

の血液を用いて血球 mRNA のマイクロアレイ解析を行ったところ、炎症性サイトカイン IL-1 β および G タンパク質関連遺伝子群の発現が高まっていたが、これらの発現はすべてミグリトールの同時投与によって抑制された (表 1)。血球における IL-1 β の遺伝子発現の変動を、リアルタイム PCR 法によって確認したところ、streptozotcin の低用量投与を受けスクロースを 2 日間断続的に投与したラットでは、3 日目

のスクロース投与前にすでに IL-1 β の遺伝子発現が高まる傾向がみられ、スクロース負荷 3 時間後にはその発現が著しく高まっていた。一方、3 日間のスクロース負荷と同時にミグリトールを投与したラットでは、3 日目のスクロース投与前の IL-1 β の遺伝子発現は対照ラットと同じ程度に低く、スクロース負荷 3 時間後でも IL-1 β の遺伝子発現の増大幅は少なかった (図 3)。

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

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

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

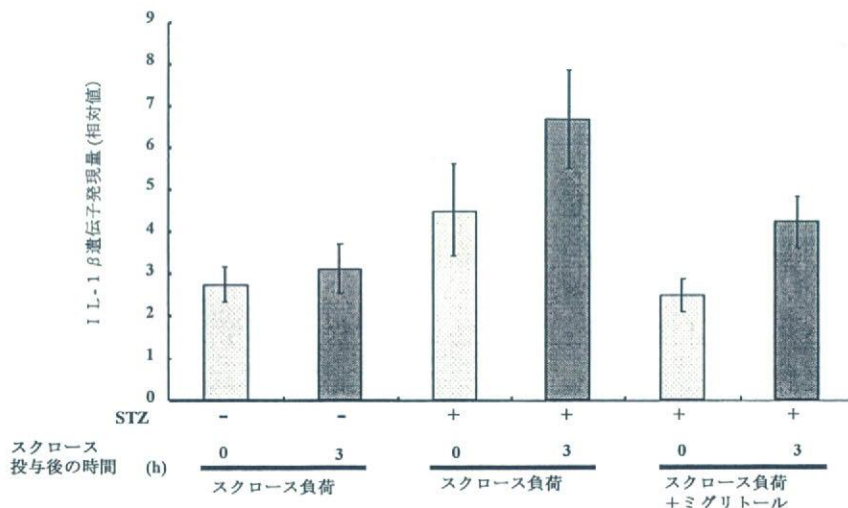


図 3 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるスクロース負荷後の血球細胞 IL-1 β の遺伝子発現量の変動

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

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

エピガロカテキンガレート (EGCG) を多く含む茶カテキン抽出物は、脂肪蓄積の抑制など脂質代謝に影響を及ぼすことから特定保健用食品の素材として利用されている。そこで、EGCG による脂質代謝の変動を鋭敏に反映するバイオマーカーとしてアディポネクチンが利用で

きるかを検証してみた。非肥満型2型糖尿病モデルである GK ラットに 0.2 %EGCG 添加食を投与したところ、体重増加率および腸間膜脂肪、副睪丸脂肪はいずれもやや減少する傾向で大きな影響はもたらさなかったにもかかわらず、投与開始8週間後から血漿アディポネクチン濃度が有意に上昇し、投与開始 12 週間後には血清中性脂肪濃度が 50%にまで低下した (図4)。

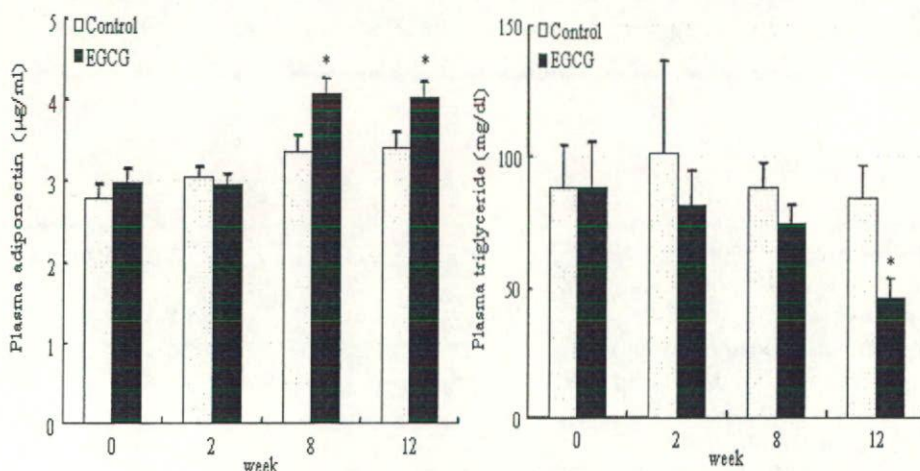


図4 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるエピガロカテキンガレート (EGCG) の投与によるGKラットの血漿アディポネクチン濃度の変動
平均値 ± SEM (N = 6/ 群)

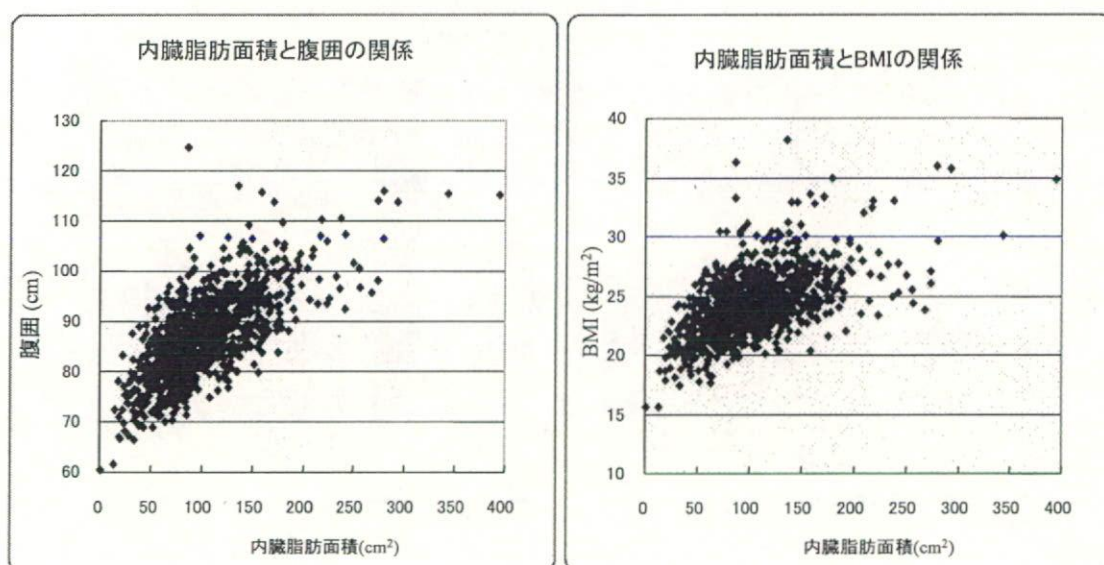


図5 人間ドック男性受診者におけるCTスキャン腹部内臓脂肪面積と腹囲およびBMIとの関連

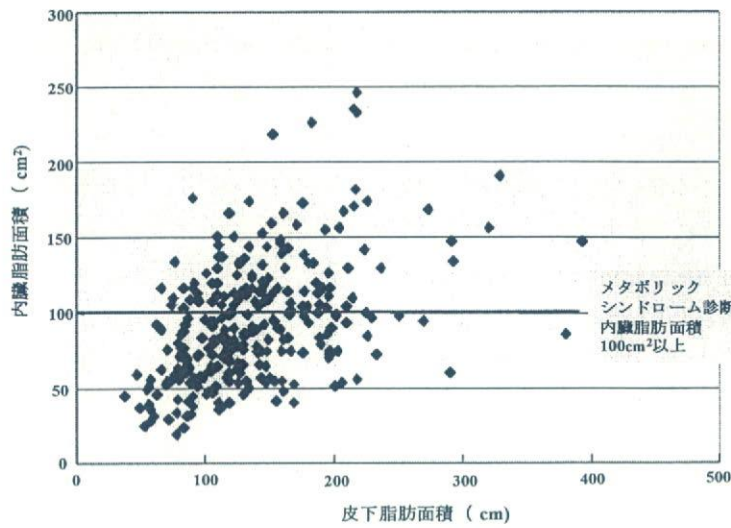


図6 人間ドック男性受診者におけるCTスキャン腹部内臓脂肪面積と皮下脂肪面積との関連

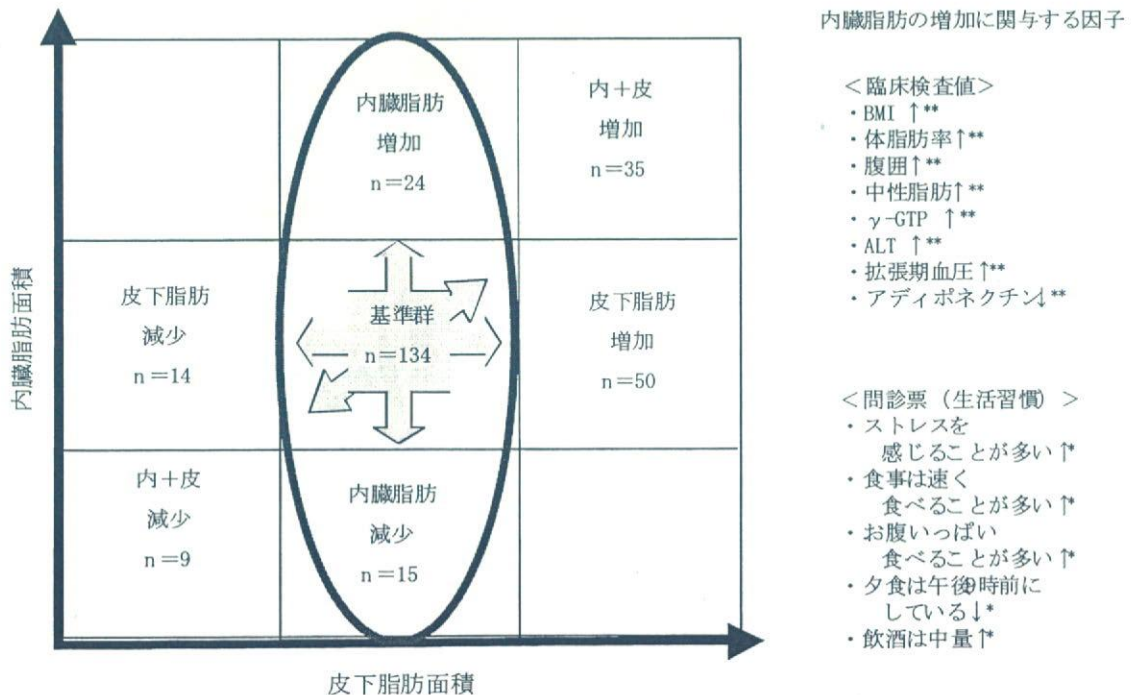


図7 内臓脂肪面積ならびに皮下脂肪面積の偏りによるグループ分け(左)と抽出された内臓脂肪の増加に関する因子(右)

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

*p<0.05, **p<0.01

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

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

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

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

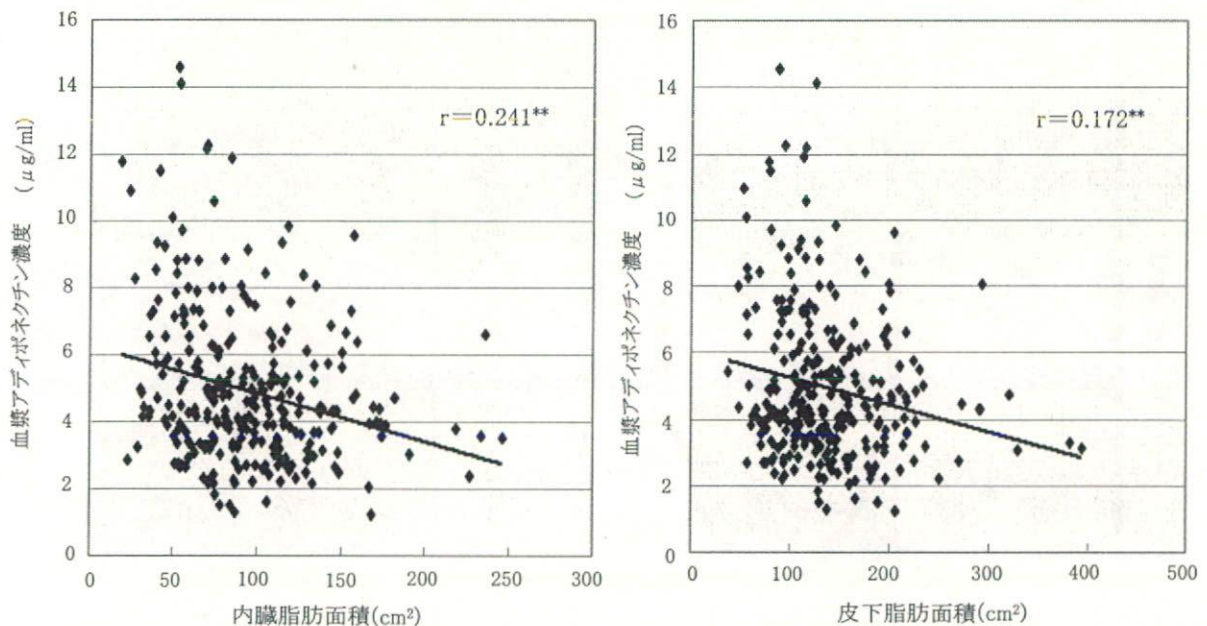


図 8 内臓脂肪面積ならびに皮下脂肪面積と血中アディポネクチン濃度との相関性

** $p < 0.01$

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

健康診断受診者の血漿アディポネクチン濃度はBMI ($r = -0.306$) および腹囲 ($r = -0.349$) と高い負の相関を示し、血清中性脂肪とも有意な負の相関 ($r = -0.190$) を示した。一方、血漿インターロイキン-6 (IL-6) 濃度は、空腹時血糖 ($r = 0.337$) およびHbA1c ($r = 0.342$) と高い正の相関を示し、血清中性脂肪とも有意な正の相関 ($r = 0.210$) を示した。食品群の摂取量をもとにして因子分析によって食品選択のパターンを類型化してみたところ、6つの因子(食事パターン)が抽出された。そのうち、因子2が血漿アディポネクチン濃度と有意な

正の相関 ($r = 0.159$) を示した。因子2に寄与している食品群は、寄与度の高い順に、淡色野菜、緑葉野菜、きのこ、乳類、海草、芋類であり、アルコールはこの因子と強く負の関連を示した。食物繊維の摂取量が少ない群では、食物繊維の摂取量が多い群と比較して血漿アディポネクチン濃度が低くなる傾向が見られたが、この血漿アディポネクチン濃度の低下は、特にアディポネクチン遺伝子の第45ヌクレオチド (ADN45) に変異 (T/G, G/G) を持つもの (44%に相当) では特徴的に見られた。この遺伝子多型を持つものでは、食物繊維の摂取量の低下によって血漿アディポネクチン濃度が有意に低下していた (図9)。

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

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

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

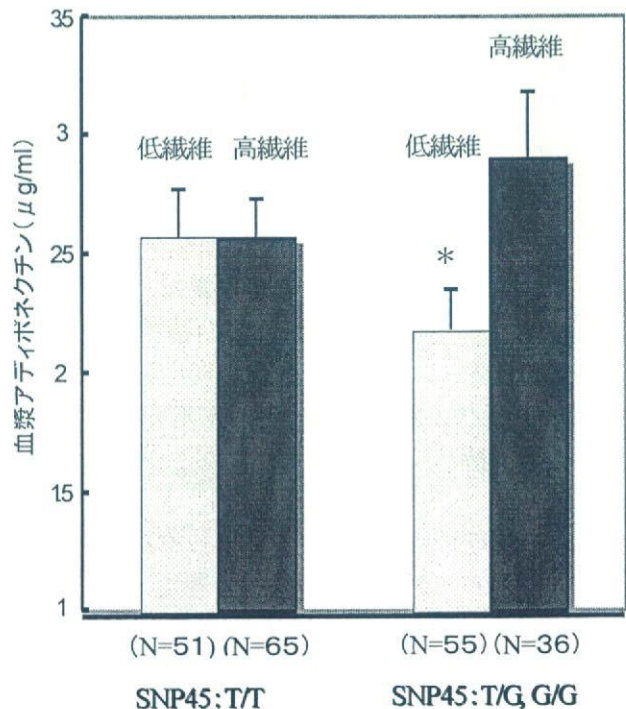


図9 食物繊維摂取量とアディポネクチンとの関連性に及ぼすアディポネクチン遺伝子多型 (SNP45) の影響 * $P < 0.05$

D. 考察

1. 血糖、脂質代謝関連バイオマーカーの検索と妥当性

本研究では、メタボリック症候群の発症リスクの中で、鍵となる代謝変化として血糖と内臓脂肪蓄積を取り上げ、それぞれ、短期的かつ初期的な変化をモニターできる血液指標を、糖尿病発症モデルラット（ストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットおよびGKラット）を用いて血球遺伝子のマイクロアレイ解析および血漿生理活性成分の分析により検索した。その結果、血糖上昇に起因する独自の変化を示す血液指標として、S100タンパク質およびIL-1 β などの炎症マーカーの血球細胞における遺伝子発現が有用である可能性が明らかになった。特に、IL-1 β はわずか2回（2日間）のスクロース負荷による食後高血糖によって血球の遺伝子発現が高まることが示され、IL-1 β が間欠的な食後高血糖をモニターする鋭敏な指標として利用できる可能性が考えられた。一方、本研究では、内臓脂肪の蓄積に由来する脂質代謝・エネルギー代謝の変化を鋭敏に捉える指標としてのアディポネクチンの有用性を検証するために、モデル食品成分としてエピガロカテキンガレート（EGCG）をGKラットに投与したところ、血清中性脂肪濃度が低下する以前に血漿アディポネクチン濃度が上昇した。この結果は、血漿アディポネクチン濃度は内臓脂肪の蓄積に由来する脂質代謝・エネルギー代謝の変化を鋭敏に捉える中間バイオマーカーとして有用だという考えを支持している。

2. 臨床研究におけるメタボリック症候群関連バイオマーカー候補の選定

健診受診者の血液を用いて、血漿アディポネクチン濃度とメタボリック症候群関連指標との関連性を検討したところ、血漿アディポネクチン濃度はBMI、腹囲、血清中性脂肪濃度と有意な負の相関を示し、内臓脂肪とも負の相関を示すことが明らかになった。因子分析によって

血漿アディポネクチン濃度と関連する食事因子を抽出したところ、淡色野菜、緑黄色野菜、きのこ類の寄与率が高かった。食物繊維摂取量と血漿アディポネクチン濃度の関連性はアディポネクチン遺伝子多型45（TG/GG）を持つ者に顕著に見られ、この多型を持つ者では、食物繊維摂取量の低下によって血漿アディポネクチン濃度が低下することが明らかになった。内臓脂肪の増減に関与が強い生活習慣因子は、ストレス感受性向、夜遅い夕食、不規則な食事、一人の食事、早食い、満腹欲求などであった。日々の飲食行動パターンがこの内臓脂肪増加の背景にあると類推される。一方、血漿アディポネクチン濃度に対しては、皮下脂肪の増減の影響は内臓脂肪のそれよりも少ないことが確認された。血中アディポネクチン濃度は、皮下脂肪の増加よりも内臓脂肪の増加とより強く相関するので、内臓脂肪量の変化を示す鋭敏なバイオマーカーとしての有用性が期待される。

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

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

E. 結論

メタボリック症候群に関連した保健の用途を表示するために必要な標準的な中間バイオマーカーの選別は、疾患モデル動物における発症過程での代謝変化の解析により効率的に行

うことができ、その中間バイオマーカーの妥当性は、モデル食品成分を用いた動物試験と健診受診者における血液指標の測定の結果を比較・総合して評価できるものと考えられる。

今後は、これまでの研究によって有効性が推定された中間バイオマーカーについて、その生理的な意義をモデル実験（細胞レベルおよび動物実験）によって検討し、メタボリック症候群関連疾患の発症プロセスの中でどのように位置づけるべきかを明確にすることが必要であり、さらに、これまでの研究によって有効性が推定された血液バイオマーカーの効果判定指標としての有用性を、健常者およびメタボリック症候群境界領域者を対象とした食品選択教育ならびにモデル試験食品の臨床介入試験により評価することが必要と考えられる。

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 cholestero;-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
- 4) 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. (2007): Nutrient and food intake in relation to serum leptin concentration among young Japanese women. *Nutrition* 23: 461-468
- 5) 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. (2007): 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
- 6) Goda, T., Suruga, K., Komori, A., Kuranuki, S., Mochizuki, K., Makita, Y. and Kumazawa, T. (2007): 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
- 7) Honma, K., Mochizuki, K. and Goda, T. (2007): Carbohydrate/fat ratio in the diet alters histone acetylation on the sucrase-isomaltase gene and its expression in mouse small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 357: 1124-1129
- 8) Mitsui, T., Kasezawa, N. and Goda, T. (2007): Milk consumption does not affect body mass index but may have an unfavorable effect on serum total cholesterol in Japanese adults. *Nutrition Res.* 27: 395-399
- 9) Shimada, M., Mochizuki, K. and Goda, T. (2007): Dietary supplementation with epigallocatechin gallate elevates the levels of circulating adiponectin in non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 71: 2079-2082
- 10) 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. (2008):
- 11) Misreporting of dietary energy, protein, potassium, and sodium in relation to body mass index in young Japanese women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 62: 111-118
- 12) Honma, K., Mochizuki, K. and Goda, T. (2008): Acute induction of histone acetylation on the jejunal sucrase-isomaltase gene by dietary fructose. *Br. J. Nutr.* in press
- 13) 加瀬澤信彦、遠山和成、島田昌也、望月和樹、合田敏尚 (2007): 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
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与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義. 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.

表1 多機能多成分複雑系としての食品

	医薬品	特定保健用食品 (従来型)	特定保健用食品 (今後)
関与成分	薬剤	食品成分(単一)	食品成分(多成分)
用途	薬理効果	保健の用途	保健の用途
評価指標 (最終)	死亡 合併症発症	疾病リスク	疾病リスク
評価指標 (中間)	臨床検査値 (血糖、血清脂質、血圧など)	臨床検査値	臨床検査値 短期バイオマーカー
効果の根拠	作用機構 体内動態	作用機構	科学的妥当性
試験方法	臨床疫学	臨床疫学	臨床疫学

表2 streptozotocin投与による高血糖に伴う
血球遺伝子の発現量の変化

発現量が増大した遺伝子	
総数	234
分類可能な遺伝子	102 (100%)
シグナル伝達関連	30 (29%)
エネルギー/代謝関連	19 (19%)
アポトーシス/ストレス関連	7 (7%)
生体防御関連	10 (10%)
細胞分裂関連	1 (1%)
クロマチン/転写関連	12 (12%)
糖タンパク質	3 (3%)
マトリクス/構造タンパク質	6 (6%)
タンパク質合成関連	14 (14%)
その他	3 (3%)
発現量が減少した遺伝子	
	17

表3 streptozotocin投与による高血糖に伴って遺伝子発現が増大した
サイトカイン様因子

遺伝子名	増大幅 (倍)
S100a9 S100 calcium binding protein A9(α granulinB)	2.83
S100a8 S100 calcium binding protein A8(α granulinA)	2.79
Il1b interleukin 1 beta	2.20
Ccl6 chemokine(C-C motif)ligand 6	2.08
S100a4 S100 calcium-binding protein A4	2.04
S100a6 S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	2.00
Ck1f1 chemokine-like factor 1	1.87

表4 streptozotocin投与による高血糖に伴って遺伝子発現が増大したG-タンパク質/
チロシンキナーゼ関連遺伝子

G-タンパク質関連タンパク質		
Gng10	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	2.89
Rgs2	Regulator of G-protein signaling 2	2.08
Edg5	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 5	1.89
Gps1	G protein pathway suppressor 1	1.75
Ras関連タンパク質		
RAP-1A	Ras-related protein RAP-1A	1.78
Rassf5	Rasassociation (RalGDS/AF-6) domain family 5	1.74
タンパク質キナーゼ /ホスファターゼ		
Dusp6	Dual specificity phosphatase 6	2.36
Pla2g7-predicted	Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma) (predicted)	1.93
Ptpro	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	1.88
Ppp1cb	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	1.85
RGD1311147-predicted	Similar to magnesium-dependent phosphatase-1 (predicted)	1.84
Impk	Inositol polyphosphate multikinase	1.84
Stk25	Serine/ threonine kinase 25 (STE20 homolog, yeast)	1.79
Map3k8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	1.78
Ptp4a1	Protein tyrosine phosphatase 4a1	1.75
その他		
Khdrbs1	Src associated in mitosis, 68 kDa	2.23
Calm2	Calmodulin 2	2.00

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 を速やかにパックジーン RNA (PreAnalytiX) 500 μ l と混和してから12-24時間、室温に放置し、RNeasy Mini キット(キアゲン)を使用して、総RNAを抽出した。総RNA 50 ng 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。

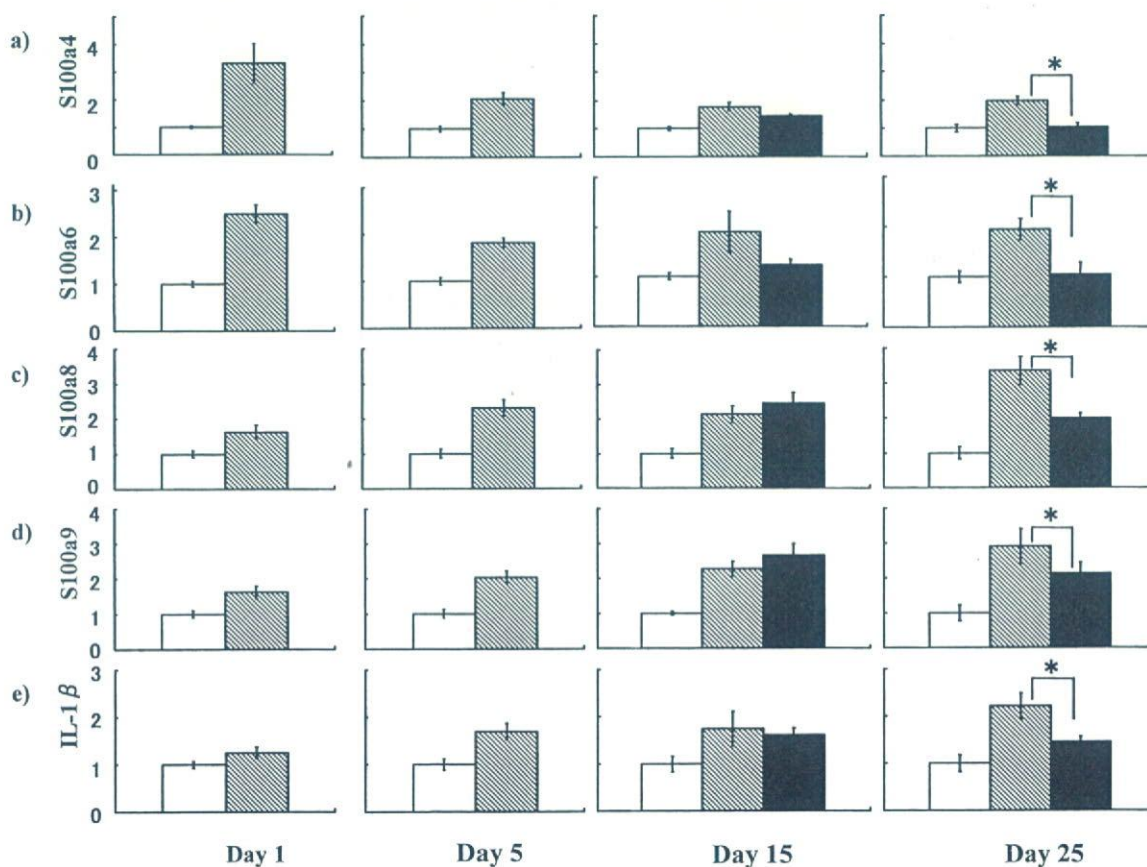


図1 高血糖によって上昇したサイトカイン遺伝子発現はα-グルコシダーゼ阻害により抑制される。

□ 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 -グルコシダーゼ阻害剤(ミグリトール)を飼料に添加して、血糖上昇を抑制してみた。その結果、streptozotcin 投与25日後には、4種類のS100タンパク質(S100a4、S100a6、S100a8、S100a9)およびインターロイキン1 β (IL-1 β)の遺伝子発現が有意に低下し、streptozotcinを投与しなかったラットとほぼ同じ程度になっていた(図1)。

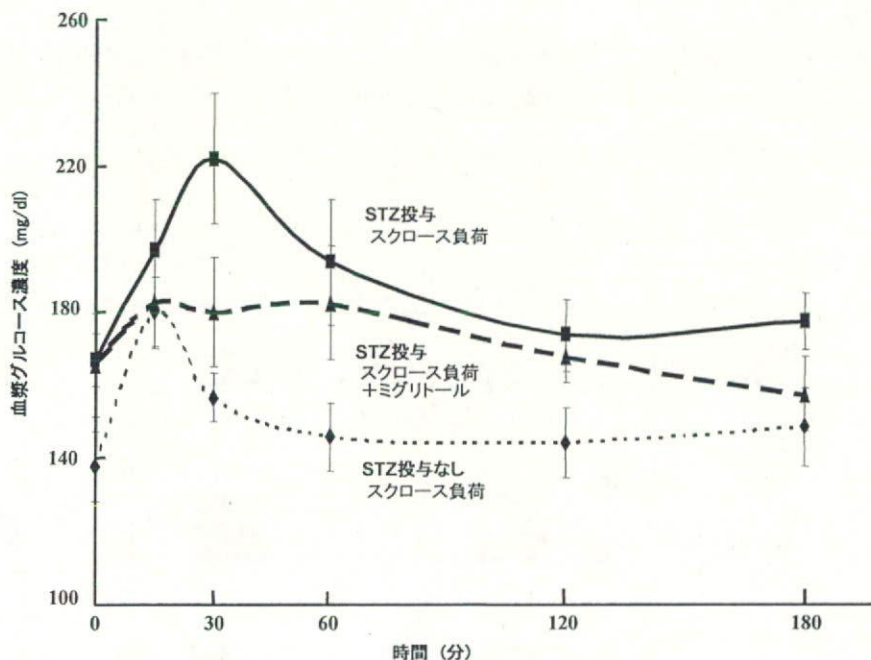


図2 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるスクロース負荷後の血糖値の変動

「絶食4時間後にスクロース投与」を3日間、毎日繰り返した。

平均値 \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

の血液を用いて血球 mRNA のマイクロアレイ解析を行ったところ、炎症性サイトカイン IL-1 β および G タンパク質関連遺伝子群の発現が高まっていたが、これらの発現はすべてミグリトールの同時投与によって抑制された (表 1)。血球における IL-1 β の遺伝子発現の変動を、リアルタイム PCR 法によって確認したところ、streptozotcin の低用量投与を受けスクロースを 2 日間断続的に投与したラットでは、3 日目

のスクロース投与前にすでに IL-1 β の遺伝子発現が高まる傾向がみられ、スクロース負荷 3 時間後にはその発現が著しく高まっていた。一方、3 日間のスクロース負荷と同時にミグリトールを投与したラットでは、3 日目のスクロース投与前の IL-1 β の遺伝子発現は対照ラットと同じ程度に低く、スクロース負荷 3 時間後でも IL-1 β の遺伝子発現の増大幅は少なかった (図 3)。

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

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

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

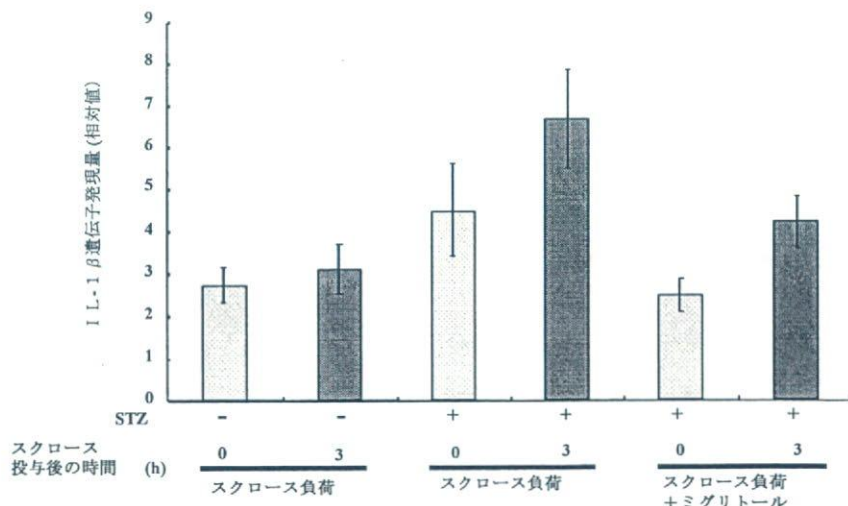


図 3 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるスクロース負荷後の血球細胞 IL-1 β の遺伝子発現量の変動

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

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

エピガロカテキンガレート (EGCg) を多く含む茶カテキン抽出物は、脂肪蓄積の抑制など脂質代謝に影響を及ぼすことから特定保健用食品の素材として利用されている。そこで、EGCg による脂質代謝の変動を鋭敏に反映するバイオマーカーとしてアディポネクチンが利用で

きるかを検証してみた。非肥満型 2 型糖尿病モデルである GK ラットに 0.2 %EGCg 添加食を投与したところ、体重増加率および腸間膜脂肪、副睾丸脂肪はいずれもやや減少する傾向で大きな影響はもたらさなかったにもかかわらず、投与開始 8 週間後から血漿アディポネクチン濃度が有意に上昇し、投与開始 12 週間後には血清中性脂肪濃度が 50% にまで低下した (図 4)。

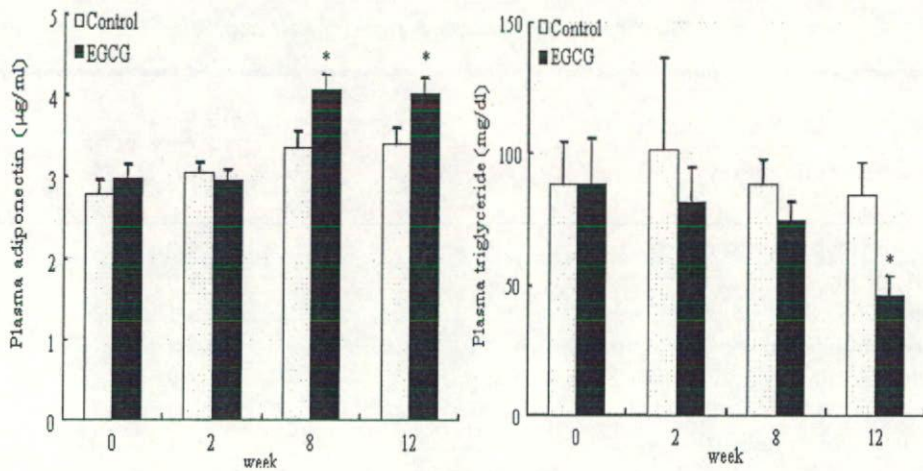


図 4 ストレプトゾトシン (STZ) 低用量投与ラット (食後高血糖モデル) におけるエピガロカテキンガレート (EGCg) の投与による GK ラットの血漿アディポネクチン濃度の変動
 平均値 \pm SEM (N = 6/ 群)

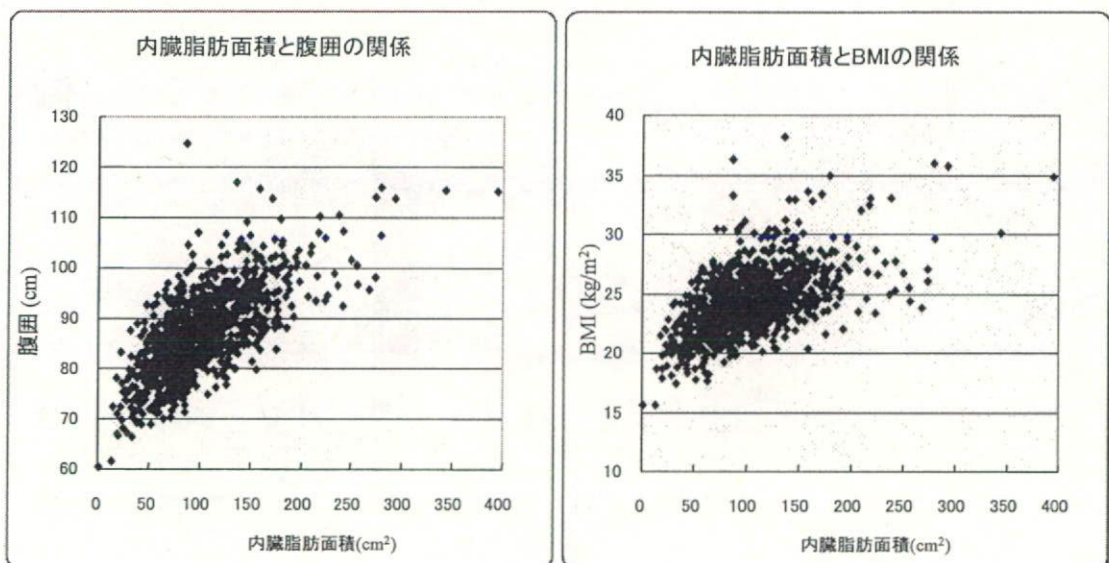


図 5 人間ドック男性受診者における CT スキャン腹部内臓脂肪面積と腹囲および BMI との関係

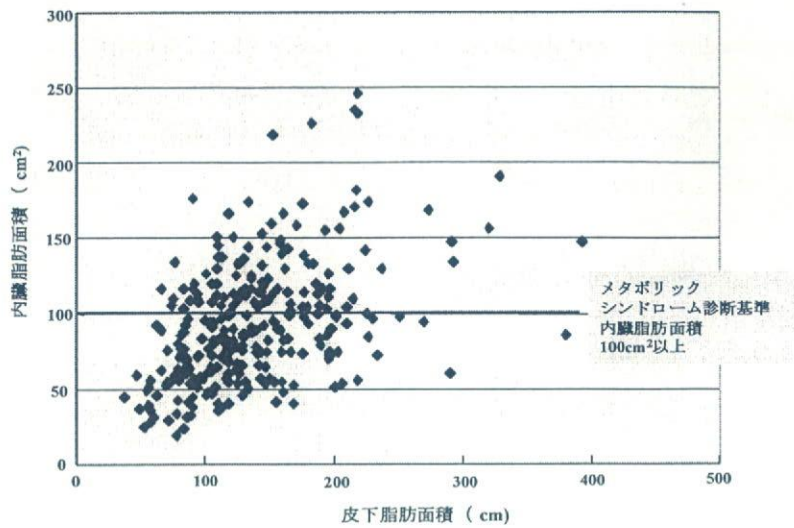


図6 人間ドック男性受診者におけるCTスキャン腹部内臓脂肪面積と皮下脂肪面積との関連

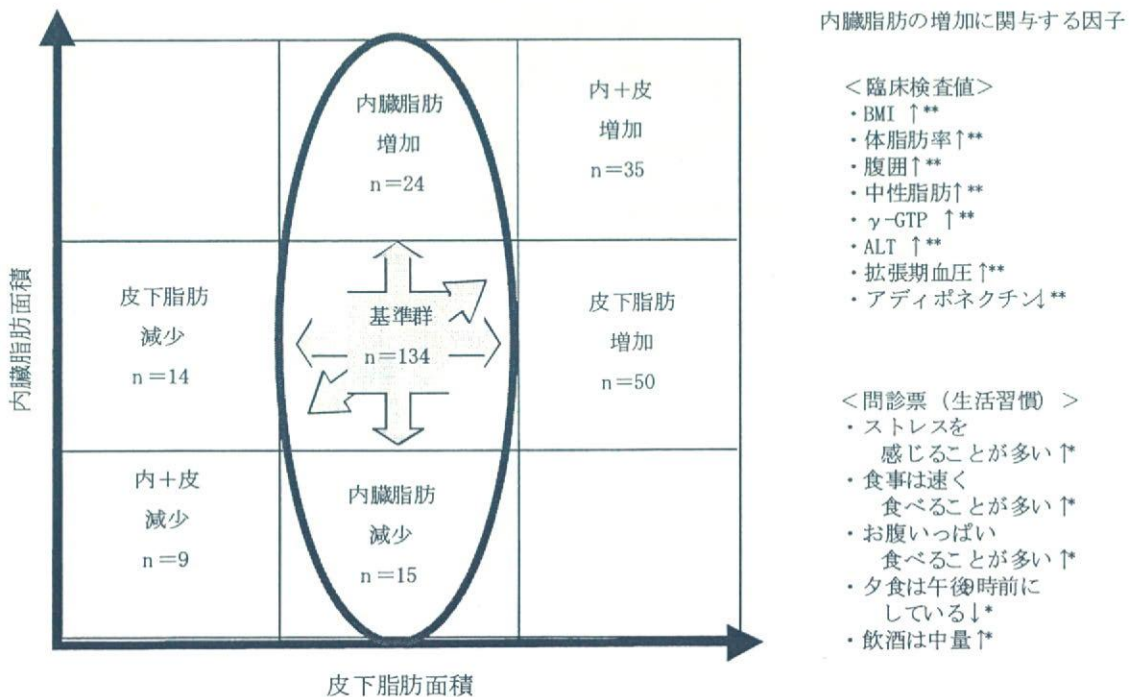


図7 内臓脂肪面積ならびに皮下脂肪面積の偏りによるグループ分け(左)と抽出された内臓脂肪の増加に関与する因子(右)

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

*p<0.05, **p<0.01

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

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

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

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

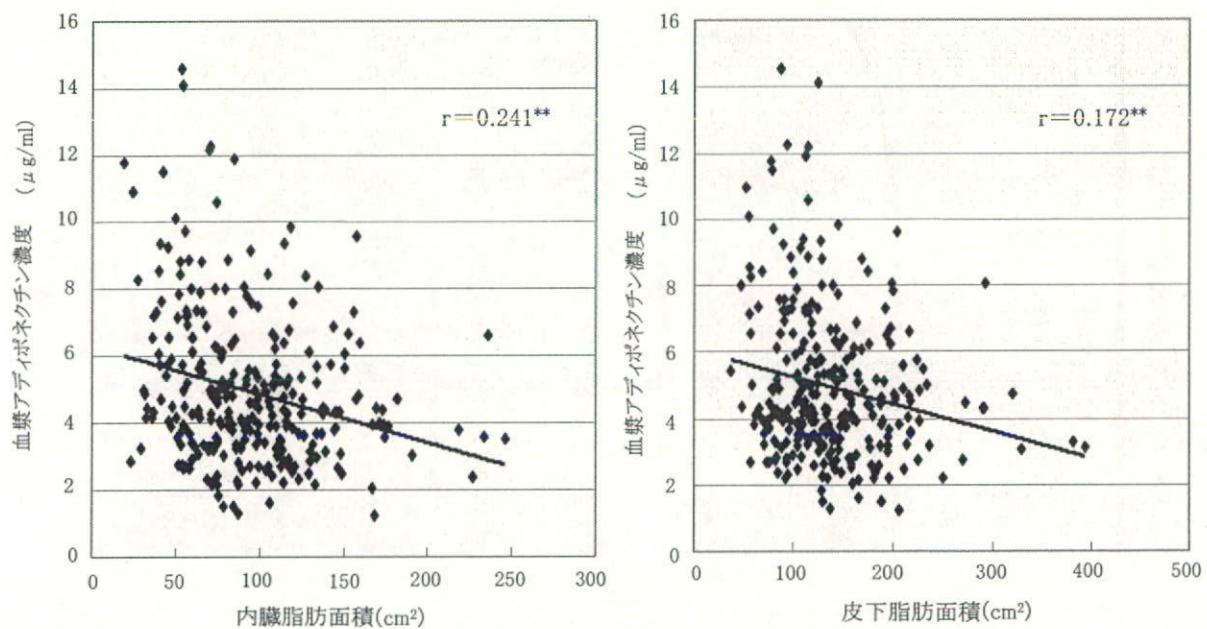


図 8 内臓脂肪面積ならびに皮下脂肪面積と血中アディポネクチン濃度との相関性

** $p < 0.01$

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

健康診断受診者の血漿アディポネクチン濃度はBMI ($r = -0.306$) および腹囲 ($r = -0.349$) と高い負の相関を示し、血清中性脂肪とも有意な負の相関 ($r = -0.190$) を示した。一方、血漿インターロイキン-6 (IL-6) 濃度は、空腹時血糖 ($r = 0.337$) およびHbA1c ($r = 0.342$) と高い正の相関を示し、血清中性脂肪とも有意な正の相関 ($r = 0.210$) を示した。食品群の摂取量をもとにして因子分析によって食品選択のパターンを類型化してみたところ、6つの因子(食事パターン)が抽出された。そのうち、因子2が血漿アディポネクチン濃度と有意な

正の相関 ($r = 0.159$) を示した。因子2に寄与している食品群は、寄与度の高い順に、淡色野菜、緑葉野菜、きのこ、乳類、海草、芋類であり、アルコールはこの因子と強く負の関連を示した。食物繊維の摂取量が少ない群では、食物繊維の摂取量が多い群と比較して血漿アディポネクチン濃度が低くなる傾向が見られたが、この血漿アディポネクチン濃度の低下は、特にアディポネクチン遺伝子の第45ヌクレオチド (ADN45) に変異 (T/G, G/G) を持つもの (44%に相当) では特徴的に見られた。この遺伝子多型を持つものでは、食物繊維の摂取量の低下によって血漿アディポネクチン濃度が有意に低下していた (図9)。

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

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

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

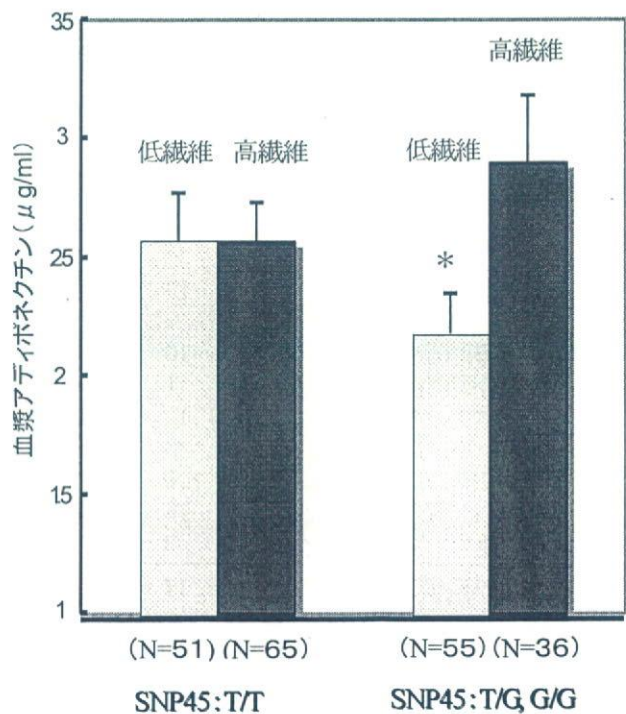


図9 食物繊維摂取量とアディポネクチンとの関連性に及ぼすアディポネクチン遺伝子多型 (SNP45) の影響 * $P < 0.05$

表1 多機能多成分複雑系としての食品

	医薬品	特定保健用食品 (従来型)	特定保健用食品 (今後)
関与成分	薬剤	食品成分(単一)	食品成分(多成分)
用途	薬理効果	保健の用途	保健の用途
評価指標 (最終)	死亡 合併症発症	疾病リスク	疾病リスク
評価指標 (中間)	臨床検査値 (血糖、血清脂質、血圧など)	臨床検査値	臨床検査値 短期バイオマーカー
効果の根拠	作用機構 体内動態	作用機構	科学的妥当性
試験方法	臨床疫学	臨床疫学	臨床疫学

表2 streptozotocin投与による高血糖に伴う
血球遺伝子の発現量の変化

発現量が増大した遺伝子	
総数	234
分類可能な遺伝子	102 (100%)
シグナル伝達関連	30 (29%)
エネルギー/代謝関連	19 (19%)
アポトーシス/ストレス関連	7 (7%)
生体防御関連	10 (10%)
細胞分裂関連	1 (1%)
クロマチン/転写関連	12 (12%)
糖タンパク質	3 (3%)
マトリクス/構造タンパク質	6 (6%)
タンパク質合成関連	14 (14%)
その他	3 (3%)
発現量が減少した遺伝子	
	17