

6 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

7 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

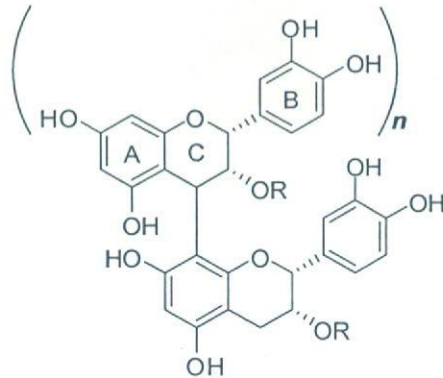
8 Sakai, S., Akiyama, H., Sato, Y., Linhardt, R. J.,
Goda, Y., Maitani, T., Toida, T., “Chondroitin Sulfate
Intake Inhibits the IgE-mediated Allergic Response by
Down-regulating Th2 Responses in Mice” Annual
Conference of the Society for Glycobiology, Los
Angels, Nov. (2006)

9 近藤一成, 太田小夜香, 穂山 浩, 大野泰雄
“シャ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

10 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

G. 知的財産権の出願・登録
なし



R=H, apple procyanidins (ACT)
R=gallate, grape seed procyanidins (GSP)

Fig.1. Structures of procyanidins

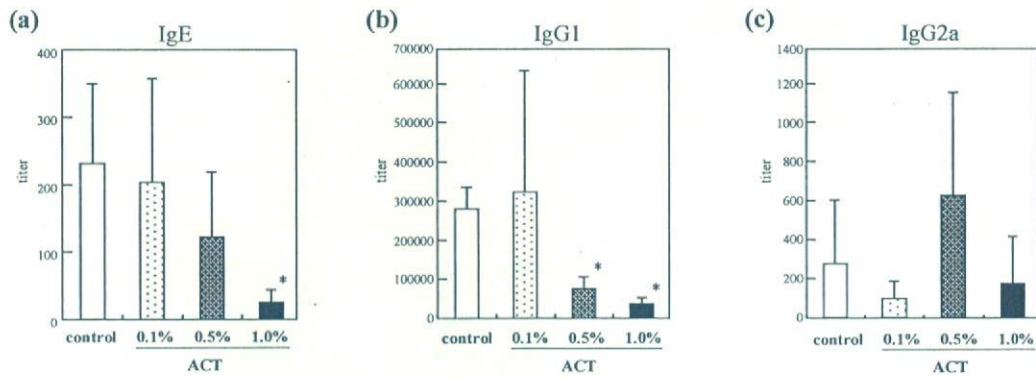


Fig.2 Effects of ACT intake on serum OVA-specific IgE (a), IgG1 (b) and IgG2 (c) titers in W/Wv mice orally sensitized by OVA

Bars represent mean values \pm S.E.M. for 5 mice. The asterisk indicates significant difference from the control group value (* $P < 0.05$).

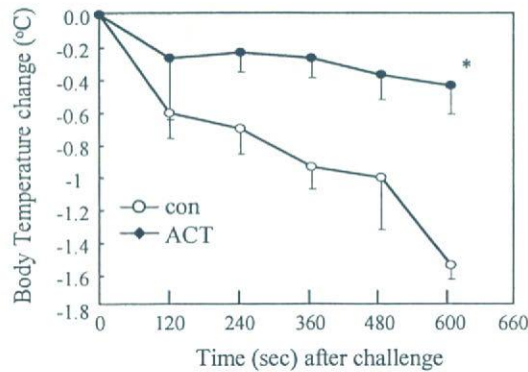


Fig.3 Changes in body temperature on the sensitized W/Wv mice after ASA

*Significantly different from control at $P < 0.05$.

Each value represents mean values \pm S.E.M. of 5 mice.

Table 1 Flow cytometric analysis of the IEL in W/W^v mice

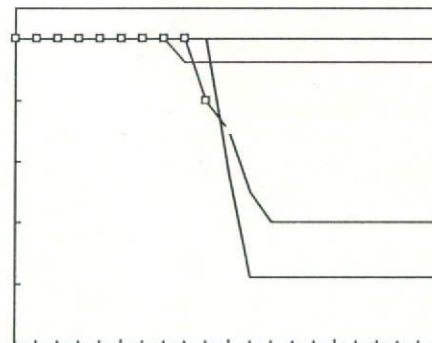
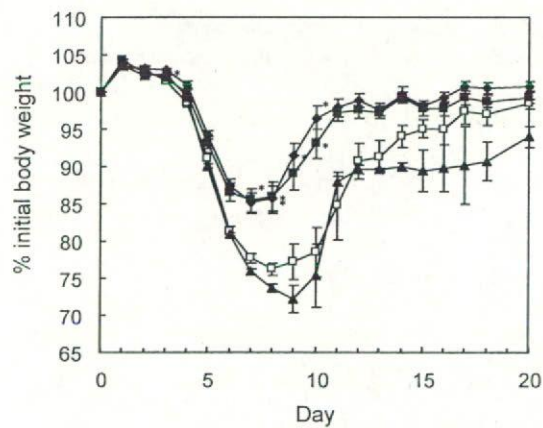
	Blank	Control	0.1% ACT	0.5% ACT	1% ACT	1% ACT (non-oral sens. for 9 weeks.)	1% ACT (non-oral sens. or 2 weeks.)
CD3 ⁺ β7 ⁺ (T cell)	86.6±6.0	82.6±5.1	84.5±5.5	88.9±3.6	90.1±2.2*	90.7±2.5*	89.4±3.8*
CD4 ⁺ CD8 ⁻ (TCRαβCD4)	13.1±2.9	15.8±5.9	12.9±5.9	16.4±4.4	10.7±2.0	7.9±3.0*	8.0±2.4*
CD4 ⁺ CD8 ⁺ (TCRαβCD4CD8αα)	24.1±9.2	29.1±5.7	29.0±8.1	33.8±5.1	25.3±7.5	24.7±12.4	10.3±4.2
CD8α ⁺ CD8β ⁻ (CD8αα)	34.9±7.0	37.2±6.1	38.3±4.7	44.6±5.4	49.9±6.1*	50.7±6.0**	41.7±2.5**
CD8α ⁺ CD8β ⁺ (TCRαβCD8αβ)	39.2±9.8	32.5±8.4	33.9±10.9	30.5±7.1	31.7±8.4	36.5±8.6	43.2±5.1
TCRαβ ⁺ γδ ⁺ (TCRγδ)	3.4±1.2	2.0±0.7	2.2±1.2	3.6±1.0*	10.1±1.7**	9.5±3.9**	11.5±2.9**
TCRαβ ⁺ γδ ⁻ (TCRαβ)	89.4±4.1	90.3±1.45	90.9±1.6	90.7±2.3	84.7±1.9*	85.0±4.8*	80.2±4.6*

ACT was *ad libitum* administered to the W/W^v mice in the form of a solution dissolved in distilled water with levels of 0%, 0.1% ACT, 0.5% ACT and 1% ACT in terms of the dose-dependent study. The control group (n=5) and ACT groups (0.1% ACT, 0.5%ACT and 1% ACT, each n=5) had free access to water and each ACT solution, respectively. All of these mice were sensitized by the administration of 1.0 mg OVA by daily gavage for 9 weeks. As far as the study for assessing the effect of just the ACT intake on the population of T cells in the IEL, the 1% ACT with non-oral sens. for 9 weeks (n=5) and 1% ACT with non-oral sens. for 2 weeks (n=5) were investigated without the oral sensitization of OVA for 9 weeks and 2 weeks, respectively. The blank group (n=5) had free access to water and the MF diet without the oral sensitization of OVA and ACT feeding for 9 weeks. The values represent mean±S.E.M. (% (gated)), **Significant difference from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

Table 2 Flow cytometric Analysis of the IEL in BALB/c mice

	CD3+β7+ (T Cell)	CD4+CD8α+ (TCRαβCD4CD8αα)	CD4+CD8α- (TCRαβCD4)	CD8α+CD8β- (CD8αα)	CD8α+CD8β+ (TCRαβCD8αβ)	TCRαβ-TCRγδ+ (TCRγδ)	TCRαβ+TCRγδ- (TCRαβ)
Control	74.1±6.4	7.4±1.7	9.3±0.5	39.4±4.0	22.4±6.4	26.9±4.1	46.3±6.8
ACT	83.6±4.9	8.1±5.9	6.3±1.8	48.1±5.7*	28.9±5.9	35.7±6.1*	51.8±7.3

The values represent mean±S.E.M. (% (gated)), *Significantly different from control at P< 0.05.



プロアントシアニジンの抗アレルギー作用に関する検討

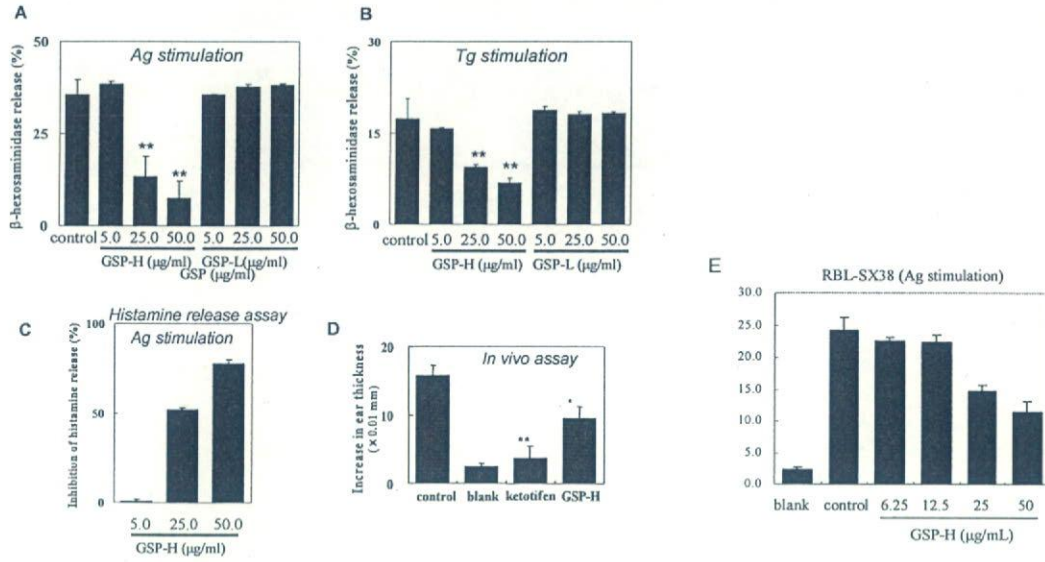


Fig. 1. Effects of GSP-H and GSP-L on degranulation. (A) The activity of β -hexosaminidase released into the culture media from RBL-2H3 cells treated with GSP samples was measured when stimulated with DNP₃₀-HSA (Ag). (B) β -hexosaminidase assay was performed when stimulated with Tg instead of Ag. The results are the percentage of the total β -hexosaminidase released in the supernatant after Ag stimulation, and are the mean \pm SD of three or four independent experiments. ($n = 3$ or 4 ; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). (C) Histamine release assay. The same experiment in A and B was done using DNP30-HSA. Histamine released from RBL cells was measured to ensure that GSP-H inhibit degranulation, not the enzyme reaction (β -hexosaminidase). The results show inhibition rate (%) ($n = 2$) (D) The ear-swelling response was tested in Balb/c mice (SLC, Japan) in order to determine the effects of GSP-H on the immediate-hypersensitivity reaction. Hybridoma cells (IGELa2) were injected subcutaneously into the back of the neck of each animal. After 10 days, ear thickness was measured using an upright thickness gauge. The ear-swelling response was then initiated by picryl-chloride challenge to the ventral side of the neck. Ear thickness was measured 1 h after the challenge. Ketotifen (0.2 mg/ml) was used as a positive control. GSP-H (10 mg/mouse) was orally administered to the mice before antigen stimulation.

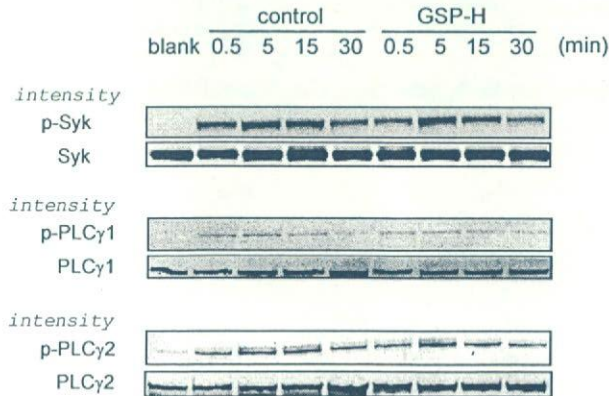


Fig. 2. Effect of GSP-H on IgE-mediated signaling. FcεRI-induced activation of Syk, PLCγ1, and PLCγ2 is not inhibited by GSP-H. RBL cells were sensitized with IgE (0.5 μg/ml) overnight and then incubated with DNP30-HSA (0.2 μg/ml) for the indicated time (0.5, 5, 15, or 30 min) after GSP-H (50 μg/ml) treatment or buffer for 10 min. Cold lysis buffer was added to the cells in a 10-cm culture dish and prepared cell lysates. For Syk phosphorylation, cell lysates were immunoprecipitated with anti-Syk (N-19), followed by protein A-agarose at 4°C under gentle rotation. The immunoblot was probed with anti-phosphotyrosine Ab (4G10). For phosphorylation of PLCγ1 and PLCγ2, immunoblots were prepared from whole cell lysates and probed with polyclonal anti-PLCγ1 (Tyr⁷⁸³), and PLCγ2 (Tyr¹²¹⁷). Results are representative of three experiments. Similar results were obtained.

大腸炎發症抑制效果

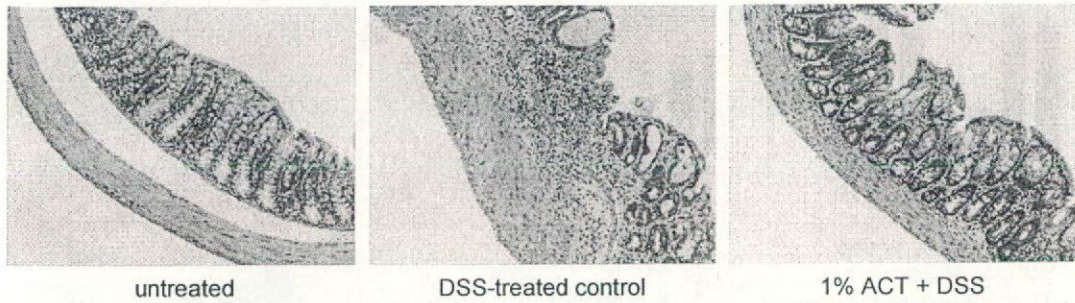


Fig.5 Microscopic changes in the colons of ACT-treated mice. Representative photomicrographs of hematoxylin and eosin-stained colonic tissue from untreated (left), DSS-treated control (middle), and 1% ACT + DSS-treated (right) mice on day 7 after initiation of DSS administration.

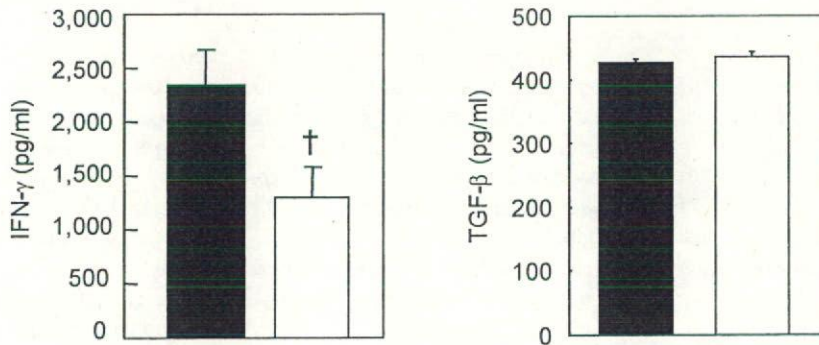


Fig.6 Changes in cytokine production by IEL after ACT administration. IEL from the small intestine were prepared from untreated mice (■) and those treated with 1% ACT mice for 14 days (□). Freshly isolated IEL were cultured with immobilized anti-CD3 antibody for 48 h, and the supernatants were collected to determine the concentrations of IFN-γ and TGF-β by ELISA. Data are presented as means ± SEM (n = 12). †, P < 0.05 versus value for untreated mice.

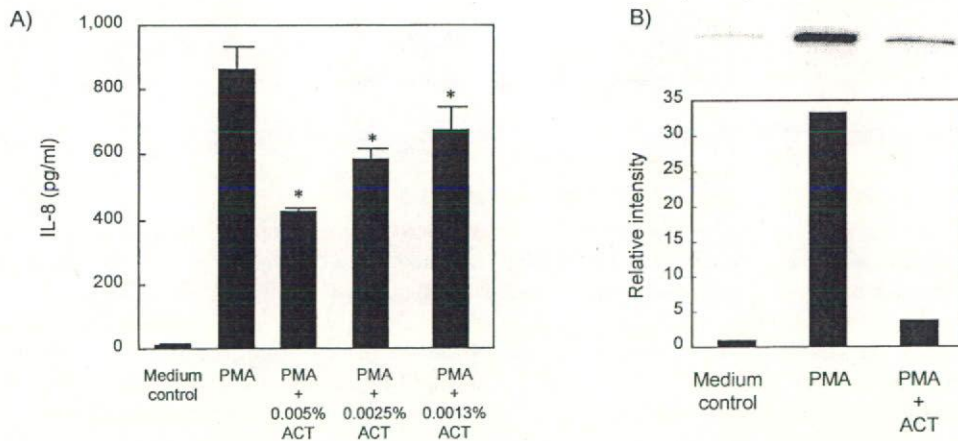


Fig.7 ACT suppresses the PMA-induced production and transcription of IL-8 in Caco-2 cells by inhibiting the activation of NF-κB. (A) Caco-2 cells were incubated at 37 ° C for 6 h in PMA with or without various concentrations of ACT. The amount of IL-8 in the supernatant was analyzed by ELISA. (B) Effect of ACT on translocation of NF-κB to the nucleus. Cells were incubated for 2h with or without PMA in the presence of ACT. Western blot analysis of NF-κB/p65 in nuclear extracts is shown. The gel is representative of results that were obtained in triplicate experiments.

Fig. 3 The inhibition of IgE-induced membrane ruffling by GSP-H. RBL-2H3 cells were sensitized with IgE (0.5 $\mu\text{g/ml}$) overnight. After treated with GSP-H (50 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 10 min, the cells were stimulated with DNP30-HSA (0.2 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 5 min. After Ag stimulation, cells were fixed, permeabilized and stained with Texas Red-labeled phalloidin (F-actin). *blank*, no stimulation; *Ag*, DNP30-HSA stimulation alone; *GSP-H + Ag*, DNP30-HSA stimulation after GSP-H treatment; *GSP-H alone*, GSP-H treatment alone. F-actin was located around the cell periphery in resting cells (*blank*). Fc ϵ RI aggregation induced membrane ruffling and actin remodeling was observed (*Ag*). Fc ϵ RI-induced membrane ruffling was impaired by GSP-H (*GSP-H + Ag*). GSP-L showed no morphological changes (*GSP-L*). Arrow indicates F-actin accumulation.

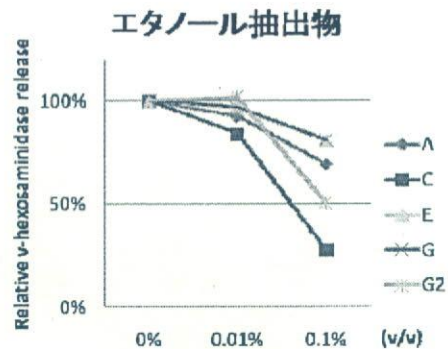
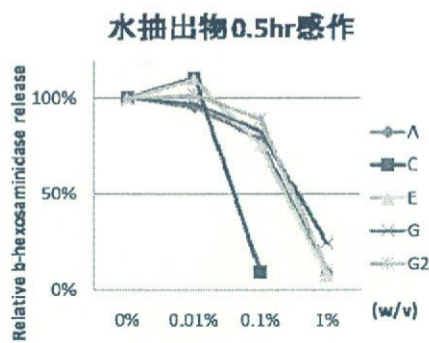
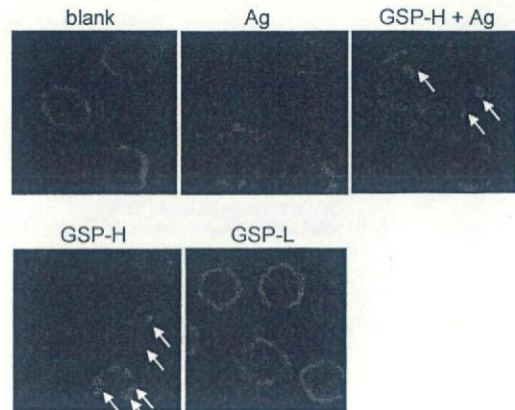
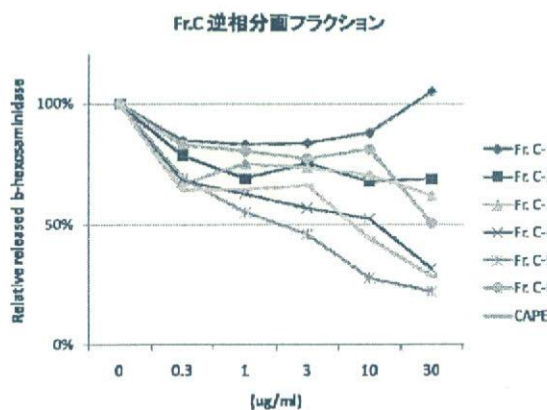


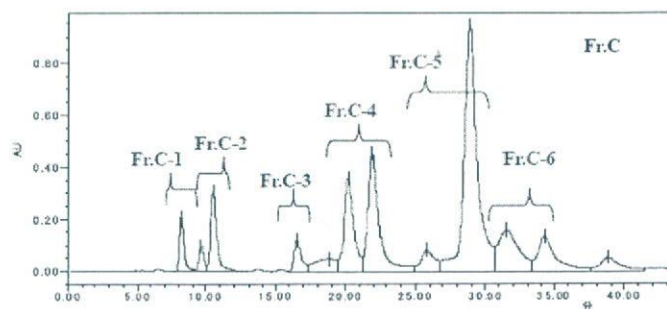
Fig.4 ブラジル産および中国産プロポリスの水抽出物およびエタノール抽出物の脱顆粒抑制作用。サンプル A, E, G, G2 がブラジル産, サンプル C



	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	Cytotoxicity (30 $\mu\text{g/ml}$)
Fr. C-1	9.08E+07	-
Fr. C-2	1818	-
Fr. C-3	1125	-
Fr. C-4	5.56	-
Fr. C-5	1.69	-
Fr. C-6	88	-
CAPE	4.96	-

Fig.5 Fr.C-1~C-6 及び CAPE (positive control) の 50%脱顆粒抑制濃度並びに 30 $\mu\text{g/ml}$ における cytotoxicity の表

Fig.6 Fr.C の分画精製
Fr.C を逆相クロマトグラフィーで分画



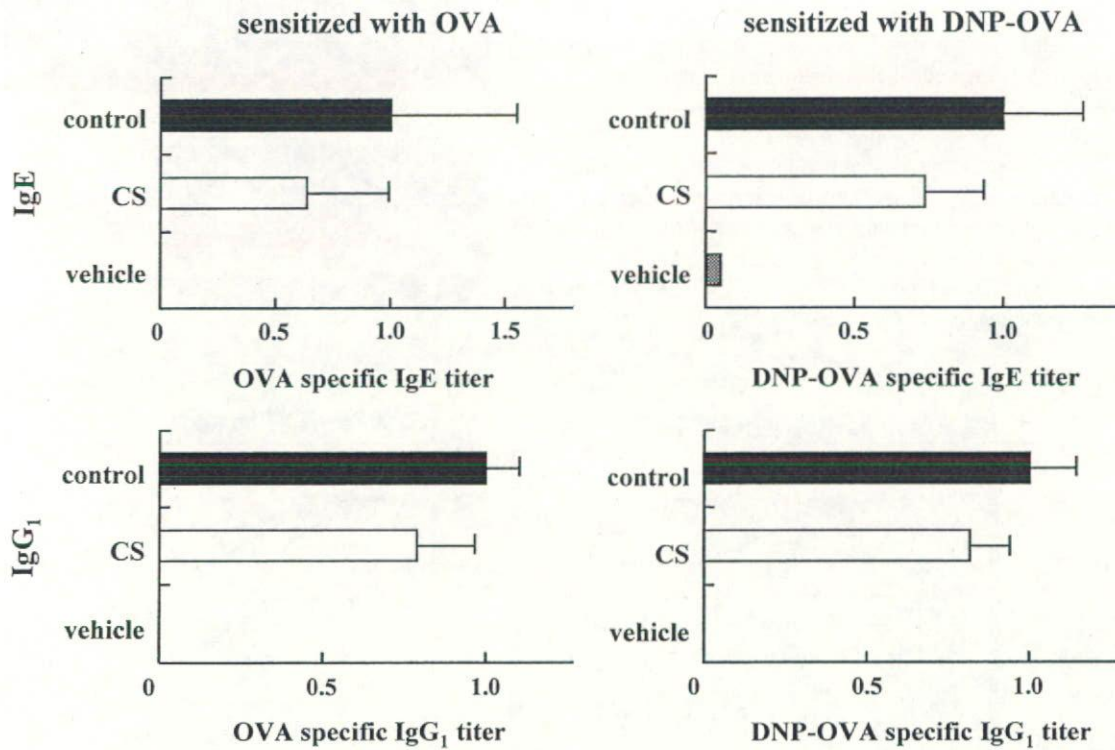


Figure 1 Effects of CS on the Serum Antigen-Specific Antibody Titer in Secondary Immune Response. Bars represent mean values \pm S. D. of 5 mice. CS (400 mg/kg/day) was administered orally from the first immunization to 7d after the second immunization.

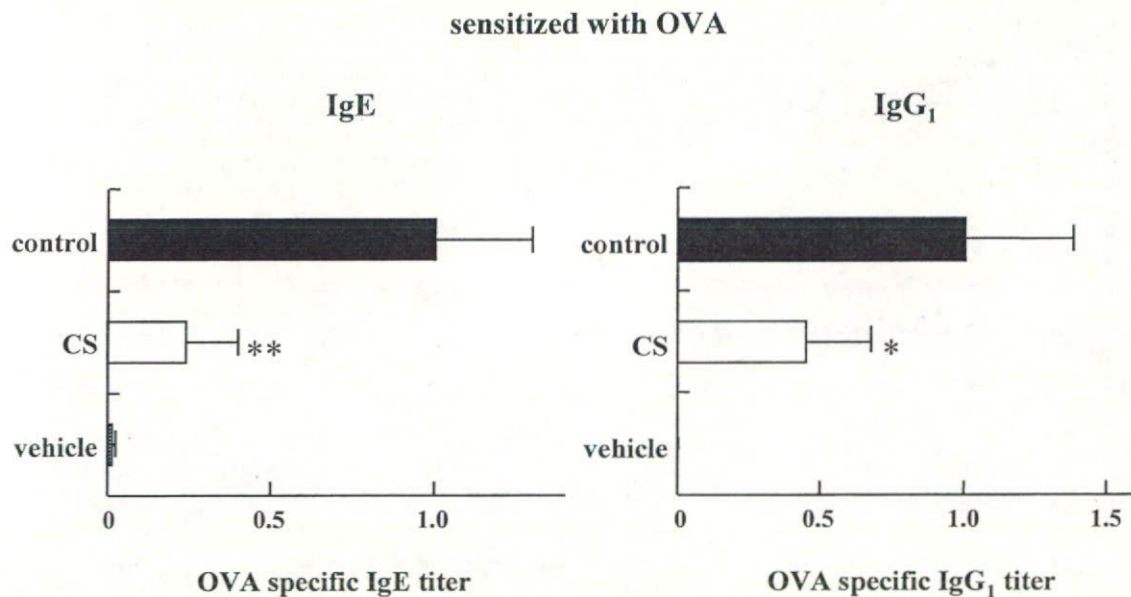


Figure 2 Effects of CS on the Serum Antigen-Specific Antibody Titer in Secondary Immune Response. Bars represent mean values \pm S. D. of 10 mice. CS was administered orally "ad libitum" from 7d before the first immunization to 7d after the second immunization.

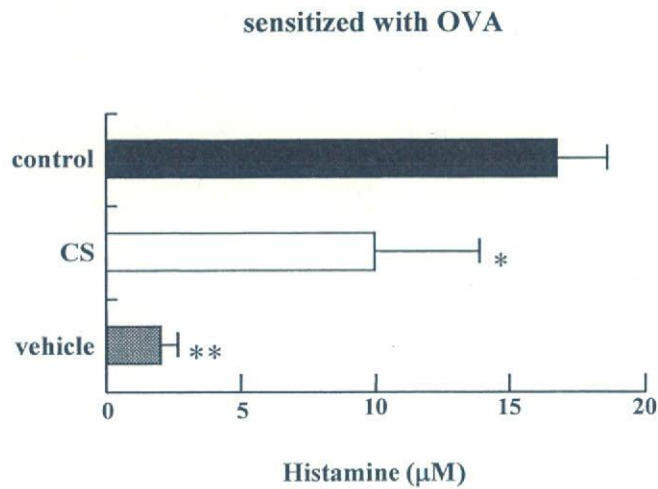


Figure 3 Effect of CS on the serum histamine concentrations in the OVA-challenged mice. Serum samples were collected after 10 min *i.p.* administration of OVA. Bars represent mean values \pm S. D. of 4 mice. CS was orally administered from the first immunization to the time of the active systemic anaphylaxis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

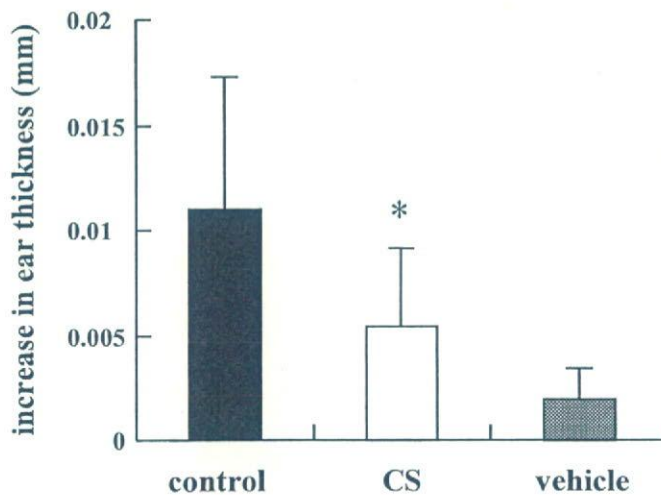


Figure 4 Effects of CS on the immunized mice ear swelling responses 1 hr after epicutaneous challenge with picryl chloride. Bars represent mean values \pm S. D. of 5 mice (10 ears). CS was administered orally from the first immunization. * $P < 0.05$ compared with control (saline).

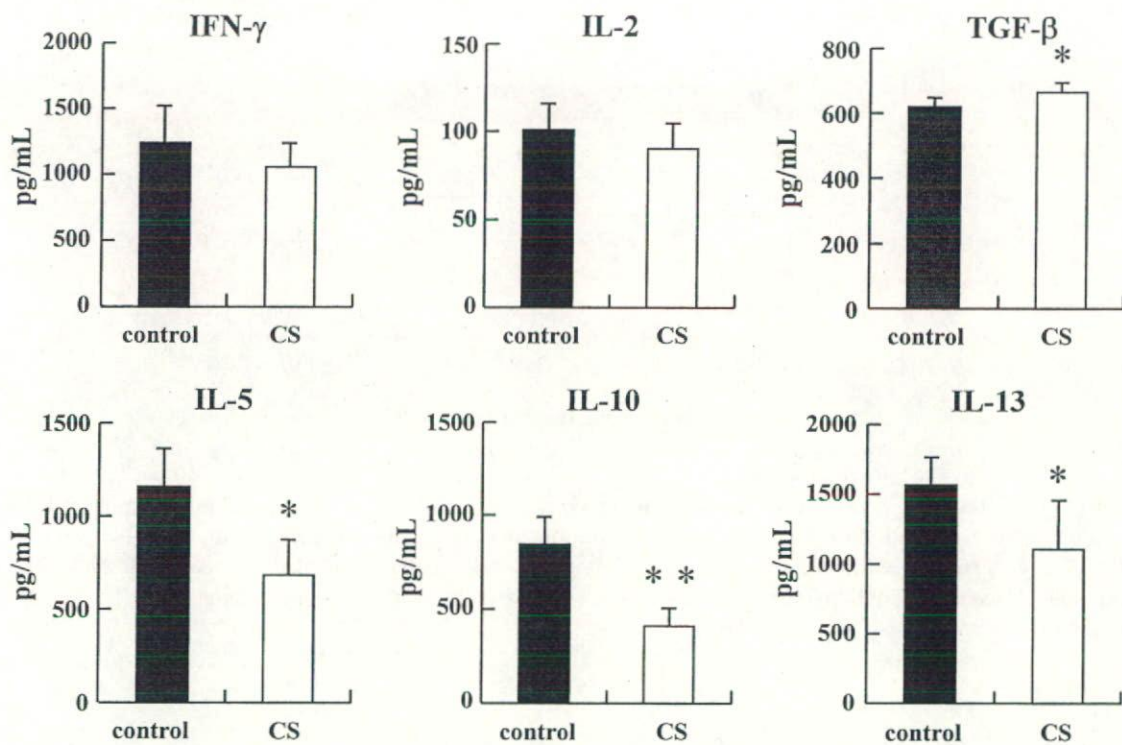


Figure 5 Effects of CS administration on the cytokine production of splenocytes *in vitro*. BALB/c mice (n=5) were intraperitoneally injected on d 0 and 10 with 20 μ g of OVA and 2 mg of Al(OH)₃ at a total volume of 400 μ l, and orally administered CS (*ad libitum*) from 7 day before 1st immunization to 7 days 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

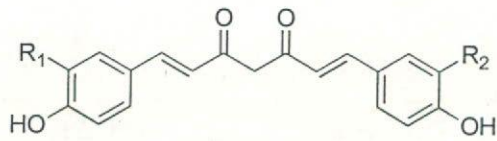
	TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$	CD8 $\alpha\alpha$	CD8 $\alpha\beta$	CD4
CS (ad libitum)	53.4 \pm 4.4 *	32.8 \pm 4.1	45.9 \pm 6.7	22.6 \pm 4.5	17.5 \pm 5.2 *
CS (400 mg/kg/day)	49.1 \pm 3.8	28.9 \pm 5.3	47.2 \pm 2.8	20.3 \pm 2.6	13.8 \pm 3.0 *
control	46.8 \pm 3.8	31.7 \pm 1.7	50.7 \pm 1.7	17.8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

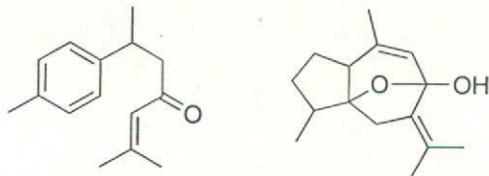
Table 2 Percentage of splenocytes expressing surface antigenic markers in each group

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

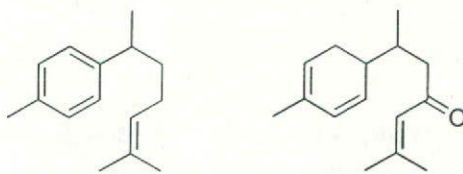
Data are means \pm S.D. (% (gated)), n = 8. *,** Significantly difference from control at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. CS was administered orally "ad libitum" from 7d before the first immunization to 7d after the second immunization. The control group had *ad libitum* free access to water.



curcumin (1): R₁=R₂=OMe
 demethoxycurcumin (2): R₁=OMe, R₂=OH
 bisdemethoxycurcumin (3): R₁=R₂=OH



ar-turmerone (4) curcumenol (5)



zingiberene (6) α-turmerone (7)

Fig. 1 ウコンの主要成分

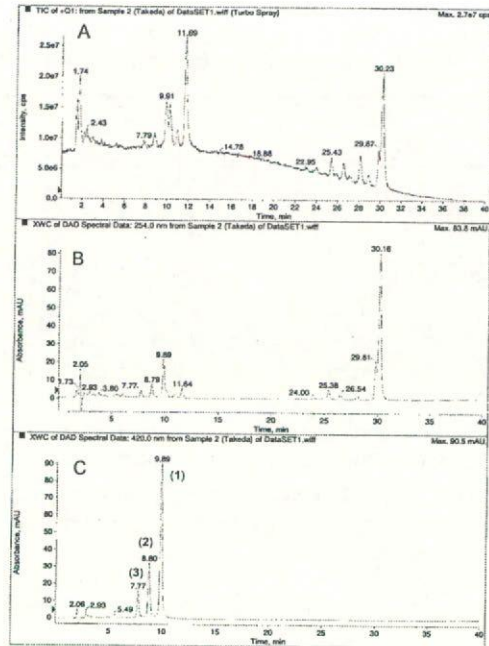


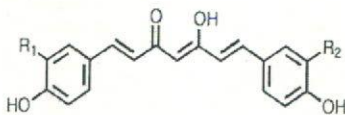
Fig. 2 HPLCによるウコン成分の分離

A: TIC; B: UV 254nm; C: UV 420nm

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)			合計
	Bisdemethoxy curcumin	Demethoxy curcumin	Curcumin	
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)血漿成分中のタンパク質(対照群)

Proteins	Score	Peptide matched
hemopexin [Rattus norvegicus]	Significant hits	
PREDICTED: similar to Alpha-1-inhibitor III precursor [Rattus norvegicus]	Significant hits	
Cc1-8 [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 murine IgG1b2 [Rattus norvegicus]	55	3
7 Cc1-8 [Rattus norvegicus]	54	1
8 Ba1-667 [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 [Polaremonas sp. J5666]	20	1
24 unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	20	1
25 alpha-1-antitrypsin-like protein [Tamias sibiricus]	20	1

表4 ESI-MS/MS分析法を用いて同定されたラット(雌)血漿成分中のタンパク質(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 Cc1-8 [Rattus norvegicus]	150	4
3 Ba1-667 [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

Table 5-1a. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	Ht (%)	Hb (g/dL)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	HDW (g/dL)	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	MPV (fL)	PDW (%)	
0	4	Mean	40.3	14.0	7.24	55.7	19.3	34.7	12.5	2.04	1215	8.1	60.1
		S.D.	2.1	0.7	0.25	1.0	0.4	0.2	0.5	0.10	159	0.5	1.9
1000	4	Mean	40.1	13.8	6.96	57.7	19.9	34.4	12.4	1.97	1308	7.8	59.1
		S.D.	0.5	0.1	0.29	1.6	0.8	0.5	0.5	0.04	157	0.5	2.4
2500	4	Mean	38.9	13.5	6.83	56.9	19.8	34.7	12.4	2.05	1307	8.2	61.1
		S.D.	1.2	0.5	0.30	1.2	0.5	0.3	0.4	0.12	220	0.6	1.0

S.D.: Standard deviation.

Table 5-1b. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	Ht (%)	Hb (g/dL)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	HDW (g/dL)	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	MPV (fL)	PDW (%)	
0 ^{a)}	4	Mean	40.1	13.8	7.15	56.1	19.3	34.3	12.3	2.07	1335	8.3	61.0
		S.D.	0.6	0.3	0.10	0.9	0.2	0.8	0.2	0.12	236	0.7	2.7
5000 ^{b)}	3	Mean	39.5	13.7	6.94	57.0	19.8	34.7	12.7	2.22	1302	7.7	60.7
		S.D.	0.3	0.1	0.17	1.0	0.6	0.4	0.4	0.01	128	0.9	2.2

S.D.: Standard deviation.

a), b): Animals were administered twice at interval of 30 minutes.
(a: the vehicle, b: the test substance)

Table 5-2a. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	PCT (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)	Retics ($10^9/\text{L}$)	%Retics (%)	ChR (pg)	MCVr (fL)	
0	4	Mean	0.98	21.0	7.8	1.46	0.59	180.1	2.5	19.1	61.8
		S.D.	0.09	0.8	0.1	0.04	0.04	57.4	0.8	0.2	0.6
1000	4	Mean	1.02	21.6	7.8	1.45	0.59	176.1	2.6	19.5	62.6
		S.D.	0.18	0.8	0.1	0.05	0.03	28.2	0.4	0.8	1.3
2500	4	Mean	1.06	20.8	7.7	1.45	0.60	202.2	3.0	19.6	63.6
		S.D.	0.12	1.0	0.2	0.09	0.06	63.0	1.1	0.7	1.7

S.D.: Standard deviation.

Table 5-2b. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	PCT (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)	Retics ($10^9/\text{L}$)	%Retics (%)	ChR (pg)	MCVr (fL)	
0 ^{a)}	4	Mean	1.10	20.9	7.8	1.48	0.62	239.8	3.4	19.0	62.3
		S.D.	0.13	0.7	0.3	0.16	0.10	70.5	1.0	0.3	1.7
5000 ^{b)}	3	Mean	1.00	22.3	7.6	1.49	0.61	249.3	3.6	19.3	63.3
		S.D.	0.04	1.3	0.2	0.04	0.02	72.9	1.0	0.3	1.2

S.D.: Standard deviation.

a), b): Animals were administered twice at interval of 30 minutes.
(a: the vehicle, b: the test substance)

Table 5-3a. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	Differential leukocyte count ($10^3/\mu\text{L}$)						
			L	N	M	E	B	LUC	
0	4	Mean	3.98	3.24	0.59	0.08	0.04	0.02	0.03
		S.D.	0.11	0.23	0.22	0.04	0.01	0.01	0.01
1000	4	Mean	4.84	3.83	0.83	0.09	0.05	0.01	0.04
		S.D.	0.70	0.70	0.08	0.03	0.03	0.01	0.03
2500	4	Mean	5.47 *	4.18	1.12 *	0.09	0.04	0.02	0.02
		S.D.	0.57	0.76	0.23	0.01	0.01	0.01	0.01

S.D.: Standard deviation.

Significantly different from control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Table 5-3b. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	WBC (10 ³ /μL)	Differential leukocyte count (10 ³ /μL)						
			L	N	M	E	B	LUC	
0 ^{a)}	4	Mean	5.73	4.48	1.05	0.10	0.05	0.02	0.04
		S.D.	0.61	0.05	0.59	0.03	0.02	0.01	0.02
5000 ^{b)}	3	Mean	5.53	4.28	1.03	0.11	0.06	0.01	0.03
		S.D.	0.23	0.50	0.50	0.02	0.01	0.01	0.01

S.D. : Standard deviation.
a), b): Animals were administrated twice at interval of 30 minutes.
(a; the vehicle, b; the test substance)

Table 6-1a. Blood biochemistry-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGTP (U/L)	Creat (mg/dL)	BUN (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	Glob (g/dL)	A/G ratio	Gluc (mg/dL)
0	4	Mean	459	58	16	1	0.30	15.5	5.78	4.38	1.40	3.15
		S.D.	145	9	1	1	0.06	1.4	0.25	0.22	0.12	0.31
1000	4	Mean	393	56	15	0	0.26	14.8	5.76	4.29	1.47	2.93
		S.D.	161	3	2	1	0.02	1.0	0.15	0.15	0.08	0.22
2500	4	Mean	500	55	16	1	0.28	15.5	5.98	4.51	1.47	3.09
		S.D.	144	3	1	1	0.01	2.7	0.14	0.15	0.05	0.17

S.D. : Standard deviation.

Table 6-1b. Blood biochemistry-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGTP (U/L)	Creat (mg/dL)	BUN (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	Glob (g/dL)	A/G ratio	Gluc (mg/dL)
0 ^{a)}	4	Mean	476	62	18	0	0.29	8.9	5.62	4.31	1.31	3.31
		S.D.	76	4	1	0	0.03	3.1	0.14	0.13	0.06	0.18
5000 ^{b)}	3	Mean	588	50 **	18	1	0.23	8.7	5.92 *	4.62 *	1.30	3.56
		S.D.	139	4	2	1	0.02	2.6	0.14	0.12	0.02	0.06

S.D. : Standard deviation.
a), b): Animals were administrated twice at interval of 30 minutes.
(a; the vehicle, b; the test substance)
Significantly different from control : *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 6-2a. Blood biochemistry-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	T.Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	T.Bil (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	4	Mean	51	17	0.07	9.7	5.5	144.5	2.88	109.6
		S.D.	6	3	0.01	0.3	0.5	1.4	0.08	1.7
1000	4	Mean	50	19	0.06 *	9.8	6.1	144.7	3.04 *	109.5
		S.D.	2	3	0.01	0.1	0.6	1.0	0.07	1.8
2500	4	Mean	56	19	0.05 *	10.0	6.4 *	144.7	3.02	107.9
		S.D.	9	5	0.01	0.3	0.3	1.0	0.21	0.7

S.D. : Standard deviation.
Significantly different from control : *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 6-2b. Blood biochemistry-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	T.Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	T.Bil (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0 ^{a)}	4	Mean	47	25	0.06	10.0	6.4	144.5	3.15	107.4
		S.D.	8	7	0.01	0.3	0.5	1.1	0.26	2.5
5000 ^{b)}	3	Mean	61 *	24	0.07	10.3	6.4	144.5	3.26	105.7
		S.D.	5	3	0.02	0.1	0.4	1.7	0.12	2.5

S.D. : Standard deviation.
a), b): Animals were administrated twice at interval of 30 minutes.
(a; the vehicle, b; the test substance)
Significantly different from control : *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 7a. Organ weight-Group mean values in female rats
(Absolute weight at terminal kill after 2 weeks of treatment)

Dose (mg/kg/day)		Body weight (g)	Brain (mg)	Pituitary (mg)	Thyroids (mg)	Salivary (mg)	Heart (mg)	Thymus (mg)	Liver (g)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenals (mg)	Ovaries (mg)	Uterus (mg)
0	Mean	144	1714	8.2	16.2	351	542	390	4.34	1141	342	63.5	83.0	440
	S.D.	8	59	0.8	2.9	29	46	34	0.23	71	22	5.9	26.3	227
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4	4
1000	Mean	146	1692	8.0	17.3	368	549	479	4.74	1275	348	73.4	96.6	339
	S.D.	13	43	1.5	4.7	49	61	298	0.40	131	39	12.6	26.8	53
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2500	Mean	150	1744	9.5	13.5	359	550	392	5.37 **	1323	388	67.2	76.5	356
	S.D.	7	15	1.2	1.6	26	34	81	0.39	125	42	8.8	10.8	59
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

S.D.: Standard deviation.
N: Number of animals examined.
Significantly different from control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Table 7b. Organ weight-Group mean values in female rats
(Absolute weight at terminal kill after 2 weeks of treatment)

Dose (mg/kg/day)		Body weight (g)	Brain (mg)	Pituitary (mg)	Thyroids (mg)	Salivary (mg)	Heart (mg)	Thymus (mg)	Liver (g)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenals (mg)	Ovaries (mg)	Uterus (mg)
0 ^{a)}	Mean	149	1694	8.0	16.9	358	572	363	4.87	1211	344	69.6	76.1	443
	S.D.	9	49	1.0	5.9	35	55	103	0.40	109	30	9.4	7.9	255
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5000 ^{b)}	Mean	151	1720	8.7	17.9	396	566	384	6.18 **	1331	354	79.9	75.8	368
	S.D.	5	18	2.1	4.0	42	55	37	0.44	170	23	9.9	8.9	87
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

S.D.: Standard deviation.
N: Number of animals examined.
a), b): Animals were administered twice at interval of 30 minutes.
(a; the vehicle, b; the test substance)
Significantly different from control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Table 8a. Organ weight-Group mean values in female rats
(Relative weight to body (%) at terminal kill after 2 weeks of treatment)

Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Thyroids	Salivary	Heart	Thymus	Liver	Kidneys	Spleen	Adrenals	Ovaries	Uterus
0	Mean	1.20	0.00570	0.01127	0.245	0.378	0.271	3.02	0.796	0.238	0.0444	0.0575	0.313
	S.D.	0.08	0.00052	0.00223	0.031	0.047	0.029	0.16	0.093	0.011	0.0069	0.0169	0.181
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1000	Mean	1.17	0.00554	0.01187	0.252	0.377	0.319	3.26	0.875	0.239	0.0511	0.0665	0.234
	S.D.	0.10	0.00120	0.00326	0.013	0.024	0.166	0.16	0.038	0.016	0.0119	0.0197	0.045
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2500	Mean	1.16	0.00627	0.00901	0.239	0.367	0.261	3.57 **	0.879	0.259	0.0447	0.0511	0.236
	S.D.	0.04	0.00058	0.00124	0.022	0.026	0.051	0.14	0.051	0.026	0.0051	0.0081	0.030
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

S.D.: Standard deviation.
N: Number of animals examined.
Significantly different from control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Table 8b. Organ weight-Group mean values in female rats
(Relative weight to body (%) at terminal kill after 2 weeks of treatment)

Dose (mg/kg/day)		Brain	Pituitary	Thyroids	Salivary	Heart	Thymus	Liver	Kidneys	Spleen	Adrenals	Ovaries	Uterus
0 ^{a)}	Mean	1.14	0.00536	0.01124	0.241	0.383	0.242	3.26	0.812	0.231	0.0467	0.0513	0.303
	S.D.	0.07	0.00070	0.00320	0.017	0.015	0.061	0.08	0.048	0.015	0.0063	0.0067	0.189
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5000 ^{b)}	Mean	1.14	0.00583	0.01193	0.263	0.375	0.255	4.10 *	0.881	0.235	0.0531	0.0502	0.246
	S.D.	0.03	0.00160	0.00298	0.028	0.025	0.028	0.24	0.086	0.007	0.0074	0.0044	0.066
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

S.D.: Standard deviation.
N: Number of animals examined.
a), b): Animals were administered twice at interval of 30 minutes.
(a; the vehicle, b; the test substance)
Significantly different from control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

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。健診受診者の血液を用いて、血漿中の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することにより、アディポネクチン濃度が内臓脂肪面積、BMI、腹囲、血清中性脂肪濃度、アラニンアミノ転移酵素（ALT）、血漿インスリン濃度と有意な負の相関を示すことを明らかにした。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ことによって、食品中の関与成分の有効性の評価が標準化され、短期間でかつ客観的な評価が可能になると考えられた。

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(表1-4)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を速やかにバックジーン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。

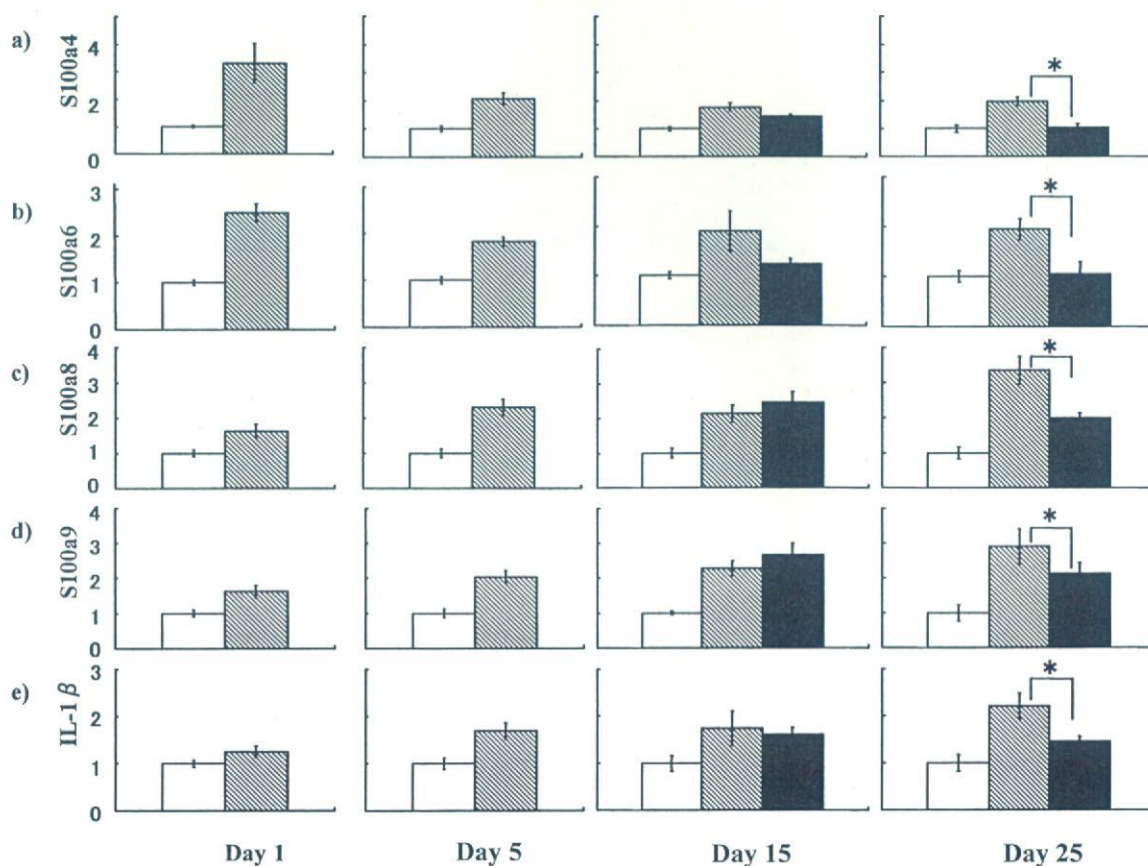


図1 高血糖によって上昇したサイトカイン遺伝子発現はα-グルコシダーゼ阻害により抑制される。

□ control ▨ stz-control ■ stz-miglitol

平均値 ± SEM (N = 4/ 群)、 * P < 0.05

C. 研究結果

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) 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)。

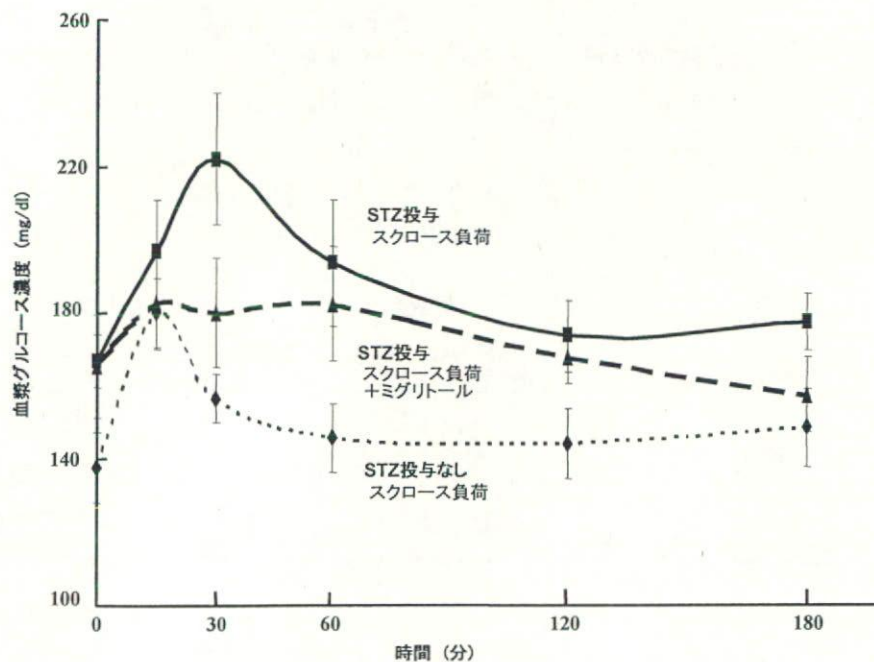


図2 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるスクロース負荷後の血糖値の変動

「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 \pm 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