

## 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25年 5月31日現在

機関番号：37104

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880028

研究課題名（和文）バイオディーゼル資源作物ジャトロファに由来する毒性成分の生体影響評価に関する研究

研究課題名（英文）Risk-assessment of toxic components derived from biodiesel feedstock *Jatropha curcas*.

研究代表者

中尾 元幸 (Motoyuki Nakao)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60610566

研究成果の概要（和文）：バイオディーゼル資源作物のジャトロファは毒性成分を含み、食用に適さない。そのため、食用作物との競合を起こさないバイオ燃料資源として注目されている。本研究ではジャトロファより毒性成分の一つであるホルボールエステル（PE）を単離し、生体影響評価を行った。その結果、マウスにおいてジャトロファ PE を塗布した場合、高濃度では急性毒性を示した。ジャトロファ PE は培養細胞を用いた形質転換試験では強い発がんプロモーター活性を示したので、急性毒性を示さない低濃度のジャトロファ PE をマウスに塗布したが、発がんは見られず、培養細胞と動物では異なった結果を示した。

研究成果の概要（英文）： *Jatropha curcas*, one of the biodiesel feedstock has been drawing spotlight as uncompetitive biological resources with edible plant because it is unfit for human consumption due to its toxic components. In this study, risk assessment of the phorbol ester (PE) isolated from *Jatropha* was carried out. High concentration of *Jatropha* PE showed severe acute toxicity in applied mice. *Jatropha* PE showed strong tumor promotion activity in transformation assay using cultured cells. However, lower concentration of PE did not develop any tumor in mice. These results suggested that *Jatropha* PE differentially behaved in vivo and in vitro.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境影響評価・環境政策

キーワード：バイオディーゼル、ジャトロファ、発癌プロモーター、健康影響評価、急性毒性、ホルボールエステル

## 1. 研究開始当初の背景

近年、CO<sub>2</sub>排出削減要請の高まりや、新興国の経済発展に伴う輸送燃料需要の急増に伴う原油価格の上昇により、低コスト輸送燃料の需要が増大している。その中で、バイオマスエネルギーを用いたバイオ燃料は「カーボン

ニュートラル」の観点から低環境負荷・非枯渇性資源として、化石燃料に代わる次世代エネルギー源の候補として注目されている。しかしながら、食用作物との競合で価格が高騰したり、耕作地を確保する目的で森林伐採などの環境破壊が行われるなど、バイオ燃料原

料作物の生産増大に伴う悪影響も指摘されている。その中で、バイオディーゼル燃料の原料作物であるトウダイグサ科の落葉低木、ジャトロファ (*Jatropha curcas*、ナンヨウアブラギリ) は、以下に示す利点から、東南アジア、南米、アフリカ大陸の、主に開発途上国において急速に作付面積を増加させている。

ジャトロファは他にも短い収穫サイクルや、その燃料としての特性やコストパフォーマンス、環境への低負荷など、バイオ燃料の原料作物として優れた特徴を多く備えているが、搾油原料となる種子には強力な発癌プロモーターとして作用する可能性のあるホルボールエステル(PE)など、多くの有害成分が含まれている。そのため、栽培・精製・流通現場での作業従事者から末端の利用者、さらにはその排ガスに曝露される第三者に対し、重大なリスク要因となる可能性がある。

Haas らの報告 (Haas W. et al., J. Nat. Prod. (2002) 65: 1434-1440) によれば、ジャトロファには 6 種の PE 成分が含まれている。しかしながら、その毒性に関しての知見は未だ十分には蓄積されていない。これまでに知られているジャトロファの毒性については、小児や動物が誤食した中毒例が報告されている以外には、少数の動物毒性実験のみである。ジャトロファの毒性成分は品種や栽培条件により大きく異なることを考慮すれば、ジャトロファの毒性分析はその都度行うべきであり、現状では信頼性の高いリスク評価に用いる情報は極めて少ない。

## 2. 研究の目的

ジャトロファはバイオ燃料資源として優れた可能性を秘めているが、毒性成分の健康影響が懸念される。

本研究課題では、ジャトロファ種子やクルードオイルに含まれる PE 成分の定性・定量分析を行った。ジャトロファ PE 成分は本研究課題の標準試料として用い、実験動物や培養細胞系による *in vivo*、*in vitro* 実験を行った。さらに *in vivo*、*in vitro* 実験の結果をジャトロファの利用に携わる人々に還元するため、簡易高感度測定法の開発を目指し、生体影響について検討し、信頼性の高いリスク評価を実現することを目指して研究を進めることとした。

## 3. 研究の方法

(1) ジャトロファ種子に含まれる PE 類の大量精製：乾燥させ、殻を除去したジャトロファ種子をフードプロセッサで粉碎し、メタノールに浸漬して抽出した。メタノール抽出液は減圧下で濃縮させ、HPLC で 2 段階に分けて精製した。HPLC システムは Hitachi

Elite LaChrome L-2000 シリーズ (Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japan) を使用した。HPLC カラムは TSK-Gel ODS-80TM (20 mm x 300 mm) (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) 及び Inertsil ODS4 (20 mm x 150 mm) (GL Science Inc., Tokyo, Japan) を使用した。溶媒は水/アセトニトリルの系を用い、流量は 5 ml/min、カラム温度 40°C に設定し、検出波長は 280 nm で精製を行った。

精製した PE は遠心エバポレーター Savant SPD-1010 SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて減圧下で濃縮し、分光光度計 MULTISKAN GO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて、分子吸光係数と 280nm の吸光度から濃度を求めた。精製した物質は LC-MS と NMR 分析により構造を確認した。

(2) ジャトロファ PE の形質転換試験：マウス胎児皮膚由来の Bhas42 細胞を用いた。継代用培地は MEM+10% FBS+ペニシリン・ストレプトマイシン、形質転換試験用培地としては DMEM/F12+5% FBS+ペニシリン・ストレプトマイシンを用いた。6 ウェルプレートに試験用培地を用いて  $2 \times 10^4$  cells/ml の濃度で播種し、3 日間培養した後、ジャトロファ PE 等の被験物質を含む試験用培地に交換し、4 日間培養した。再度被験物質を含む試験用培地に交換して 3 日間培養し、さらに被験物質を含む試験用培地に交換して 4 日間培養した。最後に被験物質を含まない試験用培地に交換して 3 日間培養した。培地を除きメタノールで固定後、ギムザ染色を行い、形質転換巢の個数を顕微鏡下で計測した。発癌プロモーターの陽性対照としては Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を用い、陰性対照としてはメタノールを用いた。

(3) ジャトロファ PE の毒性実験：8 週齢の ICR マウスを用いた。飼育環境は  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50~60%、給餌・給水は *ad libitum* で、明暗サイクルは明：午前 7 時~午後 7 時、暗：午後 7 時~午前 7 時とした。マウス背部の皮膚を脱毛処理し、週 2 回ジャトロファ PE を塗布した。塗布濃度は 1~10  $\mu\text{g}$  で行った。発癌性を検討する際には最初に発癌イニシエーターとして 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene を塗布した。実験は 8 週間継続した後、採血し血算、白血球分画を行った。

(4) マウスにおける脾細胞表面マーカーの解析：フローサイトメーター Cell Lab Quanta (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) を用いて行った。抗体は抗マウス CD4、抗マウス CD8、抗マウス CD45R 抗体 (全て Beckman Coulter Inc.) を用いた。剖検時に脾臓を摘出し、緩衝液中で細胞を解離させ、赤血球を除去した上で抗体と結合させ、分析した。

(5) DNA マイクロアレイ分析: DHPB 塗布マウスから剖検時に脾臓を摘出し、RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA から Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen (Life Technologies Corporation), Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA ライブラリを作成し、Cyanine3、Cyanine5 でラベルした (Agilent cDNA labeling kit (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA))。マイクロアレイ分析は Mouse GE v2 Genome Oligo 4x44K (Agilent Technologies Inc.) にて行った。

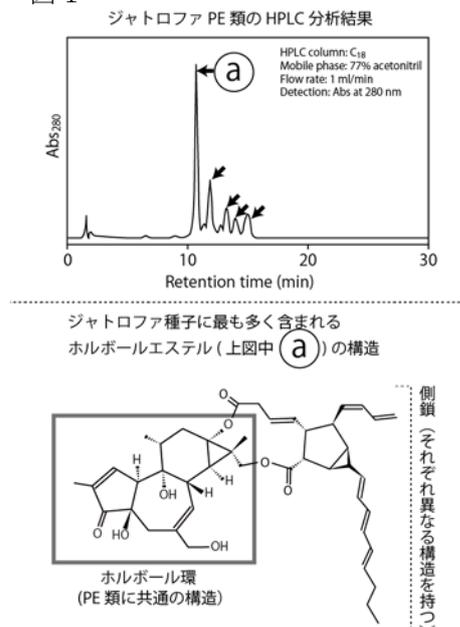
(6) サイトカインアレイ分析: DHPB 塗布マウス血清を MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を用いてサイトカインアレイ分析を行った。測定は Luminex 200 System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) を用いて行った。

(7) ジャトロファ PE の簡易測定法の開発: ジャトロファに含まれる PE 類に対する抗体を作成するために、ハプテンとして 4 $\alpha$ -ホルボールを用いた。4 $\alpha$ -ホルボールにスペーサーを結合させ、キャリアタンパク質に結合させて抗原とする予定であった。

#### 4. 研究成果

(1) ジャトロファ種子に含まれる PE 類の大量精製: ジャトロファには 6 種の PE 類が含まれている (図 1) が、そのうち最も含量の多い画分を分取した。本画分は予備実験で最も形質転換活性が高いことがわかっている。この画分は既に報告されている (Haas W. et al., J. Nat. Prod. (2002) 65: 1434-1440)

図 1



ジャトロファ PE の主要成分と同一であることを LC-MS 及び NMR 分析で確認した。構造を図 1 に示す。本画分をその物質名より DHPB と略す。本実験ではジャトロファ種子をメタノール抽出し、HPLC で精製した結果、種子 1 kg から約 2.5 mg の DHPB を単離した。

(2) ジャトロファ PE の形質転換試験: 分取した DHPB を用いて培養細胞を用いた形質転換試験を行った。Bhas42 細胞に DHPB を添加すると、発癌プロモーター活性を示すコロニーの増殖が見られた (図 2)。コロニーの増殖は陽性対照として、よく知られた発癌プロモーターである PMA の 10 分の 1 の濃度で観察されたことから、DHPB は強力な発癌プロモーション活性を持つものと考えられた。

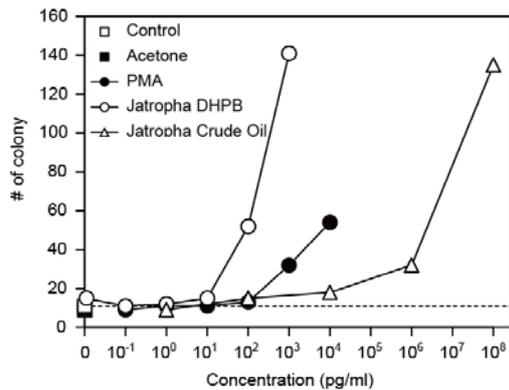


図 2 Bhas42 細胞を用いた形質転換試験結果

(3) ジャトロファ PE の毒性実験: 8 週齢の ICR マウスを用いて動物実験を行った。マウス背部を除毛し、発癌イニシエーターとして

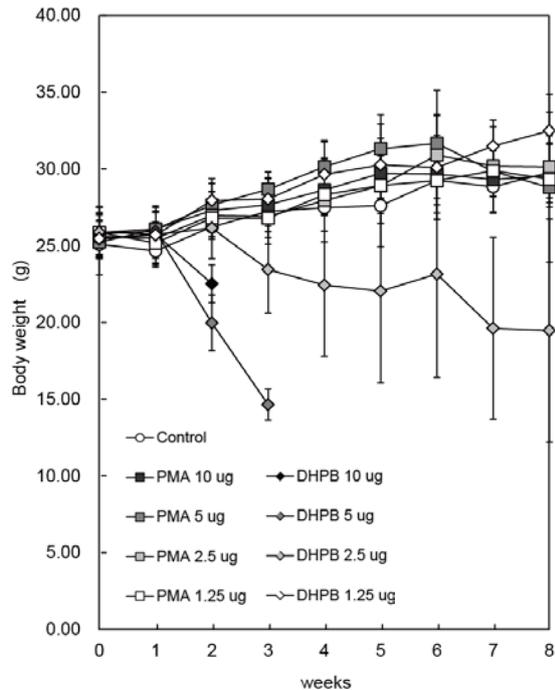


図 3 DHPB 塗布マウスの体重の変化 (n=4 ~5)

7, 12-dimethylbenz [a] anthracene を塗布した後、1~10  $\mu\text{g}$  の範囲で DHPB の塗布を行った。その結果、5  $\mu\text{g}$  以上の高濃度では塗布開始直後から体重の減少が見られ、10  $\mu\text{g}$  塗布群では塗布後1週間、5  $\mu\text{g}$  では塗布後2週間以内に全てのマウスが死亡した(図3)。体重の減少は2.5  $\mu\text{g}$  塗布群でも観察されたが、8週目まで生存した。

死亡したマウスは体重減少とともに下痢が見られた。死亡後に剖検すると、消化管からの出血が見られ、さらに脾臓の萎縮が見られた。脾臓の萎縮は2.5  $\mu\text{g}$  以上の塗布群で見られた。実験開始8週間後に生き残った全てのマウスを剖検した結果、生存したマウスの中で、2.5  $\mu\text{g}$  塗布群のみが脾臓の萎縮を示した(図4)。

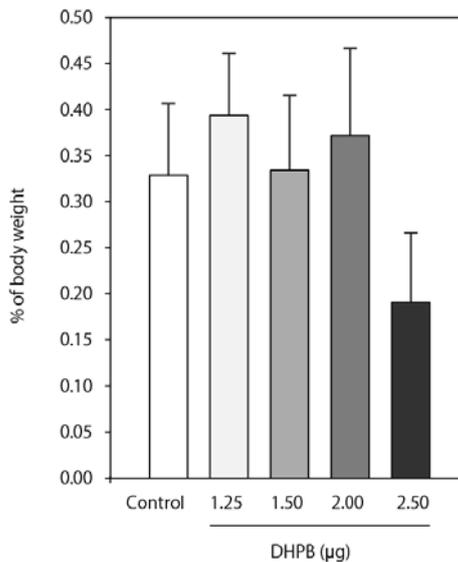


図4 DHPB 塗布マウスの体重当たりの脾臓重量 (n=4~5)

in vitro での形質転換試験では DHPB は PMA よりも強力な形質転換能を示したが、8週目まで飼育しても DHPB 塗布群に発癌は見られなかった。一方で PMA 群では塗布開始5週目から塗布部にパピローマ(乳頭腫)の発生が見られ、時間の経過とともにその数は濃度依存的に増加した(図5)。

培養細胞を用いた in vitro 実験の結果と in vivo での動物実験の結果が大きく異なることから、ジャトロファ PE の毒性の評価法については、さらなる検討が必要と考えられた。次に、DHPB 塗布マウスの血算を行った結果、DHPB 塗布マウスでは赤血球、血小板、ヘマトクリット値、白血球の減少が見られたが、中でも白血球の減少が大きかった(図6)。この結果から DHPB のマウスに対する造血機能への毒性が示唆された。

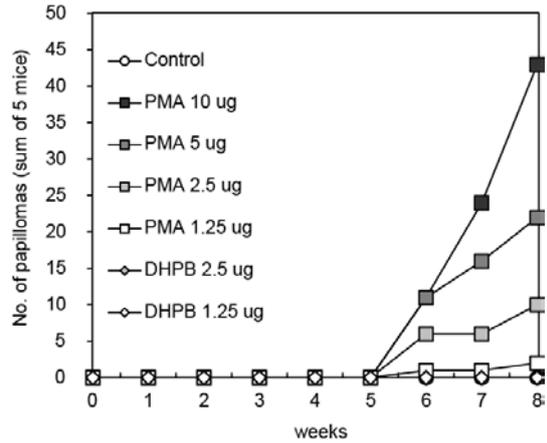


図5 被験物質塗布マウスにおけるパピローマ(乳頭腫)発生数の推移

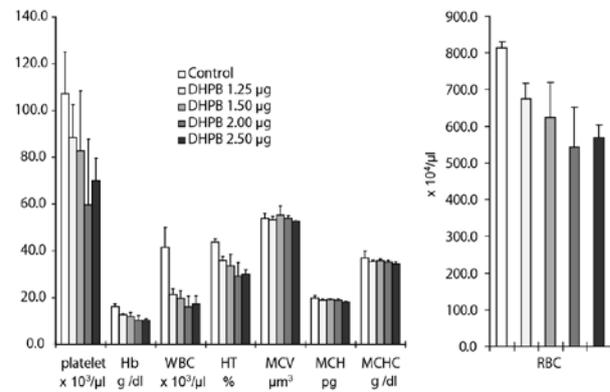


図6 DHPB 塗布マウスにおける血算の結果(n=4~5)

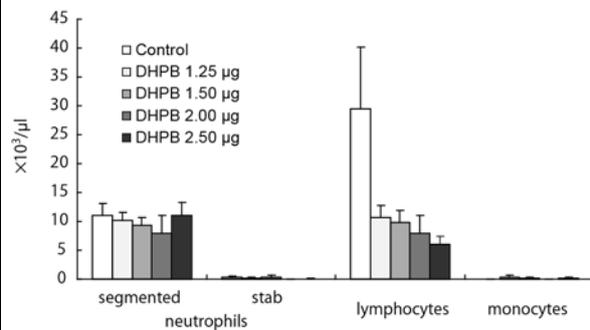


図7 DHPB 塗布マウスにおける白血球分画の結果 (n=4~5)

次に末梢血塗抹標本を作成し、白血球分画を行った。その結果、好中球、単球については対照群、DHPB 塗布群ともに同等の構成割合であったが、リンパ球については DHPB 塗布群で大きな減少が見られた(図7)。DHPB 塗布マウスでは体重当たりの脾臓重量が減少していることから、DHPB 塗布群におけるリンパ球の減少は脾臓の機能低下による可能性が考えられた。

(4) マウスにおける脾細胞表面マーカーの解析：さらに DHPB 塗布による脾臓の機能に対する影響について検討するために、フローサイトメトリー分析を行い、脾臓における細胞表面マーカーの解析を行った。しかし、対照群と DHPB 塗布群で CD4、CD8 (T リンパ球)、CD45R 陽性細胞 (B リンパ球) の割合に変化は見られなかった。

(5) DNA マイクロアレイ分析：DHPB の脾臓における DNA 発現プロファイルに対する影響を調べるために DNA マイクロアレイ分析を行った。DHPB の急性毒性による影響を除外するため、急性毒性の影響が見られない 2.0 μg 塗布群のマウスから摘出した脾臓を用いた。DHPB の塗布により、対照群に対して 2 倍以上の発現を示したのは GM-CSF、IFN-γ、IL-6、LIX であった。LIF と RANTES については対照群に対して 1/2 以下に発現が低下していた (表 1)。

(6) サイトカインアレイ分析：DHPB の血清中サイトカインレベルについて検討するために DHPB 2.0 μg 塗布群マウスの血清を用いてサイトカインアレイ分析を行ったが、個体差が大きく、さらなる検討が必要と考えられた (表 1)。

(7) ジャトロファ PE の簡易測定法の開発：ハプテンとして 4α-ホルボールにスパーサーを結合させ、キャリアタンパク質に結合させて抗原とする予定であったが、4α-ホルボールに対する修飾の検出が困難であり、高原の作成には至らなかった。

## 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 0 件)

なし

〔学会発表〕 (計 1 件)

- ① Motoyuki Nakao, Satoko Kinoshita, Yoko Ishihara.  
Transdermal Toxicity of the Phorbol Ester Isolated from Biodiesel Feedstock, *Jatropha Curcas*. Society of Toxicology, 52<sup>nd</sup> Annual Meeting, March 10-14, 2013, San Antonio, TX, USA

〔図書〕 (計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/pubh/>

表 1 DHPB 塗布マウス脾臓における DNA マイクロアレイ分析及びサイトカインアレイ分析結果

	Serum Cytokine (pg/ml)		Splenic RNA Fold increase in DHPB group
	Control	DHPB 2.0μg	
Eotaxin	244.35 ± 58.06	177.71 ± 36.13	0.96 ± 0.27
G-CSF	221.76 ± 176.71	196.75 ± 107.72	1.00 ± 0.00
GM-CSF	39.95 ± 21.25	35.713 ± 23.03	2.30 ± 0.37
IFN-γ	7.48 ± 3.27	6.25 ± 0.90	2.46 ± 0.96
IL-1α	101.11 ± 75.49	32.21 ± 7.89	1.56 ± 0.23
M-CSF	28.54 ± 39.19	6.10 ± 3.45	0.79 ± 0.06
IL-1β	16.64	30.54	1.08 ± 0.03
IL-2	2.05 ± 0.66	ND	0.80 ± 0.20
IL-3	2.97	2.13	0.77 ± 0.35
IL-4	8.56	ND	0.92 ± 0.20
IL-5	15.62	ND	0.76 ± 0.34
IL-6	ND	ND	2.49 ± 1.56
IL-7	2.99	4.94 ± 3.13	1.06 ± 0.12
IL-10	20.21 ± 11.27	20.21 ± 5.34	1.20 ± 0.22
IL-12 (p40)	62.66 ± 71.93	12.10	0.82 ± 0.13
IL-13	77.99 ± 14.90	115.90 ± 35.26	0.96 ± 0.03
IL-15	16.01 ± 12.17	15.73 ± 5.57	0.99 ± 0.09
IL-17	4.49	3.48 ± 0.54	1.82 ± 0.41
IP-10	93.65 ± 7.30	52.01 ± 14.57	1.21 ± 0.06
MIP-2	180.99	ND	1.31 ± 0.54
KC	44.65 ± 21.74	48.67 ± 14.94	1.06 ± 0.41
LIF	ND	ND	0.43 ± 0.08
LIX	2513.64 ± 2230.60	754.25 ± 718.12	2.04 ± 0.70
MCP-1	15.59 ± 4.17	20.26 ± 13.07	0.69 ± 0.07
MIP-1α	27.19 ± 6.14	36.61 ± 8.43	0.91 ± 0.18
MIP-1β	53.03 ± 10.99	41.83 ± 4.72	0.57 ± 0.08
MIG	65.08 ± 18.28	38.78 ± 21.48	0.99 ± 0.14
RANTES	17.23 ± 4.27	8.37 ± 2.47	0.47 ± 0.04
TNFα	6.03 ± 3.44	5.10 ± 3.41	0.61 ± 0.19
IL-12 (p70)	49.93 ± 57.59	9.93 ± 1.03	0.82 ± 0.13
VEGF	1.98 ± 0.25	2.34 ± 0.51	0.90 ± 0.17
IL-9	110.43 ± 42.80	139.89 ± 32.87	0.97 ± 0.05

サイトカインアレイは n=3、DNA マイクロアレイは DHPB 塗布群と対照群の発現レベルの比 (n=3)。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中尾 元幸 (Motoyuki Nakao)  
久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60610566

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：なし

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：なし