

## 魚類等の筋肉中の多様な蛍光物質の機能解析と 分子栄養学的意義の解明

伊藤 太二 (管理栄養学科・教授) ・近藤 奈々絵 (管理栄養学科・准教授)  
河内 公恵 (管理栄養学科・教授) ・大村 正史 (相模女子大学・教授)  
廣田 耕志 (東京都立大学・教授)

### 概要

蛍光物質は、それぞれに固有のある範囲の波長の光を照射すると励起され、蛍光を発する物質のことである。生体に含まれる蛍光物質には、例えば、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)等、多種多様なものが知られている。これらは、励起波長と蛍光波長が様々な異なっており、医療をはじめ生命科学分野で応用されている。蛍光物質の中にはタンパク質で構成されたものもあり、こうした蛍光タンパク質として最初に同定されたものとして、1960年代に下村脩によって発見され2008年ノーベル化学賞の対象となった緑色蛍光タンパク質 GFP がある。そしてこれまでは、脊椎動物に由来する蛍光タンパク質は知られていなかったが、最近、鹿児島大学の研究グループが、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) から緑色蛍光タンパク質を単離した<sup>(1)</sup>。そして、理化学研究所の研究グループは、そのタンパク質 UnaG がビリルビン依存的に緑色蛍光を発することを見出し、UnaG がビリルビンの高感度計測に応用できることを示した<sup>(2)</sup>。

令和5年度学術研究所助成研究では、魚類等の筋肉に焦点を当て、蛍光実体顕微鏡を用いてこれらに由来する食材の蛍光特性を解析したところ、蛍光強度の違いは見られたものの、解析したタイ、カレイ、ブリ、サバ、サケ、ウナギ、イカのいずれにおいても青色励起による緑色蛍光が観察された。さらに、カレイとサバについては斑点状の緑色蛍光も観察されたため、緑色励起による赤色蛍光も解析したところ、極めて蛍光強度の強い赤色蛍光が斑点状に観察された。この赤色蛍光はカレイやサバの筋肉中でランダムに分布していたことからカレイやサバの筋肉中の特定の構造体に特異的な蛍光物質によるものではなく、寄生体による感染の結果の可能性が高いと考えられた。そこで、寄生体としてサケ、サバ、イカへの感染が多く報告されているアニサキス等の可能性を考え、この赤色蛍光に焦点を当て、タラから単離したアニサキス生体を用いて、種々の励起波長での蛍光特性について蛍光実体顕微鏡を用いて解析したところ、アニサキスの生存組織では弱いながら緑色蛍光が検出され同じ部分についてやや強い赤色蛍光が検出された。近赤外蛍光は検出されなかった。驚いたことに、死滅組織では、生存組織に比べて強い緑色蛍光が観察され、特に、赤色蛍光が極めて強く検出された。この場合も近赤外蛍光は検出されなかった。すなわち、アニサキスでは組織が死滅することで極めて強い赤色蛍光を発することが明らかになった。そして、メジナの内臓から単離したシュードテラノーバと考えられる寄生虫についても同様に蛍光特性を解析したところ、シュードテラノーバではアニサキスと比べて生存組織で強い赤色蛍光を検出した。さらに驚いたことに、強い近赤外蛍光も検出した。この近赤外蛍光はシュードテラノーバの外皮で発していることも明らかになった。こうし

た先行研究成果をふまえ、令和6年度学術研究所助成研究では、サバ内臓から単離したアニサキスから非変性条件下で抽出液を調製し、その蛍光特性を分析した。抽出用 buffer として、これまで用いていた界面活性剤を含まないものを用いた場合と界面活性剤を含むものを用いた場合とで、蛍光物質の抽出効率が異なることが明らかとなった。そして、これまで注目してきたサバ、サケ、イカ、マグロ、タイの各筋肉組織へのアニサキスの嗜好性を解析したところ、マグロではアニサキスの嗜好性が最も低く、アニサキス感染が多く報告されているイカ、サケ、サバ、さらにタイではアニサキスの嗜好性が高いことが明らかになった。さらに、各色の LED を用いてアニサキスの走光性についても解析したところ、青色に対しては、アニサキスは正の走光性を示し、緑色、黄色、赤色に対しては、アニサキスは負の走光性を示すことが明らかとなった。

## 緒言

可視光は通常、その波長が380~780nm の範囲であり380nm 付近の紫色から、780nm 付近の赤色までとなっている。蛍光とは、ある物体が、ある波長の光を吸収し、それとは違う波長の光を放出する物理的な性質をさす。ある分子がある波長の光を吸収し、それとは違う波長の光（すなわち蛍光）を発する場合、この分子のことを蛍光物質と呼ぶ。通常、蛍光物質が放出する波長は、吸収した光よりも低エネルギーであり、例えば、青色の光を吸収して緑色の光を発する、または緑色の光を吸収して赤色光を発する、ということである。ほとんどの蛍光物質は、通常、ある範囲の波長を吸収および放出する。

魚類に寄生するアニサキスを目視で検出する技術として、370nm をピーク波長とする UV-A を用いた方法が報告されている<sup>(3)</sup>。この方法では370nm で励起することで宿主である魚類の組織は蛍光を発せずアニサキスのみが発する青色蛍光を検出する。この蛍光物質はアニサキスに存在するリポフスチンであろうと推察されている。

アニサキスは宿主の死滅後、内臓から筋肉中に移行することが報告されているが、その機序については不明な点が極めて多い。*Anisakis simplex s.s.* の第3期幼虫を用いて、*in vivo* でニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) とモザンビークのティラピア (*Oreochromis mossambicus*) を宿主として、アニサキスの筋肉への移行に及ぼす温度の影響がこれまでに報告されている。アニサキス幼虫の生存と組織移動を6週後および12週後に分析した結果、幼虫の生存率は3, 9, 15, 21℃より27, 33℃で低く、筋肉への移行は9℃で最も高いことがわかっている<sup>(4)</sup>。また、宿主としてサバを用いて宿主肥満係数とアニサキス幼生の感染強度の間の相関を解析した研究では、Spearman の順位相関係数検定  $p > 0.05$  で有意な関係はないとの報告もある<sup>(5)</sup>。こうした報告があるが、アニサキスが内臓から筋肉中に移行する分子機構については不明である。

アニサキスの宿主への感染については、宿主として、ニジマス<sup>(4)</sup>、サバ<sup>(5)</sup>、サケ<sup>(6)</sup>、イカ<sup>(7)</sup>などで報告があるが、アニサキスがつも宿主への嗜好性を同時比較した研究については、皆無である。

本研究ではこうした背景をふまえて、サバ内臓から単離したアニサキスから非変性条件下で抽出液を調製し、その蛍光特性を分析した。抽出用 buffer として、これまで用いていた界面活性剤を含まないものを用いた場合と界面活性剤を含むものを用いた場合とで、蛍光物質の抽出効率を比較した。そして、これまで注目してきたサバ、サケ、イカ、マグ

ロ、タイの各筋肉組織へのアニサキスの嗜好性を調査した。さらに、各色のLEDを用いてアニサキスの走光性についても解析したので報告する。

## 方法

### 1. アニサキスからの蛍光物質の抽出と分析

アニサキス生存個体10体または死滅個体10体を、それぞれ、1本ずつの冷やしたマイクロチューブにとった。これに冷却した抽出buffer (20 mM Na phosphate (pH 7.4), 1 mM EDTA)、または、0.3B buffer (20mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.3 M KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 0.1% Tween-20)をそれぞれ100uL 加え、滅菌したホモジナイザーペッスルを用いて30秒間すりつぶした。これを微量高速冷却遠心機を用いて4℃、13,000x g、5 min 遠心した。上清を冷却した別のマイクロチューブに移しこれを抽出液とした。抽出液に対して、UV (ドミナント波長365nm)、青色LED (ドミナント波長470nm)、緑色LED (ドミナント波長525nm)の各トランスイルミネーターを用いて、光を照射し、蛍光の有無を観察した。

### 2. アニサキスの各魚介類筋肉に対する嗜好性の解析

直径90mm、高さ15mmの浅型シャーレに生理食塩水(0.9% NaCl 水溶液)を5 mL はり、その中央に直径10mmの円領域を設定して、アニサキス1体を配置した。円領域の外周から20mmの距離をとって、10mm角で調製したサバ、サケ、イカ、マグロ、タイの筋肉を配置した。室温を20℃に設定して、白色LED 蛍光灯下で、20時間静置して、アニサキスがどの宿主筋肉に近づくかを解析した。円領域からアニサキスが完全に移動したものを近づいたと判定した。

### 3. アニサキスの走光性の解析

直径90mm、高さ15mmの浅型シャーレに生理食塩水(0.9% NaCl 水溶液)を10mL はり、その中央に直径10mmの円領域を設定して、アニサキス1体を配置した。シャーレの片側に、青色LED (ドミナント波長470 nm)、緑色LED (ドミナント波長525 nm)、黄色LED (ドミナント波長590 nm)、赤色LED (ドミナント波長625 nm)のいずれかを配置した。各LEDは暗所内で20分点灯させ、アニサキスの走光性を解析した。その後、白色LED 蛍光灯下で10分間インターバルをおいた後、別の色のLEDで試験した。アニサキスの体の中央の位置が円領域の外周から移動した距離(mm)を測定した。円領域内におさまっている場合は移動なしと判定した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、法令等に基づく手続きが必要な研究(患者から提供を受けた試料の使用、個人情報に伴うアンケート調査・インタビュー調査、ヒトゲノム研究、動物実験)には該当しない。

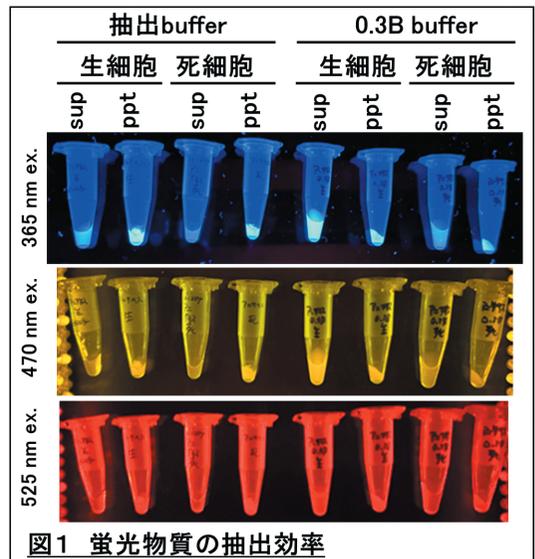
## 結果

### 1. アニサキスからの蛍光物質の抽出と分析

サバに寄生しているアニサキスを採取して、生理食塩水中に保管した。これを1.5mL

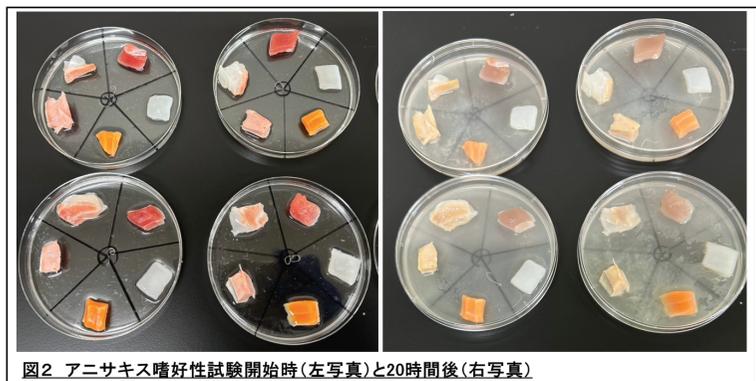
マイクロチューブに10体ずつ取った。この際、生存個体と死滅個体で分けて実験を行った。これに対して、先行研究で用いてきた抽出 buffer（界面活性剤を含まない）と0.3B buffer（界面活性剤を含む）の2種類の buffer をそれぞれ100uL 加えてすりつぶした。これを遠心して、上清（sup）と沈殿（ppt）に分けた。これらの8種類のマイクロチューブを各色のトランスイルミネーターにのせて、光を照射し励起して、蛍光を観察した（図1）。その結果、UV（365nm）で励起した場合の青色蛍光は、生存個体では、いずれの buffer でも抽出され、若干0.3B bufferの方が効率がよかった。死滅個体では、いずれの buffer を用いた場合も、抽出効率は低いままであった

（図1）。青色（470nm）で励起した場合の緑色蛍光は、生存個体では、抽出 buffer では極めて効率が悪かったものの、0.3B buffer を用いることで極めて効果的に抽出された（図1）。これは、界面活性剤が効果的に働いたものと推察された。死滅個体では、いずれの buffer を用いた場合も、抽出効率は低いままであった。緑色（525nm）で励起した場合の赤色蛍光についても、青色励起緑色蛍光と同様の傾向であり、生存個体では、抽出 buffer では極めて効率が悪かったものの、0.3B buffer を用いることで極めて効果的に抽出された（図1）。これは、界面活性剤が効果的に働いたものと推察された。死滅個体では、いずれの buffer を用いた場合も、抽出効率は低いままであった。以上の結果から、UV 励起青色蛍光の物質と、青色励起緑色蛍光の物質（緑色励起赤色蛍光の物質）は異なる物質であることが示唆された。



## 2. アニサキスの各魚介類筋肉に対する嗜好性の解析

サバ、サケ、イカ、マグロ、タイの筋肉に対するアニサキスの嗜好性について、図2に示すような実験系を用いて解析を行った。図2左の状態から20℃で20時間静置して、サバ、サケ、イカ、マグロ、タイの筋肉のうちでアニサキスが近づいたものを集計して、図3に表した。その結果、マグロではアニサキスの嗜好性が最も低く、アニサキス感染が多く報告されているイカ、サケ、サバ、さらにタイではアニサキスの嗜好性が高いことが明らかになった（図3）。今後、嗜好性の低かったものと頻度が高かったものから抽出液を



とり、これに対する嗜好性を解析する。そして、抽出液をカラムクロマトグラフィーで分画して、アニサキスの嗜好性を決定する物質を明らかにする。

### 3. アニサキスの走光性の解析

図3でアニサキスの嗜好性を決定する要因としては、化学物質や光等が考えられる。先行研究でアニサキスの緑色蛍光や赤色蛍光を蛍光実体顕微鏡で観察した際に、青色や緑色で励起を行ったがその際に、アニサキスの活動が活性化した (data not shown) ことから、本研究では、青色、緑色、黄色、赤色の各色のLED

を準備して、図4の実験系を構築した。この実験系では同時に6つのLEDを同じ明るさで点灯させ、LEDの光に対してアニサキスが近づくか遠ざかるかを評価することが可能である。実験では、実験室の白色LEDを遮蔽して、各色のLEDのみを、10分間のインターバルをあけて、それぞれ20分間照射してアニサキスの走光性を解析した。その結果を図5の箱ひげ図に示す。青色に対しては、アニサキスは正の走光性を示した。その一方、緑色、黄色、赤色に対しては、アニサキスは負の走光性を示した(図5)。アニサキス生存個体の頭部を拡大して蛍光実体顕微鏡で解析したところ、頭部に微小な蛍光が観察され (data not shown)、現在、詳細な解析を行っている。

### 考察

本研究の結果から、アニサキスには、UV (365nm) で励起される青色蛍光物質と青色 (470nm) で励起される緑色蛍光物質 (緑色 (525nm) で励起される赤色蛍光物質) の少なくとも2種類の物質があることが示唆された。現在、これらの蛍光物質を同定するため、native-PAGEなどを行っており、質量分析する予定である。先行研究では、魚介類等の筋肉で斑点状に検出される強い赤色蛍光はアニサキスが穿入し冷凍処理等で死滅した痕跡であると推測されたが、これを実証するために、現在、サバの筋肉に対してアニサキスを感染させ、タイムラプスで蛍光を観察している。これにより、斑点状の蛍光が生じる機序を

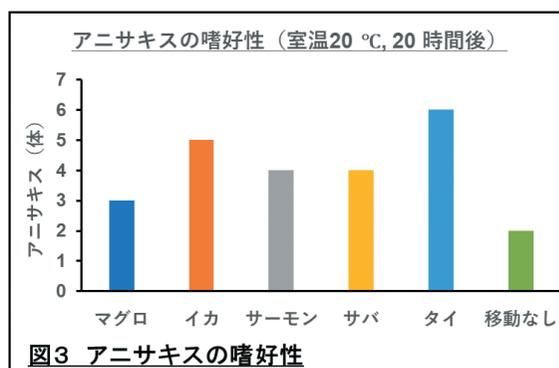


図3 アニサキスの嗜好性

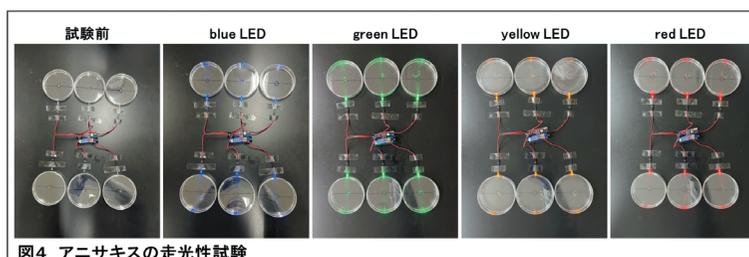


図4 アニサキスの走光性試験

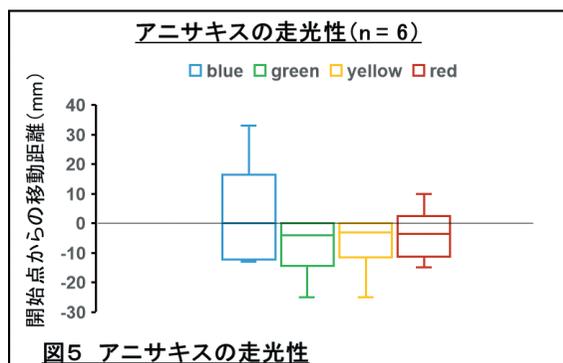


図5 アニサキスの走光性

明らかにしたい。アニサキス頭部の微小な蛍光部位を構成する物質を明らかにするとともに、その物質が、青色に対するアニサキスの正の走光性や緑色・黄色・赤色に対するアニサキスの負の走光性をもたらす分子機構について明らかにしたい。アニサキスの嗜好性については、マグロが低く、イカ、サケ、サバ、タイが高いという結果となった。現在、アニサキスの嗜好性が、これらの宿主の筋肉が発する蛍光波長や蛍光強度に依存する可能性を検証しており、魚介類の筋肉中の蛍光物質が寄生体の行動にもたらす影響についても追求したい。

## 謝辞

本研究の実施にあたり、令和6年度 鎌倉女子大学学術研究所助成研究によって支援をいただきました。心より感謝いたします。鎌倉女子大学・家政学部・管理栄養学科・講師の山本詩織先生には、アニサキスの単離をはじめ、多方面からの discussion も多くいただきました。心より感謝いたします。

## 参考資料・引用文献

- 1) Hayashi S et al. A novel fluorescent protein purified from eel muscle. *Fish Sci.*, 75, 1461–1469 (2009)
- 2) Kumagai A et al. A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle. *Cell*, 153, 1602–1611 (2013)
- 3) 大日本水産会「アニサキスを中心とした食中毒対応。～正しい知識でリスクを低減し、魚食文化を守る～」平成30年度 第1回国産水産物流通促進事業セミナー講演録
- 4) Gomes T L et al. Effects of temperature on *Anisakis simplex sensu stricto* L3 larvae experimentally challenged in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports*, 40 : 100848. doi : 10. 1016 / j. vprsr. 2023. 100848 (2023)
- 5) Kodo Y et al. Prevalence of *Anisakis* larvae in cultured mackerel *Scomber japonicas* in Japan and the relationship between the intensity of *Anisakis* infection in cultured mackerel and fish fatness. *Int. J. Food Microbiol.*, 404 : 110347. doi : 10. 1016 / j. ijfoodmicro. 2023. 110347 (2023)
- 6) Kent A J et al. Increasing intensities of *Anisakis simplex* third-stage larvae (L3) in Atlantic salmon of coastal waters of Scotland. *Parasit. Vectors*, 13(1) : 62. doi : 10. 1186 / s 13071-020-3942-5 (2020)
- 7) Abollo E et al. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters : an updated perspective. *Parasitol. Res.*, 87(6) : 492-9. doi : 10. 1007 / s 004360100389 (2001)