

論文審査結果の要旨

國宗 義雄の琵琶湖のニゴロブナ、ゲンゴロウブナの時空間利用に関する論文はバイオテレメリー手法により周年同湖に生息する上記2種のフナの時空間分布について初めて詳細な情報を捉えた、画期的な研究である。結絶滅危惧動物の保全には、特にその種が産業的に重要な動物種であった場合に、複雑な問題が絡む。資源管理政策を高い説得力を持って厳しく打ち出すためには、そのプログラムが科学的証拠に裏付けられていることが必須ある。ニゴロブナ、ゲンゴロウブナの行動を詳細にとらえると、季節移動ばかりでなく、種々の点で異なっていることが本研究から明らかになった。このことは少なくともそれぞれの保全計画が個別に立案する必要があることを示している。また、本研究でフナの産卵回帰の可能性が示唆されたことは、種が利用する産卵場所の重要性を示しており、それぞれの種に最適な産卵場所の環境がおのずと決まっていると考えられる。ゲンゴロウブナについてはそれを明らかにすることができた。今後はニゴロブナについても産卵場所の特性を明らかにすることで、効果的な保全プログラム立案につなげることができると考えられる。本研究結果は、琵琶湖で産業上重要種であるフナ類の時間・空間分布を考慮した資源管理方策(漁期・漁場の制限等)の策定に非常に有用な情報を提供することになる。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお審査にあたっては、論文に関する専攻内の審査および博士論文発表会などの所定の手続きを経たうえ、平成24年2月9日、研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏 名	田 中 照 佳
学位の種類	博 士 (農学)
学位記番号	農 第 1 7 2 号
学位授与の日付	平 成 2 4 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規程第5条第1項該当
学位論文題目	Dietary anti-osteoporotic and hepatoprotective substances and their action mechanism (食餌性骨吸収改善および肝保護物質の探索と作用機構の解明)
論文審査委員 (主 査)	教 授 河 村 幸 雄
(副主査)	教 授 内 海 龍 太 郎
(副主査)	教 授 塚 正 泰 之

## 論文内容の要旨

骨粗鬆症は、骨密度減少とそれに伴う骨微細構造の異常によって、骨の脆弱性が増加し、骨折の危険性が増加する疾患である。骨はヒトの身体を支える物理的機能だけでなく、造血系や間葉系幹細胞の成熟分化のための機能を有する。骨粗鬆症に発症するとこれらの機能を正常に維持することが困難となるため、生活の質を著しく低下させると考えられる。したがって、骨粗鬆症を予防する食品の開発が囑望されている。本研究では未利用植物クズに着目し、骨粗鬆症モデルマウスに対する効果を検証した。

一方、近年生活習慣の大きな変化により、肥満に伴う非アルコール性脂肪肝炎等が増加している。したがって、普段の食生活から肝機能を保護する食品を摂取することが望まれている。四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘発性の肝障害は広く知られた病態で、CCl<sub>4</sub>は肝障害のモデル物質として動物実験に頻用されている。本研究ではコラーゲンが主要たんぱく質である未利用資源クロマグロ皮に着目し、CCl<sub>4</sub>誘発肝障害に対する保護効果を検証した。

### I. クズ蔓抽出物の経口摂取による骨粗鬆症モデルマウスの骨密度改善作用

クズ蔓エタノール抽出物 (PVEE) の骨量改善作用が明らかとなった。HPLCでPVEE中のイソフラボン含量を定量した結果、PVEEは10% puerarin、3.6% daidzin、2.5% 6'-O-malonyldaidzinと他のマイナーなイソフラボンを含有することがわかった。成熟期 (13週齢) の骨粗鬆症モデルマウスである卵巣摘出 (OVX) マウスにPVEEを20mg/kg body weightの用量で8週間経口摂取させた。OVXによって増加した骨吸収マーカー (尿中デオキシピリジノリンと血中TRAP活性) はPVEEの摂取により有意に抑制された。骨吸収マーカーと同様に大腿骨遠位部におけるTRAP陽性破骨細胞はコントロール群と比較してPVEEの摂取群で顕著に減少した。そこで次に骨組織に及ぼすPVEEの作用をX線CTにて解析した結果、PVEEの摂取はOVXによって減少した骨密度を有意に抑制した。このような作用に伴う子宮重量や他の臓器に異常はPVEE摂取群で認められなかった。したがって、PVEEは骨粗鬆症を改善する食品素材として有望であることが示唆された。

### II. 骨粗鬆症モデルマウスの骨吸収に及ぼすプエラリンの作用とその作用機構の解明

PVEEの経口摂取によるOVXマウスの骨吸収抑制作用の作用物質を検討するため、10週齢のOVXマウスにクズの主要イソフラボンであるプエラリンを20mg/kg body weightの用量で5ヶ月間摂取させた。OVXマウスにおける骨吸収マーカー (尿中DPDおよび血中TRAP活性) は非摂取群と比較しプエラリン摂取群で有意に減少した。次にプエラリンの経口摂取が骨強度に与える影響を検討するため骨力学指標である最小断面2次モーメントおよび断面2次モーメントをCT解析により算出した。その結果、プエラリンの摂取により骨力学指標は改善された。したがって、PVEEのOVXマウスにおける骨量改善の作用物質はプエラリンであることが示唆された。

次にプエラリンが骨粗鬆症モデルマウスの骨吸収を抑制するメカニズムを解明する目的で、経口摂取プエラリンのマウスにおける体内動態を解析した。13週齢の雄マウスにプエラリン40  $\mu$ molを単回経口投与し、血中への移行形態をHPLCおよびLC-MSにて同定を試みた結果、経口摂取プエラリンの血中における主要存在形態はプエラリンとそのグルクロン酸抱合体も存在することがわかった。次にmatrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometryを用い、プエラリンを経口投与したマウス大腿骨遠位部の組織切片上でプエラリンの局在を可視化した。その結果、プエラリンは大腿骨の広い範囲で検出され、その一部は連続切片上の破骨の局在と一致した。また前駆破骨細胞株RAW264.7におけるプエラリンの蓄積を検討した結果、時間依存的なプエラリンの蓄積が認められた。したがって、経口摂取プエラリンは体内で代謝を受けず破骨細胞に移行し、破骨細胞の分化を下方制御することが示唆された。

### III. クロマグロ皮たんぱく質経口摂取マウスの肝保護作用

魚類I型コラーゲンの生理活性を見出す目的で10週齢の雄マウスに1%クロマグロ皮 (TUS) 含有食または非含有食を3週間摂取させた。

3週間後、肝障害を誘発させるためTUS摂取群と非摂取群にCC14を腹腔内投与した。CC14投与した24時間後屠殺し、肝臓および血液サンプルを得た。生体内に取り込まれたCC14はミクロソームのチトクロムP450やミトコンドリアの電子伝達系で1電子還元を受けてトリクロロメチルラジカル(•CC13)を発生して広汎なラジカル反応、脂質過酸化反応を誘発し、肝臓における細胞壊死を惹起することが知られている。そこでCC14誘発性肝障害モデルマウスに対する食餌性TUSの影響を検討するため、まず肝臓の組織切片を作製し肝細胞を観察した。その結果、CC14によって誘発された細胞壊死領域はTUS摂取群で有意に減少した。次に肝機能マーカーの血中アミノトランスフェラーゼ(ALTとAST)活性、肝臓脂質過酸化指標として肝臓TBARS値を定量した結果、いずれも非摂取群と比較しTUS摂取群で有意に減少していた。次に食餌性TUSのマウス肝臓保護作用のメカニズムを検証するためマウス肝臓における炎症シグナルの変動を解析した。炎症反応において中心的な役割を果たす転写因子nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)の核内移行レベルはTUS摂取により抑制され、その結果、下流遺伝子であるinducible NO synthase(iNOS)のmRNA発現やiNOSによって大部分が生成される血中のNOレベルは有意に減少した。以上のことから、TUSの経口摂取はCC14誘発性肝障害モデルマウスのNF- $\kappa$ B経路による炎症シグナルを下方制御することで肝機能を保護することが示唆された。

本論分ではクズ蔓とクロマグロ皮という2つの未利用資源に着目した。これらの未利用資源は有望な骨粗鬆症予防および肝機能保護食品であることを見出した。

#### I. クズ蔓抽出物の経口摂取による骨粗鬆症モデルマウスの骨密度改善作用

HPLCでクズ蔓抽出物(PVEE)のイソフラボノイド含量を定量した結果、クズ特有のグリコシド型イソフラボンであるプエラリンが最も多く、同じくグリコシド型イソフラボンであるダイジンやそのマロニルおよびアセチル化体なども含まれることが分かった。卵巣摘出(OVX)マウスにPVEEを20mg/kg body weightの用量で8週間経口摂取させた結果、大腿骨の破骨細胞の分化マーカー酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)のmRNA発現は、非摂取群と比較して有意に減少した。同様に骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン(DPD)や血中TRAP活性、骨髄細胞TRAP活性は、有意に抑制された。また、PVEEの摂取は、大腿骨遠位部におけるTRAP陽性破骨細胞の数を顕著に減少させた。CT解析による骨密度測定では、摂取4週目からPVEE摂取群は非摂取群と比べて有意な骨密度減少抑制がみられ、摂取8週目の測定ではより顕著な骨密度減少抑制作用が観察された。大腿骨遠位部の研磨標本では、PVEEの摂取はOVXマウスの減少した骨梁を改善し、大腿骨微細構造の骨量減少を抑制することが示された。子宮を含む主要臓器における解剖所見および重量にPVEE摂取による変化は認められなかった。以上の結果から、PVEEの経口摂取は卵巣摘出誘発性の破骨細胞分化を下方制御し、骨量減少を改善することが示された。

#### II. 骨粗鬆症モデルマウスの骨吸収に及ぼすプエラリンの作用とその作用機構の解明

PVEEの経口摂取によるOVXマウスの骨吸収抑制作用の作用物質を検討するため、10週齢のOVXマウスにクズの主要イソフラボンであるプエラリンを20mg/kg body weightの用量で5ヶ月間摂取させた。卵巣摘出により増加した尿中DPDおよび血中TRAP活性は、プエラリンの摂取により有意に抑制された。また、プエラリンの摂取は、大腿骨遠位部の研磨標本におけるOVXマウスの減少した骨梁を改善し、大腿骨微細構造の骨量減少を抑制することを示した。以上のことから、プエラリンの経口摂取はOVXマウスの骨吸収を抑制することが示唆された。

そこで、そのメカニズムを解明するため経口摂取プエラリンのマウスにおける体内動態を解析した。マウスにプエラリン40  $\mu\text{mol}$ を単回経口投与し、血中への移行形態をHPLCおよびLC-MSにて同定を試みた結果、主要存在形態はプエラリンで、そのグルクロン酸抱合体も存在することがわかった。次にmatrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometryを用い、プエラリンを経口投与したマウス大腿骨遠位部の組織切片上でプエラリンの局在を可視化した。その結果、プエラリン ( $m/z$  417) のフラグメントイオンの一部は大腿骨遠位部の連続切片上のTRAP染色された破骨細胞の位置と一致した。前駆破骨細胞株RAW264.7におけるプエラリンの蓄積を検討した結果、時間依存的なプエラリンの蓄積が認められた。以上のことから、経口摂取したプエラリンはマウス体内で代謝を受けず破骨細胞に移行し、破骨細胞の分化を下方制御することが示唆された。

Ⅲ. クロマグロ皮たんぱく質経口摂取マウスの肝保護作用

10週齢の雄マウスに1%クロマグロ皮 (TUS) 含有食または非含有食を3週間摂取させた。3週間後、肝障害を誘発させるためTUS摂取群と非摂取群にCCl<sub>4</sub>を腹腔内投与した。肝臓細胞の細胞壊死領域、肝機能マーカーの血中アミノトランスフェラーゼ (ALTとAST) 活性およびTBARS値はTUS摂取群で有意に減少した。したがって、クロマグロ皮の経口摂取はCCl<sub>4</sub>誘発性肝障害モデルマウスに対して肝機能保護を示すことが明らかとなった。

次に肝臓における炎症シグナルの変動を解析した。炎症反応において中心的な役割を果たす転写因子NF- $\kappa$ Bの核内移行レベルを調べた結果、TUSの摂取はNF- $\kappa$ B核内移行を抑制した。また、その下流遺伝子であるiNOSのmRNA発現やiNOSによって大部分が生成されるNOの血中レベルはTUSの摂取により減少した。以上のことから、TUSの経口摂取はCCl<sub>4</sub>誘発性肝障害モデルマウスのNF- $\kappa$ B経路による炎症シグナルを下方制御することで肝機能保護作用を発揮することが示唆された。

よって、本論文は修士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査に当たっては、論文に関する専攻内審査および修士論文発表会など所定の手続きを経たうえ、平成24年2月9日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏名	若木 泰子		
学位の種類	博士 (農学)		
学位記番号	農第173号		
学位授与の日付	平成24年3月22日		
学位授与の要件	学位規程第5条第1項該当		
学位論文題目	Studies on food components affecting the adipocyte function, and the action mechanism (脂肪細胞機能を調節する食品成分と作用機構に関する研究)		
論文審査委員 (主査)	教授	河村	幸雄
(副主査)	教授	石橋	泰典
(副主査)	教授	上嶋	繁