

地球規模課題対応国際科学技術協力

(生物資源研究分野「生物資源の持続可能な生産・利用に資する研究」領域)

乾燥地生物資源の機能解析と有効利用

(チュニジア共和国)

平成 25 年度実施報告書

代表者: 礪田 博子

国立大学法人筑波大学北アフリカ研究センター 教授

<平成 21 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

地球環境問題において沙漠化進行は、単に広大な乾燥地域を有する開発途上国の問題ではなく世界的な食糧生産・資源経済基盤を脅かすものになりかねない。また近年、地球環境保全や各国の生物資源の権利等の観点から、生物多様性が重視されている。このような背景から、その支援体制として未利用・荒廃化土壌の環境に見あった適正な植生資源の創出に向け、生物多様性条約に則り乾燥地生物資源の生息環境調査による特性を解明し、有用成分の機能解析および高度利用システムの開発を行う。これにより地球規模での持続的・資源循環的食料システムの開発や沙漠化防止に向けての環境問題解決につなげる。

具体的には、伝承的薬効を有する乾燥地植物から抽出した有効な生理活性成分の機能性メカニズム解析および精製を行い、医薬品あるいは機能性食品原料としての用途開発を行う。さらに、環境に順応した育種を目指し、乾燥地植物の耐塩性や耐乾性の分子生物学研究を行う。さらに、それを支えるエコリージョンシステムの開発として、乾燥地生物の生育基盤である土壌および水について物理化学的・生物学的分析を行い、その量的・質的な確保を目指すべく、土壌劣化の種類・程度をその水分・栄養成分の分析により把握する。

本事業による成果物としては、①乾燥地生物資源の種・生息環境情報、機能性・化合物、期待される利用法などを集約したデータベース、②多様な抽出方法による生物資源画分のバーコード管理ライブラリーなどが考えられ、地球規模での持続的・資源循環的食料システムの開発や、砂漠化防止に向けての環境問題解決につながると期待される。さらに、チュニジアが世界に先駆けた乾燥地生物資源研究拠点となることも期待される。また、学術的知見に基づく知的国際貢献を具現化し、戦略的な技術協力・経済協力の案件形成に結びつく。

2. 研究グループ別の実施内容

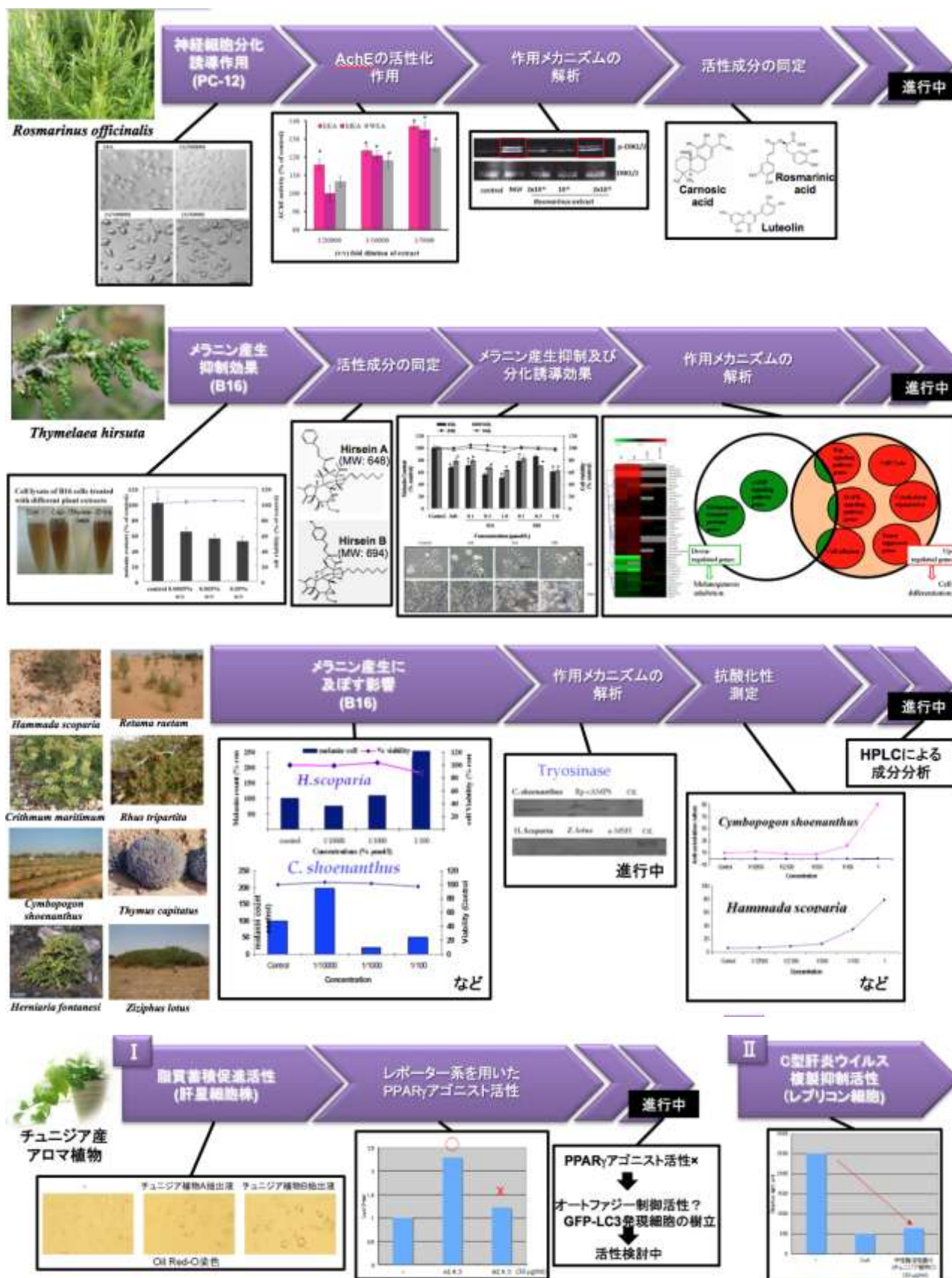
生物資源有用性評価グループ

①研究のねらい;オリーブ、薬用植物、耐塩性植物の伝承的薬効、土地利用形態別情報にもとづき対象植物を選定、採集、溶媒抽出、画分調整、機能性評価を行い、機能性を有する生物資源の経済性評価を踏まえた機能成分に関する食品加工技術の導入、食品加工のスケールアップ技術の開発を目指す。

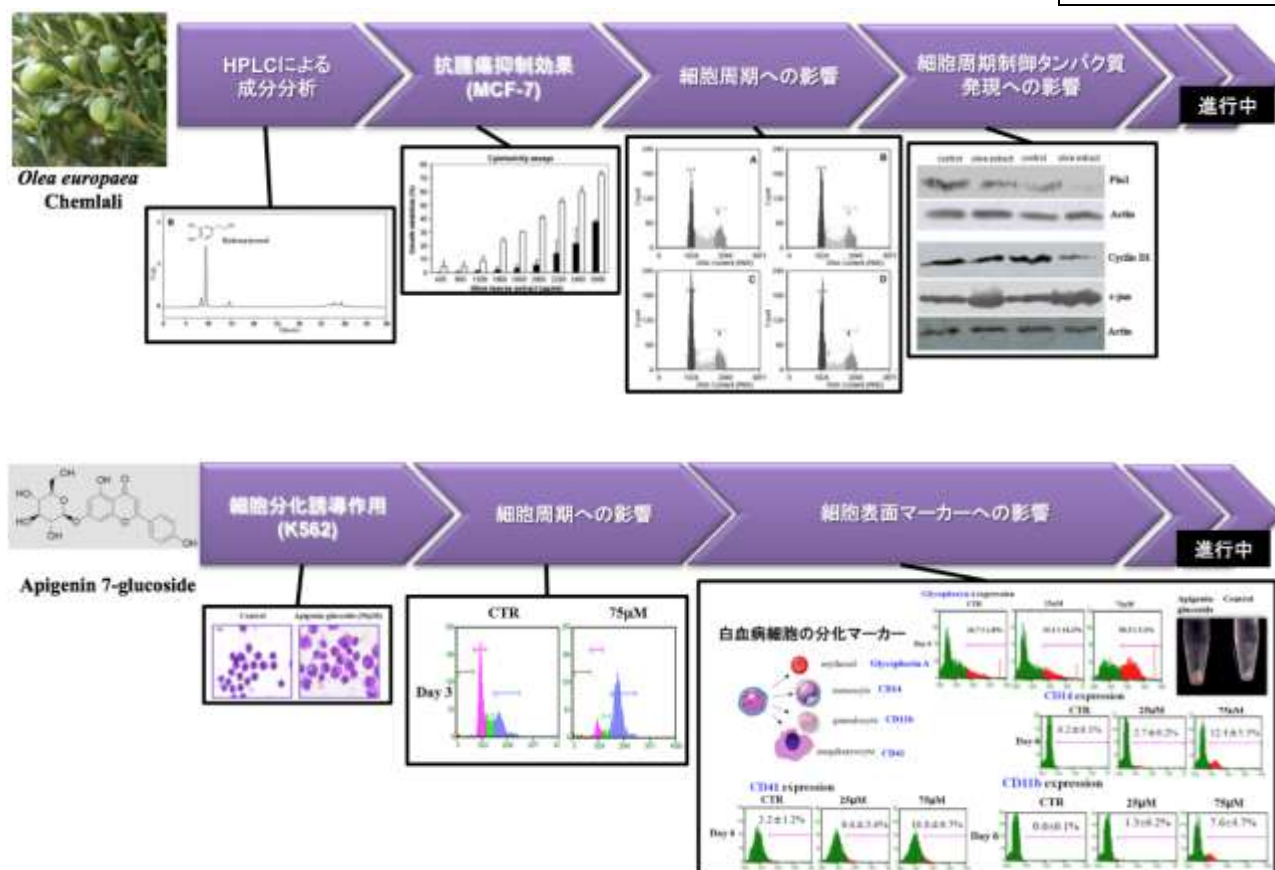
オリーブ、薬用植物、耐塩性植物の伝承的薬効、土地利用形態別情報にもとづき対象植物を選定、採集、溶媒抽出、画分調整、機能性評価を行い、機能性を有する生物資源の経済性評価を踏まえた機能成分に関する食品加工技術の導入、食品加工のスケールアップ技術の開発を目指す。また、耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に関与する遺伝子座の同定、乾燥耐性と適応関連形質と連鎖する分子マーカーの解析を行い、乾燥地植物の育種技術の向上を図る。研究成果から得られたデータを統合化するデータベースの枠組みの設計を行う。

②研究実施方法;

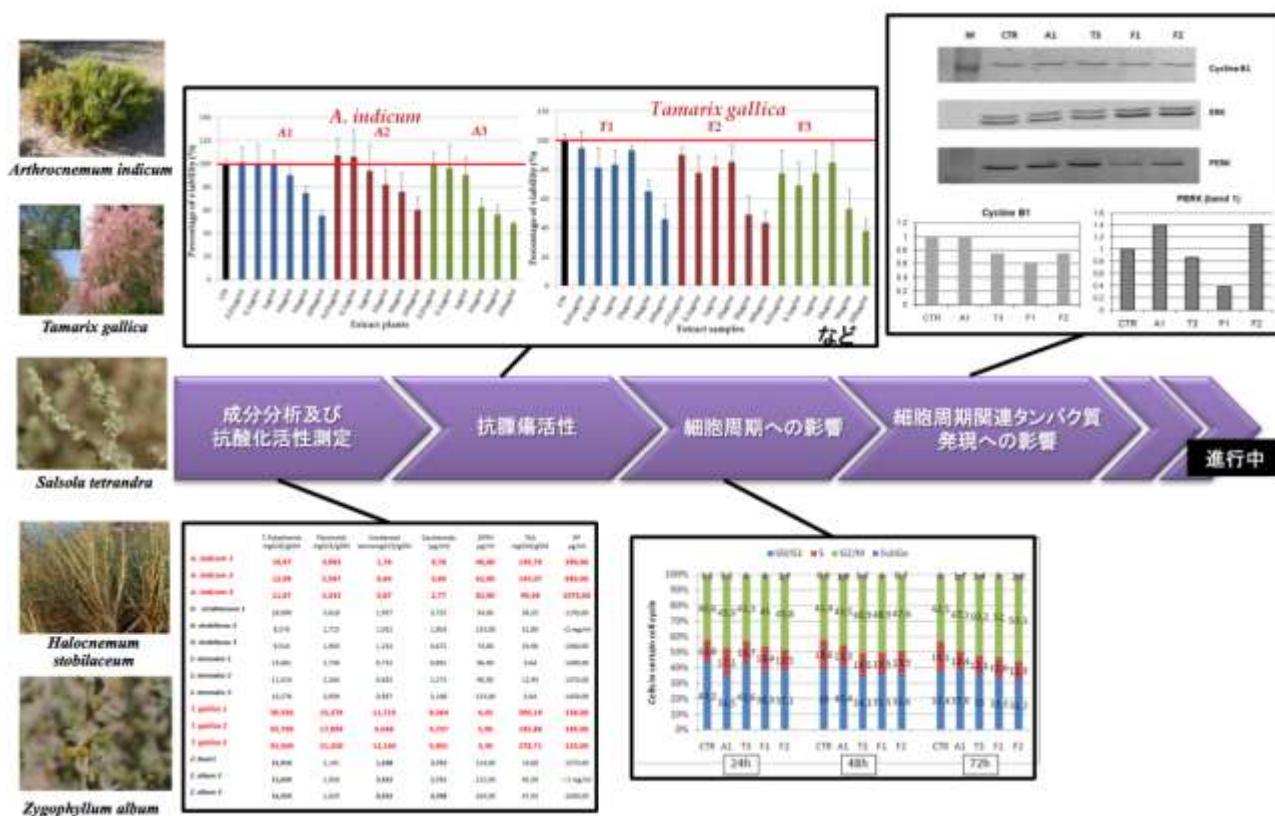
- ・ 有用生物資源の機能性評価;チュニジアに生育する生物資源のうち、地域特有の伝承薬草材料に用いられている植物等を中心に、抗酸化作用を持つ物質のスクリーニングを行った。今年度購入した吸光蛍光プレートリーダーによりアレルギー、神経疾患(アルツハイマー病など)、癌などに有効な生理活性成分のスクリーニングを行うと同時に、遺伝子レベルで評価するための有効成分の抽出・同定を行う。搬出した成分が各種病症機構の細胞情報伝達系にどのような影響を及ぼすかも踏まえて調べた。



【図 1. アロマ植物の機能性評価】



【図 2. オリーブの機能性評価】



【図 3. 塩生植物の機能性評価】

・伝統的薬効にもとづいた有効生物資源の選定;チュニジアのスファックス, メドニン, ジェルバ周辺 を対象に北アフリカの食薬資源に関する民間伝承の情報および当該物の植物学的情報(採取地, 採取時期, 使用部位, 使用形態)に関して、有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性)に関する民間伝承の聞き取り・観察を実施した。一般家庭, 香辛料商, 村落の長老, 呪術師, 産婆を現地調査対象として行った。その結果、有用植物の民衆の利用法の発見 及び民衆に伝わる新たな有用植物の発見を得られた。

調査風景

①2010年度の活動報告

1. 調査期間: 2010年12月13日～2011年1月8日
2. 受け入れ機関: CBS, IRA
3. 調査地: チュニジア南部(スファックス, マハレス, アガーレブ, ケルケナ諸島, メドニン, タタウィーン, ジェルバ島)
4. 調査内容:
調査地における有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性)に関する民衆の利用法および当該物の植物学的情報(採取地, 採取時期, 使用部位, 使用形態)に関する聞き取り・観察。
5. 調査協力者: 農業従事者, 漁業従事者, 主婦, 長老, 香辛料商, 薬剤師
6. 調査結果の一例: 表1参照

②2011年度の活動予定

1. 伝承情報と機能性情報の統合的データベースの構築
2. 植物学分野とのフィールドワーク地等情報の共有、フィールドの選定
3. CBBC, IRAをカウンタパートとして, 中西部(カスリーン, ハイドラ等)、南部(ガベス, トズール, ドゥーズ等)で、本年度と同内容のフィールドワークを網羅的に実施



2010.12.22 アガーレブ・さまざまな職業の人々



2010.12.27 タタウィーン・長老



2010.12.31 ジェルバ・ユダヤ人香辛料商

表1

植物名	学名	主な効能	服用方法
ローズマリー	<i>Rosmarinus officinalis</i>	熱冷まし	葉を煎じて茶として飲用
タイム	<i>Thymus Capitatus</i>	咳止め	葉を煎じて茶として飲用
ラベンダー	<i>Lavandula</i>	ストレス緩和	葉を煎じて茶として飲用 エッセンシャルオイルを香水・クリームとして肌に塗布
バジル	<i>Ocimum basilicum</i>	料理の薬味	乾燥: サラダに、生: パスタに

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況;「有用生物資源の機能性評価」および「伝統的薬効にもとづいた有効生物資源の選定」は当初の計画の通りに進行中である。

④カウンターパートへの技術移転の状況;JICA 短期研修を中心に導入機材に関するトレーニングや IRA と CBS と CBBC にバイオアッセイと作用メカニズム解析の技術移転を行った。

【平成23年度上半期】

1. オリーブ由来成分の機能性に関して

;オリーブの主なポリフェノール成分である Hydroxytyrosol、Apigenin などの新しい機能性(白血病の細胞分化誘導、アレルギー抑制効果)に関する研究を行った。その結果、Hydroxytyrosol と Apigenin から抗アレルギー活性を、Apigenin から白血病細胞分化誘導作用を見出した。

抗アレルギー活性に関しては、一型アレルギーモデル(RBL-2H3 細胞)において Hydroxytyrosol と Apigenin が脱顆粒を抑制することを見出し、現在その作用メカニズムをマイクロアレイやリアルタイム PCR にて解析を行っている。白血病細胞の分化誘導に関しては、Apigenin による HL-60 細胞の顆粒球への分化を見出し、現在その作用メカニズムの分析をウェスタンブロッティングにて行っている。

HydroxytyrosolとApigeninの I 型アレルギー抑制メカニズム解析

先行研究

当研究室の先行研究により、以下の事項が明らかとなっている。

- ◆チュニジア産オリーブオイルの I 型アレルギー抑制効果
- ◆抗アレルギー活性を示すチュニジア産オリーブオイルは、数種のポリフェノール(Hydroxytyrosol, Tysosol, Luteolin, Apigenin等)を含有

- ◆HydroxytyrosolとApigeninの I 型アレルギー抑制効果
- ◆HydroxytyrosolはROSの産生を抑制するが、Apigeninは抑制活性を示さない



HydroxytyrosolとApigeninは、異なるメカニズムで I 型アレルギーを抑制する。

本年度の研究

目的: HydroxytyrosolとApigeninの
I 型アレルギー抑制のメカニズム解析
(抗酸化活性の有無を指標として)

実験方法

I 型アレルギーモデル
RBL-2H3細胞播種

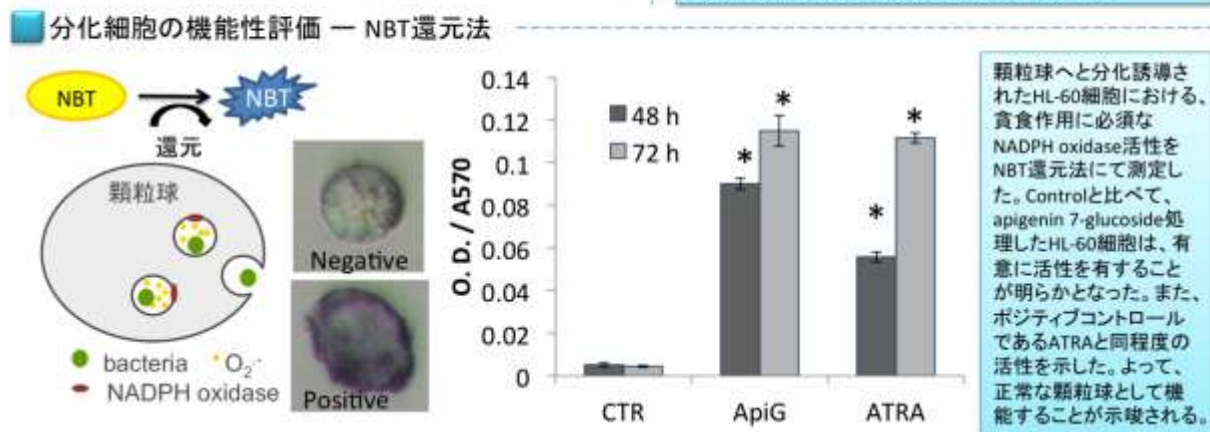
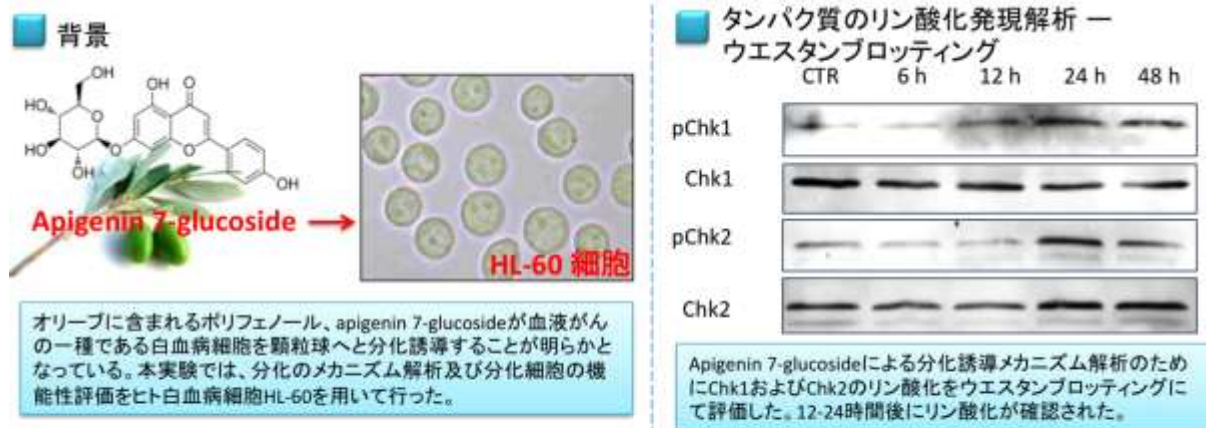
RNA抽出

cDNA合成

DNA micro-array

Real-time PCR

細胞内遺伝子発現量の変化を解析
Micro-array, RT-PCRの実験結果から、
両サンプルの活性特性を解析中



2. 薬用植物の機能性分析に関して

;チュニジア産薬用植物の機能性分析を行い、神経細胞(PC12)の分化誘導作用やうつ抑制作用を見出した。さらに、抗うつ作用は動物実験を行い、その効果を確認した。現在、チュニジア産薬用植物の神経細胞分化誘導作用や抗うつ作用に関して、そのメカニズムの分析を行っている。

チュニジア産アロマ植物由来精油(EO)が未分化の細胞に対する神経細胞分化誘導性、神経細胞での神経突起伸長促進作用を持つかどうかを神経分化モデル細胞PC12細胞を用いて調べた。

使用した地中海産アロマ植物



学名: *Rosmarinus officinalis*
EO中の含有芳香成分: α-ピネン



学名: *Crithmum maritimum*
EO中の含有芳香成分: サビネン



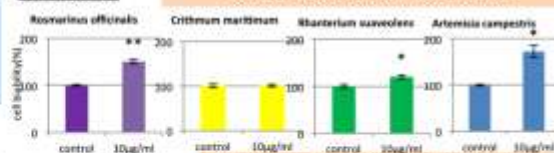
学名: *Rhanterium suaveolens*
EO中の含有芳香成分: ボルネオール



学名: *Artemisia campestris*
EO中の含有芳香成分: γ-テルピネン

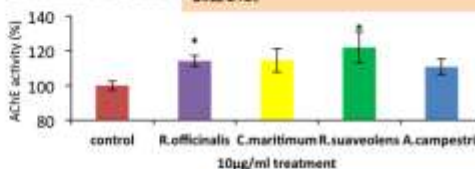
① 細胞毒性

EOが細胞に対して毒性を持つかどうかを調査し、その後の研究に用いるEOの使用濃度を決定した。



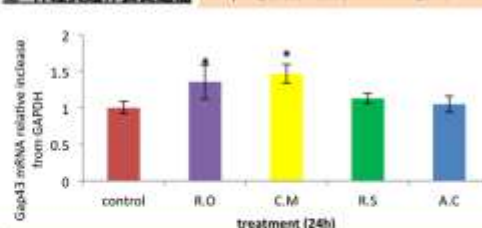
② 神経分化誘導能

AChEを神経細胞への分化マーカーとして活性を調査した。



③ 神経突起伸長促進能

Gap43を神経突起伸長マーカー遺伝子として用いた。



神経分化細胞モデルPC12細胞(ラット褐色腫細胞)を用いた
①細胞毒性評価...EOが細胞毒性を示すか
②神経分化誘導能評価...EOが細胞を神経分化させるか
③神経突起伸長促進能評価...EOに神経突起伸長作用があるか

R. officinalis, *C. maritimum*由来EOに神経成長因子用効果が見られた。それぞれのEO中の成分中の活性成分の同定、その成分の作用するメカニズムの究明を計画している。

*Rosmarinus officinalis*のエタノール抽出物及びその成分によるストレス性神経障害の抑制効果

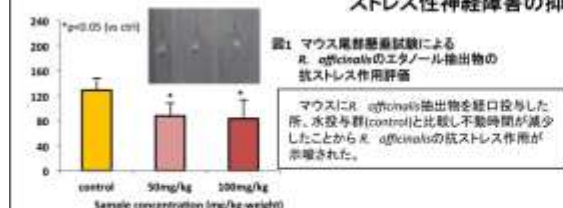


図1 マウス尾懸垂試験による *R. officinalis*のエタノール抽出物の抗ストレス作用評価

マウスに *R. officinalis*抽出物を経口投与した所、水投与群(control)と比較し不動時間が減少したことから *R. officinalis*の抗ストレス作用が示唆された。

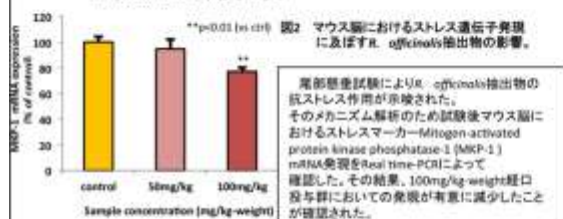


図2 マウス尾におけるストレス遺伝子発現に及ぼす *R. officinalis*抽出物の影響。

尾懸垂試験により *R. officinalis*抽出物の抗ストレス作用が示唆された。そのメカニズム解析のため試験後マウス尾におけるストレスマーカー-Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) mRNA発現をreal time-PCRによって確認した。その結果、100mg/kg-weight経口投与群において発現が有意に減少したことが確認された。

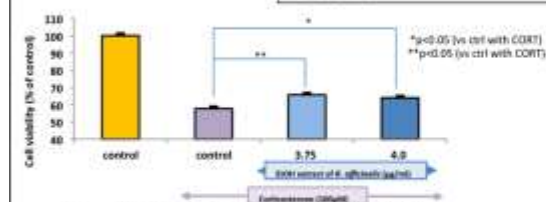


図3 ストレス下における *R. officinalis*抽出物の神経保護作用

*R. officinalis*抽出物で処理したPC12細胞(神経モデル)にコルチコステロン(CORT)によるストレスを与えた。その時の細胞生存率をMTT法により確認した。結果、ストレス処理区(CORT処理)と比較し抽出物処理区(抽出物処理+CORT処理)の細胞生存率は有意に増加した。

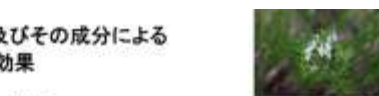


図4 PC12細胞におけるタンパク質発現に及ぼす *R. officinalis*成分の影響。

*R. officinalis*成分であるルチオール(Lut)、ローズマリン酸(RA)及びカルボキシ酸(CA)で処理したPC12細胞のタンパク質発現をプロテオミクスにより網羅的に確認した。その中で神経伝達物質合成に関する酵素pyruvate carboxylase (PC)及びtyrosine hydroxylase (TH)に焦点を当て、そのタンパク質発現量に影響を及ぼす成分を検証した。結果、Lut、CA及びRAはPC発現量を増加させ、LutはTH発現量に影響を及ぼさなかった。

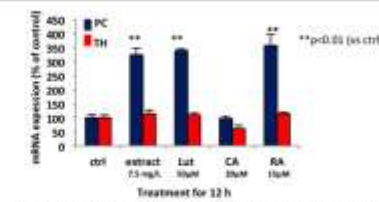


図5 PC12細胞における遺伝子発現に及ぼす *R. officinalis*抽出物及びその成分の影響

PC12細胞におけるPC及びTHのmRNA発現量に及ぼす *R. officinalis*抽出物及びその成分 Lut、RA及びCAの影響をRT-PCRにより確認した。結果として抽出物、Lut及びRAはPCのmRNA発現量を増加させた。一方でTHのmRNA発現量には影響を与えなかった。

チュニジア産薬用植物においては、ヒト腸管細胞 (Caco-2) を用いたエネルギー代謝促進効果も見出しており、現在その作用物質の同定やメカニズムの解析を行っている。さらに、B16 細胞を用いたメラニン産生に及ぼすチュニジア産薬用植物の新しい機能性の探索を行い、メラニン産生に影響するいくつかの薬用植物を見出した。現在、その作用メカニズムの解析を行っている。

*Cistus monspeliensis*に関する研究

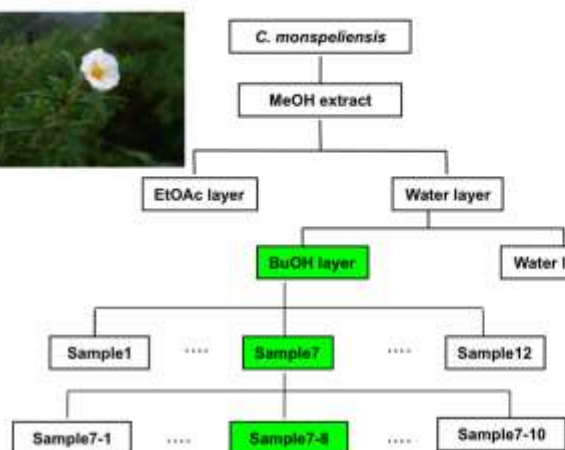


図1 MTT法による*C. monspeliensis*のフラクション解析

*C. monspeliensis*のフラクション解析を行ったところ、Sample7-8に活性成分が含まれていることを解明した。また、Sample7ではATP産生の増加が確認できた。

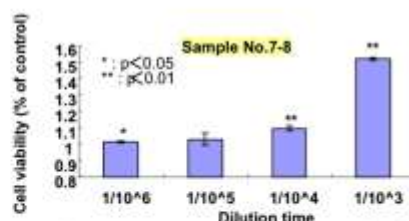


図2 *C. monspeliensis*フラクションにおけるCaco-2細胞増殖への影響

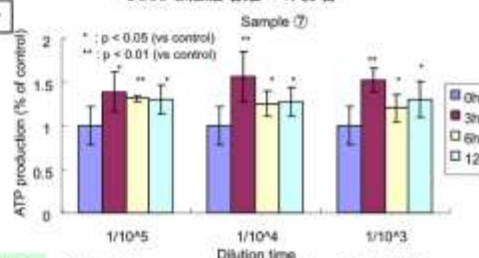


図3 *C. monspeliensis*フラクションにおけるCaco-2細胞のATP産生への影響

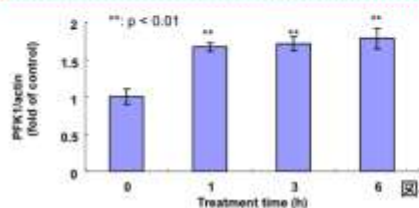
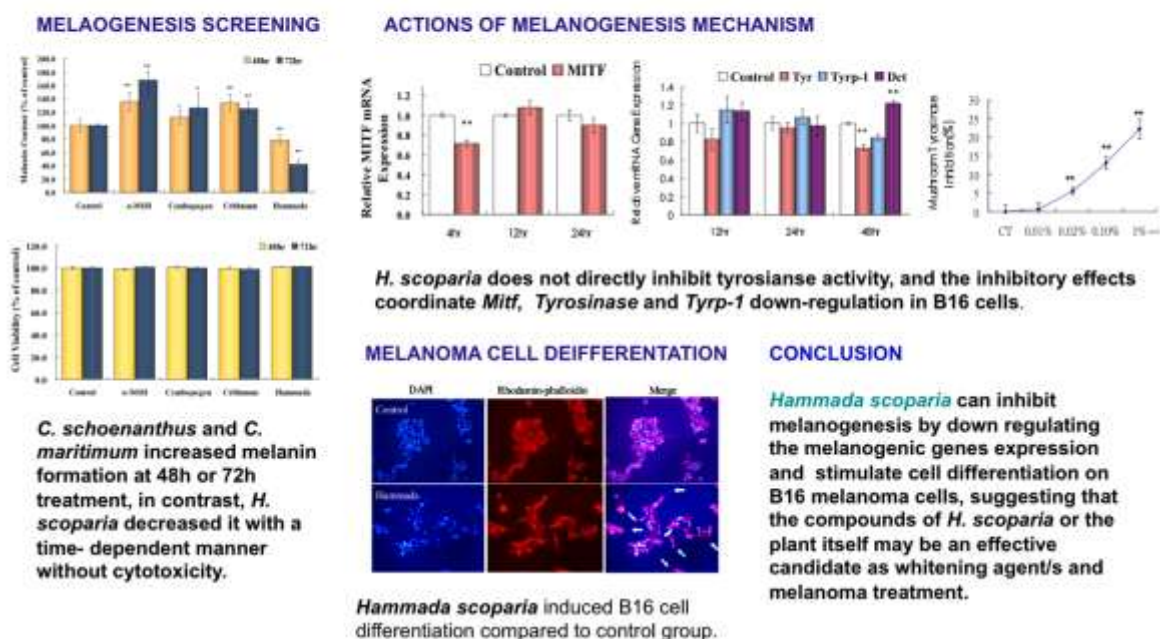


図4 PFKのmRNA発現に及ぼす*C. monspeliensis*抽出物の影響

*C. monspeliensis*抽出物はCaco-2細胞のATP産生を促進させる。そのメカニズム解析のために、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼPFKのmRNA発現について解析を行った。その結果、未処理のCaco-2細胞と比較して1,3,6hで有意的な発現の増加が確認できた。

チュニジア産アロマ植物のメラニン産生に及ぼす影響 およびその作用メカニズム



3. 肝線維化治療を目的とした植物抽出液からの有用化合物の単離精製

肝線維化には肝星細胞の活性化を抑制することが重要と考え、静止期の不活性な肝星細胞は脂肪を蓄積することにまず着目し、脂肪蓄積活性を指標に様々な植物抽出液のスクリーニングを行ってきた。肝星細胞の活性化抑制には核内受容体の一つである peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) が重要であることから、スクリーニングで脂肪蓄積活性があると思われた植物抽出液について、PPAR γ アゴニスト活性を調べ、活性が見られた植物抽出液について研究を進めた。

① MS12, *Thymelaea hirsuta* について

以前に精製を進めていた抽出液は構造決定に取り組むには量的に少なかった。そこで、再度、筑波大学磯田研究室で保管されていた約 40 g の植物乾燥体から 70%エタノールで抽出を行った後に、酢酸エチル、ブタノール、水で溶媒分配し、キメラ受容体 Gal4-DBD(DNA 結合ドメイン) / PPAR γ -LBD(リガンド結合ドメイン)とその標的配列を含むルシフェラーゼレポーター (UAS-tk-Luc) を組み合わせたアッセイ系を用いて、PPAR γ アゴニスト活性測定したところ、酢酸エチル層に活性が見られた。次に、中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製したところ、比較的強い PPAR γ アゴニスト活性を示した画分があったので、現在さらに精製を進めている。なお、昨年度、MS12 メタノール抽出液には PPAR γ アゴニスト活性は見られず、オートファジーのマーカーである LC3 の発現誘導が弱いながら見られるという報告をしていたが、新しく抽出し直した結果、全く逆で、PPAR γ アゴニスト活性が存在し、LC3 の誘導活性は殆どなかった。その原因は不明であるが、用いた乾燥体植物の違いによるのかも知れない。

② MS42, *Artemisia campestris* について

約 100 g の乾燥体植物から 70%エタノールで抽出を行った後に、酢酸エチル、ブタノール、水で溶媒分配し、上記のルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて PPAR γ アゴニスト活性測定したところ、酢酸エ

チル層に活性が見られた。そこで、中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製したところ、極性の異なる 2 つの画分において、レポーターアッセイ系で比較的強い PPAR γ アゴニスト活性が見られた。そのうちの極性の高い方の画分は、肝星細胞株 HSC-T6 細胞を用いて脂肪蓄積促進活性を Oil Red-O 法で評価すると、合成 PPAR γ アゴニストであるトログリタゾンと同様に活性が見られたが、極性の低い方の画分は活性が見られなかった。現在どちらの画分も精製を進めている。

③ ニガハッカ、*Marrubium vulgare*

まず Oil Red-O 法で評価すると、日本で栽培した、北アフリカにも自生しているニガハッカのメタノール抽出液に脂肪蓄積促進活性があること、また弱いながら PPAR γ アゴニスト活性もあることを確認できたので、活性成分を精製することにした。手持ちの少量のメタノール抽出液を出発物質とし、中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し、主に 2 つの離れた分画に PPAR γ アゴニスト活性が存在したが、一つの分画は量が少なかったため、構造を決めることは出来ず、もう一つの画分を薄層クロマトグラフィーで展開して分画後、NMR や質量分析を用いて構造解析を行ったところ、既知の脂肪酸 4 種類が同定できた。そのうちの一つは珍しい構造の脂肪酸であり、調べた限りでは PPAR γ アゴニスト活性を有するという報告はなかった。既に脂肪酸類の中に PPAR γ アゴニスト活性を有するものがあるという報告はあるため、同定した各脂肪酸について実際に PPAR γ アゴニスト活性があるかは検討中である。現在、筑波大学磯田研究室の川田先生にチュニジアで採取頂いたニガハッカの乾燥植物体を用いて抽出量をスケールアップし、精製を進めている。これにより、少量のために構造決定に至らなかった画分の活性物質の同定が可能になると考えている。

4. 抗 C 型肝炎ウイルス(HCV)複製抑制物質の精製

① アフリカヒナギク *Lonas annua* (L.) Vines et Druce

昨年、弱いながら HCV 複製抑制活性が見られたアフリカヒナギクについて活性成分の精製に取り組んだが、比活性の上がった画分はないこと、チュニジアでの植物体の採取をお願いしたが、量的に確保することは困難であったことから、このプロジェクトは中断することにした。

[考察]

今回の例でもわかるように、植物体の採取時期や、採取場所によって目的とする化合物の量が変動することはあり得るので、有用な化合物が得られた場合は、実際にチュニジアの各地で、時期を変えて採取した植物体について活性物質の量の違いを確認することは重要であると思われる。(なお、磯田先生の方でチュニジアの異なる場所で(大きくは 2 箇所、その中で各 5 箇所)採取されたローズマリーについて、HPLC を用いた簡便法でローズマリン酸とルテオリンの定量を行ったが、こちらは調べた 10 地点で両化合物ともそれ程大きな含有量の差はなかった。)

現時点では、北アフリカの植物から主に PPAR γ アゴニストを探索している。既に天然の PPAR γ アゴニストとしては、脂肪酸類、フラボノイド類が同定されているが、珍しい脂肪酸 (PPAR γ アゴニスト活性があるかは現時点では不明) が同定できたこと、北アフリカの植物由来ではないが PPAR γ アンタゴニスト GW9662 をアゴニストに変換するというユニークな活性を持つ化合物が同定できたことから、今までに同定されていない植物由来 PPAR γ アゴニストが同定できる可能性はあると考えている。

また PPAR γ のリガンド結合ドメインは複数のサブポケットからなる、ユニークな大きなポケットを形成しており、リ

ガンドによって結合するポケットが異なることがあり、その結果生じる構造変化によっては結合・解離する共役因子が異なるため、異なる活性を発現する可能性が示されている。PPAR γ は脂質代謝だけでなく、抗炎症作用、抗腫瘍性作用など、多様な作用に関わることが知られている。本プロジェクトでは北アフリカの植物から既知、未知のPPAR γ アゴニストを数多く同定し、それらの組み合わせによって、これらの他の活性についても検討することで、様々な応用の方向性も探っていきたいと考えている。

1 生物資源有用性評価

1-1 伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

1. 2011年度上半期実施内容

①現地調査

1. 調査期間: 2011年9月4日～2011年9月6日
2. 受け入れ機関: CBBC (Prof. Ksouri and Prof. Smaoui)
3. 調査地: チュニジア北部(チュニス、ベン・アルース、エル・ファハス)
4. 調査内容: 調査地における有用植物(オリーブ、薬用植物、耐塩性)に関する民衆的利用法に関する聞き取り・観察
5. 調査協力者: 農業従事者、主婦、長老、香辛料商、薬剤師、医師、薬草輸出会社関係者(計19名)
6. 調査結果: 37種の薬草に関する情報を収集
一例は本パワーポイント2枚目以降(2010年度調査結果との比較を含む)

②調査で得た伝承情報の本プロジェクトデータベースへの統合(現在準備中)

2. 2011年度下半期の活動予定

1. 国際学会(TJASST:チュニジア-日本 文化・科学・技術学術会議)での発表(2011年11月)
2. CBBCをカウンタパートとしてタバルカを中心とした北西部での、上半期と同内容のフィールドワーク(2011年11月)
3. 伝承情報と機能性情報の統合的データベースの構築
4. 植物学分野とのフィールドワーク地等情報の共有、今後のフィールドの選定

調査地と調査の様子



2011.9.8. 調査地(エル・ファハス)の自然環境



2011.9.6. 薬草利用に積極的な薬剤師への聞き取り(ベン・アルース)



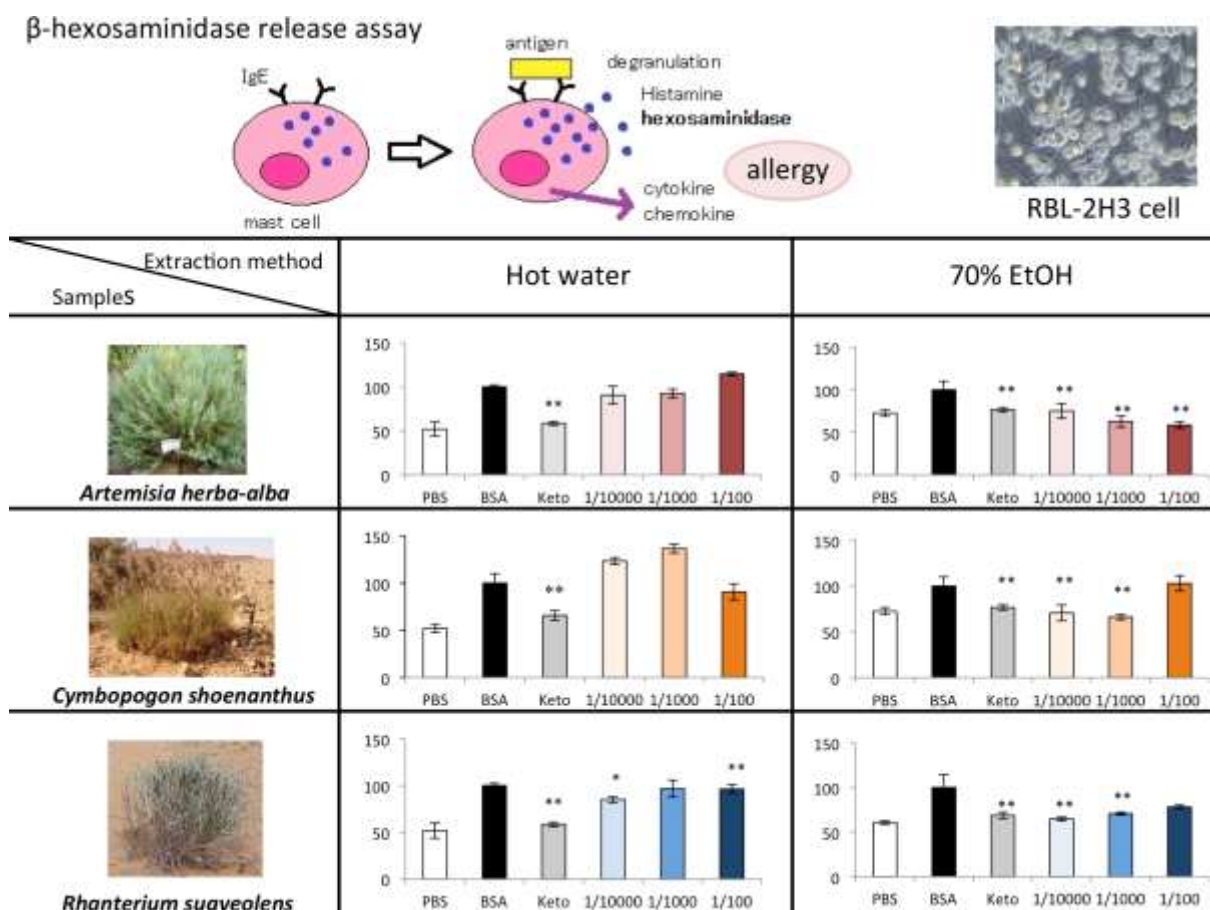
2011.9.8 農業従事者への聞き取り(エル・ファハス)

【平成 23 年度下半期】

上半期に引き続きアロマ植物、塩生植物、オリーブの新しい生理活性の機能探索を行った。

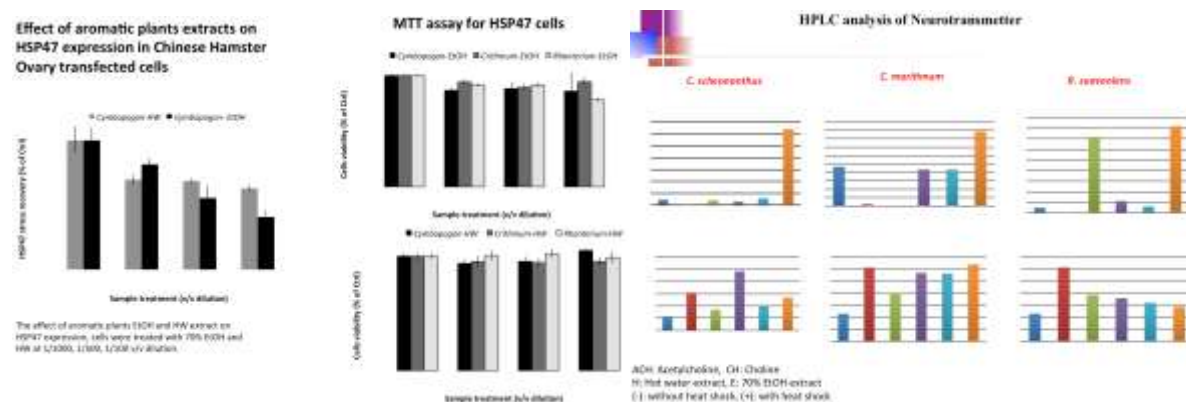
1. アロマ植物の抗アレルギー活性効果に関して

チュニジアから採集した3つのアロマ植物の抗アレルギー活性を β -hexosaminidase release assay により評価した。その結果、*Artemisia herba-alba* のエタノール抽出物、*Cymbopogon shoenanthus* のエタノール抽出物、*Rhanterium suaveolens* の熱水とエタノール抽出物から著しい β -hexosaminidase の分泌阻害効果が見られた。



2. アロマ植物のストレス抑制効果に関して

チュニジアから採集した3つのアロマ植物のストレス抑制効果に及ぶ影響をHSP47 遺伝子導入細胞やヒト由来神経細胞の神経伝達物質の測定により評価を行った。その結果、*Cymbopogon scheonanthus*, *Crithmum maritimum*, *Rhanterium suaveolens* の抽出物から HSP47 の反応を抑制する効果やアセチルコリンやコリンの産生を促進することを見出した。



3. オリーブ葉抽出物の白血病細胞分化誘導効果に関して

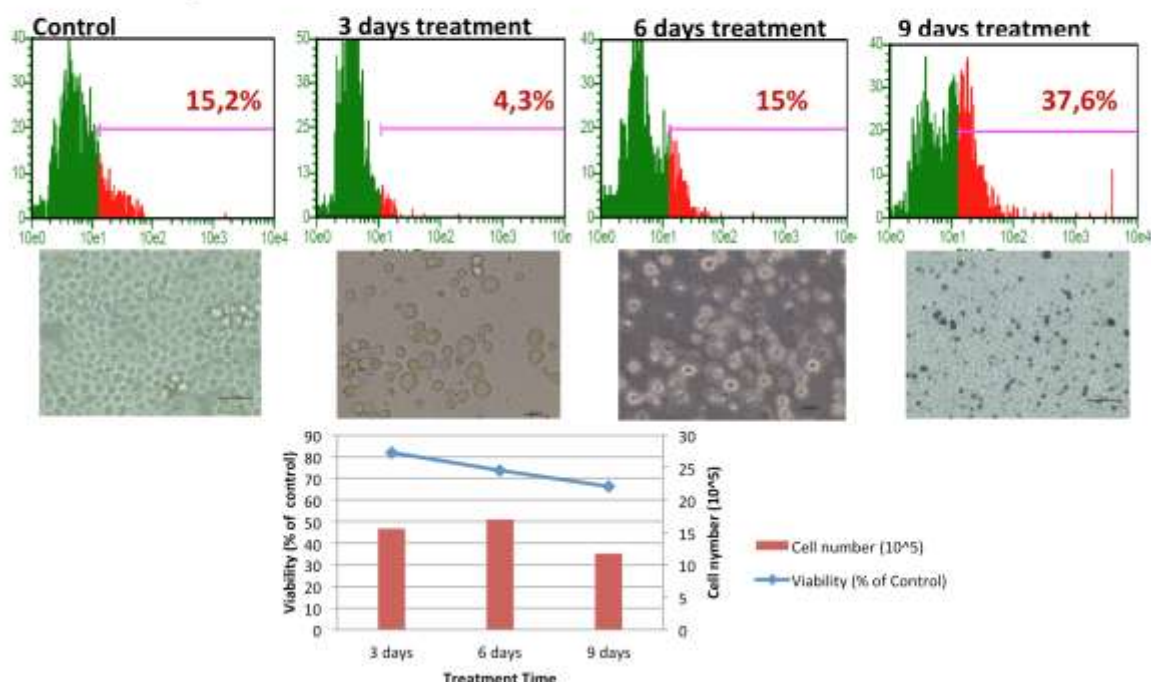
チュニジアから採集したオリーブ葉のエタノール抽出物におけるヒト由来白血病細胞である K562 の分化誘導活性を調べた。この結果、SFAX 地域から採集したオリーブ葉の抽出物から K562 細胞の分化誘導活性を見出した。

Cell Differentiation Marker Expression expression

Sample: Ethanol extract of Chemlali Sfax : 75µg/mL and 100µg/mL

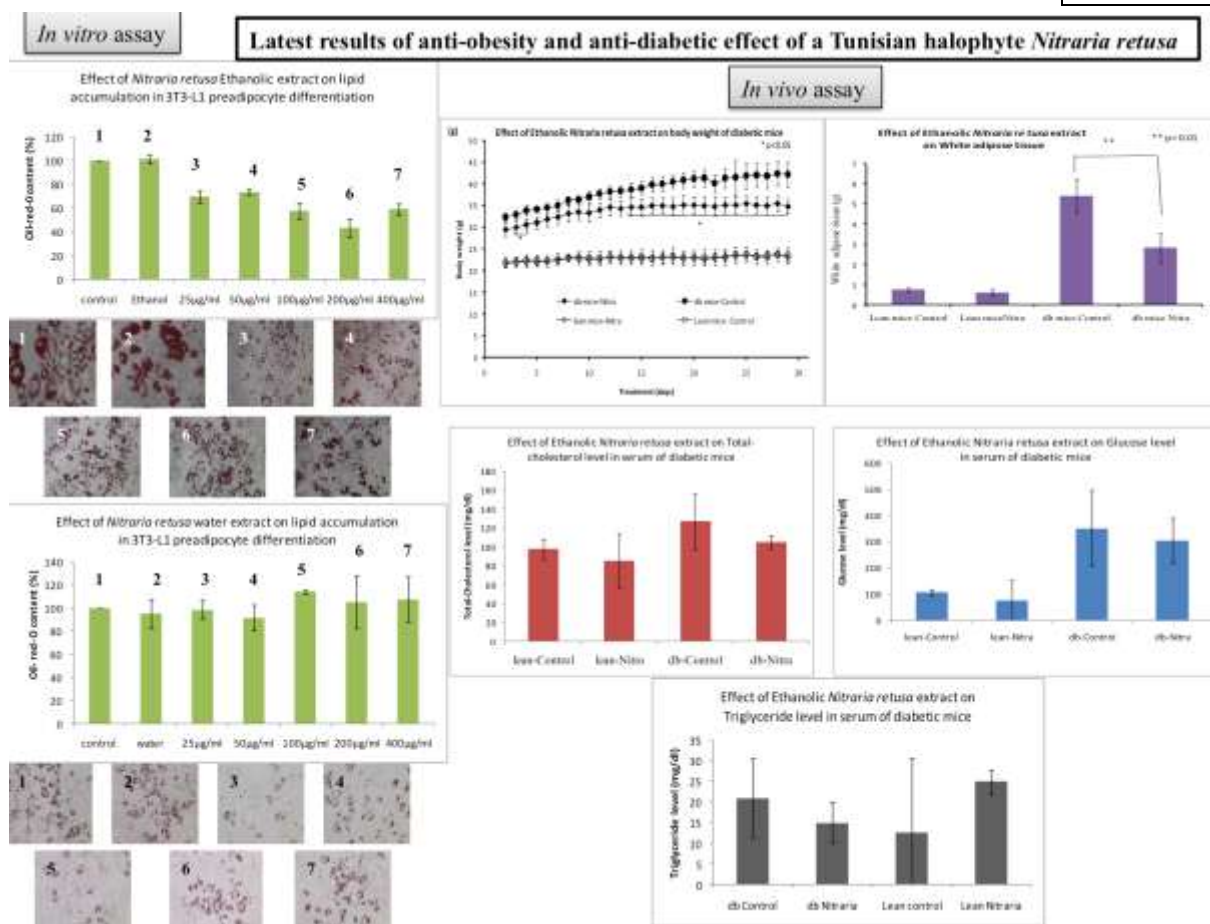
Investigated ways of differentiation: Granulocytes, Monocytes, Megacaryocytes and Erythrocytes using antibodies: CD11b, CD14, CD41 and antiglycophorin A.

No differentiation effect using 75µg/mL in all tested destinations, only Erythrocyte differentiation with 100µg/mL and after 9 days of treatment



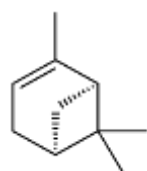
4. 塩生植物の抗肥満効果に関して

チュニジアから採集した塩生植物 (Halophyte) の抗肥満効果を調べるため、前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞や糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスを用いた。その結果、イソラムテチンを多く含有することが知られている *Nitraria retusa* の抽出物処理により、脂肪細胞の分化抑制効果や ob/ob マウスの体重増進・脂肪組織抑制効果が見られた。

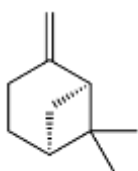


5. アロマ植物のエッセンシャルオイルの神経細胞分化誘導効果に関して

エッセンシャルオイル(EO)の神経細胞分化誘導能の評価のため、細胞より分泌される神経伝達物質質量の変化を指標としてその検量を行った。*Rosmarinus officinalis* EO中の主成分である α -pinene, β -pinene, および camphor をそれぞれ、または組み合わせて神経分化モデル細胞である PC12 細胞に処理した。48 時間後に細胞中の神経伝達物質 acetylcholine およびその基質である choline の分泌量を、ECD(電気化学検出器)を付した HPLC(高速液体クロマトグラフィー)を用いて検量した。



α -pinene

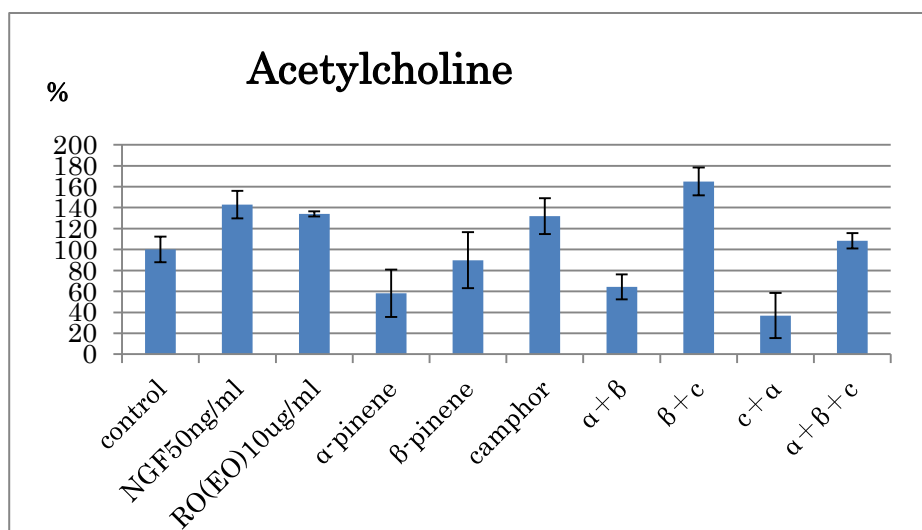
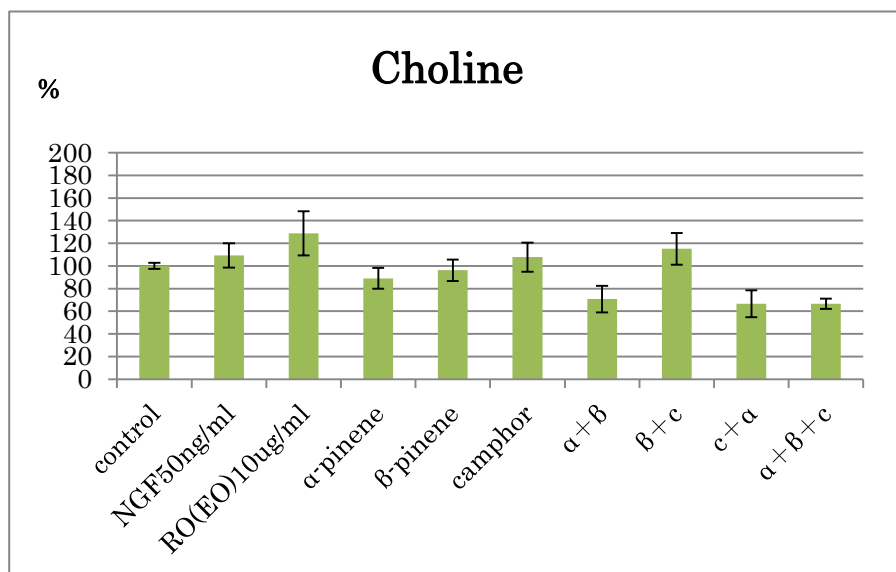


β -pinene



camphor

R. officinalis EO中の成分 α -pinene, β -pinene, および camphor のうちいずれか一種類、または複数種の組み合わせを用いて 48 時間処理を行い、PC12 細胞における神経伝達物質 acetylcholine およびその基質、分解物である choline の HPLC を用いた検量。



【京都大学 永尾】

[結果]

肝線維化治療を目的とした植物抽出液からの有用化合物の単離精製

肝線維化に関わる肝星細胞の活性化を抑制することが、線維化治療には重要であり、肝星細胞の活性化抑制に重要な機能を果たす核内受容体の一つである peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ のアゴニストを標的として、各種植物抽出液をスクリーニングして、以下の3種の植物に絞り、単離・同定を行う研究を進めた。

1. MS12, *Thymelaea hirsuta* について

以前の少量植物体サンプルを用いた実験結果をもとに、再度筑波大学磯田研究室で保管されていた約40gの植物乾燥体から70%エタノールで抽出を行った後に、酢酸エチル、ブタノール、水で溶媒分配し、キメラ受容体 Gal4-DBD(DNA 結合ドメイン) / PPAR γ -LBD(リガンド結合ドメイン)とその標的配列を含む

ルシフェラーゼレポーター (UAS-tk-Luc) を組み合わせた PPAR γ アゴニスト活性測定系を用いて、精製を進めた。酢酸エチル層に活性が見られたため、中圧シリカゲルクロマトグラフィー、および高速液体クロマトグラフィー等を用いて精製を進めた結果、今までに PPAR γ アゴニスト活性が報告されていない、構造は既知の化合物(Compound 1)を同定できた。

2. MS42, *Artemisia campestris* について

本年度前期に約 100 g の乾燥体植物から 70%エタノールで抽出を行った後に、酢酸エチル、ブタノール、水で溶媒分配し、上記のルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて PPAR γ アゴニスト活性測定したところ、酢酸エチル層に活性が見られた。そこで、中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製したところ、極性の異なる 3 つの画分(前期の報告書では 2 つの画分としたが、極性が両画分の中間にあたる画分にも活性はやや弱い、量的に存在する画分があった)において、レポーターアッセイ系で PPAR γ アゴニスト活性が見られていた。この 3 画分中、極性が中間的な、量的に多い画分の精製を進め、PPAR γ アゴニスト活性の報告のない、構造としては既知の化合物(Compound 2)を同定した。但し、Compound 2 の類縁体に PPAR γ アゴニスト活性があることが、2010 年に論文発表されていることが判明した。PPAR γ アゴニスト活性が見られた他の画分についても精製を進めている。

3. ニガハッカ、*Marrubium vulgare* について

まず Oil Red-O 法により肝星細胞株で脂肪蓄積促進活性があると認められた、日本で栽培した、北アフリカにも自生しているニガハッカのメタノール抽出液に弱いながら PPAR γ アゴニスト活性があることを確認できたので、活性成分の精製を進めた。手持ちの少量のメタノール抽出液を出発物質とし、中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行うと、弱いながら多くの画分に PPAR γ アゴニスト活性が確認された。そのうち、比較的極性の低い画分について精製を進め、4 種の脂肪酸が含まれることが質量分析で確認出来た。4 種の脂肪酸のうち、3 種については既に PPAR γ アゴニスト活性があることが報告されていたが、1 種(Compound 3: 6-octadecynoic acid)は、構造は既知だが PPAR γ アゴニスト活性の報告のない珍しい脂肪酸であった。この脂肪酸が実際に PPAR γ アゴニスト活性を持つかは、単離精製には至っていないため不明で、現在化学合成して活性を確認すべく準備を進めている。

[考察]

核内受容体の一種 PPAR γ は糖・脂質代謝制御に関与し、合成 PPAR γ アゴニストのロシグリタゾン等のチアゾリジン誘導体は糖尿病薬として、臨床で用いられているが、浮腫、心不全や膀胱癌のリスク上昇などの副作用も知られており、これらに代わる PPAR γ アゴニストの探索が進められている。本研究で発見された植物由来 PPAR γ アゴニストが *in vivo* で活性を示し、副作用の少ない薬品として開発される可能性もある。また、植物抽出液から PPAR γ アゴニストを精製する過程で、カラムクロマトグラフィーで分画した複数の画分に、弱いながら PPAR γ アゴニスト活性が見られること、精製を進めても比活性がそれ程上昇しないことから、おそらく植物抽出液中には多種の PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物が存在し、粗抽出液でも精製した単一化合物とそれ程大きく変わらない活性が見られていると考えられる。つまり、植物体やその粗抽出物が複合的に機能し、伝承薬として利用されてきた実態に即していると考えられる。このため、安全性等が確認されれば、植物エキスの形で、PPAR γ を標的とした疾患改善に利用することが可能かも知れない。なお、PPAR γ アゴニストとして、脂肪酸類、ある種のフ

ラボノイドやトリテルペノイド類などの多様な化合物が報告されつつあるが、これは PPAR γ のリガンド結合ドメインが複数のサブポケットからなる、ユニークな大きなポケットを形成していて、リガンドによって結合するポケットが異なるためと理解されている。

一方、PPAR γ は糖・脂質代謝だけでなく、抗炎症作用、抗腫瘍性作用など、多様な作用に関わることが知られてきており、本プロジェクトで同定した PPAR γ アゴニストを有する化合物については上記の多様な活性を持ちうるか、検討をしていく予定である。

1 生物資源有用性評価

1-1 伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

2011 年度実施内容

①2011年11月15日～19日の5日間にわたり CBBC の Ksouri 教授と大学院生 Mondher 氏とともにチュニジア北部のビゼルト県において、有用植物(薬用植物)に関する民衆的利用法に関するインタビューを中心とした現地調査を行なった。17名の農業従事者にインタビューを行ない、30種の薬草に関する情報を収集した。

②上記現地調査で得た伝承情報を本プロジェクトデータベースへ統合する作業を開始した。



2011.11.15 調査地(ビゼルト県)の自然環境



2011.11.15 遊牧生活を送る女性への聞き取り
(ビゼルト県)



2011.11.15 農業従事者への聞き取り(ビゼルト県)

表 1.2011 年 11 月ビゼルト県における薬草の民衆的利用法に関する聞き取り調査の結果(一例)

	植物名 ラテン語／日本語	効能があるとされる症状	形態
1	<i>Mentha pulegium</i> ペニーロイヤルミント	A. 頭痛	
		B. 関節痛	
		C. インフルエンザ	
		D. 高熱	
2	<i>Trigonella foenum-graecum</i> コロハもしくは フェネグリーク	A. 頭痛	
		B. 高熱	
		C. 腹痛	
3	<i>Rcinus communis</i> トウゴマ	A. 頭痛	
		B. 関節痛	
		C. 便秘	
		D. 咳	
4	<i>Artemisia absinthium</i> ニガヨモギ	A. 裂傷	
		B. 出血	
		C. 月経痛	
		D. インフルエンザ	

【平成 24 年度上半期】

1-1-1 伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

CBBC の Abdeli 教授および Ksouri 教授、IRA の Neffatti 教授とそれぞれ、次回調査の日程と調査地の選定を協議した。その結果、11 月 23 日～12 月 2 日の予定で、IRA に滞在し、有用植物(薬用植物)に関する民衆的利用法に関するインタビューを中心とした現地調査を行なうこととなった。

1-2-1 バイオアッセイによる生物資源の機能性評価

① *In vitro*

- ・ 抗アレルギー効果の評価; 塩生植物である *Atriplex inflata*, *Tamarix aphylla*, *Arthrocnemum indicum*, *Salicornia maritima* 抽出物の抗アレルギー活性を調べるため、1型アレルギーモデルである IgE 処理 RBL-2H3 細胞を用いた。その結果、*Atriplex inflata*, *Tamarix aphylla*, *Arthrocnemum indicum*, *Salicornia maritima* の抽出物 10 μ g/ml においてケミカルメディエーターである β -hexosaminidase の放出を抑制することを見出した。今後、上記塩生植物の抽出物によるヒスタミン放出抑制効果を調べ、抗アレルギー効果を確認する必要がある。
- ・ 抗ストレス効果の評価; 薬用植物である *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の抗ストレス活性を調べるため、Heat Shock Protein (HSP) 47 プロモーター導入細胞を用いてストレス応答を調べた。その結果、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物(EtOH、熱水)において HSP47 応答低減効果が見られた。さらに、ヒト由来神経芽細胞腫である SH-SY5Y において H_2O_2 ストレッサーによる神経細胞保護効果を評価した結果、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物が神経細胞保護効果を有することを見出した。SH-SY5Y において神経伝達物質であるアセチルコリンの分泌を *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物が促進することも HPLC-ECD を用いた測定により明らかにした。今後、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の抗ストレス作用におけるメカニズムの解析を行う予定である。なお、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の成分分析は IRA が行う予定である。

② *In vivo*

- ・ リラックス誘導効果; ローズマリーエッセンシャルオイルのリラックス効果を評価するために、マウスを用いて Tail Suspension Test (TST) を行った。その結果、30 分間のローズマリーエッセンシャルオイルの吸引により、ストレスの軽減効果が確認された。今後、各種神経伝達物質の測定や脳の分子レベルでの解析を行う予定である。
- ・ 抗肥満効果; 塩生植物である *Nitriara retusa* 抽出物の抗肥満効果を調べるために、高脂肪食を用いて動物実験を行った。実験は *Nitriara retusa* 抽出物を経口投与し、毎日の体重変化を調べた。その結果、高脂肪食のマウスにおいて *Nitriara retusa* 抽出物を経口投与による体重増加の低減が見られた。さらに、内蔵脂肪組織重量の増加における低減効果も確認された。今後、血漿及び各組織における分子レベルの分析実験を行い、作用メカニズムの解明を行う予定である。
- ・ 抗ストレス効果; *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の抗ストレス効果を評価するために、マウスを用いて Tail Suspension Test (TST) を行った。実験は *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物を経口投与し、TST 試験における無動時間の変化を調べた。その結果、30 分間のローズマリーエッセンシャルオイルの吸引により、ストレスの軽減効果が確認された。今後、各種神経伝達物質の測定や脳の分子レベルでの解析を行う予定である。
- ・ 抗がん効果; *Thymelaea hirsuta* 抽出物の B16 メラノーマ細胞における抗がん効果を評価するために、マウスを用いて B16 細胞静脈注射試験を行った。実験は *Thymelaea hirsuta* 抽出物を経口投与し、肺への

転移を調べた。その結果、*Thymelaea hirsuta* 抽出物を経口投与により、肺転移の変化は見られなかった。しかし、B16 細胞の静脈注射の成功率が低かったため、本実験による *Thymelaea hirsuta* 抽出物の抗がん効果は評価できない。今後、再度 B16 細胞静脈注射試験を行う予定である。

1-2-1 評価された機能性に関する活性本体の同定、メカニズム解析

- ・ ローズマリーのポリフェノール成分による抗うつ効果;ローズマリーの主なポリフェノール成分による抗うつ効果の作用メカニズムを調べた結果、神経伝達物質産生に関わる遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。HPLC-ECD により神経伝達物質の分泌増加も確認した。その課程でうつ病のバイオマーカーである MKP1 の発現をローズマリーの主なポリフェノール成分が抑制することを見出した。今後、ローズマリーの主なポリフェノール成分の *in vivo* 試験を行い、抗うつ効果の確認や作用メカニズムの解明を行う予定である。
- ・ *Cymbopogon schoenanthus* 抽出物の美白効果;薬用植物である *Cymbopogon schoenanthus* 抽出物の美白効果における作用メカニズムの分析を行った。その結果、*Cymbopogon schoenanthus* 抽出物がメラニン産生経路の Tyrosinase 関連分子の制御は勿論、メラノソーム (Melanosome) 関連分子の制御も誘導することを明らかにした。この二つの経路を制御する効果は非常にユニークな結果であり、活性成分を特定するための成分分析 (LC-ToF/MS) を CBBC の Ksouri 先生に依頼している状況である。
- ・ *Artemisia herba-alba* 抽出物の抗アレルギー効果;薬用植物である *Artemisia herba-alba* 抽出物の抗アレルギー効果における作用メカニズムの分析を行った。その結果、*Artemisia herba-alba* 抽出物が1型アレルギーモデルである IgE 処理 RBL-2H3 細胞において、細胞内カルシウム流入を抑制することによりケミカルメディエーター放出を抑制することを確認した。さらに、アレルギー反応関連サイトカインを調べた結果、*Artemisia herba-alba* 抽出物がサイトカインの産生を制御していることを明らかにした。今後、抗アレルギー活性を有する活性成分を特定するための成分分析 (LC-ToF/MS) を CBBC Ksouri 先生に依頼している状況である。

【京都大学 永尾】

[結果]

肝線維化抑制物質スクリーニングのための脂肪蓄積活性を指標にして得られてきた、植物由来 PPAR・アゴニストに関する研究

前年度に引き続き 1. *Artemisia campestris*, 2. *Marrubium vulgare*, 3. *Thymelaea hirsuta* に関してレポーター系を用いて、PPAR γ アゴニストの精製を進めるとともに、構造を同定した精製標品が微量の場合、今後の生物活性評価に向けて化学合成による量的確保も考えた。また、チアゾリジン誘導体等の合成 PPAR γ アゴニストの中には、核内受容体である PPAR γ だけではなく、全く構造の異なる G タンパク質共役型受容体である脂肪酸受容体の GPR40 や GPR120 にも作用するものがあるため、京都大学大学院薬学研究科の平澤明准教授を共同研究者としてお加わり頂き、上記の植物から同定した PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物、および精製初期段階の画分について、GPR40 または GPR120 のアゴニスト活性が見られるか検討した。

1. *Artemisia campestris*

PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物として、昨年度の Compound 2 に続いて、Compound 4 を単離同定した。

脂肪酸受容体 GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性について、GPR40 または GPR120 を安定発現させた細胞株を用いて、細胞内 Ca^{2+} の上昇を指標にして検討した。Compound 2 については、活性は見られなかった。一方、溶媒分配時の酢酸エチル層について中圧シリカゲルクロマトグラフィーで分画した画分について同様に検討したところ、複数の画分で活性が確認された。

2. *Marrubium vulgare*(ニガハッカ)

PPAR γ アゴニスト活性を有する画分に同定された、三重結合を有する珍しい脂肪酸の 6-octadecynoic acid(6-ODA)について、精製では微量しか得られなかったため、petroselinic acid を初発物質として合成した。合成した 6-ODA について、三重結合の位置の異なる 9-octadecynoic acid(9-ODA、市販品)と比較して、PPAR γ アゴニスト活性、ならびに GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性について検討した。その結果、6-ODA、9-ODA いずれも PPAR γ アゴニスト活性を示したが、GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性については、6-ODA のみで活性が見られた(複数回にわたり活性は確認出来たが、急に活性が見られなくなったため、再現性確認中)。一方、溶媒分配時の酢酸エチル層について中圧シリカゲルクロマトグラフィーで分画した画分について、GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性に関して検討したところ、一つの分画でのみ GPR40、GPR120 に対する弱いアゴニスト活性が観察された。

3. MS12, *Thymelaea hirsuta*

前年度に PPAR γ アゴニスト活性が確認され、構造を同定した Compound 1 については、GPR40 に対するアゴニスト活性はないが、GPR120 に対するアゴニスト活性がある可能性を示す結果が得られた。しかし、活性を再確認するには量的に不足しているため、有機合成による取得を行った。一方、溶媒分配時の酢酸エチル層を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで分画した画分について、GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性に関して検討したところ、複数の画分で両方、または片方の受容体に対するアゴニスト活性が確認された。

[考察]

PPAR γ は糖・脂質代謝の重要な制御因子である核内受容体で、その合成アゴニストであるチアゾリジン誘導体は糖尿病薬として臨床応用されている。しかし、浮腫、体重増加、心疾患等の副作用のため、より副作用の少ない PPAR γ アゴニストが求められている。既に親和性は低いが多様な天然由来の PPAR γ アゴニストの存在が知られている。現在 3 種のチュニジアに自生する植物について PPAR γ アゴニストをスクリーニングしているが、実際に複数種の活性を有する化合物がこれらの植物中に存在する事が見えて来つつあり、今までに Compound 1、Compound 2、Compound 3 (6-ODA)、Compound 4 を同定することができた。現在、更なるアゴニストの精製を進めている。また PPAR γ アゴニストは抗炎症、抗腫瘍活性の面からも注目されている。他のグループから、例えば *Artemisia campestris* については、その葉の抽出液が糖尿病性腎炎に有効であることが糖尿病動物モデルで示された(*Pathol Res Pract* 208, 157-162 (2012))。 *Thymelaea hirsuta* についても、その抽出液の糖尿病モデルでの有効性が示され始めており(*J Diabetes* 4, 307-313 (2012)、*Hum Exp Toxicol* 29, 865-871 (2010))、私たちが同定した成分がこれらの機能の一翼を担っている可能性がある。

一方、合成 PPAR γ アゴニストの中には、核内受容体 PPAR γ と全く構造が異なる G タンパク質共役型受容体で

ある脂肪酸受容体 GPR40 や GPR120 に対してアゴニスト活性を示すものが存在することが報告されていたため、単離同定した化合物、および精製途中の画分について脂肪酸受容体に対するアゴニスト活性を評価した。GPR40 や GPR120 は中・長鎖脂肪酸に対する受容体であり、直接的、間接的なインスリンの分泌への関与や、肥満や炎症への関わりで注目されている(薬学雑誌 131, 1683-1689 (2011))。今回、植物由来の PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物、または精製画分には GPR40 や GPR120 に対してアゴニスト活性を有するものが複数存在することが見えてきた。この中には逆に PPAR γ アゴニスト活性は有せず、GPR40 や GPR120 に対してのみアゴニスト活性を有するものも存在すると考えられ、更なる精製を進めている。

【平成 24 年度下半期】

【筑波大学】

1 生物資源有用性評価

①伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

・2011年11月23日～12月3日に IRA に出張した。Neffatti 教授の指導の下、Dr. Farah とともにチュニジア南部のメドニン、ベニ・ハデシュ、シーディー・マフルーフにおいて、有用植物(薬用植物)に関する民衆的利用法に関するインタビューを中心とした現地調査を行なった。12名の農業従事者にインタビューを行ない、19種の薬草に関する情報を収集した。

・上記出張中、IRA データベース担当の修士学生 Ammar 氏と協力し、現地調査で得た伝承情報を、本プロジェクトデータベースのもととなるエクセルファイルへの入力作業を行った。

②バイオアッセイによる生物資源の機能性評価

・白血病細胞分化誘導効果;白血病細胞の分化誘導におけるチュニジア産オリーブ葉の生育環境や品種による影響を調べるため、ヒト由来白血病細胞株である K562 を用いて細胞生存率、生細胞数、細胞形態観察などを行った。さらに、細胞表面マーカーである CD 抗体を用いてチュニジア産オリーブ葉抽出物の分化誘導効果をフローサイトメリーにて評価した。その結果、オリーブの品種や生育環境により、白血病細胞分化誘導における活性が異なることを見出した。

・抗腫瘍効果の評価;抗腫瘍効果におけるチュニジア産オリーブ葉の生育環境や品種による影響を調べるため、ヒト乳がん細胞である MCF-7 を用いて細胞増殖率への影響を調べた。さらに、チュニジア産オリーブ葉の抽出物における DPPH 消去能評価試験による抗酸化性の評価やフォーリン-チオカルト法による総ポリフェノール含量の測定を行い、抗腫瘍活性と抗酸化、抗腫瘍活性の総ポリフェノール含量の関係を調査した。その結果、オリーブの品種や生育環境により、抗腫瘍効果における活性が異なることやオリーブ葉抽出物の抗酸化性と抗腫瘍活性が比例することも見出した。

・リラックス誘導効果;チュニジア産アロマ薬用植物エッセンシャルオイルのリラックス効果を評価するために、神経細胞モデルである PC12 を用いて神経細胞分化誘導における影響を調べた。その結果、チュニジア産アロマ薬用植物エッセンシャルオイルは PC12 細胞において神経突起伸長を誘導した。さらに、神経伝達物質であるアセチルコリン(ACh)を分解する酵素であるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の活性を抑制することも見出した。

・抗ストレス効果; *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の抗ストレス効果を評価するために、マウスを用いて強制水泳試験(Forced swimming Test; FST)を行った。実験は *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物を経口投与し、FST 試験でのマウスにおける無動時間を測定した。無動時間の増加は過度なストレス状態を示す。その結果、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物を経口投与により、ストレスの軽減効果が確認された。さらに、試験後マウスから脳や血液における各種神経伝達物質やストレス誘導ホルモン分泌に対する *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の影響を調べた結果、いくつかの神経伝達物質の分泌を促進することやストレス誘導ホルモンの分泌を抑制することを見出した。今後、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の成分分析を行い、活性成分の同定や作用メカニズムの解明を行う予定です。現在、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の成分分析はチュニジアの IRA で行っている。

③評価された機能性に関する活性本体の同定、メカニズム解析

・*Artemisia herba-alba* 抽出物の抗アレルギー効果;チュニジア産アロマ薬用植物である *Artemisia herba-alba* 抽出物の抗アレルギー効果における作用メカニズムの分析をマイクロアレイ法にて行った。その結果、*Artemisia herba-alba* 抽出物が1型アレルギーモデルである IgE 処理 RBL-2H3 細胞において、炎症関連遺伝子やシグナル伝達遺伝子等の発現を制御していることを明らかにした。

・オリーブ葉抽出物の白血病細胞分化誘導効果;チュニジア産オリーブ葉抽出物の白血病細胞分化誘導におけるメカニズムを明らかにするため、細胞周期への影響を調べた。その結果、チュニジア産オリーブ葉抽出物は K562 の細胞周期において G2/M 期停止を誘導することを明らかにした。今後、チュニジア産オリーブ葉抽出物の成分分析を行い、生育環境や品種による活性成分含量への影響や複数の活性成分による相乗効果などを行う予定である。

【京都大学 永尾】

【結果】

～主として peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)のアゴニストの単離・精製～

肝線維化治療を目的としてスタートした研究は、主として線維化抑制に関わる PPAR γ のアゴニストの単離精製を中心に研究を進めてきた。我々は①PPAR γ のアゴニストとして三重結合を有する珍しい脂肪酸を同定したこと、②以前から天然物由来の PPAR γ アゴニストとして脂肪酸類が知られていたこと、③合成 PPAR γ アゴニストで糖尿病薬として臨床応用されているチアゾリジン誘導体は一見構造が異なるのに、中長鎖脂肪酸の受容体である GPR40 のアゴニストでもあることから、今年度は脂肪酸受容体のアゴニスト活性にも注目して、研究を進めた。また PPAR γ は糖・脂質の代謝制御に関わるだけでなく、抗炎症、抗腫瘍の面でも注目されていることから、抗炎症、抗腫瘍活性に関する評価系を導入して植物抽出液中の有用成分の探索を続けた。

① *Artemisia campestris* について

昨年度 PPAR γ アゴニストとして同定した Compound 2 について、脂肪酸受容体 GPR40、GPR120 のアゴニスト活性を有するか検討したが、アゴニスト活性は見られなかった(前期報告済)。合成 PPAR γ アゴニストのチアゾリジン誘導体には抗炎症活性も知られていること、Compound 2 の類縁体の artemipillin C は PPAR γ アゴニスト活性以外に、抗炎症作用が報告されているため、肝癌細胞 HepG2 を用いて NF- κ B の標的配列を持つレポーターpGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]の TNF- α 依存的発現に対する抑制効果

で、Compound 2 の抗炎症効果を評価したが、この系では Compound 2、ならびに artemillin C の抗炎症効果は確認出来なかった。なお、この抗炎症評価系を用いて、70%エタノール粗抽出液を溶媒分配し、得られた酢酸エチル層を中圧シリカゲルクロマトグラフィーにかけた分画について、抗炎症活性を評価したところ、一つの画分に活性が見られた。この画分について、更なる精製を進め、PPAR γ アゴニスト活性と抗炎症活性を有する画分を得たが、ごく少量しか精製出来ず、構造決定には至っていない。なお、Compound 2 に関しては 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化系で用量依存的なトリグリセリドの蓄積促進活性が確認出来た。

一方、引き続き PPAR γ アゴニストの精製を進め、Compound 4 を同定出来た(前期報告済)。Compound 4 の精製を進めてきた元の酢酸エチル層の中圧クロマトグラフィー分画から PPAR γ アゴニスト活性のある化合物の精製を行い、構造の同定を進めている。

また上記の中圧クロマトグラフィー分画の、別の複数の画分に脂肪酸受容体 GPR40 や GPR120 に対するアゴニスト活性を示す活性が確認出来たため、精製を進めている。

② *Thymelaea hirsuta* について

前年度に PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物として同定した Compound 1 は 100 μ M で脂肪酸受容体 GPR40 を介して、ゆっくりとした細胞内カルシウムの増加を引き起こしたが、MAP キナーゼ(Mitogen activated protein kinase)経路の ERK (Extracellular signal-regulated kinase) の活性化は見られなかった。

また、70%エタノール抽出液を溶媒分配し、酢酸エチル層を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで分画した複数の画分で、PPAR γ アゴニスト活性と同時に GPR40, GPR120 に対するアゴニスト活性が見られた(前期報告済)。引き続き活性物質の精製を進めている。

(なお、PPAR γ アゴニスト活性はキメラ受容体 Gal4-DBD(DNA 結合ドメイン) / PPAR γ -LBD (リガンド結合ドメイン)とその標的配列を含むルシフェラーゼレポーター (UAS-tk-Luc) を組み合わせた PPAR γ アゴニスト活性測定レポーターアッセイ系で評価した。また、GPR40 ならびに GPR120 アゴニスト活性は Dox 依存的に GPR40 または GPR120 を発現する HEK293 細胞(T-REx GPR40 または GPR120)を用いて一過的な細胞内カルシウムの上昇を蛍光プローブで測定する系で行った。)

③ *Marrubium vulgare*(ニガハッカ)について

昨年度 PPAR γ アゴニスト活性を有する精製画分中に同定した、三重結合を 1 つ有する Compound 3: 6-octadecynoic acid(6-ODA)について、6-octadecenoic acid(petroselinic acid)を初発物質として有機合成を行い、確かに用量依存性に PPAR γ アゴニスト活性を有することをキメラ受容体レポーターアッセイ系で確認した(前期報告済)。そこで、内因性の PPAR γ を介して機能することを確認する目的で、3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化系を用い、実際に PPAR γ 依存的にトリグリセリドの蓄積を促進することを確認した。

また 6-ODA は脂肪酸であること、合成 PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン類が脂肪酸受容体 GPR40 のアゴニストとしても作用することから、中鎖鎖脂肪酸の受容体である GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性について検討し、6-ODA により GPR40 依存的に一過的に細胞内カルシウムの上昇が見られることを前期に報告したが、MAPキナーゼ系の ERK の活性化について検討すると、確かに活性化が見られるこ

とから、GPR40 アゴニストとして機能することが確実視された(再現性検討中)。

④ *Rosmarinus officinalis*(ローズマリー)について

IL-6 誘導性に STAT3 を通じて、その標的配列である APRE(Acute phase response element)を介した遺伝子発現の制御を見るルシフェラーゼレポーター系(4x APRE-luc) を用いて抗腫瘍性を評価する系で、筑波大学より提供されたチュニジアで採取したローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) の 70%エタノール抽出液に弱い活性が確認出来た。そこで、ローズマリーの主要な成分である、luteolin、rosmarinic acid、Compound 5 についてこの系で活性評価したところ、いずれも用量依存的な抑制活性を示すことが明らかになった。

[考察]

チュニジアに生育する植物の抽出液から主として PPAR γ アゴニストの精製を進めてきたが、PPAR γ アゴニストの中には内因性のプロスタグランジンの一種 15d-PGJ₂ 以外に、外因性物質として脂肪酸類や、ある種のフラボノイド類、糖尿病薬として用いられている合成アゴニストのチアゾリジン誘導体が知られている。本研究では現在までに Compound 1, Compound 2, Compound 3 (6-ODA)、Compound 4 を同定したが、扱った植物抽出液中には PPAR γ アゴニスト活性を示す画分は多数有るものの、精製を進めても活性が分散し、単離同定に至らない画分も多いのが現状である。

さて、三重結合を持った珍しい脂肪酸である 6-ODA はレポーターアッセイ系で PPAR γ アゴニスト活性を示すだけではなく、3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化系でも脂肪蓄積促進活性を示した。6-ODA についてはそれ自身が脂肪酸であること、そして、合成 PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン誘導体が脂肪酸受容体 GPR40 のリガンドにもなり得ることから、脂肪酸受容体 GPR40、GPR120 アゴニストとして作用するか検討したところ、GPR40 のアゴニストとして機能し、受容体依存的に一過的な細胞内カルシウムの増加が見られ、ERK の活性化も確認出来た(再現性検討中)。このように天然由来の PPAR γ アゴニストにも脂肪酸受容体に対するアゴニスト活性を示すものが存在するため、今まで精製を進めてきた植物抽出液の様々な画分について、脂肪酸受容体 GPR40 や GPR120 に対するアゴニストの精製を始めている。なお、GPR40 は中・長鎖の飽和・不飽和の脂肪酸をリガンドとする受容体で、膵臓 β 細胞に高発現し、グルコース誘導性インスリン分泌を増強することから、そのアゴニストの TAK-875 は新たな糖尿病薬として注目されている(補足:TAK-875 は 2013 年に副作用が問題となり、開発中止)。

Compound 2 に関しては PPAR γ アゴニストとしての報告はないが、構造が極めて類似した artemillin C は PPAR γ アゴニスト活性を有し(*Biochem Pharmacol* 81, 925-933 (2011))、抗炎症作用が報告されている。また Compound 4 は flavonoid の一種であり、既にハンニチバナ科植物 *Cistus salvifolius* (Cistaceae)に含有され、PPAR γ アゴニスト活性があることが報告されていた(*Planta Medica* 77, 346-353 (2011))。なお、Compound 4 は Raw264.7 細胞を用いたリポ多糖(LPS)刺激による炎症を評価する系で iNOS (inducible nitric oxide synthase)、COX-2 (cyclooxygenase-2)の発現誘導を阻害することが知られており(*Int Immunopharmacol* 6, 1723-1728 (2006))、*A. campestris* の持つ抗炎症活性を Compound 2 とともに発揮する一因となることが考えられた。Compound 1 については既知の化合物であったが、PPAR γ アゴニスト活性は知られていない。一方、Compound 1 に関しては脂肪酸受容体 GPR40 依存的に緩やかな細胞内カルシウムの増加を引き起こしたが、ERK の活性化は見られなかった。

また抗腫瘍活性を評価すべく、癌で活性化が見られる STAT3 を介した転写調節系を抑制する化合物をスクリーニングする系で、ローズマリー由来の Compound 5 に活性が見られた。同時にローズマリーに多く含まれる luteolin や rosmarinic acid についても検討し、活性が確認出来た。なお、luteolin、rosmarinic acid については、リン酸化した活性型 STAT3 の減少を引き起こすという報告があり (*Cancer Res* 66, 4826-4834 (2006)、*Biol Pharm Bull* 34, 343-348 (2011)) この結果を支持すると思われた。Compound 5 に関しては報告がなく、その類縁体を含めた構造活性相関と、メカニズム解明を進めている。肝線維化において重要な働きをする肝星細胞の初代培養細胞をプラスチックプレート上で培養すると、活性化が見られ、線維化のモデルとされているが、その際、IL-6 が産生され STAT3 の活性化により、線維化促進物質の TGF- β の発現が誘導されることから (*World J Gastroenterol* 16, 5047-5056 (2010))、STAT3 を介した発現を抑制する Compound 5 には抗肝線維化活性が期待される。

【平成 25 年度上半期】

1-1 伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

【筑波大学】

これまで行った有用植物(薬用植物)に関する民衆的利用法に関するインタビュー・データのまとめ作業を開始した。下半期には、データベース担当者たちとの打ち合わせを行い、データベースの充実化を図る予定である。

1-2-1 バイオアッセイによる生物資源の機能性評価

1-2-2 評価された機能性に関する活性本体の同定、メカニズム解析

【筑波大学 韓】

平成26年度上半期には、オリーブやアロマ植物を中心に機能性の探索・評価研究を行った。

まず、オリーブではチュニジア産オイル葉抽出物の白血病細胞の分化誘導効果やアポトーシス誘導効果における作用メカニズムの解明のため、トランスクリプトームであるマイクロアレイ手法を用いて関連遺伝子の同定や作用パスウェイの分析を行った。その結果、チュニジア産オリーブ葉抽出物が分化能を失った白血病細胞の分化をマルチな方向で誘導することを明らかにした。さらに、その作用メカニズムにおいて細胞周期などに関わる遺伝子が関与していることも明らかにした。現在、マイクロアレイの結果を分析し、その他の影響に関する遺伝子分析を行っている。

アロマ植物においては、メラノーマである B16 細胞をマウスに静脈注射し、*Thymelaea hirsuta* 由来成分のメラノーマ増殖抑制転移に及ぼす影響を調べた。さらに、B16 細胞における *Thymelaea hirsuta* 由来成分の影響を調べるため、細胞生存率、細胞数、細胞周期などを調べた。その結果、メラノーマの細胞増殖を抑制し、細胞周期に影響することを見出した。現在、リアルタイム PCR やウェスタンブロットによる作用メカニズムの解明を行っている。さらに、チュニジア産あるアロマ植物の抽出物のメラニン産生促進における影響をメラニン産生量測定により明らかにした。現在、その作用メカニズムを明らかにするため、メラニン産生に関わる遺伝子やタンパク質の発現への影響をリアルタイム PCR やウェスタンブロットによる確認し、作用メカニズムの解明を行っている。チュニジア産あるアロマ植物の1型アレルギー細胞モデルにおける影響を調べた結果、チュニジア産あるアロマ植物が1

型アレルギーの即時性反応であるケミカルメディエーターの放出を有意に抑制することを見出した。さらに、1型アレルギーの遅延性反応に関わるサイトカインの発現や分泌を有意に抑制することを見出した。詳細な作用メカニズムの解明のため、マイクロアレイ解析を行った。その結果、1型アレルギーにおいて即時性反応と遅延性反応に関わる遺伝子の発現が有意に変化していた。現在、マイクロアレイの結果を検証するため、リアルタイムPCRにて mRNA の発現の確認を行っている。

【筑波大学 南雲】

高齢社会の進展に伴い、認知症患者の増加が問題となっている。その患者数は 2002 年には 149 万人であったのに対し、2012 年では倍の 300 万人を突破した。認知症の主なものに、レビー小体型認知症、脳血管性認知症、アルツハイマー病がある。この中で脳血管性認知症の患者数は、治療法や予防法の進歩に伴い減少傾向にあるものの、アルツハイマー病患者は未だ増加傾向を示しており、認知症患者のうち約 6 割を占めるまでになっている。以上のことからアルツハイマー病の治療薬開発は喫緊の課題となっている。

アルツハイマー病患者の脳では、細胞間質への老人斑の蓄積や、神経細胞内の神経原線維変化が特徴的に起こっており、これらの存在がアルツハイマー病の確定診断に用いられているとともに、症状の原因とも考えられている。老人斑とは、機能不明な膜タンパク質 APP (amyloid precursor protein) から切り出された、主に 40-42 残基のペプチドである Amyloid β ($A\beta$) が細胞外で凝集・沈着したものであり、細胞膜上のイオンチャネルを遮断することでカルシウム恒常性の破綻を引き起こし、最終的に神経細胞死を引き起こすことが報告されている。また、神経原線維変化は細胞内微小管系が破綻した状態であり、凝集した $A\beta$ が何らかのシグナル伝達系を介してタウタンパク質(神経特異的微小管結合タンパク質)を過剰にリン酸化することが原因だと考えられている。これらのことから、凝集した $A\beta$ による神経細胞死がアルツハイマー病の発症に繋がると考えられている。

以上のことは $A\beta$ 存在下でも神経細胞の死を防ぐことができれば、アルツハイマー病の発症を抑えられる可能性を示唆している。そこでチュニジアに生育する生物資源のうち、地域特有の伝承薬草材料に用いられている耐塩性植物抽出物を中心に、 $A\beta$ の神経細胞毒性を緩和する成分のスクリーニングを行うこととした。まず cell viability に与える影響を評価した結果、昨年度報告したように、いくつかの抽出物において $A\beta$ 毒性緩和が認められた(スライド1)。

今回は抽出物 6 (*Salicornia maritima*)、8 (*Nitraria retusa*)、13 (*Hernaria fontaesi*) について、さらに評価を進めた。 $A\beta$ を処理すると細胞が形態変化を伴い凝集し、細胞接着面積の低下がみられる。そこで、細胞接着面積の変化を指標にし、抽出物群が $A\beta$ による細胞形態変化を緩和するか評価した。その方法として、細胞を写真にとり画像解析ソフトで細胞を黒、背景を白と二値化した後、画像全体における黒の割合をだすことで細胞接着面積を定量化した。その結果(スライド2) $A\beta$ 非存在下での細胞接着面積は 50%程度なのに対し、 $A\beta$ 存在下では 25%程度に低下し、さらにポジティブコントロールである dimebon を共存させると 35%程度に回復した。上記抽出物群は、どれも有意に接着面積を回復させていた。したがって上記抽出物群は cell viability と形態変化の両方において $A\beta$ 毒性から保護していることが分かった。今後はこれら抽出物に含まれる活性物質の同定や、作用機構解析を行う予定である。

【筑波大学 我妻】

臨床応用展開の方向性を見据えた多分野統合研究

世界における慢性疾患による負担 (burden of disease、BOD) は近年爆発的に増加している。これまでの感染

症や急性疾患への対策から、高血圧や糖尿病に代表される生活習慣病予防のための有効な介入方法が多く求められている。開発途上国は、慢性疾患による世界の BOD の半数以上を占めており、うつ病態はその 60%に影響があるとして、特にその対策が急がれている (Control of chronic diseases, WHO, 2011)。

チュニスに北アフリカ・地中海事務所が 2006 年に開設されて以来、多くの日本人研究者に利用されてきた。乾燥地植物資源の医薬品シーズ活用については多くの文献があり (Ksouri R *et al*, 2011)、この分野は近年大いにそのエビデンスを蓄積しつつある (Guo R *et al*, 2012)。そのリード研究に北アフリカ食薬シーズの開発があり、600 種以上の砂漠乾燥地域特有の食薬シーズをスクリーニングし、いくつかのリード化合物がチュニジア政府と筑波大学の共同特許として登録され、前臨床試験を終了している。そのリード化合物の臨床応用研究について、パスツール研究所やスース大学医学部と協議し、チュニジア原産物抽出による臨床研究をチュニジアにて実施することについてアウトラインを作成した。チュニジアはノーベル賞学者を出したチュニスにあるパスツール研究所を有し、高度な臨床疫学研究が実施されている。

いくつかあるシーズのうち、どの化合物を早期臨床試験に移行させるかについて、各シーズにつてロードマップを作成し、専門家らによる検討を行った。33 のバイオアッセイシステムが筑波大学にて確立しているものにフォーカスし、また、公衆衛生学的に慢性疾患に優先順位があることや、慢性疾患患者のリクルートの可能性などを考慮し、中高年の慢性疾患患者に多く伴ううつ病予防の候補として、ロズマリン酸の臨床試験を実施するコンセプトとした。本研究では、POC (proof of Concept) のエビデンス作成のための臨床疫学研究を実施し、乾燥地特有の食薬バイオアクティブ化合物を、常時ハーブとして食している人口集団での臨床疫学的エビデンスを提供することを目指している。

【京都大学 永尾】

[結果]

肝線維化治療を目的とした植物抽出液からの有用化合物の単離精製

～主として peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) のアゴニストの単離・精製～

肝線維化治療を目的として始めた研究は、主として線維化抑制に関わる PPAR γ のアゴニストの単離精製を中心に研究を進めてきた。①昨年度に PPAR γ のアゴニストとして三重結合を有する珍しい脂肪酸を同定したが、この脂肪酸の PPAR γ を介した機能を論文にまとめて発表した、②前年度までにいくつかの PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物をチュニジアの植物抽出液中から見いだしたが、更にこれらの植物から新たな PPAR γ アゴニストを同定すべく研究を進めた。

1. *Artemisia campestris* について

ルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて、PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物として Compound 2 を同定していたが、PPAR γ アンタゴニストの GW9662 によって、その活性はあまり抑制されなかった。そこで、GW9662 以外の PPAR γ アンタゴニストについても検討したところ、T0070907 によって、ほぼ完全に抑制された。昨年報告した、*Marrubium vulgare* 中に発見した三重結合を有する Compound 3: 6-octadecynoic acid (6-ODA) は GW9662 で活性が抑制されたことから、Compound 2 と 6-ODA は PPAR γ の少し異なる部位に結合する可能性が考えられた。

一方、引き続き PPAR γ アゴニストの精製を進め、数種の化合物を精製し、現在その構造決定を行っている。

2. *Thymelaea hirsuta* について

PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物として、昨年度までに Compound 1 を同定したが、メタノール抽出液をシリカゲルクロマトグラフィーにかけた複数の分画で活性が確認出来、その中には PPAR γ アンタゴニストの GW9662 で活性が抑制される画分と、抑制されない画分があり、大きな複数のリガンド結合サブポケットを持つ PPAR γ の異なる部位に結合するパーシャルアゴニストが同定出来る可能性があると考え、精製を進めている。現在、複数の化合物を精製してきたが、構造決定中である。

3. *Marrubium vulgare*(ニガハッカ)について

昨年度 PPAR γ アゴニスト活性を有する精製画分中に同定した、三重結合を 1 つ有する 6-octadecynoic acid が実際に PPAR γ アゴニスト活性を持つこと、3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化系で、PPAR γ 依存的にトリグリセリドの蓄積を促進することを示す論文をまとめた。

また脂肪酸受容体に作用する化合物の同定を試みたが、最終的に完全に単一に出来ておらず、量も少なく構造決定を行うのは困難と判断し、単離同定を中断した。

4. *Rosmarinus officinalis*(ローズマリー)について

IL-6 誘導性にリン酸化した STAT3 が、その標的配列である APRE(Acute phase response element)に結合して引き起こされるルシフェラーゼレポーター(4x APRE-luc) の発現誘導を抑制する物質をスクリーニングする系で、ローズマリー (*Rosmarinus officinalis*)の主要な成分の一つ、Compound 5 が抑制活性を示すことに昨年度に見だし、本年度はその作用メカニズムの解析を始めた。今のところ、レポーター活性の低下に相関した STAT3 のリン酸化の明らかな低下は明確でなく、Compound 5 の作用メカニズムを解明すべく、研究を進めている

[考察]

Artemisia campestris, *Thymelaea hirsuta*, *Marrubium vulgare* には多種類の様々な構造の PPAR γ のパーシャルアゴニストが含まれていると考えられる。PPAR γ は大きなリガンド結合ポケットを持ち、それらは複数のサブポケットからなり、それぞれのサブポケットに結合するパーシャルアゴニストや、複数のサブポケットにまたがって結合するフルアゴニストが存在する。フルアゴニストであるロシグリタゾンのようなチアゾリジン誘導体は、糖尿病薬として利用されているものの、副作用も問題視され、パーシャルアゴニストで、副作用の低い化合物が求められている。植物由来の PPAR γ アゴニストは活性の比較的弱いパーシャルアゴニストが多いが、上記の植物の抽出液には複数の PPAR γ パーシャルアゴニストが存在するため、活性を示す成分を数多く同定することで、単一化合物というより、粗抽出液全体として、糖尿病をはじめとする疾病の治療・予防効果をうたえるものが提案出来ないかと考えている。

【平成 25 年度下半期】

1-1- 1 伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

【筑波大学】

伝承情報に関しては、これまで CBBC、CBS、IRA のカウンターパートともに、チュニジア北部(チュニス郊外、

ベンアルース、ビゼルト等)、中部(スファックス、ケルケナ、スィーディー・マハレス等)、南部(メドニン、タタウィーン)において、薬用／アロマ植物の民衆的利用方法や伝承について農業従事者や香辛料商、薬剤師等に聞き取り調査を行った。調査の過程で得られた主な植物のラテン名と効能(括弧内)は以下のとおりである。

- ① *Capparis spinosa*: 抗頭痛、抗骨内寄生虫
- ② *Peganum harmala*: 抗高血圧、抗血糖、抗尿管感染症
- ③ *Nitaria retusa*: 抗湿疹、抗 眼の腫れ
- ④ *Mauricandia arvensis*: 抗皮膚アレルギー、抗腫瘍
- ⑤ *Allinum roseum*: 解熱、抗洩
- ⑥ *Hernaria fontanseii*: 抗皮膚裂傷
- ⑦ *Artemisia herba-alba* Asso.: 抗高血圧、抗腹痛、抗寄生虫
- ⑧ *Rosmarinus officinalis*: 抗高血圧、抗頭痛、抗高熱
- ⑨ *Thymus capitatus*: 抗高熱
- ⑩ *Thymus hirtus*: 抗咳、解熱
- ⑪ *Juniperus phoenicea*: 抗咳、解熱、抗 昆虫によるラクダの皮膚の疥癬
- ⑫ *Ruta chalepensis*: 抗骨痛、抗耳痛
- ⑬ *Artemisia compestris*: 抗咳、抗爬虫類毒および蠍毒
- ⑭ *Polygonum equisitifolium*: 抗人パロマウイルスによる吹き出物
- ⑮ *Retama raetam*: 抗骨折、抗皮膚の腫れ
- ⑯ *Zizyphus lotus*: 抗湿疹、抗毛髪の前頭(フケ)、抗腹部潰瘍、洗顔
- ⑰ *Lavandula multifida*: 抗背骨痛、尿管の洗浄、抗月経不順、神経リラックス、抗高血糖、血圧安定、皮膚洗浄
- ⑱ *Matricaria recutita*: 抗腹部潰瘍、抗肝炎、血管拡大、抗皮膚アレルギー、洗顔
- ⑲ *Teucrium pollium*: 抗関節痛

現在、収集したデータをデータベースに入力しているところである。

1-2- 1 バイオアッセイによる生物資源の機能性評価

【筑波大学】

機能性の探索・分析に関しては、オリーブは、チュニジア産オリーブである *Chemali* 葉抽出物における白血病細胞分化誘導効果を調べた。その結果、*Chemali* 葉抽出物が白血病細胞の生存率抑制し、細胞周期に影響することを見出した。さらに、Flowcytometry を用いた分析により、*Chemali* 葉抽出物が白血病細胞を単球・マクロファージに分化誘導することを確認し、分化関連遺伝子である *IFI16*、*EGR1*、*NFYA*、*FOXP1*、*CXCL2*、*CXCL3*、*CXCL8* mRNA の発現に及ぼす影響を調べた。

塩生植物では、引き続き *N.retusa* の抗肥満効果を調べ、高脂肪食マウスや糖尿病モデルマウスの肝臓における脂肪代謝促進効果を調べた。

アロマ植物では、高齢社会の進展に伴い、認知症患者の増加が問題となっている。なかでもアルツハイマー病は認知症患者のうち約 6 割を占めており、その治療薬開発は喫緊の課題となっている。アルツハイマー病は

Amyloid β ($A\beta$) の凝集によって引き起こされる神経細胞死が一因と考えられている。したがって $A\beta$ 存在下でも神経細胞死を防ぐことができれば、アルツハイマー病の発症を抑えられる可能性がある。そこでチュニジアに生育する生物資源のうち、地域特有の伝承薬草材料に用いられている耐塩性植物抽出物を中心に $A\beta$ の神経細胞毒性を緩和する成分のスクリーニングを行った。

まずヒト神経芽腫細胞である SH-SY5Y の Cell viability に $A\beta$ が与える影響を評価した結果、昨年度報告したように、いくつかの抽出物において $A\beta$ 毒性緩和が認められた。その後検討を続けた結果、アルツハイマー病治療薬として開発されていた Dimebon より有意な毒性緩和を示す抽出物を 8 種得た。それら抽出物についてさらに評価を進めた。 $A\beta$ を処理すると SH-SY5Y 細胞が神経突起退縮や形態変化を伴い凝集し、細胞接着面積の低下がみられる。そこで細胞接着面積の変化を指標にし、抽出物群が $A\beta$ による細胞形態変化を緩和するか評価した。その結果 8 抽出物はどれも有意に接着面積を回復させていた。したがって 8 抽出物は Cell viability と形態変化の両方において $A\beta$ 毒性から保護していることが分かった。現在は、チュニジア側からの情報や論文を参考にこれら抽出物に含まれる活性物質を同定・購入し、活性確認・作用機構解析を進めている。

さらに、アロマ植物のエッセンシャルオイルの研究では、ICR マウスを用いて精油の吸入を行い、尾部懸垂試験を実施し無動時間を測定した。その後マウス脳におけるカテコールアミン濃度、マウス血清におけるコルチコステロン濃度をそれぞれ ELISA キットにて測定した。地中海産 *R. officinalis* 精油吸入群において尾部懸垂試験における無動時間の減少、脳内カテコールアミン濃度測定におけるドーパミン濃度上昇、血清中コルチコステロン濃度減少がみられた。以上の結果から、地中海産 *R. officinalis* 精油は、吸入により脳内神経伝達物質、血清中ストレス関連ホルモン濃度調節作用により抗ストレス作用を示すことが示唆された。

チュニジア産 *Cymbopogon schoenanthus* (*C. sch*) エッセンシャルオイルにおいてはアセチルコリンエステラーゼ活性阻害メカニズムを *in vitro* モデルで解析することを目的とした。神経分化のモデル細胞として知られている PC12 細胞を用いて実験を行った。神経分化した細胞と未分化の細胞において *C. sch* エッセンシャルオイルの処理による遺伝子発現の変動を網羅的に解析するためにマイクロアレイ解析を行った。神経分化した細胞において、エッセンシャルオイル処理による抗酸化作用やアポトーシスなど神経機能に関与する遺伝子やアセチルコリンエステラーゼ遺伝子の発現の変動が確認された。現在バリデーションを行い、再現性を検証している。

Cymbopogon schoenanthus に関してはストレス抑制効果を確認するため、 H_2O_2 処理後の SH-SY5Y 細胞における ROS と ATP 産生への影響を調べた。その結果、*Cymbopogon schoenanthus* 抽出物処理により細胞内 ROS 産生が低下し、ATP 産生が促進することを確認した。アロマ植物のメラニン産生における影響を調べた研究では、*Cymbopogon schoenanthus* 抽出物処理によってメラニンの産生が増加することを見出し、現在その作用メカニズムの解明を行っている。

【京都大学 永尾】

肝線維化に関与し、脂質代謝に重要な役割を果たす核内受容体の Peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) に対して、アゴニスト活性を示す化合物の北アフリカで生育する植物からの単離同定を進めた。その結果、*Artemisia campestris* から、精製量不足のため立体構造を同定するには至らないが、PPAR γ アゴニストとしての報告のない、新規の構造を持つと考えられる化合物 1 つと、既知化合物ではあるが、PPAR γ アゴニスト活性の報告のない 3 つの化合物を新たに同定した。また、*Thymelaeae hirsuta* からは新たに PPAR γ アゴニストとして、構造は既知だが PPAR γ アゴニスト活性の報告のない 1 つの化合物を新たに同定した。一方、*Marrubium vulgare* から、PPAR γ アゴニスト活性を有する、三重結合を持つ珍しい脂肪酸である 6-octadecynoic

acid を同定したことを論文にまとめて発表したものが公開された。

生産基盤調整グループ

①研究のねらい; アルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法を検討する。水資源利用における環境安全性のリスク評価を行い、有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発を目指す。

有用生物資源が生息する土壌、水、植物生態系の特徴についての調査を実施する。水は、降雨特性や大気環境などの水文データと地表水や地下水などに関する資源データの収集と水利用の循環について調べる。土壌は、物理性、化学性、微生物等の物性および地形・地質等に関する特異性について調べる。植物生態系は、土壌、水条件と関連付け植生の種類、分布、量などの特徴を調べる。

乾燥地生物資源(オリーブ、薬用植物、耐塩性植物)の生産のための地域環境に適合した高度水利用技術および安定的・持続的な生産環境の改善方法の開発

②研究実施方法;

・異なる気候条件下における統合水環境(地下水ー地表水連続系)の比較解析; 地下水、地表水の電気伝導度(EC)、水温等の現地観測、水サンプリング、地下水の水位観測、地表水の流量観測、水サンプルの無機溶存成分、水素・酸素安定同位体等分析、地表水による地下水涵養量の推定、降水サンプリング、気象観測装置等の設置を行った。



・有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討 ;本年度は主要ダムの一つである Joumine ダムにおいて深淺測量や堆砂サンプリングおよび分析、水質分布調査などを開始した。これらの現地観測を継続して行い、現地の状況の概略を把握できた時点で、次年度以降は貯水池内での濁水挙動を詳細に把握するために数値シミュレーションモデルを適用し、観測結果の再現を試みる。シミュレーションが完成したらそれを用いて具体的な堆砂軽減対策を検討する。

・チュニジア共和国 Joumine 貯水池の堆砂過程のモデル化;本研究の目的は Joumine 貯水池の堆積過程と底質化学組成の季節変化を明らかにし、農業等への利用可能性を検討することである。現在まで、土砂運動を再現するために、その基礎となる三次元流動モデルを、CIP-soroban 法にもとづき構築した。現時点では Joumine 貯水池の流入・流出データが入手できていないので、類似の形状を持つセケ宿貯水池において、水温成層の形成過程を検証したところ右図のように良好な結果を得た。

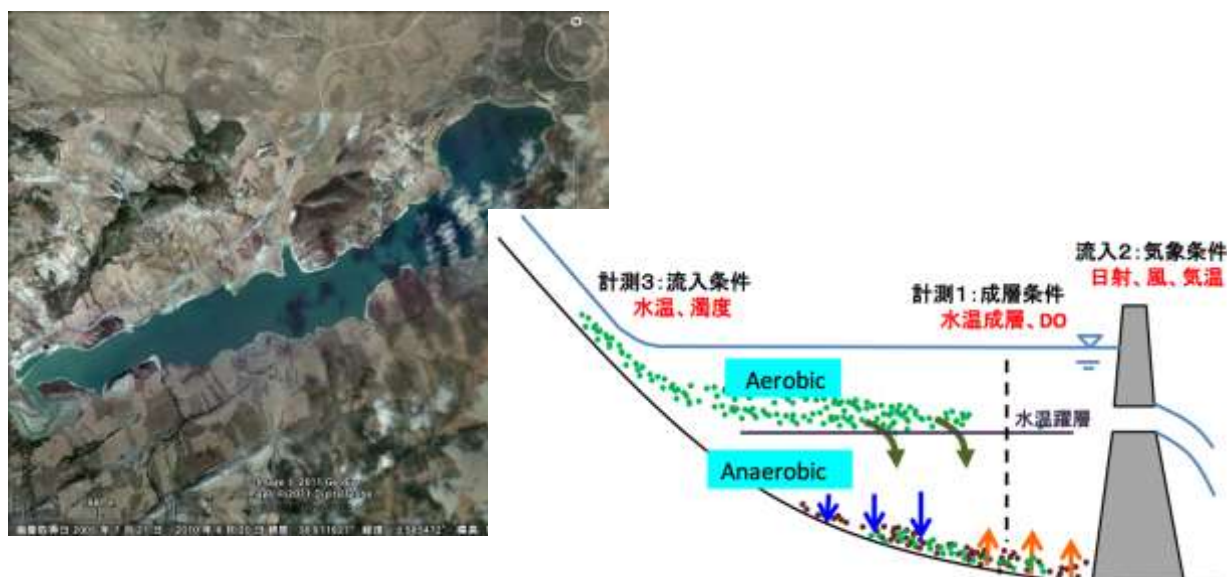


図 4.チュニジア Joumine ダムをモデルにした貯水池管理のための三次元数値モデルの作成と摘要

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況;「異なる気候条件下における統合水環境(地下水ー地表水連続系)の比較解析」、「有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討」および「チュニジア共和国 Joumine 貯水池の堆砂過程のモデル化」は当初の計画の通りに進行中である。

④カウンターパートへの技術移転の状況;JICA 短期研修を中心に導入機材に関するトレーニングおよび ENIS と INAT に対する技術移転を来年度に行う予定。さらに、平成23年度には JICA 長期研修生(博士課程)を受け

入れ、技術移転を活性化する予定。

【平成23年度上半期】

有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

調査実施期間:2011 年 4 月(予備調査・事前打ち合わせ), 6 月(本調査)

調査実施場所:Joumine 貯水池、Sejnane 貯水池(Bizerte 県)、Mellegue 貯水池(Le Kef 県)、Masri 貯水池(Nabeul 県)

共同研究者:石川(東工大)、入江、河内(筑波大学)Tarhouni(INAT)、Ksibi、Kallel(ENIS)

実施内容:

半乾燥地域は、水供給を地下水に頼る場合が多く、近年人口増加と農業の拡大によって、地下水が過剰に揚水され、地下水位の低下が問題となっている。そのため、有用植物資源の生産基盤を整備するにあたり、地下水資源の安定確保が重要な課題である。

そこで本研究では、地下水の涵養プロセス(降水や河川水等が地下水を補填するプロセス)を把握することを目的として、昨年度よりチュニジアの海岸地域(Bon 岬)と山間部(Kasserine 県)を対象に地下水調査を実施している。

今年度は、安全上 Kasserine 県へのアクセスが困難であったため、図 2 に示す Bon 岬の Al Ayn 流域(4 月)と Lebna 流域(7 月、9 月)で調査を実施した。この海岸地域では、地下水位の低下によって浅層地下水に海水が混入する状況(塩水侵入)が生じており、農業に大きな影響を及ぼしている。また、特に Al Ayn 川は、以前石油採掘の排水が流れており、また現在も未処理の生活排水が流れているため、それらの地下水への影響が懸念されている。

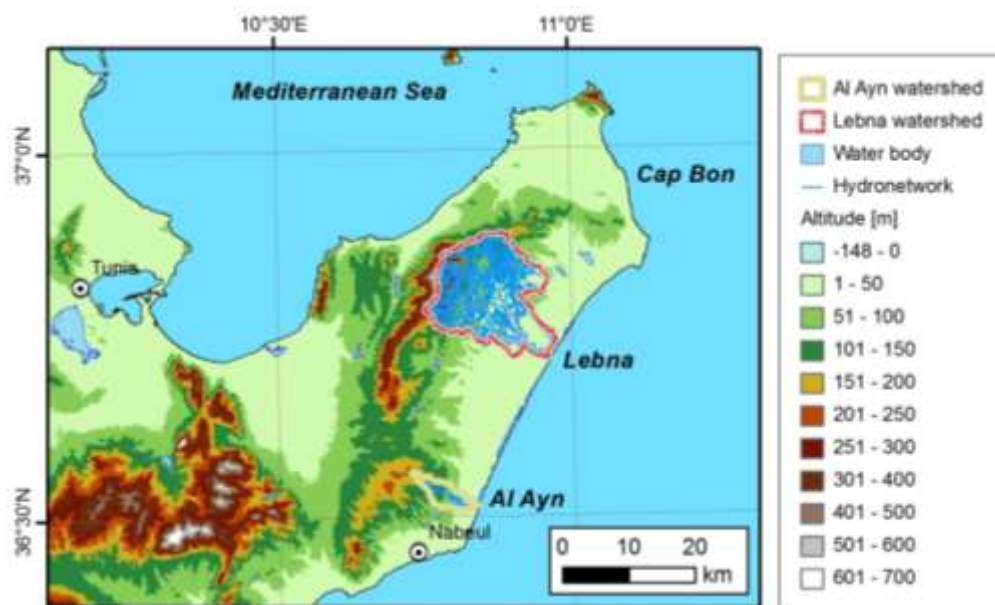


図 2: Al Ayn 流域と Lebna 流域の位置

そこで各流域において、地下水流動系と地表水との関連を把握するために、井戸、河川、貯水池での水位計測、測水(pH、電気伝導度、水温の計測)および採水を行い(写真 4)、無機溶存イオンと酸素水素安定同位体比の分析を行っている。

Al Ayn 流域では、昨年 7 月(乾季)と今年 4 月(雨季)の地下水位と溶存イオン・安定同位体比の空間分布から地下水流動系の大まかな把握ができています。また、4 月よりセンサーロガーを複数の井戸に設置し(写真 5)、水位の連続計測を行っており、そのデータを用いて今後数値シミュレーションにより地下水流動の定量的な評価を行っていく予定である。加えて、石油採掘時の排水や生活排水の地下水への影響をバイオアッセイによって検討する予定である。

Lebna 流域では、海岸から 2km の範囲で昨年 7 月、今年 7 月と 9 月の計 3 回、地下水位と電気伝導度の空間分布を捉える事ができており、塩水侵入の現状、および上流の Lebna ダムからの涵養状況を捉えられている。今後、雨季にも同様の調査を行い、年間を通じてのそれら地表水の影響について検討する予定である。



写真 4: 現地調査の様子



写真 5: 水位センサーロガーの設置の様子

チュニジア全域での水循環と水質に関する調査

調査実施期間:2011 年 7 月

調査実施場所:Medjerda 流域(Jandouba, Beja, Bizerte, Manubah 県), 及び Ichkeul 流域(Bizerte 県)

共同研究者:磯田, 辻村, 河内, B. Fredj(筑波大学), Tarhouni(INAT)

実施内容:

有用植物資源の生育, 栽培環境を整備するにあたり, 水供給の安定性や水質の安全性について議論することが必要不可欠である。

水供給の安定性を確保するためには, 地下水と地表水の交流関係の把握だけでなく, 水の起源を特定することも重要である。水の起源(海起源 or 内陸起源)は, 降水の酸素・水素の安定同位体比を調べることによって推定可能であるが, 降水の同位体比のデータにバラつきが大きいので, 多時期のサンプリングが必要となる。そこで本研究では, 降水サンプルの代替として, 降水の安定同位体比組成が反映される河川水をサンプリングし, 同位体比組成の空間分布を捉え, 流域・地域ごとの水の起源推定を試みる。

一方, 水質の安全性については, これまで BOD・COD, DO, SS, 溶存イオンおよび有害物質の濃度などが指標として用いられている。これらの指標は分析が容易である一方, 基準値の根拠があまり明確ではないことが問題であった。そこで本研究では, バイオアッセイによる細胞レベルでの水質指標によって, チュニジア全域での水質の安全性について検討することを試みる。具体的には細胞毒性やストレス応答性等, 及びそれらに関連して発現するタンパク質遺伝子の種類によって, 水質の安全性について評価・検討する。

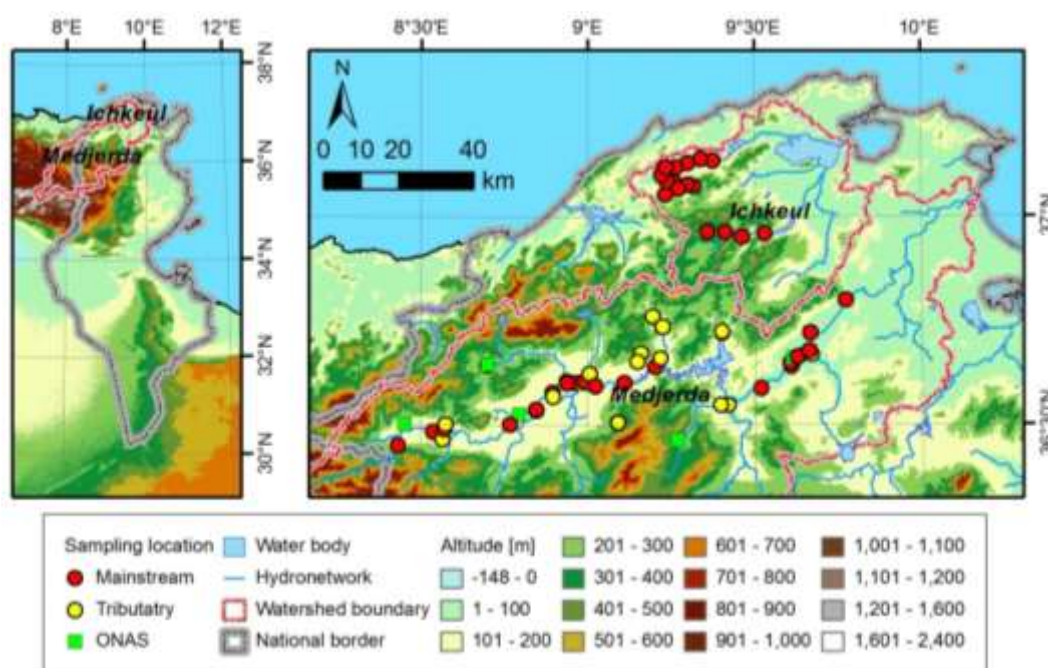


図 3: Medjerda 流域および Ichkeul 流域での水サンプリング場所

本年度上半期は, 7 月に図 3 に示すチュニジア北部の Medjerda と Ichkeul 流域において水のサンプリングを実施した。酸素水素安定同位体比用のサンプルは両流域で採取されたが, バイオアッセイ用のサンプルは Medjerda 流域のみである。図 3 中の赤丸印は本流河川水(写真 6), 黄丸印は支流河川水(写真 7), 緑四角印は下水処理水(写真 8)の採取場所である。バイオアッセイ用のサンプルは, 特に下水処理水の流入前後で採

取されている。採水時には、pH、EC、水温の測定を行っている。下半期には、それ以外の流域(渡航制限区域を除く)にて追加のサンプリングを行う予定である。



写真 6: Medjerda 本流河川



写真 7: Medjerda 支流河川



写真 8: 下水処理水の流入の様子

有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

調査実施期間:2011 年 4 月(予備調査・事前打ち合わせ), 6 月(本調査)

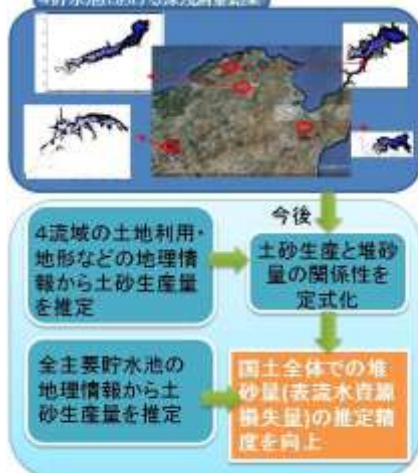
調査実施場所:Joumine 貯水池、Sejnane 貯水池(Bizerte 県)、Mellegue 貯水池(Le Kef 県)、Masri 貯水池(Nabeul 県)

共同研究者:石川(東工大)、入江、河内(筑波大学)Tarhouni(INAT)、Ksibi、Kallel(ENIS)

有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発
およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した
安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

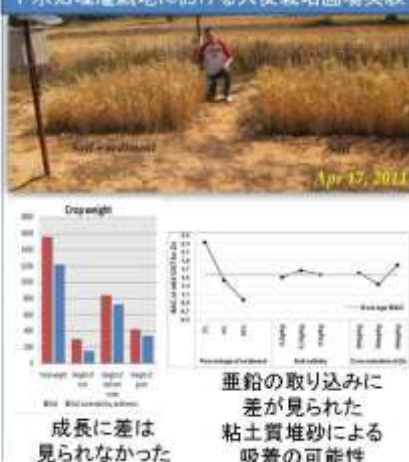
表流水資源の持続可能性の検証

4貯水池における深浅測量結果



アルカリ塩類集積リスクに対する
貯水池堆砂物の利用検討

下水処理灌漑地における大麦栽培圃場実験



昨年度 Joumine 貯水池で行ったのと同様に、チュニジア国内の他の3貯水池において深浅測量を実施し、堆砂状況を把握した。Joumine を含むこれら4つの対象貯水池を選択するにあたっては、堆砂量及びその質に最も大きく寄与すると考えられる上流域の土地利用状況や植生被覆度の差異を考慮して選択している。今後、流域土地利用や地形などの広域地理情報をもとに全国の主要貯水池上流部の土砂生産量を試算し、上記4貯水池における堆砂量実測との対比から国内

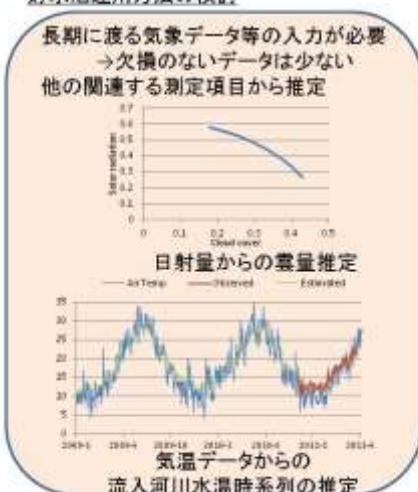
全貯水池における堆砂による水資源損失量の推定精度を向上させていく予定である。

また、堆砂物による土壌改良について、昨秋より現地圃場実験を行い、今回収穫期を迎え、結果を得た。今回の圃場実験は ENIS が以前より下水処理水灌漑の土壌環境への影響評価に関する研究を行っている圃場で、もともと砂質土壌であったため、比較的塩害が生じにくい環境であった。そのためか、堆砂物を散布しない場合とした場合との収穫量や生体長には大きな差は見られなかった。しかし、堆砂の散布により収穫物中に含まれる重金属が減少する傾向が見られた。これは粘土質である堆砂物が元々の砂質土壌に比べて重金属を吸着したために生体への取り込み量が減少したものと思われる。したがって、堆砂物の圃場への散布と下水処理水灌漑

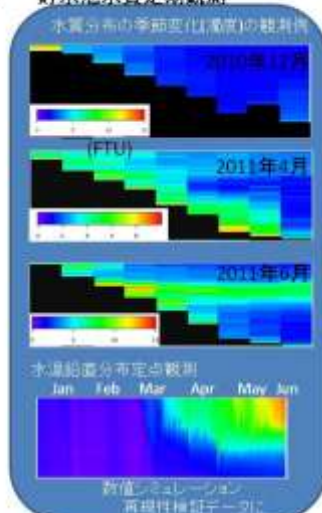
を組み合わせることにより収穫物の重金属汚染リスクを軽減できる可能性が示唆された。

有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発
およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した
安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

シミュレーションモデルによる堆砂軽減のための
貯水池運用方法の検討



貯水池水質定期観測



さらに上記の4貯水池で得られた堆砂物サンプルについて粒度分布などの物理的な基本特性とともに土壌改良効果に深く関与すると考えられる腐植物質含有量を調べた。現在、各貯水池堆砂物からの腐植抽出を終えたところである。今後その腐植物質の化学的な構造特性を把握するために、元素分析や FT-IR による評価を進めていく。

一方で現況の堆砂速度を軽減するための貯水池管理手法の構築に向けて、数値シミュレーションモデルを構築し、現在、Joumine ダムにおける水温成層、濁度等の観測データの再現を行うべくモデルを調整中である。このシミュレーションモデルを運転するにあたって種々の気象データが必要になるが、同国において気象全項目が間断なく計測されていることは極めて

て希である。また、流入河川の河川水温については非常に情報が限られている。そこで、計測が行われている項目のデータをもとに計測されていない項目や欠損のあるデータを補完する方法について検討を重ね、モデルを運転できる環境を整えた。また、水質の空間的分布を把握するために定期的に水温・濁度・クロロフィル A などの水質項目の鉛直分布を多地点で計測した。

有用植物の機能性成分量と生育環境に関する調査

調査実施期間:2011 年 4 月(予備調査・事前打ち合わせ), 6 月(以降本調査), 9 月

調査実施場所:El Fahs (Zaghouan 県) および Matmata (Medenine 県)

共同研究者:磯田, 川田, 河内(筑波大学), Neffati (IRA), Ksibi (ENIS), Smaoui (CBBC)

実施内容:

チュニジアの北は地中海に接し、南はサハラ砂漠の北縁に位置する。その範囲 400~600km で気候帯が湿潤から乾燥まで劇的に変化する。これまでに、それらの気候環境の中で生育する植物から多くの機能性成分が発見されているが、今後はそれを持続的に活用するための仕組みづくりが必要となってくる。既往研究で一部、その成分量が気候環境に応じて変化することが報告されているが、両者の関係性は未だ十分に検討されていない。

そこで本調査研究では、チュニジアの南北に広く分布するローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)を対象に、図 1 に示す半湿潤地域(Site A:El Fahs 周辺, 写真 1)と半乾燥地域(Site B:Matmatas 周辺, 写真 2)の 2 地域を対象として、植物と土壌のサンプリングを行った。成分量の季節変化を捉えるために、今年度 6 月から 3 カ月毎に、年 4 回の調査を予定し、各地域 5 地点の採取場所を設けた。これまでに 6 月と 9 月に植物サンプリングを行い、また 9 月には気象計を設置し(写真 3)、気象データの連続観測を開始した。

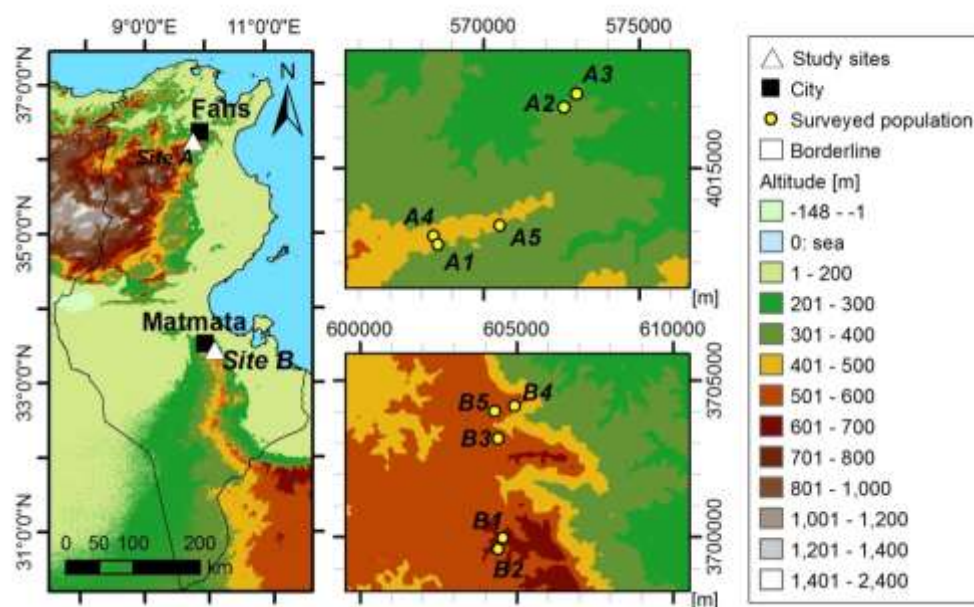


図 1: ローズマリー生育調査の場所

6 月の調査では、各地域で 7 個体を刈り取り、1 個体のバイオマス量(植物現存量)とパッチサイズ(大きさ)の関係式をもとめ、別途計測した 15m 四方の枠内のパッチサイズ結果から各地域のバイオマス密度(g/m^2)を算出した。その結果、二つの地域で植生密度の大きな差がみられた。今後衛星画像解析等で、各地域での対象

種の植生分布を推定し、全バイオマス量を推定する予定である。

また、京都大学の永尾研究室グループによって6月の採取サンプル中のロズマリン酸とルテオリンの定量が行われ、南北で成分量に有意な違いが見られた。今後、これらの成分の季節変動を捉えるとともに、ENIS が担当する土壌サンプル分析結果や、気象観測結果と併せて 2 地域での機能性成分と生育環境の関係性について検討していく。



写真 1: El Fahs 周辺のローズマリー群落



写真 2: Matmata 周辺のローズマリー群落



写真 3: 気象計の設置(2011 年 9 月)



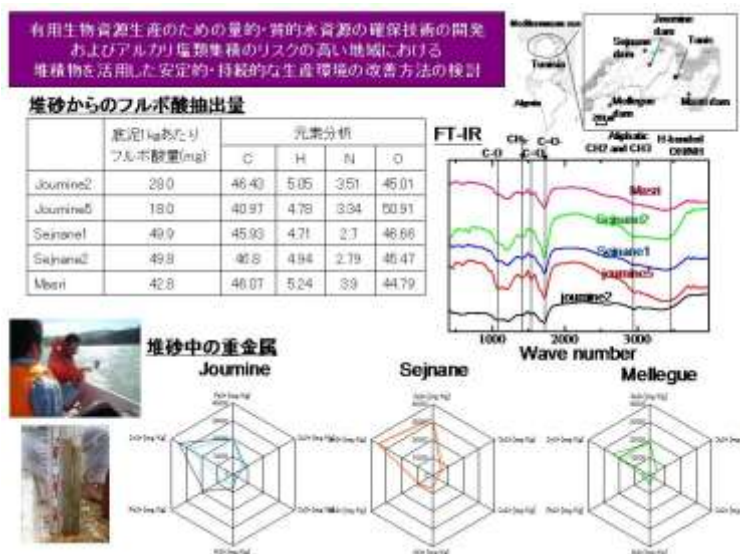
【平成23年度下半期】

1. 有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

- ・ 調査実施期間:2011 年 11 月(底泥サンプリング), 2012 年 2 月(セディメントトラップ設置)
- ・ 調査実施場所:Joumine 貯水池、Sejnane 貯水池(Bizerte 県)、Mellegue 貯水池(Le Kef 県)、Masri 貯水池(Nabeul 県)
- ・ 共同研究者:石川(東工大)、入江、河内(筑波大学)Tarhouni(INAT)、Ksibi、Kallel(ENIS)

上半期に行った深浅測量成果では堆砂量を体積として把握することができたが、有効利用の際の資源量として捉えた場合には重量(乾燥)として把握しておくことが望ましい。そこで各貯水池で堆砂物のコアサンプリングを行い、かさ密度を計測した。かさ密度は流入濁質粒子の静電気的特性などによって異なると考えられるが、今回の 4 貯水池では $0.6 \sim 0.8 \text{g/cm}^3$ 程度であった。

また、上半期に堆砂物から抽出した腐植物質について、FT-IR 解析と元素分析を行った。これらの腐植物質サンプルの化学的特性は日本の貯水池とは傾向が異なるものの、4 貯水池間では比較的よく類似していた。ただし、抽出された腐植物質量には比較的大きな開きがあった。腐植量については流域の土地利用などが大きな決定因子になっている可能性が考えられるので、次年度より衛星画像に基づく流域土地利用情報の整理についても進める予定である。また、4 貯水池の底泥について重金属含量についても分析し、1 貯水池内では金属バランスはほぼ均質であるが、貯水池間の差が同様に見られた。これについては地質分布がひとつの大きな因子となっている可能性があるため、これも各貯水池の週水域情報として今後整理を進めていく。



たりネックとなっている気象条件のデータを収集するために Joumine ダムにおいて機器不調で観測が行えていなかった気象観測セットをリハビリし、連続観測が行える体制を整えた。また、洪水時の濁水挙動を把握するために Joumine 貯水池内に多数のセディメントトラップを雨季初めの 2012 年 2 月初旬に設置し、3 月末に回収した。これらを検証データとしてシミュレーションモデルの精度向上をはかっていく。

2. 貯水池成層モデルの作成

貯水池は、半乾燥地帯の水資源を有効に利用するための重要な社会基盤施設である。また、貯水池に堆積する土砂は栄養価が高いので、農業に利用される可能性がある。そこで本研究では、貯水池の水と土砂の状態をモニタリングと数値シミュレーションによって予測し管理する手法を、チュニジアの Joumine 貯水池を対象に検討している。ところで Joumine 貯水池を始め遠隔地の貯水池では気象・水文データが十分整備されていないことが多い。そこでまず数値シミュレーションに必要なデータを推定する手法の開発を行い、計算速度の大きな鉛直二次元水理モデルにより妥当性を調べた。また現地観測データとの比較から同モデルのキャリブレーションを行った。

貯水池シミュレーションでは、雲量、日射量、風および流入条件の時系列データが必要とされる。Joumine 貯水池周辺におけるこれらの入手可能性および関連データについて調査を実施し、最終的に以下の方法で日単位の時系列データを作成した。推測結果を図-1(a)~(d)に示す。

雲量:貯水池東方 26km の Bizerte における marine sports 用の雲情報と、貯水池西方 36km の Beja の一日日照時間データを用い、日本での同緯度地点での雲量および日照時間データから得られた相関関係式を利用して Bizerte の公式雲量時系列を推定した。

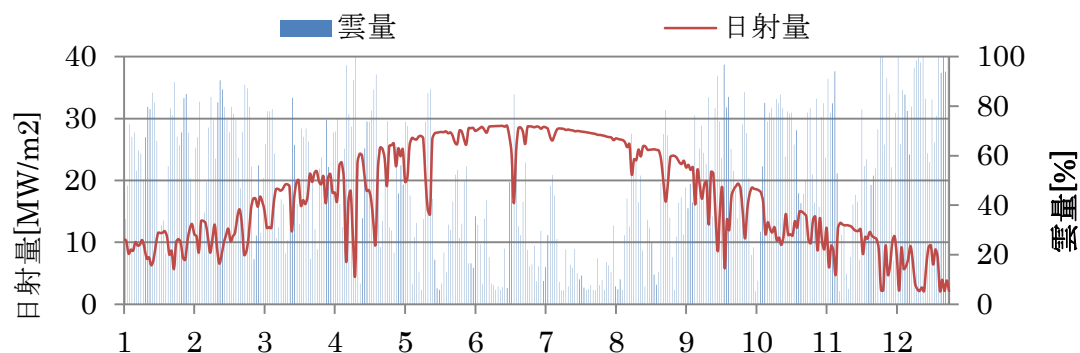


図-1(a) 雲量(青) 図-1(b) 日射量(赤)

日射量: 日本各地における大気外日射量に対する地上日射量の比を求め、一日日照時間との相関を求めた。この関係を Beja の一日日照時間に適用し、日単位の日射量時系列を推定した。

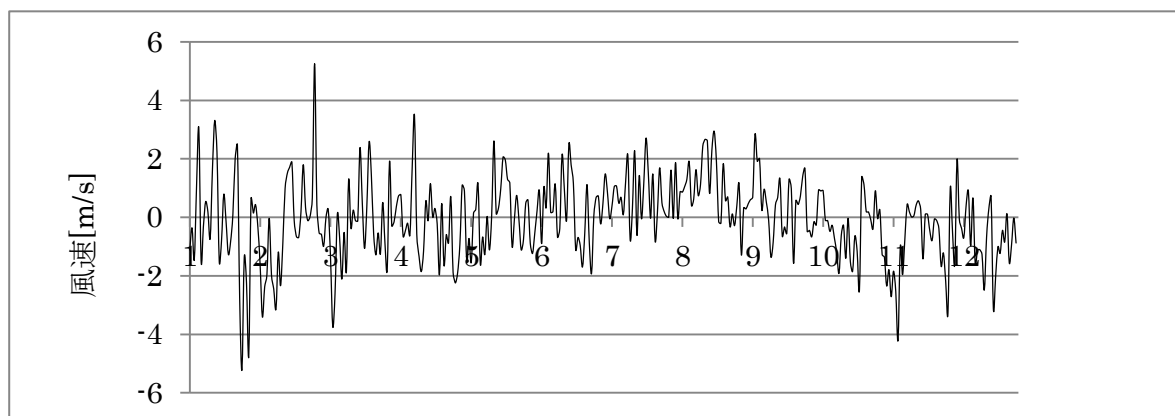


図-1(c) 風

風: ダムサイトにおいて 2010 年 11 月～12 月の約 1 カ月間に取得された風向風速データと、Bizerte における風データとの相関を調べた。その結果、貯水池では常に谷向きの風(SWS⇔NEN)が卓越し、風速は Bizerte の風の同方向成分と相関が高いことがわかった。そこで回帰式を作成して風速を推定した。

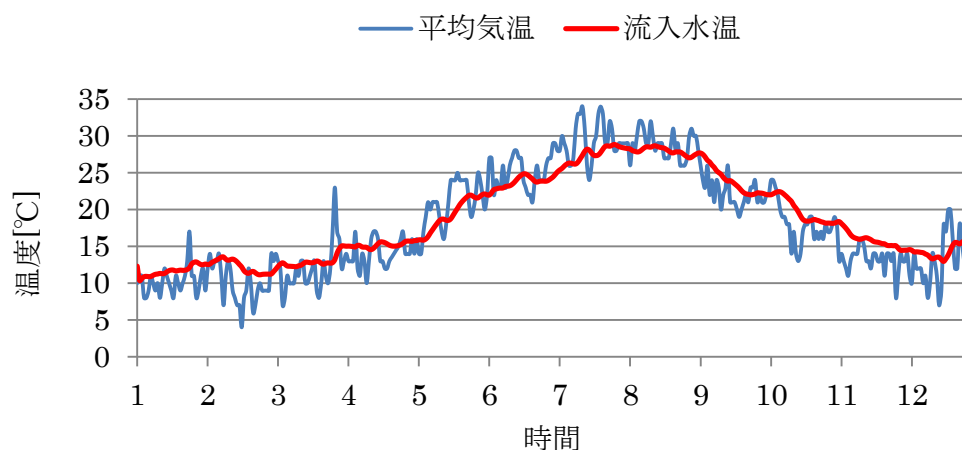


図-1(d) 流入水温(赤)

流入水温: 流入水量は貯水池水位および放流量のデータから連続条件式を用いて求めた。流入水温は気温との相関が高いことから、気温を外力条件とする線形二次微分方程式フィルターを用いて推定した。係数調整には貯水池上流端で6カ月行った水温観測データを用いた。

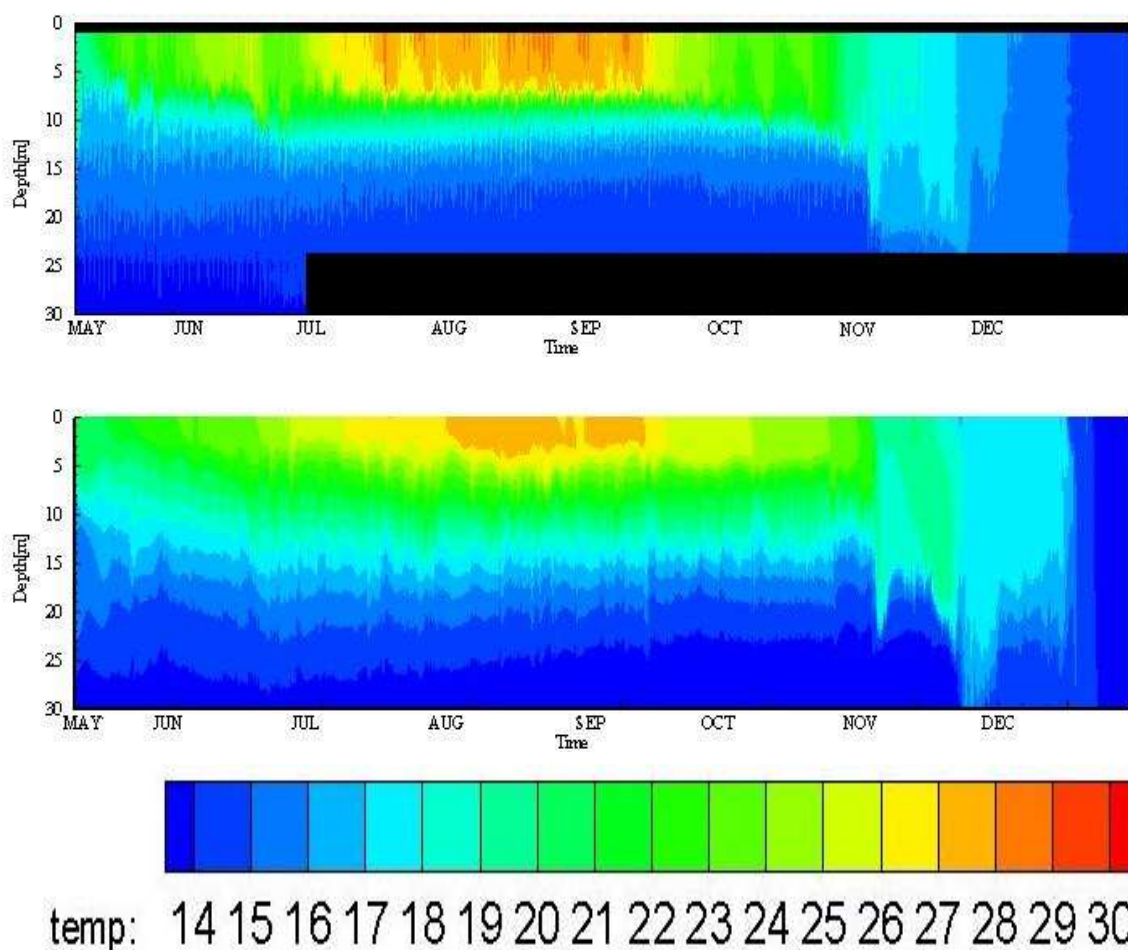


図-2(a) 観測結果(上) 図-2(b) 計算結果(下)

鉛直二次元 $k-\epsilon$ モデル方程式を CIP-Soroban 法で解くモデルを Joumine 貯水池について開発し用いた。計算期間は、水温成層の観測が行われた 2009 年 5 月～12 月とした。縦断方向の格子数は 119 とし、鉛直方向の格子点数は最深部で 90 程度とした。また計算時間ステップは CFL 条件により可変とし、最大は 30sec とした。上記の条件において熱収支式および乱流エネルギー生成式のキャリブレーションを行った。

観測結果と計算結果の比較を図-2(a),(b)に示す。成層発達期から安定期および秋の大循環期への遷移が概ね再現されていることがわかる。

以上により入力データの作成方法および計算モデルのキャリブレーションが終了したので、来年度は同モデルを三次元化して計算を継続するとともに、別途検討している細粒土砂の輸送方程式を組み込む予定である。

3. 有用植物の機能性成分量と生育環境に関する調査

- ・ 調査実施期間: 2011 年 11 月, 12 月, および 2012 年 2 月
- ・ 調査対象: (A) *Rosmarinus officinalis*, (B) *Olea europaea*
- ・ 調査実施場所: (A) El Fahs および Matmata の丘陵・山間部, (B) チュニジア全域
- ・ 共同研究者: 磯田教授, 辻村准教授, 韓准教授, 川田助教, 河内助教(筑波大学), Neffati 教授 (IRA), Ksibi 教授 (ENIS), Smaoui 教授 (CBBC), Sayadi 教授 (CBS)
- ・ 実施内容:

チュニジアの北は地中海に接し、南はサハラ砂漠の北縁に位置する。その範囲 400～600km で気候帯が湿潤から乾燥まで劇的に変化する。それらの気候環境の中で生育する植物からこれまでに多くの機能性成分が発見され、またその成分含有量が気候環境に応じて変化することが報告されている。今後それらを持続可能的に利活用するためには、有用植物のバイオマス量を把握するとともに、機能性成分の含有量と環境要因の両者の関係性を把握することが重要である。

本調査研究では、チュニジアの南北に広く分布するローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)とオリーブ(*Olea europaea*)を対象に、葉と土壌のサンプリングを行った。図 1 に調査地域を示す。ローズマリーは、半乾燥と乾燥の 2 地域 (El Fahs, Matmata) で、環境要因だけでなく成分の季節変化をみるために 2011 年 6 月より 3 カ月ごとに年 4 回サンプリングを実施した。一方、オリーブは、環境要因だけでなく品種間の差を調べるために、北から南にかけて主要 16 地域、9 品種を対象として、品種の見分けが可能な果実の収穫時期 11～12 月にサンプリングを実施した。なお前者は IRA と、後者は CBS・ENIS とともに合同で実施し、植物体サンプルは、日本とチュニジアのそれぞれで所有し、今後成分分析やバイオアッセイを行っていく。また、土壌サンプルは、すべて ENIS によって分析される予定である。

さらに、ローズマリーの生育範囲とバイオマスの把握を目的として、上記の 2 地域で 2011 年 6 月に生育密度調査を行い、2012 年 2 月に生育地調査を行った。前者は、サイズの異なる 7 個体について個体サイズを計測後、刈り取りを行い、葉の乾燥重量と個体サイズの関係式を作成した。また、15m 四方内の対象種の専有面積 (パッチサイズ) を別途調査し、単位面積当たりの葉の乾燥重量を推定した。後者は、マルチバンドスペクトル衛星画像 ASTER データより、教師無し分析を行い、ローズマリーの生育範囲を推定するとともに、2 地域で GPS を用いた Ground Truth を実施し、生育面積を推定した。今後、2 地域における葉の成分分析結果を基に、生育密度と生育面積から、機能性成分の賦存量を算出する予定である。

加えて、土壌以外の環境データとして、ローズマリー調査 2 地域に気象計を設置し、2011 年 11 月より気温、降水、相対湿度、風向風速、日射量、紫外線量の毎時データを連続観測している。また、チュニジア主要 26 都市の 2007 年までの気象日データ(最高気温、最低気温、相対湿度、可能蒸発量、降水量、風向風速)を入手し、チュニジア全域における対象パラメータの空間特性を把握している(図 2)。これらのデータを用いて、機能性成分含有量との相関解析を行う予定である。

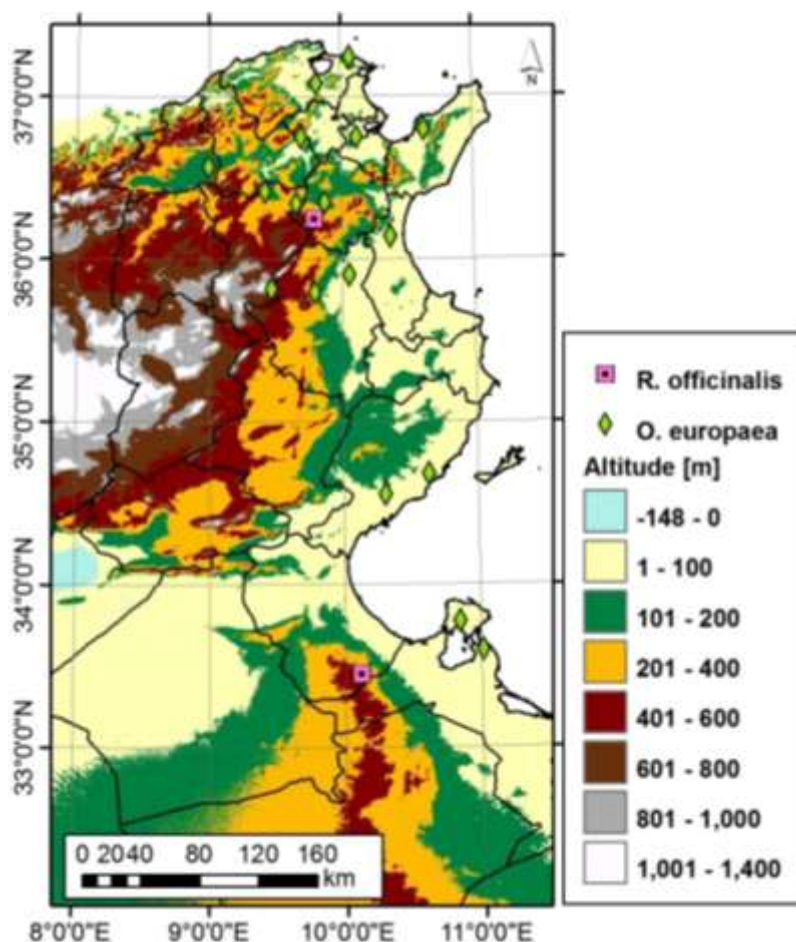


図 1: ローズマリーとオリーブのサンプリング地点

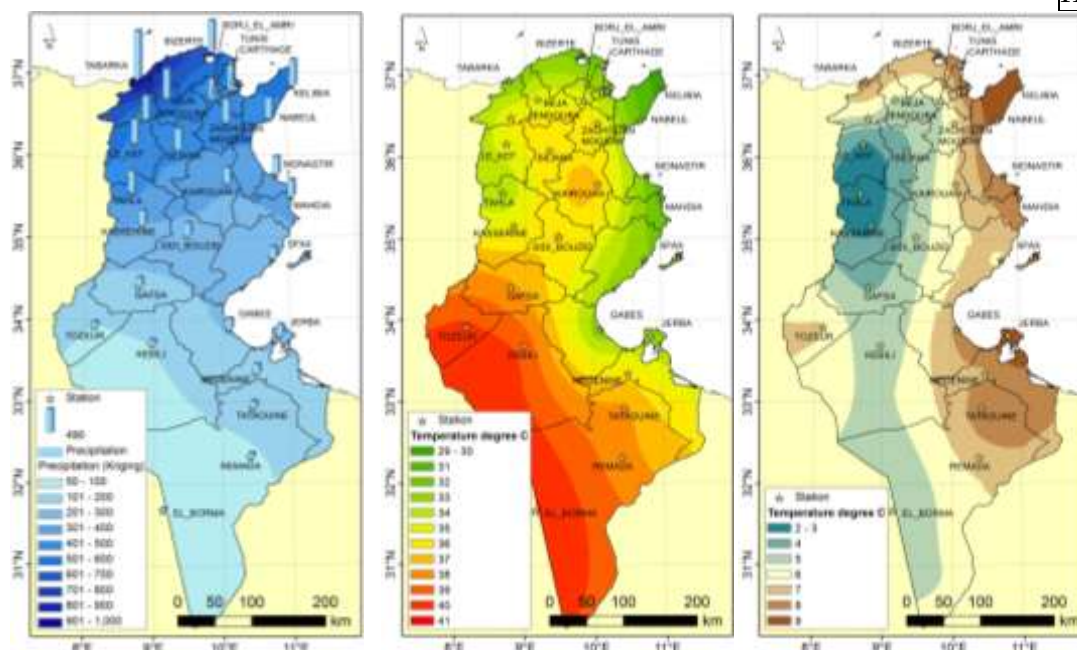


図 2: 気象データの空間特性
(左:年平均降水量, 中:年平均最高気温, 右:年平均最低気温)

4. 地下水資源の管理にむけた地表水と地下水の交流関係に関する調査

- ・ 調査実施期間:2011 年 11 月
- ・ 調査実施場所:主に Lebna 流域(Nabeul 県)
- ・ 共同研究者:磯田教授, 辻村准教授, 河内助教(筑波大学), Tarhouni 教授(INAT)
- ・ 実施内容:

半乾燥地域は, 水供給を地下水に頼る場合が多く, 近年人口増加と農業の拡大によって, 地下水が過剰に揚水され, 地下水位の低下が問題となっている。そのため, 有用植物資源の生産基盤を整備するにあたり, 地下水資源の安定確保が重要な課題である。

そこで本研究では, 地下水の涵養プロセス(降水や河川水等が地下水を補填するプロセス)を把握することを目的として, 昨年度よりチュニジアの海岸地域(Bon 岬)と山間部(Kasserine 県)を対象に地下水調査を実施している。

今年度は, 安全上 Kasserine 県へのアクセスが困難であったため, 図 3 に示す Bon 岬の Lebna 流域(11 月)を中心に調査を実施した。この海岸地域では, 地下水位の低下によって浅層地下水に海水が混入する状況(塩水浸入)が生じており, 農業に大きな影響を及ぼしている。

そこで各流域において, 地下水流動系と地表水との関連を把握するために, 井戸, 河川, 貯水池での水位計測, 測水(pH, 電気伝導度, 水温の計測)および採水を行い(写真 1), 無機溶存イオンと酸素水素安定同位体比の分析を行っている。

Lebna 流域では, 海岸から 2km の範囲で 2011 年 7 月, 23 年 7 月, 9 月, 11 月, 2012 年 3 月の計 5 回, 地下水位と電気伝導度の空間分布を捉える事ができており, 塩水侵入の現状, および上流の Lebna ダムからの涵養状況を捉えられている。今後, 雨季にも同様の調査を行い, 年間を通じてのそれら地表水の影響について検討する予定である。

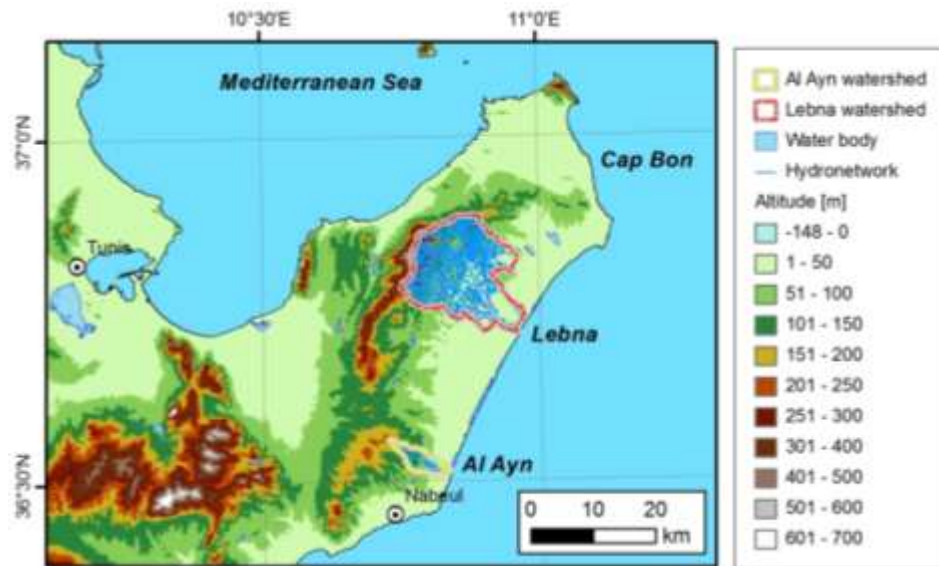


図 3: Lebna 流域の位置



写真 1: 現地調査の様子

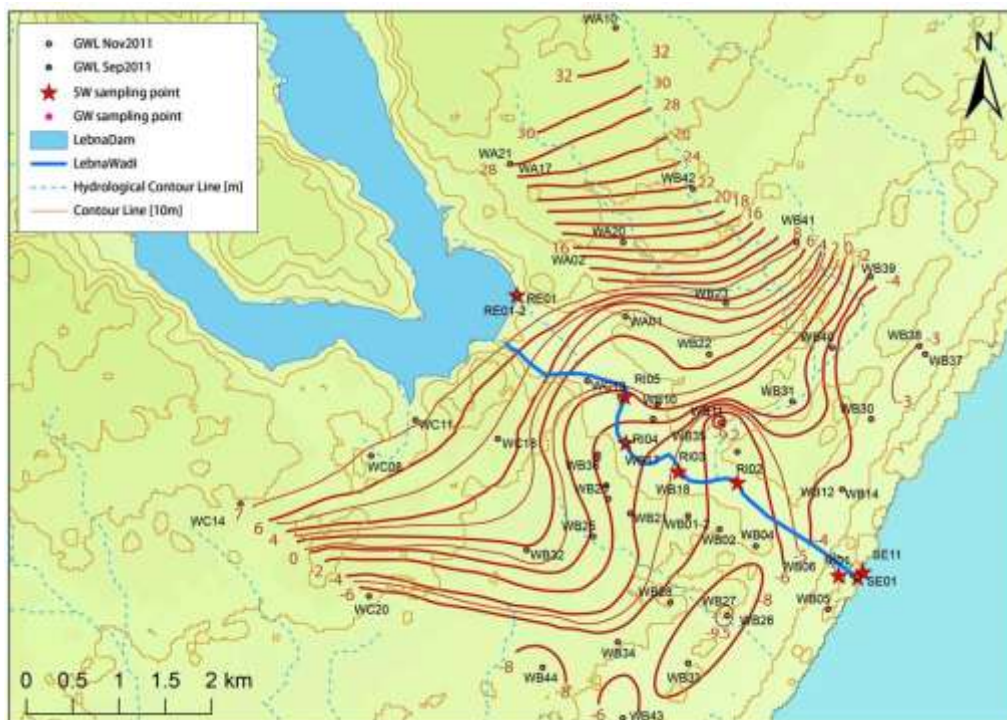


図 4: Lebna 流域において観測された地下水面等高線図(11 月)

図4に、観測された地下水面等高線図を示した。海岸線から最大で約2 kmまで、地下水位が海拔0m以下の領域が及んでおり、海水の進入が懸念される。また、河川沿いに地下水面の尾根が、河川より約1kmの距離部分に地下水面の尾根が形成されている特徴がみられる。

5. チュニジア全域での水循環と水質に関する調査

- ・ 調査実施期間:2012 年 3 月
- ・ 調査実施場所:Kairouan, Sfax, Gabes, Mahdia, Monastir, Sousse, Siliana, Beja,
- ・ Manouba, Ariana 地域
- ・ 共同研究者:磯田教授, 辻村准教授, 韓准教授, 河内助教(筑波大学), Tarhouni 教授 (INAT)
- ・ 実施内容:

有用植物資源の生育, 栽培環境を整備するにあたり, 水供給の安定性や水質の安全性について議論することが必要不可欠である。水供給の安定性を確保するためには, 地下水と地表水の交流関係の把握だけでなく, 水の起源を特定することも重要である。水の起源(海起源 or 内陸起源)は, 降水の酸素・水素の安定同位体比を調べることによって推定可能であるが, 降水の同位体比のデータにバラつきが大きいいため, 多時期のサンプリングが必要となる。そこで本研究では, 降水サンプルの代替として, 降水の安定同位体比組成が反映される河川水をサンプリングし, 同位体比組成の空間分布を捉え, 流域・地域ごとの水の起源推定を試みる。

一方, 水質の安全性については, これまで BOD・COD, DO, SS, 溶存イオンおよび有害物質の濃度などが指標として用いられている。これらの指標は分析が容易である一方, 基準値の根拠があまり明確ではないことが問題であった。そこで本研究では, バイオアッセイによる細胞レベルでの水質指標によって, チュニジア全域での水質の安全性について検討することを試みる。具体的には細胞毒性やストレス応答性と, それらに関連して発現するタンパク質遺伝子の種類によって, 水質の安全性について検討する。

本年度下半期は, 図5に示すチュニジア北部～中部の河川水, 地表水等を63地点においてサンプリングした。また同時に, 10地点のCRDA所管観測所において, 降水の連続サンプリングを依頼した(図6)。これまでチュニジア国内には, IAEA(国際原子力機関)による委託降水サンプリング地点が3ヶ所あるのみであったことを考慮すると, 本調査において, さらに10ヶ所の降水サンプリング地点が追加されたことは, 国際的な水資源研究の観点からも意義が大きい。採取した水サンプルは, 水素・酸素安定同位体, 無機溶存成分等の分析に供する予定である。



図 5: 水サンプリング地点



図 6: 降水サンプラーの設置地点(青:設置地点, 黄:IAEA 観測地点)

【平成 24 年度上半期】

1. 有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発

a) 貯水池濁水挙動観測結果解析

2011年度終盤の雨期を対象として、貯水池内での濁水挙動観測を行った。流入濁水は低水温かつ懸濁によって貯水池内より密度が高いため、底層密度流として貯水池に貫入してくることが予測されたので、貯水池内数地点の底層付近に自記水温計とセディメント・トラップを複数配置した。2012年度上半期は、この観測体制の測器回収と解析を行った。その結果、想定したとおり底層密度流として低温濁水が流入していることが、水温観測結果、セディメント・トラップ量の双方から確認され、その層厚はおよそ5mであった。今後、これらの観測結果をもとに、数値シミュレーションを適用していく。

b) 流域土地利用調査

流域の土砂生産量を推定するためには、土地利用状況を正確に把握する必要がある。そこで流域内を車で巡回し、ランダムに写真撮影とGPSによる位置記録を同時に行い、土地利用状況のグランド・トゥールース・データベースを構築した。これを検証データとし、Aster衛星画像の各バンドを用いて、教師付き分類により土地利用判別を試みたが、判別結果の精度は十分ではなかった。そのため、今後は季節的な土地被覆状況の変化を考慮した分類方法（例えば小麦畑は冬場にNDVIが高く、夏場は裸地化する等）を考案し、再度土地利用分類を試みる予定である。

c) 貯水池数値シミュレーション

シミュレーションに必要な気象観測データが不足していたため、今期に現地の気象観測体制を整え、現在は正確な観測データが得られるようになった。これをもとに他の地点の観測データや類似項目からの気象データの補完方法を再検討し、過去の期間のシミュレーションの精度も向上することが期待される。今後は貯水池内における流動シミュレーションを雨期の濁水流入に適用し、堆砂管理に役立てるようにする。

2. アルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

引き続き ENIS とともに、貯水池底泥の重金属吸着能の評価を行っている。また、底泥の鉱物特性などの基本的性質を分析し、貯水池ごとの差異について調査を進めている。同一貯水池内であれば基本的性質のばらつきはほとんどなく、底泥はほぼ均質であると判断された。したがって、底泥を土壌改良剤として利用する際にも、品質のばらつきはほとんど生じないことが示唆された。

3. 地下水資源管理のための地表水と地下水の交流関係に関する研究

a) 沿岸部農業地域における地下水流動のモデル化

半乾燥地域において持続可能な農業を展開するためには、その主要な水資源である地下水の効率的かつ持続的な利用とともに、降水や地表水(河川水やダム・湖沼水)による地下水涵養量を把握し、流域全体の水循環プロセスの理解を基に適切な資源管理体制を構築することが求められる。そこで、本研究ではチュニジアの主要な農業地域である Nabeul 県の Lebna 流域と Al Ayn 流域の 2 つの沿岸流域を対象とし、地表水(ダム水や河川水)や灌漑用水が地下水涵養に与える影響、および地下水から地表水への流出プロセス等について検討を行っている。

Lebna 流域においては、前年度までの現地地下水位調査と各種水質分析結果等により、雨期および乾期における浅層地下水面形状の空間分布および流動系が把握された。今年度は、灌漑等による揚水が地下水位に及ぼす影響を時空間的に明らかにするため、地下水位の空間分布に関する現地調査を実施するとともに、流域内の複数代表地点において自記水位計による地下水位の長期連続観測を開始した。また、現地で採取した地下水および地表水サンプルについて、無機溶存成分濃度、酸素・水素安定同位体比の分析を行った。これらの結果を基に今後、地表水と地下水の交流関係について考察するとともに、地下水の起源に関し検討を行う。

一方、Al Ayn 流域において、前年度までの現地調査結果等を基に、地下水流動シミュレーションを実施した。対象流域における定常状態の地下水流動系を再現するとともに、沿岸域の地下水における高塩分濃度帯の起源を、中流域にある採油プラントからの廃水による汚染と、海水侵入による塩水混合の 2 つに分離することに成功した。この計算結果は、地下水の無機溶存成分濃度分布等の観測事実とも整合的であった。

b) 地表水と地下水の酸素・水素安定同位体比の空間分布特性

チュニジア全土における、地表水・地下水を中心とした水循環プロセスの把握を目的とし、前年度までに国内各地で採取した河川水、ダム湖水、降水、湧水、および地下水等のサンプルについて、無機溶存成分濃度、酸素・水素安定同位体比の分析を行った。また、2012 年 7 月に沿岸域の Sousse 県と内陸の Siliana 県を対象に、新たに地表水および地下水のサンプリングを行い、併せて各種分析を実施した。

いずれの地域においても、標高が高くなるのに伴い安定同位体比が低下する傾向が認められ、いわゆる降水における安定同位体比の高度効果が、チュニジアにおいても生じていることが示された。沿岸域においては、地下水・地表水の水質に海塩の影響が現れる領域の境界線が示された。一方内陸域においては、上流から下流になるのにしたが、無機溶存成分濃度特性に、いわゆる水質の進化プロセスが進行している傾向が認められた。今後は、標高等の地理的パラメータ等を用い、地表水における安定同位体比空間分布を再現するモデル

を構築し、チュニジア国内における地表水・地下水資源の起源の同定と水循環プロセスの理解を進める。

4. 主要流域での水環境と水環境リスクに関する研究

植物の生育に不可欠な水資源の確保に向け、とくに人為的影響を受けやすい地表水に関し環境リスク評価を行うため、2012 年 5 月に INAT と共同で Medjerda 川流域 (Jendouba, Beja, Manoubah 県) の河川水 20 サンプルと、それに流入する下水処理水 7 サンプル、および工業排水 4 サンプルを採取した。また、同年 9 月には、ENIS と共同で Moknine 塩湖 (Monastir 県) へ流入する下水処理水と工業排水 (合計 6 サンプル) を、ENIS と共同で採取した。

各種水質分析はチュニジア側各機関において、またストレス応答性とエストロゲン活性に関する *in vitro* バイオアッセイ解析を筑波大学において実施した。それらの結果を基に、地表水に含まれる人間活動由来の環境汚染物質 (重金属やエストロゲン様物質等) を検出した。今後は、流域の水文データ等と統合的に解析を行い、汚染物質発生源の推定、および環境水中における拡散過程について検討を行う。

5. 有用植物の機能性成分量と生育環境に関する研究

植物の機能性成分と環境条件の関連を調べるため、昨年度から引き続き IRA と共同で Rosemary の定期採取 (2012 年 6 月と 9 月) と気象データの回収を実施した。加えて、CBBC と共同で新たに、塩生植物と周辺土壌の採取を夏期 (同年 8 月) に実施した。採取サンプルは現地において乾燥処理後、本邦へ持ち帰り成分分析等を実施する予定である。

一方、昨年度までに採取した Rosemary と Olive (葉) について、含有成分の定量や機能性解析を進めている。また、ENIS における各種土壌分析、および現地の気象観測データの収集も継続中である。今後はそれらの結果を基に、機能性成分と環境データの関係性について、統計・多変量解析等を実施し、機能性成分の含有量に関わる環境条件の抽出を試みる予定である。

【平成 24 年度下半期】

1. 有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発

① 貯水池濁水挙動観測結果解析と数値シミュレーション

上半期に得た Joumine 貯水池における雨期出水観測結果の解析を進めた。水温鉛直プロファイルおよびセディメントトラップへの堆積量から出水時の低温濁水は底層密度流として侵入しており、その層厚は約 5m であると考えられた。また、流下方向に沿って 3 地点に観測機器を設置したので、水底部に設置された水温計の計測値低下の時間差から濁水の流下速度を評価した。数値シミュレーションを行ったところ、観測結果の解析で得られたこれらの結果と比較して底層密度流としての現象は概ね再現できていることが確認できた。ただし、現地濁質の粒径を考慮し、濁質沈降-堆積のシミュレーションを行ったところ、過去の深浅測量によって評価されている堆砂分布傾向とは異なる傾向、すなわち、流入直後に大部分が沈降し、ダム堤体付近には濁質はほとんど達しない結果となった。これは実際の濁質の挙動は出水期には一旦流入部付近で堆積し、以後の乾期底水時に露呈した堆積部が流入河川によって徐々に浸食されて、濁質が堤体近くに再輸送されている可能性が示唆されると言える。このことは出水期沈降後、速やかに堆砂浚渫を行わないと最深部に運ばれ、より多くの浚渫コストを

要するようになることを示している。今後、こうした再輸送現象の検証を現地地形観測および数値シミュレーション等によって行っていく。

② 流域土地利用調査

衛星画像上での植生被服状態の季節的変化にもとづく土地利用解析を進めた結果、春期の収穫直前に NDVI が高くなり、収穫直後の夏期に裸地化する小麦畑の区分精度を向上させることができた。特に同国においては小麦畑の面積が概して多く、小麦畑の判別を正確に行うことによって他の土地利用状況の判別に教師付き分類を行った際にそれらの精度も向上した。この土地利用分類結果に基づき、流域からの土砂流出量を推算し、貯水池堆砂量との比較議論を進める。

2. アルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

これまでの圃場実験結果において、貯水池堆積物を下水処理水灌漑圃場に適用した結果、作物の重金属含量が低下する傾向が見られた。そこで貯水池底泥の重金属吸着能の評価を行うとともに、重金属濃度、土壌塩分量、堆積物添加量を変化させて室内栽培実験を行った結果、堆積物添加量の増加に伴って植物の重金属取り込み量に明らかな低下を確認することができた。

3. 有用植物の機能性成分量と生育環境に関する研究

本プロジェクトで対象とする薬用植物、塩生植物、オリーブについて、それぞれに含まれる有用成分量(特にポリフェノール類)と、気象や土壌などの生育環境条件の関係性について研究を行っている。平成 24 年度下半期は、2012 年 12 月と 2013 年 3 月に薬用植物の一つであるローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)と、12 種の塩生植物の採取をチュニジアにて実施した。また、これまでに採取されているローズマリーとオリーブの葉の試料の抽出物について、総ポリフェノール量や抗酸化能の測定を実施した。

ローズマリーを対象とした調査研究は、2010 年 6 月より開始し、2013 年 3 月にかけて約 3 ヶ月おきに年 4 シーズン、合計 8 シーズンについて試料採取を完了した。調査場所は、Fahs と Matmata の 2 地域でそれぞれ 5 定点の観測点を設定し、合計 10 定点で調査を実施した。表 1 に調査地点ごとの調査日を示す。各調査では、土壌試料の採取と気象観測を行っている。ENIS が担当する土壌分析は、これまでに 4 シーズン分、各調査定点で 3 試料の計 120 試料について分析が完了した。気象データは、Fahs では 2011 年 9 月より、Matmata では同年 12 月より観測を開始しており、途中データの欠損はあるが、概ね 1 年間のデータを蓄積できた。成分分析は、筑波大学と一部京都大学が担当し、4 シーズン分の総ポリフェノール量(図 1)、3 シーズン分のローズマリン酸とルテオリンの定量が完了している。図 1 に示すように、総ポリフェノール量は、Fahs 地域で季節変化が見られた。来年度は、引き続き成分分析を進めるとともに、環境データとの関連性について検討していく。

表 1: 植物試料および土壌試料の採取日

調査回	年	採取地点	
		Fahs: 地点 1～5	Matmata: 地点 1～5
1	2011	6 月 21～23 日	6 月 25～27 日
2		9 月 8, 9 日	9 月 12 日
3		11 月 24 日	11 月 27, 28 日
4	2012	2 月 17 日	2 月 24, 25 日
5		6 月 26 日	6 月 28 日
6		9 月 4 日	9 月 5, 6 日
7		12 月 3 日	12 月 4 日
8	2013	3 月 25 日	3 月 26 日

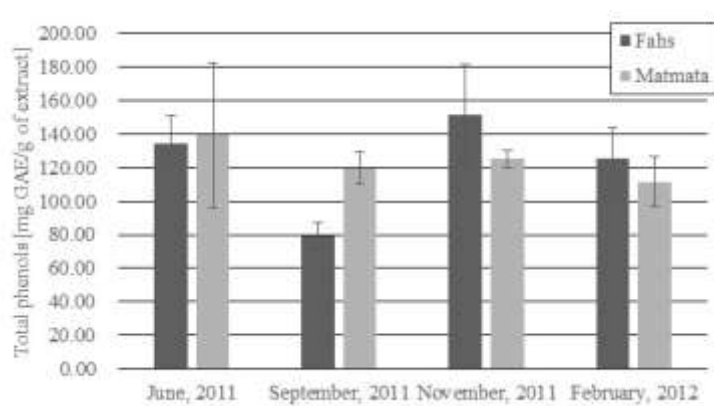


図 1: 乾燥葉抽出物の全フェノール量の季節変化

表 2: 研究対象の塩生植物リスト

学名	採取地域名					
	Soliman	Ariana; Bizerte	Kairouan	El Jem	Sfax	Gabes
<i>Atriplex inflata</i>			○			
<i>Arthrocnemum indicum</i>	○	○	○		○	
<i>Halocnemum trobilaceum</i>	○	○	○	○		
<i>Juncus maritimus</i>	○		○			
<i>Mesembryanthemum edule</i>	○	○				
<i>Nitratia retusa</i>			○			
<i>Plantago crassifolia</i>			○			
<i>Salicornia</i> sp.	○	○				
<i>Salsola tetrendra</i>			○			
<i>Tamarix aphylla</i>			●			
<i>Tamarix gallica</i>			●			
<i>Atrhrophytum scoparium</i>						○
<i>Gymnocarpos decander</i>						○
<i>Rhanterium suaveolens</i>						○

○:2012 年 8 月, 2013 年 3 月採取、●:2012 年 8 月採取

塩生植物の調査研究については、表 2 に示す 14 種類と地点を対象として乾期の 2012 年 8 月下旬と雨期の 2013 年 3 月の 2 回試料採取を行った。そのうち 2 種については 3 月期に採取ができなかったため来年度に追加調査を実施する。また 8 月期の調査で土壌試料を採取し、ENIS にて分析が行っている。来年度より成分分析等を実施する予定である。

オリーブに関する調査研究については、2011 年 11 月と 12 月に合計 9 品種、17 地点で試料採取が行われている。ただし、各地点で採取された品種は 1～3 品種であるため、試料数は合計 24 である。これまでに、11 月採取された計 15 試料について、総ポリフェノール量や抗酸化能の測定、抗腫瘍活性に関するバイオアッセイを実施し、栽培品種、栽培地域によって成分量や機能性に違いがあることが示唆されている。来年度は引き続き、12 月採取分について成分分析を実施し、気象や土壌データとの関連性について検討する予定である。

4. 有用生物資源生育の基盤となる水環境評価

① チュニジア北部域における陸水の安定同位体比空間分布解析

対象地域における持続可能な水資源管理の基盤として、水の起源、循環経路、循環速度・時間からなる水循環履歴情報を明らかにすることは、基本的に重要である。本調査では、2011 年 11 月、2012 年 3 月、7 月において、チュニジア北半分地域の河川水、地下水、湧水、貯水等を対象に試料採取を行い、水素・酸素安定同位体

比、無機溶存成分濃度分析・解析等を行った。

図 2 に全試料の採取地点と水種別を、図 3 にそれらの水素安定同位体比における空間分布を示す。全体的に、標高の高い地点における同位体比は標高の低い地点のそれに比べ低い値を示し、また内陸における同位体比は沿岸近くのそれに比べ低い値を示す傾向がみられるが、季節変動の影響も含んでいるため、それほど明瞭な特徴とは言えない。この定性的空間特性をもとに、安定同位体比と種々の空間特性因子を比較検討したところ、標高と河川の流下距離が安定同位体比にもっとも顕著な影響を及ぼすものと判断された。

そこで、標高と流下距離の二つのパラメータを用い、安定同位体比形成モデルを構築し、同位体比空間分布の予測を行った。図 4 に、予測された安定同位体比と実測のそれにおける空間分布を示した。当地域における水の安定同位体比は、高度効果により高標高におけるそれがより低い値を示すという形成過程に支配され、さらに、河川の流下にとまう同位体比の上昇により特徴付けられるものと考えられる。すなわち、水資源の起源としては、地中海起源の水蒸気がより重要な役割を果たしているものと判断される。

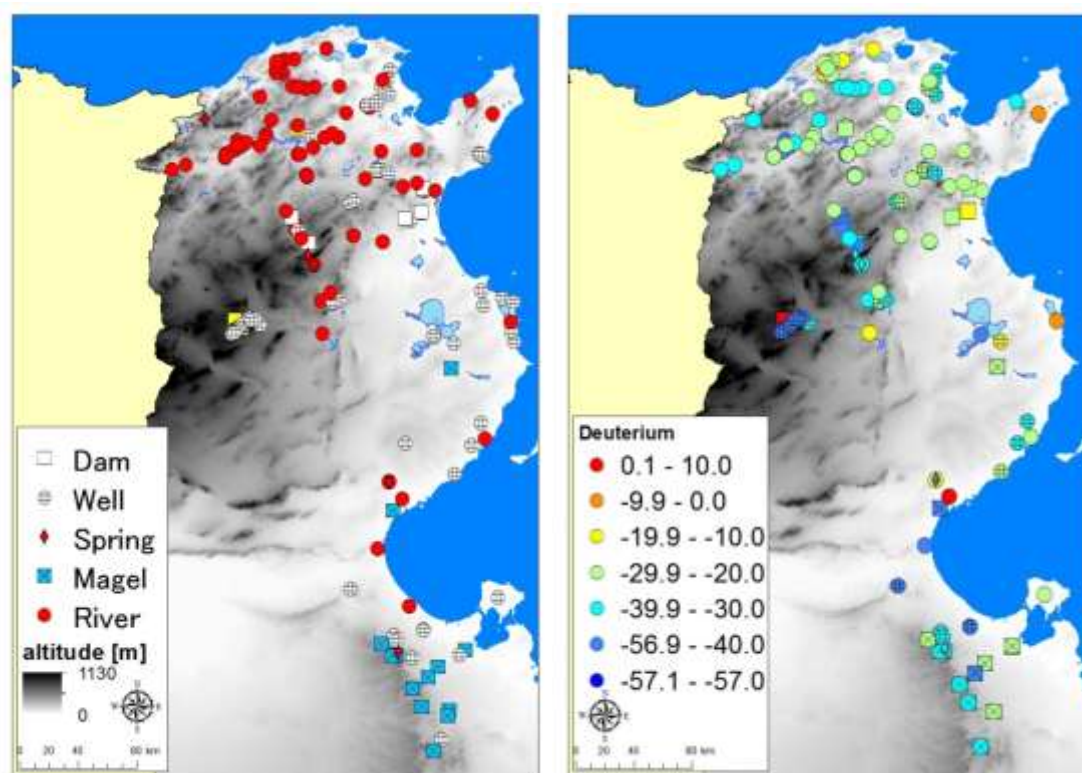


図 2. 水試料採取地点と種別。 図 3. 水試料の水素安定同位体比空間分布。

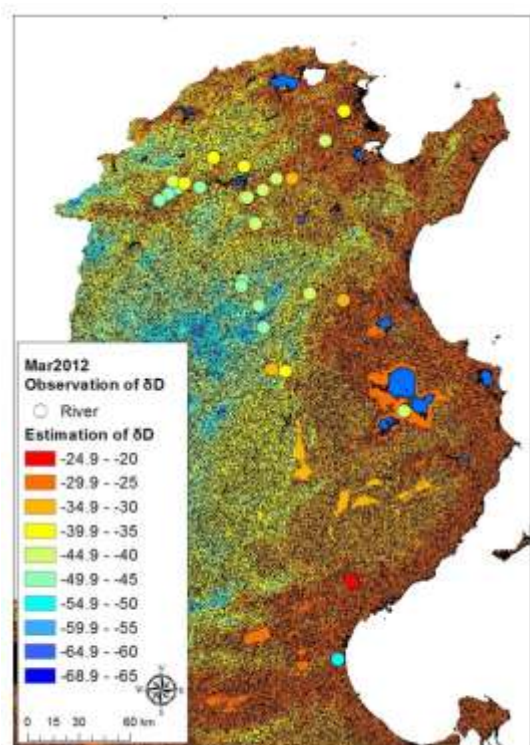


図 4. 標高と流下距離から予測された水素安定同位体比と実測値。

(2) 沿岸域および内陸域における地表水－地下水循環系

沿岸域および内陸域の流域を対象に、河川水、地下水、貯水等の水の安定同位体比、無機溶存成分解析から、地表水－地下水循環プロセスの解明を行った。

内陸流域においては、高標高の安定同位体比が低標高におけるそれに比較し低いという明瞭な高度効果がみられること、下流の無機溶存成分において $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-HCO}_3^-$ で特徴付けられる、より進化した水質特性がみられることから、流域全体をスケールとした地域的循環系と、より小規模な局地的循環系からなる地下水－地表水循環系が形成されているものと考えられた。

一方沿岸流域においては、周辺山地からの地下水による涵養と、ダムからの浸透による涵養により、浅層地下水が形成されているものと判断された。

さらに、沿岸の灌漑地域においては、ダムからの流出により維持されている河川水から浅層地下水への不飽和浸透水による涵養が示唆されるとともに、ダム水による灌漑が行われている地域においては、浅層地下水の安定同位体比が相対的に高い値を示す傾向がみられることから、ダム水による地下水涵養の影響があるものと判断された。

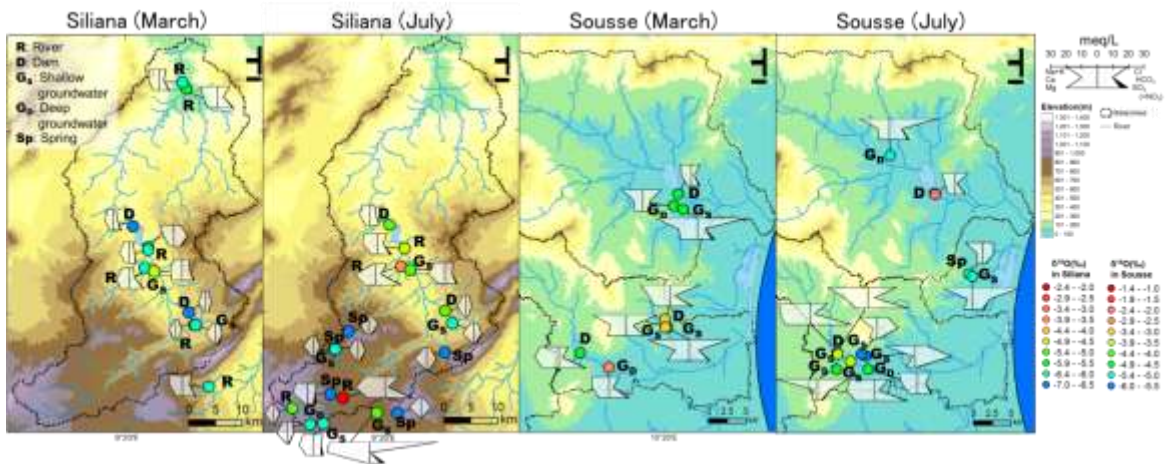


図 5. 内陸流域(Siliana)と沿岸流域(Sousse)における酸素安定同位対比と無機溶存成分の空間分布。

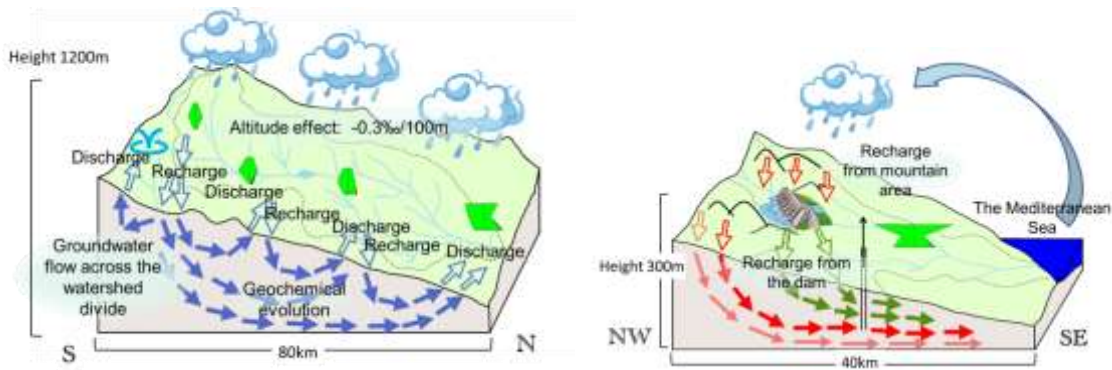
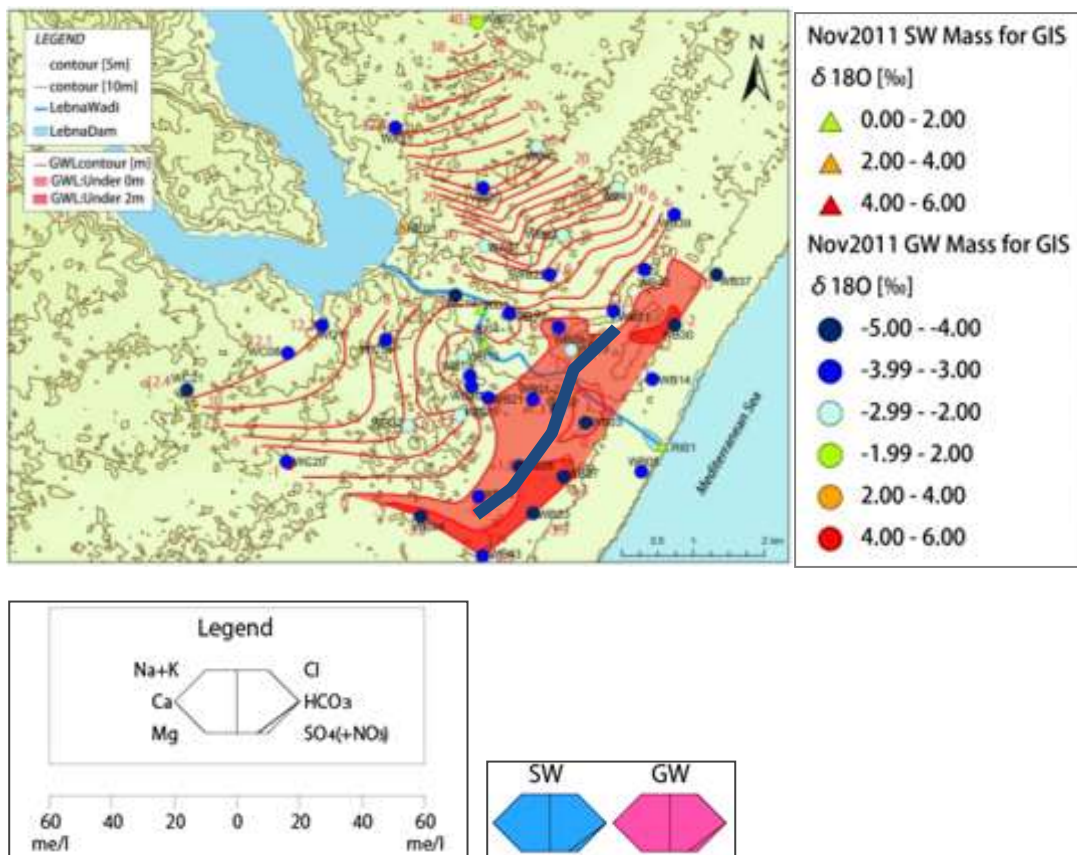


図 6. 内陸流域(左)と沿岸流域(右)における水循環プロセス概念図。



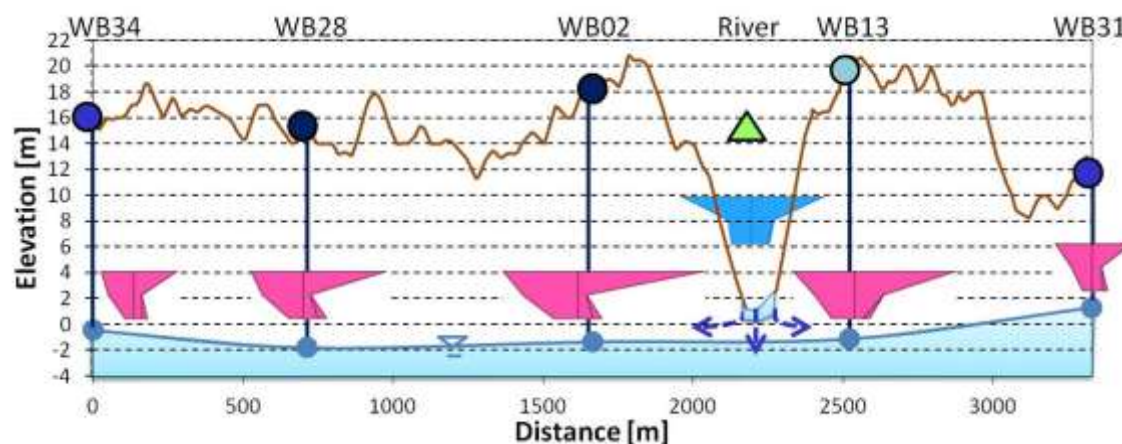


図 7. 沿岸灌漑地域における地下水－地表水循環系を示す概念図。

【平成 25 年度上半期】

有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発

(1) 貯水池濁水挙動観測結果解析と数値シミュレーション

昨年度と同様に、Joumine貯水池にサーミスターチェーンとセディメントトラップを設置し、濁水挙動の観測を試みた。昨年度に比べて出水時の気温がやや高かったことと出水の規模がやや小さかったと思われ、その結果、流入河川水温はやや高く、ピーク流量が大きいほど多くなると考えられる濁質量が少なかったために、流入河川水の密度は湖水にやや近い状況になっていると思われた。その結果、湖内に入った濁水は、昨年度とは異なり、明確な底層密度流ではなく、広範の層に広がりながら流入していると考えられた。したがって、同貯水池の堆砂管理において、集水時の気温と出水規模に応じて密度流排砂が期待できる場合とできない場合があると考えられた。

(2) 流域土地利用調査

前年度までに開発した土地利用分類法にしたがって解析を行い、降雨量、土壌分布図などをもとにUSLEを適用して、代表的な4つの貯水池の集水域別に土砂生産量を求めた。その結果を各貯水池で行った深浅測量結果から求められた使用開始以降の総堆砂量と比較したところ、一意の関係とはならなかった。傾向として、集水域面積が大きいほど土砂生産量と総堆砂量の差が大きい傾向にあり、集水域から貯水池に達する途中の河道で堆積している可能性が示唆された。

アルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

これまで土壌改良材、特に下水処理水灌漑農地での使用にあわせた評価を行ってきたが、その高いCECに着目すると、土壌に添加するよりも灌漑する前の段階、すなわち水処理の段階で、同堆積物を使って処理水中に含まれる重金属を除去したほうが効率的であると考えられた。そこで、同材料を用いた浄水フィルターの試作・評価に向けて準備を開始した。

有用生物資源生育の基盤となる水環境評価

(1) チュニジア北部沿岸流域における地下水涵養に及ぼす地表貯水池の影響

対象地域における持続可能な水資源管理の基盤として、水の起源、循環経路、循環速度・時間からなる水循環履歴情報を明らかにすることは、基本的に重要である。2013 年 6 月、チュニジア北東部 Cap-Bon 半島の沿岸域において、上流灌漑用ダム貯水池を有する Lebna 流域と、その南に位置し域内にダムを持たない Chiba 流域を対象とし、河川水、地下水、湧水、貯水等の試料採取、地下水位観測等を行うとともに、水試料の水素・酸素安定同位体比、無機溶存成分濃度分析・解析等を行った。

図 1 に Lebna 流域、および Chiba 流域における地下水面図を示す。Lebna 流域は、海岸線から約 3 km 程度の位置まで標高 40 m の丘陵地があり、一方 Chiba 流域は内陸 6 km 程度まで標高 20 m 以下の平地が広がるという地形的な違いはあるが、地下水面の空間分布特性をみると、Lebna 流域においては、ダム近傍の内陸から沿岸域に向かい地下水の流動がみられるのに対し、Chiba 流域においては、海岸部から内陸に向けての地下水流動が卓越する傾向がみられる。

対象地域の東西断面に沿った地下水面の分布、および水素・酸素安定同位体比から算定される d-excess 値の空間分布を図 2 に示す。Lebna 流域内の断面である A, B においては、内陸から沿岸域に向かい地下水面が低下するとともに、B 断面で海岸から 1 km 内陸で若干地下水面が海水面よりも低下している特徴がみられる。水の d-excess 値は、蒸発の影響を受けるほど、一般的には値が低くなる傾向を示す。Lebna 流域における地下水の d-excess 値は、Chiba 流域におけるそれに比較し、低く、また空間的変動が大きい傾向がみられる。これは、Lebna 流域のダムにおいて水面蒸発の影響を受けた水が、直接・間接的な涵養プロセスを経て、地下水に影響を及ぼしているためと考えられる。

チュニジア北部沿岸域では、灌漑目的の地下水揚水の増加により、地下水位低下とそれに伴う塩水化が問題となっており、その対策として、地表貯水池を用いた人口涵養が検討されている。本調査の結果は、ダム貯水池からの地下水涵養が地下水賦存状況に及ぼす影響を示した初めてのデータを言うてよく、今後のさらなる解析が待たれるものである。

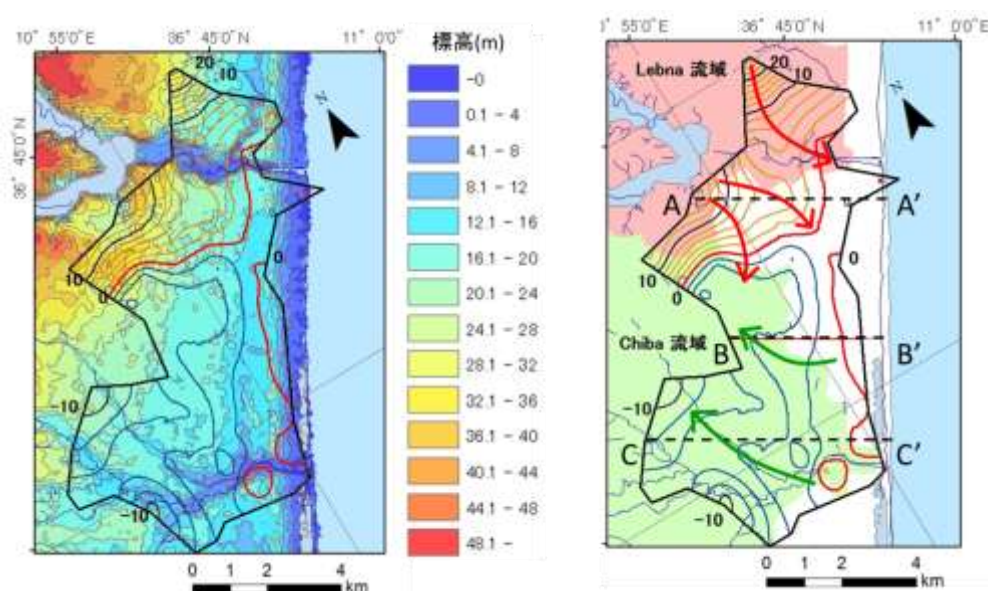


図 1. Lebna および Chiba 流域における地形面図(左)と、地下水面ならびに地下水の主流動方向(右)。

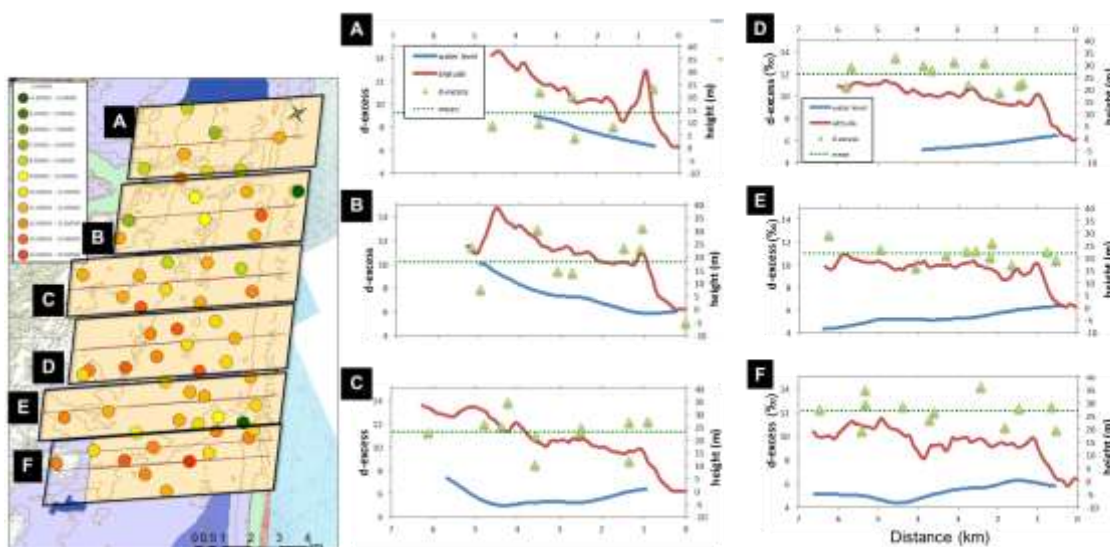


図 2. Lebna および Chiba 流域の東西断面における、地下水面および水素・酸素安定同位体の d-excess 値の空間分布。左図の小円内の色は、d-excess 値を示し、暖色系が相対的に高い値を、寒色系は低い値を示す。右側の各断面図における赤線は地表面を、青線は地下水面を、△は d-excess を、破線は d-excess の平均値を各々示す。

(2) 沿岸域および内陸域における地表水－地下水循環系

2012 年度に引き続き、2013 年 6 月において、沿岸域（Sousse 流域）および内陸域（Siliana 流域）を対象に、河川水、地下水、貯水等の水サンプリング、地下水位観測、河川水流量観測等を行い、水の安定同位体比、無機溶存成分解析等と併せ、地表水－地下水循環プロセスの解明を行った。2012 年に比較し、Siliana 流域では流量観測を空間的に高密度に行うとともに、とくに上流域では、水流の有無の確認を行った。また Sousse 流域では、ダムより上流の採水を実施し、2012 年度におけるデータの空白域を解消した。

Siliana 流域においては、一部を除き高標高の安定同位体比が低標高におけるそれに比較し低いという傾向がみられる。また、下流の無機溶存成分において $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-HCO}_3^-$ で特徴付けられる、より進化した水質特性がみられることから、流域全体をスケールとした地域的循環系と、より小規模な局地的循環系からなる地下水－地表水循環系が形成されているものと考えられた。

一方 Sousse 流域においては、上流部では Ca-HCO_3 が卓越する水質組成を示すのに対し、中下流域では Na-Cl が卓越する傾向が明瞭である。下流域では、周辺山地からの地下水による涵養と、ダムからの浸透による涵養により、浅層地下水が形成されているものと判断された。

さらに、沿岸の灌漑地域においては、ダムからの流出により維持されている河川水から浅層地下水への不飽和浸透水による涵養が示唆されるとともに、ダム水による灌漑が行われている地域においては、浅層地下水の安定同位体比が相対的に高い値を示す傾向がみられることから、ダム水による地下水涵養の影響があるものと判断された。

2012 年度の調査に比較し、2013 年度においては、水試料の空間密度が高くなったこともあり、河川水における水素・酸素安定同位体比の空間分布データに、昨年度ほど明瞭な高度分布が認められなくなった。この要因等については、今後慎重に検討する必要がある。

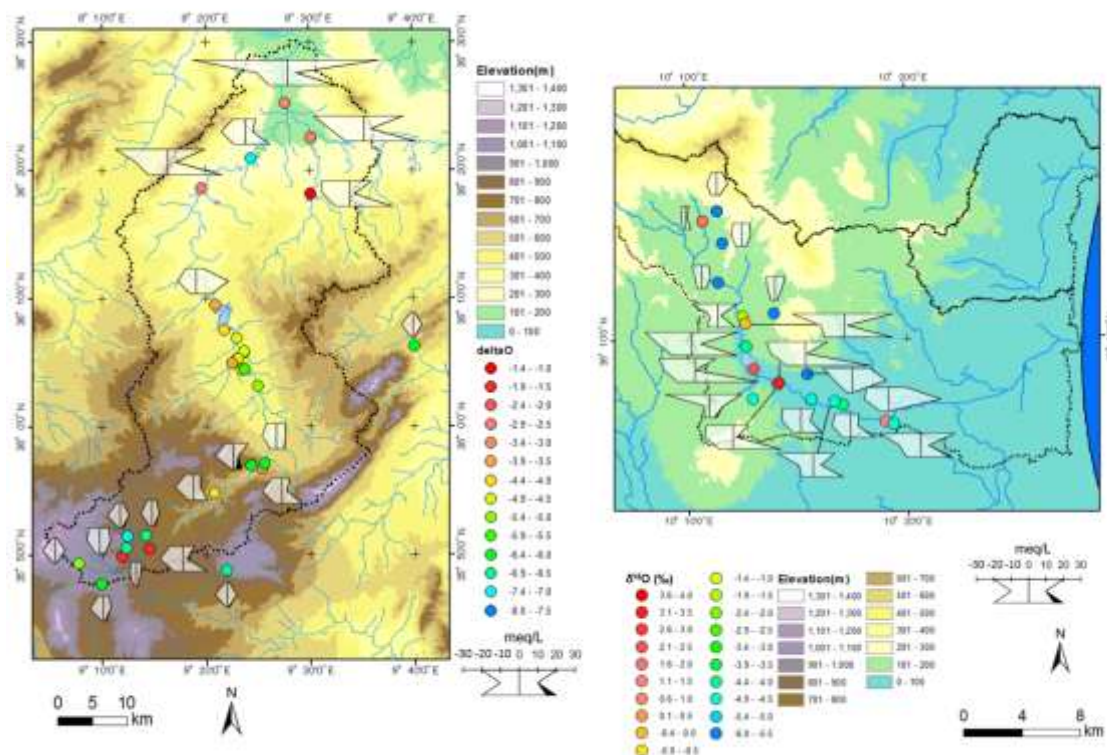


図 3. Siliana 流域(左)および Sousse 流域(右)における河川水、湧水、地下水の酸素安定同位体比、および無機溶存成分の空間分布(2013 年 6 月)。

【平成 25 年度下半期】

有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発

(1) 貯水池濁水挙動観測結果解析と数値シミュレーション

- ・Joumine ダムに設置したセディメントラップ等を回収し、解析を行った結果、前年度とは異なる濁水挙動傾向が見られ、出水規模が濁水挙動を規定していることが示唆された。
- ・鉛直二次元モデルを構築し、懸濁物質の沈降過程まで考慮したシミュレーションを行った。
- ・流入した懸濁物質はその大部分が流入直後に比較的速やかに沈降することが明らかとなった。
- ・現地では乾季末の低水位期には上流の浅水部水底が露呈していた。その観察によると一旦堆積した土砂が底層プルームもしくは水底露呈時のわずかな流れによって浸食され、堆積物上にかなり深いみずみちが形成されており、二次輸送されている様子が確認できた。

(2) 流域土地利用調査

- ・調査を行ってきた 4 貯水池の集水域の土地利用判別を行い、USLE モデルで年間土砂生産量を推定した。
- ・一方で、各貯水池の堆砂速度を評価し、年間土砂生産量と比較を行ったところ、堆砂速度の決定には土砂生産量が主たる因子ではあるものの、貯水池回転速度、河道形状なども大きな因子となっていることが示された。

有用植物の機能性成分量と生育環境に関する研究

- ・2011 度までに 25 地点で、9 品種を採取したチュニジア産オリーブ (*Olea europaea*) の含有成分を評価した。総ポリフェノール量および抗酸化性において、品種・地域間での差、および、同品種間での地域差が見られ、総ポリフェノール量と抗酸化性に相関が見られた。ヒト乳がん細胞(MCF-7)に対する抗腫瘍性評価試験では、チュニジアオリーブが MCF-7 の増殖を有意に抑制することを見出した。
- ・昨年度までに採取を完了したオリーブ、ローズマリー、塩生植物の土壌サンプルについて理化学分析が終了した。気象データの解析も含め、来年度、それら植物の機能性成分の環境条件依存性について検討していく。それらの基礎データをとりまとめ、環境データベースの構築を目指す。

有用生物資源生育の基盤となる水環境評価

- ・チュニジア北東 Cap-Bon 地域の Lebna 流域と Shiba 流域において、地下水および地表水に関する水文学的ならびに地球化学的フィールド調査を行った結果、地下水涵養におけるダム水の影響・効果が認められたとともに、地下水の溶存成分特性における塩水の影響ならびに水岩石相互作用の影響を評価することができた。
- ・チュニジア北部地域の Siliana 流域と Soucce 流域において、地表水および地下水に関する水文学的ならびに地球化学的フィールド調査を行った結果、地下水と地表水の交流関係における時空間変動が明らかにされるとともに、地下水涵養・流出域の空間分布が評価された。

育種方法開発グループ

①研究のねらい;ソルガムをモデルとした耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に関与する遺伝子座の同定、乾燥耐性と適応関連形質と連鎖する分子マーカーの開発を行うとともに遺伝子解析を行う。

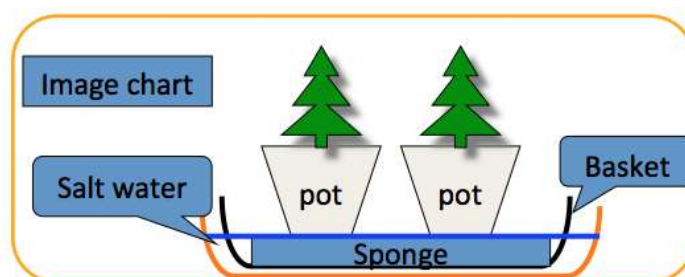
②研究実施方法;

・ソルガムの開花期を制御する QTL の同定; ソルガム・コアコレクションの連鎖不平衡解析により、染色体に散在する 5 個の QTL を検出した(表1)。SSR(Simple Sequence Repeats)マーカーを用いた遺伝解析により、自然日長での開花期に関与する 3 個の QTL と 12 時間日長での開花期に関与する 1 個の QTL を検出した。第 8 染色体の QTL は自然日長と短日日長での開花期に関与した。

・ソルガムの耐塩性検定法の確立;ソルガムの塩類耐性検定法を確立した(図1)。ソルガム・コアコレクションの品種変異を評価し、耐性強品種を選出した。

表1. ソルガムの開花期を制御する QTL の同定

Chr	QTL	Marker	Mapping population	Analysis
1	5	Xtxp58, Xtxp61, Xtxp75, Xtxp279, Xtxp302	Core collection, 45 accessions under controlled conditions of photoperiod	Linkage disequilibrium
2	6	Xtxp56, Xtxp297, Xtxp13, Xtxp298, Xtxp100, Xtxp315	Core collection, 45 accessions under controlled conditions of photoperiod	Linkage disequilibrium
4	4	Xtxp51, Xtxp59, Xtxp27, Xtxp212	Core collection, 45 accessions under controlled conditions of photoperiod	Linkage disequilibrium
5	3	Xtxp159, Xtxp312, Sb3152 and Sb3163	Core collection, 45 accessions under controlled conditions of photoperiod, F2 population	Linkage disequilibrium, linkage analysis
6	1	Xtxp10	45 accessions under controlled conditions of photoperiod	Linkage disequilibrium
7	1	Sb4143, Sb4145	F2 population	linkage analysis
8	1	Sb4366, Sb4528	F2 population	linkage analysis



塩類耐性評価

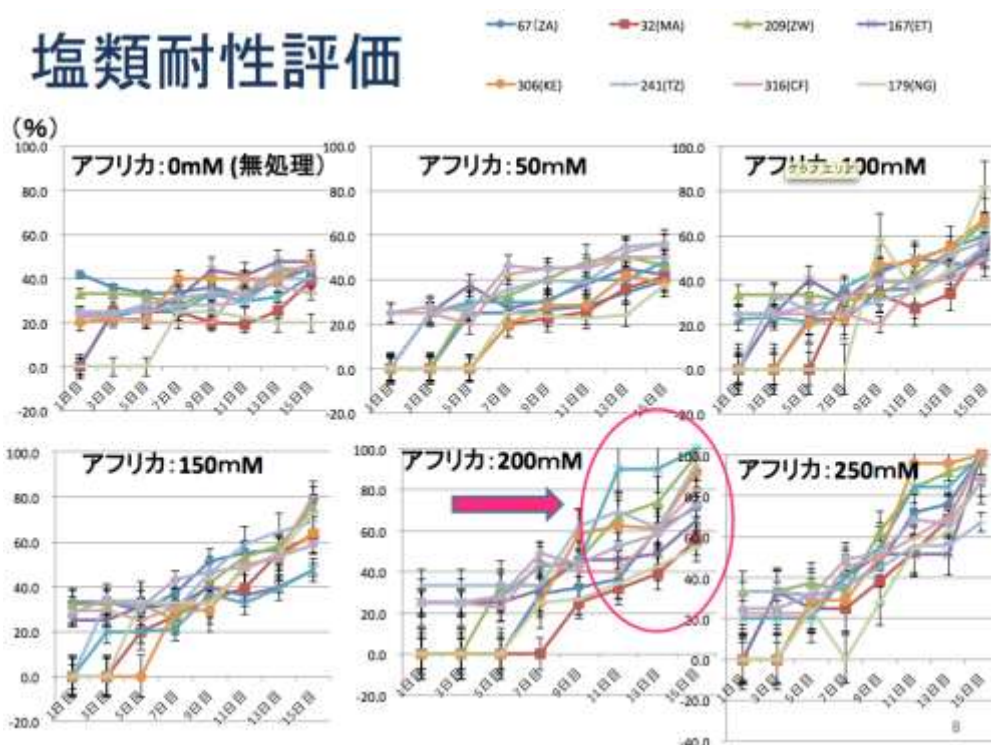


図1. ソルガムの塩類耐性評価のプロトコールと結果

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況;「ソルガムの開花期を制御する QTL の同定」および「ソルガムの耐塩性検定法の確立」は当初の計画の通りに進行中である。

④カウンターパートへの技術移転の状況;平成23年度にはJICA長期研修生(博士課程)を受け入れ、技術移転を活性化する予定。

【平成23年度上半期】

1. ソルガムの開花期を制御する QTL の同定

開花期は作物の適応性や栽培地域を決定する主要な形質である。また、開花期を自在に選択できれば、乾燥害や塩害等の環境ストレスから作物を防護できる。そのため、開花期を制御する遺伝子座を検出するため、晩生の日本品種と早生のエチオピア品種の F2 集団 144 個体を自然日長下および 12 時間日長下で栽培し開花期の分離を調査した。前年度、88 個の SSR マーカーを用いて連鎖地図を作成し、QTL (量的形質遺伝子座) 解析を行ったが、マーカー数が不十分で染色体全域をカバーできていなかった。今年度は SSR マーカーを 213 個に増やし、ほぼ全域をカバーする連鎖地図を作成し QTL 解析を行った。

その結果、自然日長条件下では開花期の決定に関与する 15 個の QTL を検出し(図2)、12 時間日長下では 13 個の QTL を検出した。これらの QTL のうち、10 個の QTL は自然日長下と 12 時間日長下で検出され、5 個の QTL は自然日長下でのみ検出され、3 個の QTL は 12 時間日長下でのみ検出された。以上の結果から、ソルガムの開花期の制御には寄与率の小さな多くの QTL が関与し、日長反応性および非(弱)日長反応性の QTL が関係していることが明らかになった。同じ短日植物のイネの開花あるいは出穂には、少数の日長反応性や開花に関わる遺伝子のネットワークが関与している。一方、ソルガムの開花期は、トウモロコシと同様に、寄与率の小さな多数の遺伝子により制御されていることが明らかになった。

2. ソルガムの日長反応性の解析

早生、中生、晩生各 15 品種を 11.5、12.0、12.5、13.0 時間の日長条件下で栽培し開花期を調査した。開花期は日長時間の短縮に伴って早くなったが、開花期の早晚性との関連性は認められなかった。これまで、ソルガムの適日長限界時間は約 12.5 時間であると報告されてきたが、今回の結果は、ソルガムの適日長限界時間は 12.5 時間よりも短い、あるいは明瞭な適日長限界時間が存在しない可能性がある。また、開花期の決定には日長時間と温度が関係し、短日植物であっても開花期の決定に対する日長時間の影響が、イネに比べて小さく、温度による影響がイネに比べて大きいと考えられる。

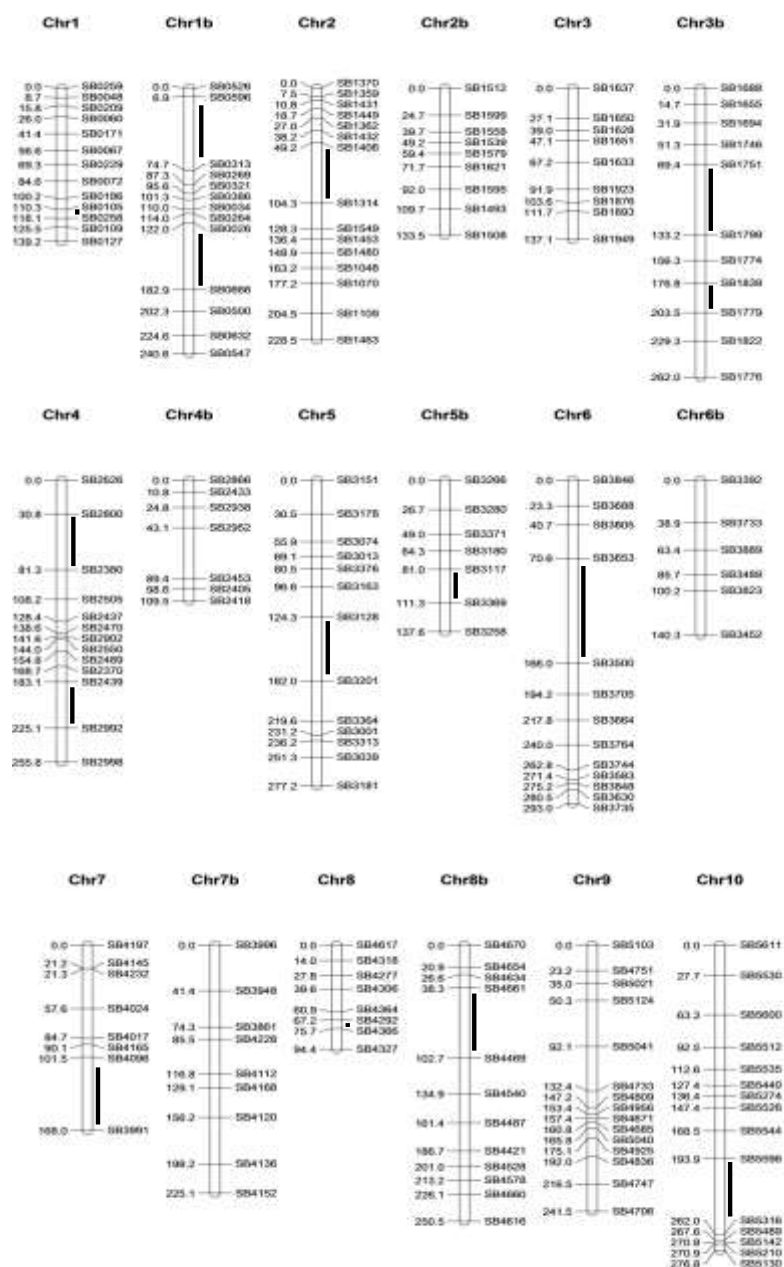


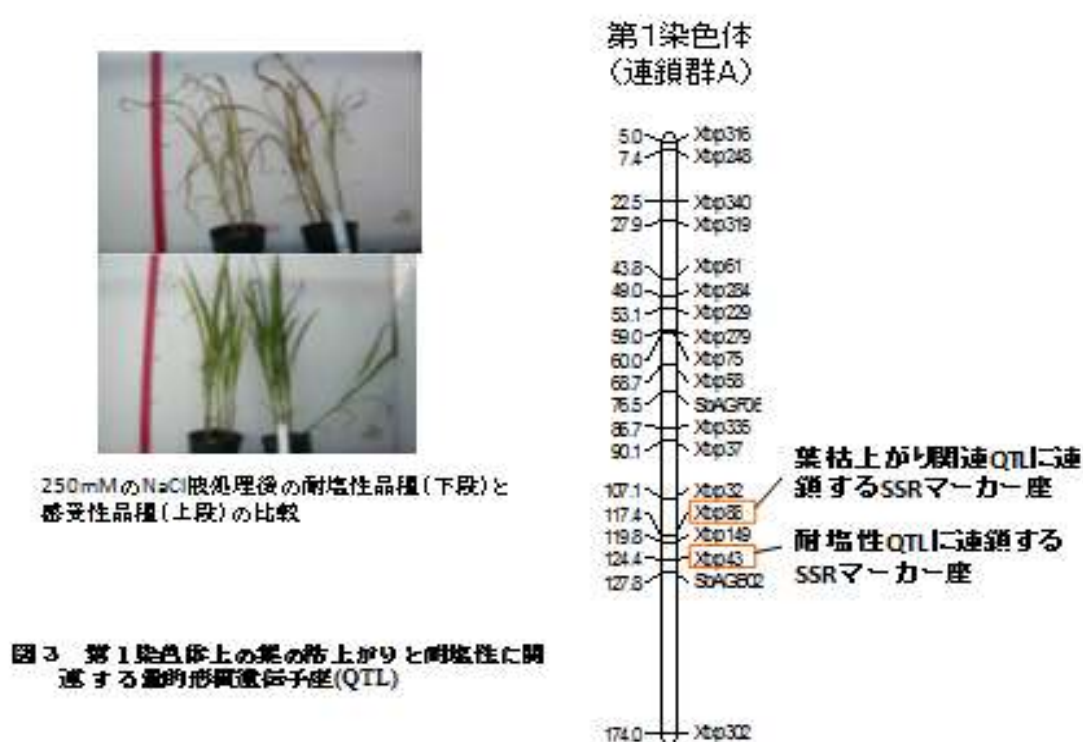
図2 ソルガムの自然日長下での開花期を制御する QTL の染色体上の位置

【平成 23 年度下半期】

1. ソルガムの耐塩性関連 QTL の同定

ソルガムはエチオピアからスーダンに至る熱帯の乾燥地で起源し、広く世界に伝播した穀物である。ソルガムは乾燥等の非生物的ストレスに対する耐性を有することから、他の主要穀物が栽培できないような不良環境条件下でも栽培が可能である。しかし、地球温暖化による砂漠化が進行する中で、乾燥とともに塩類集積が拡大し、多くの作物にとって塩害は深刻な問題となっている。強い不良環境耐性を有するソルガムであっても、耐塩性の

強化は今後の重要な育種課題である。そこで、本研究では、ソルガムの耐塩性評価法を確立し、その方法を用いてソルガムコアコレクション 107 品種の耐塩性変異を解析し、耐塩性データと SSR マーカー98 座の遺伝子型情報を用いたアソシエーション解析により耐塩性関連 QTL を検出することを目的とした。250mM の NaCl 処理後、感受性品種の葉枯死率が 80-90%になる時期から 1 週間後の枯死率を指標として耐塩性を評価する方法を確立した。この評価法を用いてコアコレクション 107 品種の耐塩性を評価し、アソシエーション解析により耐塩性関連 QTL を検索した。その結果、無処理区における葉の枯上りに関与する QTL が検出された第 1 染色体(連鎖群 A)に、SSR マーカー座 *Xtp43* と連鎖して耐塩性 QTL が検出された(図 3)。本研究の成果はソルガムで初めて耐塩性 QTL を同定したものである。



2. ソルガムの開花期を制御する量的形質遺伝子座の同定

開花期は作物の適応性や栽培地域を決定する主要な形質である。また、開花期を自在に選択できれば、乾燥害や塩害等の環境ストレスから作物を防護できる。そのため、開花期を制御する遺伝子座を検出するため、晩生の日本品種と早生のエチオピア品種の F₂ 集団 144 個体を自然日長下および 12 時間日長下で栽培し開花期の分離を調査した。今年度は SSR マーカーを 213 個に増やし、ほぼ全域をカバーする連鎖地図を作成し QTL 解析を行った。上半期に報告した連鎖地図には不具合が見つかったので、使用するプログラムを替えて連鎖地図の作成および QTL の同定を行った。

その結果、自然日長条件下では開花期の決定に関与する 9 個の QTL を検出し、12 時間日長下では 7 個の QTL を検出した。これらの QTL のうち、5 個の QTL は自然日長下と 12 時間日長下で検出され、4 個の QTL は自然日長下でのみ検出され、2 個の QTL は 12 時間日長下でのみ検出された(図 4)。以上の結果から、ソル

ガムの開花期の制御には寄与率の小さな多くの QTL が関与し、日長反応性および非(弱)日長反応性の QTL が関係していることが明らかになった。同じ短日植物のイネの開花あるいは出穂には、少数の日長反応性や開花に関わる遺伝子のネットワークが関与している。一方、ソルガムの開花期は、トウモロコシと同様に、寄与率の小さな多数の遺伝子により制御されていることが明らかになった。

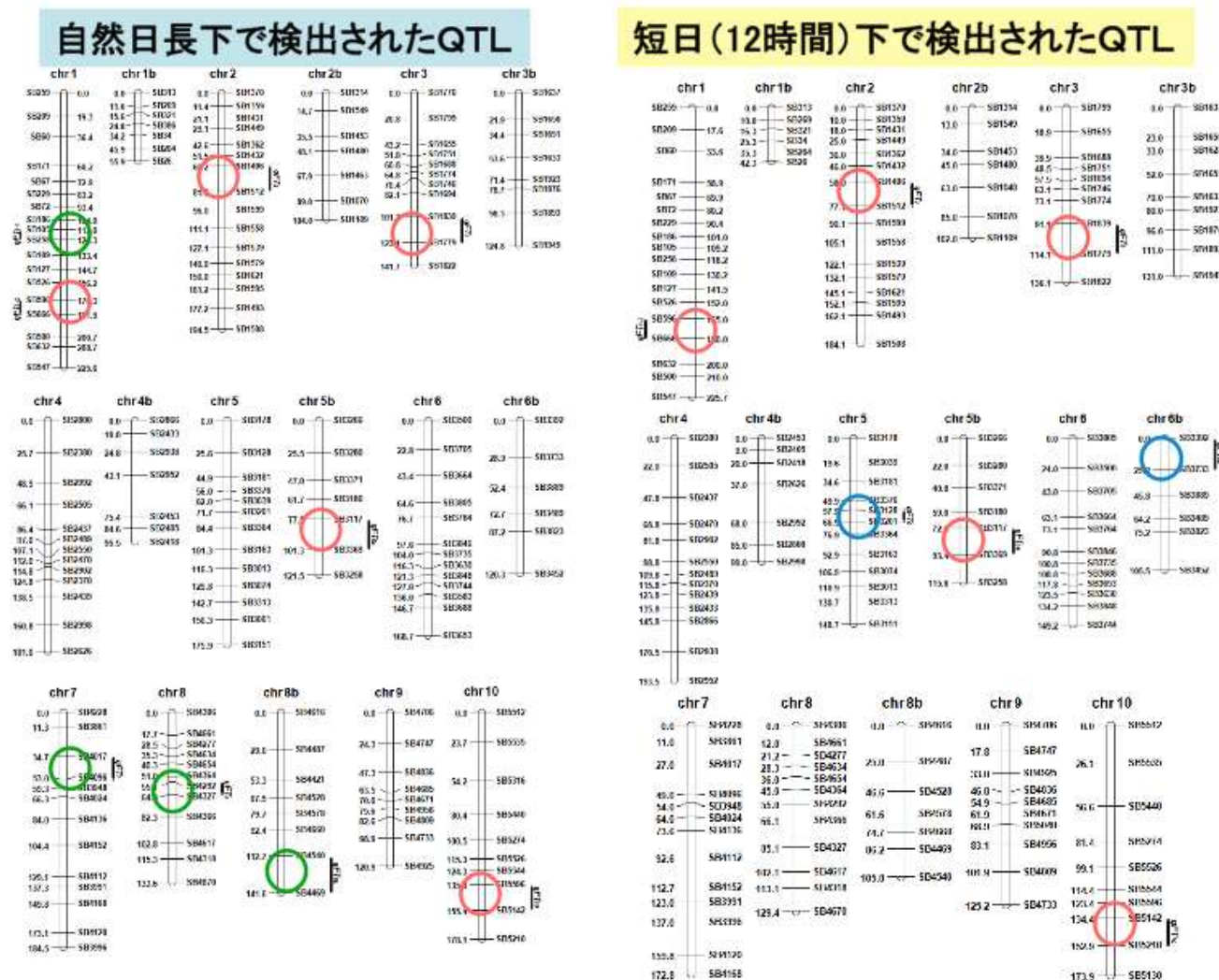


図4 自然日長条件および短日条件におけるソルガムの開花期を制御する QTL の座乗位置

【平成 24 年度上半期】

1. ソルガムの乾燥耐性関連QTLの同定

ソルガムはエチオピアからスーダンに至る熱帯の乾燥地で起源し、広く世界に伝播した穀物である。ソルガムは乾燥等の非生物的ストレスに対する耐性を有することから、他の主要穀物が栽培できないような不良環境条件下でも栽培が可能である。しかし、地球温暖化による砂漠化が進行する中で、ソルガムにおいても乾燥耐性の強化は今後の重要な育種課題である。そこで、本研究では、ソルガムのコアコレクション107品種を用いて、幼穂形成期から12日間灌水あるいは乾燥処理を行い、葉の乾燥程度他22形質の変動を調査した。乾燥耐性の指

標として用いた葉の乾燥程度については、国際イネ研究所が作成した評価マニュアルに従って0(無)～9(葉面積の90%に乾燥害が発生)の10分級で評価した。連鎖不平衡解析の結果、ソルガムの乾燥耐性に関連するQTLが第1染色体に座乗することを見出した。このQTLは全分散に対して約20%の寄与率を示した。その他の形質では、稈の内径、主稈葉数、穂の抽出度、穂長、穂数、止葉長、分げつ数について、乾燥条件における品種変異に関連するQTLが、第1、2、3および10染色体に存在することが明らかになった。これらの形質の中で、乾燥条件下でのみQTLが同定できた形質は、穂の抽出度、稈の内径および止葉長であった。とくに、穂の抽出度は乾燥から穂を守るために重要な形質であり、第10染色体に検出されたQTLが全分散の61.2%に寄与することが示唆された。以上の結果から、ソルガムの乾燥耐性を評価するための指標として、生育前期では葉の乾燥程度を、また生育後期では穂の抽出度が有効であると考えられる。

ESM Fig. 1. Response of some accessions to drought stress in comparison with control

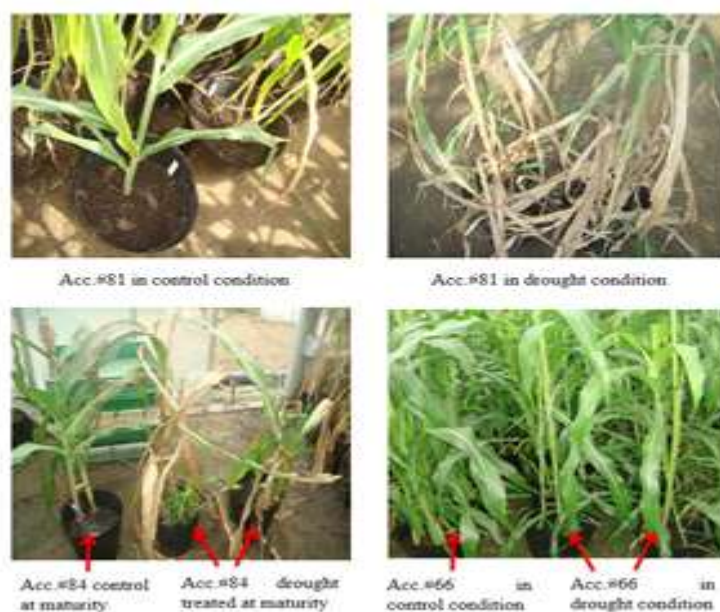


図5 乾燥ストレス応答の品種変異

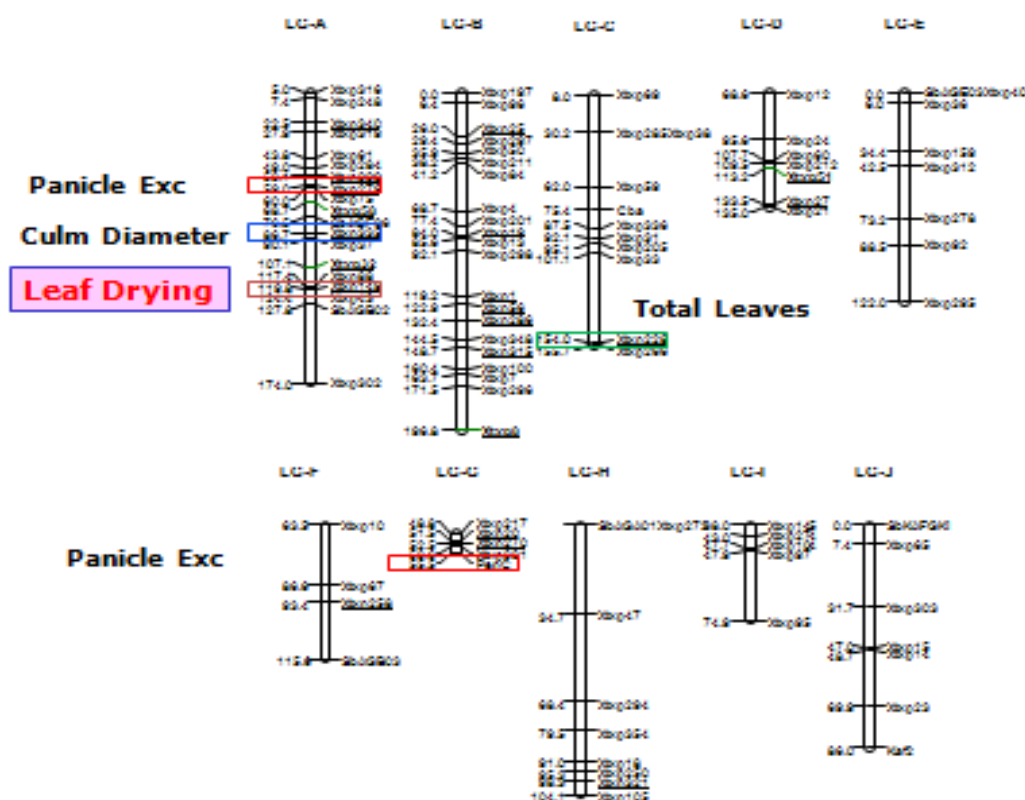


図6 ソルガムの乾燥耐性に関与するQTLの座乗位置

2. ソルガムの適日長限界時間の解明と後代検定による開花期を制御するQTL の検証

開花期は作物の適応性や栽培地域を決定する重要な形質であり、開花期を自在に選択できれば、乾燥害や塩害等の環境ストレスから作物を防護できる。開花期の変異は日長や温度に対する応答性の強弱により決まる。作物やその品種は、固有の適日長限界時間(栄養成長から生殖成長に移行するための最短の日長時間、時計)を有しており、開花期の遺伝的制御を研究する上で、ソルガムの適日長限界時間を解明することは重要な課題である。

そこで、ソルガムのコアコレクション 107 品種から任意に 36 品種を選定し、2011 年には 30 分間隔で 11.5、12.0、12.5 および 13.0 時間の日長処理を行って、開花期の変動を解析したが、11.5 時間の日長条件まで開花が早まり続けたので、適日長限界時間を決定できなかった。2012 年には 15 分間隔で 11.25、11.50、11.75、12.0 時間の日長処理を行った結果、

11.25 時間の日長条件では 11.5 時間よりも 1~2 日間、開花が遅れたことから、ソルガムの適日長限界時間は 11.5 時間であると考えられる。少数の日本品種のみを用いた研究から、ソルガムの適日長限界時間は 12.5 時間以下であると推定されていたが、アフリカやアジアの多様な品種を用いた本研究結果から、ソルガムの適日長限界時間を解明することができた。また、QTL 解析に用いた F2 個体に由来する F3 系統 (各系統 5 個体) を栽培し、各個体の開花期を調査するとともに、開花期関連 QTL に最も近接する SSR マーカー座における遺伝子型を解析した。早生の親品種と同じ遺伝子型を示す F3 個体、晩生の親品種と同じ遺伝子型を示す F3 個体およびヘテロ接合の F3 個体に分割した。各 SSR マーカー座における 3 種類の遺伝子型間で開花期の平均値を比較したところ、F2 集団の解析により検出された QTL のうち、*qFT1-1*、*qFT-2*、*qFT-3*、*qFT5b*、*qFT7*、*qFT8b* (2箇所)

の計 6 個の QTL の存在が確認された(表 2)。

表2 後代検定によるQTLの検証

QTL	Chr.	Closest marker	Mean flowering time			Level of significance
			SC112	H	K. Zairai	
<i>qFT1-1</i>	1	SB258	92.82	99.22	104.90	*
<i>qFT1-2</i>	1	SB596	97.03	97.59	98.81	ns
<i>qFT2</i>	2	SB1512	92.13	101.98	106.48	*
<i>qFT3</i>	3	SB1839	92.52	98.36	104.43	*
<i>qFT5b</i>	5b	SB3369	94.52	101.34	104.47	*
<i>qFT7</i>	7	SB4096	89.48	101.69	105.56	*
<i>qFT8b</i>	8b	SB4540	95.37	102.16	106.44	*
<i>qFT8b</i>	8b	SB4660	93.87	102.56	108.73	*

Notes: *= significant at 5% level, ns= not significant

(SC112=homozygous for early parent, H=heterozygous and K. zairai=homozygous for late parent)

(number of F₃ plants at each SSR locus are shown in Fig. 10)

【平成 24 年度下半期】

1. デュラムコムギの耐塩性に関するQTL解析

農業生物資源研究所や国際研究機関のジーンバンクより取り寄せたデュラムコムギ119品種を用いて、QTL解析およびアソシエーション解析により耐塩性に関するQTLの検出を目的とする。100mMのNaCl液で水耕栽培し幼苗期における耐塩性を評価し、土耕栽培により成熟期における耐塩性を評価した。全新鮮重を指標として幼苗期における耐塩性を評価した結果、35品種は耐性、9品種は中程度、75品種は感受性を示した。また、稔実率を指標として成熟期における耐塩性を評価した結果、75%以上の稔実率を示す耐性品種は42品種であり、稔実率0%の感受性品種は23品種であった。これらの品種の中で、チュニジア原産品種Razzekを感受性品種として、イタリア原産品種Saragollaおよびギリシャ原産品種Chryssodurを耐性品種として選定し交配を行ってF1種子を得た。25年度にはF2集団を用いてQTL解析を行う。

2. 幼苗期におけるオオムギの耐塩性評価法の確立

岡山大学資源植物科学研究所より分譲された東アジア・コアコレクション 380 品種を研究材料に用いて、幼苗期における耐塩性 QTL を検出することを目的とした。まず、幼苗期での耐塩性評価法を確立するため、任意に 5 品種を選定した。種子を滅菌後にシャーレに播種し、コンテナに移植しグロースチャンバー (22/20℃、14 時間照明/10 時間暗黒) 内で 21 日間生育させた。移植後 7 日目から 200mM および 250mM の NaCl 液で処理し、塩処理後 14 日目に根長、幼苗長、根重、幼苗重、葉の枯死程度 (1-5 の分級値) を調査した。その結果、幼苗期における耐塩性評価法として、NaCl 液の最適濃度は 250mM であり、幼苗長、幼苗の乾物重および葉の枯死

程度を耐塩性評価の指標として用いることを明らかにした。現在、確立した評価法を用いて、東アジア産オオムギ・コアコレクションの耐塩性評価を進めている。

【平成 25 年度上半期】

1. アソシエーション解析によるデュラムコムギの耐塩性QTLのマッピング

デュラムコムギ119品種と94個のSSRマーカーを用いて、アソシエーション解析により耐塩性に関係する量的形質遺伝子座(QTL)の検出を目的とした。供試材料を100mMのNaCl液で水耕栽培し、幼苗期に10形質、成熟期に4形質を調査した。得られた表現型値と遺伝子型情報を用いて一般線形モデルおよび混合線形モデルに基づくアソシエーション解析を行った。その結果、期待値と観察値の一致度が高かった混合線形モデル(QモデルおよびQ+Kモデル)を用いて解析し、P値2.1を閾値としてQTLを検出した。塩処理条件では8本の染色体(2A, 3A, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A, 7A)に、クロロフィル含量、分けつ数、葉数、葉の枯死率、新鮮重、苗長、根長、稈実穂数に関する合計11個のQTLを検出した(図7)。これらの形質の中で、葉の枯死率が二粒系コムギの耐塩性評価の指標として最適であると考えられた。葉の枯死率に関するQTLは4B染色体に検出された。形質の分散に対する各QTLの寄与率は10～26%であった。全新鮮重を指標として幼苗期における耐塩性を評価した結果、35品種は耐性、9品種は中程度、75品種は感受性を示した。また、稈実率を指標として成熟期における耐塩性を評価した結果、75%以上の稈実率を示す耐性品種は42品種であり、稈実率0%の感受性品種は23品種であった。これらの品種の中で、チュニジア原産品種Razzekを感受性品種として、イタリア原産品種Saragollaおよびギリシャ原産品種Chryssodurを耐性品種として選定して雑種集団を作成し、QTL解析を進めている。

2. 幼苗期におけるオオムギの耐塩性評価法の確立

岡山大学資源植物科学研究所より分譲された東アジア・コアコレクション 380 品種を研究材料に用いて、幼苗期における耐塩性評価法の確立を目的とした。まず、任意に選定した品種の種子を滅菌後にシャーレに播種し、コンテナに移植後にグロースチャンバー(24/20℃、14時間照明/10時間暗黒)内で21日間生育させた。第2葉の完全展開後から17日間、200mMおよび250mMのNaCl液で処理し、塩処理後14日目に根長、幼苗長、根重、幼苗重、葉の枯死程度(1-5の分級値)を調査した。その結果、オオムギの幼苗期における耐塩性評価法として、NaCl液の最適濃度は250mMであり、幼苗長、幼苗の乾物重および葉の枯死程度を耐塩性評価の指標とする方法を確立した。確立した評価法を用いて、アジア産オオムギ・コアコレクション146品種の耐塩性評価を行った結果、耐性19品種と感受性14品種を選定した。

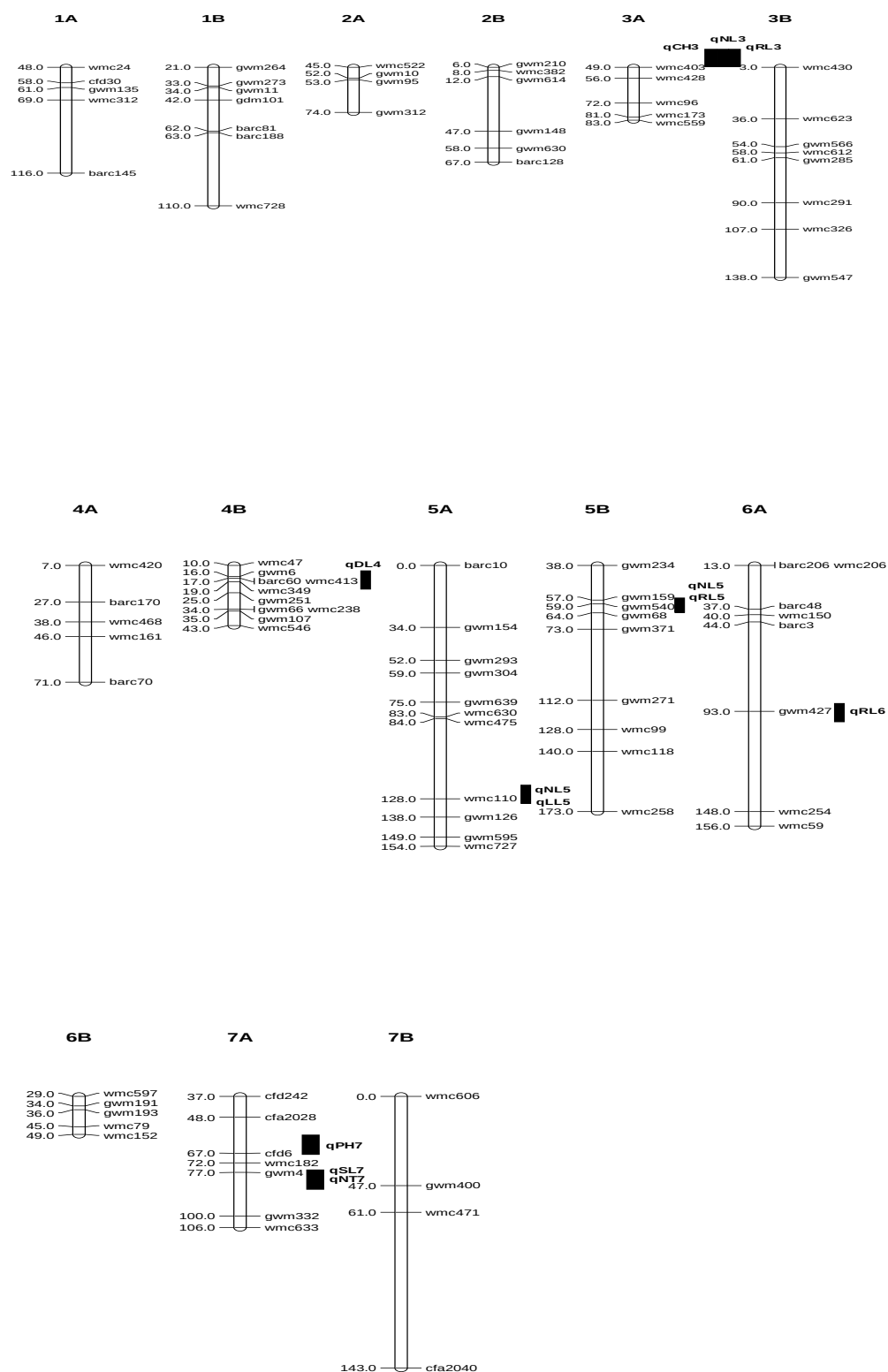


図 7 デュラムコムギの耐塩性関連QTLの検出

【平成 25 年度下半期】

1. デュラムコムギの耐塩性関連 QTL の検出

チュニジアの麦作地帯では灌漑水に含まれる塩類による障害(塩濃度 80mM 程度)が問題になっており、耐塩性品種の開発は重要な育種目標である。本研究課題では、チュニジアにおいて最大の栽培面積をもつデュラムコムギの耐塩性強化のため、多様な遺伝資源に内在する耐塩性の遺伝変異を探索し、アソシエーション解析や QTL 解析により耐塩性関連 QTL の同定をめざした。デュラムコムギ 119 品種を 100mM の NaCl 液で処理し、葉の枯死率をパラメータとして耐塩性を評価した。196 の SSR マーカーから多型を示す 94 の SSR マーカー座における遺伝子型を解析した。119 品種の耐塩性評価値と 94 の SSR マーカー座における遺伝子型データを用いてアソシエーション解析を行った結果、耐塩性 QTL が 4B 染色体に座乗することが明らかになった。また、耐塩性のイタリア原産品種 Saragolla と感受性のチュニジア原産品種 Razzek の間で交配し雑種集団を作成した。32 の SSR マーカーによる DNA 多型情報を基に連鎖地図を作製した。F₃系統を用いて耐塩性を評価した結果、耐塩性の変異は両親の耐塩性の間に分布し、超越分離は認められなかった。QTL 解析の結果、耐塩性 QTL が 4B 染色体(*qDL4*)と 5B 染色体(*qDL5*)に検出された。*qDL4*はアソシエーション解析により検出された QTL とオーバーラップする染色体領域に座乗することが明らかになった。*qDL4*と *qDL5* は耐塩性の全分散に対して 68% の寄与率を示した。

表 3 デュラムコムギにおいて検出された耐塩性 QTL

QTLs	Chr	Interval	LOD	Additive effect	Phenotypic variation
qDL4	4	Gwm6 Wmc251	13.34	1.75	25
qDL5	5	Barc128 Gwm159	23.75	-2.85	43

2. SNP マーカーを用いたアソシエーション解析によるオオムギの耐塩性関連 QTL の検出

アジア産オオムギ遺伝資源コアコレクション 296 品種の苗を 250mM の NaCl 液で水耕栽培し、葉数、苗長、根長、地上部乾物重および根乾物重の無処理区と処理区にける相対比 (STI, Salt tolerance index) と葉の損傷度 (LIS, Leaf injury score) を調査した。これらの形質の中では地上部乾物重の STI と LIS が耐塩性評価のための最適なパラメータであることを明らかにした。ついで、383 の SNP (一塩基多型) マーカー座における遺伝子型情報と耐塩性評価データを用いてアソシエーション解析を行った。その結果、地上部乾物重の STI に関する 2 個の QTL および LIS に関する 5 個の QTL を検出した(図 8)。これら 7 個の QTL のうち、3H 染色体と 4H 染色体に座乗する LIS に基づく耐塩性 QTL は、本研究により新規に検出された遺伝子座である。

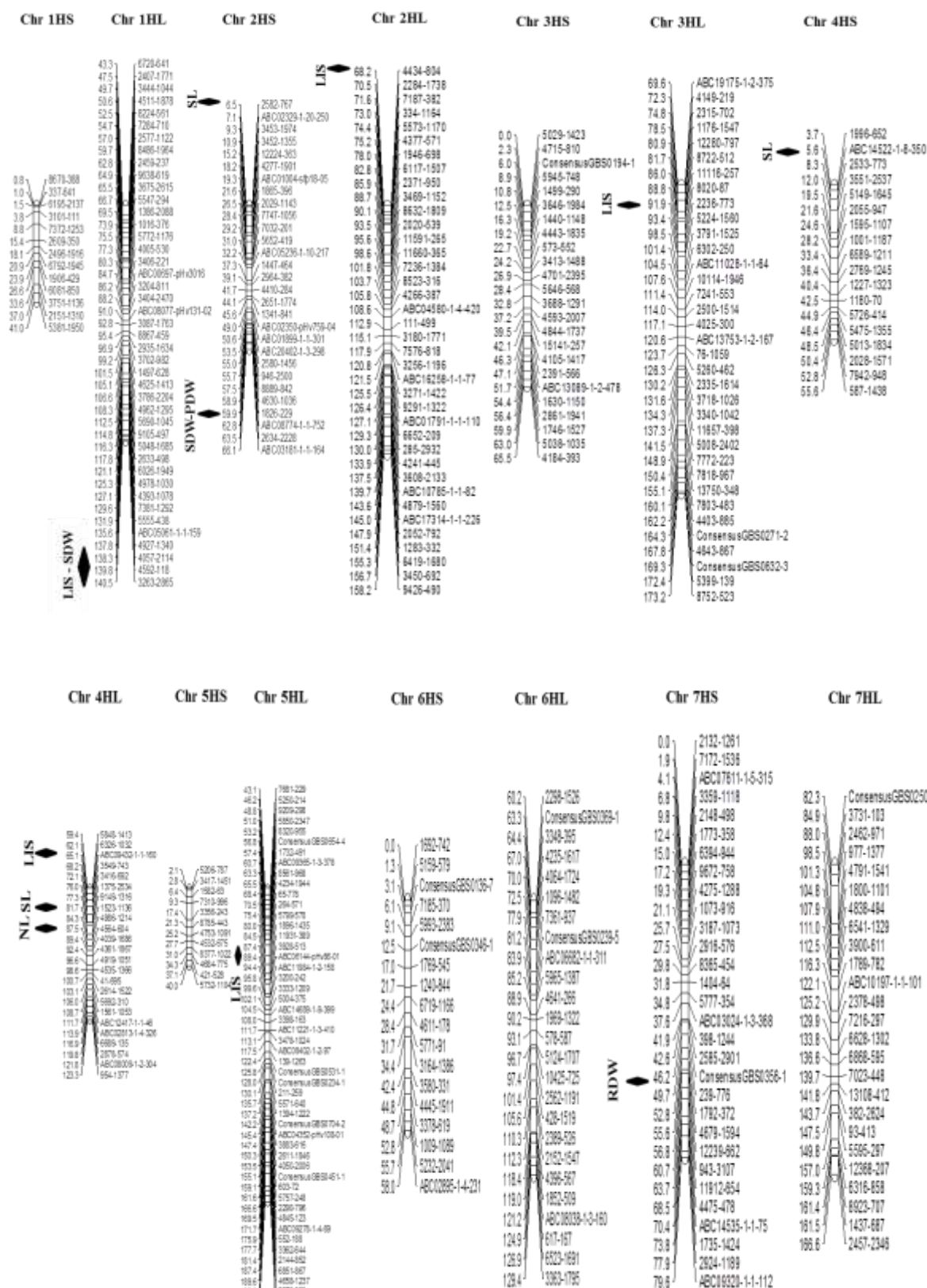


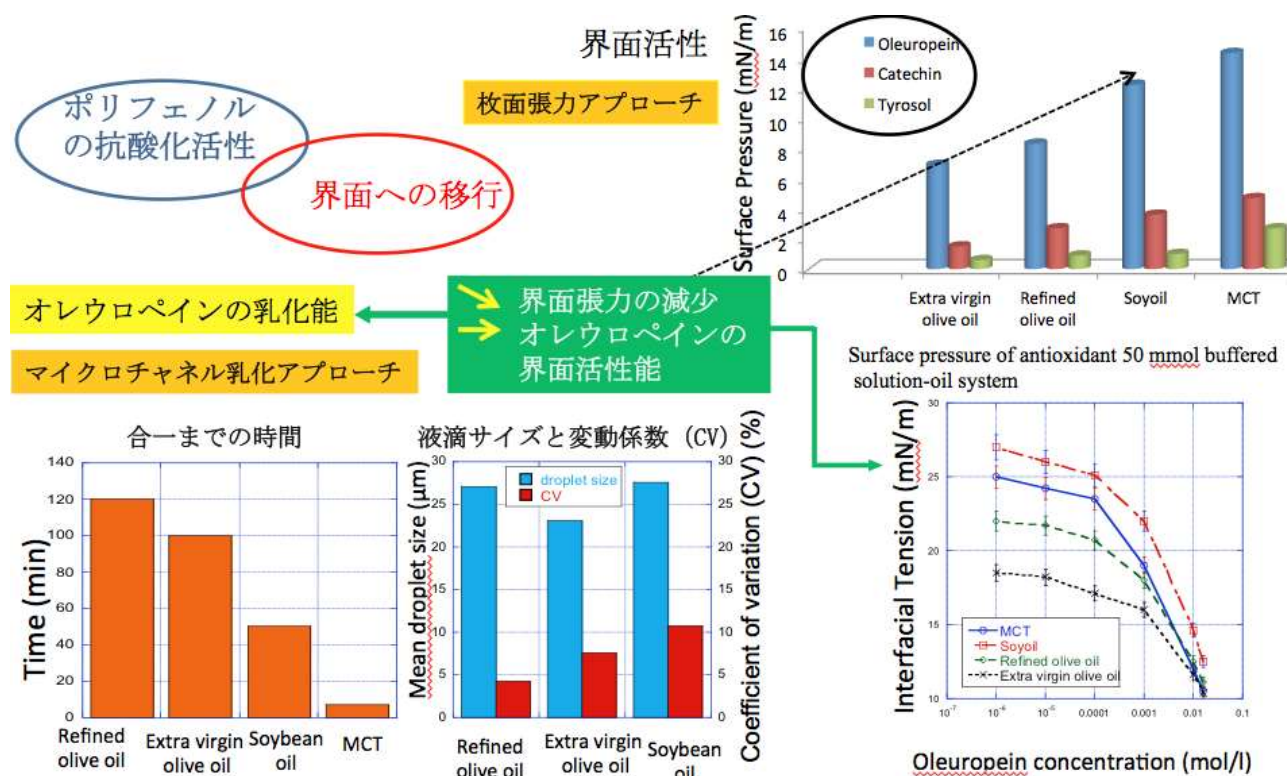
図 8 アジア原産オオムギ遺伝資源のアソシエーション解析による耐塩性関連 QTL の検出

製品化技術開発グループ

①研究のねらい; 地域特有の伝承薬草材料に用いられている植物等を中心に、生理活性成分のスクリーニングを行う。植物採集、バイオアッセイ・文献情報収集によって、これまで得られた情報群をもとにデータベースをチュニジアと共同で作成する。また、スーパーマスコロイダーによりオリーブオイル・ローズマリーエッセンシャルオイルのエマルジョン作成を検討し、製品の市場調査計画作成も同時に行う。乾燥地および半乾燥地におけるオリーブ由来の副産物の抗酸化物質等の食品・医薬品として利用価値の高い生物マテリアルの有効利用方法の開発を行う。オリーブ副産物の有効利用方法の開発を行うと共に、ナノエマルジョン、マイクロ・ナノ粒子等の食品・医薬品として利用価値の高い生物マテリアルの有効利用方法の開発を行う。

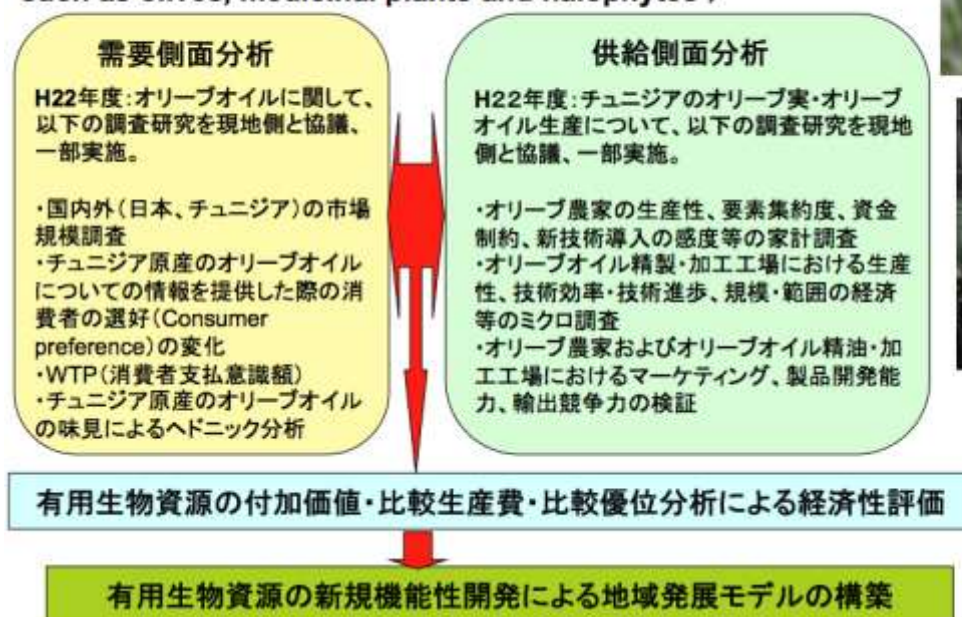
②研究実施方法;

・食品加工技術の開発; ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開を目指して、オリーブに含まれる代表的ポリフェノールであるオレウロペインの油水界面特性を検討した。



- ・ 有用植物の経済性評価; 需要側面分析として、H22 年度ではオリーブオイルに関して、調査研究を現地側と協議および一部を実施した。

5-1 有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性植物)の経済性評価 (5-1 To assess economic efficiency of useful bio-resources such as olives, medicinal plants and halophytes)



③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況;「食品加工技術の開発」および「有用植物の経済性評価」は当初の計画の通りに進行中である。

④カウンターパートへの技術移転の状況;平成23年度にはJICA長期研修生(博士課程)を受け入れ、技術移転を活性化する予定。

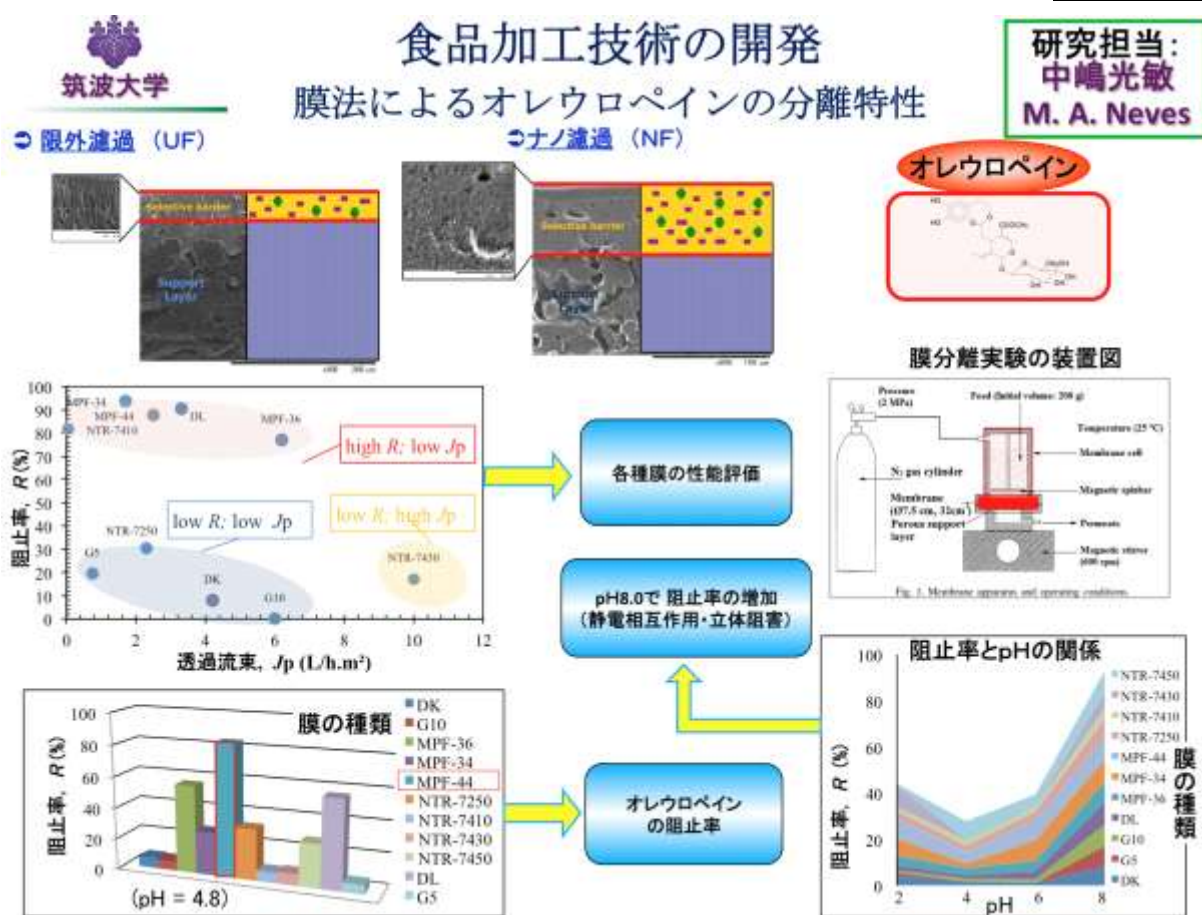
【平成23年度上半期】

- (1) オリーブ油の機能性と国内需要:チュニジアの生産者および消費者レベルでは、オリーブ油の健康面での効用についての認識はあるものの、消費者の多くはボトルではなくタンクで大量購入する。国内需要は産地には比較的敏感であるが、機能性に大きく反応しているわけではない。他方、生産者にとっては、国内向けにはいかに量的生産拡大を図るかが現在の主要関心事項であり、機能性成分が製品デザインに明示されているわけではない。国内市場において機能性で高付加価値化を図るには、消費層とその選好を特定する必要がある。
- (2) オリーブ油の機能性と輸出市場:有機オリーブ実栽培の認定を受け、ボトルで EU 市場への輸出を図る取り組みが多くみられ、積極的に製品開発、宣伝、プロモーション等を行っている農家、精油工場がある。よって機能性で高付加価値化を図るには、輸出市場に的を絞ることが重要。機能性面でイタリア、スペイン等産のオリーブ油と差別化できる可能性はあり、輸出市場であれば付加価値付与の面での機能性開発の効果は高

い。

- (3) 灌漑栽培オリーブとオリーブ油抽出率: 農家におけるオリーブ実の収量は灌漑によって増加するが、工場で精製されるオリーブ油の抽出率は低下し、品質も劣化する傾向にある(生産技術効率が灌漑農家で高いであろうが、オリーブ実一単位あたりの油精製量は減少)。これには、灌漑で栽培されるオリーブ実の成分が関係していると考えられ、機能性に及ぼす影響についても検討が必要であるが、最終的に精製されるオリーブ油の量を重視するか質を重視するか、あるいはオリーブ実生産とオリーブ油精製の分離によって無差別であるのかによって、農家の灌漑導入による生産性向上と収益増加の戦略は大きく異なる。
- (4) オリーブ油精製の生産性と品質: オリーブ工場におけるオリーブ油の近代的抽出設備(continuous-chain)は、伝統的手法に比べ、水を多く必要とし、オイル成分分離に加熱する必要があるため、オリーブ油の品質が劣化する。これに対して伝統的手法は、抽出されるオリーブ油の成分は良いが(cold press)、手間がかかり(労働集約的)、結果生産性は低下する。現行の産業近代化政策では近代的抽出設備導入が推進されている一方で、製品の差別としては「伝統的手法(cold press)」と表示するマーケティング戦略も有効とされているので、上記(3)の灌漑の普及を含めて、オリーブ油の生産性増加と品質向上の両立には工夫が必要。
- (5) チュニジア南部と北部の相違: チュニジア北部では 2000 代に入り、スペイン産、イタリア産の品種を用いての灌漑オリーブ栽培が展開。南部では近年、在来種に対する灌漑が適用されている。北部の灌漑オリーブ木の幼齢は 10 年足らずなので、現在の収量は低く、灌漑導入の生産性への効果を評価するには注意が必要。また、欧州産のオリーブ実から抽出されるオリーブ油成分は、北アフリカ乾燥地のよりも品質が劣るとされているため、オリーブ油の量を重視するか質を重視するかによって、欧州品種導入による農家の生産性・収益増加の戦略は異なる。なお、北部は南部に比べ、降水量は多いものの、土壌の耕作の回数が少なく、小石を多く含む荒い(粗放的経営)ため、灌漑以外での収量増には土壌改良が重要。

食品加工技術の開発においては、オリーブの抗酸化成分であるオレウロペインの膜法による分離特性を調べ、pH 8.0 にて阻止率が増加することを見出した。



【平成23年度下半期】

1. チュニジア・オリーブ農家およびオリーブ油工場生産性解析および日本におけるチュニジア産オリーブオイル消費選好分析

本研究では、新規機能性が特定されたオリーブ、薬用植物、耐塩性植物等の有用植物を対象に、同植物から精製される生産物の需要と生産基盤を調査し、その潜在的需要と供給能力を解析することにより、付加価値、比較生産費・優位構造を明らかにすることを目的とする。平成23年度下半期には、オリーブおよびローズマリーの栽培、オリーブオイルおよびローズマリーエッセンシャルオイルの精製・製品化を重視し、以下の3件の調査・分析を実施した。

- (1) 平成23年度上半期に実施したオリーブ農家家計予備調査を基に、10月から12月にかけて南部スファックス県、中西部ナブール県、中部ケロアン県、スース県において本調査を実施し、計167サンプルを回収した。特に、多様なオリーブ品種の導入や機能性情報の導入、灌漑システムの導入、精油工場との連携・取引契約が、オリーブ農家の生産性、技術効率性および技術進歩率に及ぼす影響を質問票に組み込み、調査を実施した。
- (2) また、需要分析では、平成22年3月に実施した日本人消費者に対するオリーブオイルの消費行動アンケート調査の結果を取りまとめ、オリーブオイルの市場規模、新規機能性に関する消費者の選好、WTP

(willingness to pay)を推計し、需要側面が創り出す付加価値を推計した。その成果を論文に取りまとめ、投稿した。

(3) チュニス県、ナブール県、スース県およびザグワン県にあるローズマリーオイル精製企業を視察し、特に、ローズマリーの採取および栽培、精油精製の技術効率性および生産性、供給能力について質問票を配布し、調査を実施した。質問票は、メールおよび直接訪問にて回収中。

以上により、新規機能性開発によって生じるオリーブおよびローズマリー、オリーブオイルおよびローズマリーエッセンシャルオイルの経済性を需要・供給側面から評価・分析した。

2. ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開

ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開を目指して、下記の2つの項目について検討を行った。

(1) 水・油の海面にオレウロペインの吸着量の検討

昨年度はオレウロペインに界面張力を低下させる効果があることを見いだした。今年度はオレウロペインの界面活性能及び乳化能の具体的な評価を目指し、水・油界面におけるオレウロペインの吸着量の理論的予測を行った。ギブスの吸着式を基礎として、オレウロペインの界面吸着量を求めることができた。得られた値は、 $8.92 \times 10^{-7} \text{ mol/m}^2$ であった。計算し、連続相の総ポリフェノール濃度に応じて水・油界面で起きる分子のパッキング現象についても検討を行った。

(2) 膜法によるオレウロペインの分離特性の検討

23 年度上半期において種々のナノ濾過膜を用いてオレウロペインの基礎的な分離特性を明らかにした。下半期は、さらに pH、濾過圧力などがナノ濾過におけるオレウロペインのナノ濾過における透過流束およびオレウロペインの阻止率に与える影響を明らかにした。また実際のオリーブミル工場廃水にナノ濾過膜分離を適用して、オレウロペインや他のポリフェノール成分の分離特性の解明と、膜法によるポリフェノール成分の効率的回収方法の開発を目指している。

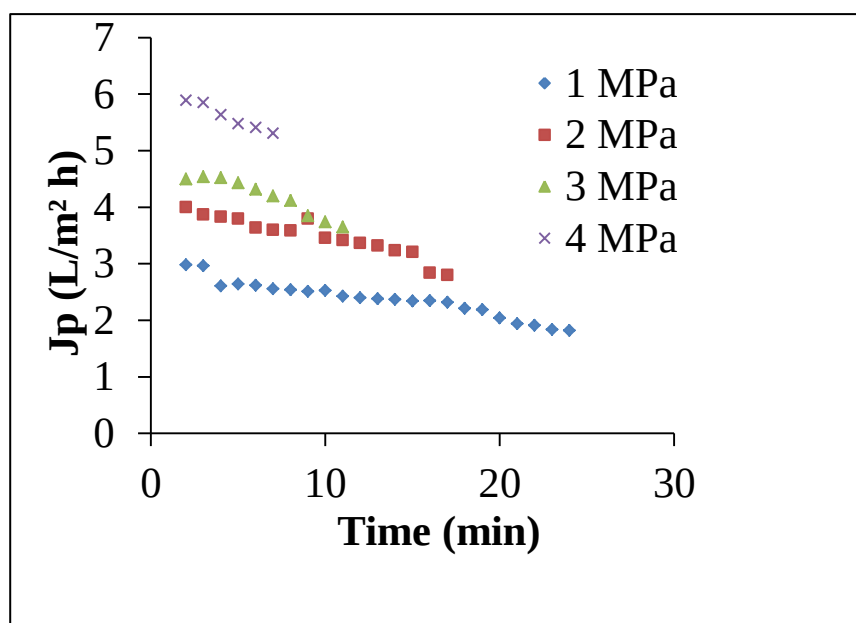


図. Effect of applied pressure at fixed initial concentration of oleuropein (0.3 g/L)

【平成 24 年度上半期】

製品化技術開発グループ「食品加工技術の開発」

ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開を目指して、下記の2つの項目について検討を行った。

(1) Formulation characteristics of oleuropein loaded W/O/W emulsion system

24年度上半期では高圧乳化法及びマイクロチャネル乳化法を用いることによって、オレウロ ペインを内包する多相エマルジョン(W/O/W型)の調製及び特性評価を行った。また多相エマルジョンにおいて疎水性乳化剤の濃度及び親水性乳化剤の種類がオレウロ ペインの内包率と長期保存における安定性に与える影響を明らかにした。1次乳化には、高圧乳化を用いて、得られた油中水敵型(O/W)エマルジョンの平均粒子径が0.15～0.31 μm であった。2次乳化ではマイクロチャネル乳化法を用いて、平均粒子径が27 μm の単分散 W/O/Wの調製が可能であった。乳化剤としてリシノール酸エステル (TGCR)8%を用いた場合、オレウロ ペインの内包率がもっとも高く、87%に達した。

(2) Integrated membrane process for the recovery of polyphenols from olive mill water

24 年度上半期にオリーブミル工場廃水からポリフェノールの分離及び濃縮を目指し、膜統合システムの評価を行った。本システムは遠心分離で廃水の前処理した後に膜統合システムは 3 つのプロセスが含まれる: 精密濾過(MF)、限外濾過 (UF) とナノ濾過 (NF)。MF 濾過膜処理及び UF 濾過膜処理プロセスにおいて廃水に含まれていたポリフェノールがほとんど透過液に回収された。また、膜統合システムを用いることによって有機物含量が 70 % も削減された。最終的に UF 濾過膜の透過液をナノ濾過膜で処理しポリフェノールの濃縮液が得られた。膜統合システムを用いることで 88%のポリフェノールを回収することが明らかにされた。

(5-1 有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性植物)の経済性評価):

チュニジア・オリーブ農家およびオリーブ油工場生産性解析および日本におけるチュニジア産オリーブオイル消費選好分析

1. 目的

本研究では、新規機能性が特定されたオリーブ, 薬用植物, 耐塩性植物等の有用植物を対象に、同植物から精製される生産物の需要と生産基盤を調査し、その潜在的需要と供給能力を解析することにより、付加価値、比較生産費・優位構造を明らかにすることを目的とする。平成 24 年度上半期には、オリーブおよびローズマリーの栽培、オリーブオイルおよびローズマリーエッセンシャルオイルの精製・製品化を重視し、以下の 3 件の調査・分析を実施した。

- (1)平成 23 年度に実施したオリーブ農家調査(北部ベジャ, 南部スファックス県, 中西部ナブール県, 中部ケロアン県, スース県)167 サンプルのデータセットを解析し、オリーブ農家の生産性と技術効率性に関する実証分析を実施した。分析結果によれば、灌漑システムを導入している農家の生産性は高いが、技術効率性は低く、ベストプラクティスは達成されていないとの結論を得た。また、経営者の知識や教育水準、品種の選別が

技術効率性を向上させる要因であると特定した。

(2) 上半期に実施したオリーブ農家調査では、以下の知見を得た。

(イ) チュニジア産オリーブ油の機能性: チュニジア産のオリーブ油に対しては、生産者レベルでは、豊富なポリフェノール含有量といった特色により、医薬品への応用や健康への効果が期待されることに関する認知度は高い。ただし、国内消費者や海外消費者のレベルでは、産地についての関心は高いものの、宣伝活動の不足から、チュニジア産オリーブ油の効果に対する認知度は依然として低い。一方、国内の生産者および輸出業者にとって、チュニジア産オリーブ油の機能性の高さを強調し、需要開拓を図って行くことが今後の課題である。

(ロ) オリーブ油の機能性と輸出市場: EU 市場や新興国市場への輸出(バルクおよびボトル)に取り組んでおり、農産物見本市への出展など積極的に宣伝、プロモーション活動を行っている農家、精油工場がある。機能性の面については、マーケティング戦略や販路開拓によって、イタリア、スペインといった欧州産のオリーブ油との間の品質優位性による差別化は十分に可能であり、先進国の輸出市場をターゲットとした場合、付加価値の面での機能性開発の効果は高い。

(ハ) 灌漑栽培オリーブとオリーブ実の成分: 農家におけるオリーブ実の収量(樹木当たり)は灌漑によって増加する一方で、オリーブ油に含まれるポリフェノールの量は低下し、高い酸価のオリーブ油となる傾向にある。これには、栽培されるオリーブ実の品種や灌漑の方法・規模・時期が関係していると見られ、機能性に及ぼす影響についてもさらなる検討が必要である。

(3) スファックス県、チュニス県、ナブール県、スース県およびザグワン県にあるローズマリーオイル精製企業に対し、ローズマリーの採取および栽培、精油精製の技術効率性および生産性、供給能力について質問票を配布し、調査を実施した。質問票は、メールおよび直接訪問にて回収中。

以上により、新規機能性開発によって生じるオリーブおよびローズマリー、オリーブオイルおよびローズマリーエッセンシャルオイルの経済性を供給側面から評価・分析した。

2. 今後の課題

- (1) 2011 年オリーブ農家調査データを用いて、下半期中に論文を報告・発表する。
- (2) スファックス・オリーブ研究所の協力を得て、スファックス県のオリーブ農家調査を実施。調査時には特に、排水灌漑を実施している農家を注視する。また、他分野と協力し、重金属等の土壌成分をサンプリングしている農家を調査対象に含める。
- (3) ローズマリーオイル精製工場調査については、北部(ザグーアン、ファス等)と南部地域(ガベス、マトマタ等)を対象に、工場リスト作成の、質問票を配布・回収する。

【平成 24 年度下半期】

ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開を目指して、下記の2つの項目について検討を行った。

(1) オレウロペインの界面活性能及び乳化能評価、並びにオリーブ由来オレウロペインを内包した多相エマルジョン(W/O/W 型)の調整及び特性評価の検討:

24年度下半期では高圧乳化法及びマイクロチャネル乳化法を用いることによって、オレウロペインを内包する多相エマルジョン(W/O/W型)の調製(図1)及び特性評価を行った。マイクロチャネル乳化法を用いて作製された水中油滴型エマルジョンにおいて、大豆油や中鎖トリグリセリドと比較して、オレウロペインを含むオリーブ油が高いエマルジョン安定性をもっていることも明らかにされた。また、以前の結果でオレウロペインに界面張力を低下させる効果があること(図2)を見いだしたことに基づき、分子動力学(Molecular Dynamics)手法を用いて、オレウロペイン油・水界面での挙動のシミュレーションの基礎検討を行い、オレウロペイン分子が界面に配位することが確認できた。

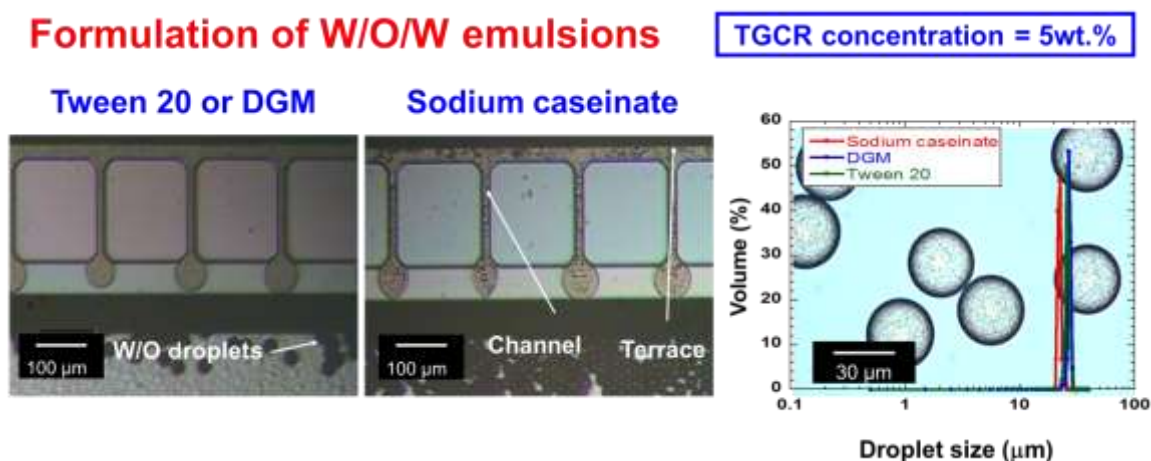
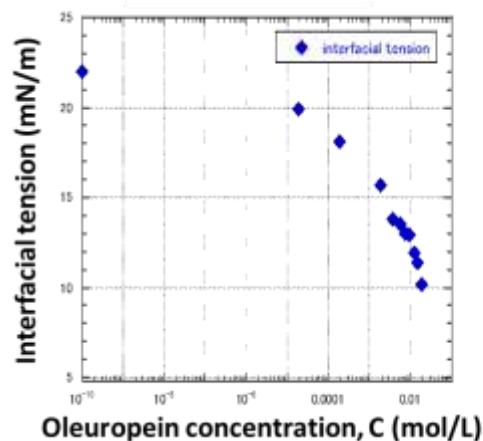


図1 オレウロペインを内包する多相エマルジョン(W/O/W 型)作成中の様相
および調製したエマルジョンの粒度分布

Surface activity of oleuropein at the O/W interface

Interfacial tension of oleuropein in 5mmol /L buffered solution at different concentrations with refined soybean oil



Adsorption of oleuropein molecules at Oil-water interface

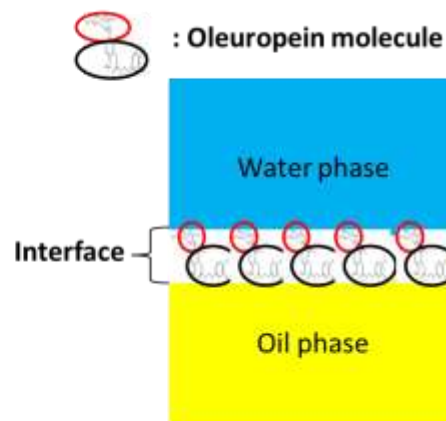


図2 オレウロ ペインが界面張力に及ぼす影響
およびオレウロ ペインによる界面面張低下作用の模式図

(2) オリーブミル工場廃水からポリフェノールの分離特性及び精製方法の検討:

本課題では24年度下半期にオリーブミル工場廃水から分離したポリフェノールの濃縮及び精製方法の開発を検討し、ポリフェノールから糖質の引き出しプロセスの評価を行った。また、引続きに膜統合分離システム(図3)を評価し、本プロセスの性能改善の検討を行った。分子量が近い糖質とポリフェノールはナノ濾過膜を用いても分離は困難であり、溶媒抽出を適用することとした。安全な溶媒としてエタノールを用いた場合、高い分離性能を示し、90%エタノールで抽出を2回繰り返すことで、糖質を分離し、ポリフェノール純度99%の高純度ポリフェノールを得ることができた。また、精製方法の前処理として、分離性能の向上を目指し、遠心分離法を用いて沈殿物の分離検討を行った。異なった沈殿剤を検討した上で、硫酸第一鉄(FeSO_4)を用いた場合、オリーブミル工場廃水全溶存固形物を30%削減(図4)でき効果的な沈殿剤であることが示された。さらに、エタノール抽出システムの最適化の検討を進めている。

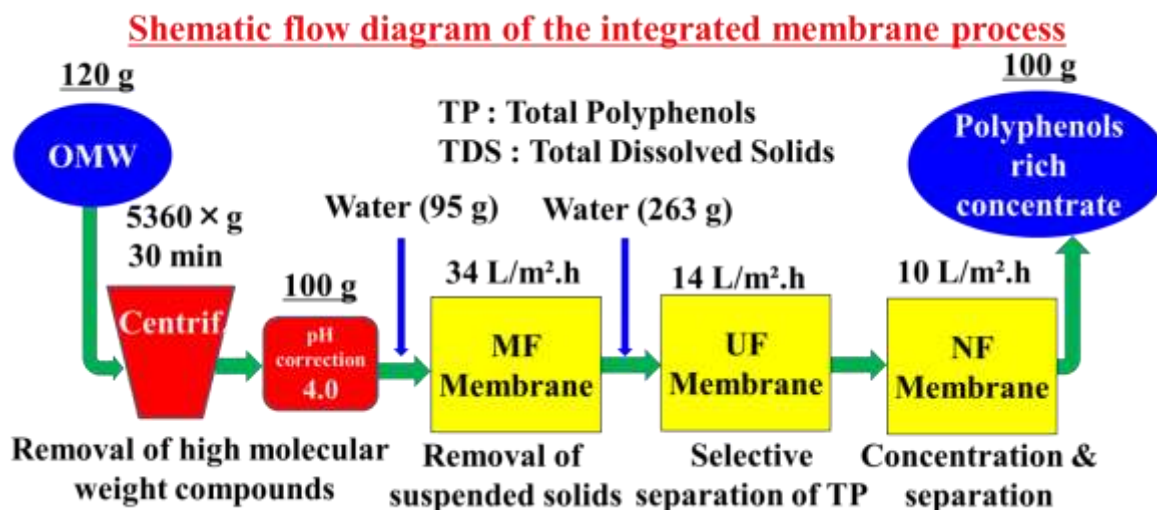


図 3 膜統合分離システムの模式図

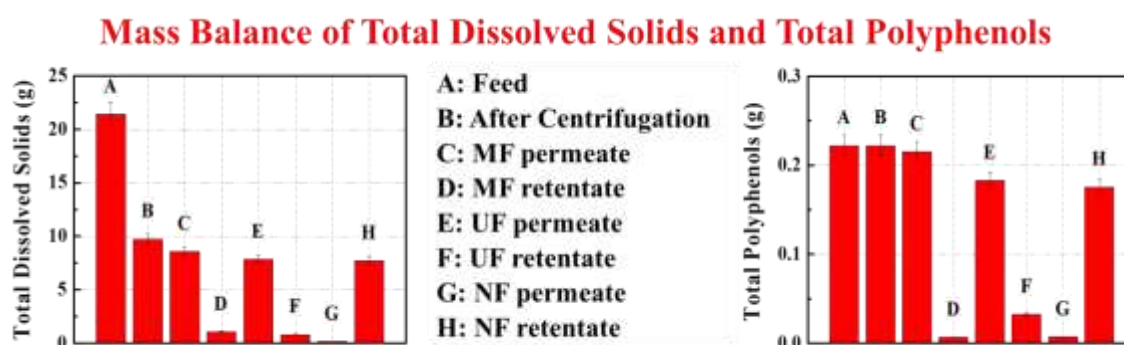


図 4 オリーブミル工場廃水から分離した全溶存固形物及びポリフェノールの物質収支図

3. 製品化技術開発(5-1 有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性植物)の経済性評価):チュニジア・オリーブ農家およびオリーブ油工場生産性解析および日本におけるチュニジア産オリーブオイル消費選好分析

①目的

本研究では、新規機能性が特定されたオリーブ、薬用植物、耐塩性植物等の有用植物を対象に、同植物から精製される生産物の需要と生産基盤を調査し、その潜在的需要と供給能力を解析することにより、付加価値、比較生産費・優位構造を明らかにすることを目的とする。

平成24年度下半期には、平成23年度に実施したオリーブ農家調査(北部ベジャ、南部スファックス、中西部ナブール、中部クロワン、スース県)167 サンプルのデータセットを解析し、オリーブ農家の生産性と技術効率性に関する2件の分析を実施した。

(1)確率的フロンティア関数に基づくオリーブ農家の効率性分析

オリーブ農家調査で収集した 109 のサブ・サンプルを用いて、農家の生産効率性(技術効率性)に関する実証分析を実施した。分析結果より、オリーブ農家の技術効率性の平均値は、61.2%と非効率を抱え、灌漑を

実施している農家の技術効率性は、非灌漑農家のそれに比べて低いとの結論を得た。また、地域比較では、ケロワン県におけるオリーブ農家の技術効率性が最も高いことが明らかとなった。技術効率性を向上させる要因として、経営者の教育水準や経験年数、品種の選抜が有意な影響を及ぼすことが明らかとなった。

(2) 包絡分析法 (DEA) に基づくオリーブ農家の効率性分析

オリーブ農家調査で収集した 118 のサブ・サンプルを用いて、農家の生産効率性 (技術効率性および規模効率性) に関する実証分析を実施した。分析結果より、ナブール県におけるオリーブ農家の技術効率性が最も高く、またケロワン県におけるオリーブ農家の規模効率性が最も高い一方で、ナブール県の規模効率性が最も低いことが示された。ナブール県におけるオリーブ農家の生産非効率性には、技術非効率性よりもむしろ操業規模の過大ないし過少から生じる規模非効率性が大きく関係しているとの結論を得た。また、灌漑を実施している農家の効率性は、非灌漑農家の効率性に比べて低いことが明らかとなった。こうした要因として、各地域における灌漑の方法・規模・時期、重金属等の土壌成分が関連している可能性が示された。

② 今後の課題

- (1) 平成23年度に実施したオリーブ農家調査で得られたサンプルデータを用いて、決定論的フロンティア法にて分析を行い、多様なオリーブ品種の導入や機能性情報の導入、灌漑システムの導入等が、オリーブ農家の経営効率性に及ぼす影響を分析する。
- (2) スファックス・オリーブ研究所の協力を得て、スファックス県のオリーブ農家調査を実施することに加え、ケロワン、スース県等中西部での調査を実施する。
- (3) 北部 (ザグワーン、ファス等) と南部地域 (ガベス、マトマタ等) を対象とするエッセンシャルオイル精製工場に関する調査については、平成23年度に予備調査を実施したエッセンシャルオイル精製工場の生産基盤調査を基に作成した質問票の配布・回収を行い、本調査の分析作業を完了する。
- (4) 日本におけるオリーブオイルの購買履歴データを用いて、日本人が最も高い選好を示すオリーブオイルの製品属性 (原産地、価格、味、色等) とそれに与える家計属性 (性別、収入、教育水準等) を分析し、機能性オリーブオイルの開発とその市場の特定を図る。

【平成 25 年度上半期】

製品化技術開発グループ「食品加工技術の開発」

1. 目的

ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開を目指して、下記の2つの項目について検討を行った。

(1) オレウロペインの界面活性能及び乳化能評価、並びにオリーブ由来オレウロペインを内包したエマルションの調製及び特性評価の検討:

これまで、高圧乳化法及びマイクロチャネル乳化法を用いて、オレウロペインを内包したエマルションの調製及び特性評価を行い、マイクロチャネル乳化法を用いて、調製された水中油滴型 (O/ W) エマルションにおいて、

オレウロペインに界面張力を低下させる効果があること、またオレウロペインを含むオリーブ油が高いエマルジョン安定性を持っていることを明らかにしてきた。

25年度上半期では、マイクロチャネル乳化を用い、種々のO/Wエマルジョン調製におけるオレウロペインの安定化効果を検討した。オリーブ油、大豆油、中鎖脂肪酸のいずれかを分散相とし、0.6 wt%オレウロペイン水溶液を連続相として用いることで、平均粒子径 $25\ \mu\text{m}$ ($\text{CV} < 5\%$)のO/Wエマルジョンが調製でき、炭素鎖長が長い脂肪酸で構成される油脂で形成したO/Wエマルジョンが高い安定性を示された。オレウロペインは乳化能力を有すること、今後、合成乳化剤の代わりに使用できることが示された。

さらに、オレウロペインの機能活性と構造の関係を解明するため、分子動力学(MD)手法を用い、真空、水および油水界面系におけるオレウロペインの分子構造シミュレーションを行った。MDシミュレーションは、温度300 Kとして、2 fsの時間ステップで、少なくとも30 fs実施した。各系において、オレウロペインの最大および最も曲がりやすい部分とする7つのねじれ角を計算し、微小環境に依存して、オレウロペインが異なる構造をとることが示された。真空中での構造は、グルコース基がヒドロキシチロソール基と近接していた。水中では、グルコース基はヒドロキシチロソール基から遠く離れる配置を取った、これは水素結合に起因すると考えられる。油水界面系では、オレウロペインのグルコース基がヒドロキシチロソールおよびエネノール酸部分基と整列した構造を取り、油水界面に広がったより開いた構造で、界面に特異的に配位していることが示された。この構造は、油水界面において実験的に明らかにされたオレウロペインの界面活性と対応している。

(2) オリーブミル工場廃水からポリフェノールの分離特性及び精製方法の検討:

25 年度上半期において、オリーブミル排水(OMW)からのポリフェノール分離精製のための新規統合プロセスを提案した。このプロセスは下記のとおり。まず OMW を 5,380 g で遠心させ、単糖類と脂質が大部分を占めている有機物質を 45%削減できる。次に上清液を真空蒸発し、結晶化の核生成速度を増大させる。このステップでは、溶解固形物の 60%が分離でき、ポリフェノールはほとんどが濃縮物に移行される。異なる濃度のエタノールを添加することで、得られた混合物の結晶化を起こし、固体相としての単糖とミネラルを分離させる。結果として、本プロセスにより、90%エタノールを添加することで、液相中のポリフェノールが最大純度を示した。得られた液相を蒸留によりエタノールを回収することで、ポリフェノール高純度含有水溶液が得られる。本プロセスは、OMW から高純度ポリフェノールを得るために、エタノールを貧溶媒として用いる方法であり、特許として申請した。

有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性植物)の経済性評価:

チュニジア・オリーブ農家およびオリーブ油工場生産性解析および日本におけるチュニジア産オリーブオイル消費選好分析

1. 目的

本研究では、新規機能性が特定されたオリーブ、薬用植物、耐塩性植物等の有用植物を対象に、同植物から精製される生産物の需要と生産基盤及び有用性植物の伝統的価値を調査し、その潜在的需要と供給能力を解析することにより、付加価値、比較生産費・優位構造を明らかにすることを目的とする。

平成25年度上半期には、オリーブ農家調査(南部スファックス)およびエッセンシャルオイル産業調査(スース県、ザグワン県、シリアナ県)を実施した。また、平成24年下半年期に引き続き、平成23年度に実施したオリーブ農家調査(北部ベジャ、南部スファックス、中西部ナブール、中部ケロワン、スース県)167 サンプルのデータセットを解析し、オリーブ農家の生産性と技術効率性に関する2件の分析を実施した。これに加えて、チュニジアにおける食品衛生法(Food Sanitation Act)および食品規制法(Food Control Act)の現状について聞き取り調査を実施した。

(1) 確率的フロンティア関数に基づくオリーブ農家の効率性分析

オリーブ農家調査で収集した 109 のサブ・サンプルを用いて、農家の生産効率性(技術効率性)に関する実証分析を実施した。分析結果より、オリーブ農家の技術効率性の平均値は、61.2%と非効率を抱え、灌漑を実施している農家の技術効率性は、非灌漑農家のそれに比べて低いとの結論を得た。また、地域比較では、ケロワン県におけるオリーブ農家の技術効率性が最も高いことが明らかとなった。技術効率性を向上させる要因として、経営者の教育水準や経験年数、品種の選抜が有意な影響を及ぼすことが明らかとなった。

(2) 包絡分析法(DEA)に基づくオリーブ農家の効率性分析

オリーブ農家調査で収集した 118 のサブ・サンプルを用いて、農家の生産効率性に関する実証分析を進めている。同様のサンプルを用いて行った分析結果では、ナブール県におけるオリーブ農家の技術効率性が最も高く、またケロワン県におけるオリーブ農家の規模効率性が最も高い一方で、ナブール県の規模効率性が最も低いことが分かった。また、灌漑を実施している農家の効率性は、非灌漑農家の効率性に比べて低いことも明らかとなった。現在、この要因について、各地域における灌漑の方法・規模・時期、重金属等の土壌成分との関わりから分析を行っている。

(3) チュニジアにおける食品の安全・衛生に係る法制度分析

食品を統制する所管省庁を訪問し、チュニジアにおける食品の安全・衛生に関する法体制、食品安全行政、欧州連合による食品安全ガイドラインへの対応等について調査を実施した。調査結果から、同国は欧州の規準に対応するため、法制度の整備を進めているものの、食品の安全に関わるシステムの一元化を可能にする立法措置の現状については依然として不明確な点が多い。

(4) チュニジアにおける有用性植物の伝統的価値の調査

チュニジアにおけるオリーブ、アロマ植物などの有用性植物の伝統的価値の基礎調査・研究を実施し、同植物由来の商品の付加価値向上と新規市場創造を図る宗教学・人類学的研究を展開するため、資料収集を行った。

2. 今後の課題

- (1) 平成23年度に実施したオリーブ農家調査で得られたサンプルデータを用いて、決定論的フロンティア法にて分析を行い、多様なオリーブ品種の導入や機能性情報の導入、灌漑システムの導入等が、オリーブ農家の経営効率性に及ぼす影響を分析する。
- (2) 北部(ザグワン)と南部地域(ガバス、メドニン)を対象とするエッセンシャルオイル精製工場・企業に対する調査に関しては、スファックス・オリーブ研究所の協力を得て、平成25年度下半期中に調査票の配布・回収を終え、平成26年度上半期までに本調査の分析作業を完了する。

- (3) ケロワン、スース県等中西部でのオリーブ農家調査を実施する。
- (4) 日本におけるオリーブオイルの購買履歴データを用いて、日本人が最も高い選好を示すオリーブオイルの製品属性(原産地、価格、味、色等)とそれに与える家計属性(性別、収入、教育水準等)を分析し、機能的オリーブオイルの開発とその市場の特定を図る。
- (5) 食品の安全性に係る法律の施行状況を明らかにする。また、食品のリスク評価に関するガイドラインの整備状況について調査を実施する。

【平成 25 年度下半期】

製品化技術開発グループ「食品加工技術の開発」

ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開を目指して、25 年度には下記の2つの項目について検討を行った。

- (1) オレウロペインの界面活性能及び乳化能評価、並びにオリーブ由来オレウロペインを内包したエマルションの調製及び特性評価の検討：

これまで、高圧乳化法及びマイクロチャネル乳化法を用いて、オレウロペインを内包したエマルションの調製及び特性評価を行い、マイクロチャネル乳化法を用いて、調製された水中油滴型(O/W)エマルションにおいて、オレウロペインに界面張力を低下させる効果があること、またオレウロペインを含むオリーブ油が高いエマルション安定性を持っていることを明らかにしてきた。

25 年度では、マイクロチャネル乳化を用い、種々の O/W エマルション調製におけるオレウロペインの安定化効果を検討した。オリーブ油、大豆油、中鎖脂肪酸のいずれかを分散相とし、0.6 wt%オレウロペイン水溶液を連続相として用いることで、平均粒子径 25 μm (CV<5%)の O/W エマルションが調製でき、炭素鎖長が長い脂肪酸で構成される油脂で形成した O/W エマルションが高い安定性を示された。オレウロペインは乳化能力を有すること、今後、合成乳化剤の代わりに使用できることが示された。

さらに、オレウロペインの機能活性と構造の関係を解明するため、分子動力学(MD)手法を用い、真空、水および油水界面系におけるオレウロペインの分子構造シミュレーションを行った。MD シミュレーションは、温度 300 K として、2 fs の時間ステップで、少なくとも 30 fs 実施した。各系において、オレウロペインの最大および最も曲がりやすい部分とする7つのねじれ角を計算し、微小環境に依存して、オレウロペインが異なる構造をとることが示された。真空中での構造は、グルコース基がヒドロキシチロソール基と近接していた。水中では、グルコース基はヒドロキシチロソール基から遠く離れる配置を取った、これは水素結合に起因すると考えられる。油水界面系では、オレウロペインのグルコース基がヒドロキシチロソールおよびエネノール酸部分基と整列した構造をとり、油水界面に広がったより開いた構造で、界面に特異的に配位していることが示された。この構造は、油水界面において実験的に明らかにされたオレウロペインの界面活性と対応している。

- (2) オリーブミル工場廃水からポリフェノールの分離特性及び精製方法の検討：

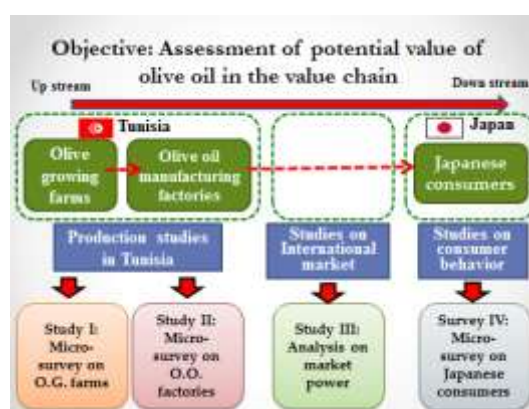
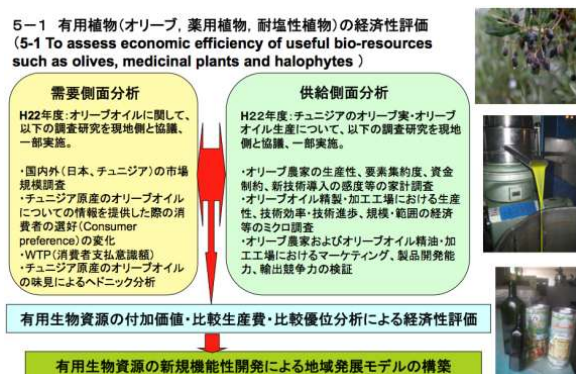
25 年度において、オリーブミル排水(OMW)からのポリフェノール分離精製のための新規統合プロセスを提案した。このプロセスは下記のとおり。まず OMW を 5,380 g で遠心させ、単糖類と脂質が大部分を占めている有機物質を 45%削減できる。次に上清液を真空蒸発し、結晶化の核生成速度を増大させる。このステップでは、溶解固形物の 60%が分離でき、ポリフェノールはほとんどが濃縮物に移行される。異なる濃度のエタノ

ールを添加することで、得られた混合物の結晶化を起こし、固体相としての単糖とミネラルを分離させる。結果として、本プロセスにより、90%エタノールを添加することで、液相中のポリフェノールが最大純度を示した。得られた液相を蒸留によりエタノールを回収することで、ポリフェノール高純度含有水溶液が得られる。本プロセスは、OMW から高純度ポリフェノールを得るために、エタノールを貧溶媒として用いる方法であり、特許として申請した。

5-1 有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性植物)の経済性評価グループ

①研究のねらい

本研究では、新規機能性が特定されたオリーブ、薬用植物、耐塩性植物等の有用植物を対象に、同植物から精製される生産物の需要と生産基盤及び有用性植物の伝統的価値を調査し、その潜在的需要と供給能力を解析することにより、付加価値、比較生産費・優位構造を明らかにすることを目的とする。



②研究実施方法

1) 確率的

フロンティア関数に基づくオリーブ農家の効率性分析

(2) 包絡分析法(DEA)に基づくオリーブ農家の効率性分析

(3) オリーブオイルの市場規模、消費性向、新規機能性に関する消費者の選好、支払意欲の解析

(4) チュニジアにおける食品の安全・衛生に係る法制度分析

(5) チュニジアにおける有用性植物の伝統的価値の調査

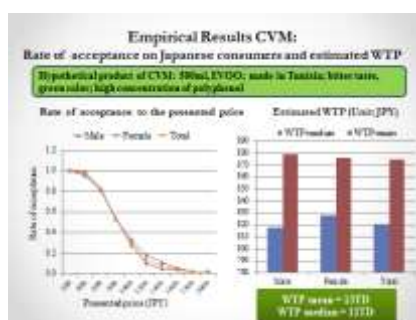
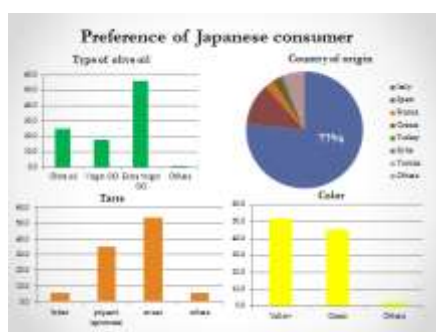
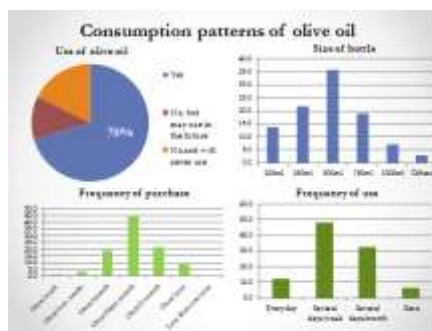
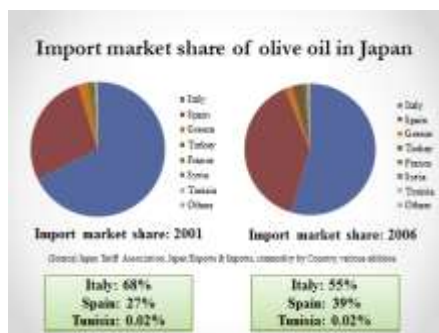
③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

平成 25 年には、オリーブ農家調査(南部スファックス)およびエッセンシャルオイル産業調査(スース県、ザグワン県、シリアナ県)を実施した。また、平成 24 年下半年期に引き続き、平成23年度に実施したオリーブ農家調査(北部ベジャ、南部スファックス、中西部ナブール、中部ケロワン、スース県)167 サンプルのデータセットを解析し、オリーブ農家の生産性と技術効率性に関する 2 件の分析を実施した。これに加えて、チュニジアにおける食品衛生法(Food Sanitation Act)および食品規制法(Food Control Act)の現状について聞き取り調査を実施した。また、オリーブ農家を中心に、有用性植物の伝統的価値の現地調査を進めた(スファックス県)。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

日本におけるオリーブオイル市場分析の結果に基づき、日本人が最も高い選好を示すオリーブオイルの

製品属性(原産地、価格、味、色等)とそれに与える家計属性(性別、収入、教育水準等)を分析し、高機能性オリーブオイル製品開発につながる属性と付加価値、ならびにターゲットとなる市場についての情報を提供した。



⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

平成 26 年 3 月 14 日に「チュニジア-日本セミナー: 経済開発を目指した自然資源の高度利用」がチュニスにて実施され、本グループからも「チュニジア産オリーブオイルの潜在的価値評価」と題して報告が行われた。また、セミナー後、ファックス県郊外のオリーブ産業、アロマ産業、食用ハーブ産業の調査を行い、チュニジアにおけるオリーブ、アロマ産業の世界市場の展開の可能性について日本企業への紹介を行った。



オリーブ油工場の生産性調査
(平成26年3月15日)



アロマ植物産業の市場調査
(平成26年3月15日)

データベース構築グループ

①研究のねらい;耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に関与する遺伝子座の同定、乾燥耐性と適応関連形質と連鎖する分子マーカーの解析を行い、乾燥地植物の育種技術の向上を図る。研究成果から得られたデータを統合化するデータベースの枠組みの設計を行う。チュニジア産の生物資源有用性評価の結果をデータベース化する。さらに、有用生物資源の抽出・画分のライブラリーを構築する。

②研究実施方法;データベース枠組みの設計として、入力項目(植物種、抽出物、環境情報)、データ仕様の策定、2次元バーコードの利用によるデータ入力の簡略化の検討、モデルデータを用いた入力・運用試験、塩生植物(CBBC)、サンプリング地におけるGISデータ(ENIS)などを行った。さらに、バーコード管理ライブラリーの運営体制の構築においては、植物サンプル、抽出物の保存・管理方法の検討などを行った。

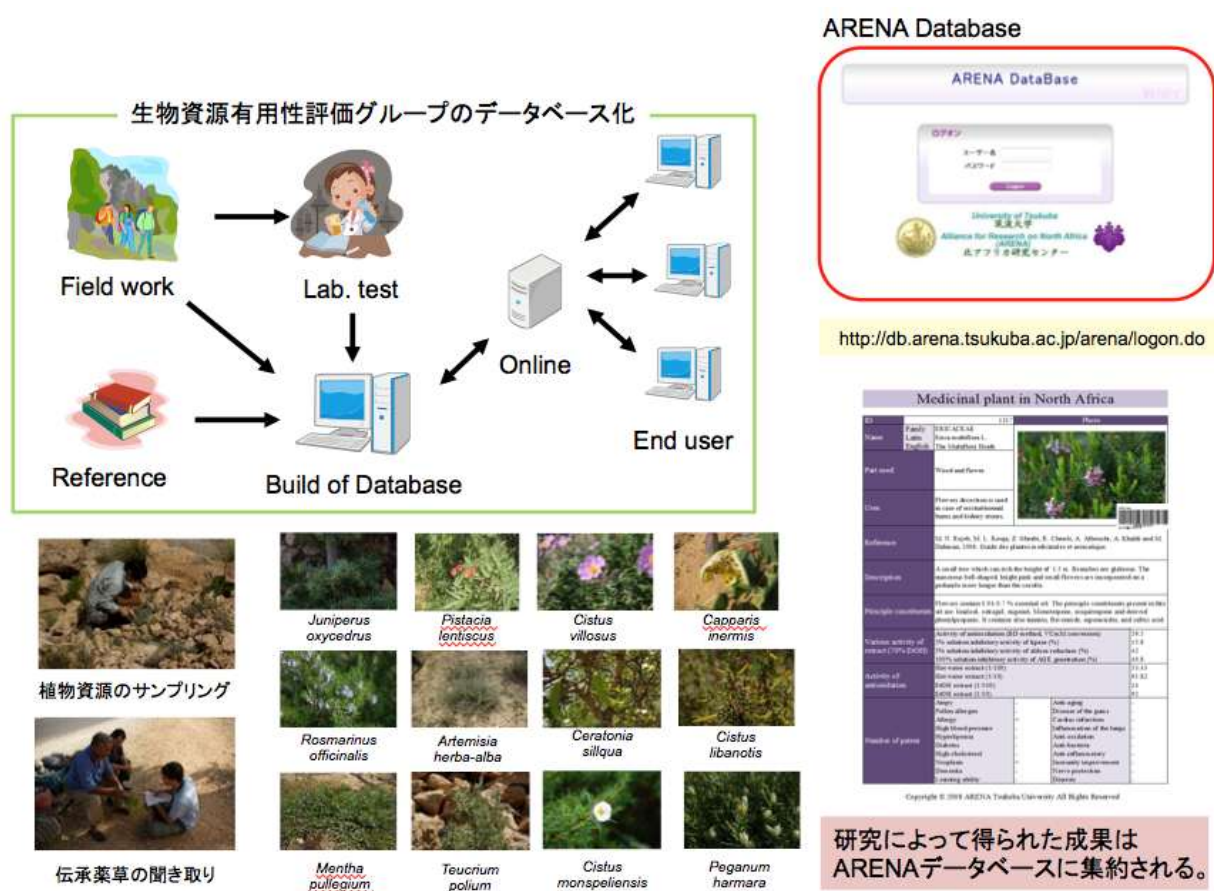


図 7. データベースの構築

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況;「食品加工技術の開発」および「有用植物の経済性評価」は、チュニジア現地の政変により現地調査及び現地のデータベースグループの打ち合わせが予定より遅れている。

④カウンターパートへの技術移転の状況;平成23年度にはJICA長期研修生(博士課程)を受け入れ、技術移転を活性化する予定。

【平成23年度上半期】

チュニジア側研究機関との調整

複数の機関で作成するリレーショナルデータベース(RDB)は、入力項目が統一されていないと項目ばかりが増えて内容が少ない RDB が出来上がってしまう。これによって利用者にとって見にくい RDB になるばかりでなく、サーバー上のデータが無駄に大きくなってしまう。このような事態を避けるために、資源植物の有用性探索を行うチュニジア側の研究機関(CBBC, CBS, IRA)の代表者を集め、入力フォームについての話し合いを4月25日月曜日午前10時(日本時間25日午後6時)よりCBSにおいて行った。

話し合いの結果、70%エタノール抽出物を用いた DPPH 法による抗酸化試験と MTT アッセイによる細胞生存率試験を共通項目とし、これらに追加する形で各研究機関に導入した機材による解析項目等を追加することにした。これにより種ごとに入力した基本データに加え、アッセイ試験の結果も効率よく追加することができる(図1)。

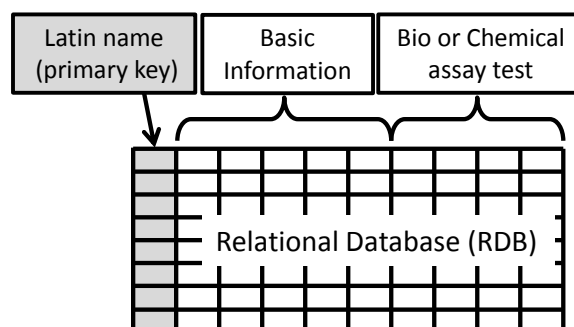


図1 RDBの入力形式

本研究に用いるサンプルはチュニジアと日本の両方で保有することとし、日本への植物サンプル持ち出しの契約としてMTA(Material transfer Agreement)を植物の区分ごとに対応する研究機関と締結する必要があることを認識し、MTAの共通フォーマットを作成した。また、環境データについては、ハンドオーガーを使った土壌調査を行い、環境データの解析を行うENISとの連携について説明した。

またデータの入力に関しては、各機関(CBBC, CBS, IRA)それぞれに入力データの管理ができ、公開前のデータが見えないようにしたいという申し出があった。そこで、1つのリレーショナルデータベースにおいてモデル項目を増やすのではなく、3つのリレーショナルデータベースを1つに統合することで、各機関のデータベースを独立して管理しながらデータベースを構築する体制をとることにした(図2)。

データの収集および入力

文献調査によって集めた有用資源植物の基本データを整理・収集し、データベースに入力した。これによりこれまでに入力した種数は745種になった。なお、新たに追

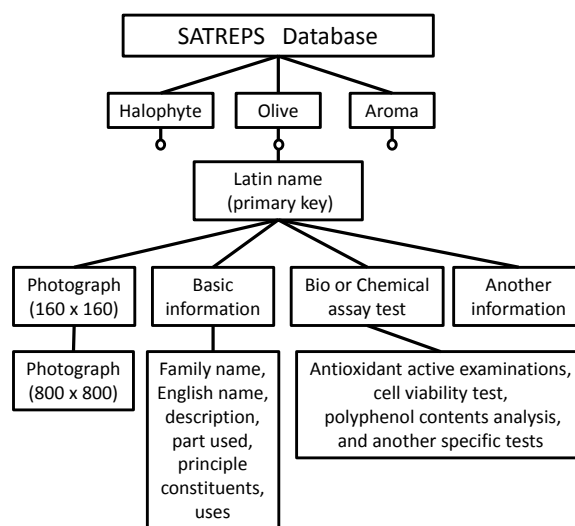


図2 データベースの構造

加した種類ではアッセイ解析を行っていない。これまでに作成した有用植物資源に関する項目に環境・土壌データを関連づけるための解析・入力項目およびフォーマットを決定した(参考資料1)。これにより現在のモデル定義ファイルを破棄し、今後は新たなデータベースのモデル定義ファイルでの運用が必要となる。

サンプリング機材の投入

データベースに使用する写真を撮影するためのデジタルカメラと土壌採取用のハンドオーガーが現地 5 機関に導入した。また近々、調査地を記録するための GPS も導入する予定である。しかしながら、導入に際して ENIS 用のデジタルカメラの盗難や GPS 使用の申請手続きによる投入遅延などの問題が生じており、機材の運搬に関する安全や手続きの簡略化のためのマニュアル作成を行う必要がある。

植物サンプルライブラリーの作成

有用植物資源はチュニジア側研究機関と共同で採集・管理している。これまでにアロマ植物に関する調査を行っており、日本保管分は乾燥体として保存し、現地保管分は抽出体としてディープフリーザーに保存している。塩生植物とオリーブのサンプリングは 11 月に行う予定である。以下に植物サンプルライブラリーの作成状況を示す(表1)。

表1 植物サンプルライブラリーの構築

	塩生植物 (CBBC)		オリーブ (CBS)		アロマ植物 (IRA)	
	日本保管分	現地保管分	日本保管分	現地保管分	日本保管分	現地保管分
サンプル採集						
乾燥						
乾燥植物体/ 種子として保存						
抽出						
凍結乾燥						
バーコード付与						
データベースとの 関連付け						

【平成23年度下半期】

データベースに格納されるデータは、統一した方法で得られたものでない限り、別のデータとして扱われるため、データベースが構築できない。そこでデータベースの設計図を作成し、必要な研修等を行ったうえで、格納データの基本体制を整備した。

最終的なデータベースによる出力を考慮して、基本フレームを作成した。実質的な作業を行うチュニジア側カウンターパートの足並みをそろえるため、データベース担当者に研修を行った。これにより、今後各機関から出力される成果は、共通した前処理のもと得られた成果となり、データベースへの格納が可能になる。

2012 年 2 月に CBBC、CBS、IRA からそれぞれ 1 名ずつデータベース担当者を日本に 3 週間招聘し、研修を行った。研修内容としては、データベースの基本フレームの説明、データベースの入力フォーマットの説明、入力フォーマットへのデータ入力、乾燥体サンプル管理方法、共通方法による抽出液作成、共通アッセイ項目(ポリフェノール測定、DPPH 測定、MTT アッセイ操作)の実習、凍結乾燥試料の作成等を行った。

2012 年以降、チュニジア政府からのサンプルの持ち出しに関して制限かけられた。これに対応するためにはチュニジア側の各研究機関によって、全ての対象種について常に提供できる状態の凍結乾燥体を用意し、

日本側からの要望に対してすみやかに研究試料の提供ができる体制を整備しなければならない。この体制が整わない限り、日本の研究機関はサンプルの品質を落とさないで得ることができず、チュニジアとの共同研究に大きな支障が生じると考えられる。

【平成24年度上半期】

チュニジア側研究機関との調整

サンプルの持ち出しに必要な契約である MTA(Material transfer Agreement)の内容について、植物体のどの部分をどの状態で持ち出すのかという議論が行われた。最終的に乾燥体であれば地上部を持ち出すことは可能という内容になった。サンプルはチュニジアと日本の両方で保有することとし、日本への植物サンプル持ち出しの契約として MTA を植物の区分ごとに対応する研究機関と締結する必要があることを確認した。

データの収集および入力

文献調査によって集めた有用資源植物の基本データを整理・収集し、データベースに入力した。現在は重複したデータの統合および削除を行っており、入力した種数は 791 種になる予定である。なお、新たに追加した種類ではアッセイ解析を行っていない。

植物サンプルライブラリーの作成

有用植物資源はチュニジア側研究機関と共同で採集・管理している。またデータの入力に関しては、チュニジア側のサンプルライブラリーの作成は各機関(CBBC, CBS, IRA)の担当者に委任している。日本保存分は乾燥体として保存し、現地保管分は抽出体としてディープフリーザーに保存している。MTA の準備やサンプリングの遅れによって塩生植物のライブラリー作成が遅れているが、8 月の調査で塩生植物のサンプリングを終え、現在は乾燥作業を進めている。以下に植物サンプルライブラリーの作成状況を示す(表1)。

表1 植物サンプルライブラリーの構築

	塩生植物 (CBBC)		オリーブ (CBS)		アロマ植物 (IRA)	
	日本保管分	現地保管分	日本保管分	現地保管分	日本保管分	現地保管分
サンプル採集						
乾燥						
乾燥植物体/ 種子として保存						
抽出						
凍結乾燥						
バーコード付与						
データベースとの 関連付け						

【平成24年度下半期】

CBS や IRA と比べて遅れていた塩生植物のサンプリングを促進するため、植物に詳しい専門家を短期派遣し、現地専門家と塩生植物のサンプリングを 3 月に実施した。Tamarix 属の 2 種が展葉前であったため採集できなかったが、他の種類については予定通りサンプリングすることができた。植物体内に水分を保持する能力が高い塩生植物を乾燥させるには時間がかかるためサンプルは CBBC に預け、乾燥作業を依頼した。また、上半期に実施したサンプリングで得られた植物体の乾燥作業はすでに終了し、チュニジアと日本で均等になるように配分する作業を続けている。次の渡航で日本に持ち出す予定である。

上半期に整理したデータベースにサンプル管理情報を紐付けする作業を進めている。これによりデータベースから日本側に保管しているサンプルを知ることができる。また、チュニジア側のサンプルライブラリーの作成は各機関(CBBC, CBS, IRA)の担当者に委任しているが、進捗状況を確認していないため、来年度は塩生植物を担当している CBBC とオリーブを担当している CBS の 2 機関に訪問する予定である。しかし、アロマ植物を担当している IRA は渡航が制限されている地域にあたるため、今後の状況を確認しながらライブラリー作成を進めていきたい。

現地保管分は抽出体としてディープフリーザーに保存しているが、通常のチューブで管理している状態である。当初の計画ではサンプル情報をデータ化して 2D コードのついたチューブに保存することになっているが、各機関が 2D コードチューブ購入していない。そこで来年度は乾燥状態で保管してあるサンプル情報の確認を行い、来年度中に 2D コードチューブによるサンプル管理を CBBC, CBS, IRA に導入したい。

ENIS が解析した土壌環境に関するデータをサンプルと対応させるために、ENIS のデータベース担当者と話し合い、GIS を用いた資源管理を試みることになった。レイヤーごとに種類の情報や土壌環境の情報を入力してその分布を視覚化する予定である。

【平成25 年度上半期】

担当者の渡航計画が遅れており、サンプルの持ち出しが遅れている。現在までにサンプル持ち出しの遅れによるプロジェクトへの支障は確認されていないが、担当者以外への協力を仰いで、速やかにサンプルの持ち出しを行いたい。今年は 11 月にチュニジアで国際会議が開催されるため、その時に研究チームのメンバーによって日本に持ち出す予定である。

文献調査によって集めた有用資源植物の基本データを整理し、データベースに入力した。現在は重複したデータの統合および削除が完了し、複数の文献からの情報を文献別に仕分ける作業を実施した。その結果、収録植物種数は 726 種になった。GIS を用いた資源管理としてデータベースに掲載されている位置情報を Google Earth と結びつける作業を試みているがエラーとなってしまう現象が続いている。今後はソフトウェア開発会社に技術面に関する支援を要請する予定である。

前年度から継続しているサンプル管理情報を紐付けする作業を進めている。また渡航延期によってチュニジア現地機関のデータベース構築状況や植物サンプルライブラリーの作成状況の確認が取れていない。IRA の渡航制限も解除されたため、今後は 3 機関の進捗状況を確認しながらライブラリー作成を進めていきたい。

サンプルライブラリーに用いる 2D コードチューブを購入したが、渡航延期によって現在までに現地への搬入

は行われていない。これらもまた研究チームのメンバーによってチュニジアでの国際会議の際に CBBC, CBS, IRA に持ちこむ予定である。しかしながら 2D コードリーダーを扱えるかどうかは不明なため、現地担当者に対する管理方法の研修を実施する必要があると考えられる。

【平成25年度下半期】

データベースは新規入力作業を行わず、データ修正作業を進めている。すでに重複データの整理が完了した 726 種のデータベースを基本に、重複情報の整理や空白情報の補完作業などを行っている。これまでに撮影した植物の写真を整理し、同定によって 215 種の植物を判別した。そのうち 81 種がデータベース該当種であった(図 1、表 1)。該当種の写真をデータベース内の写真項目に追加した。これらの写真については元ファイルの画像解像度が高いため、ウェブ上で閲覧しやすいように写真サイズを 800×800 ピクセル内に縮小したものと、また検索画面用に 160×160 ピクセルに縮小したものを作成した。



図 1 データベース掲載植物写真の一部(左上: *Adonis dentata*、右上: *Calendula arvensis*、左下: *Rosmarinus officinalis*、右下: *Thymus algeriensis*)

CBBC のデータベース担当者と打ち合わせを行い、入力状況を確認するとともに、データベースへの入力形式と必要な情報について説明した。入力したデータを確認した所、塩生植物 14 種に関する分類学的情報の入力は完了していた。しかしながら、データの情報源に関する情報が抜けており、植物の写真についてもインター

ネット上からダウンロードしたものが含まれていた。そこで植物の写真や情報に関して剽窃のないようにオリジナルデータを用いる点や引用文献との関係を明らかにする点などの必要性を確認した。現在は、オリジナルの写真への差し替えと文献情報の集計を行っている。また、アッセイデータの整理が終わっていなかったため、引き続き集計作業を進めている。CBS や IRA における進捗状況を確認していないが、同様の問題が生じることが想定されるため、現地で入力状況を担当者と確認する必要がある。

表 1 データベースで利用可能な植物写真の種リスト

Photo ID	Species name	Photo ID	Species name
1	<i>Adonis dentata</i>	41	<i>Medicago sativa</i>
2	<i>Anagallis arvensis</i>	42	<i>Mentha pulegium</i>
3	<i>Arbutus unedo</i>	43	<i>Myrtus communis</i>
4	<i>Arisarum vulgare</i>	44	<i>Nerium oleander</i>
5	<i>Artemisia campestris</i>	45	<i>Nitraria retusa</i>
6	<i>Artemisia herba-alba</i>	46	<i>Olea europaea</i>
7	<i>Asparagus acutifolius</i>	47	<i>Origanum vulgare</i>
8	<i>Astragalus armatus</i>	48	<i>Oxalis pes-caprae</i>
9	<i>Atriplex mollis</i>	49	<i>Papaver dubium</i>
10	<i>Ballota hirsuta</i>	50	<i>Papaver rhoeas</i>
11	<i>Bellis annua</i>	51	<i>Peganum harmala</i>
12	<i>Borago officinalis</i>	52	<i>Phoenix dactylifera</i>
13	<i>Calendula arvensis</i>	53	<i>Pinus halepensis</i>
14	<i>Calicotome villosa</i>	54	<i>Pistacia lentiscus</i>
15	<i>Capparis spinosa</i>	55	<i>Pituranthos scoparius</i>
16	<i>Ceratonia siliqua</i>	56	<i>Plantago coronopus</i>
17	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	57	<i>Polygonum equisetiforme</i>
18	<i>Cistus monspeliensis</i>	58	<i>Polypodium vulgare</i>
19	<i>Cleome arabica</i>	59	<i>Posidonia oceanica</i>
20	<i>Convolvulus arvensis</i>	60	<i>Prunus amygdalus</i>
21	<i>Cynodon dactylon</i>	61	<i>Punica granatum</i>
22	<i>Daphne gnidium</i>	62	<i>Quercus coccifera</i>
23	<i>Echium plantagineum</i>	63	<i>Quercus ilex</i>
24	<i>Erica arborea</i>	64	<i>Quercus suber</i>
25	<i>Erica multiflora</i>	65	<i>Raphanus raphanistrum</i>
26	<i>Erodium moschatum</i>	66	<i>Reseda alba</i>
27	<i>Eruca vesicaria</i>	67	<i>Retama raetam</i>
28	<i>Fumaria capreolata</i>	68	<i>Ricinus communis</i>
29	<i>Glaucium corniculatum</i>	69	<i>Rosmarinus officinalis</i>
30	<i>Globularia alypum</i>	70	<i>Rubia peregrina</i>
31	<i>Gymnocarpus decander</i>	71	<i>Salsola vermiculata</i>
32	<i>Hertia cheirifolia</i>	72	<i>Scorzonera undulata</i>
33	<i>Juniperus oxycedrus</i>	73	<i>Smilax aspera</i>
34	<i>Juniperus phoenicea</i>	74	<i>Sonchus oleraceus</i>
35	<i>Laurus nobilis</i>	75	<i>Stipa parviflora</i>
36	<i>Lavandula stoechas</i>	76	<i>Stipa tenacissima</i>
37	<i>Lotus creticus</i>	77	<i>Teucrium polium</i>
38	<i>Lycopus europaeus</i>	78	<i>Thymelaea hirsuta</i>
39	<i>Malva sylvestris</i>	79	<i>Thymus algeriensis</i>
40	<i>Marrubium vulgare</i>	80	<i>Vitex agnus-castus</i>
		81	<i>Ziziphus lotus</i>

日本で保管しているサンプルの整理を重点的に行なった。サンプルは 500ml の遮光瓶に入れて保管するとともに、分析時にすぐに必要量が使えるように瓶ごとの重量を測定した。アロマ植物は種および産地ごとに重量を測定した。(表 2)。現在はライブラリーへの入力作業を進めている。

表 2 日本側管理サンプルリスト(種名のみ記載)

ID	Species name	ID	Species name
1	<i>Arbutus unedo</i>	37	<i>Olea europea</i> (Chemlali)
2	<i>Artemisia campestris</i>	38	<i>Olea europea</i> (Chetoui)
3	<i>Artemisia herba-alba</i>	39	<i>Olea europea</i> (Jerboui)
4	<i>Arthrocnemum indicum</i>	40	<i>Olea europea</i> (Marsaline)
5	<i>Arthrophytum scoparium</i>	41	<i>Olea europea</i> (Meski)
6	<i>Asphodelus microcarpus</i>	42	<i>Olea europea</i> (Ouesleti)
7	<i>Atriplex inflata</i>	43	<i>Olea europea</i> (Sahri)
8	<i>Capparis inermis</i>	44	<i>Olea europea</i> (Zalmati)
9	<i>Ceratonia siliqua</i>	45	<i>Olea europea</i> (Zarrazi)
10	<i>Cistus lebanotis</i>	46	<i>Origanum majorana</i>
11	<i>Cistus monspeliensis</i>	47	<i>Peganum harmala</i>
12	<i>Cistus salviifolius</i>	48	<i>Phillyrea angustifolia</i>
13	<i>Cistus villosus</i>	49	<i>Pinus halepensis</i>
14	<i>Crithmum maritimum</i>	50	<i>Pistacia lentiscus</i>
15	<i>Cycium europeum</i>	51	<i>Plantago crassifolia</i>
16	<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	52	<i>Quercus coccifera</i>
17	<i>Daphne genkwa</i>	53	<i>Quercus ilex</i>
18	<i>Erica arborea</i>	54	<i>Rantherium suaveolens</i>
19	<i>Erica multiflora</i>	55	<i>Retama raetam</i>
20	<i>Erica scoparia</i>	56	<i>Rhamnus lycioides</i>
21	<i>Globularia alypum</i>	57	<i>Rhanterium suaveolens</i>
22	<i>Gymnocarpus decander</i>	58	<i>Rhus tripartitum</i>
23	<i>Halimium halimifolium</i>	59	<i>Rosmarinus officinalis</i>
24	<i>Halocnemum strobilaceum</i>	60	<i>Rumex sp.</i>
25	<i>Hertia cheirifolia</i>	61	<i>Ruta montana</i>
26	<i>Juncus maritimus</i>	62	<i>Salicornia sp.</i>
27	<i>Juniperus oxycedrus</i>	63	<i>Salsola tetrandra</i>
28	<i>Juniperus phoenicea</i>	64	<i>Solanum sodomaeum</i>
29	<i>Lauris nobilis</i>	65	<i>Tamarix aphylla</i>
30	<i>Lavandula stoechas</i>	66	<i>Tamarix gallica</i>
31	<i>Marrubium vulgare</i>	67	<i>Teucrium pollium</i>
32	<i>Mesembryanthemum edule</i>	68	<i>Thymelaea hirsuta</i>
33	<i>Myrtus communis</i>	69	<i>Thymus capitatus</i>
34	<i>Nitraria retusa</i>	70	<i>Verbascum sinuatum</i>
35	<i>Noyer sp.</i>	71	<i>Vitex agnus</i>
36	<i>Olea europea</i>	72	<i>Zizyphus lotus</i>

オリーブの葉は品種および産地ごとに重量を測定した(表3)。ライブラリーへの入力は完了しており、オリーブに関しては必要量のサンプルの提供に対応できる状態となっている。

表3 オリーブ葉サンプル保管状況

City	Variation	Stock amount (g)
Metline	Chetoui	375.91
Menzel Bourguba	Chetoui	225.36
Menzel Bourguba	Meski	291.31
Menzel Bourguba	Chemlali	115.8
Tebourba	Chetoui	277.93
Tebourba	Meski	404.54
Sidi Hessine	Chetoui	303.97
Sidi Hessine	Sahri	215.85
Takersa	Chetoui	276.93
Zarzis	Zarrazi	326.89
Zarzis	Zalmati	280.26
Jerba	Zalmati	241.35
Jerba	Chemlali	202.15
El Hajeb	Chemlali	1347.93
OTD Chaal	Chemlali	617.9

現在進めているサンプルライブラリーは主に植物乾燥体を対象に行なっているが、今後は抽出物としてサンプルライブラリーも作成する予定である。サンプルライブラリーに用いる 2D コードチューブを購入して日本側で管理体制を整えた後、マニュアルを作成する。すでにチュニジア側には 2D コードチューブを導入済みであるが、具体的な管理体制は自主的に作ることができない。そこでマニュアルを作成する事によって効率的にサンプル管理技術の技術移転が期待される。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

①本年度発表総数(国内 0件、国際 13 件):

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 1 件、国際 34 件)

③ 論文詳細情報

1. Tsolmon S., Nakazaki E., Han J., and Isoda H. Apigenin induces erythroid differentiation of human leukemia cells K562: Proteomics approach. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, 1, S93-S102
2. F. Ben Fredj, J. Han, M. Irie, N. Funamizu, A. Ghrabi, H. Isoda: Assessment of wastewater-irrigated soil containing heavy metals and establishment of specific biomarkers, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 54-62, 2012.
3. Yoichi Shimoda, Junkyu Han, Kiyokazu Kawada, Abderrazak Smaoui and Hiroko Isoda: Metabolomics analysis of *Cistus monspeliensis* leaf extract on energy metabolism activation in human intestinal cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2012, Article ID 428514, 7pages, DOI 10.1155/2012/428514.
4. El Mannai Y, T Shehzad, K Okuno: Mapping of QTLs underlying flowering time in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Breeding Science*, 62, 151-159, 2012.
5. M. Villareal, J. Han, K. Ikuta, H. Isoda: Mechanism of Mitf inhibition and morphological differentiation effects of hirsein A on B16 melanoma cells revealed by DNA microarray, *Journal of Dermatological Science*, 67, 26-36, 2012.
6. Hideko Motojima, Parida Yamada, Mitsuteru Irie, Masuo Ozaki, Hideki Shigemori & Hiroko Isoda: Amelioration effect of humic acid extracted from solubilized excess sludge on saline-alkali soil, *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 14, 3, 169-180, 2012.
7. Riadh KSOURI, Abderrazak SMAOUI, Hiroko ISODA and Chedly ABDELLY: Utilization of Halophyte Species as New Sources of Bioactive Substances, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 41-44, 2012.
8. Kenichi KASHIWAGI, Atsushi KAWACHI, Sami SAYADI and Hiroko ISODA: Technical Efficiency of Olive Growing Farms in Tunisia and Potential Demand for Olive Oil in Japan, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 45-48, 2012.
9. Atsushi KAWACHI, Parida YAMADA, Mitsuteru IRIE and Hiroko ISODA: Characterization of Humic Substances in Sediment on Joumine Reservoir in Tunisia, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 49-52, 2012.
10. Junkyu HAN and Hiroko ISODA: Valorization of Bio-Resources in Semi-Arid and Arid Land - Functional Analysis Group of SATREPS Project in Tunisia-, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 53-56, 2012.
11. Zouhaier BOUALLAGUI, Mohamed BOUAZIZ, Junkyu HAN, Maher BOUKHRIS, Ghayth RIGANE, Ines FRIHA, Hedya JEMAI, Hela GHORBEL, Hiroko ISODA and Sami SAYADI: Valorization of Olive Processing By-Products -Characterization, Investigation of Chemico-Biological Activities and Identification on Active Compounds-, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 61-64, 2012.
12. Mitsuteru IRIE, Atsushi KAWACHI, Jamila TARHOUNI, Ahmad GHRABI, Hiroko ISODA:

- Sedimentation trend and behavior of turbid water in the reservoir, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 91-94, 2012.
13. Slim MTIBAA, Olfa HENTATI, Mitsuteru IRIE, Mohamed KSIBI: Soil amendment by sediment from water storage reservoir as a restoration technique in secondary treated wastewater irrigated area at El Hajeb region, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 315-318, 2012.
 14. Fahmi BEN FREDJ, Mitsuteru IRIE, Junkyu HAN, Atef LIMAN, Ahmed GHRABI and Hiroko ISODA: Sensitivity of *in-vitro* Bioassays towards Several Water Origins in Tunisia Arid and Semi-arid Area, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 319-322, 2012.
 15. Mohamed BRADAI, Sami SAYADI and Hiroko ISODA: Optimization of a Physicochemical Pretreatment Combined with Biological Treatment for a Highly Loaded Wastewater with Anionic Surfactants, Using Response Surface Methodology(RSM), *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 323-327, 2012.
 16. Kazunori Sasaki, Junkyu Han, Hideyuki Shigemori, Hiroko Isoda: Caffeoylquinic acid induces ATP production and energy metabolism in human neurotypic SH-SY5Y cells, *Nutrition and Aging*, 1,141-150, 2012.
 17. Chao H, Najjaa H, Villareal M, Ksouri R, Han J, Neffati M and Isoda H.: Arthrophytum scoparium inhibits melanogenesis through the down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expressions in B16 melanoma cells, *Experimental Dermatology*, 22, 2, 131-136, 2013.
 18. Eri Nakazaki, Soninkhishig Tsolmon, Junkyu Han, Hiroko Isoda: Proteomic study of granulocytic differentiation induced by apigenin 7-glucoside in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *European Journal of Nutrition*, 52, 25-35 2013.
 19. Myra O. Villareal, Junkyu Han, Kyoko Matsuyama, Yukiko Sekii, Abderrazek Smaoui, Hideyuki Shigemori, Hiroko Isoda: Lupenone from Erica multiflora Leaf Extract Stimulates Melanogenesis in B16 Murine Melanoma Cells through the Inhibition of ERK1/2 Activation, *Planta Med*, 79, 236-243, 2013
 20. 高比良翔, 中村恭志, 石川忠晴, 入江光輝, Jamila TARHOUNI, 小島崇: チュニジア国 Joumine 貯水池の成層流動シミュレーションのための計算条件設定, 土木学会論文集 B1(水工学), 69, 4, 835-840, 2013
 21. Irie M, Kawachi A, Nsiri I and Tarhouni J: Observation of floodwater behavior and sedimentation in the reservoir, Japan Society of Civil Engineering, Ser. B1, 69, 4, 247-252, 2013
 22. Irie M., Han J., Kawachi A., Tarhouni J., Ksibi M., Isoda H.: In vitro testing and commercialization potential of extracted fulvic acid from dredged sediment from arid region reservoirs, Waste and biomass valorization, DOI 10.1007/s12649-013-9234-y, 2013
 23. Boulaaba M., Mkadmini K., Tsolmon S., Han J., Smaoui A., Kawada K., Ksouri R., Isoda H., Abdelly C.: In Vitro Antiproliferative Effect of Arthrocnemum indicum Extracts on Caco-2 Cancer Cells through Cell Cycle Control and Related Phenol LC-TOF-MS Identification, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, Article ID 529375, 11 pages
 24. Chao H, Najjaa H, Villareal M, Ksouri R, Han J, Neffati M and Isoda H.: Arthrophytum scoparium inhibits melanogenesis through the down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expressions in B16 melanoma cells, *Experimental Dermatology*, 22, 2, 131-136, 2013.

25. Kashiwagi, K., M. Kefi, M. Ksibi, M. Kallel, A. Kawachi and H. Isoda (2013) “Effect of Introduction of Irrigation on Technical Efficiency of Olive-growing Farms in Tunisia,” Journal of Agricultural Science and Technology A, Vol.3, No.9, September, pp. 667–676, 2013
26. S. Souilem, I. Kobayashi, M. A. Neves, S. Sayadi, S. Ichikawa, M. Nakajima. Preparation of Monodisperse Food-Grade Oleuropein-Loaded W/O/W Emulsions Using Microchannel Emulsification and Evaluation of Their Storage Stability. Food Bioprocess and Technology, published online DOI:10.1007/s11947-013-1182-9, September, 2013
27. El Omri A., Han J., Abdrabbah M. B., Isoda H.: Down regulation effect of Rosmarinus officinalis polyphenols on cellular stress proteins in rat pheochromocytoma PC12 cells, Cytotechnology, 2013, PMID21861121.
28. Chekirbane, A., Tsujimura, M., Kawachi, A., Isoda, H., Tarhouni, J. and Benalaya, A.: Hydrogeochemistry and groundwater salinization in an ephemeral coastal floodplain CapBon, Tunisia. Hydrological Sciences Journal, 58 (5), 1097–1110, DOI: 10.1080/02626667.2013.800202, June, 2013
29. Feten Zar Kalai, Junkyu Han, Riadh Ksouri, Abdelfatteh El Omri, Chedly Abdelly, and Hiroko Isoda. Anti-obesity effects of an edible halophyte *Nitraria retusa* Forssk in 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation and in C57B6J/L mice fed a high fat diet-induced obesity, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2013, 11 pages.
30. Kitagawa, T. W., K. Kashiwagi and H. Isoda, “Symbolism of Olive in North Africa” Book of Proceedings Tunisian-Japanese Symposium on Society, Science and Technology (TJASSST 2013) Session VII: SATREPS, March, pp. 11–14, 2014.
31. Mahmoud Ben Othman, Karima Bel Hadj Salah, Saida Ncibi, Amer Elaissi, Lazhar Zourgui. Antibacterial and antifungal activity of extracts and essential oils of *Teucrium polium* L. subsp. *gabesianum* (L.H.) from Tunisia. Journal of Essential Oil (submitted) March 2014.
32. Mahmoud Ben Othman, Konomi Murakami, Hui-chia Chao, Abdelfatteh El Omri, Abdelkarim Ben Arfa, Junkyu Han, Hideko Motojima, Myra O. Villareal, Mohamed Neffati, and Hiroko Isoda. Preliminary screening of Tunisian aromatic and medicinal plants for anti-stress and anti-allergic activities and melanin disorders. Fitoterapia (submitted) March 2014.
33. Souilem, S., Kobayashi, I., Neves, M. A., Jlaiel, L., Sayadi, S., Nakajima, M. Interfacial characteristics and microchannel emulsification of oleuropein-containing triglyceride oil-water systems. Food Research International. Accepted, March 30, 2014.
34. Imen Samet, Junkyu Han, Lobna Jlaiel, Sami Sayadi, and Hiroko Isoda. Olive (*Olea europaea*) Leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia k562 cells: Insight into the Underlying Mechanism. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2014, Article ID 927619, 16 pages.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳 (国内 0 件、海外 1 件、特許出願した発明数 1 件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 2件、海外 4件)

1. 「特願 2011-216214」:腫瘍細胞増殖抑制剤とこれを含有する医薬品組成物、化粧品組成物及び食品組成物(筑波大学&CBBC の共同出願)
2. 「特願 2011-252968」:メラニン産生抑制剤とこれを含有する医薬品組成物、化粧品組成物、食品組成物(筑波大学&IRA の共同出願)
3. 米国特許「13/684,991」:
COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING EMOTION-PSYCHOLOGICAL STRESS
(Isoda H, Han J, Neffati M, Othman M)
4. 米国特許「13/685,104」:
COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING OR AMELIORATING OBESITY OR FOR
REDUCING DIABETIC HYPERCHOLESTEROLEMIA(Isoda H, Han J, Feten K, Abdelly C, Ksouri
R)
5. 米国特許「13/685,354」:
COMPOSITIONS AND METHODS FOR LINEAR ALKYL BENZENE SULFONATE (LAS) RISK
ASSESSMENT(Isoda H, Han J, Sami S, Bradai M)
6. 米国特許
Nakajima, M., Neves, M. A., Isoda, H., Dammak, I., Sayadi, S. Method for isolating polyphenols from
olive mill water; U.S. Patent application 13/963, reference: 93552 (311771) (August 9, 2013).

4. プロジェクト実施体制

(1)「生物資源有用性評価」グループ

①研究者グループリーダー名

日本側: 礪田 博子(筑波大学・教授) 相手側: Chedly Abdelly (CBBC・教授)

②研究項目:

オリーブ、薬用植物、耐塩性植物の伝承的薬効、土地利用形態別情報にもとづき対象植物を選定、採集、溶媒抽出、画分調整、機能性評価を行い、機能性を有する生物資源の経済性評価を踏まえた機能成分に関する食品加工技術の導入、食品加工のスケールアップ技術の開発を目指す。

(2)「生産基盤調整」グループ

①研究者グループリーダー名

日本側: 辻村 真貴(筑波大学・教授) 相手側: Mohamed Ksibi (ENIS・教授)

②研究項目:

アルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法を検討する。水資源利用における環境安全性のリスク評価を行い、有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発を目指す。

(3)「育種方法開発」グループ

①研究者グループリーダー名

日本側：奥野 員敏(筑波大学・教授) 相手側：Harrabi Moncef (INAT・教授)

② 研究項目：

ソルガムをモデルとした耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に関与する遺伝子座の同定、乾燥耐性と適応関連形質と連鎖する分子マーカーの開発を行うとともに遺伝子解析を行う。耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に関与する遺伝子座の同定および乾燥耐性と環境適応形質と連鎖する分子マーカーの開発

(4)「製品化技術開発」グループ

①研究者グループリーダー名

日本側：中嶋 光敏(筑波大学・教授) 相手側：Sami Sayadi (CBS・教授)

② 研究項目：

地域特有の伝承薬草材料に用いられている植物等を中心に、生理活性成分のスクリーニングを行う。植物採集、バイオアッセイ・文献情報収集によって、これまで得られた情報群をもとにデータベースをチュニジアと共同で作成する。また、スーパーマスコロイダーによりオリーブオイル・ローズマリーエッセンシャルオイルのエマルジョン作成を検討し、製品の市場調査計画作成も同時に行う。乾燥地および半乾燥地におけるオリーブ由来の副産物の抗酸化物質等の食品・医薬品として利用価値の高い生物マテリアルの有効利用方法の開発を行う。オリーブ副産物の有効利用方法の開発を行うと共に、ナノエマルション、マイクロ・ナノ粒子等の食品・医薬品として利用価値の高い生物マテリアルの有効利用方法の開発を行う。

(5)「データベース構築」グループ

①研究者グループリーダー名

日本側：川田 清和(筑波大学・助教) 相手側：Neffati Mohamed (IRA・教授)

②研究項目：

耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に関与する遺伝子座の同定、乾燥耐性と適応関連形質と連鎖する分子マーカーの解析を行い、乾燥地植物の育種技術の向上を図る。研究成果から得られたデータを統合化するデータベースの枠組みの設計を行う。チュニジア産の生物資源有用性評価の結果をデータベース化する。さらに、有用生物資源の抽出・画分のライブラリーを構築する。

以上