9680号, 授与年月日:2014年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:吉田 尚弘,小畠 英理,西山 伸宏,大河内 直彦,山田 桂太
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9680号, Conferred date:2014/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻:	化学環境学	専攻
Department of		
学生氏名:	原口 浩幸	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野):	博士 (理学)
Academic Degree Requested	Doctor of
指導教員 (主):	吉田 尚弘
Academic Advisor(main)	
指導教員 (副):	
Academic Advisor(sub)	

要旨 (和文 2000 字程度)
Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

スフィンゴ脂質の一種であるグルコシルセラミド(GlcCer)は経口摂取することで皮膚の保湿やバリア機能を向上させる効果がある。皮膚の遊離セラミド(Cer)が増加し、保湿効果を発揮していると考えられているが、経口摂取した食餌性 GlcCer のリンパ管などでの吸収は少なく、詳細な機能は解明されていない。一方、炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) は医学や食品の分野において応用されるようになり、特に体外から摂取した標的物質の体内動態のトレーサーとして使われている。標的物質そのものが持つ固有の $\delta^{13}\text{C}$ 値を基準にトレースできるため、放射性標識などを必要としないので分析費用を抑えることができ、また標的物質の構造変化を伴わないために、腸管での消化吸収や同位体分別等の影響が少ないと考えられ、より自然に近い条件で標的物質の体内動態を観察できるメリットがある。そこで、我々は経口摂取した食餌性 GlcCer と皮膚の Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値を比較することで、食餌性 GlcCer の皮膚の Cer への移行を測定することを試みた。

$\delta^{13}\text{C}$ 値を測定するに当たり、経口摂取する GlcCer は分析に必要な十分量確保できるが、皮膚から精製して得られた Cer は微量である。よって皮膚の Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値測定には微量分析に適したガスクロマトグラフ熱分解同位体質量分析計(GC-C-IRMS)が望ましい。そこで合成セラミド(SCer)を用いて GC-C-IRMS による $\delta^{13}\text{C}$ 値の測定条件を検討した。GC-C-IRMS での Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値測定にはトリメチルシリルイミダゾール(TMSI)での誘導体化が必要であり、その誘導体化の条件を検討したところ、70℃にて 2 時間以上で約 90%の SCer が定量的に誘導体化 SCer(TMS-SCer)となる事が分かった。また GC-C-IRMS を用いた TMS-SCer の測定では誘導体化反応液中に残存している TMSI を除去する必要がある。そこで誘導体化反応後の反応液中の過剰な TMSI の除去方法を検討したところ、ヘキサン-水分配によって完全に除去することができた。これらの条件下で TMS-SCer の $\delta^{13}\text{C}$ 値を GC-C-IRMS で測定したところ、再現性のある測定ができた (S.D. < 0.3 ‰)。しかしながらマスバランスによって TMS-SCer の $\delta^{13}\text{C}$ 値から計算された Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値と誘導体化していない SCer の $\delta^{13}\text{C}$ 値を比較すると、誘導体化される SCer 中の水酸基の数や誘導体化に使用する TMSI の製造元に影響され、差が生じる事が分かった。実際の皮膚の Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値の真値を求める際には皮膚の Cer と構造の類似した標準 Cer と特定の TMSI を用いて得られた TMS-SCer の $\delta^{13}\text{C}$ 値の差を補正值とし、GC-C-IRMS によって得られた皮膚の Cer の TMS-Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値を補正する必要があることが分かった。

皮膚から精製された Cer 中の Cer 以外の脂質の残存が GC-C-IRMS での Cer のピーク分離に悪影響を及ぼすため、GC-C-IRMS 測定に適した皮膚からの Cer の精製方法の検討を行った。ヘアレス

マウスの皮膚をディスペーゼ®処理し、表皮を剥離した後、表皮から脂質粗抽出を行った。Cer 以外の脂質を除去するために固相抽出カラム(Sep-Pak®)や薄層クロマトグラフィー (TLC) を組み合わせた精製を行った。その結果、Cer 以外の脂質が除去され、GC-C-IRMS で Cer 分子種ごとの $\delta^{13}\text{C}$ 値を測定できた。

GlcCer のヘアレスマウスへの摂取試験を行い、上記条件にて皮膚の Cer を精製し、GC-C-IRMS にて $\delta^{13}\text{C}$ 値を測定し、摂取群と非摂取群の Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値を比較した。ヘアレスマウス (Hos HR-1 4 週齢 オス) を HR-AD 飼料にて 7 日間予備飼育した後、コメ由来またはトウモロコシ由来 GlcCer をそれぞれ 0.5、5.0、50.0mg/日の割合で配合した HR-AD 飼料 (5.0 g/日/匹) を与えるコメ群またはトウモロコシ群と、GlcCer 非摂取のコントロール群に分け、28 日間飼育した後、それらの皮膚を採取し、Cer を精製した。経口摂取させた GlcCer の $\delta^{13}\text{C}$ 値は波長スキャンキャビティリングダウン分光法を用いて、表皮から精製した Cer の TMS-Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値は GC-C-RIMS を用いてそれぞれ測定した。ヘアレスマウスが経口摂取した飼料中のコメ (C3 植物) 由来及びトウモロコシ (C4 植物) 由来の GlcCer の $\delta^{13}\text{C}$ 値はそれぞれ約-31‰と約-13‰となり、由来植物の $\delta^{13}\text{C}$ 値を反映した値となった。一方、Sep-Pak®と TLC を組み合わせて表皮から Cer を精製した後、TMSI で誘導体化した TMS-Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値を GC-C-IRMS で測定したところ、TMS-d17:1-16h:0 と TMS-d18:1-16h:0 の $\delta^{13}\text{C}$ 値を得ることができた。飼料中に配合した GlcCer の由来、並びに摂取量にかかわらず、TMS-Cer の $\delta^{13}\text{C}$ 値は両群ともコントロール群と有意な差はなかった。また経口摂取された GlcCer は糞便への排出が多く、これらの結果より経口摂取された食餌性 GlcCer は皮膚へはほとんど移行せず、ほとんどが排出されている事が示唆された。摂取した GlcCer が d18:1-16h:0 の $\delta^{13}\text{C}$ 値に与える影響をバスバランスによるモデル計算を用いて調べたところ、GC-C-IRMS での測定における有意な差 (>0.3‰) を得るには約 4%以上の移行が必要であるが、それ以下 (約 2%) であることが推測された。これらの結果は食餌性 GlcCer の腸管等での吸収量が少ないという先行研究を支持する結果となった。

今後は更なる測定条件の検討として、GC-C-IRMS での測定時間をより短くするための、より高度な Cer の精製の検討が必要である。また腸管やリンパへの消化吸収物の $\delta^{13}\text{C}$ 値を測定する事でより詳細な消化吸収機構が解明されると事が期待される。我々が確立した測定方法を他の機能性食品の機能解明などの研究へ応用が可能であると考えている。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： 化学環境学 専攻
Department of
学生氏名： 原口 浩幸
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (理学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)： 吉田 尚弘
Academic Advisor(main)
指導教員(副)：
Academic Advisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Glucosylceramide (GlcCer) is one of sphingolipid, it is well known that an oral intake of GlcCer taken as dietary supplement improves the moisturizing effects of skin. But no study about the relation between dietary GlcCer and Cer in skin has been performed. So I tried to apply carbon stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$) as a tracer of GlcCer to Cer in skin, to clear details.

At first, the precise experimental conditions for $\delta^{13}\text{C}$ value of synthesized Cer (SCer) using GC-C-IRMS after derivatization (TMS-SCer) by N-trimethylsilylimidazole (TMSI) were determined (about 2 hours at 70°C and TMSI removal by hexane-water). $\delta^{13}\text{C}$ value of SCer might be influenced by the intramolecular carbon isotope composition of TMSI and by the number of hydroxyl groups of SCer to be derivatized.

GC-C-IRMS is suitable for measuring $\delta^{13}\text{C}$ value because of microgram order of Cer from skin. To reduce the influence of other lipid except Cer from skin, higher level of purification was improved using Sep-Pak[®] and TLC.

In oral administration of GlcCer using hairless mice, I tried to compare $\delta^{13}\text{C}$ value of TMS-Cer in skin of a mouse between GlcCer intake group and no intake group. $\delta^{13}\text{C}$ value of maize and rice GlcCer groups were had no significant difference (below 0.3 ‰). And also that had no dependence on the content of GlcCer.

Transfer influence of GlcCer was simulated, transfer of GlcCer might be below 4%. It is considered that our results supported previous study regarding the absorption and the transfer influence of GlcCer after an intake.

Improvement of purification of Cer from skin and peak separation on GC-C-IRMS required for obtaining more information about transfer of GlcCer. $\delta^{13}\text{C}$ value of digest of GlcCer and intramolecule in GlcCer and Cer in skin will be also interesting.

These techniques are expected to be applied to other trace studies not only for unclarified function and its mechanism of food but also drug delivery and etc.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).