

### (1) ラットの生存率に及ぼす菜種油粕影響

脳卒中易発症性高血圧自然発症 (SHRSP) ラットに大豆油粕、菜種油粕が 12~13%含まれる飼料を与え、食塩を負荷した条件下で飼育し、生存率の変化を調べる。

### (2) プリオン検出系の確立

ラットの脾臓、脳、ヒト正常線維芽細胞株 (MRC-5)、骨髄系白血病細胞株 (U937) の細胞抽出液を SDS-PAGE で分画後、PVDF 膜にトランスファー後、抗プリオン抗体、B103 または 6H4 を用い Western blot 法により検出した。必要に応じて、プロテアーゼ K (from *Tritirachium album*), クリカナーゼ F (PNGase F from *Flavobacterium meningosepticum*) で処理した。

## C 研究結果

### 1 ラットの生存率に及ぼす菜種油粕の影響

与えている飼料 (大豆粕入り飼料と菜種粕入り飼料) 中の油の含量に差がないかをガスクロマトグラフィーにて測定した。その結果、粕自体には油分が少ないため、全体としてはあまり差がないという結果がえられた。n-6 系高負飽和脂肪酸 (PUFA) は若干菜種粕の方が低いという結果であった (図 1、表 1)。これらの飼料をラットに摂食させて、その生存率に及ぼす影響を評価した。

飼育を初めて 7 ヶ月の段階においては、菜種油粕、大豆油粕投与群で、生存率、生育などに特に大きな差は認められていない (図 2)。今後、血液、脳などの組織中の Cu, Mn, Mo などの含量、脳における異常プリオンの発生などについて検討する予定である。

なお、現在、菜種油製造法が圧搾法からヘキサソ抽出法に変化しつつあるか、この菜種粕はヘキサソ抽出法によると思われる、圧搾法による菜種粕に比べて脂肪酸含量が約 44% になっていた (表 1、2)。

### 2 プリオン検出系の確立

#### (A) 細胞 (in vitro)

Triton-doc lysis buffer (0.5% Triton X-100, 0.23% Na-deoxycholate, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA) で細胞を溶解後、遠心して上清を得た。これをサンプルとし Western blot 法によりプリオンを検出した (図 3)。さらに、クリカナーゼ F 処理の影響を調べた。その結果、MRC-5, U937 細胞と

もにグリカナーゼ F 処理により、プリオンの分子量が減少した (図 4)。無処理の分子量が、両細胞で異なることから、細胞により、プリオンの分子種が異なる可能性が示唆された。

#### (B) 脳、脾臓 (in vitro)

SHRSP ラットより脳と脾臓を取り出し、それを 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) によりホモジネートとした (脳 1g / 10mL)。その後、Collagenase (50.0 g / mL, 37°C, 30min, from *Streptomyces parvulus* subsp. *Citrinus*) で処理し、遠心後、pellet に lysis buffer を加えた。プロテアーゼ K (40.0 g / mL, 37°C, 30min)、PMSF (Phenylmethanesulfonyl-fluoride) を終濃度 5mM になるように加える。DNase I (from bovine pancreas) 40.0 g / mL, 室温, 5min 処理し、2-butanol / methanol 混合物 (5 : 1, v / v) を加え、遠心 12000rpm, 30min して濃縮した。上清、中間層、Pellet に 50.0 L 2×Sample buffer (0.5M Tris-HCl (pH 6.8), 10% SDS, Glycerol, BPB, β-Mercaptoethanol) を加え、これをサンプルとし、Western blot 法によりプリオンを検出した (図 5)。その結果、脳で分子量 35kDa 付近に強いバンドが検出され、プロテアーゼ K (PK) で処理することによりバンドが消失した。このことから、このバンドが正常プリオンであることが確認できた。

## D 考察

プリオン病と土壤や飼料の相関を考えると (1、2)、菜種がプリオン病発症に関与している可能性がある。菜種は栄養状態の悪い土壤においても生育し、土壤中に深い根を張って生育する植物である。土壤中の有害重金属を蓄積する可能性は十分に考えられる。また、菜種油粕は高たんぱく飼料であり、生体に何らかの悪影響を与える可能性もある。現在の酪農業では、多くの乳牛は常にストレスにさらされた状態にあると考えられ、微量金属バランス仮説におけるストレスの関与も考慮する必要がある。一方、菜種油中の微量有害因子の関与も考慮に入れる必要がある。

## E 結論

菜種粕と大豆粕を SHRSP ラットに与え、生存率を観察した。菜種粕群は 7 ヶ月の現在でも、生存率が 50% であった。菜種粕製品間の油脂

含量の差に注目した。

培養細胞および SHRSP ラットの脳、脾臓を用い、プリオン抗体で検出されプロナーゼ K 処理で消失する正常プリオン蛋白を検出する方法を確立した。二種の細胞 (MRC-5, U937) で、分子サイズの異なるプリオンが検出された。

#### F 文献、資料

- 1 Trace element (nutritional) theory of “mad cow” disease Murray McBride
- 2 The Manganese Loaded Copper Depleted Bovine Brain Fails to Neutralise Incoming Shockbursts of Low Frequency Infrasound The Origins of BSE?  
Purdey M, Elworthy, Somerset, UK British Cattle Veterinary Association Journal  
*CATTLE PRACTICE VOL 10 PART 4, 2002*
- 3 Blockade of Glycosylation Promotes Acquisition of Scrapie-like Properties by the Prion Protein in Cultured Cells S Lehmann and D A Harris J Biol Chem 272(34), 21479-21487, 1997
- 4 Scrapie-like prion protein accumulates in aggresomes of cyclosporin A-treated cells Ehud Cohen and Albert Taraboulos The EMBO Journal, Vol 22, No 3 404-417, 2003
- 5 Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance David R Brown, Farida Hafiz, Leslie L Glasssmith, Boon-Seng Wong, Ian M Jones, Christine Clive, and Stephen J Haswell EMBO J, Mar 2000; 19: 1180-1186

#### G 健康危険情報

なし

#### H 研究発表

##### 論文発表

Y Inoue, M Kitagawa, K Onozaki, and H Hayashi  
Contribution of the constitutive and inducible degradation of Smad3 by the ubiquitin- pathway to transforming growth factor  $\beta$  signaling  
J Interferon Cytokine Res 24 43-54, 2004

H Ohata, T Tetsuka, H Hayashi, K Onozaki, and T Okamoto

3-Methylcholanthrene Activates Human Immunodeficiency Virus Type I Replication via Aryl Hydrocarbon Receptor  
Microbiol Immunol 47(5) 363-370, 2003

T Hattori, N Ohoka, H Hayashi, and K Onozaki  
C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL-6 isoform  
FEBS Letters 541(1-3) 33-39, 2003

T Matsumura, T Degawa, T Takai, H Hayashi, T Okamoto, J Inoue and K Onozaki  
TRAF6-NF- $\kappa$ B Pathway is Essential for IL-1-induced TLR2 Expression and Its Functional Response to TLR2 Ligand in Murine Hepatocytes  
Immunology 109(1) 127-136, 2003

#### I 知的財産権の出願/登録状況

なし

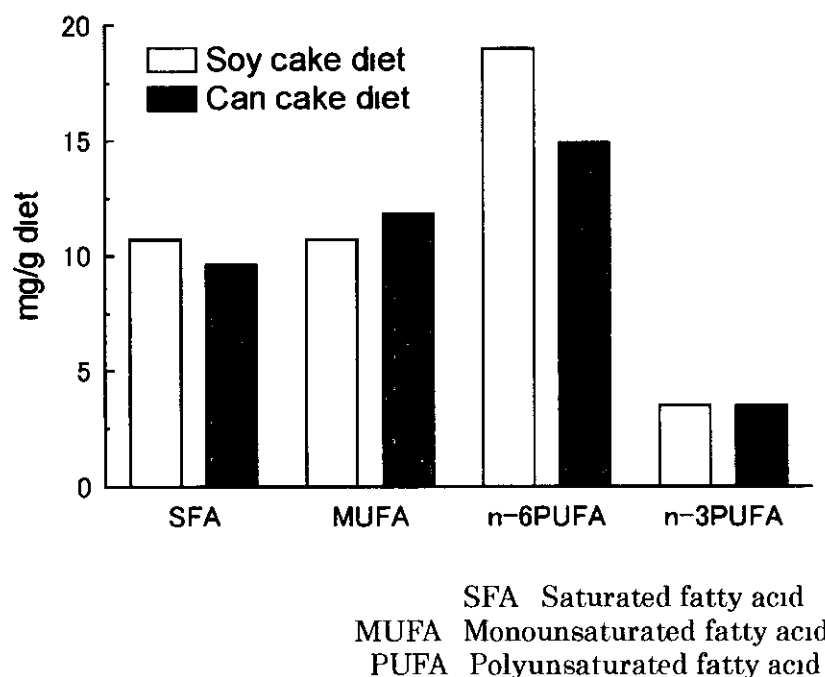


図1 大豆粕入り飼料と菜種粕入り飼料中の脂肪酸含量の比較

Fatty acid (FA)	Soy cake	Can cake
Composition (% of total FA)		
Saturated FA		
14:0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0
16:0	15.8 ± 0.0	14.8 ± 0.0
18:0	2.4 ± 0.0	2.2 ± 0.0
20:0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
22:0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
24:0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Monosaturated FA		
16:1	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0
18:1	23.3 ± 0.0	28.8 ± 0.0
20:1	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0
22:1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
24:1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
n-6 polyunsaturated FA		
18:2	45.8 ± 0.1	39.7 ± 0.1
20:4	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1
22:4	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
n-3 polyunsaturated FA		
18:3	3.7 ± 0.0	4.0 ± 0.0
20:5	2.2 ± 0.0	2.5 ± 0.0
22:6	2.6 ± 0.0	3.1 ± 0.0
<b>Total fatty acids(mg/g)</b>	<b>41.2 ± 0.5</b>	<b>37.1 ± 0.7</b>
Values represent means ± SD (n=2)		

表1 大豆粕入り飼料と菜種粕入り飼料中の脂肪酸（FA）含量の比較

Fatty acid (FA)	Pressed can cake
Composition (%)	
Saturated FA	
14:0	0.1 ± 0.0
15:0	0.1 ± 0.0
16:0	6.1 ± 0.0
18:0	1.4 ± 0.0
20:0	0.3 ± 0.0
22:0	0.1 ± 0.0
24:0	0.0 ± 0.0
Monounsaturated FA	
14:1	0.0 ± 0.0
15:1	0.0 ± 0.0
16:1	0.5 ± 0.0
18:1 n-9	51.7 ± 0.2
18:1 n-7	6.0 ± 0.2
20:1	0.6 ± 0.0
22:1	0.0 ± 0.0
n-6 polyunsaturated FA	
18:2	25.0 ± 0.0
n-3 polyunsaturated FA	
18:3	8.0 ± 0.0
<b>Total fatty acids(mg/g)</b>	<b>84.2 ± 0.38</b>
Values represent means ± SD (n=2)	

表2 圧搾菜種粕の脂肪酸含量及び組成

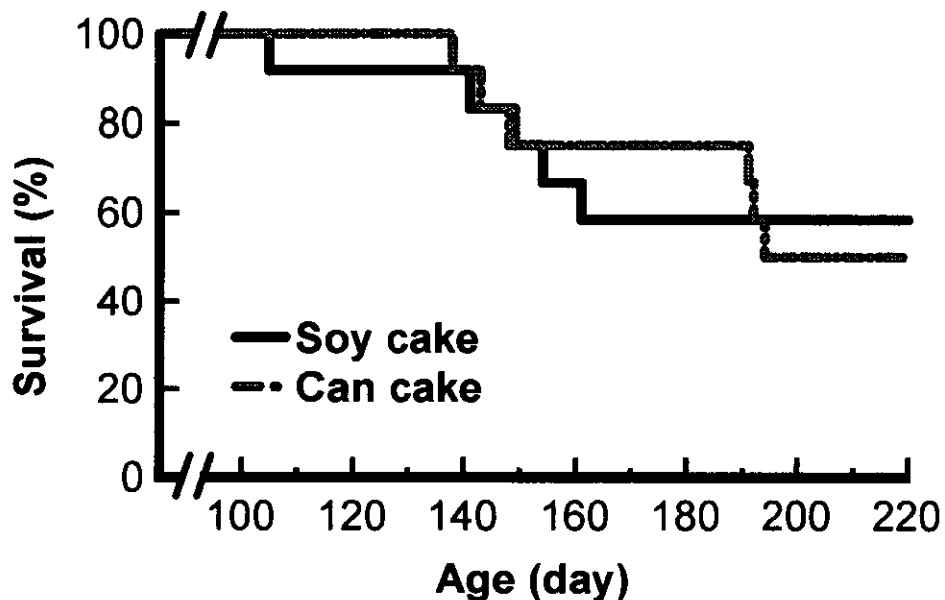


図2 SHRSP ラットの生存率の及ぼす菜種粕の影響

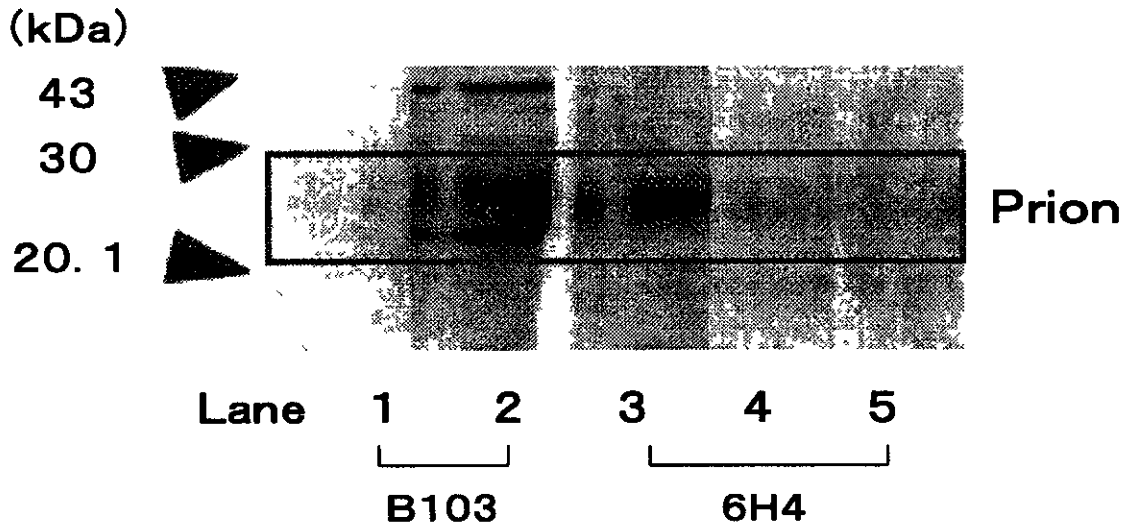
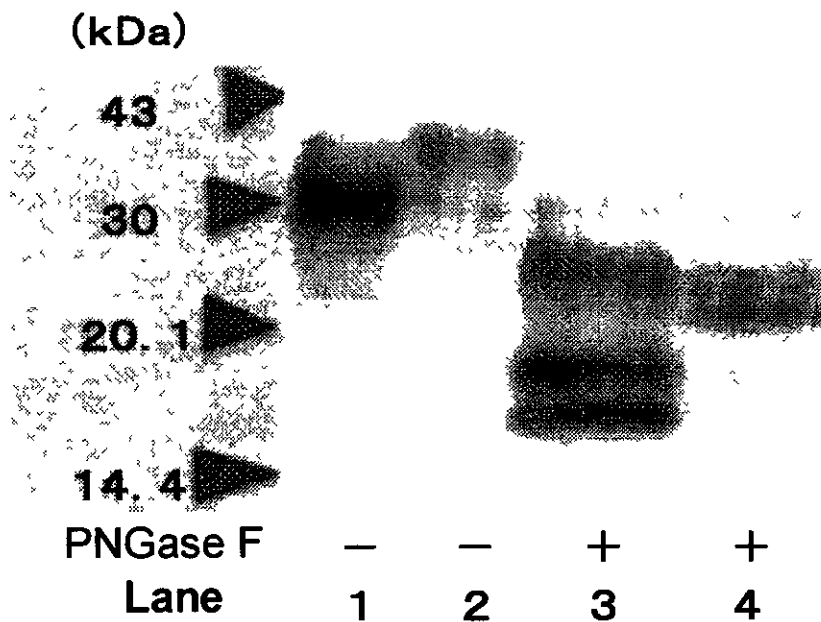


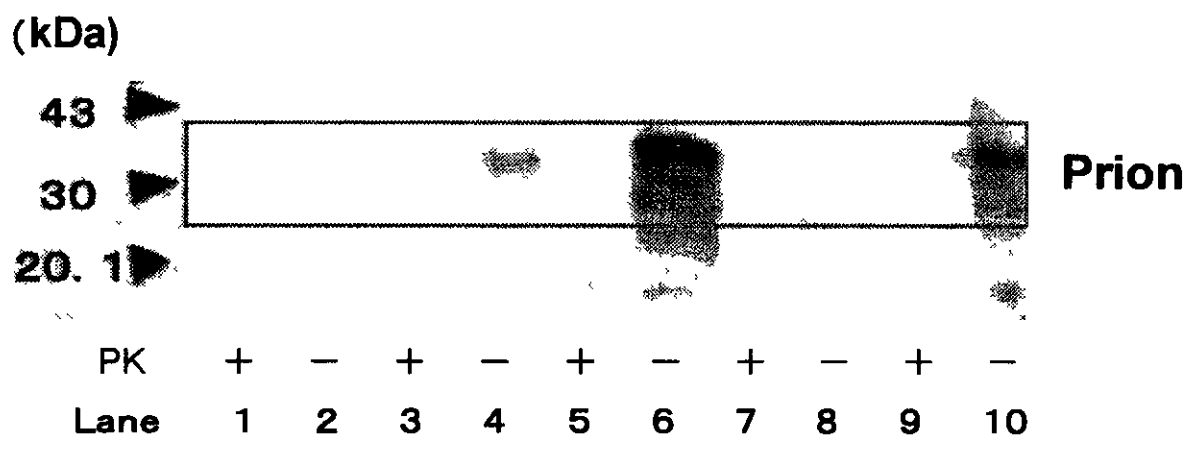
図3 抗プリオン抗体 (B103, 6H4) によるヒト骨髓系白血病細胞 (U937) のプリオン検出  
 U937 細胞抽出液について、2つの抗プリオン抗体の濃度を変えて Western blotting を行った。  
 希釈はそれぞれ Lane1 1/5000, 2 1/1000, 3 1/500, 4 1/1000, 5 1/2000。



Lane 1, 3 MRC-5 2, 4 U937

図4 細胞抽出液のグリカナーゼ F (PNGase F) 処理の影響

ヒト線維芽細胞 (MRC-5)、U937 細胞の抽出液をグリカナーゼ F 処理後、6H4 抗体を用いて Western blot 解析を行った。



Lane 1, 2 脾臓上清      3, 4 脳上清      5, 6 脳中間層  
 7, 8 脾臓ペレット    9, 10 脳ペレット

図5 ラット臓器中のプリオンの検出  
 6H4抗体 (1/1000希釈) により検出した。

## 微量有害因子の確定に有用である生物活性測定系に関する研究

分担研究者 藤井陽一 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 助教授

### 研究要旨

SHRSP ラットに菜種油および大豆油添加した飼料を給餌し、その初代肝臓細胞における繰返し配列の安定性を、ルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) をレポーターとして測定することにより検討した。菜種油は大豆油と比較して、ラット肝細胞の繰返し配列、特にプロモーターを含むトランスポソン配列の作用を抑制した。このことは、菜種油の成分が肝細胞遺伝子発現を総括的に抑制する可能性を示している。DNA チノプからのデータとも良い一致を示すことから、この生物活性の測定系は微量有害因子の迅速な確定に有用であると思われる。

### A 研究目的

我々はこれまでに、食用油の人体に与える影響を、DNA チノプとモデルラットを用いた測定系で検討してきた。遺伝子発現をアルゴリズムによりテンタルプロファイル表示することか、そのエントポイントであった。か、データ詳細を分析する時間が長いという短所がある為、さらに食用油による遺伝子発現への影響を、遺伝子発現制御状態を数値化することにより、統括的にかつ簡便に検討できうる測定系を検討した。

### B 研究方法

ラットは生後 4 週齢まで CE-2 (大豆油) により飼育し、その後 CE-2 および菜種油含有飼料で 16 週まで飼育した。実験は SPF 環境下で名古屋市立大学薬学部動物実験委員会の許可のもと行った。初代肝細胞培養法 (灌流法) を用いて、食餌の異なる SHRSP ラット (コントロール CE-2 大豆油群、及び菜種油群) より肝細胞を分離、培養した。また、HIV-1 LTR の下流にルシフェラーゼ (LUC) 遺伝子を導入したプラスミドを構築した。それぞれの初代肝細胞、およびマウス由来肝臓細胞株 (Hepa 1-6) における HIV-1 Tat に対する転写活性を LUC assay により検討した。

### C 研究結果

通常の飼料による食餌では、これまで肝臓においてトランスジェニックマウスを用いた実験で、転写活性化因子である Tat 非存在下において、レトロトランスポソン HIV-1 LTR は低い転写活性化を示すという報告がある。そこで *in vivo* における Tat の存在下でのプロモーター活性化実験を行った。コントロール群 (CE2 大豆油食餌群) からの肝細胞において、トランスポソン転写活性はプロモーターを含まない測定コン

トロールと比べ 1.5 倍の活性を示した。一方、菜種油群においては全く活性化を示さなかった。また、Hepa1-6 細胞株を用いた同様の測定においても、測定コントロールとの有意な差は無かった。総して大豆油と比較すると、菜種油では 50% 以上の発現抑制が予測される測定結果となった。

### D 考察

菜種油によるプロモーター抑制は、同時に測定したマウス肝臓細胞 Hepa1-6 における結果とほぼ類似した結果となった。癌化細胞は一般に DNA の高メチル化により遺伝子発現が抑制されることか知られており、本研究結果は、菜種油の成分に、遺伝子に影響を及ぼす物質が含まれている可能性および肝臓細胞を機能的異常 (癌化) へと誘導する物質が含まれている可能性を示唆している。本事業における他の研究結果を合わせ考慮すると、菜種油の連続摂取は、人体、特に肝臓細胞への遺伝子レベルでの著しい有害性をもたらす可能性があり、そのことを憂慮するものである。

### E 結論

全ゲノム遺伝子群 (1-2%) は、繰返し配列プロモーター (~80%) により囲われていることかヒト、ラットゲノムプロジェクトで判明している現在 (平成 16 年 3 月)、繰返し配列の ~20% を占めるレトロトランスポソンプロモーターの転写活性から遺伝子発現を総括的に予測する今回の試みからは、合理的な結果を得る事ができたと考える。従って、本測定系は更なる改良の必要性はあるものの食用油に含まれる微量有害因子の生物活性測定に有用である。

## F 健康危険情報

モデルラットにおける実験結果であるか、本研究結果はヒトの健康への危険度を側定する必要かあることを暗示している。本側定系がヒト血液細胞にも応用可能であれば、大規模なコホート調査を行う必要性を分担研究者として感ずる。現時点での危険情報は本研究から無い。

## G 研究発表

### 1 論文発表

T Yamamoto, S Omoto, M Mizuguchi, H Mizukami, H Okuyama, N Okada, N K Saksena, E A Brisibe, K Otake and Y R Fujii Double-stranded nef RNA interferes with human immunodeficiency virus type 1 replication *Microbiol Immunol*, **46**, 809-817, 2002

山本拓也、大本真也、奥山治美、水上元、ヒリンヘ・A・エヒアマトン、大竹かおり、藤井陽一 エイスとRNA<sub>1</sub> RNAワクチンへの助走 細胞工学、22、178-185、2003

E A Brisibe, N Okada, H Mizukami, H Okuyama and Y R Fujii RNA interference potentials for the prevention of HIV infections and the challenges ahead *Trends Biotech*, **21**, 306-311, 2003

M Kawai, L He, T Kawamura, S Omoto Y R Fujii, and N Okada Chimeric human/murine monoclonal IgM antibodies to HIV-1 Nef antigen expressed on Chronically infected cells *Microbiol Immunol* **47**, 247-253, 2003

大本真也、伊藤真文、奥山治美、藤井陽一 RNA<sub>1</sub>を用いたAIDS治療の展望 RNAワクチンの可能性 *Molecular Medicine*, **41**, 34-39、2004

K Otake, S Omoto T Yamamoto, H Okuyama, H Okada, N Okada, M Kawai, B Wang, N K Saksena, and Y R Fujii HIV-1 Nef in the nucleus influences

adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors *AIDS*, **18**, 1-10 2004

Y Fujii, Y Murase, K Otake, Y Yokota, S Omoto, H Hayashi, H Okada, N Okada, M Kawai, H Okuyama, and K Imakawa A potential live vector, foamy virus, directed intra-cellular expression of ovine interferon- $\tau$  exhibited the resistance to HIV infection *J Vet Med Sci* **66**, 115-121, 2004

### 2 学会発表

山本拓也、大本真也、清水里奈、杉山真也、光木裕也、安井裕子、市川祐子、藤井陽一、奥山治美 哺乳動物細胞におけるHIV-1 nefのRNA<sub>1</sub>による発現抑制 日本薬学会第124年会（大阪）2004年3月29-31日

大本真也、山本拓也、清水里奈、杉山真也、光木裕也、安井裕子、市川祐子、藤井陽一、奥山治美 AIDSワクチン開発を目的としたフォーミーウイルスヘクターによるshRNAテリハリシステムの詳細 日本薬学会第124年会（大阪）2004年3月29-31日

## H 知的財産権の出願・登録状況

### 1 特許出願

2000-351517 スーパーマウウイルスプラスミドおよびその利用 2000 藤井陽一

### 2 実用新案登録

### 3 その他



## 菜種油微量成分の化学的解析

分担研究者 永津 明人 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 講師

## 研究要旨

Ratnayake 博士から提供された「植物ステロール画分」の微量成分から、いずれも長鎖アルキルの炭化水素 5 種を単離した。

## A 研究目的

キャノーラ油を摂食させた SHR-SP ラットの寿命短縮因子を化合物のレヘルで特定することを目的に、今年度は、含有されている可能性のある画分として Ratnayake 博士から提供された「植物ステロール画分」の微量成分の同定と、候補化合物であるイントール誘導体のキャノーラ油中からの検出を試みた。

## B 研究方法

「植物ステロール画分」の微量成分の同定

Ratnayake 博士がキャノーラ油より水蒸気蒸留により得た、植物ステロール混合物中の微量成分の検索を行った。

植物ステロール混合物約 1 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて 4 画分に分離した。ステロール画分 (860 mg) より低極性の 3 画分 A (45 mg)、B (10 mg)、C (20 mg) をそれぞれ分取 TLC を用いて分画した。

イントール誘導体のキャノーラ油中からの検出

以前、ナタネ油粕の成分探索の過程で数種のイントールアセトニトリル誘導体を単離したことから、これらの化合物及びこれらの化合物の水酸基に脂肪酸が結合した化合物がナタネ油中に存在することか考えられる。その可能性の確認のためキャノーラ油をメタノール抽出し、その抽出物中の各種イントールアセトニトリル誘導体の検出を試みた。

## C 研究結果

植物ステロール画分の微量成分の同定

画分 A からは化合物 1 (14 mg)、2 (7 mg)、3

(3 mg) の 3 化合物に分画することかできた。

化合物 1 は  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルから単純な長鎖炭化水素であることか推定できた。EI-MS スペクトルから、分子量が 408 であること、規則正しい 14 mass unit ことフラグメントか観測されること、さらに高分解能 EI-MS より分子式が  $\text{C}_{29}\text{H}_{60}$  と特定できたことなどから、直鎖の  $\text{C}_{29}\text{H}_{60}$  と決定した。

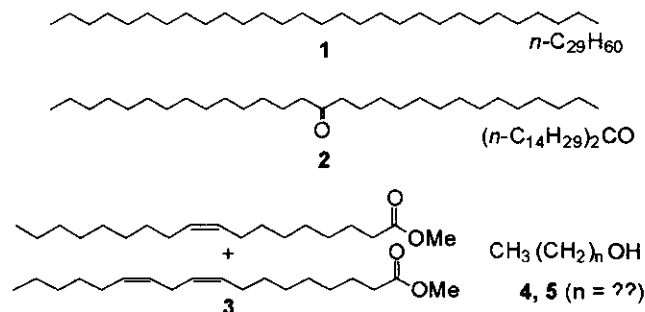


Fig 1 「植物ステロール画分」から単離された微量成分

化合物 2 はやはり直鎖炭化水素を示唆する  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルであったか、2.5 ppm にメチレンプロトンのシグナルか観測されること、 $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルにおいてケトンのシグナルか観測されることから、直鎖炭化水素にカルボニル基か挿入された構造であることか示唆された。高分解能 EI-MS より分子式が  $\text{C}_{29}\text{H}_{58}\text{O}$  と特定できたこと、フラグメントイオンピークとして 225 と 241 が特に強く観測されることから、 $\text{C}_{29}$  個の直鎖炭化水素のちょうど真ん中にカルボニル基か存在する  $(\text{C}_{14}\text{H}_{29})_2\text{CO}$  と決定した。

化合物3は<sup>1</sup>H-NMRスペクトルにおいて直鎖炭化水素を示唆する末端メチル基とメチレンのシグナルのほか、メトキシ基とオレフィンの存在を示すシグナルが観測された。<sup>13</sup>C-NMRスペクトルにおいてエステルカルボニル基のシグナルが存在すること、EI-MSスペクトルで296と294に分子イオンピークが観測されることから、オレイン酸とリノール酸のかくメチルエステルの混合物であることがわかった。

画分Bからは化合物4(4mg)を、画分Cからは化合物5(3mg)をそれぞれの画分の主成分として単離した。化合物4,5とも直鎖炭化水素を示唆する<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示したか、3.57ppmにtripletのシグナルが2H分観測されたことから直鎖の片方の末端に水酸基が存在することが示され、直鎖アルコールと推定している。現在マススペクトルのデータを解析中である。

#### イントール誘導体のキャノーラ油中からの検出

市販のイントールアセトニトリル誘導体のHPLCにおける検出条件を調べた後、これらを標準品としてキャノーラ油300gからメタノールで抽出した抽出物をHPLC分析に付した。しかしながら、各種イントールアセトニトリル誘導体を検出することは出来なかった。現在、さらに抽出に用いるキャノーラ油の量を増やして検討を行っている。

ところで、最終目標であるSHR-SPラットの寿命短縮因子を化合物のレベルで特定に関して、大量の油からいかに微量なものだけを選択的に取り出すかというのか、この研究のネックとなっていたか、先般、分子蒸留処理を行った油には寿命短縮作用が見られなくなることがわかった。このため、来年度は分子蒸留によって除かれたものにスポットを当て、装置の減圧ポンプ手前のコールド

トラップに残留する残渣の存在が明らかとなったことから、その残渣について探索を行う予定である。

#### D 考察

植物ステロール画分から得られた化合物は、いずれも長鎖アルキルの炭化水素で、これらの自然界での分布や食物中の量などを考えると、寿命短縮効果に参与してはいないと考えられる。よって、この植物ステロール画分の寿命短縮へに寄与はあったとしても微弱なものと考えられる。

イントールアセトニトリル誘導体の検出は大量の油(トリクリセリト)の影響を除くことかてきず困難な可能性もある。抽出方法も含めて検討を行っている。

#### E 結論

Ratnayake博士から提供された「植物ステロール画分」から微量成分として5化合物を単離、いずれも長鎖アルキルの炭化水素と同定した。イントールアセトニトリル誘導体の検出は困難でさらに検討が必要となった。

#### F 研究発表

##### 1 論文発表

Nagatsu A., et al., *Nat. Prod. Research* **18**, (2004) 印刷中

##### 2 学会発表

なし

#### G 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1 特許取得

なし

##### 2 実用新案登録

なし

##### 3 その他

なし

ヤギの成長に及ぼすナタネ粕長期給与の影響

分担研究者 大谷 滋 岐阜大学応用生物科学部 教授

研究要旨

ナタネ粕を反芻動物に母子2代にわたって給与し、長期間の摂取が動物に与える影響を評価することによってナタネ粕に残留する微量有害因子の存在を検索しようとした。現在実験は継続中であり結論は得られていないが、これまでのところ子ヤギの成長および健康状態に異常は認められない。

A 研究目的

ナタネはコイトロケンであるクルコシノレートを含んでおり、その搾油粕はタンパク質含量が高いが飼料原料としての利用は困難であった。しかし、低クルコシノレート含量のナタネ品種が開発されナタネ粕はタンパク質供給飼料原料としてウン、フタ、ニワトリなど家畜・家禽はもとよりイヌ用のペトフードにまで広く使用されている。一方、BSE やスクレイピーなどいわゆるプリオン病における異常プリオンの発現に菜種油中の微量有害因子が関与している可能性が示唆されており、その搾油残渣であるナタネ粕にも残留していることが十分に考えられる。そのため、本研究はナタネ粕を母子二代にわたって長期間、反芻動物に給与し、健康状態や血液性状および子の成長を観察するとともに、給与期間終了後に屠殺し種々の組織における異常プリオンの発現がないかを調査する。

を調査する。

B 研究方法

① 供試動物

妊娠中の日本在来種ヤギ雌6頭およびその産子を供試した。3頭ずつの2区に分け、それぞれナタネ粕あるいはダイス粕を給与した。ダイス粕給与区の母ヤギ1頭は分娩しなかったため試験から除外した。産子は離乳まで母ヤギと同居させ、離乳後は各母ヤギと同じ飼料を給与した。

② 供試飼料

給与飼料としてイタリアンライクラス乾草（岐阜大学農学部附属農場産）とダイス粕およびナタネ粕を使用した。それら飼料の乾物およびTDN含量と一般成分、Ca、P含量を表1に示した。

表1 給与飼料の概要

飼料名	DM	TDN	CP	EE	NFE	CF	Ca	P
	%						% of DM	
乾草	85.8	62.2	11.3	2.7	43.1	33.2	0.47	0.36
ナタネ粕	87.7	73.6	37.6*	2.5	36.8	11.1	0.71	1.25
大豆粕	88.3	86.8	49.8*	1.5	33.3	7.9*	0.33	0.70

DM 乾物率(%), TDN 可消化養分総量, CP 粗蛋白質, EE 粗脂肪, NFE 可溶性無窒素物, CF 粗繊維

表中の値は日本標準飼料成分表（2001年版）による。

\*の付いた値は飼料メーカーの保証成分値。

③ 飼料給与量および給与方法

給与飼料の栄養組成から日本飼養標準めん羊（1996年版）を参考にして、TDN および粗タンパク質量を充足できるよ

う、妊娠末期から分娩まで、分娩から離乳まで、離乳から離乳後4ヶ月までおよび離乳後5ヶ月以降の4期に分けて給与量を変えて給与した。ナタネ粕およびダイス粕の配合比率は全飼料中のタンパク質と炭

水化物の給与量比率から上限と考えられるほぼ20%とし、イタリアンライクラス乾草と混合給与した(表2)。1日あたりの給与量を朝・夕2回に等分して与えた。分娩後の子ヤキは離乳するまでの2ヶ月

間母ヤキと同居させた。また、離乳後の子ヤキは各給与飼料区ごとに群飼した。水および鉱塩は実験期間を通して自由摂取とした。

表2 飼料給与量および飼料中の試験飼料比率

	母ヤキ		子ヤキ	
	ナタネ粕区	大豆粕区	ナタネ粕区	大豆粕区
妊娠末期～分娩 <sup>1)</sup>				
給与量(g/day)	833	843	—	—
試験飼料比率(%)	20.4	20.3	—	—
分娩～離乳 <sup>2)</sup>				
給与量(g/day)	1293	1295	—	—
試験飼料比率(%)	20.4	20.5	—	—
離乳～離乳後4ヶ月				
給与量(g/day)	1077	1079	348	397
試験飼料比率(%)	20.4	20.5	21.2	22.2
離乳後5～9ヶ月 <sup>3)</sup>				
給与量(g/day)	862	755	498	480
試験飼料比率(%)	20.4	20.5	20.8	20.8

1) 各処理区とも n=3

2) ナタネ粕区 n=3, 大豆粕区 n=2 (出産しなかった個体を除いた)

子ヤキは母乳を摂取(ただし、1ヵ月齢程度から母親の飼料を摂取しているのか観察された)

3) ナタネ粕区 n=3, 大豆粕区 n=2 (出産しなかった個体を除いた) 子ヤキは群飼育

#### ④ 分析試料の採取

各供試個体について試験開始後毎月1回頸静脈より採血し、血清を分離した後、分析まで-30℃で凍結保存した。

(倫理面への配慮)

本実験計画は岐阜大学農学部動物実験指針に基づいて行ったものである。

### C 実験結果

#### ① 飼料摂取量および試験飼料比率

飼料摂取量および摂取飼料中の試験飼料比率を表3に示した。

母ヤギでは妊娠末期から分娩までの間、

乾草の残食があったか、ナタネ粕およびダイス粕の残食はなかったため、試験飼料の全飼料に占める比率はやや高くなった。分娩以降の期間でも個体により乾草の残食があったか、試験飼料の全飼料に占める比率はほぼ20%であった。ナタネ粕区とダイス粕区の間には飼料摂取量および試験飼料比率に差は認められなかった。

子ヤキは離乳まで母ヤキと同居させたか、生後1ヶ月頃から母ヤキの飼料を食べているのか観察された。離乳後は乾草の残食が少量あったか給与量をほぼ摂取した。母ヤキと同様、子ヤキにおいても、ナタネ粕区とダイス粕区の間には飼料摂取量および試験飼料比率に差は認められなかった。

表3 飼料摂取量および摂取飼料中の試験飼料比率

	母ヤキ				子ヤキ	
	ナタネ粕区		大豆粕区		ナタネ粕区	大豆粕区
妊娠末期～分娩 <sup>1)</sup>						
摂取量(g DM)	785	± 66	738	± 137	—	—
試験飼料比率(%)	21.7	± 1.7	23.1	± 5.3	—	—
分娩～離乳 <sup>2)</sup>						
摂取量(g DM)	1274	± 31	1281	± 20	—	—
試験飼料比率(%)	20.7	± 0.5	20.7	± 0.3	—	—
離乳～離乳後4ヶ月						
摂取量(g DM)	1070	± 2	1072	± 9	337	368
試験飼料比率(%)	20.5	± 0.0	20.6	± 0.2	21.9	24.0
離乳後5～9ヶ月 <sup>3)</sup>						
摂取量(g DM)	862	± 0	755	± 153	495	475
試験飼料比率(%)	20.4	± 0.0	20.5	± 0.0	20.9	21.1

1) 各処理区とも n=3

2) 母ヤキ ナタネ粕区 n=3, 大豆粕区 n=2 (出産しなかった個体を除いた) 子ヤキ ナタネ粕区 n=5, 大豆粕区 n=3

子ヤキは母乳を摂取 (ただし, 1 ヶ月齢程度から母親の飼料を摂取しているのか観察された)

3) 母ヤキ ナタネ粕区 n=2, 大豆粕区 n=2 (ナタネ粕区1頭死亡)

## ② 体重の推移

供試ヤキの体重および日増体量の推移を表4に示した。

母ヤキにおいてはナタネ粕区およびダイス粕区ともに分娩後離乳までに体重が減少したか、分娩後における通常の範囲内の変化であった。その他の期間においては、

両区とも大きな体重変化は認められなかった。

ダイス粕区の子ヤキにおいては単仔であった個体が大きく、個体間で体重差が認められたか、現在までのところ両区の子ヤキともほぼ順調に成長した。

表4 体重の推移

	母ヤキ		子ヤキ	
	ナタネ粕区	大豆粕区	ナタネ粕区	大豆粕区
体重(kg)				
試験開始時 <sup>1)</sup>	36.3 ± 2.9	34.6 ± 6.5	—	—
分娩直後 <sup>2)</sup>	35.6 ± 4.2	33.9 ± 11.9	2.2 ± 0.6	2.3 ± 0.5
離乳直後	31.8 ± 2.6	31.6 ± 11.5	7.8 ± 1.5	9.7 ± 2.6
離乳後 1ヵ月	32.4 ± 4.6	31.7 ± 11.9	10.5 ± 1.5	12.5 ± 3.8
離乳後 2ヵ月	32.8 ± 3.6	33.0 ± 9.9	11.0 ± 1.6	13.1 ± 3.9
離乳後 3ヵ月	34.1 ± 5.4	34.3 ± 9.5	11.9 ± 1.7	12.6 ± 2.5
離乳後 4ヵ月	35.1 ± 6.9	34.7 ± 9.5	12.5 ± 1.3	14.7 ± 4.7
離乳後 5ヵ月 <sup>3)</sup>	36.9 ± 8.1	34.7 ± 9.2	15.2 ± 1.7	16.4 ± 5.4
離乳後 6ヵ月	36.3 ± 6.6	35.0 ± 9.6	15.4 ± 0.7	16.7 ± 6.0
離乳後 7ヵ月	34.6 ± 7.6	33.9 ± 10.9	16.5 ± 1.5	17.4 ± 6.8
離乳後 8ヵ月	35.8 ± 7.9	33.2 ± 9.9	15.8 ± 2.2	17.1 ± 8.9
離乳後 9ヵ月	36.6 ± 8.1	35.7 ± 12.0	17.0 ± 2.3	19.1 ± 10.4
日増体重(g/day)				
開始～分娩	29 ± 17	16 ± 24	—	—
分娩～離乳	-67 ± 42	-23 ± 32	87 ± 21	119 ± 34
離乳～離乳後4ヶ月	20 ± 27	11 ± 27	37 ± 7	26 ± 7
離乳後5～6ヶ月	29 ± 18	7 ± 5	59 ± 10	67 ± 60
離乳後7～9ヶ月	-3 ± 1	9 ± 25	17 ± 20	24 ± 45
離乳後全期間	16 ± 16	15 ± 2	26 ± 5	24 ± 10

1) 各処理区とも n=3

2) 母ヤキ ナタネ粕区 n=3, 大豆粕区 n=2 (出産しなかった個体を除いた) 子ヤキ ナタネ粕区 n=5, 大豆粕区 n=3

3) 母ヤキ ナタネ粕区 n=2, 大豆粕区 n=2 (ナタネ粕区1頭死亡)

### ③ 供試ヤキの健康状態

ナタネ粕区の母ヤキ1頭か子ヤキの離乳後5ヶ月後(供試飼料給与開始後9ヶ月)に死亡した。死亡前の数日間食欲が減退したか、体温・便等は正常で特に顕著な肉眼的所見は認められなかった。病的に顕著な症状も認められなかったことから、死亡に至った原因は明らかではないか、給与飼料中のタンパク質含量がかなり高かったことから第1胃内性状の異常による要因が考えられた。

その他の供試ヤキの健康状態に特に異常は認められなかった。

### D 考察および結論

本研究はナタネ粕を反芻動物に長期間給与することか成長、血液性状、組織所見などに及ぼす影響を調べようとしたものである。現在母

ヤキにおいては試験飼料給与開始から14ヶ月、子ヤキでは試験飼料摂取開始からほぼ12ヶ月を経過した時点である。死亡した母ヤキ1頭を除く他の供試ヤキには健康上の問題は認められない。今後引き続きナタネ粕を長期間給与した後屠殺して、血液性状、組織所見などについて検討しナタネ粕に微量有害因子が存在するかを検索する予定である。

### E 研究発表

- 1 論文発表 なし
- 2 学会発表 なし

### F 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得 なし
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

## ステリルグルコシドの生理活性に関する研究

分担研究者 小林哲幸 お茶の水女子大学理学部 助教授

### 【研究要旨】

植物ステロールには、遊離型ステロールの他に糖が結合したステリルグルコシドや、糖と脂肪酸が結合したアンルステリルグルコシドなども存在する。本研究では、大豆由来のステリルグルコシドなどを用いて、細胞のストレス応答に関わる新しい生物活性を検討した。具体的には、ラットにステリルグルコシドを経口投与した後、寒冷拘束ストレスを与えて胃潰瘍の発症を定量解析した。その結果、大豆由来ステリルグルコシドの他、 $\alpha$  コレステリルグルコシドと $\beta$  コレステリルグルコシドに、強い抗潰瘍作用のあることが明らかとなった。その作用機序として、熱ショックタンパク質（Hsp）の誘導が関わっていることが考えられた。Hspを介したストレス応答機構を撓乱するステリルグルコシドが存在する可能性も考えられ、今後、更に検討する必要がある。

### A 研究目的

菜種油中の寿命短縮因子には複数の化合物が関わっていることが示唆されているか、その一つとして植物ステロールが考えられている。植物ステロールには、遊離型ステロール以外にも糖が結合したステリルグルコシドや、さらに脂肪酸も結合したアンルステリルグルコシドなど各種誘導体が存在する。しかし、これらステリルグルコシド類の生物活性、有害性についての研究はほとんどない。一方、我々は、外界からの物理的、化学的ストレスを受けた細胞が、自らを守るためのストレス応答を行う際に、ステリルグルコシドを合成誘導して役立っていることを明らかにしてきた。本研究では、これらステリルグルコシドの生物活性を詳しく探ることで、有害因子としての可能性を解析した。具体的には、ラットのストレス誘導性胃潰瘍モデルを評価系として用いた。

### B 研究方法

#### ① 材料

体重 200 230g の Sprague Dawley ラット（雌）を用いた。ラットはステリルグルコシドの投与前 24 時間、食事を断った。水は投与直前まで与えていた。

#### ② ステリルグルコシドの調製

大豆より精製したステリルグルコシド混合物を用いた。また、 $\alpha$ -コレステリルグルコシドと $\beta$  コレステリルグルコシドは、有機合成したものをを用いた。これらステリルグルコシドを、ハノファー（5%アラビアコム、0.6%Tween80）

に 20mg/300 $\mu$ l の濃度になるように加え、激しく攪拌し、超音波処理することで乳化させたものを使用した。

#### ③ ラット胃粘膜へのステリルグルコシド投与

ラットは、体重測定後、軽くエーテル麻酔を行い、胃ソング（NATUME,  $\phi$  20 × L 90mm, KN 349）により、100mg/kg のステリルグルコシドを経口投与した（体重 200g のラットでは、投与量 20mg/300 $\mu$ l）。コントロールには、ハノファーのみ与えた（buffer 群）。ステリルグルコシド、ハノファー投与後のラットはケージに戻し、室温で 30 分間放置した後、以下に述べる寒冷拘束ストレス実験に使用した。

#### ④ 寒冷拘束ストレス誘導性胃潰瘍の観察と潰瘍係数の測定

ステリルグルコシド投与群（SG）、コントロール群（buffer）のラットは金属性の拘束ケージに入れて拘束し、4℃でストレスを負荷した。ストレス負荷は、ラットの活動時間である 0 時から 5 時の間で 2 時間行った。ストレス負荷後、ラットを拘束ケージより出して、軽くエーテル麻酔を行い、開腹して胃を摘出した。摘出した胃は、大弯に沿って切開し、PBS で洗った。その後、実体顕微鏡（OLYMPUS VS IV）にデジタルカメラ（OLYMPUS DP11）を接続し、胃粘膜表面を撮影した。その画像は、NIHImage を用いて出血巣の長径を測定、その総和（潰瘍係数 UI, mm）を求めた。実験に用いた各群の

ラットは、大豆由来ステリルグルコシト投与群 4 匹、コントロール群 6 匹、グルコース投与群 2 匹である。また、 $\alpha$ 、あるいは $\beta$  コレステリルグルコシト投与の場合は、コントロール群もすべて各群 5 匹で行った。

## C 研究結果

### ① 大豆由来ステリルグルコシトかラット寒冷拘束ストレス潰瘍に及ぼす影響

大豆より精製したステリルグルコシト混合物の主要なステロール組成は、シトステロール 57%、カンペステロール 25%、スティクマステロール 16% の割合であった。

大豆由来のステリルグルコシトを経口投与した後、30 分間放置したラットに、2 時間の寒冷拘束ストレスを与え、胃粘膜の様子を観察した (図 1)。ハノファーのみ投与したコントロール群ラットの胃粘膜では、寒冷拘束ストレス誘導性の出血巣が胃粘膜全体にわたって観察された。一方、100 mg/kg の大豆由来ステリルグルコシト投与群では出血巣数の減少傾向が見られ、3 mm 以上の大きな出血巣数はステリルグルコシト投与群では 2 分の 1 以下となっていた (図 1A)。各ラットの出血巣長径の総和を潰瘍係数 (UI) として評価した結果、ステリルグルコシト投与により、有意な抑制が見られ、その抑制率は 52% であった (図 1B)。

### ② ピロリ菌型ステリルグルコシトかラット寒冷拘束ストレス潰瘍に及ぼす影響

胃潰瘍、胃かんと因果関係が疑われているピロリ菌には、大量のステリルグルコシトが存在し、また、その構造も $\alpha$  ステリルグルコシトを基本骨格にしており、一般の植物や動物中のステリルグルコシトか $\beta$ 型であることとは異なっている。そこで、①で見られた抗胃潰瘍作用について、有機合成した $\alpha$  ステリルグルコシトと $\beta$ -ステリルグルコシトを用いて比較検討した。

ハノファーのみを経口投与したコントロール群、 $\alpha$  コレステリルグルコシト投与群、 $\beta$ -コレステリルグルコシト投与群 (各群 n=5) に寒冷拘束ストレスを与え、形成された胃潰瘍の数と長さを測定し、その総和として潰瘍係数 (UI) で表した (図 2)。表の n はその個体における潰瘍の数を、各数値は潰瘍の長さを、UI は潰瘍の長さの総和を示す (図 2A)。比較のため、UI 値をグラフに示した (図 2B)。コントロール群では潰瘍の数も多く、その大きさも数 mm 単位に及ぶものも多く見られた。一方、コ

レステリルグルコシト投与群においては $\alpha$  コレステリルグルコシト群、 $\beta$  コレステリルグルコシト群ともに潰瘍の数は極めて少なく、その大きさもコントロール群に比べ、ほとんど小さいものであった。また、 $\alpha$  コレステリルグルコシト群においては、潰瘍形成が観察されない個体が多くみられた。潰瘍形成の抑制率は、 $\alpha$  コレステリルグルコシト投与群では 84 $\pm$ 9%、 $\beta$ -コレステリルグルコシト投与群では 76 $\pm$ 11% であり、いずれも強い抑制作用を示した。

## D 考察

植物ステロールの一種であるステリルグルコシトは、最近、細胞内ストレス応答の初期過程への関与が示唆されている。本研究では、ラットの寒冷拘束ストレスにより誘導される胃粘膜傷害に対して、大豆由来ステリルグルコシトの経口投与かどのような作用を示すかを検討した。その結果、大豆由来ステリルグルコシトに、ストレス誘導性胃粘膜傷害を軽減化する活性のあることが示された。大豆由来ステリルグルコシトの主成分は、 $\beta$  シトステリルグルコシトであり、その他の成分として、 $\beta$  カンペステリルグルコシトと $\beta$  スティクマステリルグルコシトであった。活性成分の本体か、これらステリルグルコシトのどの成分に対応するのかはまた明らかではない。

また、有機合成した $\alpha$  コレステリルグルコシト、あるいは $\beta$  コレステリルグルコシトを経口投与した場合にも、抗胃潰瘍作用が認められた。 $\alpha$  コレステリルグルコシトはピロリ菌に豊富に存在することが知られており、その経口投与は潰瘍を増悪化する可能性が考えられたか、今回の結果は反対に抗潰瘍活性が観察された。しかし、細胞傷害性については、投与量や投与形態などの条件を変えて更に検討する必要がある。

ステリルグルコシトの抗潰瘍活性の作用機序としては、以下のことが考えられる。第一に、経口投与したステリルグルコシトが胃粘膜細胞に直接作用し、熱ショックタンパク質 Hsp70 を誘導することにより胃粘膜細胞に対して抗アポトーシス作用などを示す可能性である。第二に、ストレス時の虚血再灌流によって発生したフリーラジカルの除去に関与し、胃粘膜を血流障害から保護する可能性、第三に、自律神経系の機能亢進によって過剰に放出された副腎皮質ホルモン (クルコルチコイト) の、胃粘膜細胞への作用を抑制する可能性である。コレステリルグルコシトはヒト正常線維芽細胞



(TIG-3細胞)において、効果的にHsp70を誘導することか既に明らかとなっている。また、現在、臨床で広く使用されている胃潰瘍治療薬ケラニルケラニルアセトン(テプレノン)は、胃粘膜細胞でのHsp70誘導を介して粘膜保護作用を示すとの報告がある。作用機作の解明には更なる解析が必要であるか、今回得られた知見は、コレステリルクルコントか細胞保護作用を示す新たな因子として働くことを示唆している。また、一方で、この細胞保護機構を攪乱するような化合物は、ストレス依存的な細胞傷害性を発揮することか予想される。今後は、食用油中に存在するステリルクルコント成分の定量分析を行うとともに、経口投与量の検討や他の構造類似体での解析をさらに進めて行く必要かあろう。

#### E 結論

今回の研究結果から、大豆由来のステリルクルコントには、経口摂取した場合に抗胃潰瘍作用のあることか、ラットの寒冷拘束ストレス胃潰瘍形成実験で示された。また、有機合成した $\alpha$ -コレステリルクルコント、あるいは $\beta$ -コレステリルクルコントにも、強い抗潰瘍作用のあることか明らかとなった。しかし、ステリルクルコントの中には、細胞障害性を示すものかある可能性も考えられ、今後、菜種油(粕)などに含まれるステリルクルコントを分析・定量し、その細胞障害活性を解析するする必要かある。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 論文発表

Yuko Fujiwara, Agnes Sebok, Susan Meakin, Tetsuyuki Kobayashi, Kimiko Murakami-Murofushi, Gabor Tigyı (2003) Cyclic-phosphatidic acid elicits the neurotrophin-like actions in embryonic hippocampal neurons J Neurochem 87 1272-1283

Shoko Kunimoto, Wataru Murofushi, Isao Yamatsu, Yukie Hasegawa, Narie Sasaki, Susumu Kobayashi, Tetsuyuki Kobayashi, Hiromu Murofushi, and Kimiko Murakami-Murofushi (2003) Cholesteryl glucoside-induced protection against gastric ulcer Cell Struct Funct 28 179-186

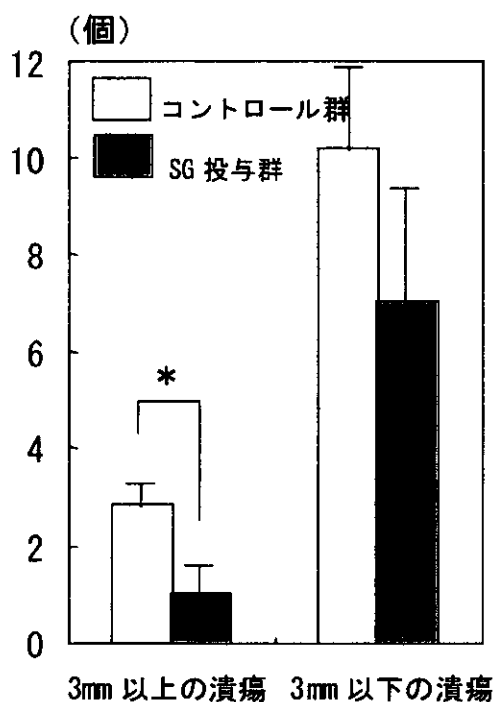
##### 学会発表

Hiromi Miki, Narie Sasaki, Kimiko Murakami-Murofushi and Tetsuyuki Kobayashi Induction of steryl glucosides coupled to heat resistance in *Saccharomyces cerevisiae* 第76回日本生化学会(パンフィコ横浜)平成15年10月15-18日 生化学 第75巻、第8号、p 998 (2003)

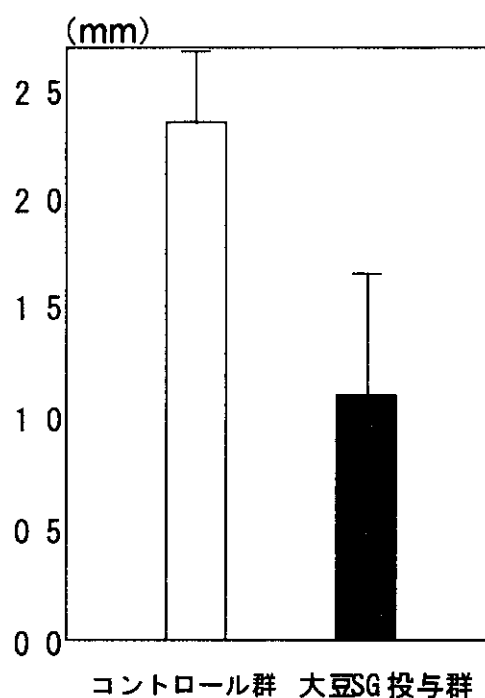
#### H 知的財産権の出願・登録状況

なし

(A) 胃潰瘍数



(B) 胃潰瘍係数



抑制率 52%

図1 寒冷拘束ストレス誘導性潰瘍に対する大豆由来ステリルクルコシトの影響

(A) 大豆由来ステリルクルコシトを経口投与したラット群とハンファーのみを与えた群の胃粘膜における潰瘍の数を比較した。潰瘍の長径が3mm以上と以下の場合に分けて、潰瘍数を数えた。(B) 形成された胃潰瘍の数と長さを測定し、その総和を潰瘍係数 (UI) として表した。数値は、平均±標準誤差、\*  $p < 0.05$  (Student's t test)。

(A)

Buffer							
	Rat1	Rat2	Rat3	Rat4	Rat5	Mean	SE
1	4	09	29	15	16		
2	25	16	1	3	07		
3	05	05	1	22	05		
4	1	03	05	05	05		
5	2	07	05	1			
6	1		35				
7	05						
n=	7	5	6	5	4	5.40	0.5
UI	115	4	9.4	8.2	3.3	7.28	1.58

$\alpha$ -CG							
	Rat1	Rat2	Rat3	Rat4	Rat5	Mean	SE
1	2	0	21	0	0		
2	12						
3	05						
n=	3	0	1	0	0	0.80	0.6
UI	37		21			1.16	0.51

$\beta$ -CG							
	Rat1	Rat2	Rat3	Rat4	Rat5	Mean	SE
1	1	1	05	03	0		
2	07	03		05			
3				15			
4				3			
n=	2	2	1	4	0	1.8	0.7
UI	17	13	05	53	0	1.76	0.93

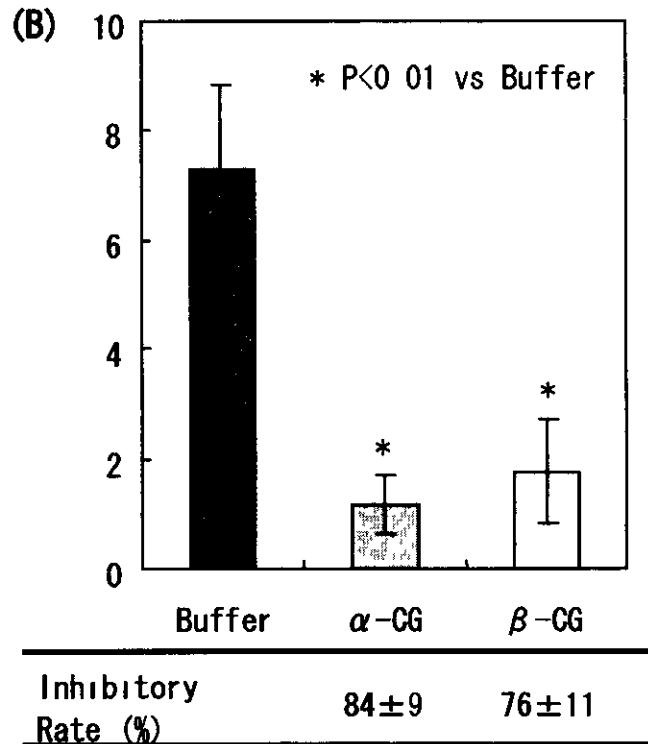


図2 寒冷拘束ストレス誘導性潰瘍に対する $\alpha$ -コレステリルクルコシトの影響

(A) 各群のラット胃粘膜における潰瘍の数と長さ。n は潰瘍の数、数値は潰瘍の長さ、UI は長さの総和を示す。(B) UI をクラブに示した。Buffer ハンパーのみ前投与後ストレスを与えたラット、 $\alpha$ -、 $\beta$ -CG  $\alpha$ -または $\beta$ -コレステリルクルコシトを前投与後寒冷拘束ストレスを与えたラット。

キャノーラ油の植物エストロゲン様作用の解析

分担研究者 井上 誠 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 助教授

研究要旨

今回、キャノーラ油の SHR ラット寿命短縮作用の原因を探るために、キャノーラ油のエストロゲン様作用に焦点を絞って検討した。卵巣摘出 (OVX) した Wistar 系雌性ラットを用いてキャノーラ油の効果を調べたところ、キャノーラ油は OVX ラットの子宮重量を増加させる作用は示さず、また、エストロゲン応答遺伝子であるラクトフェリン、エストロゲンレセプターの mRNA レベルに影響を及ぼさなかった。さらに、OVX ラットの血中にはエストロゲン様活性物質は検出されなかった。一方、OVX ラットの副腎において  $3\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 mRNA の発現を  $17\beta$ -エストラジオールと同様に減少させた。これらの結果より、キャノーラ油は子宮にはエストロゲン作用は示さないか、副腎には何らかのエストロゲン作用を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、キャノーラ油含有飼料で長期飼育した SHR ラット (雄性) の副腎、精巣では同様な抑制効果は観察されず、今後さらに詳細に検討する必要があると考えられた。

A 研究目的

これまでにキャノーラ油含有飼料で SHR-SP ラットを飼育することにより、ラットの寿命が有意に短縮すること明らかにされている。また、その寿命短縮の作用機序の解析より、性ホルモン合成系への作用が示唆されている。そこで、今回、キャノーラ油が性ホルモン合成を攪乱する植物ホルモン様作用を有する可能性を調べることを目的とした。

B 研究方法

本学動物舎施設において SPF 環境下で飼育された雌性 Wistar ラット (4 週齢) の卵巣摘出をペントバルビタール麻酔下で行った。3 週間の通常飼育により、手術の損傷より回復させた後、キャノーラ含有飼料で 2 週間あるいは 4 週間

飼育した。エーテル麻酔下でラットを屠殺し子宮および副腎を摘出し、重量を測定後、液体窒素で凍結した。子宮および副腎より TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出し、RiverTra Ace- $\alpha$ - (Toyobo) を用いて cDNA を作製し、半定量的 PCR を Table 1 に示すプライマーを用いて行った。

血中のエストロゲン様物質の測定は、HeLa 細胞にエストロゲンのレポータープラスミドである pEREtk3Luc とエストロゲンレセプター (FR) 発現プラスミド、pER $\alpha$ 、あるいは、pER $\beta$  をトランスフェクションしたルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて行った。

	センスプライマー	アンチセンスプライマー	生成物(bp)
ラクトフェリン	5-TGG GCA GAT AGA GTG TGA GTC-3	5-CTG GAA AGC CCC TGT ATA ACC-3	483
血管内皮増殖因子	5-TCG GAG AGC AAC GTC ACT ATG-3	5-GCA GGA ACA TTT ACA CGT CTG-3	278
エストロゲンレセプター $\alpha$	5-CGA TAA GAA CCG GAG GAA GAG-3	5-CAG ACC AGA CCA ATC ATC AGG-3	494
$3\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素	5-CCC ATT ACT GAG ACT TTG TG-3	5-CTA GGG ACA AGC ATC AAG GT-3	981
$17\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素	5-GCA GAC CAT CCC AAT TCA GC-3	5-ACA TTG CGG GAT CTG AAG TC-3	883
$\beta$ -アクチン	5-CCA ACC GTG AAA AGA TGA CCG A-3	5-AGC CAC CAA TCC ACA CAG AGT A-3	629

Table 1 実験に使用した PCR プライマー配列

C 研究結果および考察

卵巣摘出ラットの子宮重量に及ぼす効果は、内分泌攪乱物質の毒性試験あるいはエストロゲン様物質の検索などに汎用されている。そこで、Wistar 系雌性ラットに卵巣摘出術を施し、その 3 週間後より 2 週間あるいは 4 週間、キャノーラ油含有食餌で飼育した。ラットは麻

酔下で屠殺した後、子宮重量を測定した。その結果、キャノーラ油群ラットの子宮重量はコントロール群ラットの子宮重量と差は無かった。また、子宮のエストロゲン応答遺伝子であるラクトフェリンと ER $\alpha$  の mRNA を測定したところ、キャノーラ群とコントロール群の間に差は観察されなかった。すなわち、キャノーラ油含有