

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 ± 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 ± 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、 γ -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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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⁵⁴⁾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

副睾丸脂肪組織、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内臓外の 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、ホタルイカの肉臓および肉臓外ともに 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、ホタルイカ肉臓粉末およびホタルイカ肉臓外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、スルメイカ肉臓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、スルメイカ肉臓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臓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臓粉末は、スルメイカ肉臓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 ¹	4	4	4	4	4
Vitamin mixture ¹	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 ²	-	5	-	-	-
Internal organs of firefly squid ²	-	-	2.76	-	-
Except internal organs of firefly squid ²	-	-	-	2.24	-
Internal organs of Japanese common squid ²	-	-	-	-	2.76
Sucrose	63.6	58.6	60.84	61.36	60.84

¹ Harper mixture.⁴⁴⁾

² 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 ¹ , g/100g	6.9	9.4	4.3	0.8

¹ 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¹⁾。

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²⁾。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³⁾。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^{4,5)}。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⁶⁾。

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°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 ¹	遺伝子バンク 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

¹ 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⁷⁾。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⁸⁾。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^{9,10)}。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¹¹⁾。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¹²⁾。

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、アデニリ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¹³⁾。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¹⁴⁾。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¹⁵⁾、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。

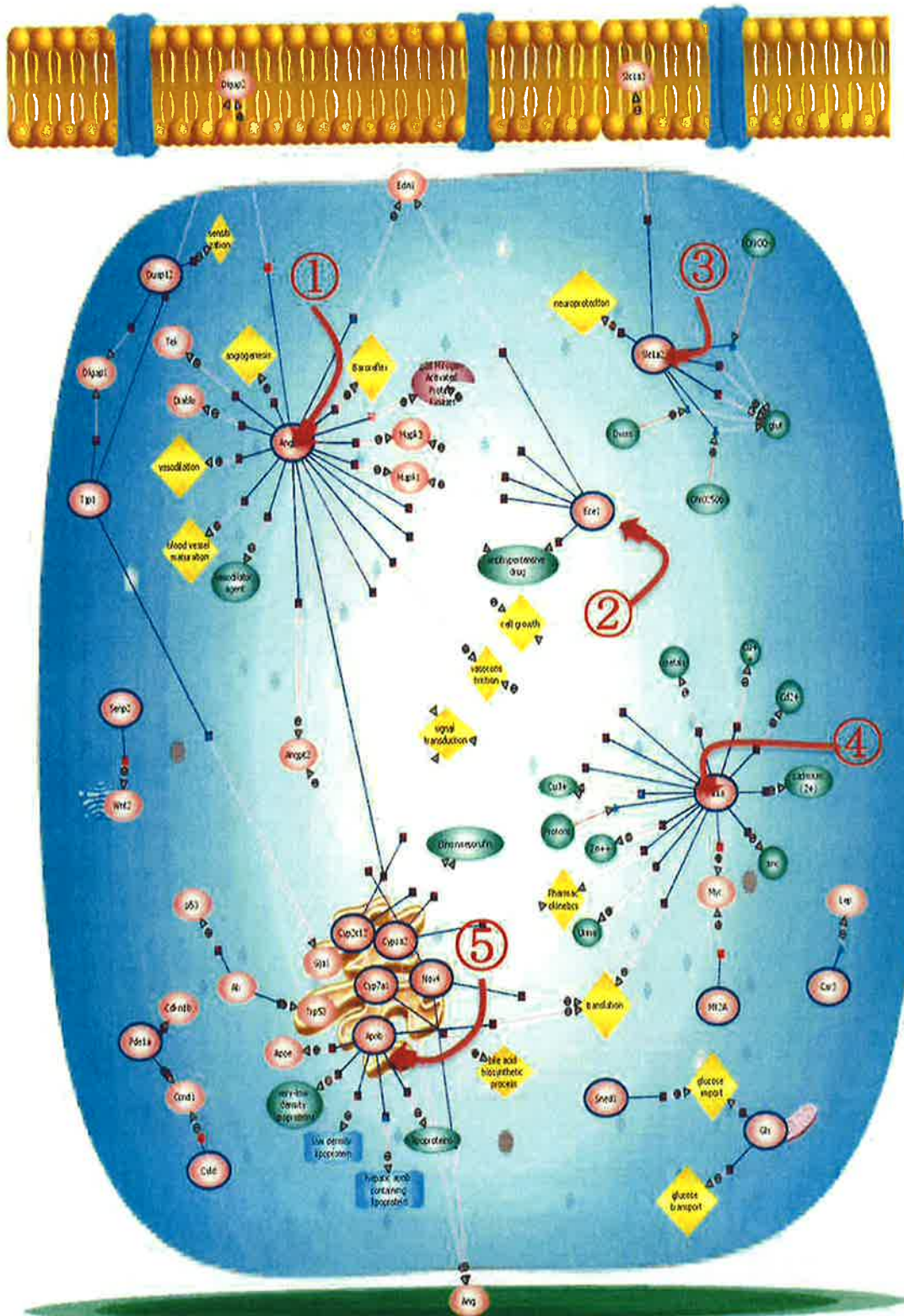
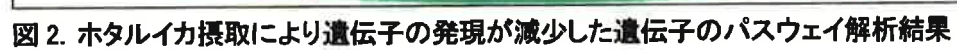


図1. ホタルイカ摂取により遺伝子の発現が増加した遺伝子のパスウェイ解析結果



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¹⁶⁾。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¹⁹⁾。ASIP はメラニン色素の合成に関与し¹⁷⁾、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¹⁹⁾。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¹⁸⁾。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¹⁹⁾。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²⁰⁾。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²¹⁾。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	β 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	β 細胞機能不全に関連
CDKAL1	未測定	β 細胞機能不全に関連
CDKN2A/2B	未測定	β 細胞機能不全に関連
IGF2BP2	未測定	β 細胞機能不全に関連
HNF1B	未測定	β 細胞機能不全に関連
WFS1	未測定	Wolfram 症候群
JAZF1	未測定	β 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²¹⁾。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, (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
- 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 sintillans）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¹⁾。

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²⁾を多く含む³⁾。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¹⁾。

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⁴⁾。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⁵⁾。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°C で保存した。

表 1 食餌組成

	対照	ホタルイカ 生粉末	ボイルホタ ルイカ粉末	素干しホタ ルイカ粉末
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 ¹	4	4	4	4
ビタミン混合 ¹	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 ²	—	5	—	—
ボイルホタルイカ粉末 ²	—	—	5	—
素干しホタルイカ粉末 ²	—	—	—	5
スクロース	63.6	58.6	58.6	58.6

¹ハーバー組成 ²凍結乾燥粉末

採取した血清中の AST、ALT、 γ -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、 γ -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、 γ -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))、 α -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, IU/L	8 ± 1	8 ± 2	8 ± 2	7 ± 1
総コレステロール, mg/dL	100 ± 10	95 ± 7	97 ± 6	96 ± 5
HDL-コレステロール, mg/dL	42 ± 2	48 ± 2**	48 ± 2**	48 ± 2**
LDL-コレステロール, 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 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 ± 13.4 歳であった。試験前の BMI は 26.4 ± 4.0 、体脂肪率は 26.1 ± 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 $1881 \pm 585 \text{ kcal}$ 、コレステロール摂取量は $291 \pm 136 \text{ mg}$ 、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、 γ -GTP およびコリンエステラーゼ値を表 10 に示した。AST、ALT、 γ -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, μ 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、 γ -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
γ -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⁶⁾。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⁷⁾、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⁷⁾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、 γ -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⁹⁾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)。

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、