

褐変しにくく、グリケーション能力はグルコースの2分の1であり、糖尿病軽減など生体にとって有用であると考えられる。タガトースの炭素原子は最終的には呼気中に二酸化炭素として排出されるので、この糖は吸収され幾分かは代謝される可能性を持っているとしている。

以上のようなことから、今後タガトースは低エネルギー性の糖質甘味料として、様々な料理に代替される可能性が高い。しかしその摂取による消化管への影響は詳細に明らかではない。そこで、本研究では、ヒトと同じく大腸発酵を主とするラットを用い、タガトースを糖質源として摂食させ、発酵特性について検討及び、血漿脂質の濃度測定や飼育中の体重変化や摂食量、排泄糞便量の観察を行い、生体内における、消化・吸収における影響についての検討を行った。

一方で、スクロースは小腸内でスクラーゼによってグルコースとフルクトースに分解された後に吸収される。このスクラーゼの作用を阻害するような食品素材があれば砂糖と混合することによって砂糖の吸収を抑制し、砂糖摂取過剰による肥満や糖尿病を予防できる可能性がある。実際に医薬品分野では、スクラーゼやマルターゼのような $\alpha$ -グルコシダーゼの強力な阻害剤であるアカルボース、ボグリボースなどは糖質の消化・吸収を抑制し、糖尿病治療薬として開発されている。スクラーゼの阻害剤に関してはグルコース、フルクトース以外にD-キシロース、L-アラビノースなどに阻害作用があることはすでに報告されている。また、本研究で用いたD-タガトースにおいても阻害作用があることが明らかとなっている。そこで、D-タガトースのスクラーゼ阻害作用に着目し、スクロースによる血糖値の上昇に及ぼす影響について検討した。

消化管への影響については、スクロース45%を含むAIN-93組成の試料により15日間飼育したところ、ほとんどの試験群ラットの体重は増加が認められたが、アカルボース群では変化しておらず、ひどい下痢の症状が認められた。一方、アラビノース群においても下痢便、タガトース15%群では軟便が認められた。この下痢は腸内容物による刺激によっておきたもので、消化不良性の下痢と考えられ、不消化物の摂取による腐敗や発酵により、腸管運動の亢進、腸液分泌過剰をきたし、下痢を生じたと考えられる。ラットの腎臓、腎臓周囲の背中側の脂肪の量、肝臓の湿重量を示し、それぞれ群ごとの比較では、腎臓ではほとんど変化は見られなかったが、脂肪についてはアカルボース群、アラビノース群でやせにより脂肪がほとんど見られなく、タガトース各群でもコントロール群に比べて若干減少した。肝臓では、アカルボース群、アラビノース群において著しい減少が見られた。脂肪がほとんどなかった原因として、アカルボース群、アラビノース群においては下痢便が激しく、エネルギー利用率が著しく少なかったためと考えられる。以上の結果より、タガトースについてはアカルボースやアラビノースに比べ、各臓器に対してほとんど影響がないのではないかと考えられる。盲腸内容物の重量については、コントロール群に比べて、水溶性の多い内容物であったアカルボース群、アラビノース群で著しい増加が認められた。タガトース各群では、コントロール群に比べて若干の増加が認められたが、ほぼ同じ量であった。乾燥糞の重量は、コントロール群に比べて各群とも増加が認められた。血清中のグルコース濃度については、アラビノース群において、有意な減少が認められたが、両タガトース群ではコントロールと比べ有意な差は認められなかった。タガトース5%、15%の摂取による、高血糖や低血糖などの症状は認められなかったため、連続摂取による血液中

のグルコース濃度についての影響はないと考えられる。アラビノース群において、有意な減少が認められたが、両タガトース群ではコントロールと比べ有意な差は認められなかった。タガトース 5%、15%の摂取による、高血糖や低血糖などの症状は認められなかったため、連続摂取による血液中のグルコース濃度についての影響はないと考えられる。コントロール群に比べ、どの群においても有意な低下が認められた。特にアカルボースや、アラビノース、タガトース 15%においては著しい低下が認められた。これは、エネルギー源として吸収されるはずの糖質が吸収されないことによるものと考えられる。しかしタガトース 5%群は、アカルボース及び、アラビノース群に比べ有意に高いことから、糖質のエネルギー利用はより行われているものと考えられる。盲腸内における腸内細菌による各群の発酵産物を見るため、短鎖脂肪酸をはじめとする有機酸分析を行った。コントロール群に比べ、アカルボース群、アラビノース群において乳酸が有意に増加し、酢酸、プロピオン酸、酪酸、コハク酸が有意に減少した。タガトース 5%群、タガトース 15%群においては各酢酸及び、コハク酸において有意な増加が認められた。アカルボース、アラビノース群において乳酸が著しく高い理由として、ひどい下痢便により盲腸内で異常発酵が起こっているためと考えられる。またタガトース群において、盲腸内容物の総量が多いのは、より大腸内での発酵が多かったためと考えられる。

糖負荷後 30 分における血漿中のグルコース濃度は、投与前の濃度を示しているコントロール群にくらべ、スクロース投与群、スクロース・タガトース同時投与群については有意に上昇が見られた。しかし、スクロース群にくらべ、同時投与群については上昇が有意に抑制された。以上より、タガトースのみの投与では血液中のグルコース濃度に影響は与えないと考えられる。しかし、スクロースと同時に投与することにより、グルコース濃度がスクロースのみ投与より有意に抑制されたことから、タガトースがスクラーゼ活性を阻害し、グルコースの吸収を抑制していると考えられる。タガトース投与による血漿中の各糖濃度は、グルコース濃度については、タガトースの投与による血液中のグルコース濃度の変化は認められなかった。また、スクロースと同時に投与することにより、15 分から 30 分におけるグルコース濃度の急激な上昇は抑えられているため、スクラーゼの活性を阻害していることが明らかとなった。血漿中のタガトース濃度については、タガトースが血液中に吸収されるということが明らかとなった。しかし、グルコースやフルクトースのように 15 分から 30 分における急激な上昇は見られず、時間とともに上昇していったことから、タガトースの吸収は穏やかであると考えられる。また、タガトースにスクロースが加わることで、さらにタガトースの吸収が穏やかになり、これより、スクロースによりタガトースの吸収が抑えられているとも考えられ、先の血漿中のグルコース濃度と合わせると、お互いがそれぞれの血液中への吸収を抑制していると考えられる。スクロース投与群における血漿中のフルクトース濃度については、血漿グルコース濃度の時と同じく、15 分から 30 分において急激に上昇した後減少した。しかし、スクロースにタガトースが加わることで、15 分から 30 分における急激な上昇は認められず、時間とともに緩やかに上昇していった。

以上より、スクロースと同時に投与することにより、15 分から 30 分におけるグルコース濃度の急激な上昇は抑えられているため、スクラーゼの活性を阻害していることが明らかとなった。

## 【要約】

従来から食品加工上の利便性以外に、肥満予防、糖尿病患者における耐糖能改善作用、便秘改善などの目的から、多くの新しい糖質甘味料が開発され、使用されはじめています。

本研究で扱ったD-タガトースは、チーズ製造時の副産物であるホエーに含まれている乳糖から作られた低エネルギー性の糖質甘味料である。甘味度は砂糖の92%で、エネルギーは砂糖の半分以下の、1.5 kcal/gである。また、実用化されてはいないが、今後過剰なエネルギー摂取を避けるための有効な手段として、様々な食品に代替されると考えられる。

しかし、タガトース摂取による、消化管機能への影響は詳細には明らかではない。そこでラットを用いて、タガトース摂取による大腸内発酵への影響、更にその生体利用について検討した。また、タガトースのスクラーゼ阻害作用に着目し、スクロースによる血糖値の上昇に及ぼす影響について検討した。

1. タガトース摂取は盲腸内発酵を亢進させるが、他の糖質消化酵素阻害物質に比較して、その作用は少ないと考えられる。
2. スクロースとタガトースを同時に摂取することによって血糖値の上昇は有意に抑制された。
3. 以上の結果より、低エネルギー性である新開発食品素材、D-タガトースの摂取は、少量では問題はないが比較的多量に摂取した場合に消化管機能への影響が明らかとなり、食品への利用については慎重な検討が必要であると考えられる。また、今回の実験結果はラットによる影響であり、今後ヒトを対象にした実験等を行うと同時に、更に詳しい検討が必要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) 藤巻正生 監修：食品機能—機能性食品創製の基盤—，学会出版センター（1988）
- 2) 日高秀昌，坂野好幸：糖と健康，学会出版センター，p44—50（1998）
- 3) Soga, T., Hewlett Packard Application Note, Publication Number 12-5965-5744E, (1996)
- 4) Heiger, D. N. and Weinberger, R., Detection of Small Ions by CZE with Indirect Photometric Detection, Hewlett—Packard Co., Publication Number 12-5963-1138E, (1994)
- 5) Applications of the HP<sup>3D</sup>CE system, Volumel, Hewlett—Packard Co., Publication Number 12-5962-6957E (1994)
- 6) Applications of the HP<sup>3D</sup>CE system, Volume2, Hewlett—Packard Co., Publication Number 12-5963-7140E (1995)
- 7) Jandik, P. and Bonn, G., Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions, VCH Publishers, Inc., New York (1993)
- 8) Waynforth, H. B. : Chronic indwelling catheters. In: Experimental and surgical Technique in the rat. p50-57, Academic Press Inc. (London) Ltd. (1980)
- 9) 浜野吉政, 百目鬼秀子, 鷹野重威, 阿部修三: りん酸—アニン法による糖分析の高速・

- 高感度化. 第33回液体クロマトグラフ研究会要旨集, p15-16 (1990)
- 10) 大嶋隆, 浜田茂幸: う蝕予防のための食品科学 (医歯薬出版, 東京) p4-35, p190-216 (1996)
  - 11) 奥恒行: 栄養学雑誌, 54, 143-150 (1996)
  - 12) 奥恒行: Health Digest, 11, No. 5, 1-8 (1996)
  - 13) 早川幸男 編著: 糖アルコールの新知識, 食品化学新聞社 (1996)
  - 14) 池田, 他: 口腔衛生学雑誌, 25 (3), 82 (1975)
  - 15) Sanai, K., Seri, K., Negishi, S. and Kurashima, K.: Jpn. J. Pharmacol., 61 (suppl.), 175 (1993)
  - 16) Seri, K., Sanai, K., Matsuo, N., Kawakubo, K., Xue, C. and Inoue, S.: Metabolism, 45, 1368 (1996)
  - 17) Cogoli, A. And Semenza, G.: J. Biol. Chem., 250, 7802 (1975)
  - 18) Semenza, G. and von Balthazar, A.-K.: Eur. J. Biochem., 41, 149 (1974)
  - 19) Bertelsen H, Jensen BB, Buemann B, World Rev. Nutr. Diet: 85:98-109 (1999)
  - 20) Buemann B, Toubro S, Astrup, : J. Nurt. Sep; 128 (9): 1481-1486 (1998)

## 「機能性脂肪酸含有食品素材の安全性及び有用性に関する研究」

分担研究者：静岡県立大学食品栄養科学部 合 田 敏 尚

### 【研究目的】

生活習慣病の発症を抑制するために脂肪の摂取量を過剰にしないことが薦められている一方で、不飽和脂肪酸のもつ遺伝子発現調節因子としての有用な機能も明らかにされている(1)。近年、脂質の組成あるいは構造に特徴を持たせた脂肪酸含有食品も開発され、その一部はすでに特定保健用食品として認可されている(ジアシルグリセロール)。本研究では、このような機能性脂肪酸含有食品を摂取した場合の安全性と有用性を評価することを目的とし、脂肪酸の種類によって特徴が見られる遺伝子発現因子としての有用性とその限界および安全性について小腸における消化・吸収機能の調節、脂肪組織における脂肪細胞の成熟・分化ならびに肝臓における脂肪酸分解系に対する影響の面から評価した。

遺伝子発現調節栄養因子としての脂肪酸の作用は、核内受容体型転写因子のひとつである PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) を介して多くの標的遺伝子の発現制御を行なうことで発揮されることが明らかにされつつある(2)。PPAR はある種の脂肪酸やその代謝産物であるエイコサノイドを直接的なリガンドとして結合することが報告されている一方、高脂血症治療薬であるフィブレート剤やII型糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導剤などもリガンドとして作用することが近年明らかにされ、幾つかの生活習慣病に対する臨床治療薬の開発の点でも注目されている(2,3)。これまで PPAR は3つのサブタイプ PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$  および PPAR $\gamma$  の存在が報告されており、それぞれ組織発現性やリガンド応答性などが異なることからそれぞれ異なる機能を有するものと考えられる。このことは、最近相次いで作製された PPAR 各サブタイプの遺伝子欠損マウスを用いた研究報告(4-6)からも明らかになりつつある。

自然界には様々な種類の脂肪酸が存在し、そのうちの幾つかは動物の体内において糖質などからも *de novo* 合成されるが、その他の合成できない多くの多価不飽和脂肪酸などは必須脂肪酸と呼ばれ食餌から摂取する必要がある。そのため、生体内における PPAR を介した様々な生理現象も食餌から摂取される脂肪酸の種類によって大きく影響を受けるものと考えられる。これまで PPAR は特に脂肪酸をはじめ、コレステロール、ビタミン A など多くの脂質代謝に関連した遺伝子の発現制御に関与していることが報告されている(2)が、実際に食餌から摂取した脂肪酸がそれらの遺伝子発現にどのように影響を及ぼすかはあまり報告されていない。本研究では実験1としてラットに脂肪酸組成の異なる各種高脂肪食を摂取させ、脂質代謝の主要な組織である小腸、肝臓および白色脂肪組織における PPAR およびその標的遺伝子発現量への影響を調べた。また、実験2では、PPAR $\alpha$  の活性化作用が強いと考えられるアラキドン酸に着目し、食事中的脂肪酸のうちアラキドン酸含量だけを変えた食餌を摂取したときの影響についても検討した。また、実験3では各種脂肪酸の PPAR $\alpha$  に対するリガンド応答性について *in vitro* の実験系により検討した。

## 【実験方法】

### 動物の飼育

(実験1) 6週齢SD系雄ラット(浜松SLCより購入)を5群に分け、それぞれ低脂肪食(2.4%コーン油)、飽和脂肪酸食(24.7%パーム油)、一価不飽和脂肪酸食(24.7%オリーブ油食)、n-6系多価不飽和脂肪酸食(24.7%コーン油)およびn-3系多価不飽和脂肪酸食(アマニ油)それぞれ2週間摂取させた(Table 1)。食餌は一日の摂取エネルギーが各食餌群間で同じになるように摂取量を調整し(pair-feeding)、その摂取量よび体重について毎日測定を行なった。Table 1 および Table 2 にそれぞれ食餌組成および脂肪酸組成を示した。

Table 1 飼料の組成 (実験1)

Ingredient	Low-fat	SFA	MUFA	PUFA(n-6)	PUFA(n-3)
	g/Kg diet				
Vitamin-free casein	157	159	159	159	159
β-Corn starch	526	36	36	36	36
FAT	Corn oil			247	
	Palm oil	24	247		
	Olive oil		247		
	Linseed oil				247
AIN-76 Mineral mix	28	28	28	28	28
AIN-76 Vitamin mix	8	8	8	8	8
DL-Methionine	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
Choline bitartrate	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
2% Agar	254	518	518	518	518

SFA: saturated fatty acid, MUFA: mono-unsaturated fatty acid, PUFA: poly-unsaturated fatty acid

Table 2 飼料に油脂の脂肪酸組成 (実験1)

Fatty acid (weight %)	Palm	Olive	Corn	Linseed
Lauric	0.18	0.00	0.00	0.00
Myristic	0.80	0.00	0.00	0.00
Palmitic	38.65	8.21	8.83	4.85
Palmitoleic	0.16	0.50	0.00	0.00
Stearic	4.69	3.39	2.26	3.35
<i>Oleic</i>	42.77	59.13	31.63	17.94
Linoleic	10.77	8.22	51.72	15.21
α-Linolenic	0.17	19.15	2.28	56.15
Arachidic	0.46	0.05	0.23	0.16
Eicosenic	0.18	0.08	0.51	0.23
others	1.17	1.27	2.54	2.12

(実験2) 6週齢SD系雄ラット(浜松SLCより購入)を4群に分け、Table 3 に示したアラキドン酸含有量の異なる4種類の実験食をそれぞれ2週間摂取させた。食餌は一日の摂取エネルギーが各食餌群間で同じになるように摂取量を調整し(pair-feeding)、その摂取量よび体重について毎日測定を行なった。本実験では、摂取する食餌中の脂肪酸のうち特にアラキドン酸含有量だけが異なるようにした。そのために牛脂、オリーブ油、コーン

油およびアラキドン酸含有脂質(AA-TG)をそれぞれ混合したものを調製し(Table 3)、Table 4に示すような組成の食餌を与えた。各食餌中の脂肪酸含量はアラキドン酸が0、1.0、2.5、5.0%で、他の主要脂肪酸の最終含量には差がないようにした (Table 5)。そのため各アラキドン酸含有食の脂肪含量はそれぞれ5、6.8、9.3、13.2%となった。

**Table 3 混合脂肪の脂肪酸組成 (実験2)**

Oil	0% AA	14.6% AA	26.8% AA	37.7% AA
Beef Tallow	52.0	34.7	19.4	0.0
Olive Oil	0.0	2.9	4.3	10.6
AA-TG	0.0	32.9	60.2	84.8
Corn Oil	48.0	29.4	16.1	4.5
total (g)	100.0	100.0	100.0	100.0
Myristic	1.0	0.8	0.6	0.4
Palmitic	15.4	13.9	12.6	10.7
Palmitoleic	1.6	1.1	0.7	0.1
Stearic	11.8	10.2	8.7	6.4
<i>Oleic</i>	<i>37.0</i>	<i>28.1</i>	<i>20.1</i>	<i>14.7</i>
Linoleic	26.0	18.8	13.9	9.8
$\alpha$ -Linolenic	1.1	0.7	0.4	0.2
$\gamma$ -Linolenic	0.0	0.1	0.2	0.3
DGLA	0.0	1.1	2.0	2.8
arachidic	0.2	1.1	1.9	2.6
<i>arachidonic</i>	<i>0.0</i>	<i>14.6</i>	<i>26.8</i>	<i>37.7</i>
Others	5.8	9.2	12.1	14.3

**Table 4 アラキドン酸含有食の食餌成分組成 (実験2)**

	0% AA	1% AA	2.5% AA	5% AA
Vitamin-free casein	159	159	159	159
$\beta$ -Corn starch	479	439	383	295
0% AA Mix Oil	50			
14.6% AA Mix Oil		68		
26.8% AA Mix Oil			93	
37.7% AA Mix Oil				132
AIN-76 Mineral mix	28	28	28	28
AIN-76 Vitamin mix	8	8	8	8
DL-Methionine	2	2	2	2
Choline bitartrate	2	2	2	2
2% Agar	272	294	325	374

**Table 5 各アラキドン酸含有食の脂肪酸含量 (%) (実験2)**

	AA 0%	AA 1%	AA 2.5%	AA 5%
Myristic	0.0	0.1	0.1	0.0
Palmitic	0.8	0.9	1.2	1.4
Palmitoleic	0.1	0.1	0.1	0.0
Stearic	0.6	0.7	0.8	0.8
<i>Oleic</i>	<i>1.9</i>	<i>1.9</i>	<i>1.9</i>	<i>1.9</i>
Linoleic	1.3	1.3	1.3	1.3
$\alpha$ -Linolenic	0.1	0.0	0.0	0.0
$\gamma$ -Linolenic	0.0	0.0	0.0	0.0
DGLA	0.0	0.1	0.2	0.4
arachidic	0.0	0.1	0.2	0.3
<i>arachidonic</i>	<i>0.0</i>	<i>1.0</i>	<i>2.5</i>	<i>5.0</i>
Others	0.3	0.6	1.1	1.9

### 各組織の採取と総 RNA の抽出

実験食摂取2週間後にラットを断頭屠殺し(午前10時から11時の間)、採取した空腸を、氷冷したジエチルピロカーボネート処理した生理食塩水で灌流し内容物を除き、水分を除いた後重量を測定した。また肝臓および副睾丸白色脂肪組織については組織全体の重量を測定した。更に Chomczynski らの方法(7)により、空腸中央部、肝臓、副睾丸白色脂肪組織それぞれ 100mg から総 RNA を抽出・調製し、遺伝子発現量測定に用いた。また断頭屠殺時に血液を採取し、血清画分のトリグリセライド濃度および総コレステロール濃度については測定キット(それぞれトリグリセライド E-テストワコーおよび総コレステロール E-テストワコー)を用いて定量を行なった。

### ノーザンブロット法による遺伝子発現解析

各組織より抽出した総 RNA (10. g または 30. g) を 2.2M ホルムアルデヒドゲル含 1% アガロースゲルにより電気泳動を行なった後、ナイロンメンブレン (HybondN+, アマシャム) に一晩 20xSSC 緩衝液でトランスファーさせた。総 RNA をトランスファーしたメンブレンを Ultrahyb ハイブリダイゼーション溶液 (Ambion) を用い 42 度で 2 時間プレハイブリダイズを行なった後、ランダムプライマー法で <sup>32</sup>P 標識した各 cDNA プローブを用い、更に 42 度で 16 時間以上ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーション終了後メンブレンを Washing 液 I (2x SSPE, 0.5% SDS) を用い 42 度で 10 分間 (2 回) インキュベートし、引き続き Washing 液 III (0.1x SSPE, 0.5% SDS) を用い 42 度で 15 分間 (1 回) インキュベートし、メンブレンの洗浄を行なった。洗浄したメンブレン上をイメージングプレート (フジフィルム) に 1 日から 2 日間感光させ、メンブレン上の mRNA のシグナル強度をバイオイメージアナライザー BAS2000 (フジフィルム) で解析した。

### ゲルシフトアッセイによる PPAR $\alpha$ リガンド応答性の解析

ゲルシフトアッセイに用いたラット PPAR $\alpha$  のタンパク質は、T7 Quick TNT *in vitro* 転写・翻訳キット (Promega) を用い合成し、ラット RXR $\alpha$  タンパク質については pET ベクター大腸菌発現系で合成した。これらの核内受容体タンパク質と <sup>32</sup>P 標識したラットアシル CoA オキシダーゼ (AOX) の PPAR 結合配列プローブ (AOX-PPRE, 5' -AGCTTGGGGACCAGGACAAAGGTCAGGAT-3') をゲルシフト反応液 (10mM Tris-HCl, pH8.0, 150mM KCl, 0.05% Nonidet P-40, 6% グリセロール, 1mM DTT, 1g BSA, 1g poly(dI-dC)) 中で 30 分室温で反応させた。またこの反応液中に各種脂肪酸を 40 $\mu$ M になるように添加した。反応サンプルを 5% ポリアクリルアミドゲル (0.5xTBE 緩衝液) で電気泳動を行ない、電気泳動終了後、ゲルを乾燥させ、イメージングプレート (フジフィルム) に一晩感光させ、PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$  ヘテロ二量体とプローブとの結合活性のシグナル強度をバイオイメージアナライザー BAS2000 (フジフィルム) で解析した。

### One-hybrid アッセイ系による PPAR リガンド応答性の解析

ラット PPAR $\alpha$  のリガンド結合ドメイン (LBD) の cDNA 断片を酵母転写因子 GAL4 の DNA 結合領域をコードする発現ベクター pBIND (Promega) に連結させ GAL4-PPAR $\alpha$  LBD キメラ発現ベクターを構築した (pBIND-PPAR $\alpha$  LBD) (8)。予め 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含むダル



ベッコ改変イーグル培地(DMEM)で前培養しておいたコンフルエント直後のヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 に対し、上記のキメラ遺伝子発現ベクターと GAL4 結合エレメントを 4 つ有するルシフェラーゼレポータープラスミド(pG5Luc, Promega)、更に内部標準ルシフェラーゼプラスミド pRL-SV40(Promega)を無血清 DMEM 培地存在下で Tfx-50 (Promega) を用いたリポフェクション法によりトランスフェクトした。各プラスミドベクターのトランスフェクト 2 時間後に培地を除き、各種脂肪酸を含む脱脂処理済 10%FBS (Hyclone) を含む DMEM 培地で更に 48 時間培養した。培養終了後細胞を細胞溶解液(PLB ; Promega)で溶解したものをサンプルとし、各細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性をルミノメーター(Lumat LB9506; ベルトールド社)を用いて測定した。なおルシフェラーゼ活性は Promega 社のデュアル・ルシフェラーゼアッセイシステムキットを用いてレポータープラスミド pG5Luc 由来のホタルルシフェラーゼ活性と内部標準である pRL-SV40 プラスミド由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定し、その相対値を求めた。

### 統計処理

各測定結果は平均値±標準誤差で表した。得られたデータについて分散分析法を用いて検定を行ない、これについて有意差が認められた結果については、Tukey による多群検定を行なった。危険率 5%以下のものは有意差とみなした。

## 【実験結果】

### 実験1 各種高脂肪食摂取による脂質代謝関連遺伝子の発現に対する影響

#### 1. 各種高脂肪食摂取による、体重組織重量および血清脂質濃度への影響

飽和脂肪酸(パルミチン酸)を多く含むパーム油、一価不飽和脂肪酸(オレイン酸)を多く含むオリーブ油、n-6系多価不飽和脂肪酸(リノール酸)を多く含むコーン油およびn-3系多価不飽和脂肪酸( $\alpha$ -リノレン酸)を多く含むアマニ油を24.7%含む高脂肪食、または、コーン油を2.4%含む低脂肪食を2週間与え飼育した。食事摂取はpair-feedingを行い各ラットにおける一日の食餌摂取量(カロリー)が同じになるようにした。2週間後の体重増加量は低脂肪食摂取群と比べ、高脂肪食群のオリーブ油、コーン油摂取群で高く、パーム油、アマニ油摂取群で低い傾向が見られた(Table 6)。また、100gあたりの組織重量は、肝臓では低脂肪食摂取群と比べ、パーム油、すなわち飽和脂肪酸の含量が多い脂肪摂取群以外の高脂肪食群での増加が見られた。副睾丸白色脂肪組織重量は低脂肪食摂取群に比べ高脂肪食摂取により増大を示したが、アマニ油摂取群ではその増大は低いものであった。一方空腸組織重量はいずれの食餌摂取によっても変動を示さなかった。また、血清トリグリセライド濃度と総コレステロール濃度を測定した結果、トリグリセライド濃度は低脂肪食群と比較し、パーム油、オリーブ油およびコーン油摂取群で高値を示したが、アマニ油摂取群ではいずれの食餌摂取群よりも著しく低値を示した。一方、血中総コレステロール濃度は低脂肪食群と比較しすべての高脂肪食摂取群、特に多価不飽和脂肪酸を多く含むコーン油、アマニ油摂取群で低値を示した(Table 6)。

Table 6 各種高脂肪食摂取時のラット体重増加量、相対組織重量および血清脂質濃度への影響

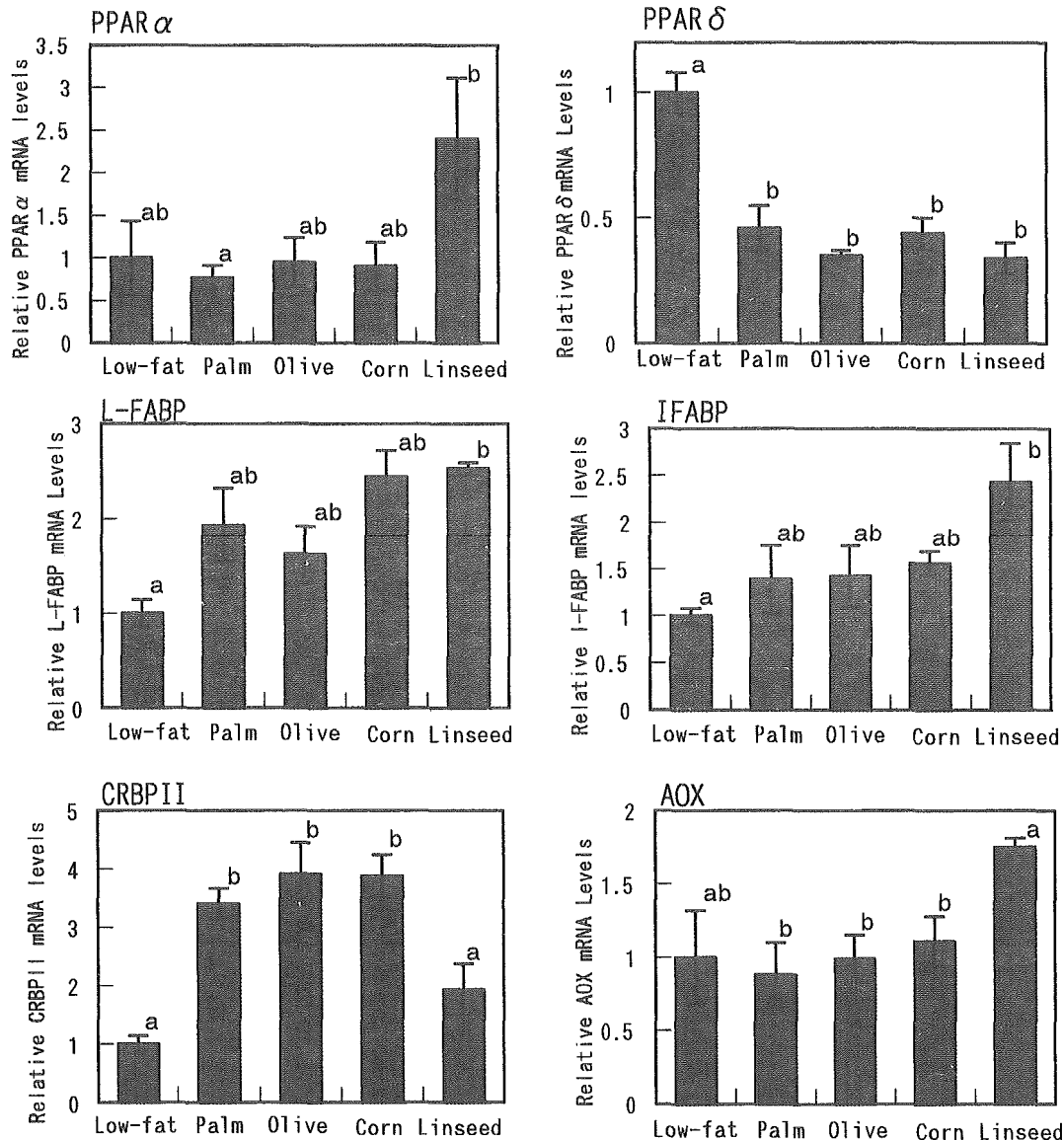
	Low fat	Palm oil	Olive oil	Corn oil	Linseed oil
体重増加量(g/14日)	86 $\pm$ 1	74 $\pm$ 6	88 $\pm$ 3	87 $\pm$ 2	80 $\pm$ 3
食餌摂取量(g/日)	27.0 $\pm$ 0.4	27.2 $\pm$ 1.0	28.2 $\pm$ 0.6	28.9 $\pm$ 2.7	28.8 $\pm$ 2.0
肝臓重量(g/体重100g)	3.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	4.8 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	4.3 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	4.5 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>
副睾丸脂肪組織重量(g/体重100g)	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>bc</sup>	1.5 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	1.8 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>
空腸重量(g/体重100g)	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0
血清トリグリセリド濃度( $\mu$ mol/dl)	118 $\pm$ 6.71 <sup>ab</sup>	253 $\pm$ 51.5 <sup>a</sup>	202 $\pm$ 41.9 <sup>ab</sup>	182 $\pm$ 44.4 <sup>ab</sup>	48.7 $\pm$ 8.68 <sup>b</sup>
血清総コレステロール濃度( $\mu$ mol/dl)	202 $\pm$ 19.5	188 $\pm$ 8.69	184 $\pm$ 11.3	163 $\pm$ 7.68	152 $\pm$ 11.1

平均値 $\pm$ 標準誤差 (N=4/群)、a-c:異なるアルファベットの肩書きを持つ群間はp<0.05で有意差あり (Tukey)

#### 2. ラット空腸におけるPPAR関連遺伝子の発現量に対する高脂肪食摂取の影響

$\beta$ 酸化が活発な組織で多く発現しており、エネルギー産生や脂質代謝に関与していると考えられているPPAR $\alpha$ のラット空腸におけるmRNA発現量は、低脂肪食摂取群と比べ、アマニ油摂取群を除くいずれの高脂肪食摂取によって増大は見られなかったが、アマニ油摂取により約2.5倍の増大を示した(Fig. 1)。また、PPARのサブタイプであるPPAR $\delta$ mRNA発現量は脂肪の種類に関係なく、低脂肪食摂取群と比べいずれの高脂肪食摂取によっても50%から60%の減少を示した(Fig. 1)。次に、遊離脂肪酸と結合し、細胞の保護や脂肪酸貯蔵、細胞内転送を行うと考えられている脂肪酸結合タンパク質FABPのmRNA発現量を測定した。肝臓型脂肪酸結合タンパク質L-FABP mRNA発現量は高脂肪食摂取により、低脂肪食摂取群と比較して増大が見られた(Fig. 1)。高脂肪食摂取群間では統計的有意差はなか

ったものの、多価不飽和脂肪酸を多く含むコーン油およびアマニ油摂取群の方が、若干高い傾向を示した(Fig. 1)。一方、小腸型脂肪酸結合タンパク質 I-FABP の mRNA 発現量の変動は L-FABP と類似した結果が得られたが、特にアマニ油摂取により顕著な増大が見られた(Fig. 1)。また、小腸特異的に発現が見られる、細胞性レチノール結合性タンパク質タイプ II(CRBP II)の mRNA 発現量は、低脂肪食摂取群に比べると、いずれの高脂肪食摂取によっても増大を示したが、アマニ油摂取群においてはその増大量は小さかった(Fig. 1)。さらに脂肪酸 $\beta$ 酸化系酵素である AOX のラット空腸における mRNA の発現量は低脂肪食摂取群と比べアマニ油摂取群を除くいずれの高脂肪食摂取群によつては増大は見られなかったが、アマニ油摂取により約 1.5 倍の増大を示した(Fig. 1)。



**Figure 1** ラット空腸における PPAR およびその標的遺伝子の発現に及ぼす各種高脂肪食摂取による影響

脂肪酸組成の異なる脂肪を 24.7%含む各種高脂肪食および低脂肪食(2.4%コーン油を含む)を 6 週齢 SD 系雄ラットに 2 週間 pair-feeding させた。ラット空腸から総 RNA を抽出し、ノーザンブロット法により PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、L-FABP、I-FABP、CRBP II および AOX mRNA 発現量を測定した。結果は内部標準遺伝子 18S rRNA 量で補正し、低脂肪食群を 1 とした相対値 (平均値 $\pm$ 標準誤差、n=3) で表した。a, b:異なるアルファベットを持つ群間には  $p < 0.05$  で有意差あり (Tukey の検定)。

### 3. ラット肝臓における PPAR 関連遺伝子の発現量に対する高脂肪食摂取の影響

ラット肝臓において顕著に発現が見られる PPAR $\alpha$  mRNA 発現量は、低脂肪食摂取群に比べると、パーム油摂取では変動を示さなかったが、その他の高脂肪食摂取群では増大を示し、その増大量は脂肪の種類により異なった。オリーブ油およびコーン油摂取群でそれぞれ4倍および3倍の増大を示し、更にアマニ油摂取群では7.3倍の増大を示した(Fig. 2)。肝臓における L-FABP mRNA 発現量は特にオリーブ油およびアマニ油摂取により顕著な増大が見られ、AOX mRNA 発現量は、PPAR $\alpha$  mRNA と良く対応した変動が見られた(Fig. 2)。一方、肝臓における脂肪酸合成酵素(FAS)の mRNA 発現量は低脂肪食摂取群で高い発現を示したが、高脂肪食摂取により顕著に減少した(Fig. 2)。

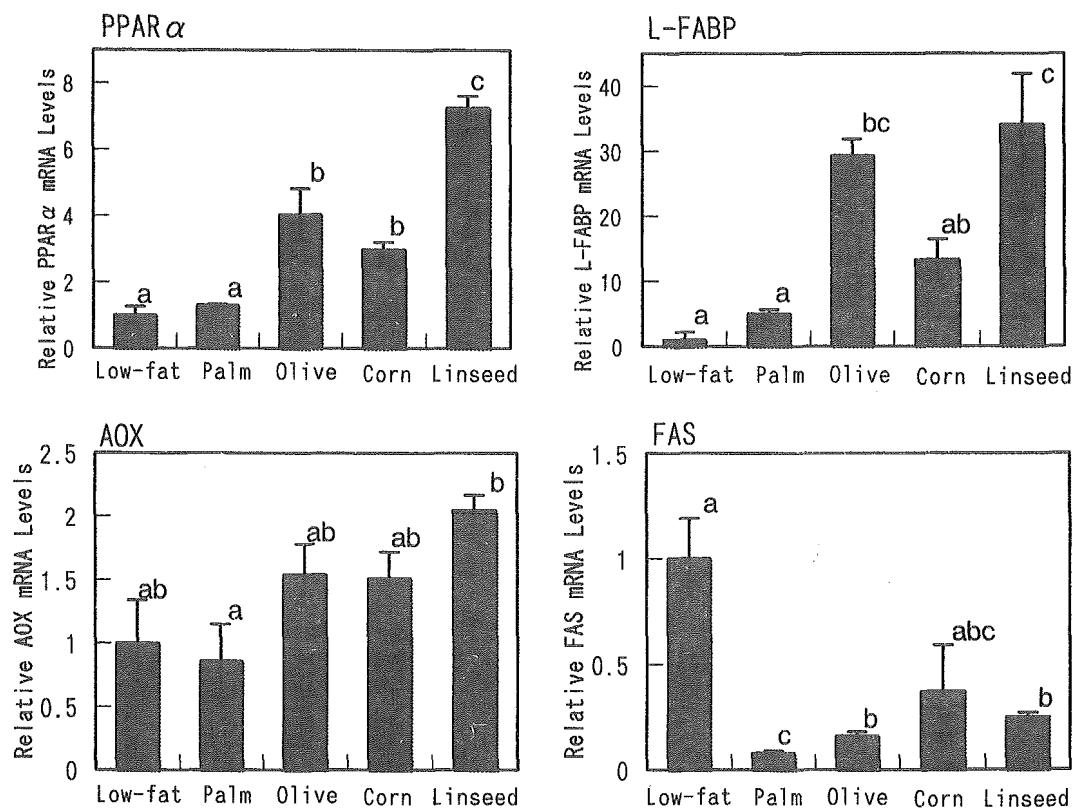


Figure 2 ラット肝臓における PPAR $\alpha$  およびその標的遺伝子の発現に及ぼす各種高脂肪食摂取による影響

脂肪酸組成の異なる脂肪を 24.7% 含む各種高脂肪食および低脂肪食(2.4% コーン油を含む)を 6 週齢 SD 系雄ラットに 2 週間 pair-feeding させた。ラット肝臓から総 RNA を抽出し、ノーザンブロット法により PPAR $\alpha$ 、L-FABP、AOX および FAS mRNA 発現量を測定した。結果は内部標準遺伝子 18S rRNA 量で補正し、低脂肪食群を 1 とした相対値(平均値 $\pm$ 標準誤差、n=3)で表した。a-c:異なるアルファベットを持つ群間には p<0.05 で有意差あり(Tukey の検定)。

### 4. ラット副睪丸白色脂肪組織における PPAR 関連遺伝子の発現量に対する高脂肪食摂取の影響

ラット副睪丸白色脂肪組織における PPAR $\gamma$  の mRNA 発現量は、低脂肪食摂取群といずれの高脂肪食摂取群との間にも殆ど差は見られなかった(Fig. 3)。一方、PPAR $\delta$  mRNA 発現量は低脂肪食摂取群に比べて、パーム油およびオリーブ油摂取群では変動が見られなかつ

たが、コーン油およびアマニ油摂取群では約 50%に減少した。なお、本実験では副睾丸白色脂肪組織における PPAR $\alpha$  mRNA の明確なシグナルは検出されなかった。PPAR $\gamma$  の標的遺伝子である脂肪組織特異的な脂肪酸結合タンパク質 aP2 の mRNA 量は、低脂肪食摂取群に比べてパーム油およびオリーブ油摂取群で増大する傾向を示したが、コーン油およびアマニ油摂取群ではむしろ減少する傾向を示した(Fig. 3)。更に白色脂肪組織の AOX mRNA 量はいずれの食餌摂取によっても変動は見られなかったが、UCP2 mRNA 量はアマニ油摂取により約 50%に減少する傾向を示した(Fig. 3)。一方、白色脂肪組織の FAS mRNA は低脂肪食摂取群に比べて、いずれの高脂肪食群でも顕著に減少した(Fig. 3)。

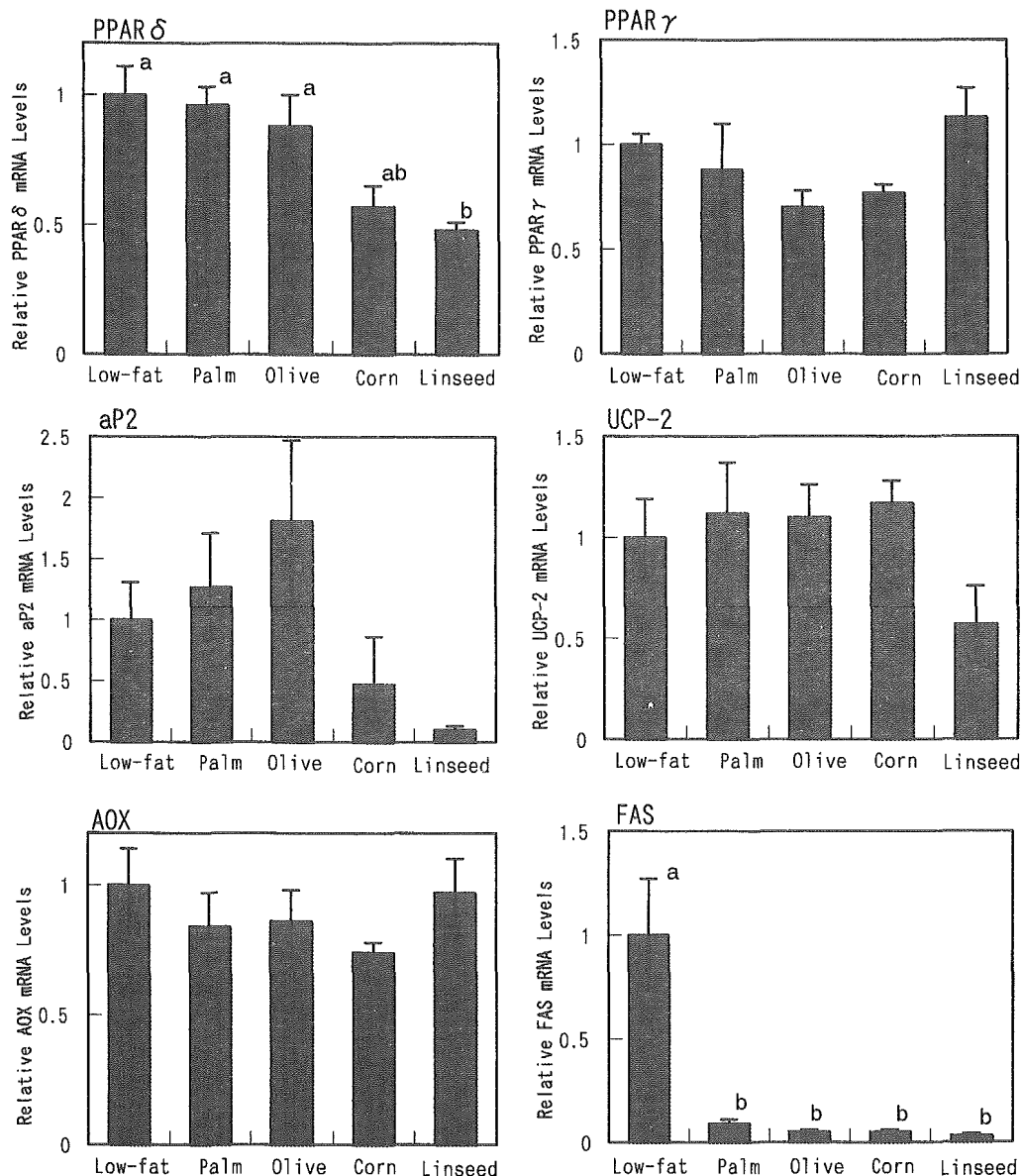


Figure 3 ラット副睾丸白色脂肪組織における PPAR および PPAR 標的遺伝子発現に及ぼす各種高脂肪食摂取による影響

脂肪酸組成の異なる脂肪を 24.7%含む各種高脂肪食および低脂肪食(2.4%コーン油を含む)を 6 週齢 SD 系雄ラットに 2 週間 pair-feeding させた。ラット副睾丸白色脂肪組織から総 RNA を抽出し、ノーザンブロット法により PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、aP2、UCP-2、AOX および FAS mRNA 発現量を測定した。結果は内部標準遺伝子 18S rRNA 量で補正し、低脂肪食群を 1 とした相対値(平均値±標準誤差、n=3)で表した。a,b:異なるアルファベットを持つ群間には p<0.05 で有意差あり(Tukey の検定)。

## 実験2 アラキドン酸含有脂肪食摂取による脂質代謝関連遺伝子の発現に対する影響

### 1. アラキドン酸含有脂肪食摂取による、体重組織重量および血清脂質濃度への影響

体内の様々な生理活性作用に関与するエイコサノイドの前駆体であるアラキドン酸の摂取により PPAR を介した脂質代謝関連の遺伝子発現がどのように変化するかを検討した。2週間各アラキドン酸含有量の異なる食餌を摂取させた結果、pair-feeding を行ったため食餌摂取量に差が見られないにも関わらず、ラットの体重増加量および副睾丸白色脂肪組織重量は食餌中のアラキドン酸含有量が高くなるにつれて低値を示した (Table 7)。また、血清総コレステロールおよびトリグリセリド濃度も食餌中のアラキドン酸含有量が高くなるにつれて低値を示した。特に血清トリグリセリド濃度の低下は顕著であり、1%アラキドン酸含有食摂取では0%群の53%までに低下した。なお、アラキドン酸投与による本実験飼育条件下では、ラットに炎症などの異常な症状は特に観察されなかった。

Table 7 アラキドン酸含有脂肪食摂取時のラット体重増加量、相対組織重量および血清脂質濃度への影響

	0% AA	1% AA	2.5% AA	5% AA
体重増加量(g/14日)	91±3.0	90±7	89±10	80±5
食餌摂取量(g/日)	27.5±0.3	26.2±0.7	27.4±0.6	26.2±0.6
肝臓重量(g/体重100g)	4.0±0.1	3.7±0.3	4.0±0.4	4.2±0.1
副睾丸脂肪組織重量(g/体重100g)	1.7±0.1 <sup>a</sup>	1.4±0.2 <sup>ab</sup>	1.4±0.1 <sup>ab</sup>	1.2±0.1 <sup>b</sup>
血清トリグリセリド濃度(μmol/dl)	242±19.7 <sup>a</sup>	128±20.3 <sup>b</sup>	112±12.8 <sup>b</sup>	87.0±12.3 <sup>b</sup>
血清総コレステロール濃度(μmol/dl)	257±6.25 <sup>a</sup>	239±19.2 <sup>a</sup>	209±16.5 <sup>a</sup>	144±14.2 <sup>b</sup>

平均値±標準誤差 (N=4-5/群)、a,b:異なるアルファベットの上書きを持つ群間はp<0.05で有意差あり (Tukey)。

### 2. ラット空腸における PPAR 関連遺伝子の発現に対するアラキドン酸含有脂肪食摂取による影響

ラット空腸における PPAR $\alpha$  mRNA 発現量は、アラキドン酸含有量 0%の食餌摂取群と比べ、1%群では変動が見られなかったが、2.5%および 5%食餌摂取群では統計的有意ではないが 1.5 倍から 1.7 倍の増大が見られた (Fig. 4)。一方、空腸 PPAR $\delta$  mRNA 発現量は食餌中のアラキドン酸含有量による変動は見られなかった。更に空腸 CRBP II、L-FABP および I-FABP mRNA 発現量に対するアラキドン酸摂取の影響を調べた結果、いずれの mRNA 発現量も 1%アラキドン酸含有食摂取では変動が見られなかったが、2.5%および 5.0%アラキドン酸含有食摂取では 2 倍前後の増大が見られた (Fig. 4)。

### 3. ラット肝臓における PPAR 関連遺伝子の発現に対するアラキドン酸含有脂肪食摂取による影響

アラキドン酸含有食摂取によるラット肝臓の PPAR $\alpha$  mRNA 発現量はアラキドン酸含有量 0%の食餌摂取群と比べ、1%および 2.5%食餌摂取群で 1.5 倍の増大が見られたが、5%食餌摂取群では 50%のレベルまで低下した (Fig. 5)。一方、肝臓 L-FABP mRNA 発現量は 5%アラキドン酸含有食摂取群でのみ約 2 倍の増大が見られた (Fig. 5)。また、肝臓 UCP2 mRNA 発現量はアラキドン酸無添加含有食群に比べ、1%食餌摂取群で 3.8 倍、2.5%および 5%食餌摂取群でそれぞれ 7.6 および 7.2 倍の増大が見られた。さらに肝臓 FAS mRNA 発現量は食餌中

のアラキドン酸含有量が増大するにつれて低下する傾向が見られた(Fig. 5)。

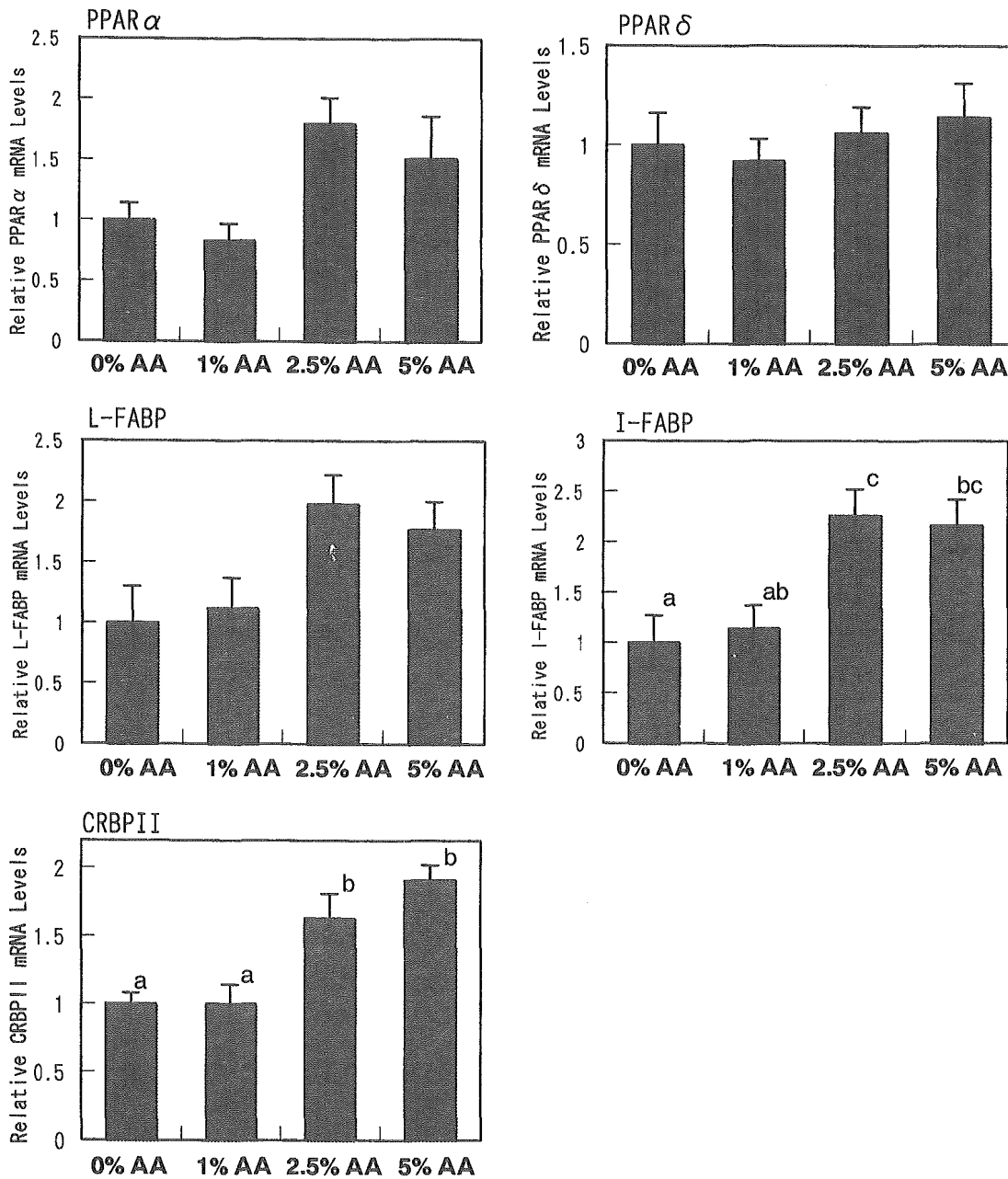
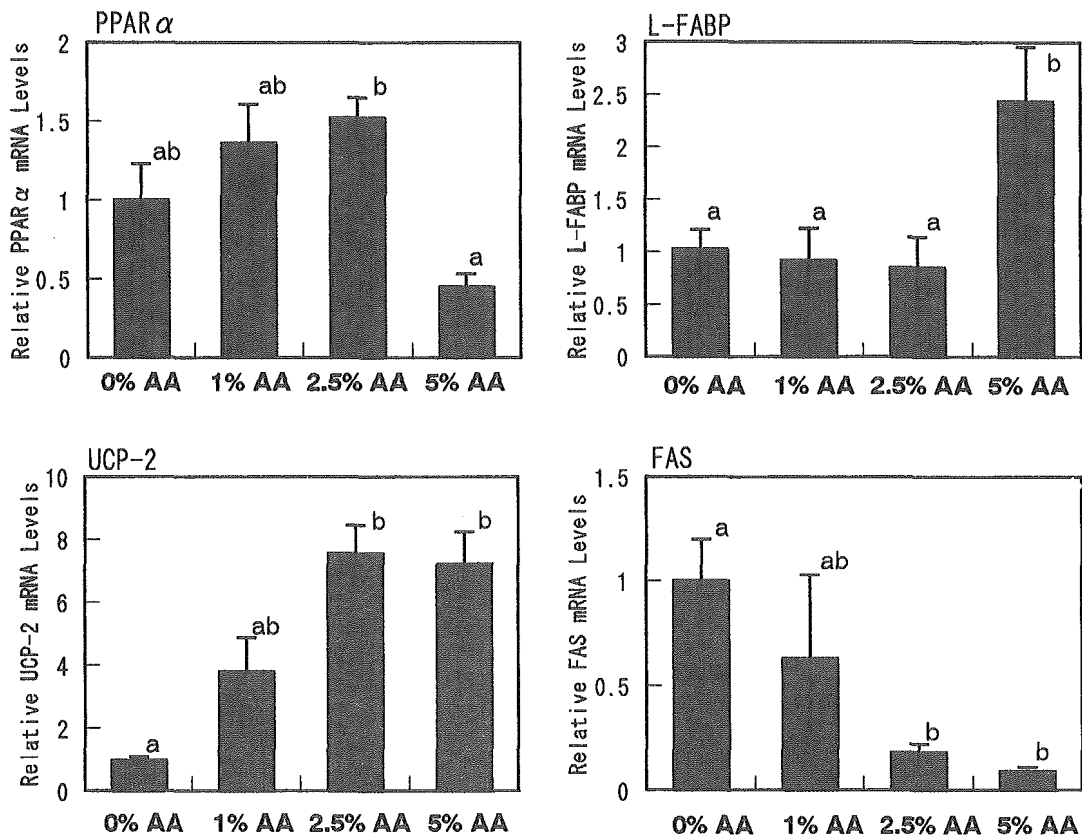


Figure 4 ラット空腸における PPAR およびその標的遺伝子の発現に及ぼすアラキドン酸含有食摂取による影響

アラキドン酸含有量の異なる食餌を6週齢SD系雄ラットに2週間 pair-feeding させた。ラット空腸から総 RNA を抽出し、ノーザンブロット法により PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、L-FABP、I-FABP および CRBP II mRNA 発現量を測定した。結果は内部標準遺伝子 18S rRNA 量で補正し、0%アラキドン酸(AA)食群を1とした相対値(平均値 $\pm$ 標準誤差、n=5)で表した。a-c:異なるアルファベットを持つ群間には  $p < 0.05$  で有意差あり (Tukey の検定)。



**Figure 5** ラット肝臓における PPAR $\alpha$  およびその標的遺伝子発現に及ぼすアラキドン酸含有食摂取による影響

アラキドン酸含有量の異なる食餌を6週齢SD系雄ラットに2週間 pair-feeding させた。ラット肝臓から総 RNA を抽出し、ノーザンブロット法により PPAR $\alpha$ 、L-FABP、UCP-2 および FAS mRNA 発現量を測定した。結果は内部標準遺伝子 18S rRNA 量で補正し、0%アラキドン酸(AA)食群を1とした相対値(平均値 $\pm$ 標準誤差、n=5)で表した。a,b:異なるアルファベットを持つ群間には p<0.05 で有意差あり(Tukey の検定)。

#### 4. 副睪丸白色脂肪組織における PPAR 関連遺伝子の発現量に対するアラキドン酸含有脂肪食摂取による影響

副睪丸白色脂肪組織における PPAR $\delta$  mRNA 発現量は、1%アラキドン酸添加食の摂取に伴い50%に減少したが、アラキドン酸含有量の違いによる大きな変動はみられなかった。また PPAR $\gamma$  mRNA 発現量はアラキドン酸含有量の増加に伴い減少していく傾向が見られた(Fig. 6)。一方、白色脂肪組織 AOX mRNA 発現量はアラキドン酸含有量0%の食餌摂取群と比べ、1%群では差が見られなかったが、2.5%および5%食餌摂取群では増大する傾向が見られた(Fig. 6)。また、白色脂肪組織 UCP2 mRNA 発現量は0%および1.0%アラキドン酸含有食摂取群に比べて、2.5%食摂取群で70%、5%食摂取群で約25%のレベルまで低下した(Fig. 6)。更に白色脂肪組織における FAS mRNA 発現量は食餌中のアラキドン酸含有量による大きな変動は見られなかった(Fig. 6)。



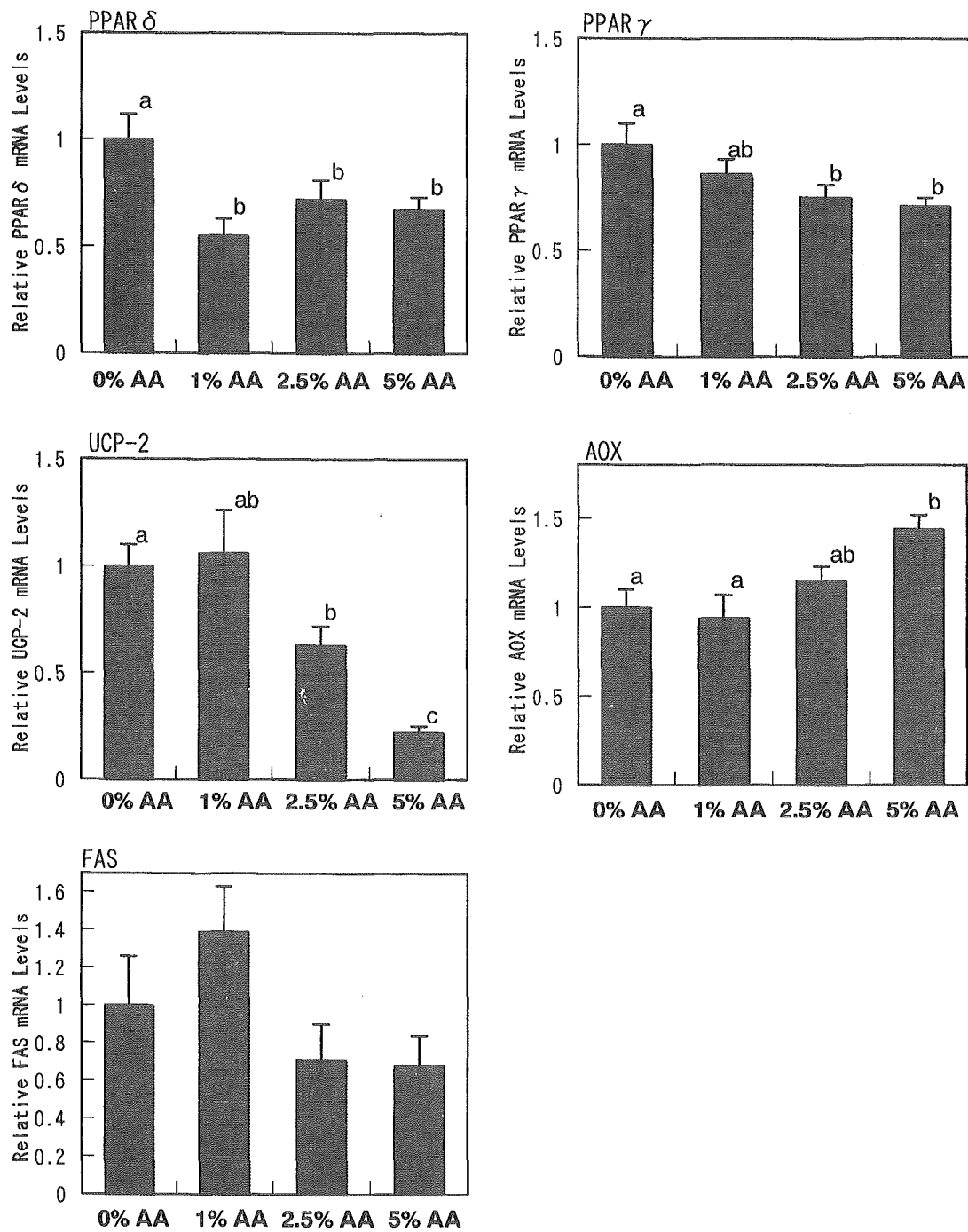


Figure 6 ラット副睪丸白色脂肪組織における PPAR およびその標的遺伝子の発現に及ぼすアラキドン酸含有食摂取による影響

アラキドン酸含量の異なる食餌を 6 週齢 SD 系雄ラットに 2 週間 pair-feeding させた。ラット副睪丸白色脂肪組織から総 RNA を抽出し、ノーザンブロット法により PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、UCP-2、AOX および FAS mRNA 発現量を測定した。結果は内部標準遺伝子 18S rRNA 量で補正し、0%アラキドン酸 (AA) 食群を 1 とした相対値 (平均値 $\pm$ 標準誤差、n=5) で表した。a, c: 異なるアルファベットを持つ群間には  $p < 0.05$  で有意差あり (Tukey の検定)。

### 実験3 各種脂肪酸の PPAR $\alpha$ に対するリガンド応答性の解析

#### 1. ゲルシフトアッセイによる PPAR $\alpha$ リガンド結合性の解析

PPAR は RXR とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の特異的配列(PPRE)に結合する。この結合活性は、PPAR にリガンドが結合することによって増大することが報告されていることから(9)、その性質を利用して PPAR のリガンド応答性を評価することができる。

本実験ではゲルシフトアッセイにより PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$ ヘテロ二量体のラット AOX 遺伝子-PPRE 配列への結合活性に対する様々な脂肪酸の影響について検討した。Fig.7 に示すように、PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$ ヘテロ二量体の結合活性シグナルはリガンド無添加時ではわずかしか検出されなかったが、添加する脂肪酸の種類によりその結合活性シグナルに違いが見られた。飽和脂肪酸ではステアリン酸 (C18) およびパルミチン酸 (C16) で強いシグナルが見られたが、アラキジン酸 (C20) ではそのシグナルは弱いものであった。また中鎖脂肪酸であるカプリル酸 (C10) では結合活性シグナルの変動は見られなかった。一方、不飽和脂肪酸では、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸(C18)による結合活性シグナルの増大は殆ど見られなかったが、炭素数 18 から 20 までの多価不飽和脂肪酸(リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、ETA、アラキドン酸およびエイコサペンタエン酸)はいずれも顕著な結合活性シグナルの増大が見られた。しかしながら、炭素数 22 の多価不飽和脂肪酸(ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸)では殆ど結合活性シグナルの増大は見られなかった。

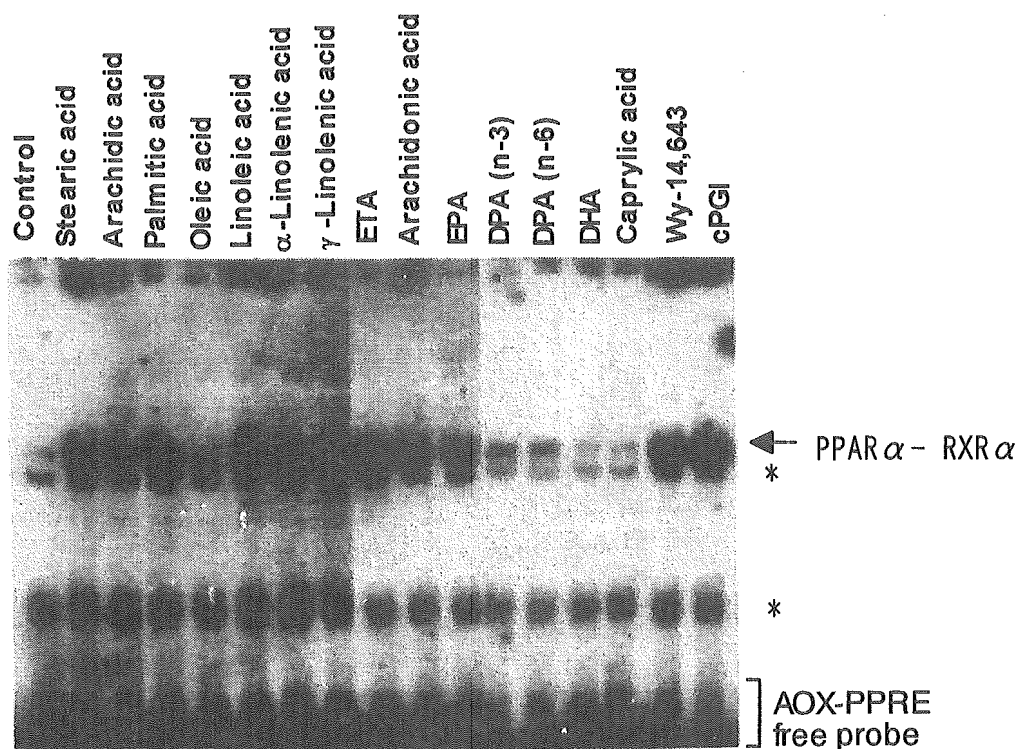


Figure 7 各種脂肪酸の PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$ ヘテロ二量体の AOX-PPRE への結合活性への影響 (ゲルシフトアッセイ)

合成した PPAR $\alpha$ および RXR $\alpha$ を各種脂肪酸リガンド(40 $\mu$ M)存在下、<sup>32</sup>P ラベルした AOX-PPRE と反応させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$ ヘテロ二量体と AOX-PPRE との結合活性に対する各種脂肪酸リガンドの影響を調べた。\*は非特異的結合を示す。

## 2. One-hybrid アッセイ系による PPAR 転写活性化の解析

ヒト小腸様細胞株 Caco-2 を用いて、細胞核内における各種脂肪酸の PPAR $\alpha$  に対する転写活性化について検討するため、GAL4-DBD / PPAR-LBD キメラタンパク質を用いた One-Hybrid アッセイ (Fig.8) を行なった。Fig.9 に示すように Caco-2 細胞核における PPAR $\alpha$  に対する各種脂肪酸の転写活性化は、脂肪酸の種類により違いが見られた。飽和脂肪酸では中鎖のカプリル酸(C10)および長鎖のアラキジン酸(C20)で活性化は全く見られなかったが、ステアリン酸(C18)およびパルミチン酸(C16)では比較的顕著な活性の増大が見られた。不飽和脂肪酸では、一価のオレイン酸による PPAR $\alpha$  の転写活性化は非常に弱いものであった。一方、炭素数 18 から 20 までの多価不飽和脂肪酸(リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、アラキドン酸およびエイコサペンタエン酸)は ETA を除き顕著な転写活性の増大を示した。しかしながら炭素数 22 の多価不飽和脂肪酸(ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸)では n-3 系のドコサペンタエン酸で若干の活性化が見られたが n-6 系ドコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸では殆ど活性化が見られなかった。

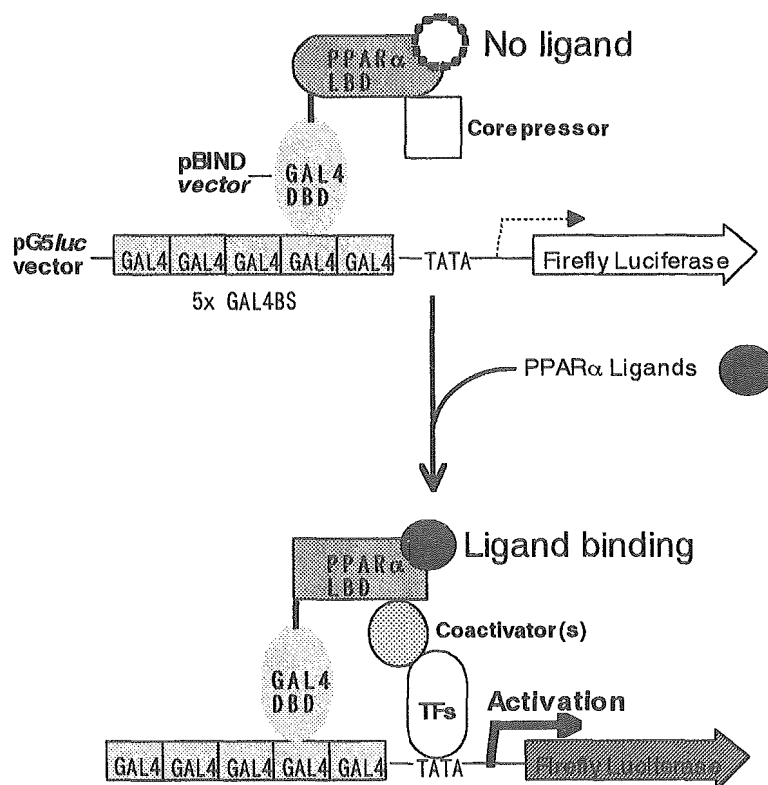


Figure 8 GAL4-DBD/PPAR $\alpha$ -LBD キメラタンパク質を用いた One-hybrid アッセイ系によるリガンド活性化解析の原理

細胞核内においてルシフェラーゼレポーター遺伝子上流の GAL4 応答エレメント (5 x GAL4 結合配列 (BS)) に結合している GAL4-DBD/PPAR $\alpha$ -LBD キメラタンパク質は、PPAR $\alpha$  リガンド非結合時には内因性転写共役抑制因子 (corepressor) と相互作用し、レポーター遺伝子の活性化を殆ど起こさない。一方、脂肪酸などの PPAR $\alpha$  リガンド存在時には PPAR-LBD にリガンドが結合することによりその立体構造が変化し、内因性の転写共役活性化因子 (coactivator) をリクルートし、基本転写調節因子群 (TFs) によるレポーター遺伝子の転写が惹起される。

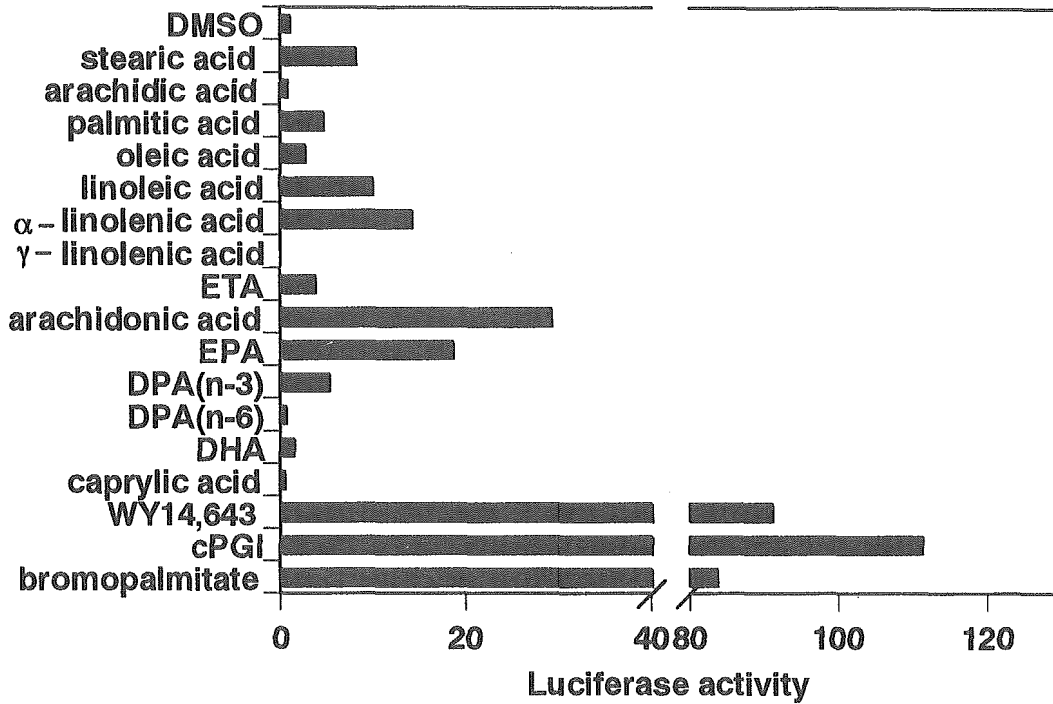


Figure 9 Caco-2 細胞における各種脂肪酸の PPAR $\alpha$  に対する転写活性化の影響 (One-hybrid アッセイ)

Caco-2 細胞に pBIND - PPAR $\alpha$ LBD 発現ベクター、pG5-Luc ルシフェラーゼレポーターベクターおよび pRL - SV40 内部標準発現ベクターをコトランスフェクトした。2 時間後に各種脂肪酸(10 $\mu$ M)を含む培地でさらに 48 時間培養を行い、細胞抽出液のレポーター遺伝子活性をルミノメータで測定した。結果は内部標準ルシフェラーゼ活性で補正し、DMSO コントロール群を 1 とした相対値(平均値、n=3) で表した。