

200837037 B

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～平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 石橋 弘志

平成21年(2009)年 4月

目 次

I. 総合研究報告

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

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）
（総合）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

研究代表者 石橋 弘志 愛媛大学沿岸環境科学研究センター客員准教授

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。ガジュツをモデルとして線虫に対する生体影響（致死、成長・成熟および繁殖）を明らかにし、全ゲノムアレイ解析からガジュツ応答遺伝子群の同定に成功した。また、抗酸化物質として知られるケルセチンについても同様の検討を試み、ケルセチン応答遺伝子群の同定に成功し、ガジュツと共通して発現誘導を示した遺伝子群は全体の75%を占めたことからガジュツの抗酸化作用が示唆された。抗酸化能を有するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 遺伝子の発現に及ぼすガジュツあるいはケルセチンの影響を調査したところ、両化合物は SOD アイソフォーム遺伝子の発現に影響した。化学発光法による測定からガジュツの抗酸化作用が認められたことから、線虫 SOD はヒトなど哺乳類と同様に活性酸素の除去を担う機能を有することが示唆された。これらの事実は全ゲノムアレイ解析からガジュツの抗酸化作用を予測できることを示唆している。カスタム DNA マイクロアレイ解析では、ガジュツ暴露により主にチトクローム P450 (CYP) やグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子群の発現の増加が確認され、我々の先行研究との比較から、ガジュツの抗高脂血症薬・抗動脈硬化剤クロフィブレート様作用、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、ガジュツ抽出成分により CYP14A2, 14A3 および 34A3 遺伝子の発現が増加し、我々の先行研究では生体異物によりこれら遺伝子の発現変動は確認されていないことから、ガジュツ抽出成分は生体異物による 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と考えられた。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て

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、ガジュツ粉末あるいはそのエキスにアセトン (AC) あるいはエタノール (EtOH) 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を用いて、以下の方法により生体影響評価試験を行った。

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

B-1 の方法により抽出したガジュツ成分 (AC 抽出ガジュツ、EtOH 抽出

ガジュツおよび EtOH 抽出ガジュツエキス)のいずれかと抗酸化物質ケルセチン(シグマ社製)を用いた。

実験には野生型線虫(N2)を用いた。DMSOを用いて各濃度に調製したガジュツ抽出成分あるいはケルセチン含有培養液に同調・孵化させたL1幼虫を20°C、給餌条件下で24時間曝露した。Total RNAを抽出後、mRNAを精製した。

カスタムDNAマイクロアレイ解析は、対照群をCy3、曝露群を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、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。

全ゲノムアレイ解析はAffymetrix社のGeneChip Expression Arrayにより行った。まずオリゴdTにT7プロモーターを付加したプライマーを用いてRNAの逆転写反応を行った。その後、double-stranded cDNAを合成し、T7 RNAポリメラーゼによるIVTでcRNAを合成した。この際ピオチンラベルされたリボヌクレオチドを取り込ませた。合成されたcRNAを断片化し、GeneChip Expression Arrayにハイブリダイゼーションした。その後、Affymetrix GeneChip Command Console Softwareソフトウェア(AGCC)制御のもと洗浄および染色を行い、レーザ

ースキャナーで画像を取得しARRファイルおよびCELファットヘッドミノー入りを作成した。データ解析には専用解析ソフト(Expression Consoleソフトウェア)でExpression Report、CHPファイトを作成し、Log2 Ratioが1(2倍)以上を発現誘導、Log2 Ratioが-1(1/2倍)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. RT-PCRによる遺伝子発現解析

既報に従い、抽出したtotal RNAを逆転写し、作製したcDNAを鋳型として各遺伝子に特異的なプライマー対を用いてRT-PCRを行った。なお内部標準遺伝子はβ-actinを用いた。

B-6. 化学発光による抗酸化能測定

O₂[•]生成にヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼの系を用い、生成したO₂[•]と発光試薬との反応による化学発光をルミノメーターで測定することにより行った。

B-7. 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 AC 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)。これらのことから、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. 全ゲノムアレイによる網羅的遺伝子発現解析

線虫の約 22500 転写産物を対象とした全ゲノムアレイ解析によりガジュツ応答遺伝子の探索を試みた。ガジュツ抽出物の 24 時間暴露により発現誘導が認められた遺伝子は 746 種類 (表 1)、発現抑制が認められた遺伝子は 291 種類 (表 2) であり、線虫においてガジュツ応答遺伝子の同定に成功した。ガジュツはこれまで抗酸化作用を有することが示唆されているため、強い抗酸化作用を示すケルセチンについても同様の解析を試みた。ケルセチン (1.53 μM) の 24 時間暴露により発現誘導が認められた遺伝子は 400 種類 (表 3)、発現抑制が認められた遺伝子は 173 種類 (表 4) であり、線虫においてケルセチン応答遺伝子の同定に成功した。

そこで両試験物質で共通して変動した遺伝子を抽出したところ、発現誘導遺伝子は 300 種類 (表 5)、発現抑制遺伝子は 40 種類 (表 6) が共通していた。

C-3. スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 遺伝子発現に及ぼす影響と抗酸化能測定

全ゲノムアレイ解析によりガジュツの潜在的な抗酸化作用が示唆されたため、抗酸化能を有する SOD に着目し、ガジュツあるいはケルセチンを暴露した線虫 SOD アイソフォーム遺伝子の発現解析を行った。ガジュツを 24 時間暴露した線虫において、SOD-3 および SOD-4 遺伝子の発現が抑制された (図 2-A)。一方、ケルセチンを 24 時間暴露した線虫では、SOD-3 および SOD-4 遺伝子に加え、SOD-2 および SOD-5 遺伝子の発現も抑制された (図 2-B)。そこで、ガジュツ抽出成分の抗酸化能を化学発光法により測定したところ、ガジュツ抽出成分の抗酸化能が確認された (図 3)。同様の測定によりケルセチンの抗酸化能も確認された (図 3)。これらのことから、ガジュツ抽出成分の抗酸化作用が明らかとなり、線虫 SOD はヒトなど哺乳類と同様に活性酸素の消去を担う機能を有することが示唆された。

C-4. ガジュツにより発現変動した遺伝子のカスタム DNA マイクロアレイ解析

より詳細にガジュツが線虫の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、3 種類のガジュツ成分 (AC 抽出ガジ

ュツ 1000 $\mu\text{g/ml}$ 、EtOH 抽出ガジュツ 1250 $\mu\text{g/ml}$ および EtOH 抽出ガジュツエキス 500 $\mu\text{g/ml}$) を線虫に 24 時間暴露し、カスタム 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。各ガジュツ成分によって変動した遺伝子数やその種類は異なっていたが、結果として、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)、ABC トランスポーターおよび脂質代謝に分類される遺伝子の発現変化が確認され、ガジュツ成分に応答する遺伝子群をスクリーニングすることができた。

3 種類の抽出方法で共通して遺伝子の発現変動が認められたガジュツ AC 抽出物を暴露したときの変動遺伝子群を表 7 に示した。主に CYP、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 7)。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 8)、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-5. 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、ガジュツ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 4)。

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、線虫の約 22500 転写産物を対象とした全ゲノムアレイ解析によりガジュツ応答遺伝子の同定に成功した。ガジュツはこれまで抗酸化作用を有することが示唆されているため、カテキンなどと同様に抗酸化作用の強いポリフェノールの 1 種であるケルセチンについても同様の解析を試み、ケルセチン応答遺伝子の同定にも成功した。そこで両試験物質で共通して発現変動した遺伝子群を抽出したところ、発現誘導遺伝子は 300 種類、発現抑制遺伝子は 40 種類が共通していた。共通して発現誘導が認められた 300 種類の遺伝子は、ガジュツにより発現誘導が認められた遺伝子の 40%

を、またケルセチンにより発現誘導が認められた遺伝子の 75%を占めていた。一方、共通して発現抑制が認められた 40 種類の遺伝子は、ガジュツにより発現抑制が認められた遺伝子の 14%を、またケルセチンにより発現抑制が認められた遺伝子の 23%を占めていた。これらのことから、特に発現誘導が認められた遺伝子はガジュツとケルセチンで非常に類似しており、ガジュツのケルセチン様作用、すなわち潜在的な抗酸化作用を示すことが示唆された。

活性酸素は各種の炎症性疾患を始め、動脈硬化、虚血性心疾患およびガン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。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は、これまで活性酸素の消去を担う機能を有することが知られている。そこで、ガジュツ抽出成分を曝露した線虫において、SOD 遺伝子の発現解析を行ったところ、SOD3 および SOD4 遺伝子の発現が抑制された。また、ケルセチンを曝露した線虫においても、SOD3 および SOD4 遺伝子の発現の抑制が確認された。そこで、ガジュツ抽出成分の抗酸化能を化学発光法により測定したところ、ガジュツ抽出成分の抗酸化能が確認された。これらのことから、ガジュツ抽

出成分の抗酸化作用が明らかとなり、線虫 SOD はヒトなど哺乳類と同様に活性酸素の消去を担う機能を有することが示唆された。またこれらの事実は、線虫の全ゲノムアレイ解析によりガジュツの抗酸化作用が予測できる可能性を示唆している。

より詳細にガジュツが線虫の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、3種類のカジュツ成分 (AC 抽出ガジュツ 1000 µg/ml、EtOH 抽出ガジュツ 1250 µg/ml および EtOH 抽出ガジュツエキス 500 µg/ml) を線虫に 24 時間曝露し、カスタム DNA マイクロアレイにより遺伝子発現解析を試みた。各ガジュツ成分によって変動した遺伝子数やその種類は異なっており、供試したガジュツ成分の季節変動あるいは異なる抽出方法などの関与が考えられた。しかしながら結果として、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)、ABC トランスポーターおよび脂質代謝に分類される遺伝子の発現変化が確認され、ガジュツ成分に応答する遺伝子群をスクリーニングすることができた。

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。

ABC トランスポーターである multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) は、ヒトではグルタチオン抱合を受けた薬物や異物を排出するポンプとして機能することが知られているが、抗がん剤などもグルタチオン抱合体として、またはグルタチオンとの共輸送の形で細胞外に輸送する。すなわち MRP1 の過剰発現や異常はがん細胞の多剤耐性を惹起する可能性が考えられる。また、P-glycoprotein (pgp) も多剤耐性に関与することが知られている。線虫 *mrp-1* はヒト MRP1 と構造・機能が類似していることが報告されており、線虫 *mrp-1* はヒト MRP1 と同様に機能する可能性が高いと考えられる。今回、ガジュツ抽出成分によって線虫 *mrp-1* 遺伝子の発現が変化し、他の *mrp-1* および *pgp* 遺伝子アイソフォームの発現も変化した。これらのことから、線虫 *mrp* や *pgp* など多剤耐性に関与する可能性がある遺伝子の発現変動によって、抗がん剤など薬剤の多剤耐性を防御する効果が期待できるのかもしれない。

以上の研究成果から、「いわゆる健康食品」の生体影響評価および遺伝子発現プロファイルが可能となり、安全性・有効性を包括的に評価するための基盤データの一部が蓄積できた。今後、さらに基盤データを取得し、本試験法の有用性を向上させるとともに、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したい。当該研究により、「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示唆された。

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。ガジュツをモデルとして線虫に対する生体影響（致死、成長・成熟および繁殖）を明らかにし、全ゲノムアレイ解析からガジュツ応答遺伝子の同定に成功した。また、抗酸化物質として知られるケルセチンについても同様の検討を試み、ガジュツと共通して発現誘導を示した遺伝子が多かったことから、

ガジュツの潜在的な抗酸化作用が示唆された。そこでガジュツあるいはケルセチンについて、抗酸化能を有するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 遺伝子の発現に及ぼす影響を調査したところ、両化合物は SOD アイソフォーム遺伝子の発現に影響した。また、化学発光法による測定でガジュツ抽出成分の抗酸化能が確認されたことから、線虫 SOD はヒトなど哺乳類と同様に活性酸素の消去を担う機能を有することが示唆された。一方、カスタム DNA マイクロアレイによる解析から、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。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。

なし

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

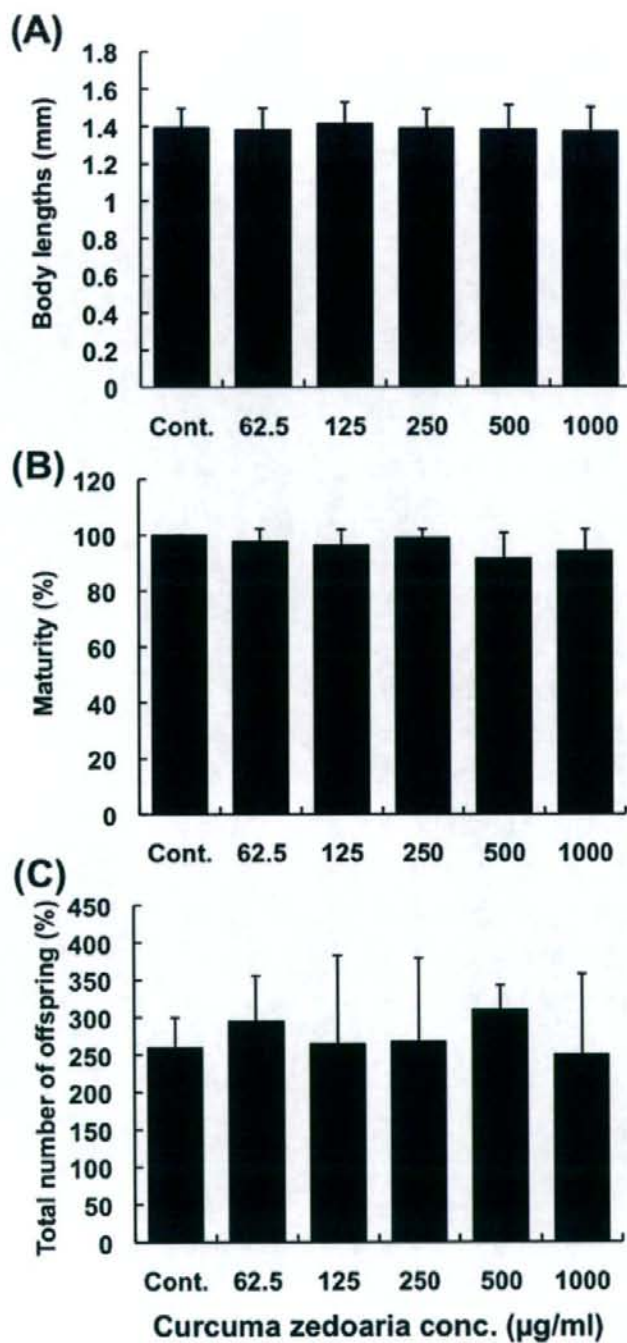


図1. ガジュツ抽出溶液を暴露した線虫の成長 (A)、成熟 (B) および繁殖 (C) に及ぼす影響. データは全て平均±標準偏差.

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

Probe Set ID	Gene Title	Log2 Ratio
171762_x_at	status:Partially_confirmed /// Y39B6A.16	2.03
171795_x_at	R12E2.14 /// status:Confirmed	2.07
171796_x_at	C02E7.6 /// status:Confirmed	1.42
171811_s_at	K01D12.15 /// K01D12.7 /// status:Confirmed /// status:Confirmed	1.28
171826_x_at	UNCoordinated	1.00
171935_s_at	D1044.2c	1.10
172055_x_at	HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// locus:his-3 /// locus:his-4 /// locus:his-7 /// locus:his-8 /// locus:his-12 /// locus:his-16 /// locus:his-19 /// locus:his-20 /// locus:his-21 /// locus:his-22 /// locus:his-29 /// locus:his-30 /// locus:his-33 /// locus:his-34 /// locus:his-43 /// locus:his-51 /// locus:his-52 /// locus:his-53 /// locus:his-54 /// locus:his-57 /// locus:his-65	1.35
172090_at	---	1.73
172171_x_at	Serpentine Receptor, class G (gamma) /// locus:srg-50	2.40
172196_x_at	COLlagen /// locus:col-65	1.87
172252_x_at	H25K10.4 /// status:Partially_confirmed	5.48
172263_x_at	F38C2.1 /// status:Predicted	4.97
172293_x_at	status:Partially_confirmed /// status:Predicted /// Y26D4A.17 /// Y26D4A.5	1.44
172346_x_at	R12E2.7 /// status:Confirmed	1.52
172353_x_at	C02E7.6 /// status:Confirmed	1.65
172390_x_at	SKN-1 Dependent Zygotic transcript /// locus:sdz-37	1.45
172401_x_at	F08B4.3 /// status:Partially_confirmed	3.20
172484_x_at	C29F9.12 /// C52B11.4 /// F22D3.5 /// status:Predicted /// status:Predicted /// status:Predicted	1.50
172497_x_at	R12E2.15 /// status:Confirmed	2.39
172547_x_at	R12E2.14 /// status:Confirmed	2.24
172552_x_at	Activated in Blocked Unfolded protein response /// Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// locus:abu-5 /// locus:pqn-76 /// locus:pqn-78 /// locus:pqn-79 /// locus:pqn-90 /// locus:pqn-91	1.97
172573_x_at	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// locus:pqn-76 /// locus:pqn-79	1.04
172638_x_at	---	1.54
172649_x_at	F55G1.10 /// locus:his-61	1.13
172729_x_at	F11G11.12 /// locus:col-73	1.10
172768_x_at	CYtochrome P450 family /// locus:cyp-33C5	1.22
172769_x_at	CYtochrome P450 family /// locus:cyp-33C4	2.07

172777_x_at	HIStone /// HIStone /// HIStone /// HIStone /// locus:his-6 /// locus:his-17 /// locus:his-27 /// locus:his-49	1.08
172799_x_at	F53F1.5 /// cuticlin	1.84
172806_x_at	B0238.13 /// carboxylesterase	1.41
172812_x_at	chitinase domains /// ZK938.6	1.13
172824_x_at	HIStone /// locus:his-4	1.03
172851_x_at	HIStone /// HIStone /// locus:his-29 /// locus:his-34	1.35
172989_s_at	R11A5.7 /// zinc carboxypeptidase	1.60
172998_s_at	K07A1.6 /// status:Confirmed	1.01
173004_s_at	GRound-Like (grd related)	1.79
173014_at	ZK20.6 /// locus:nep-1	1.32
173070_s_at	MItosis and X associated /// locus:mix-1	1.03
173083_s_at	H10E21.4 /// calcium-binding protein	2.28
173123_at	Cell Division Cycle related	2.25
173124_s_at	H42K12.3 /// status:Confirmed	1.49
173132_s_at	T06A1.1 /// status:Partially_confirmed	2.74
173142_at	H02I12.1 /// locus:cbd-1	1.40
173235_at	Y38C1BA.3 /// locus:col-109	2.37
173261_s_at	B0507.1 /// status:Partially_confirmed	1.80
173445_s_at	abnormal cell LINeage /// locus:lin-36	1.06
173494_s_at	T20F5.4 /// status:Confirmed	1.32
173567_s_at	GRound-Like (grd related)	2.11
173576_at	ZK180.5c	1.89
173584_s_at	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// locus:pqn-73	1.68
173661_s_at	Lin-12 and Glp-1 X-hybridizing	1.32
173664_at	Male ABnormal /// locus:mab-7	2.28
173786_s_at	status:Partially_confirmed /// Y37E11AR.4	1.96
173808_s_at	Kinesin-Like Protein /// locus:klp-19	1.03
173947_at	F13H8.5 /// Phospholipase ADRAB-B (Rabbit)	1.58
173990_s_at	CathePsin L family /// locus:cpl-1	1.17
174044_at	K04H4.2a	1.31
174071_at	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// locus:pqn-95	1.65
174075_at	---	1.43
174178_at	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein	1.68
174228_at	K08C7.4 /// status:Partially_confirmed	1.28
174256_at	Lin-12 and Glp-1 X-hybridizing	1.77
174325_at	C24A1.2b	1.12
174378_at	T06A4.1b	1.48
174389_s_at	K02E10.4b	1.21
174410_at	status:Partially_confirmed /// Y18H1A.9	1.30
174429_at	status:Partially_confirmed /// Y69A2AR.16	1.05
174448_s_at	F28D1.9 /// fatty acid transport protein	1.38
174486_at	C41G7.3 /// status:Partially_confirmed	1.20
174487_s_at	C41G7.3 /// status:Partially_confirmed	1.30
174508_s_at	K08E7.5c	1.84

174613_at	CaDHerin family	1.17
174628_s_at	H03E18.1 /// status:Partially_confirmed	1.13
174650_at	F49E10.2a	1.15
174660_at	T19A5.3b	1.51
174661_s_at	T19A5.3b	1.38
174666_at	ANillin (actin binding protein) /// locus:ani-2	1.21
174880_at	T23F2.1 /// locus:bus-8	1.11
174947_s_at	DAF-16/FOXO Controlled, germline Tumor affecting /// locus:dct-9	2.41
174960_at	ZK1010.7 /// locus:col-97	1.60
174995_s_at	PaTched Related family /// locus:ptr-6	1.38
175008_at	F10D11.6 /// status:Partially_confirmed	2.05
175014_at	---	1.10
175093_at	C26B9.7 /// status:Confirmed	1.43
175115_at	status:Confirmed /// Y64H9A.2	1.25
175204_at	status:Partially_confirmed /// ZK829.3	1.63
175378_s_at	F53B1.6 /// status:Partially_confirmed	1.20
175393_at	status:Partially_confirmed /// Y47D7A.13	1.93
175576_s_at	status:Confirmed /// Y75B7AR.1	1.43
175642_s_at	AntiBacterial Factor related /// locus:abf-2	1.36
175650_s_at	abnormal cell LiNeage /// locus:lin-46	1.17
175768_at	C.Elegans Homeobox	2.09
175804_s_at	F27E11.2a	1.08
175832_s_at	Enhancer of Glp-One (glp-1) /// locus:ego-1	1.31
175885_at	F12E12.11 /// status:Confirmed	6.60
175887_s_at	F54A3.6 /// status:Partially_confirmed	1.01
175888_at	F-box B protein /// locus:fbx-92	8.28
175936_at	---	3.99
175957_at	F52E4.8 /// locus:ztf-13	1.10
176074_s_at	status:Partially_confirmed /// Y32G9B.1	1.41
176142_at	GLOBin /// locus:glb-32	1.70
176188_at	CaDHerin family /// locus:cdh-12	1.12
176228_at	status:Predicted /// Y47D7A.6	2.01
176233_at	K08D12.5 /// status:Partially_confirmed	1.04
176274_at	status:Partially_confirmed /// Y52E8A.4	1.05
176293_at	status:Partially_confirmed /// Y71G12B.17	1.39
176327_s_at	GROund-Like (grd related) /// locus:grl-5	1.97
176330_at	status:Confirmed /// Y22D7AL.14	1.29
176342_at	status:Partially_confirmed /// Y105E8A.25	1.18
176349_s_at	T24E12.5 /// status:Partially_confirmed	1.42
176469_s_at	Variable ABnormal morphology /// locus:vab-2	1.11
176534_at	status:Predicted /// Y55B1BR.1	1.08
176537_s_at	TPX2 (Targeting Protein for Xenopus Klp2)-Like	1.58
176638_s_at	R144.10 /// status:Confirmed	1.22
176649_s_at	UNCoordinated	1.14
176672_at	W08G11.1 /// status:Partially_confirmed	1.81

176758_at	status:Partially_confirmed /// Y111B2A.8	1.01
176821_s_at	Kinesin-Like Protein /// locus:klp-20	1.39
176857_s_at	SaPosin-like Protein family /// locus:spp-7	1.60
176988_at	status:Partially_confirmed /// Y105E8A.8	1.29
177024_at	COLlagen /// locus:col-90	1.66
177049_s_at	status:Partially_confirmed /// status:Partially_confirmed /// Y73B6BL.23 /// ZK616.5	1.98
177056_at	status:Partially_confirmed /// Y19D10B.4	1.16
177077_at	status:Partially_confirmed /// Y48G1BL.7	1.93
177106_at	status:Partially_confirmed /// Y61A9LA.7	1.35
177113_at	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// locus:pqn-26	2.64
177138_at	status:Predicted /// Y38C1AA.8	1.12
177149_at	R74.2 /// status:Partially_confirmed	1.08
177216_at	status:Partially_confirmed /// Y53G8AM.4	1.43
177218_at	status:Partially_confirmed /// Y53G8AM.5	2.93
177244_at	Y71G10AL.1a	2.62
177247_at	BE10.2 /// status:Partially_confirmed	1.41
177255_at	M195.2 /// status:Partially_confirmed	1.42
177270_at	JC8.12a	1.39
177328_at	status:Partially_confirmed /// Y37E11AL.1	1.26
177334_at	Temporarily Assigned Gene name /// locus:tag-50	1.24
177379_at	status:Partially_confirmed /// ZC8.6	1.17
177473_at	T23G4.2 /// status:Partially_confirmed	2.14
177495_at	C01F6.2 /// status:Confirmed	1.85
177505_at	T06G6.6b	1.74
177581_at	BListered cuticle /// locus:bli-5	1.42
177586_at	C15C6.1 /// status:Confirmed	1.65
177589_at	T27C5.12 /// status:Predicted	1.00
177599_at	Serpentine Receptor, class U /// locus:sru-36	1.24
177631_at	status:Partially_confirmed /// ZK596.3	1.23
177643_at	T26C5.2 /// status:Partially_confirmed	1.21
177654_at	T06E4.5 /// status:Partially_confirmed	1.06
177696_at	C30H6.5 /// status:Partially_confirmed	1.55
177715_s_at	status:Partially_confirmed /// ZC13.3	1.22
177758_at	Seven TM Receptor /// locus:str-123	1.23
177786_at	F44A6.5 /// status:Confirmed	1.15
177801_at	C-type LECTin /// locus:clec-230	1.11
177829_at	LIPaSe related /// locus:lips-10	1.28
177870_at	C02F4.4 /// status:Confirmed	1.86
177886_at	F57E7.1 /// status:Predicted	1.85
177903_s_at	F09B9.1 /// status:Confirmed	3.41
177929_s_at	T22H2.2	1.22
177930_at	status:Predicted /// Y7A5A.6	1.21
177942_at	F33A8.7 /// status:Confirmed	1.97
178001_at	F17B5.6 /// status:Partially_confirmed	1.30

178032_at	ACyLtransferase-like /// locus:aci-13	1.24
178038_at	T23F6.1 /// status:Confirmed	1.42
178111_at	F59F5.7 /// status:Partially_confirmed	1.03
178131_at	T16G1.2 /// status:Partially_confirmed	1.03
178139_at	Serpentine Receptor, class H /// locus:srh-215	1.46
178146_s_at	R102.1 /// status:Partially_confirmed /// status:Confirmed /// Y41E3.6	1.00
178165_at	F46F3.3 /// status:Confirmed	1.33
178168_at	T01G9.1 /// status:Partially_confirmed	2.22
178189_at	F28C6.5 /// status:Partially_confirmed	1.29
178194_at	R07E3.6 /// status:Partially_confirmed	1.18
178204_at	T23F6.2 /// status:Predicted	1.79
178211_at	F08G5.1 /// status:Confirmed	1.93
178244_at	F01D5.6 /// status:Partially_confirmed	1.78
178290_at	GRound-Like (grd related) /// locus:grl-3	2.67
178316_at	C29F7.2 /// status:Confirmed	1.45
178320_at	R07D5.2 /// status:Partially_confirmed	1.56
178330_at	C54C8.2 /// status:Partially_confirmed	1.27
178343_s_at	LIPaSe related /// locus:lips-9	2.46
178372_at	status:Partially_confirmed /// ZK829.3	1.87
178420_at	F11A5.5b	2.18
178433_at	C01G6.9 /// status:Partially_confirmed	1.39
178476_at	status:Partially_confirmed /// ZC434.3	1.68
178508_at	C14A4.9 /// status:Confirmed	1.42
178522_at	W09H1.4 /// status:Predicted	1.56
178563_at	T16G1.6 /// status:Partially_confirmed	1.44
178577_at	C49F8.1 /// status:Partially_confirmed	1.09
178606_at	Serpentine Receptor, class U /// locus:sru-35	1.03
178716_at	AuTophagy (yeast Atg homolog) /// locus:atg-10	1.23
178728_at	R01E6.2 /// status:Partially_confirmed	1.59
178734_at	F-box B protein /// locus:fbxb-9	2.68
178736_at	Seven TM Receptor /// locus:str-252	1.23
178788_s_at	F45B8.3 /// status:Confirmed	1.01
178843_at	F08G5.6 /// status:Confirmed	1.16
178861_at	K02D3.2 /// status:Partially_confirmed	1.22
178865_at	Seven TM Receptor /// locus:str-141	2.97
178873_at	C43F9.4 /// status:Partially_confirmed	1.02
178886_at	F32D8.3 /// status:Partially_confirmed	1.04
178912_at	F35G2.5a	1.65
178916_at	Serpentine Receptor, class D (delta) /// locus:srd-50	1.70
178929_at	F47G9.3 /// locus:cutl-18	1.42
178938_at	C50B6.9 /// status:Partially_confirmed	1.40
179001_at	F-box B protein /// locus:fbxb-86	1.59
179027_at	W02D9.4 /// status:Predicted	1.05
179070_at	T27A8.5 /// status:Predicted	1.43
179094_s_at	T16G1.4 /// status:Partially_confirmed	1.08

179116_at	F55G7.1 /// status:Partially_confirmed	1.01
179131_at	T08G5.3 /// status:Confirmed	2.20
179159_at	C02B4.3 /// C02B4.4 /// status:Predicted /// status:Confirmed	2.04
179170_at	Serpentine Receptor, class U /// locus:sru-42	2.40
179176_at	C52G5.2 /// status:Confirmed	1.26
179199_at	T09F5.1 /// status:Partially_confirmed	1.23
179246_s_at	F54B8.1 /// M01B2.8 /// status:Partially_confirmed /// status:Partially_confirmed	1.82
179249_at	LIPaSe related /// locus:lips-6	3.06
179254_at	locus:zbed-6 /// Zinc finger protein (BED class)	1.86
179261_at	Serpentine Receptor, class H /// locus:srh-178	1.22
179317_at	Serpentine Receptor, class T /// locus:srt-43	1.46
179333_at	GRoundhog (hedgehog-like family) /// locus:grd-12	1.58
179335_at	K08E7.5c	2.48
179401_at	status:Confirmed /// ZK662.2	2.43
179431_at	C25D7.9 /// status:Partially_confirmed	1.68
179471_at	Serpentine Receptor, class SX /// locus:srsx-1	1.12
179507_at	F36D1.5 /// status:Partially_confirmed	1.83
179510_at	F58H1.2 /// status:Partially_confirmed	1.09
179534_s_at	T23F1.5 /// status:Partially_confirmed	1.00
179600_at	C38C6.3 /// status:Confirmed	1.61
179666_at	W02D9.9 /// status:Predicted	1.13
179670_at	C14A6.8 /// status:Predicted	1.34
179679_at	F52H3.4 /// status:Partially_confirmed	1.29
179686_at	Temporarily Assigned Gene name /// locus:tag-297	1.01
179731_at	Serpentine Receptor, class Z /// locus:srz-47	1.11
179749_at	Serpentine Receptor, class H /// locus:srh-32	2.18
179828_at	Serpentine Receptor, class T /// locus:srt-49	1.37
179830_at	F01D5.10 /// status:Partially_confirmed	1.27
179868_at	status:Partially_confirmed /// Y81G3A.4	1.24
179904_at	F35A5.5 /// status:Partially_confirmed	1.10
179909_at	F36G9.12 /// status:Partially_confirmed	1.12
180014_s_at	K07A1.13 /// status:Confirmed	1.39
180087_at	W05F2.6 /// status:Confirmed	1.28
180100_at	R04E5.9 /// status:Confirmed	1.27
180125_at	Serpentine Receptor, class H	1.19
180136_at	status:Predicted /// ZK488.6	3.06
180153_s_at	Serpentine Receptor, class W /// Serpentine Receptor, class W /// locus:srw-119 /// locus:srw-120	1.16
180159_at	C32B5.9 /// locus:fbxc-7	1.04
180189_s_at	T06A1.1 /// status:Partially_confirmed	2.38
180198_at	---	1.86
180200_at	T13C2.2 /// status:Confirmed	1.24
180203_at	C49C8.6 /// status:Partially_confirmed	1.58
180227_at	F21H7.10 /// status:Partially_confirmed	3.00
180266_s_at	C03A7.2 /// status:Predicted /// status:Partially_confirmed /// ZK262.8	1.70