

一般演題 -1

共役リノール酸(CLA)強化小麦粉製品について

○古賀民穂¹、佐々木久美¹、山本健太²、矢羽田歩²、宮城一菜²、太田英明²

¹中村学園大学短大、²中村学園大学

【目的】米国では共役リノール酸（CLA）は栄養補助食品としてのみでなく、スポーツ強化食品や機能性食品として販売され、糖尿病やガン再発予防食品等も開発されている。スペインではノーベルフーズ（欧州版トクホ）として許可される見込みで、CLA 配合飲料が大ヒットしている。わが国においても栄養補助食品として販売されているが、食品からの CLA の摂取が強く望まれている。よって、CLA 強化小麦粉製品の製造を試み、貯蔵による CLA の変化についても検討した。

【方法】CLA は日清オイリオグループ社製を使用し、MK 精工社製 HBD-100 自動ホームベーカリーを用いて製造した。食パン1枚（5枚切/斤）または、丸パン1個に0.5、1、2gになるように添加した。製パン性については、官能検査、容積、かたさ及び凝集性により評価した。官能検査は、平均年齢22歳の本学学生10名で7段階評点法（内部の色、すだち、かおり、食感、しっとりさ、味、総合的評価）により行った。かたさ、凝集性の測定において、食パンは、クリープメーター（山電、レオナー、RE-3305）で行い、丸パンでは卓上型物性測定器（山電、TPU-A2）を用いて行った。CLA の製造過程、貯蔵中における変化については、室温（25℃）、冷蔵（5℃）及び冷凍（-18℃）で貯蔵し、試料とした。CLA 測定法としては、C：M = 2：1 で脂質を抽出後、ケン化し、DMSO 添加硫酸メタノール法でメチル化し、SUPELCOWAXTM-10 キャピラリーカラム（60 m × 0.32 mm × 0.25 μm）で GLC 分析を行った。

【結果】官能検査の結果より、食パンでは0.5g及び1g CLA 強化食パンはスタンダードと同様の評価が得られたが、2g 強化食パンでは、すだち、食感、しっとりさ及び総合的評価の項目で有意に劣っていた。また、容積、かたさ及び凝集性ともに、1g 強化まではスタンダードと差がなかった。丸パンでは、官能検査より2g CLA 強化丸パンにおいてもスタンダードと同様の評価が得られ、容積も変化がなかった。かたさ、凝集性においても有意な差はみられなかったが、CLA の含量が増すほどかたさの値は低くなり、凝集性の値は高くなる傾向がみられた。製パン過程においてCLA は焙焼によりこねの約4倍の増加がみられた。貯蔵による変化については、25.5℃貯蔵で8日程度、-18℃では15日前後CLA が安定であることが明らかとなった。

【考察】CLA は焙焼により増加し、25.5℃貯蔵では8日程度、-18℃で15日前後の条件においてCLA は安定であった。官能検査及びかたさ、凝集性より、食パンは1g/枚（5枚切/斤）まで、丸パンではCLA 2g/個までは強化可能であると考えられた。

一般演題 -2

ヒトにおける共役リノール酸摂取の血中分布

○佐藤謙太¹、都築 毅¹、野坂直久²、青山敏明²、宮澤陽夫³、池田郁男¹
¹東北大院・農・生体分子、²日清オイリオグループ、³東北大院・農・機能分子

【目的】共役リノール酸（CLA）はリノール酸の位置・幾何異性体であり、共役二重結合をもつ脂肪酸である。CLAは現在、動物試験やヒト臨床試験を経てメタボリックシンドロームを予防する健康補助食品として販売されている。ヒト臨床試験の多くでは脂質代謝改善作用に焦点を当てているためCLAの吸収代謝に関する報告は多くなく、とくに日本人での報告はほとんどない。CLAの有益な摂取方法を考えるためにも、吸収量に関するデータの蓄積は必要である。したがって本研究では、市販されているCLAサプリメント（メタセーブ；日清オイリオグループ）を日本人の健常ボランティアに摂取してもらい、血中のCLA量を測定し、CLAの吸収量や血中分布を明らかにしようとした。

【方法】20代の健常ボランティア24名（男性12名、女性12名）を無作為にプラセボ群とCLA群に分け、サプリメントを三週間摂取してもらった。プラセボ群としてサフラワーオイルカプセル（リノール酸量として2.2g/day）を摂取してもらい、CLA群としてCLAカプセル（CLA量として2.4g/day）を摂取してもらった。採血をサプリメント摂取一週間前、摂取前、摂取後、摂取一週間後に行ない、採取した血液から血漿と血球を調製し、総脂質を抽出し、脂肪酸メチルエステルに調製してガスクロマトグラフィー分析によりCLA量を測定した。また血漿中のトリアシルグリセロール量、リン脂質量、総コレステロール量、LDLコレステロール量、HDLコレステロール量、AST値、ALT値、血糖値などの血漿パラメーターを測定した。

【結果】プラセボ群と比べて、CLA摂取による血漿パラメーターの有意な変化は見られなかった。プラセボ群とCLA群の両群において、サプリメント摂取前の血漿及び血球中に僅かではあるが9*c*,11*t*-CLAが存在していた。しかし両群ともに10*t*,12*c*-CLAは確認できなかった。CLA群において、CLAサプリメント摂取後の血漿では、摂取前及びプラセボ群と比較してCLA量は約5倍、血球では約6倍増加した。摂取一週間後において血漿、血球中のCLA量は摂取直後と比べて、減少していたが、摂取前と比較して有意に高い値を示した。また10*t*,12*c*-CLAはCLAカプセルを摂取することにより血漿、血球中に有意に増加した。

【結論】CLA摂取により、日本人体内のCLA量が顕著に増加することが確認できた。

一般演題 ー3

嫌気性細菌による多種多様な共役型高度不飽和脂肪酸生産

○朴時範¹、岸野重信^{1,2}、小川順^{2,3}、横関健三¹、清水昌²

¹京大院・農・産業微生物、²京大院・農・応用生命、³京大・微生物科学

【目的】近年、食と健康に対する消費者意識が高まっており、栄養補助食品や特定保健用食品（トクホ）として機能性脂質のニーズが多く、機能性食品関連の市場規模が劇的に増大している。したがって、脂質の生理活性や薬理作用に関する研究も急速に進展してきており、特に共役脂肪酸の生理機能が注目されている。そこで我々は、微生物を用いて高度不飽和脂肪酸（PUFA）を新規な機能性脂質へと変換する検討を行った。その結果、絶対嫌気性細菌 *Clostridium bifermentans* JCM 1386 株が、嫌気培養中において PUFA を部分的に飽和化すること、さらに本反応の飽和化過程における反応中間体として共役脂肪酸が関与することを見いだした。本発表では本菌による様々な PUFA から共役型高度不飽和脂肪酸（CPUFA）への変換反応について検討し、多種多様な共役脂肪酸ライブラリーの拡充を試みた。

【方法と結果】選抜菌株である *C. bifermentans* JCM 1386 を GAM 培地において培養・集菌後、ホモジナイズにて無細胞抽出液を調製した。本菌の無細胞抽出液を様々な遊離型 PUFA と共に嫌気条件下で 24 時間反応に供した結果、ある種の PUFA を基質とした反応液から HPLC 分析において 233 nm で吸収極大を有する新規な二つの未知物質の生成を確認した。各基質由来の反応生成物を HPLC にて分取・精製し、GC/MS や NMR などの各種機器分析により構造解析を行った。その結果、本菌は基質として分子内に *cis*- ω 6、*cis*- ω 9 を有する炭素数 18 および 20 の n-3・n-6 系 PUFA を選択的に認識し、CPUFA である *trans*- ω 7、*cis*- ω 9 及び *trans*- ω 7、*trans*- ω 9 へと変換することを明らかにした。また反応の経時変化の解析からこれらの CPUFA は飽和化反応の中間体であることを明らかにした。本研究により、CLA をはじめとする天然には稀少な多種多様な CPUFA の生産とともに脂質ライブラリーが多様化され、この共役脂肪酸ライブラリーの中から新たな生理活性物質・生理機能を探し出す発見につながる事が期待される。

一般演題 -4

乳酸菌による共役脂肪酸生産プロセスの解明

○岸野重信^{1,2}、朴時範¹、小川順^{2,3}、横関健三¹、清水昌²

¹京大院・農・産業微生物、²京大院・農・応用生命、³京大・微生物科学

【目的】反芻動物由来製品に微量に含まれている共役リノール酸（CLA）は、反芻動物胃内に存在する微生物により飼料中のリノール酸をステアリン酸へと飽和化する一連の反応における中間体といわれている。この知見に基づき、様々な乳酸菌の休止菌体を用いてリノール酸からの CLA 生産について検討した結果、種々の乳酸菌、特に *Lactobacillus plantarum* が CLA やリノール酸の水和産物である 10-hydroxy-12-octadecenoic acid (HY) を生産・蓄積することを見いだした。これら乳酸菌が生産する CLA は、活性型 CLA である *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid (18:2) (CLA1) と *trans*-9, *trans*-11-18:2 (CLA2) と同定した。本発表では、*L. plantarum* AKU1009a を用いた CLA 生産プロセスの解明を試みた。

【方法・結果】*L. plantarum* AKU1009a より得た cell-free extract (CFE) を用い、リノール酸と共に反応に供したところ、速やかに反応が進行したことより、本反応に関与するタンパク質（酵素系）の同定を試みた。本菌の CFE を超遠心し、膜画分 (UP) と可溶性画分 (US) とに分画した結果、本変換反応に必要なタンパク質が両画分に分散していることを明らかにした。さらに精製を行うことにより、本反応に関与するタンパク質は、膜画分 (UP) に存在するタンパク質 (CLA-HY) と、可溶性画分 (US) に存在する二つのタンパク質 (CLA-DH と CLA-DC) であると同定した。データベース検索を行ったところ、CLA-DH、CLA-DC はそれぞれ *L. plantarum* 由来 short-chain dehydrogenase/oxidoreductase、acetoacetate decarboxirase と一致した。CLA-HY、CLA-DH 及び CLA-DC 発現大腸菌を作成し、各タンパク質を高発現した発現大腸菌の CFE を用いて各タンパク質の相補試験を行ったところ、三つのタンパク質存在下においてのみ、リノール酸からの CLA 生産が認められた。さらに本反応が進行するためには、FAD、NAD(P)H などの酸化還元補酵素を必要とすることを明らかにした。また、リノール酸を CLA-HY と共に反応に供した結果、HY が生産することも明らかにした。

一般演題 -5

CLA 感知遺伝子: 10*t*,12*c*-CLA の抗腫瘍作用を担う遺伝子の同定

○園田知代¹、山田耕路¹、立花宏文^{1,2}

¹九大院・農・生物機能科学、²九大・バイオアーキテクチャーセンター

【目的】我々はこれまでに、共役リノール酸の一種である 10*t*,12*c*-CLA がある種の細胞株にアポトーシスを誘導することを見出してきたが、その詳細な作用機序は不明であった。一方、緑茶カテキンの一種である EGCG の抗腫瘍作用を担う生体内標的分子およびその作用を伝達する細胞内分子（緑茶カテキン感知遺伝子）を明らかにし、緑茶カテキンの機能性発現における緑茶カテキン感知遺伝子の重要性を提示してきた (*Nature Struct. Mol. Biol.*, 11, 380 (2004) ; *J. Biol. Chem.*, 283, 3050-3058 (2008))。そこで本研究では、10*t*,12*c*-CLA の抗がん作用を担う 10*t*,12*c*-CLA 感知遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】10*t*,12*c*-CLA 感知遺伝子候補のスクリーニングは、緑茶カテキン EGCG の機能性発現に必須な細胞内シグナル伝達分子の同定に成功している genetic suppressor elements (GSE) 法を用いた。GSE 法とは表現型ベースの遺伝子探索法であり、断片化 cDNA ライブラリーを細胞に導入し、導入された遺伝子断片が、その由来遺伝子の機能を阻害することを期待して機能を担う遺伝子を網羅的に同定する手法である。具体的には、10*t*,12*c*-CLA が強力に細胞増殖抑制作用を示すマウスメラノーマ細胞株 B16 に対し、マウス胚より得られた cDNA をベースに作製した断片化 cDNA ライブラリーを導入し、10*t*,12*c*-CLA による細胞増殖抑制作用が阻害され、10*t*,12*c*-CLA 耐性細胞を選択した。選択されてきた耐性細胞から回収した導入遺伝子断片の解析から、4種類の 10*t*,12*c*-CLA 感知遺伝子候補が得られた。そこで、タンパク質キナーゼに関連する候補遺伝子の一つが 10*t*,12*c*-CLA の抗がん作用を担う遺伝子であるかを検証した。RNA 干渉法によりその発現を特異的に低下させた B16 細胞を作製し検証した結果、10*t*,12*c*-CLA は本遺伝子の発現を低下させた B16 細胞に対し、細胞増殖抑制作用を示さなかった。以上の結果から、本遺伝子が 10*t*,12*c*-CLA の抗腫瘍活性の発現に重要な役割を担っていることが示唆された。

一般演題 -6

低酸素ストレス応答抑制を標的とした CLA の抗肝ガン作用

○長友琢、松山哲也、池保有理、加藤恵美子、西山慧、山崎正夫、西山和夫
宮崎大・農

【目的】ガン組織は増大する際に組織内部が低酸素状態に陥るが、ガン細胞は低酸素ストレス応答機構を介して血管新生を誘導することで組織内に酸素を効率的に取り込む。このことからガン細胞の低酸素ストレス応答を抑制することは有効なガン予防、治療の標的になると考えられる。

低酸素ストレス応答システムにおいて、最も上流に位置する酸素センサータンパク質として hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) がある。本タンパク質は HIF-1 α , β のヘテロ 2 量体転写因子であるが、通常酸素分圧下では HIF-1 α は積極的に分解されるため不活性な状態にあり、低酸素状態では HIF-1 α の安定化を通じた HIF の活性化により血管新生を促す。

そこで、本研究ではヒト肝ガン細胞株 HepG2 を用いて低酸素状態での HIF-1 α 安定化、HIF-1 の下流に位置する vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生量に及ぼす CLA の影響を検討した。

【方法】サンプルとして *cis9, trans11*-CLA、*trans10, cis12*-CLA を用いた。培養条件は、CLA 刺激を 24 時間行った後、通常酸素条件下 (20% O₂)、低酸素条件下 (1% O₂) で実験を行った。HIF-1 α レベルは低酸素刺激から 2、4、6 時間後に、VEGF 産生量は 24、48 時間後に分析した。HIF-1 α レベルは western blot、VEGF 産生量は ELISA で分析を行った。

【結果】HepG2 細胞において、低酸素処理によって HIF-1 α の安定化と VEGF 産生量の著しい増加が認められた。これらの低酸素ストレス誘導条件における CLA の影響を *cis9, trans11*-CLA、*trans10, cis12*-CLA を 5、10、20 μ M の濃度で検討したところ、両異性体とも HIF-1 α の安定化は濃度依存的に、VEGF 産生は 20 μ M の濃度で抑制することが示された。

【考察】*cis9, trans11*-CLA、*trans10, cis12*-CLA は濃度依存的に肝ガン細胞での低酸素ストレス応答を抑制することが示唆された。低酸素ストレス応答は血管新生だけでなく、解糖系の活性化、細胞死の回避などにも関与しており、CLA は多様な作用を通じた抗ガン効果を発揮することが期待される。

一般演題 ー7

大腸発癌と脂肪酸組成, CLA による化学的予防

○白石良介¹、藤瀬剛弘²、岩切龍一¹、藤本一真¹、柳田晃良³

¹佐賀大・附属病院内科学・消化器内科、²唐津赤十字病院内科、³佐賀大・農

【背景と目的】本邦において近年大腸癌は急増し、その背景には食生活の欧米化に伴う脂肪摂取量の増加が考えられている。これまで我々は、ラット大腸発癌モデルにおける様々な脂肪酸の長期摂取による発癌への影響を検討し、さらに最も発癌を促進した牛脂（飽和脂肪酸 saturated fatty acid, SFA）に共役リノール酸（conjugated linoleic acid, CLA）を添加し、その抑制効果を検討したので報告する。

【方法】6週齢雄性 SD ラットを用い、大腸選択的発癌物質であるアゾキシメタン（azoxymethane, AOM）投与群と非投与群に分け、食餌成分で対照群、10%牛脂群、10%魚油（n-3 系多価不飽和脂肪酸, polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA）群、10%コーン油（n-6 PUFA）群、10%オリーブ油（n-9 系一価不飽和脂肪酸, monounsaturated fatty acid, n-9 MUFA）群の5群に割り付けた。AOM 投与後12週に前癌病変とされる aberrant crypt foci (ACF) の発生数、投与後44週に腫瘍数や非腫瘍部背景粘膜における細胞増殖能 (BrdU) や Wnt シグナル関連分子について検討した。さらに牛脂群に1%中性脂肪型 CLA (CLA-TG)、1%遊離脂肪酸型 CLA (CLA-FFA) を各々添加し同様の検討を行った。

【結果】ACF 数、腫瘍数とも対照群と比較し牛脂群とコーン油群で有意に増加し、オリーブ油群と魚油群では低下した。最も発癌を促進した牛脂群では非腫瘍部粘膜の BrdU 陽性細胞が増加し、Wnt2 や beta-catenin、cyclin D1 の発現増加が見られた。CLA-TG および CLA-FFA 添加群では牛脂単独群と比較し ACF、腫瘍発生ともに抑制され、その抑制効果は CLA-FFA 群でより顕著であった。CLA を添加した両群で BrdU 細胞の減少およびアポトーシス亢進、Wnt シグナル関連分子の発現抑制、アラキドン酸カスケードの抑制が見られた。

【結論】SFA および n-6 PUFA の長期摂取には大腸発癌促進作用があることが判明し、細胞増殖能や Wnt シグナルの関与が考えられた。一方、n-3 PUFA や n-9 MUFA の摂取は大腸発癌を抑制することが示唆された。SFA の長期摂取において CLA を添加することで大腸発癌が抑制されることが判明し、様々な機序が関与している可能性が示唆された。