

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17-19年度 総合研究報告書

主任研究者 山田 和彦

平成20(2008)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 1

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 1 1

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 3 7

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 4 9

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

近藤 一成 6 3

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 9 9

厚生科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

総括研究報告書

特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究

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

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。網羅的遺伝子解析による食品成分の生物影響の評価方法は、有効性と同時に安全性評価においても重要であることが明らかになった。しかしながら、実験動物を用いた結果の蓄積と人試験の比較検討が今後さらに必要と考えられる。また、指標についても、明らかな生物影響も重要であるが、特定の保健の影響に直接的に連結する指標とどのように関連しているかの検討が今後一層必要と考えられる。複数の機能性成分が含まれる食品であっても、バイオマーカーを正しく設定することにより、保健の用途に関する有効性の評価が可能になるという視点が明確にされたが、詳細な検討が必要である。機能性食品成分に対する生体応答には個人差があること具体例が示された。保健の用途の妥当性を、個別の食品について評価する場合には、保健の用途ごとに、標準的で鋭敏な中間バイオマーカーを選定し、それが保健の用途に連結することを確認したのちに、評価試験の測定項目に加えることによって、食品中の関与成分の有効性評価が標準化され、短期間でかつ客観的な評価が可能になると考えられた。

分担研究者

| | | | |
|------|-----------------------|-------|--------------------------|
| 田中平三 | (甲子園大学 教授) | 瀧本秀美 | (独立行政法人国立健康・栄養研究所) |
| 阿部啓子 | (東京大学大学院農学生命科学研究科 教授) | 井上 誠 | (愛知学院大学薬学部医) |
| 梅垣敬三 | (独立行政法人国立健康・栄養研究所 室長) | 瀧 優子 | (独立行政法人国立健康・栄養研究所) |
| 穂山 浩 | (国立医薬品食品衛生研究所) | 手島玲子, | (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) | 松田りえ子 | (国立医薬品食品衛生研究所) |
| | | 吉岡靖雄 | (国立医薬品食品衛生研究所) |
| 合田敏尚 | (静岡県立大学・食品栄養科学部 助教授) | 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) |

協力研究者

| | | | |
|-------|-----------------|------|---------------------------|
| 志村二三夫 | (十文字学園女子大学 教授) | 飯田 修 | ((独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター), |
| 廣田晃一 | (独立行政法人国立健康・栄養研 | | |

藪島淳子 (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

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ことが必要であり、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。現在行われている有効性判定基準(関与成分の同定、その作用機序)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むけての研究調査をおこなった。

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。近藤(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)の特定等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。

平成17年度の研究成果は以下のような点である。食品に含まれる機能性成分の効果を評価する方法として、標的組織における遺伝子発現の網羅的解析が有効であることを検証した。事例研究として、ミルクに含まれるフラクトオリゴ糖(FOS)の機能性の解析を行った。マウスにFOSを摂取させると、IgAおよびインターフェロン γ の産生が増加し、免疫賦活効果が見られることが知られていた。本研究では、FOSを1週間摂取させて、回腸の遺伝子発現を解析した。その結果、多くの免疫系遺伝子群の発現変動がみられた。またこれらの変動は、回腸のパイエル板のみならず上皮細胞においても認められた。すなわち、FOS摂取は小腸内の環境を整

え、回腸の細胞において MHC 遺伝子やインターフェロン遺伝子等の発現を調節し、その結果、体免疫の賦活が生じることが推定された。本研究から、遺伝子発現解析はプレ・プロバイオティクスとアレルギーの関連性解明に有効である。

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、いわゆる健康食品の中でも利用実績がある、イチョウ葉エキスならびにウコンを取り上げ、その素材中に含まれている成分の中で有効性や安全性の評価に重要な成分分析を行った。その結果、イチョウ葉エキス素材中の主要なフラボノイドであるクエルセチン量には入手した素材間であまり差異は確認されなかったが、主要なテルペノイドであるピロバライド量は、各素材間でばらつきが確認された。ピロバライドは肝臓薬物代謝酵素の誘導において重要であると考えられる成分であった。また、ウコンの主要成分であるクルクミノイド量とともに、各種ミネラル量においても、各種素材間のばらつきが確認された。これらのことは、いわゆる健康食品として流通している素材のレベルにおいても、その成分含量が一定していないことを示唆した。以上のように、いわゆる健康食品として人気のある素材であっても、生体影響に重要な成分は、素材レベルで特定して規格基準を作成することが、その素材を添加した食品の有効性や安全性を確保する上で重要であると考えられた。

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リンゴプロシアニジン(ACT)の有効性を題材に種々検討した。ACT の食物アレルギー経口投与における感作抑制効果を、ACT を OVA の経口摂取感作誘導 W/WV マウス及び B10A マウスに経口摂取させることにより検討した。血清中 OVA 特異的抗体価において、ACT 摂取群は対照群に比べて血清中 OVA 特異的 IgE 及び IgG1 抗体価が有意に低かった。また、サイト

カイン濃度を測定したところ、培養脾臓細胞による検討では、ACT 摂取群は対照群と比べ IL-2、IL-12 及び IFN-g 産生が促進され、IL-5 及び IL-6 産生は抑制された。腸管上皮内リンパ球 (IEL) のサブセット解析においては、ACT 摂取群は対照群と比べ TCRgd 陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。従って ACT は経口感作誘導による TCRgd 陽性細胞組成比を増加することと関連して、食物抗原経口感作を抑制し、食物アレルギー状態成立への誘導を阻害する可能性が示唆された。また DSS 誘発性大腸炎モデル・オキサゾロン誘発大腸炎モデルを用い、ACT の大腸炎発症抑制作用を検討したところ、ACT 摂取は両モデルとも大腸炎発症抑制効果を示した。その作用メカニズムとして、IEL・腸管上皮細胞に対する免疫調節作用・抗炎症作用を介して大腸炎予防効果を示すことが示唆された。健康食品として用いられているウコン属植物の成分を LC-MS による分析で総体的に把握するとともに種間並びに種内での成分の変異の程度を明らかにするために、ウコン (秋ウコン、*Curcuma longa*)、キョウオウ (ハルウコン、*C. aromatica*)、クスリウコン (*C. xanthorrhiza*)、ガジュツ (紫ウコン、*C. zedoaria*) 32 系統を同一条件下で栽培し、成分分析用の根茎のサンプルを調製した。また、分析に用いる LC-MS の条件を検討した。

生活習慣病の境界領域者を対象とした保健の用途を分類・整理し、今後、新開発食品として開発および申請が多いと見込まれる保健の用途に関連する指標として、血糖、体脂肪と血清脂質 (中性脂肪) が注目された。複数の関与成分が混在したり作用機序の不明確な成分が含まれる場合の有効性の評価の根拠として最低限必要とされるバイオマーカーの検討を血糖上昇と内臓脂肪について開始した。その結果、食後高血糖やタンパク質糖化の指標の検索には血球遺伝子のマイクロアレイ解析が有効であること、内臓脂肪減少/インスリン感受性の指標としては血

漿アディポネクチンが有用であることが明らかになった。さらに、代表的なモデル成分（難消化性デキストリン、カテキン）を混合した食品を用いて予備臨床試験をおこない、日本人の場合にはアディポネクチン遺伝子多型により応答性に個人差があることが明らかになった。

18年度の研究成果は以下のような点である。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や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、プロスタグランディン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ヨ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。イチヨ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ビ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) イチヨ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、健常者がイチヨウ葉エキスを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、β-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、TCR α 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- β 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。

19 年度の研究成果は以下のような点である。

1) 作用機序の明確化には至っていない食品素材を広く探索し、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、鎮静・抗不安作用が示唆されている多成分系素材としてセイヨウカノコソウ、視覚機能への有効性が示唆されている単品素材ルテイン、また中枢神経系への作用が推測されている γ -アミノ酪酸 (GABA) について検討した。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) フラクトオリゴ糖 (FOS) を摂取させたマウスの回腸では、腸内細菌叢のパターンが大きく変化し、回腸上皮における免疫関連遺伝子の発現が有意に上昇し報告されていた FOS 摂取による免疫賦活作用のメカニズムの一端を根元的に明らかにした。分離大豆たん白質 (SPI) の長期摂取が生体に与える影響を、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の変化として網羅的に解析した結果、SPI を 8 週間摂食させると、血中脂質パラメーターである中性脂肪およびコレステロール値、そして肝臓重量が SPI 摂食ラットで有意に低下すると共に、遺伝子発現プロフィール解析結果は、SPI 摂取に伴い約 120 遺伝子が有意に変動を認められた。これらは、エネルギー代謝、抗酸化作用、転写制御因子、脂質代謝に関連する遺伝子であり、各代謝系の全体的な変化が関与していることが DNA マイクロアレイ解析により明らかとなった。さらに、マグネシウム欠乏食投与により発現が有意に変化した遺伝子として 734 遺伝子が抽出され、主要栄養素である糖質、脂質、タンパク質およびアミノ酸の代謝をはじめ、生体異物代謝、免疫応答、転写、輸送、細胞増殖など様々な機能に関係する遺伝子群が含まれていた。ニュートリゲノミクス解析からマグネシウム欠乏食投与により様々な代謝に関係する遺伝子の発現変動が生じ、その結果として生理生化学的变化が引き起こされていることが明らかになった。

3) 健康食品素材として利用実績があるイチョウ葉エキスとウコンをモデルとして、含有成分の規格基準作成に必要な検討を実施した。また核内レセプターの調節に着目した素材の有効性評価手法に関する検討も行った。イチョウ葉エキスは肝臓の薬物代謝酵素を強く誘導するが、その誘導にはテルペノイドの一つであるピロバライドが関与すること、またピロバライドの体内動態と薬物代謝酵素の誘導作用の詳細を明らかにした。さらにイチョウ葉エキス中のピロバ

ライド含量が、原末レベルでも一定していないことを明らかにした。ウコンの分析においても、有効成分であるクルクミノイドや各種ミネラルの含量が、原材料レベルでもかなり異なっていることを確認した。これらの結果は、新たな特定保健用食品の基準作成には、重要な成分の特定とその規格基準作成が必要であることを示唆した。核内レセプターの調節に着目したカロテノイドの有効性評価法も利用できることを示した。

4) 抗アレルギー作用の有効性について、リンゴおよびブドウ由来プロシアニジンおよびブラジル産と中国産プロポリスを試料として、RBL2H3細胞を用いた脱顆粒の測定、および、リンゴプロシアニジン並びにコンドロイチン硫酸については、マウスを用いて、血清IgE、IgG、脾臓細胞中のサイトカインを測定して検討を行った。抗アレルギー作用の有効性について、リンゴプロシアニジン投与で、血清中特異的IgE、IgG1が有意に減少し、脾臓細胞によるTh-1型IL-2、IL-12、IFN- γ が有意に増加した。リンゴ由来と部分的に異なる構成成分からなるブドウプロシアニジンについては、リンゴの場合同様強い脱顆粒抑制、及びマウス耳介肥厚抑制効果が認められ、プロシアニジン類の抗アレルギー作用は、構成単位のカテキンの重合度に由来していた。中国産プロポリスのエタノールエキスに強い脱顆粒抑制効果が認められ、ブラジル産との成分比較の結果、中国産にはカフェイン酸エステルが多く含まれおり、活性成分の主要因はカフェイン酸エステル類と考えられた。一方、ウコンの安全性について、毒性試験の最高用量である5,000mg/kgをラットに単回および14日間反復経口投与しても、ウコン投与による毒性学的に意義のある変化は認められなかったが、14日間反復経口投与毒性試験においては、総タンパク、アルブミン、総コレステロール値の上昇、肝臓の病理学的変化は用量相関的であり、ウコン投与による影響であると考えられた。

5) 種々の肥満/糖尿病発症モデルラットにおける血球遺伝子のマイクロアレイ解析により、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 、IL-6などの炎症性サイトカインの血球における遺伝子発現量が有用である可能性を明らかにした。一方、健診受診者の血液を用いて、血漿中のIL-1 β 濃度およびIL-6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、これらの炎症性サイトカインの血漿濃度が、空腹時血糖およびHbA1c、インスリン抵抗性指標と有意な正の関連性を示すことを明らかにした。さらに、食後血糖をコントロールすることによりこれらの血液指標が変動するという仮説を検証するために、 α -グルコシダーゼ阻害剤(ミグリトール)を、2型糖尿病患者に服用させ、食後の血糖上昇の抑制とともに、血球におけるIL-1 β 、S100タンパク質の遺伝子発現が抑制されることを明らかにした。血球サイトカイン遺伝子の発現量は、血糖上昇に起因する炎症およびインスリン抵抗性のリスクを評価するための短期的な血液指標として有用であることが示唆された。

D. 考察

網羅的遺伝子解析による食品成分の生物影響の評価方法は、有効性と同時に安全性評価においても重要であることが明らかになった。しかしながら、実験動物を用いた結果の蓄積と人試験の比較検討が今後さらに必要と考えられる。また、指標についても、明らかな生物影響も重要であるが、特定の保健の影響に直接的に連結する指標とどのように関連しているかの検討が今後一層必要と考えられる。保健の用途の妥当性を、個別の食品について評価する場合には、保健の用途ごとに、標準的で鋭敏な中間バイオマーカーを選定し、それが保健の用途に連結することを確認したのちに、評価試験の測定項目に加えることによって、食品中の関与成分の有

効性評価が標準化され、短期間でかつ客観的な評価が可能になると考えられた。

E. 結論

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。複数の機能性成分が含まれる食品であっても、バイオマーカーを正しく設定することにより、保健の用途に関する有効性の評価が可能になるという視点が明確にされた。機能性食品成分に対する生体応答には個人差があることの詳細が示された。さらに、保健の用途ごとに、本研究で示したような標準的で鋭敏な中間バイオマーカーを選定し、評価試験の測定項目に加えるための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) 濱口恵子, 志村二三夫: サプリメントの研究デザインとその評価. 臨床病理 レビュー特集 135, 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 3, 33-41(2007)
- 3) 山崎道子, 志村二三夫: 第3章 機能性食品としてのハーブ・スパイス, 第1節 概論: 機能性食品素材としてのハーブやスパイスに関する基本的な理解のために, 第2節 旧大陸原産のハーブ (ギリシャ本草に該当するもの). 食品機能性の科学, 産

業技術サービスセンター (印刷中)

- 4) 1. Nakai, Y., Hashida, H., Kadota, K., Minami, M., Shimizu, K., Matsumoto, I., Kato, H., and Abe, K. Up-regulation of Genes Related to the Ubiquitin-Proteasome System in the Brown Adipose Tissue of 24-h-fasted Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 139-148 (2008).
- 5) 2. Fukasawa, T., Murashima, K., Matsumoto, I., Hosono, A., Ohara, H., Nojiri, C., Koga, J., Kubota, H., Kanegae, M., Kaminogawa, S., Abe, K., and Kono, T. Identification of marker genes for intestinal immunomodulating effect of a fructooligosaccharide by DNA microarray analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 3174-3179 (2007).
- 6) Umegaki K, Taki Y, Endoh K, Taku K, Tanabe H, Shinozuka K, Sugiyama T.: Bilobalide in Ginkgo biloba extract is a major substance inducing hepatic CYPs. *J Pharm Pharmacol*, 59:871-7(2007).
- 7) 梅垣敬三: 健康食品素材の品質と製品の有効性・安全性. *薬学雑誌* 127(suppl. 4); 89-92(2007).
- 8) Akiyama H, Kondo K. Agaritine and phenylhydrazine derivatives in *Agaricus bisporus* and *Agaricus blazei* Murrill. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 48, 397-401 (2007).
- 9) Kondo K, Watanabe A, Akiyama H, Maitani T. The metabolisms of agaritine, a mushroom hydrazine in mice. *Food Chem Toxicol.*, 46, 854-62. (2008).
- 10) 加瀬澤信彦、遠山和成、島田昌也、望月和樹、合田敏尚: 人間ドック男性受診者におけるCTスキャン腹部皮下および内臓

脂肪面積の増減と生活習慣の関連性。人間ドック 22 (3) : 42-49 (2007)

- 11) 3. Murakami, K., Sasaki, S., Takahashi, Y., Uenishi, K., Yamasaki, M., Hayabuchi, H., Goda, T., Oka, J., Baba, K., Ohki, K., Kohri, T., Watanabe, R. and Sugiyama, Y.: Nutrient and food intake in relation to serum leptin concentration among young Japanese women. *Nutrition* 23: 461-468(2007)
- 12) 4. Murakami, K., Sasaki, S., Takahashi, Y., Uenishi, K., Yamasaki, M., Hayabuchi, H., Goda, T., Oka, J., Baba, K., Ohki, K., Kohri, T., Muramatsu, K., and Furuki, M.: Hardness of the habitual diet in relation to body mass index and waist circumference in free-living Japanese women aged 18-22 years. *Am. J. Clin. Nutr.* 86: 206-213. (2007)
- 13) Goda, T. Suruga, K., Komori, A., Kuranuki, S., Mochizuki, K., Makita, Y. And Kumazawa, T.: Effects of miglitol, an α -glucosidase inhibitor, on glycaemic status and histopathological changes in islets in non-obese, non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats. *Br. J. Nutr.* 98: 702-710(2007)

(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—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) 梅垣敬三: 機能性食品の開発において留意すべき事項、第 9 回応用薬理シンポジウム、2007. 9. 11 (東京)
- 3) 梅垣敬三: 健康食品素材の品質と製品の有

効性・安全性、第 2 回食品薬学シンポジウム (日本薬学会天然物部会)、2007. 10. 19 (静岡市)

- 4) 梅垣敬三: 健康食品・サプリメントの安全性と有用性—その問題点と対応を考える—健康食品・サプリメントの実態と問題点、第 28 回日本臨床薬理学会、2007. 11. 30 (宇都宮市)
- 5) 近藤一成, 太田小夜香, 穂山 浩, 大野泰雄 “シヤンピニオン中のアガリチンについて” 第 44 回全国化学技術者協議会、津、2007, 11
- 6) Kondo K, Ohta, S, Amakura Y, Kasahara Y, Akiyama H, Ohno Y. “Analysis of cytotoxic conjugated-triene fatty acids in *Pleurocybella porrigens*” 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague Czech republic, 2007, 11

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 —

主任研究者 山田和彦 (独)国立健康・栄養研究所 プログラムリーダー
分担研究者 田中平三 甲子園大学教授
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、“自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討”に関する研究・調査を進めた。すなわち、(1)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にはどのようなものがあるのかを整理し、(2)人におけるその有効性及び安全性の科学的根拠の現状を把握し、(3)自覚可能な身体状況やこれに関わり深い疾病の改善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行い、以下の結果を得、また考察した。

(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した結果、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。それらの中には、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、貧血・冷え性・生理痛にいい、ストレスや不眠症にいいとされるものや、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があったり、また脳・神経系の健康や精神保健の用途を志向するものがあった。

(2)(1)のような用途に関わり深い身体状況や疾病について、Natural Medicines Comprehensive Database (NMCD)を中心に検索し、該当する食品素材に対する有効性・安全性の評定をまとめ上げた。例えば、カフェインや茶の覚せい作用、カルシウムの月経前症候群に対する効果、セイヨウオトギリソウの抑うつに対する効果等についてはLikely Effectiveとの評定がなされている。さらに、Possibly Effectiveとの評定されたものには、慢性疲労症候群(マグネシウム)、片頭痛(バターバー)、眼のストレス(ブドウ種子)、顔面紅潮/更年期症状(ダイズ)、味覚減退(亜鉛)、運動パフォーマンス(カフェイン)等があった。

(3)PASSCLAIM (Process for the Assessment of Scientific Support for the Claims on Foods)の報告書、その他の文献に当たり、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ーについてまとめを行った。気分(Mood)、覚醒状態(Arousal)、動機(Motivation)、記憶(Memory)、知能(Intelligence)、眼の健康や視覚機能等の効果を評価する上で有用と推定される方法やバイオマーカー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ものと考えられる先行研究がいくつか報告されており、来年度以降の検討項目に導入することの根拠が得られた。以上、冒頭に示した(1)、(2)、(3)の当初の目的が概ね達成され、“自覚可能な身体動態と有効性評価基準”検討する上で有用な成果が得られたと結論される。

A. 研究目的

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、“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・研究を行うことを主目的としている。

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。しかし、食品の保健用途における効果には、食品そのものや複数の成分が関わると考えられ、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)」¹⁾からもうかがえるように、実際には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するための研究を進める必要がある。

本研究課題は、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。本年度は、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うこととした。

B. 研究方法

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の把握

主に健康食品のインターネット通信販売サイトを検索して、実際に流通している健康食品が示唆ないし標榜している効能・効果を広く探り、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としてどのようなものを志向しているか、また流通している食品の成分本質等の現状を調べた。

2. 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有効性や安全性の科学的根拠

上記1のような用途に関わり深い身体状況や疾病についてNatural Medicines Comprehensive Database (NMCD)²⁾を検索し、該当する食品素材について有効性・安全性の評定をもとにまとめてみた。NMCDはDietary Supplement等の素材となる天然物を中心に、約1,000品目についてのモノグラフを収載したデータベースで、網羅性が高く、小まめに更新がなされている。ヒト対象試験・研究に基づいて、その安全性については5段階(Likely Safe, Possibly Safe, Possibly Unsafe, Likely Unsafe, Unsafe)、有効

性については6段階(Effective, Likely Effective, Possibly Effective, Possibly Ineffective, Likely Ineffective, Ineffective)の評定化を行っており、これに必要な十分な科学的根拠・情報が不十分な場合はその旨が示されている。このように利便性の高いゴールドスタンダードのデータベースといえる。消費者への情報提供や製品開発はもとより、本研究のような行政面への寄与を目指す検討にも利用価値の高いツールである。

3. 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

PASSCLAIM (Process for the Assessment of Scientific Support for the Claims on Foods)の報告書³⁾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推定される方法やバイオマーカーについてまとめた。

3. 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

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 —

主任研究者 山田和彦 (独)国立健康・栄養研究所 食品表示分析・規格研究部長
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、“自覚可能な身体動態と有効性評価基準の検討”に関する研究・調査を進めた。すなわち、(1)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にはどのようなものがあるのかを整理し、(2)人におけるその有効性や安全性の科学的根拠の現状を把握し、(3)自覚可能な身体状況やこれに関わり深い疾病の改善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行い、以下の結果を得、また考察した。

(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した結果、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。それらの中には、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、貧血・冷え性・生理痛にいい、ストレスや不眠症にいいとされるものや、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があつたり、また脳・神経系の健康や精神保健の用途を志向するものがあつた。

(2)(1)のような用途に関わり深い身体状況や疾病について、Natural Medicines Comprehensive Database (NMCD)を中心に検索し、該当する食品素材に対する有効性・安全性の評定をまとめ上げた。例えば、カフェインや茶の覚せい作用、カルシウムの月経前症候群に対する効果、セイヨウオトギリソウの抑うつに対する効果等についてはLikely Effectiveとの評定がなされている。さらに、Possibly Effectiveとの評定されたものには、慢性疲労症候群(マグネシウム)、片頭痛(バターバー)、眼のストレス(ブドウ種子)、顔面紅潮/更年期症状(ダイズ)、味覚減退(亜鉛)、運動パフォーマンス(カフェイン)等があつた。

(3)PASSCLAIM (Process for the Assessment of Scientific Support for the Claims on Foods)の報告書、その他の文献に当たり、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ーについてまとめを行った。気分(Mood)、覚醒状態(Arousal)、動機(Motivation)、記憶(Memory)、知能(Intelligence)、眼の健康や視覚機能等の効果を評価する上で有用と推定される方法やバイオマーカー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ものと考えられる先行研究がいくつか報告されており、来年度以降の検討項目に導入することの根拠が得られた。

以上、冒頭に示した(1)、(2)、(3)の当初の目的が概ね達成され、“自覚可能な身体動態と有効性評価基準”検討する上で有用な成果が得られたと結論される。

A. 研究目的

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、“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・研究を行うことを主目的としている。

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。しかし、食品の保健用途における効果には、食品そのものや複数の成分が関わると考えられ、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)」¹⁾からもうかがえるように、実際には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するための研究を進める必要がある。

本研究課題は、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。本年度は、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うこととした。

B. 研究方法

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の把握

主に健康食品のインターネット通信販売サイトを検索して、実際に流通している健康食品が示唆ないし標榜している効能・効果を広く探り、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としてどのようなものを志向しているか、また流通している食品の成分本質等の現状を調べた。

2. 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有効性や安全性の科学的根拠

上記1のような用途に関わり深い身体状況や疾病についてNatural Medicines Comprehensive Database (NMCD)²⁾を検索し、該当する食品素材について有効性・安全性の評定をもとにまとめてみた。NMCDはDietary Supplement等の素材となる天然物を中心に、約1,000品目についてのモノグラフを収載したデータベースで、網羅性が高く、小まめに更新がなされている。ヒト対象試験・研究に基づいて、その安全性については5段階(Likely Safe, Possibly Safe, Possibly Unsafe, Likely Unsafe, Unsafe)、有効

性については6段階(Effective, Likely Effective, Possibly Effective, Possibly Ineffective, Likely Ineffective, Ineffective)の評定化を行っており、これに必要な十分な科学的根拠・情報が不十分な場合はその旨が示されている。このように利便性の高いゴールドスタンダードのデータベースといえる。消費者への情報提供や製品開発はもとより、本研究のような行政面への寄与を目指す検討にも利用価値の高いツールである。

3. 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

PASSCLAIM (Process for the Assessment of Scientific Support for the Claims on Foods)の報告書³⁾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推定される方法やバイオマーカーについてまとめた。

3. 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, 富士フイルム)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(富士フイルム)を用い、5 μmの解像度でCy3 (532 nm)およびCy5(635 nm)の蛍光をスキャンして画像データを記録した。画像データ解析用のソフトウェアにはMaltigauge Ver 3.0およびArray Gauge Ver 2.0を用いた。

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)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。

4. 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RNAlater 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)のセイウカノコソウの実験の場合と同様に実施した。

5. セイ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NMCD²⁾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。

C. 研究方法

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、セイウオトギリソウの影響と比較した。

表8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、セイウオトギリソウでは10個中6個であったが、セイウカノコソウでは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。セイウオトギリソウでは同様の遺伝子は3個あったが、セイウカノコソウでは1つも認められなかった。

また、表9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、セイウオトギリソウでは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、セイウオトギリソウは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、セイウオ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、セイウカノコソウは、ポジティブコントロールのカバやセイ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10)。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12)。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2)。しかし、海馬では両者の間に有意な相関が認められた(図2)。このことより、セイ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。

6. 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⁸⁾。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。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¹⁰⁾および無作為化比較試験¹¹⁾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、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つ

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。

C. 研究結果

(1)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

これまで述べたように、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亘っており、実際にこうした効果の示唆あるいは標榜のもとに市場に流通している素材は極めて多い。そうした中で、数的にはかなり絞られてはいるが、人試験において有効性や安全性の科学的根拠が認められている素材も少なくない。

そこで、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ついて、“高度機能強調表示”と“疾病リスク低減表示”との関連から、現時点で最もよくまとめていると考えられるPASSCLAIMの報告書^{3,4)}にあたってみた。

PASSCLAIMは、同じくILSIヨーロッパ(特定非営利活動法人国際生命科学協会ヨーロッパ支部)が中心に実施しているEU(欧州連合)との共同プロジェクトであるFUFOSE(Functional Foods Science in Europe: 1996~1999)を受け継ぎ、その成果の実用化に向けたステップである。FUFOSEでは、健康機能表示として一般に認められている栄養機能を超えた“高度機能強調表示”と“疾病リスク低減表示”に関する概念と科学的根拠に基づくマーカーについて提言されている。これらいずれの表示も適切な科学研究に基づく場合に限り、正当と認められるとされ、とりわけ、その有効性の評価にあたっては、食品成分への曝露、高度標的機能、疾病リスク低減それぞれのマーカーに対する評価が重要とされている。

PASSCLAIMの主目的は、食品および食品成分の健康関連表示に関する科学的裏づけを評価するための包括的ガイダンス・ツールの作成にある。また、健康強調表示(Health Claims)の科学的実証化の基礎として利用し得る一般的基準の選定をめざしている。これには、科学的に正当な研究デザインの開発、および健康への食事の影響を調べるためのマーカーを特定し、確証し、使用方法が含まれる。

これらの達成のために、個別テーマグループ(ITG)が生まれ、次のゴールが設定されている。

- 生理的領域に関連した機能を大局的に把握した上で、異なる領域における可能と思われる健康強調表示タイプ(網羅的リストではなく、適切な例について)を注意深く比較する。
- これらの表示の裏づけに必要とされる科学的要件を示し、さらにその科学的裏づけの妥当性を評価する。
- これらの表示の科学的実証化のためのマーカーの利用可能性および正当性を評価する。
- これらの特定表示の実証化を評価する基準のリストを開発するための基盤を設定する: このことは、高度機能表示および疾病リスク低減表示の開発と正当化の要件となる。

各グループのテーマは次の通りである。

- ITG(A): 食事と関連のある心臓血管疾患
- ITG(B): 骨の健康と骨粗鬆症
- ITG(C): 身体運動能力とフィットネス
- ITG(D): 既存プロセスの統合とレビュー
- ITG(E): インスリン感受性と糖尿病リスク
- ITG(F): 食事と関連のあるガン
- ITG(G): 精神機能と目的遂行能力
- ITG(H): 消化管の健康と免疫

本研究では、研究協力課題ととくに関連が深いと考えられるITG(G)による報告書³⁾について、有効性評価のための方法やバイオマーカーの観点からとりまとめをおこなった。

ITG(G)における精神状態(Mental state)と目的遂行能力(Performance)に関する食品の表示やその根拠となる有効性の科学的根拠に対する考え方の概要は、やや長くなるが概ね次の引用の通りである。

「食品や飲料の摂取は脳機能に影響を与える可能性があり、脳機能の変化は精神状態や目的遂行能力に作用し得る。したがって、原理的には、機能性食品の摂取が気分あるいは特定の認知能力を改善するという表示は可能であり、実際この種の食品が流通している。

この報告のねらいは、精神状態や目的遂行能力に対する食品の望ましい効果の表示の実証化、また妥当化に用いられるであろう既存の方法論をレビューすることにある。

結果に関しては、まず精神状態や目的遂行能力に関連する表示対象として、気分、覚醒状態、活性化、覚醒性、注意、睡眠、動機づけ、努力、記憶、知

覚、知能を特定した。さらに、これらに関する基本的な科学的概念およびその概念を評価するための方法についてレビューを行い、記述した。

結論としては、レビューを通して、この分野における現象は、ライフサイエンスの他の分野における現象と基本的に何ら異なることがないと判明した。この報告では、科学的方法およびプロトコールに基づく正当な形で、精神状態や目的遂行能力への食品の効果が明白に示されている。この分野における表示は、他の分野における表示と同様に、健全な科学的根拠に基づくものでなくてはならないが、本報告ではそれを生み出すに足る方法論が現実存在することを確認できた。したがって、この報告書に示され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。また、そのようになされるべきである。」

表6はこのITG(G)の報告書の記述に基づいて、精神状態や目的遂行能力に関連する表示対象となる機能、またそれらに関する有効性の評価方法をまとめたものである。可能な表示として、“不安を軽くします”、“抑うつ状態を改善します”、“慢性疲労症候群を改善します”等々といったように、食品の表示としては相当に踏み込んだ表現がなされている点に注目したい。それとともに、その裏づけを得るための科学的な評価法が実際に存在するとしている点に留意する必要がある。例えば、“抑うつ状態の改善”という表示に見合う有効性は、Hamiltonうつ病評価尺度のような臨床家による他者評価法やいくつかの自己評価法をもって検証可能であるとされている。

表6には、知覚機能として視覚についても触れられているが、同表での記載はやや不十分なので、眼の健康・視覚機能に対する食品の改善効果について検討した論文等を当たって、どのような評価法が採用されているかを調べた。その結果、表7のように様々な評価法が人を対象とする試験で実際に用いられていることが判明した。

(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、Nepriylisin-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 μ 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3)。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100mg/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Nepriylisin-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。

表1-1. 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に対する効能・効果

| | 効能・効果 | 健康食品の素材・成分の例 |
|----------|--|--|
| 循環系関係 | 心臓病・心臓疾患・心筋梗塞 | コンドロイチン, 紫イベ, ニンニク, 霊芝, リコピン, シベリアジンセン, ウコン, AHCC, ぶどうの種, ドクダミ, EPA, カテキン, 核酸, ケール, 松葉エキス, ローヤルゼリー, コエンザイムQ ₁₀ , オメガ3 |
| | 高血圧 | AHCC, アロエ, βグルカン, 田七人参, ガジュツ, ハブ茶, フラボノイド, 冬虫夏草, カキの葉, カテキン, キトサン, 高麗人参, クコ, 桑の葉, 松葉エキス, プロポリス, 霊芝, ウコン, ルチン, ペプチド |
| | コレステロール・高脂血症・動脈硬化 | AHCC, 紅麹, グルコマンナン, 冬虫夏草, カテキンキトサン, こんぶ, クロレラ, 黒酢, 桑の葉, イソフラボン, 核酸, 松葉エキス, 納豆, ザクロ, 羅布麻茶, 杜仲茶, サイリウム, フコイダン, ルチン |
| | 血栓 | DHA, 核酸, ニンニク, ウコン, フコイダン, ルチン |
| | 貧血 | 紫イベ, 根コンブ, ブルー, スピルリナ, 梅肉エキス, ヘム鉄, ジュアール, カキ肉エキス, カキの葉, ケール, コンブ, モロヘイヤ, 烏骨鶏 |
| | 冷え性 | イチョウ葉エキス, 核酸, ヨモギ, ユズの種, ザクロ, 卵黄油 |
| 代謝・内分泌関係 | 糖尿病 | AHCC, アロエ, 紅麹, βグルカン, ギムネマ, カイアポイモ, 高麗人参, 桑の葉, まいたけ, 紫イベ, プロポリス, 羅漢果, 霊芝, スピルリナ, オリゴ糖, フコイダン, リポ酸, デキストリン |
| | ダイエット | ガルシニア, ギムネマ, パナバ茶, ひじき, ビール酵母, 桑の葉, まいたけ, オリゴ糖, 羅漢果, 杜仲茶, サイリウム, にかり, コエンザイムQ ₁₀ , リポ酸, L-カルニチン, デキストリン |
| | 老化 | ビフィズス菌, ぶどうの種, ハチの子, 冬虫夏草, 松の花粉, リコピン, コエンザイムQ ₁₀ , リポ酸 |
| | 新陳代謝 | 亜鉛, 万田酵素, プラセンタ, コエンザイムQ ₁₀ |
| | 滋養強壮 | アリ(蟻), スッポン |
| | 活性化, 新陳代謝促進, 強精(虚弱体質改善, 疲労回復, 産後・病後の体力回復に) | アエン, アリ(蟻), カキ(牡蠣)エキス, キダチアロエ, クロレラ, 高麗ニンジン, シベリア霊芝(チャーガ), ニンニクエキス, ノコギリヤシ, マンガン, ヤツメウナギエキス, ローヤルゼリー |
| | 疲労回復 | ビワの葉, ハチの子, 冬虫夏草, カキ肉エキス, 高麗人参, クコ, 黒酢, モロヘイヤ, ニンニク, スッポン, アミノ酸, もろみ酢, 烏骨鶏, レモンバーム, コエンザイムQ ₁₀ , リポ酸, L-カルニチン |
| | ハツラツと若々しい毎日のために パワーあふれる毎日をサポート | インド人参, 冬虫夏草 エソウコギ |
| 消化系関係 | 胃炎・胃潰瘍・胃腸病 | アロエ, 紅麹, ビワの葉, ガジュツ, 高麗人参, 松の花粉, ウコン, スッポン, ハトムギ, アマチャズル, 甘草, スピルリナ, ドクダミ, ケール, カモミール, ペイチー茶, フコイダン, レモンバーム |
| | 肝炎・肝臓病・肝機能 | アロエ, 田七人参, シリマリン, ドクダミ, ケール, プロポリス, 霊芝, スギナ, ウコン, DHA, ガジュツ, 甘草, ケフィア, コンドロイチン, 高麗人参, クロレラ, 桑の葉, 深海鮫エキス |
| | お酒をよく飲む方に・お酒を飲むなら | ウコン, マリアアザミ |
| | 便秘・整腸 | アマチャズル, アロエ, パナバ茶, ゲンノショウコ, グルコマンナン, ハブ茶, ひじき, ケフィア, 黒酢, 桑の葉, モロヘイヤ, センナ, サイリウム, にかり, デキストリン, α-シクロデキストリン |
| 免疫系・がん関係 | 下痢 | ゲンノショウコ, ケフィア, スギナ, オリゴ糖, 乳酸菌, 梅肉エキス, カモミール |
| | 抗菌・抗ウイルス | ウコン, ユズの種, ドクダミ, フラボノイド, カテキン, 高麗人参, 納豆, 乳酸菌, βグルカン |
| | 免疫力 | 万田酵素, 松の花粉, 紫イベ, オリゴ糖, プラセンタ, プロポリス, ペイチー茶, 羅布麻茶, メシマコブ, ノニ, エキナセア, 豆乳, ペプチド, キャッツクロー |
| | がん | 核酸, カテキン, コンドロイチン, 高麗人参, アガリクス, AHCC, アロエ, βグルカン, イソフラボン, クロレラ, ムコ多糖類, 紫イベ, プロポリス, 霊芝, ウコン, メシマコブ, フコイダン |
| | 花粉症 | バラ・シソ・魚卵油調合食品, 杉花芽, 甜茶, α-シクロデキストリン, フキエキス |
| 泌尿系関係 | アトピー・アレルギー | 紫イベ, 霊芝, βグルカン, DHA, フラボノイド, ジュアール, 甘草, 免疫ミルク, 木酢液, 羅漢果, 甜茶, ペイチー茶, シソ, エキナセア, オメガ3, フコイダン, レモンバーム, ルチン |
| | 腎炎・腎臓病・腎機能 | ハトムギ, ふかひれ軟骨, 米胚芽, コンドロイチン, 紫イベ, プロポリス, タラの芽, クランベリー |
| | 前立腺肥大症・尿流量低下 | ノコギリヤシエキス |
| 脳・神経系関係 | 利尿 | ドクダミ, ガジュツ, ハトムギ, カワラケツメイ, クコ, 紫イベ, スギナ, ウコン, ウラジロ |
| | 脳卒中・脳梗塞 | ドクダミ, ガジュツ, EPA, ケール, 松葉エキス, 納豆, ニンニク, 烏骨鶏 |
| | 頭痛・鎮痛 | 田七人参, 甘草, コンドロイチン, セイヨウオトギリソウ, 天麻, カモミール, バレリアン |
| | 神経痛 | アマチャズル, ハトムギ, セイヨウオトギリソウ, 梅肉エキス, ヨモギ, ケール, ユズの種 |
| | 痴呆症 | イチョウ葉エキス, 松葉エキス, 納豆, ローヤルゼリー, 豆乳 |
| | ストレスに埋もれ, やる気が出ない, 軽うつに負けないために | セイヨウオトギリソウ |
| | 気分を落ち着きたい夜に, 寝つきが悪い, 不眠症に | アマチャズル, ハブ茶, セイヨウオトギリソウ, シベリア人参, カルシウム, バレリアン |
| | リラックス | テアニン |
| 感覚系関係 | 記憶力・学習能力アップ!, プレインフード, 勉強サプリメント | ホスファチジルセリン |
| | 自律神経失調症 | 大豆イソフラボン, カキ(牡蠣) |
| | 視力・目の疲れ, 眼精疲労 | ぶどうの種, ブルーベリー, DHA, 黒豆, めぐすりの木, ムコ多糖類, ヤツメウナギ, ルテイン |
| | 味覚障害 | 亜鉛, カキ肉エキス |
| | あらゆる痛みの緩和 | キャッツクロー |
| | VDT(Visual Display Terminal) 操作に起因する眼精疲労 | ブルーベリー, ビルベリー, ルテイン, カシスエキス, 松樹皮エキス |
| 耳鳴り, 難聴 | ヒマワリ種外皮エキス加工食品, ハチの子 | |