

農産物及び農産廃棄物の健康機能性の解明

(Effect of farm produces and the waste products
on the lipid metabolism in rats)

2008

岩手大学大学院

連合農学研究科

生物環境科学専攻

(帯広畜産大学)

桑 原 友 子

第1章 緒論	2
第2章 ソバスプラウトのコレステロール低下作用	
第1節 緒論	6
第2節 実験材料および実験方法	8
第3節 結果	29
第4節 考察	47
第3章 ソバスプラウトのアセトアミノフェンによる肝毒性軽減効果	
第1節 緒論	61
第2節 実験材料および実験方法	66
第3節 結果	73
第4節 考察	84
第4章 引用文献	95
第5章 謝辞	109

第1章 緒論

人類は飽食の時代といわれる現代、肥満、生活習慣病、アレルギーなど食に関わる様々な問題を抱えている。食と健康は、私たちの生活の根幹をなすものである。飽食の時代といわれる現代、私たちは肥満、生活習慣病、アレルギーなど食に関わる様々な問題を抱えている。一方、現代は情報化社会ともいわれており、誤った食品情報が巷にあふれている。また人は生涯を通じて健康でありたいと願っており、食に関する美味しさ、栄養素、消化・吸収はもちろんのこと、さらに代謝、運動などの問題をないがしろにすることは出来ない。

本研究では、北海道農業研究センターで新たに開発されたソバ種子の新芽植物、ソバスプラウトの健康機能性について研究をおこなった。十勝地域の特産物であり、安定的に生産されているソバを用いスプラウトを生産し、スプラウトの健康機能性の動物実験による検討を行うとともに生体作用メカニズムの解析を行った。世界中で3種類のソバが存在する。今回使用するスプラウトは普通そば（キタワセソバ）と2品種のダツタンソバである。ソバはタデ科に分類される。普通ソバは単にソバ、または甘ソバと呼ばれ、日本国内で多く生産されている。一方、ダツタンソバは特有の苦味をもつため、苦ソバとも呼ばれ、中国内モンゴル自治区、チベット自治区、雲南省、四川省などの山岳地帯で栽培されている。国産のダツタンソバを用いたスプラウトは未だ健康機能性を研究

されていない。道内のそば作付面積は、ここ 10 年ほどの間に約 2 倍に増えている。農林水産省の平成 16 年度作物統計によると、全国そば作付面積 4 万 3 千 500 ヘクタールのうち、北海道は約 30%に当たる 1 万 4 千 800 ヘクタールである。収穫量は約 7 千 650 トンで全国 2 万 4 百トンの約 38%を占め、いずれも日本一である (1)。

ダッタンソバsprawutには普通ソバsprawutの約 12 倍のルチンが含まれていることを明らかにした (2)。ダッタンソバには食用とする種の部分にルチンが多く含まれる。ルチンはフラボノイド配糖体の一種で (Figure 1)、天然に広く分布するが代表的には、ソバ、イチジク、アオギリの葉に多く含まれる(3-5)。フラボノイドは、植物に広く含まれ、2 つのフェニル基がピラン環あるいはそれに近い構造の三つの炭素原子を介して結合している物質群の総称である。その構造により、フラボン、イソフラボン、フラボノール、カテキン等に分類される。ケルセチンはフラボノール属になる。フラボンの 3 位にヒドロキシル基が結合したものをフラボノールと呼び、このヒドロキシル基は糖と結合して配糖体として植物に広く分布している。ルチンはケルセチンにグルコースとラムノースが結合した 2 糖のルチノースが結合した配糖体である (6)。ルチンには毛細血管を強化する薬理作用が確認されている(7)。さらに脳出血などの疾病を予防する作用があるばかりでなく、動脈硬化症や糖尿病などを抑制し、生活習慣

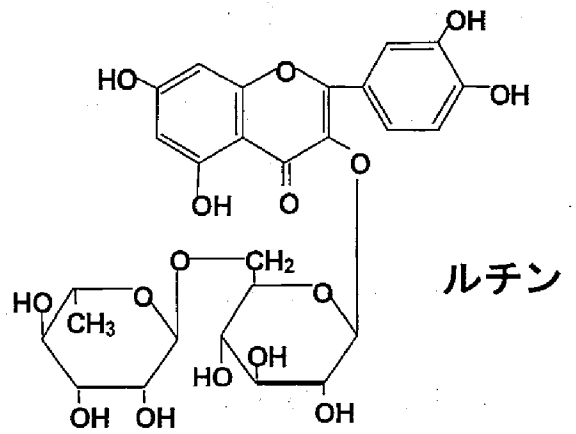
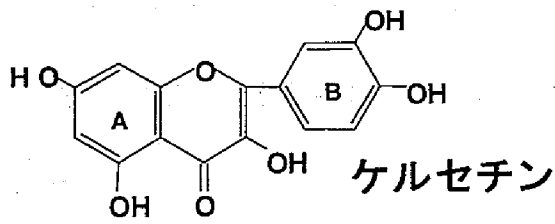


Figure 1 Chemical structures of Quercetin and Rutin

病の予防に有効である(8-10)。また、ルチンは発ガン物質が DNA を傷つけるのを防ぐ、抗変異原活性(11-12)や抗酸化作用(13-16)があることが明らかとなっている。

本研究では、特に食物繊維やタンパク質、ポリフェノール（ルチン）を含んだダットンソバスプラウトの乾燥粉末を雄性ラットに摂食させた場合、血中のコレステロール濃度低下作用を明らかにするとともに、血漿・糞便・盲腸・肝臓の脂質レベルの分析、脂質代謝関連遺伝子 mRNA 発現量を測定し、そのメカニズムの解明を試みた。さらに、ソバスプラウトには、ビタミン、ミネラルが豊富であり、抗酸化能などの機能性ポリフェノール（ルチン、クロロゲン酸、アントシアニン、グリコシルカテキン等）を有すること(17)から、アセトアミノフェンによる肝毒性の軽減機構の解明を行った。遺伝子 mRNA の発現レベルの分析を行い、健康機能性のメカニズムの解明を行った。

第2章 ダットンソバスプラウトのコレステロール低下作用

第1節 緒論

コレステロールは、脂質の一種であり、ステロイド骨格と炭化水素側鎖を持った化合物である。コレステロールはステロイドホルモンや細胞膜の合成に必要とされ、常に血中に存在し、主に肝臓と腸管で合成されている。食餌由来としては、動物性食品に多く含まれることが多く、一定レベルでのコレステロールは生体に必須である。しかし、血液中に過剰に存在することで高脂血症となり動脈硬化を誘発するリスクが上昇する (18)。

動脈硬化は、動脈内膜に脂質はコレステロールを含むリポタンパク質が蓄積し、その血流を塞ぎ止め動脈を損傷させる疾病である (19)。動脈硬化初期の動脈内膜には、脂質鈍食細胞（泡沫細胞）が存在する特徴がある。泡沫細胞は、マクロファージや平滑筋細胞に起因し、脂質やコレステロールを含む血漿由来のリポタンパク質を取り込む性質がある。泡沫細胞は、動脈内膜に沈着し、動脈硬化という複雑な病変になると考えられている。やがて、進行した病変は、中心部に脂質と壊死に陥った細胞の残屑が存在し、その周りを繊維や平滑筋細胞の被膜が取り囲むという構造をしている。この動脈硬化病変は、動脈内腔に突出し血流を妨げるようになる。血流量が減少すると、血管組織への酸素供給

が不十分となり代謝交換が低下する。そのため、動脈硬化病変より下流の組織が損害される。

ソバsprautに多く含まれる食物繊維は、食品の品質、味やテクスチャーを下げる要因として、排除されてきた。しかし、食物繊維やポリフェノール類は、生体の疾病を予防、改善する作用のあることが明らかになり、近年、その生理機能に関する研究が世界各地で行われている。

食物繊維は、ヒトの消化酵素によって加水分解されない食品中の難消化成分の総体として定義されている(20-21)。食物繊維の成分には大きく分けて2種類があり水に溶けにくい「不溶性食物繊維」と水に溶けやすい「水溶性食物繊維」がある。食物繊維は、大腸内で未消化の食物繊維が便量を増やし、腸壁を刺激することによる便秘改善作用、胃内容物の滞留時間の延長による血糖上昇の抑制やインスリンの節約作用、腸内 pH の低下による鉄やカルシウムなどのイオン化による大腸での吸収促進作用が知られている (22)。更に食物繊維の胆汁酸排泄促進や大腸発酵による短鎖脂肪酸の生成が血液中のコレステロールを低下させる働きに関与していることも確認されている(23)。食物繊維の多くは、腸内細菌の栄養源となるが、体に有用なビフィズス菌を増やす作用も知られている(23)。

ソバ粉から抽出されたソバタンパク質には、ハムスターにおける胆石形成抑

制、コレステロール濃度低下作用があるという報告 (24) や、高コレステロール食を与えたラットにおいて血清中コレステロール低下および糞便中への中性ステロール、胆汁酸排泄促進によるコレステロール低下作用を持つという報告 (25) がある。その要因の一つとして、糞便中への中性ステロールの親和性が高まり中性ステロール排泄を促進していると示唆している。しかし、ソバのソバプラウトに関して生理機能は不明である。そのため本研究では、ソバソバプラウトに含まれる成分、特に食物繊維やソバタンパク質が脂質代謝改善効果を有するかを検討した。

第 2 章では、特に食物繊維やタンパク質を含んだダッタンソバソバプラウトの乾燥粉末を雄性ラットに摂食させた場合、血中のコレステロール濃度低下作用を明らかにするとともに、血漿・糞便・盲腸・肝臓の脂質レベルの分析、脂質代謝関連遺伝子 mRNA 発現量を測定し、そのメカニズムの解明を試みた。

第 2 節 実験材料および実験方法

2.1 ソバソバプラウトの栽培

普通ソバ (CBSP) とダッタンソバ Hokkai No.8(TBSP8)、Hokkai No.9 (TBSP9) は、北海道農業研究センターで栽培したものを入手した。

ソバ種子は暗所で4日間22°Cの条件で水浸漬させた。次に暗所で5日間22°Cの条件で芽出しさせた。普通ソバは9日間、ダツタンソバは10日間照光栽培した。葉の生重量を測定し、フリーズドライを行った。ソバスプラウトパウダーは北海道農業研究センターから供給された。

2.2 ルチン濃度の測定

0.1g のスプラウト乾燥粉末を採取し1ml のメタノールでホモゲナイズし、80°C、1時間抽出した。1000 × g で5分間、遠心分離後、上清をフィルター濾過し(PTFE, 0.5 μm, hydrophobic; Advantec, Tokyo, Japan)、10% phosphoric acid (0.1% (v/v))を加え、HPLC に供した(class-VP chromatography data system; Shimadzu, Kyoto, Japan)。Capcell PAK ODS column (250 mm × 4.6 mm, particle size 5 μm; Shiseido, Tokyo, Japan)。検出波長 350 nm、流量 1.0 mL min⁻¹、カラムオープン温度 40 °C とした。移動相は、(A) MeOH:water:acetic acid (v/v/v, 5:92.5:2.5)、(B) MeOH:water:acetic acid (95:2.5:2.5)とした。

2.3 食物繊維と微量栄養素の測定

食物繊維、タンパク質、脂質、炭水化物、水分と灰分は AOAC 法を用いた (26)。

2.4 実験動物および飼育条件

F344 / DuCrj 雄性ラット (Charles River , Yokohama, Japan) 7 週齢 20 匹を 1 週間、クレアの粉末飼料を与えて馴化を行い、各投与群で体重と血漿総コレステロールに有意差がないように 4 つの投与群に群分けを行った。室温は $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $50\% \pm 5\%$ とし、12 時間の明暗サイクル (明期 : 8:00、暗期 : 20:00) のもとで飼育を行った。ラットは個別にステンレスケージに入れて飼育した。ラットの取り扱いについては Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (27) に従って行った。ラットの体重は毎日 9:00 から 10:00 の間に測定した。投与期間は 4 週間とし、給餌量は前日の摂食量より 5g 増を目安とした。食餌と水は自由摂取とした。試験飼料投与開始前、試験飼料投与開始から 1 週間ごとに、12 時間絶食後、尾静脈からの採血を行い、血漿総コレステロール濃度、高密度リポタンパク質コレステロール濃度 (HDL コレステロール)、TG (トリグリセリド) 濃度の経時変化について観察した。試験飼料投与期間終了後、10:00 にラットをエーテル麻酔処理し、腹部大静脈血より採血、その後、失血死させた。肝臓、盲腸、副睾丸脂肪組織を摘出した。摘出した肝臓、盲腸は冷生理食塩水で洗浄し、乾燥したろ紙で水分を除去し重量を測定した。その後、液体窒素で急速冷凍し、分析に用いるまで -80°C で凍結保存した。

2.5 実験食

本実験では、基本食として炭水化物源を α 化コーンスターチとした。AIN-93G (28) に準じて配合したミネラル混合物、ビタミン混合物を使用した 20%カゼイン、5%セルロース添加食を基本飼料とし、本実験の Control とした。(Table 1)。ソバスプラウト添加食群はコーンスターチと置換して 5%添加した。実験食は、酸化防止のため -30°C で保存した。

2.6 生化学的検査

血漿中の総コレステロール、HDL コレステロール、TG の測定はドライケム (FUJI FILM、3500) を用いて、酵素法により測定した。総コレステロール濃度と HDL コレステロール濃度の差を超低密度リポタンパク質コレステロール + 中密度リポタンパク質コレステロール + 低密度リポタンパク質コレステロール (VLDL+IDL+LDL コレステロール) 濃度とした。

2.7 肝臓中の全脂質の抽出

約 1g の肝臓をバイアル瓶に測り取り、凍結乾燥器 (DC41, Yamato, Tokyo, Japan) により凍結乾燥させた。これをスクリュウキャップ付試験管に移した後

Table 1 Composition of experimental diets

	Control	CBSP	TBSP8	TBSP9
Component			(g / kg diet)	
corn starch	396.5	341.5	341.5	341.5
milk casein	200	200	200	200
α -corn starch	132	132	132	132
sucrose	100	100	100	100
soy bean oil	70	70	70	70
cellulose	50	50	50	50
mineral mix ¹⁾	35	35	35	35
vitamin mix ²⁾	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3
choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
TBHQ mix	1	1	1	1
Common Buckwheat	-	50	-	-
Tartary Buckwheat 8	-	-	50	-
Tartary Buckwheat 9	-	-	-	50

¹AIN-93G mineral mixture (AIN 1993) (28)

²AIN-93G Vitamin mixture (AIN 1993) (28)

に Folch らの方法 (29) に従ってクロロホルム-メタノール混合液 (2:1, v/v) を 2 倍容加えた。その後に 20 分間超音波発生装置 (No.92, Blason, USA) で処理して脂溶性物質を抽出し、 $600\times g$ で 10 分間遠心分離を行い、クロロホルム-メタノール混合液層と残渣に分配した。この残渣を同様の操作を 2 回繰り返して得られたクロロホルム-メタノール混合液層すべてを別のスクリーキャップ付試験管に移し、その 1/4 容の 1%塩化バリウム水溶液を加え、1-2 分間攪拌した後 $600\times g$ で 10 分間遠心分離することでクロロホルム層と水層に分配した。水層を除去し、ロータリーエバポレーター (SHIBATA, Tokyo, Japan) で減圧濃縮して Total lipid を得た。Total lipid は約 100mg/ml になるようにクロロホルム-メタノール混合液を加え、 -30°C で保存した。

2.8 メチルエステル誘導体の調製

得られた Total lipid 溶液のうち 0.5ml を減圧濃縮により乾固させた後、これに 5%塩酸メタノールを 1ml 加え、 125°C の恒温槽で 3 時間封管し、脱水縮合を行うことで中性脂質メチルエステル誘導体を調製した。室温まで放冷した後、クロロホルム 1ml および超純水 0.9ml を加えて約 1 分間攪拌し、 $600\times g$ で 10 分間遠心分離した。水層を除去し、クロロホルム層にメタノール-水 (10:9, v/v) 混液 1.9ml を加えて、同様に約 1 分間攪拌後、 $600\times g$ で 10 分間遠心分離を行

った。この洗浄操作を 3 回繰り返すことで塩酸を除去し、これを減圧濃縮により乾固させて、クロロホルム-メタノール混合液を 0.1ml 加えた。

2.9 ケイ酸薄層クロマトグラフィー (TLC) による分画

得られた中性脂質メチルエステル誘導体の半量を、展開溶媒ヘキサン-酢酸-エーテル (80:30:1, v/v/v) で TLC (ワコーゲル B-5 塗布プレート) に供した。標準物質の R_f 値に従い、ステロールメチルエステル画分をかき取り約 2 倍容のクロロホルム-メタノール混合液 (2:1, v/v) を加えた。これを 5 分間の超音波処理にかけた後、600×g で 10 分間遠心分離を行い、上澄みをイアトロビーズ (メルク社) 海砂積層 (Latoron, Tokyo, Japan) のミニカラムに供した。この操作を再び行い、減圧濃縮して乾固させた。

2.10 中性ステロールアセテート誘導体の調製

Matsubara らの方法に従って、中性ステロールアセテート誘導体の調製を行った。2.9 で得られた中性ステロール画分に無水ピリジン-無水酢酸 (1:1, v/v) を 0.1ml 加え、封管中に窒素を充填し 100°C で 1 時間反応させてアセテート誘導体を得た。反応後、クロロホルム 1ml およびメタノール-水 (10:9, v/v) 混合液 1.9ml を加え、1~2 分間攪拌した後に 600×g で 10 分間遠心分離を行った。

水層は除去し、クロロホルム層にメタノール-水 (10:9, v/v) 混合液 1.9ml を加え、同様に攪拌・遠心分離を行った。この操作をさらに 2 回繰り返した後、減圧濃縮して乾固させた。これに四塩化炭素を加えて減圧濃縮、乾固させることで無水ピリジン-無水酢酸を除去した。これをアセトン 0.1ml で溶解し、このうち 1 μ l をガスクロマトグラフィーに供した。

2.11 ガスクロマトグラフィー (GLC) による中性ステロールの定量分析

中性ステロールの同定は、試料と標準物質 (GLサイエンス) との相対保持時間の比較により行った。試料中の中性ステロールの定量はクロマトグラムから得られた標準物質との面積を比較することにより求めた。GLC には DB17 キャピラリーカラム (0.25mm \times 30m ; J&W scientific, USA) を用いて 2 kg/cm² の窒素を移動相とし、水素炎イオン化検出器により検出を行った。温度条件はカラムを 270 $^{\circ}$ C、試料注入部および検出器を 300 $^{\circ}$ C とした。

2.12 肝臓からの RNA 抽出

Acid guanidium-phenol-chloroform 抽出法に従って行った。約 100 μ g の肝臓に ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を 1ml 加え、1000 rpm で氷中で冷却しながらポッターポリトロンでホモジナイズした。ホモジネートを 1.5ml

の遠心チューブに移し、200 μ l のクロロホルムを加えて、約 15 秒間激しく混合して RNA の抽出を行った。これを 4°C、17,000 \times g で 15 分間遠心分離し、水層を別のチューブに移し取った。移し取った RNA 溶液に 500 μ l のイソプロパノールを加えて、混合した後、4°C、17,000 \times g で 15 分間遠心分離することで RNA の沈殿を得た。上澄みはアスピレーターにより除去し、チューブの壁面を洗浄するために 80%エタノールを加えて再び 4°C、17,000 \times g で 15 分間遠心分離を行った。同様に上澄みを除去し、50 μ l の滅菌超純水を加えて常温で約 20 分間放置することで抽出した RNA を膨潤させ、ピペッティングにより完全に溶解して-80°Cにて保存した。以上の RNA 抽出操作に用いた器具はすべて滅菌処理したものを用いた。

2.13 RNA 溶液中の核酸およびタンパク質濃度の決定

滅菌超純水 50 μ l に溶解した RNA 溶液の 4 μ l を 1.5ml の遠心チューブに移し取り、これに滅菌超純水を 1ml 加えて混合した。この全量を石英セルに移し、分光光度計 (UV-1600、Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて 260nm にて核酸、280nm にてタンパク質の吸光度を測定した。ブランクには滅菌超純水を用いた。核酸およびタンパク質の濃度は吸光度が 1.0 で 40 μ g/ml として算出した。また、260nm と 280nm における吸光度の比をとり、この値が 1.6~1.8 の範囲である

ことを確認してから以下の実験に用いた。

2.14 RNA 試料中の DNA 分解

上記 2.12 で抽出し、2.13 で濃度を決定した RNA の $20\ \mu\text{g}$ を 0.5ml の遠心チューブに移し取り、 60mM MgCl_2 , 100mM NaCl , 100mM DTT および 200mM Tris-HCl (pH 7.5) からなる DNase buffer を $5\ \mu\text{l}$ 、RNase inhibitor (TaKaRa, Otsu, Japan) を 20U および RQ1 DNase (Promega, Tokyo, Japan) を 1U 加え、滅菌蒸留水により $50\ \mu\text{l}$ にメスアップした。これを 37°C で 45 分間酵素反応させることで DNA を分解した。反応後、滅菌蒸留水 $50\ \mu\text{l}$ およびフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v) $100\ \mu\text{l}$ を加え、15 秒間激しく混合し、 4°C で $17,000\times g$ の遠心分離を行った。上層を別のチューブに移し、再びフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v) を $100\ \mu\text{l}$ 加えて抽出および洗浄操作を繰り返した。移し取った水層に 3M NaOAc を $10\ \mu\text{l}$ 、99.5%エタノールを $300\ \mu\text{l}$ およびペレットペイント (Takara, Otsu, Japan) を $1\ \mu\text{l}$ 加え、良く混合した後に、 4°C 、 $17,000\times g$ の遠心分離を行った。上澄みをアスピレーターにより除去し、80%エタノールを加えて、 4°C 、 $17,000\times g$ の遠心分離を行い、上澄みをアスピレーターにより除去してチューブの壁を洗浄した。得られた RNA に $28\ \mu\text{l}$ の滅菌蒸留水を加え、ピペッティングによ

り溶解した。以上の操作はすべて滅菌処理した器具を用いて行った。

2.15 逆転写 (RT)

DNA を分解・除去し、滅菌蒸留水に溶解した RNA 試料の $7\mu\text{l}$ を 0.5ml の遠心チューブに移した。これに oligo (dT) primer (GIBCO, Caithersburg, USA) を $0.5\mu\text{g}$ 加えて滅菌蒸留水で $8\mu\text{l}$ にメスアップし、 70°C で 10 分間保持した後、氷中にて 1 分間急冷し RNA を直鎖上状にした。その後、 375mM KCl, 15mM MgCl_2 および 250mM Tris-HCl (pH 8.3) からなる standard buffer を $4\mu\text{l}$, 2.5mM dATP, 2.5mM dTTP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP からなる dNTP mixture (TaKaRa) を $4\mu\text{l}$, 0.1M DTT を $2\mu\text{l}$ および RNase inhibitor を 10U 加え、 42°C で 5 分間 RNA とプライマーをアニーリングさせた。その後に、Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RTase ; GIBCO, Caithersburg, USA) を 200U 加え、滅菌蒸留水で $20\mu\text{l}$ にメスアップし、 42°C で 50 分間培養することで RT を行い、cDNA を合成した。続いて 70°C で 15 分間培養し、氷中にて 1 分間急冷することで HMLV-RTase の失活および RNA と cDNA の解離を行った。これに RNase H (GIBCO, Caithersburg, USA) を 2.2U 加えて全量を $21\mu\text{l}$ とし、 37°C で 20 分間インキュベートして RNA を分解した。得られた cDNA は PCR に供するまで -20°C で保存した。以上の操作は全て滅菌

処理した器具を用いて行った。

2.16 ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

合成した cDNA 溶液 1 μ l を 0.5ml の PCR チューブに移し取り、500mMKCl, 15mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl(pH 8.3) からなる PCR 緩衝液を 5 μ l、dNTP mixture を 4 μ l、EX-Taq ポリメラーゼ (TaKaRa, Otsu, Japan) を 1.25U と 0.1mM の Upper primer および Lower primer を 0.25 μ l ずつ加え、滅菌蒸留水で 50 μ l にメスアップした。プライマーは、GAPDH プライマー (Upper primer, 5' -GCCATCAACGACCCCTTCATT-3' ; Lower primer, 5' -CGCCTGCTTCACCACCTTCTT-3'), Apo A1 プライマー (Upper primer, 5' -CAGCTAGGCCCAGTGA CT CAG-3' ; Lower primer, 5' -AGCTTCTTTTTGGCCTCATCG-3'), Apo A4 プライマー (Upper primer, 5' -TTCCTGAAGGCTGTGGTGCTG-3' ; Lower primer, 5' -GTTGCCCCTTGAGCCCTTCCA-3'), Apo B プライマー (Upper primer, 5' -GAAAGCATGCTGAAAACAACC-3' ; Lower primer, 5' -AGGCCTGACTCGTGGAAGAA-3'), Apo E プライマー (Upper primer, 5' -GCTCTGTGGGCCCTGCTGTTG-3' ; Lower primer, 5' -GGTTGGCTGTGCGCTGACCAC-3'), HMG-CoA reductase プライマー

(Upper primer, 5' -GCGTGCAAGACAATCCTGGAG-3' ; Lower primer, 5'-GTTAGACCTTGAGAACCCAATG-3'), cholesterol 7 α hydroxylase プライマー (Upper primer, 5'-GCCGTCCAAGAAATCAAGCAGT-3' ; Lower primer, 5'-TGTGGGCAGCGAGAACAAAGT-3'), LDL receptor プライマー (Upper primer , 5'-ATTTTGGAGGATGAGAAGCAG-3' ; Lower primer , 5'-CAGGGCGGGGAGGTGTGAGAA-3'), SRB I プライマー (Upper primer, 5' -GTAGGGCCCAGAAGACACCAC-3' ; Lower primer , 5' -CCTGCCACCGCTGCCACTTAC-3'), FAS プライマー (Upper primer, 5' -GCTGGAGCCCCTTTTTGTGTT-3' ; Lower primer , 5' -ACCCAGCACTGCAGTTTTCT-3'), SREBP 1c プライマー (Upper primer, 5' -GTGCTTGGGCCTGTCACAATA-3' ; Lower primer , 5'-TCCCACCCCAACAAAGAGAA-3'), SREBP 2 プライマー (Upper primer, 5'-GGAGCGAGCATTGAACTGTAT-3' ; Lower primer , 5'-TGCGGGCCACAAGAAGTAGAT-3'), PPAR γ プライマー (Upper primer, 5'-CCTTGCTGTGGGGATGTCTCA-3' ; Lower primer , 5'-GATGTCCTCGATGGGCTTCAC-3') の 13 種類を用いた。サーマルサイクラー (PTC-100, MJ Research INC, USA) の温度条件は、最初のサイクルが 94°C で 3 分間 DNA の解離、60°C で 1 分間プライマーとのアニーリング、72°C で

2 分間 DNA 鎖の伸長を行った。2 サイクル目以降は、DNA の解離を 94°C で 1 分間とし、最後のサイクルは DNA 鎖の伸長を 72°C で 10 分間行った。Apo A1、Apo E の増幅は 15 サイクル、Apo B、cholesterol 7 hydroxylase、LDL receptor、SRB I の増幅は 25 サイクル、GAPDH、HMG-CoA reductase、Apo A4、FAS、SREBP 1c、SREBP 2、PPAR γ の増幅は 30 サイクル行い、増幅後は -20°C で保存した。以上の操作は全て滅菌処理した器具を用いて行った。

2.17 増幅 DNA 断片のアガロースゲル電気泳動

電気泳動には 40mM Tris, 33mM NaOAc, 2mM EDTA および 0.17% AcOH とした 1×TAE の 2%アガロース (Seaken ME agarose, FMC Bioproducts) ゲルを用いた。PCR 産物の 10 μ l を 0.5ml の遠心チューブに移し、これに dye solution を 2 μ l 加え、ピペッティングにより混合した後に電気泳動に供した。泳動槽 (Mupid-2, コスモバイオ) は 1×TAE で満たし、1 レーンに 10 μ l の試料を供した。また、分子量マーカーとして 100 bp ladder (SIGMA genesis) も同様に泳動した。電圧は 100V とし、プロモフェノールブルー (BPB) がゲルの 3 分の 2 の位置に達するまで泳動した。電気泳動終了後に、暗所にてゲルをエチジウムブロマイド溶液に浸して 30 分間振とうすることで染色を行った。続いて滅菌蒸留水中で 15 分間振とうすることで余分なエチジウムブロマイドを除

去した。これに 256nm の紫外線を照射して、分子量マーカの移動度から増幅した DNA 断片が目的のものであることを確認した。その後、ゲルを 0.5M NaOH および 1.5M NaCl からなる denaturing buffer 中で 30 分間振とうし、続いて 3M NaCl および 0.5M Tris-HCl (pH 7.5) からなる neutralization buffer 中で 30 分間振とうしてエチジウムブロマイドを洗浄した。以上の操作は全て滅菌処理した器具を用いて行った。

2.18 増幅 DNA 断片のナイロンメンブランへの転写

電気泳動を終えたゲルを 3M NaCl および 0.3M クエン酸ナトリウムからなる 20×SSC 中で 30 分間振とうした。ナイロンメンブラン膜 (Biodine B, Pall Bio-support) は滅菌蒸留水中で 30 分間振とうした後、20×SSC 中で 30 分間振とうしたものを使用した。ナイロンメンブラン膜への転写は 20×SSC による毛細管現象を用いた 12 時間の Upward transfer method により行った。転写終了後に、ゲルの電気泳動した膜上に印を付け、室温に約 20 分間放置することで膜を乾燥させた。その後、UV cross linker (Funakoshi, Tokyo, Japan) を用いて膜上の RNA を紫外線固定した。以上の操作はすべて滅菌処理した器具を用いて行った。

2.19 ハイブリダイゼーション

紫外線固定した膜を 2×SSC 中にて約 5 分間振とうし、20×SSC 塩を洗い落とす。50% Formamide, 5×SSC, 2% Blocking reagent (Boehringer)、0.1% Na sarkosyl、0.02% SDS の hybridization buffer はハイブリダイゼーションオーブン (MICRO-4HYBRIDIZATION OVEN ; Hybaid, Teddington, U.K.) 中にて温めてから使用した。この hybridization buffer 中に膜を移し、42°C で 1 時間以上プレハイブリダイズを行った。プローブには、DIG により 3' -tailing label した。GAPDH プローブ (5' -TGATGACCAGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACTGTGCCGTTGAACTTGCCGTGGG-3')、Apo A1 プローブ (5' -GGTATGATACTCGATCAGGGTAGGGTGGTTCTTGATCTCGGTCAGGCGCTGGGC-3')、Apo A4 プローブ (5' -AGCTGGGTGAAGTAGTCCCACATCACATTGGCCACCTGGTTCGGAAGTGACCTCA-3')、Apo B プローブ (5' -TCCTTGCTTACCAAAAAGAGCTTCCAGTGTGGCTCAAAGCCCTTTCCTTCTAA-3')、Apo E プローブ (5'-CCAGGGTTGGTCCGCTTTGCCCTGGGAGCTGATCTGTACCTCCAGCTCTCCCTC-3')、HMG-CoA reductase プローブ

(5'-GATCTGTTGTGAACCATGTGACTTCTGACAAGATGTCCTGCTGCCA
ATGCTGCC-3') 、 cholesterol 7 α hydroxylase プ ロ ー プ
(5'-CCCGAAGGCCTGTTTAAGTGATGACTCTCAGCCGCCAAGGGACATC
ATCCAGTG-3') 、 LDL receptor プ ロ ー プ (5'
-GTGAACTTGGGTGAGTGGGCACTGATCTGAGGGGCAGGCAGGCACAT
GTACTGG-3') 、 SRB I プ ロ ー プ (5'
-TGCCGTGTGGACAGTGTGACATCTGGGGGCTCAGGACGTGGCACTGG
CGGGTTG-3') 、 FAS プ ロ ー プ (5'
-CTGCTCTCTGTGGATAGGACTGAATGCTGTGGCCTTCTGATAGACTCTT
CTGGA-3') 、 SREBP 1 c プ ロ ー プ (5'
-TGTGCTCTACCAGTGGGTATAAGCGTTCAGCTGCCTCCTCATCCCGCCT
CAGCC-3') 、 SREBP 2 プ ロ ー プ
(5'-TAAATTACAGTGATAGACAGGATAGGACAGGTGGGGACCAAGCACA
GGAAGGGG-3') 、 PPAR γ プ ロ ー プ
(5'-GGATCGAAACTGGCACCCCTTGAAAAATGCGGATGGCCACCTCTTTG
CTCTGCTC-3')を用いた。ハイブリダイゼーションボトルにプローブを 10pmol
加え、良く混合してハイブリダイゼーションを開始した。42°Cで 16-20 時間の
ハイブリダイゼーションの後に、膜を免疫検出に供した。以上の操作は全て滅

菌処理した器具を用いて行った。

2.20 免疫検出

膜を常温で 2×SSC, 0.1%SDS 中にて 15 分間の振とうを 3 回行った後, あらかじめ温めておいた 0.1×SSC、0.1%SDS 中にて 50℃、15 分間の振とうによる洗浄操作を 3 回行うことにより、膜に結合しなかったプローブや、非特異性 DNA とプローブの結合を除去した。続いて 1% blocking solution, 92mM Maleic acid, 137mM NaCl の blocking buffer 中に膜を移し, 常温で 30 分間振とうして膜のブロッキングを行った。続いて, アルカリフォスファターゼと結合した anti-DIG antibody (Boehringer) を 1 μ l、blocking buffer 40ml に溶解し, これに膜を移して常温で 30 分間振とうすることにより抗原抗体反応を行った。膜を 0.3% Tween 20、100mM Maleic acid、150mM NaCl の washing buffer 中で 15 分間の振とうを 3 回繰り返し、膜に結合しなかった anti-DIG antibody を除去した。その後に、常温で 100mM NaCl、50mM MgCl₂、100mM Tris-HCl (pH 9.5) の alkaline buffer 中にて 5 分間振とうして平衡化した。続いて、常温で alkaline buffer の 0.25mM Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphate (CSPD ; Boehringer) 溶液中で 5 分間振とうさせることでアルカリフォスファターゼと

CSPD の酵素-基質複合体を形成させ、37°Cで 15 分間インキュベートすることにより酵素の活性化を行った。反応後、膜を X 線フィルム (Super HR-H, FUJI medical, Tokyo, Japan) に 15 分・12 時間露光し、現像した。現像した X 線フィルムは、スキャナーで画像を取り込み、NIH-image によるデンシトメトリーで発光の強さを測定した。

2.21 盲腸内容物中の短鎖脂肪酸の定量

Hara らの方法 (30) に従って行った。盲腸内容物は摘出した盲腸からピンセットで搾り出し、攪拌しながら pH を測定した。その後に、滅菌超純水で 5ml にメスアップしてよく混合した。この 1.5ml を 1.5ml エッペンチューブに移し取り、4°C、8,000×g で 10 分間遠心分離してタンパク質を沈殿させた。この上清の 500 μ l を別のチューブに移し、4N NaOH を 100 μ l 加えて混合した後に 4°C、8,000×g で 10 分間遠心分離した。さらにこの上清の 100 μ l を別のチューブに取り、3N H₃PO₄ を 100 μ l 加えて混合した。この 2 μ l を GLC に供し、短鎖脂肪酸を定量した。酢酸、プロピオン酸および酪酸の同定は、試料と標準物質 (GL Science, Tokyo, Japan) との相対保持時間の比較により行い、定量はクロマトグラムから得られた標準物質との面積の比較により求めた。また、酢酸、プロピオン酸、酪酸の和を総短鎖脂肪酸とし、濃度と盲腸内容物の積をプールサイ

ズとした。GLCに充填剤として80-100メッシュのchromosorb W-AW DMSC (Shimadzu, Kyoto, Japan)を充填したガラスカラム(3mm×2m)を用い、 $2\text{kg}/\text{cm}^2$ の窒素を移動相とし、水素炎イオン化検出器により検出した。温度条件はカラムを 145°C 、試料注入部および検出器を 170°C とした。

2.22 糞便中の胆汁酸の抽出

総胆汁酸の抽出は Grundy らの方法の変法 (31) に従って行った。約 0.5g の試料をねじ付試験管に量り取り凍結乾燥した。これにエタノールを 10ml 加えて 20 分間超音波処理により抽出し、 $600\times g$ で 10 分間遠心分離してエタノール層と残渣に分配した。エタノール層は別のねじ付試験管に移し、残渣に 5ml のエタノールを加えて同様の操作を再度繰り返した。この抽出液を減圧濃縮、乾固させた後に 1.25N 水酸化ナトリウムを 4ml 加えて 125°C で 6 時間反応させることでアルカリ分解した。室温まで放冷した後、エーテルを 4ml 加えて約 1 分間攪拌し、 $600\times g$ で 10 分間の遠心分離を行ってエーテル層と水層に分配した。エーテル層を除去した後、水層に 2N 塩酸を 3ml、エーテルを 5ml 加えて攪拌した後に遠心分離し、再びエーテル層と水層に分配した。エーテル層を別のねじ付試験管に移し取り、減圧濃縮、乾固させて総胆汁酸を得た。これを 1ml のエーテルに溶解し、 -30°C で保存した。

2.23 胆汁酸のメチルエステル・アセテート誘導体の調整

総胆汁酸の全量を減圧濃縮により乾固させた後、ジアゾメタンを 5, 6 滴加えて室温で 1 時間反応させてメチルエステル誘導体を得た。これを減圧濃縮、乾固させ、無水ピリジン-無水酢酸 (1 : 1, v/v) を 0.1ml 加えた。窒素を充填し封管させ、室温で 1 晩放置することでアセテート誘導体を得た。反応後、クロロホルム 1ml およびメタノール-水 (10 : 9, v/v) 混液を 1.9ml 加え、約 1 分間攪拌後に 600×g で 10 分間遠心分離した。水層は除去し、クロロホルム層にメタノール-水 (10 : 9, v/v) 混液を 1.9ml 加えて同様に攪拌、遠心分離した。この操作を 3 回繰り返した後、減圧濃縮して乾固させ、さらに適量の四塩化炭素を加えて減圧濃縮、乾固することで無水ピリジン-無水酢酸を除去した。これにアセトン を 0.1ml 加え、このうち 1 μ l を GLC に供した。

2.24 GLC による胆汁酸の定量

デオキシコール酸、コール酸、ケノデオキシコール酸およびリトコール酸の同定は、試料と標準物質 (GL Science, Tokyo, Japan) の相対保持時間の比較により行った。試料中の胆汁酸の定量はクロマトグラムから得られた標準物質の面積の比較により求めた。また、デオキシコール酸、コール酸、ケノデオキシ

コール酸、リトコール酸の和を総胆汁酸とした。GLC に充填剤として 80-100 メッシュの chromosorb W-AW DMSC (Shimadzu, Kyoto, Japan) を充填した ガラスカラム (0.25mm×30m) を用い、2kg/cm² の窒素を移動相とし、水素炎 イオン化検出器により検出した。温度条件はカラムを 280℃、試料注入部および 検出器を 300℃とした。

2.25 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示し、one-way ANOVA の後、Duncan's multiple range test で有意差の検定を行った。なお、いずれの検定も有意水準は 5%とした。肝臓における脂質代謝関連タンパク質 mRNA の発現量に関して測定値は内部標準である個々の GAPDH mRNA 発現量の値により補正し、対照区の平均値を 100 とした相対比で表した。

第 3 節 結果

3.1 ソバスプラウト乾燥粉末の組成 (Table 2)

普通ソバ (CBSP) スプラウト乾燥粉末の組成(%w/w):タンパク質、29.1;脂質、6.5;食物繊維、30.1(水溶性食物繊維、5.6;不溶性食物繊維、24.5)、ルチン、0.64

Table 2 Micro-nutrient composition of buckwheat sprout powder

Component	CBSP	TBSP8	TBSP9
		<i>g/100 g</i>	
Moisture	7.8	5.4	5.6
Protein	29.1	30.3	27.5
Lipid	6.5	6.3	6.2
Ash	9.6	9.3	10.3
Carbohydrate	46.4	42.8	42.4
Water-soluble fiber	5.6	5.9	6.5
Insoluble fiber	24.5	31.1	27.9
Fiber	30.1	37.0	34.4
Rutin	0.64	5.9	8.0

であった。TBSP8 スプラウト乾燥粉末の組成 (% w/w):タンパク質、30.3;脂質、6.3;食物繊維、37.0(水溶性食物繊維、5.9;不溶性食物繊維、31.1)、ルチン、5.9
であった。TBSP9 スプラウト乾燥粉末の組成 (% w/w):タンパク質、27.5;脂質、6.2;食物繊維、34.4(水溶性食物繊維、6.5;不溶性食物繊維、27.9)、ルチン、8.0
であった。

3.2 摂食量、体重、体重増加量に及ぼす影響 (Table 3)

体重増加量及び摂取量を Table 3 に示した。体重増加量と摂食量について食餌による変化はみられなかった。

3.3 臓器重量に及ぼす影響 (Table 3)

臓器重量を Table 3 に示した。肝臓重量、盲腸重量、副睾丸周囲脂肪量に差はみられなかった。

3.4 糞重量 (Table 3)

糞重量について Table 3 に示した。糞重量は TBSP8 群において Control 群と比較して有意に増加した。CBSP 群と TBSP9 群において Control 群との有意な差はみられなかったが、増加する傾向にあった。

Table 3
 Body weight gain, feed intake, liver weight, cecum weight, epididymal adipose tissue and fecal weight in rats fed experimental diets for 4 wk

	Dietary group			
	Control	CBSP	TBSP8	TBSP9
Initial body weight (g)	174 ± 3	174 ± 4	174 ± 4	174 ± 4
Final body weight (g)	255 ± 6	256 ± 6	255 ± 15	256 ± 15
Body weight gain (g/4wk)	68 ± 6	67 ± 6	69 ± 15	68 ± 15
Feed intake (g/4wk)	400 ± 14	401 ± 21	389 ± 19	382 ± 26
Liver weight (wt g/100g b.w.)	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1
Cecum weight (wt g/100g b.w.)	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3
Epididymal adipose tissue weight (wt g/100g b.w.)	2.2 ± 0.6	2.2 ± 0.6	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.8
Fecal weight (wt g)	2.6 ± 0.9 ^b	3.6 ± 0.5 ^{ab}	4.0 ± 0.6 ^a	3.3 ± 0.7 ^{ab}

Values are expressed as mean ± SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

3.5 血漿脂質濃度 (Figure 2-3、Table 4)

血漿脂質濃度を Figure 2-3、Table 4 に示した。尾静脈より採血した血漿総コレステロール濃度の経時変化について Figure 2 に示した。試験開始から 1 週間目の時点で、Control 群に比べ、2 種類の TBSP 群で総コレステロールが低い値を示した。試験開始 4 週間目において TBSP8 群で最も低い値を示した。

TBSP8 群、TBSP9 群でのみ、総コレステロールの上昇を抑制することが確認された。尾静脈より採血した血漿 TG 濃度の経時変化について Figure 3 に示した。各群間において有意な差は認められなかった。TBSP8 群、TBSP9 群で Control 群、CBSP 群と比較して低下する傾向がみられた。

Table 4 に 4 週間目の血漿総コレステロール濃度 VLDL+IDL+LDL コレステロール濃度、HDL コレステロール濃度を示した。CBSP 群と TBSP 群は 4 週間目に Control 群と比較して有意に血漿総コレステロール濃度が低下した。

(Table 4) 3 種類のソバスプラウト乾燥粉末は、わずかに血漿 TG 濃度の低下を引き起こした。

3.6 肝臓脂質濃度 (Figure 4-5)

肝臓中の Total lipid 量、コレステロール量について Figure 4-5 に示した。

Total lipid 量において、各群間に有意な差はみられなかった。CBSP 群が最も

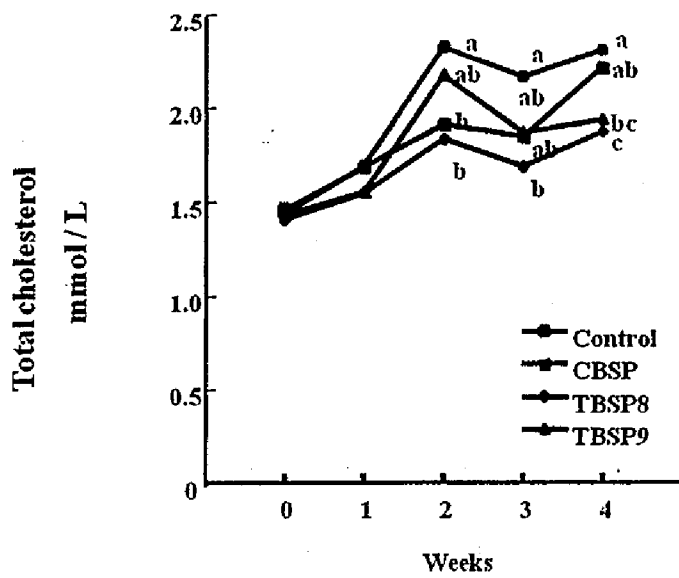


Figure 2 Plasma total cholesterol concentrations in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

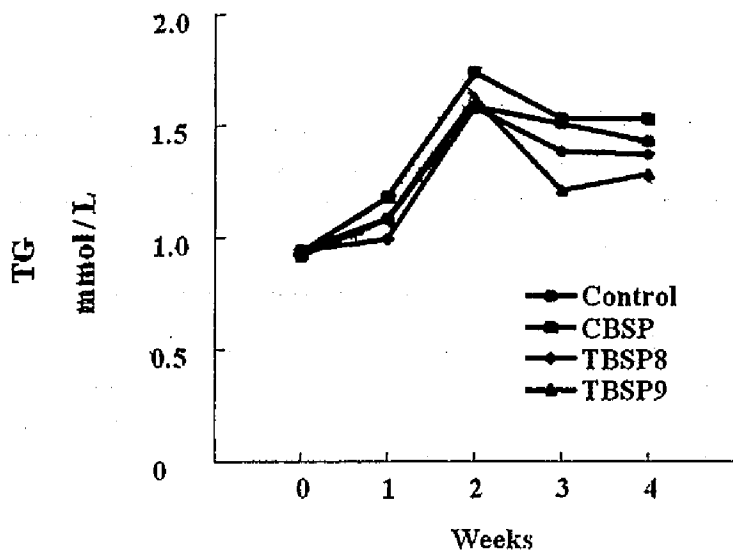


Figure 3 Plasma TG concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Table 4
Plasma total cholesterol, HDL cholesterol and VLDL+IDL+LDL cholesterol
concentration in rats fed experimental diets for 4 wk

	Dietary group			
	Control	CBSP	TBSP8	TBSP9
Total cholesterol (mmol/L)	2.30 ± 0.19 ^a	2.20 ± 0.08 ^{ab}	1.87 ± 0.27 ^c	1.93 ± 0.14 ^{bc}
HDL cholesterol (mmol/L)	1.45 ± 0.26	1.17 ± 0.31	1.22 ± 0.42	1.20 ± 0.07
VLDL+IDL+LDL cholesterol* (mmol/L)	0.84 ± 0.33	1.02 ± 0.40	0.66 ± 0.18	0.68 ± 0.20

Values are expressed as mean ± SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

HDL: high density lipoprotein, VLDL: very low density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein

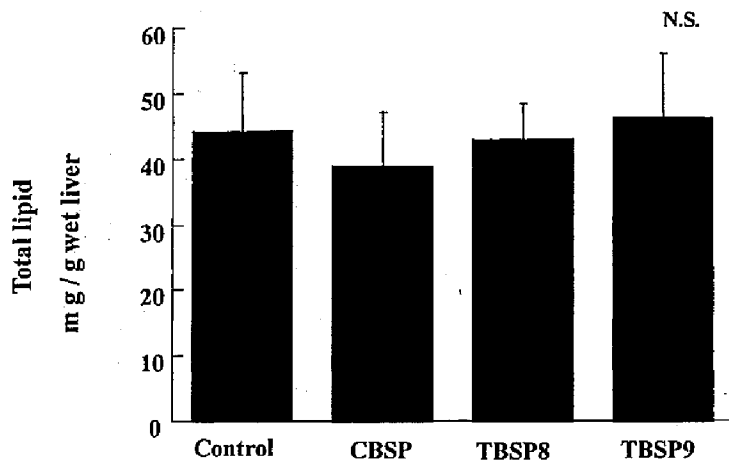


Figure 4 Hepatic total lipid concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

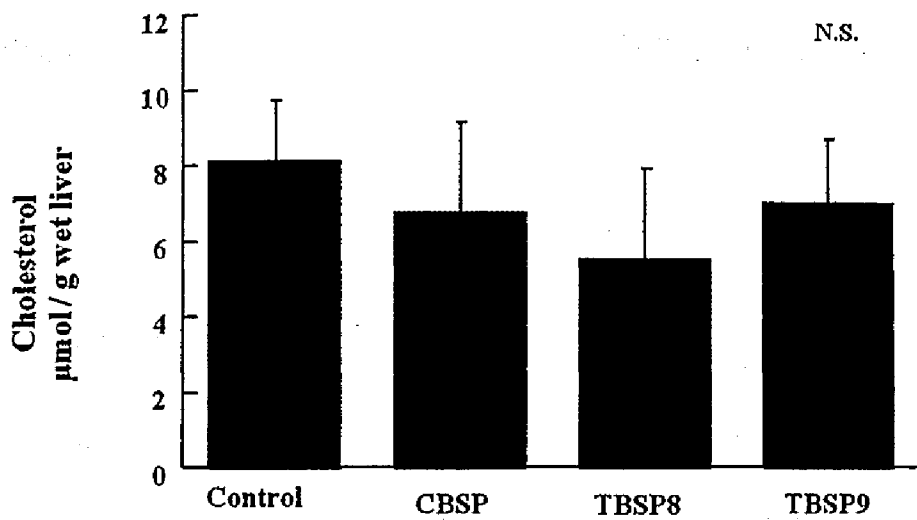


Figure 5 Hepatic cholesterol concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

低い値を示した。コレステロール量において、各群間に有意な差はみられなかった。

3.7 糞中脂質濃度 (Figure 6-9、Table 5)

糞中脂質濃度を Figure 6-9、Table 6 に示した。糞中の Total lipid 量について Figure 6 に示した。Total lipid 量において、各群間に有意な差はみられなかった。3 種類のソバスプラウト乾燥粉末摂食群において Control 群と比較して増加する傾向がみられた。糞中のコレステロール量について Figure 7 に示した。糞中コレステロール量において有意な差はみられなかった。3 種類のソバスプラウト乾燥粉末摂食群において Control 群と比較して増加する傾向がみられた。糞中のコプロスタノール量について Figure 8 に示した糞中コプロスタノール量において有意な差はみられなかった。3 種類のソバスプラウト乾燥粉末摂食群において Control 群と比較して増加する傾向がみられた。糞中のコレステロール量とコプロスタノール量を合わせた中性ステロール量を Figure 9 に示した。糞中中性ステロール量において有意な差はみられなかった。3 種類のソバスプラウト乾燥粉末摂食群において Control 群と比較して増加する傾向がみられた。

試験最終 3 日間の糞中中性ステロールと酸性ステロール量について Table 6 に示した。糞中総胆汁酸排泄量は、CBSP 群、TBSP8 群、TBSP9 群において

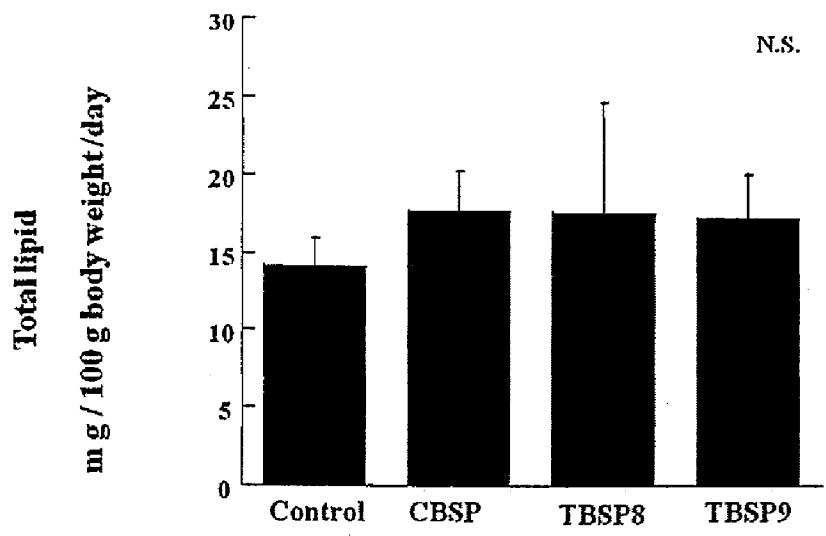


Figure 6 Fecal total lipid concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

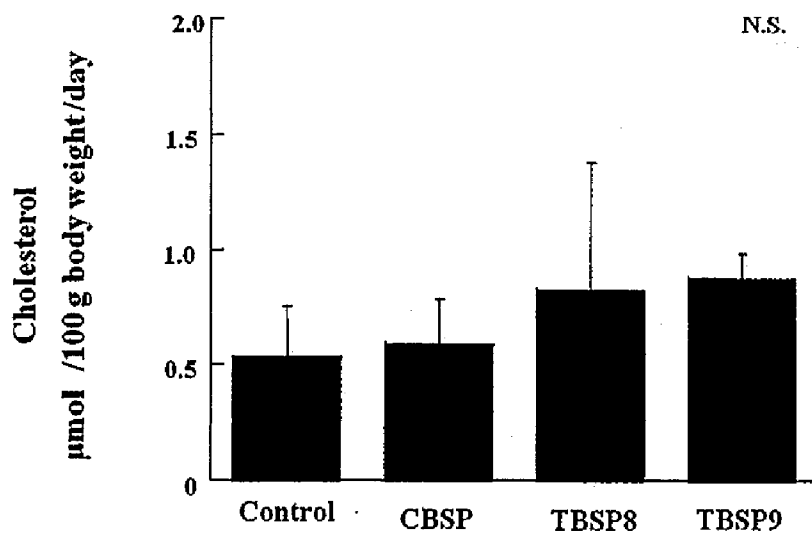


Figure 7 Fecal cholesterol concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

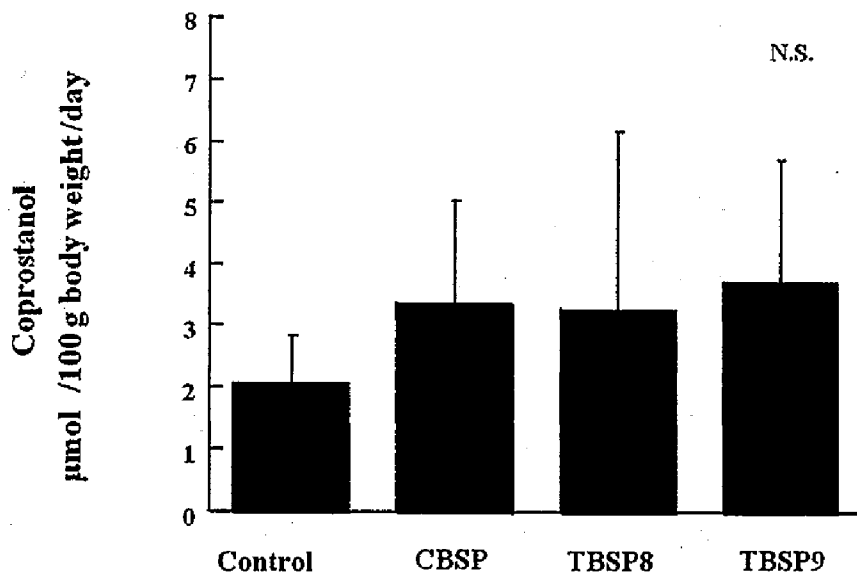


Figure 8 Fecal coprostanol concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

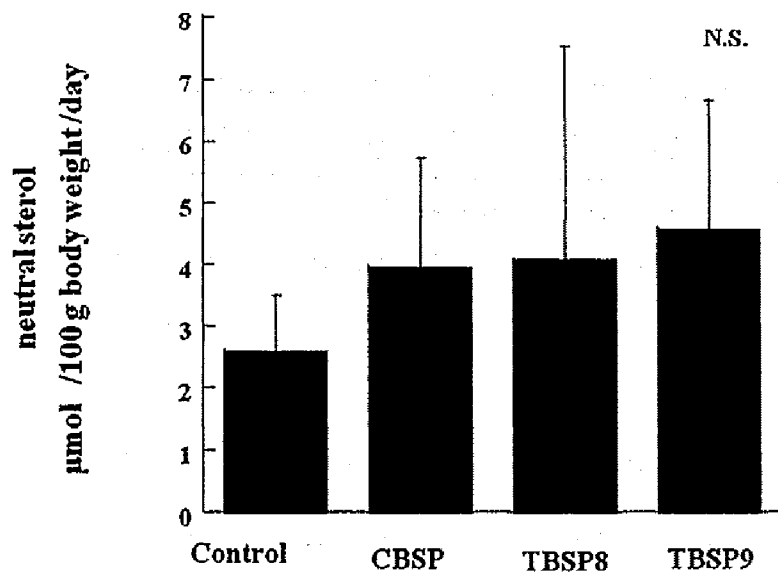


Figure 9 Fecal neutral sterol concentration in rats fed experimental diets for 4wk.

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Table 5 Fecal steroid concentrations in rats fed experimental diets for 4wk

	Control	CBSP	TBSP8	TBSP9
	<i>μmol / 100 g Body weight / day</i>			
Cholesterol	0.532 ± 0.219	0.590 ± 0.195	0.831 ± 0.548	0.882 ± 0.100
Coprostanol	2.062 ± 0.780	3.369 ± 1.666	3.265 ± 2.917	3.731 ± 1.996
Cholic acid	0.017 ± 0.012	0.033 ± 0.012	0.025 ± 0.006	0.024 ± 0.011
Deoxycholic acid	0.012 ± 0.002 ^b	0.030 ± 0.017 ^a	0.033 ± 0.001 ^a	0.030 ± 0.022 ^a
Chenodeoxycholic acid	0.005 ± 0.001 ^b	0.019 ± 0.005 ^a	0.025 ± 0.006 ^a	0.017 ± 0.010 ^a
Lithocholic acid	0.042 ± 0.008 ^b	0.091 ± 0.038 ^a	0.079 ± 0.023 ^a	0.080 ± 0.040 ^a
Total bile acid	0.075 ± 0.014^b	0.173 ± 0.068^a	0.162 ± 0.017^a	0.151 ± 0.071^a

Values are expressed as mean ± SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

Control 群と比較して有意に増加した。1 次胆汁酸であるコール酸において、Control 群と比較して、CBSP 群において 1.9 倍、TBSP8 群において 1.5 倍、TBSP9 群において 1.4 倍の上昇がみられた。同じく 1 次胆汁酸であるケノデオキシコール酸において Control 群と比較して、CBSP 群において 3.8 倍、TBSP8 群において 5 倍、TBSP9 群において 3.4 倍の有意な上昇がみられた。2 次胆汁酸であるデオキシコール酸において、Control 群と比較して CBSP 群と TBSP9 群において約 2.5 倍、TBSP8 群において 2.8 倍の有意な上昇がみられた。同じく 2 次胆汁酸であるリソコール酸において、Control 群と比較して CBSP 群において 2.2 倍、TBSP8 群、TBSP9 群において 1.9 倍の有意な上昇がみられた。

3.8 盲腸内 SCFA 濃度 (Table 6)

Table 5 にラットの盲腸内 SCFA 濃度について示した。盲腸内 酢酸量と酪酸量は Control 群と比較して 3 種類のソバスプラウト乾燥粉末摂食群で有意に増加した。CBSP 群において盲腸内プロピオン酸量は Control 群と比較して有意に増加した。盲腸内総 SCFA 量は Control 群と比較して CBSP、TBSP8、TBSP9 で有意に増加した。

Table 6 Cecal SCFA (Short chain fatty acid) concentrations and pH in rats fed experimental diets for 4 wk

	Control	CBSP	TBSP8	TBSP9
	<i>μmol / g contents</i>			
Acetic acid	12.76 ± 4.85 ^b	23.59 ± 8.79 ^a	22.73 ± 12.82 ^a	27.51 ± 8.12 ^a
Propionic acid	3.99 ± 0.93 ^b	7.36 ± 2.91 ^a	5.88 ± 3.06 ^{ab}	6.38 ± 1.87 ^{ab}
Butyric acid	1.93 ± 0.62 ^b	9.19 ± 3.77 ^a	5.98 ± 2.76 ^a	9.15 ± 3.59 ^a
Total SCFA	18.68 ± 5.60 ^b	40.14 ± 12.49 ^a	34.59 ± 17.11 ^a	43.04 ± 12.68 ^a
pH	8.10 ± 0.53	7.89 ± 0.25	7.87 ± 0.24	7.75 ± 0.24

Values are expressed as mean ± SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

3.10 肝臓における脂質代謝関連タンパク質 mRNA の発現量 (Figure 10-15)

Figure 9-14 に、肝臓における Apo B、Apo E、cholesterol 7 α hydroxylase、HMG-CoA reductase、LDL receptor、FAS の mRNA 発現量を示した。Apo B mRNA レベルにおいて CBSP 群と TBSP 群において Control 群と比較して有意に減少していた。Apo E mRNA 発現量において、各群間で有意な差はみられなかった。cholesterol 7 α hydroxylase mRNA レベルは CBSP 群、TBSP8 群、TBSP9 群において Control 群と比較して有意に増加していた。HMG-CoA reductase mRNA レベルは TBSP9 群において Control 群と比較して有意に増加していた。LDL receptor について有意な差はみられなかったが、Control 群と比較して3種類のソバスプラウト摂取群において増加する傾向がみられた。FAS mRNA レベルにおいて CBSP 群と TBSP 群において Control 群と比較して有意に減少していた。この結果から CBSP 群、TBSP8 群、TBSP9 群は肝臓の cholesterol 7 α hydroxylase mRNA が増加するため血漿コレステロールが減少すると考えられた。

第4節 考察

本研究では、ダットンソバスプラウト乾燥粉末のラットにおける血漿コレ

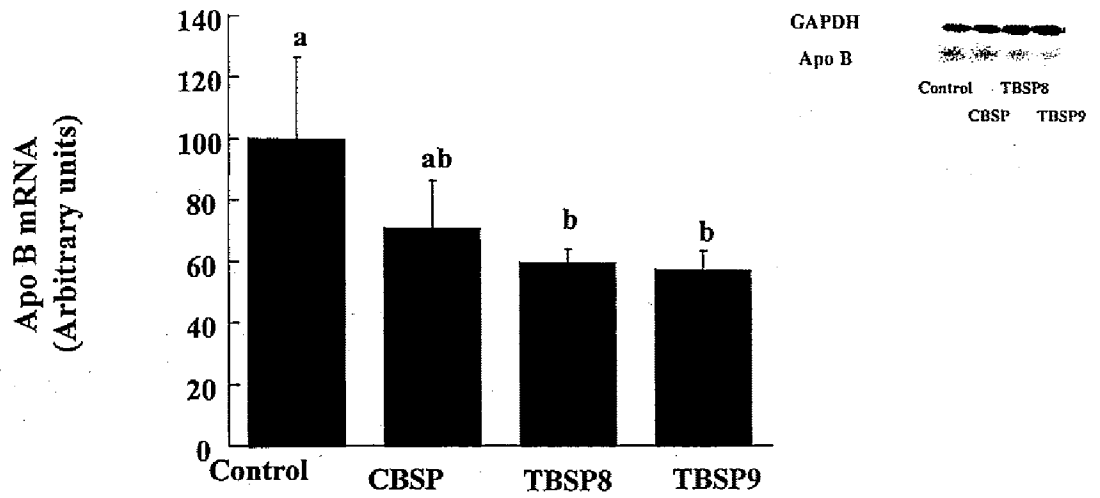


Figure 10 Hepatic Apo B mRNA level in rats fed buckwheat sprout powder diets for 4 wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

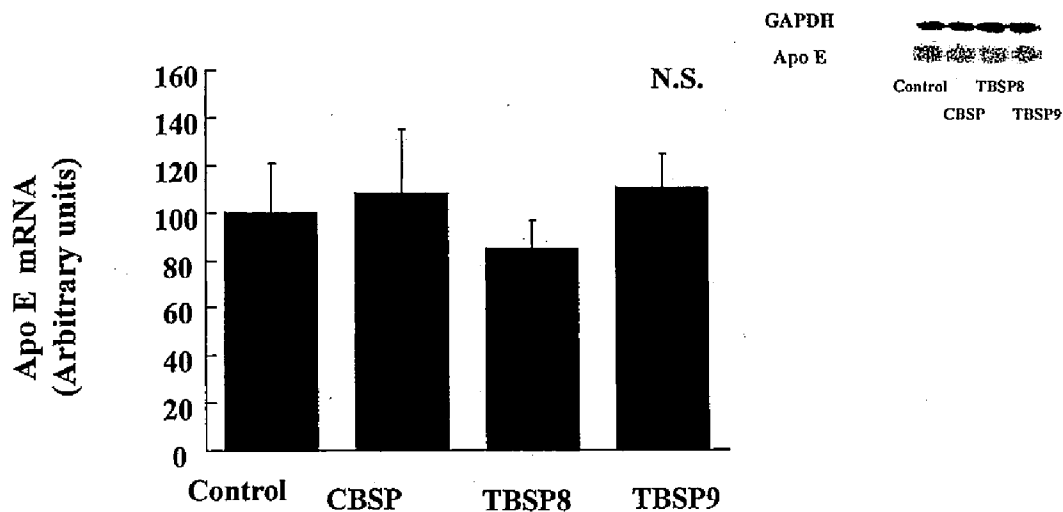


Figure 11 Hepatic Apo E mRNA level in rats fed buckwheat sprout powder diets for 4 wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

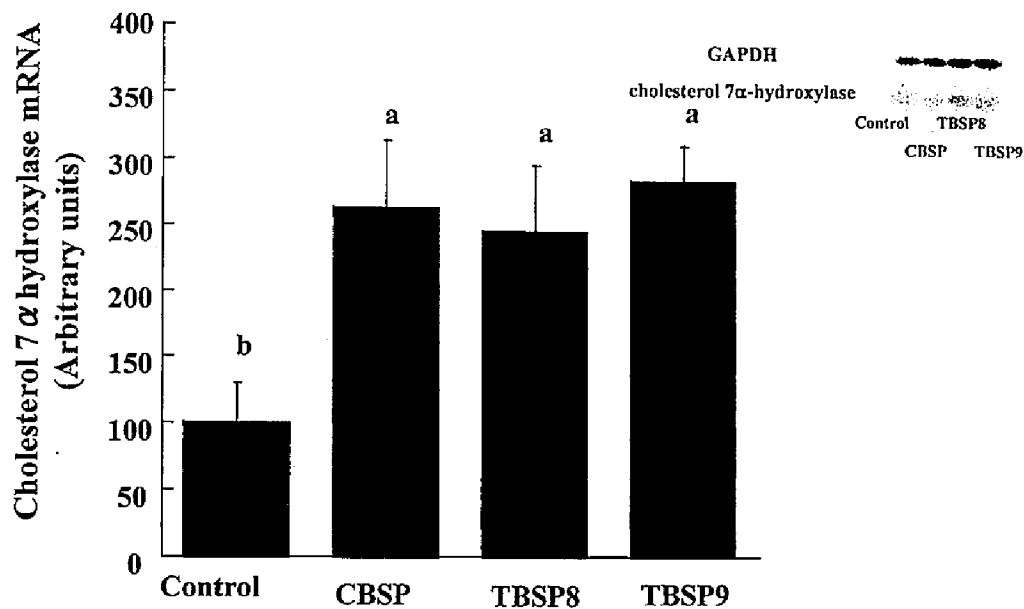


Figure 12 Hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA level in rats fed buckwheat sprout powder diets for 4 wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

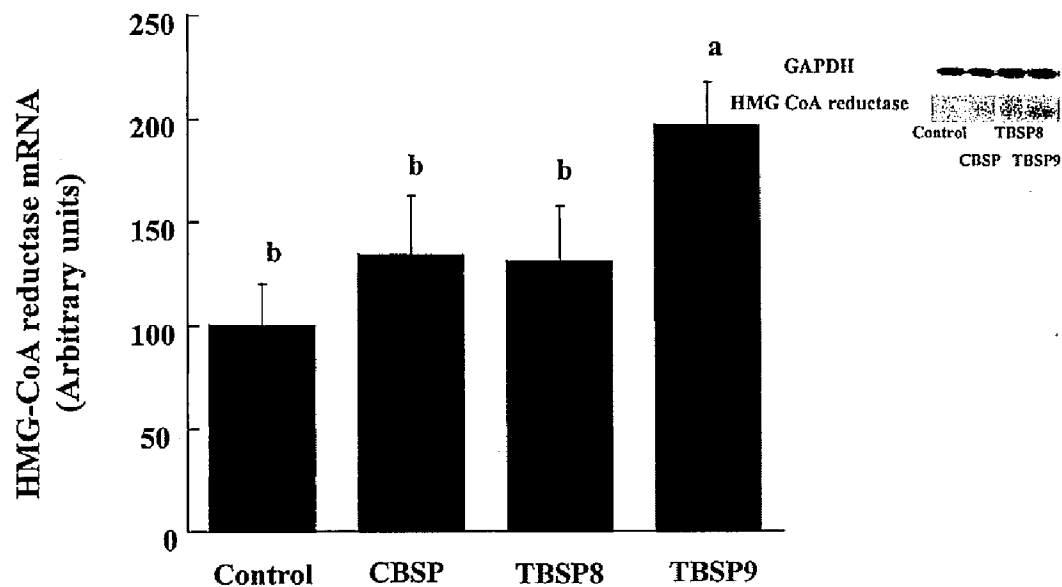


Figure 13 Hepatic HMG-CoA reductase mRNA level in rats fed buckwheat sprout powder diets for 4 wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

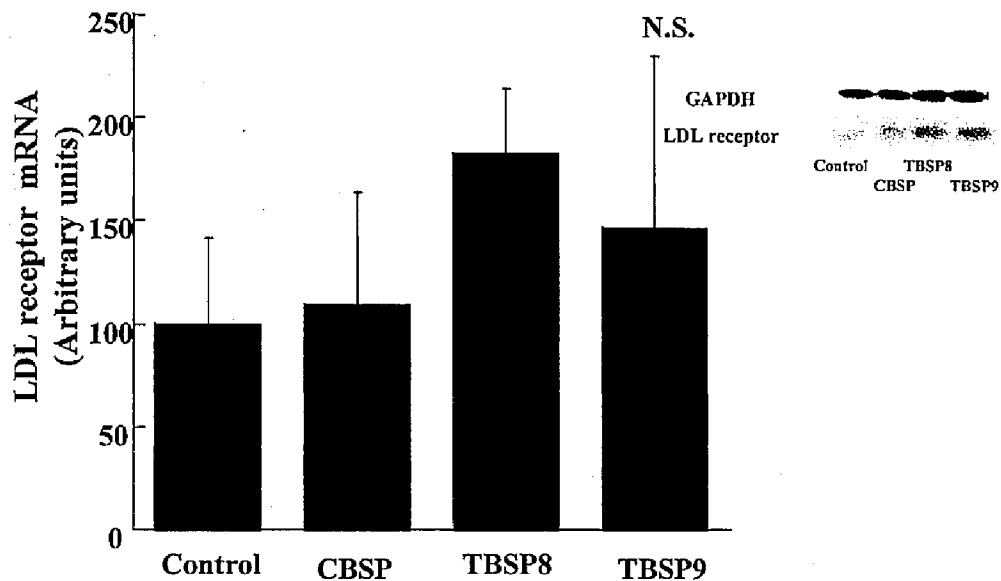


Figure 14 Hepatic LDL receptor mRNA level in rats fed buckwheat sprout powder diets for 4 wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

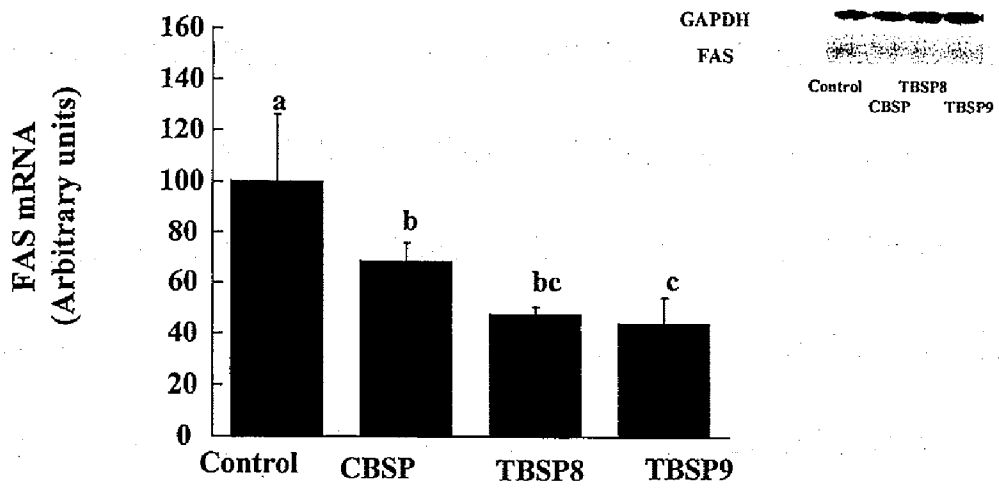


Figure 15 Hepatic fatty acid synthase (FAS) mRNA level in rats fed buckwheat sprout powder diets for 4 wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

ステロール、肝臓 mRNA レベル、糞中コレステロール排泄に及ぼす影響について研究をおこなった。Table 3 の結果から体重増加量と摂食量について食餌による変化はみられなかった。Table 3 の結果から肝臓重量、盲腸重量、副睾丸周囲脂肪量に差はみられなかった。このことからソバスプラウト乾燥粉末の摂食は、ラットの成長を阻害しないことが示唆された。血漿総コレステロール濃度は、Table 4 の結果から Control 群と比較して TBSP8 群において 18.7%、TBSP9 群において 16.1%減少した。この減少は2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末摂取群の総コレステロールのうち VLDL+IDL+LDL コレステロールと HDL コレステロールが減少したためと考えられる。

コレステロール低下作用には、肝臓でのコレステロール合成の減少、糞中へのコレステロールあるいは胆汁酸の排泄などの増加が考えられる。

食餌コレステロールは肝臓の LDL receptor 経路で代謝されることで抑制されている (32)。食餌コレステロールは、モルモットの肝臓の LDL receptor mRNA レベルを増加させた (33)。Fukushima ら (34) は、ラットにコレステロールとコール酸を負荷しない条件で、5%シュガービートファイバー添加飼料を4週間摂食させたところ、血清総コレステロール濃度と VLDL+IDL+LDL コレステロール画分濃度の低下が観察され、それには肝臓の LDL receptor の mRNA 発現量の大幅な増加が関与していると報告した。本研究において、5%ソ

バスプラウト乾燥粉末を摂食させたところ、全ての群間において、肝臓の LDL receptor mRNA に差は認められなかったため、血漿総コレステロール濃度低下作用の作用機序は異なる経路を介していると考えられた。

中性ステロールと酸性ステロールの排泄は、本研究において2種類のダットンバスプラウト乾燥粉末摂取群で有意に増加した(Table 6)。特に胆汁酸の排泄が TBSP9 群において他の群に比べ値が高かった。肝臓においてコレステロールは β 酸化を受けてコール酸とケノデオキシコール酸が生成する。これらは通常タウリンやグリシンなどとの抱合体として胆汁中に分泌される。これらは、腸内細菌により変換されデオキシコール酸やリトコール酸などの二次胆汁酸になる(35)。本実験において3種類のソバスプラウト摂食群において一次胆汁酸、二次胆汁酸ともに有意に増加した。これは、ラットにおける肝臓胆汁酸合成及び腸内細菌叢による二次胆汁酸への変換が高まったことが主な要因として考えられる。

Buhman ら(36)は、ラットにオオバコを摂取させると肝臓の cholesterol 7 α hydroxylase mRNA と糞中胆汁酸排泄量、糞中総ステロール排泄量が高まると報告している。本研究において、ソバスプラウト乾燥粉末を摂取すると Control 食と比較して、糞中胆汁酸排泄量と肝臓での胆汁酸合成律速酵素である cholesterol 7 α hydroxylase mRNA が有意に増加した(Table 6、Figure 12)。そ

して、特に2種類のダットンソバспラウト乾燥粉末において Control 食と比較して、肝臓の cholesterol 7 α hydroxylase mRNA が有意に高まった。ラットの胆汁酸は肝臓で合成された後、胆管を通じて腸管へと放出される。しかし、一次あるいは二次胆汁酸の98~99%は、腸肝循環により回腸で吸収され、門脈を経て肝臓へ運ばれる(37)。そのため、ソバспラウト乾燥粉末摂食による、糞便中胆汁酸量の増加には、腸肝循環の阻害作用が関与している可能性がある。この作用は、食物繊維の胆汁酸吸着能という性質が関与していると考えられた。食物繊維は *in vivo* でも *in vitro* においても胆汁酸を吸着することができる(38)。その結合能は酸性 pH で最も強く、pH の上昇に伴って低下する(39)。

また、肝臓でのコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA reductase の mRNA 発現量は TBSP9 群において有意に増加したことから、TBSP9 の摂食は肝臓におけるコレステロール合成を増加させる可能性がある(Figure 13)。本実験結果における mRNA 発現量の増減から、特に、TBSP9 を摂食させたラットではコレステロール代謝関連酵素の活性が変動している可能性がある。

CBSP 群、TBSP 8 群、TBSP9 群の盲腸内の総 SCFA と酪酸濃度が有意に増加した。ラットの盲腸内プロピオン酸と酪酸濃度が3種類のソバспラウト乾燥粉末摂取群において Control 群と比較して有意に高まった。盲腸内の SCFA が血漿コレステロール低下作用を有することが報告されている(40)。Annison

ら (41) は、短鎖脂肪酸のうち、盲腸で吸収された後、酢酸は胃から大腸までのトランジットタイムを早め、プロピオン酸、酪酸は腸管自体のエネルギーとなり同様に滞留時間を早めると報告している。食物繊維の中でも、特に水溶性食物繊維であるペクチンや不溶性食物繊維は大腸で短鎖脂肪酸へと資化されやすく、大腸内発酵の重要な基質となる。3種類のソバスプラウト乾燥粉末は水溶性食物繊維と不溶性食物繊維が含まれており、大腸内発酵の影響を受けやすいと考えられる。3種類のソバスプラウト乾燥粉末が大腸内細菌によって有機酸に資化されると、酢酸、プロピオン酸、酪酸の短鎖脂肪酸画分が増加することが示唆された。有機酸量と血清コレステロール濃度の間には、有意な負の相関関係があることが、ラットを用いた研究で報告されている (42)。そのため大腸内発酵産物である短鎖脂肪酸は、コレステロール代謝に、影響を与えていると示唆される。

糞中の中性ステロイド排泄量が2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末摂取群において Control 群より高まった (Table 5)。2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末がステロイドと結合して糞中ステロールの排泄が高まったと考えられる。さらに、3種類のソバスプラウト乾燥粉末中のタンパク質や食物繊維が腸内発酵を起こしたと考えられ、その量の差からコレステロール代謝に違いが出たと示唆される。食物繊維、とくに不溶性食物繊維は腸内でステロールの

吸収を抑制してコレステロール低下作用を引き起こす (43-45)。不溶性食物繊維と水溶性食物繊維は腸内でのトランジットタイムを早める。

本研究において、2種類のダットンソバスプラウトを4週間摂取することで、血漿総コレステロールが有意に減少した。コレステロール低下作用はCBSP群よりTBSP8群、TBSP9群の方が大きかった (Table 4)。2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末の摂取は、脂肪酸合成酵素の肝臓 FAS mRNA 発現量を抑制した (Figure 15)。TBSP 8群、TBSP9群は、肝臓の脂肪合成を減少させることにより血漿 TG の上昇を抑制したと考えられる。CBSP群、TBSP8群、TBSP9群は糞中胆汁酸排泄量を有意に増加させた。その結果は、コレステロールから肝臓胆汁酸合成を刺激することにより、CBSP群、TBSP8群、TBSP9群の血漿総コレステロールを減少させたと考えられる。ソバスプラウト乾燥粉末は胆汁酸排泄を有意に高めており、3種類のソバスプラウト乾燥粉末に含まれるタンパク質や食物繊維などが、胆汁酸との吸着をおこしたと考えられる。Kayashitaら (25) は、ソバタンパク質の消化性の低さが胆汁酸との吸着の可能性があると示唆している。2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末摂取群において Apo B mRNA 発現量が有意に低下していた (Figure 10)。Apo B はキロミクロン、VLDL、IDL、LDL の主要なアポリポタンパク質であるため、これらの mRNA 発現量の低下は、肝臓から生体内へのリポタンパク質の放出を低

下させた可能性がある。本研究においてラットはソバスプラウト食で中性ステロイドの排泄に影響を及ぼすことが示唆された。Taniguchiら(75)は、貝割れ大根のスプラウトがラットにおいてコレステロール低下作用があるという報告をした。そのコレステロール低下作用は、スプラウト粉末の食物繊維量によるものだと示唆している。本研究においてもソバスプラウトに含まれる食物繊維の量が脂質代謝に影響を及ぼした可能性がある。ルチンが脂質代謝低下作用と心臓保護効果を有するといういくつかの報告がある(76-78)。本研究において2種類のダッタンソバスプラウト乾燥粉末の方が普通ソバスプラウト乾燥粉末より血漿コレステロール濃度の低下作用が高かった。Santosら(76)は、体重1kgあたり5mgのルチンの添加で血中コレステロールが有意に低下したと報告した。Stanleyら(78)は、ルチンを経口投与した場合、ストレプトゾトシン誘発の糖尿病ラットのコレステロールとTGを低下させたと報告した。これらの結果からソバスプラウト乾燥粉末に含まれるソバタンパク質、食物繊維、ルチンなどが、特にダッタンソバスプラウト乾燥粉末群において有意に脂質代謝に効果があったと考えられる。

結論として、2種類のダッタンソバスプラウト乾燥粉末は、Control食のラットと比較して明白な作用を持つことがわかった。2種類のダッタンソバスプラウト乾燥粉末摂取により、糞中の胆汁酸排泄の増加、血漿総コレステロールの

減少作用が明らかとなった。それは、2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末に含まれる食物繊維、タンパク質、ルチンなどの作用によるものと考えられる。2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末摂取による血漿総コレステロール低下作用は、cholesterol 7 α hydroxylase mRNA の発現増加、SCFA による糞中ステロイド排泄促進作用によるものと考えられる。これらの結果から2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末は血漿と肝臓の脂質代謝に有益な効果を持つことが明らかとなった。

第1節 緒論

日本における三大死因は、ガン（悪性新生物）、心疾患、脳血管疾患であり、この傾向はここ数年変わっていない（46）。これらの疾病の原因には生活習慣や遺伝的なものなど、様々考えられているが、近年それらの一つに挙げられているものに、フリーラジカルがある。フリーラジカルとは、酸化や還元反応において、物質間での電子のやりとりにより生じた最外殻に不安定な不対電子を持つ分子を指す。フリーラジカルは、薬物やストレスなどで過剰に生体内に生成され、細胞膜を構成する脂質や、たんぱく質、遺伝子などに作用し、数々の疾病や老化を引き起こしている。現在、このフリーラジカルの生体に対する影響を防御するための物質について、研究が進められている。それらはまとめて抗酸化物質といわれており、生体内に存在するものや、生体外から取り入れるものがある。

抗酸化物質にはその働きによって、①フリーラジカル、活性酸素の生成を抑制する予防的抗酸化物質、②ラジカルを捕捉して連鎖開始反応を抑制し、また連鎖成長反応を断つラジカル捕捉型抗酸化物質、③損傷した膜脂質、たんぱく

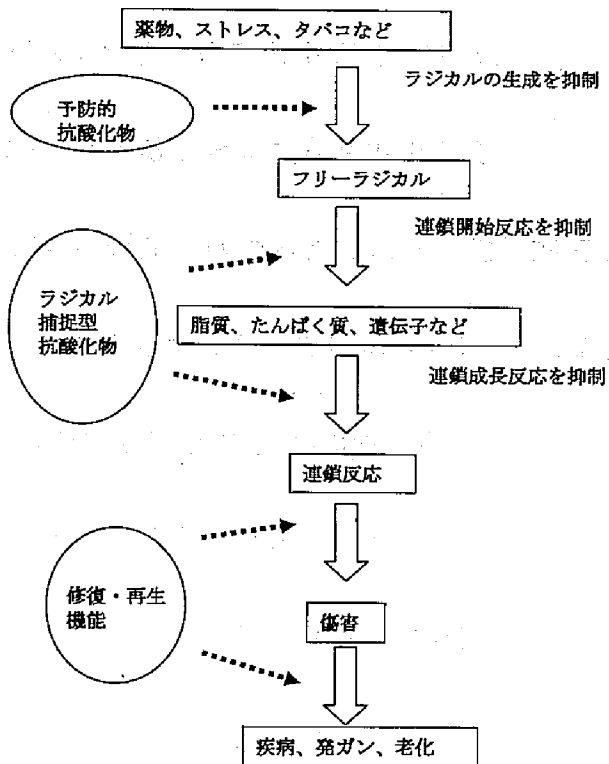


Figure 16 protection system of free radicals

質、遺伝子の修復、再生をする修復・再生機能に分類できる(47-48) (Figure 16)。

本研究では、ソバスプラウトのアセトアミノフェン（以下 AAP）誘発肝毒性に対する影響について調べることを主な目的とした。フェノール性化合物の抗酸化力については様々な研究が進められており、生体内でラジカル捕捉型抗酸化物質として働くことが明らかになっている（49）。特にフラボノイドはフリーラジカルによる LDL をはじめとする生体内の脂質過酸化反応を抑制することからソバスプラウトに含まれるポリフェノールがこのような作用をもつと考えた。今回の実験では、生体内のフリーラジカル発生モデルに、AAP の長期投与による薬物性慢性肝障害モデルラットを用いた。

AAP は比較的安全な解熱鎮痛剤として広く使用されている。適量の摂取では、肝臓で硫酸やグルクロン酸と抱合体を作り、無毒化され、排泄される。しかし、過剰量を摂取すると、その経路では間に合わず、薬物代謝酵素の影響を受け、反応性に富んだ活性中間体となる。これがフリーラジカルとしての働きを持ち、肝細胞内の脂質やたんぱく質と結合して肝障害を引き起こす（50-51）。肝臓内には、この活性中間体に対する抗酸化物質である、還元型グルタチオン（以下 GSH）が存在している。この GSH は活性中間体と抱合体を形成し、メルカプツール酸として無毒化後、排泄される(Figure 17)。生体の持つ抗酸化酵素の他にも、食物に含まれる抗酸化物質の活性酸素毒防御作用の重要性が知られてい

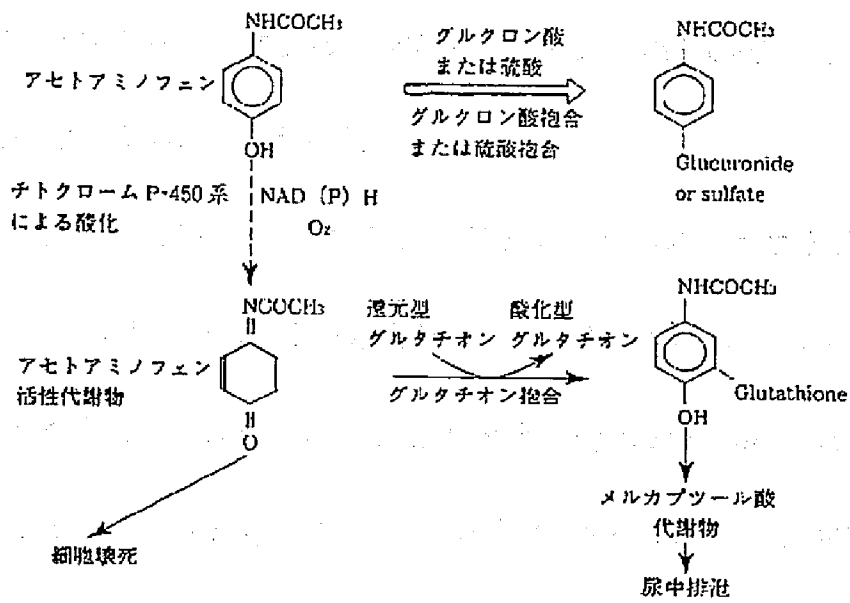


Figure 17 metabolic pathway of acetaminophen

る。そこでソバスプラウトに含まれるルチンに注目し、AAP 誘発の薬物性肝障害に対する抗酸化メカニズムを調べた。

近年、北海道農業研究センターで新しいダツタンソバスプラウト乾燥粉末 (Hokkai 8 号、Hokkai 9 号) が栽培された。世界中で 3 種類のソバが存在する。その中の 2 種類を実験に用いた。普通ソバ (*Fagopyrum esculentum*) とダツタンソバ (*Fagopyrum tataricum*) である。ルチンはソバにおいて主要な化合物でケルセチンの配糖体であり、薬理効果を持っている (Figure 1)。ルチンはビタミンのように必須栄養素ではないが、ヒトの健康に有益な効果を持つ (52)。フラボノイドの抗酸化能は、B 環のカテコール構造が他の水酸基に比べて圧倒的に電子給与性が高い。そのため、一般にフリーラジカル捕捉は、フェノール性水酸基の電子給与性に由来している。また、フラボノイドの抗酸化活性は、ラジカル発生に関与する遷移金属イオン (鉄、銅など) のキレート作用から説明できる場合もあるが、カテコール構造にもまた強いキレート作用があることが明らかとなっている (53)。

生体はフリーラジカルである活性酸素種 (reactive oxygen species) に対し、活性酸素捕捉消去や障害発生部位の修復などの防御機構を持つ。活性酸素の捕捉消去に関わる抗酸化酵素に SOD がある。SOD は細胞内 SOD と細胞外 SOD を持ち、細胞内 SOD には、補欠分子としてマンガンを含むもの (Mn-SOD) と

銅および亜鉛を含むもの（Cu, Zn-SOD）の2種類がある。Mn-SOD は主にミトコンドリアに、Cu, Zn-SOD は主に細胞質に存在する。

近年、いくつかの報告では、植物由来の自然の抗酸化物質はフリーラジカルを介在した肝毒性を緩和するとある(54-56)。Han らは、4週間飼育のラットの肝臓においてアズキの抽出物が AAP 誘発の肝毒性を GSH 経由の抗酸化、解毒システムにおいて保護作用があったと報告している (57)。AAP による酸化ストレスは、フリーラジカルによる脂質、核酸、タンパク質などの生体構成成分への攻撃変性を引き起こしてしまう。ソバスプラウトに含まれる抗酸化能をもつルチンなどのポリフェノールがどのようなメカニズムで抗酸化作用を発揮するか調べた研究はない。本研究において、ソバスプラウト乾燥粉末がラットにおけるアセトアミノフェン誘発の肝障害をどのように抑えるかを目的とした。

第2節 実験材料および実験方法

ソバスプラウトの栽培、ルチン濃度の測定、食物繊維と微量栄養素の測定、実験動物および飼育条件に関しては第2章 第2節と同じ

2.1 実験食

本実験では、基本食として炭水化物源を α 化コーンスターチとした。AIN-93G (66) に準じて配合したミネラル混合物、ビタミン混合物を使用した 20%カゼイン、5%セルロース添加食を基本飼料とし、本実験の Control とした。(Table 7)。ソバスプラウト添加食群はコーンスターチと置換して 5%添加した。さらに、各群にアセトアミノフェンを 1%添加した。実験食は、酸化防止のため -30°C で保存した。

2.2 生化学的検査

血漿中の血漿 alanine aminotransferase (ALT) 活性、aspartate aminotransferase activity (AST) 活性の測定はドライケム (FUJI FILM、3500) を用いて、酵素法により測定した。

肝臓中の全脂質の抽出、メチルエステル誘導体の調製、ケイ酸薄層クロマトグラフィー (TLC) による分画、中性ステロールアセテート誘導体の調製、ガスクロマトグラフィー (GLC) による中性ステロールの定量分析、肝臓からの RNA 抽出、RNA 溶液中の核酸およびタンパク質濃度の決定、RNA 試料中の DNA 分解、逆転写 (RT) に関しては第 2 章 第 2 節と同じ

Table 7 Composition of experimental diets

Component	Control + AAP	C BSP + AAP	Hokkai 8 + AAP	Hokkai 9 + AAP
	(g / kg diet)			
corn starch	391.5	341.5	341.5	341.5
milk casein	200	200	200	200
α -corn starch	132	132	132	132
sucrose	100	100	100	100
soy bean oil	70	70	70	70
cellulose	50	50	50	50
mineral mix ¹⁾	35	35	35	35
vitamin mix ²⁾	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3
choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
TBHQ mix	1	1	1	1
AAP	10	10	10	10
Common Buckwheat	-	50	-	-
Tartary Buckwheat 8	-	-	50	-
Tartary Buckwheat 9	-	-	-	50

¹AIN-93G mineral mixture (AIN 1993) (28)

²AIN-93G Vitamin mixture (AIN 1993) (28)

2.3 ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

合成した cDNA 溶液 1 μ l を 0.5ml の PCR チューブに移し取り、500mMKCl、15mM MgCl₂、100mM Tris-HCl(pH 8.3) からなる PCR 緩衝液を 5 μ l、dNTP mixture を 4 μ l、EX-Taq ポリメラーゼ (TaKaRa, Otsu, Japan) を 1.25U と 0.1mM の Upper primer および Lower primer を 0.25 μ l ずつ加え、滅菌蒸留水で 50 μ l にメスアップした。プライマーは、GAPDH プライマー (Upper primer, 5' -GCCATCAACGACCCCTTCATT-3' ; Lower primer, 5' -CGCCTGCTTCACCACCTTCTT-3'), GSH reductase プライマー (Upper primer, 5' -GCCGCAGCGTTATTGTGGGTG-3' ; Lower primer, 5' -CGATAGGCGGGTGGCTGAAGAC-3'), Mn-SOD プライマー (Upper primer, 5' -CGCTGTCACTGTCATCATAAG-3' ; Lower primer, 5' -GTCCGGTGCAGGGCGTCATTC-3'), Cu, Zn-SOD プライマー (Upper primer, 5' -GTCCGGTGCAGGGCGTCATTC-3' ; Lower primer, 5' -CAATCACACCACAAGCCAAGC-3'), の 4 種類を用いた。サーマルサイクラー (PTC-100, MJ Research INC.) の温度条件は、最初のサイクルが 94°C で 3 分間 DNA の解離、60°C で 1 分間プライマーとのアニーリング、72°C で 2 分間 DNA 鎖の伸長を行った。2 サイクル目以降は、DNA の解離を 94°C で 1 分間とし、最後のサイクルは DNA 鎖の伸長を 72°C で 10 分間行った。増幅は 30

サイクル行い、増幅後は-20°Cで保存した。以上の操作は全て滅菌処理した器具を用いて行った。

増幅 DNA 断片のアガロースゲル電気泳動、増幅 DNA 断片のナイロンメンブランへの転写に関しては第 2 章 第 2 節と同じ

2.4 ハイブリダイゼーション

紫外線固定した膜を 2×SSC 中にて約 5 分間振とうし、20×SSC 塩を洗い落とした。50% Formamide, 5×SSC, 2% Blocking reagent (Boehringer)、0.1% Na sarkosyl、0.02% SDS の hybridization buffer はハイブリダイゼーションオーブン (MICRO-4HYBRIDIZATION OVEN ; Hybaid, Teddington, U.K.) 中にて温めてから使用した。この hybridization buffer 中に膜を移し、42°Cで 1 時間以上プレハイブリダイズを行った。プローブには、DIG により 3' -tailing label した GAPDH プローブ (5' -

-TGATGACCAGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACTGTGCCGTTGAACTTGCCGTGGG-3')、GSH reductase プローブ (5' -ACCACATGGAGTTCCAGCCCGATGAGGTCTTCTTTACTTCCTTAACCTGTGAG -3')、Mn-SOD プローブ (5' -TGTGGGCTGAGGAGGATGATGAGGAGTGGG-3')

-CAGTCAGGAGCCTAGCTTGGGTCTGTTGATTTGTTTCAGTAGTGAGGTA
GACCC (-3')、Cu, Zn-SOD プローブ (5'
-AGCAGCCACATTGCCAGGTCTCCAACATGCCTCTCTTCATCCGCTGG
ACCGCC -3')、を用いた。ハイブリダイゼーションボトルにプローブを 10pmol
加え、良く混合してハイブリダイゼーションを開始した。42°Cで 16-20 時間の
ハイブリダイゼーションの後に、膜を免疫検出に供した。以上の操作は全て滅
菌処理した器具を用いて行った。

免疫検出、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸の定量、糞便中の胆汁酸の抽出、胆汁
酸のメチルエステルアセテート誘導体の調整、GLC による胆汁酸の定量に関し
ては第 2 章 第 2 節と同じ

2.5 グルタチオン濃度の測定

o-Phtalaldehyde をもちいた Cohn と Lye の方法 (58) に従い、蛍光光度計
で測定した。肝臓を 200mg 秤量し、除タンパク剤として 5%トリクロロ酢酸を
含む 10mM EDTA 4.5ml を加えホモジナイズした。800×g で 10 分間遠心分離
し、上澄みを 1.5ml エッペンチューブに移し取った。肝臓からの上澄み 100ml
に、10mM EDTA と 1% *o*-Phtalaldehyde (mg / mL MeOH) を含む 0.4mM

Tris-HCl buffer (pH 8.9) 5mLを加え5分反応させた後、342nmの励起と428nmの発光における蛍光強度を F-4000 分光蛍光光度計 (Hitachi, Ltd, Tokyo, Japan) で測定した。肝臓グルタチオン濃度はグルタチオンスタンダード溶液を検量線として求めた。

2.6 タンパク質の定量

Lowry 法 (59) により定量した。フェノール試薬とタンパク質とが結合する際の吸光度の変化を測定する。20 μ lのサンプル溶液に2% Na₂CO₃含有0.1 M NaOHと0.5% CuSO₄含有1% クエン酸 Naを50:1で混合したものを400 μ l添加し15分室温で静置する。1 N フェノール試薬を40 μ l 加えよく混和して、分光光度計を用いて、750 nmで吸光度を測定した。アルブミンスタンダードの吸光度から描いた標準直線から、タンパク質濃度を求めた。

2.7 肝臓における過酸化脂質濃度の測定

TBA法により測定を行った。200mgの肝臓を秤量し、0.2N KCl 1.8mLを加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートを行った。試験管に試料ホモジネート 200 μ l、0.8% SDS (Sodium dodecyl sulfate ; SDS) 200 μ Lを加えよく攪拌し、さらに1.5mL 20% Acetate solution (pH 3.5)、1.5mL 0.5% TBA

(TBA;2-thiobarbituric acid, Sigma T-5500) を加え、密栓して攪拌した。その後、90°Cで60分間水浴し、氷中で冷却後、n-ブタノール 5mLを加えて強く攪拌した。1000×g、10分間で遠心分離を行い、上澄みを励起 533nm と発光 515nm における蛍光強度を F-4000 分光蛍光光度計で測定した。過酸化脂質濃度の計算は標準液 5nmol TEP(1,1,3,3-Tetraerh oxyptopane) の吸光度に対する相対吸光度比（一点検量法）により求めた。

2.8 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示し、one-way ANOVA の後、Duncan's multiple range test で有意差の検定を行った。なお、いずれの検定も有意水準は5%とした。Hepatic GSH reductase mRNA、Mn-SOD mRNA、Cu, Zn-SOD mRNA 発現量に関して測定値は内部標準である個々の GAPDH mRNA 発現量の値により補正し、対照区の平均値を100とした相対比で表した。

第3節 結果

3.1 摂食量、体重、体重増加量、糞重量に及ぼす影響 (Table 8)

摂食量、体重、体重増加量、糞重量を Table 8 に示した。摂食量において各群

に有意な差はみられなかった。最終体重は Control AAP 群において 3 種類のソバプラウト乾燥粉末摂取群と比較して有意に低下した (Table 8)。糞重量は 3 種類のソバプラウト乾燥粉末摂取群において Control AAP 群と比較して有意に増加した。

3.2 臓器重量に及ぼす影響 (Table 8)

臓器重量を Table 8 に示した。肝臓重量は、各群において有意な差はみられなかった。盲腸重量、副睾丸周囲脂肪量に差はみられなかった。(Table 8)。

3.3 血漿脂質濃度 (Figure 18-19)

血漿脂質濃度を Figure 18-19 に示した。試験期間中、4 週目において Control AAP 群において 3 種類のソバプラウト乾燥粉末群と比較して、血漿総コレステロールが有意に低下した (Figure 18)。血漿 TG において有意な差はみられなかった (Figure 19)。

3.4 血漿 ALT 活性、AST 活性 (Table 9)

血漿 ALT 活性、AST 活性 を Table 9 に示した。Control AAP 群において、ALT 活性が 3 種類のソバプラウト群と比較して有意に増加した。Table 9 に、

Table 8

Body weight gain, feed intake, liver weight, cecum weight, epididyma adipose tissue and fecal weight in rats fed experimental diets for 4 wk

	Dietary group			
	Control + AAP	CBS \dot{P} + AAP	TBSP8 + AAP	TBSP9 + AAP
Initial body weight (g)	175 \pm 5	174 \pm 4	175 \pm 5	172 \pm 7
Final body weight (g)	235 \pm 18 ^b	255 \pm 9 ^a	251 \pm 7 ^a	247 \pm 8 ^a
Body weight gain (g/4wk)	50 \pm 18 ^b	70 \pm 9 ^a	64 \pm 7 ^a	64 \pm 7 ^a
Feed intake (g/4wk)	392 \pm 32	380 \pm 25	400 \pm 25	371 \pm 14
Liver weight (wt g/100g b.w.)	3.7 \pm 0.2	3.8 \pm 0.4	3.7 \pm 0.2	3.6 \pm 0.3
Cecum weight (wt g/100g b.w.)	1.9 \pm 0.5	1.8 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2	1.6 \pm 0.3
Epididyma adipose tissue weight (wt g/100g b.w.)	1.7 \pm 0.6	2.0 \pm 0.9	1.4 \pm 0.6	1.6 \pm 0.4
Fecal weight (wt g)	2.4 \pm 0.6 ^b	4.2 \pm 0.6 ^a	3.6 \pm 0.8 ^a	4.1 \pm 0.8 ^a

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

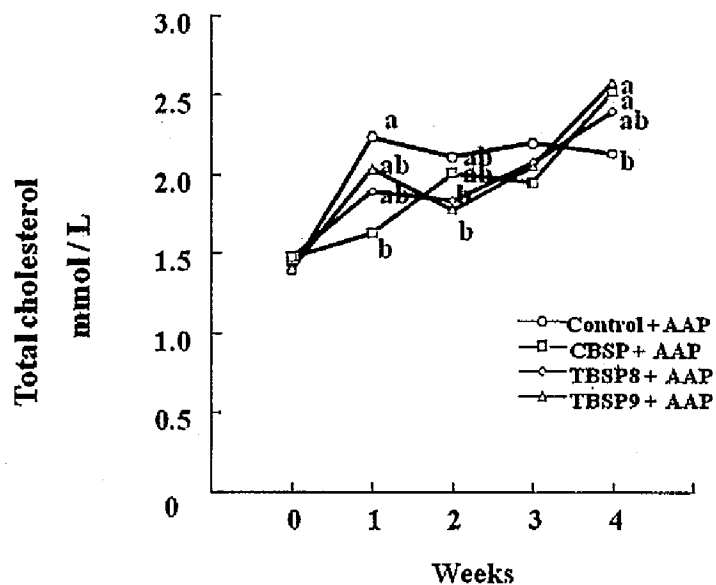


Figure 18 Plasma total cholesterol concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

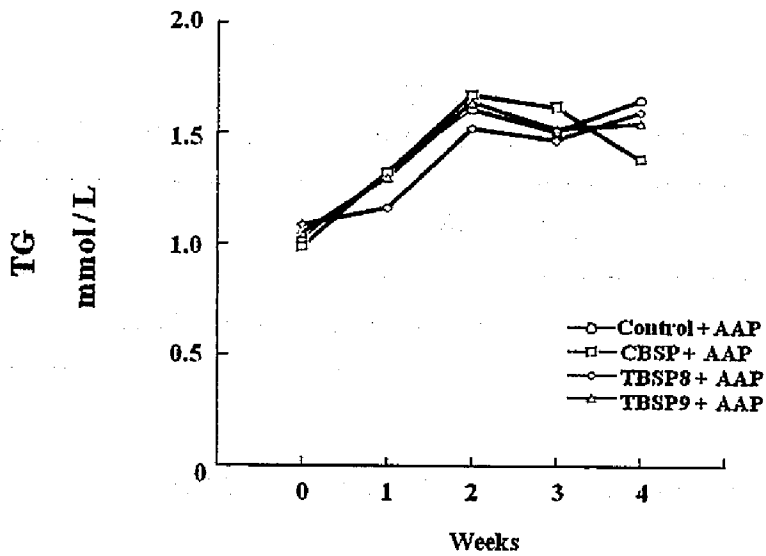


Figure 19 Plasma TG concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Table 9
Plasma ALT and AST concentration in rats fed experimental diets for 4 wk

	Dietary group			
	Control + AAP	CBSP + AAP	TBSP8 + AAP	TBSP9 + AAP
ALT (IU/L)	24.6 ± 1.3 ^a	17.6 ± 1.2 ^b	18.2 ± 1.5 ^b	18.8 ± 1.7 ^b
AST (IU/L)	65.8 ± 3.5	59.3 ± 1.3	60.2 ± 4.5	59.0 ± 1.4

Values are expressed as mean ± SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

血漿 AST 活性を示した。Control AAP 群において AST 活性が、3 種類のソバプラウト群と比較して増加した。

3.5 肝臓脂質濃度 (Figure 20-21)

肝臓中の Total lipid 量、コレステロール量について Figure 20-21 に示した。Total lipid 量において、各群間に有意な差はみられなかった。コレステロール量において、各群間に有意な差はみられなかった。

3.6 肝臓 GSH 濃度、TBARS 濃度(Figure 22-23)

肝臓 GSH 濃度、TBARS 濃度を Figure 22-23 に示した。肝臓 GSH 濃度は、Control AAP 群と比較して CBSP AAP、TBSP8 AAP 群が有意に高い値を示した。肝臓 TBARS 濃度について Figure 23 に示した。肝臓 TBARS 濃度において TBSP8 AAP 群と比較して CBSP AAP 群が最も低い値を示した。

3.10 Hepatic GSH reductase mRNA、Mn-SOD mRNA、Cu, Zn-SOD mRNA 発現量 (Figure 24-26)

肝臓における GSH reductase、Mn-SOD、Cu,Zn-SOD の mRNA 発現量を Figure 24-26 に示した。GSH reductase mRNA 発現量は TBSP9 AAP 群にお

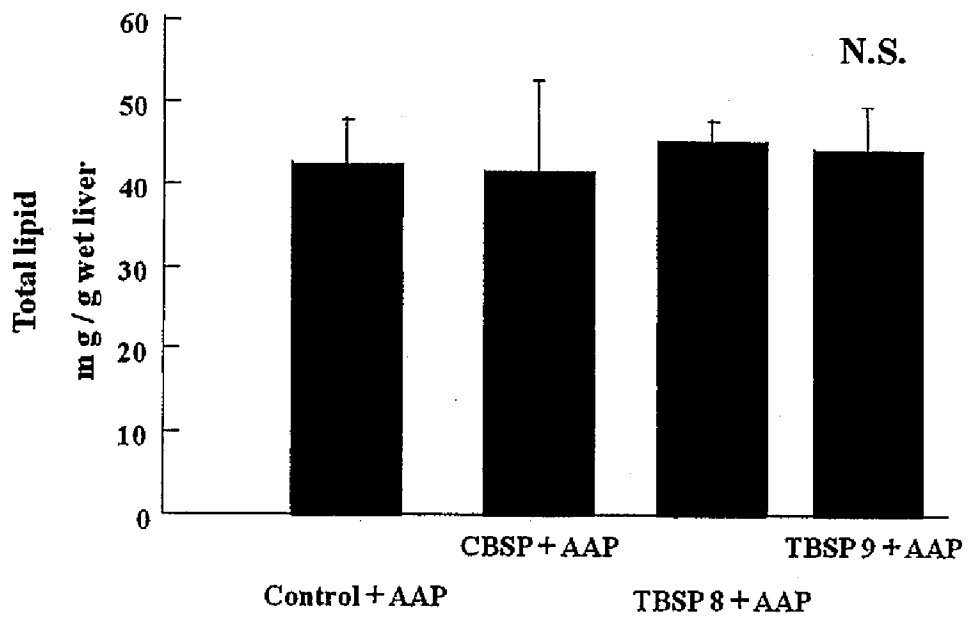


Figure 20 Hepatic total lipid concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

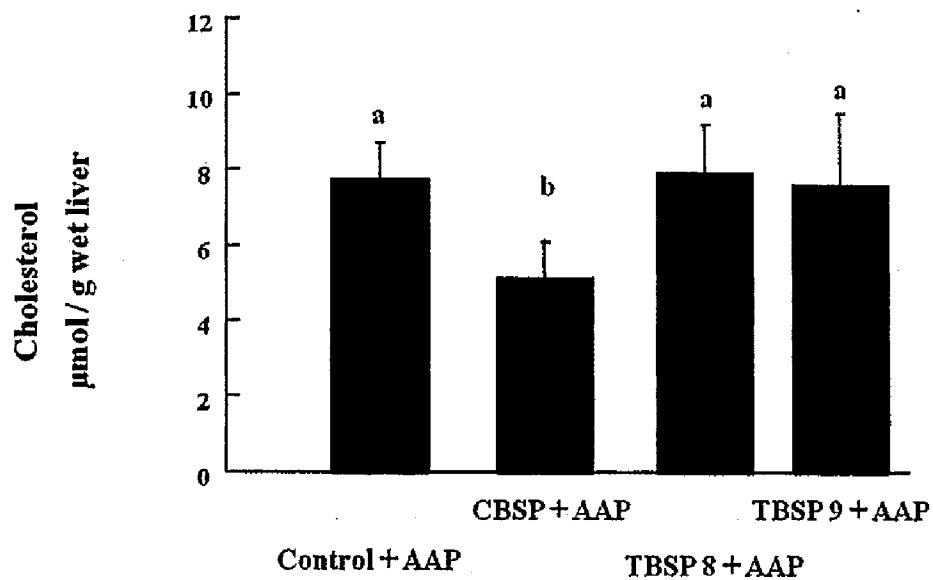


Figure 21 Hepatic cholesterol concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

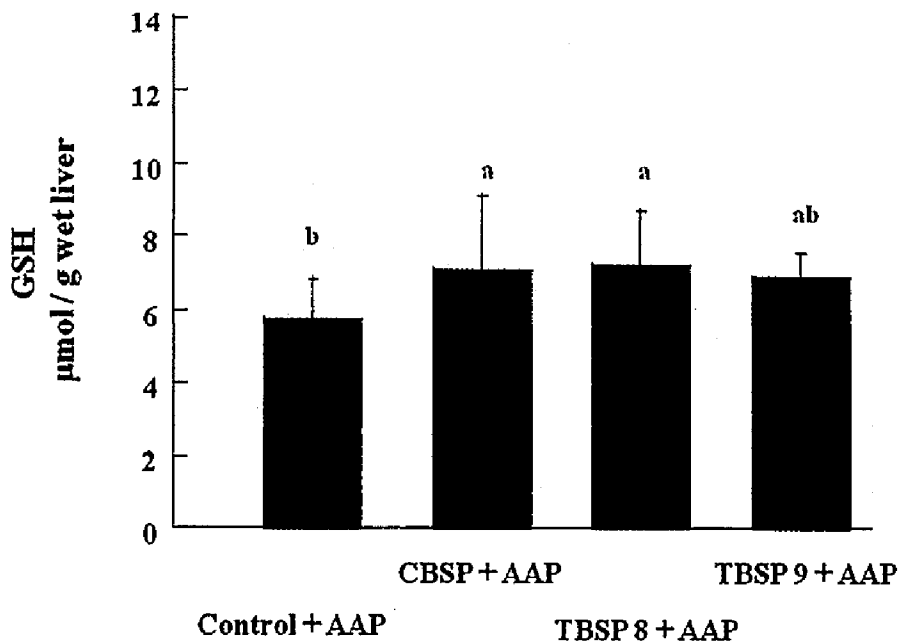


Figure 22 Hepatic GSH concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

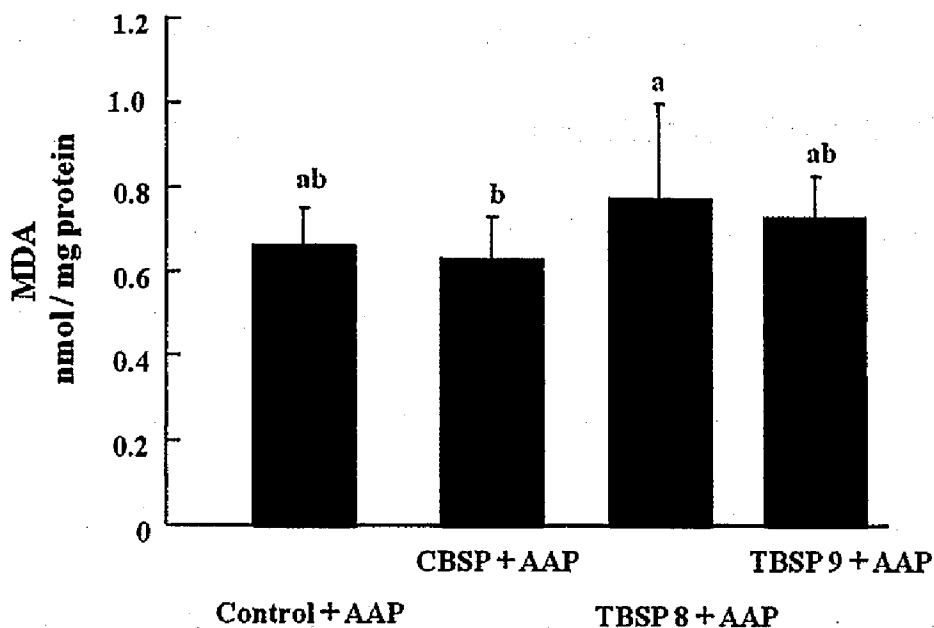


Figure 23 Hepatic TBARS concentration in rats fed experimental diets for 4wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

いて Control AAP 群と比較して有意に増加した。CBSP AAP 群、TBSP8 AAP 群において、有意な差はみられなかったが、Control AAP 群と比較して増加傾向がみられた。Mn-SOD mRNA 発現量は、TBSP8 AAP 群において Control AAP 群と比較して有意に増加した。CBSP AAP 群、TBSP9 AAP 群において、有意な差はみられなかったが、Control AAP 群と比較して増加傾向がみられた。Cu,Zn-SOD mRNA 発現量は、CBSP AAP 群において Control AAP 群と比較して有意に増加した。2 種類のダットンソバ乾燥粉末摂取群において、有意な差はみられなかったが、Control AAP 群と比較して増加傾向がみられた。

第4節 考察

アセトアミノフェンの肝毒性には、様々な種類がある (60)。ラットの肝臓におけるアセトアミノフェンの毒性は肝臓のネクロシスを引き起こす (61)。本研究では、ラットにアセトアミノフェンを 1.0 g/100 g の量で 4 週間摂食させ肝障害を引き起こした。血漿 ALT 活性が Control AAP 群で 3 種類のソバスプラウト乾燥粉末摂取群と比較して有意に上昇した。Control AAP 群と比較して、ALT 活性、AST 活性が低下しているため 3 種類のソバスプラウト乾燥粉末摂取群はアセトアミノフェンから肝臓を保護していることが示唆された。ALT は肝臓に

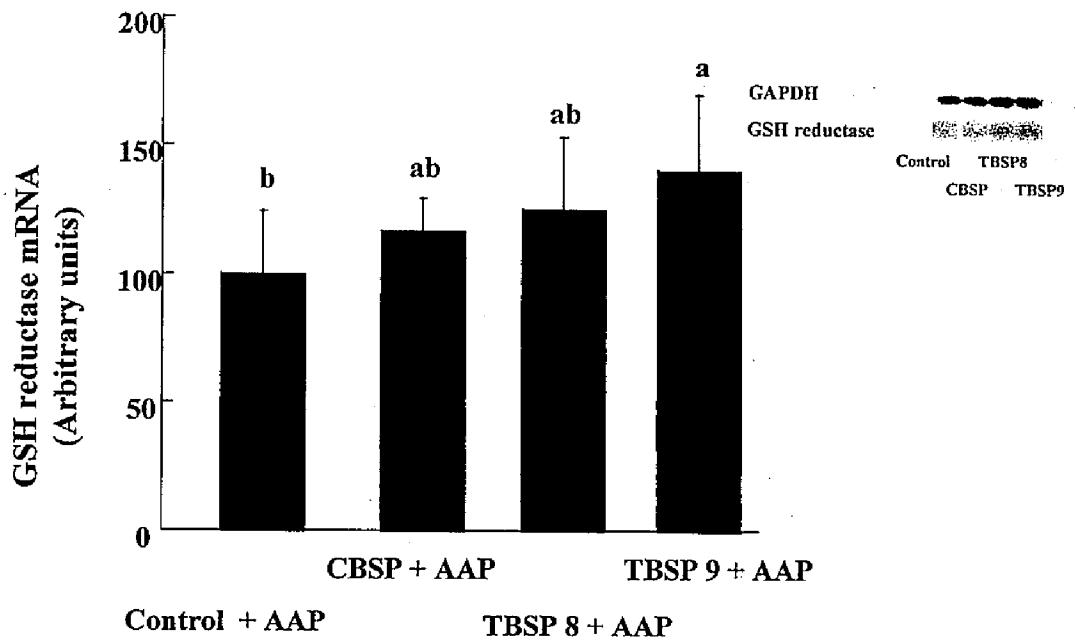


Figure 24 Hepatic GSH reductase mRNA level in rats fed buckwheat sprout powder for 4 wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

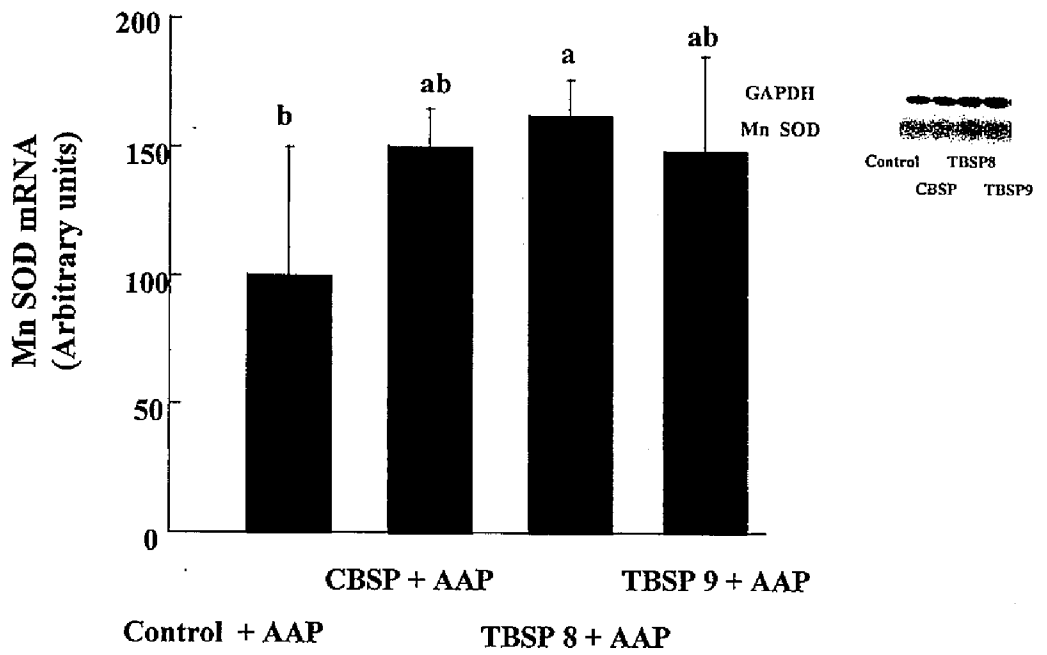


Figure 25 Hepatic Mn-SOD mRNA level in rats fed buckwheat sprout powder for 4 wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

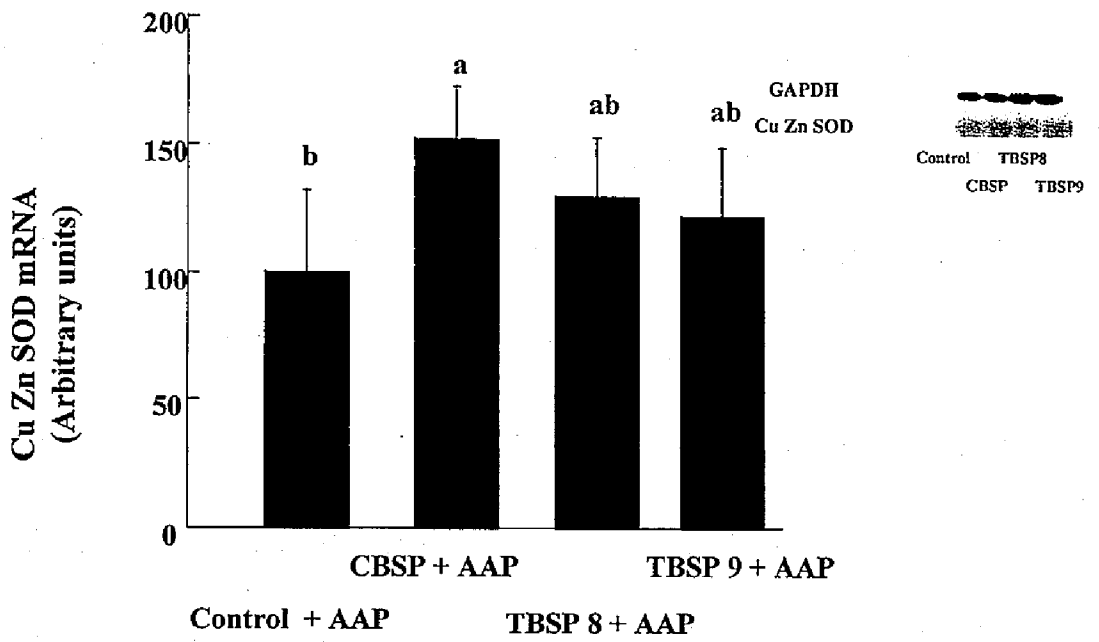


Figure 26 Hepatic Cu, Zn-SOD mRNA level in rats fed buckwheat sprout powder for 4 wk

Values are expressed as mean \pm SD for 5 rats.

Values not sharing a row superscript are significantly different at $P < 0.05$.

多く含まれる酵素で、肝細胞が破壊されると血液中に流れ出すので急性肝炎で最も強く上昇し、慢性肝炎でも上昇する。今回3種類のソバスプラウト群は、アセトアミノフェンによるALT活性上昇を抑制した (Table 9)。ASTは心臓や肝臓に多く含まれ、心筋梗塞、アルコール性肝障害などで上昇する。3種類のソバスプラウト群は、アセトアミノフェンによるAST活性上昇を抑制する傾向がみられた (Table 9)。これらの結果からソバスプラウト摂食により肝障害を抑制していることが明らかとなった。また、ルチンが四塩化炭素による肝障害誘発で増加する血清中AST濃度やALT濃度を上昇抑制させることが報告されていること (74) から、本結果はこれらの結果と一致していた。ルチンには、酸化ストレス条件下における *in vivo* での活性酸素毒性軽減作用が明らかになってきている (79)。

アセトアミノフェンの過剰投与により生体内での代謝チトクローム P-450 活性が変化する (62)。アセトアミノフェンの過剰投与による生体内での酸化ストレスが増加するという報告がある (63)。体重 1kg あたり 500mg のアセトアミノフェンを腹腔内投与した場合、血清 ALT 活性、血清 AST が上昇するが、グリーンビーンズとアズキを摂取するとその上昇が抑制されるという報告がある (64)。今回はアセトアミノフェンを 1g / 100g diets で長期的に経口投与し、同時にソバスプラウト乾燥粉末を 4 週間 5 g / 100 g diets で添加した。それにより

アセトアミノフェンによる肝障害を抑制した。特に ALT 活性、肝臓 GSH 濃度で有意な差を得られた。

脂質代謝の変化、特に血漿総コレステロールと TG の増加は、肝障害の強さを示すことがある。本研究において 4 週目において血漿総コレステロールレベルが Control AAP 群において有意に低下した(Figure 18)。いくつかの報告で、アセトアミノフェンを急性的もしくは慢性的に実験動物に摂取させると血清コレステロールレベルが上昇するとある (65-66)。しかし、本研究では血漿コレステロールが低下し、これらの報告と異なる結果が得られた。本研究では、コレステロール代謝関連遺伝子について分析していないが、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA reductase などに変動がみられる可能性がある。

以前の研究でアセトアミノフェンの解毒に GSH が重要であると報告がある (67)。GSH は、グルタミン酸、システイン、グリシンから成るトリペプチドであり、非タンパク質 SH 供与体として細胞内に多量に存在する。ラジカルの捕捉、酸化還元による細胞機能の調節、各種酵素の SH 供与体であり、抗酸化成分としても知られる。活性酸素 (スーパーオキシドなど) と反応して、安定なグルタチオンラジカルを形成し、2 量体化 (GSSG : 酸化型グルタチオン) に変化するが、これはさらに、GSH reductase が NADPH からの電子を GSSG に転移して、GSH に再生される。解毒代謝に関与して、体内の有害物質がグル

タチオンと結合し（グルタチオン抱合）、グルタミン酸とグリシンが切れることにより、メルカプツール酸となって排泄される(61)。GSH と GSH 関連酵素は、肝障害から直接保護するために枯渇する（68）。GSH は、活性酸素等が増加すると枯渇していくが、関連酵素は枯渇するのではなく、その活性が活性酸素の異常な増加についていけなくなることが知られている（48）。

Cardador-Martinez ら（69）は、マメ科植物が抗酸化効果を持つと報告している。マメ類が脂質の過酸化の抑制、フリーラジカルの除去作用があるとしている。さらに紫ジャガイモのアントシアニンが抗酸化効果を持つという報告がある（70）。彼らは、食物に含まれるポリフェノールがラジカル捕獲をおこなうと示唆している。我々は、ソバスプラウトに含まれるポリフェノールの中でルチンに着目した。本研究では、フリーラジカルを捕捉する肝臓 GSH レベルが Control AAP 群において最も減少していた(Figure 26)。これは、ルチンなどがラジカル捕獲をおこなうことにより、GSH の消費が少なかったと示唆される。ソバスプラウトに含まれるルチンなどのポリフェノールがフリーラジカルを捕捉した可能性がある。

野菜中に普遍的にみられる典型的フラボノール型フラボノイドであるケルセチンは、小腸吸収過程ですでに代謝物に変換し、血流中ではグルクロン酸や硫酸抱合体として存在することが多いことが報告されている（53）。ルチンのよう

な配糖体は腸内細菌の有する β -glucosidase により加水分解され、アグリコンになってから吸収されると考えられる。Hollman らは、ヒトにおいてルチンの方がアグリコンよりも2倍以上よく吸収されること、ラットに経口投与したルチンの吸収が遅いことを報告している (71)。ルチンの場合は、腸内細菌による糖の加水分解に時間がかかるためと考察している。肝臓で代謝されたフラボノイドの一部は胆汁とともに十二指腸に分泌され、抱合体は腸内細菌により加水分解されアグリコンとなって再吸収される。いわゆる腸肝循環がおこる。吸収されなかったフラボノイドは腸内細菌により代謝され、フェノールカルボン酸などにまで分解される。今回ルチンの吸収動態について検討を行っていないが、ケルセチンやその他のフラボノイドの生体での抗酸化活性を評価する場合、その吸収効率とともに代謝変換を十分に考慮する必要がある。

カタラーゼと GSH ペルオキシダーゼは、過酸化水素を解毒する酵素である。ヒドロキシラジカルは、初期の脂質過酸化によって脂肪酸を attack し、細胞の壊死を引き起こす。これらの酵素の活性の減少は、アセトアミノフェンを経口投与したラットの TBARS 量を増加させると報告がある (66)。本研究では、カタラーゼ、GSH ペルオキシダーゼは測定していないが、検討する必要がある。

本研究では、酸化型 GSH を還元型 GSH に生成する GSH reductase mRNA 発現量を測定した (Figure 28)。TBSP9 群において Control AAP 群と比較して有

意に増加した。CBSP 群、TBSP8 群において、有意な差はみられなかったが、Control AAP 群と比較して増加傾向がみられた。これは GSH 濃度の結果と整合性のあった挙動を示した。

Mn-SOD はミトコンドリア特有のスーパーオキシド(O_2^-)を処理する酵素である。ミトコンドリアでは、電子伝達系に伴い、近傍酸素が電子を捕獲しスーパーオキシドを生じさせてしまうことが知られている。Mn-SOD mRNA 発現量は、TBSP8 群において Control AAP 群と比較して有意に増加した(Figure 29)。CBSP 群、TBSP9 群において、有意な差はみられなかったが、Control AAP 群と比較して増加傾向がみられた。このことは、ソバプラウト乾燥粉末摂取により Mn-SOD の発現が高まり、酸化を抑制し、抗酸化能を高めている可能性がある。

細胞質に存在する Cu, Zn-SOD は、細胞質のスーパーオキシドを処理する酵素である。Cu, Zn-SOD mRNA 発現量は、CBSP 群において Control AAP 群と比較して有意に増加した(Figure 30)。2 種類のダットンソバ乾燥粉末摂取群において、有意な差はみられなかったが、Control AAP 群と比較して増加傾向がみられた。これらの結果から CBSP 群、2 種類のダットンソバ乾燥粉末摂取群において GSH reductase mRNA、Mn-SOD mRNA、Cu, Zn-SOD mRNA 発現が増加し、抗酸化システムを高めることが示唆された。

2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末は、抗酸化酵素 mRNA 発現量と肝臓中 GSH 量の増加により、ヒドロキシラジカルの元となる過酸化水素の分解促進をおこなったと考えられる。Yeh ら (72) は、ラットにフェノール性化合物を与えると、肝臓 SOD mRNA、GSH-ペルオキシダーゼ mRNA 発現量が増加したと報告している。本研究においても、SOD mRNA 発現量が増加したことから、2種類のダットンソバスプラウト乾燥粉末に含まれるフェノール性化合物が抗酸化機構に作用したのかもしれない。

本研究において *in vivo* において酸化ストレスに対してソバスプラウト乾燥粉末が抗酸化作用、予防作用をもつと示唆される。これには2つのメカニズムの可能性がある。1つは3種類のソバスプラウト乾燥粉末が、アセトアミノフェン代謝により生成されたフリーラジカルの補足能を有し、肝臓での細胞膜のラジカル連鎖開始の抑制などである (69)。その結果、細胞膜の酸化ダメージから保護された可能性がある。もう1つの可能性は、3種類のソバスプラウト乾燥粉末による細胞の抗酸化機構の活性化である。肝臓におけるアセトアミノフェンの感受性を低下させ、GSH reductase mRNA 発現量が Control AAP 群よりも強まった。それにより、3種類のソバスプラウト乾燥粉末が GSH 濃度を増加させた。ソバスプラウト乾燥粉末が GSH reductase 活性経路で肝臓 GSH レベルを調整しているのかもしれない。なぜなら GSH reductase は GSSG から

GSH の再生を促進し肝臓 GSH を増加させると知られているからである (73)。

結論として、ラットにソバスプラウト乾燥粉末を経口的に投与するとアセトアミノフェンによって引き起こされる肝障害を抑制することが明らかとなった。特に ALT 活性の有意な低下、肝臓 GSH 濃度の有意な増加、GSH reductase mRNA、Mn-SOD mRNA、Cu, Zn-SOD mRNA の発現量の有意な増加という結果が得られた。これらの結果により、3 種類のソバスプラウト乾燥粉末はアセトアミノフェン誘発による肝障害をラットの肝臓 GSH による抗酸化システム、解毒システムを介して肝障害から保護する作用を有する可能性があることが示唆された。2 種類のダットンソバスプラウトに含まれるルチンなどのポリフェノールが AAP 投与によって発生するフリーラジカルを消去することにより血漿中への ALT 活性を低下させ、抗酸化酵素 mRNA の発現量が増加し、その結果、生体内抗酸化活性が高まり、肝臓毒性の軽減作用が確認された。

農産物及び農産廃棄物の健康機能性の解明について特にダットンソバスプラウトの健康機能性に注目した。第 2 章、第 3 章の結果よりダットンソバスプラウトは脂質代謝改善効果、生体内抗酸化活性を高めるなど、健康機能性を持った新たな食品として有効に利用することが期待される。

1. 農林水産省作物統計 平成 16 年度 2003. 農林統計協会 第一出版
3-10.
2. Kuwahara T, Han KH, Hashimoto N, Yamauchi H, Shimada K,
Sekikawa M, Fukushima M. 2007. Tartary buckwheat sprout
powder lowers plasma cholesterol level in Rats. *J Nutr Sci Vitaminol*
53:501-507.
3. Kamalakkannan N, Stanely M, Prince P. 2006. Rutin improves the
antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues.
Mol Cell Biochem 293:211-219.
4. Kalinova J, Vrchotova N, Triska J. 2007. Exudation of Allelopathic
Substances in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*). *J Agric
Food Chem* 8:6453-6459.
5. Choi I, Seog H, Park Y, Kim Y, Choi H. 2007. Suppressive effects of
germinated buckwheat on development of fatty liver in mice fed
with high-fat diet. *Phytomedicine* 14:563-567.
6. Ishimi K. 2000. Physiological functions and safety of plant

- polyphenols. *Food processing and ingredients* 35: 5-10.
7. 大木 道則, 田中 元治, 大沢 利昭, 千原 秀昭. 1989. 化学大事典. 東京化学同人 22-23.
 8. Kanashiro A, Kabeya LM, Martinello F, Turato WM, Paula FS, Polizello AC, Uyemura SA, Lucisano-Valim YM. 2007. Effect of rutin on polymorphonuclear leukocytes oxidative metabolism in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters: evaluation by chemiluminescence and flow cytometry. *Pharmazie* 62:295-298.
 9. Toth O, David M, Habon T, Nagy A, Keszthelyi Z, Kovacs N, Losonczy H. 2005. Type I antithrombin deficiency as a cause of arterial and venous thrombosis in a family with severe *thrombophilia* 9:2121-2125.
 10. Lund F, Glenne PO, Inacio J, Larsson UB, Lavstedt S, Qian Z, Schiotz J, Tillgren C. 1999. Intravenous hydroxyethylrutosides combined with long-term oral anticoagulation in atherosclerotic nonreconstructable critical leg ischemia: a retrospective study. *Angiology* 50:433-445.
 11. Snijman PW, Swanevelder S, Joubert E, Green IR, Gelderblom

- WC. 2007. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*) : Some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutat Res* 28:111-123.
12. Hu J, Huang Y, Xiong M, Luo S, Chen Y, Li Y. 2006. The effects of natural flavonoids on lipoxygenase-mediated oxidation of compounds with a benzene ring structure--a new possible mechanism of flavonoid anti-chemical carcinogenesis and other toxicities. *Int J Toxicol* 25:295-301.
13. Kostyuk VA, Potapovich AI, Kostyuk TV, Cherian MG. 2007. Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress in vivo. *Cell Mol Biol* 15:62-69.
14. Choi SY, Ko HC, Ko SY, Hwang JH, Park JG, Kang SH, Han SH, Yun SH, Kim SJ. 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull* 30:772-778.
15. Que F, Mao L, Zheng X. 2007. In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic

- compounds. *Asia Pac J Clin Nutr* 1:196-203.
16. Kampkotter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Watjen W, Kahl R. 2007. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 234:113-123.
17. Sun L K, Sung K K, Cheol H P. 2004. Introduction and nutritional evolution of buckwheat sprouts as vegetable. *Food Research International* 37: 319-327.
18. 健康・栄養情報研究会. 2003. 国民栄養の現状 平成 13 年度厚生労働省国民栄養調査結果. 第一出版 12-15.東京.
19. Grundy S, Bazzarre T, Cleeman J. 2000. Prevention conference V. Beyond secondary prevention. Medical office assessment. *Circulation* 101:3-11.
20. 印南 敏, 桐山 周八. 1995. 改訂新版 食物繊維. 第一出版 68-67
21. 木村 秀一, 小林修平. 2002. 最新栄養学. 建帛社 122-123
22. Mitamura R, Hara H, Aoyama Y, Takahashi T, Furuta H. 2003. Ingestion of water –soluble soybean fiber prevents osteopenia and hypercholesterolemia induced by ovariectomy in rats. *J Agric Food*

23. Adam A, Levrat-Verny MA, Lopez HW, Leuillet M, Demigne C, Remesy C. 2001. Whole wheat and triticale flours with differing viscosities stimulate cecal fermentations and lower plasma and hepatic lipids in rat. *J Nutr* 131:1770-1776.
24. Tomotake H, Shimaoka I, Kayashita J, Yokoyama F, Nakajoh M, Kato N. 2000. A buckwheat protein product suppresses gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters. *J Nutr* 130:1670-1674.
25. Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, Yamazaki M, Kato N. 1997. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility. *J Nutr* 127:1395-1400.
26. Helrisk K. 1990. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods Of Analysis, 15th ed. Arlington, *Association of Official Analytical Chemists*
27. National Research Council. 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. National Institute of Health Publication no.

- 85-23, revised, Washington: *National Academy of Sciences*
28. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodent : final report of the American Institute of Nutrition adhoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939-1951.
 29. Folch J, Lees M, Slone-Stanley JH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226: 497-509.
 30. Hara H, Saito Y, Nakashima H, Kiriya S. 1994. Evaluation of fermentability of acid-treated maize husk by rat cecal bacteria *in vivo* and *in vitro*. *Br J Nutr* 71: 719-729.
 31. Keys A, Grande F, Anderson JT. 1961. Fiber and pectin in the diet and serum cholesterol concentration in man. *Proc Soc Exp Med* 106: 555-561.
 32. Sehayek E, Ono JG, Shefer S, Nguyen LB, Wang N, Batta AK, Salen G, Smith JD, Tall AR, Breslow JL. 1998. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10194-10199.

33. Ramjiganesh T, Roy S, Freaque HC, McIntyre JC, Fernandez ML. 2002. Corn fiber oil lowers plasma cholesterol by altering hepatic cholesterol metabolism and up-regulating LDL receptors in guinea pigs. *J Nutr* 132:335-340.
34. Fukushima M, Nakano M, Morii Y, Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K. 2000. LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber. *J Nutr* 130:2151-2156.
35. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* 34:1637-1659.
36. Buhman KK, Furumoto EJ, Donkin SS, Story JA. 1998. Dietary psyllium increases fecal bile acid excretion, total steroid excretion and bile acid biosynthesis in rats. *J Nutr* 128:1199-1203.
37. 中村 治雄. 1990. 脂質の科学. 朝倉書店 37-38.
38. Story JA, Watterson JJ, Matheson HB, Furumoto EJ. 1990. Dietary fiber and bile acid metabolism. *Adv Exp Med Biol*

270:43-48.

39. Eastwood MA, Hamilton D. 1968. Studies on the adsorption of bile salts to non-absorbed components of diet. *Biochim Biophys Acta* 152:165-173.
40. Topping DL, Clifton PM. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81:1031-1064.
41. Annison G, Illman RJ, Topping DL. 2003. Acetylated, propionylated or butyrylated starches raise large bowel short-chain fatty acids preferentially when fed to rats. *J Nutr* 133:3523-3528.
42. Nishimura N, Nishikawa H, Kiriyama S. 1993. Heorectostomy or cecetomy but not colectomy abolishes the plasma cholesterol-lowering effect of dietary beet fiber in rats. *J Nutr* 123 : 1260-1269.
43. Fernández ML. 2001. Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *J Nutr* 131:10-20.
44. Fernandez ML, Wilson TA, Conde K, Vergara-Jimenez M, Nicolosi RJ. 1999. Hamsters and guinea pigs differ in their plasma

- lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, or cholesterol content. *J Nutr* 129:1323-1332.
45. Shen H, He L, Price RL, Fernandez ML. 1998. Dietary soluble fiber lowers plasma LDL cholesterol concentrations by altering lipoprotein metabolism in female guinea pigs. *J Nutr* 128:1434-1441.
46. 厚生省の指標 臨時増刊 国民衛生の動向. 2002. 衛生の主要指標 財団法人 構成統計協会 75.
47. 近藤元治. 1993. 最新医学からのアプローチ 4 フリーラジカル. メジカルビュー社 176.
48. 加藤隆一, 鎌滝哲也. 2001. 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として. 第2版. 東京化学同人 282.
49. 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美農真. 1994. 抗酸化物質 フリーラジカルと生体防御. 学会出版センター 332.
50. 内藤裕史. 2001. 中毒百科 事例・病態・治療 改訂第2版. 南江堂 599.
51. 北川治雄, 花野学 編. 1985. INTEGRATED ESSENTIALS 薬物

52. Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C. 1997. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett* 409:12-16.
53. 山田耕路. 2004. 食品成分のはたらき. 朝倉書店
54. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. 1999. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Gen pharmacol* 32:661-667.
55. Lim HK, Kim HS, Choi HS, Oh S, Jang CG, Choi J, Kim SH, Chang MJ. 2000. Effects of acetylbergenin against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 42:471-474.
56. Sugiyama K, He P, Wada S, Saeki S. 1999. Teas and other beverages suppress D-galactosamine-induced liver injury in rats. *J Nutr* 129:1361-1367.
57. Han KH, Fukushima M, Oba K, Shimada K, Sekikawa M, Chiji H, Lee CH, Nakano M. 2004. Hepatoprotective effects of the water extract from adzuki bean hulls on acetaminophen-induced damage

- in rat liver. *J Nutri Sci Vitaminol* 50: 380-383.
58. Chon V H, Lyle J A. 1966. Fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* 14:434-440.
59. Lowry OH, Rosebrough NJ. 1954. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 54:1143-1148.
60. Gregus Z, Madhu C, Klaasswn CD. 1988. Species variation in toxication and detoxication of acetaminophen in vivo: a comparative study of biliary and urinary excretion of acetaminophen metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 91-99.
61. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 211-217.
62. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. 1984. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1327-1331.
63. Lei XG, Zhu JH, McClung JP, Aregullin M, Roncker CA. 2006. Mice deficient in Cu,Zn-superoxide dismutase are resistant to

- acetaminophen toxicity. *Biochem J* 1:455-461.
64. Wu SJ, Wang JS, Lin CC, Chang CH. 2001. Evaluation of hepatoprotective activity of legumes. *Phytomedicine* 8:213-219.
65. Jaya DS, Augustine J, Menon VP. 1995. Protective effect of testosterone against alcohol and paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Indian J Exp Biol* 33: 194-200.
66. O'Brien PJ, Slaughter MR, Swain A, Birmingham JM, Greenhill RW, Elcock F, Bugelski PJ. 2000. Repeated acetaminophen dosing in rats: adaptation of hepatic antioxidant system. *Hum Exp Toxicol* 19: 277-283.
67. Cohen SD , Khairallah EA. 1997. Selective protein arylation and acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab* 29: 59-77.
68. Chen LH, Lin SM. 1996. Acetaminophen alters antioxidant defense enzyme activities in hepatocyte culture. *Biochem Arch* 12: 33-42.
69. Cardador-Martinez A, Loarca-Pina G, Oomah BD. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *J Agric Food Chem* 50: 6975-6980.

70. Han KH, Sekikawa M, Shimada K, Hashimoto M, Hashimoto N, Noda T, Tanaka H, Fukushima M. 2006. Anthocyanin-rich purple potato flake extract has antioxidant capacity and improves antioxidant potential in rats. *Br J Nutr* 96:1125-1133.
71. Hollman PC, Katan MB. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37:937-942.
72. Yeh CT, Yen GC. 2006. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *J Nutr* 136:11-15.
73. Kaplowitz N, Au TY, Okhtens. 1985. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25: 715-744.
74. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. 2002. Protective effect of rutin on paracetamol and CCl₄ induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 73:557-563.
75. Taniguchi H, Kobayashi-Hattori K, Tenmyo C, Kamei T, Uda Y, Sugita-Konishi Y, Oishi Y, Takita T. 2006. Effect of Japanese radish (*Raphanus sativus*) sprout (Kaiware-daikon) on

- carbohydrate and lipid metabolisms in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 20:274-278.
76. Santos KF, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Oliveira MG. 1999. Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacol Res* 40:493-496.
77. Krishna KM, Annapurna A, Gopal GS. 2005. Partial reversal by rutin and quercetin of impaired cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 83: 343-355.
78. Stanely Mathizen Pritce P, Kannan NK. 2006. Protective effect of rutin on lipids, lipoproteins, lipid metabolizing enzymes and glycoproteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 58:1373-1383.
79. Bast A, Kaiserová H, den Hartog GJ, Haenen GR, van der Vijgh WJ. 2007. Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity: flavonoids. *Cell Biol Toxicol* 23:39-47.

第5章 謝辞

本研究を進めるにあたり、懇切丁寧な御指導、御助言を頂き、主査を努めて頂いた帯広畜産大学 環境生化学研究室 福島道広教授に深く感謝申し上げます。また、副査を努めて頂き、御指導を頂きました岩手大学 長澤孝志教授に厚くお礼申し上げます。また副査を努めて頂き御指導を頂きました帯広畜産大学 畜肉保蔵学研究室 関川三男教授には大変感謝しております。また副査を努めて頂き御指導を頂きました山形大学 五十嵐 喜治教授に心から感謝申し上げます。副査を努めて頂き適切なアドバイスを頂きました帯広畜産大学 畜肉保蔵学研究室 島田謙一郎助教授に心より感謝申し上げます。また、御指導、御校閲を頂きました北海道農業研究センター研究員 橋本直人さんに厚くお礼申し上げます。実験の細部まで教えてくださった環境生化学研究室韓さん、様々なアドバイスを頂きました北海道農業研究センター研究員 鈴木達郎さん、金さん、古賀伸久さんに深く感謝申し上げます。

そして、様々な面でお世話になりました本校教職員の皆様、環境生化学研究室のゼミ生の皆様に心より御礼申し上げます。

最後になりましたが、至らない私を支えて下さいました、両親、家族、友人に心より感謝の意を申し上げます。