

同意は、文書を用いて説明をした後、意志を確認、文書にて承諾を確認した。また本試験は東邦大学医学部佐倉病院の倫理委員会にて承認を得た。

検査項目

身長、体重、(BMI Body Mass Index)

糖関連 血糖、HbA1c、血清インスリン
脂質関連 総コレステロール、中性脂肪、
HDL-コレステロール、LDL-コレステ
ロール、LDL 粒子サイズ (PAG ディスク
電気泳動)、ヘパリン静注前血清リポ蛋白
リパーゼ(免疫法、第一化学)

副作用検討項目 ALT, AST, γ -GTP, ChE,
尿素窒素, クレアチニン、尿酸、CPK

C 研究結果

体重および一般状態

体重変動、BMI Body Mass Index は、図 1、図 2 に示すことく、小麦アルブミン(グルコテザイン)服用期間にて、4 週目に有意に減少を見た。他とくに副作用と考えられる症状は認めなかった。

血糖関連

空腹時血糖値は、服用前に比し、4、8、12 週目と徐々に低下認めたが、有意差はなく (図 3)、インスリン値は、4 週目やや増加したが有意ではなかった (図 4)。HOMA-R は 4、8、12 週目と徐々に低下認めたか、有意差はなかった (図 5)。平均血糖を表す HbA1c は、服用前に比へて 4 週目に有意に低下を認め、12 週目にはやや上昇を認めた (図 6)。これらから、小麦アルブミン(グルコテザイン)の単独服用は糖尿病に対して有効と考えられた。

血清脂質

総コレステロール値は、服用前に比し、4、

8、12 週目、やや上昇を見た (図 7)。一方、図 8 に示す中性脂肪値は 4 週目(a 投与前 VS 4 週(p=0.05))に有意に低下を見た。8 週目及び 12 週目には更に低下 (b 投与前 VS 8 週(p=0.05))が見られ、小麦アルブミン(グルコテザイン)と乳果オリゴ糖(ワナナイトンシヤール)には血清中性脂肪低下作用を認めた。HDL-コレステロールは、12 週目に上昇をみた。(図 9)。

LDL コレステロールは服用前に比し、4、8、12 週目とやや上昇を見た (図 11)。LDL サイズは、Rm 値で見ると低下を示し、4 週目及び 8 週目には有意な低下 (a 投与前 VS 4 週, p=0.05), b 投与前 VS 8 週(p=0.05))を認めた、すなわち粒子サイズは大きくなった (図 12)。ヘパリン静注前血清リポ蛋白リパーゼ^{6, 7)}は、インスリン感受性を現していると考えられ、冠動脈硬化の危険因子ともいわれているが、今回、有意の変動は認められなかった。

副作用関連、その他検査

ALT(図 13), AST(図 14), γ -GTP(図 15), ChE(図 16), などの肝機能検査では、全体で異常変動を認めず、個々の例でも異常値を示した例は、一例も認められなかった。CPK(図 17)も異常を認めなかった。

腎機能 BUN(図 18), クレアチニン(図 19)、尿酸(図 20)も異常を示さなかった。

D 考察

小麦アルブミン(グルコテザイン)と乳果オリゴ糖(ワナナイトンシヤール)をそれぞれ単独で飲用した後、併用し、糖・脂質代謝への影響と安全性として肝機能等に及ぼす影響を検討した。

小麦アルブミン(グルコテザイン)服用は、

血糖値、インスリンに影響を認めず、HOMA-Rにも変動を認めなかったが、HbA1cは有意に低下を認めた。また、乳果オリゴ糖との併用では、変動は認めなかった。これらのことから、小麦アルブミン(グルコデザイン)は、食後血糖上昇を抑えるとともに、長期の血糖改善効果を認め、糖尿病の改善・予防効果が期待できると考えられた。

また脂質代謝においても、特に中性脂肪値の低下が認められた。さらにはRm値の低下即ちLDLサイズが増した。これらは、糖分の吸収低下に伴い、肝臓での中性脂肪合成低下に伴う変動と思われる。体重、BMIが有意に減少したか、これも糖質吸収の低下に伴うものと考えられた。

乳果オリゴ糖(ワナナイトシンシャー)は、服用後、体重、BMIの変動はなかったが、脂質代謝では中性脂肪低下作用を認めた。Rm値が有意に低下認めており、LDLサイズの大きさが増し、中性脂肪低下に伴う変動が見られ、脂質代謝改善が期待できる結果となった。今回、LPL massを見た限り、変動がなく、吸収抑制による低下が最も考えられた(図8)。

副作用については、今回肝機能、腎機能、横紋筋に対して全体では影響が認められなかった。

E 結論

小麦アルブミン(グルコデザイン)は、食後血糖を下げると報告されているが、それか長期的に作用し糖尿病患者で血糖コントロール改善につながり、かつ中性脂肪低下や体重減少も見られた。従って糖・脂質代謝改善の食品特定保健食品として有用と思

われた。

乳果オリゴ糖(ワナナイトシンシャー)は、中性脂肪低下効果もあり、副作用も認められず、特定保健食品として適正と思われた。また、小麦アルブミン(グルコデザイン)と乳果オリゴ糖(ワナナイトシンシャー)の併用投与は相互に干渉されず、効果の低下、あるいは新たな副作用と思われる兆候は認められなかった。

文献

- 1 森本聡尚、宮崎俊之、村山隆二、児王俊明、北村育夫、井上修二 ヒトにおける小麦アルブミン単回投与による食後血糖上昇抑制作用と安全性 日本栄養 食糧学会誌 Vol 52 No 5 285-291 1999
- 2 森本聡尚、澤 純子、吉田宗儀、穂積俊樹、末永謙治、宮崎俊之、北村育夫、土井邦紘 小麦アルブミン添加餌の長期投与かストレプトソトシン糖尿病ラットの糖代謝へ及ぼす影響 糖尿病 43 (6) 421-430 2000
- 3 森本聡尚、田中俊一、宮崎俊之、児王俊明、北村育夫、井上修二 軽症 NIDDM 患者における小麦アルブミン長期摂取の効果と安全性 日本栄養・食糧学会誌 Vol 52 No 5 293-300 1999
- 4 森本聡尚、宮崎俊之、鈴木誠一 小麦アルブミン添加スープによる食後血糖上昇の調節 健康・栄養食品研究 Vol 1 (2)別冊 1998
- 5 野田恒行、久米村恵、正木恭介 乳果オリゴ糖の摂取か OLETF ラットの腸内細菌叢に及ぼす影響(会議録) 日本栄養 食糧学会 53 回講演要旨集

Pagect59(1999 04)

- 6 Shirai,K , Murano,T , Watanabe,H ,
Miyashita,Y , Itoh,Y ,
Totsuka,M , Preheparin lipoprotein lipase
mass might reflect the amount of working
lipoprotein lipase in the whole body
Springer,2000, 51-53
- 7 Hitsumoto,T , Ohsawa, H , Uchi T ,
Noike,H , Kanai, M , Yoshimura,M ,
Miyashita,Y , Watanabe,H
Shirai,K , Preheparin serum lipoprotein
lipase mass in negatively related to
coronary atherosclerosis Atherosclerosis,
2000, 153 391-396

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

- 1 論文発表
なし
- 2 学会発表
なし

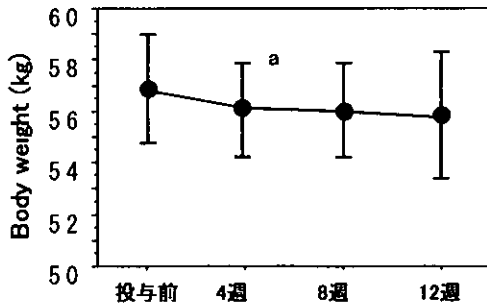
H 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
なし

患者背景

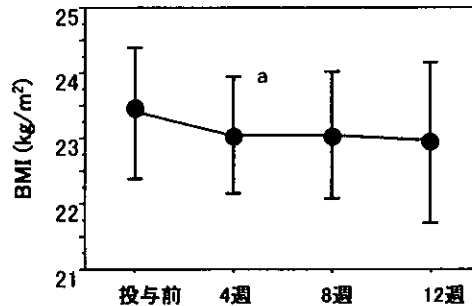
対象	30名(男性11名、女性19名)
年齢	64±9.1歳(44~72歳)
身長	155.4±7.6cm(143.0~170.0cm)
体重	58±10.1kg(43.0~78.2kg)
BMI	23.4±4.2kg/cm ² (17.5~35.7kg/cm ²)
HbA1c	6.7±0.8%(5.0~7.8%)
総コレステロール	202.0±35mg/dl(136~245mg/dl)
中性脂肪	135±66mg/dl(51~326mg/dl)
HDLコレステロール	57±14mg/dl(33~78mg/dl)

図1 体重の変動



a 投与前 VS 4週 (p=0.05)

図2 BMI値の変動



a 投与前 VS 4週 (p=0.05)

図3 血糖値の変動

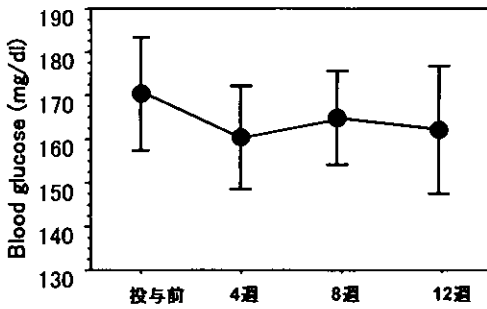


図4 インスリン値の変動

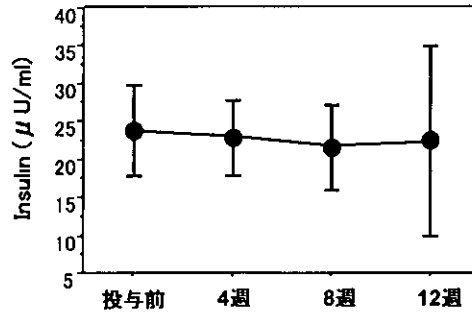


図5 HOMA-R値の変動

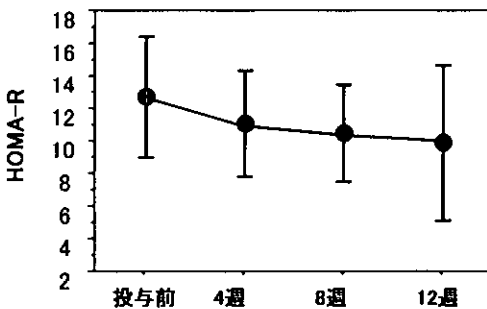
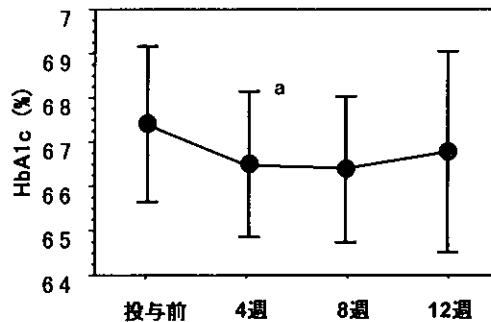


図6 HbA1c値の変動



a 投与前 VS 4週 (p=0.05)

図7 コレステロールの変動

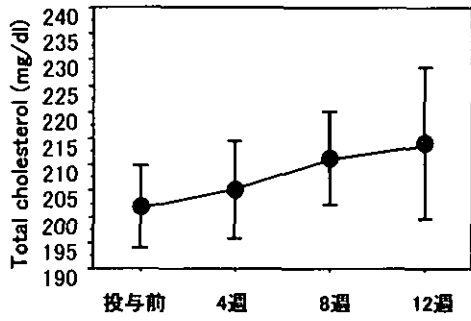
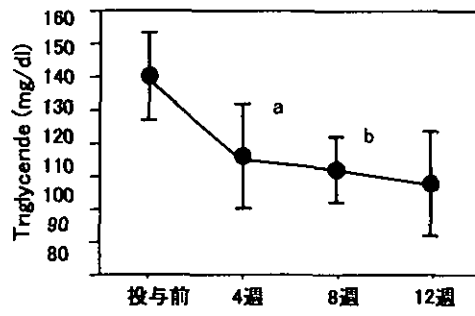


図8 中性脂肪値の変動



a 投与前 VS 4週 (p=0.05) b 投与前 VS 8週 (p=0.05)

図9 HDL-コレステロール値の変動

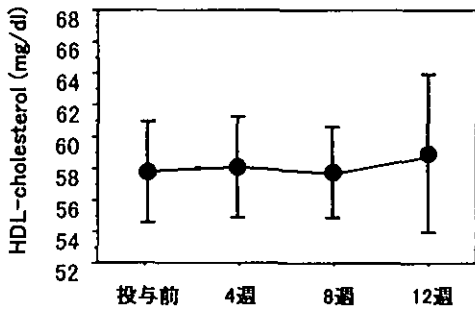


図10 ヘパリン静注前リポ蛋白リパーゼの変動

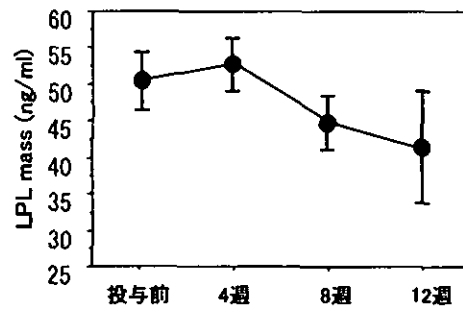


図11 LDLコレステロール値の変動

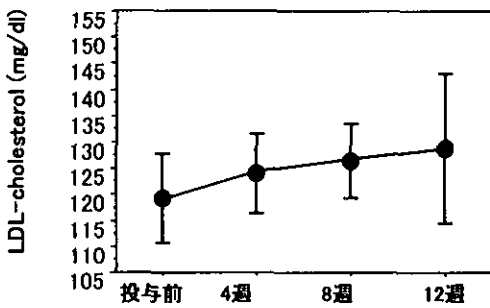
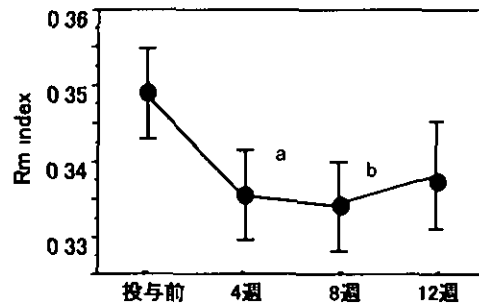


図12 Rm値の変動



a 投与前 VS 4週 (p=0.05) b 投与前 VS 8週 (p=0.05)

図13 ALT値の変動

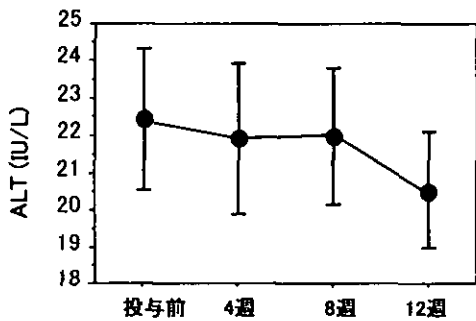


図14 AST値の変動

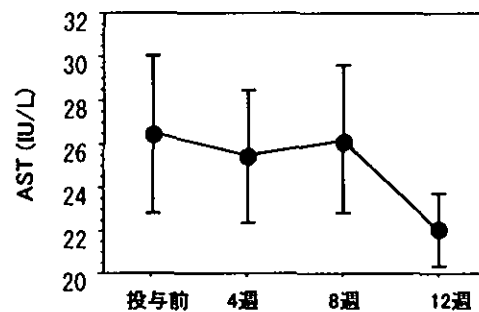


図15 γ -GTP値の変動

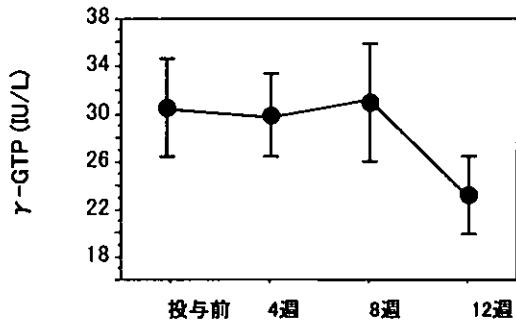


図16 コリンエステラーゼ値の変動

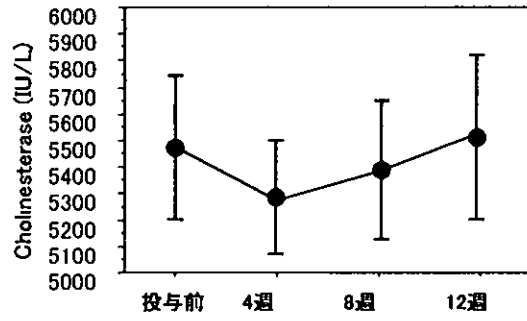


図17 CPK値の変動

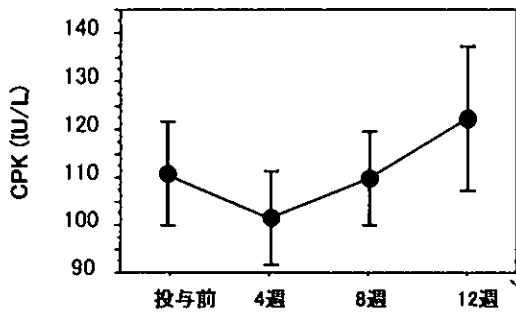


図18 尿素窒素値の変動

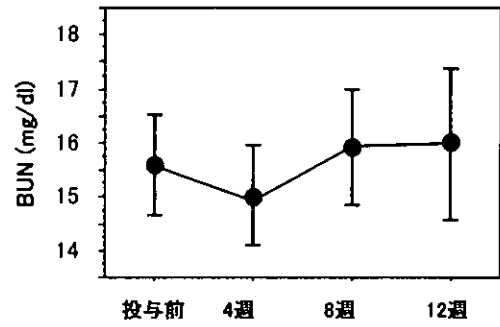


図19 クレアチニン値の変動

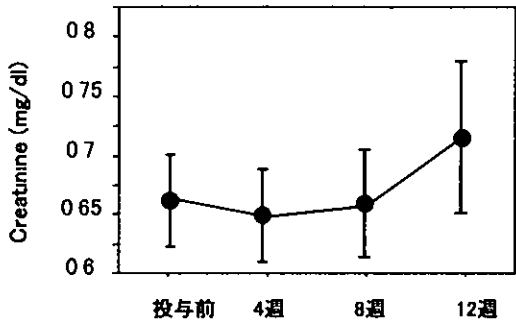
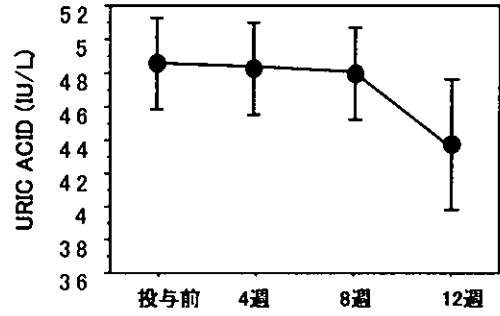


図20 尿酸値の変動



厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

特定保健用食品素材の組合せ摂取による安全性および有効性に関する研究
—シアシルグリセロールおよびグロヒン蛋白分解物の組合せ摂取による検討—

分担研究者 斎藤衛郎 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 食品機能研究部長
研究協力者 永田純一 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 食品機能研究部室長

本研究は、食後の血中中性脂肪の上昇を穏やかにする保健の用途を有する特定保健用食品素材であるノアンルグリセロール（エコナ）とグロヒン蛋白分解物（GD）を組合せて高脂肪、GD 過剰摂取の条件下で 8 週間ラットに与えたときの血中脂質濃度、体脂肪蓄積、血糖指標、安全性に関して、肝機能および病理組織学的検討を行った。その結果、x50 量の GD 摂取は有意な体重増加の減少と血清脂質濃度の減少を示した。エコナの組合せと比較して、GD と大豆油の組合せ摂取は、血中中性脂肪濃度の上昇を有意に抑制した。以上の結果より、GD と大豆油の組合せ摂取はエコナ組合せ食と比較して血中中性脂肪濃度の上昇を継続的に抑制することが明らかとなった。また、併用摂取による血液生化学値あるいは病理組織学的所見に対し有害事例を認めなかったことから、組合せによる安全性が示唆された。

A 研究目的

特定保健用食品には、保健の用途としてコレステロールが高めの方、食後の血中中性脂肪（TG）を抑える、体脂肪をつきにくくするものや糖の吸収を緩やかにするもの、お腹の調子を整えるものなど様々な食品がある。これらの食品は個別にその審査の過程で食品あるいは関与成分の安全性が厳しく審査され許可を受けるが、保健の用途の類似する食品あるいは成分を組合せて同時に摂取したときの安全性と有効性に関する検討はほとんど行われていないのか現状である。その一方で、強調表示を基に類似の効果を期待して複数の特定保健用食品を摂取している実態がある。

今回我々は、特定保健用食品の中でも食後の血中中性脂肪を抑えるシアシルグリセロールとグロヒン蛋白分解物（GD）に着目

した。これらの成分は、構造特異性による吸収抑制や膵酵素リパーゼの作用阻害などの作用が知られており、これらの組合せか脂質濃度にとどのような影響を及ぼすのか実験動物を用いて検討を行った。実験は、ラットに高脂肪と様々な濃度の GD を添加した飼料を 8 週間与えたときの脂質代謝、体脂肪蓄積、血糖指標に及ぼす影響と安全性に関する肝機能および病理組織学的検討を行った。

B 研究方法

4 週令の雄 Wistar 系ラットに 40%（エネルギー%）のエコナあるいは大豆油と通常摂取目安量（摂取油脂に対する比率で規定される）を x1 摂取量とした GD 群から x10、x25 および x50 量の GD を含む組合せ食群を設け 8 週間自由に摂取させた。対照群は、

GD を含まない食餌とした。その際、GD のタンパク価がカゼインの約 70% であることからエネルギー不足分をカゼインで補正し、ほぼ各群とも等しい摂取エネルギーとした。実験動物は、1 週間予備飼育を行い、各群 6 匹ずつ個別に飼育を行い、各油脂に対して上述した各 GD 添加量の 5 群、全計 10 群を設け実験を行った。飼育開始時より各週、約 8 時間の絶食を行った後、末梢血管より採血を屠殺前週まで行い、血液中の TG 濃度を測定した。飼育期間終了後、飼育最終日に 1 夜絶食を行い、腹部大動脈より採血した。各臓器重量を測定し、分析に供する組織を採取した。血液生化学分析は依頼分析を行った。肝臓脂質濃度は、クロロホルム-メタノール混液 (2:1(v/v)) を用いて総脂質を抽出し、コレステロール、トリグリセリド (TG) 濃度を測定した。また飼育最終日に採取した糞中へ排泄される TG あるいはシアシルグリセロール量はガスクロマトグラフにて現在測定中である。

実験結果は、平均値±標準誤差で表した。同一油脂を摂取した群間の比較は、一元配置分散分析を行った。一方、異なる油脂間の比較は student's t-test を行った。

C 研究結果

x50 量の GD を摂取したエコナあるいは大豆油群の体重増加量は、実験食摂取 6 週目以降、他の群と比較して有意に低い値で最終日まで推移した。他の群は対象群とほぼ等しい成長を示した (図 1)。

食餌摂取量はほぼ等しい値を示した (表 1)、食餌効率は大豆油摂取群で GD の摂取量に伴い有意な低下を示した。一方、エコナとの組合せは x50 量 GD 摂取群で有

意な低下を示した。

ラット体重 100g あたりの肝臓、腎臓、脾臓および睾丸重量は有意な差を認めなかった。脂肪組織重量は、大豆油と GD との組合せにおいて、GD 摂取量の増加に伴い、腎臓周囲脂肪組織重量が低下傾向を示し、x50 量 GD と大豆油の組合せを行った群でのみ有意な低下を示した (表 1)。

血清 TG 濃度の経日的変化において、高脂肪食条件にも関わらず大豆油と GD の組合せは血中 TG 濃度の上昇をほぼ実験終了時まで抑制した (図 2)。これに対して、エコナと GD の組合せは上昇傾向を示し、4 週目をピークに上昇を示した。特に、x25 と x50 量の GD とエコナの組合せ群は、大豆油との組合せ群と比較して x25 量は、3 週、4 週目で有意に高い値を示し、x50 量では 2 週、3 週および 6 週目で有意に高い値を示し、6 週目まで高い値で推移した。

屠殺時の血清脂質濃度は、GD といずれの油脂との組合せにおいても総コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質濃度が DG の摂取量の増加に伴い低下傾向を示した (図 3)。特に、大豆油との組合せで対照群との比較において TG 濃度の有意な低下を認めた。一方、エコナとの組合せは他の群と比較してコレステロールあるいは HDL-コレステロール濃度の有意な低下を示した。

肝機能の指標である血清 GOT および GPT 濃度は、組合せによる有意な差を認めなかった (表 2)。一方 ALP 濃度は、x50 量と GD の組合せにより有意に低い値を示した。

また総タンパク質濃度において、x50 量 GD とエコナの組合せは x1 GD 群と比較し

て有意に低い値を示したか、顕著な変化はなかった。また、血糖値もいずれの組合せにおいても有意な差を認めなかった(表2)。

肝臓脂質濃度も血清脂質濃度と同様にx50量GD摂取によりコレステロールおよびTG濃度に有意な低下を認めた(図4,5)。いずれもx25量まではほとんどGDの影響を認めないか、x50量のGDの摂取によりいずれの脂質レベルもx25量GD群と比較して有意な低下を示した。

病理学的所見は、腎臓において好酸性物質の浸潤が見られた。肝臓においては小葉周辺性の脂肪滴の沈着とグリソン鞘の細胞浸潤がそれぞれの油脂に1,2例認められた。その他の異常所見は認められなかった。

D 考察

エコナあるいは大豆油と過剰量グロヒン蛋白分解物(GD)の組合せ摂取は、体重増加の有意な減少を認めた。特に、大豆油とGDの組合せにおいては、血中TG濃度の上昇を実験終了時まで全ての摂取量において抑制した。一方、エコナとの組合せは高用量(x25、x50量)GD摂取群で血中TG濃度の上昇を認めた。これらの結果は、GDはトリグリセリドからなる食用油脂との組合せにより血中TG濃度の上昇抑制効果を示し、通常摂取目安よりも高用量で効果的に作用することを示唆している。また、今回の摂取量における血液学的あるいは病理組織学的有害事象は認められず、安全な摂取範囲と考えられた。

x50量GD摂取による体重増加量の減少は、GDのたんぱく質としての利用効率によるのかもしれない。今回の実験では、GD

の栄養価が約70%であることを考慮し、ほぼ等しい摂取エネルギーへ飼料の調整を行っているが、食餌効率の結果からも利用効率か他のGD添加と比較して低く、栄養価の点において過度のGDの摂取による効果に疑問が残る。

血中中性脂肪濃度に及ぼす影響に関して、食用油の消化および吸収は、膵リパーゼによる加水分解と消化管内におけるミセルの形成が必須の条件と考えられる。今回用いた機能性食品素材は、いずれも膵リパーゼによる加水分解を抑える作用と吸収形態の相違が食後血中TG濃度の上昇抑制メカニズムと考えられている食品成分であり、リパーゼの親和性と消化管内におけるミセルの状態はこれら食品成分の生理機能に大きく影響すると考えられる。

今回の実験では、大豆油とGDの組合せはGDの作用機序であるリパーゼによる加水分解の効率的な阻害作用により継続的に血中中性脂肪濃度の上昇を抑制したものと考えられた。これらの背景にはタンパク質及び油脂の乳化特性が関与すると考えられる。エコナの主成分であるシアシルグリセロールおよびGDは、それぞれ今回の実験に用いた大豆油あるいはカゼインと異なる乳化特性を有することか知られている。従って、消化管内におけるミセル形成に影響を及ぼし、結果として食品成分の組合せによる生理学的有効性に影響を及ぼしたと推察される。今回の実験結果から、類似の機能を有するエコナとの組合せよりも大豆油とGDの組合せか、効果的であることか明らかとなった。

また、近年過剰なシアシルグリセロール摂取は消化器官における腫瘍発現のプロモ

ーターとして作用する危険性が指摘されている。しかし、40 エネルギー%のエコナを8週間摂取した実験条件では、大腸における肉眼的な組織変化を認めないことから、今回の摂取用量と期間における腫瘍発現のプロモーターとしての危険性は認められなかった。しかしシアシルグリセロールは加工食品や加工油脂としての利用がさらに行われており、食品形態の違いによる過剰摂取の影響や長期に及ぶ摂取の影響に関して更に慎重な検討が必要と考えられる。

今回の実験で、高脂肪食条件において大豆油とGDの組合せは継続的な血中TG濃度の上昇を抑制し、摂取油脂に対する比率が50 (x25量) および100% (x50量)のGD添加で、エコナと比較して効果的に血中中性脂肪の濃度上昇を抑制することか観察された。類似する機能性食品であるエコナとの組合せか血中TG濃度の上昇を引き起こすのかどうか、あるいはエコナの適切な摂取条件はどのようなものかなどに関しては今後の検討課題と考えられる。

E 結論

高エネルギーの大豆油あるいはエコナと通常摂取量からx50量のグロヒン蛋白分解物(GD)を組合せてラットに8週間与えたとき、大豆油とGDの組合せ摂取は、実験最終日まで血中中性脂肪濃度上昇を抑制した。x50量GD摂取群で体重の減少が認められたが、その他の顕著な障害を認めなかった。加えて、血液生化学的あるいは病理組織学的所見においても有害事象を認めなかった。今回の実験から大豆油とGD併用摂取は効果的であり、病理組織学的にはいずれの油脂との組合せにおいても安全な組

合せであると考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

大豆たんぱく質およびシアシルグリセロール組合せ摂取のラット血清・肝臓脂質濃度および体脂肪蓄積に及ぼす影響 永田純一、斎藤衛郎，第57回日本栄養・食糧学会，2003，福岡

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

表1 ラットの体重増加量と食餌効率および体重100g当たりの臓器重量

GD content	x10					x25					x50				
	0	x1	x10	x25	x50	0	x1	x10	x25	x50	0	x1	x10	x25	x50
Soybean oil															
Body weight gain (g)	176 ± 6 21a	171 ± 14 05a	165 ± 3 49a	158 ± 3 87a	123 ± 6 88b	2 44 ± 0 05a	2 53 ± 0 04ab	2 46 ± 0 03a	2 46 ± 0 03a	2 61 ± 0 06b	10 5 ± 0 39	10 7 ± 0 50	10 8 ± 0 09	10 6 ± 0 25	10 9 ± 0 40
Food intake (g/day)	16 8 ± 0 27a	15 9 ± 0 63abc	15 3 ± 0 23bc	14 9 ± 0 24c	11 2 ± 0 50d	0 59 ± 0 01a	0 60 ± 0 02a	0 62 ± 0 01a	0 62 ± 0 01a	0 70 ± 0 00b	0 20 ± 0 00	0 21 ± 0 01	0 21 ± 0 00	0 20 ± 0 00	0 20 ± 0 00
Food efficiency (g gain/g FI)						1 02 ± 0 03a	1 04 ± 0 04a	1 02 ± 0 02a	1 03 ± 0 01a	1 18 ± 0 03b	2 46 ± 0 27	2 89 ± 0 25	2 46 ± 0 14	2 56 ± 0 15	2 35 ± 0 13
Issue weight (g/100g body weight)						3 05 ± 0 24a	3 01 ± 0 15ab	3 08 ± 0 09a	2 96 ± 0 15ab	2 59 ± 0 07b					
Liver											0 20 ± 0 00	0 21 ± 0 01	0 21 ± 0 00	0 20 ± 0 00	0 20 ± 0 00
Kidney											1 02 ± 0 03a	1 04 ± 0 04a	1 02 ± 0 02a	1 03 ± 0 01a	1 18 ± 0 03b
Spleen											2 46 ± 0 27	2 89 ± 0 25	2 46 ± 0 14	2 56 ± 0 15	2 35 ± 0 13
Testis											3 05 ± 0 24a	3 01 ± 0 15ab	3 08 ± 0 09a	2 96 ± 0 15ab	2 59 ± 0 07b
Epididymal WAT															
Perirenal WAT															
l-cona															
Body weight gain (g)	164 ± 5 40a	164 ± 4 26a	176 ± 4 65a	163 ± 6 16a	131 ± 9 08b	10 3 ± 0 14a	10 3 ± 0 22a	11 0 ± 0 27ab	10 4 ± 0 31ab	11 2 ± 0 44b	15 9 ± 0 37a	16 0 ± 0 17a	16 0 ± 0 18a	15 7 ± 0 32a	11 6 ± 0 40b
Food intake (g/day)						2 53 ± 0 03a	2 65 ± 0 04ab	2 58 ± 0 06ab	2 68 ± 0 04b	2 64 ± 0 06ab	0 61 ± 0 01a	0 60 ± 0 01a	0 62 ± 0 01ab	0 64 ± 0 01b	0 71 ± 0 01c
Food efficiency (g gain/g FI)						0 21 ± 0 01a	0 22 ± 0 01b	0 21 ± 0 01ab	0 21 ± 0 00ab	0 19 ± 0 01c	1 02 ± 0 03a	1 03 ± 0 03ab	0 99 ± 0 02a	1 01 ± 0 03a	1 10 ± 0 03b
Issue weight (g/100g body weight)						2 36 ± 0 07	2 44 ± 0 14	2 58 ± 0 09	2 38 ± 0 16	2 61 ± 0 17	2 53 ± 0 03a	2 44 ± 0 14	2 58 ± 0 09	2 38 ± 0 16	2 61 ± 0 17
Liver (g/100g body weight)						3 01 ± 0 11	2 82 ± 0 08	3 09 ± 0 15	2 79 ± 0 12	2 75 ± 0 17					
Kidney															
Spleen															
Testis															
Epididymal WAT															
Perirenal WAT															

Values are means ± S.E.M, n=6 Values in a row not sharing a same superscript letter differ, P<0.05

表2 ラットの血中肝機能指標、血糖値およびタンパク質濃度

GD content	0	x1	x10	x25	x50
Soybean oil					
GOI (IU/L)	136 ± 23.9	111 ± 9.69	111 ± 11.4	112 ± 8.60	129 ± 11.7
GPT (IU/l)	43.2 ± 2.98	46.7 ± 1.91	42.0 ± 3.53	44.5 ± 3.37	49.8 ± 4.38
ALP (IU/l)	588 ± 16.5 a	581 ± 13.4a	564 ± 9.85ab	583 ± 21.1a	530 ± 23.4b
Glucose (mmol/L)	4.85 ± 0.72	5.21 ± 0.14	4.59 ± 0.32	4.79 ± 0.22	4.54 ± 0.51
Total protein (g/dl)	6.22 ± 0.07	6.27 ± 0.11	6.27 ± 0.04	6.27 ± 0.03	6.28 ± 0.08
H:con					
GOI (IU/l)	118 ± 8.96	171 ± 50.9	129 ± 7.86	117 ± 13.7	153 ± 9.31
GPT (IU/l)	45.7 ± 4.98	86.2 ± 34.6	56.0 ± 4.52	41.7 ± 2.78	54.0 ± 5.62
ALP (IU/l)	657 ± 14.3a	671 ± 25.5a	637 ± 26.5a	657 ± 13.5a	563 ± 19.3b
Glucose (mmol/L)	5.19 ± 0.25	5.62 ± 0.28	5.53 ± 0.26	5.49 ± 0.34	4.96 ± 0.50
Total protein (g/dl)	6.38 ± 0.07ab	6.48 ± 0.09a	6.40 ± 0.06ab	6.37 ± 0.08ab	6.25 ± 0.08b

Values are means ± S.E.M, n=6 Values in a row not sharing a same superscript letter differ, P<0.05

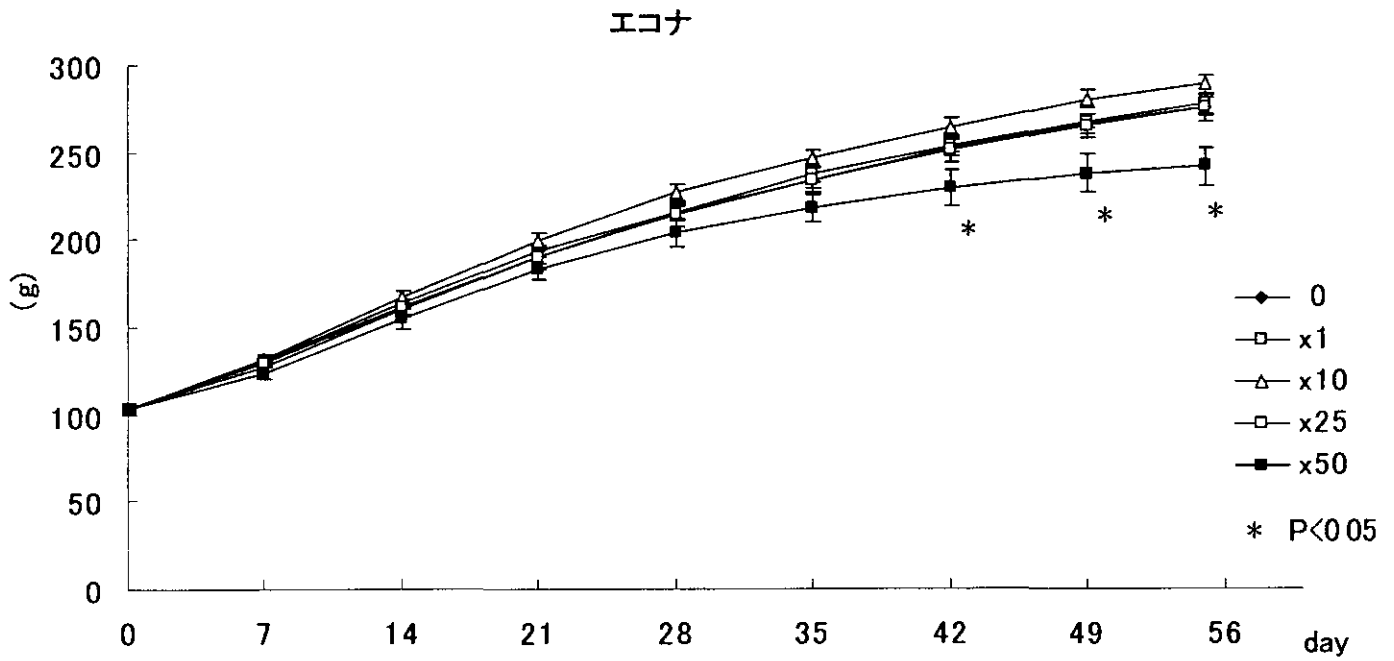
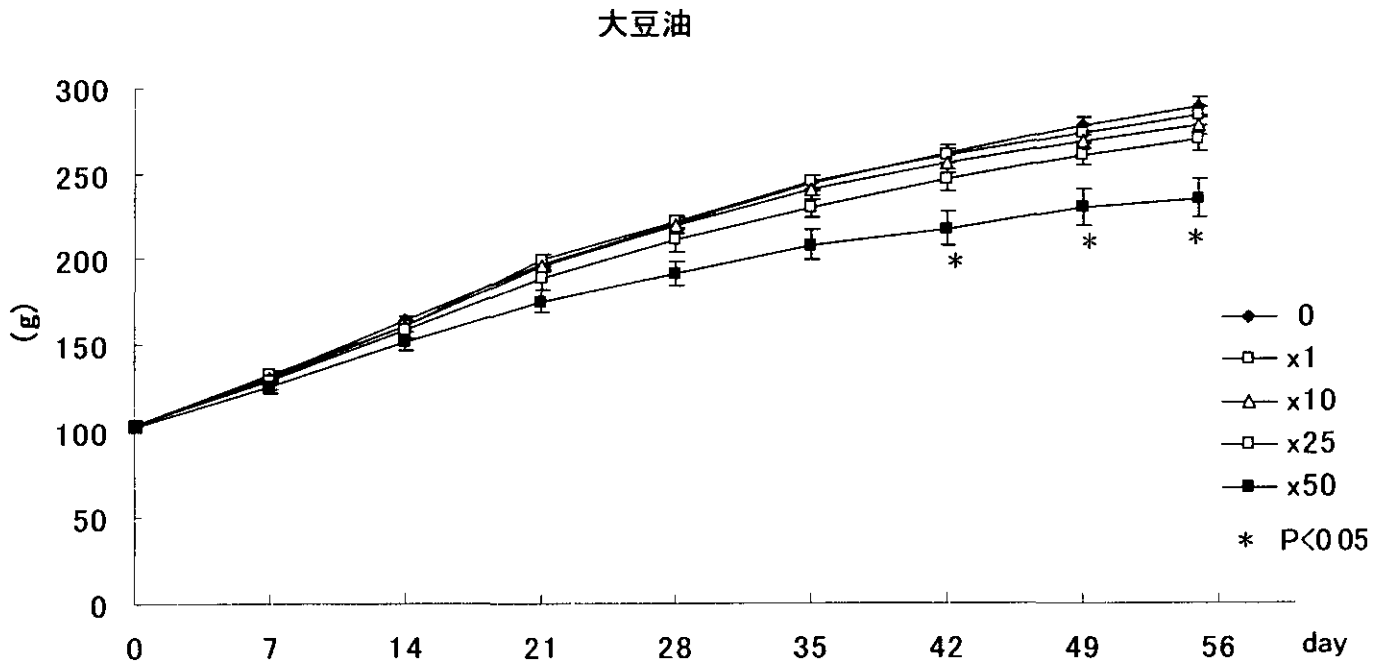


図1 GDと大豆油あるいはエコナを含む食餌を与えたラットの体重変化

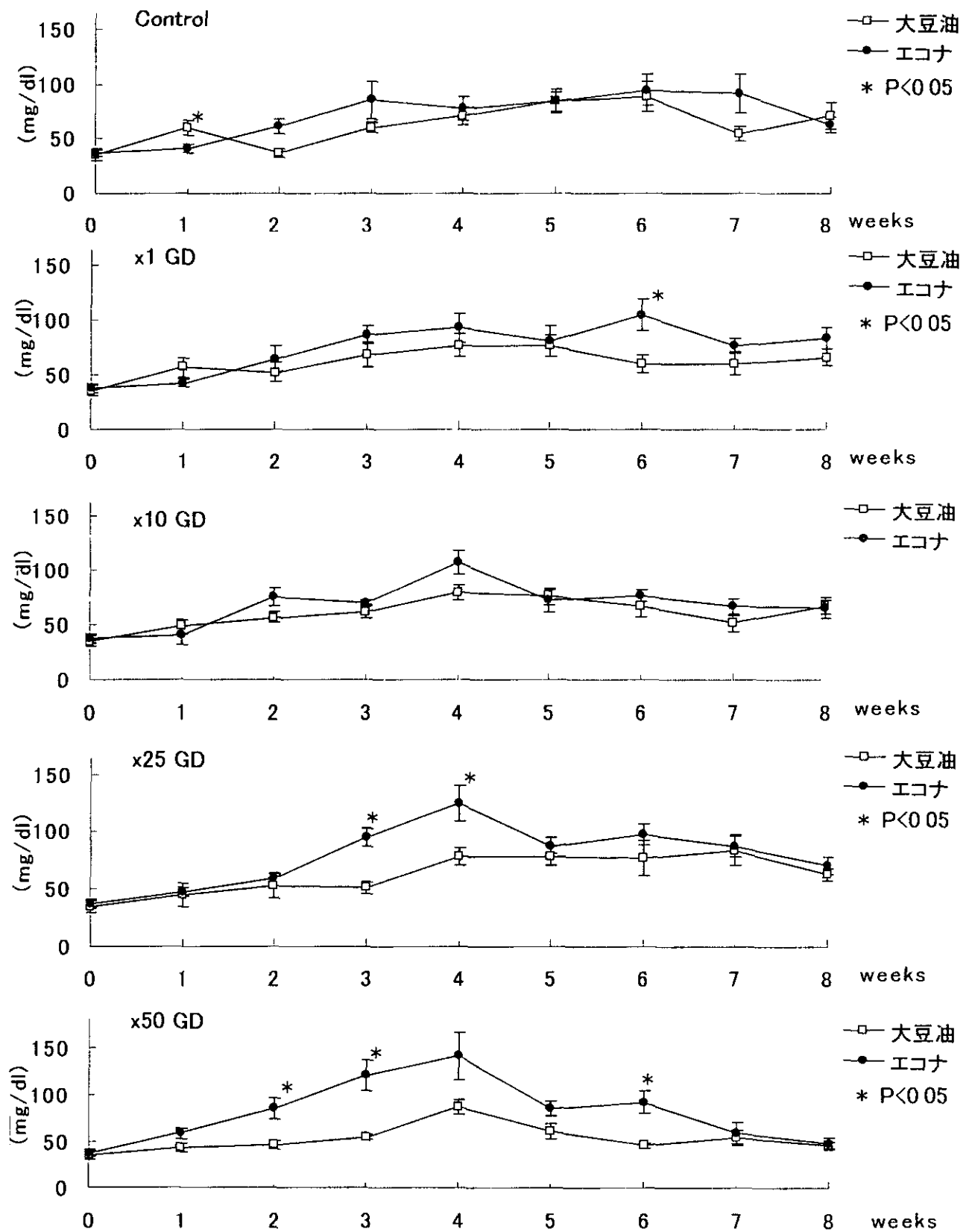
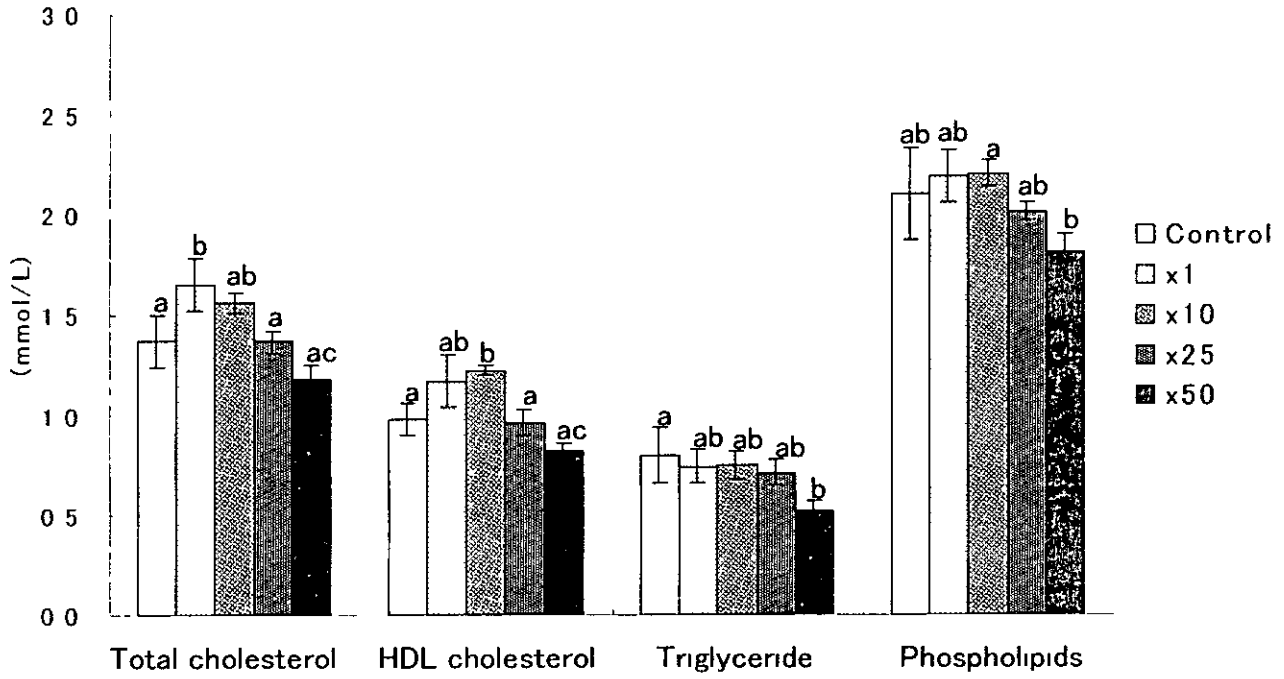


図2 GDと大豆油あるいはエコナを含む食餌を与えたラットの血中トリグリセリド濃度の経目的変化

大豆油



エコナ

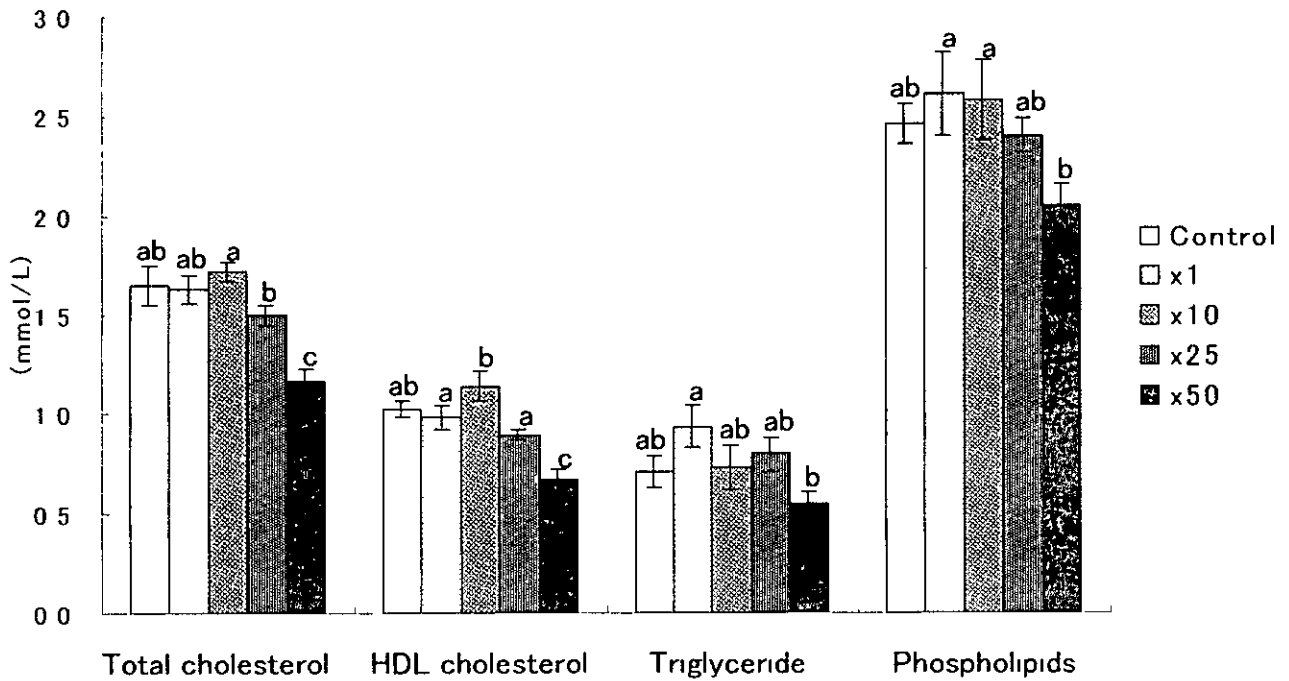


図3 血清中の脂質濃度

平均値±標準誤差 (n=6)、異なる符号間て有意差 (p<0.05)

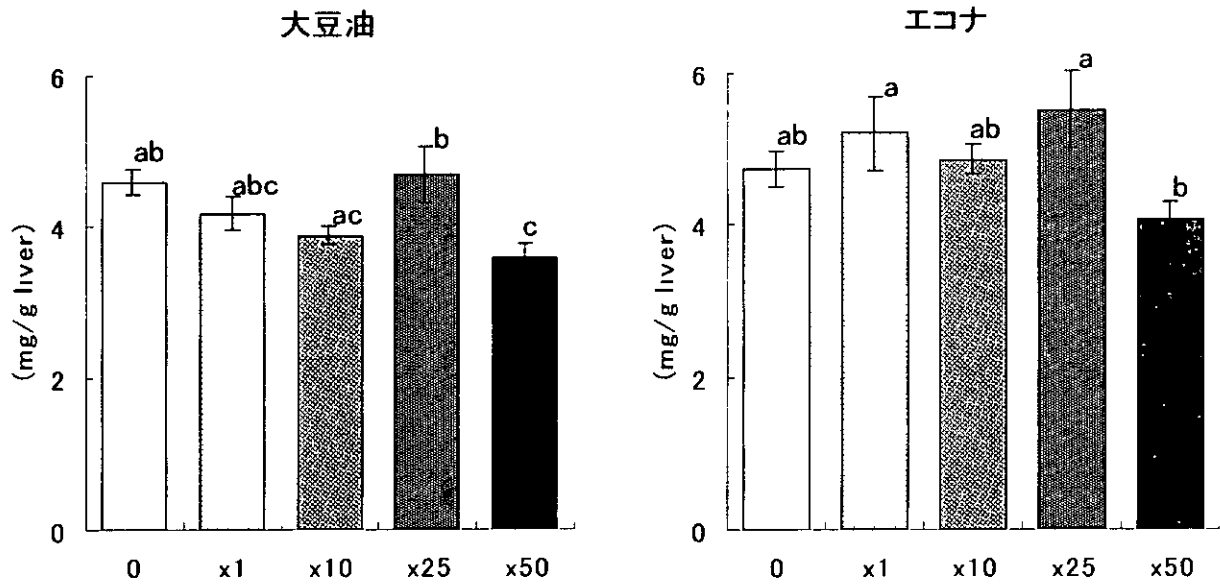


図4 肝臓中総コレステロール濃度
 平均値±標準誤差 (n=6)、異なる符号間で有意差 (p<0.05)

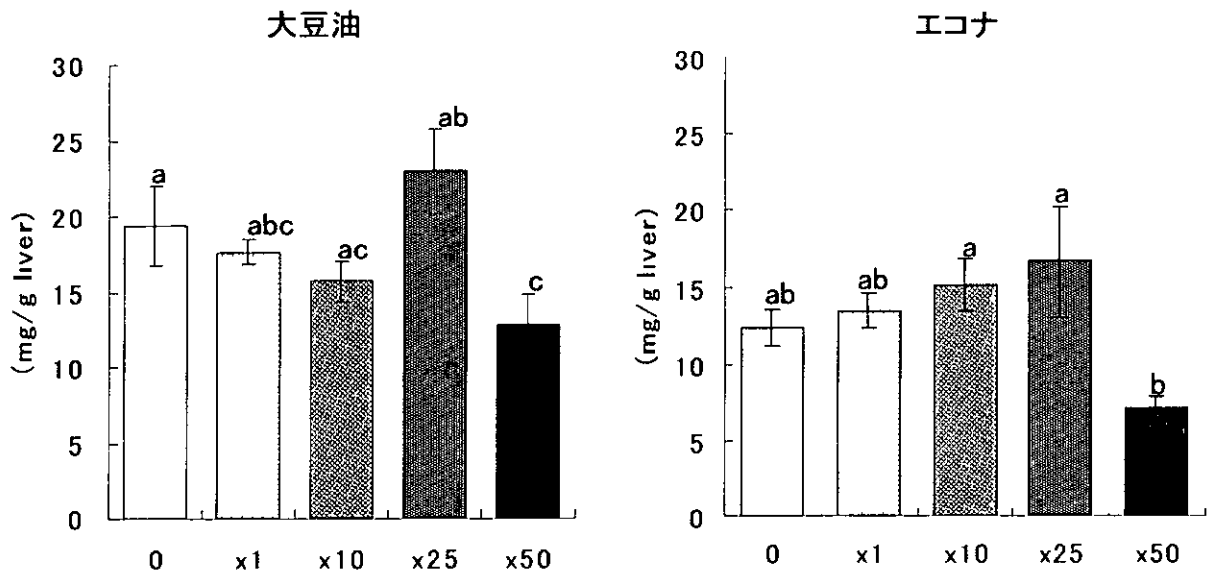


図5 肝臓中トリグリセリド濃度
 平均値±標準誤差 (n=6)、異なる符号間で有意差 (p<0.05)

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

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

特定保健用食品素材となる大豆中のアレルゲンと、ピーナツあるいはグアー豆等の特定保健用食品素材との交差性について部分精製たんぱく質を用いて検討した。グアーガム中の交差性アレルゲンはグアー豆からの混入たんぱく質と考えられた。また、合成ペプチドを用いた豆類アレルゲンの超高感度酵素免疫測定法(免疫複合体転移酵素免疫測定法)を開発した。従来アレルギー児血清中の特異抗体と交差性のある素材中のたんぱく質との親和性の程度はかならずしも明らかでなかったが、合成ペプチドを用い、アレルギー児血清中の特異抗体を測定することによって抗体特異性には相当な個人差があることが示唆された。

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その安全性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。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が問題となる。

また、アレルギーの発症は患者側の状態によっても異なり、特に交差反応の場合、アレルギー児血清中の抗体の特異性に強く依存すると考えられることから、新たに合成ペプチドを用いた免疫複合体転移酵素免疫

測定法を開発し、アレルギー児の特異抗体の多様性について検討を行なった。

B 研究方法

1 ウェスタンブロットを用いた特定保健用食品素材中の大豆トリプシンインヒビター (TI) 様物質の検出

[グアー豆及びグアーガムからのたんぱく質部分精製] グアー種子は新和物産(株)より購入した。インゲン、アキシマササゲは一般店頭販売品を購入した。莢から取り出した種子を乳鉢ですり潰した粉末 1 g を 0.25% NaCl を含む 5N NaOH 50 ml で 40 分抽出後、10,000 x g、1 時間遠心して得られた上清に pH4.5 になるまで 0.1N HCl を加えた。析出したたんぱく質を 10,000 x g、1 時間の遠心で回収し PBS 溶液に溶解した。[ウェスタンブロットによる食品素材中の TI 様物質の検出] サンプルを電気泳動後、ウェスタンブロットし、5% BSA でブロッキングした。洗浄後、ウサギ抗大豆トリプシ

ン・インヒビター抗体(一次抗体)と1時間反応させ、洗浄後ペルオキシダーゼ標識した抗ウサギ IgG 抗体(二次抗体)と1時間反応させた。洗浄後4-クロロ-1-ナフトール基質を用いてバントの呈色を観察した。

2 合成ペプチドを用いた特異抗体の高感度酵素免疫測定法 (ICTEIA) の開発

[材料]合成ペプチドは表1に示した5種類を使用した。兔抗2,4-シニトロフェニル-牛血清アルブミン血清はシハヤギ社より購入した。

[標識抗原調製]

N-succinimidyl-S-acetylmercaptoacetate(SATA)及び

N-succinimidyl-6-maleimidohexanoate(EMCS)

を用いて DNP-ヒオチン標識ペプチド及びβガラクトシダーゼ酵素標識ペプチドを調製した。[ICTEIA]ヒト血清をペプチドの存在下又は非存在下において酵素標識ペプチド及びDNP-ヒオチン標識ペプチドと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-シニトロフェニル基IgGを固相化した直径64mmのポリスチレンヒーズを加え0.5時間反応させた。ヒーズを洗浄後、2mMシニトロフェニル-L-リジンと0.5時間反応させた後ヒーズを除去した。溶出液に(1)ストレプトアヒシン、(2)マウスモノクローナル抗ヒトIgE(ε)抗体(IgG1)あるいは(3)ウサギポリクローナル抗ヒトIgG(γ)抗体を固相化したポリスチレンヒーズ(3種)を加え0.5時間反応させた。ヒーズとの反応は全て25℃で210rpmの振とう下に行った。再びヒーズを洗浄後、ヒーズ上のβガラクトシダーゼ活性を蛍光基質を用いて励起波長360nm、吸収波長450nmで測定した。

C 研究結果

1 ウェスタンブロットを用いた特定保健用食品素材中のTI様物質の検出

昨年度の研究により、特定保健用食品素材として用いられているグアーガム中に大豆TI様物質の存在することが示唆されていたことから、グアーガム及びビント産グアー豆からこのアレルゲンの精製を試みた。pHを酸性にシフトさせることによって沈殿した画分について5-20%グラシエント・ゲルを用いたSDS-電気泳動を行なったところ、たんぱく質と思われる銀染色像が複数観察され(図1)、同時にこれらのバントは抗大豆TI抗体によって免疫染色されることも明らかになった(図2)。きわめて高度に精製したグアーガム標品中からはこのようなたんぱく質は検出されず、明らかにグアー豆からの混入であると考えられた。

抗大豆TI抗体と反応する物質は、インゲンとアキシマササケからも上記と同様の方法で部分精製されたことから、これらから植物共通アレルゲンとして認識されているトリプシン・インヒビター・ファミリーのたんぱく質である可能性が示唆された。

2 ICTEIAによるアレルギー児血清中の特異抗体の検出

大豆とピーナッツのアレルゲンには交差性があるといわれていることから、大豆TIに対する特異抗体を有するアレルギー児血清に対する、ピーナッツ・アレルゲンのエピトープアミノ酸配列に基づく5種類の合成ペプチドの反応性を、アレルギー患者55名と健常者12名の血清を用いて検討した。その結果、このうち患者7名と健常者1名が高値であった。うちわけはAra h 1 ep3で

4名、Ara h 1 ep4で2名、Ara h 2 ep7で1名、Ara h 3 ep3で1名であった。

5種類の合成ペプチドを混合して測定を行なった場合の反応性を、抗大豆 TI 抗体の抗体価と比較したグラフを図 3 (IgG クラス)及び図 4 (IgE クラス)に示す。

ピーナツ合成ペプチドと反応する抗体と大豆 TI と反応する抗体との間には相関関係は見られなかった。また、合成ペプチドひとつひとつを単独に用いて測定を行なった場合、混合で測定した場合に高い抗体価を示した血清は、特定の合成ペプチドとのみ反応していることが示唆された(図 5)。

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がある。しかし、文献調査の結果からも明らかかなように、その大半は、職業的に連続的な接触が避けられない場合にまれに観察される症例であるが、安全性に問題ないと結論するのは早計であるように思われる。

免疫的に大豆 TI に類似した物質が検出されたグアーガムは、イント産の植物 *Cyamopsis tetragonolobus*(グアー豆)から取られ、職業病の一種として、カーペント製造工場における鼻炎と喘息が5報報告されている。これは、同様に工業原料に用いられるアルギン酸ナトリウムについては、実質的にはアレルギーの症例報告が存在しないのに較べれば、決して少ない数ではない。しかし、その原因となるアレルゲンについては全くわかっていない。

ICTEIA 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、抗体との反応によって検出するのでアレルゲンの検索には適していると思われる。しかし、用いる抗体の種差(ウサギとヒトのように)や抗体のクラス (IgG と IgE) などによって免疫反応は異なっており、あくまでも可能性に留まる。

昨年度の研究により、グアーガム中に、抗大豆 TI 抗体と反応する物質が存在し、それがグアーガムを素材とした特定保健用食品にも残存しているらしいことは、ICTEIA 及びウェスタンブロットとともに検出されたことから明らかであったか、ウェスタンブロットの結果では、明瞭な蛋白バンドとしては検出されず、アーチファクトである可能性も否定できなかった。今回、グアー豆及びグアーガムからたんぱく質の部分精製を行なうことで、抗大豆 TI 抗体と反応する物質はたんぱく質であり、グアーガムの主成分である多糖類ではないことが示唆された。

インゲン、アキシマササゲより精製したたんぱく質画分中にもグアー豆同様に抗大豆 TI 抗体と反応するバンドが検出されたことから、これらはいずれも、大豆 TI に類似のたんぱく質であることが考えられた。実際、DNA 配列のホモロジー検索によるとグアー豆の TI は解析されていないが、 β -ガラクトシダーゼの塩基配列には、大豆、インゲンとの間に高い相同性があった。

これらの結果をまとめると、グアーガム中の抗大豆 TI 抗体反応性物質は、グアー豆中の TI の混入である可能性が高い。大豆 TI は大豆の主要なアレルゲンのひとつであることから、グアーガム工場における職業性喘息の原因物質のひとつとなっている可能性もあると考えられた。

しかし、この大豆アレルゲンと類似のたんぱく質がアレルギー児の血清と反応するかどうかは不明であり、結果には示していないか、グアー豆たんぱく質と反応する血清は現在までのところ見つかっていない。またクアー豆たんぱく質の構造は不明である。そこで、大豆アレルギーとの交差性が問題になっているピーナッツアレルゲンのエピトープ部分の合成ペプチドをアレルゲンとした ICTEIA 法を開発した。

図 5 に示すように、合成ペプチドを混合して測定したもので高い抗体価を示した血清でも、各ペプチド単独で測定した場合、異なる一つか二つのペプチドとのみ反応した。すなわち、大豆 TI に対する抗体を有する血清であっても、その抗体の特異性はかなり変異があることが明らかになった。

E 結論

特定保健用食品素材であるグアーガム中の抗大豆 TI 抗体反応性物質はグアー豆からの混入たんぱく質であり、インゲン豆等にも見られる TI 様物質である可能性が示唆された。大豆以外のその他の特定保健食品素材からは検出されなかった。アレルギー児血清中の特異抗体は広い抗体特異性を有しており個人差が大きく、疾患特異性は明らかではなかった。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

免疫複合体転移酵素免疫測定法とウェスタンブロットによる健康食品中の大豆アレルゲンの検出 島田光世、廣田晃一、斎藤衛郎、第 50 回日本栄養改善学会学術総会 2003 9 18 倉敷

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