

2006360/8A

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

特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究

(H17-食品-004)

平成18年度 総括・分担研究報告書

**差替版**

主任研究者 山田 和彦

平成19（2007）年 3月

## 目次

### 総括研究報告

#### 特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究

山田和彦 .....p3~9

### 分担研究報告

#### 1. 自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討

山田和彦 .....p10~33

#### 2. 遺伝子レベルの網羅的解析による評価基準の検討

阿部啓子 .....p34~44

#### 3. 健康食品成分体内動態解析による有効性評価基準の検討

梅垣敬三 .....p45~55

#### 4. 植物成分を中心とした多成分解析による有効性基準の検討

穉山 浩 .....p56~69

#### 5. 複数の機能性食品成分が混在する食品モデルによる検討

合田敏尚 .....p70~81

### 資 料

研究成果の刊行物 .....p82~138

特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究

主任研究者 山田和彦 独立行政法人国立健康・栄養研究所 プログラムリーダー

研究要旨

食品機能の表示の科学的根拠が現行の審査基準を完全には満たしていないものであっても、一定の科学的根拠が存在すれば、効果の根拠が確立されていない旨の表示を付けることを条件として、「身体の構造/機能表示」を広く許可するべきであるとの提言がなされ、特定保健用食品の枠組みが拡充されてきた。しかし、実際に効果があることが科学的に確認される食品について、食品中の複数成分の作用によると推定されるものの、必ずしも作用機序が明確化されないものもある。食品の表示許可及び審査のために、このような分野の研究が必要とされている。平成 18 年度においては、以下のような成果を得た。①作用機序の明確化には到達していない食品素材をインターネット上のデータベース等を利用して、複数素材について標的作用部位の特定や評価マーカーの特定に結びつく可能性の高い、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現応答の網羅的解析法を活用して検討した。セイヨウカノコソウおよびルテインを対象とした DNA マイクロアレイによる遺伝子発現応答の網羅的解析法は、“身体の状態が自覚でき、一時的であって継続的・慢性的ではない生体調節作用あるいは体調変化等”との関わり合いが深い脳や眼球における食品素材の作用を評価する上で有用であると結論された。②大豆タンパク質を摂取すると、血中の中性脂肪 (TG)・コレステロール (CT) 濃度が低下する効果があることから、短期及び長期摂食後の遺伝子発現解析を行った。その結果、肝臓中の TG 合成系遺伝子発現が down-regulation した。一方、CT については、短期では合成・異化系両酵素遺伝子群が up-regulation し、長期になると合成系のみが up-regulation した。③医薬品との併用による相互作用が危惧されることから、その肝臓薬物代謝酵素の誘導作用を動物実験において検討し、多成分から構成されるハーブでは、少なくとも安全性に影響を与える可能性がある成分はその詳細な含有量、体内動態を示す必要性が示唆された。④食品機能成分中の高分子物質のような消化管から吸収困難な健康食品の有効性機序の解明を試み、機能成分の例としてコンドロイチン硫酸 (CS) の抗アレルギー作用の検討を行った。臨床試験において有効性の効果は評価可能であるが、有効性の腸管免疫系に関与するメカニズム解析はマーカー測定のための検体試料が血清・尿等に限られるので、困難であることが示唆される。⑤保健の用途ごとに中間評価指標として利用できる標的バイオマーカーの探索と考案を行うことを目的とし保健の用途を表示するために必要な標準的な中間バイオマーカーの選別は、疾患モデル動物における発症過程での代謝変化の解析により効率的に行うことができ、その中間バイオマーカーの妥当性は、モデル食品成分を用いた動物試験と健診受診者における血液指標の測定の結果を比較・総合して評価できるものと考えられた。

## 分担研究者

- 阿部啓子 (東京大学大学院農学生命科学研究科 教授)
- 梅垣敬三 (独立行政法人国立健康・栄養研究所 室長)
- 穂山 浩 (国立医薬品食品衛生研究所食品部第三室 室長)
- 合田敏尚 (静岡県立大学・食品栄養科学部 助教授)

## 協力研究者

- 志村二三夫 (十文字学園女子大学 教授)
- 廣田晃一 (独立行政法人国立健康・栄養研究所 室長)
- 瀧本秀美 (独立行政法人国立健康・栄養研究所)
- 井上 誠 (愛知学院大学薬学部医)
- 瀧 優子 (独立行政法人国立健康・栄養研究所)
- 酒井信夫 (国立医薬品食品衛生研究所)
- 近藤一成 (国立医薬品食品衛生研究所)
- 米谷民雄 (国立医薬品食品衛生研究所)
- 菱田敦之 ((独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター)
- 木内文之 ((独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター)
- 靛島淳子 (財団法人残留農薬研究所神経毒性研究室)
- 首藤康文 (財団法人残留農薬研究所神経毒性研究室)
- 望月和樹 (静岡県立大学食品栄養科学部)

## A.目的

平成 16 年 6 月 9 日にとりまとめられた「健康食品に係る今後の制度のあり方について(提言)」では「食品は食品そのもの又は複数の成分が効果に関係していると考えられ、関与成分の特定が困難な食品が多数あると考えられている。

こうした食品の特性を踏まえ、その有効性の評価方法等の研究を進めるべきである」と結ばれており、実際には効果があるものの作用機序や関与成分が特定できないものを科学的に評価できる研究の推進が求められている。食品の持つ健康への効果や効能は長期間の摂取が必要であったり、一つの成分だけでなく、複数の成分が関与し、それらの相互作用が必要なことも推察される。このため現行の審査方法を改良した新たな有効性評価基準について研究を行い、行政上の施策に貢献することを目的とした。

## B.研究方法

具体的な調査試験研究は各分担研究者が以下の事を行った。山田(分担研究者)は、自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討。阿部(分担研究者)は、遺伝子レベルの網羅的解析による評価基準の検討。梅垣(分担研究者)は、健康食品成分体内動態解析による有効性評価基準の検討。穂山(分担研究者)は、植物成分を中心とした多成分解析による有効性基準の検討。合田(分担研究者)は、複数の機能性食品成分が混在する食品モデルによる検討。等を中心に遂行した。文献調査、現状把握、国内外の医薬品ならびに食品の生態影響評価の現状調査を中心にして基礎的調査及び試験研究を行い、各自の結果から審査方法を改良した新たな有効性評価基準作成に資料を取得した。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するに当たり、対象者の臨床データの収集と採血に当たっては担当医師及び研究協力医師等から、この研究の不利益、危険性の排除に関する考慮、必要性和有用性を、対象者に充分説明して同意を得た場合に限り研究を実施した。その後のデータはすべて連結不可能な ID 化を行い、匿名化した。遺伝子解析に当たってはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研

究に関する倫理指針を遵守し、当該施設における倫理委員会での審査を受けた。動物実験を行う場合には、実験動物に関する動物愛護の配慮を行い、あわせて倫理委員会への審査を行った。

### C.研究結果

“特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究”の一環として、“自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討”に関する調査・研究を進めた。人対象試験で有効性がある程度実証されているが、作用機序の明確化には到達していない食品素材をインターネット上のデータベース等を利用して探索し、複数素材について標的作用部位（直接的・間接的を問わず）の特定や評価マーカーの特定に結びつく可能性の高い、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現応答の網羅的解析法を活用して検討した。すなわち、多成分系素材として鎮静・催眠効果が示唆されているセイヨウカノコソウ、また単品素材として視覚機能への有効性が示唆されているルテインを対象に、これらを反復投与したラットの脳（セイヨウカノコソウ）、眼球（ルテイン）、肝臓を対象部位として検討した。セイヨウカノコソウに関しては、肝臓の薬物代謝系酵素の遺伝子発現を強く誘導するカバヤセイヨウオトギリソウとは異なり、ヒト常用量の100倍の用量においてもこのような作用は認められず、脂溶性生体異物の処理器官である肝臓への有害作用は、比較的小さいと推定された。一方、脳の海馬では、セイヨウカノコソウ投与により発現量比が増大した遺伝子のトップ15は、鎮静・催眠薬ジアゼパム投与によっても発現量比が増大しており、セイヨウカノコソウが海馬を標的作用部位とし、ジアゼパムと類似的作用機序を示す可能性が推定された。ルテインに関しては、その投与にともない発現応答の亢進あるいは低下を示す遺伝子が眼球において確認された。しかも、眼球における発現応答の変化は肝臓に比べてよ

り顕著であった。ルテインは肝臓よりも眼球に対する親和性がより高く、同部位を標的作用部位とする可能性が示唆された。一方、食品摂取の影響を皮膚の表面温度分布並びに深い部分でのスペクトル変化を測定すると同時に身体計測、血液等の指標の測定を行い、食品が抹消循環や冷え性等に及ぼす影響の評価法としての妥当性を検証した。大学生37名に、冷え性の自覚、及び生活習慣に関するアンケート調査を行なうとともに、身長・体重・腋下温の測定・DEXA法を用いた全身骨密度と体脂肪率の測定を行なった。冷え性に効果があることが期待される有効成分を含む飲料（A飲料）またはプラセボ（P飲料）を摂取して、30分後及び10時間後に15℃の冷水に両手を1分浸す冷水負荷を行い、その直後から5分おきに30分間サーモグラフィで両手背の表面温度を測定した。超音波による上腕動脈の血流速度・血管径の測定も行なった。また血漿中ヒスタミン、プロスタグランジンE2、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、血清総コレステロール、及び中性脂肪を測定した。その結果、複数の成分が作用する生薬に見られる血行改善を良くするような食品について身体状態測定、別の血中マーカー測定等と比較検証して、有効性評価法としての精度を向上させうることが推察された。

大豆タンパク質の生理・生化学的効果の検証を遺伝子発現から解明する研究を行った。①大豆タンパク質（SPI）を長期（8週間）摂取させると血中TG濃度およびコレステロール濃度が低下する。この理由をラット肝臓中の遺伝子発現変動から解析した（DNAマイクロアレイ）。②肝臓中TG合成系遺伝子がdown-regulationされることが明らかになり、このことは血中TG濃度低下を説明し得た。一方、肝臓中コレステロールについては合成系遺伝子がup-regulationされており、血中コレステロール濃度の低下とは矛盾した。この矛盾は長期摂

取が原因と推定した。③ 次にこの仮説を検証するために、本研究では、(1) SPI 摂取期間 (短期) の違いが生理的に影響を及ぼしていないか、

(2) SPI 摂取開始時期の違い (5 週齢と 12 週齢) が生理的に影響を及ぼしていないかについて解析した。④ その結果、短期摂取ではいずれも *de novo* 合成系・異化系の両方の律速酵素の発現が変動していた。⑤ すなわち、TG については短期、長期とも合成系が *down-regulation* されていたが、コレステロールに関しては短期でコレステロール合成 (HMG-CoA)、異化 (CYP7A1) 遺伝子が *up-regulation* されており、肝臓中のコレステロール濃度は低下することが示唆された。

新しい特定保健用食品の規格基準を作成する上での方向性を示唆するデータを得るため、科学的根拠が蓄積しており多成分から構成されるイチョウ葉エキスについてその有効性・安全性の評価にかかる検討を行った。イチョウ葉エキスでは医薬品との併用による相互作用が危惧されることから、その肝臓薬物代謝酵素の誘導作用を動物実験において詳細に検討し、1) 誘導作用はテルペノイドの中のピロバライドで最も強く、その他のテルペノイドやフラボノイド類では弱いこと、2) イチョウ葉エキス投与によるテルペノイドの血液中濃度は投与 2 時間後で検出でき、24 時間後にはほとんど代謝されてしまうことを明らかにした。文献検索を行ったところ、健常者がイチョウ葉エキスを 240mg/日以下で摂取した範囲では種々の医薬品との相互作用の報告はなかった。以上のモデル実験から、多成分から構成されるハーブでは、少なくとも安全性に影響を与える可能性がある成分は、その詳細な含有量、体内動態を示す必要性が示唆された。新規の有効性・安全性評価の手法として、生体内モノアミンの測定による抗うつ作用が期待できる多成分の評価法、 $\beta$ -クリプトキサンチンやアスタキサンチンをモデルとして核

内レセプターの調節に着目した成分の評価法についての検討も行った。

食品機能成分中で高分子物質のような消化管から吸収困難な健康食品の有効性の機序を解明することを試みた。今年度は機能成分の例としてコンドロイチン硫酸(CS)の抗アレルギー作用の検討を行った。血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体価の測定では、2%CS 任意摂取群においては、コントロール群と比較して OVA 特異的 IgE 及び IgG1 抗体価の有意な抑制が認められた。OVA 感作マウスに抗原過剰投与によるアナフィラキシー反応を惹起させ、肥満細胞から血清中に遊離されたヒスタミン量を定量したところ、CS 投与群は、コントロール群と比較して、血清中ヒスタミンの遊離を有意に抑制した。抗原誘発耳介浮腫に及ぼす影響では、CS 経口投与群では 1.5~2 倍と、肥厚が有意に抑制された。腸管免疫細胞組成に及ぼす影響では、抗アレルギー活性が示されたマウスの免疫担当細胞のうち、粘膜免疫系に高頻度に存在する IEL を単離し、抗アレルギー活性に関与する細胞表面抗原組成を FCM で解析した。2%CS 任意摂取群の IEL は、コントロール群と比較して、TCRab 陽性細胞、CD4 陽性細胞組成比の有意な増加が観察された。脾細胞に及ぼす影響では、2%CS 任意摂取マウスの脾細胞は、コントロール群の脾細胞と比較して、成熟 T 細胞の指標である CD3e(145-2C11) 陽性細胞組成比の増加、B 細胞の指標である CD45R/B220 (RA3-6B2) 陽性細胞組成比の減少が認められた。また、T 細胞のサブセット解析においては CD4(L3T4, H129, 19) 陽性細胞、CD8a(Ly-2, 53-6, 7) 陽性細胞及び CD25 陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。また、CS の経口投与によるサイトカイン産生能へ及ぼす影響の解析では、コントロール群と比較して、2%CS 任意摂取マウスの培養脾細胞は Th1 型サイトカインである IFN-g 及び IL-2 の

産生には変化が認められなかったものの、Th2型サイトカインであるIL-5、IL-10及びIL-13産生を有意に抑制することが明らかとなった。また、FCMで有意な増加が認められた抑制性T細胞から産生されると考えられるTGF- $\beta$ は、コントロール群と比較して有意な増加が認められた。また生薬・薬用植物についてバイオマーカーを指標とした科学的評価法の開発と安全性の検証を行うために、本年度はウコンのラットに対する急性経口毒性試験を行い、その安全性を検証するとともに、血液(血漿)試料中のバイオマーカーを検索するための試料調製法およびESI-MS/MS分析の測定条件を検討した。ESI-MS/MSを用いたタンパク質の同定法では、アルブミンを除去することで、数種のタンパク質が同定できたが、適当なバイオマーカーの検索には、イオン交換クロマト等による前分画と、LC-MS/MS分析が必要であると考えられた。

保健の用途ごとに中間評価指標として利用できる標的バイオマーカーの探索と考案を行うにあたり、メタボリック症候群の発症リスク低減を目的とした食品選択の有効性を評価するための概念基盤を整理し、鍵となる代謝変化として血糖と内臓脂肪蓄積を取り上げて検討した。血糖と内臓脂肪蓄積のそれぞれについて、短期的かつ初期的な変化をモニターできる血液指標を、肥満/糖尿病発症モデルラットを用いて血球遺伝子のマイクロアレイ解析および血漿生理活性成分の分析により検索し、いくつかの候補を選択した。健診受診者の血液を用いて、候補バイオマーカーを測定したところ、血中アディポネクチン濃度はBMI、腹囲、血清中性脂肪濃度と有意な負の相関を示し、内臓脂肪の蓄積に由来する脂質代謝・エネルギー代謝の変化を鋭敏に捉える指標として有用なこと、IL-6濃度は空腹時血糖およびHbA1cと有意な正の相関を示し、糖代謝の異常を捉える指標として有用なことが明らかになった。

## D. 考察

セイヨウカノコソウおよびルテインを対象とした研究を通じ、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現応答の網羅的解析法は、“身体の状態が自覚でき、一時的であって継続的・慢性的ではない生体調節作用あるいは体調変化等”との関わり合いが深い脳や眼球における食品素材の作用を評価する上で有用であると考えられた。複数の成分が作用する生薬に見られる血行改善を良くするような食品について身体状態測定、別の血中マーカー測定等と比較検証して、有効性評価法としての精度を向上させることが推察された。

遺伝子発現変動から解析法(DNAマイクロアレイ)により、大豆を短期間摂取すると、肝臓中のコレステロール濃度は低下し、その結果、血中コレステロール濃度も低下する。しかし、その後ホメオスタシスが働き、コレステロール合成が生じ、長期間摂取では肝臓中でコレステロール合成が生じることが明らかになった。

多成分から構成される食品素材では、少なくとも重要な特定成分の同定とその体内動態を明確にし、その結果を踏まえた製品の規格基準作成が、特定保健用食品の新たな審査基準に必要と考えられた。また抗うつ作用を期待させる多成分系の健康食品素材の評価法として、生体内モノアミンの測定、 $\beta$ -クリプトキサンチンやアスタキサンチンをモデルとして核内レセプターの調節に着目した成分の評価法による新規の有効性・安全性評価の手法を検討が必要であると考えられる。

臨床試験において有効性の効果は評価可能であるが、有効性の腸管免疫系に関与するメカニズム解析はマーカー測定のための検体試料が血清・尿等に限られるので、困難であることが示唆される。そのため有効性のメカニズム解析は、今回の検討したように小動物を用いたin vivo試験による詳細な解析、培養細胞等のin vitro

試験、で補完する必要があると思われた。

メタボリック症候群に関連した保健の用途を表示するために必要な標準的な中間バイオマーカーの選別は、疾患モデル動物における発症過程での代謝変化の解析により効率的に行うことができ、その中間バイオマーカーの妥当性は、モデル食品成分を用いた動物試験と健診受診者における血液指標の測定の結果を比較・総合して評価できるものと考えられた。

#### E. 結論

得られた結果は、審査基準の見直しの際には有用な基礎資料として活用されると考える。実際に効果があることが科学的に確認される食品について、必ずしもその作用機序が明確化されなくても許可できる審査体制、審査基準の見直しと同時に、申請者側の負担、既許可品も含めた再評価や市販後調査の必要性等、健康増進へむけた食品制度の安全・信頼性向上にも貢献する。さらに、基礎的な研究を蓄積することが必要であると考えられた。

#### F. 健康危機情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

(論文発表)

- 1) 山田和彦：新しい保健機能食品制度，公衆衛生：70(5)：358-362，2006.
- 2) 濱口恵子，志村二三夫：サプリメントの研究デザイン．臨床病理レビュー 特集 第135号，29-37，2006
- 3) Kondo, H., Minegishi, Y., Komine, Y., Mori, T., Matsumoto, I., Abe, K., Tokimitsu, I., Hase, T., and Murase, T. Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J versus obesity-prone C57BL/6L mice. *Am. J. Physiol.*, 291, 1092-1099, 2006.
- 4) Narasaka, S., Endo, Y., Fu, Z. W., Moriyama, M., Arai, S., Abe, K., and Kato, H. Safety evaluation of hypoallergenic wheat flour using DNA microarray. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1464-1470, 2006.
- 5) Oike, H., Matsumoto, I., and Abe, K. Group IIA phospholipase A2 is co-expressed with SNAP-25 in mature taste receptor cells of rat circumvallate papillae. *J. Comp. Neurol.* 494, 876-886, 2006.
- 6) Sugiyama T, Nagata J, Yamagishi A, Endoh K, Saito M, Yamada K, Yamada S, Umegaki K. Selective protection of curcumin against carbon tetrachloride-induced inactivation of hepatic cytochrome P450 isozymes in rats. *Life Sci.* 78(19):2188-93, 2006.
- 7) Kusano, S., Igarashi, N., Sakai, S., Toida, T., "Effect of Orally Administered Chondrosine on Uptake of <sup>35</sup>S Sulfate into Mice Cartilage" *Journal of Pharmaceutical Society of JAPAN*, 126, 297-300, 2006
- 8) Sakai, S., Akiyama, H., Sato, Y., Yoshioka, Y., Linhardt, R. J., Goda, Y., Maitani, T., Toida, T., "Chondroitin Sulfate Intake Inhibits the IgE-mediated Allergic Response by Down-regulating Th2 Responses in Mice" *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 19872-19880, 2006
- 9) Toida, T., Sakai, S., Akiyama, H., Linhardt, R. J., "Immunological Activity of Chondroitin Sulfate" *Advances in*

Pharmacology, 53, Chapter 19, 403-415 , 2006

- 10) Goda, T., Kajiya, Y., Suruga, K., Tagami, H. and Livesey, G.: Availability, fermentability and energy value of resistant maltodextrin: modeling of short-term indirect calorimetry measurements in healthy adults. Am. J. Clin. Nutr., 83, 1321-1330, 2006
- 11) Fushimi, T., Suruga, K., Oshima, Y., Fukiharuru, M., Tsukamoto, Y. and Goda, T. : Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triglyceride in rats fed a cholesterol-rich diet. Br. J. Nutr., 95, 916-924, 2006
- 12) Mochizuki, K., Suruga, K., Fukami, H., Kiso, Y., Takase, S. and Goda, T. : Selectivity of fatty acid ligands for peroxisome proliferator-activated receptors, which correlates both with binding to cis-element and DNA binding-independent transactivity in Caco-2 cells. Life Sci., 80, 140-145, 2006

(学会発表)

- 1) 水落里奈, 森島絵美, 柳沢梢, 道川優子, 志村二三夫 : ハーブサプリメント (HS) の有用性評価法の検討ーセイヨウカノコソウを例に, 第 60 回日本栄養・食糧学会大会, 平成 18 年 5 月.
- 2) 今村文美, 鈴木真奈美, 萩野谷実香, 押田恭一, 山崎優子, 志村二三夫 : ラット眼球における遺伝子発現に対するルテイン投与の影響 : DNA マイクロアレイを用いる網羅的解析の試み, 第 54 回日本栄養改善学会学術総会, 平成 19 年 9 月.
- 3) 五十嵐尚子, 竹口敦子, 酒井信夫, 豊田英尚, 戸井田敏彦. “コンドロイチン硫酸 Th1

促進活性における分子量の影響” 日本薬学会第 126 年会, 仙台, 平成 18 年 3 月

- 4) 宮内理絵, 見崎泰美, 望月和樹, 市川陽子, 小川和子, 小林公子, 佐々木敏, 合田敏尚 : 事業所健康診断者におけるメタボリックシンドローム関連指標に及ぼす食事要因と遺伝素因の解析. 第 60 回日本栄養・食糧学会総会 (静岡), 講演要旨集, p.149, 平成 18 年.
- 5) 見崎泰美, 宮内理絵, 望月和樹, 合田敏尚 : メタボリックシンドロームの診断指標を用いた住民基本健康診査受診者の類型化とその食習慣の解析. 第 28 回日本臨床栄養学会総会 (東京), 講演要旨集, p.202, 平成 18 年.

#### H.知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

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

特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究  
— 自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討 —

分担研究者 山田和彦 (独)国立健康・栄養研究所 プログラムリーダー  
研究協力者 志村二三夫 十文字学園女子大学教授

研究要旨

“特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究”の一環として、身体の状態が自覚でき、一時的であって継続的・慢性的ではない生体調節作用あるいは体調変化等の科学的評価法の開発に向けて取り組んだ。とくに、現行の特定保健用食品の審査基準では、関与成分の作用機序が明確であることが重要とされているため、この観点からの検討を中心に調査研究を進めた。作用機序が明確であることは、特定保健用食品の審査において主に次の点で有用と考えられる：①有効性の科学的根拠へのサポートが得られること、②有害作用に関する情報が得られること、③医薬品・他の食品・添加物・環境汚染物質等との相互作用に関する情報が入手し得ること、④標的作用部位(直接的・間接的を問わず)や評価マーカーが特定され得ること。

これらの背景のもと、昨年度は、身体の状態が自覚でき、一時的であって継続的・慢性的でない生体調節作用あるいは体調変化等についての改善効果をねらった健康食品の実態を調査した上で、脳・神経系や視覚機能を標的とする食品素材の有効性の科学的根拠について調査検討を行った。本年度は、前年度の結果を踏まえ、人対象試験で有効性がある程度実証されているが、作用機序の明確化には至っていない食品素材をインターネット上のデータベース等を利用して探索し、標的作用部位(直接的・間接的を問わず)の特定や評価マーカーの特定に結びつく可能性の高い、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現応答の網羅的解析法を活用して検討した。すなわち、多成分系素材として鎮静・抗不安作用が示唆されているセイヨウカノコソウ(学名 *Valeriana officinalis*)、あるいは単品素材として視覚機能への有効性が示唆されているルテインを反復投与したラットにつて、脳(セイヨウカノコソウ)、眼球(ルテイン)、肝臓(セイヨウカノコソウ)を対象部位として検討した。

セイヨウカノコソウに関しては、肝臓の薬物代謝系酵素の遺伝子発現を強く誘導するカバ(*Piper methysticum*)やセイヨウオトギリソウ(*Hypericum perforatum*)とは異なり、ヒト常用量の100倍の用量においてもこのような作用は認められず、脂溶性生体異物の処理器官である肝臓への有害作用は、比較的小さいと推定された。一方、脳の海馬では、セイヨウカノコソウ投与により発現量比が増大した遺伝子のトップ15は、鎮静・催眠薬ジアゼパム投与によっても発現量比が増大しており、セイヨウカノコソウが海馬を標的作用部位とし、ジアゼパムと類似の作用機序を示す可能性が推定された。

ルテインに関しては、その投与にともない発現応答の亢進あるいは低下を示す遺伝子が、眼球において確認された。

セイヨウカノコソウおよびルテインを対象とした実験を通じ、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現応答の網羅的解析法は、“身体の状態が自覚でき、一時的であって継続的・慢性的ではない生体調節作用あるいは体調変化等”との関わり合いが深い脳や眼球における食品素材の作用を評価する上で有用であると結論された。

A. 研究目的

本分担研究課題の主目的は、“特定保健用

食品の新たな審査基準に関する研究”の一環と

して、“自覚可能な身体動態と有効性評価基準

の検討”に関する調査・研究を行うことにある。

現行の特定保健用食品の審査基準では、有効性の判定において、特定された関与成分について、その作用機序が明確であることが求められている。作用機序が明確になることで、特定保健用食品の評価において主に次のような利点があると考えられる：①有効性の科学的根拠へのサポートが得られること、②有害作用に関する情報が提供され得ること、③医薬品・他の食品・添加物・環境汚染物質等との相互作用に関する情報が入手し得ること、④標的作用部位(直接的・間接的を問わず)や評価マーカ―が特定され得ること。

一方、食品の保健用途における効果には、単一の関与成分が特定できる場合よりも、食品そのものや複数の成分が関わる場合が多いと考えられ、また関与成分の特定が困難な食品も多数あると考えられる。したがって、特定保健用食品の新たな審査基準の設定にあたっては、食品の特性を踏まえた有効性の評価方法等の研究を推進する必要がある。すなわち、平成16年6月にとりまとめられた「健康食品に係る今後の制度のあり方について(提言)」<sup>1)</sup>が示しているように、健康の維持増進における効果がある程度実証されてはいるが、作用機序や関与成分が特定できないものを科学的に評価するための研究を進める必要がある。

本分担研究課題は、これらの背景のもとに、現行の特定保健用食品の有効性判定基準(関与成分の同定、その作用機序の明確化)では補完できない、身体の状態が自覚でき、一時的であって継続的・慢性的でない体調変化等の科学的評価法の開発にむけての研究・調査をおこなうものである。昨年度は、そのための基礎的調査として、(1)自覚可能な身体状況やこれに関わり深い疾病の改善効果を志向する健康食品の現状を把握し、(2)そうした特性をもつ食品の有効性や安全性の科学的根拠について調査し、(3)

さらに自覚可能な身体状況の改善に関する有効性評価のための方法やバイオマーカ―に関する調査をおこなった<sup>2)</sup>。

その結果、(1)健康食品の解説や通信販売のサイトを中心に、インターネットを広く検索することで、自覚可能な身体状況やこれに関わり深い疾病の改善効果を示唆ないし標榜している健康食品が多数流通している実態が明らかとなった。(2)また、上記用途に関わり深い身体状況や疾病について、Natural Medicines Comprehensive Database(NMCD)<sup>3)</sup>を中心に検索し、該当する食品素材に対する有効性・安全性の評定を整理したところ、脳・神経系の健康や精神保健の用途を志向する素材、眼の健康や視覚機能の維持増進を志向する食品の中には、信頼のおける人対象試験において有効性が示唆されているものが認められた。(3)さらに、PASSCLAIM(Process for the Assessment of Scientific Support for the Claims on Foods)報告書<sup>4)</sup>等に当たり、脳・神経系の健康や精神保健の用途を志向する素材や、眼の健康や視覚機能の維持増進を志向する食品の有効性評価に適用可能とされる方法やバイオマーカ―についてまとめたところ、有用と推定される方法やバイオマーカ―が多数あることが判明した。さらに、DNAマイクロアレイを用いる遺伝子発現プロファイルの解析は、“自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討”においても有用なツールとなる可能性を示す先行研究が報告されている<sup>5-7)</sup>。

本年度は、これらの結果を受けて、身体の状態が自覚でき、一時的であって継続的・慢性的ではない生体調節作用あるいは体調変化等をもたらすと推定される素材を対象に、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現応答の網羅的解析法を活用して、検討した。すなわち、多成分系素材として催眠・鎮静効果が示唆されているセイヨウカノコソウ、また単品素材として視覚機能への有効

性が示唆されているルテインを対象に、これらを反復投与したラットの脳(セイヨウカノコソウ)および眼球(ルテイン)を対象部位として検討した。また、セイヨウカノコソウについては、有害作用との関連から、脂溶性生体遺物の処理器官である肝臓における遺伝子発現応答への影響についても検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. セイヨウカノコソウ投与に対するラット肝臓および脳の遺伝子発現応答

催眠作用や抗不安作用やが人対象試験において示唆されているセイヨウカノコソウ(学名 *Valeriana officinalis*)抽出物を評価対象とし、ラットを用いて、脳局所すなわち視床下部および海馬における遺伝子発現へのその影響を検討した。実験に供したセイヨウカノコソウ抽出物は、ヨーロッパ薬局方に適合した製品(VARELIAN DRY EXTRACT Ph. Fr. X PWD: BATCH N. 05925/N1)をインデナジャパン社より購入した。

実験動物はSD系雄ラット(体重約200g)とし、純水に懸濁させたセイヨウカノコソウ抽出物を1,500 mg/kg BWの用量で、フィーディングチューブを用いて8日間連日、ラット胃内に投与した(VAL群)。その対照群には純水のみを投与した(CONT A群)。また、ベンゾジアゼピン系催眠・抗不安薬ジアゼパム(2 mg/kg BW, 和光純薬)を8日間連日腹腔内投与した群(DAZ)も設定し、その影響を調べた。この場合の対照群(CONT B)には 溶媒(エタノール, プロピレングリコール, 生理食塩水混合液(1:4:15))を腹腔内投与した。

一方、ラット肝臓において複数のチトクロムP450(CYP)分子種を誘導することを既に確認しているカバ抽出物の製品(Kava GOLD)を1,800 mg/kg の用量で投与した群(KVG群), 同様にセイヨウオトギリソウ規格抽出物の製品(Kira)を

1,500 mg/kg の用量で投与した群(SJW群)を設定し、肝臓における遺伝子発現応答へのこれらハーブ投与の影響についても調べた。

飼料(AIN-93M)および紫外線照射水は自由に摂取させた。

飼育終了時に放血死させたラットを解剖し、脳局所(視床下部および海馬)、肝臓を摘出して、RNAlater RNA Stabilization Reagent(キアゲン)中に取り、用時まで凍結保存させた。組織からのトータルRNAの抽出の際は、Mixer Mill MM 300(キアゲン)を用いてホモジナイズした後、自動核酸抽出システム(QuickGene-800, 富士フィルム)を用い、マニュアルに従って実施した。

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 Malti Guage Ver 3.0 および Array Guage Ver 2.0を用いた。

肝臓における遺伝子発現応答については、上記DNAマイクロアレイ法による網羅的解析のほか、いくつかのCYP分子種について表1に示すプライマーを用いるリアルタイムRT-PCR法によって検討した。測定用キットは、SYBR Greenベースのインターカ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)を用いた。反応液量は15 μℓとし、プライマーは100 nM, 試料RNAは5 ng/μℓの濃度、その他は試薬キットのマニュアルに従い、リアルタイムPCR装置(Mx3000P:ストラタジーン

ン)を用いて測定を行った。反応温度と時間は次のように設定した: 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)。標的遺伝子およびサイクロフィリン(ハウスキーピング遺伝子マーカー)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, ハーブ抽出物の影響を評価した。

## 2. ルテイン投与に対するラット肝臓および眼球の遺伝子発現応答

実験に用いた FloraGLO®ルテインはマリーゴールドの花から抽出・精製・結晶化したもので, そのコーン油懸濁品(20%)を, ケミン・ジャパン株式会社の押田恭一博士のご好意により供与して頂いた。

実験動物は SD 系雄ラット(体重約 200g)とし, 上記ルテインをコーン油に懸濁させて 1 mg/kg BW, 10 mg/kg BW, 100 mg/kg BW の用量で, フィーディングチューブを用いて 8 日間連日, ラット胃内に投与した。対照群にはコーン油を投与した。飼料(AIN-93M)および紫外線照射水は自由に摂取させた。

飼育終了時に放血死させたラットを解剖し, 摘出した肝臓, および切開して硝子体を除去した眼球を RNeasy RNA Stabilization Reagent(キアゲン)中に取り, 用時まで凍結保存させた。

トータル 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, 上記(1)のセイヨウカノコソウの実験の場合と同様に実施した。

## C. 研究結果

### 1. セイヨウカノコソウ投与に対するラット肝臓および脳の遺伝子発現応答

#### (1) 実験研究の必要性

本分担研究課題の主目的は, “特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究”の一環と

して, “自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討”に関する調査・研究を行うことにある。

セイヨウカノコソウは, ダイエタリーサプリメント素材等の有用性に関する最高水準のデータベースである NMCD<sup>2)</sup>において, 安全性が Possibly Safe, 催眠作用に関する有効性が Possibly Effective と評定され, 安全性および有効性がある程度実証されている。しかし, 催眠作用の機序はもとより, 肝臓の薬物代謝系への影響もほとんど不明である。したがって, 作用機序の解明は措くにしても, その標的作用部位やバイオマーカーとなり得る機能素子の特定, また肝臓に対する有害作用に関する検討・評価の必要性は大きい。

そこで, この実験研究では, セイヨウカノコソウ投与ラットの脳局所(視床下部および海馬), あるいは肝臓における遺伝子発現への影響を 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検証することを通して, 自覚可能な身体状況の改善に関する有効性評価のための方法, また標的作用部位やバイオマーカーの確立における, 同アプローチの有用性を評価することをめざした。

#### (2) 実験研究の結果

まず, 肝臓における遺伝子発現に対するセイヨウカノコソウ投与の影響を DNA マイクロアレイ法を用いて検討し, カバ, セイヨウトギリソウの影響と比較した。

表1は, これらのハーブの投与により, 肝臓における発現亢進が見られた遺伝子のうち, 上位 10 番までを示している。カバではこれら 10 個の遺伝子すべての発現が 2 倍以上の亢進を示しており, セイヨウトギリソウでは 10 個中 6 個であったが, セイヨウカノコソウでは 10 個中 1 個のみであった。また, カバでは 10 個の遺伝子のうちの 6 個は, CYP3A3 や CYP1A1 をはじめとする薬物代謝に関わる遺伝子であった。セイヨウトギリソウ

ウでは同様の遺伝子は3個あったが、セイヨウカノコソウでは1つも認められなかった。

また、表2は、これらのハーブの投与によって肝臓での発現が低下した遺伝子のうち、その割合が大きなもの上位10個を示している。カバでは10個すべて、セイヨウトギリソウでは5個の遺伝子の発現量が1/4以下に低下していたが、セイヨウカノコソウでは3個のみであった。

さらに、CYP分子種8つの遺伝子発現への影響をリアルタイムRT-PCRで検討した結果では、セイヨウトギリソウはCYP3Aの発現、また、カバではCYP1A, 2B, 3Aのいずれの発現に対しても強い促進作用を示す一方、セイヨウカノコソウについては有意な影響は認められなかった。肝臓重量に関しても、セイヨウトギリソウではやや増加、カバ群では著しい増加が認められたが、セイヨウカノコソウの有意な影響は認められなかった。

以上より、遺伝子発現への影響を評価マーカーとした場合に、セイヨウカノコソウは、ポジティブコントロールのカバやセイヨウトギリソウに比べ、肝臓に対する有害作用が小さい可能性が推定された。

そこで、標的作用部位やバイオマーカーの特定に向けて、脳局所における遺伝子発現に対するセイヨウカノコソウの影響を、鎮静・催眠薬ジアゼパムのそれと比較検討した。視床下部では、セイヨウカノコソウによって発現が増大した遺伝子上位15個すべてについて5倍以上の増大が認められた(表3)。これらのうち、ジアゼパムによっても発現量が増大したものがあり、2.5倍以上に増大したものは8個、2~2.5倍に増大したものは2個であったが、2倍未満のものも4個認められた。

海馬においては、セイヨウカノコソウによる変化は小さく、上位15番の遺伝子であっても1.6倍程度の増大であった(表4)。しかし、これらすべての遺伝子の発現はジアゼパムによって2倍

以上に増大していた。

そこで、セイヨウカノコソウによる発現量の増大とジアゼパムによる発現量の増大との相関を調べたところ、視床下部ではセイヨウカノコソウとジアゼパムとの間に有意な相関は認められなかった(図1)。しかし、海馬では両者の間に有意な相関が認められた(図1)。このことより、セイヨウカノコソウ投与およびジアゼパム投与ラットの海馬における遺伝子発現プロファイルには、ある程度の共通性のあることが示唆された。

## 2. ルテイン投与に対するラット眼球の遺伝子発現応答

### (1) 実験研究の必要性

ルテインはヒトでは生合成されないが、食品由来のルテインはゼアキサンチンとともに網膜の黄斑や水晶体に濃縮され、とくに黄斑ではその色調を決定しているキサントフィルとされている<sup>8)</sup>。黄斑色素の作用は、色覚のほか、有害な短波長光の捕捉に寄与し、その抗酸化能も相俟って、網膜や水晶体をストレスから保護する作用があると推定されている<sup>8, 9)</sup>。これに関連し、網膜変性疾患に対するルテインの有効性を示したコホート研究<sup>10)</sup>および無作為化比較試験<sup>11)</sup>の報告がある。

NMCDでは、ルテインは、安全性がLikely Safe、加齢黄斑変性および白内障に対する有効性がPossibly Effectiveと評定されており<sup>2)</sup>、安全性はもとより、有効性についてもある程度の実証がなされているとの評価が得られている。しかし、眼の健康の維持・増進や疾病リスク低減に関する作用機序をはじめ、網膜や水晶体が評定部位であるのか否か、またルテインの機能に関する眼のバイオマーカーとなり得る機能素子についてはほとんど不明である。したがって、作用機序の解明は措くにしても、その標的作用部位やバイオマーカーの特定に向けた検討・評価の必要性は大きい。

そこで、この実験研究では、ルテイン投与ラットの眼球における遺伝子発現への影響を 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検証することを通して、自覚可能な身体状況の改善に関する有効性評価のための方法、また標的作用部位やバイオマーカーの確立における、同アプローチの有用性を評価することをめざした。

## (2) 実験研究の結果

1mg/kgルテイン投与ラットの眼球より抽出したトータル RNA を2つのプールサンプルに分けて、それぞれの試料についてDNAマイクロアレイを行い、いずれの解析においてもコントロールラットに対して、2倍以上の発現亢進を示した遺伝子は 140 個検出された。表5はそのうちのトップ 20 を示している。Keratin complex 1 [NM\_001008761], Aquaporin 5 [NM\_012779], Desmoplakin [XM\_001058477]等の遺伝子発現がルテイン投与にともない高度に亢進している可能性を示唆する結果が得られている。

一方、ルテイン投与にともない、発現量が 1/2 以下に低下した遺伝子は112個が検出された。表6はそのうちのトップ 20 を示している。Tetraspanin 8 [NM\_133526] , NADH dehydrogenase 1 [NM\_001009290] および [NM\_001037338], Crystallin [XM\_340846]等の遺伝子発現がルテイン投与にともない抑制される可能性を示唆する結果が得られている。

表7は、ルテイン投与の全群において、発現量の 1/2 以下の低下または2倍以上の亢進が観察された遺伝子を示す。3群共通に発現の亢進が観察された遺伝子は6つがあり、共通に発現の低下が観察されたものとしては、Neprilysin-like peptidase gamma, partial [TC518066]が認められた。

そこで次に、これらのうちいくつかについて、リアルタイムRT-PCRによる検討を行ってみた。そ

の結果、DNA  $\mu$ アレイによって、ルテイン投与にともなう発現の亢進が示唆された Keratin Complex1 および Aquaporin5 の発現に関しては、ルテイン投与による増加傾向が認められた(図2)。両者とも、10mg/kgルテイン投与ラットでは、統計的な有意差は認められなかったが、亢進傾向にあり、とくに1mg/kgルテイン群および100 mg/kgルテイン群では、有意な発現の亢進が認められた。また、DNAマイクロアレイで 1/2 以下に発現が観察された Neprilysin-like peptidase gamma に関しては、ルテイン投与の全群において、対照群に比べて有意 ( $P < 0.05$ ) な発現の低下が認められ、用量反応相関が示された。

## 3. 考察

本研究課題は、“特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究”の一環として、現行の特定保健用食品の有効性判定基準(関与成分の同定、その作用機序の明確化)では補完できない、身体の状態が自覚でき、一時的であって継続的・慢性的でない体調変化等の科学的評価法の開発にむけての研究・調査をおこなうものである。

研究計画の初年度に当たる昨年度は、そのための基礎的調査として、(1)自覚可能な身体状況やこれに関わり深い疾病の改善効果を志向する健康食品の現状を把握し、(2)そうした特性をもつ食品の有効性や安全性の科学的根拠について調査し、(3)さらに自覚可能な身体状況の改善に関する有効性評価のための方法やバイオマーカーに関する調査をおこなった<sup>3)</sup>。

その結果、健康食品が志向している自覚可能な身体状況やこれに関わり深い疾病の改善効果は、多岐にわたる現状が明らかとなった。ことに、虚弱体質改善、産後・病後の体力回復、疲労回復、美容にいい、眼にいい、冷え性や生理痛にいい、ストレスや不眠症にいいとされたり、強壮効果や性機能増強作用(精力増強)を示唆

ないし標榜するものや、エチケット食品、ビューティーサポート食品等と称するもの、また、脳・神経系の健康や精神保健の用途を志向するものも多数見受けられた。しかし、これらに関連した保健用途の表示許可を得た特定保健用食品は現時点では1つもない。

そこで、自覚可能な身体状況やこれに関わり深い疾病の改善効果を志向する食品の有効性や安全性の科学的根拠について調査した結果、NMCD が安全性および有効性の両面で一応ポジティブに評価している素材は必ずしも少なくはなかった。ことに、脳・神経系の健康や精神保健の用途、また眼の健康・視覚機能の改善のための用途に関するものが多かった。すなわち、これらの用途における有効性を科学的根拠に基づいて評価する方法が実際に存在するものと考えられた。

事実、PASSCLAIM の報告書には、科学的方法およびプロトコールに基づいて、精神状態や目的遂行能力に対する食品の有効性を評価する方法が現実に存在し、またこうした方法を用いることで、特定の精神機能の強化に関する表示を実証化および正当化できる可能性がある旨が述べられている<sup>4)</sup>。さらに、眼の健康・視覚機能の改善のための用途における有効性を評価するための方法も種々存在することを文献調査等によって知り得た<sup>3)</sup>。

しかし、現行の特定保健用食品の有効性の判定においては、関与成分の同定や、その作用機序の明確化が求められている。したがって、仮に上記のような方法を駆使して、人対象試験において有効性が確認された素材であっても、関与成分が未同定であったり、その作用機序が不明確ならば、特定保健用食品への昇格の道は閉ざされたままとなる。

現在、健康食品の開発方法は、大きく2つのタイプに分けられると考えられる。1つは、シーズ探索を入念に行ったうえで、医薬品等の標的機能素

子、例えば $\alpha$ -グルコシダーゼやアンギオテンシン変換酵素の阻害活性をマーカーに素材をスクリーニングし、動物試験、さらには人試験へと進めるやり方である。こちらは、作用機序は明確であり、また関与成分の同定も比較的容易に行えるので、特定保健用食品への道筋が割合につき易い。

一方、伝承・伝統・直感に基づいて開発されている健康食品もあり、これらの中には人試験において有効性がある程度実証されているものも少なくない。しかし、そのほとんどは作用機序が不明であり、ことにハーブ素材では関与成分が同定されているものは皆無といってよい。他成分系からなるハーブ素材では、関与成分が単一物質とは限らず、複数成分の相互作用によって効果が発現されている可能性も大きい<sup>1)</sup>。こうした素材に関しては、ピンポイント的な作用機序・関与成分の探求は困難を極めると考えられる。特定保健用食品への道筋をつけるには、何らかの網羅的な解析が不可欠である。

このことに関連し、トランスクリプトミクスの考え方に基づく遺伝子発現の網羅的解析は、DNAチップ技術の発展と相俟って、食品の機能性・安全性評価に大きな威力を発揮しており、ハーブサプリメントへの応用も行われている。

例えば、セイヨウオトギリソウを8週間投与したラットの視床下部における遺伝子発現をDNAチップを用いて調べた報告がある<sup>5)</sup>。これによると、セイヨウオトギリソウ投与は66種の遺伝子ないしExpressed Sequence Tag(発現断片配列)の発現に、また三環系抗うつ薬(イミプラミン)の投与は74種の発現に有意な変化をもたらした。双方で共通に変化したものは6種あり、これが偶然に起こる確率は $1.14 \times 10^{-23}$ と極めて小さく、セイヨウオトギリソウとイミプラミンの作用に共通性のあることが推定される。このニュートリゲノミクスに基づく知見は、人臨床試験等で示されたセイヨウオトギリソウの抗うつ作用の科学的根拠をさらに確実なものとしている。

本年度は、これらを踏まえ、人対象試験で不眠に対する有効性が示唆されてはいるが、関与成分および作用機序が不明確であるセイヨウカノコソウ、またコホート研究や無作為化比較試験において網膜変性疾患に対する有効性が示唆されているルテインを取り上げ、これらを投与したラットの脳局所(セイヨウカノコソウ)および眼球(ルテイン)における遺伝子発現に対する影響を、DNA  $\mu$  アレイを用いる網羅的解析によって検討した。

セイヨウカノコソウに関しては、まずポジティブコントロールのカバヤセイヨウオトギリソウに比べ、肝臓に対する有害作用が小さい可能性が推定された。その上で、脳内局所における遺伝子発現に対する影響を検討したところ、視床下部および海馬における遺伝子発現がセイヨウカノコソウ投与によって変動するという結果が得られた。すなわち、この両部位はセイヨウカノコソウの標的部位である可能性が示唆された。さらに、それぞれの物質の投与にともない発現増大を示す遺伝子トップ 10 について、ジアゼパム投与の場合とセイヨウカノコソウ投与の場合の相関を調べたところ、視床下部では両者の間に有意な相関は認められなかったが、海馬では両者の間に有意な相関が認められた。すなわち、セイヨウカノコソウ投与およびジアゼパム投与ラットの海馬における遺伝子発現プロフィールには、ある程度の共通性のあることが示唆された。

海馬は情動の中枢の役割を果たしており、ベンゾジアゼピンは海馬を中心に分布しているガンマーアミノ酪酸(GABA)受容体に結合し、抑制性神経伝達物質としてのGABAの作用を賦活化することで、情動性興奮を抑えて鎮静・催眠・抗不安等の作用をもたらすとされている。今回の実験研究で得られた結果は、セイヨウカノコソウが、少なくとも一部はジアゼパムと類似の機構で作用を発現する可能性を示唆している。これに関連し、セイヨウカノコソウの成分バレレン酸がサブユニット特異的なアロステリック調節因子として、

GABA<sub>A</sub>受容体に対する賦活化作用を有することが最近報告されている<sup>12)</sup>。

よって、セイヨウカノコソウは海馬を標的部位とし、ジアゼパムと類似の機構で作用を発現する可能性が示唆された。また、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は、標的作用部位やバイオマーカーの探索のための手段として有用であることが示された。

一方、ルテインに関しては、DNA マイクロアレイ法により、ルテイン投与群の全てにおいて、眼球における発現が2倍以上に亢進あるいは 1/2 以下に低下した遺伝子が検出された。これらの遺伝子のうち、Keratin Complex1, Aquaporin5, Desmoplakin, Nephilysin-like peptidase gamma の3つについては、リアルタイムRT-PCRによる検討においてもDNAマイクロアレイの場合とある程度整合する結果が得られた。よって、経口投与されたルテインは、直接ないし間接的な機構を介し、眼球の諸機能素子の遺伝子発現に影響をおよぼす可能性が示唆された。

NMCDの評価では、ルテインは加齢黄斑変性症や白内障に POSSIBLY EFFECTIVE であるとされている<sup>2)</sup>。網膜の中心にある黄斑は、ものを見る際に最も鋭敏な働きをしているが、加齢黄斑変性症ではこの黄斑部が加齢にともなって変性し、視野の中央が、暗く見える、よく見えない、線がゆがむといった症状が現れる。欧米では、失明原因の第一位は黄斑変性症であり、日本でも高齢化と並行するかのように増加している。加齢性黄斑変性の発症リスクとして知られているのは、遺伝、喫煙、食生活、淡色の眼の色、年齢(55歳以上)、性別(男性に多い)である。食生活との関連では、血清カロテノイド(ルテイン、ゼアキサンチン、 $\beta$ -カロテン、 $\alpha$ -カロテン、クリプトキサンチン、リコペン)レベルが高いと、加齢黄斑変性症のリスクが低いことが報告されている<sup>8, 9)</sup>。さらに、ルテインの摂取量が高いと加齢黄斑変性症のリスクが低いこと、ルテイン摂取量と血清

ルテイン濃度と黄斑色素濃度との間に相関のあることが知られている。これらを背景に, Richer らによって介入研究が行われている<sup>10)</sup>。すなわち, ルテイン単品 10mg, あるいは同品を 10mg 含む多成分サプリメントの 12 か月の投与により, 黄斑色素濃度の増加とともに, 視覚機能の改善が認められている。

食品由来のルテインおよびその代謝産物のゼアキサントンは, 黄斑と水晶体に特異的に濃縮されている<sup>8, 9)</sup>。これに関連し, ヒト網膜黄斑にはゼアキサント結合タンパク質が存在し, そのものがグルタチオン S-トランスフェラーゼのアイソフォームの 1 つであることが示されている<sup>8, 9)</sup>。こうした素子が見つかることは, ルテインやゼアキサントンが黄斑において重要な生理的役割を担っている可能性を示唆している。また, 眼球におけるルテインやゼアキサントンの機能については, その吸光スペクトルを根拠に, 有害作用の強い青色光に対するフィルターの役割が重要視されており, 活性酸素主の中和による細胞障害の防御, 色覚への関与等が推定されている<sup>8, 9)</sup>。しかし, ルテインの作用発現における標的機能素子については殆んど知られていない。本研究では, DNAマイクロアレイを採用することにより, 経口投与されたルテインが, 直接ないし間接的な機構を介し, 眼球の諸機能素子の遺伝子発現に影響をおよぼす可能性が示唆された。

以上より, DNAマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析は, 自覚可能な身体状況の改善に関する有効性評価のための方法, また標的的作用部位やバイオマーカーを確立する上で有用であると評価される。

#### 文献および URL

1) 「健康食品」に係る制度のあり方に関する検討会: 「健康食品」に係る今後の制度のあり方について(提言), 平成16年6月9日

- 2) <http://www.naturaldatabase.com/naturaldatabase>
- 3) 志村二三夫: 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「特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究」平成17年度 総括・分担研究報告書, 8-21 (2006)
- 4) Westenhoefer J, Bellisle F, Blundell JE, de Vries J, Edwards D, Kallus W, Milon H, Pannemans D, Tuijelaars S, Tuorila HJ: *Eur. J. Nutr.* **43**, Suppl 2, II/85-II/117 (2004)
- 5) Wong ML, O’Kirwan F, Hannestad JP, Irizarry KJ, Elashoff D, Licinio J: *Mol. Psychiatry.* **9**, 237-251 (2004)
- 6) Wang CY, Chiao MT, Yen PJ, Huang WC, Hou CC, Chien SC, Yeh KC, Yang WC, Shyur LF, Yang NS.: *Genomics* **88**, 801-808 (2006)
- 7) Fukasawa T, Murashima K, Matsumoto I, Hosono A, Ohara H, Nojiri C, Koga J, Kubota H, Kanegae M, Kaminogawa S, Abe K, Kono T.: *J Agric Food Chem.* **55**, 3174-3179 (2007)
- 8) Whitehead AJ, Mares JA, Danis RP: *Arch Ophthalmol.* **124**, 1038-1045 (2006)
- 9) 道川優子, 志村二三夫: *FOOD STYLE* **21** 9(9), 134-139 (2005)
- 10) Richer S, Stiles W, Statkute L, Pulido J, Frankowski J, Rudy D, Pei K, Tsipursky M, Nyland J: *Optometry.* **75**, 216-230 (2004)
- 11) 志村二三夫: ハーブサプリメントの現状と展望, *日本抗加齢医学会雑誌* **1**, 23-30 (2005)
- 12) Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B, Hering S: *Neuropharmacology.* **53**, 178-187 (2007)

## C. 結論

“特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究”の一環として、催眠・鎮静・抗不安作用が示唆されているセイヨウカノコソウ、また眼の健康の保持・増進への有効性が示唆されているルテインを対象素材に取り上げ、“自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討”に関する動物実験を実施し、次の結果を得、考察した。

2つの素材を対象とした実験を通じ、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現応答の網羅的解析法は、標的作用部位の特定や標的機能素子の探索に有用であることが示唆された。よって、“身体の状態が自覚でき、一時的であって継続的・慢性的ではない生体調節作用あるいは体調変化等”との関わり合いが深い脳や眼球における食品素材の作用を評価する上で有用であると結論される。

## D. 健康危険情報

なし

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 濱口恵子, 志村二三夫: サプリメントの研究デザイン. 臨床病理レビュー 特集 第 135号, 29-37 (2006)
- 2) 山崎優子, 志村二三夫: 抗うつ作用を志向するハーブ類サプリメントのエビデンス, 日本抗加齢医学会雑誌 印刷中

### 2. 学会発表

- 1) 水落里奈, 森島絵美, 柳沢梢, 道川優子, 志村二三夫: ハーブサプリメント(HS)の有効性評価法の検討ーセイヨウカノコソウを例に, 第 60 回日本栄養・食糧学会大会, 平成 18 年 5 月.
- 2) 今村文美, 鈴木真奈美, 萩野谷実香, 押田恭一, 山崎優子, 志村二三夫: ラット眼球における遺伝子発現に対するルテイン投与

の影響:DNA マイクロアレイを用いる網羅的解析の試み, 第 54 回日本栄養改善学会学術総会, 平成 19 年 9 月.

- 3) 神谷恵理, 海老原佐苗, 小澤香織, 山崎優子, 志村二三夫: Cytochrome P450 (CYP) 分子種を指標とするハーブサプリメント (HS) の安全性評価: 免疫組織化学法の導入の検討, 第 54 回日本栄養改善学会学術総会, 平成 19 年 9 月.

## 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
3. その他  
なし

表1 ラット肝臓における遺伝子発現へのハーブの影響  
(DNA  $\mu$ アレイ: Up Regulated)

	カバ		セイヨウオトギリソウ		セイヨウカノコソウ	
	Ratio	Description	Ratio	Description	Ratio	Description
1	3.419	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2C (Grin2c), [NM_012575]	11.481	cytochrome P450, subfamily 3A, polypeptide 3 (Cyp3a3) [NM_013105]	2.579	heat shock 70kD protein 1A (Hspa1a) [NM_031971]
2	3.210	PREDICTED:cytochrome P-450e-M (LOC361523)[XM_341808]	2.904	cytochrome P450, 3a18 (Cyp3a18) [NM_145782]	1.911	testis-specific serine protease-5 (Tessp5) [NM_001008864]
3	2.895	liver UDP-glucuronosyltransferase, phenobarbital-inducible form (Udpgr2)[NM_173295]	2.571	aldehyde dehydrogenase family 1, member A1 (Aldh1a1) [NM_022407]	1.681	BI275187 UI-R-CX0-bxc-e-11-0-UI.s1 UI-R-CX0 cDNA clone UI-R-CX0-bxc-e-11-0-UI 3', sequence [BI275187]
4	2.860	PREDICTED:protocadherin 9 (predicted) (Pcdh9_predicted)[XM_224429]	2.106	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like) (Mst1) [NM_024352]	1.509	AI136420 UI-R-C2p-od-h-06-0-UI.s1 UI-R-C2p cDNA clone UI-R-C2p-od-h-06-0-UI 3', sequence [AI136420]
5	2.473	cytochrome P450-like (LOC293989) [NM_001013904]	2.051	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A4 (Aldh1a4) [NM_017272]	1.440	AA819895 UI-R-A0-aq-c-08-0-UI.s1 UI-R-A0 cDNA clone UI-R-A0-aq-c-08-0-UI 3' similar to gb
6	2.369	putative G-protein coupled receptor GPCR14 (Gpcr14) partial cds. [AF090348]	2.014	PREDICTED: similar to RIKEN cDNA 2010321J07 (predicted) (LOC289533) [XM_232289]	1.425	PREDICTED: similar to GTPase activating protein testicular GAP1 (LOC363393), [XM_347133]
7	2.360	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase) (Akr7a3) [NM_013215]	1.970	CA509607 UI-R-FS0-cqs-a-03-0-UI.s1 NCLCGAP_FS0 cDNA clone IMAGE:7357421 3', sequence [CA509607]	1.420	MARRLC2A, partial cds. [AF010437]
8	2.353	cytochrome P450, subfamily 3A, polypeptide 3 (Cyp3a3) [NM_013105]	1.950	mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds [AB033713]	1.416	homeo box, msh-like 1 (Msx1), [NM_031059]
9	2.318	carboxylesterase 2 (intestine, liver) (Ces2) [NM_133586]	1.904	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A8 (Ugt1a8) [NM_175846]	1.404	AI059740 UI-R-C1-ik-f-10-0-UI.s1 UI-R-C1 cDNA clone UI-R-C1-ik-f-10-0-UI 3', sequence [AI059740]
10	2.063	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp1a1) [NM_012540]	1.894	MARRLC2A, partial cds. [AF010437]	1.393	similar to B-cell CLL/lymphoma 11A isoform 1; ecotropic viral integration site 9 homolog; C2H2-type zinc finger protein (LOC305589), [XM_223693]