

研究報告 2018 (KISTEC Annual Research Report, 2018)

【研究開発部】

実用化実証事業

「食品機能性評価」グループ

◆総括	169
	グループリーダー 阿部 啓子
◆ヒトを用いた自然薯ムカゴの生理的機能性評価 - パイロットスタディ	174
	篠崎 文夏
◆食品機能性評価と未病マーカーの探索メープルシロップを例にして	177
	亀井 飛鳥
◆動物を対象とする脳機能評価系の確立に向けた検討	180
	嶋田 耕育・野原 正勝・飯尾 将太・安岡 顕人
◆食品機能性評価のための新規マーカー検出手法の開発と検討	183
	野原 正勝、安岡 顕人、嶋田 耕育、亀井 飛鳥、篠崎 文夏
◆食品機能性成分によるエピゲノム制御を基盤とした世代間健康評価系の開発	186
	安岡 顕人、嶋田 耕育、近藤 隆
◆生体ガス分析を利用した食品機能性の短期間評価系の確立	188
	豊田集
◆生体内代謝を考慮した細胞形質転換試験法の開発	190
	廣岡 孝志, 大森 清美
◆機器共用化	192
	飯尾 将太、亀井 飛鳥
◆業績	194

食品機能性評価グループ

グループリーダー 阿部啓子

【基本構想】

食は健康な生体を築き上げ、それを維持する上で限りなく重要であり、適正な食生活は“quality of life” (QOL) の向上に寄与し、生活習慣病を防ぎ、健康寿命を延ばす手段としても高い関心が寄せられている。わが国ではまもなく 65 歳以上の高齢者が人口の 30% に達すると予想されており、健康を保ち、エイジング（加齢）に伴う生活習慣病の発症を遅らせる機能性食品の開発は国際的にも注目されている。本テーマの出口としては、科学的エビデンスに基づく商品を開発するための公的機能性評価システム機関を世界に先駆けて構築し、この日本発の領域を、学術的・産業的・社会的に発展させ世界に発信していくことにある。

1. 平成 29 年度の研究目的

グループ 1 年目となる平成 29 年度は、以下の各項目を重点項目として実施した。

(1) 未病評価技術センター構想

(1)-1 ヒト介入試験：動物実験を基盤として

食品は私たちが日常的に摂取するものである。複数の成分から成り、それらが相加・相乗・拮抗作用するために機能性は多岐に亘るといふ特徴を持つ。食品に期待される機能性は、未病の維持・改善に働く効果であるため、本グループでは、未病評価という観点から食品機能性の評価技術センター構想を描き、実現に向けて取り組んでいる。

食品には、長い食経験という歴史を持つものが多いが、昨今の研究開発により、特定の成分の高含有作物や、特定の成分を抽出したサプリメント食品等が普及し始めている。そのため、現在の食品の機能性評価においては安全性の確認が必須条件であり、さらにその理解のためには作用メカニズムを明らかにすることが不可欠であることから、動物を対象とする実験を中心に進めてきた。一方で、2015 年に始まった食品の機能性表示制度においては、ヒトにおける評価研究が求められることから、ヒトにおける食品機能性評価の需要も高まってきた。現状では、ヒトにおいては血液の生化学データ等、健康診断に用いられる手法で判断せざるを得ないが、これら指標は病気を検出するためのものであり、病気の治癒を目的としない食品の機能性評価のためには、より感度が高く応答がはやく、ヒトにも応用可能な評価試験手法や指標が必要である。現在、動物からヒトへ、研究展開を図るための取り組みを進めており（図 1）、その成果を報告する。

<実施項目>

- (1)-1-1 自然薯ムカゴの機能性解析：動物実験
- (1)-1-2 自然薯ムカゴの機能性解析：ヒト介入試験
- (1)-1-3 メープルシロップの機能性解析：動物実験
- (1)-1-4 メープルシロップの機能性解析：ヒト介入

(1)-2 ヒト介入試験：未病改善食品の評価技術の開発（未病マーカー）

われわれは動物実験やヒト試験を行い、トランスクリプトーム解析等により食品の有効性や機能性についての評価を行っているが、評価技術センターとして、新しい評価系で新しいマーカーを探索することは、受託研究を進めるうえで非常に重要である。そこで新たなマーカー候補探索を目的とし、単一細胞のトランスクリプトーム解析技術、並びに好中球活性測定技術、DNA マイクロアレイの新たなプラットフォームの導入を試みた。

<実施項目>

- (1)-2-1 単一細胞トランスクリプトーム解析技術の
- (1)-2-2 好中球活性測定技術の導入
- (1)-2-3 DNA マイクロアレイのプラットフォーム間の比較

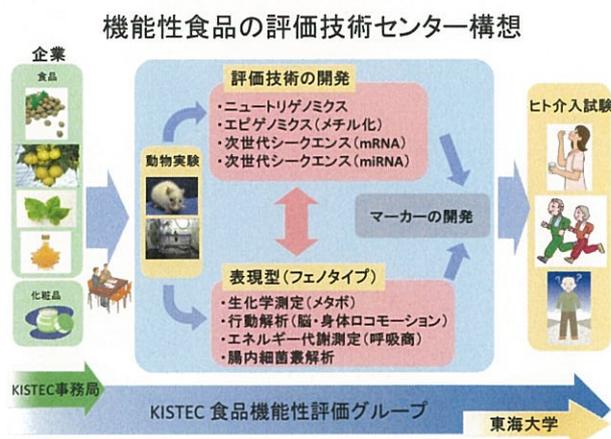


図1 機能性食品の評価技術センター構想

(2) 地域イノベーション戦略支援プログラム

平成 25 年 8 月より地域イノベーション戦略支援プログラムがスタートした。食品の機能性ならびに安全性の科学的エビデンスに基づいて評価解析することを目的とし、ト

ランスクリプトーム、エピジェノミクスを基礎においた食品評価法の確立、世代伝播を可能とする食品成分の探索と検証、生体内代謝を考慮した細胞形質転換試験法の開発を主なテーマに研究を実施した。また、脳機能解析技術導入の検討を実施するとともに、研究機器の共用化を進め、研究技術の地域波及・還元を目指した(図2)。

＜実施項目＞

- (2)-1 トランスクリプトーム、エピジェノミクスを基礎においた食品評価法の確立
- (2)-2 生体ガス分析を利用した食品機能性の短期間評価系の確立
- (2)-3 世代伝播を可能とする食品成分の探索と検証
- (2)-4 生体内代謝を考慮した細胞形質転換試験法の開発
- (2)-5 脳機能解析法の導入：認知・行動試験
- (2)-6 機器の共用化

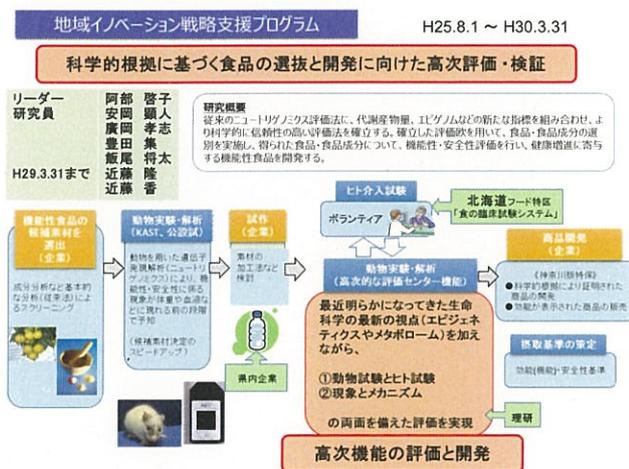


図2 地域イノベーション研究支援プログラム概要

(3) 受託・共同研究

企業からの受託、企業との共同研究に加え、文部科学省「地域イノベーション戦略支援プログラム事業」、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」(管理法人：生研支援センター)、農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」発展融合ステージ『北方圏紅藻類の資源開発とその健康機能・素材特性を活かした次世代型機能性食品の創出』等の国家プロジェクトにて研究コンソーシアムを形成し、産学官連携の共同研究も推進した。

2. 平成29年度の研究成果

(1) 未病評価技術センター構想

(1)-1 ヒト介入試験：動物実験を基盤として

(1)-1-1 自然薯ムカゴの機能性解析：動物実験

県産品の自然薯ムカゴ(以下、ムカゴ)の生理機能を有すると推定される成分の抽出を東京大学とともに行ない、そのうち有色画分について高脂肪負荷未病モデルマウス

を使用し実験を実施し、肝臓を対象とするDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。二群間比較により高脂肪の影響が改善する遺伝子を抽出し、パスウェイ解析を行った結果、高脂肪摂取によって亢進するコレステロール合成をムカゴ抽出物摂取群では低下させるように変動していることが明らかとなった。また、ムカゴ抽出物摂取群ではケトン体合成パスウェイが亢進する方向に遺伝子発現が変動した。したがって、ムカゴ抽出物は脂質負荷時の脂質代謝異常を軽減する可能性が示唆された。試験食の摂取から4週目に呼吸代謝測定装置を用いて、酸素消費量および二酸化炭素排出量を測定し、呼吸商、エネルギー消費量、脂質および炭水化物消費量を算出した。その結果、高脂肪ムカゴ抽出物摂取群では高脂肪群よりも活動期の呼吸商が低下する傾向にあり、活動期の脂質消費量が多くなった。

(1)-1-2 自然薯ムカゴの機能性解析：ヒト介入試験

ヒト介入試験は特定非営利活動法人環瀬戸内自然免疫ネットワーク(NPO-LSIN)に依頼した。研究の種類は2群のランダム化クロスオーバー試験とした。また、試験自体はオープンだが、測定者がブラインド化されている状態で実施した。目的は日本原産の自然薯ムカゴが肝機能改善効果を有するかを検証することで、自然薯ムカゴ含有食品を2週間連続摂取前後のデータを蓄積し、質問紙調査、身体検査、血液検査の結果および全血遺伝子発現解析を実施した。研究対象者は同意取得時の満年齢が20歳以上75歳未満の男女とした。自然薯ムカゴの摂取がヒトの体内において何かしらの変化をもたらしていることを示すと考えられた。今後は、血中成分と変動遺伝子との相関分析や、mRNAとmiRNAの統合解析などを組み合わせて解析を進める。現在得られている分析結果をさらに詳細に解析することで、各々の試験食摂取がどのような影響を及ぼしているかを明らかにできると思われる。ヒトにおいて自然薯ムカゴ摂取の効果が認められれば、機能性発現に寄与する成分の特定、作用メカニズム解明を目指す。

また、本研究では血液検査の肝機能マーカーのひとつであるALTが病気ではない「未病」の範囲に属する研究対象者に限定し、その他の項目については治療を要する値を示す方を除外した。そのため、身体の状態がこれまでの試験と比較してより未病と言われる状態でそろっていたと推察される。今回血液遺伝子発現解析で食品摂取によって未病を改善するような変動を示す遺伝子が発見された場合には、未病の指標となるバイオマーカーの候補になると考えられる。

(1)-1-3 メープルシロップの機能性解析：動物実験

メープルシロップはその成分の多くが糖と水であり、微量のポリフェノール、ミネラル、オリゴ糖、アミノ酸等が含まれている。カナダ産のメープルシロップよりポリフェノール等の微量成分を濃縮したメープルシロップ抽出物(MSXH)を調製し、混餌によりマウスに投与する実験を

行った。摂取させた飼料は、エネルギー比で脂肪を10%含む通常脂肪食、45%含む高脂肪食、MSXHを0.02%添加した高脂肪食（0.02MSXH食）とMSXを0.05%添加した高脂肪食（0.05MSXH食）である。この飼料を4週間摂取させたマウスの肝臓のトランスクリプトーム解析を実施したところ、高脂肪食摂取時においては、メープルシロップ摂取量は多いほどよいということではなく、適度な量を摂取することが重要であるということを示唆する結果を得、論文にて成果を公表した。

(1)-1-4 メープルシロップの機能性解析：ヒト介入試験

カナダのケベック・メープル製品生産者協会（FPAQ）からの助成により、ヒトを対象とするメープルシロップの機能性評価を実施した。被験者20名に対し、試験食群と対照食群の2群に分け、各群試験食、対象食ともに14日間に亘り摂取し、各群2週間のウォッシュアウト期間を設けクロスオーバーによる試験を実施した。本試験より得られた血液のトランスクリプトーム結果より、メープルシロップ摂取によって変動する遺伝子が多く抽出されることが明らかになった。本研究により、血液のトランスクリプトームは、長期的摂取時に起こる変化の兆候を捉えている可能性が示された。

(1)-2 ヒト介入試験：未病改善食品の評価技術の開発（未病マーカー）

(1)-2-1 単一細胞トランスクリプトーム解析技術の開発と導入

血液を用いてトランスクリプトーム解析を行い、全体を見た変化から食品の機能性を評価することも大切であり、これまでに動物、ヒト試験でその有効性を評価してきた。一方で、血液は液体成分である血漿、固形成分である白血球、白血球、血小板で構成されており、生体防御にかかわる免疫担当細胞である白血球は、細胞のなかに顆粒を有する好中球、好酸球、好塩基球、顆粒を持たないリンパ球、単球とさらに細かく分類される。血液細胞全体から見えてきた食品の機能性が免疫系に影響した結果であれば、血液細胞とりわけ白血球の1つ1つの変化も重要な情報となる。また、食品に対する個々人の応答のブレを解消し、個々の細胞について食品への応答の小さな変化を捉えるためには、細胞の単一細胞分離（シングルセル化）がトランスクリプトーム解析の高精度化に向けて必要となる。未病におけるヒト血液トランスクリプトームの高精度な評価系を確立するために、われわれはまずマウスの血液から白血球を分離するための条件検討を行い、さらに、得られた白血球サンプルからシングルセルの分離を試みた。複数の手法による検討を重ねた結果、単一細胞のトランスクリプトーム解析に適した条件を見出し、予備的な実家結果を得た。今後、得られたデータの解析を進める。

(1)-2-2 好中球活性測定技術の導入

白血球のうち、好酸球と好塩基球はアレルギー反応に関

与しており、好中球に次いで多く存在するリンパ球は免疫反応の中心的な役割を担っている。さらに、好中球に次ぐ活発な貪食作用を有する単球は、体内に侵入してきた細菌や不要な細胞を貪食する。好中球の活性化指標であるスーパーオキシド（ $O_2\cdot^-$ ）産生とミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性を化学発光と蛍光という2種類の光の情報に変換して検出する技術が確立されつつある。好中球は体内に侵入してきた細菌を捕食して食胞内に取り込み、食胞内に $O_2\cdot^-$ を放出して細菌を攻撃する。好中球が酸素から直接作る $O_2\cdot^-$ は、それほど強力な活性酸素ではないが、同時に好中球の顆粒から放出されるMPOによって、過酸化水素に塩素を付加して、強力な活性酸素種である次亜塩素酸を産生する。食品の抗酸化作用や免疫系への効果を評価するためには、好中球の活性化は重要な指標となると考えられたため、この測定技術を有する浜松ホトニクス株式会社との連携により、食品機能性評価のための好中球活性測定技術導入の検討を開始した。本手法は、動物、ヒト試験の双方において食品素材の新しい機能性評価法として期待される。

(1)-2-3 DNA マイクロアレイのプラットフォーム間の比較

DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析は、そのスクリーニング手法としての有効性から普及が進み、その解析技術も成熟の域に達しつつある。一方、DNA マイクロアレイには、様々なプラットフォームが市販されており、それぞれのプラットフォームによって使い勝手や測定結果に特徴があることが予想される。従って、研究の目的に応じて、プラットフォームを適切に選択することが重要だと考えられる。そこで、様々な研究課題に対して適切な条件での測定が実施出来るよう基礎的なデータを収集することを目的とし、同一のRNAサンプルを異なるプラットフォームで測定した結果を比較し、プラットフォームによる測定結果の特徴抽出を試みた。

(2) 地域イノベーション戦略支援プログラム

(2)-1 トランスクリプトーム、エピジェノミクスを基礎においた食品評価法の確立

これまでのニュートリゲノミクス評価法から発展させ、より科学的に信頼性が高く、実用的な食品の機能性・安全性の評価法を確立した。また、これらの評価法の科学的基盤を深めることを目的とし、エピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構に関する研究を行い、その理解を深めた。

表現型（病変、肥満等）に影響を与える食品を摂取させたマウスについて、従来のトランスクリプトーム手法を用いた転写産物（mRNA）の解析に加え、新たな指標としてヒストンの修飾やDNAのメチル化といった、遺伝子の変異を伴わない転写の変化を検出するための解析を実施した。また、これらの技術は日々進歩しており、その新たな技術の取得、開発を並行して行っていくと同時にエピジェネティクスの機構解析にも貢献していく。これら一連の解析から得られる膨大な情報を、パイオインフォマティクス

手法を用いて比較・検討し、新規指標を加えた解析の有用性を検証した。

以上の取り組みを通じて、転写調節、代謝産物に係る解析系を統合し、食品の摂取による表現型の変化に至る因果関係の明確化が可能な食品評価法を確立した。確立した評価法は、KISTEC(旧 KAST)で構築する評価技術センターに導入し、利用企業による新たな機能性食品の開発に寄与する。

具体的には、エピジェノミック解析手法として DNA メチレーション解析技術の一つである MDB-seq、転写因子やクロマチン因子のゲノム上での DNA 結合部位を網羅的に解析する手法である ChIP-seq を研究室に導入した。DNA-DNA 間の相互作用(染色体立体配座)解析の手法の開発を終了し、これらの手法は、食品評価技術として導入・実施されている。また、今年度において、組織切片に対する FISH を用いた染色体高次構造形成の手法を改良し、新たにより簡便なプローブ作成方法を開発した。エピジェネティクス解析の技術は日進月歩であり、それらの技術もさらなる最適化を目指し、常に使用可能な技術をアップデートし、より良い抗体を見出ししていく努力を常に並行して行っている。また、次世代核酸塩基配列解析を用いた遺伝子発現解析、エピジェネティクス解析の有効性について継続的に検証している。

(2)-2 生体ガス分析を利用した食品機能性の短期間評価系の確立

食品の機能性の一般的な評価系として、食品を実験動物に長期間継続摂取させ、身体的変化を検出する方法がある。この身体的変化は、摂取した食品に起因する僅かな代謝変化の積み重ねによって引き起こされるが、既存の手法では僅かな変化の初期段階を捉えることが困難であった。本研究では、より初期に引き起こされる僅かな代謝変化を生体ガス分析により検出することで、食品機能性の短期間評価系を確立することを目指した。生体ガス分析を利用した本短期間評価系の確立により、代謝変化を引き起こす食品素材を対象としたスクリーニングの効率化が期待される。

(2)-3 世代伝播を可能とする食品成分の探索と検証

親から子へ継承される塩基配列以外の情報エピゲノムを制御することにより代謝改善効果を現す機能性ポリフェノールを探索し、世代間の健康維持を促進する食品の開発を行った。本プログラム開始前より、ゴマやブドウに含まれるポリフェノールに対する肝臓のトランスクリプトーム応答を解析し、その生体調節作用に関する総体的な知見を得ていたが、この作用は親から子へと DNA 配列以外の遺伝情報(エピゲノム)として継承されることが明らかになりつつあった。そこで、エピゲノムの制御という観点から機能性成分の効果を再検討し、世代を越えた健康維持に役立つ機能性成分の探索と作用機構の解明を目指した。

「短期間の食品ポリフェノール摂取による代謝制御機構の解析」

アスタキサンチン、黒豆ポリフェノール(カテキン重合

体)、湘南ゴールド皮抽出物をマウスに投与し、代謝ケージを用いて短期的な代謝応答を測定した。一部については呼吸商、すなわち、糖質、脂質、たんぱく質のエネルギー利用率に変化が観察された。

「食品ポリフェノールによるエピジェネティックな代謝制御の解析と次世代健康指標の探索」

アルコール脂肪肝を誘導した雄マウスと通常雌を交配した仔は代謝指標に変化が見られ、この変化は雄親へのレスベラトロールの同時投与で解消された。雄親精子ゲノム仔肝臓のゲノム DNA メチル化状態を解析し、対照群、アルコール群、アルコール+レスベラトロール群で親子で共通に変動しているゲノム領域を抽出した。これらのゲノム領域と相互作用している遺伝子プロモーター領域をデータベースにより照合した。さらにそのプロモーター支配下にある遺伝子群と、仔肝臓で発現変動した遺伝子群とを比較し、代謝ストレスと食品ポリフェノールが染色体高次構造に影響を与えるようなゲノム領域の候補を得た。

(2)-4 生体内代謝を考慮した細胞形質転換試験法の開発

Bhas42 細胞形質転換試験は、簡便かつ高感度に食品添加物等の化学物質の発がんイニシエーション、プロモーション活性を評価できる優れた評価系である。しかし、Bhas42 細胞の代謝系は肝細胞とは異なっており、またその活性も非常に低いことから、代謝を受けることにより発がん性を獲得する化学物質のイニシエーション、プロモーション活性を正確に評価できない点が課題となっていた。本研究テーマでは、①iPS 細胞誘導肝細胞等のヒト肝代謝系を Bhas42 細胞培養系に加えることにより、化学物質の代謝産物のプロモーション活性を評価できる Bhas42 試験法を構築する。また、②新たに構築した評価法を用いて、従来の評価法では検出できなかった、発がん性化学物質を同定するとともに、③その発がんメカニズムの詳細な解析を、ゲノミクス研究手法により行い、新しい評価系の有用性を検証した。これらについては、KISTEC(旧 KAST)内の委託試験等において活用する。新たな評価系の構築により、化学物質の代謝産物の発がんリスクに関する安全性試験の高感度かつ簡便な実施が期待される。

(2)-5 脳機能解析法の導入：認知・行動試験

食品の機能性成分が脳機能に与える影響を評価する為、実験動物を用いた行動試験を導入した。実験動物を用いた行動試験では認知、不安様行動をはじめとした様々な項目の脳機能評価が可能である。食品の機能性成分摂取が脳機能に及ぼす影響を評価するために、動物へのストレス負荷が低いと考えられる測定手法を取り入れ、検討、精査を重ねた。その結果、不安様行動、短期記憶や好奇心などの評価系が確立された。

(2)-6 機器の共用化

実験室、動物室、機器・インフラ等の整備を行い、徐々に共用化への展開を図った。5年間の活動を通し、食品機

能性評価における動物試験から作用メカニズム解明までの一連の研究システムについて共用化体制を整えるに至った。また、企業ニーズについてヒアリングを行い、機能性表示やトクホ等の認定を目指すまでの専門人材や資金のない中小企業等の利用を促進することを目標とした他、大企業からのエビデンス検証のニーズも強いことから、それらへの協力も併せて実績を作りつつある。なお、一連の食の評価には、ノウハウ・経験を要するため、利用する企業や公設試担当者への指導も随時行っている。

(3) 受託・共同研究

企業からの受託、企業との共同研究に加え、文部科学省「地域イノベーション戦略支援プログラム事業」、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）「次世代農林水産業創造技術」（管理法人：生研支援センター）、農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」発展融合ステージ『北方圏紅藻類の資源開発とその健康機能・素材特性を活かした次世代型機能性食品の創出』等の国家プロジェクトにて研究コンソーシアムを形成し、産学官連携の共同研究も推進した。

(4) その他

平成 28 年 10 月 1 日から JSPS 先導的研究開発委員会「食

による生体恒常性維持の指標となる未病マーカーの探索戦略」（委員長：阿部啓子）が発足した。未病マーカーの開発研究には、本グループの研究者も従事し、全国の大学、企業との連携により、最新のマーカー探索に向けての情報共有、情報収取、開発研究を進めている。

平成 29 年度より、動物からヒトへ、研究のシームレス化を図る目的で、神奈川県にキャンパスを持つ東海大学との連携研究の取り組みを開始した。平成 30 年度にはヒトを対象とする試験を開始予定である（図 3）。

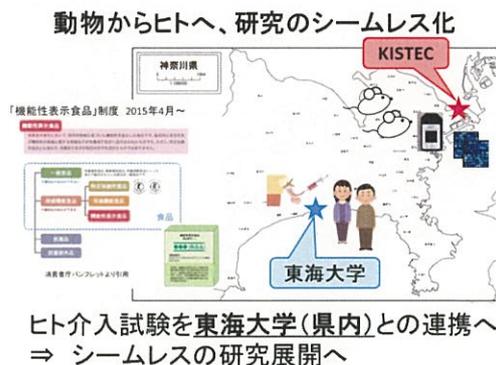


図 3 動物からヒトへ研究のシームレス化

ヒトを用いた自然薯ムカゴの生理的機能性評価

- パイロットスタディ

篠崎 文夏

1. はじめに

現在の日本は高齢人口が高い超高齢化社会となった。人は高齢になるに従い高血圧、糖尿病や肥満などの生活習慣病のリスクが高まり、現に生活習慣病の人口およびその予備軍とされる人口が増加している。生活習慣病人口が多くなると医療費が増大するなど将来的に国家的な危機を招くと考えられる。また、人口の大部分を占めることになる高齢者が、高齢であっても健康で質の高い生活をおくることが大切である。そのために如何に健康を作るかが重要視され、毎日の食事と健康との関係に注目が集まり、今日の問題となっている肥満や高血圧などの生活習慣病を食事によって改善または予防することが試みられている。生活習慣病のリスク軽減効果などを有する機能性食品は健康維持に有効とされ、現在では機能性を持つ新規食品とその成分の発見・開発が盛んとなっている。

東洋医学の食療は医食同源の理念に基づいており、食を以て病を予防する、食を以て病を治すという。基本的には栄養バランスのよい食事を適量摂取し、その中に身体によいとされる食材を取り入れて健康を保つといったものである。そういった古くから摂取されている身体に良い食材は機能性食品としての有力候補である。

日本に現存するヤマノイモ類の中で自然薯は唯一の日本原産種である。通常食べる根の部分は皮がうすいため、皮ごと食べられることが多い。また、古来より滋養強壮などに効果があるとされている。自然薯は根の部分の他に葉の根元にできるムカゴも食用である(図1)。我々は自然薯ムカゴに着目し、その生理的機能性を調べた。



図1. 自然薯ムカゴ

1. 1 自然薯ムカゴの栄養成分

生理的機能性を調べる前にまず、自然薯ムカゴの栄養成分

分を測定した。自然薯ムカゴは根の部分と同様に皮ごと加熱して食べる人が多い。そのため、皮ごと加熱後凍結乾燥して粉末とし、栄養成分を分析した。その結果、約70%が炭水化物、約9%がタンパク質で、その他にカロテンやミネラルが含まれていた。また、ポリフェノールが含まれ、抗酸化能が一般的な野菜と比較して高めであった。抗酸化能が高い食品は機能性を有する可能性が高いことから、自然薯ムカゴに生理機能性があると推測された。

1. 2 実験動物を用いた検証

自然薯ムカゴ粉末摂取の影響について高脂肪負荷により生活習慣病を模倣した未病モデルマウスを用いて調べた。マウスは一週間馴化したのち3群に分け、それぞれに通常脂肪餌、高脂肪餌(エネルギー比45%)、高脂肪餌に自然薯ムカゴを5%混合した餌(ムカゴ餌)を投与し、4週間飼育した。飼育期間中の餌と水は自由摂取とした。4週間飼育後、採血および採材した。

4週間の高脂肪餌の摂取は通常脂肪餌群よりも体重を有意に増加させた。しかし、高脂肪餌とムカゴ餌との比較では体重に差はなかった。なお、飼育期間中の総摂取エネルギーは各群間に差はなかった。血漿生化学成分分析では、高脂肪餌群では血中肝機能マーカーの一種であるアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)が高脂肪餌群に比べて上昇したが、ムカゴ餌群は高脂肪餌群よりも低く通常脂肪餌群に近づく傾向であった¹⁾。

採材した肝臓からはTotal RNAを抽出しDNAマイクロアレイ(Genechip[®] mouse genome 430 2.0, Affymetrix)を用いて遺伝子発現を調べた。階層的クラスタ解析の結果、各群は異なったクラスターを形成しており、肝臓の遺伝子発現傾向は各群で異なっていることがわかった。また、高脂肪餌群とムカゴ餌群と比較し、どのような遺伝子が発現しているかを調べたところ、脂質代謝関連遺伝子が発現しており、4週間のムカゴ摂取は高脂肪負荷マウスの脂質代謝に関与し、高脂肪負荷による脂質代謝の乱れを改善するように遺伝子発現が変動していることが明らかとなった²⁾。

以上の結果を踏まえて、本研究では自然薯ムカゴの生理的機能性をヒトで検証した。

2. 実験と結果

2. 1 方法
2. 1. 1 試験食の作製



図2 自然薯ムカゴ粉末



図3 試験食

ヒトに投与する自然薯ムカゴは神奈川県伊勢原市の株式会社ファームいせはらより購入した。自然薯ムカゴは株式会社グラートにて洗浄後、皮ごとスチーム加熱し凍結乾燥を経て微粉末化された(図 2)。作製した自然薯ムカゴ粉を用いてクッキータイプの焼菓子を作製し、試験食(自然薯ムカゴ含有食品)とした。対象食は小麦を使ったクッキーとした(図 3)。試験食の作製はおかし工房しいの実に依頼した。完成した試験食は微生物試験を行い、品質を確認した後に使用した。

2. 1. 2 ヒト介入試験方法

ヒト介入試験は特定非営利活動法人環瀬戸内自然免疫ネットワーク(NPO-LSIN)に依頼した。

研究の種類は 2 群のランダム化クロスオーバー試験とした。また、試験自体はオープンだが、測定者がブラインド化されている状態で実施した。目的は日本原産の自然薯ムカゴが肝機能改善効果を有するかを検証することで、図 4 に示す方法で自然薯ムカゴ含有食品を 2 週間連続摂取前後のデータを蓄積し、質問紙調査、身体検査、血液検査の結果および全血遺伝子発現解析を実施した。研究対象者は同意取得時の満年齢が 20 歳以上 75 歳未満の男女とした。試験は次のように進められた。まず、試験開始前に試験参加検討者への説明会を行い、同意を得られた試験参加検討者へ問診と血液検査による研究対象者決定のためのスクリーニングを行い、スクリーニングされた被験者による試験品および対照品摂取期間を各 2 週間、ウォッシュアウト期間を 2 週間として、前期摂取開始前(摂取開始前)、前期



図4 ヒト介入試験方法

摂取終了後(摂取開始 2 週後)、後期摂取開始前(摂取開始 4 週後)、後期摂取終了後(摂取開始 6 週後)に、評価項目の検査を実施した。

主要評価項目は、肝機能マーカー (ALT、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、ガンマグルタミールトランスペプチターゼ (γ -GT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸脱水素酵素 (LD)、総ビリルビン (T-Bil)) とし、他に身体検査、血液検査、全血遺伝子発現、腸内菌叢、VAS アンケートを実施した。

倫理委員会の承認ののち、UMIN 登録 (ID: UMIN000029619) を行い、研究対象者を募集した。応募者の中から、選択基準(試験参加に際し、事前に当該試験の説明を受け、その内容が理解でき、試験参加に同意できる者。同意取得時の満年齢が 20 歳以上の男女で、スクリーニング時の血液検査値が次の範囲内の者。ALT(U/L):30~50, AST(U/L):~50, γ -GT(U/L):~100, ALP(U/L):~499, LD(U/L):~280, T-Bil(mg/dL):~2.9, RBC(10^4 /microL):male 400~599, female 360~549, Hb(g/dL):male 13.1~17.9, female 12.1~15.9, Ht(%):male 38.5~50.9, female 35.5~47.9, Cre(mg/dL):male ~1.09, female ~0.79, T-cho(mg/dL):140~219, TG(mg/dL): 30-199, LDL-Cho(mg/dL): 60-133, HDL-Cho(mg/dL): 40-119, FPG(mg/dL):~109, HbA1c(%):~5.9) に合致する ALT が通常よりも高め、かつ、治療を要しない、未病の状態に近いと考えられる方を選抜した。また、スクリーニング時の血液検査で日本人間ドック学会判定区分表の空腹時血糖、HbA1c、T-Cho、TG、LDL-Cho、HDL-Cho、CRE、赤血球数、Hb、Ht に、C; 要経過観察・生活改善、D1; 要治療および D2; 要精検に相当する項目がある方、脂質異常症、または、糖尿病により治療、投薬を受けている方、薬物または食品(特にヤマノイモ類、小麦)に対しアレルギー症状を示す恐れのある方、試験担当医師が試験参加に影響が有ると判断する医薬品およびサプリメントを使用中の方、他の臨床試験に参加している、もしくは参加予定の方、同意取得日より 3 ヶ月前までに 400mL 以上、もしくは 1 ヶ月前までに 200mL 以上の献血を行った方、その他、試験担当医師により試験参加が不適であると判断された方は除外とした。

2. 2. 結果

本試験の研究対象者募集に対する応募人数は 189 名であった。スクリーニングの結果、選択基準に合致し、かつ、除外基準に当てはまらない方は 10 名(男性 7 名、女性 3 名)であった。この 10 名で試験を開始した。しかし、試験途中女性 1 名が責任医師の判断により継続不可となり、

最終的に9名（男性7名，女性2名）となった。

VAS アンケートでは排便の様子（におい、しやすさ等）を伺ったが、特に摂取物との関連は見いだされなかった。また排便回数にも影響しなかったが、腸内菌叢解析ではそれぞれの試験食の摂取前後でわずかにだが増減する菌が数種類あった。また、体脂肪や体重など身体検査項目に影響は認められなかった。血中生化学成分では、試験食摂取の影響が数項目で認められた。全血遺伝子発現では、それぞれの試験食の摂取前後で変動する遺伝子があった。それらの中には両試験食で共通して変動するものもあったが、試験食毎に異なるものの方が多く、それぞれに特徴があることがわかった(図5)。

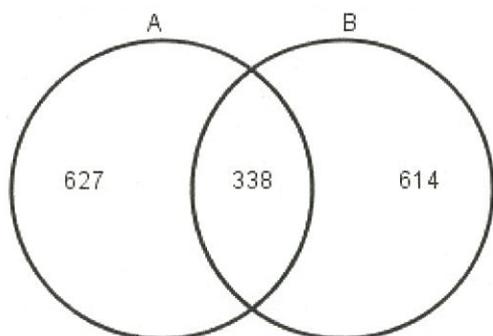


図5 試験食摂取前後での変動遺伝子数

A：自然薯ムカゴ含有食，B：小麦含有食

3. 考察及び今後の展望

以上の結果は自然薯ムカゴの摂取がヒトの体内におい

て何かしらの変化をもたらしていることを示すと考えられる。今後は、血中成分と変動遺伝子との相関分析や、mRNAとmiRNAの統合解析などを組み合わせて解析を進める。現在得られている分析結果をさらに詳細に解析することで、各々の試験食摂取がどのような影響を及ぼしているかを明らかにできると思われる。ヒトにおいて自然薯ムカゴ摂取の効果が認められれば、機能性発現に寄与する成分の特定、作用メカニズム解明を目指す。

また、本研究では血液検査の肝機能マーカーのひとつであるALTが病気ではない「未病」の範囲に属する研究対象者に限定し、その他の項目については治療を要する値を示す方を除外した。そのため、身体の状態がこれまでの試験と比較してより未病と言われる状態でそろっていたと推察される。今回血液遺伝子発現解析で食品摂取によって未病を改善するような変動を示す遺伝子が発見された場合には、未病の指標となるバイオマーカーの候補になると考えられる。

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議のSIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」、JSPS 科研費 JP26350177、および神奈川県委託事業先進異分野融合プロジェクト研究・立案推進事業資金を活用して行われました。

【参考文献】

1. 日本農芸化学会 2014 年度大会
2. 日本農芸化学会 2015 年度大会

食品機能性評価と未病マーカーの探索

メープルシロップを例にして

亀井飛鳥

1. はじめに

神奈川県立産業技術総合研究所では、これまでに食品機能性研究として、主に動物を対象とする評価を実施してきた。これらの研究成果や評価技術を応用し、現在はヒト試験、特に未病という観点から評価する研究へと展開しつつある。昨年度の報告では、神奈川県産の桑葉について、ヒトを対象とする機能性評価のモデルスタディについて紹介した。本稿では、さらにその評価手法をブラッシュアップし、試験対象食品をカナダ産メープルシロップとした研究について紹介する。

1. 1 未病とその評価

未病は、病気ではないが、健康でもない状態であり、日本未病システム学会では「自覚症状はないが検査では異常がある状態」と「自覚症状はあるが検査では異常がない状態」とを合わせたものと定義している。健康状態から病気に至るまで、身体の中は徐々に変化するが、このわずかな変化、すなわち病気に至る兆しを捉え、対策を講じることが病気の予防の一つであると考えられる。このわずかな変化は、既存の手法では検出が難しいため、未病を評価するにあたり新たなマーカー分子の探索が必須である。

1. 2 未病と食品

1. 1にて述べたように、未病は病気に至る前の状態である。そのため、医薬に頼る段階ではないが、未病から病気に至ることのないように講じるべき対策として、食品の機能性への期待が高い。食品にはそれぞれに様々な機能があるが、そのほとんどにおいて、摂取することによる身体の中の変化はわずかである。しかし食品は日常的に摂取するものであるため、そのわずかな変化が重要な意味を持つと考えられる。例えばわずかな変化の積み重ねにより大きな変化となる、あるいはわずかな変化を繰り返すことにより、病気への進行を遅らせるといったことなどが期待される。

1. 3 メープルシロップの成分

メープルシロップはサトウカエデなどの樹液を濃縮した甘味料で、世界シェアの約8割がカナダ産のものである。メープルシロップにはグレードが存在する。収穫時期が早く、光透過率の高いものからゴールデン(デリケートテイスト)、アンバー(リッチテイスト)、ダーク(ロバストテイスト)、ベリーダーク(ストロングテイスト)の4段階(旧基準ではエキストラライト、ライト、ミディアム、アンバー、ダークの5段階)に格付けされている⁽¹⁾(http://maplefromcanada.jp/about/4_index_detail.php)。それぞれ、色や香りが少しずつ異なるが、いずれのグレードであってもメープルシロップは日常的に使用される甘味料である。メ

ープルシロップの組成はスクロース66%、グルコース0.5%、フルクトース0.3%、約30%が水である。そのほかにポリフェノール^(2, 3, 4)、ミネラル、アミノ酸等が微量含まれている。本研究室では、この微量成分の健康機能性に着目した。まず、メープルシロップそのものの健康機能性評価を行い、メープルシロップ摂取によるラットの肝機能マーカー値の低下という実験結果を得た⁽⁵⁾。続いて、メープルシロップ抽出物を用いて実験を行った。メープルシロップを陰イオン交換カラムに通し、主成分である糖をできるだけ除き、ポリフェノール等の微量成分を濃縮したメープルシロップ抽出物を2種類調製し、ポリフェノール低含有量のをMSX、高含有量のをMSXHとした。MSXについては、マウスを対象とした肝臓のトランスクリプトーム解析を行い、高脂肪食摂取により誘導される肝臓の炎症を緩和する可能性を示唆する実験結果を得た⁽⁶⁾。

本稿では、MSXHの機能性評価研究について、また、メープルシロップそのもののヒトにおける健康機能評価研究について紹介する。

2. 方法と結果

2. 1 方法

2. 1. 1 動物飼育

エネルギー比で脂肪を10%含む通常脂肪食、45%含む高脂肪食、MSXHを0.02%添加した高脂肪食(0.02MSXH食)とMSXを0.05%添加した高脂肪食(0.05MSXH食)を作成した。

C57BL/6J雄性マウス3週齢を、環境順化のため7日間の飼育後、4群(n=10)に分け、それぞれに通常脂肪食、高脂肪食、0.02MSXH食、0.05MSXH食を29日間与えた。16時間絶食後、30日目に解剖を行った(図1)。体重増加や総摂取エネルギー量などの4群間の統計的な差はTukeyによって検定を行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。

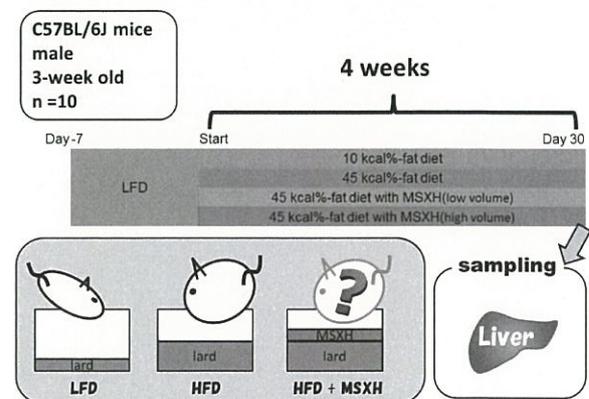


図1. 動物飼育スケジュール

2. 1. 2 DNA マイクロアレイ実験

解剖時に採取した肝臓(n = 10)から、total RNA を抽出後、Affymetrix 社の定法に従って調製した。DNA マイクロアレイは、約 4 万の遺伝子情報が搭載されている Gene Chip® Mouse Genome 430 2.0 Array を使用した。得られた画像データ(CEL files)を、「R」(<http://cran.r-project.org/>)を用いて Distribution Free Weighted method (DFW) のアルゴリズムにて正規化し、Rank products にて通常脂肪食群と高脂肪食群の2群間比較、高脂肪食群と0.02MSXH 食群の2群間比較、および高脂肪食群と 0.05MSXH 食群の 2 群間比較、0.02MSXH 食群と0.05MSXH 食群の 2 群間比較をそれぞれ行い、False discovery rate(FDR) < 0.01 を満たす遺伝子を顕著な変動遺伝子と定義した。

2. 1. 3 ヒトを対象とする試験

試験食として、メープルシロップと対照シロップ(プラセボ)を準備し、新潟バイオリサーチセンターにてボランティアを募集し、2 週間 2 期(ウォッシュアウト 2 週間)の無作為化プラセボ対照クロスオーバー試験を実施した。対象は下記の通りとした。

1. BMI が 23 以上 30 未満であること
2. ALT が男性で 26U/L 以上、女性で 18U/L 以上の方
3. 本食品ヒト試験への参加を志願し、文章により同意する能力を有する者
4. スクリーニング検査を実施し、試験責任医師、試験担当医師が被験者として適切だと判断した者

主要アウトカム評価項目として、肝機能(ALT、AST、 γ -GT、ALP、LD、T-Bil)、副次アウトカム評価項目として、血液 RNA 解析、糞便(腸内)細菌叢解析を設定した。

2. 2 結果

2. 2. 1 生化学データ解析

通常脂肪食群、高脂肪食群、0.02MSXH 食群、0.05MSXH 食群の 4 群間で体重増加、総摂取エネルギー量に差はなかった。このことからマウスは MSXH 入りの餌を忌避せず食べることがわかった。

2. 2. 2 DNA マイクロアレイ解析

変動遺伝子について、各群における発現パターン別に 3 つに分類した。すなわち、高脂肪食群において通常脂肪食群に比べて顕著な変動を示す遺伝子のうち、0.02MSXH 食群、0.05MSXH 食群の両群ともに通常脂肪食群と差のないレベルを示すもの(pattern A)、0.02MSXH 食群では高脂肪食と同レベルで、0.05MSXH 食群は通常脂肪食群と差のないレベルを示すもの(pattern B)、0.02MSXH 食群では通常脂肪群と差のないレベルを示すものの 0.05MSXH 食群では高脂肪食と同様のレベルを示すもの(pattern C)である。各群に含まれるプローブセット数を図 2 に示す。

	LFD	HFD	0.02MSXH	0.05MSXH	Probe sets
Pattern A high sensitivity	↔	↔	↔	↔	126
					123
Pattern B low sensitivity	↔	↔	↔	↔	82
					78
Pattern C opposite effect due to dosage	↔	↔	↔	↔	288
					181

図 2 発現パターン別変動プローブセット数
Kamei et al. *Mol Nutr Food Res.* (2017) より

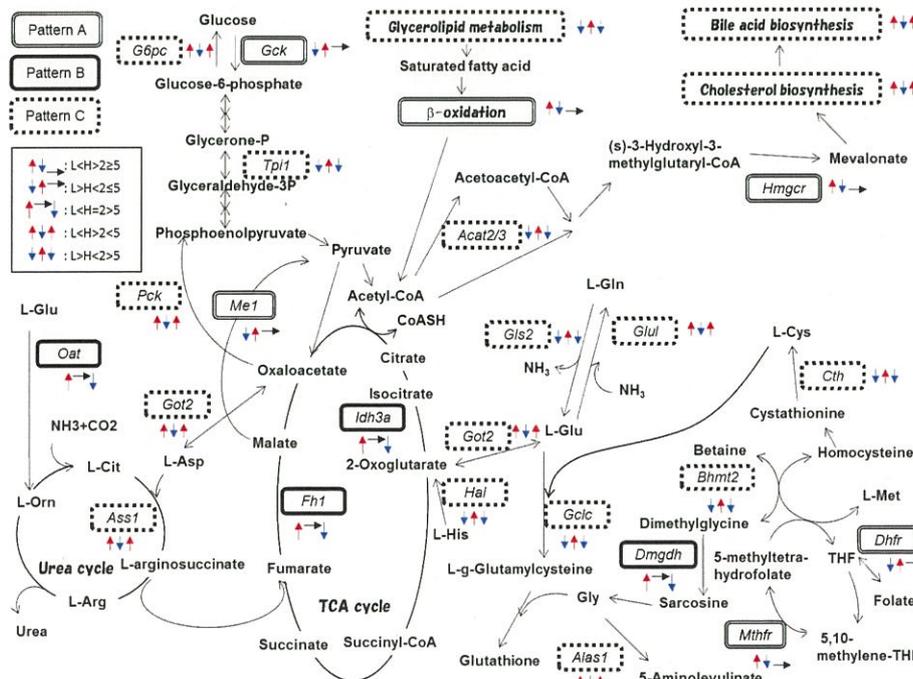


図 3 変動パターンを付与した代謝マップ
Kamei et al. *Mol Nutr Food Res.* (2017) より一部改編

ここから、pattern C に該当する遺伝子が最も多く存在することが明らかになった。また、変動遺伝子の特徴を抽出したところ、複数の栄養素代謝系に関連するものが多く含まれることが明らかになった。図 3 に代謝マップとして示す。Pattern A に該当する遺伝子名あるいは代謝プロセス名を二重線で、pattern B を太線で、pattern C を点線で囲んだ。また、各遺伝子名あるいはプロセス名の右隣に 3 つの矢印を記載した。

ここから、解糖、脂肪酸の酸化については pattern A、tricarboxylic acid (TCA) サイクルについては pattern B、その他糖新生、コレステロール代謝、アミノ酸代謝、葉酸代謝については pattern C に大別されることが明らかになった。特に pattern C のアミノ酸代謝に着目したところ、0.02MSXH 食群において、グルタミン酸の利用に関わる変動、例えばグルタチオン合成の亢進を示唆する変動が見出された。グルタチオンは酸化還元に関与するペプチドである。以上の結果より、遺伝子発現レベルにおいて、高脂肪食摂取による生体内変化を通常脂肪食に近づけることを目的とする場合の MSXH の摂取量は 0.02% で十分であることが示された(7)。

2. 2. 3 ヒトを対象とする試験

ボランティア募集に対し 41 人の応募があったが、スクリーニングの結果、20 名が本試験への適合者であった。試験実施期間中に付けていただいた生活日誌を調査した結果、除外基準を上回る飲酒量に該当する方がおり、その方々は本試験の解析対象から除外した。血液遺伝子発現解析の結果、メープルシロップ摂取前後比較で変動する遺伝子と、プラセボ摂取前後比較で変動する遺伝子の共通性が高くなく、メープルシロップ摂取に対する生体応答はプラセボ摂取時とは異なることが示唆された(図 4)。

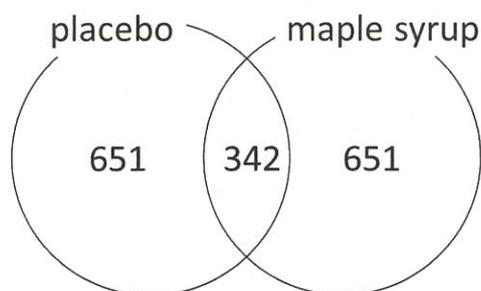


図 4 変動プロセブセットの共通性

3. 考察と今後の展望

動物実験から、MSXH の摂取量によって変動する代謝プロセスが異なることが明らかになり、さらにその作用は、大量摂取である必要はないことが示された。すなわち、遺伝子発現レベルにおいて、高脂肪食摂取による生体内変化を通常脂肪食に近づけることを目的とする場合の MSXH の摂取量は 0.02% で十分であった。MSXH は、ポリフェノール高含有となるようにメープルシロップから抽出した画分である。ポリフェノールは、適量の摂取であれば様々な健康機能性を呈することが報告されているが、一方で摂取量が多すぎる場合にはその作用は減弱あるいは悪化に働くことが報告されている。本

試験でも同様であり、高脂肪食摂取時においては、メープルシロップ摂取量が多いほどよいということではなく、適度な量を摂取することが重要であるということを示唆する結果であった。

ヒトを対象とする試験においては、動物同様にメープルシロップ摂取によって変動する遺伝子が多く抽出されることが明らかになった。本研究では、シロップの摂取期間は 2 週間と短く、血液のトランスクリプトーム結果は、長期的摂取時に起こる変化の兆候を捉えている可能性がある。これらの結果より、メープルシロップ摂取は実験動物、ヒトのいずれであっても生体に変化をもたらすことが示された。

このプロジェクトの一部は、ケベック・メープル製品生産者協会(FPAQ)も参加しているプログラム「セクター開発への分野別開発戦略コンポーネント 1」を通じた、ケベック州農業・漁業・食品省(MAPAQ)からの援助、ならびに JSPS 科研費 JP26242007、JP15K12334、JP15K15076、JP15H02905、JP26350177、JP15H05346、JP16K12734 の助成を受けて実施されました。

【参考文献】

1. Perkins TD, van den Berg AK. *Adv Food Nutr. Res.*, 56, 101-143. (2009)
2. Li L, Seeram NP. *J Agric Food Chem.* 58, 11673-11679. (2010)
3. Li L, Seeram NP. *J Agric Food Chem.* 59, 7708-7716. (2011).
4. Li L, Seeram NP. *J Funct Foods.* 3, 125-128 (2011)
5. Watanabe Y, Kamei A, Shinozaki F, Ishijima T, Iida K, Nakai Y, Arai S, Abe K. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75, 2408-2410 (2011)
6. Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F, Yasuoka A, Kondo T, Ishijima T, Toyoda T, Arai S, Abe K. *Biosci Biotechnol Biochem.* 79, 1893-1897 (2015)
7. Kamei, A., Watanabe, Y., Shinozaki, F., Yasuoka, A., Shimada, K., Kondo, K., Ishijima, T., Toyoda, T., Arai, S., Kondo, T., Abe, K. *Mol Nutr Food Res.* 61. (2017)

動物を対象とする脳機能評価系の確立に向けた検討

嶋田 耕育・野原 正勝・飯尾 将太・安岡 顕人

1. はじめに

近年、食品及び食品素材が持つ機能性に注目が集まっている。食品には主に3つの機能性があるがとりわけ栄養機能、感覚機能以外の三次機能(生体調節機能)としての食品非栄養成分の持つ新たな機能性の探索、及びその効果検証が鋭意進められている。現在、食品非栄養成分の多岐に亘る効果が知られている。例として、食品に含まれる食品ポリフェノールであるカテキンは、脂肪吸収の阻害作用や抗酸化作用などを有することが報告されている¹。食品の機能性成分の作用の特徴は、薬物(特に人工的な化合物)のように少数の作用点に強く働きかけるのではなく、複数の作用点に対して穏やかに働きかけることである。食品ポリフェノールの多くが有する抗酸化作用は多面的な作用の一例である。

このように多様な効果を有し、穏やかな効果が見込まれる食品の機能性成分は、今後社会問題として憂慮されている超高齢化や深刻なストレス社会の分野においても、その効果を期待されている。未曾有の高齢化社会の到来に伴い、アルツハイマー病などに代表される認知症疾患の推定有病率の増加が危惧されている(図1)。一方高齢化因子以外において、全年代を通してストレス起因性の疾患も近年増加傾向にある(図2)。益々進む高齢化社会において認知機能低下を予防する効果、また深刻なストレス社会においてストレス軽減・予防効果を有する食品機能性素材の探索は、生活の質(QOL)の向上を目指す上で重要な課題である。脳機能への影響やストレス抑制効果といった機能性は、食品ポリフェノールの多面的作用のように複数の因子に対して働き、その効果を発揮することが示唆される。しかしこれらの効果を検討する為には細胞培養実験のみで評価することは困難である。マウスやラットなどの実験動物を用いた評価系は全身に張り巡らされた神経系や内分泌系、腸内細菌叢による代謝物等を介した脳機能への作用やストレス応答などの複雑な機構に対する機能性効果を検証する上で重要なツールである。



図2：ストレス関連性神経症性障害(躁鬱含む)の年次患者数推移
 現在、薬物(医薬品など)を用いた脳機能への影響、ストレス抑制効果への検討に用いられる動物実験系がいくつか存在する。これらの動物実験系の多くは実験動物に対して一定のストレス源を負荷し、結果としてストレス源が継続することによるストレス起因性疾患を誘起する動物実験系である。このモデル動物に対してストレス予防もしくは、軽減効果が期待される素材投与によりストレス起因性疾患の発症の程度を検討し、投与素材の機能性が検証されている。したがって、ストレス予防・軽減効果や認知機能などの脳機能への影響について実験動物を用いて検証する場合、モデル動物の作出が必要不可欠である。しかしながら作用点の明確な医薬品や化合物などの効果を推定する場合、これらモデル動物による評価は有用であるが、作用点が明確ではなく緩やかな効果が期待される食品機能性成分の評価においては必ずしも有用とは限らない。その理由として、モデル動物作出時に使用されるストレス負荷が過大である場合、食品機能性成分ではその負荷に対抗できずその効果がマスクされてしまうことが懸念される。一般的にモデル動物作出に用いられるストレス源はトラウマティックな侵襲度の高いものが多く使用されている(図3)。またこのようなストレス負荷を長期間、複数回もしく

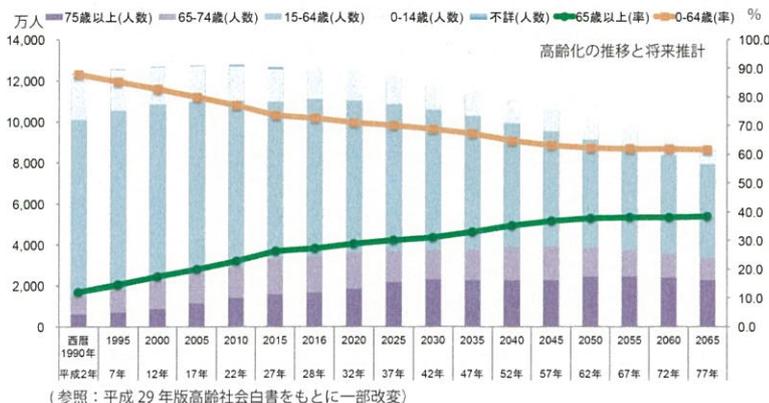


図1：超高齢化社会の到来とそれに伴う認知症有病率の推移

はいくつかのストレス負荷を複合的に実施する必要があることから実験者への負担も大きく、さらに長期間継続することによる操作のばらつきなども危惧される。従って、食品機能性成分を用いた評価においては、操作によるばらつきを低減するために、比較的短期間かつ簡便に実施可能で、トラウマティックな侵襲度の低い負荷源を用いたモデル動物実験系を用意することが望ましいと考えられる。

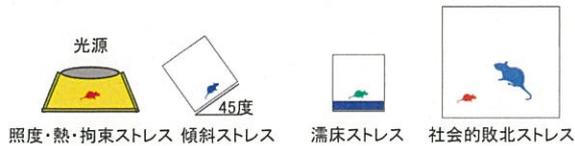


図3：モデル動物作出に用いられる一般的なストレス源

以上のことから脳機能への影響やストレス抑制効果が期待される食品や食品素材の探索を実施するためには、『食品の機能性評価に適した抗ストレス効果、もしくは脳機能に対する効果を検証する動物実験系の構築』が求められる。そこで、本グループでは脳機能解析の一端として、一つにはその表現型の解析を目的として、新たに行動試験の導入や飼育環境の整備を行ってきた。また、食品の機能性評価に適したモデル動物の構築についても現在検討を開始している。今後、我々がこれまで蓄積してきた従来の遺伝子発現解析技術の手法と行動学的解析を合わせた総合的な脳機能解析を実現し、食品または機能性成分による脳機能への影響について網羅的・多角的な評価を遂行することを目指している。

2. 実験と結果

2.1 行動学試験の導入

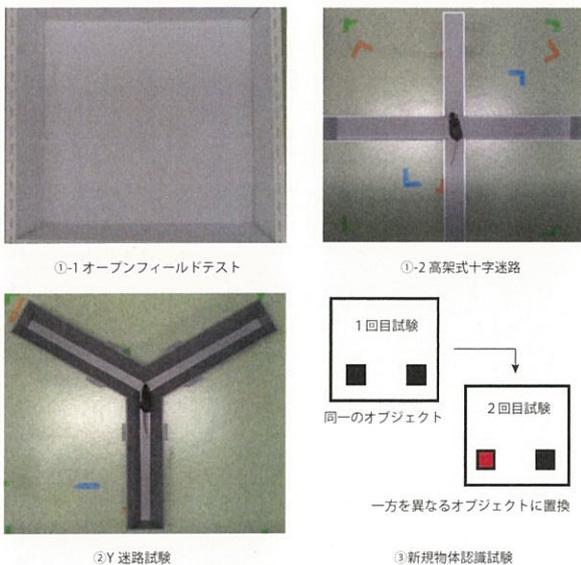


図4：行動試験の導入

脳機能の表現型の解析方法として、マウスを用いた行動学的解析を挙げることができる。本グループにおいては、食品の機能性成分が脳機能に与える影響を評価する目的として数種類の行動解析技術を導入している。食品の機能性成分による脳機能への効果についても、複数の作用点に対して緩やかに働きかける多面的作用を示すものであると想定さ

れる。つまり脳機能の評価においても単独の行動試験項目についての評価のみではなく、複数の行動試験による総合的な行動指標の評価をすることが必要と考えている。複数の行動指標を評価する為には行動試験の先行経験のないマウスを用いて各行動試験を実施し、試験毎にマウスを用意する必要がある。我々はマウスを用いた食品機能成分による脳機能評価は、脳機能に対して影響しうる素材を探索するための一次スクリーニングとしての運用も想定している。したがって、多くの素材に対して網羅的に検討し、さらに、効率的に評価することが必要と考えている。以上のことから1つの素材に対して行動試験毎にマウスを準備する大規模な評価よりも、同個体のマウスを用いて様々な項目の行動試験を複数実施する評価系を確立することが望ましいと考えている。複数の行動試験による脳機能を横断的に評価するために、既存の様々な行動試験項目からトラウマティックな侵襲度の低い試験を選択する必要がある。トラウマティックな侵襲度の低い試験は別の行動試験に及ぼす影響も低いと考えられる。これまで本グループで導入した主な行動試験は①マウスの情動行動や不安様行動の観察に用いられているオープンフィールドテスト、高架式十字迷路試験、②マウスの自発的な行動量と空間作業記憶(自発的交替行動)の評価に用いられるY迷路試験、③新規物質への好奇心を検討する新規物体認識試験、④マウスの社会性行動の観察に用いられる社会的相互作用テストなどを導入している(図4)。これらの行動試験は、マウスによる一般的な認知・記憶試験の機能評価に使用される場所課題試験、モーリス水迷路、受動回避試験のようにある種の報酬系、罰刺激を加えることなく、マウス自身の自発行動の測定を行うものであることから非常にトラウマティックな侵襲性が低くかつ、多くの情報を得ることができる試験である。現在、行動試験の導入は完了し、予備検討を重ねた結果、運用に使用できる水準に達している。したがって、同一個体に対して複数組み合わせで実施することが可能であり、同一個体から多くの行動指標を得ることができる環境が整った。

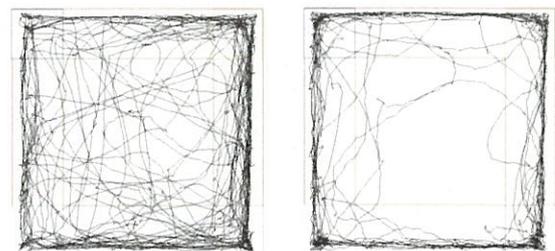


図5：飼育環境の違いによる行動様式(オープンフィールドテスト)の変化

2.2 試験環境の整備

行動試験を実施するにあたりマウスの飼育環境(温度・湿度条件、照度、室内騒音など)が大きく試験結果に影響を及ぼすことが報告されている^{2,3}。食品の機能性成分による行動様式へのわずかな影響をも精査する必要があるため、安定した飼育環境の維持は非常に重要であると考えられる。飼育環境がどのように行動試験に影響するのかを検討するた

め、異なる照度下で飼育したマウスを用い、オープンフィールドテストを実施した結果、飼育環境の違いが行動様式に対して影響を及ぼすことを確認した(図5)。現在、マウスの飼育環境について、全ての飼育ケージ内の照度を一定に保つために適宜照度を確認し飼育環境の整備を進めている。その他、マウス飼育施設の環境(温度、湿度、室内騒音など)についても全ての飼育マウスにおいて一定となるように適宜飼育室内の環境測定を実施し、環境整備を務めている。

2. 3 負荷動物モデル構築の検討

食品による脳機能への影響やストレス抑制効果といった機能性評価を実施するにあたり、動物実験を用いた評価系は重要なツールである。一般的にマウスを用いて脳機能の評価する方法として、一定のストレス負荷を与えたモデル動物を用いた方法が挙げられる。モデル動物に与える様々なストレス負荷によってマウスなどの実験動物の行動様式が変化することが知られている⁴。本グループでは『食品による脳機能性評価に適したモデル動物』の作出を目指しており、いくつかの負荷源を用いてマウスの行動解析を実施して最適な方法の検討を開始している。求められるモデル動物は、トラウマティックな侵襲度が低い負荷源であるが、短期の負荷によって行動様式の表現型が認められるモデル動物である。我々はまず、トラウマティックな侵襲度の低い負荷源を短期間マウスに負荷し、行動様式がどのように変化するかを検討するために行動解析を実施した。負荷強度の異なる2つの負荷源を用い、負荷した群(強、弱)と負荷しない群について行動学的試験の一つであるY字迷路試験を実施した。結果、負荷の程度に従ってY字迷路内での行動回数に各群間で有意な差が認められた。現在、行動試験による評価をいくつかの侵襲性の低い負荷源を用いて実施しており、食品の脳機能評価に適した負荷源及び条件の検討を重ねている。

3. 考察及び今後の展望

食品機能性成分は、医薬品や化合物のように治療効果を期待し服用するものではなく、食品または食材として日々の食生活に取り入れることで結果的に抑制効果や緩和作用を期待できるものである。このような効果を評価するためにはモデル動物を用いた評価系の樹立が必要である。我々はまずトラウマティックな侵襲度の低い行動試験の導入を試み、同一個体での複数の行動試験による評価系を確立した。また、食品による脳機能への僅かな効果についても検証する必要があることから行動試験に影響を与える飼育条件及び飼育環境の整備に尽力した。安定した行動試験データを得るための整備は概ね整いつつあり、現在は『食品による脳機能性評価に適したモデル動物』の作成に取り組んでいる。“医薬薬”とは異なる“食品の機能性成分”の脳機能効果を評価するためには、トラウマティックな侵襲度の低い負荷が好ましく、いわゆる“ストレス未病モデル”のような動物モデルが評価に向け有用ではないかと想定される。“ストレス未病モデル”とは、ストレス起因性疾患と健常の間のグレーゾーンに位置し、一見正常かのように見られるモデルである。このようなモデル動物を用いて食品の機能性成分による緩和や

抑制効果を検討することは脳機能に対して効果が期待される素材のスクリーニングだけでなく、その機能メカニズムについても検討することが可能になることが期待される。我々は比較的トラウマティックな侵襲度の低い短期間の負荷条件を用いて負荷の有無やその程度の違いによってマウスの行動様式が変化することを見出しており、このモデル動物が食品の脳機能性評価に応用できるのではないかと期待し、鋭意研究を進めている。今後はモデル動物を用いて、脳機能への効果が期待される食品機能性素材を投与することで行動フェノタイプもしくは遺伝子発現の変化を緩和、改善し得るかなどの機能メカニズムについても順次検討を開始する予定である。

謝辞

本研究(の一部)は、総合科学技術・イノベーション会議のSIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」及び、科学研究費助成事業・挑戦萌芽「孤独ストレスによる脳トランスクリプトーム失調とその食品三次機能成分による予防」によって実施されました。

【参考文献】

1. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS., *The Journal of Nutrition.*, 133, 9 (2008).
2. ED. Kemble and MJ. Goblirsch, *The Psychological Record.*, 47, 167-174 (1997)
3. FJ Martin-Arenas and C.O.Pintado, *Proceedings of Measuring Behavior.*, August 27-29, (2014)
4. Jessica L. Ihne, Paul J. Fitzgerald, Kathryn R. Hefner1, and Andrew Holmes, *Neuropharmacology.*, 62, 464-473 (2012)

食品機能性評価のための 新規マーカー検出手法の開発と検討

野原 正勝、安岡 顕人、嶋田 耕育、亀井 飛鳥、篠崎 文夏

1. はじめに

われわれは動物実験やヒト試験を行い、トランスクリプトーム解析等により食品の有効性や機能性についての評価を行っているが、評価センターとして、新しい評価系で新しいマーカーを探索することは、受託研究を進めるうえで非常に重要である。

1.1 トランスクリプトーム解析の現状

マウスやラットを用いた研究では、脳や肝臓といった組織や臓器単位で材料採取を行い、これらの組織や臓器をサンプルにしてデータを得ることが一般的である。そして、脳や肝臓といった組織や臓器は1種類の細胞のみで構成されているのではなく、役割の異なる複数の種類の細胞が集まってできている(図1)。したがって、これらの組織や臓器をサンプルとして行われるトランスクリプトーム解析は、平均化されたデータを抽出して全体の変化を評価していることになる。一方ヒト試験の場合、ヒトから組織や臓器を採取することは非常に困難であるが、血液を採取することは比較的容易であり(図2)、ヒト試験を行う際には、血液をサンプルとしてトランスクリプトーム解析を行い評価する。

1.2 血液の組成について

血液は液体成分である血漿、固形成分である赤血球、白血球、血小板で構成されており、生体防御にかかわる免疫担当細胞である白血球は、細胞のなかに顆粒を有する好中球、好酸球、好塩基球、顆粒を持たないリンパ球、単球とさらに細かく分類される(表1)。好中球は白血球のうち最も多く存在し、体内に侵入した細菌を攻撃して貪食する機能を有している。また、好酸球と好塩基球はアレルギー反応に関与しており、好中球に次いで多く存在するリンパ球は免疫反応の中心的な役割を担っている。さらに、好中球に次ぐ活発な貪食作用を有する単球は、体内に侵入してきた細菌や不要な細胞を貪食する。このように、他の組織や臓器と同様に、血液はそれぞれが別々の役割を担っている複数の種類の細胞で構成されており、複数種類の細胞の集合である血液を用いてトランスクリプトーム解析を行うと、組織・臓器で行う際と同様に、血液においても平均化されたデータを抽出して全体の変化を評価することになる。

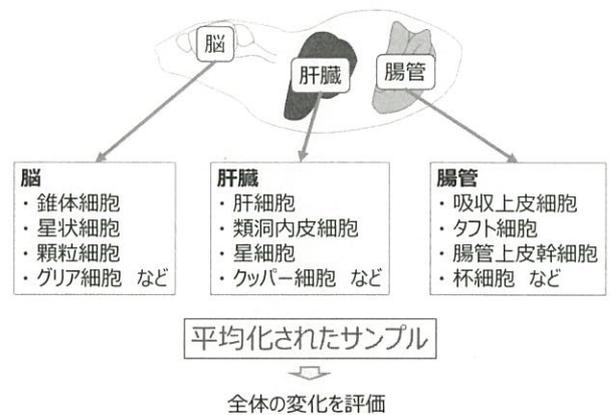


図1 臓器・組織を構成する細胞の種類

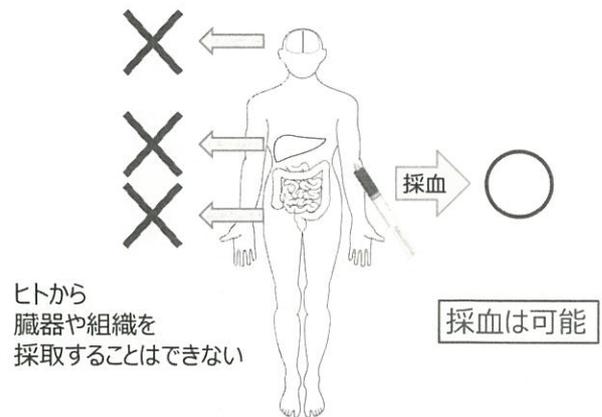


図2 ヒトにおいて用いることが容易なサンプル

表1 血球の分類とヒトにおける正常値 [看護 roo!, 血液の仕組みとはたらき- 血液の流れから理解する (5)「血球の種類」 (<https://www.kango-roo.com/sn/k/view/1845>) を基に作成]

分類		正常値		
血小板		15~40 万/mm ³		
白血球	顆粒球	好中球	} 0.5 ~ 1 万/mm ³	
		好酸球		白血球のうち 30~70%
		好塩基球		1~6%
	リンパ球	Tリンパ球		0~3%
		Bリンパ球		30~40%
単球マクロファージ	3~10%			
赤血球		370~570 万/mm ³		

1. 3 トランスクリプトーム解析の高精度化

血液を用いてトランスクリプトーム解析を行い、全体を見た変化から食品の機能性を評価することも大切である。一方で、血液細胞全体から見えてきた食品の機能性が免疫系に影響した結果であれば、血液細胞とりわけ白血球の1つ1つの変化も重要な情報となる。また、食品に対する個々人の応答のブレを解消し、個々の細胞について食品への応答の小さな変化を捉えるためには、細胞の単一細胞分離（シングルセル化）がトランスクリプトーム解析の高精度化に向けて必要となる。

1. 4 好中球活性測定

トランスクリプトーム解析の高精度化に加えて、われわれは生体防御にかかわる免疫担当細胞である白血球に着目し、他社との連携で白血球のうち最も多く存在する好中球の活性化を測る手法の検討を行っている。

好中球の活性化指標であるスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) 産生とミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を化学発光と蛍光という2種類の光の情報に変換して検出する技術が確立されている¹⁾。

好中球は体内に侵入してきた細菌を捕食して食胞内に取り込み、食胞内に $O_2^{\cdot-}$ を放出して細菌を攻撃する。好中球が酸素から直接作る $O_2^{\cdot-}$ は、それほど強力な活性酸素ではないが、同時に好中球の顆粒から放出される MPO によって、過酸化水素に塩素を付加して、強力な活性酸素種である次亜塩素酸を産生する。

食品の抗酸化作用や免疫系への効果を評価するためには、好中球の活性化は重要な指標となると考えられる。

本研究では、生体防御にかかわる免疫担当細胞である白血球に着目し、未病におけるヒト血液トランスクリプトームの高精度な評価系を確立するために、われわれはまずマウスの血液から白血球を分離するための条件検討を行い、さらに、得られた白血球サンプルからシングルセルの分離を試みた。そして、好中球活性については、新たな測定手法の導入を試みた。

2. 実験と結果

本研究の一番の特徴は、ヒト試験を想定し、採取した血液を RNA、タンパク質や細胞を安定的に保存することができる細胞保存試薬と混和してサンプル処理を行っていることである。

採血から塩基配列解析用のサンプル調製までの流れは次に示すとおりである。

- ① 採血し、血液を細胞保存液と混和
- ② 血液からの白血球分離
- ③ 単一細胞分離装置による単一白血球の分離
- ④ 顕微鏡観察による細胞分離の確認
- ⑤ 塩基配列解析用サンプルの調製

2. 1 血液からの白血球分離

まず、本研究の特徴である細胞保存試薬と混和した血液から白血球を分離するための条件検討を行った。

表1に示したように、白血球数は血液 1 mm^3 あたり5千から1万個であるのに対して、その数の400倍から1000倍近くの赤血球が血液中には存在している。白血球をターゲットにしてシングルセル化を行う場合、この赤血球の多さが問題となるため、血液から赤血球を取り除き白血球を分離する必要がある。

マウスから採取した血液を RNA、タンパク質や細胞を安定的に保存可能な細胞保存試薬と混和した。この血液を材料として赤血球を凝集させて白血球と分離する試薬（赤血球凝集試薬）と混和、または細胞の密度の違いによって分離する試薬（密度勾配分離試薬）に重層して遠心分離を行い、血液からの白血球分離を試みた。赤血球凝集試薬で得られた細胞懸濁液には白血球のほかにも多くの赤血球や血小板が認められ、白血球のみを分離することができなかった。また密度勾配分離試薬では赤血球の層と白血球の層が分離せず、白血球のみを分離することができなかった。この2系統の試薬では白血球を分離することができなかったため、次いで、細胞表面の構造の違いを利用して赤血球を破裂させる溶血試薬を用いて白血球分離を検討した結果、細胞保存試薬と混和した血液から白血球を分離することができた（図4）。

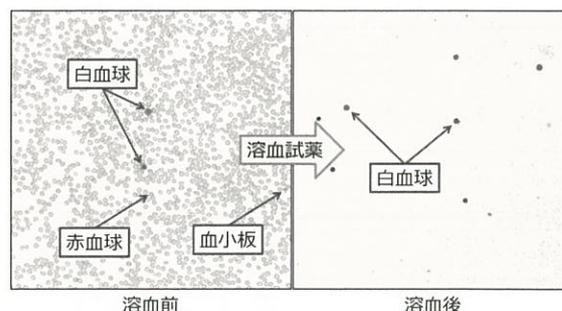


図4 溶血試薬を用いた血液からの白血球分離の結果。採血した血液では多くの赤血球に囲まれた中にわずかな白血球が認められるが、溶血試薬を加えることで赤血球はなくなり、白血球のみとなった。

2. 2 白血球の単一細胞分離

次いで、確立した白血球分離法で得られた細胞懸濁液を材料として、流路分離型の単一細胞分離装置による白血球のシングルセル化を行った。

単一細胞分離装置はシングルセル遺伝子解析のための自動化システムであり、細胞のシングルセル化から塩基配列解析用サンプルの調製を行うことができる。この装置はシングルセル研究には欠かせない重要なアイテムとなっている。単一細胞分離装置を用いた研究は、腫瘍学、神経学、免疫学、遺伝性疾患などのとりわけヒトの疾病にかかわる分野において多く報告されている。しかしながら、食品の機能性について、単一細胞解析を用いた研究は現在報告されていない。

表 2 白血球の単一細胞補足率

	単一細胞	死細胞	複数の細胞	細胞なし	生細胞の割合
1回目	66	1	23	7	67.7
2回目	75	8	10	11	69.8
平均	70.5	4.5	16.5	9.0	68.8

今回使用した単一細胞分離装置では、細胞サンプルを流すと個々の細胞が96個の小さな部屋（チャンパー）を通り、それぞれのチャンパーに1個1個の細胞が留まる仕組みとなっている。細胞分離後の顕微鏡観察によって捕捉率を算出した結果、およそ70%の単一細胞捕捉率であった（表2）。

次に塩基配列解析用のサンプルを調製すると、細胞のあるチャンパーからは細胞由来のDNAのピークが認められたのに対して、細胞のないチャンパーからは、DNAのピークは認められなかった（図5）。

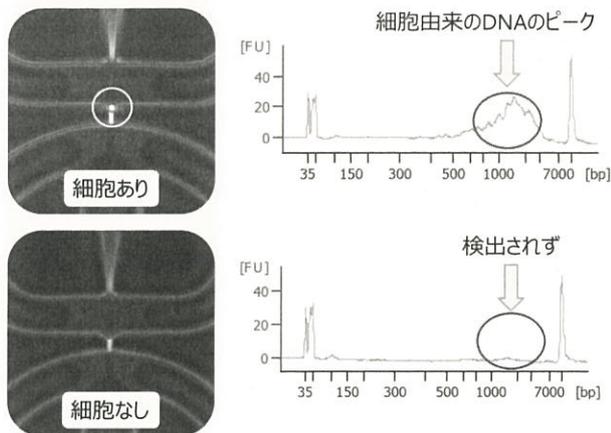


図5 細胞由来 DNA の確認

3. 考察及び今後の展望

本研究の特徴である細胞保存試薬と混和した血液から白血球を分離する方法を確立し、さらにこの細胞懸濁液を用いて高い捕捉率での単一細胞分離を実現した。

今後は細胞1つ1つの情報を取得し、ヒト試験への実用化に向けて、普遍的な未病マーカーの選定や細胞を安定に保存できる期間の検討を行う予定である。また、好中球活性の測定については新規手法の導入を試み、現在、データを蓄積しつつある。今後、解析を進め、新たなマーカーとしての可能性を探る。

4. 謝辞

本研究の一部は、文部科学省「地域イノベーション戦略支援プログラム事業」、内閣府「戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)」「次世代農林水産業創造技術」(管理人:生研支援センター)により実施されました。また、好中球活性測定については、内閣府SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」コンソーシアム間の物品等の提供に関して浜松ホトニクス株式会社からの装置の貸与をもって実施され、同中央研究所 数村公子氏のご指導、ご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Y. Kobayashi, H. Inagawa, C. Kohchi, K. Kazumura, H. Tsuchiya, T. Miwa, K. Okazaki, G. Soma, *PLoS One*, **13**, e0195008 (2018).

食品機能性成分によるエピゲノム制御を基盤とした

世代間健康評価系の開発

安岡 顕人、嶋田 耕育、近藤 隆

1. はじめに

DNA メチル化やヒストン修飾といった遺伝子のエピジェネティック修飾は、遺伝子発現の基本メカニズムを担うとともに、親が受けた環境要因を子に伝える機構でもある。疫学的には、母親や父親の栄養状態が出生児の健康に影響することがよく知られている。母親の場合はエピジェネティックな要因だけでなく胎内環境も大きな要因となるが、父親の場合、精子のみが次世代に受け継がれるため、よりエピジェネティックな要因の寄与が大きいと考えられる。我々は、父親世代での代謝ストレスが食品ポリフェノールの同時摂取により緩和され、さらにこの現象が仔世代にも受け継がれるということを見出した。本研究では、この現象のエピジェネティックな要因を詳細に解析することにより、世代を通じて健康を維持するために重要なエピジェネティック修飾を特定し、健康評価系として確立することを目的とする。

1.1 本研究の概要

糖質、脂質、アルコールの過剰摂取は代謝系にストレスを与え、肥満や血管系疾患を起こす一要因となっている。最近、このような代謝ストレスがエピゲノムを変化させ、次世代の健康に影響を与えていることが示されつつある。これに対して、レスベラトロールなど一部の食品ポリフェノールにはこのような代謝ストレスを軽減する作用があることが知られている。我々はアルコール性脂肪肝を誘導した雄マウスと、通常の雌マウスを交配した仔は、通常両親の仔に比べて体重が重く、肝トランスクリプトームにも差異が見られることを見いだした。さらにこの差異が、雄親へのレスベラトロールの同時投与で解消されることを確かめた。雄親精子と仔肝臓のメチル化修飾とヒストン修飾を解析したところ、対照群、アルコール群、ア

ルコール+レスベラトロール群との間に差異が観察された。本研究は食品ポリフェノールによる代謝ストレスの緩和過程におけるエピゲノム修飾の全体像を理解する基盤となると考えられる。

1.2 材料と方法

1.2.1 動物飼育

全ての動物飼育は、温度(25°C)・照明の点灯時間(8:00-20:00(day)、20:00-8:00(night))・湿度(35-40%)を調節した飼育室にて行った。5週齢の C3H/HeN 雄マウスは CE-2 の固形餌と純水を自由に摂食させながら1週間環境に慣れさせた。6週齢の時点で群の平均体重が近似するように3群に分け、Lieber のエタノール非含有食(C群、n=17)、Lieber のエタノール含有食(E群、n=12)、73 mg/L の RSV を含む Lieber のエタノール含有食(ER群、n=13)をそれぞれ5週間ペアフィードした。5週間の給餌後、各群内で平均体重が揃うように半分に分け、一方からは遊走精子を採取し、もう一方は正常な8週齢の C3H/HeN 雌マウスと8日間交配させた。妊娠した雌マウスを個別ケージに移し、CE-2 の固形餌と純水を自由に摂取出来る状態で飼育した。得られた仔マウスは3週齢の時点で解剖して血清・肝臓を採取した。

1.2.3 染色体免疫沈降シーケンシング

雄親の精巣、精巣上体、遊走精子、仔の肝臓を採取し、プロテアーゼ阻害剤を含む PBS 中(PBS-I)でホモゲナイズし、組織を遠心分離し、1%ホルマリンを含む PBS で固定し、PBS-I で3回洗浄し、-80°Cで保存した。界面活性剤中で450bpに超音波断片化し、抗 RXR 抗体あるいは抗修飾ヒストン抗体を使って精製した。得られた DNA を再度 150bp に断片化したのち、SMART ChIP-Seq キットによりライブラリーとし、次世代シーク

エンサーで解析した。C, E, ER 群の親精子、仔肝臓それぞれについてリード長 150 bp、4000 万リードのデータを得た。データを SraTailor (http://www.devbio.med.kyushu-u.ac.jp/sra_tailor/) [39]により、マウスリファレンスゲノム mm9 ヘマップし、MACS によりピークデータを得た。東京大学応用生命科学科 岡田准教授作製の R-script により、MACS ピークデータの染色体座標を比較し、重複しているものを選択した。

2. 結果と考察

2.1 精子染色体と肝臓染色体におけるシトシンメチル化とヒストン修飾の分布

これまでの研究で得たシトシンメチル化の分布状態を、今回得たヒストン修飾の分布状態と比較した。図 1 に仔肝臓で発現変動した Igfbp2 の近辺のデータを示す。

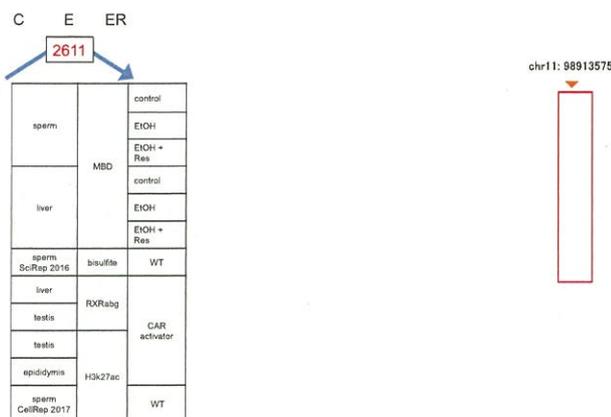


図1 肝臓でC > E < ERという発現変動を示した Igfbp2遺伝子付近のメチル化とヒストン修飾の分布プロモーターとの相互作用が検出されている領域(赤枠)において、父精子と仔肝臓でメチル化の変動がみられたが、ヒストン H3k27ac 修飾は検出されなかった。一方、プロモーター領域にはヒストン H3k27ac 修飾が検出されている。今後は C, E, ER 群間でのヒストン H3k27ac 修飾の違いを検討する必要がある。

2.2 精巣染色体と精子染色体のヒストン修飾の比較

精巣から精子が形成される過程でヒストン H3k27ac 修飾がどのように変化するかを予備的に検討した。

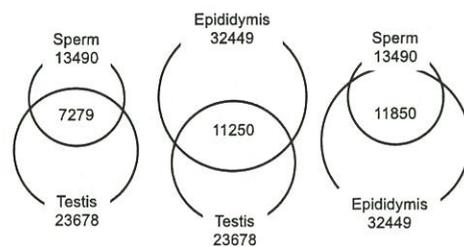


図2 精巣、輸精管内精子、精子染色体のヒストンH3k27ac修飾の比較
図 2 に示すように、輸精管精子と精子のピークが比較的良好一致した(精子の 85%)。一方、精巣と輸精管精子あるいは、精巣と精子を比較した場合はピーク的一致が輸精管精子あるいは精子に対して 50%以下であった。輸精管精子は、精子に比べてより高い効率で染色体免疫沈降サンプルを採取することが可能なため、輸精管精子を用いた解析を進める。今後は、父輸精管精子と仔肝臓の C, E, ER 群間でヒストン H3k27ac、H3k27me3、H3k4m3、H3k4m1 修飾を解析し、シトシンメチル化やトランスクリプトームとの関係を探っていく。

この研究は、科学研究費補助金 15H02905 平成 27-29 年度基盤研究(B)「食品非栄養性成分によるエピジェネティクスを介した子孫の健康維持」の助成により行われた。

【参考文献、発表】

- 1) Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Tateishi N, Tsuruoka N, Kiso Y, Sueyoshi T, Negishi M, Misaka T, Abe K. J Agric Food Chem. 2010 Feb 24;58(4):2168-73.
- 2) Polyphenols in alcoholic beverages activating constitutive androstane receptor CAR. Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Rogi T, Taieishi N, Tsuruoka N, Kiso Y, Misaka T, Abe K. Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75(8):1635-7.
- 3) Nuclear receptor-mediated alleviation of alcoholic fatty liver by polyphenols contained in alcoholic beverages. Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Ushiyama S, Kitagawa Y, Rogi T, Shibata H, Abe K, Misaka T. PLoS One. 2014 Feb 3;9(2):e8714.
- 4) Transgenerational effect of ethanol induced metabolic stress and its alleviation by dietary polyphenol. A. Yasuoka, A. Kamei, F. Shinozaki, K. Shimada, K. Kondo, T. Kondo, K. Abe. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Impact for Biology and Society 28-30 August 2017, ETH Zürich, Switzerland

生体ガス分析を利用した食品機能性の短期間評価系の確立

豊田集

1. はじめに

1. 1 背景

食品の機能性の一般的な評価系として、食品を実験動物に長期間継続摂取させ、身体的変化を検出する方法がある。この身体的変化は、摂取した食品に起因する僅かな代謝変化の積み重ねによって引き起こされるが、既存の手法では僅かな変化の初期段階を捉えることが困難であった。本研究では、より初期に引き起こされる僅かな代謝変化を生体ガス分析により検出することで、食品機能性の短期間評価系を確立することを目指した。

1. 2 代謝変化を検出するための生体ガス分析の利用

本稿で扱う生体ガスとは、呼気に排出される二酸化炭素 (CO₂) と吸気から消費される酸素 (O₂) を指す。これらは、生体内で糖質、脂質、タンパク質などを基質として代謝する際に、産生もしくは消費される。CO₂ 量と O₂ 量のそれぞれに係数を乗じて足した値をエネルギー消費量、CO₂ 量を O₂ 量で除した値を呼吸商と定義する。

呼吸商は、代謝した基質の種類によって異なる。基質として糖質を代謝した場合は 1.0 に近くなり、脂質を代謝した場合は 0.7 に近くなる。呼吸商を本評価系で活用する方法として、脂質代謝促進作用を持つ食品を例に挙げる。食品 A をマウスに 8 週間継続摂取させた時に、摂取開始から 7 週目で体脂肪率が食品 A の摂取により有意に低下したと仮定する。そのような場合、摂取開始直後などの体脂肪率に有意差がない時期であっても、食品 A の摂取で脂質代謝が促進されるなどの代謝変化が引き起こされている。そこで、摂取開始直後に呼吸商を測定すると、脂質を代謝したことを表す 0.7 に近い値が測定されることが推測される。このように、呼吸商を変化させる食品素材を探索することで、いずれ身体的変化を引き起こす候補を選び出すことが可能になる。

2 方法および結果

2. 1 方法

2. 1. 1 予備実験

6 週齢の雄の C57BL/6N マウスを通常のケージに入れ、飼育室への馴化のために 5 日間飼育した。その後、一般的な群分けの指標として用いられる平均体重が概ね等しい 2 群に分けた。続いて、マウスを代謝チャンバーに移し、このチャンバーへの馴化を行った。対照群には超純水を、実験群には食品 M を単回経口投与後、2 日間本飼育した。代謝チャンバー内で飼育した 3 日間の体重、摂餌量、および呼吸商を毎日測定した。全ての飼育期間中、標準固形飼料を自由摂食させた。

2. 1. 2 課題解決のための検討実験

5 週齢の雄の C57BL/6N マウスを通常のケージに入れ、飼育室への馴化のために 2. 1. 1 よりも長期間飼育した。その後、マウスを代謝チャンバーに移し、このチャンバーへの馴化を行った。馴化期間中の平均呼吸商が概ね等しい 2 群に分け、全てのマウスに超純水を単回経口投与後、3 日間本飼育した。代謝チャンバー内での飼育期間中、体重、摂餌量、および呼吸商を毎日測定した。全ての飼育期間中、標準固形飼料を自由摂食させた。

2. 2 結果

2. 2. 1 予備実験

体重および摂餌量は、食品 M の有無に関わらず複数のマウスで経口投与後に低下した (図 1)。経口投与とは、マウスを保定し、経口にて胃内へサンプルを投与する方法である。この操作に対して、マウスが不慣れであるために著しい応答を示したという仮説を立て、マウスを経口投与操作に馴化させるための検討を行うことにした。

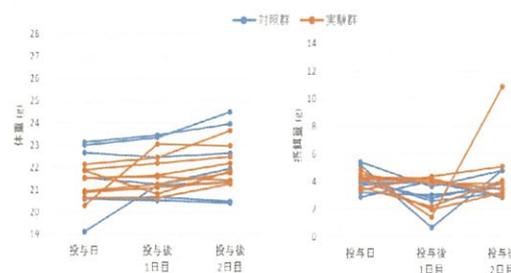


図 1 予備実験における体重および摂餌量

また、呼吸商は、食品 M の投与後 2 日目に有意に高値を示した (図 2)。しかし、この 2 群間の大小関係は、投与前から投与後 2 日目まで同様に維持されていた。これは、食品 M の投与後 2 日目に呼吸商が高値を示したことが、食品 M の摂取だけに起因するのが疑わしいことを意味する。この結果から、体重ではなく、呼吸商を基にした群分けが必要であると考えられた。

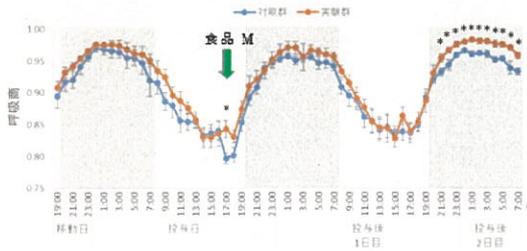


図2 予備実験における呼吸商
 平均値±標準誤差 (8匹/群)
 * $p < 0.05$ (Student の t -検定)

2. 2. 2 課題解決のための検討実験結果

マウスを経口投与に馴化させるために、飼育期間中から馴化操作を繰り返し行った。その結果、超純水投与後の体重および摂餌量の低下度合いは、予備実験時よりも小さかった(図3)。この結果から、マウスに経口投与前から経口投与への馴化操作を行うことで、経口投与ストレスを軽減できる可能性が示された。

また、経口投与前の2群の呼吸商を揃えるため、投与前日の平均呼吸商が揃うように群分けした。その結果、超純水投与前後の呼吸商は、2群で概ね等しかった(図4)。この結果から、呼吸商を基に群分けを行うことで、呼吸商の群間差を抑えることができ、食品摂取により生じる僅かな代謝変化を検出できるようになる可能性が示された。

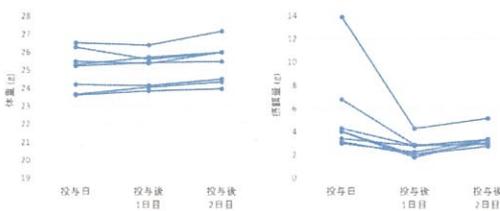


図3 検討実験における体重および摂餌量

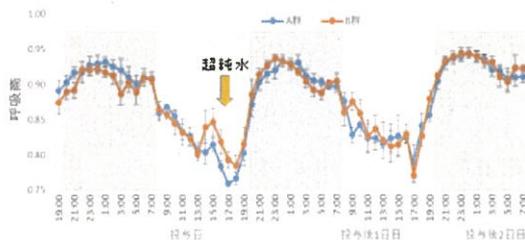


図4 検討実験における呼吸商
 平均値±標準誤差 (4匹/群)

3. 考察及び今後の展望

生体ガス分析を利用した本短期間評価系の確立により、代謝変化を引き起こす食品素材を対象としたスクリーニングの効率化が期待される。今後、本評価系を用いて、種々の食品素材の代謝に与える影響を調べる。

生体内代謝を考慮した細胞形質転換試験法の開発

廣岡 孝志, 大森 清美

1. はじめに

1.1 細胞形質転換試験

生体内の正常細胞のがん細胞への転換,そして悪性腫瘍の形成までのプロセスは多段階発癌 (multistep carcinogenesis) と呼ばれる (1, 2)。すなわち図1に示すように,まず,正常細胞が遺伝毒性(変異原性)を有する化学物質によりDNAの損傷(突然変異)を受ける。このプロセスは“開始(イニシエーション)”と呼ばれ不可逆的に進行する。このイニシエーションを引き起こす遺伝毒性化学物質は発がんイニシエーターと呼ばれる。次に“促進(プロモーション)”と呼ばれる段階で化学物質の刺激を受けることにより増殖制御システムの破綻が誘発され異常な細胞増殖を起こし,腫瘍が形成される。このプロモーションを引き起こす化学物質は,発がんプロモーターと呼ばれる。さらに,異常な細胞増殖にともなう変異細胞の蓄積により腫瘍は悪性化する。この段階は“進行(プログレッション)”と呼ばれる。

化学物質の発がん性予測 *in vitro* 試験法である細菌を用いた Ames 試験(復帰突然変異試験)や哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験などは,化学物質のイニシエーション活性を検出することができる。一方,これらの *in vitro* 発がん性予測試験では検出できない発がん物質が存在する。これらの物質は,図1に示したように,プロモーション作用により腫瘍形成に関与する発がんプロモーターである可能性が高いと考えられる。しかしながら, *in vitro* で発がん物質のプロモーション活性を検出できる試験法はこれまでなかった。

動物細胞を用いた化学物質の *in vitro* 発がん性予測試験法の1つである細胞形質転換試験では,細胞形態転換もしくは腫瘍形成能の獲得に伴うフォーカス形成を指標として被験物質の発がん性を予測する。フォーカス形成過程は,多段階発癌プロセス(図1)のイニシエーションとプロモーションのステップを再現していることから発がん物質のプロモーション活性の検出が可能である(3)。大森らは, BALB/c3T3 A31-1-1 にがん遺伝子 v-Ha-ras を導入して作成された Bhas42 細胞を用いて発がんプロモーション活性を検出できる形質転換試験法を開発した(4)。さらに,浅田らは,培養条件の変更により Bhas42 細胞形質転換試

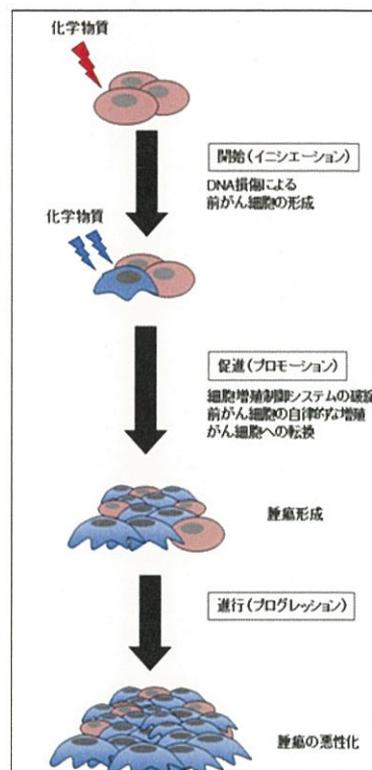


図1. 多段階発癌プロセス

験で発がんイニシエーション活性も予測できることを示した(5)。この Bhas42 細胞形質転換試験法は, 2016年1月に経済協力開発機構(OECD)において発がん物質の細胞試験法のガイダンスドキュメントとして認定されている(6)。

1.2 ヒト肝代謝を考慮した Bhas42 細胞形質転換試験法の開発

一部の化学物質は生体内で代謝活性化を受けることにより発がん性を獲得することが知られている。例えば, Benzopyrene, nitrosamine などの化学物質は, シトクロム P-450 (CYP) による代謝を受けることにより発がん性を示すことが知られている(7, 8)。このような発がん化学物質の代謝活性化を, 単一細胞培養による細胞形質転換試験法により評価することは難しい。

哺乳類細胞を用いて生体内代謝による化学物質の発がん性を予測する試験方法については BALB/c3T3 細胞および V79 細胞で報告例がある。いずれの方法においても代謝反応系として S9mix (9, 10), 肝臓ミクロソームや肝

細胞を加えた培養系を用いている(9, 11)。しかし, S9mix や肝臓ミクロソームは, 主としてラットなどの実験動物から作成されたものを使用するため, 化学物質に対するヒトと実験動物種との種差が問題となる。また, S9mix では, その溶液成分の細胞毒性が問題になる。また, Bhas42 細胞形質転換試験法の発がん性検出のエンドポイントであるフォーカス形成は, 細胞-細胞接触阻害の抑制により誘導されることが分かっている(12)。このため, 肝細胞との混合培養は, 異種細胞との接触がフォーカス形成に影響を与える可能性がある。

Bhas42 細胞を用いた細胞形質転換試験については, 生体内代謝による発がん物質の活性化を考慮した試験法についてはまだ確立されていない。そこで, 我々は, トランスウエル培養法による Bhas42 細胞とヒト肝細胞株との共培養系を構築することにより, ヒト肝代謝活性化により獲得もしくは増強された化学物質の発がん性の予測に対応した Bhas42 細胞形質転換試験方法の開発を行ってきた。昨年度までの研究では, ヒト肝細胞株と Bhas42 細胞との共培養系についての検討を行った。本年度は, ヒト肝細胞株と Bhas42 細胞との共培養条件についてさらに詳細な検討を行った。また, Bhas42 細胞自身が持つ化学物質代謝機能についても, 昨年までの研究で Bhas42 細胞において発現が確認された CYP 酵素タンパクについて, 発がん物質である 3-メチルコラントレンによる Bhas42 細胞フォーカス形成に対する寄与を詳細に調べた。

2. 実験と結果

2.1 ヒト肝細胞株と Bhas42 細胞との共培養系の構築

Bhas42 試験培地中でのヒト肝細胞株の CYP3A4 活性を詳細に検討した。その際, 昨年まで使用してきた分析法よりもさらに感度の高い分析方法を採用し CYP3A4 活性の測定を実施した。その結果, ヒト肝細胞株の CYP3A4 活性も昨年までに使用していた HepG2 と同様に Bhas42 試験培地中では急激に減少することが明らかとなった。そこで, ヒト肝細胞株の CYP3A4 活性を維持できる培養条件を検討した。その結果, ヒト肝細胞株の CYP3A4 活性を長期間(10 日間)維持可能な培地組成を見つけることができた。さらに, 被験物質非存在下, 新たな培地組成で作成した改変試験培地で単独培養した Bhas42 細胞では, 培地組成の変化に起因したフォーカス形成数の増加は確認されなかった。

2.2 Bhas42 細胞における薬物代謝酵素 CYP の発現

ヒト肝代謝系を考慮した Bhas42 細胞試験の作成に向けて, ヒト肝細胞株だけでなく Bhas42 細胞の薬物代謝機能についても知っておく必要がある。昨年までの研究から Bhas42 細胞では, CYP1A1 および CYP1A2 タンパクが 3-

メチルコラントレンにより発現誘導されること, および CYP2B6 タンパクを定常的に発現していることを明らかにした。本年度は, 3-メチルコラントレンをモデル被験物質として, その Bhas42 細胞フォーカス形成誘導に対する CYP1A1, 1A2 および CYP2B6 酵素の寄与を検討した。その結果, 3-メチルコラントレンによる Bhas42 細胞のフォーカス形成には, 主に CYP1A1 および CYP1A2 酵素が寄与することを明らかにした。

3. 考察及び今後の展望

ヒト肝細胞株の薬物代謝機能(CYP3A4 活性)を単独培養下、被験物質処理期間である 10 日間維持でき, かつ被験物質非存在下で単独培養した Bhas42 細胞のフォーカス形成にも影響を与えない改変試験培地を見いだした。今後この改変試験培地を用いたヒト肝細胞株と Bhas42 細胞との共培養条件の詳細な検討により, ヒト肝代謝を考慮した Bhas42 細胞形質転換試験法の構築が可能になることが期待できる。

Bhas42 細胞では薬物代謝酵素 CYP1A1/1A2 が, 3-methylcholanthrene による Bhas42 細胞のフォーカス形成に寄与することを明らかにした。この結果は, Bhas42 細胞について, フォーカス形成に対する薬物代謝酵素 CYP の寄与を初めてタンパク質および酵素活性レベルで証明した研究例である。

【参考文献】

1. 山崎聖典, 岡山大学医学部保健学紀要, 14,1-14 (2003).
2. Harris CC, Weston A, Willey JC, Trivers GE, Mann DL, Environ. Health Perspect., 75, 109-119 (1987).
3. Creton S, Aardema MJ, Carmichael PL, et. al., Mutagenesis, 27, 93-101(2012).
4. Ohmori K., Sasaki K., Asada S., et al., Mutat. Res., 557, 191-202 (2004)
5. Asada S, Sasaki K, Tanaka N, et. al., Mutat. Res., 588, 7-21(2005).
6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO BHAS42 CELL TRANSFORMATION ASSAY (2006).
7. Shimada T, Fujii-Kuriyama Y., Cancer Sci., 95, 1-6(2004).
8. Kuroki T, Drevon C, Montesano R., Cancer Res., 37, 1044-1050 (1977).
9. McCarvill JT, Lubet RA, Schechtman LM, Kouri RE, Putman DL, Environ. Mol. Mutagen., 16, 304-310 (1990).
10. Sheu CJ, Lee JK, Rodriguez I, Randolph SC, Drug Chem. Toxicol., 14,113-126 (1991).
11. Langenbach R, Freed HJ, Huberman E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2864-2867 (1978).
12. Sasaki K., Mizusawa H., and Ishidate M., Jpn. J. Cancer Res., 79, 921-930 (1988).

機器共用化

飯尾将太、亀井飛鳥

1. はじめに

本稿では、地域イノベーション戦略支援プログラム・神奈川国際ライフサイエンス実用化開発拠点におけるニュートリゲノミクス研究関連事業の機器共用化への取り組みについて紹介する。

地域イノベーション戦略支援プログラムにおけるニュートリゲノミクス研究は、神奈川科学技術アカデミー 健康・アンチエイジングプロジェクト（2013～2014 年度）、未病改善食品評価法開発プロジェクト（2015～2016 年度）、神奈川県立産業技術総合研究所 食品機能性評価グループ（2017 年度）の3プロジェクトに亘って継続実施された。特任研究員を採用し、実験室、動物室、機器・インフラ等の整備を行い、徐々に共用化への展開を図った。5年間の活動を通し、食品機能性評価における動物試験から作用メカニズム解明までの一連の研究システムについて共用化体制を整えるに至った。また、企業ニーズについてヒアリングを行い、機能性表示やトクホ等の認定を目指すまでの専門人材や資金のない中小企業等の利用を促進することを目標とした他、大企業からのエビデンス検証のニーズも強いことから、それらへの協力も併せて実績を作りつつある。

2. 具体的な取り組みと実績

DNA マイクロアレイ装置は、当初より県内の企業による共同研究あるいは受託研究による利用が進んでいる。また、DNA マイクロアレイ装置による食の評価にあたり、必要な前処理や、解析の検証で必要となる装置類の他、組織学的解析の受託等を可能にするための装置を徐々に共用化へと展開したことで、共用化機器の利用実績が増加した（図1）。さらに、平成28年度には、DNA マイクロアレイ装置にかけるサンプルを得るための動物飼育を行う環

実験名		機器名
動物実験		生体ガス分析装置
細胞調製		多本架遠心機
メカニズム解析	核酸抽出	ホモジナイザー
		Maxwell®
		Fast Prep
	核酸の定量、QC	NanoDrop
		電気泳動装置
		BioAnalyzer
	解析用データの取得	サーマルサイクラー
		DNAマイクロアレイ装置一式
	解析	リアルタイムPCR
		PCでの解析（計算および担当者による詳細な解析）
IPA（解析用ソフトウェア）		
組織学解析		クライオスタット
		倒立顕微鏡

図1 共用化機器リスト

境を整備し、また、DNA マイクロアレイデータ等の解析のための計算環境についても更なる展開を図り、共用機器の利用拡大へと繋げた（図2）。なお、一連の食の評価には、ノウハウ・経験を要するため、利用する企業や公設試担当者への指導も随時行っている。

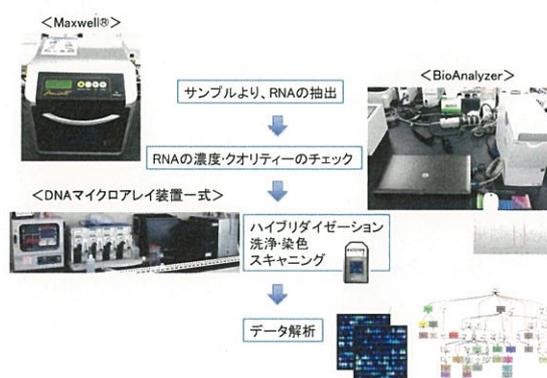


図2 DNA マイクロアレイ実験の流れと代表的な使用機器

なお、共用化時間の実績は下記の通りである。

- ・平成25年度共用時間実績：29 時間
- ・平成26年度共用時間実績：44 時間
- ・平成27年度共用時間実績：281 時間
- ・平成28年度共用時間実績：1,042 時間
- ・平成29年度共用時間実績：2328 時間

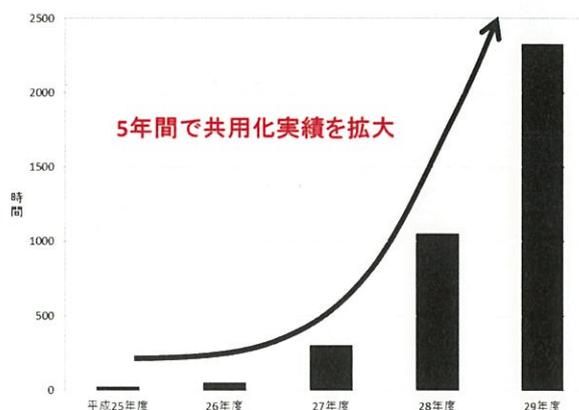


図3 共用化実績

3. 今後の展望

共同および受託研究契約の範囲で、評価法を指導し、装置の利用方法を覚えていただいた上で、使用していただく事を希望しており、今後もこれまで同様、その活動は継続して行く。なお、この5年間の活動を通し、共用時間実績は経年増加しており（図3）、食品機能性評価研究への関心の高さがうかがえる。また、RNA抽出装置、マイクロチップ型電気泳動装置の活用による安定的なDNAマイク

ロアレイのデータ取得や、リアルタイムPCR装置等を用いた解析を行う補助を継続して行う他、要望に応じて新規解析手法を用いた研究の相談や共同研究による取り組みを目指す。機器共用化のさらなる拡大を目指し、食品機能性評価のための一連の研究システムを広く紹介する活動も進めていく。

本取り組みは、文部科学省「地域イノベーション戦略支援プログラム事業」により実施されました。

業 績

【原著論文】

1. Kozuka, C., Kaname, T., Shimizu-Okabe, C., Takayama, C., Tsutsui, M., Matsushita, M., Abe, K., and Masuzaki, H. Impact of brown rice-specific γ -oryzanol on epigenetic modulation of dopamine D2 receptors in brain striatum in high-fat-diet-induced obesity in mice *Diabetologia* 60(8):1502-1511 (2017)
2. Yoshida, K., Yamamoto, N., Fujiwara, S., Kamei, A., Abe, K., and Nakamura, A. Inhalation of a racemic mixture (R,S)-linalool by rats experiencing restraint stress alters neuropeptide and MHC class I gene expression in the hypothalamus. *Neurosci Lett.* 653:314-319 (2017)
3. Hirooka, T., Yoshida, E., Eto, K., and Kaji, T. Methylmercury induces hyaluronan synthesis in cultured human brain microvascular endothelial cells and pericytes via different mechanisms. *J Toxicol Sci.* 42(3):329-333 (2017)
4. Kobayashi, Y., Sugahara, H., Shimada, K., Mitsuyama, E., Kuhara, T., Yasuoka, A., Kondo, T., Abe, K., and Xiao, JZ. Therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 7(1):13510 (2017)
5. Ogawa, M., Yamanashi, Y., Takada, R., Abe, K., and Kobayashi, S. Effect of luteolin on the expression of intestinal cholesterol transporters *J Funct Foods.* 36, 274-279 (2017)

【総説等】

1. 阿部啓子、成熟社会におけるアグリ・フードの未来、アグリバイオ 2017 年 8 月臨時増刊号 特集「アグリ・フードの未来像」(2017 年 8 月)
2. 亀井飛鳥、新規食品の機能性評価—桑葉を例にして、生物工学会誌 特集 95 巻 5・6 号 (2017 年 6 月)
3. 亀井飛鳥、食品とその機能性、アグリバイオ 2017 年 8 月臨時増刊号 特集「アグリ・フードの未来像」(2017 年 8 月)
4. 亀井飛鳥、食品機能性の新規マーカーの探索、ILSI Japan 機関誌「イルシー」132 号 (2017 年 10 月)
5. 亀井飛鳥、阿部啓子、次世代の機能性食品、細胞 11 月号 特集「機能性表示食品の現状、そして未来」(2017 年

10 月)

6. 阿部啓子、機能性食品科学から見た未病の評価と検証、国際シンポジウム「ME-BYO サミット神奈川 2017 in 箱根」セッション①「ME-BYO の可視化と科学的エビデンス」ハンドアウト (2017 年 10 月)
7. 亀井飛鳥、阿部啓子、メープルシロップの健康効果と食品の機能性を評価する研究、Maple Products from Quebec, Canada Information Booklet for Traders (2017 年 11 月)
8. 阿部啓子、次世代機能性食品、不二たん白質研究振興財団 財団時報 平成 29 年度 (第 20 号) (2017 年 11 月)

【口頭発表】

1. Kamei, A., (Abe, K.) Report on human clinical intervention trial to evaluate the effects of maple syrup. FPAQ meeting (2017 年 5 月、カナダ、モントリオール)
2. 阿部啓子、食と健康の研究—その未来像に想いを馳せて Food for life — considering the future of its research、第 71 回日本栄養・食糧学会 特別記念講演 (2017 年 5 月、沖縄)
3. 嶋田耕育、(安岡顕人、亀井飛鳥、篠崎文夏、近藤 香、阿部啓子、近藤 隆) 孤独飼育がマウスの脳と各臓器のトランスクリプトームに与える影響、第五回 NGS 現場の会 (2017 年 5 月、仙台)
4. 食と健康—日本におけるその科学と行政 “Food for health—science and policy in Japan”、第 19 回アジア地区家政学会 (2017 年 8 月、東京)
5. Ohmori, K., (Kamei, A., Watanabe, Y., and Abe, K.) Non-genotoxic carcinogen-induced changes in gene expression over time on Bhas 42 cell transformation assay. World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: WC10 (2017 年 8 月、米国、シアトル)
6. 亀井飛鳥、(薩秀夫) 吸入・摂食によってストレスを緩和する食品成分の探索と応用、内閣府 SIP 「次世代機能性農林水産物・食品の開発」1、2 班合同会議 (2017 年 8 月、東京)
7. 篠崎文夏、(山下治之) ポリフェノールや多糖含有食品摂取時の末梢組織での脂質代謝における脳の関与の検証、内閣府 SIP 「次世代機能性農林水産物・食品の開発」1、2 班合同会議 (2017 年 8 月、東京)

8. 阿部啓子、QOL 向上と ME-BYO を維持する機能性食品の開発、特に腸内細菌の重要性解析、ME-BYO サミット神奈川 2017 県民フォーラム in 川崎「未病改善に大きく寄与する機能性食品と腸内細菌叢に関する最新状況」基調講演 (2017 年 9 月、神奈川)
9. 阿部啓子、未病改善に寄与する腸内細菌叢の最新の研究・解析状況、ME-BYO サミット神奈川 2017 県民フォーラム in 川崎「未病改善に大きく寄与する機能性食品と腸内細菌叢に関する最新状況」パネルディスカッション (2017 年 9 月、神奈川)
10. 阿部啓子、機能性食品科学から見た未病の評価と検証、国際シンポジウム「ME-BYO サミット神奈川 2017 in 箱根」セッション①「ME-BYO の可視化と科学的エビデンス」(2017 年 10 月、神奈川)
11. 篠崎文夏、未病モデルマウスを用いた日本原産自然薯ムカゴの生理機能性の検証、第 25 回「食と健康」講演会 (2017 年 10 月、東京)
12. 嶋田耕育、機能性食品による脳機能評価を目指して、食品開発展 2017 (2017 年 10 月、東京)
13. 嶋田耕育、機能性食品による脳機能評価を目指して、食品開発展 2017 ポスターセッション (2017 年 10 月、東京)
14. 篠崎文夏、(山下治之) 自然薯ムカゴの生理的機能性の検証、BioJapan 2017 シンポジウム (2017 年 10 月、神奈川)
15. 亀井飛鳥、(薩秀夫)、桑葉の機能性評価、BioJapan 2017 ポスターセッション (2017 年 10 月、神奈川)
16. 篠崎文夏、(山下治之)、自然薯ムカゴの生理的機能性、BioJapan 2017 ポスターセッション (2017 年 10 月、神奈川)
17. 阿部啓子、口腔・消化管シグナルとエネルギー代謝、第 39 回 日本臨床栄養学会総会 第 38 回 日本臨床栄養学会総会 第 15 回 大連合会 (2017 年 10 月、千葉)
18. 阿部啓子、次世代機能性食品開発へのグランドデザイン、第 7 回 食品薬学シンポジウム (2017 年 10 月、京都)
19. 廣岡孝志、(阿部啓子、大森清美) 3-methylcholanthrene による Bhas42 細胞の形質転換フォーカス形成における薬物代謝酵素 CYP1A1,1A2 および 2B6 の寄与、日本動物実験代替法学会 (2017 年 11 月、東京)
20. 大森清美、(亀井飛鳥、渡部由貴、阿部啓子) Bhas42 細胞形質転換試験法における非遺伝毒性発がん物質による網羅的遺伝子発現変動解析、日本動物実験代替法学会 (2017 年 11 月、東京)
21. 阿部啓子、内閣府・農水省プロジェクト研究「次世代機能性食品」の概要、第 2 回学術フォーラム・日本抗加齢協会 アンチエイジングを極める。(2017 年 12 月、大阪)
22. 篠崎文夏、安全性・機能性メカニズムの解明、第 5 回北方圏紅藻類コンソーシアム推進会議 (2018 年 1 月、札幌)
23. 亀井飛鳥、(篠崎文夏、安岡顕人、嶋田耕育、荒井綜一、阿部啓子) 体内鉄量の変化に応答する血液遺伝子の発現変化の解析、日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月、名古屋)
24. 野原正勝、(安岡顕人、嶋田耕育、亀井飛鳥、篠崎文夏、豊田 集、飯尾将太、阿部啓子) 血球トランスクリプトーム解析の高精度化にむけた血液処理方法の検討、日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月、名古屋)
25. 篠崎文夏、(亀井飛鳥、嶋田耕育、安岡顕人、荒井綜一、阿部啓子) 高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与が回腸遺伝子発現に及ぼす効果、日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月、名古屋)
26. 安岡顕人、(亀井飛鳥、篠崎文夏、嶋田耕育、野原正勝、飯尾将太、近藤 香、岡田晋治、近藤 隆、阿部啓子) エタノール誘導代謝ストレスの次世代への影響と食品ポリフェノールによるその緩和、日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月、名古屋)
27. 嶋田耕育、(安岡顕人、亀井飛鳥、篠崎文夏、野原正勝、豊田 集、飯尾将太、阿部啓子) 孤立飼育条件がマウスの脳及びその他臓器のトランスクリプトームに与える影響、日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月、名古屋)
28. 豊田 集、(石島智子、亀井飛鳥、阿部啓子、岡田晋治) メープルシロップ抽出物が 2 型糖尿病モデルマウスのコレステロール代謝に与える影響、日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月、名古屋)
29. 本田瑞希、(亀井飛鳥、相田美緒、薩 秀夫) 抗炎症作用を有するクワ葉成分の探索および解析、日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月、名古屋)

【特許】

国内特許準備中 1 件

