

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、 ω -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_3 -Methanol 溶液で、 100°C 、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、 α -リノレン酸を総油量の約 24%、 γ -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、 α -リノレン酸（総油量の約 7%）、 γ -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、 α -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、 α -リノレン酸（総油量の約 23%）、 γ -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、 α -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 NaHCO₃, 1.5 g MgCl₂ · 6H₂O, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.2 g KCl, 0.2 g CaCl₂ · 2H₂O, 1 g KNO₃, 35 mg K₂HPO₄, 1.89 mg EDTA-Na₂ · H₂O, 2.44 mg FeCl₃ · 6H₂O, 41 μg ZnCl₂, 610 μg H₃BO₃, 15 μg CoCl₂ · 6H₂O, 41 μg CuCl₂ · 2H₂O, 41 μg MnCl₂ · 4H₂O, 380 μg (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 41 μg VOCl₂ 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。

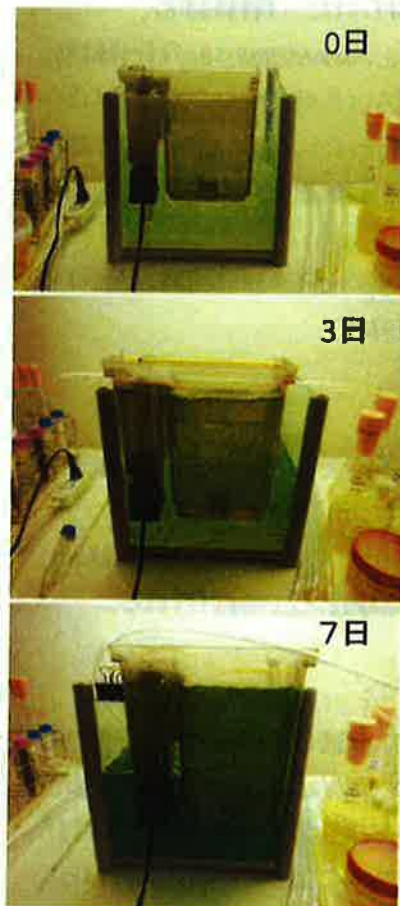


図 1. *Tetraselmis* sp. の開放容器における増殖試験。0日目に藻体密度 4.1×10^4 cells/mL で開始したところ 7日目には 5.8×10^5 cells/mL に到達した。そして、この間、コンタミネーションによって引き起こされる培養液の大きな濁りや泡立ちなどは観察されなかった。培地量約 8L, 水深 10cm で実施。

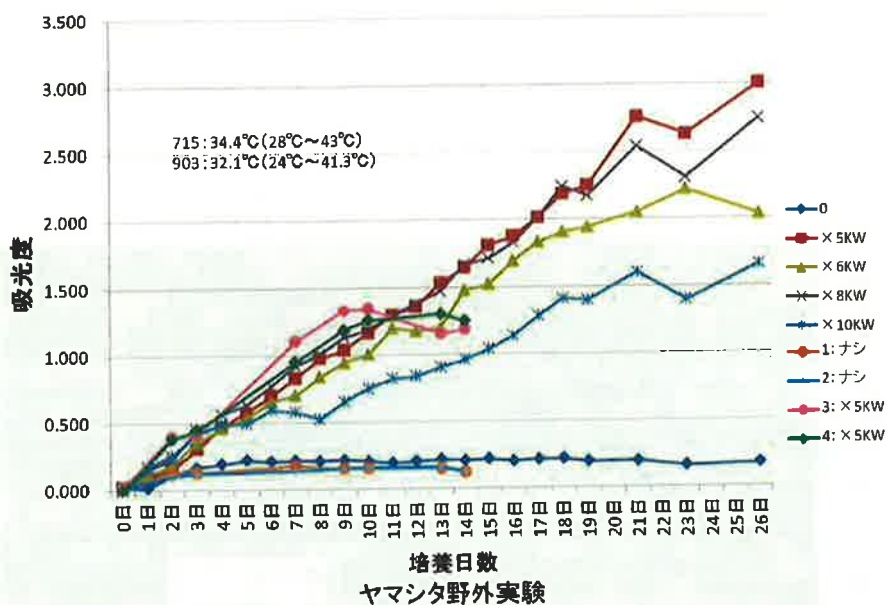


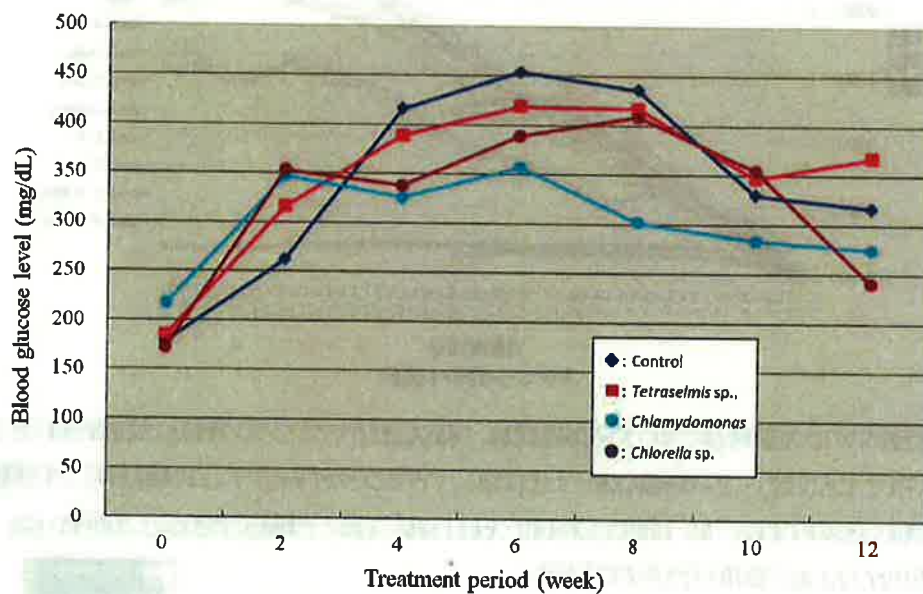
図 2. 野外での大量培養に向けた基礎試験。株式会社ヤマシタの敷地に設置されたビニールハウス内（上左図）での培養試験（上右図）。ヤマシタが保有する自噴温泉に 5 倍量の KW 溶液を入れたものでは、26 日間で 8×10^7 cells/mL にまで増殖できることが判った。いずれも *Chlorella* sp. を用いたものである。



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。

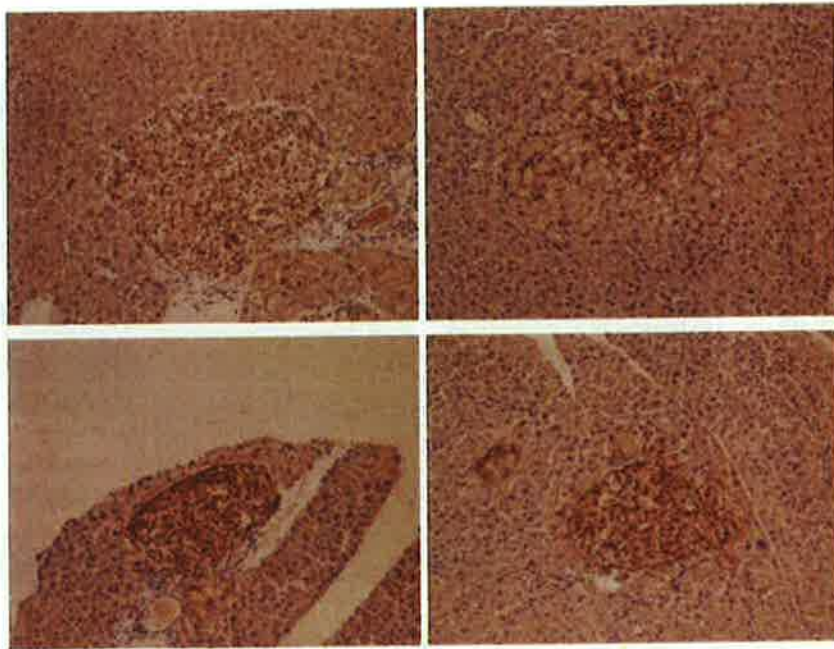
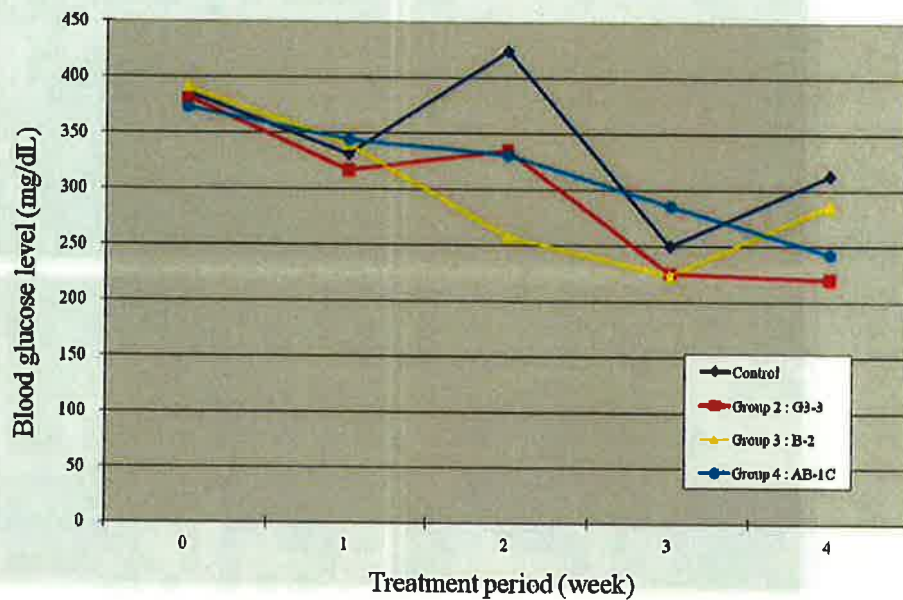


図 6. マウス脾臓のランゲルハンス島内における M2 マクロファージの浸潤状況。ランゲルハンス島の切片をマクロファージ抗体で染色した。上段はコントロールで，下段が *Chlamydomonas* sp. を投与したマウスのも。免疫染色で褐色になった部分の縮小が下段で確認できる。



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。