

研究プロジェクト研究課題報告書

優先課題 1－②「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化」

研究代表者：有瀧真人

研究分担者：倉掛昌裕、伊丹利明、太田健吾、我如古菜月、杉原成美、竹田修三

【はじめに】

人が自然と共存して持続可能な社会を構築していく事は、人類に課された大きな課題である。この様な観点から、最近では生態系や生物多様性に関する研究が世界的に活発に行われている。優先課題 1－①の『瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と環境教育』は、私たちにとって身近な瀬戸内をフィールドにして生態学・生物多様性研究を行おうとするものであるのに対して、本優先課題 1－②の『瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化』は、瀬戸内の里山や里海に由来する生物資源を地域の産業や人々の健康という実社会に活かそうとする研究プロジェクトであり、応用研究主体の 1－②は基礎研究主体の 1－①を相補するものである。以下に、本研究で行おうとする研究について簡単に記載する。

日本の水産業は 1960 年代以降衰退の一途をたどり、極めて危機的な状況となっている。瀬戸内海はかつて豊饒の海と呼ばれ日本の水産業を支えてきたが、現状は全国で生じているのと同様の課題に苦しめられている。我々は里山・里海というワードの発祥の地である備後地域で、増養殖および、未利用資源の探索を中核に地域に根ざし、地域と連携した研究・教育活動を展開していくとともに、得られた成果をもとに持続可能な水産業のモデルを提案する。また、瀬戸内の農林水産資源に高付加価値を付与することは地域活性化につながる事が期待される。これらの目的に資するため本研究では、地域の特徴を生かした固有の水産物ブランドを開発し、かつブランド化につながる基礎的な研究を行う。具体的には、有瀧はシロギスをモデルとした新規養殖技術の確立、倉掛は藻類からの未利用有用物質の探索、伊丹はエビ類の持続的養殖技術の高度化、

太田は増殖技術による沿岸漁業振興策の検討、我如古は新素材添加による多機能飼料の開発、杉原・竹田は地元農水産物由来生理活性物質の研究などを行う。

研究報告書

1. テーマ名

優先課題 1-②

2. 研究課題名

瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化

(1) シロギス養殖技術の確立と実証化

3. 研究者名

生命工学部海洋生物科学科

有瀧真人

4. 研究協力者

生命工学部海洋生物科学科 4年

中田 大暉、竹内 舜、内田 智也、段田 裕斗、田中 佑季

5. 研究目的と方法

(1) 飼育したシロギスの発育と成長

これまでに沿岸資源培養学研究室ではシロギス養殖技術の課題を抽出し、人工種苗の形態異常、産卵抑制、卵質の評価などが検討されてきた。その一方で、仔稚魚期の成長や発育にかかる基礎的な詳細な情報は未だ把握されていない。そこで本研究ではシロギスの仔稚魚を飼育し、ふ化直後から稚魚になるまでの測定、観察によって初期発育及び成長の特徴を明らかにした。また、養殖期間中の成長と給餌率についても検討した。2020年7月9日に採卵・収容したシロギスの卵3.9万粒を飼育した。観察に使用する標本は、0、2日齢と5日齢から5日おきに40日齢までサンプリングした。標本は10%ホルマリンで固定した後に、80%エタノールで置換・保存した。これらは、全長、体長、肛門前長、頭長を15~25尾ずつ測定して成長の過程と相対比值(/全長%)を算出した。加えて、養殖試験を実施した2017年~2020年11月24日までの3群のシロギスの全長、体重の測定データ及び給餌データを用いてふ化してから出荷サイズに達するまでの成長や飼料効率等を把握した。

(2) 飼育したシロギスにおける椎骨の発達

沿岸資源培養学研究室ではこれまでシロギス *Sillago japonica* の人工種苗

生産の技術開発に取り組み、その過程で生じる形態異常、特に短軀の発現状況やその機序について検討してきた。しかし、形態異常の原因となる椎骨に関して、人工飼育下における化骨形成過程は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、シロギス人工種苗の椎骨の形成過程を観察した。2020年7月9日に採卵・収容したシロギスの卵 39,000 粒を飼育した。観察に使用した標本は、毎日飼育水槽からランダムサンプリングし 10%ホルマリンで固定した後に、80%エタノールで置換・保存した。得られたサンプルの内、10日齢から25日齢までの16回分、各10個体ずつ計160個体を使用し、全長を計測後、トリプシン法による透明化処理とアリザリンレッドSによる硬骨染色を施し、脊椎骨の化骨状況を観察した。化骨の進行は開始及び終了の日齢やサイズにより評価した。

(3) 養殖シロギスの評価調査

我々はこれまで、人工種苗に発現する形態異常や多くの養殖魚で問題となっている初期減耗の原因究明・防除手法の開発でシロギスを実験魚として用いてきた。その中で極めて成長が早く養殖対象魚としてシロギスが優れていることが明らかとなり、この特徴を利用した大型シロギス養殖技術開発「テッポウギスプロジェクト」を進めている。本研究では地元の企業および飲食店の協力のもと、養殖シロギスの商品としての評価を明らかにするとともに、得られた結果を養殖の技術開発にフィードバックすることを目的とした。2019年生産の養殖シロギス552尾を以下の各店舗に出荷して評価を得た。活魚として342尾(大サイズ:平均 59.5 ± 10.0 g、小サイズ:平均 46.3 ± 6.9 g)をすし丸「春日店」、阿藻珍味「駅家店」、「川口店」、三魚商に出荷した。期間は7月～11月の5ヶ月間としてアンケート調査を行い、評価を得た。鮮魚として10月に東京鮨おちあいへ15尾(大サイズ)、11月195尾(大サイズ:60g以上、小サイズを60.0g以下)を尾道ケンスイ、島田鮮魚店、安原商店、ハート新徳田店に出荷後アンケート調査を行い、評価を得た。

(4) シロギスを用いたおいしさタグの開発

シロギスを新たな寿司ネタとして流通させるため、寿司商材としての特徴について、おいしさタグを用い検討した。おいしさタグとは、味覚を数値化し、顧客の商品選択をサポートするものである。おいしさタグを開発することによって、生産者と消費者が直接的なコミュニケーションツールを持つこと、すなわち双方の関係性の大きな飛躍につなげることを目的としている。因島キャンパスで2年間養殖してきたシロギス129尾、全長21.6(19.0～23.7)cm、体重733.7(52.6～107.8)gを用い、天然のマダイを比較対象とした。これらを用いて活魚の握り、酢締め炙り、糸作りの握りおよび対象区のマダイの握りの4貫を80セット提供した。総数75人、男性21人、女性18人(未回答36人)、若年層35人、大人層36人(未回答4人)からデータ

を回収した。

6. 研究成果

(1) 飼育したシロギスの発育と成長

仔稚魚はその外部形態の特徴から A:ふ化仔魚期、B:開口期、C:前屈曲期、D:屈曲期、E:後屈曲期、F:稚魚期、G:幼魚期、H:若魚期の8段階の発育ステージ(st)に区分した。ふ化直後、未開口であった仔魚(Ast)は、2日齢には開口し(Bst)、10日齢には尾鰭原基の出現が確認された(Cst)。15日齢には屈曲が開始(Dst)、もしくは完了する個体(Est)が現れ

その後、各鰭条が発達して25日齢には稚魚が出現し、30日齢にはすべて稚魚となった(Fst)。孵化直後、 $1.83 \pm 0.07 \text{ mm}$ であった全長は30日齢(稚魚期)には $16.5 \pm 3.92 \text{ mm}$ までに成長した。また、相対成長の変化から、体型が大きく変化するのは、内部栄養から外部栄養への転換に伴う生態的、形態的な変化が集中しているBstと、尾鰭原基の出現、脊索末端の屈曲の開始、尾鰭鰭条が形成される仔魚から稚魚への変態期間であるC、D、Estと考えられた。養殖開始時の平均全長、平均体重が75cm、0.48gであったものが1歳時には14cm、25g、2歳時には19cm、60g、3歳時には21cm、84gまで成長した。出荷サイズである20cmに達するまでに必要な最低積算温度は約 12000°C であった。給餌率は全長3~5cmサイズで体重の5~4%、全長5~7cmサイズで4~3%、全長7~9cmサイズで3~2%、全長10cm以上のサイズは2~1%であると推測された。

(2) 飼育したシロギスにおける椎骨の発達

飼育下においてシロギスは頭部側の第1椎骨から順番に化骨が始まった。しかし、第18椎骨まで化骨が進行して以降は、最後端の第35椎骨の化骨が先に始まった。その後第35椎骨に遅れた第18~第34椎骨も頭部側から順に

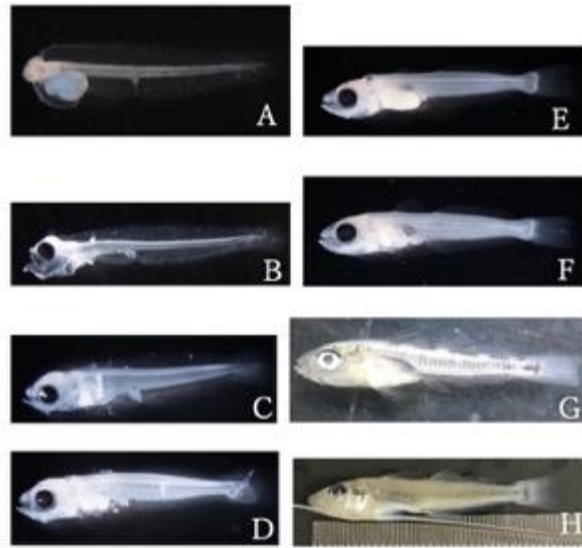


図1 ステージ区分

A: 0日齢, 平均全長 $1.83 \pm 0.07 \text{ mm}$
B: 2, 5日齢, 平均全長 $2.4 \pm 0.19 \text{ mm}$
C: 10, 15日齢, 平均全長 $4.16 \pm 0.39 \text{ mm}$
D: 15, 20日齢, 平均全長 $5.99 \pm 0.7 \text{ mm}$
E: 15, 20, 25日齢, 平均全長 $8.21 \pm 1.42 \text{ mm}$
F: 25日齢, 平均全長 $12.54 \pm 1.68 \text{ mm}$
G: 30, 35, 40日齢, 平均全長 $19.02 \pm 3.76 \text{ mm}$
H: 30, 35, 40日齢, 平均全長 $33.58 \pm 4.77 \text{ mm}$

図1 発育ステージ

化骨が進み、第 28 椎骨の化骨が完了する時期には、それより後方 27～34 椎骨でも化骨が認められた。さらに、一番遅れて化骨するのは、第 34 椎骨であることが明らかとなった（図 2）。化骨が最も早く観察出来たのは 11 日齢、全長 5.4mm で、最も遅いものは

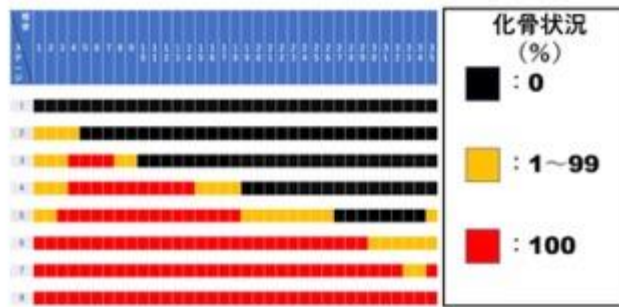


図 2 化骨過程

21 日齢、6.7mm であった。また化骨完了が最も早いものは 18 日齢、全長 9.7mm で、最も遅いものは 25 日齢、9.5mm であった。化骨課程を化骨前から完了まで 8 段階に分け、進行状況を確認したところ、急速に化骨が進行するのは 12～16 日齢、全長 6～8mm の期間、サイズであることが明らかとなった。以上のことからシロギスの化骨は成長が早い個体では 11 日齢、遅い個体では 21 日齢の全長 5～6mm で化骨が始まり、終了は成長の早い個体で 18 日齢、遅い個体で 25 日齢の全長 8～9mm サイズであることが確認できた。このように、開始終了ともに全長では大きな差異が認められないものの、日齢では 10～7 日の幅が生じたことから、化骨の開始、終了はサイズ依存で誘導される可能性が高い。

(3) 養殖シロギスの評価調査

活魚:5ヶ月間のアンケート調査の結果、料理は主に姿造り(図 3)、刺身の盛り合わせ、握り、天ぷらとして使用されることが多かった。また、特に一般の方は天ぷらでの使用率が高かった。活魚の良かった点は、「鮮度が天然の鮮魚に比べて明らかに良く、身がコリコリとして厚みもあり美味しい」、



図 3 姿造り

「活魚の方が使用用途も広がり、物珍しい」等の意見があった。一方、「小さいサイズでは物足りない」、「価格が高い」、「シロギスを知らないお客さんの反応が薄い」等の意見もあった。鮮魚:鮮魚は主に刺身の盛り合わせ、天ぷら、骨を骨せんべいに調理・提供していた。鮮魚の良かった点は、「天ぷらの身はフワフワで、冷凍品とは別物」、「1日たっても鮮度が良

く、コリコリ感は無くなるが旨味はでた」等の意見があった。マイナスの評価としては、「早めに使い切らないといけなく、握りにすると活魚みたいな透明感はない」、「養殖シロギスの鮮魚を使うなら値段段的に見て冷凍品の方が需要はある」等の意見があった。販売価格はサイズや鮮

表 1 養殖シロギスの評価

	活魚		鮮魚	
	大	小	大	小
味	◎		◎	
鮮度	◎		◎	
サイズ	△	×	○	×
価格	○		△	×
店舗の認知度	○			
来客者の認知度	×			

魚、活魚により 1500 円～4500 円/kg とばらついた(表 1)。以上の結果から、養殖シロギスの味はとて好評だが、知らない人にメディア等でアピールが必須である。また、値段に関しても地域や業種ごとによって異なっていたため、よりニーズに沿った出荷の形態が求められていると考える。加えて、小さいシロギスは活魚にするメリットはなく、加工すると輸入品の需要が勝るため、より大きいシロギス(80g 以上)の安定供給が今後重要になると考える。

(4) シロギスを用いたおいしさタグの開発

透明感、②シロギス(酢締め炙り) 1.01 ± 0.88 と①シロギス(活魚の握り) 1.73 ± 0.77 、③シロギス(糸作りの握り) 1.96 ± 0.82 、④マダイ 1.76 ± 0.85 、それぞれに優位な差がみられた。食感、②シロギス(酢締め炙り) 1.31 ± 0.87 と①シロギス(活魚の握り) 1.60 ± 0.86 、④マダイ 1.95 ± 0.85 、それぞれに優位な差がみられた。このほかの香り、舌触り、甘み、旨味、水っぽさ、苦味の 6 項目間では各商品で差異が認められなかった。③シロギス(糸作りの握り)の旨味は、男性 (0.65 ± 0.88) より女性 (1.28 ± 0.94) の方が、評価が高く、男女の差の有意差がみられた。また、水っぽさは、①シロギス(活魚の握り) (0.56 ± 1.01 , 1.24 ± 0.73)、②シロギス(酢締め炙り) (0.57 ± 1.01 , 1.33 ± 0.73)、③シロギス(糸作りの握り) (0.40 ± 1.01 , 1.06 ± 0.73)、④マダイ (0.67 ± 1.01 , 1.22 ± 0.73)、全種において男性より女性の方が、評価が高く、男女の差の有意差がみられた。このほかの透明感、香り、舌触り、食感、甘み、苦味の 6 項目間では各商品で差異が認められなかった。②シロギス(酢締め炙り)の香りは、大人層 (0.69 ± 0.92) より若年層 (1.24 ± 1.00) の方が、評価が高く、年代の差の有意差がみられた。③シロギス(糸作りの握り)の甘みは、大人層 (0.82 ± 0.89) より若年層 (1.29 ± 0.79) の方が、評価が高く、年代の差の有意差がみられた。このほかの透明感、舌触り、食感、旨味、水っぽさ、苦味の 6 項目間では

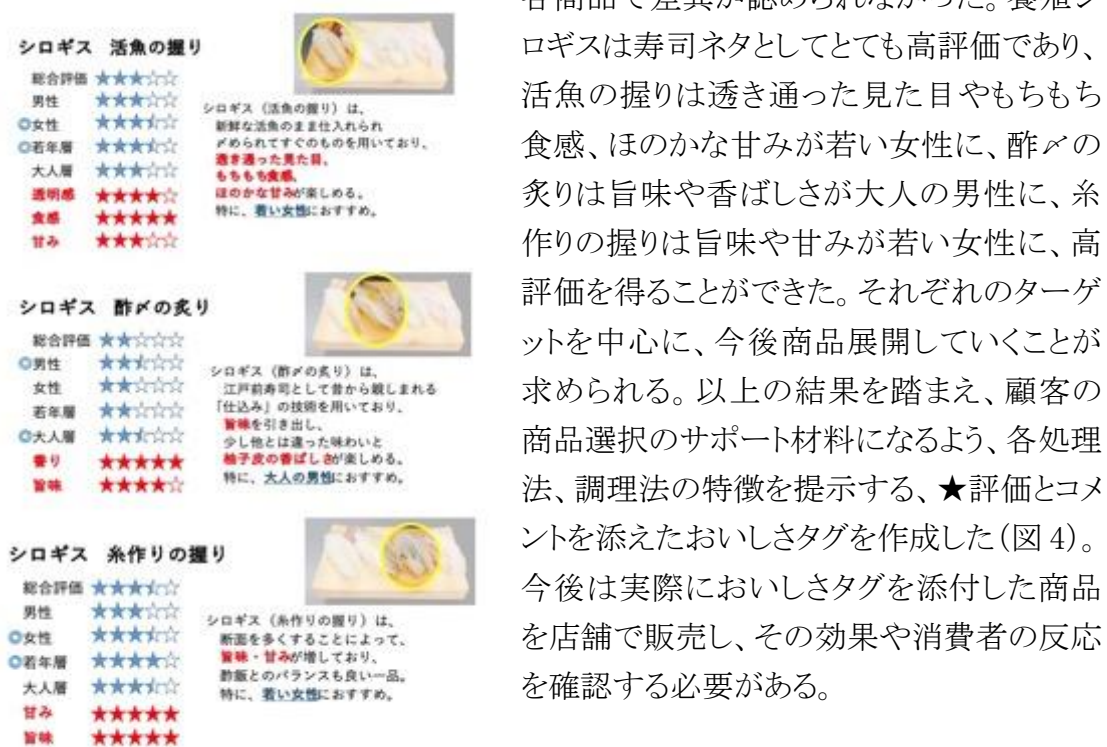


図4 おいしさタグ

7. 今後の研究計画

(1) ~ (4) の取り組みから、1) 養殖シロギスは約2年で概ね20cm、60gまで成長すること、2) 孵化後20日、全長10mmで化骨が完成すること、3) 活魚で大型サイズの需要が高いこと、4) 寿司では活魚や糸作りの人気が高く、年齢や性別で好みが変わることなどが明らかとなった。今後は、この成果を用いてできるだけ短期間に大型のシロギスを生産できる技術確立する。また、一般的でないシロギスの生食や活魚出荷について更なる検討と普及を試み、養殖シロギスの評価を高めていくことに着手する。

得られた成果は、民間と連携して実証化を検討する目的で本州より水温が高く、シロギスの成長が促進される沖縄の施設での養殖試験を始めた。今後は実証試験で発生する課題を基礎的な知見を重ねることで解決するとともに、福山大学で得られた成果をフィードバックする予定である。

研究報告書

1. テーマ名

優先課題1-②

2. 研究課題名

瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化

(2) 海洋資源の有効利用性の検討

3. 研究者名

生命工学部 海洋生物科学科 食品衛生学研究室・倉掛昌裕

4. 研究協力者

生命工学部海洋生物科学科 4年生

小田 祥己、竹本 拓哉、斎藤 清華、澤島 冬生、門田 和也、石本 圭亮

5. 研究目的

(1) アオサ等からの有用物質の探索

アオサはアオサ科アオサ属の海藻であり、海の富栄養化などが原因で大量繁殖することで緑潮（グリーンタイド）を発生させ、自然環境、漁業、観光へ影響を及ぼす。アオサはアオノリの代用品、家畜の飼料や農作物の肥料、バイオマス等へ利用できるが、その多くは未利用の状況である。福山市内海町にて採取したアオサ等の藻類の成分の有効利用として、ポリフェノール等の抗酸化性、蛋白質の分解物ペプチドによるアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性、多糖類の酵素分解による糖類への変換について検討する。

(2) 糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成

カニやエビ殻等の成分であるキチンは *N*-アセチルグルコサミンが β -1,4 結合した多糖である。キチン分解酵素系の中で *N*-アセチルグルコサミンを遊離させる *N*-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。本研究では土壌よりキチン分解菌の分離を行い、糖転移性を有する *N*-アセチルヘキソサミニダーゼを探索し、新規のオリゴ糖の合成について検討する。

(3) 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

海藻由来の多糖類は陸上植物と異なりウロン酸等を含みヘテロなものが多い。難分解性のカラギーナン等に対する高活性分解酵素を探索し、これら

多糖類からのオリゴ糖等の糖類への変換能およびその生成糖類について検討する。ここでは κ -カラギナーゼ生産菌の分離を行い、その酵素生産のための培養条件等について検討する。

6. 研究成果

(1) 福山市内海町にて採取したアオサ、ミル、クロミル、ミリン、ヒジキ、ウミウチワのポリフェノール量および SOD 様活性の抗酸化性は褐藻類のヒジキおよびウミウチワが高かった。一方、プロテアーゼ（アマノ SD 天野エンザイム株）により 40℃で 19 時間作用させ、その反応液上清のアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性（血圧上昇抑制機能の指標）を測定したところ、褐藻類のヒジキ、ウミウチワは 62～64%に対し、緑藻類のアオサ、ミル、クロミルで 76～79%と高いことがわかった（図 1）。

大量発生するアオサの ACE 阻害活性について詳しく調べたところ、図 2 に示すように、ACE 阻害活性が高いことで知られるスサビノリ（海苔）よりも高活性であることがわかった。活性値が 50%となるときの試料濃度、すなわち IC50 値はスサビノリが 0.170 mg/mL に対してアオサが 0.045 mg/mL となり、アオサペプチドの血圧上昇抑制作用が 3.8 程度高いことがわかった。

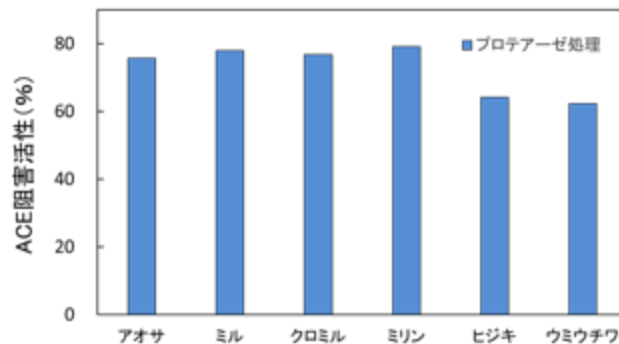


図 1 各種海藻類の ACE 阻害活性

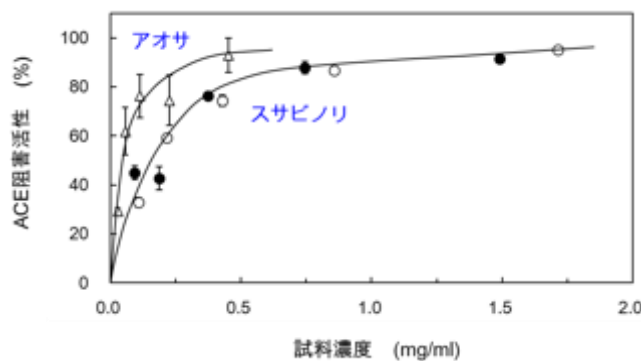


図 2 アオサ及びスサビノリ（海苔）の ACE 阻害活性

次にアオサからの糖質変換について調べた。以前土壌より分離したアオサ分解菌 K14 株をアオサ 1%、酵母エキス 0.5%の培地に植菌し 150 回/分（レシプロ）、30℃で 3 日間培養し、培養液上清を各種基質に作用させて酵素活性を測定した。図 3 に示すようにアオサの他に λ -カラギーナンおよび CMC（セルロース）に対する分解活性が認められた。この培養液上清を 4% アオサ粉末に、pH 5、40℃で反応させたところ、図 4 に示すように、反応に伴い生成還元糖量は増加し、アオサから生成する還元糖量のほとんどがグルコースであることがわかった。 β -グルコースが縮合重合したものがセルロースであるため、アオサにはセルロースが多く含まれるものと推察される。また K14 株培養液上清によりアオサ 1g 当たり 100mg 程度の糖が得られることがわかった。

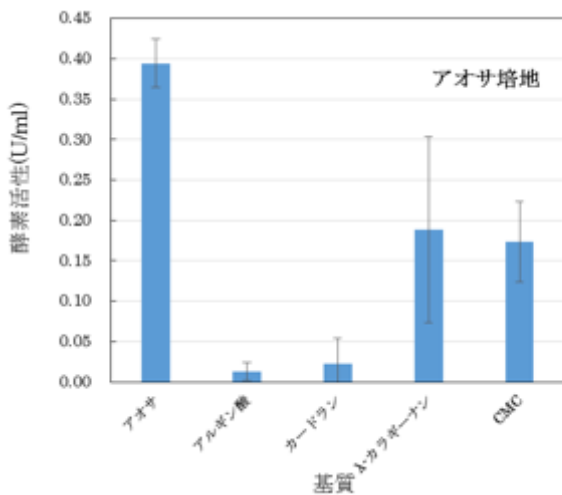


図 3 K14 株液体培養液の各種酵素活性

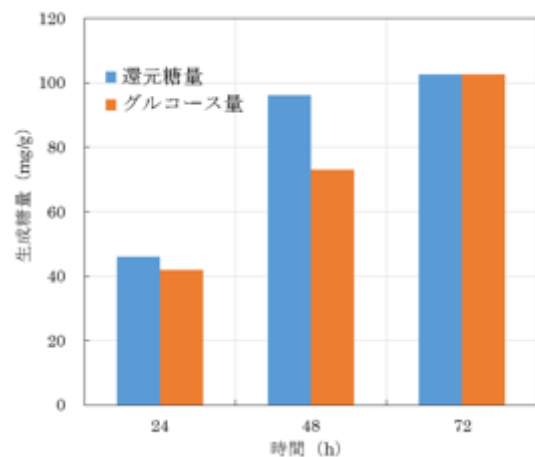


図 4 K14 株酵素によるアオサの加水分解

(2) 土壌からの *N*-アセチルヘキサミンダーゼ生産菌の分離を行ったところ、比較的高活性の酵素生産菌 38 株が得られた。これらの液体培養液上清を 2% *N,N'*-ジアセチルキトビオースに作用させて糖転移性について調べたところ、図 5 に示すように基質の分解率が約 60%以下で糖転移率が高くなることがわかった。また、糖転移率は分解率が低いほど高くなる傾向があり、糖転移率の傾向として 3 つのグループ (a, b, c) に大別された。反応後の生成オリゴ糖の糖組成は、分解率が 36%程度において最大になることがわかった。糖転移性の高い A-34、A-191、A-285、A-216、A-221 株のカビ類 5 株酵素について同程度の酵素活性となるように調製し、糖転移反応を行った結果、基質分解率はいずれの菌株酵素とも 20~40%の範囲となった。この中で A-216 および A-221 株酵素では糖転移率が 49%以下となったが、A-34、A-191 および A-285 株酵素で 74%以上となり、特に A-34 株の糖転移性が高

いことがわかった。A-34 株酵素の糖転移反応での受容体特異性について調べたところ、図 6 の HPLC チャートに示すように炭素数 5 以下の糖アルコールのグリセリン、エリスリトール、キシリトールに対して糖転移生成物 (TP) が検出され、受容体の炭素数が小さいもの程その糖転移性が高いことがわかった。また、最も糖転移性の高いグリセリンへの糖転移生成物は、解析の結果、1-O- β -D-N-acetylglucosaminyl glycerin であることがわかった。これは糖脂質の基幹物質であり、様々な機能性糖脂質合成への利用が期待できる。

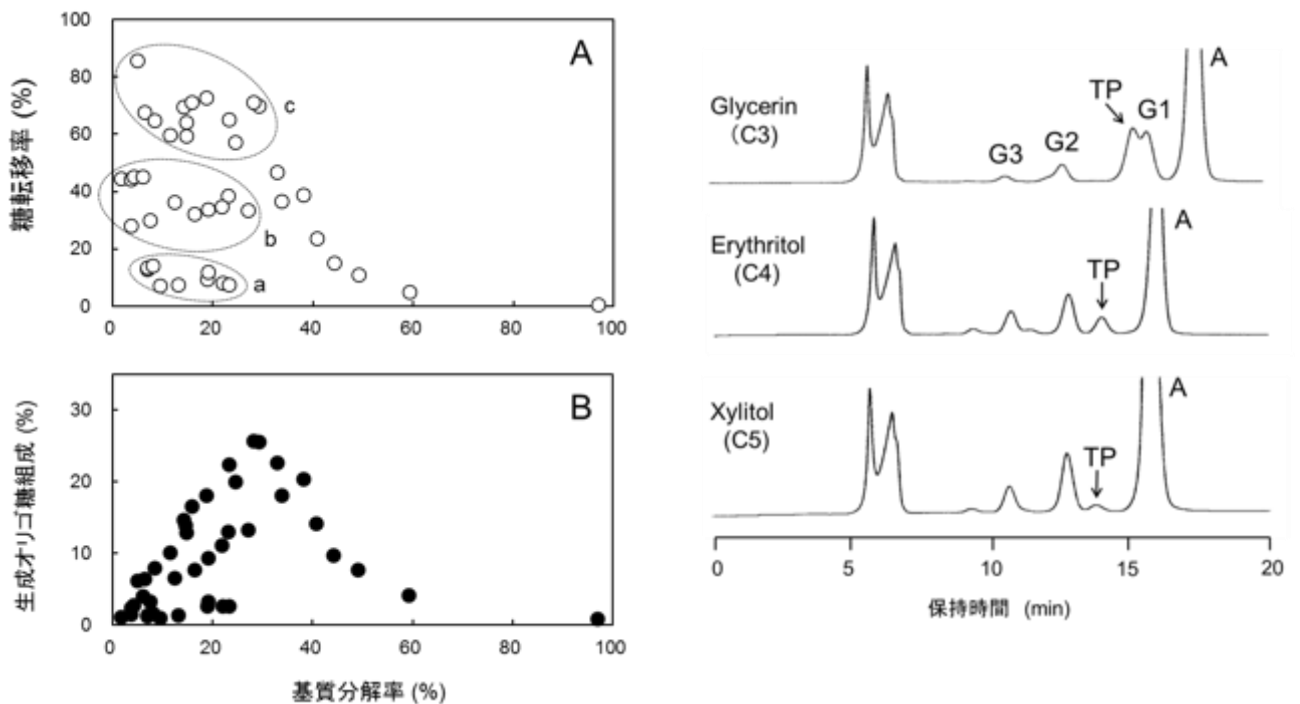


図 6 A-34 株酵素による糖アルコール類への糖転移性

図 5 分離菌酵素による糖転移率及び生成オリゴ糖組成と基質分解率との関係

(3) ここでは海藻多糖類の κ -カラギーナンに関する研究結果を報告する。土壌からの κ -カラギーナン分解菌の分離の結果、生育の良いものとして 33 株の菌株が得られ、液体培養において 5 株にて酵素生産性が認められたが、表 1 に示すようにその酵素活性は低いものであった。しかし 1% κ -カラギーナンゲルに作用させたところ、細菌 Y35 株酵素に高いゲル溶解性 (ゲル残存率の低下) が認められた。このときゲルは完全に崩壊し、ほとんど粘性のない液状となった。

Y35 株を 0.5% 炭素源 (κ -カラギーナン、 λ -カラギーナン、グルコース、グリセリン)、0.25% 酵母エキスの液体培地 3ml (ϕ 18×180mm 試験管) に植

菌し 130 回/分（レシプロ）、30°Cで 2 および 3 日間液体培養し、その培養液上清による κ -カラギーナンゲル溶解性（ゲル残存率）を測定したところ、 λ -カラギーナン培地で高いゲル溶解性が認められ、Y35 株の κ -カラギーナン分解酵素の生産は λ -カラギーナン培地によって促進されることがわかった（図 7）。次に培養時のエアレーションによる影響を調べるため λ -カラギーナン培地にて液量を 2、3、4ml と変えて 150 回/分（レシプロ）で液体培養を行ったところ、図 8 に示すように液量 3ml でのエアレーションが酵素生産に最適であることがわかった。次に培養液の λ -カラギーナン培地濃度を、0.5~2.0%と変え、Y35 株を液体培養しゲル残存率を調べた。図 9 に示すように 0.5%と 1.0%の培地濃度で同程度の高いゲル溶解性が認められた。一方、1.5%と 2.0%ではゲル溶解性はほとんど認められなかった。これは培地のゲル粘性が高まることで、培養時のエアレーションが低下したため酵素生産が減少したためと考えられる。なお Y35 株酵素の活性は培地濃度 1.0%にて 0.404 U/ml と最大となることがわかった。次に Y35 株酵素の活性に及ぼす pH の影響を調べたところ、その最適 pH は 6 付近であった。

以上のように細菌 Y35 株酵素は難分解性の κ -カラギーナンへの分解活性が高いことがわかり、 κ -カラギーナンからオリゴ糖等の糖質への変換能について調べている。さらに高分解性の菌株酵素の探索も続けている。

表 1 分離菌株培養液の酵素活性と基質ゲル溶解性

菌株	κ -カラギーナン分解活性 (U/ml)	ゲル残存率(%) (0.5%基質)
Y18	0.010	81
Y21	0.009	58
Y31	0.025	15
Y32	0.012	96
Y35	0.072	0
Blank	-	100

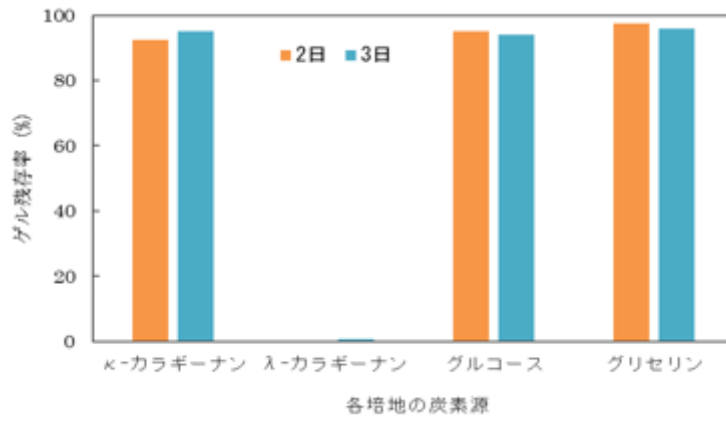


図7 各炭素源での Y35 株液体培養液のゲル溶解性

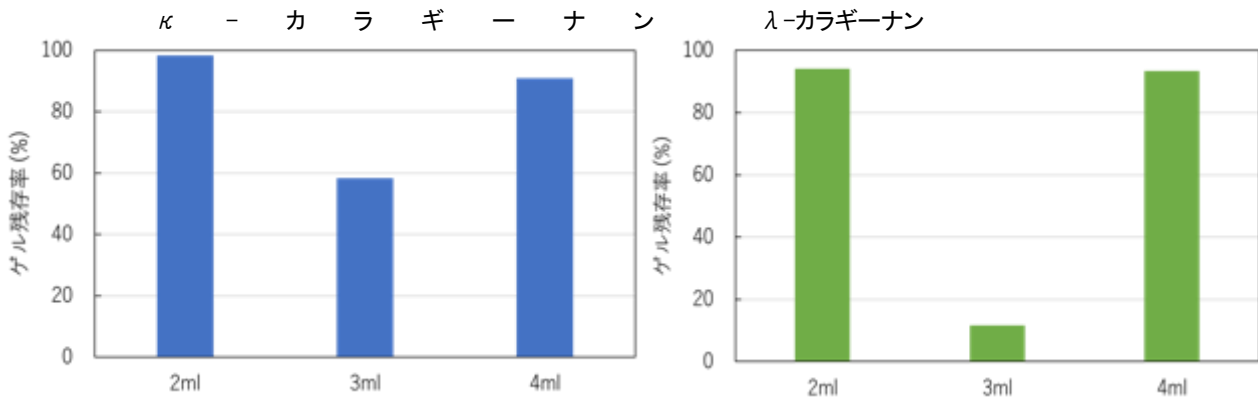


図8 Y35 株の液体培養における酵素生産に及ぼすエアレーションの影響

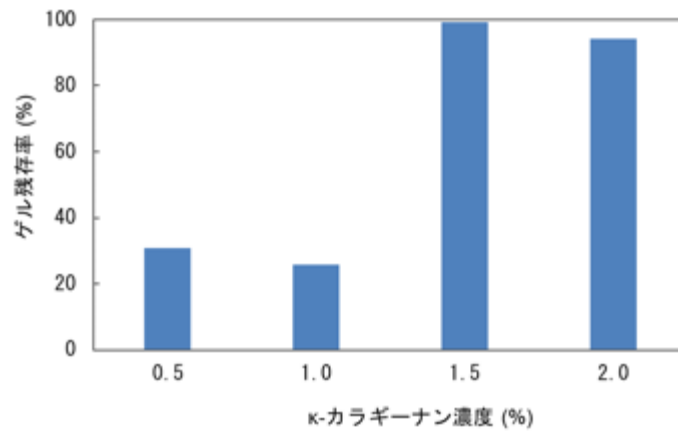


図9 各培地濃度での培養により生産した Y35 株酵素のゲル溶解性

研究報告書

1. テーマ名

優先課題 1 – ②

2. 研究課題名

瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化

(3) エビ類養殖のための効率的な成長促進技術の開発

3. 研究者名

生命工学部海洋生物科学科

伊丹利明

4. 研究協力者

生命工学部海洋生物科学科 4年

中原 真人、山口 勇希

5. 研究目的と方法

(1) クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) に対するウイルスの病原性の検討

クルマエビ急性ウイルス血症 (Penaid Rod-shaped DNA Virus : PRDV) は甲殻類に強い病原性を持ち、本邦のみならず世界中に大きな被害をもたらしているウイルス感染症である。そこで、本研究では新たな予防対策を確立するために、まず本ウイルスの病原性を実験室内で確認したのちに、予防対策としての担子菌類抽出物の効果について検討する。本年度は、まずウイルスの病原性について検討した。供試クルマエビは愛媛県上島町生名島の日輪養魚で養殖されたエビを使用した。平均体重は 12.4g と 24.9g であった。供試ウイルスは罹病エビから得て、クルマエビ急性ウイルス血症原因ウイルス

(Penaid Rod-shaped DNA Virus : PRDV) であることを PCR で確認したウイルス株を用いた。人為感染方法には注射法と経水感染法を用いた。担子菌類抽出物によるウイルス中和活性についても予備的にバナメイエビを用いて検討した。クルマエビもバナメイエビ (*Litopenaeus vannamei*) もいずれも海水で飼育した。飼育水温は 26°C とし、上面ろ過装置を用いて 1 日に 1 回餌を投与して飼育した。

6. 研究成果

(1) 注射法による人為感染試験

2.5×10^7 copies/ml

のウイルス懸濁液原液をエビ用生理食塩水で希釈して用いた。注射量は 0.1ml とした。5

(0.5×10^7 copies/ml), 10 (2.5×10^6 copies/ml), 100 (2.5×10^5 copies/ml) および 1000 (2.5×10^4 copies/ml) 倍に希釈し

て、健康クルマエビに注射した。その結果、5 と 10 倍希釈ウイルス注射区では 2~4 日以内に全尾が死亡し、100~1000 倍希釈ウイルス区では、5~6 日で全尾が死亡した (図 1)。

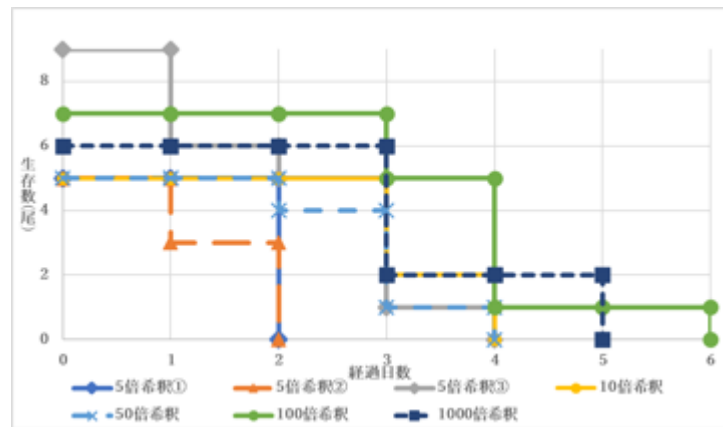


図 1. クルマエビに対する PRDV の注射法による病原性

(2) 担子菌類抽出物のウイルス中和活性

担子菌類抽出物 0, 60, 120 mg/ml に対して約 10^6 copies/ml に調整したウイルス懸濁液を等量混合して、3 時間 20°C で静置後、バナメイエビ 5 尾に注射した。この実験を 2 回繰り返した。その結果、いずれの試験区においても対照区 (0 mg/ml) と同様に、すべてのエビが 3 日以内に死亡した。今回の試験はクルマエビの予備試験をほぼそのままバナメイエビという異なる種に適用したものであるため、適正とは言えない。冬場は時期的にクルマエビが入手できないために、バナメイエビを用いたが、結果的にウイルスの病原性が高すぎて、担子菌類抽出物の評価には至らなかった。そこで、来年度はバナメイエビで予備試験をして、人為感染試験のウイルス濃度を決定する必要がある。同時に、次節のような比較的マイルドな人為感染方法を試験することも必要である。

(3) 経水感染による人為感染試験

経水感染では、上記 (1) で用いた 100 倍希釈ウイルス液の注射によって全エビが死亡した飼育水と水槽、ならびに 1000 倍希釈で全尾が死亡した飼育水と水槽を用いた。いずれも飼育水と飼育装置は消毒等の処理は行わず、そのまま用いた。これらのウイルス注射エビが全尾死亡後 2 日後に、新たに健康エビを 5 尾ずつ入れて、飼育した。その結果、1000 倍希釈ウイルス液注射

エビ飼育水槽では健康エビ飼育開始後9日で、100倍希釈ウイルス液を用いた区では飼育開始後12日で全5尾が死亡した(図2)。

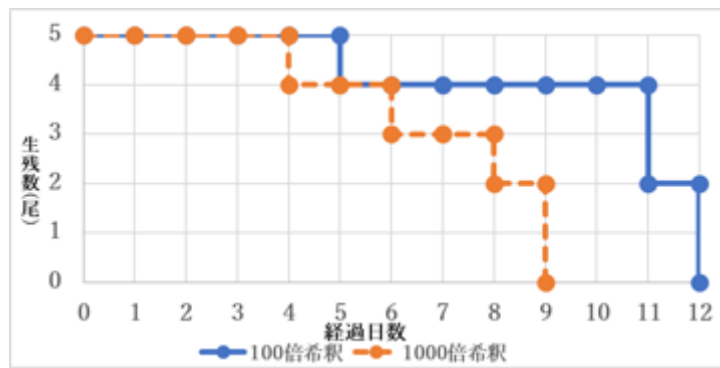


図2 クルマエビに対するPRDVの経水法による病原性

7. 今後の研究計画

以上の結果から、(2)で示したバナメイエビを用いた注射法による中和試験では、病原性が強すぎて担子菌類抽出液の評価はできなかった。そこで、本抽出液のウイルス感染防御効果を評価するためには、バナメイエビでのウイルス感受性(ウイルス濃度依存性)を調べると同時に、(3)で示したような比較的マイルドな感染である経水感染法を用いたほうが効果の差がはっきりとみられると考えられる。これにより、クルマエビとバナメイエビの両方の種類に対する本抽出物の効果が明らかとなる。

得られた成果は、民間と連携して実証化を検討する目的で、バナメイエビ養殖場とクルマエビ養殖場で現地実験を実施し、より効果の高い投与方法やこれに関連した新たな飼育方法を具体的に検討する。

研究報告書

1. テーマ名

優先課題 1－②

2. 研究課題名

瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化

(4) キジハタ、オニオコゼの資源管理・増殖技術の開発

3. 研究者名

生命工学部海洋生物科学科

太田健吾

4. 研究協力者

生命工学部海洋生物科学科 4年

田中 天真、山縣 龍仁

5. 研究目的と方法

(1) キジハタにおける寒冷麻酔の有効性

キジハタは刺身、煮つけなどで好んで食され、瀬戸内海の沿岸漁業の重要な収入源となっている。特に刺身は人気があり、市場では鮮度の高い活魚での供給が求められている。しかし、活魚専用の水槽を用いる現行の輸送方法ではコストが嵩むことが問題となっている。そこで、

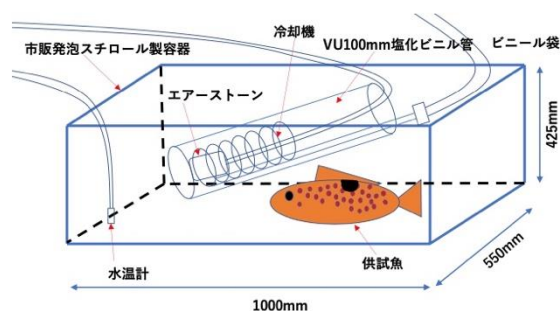


図 1 試験方法

魚に麻酔を施して無水条件下で輸送することにより、機材の縮小、作業効率の向上、コスト低減が図れると考え、ヤイトハタ、ヒラメ等で用いられる寒冷麻酔法の本種での有効性を検討した。供試魚には人工養成 3 歳魚を用い、試験は自然水温が 24℃となる7月、26～27℃となる9月に各々自然水温の海水を満たした水槽へ供試魚を収容後、冷却機を用いて-2～-4℃/時間の割合で冷却する方法で行った(図 1)。麻酔の目安は、供試魚の鰓動運動が緩慢になり、乾出してもほとんど動かない状態とした。試験では麻酔時の水温を確

認するとともに、麻酔後は自然水温の海水へ戻して覚醒の有無を確認した。

(2) オニオコゼの中間育成における配合飼料の効率的な給餌法の検討

オニオコゼは白身で美味なことから高値で取り引きされる高級魚であり、漁業者からは種苗放流による資源増大が望まれている。本種は魚食性であり、餌料生物を待ち伏せて捕食するため、飼育環境下でも餌は口元付近に近づけないと摂餌しない。人工生産した稚魚も同様の傾向を示し、生簀網を用いる中間育成では大量の配合飼料を撒いて摂餌を促す必要がある。

このため、生簀内へ撒いた配合飼料の大半は摂餌されずに残餌となり、それらの回収にも膨大な時間と労力を要する。このため、市販のアルテミアふ化槽を利用し、中間育成において配合飼料の残餌が発生しにくい効率的な給餌方法について検

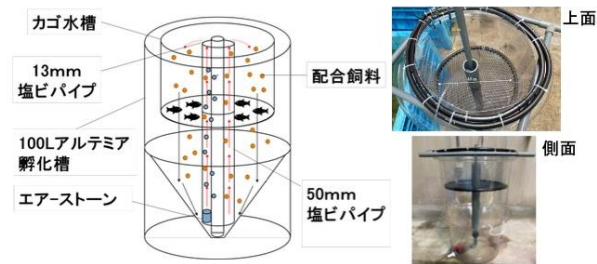


図2 試験方法

討した。供試魚は人工生産1歳魚(平均全長40mm)を用い、100Lアルテミアふ化槽内に設置したカゴに520個体を収容した。飼育は給餌後に残餌として水槽底面に溜まった配合飼料を水槽中央に設置したエアリフトで水面までリフトアップし、再び摂餌させる方式で行った(図2)。配合飼料を完食した時点で従来の飼育方法で給餌した対照区とともに各々配合飼料の平均摂餌数を調べた。

6. 研究成果

(1) キジハタにおける寒冷麻酔の有効性

既報では、本種は27℃の自然水温の海水を20℃冷却して7℃まで下げると寒冷麻酔が可能と報告されている。今回の試験結果からも本種は自然水温が24~27℃であれば、20℃冷却することで麻酔可能なことがわかった(図3)。このことから、本種の寒冷麻酔は上記の水温条件下では20℃の冷却が有効と考えられる。既報では、ヤイトハタは19~31℃の自然水温下で麻酔する際の冷却水温は11.5~12.5℃が最良とされている。また、ヒラメでは自然水温が10℃の時に1~2℃での冷却が有効と報告されている。本種では24℃以下での有効な麻酔水温が明らかになっていないため、今後は

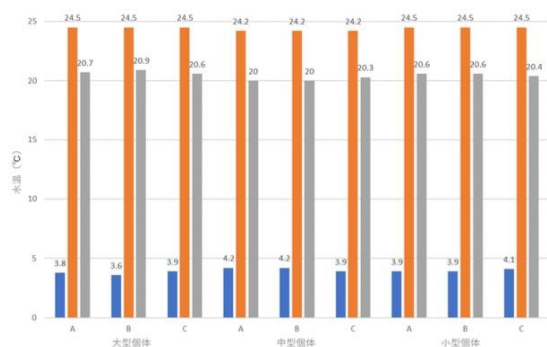


図3 試験結果

この点を明らかにするとともに、天然魚を用いた実用規模での有効性についても検討する。

(2) オニオコゼの中間育成における配合飼料の効率的な給餌法の検討

配合飼料の平均摂餌数は 18.5 個/個体であり、従来の飼育方法で給餌した対照区の 7.9 個/個体より有意に多かった。このため、アルテミアふ化槽とカゴを用いる飼育方法は中間育成において配合飼料を効率的に摂餌させる新しい飼育システムとして期待が持てる(図 4)。

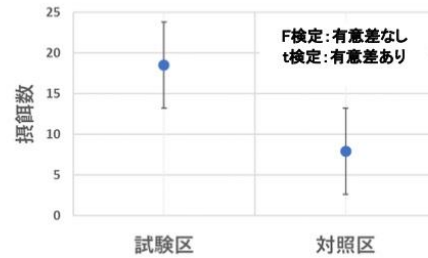


図 4 試験結果

今後はアルテミアふ化槽の規模を拡大するなど、実用規模での有効性を検討する。

7. 今後の研究計画

(1)、(2)の取り組みから、1) キジハタが冷却によって安定して寒冷麻醉にかかること、2) オニオコゼの中間育成において飼育容器で効率的な給餌が可能であることなどが明らかとなった。今後は、この成果を用いてキジハタ並びにオニオコゼの増殖技術を確立する。また、今回得られた知見をもとにキジハタ活魚出荷技術の開発やオニオコゼの放流工程の省力化・効率化に着手する。

得られた成果は、広島県や尾道市および漁業関連団体と連携して実証化を検討する。今後は実証試験で発生する課題を基礎的な知見を重ねることで解決するとともに、福山大学で得られた成果を社会へフィードバックする予定である。

研究報告書

1. テーマ名

優先課題 1 – ②

2. 研究課題名

瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化

(5) 赤米ポリフェノールの養殖用餌料添加効果の検証

3. 研究者名

生命工学部海洋生物科学科

我如古菜月

4. 研究協力者

生命工学部海洋生物科学科 4 年

岩渕安慈、小川育夢、藤堂源喜、山本哲也

5. 研究目的と方法

昨今、各メーカーでは魚類に用いる飼料の開発が進んでおり、観賞魚の色揚げを目的としてカロテノイドやスピルリナ色素が混合された例がある。一方、赤米表皮には赤褐色の色素成分が含まれており、その色素の大部分は(+)-カテキンが 8~10 量体結合したプロシアニジンオリゴマーである。また、赤米と同じ有色米である黒米の表皮には黒紫色の色素成分が含まれており、その色素成分は赤米とは違いアントシアニン系色素成分であることが知られている。これら有色米の色素成分を魚に与えて影響を検討した報告はないため、本研究では、赤米および黒米に含まれる色素成分を餌に混合し、その影響について検討することを目的とした。

(1) 赤米および黒米の色素成分抽出

赤米および黒米はそれぞれ精米機にて表皮のみ削り取り、70%含水アセトンにてホモジナイズし溶媒留去後、デシケーター内でさらに濃縮乾固させて総エキスを得た。各総エキスを餌重量の 2.5%濃度になるように 70%エタノールと共に混合し、そこに市販餌を加えて混ぜ合わせ、最終的にエタノールを揮発させて実験試料とした。

(2) 未成熟メダカおよび稚魚メダカへの給餌実験

実験魚はヒメダカとし、生後 2 か月以上の産卵経験のない未成熟メダカと、

孵化後 1 週間経過した稚魚メダカを用いた。給餌は市販餌を与えるコントロール群、赤米色素混合餌を与える赤米群、黒米色素混合餌を与える黒米群の 3 群にわけ、1 群あたり 30 匹程度とした。給餌は午前と午後一日 2 回、週 5 日の平日のみとし、未成熟メダカは 16 週間、稚魚メダカは 15 週間経過観察後、全長、体長、体重を測定した。また、実験開始日から終了日まで生存したヒメダカの匹数により生存率を算出した。

(3) 赤米および黒米色素成分の基礎分析

(1) で抽出した赤米および黒米総エキスの基礎データの蓄積を目的として各種分析を行った。まず、各総エキスに対してゲル浸潤クロマトグラフィーを行い分子量分布を調べた。さらにフォーリンチオカルト法を用いて各エキスの総ポリフェノール量を測定した。合わせて、赤米総エキスについてはバニリン法の簡易法により総プロアントシアニジン量を測定した。各総エキスの機能性に関する研究として、抗糖化作用を保持するか検証を行った。抗糖化作用を検証する実験方法は様々あるが、本研究では最終糖化産物(AGEs)による架橋を切断する活性があるか、1-phenyl,2-propanedione 分解による α -ジカルボニル化合物分解能測定モデル系を利用して測定した。

6. 研究成果

(1) 未成熟メダカに対する赤米および黒米エキスの影響

全長はコントロール群が 2.2 ± 0.3 cm、赤米群で 2.1 ± 0.3 cm、黒米群で 2.2 ± 0.3 cm であったが、コントロール群と赤米群、または黒米群間で統計解析をしたところ有意差は見られなかった。体長についても同様に有意差は見られなかった。体重は、コントロール群が 0.09 ± 0.03 g、赤米群 0.08 ± 0.04 g、黒米群 0.09 ± 0.04 g となり、黒米が若干重かったが、統計学的な有意差は見られなかった (図 1)。生存率は黒米群でやや生存率が低下したが、有意差はなかった (図 2)。

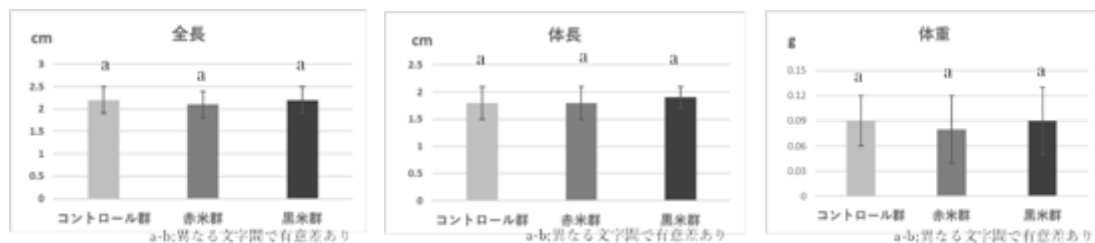


図 1. 16 週間投与後の各群におけるヒメダカ的全長、体長および体重

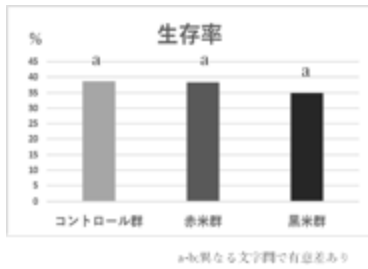


図2. 各群における生存率

図3. 各群のヒメダカの様子

以上の結果により、コントロール群と赤米群、および黒米群間で生存率や全長、体長、体重には有意差が見られなかったことから、少なくとも赤米や黒米の色素成分を与えることが生存率や体型等に対して負の影響を及ぼすことは考えにくく、魚毒性はほとんどないことが示唆された。外観については、肉眼では大きな差は見られなかったが（図3）、今後は鱗に所在する色素胞の観察等により影響があるか確認していく予定である。

(2) 稚魚メダカに対する赤米および黒米エキスの影響

生存率は、コントロール群 25.7 %、赤米群 35.6 %、黒米群 34.7 %という結果になった（図4）。平均値を用いて統計解析したところ、有意差は認められなかった。また、全長や体長、体重においては図5の通りとなり、いずれもコントロール群がやや高い傾向にはあったが、こちらも有意差は認められなかった。

以上の結果により、成育過程においても赤米や黒米を投与することで阻害される可能性は低いものと考えられた。稚魚においても外観の違いは肉眼では識別できなかった（図6）。



図4. 稚魚メダカの生存率

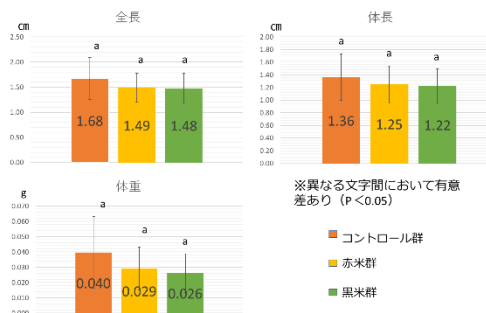


図5.各群における稚魚メダカの全長、体長、体重



図 6.稚魚メダカの外観の様子

(3) 赤米および黒米色素成分の基礎分析結果

赤米および黒米総エキスの分子量分布を測定したところ、赤米総エキスでは 4.092 分にピークが見られ、黒米総エキスでは 4.843 分に大きなピークが見られた。得られた保持時間を、標準品を用いて作成した検量線に代入して平均分子量を算出したところ、赤米では 3942、黒米では 968 となった (図 7)。総ポリフェノール量は、赤米が 16 mg/mL、黒米が 20 mg/mL であった。赤米の総プロアントシアニン量を測定したところ、乾燥総エキス 100mg 中に 79.0mg 含まれているという結果になった。

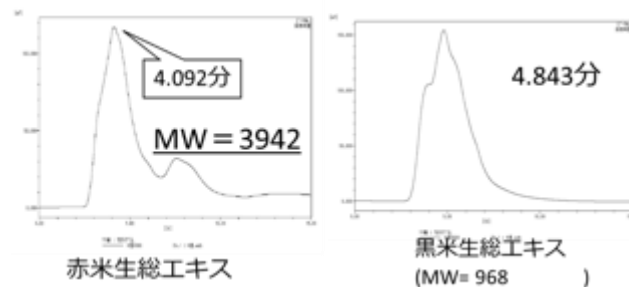


図 7.赤米および黒米総エキスの GPC 分析結果

1-phenyl,2-propanedione 分解による α -ジカルボニル化合物分解能測定のモデル系を利用して抗糖化作用を測定したところ、赤米総エキスは 0.05%、黒米総エキスは 0.8%となり、ポジティブコントロールの 1.4%よりも低い結果となったことから、 α -ジカルボニル化合物の分解能は低いものと考えられた。

7. 今後の研究計画

(1) ~ (3) の取り組みから、赤米総エキスおよび黒米総エキスの投与により未成熟および稚魚メダカの成育に対するネガティブな影響は見られなかったことを確認した。本研究では 2.5%濃度になるように赤米および黒米のエキスを混合し、一日 2 回給餌したが、今後は濃度を 5%に引き上げた上で給餌回数を 3 回に増やして色素成分の摂取量を増やすことによる影響を検討する。また、ヒメダカよりも体長の大きい金魚を用いて同様の実験を行い、成育に影響があるか検証する予定である。また、総エキスは様々な成分が混ざった

ものであることから、さらに総エキスを単離精製し成分解析を行い、それらに抗糖化作用をはじめとする機能がどれだけ備わっているかを検証することと並行して、単離した成分を分取クロマトグラフィーにより回収し、総エキスと同様に市販餌に混合して実験魚に与えることにより、総エキスを与えた時と違いがあるか比較する予定である。

研究報告書

1. テーマ名

優先課題 1 – ②

2. 研究課題名

瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化

(6) 海藻抽出物の抗がん活性に関する検討

(7) 海藻抽出物による生体膜の各種トランスポーターを介した輸送機能に及ぼす影響

3. 研究者名

薬学部薬学科

杉原成美、竹田修三

4. 研究協力者

薬学部薬学科学生：杉原崇寛、田中麻貴、金子正尚、香山桃恵、
熊中葉月、國兼友里、花山智哉、上利海仁

生命工学部海洋生物科学科 准教授：山岸幸正

(6) 海藻抽出物の抗がん活性に関する検討

5. 研究目的と方法

1) 採取地点の異なるスサビノリ(*Neopyropia yezoensis*)が 10 種類のがん細胞の増殖に与える影響評価

これまでに、スサビノリが、がん細胞の増殖に対してどのような影響を及ぼすのかについて詳細に検討した報告はなかった。本研究では、所有する 10 のがん細胞パネルに対して、スサビノリの影響を解析することにした。まず、図 1 に示すように、瀬戸内海産の採取地点の異なる 3 つのスサビノリ(A, B, and C)を採取した。スサビノリサンプルの影響評価は、これらのエタノール抽出物を独自に調製したものを処理した。なお、スサビノリは、本学生命工学部の山岸幸正博士に仲介いただき、有限会社ぬまくま夢工房および有限会社マルコ水産の諸氏から供与いただいた(図 1)。

2) スサビノリのがん細胞増殖抑制評価(MTS アッセイ法)

スサビノリの影響は、細胞毒性評価で汎用される MTS アッセイ法(Promega)

により評価した。3つのスサビノリ(A, B, and C)サンプルは、最終濃度が0.25、0.5、1.25、2.5、5、12.5、25、50 μmL になるように各種がん細胞パネルに添加した。処理時間は、48時間とし、ポジティブコントロールとして(乳がん細胞を用いた検討時：図4)、作用機序の異なる既存の抗がん薬(エトポシド、LY2835219、パクリタキセル、トリコスタチンA)を用いた。

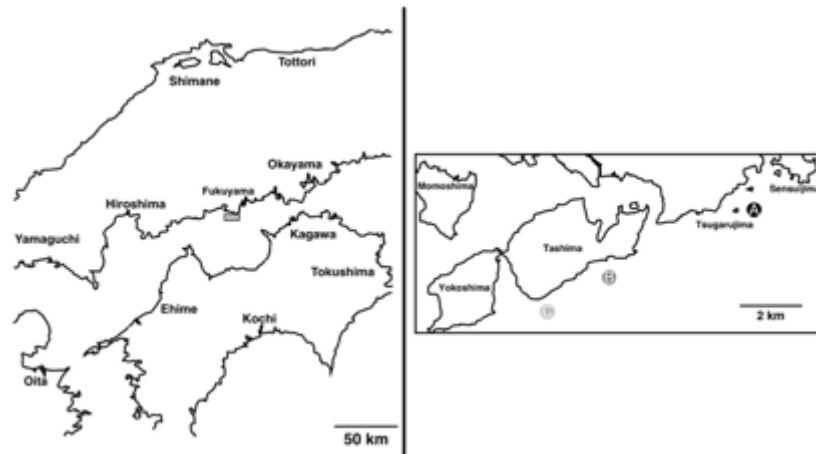


図 1. Map showing the locations of original sampling sites and morphology of live thalli of *Neopyropia yezoensis*. (A) Map showing the locations of original sampling sites (A-C) of *N. yezoensis* in Setonaikai. An enlarged map of the square filled with grey shade indicated in the left panel is shown in the right panel. Sample A was obtained from a site close to Tsugarujima/Fukuyama and samples B/C were obtained from sites close to Tashima/Fukuyama.

6. 研究成果

1) 採取地点の異なるスサビノリ(*Neopyropia yezoensis*)が10種類のがん細胞の増殖に与える影響評価

スサビノリ抽出物が婦人科系がん細胞増殖に及ぼす影響は、全てのがん細胞種(乳がん：MCF-7細胞、LTED細胞、SK-BR-3細胞；子宮内膜がん：HEC-1B細胞、卵巣がん：SK-OV-3細胞)に対して、スサビノリ抽出物Aが濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示した(図2)。スサビノリ抽出物が大腸がん、肝臓がん、肺がん、およびすい臓がん細胞増殖に及ぼす影響は、上述した婦人科系のがん細胞の検討結果と同様に、全てのがん細胞種(大腸がん：HCT116細胞、HT-29細胞；肝臓がん：HepG2細胞、肺がん：A549細胞；すい臓がん：PANC-1細胞)に対して、スサビノリ抽出物Aが濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示した(図3)。以上のように、スサビノリ抽出物A~Cの中で、サンプルAが上記の10種類のがん細胞に対して強い死滅作用を示した。図1に示すように、スサビノリの採取スポットは比較的近接している。具体的には、サンプルAは津軽島近くで養殖されており、Aとは異なり、サンプルB・Cは

田島近郊養殖されている。これらの地理的違いが死滅作用に与える可能性であるが、A と B スポット間における栄養塩類濃度が大きく異なることが挙げられる。具体的には、A スポットの栄養塩類濃度は、B スポットの 1/4(約 0.04 mg/L)であった。ここに示した事項は、状況証拠のみであり、推測の域を出ないが、スサビノリの生育環境により、含まれる抗がん性の成分の質的变化が生じる可能性は否定できない。

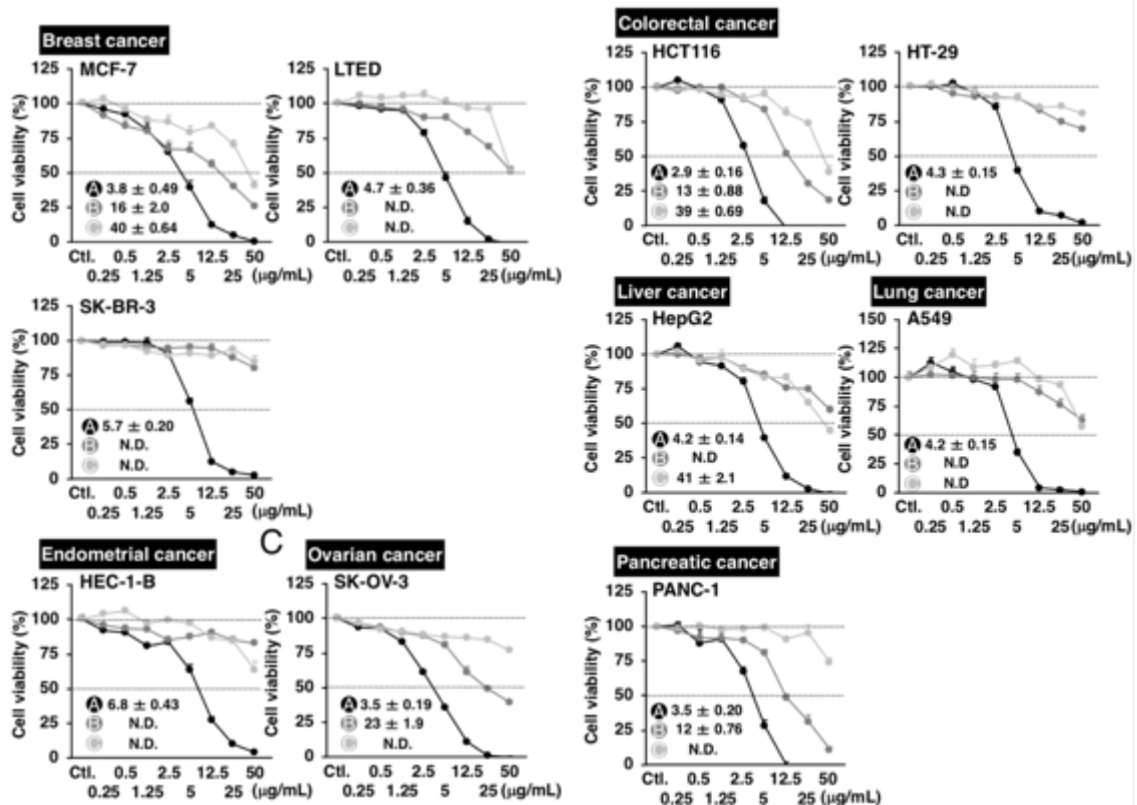


図 2. Effects of the ethanol extracts of *Neopyropia yezoensis* on the viability of MCF-7, LTED, SK-BR-3, HEC-1-B, and SK-OV-3 cells. The cells were treated with the ethanol extracts of *N. yezoensis* (0.25 to 50 µg/mL) for 48 hr. Data are expressed as mean ± S.E. (n = 6) percentage of the vehicle-treated control (Ctl).

図 3. Effects of the ethanol extracts of *Neopyropia yezoensis* on the viability of HCT116, HT-29, HepG2, A549, and PANC-1 cells. The cells were treated with the ethanol extracts of *N. yezoensis* (0.25 to 50 µg/mL) for 48 hr. Data are expressed as mean ± S.E. (n = 6) percentage of the vehicle-treated control (Ctl).

2) スサビノリのがん細胞増殖抑制評価(MTS アッセイ法)

結果を図 4 に示すが、悪性度の低い MCF-7 細胞と比較して、再発乳がんモデルとして知られる LTED 細胞は、パクリタキセル以外の抗がん薬であるエトポシド、LY2835219、ならびにトリコスタチン A に対して抵抗性を示した。

細胞周期解析の結果、スサビノリ抽出物 A は、微小管を形成するチューブリンに作用するパクリタキセルと同様に、G2/M 期でのアレストを来たしたことから、これらは同様な機序でがん細胞の死滅を誘発している可能性が示唆された。

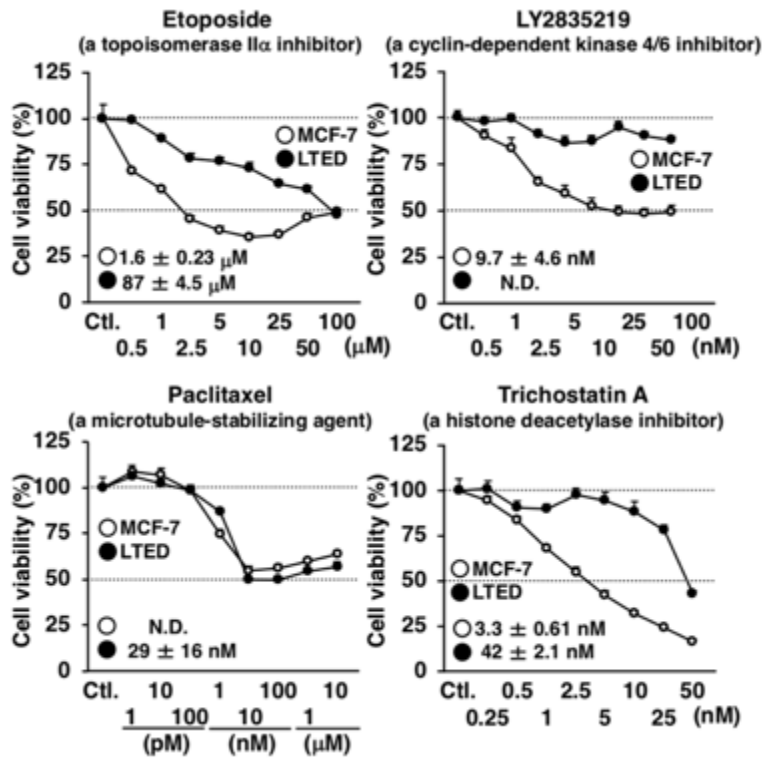


図 4. Effects of the established anti-proliferative agents on the viability of MCF-7 and LTED cells. The cells were treated with etoposide (0.5 to 100 μ M), LY2835219 (0.5 to 100 nM), paclitaxel (1 pM to 10 μ M), trichostatin A (0.25 to 50 nM) for 48 hr. Data are expressed as mean \pm S.E. (n = 6) percentage of the vehicle-treated control (Ctl).

7. 今後の研究計画

本研究により、瀬戸内海産のスサビノリ (*Neopyropia yezoensis*) のエタノール抽出物中に、がん細胞種を超えて死滅作用を示す物質が存在することが明らかになった。さらに、スサビノリの影響は、それらの採取スポットにより大きく異なることが判明した。残念ながら、スサビノリ中の候補物質の単離・同定には至らなかったが、今後も継続して研究を展開する計画である。今回得られた知見を基盤として、福山大学初の抗がん薬の開発に貢献したい。

(7) 海藻抽出物による生体膜の各種トランスポーターを介した輸送機能に及ぼす影響

5. 研究目的と方法

1) 瀬戸内海産スサビノリ抽出物によるコレステロール吸収抑制効果ならびにその作用機序

瀬戸内海で養殖されているスサビノリの抽出物によるコレステロール吸収抑制効果について、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 腸管吸収モデルにより、Caco-2 細胞内に蓄積する³H-コレステロール量の変動から評価した。海藻抽出物によるコレステロール吸収抑制効果の機序については、小腸上皮細胞に発現し、消化管からのコレステロール吸収に大きく関与している NPC1L1 (Niemann-Pick C1 like-1) を介した Clathrin-dependent endocytosis 関連タンパク質の発現変化を分子生物学的手法により解析した。実験の対象としては、NPC1L1 を結合阻害する高コレステロール血症治療薬 Ezetimibe や Clathrin-dependent endocytosis 関連因子の発現抑制作用を示すフラボノイドである Luteolin を用いた。

2) 潰瘍性大腸炎治療薬のサラゾスルファピリジンの服用量軽減に及ぼすスサビノリ抽出物の効果

海藻の中には機能性成分を有し、フラボノイドと同様に医薬品の動態に影響を与え、有益な生物活性を有するものが存在する。スサビノリ抽出物について、サラゾスルファピリジンのヒト大腸がん由来細胞である Caco-2 細胞内への蓄積量に及ぼす影響や Caco-2 細胞を単層培養した Transwell を用いた透過実験により評価し、服用量軽減の可能性を検討した。

6. 研究成果

1) 瀬戸内海産スサビノリ抽出物によるコレステロール吸収抑制効果ならびにその作用機序

①スサビノリ抽出液により 1 時間あるいは 24 時間前処理した Caco-2 細胞内への³H-コレステロール蓄積量は有意に減少した。しかし、前処理時間の長さは、³H-コレステロール蓄積量の減少効果に関係しなかった。スサビノリ抽出液による前処理後、スサビノリ抽出液を除去すると、³H-コレステロール蓄積量の減少は認められなかった。

②NPC1L1 の mRNA の発現は、スサビノリ抽出液により抑制されなかった。Clathrin-dependent endocytosis の関連因子である Numb や Clathrin の発現量も変化しなかった。

③スサビノリ抽出液による $[^3\text{H}]$ -コレステロール量細胞内蓄積抑制作用は、Ezetimibe に類似した NPC1L1 への直接的な阻害作用による可能性が推察された。

2) 潰瘍性大腸炎治療薬のサラゾスルファピリジンの服用量軽減に及ぼすスサビノリ抽出物の効果

①Caco-2 細胞内蓄積実験において、スサビノリは濃度依存的にサラゾスルファピリジンの細胞内蓄積量を増大させた。

②Transwell を用いた細胞単層膜透過実験において、スサビノリはサラゾスルファピリジンの排泄方向輸送を抑制した。透過実験終了後の単層細胞膜内においてもサラゾスルファピリジンの量は Control に比べて増大が認められた。

以上のことから、スサビノリとの併用はサラゾスルファピリジンの患部における濃度を増加させ、服用量の軽減につながる可能性が示唆された。

7. 今後の研究計画

(1) スサビノリ抽出液による $[^3\text{H}]$ -コレステロール量細胞内蓄積抑制作用が、Ezetimibe と同様に NPC1L1 への直接的な阻害作用によるものであるか、スサビノリ抽出液の作用機序について、さらに詳細に検討する。

色落ちしたスサビノリは商品価値がなくなるために廃棄される。廃棄資源の有効活用として、色落ちしたスサビノリについても $[^3\text{H}]$ -コレステロール量細胞内蓄積抑制作用を有するか検討する。

(2) 潰瘍性大腸炎治療薬のサラゾスルファピリジンの服用量軽減に及ぼすスサビノリ抽出物の効果については、これまでの知見等から排泄トランスポーターである Breast cancer resistance protein (BCRP) の阻害による可能性が推察される。BCRP の基質である抗がん剤のミトキサントロン等に対しても同様の効果を有するか検討する。紅藻のスサビノリについて検討したが、緑藻のアナアオサや褐藻のアカモクについても検討する。

研究業績

A. 研究発表

1. 論文 ※審査のあるもの

- 1) Barthel Index の項目と終末期がん患者の死亡率との関連性(The Relationship between Components of the Barthel Index and Mortality of Terminal Cancer Patients). 岡田昌浩、岡崎和子、村上史承、岡本伸也、杉原弘記、星野祥儀、後藤裕香、番匠谷研吾、木村圭佑、小野田正、竹井英介、瀬尾 誠、**杉原成美**. 医療薬学、45、605-609 (2019)
- 2) Fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) as a stimulatory molecule responsible for breast cancer cell migration, Masayo Hirao-Suzuki, Takayuki Koga, Genki Sakai, Takanobu Kobayashi, Yuji Ishii, Hiroshi Miyazawa, Masufumi Takiguchi, Narumi Sugihara, Akihisa Toda, Masahiro Ohara, Shuso Takeda. Biochem Biophys Res Commun., 531(2), 215-222 (2020)
- 3) Pharmacist's Intervention Considering the Prognosis for a Terminal Cancer Patient: A Case Report., Masahiro Okada, Kazuko Okazaki, Keisuke Kimura, Hiroki Sugihara, Fumiyooshi Murakami, Shinya Okamoto, Yoshinori Hoshino, Yuka Goto, Kengo Banshoya, Tadashi Onoda, Eisuke Takei, Shuso Takeda, Narumi Sugihara, Pharmacy8040212, (<https://doi.org/10.3390/pharmacy8040212>), 8(4), 212 (2020)
- 4) Examination of a Short-Term, Prognostic Predictive Method for Terminal Cancer Patients Using the Barthel Index, Masahiro Okada, Kazuko Okazaki, Fumiyooshi Murakami, Shinya Okamoto, Hiroki Sugihara, Kengo Banshoya, Tadashi Onoda, Eisuke Takei, Shuso Takeda, Narumi Sugihara, Reports, (<https://www.mdpi.com/2571-841X/3/3/26/pdf>), 3(3), 26 (2020)
- 5) ブリ人工種苗の頭部等に発現する形態異常. 豊田陽子、柳田忠、原田悠生、**有瀧真人**. 福山大学内海生物資源研究所報告、31、21-30 (2021)
- 6) Characterization and identification of bioactive polyphenols in the *Trapa bispinosa* Roxb. pericarp extract, Iwaoka, Y., Suzuki, S., Kato, N., Hayakawa, C., Kawabe, S., Ganeko, N., Uemura, T., Ito, H., Molecules, 26 (19), 5802. <https://doi.org/10.3390/molecules26195802> (2021)
- 7) 管理栄養士養成課程学生の国際活動への志向が高い学生の特徴. 川上 貴代、岸本 (重信) 妙子、平松 智子、佐藤 ゆかり、田淵 真愉美、**我如古 菜月**、吉

- 本 優子、久野 一恵、沖田 千代. 栄養学雑誌、79 (4)、196-203 (2021)
- 8) Functional properties of nori seaweed (*Pyropia yezoensis*) with different quality and *Ulva* sp. Masahiro Kurakake, Keisuke Itakura, Mayuko Nakano. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **30**, 188-195 (2021)
- 9) Effects of the ethanol extract of *Neopyropia yezoensis* (nori), cultivated in the Seto Inland Sea (Setonaikai), on the viability of 10 human cancer cells including endocrine therapy-resistant breast cancer cell., Shuso Takeda, Masayo Hirao-Suzukib, Yukimasa Yamagishi, Takahiro Sugihara, Masataka Kaneko, Genki Sakai, Tetsuya Nakamura, Yuhzo Hieda, Masufumi Takiguchi, Masahiro Okada, and Narumi Sugihara. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 8(3), 75-80 (2021)
- 10) 4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene (MBP) Targets Estrogen Receptor β , to Evoke the Resistance of Human Breast Cancer MCF-7 Cells to G-1, an Agonist for G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1., Masayo Hirao-Suzuki, Keita Nagase, Tatsuya Suemori, Kana Tsutsumi, Egao Shigemori, Michitaka Tanaka, Masufumi Takiguchi, Narumi Sugihara, Shin'ichi Yoshihara, Shuso Takeda, *Biol. Pharm. Bull.*, 44, 1524-1529 (2021)
- 11) Cadmium-stimulated invasion of rat liver cells during malignant transformation: Evidence of the involvement of oxidative stress/TET1-sensitive machinery., Masayo Hirao-Suzuki, Shuso Takeda, Genki Sakai, Michael P. Waalkes, Narumi Sugihara, Masufumi Takiguchi, *Toxicology*, 447, 152631(2021)
- 12) 握力測定による潜在的なロコモティブシンドローム予備群の簡易スクリーニング(Convenient Screening of Latent Preliminary Group of Locomotive Syndrome by Measurement of Handgrip Strength). 徳毛孝至、梶原敏道、石橋 勇、高本健彦、石井智紋、広瀬雅一、上敷領淳、竹田修三、長崎信浩、小嶋英二郎、田中哲郎、岡田昌浩、杉原成美. *医療薬学*、47 (10)、558-568 (2021)
- 13) キンギョの椎骨異常は鰾の形成時期に影響される. 森田吉彦、有瀧真人. 福山大学内海生物資源研究所報告、32、1-7 (2022)
- 14) "Enhancement of immune response and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in Tilapia fish (*Oreochromis mossambicus*) by dietary supplementation of *Portieria hornemannii*" R. Fatima, P.S. Nilofer, K. Karthikeyan, R. Vidya, T. Itami, and R. Sudhakaran, *Aquaculture*, 547(2022)737448, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737448>

15) "Image Technology Based Detection of Infected Shrimp in Adverse Environments", Thi Thi Zin, Takehiro Morimoto, Naraid Suanyuk, Toshiaki Itami, Chutima Tantikitti, Songklanakarinn Journal of Science and Technology, 2022, 44, January (accepted, Scopus 掲載誌)

16) Characterization of a β -N-acetylhexosaminidase with transglycosylation activity from *Metarhizium* sp. A34. Masahiro Kurakake and Yukari Amai *Journal of Food Science*, **87**, 1466-1474 (2022)

2. 報文 ※報告書等審査のないもの

1) 「しまなみテッポウギス」の種苗生産と養殖. **有瀧真人**、大瀧一登、占部侑子、藤川稔晃. 養殖ビジネス、1月号, 46-50 (2019)

2) 「しまなみテッポウギス」の商品開発と販売. **有瀧真人**、大瀧一登、占部侑子、藤川稔晃. 養殖ビジネス、2月号, 53-56 (2019)

3) 養殖でシロギスを瀬戸内の名産に ～しまなみテッポウギスプロジェクト～. **有瀧真人**. 海洋と生物、51 (6)、292-297 (2019)

4) シロギス養殖を中核とした大学と地域の取り組み. **有瀧真人**. 豊かな海、56、17-22 (2021)

3. 学会発表

1) 分離菌 A34 株 *N*-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移作用

天井 裕可里、**倉掛 昌裕**

日本農芸化学会 2019 年度大会 (東京)、講演要旨集 p.590 (2019-3-24)

2) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (5) ～シロギスの産卵制御と終了要因についての検討～

藤川稔晃、西原徹、(福山大生命工) 征矢野清 (長大海セ)、**有瀧真人** (福山大生命工)

令和元年度日本水産学会秋季大会 (2019 年 9 月福井)

3) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (6) ～ストレスによるコルチゾルが短軀症を誘起する可能性～

鶴巻佑介(京大院農)、藤川稔晃、南卓志、**有瀧真人**(福山大生命工)、宇治督、風藤行紀(水研セ増養研)、田川正朋(京大院農)

令和元年度日本水産学会秋季大会 (2019 年 9 月福井)

4) κ -カラギナーゼ生産菌の分離およびその酵素の性質

倉掛 昌裕、石本 圭亮、山岡 美桜、筒井 莊周、長岡 洋大

第 71 回 (2019 年) 日本生物工学会大会 (岡山)、講演要旨集 p.279 (2019-9-18)

5) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (8) ~シロギス人工種苗の短軀症とその発現要因

藤川稔晃、西藤年良、有瀧真人 (福山大生命工)

令和 2 年度日本水産学会春季大会 (2020 年 3 月東京)

6) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (9) ~コルチゾルは短軀症の原因になりうる~

鶴巻佑介 (京大院農)、藤川稔晃、有瀧真人 (福山大生命工)、宇治督、風藤行紀 (水研機構増養殖研)、田川正朋 (京大院農)

令和 2 年度日本水産学会春季大会 (2020 年 3 月東京)

7) 糖転移性を有する β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの探索

倉掛 昌裕、門田和也

日本農芸化学会 2020 年度大会 (福岡)、講演要旨集 p.1660 (2020-3-28)

8) サラズスルファピリジンの Caco-2 細胞内への蓄積量に及ぼすスサビノリの影響

田中麻貴、村瀬聖幸、香山桃恵、熊中葉月、山岸幸正、倉掛昌裕、

瀬尾 誠、杉原成美

日本薬学会第 140 年会 2020 年 3 月 Web 開催

9) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (10) ~耳石標識から調べた種苗生産における共食いの影響~

鶴巻佑介 (京大院農)、藤川稔晃、有瀧真人 (福山大生命工)、田川正朋 (京大院農)

令和 2 年度日本水産学会水産学会秋期会 (2020 年 9 月オンライン)

10) キジハタ種苗の形態異常と開鰓時期について

大美博昭、辻村浩 (大阪水試)、下村知恵、有瀧真人 (福山大生命工)

令和 2 年度日本水産学会水産学会近畿支部例会 (2020 年 11 月オンライン)

11) NPC1L1 を介したコレステロールの細胞内蓄積に及ぼすカテキン類による抑制機序

杉原成美、福田恵大、國兼友里、上敷領淳、平尾雅代、瀬尾 誠、境 絃樹、

竹田修三

日本薬学会第 141 年会 2021 年 3 月 Web 開催

12) 細菌由来ヒアルロン酸分解酵素の性質について

小田祥己、川嶋 亮、加藤駿貴、太田雅也、倉掛昌裕

日本食品科学工学会 第 68 回大会（福岡：オンライン）、講演要旨集、p.424（2021-8-28）

13) 岡山県の家庭料理 行事食の特徴、我如古 菜月、藤井 わか子、藤堂 雅恵、青木 三恵子、大野 婦美子、小川 眞紀子、加賀田 江里、槇尾 幸子、新田 陽子、人見 哲子、藤井 久美子、日本調理科学会 2021 年度大会、実践女子大学（オンライン開催）、2021 年 9 月 7 日～9 月 8 日（2021）

14) Cytokine Homologue Genes in Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus*

M. Inada, T. Yui, T. Mekata, M. Sakai, M. Mizukami and T. Itami

The First International Conference on Sustainable Agriculture and Aquaculture, January 11-12, 2021, Prince of Songkla Univ., Hat Yai, Thailand.

15) Image Technology Based Detection of Infected Shrimp in Adverse Environments.

Thi Thi Zin, T. Morimoto, T. Itami, N. Suanyuk, and C. Tantikitti

The First International Conference on Sustainable Agriculture and Aquaculture, January 11-12, 2021, Prince of Songkla Univ., Hat Yai, Thailand.

16) Species Diversity and Tetracycline Resistance of Pathogenic *Aeromonas* spp. in Nile Tilapia Seed Farms in Southern Thailand over a 5-Year Period (2016-2020).

N. Chirapongsatonkula, R. Sudhakaran, T. Itami and K. U-taynapun

The First International Conference on Sustainable Agriculture and Aquaculture, January 11-12, 2021, Prince of Songkla Univ., Hat Yai, Thailand.

B. 特許

なし

C. 著書

1) 健康寿命の延伸支援に役立つ基礎知識 ～生活習慣を改善する栄養指導・運動指導のために～改訂版. 杉原成美、上敷領淳、古野浩二 . ふくろう出版、(2019)

2) スタンダード薬学シリーズⅡ 第9巻 薬学演習Ⅲ. 薬学総論・衛生薬学. 太田 茂、市川 厚、上村直樹、杉原成美、以下省略（総数 43 名）. 東京化学同人、(2020)

3) 栽培漁業の変遷と技術開発-その成果と展望（有瀧真人・虫明敬一編著）. 恒星社厚生閣、東京、PP220（2021）

- 4) 親魚養成と良質卵の確保、魚類「ヒラメ」. **太田健吾**. 栽培漁業の変遷と技術開発-その成果と展望 (有瀧真人・虫明敬一編著). 恒星社厚生閣、東京、39-41 (2021)
- 5) 種苗生産、魚類「ヒラメ」. **太田健吾**. 栽培漁業の変遷と技術開発-その成果と展望 (有瀧真人・虫明敬一編著). 恒星社厚生閣 東京、115-116、2021年9月.
- 6) 放流効果の把握、調査目的と標識技術. **太田健吾**. 栽培漁業の変遷と技術開発-その成果と展望 (有瀧真人・虫明敬一編著). 恒星社厚生閣、東京、143-146 (2021)
- 7) 放流効果の把握、コラム「新たな標識技術の開発」. **太田健吾**. 栽培漁業の変遷と技術開発-その成果と展望 (有瀧真人・虫明敬一編著). 恒星社厚生閣 東京、147 (2021)
- 8) 予防薬学としての衛生薬学—健康と環境— 第4版. **杉原成美**. 廣川書店 (2022 出版予定)

D. 獲得した研究費 (外部資金)

1. 受託研究

- 1) 大型シロギス養殖に関わる実証性の検討. **有瀧真人・太田健吾**. (株)アペックスインターナショナル、2019～2021年
- 2) 沖縄県伊平屋島養殖施設におけるシロギス養殖の検証. **有瀧真人**. (株)クラハシ、2019、2020年

E. その他

1. 講演会

- 1) しまなみと木浦～ 島嶼研究の2国間国際シンポジウム ～
：養殖による里海資源の高付加価値化. **有瀧真人**. 2019年4月20日
尾道ロータリークラブ令和4年3月定例会
：沿岸漁業のサポーター栽培漁業について. **太田健吾**. 2022年3月18日

2. メディア

- 1) 中国新聞：「一目でわかるおいしい数値 福山大学試食・測定で基準作成」、2019年7月29日
- 2) びんご経済レポート：「福山大学が廻鮮寿司しまなみと共同研究」、8月号、2019年8月10日

- 3) Wink 福山・備後：「魚の旨味を数値化！？美味しさを科学する」、9月号、2019年8月25日
- 4) 日本経済新聞：魚のおいしさ「見える化」福山大学と廻鮮寿司しまなみ 2019年10月11日
- 5) 中国放送テレビ：「福山大学発の養殖キス ブランド化に挑戦」、2019年11月6日
- 6) 広島ホームテレビ：Jステーション 「刺身のおいしさグラフ化しました 福山大×寿司店の取り組み」、2019年11月18日
- 7) 中国放送テレビ：「ぶら島太郎の海魅人に会いたい！養殖シロギスを探せ！」、2019年11月29日
- 8) 経済レポート：「沖縄でシロギスを量産化」、2019年10月1日
- 9) 日本経済新聞：「キス沖縄で養殖 水産卸のクラハシ、福山大と」、2020年1月21日
- 10) 山陽新聞：「福山大生 おいしさ数値化」、2020年7月6日
- 11) びんご経済レポート：「瀬戸内の水産業を救え」、2020年8月20日
- 12) 経済レポート：「廻鮮寿司しまなみと連携待坐穴を地域にアピール」、2021年5月10日
- 13) びんご経済レポート：「魚の形態異常研究を出発点に養殖シロギスの実用化に貢献」、2021年5月20日
- 14) 中国新聞：魚の成長顕微鏡でじっくり、2021年8月11日
- 15) RCC（イマナマ）：「シロギスのおいしさタグ開発」、2021年11月18日
- 16) 尾道新聞：「養殖のオニオコゼ稚魚尾道近海 3カ所に5千尾放流」、2021年11月28日
- 17) 中国新聞：「オニオコゼの稚魚放流 福山大学生が因島で人工ふ化」、2021年12月1日
- 18) 毎日新聞：「オニオコゼの宝庫に 福山大生 3人 稚魚 5000匹を放流」、2021年12月1日
- 19) RCC（イマナマ）：「オニオコゼの稚魚を放流」、2021年12月3日
- 20) 軽井沢 FM：「世界のトップレベル日本発祥の水産技術栽培漁業とは」、2021年12月24日