

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05820

研究課題名(和文) 紅藻類に含まれる急性胃腸炎原因アニサキス寄生虫に対する新規駆虫物質に関する研究

研究課題名(英文) A anthelmintically active compound for acute gastroenteritis caused by anisakis parasite containing in a red algae

研究代表者

浅川 学 (Asakawa, Manabu)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授

研究者番号：60243606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アニサキス寄生虫の感染力を寒天侵入測定法に準じた方法で検討した。即ち、加温溶解させた寒天を入れた試験管につき、固化後その表面に1mm程度の穴を開け、さらに3cmの高さに生理食塩水を重層した。この試験管にアニサキスを入れ、寒天層への穿入能力を観察した。比較対照として用いたメントールを溶解させた生理食塩水を使用した。メントールを添加した試験管ではアニサキスは寒天に侵入しなかったが、被験物質無添加の試験管では活発に寒天層に侵入していた。これによりアニサキスの感染力の有無を明確に観察でき、本試験がアニサキス寄生虫の不規則運動を抑制する活性成分のスクリーニングに適した方法であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生鮮水産物を原因とするアニサキス寄生虫症(消化管内で不規則運動をする可動性虫体が胃腸壁に穿入することによる急性胃腸炎)が、近年、急増し、食品衛生上の大きな問題となっている。本疾患の治療法は、内視鏡による可動性虫体の摘出が一般的があるが、治療薬の早急な開発が社会的急務となっている。有用生理活性物質の探索中に、紅藻類に胃腸壁穿入の原因となる本寄生虫の不規則運動を抑制する活性成分の存在を確認した。本研究課題では、この活性成分の諸性状を明らかにするとともに、アニサキス寄生虫に対する安全で効果的な治療薬(駆虫薬)を開発するための基礎データを集積することを目的としている。

研究成果の概要(英文)：Digenea simplex, a red algal species is distributed in tropical and subtropical regions. This species contains kainic acid, which is a cyclic analog of glutamate and one of the most potent excitants in the mammalian central nervous system. However, little is known about the exact free amino acid composition of this species. This study aimed to determine the free amino acid composition of this algae, and to clarify the production mechanism of kainic acid. Free amino acid composition was then determined using an amino acid analyzer. It was possible to distinctly separate kainic acid from other structurally analogous imino acids (hydroxyproline and proline). A total of twenty-three free amino acids were detected. Of these amino acids, the primary component was kainic acid, followed by alanine, glutamic acid and γ -aminoadipic acid.

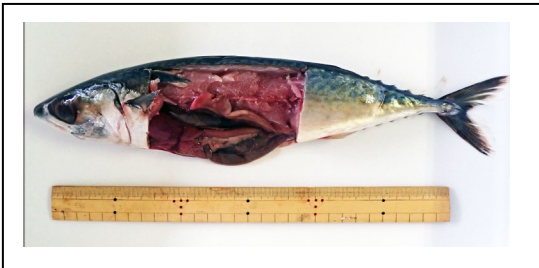
研究分野：海洋生物資源化学

キーワード：アニサキス寄生虫 急性胃腸炎 寒天侵入測定法 不規則運動抑制 紅藻類 精油成分

1. 研究目的

近年、食品の低温輸送技術の飛躍的な発達などにより、生鮮水産物の生食を原因とするアニサキス寄生虫症（患者の消化管内で不規則運動をする可動性虫体が胃腸壁に穿入することにより発症する劇症型急性胃腸炎）が、日本国内で多数報告され、水産上および食品衛生上の大きな問題となっている。本疾患の一般的な治療法は、内視鏡（生検鉗子）による可動性虫体の摘出であるが、患者に肉体的負担を伴うことや他に有効な治療法も無いことから、治療薬（駆虫薬）の早急な開発が社会的急務となっている。そこで本研究では、本疾患発症の代表的な水産物であるマサバを日本近海の海域ごとに採取し、アニサキス寄生虫の形態学的同定後、その分布状況を検討した。次いで、アニサキス寄生虫による急性胃腸炎治療薬探索に応用できるアニサキス寄生虫の感染力（消化管壁への穿入能力）評価法として、寒天侵入率測定法の有用性について検討した。さらに、本評価法を用いてアニサキス寄生虫の駆虫物質の探索を試みた。

(A)



(B)

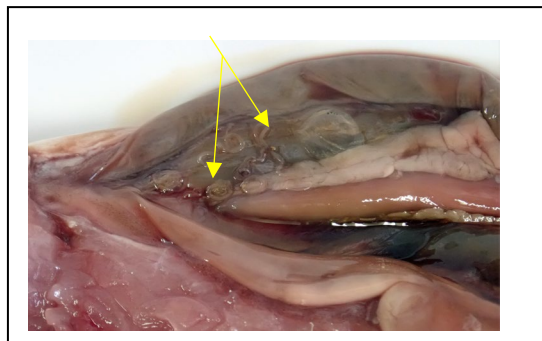


図 1. 日本周辺海域に生息するマサバに寄生するアニサキス寄生虫

(A) マサバ (B) マサバに寄生するアニサキス寄生虫

2. 実験方法

1) 生鮮水産物におけるアニサキスの寄生数と分布の検討

広島県および和歌山県内の小売店から購入した日本国内（青森県、石川県、和歌山県、鳥取県、島根県、広島県、高知県、福岡県、長崎県）の鮮度良好のマサバの内臓から、アニサキスを1隻ずつピンセットで取り出し、生理食塩水を満たした滅菌シャーレに移し、供試したマサバ個体あたりの虫体数を測定した。なお採取したアニサキスは、片平浩孝博士（三重大学大学院生物資源学研究科）により、形態学的特徴の観察および胃長（簡易的に食道長）と体長の比を測定することにより同定された。

2) アニサキスの感染力評価法の検討

アニサキスの感染力評価を寒天侵入測定法（大石ら、1975年）に準じて検討した。すなわち、蒸留水を用いて加温溶解させた寒天を試験管（ $\phi 1.5 \times 15$ cm）に7 cmの高さに入れ、固化後その表面に1 mm程度の穴を開け、さらに3 cmの高さに生理食塩水を重層した。この試験管にアニサキス（10隻）を入れ、寒天層への穿入能力を観察した。この際、比較対照としてアニサキスの活動能力低下が認められるメントールおよび、アニサキス症を発症するリスクの高い料理であるしめ鯖において使用されるコンブを水抽出して作成したコンブ出

汁を溶解させた生理食塩水を使用した。

3) アミノ酸組成分析

カイニン酸の含量やアミノ酸組成を比較することと、カイニン酸の誘導体の存在を検討することを目的とし、各試料のアミノ酸組成を調査した。即ち、粉碎した試料 5.0 g に 75%エタノール 25 ml を加え、80℃湯浴上で 20 分間加熱還流抽出を行い、遠心分離して上清を得た。さらに、残渣について同様の操作を 3 回繰り返して、上清を合一し、遊離アミノ酸の抽出液とした。この抽出液を濃縮後、蒸留水 5 ml に溶解した。次いで、メタノール(A) 10 ml で 2 回、0.1%TFA(B) 10 ml で 1 回、最後に A:B=1:4 の溶液 10 ml で順次洗浄することにより活性化させた Sep-Pak C18 (Waters 社製) 2 個を連結させたシリンジを用いて処理し、溶出液(I)、溶出液(II)を回収した。溶出液(I)、(II)は、合一した後、減圧下で濃縮乾固し、蒸留水(HPLC 用) 2 ml に溶解するとともに、クロマトディスクでろ過し、1 ml をオートサンプラー用のバイアルに注入し、50 μ l を全自動アミノ酸分析装置(JEOL JLC-500/V2)に導入した。

3. 結果・考察

1) 産地別のマサバにおけるアニサキスの寄生数を調査した結果、太平洋側で漁獲されたマサバにおけるアニサキスの寄生率は、日本海側で漁獲されたマサバに比べて低かった(図 1)。これは黒潮の流れの異変による可能性が高い。また、瀬戸内海で漁獲されたマサバも太平洋側で漁獲されたマサバと同様にアニサキスの寄生が殆ど見られなかった。この理由として、マサバの回遊との関係などから広島県で漁獲されるマサバにはそもそもアニサキスが寄生しにくいという可能性が考えられる。一方、マサバ 1 尾あたりのアニサキスは最大で 155 隻(長崎県産)であり、調査したマサバ全 106 尾のうち一尾当たりの 100 隻を越えている個体は 8 尾(7 尾においては長崎県産であり、1 尾のみ石川県産)であった。またマサバの内臓に寄生するアニサキスはその殆どが *Anisakis pegreffii* であったが、島根県産のマサバに寄生していたアニサキスは *Anisakis simplex (s. s)* であった。*A. pegreffii* は主に日本海側で多く寄生が見られる種であり *A. simplex(s. s)* は太平洋側に多く寄生が見られる種である。また、両方の海域に面する青森県では *A. simplex(s. s)* が多く見られる。この 2 種は互いに完全な分断がなされているわけではないため、島根県と青森県で期待と異なる種が同定されたことは不思議ではない。また 2 種間にはハイブリッド種も存在しているため形質的な同定は精度の低い同定方法であるため今後はより精度の高い遺伝子解析を行う予定である。

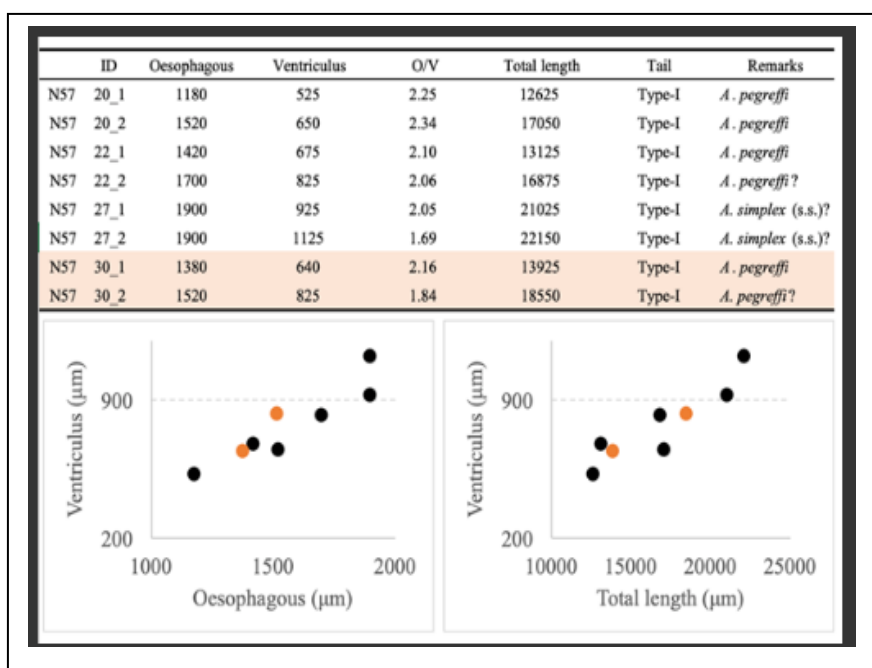


図2. 日本周辺海域に生息するマサバに寄生するアニサキス寄生虫の同定結果

N57-20-1, N57-20-2:青森県産、N57-22-1, N57-22-2:長崎県産、N57-27-1, N57-27-2:島根県産、N57-30-1, N357-30-2:福岡県産

2) メントールを添加した試験管ではアニサキスは寒天に侵入せず寒天上での運動も見られなかった。それに対して被験物質無添加の試験管やコンブ出汁を添加した試験管では活発に寒天層に侵入していた。アニサキスの運動制御に有効な物質添加では寒天層への侵入があり、無効な物質の添加あるいは被験物無添加の試験管では侵入がない。以上、寒天侵入試験を行うことでアニサキスの寒天層への侵入能力の有無を目視にて明確に観察できた。それにより、この試験はアニサキス運動制御への効果の評価を行うために適した実験であることが確認できた。

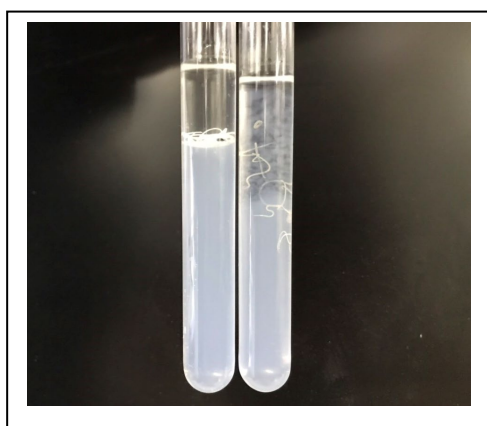


図3. アニサキス運動制御への効果の評価法 (メントールを添加した試験管:左)

(A) 上層（生理食塩水）にメントールを添加した試験管（左）

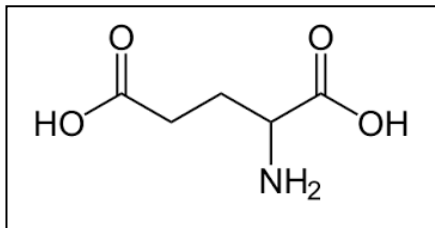
(B) 上層（生理食塩水）にメントール無添加の試験管（右）

被験物質無添加の試験管ではアニサキスの運動および寒天への侵入が見られる試験管が多く、一方で0.5%メントール(w/w)および2.5%リモネン(v/v)（図4.）を添加した試験管では、アニサキスは寒天への侵入はなく、アニサキスの侵入能力低下に効果があると考えられる。被験物質無添加およびマクリ（沖縄県産紅藻類）粗抽出液(75 μ l/ml)を添加したウェルではアニサキスは弱いながらも運動抑制が認められた。一方でリモネン0.5%(v/v)では虫体は生きているものの、3時間以内に運動は抑制されていた。寒天侵入測定法において、アニサキスの生死の判定が容易に判断できないといった点をこの評価法では行うことができた。

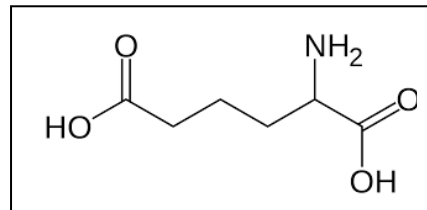
3. アミノ酸組成分析

マクリのアミノ酸組成を調べた結果、産地によってアミノ酸組成がかなり異なっていることが考えられる。その中でも特に共通しているのは α -アミノアジピン酸(AAA)の含有量がどの産地でも比較的多いことだ。 α -アミノアジピン酸はグリア毒性を示すことで知られていて、カイニン酸と同様に神経毒性に関与するアミノ酸である。また神経興奮毒性活性を持つグルタミン酸も今帰仁産や大崎産のマクリで、多くの割合を占めている。カイニン酸と同様に神経毒性を持ち、かつマクリに多く含まれると考えられる α -アミノアジピン酸とグルタミン酸は互いに化学構造が類似しており（図4）、カイニン酸の誘導体であることも考えられる。それを明確にするには今後、さらなる調査を行っていく必要がある。

(A)



(B)



(C)

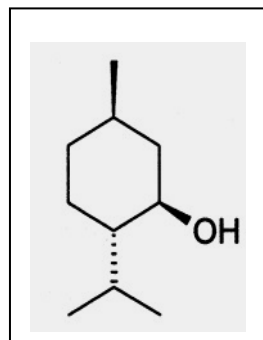
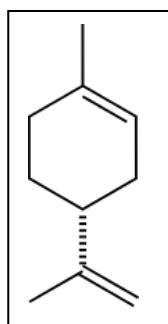


図4. 紅藻類由来のグルタミン酸 (A)、 α -アミノアジピン酸 (B) と柑橘系由来のリモネン(C: 左)、メントール（標準物質、C: 右）の化学構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Manabu Asakawa, Takuya Matsumoto, Kohei Umezaki, Kyoichiro Kaneko, Ximiao Yu, Gloria Gomez-Delan, Satoshi Tomano, Tamao Noguchi, Susumu Ohtsuka	4. 巻 11
2. 論文標題 Toxicity and Toxin Composition of the Greater Blue-Ringed Octopus <i>Hapalochlaena lunulata</i> from Ishigaki Island, Okinawa Prefecture, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 245-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins11050245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 浅川 学	4. 巻 81
2. 論文標題 水産食品の安全管理、魚介類を介した食中毒の現状と対策	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 瀬戸内海	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Manabu Asakawa, Gloria Gomez Delan, Tamao Noguchi, Susumu Ohtsuka
2. 発表標題 Free amino acid composition of a red algal species (<i>Digenea simplex</i>) containing neuroexcitotoxic kainic acid from Ishigaki Island, Okinawa, Prefecture, Japan
3. 学会等名 20th World Congress of the International Society on Toxinology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅川 学、梅崎航平、藤井美和子、松本拓也、大竹純也、門田信幸、瀧口謙一、金子恭一郎、于 夕森、大塚 攻
2. 発表標題 日本産ヒョウモンダコ <i>Hapalochlaena fasciata</i> の毒性と毒成分
3. 学会等名 第114回（公社）日本食品衛生学会 学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅川 学、金子恭一朗、梅崎航平、藤井美和子、于 夕森、山西秀明、松本拓也、高谷智裕、荒川 修、齋藤俊郎
2. 発表標題 和歌山県産オウギガニ科カニ類の毒性
3. 学会等名 第114回 (公社)日本食品衛生学会 学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 落合芳博、石崎松一郎、神保 充 編 (浅川 学分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 198
3. 書名 水産・食品化学実験ノート	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------