

## 研究成果

<p>サブテーマ名:赤潮プランクトンの生理化学的分析 小テーマ名:アルギン酸オリゴマーの免疫活性化作用の活用(オリゴマー含有飼料の開発)</p>
<p>サブテームリーダー:長崎大学・水産学部・海洋生物機能科学講座、教授、藤田雄二 研究従事者:長崎大学・水産学部・海洋生物機能科学講座、教授、小田達也 (財)長崎県産業振興財団、研究員 中島琢自 (財)長崎県産業振興財団、研究補助員 宮崎洋介 別府大学食物栄養科学部、教授 村松毅 別府大学食物栄養科学部、助教授 高松伸枝 長崎県総合水産試験場、種苗量産技術開発センター、所長 池田義弘 長崎県総合水産試験場、種苗量産技術開発センター、魚類科長 宮木廉夫 長崎県総合水産試験場、種苗量産技術開発センター、主任研究員 築山陽介 林兼産業株式会社、三代健造 林兼産業株式会社、門田洋二</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>研究の概要</p> <p>酵素処理で得たアルギン酸オリゴマーはマクロファージに対して、強いサイトカイン放出誘導作用を発現することを見出している。この作用は元の高分子アルギン酸の数十倍と著しく上昇しており、さらにマウスへのアルギン酸オリゴマー腹腔内投与により、血中サイトカインレベルの著しい上昇も確認された。一方、高分子アルギン酸のマウスでの効果は極めて弱いものであった。これらの結果から、アルギン酸のオリゴマー化により、細胞レベルでのサイトカイン放出誘導活性の上昇に加え、生体レベルでの吸収動態の著しい改善の達成に伴う生理活性の改善ができたと推定される。平成17年度、酵素処理で得たアルギン酸オリゴマー混合物を重量比で5%添加した養殖魚用配合飼料を調製し、長崎県の新たなブランド魚として開発中のマハタ稚魚に一定期間投与し、その成長及び沖だし後のウイルス感染症に対する抵抗性について調べた。アルギン酸水溶液は一般に非常に粘性が高く、特異的酵素分解処理の際、この高い粘性がしばしば問題となる。施設内での飼育から沖だしに移行する時期(夏季)に長崎県沿岸域では毎年ウイルス性神経壊死症(VNN)が蔓延し、養殖魚の大量斃死を引き起こす原因となっている。通常の餌による飼育後のマハタ稚魚では沖だし後、その半数以上が斃死し、症状からVNNが原因と推定された。一方、アルギン酸オリゴマー添加飼料で飼育した群では80%近くが生残し、コントロール群とは際立った相違が認められた。これらの結果は、アルギン酸オリゴマー混合物を重量比で5%添加した養殖魚用配合飼料はマハタ稚魚の成長に対して、何らマイナス効果を示さず、栄養学的にも問題無いことを示すと共に、アルギン酸オリゴマーの免疫賦活作用がマハタVNN感染症に極めて有効に作用したことを示唆する。</p> <p>研究の独自性・新規性</p> <p>高分子アルギン酸は食品添加物あるいは医薬品分野に広く利用されているが、低分子化オリゴマーでの研究或いは応用例は極めて少ない。本研究ではアルギン酸オリゴマーの強いサイトカイン放出誘導活性に着目し、養殖魚のウイルス感染症対策との観点から、アルギン酸オリゴマーを含有する養殖魚餌を開発しようとする試みである。</p> <p>研究の目標(フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に)</p> <p>フェーズ1:(1) マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞に対する精製アルギン酸オリゴマーのサイトカイン放出誘導活性に関する解析を行い、オリゴマーの構造と活性との関連性についての基礎的知見を得た。</p> <p>フェーズ2:(1) マウスに対してアルギン酸オリゴマーを腹腔内或いは経口投与後、血中サイトカインレベルの経時的变化を解析し、in vivoでの効果を評価した。</p> <p>フェーズ3:アルギン酸オリゴマーを添加した魚餌を開発し、特にマハタ養殖での応用実験を行った。マハタ養殖においては沖だし後、VNN(ウイルス感染症)による斃死が大きな問題となっていることから、アルギン酸オリゴマーの免疫賦活作用の本ウイルス病対策としての有効性について検討する。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況(目標と対比して)</p> <p>本年度、免疫賦活化実験においてマハタの沖だし実験で成果が得られた。すなわち、アルギン酸オリゴマー5%添加餌投与群がコントロール群に比べ生残率が約2倍と優位に高い結果となった。来年度は同様な実験により、この成果の再現性を得ることが大変重要である。さらに、マウスでのin vivo実験を継続し、その作用機構の解明に関する実験に取り組む。高濃度アルギン酸オリゴマー含有餌の調製法(10%レベル)は企業との共同研究で開発中である。オリゴマー含有餌の大量調製に関しては林兼産業との共同開発研究がスタートした。工業的レベルでの生産における問題点として、コスト、品質管理等につて、林兼産業と、</p>

さらに密接な情報交換と共同研究を遂行する。

アルギン酸オリゴマーの構造と免疫賦活作用との構造活性相関に関する研究結果はほぼ網羅的データとして得られ、投稿中の論文が受理された。マウスを用いたin vivo実験でのアルギン酸オリゴマーの免疫賦活作用に関する解析は、別府大学との共同研究によりさらに総括的に取り組み、経口および腹腔内投与何れにおいても、血中サイトカインレベルの上昇が認められている。

**主な成果**

具体的な成果内容：

アルギン酸オリゴマーの構造と免疫賦活作用との構造活性相関に関する研究成果をまとめた論文が、国際的にも評価が高いFEBS Lettersに掲載された。アルギン酸オリゴマーのマクロファーへの添加により、TNF- $\alpha$ 、その他、G-CSF、IL-1、IL-6などのサイトカイン放出誘導作用が見出されている。アルギン酸オリゴマーをマウス腹腔内に投与した結果、血中G-CSFレベルの上昇が観察された。これに対してTNF- $\alpha$ の検出レベルは低値であった。従って、これまでのところ、マウスではアルギン酸オリゴマーで誘導される主要なサイトカインはG-CSFと推定される。比較的精製が容易で大量調製が可能な3量体オリゴマーについて詳細にその活性と構造について検討した。その結果、酵素処理及び酸加水分解で得られるオリゴマーの活性に相違が認められたが、基本的には3量体オリゴマーに強いサイトカイン放出誘導活性が確認された。

特許件数：2

論文数：12

口頭発表件数：6

**研究成果に関する評価**

1 国内外における水準との対比

アルギン酸高分子の細胞に対するin vitroにおけるサイトカイン放出誘導作用に関する国内外における研究報告例はこれまで数報あるものの、低分子化アルギン酸オリゴマーでの発見は本研究が初めてである。また、その活性は元の高分子アルギン酸に比べ、著しく高い点、大変興味ある発見といえる。その詳細なメカニズム及び構造活性相関についてはさらに検討が必要である。また、このアルギン酸オリゴマーの免疫賦活作用を利用した養殖魚感染症対策餌の開発はこれまであまり例が無く、ユニークな取り組みである。平成17年度のマハタでの実験結果では、ウイルス感染症に対して、経口投与においてもある程度の効果が期待できることを示唆している。養殖産業において、感染症は大変大きな問題であり、その対策法としてアルギン酸オリゴマー含有餌の開発は今後さらに検討すべき課題である。

2 実用化に向けた波及効果

養殖の現場ではさまざまな感染症が大きな問題となっている。特にウイルス感染症対策は多くの難しい問題を含んでおり、ワクチン開発も実用化には多くの時間を要する。此の様な現状において、アルギン酸オリゴマーの免疫賦活作用を利用した感染症対策餌が開発されればその利用価値は大変高いと言える。

**残された課題と対応方針について**

文教地区でのマハタウイルス感染実験において、水質の悪化が大きな問題で、施設的に限界があると思われる。マハタウイルス感染実験については今後、水産試験場との共同研究で、水産試験場での実施を検討する。

	JST負担分(千円)							地域負担分(千円)							合計
	H13	H14	H15	H16	H17	H18	小計	H13	H14	H15	H16	H17	H18	小計	
人件費	0	0	0	6,471	7,880	3,844	18,195	0	0	0	0	6,155	9,060	15,215	33,410
設備費	0	0	0	9,051	14,178	2,781	26,010	0	0	0	0	0	0	0	26,010
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	0	1,366	1,000	1,783	9,134	5,945	19,228	0	0	0	0	4,000	8,775	12,775	32,003
旅費	0	0	0	462	699	95	1,256	0	0	0	0	0	0	0	1,256
その他	0	0	0	56	44	20	120	0	0	0	0	0	0	0	120
小計	0	1,366	1,000	17,823	31,935	12,685	64,809	0	0	0	0	10,155	17,835	27,990	92,799

**代表的な設備名と仕様[既存(事業開始前)の設備含む]**

JST負担による設備：安全キャビネット、マルチスキャンスペクトラム、ハイエンド電動実体顕微鏡、示差屈折計、真空凍結乾燥機システム、ミニジャーファーマンター  
 地域負担による設備：濃縮乾燥装置

複数の研究課題に共通した経費については按分する。