

2. 学会発表
日本脂質栄養学会第13回大会
演題名：脳卒中易発症性(SHRSP)
ラット脳のプリオン(PrP)分子発現
に及ぼす油糧種子の影響
3. 参考文献
 1. Prusiner SB Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982 Apr 9;216(4542):136-44.
 2. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):10962-6.
 3. Philip Yam SHOOT this deer : *SCIENTIFIC AMERICAN* 2003/01/06 26-31
 4. Belay, E.D. et al. Creutzfeldt-Jakob disease in unusually young patients who consumed venison. *Arch. Neurol*. 2001, 58, 1673-1678.
 5. Huang, M. Z., Naito, Y., Watanabe, S., Kobayashi, T., Kanai, H., Nagai, H., and Okuyama, H. Effect of rapeseed and dietary oils on the mean survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biol.Pharm. Bull*. 1996. 19, 554-557.
 6. Huang, M. Z., Watanabe, S., Kobayashi, T., Nagatsu, A., Sakakibara, J., and Okuyama, H. Unusual effects of some vegetable oils on the survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 1997, 32, 745-751.
 7. Miyazaki, M., Watanabe, S., Oikawa, T., Morozumi, K., Fuzinami, T., and Okuyama, H. Early mortality effect of partially hydrogenated vegetable oils in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Nutr. Res*. 1998, 18, 1049-1056.
 8. Miyazaki, M., Watanabe, S., Oikawa, T., Morozumi, K., Fuzinami, T., and Okuyama, H. Free fatty acid fractions from some vegetable oils exhibit reduced survival time-shortening activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 1998, 33, 655-661.
 9. 黄 敏昭 名古屋市立大学学位論文 (1998年)
 10. 宮崎 淳 名古屋市立大学学位論文 (1999年)
 11. Murray McBride Trace element (nutritional) theory of "mad cow" disease. <http://bse.airtime.co.uk/copper.htm>
 12. Purdey M., Elworthy, Somerset, UK. The Manganese Loaded Copper Depleted Bovine Brain Fails to Neutralise Incoming Shockbursts of Low Frequency Infrasound: The Origins of BSE? *British Cattle Veterinary Association Journal*, 2002, CATTLE PRACTICE VOL 10 PART 4
 13. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*. 1997 Dec 18-25;390(6661):684-7.
 14. Shibuya S, Higuchi J, Shin RW, Tateishi J, Kitamoto T. Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*. 1998 Feb 7; 351(9100):419.
 15. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*. 1997 Jul;146(1):104-12.
 16. David R. Brown, Farida Hafiz, Leslie L. Glasssmith, Boon-Seng Wong, Ian M. Jones, Christine Clive, and Stephen J. Haswell Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. *EMBO J.*, 2000 Mar ; 19 : 1180-1186.
 17. S. Lehmann and D.A. Harris Blockade of Glycosylation Promotes Acquisition of Scrapie-like properties by the Prion Protein in Cultured Cells. *J. Biol. Chem*. 1997. 272(34), 21479-21487,

18. Chun HS, Lee H, Son JH. Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741. *Neurosci Lett.* 2001 Dec 4;316(1):5-8.
19. Guo J, Zhang L, Jiang Y, Zeng Z, Sun D, Ka W, Zheng J, Guo Z, Wen Z. Effects of Compound Dan-shen Root Dropping Pill on hemorheology in high-fat diet induced hyperlipidemia in dogs. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005;32(1):19-30.
20. Kubo C, Day NK, Good RA. Influence of early or late dietary restriction on life span and immunological parameters in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Sep;81(18):5831-5.
21. Tatematsu K, Fuma SY, Satoh J, Ichikawa Y, Fujii Y, Okuyama H. Dietary canola and soybean oil fed to SHRSP rat dams differently affect the growth and survival of their male pups. *J Nutr.* 2004 Jun;134(6):1347-52.
22. Ward AT, Reichert RD. Comparison of the effect of cell wall and hull fiber from canola and soybean on the bioavailability for rats of minerals, protein and lipid. *J Nutr.* 1986 Feb;116(2):233-41.
23. Vermorel M, Evrard J. Valorization of rapeseed meal. 4. Effects of iodine, copper and ferrous salt supplementation in growing rats. *Reprod Nutr Dev.* 1987;27(4):769-79.
24. Hijazi N, Shaked Y, Rosenmann H, Ben-Hur T, Gabizon R. Copper binding to PrP^C may inhibit prion disease propagation. *Brain Res.* 2003 Dec 12;993(1-2):192-200.
25. Sigurdsson EM, Brown DR, Alim MA, Scholtzova H, Carp R, Meeker HC, Prelli F, Frangione B, Wisniewski T. Copper chelation delays the onset of prion disease. *J Biol Chem.* 2003 Nov 21;278(47):46199-202.
26. Toni M, Massimino ML, Griffoni C, Salvato B, Tomasi V, Spisni E. Extracellular copper ions regulate cellular prion protein (PrP(C)) expression and metabolism in neuronal cells. *FEBS Lett.* 2005 Jan 31;579(3):741-4.
27. Kikuchi Y, Kakeya T, Yamazaki T, Takekida K, Nakamura N, Matsuda H, Takatori K, Tanimura A, Tanamoto K, Sawada J. G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol Pharm Bull.* 2002 Jun;25(6):728-33.

H. 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

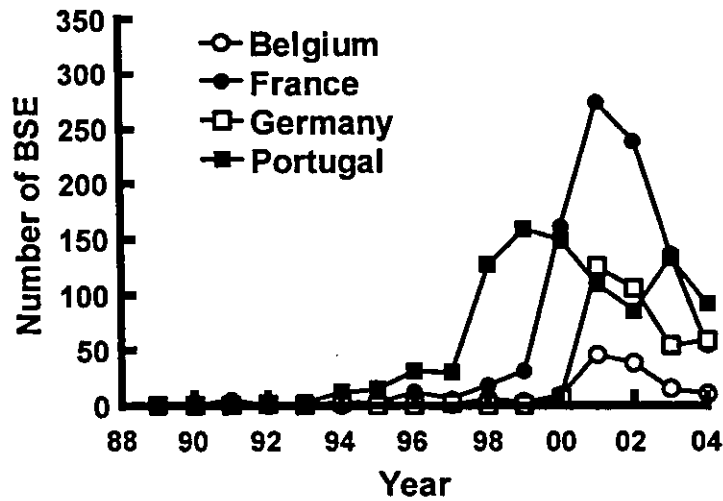
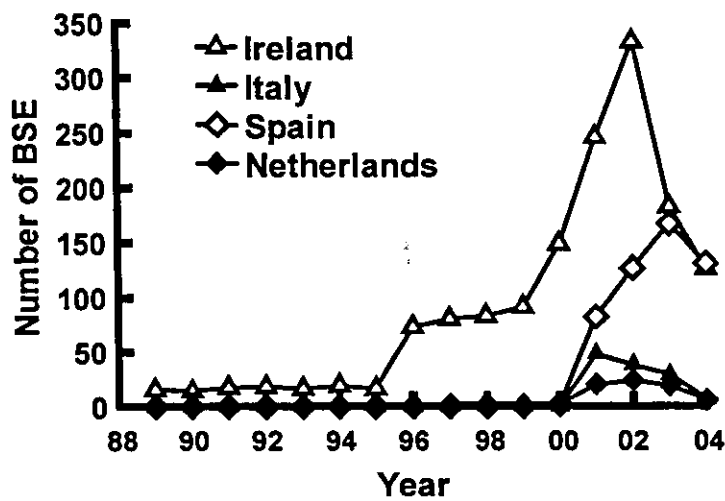
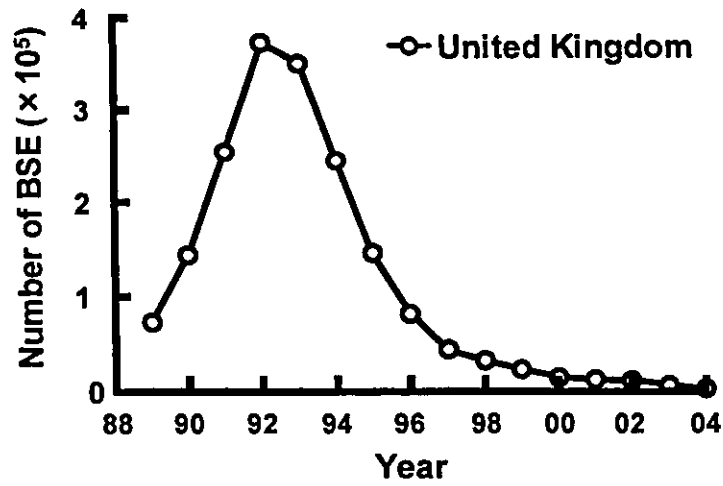


Figure 1. Trends of BSE incidence in Europe. Data taken from National Institute of Animal Health, Supplemental Data.

Table 1. Fatty acid compositions of the test diets (% of total fatty acids)

Fatty acid (FA)	Soy oil	Can oil	Soy cake	Can cake
Saturated FA				
14:0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0
16:0	12.0 ± 0.0	7.8 ± 0.1	15.8 ± 0.0	14.8 ± 0.0
18:0	3.7 ± 0.0	1.6 ± 0.0	2.4 ± 0.0	2.2 ± 0.0
20:0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
22:0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
24:0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Monosaturated FA				
16:1	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0
18:1	23.2 ± 0.0	51.2 ± 0.1	23.3 ± 0.0	28.8 ± 0.0
20:1	0.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0
22:1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
24:1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
N-6 polyunsaturated FA				
18:2	52.5 ± 0.1	29.0 ± 0.1	45.8 ± 0.1	39.7 ± 0.1
20:4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1
22:4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
N-3 polyunsaturated FA				
18:3	6.1 ± 0.0	6.8 ± 0.0	3.7 ± 0.0	4.0 ± 0.0
20:5	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	2.2 ± 0.0	2.5 ± 0.0
22:6	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	2.6 ± 0.0	3.1 ± 0.0
Total fatty acids(mg/g diet)	114.5 ± 0.9	106.6 ± 1.6	41.2 ± 0.5	37.1 ± 0.7

Values represent means ± SD (n=3)

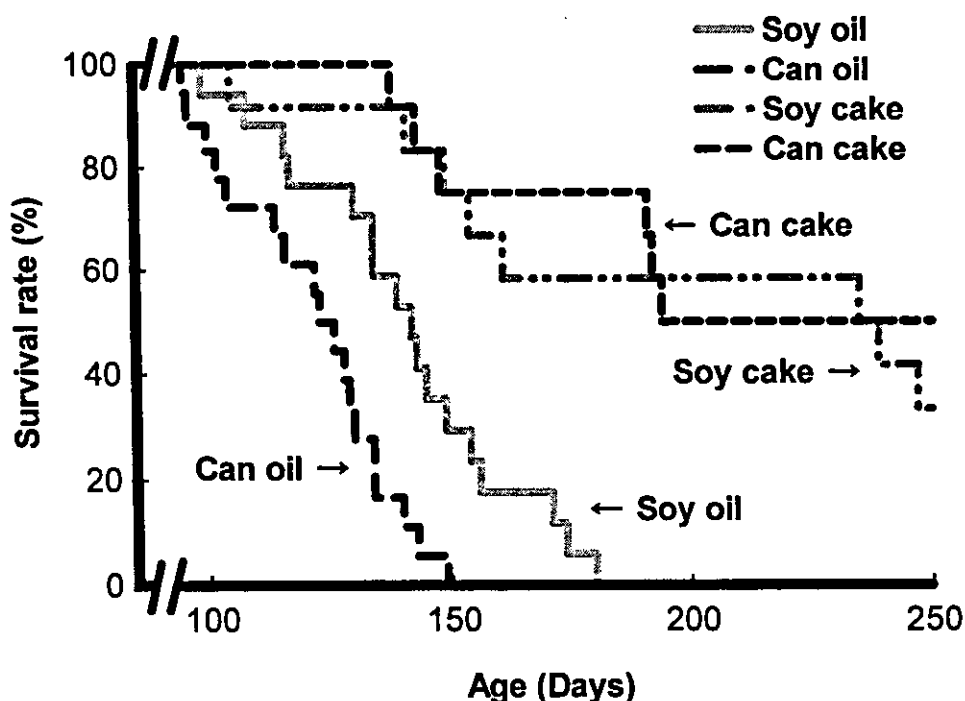


Figure 2. The survival curve of SHRSP rats fed a diet containing 10% oil (soybean or canola oil), soybean cake or canola cake. Diet supplemented with oil was fed to SHRSP rats from 4 weeks of age. NaCl solution (0.5%) was given ad libitum as drinking water. Results of statistical analysis were presented in Table 2.

Table 2. Statistical analysis of the survival rates shown in Figure 1.

Dietary group	Can cake	Soy cake	Can oil	Soy oil
Survival , Days \pm SEM	>209 \pm 14	>203 \pm 16	120 \pm 4	140 \pm 6
v.s. Can cake	Log-rank	0.538	<0.001	<0.001
	Wilcoxon	0.633	<0.001	<0.001
v.s. Soy cake	Log-rank		<0.001	0.001
	Wilcoxon		<0.001	0.004
v.s. Can oil	Log-rank			0.001
	Wilcoxon			0.005

(Soy oil : n=17, Can oil : n=20, Soy cake : n=12, Can cake : n=12) Rats were assigned for survival measurements.

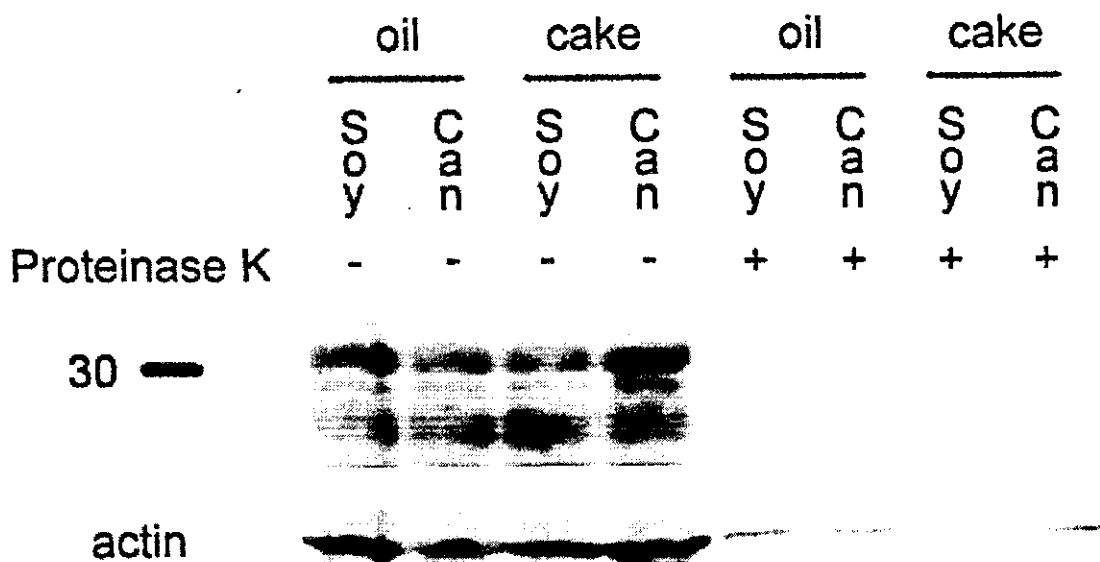


Figure 3. Prion protein expression in SHRSP rat brain homogenates. SHRSP rats were fed Soy oil diet, Soy cake diet, Can oil diet or Can cake diet. (Soy oil : n=8, Can oil : n=6, Soy cake : n=4, Can cake : n=6).

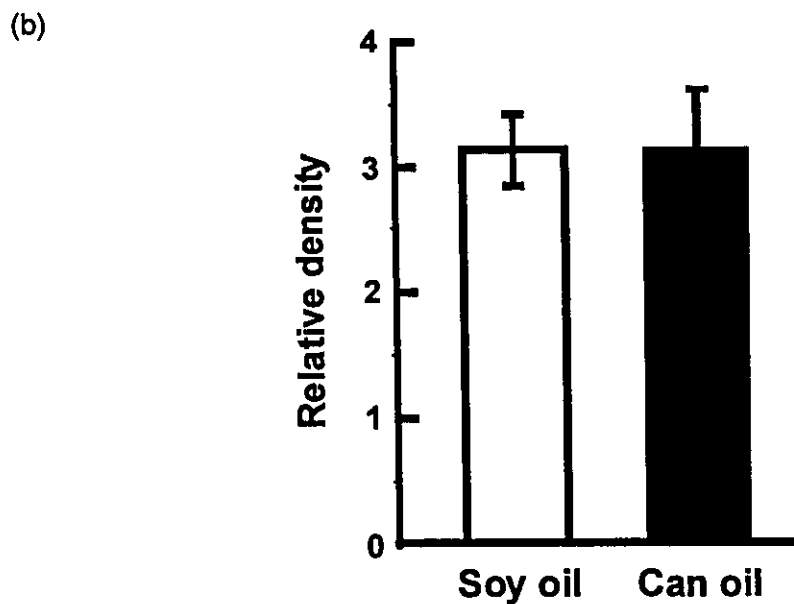
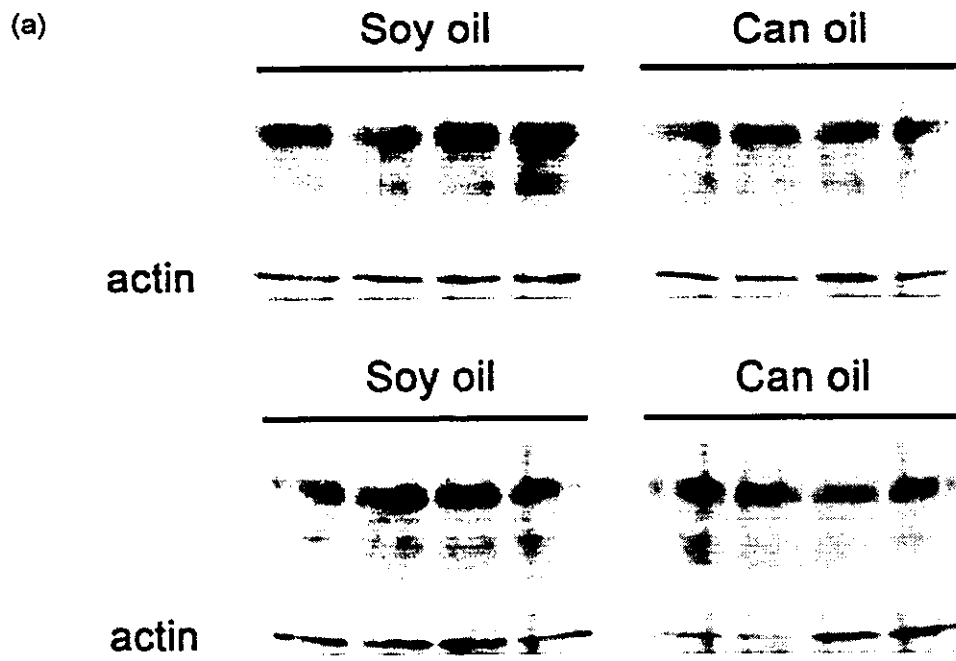


Figure 4. Expression of PrP^C in SHRSP rat brain fed Soy or Can oil diet. (a) Immunodetection of PrP in the brain homogenates of each SHRSP rat using anti-PrP 6H4 without proteinase K-treatment. (b) Densitometric quantitation of the PrP^C expression. Quantitative analysis of the PrP^C shown in (a) was performed by computer-assisted densitometry. Data were shown as means ± SEM. (n=8)

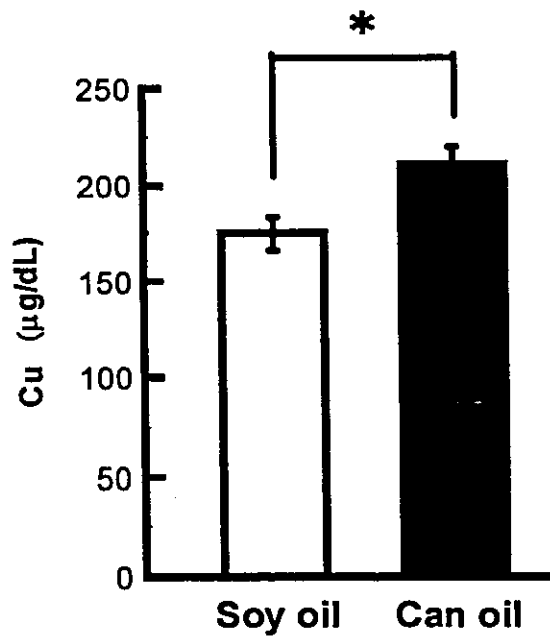


Figure 5. Serum copper levels in 16-wks-old SHRSP rats fed Soy or Can oil diet. Data were shown as means \pm SEM (Soy oil n=16, Can oil n=14 rat). Significance of the difference was analyzed by *t*-test (*, $p < 0.01$).

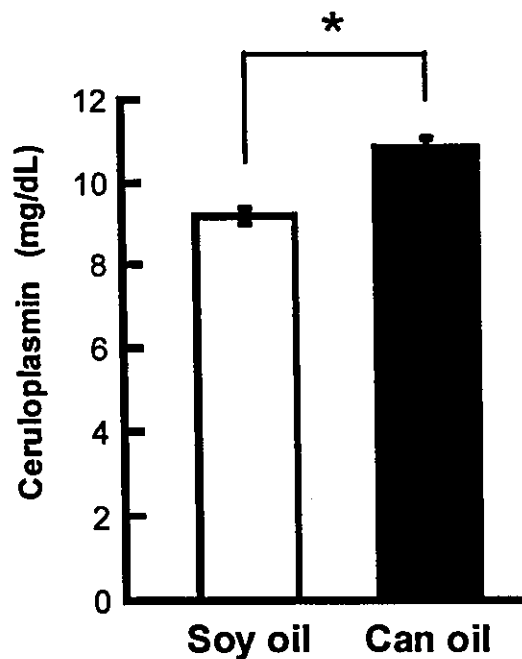


Figure 6. Serum ceruloplasmin levels in 16-wks-old SHRSP rats fed Soy oil diet or Can oil diet. Data were shown as means \pm SEM (n=8 in each dietary group). Significance of the difference was analyzed by *t*-test (*, $p < 0.001$).

カテゴリー	感染伝播リスク	臓器等
i	高リスク	脳、脊髄、眼
ii	中リスク	回腸、リンパ節、近位結腸、脾臓、扁桃、 脳脊髄液、下垂体、副腎(硬膜、松果体、胎盤)
iii	低リスク	末梢結腸、鼻粘膜、末梢神経、脊髄、肝臓、肺、膵臓、胸腺
iv	リスクなし	血液凝固物、便、心臓、腎臓、乳腺、乳、卵巣、唾液、唾液腺、 精囊、血清、骨格筋、精巣、甲状腺、子宮、胎児組織、 (胆汁、骨軟骨、結合組織、髪の毛、皮、尿)

Table 3 EU医薬品審査庁による臓器分類

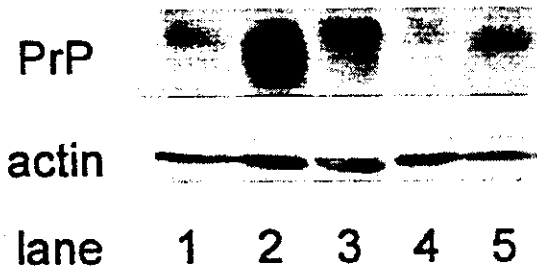


Figure 7. Relative PrP expression. Lane 1, Neuro2a; lane 2, MRC-5; lane 3, MRC-5 SVTG1; lane 4, PC12; lane 5, HepG2.

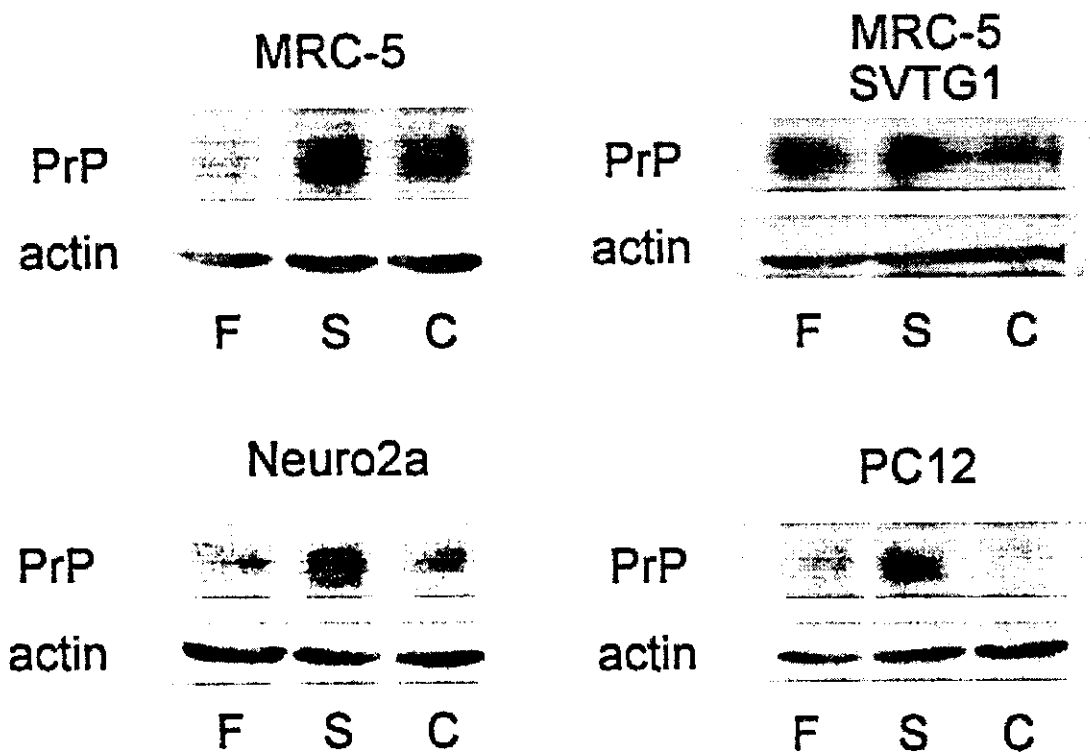


Figure 8. Relative PrP expression. F, 10% FBS; S, serum free; C, 10% Chelex100-treated FBS.

カノーラ油の微量成分の科学的解析

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
カノーラ油分子蒸留時のポンプの手前にある冷却装置に捕捉された化合物の検索を行ったところ、4-butylresorcinol が含有されていることが明らかになった。

A. 研究の目的

カノーラ油に含有される、高血圧自然発症ラット(SHR-SP)の寿命短縮に関連する化合物を解明することを目的とする。

B. 研究方法

カノーラ油の分子蒸留を行い、その減圧の際の吸引用ポンプの手前にある冷却装置内(Fig. 1)をヘキサン、つづいてエタノールを用いて洗浄回収し、それぞれの可溶部をサンプルとして得た。これら回収部のサンプルをそれぞれ

順相のカラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて分離、単離された化合物は各種スペクトルの測定を行い、構造決定に導くこととした。

C. 研究結果

カノーラ油分子蒸留後の残渣はカノーラ油よりもさらに SHR-SP の寿命を短縮させることがわかったこと、蒸留部、凝集面付着物にはステロール類、長鎖のアルコールやケトン、脂肪酸およびそのエステルしか検出できずこれらの化合物は寿命に影響しないことがわかってることなどから、今回、吸引用ポンプの手前にある冷却装置内の捕捉物に着目して探索を行うことにした。

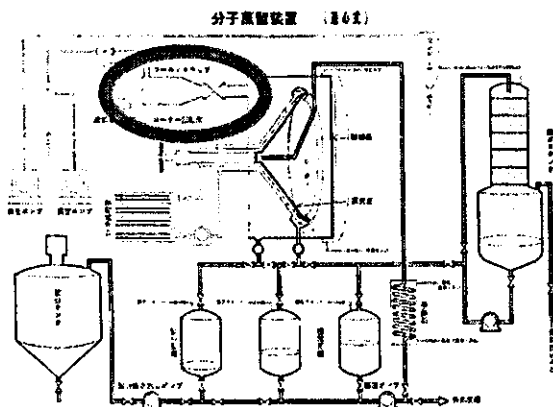


Fig. 1 分子蒸留装置の模式図

○内が冷却装置

Hexane 回収部 +	
EtOH 回収部 +	0 0

Fig. 2 ヘキサン、エタノール回収部の TLC シリカゲルプレートは Merck No.106715 を使用し、展開は hexane : i-PrOH = 9 : 1 で行った。検出は塗漬し部分がヨウ素発色、○部分が UV 吸収。

カノーラ油 44 kg を分子蒸留処理し、ヘキサンつづいてエタノールを用いて洗浄しそれぞれの回収部を得た。各回収部を TLC 分析すると Fig. 2 のようなスポットが観察された。そこで、各回収部におけるそれぞれのスポットの化合物の単離同定を目標に分離を行うこととした。

ヘキサン回収部 311 mg 中 50 mg を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分離し 3 フラクションを得、さらに分取 TLC で、TLC 上 1spot として観察される程度まで精製した。(Fig. 3) これらの化合物の ¹H-NMR スペクトルを測定したところ、これらは凝集面付着物などと同様の長鎖アルキル基を持つケトン又は脂肪酸といった化合物群であると推定できた。

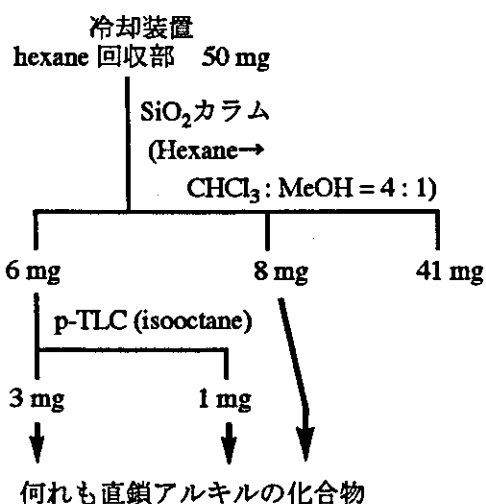


Fig. 3 ヘキサン回収部の分離精製

一方、エタノール洗浄回収部 47 mg 中 12 mg を、順相 HPLC を用いて精製していったところ、3 mg の 4-butylresorucinol が単離された。(Fig. 3) この化合物の構造は、質量分析から分子量

が 166 であること、2 次元 NMR 測定を含む各種 NMR スペクトルにおいて 1,2,4,3 置換ベンゼンと直鎖のブチル基が存在することおよび酸素官能基が 2 個存在すること、質量分析の結果と合わせて考えるとその酸素官能基は水酸基であることなどにより決定した。(Fig. 5, Table 1)

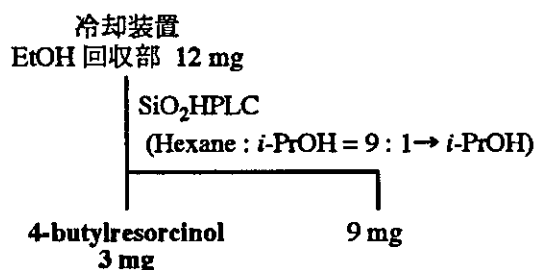


Fig. 4 エタノール回収部の分離精製

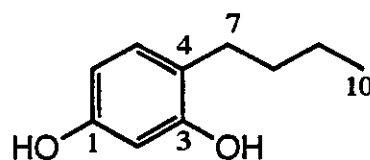


Fig. 5 4-Butylresorcinol の構造

Table 1 4-Butylresorcinol の NMR データ (in CDCl₃, ¹³C: 125 MHz, ¹H: 500 MHz)

pos.	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	154.6	
2	102.8	6.31 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)
3	154.3	
4	120.8	
5	130.7	6.94 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)
6	107.6	6.35 (1H, dd, $J = 2.4, 7.9$ Hz)
7	28.9	2.52 (2H, t, $J = 7.6$ Hz)
8	32.2	1.55 (2H, m)
9	22.5	1.37 (2H, sextet, $J = 7.3$ Hz)
10	14.0	0.93 (3H, t, $J = 7.3$ Hz)

D. 考察

4-Butylresorcinol を含む 4-alkyl resorcinol 類にはプロスタグランジン H₂ の生合成阻害活性が報告されている。プロスタグランジン H₂ はアラキドン酸カスケードの比較的上流部にあることから、種々の生理活性が見られる可能性があり、今後活性の検討が必要である。今回単離したサンプル量では生理活性試験に供することができないため、現在合成により、サンプル量の確保を行っている。

E. 結論

カノーラ油分子蒸留時のポンプの手前にある冷却装置に捕捉された化合物の検索を行ったところ、4-butylresorcinol が含有されていることが明らかになった。この化合物を含む 4-alkyl resorcinol 類にはプロスタグランジン H₂ の生合成阻害活性が報告されている。カノーラ油中に含まれる寿命短縮に関連する化合物として検討を行うべき化合物と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

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

ヤギにおける大豆粕、カノーラ粕の安全性評価

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】

カノーラ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でカノーラ粕に残留する微量有害因子の存在を検索しようとした。母ヤギを25ヶ月、その産子を22ヶ月、カノーラ粕と乾草のみで飼育したが、対照とした大豆粕と乾草のみで飼育したヤギと比較して、子ヤギの成長、健康状態および行動に異常は認められなかった。

A. 研究目的

ナタネはエルシン酸やゴイトロゲンであるグルコシノレートなど、家畜に対する抗栄養因子を含んでおり、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、それらの抗栄養因子含量を低減したナタネ品種、カノーラが開発され、その搾油残渣であるカノーラ粕はタンパク質供給飼料原料として主としてウシ、ヒツジなどの反芻動物やブタ、ニワトリなど家畜・家禽はもとよりイヌ用のペットフードにまで広く使用されるようになった。現在では国内におけるタンパク質源としての使用率は同じ搾油残渣である大豆粕に次いで多くなっている。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カノーラ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カノーラ粕にも残留していることが十分に考えられる。そのため、本研究はカノーラ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や行動を観察した。

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、それぞれカノーラ粕あるいは大豆粕を給与した。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。大豆粕給与区の母ヤギ1頭は分娩しなかったため、産子はカノーラ粕区が3頭の母ヤギからの5頭（雄3頭、雌2頭）、大豆粕区が2頭の母ヤギからの3頭（雄1頭、雌2頭）を供試した。

② 供試飼料

給与飼料としてイタリアンライグラス乾草（岐阜大学応用生物科学部附属岐阜フィールド科学教育研究センター農場産）と大豆粕およびカノーラ粕を使用した。カノーラ粕は2004年7月（母ヤギ：分娩後17ヶ月、子ヤギ：17ヶ月齢）より、それまでの抽出カノーラ粕から圧搾カノーラ粕に変更した。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
抽出カノーラ粕	87.7	73.6	37.6*	2.5	36.8	11.1	0.71	1.25
圧搾カノーラ粕	89.8	—	43.9	4.2	35.2	9.4	—	—
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

圧搾カノーラ粕(実測値)を除く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。カノーラ粕および大豆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、イタリアンライグ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。分娩後の子ヤギは離乳するまでの2ヶ月間母ヤギと同居させた。また、離乳後の子ヤギは各給与飼料区ごとに群飼した。水および鈣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

	母ヤギ		子ヤギ	
	カノーラ粕区	大豆粕区	カノーラ粕区	大豆粕区
妊娠末期～分娩 ¹⁾				
給与量(g/day)	833	843	—	—
試験飼料比率(%)	20.4	20.3	—	—
分娩～離乳 ²⁾				
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ヶ月～ ³⁾				
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) カノーラ粕区 n=3, 大豆粕区 n=3.

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

3) カノーラ粕区 n=3, 大豆粕区 n=2 (出産しなかった個体を除いた).子ヤギは群飼育.

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

1日1頭あたりの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が、カノーラ粕

および大豆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が、試験飼料の全飼料に占める比率はほぼ20%であった。カノーラ粕区と大豆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。

子ヤギは離乳まで母ヤギと同居させたが、生後1ヶ月頃から母ヤギの飼料を食べているのが観察された。離乳後は乾草の残食が少量あったが給与量をほぼ摂取した。母ヤギと同様、子ヤギにおいても、カノーラ粕区と大豆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

	母ヤギ		子ヤギ	
	カノーラ粕区	大豆粕区	カノーラ粕区	大豆粕区
妊娠末期～分娩 ¹⁾				
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 ²⁾				
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ヶ月～ ³⁾				
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) 母ヤギ:カノーラ粕区 n=3, 大豆粕区 n=2 (出産しなかった個体を除いた).子ヤギ:カノーラ粕区 n=5, 大豆粕区 n=3.

子ヤギは母乳を摂取(ただし,1ヵ月齢程度から母親の飼料を摂取しているのが観察された)

3) 母ヤギ:カノーラ粕区 n=3, 大豆粕区 n=2 (カノーラ粕区1頭死亡).

② 体重の推移

供試ヤギの体重の推移を表4に示した。

母ヤギにおいてはカノーラ粕区および大豆粕区ともに分娩後離乳までに体重が減少したが、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。

大豆粕区の子ヤギ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が、両区の子ヤギともほぼ順調に成長した。14月齢以降は19~20kgで推移しており、成長は停止したと考えられる。この体重は母ヤギに比較して小さく、通常使用される種々の飼料

原料を配合した混合飼料ではなく、カノーラ粕または大豆粕のみの単味飼料を給与したことが影響したものと考えら

れる。しかし、カノーラ粕区と大豆粕区の産子において成熟時体重の間に差は認められなかった。

表4 体重の推移

	母ヤギ		子ヤギ	
	カノーラ粕区	大豆粕区	カノーラ粕区	大豆粕区
試験開始時 ¹⁾	36.3 ± 2.9	34.6 ± 6.5	—	—
分娩直後 ²⁾	35.6 ± 4.2	33.9 ± 11.5	出生時	2.2 ± 0.6 2.3 ± 0.5
分娩後1ヶ月	31.7 ± 3.8	30.6 ± 11.3	1月齢	5.4 ± 1.1 6.4 ± 1.7
2ヶ月	31.8 ± 2.6	31.6 ± 11.5	2月齢	7.8 ± 1.5 9.7 ± 2.6
3ヶ月	32.4 ± 4.6	31.7 ± 10.9	3月齢	10.4 ± 1.5 12.1 ± 3.4
4ヶ月	32.4 ± 4.6	31.7 ± 10.3	4月齢	10.5 ± 1.5 12.5 ± 3.8
5ヶ月	32.8 ± 3.6	33.0 ± 9.9	5月齢	11.0 ± 1.6 13.1 ± 3.9
6ヶ月	34.1 ± 5.4	34.3 ± 9.5	6月齢	11.9 ± 1.7 12.6 ± 2.5
7ヶ月	35.1 ± 6.9	34.7 ± 9.5	7月齢	12.5 ± 1.3 14.7 ± 4.7
8ヶ月 ³⁾	36.9 ± 8.1	34.7 ± 9.2	8月齢	15.2 ± 1.7 16.4 ± 5.4
9ヶ月	36.3 ± 6.6	35.0 ± 9.6	9月齢	15.4 ± 0.7 16.7 ± 6.0
10ヶ月	34.6 ± 7.6	33.9 ± 10.9	10月齢	16.5 ± 1.5 17.4 ± 6.8
11ヶ月	35.8 ± 7.9	33.2 ± 9.9	11月齢	15.8 ± 2.2 17.1 ± 8.9
12ヶ月	36.6 ± 8.1	35.7 ± 12.0	12月齢	17.0 ± 2.3 17.8 ± 8.4
13ヶ月	37.8 ± 6.8	36.3 ± 12.0	13月齢	18.4 ± 3.0 17.9 ± 6.8
14ヶ月	39.3 ± 7.2	35.6 ± 10.5	14月齢	18.6 ± 3.4 19.2 ± 6.1
15ヶ月	40.0 ± 8.8	35.9 ± 13.6	15月齢	18.7 ± 3.5 19.2 ± 5.3
16ヶ月	41.0 ± 8.5	39.5 ± 13.2	16月齢	20.7 ± 4.4 20.8 ± 6.6
17ヶ月 ⁴⁾	41.2 ± 8.2	38.5 ± 14.2	17月齢	21.3 ± 4.7 22.2 ± 6.1
18ヶ月	43.1 ± 7.5	40.0 ± 14.1	18月齢	21.2 ± 4.9 22.3 ± 5.1
19ヶ月	41.2 ± 7.4	39.4 ± 13.3	19月齢	19.2 ± 4.1 20.6 ± 4.5
20ヶ月 ⁵⁾	41.4 ± 7.1	38.2 ± 14.3	20月齢	20.7 ± 4.2 22.1 ± 6.3
21ヶ月	40.2 ± 7.4	37.0 ± 13.6	21月齢	19.2 ± 3.8 20.5 ± 5.8
22ヶ月	38.5 ± 6.4	36.6 ± 14.1	22月齢	19.1 ± 4.1 21.3 ± 6.4

1) 各処理区とも n=3.

2) 母ヤギ:カノーラ粕区 n=3, 大豆粕区 n=3, 子ヤギ:カノーラ粕区 n=5, 大豆粕区 n=3.

3) 母ヤギ:カノーラ粕区 n=2, 大豆粕区 n=3 (カノーラ粕区1頭死亡)

4) これ以降カノーラ粕は圧搾搾油粕を使用

5) 母ヤギ:カノーラ粕区 n=2, 大豆粕区 n=2 (大豆粕区1頭死亡)

③ 供試ヤギの健康状態

カノーラ粕区の母ヤギが供試飼料給与開始後9ヶ月、また、大豆粕区の母ヤギが供試飼料給与開始後22ヶ月に各1頭死亡した。両個体とも死亡前の数日間食欲が減退したが、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。また、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が、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ものかあるいは両個体とも12~3歳とヤギの平気寿命に近い老齢であったためと考えられた。

その他の供試ヤギの試験開始から現在までの健康状態や行動に特に異常は認められなかった。また、途中からカノーラ粕を抽出によるものから圧搾による搾油粕に変更したが、変更後の供試ヤ

ギの健康・行動にも異常は認められなかった。

D. 考察および結論

本研究はカノーラ粕を反芻動物に長期間給与することが成長や健康状態に及ぼす影響を調べようとしたものである。現在母ヤギにおいては試験飼料給与開始から25ヶ月、子ヤギでは試験飼料摂取開始からほぼ22ヶ月が経過した。死亡した母ヤギ2頭を除く他の供試ヤギには健康上の問題は認められない。今後引き続きカノーラ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カノーラ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

腫瘍誘導血管新生抑制物質探索を目的とした *in vitro* および *in vivo* 実験系の 確立とその応用

分担研究者 加治 和彦 静岡県立大学・大学院生活健康科学研究科教授

【研究要旨】

培養血管内皮細胞を用いた *in vitro* 簡易評価系を用いて、遠心分子蒸留法、CO₂超臨界流体抽出法、分子篩法などで分画した19種類のカノーラ油由来フラクションの中から有害因子含有フラクションを探索した。その結果、フラクションNo.6（分子蒸留冷却捕集部 EtOH 回収物）が血管新生を阻害する有害因子を含むことを見出した。

A. 研究目的

平成14年度に確立した簡易評価系を用いて、数種の食用油に存在が想定されている微量有害因子（脳卒中易発症性ラットの寿命を短縮する因子）を同定することを目的としている。この微量有害因子が血管障害から来る腎障害を引き起こすことから、血管新生阻害因子を検出するための管腔形成アッセイを用いて有害活性をチェックした。具体的には、特に有害作用を示すカノーラ油を、遠心分子蒸留法、CO₂超臨界流体抽出法、分子篩法等の様々な技法を用いて分画し、これら分画フラクションの中から有害因子含有フラクションを検出することが目的である。

B. 研究方法

① カノーラ油の分画

1. 分子蒸留法

本分担研究報告書（奥山治美）の研究方法を参照。

2. 超臨界蒸留法

二酸化炭素を超臨界流体として180bar、40℃に保ち、カノーラ油（太田油脂）13kgを34時間かけて抽出した（180bar抽出物）。続いて350barまで昇圧し、同じく40℃で26時間抽出した（350bar抽出物）。これを減圧し、分離槽に残留した残留部を回収し残留部画分とした。

3. 分子篩法

平成15年度分担研究報告書（門田重利）の研究方法を参照。

② 管腔形成アッセイ（*in vitro* 簡易評価系）

培養細胞はヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた。通常のHUVECの継

代培養には、HUVEC培地として基礎培養液MCDB-104に10%FBS、EEP（FGFを主とする成長因子カクテル）を添加して用いた。管腔形成アッセイには、0.21%コラーゲンゲル（KOKEN CELLGEN タイプIコラーゲン溶液より調整）を24穴マルチプレートに下層150μl/wellと上層100μl/wellとに分けて添加し、その間に1.2×10⁵ cells/wellのHUVECをサンドイッチした。これに、EEPの代わりにbFGF（10 ng/ml）とPMA（8 nM）を添加したHUVEC培地を加えて管腔形成を誘導し、時間経過を追って48時間後まで形態観察を行った。管腔形成誘導開始時に、DMSOで可溶化した分画サンプルを50μg/ml（final）になるように添加し、阻害活性の有無をチェックした。

（倫理面への配慮）

本実験に用いたヒト臍帯静脈内皮細胞は、約10年前に東京都老人総合研究所で分離したものであり、口頭によるインフォームドコンセントを得ているので問題はない。

C. 研究結果

培養血管内皮細胞を使ったアッセイ系を用いて、遠心分子蒸留法、CO₂超臨界流体抽出法、分子篩法などで分画した19フラクション（表1）を50μg/ml（final）の濃度で培地に添加した。管腔形成誘導の結果、フラクションNo.6（分子蒸留冷却捕集部 EtOH 回収物）のみに強い管腔形成阻害作用があることを見出した（図1）。この時、同時にアッセイした他の18フラクションは溶媒として用いたDMSOサンプルと同程度の管腔形成が進行し、阻害活性をほとんど示さなかった。

フラクション No.6 については、時間変化の観察から、管腔形成誘導後 12 時間目とかな

り早い段階で阻害作用が見られ、強い阻害活性を有することが示された (図 2)。

No.	カノーラ油由来フラクション	表記
1	分子蒸留残留部	キャノーラ油分子蒸留 残留部 Lot.213001 (1回目)
2	分子蒸留蒸留部	キャノーラ油分子蒸留 蒸留部 Lot.213001 (1回目)
3	分子蒸留残留部	キャノーラ油分子蒸留 残留部 Lot.316002 (2回目)
4	分子蒸留蒸留部	キャノーラ油分子蒸留 蒸留部 Lot.316002 (2回目)
5	分子蒸留蒸留部凝集物	キャノーラ油分子蒸留 蒸留部凝集物 Lot.316002 (2回目)
6	分子蒸留冷却捕集部 EtOH回収物	キャノーラ油分子蒸留 冷却捕集部 Lot.316001 (2回目)
7	超臨界流体180bar抽出物	キャノーラ油超臨界流体抽出物 180 bar 分 Lot.020806 (1回目)
8	超臨界流体350bar抽出物	キャノーラ油超臨界流体抽出物 350 bar 分 Lot.020806 (1回目)
9	超臨界流体残留部	キャノーラ油超臨界流体抽出 残留物 Lot.020806 (1回目)
13	超臨界流体180bar抽出物	キャノーラ油超臨界流体抽出物 180 bar 分 Lot.040406 (2回目)
14	超臨界流体350bar抽出物	キャノーラ油超臨界流体抽出物 350 bar 分 Lot.040406 (2回目)
15	超臨界流体残留部	キャノーラ油超臨界流体抽出 残留物 Lot.040406 (2回目)
19	分子篩 CHCl ₃ -MeOH第1流出画分	キャノーラ油分子ふるい Ch I -1-a
20	分子篩 CHCl ₃ -MeOH第2流出画分	キャノーラ油分子ふるい Ch I -1-b
21	分子篩 CHCl ₃ -MeOH第3流出画分	キャノーラ油分子ふるい Ch I -1-c
22	分子篩 CHCl ₃ -MeOH第4流出画分	キャノーラ油分子ふるい Ch I -1-d
27	分子篩 Et ₂ O-EtOH第1流出画分	キャノーラ油分子ふるい Etr-1-a
28	分子篩 Et ₂ O-EtOH第2流出画分	キャノーラ油分子ふるい Etr-1-b
29	分子篩 Et ₂ O-EtOH第3流出画分	キャノーラ油分子ふるい Etr-1-c

表 1. 実験に用いたカノーラ油由来フラクションサンプルのリスト。

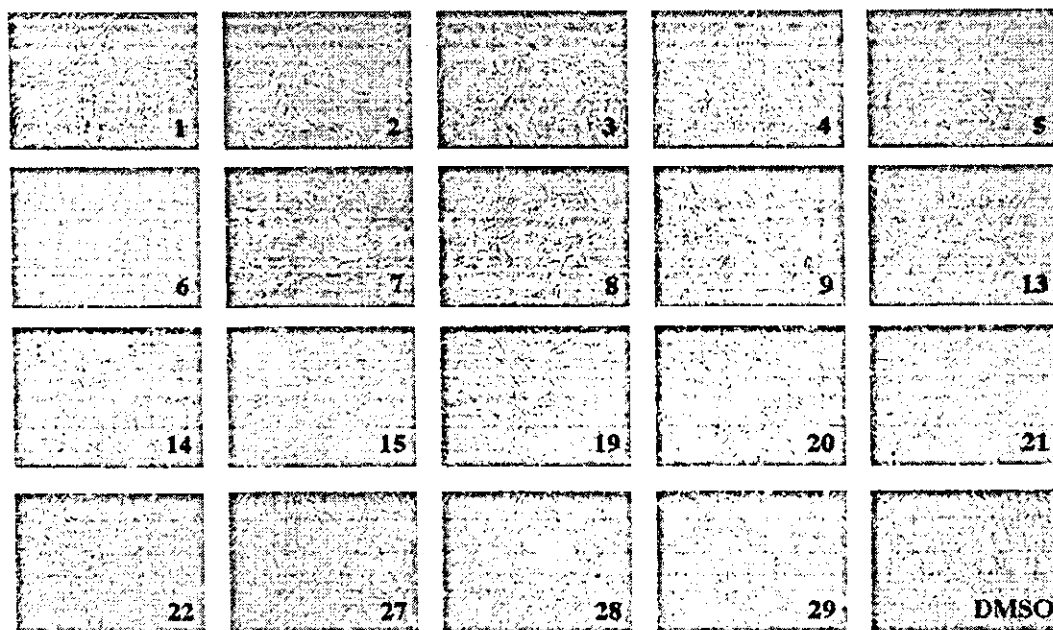


図 1. カノーラ油由来フラクションによる管腔形成阻害 (処理濃度 final 50 µg/ml)。数字は表 1 に示したサンプル番号を表す。サンプル No. 6 (分子蒸留冷却捕集部 EtOH 回収物) のみが管腔形成を阻害し、HUVEC に細胞死を誘導する作用を示した。

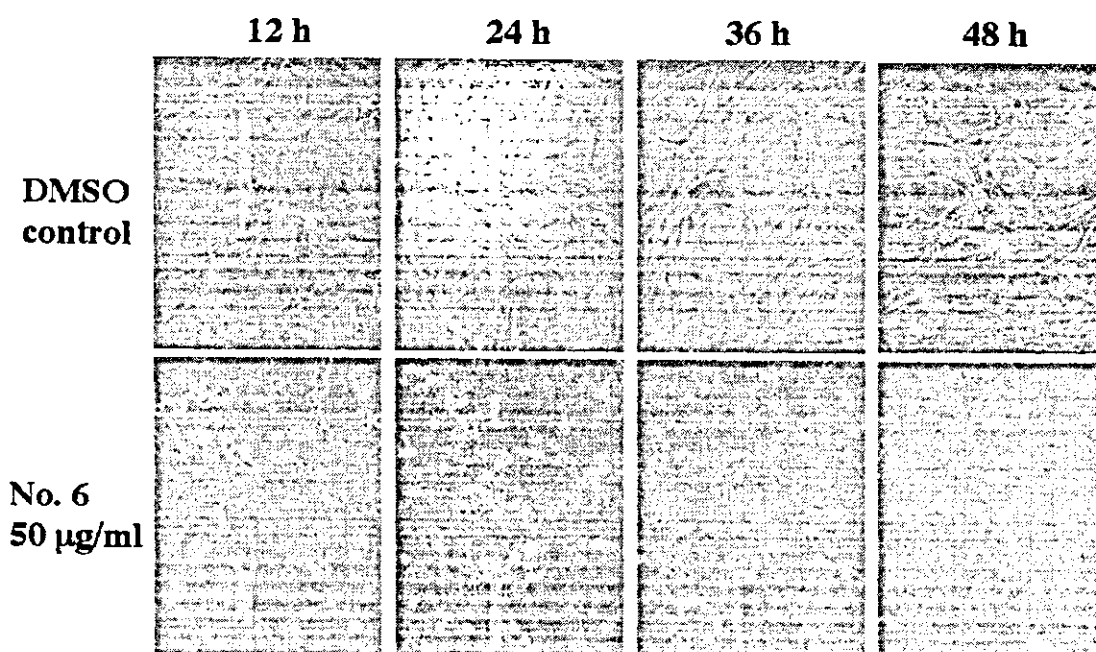


図2. カノーラ油由来フラクション No. 6 (分子蒸留冷却捕集部 EtOH 回収物) による管腔形成阻害の時間変化 (処理濃度 final 50 µg/ml)。処理後 12 時間目と早い時間から阻害がおこり、24 時間目には細胞死が多く見られた。

D. 考察

今回の実験で有害作用を示したフラクション No.6 について、今後その阻害作用の濃度依存性を検討する。さらに、血管内皮細胞への影響を、細胞内シグナル伝達や血管特異的発現タンパク質の変化などについて分子レベルで解明し、作用メカニズムについても解析を行う。

2. 学会発表
無し

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
特にない。

E. 結論

先に確立した天然物の生体有害性を検討する *in vitro* および *in vivo* の実験系の中で、管腔形成アッセイを用いることでカノーラ油中の有害成分の活性検出が可能であることを示すことが出来た。今後、このアッセイを用いてさらなる有害成分の精製を行い、最終的には有害成分の同定につなげたい。

F. 健康危険情報

現段階では健康危険情報は特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表
無し

大豆レシチン画分中の微量成分と培養細胞を用いた生理活性評価

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】

大豆レシチン画分には、植物ステロールに糖が結合したステリルグルコシドが含まれる。本研究では、このステリルグルコシドの生理活性として、ストレス性胃潰瘍形成における役割を解析した。ラット胃にはコレステリルグルコシドの生合成酵素活性が存在し、寒冷拘束ストレス負荷時にコレステリルグルコシドが蓄積されることが見いだされた。この生体内コレステリルグルコシドと類似した構造をもつ、大豆レシチン画分由来ステリルグルコシドをラットに経口投与すると、ストレス性胃潰瘍の形成が抑制された。その抑制機構は、細胞内ストレスタンパク質 HSP70 の誘導を介さないことが示された。

A. 研究目的

大豆油は大豆から通常抽出法によって得られる半乾性油であるが、抽出油中のガム質を分離すると大豆レシチン画分が得られる。リン脂質を約 60%含むこのペースト状画分は、食用・工業用界面活性剤として広い用途があり、精製して純度を高めたものは医薬用等としても用いられている。大豆レシチン画分には、リン脂質の他に、植物ステロールにグリセロールが結合したステリルグルコシドやアシルステリルグルコシドも混入している。しかし、植物由来のステリルグルコシドやアシルステリルグルコシドの食品としての機能や安全性に関して未解明である。また、ステリルグルコシドの動物体内での合成や役割についても、ほとんど研究されていない。

本研究では、寒冷拘束ストレス胃潰瘍を発症したラットの胃において、ストレス依存的にステリルグルコシドの一種であるコレステリルグルコシドが蓄積されることを見だし、その合成酵素活性を解析した。また、大豆レシチン画分由来のステリルグルコシドについて、細胞のストレス応答機構への作用を解析するため、培養細胞におけるストレスタンパク質 HSP の誘導活性とラット胃潰瘍形成モデルへの作用を検討した。

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、食餌を断った。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。その組成は、シトステロール 57%、カンペステロール 25%、スティグマステロール 16%であった。また、 α -コレステリルグルコシドと β -コレステリルグルコシドは、有機合成したものを用いた。ラットに経口投与する場合には、これらステリルグルコシドを、バッファー（5%アラビアゴム、0.6%Tween80）に 20mg/300 μ l の濃度になるように加え、激しく攪拌した後、超音波処理して乳化させたものを使用した。

③ 冷拘束ストレスを与えたラットの各臓器でのコレステリルグルコシド分析

金属製拘束ケージに入れて 4°C で 2 時間静置してストレスを与えたラットから、胃を摘出し、Bligh & Dyer 法にて脂質を抽出した後、HPTLC を用いてコレステリルグルコシドの検出を行った。

脂質の LC-ESI/MS 分析は以下の方法で行った。液体クロマトグラフィー (LC) は Aqilant 1100 system、質量分析計 (MS) は Bruker equire 3000 plus を用いた。カラムには MERCK chromolith 4.6×50mm (pressure 30bar) を用い、陽イオンモードで測定した。溶出は 0.1%ギ酸を含むエタノール/水混液により、0.2ml/min の流速で行った。サンプルは、810pmol/ μ l になるようにエタノールに溶かしたものを 0.4 μ l 注入した。標準品には有機合成した β -コレステリルグルコシドを用いた。

④ コレステリルグルコシド合成酵素の活性測定法

粗酵素液に、UDP-[¹⁴C]グルコース、および、コレステロールを基質として加え、各種緩衝液中、37°C で反応させた。反応後、Bligh & Dyer 法によって脂質を抽出し、薄層クロマトグラフ