

魚の腸内細菌による有用物質の生産 ～魚のEPA/DHAはどこから来る？～



早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構
規範科学総合研究所ヘルスフード科学部門 部門長
矢澤 一良

1. はじめに

生物に関する精密な研究の最近の著しい進展から、生命の本質や生命存続の諸反応が解明されてきました。また、遺伝子操作技術、細胞融合技術、蛋白質工学などの急速な進展により、生体の有する生合成や物質代謝の機能を有用物質の生産に合理的に利用する技術（バイオテクノロジー）が高度に進展しています。さらに、主な最先端バイオテクノロジー技術と応用として、ゲノム編集技術の進化、人工知能（AI）との統合による次世代コンピューターを駆使した新薬探索、マルチオミクスを用いる個別化医療／精密医療、高度な再生医療・細胞療法、組織工学による人工臓器や3Dプリントによる臓器・細胞構造の再生、シークエンシング技術の革新、バイオプロセス開発の最適化、すなわち生物／微生物を使って有害物質を分解する“バイオリメディエーション”（生物による環境浄化）の応用技術、合成生物学／バイオデザイン、すなわち微生物を用いる生分解プラスチック、バイオファイバー、代替タンパク質などの生産、代替食品・細胞培養／培養肉（畜産系・水産系）の構造や食感の3Dスキャフォールド／バイオリクター技術を用いた改善、グリーンバイオテクノロジー（バイオ燃料／バイオエネルギー用植物の改良、生物由来プロセスでの廃棄物低減、環境への負荷低減）など、基礎技術から実用化に至るものまで広範囲に広がってきています。

このような状況から、資源としての微生物およびその遺伝子を利用する新たな段階の“バイオテクノロジー”を駆使して、実践段階が必要になっていると考えます。

脂質および脂質関連物質の研究開発の動向は、これまでの動物、植物、鉱物等の天然物より抽出生産する方法に加えて、炭素鎖長、不飽和度、立体配位の差異等、脂肪酸・グリセライドの特性をいかした機能性を有する諸脂質関連物質の生産・研究が多く行われています。さらに、新規な微生物を探索して特徴的な脂質（主として脂肪酸）を生産させる、あるいは脂質関連酵素を用いた有用脂質への改質等の開発・研究が、バイオテクノロジーを駆使して活性化してきました。

2. 微生物発酵の温故知新（SCPからSCOへの潮流）

微生物を用いて蛋白質・ペプチド・アミノ酸を生産する「Single Cell Protein（SCP）」研究は

1960年代が起源と考えます。世界的な人口増加に伴い「タンパク質危機」が叫ばれ、家畜飼料や人間の栄養源として新しいタンパク質源が求められました。すでにこの時代にも「タンパク質クライシス」があったわけです。すなわち、その時代にSCPの概念が誕生し、単細胞微生物(酵母、藻類、細菌、カビなど)を利用してタンパク質・ペプチド・アミノ酸を大量生産する研究が開始されました。

初期研究としては、1960年代に石油を炭素源として増殖する細菌を使ったSCP生産が注目を浴びました。1970年代に入ると発展期として国際機関が関与し始め、「SCPは未来の食糧資源」として大プロジェクトが始まりました。しかしながら、栄養的には優れていたものの、製造コストの高さ、消費者受容性、規制面の問題などから「人間向け食品」としては普及が進まず、主に飼料用途に利用されるにとどまり、一気にSCP研究者が減少しました。化石燃料を原料としては受け入れられないことから、その後は廃糖蜜、農業副産物、木材由来糖などを利用する発酵研究として今日でも継続しています。

また、藻類研究ではこの時期からスピルリナ、クロレラなどの藻類SCPが健康食品として注目され始めた時期でもあります。そして今日では、環境・サステナビリティ視点、気候変動や資源問題を背景に、再びSCPが「持続可能なタンパク源」として再注目されるようになり、肉代替製品の展開(英国を発生として、現在は世界的に流通)、魚類養殖飼料の商業化、藻類・バイオテクノロジー研究から遺伝子工学を利用した高栄養価SCP生産の研究などが進展してきています。2010年代以降はさらに発展して、精密発酵(Precision Fermentation)として微生物に目的のタンパク質を作らせる技術(例:乳タンパク質、卵白タンパク質)や、フードテック領域での「代替肉・代替乳製品」の基盤技術として、SCPはスタートアップや大手食品企業に採用されています。すなわち1960年代から脈々と研究開発が進み、未来においても社会的意義として「持続可能な食料供給」や「飼料から人間への直接利用」への展開となってきています。

実は、この1970年代の仕事にあぶれたSCP研究者(失礼します)の一部は、そのノウハウを「Single Cell Oil」(SCO)、すなわち蛋白質から脂質・脂肪酸の微生物生産に関することに応用し始めました。当時の研究は、変わった脂肪酸を産生する微生物の探索が主だったと思います。ちょうど1973年に筆者がヤクルト本社中央研究所に入所したころには、一部はSCPに向かった友人もいましたが、私はたまたま大学恩師の推薦からヤクルト・シロタ株の代田稔先生に直接面談後、ヤクルト本社中央研究所で腸内細菌研究に入ることになりました。

3. 腸内細菌や乳酸菌シロタ株の研究で何を学んだか?……「微生物ハンター」の芽生え

詳細の研究内容は省略しますが、ヤクルト本社中央研究所で学んだ2つのことは、今日の自分の根幹にもなっています。在籍して学べて良かったと今でも思います。

学んだことの1つは、「ヤクルトは毎日飲まなければ有効ではない」ということです。どういう意味かという、これは「宿主特異性」が関係しています。つまり、毎日飲むことは感染防御に大変必要であり、自分の菌(常在菌)以外は何を飲んでも定着せず、ほとんどすべて排除されてしまうということです。排除されないと感染して生体・生命の危機となるため、ホメオスタシスが働いているわけです。

もう1つは、食べ物や飲み物など口に入れる理由は、病気の発症予防や健康を維持・増進することができる「予防医学」である、という強い認識を持てたことです。あの頃、予防医学はまだ食の世界では広がっていませんでしたが、ヤクルト本社中央研究所で学んだこの2つのことは、

今の「食による予防医学」という私のライフワークにつながっています。

その後、諸事情・諸状況により（文字数限定で割愛します）、1986年に財団法人相模中央化学研究所（以下相模中研）に入所して、新たな研究テーマとして「魚の腸内細菌」研究を開始しました。考え抜いたテーマの1つが、「魚の腸内細菌からEPA・DHAを作る」というものでした。すなわち自分の興味の中にあった3つ、「EPA・DHAの予防医学的機能」・「海と魚が好き」・「腸内細菌の宿主特異性」——それらの円を結ぶ輪の中にあったのが、この研究テーマでした。

この研究テーマが浮かんだ背景には、当時東北大学の安元健教授の論文がありました。フグのフグ毒であるテトロドトキシンはフグが作るのではなく、フグの腸内細菌が作るのだ、ということが論文の骨子です。フグでも他の魚と同じように排便することで他の魚類にテトロドトキシン産生菌が感染してもおかしくないにもかかわらず、他の魚にはテトロドトキシンが見つけれられません。これこそが、魚の世界でも腸内細菌の「宿主特異性」というものがあり、フグにはフグ毒を作る菌が「定着」しているという考えです。そして、その菌がほかの魚の口に入っても定着・増殖してテトロドトキシンを産生して毒化することがないということです。余談ですが、フグは特殊な部位にのみ毒素をため込み、また毒性耐性がある程度あるために生きていられますが、テトロドトキシンを注射した（濃度によりますが）フグはフグ毒で死ぬそうです。

興味と新規性を考え、魚で一番健康に良い成分は何だろうかと考え、エイコサペンタエン酸（EPA）とドコサヘキサエン酸（DHA）を思いつきました。そこで、EPA・DHAを作る腸内細菌を魚の腸内から探そうということになりました。「微生物ハンター」の研究の開始です。

「微生物ハンター」として、魚の腸内に共生する微生物である海洋細菌にしばり、脂肪酸であるEPAとDHAの生産に焦点を当てて概説します。さらに、予防医学的機能性を有する脂肪酸であるEPAやDHAを産生する海洋細菌の有用遺伝子群（Marine Genome）を他生物に導入・発現させる試みにも言及します。

魚の腸内細菌の研究者は当時殆どおらず、今でも穴場（研究ネタが多く、研究者が少ない）だと思います。それまでにないような有用な物質を産生するなど、少し変わった有用な性質を持っている菌は、それ自体が特許になりえます。筆者は相模中研の頃には微生物特許を200件ほど出願しました。ものになったのはそのうち5件ほどですが、審査請求には費用が一段と嵩み、海外出願にはさらに手間も費用も嵩むことから、戦略を考えて行うことが必要です。有用性・有効性が認められる新規な微生物は特許になり得るのだということを認識してからは、このような研究（微生物ハンター）をすることがさらにおもしろいものになりました。

4. 魚の腸内共生微生物（腸内細菌）による有用脂質生産

EPAやDHAはヒトや動物ではほとんど生合成することができないため、健康機能や予防医学としては、食品（サプリメントを含む）として摂取する必要があります。EPA・DHAは魚油（特に青背の海産魚の油）に多く含まれているため、上述したように現在そのほとんどは魚油から抽出されてサプリメントとなっています。しかしながら最近では、微細藻類などによる生産も多々みられるようになって来ています。

これまでに知られているEPA・DHAの化学構造（図1）と薬理作用（表1）に示しました。このような有用な高度不飽和脂肪酸であるEPA・DHAのより効率の良い生産源を求めて、筆者の研究室で行ってきた海洋共生細菌からのEPA・DHA産生菌の発見の経緯と、これまでの研究経過について概説します。

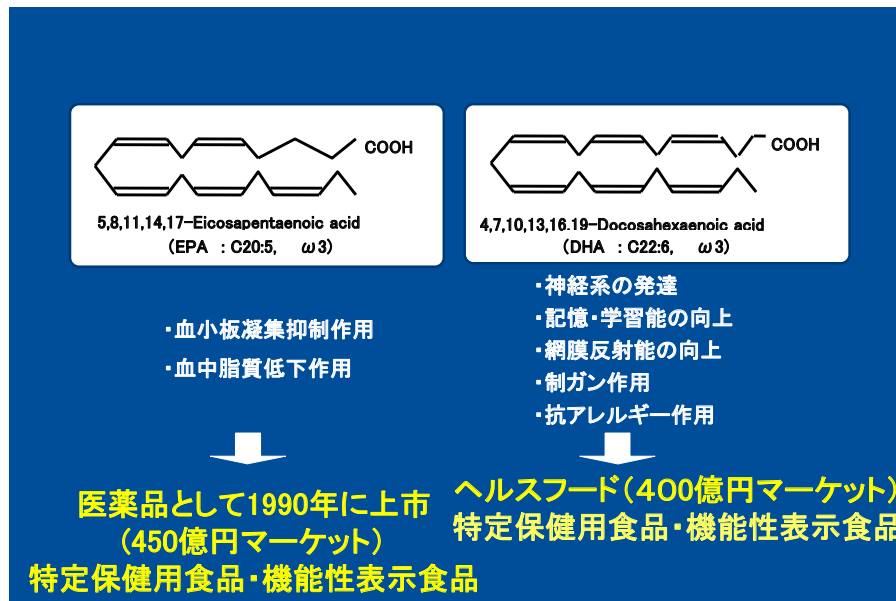


図1 EPAとDHAの化学構造

効果効能	DHA	EPA
脳・眼機能の発達に必要	○	—
認知症予防作用	○	—
脳卒中の予防作用	○	—
抗うつ作用(神経疾患予防作用)	○	—
虚血性心疾患の予防作用	○	○
中性脂質低下作用	○	○
血圧低下作用	○	○
糖尿病改善作用	○	○
抗アレルギー作用	○	○
抗炎症作用	○	○
抗癌作用	○	○
骨強化作用	○	○
関節リュウマチ改善作用	○	○
血小板凝集抑制作用	—	○

表1 DHAとEPAの薬理作用

5. 海洋共生菌(腸内細菌)によるEPAの生産と特許出願、さらにその利活用

EPAは1990年に世界に先駆けて我が国で医薬品化されました。イワシ魚油より高純度精製されたEPAエチルエステルは「閉塞性動脈硬化症」を適応症として上市され、さらに動脈硬化用剤(脂質低下剤)として適応症拡大に成功しました(1994年)。臨床医の間では副作用の少ない使いやすい医薬品として評価され、1998年度には400億円を超す市場にまで広がり、その後も順調に伸びています。さらに後発品(ジェネリック)も販路拡大に貢献しています

本題の「魚のEPA/DHAはどこから来るのか」という疑問についての模範解答は以下が主流です。魚類自身が生合成できないことが知られている魚のEPA・DHAの起源としては、藻類・

植物プランクトン→動物プランクトン→(小魚)→魚類や海産動物とつながる一連の「食物連鎖」で説明されており、藻類や海産微細藻類等植物プランクトンがその第一次生産者であるとされてきました。

しかしながら、筆者はこのような「食物連鎖」だけではなく、EPA・DHAを体内(可食部)に豊富に持つ「青背の魚」の腸内に棲息する共生微生物(腸内細菌)にはEPA・DHAを産生するものがあるのではないかとの仮説を立て、検索(スクリーニング)を開始しました。それは前出の乳酸菌の「宿主特異性」や、フグとフグ毒とフグの腸内細菌の関係が、研究の大きな原動力になっているためです。

微生物探索にはいくつかのノウハウがあり、新規微生物や新規機能の発見につながります。魚屋で売っている魚の腸内細菌をスクリーニングしても、面白い腸内細菌は見つかりません。共生細菌は生きている魚の腸内にいること、また分離培地も試行錯誤を経てある組成の培地に落ち着いたことなどから、探索は現場で行うことが必須であると示唆されました。そこで、全国の港へ行き、漁協の了解を得、その地域に特徴のある生きた魚を現場(船上または港の片隅など)で解剖(写真1)して腸内細菌を取り出しました。小型船舶一級の免許取得が役に立ったこともあり(前出「諸状況」の内の浪人中に)、小型漁船を借りて操縦し現場に向かうこともありました(写真2)。北海道から沖縄の離島まで、漁師に怪しまれたり、極寒での採取(写真3)や船酔いなど冒険の域(危機一髪)になるような苦難も多々ありましたが、思い出せば楽しい野外研究でもありました。こんな事も許してくれた当時の相模中研の懐の深さには感謝するとともに、発明・発見はこんなところにあるのだと今更ながら認識しております。



写真1 船上でのサンプル解剖

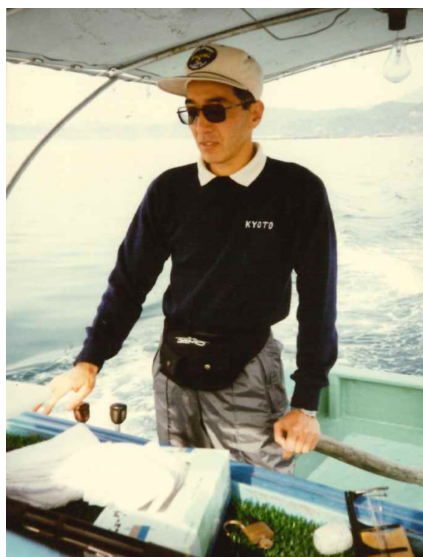


写真2 小型漁船を操縦してサンプル採取



写真3 極寒にて鮭採取現場（大型船）

このようなスクリーニングの連続の結果、筆者は開始1年目の1987年に、ビギナーズラックにてEPAをその体内に豊富に含有する青背の魚の腸内より、EPA産生菌（バクテリア）を世界で初めて発見することに成功しました。数種類の腸内細菌を取得しましたが、その中でも最もEPA生産能の高い *Shewanella putrefaciens* 類縁の新種海洋細菌 SCRC-2738 株（写真4 電子顕微鏡写真）を見出しました。研究成果の微生物やこれを用いたEPAなどの製造方法について、さまざまな特許出願をしました。「特許明細書」は特許部の指導を受けながら作成し、「特許請求の範囲」の内容は、微生物によるEPAの製造方法とEPA産生菌そのものがクレームとなっていると記憶しております（ノウハウとして秘匿したものもあります）。ところで、特許取得においては、微生物寄託が必須です。まずは凍結乾燥とグリセロールストック（グリスト）を作成して生育試験（バイアルを開封して生きていることの確認）をしました。確認した後に数本を当時の微工研の微生物寄託センター（現在は特許微生物寄託センター）に送るまたは持参（つくばには何回も足を運びました。おかげで担当者とも仲良くなった記憶があります。）しました。

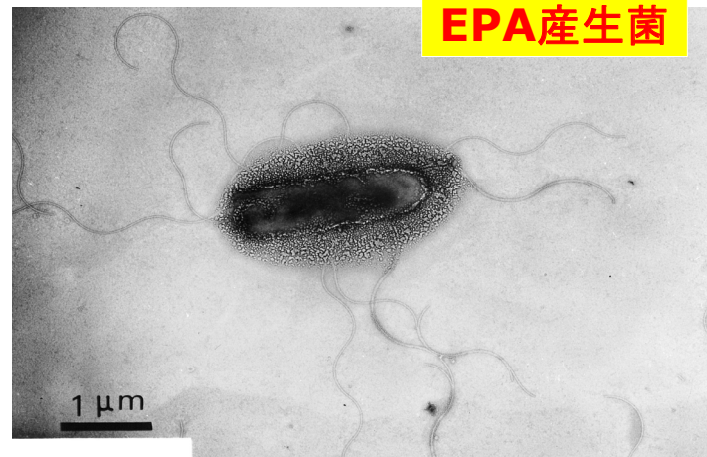


写真4 新種海洋細菌 SCRC-2738株

またこの菌は細胞膜として体内リン脂質の形態でEPAを含有し、培養条件により総脂肪酸中の18～40%をEPAが占め（図2 液クロ分析）、また高度不飽和脂肪酸としては唯一EPAのみを含有するという特徴を持つ新種の海洋細菌で、周毛性の鞭毛をもつグラム陰性細菌です（写真4. 電子顕微鏡写真）。

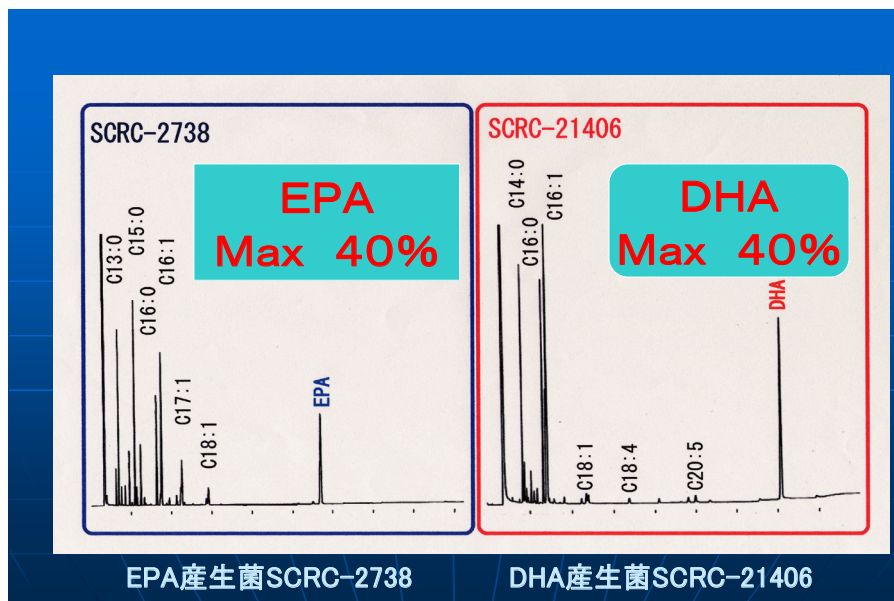


図2 海産動物腸内細菌の菌体脂肪酸分析

ここでは詳述しませんが（DHA産生菌のところで詳細説明）、スクリーニングや培地・培養方法には若干のノウハウがあり、そこまで到達するまでの試行錯誤は苦難であると同時に研究の楽しさでもありました。ここまでの研究成果は3報の学術論文となり、1989年東京大学農学部水産化学の分野で論文博士（農学博士）を取得することができました。このことは筆者のその後の人生の大きな転換となりました。

その後、筆者は本菌よりEPA生合成に関与する遺伝子群を含む約38 kbp のDNA断片をクローニングし、大腸菌においてEPA産生を発現させることに成功しました。また、全塩基配列の決定、5個のORFの存在の確認とホモロジー検索も終了しており、このことは本遺伝子群の多岐

にわたる応用が開けてきたことを意味します。すなわち、適当なベクターを用いることにより、脂肪酸を細胞膜リン脂質としてしか持ち得ない細菌（原核生物）よりも、多量の脂質をトリグリセライドとして菌体内に含有し得る真核生物においてEPA生産の可能性が出てきました。本技術は新規性が高いため特許となり海外出願も行いました（その後、諸事情により相模中研は米国企業に売却したようですが、その後の経過は不明です）。相模中研では、発明者は取得した特許を譲渡する契約になっており、その後の特許戦略は相模中研が主導で行います。したがって発明者の権利は当時は非常に低い立場だったと記憶しております。

特に真核生物である酵母や糸状菌のほか、微細藻類・藻類や高等植物への遺伝子導入によりEPA生産性の向上をはかり、また全く新しいタイプの食品開発も考えられます（図3）。現在ではEPAを含有するGMO菜種（カノーラ）も存在するようになってきました（筆者の特許技術が一部でも使われているとすれば本望です）。豪州・米国・カナダでは商業栽培・利用が認可済みですが、EU・日本では遺伝子組換え作物（GMO）規制が厳しいため食品利用は限定的であり、ただし飼料や輸入油脂原料としては議論が進んでいる段階と認識しています。

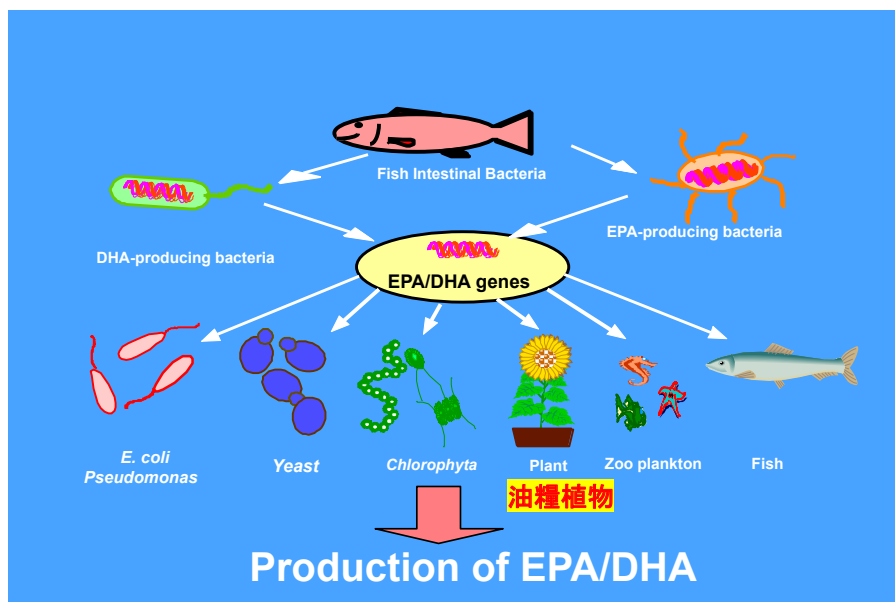


図3 EPA・DHA生合成遺伝子群の利用と開発

6. DHAの微生物生産

一方、現在のDHA供給源は主として魚油（マグロ・カツオが主）ですが、将来の需要拡大と安定供給に対応するため、他のDHA生産源が検討されています。海産魚介類はEPAだけでなくDHAも大量に持つものが多く、上記の延長線にはDHAを大量に生産する海洋細菌の存在も考えていましたが、DHA産生菌に関する報告はありませんでした。筆者はEPA産生菌のスクリーニングで集積された知見と技術に基づき、常温常圧培養で高いDHA生産性を有する海洋細菌のスクリーニングを行いました。対象とした菌株数は14年の歳月をかけ約40,000株を超える多数の魚の腸内細菌であり、EPA産生菌の発見以来懲りずに「微生物ハンター」を続け、10年後の1987年になって富山湾沖で捕獲した海洋性深海魚ニギスの腸内細菌からDHAを大量に生産する海洋細菌を世界で初めて取得することに成功しました（図2、写真4）。以下、このDHA産生菌の同定、増殖、脂質、DHA生産性などについて詳細ノウハウを概説します。

7. DHA産生菌の同定と分類

海産魚介類を主な対象としてそれらの消化管内容物を採取し、滅菌海水で10倍ずつ段階的に希釈して分離用の寒天培地に播き、4℃で培養しました。富山湾で捕獲された深海性のニギスの腸内細菌からDHA産生能を有する菌株、SCRC-21406株と21416株を分離しました。より高い生産性を有するSCRC-21406株を選択し、生産する脂肪酸分析を行いました。硝酸銀処理シリカゲルTLCで精製して¹H-NMR分析を行い、さらにピロリジド誘導体に変換して質量分析とIR分析を実施しました。その結果、この脂肪酸がドコサヘキサエン酸(22:6 n-3、DHA)であることを確認しました。

SCRC-21406株と21416株は、グラム染色と電子顕微鏡像観察によって一本極鞭毛を有するグラム陰性桿菌であることがわかりました。The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB、英国)に菌株同定を依頼した結果、NCIMBで行われた約50項目の生化学的性状試験のデータおよび形態学的観察から、分類学上、SCRC-21406株は深海性好圧菌 *Shewanella benthica* に類縁の新種(写真5 電子顕微鏡写真)、SCRC-21416株は *Pseudoalteromonas* 属の新種であると同定されました。

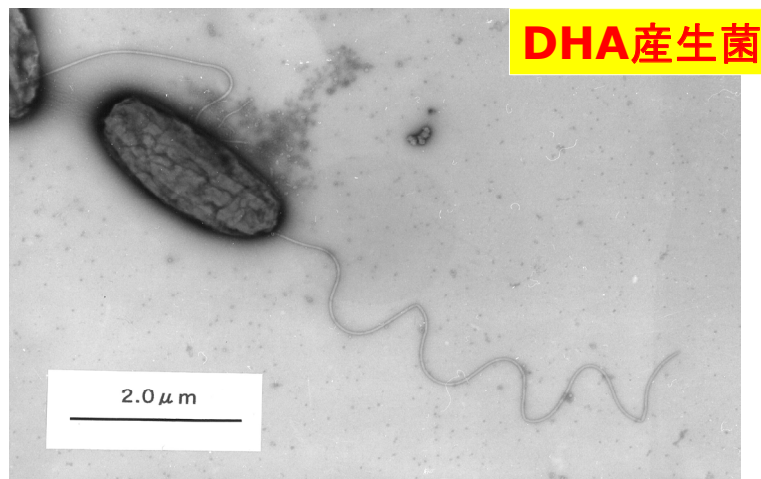


写真5 新種海洋細菌 SCRC-21406株

8. DHA産生菌の培養条件

培養はK28培地(ペプトン0.5%、酵母エキス0.1%、人工海水50%、pH 7.0) 100 mLを500 mLのコブ付き三角フラスコに入れ、4~16℃の振盪条件下で行いました。SCRC-21406株と21416株の増殖を調べたところ、両菌株とも20℃以上では生育しませんでした。生育温度範囲では菌体密度はほぼ30時間で定常期に達しました。pH 6~9で生育し、至適pHは8.0付近でした。またNaCl要求性であることから海洋起源の細菌であることが確認できました。常圧でも培養可能であったことは幸運でした。

9. DHA産生菌の脂質・脂肪酸組成の特徴

SCRC-21406株の菌体脂質をFolchの方法に従って抽出しました。シリカゲルTLCに総脂質を展開してヨウ素、ディットマー試薬、ニンヒドリンで発色させました。ヨウ素発色では3つの大きなスポットと小さな1つのスポットが検出されました。Rf値の大きなスポットはホスファチジルエタノールアミン (PE) 標品に近く、小さなスポットを含む残りの2つはホスファチジルグリセロール (PG) 標品に近い位置でした。これらはディットマー試薬でも発色しました。ニンヒドリンに発色したのはRf値の大きな2つのスポットだけでした。これらの脂質をシリカゲルTLCからかき取り、¹H-NMR分析を行った結果、Rf値の大きな2つのスポットはPE、Rf値の小さなスポットはPGと一致しました。PE、PGがシリカゲルTLC上でさらに2つに分かれたのは、各々の分子種、すなわちアシル基の炭素鎖長と不飽和度の違いによるものです。両リン脂質はシリカゲルTLCによって分画し、以後の分析に用いました。

SCRC-21406株の総脂質とPE、PGの構成脂肪酸メチルエステルを上述の塩酸メタノール法で調製し、GLC分析を行いました。K28培地 (pH 8.0) を用いた12°C培養では、DHAは菌体総脂肪酸の23%、PE構成脂肪酸の18%、PG構成脂肪酸の47%でした。PE / PGのモル比は約4でした。両リン脂質の脂肪酸分子内分布を調べるため、PEとPGのアシル基をブタ膵臓由来PLA 2で加水分解し、生成した遊離酸とリゾリン脂質をシリカゲルTLCで分画して各々の脂肪酸組成を分析しました。その結果、DHAはPE、PGともにsn-2位に局在していました。

10. Marine Genome (EPA・DHA遺伝子) の応用

本菌はDHAをリン脂質として生産しますが、筆者はDHA含有リン脂質がDHAトリグリセリドよりも優れた血中脂質改善作用を有することを明らかにしており、DHAリン脂質は吸収性などの優位点からDHAトリグリセリドに勝る生理活性が期待できると考えています。

さらに、DHA合成遺伝子群の取得と塩基配列の決定に成功し、大腸菌変異株にDHAを産生させることができました。このようにEPA合成遺伝子群やDHA合成遺伝子群等のMarine Genomeを他種微生物で発現させる基礎的研究はほぼ終了しており、今後は本遺伝子群の生理活性物質生産や予防医学的生理活性脂肪酸の大量生産のためのさらなる技術開発、食用・飼料用への応用、そして植物・野菜・穀物等一般食品での応用等が重要であると考えます (前述：図3)。

11. 「微生物ハンター」から変身? : EPA・DHAの予防医学的機能性の研究

1) EPAの機能性

「魚食」や「魚油摂取」に関する疫学調査は1970年代初期のイヌイット研究以来、枚挙に暇がないほどありますが、その成分であるEPAとDHAの研究にはその後20年が費やされてきました。疫学研究より推測されたEPAの抗血栓・抗動脈硬化作用のメカニズムを明らかにするために、高純度EPAエチルエステルを健常人および種々の血栓症を起こしやすいと考えられている疾患 (虚血性心疾患、動脈硬化症、糖尿病、高脂血症) 患者に投与し、血小板および赤血球機能や血清脂質に与える影響が検討されました。

その結果、EPA投与によりヒト血小板膜リン脂質脂肪酸組成、血小板エイコサノイド代謝および血管壁プロスタグランジンI産生が変動し、血小板凝集抑制作用が見られました。また、EPAは赤血球膜リン脂質に取り込まれ、その化学構造に由来する物理化学的性状から赤血球膜

の流動性が増し、すなわち赤血球変形能が増加することにより血栓症の予防に役立っていることが推測されました。さらに、血清トリアシルグリセロール値の低下がみられました。つまり、高純度EPAエチルエステルは高脂血症患者の血清脂質の改善、各種血栓性疾患での昂進した血小板凝集の是正、血栓性動脈硬化性疾患の臨床症状の改善に寄与することが推定されました。

このように先行したEPAに関する研究・開発の結果、1990年に我が国で世界に先がけて高純度EPAエチルエステルが「閉塞性動脈硬化症」を適応症とした医薬品として上市され、さらに1994年には中性脂肪低下作用から「脂質低下剤」として薬効拡大の申請が認可されており、以来20年以上にわたり臨床医からは副作用の少ない使いやすい医薬品であるとの評価を得ています。その後、ジェネリックの出現とスイッチOTCへの移行（2012年）などによりEPA市場は拡大の一途です（前述）。

なお、2004年には中性脂肪の低下作用が認められ特定保健用食品（トクホ）に認可され、2015年の機能性表示食品にも登録（消費者庁）されています。

2) マグロの眼窩脂肪にDHAが高含有の発見、DHA研究が始まる

1990年に「マグロの目」の裏にある眼窩脂肪にDHAがこれまでになく高含有されていることの発見は筆者が行いました。偶然の発見でしたが、そこから「微生物ハンター」を継続しつつ少し脇道に逸れた研究を開始しました。DHA産生菌の大量培養はコスト的に合わず苦慮していた時の思わぬフロックでしたが、この発見が日本のDHA研究の発展やビジネス上DHA油開発への応用となり、今日でも大きなシェアを有する ω 3脂肪酸の機能性食品やサプリメントに発展しました。

この発見は「製法特許」になり得ると考えて特許出願と審査請求も行いました。しかしながら、期限ぎりぎりである水産研究機関の年次報告書に、マグロ各部位の分析結果の中で眼窩脂肪の脂肪酸分析にてDHAが多いというデータがあったことを審査官に指摘され、新規性がないと判断されました。何も有用性を考えていない単なる分析データが存在したことにより、新規性がなくなり筆者は大きな残念感を抱いたことを記憶しています。しかしながら気を取り直して精製したDHAを多くの研究者に使っていただき、その後1990年以降に非常に重要な研究成果が多数得られるようになりました。筆者も動物実験や臨床実験の共同研究にてDHAの機能性を実証することができ、DHAの知名度が急激に高まった時代となりました。

3) DHAの中樞神経系作用

DHAは ω 3系の炭素数22、不飽和結合6か所を有する高度不飽和脂肪酸の一種であり、EPA同様、化学的な合成による量産は不可能です。また上述のように微生物発酵による生産もコストに合いません。DHAは、ヒトにおいて脳灰白質部、網膜、神経、心臓、精子、母乳中に多く含まれて局在していることが知られており、何らかの重要な働きをしていると予想されていました。

記憶学習能に関する報告として、論文においてはアルツハイマー病で死亡した人（平均年齢80歳）と他の疾患で死亡した人（平均年齢79歳）の脳リン脂質中のDHAを比較した結果、脳の各部位、特に記憶に関与しているといわれている海馬において、アルツハイマー病の人ではDHAが1/2以下に減少していることが報告されました。さらに、300名の未熟児に対し7～8歳時の知能指数（IQ）を調べ、DHAを含む母乳を与えられたグループに比較して、DHAを含まない人工乳を与えられたグループではIQがおよそ10低いことも報告されました。脳血管性認知症や多発梗塞性認知症のモデルラットを用いて、DHAの投与による一過性の脳虚血により誘発される空

間認知障害の回復を明らかにし、海馬の低酸素による細胞障害（遅発性神経細胞壊死）や脳機能障害の予防を示唆されました。このことは具体的な疾患に対するDHAの治療効果がある程度予測させるものと考えます。その他、栄養学的にDHA食を与えた動物では記憶・学習能力が高いという実験成績は多くの研究機関から報告されています。

一方、ヒトへの少数臨床試験として、筆者らの共同研究により、軽度老人性認知症の改善効果が得られました。カプセルタイプを1日当たりDHAとして700～1400 mg、6か月間投与した結果、脳血管性認知症13例中10例に、またアルツハイマー型認知症5例中全例に「やや改善」以上の効果が見られ、その精神神経症状における意思の伝達、意欲・発動性の向上、せん妄、徘徊、うつ状態、歩行障害の改善が認められました。さらに翌年、筆者らの共同研究において、軽度脳血管性認知症患者へのDHAカプセル投与による改善効果に関し、統計処理上有意な有効性を示しました。そのメカニズムについても推論し、DHA投与群における赤血球変形能および全血粘度に統計的に有意な改善がみられ、脳の微小血管における血行改善が示唆されました。

以上のような初期のヒト試験からも、ヒトもDHAを摂取することで記憶学習能力の向上が図れる可能性が高いことを、世界に先駆けて解明してきたと考えます。なお、 ω 3系脂肪酸のなかで血液脳関門を通過できるのはDHAのみであり、その作用機序の一つとして、細胞膜リン脂質にDHAが取り込まれた細胞の膜流動性が高まり、そのため神経細胞の活性化や神経伝達物質の伝達性が向上すると推定されました。

網膜細胞に存在するDHAは脂肪酸中の50%以上にも上り、脳神経細胞中を凌ぐことはよく知られている事実ですが、その機能と作用メカニズムにはまだ不明な点も多いです。ERG (electroretinogram；網膜の活動電位を描写したもの) 波形のa波およびb波に関して81名の未熟児を調査し、その網膜機能を検討した結果、母乳あるいは魚油添加人工乳を与えた場合に比較して植物油添加人工乳を与えた場合では、正常な網膜機能が低下していることが報告されました。 ω 3系脂肪酸欠乏ラットではERG波形のa波およびb波に異常が見られること、また異常が見られた赤毛猿では ω 3系脂肪酸欠乏食を解除しても元に戻らない等の事実から、未熟児における ω 3系脂肪酸の必要性が示唆されました。

未熟児の視力発達および認識力における ω 3系脂肪酸の重要性が検討され、DHA 0.1%、EPA 0.03%を含む調整粉乳を与えた場合では、視力と認識力が向上しました。一方、母乳または市販粉乳で生育した未熟児の血中リン脂質中の脂肪酸を分析し、2週間および8週間後のDHAとアラキドン酸含有量は母乳児で有意に高値を示すことが報告されました。このことは、少なくとも生後2か月のうちにDHAとアラキドン酸が必要であり、未熟児の期間だけではなく正常に成長を示す乳幼児にも両者が必要であることを示唆します。このような研究結果により日本ではHAD入りの調整粉乳の開発が行われ、現在では世界中の粉ミルクにはすべてDHAが強化されています。

これらを総合的に考えると、神経系や視力の適正な発達にとってDHAが必須であり、未熟児だけでなく正常に成長している乳幼児にも有効であることが強く示唆されます。以上のように、DHAは脳や神経の発達する時期の栄養補給にとどまらず、広く幼児期から高年齢層の脳や網膜の機能向上にも役立つとの期待が持たれます。すなわち現代および未来においても、極めて重大な社会問題として提起されている老人性認知症・アルツハイマー病の予防や改善に必要な「ブレインフード」の代表として評価すべき栄養素と考えられます（図4）。

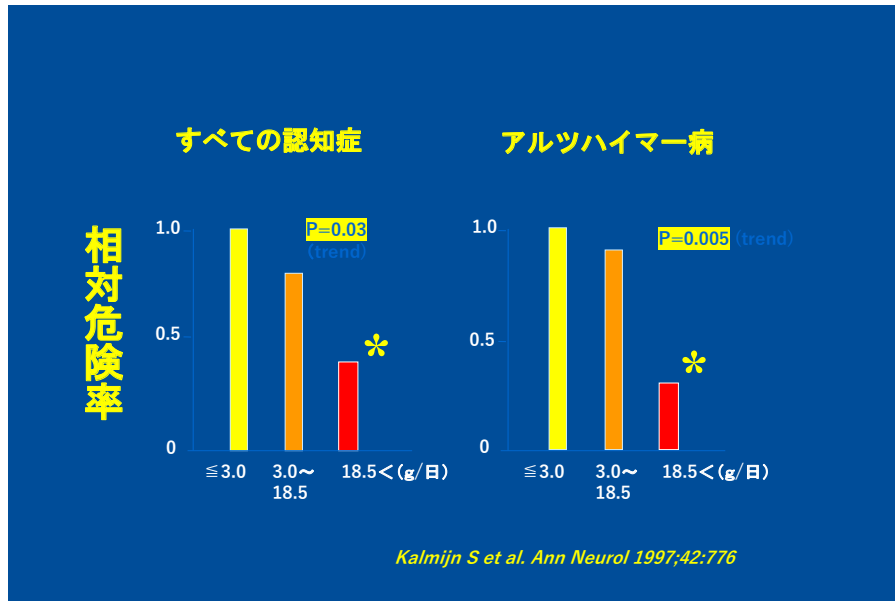


図4 魚食で認知症予防

4) DHAのその他の薬理作用と予防医学

筆者らは、DHAがPAF（血小板活性化因子）産生を抑制していること、またリン脂質に結合したDHAが細胞性ホスホリパーゼA2を阻害することから、アレルギーや炎症のDHAによる抑制の作用機序の一端を証明しました。DHAの炎症性疾患に対する臨床成績として、アトピー性皮膚炎の改善や乾癬の改善が報告されています。オメガ3系高度不飽和脂肪酸としてDHA、EPA、ALA（ α -リノレン酸）の3種での投与効果の比較を行いました。その結果、血漿中および肝臓中の脂質を測定したところ、DHA投与により、血漿コレステロールおよび肝臓コレステロールと中性脂肪はEPAやALA投与群ラットと比較して低値を示しました。また、SHRラット（遺伝性高血圧ラット）を用いた実験においても、上記3種の脂肪酸のうちDHAのみが血圧上昇を抑制しました。

著者らは国立ガンセンター研究所と大腸発がんに対するDHAの抑制作用について検討しました。発がん物質であるジメチルヒドラジンの皮下投与ラットにDHAエチルエステル（純度97%）の胃内投与を行いました。その結果、ラット1匹当たりの病巣の数と消化管部位異常腺窩の数、および1病巣当たりの平均異常腺窩数はDHAエチルエステル投与によりいずれも有意に低下しました。これらの結果から、DHAは前がん状態である異常腺窩を抑制し、発がんを抑制（発がん予防）することが示唆されました。その他では、網膜機能の改善、細胞膜流動性と膜酵素およびレセプターの活性化、ペルオキシソーム症の治療など、重要な薬理活性が現象面で得られています。

5) DHAは予防医学的健康栄養素

以上のように、多岐にわたる薬理活性を有するEPA・DHAは、通常の食生活の中に取り入れることにより多くの疾病の予防に役立つ予防医学的健康栄養素、すなわちヘルスフードであると位置づけられます。悪くなってしまったものをリスクの多い医薬品で治療するよりも、悪くなる前から予防する、あるいは悪くなる時期を遅らせるような機能を有する、医療費のリデュースングファクターとしての予防医学的食品が今後より重要になると考えます。特定保健用食品や機能性表示食品としてEPA、DHAは既に大きなマーケットを形成しており、より広範囲に予防医学

上の貢献をしていると考えられます。

11. 今後のバイオテクノロジーへの期待は・・・

世界中の微生物や天然物には、無尽蔵の宝がまだ眠っていると思っており、この生命科学の分野にて多くのヒトに役に立つ仕事が残っていると考えています。多くの若手研究者には、「自然界にお願いして叶えられないことは無い」ことを実証して頂きたいと、心から期待をしています。

ちなみに・・・タイトルのところの顔写真は「全球入魂」という色紙をバックにしたものです。語源は矢澤が考えた言葉ですが、一球に魂を込めるだけではなく、全ての球に全力を尽くすという自分への戒めであり、また人生目標でもあります。

付録：

① DHAが安価に利活用できるようになったこと

「マグロの目の裏にDHAが多い」という発見（1990年）により、食品廃棄物であったマグロやカツオの頭には目の裏の眼窩脂肪が豊富にあり、その中には高価（当時100 mgで1万円）なDHAが30%以上も含まれていることを見出しました。これは微生物発酵よりも効率良く、極めて安価に生産できることがわかりました。これが現在のDHAサプリメント開発につながりました。この原料をもとにサプリメントや他の機能性食品が開発され、今日まで最も知名度の高い素材としてブームが継続しており、機能性食品素材の中で最も論文数の多いエビデンスの高い素材として今日に至っています。「DHA卵」などの全く新しい食材の開発も行いました。

この1990年には「魚を食べると頭が良くなる」という水産庁のキャッチコピーや「おさかな天国」という歌がスーパーマーケットに流れ（これも魚食普及の水産庁の仕掛け）、また英国のマイケル・クロフォード博士を招聘しての「DHA国際会議」の開催も企画され、産業界ではDHAサプリメントの急速なマーケット展開も活発となりました。産・官・学が一体となったDHAの広報活動もあって知名度が上がり、国民のDHAブームが盛り上がった時期でもありました。さらにDHAの上述のような健康機能の研究開発により、業界では一過性のブームではなく、その後の25年間は拡大の一途となっています。

ちなみに、前述のDHA強化粉ミルクについての経緯を概説します。牛乳には元々DHAとEPAは含まれませんが、DHAは乳児の脳・神経系の発達には必須です。したがって牛乳由来の粉ミルクにはDHA強化が強く推奨されていますがEPAは母乳にも極わずかであることなどから推奨されていません。魚油に通常EPAもDHAも含まれますが、ほとんどの魚油はEPAが主です。イワシ魚油はEPAが多いために前述のEPA製剤の原料として使用されています。母乳に近づけるためにはDHAの組成の高い魚油が求められていましたが、1990年発見のマグロ眼窩脂肪（後にカツオ頭）はDHA：EPAが約5：1であり、魚油の中では最も母乳（5：1～10：1）に近い組成であることから、粉ミルクへのDHA強化が可能になりました。他国ではマグロ油やカツオ油はありませんので、日本の独壇場でした。DHA油の開発が世界を変えたとも言えます。

② 「〇〇ハンター」研究と学生教育について

2002年から東京海洋大学（前・東京水産大学）に12年間、その後2014年から早稲田大学に11年間留任しており、その間、微生物に限らず多くの天然物起源となる機能性成分の探索を続けてきました（広く「機能性成分ハンター」）。東京海洋大学時代の卒業生は、修士60余名と博士5名を世に送り出しました。現在もほとんどが主に食品企業において活躍してくれています。

東京海洋大学での研究手法は、学生各人が思い思いの天然物由来の試験サンプルから得られた抽出物（エキス）を用い、動物実験にてその機能性を検討するところから始まります。試験サンプルとは、日本各地に飛び出てその地方に特有の植物（海藻を含む）をサンプリングすることで得ます（学生はそれを楽しみにしています）。そして抽出エキスをマウスに経口投与して機能性を検討します。実験マウスは約10種類の病態モデル（血中コレステロール値上昇抑制、血中中性脂肪値上昇抑制、体脂肪蓄積抑制、血糖値上昇抑制、肝障害抑制、骨量減少抑制、関節炎抑制、持久力増強、血圧調整、抗酸化など）を研究室として保有しており、学生たちはそのどれかの動物実験系の技術を研修・習得し、自分の採取してきたサンプルをアッセイにかけます。スクリーニングの常として、そう簡単にはヒットしませんが、時にはビギナーズラックもあり、運が左右することもあります。しかしながら、特徴ある発想ともっばら「くじけない努力」が最後はものを言うことになります。

スクリーニング対象については、ある学生たちは植物の葉に注目し、比較的ヒットが多かったです。モミジの葉の糖尿病予防効果で学位を取得し、卒業後に起業して成功している教え子もいます。また、植物の葉以外にも野菜、果実、果実の皮（廃棄物）、花、根、生薬（食薬区分にて食に該当するもの）、ハーブ類（香辛料素材）、茸、微細藻類など様々であり、変わった学生は昆虫にも注目していました。

これらのスクリーニングでヒットしただけでは修士論文・博士論文はできません。この間に成分の探索（単離精製・構造決定）も行います。天然物化学の他大学の友人の教授方には多くのご指導を仰ぎました。さらに作用機作を検討するために、細胞レベル、酵素レベルでの *in vitro* 試験を行うことも必須です。すなわち、生理活性機能（*in vivo*）・成分の単離精製と構造決定・作用メカニズム（*in vitro*）の3点セットが論文には必要となります。研究途中で卒業する学生も多いのですが、目指すところは3点セットであり、学生たちの努力も想像に難くありません。大変な努力の後には達成感というご褒美もあります。

重要なことは、新規性が見いだされれば、筆者の研究室では特許出願を行うことが義務付けられている点です。多くは用途特許ですが、製法特許や物質特許となり得る新規性・進歩性を見出すこともありました。学生たちには特許出願に必要な明細書の書き方を教えてきました（慣れれば容易です）。12年間に特許出願した特許は100件を超えており、全て学生が一度は発明者となり、自分で書いた願書や明細書を特許庁の窓口を持って行かせました。幸い(?) 大学側は権利を承継しないことがほとんどであるため、特許を受ける権利は発明者の個人に帰属し、発明者の責任で出願することになります（出願費用は教授（私）のお財布からです）。特許出願した段階で収入となるケースは少ないですが、発明者である学生の年間授業料が軽く出たレアなケースもあり、また商品化されたケースもあります。そして、学生たちは特許出願後によりやく学会発表・論文投稿ができることになります。

このような研究指導をしてきましたが、その間には多くの企業からの持ち込みサンプルの検討も行い、共同研究も数多く行ってきました。学生たちの研究内容は、すべて何らかの健康機能を考えて基礎研究になりますが、それらを本当にヒトの役に立つ価値に高め、探索研究を応用研究にまでつなげる考えが必要です。その目標は「機能性食品による予防医学」に尽きます。

「好奇心が重要である」ことは研究の原点です。「ヒトに喜びをもたらす事に喜びを見いだせる」のは開発の原点・醍醐味であり、私もずっと学生たちに「ナンバーワンでなくてもオンリーワンのたれ」と伝えてきました。

フロック（正しくは fluke）とは、玉突き競技のまぐれ当たりを語源とするようですが、前述したスクリーニングでのビギナーズラックは、偶然ではなく「好奇心・観察」なくして発生しな

いのではないかと考えています。スクリーニングを行う秘訣は継続することにあると思います、ネクラには不向きで「ネアカ」であることが重要な資質であると考えています。今日はダメだったが、明日にはきっと見つかるという前向きな思いをどれだけ継続できるかが鍵となります。継続へのモチベーションは情熱であり、好奇心であると考えています。また自分の「感性」を信じる事でもあると考えています。

③ やり残した研究の夢

「龍涎香」(りゅうぜんこう、Ambergris)は、その希少性と独特の香りから、世界各地で珍重され、数々の歴史的エピソードを生んできました。『千夜一夜物語 (アラビアンナイト)』にも登場し、物語の中で「宝物」や「珍しい香料」として記述され、王侯が好む貴重な品として描かれています。また薬用としての利用では、アラビアの医学書(イブン・シーナー『医学典範』など)には、強壯剤や媚薬としての処方記録されています。中世ヨーロッパの万能薬として14~16世紀のヨーロッパでは、龍涎香を「解毒剤」「強壯剤」「媚薬」と信じ、王侯貴族は粉末にしてワインに混ぜたり、砂糖菓子にまぶして食べた記録されています。またナポレオン・ボナパルトは龍涎香をこよなく愛し、常にポケットに小さな塊を入れて香りを嗅いでいたと言われていました。これは「精神を集中させ、活力を与える」と信じられていたためです。中国の皇帝たちでは、明・清の時代、龍涎香は「海から得られる神秘の宝」とされ、宮廷で香として焚かれたり、薬用として珍重されました。では日本ではどうかと言えば、平安時代以降、香木や沈香と並んで「妙香」として珍重され、香道の世界で特別な位置を占めました。江戸時代には将軍家や大名が献上品として用いた記録もあります。この龍涎香、マッコウクジラの腸内で生成される希少で高価な天然物質であることが分かっています。主成分はアンブレイン(Ambrein)というトリテルペンアルコールであり、ワックス状の塊となり、海に浮かんで熟成すると言われております。比重が軽いので海をぶかぶか浮かんでいるのを発見される訳です。またこの塊にはイカのくちばしがしばしば入っているようです。極めて稀にしか得られない(マッコウクジラのごく一部しか産生しない)ため、「海の宝石」とも呼ばれ、市場価格は非常に高く、品質によっては数百万円~数千万円の価値がつくことがあるとの事です。捕鯨船団のワッチは鯨よりも龍涎香を見つけたことにも集中しているかも知れません。

このような情報から、筆者は「龍涎香はマッコウクジラの腸内細菌がイカを食べた時の腸内発酵産物である」と推測しております。すなわち腸内細菌にテルペンを産生する菌が存在するという仮説です。実験としては、イカのエキスを培地としてマッコウクジラの腸内細菌で培養すれば良い香りが出てくるかも知れません。高価な天然の香料・機能性成分を大量に生産できる可能性があります。

筆者も計画したこともありましたが、マッコウクジラの腸内細菌の入手が出来ずに断念しました。こんな研究に興味があれば是非どなたか研究を進めて頂けることが夢でもあります。

参考資料

- 1) 鈴木修: γ -リノレン酸の微生物生産, 発酵と工業, 43, 1024 (1985)
- 3) Iizuka Hiroshi, T.Ohtomo. & K. Yoshida: Production of Arachidonic Acid by a Hydrocarbon-Utilizing Strain of *Penicillium cyaneum*., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*,7, 173 (1979)
- 4) Hideaki Yamada, Sakayu Shimizu, Yoshinori shinmen, H.Kawashima & Kengo Akimoto: Production of Arachidonic Acid and Eicosapentaenoic Acid by Microorganisms., *Proceedings of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry*, 173 (1988)

- 5) Kenichi Higashiyama, Toshiaki Yaguchi, Kengo Akimoto, Shigeaki Fujikawa, and Sakayu Shimizu : Enhancement of Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina* 1S-4, JAOCS, Vol.75, no.11,1501-1505 (1998)
- 6) Kenichi Higashiyama, Toshiaki Yaguchi, Kengo Akimoto, Shigeaki Fujikawa, and Sakayu Shimizu : Effects of Mineral Addition on the Growth Morphology of and Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina* 1S-4, JAOCS, Vol.75, no.12 ,1815-1819 (1998)
- 7) Ency Y. Park, Yasuhisa Koike, Kehichi Higashiyama, Shigeaki Fujikawa and Mitsuyasu Okabe : Effect of Nitrogen Source on Mycelial Morphology and Arachidonic Acid Production in Cultures of *Mortierella alpina*, J. Biosci.Bioeng., Vol.88, No.1, 61-67 (1999)
- 8) Kenichi Higashiyama, Shigeaki Fujikawa, Ency Y. Park, and Mitsuyasu Okabe : Image Analysis of Morphological Change during Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina* 1S-4, J. Biosci.Bioeng.Vol.87, No.4, 489-494 (1999)
- 9) Kenichi Higashiyama, Katsushi Murakami, Hideo Tsujimura, Nobuya Matsumoto, Shigeaki Fujikawa : Effects of Dissolved Oxygen on the Morphology of an Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina* 1S-4, Biotechnology and Bioengineering, Vol.63, No.4, 442-448 (1998)
- 10) Sakayu Shimizu, Hiroshi Kawashima, Yoshinori shinmen, Kengo Akimoto and Hideaki Yamada : Production of Eicosapentaenoic acid by *Mortierella Fungi*, JAOCS, 65, 1455 (1988)
- 11) Sakayu Shimizu, Kengo Akimoto, Hiroshi Kawashimawa, Yoshinori shinmen and Hideaki Yamada. : Production of Dihomo-gammalinolenic Acid by *Mortierella alpina* 1S-4 JAOCS, 66, 237 (1989)
- 12) 野口泰久, 亀昌治, 岩本浩明 : 酵母による脂質生産に関する研究, 油化学, 31, 431 (1982)
- 13) 公開特許公報, 昭58-34114 (1983)
- 14) A. Sato, Wang,H.L. & Hesseltire,C.W. : Culture Conditions Affected Eicosapentaenoic Acid Content of *Chlorella minutissima*, JAOCS, 61, 892 (1984)
- 15) 瀬戸明, 北川清弘 : EPA含有クロレラの開発, フードケミカル, 10, 52 (1987)
- 16) 荒木繁, 鹿山光 : 総合脂質化学 ; 15 - 5 藻類の脂質, 795, 恒星社厚生閣 (1989)
- 17) 秦和彦 : 『水産学シリーズ96水産脂質 (藤本健四郎編)』, p.101 ~ 110, 恒星社厚生閣 (1993)
- 18) 遠藤将光ら : 脈管学, 32, 233 ~ 238 (1992)
- 19) Kazunaga Yazawa, Keiko Araki, Noriko Okazaki, Kazuo Watanabe, Chikako Ishikawa, Akira Inoue, Naganori Numao, Kiyoshi Kondo : Production of Eicosapentaenoic Acid by Marine Bacteria, J.Biochemistry, 103, 5 - 7 (1988)
- 20) Kazunaga Yazawa, Keiko Araki, Kazuo Watanabe, Chikako Ishikawa, Akira Inoue, Kiyoshi Kondo, Shugo Watabe and Kanehisa Hashimoto : Eicosapentaenoic Acid Productivity of the Bacteria Isolated from Fish Intestines, Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 1835 - 1838 (1988)
- 21) 矢澤一良 : 新種海洋細菌からのEPA生産、化学と工業, 41, 1137 - 1139 (1988)
- 22) 山田章子、渡部和郎、矢澤一良、加藤誠志、近藤聖 : EPA産生海洋細菌のEPA生合成系遺伝子のクローニングと解析、脂質生化学研究, 36, 417 - 420 (1994)
- 23) Haruko Takeyama, Daisuke Takeda, Kazunaga Yazawa, Akiko Yamada, and Tadashi Matsunaga : Expression of the eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster from *Shewanella* sp. in a transgenic marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp., Microbiology, 143, 2725-2731,(1997)
- 24) 宮永和夫, 米村公江, 高木正勝, 貴船亮, 岸芳正, 宮川富三雄, 矢澤一良, 城田陽子 : 痴呆

性疾患に対するDHAの臨床的検討、臨床医薬, 11, 881-901 (1995).

25) 寺野隆、藤代成一、山本恭平、伴俊明、野口義彦、田中知明、田村泰、平井愛山、平山登志夫、矢澤一良、齋藤康：痴呆高齢者に対するドコサヘキサエン酸 (DHA) 投与の効果、脂質生化学研究、38、308—311、(1996)

26) Mayumi Shikano, Yasuo Masuzawa, Kazunaga Yazawa, K.Takayama, Ichiro Kudo and Keizo Inoue : Complete discrimination of docosahexaenoate from adachidoonate by 85 kDa cytosolic phospholipase A 2 during the hydrolysis of diacyl-and alkenylacylglycerophoethanolamine, *Biochim.Biophys.Acta*,1212,211 - 216 (1994).

27) Ikuo Ikeda, K.Wakamatsu, A.Inayoshi, Katsumi Imaizumi, Michihiro Sugano and Kazunaga Yazawa : α -Linolenic, Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids Affect Lipid Metabolism Differently in Rats, *J.Nutr.*, 124,1898 - 1906 (1994).

28) Mami Takahashi, Toshinari Minamoto, Naoyuki Yamashita, Kazunaga Yazawa, Takashi Sugimura and Hiroyasu Esumi : Reduction in Formation and Growth of 1,2-Dimethylhydrazine-induced Aberrant Crypt Foci in Rat Colon by Docosahexaenoic Acid, *Cancer Research*, 53,2786-2789(1993)

29) 沢木啓祐、吉儀宏、中島宣行、佐渡一成、金井淳、矢澤一良：DHA摂取がスポーツ選手の動体視力に及ぼす効果、基礎と臨床, Vol. 31, NO.7, 241-247(1997)

30) 鈴木信雄、矢澤一良、渡部和郎、赤堀結花里、石川千夏子、近藤聖、高田清克：エイコサペンタエン酸産生細菌SCRC-2738の大量培養条件の検討、*Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 323 - 328 (1992).

31) Kazuo Watanabe, Keisuke Sezaki, Kazunaga Yazawa and A.Hino, : Nutritive Fortification of the Rotifer *Brachionus plicatilis* with Eicosapentaenoic Acid-producing Bacteria, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58 271 - 276 (1992).

32) Kazuo Watanabe, Chikako Ishikawa, Kazunaga Yazawa, Kiyoshi Kondo and Akihiko Kawaguchi, : Fatty acid and lipid composition of an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium, *J.Mar.Biotechnol.*, 4, 104 - 112 (1996).

33) 渡部和郎、石川千夏子、矢澤一良、近藤聖、川口昭彦：EPA産生海洋細菌の脂肪酸合成反応と鎖長延長反応の特性、脂質生化学研究, 35, 379 - 382 (1993).

34) Kazuo Watanabe, Kazunaga Yazawa, Kiyoshi Kondo, and Akihioko Kawaguchi : Fatty Acid Synthesis of an Eicosapentaenoic Acid-Producing Bacterium: De Novo Synthesis, Chain Elongation, and Desaturation Systems, *J.Biochem.* 122, 467-473 (1997)

35) Kazunaga Yazawa : Production of Eicosapentaenoic Acid from Marine Bacteria, *Lipids*, Vol.31, Supplement, S297-S300(1996)

36) Kazuo Watanabe, Chikako Ishikawa, Itsuko Ohtsuka, Masazumi Kamata, Miho Tomita, Kazunaga Yazawa, and Hiroshi Muramatsu : Lipid and Fatty Acid Compositions of a Novel Docosahexaenoic Acid-Producing Marine Bacterium, *Lipids*, Vol.32, no.9 (1997)

37) 矢澤一良、渡部和郎：海洋共生細菌によるドコサヘキサエン酸の生産、*New Food Industry*, Vol.39, NO.7 (1997)

39) Haruko Takeyama, Daisuke Takeda, Kazunaga Yazawa and Tadasi Matsunaga : Expressopn of the eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster from *Shewanella* sp. in a transgenic marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp., *Microbiology*, 143 2725-2731(1997)

40) James G. Metz, Paul Roessler, Daniel Facciotti, Charlene Levering, Franziska Dittrich, Michael Lassner, Ray Valentine, Kathrin Lardizabal, Frederic Domergue, Akiko Yamada, Kazunaga Yazawa, Vic Knauf and John Browse : Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Polyketide Synthases in Both Prokaryotes and Eukaryotes, Science, Vol.293, 290-292(2001)