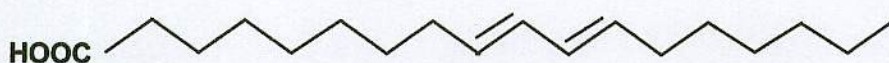
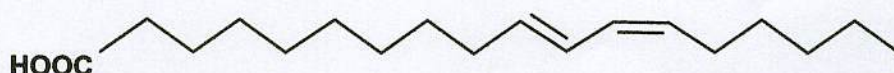
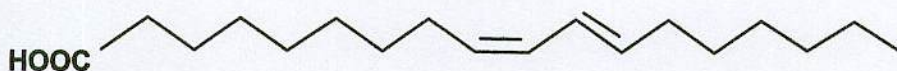


第 6 回 CLA 懇話会



懇話会代表 菅野道廣 熊本県立大学長

第 6 回世話人 清水昌 京都大学大学院教授

場所：ぱ・る・るプラザ京都

日時：平成 16 年 10 月 30 日(土) 13 時 00 分より



第6回 CLA 懇話会プログラム

1. 講演会

13:00～14:50

- 1) 代表世話人挨拶：共役リノール酸研究に求められるもの
菅野道廣 (熊本県立大)
- 2) 微生物を用いる共役脂肪酸の生産技術に関して
○小川順、岸野重信、安藤晃規、杉本聡、三原皓典、清水昌 (京大院農・応生科)
- 3) 加工調理による牛肉中のCLA含量の変化
○古賀民穂¹、石井利直²、太田英明²
(中村学園大学短大部¹、中村学園大学栄養科学部²)
- 4) CLAは薄層クロマトグラフィーにより分解するのか？(予備的検討)
○池田郁男、児玉陽子、宇津和範 (九州大学大学院農学研究院)
- 5) CLA摂取と運動トレーニング負荷したラットの赤血球膜および筋細胞膜成分のCLA含量
○山口正弘¹、井上節子^{2,4}、蓬田伸³、岩田敏夫⁵、鯉川なつえ²、澤木啓祐²、長岡功³、黒田善雄⁶
(¹順天堂大学・スポーツ健康医科学研究所、²順天堂大学・スポーツ健康科学部、³順天堂大学・医学部・生化学・生体防御学、⁴文教大学、⁵日清オイリオグループ(株)、⁶東京大学)
- 6) CLAの単独および混合摂取が皮膚の状態に及ぼす影響
○及川大地¹、仲西友紀¹、中村好徳¹、山本隆也²、山口暁子²、柴伸弥³、岩元久雄¹、橘哲也¹、古瀬充宏¹
(九大院生資環¹、リノール油脂(株)²、九州沖縄農業研究センター³)
- 7) 乳癌細胞におけるエストロゲンシグナリングに及ぼす共役リノール酸の影響
○中條瞳¹、山崎正夫²、立花宏文¹、山田耕路¹
(九大院・生機科・食糧科学¹、宮崎大・農・応用生科²)

14:50～15:20

コーヒーブレーク

15:20~17:30

8) CLA と魚油の相互作用による、肝臓の脂肪酸合成と肝臓・脂肪組織の遺伝子発現の制御

井手隆 (独立行政法人食品総合研究所)

9) 肥満・糖尿病ラットの非アルコール性肝臓障害に及ぼす CLA の影響

○永尾晃治、井上奈穂、王玉明、城内文吾、柳田晃良 (佐賀大学・応用生物科学科)

10) ザクロ種子油の摂取がマウスの脂肪組織重量に及ぼす影響

○古場一哲¹・赤星亜朱香²・田中一成¹・今村 順^{3,4}・河野淳子³・菅野道廣²
(県立長崎シーボルト大学看護栄養学部¹・熊本県立大学環境共生科学部²・
植物工学研究所³・玉川大学農学部⁴)

11) 10*trans*,12*cis*-CLA による肝がん細胞へのアポトーシス誘導

○山崎正夫¹、西山和夫¹、立花宏文²、山田耕路²
(宮大・農・応用生物科学¹、九大院・農・生械科²)

12) 共役リノール酸の血管新生抑制効果

○都築 毅、宮澤陽夫 (東北大・院農・生物産業創成)

13) ニガウリ種子油による大腸癌抑制メカニズムの解明

○安井由美子¹、細川雅史¹、佐原健彦²、扇谷悟²、甲野裕之³、
田中卓二³、宮下和夫¹(北大院水産科学¹、産総研²、金沢医大³)

14) 9*trans*,11*trans* 型共役リノール酸によるヒト結腸ガン細胞の増殖抑制及びアポトーシス誘導効果

○別府史章¹、細川雅史¹、田中礼央²、宮下和夫¹ (北大院水¹、雪印乳業(株)²)

2. 懇親会

18:00~20:00

共役リノール酸研究に求められるもの

菅野道廣

(熊本県立大) (CLA 懇話会代表世話人)

わが国における CLA 研究の底辺が広がり、本懇話会においても斬新な研究成果が数多く発表され、同慶の至りです。

しかし、きわめて多様な CLA の生理機能が知られ、しかも作用機構はもとより活性型異性体が解明されるに及んで、研究のフィロソフィーや方法論はかなり狭められているのではないのでしょうか。そのような中で、おそらくヒトでの恒常的な有効性の確認実験はもっとも現実的な課題と思われます。この場合、有効性と同時に副作用についての考察が不可欠であります。

昨年3月カナダで開催されたワークショップ‘The Role of Conjugated Linoleic Acid in Human Health’ [Am. J. Clin. Nutr., 79 (Suppl. 6):1131S-1220S, (2004)]は CLA のヒトでの効果に焦点を当てたものですが、その中で C.J. Field & P.C. Schley (同上 1190S-1198S)による癌・免疫系での問題点の指摘は、今後の研究の展開に有用と思われます。これを引用して、わが国における研究の問題点を整理してみたいと思います。

皆さん方の素晴らしい研究成果を期待しています。

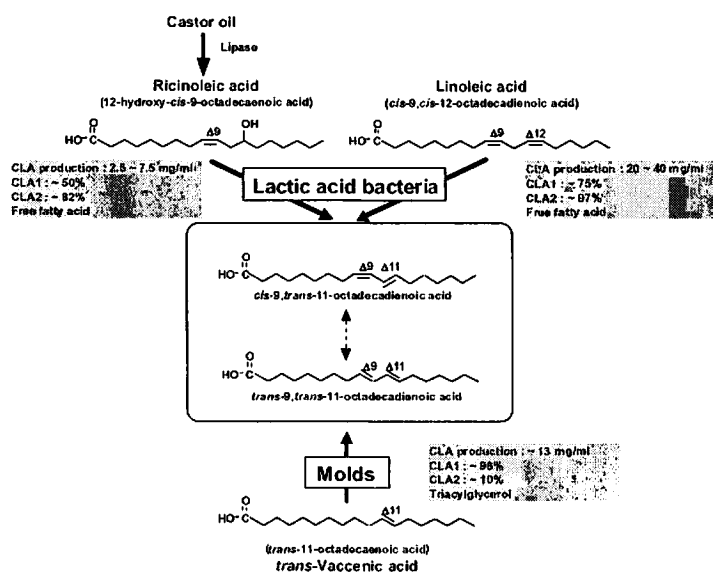
微生物を用いる共役脂肪酸の生産技術に関して

小川 順、岸野重信、安藤晃規、杉本 聡、三原皓典、清水 昌
(京大院農・応生科)

共役リノール酸 (CLA) に代表される共役脂肪酸に、体脂肪減少、癌形成抑制などのユニークな生理活性が見いだされてきている。多種存在する異性体が異なる活性を示すことや、医薬、機能性食品としての利用を考慮すると、選択性・安全性の高いプロセスの開発が求められる。

乳酸菌による共役脂肪酸生産

反芻胃内微生物が生育阻害回避のために不飽和脂肪酸を飽和化する過程で、共役脂肪酸が生成することが知られていた。そこで、乳酸菌を中心に消化管内微生物にリノール酸からの CLA 生産能を探索した結果、*Lactobacillus acidophilus* や *L. plantarum* に高い活性を見いだした。生成する CLA は *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid (18:2) および *trans*-9, *trans*-11-18:2 であり、*L. plantarum* AKU1009a の湿菌体を触媒的に用いると、リノール酸からの CLA 生産は 40 mg/ml に達した。異性体生成比は反応条件により変動し、*cis*-9, *trans*-11-18:2 は最大 80%、*trans*-9, *trans*-11-18:2 は 97% 以上の選択率で生産された。同様の反応により、 α -リノレン酸および γ -リノレン酸からの共役リノレン酸生産も可能であった。また、生産される共役脂肪酸は遊離脂肪酸として回収された。この乳酸菌による変換反応は、不飽和脂肪酸の水和によるヒドロキシ脂肪酸の生成とその脱水にともなう二重結合転移の二段階からなると推定された。これに基づき、各種ヒドロキシ脂肪酸の乳酸菌による変換反応を検討したところ、リシノール酸 (12-hydroxy-*cis*-9-octadecaenoic acid) が CLA へと変換されることが判明した。反応は遊離型リシノール酸に特異的であったが、リパーゼを用いることにより、リシノール酸含量の高いトリアシルグリセリド (TG) に富むひまし油も、CLA 生産の原料となりえた。



糸状菌による CLA 生産

哺乳類では、 $\Delta 9$ 不飽和化酵素 (DS) により *trans*-バクセン酸 (*trans*-11-octadecaenoic acid) が CLA へと変換されることが知られていた。同様の反応を微生物に探索した結果、糸状菌 *Delacroixia coronata* IF08586 により *trans*-バクセン酸が効率よく CLA へと変換されることが見いだされた。乳酸菌の場合とは対照的に、*cis*-9, *trans*-11-18:2 が高い選択率で主に TG として生産された。

加工調理における牛肉中の CLA 含量の変化

古賀民穂¹、石井年直²、太田英明²

(中村学園大学短大部¹、中村学園大学栄養科学部²)

(目的) 共役リノール酸 (CLA) はリノール酸の共役ジエン幾何異性体および位置異性体の集合体で、抗癌、抗動脈硬化、抗糖尿病、体脂肪減少および体蛋白質増加など多くの生理作用が報告され、注目を浴びている機能性食品である。我々は日本人の CLA 摂取量を検討するなかで、CLA の加熱調理による影響を知る必要がでてきた。CLA は加熱処理により、増加するとの 2、3 の報告がみられるが、明らかではない。今回は加工調理が牛肉中の CLA 量に及ぼす影響を検討した。

(方法) 市販の和牛もも赤身肉 (脂肪量、約 18.3g%) を用いて、ボイル、グリル、ロースト、電子レンジの 4 操作で調理した。試料からの脂肪の抽出は CHCl₃:MeOH (2:1) で行い、総脂肪量は重量法で求めた。CLA はけん化後、DMSO を添加、硫酸メタノール法でメチル化し、SUPELCO™-10 (60mx0.32mmx0.25 μm) を用いて、9c11t, 10t12c, 10c12c, all trans (9t11t, 10t12t) を分析した。脂肪酸組成は硫酸メタノール法でメチル化し、CP-SIL 88 (50mx0.25mmx0.2 μm) にて GLC 分析を行った。

(結果) 生肉の総 CLA 量は 2.91mg/g 脂肪で、9c11t は 65% で、報告値と大差はなかった。加熱処理でボイルでは、総 CLA 量は 1.09mg/g 脂肪で生肉の約 38% と低く、分析した異性体中、9c11t, all trans のみ検出された。グリルでは総 CLA 量が生肉の約 92% となり、主要 CLA である 9c11 は約 70% と減少したが、生肉で極値であった 10t12c の増加が見られた。ローストは総 CLA 量は 3.54mg/g 脂肪で生肉の 122% と著しい増加がみられ、その理由として 9c11t, all trans 体が生肉より、それぞれ約 20% 増加したこと、および 10t12C の生成によるものであった。電子レンジ調理ではすべての異性体は検出されたが、総 CLA 量は生肉の約 56% と低値であった。今回行った加熱処理で、試料の CLA 量に異なった変化が見られたが、その機序は不明である。

CLA は薄層クロマトグラフィーにより分解するのか？（予備的検討）

池田郁男、児玉陽子、宇津和範
（九州大学大学院農学研究院）

CLA には主に 9c,11t-18:2 (9c と略記する) および 10t,12c-18:2 (10t) が存在する。これらが有する共役ジエン構造は不安定であり、通常の酸触媒のメチル化により、転移や異性化が起こり、元となる CLA は減少することが明らかとなっている。今回は、CLA が薄層クロマトグラフィー (TLC) で分解する可能性を探るために予備的検討を行った。

【方法】

(1) 高純度の 9c あるいは 10t を TLC プレート上にスポットし、そのまま 1~2 時間放置した。

(2) CLA-TG あるいは高純度の 9c あるいは 10t を TLC プレート上にスポットし、石油エーテル：ジエチルエーテル：酢酸=82:18:1 で展開した。

上記の操作終了後、直ちに TLC プレートからはぎ取り、クロロホルム：メタノール=2：1 で抽出し、メチル化を行い GLC に供した。メチル化は、以前に我々が報告した、異性化がほとんど起こらない方法で行った。内部標準物質としては 15：0 を用いた。なお、TLC 上にスポット後、クロロホルム-メタノール混液で抽出するまでの時間は極力同じになるよう努めた。

【結果】

TLC にスポット後 2 時間放置した場合、1 回目の実験では、9c は 74%、10t は 61% に減少した。2 回目の実験では、9c はほとんど減少せず、10t は 92% に減少した。

TLC にスポット後展開溶媒で展開する実験を行ったところ、高純度品の場合、9c では、1 回目 69%、2 回目 87% に減少し、10t では、1 回目 68%、2 回目 83% に減少した。しかし、3 回目を行ったところ、減少は認められなかった。また、CLA-TG では、9c は 80%、10t は 79% に減少した。

【考察】

以上のように、CLA は TLC 操作により減少する可能性が示された。TLC にスポット後に放置した場合、9c よりも 10t の減少の割合が大きいと考えられたが、展開溶媒で展開した場合は、9c と 10t はほぼ同程度減少した。しかし、減少が見られない場合があり、また、減少率も一定しないなど、その挙動は不可解であり、現時点では定量的に把握することは困難である。

CLA 摂取と運動トレーニングを負荷したラットの赤血球膜および筋細胞膜成分の CLA 含量

山口正弘¹、井上節子^{2,4}、蓬田伸³、岩田敏夫⁵、鯉川なつえ²、澤木啓祐²、長岡功³、黒田善雄⁶

(¹順天堂大学・スポーツ健康医科学研究所、²順天堂大学・スポーツ健康科学部、³順天堂大学・医学部・生化学・生体防御学、⁴文教大学、⁵日清オイリオグループ(株)、⁶東京大学)

【背景と目的】我々は昨年、CLA 摂取が運動トレーニング負荷による生体機能変化にどのように影響するかを血液性状を中心に調べた。その結果、CLA 非摂取ラットと比較して CLA 摂取によって、1) 運動トレーニング負荷による血液流動性の低下が抑制され、2) 運動トレーニング負荷によって乳酸脱水素酵素 LDH やクレアチンキナーゼ CK などの酵素が筋肉から血液中へ逸脱するのが抑制されることを見出した。

これらの現象は摂取した CLA が赤血球膜や筋細胞膜に取り込まれることによると考えられるので、今回は、CLA 摂取ラットの赤血球膜や筋細胞膜成分に CLA が取り込まれているかどうかを検討した。

【方法】①運動トレーニング負荷：SD 系ラットをトレッドウィール (tread-wheel) ケージで飼育し自由意志による走運動負荷を 3 週間行った。対照ラットはトレッドウィールの無いケージで飼育した。②血液検査：3 週間後、ヘパリン採血し、血液流動性 (hemorheology) を測定し、走運動トレーニング負荷によって血液中に逸脱した酵素量を調べた。③赤血球のゴーストを調製し赤血球膜サンプルとした。④腓腹筋を単離し、高速遠心によって筋細胞膜成分を調製した。

【結果】1) 運動負荷による血液流動性の低下が抑制された。2) 筋肉から血液中に逸脱する CK や LDH の酵素量が抑制された。3) CLA 摂取したラットの赤血球ゴースト及び腓腹筋細胞膜成分に CLA の取り込みが見られ、その取り込み量は走運動トレーニング負荷によって減少した。4) 腓腹筋細胞膜成分の脂質に関して、運動負荷によってアラキドン酸の減少と、CLA の異性化が見られた。

【考察】1) の結果から、CLA 摂取により運動時に筋肉により多くの酸素が供給され、筋肉に生じた疲労物質が速やかに除去されることによって、運動能力が向上する可能性が期待される。また、2) と 3) の結果は、CLA が、強い抗酸化作用をもつことから、運動トレーニング負荷によって生成された活性酸素の清掃物質として消費され、それにより攻撃されやすい筋細胞膜の損傷を軽減したためと考えられる。さらに 4) の結果は、運動負荷によって生成された活性酸素によるアラキドン酸の消失と、CLA の異性化の可能性を示唆している。

CLA の単独および混合摂取が皮膚の状態に及ぼす影響

○及川大地・仲西友紀・中村好徳・山本隆也¹・山口暁子¹・柴伸弥²・

岩元久雄・橘哲也・古瀬充宏

(九大院生資環・¹リノール油脂(株)・²九州沖縄農業研究センター)

【目的】共役リノール酸 (CLA) は、内臓脂肪の蓄積抑制効果を有するが、我々はマウスの皮下組織層が薄くなることも確認した。また、皮膚中の脂肪酸組成を同定したところ、CLA は皮膚脂肪に移行しやすい脂肪酸であることが判明した。一方、CLA を過剰に摂取すると、肝臓に脂肪が蓄積することがマウスで報告されているが、CLA と γ -リノレン酸 (GLA) を同時摂取することで、肝臓肥大の抑制と同時に、内臓脂肪の蓄積抑制効果も確認した。そこで本実験では、CLA と GLA をマウスに与え、油脂源と皮膚の状態との関係について生化学的手法と組織学的手法を用いて調べた。

【方法】8 週齢の雄 ddY マウスを 6 群に分け、高リノール酸 (HLA)、CLA、GLA および HLA+GLA、CLA+GLA、CLA+HLA の混合油脂を 4 週間経口投与した。屠殺後、全皮膚を用いてトリアシルグリセロール (TG)、脂肪酸組成の同定および総コラーゲンの測定を行なった。また、1 cm 角の皮膚シートを背部から切りとり、アルカリ浸軟法によりコラーゲン標本を作製し、走査型電子顕微鏡下で真皮と皮下組織の厚さを観察し、皮下組織の脂肪細胞の数と大きさも測定した。

【結果】CLA、CLA+GLA および CLA+HLA 群は、皮膚中の脂肪酸組成として CLA を約 10% 含有した。CLA 異性体の組成比は、CLA 単独・混合摂取共に 9cis,11trans 型が 10trans,12cis 型より高かった。皮膚 TG 量は、HLA 群と比較して CLA 単独・混合油脂群で有意に減少した。また、GLA は CLA の効果より弱いながらも TG 量を減少させた。それに伴い、皮下組織層の厚さは CLA 単独・混合油脂群と GLA 混合油脂群において HLA 群より有意に薄くなった。一方、真皮層の厚さとコラーゲン量は全ての群において有意な差が認められなかった。

【結論】CLA の単独および混合摂取は、皮膚の TG 含量と皮下組織層の厚さに影響を及ぼすことが明らかになった。このことから、CLA は単独摂取のみならず、他の油脂と混合しても皮膚中の脂肪蓄積を抑制する効果があるものと結論づけた。

04 CLA懇話会要旨

乳癌細胞におけるエストロゲンシグナリングに及ぼす共役リノール酸の影響

○中條 瞳¹⁾、山崎 正夫²⁾、立花 宏文¹⁾、山田 耕路¹⁾

¹⁾九大院・生機化・食糧化学、²⁾宮崎大・農・応用生科

共役リノール酸 (conjugated linoleic acid; CLA) は共役ジエン構造を有するリノール酸の位置および構造異性体の総称であり、これまでに乳癌抑制効果を有することが報告されているが、その作用機序については不明な点が多い。本研究室ではこれまでにCLA異性体の一つであるtrans10,cis12 (t10,c12)-CLAがヒト乳癌細胞株MCF-7のエストロゲン誘導性増殖を抑制することを明らかにしている。今回はその作用経路を明らかにするため、細胞周期進行に関係するシグナル伝達分子の発現に及ぼすCLAの影響について検討した。

われわれは、t10,c12-CLAが17 β -estradiol (E2) により誘導されるMCF-7細胞の増殖をG1期からS期への細胞周期移行の阻害を通じて抑制すること、その移行を抑制するp21およびp27の発現を増強することをすでに明らかにした。本実験ではこのp21発現増強の上流シグナルであるp53およびc-mycの発現をタンパク質レベルで検討した。その結果、t10,c12-CLAによりp53発現の増強が認められたが、一方でc-mycの発現にはCLAの影響が見られなかった。エストロゲンレセプター (ER) は核内で転写因子として働くことが知られており、c-mycはその転写産物のひとつである。そこで、t10,c12-CLAのエストロゲンシグナリング抑制作用におけるERの関与についてもう一つの転写産物として知られるcyclin Dの発現を調べた。その結果、t10,c12-CLA添加によりcyclin Dの発現が抑制傾向を示した。以上の結果はE2のp53経路を介したMCF-7細胞の細胞周期移行の抑制を通じて、t10,c12-CLAが乳癌細胞の増殖を抑制することを示唆している。

CLA と魚油の相互作用による、肝臓の脂肪酸合成と肝臓・脂肪組織の遺伝子発現の制御

井手隆

(独立行政法人食品総合研究所)

【目的】 CLA はマウス脂肪組織の顕著な減少を引き起こし、抗肥満作用を示すが、肝臓への脂肪蓄積や高インスリン血症、耐糖能の減少などの悪影響を引き起こすことも知られている。我々は前に CLA が SREBP-1 発現上昇を伴い肝臓の脂肪酸合成系酵素の活性と遺伝子発現の大きな増加を引き起こすことを明らかにし、CLA による脂肪肝発現は主に脂肪酸合成の上昇に基づくものと推定した。本研究では強い肝臓脂肪酸合成抑制活性を持つ魚油と CLA が肝臓の脂肪酸合成と肝臓・脂肪組織の遺伝子発現に与える影響を調べた。【方法・結果】雄 ICR マウスに CLA を含まない魚油無添加（対照）および 6% 魚油添加食あるいは魚油を 0, 1.5, 3 および 6% 含む 1% CLA 添加食を 3 週間与えた。CLA 無添加群では 6% 魚油添加により肝臓の TG 量は約 1/2 となった。CLA は肝臓の TG 量を約 7 倍に増加させた。CLA 食への魚油添加は用量依存的に肝臓 TG 量を低下させ、3~6% 添加で対照群のレベルにまで減少した。CLA 無添加群で脂肪組織重量は魚油添加により影響を受けなかった。CLA は睾丸および腎臓周辺脂肪組織脂重量を対照群の 25 及び 14% に値にまで低下させた。CLA 食への魚油の添加は用量依存的に脂肪組織重量を増加させ、6% 魚油添加で、睾丸および腎臓周辺脂肪組織脂重量は対照群の 64 及び 37% にまで回復した。CLA 無添加群で脂肪酸合成系酵素の活性と mRNA 量および Δ^5 及び Δ^6 不飽和化酵素と SREBP-1c の mRNA 量は 6% 魚油添加により低下した。SREBP-1a の mRNA 量には変化がなかった。これらのパラメーターは CLA の食餌への添加により大きく増加し（1.5~3 倍）、魚油の同時投与により用量依存的に減少した。3% の魚油添加で、これらの値はほぼ対照群の値にまで低下した。また、CLA は一般的には脂肪組織特異的遺伝子として知られている脂肪酸転移酵素(FAT)/CD36、アディポニュートリンおよび PPAR γ 2 の肝臓での mRNA 発現を強く誘導し、発現量は魚油の同時添加により用量依存的に低下した。脂肪組織に高発現する数多くの遺伝子（レプチン、アディポネクチン、脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質 (ALBP)、FAT/CD36、リポタンパク質リパーゼ、グルコース輸送体 4、アディポニュートリン、IL-6 および PPAR γ 1 と γ 2) の発現は CLA により大きく減少したが（70~80% の低下）、魚油の同時添加により上昇し、6% 添加で対照群の 25~110% にまで増加した。しかし、脂肪組織での脂肪酸合成系酵素 mRNA 量に CLA および魚油添加の影響は認められなかった。また、CLA の抗肥満作用の原因遺伝子と推定されている TNF α と UCP2 の発現量は CLA により上昇したが魚油の同時添加によりその発現量に変化は見られなかった。血清のレプチンとアディポネクチン濃度は CLA により大きく減少したが、魚油の同時添加により上昇し、6% 添加では対照群と差が見られなかった。血清インスリン濃度は CLA により対照群の約 4 倍に増加し、魚油 1.5% 同時添加でさらに（約 9 倍）増加したが、魚油添加量増加と共に減少に転じ、6% 同時添加で対照群の値にまで減少した。血清グルコース濃度はインスリン濃度と平行した変化を示した。【考察】以上の結果から CLA による脂肪肝と高インスリン血症は魚油の同時摂取により脂肪組織の部分的再生を伴い、効果的に緩和できることが示された。また、本研究の結果から以下のことが推察された。①CLA による脂肪肝の発症は主に脂肪酸合成の昂進に起因するが②肝臓での“脂肪組織特異的遺伝子”発現上昇も関与する可能性がある。③CLA により脂肪組織が枯渇した条件では肝臓での脂肪酸合成は体内のグルコース処理に大きな役割を果たしている。④TNF α と UCP2 および種々のアディポサイトカインが CLA の抗肥満作用の原因遺伝子として機能していると考え難いことは困難である。

肥満・糖尿病ラットの非アルコール性肝臓障害に及ぼす CLA の影響

永尾晃治、井上奈穂、王玉明、城内文吾、柳田晃良

(佐賀大学・応用生物科学科)

[目的] 共役リノール酸 (CLA) は、高脂血症の改善・癌形成の阻害・動脈硬化の予防など様々な栄養生理機能を持つ機能性脂質として近年注目を集めている。モデル動物 Zucker ラットは、レプチン受容体変異により肥満・糖尿病を発症し、非アルコール性肝臓障害 (NAFLD) も発症することが知られている。本研究では、CLA が Zucker ラットの肝機能に及ぼす影響を検討した。

[方法] 7 週齢の Zucker ラットに対照食 (5%コーン油+1%サフラワー油)、CLA 食 (5%コーン油+1% CLA) を与えた 2 群 (各 6 匹) を設け、8 週間飼育した。飼育終了後、エーテル麻酔下で大動脈採血により屠殺を行い、血漿と肝臓を得て分析に供した。

[結果] 対照食を与えた Zucker ラットでは重篤な脂肪肝と肝肥大を発症していたが、CLA 食摂取により顕著な改善が認められた。肝機能の指標である、血漿中のアスパレートアミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、乳酸脱水素酵素、アルカリフォスターゼ活性は、対照群で非常に高値を示したが、CLA 群で顕著な改善が認められた。よって CLA は Zucker ラットの NAFLD 発症を抑制することが示され、その作用機序には、脂質代謝関連蛋白質活性および炎症系サイトカイン遺伝子発現の調節が関与していると考えられた。

ザクロ種子油の摂取がマウスの脂肪組織重量に及ぼす影響

古場一哲¹・赤星亜朱香²・田中一成¹・今村 順^{3,4}・河野淳子³・菅野道廣²

(県立長崎シーボルト大学看護栄養学部¹・熊本県立大学環境共生科学部²・植物工学研究所³・玉川大学農学部⁴)

【目的】私たちはこれまでに、ザクロ種子油に含まれる共役リノレン酸(プニカ酸: 9c,11t,13c-18:3)の摂取が、軽度ながらもラットの脂肪組織重量を減少させることを観察している。一般に、共役リノール酸に対する応答は、ラットよりもマウスで明確であることが知られているので、今回、ザクロ油摂取の効果をマウスで検討した。

【方法】食餌は10%ナタネ油を含むAIN-93G組成の純化食を対照食とした。食餌脂肪の一部をザクロ種子油と置換えて食餌中のプニカ酸濃度が0.25%および0.5%となるように調製した。これらの食餌をICR系CD-1雄マウスに4週間自由摂食させて屠殺し、脂肪組織重量、肝臓脂質濃度などを測定した。

【結果・考察】単位体重当たりの腎臓周辺脂肪組織重量は、対照群に比べ0.5%群で低値を示した。睾丸周辺の脂肪組織重量でも同様の傾向が認められた。肝臓トリグリセリド濃度も、対照群に比べ0.5%群で低かった。肝臓リン脂質濃度は各群間で違いはなかった。肝臓ミトコンドリア画分のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は、対照群に比べ0.5%群で高く、脂肪組織重量の減少と肝臓トリグリセリド濃度の低下の一因と考えられた。なお、本研究は一部生研センター「新事業創出研究開発事業」に基づいて行われた。

10*trans*, 12*cis*-CLA による肝がん細胞へのアポトーシス誘導

山崎正夫 1、西山和夫 1、立花宏文 2、山田耕路 2

(1 宮大・農・応用生物科学、2 九大院・農・生機科)

<目的、背景>

これまでにわれわれは、10*trans*, 12*cis*-CLA がラット肝癌細胞にアポトーシス誘導を介した、強い細胞致死効果を有することを明らかとした。今回 10*trans*, 12*cis*-CLA によりアポトーシス誘導機構として新たに小胞体ストレスとの関与を見出した。

<方法>

細胞はヒト肝癌細胞株 PLC/PRF5 を用いた。細胞は 5.0×10^4 cell/ml を初発濃度として 1% FBS 添加 DMEM で各時間培養を行った。アポトーシスの評価として、caspase-3 活性、DNA の断片化の検出を行った。PARP、チトクロム c, Bax, Bcl2, Bid, CHOP, caspase-12 の検出はウエスタンブロット法を用いた。Caspase 活性測定は蛍光法、また小胞体からの Ca²⁺ 放出阻害剤としてダントロレンを用いた。

<結果、考察>

10*t*, 12*c*-CLA は、9*cis*, 11*trans*-CLA に比べて、PLC/PRF-5 細胞に強い細胞致死活性を有していた。細胞死の形態について、10*t*, 12*c*-CLA 作用機構を検討したところ、caspase-3 の活性化、DNA ラダーの検出、PARP の切断、細胞質画分へのチトクロム c (cyt.c) の放出が認められ、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導が関与することが示された。次に、ミトコンドリア関連アポトーシスの実行に関与するタンパク発現を検討したところ、10*t*, 12*c*-CLA 処理により Bcl2 の発現低下と CHOP の発現誘導が認められた。また、Bcl2 の発現低下はダントロレンにより阻害された。加えて、10*t*, 12*c*-CLA は caspase-12 の発現増強とその断片化を誘導することが示された。これらの結果から、10*t*, 12*c*-CLA は小胞体ストレスを介してアポトーシスを誘導することが示唆された。現在、CLA の細胞内カルシウム代謝への影響を検討中である。

共役リノール酸の血管新生抑制効果

○ 都築 毅、宮澤陽夫（東北大・院農・生物産業創成）

【目的】

分子内に共役二重結合を有する共役リノール酸(CLA)は、抗癌作用を始め様々な生理機能を持つことが報告されている。我々も最近、細胞培養試験や動物試験においてCLAが癌抑制作用を示すことを報告した[1]。その時、CLAを投与したマウスの癌組織では、内部が変色し、壊死を起こしているように見えた。つまり、癌組織内部にまで栄養が行き届いていない状態、栄養を運ぶ血管が新生されていない状態であるように考えられた。癌の発生と進展には、血管系がさまざまな形で密接に関係している。癌が増殖するときには、宿主から癌組織に向かう血管の新生が重要なステップになる。癌治療の目的で血管新生を抑制する成分が注目されている。そこで本研究では、CLAの血管新生抑制効果を *in vitro* と *in vivo* で検討した。

【方法】

供試試料には9Z11E-CLAと10E12Z-CLAの2種類の脂肪酸を使用し、ヒト内皮細胞(HUVEC)を用いて、血管新生の重要なステップである細胞の増殖、遊走、管腔形成を評価し、マウス背部皮下法にて生体でも検討した。また、定量PCR法にて、血管新生に関与するタンパク質のmRNAの動向を追った。

【結果】

CLAはどちらの異性体も管腔形成を抑制した。その活性の強さは、10E12Z-CLAが9Z11E-CLAより強い作用をしめした。CLAは細胞増殖には影響を与えなかったが、細胞の遊走を阻害した。CLAは *in vivo* でも血管新生を阻害した。そして、CLAの血管新生阻害メカニズムは、細胞の遊走を促進するMMPや血管内皮細胞増殖因子であるVEGF受容体の発現を阻害することを定量PCR法にて明らかにした。

【考察】

CLAの様々な生理機能(癌抑制機構、動脈硬化抑制、体脂肪蓄積抑制など)のメカニズムの一つとして、血管新生抑制作用が関わっていることが示唆できた。

[1] T. Tsuzuki, Y. Tokuyama, M. Igarashi, T. Miyazawa (2004) Tumor growth suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation, *Carcinogenesis*, 25, 1417-1425

ニガウリ種子油による大腸癌抑制メカニズムの解明

○安井 由美子¹・細川 雅史¹・佐原 健彦²・扇谷 悟²・甲野 裕之³・
田中 卓二³・宮下 和夫¹ (北大院水産科学¹・産総研²・金沢医大³)

【緒言】ある種の植物種子油中には高濃度で特定の共役リノレン酸(CLN)異性体が含まれている。その一つである *c9,t11,t13*-CLN を含むニガウリ種子油(BGO)をラットに摂取させたところ、AOM によって誘発される大腸癌が顕著に抑制された。そこで本研究では、BGO による大腸癌抑制メカニズムの一端を解明するために、ヒト結腸癌細胞に対する BGO の影響を DNA マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現の観点から検討した。

【実験】ヒト結腸癌 Caco-2 細胞培養液に *c9,t11,t13*-CLN を約 60% 含有する BGO 由来の脂肪酸(BGO-FFA)を添加し一定時間培養した。その後細胞から Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイにて発現に変化のみられた遺伝子を調べた。比較対照として α -リノレン酸および *c9,t11*-CLA を添加して同様に行った。発現に変化のあった遺伝子に関してはリアルタイム定量 PCR で詳細に解析した。

【結果と考察】BGO-FFA は *c9,t11*-CLA や α -リノレン酸と比較して多くの遺伝子の発現を変化させた。その中で特に注目される遺伝子として、GADD45, p53 の発現が上昇し、PCNA(proliferating cell nuclear antigen)や cyclinG1 の発現が低下した。そこで、更に詳細に定量 PCR を用いて GADD45 と p53 の発現量への影響について検討したところ、BGO-FFA 処理によりいずれの遺伝子も顕著な増加が認められた。GADD45 と p53 はアポトーシス誘導や細胞の増殖抑制機能を有する遺伝子である。演者らはこれまでに BGO が AOM により誘発されるラットの前癌病変部中でアポトーシスを誘導することを報告している。以上の結果から BGO はアポトーシスや細胞増殖に関連する様々な遺伝子の発現を制御することにより大腸癌を抑制していることが示唆された。

9*trans*,11*trans* 型共役リノール酸によるヒト結腸ガン細胞の増殖抑制及びアポトーシス誘導効果

○別府 史章¹・細川 雅史¹、田中 礼央²、宮下 和夫¹ (¹北大院水、²雪印乳業㈱)

【目的】

自然界には共役型の二重結合を有する脂肪酸が存在し、優れた機能性が注目されている。その代表的なものに共役リノール酸(CLA)が挙げられ、主要な異性体である 9*cis*,11*trans*-CLA 及び 10*trans*,12*cis*-CLA については多くの研究がなされている。一方で CLA の異性体の中には全 *trans* 型の 9*trans*,11*trans*-CLA も存在することが知られているが、それらに関する研究例は少ない。そこで本研究では、9*trans*,11*trans*-CLA の機能性を明らかにする目的で、ヒト結腸癌細胞の増殖抑制能及びアポトーシス誘導能に及ぼす影響について他の CLA 異性体と比較した。

【方法】

ヒト結腸癌 Caco-2 細胞は MEM 培地を用いて培養した。Caco-2 細胞を 24 時間前培養した後、CLA 異性体をそれぞれ培地中に終濃度 50 μ M~200 μ M となるように添加した。細胞生残率を WST-1 法により測定した。また、アポトーシス誘導能は断片化 DNA 量をサンドイッチ ELISA 法で測定し評価するとともに、アポトーシス関連タンパク質の発現量を Western blot 法で解析した。

【結果・考察】

まず最初に 9*trans*,11*trans*-CLA、9*cis*,11*trans*-CLA、9*cis*,11*cis*-CLA、10*trans*,12*cis*-CLA をそれぞれ含んだ培地中で Caco-2 細胞を培養し細胞生残率を測定した。その結果、9*trans*,11*trans*-CLA > 10*trans*,12*cis*-CLA > 9*cis*,11*cis*-CLA > 9*cis*,11*trans*-CLA の順で顕著な増殖抑制効果がみられた。更にアポトーシスの指標として断片化 DNA 量を測定した結果、9*trans*,11*trans*-CLA で最も高い DNA の断片化が認められた。9*trans*,11*trans*-CLA で処理した Caco-2 細胞では未処理のコントロールと比較して、アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 及び Bcl-xL の発現量の減少が見られた。これらの結果は、Caco-2 細胞に対する増殖抑制効果及びアポトーシス誘導能が CLA 異性体間で大きく異なり、特に 9*trans*,11*trans*-CLA が強い効果を有することを示唆するものである。