

## 核酸高含有のサケ白子抽出物はマウスの生殖機能 および胎児発育には影響しない

渡 邊 涼 子<sup>1)</sup>, 岸 岡 沙 帆<sup>1)</sup>, 渡 邊 敏 明<sup>1,2)</sup>, 関 口 博 太<sup>3)</sup>,  
須 藤 慶 太<sup>3)</sup>, 宇 住 晃 治<sup>3)</sup>

(<sup>1)</sup>大阪青山大学健康科学部健康栄養学科\*, (<sup>2)</sup>兵庫県立大学環境人間学部\*\*,

<sup>3)</sup>株式会社ライフ・サイエンス研究所学術研究部\*\*\*)

(受付 2017年9月11日, 受理 2017年10月13日)

### No reproductive and embryonic effects of salmon milt extract containing a large amount of nucleic acid in mice

Ryoko WATANABE<sup>1)</sup>, Saho KISHIOKA<sup>1)</sup>, Toshiaki WATANABE<sup>1,2)</sup>, Hiroataka SEKIGUCHI<sup>3)</sup>,  
Keita SUTOH<sup>3)</sup> and Koji USUMI<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Human and Nutrition, Faculty of Human Sciences, Osaka Aoyaka University

<sup>2)</sup>School of Human Sciences and Environment, University of Hyogo

<sup>3)</sup>Life Science Institute Co., Ltd.)

#### Summary

Nucleic acid is known to show antioxidant, anti-allergy and anti-aging effects and has long been used as an additive. In recent years, various physiological function of salmon milt extract, which consists of nucleic acid and nucleoprotein, has been clarified. On the other hand, the ingested foreign DNA can transgress not only the intestinal but also placental barrier, and reach the nuclei of cells of fetuses. It is suggested that maternally ingested foreign DNA can be a potential mutagen for the developing embryos. However, there is insufficient evidence on the effect of nucleic acid on fetal growth and development. The detailed mechanism remains unclear. Therefore, in this study, we aimed to examine effects of nucleic acid on maternal reproductive function and fetal growth using salmon milt extract (SM). Pregnant mice were given diets containing SM during gestation. There was no difference in body weight gain and food intake in SM groups. In fetuses micrognathia and hematoma were seen in the control group and macroglossia in only 2 cases in SM group, but no significant increase in gross malformations was observed in this group. Previous and present studies show no general toxicity or reproductive and developmental toxicity in nucleoprotein. These findings suggest that safety is high even if foods and food supplements containing salmon milt extract are daily ingested.

サケの白子をヌクレアーゼ及びプロテアーゼ処理して作成したサケ白子抽出物の主要な構成成分である核酸は、デオキシリボ核酸 (DNA) とリボ核酸 (RNA) の成分であり、遺伝情報の伝達や発現に不可欠な物質である。核酸は塩基、糖およびリン酸からなり、リン酸のジエステル結合によって重合した高分子化合物である。塩基の基本骨格には、ピリミジン環とプリン環がある。ピリミジン塩基としてはシトシン、チミン、ウラシルがある。プリン塩基としてはアデニンとグアニンがある。核酸を構成している糖と

しては、五炭糖 (ペントース) であるリボースとデオキシリボースがある。

ヒトは食物として核酸を摂取すると、多くの核酸は腸管内でヌクレアーゼによってモノヌクレオチドまで分解される。モノヌクレオチドは酵素によって、ヌクレオシドおよび塩基まで分解され、吸収される。このように経口的に摂取した核酸は、ほとんどが代謝され、排泄されることが知られている<sup>1)</sup>。

近年、核酸やサケ白子抽出物摂取による健康効果が報告

\*所在地: 大阪府箕面市新稲2-11-1 (〒562-8580)

\*\*所在地: 兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

\*\*\*所在地: 東京都中央区日本橋堀留町2-6-6 ライフサイエンスビル (〒103-0012)

されている。その機能性としては、免疫能の増強効果や抗アレルギー効果、加齢に伴う記憶力減退防止効果、アルコール性肝機能低下の改善、さらには腸管生理機能改善効果や術後回復の促進効果などが示されている<sup>2,3)</sup>。

一方、妊娠動物に合成 DNA を与えると、胎児及び出産児に外来 DNA が含まれることが報告されている<sup>4)</sup>。また、妊娠動物に過剰の核酸を与えても胎児の発育に影響しないが、鶏胚の発育には影響することが報告されている<sup>5,6)</sup>。このように、核酸の胎児発育への影響については十分なエビデンスが得られていない。そこで、本研究では、妊娠マウスに水溶性サケ白子抽出物を摂取させ、母体の生殖機能および胎児発育への影響について検討した。

## 実験方法

### 1. 実験動物および飼料

Jcl:ICR 系の 8 週齢雌性マウス（日本クレア(株)、東京）を実験に用いた。室温  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗サイクル 12 時間（明サイクル：9:00–21:00）で飼育した。1 週間の予備飼育後、同系雄性マウスと短時間交配（9:00–11:00）させ、妊娠マウスを作成した。妊娠確認日を妊娠 0 日とした。

飼料は精製飼料 AIN-93G（オリエンタルバイオ(株)、東京）を用い、サケ白子抽出物としては、水溶性サケ白子抽出物（Salmon milt extract: SM）（フォーデイズ株式会社・ライフ・サイエンス研究所提供）を用いた。水溶性サケ白子抽出物は、サケの白子をスクレーパー、プロテアーゼ処理して作製した DNA（分子量 330~1500）約 30% 含む水溶性の粉末状の抽出物である。対照群（AIN-93G）、SM1.2% 添加群をランダムに分け、各群 9 匹とした。

妊娠動物は、糞食を防ぐために、ステンレス網の中敷のあるプラスチックケージ（日本クレア(株)、東京）で飼育した。妊娠 16 日目から絶食させ、妊娠 17 日目に屠殺した。

なお、本研究は大阪青山大学動物倫理委員会で承認を受けている。動物実験は「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号、一部改正平成 14 年 5 月 28 日）に従って行った。

### 2. 試料採取

妊娠 17 日目に妊娠マウスをネンプターで麻酔した後、母体から採血した。血液は遠心した後、血清を採取して分析直前まで凍結した。妊娠マウスは屠殺後、胎児を摘出するとともに肝臓、腎臓などの臓器を摘出した。子宮については着床数についても確認した。

### 3. 分析方法

#### 3-1 母体血清の生化学検査

母体の血清は、総蛋白（TP）、アルブミン（ALB）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRE）、尿酸（UA）、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、クロール（Cl）、カルシ

ウム（Ca）、無機リン（IP）、AST（GOT）、ALT（GPT）、乳酸脱水素酵素（LDH）、アミラーゼ（AMY）、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ（ $\gamma$ -GT）、総コレステロール（T-CHO）、中性脂肪（TG）、HDL-コレステロール（HDL-C）、グルコース（GLU）、総ビリルリン（T-BIL）を測定した。

それぞれの測定方法は、TP は Biuret 法（使用試薬：総蛋白-HR11、和光純薬）、ALB は BCG 法（アルブミン IIHA-テストワコー、和光純薬）、BUN はウレアーゼ-GLDH 法（自動分析試薬「生研」UN-S、デンカ生研）、CRE 及び UA は酵素法（L タイプワコー CRE・M 及び UA・M、和光純薬）、Na 及び K、Cl はイオン選択電極法（日立イオン電極試薬、和光純薬）、Ca 及び IP は酵素法（アキュラスオート Ca、シノテスト及びデタミナー L IP II、協和メデックス）、AST、ALT、LDH、AMY 及び  $\gamma$ -GT は JSCC 標準化対応法（L タイプワコー AST・J2、ALT・J2、LD・J、アミラーゼ及び  $\gamma$ -GT・J、和光純薬）、T-CHO 及び TG は酵素法（L タイプワコー CHO・J 及び TG・M、和光純薬）、HDL-C は直接法（コレステスト N HDL、積水メディカル）、GLU は KH-GUPDH 法（クイックオート ネオ GLU-HK、シノテスト）、BIL は酵素法（ネスコート VL T-BIL、アルフレッサ）で、日立 7180 自動分析装置（(株)日立ハイテクノロジーズ）を用い測定した。それぞれの測定法については、各メーカーの試薬名から検索が可能である<sup>5)</sup>。

#### 3-2 胎児の形態観察

胎児は、実体顕微鏡を用いて外表奇形の有無を観察した。

#### 3-3 統計学的解析

得られたデータの集計・解析には、Excel 2016（Microsoft）を用いた。分析値は、すべて平均値  $\pm$  標準偏差（SD）で示した。統計処理には、*t*-検定およびフィッシャーの直接確率検定を用いた。なお、有意水準  $p < 0.05$  を統計学的に有意な差異があると判定した。

## 結果

### 1. サケ白子抽出物による母体への影響

母体の体重増加量および飼料摂取量については、各群とも差はみられなかった（Table 1, Fig. 1）。なお、実験期間中、これらの動物に皮膚炎や脱毛などの臨床的症状はみられなかった。

母体の血清成分の内、UA と T-BIL が SM 添加で有意に増加した（Table 2）。その他の成分に有意な差は見られなかった。

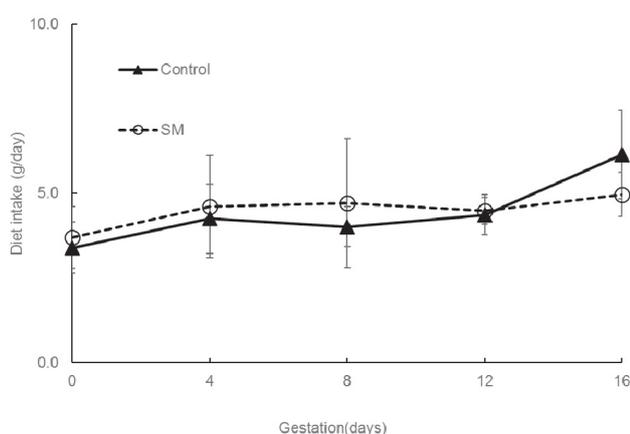
### 2. サケ白子抽出物による胎児への影響

胎児への影響を見てみると、生存胎児数及び体重において各群で有意な差はみられなかった。吸収胚は対照群で出

**Table 1** Effects of salmon milt extract on reproductive function and embryonic growth in pregnant mice.

Dietary groups	Control	SM
No. of pregnant mice examined	9	9
Maternal body weight gain, g	26.4 ± 3.9*	25.2 ± 4.2
No. of live fetuses, total	120	104
mean	13.3 ± 1.9*	11.6 ± 3.6
No. of resorption sites	1	0
No. of death fetuses	1	1
Fetal body weight, g	1.04 ± 0.16*	1.03 ± 0.11

\*Values are means ± SD.  
SM: salmon milt extract



**Fig. 1** Diet intake in control and salmon milt extract-fed pregnant mice.  
Each point represents means ± SD.  
SM: salmon milt extract

現し、死亡胎児は対照群と SM 群で出現した (Table 1)。しかし、サケ白子抽出物による影響は観察されなかった。

外表奇形は、対照群で小顎症と血腫が見られ、SM 群で巨舌症が 2 例見られたが、有意な増加は認められなかった (Table 3)。

## 考 察

食品や医薬品の安全性を調べるためにはいくつかの試験がある。一般的な試験法である一般毒性試験は被験物質を短期間または長期間曝露し、生体への影響をみる試験法である。これに対して被験物質の特定の影響を確認する特殊毒性試験としては、免疫毒性、遺伝毒性や生殖発生毒性試験など多岐にわたっている。遺伝毒性試験は、化学物質や医薬品の遺伝子突然変異誘発性の有無を *in vitro* および *in vivo* で調べる試験法である。生殖発生毒性試験とは、被験物質の親世代の生殖機能や次世代の発育への影響を見る試験法である。近年食品の安全性への意識が高まり、機能的食品、特定保健用食品や食品添加物の有害影響を調べる

ためには急性毒性試験、慢性毒性試験および繁殖試験が実施されている。

本研究においては、核酸の生殖発生毒性試験として、妊娠マウスに水溶性サケ白子抽出物を与え、胎児の発育および形態形成への影響を調べた。その結果、サケ白子抽出物の摂取によって親動物の体重増加および胎児の体重に変化は見られなかった。また吸収胚や胎児に血腫が散見されたが、外表奇形の増加は観察されなかった。

サケ白子抽出物に含まれる核酸の生殖発生毒性および遺伝毒性については、これまで数編の報告がある。核酸および塩基の生殖毒性については、古くから研究されている。うま味調味料として使用されているリボ核酸塩 (disodium 5'-ribonucleotide) を妊娠マウス、ラットおよびサルに器官形成期に強制経口投与した結果では、胎児の発育にはまったく悪影響は認められていない<sup>5)</sup>。同様にイノシン酸やグアニル酸でも影響はみられていない。これらの結果は、本研究での結果と一致している。

一方、Karnofsky and Lacon<sup>6)</sup> は、DNA スクレオシドであるアデノシン、グアノシンおよびイノシンをニワトリ受精卵の卵黄嚢に直接投与すると、胚に成長抑制、浮腫、骨の欠失、および顔面の異常など重篤な影響が認められている。哺乳動物においても、塩基の生殖発生毒性が報告されている。妊娠ラットに fluorocytosine (シトシンの代謝拮抗剤) を腹腔内投与すると、妊娠 9、10 日では催奇形性は認められていないが、妊娠 11、12 日では口唇口蓋裂、小顎症などの外表奇形がみられている<sup>7)</sup>。またアデニンの拮抗剤であるヒドロキシアミノプリンを妊娠ラットに腹腔内投与すると、妊娠 9、10 日では胎児に異常は観察されなかったが、妊娠 11、12 日では口蓋裂、小顎症、尾の異常などが胎児にみられた<sup>8,9)</sup>。AMP を妊娠マウスや妊娠ラットに腹腔内投与すると、胎児の発育に僅かな抑制がみられている<sup>10)</sup>。これらの結果の違いについて、投与した化合物の違いによるものであるが、投与経路の違いも一つの可能性として考えられる。

Schubbert et al.<sup>4)</sup> は、妊娠マウスに合成した DNA を摂

**Table 2** Blood test results in control and salmon milt extract-fed pregnant mice.

Dietary groups	Control	SM
TP (g/dL)	4.2±0.1	4.0±0.2
ALB (g/dL)	2.5±0.1	2.4±0.2
BUN (mg/dL)	22.5±4.28	24.1±5.97
CRE (mg/dL)	0.12±0.02	0.14±0.03
UA (mg/dL)	0.5±0.1	0.7±0.2*
Na (mEq/L)	152±0.84	150±1.79
K (mEq/L)	6.3±0.9	6.8±1.1
Cl (mEq/L)	110±2.49	109±3.58
Ca (mg/dL)	10.4±0.34	10.7±1.06
IP (mg/dL)	8.5±1.3	10±2.8
AST (IU/L)	85±15	97±49
ALT (IU/L)	22±5.3	20±1.5
LDH (IU/L)	406±121	441±162
AMY (IU/L)	7833±891.4	7404±444.0
γ-GT (IU/L)	3>	3>
T-CHO (mg/dL)	30±4.5	28±2.9
TG (mg/dL)	150±39.9	102±48.8
HDL-C (mg/dL)	12±2.4	12±2.2
T-BIL (mg/dL)	0.06±0.01	0.06±0.01
GLU (mg/dL)	110±10.1	132±27.6

Values are means ± SD.

\* $p < 0.05$ , compared with the control group ( $t$ -test).

SM: salmon milt extract

**Table 3** Incidences of gross malformations in fetuses of salmon milt extract-fed mice.

Dietary groups	Control	SM
No. of fetuses examined	120	104
No. of fetuses with		
micrognathia	1	0
(%)	(0.8)	(0.0)
macroglossia	0	2
(%)	(0.0)	(1.9)
hematoma	3	0
(%)	(2.5)	(0.0)

SM: salmon milt extract

取させると、胎児および出産児の核内に合成した外来DNAが移行していることを見出している。しかしながら、これらの遺伝子がゲノムに取り込まれているのか、あるいは機能しているのか明らかではない。この実験で使用している核酸は、単一の塩基配列を持つ遺伝子（ファージ由来およびオワンクラゲ由来の融合遺伝子）を摂取させている。これは食品やサプリメントに含まれる核酸とは全く異なるものである。このようなことから、われわれは毎日多種類の食品を摂取しているが、これらの食品のDNAがわれわれのゲノムの中に取り込まれていることについてはさらなる検討が必要である。

サケ白子の核酸以外では、たんぱく質の有用性についての報告も見られている。サケ白子たんぱく質の主な成分であるプロタミンには、アルギニンが豊富に含まれている。このアルギニンには、免疫反応の上昇、繁殖力の増加、インスリン分泌の活性化などの機能があることが知られている<sup>11-13</sup>。しかしながら、酵素処理により、プロタミンの多くはアミノ酸もしくはペプチドとなっていると想定される。したがって、核酸及びアルギニンが含まれているためにより効果的な生理作用があると考えられている。

*C. elegans* は、非寄生性の線虫（nematoda）の一種で全ゲノムの塩基配列が分かっている。また受精から成虫に至るまでの細胞系譜が完全に解明されているため、一般毒性のみでなく、遺伝、生殖毒性などの研究に利用されている。Shintani et al.<sup>14</sup> は、このサケ白子抽出物の *C. elegans* における生理機能への影響について調べたところ、ストレス耐性関連遺伝子の発現による熱や酸化に対するストレス耐性の促進、老化による運動減少の回復、寿命の延長が認められている。

これらの結果を総合的に判断すると、核酸を多く含む水溶性サケ白子抽出物には一般毒性試験および特殊毒性試験において有害な生体影響は観察されていない。このようなことから核酸を含む食品を日常的に摂取しても安全性が高いことが示唆される。

## 参考文献

- 1) Burrige PW, Woods RA, Henderson JF. (1976) Utilization of dietary nucleic acid purines for nucleotide and nucleic acid synthesis in the mouse. *Can J Biochem* 54: 500-506.
- 2) 岸直邦 (2008). 核酸・核タンパク質の機能性. 食品と科学 別冊, 食品と科学社, 東京.
- 3) Kojima-Yuasa A, Goto M, Yoshikawa E, Morita Y, Sekiguchi H, Sutoh K, Usumi K, Matsui-Yuasa I. (2016) Protective Effects of Hydrolyzed Nucleoproteins from Salmon Milt against Ethanol-Induced Liver Injury in Rats. *Mar Drugs* 14: E232.
- 4) Schubbert R, Hohlweg U, Renz D, Doerfler W (1998) On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol Gen Genet* 259: 569-576.
- 5) Kaziwara K, Mizutani M, Ihara T (1971) On the fetotoxicity of disodium 5'-ribonucleotide in the mouse, rat and monkey. *J Takeda Res Lab* 30: 314-321.
- 6) Karnofsky DA, Lacon CR (1961) Effects of physiological purines on the development of the chick embryo. *Biochem Pharmacol* 7: 154-158.
- 7) <http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/whatsnew/companylist/companyframe.html>
- 8) Chaube S, Murphy ML (1969a) Teratogenic effects of 6-hydroxylaminopurine in the rat-Protection by inosine. *Biochem Pharmacol* 18: 1147-1156.
- 9) Chaube S, Murphy ML (1969b) The teratogenic effects of 5-fluorocytosine in the rat. *Cancer Res* 29: 554-557.
- 10) Hashimoto Y, Nobuo T, Nomura M (1970) Studies on teratogenic action of adenine-5'-monophosphate in mice and rats. *Oyo Yakuri* 4: 625-633.
- 11) Zajac A, Poprzecki S, Zebrowska A, Chalimoniuk M, Langfort J (2010) Arginine and ornithine supplementation increases growth hormone and insulin-like growth factor-1 serum levels after heavy-resistance exercise in strength-trained athletes. *J Strength Cond Res* 24: 1082-1090.
- 12) Witte MB, Thornton FJ, Tantry U, Barbul A (2002) L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. *Metabolism* 51: 1269-1273.
- 13) Piñeiro V, Ortiz-Moreno A, Mora-Escobedo R, Hernández-Navarro MD, Ceballos-Reyes G, Chamorro-Cevallos G (2010) Effect of L-arginine oral supplementation on response to myocardial infarction in hypercholesterolemic and hypertensive rats. *Plant Foods Hum Nutr* 65: 31-37.
- 14) Shintani H, Furuhashi T, Hano H, Matsunaga M, Usumi K, Shudo N, Sakamoto K (2012) Physiological effects of salmon milt nucleoprotein on movement, stress tolerance and lifespan of *C. elegans*. *Food Nutr Sci* 3: 48-54.