

200734051A

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

健康食品等の安全性・有効性評価研究分野に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 石橋 弘志

平成20年(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

健康食品等の安全性・有効性評価研究分野に関する研究-----1

石橋 弘志

(資料1) カスタムチップにスポットした遺伝子の種類

(資料2) カスタムチップ作製で使したプライマー配列一覧

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）

総括研究報告書

健康食品等の安全性・有効性評価研究分野に関する研究

主任研究者 石橋 弘志 熊本県立大学環境共生学部嘱託職員

研究要旨

本研究では、「いわゆる健康食品」の有効成分および非意図的含有成分の相互作用やそれらと医薬品・食品との相互作用について、ヒトへ外挿可能な線虫 *C. elegans* をモデル生物として、高感度・迅速・簡便かつ網羅的に評価可能な新規 *in vivo* スクリーニング手法を開発し、安全性・有効性を評価することを目的とした。ガジュツの抽出成分を用いて線虫に対する生体影響評価を試みたところ、62.5–1000 $\mu\text{g/ml}$ の暴露濃度範囲で致死、成長・成熟および繁殖に対する影響は確認されなかった。そこで、1000 $\mu\text{g/ml}$ の抽出成分を24時間線虫に暴露し、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を試みたところ、チトクローム P450 (*CYP*) やグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (*GST*) 遺伝子群の発現の増加が確認された。ガジュツにより発現誘導した *CYP* 遺伝子のうち *CYP34A10* 遺伝子は、抗高脂血症薬・抗動脈硬化剤であるクロフィブレートによっても発現が増加することが我々の先行研究で明らかとなっている。このことから、ガジュツ抽出成分は一部クロフィブレートと同様の作用を有すると考えられた。また、*GST* は生活習慣病予防因子としても有望視されており、これまで様々な食品で *GST* を誘導する食品因子の探索が行われている。ガジュツ抽出成分には解毒酵素 *GST* の遺伝子発現を増加する作用があることが示され、機能性食品素材としての可能性が示唆された。一方、除草剤であり酸化ストレスを誘導するパラコートについて同様の検討を行った。25 ng/ml 以上の試験区で成長・成熟および繁殖影響が確認され、50 ng/ml の暴露では、*CYP*、*GST*、脂質代謝関連および ABC トランスポーター遺伝子の発現が変化し、パラコートの生体影響にこれら遺伝子群が関与する可能性が示唆された。以上のことから、「いわゆる健康食品」の安全性・有効性評価において、線虫を用いた新規 *in vivo* スクリーニング試験法が有効であることが確認できた。さらに、本研究の成果は、汎用されている医薬品や食品との相互作用の評価にも応用が可能であり、今後、グローバルスタンダード評価手法となりえることが期待される。

A. 研究目的

近年、我が国では高齢化が進んでおり、それに伴い国民医療費が増大しているといわれている。それら医療費を削減するため、疾病などの「早期発見・治療」から「予防」へと政策をシフトしている。このような現状のなか、国民の意識も健康志向が強くなってきており、バランスのとれた食事気を使う人が増えている。健康な体を作るための栄養補給、また疾病予防に効果があるとして、さまざまな「いわゆる健康食品」が販売されており、その需要は年々増大している。

「健康食品」とは、法令上定義されている言葉ではなく、一般的に「広く健康の保持増進に資する食品として販売・利用されるものの全般」を示すものであり、医薬品とは異なり疾病に関する影響などを表示することは薬事法に基づき禁止されている。しかし、「健康食品」の需要が拡大していることから、平成13年4月に保健機能食品制度が創設され、例外として身体構造や機能に影響を及ぼすことを目的とする表示を行って販売することが可能になった。保健機能食品は有効性および安全性について定めた基準によって評価された食品で、国の個別審査、厚生労働大臣による許可など、法令状に規定された食品であり、「栄養機能食品」と「特定保健用食品」に分

類することができる。それ以外の「健康食品」が「いわゆる健康食品」であり、これは法令上の規定がなく、食品に位置づけられている。近年の情報社会の中で「いわゆる健康食品」の持つ効果に対する情報が錯綜しており、商品に表示されていなくても、個人で情報を得て、疾病や老化予防などのために購入するケースが多いといわれている。「いわゆる健康食品」の効能の多くは、食経験に基づくものが多いが、その有効性・安全性に関する科学的根拠が明らかになっているものは少ない。また、成分規格が決められていないため、製品によって有効成分に違いがあることが考えられる。さらに、需要は高まっているものの、過剰摂取や非意図的成分含有などによる健康被害が相次いでいるという現状もある。多くの「いわゆる健康食品」について生体影響は不明であるため、その安全性に対する国民の不安は大きく、それを解消すべく、健康食品の安全性・有効性の検査体制の徹底が求められている。

「いわゆる健康食品」のなかでもウコン類は人気が高く、その中でも紫ウコンは希少価値が高いとされている。紫ウコンはガジュツとも言われ、ショウガ科クルクマ属の多年草植物で、古くから日本や中国を中心にアジアの国々では芳香性健胃薬やスパイスと

して使用されてきた。ガジュツ中に約1~1.5%含まれている精油成分にはシオネール、カンファー、アズレンなどのテルペン類があり、微量成分を含めると100種類近くの成分が検出されており、それらの作用機序が解明されつつある。健胃作用のほかに、血中コレステロール低下作用、殺菌・防腐作用、抗潰瘍作用、肝臓保護作用、抗アレルギー作用、抗酸化作用、また胃潰瘍・十二指腸潰瘍の元凶と考えられているヘリコバクター・ピロリ菌の消去作用などの報告がある。このような様々な効果があるため、ガジュツへの注目度は高いが、それら作用に関して科学的に調査した例は少なく、生体への影響は不明な点が多い。これまで「いわゆる健康食品」の安全性評価は、培養細胞などの *in vitro* 試験に加え、マウス・ラットなど齧歯類をモデル生物とした *in vivo* 試験により行われてきた。しかしながら、動物愛護上、多くの実験動物を使用することは不可能であり、現在市販されている多種多様な「いわゆる健康食品」の有効性・安全性評価を行うためには、それらを迅速かつ定量的に検査する方法の確立が急務である。そこで、我々は新たなモデル生物として線虫 *C. elegans* に着目した。

線虫 *C. elegans* は、土壌自活の非寄生性の線虫で、受精卵から成熟個体に

なるまで約3日と生活史が短い。体長は約1mmととても小さいが、筋肉、消化管、神経系、上皮、生殖器などを備えた多細胞生物である。基本的には自家受精を行う雌雄同体であるため、個体差が極めて少ない。寒天培地や液体培地中で大量飼育が可能であり、取り扱いが簡便である。また、全ゲノム配列が解明されており、線虫遺伝子とヒト遺伝子に高い相同性が見られることが明らかになっている。これらのことから、発生・遺伝学分野で汎用されており、近年では毒性学分野などでも活用されている。

当該研究では、国民の健康の保護を図るため、「いわゆる健康食品」を対象として、その有効性・安全性評価のための迅速かつ簡便な新規スクリーニング法の開発を目的とする。すなわち、生物で最も早く全ゲノム配列が明らかにされ、発生、神経および老化などに関する生物学的特性がヒトに外挿可能な土壌自活性線虫 *C. elegans* をモデル生物として、これまでに我々が確立した致死、成長・成熟、繁殖、老化および多世代影響を指標とした生体影響評価試験法による安全性評価に加え、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析および標的遺伝子の機能解析から「いわゆる健康食品」の安全性・有効性を詳細に評価する。また、医薬品・食品との相互作用につい

でも上記と同様に生体・遺伝子レベルでの解析を行うことにより、「いわゆる健康食品」の安全性・有効性を評価するための新規 *in vivo* スクリーニング法の開発を行う。当該年度は「いわゆる健康食品」の生体影響評価と遺伝子発現プロファイルを試み、安全性・有効性を包括的に評価するための基盤データを蓄積する。当該研究の遂行は、行政のみならず民間も含めた検査機関での「いわゆる健康食品」の検査体制の充実・強化を図り、国内外産を問わず、本邦に流通する健康食品のモニタリング実施に大きく寄与すると考えられる。それに伴い、「いわゆる健康食品」による健康被害の未然防止や、これまで毒性が不明で未利用資源となっているものの流通化が実現する可能性がある。さらに、本研究の成果は、汎用されている医薬品や食品との相互作用の評価にも応用が可能であり、今後、グローバルスタンダード評価手法となりえることが期待される。

B. 研究方法

B-1. ガジュツ成分の抽出方法

既報に従い、ガジュツ 1 g にアセトン 10 ml を加え、10 分間の超音波処理後、3000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上澄みを採取した。この操作を 3 回行い、試料は窒素気流下で乾固させたのち、ジメチルスルホキ

シド (DMSO) に溶解し試験原液とした。

B-2. 致死、成長・成熟および繁殖影響試験

B-1 の方法により抽出したガジュツ成分あるいは超純水で溶解したパラコートを用いて、以下の方法により試験を行った。

致死影響試験：L1 幼虫を洗浄・回収し、各濃度の粗抽出液を含む試験液に幼虫を入れ、24 穴培養プレートに各穴 10 匹となるよう幼虫を分注した。無給餌条件下で暴露試験を行い、24 時間後の生存率を算出した。

成長・成熟影響試験：24 穴培養プレートを用い、各濃度の粗抽出液を含む試験液に L1 幼虫を各穴 10 匹となるよう分注し、餌を含む条件で約 60 時間暴露試験を行った。暴露終了後に体長を測定すると共に、受精卵を体中央部に有する個体の割合を算出した。

繁殖影響試験：24 穴培養プレートを用い、各濃度の粗抽出液を含む試験液に各穴 1 匹の線虫を分注し、産卵開始から生涯産仔数を計測した。

B-3. DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析

野生型線虫 (N2) を用いた。DMSO を用いて 1000 $\mu\text{g/ml}$ に調製したガジュツ粗抽出液あるいは超純水を用いて 50 ng/ml に調整したパラコートに同調・孵化させた L1 幼虫を 20°C、給

餌条件下で 24 時間暴露した。Total RNA を抽出後、mRNA を精製し、対照群を Cy3、暴露群を Cy5 で蛍光標識したのち、DNA チップ上でハイブリダイズを行い、Cy3 および Cy5 の蛍光強度を測定した。なお、Cy5/Cy3 比が 2.0 以上を発現誘導、0.5 以下を発現抑制とした。

B-4. 階層的クラスタリング解析

クラスタ解析はソフトウェア cluster(<http://rana.stanford.edu/software/>)、treeview(<http://rana.stanford.edu/software/>)を用いた。DNA マイクロアレイ解析で得られた CYP 遺伝子発現の結果を用いて行った。

B-5. 統計解析

全ての統計処理は、Stat View 5.0 for Macintosh を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差とみなした。体長、成熟率および次世代産仔数は等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は、一元配置分散分析 (one way ANOVA) を行った。一元配置分散分析において、有意差が認められた場合には多重検定 (Dunnett's post-hoc 検定) により有意差検定を検定した。等分散性が認められない場合は Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意差が認められた場合には Bonferroni adjustment をもって Mann Whitney の U 検定を行った。

(倫理面への配慮)

当該研究では、線虫を実験動物として用いる為、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

C-1. ガジュツの生体影響評価試験

ガジュツの抽出成分 (試験区 62.5, 125, 250, 500 および 1000 $\mu\text{g/ml}$) を用いて線虫に対する生体影響評価を試みた。24 時間の致死影響試験では線虫に対する影響は確認されなかった。また、成長・成熟影響試験でも影響は確認されず、成熟率は全ての試験区で平均 90%以上であり、体長にも変化は確認されなかった (図 1-A, 図 1-B)。産仔数を指標とした繁殖影響試験でも全ての試験区で影響は確認されなかった (図 1-C)。これらことから、1000 $\mu\text{g/ml}$ 以下のガジュツ抽出成分は、線虫の致死、成長・成熟、繁殖に影響しないことが示唆された。

C-2. ガジュツにより発現変動した遺伝子の DNA マイクロアレイ解析

生体影響評価試験において 1000 $\mu\text{g/ml}$ 以下のガジュツ抽出成分は線虫に影響しないことが確認された。そこで、1000 $\mu\text{g/ml}$ の抽出成分を 24 時間線虫に暴露し、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を試みた。結果として、主にチトクローム P450 (CYP)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) およびカ

ドミウム応答遺伝子群の発現誘導が確認された(表1)。一方、発現抑制された遺伝子群としては、*CYP*、*p-glycoprotein related (pgp)* および *HA1F transporter (haf)* などであり(表2)、これら遺伝子のうち *CYP13B2* 遺伝子の発現は最も抑制されていた。

C-3. 階層的クラスタリング解析

我々の先行研究では、哺乳類 *CYP1A* (3メチルコラントレン:3MC)、*CYP2B* (フェノバルビタール:PB)、*CYP3A* (リファンピシン:RF) および *CYP4A* (クロフィブレート:CF) 誘導剤を線虫に暴露し、線虫 *CYP* 遺伝子の発現プロファイル解析を行ってきた。そこで本研究で明らかとなったガジュツ抽出成分(ZR)の暴露により変動した線虫 *CYP* 遺伝子群とともに階層的クラスタリング解析を試みた。結果として、ZRにより発現変動した線虫 *CYP* 遺伝子は、各種哺乳類 *CYP* 誘導剤によるものとは異なるクラスターに位置した(図2)。

C-4. パラコートの生体影響評価試験

酸化ストレス剤であるパラコートを用いて線虫に対する生体影響評価を試みた。24時間の致死影響試験を行ったところ、400 ng/ml以下の濃度区で影響は確認されなかった。しか

しながら、成長・成熟および繁殖影響試験では、25 ng/ml以上の濃度区で統計学的に有意な減少がみられた(図3)。これらのことから、パラコートは25 ng/ml以上の濃度において、線虫の成長・成熟あるいは繁殖に影響することが示唆された。

C-5. パラコートにより発現変動した遺伝子のDNAマイクロアレイ解析

生体影響評価試験において25 ng/ml以上の濃度のパラコートは線虫に影響することが確認された。そこで、50 ng/mlのパラコートを24時間暴露し、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を試みた。パラコート暴露により3遺伝子の発現誘導が確認され、それらには *CYP* や脂質代謝関連遺伝子が含まれていた。一方、発現抑制した遺伝子は23遺伝子で、それらには *CYP*、*GST*、脂質代謝関連およびABCトランスポーター遺伝子などが含まれていた。

D. 考察

生体影響評価試験において1000 µg/ml以下のガジュツ抽出成分は線虫に影響しないことが確認された。そこで、1000 µg/mlの抽出成分を24時間暴露し、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を試み

た。結果として、主にチトクローム P450 (CYP) やグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子群の発現誘導が確認された。CYP ファミリーは第一相薬物代謝酵素の一つであり、CYP により触媒される官能基の形成や開裂反応 (酸化・還元・加水分解) を担っている。CYP ファミリーは各種ステロイドホルモンの合成、あるいは脂肪酸の ω 酸化、ビタミン D の活性化反応に関わり、内因性物質だけでなく様々な外因性の生体異物の代謝にも関与する。今回、ガジュツ抽出成分により CYP34A10 遺伝子の発現は最も増加した。我々の先行研究では、抗高脂血症薬・抗動脈硬化剤であるクロフィブレートによっても CYP34A10 遺伝子の発現が増加することを確認している。このことから、ガジュツ抽出成分は一部クロフィブレートと同様の作用を有すると考えられた。さらに、我々の先行研究では、各種の外因性の生体異物を用いて線虫 CYP 遺伝子の発現解析を行ってきたが、生体異物により発現変化がみられなかった CYP14A2, 14A3 および 34A3 遺伝子の発現がガジュツ抽出成分により増加した。このことから、ガジュツ抽出成分には生体異物による CYP 遺伝子の発現応答プロファイルと異なる作用を有する可能性が示唆された。

GST は様々な有害物質に還元型グルタチオンを付加しグルタチオン抱

合体を形成させる酵素であることが知られている。有害物質のグルタチオン抱合体は毒性が低下すると共に、水溶性が増し体外に排出されやすくなる。今回、ガジュツ抽出成分により複数の GST 遺伝子の発現が増加した。GST は生活習慣病予防因子としても有望視されており、これまで様々な食品で GST を誘導する食品因子の探索が行われている。このことから、ガジュツ抽出成分には解毒酵素 GST の遺伝子発現を増加する作用があることが示され、機能性食品素材としての可能性が示唆された。

CYP や GST は、生体の恒常性を維持するために必要であり、特に GST は過酸化水素などの消去といった酸化ストレスなどからの生体防御に関与することが知られている。本研究でガジュツにより線虫 GST 遺伝子の発現変動が確認された。そこで、酸化ストレスに対するガジュツの作用を確認する端緒として、除草剤であり酸化ストレスを誘導するパラコートについて、生体影響評価試験と DNA マイクロアレイ解析を試みた。パラコートの線虫に対する影響は 25 ng/ml 以上の暴露でみられ、50 ng/ml の暴露では、主に CYP、GST、脂質代謝関連および ABC トランスポーター遺伝子の発現が変化した。すなわち、線虫でみられたパラコートの生体影響にこれらの遺伝子群が関与する可能性が示唆された。今後、ガジュツとパラコートの

相互作用について検討する必要がある。

以上の研究成果から、本年度における達成度は良好であったと判断した。また、「いわゆる健康食品」の安全性・有効性評価において、線虫を用いた新規 *in vivo* 試験法が有効であることが確認できた。現在、本研究で検討したガジュツ抽出成分以外についても同様の検討を開始している。また、これまで多くのガジュツ成分では抗酸化作用が確認されている。そこで、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) などの活性酸素の消去を担う酵素群の発現解析も行っている。活性酸素は各種の炎症性疾患を始め、動脈硬化、虚血性心疾患、がんなどの生活習慣病の発生や老化などに深く関わっており、防御系としての活性酸素の消去系の役割は重要である。本年度の研究成果も伏せて解析することにより、今後「いわゆる健康食品」の安全性・有効性評価がより包括的に行えるものとする。

E. 結論

本研究では、「いわゆる健康食品」の有効成分および非意図的含有成分の相互作用やそれらと医薬品・食品との相互作用について、ヒトへ外挿可能な線虫 *C. elegans* をモデル生物として、高感度・迅速・簡便かつ網羅的に評価可能な新規 *in vivo* スクリーニング手法を開発し、安全性・有効性を評価す

ることを目的とした。本年度は、ガジュツ抽出成分の線虫に対する生体影響（致死、成長・成熟および繁殖）が確認でき、DNA マイクロアレイ解析から、チトクローム P450 (*CYP*) やグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (*GST*) 遺伝子群の発現の増加が確認され、ガジュツのクロフィブレート様の作用、あるいは機能性食品素材としての可能性が示唆された。また、酸化ストレス誘導剤パラコートを用いて、生体影響を惹起する暴露濃度が明らかとなり、*CYP*、*GST*、脂質代謝関連および *ABC* トランスポーター遺伝子の発現に影響することが確認された。以上のことから、「いわゆる健康食品」の安全性・有効性評価において、線虫を用いた新規 *in vivo* スクリーニング試験法は有効であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

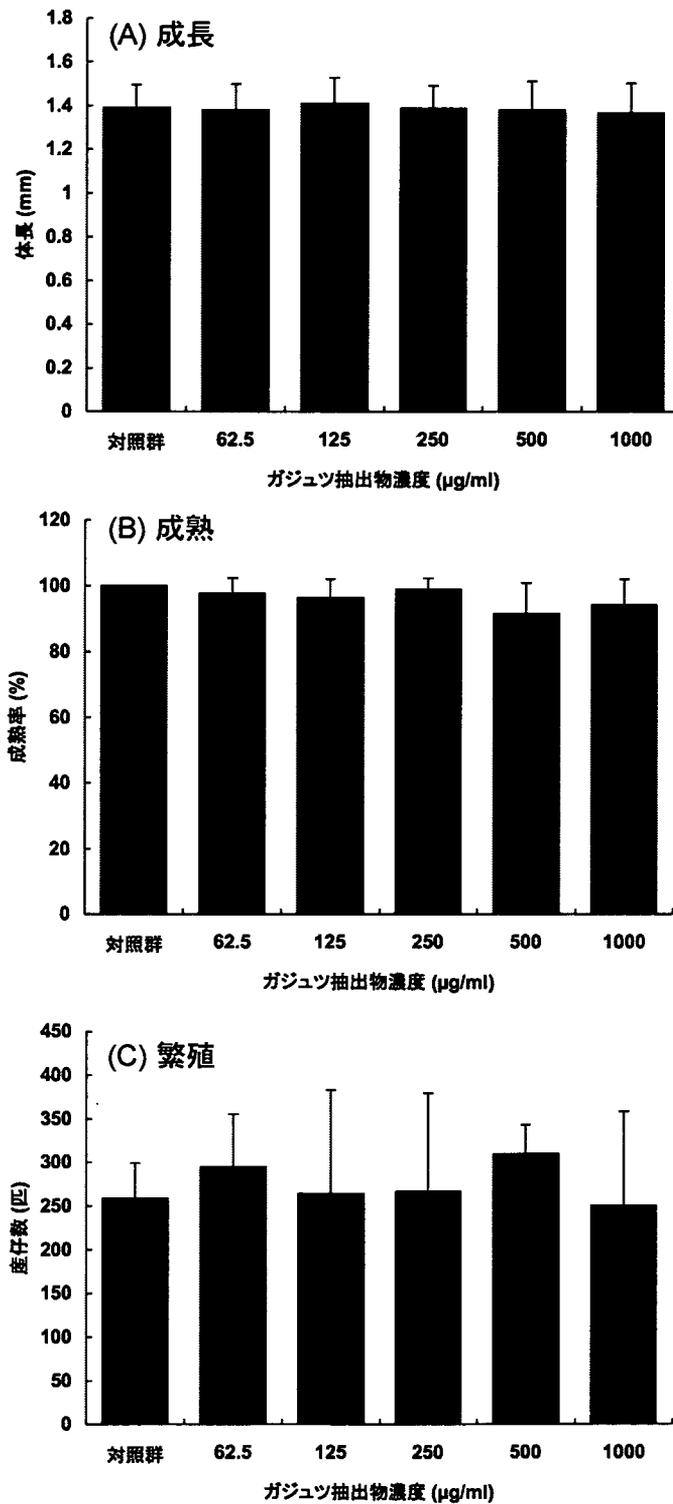


図1. ガジュツ抽出溶液を暴露した線虫の成長 (A)、成熟 (B) および繁殖 (C) に及ぼす影響。データは全て平均±標準偏差。

表 1. ガジュツ抽出物の 24 時間暴露により
発現が誘導した線虫の遺伝子群

遺伝子名	誘導倍率
<i>gst-8</i>	2.04
<i>cdr-2</i>	2.06
<i>gst-38</i>	2.11
<i>cyp-33C6</i>	2.14
<i>cyp-33C4</i>	2.22
<i>cdr-1</i>	2.50
<i>cdr-7</i>	2.76
<i>cyp-34A4</i>	2.92
<i>cyp-35A1</i>	3.36
<i>cyp-14A5</i>	3.75
<i>cyp-14A2</i>	4.01
<i>cyp-14A3</i>	4.23
<i>cyp-34A3</i>	4.4
<i>cyp-34A10</i>	5.97

cyp: cytochrome P450

gst: glutathione S-transferase

cdr: cadmium responsive

表 2. ガジュツ抽出物の 24 時間暴露により
発現が抑制した線虫の遺伝子群

遺伝子名	抑制倍率
<i>cyp-13B2</i>	0.38
<i>cyp-42A</i>	0.40
<i>cyp-37A1</i>	0.40
<i>pgp-4</i>	0.44
<i>cyp-33C2</i>	0.4
<i>haf-3</i>	0.48
<i>pgp-5</i>	0.48
<i>cyp-33A1</i>	0.48
<i>pgp-14</i>	0.49
<i>pgp-8</i>	0.49
<i>cyp-23A</i>	0.49

cyp: cytochrome P450

pgp: p-glycoprotein related

haf: HAIF transporter

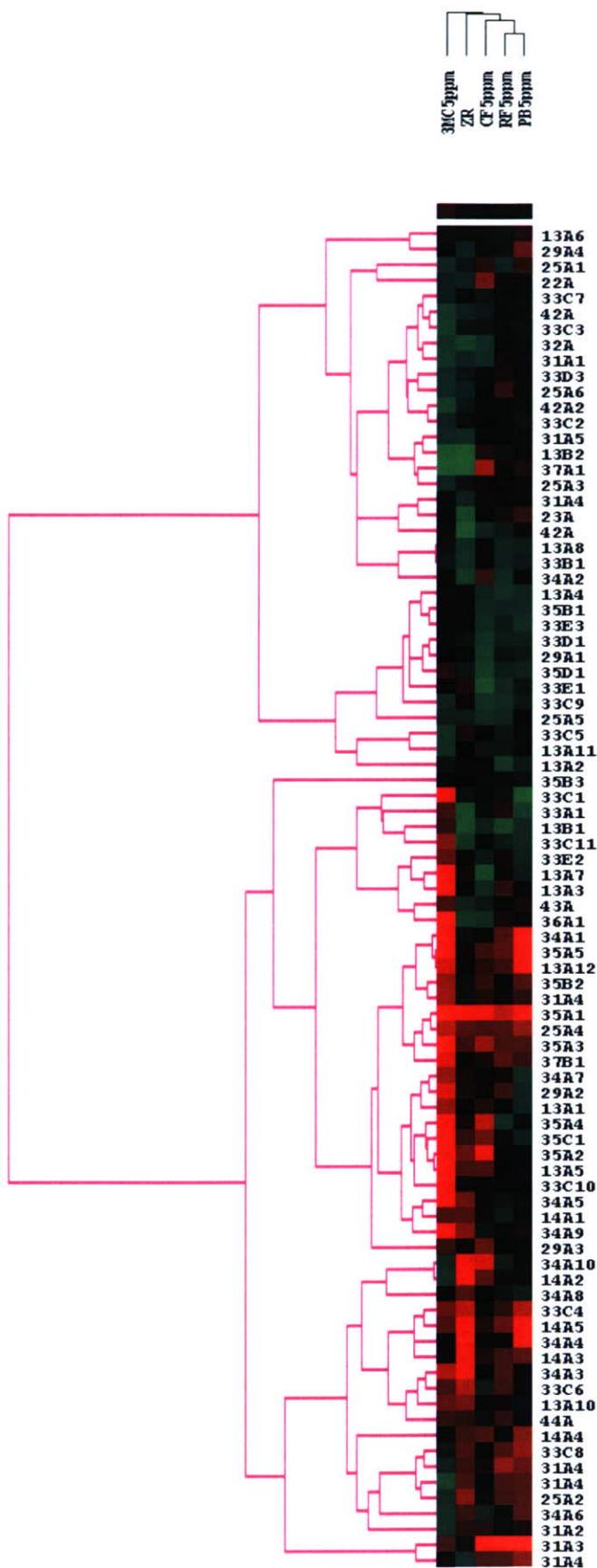


図2. 哺乳類 CYP1A (3メチルコラントレン: 3MC)、CYP2B (フェノバルビタール: PB)、CYP3A (リファンピシン: RF) および CYP4A (クロフィブレート: CF) 誘導剤とガジュツ抽出成分 (ZR) の暴露による線虫遺伝子群の階層的クラスタリング解析

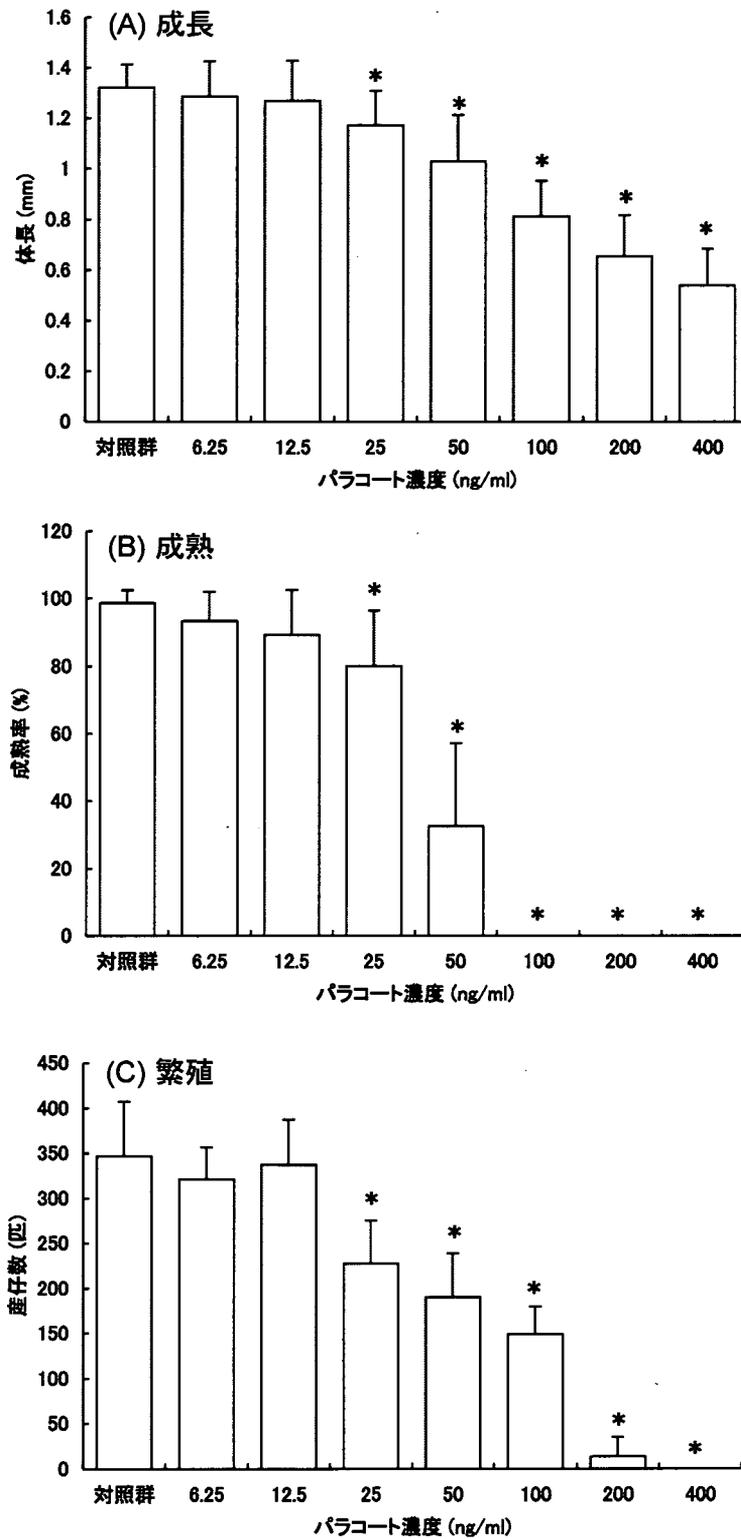


図3. パラコートを暴露した線虫の成長 (A)、成熟 (B) および繁殖 (C) に及ぼす影響。データは全て平均±標準偏差。*, $p < 0.05$.

(資料 1)

Table 1 カスタムチップにスポットした遺伝子の種類

cytochrome P450 (CYPs)	79 種類
ABC transporters	71 種類
glutathione <i>S</i> - transferase (GSTs)	67 種類
lipid metabolism related (LMs)	80 種類
vitellogenin (VITs)	6 種類
metallothionein (MTLs)	2 種類
nuclear hormone receptor (NHR)	1 種類
内部標準遺伝子 : act	4 種類
ama-1	1 種類

(資料 2)

Table 2-1 Cytochrome P450 (CYP) プライマー配列

No.	name	Forward primer	Reverse primer	product
		Sequence 5'-3'	Sequence 5'-3'	
1	13A1	caatcttccggcgatttta	tggtgaagatagcgattgg	1142
2	13A2	catcggcactcaattccttt	tggcactcagcgaacattag	1098
3	13A3	tggggttctccagatgactc	gagaaaagggatcaaagggc	955
4	13A4	tggtcaattccagcttttt	ccggtgctctgtttattgg	950
5	13A5	gctcaattccagctttttcg	ttcgcattcatttcccat	1151
6	13A6	accaacttcaccggaatctg	gctctggccagtctgaatc	1096
7	13A7	tcctttcgttgaattgctc	tgatggcgcaatagtagcag	974
8	13A8	cctttctgctccaaaagtgc	caccttgacgtgatctcca	1142
9	13A10	acttggtcacagttggggtc	gaacaaacttcggagggaca	1189
10	13A11	ttctggcatttaaagcacaattt	atataggccaatctcattccgat	1158
11	13A12	aaacaaccgtcgaagaatgc	gcatccccaagtattgcta	1040
12	13B2	ggaaacgacgaggaattgaa	tttgggcaggtacaacaca	1199
13	14A1	cgtgctgtccaacattgctc	cgtaggggtgcaagactgat	1042
14	14A2	ttctggttcgcttttccat	tgagcaaatatccgaaaggg	1135
15	14A3	aaatcaatgctgccgttagg	gttcaagaaatgctcgaca	1197
16	14A4	ttgcgttgctaccttctct	gtggccacagttgggtatct	1128
17	14A5	tgttaacgttttccgta	tctgttcatgaaatgctggc	1101
18	22A	aattccccactgcccttact	agcccatggcaaacattag	1080
19	23A	agatgaaatgattgagcaagagc	attcaacgggagacactgttaga	1644
20	25A1	acacctcccttgcaattacg	taaaggaggagtagcgcaa	924
21	25A2	aaaaatgaaggcaatgcagg	atagccatcaaagtggctg	1643
22	25A3	caaattttgaaaccgcaatgtat	taagttgtgatgaaacctggac	1063
23	25A4	tttgagggttgaatcttcgg	gctgaaccaatctctgctcc	1196
24	25A5	ttgagggttgaatctttggg	gctgaaccaatctctgctcc	1193
25	25A6	aaactcgaaacctctattttggc	cctcctgaaggctgtaaagatt	1566
26	29A1	cctaacggcatgctcaaact	cccgattgtctttgttcgt	813
27	29A2	catccaattttcggcaatct	attccaacaagcccatgaag	982
28	29A4	aggcaagatcaaaggagca	gaaatcctggaactggtgga	1081

29	31A1	gcggtgaacaaggtacaggt	tcagcatctcaatcagccac	1186
30	31A2	gtcatcatccccgtgtact	ttcccagaagatgaattgcc	1126
31	31A4	aatttgggcattggagaatctat	tcgtgaatcttcttcttcttgc	1537
32	31A4	attggattatggcctcatttctt	atctgggtatattctgaacgggt	857
33	31A4	aagctgaacaaacaggattcaaa	tagaacacgcaacaaaactagca	998
34	31A4	aagacgctgaggttcttctctt	cggattacagacaaatctatcgc	2493
35	31A4	tttgacaactttctaccctcaa	tttattctagaagtggctgtggc	1033
36	32A	ctgtcctggagagcaacaca	agccgagccaaagaattgta	1176
37	33A1	gtccgattgcatagccctaa	ggctgagcttctcactcctg	1079
38	33B1	acaaaatacgggtctgcgctc	ttgaccgctcgatttggtta	1183
39	33C1	gttccggaagtttctgatca	ggtaggccttctttgaggg	1187
40	33C2	gaattgtgtctatcgcgaatc	cacttccaatcactttgtccatt	1150
41	33C4	agtacccccagcctctcaat	tcgccaaaaagaggaacatc	1175
42	33C5	agactatgtcggtcgctct	atggctctgggaagatctga	1194
43	33C6	gctttccattctcgcctatg	ctgtggagcactcatcgtaaa	1018
44	33C7	cgcagatttgcctctctac	tggaagtccttccgaagatg	1197
45	33C8	cacgcttttaagcagtccc	ttcattcgagacgcagacac	1059
46	33C9	gtgctcacctgaacgactca	agggattttcaggcagcata	930
47	33C10	acaaggcctagatgtagaatccc	gtgagagactcggaaagagtaa	946
48	33D1	gcgtcacgaaattgtccttt	atcaattcacatttggggga	1141
49	33D3	tgctctttgagataggcttcaac	tgctcttgaagactcttaagccg	2409
50	33E1	gagactgtgctaggagtaaccga	ggatgatagatggattcagcaaag	1127
51	33E2	aatttgcaccaggtttttg	cattccagcaaccagagat	1185
52	33E3	gcactatcgttagcactgctttt	aattacaatgtaatgtcgtccc	1067
53	34A1	catccaaccgtgttcaagtg	tcgattttgaaatggaggc	1143
54	34A2	catgaaccagctcttcacga	tgccaacagcttcatctcg	1125
55	34A3	tcccaaagcaatcaatttttaga	gatctctggttgattccaactg	1193
56	34A4	taaaggcacatgtgtttctgtg	agtccaagatcatatttccggtt	1194
57	34A5	gtcgcagaaatcatcacct	aaggaaaccgaaaggtttgt	1029
58	34A6	ggagcacttacataggcca	tggcattggaaaacagtcca	1599
59	34A7	gaccagtctcagccaaagaatta	tttgcctcatttgattttgttt	1183
60	34A8	aaagtcaaacggagcgaatg	cagagaccacgcttttctcc	939
61	34A9	tggattccctcgtttttgtc	agcaaggcagaaacttccaa	1075
62	34A10	cagcctgccatagatcgaat	ctgccactcattgggaattt	921

63	35A1	agccaatgattctccaatgc	gggtgttttgtaacgaacg	1164
64	35A2	aatggatgcatgacgttgaa	ggtagcattgttcgactct	1199
65	35A3	agcaaagaacggagtcactgtag	ttatagcgaagaaggaggttcc	1065
66	35A4	aacgatttgatgcaaccaca	atggctctttccgatgctg	1030
67	35A5	gatgttgctcattctccggt	acggcattgtctcctctgtt	1446
68	35B1	aattctctgctcgtcggaaa	ttccagcgtatacgggaagt	958
69	35B2	aaccgttgttcaacttccg	gcaactggtcagctgttgaa	991
70	35B3	ttgccgccaatttttattc	atctggcgatattctaccg	1154
71	35C1	ccatgactggggattgttc	atgccgataagcatgtttcc	900
72	35D1	tgcttacacactctggctgg	ttcccggatccacttgatag	1179
73	36A1	actgcaaaagtagggcatgg	ttggatggattagaaagcgg	1152
74	37A1	ggattgcctaccgtatacctacc	tcttatgtccaaaatcgatggtc	2052
75	37B1	acaaatcaaaccttacgcgg	tttggaagaagtcaccgtc	1142
76	43A	gaattgcatttctgctcaa	acaaattttcgaacggcag	1154
77	44A	cccggctcttgaaatctgta	cgaatccgaacggaagataa	1195
78	29A3	taaggcatagaatccttgaaca	tcttttcgactctttgagcattc	1921
79	31A3	caatttctcaagtttcaacg	ctagtgaaactgtgtacgttgcg	2185
80	33C3	tacccccagccatttaataca	gaaaatttccatccgagcaa	1176
81	33C11	acattcgtaaaaacgctcagaaa	gacctacaccacttctttcctt	2297
83	42A	ggagacgagagaattacaagggt	tggacctattatcagctgcattt	1111
84	13B1	agaaatcagcatattgaacca	tcaaagtccgaaccaagaataaa	1156
85	31A5	ttaaacgcttttgatgctttgt	tacctaaatgaagggtgaaacccc	1329
86	42A2	ggagacgagagaattacaagggt	tggacctattatcagctgcattt	2613

Table 2-2 ABC transporter 関連遺伝子プライマー配列

No.	name	Forward primer	Reverse primer	product
		Sequence 5'-3'	Sequence 5'-3'	
1	pgp-5	agatatgcaactgcggaacc	tcgtcccattctgattttcc	1193
2	C05D10.3	gccaagtccgtagacaaaa	rttcgcaacaatatgccaaaa	1164
3	C10C6.5	tctcacacaaatcggtgctc	ttgctgactcgcaaagctaa	1183
4	C16C10.12	tcaaacatggtgcatttctg	tgaagcaatthttgttcagcg	1495
5	C18C4.2	agttttgcgattttcgtgg	catgggtcaatgttgctacg	1114
6	abt-1	agaaatggggtggaatacagttt	catgtttctatctcttcatgcc	1174
7	haf-1	ctcgagctgaaaaatgcaca	catcaaatgttccttggcct	837
8	pgp-2	cagcatttgggggtgtaagt	agagaagcagcaagacgagc	1199
9	C44B7.8	caagctacccatccaacgat	ggatttgttctccttgcctcg	1076
10	C44B7.9	ctcctcctgacagtacatccatc	tcttggaacatcacttggattct	1158
11	pgp-9	ccacataggaaccagcatt	atattggcctttgaacacgc	1062
12	C48B4.4	gtttgaaccaattgaacaacat	atccttgacaacgctaaatcaa	2247
13	pgp-10	ccgttttcgctacatttt	aaaattccgtttgcacagc	1198
14	C54G10.3	ltcgaaccgccaataactcttc	tgacgtggattcatcaagga	1146
15	C56E6.5	ltgcagcagttactgggaatg	acaagtggagcaggaggaga	1108
16	D2023.6	aagttgccgatgcagcttt	actatctgaacggcgaatgg	987
17	pgp-11	cagtgcagaccgtcaaaga	ggcgttcggagatgaaagta	1066
18	mrp-3	cctgagtggattcaacggt	agacacccaatgctcctttg	1060
19	F02E11.1	acatcgggtaccagatgctc	tgacacgaatcttcaaagcg	1083
20	abt-2	agaaacccgatctcctcgat	tttccctgacatccaggttc	1669
21	F14D7.6	gtatttcccacatttgtatgct	ggcaccaatctctttagaacac	1306
22	mrp-5	gttgcgagacgatgagcaa	cccactctacgatcacgtt	1139
23	F18E2.2	gagctccagcatcatcatca	gaagatacggtttggtcggga	1021
24	F19B6.4	acgaaagtcggaacatgac	ccaactgagcaagcattcaa	1173
25	mrp-6	cttcaattcccgtgaacgat	ggaaatggatctctggacga	1038
26	mrp-4	tctgcactgtttgctgctct	tgatgtggtgggaaaagt	1199
27	pgp-12	tcgaaaatcaaaaaccggag	aacaaaacccgcacaaaaag	1035
28	pgp-13	gattaaccggcaacctcaga	atttggatctctaccgcag	936
29	pgp-14	ccacaaccaagaaggagaa	gccgtttgaacacatcattg	935