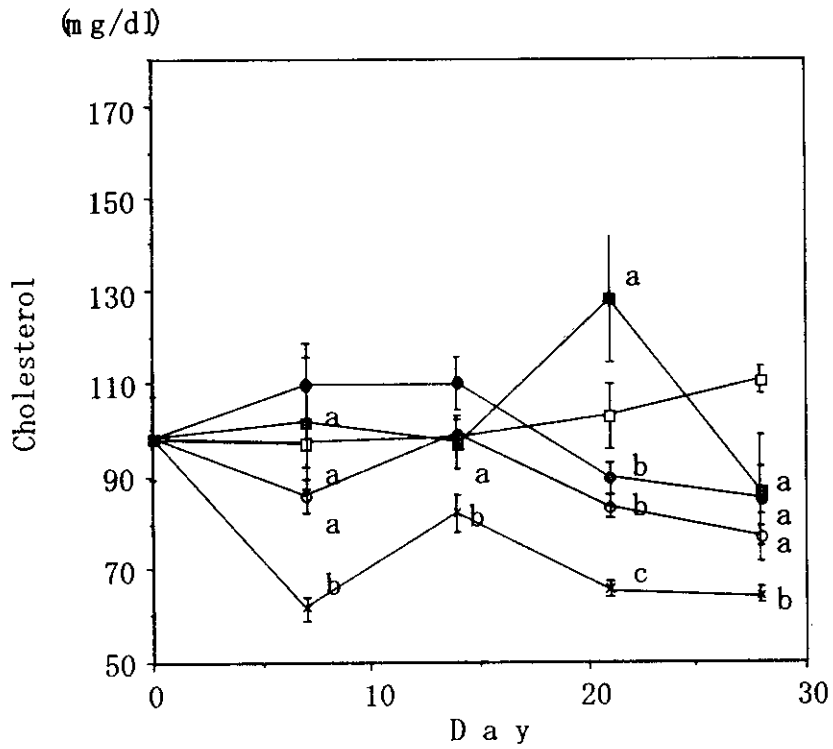


- 20% Casein+ Corn oil(15 eng%)
- 20% Soy protein+ Corn oil(15 eng%)
- 20% Soy protein+Econa cooking oil(15 eng%)
- 20% Soy protein+Econa cooking oil(30 eng%)
- ×— 20% Soy protein+Econa cooking oil(50 eng%)

図2 高コレステロールを含む食餌を摂取した動物の体重変化



a, b, c : $p < 0.05$ (vs Soy protein+Corn oil)

- 20% Casein+ Corn oil (15 eng%)
- 20% Soy protein+ Corn oil (15 eng%)
- 20% Soy protein+ Econa cooking oil (15 eng%)
- 20% Soy protein+ Econa cooking oil (30 eng%)
- ×— 20% Soy protein+ Econa cooking oil (50 eng%)

図3 血中コレステロールの経時的变化

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

特定保健用食品素材のアレルギー発現と安全性評価に関する研究

分担研究者 廣田晃一 独立行政法人 国立健康・栄養研究所健康・栄養情報研究室長
研究協力者 橋田誠一 宮崎医科大学助教授

系統的な文献検索の結果、通常アレルギーを惹起しないと思われる食品素材でも、特殊な環境においてはアレルゲンになるという報告が、特定保健用食品の素材においても見出され、確認試験を確立する必要性が示唆された。そこで大豆のアレルゲンであるトリプシンインヒビターをモデルとしたアレルゲンの高感度検出法を開発し、1amol(アットモル)/assay の検出が可能になった。

A. 研究目的

特定保健用食品素材がアレルギーを惹起する危険がないかどうか、その安全について明らかにすることを目的とした。既に多くの特定保健用食品が開発されているが、その幾つかは過去にアレルギー症例の報告された素材を用いている。したがってそのような素材を用いた特定保健用食品にはアレルギーを惹起する危険性がないとはいえないが、素材を精製、加工して用いている場合には、アレルゲン性も変化あるいは全く消失している可能性も考えられる。食品素材と一口にいっても、その種類は多様であり、その加工法も千差万別であることから、本研究において、まずその全体像を文献的な調査によって把握することとした。

調査対象とした食品素材は以下のものである。

キトサン
グアーガム
アルギン酸ナトリウム
サイリウム

大豆たんぱく質

茶

茶ポリフェノール

グアバ茶ポリフェノール

デキストリン

オリゴ糖

valyl-チロシン

LKPNM

ジアシルグリセロール

さらに、安全性評価は最終的には食品素材中のアレルゲンの特定保健用食品中での残存（アレルゲン性を保持した状態において）が問題になると思われるので、アレルゲンの高感度測定法の開発を行った。

なお、以下のセクションにおいては、混乱を避ける為に、1.文献調査と2.実験を分けて各々方法及び結果を続けて詳述することにした。

1. 文献調査：特定保健用食品素材のアレルギー関連文献について

B-1. 研究方法

米国立医学図書館がインターネット上で提供している PubMed を用いて Index Medicus 収録文献の粗検索を行い、食品素材のアレルギーその他過敏症例に関する文献を収集整理した。

C-1. 研究結果

[キトサン]

キトサンは多糖類の一種であり、化粧品にも使用されているため、接触性皮膚炎の報告が2報あった。共に化粧品会社から提供されたキトサンのサンプルがパッチテストで陽性反応を示したというものである。

Cleenewerck, M.B. et al.; Allergic contact dermatitis due to a moisturizing body cream with chitin. *Contact Dermatitis*, 31: 196-197 (1994).

アレルギー性接触性皮膚炎を起こした37才の非アトピーの女性。顔と首に湿疹、眉に紅斑。通常のパッチテストではいずれも陰性。キチン誘導体入りの化粧品が疑われ、製造者より提供された原料のうち chitosan gluconate に++反応を示した。

Pereira, F. et al.; Contact dermatitis due to a cream containing chitin and a Carbitol. *Contact Dermatitis*, 38: 290-291 (1998).

接触性皮膚炎を起こした32才の主婦。14年間手に湿疹。キチン入り化粧品で皮膚炎。製造者より提供された23種の原料のうち chlorhydrate glucosamine、ethyl diglycol Carbitol、chitosan gluconate に陽性。

[グアーガム]

植物性のゴムには喘息を惹起するものが幾つか知られている。グアーガムは、インド産の植物 *Cyamopsis tetragonolobus* から取れる。職業病の一種として、グアーガムによる鼻炎と喘息が報告されている。

Kanerva, L. et al.; Occupational allergic rhinitis from guar gum. *Clin. Allergy*, 18: 245-252 (1988).

グアーガムに起因するアレルギー性鼻炎3例。2例はゴム管の絶縁体に使われていたグアーガム微粉末に曝露。1-2年間の曝露後に鼻炎発症。1例は製紙会社で別のグアーガムに2年間曝露後アレルギー性鼻炎発症。

Lagier, F. et al.; Occupational asthma caused by guar gum. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 85: 785-790 (1990).

喘息3例。1例は製薬会社勤務、残り2例はカーペット製造プラント勤務。3例とも鼻炎と喘息を発症、グアーガムに対する血清特異IgEを検出。また特異IgG値も高め。

Malo, J.-L. et al.; Prevalence of occupational asthma and immunologic sensitization to guar gum among employees at a carpet-manufacturing plant. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 86: 562-569 (1990).

カーペット製造プラント勤務者の調査。23%に職業性喘息の疑い、36%に職業性鼻炎の疑い。5%にグアーガムパッチテスト陽性。8.3%にグアーガムに対する血清特異

IgE を検出。

Cloutier, Y. et al.; Validation of an exposure system to particles for the diagnosis of occupational asthma. *Chest*, 102:402-407 (1992).

職業性喘息診断の為の粒子曝露システムの評価報告。グアーガム陽性患者 9 例を含む。

Lemiere, C. et al.; Persistent specific bronchial reactivity to occupational agents in workers with normal nonspecific bronchial reactivity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162: 976-980 (2000).

特異気管支反応性に関する報告。4 例のグアーガムによる職業性喘息発症者を含む。

[アルギン酸ナトリウム]

アルギン酸塩は海草から抽出された複雑に重合した多糖類である。アレルギーの報告は特になく、アルギン酸工業従事者に対する調査があるだけと思われる。

Henderson, A.K. et al.; Pulmonary hypersensitivity in the alginate industry. *Scott. Med. J.*, 29: 90-95 (1984).

英国 2 工場のアルギン産工業従事者に対する調査の結果 7%の従事者に海草粉塵に対する肺過敏症があり、4.5%の血清から特異的な抗体が検出されたというもの。

[サイリウム]

サイリウムはオオバコ科の植物 *Plantago ovata* の種皮であり、可溶性繊維

に富むことから食物繊維としてスナック麺等に使用されている。また血清コレステロール値を低下させる作用があることも知られているが、職業的にサイリウムのダストに曝露している場合にアレルギーの惹起される場合のあることが知られている。

既に平成 9 年 12 月 26 日付けで各都道府県政令市特別区衛生主管部局長宛に厚生省生活衛生局食品保健課長食品化学課長連名で「サイリウム種皮、サイリウムシードガム等サイリウムを含む食品又は添加物によるアレルギーの報告について」(衛保第 361 号衛化第 169 号)が出されているのでここでは症例についての文献は書誌事項を列挙するに留め、詳しくは述べない。なお、同文書中の高度に精製されたサイリウム製品では抗体結合が実質的に検出されなかったという記述は、*Plantago ovata* の種皮に結合している「たんぱく質」がアレルゲンであるという意味であって *Plantago ovata* 以外の混在する不純物が原因であるということではない。

Busse, W.W. et al.; Asthma from psyllium in laxative manufacture. *Ann. Intern. Med.*, 83: 361-362 (1975).

Machado, L. et al.; Occupational allergy in nurses to a bulk laxative. *Allergy*, 34:51-55 (1979).

Nelson, A.M. et al.; Eosinophilia associated with psyllium hydrophilic colloid ingestion. *JAMA*, 243:329-330 (1980).

- Rosenberg, S. et al.; Serum IgE antibodies to psyllium in individuals allergic to psyllium and english plantain. *Ann. Allergy*, 48: 294-298 (1982).
- Machado, L. et al.; Dust exposure challenge test as a measure of potential allergenicity and occupational disease risk in handling of ispaghula products. *Allergy*, 38: 141-144 (1983).
- Suhonen, R. et al.; Anaphylactic shock due to ingestion of psyllium laxative. *Allergy*, 38: 363-365 (1983).
- Seggev, J.S. et al.; IgE mediated anaphylaxis due to a psyllium-containing drug. *Ann. Allergy*, 53: 325-326 (1984).
- Zaloga, G.P. et al.; Anaphylaxis following psyllium ingestion. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 74:79-80 (1984).
- Gauss, W.F. et al.; Workplace allergenicity of a psyllium-containing bulk laxative. *Allergy*, 40: 73-76 (1985).
- Bardy, J-D. et al.; Occupational asthma and IgE sensitization in a pharmaceutical company processing psyllium. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 135: 1033-1038 (1987).
- Lantner, R.R. et al.; Anaphylaxis following ingestion of a psyllium-containing cereal. *JAMA*, 264: 2534-2536 (1990).
- Kaplan, M.J.; Anaphylactic reaction to "Heartwise." *N. Engl. J. Med.*, 323: 1072-1073 (1990).
- McConnochie, K. et al.; Ispaghula sensitization in workers manufacturing a bulk laxative. *Clin. Exp. Allergy*, 20: 199-202 (1990).
- Malo, J-L. et al.; Prevalence of occupational asthma and immunologic sensitization to psyllium among health personnel in chronic care hospitals. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 142: 1359-1366 (1990).
- James, J.M. et al.; Anaphylactic reactions to a psyllium-containing cereal. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 88: 402-408 (1991).
- Marks, G.B. et al.; Asthma and allergy associated with occupational exposure to ispaghula and senna products in a pharmaceutical work force. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144:1065-1069 (1991).
- Drake, C.L. et al.; Systemic anaphylaxis after ingestion of a psyllium-containing breakfast cereal. *Am. J. Emerg. Med.*, 9: 449-451 (1991).
- Cloutier, Y. et al.; Validation of an exposure system to particles for the

diagnosis of occupational asthma. *Chest*, 102:402-407 (1992).

職業性喘息診断の為の粒子曝露システムの評価報告。サイリウム陽性患者 9 例を含む。

Gillespie, B.F., Rathbun, F.J.; Adverse effects of psyllium. *Can. Med. Assoc. J.*, 146:16-17 (1992).

Freeman, G.L.; Psyllium hypersensitivity. *Ann. Allergy*, 73: 490-492 (1994).

Vaswani, S.K. et al.; Psyllium laxative-induced anaphylaxis, asthma, and rhinitis. *Allergy*, 51: 266-268 (1996).

Lemiere, C. et al.; Persistent specific bronchial reactivity to occupational agents in workers with normal nonspecific bronchial reactivity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162: 976-980 (2000).

以下はアレルゲンの精製についての報告である。ただし、サイリウムそのものについての報告はまだない。

Morgan, M.S. et al.; English plantain and psyllium: lack of cross-allergenicity by crossed immunoelectrophoresis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 75: 351-359 (1995).

サイリウムのアレルゲンは特定されていないが、この報告は類縁植物である English plantain とサイリウムでは交差ア

レルゲン性が低いというもの。

Calabozo, B. et al.; Purification and characterization of the main allergen of *Plantago lanceolata* pollen, Pla l 1. *Clin. Exp. Allergy*, 31: 322-330 (2001).

前項の報告から、サイリウムのアレルゲンとの共通性は低いと思われるが、English plantain の花粉アレルゲン Pla l 1 の精製の報告。

Calabozo, B. et al.; Monoclonal antibodies against the major allergen of *Plantago lanceolata* pollen, Pla l 1: affinity chromatography purification of the allergen and development of an ELISA method for Pla l 1 measurement.

さらに、Pla l 1 に対するモノクローナル抗体の調製と ELISA の開発の報告。

[大豆たんぱく質]

大豆は、牛乳、卵等と並ぶ著名な食物アレルギーの原因素材であり、植物性食品中では比較的アレルゲンの解析が進んでいる。植物アレルゲンには、アミラーゼ/トリプシン・インヒビターファミリーのように植物間で高い共通性のあるものが知られており、IgE の交差性も高いと思われることから、食品素材のアレルゲンを検索していくためのひとつの手がかりになると思われる。大豆アレルゲンとして Gly m Bd 60K, Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K, Gly m 1A, Gly m 1B, Gly m 3、グリシニン、トリプシンインヒビター等のたんぱく質が同定されている。

大豆トリプシンインヒビターは Kunitz によって 1946 年に結晶化されており、高

純度の精製標品が入手可能な数少ないアレルギーの一つである。1980年にMorozとYangによってアレルギー症例が報告されて以来大豆の主要なアレルギーの一つと考えられている。上記のような理由から大豆以外の植物を素材として用いている場合にも大豆トリプシンインヒビターに対する抗体(交差反応性を有する抗体)が検出される可能性がある。この点を考慮して後半の高感度測定法の開発においては、トリプシンインヒビターをモデルとした。

Moroz, L.A., Yang, W.H.; Kunitz soybean trypsin inhibitor. A specific allergen in food anaphylaxis. *N. Eng. J. Med.*, 302: 1126-1127 (1980).

ある種の豆類を食べた後にangioedema及び蕁麻疹を起こす女性。大豆摂食後に重篤な反応。チリ生まれで大豆は日常的に摂取、現在はカナダ在住。市販の精製トリプシンインヒビターにパッチテスト陽性であり、このたんぱく質に対する血清特異IgE抗体を保有することが明らかにされた。

Quirce, S. et al.; Soybean trypsin inhibitor is an occupational inhalant allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 109:178 (2002).

35才と37才の2例のパン職人。職業的に大豆粉に接触。大豆粉に対する職業的喘息と診断。市販の精製トリプシンインヒビターのウェスタンブロットで、このたんぱく質に対する特異的IgEの存在が証明された。

Codina, R. et al.; Neoallergens in heated

soybean hull. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 117: 120-125 (1998).

大豆アレルギーの熱処理による変化についての報告。アレルギーが熱処理によって変化するだけでなく、熱処理自体が新たにアレルギー性を持つ変性たんぱく質を生じた。

Codina, R. et al.; Identification of the soybean hull allergens responsible for the Barcelona asthma outbreaks. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 119: 69-71 (1999).

スペインのバルセロナとカルタゲナを襲った喘息の大流行は市港湾からの大豆莢の飛散によるものであった。18の症例について検討した結果、15例から特異的IgEが検出され、ウェスタンブロットによる解析の結果Gly m2, Gly m 1A, Gly m 1Bの3種のたんぱく質が主要なアレルギーであると示唆された。

Codina, R. et al.; Sensitization to soybean hull allergens in subjects exposed to different levels of soybean dust inhalation in Argentina. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105: 570-576 (2000).

365例の喘息あるいはアレルギー性鼻炎患者血清の検討から、接触頻度によってパッチテストの陽性率やIgE、IgG4抗体価が有意に異なることが示唆された。

Ogawa, T. et al.; Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 46: 271-279 (2000).

大豆に感受性のあるアトピー性皮膚炎患

者血清はおよそ 15 種の大豆たんぱく質と反応するが、主要な 3 つは、Gly m Bd 60K, Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K である。

Helm, R.M. et al.; A soybean G2 glycinin allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 123: 205-212 (2000).

G2 グリシニン大豆たんぱく質ファミリーのひとつである 22 kD のたんぱく質がアレルゲンとして同定された。

Beardslee, T.A. et al.; Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 123: 299-307 (2000).

大豆アレルゲンであるグリシニン G1 酸性鎖はピーナッツのアレルゲン Ara h 3 と同じエピトープ部分を有する。

[茶ポリフェノール]

次項のグアバ茶と同様一般的にはアトピー性皮膚炎等アレルギー性疾患に治療効果を有すると考えられており、実際そのような報告もあるが、以下に取り上げるようにポリフェノールそのものが喘息を惹起したというような報告も見られた。ただし、茶粉塵による喘息の原因が全てポリフェノールかどうかは明らかではない。

Roberts, J.A., Thomson, N.C.; Tea-dust induced asthma. *Eur. Respir. J.*, 1: 769-770 (1988).

茶パッキング製造ラインで働く 55 歳の女性労働者。茶粉塵に対する喘息を発症。茶粉塵の溶液を含めて全てのパッチテストに陰性。PEFR の測定から職業性のものと

判定。茶粉塵を用いた気管支誘発試験で遅発性喘息と診断。

Cartier, A., Malo, J.-L.; Occupational asthma due to tea dust. *Thorax*, 45: 203-206 (1990).

茶パッキング業に従事して喘息を発症した 43 才、38 才及び 40 才の女性 3 例。3 例とも茶溶液のパッチテスト陰性。

Shirai, T. et al.; Epigallocatechin gallate. The major causative agent of green tea-induced asthma. *Chest*, 106: 1801-1805 (1994).

緑茶工場に勤務する緑茶粉塵によって喘息及び鼻炎を発症した 3 例。3 例とも精製したポリフェノールの一種であるエピガロカテキンガレートに陽性反応（健常人コントロール群及び茶粉塵非曝露喘息症群は陰性）。

Shirai, T. et al.; Epigallocatechin gallate-induced histamine release in patients with green tea-induced asthma. *Ann. Allergy, Asthma, Immunol.*, 79: 65-69 (1997).

前報と同じ報告者によるエピガロカテキンガレートの作用機作に関する報告。

Jayawardana, P.L., Udupihille, M.; Ventilatory function of factory workers exposed to tea dust. *Occup. Med.*, 47: 105-109 (1997).

53 人の 5 年以上製茶工場に勤務する研究群と茶粉塵に接触したことのないフィールドワーカーの対照群の疫学的検討。茶粉塵

に慢性的に曝露することで呼吸器系障害を起こす率が有意に高まる。

[グアバ茶]

グアバ(*Psidium guajava*)は中南米に広く生育する植物である。通常果実をゼリーやジャムにする。根や樹皮はタンニンのために渋い。近年日本ではグアバ茶が皮膚病に良いとして商品化されたが、このグアバ茶に起因するアレルギー性接触性皮膚炎の症例報告が1例ある。

Obi, M. et al.; Allergic contact dermatitis due to guava tea. *Contact Dermatitis*, 44: 116-117 (2001).

5才のときからアトピー性皮膚炎の現在17才の高校生男子。典型的なコルチコステロイド剤を処方され、最近グアバ茶抽出物が処方された。50リットルの湯船に30グラムのグアバ茶ティーバックを入れて使用したが、皮膚炎が拡大したので使用を中止した。パッチテストでグアバ茶抽出物陽性(他にも陽性あり)。電気泳動で抽出物から45 kDのたんぱく質を検出。このたんぱく質とタンニン(ポリフェノール的一种)がアレルゲンと思われた。タンニンについては他の植物の場合であるが接触性皮膚炎を惹起したという報告が複数存在した。

[デキストリン]

[オリゴ糖]

[valyl-チロシン]

[LKPNM]

[ジアシルグリセロール]

以上5種の食品素材については、アレルギーを惹起したという報告は見つからなかつた。

2. 実験:大豆トリプシンインヒビターの高感度酵素免疫測定法(ICT-EIA)の開発

B-2. 研究方法

[材料]精製大豆トリプシンインヒビター Biogenesis社より購入した。抗大豆トリプ

シンインヒビターIgGはRockland社より購入した。兔抗2,4-ジニトロフェニル-牛血清アルブミン血清はシバヤギ社より購入した。

[標識抗体調製]SATAを用いて調製したTriacetyl-protected sulphhydryl非特異

兔IgGをCNBr活性化法を用いてセファロース4Bに固定化した。続いてこのTriacetyl-protected sulphhydryl非特異

兔IgGのSH基を活性化し、EMCSを用いてマレイミド基を導入したトリプシンインヒビターと結合させ、最終的にトリプシン

インヒビター固定化セファロース4Bを得た。このトリプシンインヒビター固定化セファ

ロース4Bを用いて抗大豆トリプシンインヒビターF(ab)₂をアフィニティ精製した。抗体の溶出はpHを2.5にすることで行った。

アフィニティ精製抗大豆トリプシンインヒビターF(ab)₂を還元後、βガラクトシダーゼによって酵素標識したものと、2,4-ジ

ニトロフェニル-牛血清アルブミンで捕捉用標識した2種類のコンジュゲートを調製した。

[ICT-EIA]大豆トリプシンインヒビターを酵素標識抗体及び捕捉用標識抗体と16時間インキュベーションした後、アフィ

ニティ精製した抗2,4-ジニトロフェニル基IgGを固相化した直径6.4mmのポリスチレンビーズを加え0.5時間反応させた。ビーズを洗浄後、2mMジニトロフェニル-L-

リジンと 0.5 時間反応させた後ビーズを除去した。溶出液にストレプトアビジンを固相化したポリスチレンビーズを加え 0.5 時間反応させた。ビーズとの反応は全て室温で 180rpm の振とう下に行った。再びビーズを洗浄後、ビーズ上の β ガラクトシダーゼ活性を蛍光基質を用いて測定した。

C-2. 研究結果

大豆トリプシンインヒビターの検出限界は 20 fg(1 amol)/assay であった (図 1)。またアッセイレンジは 1-10,000 amol/assay であった。測定値のアッセイ内変動は CV 値 7.5%以下であった。

D. 考察

特定保健用食品素材には食品アレルギーを惹起することが良く知られているものももちろんあるが、茶ポリフェノールやキトサンのように通常はアレルギーを起こさないとされるものもある。しかし、通常アレルギーを起こさないとされる食品素材であっても、連続的に吸入していると喘息や鼻炎の原因になることがある。その数は少ないものの、時としてサイリウムのように医薬品として大量に用いられていたために医療関係者が感作され、また一般的なシリアルに用いられた為に思わぬアレルギーを惹起する場合があります、注意が必要と思われる。

しかし、やはり通常の食品としてもっとも問題になるのは、経口摂取でアレルギーを惹起する食品アレルギーであり、特にラベル等に明示されていない、製造工程での混入や交差性のある食品素材による場合であろう。実際、製造工程での器具洗浄が不

充分であった為に予期せぬ混入を起し、それがアレルギーを惹起した例が実際に知られている。

このような事件を避ける為には、食品素材だけでなく特定保健用食品そのものにそのような予期せぬ混入がないかを検査する必要があり、そのためには高感度でかつ特異性の高い検出法の開発が必要である。

ICT-EIA 法は免疫学的な特異性の高い検出法の中でも最も検出感度の高い方法の一つであり、1 zmol の検出も報告されている。今回我々は、この方法を大豆トリプシンインヒビターの検出に応用し、1 amol/assay の感度を得た。1 amol のたんぱく質はアレルギーとして作用し得る限界以下の量と考えられるが、もしこの方法によりトリプシンインヒビターを検出し得たとすれば、大豆あるいは類縁植物の混在が示唆されたことになり、もしラベル等に明示されていない場合には問題となりうるだろう。これはあくまで可能性の問題であって、特定保健用食品でそのような事例は確認されておらず、またあつてはならないと思うが、実際に通常の食品でそのような事例があるとすれば、確認試験の方法を確立し実際に確認試験を適用することも必要であろうと思われる。

E. 結論

通常アレルギーを惹起しないと思われる食品素材でも、特殊な環境においてはアレルギーになるという報告が、特定保健用食品の素材においても見出され、確認試験の必要性が示唆された。そこで大豆のアレルギーであるトリプシンインヒビターをモデルとしたアレルギーの高感度検出法を開発

した。

F. 健康危険情報

キトサン、グアーガム、緑茶、グァバ茶にはアレルギーが存在し、製造工場のような特殊な条件下で粉塵を持続的に吸入したばあいに喘息が惹起されたり、直接接触によってアトピー性皮膚炎が惹起される可能性があるが、極めて稀である。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

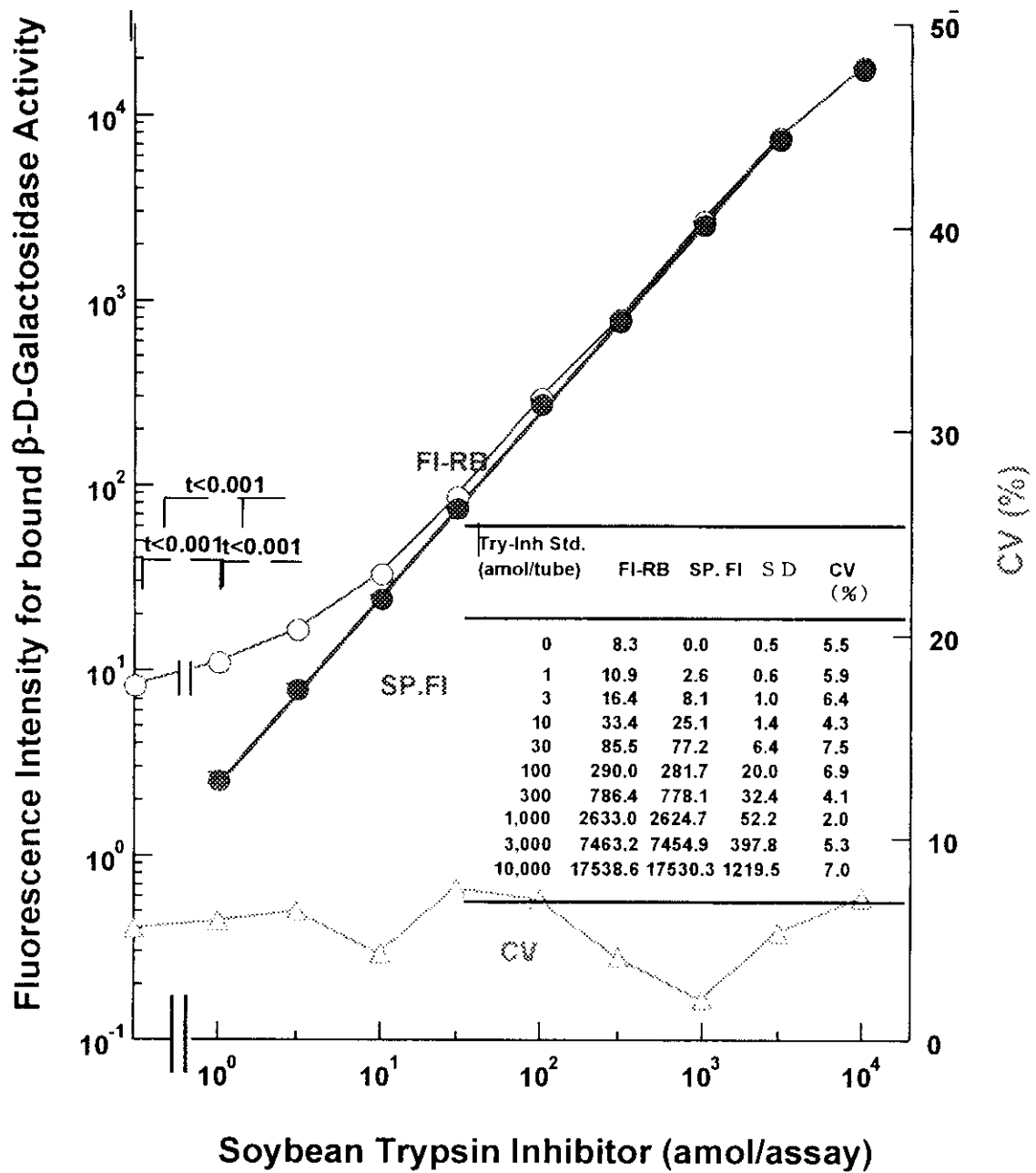


図1 大豆トリプシンインヒビターのICT-EIA
(検量線と各濃度における変動係数)

抗肥満作用を示す食品、栄養成分の検索と安全性の研究

分担研究者 江崎 治 独立行政法人 国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部長
研究協力者 仲谷照代, 高橋真由美 独立行政法人 国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部

抗肥満作用を示すと考えられる食品が多数存在するが、中でもn-3系脂肪酸含量の多い魚油摂取は、血中脂質低下作用や虚血性心疾患および炎症を抑制する。マウスにおいては魚油の高脂肪食は肥満を生じない。本研究ではこれらの作用に、どのような遺伝子が関与しているか検討した。魚油による抗肥満作用とPPAR α の活性には強い相関が認められたがSREBP-1c量との相関性はなかった。PPAR α の活性化により熱消費に関与するUCP2発現が肝細胞において増加した。又、抗酸化関連遺伝子の発現の増加が認められ、魚油の多くの生理作用がPPAR α を介することが推定された。

A. 研究目的

魚油、お茶、L-カルニチン、ピルビン酸、クエン酸など抗肥満作用を示すと考えられている物質が多く存在する。これらの成分はいわゆる健康食品として多く出回っているが、効果と安全性は充分には検証されていない。抗肥満作用機序についても、未だ明らかにされていない。近年、脂質代謝をコントロールする、PPARs, SREBPsといった転写因子が肥満に関与していることがわかってきた。本年度は、魚油について焦点をあて、その抗肥満効果と作用メカニズムについて検討を行った。

魚油に多く含まれるn-3系脂肪酸は疫学的研究より虚血性心疾患を防ぐ効果があることが明らかになっており、eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA)といったn-3系脂肪酸を多く含む魚油の摂取は虚血性心疾患予防に有効であると考えられ

る。また動物実験においてはインスリン抵抗性改善や肥満抑制作用も報告されている。しかし未だにそのメカニズムは明らかではないことや、魚油は容易に酸化を受ける性質を持つことから、生じた酸化物による細胞へのダメージが懸念されるなど、生体での安全性については明らかになっていない。

実際に魚油摂取により抗肥満効果がみられるのかフェノタイプの変化を調べ、その作用メカニズムを検討するため、どのような遺伝子が増加するかジーンチップを用いて網羅的に遺伝子発現の変化を調べた。また、肥満に関与する脂質代謝関連遺伝子(SREBP-1, SCD-1, FAS)や熱消費に関連するUCP2発現についての検討も行った。

B. 研究方法

実験1：脂肪エネルギーを一定にし（摂取エネルギーの60%）、魚油をサフラワー油と置き換えることにより魚油の量を10-

60%と10%ごとに変え、C57BL/6J マウスに1週間与えた。

実験2：対照群を炭水化物食群（脂肪エネルギー比10%）とし、高脂肪食群（脂肪エネルギー比60%）としてn-6系のサフラワー油食とn-3系の魚油食を7週齢C57BL/6Jの雌マウスに24週間自由摂取させた。飼育終了後、肝臓よりmRNAを抽出し、アフィメトリクックス社ジーンチップMurine6.5Kを用いて遺伝子の発現を解析した。

実験3：7週齢C57BL/6Jの雌マウスに対照群を炭水化物食とし、炭水化物食にPPAR α の活性化剤であるフィブレートを追加

(0.5%,wt/wt)したフィブレート食、サフラワー油食、魚油食を1週間自由摂取させた後、肝臓よりmRNAを抽出し各種遺伝子の発現量をNorthern Blotにより定量した。

実験4：C57BL/6Jマウス及びSD系ラットに高魚油食、高炭水化物食にフィブレートを添加(0.5%, wt/wt)したフィブレート添加食を2日間摂取させた後、肝実質及び非実質細胞を分離・採取し、UCP2の発現量について調べた。細胞実験では、初代培養肝細胞を用いた。

C. 研究結果

魚油摂取による体重増加、脂肪蓄積抑制効果は、1週間の投与にもかかわらず魚油濃度依存的に認められた（図1）。この抑制効果は、PPAR α のターゲット遺伝子LPL、ACSとの発現量の変化と一致したが（図2）、SREBP-1cのターゲット遺伝子FAS、SCD1との変化とは相関せず、PPAR α の活性化が関与していることが強く示唆された。

ジーンチップによる遺伝子解析の結果、

魚油食により発現増加していた遺伝子を機能別に分類すると、免疫反応、脂質代謝、抗酸化関連の遺伝子が著しく増加していた。免疫反応ではkappa-immunoglobulin、gelsolin、脂質代謝ではfatty acid transport protein、cytochrome P-450 4a-10、long-chain fatty acyl CoA synthetase、carnitine palmitoyltransferase IIなどのPPAR α の活性化により増加することが報告されている脂肪酸の β 酸化に関与する遺伝子が増加し、抗酸化関連ではUCP2、glutathione transferase、Manganese superoxide dismutaseの遺伝子が増加していた（図3）。また免疫反応に関与する遺伝子は魚油食の長期摂取においてのみ発現が増加し、PPAR α の活性化剤であるフィブレートをマウスに投与しても発現の変化が認められなかったことからPPAR α を介した調節ではないことが示唆された。抗酸化関連の遺伝子についてはフィブレート食でも増加したことより、PPAR α の活性化を介した調節が行われていることが示唆された。

次にUCP2の発現増加機序について詳しく検討した。その結果、魚油によるUCP2の発現増加は肝実質細胞で認められ、PPAR α の活性化を介しROSを介した作用でないことが示唆された。肝細胞では、 β -oxidationとともにエネルギー消費の亢進に関与するUCP2の発現量が亢進することを見出した（図4）。

D. 考察

魚油摂取はPPAR α を活性化により、肝臓での脂肪酸の β 酸化に関与する遺伝子の発

現を増加させ、脂肪酸の β 酸化を亢進させることにより抗肥満作用を及ぼしている可能性が示唆された。また SREBP-1c による転写調節で血中脂質低下作用も行っていることが示唆された。

一方、魚油は長鎖脂肪酸を多く含むことや、PPAR α の活性化のためペルオキシゾームでの β 酸化が活発になり活性酸素の生成も上昇すると考えられるが、これに対しては抗酸化関連遺伝子の発現を増加させることで生体を酸化から防御すると考えられた。したがって、抗肥満作用や血中脂質低下作用をもつ魚油摂取は安全性が高く、生活習慣病の予防に有効であると考えられた。

E. 結論

魚油の抗肥満作用は、肝での PPAR α 活性化によること、又、肝細胞での UCP2 の発現増加が関与していることが示された。又、魚油による PPAR α 活性化機序により抗酸化に関与する酵素の発現量が増加することが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, and Ezaki O. (2002) Mechanism for PPAR α activators-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. J. Biol. Chem.; 277: 9562-9569
2. Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, and Ezaki O. (2002) Fish

oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR α activation and ROS production. Am. J. Physiol. Feb; 282(2): G338-348.

3. Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T. (2001) Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. J. Clin. Invest., Oct;108(7):1001-13.

4. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. Nat. Med. Aug; 7(8): 941-6.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

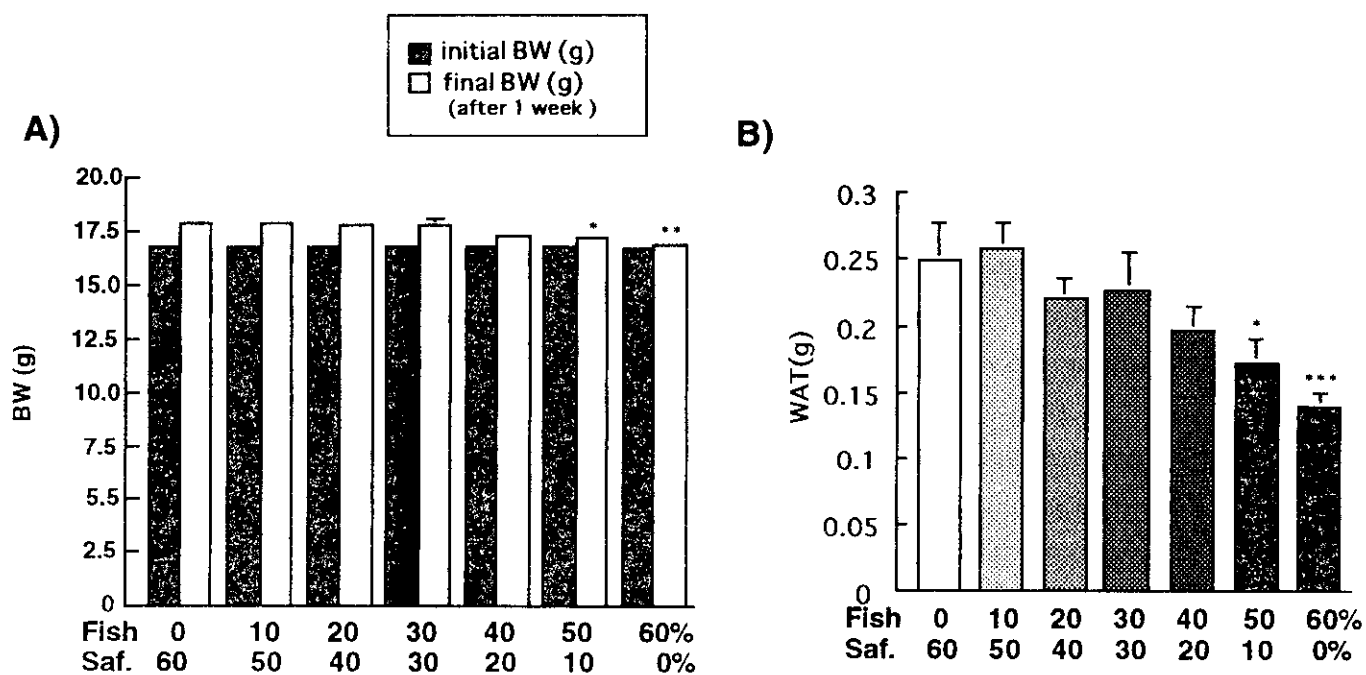
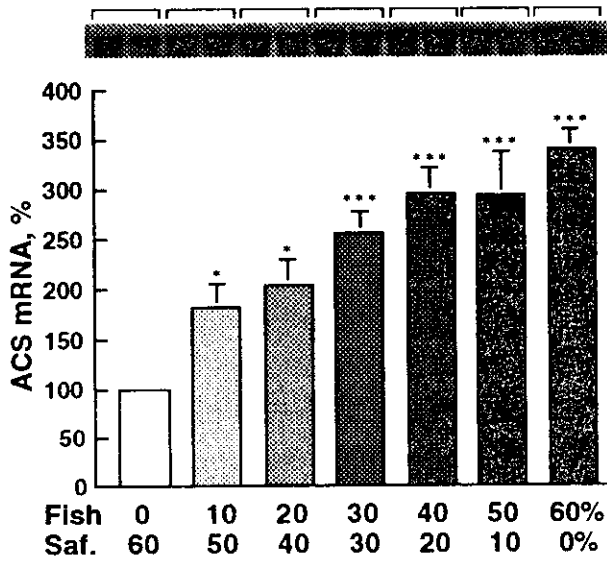


図1 魚油0, 10, 20, 30, 40, 50, 60%と摂取量を変化させた時の体重(A)、子宮周囲脂肪量(B)の変化

A)



B)

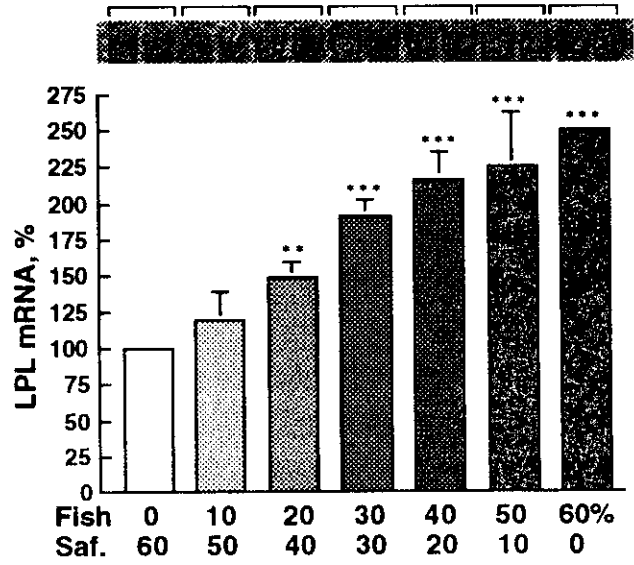


図2 PPAR α 活性化に関連する遺伝子:アシルCoAシンターゼ (ACS) (A),
リポタンパク質リパーゼ (LPL) (B)への魚油の濃度依存的な効果

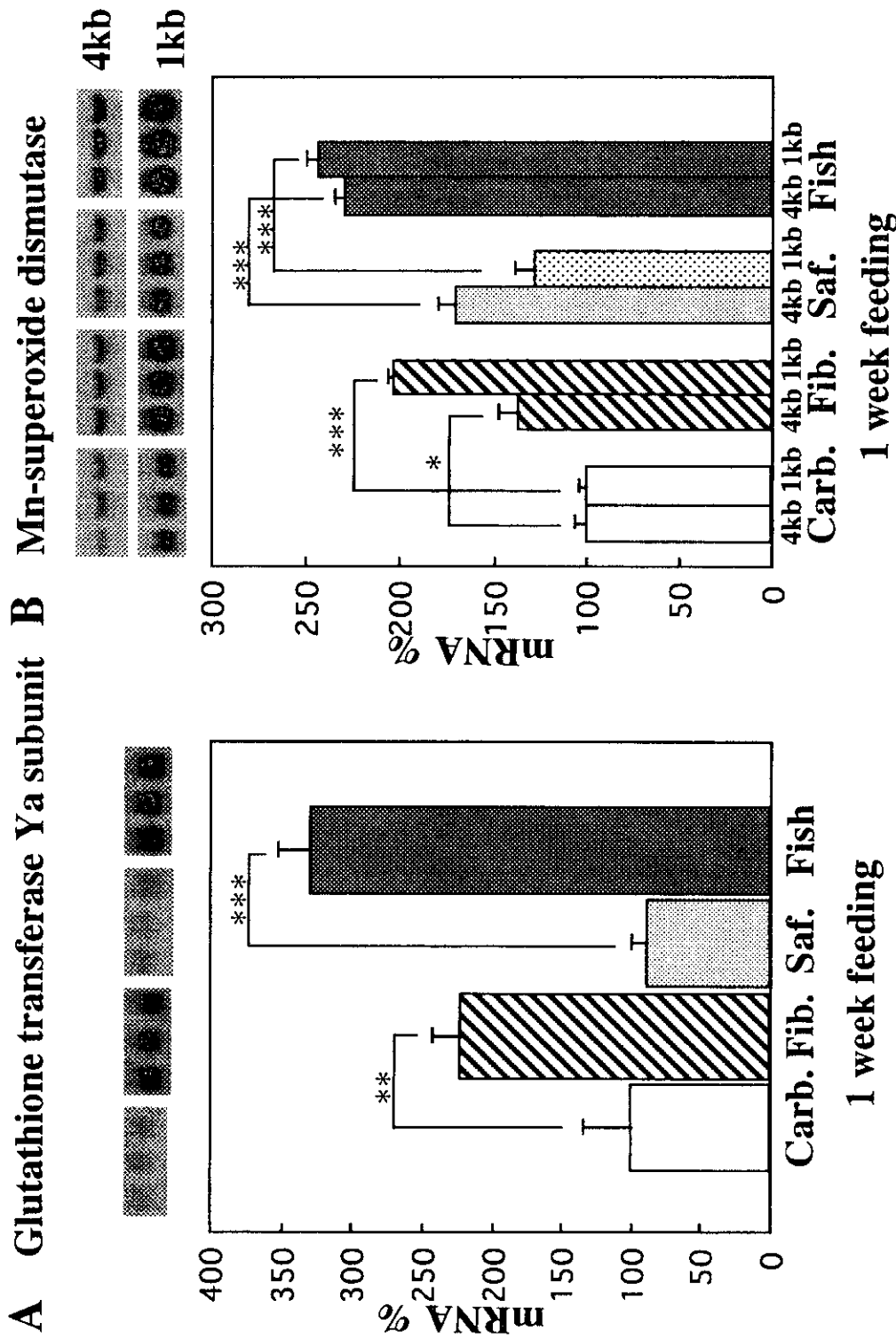


図3 魚油、フィブレート摂取による抗酸化関連酵素：glutathione transferase Ya subunit(A), Mn-superoxide dismutase(B)mRNA発現量の変化

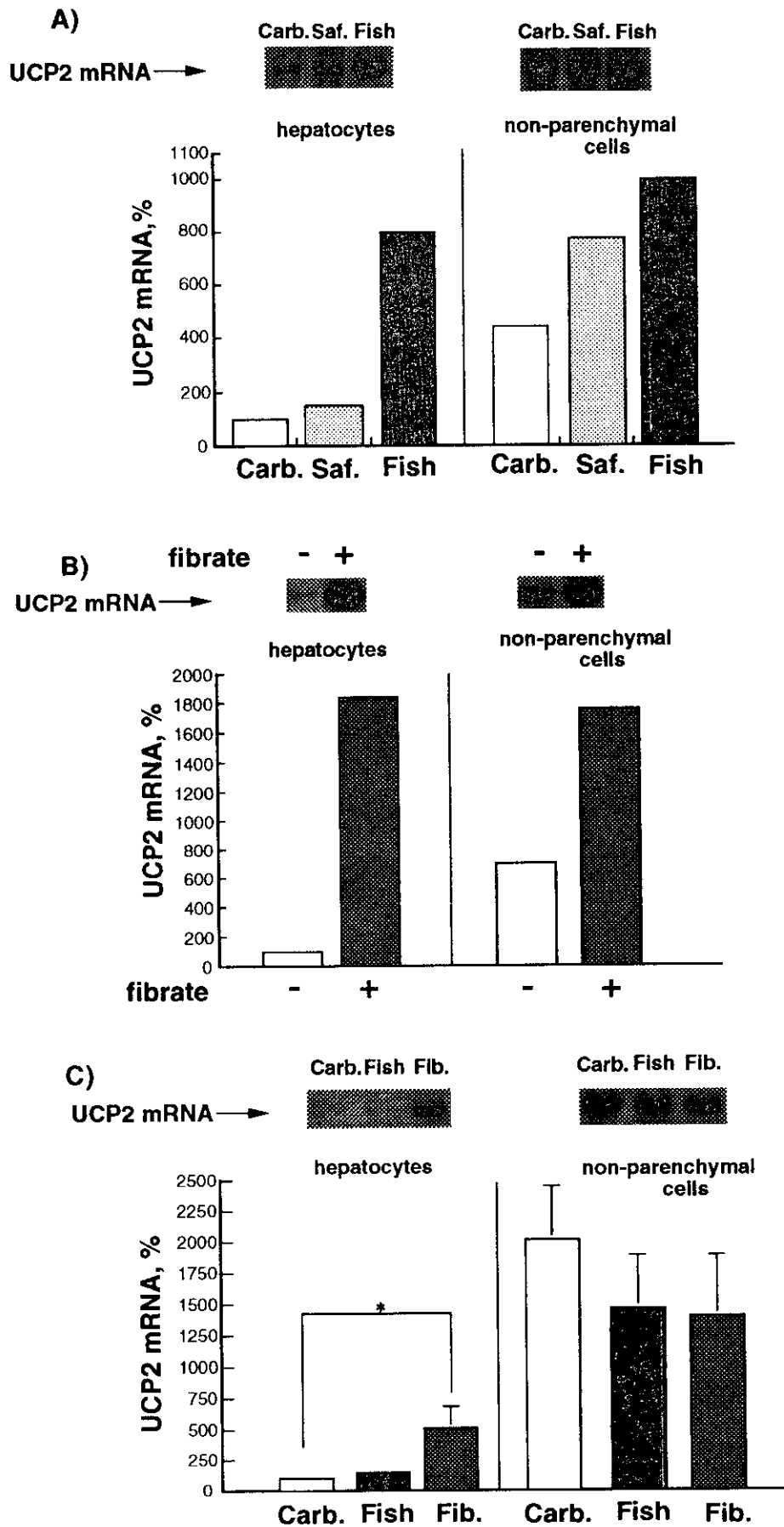


図4 魚油、フィブレート添加食摂取によるマウス(A,B)及びビラット(C)での肝実質細胞、非実質細胞におけるUCP2mRNA発現量の変化