

# 助成研究完了報告書一覧

平成 24 年度～平成 25 年度

平成 28 年 3 月

一般財団法人北陸産業活性化センター

## はじめに

当財団では、事業の一環として、北陸地域の産業の活性化に資する研究を行う大学及び企業の研究・共同研究に対し助成活動を行っておりますが、その研究成果を広く地域の関係者の方々に利用していただくことを目的に、「助成研究完了報告書」を発行することといたしました。

本書は、平成 24 年度から平成 25 年度にかけて採択された研究で大学教員・企業技術者が 2 年間にわたり取り組んだ成果をまとめたものであります。

産学連携の取り組み事例として、関係企業や機関でご利用いただけたら幸いです。

平成 28 年 3 月

一般財団法人北陸産業活性化センター

# 目 次

## 平成 24 年度「助成研究終了報告書」

### 庄川扇状地域の地下水調査による冷暖房・無散水消雪への応用

富山大学 上田 晃・・・・・・・・・・ 1

### 中皮腫の診断補助キットと診断アルゴリズムの開発

株式会社パソロジー研究所・・・・・・・・ 5

### ホタルイカに含まれる生活習慣病予防成分の解明と応用

富山短期大学 竹内弘幸・・・・・・・・ 1 1

### 酵素保護材としての利用をめざした、多糖フルクタンの高機能化

福井大学 寺田 聡・・・・・・・・・・ 4 7

### 布模様検出機構付きニット織り傷検出システムの開発

富山県立大学 中田崇行・・・・・・・・ 5 1

### 高強度・高ガスバリア性ナノ複合材料の開発とチューブ型真空断熱材への応用

富山県立大学 真田和昭・・・・・・・・ 5 5

### 人工関節置換術における術中インプラント設置角測定デバイスの開発

金沢大学 加畑多文・・・・・・・・・・ 5 9

# 目 次

## 平成 25 年度「助成研究終了報告書」

### 高齢者や小児の患者などが服用し易い経口固形製剤に関する研究

テイカ製薬株式会社・・・・・・・・・・ 6 3

### 共焦点顕微鏡による悪性脳腫瘍の術中診断・治療システムの開発

金沢大学 中田光俊・・・・・・・・・・ 6 5

### 生体吸収性材料および非培養脂肪由来幹細胞を用いた人工神経の開発

金沢大学 多田 薫・・・・・・・・・・ 6 9

### 富山湾より採取・単離した新規微細藻類の機能性の検証

富山大学 中村省吾・・・・・・・・・・ 7 3

### 液体燃料循環型社会の構築を想定した安全運転が可能な直接ギ酸形燃料電池の開発

金沢大学 辻口拓也・・・・・・・・・・ 8 1

### 内部加熱・冷却による回転成形プロセスの最適化

株式会社タカギセイコー・・・・・・・・ 8 5

平成 24 年度 助成研究終了報告書

平成24年度

庄川扇状地域の地下水調査による冷暖房・無散水消雪への応用

富山大学  
上田 晃

平成24年度

庄川扇状地域の地下水調査による冷暖房・無散水消雪への応用

富山大学

上田 晃

平成26年9月1日

## 成果報告書

富山大学理工学研究部

上田 晃

研究テーマ：庄川扇状地域の地下水調査による冷暖房・無散水消雪への応用

### 1. 研究課題

地下水が豊富な庄川扇状地域で、地中熱ヒートポンプを用いて室内冷暖房や無散水路消雪へ応用する。このための地下水流動状況・水質適合性を調査する。本研究は、2種類ある Geo-HP のどちらの様式が、地下水利用を図るために適正であるかを判断するために、水質と流動様式を調査するものである。その結果として、対象地域内でどの種類の Geo-HP が最適かを検討する。水質は、Geo-HP を使う際の問題となる熱交換部への沈殿物の有無の検討を行うものである。

### 2. 研究の実施内容及び成果

本調査は地下水の水質や流動様式を調べるため、地下水を採取し、その水素・酸素同位体組成や主要化学成分の分析を行った。地下水試料の採取は、図1に示す庄川扇状地内の黒丸の箇所、広域にわたって採取し、その後、2013年3月までに2か月毎に同様の地点の地下水を採取した。この地域を流れる庄川と小矢部川の河川水も採水した。



図1 水試料採取地点

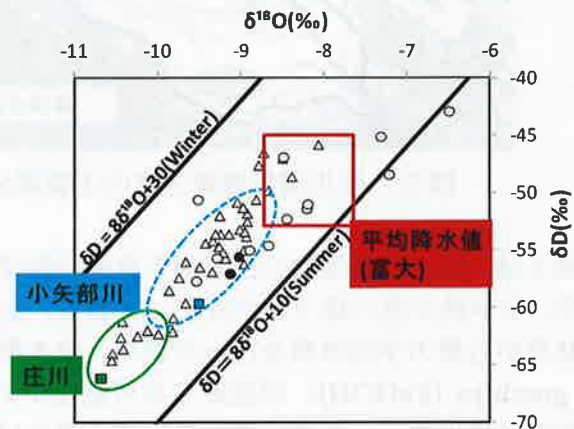


図2 水素( $\delta D$ )・酸素( $\delta^{18}O$ )同位体組成

浅層地下水(●), 観測井水(■), 河川水(▲) 浅層地下水(△), 観測井水(○), 河川水(□)

富山県の観測井と民家の井戸から採取した地下水は、 $\delta D$  が $-42.9 \sim -64.6\%$ の範囲に、 $\delta^{18}O$  が $-6.5 \sim -10.65\%$ の範囲にある。また河川水は庄川で $\delta D$  が $-66.2\%$ 、 $\delta^{18}O$  が

-10.7‰であり、小矢部川では、 $\delta D$  が-59.7‰、 $\delta^{18}O$  が-9.5‰と、庄川の水と比較すると低い値を示した（図2）。これは庄川が高度の高い山地、小矢部川が低い山地を起源としているためであり、この河川の源頭の違いが地下水の同位体組成にも反映されている。

民家の井戸から採水した浅層地下水の水質結果をヘキサダイアグラムに示す(図5)。浅層地下水の現場測定の結果はpHが6.26~7.92、電気伝導度 (EC) が8.22~37.1 mS/m、酸化還元電位 (ORP) が-9~+315 mV、水温が12.2~21.4℃の範囲にある。イオンクロマトグラフで測定した主要化学成分結果に関して、この地域の地下水の大部分がCa-HCO<sub>3</sub>型の水質を呈しており、これは浅層地下水特有のものである。

地下水の主要成分濃度や同位体組成の違いにより、地下水の主な流入源を特定することができた(図3中の矢印)。地下水の主な流入源は5つであり、過去に報告されていたものと、同様の結果が得られた。

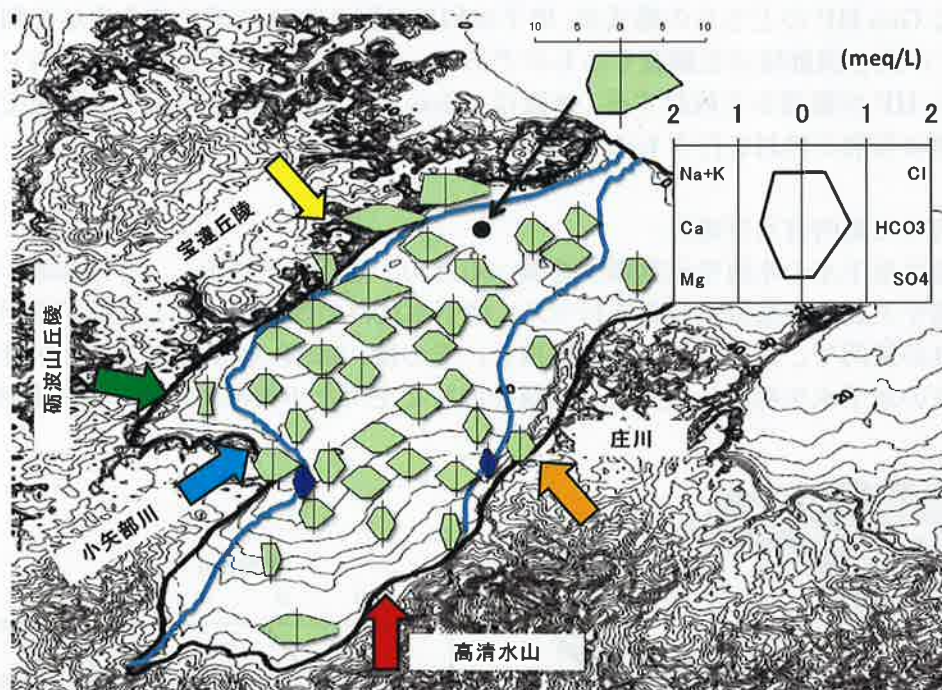


図3 庄川扇状地地下水の主要成分図（ヘキサダイアグラム）

図4は、庄川扇状地内の浅層地下水中の鉄(Fe)濃度の分布を示している。扇状地中央域で、やや鉄が高い地下水が存在しており、宝達丘陵付近でも高い値を示した。これらの結果から熱力学的考察を行った結果、鉄水酸化物 (ferrihydrite :  $(Fe(OH)_3)$ ) あるいは goethite ( $FeOOH$ ) が沈殿する可能性があることが判明した。これらのことから、開放型の地中熱ヒートポンプを使用する際には、鉄水酸化物の沈殿を考慮する必要があることを示している。



平成24年度

中皮腫の診断補助キットと診断アルゴリズムの開発

株式会社パソロジー研究所

## (1) 研究課題

本研究開発は、中皮腫診断の標準化に向けてのものであり、診断を容易にするために、標準化されたマーカーを免疫染色でチェックする診断補助キットおよび診断アルゴリズムの開発を目的としている。

①中皮腫症例 20 例、良性の中皮組織 30 例、肺腺がん 50 例、子宮体癌 30 例、卵巣癌 30 例を網羅する組織の収集と組織アレイの作製

②染色による候補マーカー抗体の感受性と特異性の検討

③カクテル抗体の組み合わせの選定

④カクテル抗体の混和条件、染色条件の検討

以上の4つの課題について検討を行う。

最終的に ①良性 vs. 悪性カクテル、②中皮腫 vs. 癌(胸腔)、③中皮腫 vs. 癌(腹腔)

・ の3種のカクテル抗体キットを作製することを予定した。

| 実施項目          | 具体的内容と参加機関・個人の役割分担          |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   |   |
|---------------|-----------------------------|---|----|----|----|----------|----------|---|---|---|---|---|---|
| 1.症例選択        | 組織アレイ用の症例を選択する(富山大学)        |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   |   |
| 2.組織アレイ作製・染色  | 組織アレイブロック作製、組織アレイの免疫染色(パソ研) |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   |   |
| 3.組織アレイ評価・解析  | 免疫染色した組織アレイの評価・解析(富山大学)     |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   |   |
| 4.カクテル抗体デザイン  | カクテル抗体のデザイン(富山大学)           |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   |   |
| 5.カクテル抗体条件設定  | カクテル抗体の染色条件設定、染色画像の解析(パソ研)  |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   |   |
| 6.カクテル抗体評価    | カクテル抗体の性能評価(富山大学)           |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   |   |
| 7.キット化        | カクテル抗体のキット化(パソ研)            |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   |   |
| 実施年・月<br>実施項目 | H24<br>7                    | 8 | 9  | 10 | 11 | 12       | H25<br>1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1.症例選択        |                             |   |    |    |    |          | →        |   |   |   |   |   |   |
| 2.組織アレイ作製・染色  |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   | → |
| 3.組織アレイ評価・解析  |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   | → |
| 4.カクテル抗体デザイン  |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   | → |
| 5.カクテル抗体条件設定  |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   | → |
| 6.カクテル抗体評価    |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   | → |
| 7.キット化        |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   | → |
| 実施年・月<br>実施項目 | H25<br>8                    | 9 | 10 | 11 | 12 | H26<br>1 | 2        | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |   |
| 1.症例選択        |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   |   |   |
| 2.組織アレイ作製・染色  |                             |   |    |    |    |          |          |   |   | → |   |   |   |
| 3.組織アレイ評価・解析  |                             |   |    |    |    |          |          |   |   | → |   |   |   |
| 4.カクテル抗体デザイン  |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   | → |   |   |
| 5.カクテル抗体条件設定  |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   | → |   |
| 6.カクテル抗体評価    |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   | → |   |
| 7.キット化        |                             |   |    |    |    |          |          |   |   |   |   | → |   |

## (2) 研究の実施内容及び成果

### ①検討症例の組織アレイ作製

検討症例として、中皮腫、良性中皮組織、肺腺癌、子宮体癌、そして卵巣癌症例を各々収集して組織アレイを作製する計画であったが、当初に目標とした症例数の確保、特に良性中皮組織の収集が困難にて、例数を減らし日常の病理診断で形態的に中皮腫と鑑別困難な診断症例を厳選し組織アレイを作製した。

症例数は、各々以下の通りである。なお、組織 **heterogeneity** を評価する必要性から、中皮腫、良性中皮細胞ブロック、非小細胞肺癌低分化型はスパイラルアレイ標本とした。

#### 【悪性中皮腫 13 例】

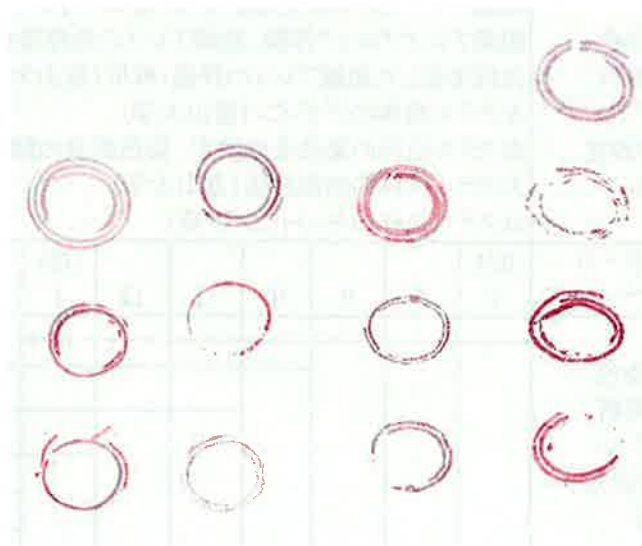
上皮型 7 例

肉腫型 4 例

二相型 2 例

上皮型中皮腫と低分化扁平上皮癌の診断困難例 1 例

[アレイ標本]



#### 【良性中皮細胞ブロック 3 例】

胸腹水細胞診にて良性と診断された材料 3 例

[アレイ標本]



【非小細胞肺癌低分化型 7 例】

低分化腺癌 2 例

低分化腺扁平上皮癌 2 例

大細胞癌 1 例

多形性癌 1 例

肉腫様癌 1 例

【アレイ標本】



【子宮体癌、卵巣癌 50 例】

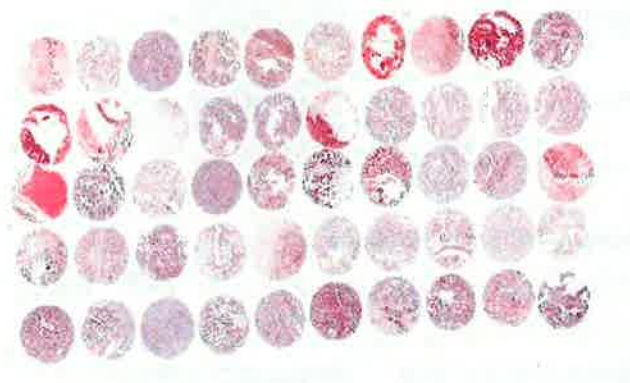
類内膜腺癌 15 例

漿液性腺癌 16 例

明細防腺癌 11 例

粘液癌 8 例

【アレイ標本】



②免疫染色による候補マーカー抗体の感受性と特異性の検討

計画書で挙げた候補マーカー抗体に PAX8, CD146, IMP3, TERT を加えた 14 種類について免疫染色し、その結果をスコア化した。

・候補マーカー抗体

WT-1, TTF-1, p53, p63, Ber-EP4, Calretinin, EMA, D2-40, Glut-1, CEA  
PAX8, CD146, IMP3, TERT,

・染色結果のスコアリング方法

・染色結果のスコアリング方法

**Distribution**

| Rxpression ratio (%) | Distribution score |
|----------------------|--------------------|
| 0                    | 0                  |
| 1                    | 1                  |
| 10                   | 10                 |
| 20                   | 20                 |
| 30                   | 30                 |
| 40                   | 40                 |
| 50                   | 50                 |
| 60                   | 60                 |
| 70                   | 70                 |
| 80                   | 80                 |
| 90                   | 90                 |
| 100                  | 100                |

**Intensity**

| Rxpression level | Intensity score |
|------------------|-----------------|
| No expression    | 0               |
| Weak             | 1               |
| Moderate         | 2               |
| Marked           | 3               |

**Total score = [Distribution score] multiplied by [Intensity score]**

**Evaluation**

| Evaluation | Total score |  |
|------------|-------------|--|
| Negative   | 0 - 50      |  |
| Positive   | 60 - 100    |  |
|            | 120 - 200   |  |
|            | 210 - 300   |  |

**Scoring table and evaluation**

(エクセル：Scoring data 表、クラスター評価 参照)

・染色結果のスコアリング表 (別 Excel ファイル)

③カクテル抗体の組み合わせの選定

Scoring 表よりクラスター評価を行い、カクテル抗体の組み合わせを 3 種類に絞った

(1)中皮腫 陽性カクテル：WT-1 と D2-40 の 2 種

(2)中皮腫 陰性カクテル：TTF-1 と PAX8 と BerEP4 と CEA の 4 種

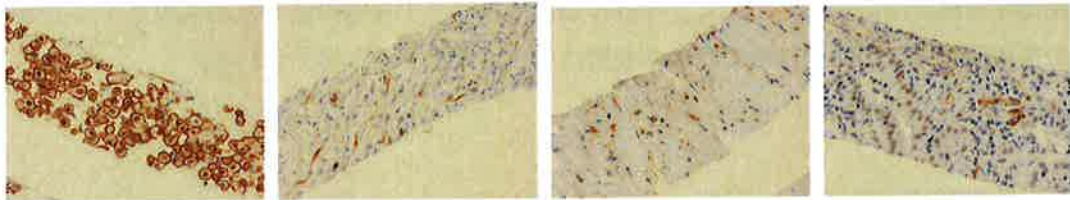
(3)反応性中皮との鑑別カクテル：p53 と IMP3 と CD146 の 3 種

以上、(1)～(3)の 3 種類のカクテル抗体を 1 セットとする。

## ・染色例

### (1) 中皮腫 陽性カクテル

上皮型中皮腫では強く発現するが、肉腫型、線維形成型では部分的な陽性像となる。



上皮型中皮腫

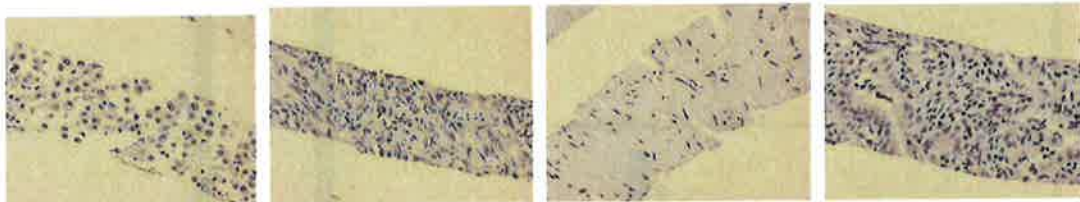
肉腫型中皮腫

線維形成型中皮腫

二相型中皮腫

### (2) 中皮腫 陰性カクテル

中皮腫のいずれの型（上皮型、肉腫型、線維形成型、二相型）も陽性像は見られない。



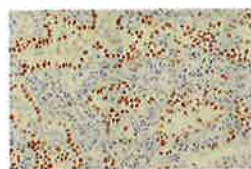
上皮型中皮腫

肉腫型中皮腫

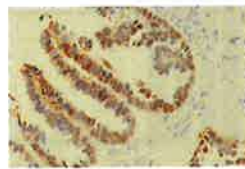
線維形成型中皮腫

二相型中皮腫

一方、癌腫では陽性を示す



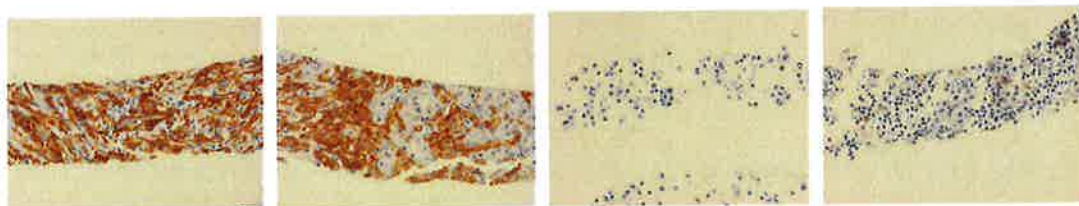
肺癌 (TTF-1 & Ber-EP4)



卵巣癌 (PAX8 & Ber-EP4)

### (3) 反応性中皮との鑑別カクテル

中皮腫では強い陽性像が見られるのに対し、反応性中皮細胞では陽性像は全く見られない。



肉腫型中皮腫

二相型中皮腫

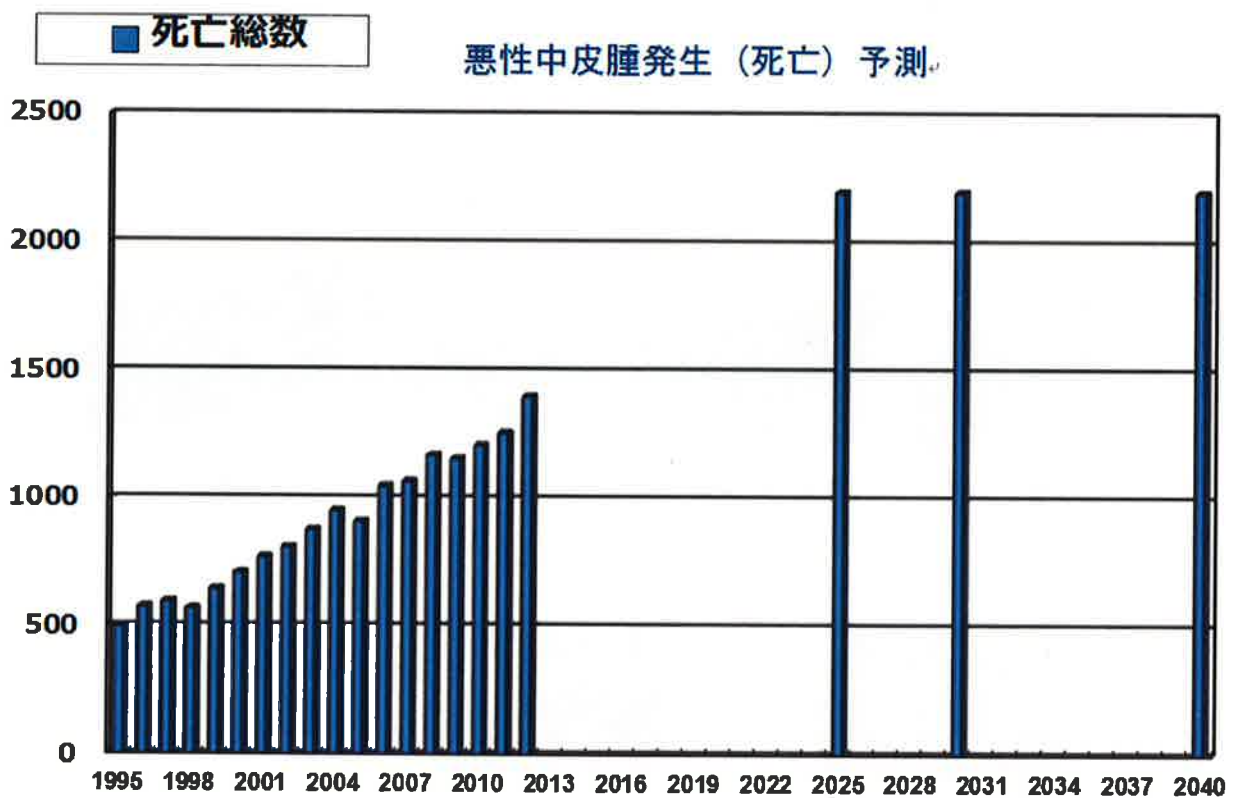
反応性中皮細胞

反応性中皮細胞

最適条件でカクテル化した各々抗体（陽性カクテル抗体、陰性カクテル抗体、良悪鑑別カクテル抗体）で、中皮腫と反応性中皮の組織を染色した結果、中皮腫のいずれの型（上皮型、肉腫型、線維形成型、二相型）にも陽性カクテル抗体、あるいは鑑別カクテル抗体の陽性像を認めた。一方、いずれの型の中皮腫も陰性カクテル抗体は染まらず、また、反応性中皮も鑑別カクテル抗体に染まらなかった。

### (3) 今後予想される効果

今日、中皮腫の発生と死亡者数が増加の一途をたどるなかで（下グラフ）、医療機関が中皮腫の診断に遭遇する機会は益々増えていく。今回作製に成功した中皮腫診断のためのカクテル抗体キットは、医療機関における病理診断のための要望に大きく貢献すると考えられる。



平成24年度

ホタルイカに含まれる生活習慣病予防成分の解明と応用

富山短期大学  
竹内 弘幸

## 1. 研究の実施内容及び成果に関する報告書

### (1)研究課題ホタルイカに含まれる生活習慣病予防成分の解明と応用

ホタルイカは、北陸を代表する貴重な水産資源の一つである。しかしながら、水揚げは3月～5月に限られ、また旬の時期でも日々の水揚げ量は安定していない。魚介類の中でもホタルイカの鮮度低下は特に早いことから、安定して供給することが難しい。その一方で、大量に水揚げされれば取引価格は大きく低下するなど、産業としての大きな課題を抱えている。

申請者らは、ホタルイカ健康機能について研究を行い、強力な肝脂肪低下作用のあることを動物実験にて初めて明らかにしてきた。本研究の成果は、非常に大きな反響を呼び、北陸だけでなく、全国版のテレビ、新聞、インターネットなどで大きく取り上げられた。

ホタルイカの肝脂質低下作用の有効成分については、まだわかっていない。有効成分が不明なままでは、成分の安定性や濃縮方法がわからないため、応用化に大きな支障をきたす。そこで本研究では、付加価値の高いホタルイカ加工食品ならびに機能性素材の開発を目指し、ホタルイカに含まれる機能性成分を特定し、その有効成分の特性やより効果のある加工品を開発していくことを課題とした。

### (2)研究の実施内容および成果

#### ①有効成分の存在部位解明（添付資料①）

本実験では、ホタルイカの内臓または内臓外のどちらの画分に有効成分が含有しているのかを調べるため、ホタルイカの内臓または内臓外の乾燥粉末で調製した餌をラットに摂食させ、肝臓および血中脂質濃度に及ぼす影響を検討した。【方法】4週齢のWistar系雄ラット40匹を5群に分け、対照食、ホタルイカ全粉末添加食、ホタルイカ内臓粉末添加食、ホタルイカ内臓外粉末添加食またはスルメイカ内臓粉末添加食を各群に自由摂食させ、2週間飼育した。飼育期間終了後、5時間絶食させたのちに断頭屠殺し、血液および肝臓を採取した。【結果】体重増加量および食餌摂取量には各群間で差は見られなかった。血清総コレステロール濃度は、対照群およびホタルイカ内臓外粉末食群に比べて、スルメイカ内臓粉末食群で有意に低値を示した。肝臓中性脂肪含量は対照群に比べてホタルイカ全粉末食群、ホタルイカ内臓粉末食群およびスルメイカ内臓粉末食群で有意に低い値を示した。【結論】ホタルイカの肝臓脂質低下作用は、ホタルイカの内臓に含有する成分に起因している可能性が示唆された。さらにこの作用がスルメイカ内臓についても同様に見られたことから、ホタルイカに限らずスルメイカの内臓にも血中および肝臓脂質低下作用を有する機能性成分が含まれている可能性が示唆された。

## ②マイクロアレイデータの解析による新規機能性の探索（添付資料②）

本研究では、マイクロアレイにより得られたデータをネットワーク解析することで、ホタルイカの新規健康機能について探索することを試みた。【方法】4週齢のWistar系雄ラットに、対照食またはホタルイカ粉末5%添加食を2週間自由に摂取させた。飼育終了後、6時間絶食させたのち肝臓サンプルを採取した。肝臓mRNAを抽出した後、Agilent社製のWhole Rat Genome Oligo Microarrayを用いて遺伝子発現量を測定した。データ解析ソフトは、GeneSpring GX 11.0を使用した。対照群と比較して発現量が、半分以下の遺伝子を発現減少遺伝子、2倍以上であるものを発現増加遺伝子とした。Pathway解析は、GeneSpring GX 11.0のPathway Analysis機能を用いて行った。マッピングされたネットワーク情報から発現が変動した遺伝子についての生物学的な解釈を行うことで、新規の健康機能探索を試みた。【結果】ホタルイカの摂取により発現が減少した遺伝子についてPathway解析を行った結果、肝臓のLDL受容体を分解する酵素である前駆蛋白転換酵素サブチリシン/ケキシシン9 (PCSK9)が、コレステロール代謝プロセスとネットワークを形成してマッピングされた。この酵素は、家族性高コレステロール血症の原因遺伝子であることが報告され、近年血中LDLを上昇させる因子として近年注目を集めている。【結論】以上の結果より、ホタルイカ摂取により、PCSK9の遺伝子発現は低下し、LDL受容体の分解が抑制されることで、高LDL-コレステロール血症が予防できるかもしれないことが示唆された。

## ③ホタルイカ加工品の機能性について（添付資料③）

私たちの研究グループは以前に、生ホタルイカに肝臓中性脂肪低下作用のあることを、ラットを用いて実証してきた。本研究では、ボイルおよび素干ししたホタルイカの肝臓脂質低下作用について検討した。【方法】生ホタルイカ（生粉末）、ボイルしたホタルイカ（ボイル粉末）および素干ししたホタルイカ（素干し粉末）を凍結乾燥した後、粉末化したものをラットの飼料に5%添加した。対照群、生粉末群、ボイル粉末群および素干し粉末群の4群に分け、実験食を2週間自由摂取させた。試験最終日、血液および肝臓を採取し、分析を行った。【結果】対照群に比べて生粉末群、ボイル粉末群、素干し粉末群の肝臓中性脂肪含量は、有意に低かった。また、生粉末群に比べてボイル粉末群の肝臓中性脂肪含量は、有意に低かった。【結論】以上のことから、ボイルおよび素干ししたホタルイカにも、肝臓中性脂肪含量を低下させる作用のあることが示唆された。また、ボイルホタルイカの肝臓中性脂肪低下作用は、生ホタルイカよりも強力である可能性が示唆された。

## ④ヒトにおける脂肪肝改善作用（添付資料④）

今回の試験では、ヒトを対象にした試験を行い、ホタルイカの脂肪肝改善作用について検討を行った。【方法】本試験に協力したボランティアは、富山短期大学に勤務する30～60代（平均47±13歳）の男性職員7名であった。ボイルしたホタルイカを1

日 40 g、日曜日を除き 4 週間取してもらった。試験前後に、超音波画像診断による脂肪肝検査、および早朝空腹時に採血を行った。試験開始前および試験期間中の各 3 日間、食事調査を行った。【結果】試験前に測定した BMI は平均  $26.4 \pm 4.0$ 、体脂肪率は平均  $26.1 \pm 4.1\%$  であった。試験後の BMI は  $26.3 \pm 3.8$ 、体脂肪率は  $26.3 \pm 4.5\%$  であり、試験の前後で有意な変化は見られなかった。試験前の食事調査の結果は、エネルギー  $1881 \pm 585 \text{ kcal}$ 、脂質エネルギー比  $28.8 \pm 6.2\%$ 、コレステロール  $291 \pm 136 \text{ mg}$  であった。試験の前後で、血清総コレステロール濃度は、有意に変化しなかった。血清 LDL-コレステロール、HDL-コレステロールおよび中性脂肪濃度も、試験前後で有意な変化はなかった。試験開始前、画像診断により脂肪肝が認められた 6 名中 3 名に、ホタルイカ摂取後に脂肪肝の改善が認められた。また、脂肪肝の程度が悪化した者は、いなかった。試験前後で GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP、コリンエステラーゼの数値に有意な変化は認められなかった。【結論】以上の結果から、ボイルしたホタルイカを摂取することで、脂肪肝の改善が期待できるかもしれないことが示唆された。しかしながら、本研究の対象者数は少ないので、脂肪肝の改善効果を確認するためには、さらなる研究が必要であると考えられる。

#### ⑤研究の成果

本研究により得られた成果をまとめると以下の通りです。

- 1) ホタルイカの内臓部位に肝臓脂質を低下させる成分が含まれている。
- 2) LDL-受容体分解抑制を介した高コレステロール血症の改善効果が期待される。
- 3) ボイルや素干ししたホタルイカにも肝臓脂質低下作用がある。
- 4) ボイルすることで肝臓脂質低下作用は増大する可能性がある。
- 5) ヒトにおいて脂肪肝の予防や改善効果が期待できる予備的知見を得ることができた。

#### (3)今後予想される効果

##### ①残された課題

本研究では、次の 2 点についてさらなる研究が必要であると考えられる。

- 1) 有効成分について、具体的に物質および構造の解明
- 2) ヒトにおける有効性を確認するための大規模試験

##### ②予想される効果と事業化の見通し

本研究により、ホタルイカが全国のマスメディアに取り上げられてきた。富山県ホタルイカ協会とも協力しながら、PR 活動を行ってきたこともあり、ホタルイカの需要は高まり、取引単価は上昇傾向を示すなど、ホタルイカ関連産業の活性化に貢献している。また、この数年でホタルイカを使ったお土産品や加工品などの種類も多くなっている。具体的な商品開発については、ホタルイカ加工会社や全国に販売ルートを持つ健康食品会社と連携しながら、具体的な商品開発を検討中である。 以上

## 有効成分の存在部位の解明

### 1. 諸言

先行研究において、ホタルイカの乾燥粉末を 5%含む食餌をラットに摂取させることにより、肝臓中性脂肪含量の有意な低下が見られた。一方、スルメイカの乾燥粉末を 5%含む食餌をラットに摂取させた場合では、肝臓中性脂肪含量の有意な低下は見られなかった。この結果よりホタルイカには、他のイカとは異なり、肝臓脂質低下作用を有している特有の成分が含まれている可能性が示唆された。しかし、この肝臓脂質低下作用を示すホタルイカの機能性成分については特定されていない。

先行研究で用いたイカのサンプルについて、ホタルイカは内臓を含む全体の乾燥粉末をラットに摂取させたのに対し、スルメイカは内臓を取り除いた外套部の乾燥粉末をラットに摂取させていた。食餌に添加した各イカのサンプルには、内臓の有無の違いがあったことから、イカの内臓に脂質低下作用を有する機能性成分が含まれている可能性が考えられたので、本実験ではイカの内臓に着目した。

本実験の目的は、ホタルイカの肝臓脂質低下作用がホタルイカの内臓および内臓外のどちらの画分に起因するものなのか、ホタルイカの内臓粉末または内臓外粉末を添加した食餌をラットに摂食させ検討した。さらにスルメイカの内臓粉末を比較として摂取させ、この肝臓脂質低下作用がホタルイカ特有の成分によるものか、もしくはイカ類の内臓画分に含まれる成分によるものか否か検討した。

### 2. 実験方法

#### ①実験動物および飼料

実験動物には、4 週齢の Wistar 系雄ラット 40 匹（日本エスエルシー株式会社）を用いた。飼育環境については、明期を 8:00~20:00、暗期を 20:00~8:00 とする 12 時間の明暗サイクルとし、室温を  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度を約 55%に設定し、全てのラットを個別ステンレスゲージで飼育した。予備飼育期間には、市販粉末飼料 MF（オリエンタル酵母工業株式会社）と水を自由に摂取させた。3 日間の予備飼育後、ラットを 8 匹ずつの 5 群に分け、それぞれ対照食を摂取させる対照群（C 群）、ホタルイカ全粉末添加食を摂取させるホタルイカ全粉末食群（FS 群）、ホタルイカ内臓粉末添加食を摂取させるホタルイカ内臓粉末食群（IFS

群)、ホタルイカ内臓外粉末添加食を摂取させるホタルイカ内臓外粉末食群 (EFS 群)、スルメイカ内臓粉末添加食を摂取させるスルメイカ内臓粉末食群 (IJCS 群) として、14 日間ラットに各実験食を摂取させた。本飼育期間中、ラットには食餌および水を自由に摂取させ、体重および食餌摂取量を毎日記録した。また糞を本飼育期間終了前 3 日間採取した。

各群の実験食の組成を Table 2-1 に、ホタルイカ全粉末、ホタルイカ内臓粉末、ホタルイカ内臓外粉末、スルメイカ内臓粉末の成分値は Table 2-2 にそれぞれ示した。各実験食における乾燥粉末サンプルの添加量は、ホタルイカ全粉末 5%、ホタルイカ内臓粉末 2.76%、ホタルイカ内臓外粉末 2.24%、スルメイカ内臓粉末 2.76% とし、それぞれ対照食中のスクロースと置換した。ミネラル混合およびビタミン混合には、ハーバー組成のものを使用した。

本飼育期間終了日に 5 時間絶食させた後、断頭屠殺し、血液を採取した。その後、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副睾丸脂肪組織、腎周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋を摘出し、肝臓については分析まで -80℃ で保存した。血液については、遠心分離機 (テーブルトップ遠心機 5220、久保田商事株式会社) を用いて、1,640×g で 15 分間遠心分離し、得られた血清を分析まで -20℃ で保存した。

## ②血清成分分析

血清中性脂肪濃度については、市販キット (トリグリセライド E-テストワコー、和光純薬工業株式会社) を用いて、GPO・DAOS 法で測定した。血清総コレステロール濃度については、市販キット (コレステロール E-テストワコー、和光純薬工業株式会社) を用いて、コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法で測定した。血清 HDL コレステロール濃度については、市販キット (HDL・コレステロール E-テストワコー、和光純薬工業株式会社) を用いて、リンタングステン酸・マグネシウム塩沈殿法で測定した。血清遊離脂肪酸濃度については、市販キット (NEFA C-テストワコー、和光純薬工業株式会社) を用いて、ACS・ACOD 法で測定した。血清グルコース濃度については、市販キット (グルコース CII-テストワコー、和光純薬工業株式会社) を用いて、ムタロターゼ・GOD 法で測定した。血清インスリン濃度の測定には市販キット (レビス インスリン-ラット T、シバヤギ) を用いた。

## ②肝臓脂質分析

肝臓の脂質抽出については Folch らの方法で行なった。検体 50  $\mu$ L をチューブに取り、窒素ガスを用いて溶媒を除去した後、脂質溶解液 (ブタノール:メタノール:トリトン X-100

=2:1:1 (v/v)) を 50  $\mu$ L 加え、溶解した。その後、検体に含まれる中性脂肪含量を市販キット（トリグリセライド E・テストワコー、和光純薬工業株式会社）を用いて、GPO・DAOS 法で測定した。検体 160  $\mu$ L をチューブに取り、窒素ガスを用いて溶媒を除去した後、脂質溶解液（ブタノール：メタノール：トリトン X-100=2:1:1 (v/v)) を 20  $\mu$ L 加え、溶解した。その後、検体に含まれるコレステロール含量を市販キット（コレステロール E・テストワコー、和光純薬工業株式会社）を用いて、コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法で測定した。

### ③脂肪酸代謝系酵素活性分析

肝臓約 100 mg をチューブに取り、氷中で 0.25 M ショ糖と 1 mM EDTA を含む 3 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) 1.0 mL でホモジナイズした。その後、微量高速冷却遠心機 (MX-300、株式会社トミー精工) を用いて、700 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離した。上清を別のチューブに移し、20,400 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 60 分間遠心分離した。得られた上清画分を、脂肪酸合成酵素、およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素の測定用として小分けし、-80 $^{\circ}$ C でそれぞれの分析まで保存した。グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は Kelly らの方法により測定した。脂肪酸合成酵素活性は Kelly らの方法により測定した。

### ④統計分析

すべての測定値について、平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。また有意差検定には統計ソフト（エクセル統計 2008、社会情報サービス）を用いた。一元配置分散分析を行い 5 群間の差を分析した。 $p < 0.05$  で有意差ありとし、有意差が生じた場合に Tukey の多重範囲検定<sup>54)</sup>を行い、各群間の有意差を算出した。 $p < 0.05$  で有意差ありと判定した。

## 3. 実験結果

### ①体重および食事摂取量

体重および食餌摂取量には、各群間に有意差を認めなかった。

### ②内臓組織重量

心臓、肝臓、腎臓および脾臓の絶対重量には、各群間に有意差を認めなかった。心臓、肝臓および腎臓の相対重量には、各群間に有意差を認めなかった。脾臓の相対重量は、EFS 群および IJCS 群に比べて IFS 群で有意に大きかった。

### ③脂肪組織重量

副辜丸脂肪組織、腎周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織およびこれらの合計である総腹腔内

脂肪組織の絶対重量には、各群間に有意差を認めなかった。

#### ④血清成分

血清中性脂肪濃度は、C 群に比べて EFS 群で有意に高値を示した。血清総コレステロール濃度は、C 群および EFS 群に比べて IJCS 群で有意に低値であった。血清 non-HDL コレステロール濃度は、EFS 群に比べて IJCS 群で有意に低値を示した。血清 HDL コレステロール濃度、血清遊離脂肪酸濃度、血清グルコース濃度および血清インスリン濃度には、各群間に有意差を認めなかった。

#### ⑤肝臓脂質

肝臓中性脂肪含量は、C 群に比べて FS 群、IFS 群および IJCS 群で有意に低値であったが、EFS 群では有意な差は見られなかった。肝臓コレステロール含量は、C 群に比べて FS 群、IFS 群および EFS 群で有意に高値を示したが、IJCS 群では有意な差は見られなかった。

#### ⑥肝臓酵素活性

グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は、C 群に比べて FS 群、IFS 群、EFS 群および IJCS 群の 4 群で有意に低値であった。脂肪酸合成酵素活性では、C 群に比べて FS 群で有意に低値であったが、IFS 群、EFS 群および IJCS 群には、有意な差は見られなかった。

### 4. 考察

先行研究において、ホタルイカの乾燥粉末を添加した食餌をラットに摂取させたことによる、肝臓中性脂肪含量の有意な低下を確認した。このホタルイカによる肝臓脂質低下作用は、主に肝臓のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 活性を抑制したことに起因していると考えられた。しかし、この肝臓脂質低下作用を示すホタルイカの機能性成分については特定されていない。本実験では、ホタルイカの臓器および臓器外の 2 つの画分に注目して、肝臓脂質低下作用に関与するホタルイカの機能性画分の探索を行った。

肝臓脂質含量の結果において、C 群と比較して FS 群、IFS 群および IJCS 群で、肝臓中性脂肪含量が有意に低いことを確認した。この結果は、ホタルイカの肝臓脂質低下作用が、ホタルイカの臓器画分に起因している可能性を示唆していると考えられる。

ホタルイカの肝臓脂質低下作用のメカニズムの一つに G6PD 活性の抑制が考えられている。脂肪酸合成系酵素の一つである G6PD は、脂肪酸の新規合成に必要な補酵素である

NADPH を生成する。G6PD 活性を抑制することによって、脂肪酸の新規合成に関わる酵素への NADPH の供給量が減り、脂質の生成が抑えられることで、肝臓の脂肪蓄積を抑制していると考えられる。本実験においても、FS 群、IFS 群、EFS 群および IJCS 群の全ての群で G6PD 活性の抑制が見られた。よって、本実験においてもホタルイカの肝臓中性脂肪含量の低下は、G6PD 活性の抑制によって引き起こされたと考えられる。さらに IFS 群と EFS 群ともに G6PD 活性の有意な低下が見られたことから、ホタルイカの肉および肉外ともに G6PD 活性の抑制に関与する成分が含まれていることが示唆された。

また、脂肪酸の合成における重要な酵素に脂肪酸合成酵素 (FAS) がある。FAS は、アセチル-CoA とマロニル-CoA から、NADPH を用いてパルミチン酸 (C16:0) を生成する酵素であり、EPA の摂取による脂質低下作用のメカニズムの一つに、FAS 活性を抑制することで肝臓への脂肪蓄積を防ぐことが知られている。本実験における FAS 活性の結果では、FS 群でのみ有意な低下が見られた。このことから、ホタルイカ全粉末の摂取による肝臓の脂肪蓄積の抑制は、FAS 活性の低下も関与していると考えられる。

先行研究で、ホタルイカの摂取によるラットの血清総コレステロール濃度の有意な低下が確認されている。しかしながら、本実験では、ホタルイカ全粉末、ホタルイカ肉外粉末およびホタルイカ肉内粉末の摂取によるラットの血清総コレステロール濃度の有意な低下が見られなかった一方で、スルメイカ肉内粉末を摂取させた群では対照群と比べ、血清総コレステロール濃度の有意な低下が確認された。この要因として、スルメイカ肉内粉末の摂取によって、糞中へのコレステロールと胆汁酸の排泄量が増えたことが一つ考えられる。糞中総コレステロール排泄量は、C 群に比べて IJCS 群で有意に高く、糞中総胆汁酸排泄量も IJCS 群は C 群に比べて有意に高かった。Tanaka らは、スルメイカの非脂質画分の摂取が、糞中へのコレステロールおよび胆汁酸の排泄量を増加させることを確認しており、メカニズムとして腸管における胆汁酸ミセルの形成阻害によるコレステロール低下作用を報告している。また、スルメイカの脂質画分によるコレステロール低下作用への関与の可能性も報告している。本実験におけるスルメイカ肉内粉末のコレステロール低下作用も、Tanaka らの報告と同様に、非脂質画分と脂質画分の関与によるメカニズムで引き起こされていると考えられる。一方でホタルイカ肉内粉末は、スルメイカ肉内粉末と同量を食餌に添加しているが、血清総コレステロール濃度の有意な低下は確認できなかった。特に異なる点として、糞中総胆汁酸排泄量が IJCS 群に比べて IFS 群で有意に低かったことから、スルメイカはホタルイカよりも強いコレステロール代謝改善作用を有している可

能性が示唆された。

本実験では、ホタルイカの内臓および内臓外の肝臓脂質低下作用への影響について検討した。ホタルイカの肝臓脂質低下作用は、主に内臓画分に起因している可能性が示唆された。また、スルメイカ内臓粉末の摂取によっても肝臓中性脂肪含量の有意な低下が確認できたことから、イカ類の内臓画分には共通して肝臓脂質低下作用を有している可能性が示唆された。

Table 2-1. Compositions of experimental diets

| Ingredients, %                                        | C    | FS   | IFS   | EFS   | IJCS  |
|-------------------------------------------------------|------|------|-------|-------|-------|
| Casein                                                | 22.2 | 22.2 | 22.2  | 22.2  | 22.2  |
| Soybean oil                                           | 5    | 5    | 5     | 5     | 5     |
| Mineral mixture <sup>1</sup>                          | 4    | 4    | 4     | 4     | 4     |
| Vitamin mixture <sup>1</sup>                          | 1    | 1    | 1     | 1     | 1     |
| Cellulose                                             | 4    | 4    | 4     | 4     | 4     |
| Choline chloride                                      | 0.2  | 0.2  | 0.2   | 0.2   | 0.2   |
| Firefly squid <sup>2</sup>                            | -    | 5    | -     | -     | -     |
| Internal organs of firefly squid <sup>2</sup>         | -    | -    | 2.76  | -     | -     |
| Except internal organs of firefly squid <sup>2</sup>  | -    | -    | -     | 2.24  | -     |
| Internal organs of Japanese common squid <sup>2</sup> | -    | -    | -     | -     | 2.76  |
| Sucrose                                               | 63.6 | 58.6 | 60.84 | 61.36 | 60.84 |

<sup>1</sup> Harper mixture.<sup>44)</sup>

<sup>2</sup> Freeze-dried powder.

C, control diet; FS, firefly squid diet; IFS, internal organs of firefly squid diet; EFS, firefly squid except internal organs diet; IJCS, internal organs of Japanese common squid diet.

**Table 2-2. Nutrient composition of the freeze-dried powder samples**

|                                | FS   | IFS  | EFS   | IJCS |
|--------------------------------|------|------|-------|------|
| Crude protein, %               | 56.0 | 40.0 | 66.6  | 49.0 |
| Crude fat, %                   | 22.5 | 35.5 | 8.9   | 34.9 |
| Ash, %                         | 7.57 | 6.72 | 11.95 | 5.03 |
| Carbohydrate, %                | 13.9 | 17.8 | 12.5  | 11.1 |
| Taurine, g/100g                | 1.8  | 1.8  | 2.9   | 1.8  |
| Cholesterol, g/100g            | 1.4  | 1.2  | 1.6   | 1.3  |
| n-3 PUFA <sup>1</sup> , g/100g | 6.9  | 9.4  | 4.3   | 0.8  |

<sup>1</sup> n-3 polyunsaturated fatty acids = eicosapentaenoic acid + docosahexaenoic acid

FS, firefly squid; IFS, internal organs of firefly squid; EFS, firefly squid except internal organs; IJCS, internal organs of Japanese common squid.

## マイクロアレイデータの解析による新規機能性の探索

## I. 序論

ホタルイカ（学名：*Watasenia scintillans*）とはホタルイカモドキ科に属する深海性のイカで、胴長5cm、体重10gほどの小型のイカである。全身が青く発光することからホタルイカと命名されている。富山県を代表する特産品の1つであり、4～6月の春にかけて富山湾などで水揚げされる。ホタルイカは内臓を取り除かず丸ごと塩茹でにして食べられることが多い。

イカ類の成分の特徴は、良質のたんぱく質や脂質を多く含むことである。コレステロール含量は多いが、その一方で血中コレステロール濃度を低下させる働きのあるタウリンが多く含まれている。ホタルイカは、スルメイカなどの大型のイカと異なり、内臓ごと塩茹でして食べるので、一般的なイカを摂取した場合と摂取できる栄養素が異なる。ホタルイカには、EPAやDHAの他に、ビタミンAなども、多く含まれている<sup>1)</sup>。

田中らの研究によると、動物実験でスルメイカ、エビ、タコの乾燥粉末を添加した食餌をラットに投与した結果、血清及び肝臓コレステロールの低下作用を及ぼすことを報告している<sup>2)</sup>。また、エビやスルメイカの血清コレステロールを下げる作用はエビやスルメイカに含まれる脂質成分の一部であると推測している。肝臓コレステロールを下げる作用はエビやスルメイカに含まれる除脂肪成分であることを報告している。この研究ではホタルイカについては検討されていなかった。

私たちの研究グループは、ラットにホタルイカの凍結乾燥粉末を5%添加した食餌を2週間投与し、通常食との比較を行った<sup>3)</sup>。その結果、ホタルイカ群の肝臓中性脂肪含量は、通常食に比べて有意に低かった。また、肝臓中の脂肪合成に関係する酵素活性も、ホタルイカ群で低かった。以上の結果から、ホタルイカの摂取により、肝臓の脂肪合成が抑制され、肝臓脂肪が減少することが示唆された。ホタルイカは、脂肪肝の改善や予防に有効である可能性が考えられた。

動脈硬化とは、血管内膜にリポ蛋白が蓄積されてプラークを作ることによって動脈が肥厚し硬化した状態を言い、最終的には動脈の血液が遮断されて、酸素や栄養が重要組織に到達できなくなる結果、虚血性心疾患や脳血管障害などを引き起こす。現在、LDL-コレステロールの血中濃度が高い場合、糖尿病患者、高血圧患者、喫煙者などでは動脈硬化が進行しやすいことが証明されている。

糖尿病とは、遺伝的要因によるⅠ型と生活習慣要因によるⅡ型があり、現在はⅡ型糖尿病が増え問題視されている。Ⅰ型糖尿病では遺伝的にインスリン分泌が低下しており血中の糖を各組織に取り込むことができずにいる状態である。Ⅱ型糖尿病では生活習慣によって、インスリン感受性が低下しており血中の糖を各組織に取り込むことができずにいる状

態である。そのほかにも、Ⅱ型糖尿病には運動不足や高血圧や脂質異常症など様々な要因が関わっている。合併症として、網膜症、神経障害、腎症がよく知られている。他にも動脈硬化を進行させ、心筋梗塞や脳梗塞も引き起こす。

脂肪肝とは肝脂肪量の5%以上が脂肪、おもに中性脂肪で占められた状態をいう。組織学的には肝細胞の1/3以上に脂肪化が認められる。原因としてはアルコールの大量摂取によるアルコール性脂肪肝と過栄養が原因の非アルコール性脂肪肝がある。後者は近年増えてきている。脂肪肝は放置しておくと慢性肝炎から肝硬変、肝がんに至る可能性がある。また、肥満を伴う非アルコール性脂肪肝は肥満によって脂質異常症や高血圧、糖尿病などの生活習慣病へのリスクも高まるとされている。

マイクロアレイとはガラス基板上に数千～数万種類のプローブを結合させることで、それらに対応した多数の遺伝子を同時に検出することが可能で、細胞がどのような状況において遺伝子発現が上昇、低下するかを1度の分析で調べられる方法である<sup>4,5)</sup>。膨大な遺伝子の中から、研究者が興味を持っている現象によって発現が変化する遺伝子を見つけ出す方法としても使用できる。マイクロアレイ分析法は、遺伝子発現分析を推し進める技術として登場した比較的新しい分析技術である。

## II. 目的

私たちはこれまでホタルイカの新たな健康機能の探索を行ってきた。その結果、ホタルイカには肝臓脂質低下作用があることが新たに見出すことができた。本研究では、ホタルイカを摂取したラットの肝臓サンプルについて遺伝子発現パターンを解析することで、肝臓脂質低下作用の遺伝子的なメカニズムならびにホタルイカの新たな健康機能の探索を行うことを目的とした。具体的には、肝臓サンプルから得られた遺伝子をマイクロアレイにより発現量を測定し、そのデータについて遺伝子オントロジー解析やパスウェイ解析を行った。また、美肌、糖尿病および老化に関連すると考えられる遺伝子について、ホタルイカの摂取によりラット肝臓の遺伝子発現量がどのように変化するかを調べることで、美肌作用、糖尿病予防および老化予防に効果が期待できるかどうかについて検討した。

## III 方法

ホタルイカは、富山県ほたるいか協会より提供されたものを用いた。試料は、可食部を凍結乾燥した後、フードミルによって粉末化したものを、実験動物用の飼料に添加した。ホタルイカはまるごと全体を可食部とした。試験に用いたホタルイカ成分を表1に示した。たんぱく質量は、ケルダール法、脂質量はソックスレー法、灰分量は直接灰化法により測定した。炭水化物量は、差し引き法により求めた<sup>6)</sup>。

動物飼育条件等は、以下のとおりである。4週齢のWistar系雄ラット（日本SLC）14匹を実験動物に用いた。3日間の予備飼育後、ラット各7匹を対照群およびホタルイカ群

に分けた。飼育室の環境は、室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 2\%$ 、明暗サイクルを明期 8:00~20:00、暗期 20:00~8:00 とした。表 2 に示した実験食を、ラットに 2 週間自由に摂取させた。試験最終日 6 時間の絶食の後、断頭屠殺し血液採取後、すばやく肝臓を採取した。肝臓サンプルは、RNA 安定化剤 (RNAlater, Ambion 社製) で処理した後、分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

表 1. 乾燥ホタルイカの栄養素組成

|                  | ホタルイカ |
|------------------|-------|
| たんぱく質, %         | 55.0  |
| 脂質, %            | 15.2  |
| 灰分, %            | 7.4   |
| 炭水化物, %          | 22.3  |
| コレステロール, mg/100g | 760   |
| タウリン, g/100g     | 1.8   |

生ホタルイカの水分; 81.6%。

表 2. 食事組成

|           | 対照   | ホタルイカ |
|-----------|------|-------|
| カゼイン      | 22.2 | 22.2  |
| コーン油      | 5    | 5     |
| ミネラル混合*   | 4    | 4     |
| ビタミン混合*   | 1    | 1     |
| セルロース     | 4    | 4     |
| 塩化コリン     | 0.2  | 0.2   |
| ホタルイカ乾燥粉末 | -    | 5     |
| スルメイカ乾燥粉末 | -    | -     |
| スクロース     | 63.6 | 58.6  |

\*ハーバー組成。

マイクロアレイ分析は、株式会社バイオマトリックス研究所に依頼した。対照食群とホタルイカ食群の肝臓をサンプルとして、各 7 匹分を 1 サンプルにプールした後、分析に用いた。マイクロアレイは、アジレント社の Whole Rat Genome Oligo Microarray (4×44K) を用いた。

蛍光シグナルの数値データを、解析ソフト GeneSpring® GX 11.0 を用いて比較解析した。ホタルイカサンプル数値をコントロールの数値で割り、その商を発現変動倍率とした。発現変動率が、0.5 以下の遺伝子を発現減少遺伝子、2.0 以上を発現増加遺伝子とし、同解析

ソフトを用いて遺伝子オントロジー解析を行った。パスウェイ解析も、GeneSpring® GX 11.0を用いて解析を行った。遺伝子オントロジー解析と同様に、発現変動率が、0.5 以下の遺伝子を発現減少遺伝子、2.0 以上を発現増加遺伝子として、変動した遺伝子と代謝への関係性についてマッピングを行った。文献情報をもとに、美肌（5 遺伝子）、糖尿病（15 遺伝子）および老化（8 遺伝子）に関連すると考えられる遺伝子を抽出した。抽出遺伝子の遺伝子発現変動比率を、マイクロアレイデータより調べ一覧表にまとめた。

肝臓分析結果は、平均値±標準偏差で示した。遺伝子オントロジー解析では、補正危険率5%未満で有意とした。

#### IV 結果および考察

##### 1. 動物飼育結果

肝臓中の中性脂肪およびコレステロール含量を表3に示した。対照に比べてホタルイカの肝臓の中性脂肪は有意に低い値だった。

##### 2. マイクロアレイ分析結果

マイクロアレイ分析結果の発現遺伝指数を表4に示した。対照に比べてホタルイカでは2倍以上に増加した遺伝子が259、半分以下に減少した遺伝子が201あり、ホタルイカのみで発現が認められた遺伝子は767あった。

##### 3. 遺伝子オントロジー解析結果

遺伝子オントロジー解析によるホタルイカ食群で有意に発現量が減少した遺伝子オントロジー（GO）タームを表6に示した。また、遺伝子オントロジー解析により有意な低下が認められた遺伝子群中の遺伝子名を表7に示した。遺伝子オントロジー解析によるホタルイカ食群で有意に発現量が低下した遺伝子は脂質合成過程、脂質代謝過程、細胞脂質代謝過程、脂質生合成過程、ステロイド代謝過程、ステロイド生合成過程、ステロール代謝過程、ステロール生合成過程、コレステロール代謝過程、コレステロール生合成過程、アルコール代謝過程に関係した遺伝子であった。

表 3. 肝臓分析結果

|               | 対照   |        | ホタルイカ |        |
|---------------|------|--------|-------|--------|
| 中性脂肪, mg/g    | 30.9 | ± 15.1 | 19.6  | ± 2.9* |
| コレステロール, mg/g | 3.58 | ± 0.23 | 4.31  | ± 0.80 |

平均値±標準偏差。\*: 対照群と比較して有意差あり(P < 0.05)。

表 4. マイクロアレイ分析結果:発現遺伝子数

|              | 対照    | ホタレイカ |
|--------------|-------|-------|
| 総分析遺伝子       | 41090 | 41090 |
| 総発現遺伝子       | 23986 | 23277 |
| 対照およびホタレイカ群  | 22510 | 22510 |
| 対照群のみ        | 1476  | -     |
| ホタレイカ群のみ     | -     | 767   |
| 2倍以上増加した遺伝子  | -     | 259   |
| 半分以下に減少した遺伝子 | -     | 201   |

表 5. 遺伝子オントロジー解析によるホタレイカ食群で有意に発現量が減少した遺伝子オントロジー(GO)ターム

| GO-ID   | GO ターム      | 遺伝子数 | 補正 P 値  |
|---------|-------------|------|---------|
| 0008610 | 脂質生成過程      | 11   | 0.01    |
| 0006629 | 脂質代謝過程      | 20   | 0.01    |
| 0044255 | 細胞脂質代謝過程    | 18   | 0.03    |
| 0008610 | 脂質生成過程      | 11   | 0.01    |
| 0008202 | ステロイド代謝過程   | 14   | 0.01 未満 |
| 0006694 | ステロイド生成過程   | 15   | 0.01    |
| 0016125 | ステロール代謝過程   | 13   | 0.01 未満 |
| 0016126 | ステロール生成過程   | 11   | 0.01 未満 |
| 0008203 | コレステロール代謝過程 | 12   | 0.01 未満 |
| 0006695 | コレステロール生成過程 | 10   | 0.01 未満 |
| 0006066 | アルコール代謝過程   | 14   | 0.04    |

共同研究グループの分析結果では、肝臓中性脂肪はホタレイカ投与群で、対照群に比べて有意に低かった。遺伝子オントロジー解析結果と合わせて考えると、ホタレイカの摂取により、ラット肝臓中の脂肪合成に関係する遺伝子発現が減少し、その結果、肝臓中の脂肪が低下したことが推察される。

遺伝子オントロジー解析によって有意な低下認められた遺伝子群のうち、遺伝子発現が対照群と比べて半分以下に減少した遺伝子名を表 6 に示した。脂肪酸合成に関係している Glucose-6-phosphate dehydrogenase の遺伝子発現が、対照群に比べて 4 分の 1 に減少していた。ホタレイカ摂取による肝臓脂質低下には、本酵素の遺伝子発現減少による活性低下が関与していると考えられる。

表 6. 遺伝子オントロジー解析により有意な低下が認められた遺伝子群中の遺伝子名

| 遺伝子名                                                                           | 遺伝子シンボル    | 倍率 <sup>1</sup> | 遺伝子バンク<br>登録名 |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------|---------------|
| Patatin-like phospholipase domain containing 3                                 | Pnpla3     | 0.08            | XR_085887     |
| Acetoacetyl-CoA synthetase                                                     | Aacs       | 0.16            | NM_023104     |
| Solute carrier family 2, (facilitated glucose transporter) member 8            | Slc2a8     | 0.24            | NM_053494     |
| Glucose-6-phosphate dehydrogenase                                              | G6pd       | 0.25            | NM_017006     |
| Squalene epoxidase                                                             | Sqle       | 0.28            | NM_017136     |
| Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9                                  | Pcsk9      | 0.33            | NM_199253     |
| Sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 2 | Sult2a2    | 0.33            | NM_001025131  |
| Insulin induced gene 1                                                         | Insig1     | 0.35            | NM_022392     |
| Patatin-like phospholipase domain containing 5                                 | Pnpla5     | 0.37            | NM_001130497  |
| Farnesyl diphosphate synthase                                                  | Fdps       | 0.38            | NM_031840     |
| Fatty acid desaturase 2                                                        | Fads2      | 0.38            | NM_031344     |
| Similar to Farnesyl pyrophosphate synthetase (FPP synthetase)                  | RGD1560208 | 0.38            | XM_227370     |
| Insulin induced gene 1                                                         | Insig1     | 0.39            | NM_022392     |
| Adenosine A1 receptor                                                          | Adora1     | 0.40            | Y12519        |
| Mevalonate (diphospho) decarboxylase                                           | Mvd        | 0.42            | NM_031062     |
| Cytochrome P450, family 51                                                     | Cyp51      | 0.42            | NM_012941     |
| Sterol-C4-methyl oxidase-like                                                  | Sc4mol     | 0.43            | NM_080886     |
| Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2                                | Acss2      | 0.45            | NM_001107793  |

<sup>1</sup> 対照群を 1.0 としたときのホタルイカ群の遺伝子発現相対値

#### 4. パスウェイ解析結果

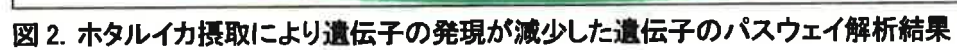
ホタルイカの摂取により発現が増加した遺伝子について、パスウェイ解析を行いマッピングを行った (図 1)。ネットワークの形成が認められたもののうち、①Angpt1 (アンジオポエチン 1)、②Ecel (エンドセリン変換酵素)、③Slc1a2 (溶質キャリアー族 1 メンバー 2)、④Mtl1a (メタロチオネイン 1A)、⑤Apob (アポリポタンパク質 b) の 5 つの遺伝子に注目して調べた (図中に赤字で示した)。Angpt1 は、脈管の成長と血管新生において重要な役割を持つことが知られている<sup>7)</sup>。Ecel は、強力な血管収縮作用を持つエンドセリンを生成する酵素である<sup>8)</sup>。Slc1a2 は、GLT-1 として知られているグルタミン酸トランスポーターである。神経細胞内にグルタミンを速やかに取り込むことで、グルタミン酸による神経細胞の損傷を防止する働きがある<sup>9,10)</sup>。Mtl1a は、酸化ストレスから卵巣組織を保護する役割を果

たしているかもしれないと考えられている<sup>11)</sup>。ApoB は、カイロミクロンと低密度リポタンパク質の主要なアポリポタンパク質である<sup>12)</sup>。

ホタルイカ摂取による発現が減少した遺伝子のパスウェイ解析結果から（図2）、① Adora1（アデノシン A1 レセプター）、② Dusp1（二重特性タンパク質ホスファターゼ 1）、③ Pcsk9（前駆蛋白質転換酵素 サブチリシン／ケキシシン 9 型）の 4 つの遺伝子に注目して調べた。Adora1 は、アデニルシクラーゼ活性を阻害する働きがある。動脈圧、心拍数、及びナトリウム排泄の調節に関係している<sup>13)</sup>。Dusp1 は細胞増殖の負の調節だけでなく、環境ストレスに対するヒト細胞応答において重要な役割をする<sup>14)</sup>。Pcsk9 は 2003 年に家族性高コレステロール血症（FH）の第 3 の原因遺伝子であることが発表され<sup>15)</sup>、その後多くの研究から Pcsk9 は血中の LDL-コレステロールを除去する肝臓 LDL 受容体の分解を促進する機能が明らかにされた。また、LDL 受容体分解能が増強する Pcsk9 遺伝子変異により高コレステロール血症が発症することが分かっている。このような知見から、Pcsk9 は血中 LDL コレステロールを調節させる因子として近年注目を集めている。

パスウェイ解析から、ホタルイカは、Pcsk9 が減少することにより、LDL 受容体の分解が抑制され、血中 LDL-コレステロール濃度が低下する可能性があるかもしれないことが示唆された。しかしながら、遺伝子発現の変化だけでは、これらの健康機能が発揮されるかどうかを判断することはできないので、より詳細な検討が必要である。





## 5. 美肌、糖尿病および老化に関連した遺伝子結果

美肌関連遺伝子の解析では、MMP1 (matrix metalloproteinase マトリックスメタロプロテアーゼ) 遺伝子、ASIP (agouti signaling protein アグーチシグナル伝達タンパク質) 遺伝子、SPINK5 (serine protease inhibitor, Kazal type 5 セリンプロテアーゼ阻害剤カザールタイプ5) 遺伝子、filaggrin 遺伝子の5つの遺伝子について調べた。MMP1 遺伝子は、間質性コラーゲン、タイプ I、II、および III の分解分泌酵素をコードしている<sup>16)</sup>。コラーゲンを分解する酵素活性に関連するため、肌のしわをできやすくすることで知られている<sup>19)</sup>。ASIP はメラニン色素の合成に関与し<sup>17)</sup>、この遺伝子が増加するとシミが現れやすくなることで知られている<sup>19)</sup>。SPINK5 遺伝子は、セリンプロテアーゼ阻害剤をコードしている。この阻害剤は、皮膚および毛髪形態形成および粘膜上皮の抗炎症性および抗菌性保護の役割を果たすことができる<sup>18)</sup>。このことから、角層の保湿や皮膚のバリア機能に関与している<sup>19)</sup>。filaggrin は、プロテアーゼの作用を受けて天然保湿因子 (NMF) として機能することで知られている<sup>20)</sup>。解析の結果、MMP1a 遺伝子は、対照とホタルイカ群の両方で発現が認められなかった。ASIP 遺伝子と filaggrin 遺伝子は、測定項目に入っていなかったため、測定できなかった。SPINK5 遺伝子は、対照群では発現が認められたが、ホタルイカでは発現は認められなかった。遺伝子解析結果から、美肌に関連する遺伝子の変化は見られなかったことから、美肌への効果は考えられなかった。

糖尿病関連遺伝子の分析では、遺伝子の増加が2型糖尿病発症リスクと強い関連のある KCNQ1 (potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1) 、TCF7L2

(Transcription factor 7-like 2)、遺伝子の増加が新生児の糖尿病に関連する KCNJ11 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11.)、遺伝子の増加が肥満に関連する FTO (Fat mass and obesity associated) 、遺伝子の増加がβ細胞機能不全に関連する HHEX/IDE 、CDKAL1 (Cdk5 regulator subunit associated protein 1-like 1) 、CDKN2A/2B 、IGF2BP2 (Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2)、HNF1B (hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B)、遺伝子の減少がβ細胞機能不全に関連する SLC30A8 (solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8) を検索したが、KCNQ1 および SLC30A8 は対照とホタルイカの両群で発現が認められなかった。遺伝子の増加が脂質細胞分化に関連する PPARG (peroxisome proliferator activated receptor gamma) はスルメイカで発現が信頼できない、ホタルイカで発現なしという結果であった<sup>21)</sup>。その他の遺伝子は測定項目に入っていなかったため、測定できなかった。糖尿病関連遺伝子では、予防や改善効果に繋がる結果を得ることはできなかった。

表 7. 美肌関連遺伝子

| 遺伝子名                  | 倍率   | 遺伝子の作用       |
|-----------------------|------|--------------|
| 発現が少ないほうが好ましいと考えられるもの |      |              |
| Mmp1a (predicted)     | 検出なし | 肌のしわを作る      |
| SPINK5①               | 検出なし | 肌荒れや炎症に関与    |
| SPINK5②               | 検出なし | 肌荒れや炎症に関与    |
| ASIP                  | 未測定  | メラニン色素の合成に関与 |
| Filaggrin             | 未測定  | 皮膚のバリア機能に関与  |

表 8. 糖尿病関連遺伝子

| 遺伝子名                  | 倍率   | 遺伝子の作用            |
|-----------------------|------|-------------------|
| 発現が多いほうが好ましいと考えられるもの  |      |                   |
| PPARG                 | 検出なし | 脂肪細胞の分化に関連        |
| SLC30A8               | 検出なし | $\beta$ 細胞機能不全に関連 |
| 発現が少ないほうが好ましいと考えられるもの |      |                   |
| KCNQ1                 | 検出なし | 2 型糖尿病に関連         |
| KCNJ11                | 未測定  | 新生児の糖尿病に関連        |
| TCF7L2                | 未測定  | 2 型糖尿病に関連         |
| FTO                   | 未測定  | 肥満に関連             |
| HHEX/IDE              | 未測定  | $\beta$ 細胞機能不全に関連 |
| CDKAL1                | 未測定  | $\beta$ 細胞機能不全に関連 |
| CDKN2A/2B             | 未測定  | $\beta$ 細胞機能不全に関連 |
| IGF2BP2               | 未測定  | $\beta$ 細胞機能不全に関連 |
| HNF1B                 | 未測定  | $\beta$ 細胞機能不全に関連 |
| WFS1                  | 未測定  | Wolfram 症候群       |
| JAZF1                 | 未測定  | $\beta$ 細胞機能不全に関連 |
| CDC123/CAMK1D         | 未測定  | 不明                |
| TSPAN8/LGR5           | 未測定  | 不明                |

老化関連遺伝子の分析では、遺伝子の増加が抗老化作用を増加させる Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 遺伝子 2～7 の発現が対照とホタルイカ群の両方で認められたが、発現量に大きな差は見られなかった<sup>21)</sup>。遺伝子増加が抗老化作用を増加させる Klotho beta 遺伝子 Sirtuin においても大きな差はなかった。Klotho 遺伝子は、対照とホタルイカ群の両方で発現が認められなかった。この結果から老化関連遺伝子についても、予防効果が期待できる結果を得ることはできなかった。

表 9. 老化関連遺伝子

| 遺伝子名                                     | 倍率   | 遺伝子の作用 |
|------------------------------------------|------|--------|
| 発現が多いほうが好ましいと考えられるもの                     |      |        |
| Sirt2                                    | 0.74 | 抗老化作用  |
| Sirt3_predicted                          | 0.98 | 抗老化作用  |
| Sirt4_predicted                          | 0.87 | 抗老化作用  |
| Sirt5                                    | 0.90 | 抗老化作用  |
| Sirt6                                    | 0.82 | 抗老化作用  |
| Sirt7_predicted                          | 0.73 | 抗老化作用  |
| Rattus norvegicus Klotho (Kl)            | 検出なし | 抗老化作用  |
| PREDICTED: Rattus norvegicus klotho beta | 0.98 | 抗老化作用  |

## V. まとめ

遺伝子オントロジーの解析結果では、脂肪酸合成に関係している Glucose-6-phosphate dehydrogenase の遺伝子発現が減少した。このことから本研究の肝臓脂質の低下は脂肪合成能の減少によるものであると考えられた。マイクロアレイ分析のパスウェイ解析からは、血中の LDL - コレステロールを除去する肝臓の LDL 受容体を分解するタンパク質の発現をコードすることで近年注目されている Pcsk9 遺伝子の発現の減少が認められたことから、血中 LDL - コレステロール濃度の上昇抑制に効果あるかもしれないことが示唆された。

美肌、糖尿病および老化に関連する遺伝子について、発現量変化を調べたが、新しい健康機能につながる知見は得られなかった。遺伝子発現の変動だけでは、実際の健康機能を断定することはできないので、遺伝子解析結果をもとに、さらなる研究が必要である。

## 参考文献

- 1) 富山県食品研究所, とやまの特産品, p. 116-117 (2003), 富山県食品研究所発行.
- 2) Kazunari Tanaka, Tadashi Sakai, Ikuo Ikeda, et al. : Effects of dietary shrimp, squid and octopus, on serum and liver lipid levels in mice, Biosci. Biotechnol. Biochem, 62, 1369-1375 (1998).
- 3) 竹内弘幸, 守田律子, 中川義久ら : ホタルイカの健康機能の探索, 第 66 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, p. 156 (2012).
- 4) Steen Knudsen (著者), 塩島聡ら (監訳) : DNA マイクロアレイデータ解析入門, 株式会社羊土社 (2002)
- 5) 独立行政法人農業生物資源研究所: マイクロアレイとは  
<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/RMOS/background.html#1> (2013 年 8 月 5 日)
- 6) 飯盛和代, 仮屋園璋, 草野麻男, 他 : 改訂食品学実験ノート (1998), 建帛社, 東京

- 7)National Center for Biotechnology Information : ANGPT1 angiopoietin 1,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/284>, (2013年8月5日)
- 8)National Center for Biotechnology Information: ECE1 endothelin converting enzyme  
1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1889>, (2013年8月5日)
- 9)National Center for Biotechnology Information: solute carrier family 1,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6506> , (2013年8月5日)
- 10)田中基樹, 細谷類, 佐藤秀臣ら: アストロサイト・グルタミン酸トランスポーター  
GLT-1 の機能逆転と神経細胞死の解析, MBE, ME とバイオサイバネティクス 103  
(133) , 5-10, (2003)
- 11)National Center for Biotechnology Information: metallothionein 1a, 4  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24567> , (2013年8月5日)
- 12)National Center for Biotechnology Information: APOB apolipoprotein B,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338> , (2013年8月5日)
- 13)National Center for Biotechnology Information: Adora1 adenosine A1 receptor,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29290> , (2013年8月5日)
- 14)National Center for Biotechnology Information: DUSP1 dual specificity phosphatase  
1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1843>, (2013年8月5日)
- 15)株式会社 BML:LDL コレステロールの新たな調節因子,  
[http://www.bml.co.jp/r\\_and\\_d/article/article11.html](http://www.bml.co.jp/r_and_d/article/article11.html), (2013年8月5日)
- 16)National Center for Biotechnology Information: MMP1 matrix metalloproteinase 1,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4312> , (2013年8月5日)
- 17)National Center for Biotechnology Information: ASIP agouti signaling protein,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/434> , (2013年8月5日)
- 18)National Center for Biotechnology Information: SPINK5 serine peptidase inhibitor,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11005> , (2013年8月5日)
- 19)株式会社 DHC:DHC の遺伝子検査  
[http://top.dhc.co.jp/shop/identshi/bihada/index.html?sc\\_iid=catop\\_idenshi\\_01\\_20130426\\_3](http://top.dhc.co.jp/shop/identshi/bihada/index.html?sc_iid=catop_idenshi_01_20130426_3)
- 20)日本化粧品技術者会 : <http://www.sccj-ifsc.com/terms/detail.php?id=272>, (2013  
年8月8日)
- 21)堀越桃子, 門脇孝: 糖尿病患者の遺伝子解析, 内科 Vol.105 P.108-114(2010),
- 22)大田秀隆: Topics 1. Sirt1 による抗老化作用, 老年医学 Vol.48, P.79 (2010).

## ホタルイカ加工品の機能性およびヒトにおける脂肪肝改善作用

## I 序論

タリイカ（学名：Watasenia tintillans）は、ツツイカ目ホタルイカモドキ科に属する深海性のイカで、胴長 5～7cm、体重 5～10g ほどの小型のイカである。全身が青く発光することからホタルイカと命名されている。富山県を代表する特産品の 1 つであり、4～6 月の春にかけて富山湾などで水揚げされる<sup>1)</sup>。

イカ類のコレステロール含量は多いが、その一方で血中コレステロール濃度を低下させる働きのあるタウリン<sup>2)</sup>を多く含む<sup>3)</sup>。ホタルイカは、スルメイカなどの大型のイカと異なり、一般的に内臓ごと塩茹でて食べることが多いので、内臓を除いて食べるスルメイカなどを摂取した場合と摂取する栄養素が異なる。

水揚げされたホタルイカの一部は、他の水産物と同様に加工食品として流通し、消費される。ホタルイカの加工食品には、塩辛、乾製品である素干しや煮干し、調味液に漬け込んだ醤油漬け、酢漬け、甘露煮などがある<sup>1)</sup>。

以前に私たちの研究グループは、通常ラットに生ホタルイカの凍結乾燥粉末を添加した食餌を 2 週間投与する実験を行った。その結果、ホタルイカ食群の肝臓中性脂肪含量は、対照食に比べて有意に低かった。また、肝臓中の脂肪合成に関係する酵素活性も、ホタルイカ食群で低いことを観察した<sup>4)</sup>。これらのことから、ホタルイカを摂取することで、肝臓の脂肪合成が抑制され、肝臓脂肪が減少することが示された。

健康な肝臓は 3～5% の脂肪を含んでいる。脂肪肝は肝臓の 5% 以上が脂肪（主に中性脂肪）で占められた状態をいう<sup>5)</sup>。組織学的には肝細胞の 1/3 以上に脂肪化が認められる。アルコール多飲歴の有無により、アルコール性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）に分類される。非アルコール性脂肪肝疾患で脂肪沈着のみを認めるものを単純性脂肪肝、脂肪沈着とともに壊死や炎症、繊維化などを認めるものは非アルコール性脂肪肝炎（NASH）とされ、近年増加してきている。脂肪肝は放置しておくと慢性肝炎から肝硬変、肝がんに至る可能性がある。また、肥満を伴う非アルコール性脂肪肝は脂質異常症や高血圧、糖尿病などの生活習慣病へのリスクも高まるとされている。

## II 目的

先に述べたように、私たちはこれまでの研究で生ホタルイカに肝臓中性脂肪低下作用のあることを実証してきた。ホタルイカを生で食べることは少なく、ボイルや加工品として食されることが多い。そこで本研究では、ボイルおよび素干ししたホタルイカの肝臓脂質低下作用について明らかにすることを一番目の目的とした。獲れたてのホタルイカは、ボイルして食べられることが多い。素干しされたホタルイカは、保存性の高いホタルイカ加工品として比較的多く流通しているものである。これまで通常ラットを用いて行ってきた研究結果から、ホタルイカには脂肪肝を改善したり、予防したりする効果があるという可能性が考えられた。本研究の二番目の目的は、脂肪肝の症状を持ったヒトにホタルイカを摂取してもらい、脂肪肝の改善にホタルイカが有効であるかどうかを検討することである。

## III 方法

### 1. 実験1 動物実験

ホタルイカは、富山湾産のホタルイカを富山県内のスーパーで入手した。ホタルイカ生粉末（生粉末）は、生ホタルイカをフードプロセッサーで処理したものを凍結乾燥させた。高速フードミルを用いて凍結乾燥物を粉末化した。ボイルホタルイカ粉末（ボイル粉末）は、生ホタルイカを沸騰水にいれボイルした。沸騰水の温度が急激に下がらないように、大きめの鍋に10匹程度ずつ1分間ボイルした。素干しホタルイカ粉末（素干し粉末）は、ファン循環式の乾燥機を用いて、50℃で14時間乾燥させた。ボイルおよび素干しホタルイカサンプルは、生粉末と同様に凍結乾燥したのち高速フードミルを用いて粉末化した。

4週齢のWistar系雄ラット（日本S L C）32匹を実験動物に用いた。8日間固形飼料（MF、オリエンタル酵母）で予備飼育後、ラット各8匹を対照群、生粉末群、ボイル粉末群および素干し粉末群の4群に分けた。飼育室の環境は、室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、明暗サイクルを明期7:00~19:00、暗期19:00~7:00とした。表1に示した実験食を、ラットに2週間自由に摂取させた。試験最終日、イソフルラン麻酔下で断頭屠殺し、血液および肝臓をすばやく採取した。血液を3000rpmで15分間遠心分離し、得られた血清を分析に供した。採取した肝臓は、分析まで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

表 1 食餌組成

|                         | 対照   | ホタルイカ<br>生粉末 | ボイルホタ<br>レイカ粉末 | 素干しホタ<br>レイカ粉末 |
|-------------------------|------|--------------|----------------|----------------|
| カゼイン                    | 22.2 | 22.2         | 22.2           | 22.2           |
| 大豆油                     | 5    | 5            | 5              | 5              |
| ミネラル混合 <sup>1</sup>     | 4    | 4            | 4              | 4              |
| ビタミン混合 <sup>1</sup>     | 1    | 1            | 1              | 1              |
| セルロース                   | 4    | 4            | 4              | 4              |
| 塩化コリン                   | 0.2  | 0.2          | 0.2            | 0.2            |
| ホタルイカ生粉末 <sup>2</sup>   | —    | 5            | —              | —              |
| ボイルホタルイカ粉末 <sup>2</sup> | —    | —            | 5              | —              |
| 素干しホタルイカ粉末 <sup>2</sup> | —    | —            | —              | 5              |
| スクロース                   | 63.6 | 58.6         | 58.6           | 58.6           |

<sup>1</sup>ハーバー組成 <sup>2</sup>凍結乾燥粉末

採取した血清中の AST、ALT、 $\gamma$ -GTP、コリンエステラーゼ、総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、中性脂肪、グルコースおよびグリコアルブミンの値の測定は、株式会社ビー・エム・エルに依頼した。

肝臓の脂質は、Folch らの方法により抽出を行った。凍結乾燥した肝臓を粉碎し、クロロホルム：メタノール（2：1）を用いて抽出した。生理食塩水を加えて、冷蔵庫にて一晩放置し、冷却遠心後に分かれた下層のクロロホルム層を脂質抽出液とした。

中性脂肪含量の測定は、市販のキット（トリグリセライド E-テスト ワコー、和光純薬株式会社）を用いた。脂質抽出液を試験管に採り、窒素ガスにて溶媒を除去し、脂質溶解液（ブタノール：メタノール：トリトン X-100＝2：1：1）を加え溶解したものを分析サンプルとした。

コレステロール含量の測定は、市販のキット（コレステロール E-テスト ワコー、和光純薬株式会社）を用いた。脂質抽出液を試験管に採り、窒素ガスにて溶媒を除去した。脂質溶解液（ブタノール：メタノール：トリトン X-100＝2：1：1）を加え溶解したものを分析サンプルとした。

脂肪酸組成分析は、まず脂質抽出液の溶媒を除去し、0.5M 水酸化ナトリウム・メタノー

ル溶液を用いてケン化した。次に、三フッ化ホウ素・メタノール溶液を加えて、メチル化を行った。メチル化されたサンプルは、ガスクロマトグラフにより脂肪酸組成を分析した。

データは、平均値±標準偏差で示した。各群の平均値の差の検定は、一元配置の分散分析の後、対応のないt検定（両側）により行った。危険率5%未満を有意差ありとした。統計処理は、Microsoft Excel の統計分析ツールを用いた。

## 2. 実験2 ヒト試験

本試験に参加を希望したボランティアは、富山短期大学の30～60代の男性職員8名であった。1名は自己都合のため自らの意志で試験を中止した。試験期間の4週間、1日40gのボイルしたホタルイカを、日曜日を除く週6日間摂取してもらった。ホタルイカの賞味期限と受け渡し方法の都合により、日曜日にはホタルイカを摂取してもらうことができなかった。試験期間中、食事や運動を含めた日常生活は普段通りとするように指示した。試験前および試験終了後に血液検査および腹部超音波検査による脂肪肝の診断を行った。試験開始前に、食物摂取頻度調査（エクセル栄養君 Ver.6.0 アドインソフト FFQg Ver3.5、建帛社）を行った。なお、本試験はヘルシンキ宣言の精神に則り、富山短期大学倫理委員会の承認を得て実施した。

採血は北陸予防医学協会にて行った。総コレステロール、HDL・コレステロール、LDL・コレステロール、中性脂肪、グルコース、インスリン、HbA1c、AST、ALT、 $\gamma$ -GTP およびコリンエステラーゼの値の測定は、北陸予防医学協会に依頼した。

脂肪肝の検査は北陸予防医学協会で行った。腹部超音波の画像をもとに医師が脂肪肝の程度を、所見なし、軽度、中等度、高度と診断した。超音波診断装置は、東芝メディカルシステムズ社製のNEMIO SSA - 550Aを用いた。

体重、BMI、体脂肪率および血液分析結果のデータは、平均値±標準偏差で示した。試験前後の平均値の差の検定は、対応のあるt検定（両側）により行った。脂肪肝の段階は、脂肪肝の所見なしは「0」、軽度脂肪肝は「1」、中等度脂肪肝は「2」、高度脂肪肝は「3」とした。試験前後の脂肪肝の程度について対応のあるt検定（両側）を行った。危険率5%未満を有意差ありとした。統計処理は、Microsoft Excel の統計分析ツールを用いた。

## IV 結果

### 1. 実験1 動物実験

体重、飼料摂取量および肝臓重量を表 2 に示した。初体重、終体重、飼料摂取量、肝臓重量において、群間で有意な差は認められなかった。

血液検査結果を表 3 に示した。対照群の HDL・コレステロール濃度は、他の 3 群と比較して有意に低かった。対照群の LDL・コレステロール濃度は、他の 3 群と比較して有意に低かった。対照群の中性脂肪濃度は、他の 3 群と比較して有意に低かった。AST、ALT、 $\gamma$ -GTP、コリンエステラーゼ、総コレステロール、グルコースおよびグリコアルブミンの濃度において、群間で有意な差はなかった。

肝臓脂質の分析結果を表 4 に示した。対照群に比べて生粉末群、ボイル粉末群、素干し粉末群の肝臓中性脂肪含量は、有意に低かった。また、生粉末群に比べてボイル粉末群の肝臓中性脂肪含量は、有意に低かった。対照群に比べて生粉末群、ボイル粉末群、素干し粉末群の肝臓コレステロール含量は、有意に高かった。

肝臓中の脂肪酸組成を表 5 に示した。ボイル粉末群のパルミチン酸 (16:0) 含量は、対照群および生粉末群と比べて有意に低かった。生粉末群、ボイル粉末群および素干し粉末群のアラキドン酸 (20:4(n-6))、リグノセリン酸 (24:0) およびドコサペンタエン酸 (22:5(n-6)) は、対照群と比較して有意に低かった。生粉末群、ボイル粉末群および素干し粉末群のリノール酸 (18:2(n-6))、 $\alpha$ -リノレン酸 (18:3(n-3))、エイコサペンタエン酸 (20:5(n-3))、ドコサヘキサエン酸 (22:5(n-3)) およびドコサヘキサエン酸 (22:6(n-3)) は、対照群と比較して有意に高かった。その他の脂肪酸含量は、群間で有意差が認められなかった。

表 2 体重、飼料摂取量および肝臓重量

|           | 対照    |   |      | 生粉末   |   |      | ボイル粉末 |   |      | 素干し粉末 |   |      |
|-----------|-------|---|------|-------|---|------|-------|---|------|-------|---|------|
| 初体重,g     | 120.0 | ± | 8.5  | 119.7 | ± | 8.1  | 121.0 | ± | 4.5  | 119.2 | ± | 4.6  |
| 終体重,g     | 185.7 | ± | 13.4 | 186.8 | ± | 17.4 | 190.3 | ± | 11.7 | 183.5 | ± | 11.2 |
| 飼料摂取量,g/日 | 15.3  | ± | 1.2  | 15.6  | ± | 1.5  | 15.6  | ± | 0.9  | 15.4  | ± | 1.0  |
| 肝臓重量,g    | 9.76  | ± | 0.90 | 10.47 | ± | 1.58 | 10.47 | ± | 0.75 | 10.08 | ± | 0.90 |

平均値±標準偏差。群間で有意差なし。

表 3 血液分析結果

|                       | 対照        | 生粉末       | ボイル粉末      | 素干し粉末     |
|-----------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| AST, IU/L             | 127 ± 15  | 126 ± 22  | 130 ± 18   | 131 ± 20  |
| ALT, IU/L             | 37 ± 5    | 42 ± 5    | 39 ± 6     | 38 ± 5    |
| γ-GTP, IU/L           | 1 ± 1     | 0 ± 0     | 0 ± 1      | 0 ± 0     |
| コリンエステラーゼ,<br>IU/L    | 8 ± 1     | 8 ± 2     | 8 ± 2      | 7 ± 1     |
| 総コレステロール,<br>mg/dL    | 100 ± 10  | 95 ± 7    | 97 ± 6     | 96 ± 5    |
| HDL-コレステロール,<br>mg/dL | 42 ± 2    | 48 ± 2**  | 48 ± 2**   | 48 ± 2**  |
| LDL-コレステロール,<br>mg/dL | 4 ± 0     | 5 ± 1**   | 5 ± 1**    | 4 ± 1*    |
| 中性脂肪, mg/dL           | 153 ± 36  | 213 ± 72* | 277 ± 88** | 207 ± 53* |
| グルコース, mg/dL          | 150 ± 17  | 135 ± 12  | 134 ± 12   | 138 ± 12  |
| グリコアルブミン, %           | 4.5 ± 0.1 | 4.5 ± 0.1 | 4.5 ± 0.1  | 4.4 ± 0.1 |

平均値±標準偏差。\*対照群と比較して有意差あり( $p<0.05$ ), \*\*対照群と比較して有意差あり( $p<0.01$ ), †生粉末群と比較して有意差あり( $p<0.05$ )。

表 4 肝臓脂質分析結果

|                    | 対照         | 生粉末         | ボイル粉末         | 素干し粉末       |
|--------------------|------------|-------------|---------------|-------------|
| 中性脂肪含量,mg/g        | 22.2 ± 5.2 | 14.8 ± 3.6* | 11.2 ± 1.9**† | 15.2 ± 3.6* |
| コレステロール<br>含量,mg/g | 3.2 ± 0.3  | 4.2 ± 0.6** | 4.2 ± 0.7**   | 4.1 ± 0.4** |

平均値±標準偏差。\*対照群と比較して有意差あり( $p<0.05$ ), \*\*対照群と比較して有意差あり( $p<0.01$ ), †生粉末群と比較して有意差あり( $p<0.05$ )。

表 5 肝臓中の脂肪酸組成

|           | 対照           | 生粉末         | ボイル粉末         | 素干し粉末       |
|-----------|--------------|-------------|---------------|-------------|
|           | (g/100g 脂肪酸) |             |               |             |
| 14:0      | 0.9 ± 0.3    | 1.0 ± 0.1   | 0.9 ± 0.1     | 0.9 ± 0.1   |
| 16:0      | 28.8 ± 2.0   | 27.5 ± 1.7  | 25.9 ± 1.0**† | 27.8 ± 1.6  |
| 16:1      | 5.5 ± 0.9    | 6.5 ± 0.9   | 6.2 ± 0.5     | 5.7 ± 2.7   |
| 18:0      | 10.7 ± 0.8   | 11.0 ± 0.9  | 10.7 ± 0.6    | 10.4 ± 1.1  |
| 18:1      | 23.5 ± 2.1   | 20.6 ± 2.7  | 20.8 ± 1.6    | 19.2 ± 4.8  |
| 18:2(n-6) | 9.3 ± 1.6    | 11.2 ± 1.2* | 12.1 ± 0.7**  | 11.3 ± 1.7* |
| 18:3(n-3) | 0.3 ± 0.1    | 0.4 ± 0.1*  | 0.5 ± 0.1**   | 0.5 ± 0.1** |
| 20:4(n-6) | 11.3 ± 1.5   | 8.5 ± 1.0** | 8.8 ± 0.6**   | 8.7 ± 1.3** |
| 20:5(n-3) | 0.2 ± 0.0    | 1.8 ± 0.3** | 1.6 ± 0.2**   | 1.4 ± 0.3** |
| 24:0      | 0.3 ± 0.1    | 0.1 ± 0.0** | 0.1 ± 0.1**   | 0.1 ± 0.1** |
| 22:5(n-6) | 0.5 ± 0.1    | 0.0 ± 0.0** | 0.0 ± 0.0**   | 0.0 ± 0.0** |
| 22:5(n-3) | 0.5 ± 0.2    | 1.0 ± 0.3** | 1.1 ± 0.2**   | 1.0 ± 0.2** |
| 22:6(n-3) | 4.3 ± 0.7    | 6.4 ± 1.0** | 6.7 ± 0.7**   | 6.2 ± 0.8** |

平均値±標準偏差。\*対照群と比較して有意差あり( $p<0.05$ )，\*\*対照と群比較して有意差あり( $p<0.01$ )，†生粉末群と比較して有意差あり( $p<0.05$ )。

## 2. 実験 2 ヒト試験

被験者の年齢、身長、体重、BMI および体脂肪率を表 6 に示した。被験者の年齢は、 $47.3 \pm 13.4$  歳であった。試験前の BMI は  $26.4 \pm 4.0$ 、体脂肪率は  $26.1 \pm 4.1$  であった。試験後の BMI および体脂肪率は、試験前と比べて有意な差はなかった。試験前に行った食物摂取頻度調査の結果を表 7 に示した。エネルギー摂取量は  $1881 \pm 585$  kcal、コレステロール摂取量は  $291 \pm 136$  mg、脂質エネルギー摂取比は  $28.8 \pm 6.2\%$  であった。

総コレステロール、HDL・コレステロール、LDL・コレステロールおよび中性脂肪濃度を表 8 に示した。総コレステロール、HDL・コレステロール、LDL・コレステロールおよび中性脂肪濃度は、試験前と試験後で有意な差は見られなかった。

グルコース、インスリンおよび HbA1c(NGSP)値を表 9 に示した。グルコース、インスリンおよび HbA1c(NGSP)値においても、試験前と試験後で有意な差は見られなかった。

AST、ALT、 $\gamma$ -GTP およびコリンエステラーゼ値を表 10 に示した。AST、ALT、 $\gamma$ -GTP およびコリンエステラーゼ値においても、試験前と試験後で有意な差は見られなかった。

脂肪肝の検査結果を表 11 に示した。試験前の脂肪肝の程度は、被験者 7 名中、高度脂肪肝は 1 名、中等度脂肪肝は 2 名、軽度脂肪肝は 3 名、所見なしは 1 名であった。試験前に高度脂肪肝の所見があった被験者 1 名は、試験後に中等度脂肪肝にまで改善した。試験前に中等度脂肪肝の所見があった被験者 2 名のうち 1 名は、試験後に軽度脂肪肝にまで改善し、1 名は中等度脂肪肝のままであった。試験前に軽度脂肪肝の所見があった被験者 3 名のうち 1 名は、脂肪肝の所見なしにまで改善し、2 名は軽度脂肪肝のままであった。脂肪肝の所見がなかった被験者 1 名は、脂肪肝の所見なしのままであった。試験前に脂肪肝であった 6 名中 3 名で試験後の検査結果に改善がみられ、脂肪肝が悪化した人はいなかった。試験前と比べて試験後の脂肪肝の程度に有意な差はなかったが、低下する傾向がみられた ( $p=0.08$ )。

表 6 被験者の年齢、身長、体重、BMI および体脂肪率

|         | 試験前   |   |      | 試験後   |   |      | p値   |
|---------|-------|---|------|-------|---|------|------|
| 年齢      | 47.3  | ± | 13.4 | 47.3  | ± | 13.4 | —    |
| 身長, cm  | 171.0 | ± | 7.4  | 171.0 | ± | 7.4  | —    |
| 体重, kg  | 78.0  | ± | 17.8 | 77.7  | ± | 17.6 | 0.64 |
| BMI     | 26.4  | ± | 4.0  | 26.3  | ± | 3.8  | 0.62 |
| 体脂肪率, % | 26.1  | ± | 4.1  | 26.0  | ± | 4.5  | 0.60 |

平均値±標準偏差。試験前と試験後で有意差なし。

表 7 栄養計算

|              | 試験前  |   |     |
|--------------|------|---|-----|
| エネルギー, kcal  | 1881 | ± | 585 |
| コレステロール, mg  | 291  | ± | 136 |
| たんぱく質 E 比, % | 13.2 | ± | 2.5 |
| 脂質 E 比, %    | 28.8 | ± | 6.2 |
| 炭水化物 E 比, %  | 58.0 | ± | 8.5 |

平均値±標準偏差

表 8 被験者の総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪濃度

|                    | 試験前         | 試験後         | p値   |
|--------------------|-------------|-------------|------|
| 総コレステロール, mg/dL    | 221 ± 40    | 223 ± 41    | 0.82 |
| HDL-コレステロール, mg/dL | 54.9 ± 15.4 | 52.0 ± 12.2 | 0.26 |
| LDL-コレステロール, mg/dL | 140 ± 31    | 148 ± 37    | 0.31 |
| 中性脂肪, mg/dL        | 169 ± 55    | 151 ± 30    | 0.42 |

平均値±標準偏差。試験前と試験後で有意差なし。

表 9 被験者のグルコース、インスリン、HbA1c(NGSP)値

|                   | 試験前         | 試験後         | p値   |
|-------------------|-------------|-------------|------|
| グルコース, mg/dL      | 91.0 ± 10.6 | 92.4 ± 7.3  | 0.43 |
| インスリン, $\mu$ U/ml | 8.90 ± 3.37 | 7.97 ± 2.27 | 0.52 |
| HbA1c(NGSP), %    | 5.31 ± 0.39 | 5.34 ± 0.40 | 0.46 |

平均値±標準偏差。試験前と試験後で有意差なし。

表 10 被験者のAST、ALT、 $\gamma$ -GTP、コリンエステラーゼ値

|                     | 試験前         | 試験後         | p値   |
|---------------------|-------------|-------------|------|
| AST, IU/L           | 24.7 ± 9.8  | 24.6 ± 9.3  | 0.86 |
| ALT, IU/L           | 34.9 ± 28.9 | 31.9 ± 25.9 | 0.12 |
| $\gamma$ -GTP, IU/L | 38.4 ± 16.2 | 36.3 ± 13.6 | 0.15 |
| コリンエステラーゼ, IU/L     | 392 ± 61    | 378 ± 60    | 0.18 |

平均値±標準偏差。試験前と試験後で有意差なし。

表 11 脂肪肝の検査結果

| ボランティア | 試験前  | 試験後  | 変化   | t 検定     |
|--------|------|------|------|----------|
| A      | 0    | 0    | なし   |          |
| B      | 1    | 0    | 改善   |          |
| C      | 1    | 1    | なし   |          |
| D      | 1    | 1    | なし   |          |
| E      | 2    | 1    | 改善   |          |
| F      | 2    | 2    | なし   |          |
| G      | 3    | 2    | 改善   |          |
| 平均     | 1.43 | 1.00 | 3名改善 | p = 0.08 |

0・・・脂肪肝の所見なし    1・・・軽度脂肪肝    2・・・中等度脂肪肝    3・・・高度脂肪肝

## V 考察

### 1. 実験 1 動物実験

本試験は、ボイルおよび素干ししたホタルイカの肝臓中性脂肪低下作用について明らかにすることを目的として行った。その結果、肝臓中性脂肪含量は、対照群と比較して生粉末群、ボイル粉末群、素干し粉末群で有意に低かった。また、生粉末群と比較してボイル粉末群で有意に低かった。以上のことから、ラットにおいて、ボイルおよび素干ししたホタルイカにも、肝臓中性脂肪含量を低下させる作用のあることが示唆された。また、ボイルホタルイカの肝臓中性脂肪低下作用は、生ホタルイカよりも強力である可能性が示唆された。ホタルイカをボイルすることで、肝臓中性脂肪低下作用が強まることは大変興味深い。

メカニズムについては序論で述べたように、ホタルイカを摂取することで、肝臓の脂肪合成が抑制され、肝臓脂肪が減少したと考えられる。しかしながら、有効成分についてはまだ、明らかになっていない。ボイル粉末を摂取すると、生粉末を摂取した場合より肝臓中性脂肪低下作用が強まったことから、未知の有効成分がボイルすることで、より効果のある成分に変化したかもしれない。もう一つの推測として、ボイルしたことで消化吸収性が向上し、その結果有効性が増したとも考えられる。

ラットの体重、飼料摂取量、肝臓重量は、群間で有意な差は認められなかった。ホタルイカの摂取が、体重、飼料摂取量および肝臓重量におよぼす影響は認められなかった。血

液の肝機能検査結果において、群間で有意な差は認められなかった。一般に、脂肪肝が改善すると肝機能検査結果の数値も下がるので、脂肪肝のラットにホタルイカを摂取させ、脂肪肝が改善すると肝機能検査結果の数値も下がると思われる。本研究の動物実験で使ったラットは、脂肪肝でない通常ラットであったため、肝臓中の中性脂肪が低下しても肝機能検査結果に影響をおよぼさなかったかもしれないと考えられる。

生粉末群、ボイル粉末群および素干し粉末群の血清 HDL および LDL-コレステロール濃度は、対照群と比較して有意に高かった。生粉末群、ボイル粉末群および素干し粉末群の肝臓コレステロール含量も、対照群と比較して有意に高かった。乾燥前で生ホタルイカ中には 100g 当たり 240mg のコレステロールが含まれている<sup>6)</sup>。ホタルイカ中に含まれるコレステロールが、血清 HDL-コレステロール、LDL-コレステロール濃度および肝臓コレステロール含量に影響をおよぼしているかもしれない。

肝臓の脂肪酸組成において、生粉末群、ボイル粉末群、素干し粉末群の n-3 系脂肪酸は、対照群に比べて高かった。生ホタルイカには、全脂肪酸中に 35% 程度の n-3 系脂肪酸が含まれており<sup>7)</sup>、ホタルイカ中の n-3 系脂肪酸が、肝臓に蓄積したと考えられる。n-3 系脂肪酸には、肝臓脂質低下作用がある<sup>7)</sup>ことから、肝臓中性脂肪低下に関与している可能性が高い。しかし、実験食中に含まれていた n-3 系脂肪酸は計算によると約 0.4% と少ないので、ホタルイカ中の n-3 系脂肪酸以外の成分が働いていると思われる。

## 2. 実験 2 ヒト試験.

実験 2 では、脂肪肝の症状を持ったヒトにホタルイカを摂取してもらい、脂肪肝の改善にホタルイカが有効であるかどうかを検討することを目的として行った。脂肪肝の所見があった 6 名中 3 名で脂肪肝が改善し、悪化した人はいなかった。試験前と比べて試験後の脂肪肝の程度は、有意な差はなかったが、低下する傾向がみられた。対象者数が少ないので、今後より研究を重ねる必要があるが、今回の実験では、ホタルイカを摂取することにより脂肪肝が改善すると期待できる結果が得られた。

被験者の AST、ALT、 $\gamma$ -GTP およびコリンエステラーゼ値は、試験前後で有意な差は見られなかった。脂肪肝になると、一般に AST、ALT などの肝機能検査値が上昇する<sup>9)</sup>が、本研究の被験者のうち、AST および ALT の値が異常値であったのは 1 名のみであった。このことが、試験前後で肝機能検査値に有意な差が見られなかった理由の 1 つかもしれない。この 1 名の脂肪肝の程度は中程度で、AST は試験前 46 IU/L から試験後 44 IU/L、

ALT は 100 IU/L から 90 IU/L へとやや低下していた。

被験者の BMI と体脂肪率は試験前後で変化は認められなかった。このことから、ホタルイカの摂取が、BMI や体脂肪率に与える影響はほとんどないと思われる。血中脂質濃度も、試験前後で有意な差は見られなかった。グルコース、インスリンおよび HbA1c 値においても、試験前後で有意な差は見られなかった。血液検査結果のいずれの項目においても、ホタルイカ摂取は影響をおよぼさないと考えられる。

## VI 結論

実験 1 の結果から、ボイルおよび素干ししたホタルイカにも、肝臓中性脂肪含量を低下させる作用のあることが示唆された。また、ボイルホタルイカの肝臓中性脂肪低下作用は、生ホタルイカよりも強力である可能性が示唆された。ホタルイカには肝臓中性脂肪低下に関与する成分が存在し、ボイルすることでその成分がより効果のある成分に変化した可能性があると考えられる。今後は、有効成分を解明していくことが必要である。

実験 2 から、有意な差は見られなかったものの、脂肪肝の改善に期待ができる結果が得られた。ホタルイカの脂肪肝改善作用を明らかにするためには、今後さらに被験者を増やした試験が必要であると考えられる。

## VII 参考文献

- 1) 富山県食品研究所：とやまの特産物，p.p.31-32 (2003)。
- 2) 全国栄養士養成施設協会，日本栄養士会監修：管理栄養士受験講座 食べ物と健康 I 初版，p.89 第一出版 (2008)。
- 3) 富山県食品研究所：とやまの特産物機能性成分データ集，p.46 (2005)。
- 4) 竹内弘幸ら：ホタルイカの健康機能探索，第 66 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集，p.156 (2012)。
- 5) 福本陽平ら監修：病気がみえる vol.1 消化器第 4 版，p.214，メディックメディア(2012)。
- 6) 香川芳子監修：食品成分表 2014 本表編初版，p.p.162-163，女子栄養大学出版部 (2014)。
- 7) 富山県食品研究所：とやまの特産物，p.116 (2003)。
- 8) 日本栄養・食糧学会監修：脂肪酸栄養の現代的視点初版，p.p.51-74，光生館 (1998)。
- 9) 櫻林郁之介監修：今日の臨床検査 2013-2014 第 13 版，p.p.195-203，南江堂 (2013)。

平成24年度

酵素保護材としての利用をめざした、多糖フルクタンの高機能化

福井大学  
寺田 聡

## 研究の実施内容及び成果に関する報告書

### 酵素保護材としての利用をめざした、多糖フルクタンの高機能化

福井大学 寺田 聡

#### (1) 研 究 課 題

酵素を用いた臨床診断薬が医療機関で広く利用されているが、酵素は極めて不安定なため、安定化剤としてウシ血清アルブミン（BSA）が添加されている。しかしBSE問題から人畜共通感染症が懸念され、医療現場での臨床診断では動物因子の使用が制限されるようになった。そこで、酵素の失活を防止し、人畜共通感染症の懸念のない、安全で優れた酵素安定化剤が望まれている。

今回、我々が提案するラッキョウ由来の多糖フルクタンは植物由来であるため、人畜共通感染症の懸念が無い。ポリペプチドを用いた酵素保護剤も用いられるが、ペプチドは水溶性に乏しく、また糖に比べると安定性も大きく劣っている。フルクタンは安定性にも優れ、さらに生体高分子としては例外的に、極めて溶解度が高く、40%以上の溶解度に達することから、調製も容易でかつ取り扱いやすい利点がある。加えて、栽培植物であるラッキョウから大量に取得できることから供給も安定しており、製造コストも安価であるという利点がある。

本研究開発では、ラッキョウから得られる多糖フルクタンを用いて、安価で効果の高い、「フルクタンを用いた酵素保護剤」を実現する。

そこでまず、「フルクタンの酵素保護材としての評価系」を確立し、続いて「どのような構造のフルクタンが有効か」を特定し、続いて「フルクタンを様々な糖と比較して保護材としてどれくらい有効か」を決定し、実用化に近づける。

#### (2) 研究の実施内容及び成果

##### 2-1 フルクタンの酵素保護材としての評価系の構築

酵素として、安定で取り扱いやすいという点で、西洋ワサビ由来のペロキシダーゼを用いることとした。続いて、酵素の保護効果を検討するために、酵素が失活する条件を探索することとした。そして、このようにして定めた条件で、

フルクタンを共存し、実際に活性が保持されるかを検討していくことになる。そこで、酵素が大きく失活し始めるpH値を測定することとした。

具体的には、ペロキシダーゼを対象に、酸性（pH1からpH7の範囲）の条件に10分間置き、その後、中性に戻して酵素活性を測定した。ペロキシダーゼ酵素の濃度は、1.2 U/mlとした。

pH3以下で急速に酵素の活性が低下することがわかった。実験の再現性も考慮して、pH2ないしpH2.5の範囲で10分間、4℃で酵素を処理することに定めた。

続いて、この方法に従って、フルクタンが実際に酵素の失活を抑制できるかを検討した。

先の実験で、酵素溶液を酸性の緩衝液（pH=2.4）で処理したとき、大きく失活することが確認できた。そこで、今回は、pH2.3近傍で酵素を処理してフルクタンを共存させた場合に酵素を保護できるか、という観点で、検討を行う。フルクタンの濃度は、50、100、200 mg/mLで検討した。

その結果、フルクタンの添加によって、酸性の液中での酵素活性の低下が抑制された。そして、その効果は、フルクタンの濃度の上昇に伴い、高められた。本実験では、酵素活性に良い影響を与えるフルクタンの最適濃度は200 mg/mlであったが、これより濃度を大きくすることで、より高い効果が予想できるが、実験操作に関連して、溶解させることのできる最大濃度は200 mg/mlであった。

有意差検定の結果によると、「酸処理無し、かつFructan無添加」と「Fructan(200 mg/ml)中での酸性緩衝液で処理」には、有意差が確認できなかった。すなわち、フルクタンの添加により、酸処理による失活をほぼ阻害できたと考えられる。

なお、フルクタン自体は、この酵素の活性には何ら影響しなかった。

以上を踏まえ、フルクタンの200 mg/mlを最適濃度とし、検討することとする。

## 2-2 どのような構造のフルクタンが有効か

今までの検討では、“S-5フルクタン”を酵素保護剤として使用してきた、これ以外のフルクタンを酸性緩衝液で処理しその効果を比較する。すなわち、S-5フルクタンとは特に平均分子量が大きく異なっており、これらを比較して検討する。これにより、フルクタンの効果を検証する。なお、S-5、3年堀未分画（低分子）、3年堀残留画分（高分子）の平均分子量は、それぞれ、16.1、29.4、81.7 kDaである。

測定したところ、フルクタンの酵素保護効果は、分子量に依存していた。3年堀未分画（低分子）29.4 kDaのものが最も強く、続いて16.1 kDaのS-5であり、3年堀残留画分（高分子）81.7 kDaのものは大きく劣っていた。すなわち、最適な分子量のサイズがみいだされた。

## 2-3 フルクタンを様々な糖と比較して保護材としてどれくらい有効か

フルクタンと他の糖とを比較し、その酵素保護の効果を比較する。

具体的には、フルクタンのモノマーであるフルクトース（単糖）、二糖としてスクロースとトレハロース（これら二糖は、しばしば酵素保護材として利用されている）、さらにフルクタンの仲間であるイヌリンと比較検討した。

酵素を酸性処理することによって大きく酵素活性が損なわれていた。この酸性処理の際にフルクタンを共存することによって、この失活は大きく抑制され、ほとんど酵素活性は同等であった。一方、フルクタン以外の糖、フルクトース、スクロース、トレハロース、イヌリンのいずれも、若干の保護効果は認められたものの、フルクタンに比べると大幅に小さいものであった。

このことより、酵素保護効果はフルクタンにおいて顕著であり、非常に有効性が高いと期待される。

### (3) 今後予想される効果

以上のように、フルクタンは大変に優れた酵素保護材であることが示された。すなわち、他の糖類、フルクトース、スクロース、トレハロース、イヌリンのいずれも、若干の保護効果は認められたものの、その効果ははるかに小さいものであった。

そして、フルクタンの分子量の異なるものを比較した場合、その保護効果は分子量で変化していた。今回の検討では必ずしも詳細に検討できた訳ではないため、より詳細に検討することで、酵素保護に優れたフルクタンの特性を決定していくことで、実用化に大いに貢献できると期待している。



平成24年度

布模様検出機構付きニット織り傷検出システムの開発

富山県立大学  
中田 崇行

## (1) 研究課題

本研究は、日本一のシェアを誇る富山県南砺市城端の経編(たてあみ)ニット生産に伴う編み傷を、画像処理を用いて自動検出するシステムの開発を目的とする。ユニフォーム等に使用され、吸水性や速乾性に優れた機能を有する経編ニットは、糸自体の性能もさることながら、三次元的に複雑に糸を絡ませることにより、これらの機能を達成している。それ故、布表面は複雑な表面形状や穴を持つことから、従来の検査装置では編み傷を検出できず、夜間の無人操業等が不可能なことからコスト削減の障害となっているため、この解決は急務となっている。本研究はこれまでの取り組みにおいて、布傷の検出をある程度可能にしてきたが、現在は画像処理の専門家が半日程度、現場に常駐してパラメータを調整する必要がある、この解決が実用化までに残された最大の課題であった。経編ニットは少量多品種のため、1週間程度で新たな布に変えることも珍しくはない。その度に専門家の常駐が必要となれば、システム全体の実用化に大きな疑問符がつく。

そのため本申請では、現場において画像処理の非専門家しかいない状況であっても、自動的に新規の布の模様パターンおよび傷を自動検出することにより、未知の新規布種へ対応させるシステム(ハードウェアおよびソフトウェア、ユーザーインターフェース)の開発を行った。また、本研究システムが実際に実用化された際のシステム開発および製造、技術メンテナンス先の企業を探し出す必要があり、これらの調査、提携を行った。

## (2) 研究の実施内容及び成果

### 1. 布傷の検出主方式～ブロック分割方式～

提案手法では撮影画像を図1のように布の模様に合わせて幅でブロックに分割し、ブロック内部の輝度情報を利用して欠陥の検出を行う。ブロックの大きさを布の模様の周期に合わせていることから、欠陥がない場合は隣接しているブロックで平均値に大きな差は発生しないが、欠陥がある場合は欠陥があるブロックのみ平均値が低くなる。この平均値が低いブロックをフィルタによって検出する。図2のように2つのフィルタをブロック内の平均輝度値に対して適用し、両方のフィルタが反応した場合に、そのブロックに欠陥が存在すると判断する。ノイズや機器の写り込みに片方のフィルタが反応してももう片方のフィルタで過検出を防ぐことができることから、ノイズや機器の写り込みに強い欠陥検出が可能となる。このとき、いずれのフィルタも欠陥部分に対して適用すると絶対値が大きな負の値を出力することから、閾値は負の値のみを設け、フィルタの出力値が閾値を下回った場合にそのブロックに欠陥が存在すると判断する。

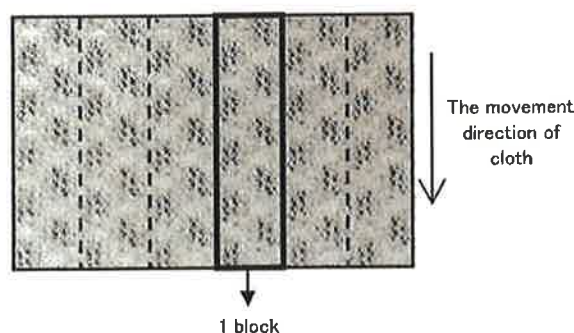


図1 ブロック分割方式

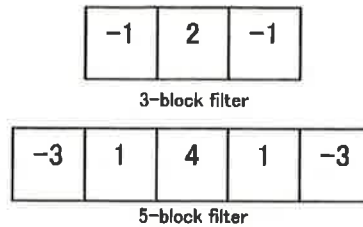


図2 フィルタ値

## 2. ブロック幅の自動検出および検出システムの作成

前記において、ブロック幅の指定は手作業によっていた。これを自動化することも、実稼働システムにおけるわかりやすいユーザーインターフェースを作成する上で重要である。複数のパラメータの中で「ブロック幅」の設定についての取得法を提案した。これを、図3のような周波数解析によって求める方法を提案した。

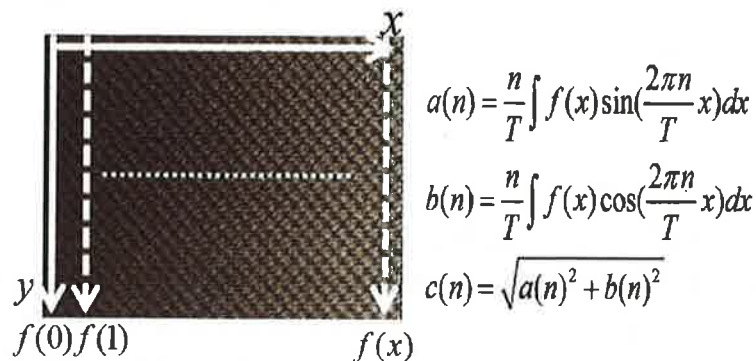


図3 平均輝度値の取得

式(1) 周波数解析式

また、これらのアルゴリズムをシステムに組み込んで稼働させた。現場に画像処理の非専門家しかいない場合においても、ブロック幅検出や閾値の自動調整は新しい布を編み始めた後、検査カメラを数往復させることによって自動的に学習が終了し、新しい布において傷を検出出来る状態となる。これらをわかりやすく操作するためのユーザーインターフェースの開発も同時に行っている。

### (3) 今後予想される効果

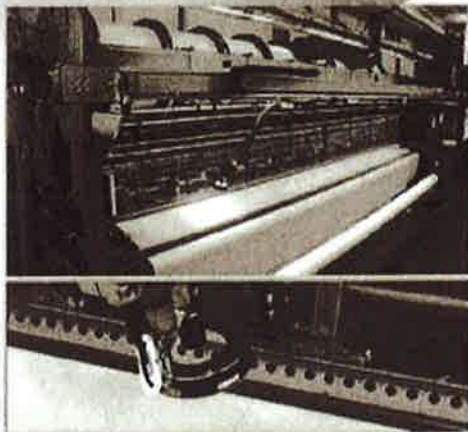
上記の技術を組み込んだシステムを実可動の織機に組み込み、工場内での実運用を行っている。また、今後商用化した場合のシステム開発および製造、技術メンテナンスを株式会社ロゼフテクノロジーに担当して頂くこととなった。図4はロゼフテクノロジーが作成したPR資料である。現在は作成システムのテスト運用、これに伴うシステムの改良中である。

システムの完成が見える中、ロゼフテクノロジーは各種商談会において、本システムを話題にすることもあるが、かなり関心を持って完成を待っている国内企業も複数存在するようである。本研究の申請の際に述べた、本システムの普及によって北陸ひいては日本の価値を高めることは可能と感じ、さらに性能のいい、使い勝手のいいシステムの開発を行う予定としている。

# ニット用編み疵検知装置

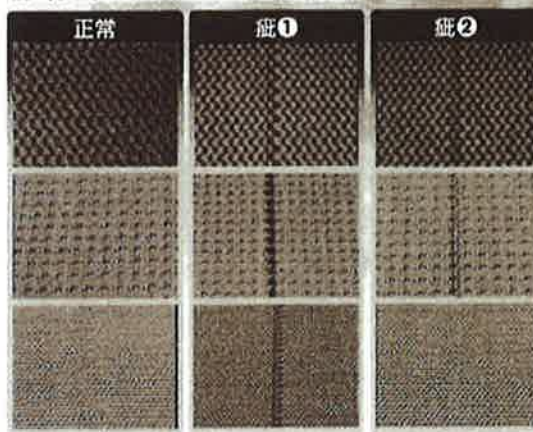
## 概要

ニット生地編立中に糸が切れると、ニット生地の柄に編み疵(きず)が発生します。この疵を検知する装置です。  
スポーツユニフォームや自動車内装用ニット生地は、通気、質感、デザイン的に、高度な編み柄を有します。  
この凹凸感のある柄の中に発生する疵を確実に検出できます。



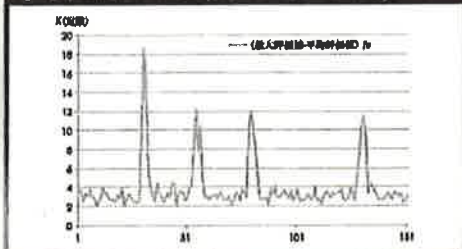
## ニット柄と疵の例

ニット柄には、色々な種類があります。  
疵の見え方は、切れる糸によって異なります。

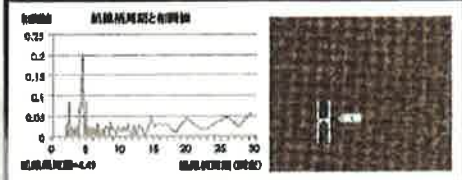


## 技術

### ① S/N比の高い疵検知アルゴリズムを開発



### ② 周期解析技術



## 使い易い装置

ティーチングにより柄品種対応を自動化。専門知識を必要としない作業者に優しい装置実現。カメラが1往復する間にティーチング完了。



## ニット柄の品種切替

様々なニット柄の検査をする為のパラメータをティーチングする機能を有していますので、ニット柄の品種切替が誰にでもできます。

## マクロ検査

最近の流行りである高解像度化に反して、低解像度のカメラを用い、マクロに剛像をとらえ、欠陥を検知する所に特徴。  
「ムラ」の検査に応用。



## 周期的な模様の中の欠陥検知

周期的な模様の中の欠陥を検知する所に特徴。  
半導体、パンチングメタルなど周期的なパターンを有する対象の検査に応用。

作成中

LOSSEV  
TECHNOLOGY

図4 株式会社ロゼフテクノロジー作成ニット編傷検知装置 PR 資料



平成24年度

高強度・高ガスバリア性ナノ複合材料の開発と  
チューブ型真空断熱材への応用

富山県立大学  
真田 和昭

## (1) 研究課題

住宅・商業施設等における省エネルギー対策を推進するためには、冷暖房効率を向上させるための高性能な建築用断熱材の開発が不可欠である。近年、図 1(a)に示すように、薄いラミネートフィルムで従来の断熱材(ガラスウール等)を真空パックして、高い断熱性能を実現した真空断熱材が家庭用冷蔵庫等の家電分野で実用化され、消費エネルギー低減に大きく貢献している。この真空断熱材は建築分野でも注目されているが、薄いラミネートフィルムが損傷を受けると容易に断熱性能が低下するため、簡単な施工と長期信頼性が要求される建築用断熱材としての適用には多くの問題がある。本研究は、図 1(b)に示すように、損傷を受けにくく、ガスバリア性の高いポリマー系ナノ複合材料を用いたチューブ型真空断熱材の開発を行うもので、建築用断熱材等としての実用化を目指すことで、北陸地域の産業を活性化するとともに、消費エネルギー低減による地球環境問題解決に貢献することを目的とする。

チューブ型真空断熱材は、軽量でシンプルな円筒構造のため、大型化が容易で従来の成形技術で量産も可能である。また、損傷を受けにくいため、簡易な施工が要求される建築用断熱材としての適用に有利である。しかし、長期間の真空保持と大気圧による座屈変形阻止に適した材料開発および性能最適化構造設計が課題である。本研究では、高強度・高ガスバリア性を有する新規ナノ複合材料を開発するとともに、実験とコンピューター解析を併用して性能最適化構造を見出し、課題解決を目指す。

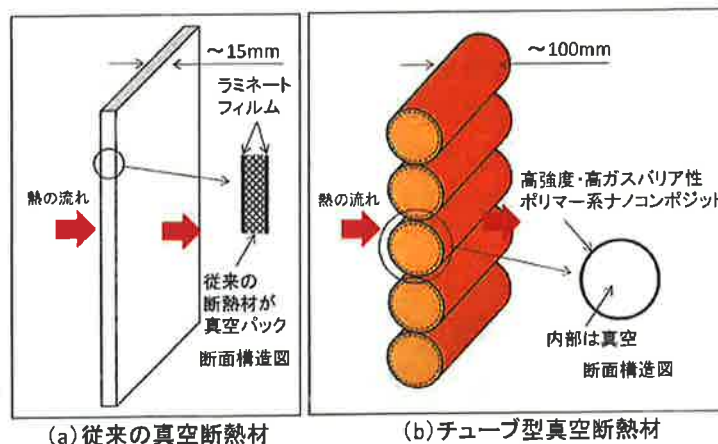


図1 従来の真空断熱材と開発中のチューブ型真空断熱材

## (2) 研究実施内容及び成果

### a. 新複合化技術による新規ナノ複合材料の開発と特性評価

ペットボトルに用いられているPET樹脂とナノクレイ(粘土鉱物)を対象に、熔融混練と超音波印加を併用した新複合化技術を確立し、高強度・高ガスバリア性を有するナノ複合材料を開発することを目的とした。まず、熔融混練法を用いて作製したナノクレイ/PET樹脂複合材料を対象に、動的粘弾性試験を行い、動的粘弾性特性の温度依存性に及ぼすナノクレイ体積分率、ナノクレイに対する超音波印加時間、熔融混練速度の影響を検討した。また、ナノクレイ/PET樹脂複合材料のガス透過試験を行い、ガスバリア性に及ぼすナノクレイ体積分率、熔融混練速度の影響を検討した。次に、ナノクレイ/PET樹脂複合材料の弾性特性に関する有限要素解析を行い、複合材料の剛性を示すヤング率とはく離したナノクレイの厚さとの関係について考察を加えた。

動的粘弾性試験を行った結果、ナノクレイ添加量の増大に伴い、材料の剛性を示す貯蔵弾性率は増大したが、材料の耐熱性を示すガラス転移温度は低下する傾向を示した。また、粒子状のナノクレイは、超音波印加により、はく離して平板状になったが(図2)、超音波印加時間が長くなると、平板が小さくなり、貯蔵弾性率が低下する傾向を示した。超音波印加ナノクレイ/PET樹脂複合材料の貯蔵弾性率は、超音波印加時間2hの場合に最大値を示し、超音波印加時間には最適値があることが明かとなった。さらに、熔融混練速度の増大に伴い、貯蔵弾性率は少し増大し、ガラス転移温度も増大する結果が得られた。一方、ガス透過度試験を行った結果、ナノクレイ体積分率の増大に伴い、ガス透過係数は増大したが、熔融混練速度の増大に伴い、ガス透過係数は減少した。しかし、いずれの条件でも得られたナノ複合材料は優れたガスバリア性を示した。

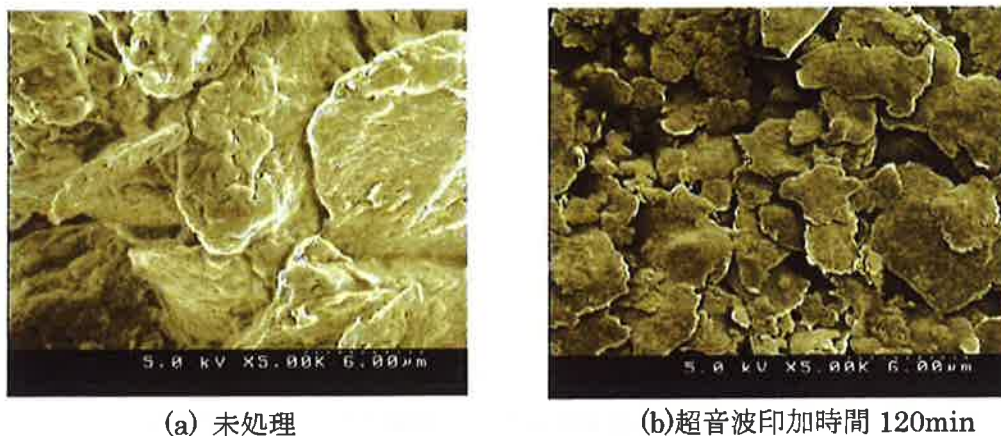


図2 超音波印加によるナノクレイの形態変化

ナノクレイ/PET樹脂複合材料の弾性特性に及ぼすナノクレイのはく離の影響を解明するため、PET樹脂中にナノクレイがランダムに分散した複合材料のユニットセルモデル(図3)を用いた弾性特性に関する有限要素解析を行った。その結果、複合材料のヤング率は、ナノクレイ厚さの減少に伴い増大する傾向を示した。超音波印加によるナノクレイのはく離は、複合材料の力学特性向上に有効であることを明らかにした。

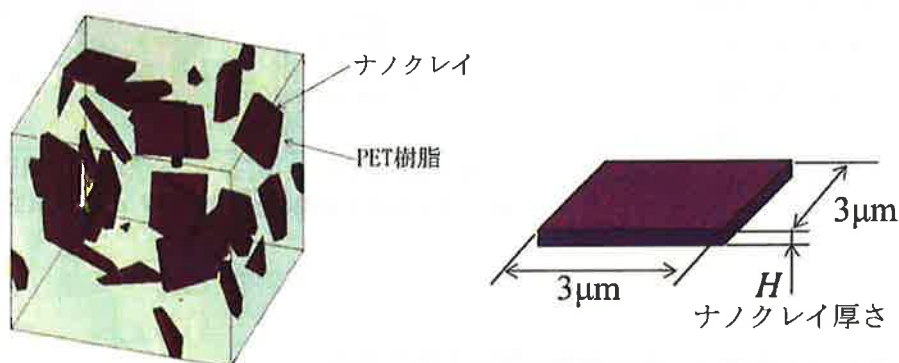


図3 ナノクレイ/PET樹脂複合材料のユニットセルモデル

図4に解析で得られたナノクレイ/PET樹脂複合材料のヤング率に及ぼすナノクレイ厚さ  $H$  の影響を示す。解析で得られた複合材料のヤング率は、ナノクレイ厚さの減少に伴い増大し、 $0.25 \mu\text{m}$  より小さくなると非線形的に増大する傾向を示した。これは、動的粘弾性試験で得られた  $E'$  と超音波印加時間との関係に定性的に一致しており、ナノクレイのはく離を促進させることで、さらに高いヤング率の複合材料が得られると予想される。

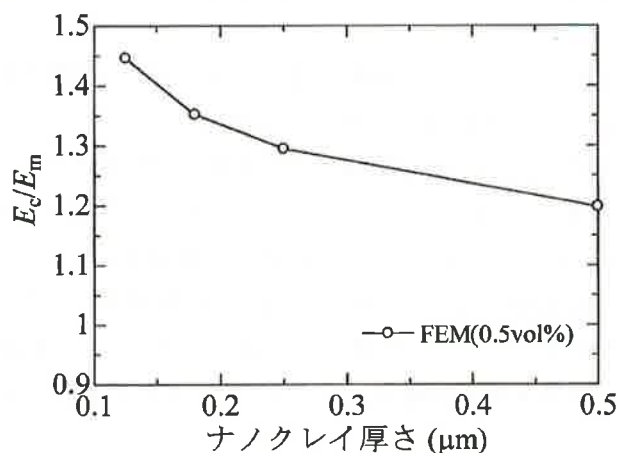


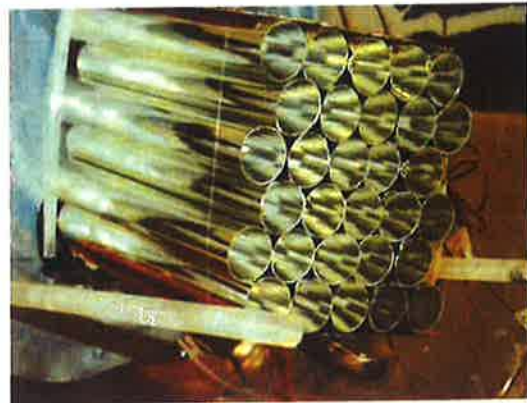
図4 ナノクレイ/PET樹脂複合材料のヤング率に及ぼすナノクレイ厚さ  $H$  の影響

#### b. チューブ型真空断熱材の輻射防止構造設計と断熱性能評価

チューブ型真空断熱材の断熱性能を向上させるために、鏡面処理と輻射防止構造を組み合わせた複合的な輻射防止技術を開発することを目的とした。まず、直径4.2～15mmの樹脂パイプを複数積層したチューブ型真空断熱材を作製し、断熱性能に及ぼす樹脂パイプ積層数の影響を検討した(図5)。また、内側に銀鏡反応による鏡面処理を施した樹脂パイプを複数積層したチューブ型真空断熱材も作製し、断熱性能に及ぼす輻射防止処理の影響についても考察を加えた。



(a) 未処理の樹脂パイプ(直径 15mm)



(b) 銀鏡処理の樹脂パイプ(直径 15mm)

図5 樹脂パイプを用いた積層断熱材の断熱性能評価

樹脂パイプを複数積層したチューブ型真空断熱材を作製し、断熱性能に及ぼす樹脂パイプ積層数の影響を検討した結果、同じ厚さとした場合、細い樹脂パイプを多く積層するほど断熱性能は向上した。また、内面に輻射防止処理(銀鏡処理)を行った樹脂パイプを用いた場合、断熱性能は、未処理の場合に比べて、約2倍に増大したが、グラスウールの断熱性能を上回ることはできなかった。

#### (3) 今後予想される効果

共同研究者の株式会社住まい環境プランニングと住宅断熱に関する調査・検討を進め、チューブ型真空断熱材の形状に関する特許を申請する予定である。また、従来の断熱材に対する優位性を明確にすることで、梱包材メーカー、住宅メーカー等との共同研究を打診して、新規断熱材としての実用化を目指していく予定である。

以上



平成24年度

人工関節置換術における  
術中インプラント設置角測定デバイスの開発

金沢大学  
加畑 多文

## (1) 研究概要

人工股関節全置換術【図1】は、末期の変形性関節症などの股関節疾患に対する手術治療の1つである。傷んだ患者の関節を金属やポリエチレン、セラミックでできた人工関節（インプラント）に置換することで、痛みや歩行障害を改善する目的で行われ、整形外科手術の中でも重要な位置を占めている。手術件数は増加の一途をたどり、日本国内で年間5万件（2012年データ）を超えている。この手術は、1900年代中頃に欧米で開発され、インプラントの改良と手術技術の進歩により、長期成績が向上しているが、現在でもインプラントのゆるみや術後の脱臼といった合併症が存在している【図2】。手術後に良好な関節可動域を獲得し、かつこれらの合併症の発生率を減少させるためには、インプラントを患者個々の骨格に適した正確な位置、角度に設置することが必要不可欠である。正確なインプラントの設置を目的に、手術支援ナビゲーションシステムも開発されているが、非常に高価であり普及していないのが現状である。その為、インプラントの設置状態の判断は、執刀医の経験や見た目で行っているのが現状であり、不正確である。

そこで今回の研究の目的は、人工股関節全置換術において、手術中にインプラント（特に大腿骨側のステム）の設置位置と角度を測定可能な簡易測定デバイスを開発することである。



【図1】人工股関節全置換術



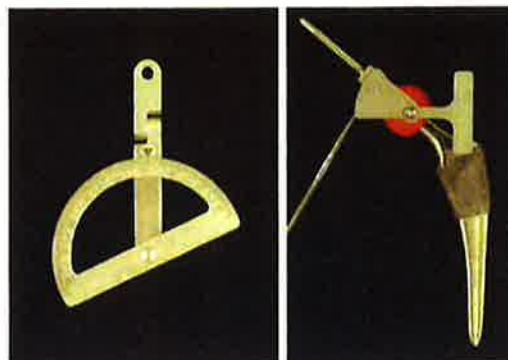
【図2】脱臼例

## (2) 研究の実施内容及び成果

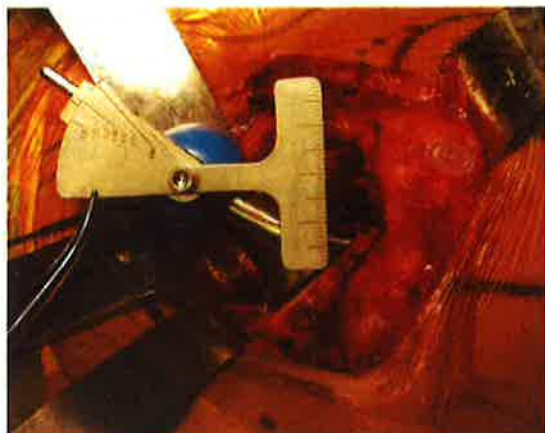
基本コンセプトとして、①汎用性、②正確性、③低コストの3点を目標として機器の開発を実施した。①汎用性としては、日本国内で使用されている人工股関節メーカーの中で大手であるストライカー社、ジンマー社、京セラメディカル社、デピュー社のインプラントに対応する骨頭ボールのデザインおよび、製作を終了した【図3】。その他の共通部品として、当初計画していたインプラントの設置角度の測定デバイス【図4左】に加えて、設置位置の測定デバイス【図4右】も試作品の製作を終了した。②正確性に関しては、まずインプラントの設置位置の測定を、金沢大学医学倫理委員会の承認を得て、2013年1月から2014年8月の期間に金沢大学附属病院で手術を施行した患者35名において、実際の手術中に計測を行い、平均 $1.6 \pm 1.0$ mmの誤差での計測が可能であった【図5,6】。解析結果は、第42回 北陸リウマチ・関節研究会および、第44回 日本人工関節学会で発表し、現在論文発表の準備中である。設置角度に関しては今後、データを蓄積していく予定である【図7】。③コストに関しては、現在市販されている手術支援ナビゲーションシステム（数千万円）に比較すると、格段に安価で製作が可能である。販売ルートに関しては、国内外の人工関節メーカーとのタイアップを目標にしているが、今後の検討課題である。



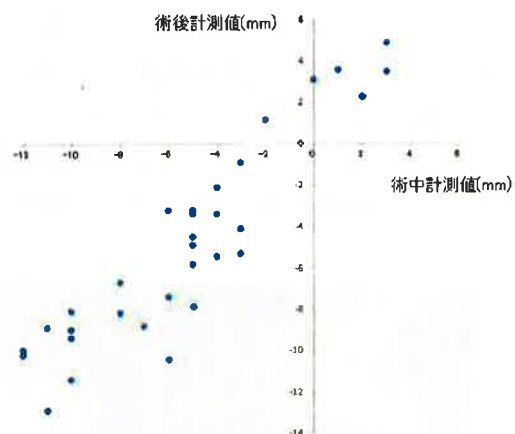
【図3】メーカー別骨頭ボール



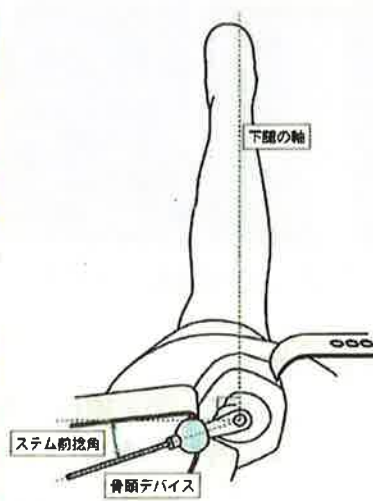
【図4】測定デバイス



【図5】設置位置の計測



【図6】設置位置測定結果



【図7】設置角度測定デバイス (左)と測定原理 (右)

今回開発した計測デバイスは、過去に報告されていない独創的な物であり、以下の2件の特許出願を金沢大学TLOより行った。

人工股関節のステム設置角測定具

出願日: 2012/11/15, 出願番号: 特願2012-250750

発明者: 楫野良知、加畑多文、土屋弘行

出願人: 金沢大学

## 人工股関節のステム挿入深度測定具

出願日: 2013/4/11, 出願番号: 特願2013-082557

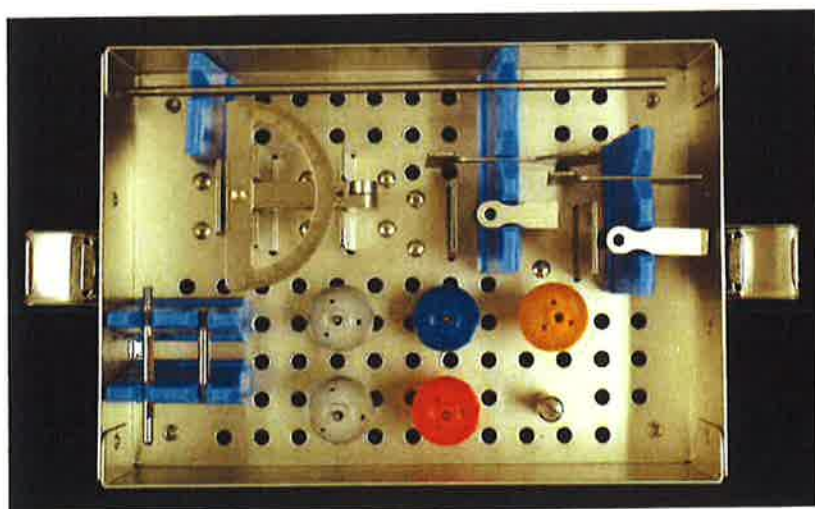
発明者: 楫野良知、加畑多文、土屋弘行

出願人: 金沢大学

### (3) 現状における課題、問題点

人工股関節の大腿骨側インプラントの設置角度および設置位置の計測に最低限必要なデバイスの開発は今回の研究期間内に終了した。今後の課題としては、実際の手術においてそれぞれの測定デバイスを用いて計測を行い、手術後のレントゲン等から計測した実際の値との比較を行い、正確な計測が行われているのかどうかの検証を行う必要がある。これまでの計測結果では、結果にばらつきがあり、その原因を明らかにした上で使用方法を確立していく。また開発者以外の医師にもデバイスを使用してもらい、同様の計測ができるかどうかの検証も実施しなければならない。さらにこれらのデバイスを用いて施行した手術後の成績が、使用しない場合と比較して良好であることを証明する必要があるが、これには長期間の経過観察が必要である。

現状の問題点としては、現在は試作したデバイス一式が、2 セットしかない点が挙げられる【図 8】。少量の受注精算で、医療機器であるために製作に時間がかかり、また製作コストがかさんでいる点も問題である。多くの医師に使用してもらうためには、学会等での広報活動および、国内外における人工関節メーカーあるいは医療機器メーカーとのタイアップが必要である課題である。



【図 8】開発デバイス一式

### (4) 今後の目標と展開

今後の目標としては、前述の課題を克服するため、臨床使用データを蓄積することが第一である。使用していく中でデバイスの不具合を検証し、デバイスの改良を進める。臨床データが蓄積した時点で、国内外での学会発表および論文発表を進め、デバイスの有用性を広める必要がある。それらを受けて、今後の展開として人工関節メーカーあるいは医療機器メーカーとのタイアップを受けることが可能になれば、広くデバイスを普及させることができ、患者にもより良い医療を提供できることが期待される。



平成 25 年度 助成研究終了報告書

平成 25 年度

高齢者や小児の患者などが服用し易い経口固形製剤に関する研究

テイカ製薬株式会社

## [詳細]

### 1 研究の実施内容及び成果に関する報告書

#### [1] 研究の概要

医薬品の分野における経口固形製剤の剤形としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等が一般的に知られているが、いずれも服用時に水を必要とするため、高齢者・小児・幼児の患者、嚥下困難な患者、寝たきりの患者、水分摂取が制限されている患者等にとっては服用しづらいといった、患者のコンプライアンス及びアドヒアランスの面で大きな問題があるとされている。

しかしながら、近年では、これらの患者のコンプライアンス及びアドヒアランスの向上を目指し、容易にかつ安全に服用できる剤形として、口腔内の唾液で崩壊し、水なしで服用、もしくは、少量の水で服用が可能な口腔内崩壊錠が相次いで開発されてきている。

我々は、上述した内容を踏まえ、高齢者や小児などの患者にとって服用しやすい経口固形製剤として、口腔内崩壊錠という剤形を選択し、その研究を実施した。

#### [2] 研究の実施内容及び成果

本研究を実施する中で、口腔内の少量の唾液のみで速やかに崩壊可能な口腔内崩壊錠の製剤設計をプラットフォーム化することが可能となりました。その研究内容については、医薬品業界での情報雑誌に投稿を行っており、それらの資料[4文献]を添付しますので、それらの詳細をご確認ください。

また、上述した情報雑誌で紹介した基本データを基に、一般用医薬品の研究開発に取り組み、口腔内崩壊錠の特性を有する製剤[4品目]を上市しました。下記に、その詳細について記載します。

- 〈1〉 下痢止め薬Ⅰ(商品名：テイカエース下痢止め)  
有効成分：タンニン酸ベルベリン、ロートエキス3倍散  
効能：腹痛を伴う下痢、下痢、消化不良による下痢、食あたり、吐き下し、下り腹、軟便  
用法・用量：成人（15才以上）1回2錠、7～14才1回1錠、1日3回
- 〈2〉 下痢止め薬Ⅱ(商品名：ほわっと下痢止めLP)  
有効成分：ロペラミド塩酸塩  
効能：食べすぎ、飲みすぎによる下痢、寝冷えによる下痢  
用法・用量：成人（15才以上）1回1錠、1日2回
- 〈3〉 乗物酔い薬(商品名：テイカエース乗物酔い止め)  
有効成分：塩酸メクリジン、スコポラミン臭化水素酸塩水和物  
効能：乗り物酔いによるめまい・吐き気・頭痛の予防及び緩和  
用法・用量：成人（15才以上）1回2錠、7～14才1回1錠、1日2回
- 〈4〉 鼻炎薬(商品名：ほわっと鼻炎KF)  
有効成分：ケトチフェンフマル酸塩  
効能：花粉、ハウスダスト（室内塵）などによる次のような鼻のアレルギー症状の緩和：くしゃみ、鼻みず（鼻汁過多）、鼻づまり  
用法・用量：成人（15才以上）1回1錠、1日2回 ※朝食後及び就寝前に服用する。

### [3] 現状における課題の問題点

口腔内崩壊錠は、口腔内での溶け具合が非常に重要な要因ではありますが、その他に、口腔内で拡散する薬物の味、特に、苦みは、患者の服用性を悪くする要因となっています。そのため、製剤に含有する薬物の苦みをマスキングする必要があり、一般に、①官能性マスキング、②化学的マスキング、③物理的マスキングの3つの手法が採られていますが、各々の手法には、メリットやデメリットがあります。

[2] で述べた、上市された製剤は、余り苦みを有しない薬物を含有しているため、苦みマスキングを①の官能的マスキングを採用することで、良好に進めることが可能ではありましたが、今後、苦みの強度が高い薬物を含有する製剤にどのように対応するかを考慮していく必要があると考えています。

### [4] 今後の目標と展開

上述した内容を踏まえ、崩壊性と共に、官能性にも優れた製剤設計に努め、更なるプラットフォーム化を進めていく予定としています。また、上市した4品目以外でも、ニーズが高い製剤については研究開発を行い、それらの市場化を目指して進めていくつもりです。

平成25年度

共焦点顕微鏡による悪性脳腫瘍の術中診断・治療システムの開発

金沢大学  
中田 光俊

# 共焦点顕微鏡による悪性脳腫瘍の 術中診断・治療システムの開発

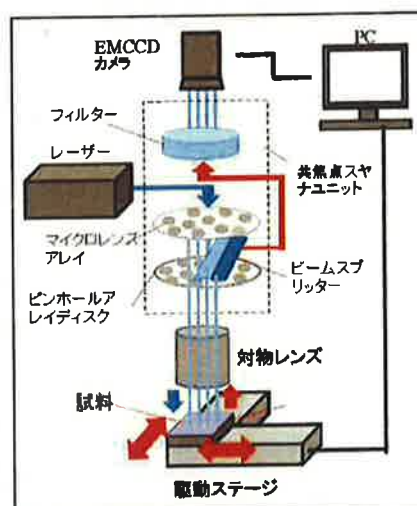
## ■実施機関／研究者

|      |            |
|------|------------|
| 金沢大学 | 医薬保健研究域医学系 |
| 金沢大学 | 理工研究域機械工学系 |
| 金沢大学 | 医薬保健研究域医学系 |
| 金沢大学 | 理工研究域機械工学系 |
| 金沢大学 | 理工研究域機械工学系 |

|     |       |
|-----|-------|
| 教授  | 中田光俊  |
| 教授  | 米山 猛  |
| 准教授 | 林 裕   |
| 准教授 | 渡辺 哲陽 |
| 講師  | 香川 博之 |

## 1. 研究概要

脳原発の腫瘍である膠芽腫は、根治不能な悪性腫瘍の一つである。外科手術において脳腫瘍と正常脳の境界の見極めは難しく、広汎に摘出すれば正常脳を損傷し、言語障害や運動障害などの後遺症を来す危険性がある。一方、腫瘍部分を取り残すと、早期に再発をきたし生存期間は大幅に短縮する。そのため客観的な術中診断法と新たな治療法の開発が急務である。本研究の目的は、アミノレブリン酸 (5-ALA) 内服による蛍光ガイド下脳腫瘍摘出手術において、術野にて細胞レベルで腫瘍の蛍光強度判別を行い、腫瘍領域を明示するとともに、特定された腫瘍部に光線力学療法を適用して細胞レベルで腫瘍を死滅させて、悪性脳腫瘍の治療効率を飛躍的に向上させるシステムを構築することにある。



## 2. 研究の実施内容及び成果

- ① 観察時に使用するフィルターを変えて透過波長を変えることで、腫瘍組織に見られる蛍光が 5-ALA の代謝産物である Protoporphyrin IX (Pp IX) によるものであるか確認した。

Filter 1 : 透過波長 618nm～675.5nm

Filter 2 : 短波長側のフィルター. 透過波長 580.5nm ～653.5nm

Filter 3 : 狭い範囲の波長を観察するためのフィルター. 透過波長 632nm～640nm

### ・病理所見：腫瘍 の観察結果



H&E 染色



Filter 1



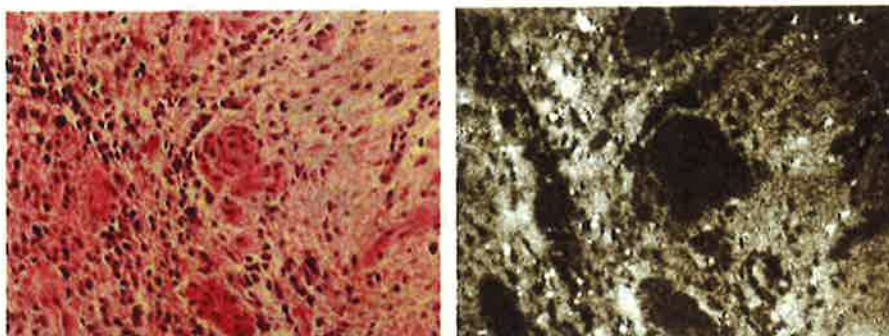
Filter 2



Filter 3

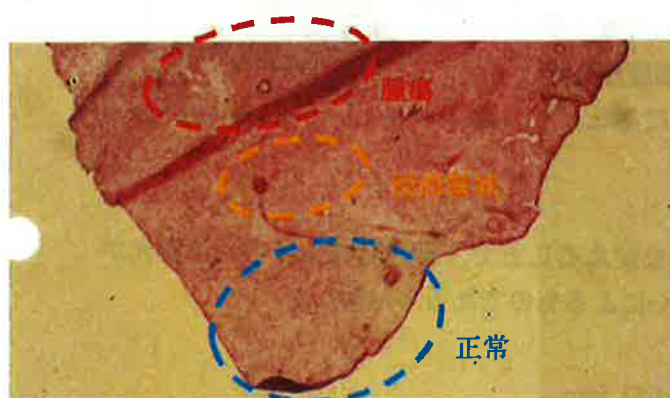
結果：腫瘍組織において3種類のフィルターによる輝点の局在は一致したことから共焦点顕微鏡において観察される輝点はPpIXであると考えられた。

- ② 腫瘍組織を共焦点顕微鏡で観察した後、その試料にH&E染色を施し、両者を比較することで、蛍光局在を明らかにした。

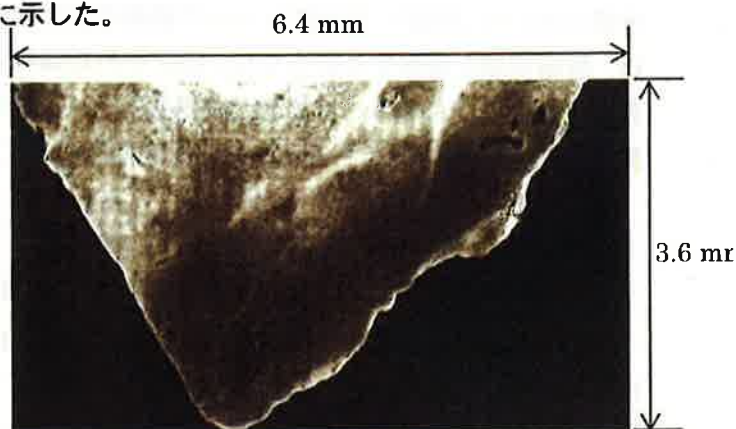


結果：膠芽腫組織において細胞密度の高い領域は特に高い蛍光強度を示した。蛍光は腫瘍細胞の細胞質で検出され核には認めなかった。血管は蛍光を示さなかった。増殖腫瘍細胞は必ずしも蛍光を示さず、増殖腫瘍細胞が多い領域は細胞密度が高くなるため蛍光強度が相対的に高くなった。

- ③ H&E染色によって腫瘍組織から正常組織への段階的な変化が確認された試料を共焦点顕微鏡で観察した。共焦点顕微鏡の観察画像1枚ごとのR値（darkよりも明るい確率）を求めマップ化することで蛍光の差異について数量的に示した。

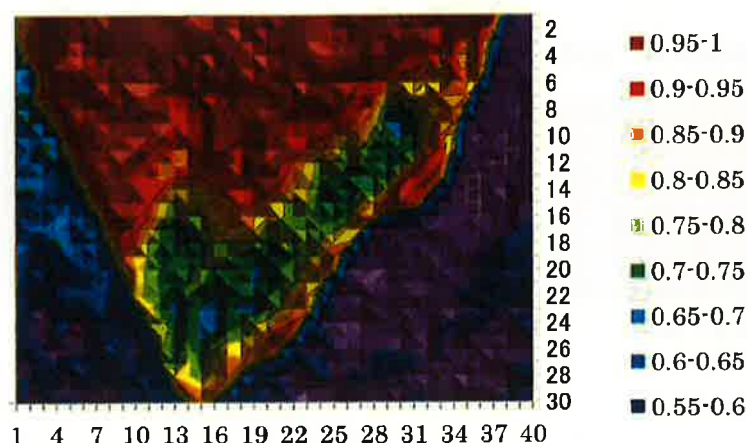


H&E染色の観察画像



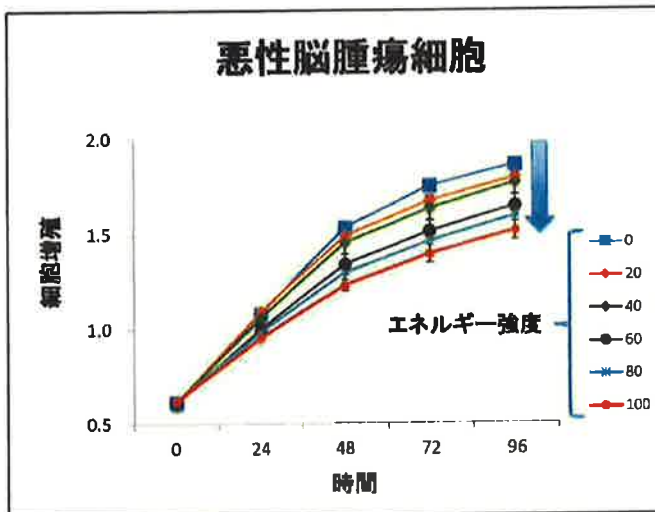
共焦点顕微鏡の観察画像

共焦点顕微鏡の観察データから得られたR値のマップ図



結果：H&E 染色で腫瘍、浸潤、正常組織が確認された部分と同一箇所を共焦点顕微鏡で観察したところ、共焦点顕微鏡の画像では正常組織から腫瘍領域に向かうにつれて蛍光強度が段々強くなっていった。また R 値のマップ図を作成することで明るさの違いを数量的に示すことができた。

- ④ 5-ALA 処理後の膠芽腫細胞株に対してレーザー照射を行い、光線力学療法の効果を確認した。



結果：膠芽腫細胞はレーザー光照射により照射量依存性に増殖が抑えられることを確認した。

以上のことから、術中蛍光診断の基礎原理が明らかとなり、また光線力学療法の可能性が見いだせた。

### 3. 現状における課題、問題点

課題は下記の 2 点に集約される。

- ① 手術中に実際に使用できるシステムにする。

現在のシステムでは実験の域を出ていない。システムをコンパクト化し、術者が片手で操作できるプローブの作成が望まれる。また数値化した明るさの違いについて腫瘍か浸潤領域か正常かのカットオフ値の設定が重要と思われる。

- ② 光線力学療法を行う際の適切なエネルギー量の設定

特殊な波長のレーザー光を照射すると腫瘍細胞の増殖は阻害され、光線力学療法が可能であることが示せたが、正常脳細胞にダメージを与えず腫瘍細胞のみに効果を示すエネルギー量を決定せねばならない。

### 4. 今後の目標と展開

上記の問題点をクリアすべく下記の課題に取り組む。

- ① 蛍光診断と光線力学療法を同時に行える小型プローブの開発
- ② 蛍光強度の定量評価による腫瘍判別のカットオフ値の統計学的解析
- ③ 5-ALA による光線力学療法の正常脳細胞に対する影響の検討
- ④ 動物実験と前臨床試験

上記を達成し膠芽腫細胞株を脳内に移植したラットを使用した動物実験により蛍光診断の確実性と光線力学療法の安全性・抗腫瘍効果を確認する。その後に学内の倫理委員会の承認を得て臨床現場で活用する。



平成25年度

生体吸収性材料および非培養脂肪由来幹細胞を用いた  
人工神経の開発

金沢大学  
多田 薫

## (1)研究概要

外傷や手術に伴う末梢神経の欠損に対しては古くから自家神経移植術が行われていますが、自家神経移植術は神経採取部にしびれなどの愁訴が残ることが問題となるため、その解決策として「人工神経」の研究が行われています。これまでの研究結果から人工神経は「人工神経内の封入物質」と「人工神経の素材」の2点によりその成績が決定されることが判明しています。金沢大学整形外科では既にシリコンチューブ内に非培養脂肪由来幹細胞を封入するという手法で末梢神経の再生を促進することを報告（J Orthop Sci. 18: 145-51, 2013.）しています。しかし、臨床応用するためには体内に遺残してしまうシリコンではなく生体吸収性材料を用いたチューブが必要となります。

本研究の目的は、生体吸収性材料を用いたチューブに非培養脂肪幹細胞を封入した、ハイブリッド型の人工神経を開発することです。また、開発した人工神経の成績についてラット坐骨神経欠損モデルを用いて評価を行うことです。これらの研究結果を元に、我々の人工神経の臨床応用が可能となります。外傷や腫瘍などにより生じた末梢神経の欠損のために、北陸だけでなく世界中で数多くの患者さんが疼痛やしびれなどに苦しんでいます。北陸の技術力や研究力から生み出す人工神経で世界中の患者さんを治療することが本研究の目標です。

本研究における課題は、

①人工神経として適切な強度と生体吸収性を持つチューブを開発すること。

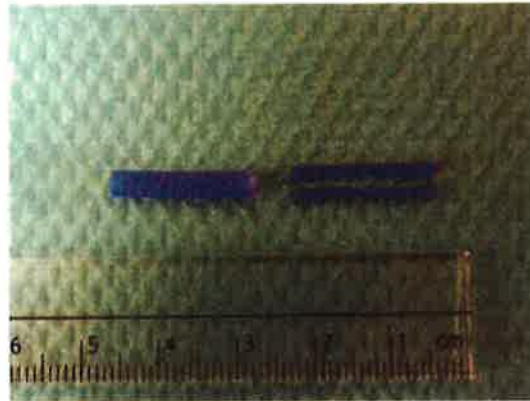
②開発したハイブリッド型の人工神経の成績について評価すること。

の二つです。

## (2)研究の実施内容及び成果

### ①人工神経として適切な強度と生体吸収性を持つチューブを開発すること。

セーレン株式会社と共同で、ポリグリコール酸(PGA)の原糸を用いた編みこみ型チューブの開発を行いました。チューブの内径は実験に供する白色家兎の坐骨神経の直径を考え 3.5mm としました。またチューブの外壁面にはコラーゲンによるコーティングを行い、適度な強度と柔軟性を持たせました。チューブは内腔が空洞である中空型のチューブ、および内腔により細い直径のチューブ



を挿入した充実型のチューブの 2 種類を作成し、実際に使用する際の使いやすさについても検討しました（上図左は中空型のチューブ、右は充実型のチューブの内腔に挿入した細いチューブです）。その結果、チューブが軟らかいため縫合固定にはやや時間を要しましたが、神経断端をチューブ内に引き込むという基本的な手技は問題なく遂行できました。ただし、充実型のチューブでは内部の細いチューブが神経断端を引き込む手技の妨げとなっていました。

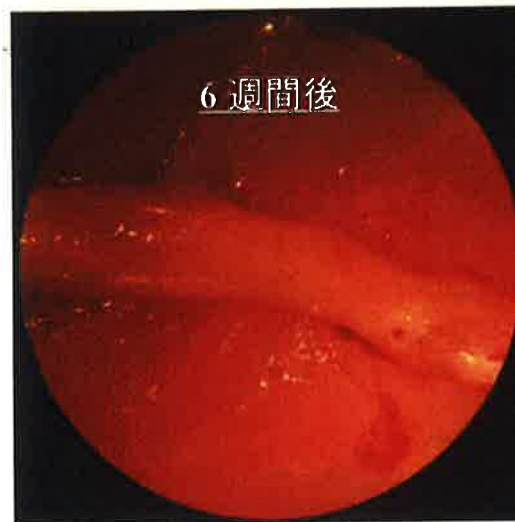
### ②開発したハイブリッド型の人工神経の成績について評価すること。

当初ラットを用いた実験を計画していましたが、よりヒトに近い白色家兎を用いて評価を行いました。白色家兎の坐骨神経を大腿中央部および同部から 10mm 遠位側で切離し、神経断端の距離が 15mm となるように 17mm の人工神経で架橋し縫合固定しました。チューブを人工神経として用いる際にはチューブが吸収分解されるタイミングが重要になりますので、まず処置 1,2,3,4,6,8 週間後において顕微鏡視下に肉眼所見を評価しました。さらに電気生理学的所見や病理学的所見についても適宜評価を加えました。

電気生理学的評価としては、処置 4,6,8 週間後に坐骨神経を直接刺激して前脛骨筋からの複合筋活動電位を導出し、遠位潜時および振幅について健側との比較を行いました。また病理学的評価としては、処置 1,2,3,4,6,8 週間後に人工神経を含めた坐骨神経を摘出し、その横断面について HE 染色で評価しました。

なお、残念ながら試験期間中にはチューブに非培養脂肪幹細胞を封入した、ハイブリッド型の人工神経を用いた研究を遂行することができませんでした。

肉眼所見については、処置 3 週間後まではチューブが遺残し、4 週間後以降に吸収分解され消失してゆくことが確認できました。また、処置からの時間経過に伴い周囲組織との癒着が出現し、処置 4 週間後以降は鋭的な剥離を要する状態となっていました。なお、チューブ留置に伴う有害事象は特に認められませんでした。以下に処置直後から 6 週間後までの人工神経の肉眼所見を供覧します。



電気生理学的評価においては、遠位潜時が処置 8 週間後に 1.95 ms となっており、健側の結果(1.49 ms)には及びませんでしたが、当科で過去にシリコン製のチューブを用いて行った実験結果(8 週間後 4.84 ms)に比べ良好な結果が得られました。また振幅については健側比が処置 4 週間後 0.012、6 週間後 0.027、8 週間後 0.039 と経時的に増加しており、こちらでもシリコン製のチューブを用いて行った実験結果(8 週間後 0.014)に比べ良好な結果が得られていました。また病理学的評価においては、管腔内の細胞成分が経時的に増加しており、神経が再生している所見を認めました。

### (3)現状における課題、問題点

当方の動物実験施設の事情から、非培養脂肪幹細胞を封入したハイブリッド型の人工神経を用いる動物種をラビットからラットへ変更する必要がありましたが、原糸から特定のサイズのチューブを大量に作成したため、必要なサイズが異なるラットでの実験が遂行不可能になってしまったことが大きな問題でした。

### (4)今後の目標と展開

本研究で開発した人工神経は、適切な強度を持ち神経の再生を妨げることなく、また理想的なタイミングで吸収分解されることが確認できました。また、その結果は当科での過去の実験結果と比較しても遜色がありませんでした。予定していた脂肪幹細胞を用いた研究までは遂行できませんでしたが、本研究では今後も人工神経の研究を進めてゆく上で基準となる重要なデータが得られたと考えています。

事業化に向けては、12 週間、24 週間のより長期のモデルを作成し評価する必要があると考えています。特に処置 6 週間後以降に認められた異物反応や癒着に関して、さらなる検討が必要だと考えています。長期モデルの評価の際には、現在の評価項目に加え S-100 染色や PGP9.5 染色、トルイジンブルー染色などを行い、Schwann 細胞や軸索の再生についてより定量的な評価を行いたいと考えています。チューブの形状については、今後中空型のチューブを用いる予定です。

平成25年度

富山湾より採取・単離した新規微細藻類の機能性の検証

富山大学  
中村 省吾



[様式－9] (契約書様式－6)

平成27年9月29日

一般財団法人 北陸産業活性化センター  
会 長 久 和 進 殿

住 所 富山県富山市五福3190番地  
名 称 国立大学法人富山大学  
代表者 分任契約責任者  
研究振興部長 平野 茂一 印

## 助 成 研 究 終 了 報 告 書

研究テーマ：富山湾より採取・単離した新規微細藻類の機能性の検証

平成27年 8月31日に助成研究を終了しましたので、R&D推進・研究助成契約書第10条第1項の規定により、次の書類を添えて報告します。

### 1. 研究の実施内容及び成果に関する報告書

#### (1) 研 究 概 要

われわれは、燃料油や機能性油を産生する微細藻類を、富山湾の海水中から独自に単離することを試みている。そして、これまでに単離した微細藻類 30 株の中の 3 株 (*Tetraselmis* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp.) が、 $\omega$ -3、-6 不飽和脂肪酸等の機能性油を含むことを見出した。これらの不飽和脂肪酸の効果として、血糖値の低下、高血圧の予防、血中コレステロールの減少、アトピー性皮膚炎の予防・改善、腫瘍の抑制などが報告されている。そこで、本研究では、これら 3 株の大量培養方法の開発と、藻体丸ごとでの機能性を、肥満、糖尿病、高脂血症、肝細胞ガン等を発症する TSOD (肥満性糖尿病) マウスを用いて検証することを主な目的とした。

研究計画としては、(1) 微細藻類の大量培養方法の開発、(2) 微細藻類の回収方法の



検討、(3) 微細藻類の産生油量との産生油種の分析、(4) 微細藻類の機能性検証等を実施することを挙げた。なお、前記 3 株に加えて特色のある 2 株 (*Chlamydomonas* sp. -2, *Senedesmus* sp.) についても調べた。

## (2) 研究の実施内容及び成果

[1] 微細藻類の微細藻類の大量培養方法の開発：3 株の各々について最適な培地を検討した。その結果、*Tetraselmis* sp. はドナリエラ培地や 5KWSW (5 倍量 KW 溶液入り 自然海水) で、*Chlamydomonas* sp. は 5KW (5 倍量 KW 入り) ドナリエラ用培地で、そして *Chlorella* sp. は SGI 培地や TAP 培地で、新たに追加した *Chlamydomonas* sp. -2 は TAP 培地で、*Senedesmus* sp. は SGI 培地や TAP 培地で (資料 1) それぞれ最もよく増殖することが判った。そして、培地の量を大きく増加させることで大量培養が可能となることも確認された。また、*Tetraselmis* sp. (資料図 1) や *Chlorella* sp. は、屋内・外の開放的な培養においても深刻なコンタミネーションは起こらず、野外における大量培養の可能性が示された (資料図 2)。

さらに、本研究でご協力頂いた株式会社ヤマシタの、自社が保有する古海水型の自噴温泉水によって *Chlorella* sp. や *Senedesmus* sp. が良く増殖することや、ビニールハウス内で大量培養できる可能性も見出された (資料図 2)。

[2] 微細藻類の回収方法の検討：大量培養した微細藻類から油を抽出するためには、培養液から微細藻類を回収する作業が必要となる。回収方法としては、遠心・濃縮、濾過、凝集などがある。そこで、3 株について検討した結果、*Tetraselmis* sp. , *Chlamydomonas* sp. , *Chlamydomonas* sp. -2, *Senedesmus* sp. は、約 1 日間で自然沈降することが判り (資料図 3)、前述の回収方法は必要ないことが示された。これは、省エネの面から優れた特性であると思われた。一方、*Chlorella* sp. は、高分子カチオン凝集剤 (アクリル酸ジメチルアミノエチル) で凝集することが判り (資料図 4)、この凝集剤の使用で回収が可能となるものと思われた。

[3] 微細藻類の産生油量と油種の分析：各液体培地で培養した各藻類の凍結乾燥試料を量り取りキャップ付きの耐圧試験管に量り取り、BF<sub>3</sub>-Methanol 溶液で、100℃、40 分間の反応で、微細藻類に含まれる中性脂肪酸を脂肪酸メチル (BDF 成分) へ変換した。それを Pentane 抽出した後揮発させ、その残渣を Hexane に溶解させて脂肪酸分析を行った。炭化水素成分を分析するためには、各微細藻類の凍結乾燥試料を KOH/Methanol でケン化させ、Hexane 抽出した試料で炭化水素成分の分析も行った。

各試料の分析は、キャピラリーガスクロマトグラフィー (GC, GC-2010 Shimadzu Co.) を用いて行った。脂肪酸の分析は、InertCAP WAX (GL サイエンス, 30m, 内径 0.25mm) カラムを、また、炭化水素成分の分析には、DB-1ms (SEG, 内径 0.25mm) カラムを用いた。なお、いずれも検出器は FID を使用し、キャリアーガスは He ガスを用いた。

その結果を以下に記す。

*Tetraselmis* sp. : 乾燥重量の約 19%の油を含有し、機能性油として、 $\alpha$ -リノレン酸を総油量の約 24%,  $\gamma$ -リノレン酸を総油量の約 24%, アラキドン酸を総油量の約 24%産生する。

*Chlamydomonas* sp. : 乾燥重量の約 20%の油を含有し、機能性油として、 $\alpha$ -リノレン酸（総油量の約 7%）、 $\gamma$ -リノレン酸（約 4-27%）などを産生する。

*Chlorella* sp. : 乾燥重量の約 18-22%の油を含有し、機能性油として、 $\alpha$ -リノレン酸を総油量の約 43%産生する。

*Chlamydomonas* sp. -2 : 乾燥重量の約 33%の油を含有し、機能性油として、 $\alpha$ -リノレン酸（総油量の約 23%）、 $\gamma$ -リノレン酸（約 7%）などを産生する。

*Senedesmus* sp. : 乾燥重量の約 40%の油を含有し、機能性油として、 $\alpha$ -リノレン酸（総油量の約 11%）、オレイン酸（約 45%）などを産生する。

【4】 微細藻類の機能性検証：平成 26 年度は、*Tetraselmis* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. の各凍結乾燥試料を、藻体濃度 0.2% (w/v) として、TSOD メタボマウス（メタボリックシンドロームモデルマウス）に飲料水に混入して 12 週間の投与試験を行った。その結果、全ての藻種に関して、発病、死亡するマウス個体は見られなかったことから、藻種そのものの毒性が無いことが明らかとなった。そして、*Chlamydomonas* sp. で血糖値を下げる効果（資料図 5）や、膵臓のランゲルハンス島を破壊することが推察されているマクロファージの活性を防ぐ効果を持つことが示唆される結果が得られた（資料図 6）。

平成 27 年度は、*Chlamydomonas* sp., *Chlamydomonas* sp. -2, *Senedesmus* sp. の各凍結乾燥試料を、藻体濃度 0.2% (w/v) として、TSOD メタボマウス（メタボリックシンドロームモデルマウス）に飲料水として強制投与する試験を 4 週間行った。その結果、どの微細藻種も毒性が無いこと示され、さらに、*Chlamydomonas* sp. で血糖値を下げる効果や肥満度を下げる効果を持つ可能性が示された（資料図 7）。

なお、*Tetraselmis* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. などの特許出願した。「燃料油および機能性油を産生する微細藻類」出願番号：2014-099787

### (3) 現状における課題、問題点

今回試験に用いた藻種は全て、肥満や糖尿病の防止、肝機能保全等に効果を持つ可能性が示された。特に、*Chlamydomonas* sp. にその可能性が強く見られたが、断言できるまでのデータは得られなかった。従って、それらの効果をはっきりと示すデータの獲得が大きな課題として残った。また、大量培養した試料での毒性や効能の検証も課題として挙げられる。

### (4) 今後の目標と展開

上記課題を解決するために、平成 27 年度後半に、db マウス（遺伝性過食・肥満、高血糖発症マウス）を用いた試験を計画している。この試験により、*Chlamydomonas* sp. の効果が明確になれば、高機能性藻種として、食品や健康機能材として広く用いられる展望が開かれる。また、屋外における大量培養方法も、継続して開発していくことを目標としている。

## 【添付資料】

### \* 微細藻類用各種培地組成

ドナリエラ用培地：Yuasa T, Muto S. (1992) *Arch Biochem Biophys.* 296: 175-182. に記載されている培地組成を使用。20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 43 mg NaHCO<sub>3</sub>, 1.5 g MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.5 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2 g KCl, 0.2 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1 g KNO<sub>3</sub>, 35 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.89 mg EDTA-Na<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 2.44 mg FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 41 μg ZnCl<sub>2</sub>, 610 μg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 15 μg CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 41 μg CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 41 μg MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 380 μg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 41 μg VOCl<sub>2</sub> per liter.

KW21：海洋微細藻類培養補強剤。熊本県荒尾市 第一製網株式会社製

TAP 培地：Gorman, D. S., and R. P. Levine (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54: 1665-1669. に記載されている培地組成を使用。

Sager & Granick Medium I：

Sager, R and Granick, S. (1953) Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann. NY Acad. Sci.* 56: 831-838. に記載されている培地組成を使用。

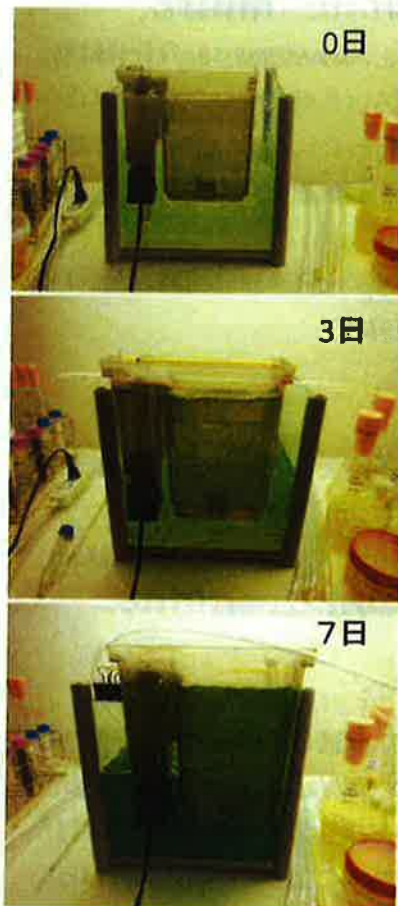


図 1. *Tetraselmis* sp. の開放容器における増殖試験。0 日目に藻体密度  $4.1 \times 10^4$  cells/mL で開始したところ 7 日目には  $5.8 \times 10^5$  cells/mL に到達した。そして、この間、コンタミネーションによって引き起こされる培養液の大きな濁りや泡立ちなどは観察されなかった。培地量約 8L, 水深 10cm で実施。

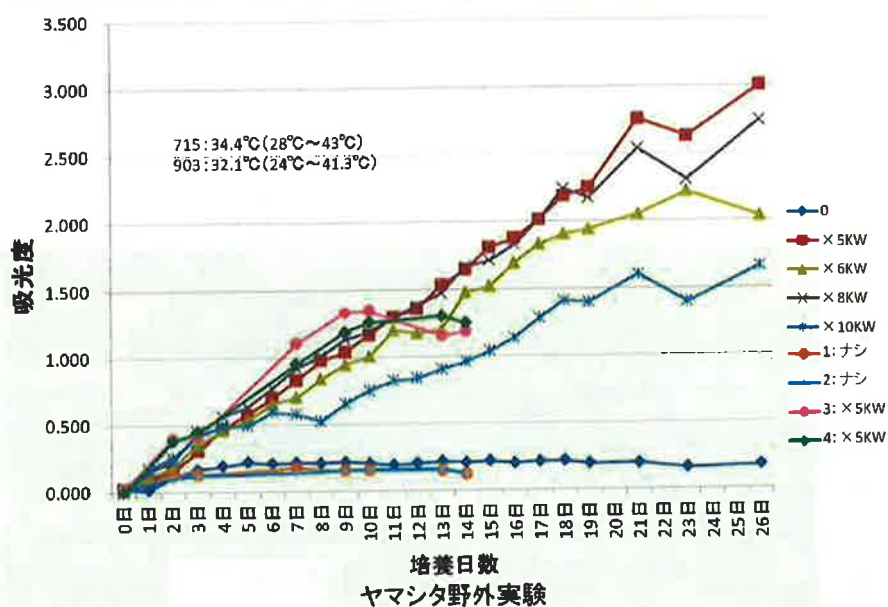


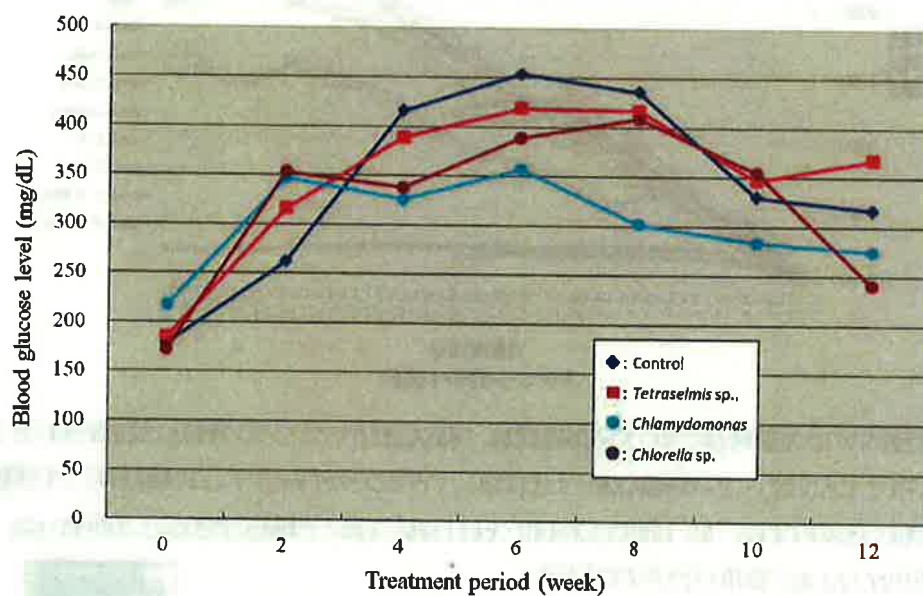
図 2. 野外での大量培養に向けた基礎試験。株式会社ヤマシタの敷地に設置されたビニールハウス内（上左図）での培養試験（上右図）。ヤマシタが保有する自噴温泉に 5 倍量の KW 溶液を入れたものでは、26 日間で  $8 \times 10^7$  cells/mL にまで増殖できることが判った。いずれも *Chlorella* sp. を用いたものである。



図 3. 培養した微細藻類 3 種類の自然沈降の観察。左から *Tetraselmis* sp., *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp.。 *Tetraselmis* sp. は、約 1 日間で沈殿することが判り、培養後の回収における省エネルギー化が期待された。



図4. 培養した *Chlorella* sp. への凝集剤の効果観察。右端の高分子カチオン凝集剤では、ほとんどの藻体が凝集し、浮上することが判った。



Blood Glucose Levels of Male TSOD-Mice

図5. *Tetraselmis* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. の TSOD メタボマウスの血糖量への影響。培養した各藻体を凍結乾燥後、各藻体の濃度が 0.2% (w/v) となるよう飲料水に懸濁し、TSOD メタボマウスに 12 週間の投与試験を実施した。4 週間後あたりから、*Chlamydomonas* sp. を投与したマウスで血糖量の低下が見られた。実験には、各藻体について TSOD 系マウス雄 5 匹を供した。

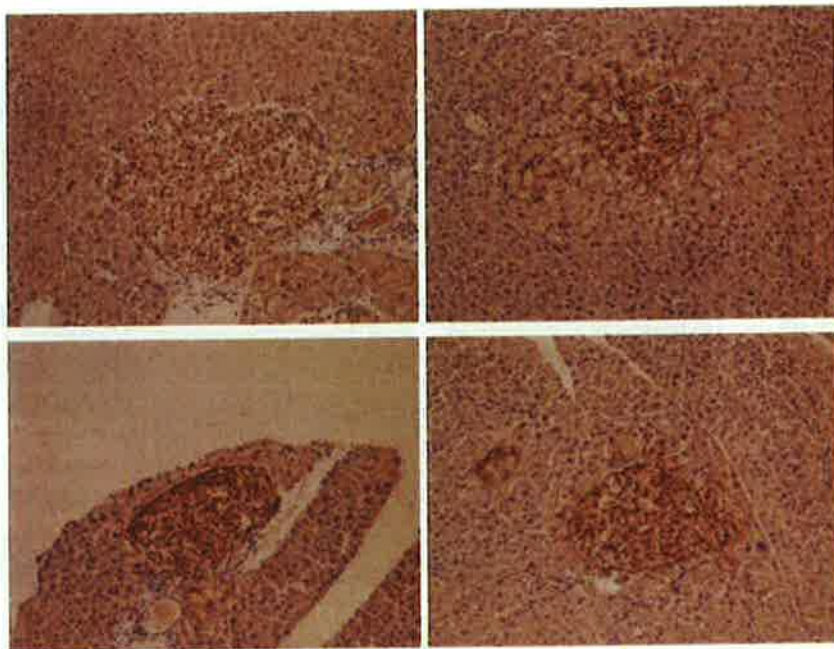
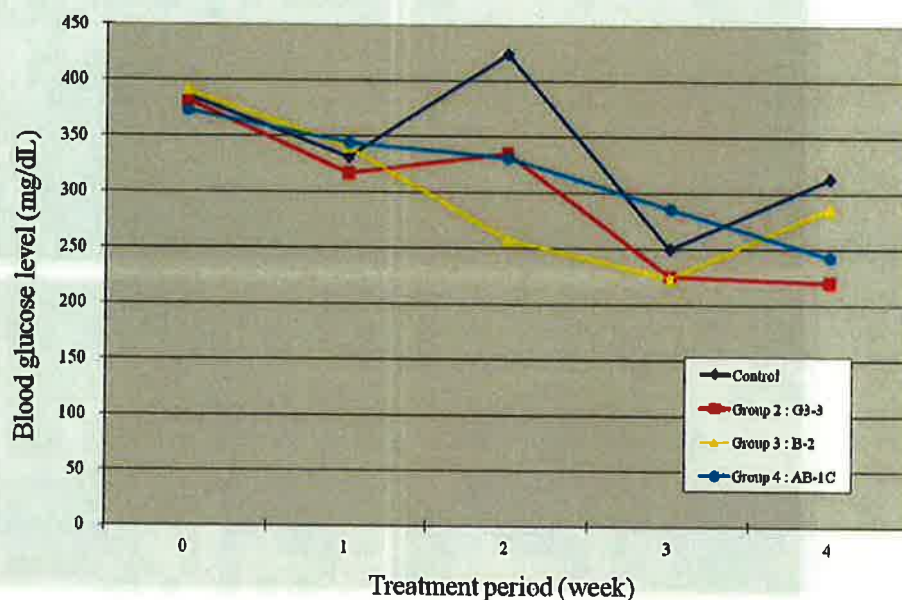


図 6. マウス脾臓のランゲルハンス島内における M2 マクロファージの浸潤状況。ランゲルハンス島の切片をマクロファージ抗体で染色した。上段はコントロールで，下段が *Chlamydomonas* sp. を投与したマウスのもの。免疫染色で褐色になった部分の縮小が下段で確認できる。



Blood Glucose Levels of Male TSOD-Mice

図 7. *Chlamydomonas* sp. (G3-3), *Chlamydomonas* sp.-2 (B-2), *Senedesmus* sp. (AB-1C) の TSOD メタボマウスの血糖量への影響。各藻体の凍結乾燥試料の濃度が 0.2% (w/v) となるよう飲料水に懸濁し、血糖量が 350-400mg/dL に上昇した TSOD メタボマウスに 4 週間の強制投与試験を実施した。*Chlamydomonas* sp. を投与したマウスで、コントロールよりも血糖量の低下がコンスタントに見られた。実験には、各藻体について TSOD 系マウス雄 5 匹を供した。

#### 【謝 辞】

本研究に、古海水型温泉水とビニールハウスを提供して頂いた株式会社ヤマシタ様（富山市）に感謝申し上げます。

平成 25 年度

液体燃料循環型社会の構築を想定した安全運転が可能な

直接ギ酸形燃料電池の開発

金沢大学  
辻口 拓也

## (1) 研究概要

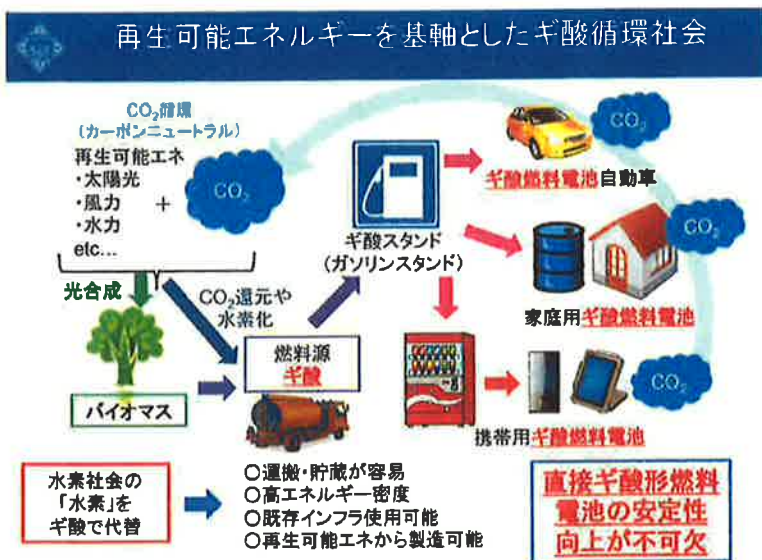


図 1: ギ酸循環社会のイメージ図

かしながら、一定の効果は得られるものの、2 時間で 30% 程度の出力低下は避けられない。申請者からも、触媒被毒抑制へ向けた取り組みを行っており、その中で電極の物質移動抵抗と出力低下に相関性があることを見出した。このアプローチは従来の新規触媒開発とは一線を画すものである。そのため本研究では 2 年間で、物質移動抵抗の最適化により DFAFC の出力低下を 2 時間 10% 程度にまで低減させた DFAFC を開発することを目標として研究に取り組んでいる。

初年度では、触媒層や電解質膜などの厚さなどが出力低下挙動におよぼす影響について検討した。また、2 年度目では、触媒被毒に耐性をもつ触媒の開発とそのギ酸電池への適用について検討した。

## (2) 研究の実施内容および成果

### (2)-1 カーボン粒子の塗布量の影響

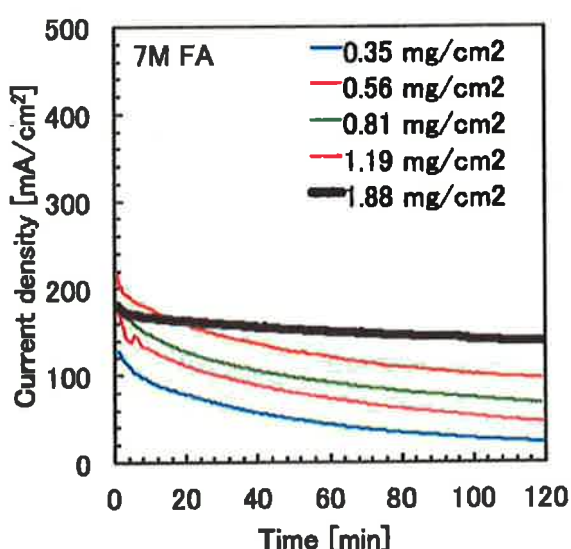


図 2 カーボン粒子塗布量が出力におよぼす影響

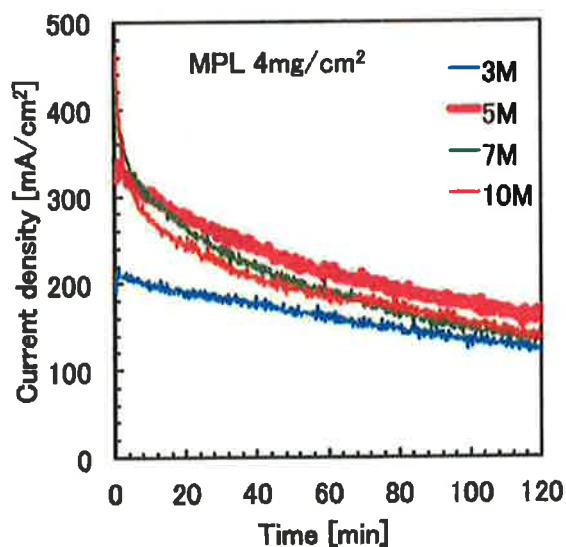


図 3 ギ酸濃度が出力におよぼす影響

図 1 にはカーボン粒子塗布量が出力におよぼす影響を図 2 にはギ酸濃度が出力におよぼす影響を示す。図 1 がこれまで明らかになっていた出力特性でありカーボン粒子の塗布量を増加させる

と初期出力はていかするものの出力の低下を抑制できることが知られていた。そこで、本検討期間ではカーボン粒子の塗布量を  $4 \text{ mg/cm}^2$  まで増加させ、異なるギ酸濃度で発電を行った。その結果、濃度の増加に伴い初期出力は増加するものの、7M や 10M では著しい初期出力の低下が見られた。一方で 5M や 3M では緩やかな出力低下に留まっている。特に、5M では図 1 のおよそ 2 倍の初期出力を得ることに成功した。しかしながら、依然として出力の低下が見受けられるギ酸電池の物質移動に大きな影響をおよぼす電解質膜の影響について検討した。

## (2)-2 電解質膜の影響

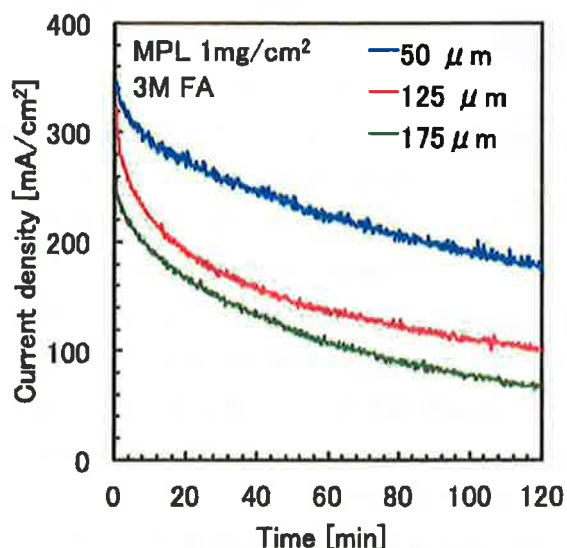


図 3 電解質膜厚さが出力におよぼす影響

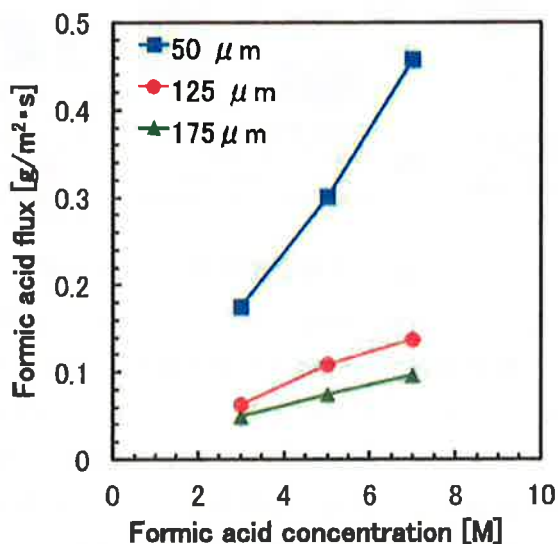


図 4 電解質膜厚さとクロスオーバーの関係

図 3 には電解質膜厚さが出力におよぼす影響を、図 4 には電解質膜厚さとクロスオーバーの関係を示す。これより、電解質膜厚さが薄い場合のほうが出力低下の抑制効果が高いことがわかる。また、このときギ酸クロスオーバーが小さいことがわかる。クロスオーバーとは燃料極のギ酸が空気極に到達し、電圧の低下を引き起こすものであり、出力低下の一因であると考えていたが、この結果からクロスオーバーは出力低下因子ではないことが明らかとなった。また、電解質膜巻く厚さが薄い方が出力が高いが、これは電解質膜厚さが小さい方が電池の内部抵抗が下がるためであり、物質移動とは関係の無い因子である。検討項目 1 と 2 より得られた結果をまとめると、MPL 層は厚く設計し、電解質膜は内部抵抗削減を狙うため薄いものを用いる方が好ましい。また、物質移動と出力低下には相関が見受けられたものの、触媒層の物質移動と出力低下に関しては未検討である。そこで、3 の取り組みとして触媒層構成物質を変化させた電極について検討した。なお、触媒層の構造を変化させた場合、物質移動以外の因子で大きく出力特性が変化する可能性がある。そのため、現在は物質移動速度の制御が容易に行える繊維状触媒の作製に取り組んだ。

## (2)-3 繊維状触媒を用いた検討

アノード触媒の被毒抑制による出力低下の抑制を狙って、図 5 に示すような  $\text{SiO}_2$ 、 $\text{TiO}_2$ 、カーボンブラックといったナノ粒子をカーボンナノファイバーに埋め込んだものを Pd の担体とした触媒を開発し、ギ酸酸化活性ならびに耐被毒性を評価した。その結果を図 8 に示す。ここで、CECNF はカーボンブラックを埋没させたもの、SECNF は  $\text{SiO}_2$  を埋没させたもの、TECNF は  $\text{TiO}_2$  をも埋没させたもの、CNF は埋没粒子のないカーボンナノファイバー、C はカーボンブラックを示す。これ

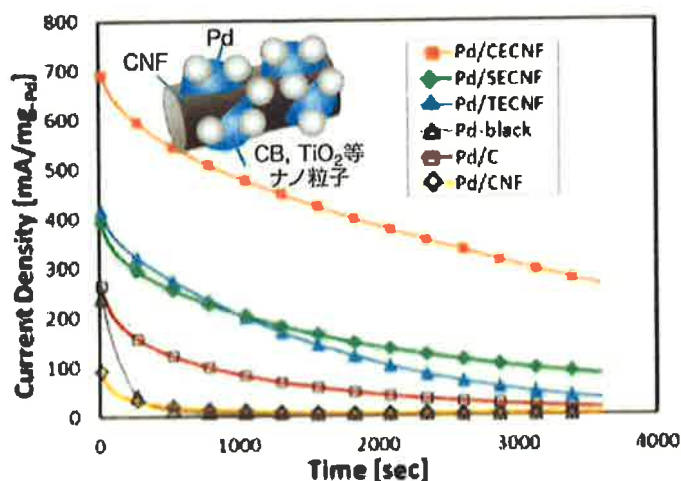


図 5: 異なる触媒担体を用いた際の電流密度の経時変化

より、粒子含有触媒担体を用いた際に DFAFC の被毒耐性が飛躍的に向上した。特に CECNF では 1 時間語の電流密度が 23 倍近く向上した。これは埋没粒子と触媒間の相互作用による触媒被毒の抑制によるものである。また、同触媒のギ酸酸化活性も従来のものと比べて 4 倍程度に相当することがわかった。この成果は被毒抑制効果による出力低下抑制だけではなく、DFAFC の出力向上にも大いに貢献できるものであり、今後の DFAFC の高出力化に向けた検討において非常に重要な成果である

## (2)-4 成果発表

上記の成果を学術論文2報，国内学会発表8件，国際会議発表3件ほどにまとめて報告した。

## (3)現状における課題と問題点

現状の課題は開発した触媒のセルへの適用にある。今回開発した触媒は繊維状触媒であり、従来の粒子状触媒と同様の作製方法では高い電池性能が得られないことがわかった。従って、今回開発した触媒の最適利用方法を考案する必要がある。

## (4) 今後の目標と展開

今回の研究期間では、性能低下の抑制が可能な電池構造および新規触媒の開発には成功したものの、新規触媒を適用した電池の開発には至らなかった。従って今後は本触媒を用いた電池の作製を実現する必要がある。今回開発した開発した触媒には担体効果による触媒の被毒抑制（性能の維持）を期待したものであるが、その効果に加え非常に高い触媒活性が得られることが明らかとなった。これは現在の世界最高の触媒活性を凌ぐものである。この成果をベースに、JST が主導する国家プロジェクトである戦略的創造研究推進事業（さきがけ：再生可能エネルギーからのエネルギーキャリアの製造とその利用のための革新的基盤技術の創出）に採択され、この資金援助を受けながら高活性ならびに出力低下のないギ酸形燃料電池の開発に取り組む予定である。また、本 JST 事業に参画することは、再生可能エネルギーを効率的に使用するための要素技術として「ギ酸」ならびに「ギ酸燃料電池」が国の戦略のひとつとして挙げられたことを意味するものであり、私が目標に掲げるギ酸循環型社会の実現に一步近づいた。従って、今後は本成果を基にギ酸燃料電池の高性能化から実用化を目指すと同時に、ギ酸循環型社会の構築にむけたその他要素技術開発に取り組む予定である。



平成25年度

内部加熱・冷却による回転成形プロセスの最適化

株式会社タカギセイコー

## 1. 目的

本研究では、回転成形における物性劣化を最小限に抑えるために、劣化の原因となる成形サイクル増大を解消できる熱交換システムを構築するとともに、回転成形プロセスの加熱・冷却効率の最適化について研究開発を行う。

## 2. 構想概念

回転成形は、金型外部からの熱入力のみとなるため、効率的な熱交換が出来ない。

密閉された金型に導通孔を設け、金型内部に加熱(冷却)された気体を送り込み、形成された樹脂膜の内部より積極的に加熱・冷却することにより、樹脂の外層、内層双方から熱入力することで効率的な熱交換が可能となる。

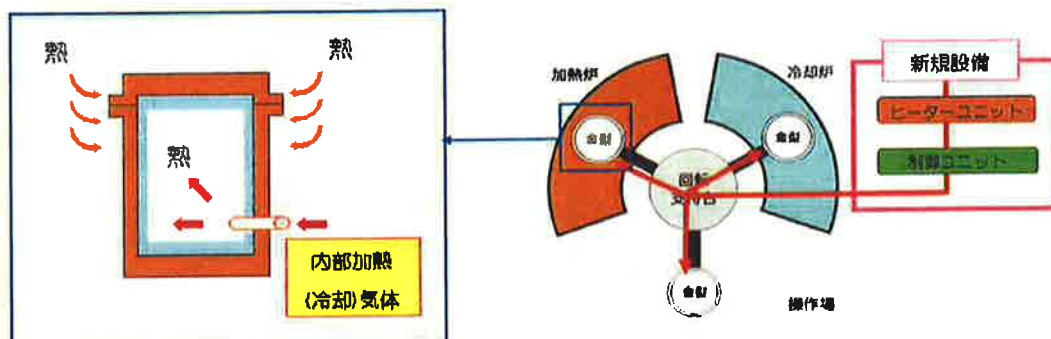


Fig.1 内部加熱冷却システムを有する回転成形機システム案

## 3. 研究の実施内容および成果

### 3-1. 装置システムの構築

#### (1) システム概要

下図 Fig.2に装置回路の概要を示す。酸化劣化を抑えるため加熱媒体として窒素ガスとエアの切替えが可能なシステムとし、冷却エアと合わせて3系統を配置した。

3系統の供給源には流量制御の機能を持たせ、加熱媒体の2系統の先にヒーターユニットを配置、そこで昇温された制御媒体を金型内へ送り込む。回転成形の場合、金型が2軸回転運動をするため複雑な動きをする回転アームに配管を追従させる必要があるが、アームの中空構造を利用してアーム内を媒体流路としスライジョイントで繋ぐことで、金型への配管接続を可能にした。

回路中には流量/圧力/温度センサーが配置され、制御盤モニターで設定/監視できるようにし、さらに時間制御によりプログラミングできるようにすることで、多様なパラメータ設定を可能にした。

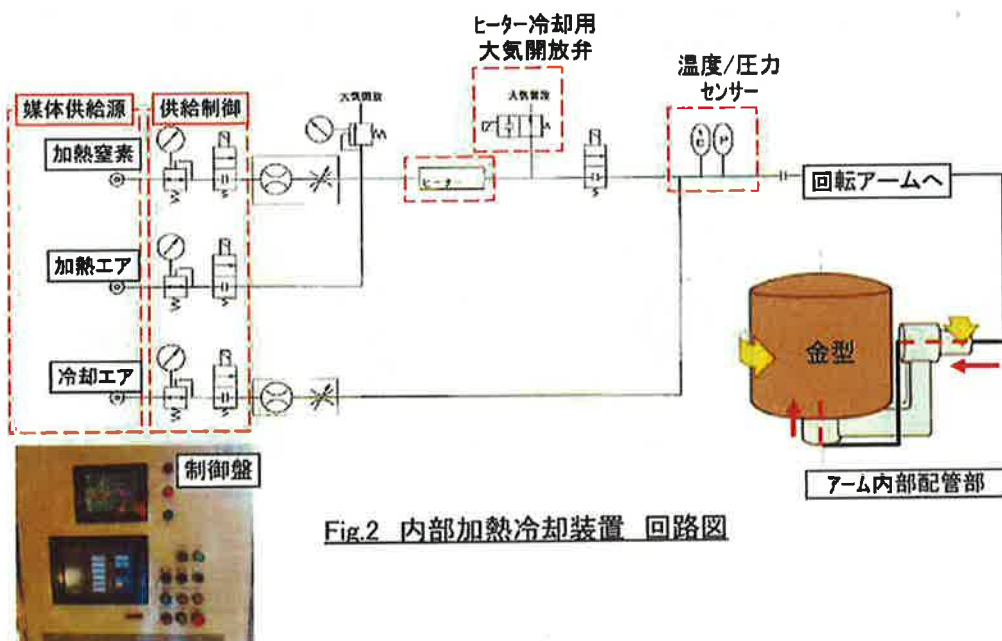


Fig.2 内部加熱冷却装置 回路図

加熱ユニットには、シェルにネジ込みヒーターを差し込んだ空気加熱用のシェル型ヒーターを採用した。(Fig.3)

流体の経路中に設置し、シェルの中を流体が通過する過程で内蔵されたヒーターにより昇温されるもので、200℃までの加熱媒体を発生させることが可能。

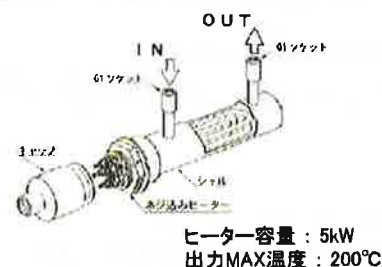


Fig.3 ヒーター構造

## (2) システムの最適化

本システムの性能検証を行ったところ、媒体の圧力損失と熱損失が大きく、狙った性能が出ていないことが判明した。

### ① 圧力損失の改善

これらは既存の回転成形機を改造して増設したシステムであるため、回転アームの構造が流体を通す仕様に沿わない部分があることによる。

回転アームの中空形状を、流体抵抗を受けにくい形状に改造した。加えて回転軸連結部の配管に補強を入れることで、連結部分のシール性を高めた。以上により、システム中の媒体圧力損失は大幅に減少し、設定値の約20%程度だった流量がほぼ設定値通りとなった。供給媒体の流量実測値をFig.4に示す。

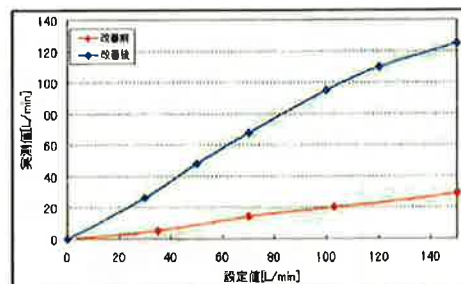


Fig.4 媒体流量実測値

### ② 熱損失の改善

加熱・冷却ともに媒体温度が回転アーム内を通過中に、アームの温度に大きく影響を受けていることが分かった。流量向上による熱損失の軽減を狙ったが、残念ながら効果は限定的であった。

そこで、外部から補助的に熱を取り入れる方策の検討を行った。アームから金型へ通ずる部分の銅配管の媒体流動長を稼ぐことで、加熱炉内の熱を取り込むようにした。それにより、回転アームで奪われた熱量以上の補填が出来た。経路中の媒体温度をFig.5に示す。

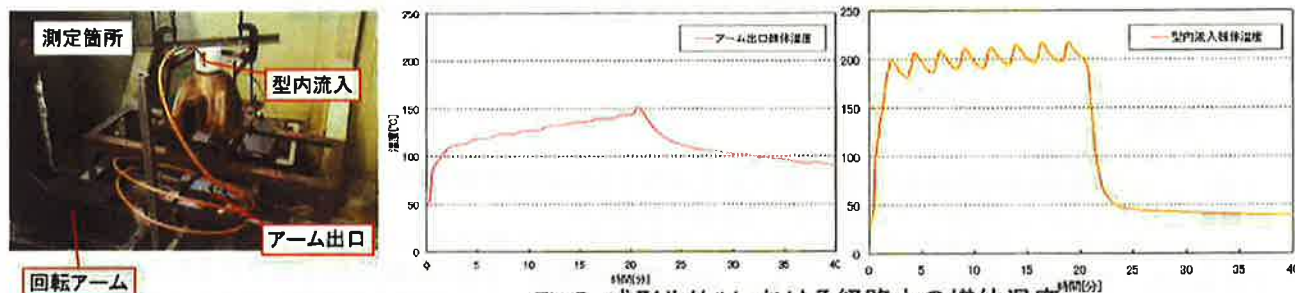


Fig.5 成形サイクルにおける経路中の媒体温度

## 3-2. 金型への供給/排出機構の検討

### (1) 1系統ベントの検討

金型内部から熱交換を行うには、加熱/冷却媒体を金型内に供給すると同時に排出し続けなければならず、いかに効率的に給排気が出来ることが重要なポイントになる。

本研究では、まず1部品で供給/排出を同時に行える機構を持つベント部品で検証を行った。(Fig.6) 供給と排気を同じ箇所で行うため、排気時にパウダーや溶融樹脂もベントから排出されてしまう事象が発生した。その対策として、ベント周りにインナーパイプを設けて樹脂の流入が起きないような形状の検討を行った。樹脂の付着防止と断熱のため、材質はテフロンとした。

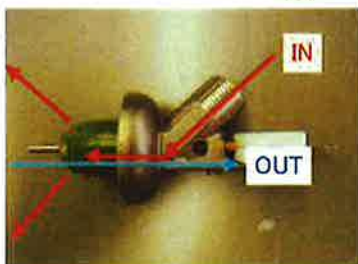


Fig.6 1系統ベントの機構



Fig.7 インナーパイプの一例

検討形状の一例をFig.7に示す。

媒体の給排気を型の中央付近で行い、形状と断熱で樹脂の流入を抑えることを狙ったが、給排気を同じ場所で行う以上、排気に伴う樹脂の流出は抑え切れなかった。また、給排気が入り混じるため、流量の限界点が低いことも分かった。

## (2) ベントの2系統化

前述の理由により、供給/排出を独立させ2系統とした。給排気それぞれのベント部品には、圧力で開閉するスリット加工がなされており、溶融前のパウダーが配管内に進入しないよう工夫されている。(Fig.8) 2系統化とすることにより、1系統で起きた樹脂流入は解消され、スムーズな給排気が可能となった。



Fig.8 2系統ベント

## 3-3. 成形検証

### (1) 型内温度検証

まず、回転成形の通常工程における炉内温度と型内温度の推移をFig.9に示す。炉内温度に対して型内温度の追従性の悪さが分かる。そこに加熱/冷却各工程全般にわたって内部からの熱を与えてやれるのが理想的な形と言える。

加熱/冷却工程ともに、温度勾配が緩やかになっている部分がそれぞれ溶融/凝固過程となり、温度カーブから型内の樹脂の状態を把握することが出来る。

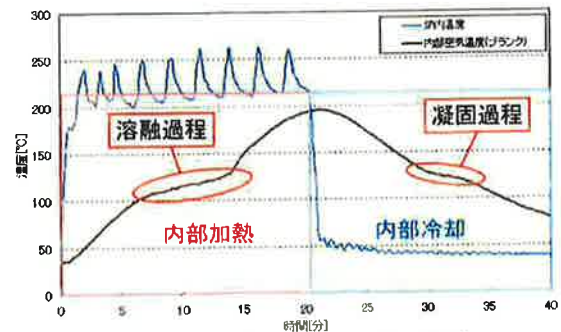


Fig.9 回転成形の型内温度

次に、内部加熱/冷却を導入した型内温度カーブをFig.10に示す。(媒体流量は70L/min)

内部加熱の流入タイミングは、14minからとなっており、それと同時に通常成形(ブランク)に比べ温度勾配が上がっているのが分かる。

加熱タイミングを14minからとしたのは、やはり未溶融のパウダー状態の場合、どうしても排気に混合してパウダーも排出される為である。また、内部冷却タイミングも10min遅らせているのは、ピーク温度付近をキープしたいためである。

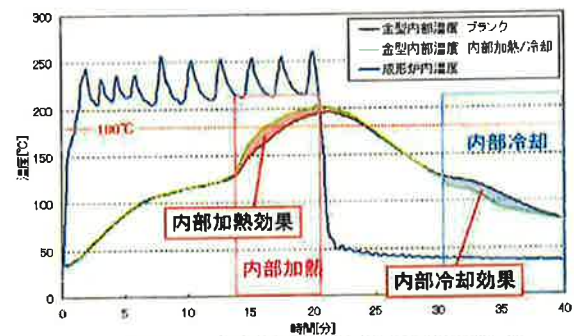


Fig.10 内部加熱/冷却の温度効果

検証には架橋ポリエチレンを供しており、180°Cが架橋反応に重要な温度目安となる。この温度域を保持することで、より優れた物性の成形物を得ることが出来る。

内部加熱の流入タイミングにおける温度立ち上がり、ブランクとの差がそのままピーク温度の差となって表れ、そのエリアが熱量のアドバンテージとなり、より物性面で有利に働くと言える。

また、内部加熱で得られた熱量アドバンテージは、そのまま加熱時間短縮へ繋げることが出来る。立ち上がり部分からのブランクとの熱量差を算出し、その熱量分、180°C以上のピーク温度域を保持したまま、加熱工程を前へシフトすることができ、加熱工程で2min短縮することが可能となった。(Fig.11)

冷却工程においても、内部からの冷却効果により製品取り出し温度を下げることで、冷却タイミングを早めることで15%までの成形サイクル短縮が確認出来た。

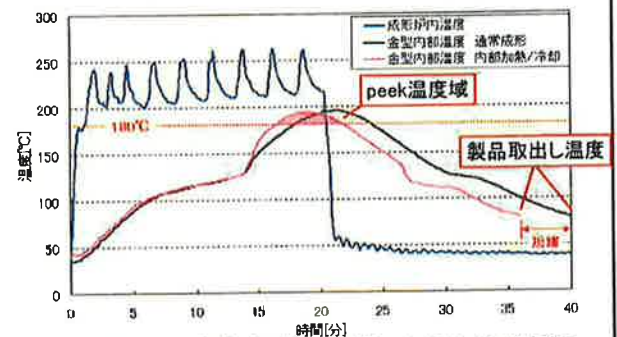


Fig.11 内部加熱/冷却によるサイクル短縮

成形炉内温度との組合せを最適化することにより、さらなる温度効果を得ることが出来た。加熱工程でパウダーの溶融完了を早めることにより、より早いタイミングで内部加熱を開始することが可能となった。これにより、成形サイクル20%短縮を達成することが出来た。(Fig.12)

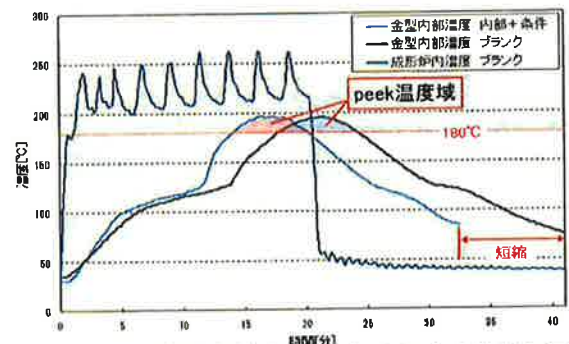
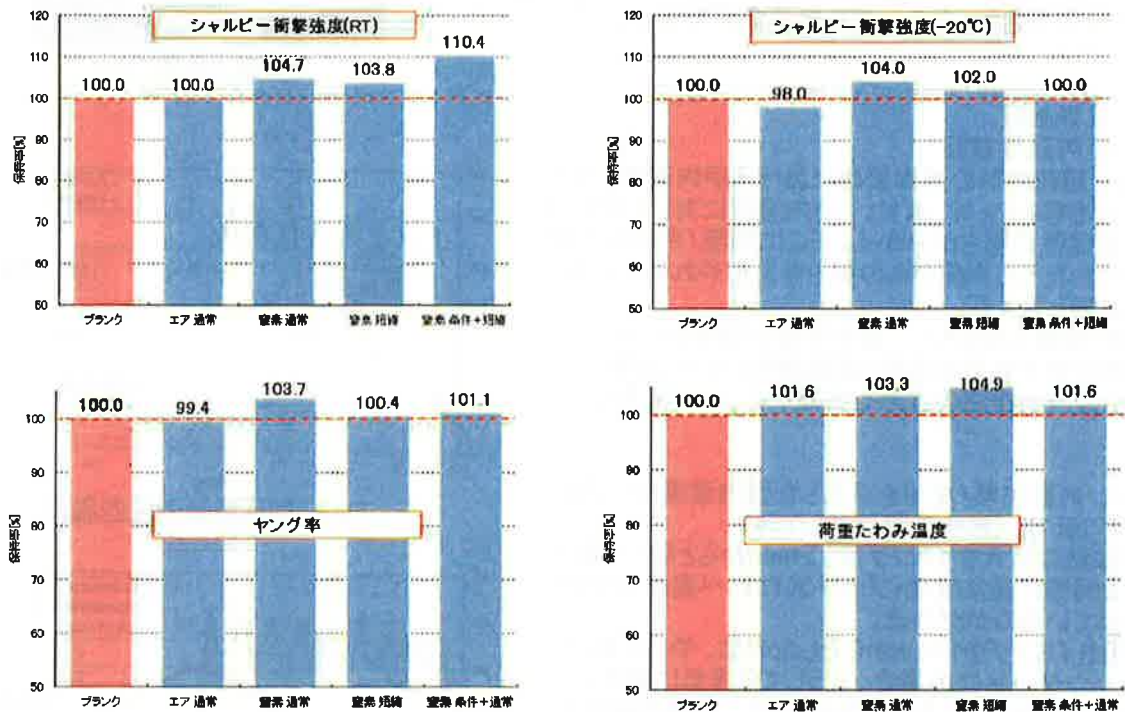


Fig.12 成形条件との組合せによるサイクル短縮

## (2) 物性評価

温度検証で得られた成形品の性能把握として、物性評価を行った。  
評価物性としては、架橋物性の度合いを図り知る代表値として、シャルピー衝撃強度と荷重たわみ温度、ヤング率の測定を行い、通常成形の物性値に対して相対評価を行った。その結果を以下に示す。



通常成形のブランクデータに対して、各水準ともほぼ同等以上の物性を保持している。  
上記結果について下記にポイントを記す。

- ・エア媒体の通常サイクルにおける結果から、熱量相当分の効果は認められず、酸化劣化の影響があると思われる。
- ・一方、上記同一条件で窒素媒体に置き換えた場合、すべての物性が明らかに向上しており、窒素環境が非常に有効であることが分かった。
- ・サイクル短縮をしても物性は保持しており、熱量相当の性能が発揮されていることが裏付けられ、内部加熱/冷却がサイクル短縮に有効な手段であることが確認された。

## (3) 成形外観

内部加熱/冷却による成形外観への影響としては、脱泡効果が確認された。(Fig.13)

通常成形では、製品肉厚内の気泡を取り除くため樹脂の溶融時間が長く設けられており、サイクル押し上げの大きな要因となっている。

内面から加熱することで樹脂内表面の溶融粘度が下がり、これに内圧が加わることで、溶融樹脂中の気泡を脱泡する作用が促進されと考えられる。

回転成形において、溶融樹脂中の気泡(ピンホール)は外観品質の低下、物性低下を引き起こす要因となり、日常的な課題として常に付きまとっている。このピンホールを解決できれば、回転成形品質全体の底上げが期待できる。

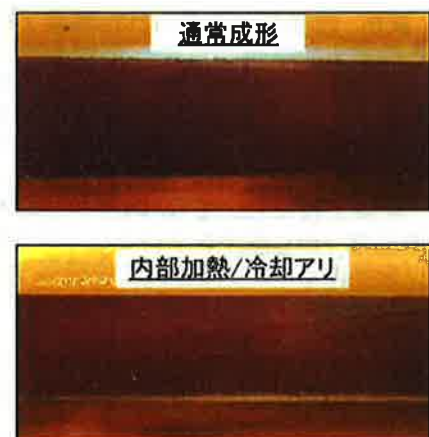


Fig.13 成形品断面比較

#### 4. 現状における課題、問題点

本研究により、回転成形プロセスに内部加熱/冷却システムを導入し、その有効性を確認することに成功した。しかし、まだ実用化レベルまでに達していないのが実状であり、実用化に向けた課題を下記に記す。

1. 内部加熱タイミングの早期化
  - ・未熔融パウダーが介在する環境での排気機構の検討
  - ・金型パーティング(型合わせ面)のシール性向上
2. 型内における熱供給の均等化
  - ・供給媒体の拡散方法の検討
3. 供給媒体の流量アップ
  - ・回転成形機の専用仕様へのカスタマイズ
  - ・供給システムのバージョンアップ
  - ・金型への給排気機構の容量アップ
4. 加熱媒体温度の更なる向上
  - ・加熱ユニットの見直しおよびシステム配置の見直し

#### 5. 今後の目標と展開

本研究の当初目標であった、成形サイクル30%削減には残念ながら届かなかった。今後は更に技術検証を行いながら装置システムの性能を高め、目標達成を目指す。

また、装置システムの見直しを含めてシステム全体の熟成を進め、実用化を視野に入れたシステムの構築を行い、事業化につなげていく。

今後の展開としては、今回成果として得られた成形サイクル短縮によるコストダウンと、物性向上、外観性向上により、回転成形の市場競争力アップと付加価値向上を図っていく。

また、装置システムの性能向上を進めていき、今回実現できなかったエンブラ等々の他材質への展開を推進し、回転成形の市場拡大と新たなニーズ発掘を目指していく。

以上

