

F. 研究発表

1) 論文発表

- 1) 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
- 2) Fushimi, T., Suruga, K., Oshima, Y., Fukiharu, 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
- 3) Mochizuki, K., Suruga, K., Fukami, H., Kiso, Y., Takase, S. and Goda, T. : Selectivity of fatty acid ligands for peroxisome proliferator-activated receptor α , which correlates both with binding to cis-element and DNA binding-independent transactivity in Caco-2 cells. *Life Sci.*, 80, 140-145, 2006

2) 学会発表

- 1) 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, 2006.
- 2) 深谷奈々江, 田中雄太郎, 望月和樹, 合田敏尚 : 1 型ならびに 2 型糖尿病の発症および進展に関連する血液由来の新規分子マーカーの網羅的探索. 第 60 回日本栄養・食糧学会総会 (静岡), 講演要旨集, p.162, 2006.
- 3) 田中雄太郎, 深谷奈々江, 望月和樹, 合田敏尚 : 自然発症糖尿病モデルラット OLETF の糖尿病発症過程に及ぼす α -グルコシダーゼ阻害剤の抑制作用. 第 60 回日本栄養・食糧学会総会 (静岡), 講演要旨集, p.163, 2006.
- 4) 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, 2006.

- 5) 加瀬澤信彦, 合田敏尚 : 内臓脂肪および皮下脂肪の増減に関するライフスタイルは何か? 第 13 回日本未病システム学会学術総会 (東京), 抄録集, p.91, 2006.
- 6) 加瀬澤信彦, 島田昌也, 望月和樹, 合田敏尚 : 内臓脂肪評価マーカーとしてのアディポネクチン測定の意味. 第 13 回日本未病システム学会学術総会 (東京), 抄録集, p.92, 2006.

別紙 4 研究成果物の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論部タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山田和彦	新しい保健機能食品制度	公衆衛生	70(5)	358-362	2006
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
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/6J mice.	Am. J. Physiol.	291	1092-1099	2006
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)	:2188-2193	2006
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
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

Suruga, K., Tagami, H. and Livesey, G	maltodextrin: modeling of short-term indirect calorimetry measurements in healthy adults.				
---------------------------------------	---	--	--	--	--

食育時代の健康食品①

新しい保健機能食品制度

山田 和彦

提言

「医薬品—従来制度に基づく保健機能食品—いわゆる健康食品—一般食品」の体系のあり方について、「健康食品」の利用・製造・流通の実態は、国民の健康づくりに有効に機能しているか、「健康食品」の安全性・有用性の確保、消費者に対する適切な情報提供、利用者の期待に応える「健康食品」はどうあるべきか。これらをもとに、行政、関係業界、消費者の果たすべき役割、制度はどうあるべきか。以上のような点について広く意見募集を行い、平成17年6月9日には検討会による提言が厚生労働省から発表された(図1)。

「提言」においては、国民が健やかで心豊かな生活を送るためには、一人ひとりがバランスの取れた食生活を送ることが重要であるとともに、国民が日常の食生活で不足する栄養素を補給する食品や、特定の保健の効果を有する食品を、適切に利用することのできる環境整備を行うことが重要であるとされた。そのためには、国民が様々な食品の機能を十分に理解できるよう、正確で十分な情報提供が行われることが必要であり、「健康食品」において表示できる内容を充実させることがその主要な柱の1つとされている。そのなかで「健康食品」とは、広く、健康の保持増進に資する食品として販売・利用されるもの全般を指し、保健機能食品も含むものであり、「いわゆる健康

食品」とは、「健康食品」から保健機能食品を除いたものであるとの立場から、制度の改善点を提言している。

「おわりに」では、下記のごとく結んでいる。

「いわゆる健康食品」に見られる「健康に有効」「体にいい」などの曖昧な表示が減ることにより、国民に正確な情報が広く提供され、国民1人1人の食品の適切な選択に資することを期待する。事業者は、「健康食品」の安全性について第一義的責任を有することは言うまでもないが、「健康の保持増進の効果」の表示を行うにあたっては、国民が混乱することの無いよう、自らその責任を自覚し、利益のみ最優先するのではなく、モラルを持って適切な表示を行うことが重要である。また、関係団体が作る自主基準の活用等により信頼を高めるよう努めるとともに、安全性・有効性に関する情報の収集・分析・提供も積極的に行う必要がある。また、健康と食に関する情報が氾濫する中で、マスメディア等が国民の健康づくりにおいて情報源として果たす役割は非常に大きいことから、「健康食品」について正確で分かり易く迅速な情報提供を期待したい。行政、事業者、消費者、マスコミ、関係有資格者、関係団体等がそれぞれの役割を適切に果たすことにより、「健康食品」の表示の信頼性が高まり、真に国民の健康づくりに役立つことを期待する。新制度が国民の健康づくりに適切な役割を果たしていくことを期待しているが、今後、新制度の実施状況をきちんと調査し、必要に応じ

やまだ かずひこ：(独)国立健康・栄養研究所食品表示分析・規格研究部 連絡先：☎ 162-8636 東京都新宿区戸山1-23-1

国民が健やかで心豊かな生活を送るためには、1人1人がバランスの取れた食生活を送ることが重要であるとともに、国民が日常の食生活で不足する栄養素を補給する食品や、特定の保健の効果を有する食品を適切に利用することのできる環境整備を行うことが重要。

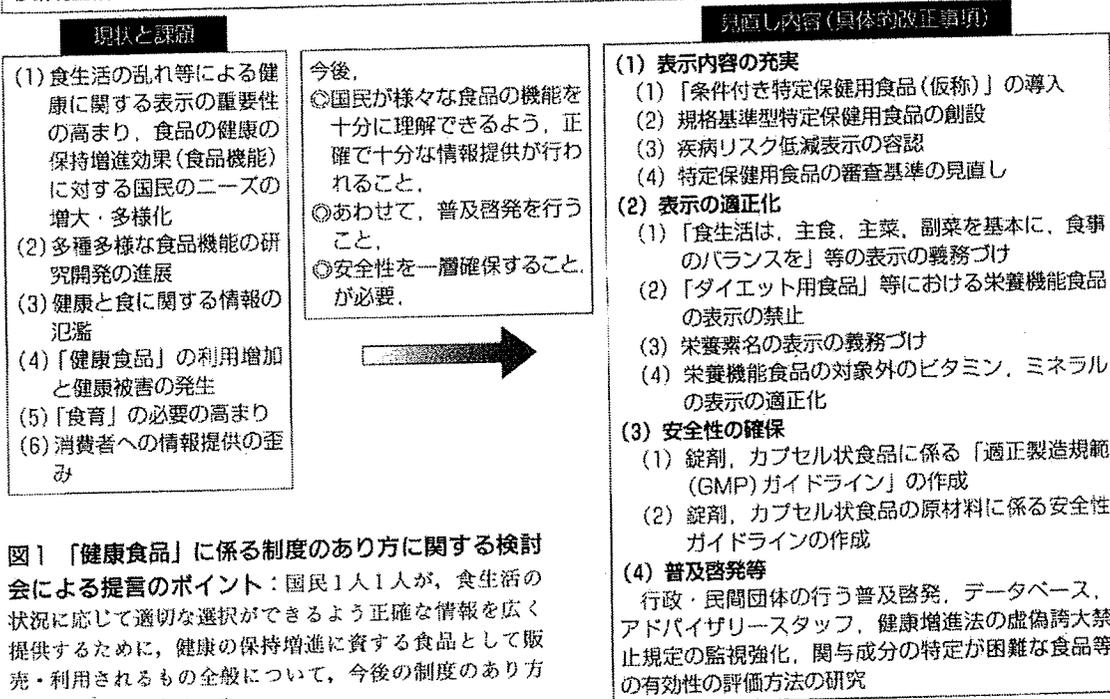


図1 「健康食品」に係る制度のあり方に関する検討会による提言のポイント：国民1人1人が、食生活の状況に応じて適切な選択ができるよう正確な情報を広く提供するために、健康の保持増進に資する食品として販売・利用されるもの全般について、今後の制度のあり方の方向性をまとめている。

てさらなる見直しを行うべきである。あわせて、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等が多数あると考えられる。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。

新しい保健機能食品制度

「提言」を受け、従来の特定保健用食品の許可制度を維持したうえで、科学的根拠に基づく表示内容のいっそうの充実を図ることを目的に、具体的には以下の①～③に関し、特定保健用食品の審査基準の見直しについて検討がなされた。①条件付き特定保健用食品の導入、②規格基準型特定保健用食品の創設、③疾病リスク低減表示の容認、である(図2)。

①～③について、特に有効性の考え方を中心に具体的な実施についての検討を行い、栄養機能食品の表示の適正化なども含め、平成17年2月

からと7月から、一部ずつが施行されている。

①については、現行の特定保健用食品に比べ、作用機序(関与成分の体内での作用の仕方)、および有効性を確認する試験の方法、の2方向から審査基準が見直された。許可表示内容は、「○○を含んでおり、根拠は必ずしも確立されていませんが、△△に適している可能性がある食品です」とし、「条件付き特定保健用食品」と表示したマークをつけることになり、現行の特定保健用食品と差別化された。

②については、すでに許可されている特定保健用食品のうち、一定の基準、すなわち許可件数が100件を超えた保健の用途の表示に係る関与成分のうち、最初の許可から6年経過し、複数の企業が許可を取得しているものを満たすものについて、研究班で検討された。その結果、「お腹の調子を整える」旨の保健の用途を表示する成分として、3種類の食物繊維ならびに6種類のオリゴ糖につ

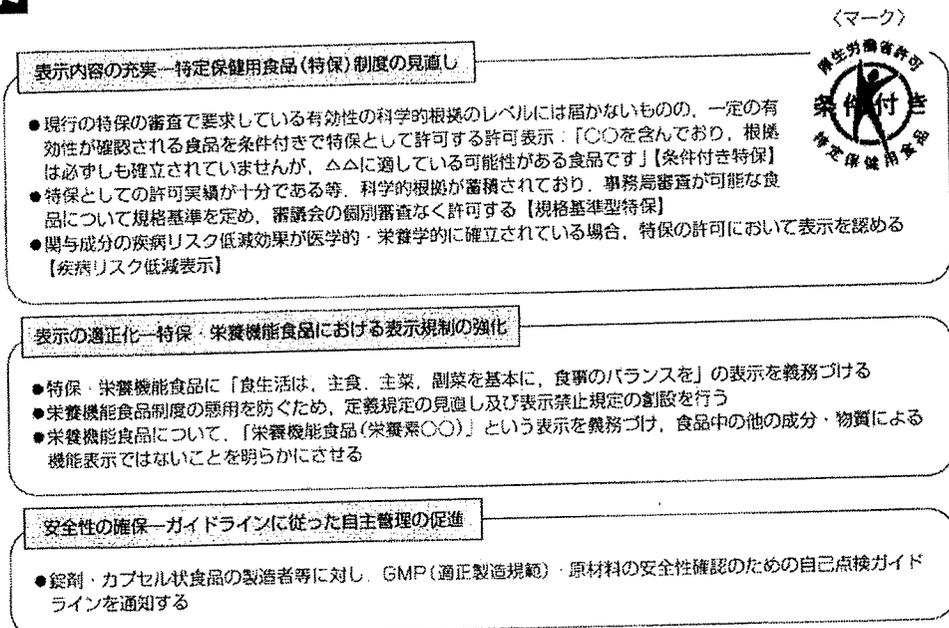


図2 「健康食品」に係る見直し内容：新しい特定保健用食品規格、保健機能食品の表示規制の強化、製造者に対する適正製造規範の作成などに関しての方向性がまとめられた。

いて規格基準が定められている。原則として、関与成分と同種の原材料(他の食物繊維またはオリゴ糖)を配合してはならない。当該食品として摂取する量の3倍以上の範囲での過剰用量における摂取試験が実施されていることが必要である。

③については、「カルシウムと骨粗鬆症」「葉酸と胎児の神経管閉鎖障害」に関して、研究班でその科学的根拠等が収集され、摂取量の上限值・下限値等も定められた。申請に当たっては、摂取量が上限値・下限値の範囲内であれば有効性についての試験は不要とし、安全性についてのヒト試験のみ求められている。また、カルシウム・葉酸以外の関与成分について、今後に表示許可を求める場合には、必要な科学的根拠の考え方についても示すことになっている。特定の保健の用途に係る表示は、カルシウムの場合は「この食品はカルシウムを豊富に含みます。日頃の運動と、適切な量のカルシウムを含む健康的な食事は若い女性が健全な骨の健康を維持し、歳をとってからの骨粗鬆症になるリスクを低減するかもしれません」であり、葉酸の場合は「この食品は葉酸を豊富に含

みます。適切な量の葉酸を含む健康的な食事は、女性にとって、二分脊椎などの神経管閉鎖障害を持つ子どもが生まれるリスクを低減するかもしれません」となっている。また、摂取をする上の注意事項はそれぞれ、「一般に疾病は様々な要因に起因するものであり、カルシウムを過剰に摂取しても骨粗鬆症になるリスクがなくなるわけではありません」および、「一般に疾病は様々な要因に起因するものであり、葉酸を過剰に摂取しても神経管閉鎖障害を持つ子どもが生まれるリスクがなくなるわけではありません」である。

疾病リスク低減表示の特定保健用食品を導入した主な経緯については、以下のようなものである。構造機能強調表示とは別に、疾病リスク低減表示を認めようという国際的な健康強調表示の流れにも合致する。諸外国ですでに認められている疾病リスク低減表示制度を見ると、摂取過剰となっている脂肪、コレステロール、ナトリウム等について、例えば、「低ナトリウムの食事は高血圧になるリスクを減らします」等、摂取量を減らすことによる疾病リスク低減表示が一般食品に認められてい

る例がある他、当該食品または栄養素の疾病リスク低減効果について、科学的な根拠が乏しいとして、限定的な表示をさせているものがある。

これらを日本における疾病リスク低減表示の考え方に取り入れることもありうるが、現行の特定保健用食品の制度になじむものであるかどうかについての検討がされた。特定保健用食品の考え方は、当該許可食品を通じた関与成分の積極的な摂取が、健康の保持増進に寄与するというものである。「低ナトリウムの食事は高血圧になるリスクを減らします」等、食品中のある成分の摂取量を直接減らすことによる効果の発現は、特定保健用食品の考え方とは発想が逆であり、特定保健用食品の制度になじまないものと考えられる。

一方、低ナトリウム等の表示は特別用途食品(病者用食品)において許可がなされている。また、科学的根拠の考え方としては、国内外において複数の疫学的研究があり、その疫学的研究は試験デザイン、研究の質等から見て、十分な科学的根拠であると判断されるものであることとされた。介入研究だけでなく、観察研究も存在することも必要である。さらに複数の疫学的研究をメタアナリシスした論文があることも必要とされた。

例外となるのは、すでに多くの諸外国において一致した公衆衛生政策がとられており、その根拠となる疫学的研究が共通していることが示された場合等が考えられる。

一方、栄養機能食品については、消費者に誤認させるような悪用を防ぐための表示禁止規定の創設を新たに行っている。「栄養機能食品(栄養素〇〇)」という表示を義務づけて、食品中の他の成分・物質による機能表示ではないことを明らかにさせるようになった。同時に、特定保健用食品ならびに栄養機能食品には、「食生活は、主食、主菜、副菜を基本に、食事のバランスを」の表示を義務づけることになった。

また、食品における栄養表示の根拠となる数値については、「日本人の食事摂取基準(2005年版)」策定に伴い、「第6次改定栄養所要量一食事摂取基準」をもとに算出し、食品における栄養表

示に用いていた栄養素等摂取目安量の見直しが必要となった。新しく見直され設定された栄養素等表示基準値(NRV: Nutrient Reference Value)は、これを用いて定められる①栄養機能食品の1日当たり摂取目安量に含まれる栄養成分の上限値および下限値、および②栄養表示基準のための「含む旨の表示」、「高い旨の表示」の値に影響し、当該食品当たりの栄養成分の量が若干変更された。平成17年7月1日付けで施行されている。

普及啓発

保健機能食品制度に関する国民の認知および理解が十分でないとの指摘があり、パンフレットやホームページの改訂により、見直し内容を含め、制度をわかりやすく広報し、周知を図ることが重要とされ、普及啓発が推進されている。そのためには、厚生労働省をはじめ(独)国立健康・栄養研究所の「健康食品」の安全性・有効性情報(<http://hfnet.nih.go.jp/main.php>)等のデータベースを活用し、国民の食品の選択に資するための科学的かつ客観的な情報を提供している。

さらに、食品の持つ機能、その必要性、使用目的、活用方法等について理解し、正しく情報を提供できる身近な助言者として、民間におけるアドバイザースタッフの養成・活用が勧められており、(独)国立健康・栄養研究所認定の栄養情報担当者(NR)等の活躍が期待されている。一方、虚偽誇大表示の抑制のために、健康増進法第32条により禁止されている、食品として販売するものに関して行う健康の保持増進効果等に係る虚偽誇大広告等の表示について、引き続き監視指導を行い、適正化に努めている。

消費者が自分の健康維持増進等の目的に合致した食品や消費者の食生活状況や健康状態に応じた食品を、安全にかつ適切に選択し、摂取することを可能とすることが大切であり、食品の持つ成分の機能およびその活用方法等について理解し、正しく情報を提供できる助言者の存在はますます重要と考える。

特集

参考資料ならびにホームページ

- 1) 厚生労働省：日本人の食事摂取基準(2005年版)．第一出版，2005
- 2) 田中平三：保健機能食品制度の創設をめぐって．日医雑誌 126：792-805，2001
- 3) (独)国立健康・栄養研究所(監修)：健康・栄養食品アドバイザー・スタッフ・テキストブック．第一出版，2005
- 4) 「健康食品」の有効性，安全性，規制制度について(座談会)．会報ヒューマンサイエンス(ヒューマンサイエンス財団)15(4)：4-16，2004
- 5) 特定保健用食品の表示許可等一覧等について：厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/topics/0102/tp0221-2.html>
- 6) 「健康食品」に係る制度の見直しについて：厚生労働省ホームページ <http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/mhlw/news/2005/050203/170203-2.html>
- 7) 保健機能食品の表示に係る見直し等について：厚生労働省ホームページ <http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/mhlw/news/2005/050704/050704.html>
- 8) 「健康食品」に係る制度に関する質疑応答集：厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/topics/050131/dl/tauchi07.pdf>
- 9) 保健機能食品等に係るアドバイザー・スタッフの養成に関する基本的考え方について：厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/topics/2002/03/tp0313-1.html>
- 10) 独立行政法人国立健康・栄養研究所，「健康食品」の安全性・有効性情報のホームページ <http://hfnet.nih.go.jp/main.php>

6. サプリメントの研究デザインとその評価

濱口 恵子*¹ 志村 二三夫*²

要 旨

サプリメントの安全・安心な利用の原点は科学的根拠に基づく利用である。これを支える人を対象とした研究のデザインは多彩であるが、無作為化比較試験は、他に比べて、より信頼性の高い情報を得るのに適している。実際、サプリメントの安全性や有効性に関する情報源として定評のあるデータベース、また特定保健用食品制度等の食品の健康表示に係る制度においては、無作為化比較試験による知見が最も重視されており、この研究デザインが高く評価されていることがわかる。

Key words サプリメント, 研究デザイン, EBM, 無作為化比較試験,
Natural Medicines Comprehensive Database, 特定保健用食品

はじめに

日本サプリメントアドバイザー認定機構によると、サプリメントは“食品の機能を強調したものであり、医薬品と食品の性格を兼ね備えるもの”とされる。より具体的には、サプリメントは形状(従来医薬品的な形状とされてきたカプセルや錠剤等が多い)や有効性(健康の維持・増進等の用途における)の面で医薬品的な性格をもつが、食品素材を原料とし、食薬区分の観点からは食品に区分される¹⁾。一方、表示や広告等によってふつうの食品よりも健康によいと

称して売られている食品を総称して、一般に健康食品と呼ぶ。したがって、サプリメントは健康食品の1タイプである。本稿では、このようなサプリメント/健康食品の研究デザインのうち、人における有効性の実証に用いられる研究デザインとその評価を中心として述べる。

I. 科学的根拠に基づく サプリメントの利用の重要性

サプリメント/健康食品の分野にも、EBM(科学的根拠に基づく医療)に準じた理念が急速に浸透している。有害作用による健康被害、効果

Study design and assessment of the usefulness of dietary supplements.

*^{1,2} Keiko HAMAGUCHI and Fumio SHIMURA, PhD

Department of Food and Nutrition, Jumonji University

十文字学園女子大学 人間生活学部食物栄養学科(〒352-8510 埼玉県新座市菅沼 2-1-28)

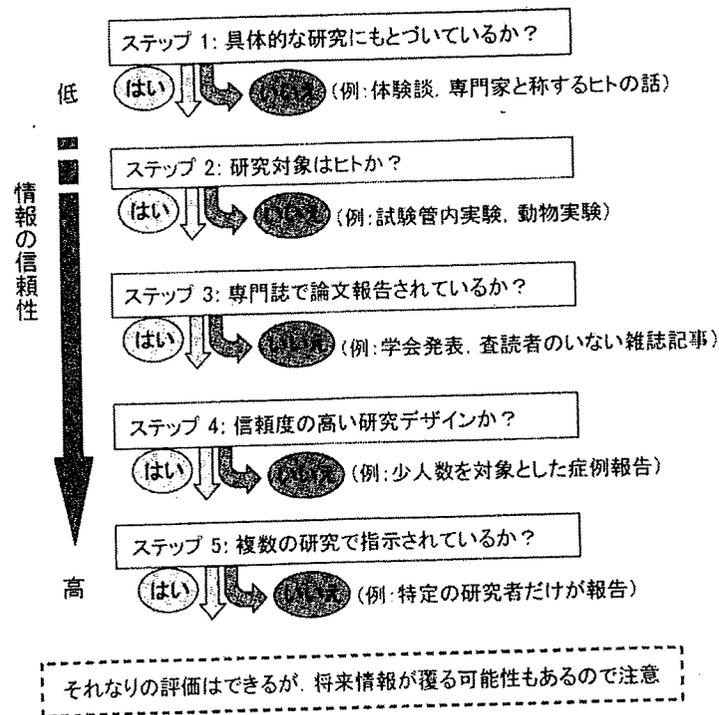


図1 健康情報の信頼性を評価するためのフローチャート

がないままに使い続けることによる疾病の悪化や適切な医療機会の逸失、また経済被害といった負の側面を防止し、安全・安心な利用をはかるには、当然ながら、科学的根拠に基づく利用が原点となる。ちなみに、消費者に健康食品の情報を提供する役割を担うアドバイザースタッフは、「有効性と安全性が、科学的に正しいものであるかを判断できる応用力が求められ、また EBM の観点から科学的根拠を調べた試験研究の種類を見極めて、有効性の信頼度を判断できなくてはならない。」²⁾とされる。

情報の信頼性を評価する際には、図1のフローチャート³⁾のような一応の目安に沿って進むことができる。具体的な研究に基づかない情報は話にならないが、仮にそうであっても、試験管内実験や動物実験の成績は、信頼性が不十分とされる。確認された有効性が、人において普遍的には認められないことがよくあるためである。一方、有害作用については、人でも同じ

ような現象が少数例として生じる可能性があり得るので、十分な注意を払うとともに、何らかの対策が求められる。したがって、食品の安全性確保をめざす健康影響評価においては、*in vitro* あるいは動物を用いた *in vivo* 試験のデータが重視され、動物を用いた試験では、一般毒性のほかに、生殖・発生毒性、神経毒性、免疫毒性、発癌性等の特殊毒性を指標として綿密な検討がなされる⁴⁾。

II. サプリメントの研究デザイン^{5)~8)}

A. 研究デザインによる臨床医学研究の分類

サプリメントの研究の主な目的は、健康の維持・増進等の用途における有効性および安全性の科学的根拠を得て、その開発や人での実証に役立てることにある。開発段階では、生体機能素子(例えば、酵素、受容体)や培養細胞等を用いた *in vitro* の実験、動物実験による研究を通して、機能性成分の探索や機能性評価が行われ、

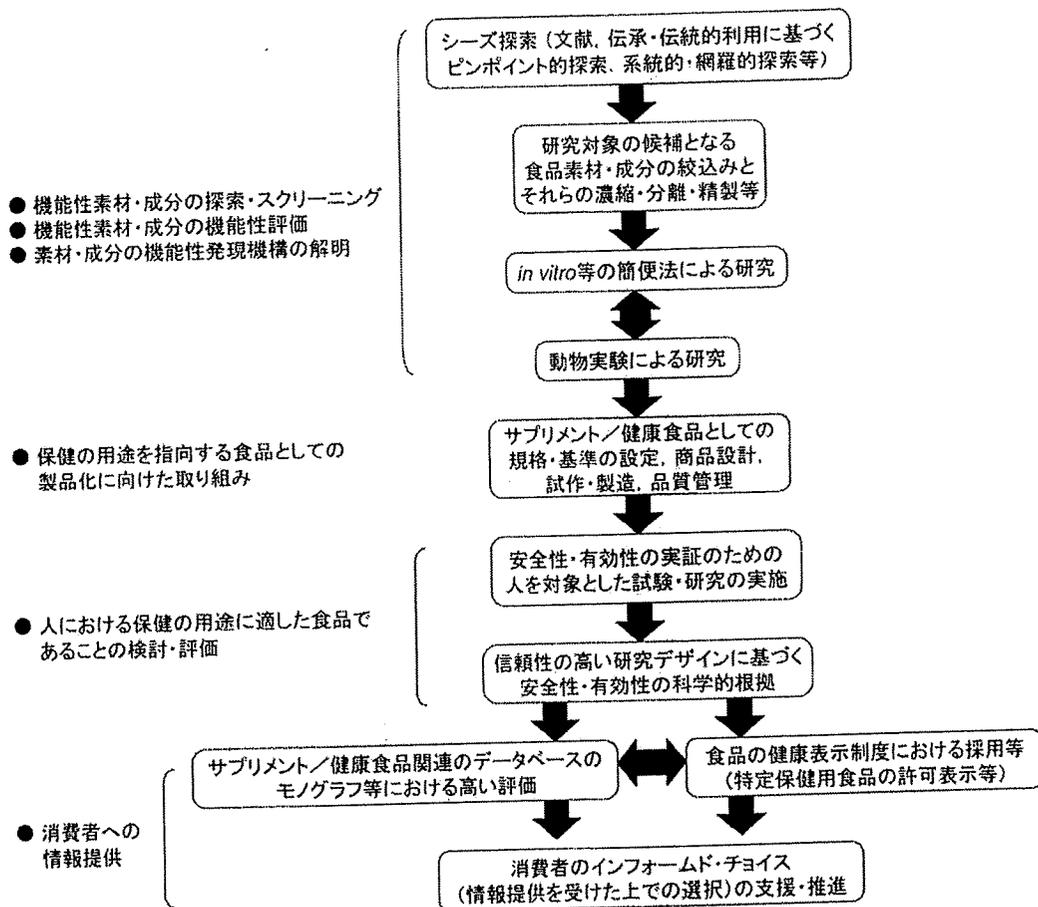


図2 サプリメント/健康食品の開発および検討・評価の流れ

また機能性発現機構の解明等をめざす(図2)。その上で、人を対象とした研究によって有効性・安全性が実証されれば、健康食品関連のデータベース等において高い評価を勝ち得るとともに、別格のサプリメント/健康食品として、踏み込んだ健康表示が可能な特定保健用食品への道も開かれる。これらに基づく公正・公平な情報提供によって消費者のインフォームド・チョイスを支援・推進することが可能となり、もってサプリメント/健康食品が国民の健康の維持・増進に資することを期待できる。

サプリメントの有効性・安全性を人において実証するための研究は、臨床医学研究によって行われる。臨床医学研究は研究デザイン(研究

方法)に応じて、記述的研究と分析的研究に大別され、分析的研究はさらに観察的研究と実験的研究(介入研究)に分けられる(表1)。

記述的研究は、健康関連事象の頻度や分布の測定とその記述を中心とする研究であり、規定要因との関連性の解析・検討には適さない。分析的研究では、健康関連事象の頻度や分布の測定とともに、その規定要因との関連性が解析・検討される。

観察的研究では、研究者自身は対象集団、集団構成員に対して何らの介入もしない。これに対して、実験的研究では、研究者自身が対象集団、集団構成員に対して意図的に介入し、健康関連事象の規定要因の変容をはかる。

表1 臨床医学研究の主なデザイン

記述的研究 ● 症例研究, 症例報告 ● 症例集積研究 ● 横断研究, 調査(有病率/存在率等) ● 記述的疫学研究 ● その他 分析的研究 観察的研究 ● 症例対照研究(後ろ向き) ● コホート研究(前向き) ● その他 実験的研究(介入研究) ● 対照のある臨床試験 ○ 無作為化比較試験(RCT) パラレル試験(並行群間試験) クロスオーバー試験(交差試験) ○ 無作為化をしない比較試験(CCT) パラレル試験(並行群間試験) クロスオーバー試験(交差試験) ○ その他 ● 対照のない臨床研究

以下に、主な研究デザインの概要を紹介する。

B. 症例対象研究(後ろ向き研究)

1. 症例対照研究の進め方

・すでに疾病罹患その他の健康関連事象に問題のある人々を“症例”として選ぶ。

・この“症例”と性別や年齢などの要因が似た人を“対照”に選ぶ。“対照”は“症例”と同じ地域の健康な住民や、“症例”と同じ病院の患者や健診の受診者などから選ばれる。

・“症例”と“対照”の双方に対して、疾病罹患等の原因と考えられる仮説要因(例えば、食生活、サプリメントの素材や成分の摂取状況等)を、過去にさかのぼって調べ、両者で比較する。

2. 症例対照研究の長所と短所

長所：無作為化比較試験やコホート研究よりも、手間や労力が少ない。発生頻度の低い疾病にも対応できる。

短所：仮説要因を過去にさかのぼって調査するため、仮説要因と疾病との関連を過大評価したり、反対に過小評価する危険性がある(思い

出しバイアス)。また、「住民対照」や「病院対照」を選択する際に、選択バイアスの生じるおそれがある。したがって、得られた結果の科学的根拠は、無作為化比較試験やコホート研究よりも低い。症例対照研究の結果を解釈する際には、これらの問題点を十分に考慮する必要がある。

C. コホート研究(前向き研究)

1. コホート研究の進め方

・多数の健康人の集団を対象に、まず疾病罹患等の原因となる可能性のある要因(例えば、食生活、サプリメントの素材や成分の摂取状況、喫煙、化学物質への曝露、血液データ等)を調査する。

・この集団(コホート)を追跡調査して、疾病に罹る者を確認する。コホートの語源は、古代ローマの数百人規模の軍団を意味する言葉に由来する。

・最初に調査した要因と、その後の疾病の発生との関連を分析する。例えば、喫煙者と非喫煙者で、肺癌の発生率を比較する。

・この方法で得られた古典的な知見として、血清コレステロール値と心筋梗塞との関連や、喫煙と肺癌の関連等がある。

2. コホート研究の長所と短所

長所：症例対照研究に比べて、得られた結果の科学的根拠が高い。最近では、世界中で大規模コホート研究が進められている。

短所：コホート研究は、多人数の集団(数万から数十万人)を長期間(5~20年)にわたり追跡調査する必要があり、多大な手間と費用がかかる。発生頻度の低い疾患への対応は難しい。

D. 無作為化比較試験(randomized controlled trial: RCT)

無作為化比較試験は、疾病の予防法や治療法を評価するために実施する臨床試験の方法の1つであるが、サプリメントの有効性や安全性の評価においてもゴールドスタンダードといえる。上記の症例対照研究やコホート研究とは異なり、介入研究にあたる。

1. 無作為化比較試験の進め方

・被験者を、乱数表やコンピューター等を用

い、無作為に 2 群に分けて両群の特性を均等化する。この操作を無作為化、または無作為割付という。無作為とは、作為を入れないというよりも、恣意の入れぬよう確率的に選ぶという意味である。

・一方の群(介入群)には、評価しようとする予防・治療法(サプリメントの評価ではその投与)を適用する。他方の群(対照群)には、評価しようとする予防・治療法は適用せず、従来の方法を行ったり、評価しようとする医薬品やサプリメントと外見は同じであるが、関与成分を含まないプラセボを投与する。

・その後、エンドポイントとして、臨床検査値、症状の重症度、疾病の罹患率、死亡率等の評価項目を 2 群間で比較する。介入群におけるこれらの評価項目の指標が、対照群よりも望ましい方向にあれば、予防法や治療法の有効性が示されたことになる。

・介入をインプットと考えた時に、症状の軽減や死亡率の低下のような、この介入から得られる全ての結末をアウトカムという。

2. 無作為化比較試験の長所と短所

長所：例えば、試験に協力的な者ばかりが介入群となり、非協力的な者ばかりが対照群に設定されると、介入の実際の効果を過大評価する危険性がある(選択バイアス)。無作為化比較試験では、研究者の恣意や対象者の希望を排除し、対象者を無作為に分けるので、介入群と対照群の特性をそろえられ、介入の効果をより正しく評価できる。最も質の高い臨床医学試験の方法とされている。無作為化は、介入群と対照群の特性の均等化等のために行うが、これをしない比較臨床試験(Controlled Clinical Trial, CCT: 準無作為化比較試験ともいう)もある。CCT は研究デザインとしてのランクが RCT より低い。

短所：無作為化比較試験は、他の研究方法と比べて、費用や手間がより多くかかる。また、対象者自身の希望や意志を排除して群分けするので、事前の十分な説明と同意がないと倫理的な問題を生じる場合がある。

3. 二重盲検試験

サプリメント/健康食品の RCT や CCT では、被験者と介入者・評価者(通常、医師)の両者とも、摂取されたものが試験対象品なのかプラセボなのかをわからないようにした二重盲検試験が代表的な方法となっている。これに対し、摂取されたものが試験対象品なのかプラセボなのかを、被験者だけがわからないようにした試験を単盲検試験といい、被験者と介入者・評価者双方が知っている試験を非盲検試験という。非盲検試験はオープンラベル試験やオープントライアルとも呼ばれるが、あくまでも RCT や CCT の方式の 1 つである。インターネットや書物などには、対照群が設定されていない研究をオープントライアルと呼んでいる場合が時折見受けられるので注意を要する。

4. パラレル試験とクロスオーバー試験

RCT や CCT の進め方には、介入群と対照群とが同時並行で試験を受けるパラレル試験(並行群間比較試験ともいう)がある。一方、クロスオーバー試験(交差試験または交互試験ともいう)では、被験者を 2 群に分け、各被験者が時期を互いにずらして、介入群あるいは対照群になって試験を受け、それぞれの結果を集計して、評価が行われる。個人間比較が前提となるパラレル試験とは異なり、クロスオーバー試験ではいずれの群に割り当てられても、前期と後期で別の処置を受けるので、各被験者という個人内で 2 つの処置の効果を比較できる。個人内比較によって、個人差を解消できる点がクロスオーバー試験の最大の長所である。しかし、デメリットとして、前期の処置の効果が残る可能性のあること、また後期試験に入る前に脱落する被験者がでるといった短所もある。

5. 系統的レビューとメタアナリシス

図1では、上質の研究デザインによる知見であるとともに、複数の研究者に支持されていることで、最も高い信頼性が得られるとされている。その確認には、多数の論文を探索して、一定の系統的な手順に沿って内容をまとめる作業が必要であり、これを系統的レビュー(Systematic

Review) という。近年は、サプリメント素材関係はもとより、医学・生物学分野の論文の多くは英文で書かれ、米国国立医学図書館の文献データベース PubMed に収載されているので、そこを中心に客観的な視点で信頼度の高い文献を探し、批判的な検討・評価を行うことになる。系統的レビューの際に、同じ問題を扱う 2 つ以上の試験から得られる定量的な証拠について、一定の形式に従って行う統計的な解析をメタアナリシスという。一般的にメタアナリシスでは、さまざまな試験で得られた要約統計量(生データではなく)を統計的に結合して解析する。

サプリメントの安全性や有効性に関するデータベースにおけるモノグラフの作成や、食品の健康表示制度の枠組みにおける検討・評価の際には、系統的レビューが有効な手段となる。The Cochrane Database of Systematic Reviews⁹⁾ は RCT の系統的レビューのデータベースであり、EBM の情報源として権威が高い。ちなみに、日本人の食事摂取基準(2005 年版)¹⁰⁾では、

系統的レビューを導入して、従来よりも科学的裏づけの強い摂取基準が策定されている。

III. サプリメントの研究デザインの評価

サプリメントの有効性・安全性を調べた研究結果の信頼性は、研究デザインによって大きく異なる。例えば、米国予防サービス特別委員会(United States Preventive Services Task Force)は、研究デザインに応じて、疾病予防施策に関する知見の信頼性を表2のように評価している¹¹⁾。

米国食品医薬品局は、ダイエタリーサプリメント等における健康表示の適格化(Qualified Health Claim)をめざして、その科学的根拠の区分を次のように示している¹²⁾。B: 表示内容を支持する科学的根拠はあるが、確定的ではない、C: ある種の科学的根拠は表示内容を示唆する・・・、D: 表示内容を示唆する科学的根拠はごく限られた予備的なものである・・・。この区分のための知見を提供する研究は、そのデザインに応じて表3のように評価されており、

表2 疾病予防施策に関する知見の質と研究デザインの関係¹¹⁾

クラス I	少なくとも 1 つの適切な無作為化比較試験から得られた知見。
クラス II-1	無作為化されてはいないが適切に設計された比較試験から得られた知見。
クラス II-2	適切に設計されたコホート研究または症例対照研究から得られた知見。 1 つ以上の対象集団ないし研究組織から得られた知見であることが望ましい。
クラス II-3	予防施策の実施前後を比較する時系列研究複数から得られた知見。 対照群を設定しない臨床試験で得られた劇的な知見(1940 年代のペニシリン治療の導入の結果等)は、このタイプの知見とみなすこともできる。
クラス III	臨床経験に基づく権威者の意見。 記述的研究や症例報告。 専門家団体の見解。

表3 ダイエタリーサプリメント等における健康表示の適格化のための科学的根拠の区分(米国食品医薬品局による)

タイプ 1	● 無作為化比較介入試験
タイプ 2	● 前向き観察コホート研究
タイプ 3	● 非無作為化比較介入試験 (同時進行または歴史的な対照群との比較) ● 症例対照研究
タイプ 4	● 横断研究 ● 介入試験における二次的エンドポイントの分析 ● 症例集積研究

表4 Natural Medicines Comprehensive Database における安全性・有効性の評定化基準

安全性に関する評定化
【LIKELY SAFE】 FDA, Health Canada, その他の政府機関によるレビューと同等の厳密な科学的評価を経て、適切な使用においてその製品は安全であると判断される場合。または、定評ある文献が、次に基づいて、適切な使用においてその製品は安全であることに基本的に合意している場合：レフリーのいる雑誌に公表された2件以上の無作為化比較試験(数百人～数千人の総被験者数)、あるいは有意な有害事象の発生率が低いことを示す大規模市販後調査。
【POSSIBLY SAFE】 定評ある文献が適切な使用においてその製品は安全であるかも知れないことに合意しており、かつ人対象研究で重篤な有害作用のないことが報告されている場合。
【POSSIBLY UNSAFE】 その製品の使用が危険であるかも知れないことを示唆する何らかの根拠がある場合。
【LIKELY UNSAFE】 定評ある文献が、次に基づいて、その製品が危険であり得ることに合意している場合：有意な有害作用を示す人対象研究や信頼のおける症例報告。
【UNSAFE】 厳密な科学的評価ないし信頼できる政府規制機関によるレビューを経て、その製品はしばしば臨床的に有意な危険を生じることが判明した場合。あるいは大規模市販後調査において、有意な有害作用の発生率が高いことが示された場合。
【INSUFFICIENT EVIDENCE】 安全性を評定化するための信頼できる科学的根拠が不十分。
有効性に関する評定化
【EFFECTIVE】 FDA, Health Canada, その他の政府機関によるレビューと同等の厳密な科学的評価を経て、その製品は特定の適応に対して、OTC薬、オーファンドラッグ、処方薬製品と同様に有効であると判断される場合。
【LIKELY EFFECTIVE】 定評ある文献が、次に基づいて、その製品が特定の適応に対して有効であることに基本的に合意している場合：レフリーのいる、権威ある雑誌に公表された2件以上の無作為化比較試験(数百人～数千人の総被験者数)において得られた、臨床的意義のあるエンドポイントに対するポジティブな結果。
【POSSIBLY EFFECTIVE】 定評ある文献が、次に基づいて、その製品は特定の適応に対して有効であるかも知れないことを示唆している場合：1件以上の臨床試験における臨床的意義のあるエンドポイントに対するポジティブな結果。
【POSSIBLY INEFFECTIVE】 定評ある文献が、次に基づいて、その製品は特定の適応に対して無効であるかも知れないことを示唆している場合：人対象研究における臨床的意義のあるエンドポイントに対するネガティブな結果。
【LIKELY INEFFECTIVE】 定評ある文献が、次に基づいて、その製品は特定の適応に対して有効でないことに基本的に合意している場合：レフリーのいる、権威ある雑誌に公表された2件以上の無作為化比較試験において得られた、臨床的意義のあるエンドポイントに対するネガティブな結果。
【INEFFECTIVE】 大部分の定評ある文献が、ある適応に対してその製品が無効であることに合意している場合。または、多数の質の高い研究でネガティブな結果が得られている場合。信頼性が同等の人対象研究において、相反するもっともらしいデータが示されていないこと。
【INSUFFICIENT EVIDENCE】 有効性を評定化するための信頼できる科学的根拠が不十分。

*可能性を表す副詞である likely は70～80%ほどの可能性、possibly は40%以下ほどの可能性を示すといわれている(鈴木英次：科学英語のセンスを磨く—オリジナルペーパーに見られる表現、化学同人(1999))。

米国予防サービス特別委員会の場合と同様に、RCTが最上位にある。

Natural Medicines Comprehensive Database¹³⁾ は、サプリメントの有効性・安全性の情報源の

最高峰といえるもので、収載品目の網羅性、情報の新しさとともに、科学的根拠に基づく安全性・有効性の評定化に大きな特長がある。評定化の基準(表4)はかなり詳細に設定され、よ

表5 従来型の特定保健用食品と条件付き特定保健用食品の区分

試験 作用機序	無作為化比較試験(RCT)		非無作為化 比較試験
	有意水準 5%以下	有意水準 5%~10%以下	
明確	従来型の 特定保健用食品	条件付き 特定保健用食品	条件付き 特定保健用食品
不明確	条件付き 特定保健用食品	条件付き 特定保健用食品	×

い評定を得るには RCT によるポジティブな知見が必須であり、ここでも RCT の評価が高い。平成 17 年 2 月に、別格のサプリメント/健康食品である特定保健用食品に係る制度が改正された。これに伴い、従来型の特定保健用食品のほかに、規格基準型の特定保健用食品および条件付き特定保健用食品が新たに創設された。規格基準型の特定保健用食品は、これまでの許可件数が多く(100 件以上)、保健の用途における科学的根拠が蓄積した関与成分を用いたもののうち、定められた規格基準に適合しているか否かを厚生労働省の担当部署が審査して、許可等を受けるものである。

条件付き特定保健用食品は従来型の特定保健用食品と同様に、薬事・食品衛生審議会および食品安全委員会により申請品ごとに審査を受ける個別審査型に相当するが、両者は表5のように明確に区分されている。従来型の特定保健用食品の科学的根拠については、作用機序が明確であり、かつ RCT において危険率 5% 以下で有意差が認められることが許可要件となっている。一方、条件付き特定保健用食品の科学的根拠については、従来型の特定保健用食品と比べて、作用機序、および有効性を確認する試験方法の 2 方向から審査基準が緩和されている。条件付き特定保健用食品では、「〇〇を含んでおり、根拠は必ずしも確立されていませんが、△△に適している可能性がある食品です。」といった許可表示が可能とされる。かなり消極的な表示ではあるが、それでも RCT あるいは CCT のような評価の高い研究デザインによる人での実証が求められる。

IV. むすび

サプリメント/健康食品の安全・安心な利用に向けて、EBM に準じた理念が急速に浸透し、安全性・有効性の科学的根拠に基づく表示や情報提供の必要性が増している。これらを支える研究のデザインは本稿で紹介したように多彩であるが、無作為化比較試験は、症例対象研究やコホート研究に比べて、より信頼性の高い情報を得るのに適している。実際、サプリメント/健康食品の安全性や有効性に関する情報源として定評のある Natural Medicines Comprehensive Database、また特定保健用食品制度等においては、無作為化比較試験による知見が最も重視されており、この研究デザインは評価の高いことがわかる。

文 献

- 1) 志村二三夫. アンチ・エイジング医学. 日本抗加齢医学会雑誌 2005; 1: 23-9.
- 2) 田中平三. 監修のことば. 健康・栄養食品アドバイザー・テキストブック(独立行政法人国立健康・栄養研究所, 監修, 山田和彦・松村康弘, 編著), 第一出版, 2003.
- 3) <http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail.php?no=146>
(独立行政法人国立健康・栄養研究所ウェブサイト)
- 4) 道川優子, 志村二三夫. FoodStyle 2004; 21(89): 26.
- 5) 日本サプリメントアドバイザー認定機構, 編. サプリメントアドバイザー必携, 第 2 版, 薬事日報社, 2005.
- 6) 佐々木 敏, 等々力英美, 編著. EBN 入門. 第一出

- 版, 2000.
- 7) 中島 宏, 監修. EBMのための情報戦略, 中外医学社, 2000.
- 8) 日本疫学会, 編. 疫学. 南江堂, 1996.
- 9) <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/mrwhome/106568753/HOME>
- 10) 第一出版編集部, 編. 日本人の食事摂取基準 (2005年版), 第一出版, 2005.
- 11) United States Preventive Services Task Force. Guide to Clinical Preventive Services. 2nd ed. (1996) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hstat3.section.17745#top>より入手可能)
- 12) <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/nuttftoc.html>
- 13) [http://www.naturaldatabase.com/\(xcay5aepvlbivi13uadg5nr\)/home.aspx?li=0&st=0&cs=&s=ND](http://www.naturaldatabase.com/(xcay5aepvlbivi13uadg5nr)/home.aspx?li=0&st=0&cs=&s=ND)
-

Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J vs. obesity-prone C57BL/6J mice

Hidehiko Kondo,¹ Yoshihiko Minegishi,¹ Yumiko Komine,¹ Takuya Mori,¹ Ichiro Matsumoto,² Keiko Abe,² Ichiro Tokimitsu,¹ Tadashi Hase,¹ and Takatoshi Murase¹

¹Biological Science Laboratories, Kao Corporation, Tochigi, Japan; and ²Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Submitted 28 November 2005; accepted in final form 28 June 2006

Kondo Hidehiko, Yoshihiko Minegishi, Yumiko Komine, Takuya Mori, Ichiro Matsumoto, Keiko Abe, Ichiro Tokimitsu, Tadashi Hase, and Takatoshi Murase. Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J vs. obesity-prone C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E1092–E1099, 2006. First published July 5, 2006; doi:10.1152/ajpendo.00583.2005.—The effects of high-fat (HF) feeding on gene expression in the small intestine were examined using obesity-resistant A/J mice and obesity-prone C57BL/6J (B6) mice. Both strains of mice were maintained on low-fat (LF; 5% fat) or HF (30% fat) diets for 2 wk. Quantitative reverse transcription-PCR analysis revealed that lipid metabolism-related genes, including carnitine palmitoyltransferase (CPT) I, liver fatty acid binding protein, pyruvate dehydrogenase kinase-4, and NADP⁺-dependent cytosolic malic enzyme, were upregulated by HF feeding in both strains of mice. The upregulated gene expression levels were higher in A/J mice than in B6 mice, suggesting more active lipid metabolism in the small intestine of A/J mice. The prominent upregulation of the lipid metabolism-related genes were specific to the small intestine; the expression levels were little or unchanged in the liver, muscle, and white adipose tissue. The increase by HF feeding and predominant expression of the intestinal lipid metabolism-related genes in A/J mice were reflected in the enzyme activities; malic enzyme, CPT, and β -oxidation activities were increased by HF feeding, and the upregulated malic enzyme and CPT activities were significantly higher in obesity-resistant A/J mice compared with those in obesity-prone B6 mice. These findings suggest that intestinal lipid metabolism is associated with susceptibility to obesity.

high fat; intestine; β -oxidation; carnitine palmitoyltransferase; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate⁺-dependent cytosolic malic enzyme

OBESITY IS A WELL-KNOWN RISK FACTOR for non-insulin-dependent diabetes mellitus, hypertension, and heart disease (4, 14, 20, 29, 40). Many studies (1, 33, 39, 42) have demonstrated that obesity is a multifactorial syndrome influenced by both genetic and behavioral factors. Excessive intake of dietary fat and low levels of physical activity are representative behavioral factors. However, genetic polymorphisms in the β_3 -adrenergic receptor and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ gene have been reported to be associated with obesity in humans (11, 37).

Several studies (15, 44, 45, 48) have also demonstrated a difference in the sensitivity to dietary fat among mouse strains; particular strains readily develop an obesity syndrome after chronic consumption of high-fat (HF) diets. C57BL/6J (B6) mice develop severe obesity accompanied by hyperglycemia when fed a HF diet. Therefore, B6 mice are among the several

strains of mice classified as sensitive to diet-induced obesity. In contrast, A/J mice become only moderately obese on HF diets and are classified as resistant to diet-induced obesity.

These mouse strains that differ in obesity sensitivity provide excellent experimental models to study the developmental pathophysiology of an obesity syndrome (35, 47). Watson et al. (47) have shown that leptin and uncoupling proteins were induced by the HF diet to higher levels in the adipose tissue of A/J mice compared with B6 mice, suggesting that the thermogenic capacity in adipose tissue is a factor responsible for the development of the diet-induced obesity.

On the other hand, it is well known that the small intestine plays an indispensable role in the digestion and absorption of lipids derived from the diet. The small intestine has enzymes involved in triacylglycerol resynthesis, such as monoacylglycerol-*O*-acyltransferase (MOGAT) and diacylglycerol-*O*-acyltransferase (DGAT). In addition, this tissue also expresses β -oxidation-related enzymes, such as acyl-coenzyme A (CoA) oxidase (ACOX1) and medium-chain acetyl-CoA dehydrogenase (ACADM), at comparable levels to the liver (21, 31). However, the role of the fatty acid catabolism-related enzymes in the small intestine is not fully understood. Because the small intestine is directly exposed to dietary fat, the tissue may play an important role in the control of the amount of lipids that enter the body. Therefore, the capability of lipid metabolism in the small intestine may also be a factor responsible for the development of obesity.

In this study, to address the relationship between the lipid metabolism in the small intestine and the susceptibility to obesity, we examined the effects of HF feeding on gene expression in the small intestine of the obesity-resistant and obesity-prone mice. Preliminary studies using microarrays for RNA samples from a limited number of animals suggested that the expression of fatty acid metabolism-related genes were altered in obesity-resistant and obesity-prone mice in response to HF feeding. Therefore, we performed the following studies using quantitative RT-PCR (qRT-PCR) to analyze changes of gene expression and compared the responses of the two strains of mice to HF feeding.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets. Male A/J and B6 mice were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) at 7 wk of age and were maintained at 23 \pm 2°C under a 12:12-h light-dark cycle (lights on from 7 AM to 7 PM). The mice were fed laboratory chow for 1 wk to

Address for reprint requests and other correspondence: H. Kondo, Biological Science Laboratories, Kao Corporation, 2606 Akabane, Ichikai-machi, Haga-gun, Tochigi 321-3497, Japan (e-mail: kondo.hidehiko@kao.co.jp).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

stabilize metabolic conditions. Both strains of mice were each randomly divided into two groups ($n = 6, 3$ mice/cage) and were allowed ad libitum access to water and one of two powder diets for 2 wk. We used a dome-type cover, Roden CAFE (Oriental Yeast, Tokyo, Japan), to avoid scattering of the powder diets. At the beginning of the experiment there was no significant difference in body weight among the groups. The synthetic diets were as follows: low-fat (LF) diet containing 5% (wt/wt) triacylglycerol (TG) oil, 20% casein, 4% cellulose, 3.5% mineral mixture, 1% vitamin mixture (AIN-76), 13% sucrose, and 53.5% potato starch; a high-fat (HF) diet containing 30% (wt/wt) TG oil, 20% casein, 4% cellulose, 3.5% mineral mixture, 1% vitamin mixture (AIN-76), 13% sucrose, and 28.5% potato starch. The fatty acid composition of the TG oil used in this study was as follows, 0.05% C14:0; 5.4% C16:0; 0.2% C16:1; 2.0% C18:0; 37.1% C18:1; 46.0% C18:2; 7.3% C18:3; 0.5% C20:0; 0.9% C20:1; 0.2% C22:0; 0.1% C22:1. Food intake was measured on a per-cage basis throughout the study every 2 or 3 days. This study was approved by the Animal Care Committee of Kao Tochi Institute.

Total RNA isolation. After 2 wk of HF or LF feeding, the upper part of the small intestine (0–15 cm from the pylorus) was excised from mice in a nonfasting state between 9 AM and 11:30 AM and washed with 10 ml of ice-cold PBS. Then the intestine was opened lengthwise on an iced aluminum plate, and the mucosal side was intensely scraped off using a glass microscope slide so that any variation in the scraping procedure was minimized. Histological examination of the remaining tissue revealed that the mucosal scraping obtained by this procedure contained mucosal epithelium, mucosal connective tissue, mucosal muscles and pliable connective tissue layer, remaining circular and longitudinal muscle layers, and serosa. The intestinal mucosa, liver, muscle, and epididymal white adipose tissue (WAT) were homogenized in Isogen (Nippon Gene, Toyama, Japan) using Physcotron (Microtech, Chiba, Japan). Total RNA was extracted from the homogenate according to the manufacturer's instructions and purified using an RNeasy Mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan).

qRT-PCR analysis. qRT-PCR analysis was performed for gene expression analysis, because highly quantitative characteristics are required for individual analysis for multiple samples. cDNA was produced using TaqMan reverse transcription kits (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time PCR was performed on an ABI-Prism 7000 using the SYBR Green Master Mix kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. For quantitative precision, the same amount of total RNA was consistently used for each expression analysis, and the expression amount of each gene was normalized by the expression of a housekeeping gene, acidic ribosomal phosphoprotein P0 (*Arbp/36B4*). In each analysis, we confirmed that the expression level of *Arbp* did not differ between diets or between strains.

Primers used in this study were as follows: NADP⁺-dependent cytosolic malic enzyme (ME) (*Mod1*; NM_008615, nt 1,562–1,586 and nt 1,728–1,752); cytochrome P450 4A10 (*Cyp4a10*; BC010747, nt 1,876–1,898 and nt 1,997–2,022); 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (*Hmgcs2*; BC024744, nt 1,401–1,423 and nt 1,515–1,536); acyl-CoA thioesterase 1 (*Acot1*; BC022951, nt 2,464–2,483 and nt 2,565–2,586); acyl-CoA thioesterase 2 (*Acot2*; BC064469, nt 1,683–1,704 and nt 1,839–1,858); pyruvate dehydrogenase kinase-4 (*Pdk4*; BC026134, nt 3,038–3,060 and nt 3,144–3,168); acetyl-CoA acyltransferase 1B (*Acaal1b*; BC019882, nt 1,416–1,437 and nt 1,511–1,532); carnitine palmitoyltransferase (CPT) I (*Cpt1*; nt 1,978–1,997 and nt 2,232–2,252); fatty acid-binding protein 1 (*Fabp1*; MMLFABP, nt 151–172 and nt 396–416); long-chain acetyl-CoA dehydrogenase (*Acadl*; BC027412, nt 912–931 and nt 1,084–1,103); ACADM (*Acadm*; BC013498, nt 968–988 and nt 1,232–1,252); acyl-CoA oxidase 1 (*Acox1*; nt 1,768–1,789 and nt 1,961–1,985); uncoupling protein 2 (*Ucp2*; BC012697, nt 975–995 and nt 1,225–1,246); fatty acid translocase (*Cd36*; NM_007643, nt 1,262–1,282 and nt 1,490–1,510); dodecenoyl-CoA δ -isomerase (*Dci*; BC054444, nt 675–695 and nt 829–853); PPAR α (*Ppara*; NM_011144, nt 1,302–

1,322 and nt 1,540–1,561); MOGAT2 (*Mogat2*; BC052831, nt 841–861 and nt 1,027–1,047); DGAT1 (*Dgat1*; NM_010046, nt 1,268–1,289 and nt 1,537–1,558); DGAT2 (*Dgat2*; NM_026384, nt 1,094–1,114 and nt 1,282–1,301); apolipoprotein B (*ApoB*; XM_894981, nt 13,197–13,217 and nt 13,330–13,353); apolipoprotein C-II (*ApoC2*; BC024697, nt 488–511 and nt 605–624); apolipoprotein C-III (*ApoC3*; BC021776, nt 291–312 and nt 455–479); hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (*Hadha*; BC058569, nt 1,111–1,130 and nt 1,408–1,427); solute carrier family 27, member 1 (*Slc27a1*; BC028937, nt 2,234–2,255 and nt 2,368–2,387); solute carrier family 27, member 4 (*Slc27a4*; AF072759, nt 1,108–1,126 and nt 1,371–1,391); leptin (*Lep*; NM_013076, nt 258–278 and nt 471–490), *Arbp* (MMARPP0, nt 632–651 and nt 862–881).

Measurement of enzyme activity. The intestine was excised between 9 AM and 11:30 AM. Mice were fasted for 3 h before the start of dissection to minimize contamination of the mucosal samples by lipids. Mucosal scraping was obtained as described in *Total RNA isolation* and homogenized on ice with 8 vol (wt/vol) of 250 mM sucrose buffer containing 0.1 mM EDTA and 2 mM HEPES (pH 7.3). Subcellular fractionation was performed according to the methods described by de Duve et al. (13). After the centrifugation of the homogenate of the intestinal mucosa at 600 g for 10 min, the supernatant was centrifuged at 12,500 g for 20 min. The resultant precipitate containing mitochondria was resuspended in sucrose buffer and used for the measurement of CPT and β -oxidation activity as a mitochondrial fraction. The supernatant was centrifuged at 100,000 g for 30 min, and the obtained supernatant was used for the measurement of ME activity as a cytosol fraction. Protein concentrations were determined using a Micro BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL).

The NADP⁺-dependent cytosolic ME activity was measured spectrophotometrically with a UV-2550 by observing the appearance of NADPH at 340 nm at 30°C according to the method described previously (5). The reaction mixture contained 50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 20 mM imidazole HCl, 0.5 mM NADP, 1 mM L-malate, 1 mM MnCl₂, and the cytosol fraction in amounts that caused the increase of absorbance at a range of 0.1–0.2/min. Enzyme activities were calculated using the molecular extinction coefficient for NADPH at 340 nm, 6,220 M/cm.

CPT activity was measured spectrophotometrically as described by Markwell et al. (24). The reaction mixture (final 500 μ l) contained 58 mM Tris·HCl (pH 8.0), 1.25 mM EDTA, 0.25 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 40 μ M palmitoyl-CoA, 0.1% Triton X-100, and 1.25 mM L-carnitine, and the solution was equilibrated at 30°C. The reaction was initiated by the addition of 100 μ g of the mitochondrial fraction, and the rate was followed at 412 nm on a UV-2550 spectrophotometer (Shimazu, Kyoto, Japan). The L-carnitine-independent rate was determined using a reaction mixture identical with the above, except for the omission of L-carnitine. The CPT activity and L-carnitine-dependent rate for the formation of CoA were calculated from the difference between the rates with and without L-carnitine, using the molecular extinction coefficient 13,600 M/cm for 2-nitro-5-thiobenzoic acid, which was generated by the reaction of CoA and DTNB.

The β -oxidation activity was measured according to the method described by Singh et al. (38), with minor modifications. The reaction mixture contained 10 mM phosphate buffer (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 2 mM ATP, 1 mM L-carnitine, 1 mM nicotinamide adenine dinucleotide, 0.06 mM flavin adenine dinucleotide, 0.25 mM CoA, 25 μ M [¹⁴C]palmitic acid (1.25 μ Ci/ml) and the mitochondrial fraction containing 50 μ g protein in a final volume of 200 μ l. The reaction was performed at 37°C for 10 min and terminated by adding 200 μ l of 0.6 N perchloric acid, followed by centrifugation at 2,000 g for 10 min. The supernatant was extracted three times with 800 μ l of *n*-hexane to remove the residual radiolabeled palmitate. The radioactivity of the aqueous phase was measured using a liquid scintillation counter (Packard, Meriden, CT).

Blood analysis. The serum glucose concentrations were determined using L-type Wako Glu2 enzyme assay kits (Wako). The serum insulin and leptin level were measured using an insulin EIA kit (Morinaga, Yokohama, Japan) and a mouse leptin assay kit (Morinaga), respectively.

Statistical analysis. All values are presented as means \pm SE. Statistical analyses were performed with two-factor factorial analysis of variance (ANOVA). One-factor ANOVA analyses were conducted when two-factor factorial ANOVA revealed a significant interaction between the factors (i.e., strain and diet). Differences between individual group means were analyzed by Fisher's protected least significant difference test. Analyses were performed using StatView 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC). Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

RESULTS

Growth characteristics and serum hormone concentrations. The body weights 2 wk after the LF or HF feeding and average daily food intake during the period are shown in Table 1. There was no significant difference in body weight at the time point among the four mice groups, and the food intake also did not differ between A/J and B6 mice. The serum glucose level in the B6 mice was significantly higher than that in the A/J mice under the HF diet condition. The serum insulin levels were not significantly different. The serum leptin level in the A/J mice was significantly higher than that in the B6 mice under the LF diet condition. In the B6 mice, HF feeding showed a trend of increase in the serum leptin level compared with LF feeding, but the increase was not significant. In another set of experiments, B6 mice fed the HF diet for 12 wk exhibited significantly higher body weights than A/J mice (30.0 ± 2.6 g in B6 mice, 26.7 ± 2.6 g in A/J mice, $P < 0.05$, $n = 6$).

Effects of HF feeding on expression of fatty acid metabolism-related genes in the small intestine. To identify genes that change in response to HF feeding, oligonucleotide microarray analyses were performed for the A/J or B6 mice fed on the LF or HF diet for 2 wk, a short time during which body weight did not significantly differ among the experimental groups, but which was considered to be long enough for HF ingestion to affect gene expression, according to a previous report (47). qRT-PCR analysis revealed that HF feeding significantly increased expression levels of lipid metabolism-related genes.

The genes included *Mod1*, *Cyp4a10*, *Hmgcs2*, *Acot1*, *Acot2*, *Pdk4*, *Acaa1b*, *Cpt1*, *Fabp1*, and *Acadl* (Fig. 1). The expression of the genes in the intestine was markedly increased by HF feeding in both mouse strains, and the expression levels of the genes were significantly higher in obesity-resistant A/J mice than in obesity-sensitive B6 mice (Fig. 1). *Acadm*, *Acox1*, *Ucp2*, and *Cd36* were not increased by HF feeding; however, the expression levels of *Acadm*, *Ucp2*, and *Cd36* in A/J mice were significantly higher than those in B6 mice (Fig. 1). The expression of *Dci* was increased by HF feeding only in A/J mice. The expression of *Ppara*, which encodes a nuclear factor responsible for the expression of lipid metabolism-related genes, was not affected by HF feeding but was higher in A/J mice than in B6 mice under both diet conditions.

The primary function of the small intestine as it relates to lipid metabolism is the resynthesis of TG and the secretion of TG as chylomicrons. However, qRT-PCR analysis revealed that HF feeding did not affect *Mogat2*, *Dgat1*, and *Dgat2* expression, although the expression level of these TG synthesis-related genes was slightly higher in A/J mice compared with B6 mice under both diet conditions (Fig. 1). On the other hand, gene expression of *Apob* was reduced in A/J mice. Gene expression of *Apoc2* was upregulated by HF feeding in both mouse strains, whereas the gene expression of *Apoc3* was reduced by HF feeding. The levels of these genes were significantly higher in A/J mice.

Gene expression in liver, muscle, and adipose tissue. Changes in the expression levels of the lipid metabolism-related genes were also examined for the liver, muscle, and WAT from the obesity-resistant A/J and obesity-prone B6 mice fed the LF or HF diet for 2 wk.

In the liver, the strain difference in expression was not as obvious as in the small intestine. Unlike in the intestine, the gene expression of *Mod1* and *Cyp4a10* in the liver was significantly decreased in A/J mice by HF feeding (Fig. 2A). Gene expression of *Cyp4a10* and *Hmgcs2* was slightly increased by HF feeding only in B6 mice. Similar results were obtained for the other lipid metabolism-related genes (i.e., *Cpt1*, *Fabp1*, *Acadm*, *Acox1*, *Ucp2*, and *Cd36*; Fig. 2A). Unlike that in the intestine, there was no clear strain difference in the gene expression levels in the liver. The expression levels of *Cpt1*

Table 1. Body weight, food intake, tissue weights, and serum parameters of A/J and C57BL/6J mice fed on LF or HF diets for 2 wk

	A/J		C57BL/6J	
	LF	HF	LF	HF
Body weight, g	23.7 \pm 1.1	25.1 \pm 0.5	25.0 \pm 0.7	26.2 \pm 0.5
Food intake				
g/day	2.7 \pm 0.1*	2.2 \pm 0.1†	2.6 \pm 0.1*	2.2 \pm 0.0†
kcal/day	10.7 \pm 0.9*	11.3 \pm 0.8†	10.6 \pm 1.4*	11.7 \pm 0.5†
Liver, g	1.13 \pm 0.04	1.18 \pm 0.05	1.22 \pm 0.07	1.32 \pm 0.04
Epididymal WAT, g	0.43 \pm 0.04	0.54 \pm 0.06	0.34 \pm 0.03	0.46 \pm 0.09
Retroperitoneal WAT, g	0.13 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.13 \pm 0.03
Glucose, mg/dl	206.8 \pm 11.7*†	180.5 \pm 7.7*	238.7 \pm 34.0†	252.1 \pm 10.5†
Insulin, ng/ml	1.00 \pm 0.1	0.90 \pm 0.1	0.83 \pm 0.15	1.31 \pm 0.27
Leptin, ng/ml	10.5 \pm 1.2*	9.2 \pm 2.5*	3.9 \pm 0.6†	6.6 \pm 1.9*†

Values for body weight, tissue weights, and serum parameters are means \pm SE of 6 mice. Values for food intake are means \pm SE of 6 measurements performed during the experiment. LF, low fat; HF, high fat; WAT, white adipose tissue. Means in a column with symbols without common symbol are different at $P < 0.05$.