

# 食品因子による生体防御を目的とした DNA傷害マーカーの開発と応用

(課題番号 05556021)

平成7年度科学研究費補助金(試験研究B)  
研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 大澤俊彦  
(名古屋大学教授)

# は し が き

## 研究組織

- 研究代表者： 大澤俊彦 (名古屋大学農学部教授)  
研究分担者： 山下かなへ (椋山女学園大学生生活科学部教授)  
三村精男 (山梨大学工学部教授)  
中山勉 (静岡県立大学食品栄養科学部助教授)  
豊國伸哉 (京都大学医学部講師)  
内田浩二 (名古屋大学農学部助手)

## 研究経費

平成5年度	7,900千円
平成6年度	3,700千円
平成7年度	1,800千円

## 研究発表

### (1) 学会誌

1. Nakayama, T. (1994) Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Res.* **54**, (7, Supplement), 1991s-1993s.
2. Nakayama, T., Yamada, M., Osawa, T., and Kawakishi, S. (1996) Inhibitory effects of caffeic acid ethyl ester on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity and DNA single-strand breaks in Chinese hamster V79 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, (2), 316-318.
3. Nakayama, T. (1995) Protective effects of caffeic acid esters against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damages. "16th international scientific colloquium on coffee." Association Scientifique Internationale du Café, pp372-379.
4. Toyokuni, S., Miyake, N., Hiai, H., Hagiwara, M., Kawakishi, S., Osawa, T., and Uchida, K. (1995) The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct. *FEBS Lett.* **359**, 189-191.
5. Sakai, T., Kawazuru, S., Yamauchi, K., and Uchida, K. (1995) A lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal as a marker for assessing the quality of raw Meats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1379-1380.

名古屋大学図書	
和B	89383

6. Uchida, K., Osawa, T., Hiai, H., and Toyokuni, S. (1995) 4-Hydroxy-2-nonenal-trapping ELISA: direct evidence for the release of a cytotoxic aldehyde from oxidized low density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 1068-1073.
7. Uchida, K., Itakura, K., Kawakishi, S., Hiai, H., Toyokuni, S., and Stadtman, E.R. (1996) Characterization of epitopes recognized by 4-hydroxy-2-nonenal specific antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.*, in press.
8. Tsuda, T., Mizuno, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1995) Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidative Components from Tamarind (*Tamarindus indica*, L.) Seed Coat. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2803-2806.
9. Miura, S., Watanabe, J., Sano, M., Tomita, T., Osawa, T., Hara, Y. and Tomita, I. (1995) Effects of Various Natural Antioxidants on the Cu<sup>2+</sup>-mediated Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1-4.
10. Osawa, T., Sugiyama, Y., Inayoshi, M. and Kawakishi, S. (1995) Antioxidative Activity of Tetrahydrocurcumin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1609-1612.
11. Toyokuni S, Sagripanti J-L and Hitichins VM. (1995) Cytotoxic and mutagenic effects of ferric nitrilotriacetate on L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Lett* **88**: 157-162.
12. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J and Hiai H. (1995) Hypothesis: Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* **358**: 1-3.
13. Matsuo S, Toyokuni S, Osaka M, Hamazaki S and Sugiyama T. (1995) Degradation of DNA in dried tissues by atmospheric oxygen. *Biochem Biophys Res Comm* **206**: 1021-1027.
14. Toyokuni S, Mori T, Hiai H and Dizdarolu M. (1995) Treatment of Wistar rats with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, causes DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in their renal chromatin. *Int J Cancer* **62**: 309-313.
15. Nishiyama Y, Suwa H, Okamoto K, Fukumoto M, Hiai H and Toyokuni S. (1995) Low incidence of point mutations in H-, K- and N-ras oncogenes and p53 tumor suppressor gene in renal cell carcinoma and peritoneal mesothelioma of Wistar rats induced by ferric nitrilotriacetate. *Jpn J Cancer Res* **86**: 1150-1158.
16. Yamashita, K., Iizuka, Y., Imai, T., and Namiki, M. (1995) Sesame seed and its lignans produce marked enhancement of vitamin E activity in rats fed a low a-tocopherol diet. *Lipids* **30**, 1019-1028.

(2) その他の刊行物

1. Osawa, T., Yoshida, A., Kawakishi, S., Yamashita, K. and Ochi, H.: Protective Role of Dietary Antioxidants in Oxidative Stress. *Oxidative Stress and Aging* (Cutler, R.G., Packer, L., Bertram, J. and Mori, A.), Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland, p.367-377 (1995)
2. 大澤俊彦監修、がん予防食品の開発、シーエムシー(1995)

3. 内田浩二：過酸化脂質の特異的新検出法。ファルマシア 31, 755-759 (1995).
4. 大澤俊彦：食品抗酸化成分の最新の生体系評価法の開発。フードケミカル、9 (3), 19-26 (1995).
5. 大澤俊彦：抗がん機能の評価。フードケミカル、10 (1), 62-68 (1996).
6. 豊國伸哉 発癌とレドックス制御異常 最新医学 第49巻 第12号 2267-2263頁、平成6年.
7. 山下かなへ、飯塚佳恵、並木満夫：トコフェロール同族体とセサモール・ビタミンCとの相互作用。ビタミンE研究の進歩V、45-50 (1995).
7. 山下かなへ、飯塚佳恵、今井貞子、並木満夫：生体内トコフェロールの局在に及ぼすゴマ投与の影響。ビタミンE研究の進歩V I、122-127 (1996).

# 1 動物培養細胞を用いた評価系

## 1. 目的

過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、スーパーオキシドアニオンラジカル( $O_2^-$ )、ヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ )、一重項酸素( $^1O_2$ )、などの活性酸素による酸化細胞傷害が、ヒトの循環器系疾患、癌、老化などの一因として注目されている。本担当者はすでに動物培養細胞を用いたコロニー形成法により、食品因子のうち一定の構造的特徴を持つ植物ポリフェノールが酸化細胞傷害を抑制することを明らかにした。活性酸素の細胞内標的として、核内のDNAが考えられるので、本研究では食品因子の生体防御作用を、DNA傷害抑制の観点から明らかにすることを目的とした。活性酸素はDNAに対し、塩基の酸化、塩基の脱離、糖の酸化、DNA切断などの様々な酸化傷害を起こす。本研究では特にDNA切断に注目し、これがDNA傷害のマーカーになり、さらに食品因子がこれを抑制するかどうかを検討した。

## 2. 方法

$H_2O_2$ による細胞内DNA切断作用をアルカリ沈殿法により検出した。動物培養細胞として、酸化細胞傷害に対する食品因子の抑制効果における構造活性相関がすでに明らかになっている、チャイニーズハムスターV79細胞を用いた。予め細胞内のDNAを $^3H$ -チミンでラベルしておき、 $H_2O_2$ を作用させた。一定時間インキュベートした後、細胞を洗い、アルカリ条件下で高温処理することにより細胞を溶解させた。再び低温にして遠心分離しDNAを沈殿させた。上清中と沈殿中のDNA量をシンチレーションカウンターで計測し、その割合を計算した。DNA切断がおこると、DNA断片が上清中に残ることから、その切断量が推測できる。 $H_2O_2$ を加える前に食品因子を細胞に取り込ませ、その結果DNA沈殿量が増加すればその抑制効果が証明されたことになる。またコロニー形成法により $H_2O_2$ の細胞毒性に対する食品因子の抑制効果を調べた。

## 3. 結果

コンフルエントになった細胞に過酸化水素( $H_2O_2$ )を30分間作用させ、アルカリ沈殿法により細胞内DNA単鎖切断を検出した。すなわち $H_2O_2$ の濃度を0~40  $\mu M$ まで増加させると、沈殿したDNAの量がほぼ直線的に100%から約40%まで減少した(figure 1)。次に、これをマーカーとして食品因子の抑制効果を調べた。食品因子としては抗酸化性や $H_2O_2$ の細胞毒性に対する抑制効果がすでに明らかになっている植物ポリフェノールを用いた。ここでは特に部分構造が一部だけ異なる典型的なポリフェノールとしてカフェ酸エチルエステル(CAEE)とフェルラ酸エチルエステル(FAEE)の効果を比較した。これらのポリフェノールを予め細胞に取り込ませておき、先ほどと同じ条件で40  $\mu M$ の $H_2O_2$ を作用させた。CAEE

の場合はその濃度に応じて沈殿したDNAの割合が増加しているのに対し、FAEEの場合はほとんど変わらないかむしろやや減少している (figure2、\*と\*\*はt-検定においてポリフェノール濃度が0のときに対する有意差の危険率がそれぞれ5%と1%であることを示している)。これはCAEEがH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による細胞内DNA切断を抑制したことを示している。Figure 3に示すようにCAEEはo-dihydroxy構造をFAEEは o- methoxy-phenolを持ち、どちらもモデル反応系においてはラジカル消去能を示す (天然の植物ポリフェノールもどちらかの構造を持つものが多い)。したがって今回の抑制効果は単純なラジカル消去能に基づくものでないことが確かである。一方H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の細胞毒性をコロニー形成法で調べると、CAEE、FAEEのうち、CAEEだけが抑制効果を示した (figure 4)。これは抑制効果にはやはりo-dihydroxy構造が必須なことを示している。このように細胞分裂能というマクロなレベルの現象とDNA切断という分子レベルの現象における抑制効果について同じ構造活性相関がみられたことは、その機構になんらかの共通点があることを示唆している。

#### 4. 考察

以上の結果から、アルカリ沈殿法を用いて検出される細胞内DNA切断はDNA傷害のよいマーカーとなり得ることが判明した。さらにCAEEなどの食品因子による抑制効果がこの方法を用いて明らかになったことは、他の食品因子による生体防御作用を調べる場合にも応用できると考えられる。実際、没食子酸エステルやフラボノイドなど他のポリフェノールにも同様の防御作用があることが明らかにされつつあり、食品因子全般に渡ってこの方法を適用することが可能である。

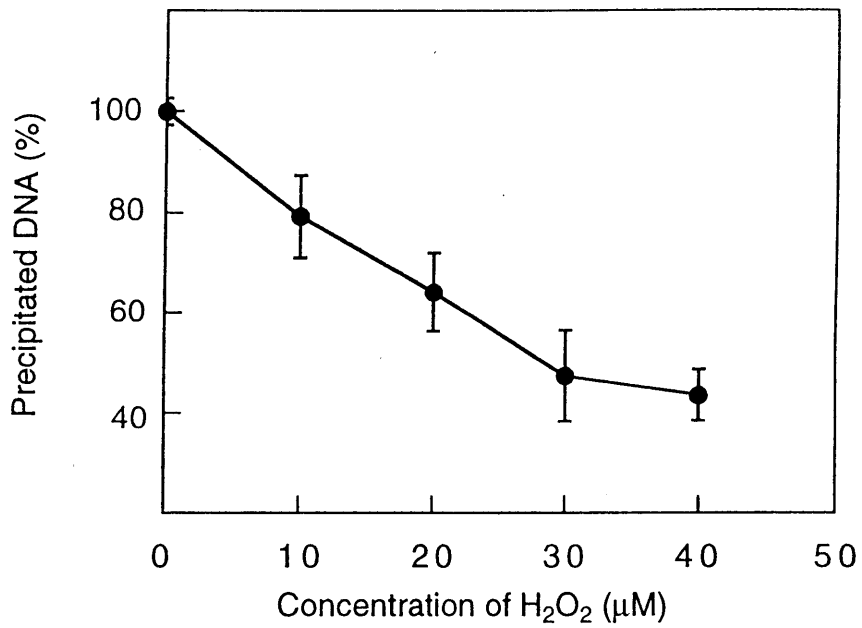


Fig. 1 DNA Precipitation Assay to Determine Single-strand Breaks in the Cells Exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

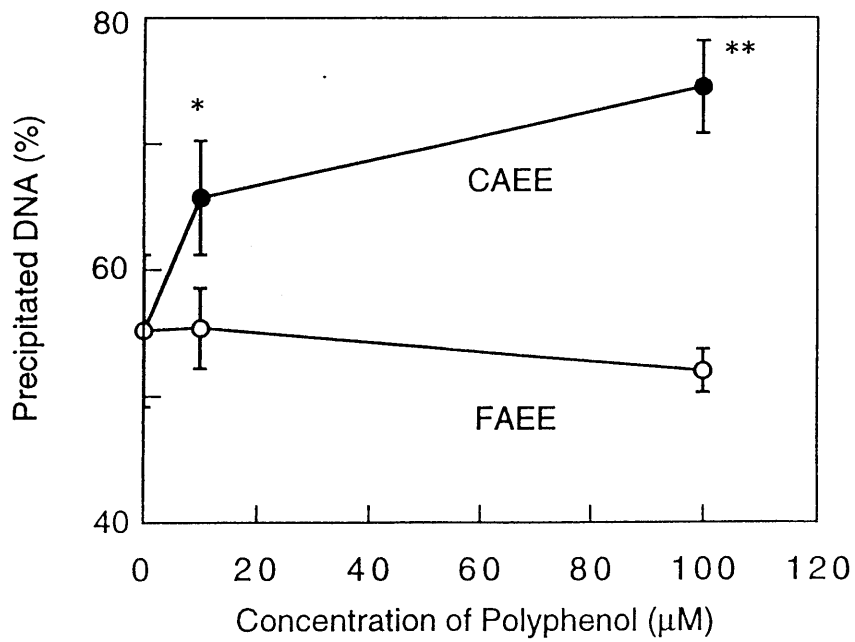


Fig. 2 Dose Effects of Preincubation of V79 Cells with CAEE or FAEE on the Production of Single-strand Breaks in the Cells Exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM)

\*P<0.05, \*\*P<0.01

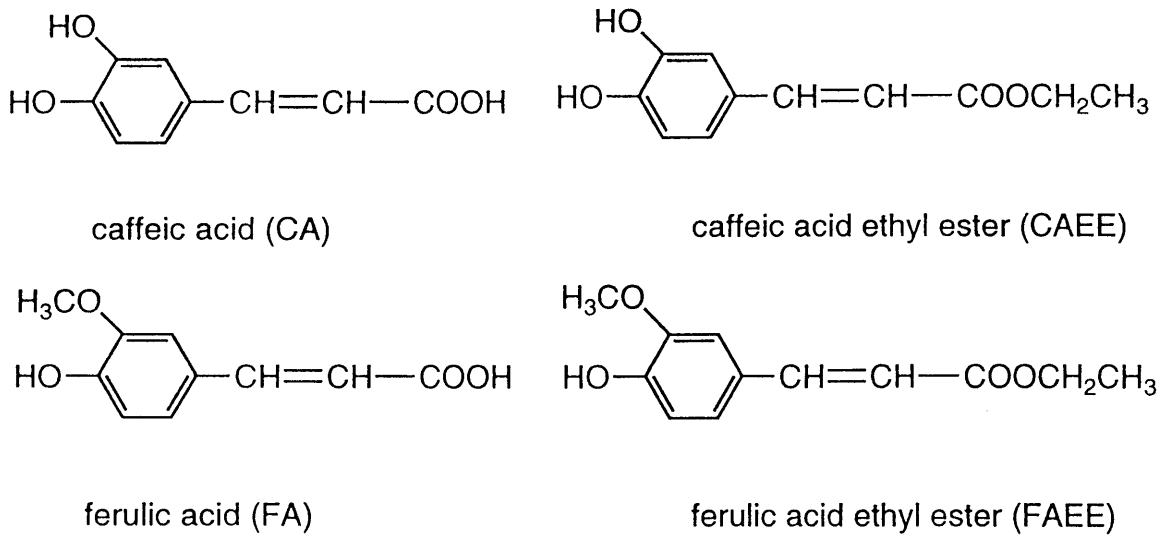


Fig.3 Structures of caffeic acid, ferulic acid, and their esters

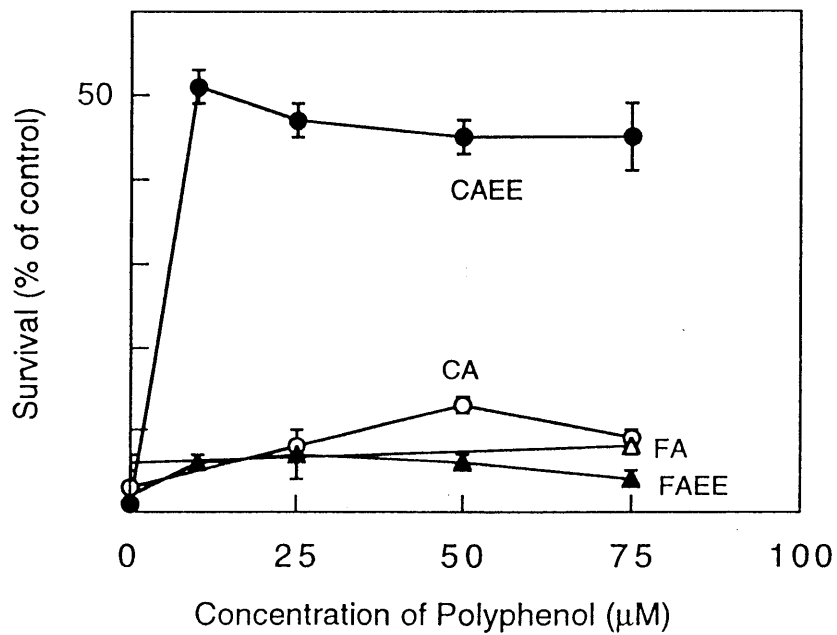


Fig. 4 Dose Effects the Polyphenols against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Cytotoxicity



## 2 フリーラジカルによる生体高分子の損傷と癌

### 1 はじめに

今日の地球環境において、ヒトをはじめとする好気性生物における酸化ストレスとは何を意味するのであろうか？これには、まず、酸素を利用し、ATPなどのエネルギーを産生する際に、電子伝達系から漏れ出てくる活性酸素・フリーラジカルが重要であると考えられる。この現象は、細胞や個体は、生きている限り酸化ストレスに曝露されていることを意味する。1988～90年に、カリフォルニア大学のAmes博士らは、体重あたりの酸素消費量の多い動物（マウス>ラット>サル>ヒト）ほど、体内における体重あたりの活性酸素の発生量が多く、しかも寿命が短いという興味ある事実を報告した。その他の酸化ストレスの原因としては、鉄などの遷移金属、紫外線、放射線、炎症、四塩化炭素などの化学薬品、喫煙、ディーゼルエンジンの排気ガス、アドリアマイシン・ブレオマイシンといった抗癌剤、更には虚血・再灌流障害などがあげられる。興味あることに、これらの化合物や現象はすべて、発癌あるいは癌の細胞生物学に関係している。本試験研究においては、3年間に渡り、酸化ストレスのマーカーを開発すると同時に、それらのマーカーを癌に関連した生物現象へ応用し、in vivoにおける評価を行った。

### 2 酸化ストレスのマーカー

酸化ストレスのマーカーとしては、大きく分けて、1) フリーラジカル反応による修飾化合物の生成；2) 酸化ストレスに対する防御因子となる化合物・酵素の減少あるいは誘導；3) 転写因子の誘導あるいは阻害の3種類があげられる。

生じたフリーラジカルの標的はすべての生体分子であるが、脂質・核酸・蛋白質がその主要部分をしめる。フリーラジカルは、膜（細胞膜、ミトコンドリア、小胞体など）の近傍で発生することが多いため、最初に脂質過酸化反応が起こることが多い。その産物は古典的なチオバルビツール酸産物（TBA反応）として検出されるが、近年は、より特異性の高い4-hydroxy-2-nonenal (HNE) や malondialdehyde (MDA) の検出が利用される。これらのアルデヒド化合物は、脂質過酸化の最終産物でありながら、蛋白質との反応性を有し、特にヒスチジン、リシン、システイン残基と Michael addition reaction により、特徴的な五員環構造を形成する。私たちはこの構造に対する種々のモノクローナル抗体を作成するのに成功した。このうち、HNE-histidine を認識する mAb HNEJ-2 に関する特異性のデータを図1～3に示す。私たちはこの抗体を、代表的なフリーラジカルを介した発癌モデルである「鉄ニトリロ三酢酸腎癌モデル」に応用した。この抗体は、免疫組織化学にも有用であった。

核酸とフリーラジカルの反応は、特にDNAについて詳しく検討を行った。反応の種類としては、鎖切断、塩基修飾、DNA・蛋白架橋結合などがあげられる。生体試料における鎖切断の測定は感度が低く、特異性にやや欠ける。このなかで、最近最も高頻度に使用

されているのは、修飾塩基のひとつである 8-oxoguanine (8-oxoG) である。この修飾塩基は、1984年にわが国の葛西らにより初めて報告されたが、HPLCと電気化学検出器により比較的容易に測定可能である。その構造は、グアニンの8位に水酸基が付加されたものであるが(生体内ではケト基で存在)、この付加により立体配位構造が変化し、シトシンのみならずアデニンとも水素結合で対合できるようになる。このため8-oxoGは、DNA複製の際にGからTへの変異を誘発しうるが、この現象は発癌や癌生物学においても重要であると考えられる。8-oxoG以外にも、実に多数の修飾塩基がフリーラジカルの反応により生成するが、これらの測定には、質量検出器とガスクロマトグラフィーを必要とするため、まだ世界的にデータ不足の状態である。私たちは、鉄ニトリロ三酢酸による腎発癌モデルにおいて、8-oxoG以外の種々の修飾塩基やDNA・蛋白架橋結合である thymine-tyrosine cross-link を検出した。

更に、私たちは越智、大澤らにより開発された 8-oxo-2'-deoxyguanosine に対するモノクローナル抗体を使用し、半定量的免疫組織化学法を確立した。この方法には、臓器における局在の同定が可能、従来よりしばしば問題にされたサンプル処理段階で生じる 8-oxoG の人工的産生の問題をクリアできるなどの長所を持つ。他の測定法との併用が望まれる。

2) の範疇に入るものとしては、低分子のものより、グルタチオン (GSH)、チオレドキシシン (TRX, adult T-cell leukemia-derived factor)、TRX-dependent peroxide reductase (thiol-specific antioxidant)、グルタレドキシシン (thiol-transferase)、GSH peroxidase、GSH S-transferase、catalase、superoxide dismutase などがある。3) については、NF-kB, c-myc, c-fos, c-jun などがあげられる。2) 3) は1) を緩和するためのレドックス制御機構と理解することもできる。これらについては、現在評価を続行中である。

### 3 酸化ストレスと発癌

鉄ニトリロ三酢酸により活性酸素を介して誘発された腎癌には以下の特徴がある。1) 上皮性である；2) 組織像がヒトの腎癌に類似する；3) 腫瘍が、約半数で転移・腹腔内浸潤するため、動物は肺転移による呼吸不全や腹腔内出血で死亡する例が多い。これらは、他の化学発癌や遺伝性の動物腎癌モデルでは見られない特徴であり、次の項目で述べる癌細胞における酸化ストレスと何らかの関連があるのではないかと、私たちは推測している。また、分子疫学の観点より、腎癌の遺伝子解析も行われているが、変異や欠損などの頻度の高い標的遺伝子は現在検討中である。私たちは、低頻度ではあるが、肺転移を認める例の p53 癌抑制遺伝子において、8-oxoG で説明のつく G から T への変異を見いだした。

### 4 癌生物学における酸化ストレス

酸化ストレスと発癌に関する研究の歴史は長く、確立されたものであるが、癌生物学における酸化ストレスの研究は80年代の後半より始まったばかりである。私たちはヒト腎

細胞癌の手術材料を使用し、癌と非癌部の 8-oxoG の比較を試みた。手術例を使用したのは、病理解剖より得られた試料では、非癌部の 8-oxoG の値が非常に高くなるからである。これには、おそらく死亡直前の虚血性変化と死後変化の双方が関与していると考えられる。腎細胞癌では非腫瘍部腎より 8-oxoG が 50%ほど高いという結果を得た。また、この傾向は腫瘍の形態学的悪性度や臨床病期に無関係であった。前述の Fe-NTA による発癌モデルにおいては、その急性期において 8-oxoG の値は 2-10 倍に上昇し、その後は腎近位尿細管の壊死が見られる。したがって、8-oxoG の大幅な上昇は細胞死を誘発すると考えられる。50%の上昇は、癌細胞の増殖に都合のよい範囲である可能性がある。このような調節を行うためには、当然、何らかの抗酸化物質の誘導やレドックス制御が必要であろう。

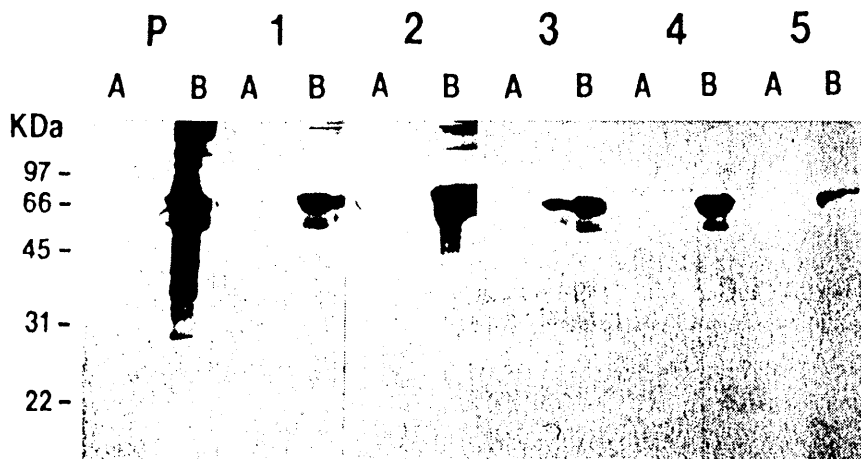


Fig. 1. Western blot analysis of mAbs HNEJ-1-5 (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) using BSA and HNE-BSA (25  $\mu\text{g}$  each/lane). (A) BSA; (B) HNE-BSA; (P) polyclonal antibody published in [5] (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) as a control. 1-5 correspond to mAbs HNEJ-1-5, respectively.

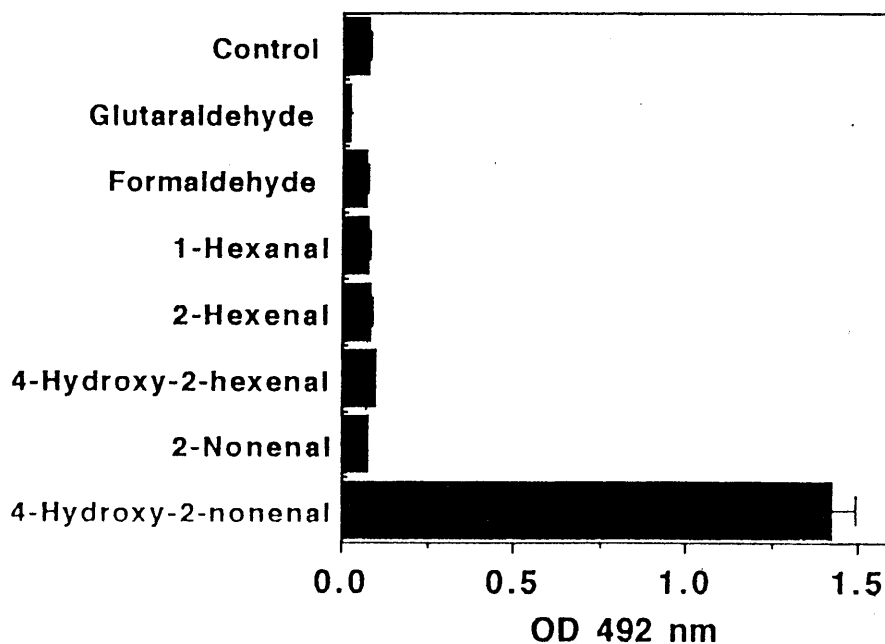


Fig. 2. ELISA study for the specificity of mAb HNEJ-2. Aldehyde-modified proteins were prepared by reacting protein (GAPDH) with 1 mM aldehyde (1 M for glutaraldehyde and formaldehyde) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) for 2 h at 37°C. Refer to section 2 for details.

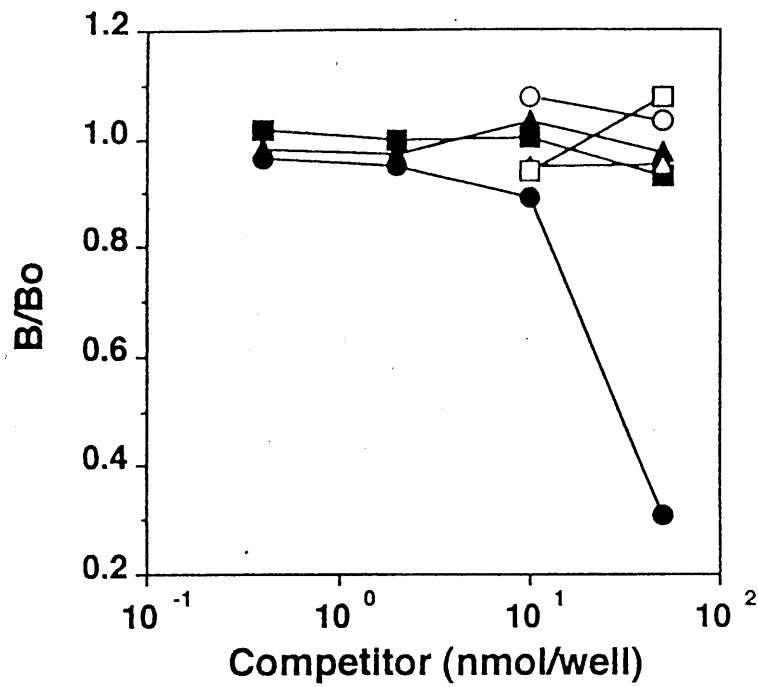


Fig. 3. ELISA competition curves for mAb HNEJ-2. Refer to section 2 for details. Assays used HNE-modified GAPDH as the absorbed antigen. The numbers on the abscissa indicate the concentration of competitors when antibody was preincubated with competitors at 4°C for 20 h. Competitors were as follows: ●, HNE-*N*-acetylhistidine; ▲, HNE-*N*-acetyllysine; ■, HNE-glutathione; ○, *N*-acetylhistidine; △, *N*-acetyllysine; □, glutathione.  $B/B_0$ , calculated as [experimental OD - background OD (no antibody)]/[total OD (no competitor) - background OD].

### 3 過酸化脂質由来 4-ヒドロキシノネナールを指標にした加工食品の安全性評価

#### 1 研究目的

脂質由来の過酸化物 4-ヒドロキシノネナール（以下HNEという）は、食用油脂の加熱、工業用油脂の劣化、生体膜傷害などにおいて発生する主要な毒性物質の一つであり、多量に摂取すると肝臓や腎臓等の障害を引き起こし、ときには急性腎不全のため死に至る場合もある。我々の研究室では、この毒物であるHNEを指標として、これを迅速・微量定量することにより、食品や工業用油脂の劣化あるいは生体の酸化ストレスの評価を試みている。

本研究課題において、我々はHNEを特異的に認識するモノクローナル抗体の作成に成功するとともに、ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)法を基盤にした免疫化学的迅速・微量定量法の確立にも成功した。

#### 2 研究方法

##### 2.1 HNEの合成

HNEは、グリニヤール試薬であるn-ペンチルマグネシウムブロミドとフマルアルデヒドモノジメチルアセタールとの一段階反応により合成した。

##### 2.2 モノクローナル抗体の作成

HNEとカギアナカサガイのヘモシアニン（以下KLHという）とを反応させ、これをHNE修飾蛋白質として免疫に用いた。このHNE修飾蛋白質を抗原とし、免疫されたマウスの脾臓細胞と、同系のミエローマのハイブリッドを作成し、そのハイブリドーマを増殖させることにより、抗HNE修飾蛋白質に対するモノクローナル抗体量を増加させた後、HNE修飾蛋白質に対するモノクローナル抗体(AbHNEJ-2)を分離した。

##### 2.3 ELISA法によるHNEの定量

図1にHNE定量法のプロトコールを示した。ELISAプレートの各ウェルにあらかじめHNEの標的となる蛋白質（グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、GAPDH）溶液を分注しておき、4℃、24時間インキュベートする。そして、HNEを含んだ試料を分注し、インキュベートしてウェル内でHNE修飾蛋白質を生成させる。その後、HNE修飾蛋白質に対するモノクローナル抗体(AbHNEJ-2)、続いてペルオキシダーゼ結合二次抗体との反応を行い、最終的に過酸化水素・フェニレンジアミンの混合液を加えプレート内で発色させ、ELISA用自動比色定量装置（プレートリーダー）により定量した。

#### 3 研究結果と考察

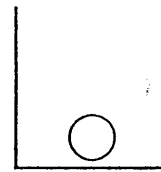
HNE修飾蛋白質に対するモノクローナル抗体(AbHNEJ-2)の特性を検討したところ、AbHNEJ-2は過酸化脂質分解産物である2-ノネナール、2-ヘキセナール、1-ヘキセナール、4-ヒドロキシ-2-ヘキセナールにより修飾された蛋白質とは全く交差反応性を示さなかった。1) また、高濃度のグルタルアルデヒドあるいはホルムアルデヒドによる修飾蛋白質もまたほとんど反応性を示さなかった。このことは、グルタルアルデヒドあるいはホルムアルデヒドにより固定された組織への本抗体の有用性を示している。

本研究課題において開発されたELISA法により、標品であるHNEを用い、検量線を作成したところ、良い直線性が得られるとともに、かなり低濃度のHNEの定量が可能であることが分かった(図2)。そこで本法を用い、加熱後の食用油脂中のHNEの定量を試みた(図3)。その結果、コーン油とサフラワー油において最も高濃度のHNEが生成されており、続いて菜種油にも多量のHNE生成が確認された。興味深いことに、酸化安定性、老化防止作用などが報告されているゴマ油においてはHNEの生成が全くみられなかった。従来の油脂過酸化測定法では、食用油など粘質性の試料についてはその劣化度を評価することは困難であったが、今回の免疫化学的定量法により、こうした問題を克服することができた。

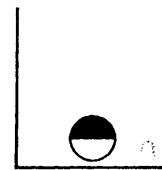
このほか、動脈硬化症とも関連して、最近では悪玉コレステロールとして名高い低密度リポタンパク質(以下LDLという)の過酸化によりHNEの生成がみられるのかどうかを調べたところ、図4のようにコントロールのLDLに比べ、極めて多量のHNEが生成されていた。HNEは強い細胞毒性が知られており、もし血管内において生成された場合、内皮細胞などの傷害を引き起こし、これが動脈硬化発症につながっている可能性が予測される。

従来の天然・生体試料を用いてのHNEの定量は高速液体クロマトグラフィーなどを用いて行われてきており、定量性に問題があるほか、測定に長時間を要すること、装置が極めて高価であること、またカラム交換などに多額の維持費用を要するなど、改良すべき問題点多すぎた。しかし、本研究において開発された免疫化学的定量法はこうした問題点を克服し、さらにELISAプレートを用いることにより多検体同時測定が可能になった。また、試料の色や試料に含まれる不純物の影響を全く受けないなどの利点があった。従って、今後本法は食品のみならず、医学、薬学、工業化学の各分野において有用と考えられ、キット化を含め大いに利用されるようになるものと確信する。

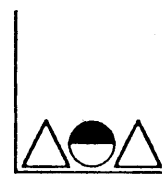
1. WellにGAPDHを吸着させる.  
(4°C, O/N)



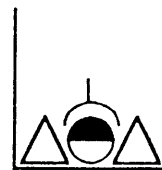
2. TTBSで洗浄した後、HNEの入った試料を入れ反応させる  
(37°C, 2hr)とHNE修飾タンパク質が生成する.



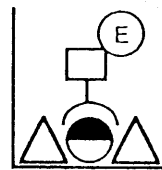
3. TTBSで洗浄した後、抗原が吸着していない固相表面を、抗原と無関係なタンパク質で覆う. (37°C, 30min)



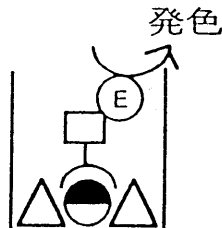
4. TTBSで洗浄した後、HNE修飾タンパク質を認識する一次抗体を添加する.  
(4°C, O/N or 37°C, 3hr)



5. TTBSで洗浄した後、一次抗体に対するペルオキシダーゼ標識二次抗体を添加する.  
(37°C, 1hr)



6. TTBSで洗浄した後、基質(o-フェニレンジアミン)を添加する.  
(R/T, 15min)



7. 2 N 硫酸で、反応を停止する.  
8. 492nmの吸光度を、測定する.

図1 : ELISA法を用いた4-ヒドロキシノネナールの免疫化学的定量法のプロトコール。



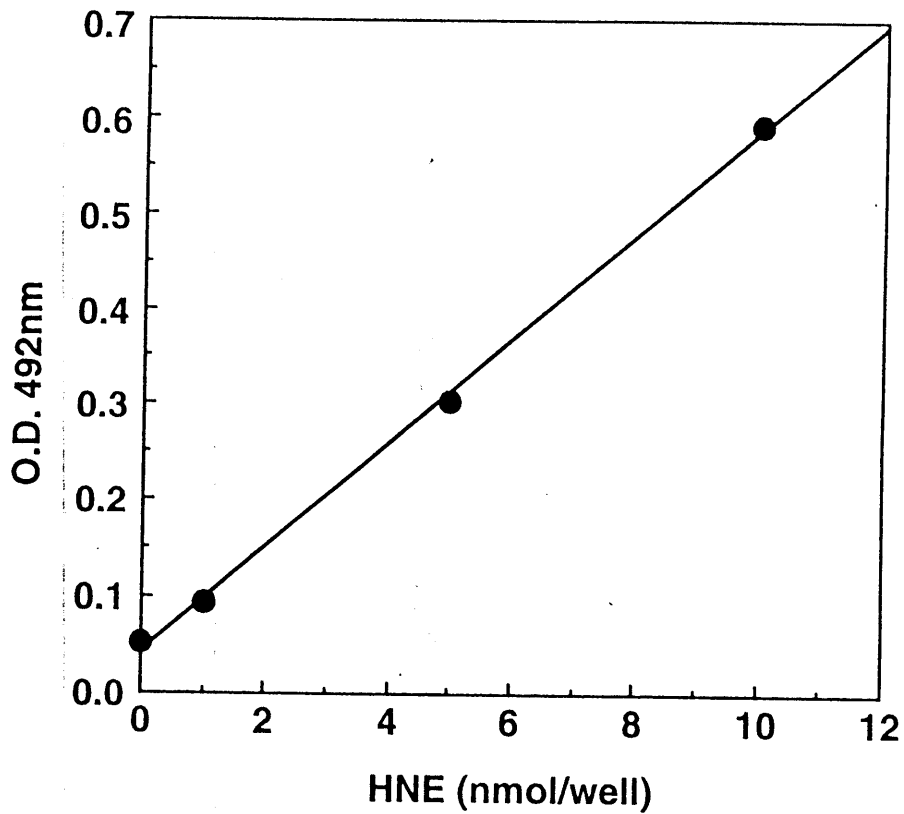


図 2 : 検量線の作成。

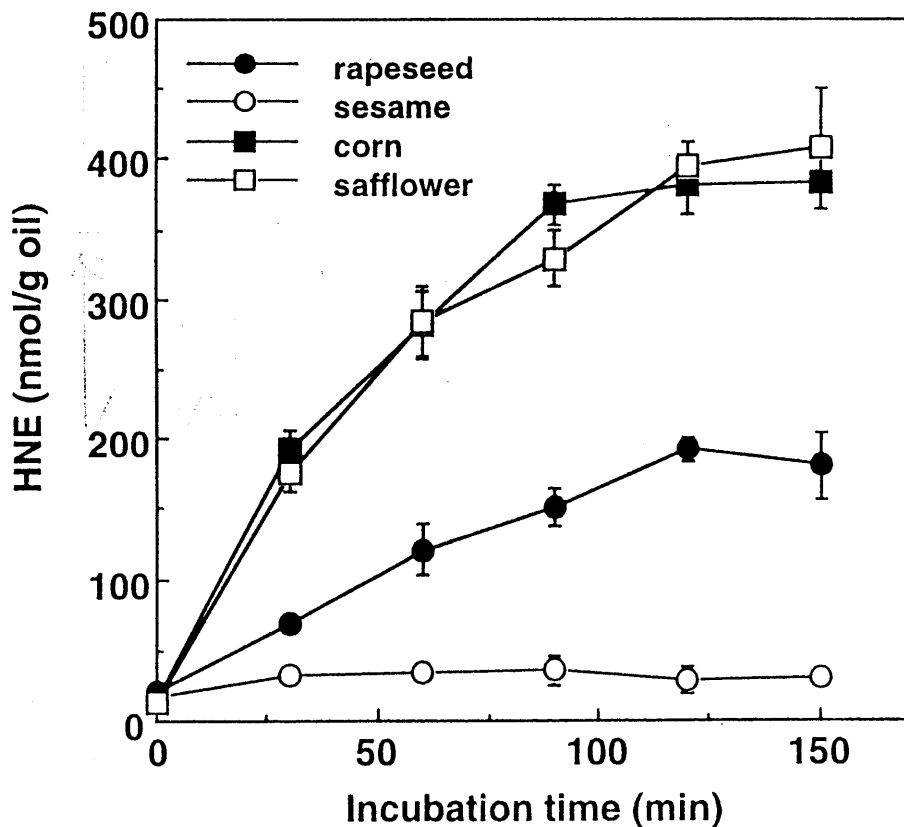


図 3 : 食用油脂の加熱による 4-ヒドロキシノネナールの生成。食用油脂(市販のものを用いた)をオイルバス中、180°Cで加熱し、経時的にサンプリング後、ELISA法により 4-ヒドロキシノネナールを定量した。

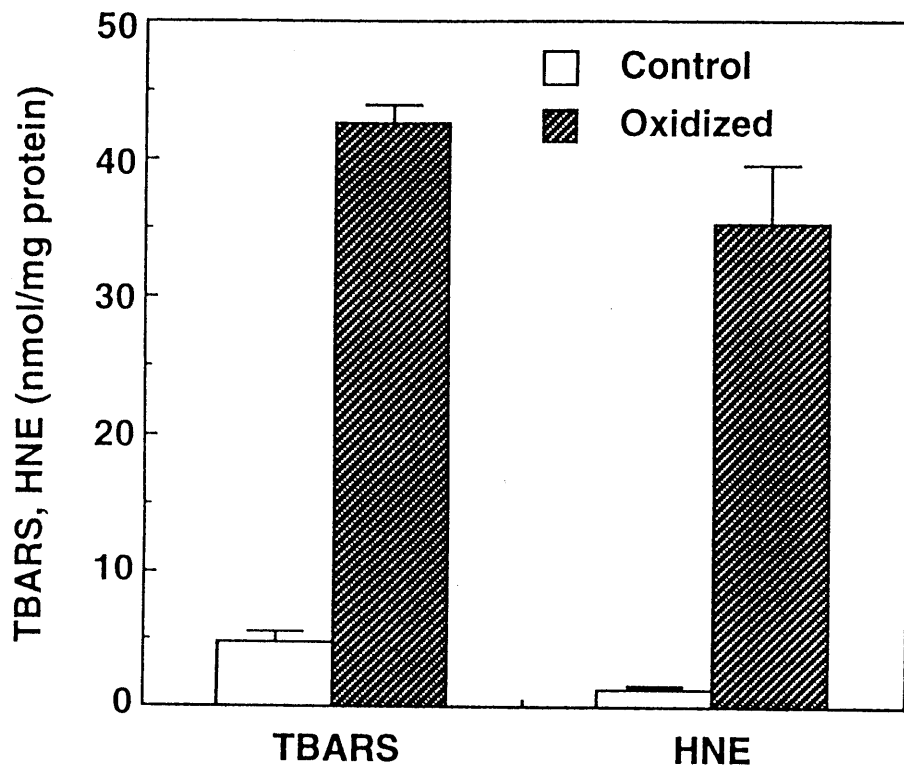


図4 低密度リポタンパク質 (LDL) の過酸化による4-ヒドロキシノネナールの生成。ヒト血漿より超遠心分画によりLDLを調製し、銅イオン(5 mM)との反応(37度、2.4時間)により過酸化LDLを調製した。

## 4 ゴマの老化抑制効果及びゴマリグナンのビタミンE増強効果

ゴマには老化防止効果がある食品として古くより中国、日本で賞用されてきたが、最近まで科学的説明はほとんどなされていなかった。ゴマはタンパク質が約20%、脂質が約50%、またビタミン、ミネラルも豊富に含む栄養に富んだ食品である。その他、ゴマにはゴマに特有なリグナン物質（セサミン、セサモリン等）が多量含まれている。ゴマ油は古くから最も酸化安定性に優れた油として賞用されてきた。並木らは他の植物油に較べてゴマ油の極めて高い酸化安定性はゴマに特徴的な成分であるリグナン物質が関係していることを明らかにした。

老化は過酸化脂質の蓄積によって促進されるという酸化障害老化原因説がある。ゴマ成分がゴマ油の酸化を防止していると同じ様に、ゴマ摂取により生体内の酸化が抑制されれば、老化の進展を遅らす可能性が考えられる。そこで老化研究の有用なモデル動物として京都大学の竹田俊男教授らにより開発された老化促進モデルマウス（SAM）を導入して、ゴマの老化抑制効果に関する研究に着手した。

### 1. ゴマの老化抑制効果

#### 1) ゴマ投与によるSAMの促進老化の抑制

SAMには正常に発育したあと急速に老化兆候を示すP系と通常に老化するR系があり、またP系にはそれぞれ特徴的な老化兆候を示すP1からP11までである。私たちは老化兆候としてアミロイドウシスと免疫不全を主兆候とするP1系とその対照となるR1系を京大竹田研究室より導入して実験を開始した。先ず最初の実験として、SAM P1系マウスをゴマ20%含有飼料で7ヶ月間飼育し、老化の進展を2ヶ月齢SAM R1マウスを対照に細川らが考案した外観より判定する老化度評点法で評価した。図1に示すようにゴマ無添加群に比べゴマ添加群は明らかに老化の進展が抑制されていた。この効果は白ゴマより黒ゴマの方がいくぶん大きいように見受けられた。7ヶ月間飼育したマウスを処理し、肝臓の過酸化脂質とリポフスチン量を調べたところ、ゴマ投与群で低下する傾向が認められ、ゴマの成分に老化の原因となる物質の蓄積を抑える作用のあることが認められた。

#### 2) ゴマを唯一のビタミンE源とした飼料の老化抑制効果

ゴマはタンパク質、脂質、ビタミン、ミネラルを豊富に含む栄養価の高い食品であるが、老化防止に最も関係が深いビタミンEはビタミンE活性の低い $\gamma$ -トコフェロールしか含有せず、活性の高い $\alpha$ -トコフェロールは殆ど含まれない。ゴマは $\gamma$ -体でかなりの量（23mg/100g）のトコフェロールを含有するので以前にはゴマはビタミンEが豊富に含まれるとよく書かれた。しかし、日本標準食品成分表の別冊として日本食品脂肪酸・コレステロール・ビタミンE成分表が発表されて以来、食品のビタミンE量はE効力で比較するようになった。成分表のE効力はそれぞれ同族体含有量に $\alpha$ は1、 $\beta$ は0.25、 $\gamma$ は0.05、 $\delta$ は0.001を乗じて加算された数値である。重要なビタミンE源である植物油のE効力を

比較すると $\alpha$ 体をほとんど含まないゴマ油は最もE効力の低い油である。ゴマも当然のことであるが成分表で見ればE効力は低い。そうすると先の実験で観察されたゴマの老化防止効果にビタミンEは関与していないのかという疑問がもたれる。先の実験では $\alpha$ -トコフェロールを充分含む飼料にゴマを添加していたので、今回はゴマを唯一のビタミンE源とした飼料と $\alpha$ -トコフェロールを充分含む飼料でSAMを9ヶ月飼育した。ビタミンE欠乏で動物は不妊になることからビタミンEは発見された。そこでこの実験は雌雄マウスをペアで飼育し、その間の出産回数と雄マウスの老化度を調べることにした。図2に示すように出産回数は両者において差はなく9ヶ月後には全く出産しなくなった。一方、老化度評点の合計は飼育開始(1.5ヶ月齢)から5ヶ月間は両者に差はなかったが9ヶ月後はゴマ群が有意に低値を示した。この結果は $\alpha$ -トコフェロールを摂取しなくてもゴマ摂取のみでSAMの促進老化は抑制されることを示す。

### 3) セサミノールの老化抑制効果

並木グループはゴマサラダ油から強い抗酸化性を示すリグナン物質を単離しセサミノールと命名した。ゴマのみでSAMの老化抑制効果が認められたことからゴマ成分中に老化抑制効果を示す物質の存在が示唆された。最も可能性の高い物質としてリグナンが考えられる。入手可能なリグナン物質としてセサミンとセサミノール(竹本油脂より供与)があった。私たちは老化を酸化障害の蓄積によるものという仮設のもとに研究を進めてきた。セサミンはin vitroの実験では抗酸化性は示さないし、一方セサミノールはゴマ種子中にはごく微量しか含まれない。ゴマの効果はセサミノールの結果で説明するのは問題があるかもしれないが、新規抗酸化物質セサミノールの生理機能を調べることは意義あることと考えセサミノールの老化抑制効果を調べることにした。この実験ではセサミノールの効果を鮮明にするために対照を50%ビタミンE欠乏食( $\alpha$ -トコフェロール25mg/kg)とし、セサミノール食は対照に0.1%のセサミノールを添加した。試験飼料で5ヶ月間飼育後の老化度はセサミノール群で明らかに低値を示し、セサミノール投与によりSAMの老化抑制が観察された。特に皮毛の状態が良好に保持されていた。最近、大澤らはゴマ種子にセサミノールが配糖体で存在することを見いだしている。まだ証明されていないが、ゴマ油製造工程中でセサモリンがセサミノールに変換したように生体内でセサモリンからセサミノールが生成することも在り得る。このセサミノール添加実験からゴマリグナンによってビタミンE効果が高められる可能性が考えられた。

以上老化促進モデルマウスを用いた実験で、SAMの促進老化がゴマ投与により抑制され、飼料に $\alpha$ -トコフェロールを含まない状態でゴマを投与しても老化は抑制され、更にゴマの代りにゴマリグナン物質であるセサミノールを投与しても老化抑制効果が認められた。

## 2. ゴマのビタミンE活性増強効果

### 1) ゴマ $\gamma$ -トコフェロールのビタミンE活性

先にも述べたようにビタミンE効力の極めて低いゴマを唯一のビタミンE源としてSAMを飼育すると $\alpha$ -トコフェロールを充分含有する飼料群と同じような繁殖力を示し、更にその上老化度評点は $\alpha$ -トコフェロール群より良好であった。このような結果にビタミンEはどの様に関与しているのか疑問が持たれたので、今一度ゴマのビタミンE活性をラットを用いて調べてみることにした。実験としてはビタミンEフリー（-E）飼料を対照に、ビタミンE源として $\alpha$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール、ゴマ（3群ともトコフェロール量は約50mg/kgにする）を用いた飼料でラットを8週間飼育し、ビタミンE活性を調べた。ビタミンE活性の指標として溶血率、血漿ピルビン酸キナーゼ、血漿・肝臓の過酸化脂質量、血漿・肝臓のトコフェロール量を測定し比較した。ビタミンEが欠乏すると赤血球膜や組織を形成している細胞膜が脆弱化し、溶血したり、筋肉中に多く存在しているピルビン酸キナーゼが血液中に流出してくるので血漿のピルビン酸キナーゼ活性が上昇する。また、E欠乏で血漿や組織の過酸化脂質は増加する。測定の結果、図3に示すようにビタミンEフリー群、 $\gamma$ -トコフェロール群は溶血率、血漿ピルビン酸キナーゼ活性、過酸化脂質が高く、ビタミンE欠乏状態であったが、 $\alpha$ -トコフェロール群ではこれらビタミンE欠乏状態を示す指標はすべて低く、 $\alpha$ -トコフェロールは $\gamma$ -トコフェロールに比べ明らかにビタミンE活性が高いことが示された。ところがビタミンEとして $\gamma$ -トコフェロール群と同量の $\gamma$ -トコフェロールをゴマとして摂取したゴマ群は $\alpha$ -トコフェロール群とほぼ同じビタミンE活性を示した。そこで血漿および肝臓のトコフェロール量を測定したところ、図4に示すように $\alpha$ -トコフェロールは $\alpha$ -トコフェロールを摂取した群にのみ高レベル検出され、他の3群は極微量しか検出されなかった。一方、 $\gamma$ -トコフェロールは $\gamma$ -トコフェロール群にはほとんど検出されなかった。 $\alpha$ -トコフェロールを摂取すれば、 $\alpha$ -トコフェロールは生体内に充分量保留されるのに、同量の $\gamma$ -トコフェロール摂取では $\gamma$ -トコフェロールは生体内にほとんど保留されないことが判った。このために $\gamma$ -トコフェロールは生理活性が低いのであろう。その理由は後述するようにはほぼ解明されつつある。ところが同量の $\gamma$ -トコフェロールをゴマとして摂取すると $\gamma$ -トコフェロールは生体内に充分量保留され、 $\alpha$ -トコフェロールと同じ様にビタミンEとして働いていることが判った。そしてゴマ成分中に $\gamma$ -トコフェロールを生体内に保持させる働きのあるものの存在が推定された。その物質としてゴマの特徴的成分であるリグナンが先ず考えられた。そこでゴマの代りに $\gamma$ -トコフェロールとセサミノール、 $\gamma$ -トコフェロールとセサミンの組合わせで飼料中に添加し同様の実験を行った。 $\gamma$ -トコフェロールと共に投与されたゴマリグナン物質の作用により、溶血率、血漿ピルビン酸キナーゼ活性、過酸化脂質は顕著に抑制され、ゴマ投与の場合と同様に、生体内に多量の $\gamma$ -トコフェロールが検出された（図5）。この効果はセサミンより抗酸化性を持つセサミノールの方が顕著であった。これらの実験からゴマはゴマリグナン物質が $\gamma$ -トコフェロールと相乗的に働いて $\gamma$ -トコフェロール量だけからは判定できない高いビタミンE活性を持つことが判明した。

## 2) ゴマリグナン物質と $\alpha$ -トコフェロールとの相乗効果

生体内では $\alpha$ -トコフェロールが絶対的な優位性を示す。先の実験で示したように同量の $\alpha$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールを摂取した時、 $\alpha$ -トコフェロールは生体内に多量保留されていたが $\gamma$ -トコフェロールはほとんど検出されなかった。また私たちは日常の食生活で $\alpha$ 体より $\gamma$ 体を多く摂取しているが、血漿中のトコフェロールは大部分が $\alpha$ -トコフェロールである。この $\alpha$ の優位性、 $\alpha$ と $\gamma$ の識別は肝臓に存在するトコフェロール輸送タンパク質で行われていることが最近東大の新井らにより明らかにされた。肝臓に入ってきたトコフェロールはトコフェロール輸送タンパク質と結合して超低密度リポタンパク質(VLDL)の合成の場に運ばれ、VLDLに組込まれて各組織に運ばれる。 $\alpha$ はトコフェロール輸送タンパク質に著しく強い親和性を持つが、他の同族体は親和性が弱いため生体内に保留されることなく排泄されるといわれている。

ところで私たちの研究であるが、日常ゴマのみを摂取することはなく、多少とも $\alpha$ -トコフェロールの存在下にゴマを摂取しているので、 $\alpha$ -トコフェロールとゴマとの関係を明らかにする必要がある。そこで飼料中の $\alpha$ -トコフェロール量を0、10(低)、50(通常)、250(高) mg/kg diet と4段階とりそれぞれにゴマ(20%)を加えた飼料でラットを8週間飼育し、ゴマの添加効果を調べた。その結果を図6に示す。血漿 $\alpha$ -トコフェロール量は摂取した $\alpha$ -トコフェロールに応じて増加した。ゴマは $\alpha$ -トコフェロールが存在しない場合は $\alpha$ -トコフェロール量に影響しないが、 $\alpha$ -トコフェロールが存在すると著しく $\alpha$ -トコフェロール量を増加させた。一方 $\gamma$ -トコフェロールは $\alpha$ -トコフェロールが存在しないかその量が少ない時のみ検出され、 $\alpha$ -トコフェロールの摂取が増すと血漿中に存在しなくなるが判った。この結果はゴマは $\alpha$ 、 $\gamma$ に関係なく生体内トコフェロール保有量を上昇させる効果を持つ。 $\alpha$ がある程度以上存在すると $\gamma$ は生体内に保留されなくなるということはゴマの効果とは別に、 $\alpha$ と $\gamma$ の識別が優先して働いていることを示している。

$\alpha$ -トコフェロールの摂取の少ない時、ゴマを摂取すればビタミンE不足状態が改善され、生体内のビタミンE活性が上昇している可能性が考えられる。そこで、低 $\alpha$ -トコフェロール(10 mg/kg)食にゴマを5%、10%、15%添加してゴマの効果を調べた。図7に示すように肝臓の過酸化脂質は低 $\alpha$ -トコフェロール食ではかなり高いがそこへゴマを5%添加すると過酸化脂質生成は著しく抑制された。血漿 $\alpha$ -トコフェロールはゴマ5%添加で有意に上昇し、10%添加で更に上昇したが15%添加は10%と差はなかった。一方、 $\gamma$ -トコフェロールも $\alpha$ -トコフェロールの摂取が少ないので血漿中にかなりの量検出された。 $\gamma$ -トコフェロールもゴマ5%より10%で増加し、10%と15%で差はなかった。肝臓の過酸化脂質生成抑制効果にはゴマ5%添加で充分であったが、トコフェロール量上昇効果は最大限発揮するには10%の添加が必要であった。

次にゴマの効果にリグナン成分が関与していることを確認するために前述したと同じようにゴマリグナン物質としてセサミノールとセサミンを用い、低 $\alpha$ -トコフェロール食にセサミノールまたはセサミンを添加してリグナンのビタミンE活性増強効果を調べた。図8に示すように肝臓過酸化脂質は低 $\alpha$ -トコフェロール食で高値を示していたがセサミノ

ールやセサミンの添加で正常 $\alpha$ -トコフェロール群と同じレベルまで低下し、血漿や肝臓の $\alpha$ -トコフェロール量は著しく上昇した。 $\alpha$ -トコフェロール上昇効果はセサミンよりセサミノールの方が明らかに強かった。

#### 結論

これらの実験を通して、ゴマまたはゴマリグナン物質はトコフェロールと相乗的に働いてラットの生体内 $\alpha$ -または $\gamma$ -トコフェロール量を著しく上昇させ、過酸化脂質生成を抑制することが判った。この効果は強い抗酸化性を持ったセサミノールでより顕著に認められた。ゴマについていわれている老化抑制効果の一部はこのリグナン成分によるビタミンE活性増強効果によって説明されると思われるが、まだその機構はほとんど解明されていない。

### 老化度評点

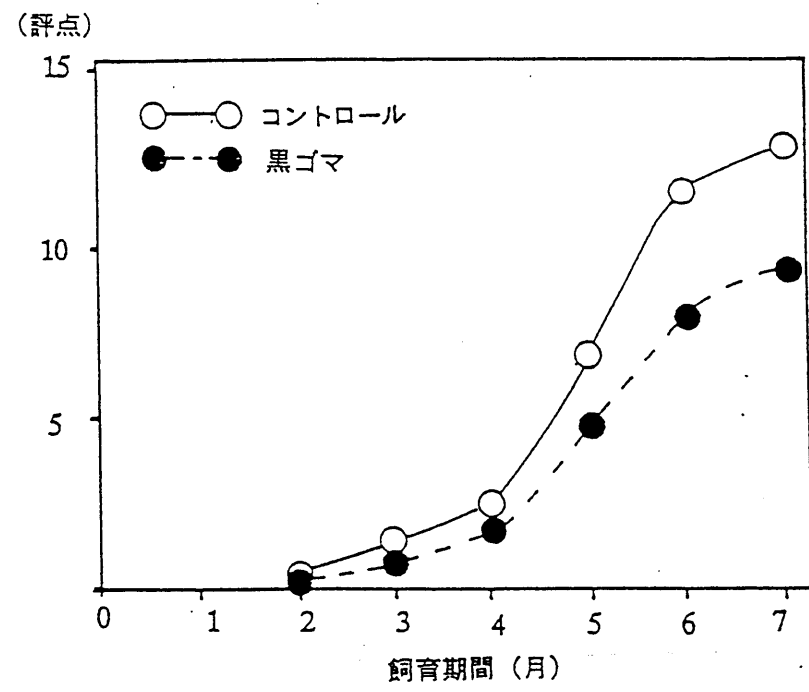
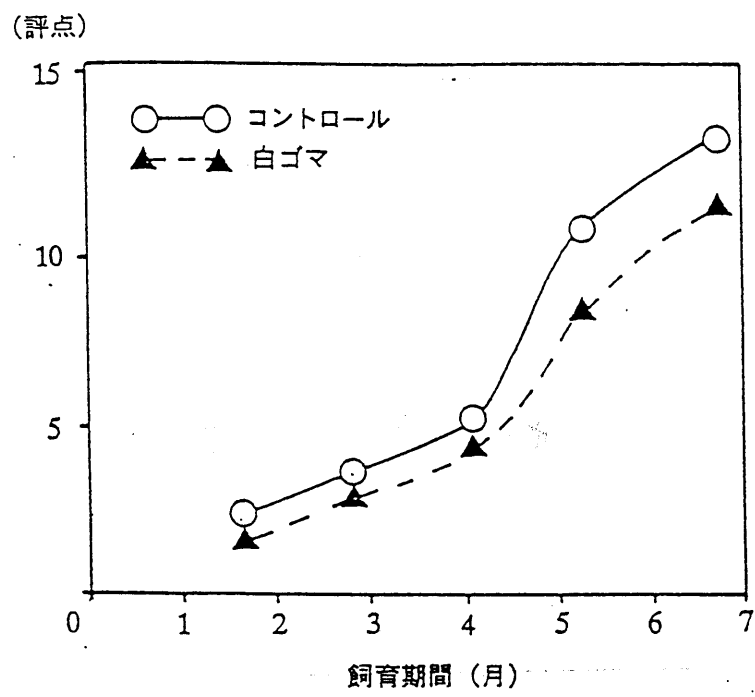


図1：老化促進モデルマウス (SAM) の促進老化に及ぼすゴマ長期間投与による老化抑制効果



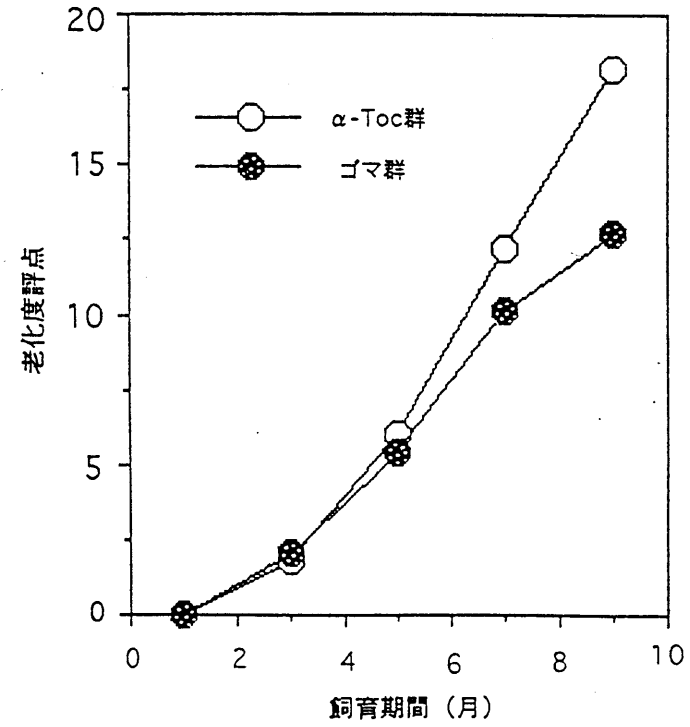
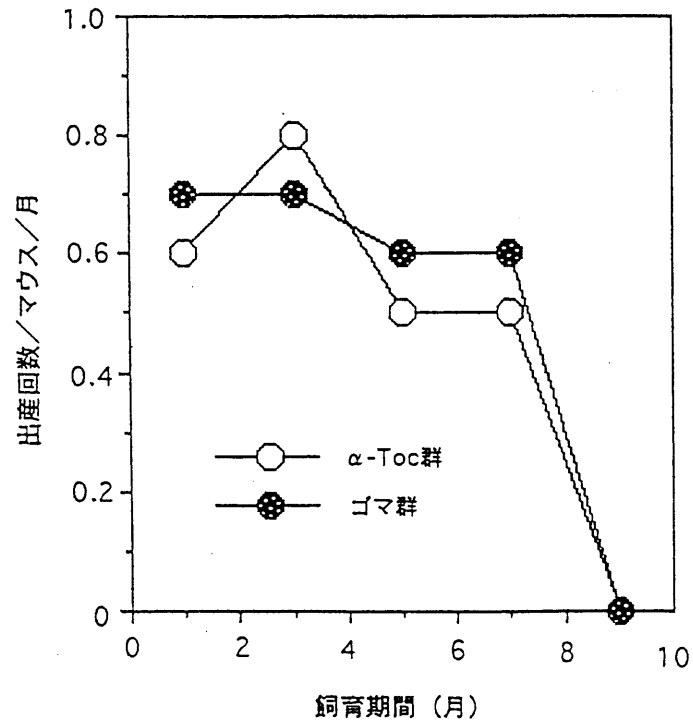


図2 : ゴマを唯一のビタミンE源として長期間飼育したSAMの繁殖力と老化度

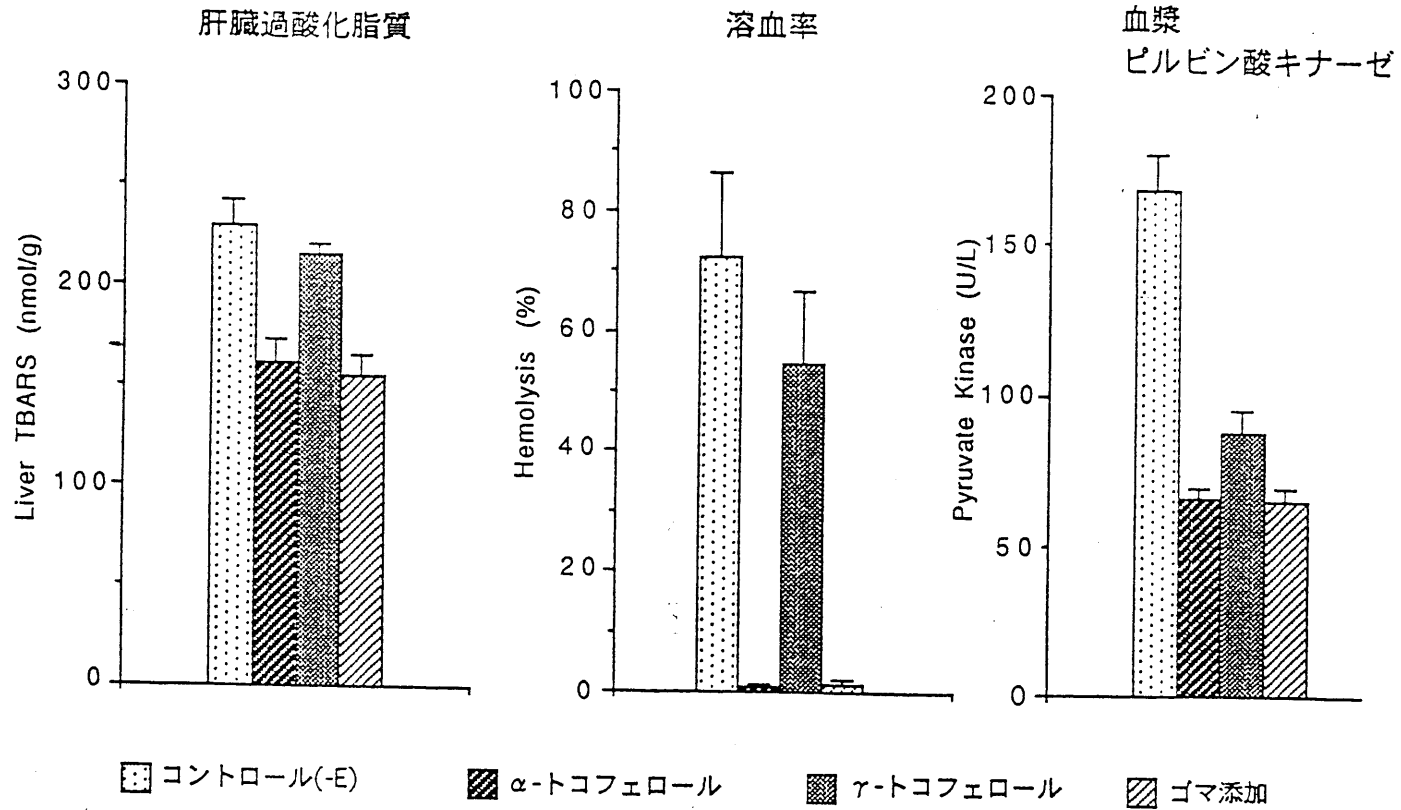


図3 : ラットを用いたゴマのビタミンE活性(過酸化脂質、溶血率、血漿ピルビン酸キナーゼ活性で比較)

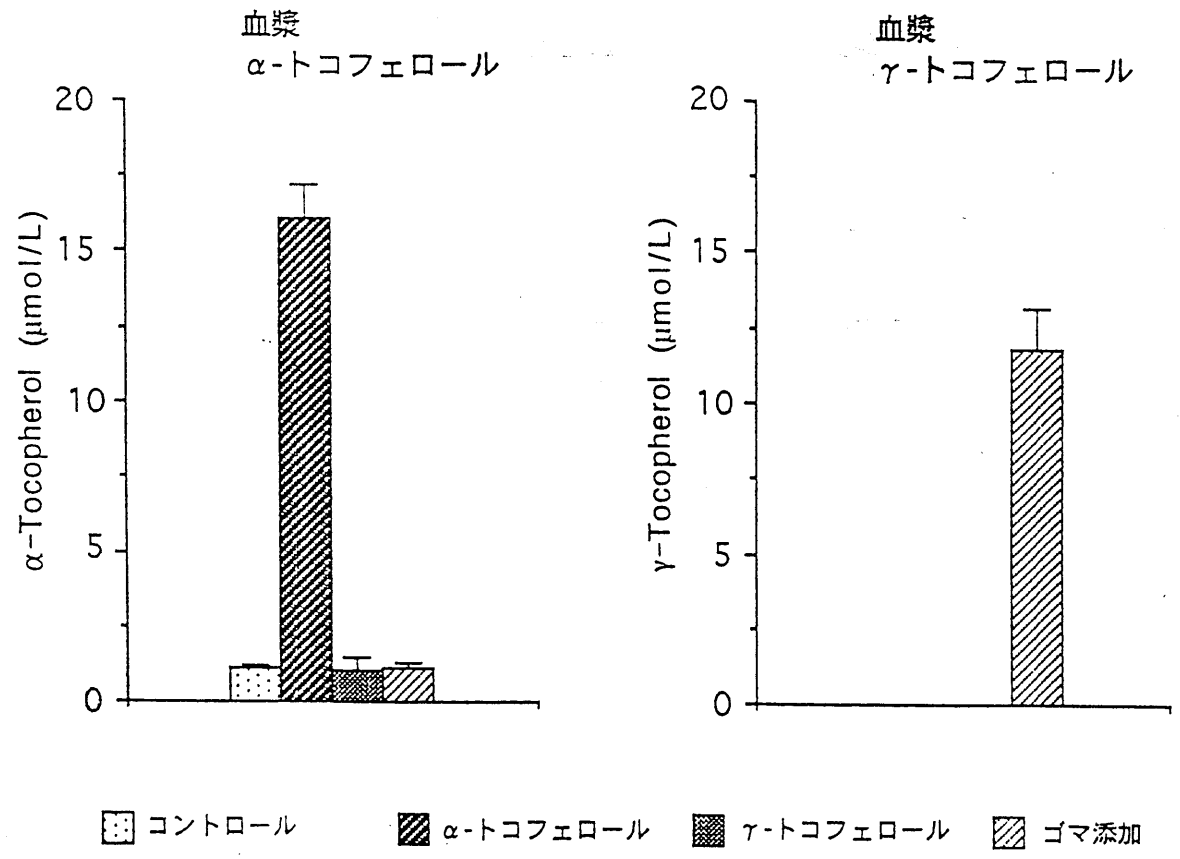


図4：ビタミンE源としてα-トコフェロール、γ-トコフェロール及びゴマを用いてラットを8週間飼育した時の血漿トコフェロール量

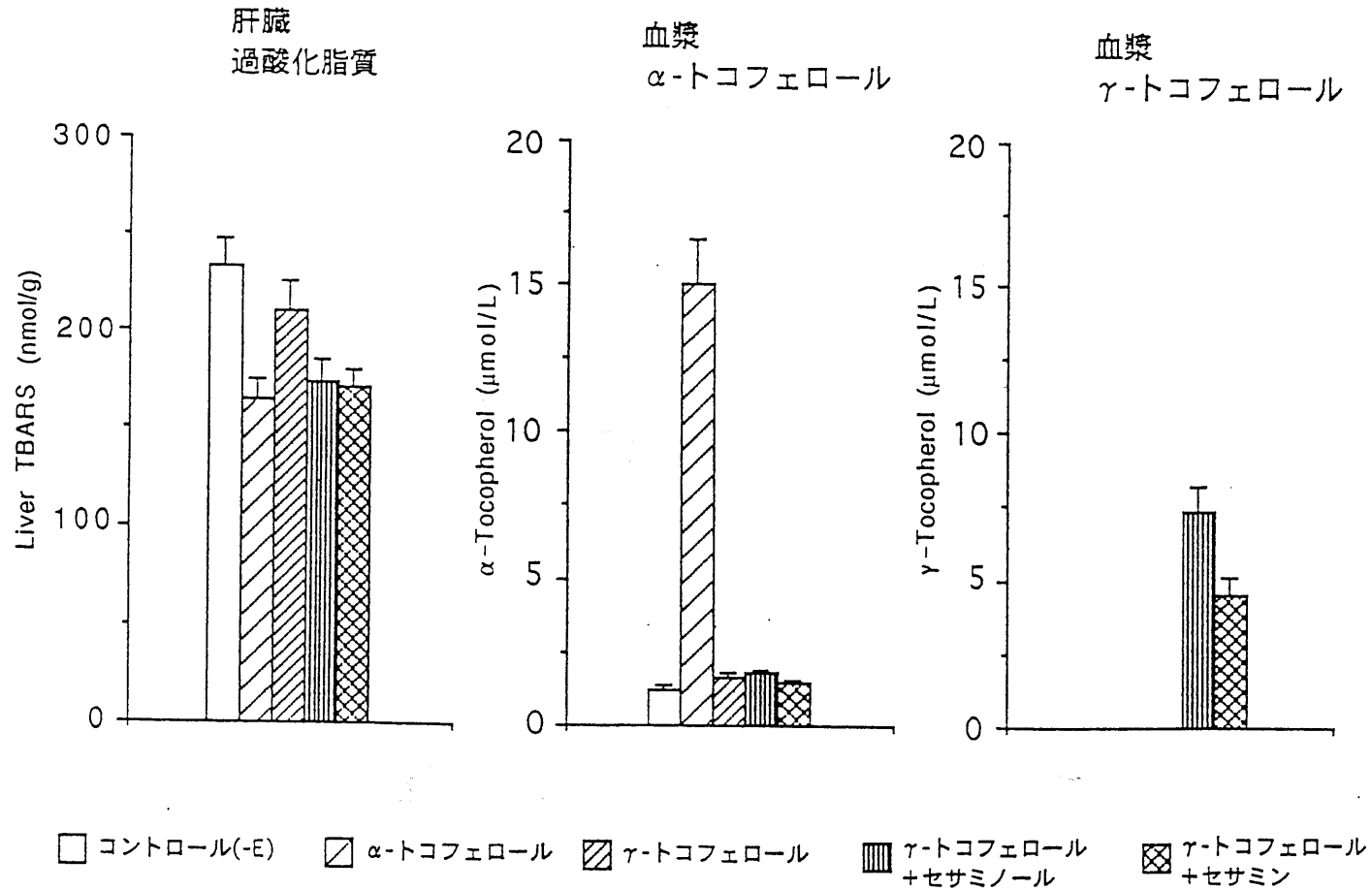


図5 : ゴマリグナンとγ-トコフェロールのビタミンE活性における相乗効果

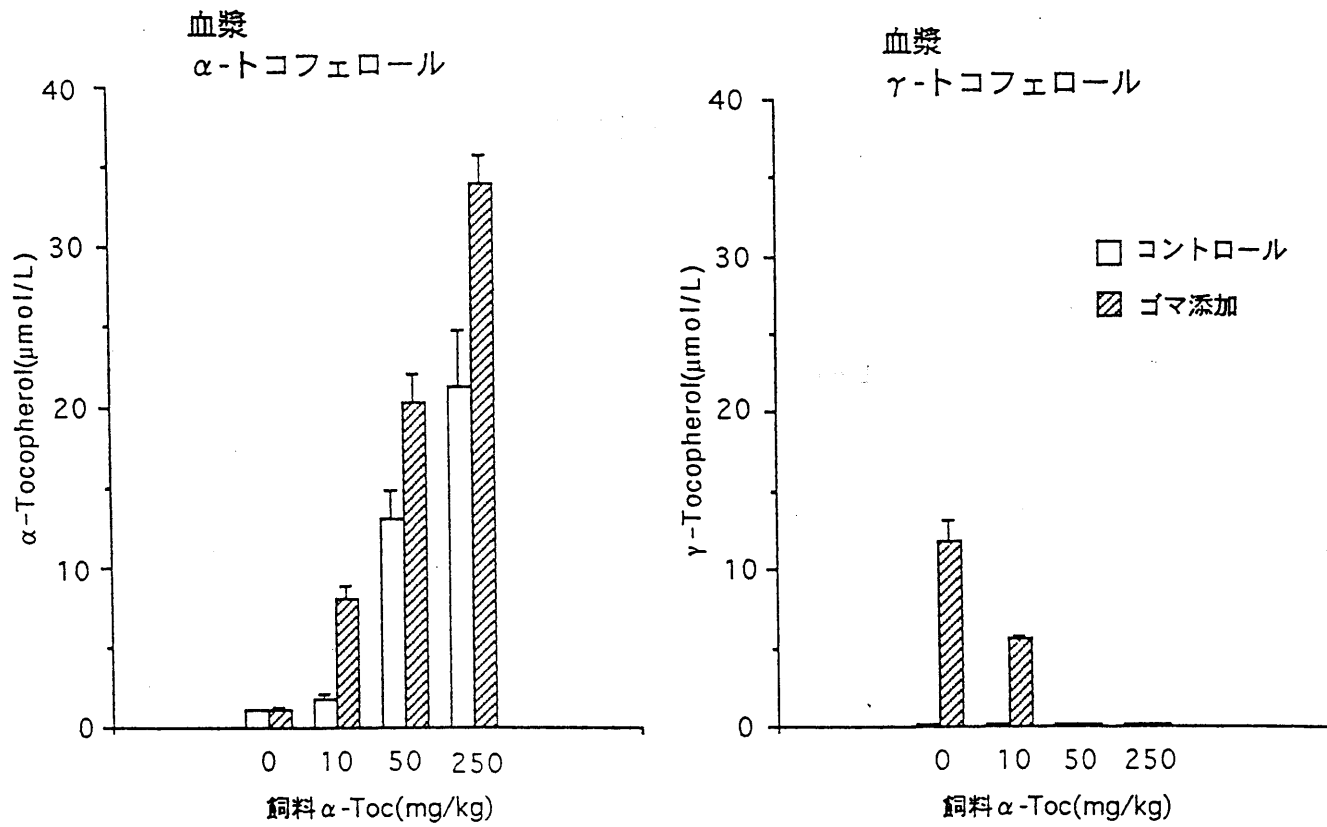


図 6 : 血漿トコフェロール量に及ぼす飼料中の α-トコフェロールレベルとゴマ摂取の影響

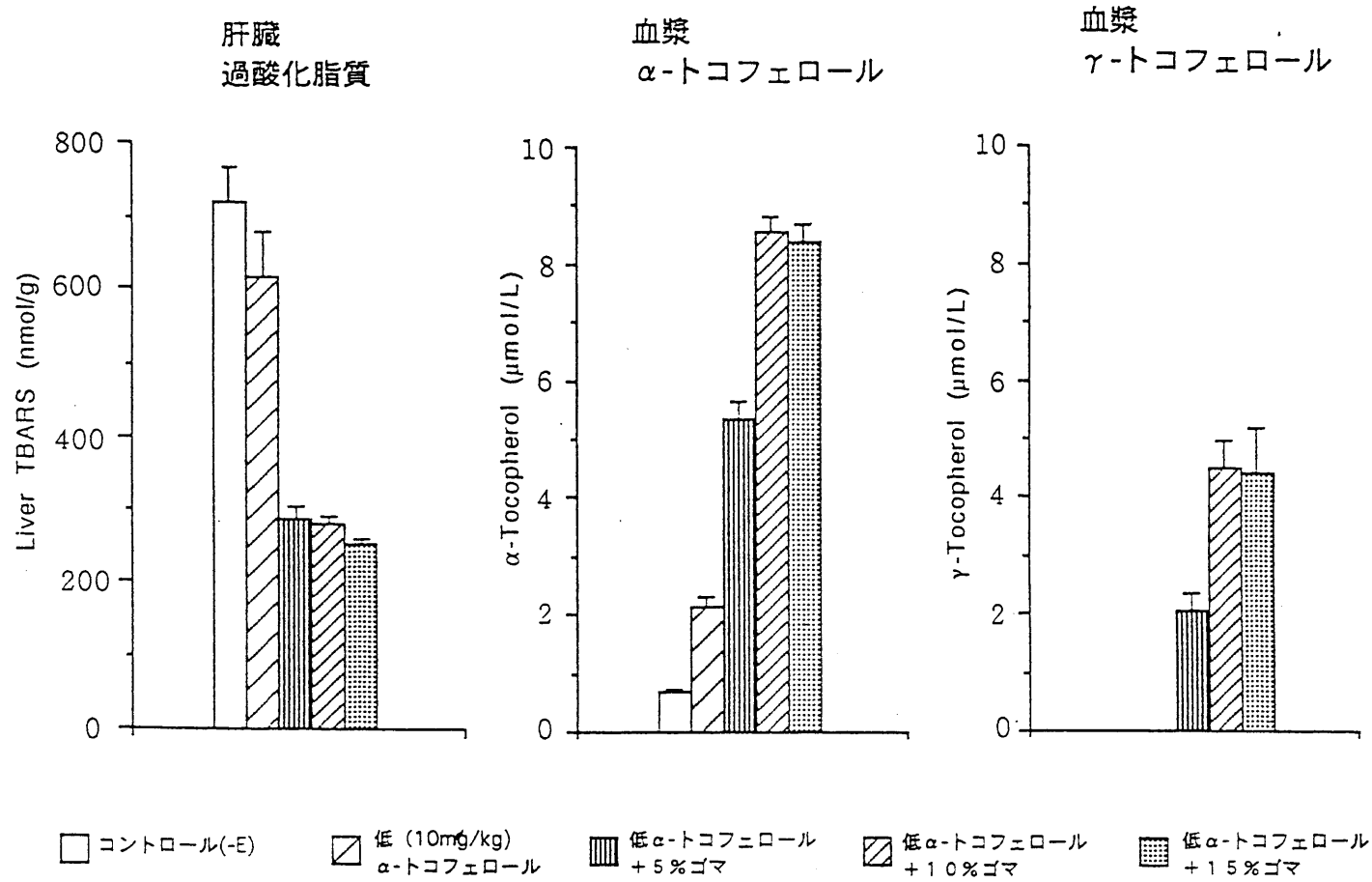


図7：低α-トコフェロール含有飼料へのゴマの添加効果

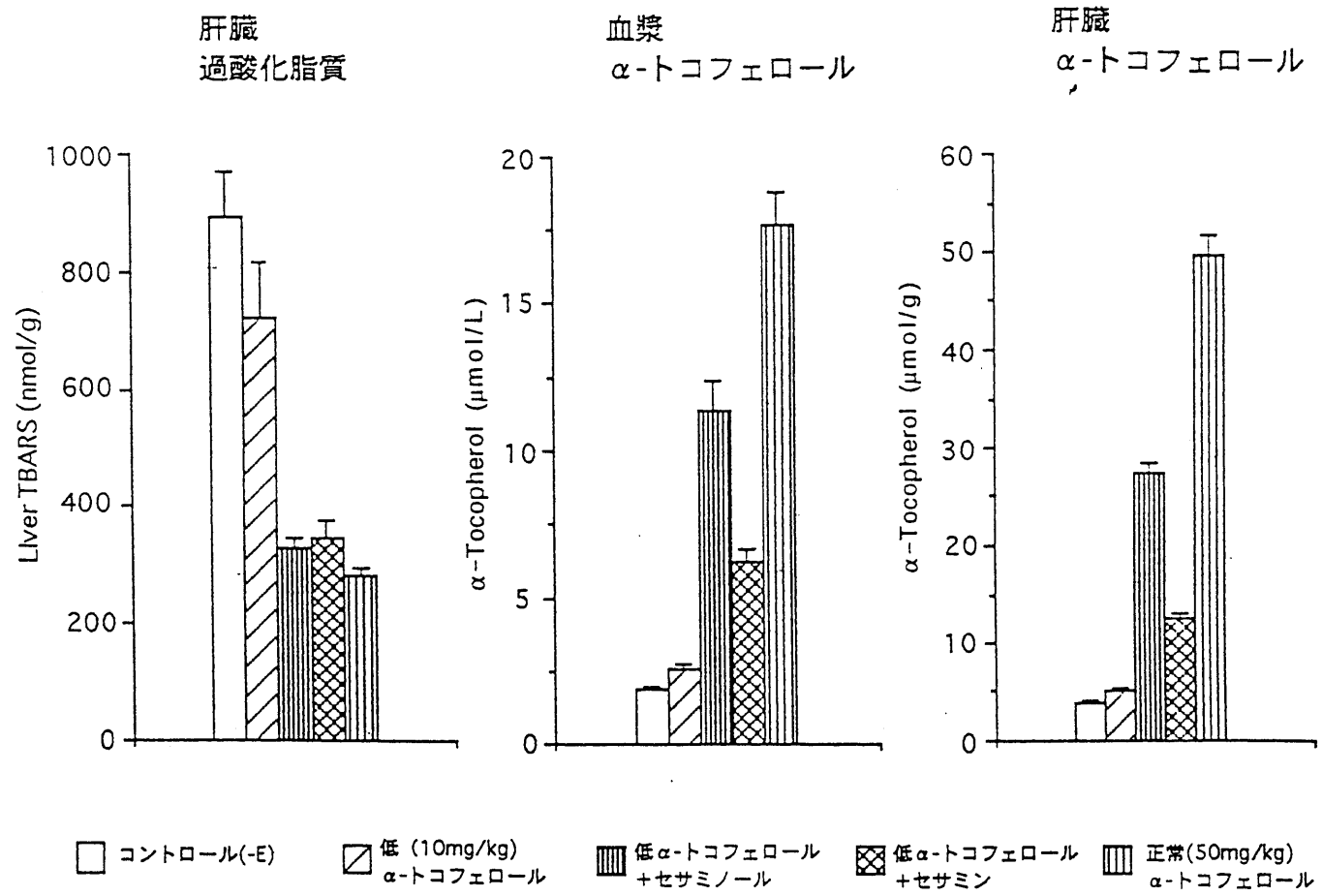


図8 : ゴマリグナンとα-トコフェロールのビタミンE活性における相乗効果