

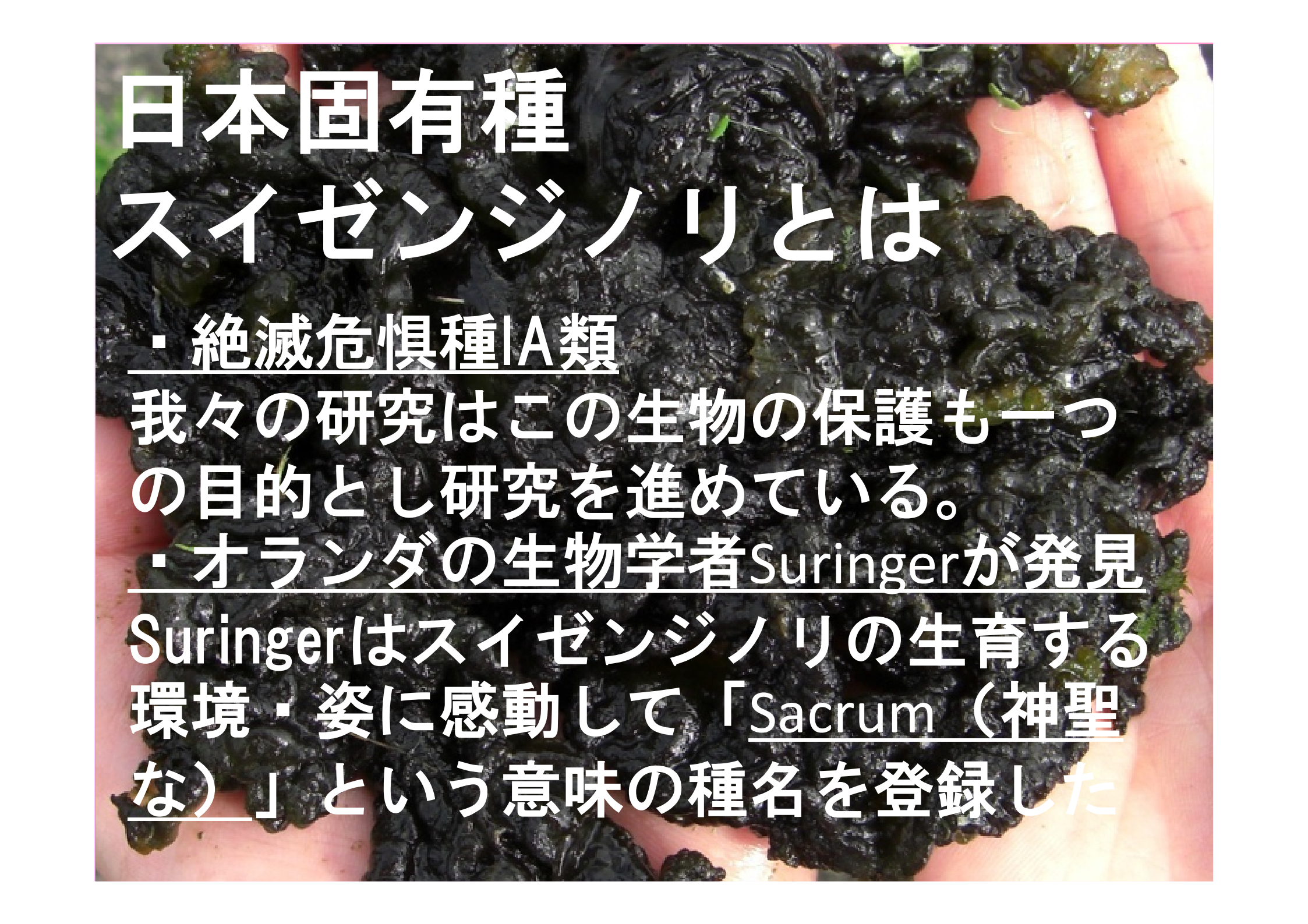
第一回サクラん勉強会

化粧品原料としての サクラんの機能性

国立大学法人 北陸先端科学技術大学院大学
マテリアルサイエンス研究科
岡島 麻衣子

2014年1月21日

於 日本橋倶楽部



日本固有種 スイズンジノリとは

・絶滅危惧種IA類

我々の研究はこの生物の保護も一つの目的とし研究を進めている。

・オランダの生物学者Suringerが発見

Suringerはスイズンジノリの生育する環境・姿に感動して「Sacrum（神聖な）」という意味の種名を登録した



Aphanothera sacrum
(スイゼンジンノリ)とは

養殖場の風景

福岡朝倉市





スイゼンジノリとは？

学名：*Aphanothece Sacrum*

日本固有の藍藻（光合成微生物）、江戸時代以来の高級食材、健康食品として注目。花粉症や種々の胃腸不良、風邪の予防など古くから健康維持に利用されてきた

年間120tの養殖規模



スイゼンジノリ



生育環境

安心・安全

無農薬・無肥料
地下水（湧水）で生育

バイオ資源

条件が整えば増殖を
続ける光合成生物

一方で、我々人が飲料している同じ地下水で育つスイゼンジノリは、この地下水を守っていかなければ絶滅する危機にある。

→ スイゼンジノリは綺麗な日本の水資源が育てる貴重で希少な生物！

食品としてのスイゼンジノリ



スイゼンジノリからサクランとの出会い

スイゼンジノリからフェノール系の分子(プラスチックの原料)の探索を行ってみるとその抽出工程の中で水の層に現れる大量のゼリー状物質が存在することが分かる



アルコール中に析出した物質

ある時、そのゼリー状物質を
ビーカーに集め、
水を加えると更に膨潤！！



膨潤する様子

アルコールを加えるとアルコール中に白い繊維状物質が出現

今から7年前……

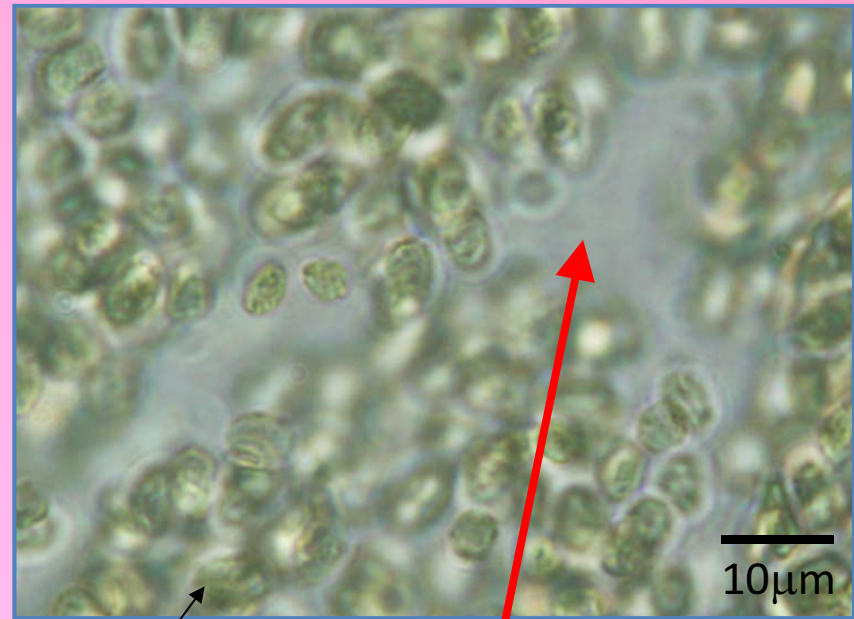
スイゼンジノリから新物質‘サクラン’誕生！！

スイゼンジノリの学名 *Aphanothece sacrum* の
‘サクラム’ に多糖類を表す接尾語 ‘an’ をつけた名前

多糖類サクランの存在する箇所



図1 スイゼンジノリの写真



細胞体 寒天質(細胞外マトリックス)

図2 スイゼンジノリの顕微鏡写真

サクランは肉厚で丈夫な寒天質を形成している

細胞によって生産され外に出されたサクランは、水中のイオンを吸着しゲルを形成、その中に大量の水を蓄え細胞分裂の足場となったり、外部衝撃の吸収により細胞を保護したり、巨大な網目構造でバクテリア等の細胞への侵入を防ぐ役割を持つ。

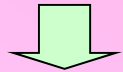
サクランはその巨大な構造と高い保水能力からバリア機能を有する

NaOH水溶液を用いた酸性多糖類抽出法

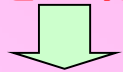
1. 一度凍結させたAphanothece sacrumを再融解する事で水溶性蛍光色素フィコビリプロテインなどを細胞から溶出させ、水洗により除去



2. アセトンを用い脂溶性色素、クロロフィル、カロテノイド系色素などを洗浄除去



3. 洗浄したAphanothece sacrum試料を0.1N-NaOH水溶液で80度、5時間攪拌しながら、タンパク質やDNAを分解して、多糖類を溶出



4. ガーゼ濾過で不純物を除去後、HClを用いおよそpH 7-8になるまで中和



5. アルコール:水=70:30の溶媒に抽出物質を含む水溶液を流し込み、攪拌することで多糖類を回収/精製



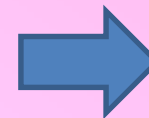
6. 回収した抽出物質を再度水に溶かし、それを100%アルコールに再度流し込み脱水・繊維化

収率：50-80wt%
(対乾燥原料)



繊維化した抽出物

乾燥



乾燥後のサクラン

高純度多糖類の証明

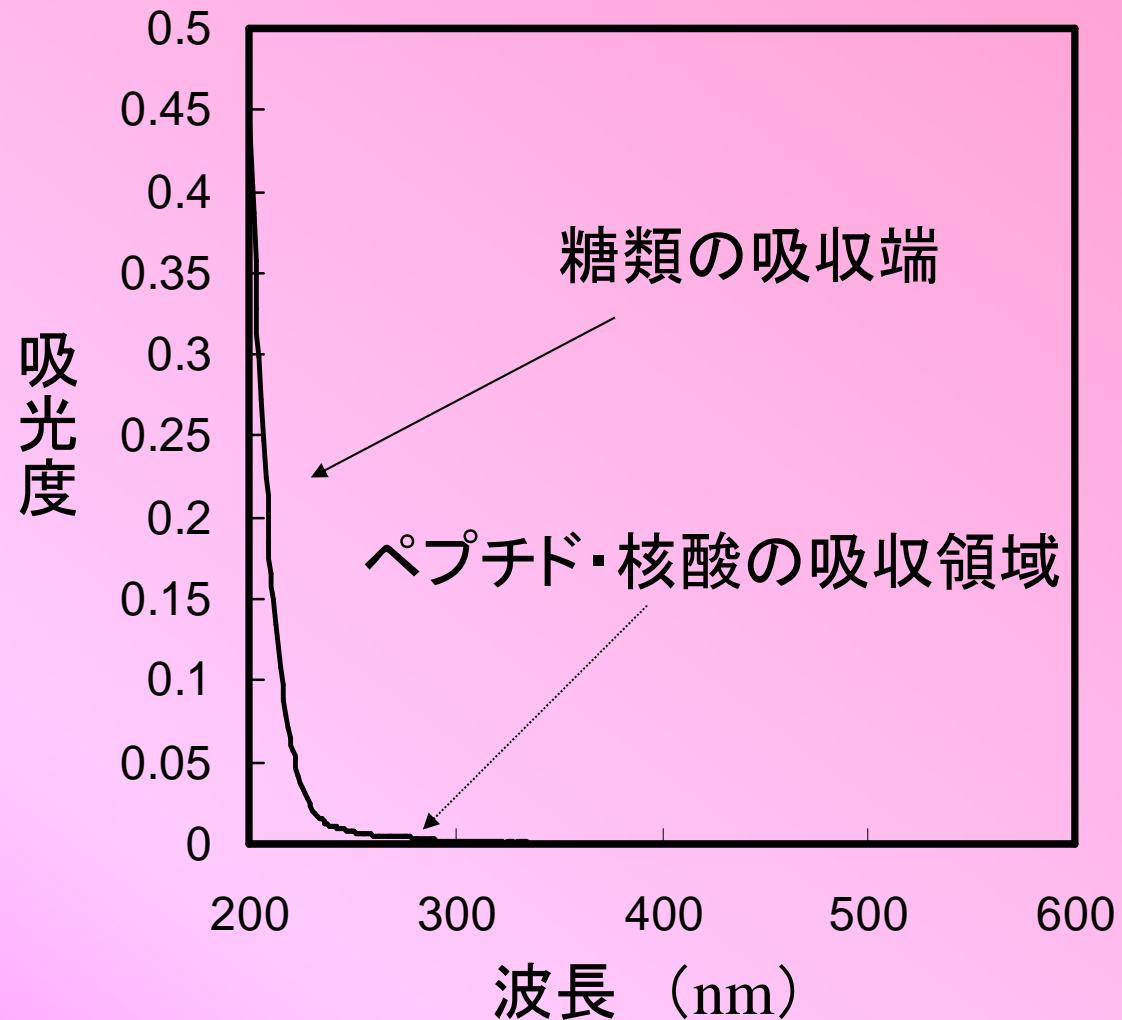


図3 抽出した多糖類水溶液の紫外可視分光スペクトル。タンパク質、核酸、色素類のピークは検出されず(250 nm以上の領域)、250 nm以下の領域に多糖類に特徴的なスペクトルの立ち上がりがみられた。

pH8.5の多糖類水溶液から得たサンプル

pH2.5の多糖類水溶液から得たサンプル

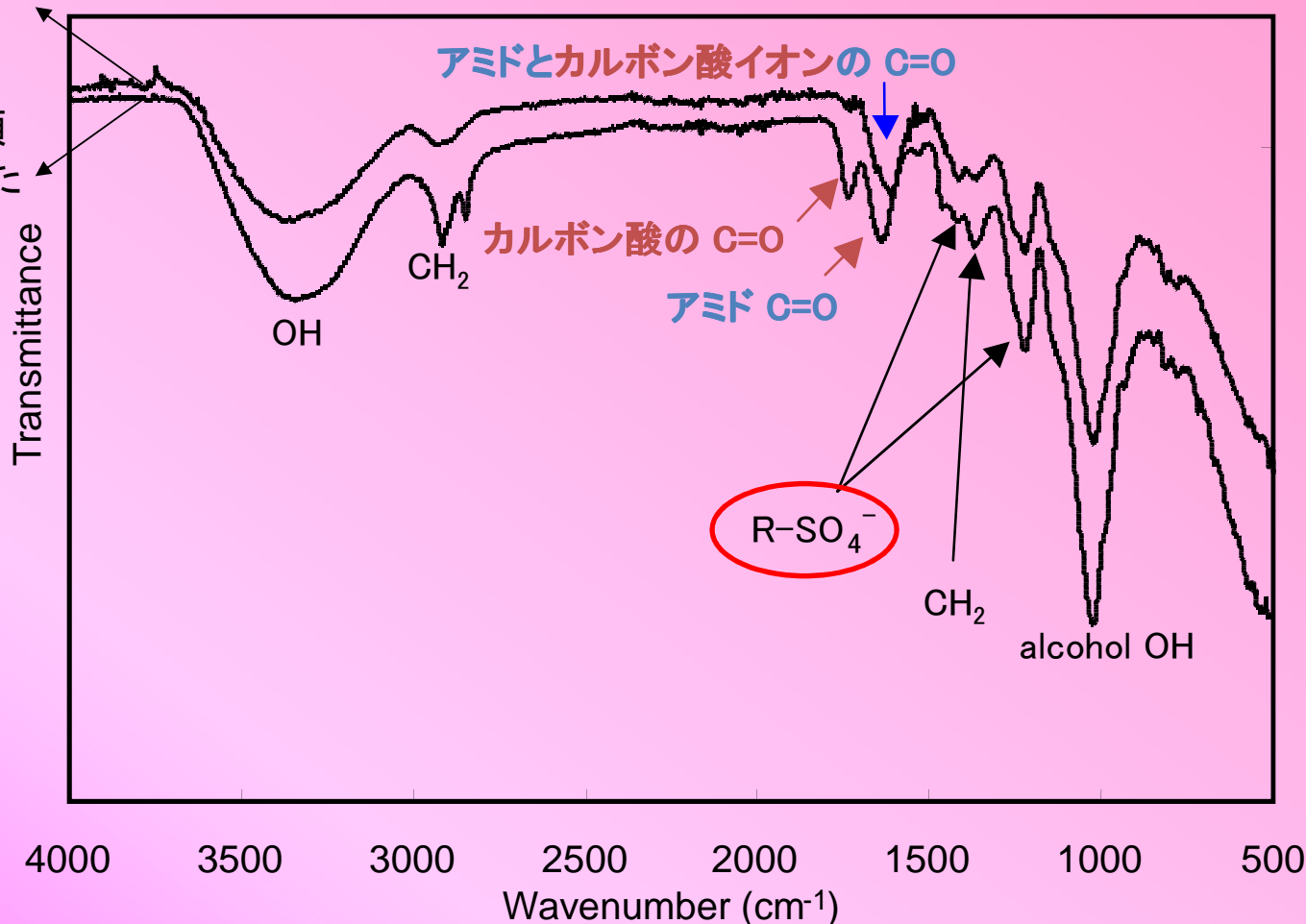


図4 抽出多糖類の赤外線吸収スペクトル。糖に特徴的なピークのほかに、**硫酸エステル、アミド基、カルボン酸**に特徴的なピークが見られた。

動物由来多糖類グリコサミノグリカンと類似構造であることが分かる

多糖類とは・・・

生物の生体内外に存在し重要な機能を与える物質。取り出された多糖類は様々な用途に使用されている。



植物からの
多糖



セルロース



動物からの
多糖



キチン・キトサン
ヒアルロン酸



写真提供：築地 松美絵さん



微生物からの
多糖



アルギン酸
カラギーナン
キサンタンガム
ヒアルロン酸



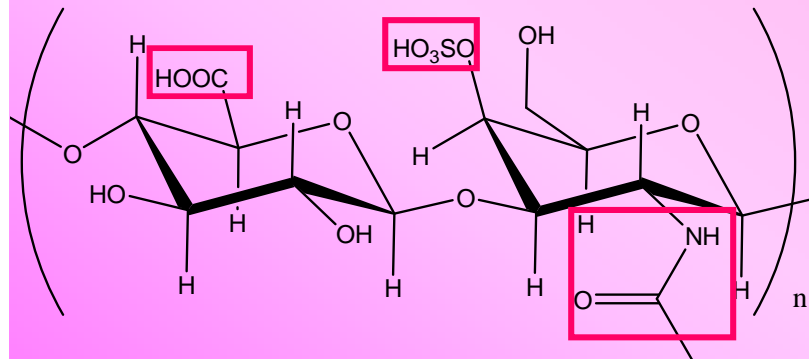
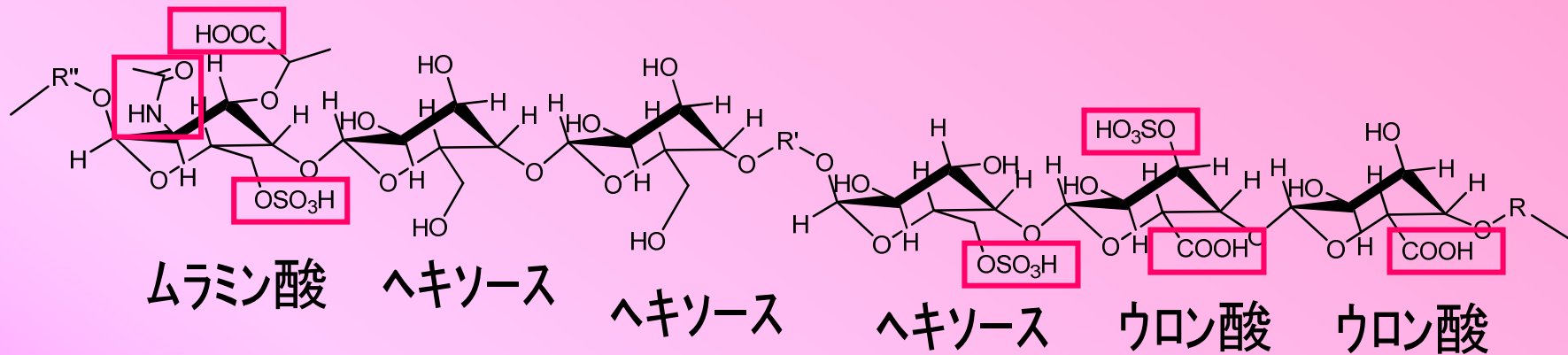
サクランのようなラン藻由来の多糖類の応用は無い？

スピルランというスピルリナから取れる硫酸化多糖が医薬品として用いられているだけ・・・

サクランとは

- 超高分子量($\sim 10^7$ g/mol)
- 糖鎖当たり約11%の硫酸基と22%のカルボキシル基を持つ**硫酸化多糖類**
- 新規単糖硫酸化ムラミン酸を含む

注) サクランは負電荷を多く有するためカチオン性物質(+電荷)を吸着する



ムコ多糖類の一種
コンドロイチン硫酸Cの構造

スイゼンジノリは原核生物でありながら、サクランは真核生物の作るムコ多糖類と類似構造を持つと推測される



サクランは様々な生理活性を持つ

サクランの構成単糖

Table1 多糖類の糖残基

多糖類	糖残基の種類						種類の数
セルロース	グルコース						1
デンプン	グルコース						1
キチン			N-アセチルグルコサミン				1
ペクチン						ガラクトン酸	1
フコイダン				フコース			1
カラギーナン			ガラクトース				1
アガロース			ガラクトース				1
アルギン酸					マンヌロン酸	グルロン酸	2
コンニャク							
グルコマンナン	グルコース	マンノース					2
ヒアルロン酸	グルコース		N-アセチルグルコサミン				2
コンドロイチン硫酸			N-アセチルガラクトサミン		グルクロン酸		2
ヘパリン			N-アセチルグルコサミン		グルクロン酸	イズロン酸	3
キサントガム	グルコース	マンノース			グルクロン酸		3
スピラン ¹	ラムノース	キシロース	キシリトール		グルクロン酸	ガラクトン酸	5
イシクラゲ由来多糖類 ²	グルコース	マンノース	ガラクトース	リボース	グルクロン酸	キシロース	6
ノストフラン ³	グルコース	マンノース	ガラクトース	キシロース	グルクロン酸		5
サクラン ⁴	グルコース	マンノース	ガラクトース	フコース	未知の酸性糖A	未知の酸性糖B	11
	ラムノース	キシロース	ガラクトサミン	N-アセチルムラミン酸	アラビノース		

一般的な植物由来や動物由来多糖類の糖残基は**3種類以内**である。

一方、ほとんどのラン藻由来の多糖類は5種類以上あると言われている。その中でも**サクランに関しては11種類もの構成単糖を含むことが判明した。これは非常に特徴的であると言える。**

1) J. B. Lee et al. *Carbohydr. Polym.* 69, 651 (2007); 2) R. L. Helm et al. *J. Bacter.* 182, 974 (2000);

3) K. Kanekiyo et al. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1573 (2007); 4) M. Okajima et al. *Macromolecules*, 41, 4061 (2008).

サクランの分子量測定

測定条件

Apparatus

MALLS: Dawn Heleos II

Condition

注入時濃度: 0.01 %

Injected volume: 100 μ m

Flow rate: 1 ml/min

Solvent: NaNO₃ aq (0.1 M)

Columns: Shodex OHpak

SB-807 HQ, and SB-804 HQ

Column temperature: 40 °C

測定温度: 25 °C

レーザー波長: 665.2 nm

測定角: 13.0°, 20.7°, 29.6°,

37.5°, 44.8°, 53.1°, 61.1°

Cell Type: Fused Silica

RI detector: Optilab T-rEX (Wyatt Technology;
laser wavelength (658.0 nm))

Parameters

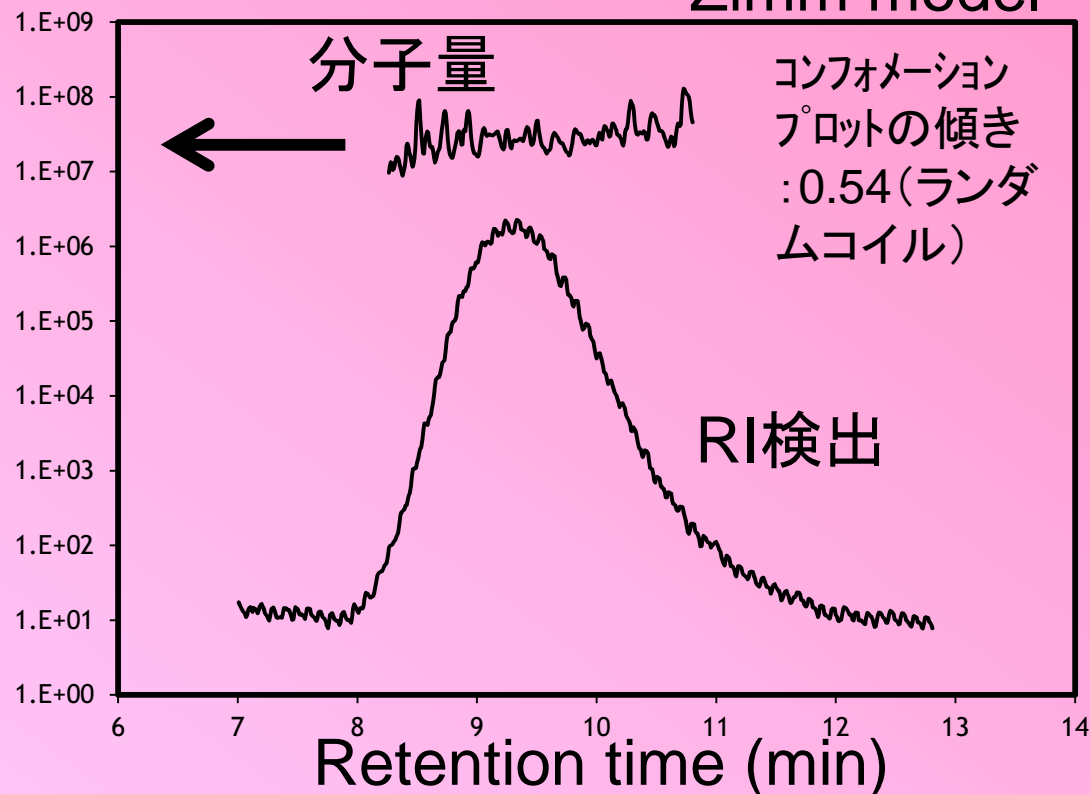
Water Refractive index (665.2 nm): 1.331

Water viscosity (25 °C): 0.8945

Rayleigh ratio (665.2): 7.3239×10^{-7}

dn/dc (25 °C, 658.0 nm): 0.108 mL/g

Molar weight (g/mol)



(Zimm model (generally used model))

Mw: 2.90×10^7 g/mol, Rg: 564 nm

(Berry model)

Mw: 1.51×10^7 g/mol, Rg: 275 nm

(Random coil model (most appropriate))

Mw: 2.29×10^7 g/mol, Rg: 415 nm

(Rod model)

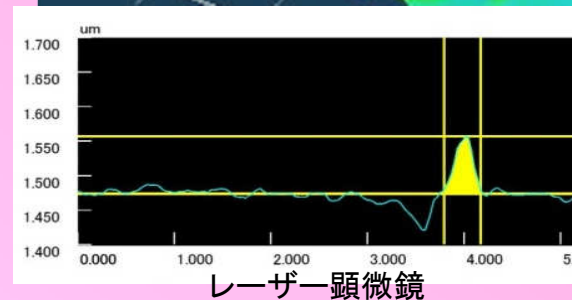
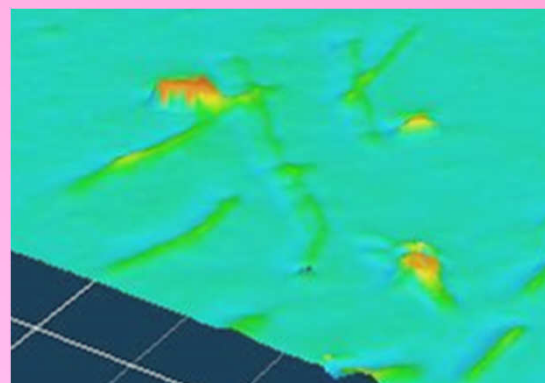
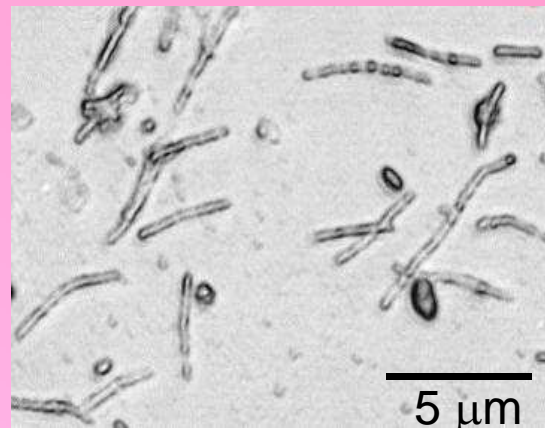
Mw: 1.09×10^7 g/mol

サクランは分子量が1000万を超える超巨大分子であった！！

各種多糖類の分子量

Table 2. Molecular weight of polysaccharide

多糖類	分子量
セルロース	数百万
アミロース	2,000,000
キチン	2,000,000
ペクチン	360,000
フコイダン	800,000
カラギーナン	100,000
アルギン酸	200,000
コンニャクグルコマンナン	1,000,000
ヒアルロン酸(動物由来)	8,000,000
コンドロイチン硫酸	40,000
ヘパリン	30,000
キサンタンガム	4,000,000
スピルラン	220,000
サクラン	22,900,000



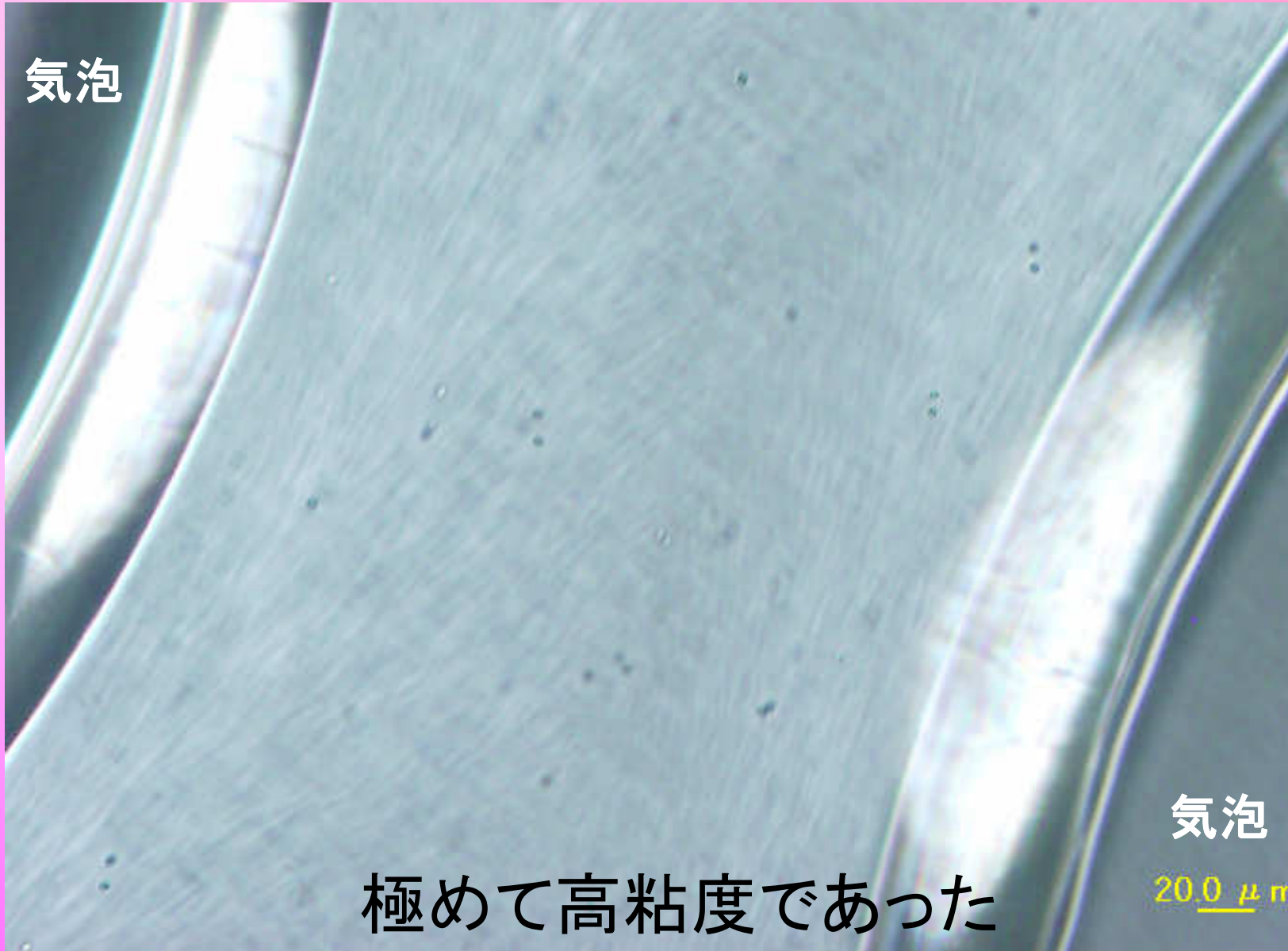
サクランはマイクロオーダーの巨大分子！！

現在様々な用途に使われている多糖類の中でサクランは最も大きな分子であることが分かる。

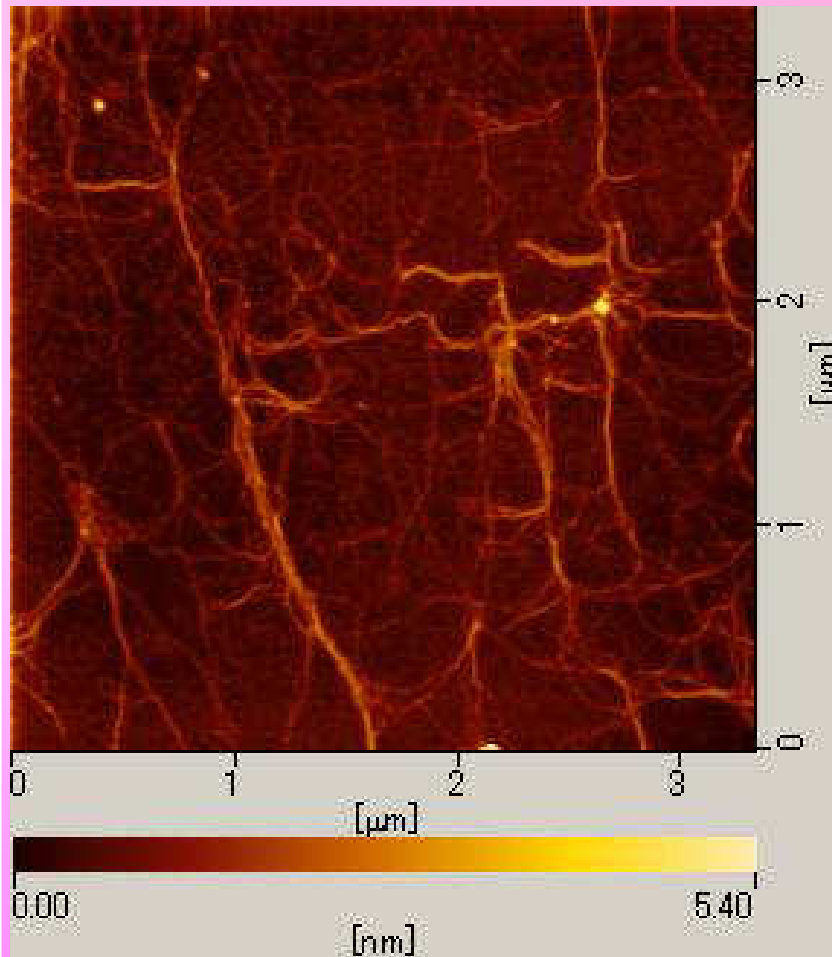
そんなに大きいならば、サクランは目に見える分子なのでは？

cover glass

sacran sol.



原子間力顕微鏡像(AFM)



伸びきり鎖でMax 13μmの長さ
サクラン分子鎖の形状(濃度:10ppm)



溶液状態中のサクランの形状を調べてみた

ρ 値:分子の形状を見積もる指標値

「ρ 値とは:回転半径 $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ と流体力学半径 R_h の比 ($\rho = \langle s^2 \rangle^{1/2} / R_h$)」

(光散乱装置で簡単に測定できる)

- 剛直鎖の場合 : $\rho > 2$,
- 一般的な屈曲鎖の場合 : $\rho = 1.4 - 1.7$,
- 高分岐高分子の場合 : $\rho = 0.8 - 1.3$,
- 小さな球状高分子の場合: $\rho < 1.0$

具体例

- キサンタンガム : $\rho=2.1$,
- ジェランガム: $\rho=3.1$,
- 1,3-β-グルカン (PD3): $\rho=3.4$ (文献最高値)

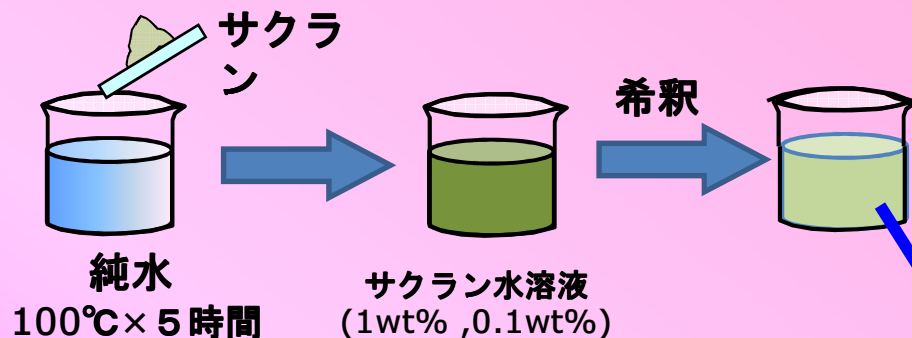
サクランの R_h (測定濃度 0.0135%, 動的散乱) **106 nm**
回転半径 $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ は**402 nm** (<0.01%, 静的散乱)

結果: $\rho = 402 \text{ nm} / 106 \text{ nm} = 3.8$

サクランは巨大でかつ極めて剛直な高分子であることが分かる!

巨大分子サクランの粘度測定

試料 サクラン(水酸化ナトリウム抽出タイプ) 0.01~1.0wt%
塩化ナトリウム 1~1000mM
溶解条件: 0.01%-0.5% 80°C以上5時間攪拌
0.5%-1% 80°C以上10時間攪拌

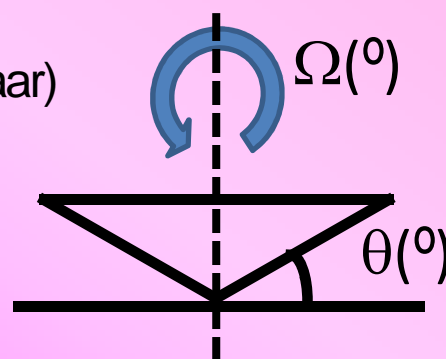


定常流粘度測定

Temp. 25 °C
Cone plate (CP50-1 Anton Paar)
Diameter: 49.969mm
Angle: 0.997°

せん断速度 (shear rate) $\dot{\gamma}$

$$\dot{\gamma} = \frac{\Omega}{\theta \Delta t}$$



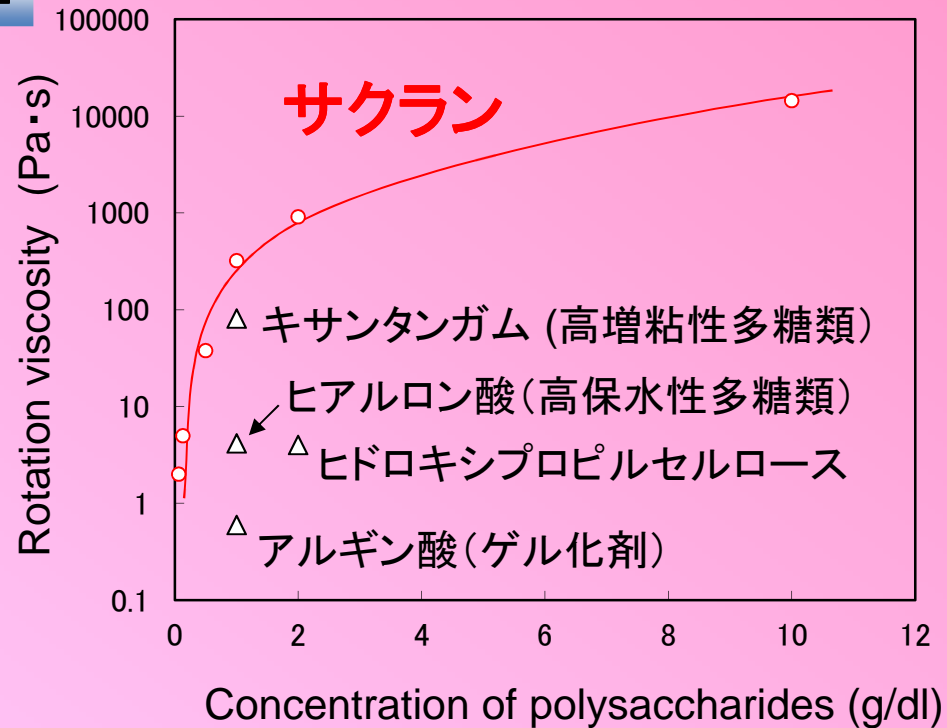
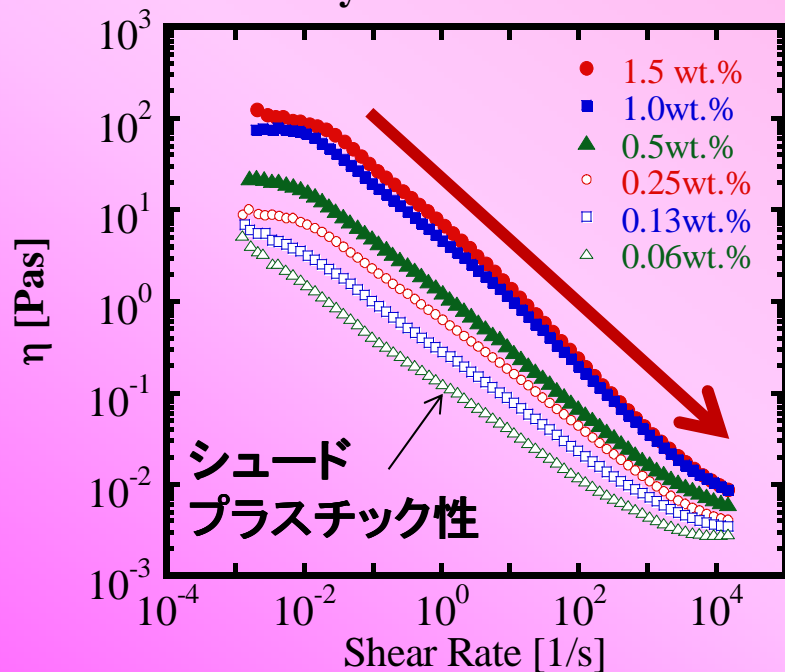
回転粘度計



サクラン水溶液が示す超高粘性



Steady State Measurement

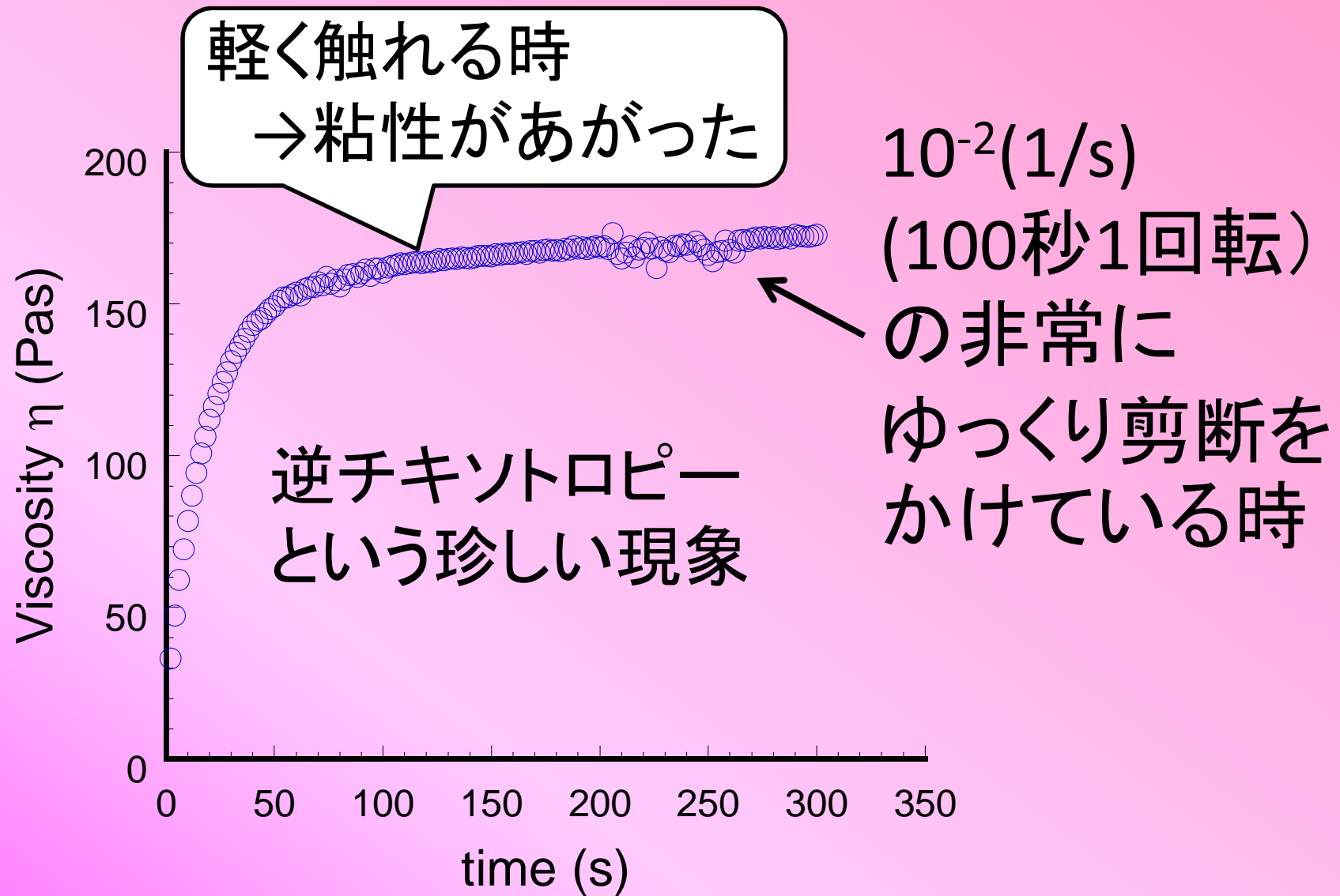


サクランは1%濃度ではキサンタンガムの4倍、ヒアルロン酸の80倍、0.05%濃度でヒアルロン酸1%と同程度の粘性を示す)

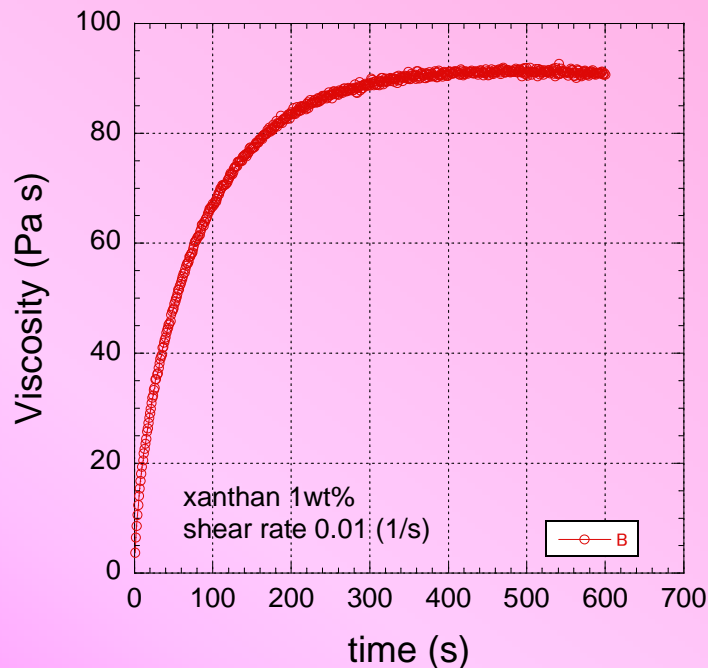
超高粘性であったサクランも不思議なことに、剪断を掛けることでその粘性は水と変わらない程サラサラになる(シュードプラスチック性)

化粧品の高い塗布性に貢献する

流動のごく初期には(触れた瞬間)粘性が劇的に上昇する

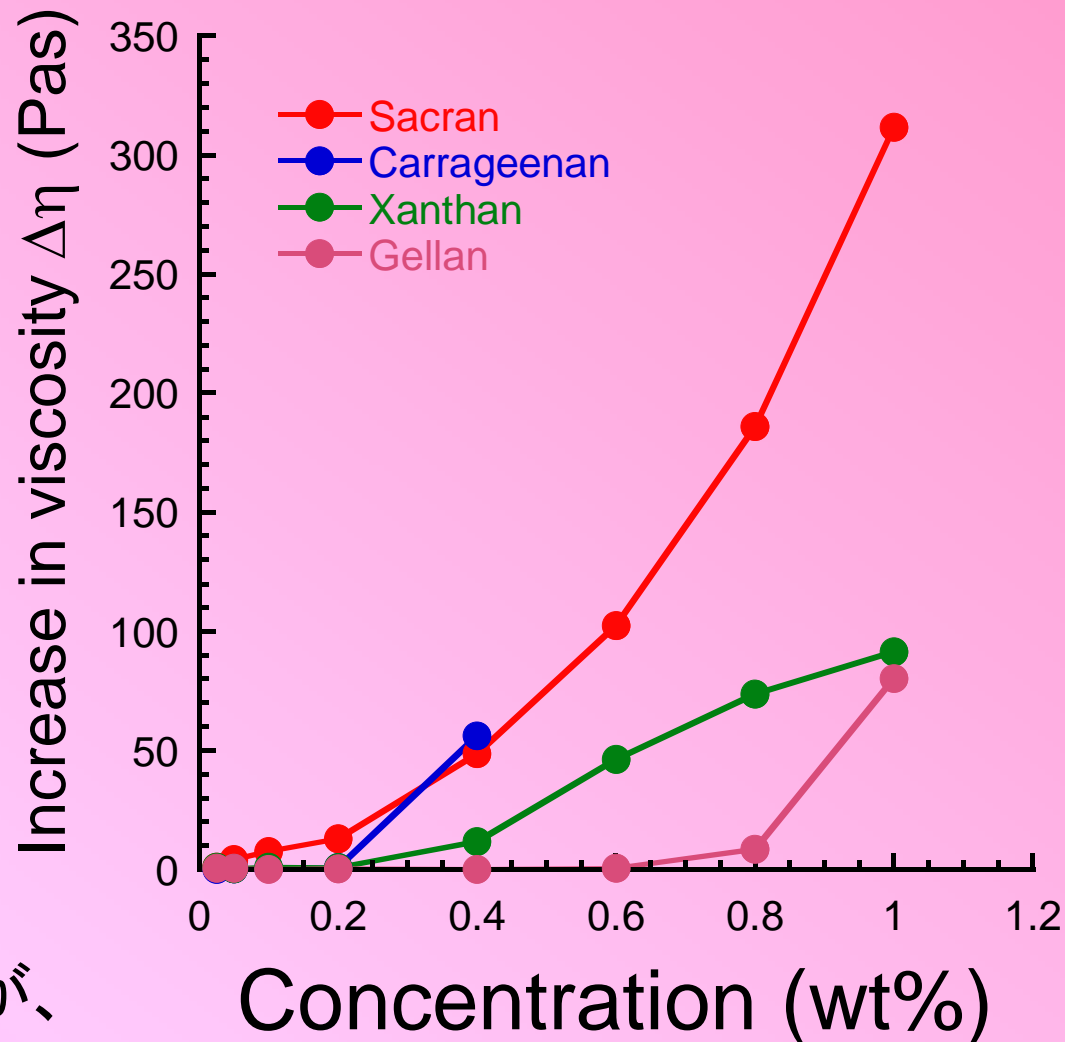


一般的な多糖との比較



- 1)いくつかの多糖で認められたが、アルギン酸では見られなかった
- 2)サクランでもっとも劇的に増粘した (1%濃度でキサンタンガムの約4倍)

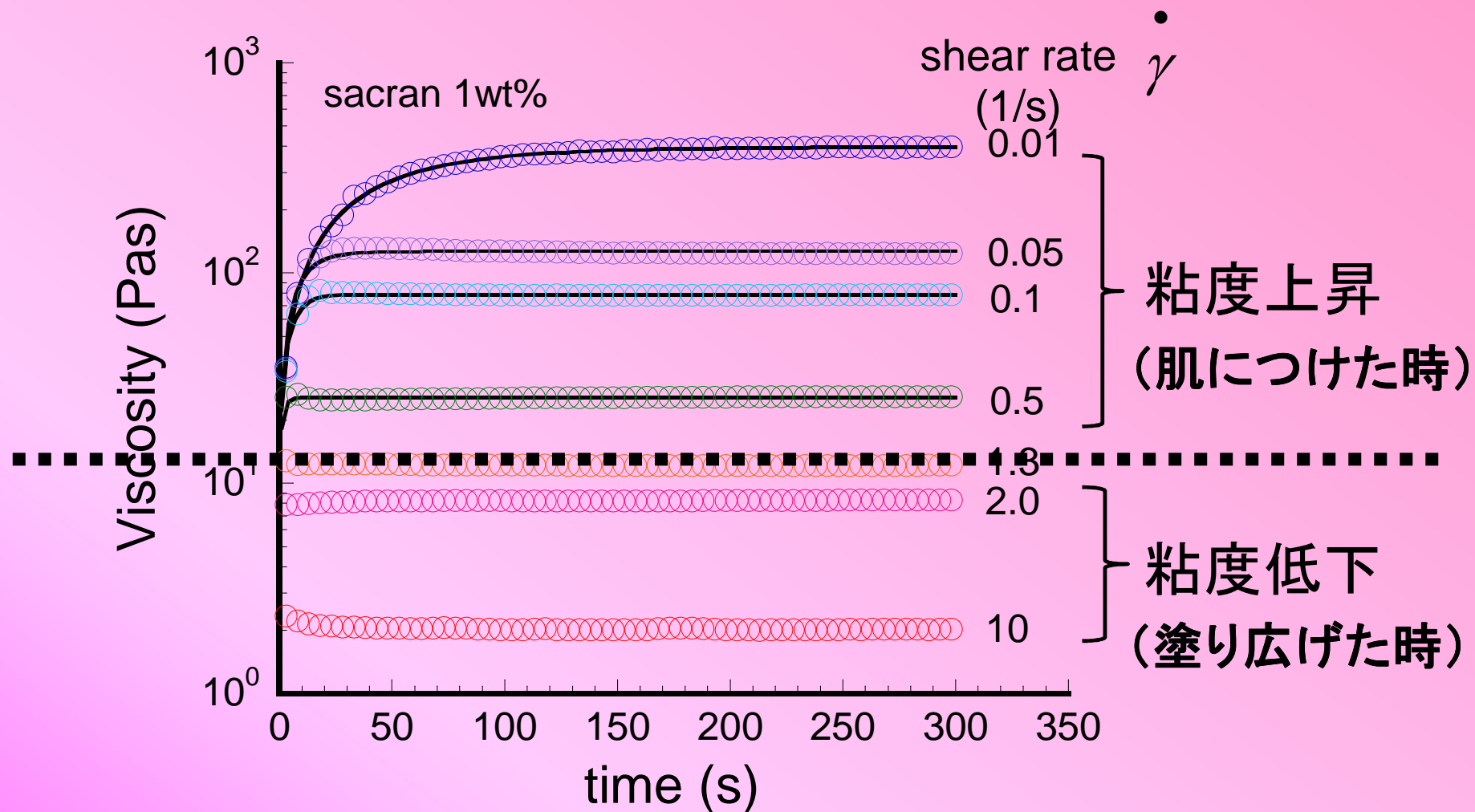
サクランは軽く触れた時のつけ感が大



サクラン

肌につける際、最も「つけ感」を感じる多糖類といえる

粘度の経時変化(せん断速度)

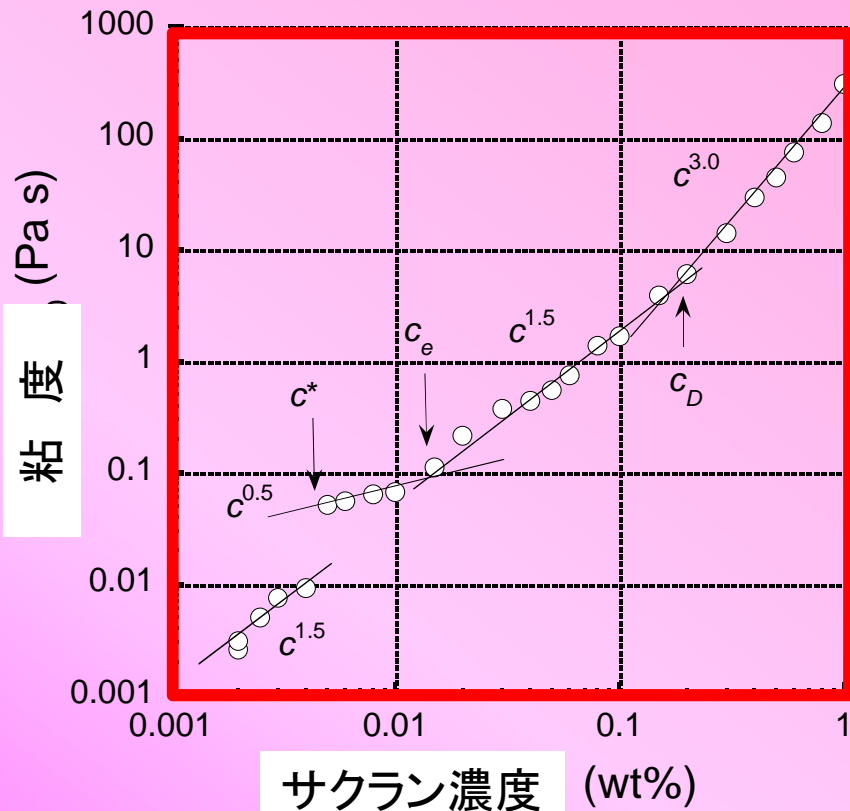


サクランのテクスチャーの特徴:

肌に乗せた時は**しっかりとしたつけ感**、その後塗り広げると**スムーズなコーティング感**がある

サクランで見られる特徴的な粘性

サクラン溶液の粘度は濃度を上げると上昇する



しかし

濃度範囲により粘度上昇率は変化する

↓

粘度上昇率(傾き)を表にまとめると

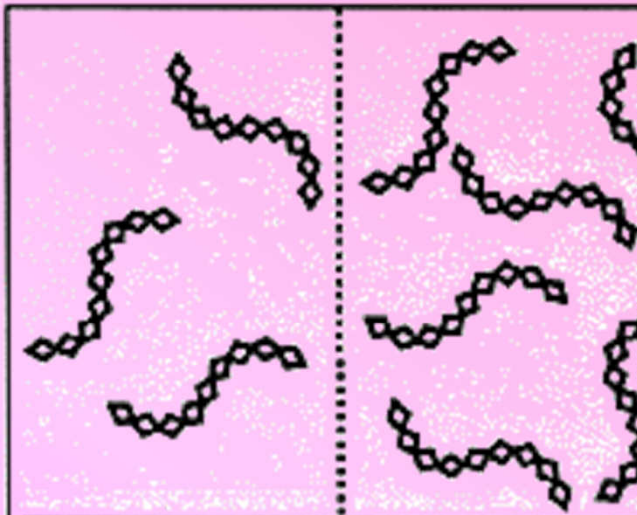
準希薄溶液		非電解質
非絡み合い状態	絡み合い状態	状態
$\eta_0 \sim c^{1/2}$	$\eta_0 \sim c^{3/2}$	$\eta_0 \sim c^{15/4}$
Fuoss law	scaling theory*	

*Dobrynin et al *Macromolecules* 28, 1859 (1995)

サクランの各濃度における粘度をプロット(左図)し傾き(粘度上昇率)を見積もり、理論と照らし合わせることで水溶液中におけるサクラン分子鎖の形状を見積もる事が出来る(次ページ)

サクラン鎖の形態

粘度測定より類推されるサクラン鎖の形態

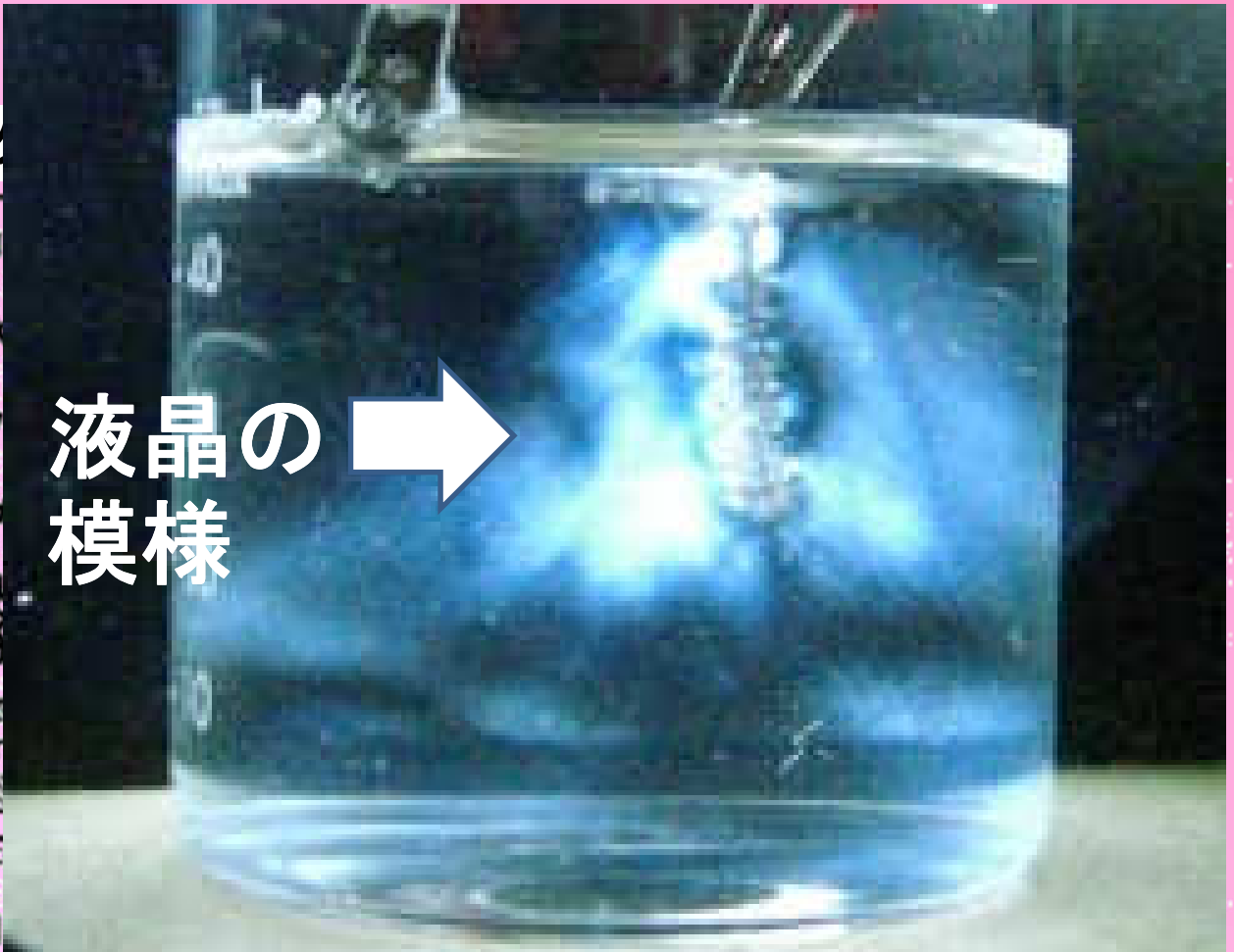


electric charge of polyion

dilute

semidilute unentangled

液晶の模様



サクラン分子は孤立
 C^*
0.004 (wt %)

サクラン分子接触
 C_e
0.015 (wt %)

サクラン分子絡み合う
 $C_D (=C_h)$
~0.1 (wt %)

C_g
~0.2 (wt %)

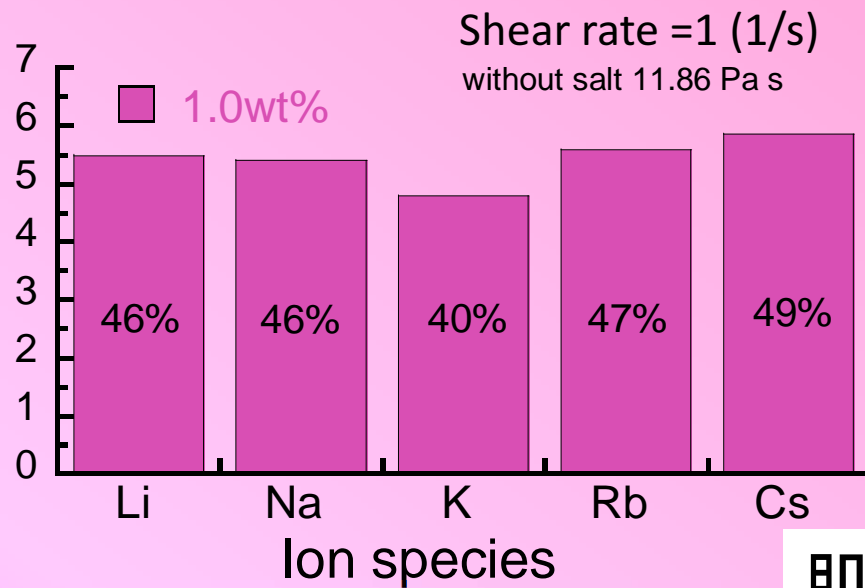
Sacran concentration

ローション最適濃度 クリーム・美容液最適濃度

T. Mitumata, M. Okajima et al *Physical Review E* 83 042607 (2013)

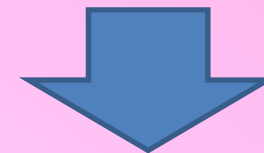
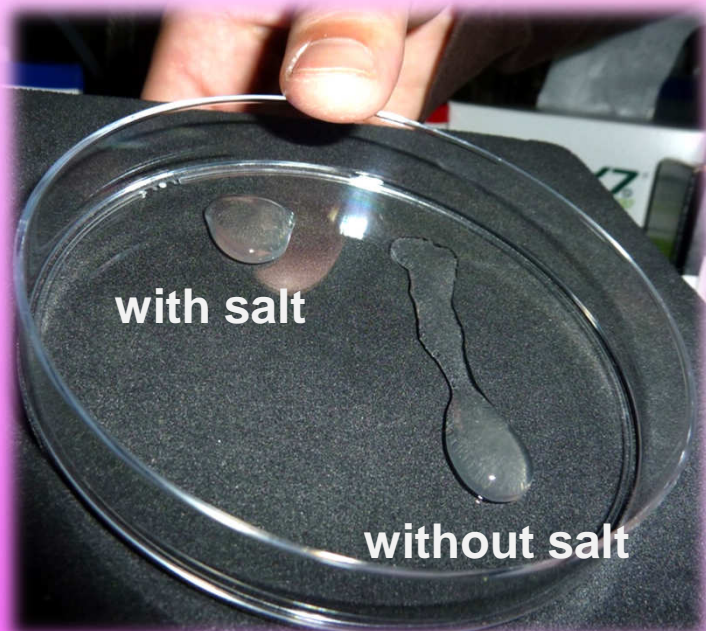
粘度に及ぼす塩効果

Viscosity $\Delta\eta$ (Pa s)



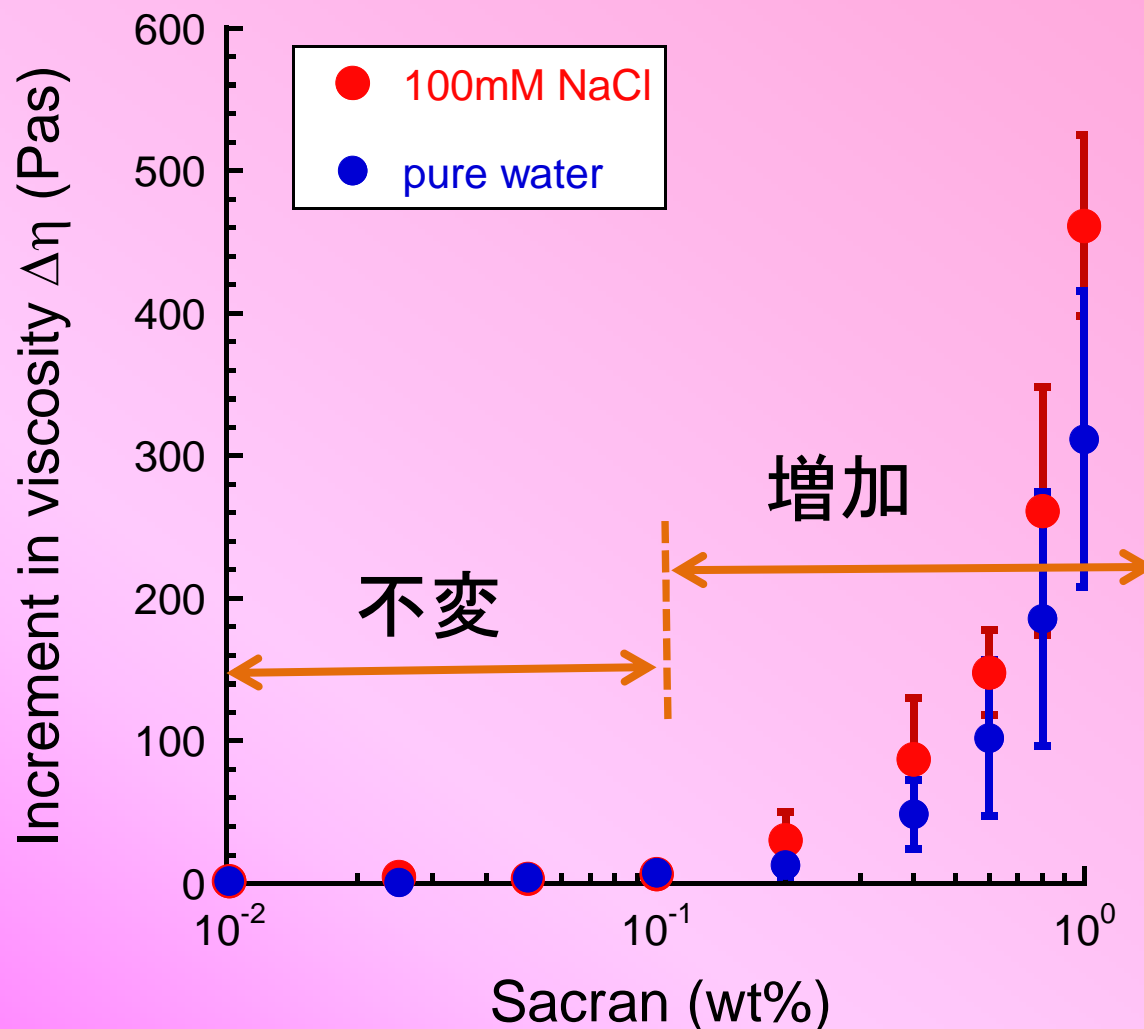
塩添加により架橋点が生じた結果粘度が増加。

肌の上は塩リッチであり、サクラン水溶液は皮膚上ではさらに高粘性となると予測される



肌の上でゲル膜が形成される

サクランの濃度別の塩添加粘性上昇率



サクラン水溶液が高濃度であればあるほど塩添加による粘度増加は効果的であった

サクラン低濃度水溶液は塩に対して安定。一方高濃度では粘度が増し、ゲルとしての機能性が増す。

例えば。ローション等にサクランを低濃度配合した場合、肌に乗せた後も汗の影響は受けず粘性は安定、一方クリーム等に高配合した場合は肌に乗せた後、汗の中の塩を吸着し粘性が上がり安定したゲル状態になりやすい。

Sacranのゲル形成濃度

動的粘弾性を測定し、 $\tan \delta$ を求めた
 $\tan \delta$ は弾性成分である貯蔵弾性率 G' と粘性成分である損失弾性率 G'' の比
 $\tan \delta = G'' / G'$ であり $\tan \delta > 1$ でゾル、 $\tan \delta < 1$ でゲル

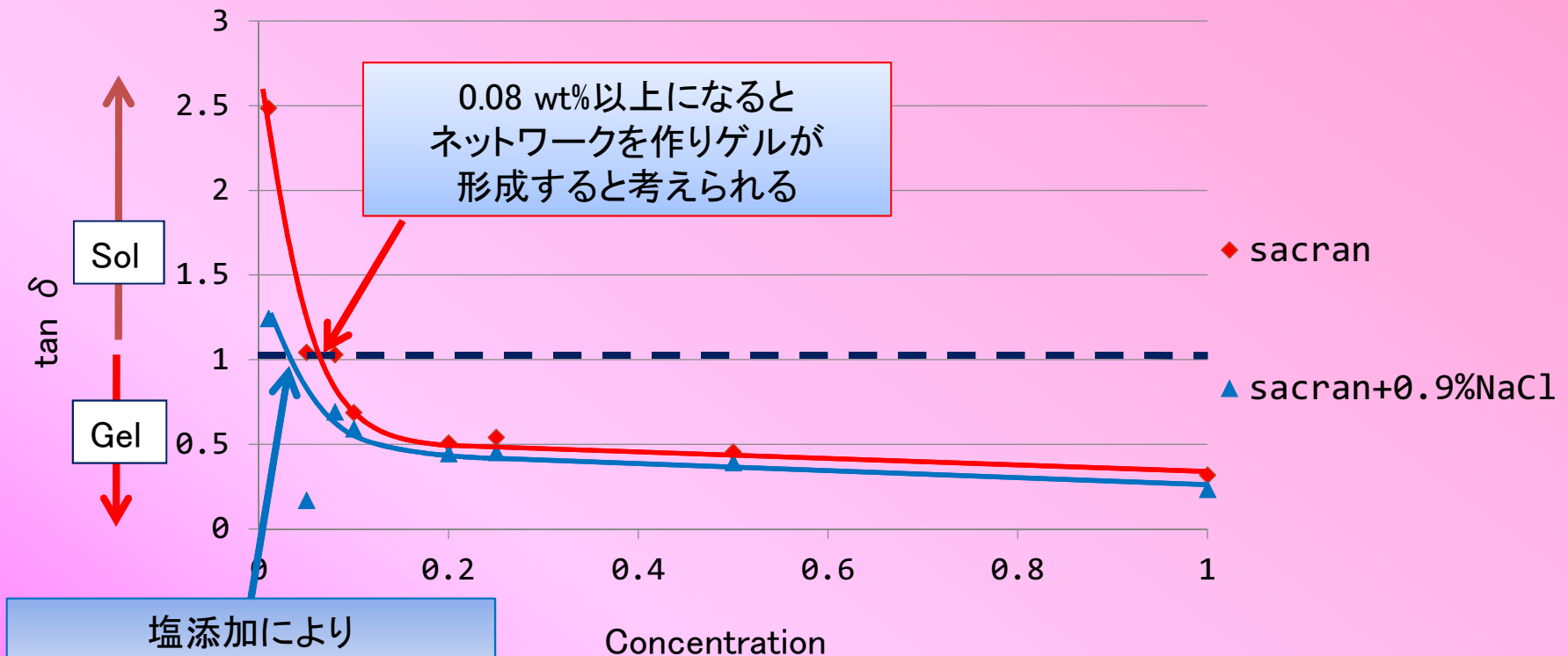
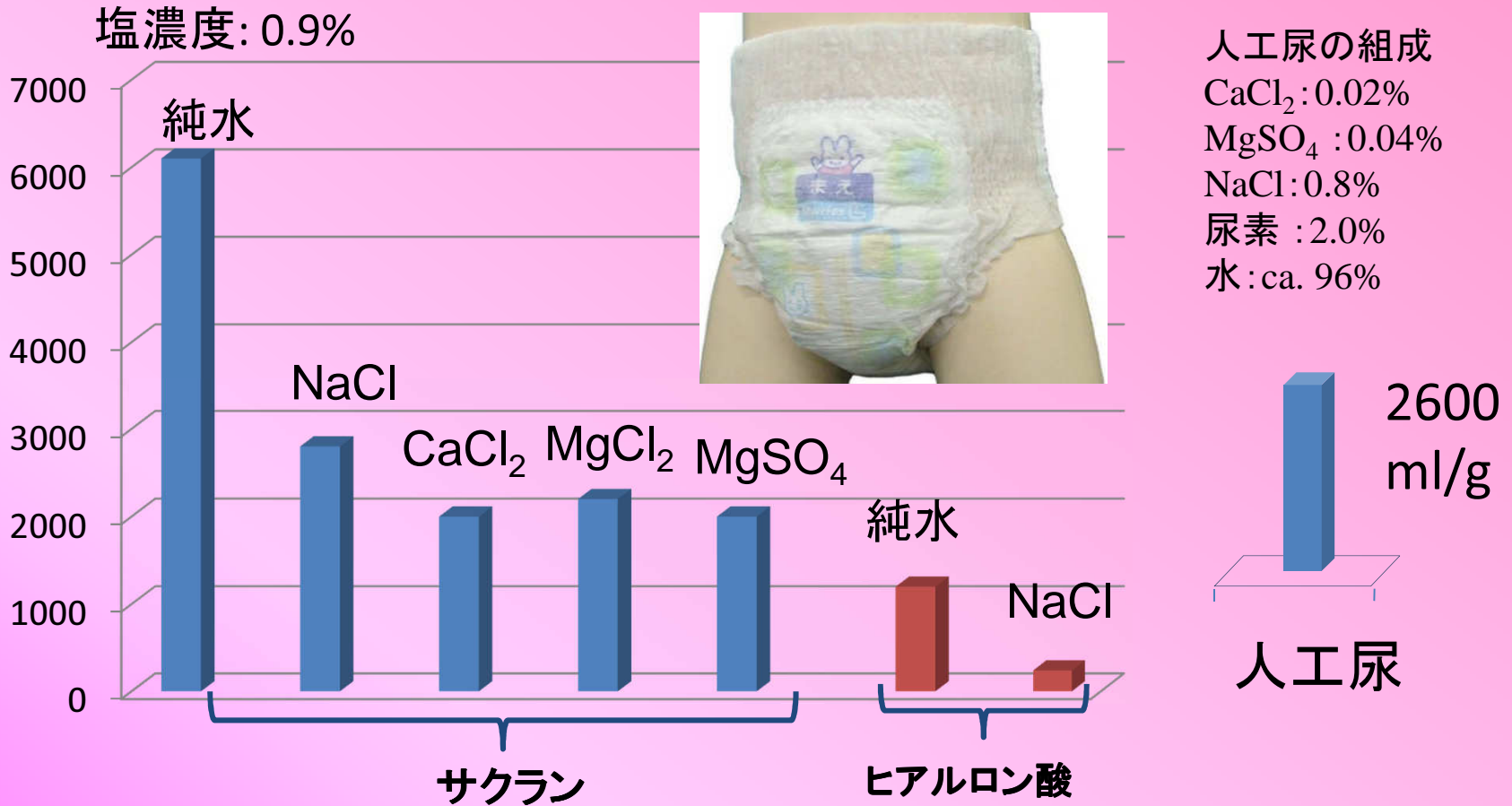


図2-9 $\tan \delta$ of sacran (27°C)

塩添加によりゲル化点が低下し、ゲル粘性も上がった

サクランの保水性能力

人工尿でも驚異的な保水力



純水のみならず各種イオン水においてもサクランの保水力は際だっていた

サクラン分子鎖周辺の水について

サクランの周囲には、自由水の他に高分子鎖との相互作用によって極めて低温で凍る水(凍結結合水)と凍ることの出来ない水(不凍水)が存在する。



図 結合水について

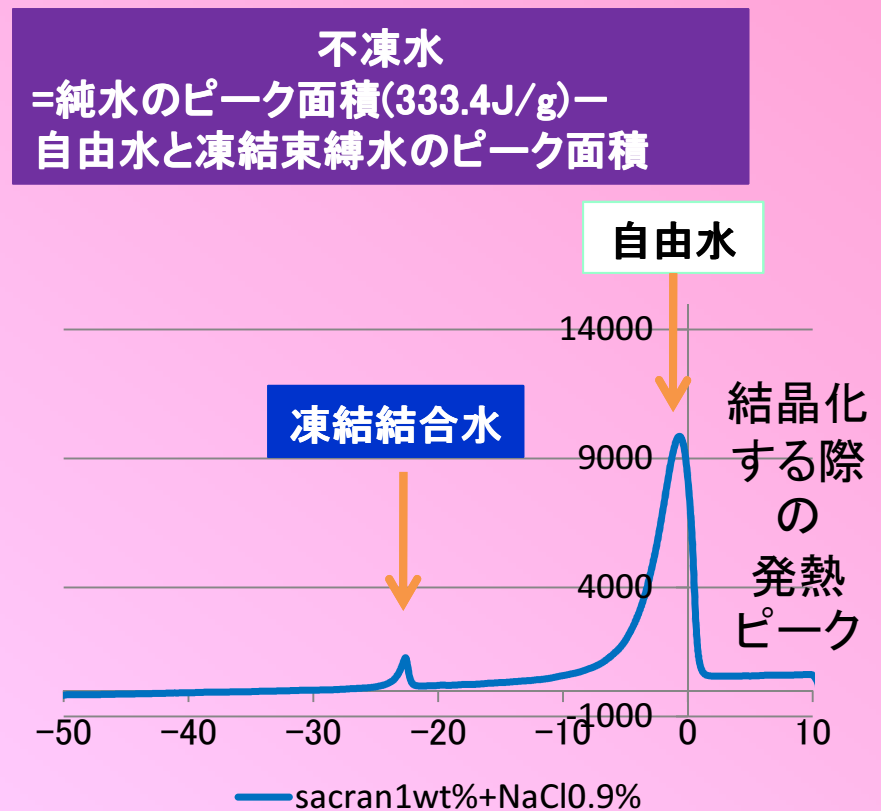
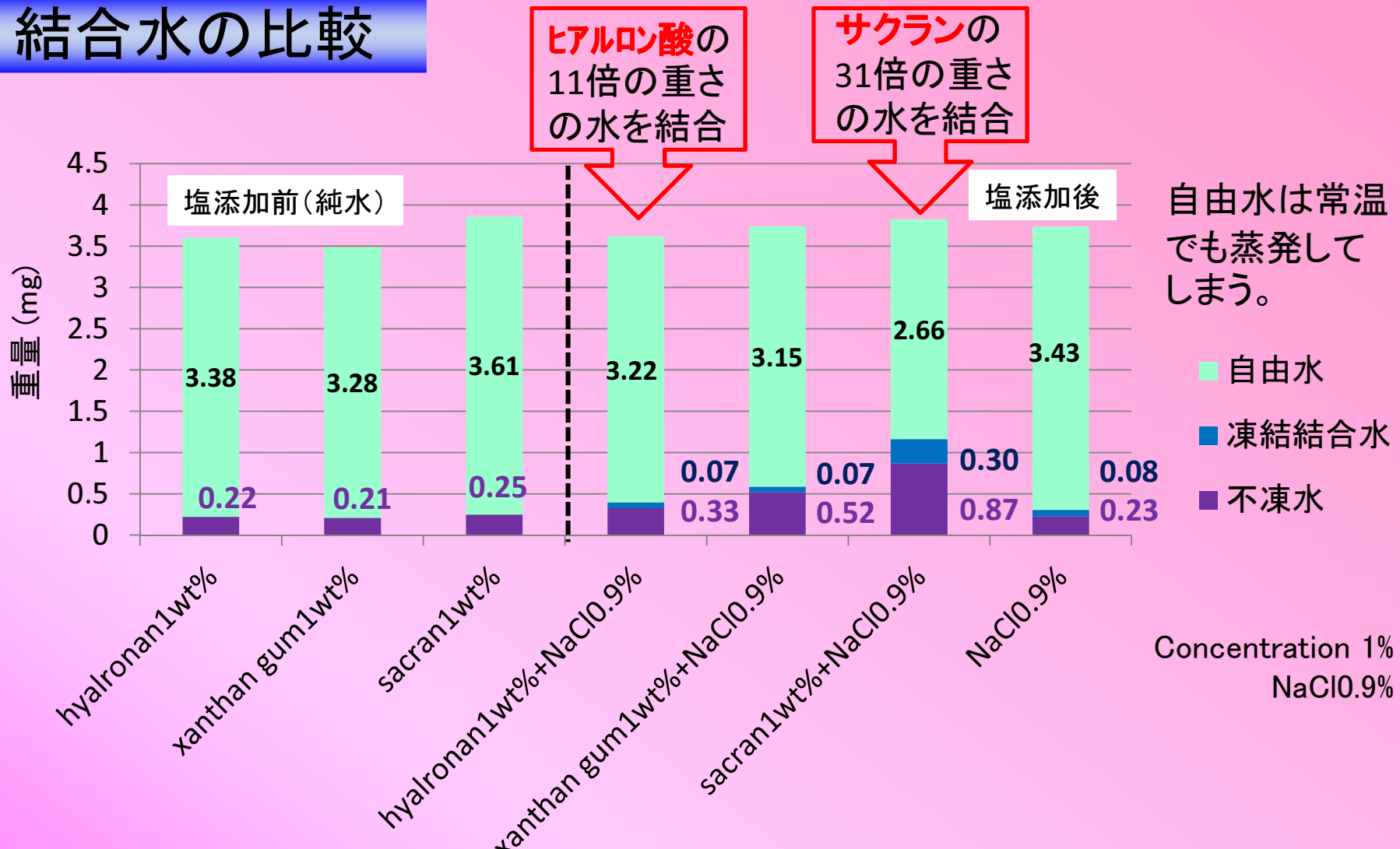


図 DSCによる結合水のピーク

示差走査熱量測定(DSC)を用いてサクラン水溶液中の結合水率(凍結結合水+不凍水)を調べた

結合水の比較



塩添加前(純水)に関しては不凍水率はいずれの多糖類においても大きな違いは無く、塩を加えることでそれぞれその割合は上昇した。特にサクランに関しては**31%もの高い結合水率(凍結結合水+不凍水)**であった。これが、サクランの高い保水能力に繋がると考えられ(サクランが自身の周辺に留める水の量がヒアルロン酸より3倍多かった)→**ヒアルロン酸より高い保水効果が期待出来る**

Sacran improves ear skin lesions in atopic mice

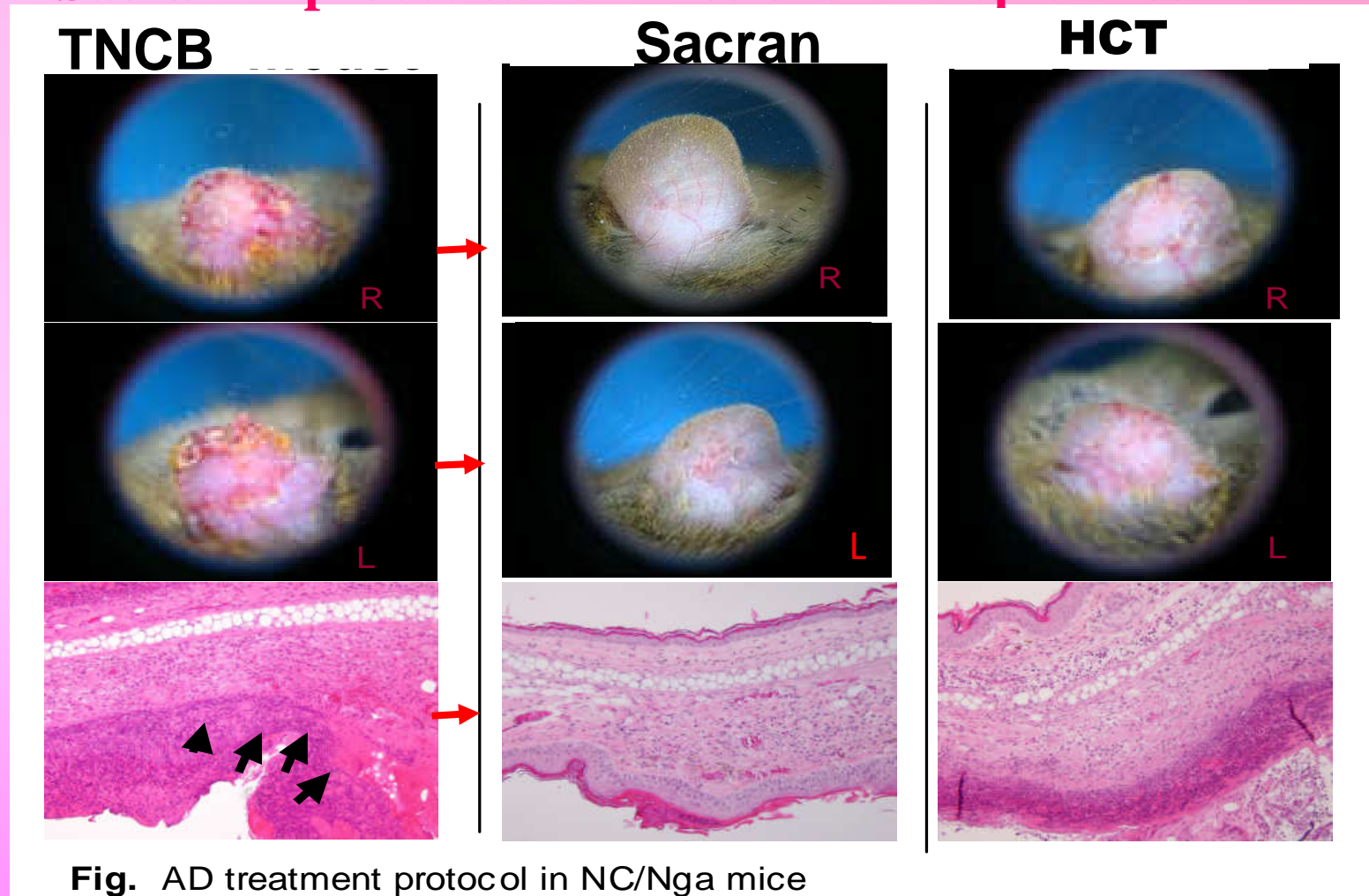
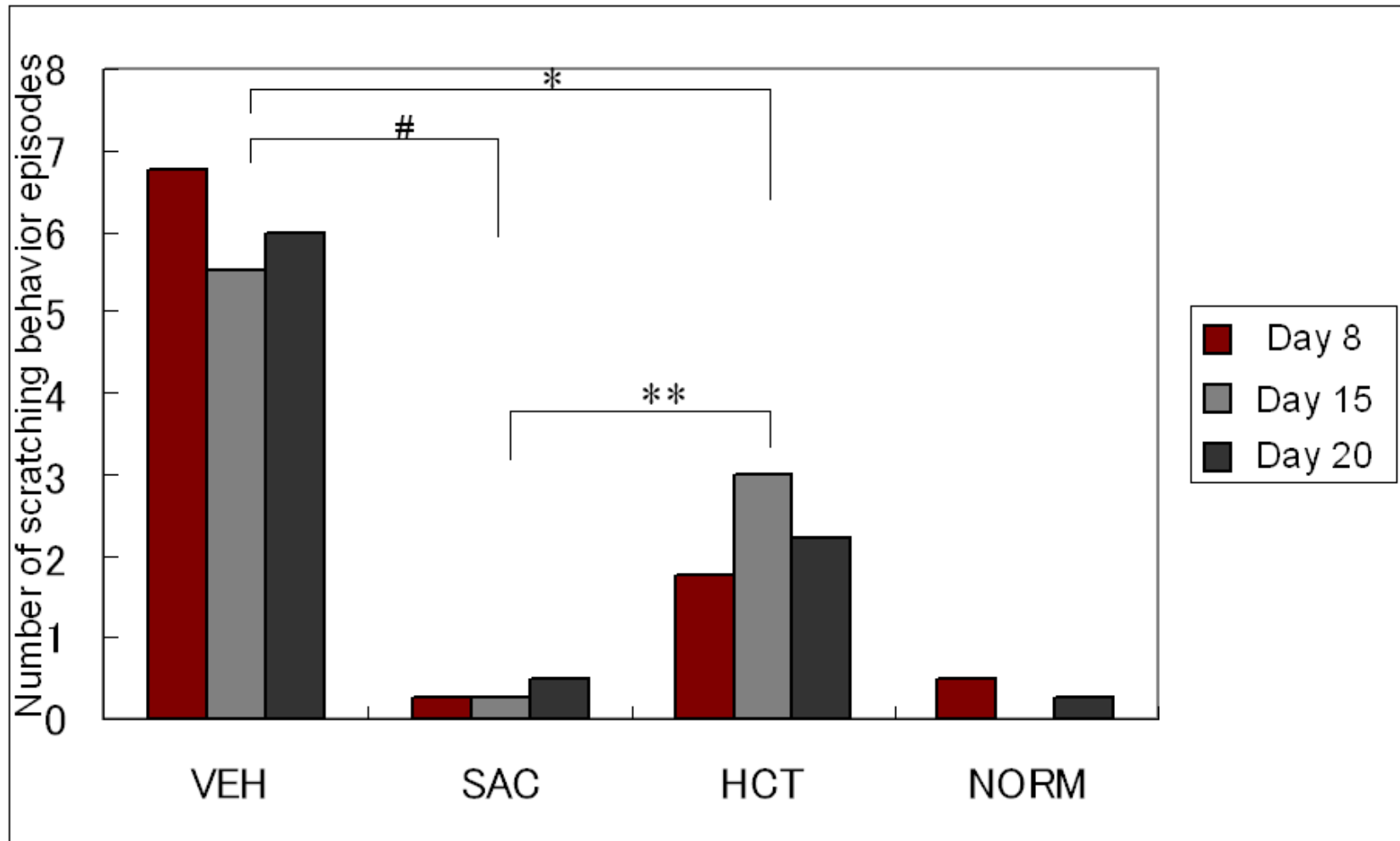


Fig. AD treatment protocol in NC/Nga mice

Sacranおよびヒドロコルチゾン塗布によって、炎症細胞(矢頭)の浸潤が増えていないことが確認できる。

マウスのひっかき回数の評価



ステロイドを超える痒み低減効果！

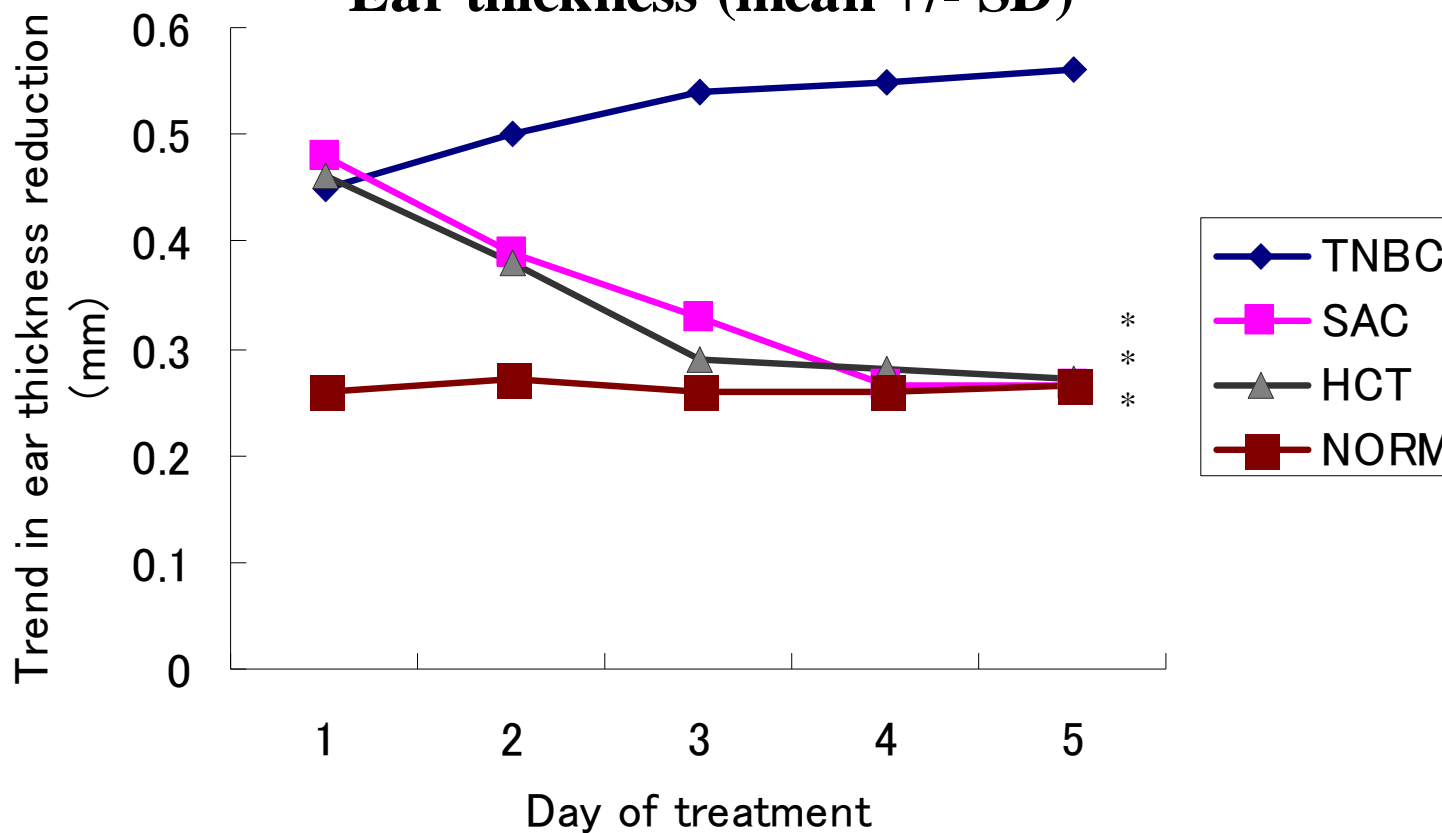
高知大学医学部 Ngatu医学博士提供

その他、薬学部でもサクランを用いた医薬品の研究が進行中！

マウスの耳の厚みの評価

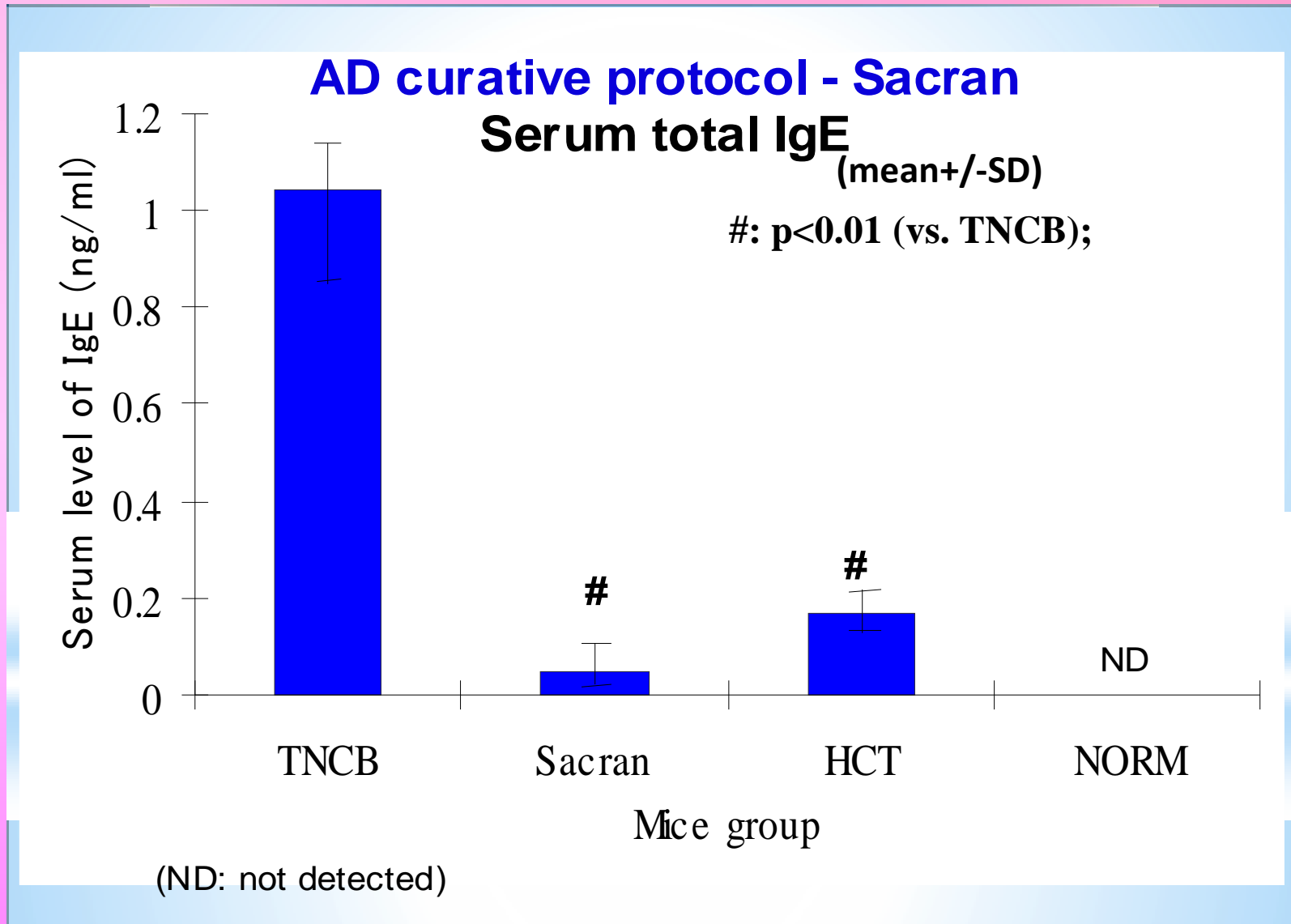
AD curative protocol - Sacran

Ear thickness (mean +/- SD)



サクランで治療後炎症部位の耳の厚みが、正常の厚みに戻った(ヒドロコロチゾンと同効果が確認される)

血清中のIgE量の評価



サクランで治療後血清中のIgE量がヒドロコロチゾンよりも減少し、アレルギーが抑制されたことが分かった。

人での症例 1

Patient 1

1

A



薬の使用を止め、サクラン
水溶液を塗布



三週間後ほぼ完治
(痒みが止まり赤みも
ほぼ無くなる)

患者:11歳 女性

(症状:3歳よりアトピー性皮膚炎となりFluocinolone acetonideを処方するが悪化する一途)

高知大学医学部 Ngatu医学博士提供

人での症例2

Patient 3

Day 1



Day 10



Day 14



Day 21



高知大学医学部 Ngatu医学博士提供

高知大学医学部 Ngatu医学博士提供

患者:32歳女性(家族性アトピー性皮膚炎(熱も伴う))
0.5%サクランを塗布、14日目に医学的に治癒が認められる。

33 year-old-lady: - atopic since infancy; presented with moderate lesions on her shoulder.

week1



week2



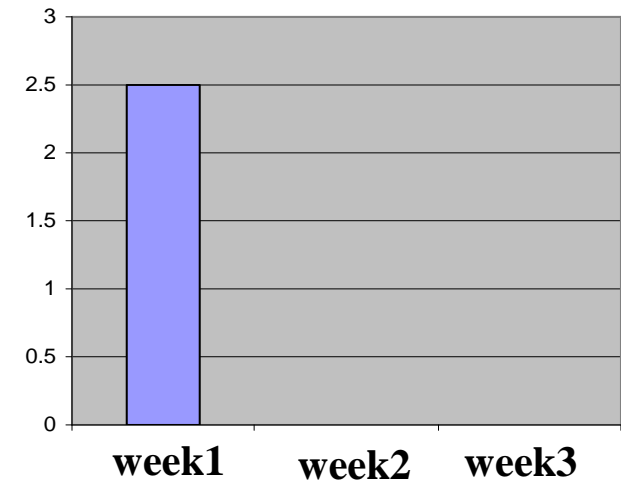
week3



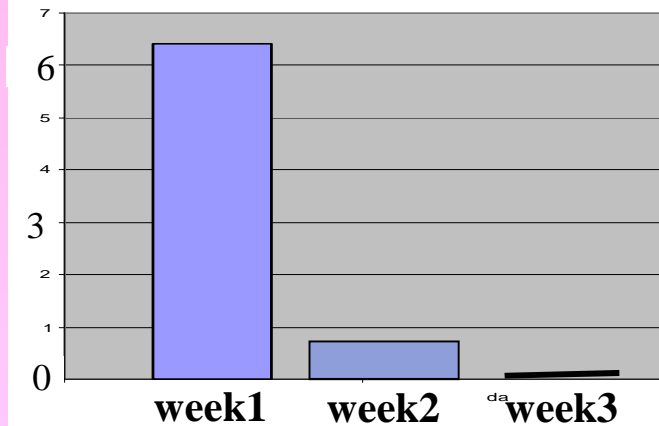
week4



Trend in severity of Itch



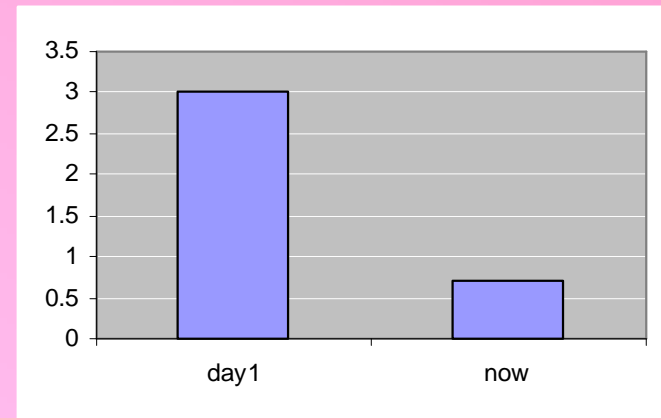
Trend in EASI score



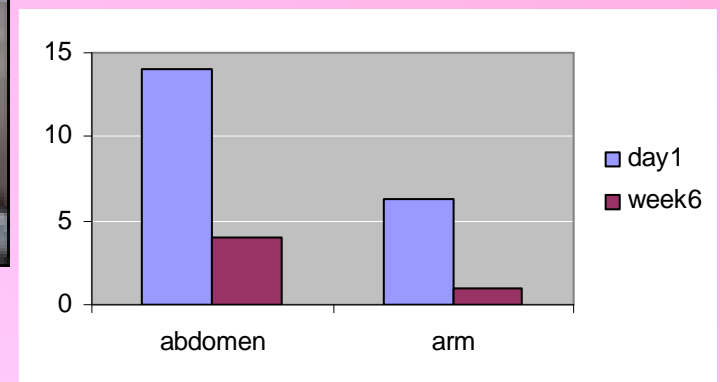
30 year-old-man (S.S): - atopic since early days, with severe chronic skin lesions on upper limbs, abdomen. He has been using at least 2 different drugs when the worsened. She used 2% sacran for 2 weeks, then 0.2% sacran without any other medication.



Trend in severity of Itch

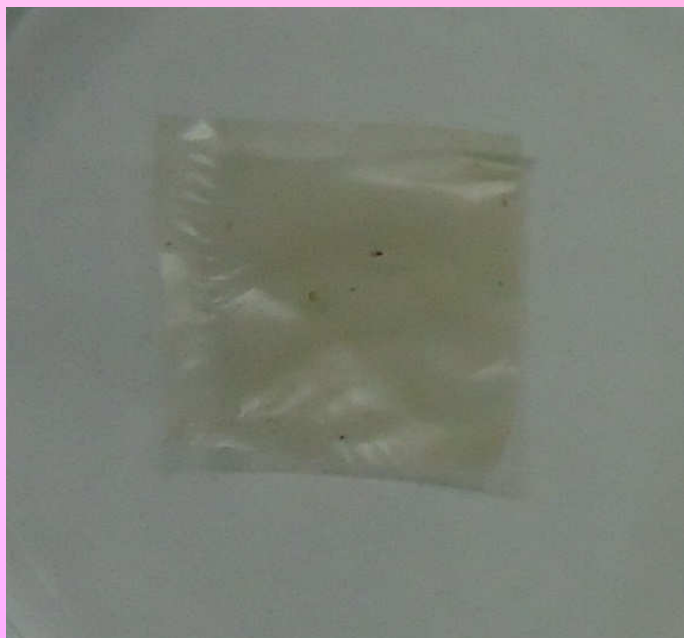


Trend in EASI score

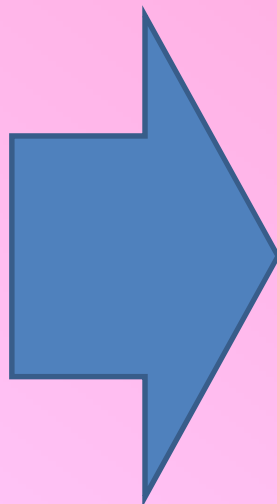


サクランを用いた新素材の開発

サクランのフィルム



熱処理後
10秒間水に浸す



皮膚のように固いサクランゲル



可能性のある用途……人工皮膚、創傷被覆材、経皮吸収剤、ドラッグデリバリー
火傷などの感染予防剤、抗炎症効果を有したゲルパック基剤など。。。。

他の多糖類では出来ないゲルをサクランから作成！

フィルムゲルの作成手順

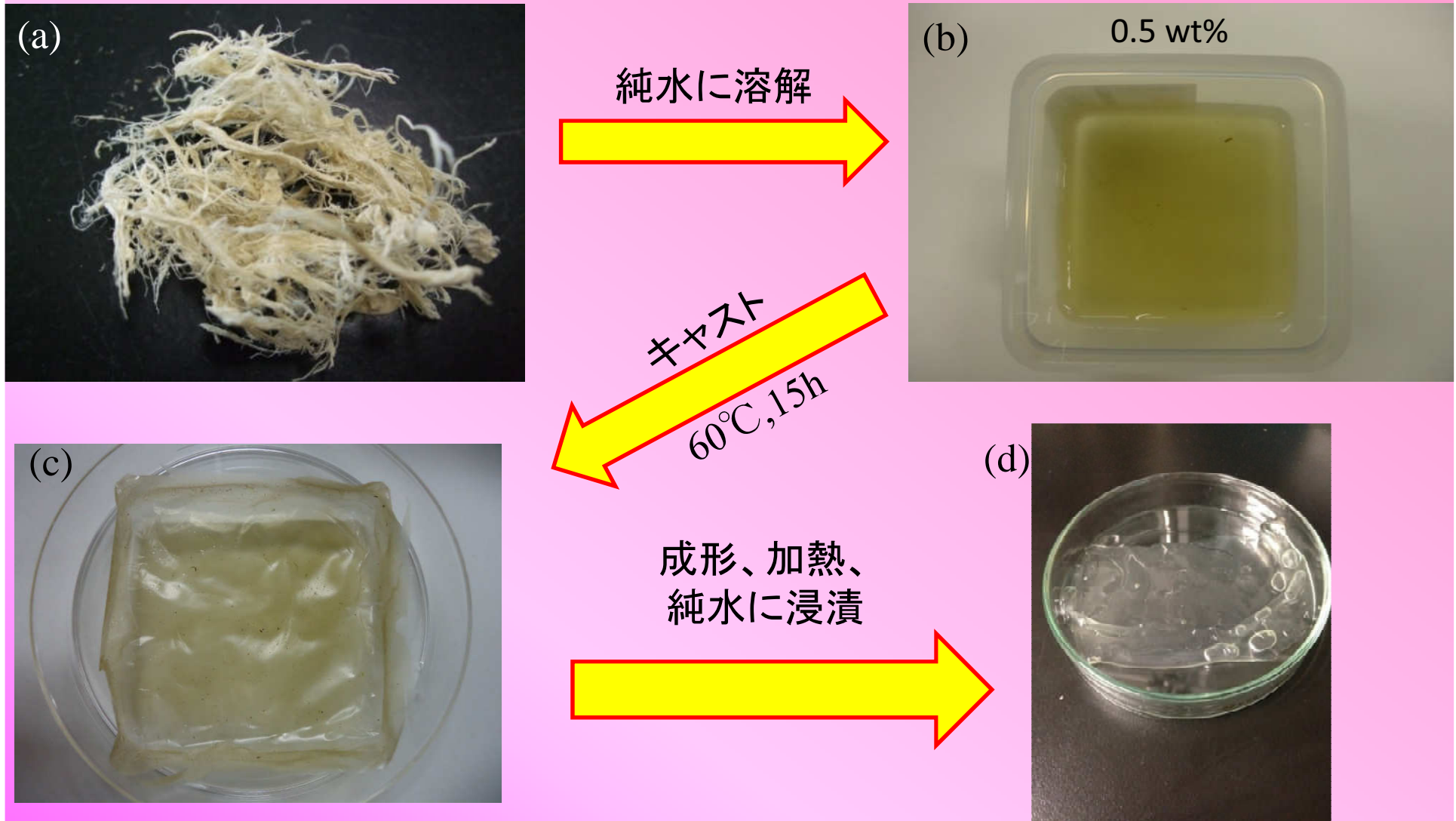


Fig. 5 サクランフィルムゲルの作成方法

加熱温度によるゲルの膨潤度の変化

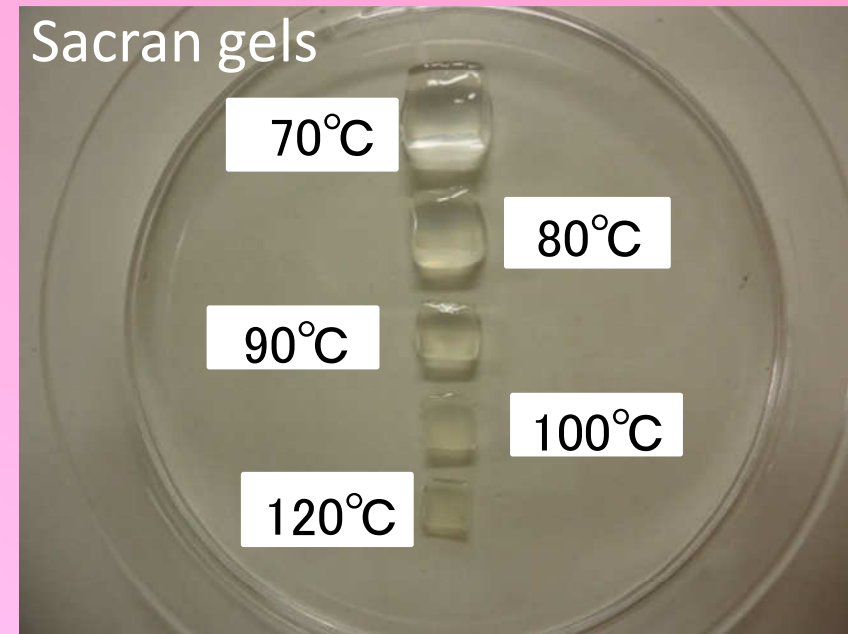
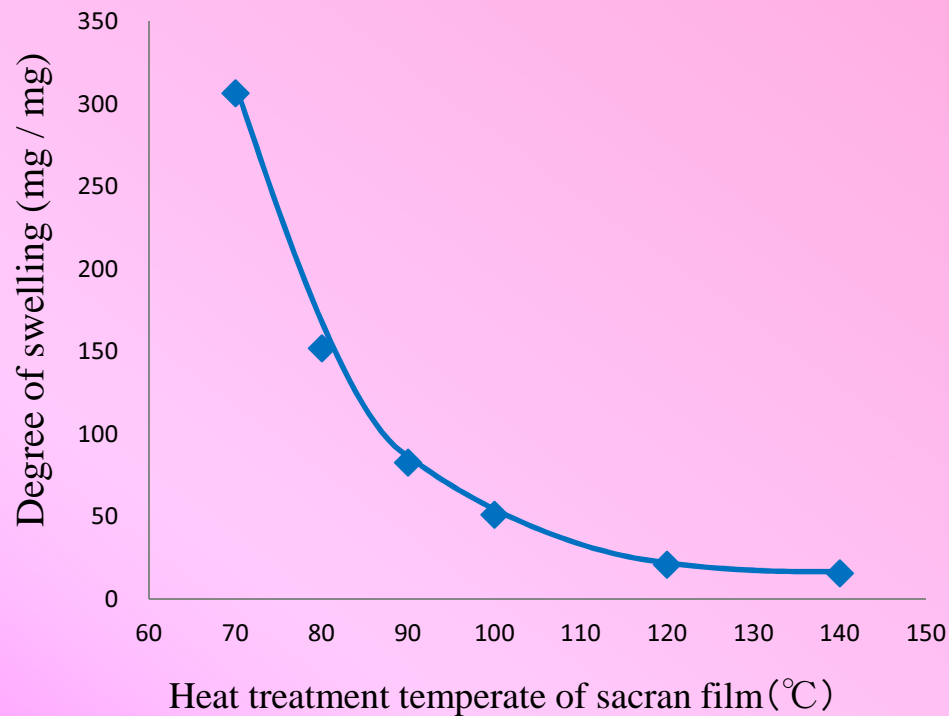
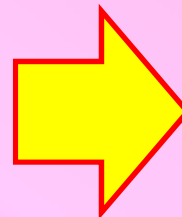


Fig. 6 フィルムの加熱処理に応じた膨潤度

サクランゲルの膨潤度は加熱処理の温度の上昇に伴い低下した。



サクランゲルはフィルムの加熱処理の温度の上昇に伴い、架橋点密度は増加したと推測される。

フィルムの加熱温度を調整することで目的に応じた強度・膨潤度・厚みを持つゲルの作成が可能。

その場ゲル化法による天然多糖類のゲル化

Table 3 Behavior of natural polysaccharides by in-situ gelation method

加熱処理時間	サクラン	低分子サクラン	アルギン酸Na	ヒアルロン酸	キサンタンガム
M_w (mol / g)	約2900万	400万以下	15万	130万	450万
0h (60°C)	×	×	×	×	×
2 (60°C)	×	×	×	×	×
4h (60°C)	○	×	×	×	×
2 (120°C)	○	×	×	×	×

○:ゲル化 ×:ゲル化しない

全ての多糖類において水溶液からフィルムを作成は可能であったが、その後、純水に膨潤させるとサクランのみが自己支持性のあるゲルを形成した。



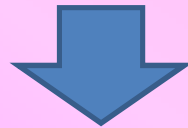
一方で、サクランを加水分解し分子量を低下させた場合(400万以下)、ゲルの形成がみられなかった。

これらからサクランのゲル形成能は分子量が大きく関与することが推測される。

超高分子量体サクランのみでフィルムゲルは作成可能である。

まとめ

1. 日本オリジナルのラン藻から抽出多糖類で最も分子量の大きい「サクラン」が発見された
2. サクランは硫酸化酸性多糖類で構成単糖は11種類以上からなる
3. サクランは弱い剪断で劇的に粘性が上昇し(レオペクシー)、強い剪断で粘性が減少するシュードプラスチック性を示した。また塩添加により粘度は上昇する。塩の存在でゲル化の効果が高まる
4. サクランは塩存在下でも高い保水能力を示し、結合水の割合がヒアルロン酸よりも高く、肌の上に於いても高い保水能力が期待出来る
5. サクランは抗炎症効果が確認され(痒み軽減、炎症部位治癒効果)医薬品としても期待される。
6. サクランを用い、肌に密着するゲルシートが作成出来た。



サクランは特徴ある溶液物性(粘性)により今までにないテクスチャーを与え、高い保水能力を有し、更に抗炎症効果を示す「夢の新素材」