

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450285

研究課題名(和文) 培養細胞を利用した養殖クロマグロ品質改善システムの構築

研究課題名(英文) Study on the systems of improving meat qualities using cultured cell

研究代表者

塚正 泰之 (TSUKAMASA, Yasuyuki)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：90298943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞等を用いて品質改善に役立つ成分を調べた。ヒト正常線維芽細胞を用いてUV誘導光老化を抑制する成分を検討し、植物エキスXが細胞内活性酸素濃度と活性酸素種で活性化されるp38MAPKの活性を低下させることを確認した。

腸管吸収モデルとしてヒト結腸癌由来のCaco-2細胞を用い、野菜搾液中の水銀吸収阻害物質をスクリーニングした。

その結果、分子量3000前後のシシトウ成分に高い水銀吸収阻害活性が認められた。

活魚の血管への抗酸化物質の注射によって、カテキン130 $\mu\text{mol/g}$ とL-アスコルビン酸ナトリウム1.3 $\mu\text{mol/g}$ が同等のメト化抑制効果を持ち、pHと破断強度の低下も抑制することを確認した。

研究成果の概要(英文)：UV-induced photoaging effect was examined by human normal fibroblast. Plant extract X reduced the concentration of reactive oxygen species (ROS) in cells and p38MAPK activity which was activated by ROS.

The human colon cancer cell line Caco-2 was used as an intestinal absorption model. Mercury absorption inhibitors of various vegetables squeezing olution were screened. High mercury absorption inhibitory activity was observed in green pepper component of which molecular weight was around 3000.

It was found that 130  $\mu\text{mol/g}$  of catechin and 1.3  $\mu\text{mol/g}$  of sodium L-ascorbic acid had equivalents of inhibition effect of metmyoglobin formation, also suppression effects of lowering of pH and breaking strength by injection into the blood vessels of live fish.

研究分野：水産化学

キーワード：細胞培養 繊維芽細胞 光老化 水銀 メト化

## 1. 研究開始当初の背景

天然資源に依存しない完全養殖クロマグロの存在が年々大きなものになりつつあるが、皮膚からの感染症による弊死の多発、配合飼料の難消化性、肉のメト化による赤色の退色などの問題点がある。

(1) 皮膚からの感染症による弊死 クロマグロは、幼魚、成魚ともに皮膚が弱く、皮膚の損傷によって感染症を引き起こし弊死要因となるため、皮膚における抵抗力の強さは重要である。対策として皮膚傷害の治癒効果を高める物質を投与する方法が考えられる。天然物由来の薬理効果を有する物質を探索するため、魚鱗由来の線維芽細胞、骨芽細胞および破骨細胞からそのスクリーニングシステムを構築する。

(2) 配合飼料の難消化性 養殖クロマグロは現在のところ、一般的には生餌しか食べないため、それが生産コストを押し上げる一因になっている。クロマグロの稚魚の入手は年に1度の産卵期に限定され、短期間に実験を終了させなければならないという大きな問題がある。クロマグロの腸管上皮細胞を培養して腸管モデルを作成し、それを用いて種々の加工工程によって製造された配合飼料の吸収度を調べることにより、クロマグロにとって吸収が容易な配合飼料の開発が加速されることになる。

(3) 肉のメト化による赤色の退色 クロマグロの食品としての最も重要な品質指標は赤い肉色であるが、ミオグロビンに由来するこの赤色は冷蔵中に褐色化(メト化)が進む。魚体を用いたメト化抑制試験では時間とコストがかかるため、筋肉細胞を用いたメト化抑制物質のスクリーニングシステムを構築する。

## 2. 研究の目的

完全養殖クロマグロの品質(皮膚の耐久性・成長速度・餌料効率・肉色など)の改善を最終目標に、培養細胞を利用したシステムの構築を試みる。品質評価指標ごとに線維芽細胞・腸管上皮細胞・骨格筋細胞などの培養系を樹立し、従来は活魚を用いて行われてきた各種試験の対象を培養細胞に置き替えることにより、より多くの試験を短時間で行うシステムを構築する。

(1) 太陽光からの紫外線刺激を皮膚の細胞(表皮細胞、線維芽細胞)が受けると、細胞内で活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)の濃度が高まり、コラーゲンを分解する真皮マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MMP-1)の発現が高まる。皮膚細胞内で発生した過剰な ROS がイニシエーターとなることから、この発生した ROS を消去することで皮膚の老化を軽減でき、抗酸化作用を有するビタミンやファイトケミカルの積極的な摂取が有効と考えられている。ROS をイニシ

エーターとした MMP-1 の発現を指標にスイカスプラウト (CS) および摘果スイカ (A7) エタノール抽出物を評価した。

(2) ヒト結腸癌由来の細胞 (Caco-2 細胞) による腸管モデルを用いて、各種野菜搾液中の水銀吸収阻害物質のスクリーニングと有効成分の同定を行う。

(3) 骨格筋細胞の培養が不調に終わったため、活魚に各種天然物質を直接注射することで冷蔵中のメト化と物性劣化抑制物質をスクリーニングするとともに、注射操作による肉質への影響についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 供試サンプルの調製 CS および A7 のエタノール抽出物を減圧濃縮後、凍結乾燥処理した。100 mg/mL となるように溶解し、細胞試験に供した。

細胞培養 正常ヒト皮膚線維芽 (HDF) 細胞は正常ヒト皮膚線維芽細胞増殖用無血清培地 FibroLife に増殖添加剤セット FibroLife LifeFactors を添加し、37、95% 空気-5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。

細胞生存率の測定 HDF 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL に調整し、96 ウェルマルチプレートに 100  $\mu$ L/well ずつ播種後、CS エタノール抽出物および A7 のエタノール抽出物をそれぞれ添加し、培養した。48 時間後細胞培養液中に Premix WST-1 試薬を添加し、30 分間培養後、マイクロプレートリーダーを用いて波長 450nm の吸光度を測定した。

UV-B 照射実験 HDF 細胞をウェルマルチプレートに 1 mL ずつ播種し、その後無血清培地に切り換え、CS エタノール抽出物および A7 エタノール抽出物を終濃度が 100  $\mu$ g/mL となるように添加し 24 時間培養後、UV-B を 100 mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。

細胞内活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) の測定 HDF 細胞を 6 ウェルマルチプレートに 1.5 mL/well ずつ播種した。培養後、無血清培地に切り換え A7 エタノール抽出物を終濃度が 100  $\mu$ g/mL となるように添加した。培養後、UV-B を 100 mJ/cm<sup>2</sup> 照射し、照射 1 時間後に 160  $\times$  g、3 分間、4 にて遠心処理して細胞を回収した。PBS にて 3 度洗浄後、細胞を Muse Oxidative Stress Reagent working solution 200  $\mu$ L に溶解し、10 分間、37 でインキュベートした後、Muse Cell Analyzer にて細胞内の ROS の変化を測定した。

(2) 細胞培養 Caco-2 細胞を用いた。培地は高グルコース含有 DMEM 培地 500ml に、56 1 時間加熱済み FBS 50ml、ペニシリン・スプレプトマイシン混合液 5ml、L グルタミン 10ml を混合したものをを用いた。Caco-2 細胞をトランスウェルに撒き込み、37 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内

で培養した。細胞間結合の完成度を確認するために電気抵抗値の測定を行った。

**試料液の作製** 野菜をおろし器ですりおろした後、25、4000rpmで20分遠心分離する。上澄み液をシリジンで吸い取り、フィルターを通して除菌する。培地9.9mlに対して過滅菌した野菜汁0.1ml、500ppmメチル水銀0.2 $\mu$ lを混合したものを試料液とした。用いた野菜はレタス、キャベツ、アスパラガス、ホウレンソウ、タマネギ、ニンニク、ブロッコリー、セロリ、ショウガ、ニンジン、ジャガイモ、ダイコン、トマト、ナスである。

**トランスウェルへの試料液の添加** 腸管モデルが完成したものに関してはトランスウェル下部に培地を1.5ml、上部には試料液を0.75ml投入する。この作業は、トランスウェル1区画毎に電気抵抗の上がり方が異なってくるので、800になったものから随時行った。試料液を投入したトランスウェルはCO<sub>2</sub>インキュベーターに戻し、1時間、3時間、24時間後に回収する。サンプルの回収は一つの野菜についてトランスウェルの上部、下部、細胞部の3部分に分けて行う。回収したサンプルに60%硝酸を加え、マイクロ波分解装置により有機物を分解後、冷蒸気水銀分析計を用いて水銀量を測定した。この数値を用い、全水銀量に対する各画分の割合を計算した。

(3) 供試魚 マアジの活魚を前日に入手し、一晚安静に保ってから翌日、実験に供した。

**麻酔** 低温麻酔はマアジを水温約9の1/3人工海水に約5分間入れた。薬剤麻酔は18の人工海水に10%麻酔薬(オイゲノール10.7g、SDS5.0g、メタノール42.8ml、精製水55.5ml)を0.2ml/Lとなるように入れ、マアジを約7分間入れた。

**脱血** 麻酔後にマアジをまな板に取り上げ、23G x 1 1/4(0.60 x 32mm)の注射針で尾柄部の背骨下部の血管から2ml採血した。

**注射** 脱血と同じ手順で行い、生理食塩水にアスコルビン酸ナトリウム(ビタミンC)、乳化剤(SYグリスターMCA-750、阪本薬品工業株式会社)で乳化した $\alpha$ -トコフェロール(ビタミンE)、カテキンを溶かして注射液とし、体重150gあたり2mLを注射した。

**メト化率** Tangらの方法により行った。マアジ血合肉に40mMリン酸Buffer(pH6.8)を入れ、10000rpmで10秒間ホモジネートした。25000 x gで15分間遠心分離後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過し、525、582、557、503nmの吸光度を測定してメト化率を求めた。

**破断強度** マアジの背側の普通肉を幅1cmに切断し、直径3mmの円盤状プランジャーを使用して筋繊維に平行に6cm/分で測定した。

**組織観察** 定法により固定・脱水後、樹脂で包埋し、厚さ3mmの切片を0.1%トルイジンブルーで染色して、光学顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

(1) CS および A7 エタノール抽出物による HDF 細胞の増殖への影響

HDF 細胞に CS および A7 エタノール抽出物処

理したところ、100  $\mu$ g/mL 処理までは両サンプルで細胞の増殖に影響はなかった。200, 300  $\mu$ g/mL 処理では48時間後にはそれぞれ生細胞率がCSでは80.1%、71.3%、A7 エタノール抽出物では65.3%、48.7%となった(図1)。この結果から、細胞内情報伝達系の影響や MMP-1 発現確認試験では供試サンプルの濃度を100  $\mu$ g/mLとした。

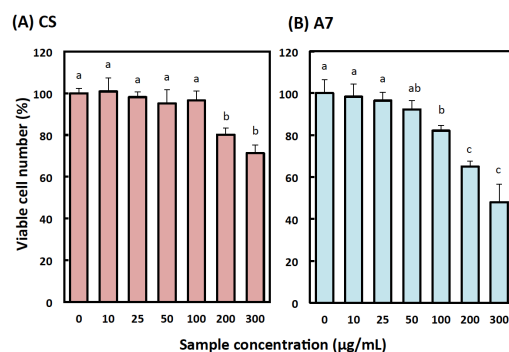


図1. CS および A7 エタノール抽出物による HDF 細胞増殖への影響

(A) CS (B) A7 エタノール抽出物

A7 エタノール抽出物による UVB 照射処理 HDF 細胞における活性酸素種の産生増加と p38 MAP キナーゼの活性化抑制

UV-B 照射後の HDF 細胞内では活性酸素種 (ROS) が産生され、細胞内の濃度が高まる。この産生した ROS がチロシノフォスファターゼを酸化することにより、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ等のシグナル伝達のカスケードの活性増強を導き、転写因子 activator protein-1 (AP-1) を活性化し、MMP の発現を誘導することで MMP-1 の mRNA と蛋白の発現増加を誘導する。そこで、細胞内の活性酸素種濃度を Muse cell analyzer の Oxidative Stress kit により測定した。

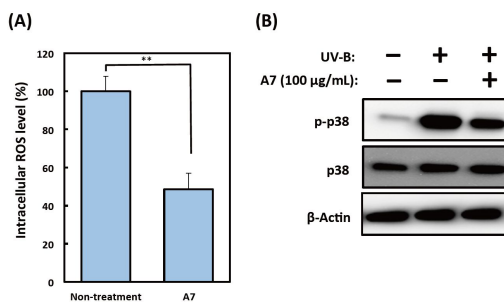


図2. A7 エタノール抽出物処理 UVB 照射 HDF 細胞における細胞内 ROS 濃度および p38 MAP キナーゼ活性の低下

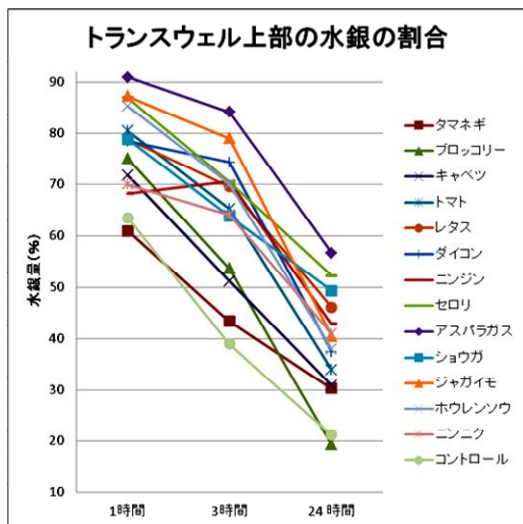
(A) UV-B 照射 HDF 細胞における細胞内 ROS 濃度 (照射後1時間)

(B) UV-B 照射 HDF 細胞における p38 MAP キナーゼ活性 (照射後1時間)

また、酸化ストレスキナーゼである p38 MAP キナーゼの活性化（リン酸化）についても検証した。その結果、無処理の UV-B 照射後（照射 1 時間後）の HDF 細胞内で発生する ROS 量を 100% とした時、A7 エタノール抽出物で処理した HDF 細胞内で発生した ROS 量は、そのおよそ半分以下までに低下していた（図 2A）。また、UV-B 照射後（照射 1 時間後）の HDF 細胞内における p38 MAP キナーゼの活性もおよそ半分程度に低下していた（図 2B）。A7 に UV-B 照射後のコラーゲン分解を司る MMP-1 のタンパク発現低下を確認した。さらに、この A7 による MMP-1 の発現低下は、UV-B 照射後の HDF 細胞における活性酸素種の産生を低下させたことによる MMP-1 発現の細胞情報伝達が低下したことが要因として考えられた（図 4）。今後は、A7 エタノール抽出物に含まれる活性成分の同定と UV-B 照射による活性酸素種の産生機構にどのように活性成分が作用しているのか明確にする必要がある。

(2) トランスウェル上部の水銀割合の結果から、野菜汁を含まない対照に比べて有意に数値が低い、つまり水銀吸収が抑制された野菜はタマネギをはじめとしたブロッコリー、タマネギを除くすべて野菜であった。よって、野菜の多くに水銀吸収を阻害する物質が含まれていると思われる。

なお、回用したトランスウェル上の Caco-2 細胞層の電気抵抗値は 800 と高かったことから、物理的に水銀が細胞層を透過しにくかった可能性がある。今後の課題としては、より低い電気抵抗値を示す状態でいかなる結果が得られるかを調べる必要がある。



(3) 冷蔵中のメト化と破断強度に及ぼす抗酸化物質の影響

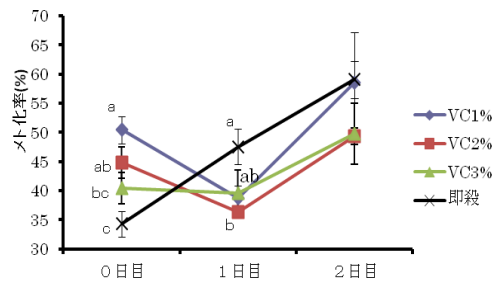


図 1 ビタミン C 注射による冷蔵中のメト化の変化

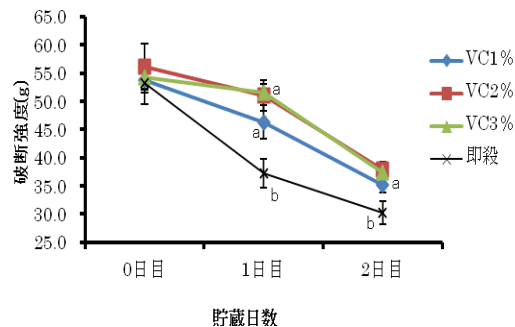


図 2 ビタミン C 注射による冷蔵中の破断強度の変化

マアジ冷蔵中のメト化と破断強度に及ぼすビタミン C 注射の影響を図 1 に示す。注射直後に即殺（無処理）区より高いメト化率を示す区があったが、1 日後以降は即殺区が最も高いメト化率を示し、2%以上のビタミン C が即殺区よりも 2 日後まで低い値を示した。

破断強度については 1 日後以降即殺区よりもビタミン C 区が高い値を示した。（図 2）ビタミン C はメト化率だけでなく破断強度に対しても効果を発揮することが確認された。

水溶性ビタミンであるビタミン C に効果が確認されたため脂溶性ビタミンであるビタ

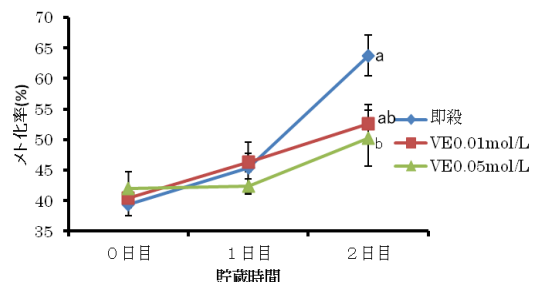


図 3 ビタミン E 注射による冷蔵中のメト化の変化

ミン E について乳化物としてメト化への影響を調べた。（図 3）冷蔵 2 日後に即殺区よりもメト化の上昇を抑制し、破断強度への影響を図 4 に示すが、冷蔵 1 日後に即殺区と有意な差が認められた。

水溶性、脂溶性にかかわらず抗酸化性を有するビタミンが冷蔵中のメト化率と破断強度に効果を

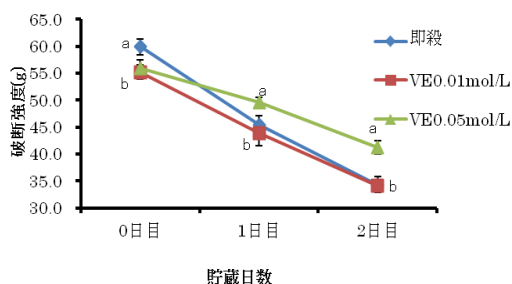


図4 ビタミンE注射による冷蔵中の破断強度の変化

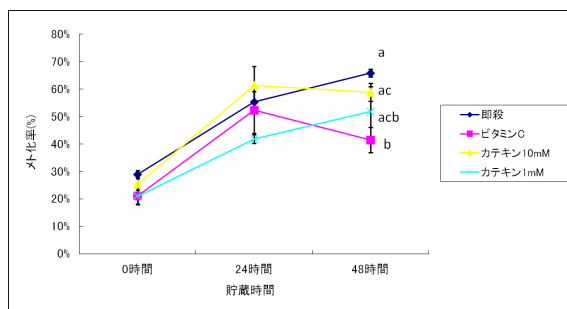


図5 カテキン注射による冷蔵中のメト化率の変化

示すことが確認された。カテキンを注射した場合も(図5), ビタミンCほどではないが, メト化の進行を抑える傾向が認められた。

#### 注射処理による物性への影響

注射処理自体が処理直後の破断強度の低下に影響している可能性があったことから, 注射処理直後の組織を観察した。(図6)しかし, 注射処理は無処理と変わらず, 組織構造に影響がないことが確認された。

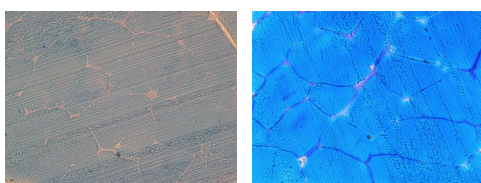


図6 注射処理の異なる肉の光学顕微鏡像

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tomohiro Itoh, Masahiro Nakamura, Hirohisa Nakamichi, Masashi Ando, Yasuyuki Tsukamasa, Yukio Furuichi, Regulation of the differentiation of osteoblast and osteoclast by a hot-water extracts of adzuki beans (Vigna angularis), Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 78 巻, 2014, 92-99

〔学会発表〕(計 3 件)

Yasuyuki Tsukamasa, Delay of met-myoglobin formation in frozen skipjack tuna (Katsuwonus pelamis) meat during cold storage using NADase, 4th International Conference and Exhibition on Food Processing & Technology, 2015 年 8 月 11 日, ロンドン(イギリス)

Yasuyuki Tsukamasa, Effect of injection of antioxidant compounds into the blood vessels of live Japanese horse mackerel (Trachurus japonicus) on oxidation and hardness of meat during chilled storage, Aquaculture Europe 2014, 2014 年 10 月 15 日, サンセバスチャン(スペイン)

塚正泰之, 抗酸化物質を注射した魚の肉質に及ぼす麻酔の影響, 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014 年 3 月 29 日, 北海道大学函館キャンパス(北海道・函館市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

塚正 泰之 (TSUKAMASA Yasuyuki)  
近畿大学・農学部・教授  
研究者番号: 90298943

##### (2) 研究分担者

安藤 正史 (ANDO Masashi)  
近畿大学・農学部・教授  
研究者番号: 80247965

##### (3) 研究分担者

伊藤 智弘 (ITOH Tomohiro)  
近畿大学・農学部・准教授  
研究者番号: 30435854