

年度計画管理番号：24

平成27年度
生命環境医学部門 活動報告書

「生物多様性の保全と利用に関する研究」



総合科学系・生命環境医学部門長
永田 信治

平成28年3月31日

I. 生命環境医学部門の活動概要

本部門における活動の使命は、植物健康基礎医学拠点研究と学系プロジェクト研究を核として、そこで得られた研究成果を、大学教育にフィードバックすることにある。植物健康基礎医学拠点研究の実施状況に関しては、年度計画管理番号【19】に記載している。そこで年度計画管理番号【24】では、学系プロジェクトに関してのみ記載する。

包括的テーマは、「生物多様性の保全と利用に関する研究」にあり、「土壌環境」、「環境物質」、「持続可能性」、「機能物質」をキーワードとして、植物健康基礎医学拠点研究の課題では取り上げていない、基礎的な研究課題3項目について報告する。

「土壌環境」、「環境物質」をキーワードとする研究では、土壌の重金属汚染の現状を分析すると共に、汚染状況の改善を可能にする新技術を確立することを目的としている。第一研究課題「草原退化に伴う土壌粘土含量および粘土鉱物組成の変化に関する研究」では、砂漠化や温暖化など地球規模の環境問題の原因になっている草原退化の理解を深めるために、中国内モンゴ草原をモデルとして草原退化に伴う土壌粘土鉱物の挙動について検討を試みた。

「持続可能性」をキーワードとする研究では、第二の研究課題である「哺乳動物の遺伝資源保存に関する研究」において、現存する希少動物種の保存ばかりではなく、2011年に日本が体験したような、想定外の災害から哺乳動物種の保護・増殖に貢献する成果を得る目的で、凍結乾燥体細胞由来のクローン胚に関する研究および抗酸化物質によるウシ受精卵作出の向上に関する研究を行った。

「機能物質」をキーワードとする研究では、第三の研究課題である「食品の機能性解明および評価法の開発」において、牛乳中の溶存酸素濃度がメイラード反応生成物であるアミノレダクトンに及ぼす影響について調べた。さらに、酸化防止剤の力価評価標準法としての適用が検討されている DPPH 法を用い、既存添加物カンゾウ油性抽出物中に含まれる抗酸化成分の解明に取り組んだ。

学系プロジェクト研究と植物健康医学拠点研究の成果は、生命環境医学部門の教員が関与する教育・研究分野のみならず、平成24年度より設置した総合人間自然科学研究科の植物医学準専攻を選択した大学院生に対する大学院教育にもフィードバックされて、新たな人材育成システムの構築と、高い水準の研究成果を世界に向けて発信するために、地域への施策提言等を通じた地域の活性化を目指して、本部門の中期計画・中期目標の達成に貢献するプロジェクトとなることが期待されている。

II. 学系プロジェクトにおける各課題研究のタイトル・構成および研究組織

課題研究1 「環境浄化用高性能鉄吸着剤の開発と応用に関する研究」

研究代表者 康 峪梅（総合科学系生命環境医学部門、教授）

課題研究2 「土佐あかうしの維持・増頭に関わる研究」

研究代表者 松川和嗣（総合科学系生命環境医学部門、准教授）

研究協力者 枝重圭祐（総合科学系生命環境医学部門、教授）

IV. 課題研究成果のまとめ

課題研究 1 「環境浄化用高性能鉄吸着剤の開発と応用に関する研究」

研究代表者 康 峪梅（総合科学系生命環境医学部門，教授）

1. 研究概要

土壌，水，大気などの環境汚染は人体に深刻な健康被害をもたらす場合が多く，有害物質の除去技術の開発は未だに重要な課題となっている。動物の必須微量元素でありながら，過剰摂取すると中毒を引き起こすセレンは長年工業材料として使用され，環境汚染物質の一つであるにも関わらず，その処理法は開発されてなかった。一方，1980年代後半ごろから地下水のヒ素汚染と地域住民のヒ素中毒が世界の数十ヶ国で発見されました。しかし，ヒ素を除去する有効かつ実用的な方法はなかった。また，車の排ガスや化石燃料の燃焼ガスなどに含まれる多環芳香族炭化水素（PAHs）は肺がんや気管支喘息，アレルギーなどの原因物質であり，近年中国から飛来するPM2.5の増加はこれらの問題にさらに拍車をかけている。

本研究で開発した非晶質水酸化鉄吸着剤は，環境中のセレン，ヒ素等の有害物質の除去に極めて有効であり，その概要は以下の通りである。

- ①本吸着剤は当初セレン汚染土壌中の水溶性セレンを不溶化するために開発された。全セレン含量 $10.9 \sim 155.6 \text{ mg kg}^{-1}$ （水溶性セレン $21 \sim 3790 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ，基準値の $2 \sim 379$ 倍）の汚染土壌に，本吸着剤を $1 \sim 2\%$ 添加することで，水溶性セレン濃度を WHO 飲料水基準値 ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) 以下に抑えることができた。本吸着剤は建築現場や鉱山跡地などのセレン，ヒ素，重金属汚染土壌の処理，あるいはこれら汚染物質の複合汚染の処理が利用可能である。
- ②本吸着剤は猛毒のヒ素にも優れた吸着効果があることから，世界の数十ヶ国で深刻な健康被害を引き起こしている地下水のヒ素汚染除去に応用した。本吸着剤を利用したヒ素除去浄水装置を開発し，カンボジアで実証試験を行った。その結果，ヒ素除去浄水装置を適切に管理・操作することによって，井戸水のヒ素濃度を WHO の飲料水基準値以下にすることができることが示され，非晶質鉄水酸化物吸着剤は実験室条件だけではなく，現場でも高いヒ素吸着力を有することが明らかになった。本研究で開発したヒ素除去浄水装置は原位置で水のヒ素濃度を WHO の飲料水基準値以下にできるヒ素除去技術であり，住民のヒ素暴露リスクを大幅に軽減できることが明らかになった。
- ③本吸着剤は喘息やアレルギーの発症原因物質で，PM2.5にも多く含まれるPAHsにも高い吸着能を持っている。従来のフィルター用活性炭はフェナントレンの除去率が7割程度であったのに対し，本吸着剤は約100%の高い除去率を示した。また，実用化を想定して活性炭に担持させたところ，9割の高い除去率が得られた。現在は大手電機メーカーと連携し，PAHsに有効な空気清浄器用フィルターの共同開発を行っている。本技術は空気清浄器，エアコンフィルター，自動車用キャビンフィルター，ビル空調用フィルターなどに利用可能で，喘息等アレルギーの予防，症状の低減につながると期待される。

2. 研究業績

(1) 原著論文 (計 1 編)

Yumei Kang, Arsenic-Polluted Groundwater in Cambodia: Advances in Research.
International Journal of Water and Wastewater Treatment. Vol.2.1, 2016.

(2) 学会発表等 (計 0 回)

(3) 著書・総説 (計 0 編)

(4) 講演会, 報告会等 (計 1 件)

康峪梅: 環境浄化用高性能鉄吸着材の開発と応用に関する研究。高知県産学官民連携推進センター「シーズ・研究内容紹介」2015年7月1日。

(5) 特許 (計 0 件)

(6) 受賞等 (計 2 件)

1. 平成 27 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰科学技術賞「環境浄化用高性能鉄吸着材の開発と応用に関する研究」
2. 平成 27 年度平高知大学研究顕彰制度研究功績者賞「「環境浄化用高性能鉄吸着材の開発と応用に関する研究」

(7) 報道 (計 3 件)

1. 中国科技日報、2015 年 4 月 29 日
2. FM 高知「THE こうちユニバーシティ CLUB」2015 年 5 月 17 日
3. 高知新聞、2015 年 5 月 19 日

(8) 外部資金 (計 0 千円)

課題研究2 「土佐あかうしの維持・増頭に関わる研究」

研究代表者 松川和嗣（総合科学系生命環境医学部門，准教授）

研究協力者 枝重圭祐（総合科学系生命環境医学部門，教授）

1. 概要

本課題研究では、実験動物や家畜だけでなく絶滅に瀕する哺乳動物種の保護や増頭に役立つ技術の開発を目的として、以下の2項目について検討した。

(1) 凍結乾燥細胞を用いた遺伝資源保存法の開発

a. 凍結乾燥体細胞

【目的】これまでウシ凍結乾燥（FD）体細胞を用いた核移植によって、胚盤胞期胚の作出に成功しているものの、作出した胚盤胞の発生率は低く、体外受精胚と比較して質が劣ることを認めている。そこで本研究では、FD緩衝液の種類、および体外発生培養液の交換時期が、核移植後の発生に与える影響を検討した。さらに、初期発生にかかわる遺伝子の発現量を核移植（NT）および体外受精（IVF）胚で比較した。【材料と方法】ウシ線維芽細胞を供試し、FD後の体細胞のDNA損傷はコメットアッセイ法によって評価した。FD体細胞を除核未受精卵に注入し、活性化処理後、核移植胚を8日間培養し、卵割、胚盤胞発生率、および胚盤胞の形態を調査した。実験1：FD緩衝液にはm-EGTAおよびNa-EGTAを用い、FD後のDNA損傷細胞数および核移植後の発生能を検討した。実験2：体外発生培養液は核移植胚の卵割の確認後2日ごとに交換する区（Day2区）、および3日ごとに交換する区（Day3区）を設け、胚盤胞発生率および形態を比較した。実験3：NTおよびIVF胚からRNAを抽出しcDNAの作製後、リアルタイムPCRによってOct4およびIFN-tauの相対的発現量を計測した。【結果】実験1：m-EGTAおよびNa-EGTAで調整したFD細胞のDNA損傷細胞割合は、それぞれ12および24%となり有意な差が認められた（ $P<0.05$ ）。核移植後の胚盤胞発生率は20および0%となり、有意な差は認められなかったがNa-EGTAでは胚盤胞作出には至らなかった。実験2：Day2およびDay3区の胚盤胞発生率には有意な差は認められなかったものの（20% vs. 25%）、Day3区では胚盤胞の質の向上が認められた。実験3：NTおよびIVF胚のOct4の発現量には有意な差は認められなかったが、IFN-tauにおいてNTがIVFに比べ有意に低い値を示した。

b. 凍結乾燥精子

【目的】一般に、哺乳動物精子は液体窒素中に“凍結”保存され、融解後、人工授精、体外受精などの生殖技術を介して産子が得られる。しかし、液体窒素保存には安全面、コスト面等で問題があり、液体窒素を使用しない新たな精子保存技術が求められている。そこで本研究では、“凍結乾燥”技術を応用したウシ精子の保存技術の確立のため、凍結乾燥後の精子DNAの損傷を抑制する条件についての検討をおこなった。【材料及び方法】実験1：精子のDNA損傷を評価するためのコメットアッセイ法を開発し

た。陽性対照に液体窒素から取り出し融解した精子 (融解精子)、陰性対照に過酸化水素処理区を設け、精子細胞膜の透過処理条件を検討した。以降の実験には開発したコメットアッセイ法を用い精子 DNA の損傷を評価した。**実験 2** : 融解精子の最適な回収法を検討するため、2 種類 (通常の遠心法およびパーコール密度勾配遠心法) の精子の洗浄処理を実施し、DNA 損傷によって評価した。**実験 3** : 凍結乾燥緩衝液を検討するため、m-EGTA (50 mM EGTA、100 mM Tris HCl、pH 8.2) および Na-EGTA (50 mM NaCl、50 mM EGTA、10 mM Tris HCl、pH 8.2) で浮遊させ凍結乾燥した精子の DNA 損傷を比較した。**実験 4** : 精子の乾燥前の最適な凍結法を検討するために、0.3°C/分で-30°Cまで冷却する緩慢凍結と液体窒素による急速凍結を比較した。**実験 5** : 精子の前処理を検討するため、融解精子を 8 mM L-グルタチオン (GSH)、5 mM ジチオトレイトール (DTT) で 10 分間処理した後、凍結乾燥し DNA 損傷を評価した。【結果及び考察】**実験 1** : 細胞膜透過液で 1 時間処理した後に 10 mM DTT 添加細胞膜透過液で 30 分間処理し、さらに 4 mM ジョードサリチル酸リチウム添加細胞膜透過液で 15 分間処理することで、細胞膜の強固な精子でもコメットアッセイによる評価が可能となった。**実験 2** : パーコール密度勾配遠心法によって回収した精子では DNA 損傷は観察されず、通常の遠心法では 16.7%の損傷が確認された。**実験 3** : Na-EGTA では損傷は観察されず、m-EGTA では 1.67%の損傷が確認された。**実験 4** : 緩慢凍結では損傷は観察されず、液体窒素による急速凍結では 1.7%の損傷が確認された。**実験 5** : GSH 処理では損傷は観察されず、DTT 処理では 25%の損傷が確認された。以上より、ウシ融解精子をパーコール密度勾配遠心法によって洗浄し、GSH による前処理後 Na-EGTA に浮遊させ、緩慢に凍結し乾燥することで DNA 損傷を抑制した凍結乾燥精子を調整することが可能となった。

(2) 高知系褐毛和種への柚子果皮給餌の効果

【目的】現在、高知県特産で地方特定品種の褐毛和種高知系は、飼養頭数および戸数の減少が著しく“幻の和牛”となりつつある。一方、高知県は全国最大のユズの産地であり、近年の健康ブームによりその需要は増大しているが、搾汁後の果皮などの搾りかすの処理が問題となっている。そこで本研究では、褐毛和種高知系牛肉の高付加価値化を目的として、夏期のユズ果皮給与が肥育牛に及ぼす影響を検討した。【材料および方法】褐毛和種高知系肥育牛 6 頭をユズ給与区 4 頭および無給与区 2 頭に分け、6 月から 7 月にかけて出荷前 1 ヶ月間の給与試験を実施した。ユズ果皮は食用に販売されているものを用い、乾燥後、飼料に 2.5%の割合で添加した。飼料摂食量および飲水量を毎日測定し、給与試験前後に体重測定および血液検査を実施した。出荷後、と体から骨格筋、肝臓および皮下脂肪を採取した。さらに、熟成 20 日目のロース部から骨格筋、皮下脂肪および筋間脂肪を採取し、メタボローム解析および脂肪融点測定に供試した。【結果および考察】1 日あたりの飲水量は、ユズ給与区および無給与区間で有意な差は認められなかった。飼料摂食量では、ユズ給与区において濃厚飼料摂食量が有意に減少したが、増体においてはユズ給与区で増加する傾向にあり、飼料効率の向上が認められた。血液分析の結果、ユズ給与区において肝臓および脂質の改善効果が認められた。また、メタボローム解析の結果、骨格筋において N-グリコリルイノラミン

酸やジエタノールアミン、ヒスタミンなど有害物質が減少していた。一方、脂肪融点はユズ給与区で無給与区よりも高くなった。以上本研究より、夏期のユズ果皮給与は高温暴露によって衰えた牛の生体機構を回復させ、生産性および健全性を改善することが示唆された。

2. 研究業績

(1) 原著論文 (計 2 編)

1. Oshita K, Kawaguchi K, Takaoka M, Matsukawa K, Fujimori T, Fujiwara T
Emission and control of N₂O and composition of ash derived from cattle manure combustion using a pilot-scale fluidized bed incinerator. Environ Technol, 6, 1-7, 2015.
2. Tsutsui H, Fujiwara T, Inoue D, Ito R, Matsukawa K, Funamizu N. Relationship between respiratory quotient, nitrification, and nitrous oxide emissions in a forced aerated composting process. Waste Manag, 42, 10-16, 2015.

(2) 学会発表等 (計 3 回)

1. 細川真美, 竹中由布, 枝重圭祐, 松川和嗣. アスコルビン酸 2 リン酸は暑熱ストレスに暴露されたウシ体外受精胚の作出率を改善する. 日本畜産学会, 北海道, 2015/9/11-12.
2. 岩本侑希子, 梅脇冨矢香, 浦部光治, 垣渕和正, 石田豊, 松川和嗣. 果皮ペースト給与が褐毛和種高知系の肥育に及ぼす影響. 日本畜産学会, 北海道, 2015/9/11-12.
3. 田村慎之介, 小西裕子, 枝重圭祐, 赤木 悟史, 松川 和嗣. 長期保存フリーズドライ体細胞を用いたウシ核移植胚の作出. 日本畜産学会, 北海道, 2015/9/11-12.

(3) 著書・総説 (計 0 編)

(4) 講演会, 報告会等 (計 2 件)

1. 松川和嗣: 土佐あかうしを守れ! ~高知大学農学部附属農場での取り組み~. 高知県産学官民連携推進センター「シーズ・研究内容紹介」2015年10月21日.
2. 松川和嗣: 土佐あかうし+高知県産柚子果皮: 高知大学発の新たなブランド創出の試み. 平成27年度四国オープンイノベーションワークショップ, 2015年11月10日.

(5) 特許 (計 0 件)

(6) 受賞等 (計 0 件)

(7) 報道 (計 1 件)

高知新聞, 2015年12月12日

外部資金 (計 21,275 千円)

1. 松川和嗣：平成 26 年度科学研究費補助金，基盤 B，「フリーズドライ体細胞を用いた家畜の遺伝資源保存・再生技術の開発」，代表，1,459,984 円
2. 松川和嗣：平成 26 年度科学研究費補助金，基盤 B，「温度センサーチャンネル制御による生殖細胞と胚の低温/高温傷害の克服」，分担，100,000 円
3. 松川和嗣：高知県農業振興部（受託研究），「種雄牛の現場後代検定及び遺伝子検査」，515,970 円
4. 松川和嗣：高知県農業振興部（受託研究），「土佐あかうし受精卵委託業務」，1,522,794 円 1,600,330 円
5. 松川和嗣：農林水産省，農林水産業の革新的技術緊急展開事業（うち産学の英知を結集した革新的な技術体系の確立）「柚子果皮による高知系褐毛和種の高付加価値化：実証試験と作用機序の解明」，17,601,546 円