

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009-2011

課題番号：21500775

研究課題名（和文） トランス脂肪酸による炎症とラジカル生成に対する魚油の効果

研究課題名（英文） The effects of fish oil for the cell inflammatory reaction caused by trans-fatty acids

研究代表者

木谷 誠一 (KITANI SEIICHI)

東京海洋大学 保健管理センター・教授

研究者番号：10231284

研究成果の概要（和文）：平成 22 年国民健康栄養調査によれば若者の脂肪エネルギー比率は、20 代の年代に多く、とくに飽和脂肪酸の摂取量が増加している。疫学的あるいは臨床的に脂質と健康の関連が報告されているが、本研究は細胞レベルで、特にトランス脂肪酸は炎症惹起作用を、魚油は、それに対して炎症抑制作用をもつことを、明らかにした。アラキドン酸や飽和脂肪酸も炎症惹起作用を持っていた。細胞レベルの知見で、栄養保健と予防医学にひとつのエビデンスを提供した。

研究成果の概要（英文）：According to the national health and nutrition examination survey 2010, fat energy ratio have increased in the young generation in twenties, Although lipid-related health problem have been repeatedly reported from epidemiological or clinical point of view, this research revealed pro-inflammatory action of trans fatty acid and counter-action of fish oils at the cellular level. Saturated fatty acids and arachidonic acid also had inflammatory actions. Thus, these cell-level findings provided good evidence for preventive medicine and public health nutrition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,500,000

研究分野：総合領域

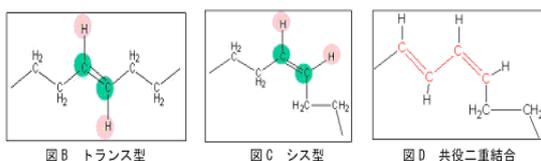
科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活・トランス脂肪酸・魚油・アラキドン酸

1. 研究開始当初の背景：

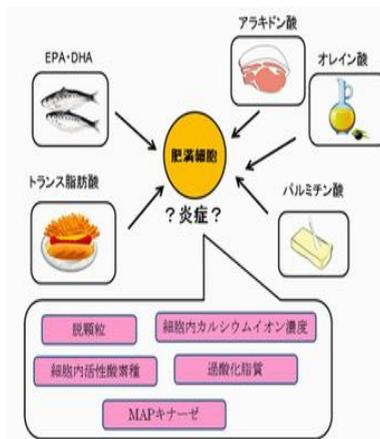
平成22年国民健康栄養調査によれば若者の脂肪エネルギー比率は、20代の年代に多く、とくに飽和脂肪酸の摂取量が増加している。近年の高タンパク質・高脂肪という食生活は、病態としてメタボリック炎症あるいはアレルギー性炎症が該当臓器に認められ、有病率の急激な増加をもたらした。脂肪酸についての疫学データは、近年数多く報告されている。トランス脂肪酸は、トランス型の二重結合を有する不飽和脂肪酸であって、マーガリンやショートニングなど加工油脂に含まれる。トランス脂肪酸の摂取でコレステロールの増加と善玉HDLコレステロールの低下により動脈硬化の危険が増加する。Omega3(n-3)脂肪酸 DHA, EPA は魚介類に多く含まれる脂肪酸で、抗炎症作用、赤血球膜変形能向上作用がある。しかし、細胞生物学知見は、未だ乏しい。

【不飽和脂肪酸中の炭素-炭素二重結合】



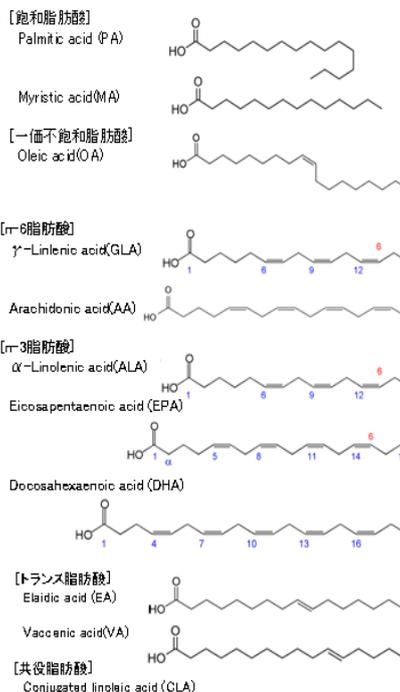
2. 研究の目的

大学生の食生活の乱れと国民からの食品安全性が社会問題になっている中、脂肪酸特にアラキドン酸とトランス脂肪酸が、炎症に及ぼす影響を検討するものである。総論的臨床的に脂肪食の制限が喧伝されているが、各論的に脂肪酸の種類の特特定まで至っていない。そこで細胞レベルで実証し、栄養保健や予防医学への筋道をつけることである。



3. 研究の方法

(1) アレルギーは、食生活を背景とした生活習慣病の側面を否定できない。そこで肥満細胞を使用し細胞内の活性酸素(ROS)や過酸化脂質の測定、細胞内カルシウムイオン濃度の測定、細胞内からの炎症性メディエーターの遊離の測定等、各種脂肪酸の短期投与長期投与による影響を検討した。プローブと測定原理として、それぞれDCFH-DAを用いた蛍光分析法、DPPPを用いた蛍光分析法、Fura 2を用いた蛍光分析法、ヘキササミニダーゼの酵素活性を吸光光度法である。(2) そのうち細胞機能に著明な影響を与えた脂肪酸による細胞内シグナル分子の検討のためリン酸化分子p38とERK, JNKに対する抗体を使用してウェスタンブロッティングを行った。(3) 脂肪酸以外の各種脂質の肥満細胞活性に及ぼす制御機構のメカニズムの検討をおこなった。(4) 一方、学生の食習慣のアンケートを実施した。このうち特にファストフードを利用する被験者を選びだし、血清中ヒスタミンをHPLCにて測定する予定であった。



4. 研究成果

(1) 脂肪酸として、n-3脂肪酸(α-リノレン酸、EPA、DHA)、n-6脂肪酸(γ-リノレン酸、アラキドン酸)や飽和脂肪酸(パルミチン酸、ミリスチン酸)、トランス脂肪酸(エライジン酸、バクセン酸)、共役リノール酸

を用いた。粘膜型肥満細胞 RBL-2H3 細胞における IgE 受容体を介した脱顆粒と結合組織型 CM-MC 細胞における NK-1 受容体を介した脱顆粒に対する影響を検討した。

結果として、アラキドン酸や代表的なトランス脂肪酸のエライジン酸は、単独で、活性酸素 (ROS) 産生、脂質過酸化の促進や脱顆粒促進作用等の炎症促進作用を示した (図参照)。しかし、反芻動物由来バクセン酸は、炎症効果やラジカル効果は示さなかった。DHA や EPA は炎症促進作用を示さなかった。また、飽和脂肪酸のパルミチン酸も前処理によって他の刺激による炎症促進作用を示した。必須 n-6 脂肪酸であるアラキドン酸は、著明な脂質過酸化を示した。このように、トランス脂肪酸にも 2 種類あり、反芻動物由来のトランス脂肪酸は、健康被害は無いと思われた。また一定程度必要なアラキドン酸の炎症作用が危惧され、は n-6 と n-3 脂肪酸摂取量のバランスとともに、脂質の質が重要であることが分かった。

図 1 各種脂肪酸の肥満細胞 IgE 受容体を介した脱顆粒に及ぼす影響

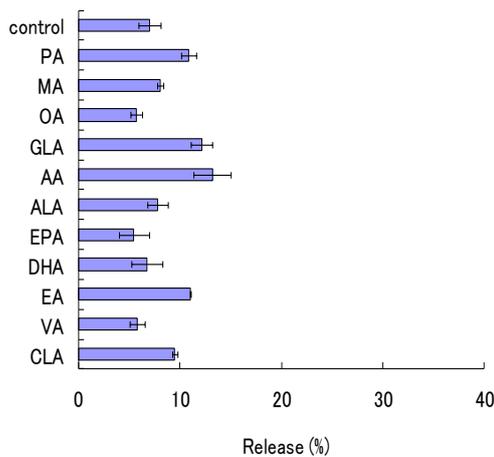
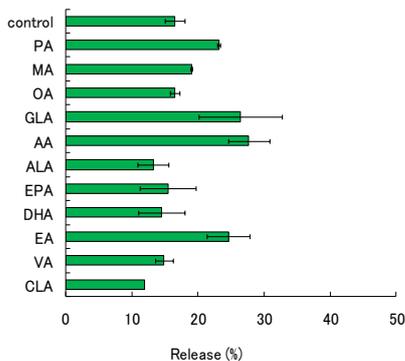


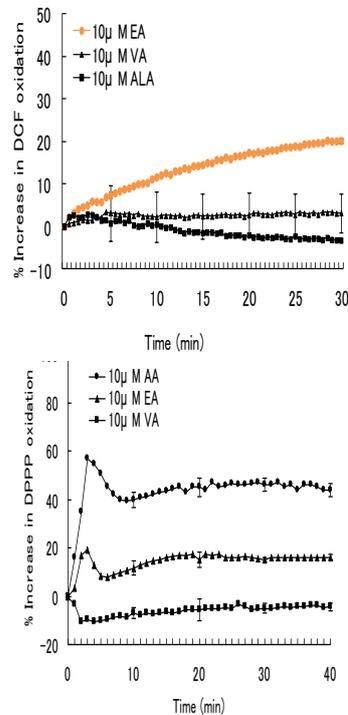
図 2 : 各種脂肪酸の肥満細胞上 NK-1 受容体を介した脱顆粒に及ぼす影響



またパルミチン酸、オレイン酸、 γ -リノレン酸、アラキドン酸、EPA、エライジン酸、共役リノール酸は Substance P による細胞内カルシウム濃度上昇を促進させた。

アラキドン酸とエライジン酸処理にて細胞内活性酸素 ROS の産生と細胞膜脂質の過酸化が見られた。(図 3 上: ROS 産生、下: 過酸化脂質生成) しかしバクセン酸には、細胞内活性酸素 ROS の産生と細胞膜脂質の過酸化作用は、認められなかった。

図 3 各種脂肪酸の細胞内活性酸素および細胞膜過酸化脂質の生成に及ぼす影響



しかも、特記すべきこととして、アラキドン酸による細胞膜の脂質の過酸化は著明であったが、魚油 n-3 脂肪酸 DHA と EPA は、有意に抑制した。

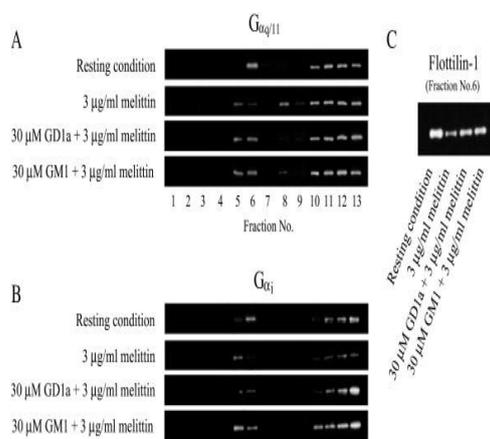
(2) RBL-2H3 肥満細胞において、エライジン酸 (1, 3, 10uM) 一昼夜の単独前処理によって、用量依存的に p38 と ERK リン酸化が活性化された。

一方、DHA (1, 3, 10uM) は、一昼夜の単独前処理によって、p38 と ERK, JNK いずれのリン酸化も起こさなかった。IgE 受容体の架橋による p38 と ERK, JNK のリン酸化を用量依存

性に抑制した。さらにトランス脂肪酸の向炎症作用とDHAの抗炎症作用を直接同時投与することで検討したところ、エライジン酸(10 μ M)による p38 と ERK リン酸化を、DHA(1, 3, 10 μ M)は、用量依存性に抑制した。

(3) グリセロ糖脂質であるガングリオシドは、ミツバチ由来毒素メリチンの細胞障害作用をよくせいた。しかしもう一つの毒素であるフォスフォイパーゼ A2 による脱顆粒は抑制しなかった。一方スズメバチの毒素であるマストパランの細胞障害作用と脱顆粒作用をともに抑制した。これらの抑制作用は、いずれもリポドラフト構造の安定化によるものであった。ハチ毒素による G タンパク質 G $\alpha_q/11$ (A) と G α_i の変化を、ガングリオシド GD1a と GM1 は、最小限にとどめることによって、抑制している (図4)。スフィンゴ糖脂質であるセラミドは、マクロファージや肥満細胞、表皮角化細胞における NO 産生、ROS 産生、脱顆粒等の活性化を抑制した。

図4 リポドラフトにおける G タンパク質の安定化に及ぼす糖脂質ガングリオシドの効果



(4) エキシマー蛍光誘導体を使用したヒスタミンの高感度 HPLC 法を検討した。しかしエキシマー蛍光誘導体によるヒスタミン測定は、既報 (福岡大学薬学集報 7(0), 13-24, 2007) のようにはできなかった。方法論自体に問題ありと現在考えている。トランス脂肪酸あるいは魚油を多く摂取するヒト被験

者血清中ヒスタミン測定について残念ながら頓挫した形になった。しかし、PSE エキシマーをもちいたアミン測定ではプトレシン、スペルミン、スペルミジン、カダベリンのように1級アミンを両端にもつ直鎖脂肪族炭化水素(ジアミン)を選択的に測定できることが判明した (Simple detection method of biogenic amines in decomposed fish by intramolecular excimer fluorescence. 投稿中)。

100 項目に亘る食習慣のアンケートを本学学生に行った。本研究に関連する項目についての記述統計に結果は、以下の通りであった。ファストフードをよく食べる (32.5%)。食品にアレルギーがある。(14.1%)。マーガリンやファットスプレッドをよく食べるほうだ (14.3%)。バターをよく摂るほうだ (8.1%)。最近特に原因がないのにイライラする (15.7)。魚をよく食べるほうだ (43.1%)。比較的魚食になじんでいる傾向があるものの、ファストフードでの食事が多い傾向にある。

考察と結論：アラキドン酸やエライジン酸は、単独で活性酸素種 (ROS) 産生、脂質過酸化を示し、かつ他の刺激による炎症促進作用を示した。また、エライジン酸は MAPK (p38、ERK) のリン酸化を示した。n-3 脂肪酸 (DHA や EPA) は炎症作用を示さなかった。また、アラキドン酸による脂質過酸化を抑制した。

トランス脂肪酸の向炎症作用とDHAの抗炎症作用を直接同時投与することで検討したところ、エライジン酸(10 μ M)による p38 と ERK リン酸化を、DHA(1, 3, 10 μ M)は、用量依存性に抑制した。パルミチン酸などの飽和脂肪酸は前処理によって他の刺激による炎症促進作用を示した。

このように、トランス脂肪酸や n-3 脂肪酸による細胞膜あるいは脂肪酸固有の受容体を介して、細胞内で MAP キナーゼを活性化し細胞機能を修飾していることが判明した。食品中のトランス脂肪酸を減少させる主な方法として、業界の自主的対策、各食品の含有量表示、製品中の上限値設定の3つがある。日本では、すべてのトランス脂肪酸を対象に任意表示を行なうとした。本研究ではまた、魚油の抗炎症作用や広義の意味での脂質として糖脂質の有用性についても幅広く検討した。コレステロールの関与以外に脂肪酸の生合成と酸化双方における制御の逸脱による脂肪毒性 (lipo-toxicity) が、メタボリック症候群や動脈硬化、糖尿病ガンの実効的な経路であると最近提唱されており、アレルギーも含めて、よりきめ細やかな栄養保健対策が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Nishikawa H, Kitani S.: Gangliosides inhibit bee venom melittin cytotoxicity but not phospholipase A(2)-induced degranulation in mast cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011 252(3)228-236

② Nishikawa H, Kitani S.: Inhibitory effect of ganglioside on mastoparan-induced cytotoxicity and degranulation in lipid raft of connective tissue type mast cell. *J Biochem Mol Toxicol.* 2011 Vol25 no.3, 158-168

[学会発表] (計 2 件)

① 西川 洋史, 木谷誠一: ハチ毒による傷害予防のための肥満細胞活性化機序の解明と応用 2009年みつばち研究助成基金成果報告会 2009年11月11日 東京目黒 雅叙園

② 西川 洋史, 木谷誠一: スズメバチ毒素によるマスト細胞および細胞毒性に対するガングリオシドの効果 東京海洋大学水産海洋プラットフォーム 2010年2月15日, 東京 東京国際フォーラム

[図書] (計 9 件)

① 木谷誠一 分担執筆 南江堂 ISBN978-4-524-26266-3
各論 29 性感染症 書名 新版 学生と健康 国立大学法人保健管理施設協議会 分担 (110p~112p)

② 木谷誠一 分担執筆 ワクチンの免疫学 書名 ワクチンと大学の保健管理ガイドブック 2012, 2012/3 カマル社 ISBN978-4-907747-30-5 分担 p23-30

③ 発行 国立大学法人保健管理施設協議会エイズ・感染症特別委員会・委員のひとり 木谷誠一: ワクチンと大学の保健管理ガイドブック 2012, 2012.3 総ページ 100p カマル社 ISBN978-4-907747-30-5

④ 発行 国立大学法人保健管理施設協議会エイズ・感染症特別委員会・委員のひとり 木谷誠一: エイズハンドブック 2012 2012/3 総ページ 16, カマル社 ISBN978-4-907747-29-9

⑤ 山本和彦, 木谷誠一ら編著, 国立大学保健管

理施設協議会エイズ感染症委員会発行
インフルエンザとキャンパス感染症補遺
2010, 2010 総ページ数 39

⑥ 山本和彦, 木谷誠一ら編著, 国立大学保健管理施設協議会エイズ感染症委員会発行
書名 (パンフレット) 子宮頸がん予防
HANDBOOK 2011, 2011 総ページ数 4

⑦ 山本和彦, 木谷誠一ら編著: 国立大学保健管理施設協議会エイズ感染症委員会発行
インフルエンザとキャンパス感染症 2009/3
総ページ数 127

⑧ 山本和彦, 木谷誠一ら編著, 国立大学保健管理施設協議会エイズ感染症委員会発行 大学
における大麻薬物問題とその対策 2010,
2009 総ページ数 110

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木谷誠一 (KITANI SEIICHI)
東京海洋大学 保健管理センター・教授
研究者番号: 10231284

(2) 研究分担者 なし

(3) 研究協力者

西川洋文 (NISHIKAWA HIROHUMI)
柳沢 雄太 (YANAGISAWA YUTA)
和田 萌 (WADA MOE)