

**Fig III-2 Expression of mRNAs related to lipid metabolism in the liver**

CO: Control A: Material A, B: Material B, C: Material C

Bars represent mean  $\pm$  SD, n=8.

\*Significantly different from the control group ( $p < 0.05$ ).

	TABLE IV-1 Composition of the test diet			
	(g/kg diet)			
	Control	Material A	Material B	Material C
Casein	200	200	200	200
L-cystine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	529.5	529.5	529.5	529.5
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	70	70	70	70
Cellulose	50	-	-	-
Material A	-	50	-	-
Material B	-	-	50	-
Material C	-	-	-	50
Mineral mixture	35	35	35	35
Vitamin Mixture	10	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
t-butylhydroxyquinone	0.014	0.014	0.014	0.014

TABLE IV-2 Body weight, food intake and food efficiency in KK mice

	Control	Material A	Material B	Material C
Initial weight(g)	18.3±0.9	18.2±0.6	18.3±1.2	18.3±0.9
Final weight(g)	35.5±2.2 <sup>ab</sup>	33.5±2.7 <sup>a</sup>	36.7±2.2 <sup>b</sup>	34.2±2.3 <sup>ab</sup>
Weight gain(f/day)	0.40±0.05	0.34±0.05	0.40±0.05	0.36±0.07
Food intake(g/day)	5.14±1.57	5.40±2.00	4.66±0.41	4.58±0.31
Food efficiency(%)	7.65±1.16 <sup>ab</sup>	6.61±1.36 <sup>a</sup>	8.80±0.97 <sup>b</sup>	7.72±1.33 <sup>ab</sup>

Values are means±SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLE IV-3 Weight of liver and adipose tissue in KK mice

	Control	Material A	Material B	Material C
Liver(g)	1.57±0.18 <sup>ab</sup>	1.53±0.18 <sup>ab</sup>	1.63±0.23 <sup>b</sup>	1.39±0.16 <sup>a</sup>
Epididymal fat(g)	1.06±0.30 <sup>ab</sup>	0.81±0.29 <sup>a</sup>	1.26±0.31 <sup>b</sup>	0.91±0.30 <sup>ab</sup>
Retroperitoneal fat(g)	0.525±0.125	0.430±0.127	0.563±0.094	0.537±0.140
Mesenteric fat(g)	0.455±0.132 <sup>ab</sup>	0.454±0.166 <sup>ab</sup>	0.669±0.144 <sup>a</sup>	0.437±0.222 <sup>b</sup>

Values are means±SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLEIV-4 Adipose tissue parameters in KK mice

	Control	Material A	Material B	Material C
Epididymal fat cell size( $\mu\text{m}$ )	73.5 $\pm$ 3.8	72.1 $\pm$ 8.6	68.3 $\pm$ 3.7	68.7 $\pm$ 3.5
Retroperitoneal fat cell size( $\mu\text{m}$ )	81.1 $\pm$ 9.6 <sup>a</sup>	70.9 $\pm$ 9.0 <sup>ab</sup>	70.2 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	68.9 $\pm$ 8.0 <sup>b</sup>
Mesenteric fat cell size( $\mu\text{m}$ )	63.6 $\pm$ 5.1	57.3 $\pm$ 8.7	64.3 $\pm$ 3.3	60.8 $\pm$ 2.5
Subcutaneous fat cell( $\mu\text{m}$ )	43.2 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	37.7 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	39.1 $\pm$ 4.0 <sup>ab</sup>	36.6 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>
Epididymal fat cell number( $\times 10^6$ )	5.51 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	4.51 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>	8.14 $\pm$ 1.41 <sup>b</sup>	5.74 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>
Retroperitoneal fat cell number( $\times 10^6$ )	2.14 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	2.51 $\pm$ 0.91 <sup>ab</sup>	3.40 $\pm$ 0.74 <sup>ab</sup>	3.61 $\pm$ 1.46 <sup>b</sup>
Mesenteric fat cell number( $\times 10^6$ )	3.74 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	5.36 $\pm$ 1.82 <sup>b</sup>	3.52 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	4.15 $\pm$ 0.50 <sup>ab</sup>

Values are means $\pm$ SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLEIV-5 Serum lipid levels in KK mice

	Control	Material A	Material B	Material C
Total cholesterol(mg/dl)	112.6 $\pm$ 17.9	110.5 $\pm$ 23.6	133.5 $\pm$ 31.2	109.4 $\pm$ 22.5
Triglyceride(mg/dl)	115.1 $\pm$ 60.7 <sup>a</sup>	151.7 $\pm$ 47.8 <sup>ab</sup>	208.7 $\pm$ 60.3 <sup>b</sup>	156.4 $\pm$ 58.9 <sup>ab</sup>
NEFA(mEq/L)	0.360 $\pm$ 0.111	0.411 $\pm$ 0.168	0.462 $\pm$ 0.103	0.380 $\pm$ 0.103

Values are means $\pm$ SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLEIV-6 Serum adipocytokines levels in KK mice

	Control	Material A	Material B	Material C
Leptin(ng/ml)	16.0 $\pm$ 21.9	28.2 $\pm$ 59.8	53.8 $\pm$ 38.6	27.5 $\pm$ 20.6
Adiponectine( $\mu\text{g/ml}$ )	29.0 $\pm$ 3.5	26.8 $\pm$ 6.2	25.3 $\pm$ 5.6	29.6 $\pm$ 5.1

Values are means $\pm$ SD.

TABLEIV-7 Liver lipid levels in KK mice

	Control	Material A	Material B	Material C
Cholesterol(mg/g liver)	1.5±0.4 <sup>a</sup>	1.0±0.2 <sup>b</sup>	1.0±0.3 <sup>b</sup>	1.1±0.2 <sup>b</sup>
(mg/liver)	2.4±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.3 <sup>b</sup>	1.6±0.5 <sup>b</sup>	1.5±0.3 <sup>b</sup>
Triglyceride(mg/g liver)	7.7±3.7	5.7±6.2	7.7±3.6	5.1±2.9
(mg/liver)	12.2±6.2	9.5±11.6	13.0±7.5	7.5±4.8
Phospholipid(mg/g liver)	7.2±1.0 <sup>ab</sup>	6.3±0.4 <sup>a</sup>	8.1±0.9 <sup>b</sup>	7.5±1.1 <sup>b</sup>
(mg/liver)	11.3±1.9 <sup>ab</sup>	9.6±1.4 <sup>a</sup>	13.2±2.7 <sup>b</sup>	10.6±1.9 <sup>ab</sup>

Values are means±SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLE V-1 Body weight, food intake and food efficiency in growing rats

	Control	Material A	Material B	Material C
Initial weight(g)	104.1±2.6	104.2±2.3	104.1±3.0	104.1±2.4
Final weight(g)	415.8±21.0	425.6±22.1	393.1±25.6	391.2±31.9
Weight gain(f/day)	7.1±0.5	7.3±0.5	6.6±0.5	6.5±0.7
Food intake(g/day)	12.5±0.6 <sup>a</sup>	11.9±0.6 <sup>a</sup>	10.9±0.7 <sup>b</sup>	11.6±0.8 <sup>ab</sup>
Food efficiency(%)	56.8±1.6 <sup>ab</sup>	61.4±2.0 <sup>a</sup>	60.4±3.9 <sup>ab</sup>	56.1±1.6 <sup>b</sup>

Values are means±SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLE V-2 Relative weight of liver and adipose tissue in growing rats

	Control	Material A	Material B	Material C
Liver(g/100gBW)	3.42±0.31	3.65±0.18	3.63±0.45	3.40±0.29
Epididymal fat(g/100gBW)	1.34±0.19	1.29±0.22	1.27±0.29	1.16±0.27
Retroperitoneal fat(g/100gBW)	2.01±0.37	1.80±0.52	1.57±0.50	1.35±0.39
Mesenteric fat(g/100gBW)	1.64±0.28 <sup>a</sup>	1.21±0.17 <sup>b</sup>	1.15±0.16 <sup>b</sup>	1.23±0.22 <sup>b</sup>

Values are means±SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLE V-3 Adipose tissue parameters in growing rats

	Control	Material A	Material B	Material C
Epididymal fat cell size( $\mu\text{m}$ )	68.1 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	61.7 $\pm$ 3.5 <sup>ab</sup>	62.6 $\pm$ 4.7 <sup>ab</sup>	58.1 $\pm$ 6.1 <sup>b</sup>
Retroperitoneal fat cell size( $\mu\text{m}$ )	93.9 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	77.2 $\pm$ 8.3 <sup>b</sup>	81.6 $\pm$ 7.2 <sup>b</sup>	74.0 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>
Mesenteric fat cell size( $\mu\text{m}$ )	52.7 $\pm$ 2.4	51.8 $\pm$ 5.1	48.8 $\pm$ 5.4	49.3 $\pm$ 4.2
Subcutaneous fat cell( $\mu\text{m}$ )	75.8 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	63.3 $\pm$ 8.0 <sup>b</sup>	63.8 $\pm$ 8.0 <sup>ab</sup>	64.4 $\pm$ 9.7 <sup>ab</sup>
Epididymal fat cell number( $\times 10^6$ )	47.7 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>	62.9 $\pm$ 9.3 <sup>b</sup>	54.4 $\pm$ 10.4 <sup>ab</sup>	61.4 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>
Retroperitoneal fat cell number( $\times 10^6$ )	19.5 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	35.3 $\pm$ 18.1 <sup>b</sup>	22.6 $\pm$ 3.8 <sup>ab</sup>	26.4 $\pm$ 2.9 <sup>ab</sup>
Mesenteric fat cell number( $\times 10^6$ )	126.0 $\pm$ 25.2	91.7 $\pm$ 32.6	128.0 $\pm$ 51.4	107.3 $\pm$ 14.8

Values are means $\pm$ SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLE V-4 Serum lipid levels in growing rats

	Control	Material A	Material B	Material C
Total cholesterol(mg/dl)	150.8 $\pm$ 64.1	116.0 $\pm$ 20.6	121.4 $\pm$ 27.9	134.2 $\pm$ 18.9
Triglyceride(mg/dl)	131.9 $\pm$ 47.3 <sup>a</sup>	128.2 $\pm$ 33.0 <sup>a</sup>	323.1 $\pm$ 151.6 <sup>b</sup>	216.2 $\pm$ 87.5 <sup>ab</sup>
NEFA(mEq/L)	0.512 $\pm$ 0.154	0.617 $\pm$ 0.282	0.481 $\pm$ 0.147	0.697 $\pm$ 0.104

Values are means $\pm$ SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLE V-5 Serum adipocytokines levels in growing rats

	Control	Material A	Material B	Material C
Leptin(ng/ml)	1.99 $\pm$ 0.68	2.63 $\pm$ 1.30	3.06 $\pm$ 1.23	2.42 $\pm$ 1.10
Adiponectine( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	6.97 $\pm$ 2.05	6.50 $\pm$ 2.44	4.80 $\pm$ 2.09	6.72 $\pm$ 1.35

Values are means $\pm$ SD.

TABLE V -6 Liver lipid levels in growing rats

	Control	Material A	Material B	Material C
Cholesterol(mg/g liver)	2.1±0.3	2.2±0.2	2.0±0.2	2.1±0.3
(mg/liver)	11.2±1.6	12.6±1.7	11.9±2.2	10.2 ±1.8
Triglyceride(mg/g liver)	14.1±5.1 <sup>a</sup>	10.3±2.8 <sup>ab</sup>	8.2±1.8 <sup>b</sup>	10.2±4.6 <sup>ab</sup>
(mg/liver)	73.7±26.5	59.4±17.7	48.1±12.4	52.0±30.3
Phospholipid(mg/g liver)	16.2±0.9	16.7±1.1	16.4±1.2	17.6±1.8
(mg/liver)	85.4±8.5	95.9±7.1	96.2±20.3	85.4±10.6

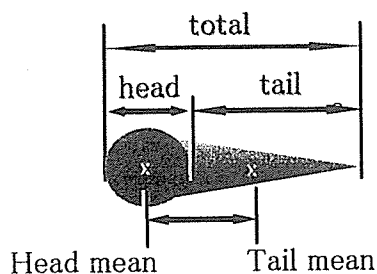
Values are means±SD.

Different superscripts in a row indicate significant difference among the groups(P<0.05)

TABLE VI-1 Composition of the test diet

(g/kg diet)

	Control	Material A	Material B	Material C	Material D	Material E	Material F
Corn starch	397.486	386.181	392.223	392.486	392.486	392.486	392.486
α-Corn starch	132	132	132	132	132	132	132
Sucrose	100	100	100	100	100	100	100
Casein	200	198.935	200	200	200	200	200
Soybean oil	70	69.988	70	70	70	70	70
Cellulose	50	50	50	50	50	50	50
Mineral mixture (AIN-93G)	35	35	35	35	35	35	35
Vitamin mixture (AIN-93G)	10	10	10	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
t-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Material A	—	12.382	—	—	—	—	—
Material B	—	—	5.263	—	—	—	—
Material C	—	—	—	5.000	—	—	—
Material D	—	—	—	—	5.000	—	—
Material E	—	—	—	—	—	5.000	—
Material F	—	—	—	—	—	—	5.000



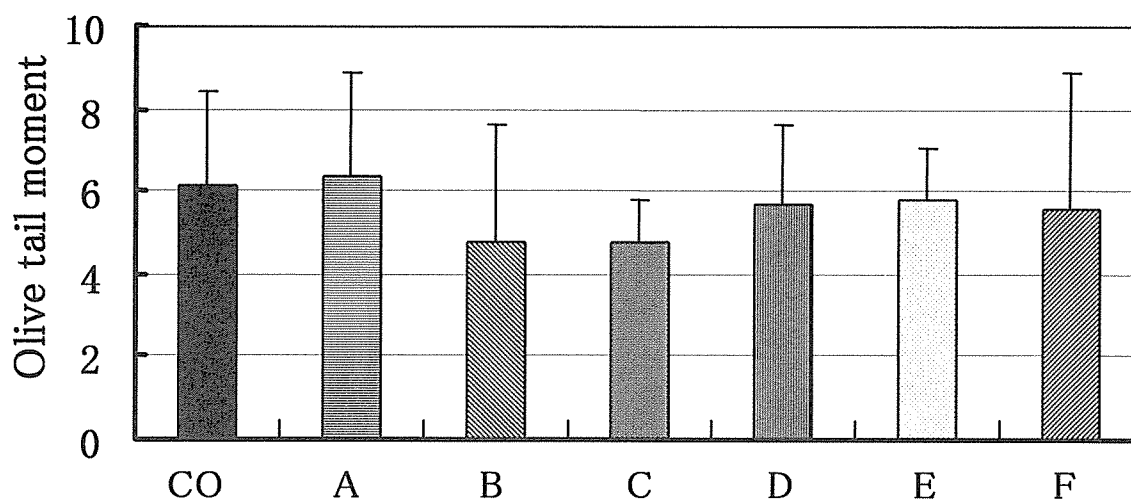
Tail mean=Center of gravity of the tail  
 Head mean=Center of gravity of the head weighted by gray values  
 % DNA in tail=100-% DNA in head  
 Olive tail moment = (Tail mean-Head mean) X( % DNA in tail) /100

Fig. VI- 1 The calculation methods of olive tail moment

**TABLE VI - 2 Body weight and food intake in ICR mice.**

	Control	Material A	Material B	Material C	Material D	Material E	Material F
Initial weight (g)*	31.6±1.3	31.8±2.4	31.1±1.2	30.8±0.8	31.4±2.0	31.0±1.5	30.4±0.5
Final weight (g)*	37.6±4.8	34.4±1.2	37.1±3.1	36.7±1.4	36.5±4.5	36.7±2.9	36.3±0.3
Weight gain (g/21d)*	6.0±4.6	2.5±1.5	8.0±1.4	6.9±1.9	7.2±5.5	5.7±3.5	5.9±0.3
Food intake(g/5mice)	98.0	94.4	106.7	90.4	80.7	99.8	94.5

Value are mean ±SD



**Fig. VI - 2 The inhibitory effects of food components on mutagenicity of DEN.**

CO: Control, A: Material A, B: Material B, C: Material C, D: Material D, E: Material E, F: Material F  
 Bars represent mean SD, n=5.

**TABLE VII - 1 Body weight and food intake in ICR mice.**

	Control	Material A	Material B	Material C	Material D	Material E	Material F
Initial weight (g)*	28.8±1.3	31.7±2.2	28.7±2.0	31.6±0.8	32.1±1.1	31.0±2.1	31.0±1.1
Final weight (g)*	34.7±1.0	32.4±2.8	35.5±3.1	34.3±2.9	37.0±2.4	36.6±2.2	34.8±1.4
Weight gain (g/21d)*	4.4±3.2	0.7±1.7	6.8±3.5	2.7±2.3	4.9±2.4	5.6±3.7	3.8±1.0
Food intake(g/5mice/21d)	91.4	113.4	91.3	94.7	108.3	122.6	89.0

\* Value are mean ±SD



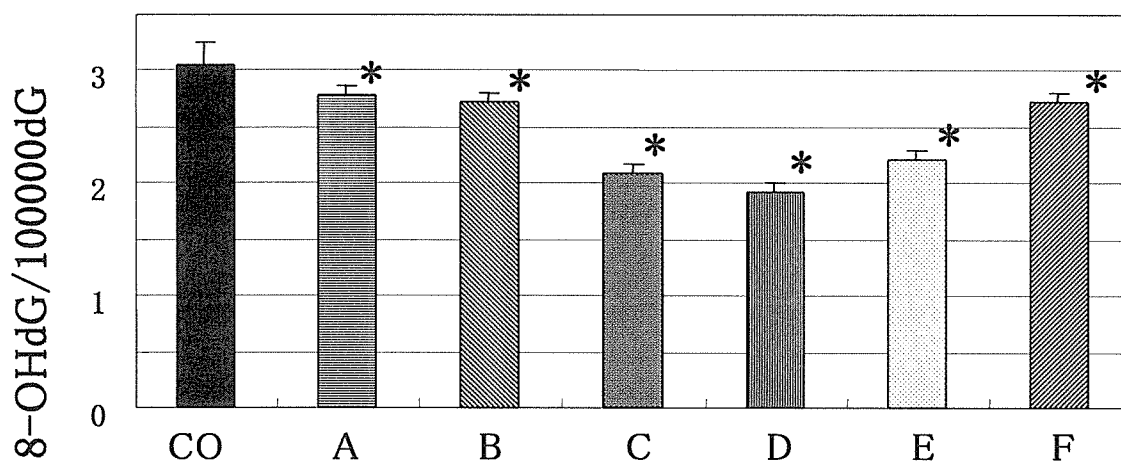


Fig. VII - 1 The inhibitory effects of food components on mutagenicity of B(a)P.

CO: Control, A: Material A, B: Material B, C: Material C, D: Material D, E: Material E, F: Material F  
 Bars represent mean SD, n=5.

\*Significantly different from the Control group (P<0/05).

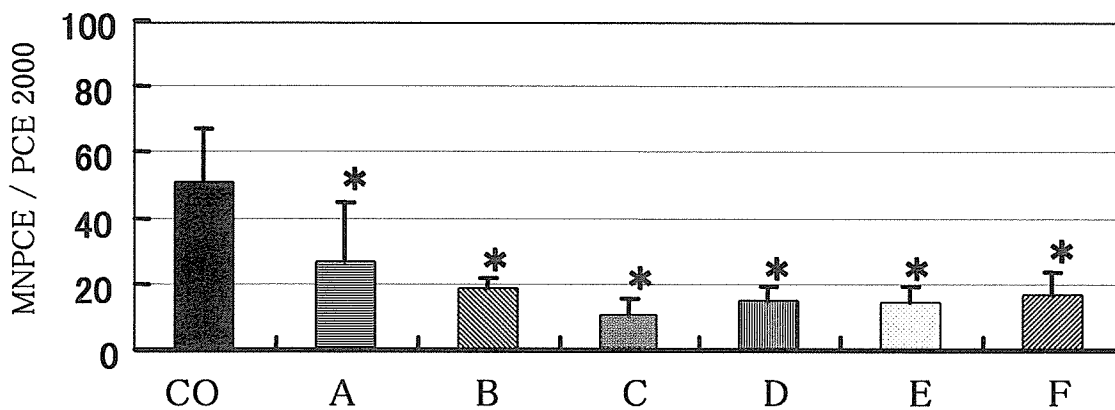


Fig. VII - 2 The inhibitory effects of food components on mutagenicity of B(a)P.

CO: Control, A: Material A, B: Material B, C: Material C, D: Material D, E: Material E, F: Material F  
 MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte, PCE: polychromatic erythrocyte  
 Bars represent mean SD, n=5.

\*Significantly different from the Control group (P<0/05).

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進 研究事業)  
分担研究報告書

作用機序が明確ではない食品の有効性の評価方法に関する研究  
—精神疾患の改善や精神保健の用途における有効性が人試験で示唆されている食品素材について—

分担研究者 志村二三夫 (十文字学園女子大学教授)

研究要旨

“いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究”の一環として、“作用機序が明確ではない食品の有効性の評価”に関する調査・研究を行政研究の観点から行った。すなわち、(1)いわゆる健康食品の作用機序を明確にすることの必要性・重要性について整理・検討した上で、(2)脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されているが、作用機序が明確ではない食品素材をデータベース等で探索し、(3)この種の素材を対象に、作用機序解明への手掛かりを得る上で突破口を開く手法と推定されるDNAマイクロアレイを用いる遺伝子発現応答の網羅的解析を行い、その有用性を検討・評価した。以下の結果を得、また考察した。

(1) 現行制度では、いわゆる健康食品が、条件付き特定保健用食品、さらに従来型の特定保健用食品等へとレベルアップするには、作用機序の解明が求められるが、これは容易ではない。一方、PASSCLAIMの報告では、食品成分の曝露、高度標的機能に関して、科学的根拠に基づく正当なマーカが得られれば、“高度機能強調表示”が可能との提言されている。したがって、“作用機序が明確ではない食品”を、その体内動態や標的部位の特定化作業を通して“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へのレベルアップとが重要といえる。

(2) NMCDの検索により、脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されているものが20品目以上見出された。そのうちの1つ、亜鉛に対するNMCDの評価は、注意欠陥/多動性障害および神経性食欲不振症にPossibly Effectiveである。しかし、これらの病態の改善はもとより、中枢神経系における亜鉛の作用機序は明確ではない。さらに、GABAについては、「血圧が高めの人に適する」旨の表示が許可された特定保健用食品の関与成分であるが、NMCDは「有効性を評価するための情報が不十分」と評価している。一方、GABAは脳内の主要な抑制性神経伝達物質であるが、恐らくこの事実が拡大解釈され、鎮静作用や抗ストレス作用の示唆・標榜がインターネット等に氾濫している。

(3) 上記を踏まえ、亜鉛やGABAが間接的にしろ直接的にしろ、脳を標的とするか否かの明確化は重要なので、その実験的検証のための評価方法を検討した。すなわち、亜鉛に関しては、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現応答の網羅的解析によって、metallothionein 1 (MT1)が亜鉛に対する生体応答の有用な評価マーカとなるとの推定のもとに、リアルタイムRT-PCR、さらには免疫組織化学による検討を行った。その結果、亜鉛欠乏ラットへの亜鉛投与により、摂食量が増大する投与12時間に先立つ6時間後に、視床下部近傍近傍でMT1遺伝子の軽度の発現亢進が認められ、さらに嗅球や視床下部近傍にニューロンと推定されるMT1細胞が一過性に出現する傾向が認められた。GABAに関しては、DNAマイクロアレイを用いる解析により、その連日投与により遺伝子発現応答が用量-反応関係に基づいて変動するという結果が得られた。5 mg/kgの用量では、小脳の機能に関わりの深いionotropic glutamate receptor (Gria4), ionotropic glutamate receptor (N-methyl D-aspartate 2A型), potassium large conductance calcium-activated channel等のアップレギュレーション、annexin-13等のダウンレギュレーションが認められ、脳が食事性GABAの標的(おそらく間接的な機構により)となり得る可能瀬が示された。

以上、冒頭に示した(1)、(2)、(3)の当初の目的が概ね達成され、“作用機序が明確ではない食品の有効性の評価”に関する新たな進展に、DNAマイクロアレイを用いる遺伝子発現応答の網羅的解析は極めて有用であると評価される。

## A. 研究目的

本分担課題の主な目的は、“いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究”の一環として、“作用機序が明確ではない食品の有効性の評価”に関する基本的な考え方・方針やそのための方法に関する調査・研究を行うことにある。

いわゆる健康食品には有効性や安全性の科学的根拠が乏しく、また適正な品質管理がなされていないものが少なくない。また、「いわゆる健康食品は食品であるのだから、安全性や品質が確保されていればよく、有効性の科学的根拠を詮議する必要はない」とする考えも一部にはあるようである。しかし、健康食品等といった名称で、健康の維持・増進における何らかの効能・効果を示唆・標榜するからには、当然、それらに見合う有効性の科学的根拠が求められる。

いわゆる健康食品の利用者の中には、疾病の治療効果を期待して利用する患者もあり、有効性の乏しいものを長期にわたって利用することで、適切な医療機会を逸するという健康被害、また経済被害を蒙る恐れがある。さらに、いわゆる健康食品と医薬品を併用している利用者も多い。こうした場合、有効性の裏づけとなる作用機序が不明な食品の摂取にともない、医薬品との相互作用にともなう有効性の現弱や増強、また環境汚染物質等の代謝活性化に伴う有害作用の発生等の思わぬ影響がもたらされる可能性がある。

これらの背景をもとに次の取り組み・実験を行った。

1. “作用機序が明確ではない食品”を“作用機序が明確な食品ないしはそれに準ずる食品”へとレベルアップさせることの重要性やそのための要件・方法についての調査・検討。

2. 脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されているが、作用機序が明確ではない食品素材をデータベース等で探索。

3. この種の素材について、下記の方法に従って実験を行い、“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップさせるための作業事例を示すこととした。この作業には、いわば“下手な鉄砲数打ち当たる”の格言のように、網羅性が必要と考えられるので、食品素材投与に対する脳の遺伝子発現応答をDNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスによる解析し、その有用性を検討することとした。なお、

この実験では、ハーブ等の多成分系の素材は関与成分の特定が困難であり、結果の解釈に不確実性が伴うとの観点から、上記2の結果を踏まえ、亜鉛およびγ-アミノ酪酸(GABA, ギャバ)を解析対象に選んぴ、下記(1)(2)に取り組んだ。

(1) 亜鉛投与に対する脳の遺伝子発現応答に関する実験

(2) GABA投与に対する脳の遺伝子発現応答に関する実験

## 研究方法

1. “作用機序が明確ではない食品”から“作用機序が明確な食品ないしはそれに準ずる食品”へとレベルアップさせることの必要性やそのための要件・方法に関する検討

文献その他の資料、また健康食品のインターネット通販サイト等を広く当たり、調査・検討を行った。

2. 作用機序は明確ではないが、脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されている食品素材の探索

Natural Medicines Comprehensive Database (NMCD)<sup>1)</sup>およびPubMedを中心に、脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されている食品素材の探索を行った。その上で、上記1に基づいて下記3を進めるのに適していると推定される素材2つ、亜鉛およびGABAを選定した。

NMCDはDietary Supplement等の素材となる天然物を中心に、約1,000品目についてのモノグラフを収載したデータベースで、網羅性が高く、小まめに更新がなされている。ヒト対象試験・研究に基づいて、その安全性については5段階、有効性については6段階の評定化を行っており、当該分野におけるゴールドスタンダードのデータベースといえる<sup>2)</sup>。

3. “作用機序が明確ではない食品”から“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップさせるための実験研究

(1) 亜鉛投与に対する脳の遺伝子発現応答に関する実験

上記2において選定された亜鉛について、ラットを用いる実験によって検討した。

初体重80gのWister系雄ラットを20%カゼイン食で3日間予備飼育し、体重が約90gとなった時点で亜鉛欠乏食(1.1ppmZn:オリエンタル酵母株式会社)を3週間与えて亜鉛欠乏動物を作成した。

解剖(AM10:00±1.5 h)前の0 h, 6 h, 12 h, 24 hのいずれかに、ZnSO<sub>4</sub>を1mg Zn/kg BWの用量で腹腔内投与した。所定の時刻に、臓器を摘出してRNAlater RNA Stabilization Reagent (キアゲン)中に投入して要時まで-80°Cに保存した後、QuickGene-800(富士フィルム)を用いて、トータルRNAを抽出した。トータルRNAの調製にはQuickGene(富士フィルム)を用いた。

DNAマイクロアレイ法による遺伝子発現の解析の際は、まず、アジレント社のプロトコールに従い、トータルRNAをもとにcDNAを合成し、つぎにT7RNAポリメラーゼを用いてCy3あるいはCy5標識CTPを取り込んだcRNAを合成した。さらに、それぞれの蛍光標識cRNAを断片化させた後、等量を混合し、DNAマイクロアレイ(アジレント)とハイブリダイズさせた(65°C, 17 h)。アレイを洗浄・乾燥後、FLA-8000スキャナー(富士フィルム)を用い、5 μmの解像度でCy3 (532 nm)およびCy5 (635 nm)の蛍光をスキャニングして画像データを記録した。画像データ解析用のソフトウェアにはMaltigauge Ver 3.0およびArray Gauge Ver 2.0を用いた。

メタロチオネイン(MT)mRNAの半定量化は、リアルタイムRT-PCRを用いて行った。測定用キットは、SYBR Greenベースのインターカーレーション法によるBrilliant SYBR Green 1-Step QRT-PCR Master Mix(ストラタジーン)を用い、リアルタイムPCR装置(Mx3000P:ストラタジーン)を用いて測定した: 50°C(30分), 95°C(10分), [95°C(30分), 60°C(1分), 72°C(30秒)] X 40サイクル, 72°C(5分), 95°C(10分)。MT遺伝子およびサイクロフィリンについて得られたCt値から、サイクロフィリンmRNAに対する標的遺伝子mRNAの量比を求めた。

一方、別の実験の際には、ネブタール麻酔科でパラフォルムアルデヒド溶液を用いて臓器を灌流固定した。後固定の後、定法に従って肝臓および脳をパラフィン包埋し、リトトームを用いて切片を作成した。脱パラフィン化した切片について、第一抗体として抗ウマmetallothionein抗体(DAKO社)、また第二抗体としてLSAB2(DAKO社)を用いて免疫染色を行い、DABにて発色させ、さらにヘマトキシリンで核の対比染色を行った。

## 2) GABA投与に対する脳の遺伝子発現応答に関する実験

上記2において選定されたGABAについて、ラットを用いる実験によって検討した。7週齢のSHR系雄ラットをAIN93G飼料で2週間飼育した。この間、GABAを水溶液として5mg/kg BWあるいは0.5mg/kgの用量で連日胃内投与した。肝臓および脳組織からのRNAの抽出、およびDNAマイクロアレイ法による遺伝子発現の解析は、亜鉛に関する実験の場合と同様に行った。

## C. 研究結果

### 1. “作用機序が明確ではない食品”から“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップさせることの必要性やそのための要件・方法に関する調査研究

ここでは、表記項目に関する整理を行い、またD項に該当する考察も加えることとする。

H17年に改正された保健機能食品制度では、従来型の特定保健用食品に比べて、①作用機序、および②有効性を確認する試験方法の両面から審査基準が緩和された条件付き特定保健用食品が新設された。保健機能食品という別格の健康食品ないしはそれに近い有効性・安全性の科学的根拠をもつ製品の隆昌は、健康被害や経済被害を生じる恐れのあるいわゆる健康食品を市場から追放する上の大きな力となり得る。こうした環境づくりを進め、消費者のインフォームド・チョイスを支援するためには、上記のような保健機能食品の枠組み内での規制緩和は望ましい方向の1つといえる。一方、保健用途における有効性が人対象試験である程度実証されているものの、その関与成分の特定が困難であったり、また作用機序が不明確である食品も多い。現行の制度では、こうした食品が安全性・有効性により信頼のおける条件付き特定保健用食品、さらには従来型の特定保健用食品へとレベルアップするためには、その作用機序が明確にされる必要がある。

逆にいえば、作用機序の明確化によって、この種の食品の将来が開かれるといえる。また、より精密な人対象試験を実施する上での有力な情報を提供することになる。

しかし、作用機序の明確化は容易にはなし得ないことも事実である。その前提として、関与成分の特定や、その成分と相互作用する共有成分の解析が必要となる場合も少なくないと考えられる。

特定保健用食品の関与成分や栄養機能成分等のように、身体の構造・機能に対する作用を示す食品成分は、主に消化管内腔あるいは消化管壁を標的部位とし、これらへの影響を介して作用を発現するもの(例えばプレバイオティックス・プロバイオティックス)、および消化・吸収されて真の体内に取り込まれた後、標的部位に到達して作用を発現するものに大別される。さらに、後者の場合は、体内での代謝を受けて化学構造の異なる活性型に変換された後に作用を発揮するもの(例えば大部分のビタミン)と、こうした代謝活性化を経ずに作用を発現するもの(例えばミネラル)とに分けられる。加えて、このような体内動態や作用機序に応じて、消化・吸収系、血中輸送タンパク質、薬物代謝系、細胞膜輸送体やイオンチャンネル、標的酵素・受容体等々の機能素子の阻害・賦活化や誘導・抑制等の現象が引き起こされる。こうして、食品成分同士あるいは医薬品と相互作用を生じる可能性もある。さらに、脳に作用を及ぼす食品成分の中には、血液・脳関門を通過して脳組織に到達して直接的に作用を現すものもあれば、末梢の自律神経系に作用し、その結果として間接的に脳機能の変動を生じる可能性もある。

したがって、作用機序の解明は、“作用機序が明確ではない食品”が別格の健康食品にレベルアップするための最も重要な作業目標に相違はないが、たとえそこには到達しないにしても、関与成分の体内動態や標的部位(直接的・間接的を問わず)を特定する作業は必須性が極めて高い。

このことと関連し、EUとILSI ヨーロッパ(特定非営利活動法人国際生命科学協会ヨーロッパ支部

の共同プロジェクトであるFUFOSE (Functional Foods Science in Europe: 1996~1999) は、健康機能表示として一般に認められている栄養機能を超えた“高度機能強調表示”と“疾病リスク低減表示”に関する概念と科学的根拠に基づくマーカーについての提示を行っている<sup>3, 4)</sup>。これらいずれの表示も適切な科学研究に基づく場合に限り、正当と認められるとされ、とりわけ、食品成分への曝露、高度標的機能、疾病リスク低減のマーカーが重要とされている。

したがって、関与成分の体内動態や標的部位を特定する作業は、“高度機能強調表示”へとつながり得る評価マーカーの探索作業の一環であるといえる。なお、この作業の実施に関しては、消化管で吸収されて真の体内に取り込まれるが、体内での化学変化を受けない成分、例えばミネラルについては、標的

部位の探索の際に避賜的な投与方法を採用することが原理的に可能である。こうすることで、経口摂取させた場合に生じる吸収過程等における実験動物の個体差によるバラツキを除外でき、実験の精度をより高くできるものと推定される。

これらの作業課題がクリアされるならば、標的臓器、標的組織、標的細胞、標的分子、有効性の評価マーカー、安全性の評価マーカー等が明確となり、構造活性相関に関する知見等も考慮することで、有効性はもとより、安全性に関する科学的根拠も充実し、作用機序が明確な食品へとレベルアップするための道筋が付くと考えられる。

## 2. 作用機序は明確ではないが、脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されている食品素材の調査・探索研究

ここでは、表記項目に関する整理を行い、またD項に該当する考察も加えることとする。

脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験で検討されている食品素材(米国でDietary Supplement素材として用いられているもの)について、Natural Medicines Comprehensive Database (NCD)を中心に探索した結果を表2に示す。これらのうち、有効性の評価がPossibly Effective以上、かつ安全性の評価がPossibly Safe以上であるものが、上記1に基づいて下記3を進めるのに値する素材と推定される。これらに該当するものは20品目以上あったが、そのうち、標的部位の探索の際に避賜的な投与方法を採用が可能なものとして亜鉛を選定した。亜鉛は、脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性に関しては、注意欠陥/多動性障害および神経性食欲不振症に対する有効性が人試験においてある程度実証されているといえる。しかしながら、その作用機序が不明確であることはもとより、これらの用途における効果に関連して、脳が直接の作用部位となっていることを示した報告は見当たらなかった。

一方、特定保健用食品の関与成分には、インターネットの通販サイト等で脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が示唆・標榜されているものがある。この種の成分は、特定保健用食品の申請の際に安全性試験が行われているので、実験研究の対象として適していると考えられる。それらのうち、GABAについては、末梢機構、すなわち交感神経抑制作用により血圧を低下する作用があるとされ、GABAを関与成分とし、

「血圧が高めの人に適する」旨の表示が許可された特定保健用食品が数種類ある。一方、GABAは脳内における最も重要な抑制性神経伝達物質であり、塩化物イオンチャンネルであるGABA受容体を開口させて抑制性シナプス後電位を発生させ、ニューロンの過分ニューロンの過分極(抑制)をもたらす<sup>5)</sup>。確かに、GABAは脳内において、鎮静・催眠作用、抗不安作用、抗痙攣作用、骨格筋弛緩作用などをもつが、食物として摂取されたGABAが脳に対して間接的にしる直接適しる何らかの作用を示すか否かについては不明である。NMCDはGABAの有効性を評価するための情報は不十分であるとされている。

### 3. “作用機序が明確ではない食品”から“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップさせるための実験研究

#### (1) 亜鉛投与に対する脳の遺伝子発現応答に関する実験研究

##### ① 実験研究の必要性

この実験研究では、亜鉛投与の脳への影響をDNAマイクロアレイ法を用いる遺伝子発現応答の網羅的解析によって追及することを通して、同アプローチが作用機序が明確ではない食品の有効性評価において、いかに有用であるかを評価することをめざす。

亜鉛が食欲の維持・増進に重要な役割を果たす栄養素であることは、古くから知られている。例えば、成長期のラットを亜鉛欠乏食で飼育すると、数日以内に摂食量が低下し、体重増加が抑えられる<sup>6,7)</sup>。また、摂食量の低下にともない、3-4日の周期をもつ摂食量の変動、すなわちサイクリック・フィーディングという特異な摂食行動パターンが発現する<sup>6-8)</sup>。一方、亜鉛欠乏状態における食欲の低下は亜鉛の補給により割合に速やかに回復するとされる<sup>9)</sup>。しかし、亜鉛の食欲増進作用の機序を探るために重要なこの摂食量増大のタイミング、またこの変化にともなう生理的变化等を時間単位で把握した報告は見当たらない。これらの背景の下に、研究を進め、概ね下記の結果を得た。

亜鉛欠乏ラットに亜鉛を腹腔内投与すると、血清亜鉛濃度は速やかに上昇(図1)し、24時間後には対照群のレベルにまで低下する。この間、体重や脳の相対重量には亜鉛投与の影響は認められないが、摂食量、また肝臓ならびに小腸粘膜の相対重量は、亜鉛投与にともなって有意に増大する。さらに、血清ALP活性や血清LEP濃度も亜鉛投与に対して速や

かに応答し、投与後24時間以内に上昇する。これらの結果より、腹腔内投与された亜鉛は、これまで調べた評価マーカーに関し、食事性亜鉛と同等の効果を有することが確認されている。

これまで述べたように、亜鉛の腹腔内投与24時間以内に、摂食量が増大した。このことより、亜鉛の食欲維持・増進作用は、消化管内腔や消化管壁への影響を介して内分泌系や神経系が刺激されて生じる間接作用というよりは、亜鉛が食欲の中枢制御部位に対して直接的に作用している可能性を示唆している。この点の検討には、食欲中枢の存在部位とされる視床下部近傍における遺伝子発現応答に対する亜鉛の作用を網羅的に解析することが効果的であると考えられる。その前提として、亜鉛欠乏ラットに亜鉛を投与した後の摂食量の増大のタイミングを時間単位で捉えておくことが必須である。そこで、亜鉛投与前後の摂食量を96時間にわたり、1時間ごとに測定する実験を行ったところ、亜鉛投与12時間以後に投与群の摂食量は対照群に比べて有意に増大した。

この結果をもとに、摂食量増大がもたらされる亜鉛投与12時間後以前、また亜鉛の血中濃度の急騰が回復しつつある時点ということで、投与6時間後の亜鉛に対する応答をDNAマイクロアレイ法を用いて検討した。まず、肝臓について調べてみた結果、MT1の遺伝子発現が亜鉛投与によって強く促進されることが確認されている(平成17年度研究報告書)。MT1は亜鉛・銅などに対して親和性を示し、またこれらミネラルの投与によって、肝臓においてその合成が誘導されるとされている。その他、構造タンパク質(XM\_214400)、リボソームタンパク質(XM\_226370)、転写調節因子(NM\_012543, TC5\_68136)などの遺伝子の発現亢進が認められた。また、MT1遺伝子の転写活性化因子の発現も軽度亢進していたが、MT3遺伝子の発現には変化が見られなかった。亜鉛投与によって発現が抑制されるものとしては、いくつかの急性期タンパク質遺伝子が検出された(NM\_130741, TC543377, NM\_012488, NM\_053288)。リアルタイムRT-PCRによる検討では、亜鉛投与に伴い、肝臓におけるMT1の遺伝子発現応答が強くかつ一過性に促進されることが確認され、MT1の遺伝子発現応答は亜鉛投与に対する肝臓の評価マーカーになり得ると推定された。

##### ① 実験研究の結果

これらの結果をもとに、また上記1および2を踏まえ、

亜鉛を対象に、“作用機序が明確ではない食品”から“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップさせるための作業事例に該当する実験を進展させた。

すなわち、視床下部近傍では、DNAマイクロアレイによる亜鉛投与6時間後の遺伝子発現の変化は概して小さく、また0時間に対するMT1の発現比は1.51ほどであった。しかしながら、リアルタイムRT-PCRで検討した結果、亜鉛投与6時間後に視床下部近傍におけるMT1の遺伝子発現がほぼ有意に亢進していた(図2)。

これらの結果を受け、免疫組織化学による検討を行った。肝臓では、亜鉛投与6時間後に多数の実質細胞がMT1抗体により濃染していた(図3)。脳では、MT1陽性細胞はほとんど見受けられなかったが、嗅覚および視床下部近傍に、亜鉛投与に反応してMT1が出現したと推定されるニューロン様の形態の細胞が検出された(図4)。

## (2) GABA投与に対する脳の遺伝子発現応答に関する実験

### ①実験研究の必要性

GABAは末梢機構、すなわち交感神経抑制作用により血圧を低下する作用があるとされ、GABAを関与成分とし、「血圧が高めの人に適する」旨の表示が許可された特定保健用食品が数種類ある。一方、GABAは脳内における最も重要な抑制性神経伝達物質であり、塩化物イオンチャンネルであるGABA受容体を開口させて抑制性シナプス後電位を発生させ、ニューロンの過分極(抑制)をもたらす。鎮静・催眠作用、抗不安作用、抗痙攣作用、骨格筋弛緩作用などをもつベンゾジアゼピン系薬物は、GABA受容体に対するGABAの作用を増強する働きがある。また、ビタミンB<sub>6</sub>欠乏やビタミンB<sub>6</sub>依存性けいれんにおけるけいれん症状は、ピリドキサルリン酸を補酵素とするグルタミン酸脱炭酸酵素の活性低下により、小脳においてGABA産生が低下するためとされている。

これらの背景から、GABAの摂取が抗不安、抗ストレス、リラックス等の作用をもたらすといった期待がもたれ、例えば、インターネットには次のような情報が溢れている。

●ギャバは、脳内で抑制系の神経伝達物質としてはたらく成分。このため、ギャバを摂ることでイライラなどをやわらげる効果がある。実際、パニックや不安の状態にある人の脳脊髄液を調べたところ、ギャバが著しく減

っていたという実験結果も。これらのことから睡眠障害、自律神経の失調、うつ、更年期の抑うつや初老期の不眠といった症状の改善にも効果が期待されている。

●最近では、ギャバはアルツハイマー型痴呆症の予防・改善にも期待できると話題を集めている。

●GABAはアミノ酸の一種で、GABAが不足するとイライラしたりぐっすり眠りにくくなったり。XXXXにはGABAがたっぷり。気分が落ち着かない時にもピッタリ。

●近年までは食べ物によってギャバを摂取しても、脳内へ到達することはないと言われてきた。しかしギャバの研究が進み、最近になって、食べ物によって摂ったギャバも脳へ届くことがようやくわかってきたのだ。つまり、不足するギャバは食べ物から摂ればよいというわけだ。

こうした状況を反映して、いわゆる健康食品には、GABAを高濃度に含む旨を謳った製品が多数出回っている。しかしながら、経口摂取したGABAが血液脳関門を通過して脳内組織に到達し、そこで作用するという保証はない。また、NMCDの評価においても「GABAの有効性に関する信頼のおける情報はない」とされている。すなわち、経口摂取したGABAが直接的にせよ間接的にせよ脳に対して効果を及ぼすことに関する実証は未だ得られていない状況である。

そこで、高血圧自然発症ラット(SHR)にGABAを0.5mg/kg BWあるいは5mg/kgの用量で2週間連日投与し、肝臓および小脳における遺伝子発現への影響をDNAマイクロアレイを用いて調べた。

### ②実験研究の結果

肝臓では、0.5mg/kg BWのGABA投与によって、4個の遺伝子の発現が2倍以上に促進され、35個の遺伝子の発現が1/2以下に低下するという結果が得られた。これらのうち変化の大きいものから順に表1にリストアップした。

5mg/kg BWのGABA投与の場合は、6個の遺伝子の発現が2倍以上に促進され、85個の遺伝子の発現が1/2以下に低下するという結果が得られた。表2はこれらの遺伝子のうち変化の大きいものから順にリストアップしている。

0.5mg/kg BWの用量で発現量が2倍以上に増大した遺伝子4つのうちchemokine ligand 1およびlipocalin 2は、5mg/kg BWの用量の場合にも発現量が2倍以上に増大していた。また、0.5mg/kg BWの用量で発現量が1/2以下に低下した遺伝子35個のうち28個は、5mg/kg BWの用量の場合にも発現量が1/2



以下に低下していた。これらの中には、uncoupling protein 2, telomerase catalytic subunit, annexin-31等があった。

一方、小脳では、0.5mg/kg BWのGABA投与によって発現が2倍以上に亢進した遺伝子は検出できなかったが、11個の遺伝子の発現が1/2以下に低下するという結果が得られた。これらのうち変化の大きいものから順に表3にリストアップした。その1つとして、annexin-31が認められた。5mg/kg BWのGABA投与の場合には、177個の遺伝子の発現が2倍以上に亢進し、22個の遺伝子の発現が1/2以下に低下するという結果が得られた。これらのうち変化の大きいものから順に表4にリストアップした。0.5mg/kg BWのGABA投与によって発現が1/2以下に低下した遺伝子のうち、9個は5mg/kg BWのGABA投与の場合にも発現が1/2以下に低下していた。annexin-31もその1つであった。神経機能に関わりが深いと推定されるprotein kinase C (gamma, Prkcc)やsynaptosomal-associated protein 25の発現も5mg/kg BWのGABA投与にともなう低下を示した(図@)。5mg/kg BWのGABA投与にともない遺伝子発現が2倍以上に亢進したもののトップ20中には、神経機能に関わりが深いと推定されるものとして、ionotropic glutamate receptor (Gria4) (図3)、potassium large conductance calcium-activated channel (Kcnma1)、(presynaptic cytomatrix protein (Pclo)等があった。遺伝子発現の量比がこれらトップ20のものには及ばないものの中にも、ionotropic glutamate receptor (N-methyl D-aspartate 2A型:発現量比3.150)やsynaptic vesicle glycoprotein 2b (Sv2b)のようなニューロン機能に関わり深い、あるいは神経系疾患との関連が指摘されているalpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked homolog (Atrx:発現量比3.263)等が2倍以上の発現量比を示した。

#### 考察

1. “作用機序が明確ではない食品”から“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップさせることの必要性やそのための要件・方法に関する調査研究

結果の項に述べた。

2. 作用機序は明確ではないが、脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されている食品素材の調査・探索研

#### 究

結果の項に述べた。

3. “作用機序が明確ではない食品”から“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップさせるための実験研究

(1) 亜鉛投与に対する脳の遺伝子発現応答に関する実験研究

亜鉛欠乏ラットに対する亜鉛投与が肝臓はもとより、食欲の中枢制御の場と推定される視床下部近傍近傍においても、MT1の遺伝子発現を一過性に促進する可能性がリアルタイムRT-PCRによる実験で認められた。DNAマイクロアレイを用いる遺伝子発現応答の網羅的解析により、MT1が亜鉛の作用の評価マーカーになり得る可能性をさらに発展させた結果であるといえる。また、免疫組織化学による検討では、亜鉛投与に反応してMT1を発現させると推定させるニューロンと考えられる細胞が視床下部近傍近傍や嗅球から検出され、食欲の維持・増進における亜鉛の作用機序を探る上の評価マーカーとして利用できる可能性が認められた。今後さらに脳内を広く検索することで、作用機序の明確化に結びつく可能性が考えられる。

DANマイクロアレイ法に留まらず、リアルタイムRT-PCR、さらには免疫組織化学の手法を導入することで、脳に対する作用・有効性が推定されている“作用機序が明確ではない食品”を“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップさせるための道筋が得られるものと推定される。そのための突破口としてDNAマイクロアレイ法による遺伝子発現応答の網羅的解析は極めて有用であると考えられる。本実験研究では、亜鉛を対象に研究を進め、この点を示すことができた。

(2) GABA投与に対する脳の遺伝子発現応答に関する実験研究

GABA水溶液を2週間連続で胃内投与すると、肝臓および小脳において、発現量比が2倍以上に増加、あるいは1/2以下に低下する遺伝子のあることが明らかとなった。低用量(0.5 mg/kg BW)の場合に比べ、高用量(5 mg/kg BW)の場合にはこのような変化を示す遺伝子数が多く、用量-反応関係が認められた。

それらの遺伝子のうち、ionotropic glutamate receptor (Gria4)やionotropic glutamate receptor (N-methyl D-aspartate 2A型は興奮性アミノ酸であるグ



ルタミン酸の受容体であり、ニコチン<sup>10)</sup>やコカイン<sup>11)</sup>への曝露により、またエタノールの禁断症状<sup>12)</sup>に伴い脳の特定の部位においてアップレギュレーションを受けることが知られている。potassium large conductance calcium-activated channel (Kcnma1)は、主に小脳のGABA作動性抑制性ニューロンであるPurkinje細胞に発現されている<sup>13)</sup>、このタンパク質を欠損させたトランスジェニックマウスでは、瞬目条件反射学習の記憶形成の異常、運動性の異常、協調運動の顕著な異常等の小脳機能不全が見られる<sup>14)</sup>。また、このマウスのPurkinje細胞では、脱分極に誘発される活動電位の不活性化により、自発活動が抑制されているという。

annexinはCa<sup>2+</sup>依存性リン脂質結合タンパク質で、そのサブタイプannexin A2は学習や神経活動に強く関わっているとされるが、ごく最近このannexin A2が、ラット脳内に広く分布するGABA作動性の抑制性介在ニューロンによって発現されていることが明らかとなった。しかも、ニューロンの脱分極に伴ってニューロン外への分泌が亢進するという。GABA投与ラット小脳におけるannexin-31の遺伝子発現の低下は、GABA投与に伴う神経活動の抑制を反映した可能性も否定できない。

以上より、DNAマイクロアレイを用いる遺伝子発現の網羅的解析により、GABA投与ラットの脳では、神経機能に密接に関わると推定される遺伝子の発現がアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションを受ける可能性が示された。直接的か間接的かは不明であるが、脳が食事性に摂取されたGABAの標的となっていることが強く示唆された。

食べ物として摂取したGABAが脳組織へ到達するか否かに関しては、アカデミックな知見としてこれを否定するものが多い。例えば、血漿中のGABA濃度は120~210 nMほど<sup>15)</sup>であり、一方脳内の濃度は~760±110 μMとされており、この極めて大きな濃度勾配を逆行してGABAが血液脳関門を透過し、脳組織に取り込まれる可能性は常識では考え難い。専門家による「GABAは血液脳関門を通過しないため、中枢神経系のGABAは興奮性伝達物質であるグルタミン酸を基質とし、glutamic acid decarboxylaseによる脱炭酸反応で合成されているという記述もある。また、血液脳関門は脳内間質液中のGABA濃度を低下させるための排出ポンプとして働くという見方もある。

GABAを関与成分とし、「血圧が高めの人に適し

た旨」の表示が許可された特定保健用食品のうち、純品に近いGABAを用いている製品「ギャバ・20タブレット(大塚製薬)」は、お召し上がり方として、「1日1粒(γ-アミノ酪酸 20mg)を目安にお召し上がり下さい」と示している。すなわち、20mg/60kg BW=0.333 mg/kg BWほどの用量のGABAが、血圧低下作用をもつことを示す科学的根拠が得られているといえる。その作用機序は、末梢の交感神経系に対する抑制作用によって説明されている。一方、インターネットの通販サイト等には、GABAの摂取が抗不安、抗ストレス、リラックス等の作用をもたらすといった情報が溢れている。しかし、今回得られた結果からは、これらの情報を一概に否定することはできない。これに関連して、Yokogoshiらのグループは、GABA摂取60分後に脳波のα波が増加してβ波が減少すること、また唾液中のIgAをストレスの評価マーカーに用いて、ストレス負荷時のIgA濃度の低下をGABAが抑制するという報告を行っている。食事性に摂取されたGABAが抗ストレス作用等をもたらす可能性を示したこの報告と、今回の実験研究で得られた知見とがどのように関わるかは全く不明であるが、実験結果はこの報告と大きく矛盾はしないと思われる。今後、GABAの短回投与でも連続投与の場合と同様の結果が得られるのか、またこれに対する遺伝子発現応答のタイミングを垂鉛の実験のながいに準じて明らかにする必要があるとともに、SHR以外のラットの系統についても検討する必要がある。

いずれにしても、マイクロアレイ法を用いる遺伝子発現の網羅的解析により、脳が間接的あるいは直接的な標的となっている可能性が示され、アップレギュレートあるいはダウンレギュレートされる遺伝子の中には、GABAの有効性や作用機序解明のための評価マーカーとなり得るものがあると推定される。

こうした知見を得ることができた意味で、垂鉛に関する実験研究の場合も合わせ、DNAマイクロアレイ法による遺伝子発現応答の解析は、作用機序が作用機序が明確ではない食品の有効性の評価において極めて有用であると判断される。

#### 文献およびURL

- 1) <http://www.naturaldatabase.com/naturaldatabase>
- 2) 志村二三夫:アンチ・エイジング(日本抗加齢医学会雑誌) 1, 23-30 (2005)
- 3) Asp, N. G., Contor, L.: Eur. J. Nutr. 42 S suppl 1, 13-15 (2003).

- 4) 道川優子, 志村二三夫: FOOD STYLE 21 9 (9), 134-139 (2005)
- 5) Kandel, E. R., Schwartz, J. H. Jessel, T. M.: Principles of Neural Sciences, pp 207-228
- 6) Mills, C. F., Quarterman, J., Chesters, J. K., Williams, R. B., Dalgarno, A. C.: Am. J. Clin. Nutr. 22, 1240-1249 (1969)
- 7) Wallwork, J. C., Fosmire, G. J., Sandstead, H. H.: Br. J. Nutr. 45, 127-136 (1981)
- 8) Aiba, K., Kimura, M., Sakata, S., Matsuda, K., Kaneko, M., Onosaka, S., Yamaoka, Y., Tamaki N; J.Nutr.Sci.Vitaminol. 43, 327-343 (1997)
- 9) Shay, NF., Mangian, H. F.: J. Nutr. 130, 1493S-1499S (2000)
- 10) Wang, F., Chen, H., Steketee, J. D., Sharp, B. M.: Neuropsychopharmacology 32, 103-109 (2007)
- 11) Hemby, S. E., Tang, W., Muly, E. C., Kuchar, M. J., Howell, L., Mash, D. C.: J. Neurochem. 95, 1785-1793 (2005)
- 12) Haugbol, S. R., Ebert, B., Ulrichsen, J.: Alcohol Alcohol. 40, 89-95 (2005).
- 13) Sausbier, M., Hu, H., Arntz, C., Feil, S., Kamm, S., Adelsberger, H., Sausbier, U., Sailer, C. A., Feil, R., Hofmann, F., Korth, M., Shipston, M., J., Knaus, H.-G., Wolfer, D. P., Pedroarena, C. M., Storm, J., F., Ruth, P.: Proc. Nat. Acad. Sci. 101, 9474-9478 (2004)
- 14) Zhao, W. Q., Lu, B.: J. Neurochem. 100, 1211-23 (2007)
- 15) [http://61.194.2.85/srinfo/kensa\\_ref\\_CD/KENSA/SRL5842.htm](http://61.194.2.85/srinfo/kensa_ref_CD/KENSA/SRL5842.htm)
- 16) Hanstock CC, Coupland NJ, Allen PS.: Magn. Reson. Med. 48, 617-623 (2002)
- 17) 島本啓子, 茂里康: 日本薬理学雑誌 127, 279-287 (2006)
- 18) Kakee, A., Takanaga H., Terasaki, T., Naito, M., Tsuruo T., Sugiyama, Y.: J. Neurochem. 79, 110-118 (2001)
- 19) Hayakawa, K., Kimura, M., Kamata, K.: Eur. J. Pharmacol. 438, 107-113 (2002)
- 20) Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., Yokogoshi, H.: Biofactors 26, 201-208 (2006)

## 結論

“作用機序が明確ではない食品の有効性の評価”に関する調査・研究を次の方針で実施した。(1)“作用機序が明確ではない食品”を“作用機序が明確な食品ないしはそれに準ずる食品”へとレベルアップさせることの重要性やそのための要件・方法を検討し、(2)脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されているが、作用機序が明確ではない食品素材をデータベース等で探索し、(3)これに該当する亜鉛およびGABAを対象に関する実験研究を行った。亜鉛については、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現応答の評価マーカーとなり得る可能性をもとに、さらにリアルタイムRT-PCR→免疫組織化学による検討を行い、このアプローチが“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップ実験作業において有用である可能性を示した。また、GABAについては、DNAマイクロアレイを用いる位分子発現応答の網羅的解析により、間接的か直接的かの問題は措いて、脳が食事性GABAの標的となり得る可能性を示し得た。すなわち、“作用機序が明確ではない食品”を“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へとレベルアップさせる取り組み方の1つを提示し得た。

以上、冒頭に示した(1)、(2)、(3)の当初の目的が概ね達成され、“作用機序が明確ではない食品の有効性の評価”に関する新たな進展に寄与する成果が得られたと結論される。

健康危険情報  
なし

## 研究発表

1. 論文発表  
特記事項なし。

## 2. 学会発表

1) 佐野 涼子, 相原 直美, 竹内 宏美, 戸澤 佳恵, 道川 優子, 志村 二三夫: 亜鉛欠乏ラットにおける亜鉛投与への応答—視床下部近傍における遺伝子発現, 第60回日本栄養・食糧学会大会, 平成18年5月(静岡)。

2) 亜鉛欠乏ラットにおける亜鉛投与への応答: ニュートリゲノミクスによる検討: 竹内 宏美, 戸澤 佳恵, 相原 直美, 佐野 涼子, 道川 優子, 志村 二三夫, 第53回日本栄養改善学会学術総会, 平成18年1

0月, 茨城.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)

1. 特許取得

なし  
2. 実用新案登録  
なし  
その他  
なし

図1 亜鉛欠乏ラットにおける  
亜鉛腹腔内投与への応答

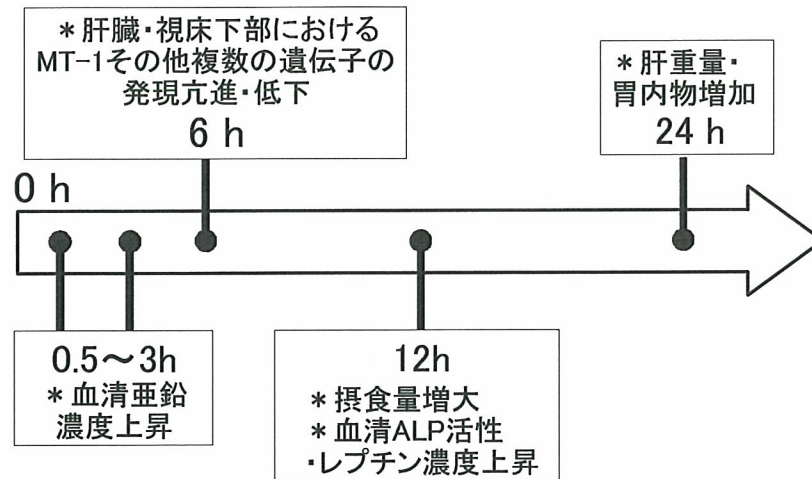


図2 亜鉛欠乏ラットへの亜鉛投与後の  
MT1遺伝子発現応答の経事変化

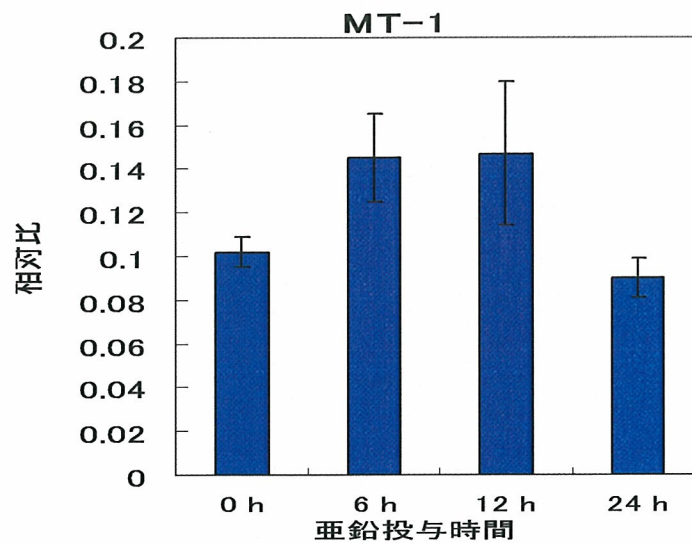
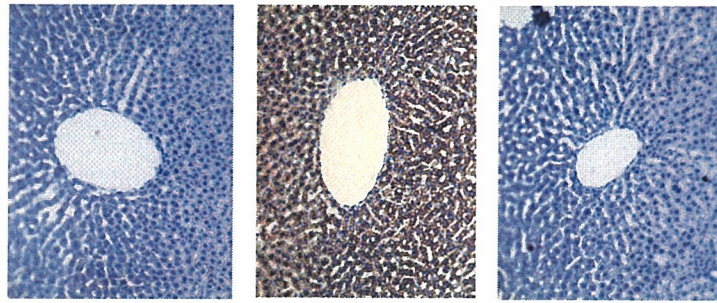
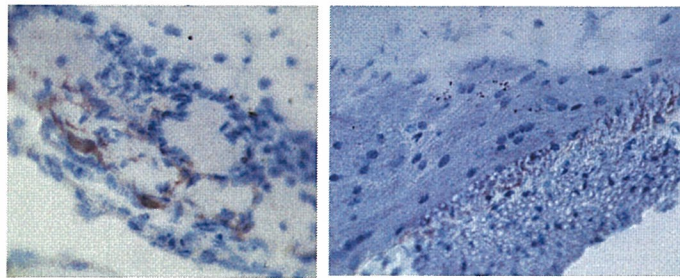


図3 亜鉛欠乏ラットへの亜鉛投与後の  
MT1の発現応答—免疫組織化学的検索(肝臓)—



IPZn(0h)-w/α-MT      IPZn(6h)-w/α-MT      IPZn(6h)-w/α-MT

図4 亜鉛欠乏ラットへの亜鉛投与後の  
MT1の発現応答—免疫組織化学的検索(脳)—



IPZn(3h)-嗅球

IPZn(3h)-視床下部近傍

図5 DNAマイクロアレイ画像  
(小脳: 5 mg/kg BW GABA)

