

テブシン B₁, エラスターゼ活性を阻害することが認められ, ウサギ膝実験的変形性関節症の関節腔へグリコサミノグリカン多硫酸エステルを 1 週 1 回 10 週注入することにより, 非投与群の変形性膝関節症膝よりも軟骨変性を抑制することが観察されている。しかしながら, インドール酢酸系非ステロイド性抗炎症薬として有名なインドメタシンについても中性プロテアーゼ, コラゲナーゼ活性を抑制することが報告されていることもあり, リソソーム酵素活性阻害と軟骨変性抑制との因果関係に関しては明らかにされていない。また, グリコサミノグリカン多硫酸エステルもカテプシン B₁ のコラーゲン分解活性をインドメタシンと同様に阻害することが報告されているが, これが変形性関節症に対して有利であるか, 不利であるかについては疑問が残る。炎症性疾患を持つ患者数は増加の一途を辿り, 世界で慢性関節リウマチ患者は 700 万人, 喘息患者は 3,400 万人にのぼると言われている。現在のステロイド系の抗炎症剤はその有効性, 安全性が限られていることから, より高効率で安全性の高い抗炎症治療剤の開発が待たれていることをふまえると, CS の薬理効果の解明が急務であると考えられる。

アレルギー疾患の頻度は, 近年の統計によると, 日本のみならず欧米においても増加の一途を辿り, 控えめに見積もっても総人口の 20%前後にものぼる人々が何らかのアレルギー性疾患を煩っているといわれている。アレルギー疾患の治療に用いられる抗アレルギー薬の開発は多角的に検討され, 特に IgE-肥満細胞系によって生じる I 型のアレルギー応答に対する抗アレルギー薬として多くの薬剤が開発されてきた。それらは肥満細胞から遊離されるヒスタミンに対して拮抗的な作用を有する古典的な抗ヒスタミン薬の開発に始まり, 肥満細胞からの化学伝達物質遊離を広く抑制する化学伝達物質遊離抑制薬が開発されたが, 全てのアレルギー反応において未だに十分に満足する薬剤が見出されていないのが現状である。現在では更に多様化し, ロイコトリエン受容体拮抗薬やトロンボキサン合成阻害薬・受容体拮抗薬, サイトカイン産生抑制薬などが次々と開発されている。アレルギーモデルマウスを用いた本研究において, CS の

経口投与は血清中抗原特異的 IgE, IgG₁ 抗体価, 血清中ヒスタミン遊離及び接触性アレルギーの抑制を示し, CS に抗アレルギー活性が賦与されることが初めて見出された。また, 抗アレルギー活性が呈示されたマウスの免疫担当細胞の表面抗原組成を解析し, 粘膜免疫系において IEL の TCRαβ陽性細胞, CD4 陽性細胞の組成比が有意に増加したことから, CS の抗アレルギー活性発現に対する TCRαβ陽性細胞, CD4 陽性細胞の関与が示唆された。近年の研究において, IEL の性状と発生・分化に関し, その特殊性が解明されてきたが, IEL 中の T 細胞の機能, とくに腸管免疫機構における役割に関してはまだ詳細は不明である。本研究において得られた新規知見である, CS の抗アレルギー活性発現に対する TCRαβ陽性細胞, CD4 陽性細胞の関与は, 腸管免疫機構における IEL の機能解明に役立つものとなるであろう。また, CS の経口投与が全身性免疫系に及ぼす影響を明らかにするために, CS を自由に摂取させたアレルギーモデルマウスの脾細胞表面抗原を FCM で解析した。その結果, CD3ε陽性細胞組成比の増加, CD45R/B220 陽性細胞組成比の減少が認められ, T 細胞サブセットの解析では CD4 陽性細胞, CD8α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。本研究において示した CS 経口投与による血清中抗原特異的 IgE 及び IgG₁ 抗体価の有意な抑制は, 全身性免疫系において, それら抗原特異的抗体を産生する B 細胞機能の抑制が要因となっていることが考えられた。また, 我々はこれまでに *in vitro* の実験系において, OVA 免疫感作マウス脾細胞を CS と共に培養した後に, 細胞表面抗原を解析したところ, T 細胞組成比に増加が認められ, そのサブセットでは, CD4 陽性細胞の増加, CD8α陽性細胞の抑制を確認している。これらの実験では生体内における免疫応答を模倣した系を考慮したが, CS の自由経口投与による生体内の免疫応答と, CS の抗原感作脾細胞との直接的な相互作用は異なる機序であると考えられた。

II バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

実験に用いたウコン(種子島系)のcurcumin含量は、5.54 mg/g(0.55 %)で、市場品(0.10-1.79 %と報告されている¹⁾)と比較するとやや低いと思われる。

急性経口毒性試験に準じてウコンをラットに投与した結果、死亡は雌雄ともに認められなかった。臨床症状の観察で異常は認められなかった。また体重は投与後7日および14日目ともに全例で増加しており、一般状態の良好な推移を反映していた。一方、観察期間終了時に行った剖検では対照群で左側腎臓の腎盂拡張および水腎症が、またウコン投与群で肝臓にHD結節が認められたが、これらの所見は、正常のWistarHannover系SPFラット(Br/Han:WIST@Jcl(GALAS))でも認められること、また当該試験における臨床症状の観察で異常が認められなかったことから、被験物質または溶媒による影響ではないと判断した。以上の結果から、ウコン5,000 mg/kgの単回投与では、ラットに対して毒性は認められないと判断した。

ESI-MS/MS分析法を用いた血漿画分中のタンパク質の同定を行うため、試料調製法および装置条件を検討した。血漿中には、アルブミンが50-60 %程度含まれ、アルブミン存在下ではESI-MS/MS分析法は、測定感度が低下することが予測される。そこで、ラットアルブミンを特異的に吸着する担体を用いて血漿画分のアルブミンを除去した。アルブミンを除去することで、粗精製の血漿画分であっても、MSへの直接導入によって数種のタンパク質が同定できた。対照群では、25種の候補から3種が有意に同定され、投与群では、19種の候補から4種が有意に同定できることが示された。

しかし、同定されたタンパク質の種類が非常に少ないことから、今回用いた方法では、有効なバイオマーカーを検索することはできないと判断した。バイオマーカーとなるタンパク質・ペプチドの候補を検索するためには、多くのタンパク質、ペプチドを検出、同定する必要があり、分析時のペプチドフラグメントの分離能、検出力を向上させる必要がある。今後、トリプ

シン処理した試料を陽イオン交換クロマトグラフィなどで分画した上で、画分毎に逆相カラムを用いたLC-MS/MS分析を行うことが必要であると思われる。

E. 結論

I コンドロイチン硫酸の抗アレルギー作用に関する検討

血清中抗原特異的IgE及びIgG₁抗体価、血清中遊離ヒスタミン、接触性アレルギーを指標として、即時型アレルギーに対するCSの経口的活性を評価したところ、疾患に抑制が認められ、抗アレルギー活性の賦与が示唆された。また、抗アレルギー活性が呈示されたマウスの免疫担当細胞の表面抗原解析を試みたところ、CSを経口投与したマウスでは粘膜免疫系における腸管上皮間リンパ球上のTCR $\alpha\beta$ 陽性細胞、CD4陽性細胞の組成比の有意な増加が観察された。また、全身性免疫系においては脾細胞上CD3e陽性細胞組成比の増加、CD45R/B220陽性細胞組成比の減少が観察され、それら免疫担当細胞の抗アレルギー活性への関与が示唆された。また、2次免疫応答後に脾臓を摘出し、*in vitro*におけるサイトカイン産生能について検討したところ、CSを経口投与したマウスの培養脾細胞はTh2型サイトカイン産生に抑制が認められた。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。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。

II バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

Wistar Hannove系SPFラットの雌雄にクルクミノイド6.59 mg/gを含むウコン5,000 mg/kgを単回投与しても急性経口毒性は認められなかった。

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、粗精製の血漿画分であっても、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。

Los Angeles, Nov. (2006)

F. 研究発表

1. 論文発表：

1) Kusano, S., Igarashi, N., Sakai, S., Toida, T.,
“Effect of Orally Administered Chondrosine on
Uptake of ³⁵S Sulfate into Mice Cartilage” *Journal
of Pharmaceutical Society of JAPAN*, **126**, 297-300
(2006)

2) 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)

3) Toida, T., Sakai, S., Akiyama, H., Linhardt, R. J.,
“Immunological Activity of Chondroitin Sulfate”
Advances in Pharmacology, **53**, Chapter 19,
403-415 (2006)

. 学会発表：

1) 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, 2006 年 3 月

2) 武田真実, 酒井信夫, 豊田英尚, 戸井田敏彦.
“バカ貝由来コンドロイチン硫酸の単離と構造解
析” 日本薬学会第 126 年会, 仙台, 2006 年 3 月

3) 平野花奈, 酒井信夫, 豊田英尚, 戸井田敏彦.
“メチルエステル化グリコサミノグリカンの酵素分
解” 第26回日本糖質学会年会, 仙台, 2006年8月
2

4) Sakai, S., Akiyama, H., Sato, 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”
Annual Conference of the Society for Glycobiology,

G. 知的財産権の出願・登録：なし

H. 参考文献

1) Chen, J.M., *et al*: Chung Ts'ao Yao 1983, **14**(2),
59-63.

I.コンドロイチン硫酸の抗アレルギー作用に関する検討

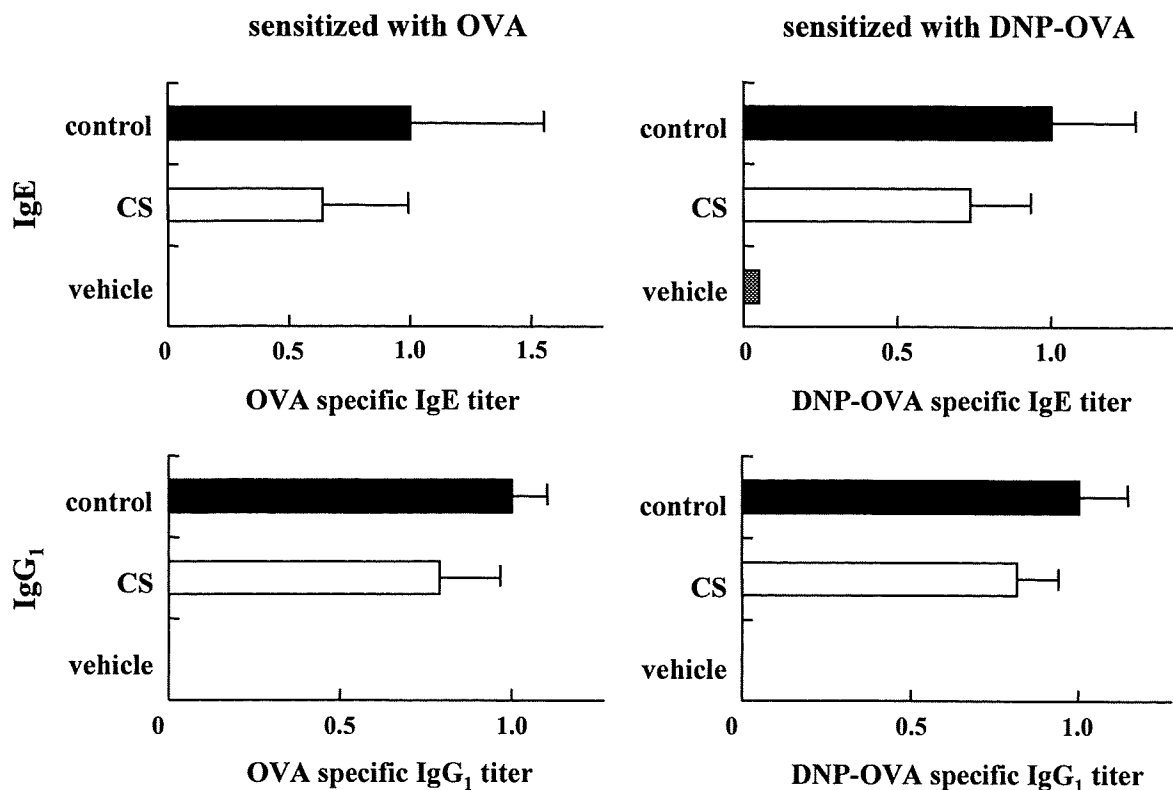


Figure 1 Effects of CS on the Serum Antigen-Specific Antibody Titer in Secondary Immune Response. Bars represent mean values \pm S. D. of 5 mice. CS (400 mg/kg/day) was administered orally from the first immunization to 7d after the second immunization.

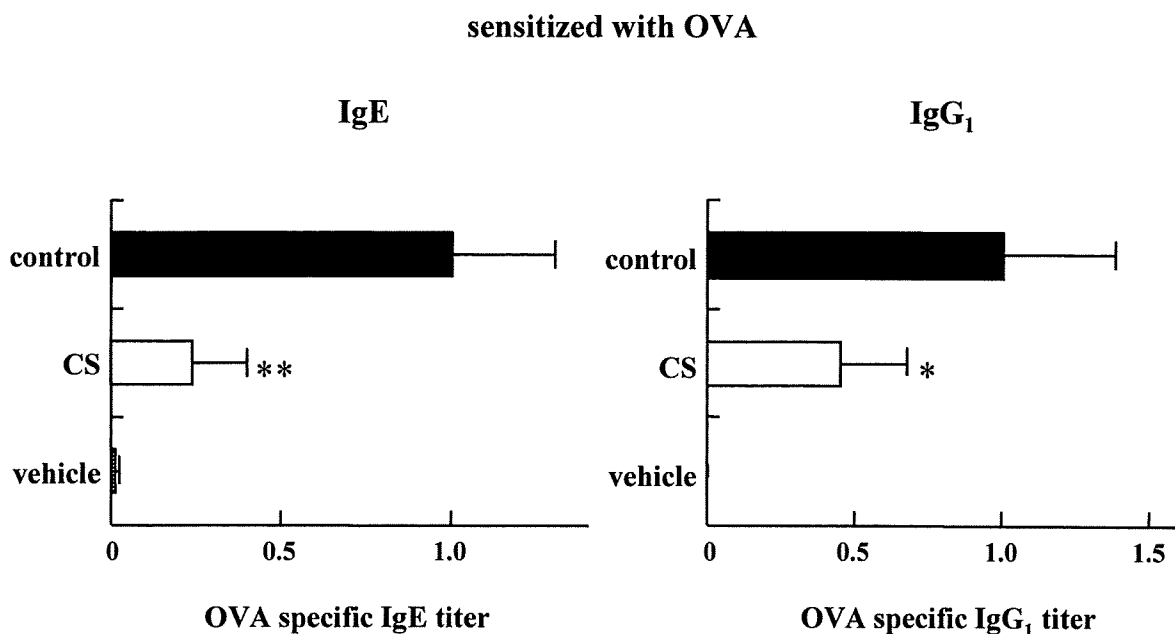


Figure 2 Effects of CS on the Serum Antigen-Specific Antibody Titer in Secondary Immune Response. Bars

represent mean values \pm S. D. of 10 mice. CS was administered orally “*ad libitum*” from 7d before the first immunization to 7d after the second immunization.

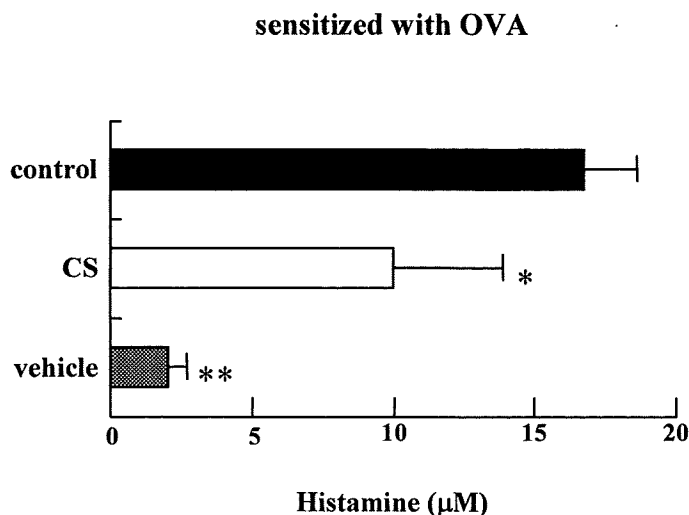


Figure 3 Effect of CS on the serum histamine concentrations in the OVA-challenged mice. Serum samples were collected after 10 min *i.p.* administration of OVA. Bars represent mean values \pm S. D. of 4 mice. CS was orally administered from the first immunization to the time of the active systemic anaphylaxis test. Mice were challenged with 1 mg antigen. Asterisk indicates the significance of difference from the control value (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

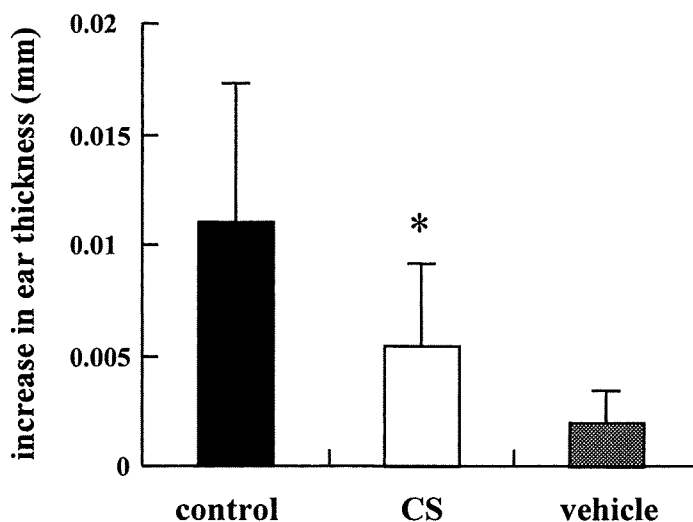


Figure 4 Effects of CS on the immunized mice ear swelling responses 1 hr after epicutaneous challenge with picryl chloride. Bars represent mean values \pm S. D. of 5 mice (10 ears). CS was administered orally from the first immunization. * $P < 0.05$ compared with control (saline).

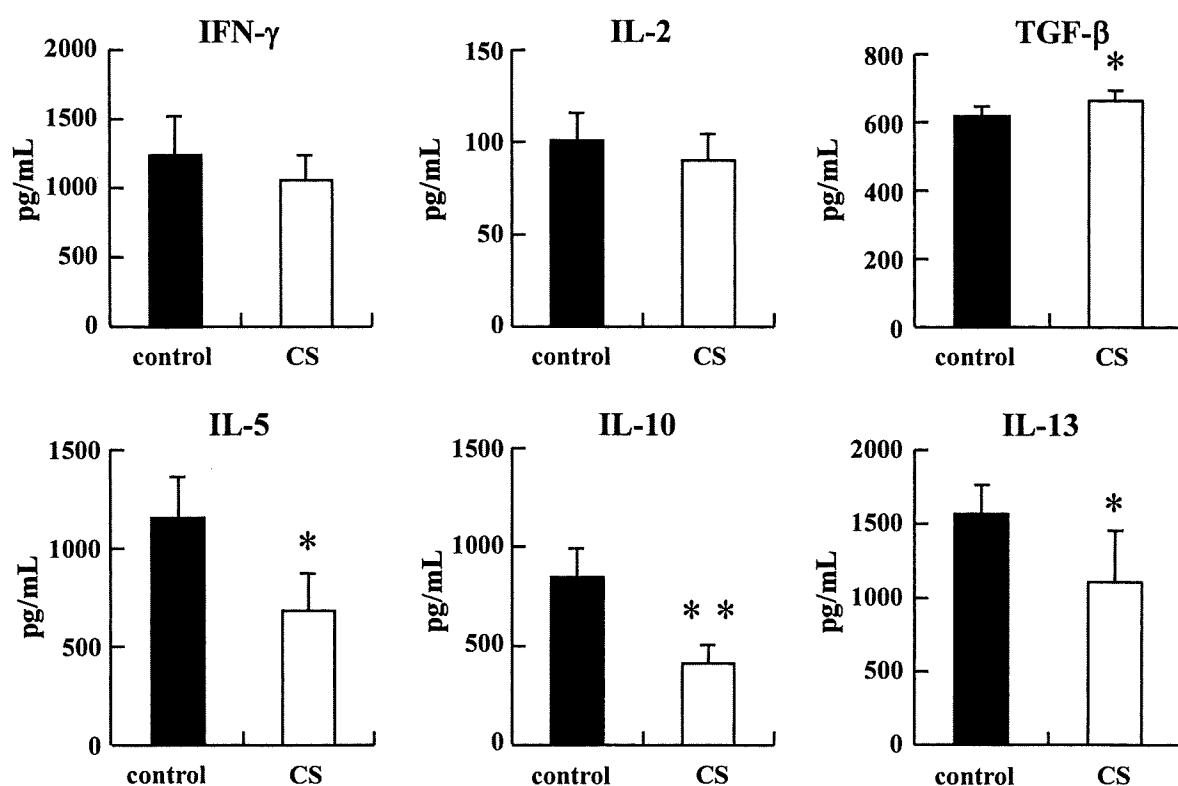


Figure 5 Effects of CS administration on the cytokine production of splenocytes *in vitro*. BALB/c mice (n=5) were intraperitoneally injected on d 0 and 10 with 20 μ g of OVA and 2 mg of Al(OH)₃ at a total volume of 400 μ l, and orally administered CS (*ad libitum*) from 7 day before 1st immunization to 7days after the 2nd immunization. Splenocytes (5.0×10^6 cells/ml) were collected on d 18 and were co-cultured with OVA (final 100 μ g/ml). The amounts of cytokines in the supernatant were measured by ELISA. Asterisk indicates the significance of difference from the control value (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$). Bars represent mean values (\pm S. D.) for 6 wells.

Table 1 Percentage of IEL expressing surface antigenic markers in each group

	TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$	CD8 $\alpha\alpha$	CD8 $\alpha\beta$	CD4
CS (<i>ad libitum</i>)	53.4 \pm 4.4 *	32.8 \pm 4.1	45.9 \pm 6.7	22.6 \pm 4.5	17.5 \pm 5.2 *
CS (400 mg/kg/day)	49.1 \pm 3.8	28.9 \pm 5.3	47.2 \pm 2.8	20.3 \pm 2.6	13.8 \pm 3.0 *
control	46.8 \pm 3.8	31.7 \pm 1.7	50.7 \pm 1.7	17.8 \pm 1.9	9.7 \pm 1.1

Data are means \pm S.D. (% gated), n = 5. * Significantly difference from control at $P < 0.05$. CS (*ad libitum*) was administered orally "*ad libitum*" from 7d before the first immunization to 7d after the second immunization. CS (400 mg/kg/day) was administered by gavage from the first immunization to 7d after the second immunization. The control group had *ad libitum* free access to water.

Table 2 Percentage of splenocytes expressing surface antigenic markers in each group

	CD3 ⁺ CD45R/B220 ⁻ (T cell)	CD3 ⁻ CD45R/B220 ⁺ (B cell)	CD4 ⁺ CD8 ⁻ (CD4)	CD4 ⁻ CD8 ⁺ (CD8)	CD4 ⁺ CD25 ⁺
CS	38.0 ± 2.8	52.9 ± 2.0	27.7 ± 2.0 *	11.8 ± 0.7 *	4.4 ± 0.5 **
control	36.2 ± 2.8	53.2 ± 2.6	25.2 ± 1.3	10.8 ± 0.9	3.9 ± 0.3

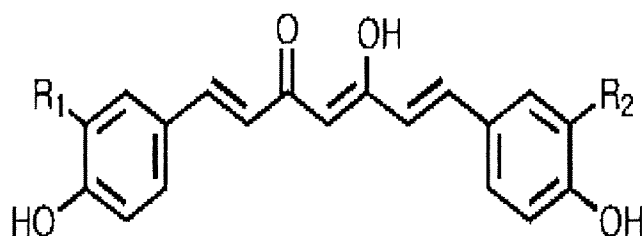
Data are means ± S.D. (% gated), n = 8. *,** Significantly difference from control at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. CS was administered orally "ad libitum" from 7d before the first immunization to 7d after the second immunization. The control group had *ad libitum* free access to water.

II バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

表1 投与材料にしたウコン（種子島系）のクルクミノイド含量
クルクミノイド (mg/g · DW)

	Bisdemethoxy curcumin	Demethoxy curcumin	Curcumin	合計
平均	0.23	0.82	5.54	6.59
SD	0.00	0.02	0.11	0.13

(n=3)



	R1	R2
Bisdemethoxycurcumin	H	H
Demethoxycurcumin	OCH ₃	H
Curcumin	OCH ₃	OCH ₃

図1 3種のクルクミノイドの構造式

表2 ウコン投与によるラット(雌)体重の変化

投与量 (mg/kg)	動物番号	ラット重量(g/個体)		
		投与前	投与7日後	投与14日後
0	1	214	284	319
	2	202	262	293
	3	205	261	289
	4	217	278	320
	5	209	275	310
	平均	209	272	306
	標準偏差	6	10	14
5,000	6	208	268	299
	7	206	273	309
	8	227	293	325
	9	216	278	314
	10	214	278	312
	平均	214	278	312
	標準偏差	8	9	9

表3 ESI-MS/MS分析法を用いて同定されたラット(雌)血漿画分中のタンパク質(対照群)

Proteins	Score	Peptide matched
hemopexin [Rattus norvegicus]	Significant hits	
PREDICTED: similar to Alpha-1-inhibitor III precursor [Rattus norvegicus]	Significant hits	
Cc1-B [Rattus norvegicus]	Significant hits	
1 hemopexin [Rattus norvegicus]	105	2
2 hemopexin [Mus musculus]	105	2
3 Hemopexin [Rattus norvegicus]	105	2
4 hemopexin [Mus musculus]	105	2
5 Alpha-1-inhibitor III precursor	56	3
6 murinoglobulin 2 [Rattus norvegicus]	55	3
7 Cc1-B [Rattus norvegicus]	54	1
8 Bcl-667 [Rattus norvegicus]	54	1
9 PREDICTED: transferrin [Rattus norvegicus]	54	1
10 Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1-metal binding globulin)	54	1
11 liver regeneration-related protein LRRG03 [Rattus norvegicus]	54	1
12 liver regeneration-related protein 1 [Rattus norvegicus]	39	1
13 putative alpha 1B-glycoprotein [Rattus norvegicus]	39	1
14 Alpha-1-B glycoprotein [Rattus norvegicus]	39	1
15 Alpha-1-antiprotease precursor (Alpha-1-antitrypsin) (Alpha-1-proteinase inhibitor)	21	1
16 alpha-1-antitrypsin precursor	21	1
17 serine protease inhibitor alpha 1 [Rattus norvegicus]	21	1
18 methyltransferase, putative [Chlorobium phaeobacteroides DSM 266]	20	1
19 serine protease inhibitor 1	20	1
20 unnamed protein product [Rattus norvegicus]	20	1
21 Ab1-021 [Rattus norvegicus]	20	1
22 Spin2a protein [Rattus norvegicus]	20	1
23 Cyclic nucleotide-binding domain [Polaromonas sp. J5666]	20	1
24 unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	20	1
25 alpha-1-antitrypsin-like protein [Tarsus sibiricus]	20	1

表4 ESI-MS/MS分析法を用いて同定されたラット(雌)血漿画分中のタンパク質(投与群)

Proteins	Score	Peptide matched
liver regeneration-related protein LRRG03 [Rattus norvegicus]	Significant hits	
PREDICTED: transferrin [Rattus norvegicus]	Significant hits	
hemopexin [Mus musculus]	Significant hits	
serine protease inhibitor alpha 1 [Rattus norvegicus]	Significant hits	
1 liver regeneration-related protein LRRG03 [Rattus norvegicus]	150	4
2 Cc1-B [Rattus norvegicus]	150	4
3 Bcl-667 [Rattus norvegicus]	150	4
4 Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1-metal binding globulin)	150	4
5 PREDICTED: transferrin [Rattus norvegicus]	101	3
6 hemopexin [Mus musculus]	87	3
7 hemopexin [Rattus norvegicus]	87	3
8 Hemopexin [Rattus norvegicus]	87	3
9 hemopexin [Mus musculus]	87	3
10 hemopexin [Mus musculus]	87	3
11 serine protease inhibitor alpha 1 [Rattus norvegicus]	67	2
12 alpha-1-antitrypsin precursor	67	2
13 Alpha-1-antiprotease precursor (Alpha-1-antitrypsin) (Alpha-1-proteinase inhibitor)	67	2
14 albumin precursor [Schistosoma mansoni]	44	2
15 putative alpha 1B-glycoprotein [Rattus norvegicus]	38	1
16 liver regeneration-related protein 1 [Rattus norvegicus]	38	1
17 Alpha-1-B glycoprotein [Rattus norvegicus]	38	1
18 DNA methylase N-4-N-6 [Chlorobium phaeobacteroides BS1]	35	1
19 anti-potato cyst nematode monoclonal antibody MGR48 immunoglobulin heavy chain [Mus musculus]	33	1

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全・安心確保推進研究事業）
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
—多機能多成分複雑系としての食品における有効性評価—

分担研究者 合田 敏尚 静岡県立大学食品栄養科学部助教授
研究協力者 望月 和樹 静岡県立大学食品栄養科学部助手

研究要旨

代謝性疾患のリスクを低減させることを目的とする特定保健用食品について、多機能多成分であっても有効性を評価できる方法を明らかにすることを目的とし、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を探索し、候補バイオマーカーの妥当性の検討を行った。

血糖および内臓脂肪蓄積の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検討したところ、血糖上昇に起因する独自の変化を示す血液指標として、S100 タンパク質、IL-1 β などの炎症マーカーが有用であること、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はアディポネクチンが有用であることが明らかになった。これらのバイオマーカー候補を健診受診者における血液試料を用いて測定し、ヒトにおける代謝性疾患のリスクを特異的に反映できる指標として妥当なものであることを明らかにした。本研究の結果から、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。

A. 研究目的

現行の特定保健用食品の表示制度では、関与成分と保健の用途がそれぞれ単一であることが原則であるため、複数の関与成分が混在したり、複数の生理作用をもたらす成分が含まれている場合には、一部の成分や一部の生理作用だけが考慮の対象になり、他は無視されるという矛盾がある。本来、食品は複数の機能性成分が含まれる複雑系として存在しているので、目的とする保健の用途に対する食品の有効性を、食品全体として評価する

システムが構築されることが望ましい。医薬品とは異なり、食品の最終評価指標は健康の維持増進と疾病リスクを低減させることであり、中間評価指標についても、より短期的な臨床検査指標をバイオマーカーとして選択できることが望ましい。また、効果の根拠についても、薬理的な作用機構が明確になるまで判断を保留にするということよりも、信頼できるバイオマーカーによって作用の各ステップを確認し、それを統合して「科学的な論理的妥当性」によって有効性を判断す

るという視点の転換が必要と考えられる。

そこで、本研究では、代謝性疾患のリスクを低減させることを目的とする特定保健用食品について、多機能多成分であっても有効性を評価できる方法を明らかにすることを目的とし、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い、有効性が推定された候補バイオマーカーについては、健診受診者の血液を用いて、代謝性疾患のリスクを特異的に反映できる指標としての妥当性を検討した。

B. 研究方法

1. 動物モデルによる血糖および肥満関連バイオマーカーの妥当性の検討

1) 動物

昨年までの検討により、高血糖誘導により血球遺伝子発現が大きく変動することが明らかになり、その中に短期間の血糖上昇の履歴を鋭敏に検出する複数のバイオマーカー候補が見い出されたので、そのバイオマーカー候補について、妥当性を検討した。6週齢のWistar系雄ラットに streptozotocin を腹腔内投与 (40 mg/kg 体重) し、投与の5日後に2群に分け、一方には対照食、他方には α -グルコシダーゼ阻害剤 (miglitol) 添加食 (800 mg/kg 飼料) を用いて、さらに20日間飼育した後、ジエチルエーテル麻酔下で尾先端から採血した [実験1]。

断続的な食後高血糖を評価するためのバイオマーカーを検索するために、7週齢のSD系雄ラットに低用量の streptozotocin を尾静脈内投与 (25 mg/kg 体重) し、中程度の随時高血糖 (220 mg/dl) にした後、スクロース経口負荷 (2 g/kg 体重) を毎日1度、3日間行った。候補バイオマーカーの変動と血糖上昇との直接の関連性を確認するために、一群のラットにはスクロース経口負荷時に α -グルコシダーゼ阻害剤 (miglitol) をスクロース水溶液に添加 (1 mg/ml) して投与した。3日目のスクロース負荷の直前、および投与後15分、30分、60分、120分、180分後に

尾静脈より採血し、投与180分後の血液を用いてマイクロアレイ解析を行った [実験2]。

また、脂質代謝関連の有力なバイオマーカー候補であるアディポネクチンが、脂質代謝の変動を示す中間バイオマーカーとして有用なものかを検証するために、12週齢の非肥満型2型糖尿病モデルGKラットを用いて、対照食 (55%コーンスターチ、20%カゼイン、5%コーンオイル、10%ラード、AIN93準拠ミネラル、ビタミン含有)、あるいは対照食に緑茶カテキン (エピガロカテキンガレート90%以上; サンフェノンEGCg、太陽化学) を0.2%添加した飼料を12週間、pair-feedingにより摂取させた。実験開始2週間後、8週間後、12週間後に、ジエチルエーテル麻酔下で尾先端から採血し、血漿アディポネクチン濃度をELISA (サイクレックス社) により、また血清トリアシルグリセロール濃度をトリグリセリド-E-テストワコーキット (和光純薬工業) を用いて測定した [実験3]。

2) マイクロアレイ解析

尾先端から採血した血液150 μ lを速やかにパックジーンRNA (PreAnalytiX) 500 μ lと混和してから12-24時間、室温に放置し、RNeasy Miniキット (キアゲン) を使用して、総RNAを抽出した。総RNA50ngをテンプレートとして用い、Low RNA Fluorescent Linear Amplificationキット (アジレント) を使用してcyanine 3で蛍光ラベルしたcRNAを合成した。合成されたcyanine 3ラベル化cRNAを1 μ g用い、Gene Expression Hybridizationキット (アジレント) のプロトコールに従ってrat 22k microarrayシステム (アジレント) を用いてマイクロアレイ解析を行った。

2. 臨床研究におけるバイオマーカーの妥当性の検討

1) CTスキャンによる内臓脂肪の評価とメタボリック症候群関連指標との関連性の検討

S市の人間ドック健診センターでCTスキャン検査を受診し、服薬治療中でない30～79歳の男性受診者281人を対象とした。調査項目は人間ドック実施項目のほかに血中アディポネクチン濃度、食事歴法による食習慣の調査項目および生活習慣の問診調査項目を加えた120項目とした。腹部CTスキャン計測は、仰臥位、軽い呼気後の臍部位置断面画像から専用の市販ソフト Fat Scan, N2 システムを用いて行い、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積および腹部周囲径を算出した。CTスキャンを用いて計測された皮下および内臓脂肪面積をそれぞれx-y座標で表し、その各々の基準値上下限域(平均値±SD)を外れる両群間について、各項目の平均値または問診回答比率のオッズ比を算出し、比較した。内臓脂肪のみ基準範囲外の2群について比較を行い、それぞれ群間に差をもたらす項目の種類と強度を比較した。

2) 健康診断受診者における候補バイオマーカーとメタボリック症候群関連指標との関連性の検討静岡県I市およびT事業所における健康診断受診者の中から、服薬中でない60～69歳の男性207名を対象とした。ELISA法によって血漿のアディポネクチンおよびIL-6の濃度を測定し、メタボリック症候群と関連する臨床検査値との相関性を検討した。また、対象者には健康診断受診時に簡易版自記式食事歴質問表(BDHQ)を用いて食事調査を行った。食品群の因子分析により抽出された6つの因子(食事パターン)について、血漿アディポネクチン濃度と関連する因子を探索した。アディポネクチン遺伝子多型(ADN45)を血球ゲノムDNAのPCR-RFLPにより解析した。統計解析にはSPSS for windows 12.0Jを用いた。

3. 倫理面への配慮

動物を用いる研究については、静岡県立大学実験動物利用倫理規定に従って行った。また、臨床研究は、静岡県立大学倫理委員会の承認(承認番号17-1、17-7)を受けて行った。

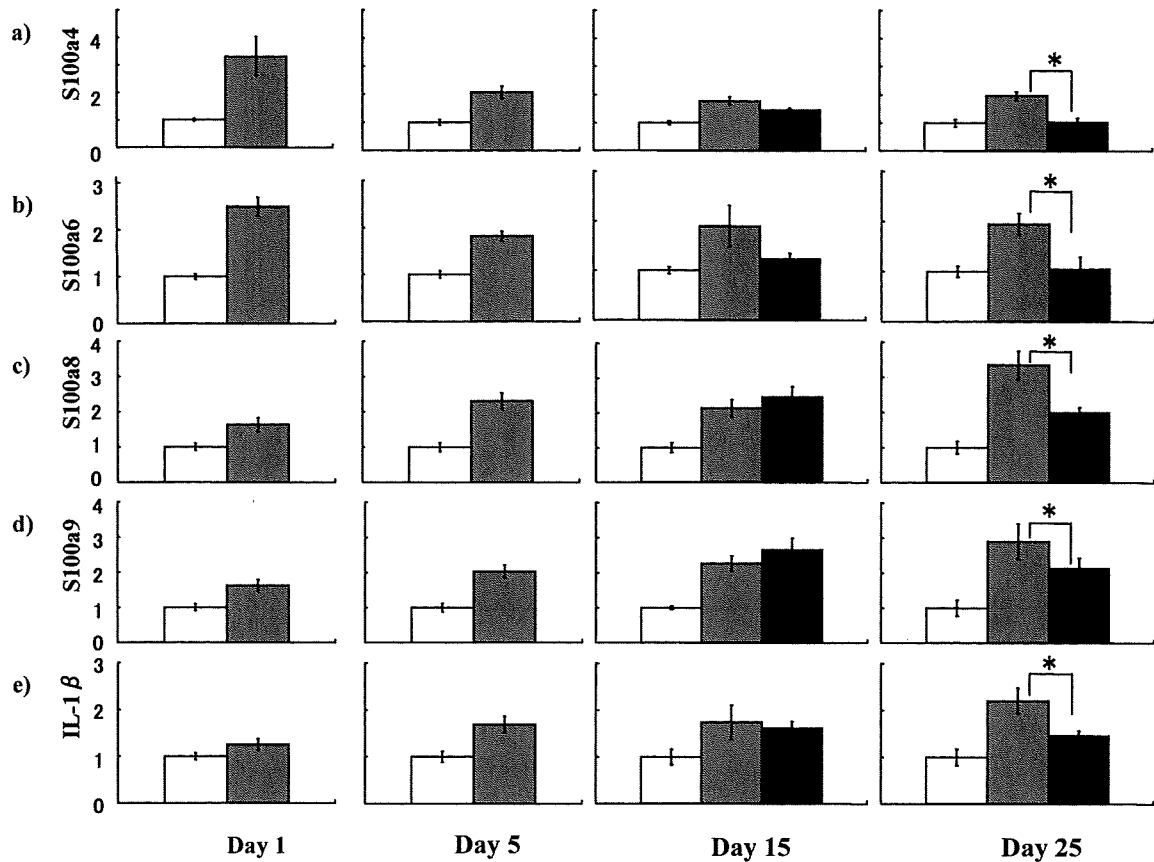


図1 高血糖によって上昇したサイトカイン遺伝子発現は α -グルコシダーゼ阻害により抑制される。

□ control ■ stz-control ■ stz-miglitol

平均値 ± SEM (N = 4/ 群)、 * P < 0.05

C. 研究結果

a) 動物モデルによる血糖および肥満関連バイオマーカーの妥当性の検討

1) 高血糖誘導に伴う血球遺伝子発現の変化 [実験 1]

streptozotcin 投与によって高血糖が誘導されたラットの血球 mRNA のマイクロアレイ解析より、これまで S100 タンパク質、インターロイキン 1 β などの分泌型サイトカイン様因子が高血糖応答マーカーとして利用できる可能性が考えられた。そこで、これらの

サイトカイン様因子が高血糖状態を鋭敏に反映する血球遺伝子指標として有用なものかを検証するために、streptozotcin 投与5日後から α -グルコシダーゼ阻害剤（ミグリトール）を飼料に添加して、血糖上昇を抑制してみた。その結果、streptozotcin 投与25日後には、4種類の S100 タンパク質（S100a4、S100a6、S100a8、S100a9）およびインターロイキン 1 β （IL-1 β ）の遺伝子発現が有意に低下し、streptozotcin を投与しなかったラットとほぼ同じ程度になっていた（図1）。

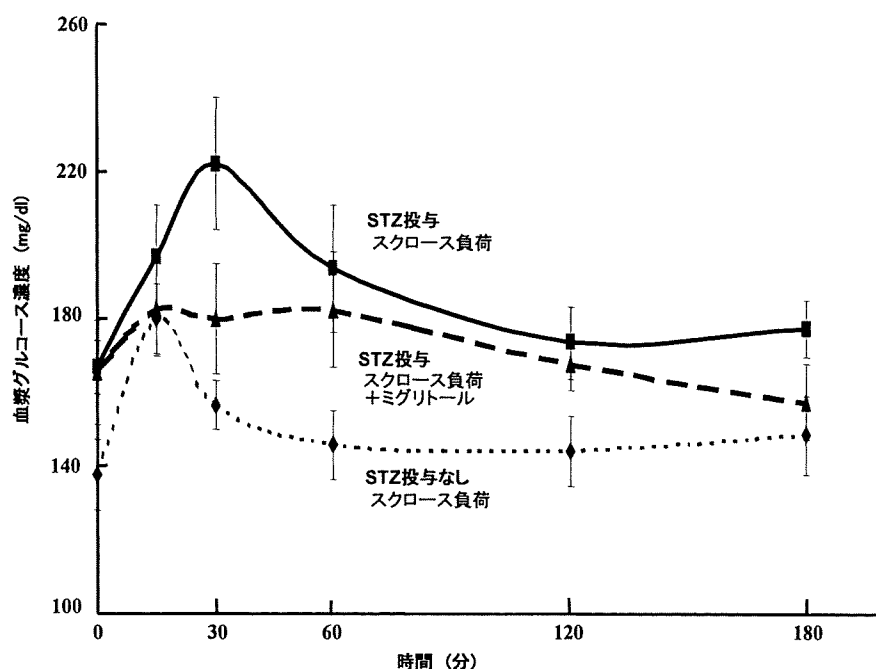


図2 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるスクロース負荷後の血糖値の変動

「絶食4時間後にスクロース投与」を3日間、毎日繰り返した。

平均値 ± SEM (N = 4/ 群)

2) 断続的な食後高血糖を評価するためのバイオマーカーの検索 [実験2]

streptozotcin をラットに低用量投与し、スクロース負荷によって一過性に食後の高血糖が起こるモデルを作成した。このモデル動物は、空腹時血糖値は 170 mg/dl 程度であるが、スクロースを投与することによって 30 分後に血糖値が 220 mg/dl 程度まで上昇し、その後、120 分後までにはほぼ投与前の血糖値に戻った。一方、このモデル動物にスクロースとともにミグリトールを投与したところ、血糖上昇は著しく抑制された (図2)。スクロース負荷 3 時間後の血液を用いて血球 mRNA のマイクロアレイ解析を行ったところ、炎症性サイトカイン IL-1 β および G タンパク質関連遺伝子群の発現が高まっていたが、これら

の発現はすべてミグリトールの同時投与によって抑制された (表1)。血球における IL-1 β の遺伝子発現の変動を、リアルタイム PCR 法によって確認したところ、streptozotcin の低用量投与を受けスクロースを 2 日間断続的に投与したラットでは、3 日目のスクロース投与前にすでに IL-1 β の遺伝子発現が高まる傾向がみられ、スクロース負荷 3 時間後にはその発現が著しく高まっていた。一方、3 日間のスクロース負荷と同時にミグリトールを投与したラットでは、3 日目のスクロース投与前の IL-1 β の遺伝子発現は対照ラットと同じ程度に低く、スクロース負荷 3 時間後でも IL-1 β の遺伝子発現の増大幅は少なかった (図3)。

表1 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるスクロース負荷3時間後の血球細胞 mRNA のマイクロアレイ解析

遺伝子名 (microarray)	STZ投与 スクロース負荷 /STZ投与なし	STZ投与 スクロース負荷 +ミグリトール /STZ投与なし
G protein pathway suppressor 2	14.8	2.6
protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	4.9	1.5
interleukin 1b	4.1	1.7
vasodilator-stimulated phosphoprotein	3.4	0.5
growth factor receptor bound protein 2-associated protein	3.2	1.7
cDNA clone UI-R-E1-fg-e-06-0-UI 5'	3.2	1.5
O88466 Zinc finger protein 106	3.1	1.0
Q8R5G6 Dual-specificity Rho-and Arf-GTPase activating protein 1	3.0	2.3
similar to RIKEN cDNA 3110050F08	2.9	1.2
similar to PAP-1	2.8	0.9

ストレプトゾトシン投与ラットではスクロース投与3時間後のmRNA発現量が2倍以上に増大した遺伝子が37個あり、そのうちの上位10を示した (ストレプトゾトシン非投与ラットと比較)

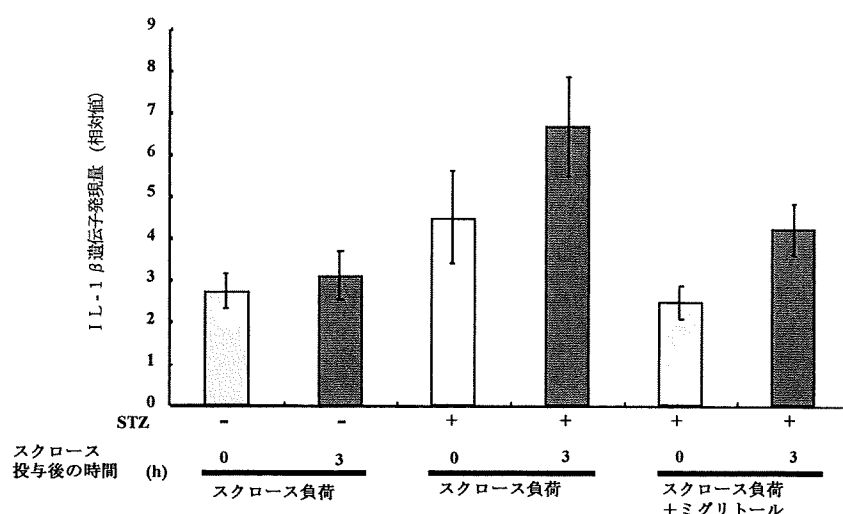


図3 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるスクロース負荷後の血球細胞IL-1βの遺伝子発現量の変動

「絶食4時間後にスクロース投与」を3日間、毎日繰り返した。平均値 ± SEM (N = 4/ 群)

3) モデル食品成分を用いたアディポネクチンの脂質代謝変動指標としての妥当性の検証

エピガロカテキンガレート (EGCg) を多く含む茶カテキン抽出物は、脂肪蓄積の抑制など脂質代謝に影響を及ぼすことから特定保健用食品の素材として利用されている。そこ

で、EGCgによる脂質代謝の変動を鋭敏に反映するバイオマーカーとしてアディポネクチンが利用できるかを検証してみた。非肥満型2型糖尿病モデルである GK ラットに0.2%EGCg 添加食を投与したところ、体重増加率および腸間膜脂肪、副睾丸脂肪はいずれもやや減少する傾向で大きな影響はもたら

さなかったにもかかわらず、投与開始8週間後から血漿アディポネクチン濃度が有意に

上昇し、投与開始12週間後には血清中性脂肪濃度が50%にまで低下した(図4)。

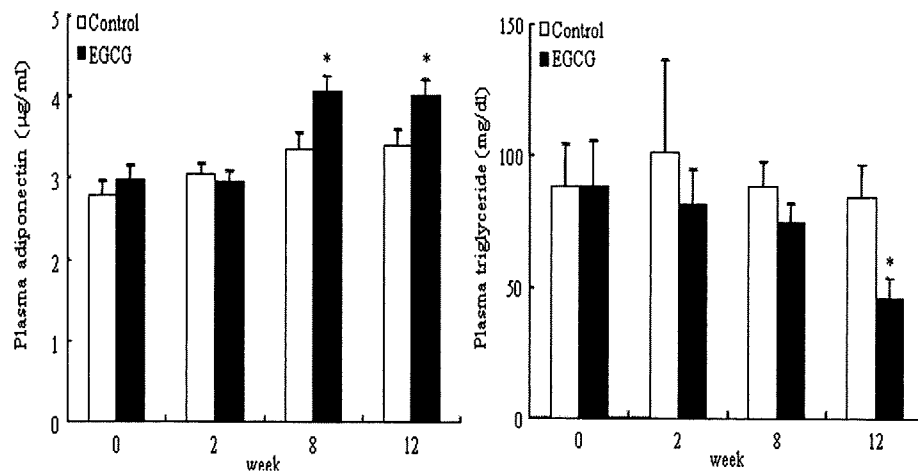


図4 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるエピガロカテキンガレート (EGCG) の投与によるGKラットの血漿アディポネクチン濃度の変動
 平均値 ± SEM (N = 6/ 群)

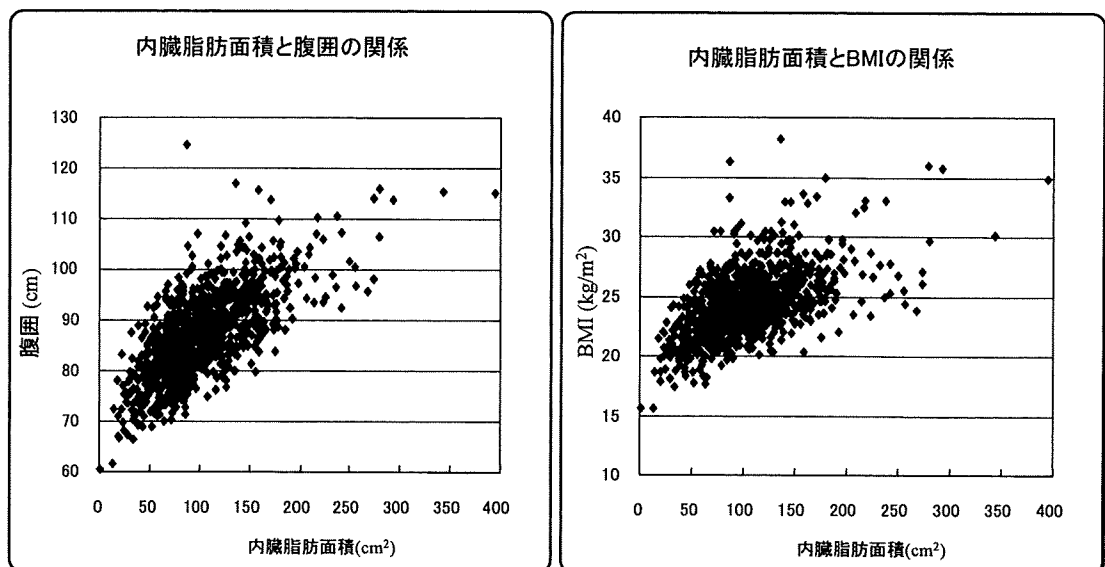


図5 人間ドック男性受診者におけるCTスキャン腹部内臓脂肪面積と腹囲およびBMIとの関連

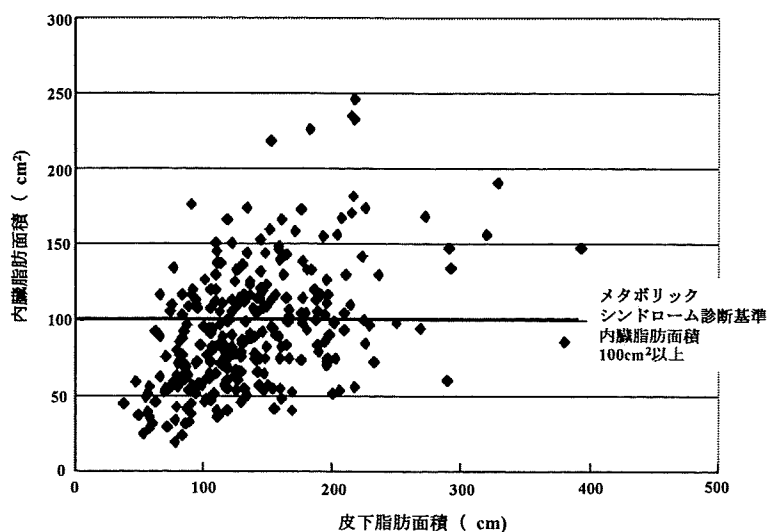


図6 人間ドック男性受診者におけるCTスキャン腹部内臓脂肪面積と皮下脂肪面積との関連

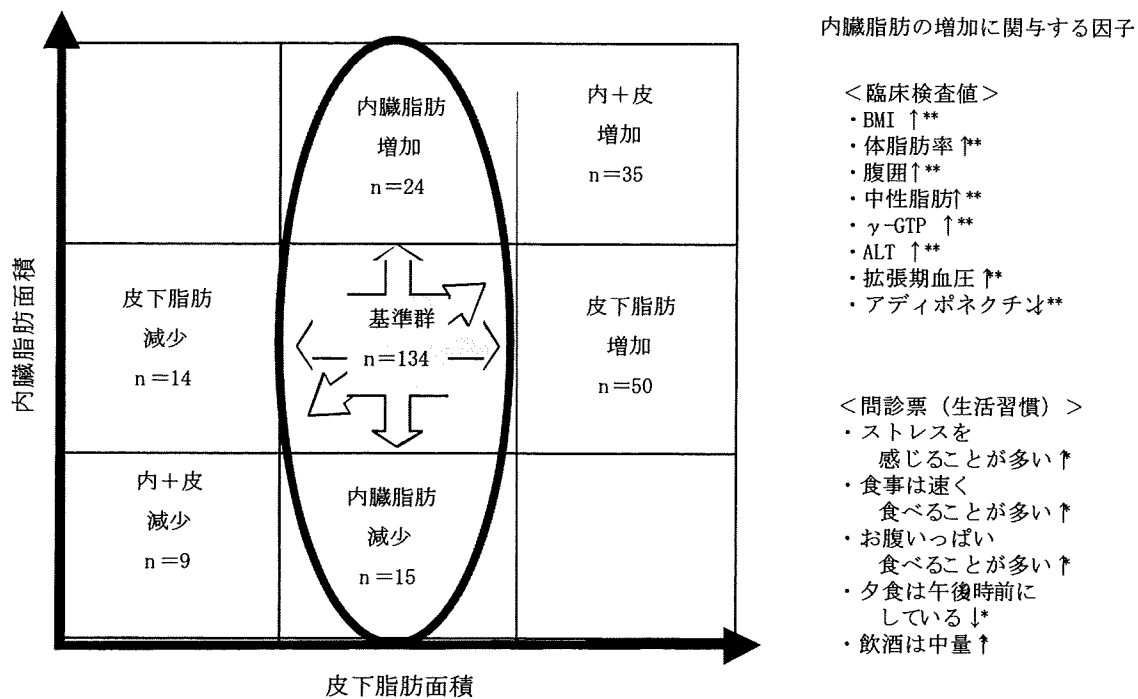


図7 内臓脂肪面積ならびに皮下脂肪面積の偏りによるグループ分け(左)と抽出された内臓脂肪の増加に関する因子(右)

男性基準個体419人から算出された基準範囲を中心にそれぞれ3区分(3×3分割)した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

b) CT スキャンによる内臓脂肪面積とメタボリック症候群関連指標との関連性の検討

男性基準個体 419 人から算出された CT 腹部スキャン基準値 (平均値±SD) は、皮下脂肪面積 114.6 ± 39.3 (75~154) cm^2 、内臓脂肪面積 84.6 ± 36.2 (48~121) cm^2 であり、どちらもほぼ正規分布を示した。内臓脂肪面積は腹囲および BMI と正の相関を示したが、特に腹囲とは高い相関 ($r = 0.599$) を示した (図 5)。一方、内臓脂肪面積と皮下脂肪面積の相関は低く ($r = 0.280$)、両者は同質でないことを示す分布の広がりが見られた (図 6)。

皮下脂肪面積が基準範囲にある群の中で、内臓脂肪面積が基準外に多い群と基準外に少ない群を比較することによって、内臓脂肪

の蓄積と関連する因子を抽出してみた。内臓脂肪面積が多い群で有意に ($P \leq 0.05$) 高まっている項目は、身体計測および臨床検査値としては、BMI、体脂肪率、ウエスト径、血清中性脂肪、 γ -GTP、ALT、拡張期血圧であり、この群の血漿アディポネクチン濃度は有意に低下していた。内臓脂肪面積が多い群の生活習慣の項目としては、ストレスを感じることが多く、食べ方が速く、腹いっぱい食べ、夕食は 21 時より前に食べるのが少ないという特徴が見られた (図 7)。血漿アディポネクチン濃度は、皮下脂肪面積と内臓脂肪面積の両方に有意な相関を示したが、皮下脂肪面積に対する相関 ($r = 0.172$) よりも内臓脂肪面積に対する相関 ($r = 0.241$) の方が高かった (図 8)。

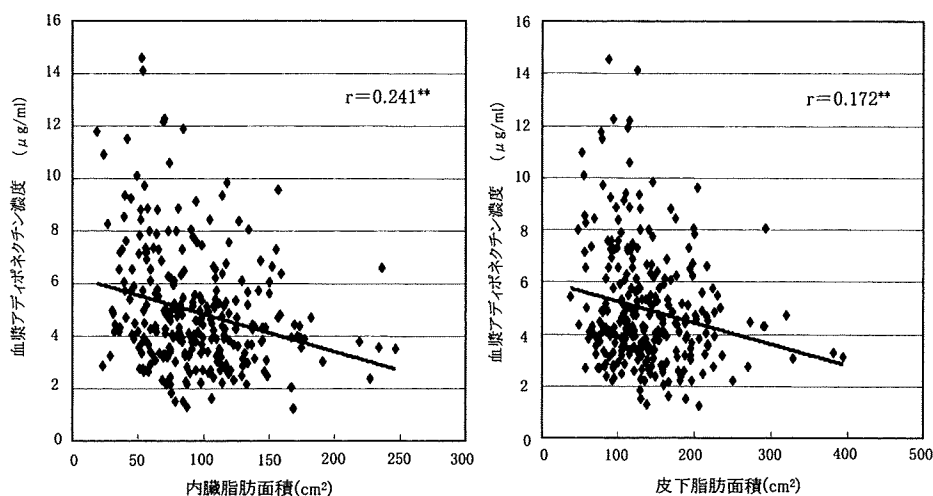


図 8 内臓脂肪面積ならびに皮下脂肪面積と血中アディポネクチン濃度との相関性

** $p < 0.01$

c) 健康診断受診者における候補バイオマーカーとメタボリック症候群関連指標との関連性

健康診断受診者の血漿アディポネクチン濃度は BMI ($r = -0.306$) および腹囲 ($r = -0.349$) と高い負の相関を示し、血清中性脂肪とも有意な負の相関 ($r = -0.190$) を示した。

一方、血漿インターロイキン-6 (IL-6) 濃度は、空腹時血糖 ($r = 0.337$) および HbA1c ($r = 0.342$) と高い正の相関を示し、血清中性脂肪とも有意な正の相関 ($r = 0.210$) を示した。食品群の摂取量をもとにして因子分析によって食品選択のパターンを類型化してみたところ、6つの因子 (食事パターン) が

抽出された。そのうち、因子2が血漿アディポネクチン濃度と有意な正の相関 ($r = 0.159$) を示した。因子2に寄与している食品群は、寄与度の高い順に、淡色野菜、緑葉野菜、きのこ、乳類、海藻、芋類であり、アルコールはこの因子と強く負の関連を示した。食物繊維の摂取量が少ない群では、食物繊維の摂取量が多い群と比較して血漿アデ

ィポネクチン濃度が低くなる傾向が見られたが、この血漿アディポネクチン濃度の低下は、特にアディポネクチン遺伝子の第45ヌクレオチド (ADN45) に変異 (T/G, G/G) を持つもの (44%に相当) では特徴的に見られた。この遺伝子多型を持つものでは、食物繊維の摂取量の低下によって血漿アディポネクチン濃度が有意に低下していた (図9)。

表2 アディポネクチンおよび IL-6 とメタボリック症候群関連指標との関連性 (相関係数)

	アディポネクチン	IL-6
BMI	-0.306**	0.131
腹囲	-0.349**	0.092
収縮期血圧	-0.115	-0.026
拡張期血圧	-0.123	0.079
空腹時血糖	-0.005	0.337**
HbA1c	-0.004	0.342**
血清中性脂肪	-0.190*	0.210*
血清総コレステロール	-0.024	-0.157
HDL-コレステロール	0.161*	-0.223**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

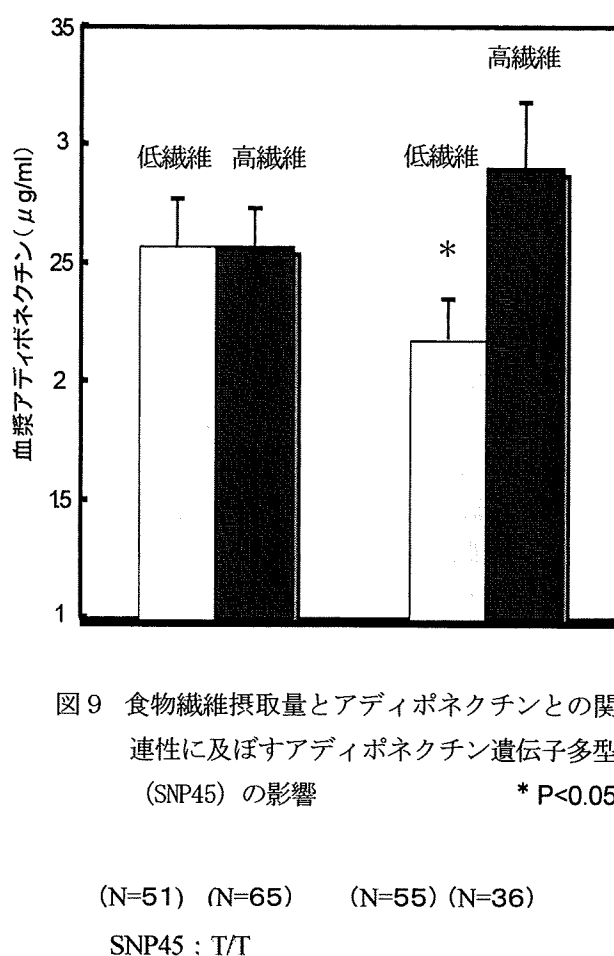


図9 食物繊維摂取量とアディポネクチンとの関連性に及ぼすアディポネクチン遺伝子多型 (SNP45) の影響 * $P < 0.05$

(N=51) (N=65) (N=55) (N=36)
SNP45 : T/T

D. 考察

1) 血糖、脂質代謝関連バイオマーカーの検索と妥当性

本研究では、メタボリック症候群の発症リスクの中で、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、それぞれ、短期的かつ初期的な変化をモニターできる血液指標を、糖尿

病発症モデルラット (ストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットおよび GK 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た。その結果、血糖上昇に起因する独自の変化を示す血液指標として、S100 タンパク質および IL-1 β などの炎症マーカーの血球細胞における遺伝子発現

が有用である可能性が明らかになった。特に、IL-1 β はわずか2回（2日間）のスクロース負荷による食後高血糖によって血球の遺伝子発現が高まることが示され、IL-1 β が間欠的な食後高血糖をモニターする鋭敏な指標として利用できる可能性が考えられた。一方、本研究では、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のアディポネクチンの有用性を検証するために、モデル食品成分としてエピガロカテキンガレート（EGCG）を GK ラットに投与したところ、血清中性脂肪濃度が低下する以前に血漿アディポネクチン濃度が上昇した。この結果は、血漿アディポネクチン濃度は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中間バイオマーカーとして有用だという考えを支持している。

2) 臨床研究におけるメタボリック症候群

関連バイオマーカー候補の選定

健診受診者の血液を用いて、血漿アディポネクチン濃度とメタボリック症候群関連指標との関連性を検討したところ、血漿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、内臓脂肪とも負の相関を示すことが明らかになった。因子分析によって血漿アディポネクチン濃度と関連する食事因子を抽出したところ、淡色野菜、緑黄色野菜、きのこ類の寄与率が高かった。食物繊維摂取量と血漿アディポネクチン濃度の関連性はアディポネクチン遺伝子多型 45 (TG/GG) を持つ者に顕著に見られ、この多型を持つ者では、食物繊維摂取量の低下によって血漿アディポネクチン濃度が低下することが明らかになった。内臓脂肪の増減に関与が強い生活習慣因子は、ストレス感受性向、夜遅い夕食、不規則な食事、一人の食事、早食い、満腹欲求などであった。日々の飲食行動パターンがこの内臓脂肪増加の背景にあると類推される。一方、血漿アディポネクチン濃度に対しては、皮下脂肪の増減の影響は内臓脂肪のそれよりも少ないことが確認された。血中アディポネクチン濃度は、皮下

脂肪の増加よりも内臓脂肪の増加とより強く相関するので、内臓脂肪量の変化を示す鋭敏なバイオマーカーとしての有用性が期待される。

一方、血中の IL-6 濃度はアディポネクチンとは異なり、健診受診者の肥満度とは関係なく、空腹時血糖および HbA1c と有意な正の相関を示すことが明らかになった。それゆえ、アディポネクチンと IL-6 は、それぞれ脂質代謝と糖代謝の異常を検出する独立した中間バイオマーカーとして有用であるものと考えられる。

以上の結果より、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

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る。

今後は、これまでの研究によって有効性が推定された中間バイオマーカーについて、その生理的な意義をモデル実験（細胞レベルおよび動物実験）によって検討し、メタボリック症候群関連疾患の発症プロセスの中でどのように位置づけるべきかを明確にするこ

とが必要であり、さらに、これまでの研究によって有効性が推定された血液バイオマーカーの効果判定指標としての有用性を、健常者およびメタボリック症候群境界領域者を対象とした食品選択教育ならびにモデル試験食品の臨床介入試験により評価することが必要と考えられる。