

氏 名 (本 籍)	服 部 隆 史 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第29号
学 位 授 与 年 月 日	平成7年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学 納豆脂溶性成分の抗酸化性を基盤とする機能に 関する研究
学 位 論 文 題 目	
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 渡 邊 乾 二 副査 岐 阜 大 学 教 授 加 藤 宏 治 副査 岐 阜 大 学 教 授 篠 田 善 彦 副査 信 州 大 学 教 授 細 野 明 義 副査 静 岡 大 学 教 授 碓 氷 泰 市

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

O<sub>2</sub><sup>-</sup>をはじめとする活性酸素種は、生体の防御機能などにおいて重要な働きをすることは周知である。しかし、近年の活性酸素に関する広範な研究により、過剰量の活性酸素は生体において傷害を促し、強いては、炎症、発癌、老化そして成人病などの要因や進展に関わっていると明らかになってきた。最近では、こうした面から上記の疾患などの予防に対して、より良き生理活性機能を持つ食品が注目されてきている。しかし、食品成分の生体内での抗酸化能などについて検討された報告は数少ない。

本研究では活性酸素の除去を行う抗酸化物質を含有する食品を探索し、納豆にそのような活性があることをまず見出した。その成分の、特に生体内における抗酸化性を基盤とする機能に関する研究を開始した。本研究の内容は次のように要約される。

一般的に市販されている食品素材 (ジャガイモ、タマネギ、ニンニク、ゴマとダイズ) 及び植物性発酵製品 (味噌、テンペと納豆) について、in vitro (DPPHラジカル消去活性測定法) 及びin vivo (ラット拘束水浸ストレス胃潰瘍モデル法) における抗酸化能について探索した。その内、納豆のエタノール抽出物がin vitroではほとんど抗酸化能を発現しないにも関わらず、後者の試験におい

て、それを試験2週間前より投与することによって胃潰瘍抑制作用を示すと見出した。ストレス性胃潰瘍が $O_2^-$ による組織傷害であることから、納豆エタノール抽出物中の抗酸化物質が、 $\alpha$ -トコフェロール( $\alpha$ -Toc)の場合と同様に生体内に貯留されることにより酸化傷害作用を発揮していると推察した。そこで、納豆用の市販納豆菌あるいは保存菌株を用いて納豆を製造し、その内から強い抗酸化物質を生産する菌株を選定した。この菌株を用いて納豆(12Kg)を自作し、この物より脂溶性の抗酸化物質を抽出後、 $O_2^-$ 消去活性を指標としてHPLCにより分離精製を試みた。この分画物をNMR測定、薄層クロマトグラム上における定性反応試験等を通して構造解析したが、リン脂質骨格に1,4-ジエンを3ないし4個持つ脂肪酸(主としてアラキドン酸)と1ないし2個の糖(ガラクトロン酸)を含有する化合物であるとしたにとどまった(目的物質を精製すると、その物質の不安定性に基づき完全な構造解析には至らなかった)。このため、以後の実験においては部分精製品(NTC-100C)を用いて検討した。

$\alpha$ -Tocとの比較の下にNTC-100Cの抗酸化作用を、常法による不飽和脂肪酸(リノール酸、リノレイン酸とDHA)系及びクメンヒドロパーオキシドにより酸化傷害を負荷した培養細胞(ヒト内皮細胞株)系において検討した。このような系にNTC-100Cを存在させると、その過酸化脂質産生抑制と細胞傷害抑制効果が同重量の $\alpha$ -Tocと同程度発現されると認められた。後者の試験区分においても、NTX-100Cが細胞膜における脂質過酸化反応を抑制した結果、現れた現象であると判断した。

次に、NTX-100Cの生体内での抗炎症作用をキサンチンオキシダーゼとヒポキサンチン誘導ラット足趾浮腫モデル系において試験し、NTX-100Cにはその抑制効果があると評価した。この効果は、炎症ケミカルメディエーターである過酸化脂質、ロイコトリエン $B_4$ とヒスタミンの産生を抑制し、プロスタグランジン $E_2$ のそれを促進することによるとした。この抑制機構は抗炎症用の医薬品であるアロプリノール(キサンチンオキシダーゼの特異的インヒビター)のものとは異なっていると考察した。

以上のような抗酸化能の生体内における発現機構の証明の一つとして、NTX-100Cの細胞内貯留部位につき確認すべく検討した。NTC-100C存在下において上記内皮細胞を培養し、その細胞に取り込まれて蛍光を発するNTX-100Cをレーザー共晶点顕微鏡像としてとらえ、それを解析した。すなわち、顕微鏡像をコンピューターにより解析し、細胞の多層断面図からの立体像を合成した。この結果、NTX-100Cの無添加の系では何等蛍光を発することはなかったのに対して、その添加の系では蛍光が細胞の表面全体に存在すること及び細胞内部には蛍光が点在しているに過ぎないことを見出した。このようにして、NTC-100Cが細胞の表面の膜に局在していることを証明し得た。これらの結果を総合して、リン脂質を骨格とする脂質と糖を含む抗酸化物質であるNTX-100Cは $\alpha$ -Tocと同様に生体膜に親和性が高いこと、さらに生体において組織内、特に細胞の膜に蓄

積されることにより、抗酸化作用、抗炎症作用などを発現していると結論した。

以上の成果は、納豆には脂溶性の抗酸化物質が含まれており、それが生体内における細胞傷害に対して抑制効果を発揮すると明らかにしたものである。納豆が代表的な抗酸化性を有する機能性食品であることを裏付けるとともに、納豆を常食することによって生体における酸化傷害に起因する様々な疾患を充分予防できる可能性を示唆した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

平成7年1月24日、岐阜大学大学院連合農学研究科において、審査員全員出席のもとに約35分間に亘る発表と、約25分間の質疑応答が行われた。各審査員からの質問に対しては論理的かつ具体的に答えたとは必ずしも言い難いが、発表態度は良好であった。論文の内容を伝えるためには、強調すべき点に時間をとるべきであったという意見もだされた。

その結果、岐阜大学大学院連合農学研究科修了者として十分な学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに足る資格をもつものと認めた。

近年の研究において、過剰量の活性酸素が生体において傷害を促し、強いでは、炎症、発癌、老化そして成人病などの要因や進展に関わっていると明らかにされている。このような疾病などの予防には、より良き生理活性機能を持つ食品が注目されてきているが、その生体内での機能について検討された報告は数少ない。本研究では、納豆には活性酸素の除去を行うような抗酸化物質が含まれ、その成分の、特に生体内における抗酸化性を基盤とする機能を科学的に証明・考察したものであり、大豆発酵食品の普及の面からも大きな意義を持っている。本研究は下記の学術雑誌に印刷中（校正終了）であり、その内容は次のように要約される。

第一報 Antioxidative effect of crude antioxidant preparation from soybean food fermented by Bacillus natto. T. Hattori et al., Lebensm.-Wiss. u. -Technol., 28, (2) (1995)

自作した納豆より分離・精製した抗酸化物質の構造を、リン脂質骨格に1, 4-ジエンを3ないし4個持つ脂肪酸（主としてアラキドン酸）と1ないし2個の糖（ガラクトツロン酸）を含有するものとした。この物質を含有する部分精製品（N T C-100 C）の抗酸化能を、 $\alpha$ -トコフェロールとの比較の下に、常法による不飽和脂肪酸（リノール酸、リノレイン酸とD H A）系及びクメンヒドロパーオキシドにより酸化傷害を負荷した培養細胞系において検討した。3種の不飽和脂肪酸に対する抗酸化作用の検討において、同重量の $\alpha$ -トコフェロールと同程度の過酸化脂質（TBA 反応法による評価）産生抑制を

示した。この結果より、NTX-100Cの抗酸化作用機序を $\alpha$ -トコフェロールのものと同様のものであると考察した。さらに、培養細胞（Endocell-UV）に対するクメンヒドロパーオキシドによる負荷モデルを作製した。NTX-100C処理細胞は、クメンヒドロパーオキシドに対してNTC-100Cの添加濃度に依存して細胞傷害の抑制効果を示した。この系においても、NTX-100Cは $\alpha$ -トコフェロールと同程度の細胞傷害抑制を発揮すると認めた。

第二報 Beneficial effect of crude antioxidant preparation from fermented soybean food on xanthine oxidase-hypoxanthine-induced foot-edema in rats. T. Hattori et al.,

Lebensm.-Wiss. u. -Technol., 28, (4) (1995)

XOD-HPX 誘導足趾浮腫モデル系によるNTX-100Cの生体内における抗炎症作用を検討し、NTX-100Cにはその抑制効果があると評価した。この効果は、炎症ケミカルメディエーターである過酸化脂質、ロイコトリエン $B_4$ とヒスタミンの産生を抑制し、プロスタグランジン $E_2$ のそれを促進することによるとした。この抑制機構は抗炎症用の医薬品であるアロプリノール（キサンチンオキシダーゼの特異的インヒビター）とは異なったものであると考察した。

この他、第三報として、NTX-100Cのヒト培養内皮細胞への取り込みとその細胞内局在性につき投稿準備中である。

以上の成果から、納豆が特に生体内で抗酸化能を発揮する成分を含有する代表的な発酵食品であることを明らかにした。