研究報告 2019(KISTEC Annual Research Report,2019)

【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…… 175
グループリーダー　阿部　啓子
◆食品素材を対象とした脳機能評価系の導入…… 178
嶋田　耕育
◆腸における自然薯ムカゴ投与の影響…… 182
篠﨑　文夏
◆食品機能性評価研究－脳機能評価…… 185
亀井　飛鳥
◆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…… 188
野原　正勝、嶋田　耕育、亀井　飛鳥、篠崎　文夏
◆機器共用化…… 191
飯尾　将太、亀井　飛鳥
◆業績…… 193

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や認知機能・運動機能の低下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 30 年度の研究目的

グループ 2 年目となる平成 30 年度は、以下の各項目を重点項目として実施した。

(1)　食品機能性評価技術センター

(1)-1 動物とヒトのシームレス研究

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う特徴を持つ。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においては、指標としての有効性が低い。食品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いるが（図 1)、その一方で、ヒトで得られた結果について、動物でメカニズム解明をする研究にも着手しており、その成果について紹介する。

＜実施項目＞

(1)-1　自然薯ムカゴの機能性解析：動物実験

(1)-2 メタボリックシンドロームへの作用から脳機能への作用まで

食品の機能性評価研究は、特定保健用食品（トクホ）においてはメタボリックシンドロームに対する作用が中心であったが、機能性表示制度の対象が脳機能、運動機能（ロコモティブシンドローム）等多岐に亘るようになったことを受け、脳機能評価にも重点を置いて進めており、その成果についても紹介する。

＜実施項目＞

(1)-2-1　脳機能評価方法の導入：動物実験

(1)-2-2　脳機能評価方法の導入：ヒト実験

(1)-3 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の導入を試みた。また、生体ガス（呼気ガス）も動物とヒトとの双方で測定可能な指標のひとつであることからマーカー候補とし、微細な変化を検出するための精度化を常時検討している。これらの研究成果について紹介する。

＜実施項目＞

(1)-3-1　単一細胞トランスクリプトーム解析技術の検討

(1)-3-2　生体ガス分析を利用した食品機能性の機能性評価系の高精度化

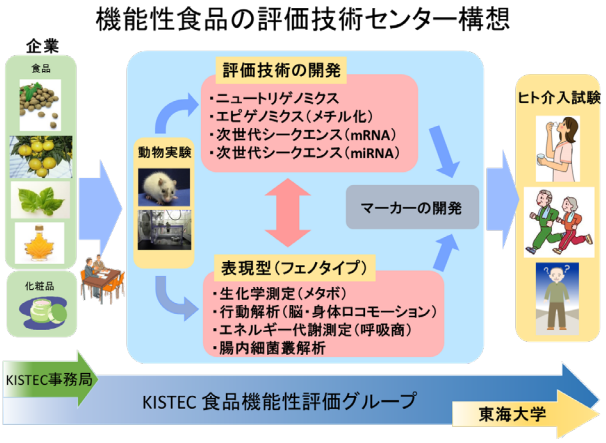


図１　機能性食品の評価技術センター構想

(2) 地域イノベーション戦略支援プログラム事業ー機器の共用化

2017 年度にて終了予定であった地域イノベーション戦略支援プログラム事業について、業績が認められ、1 年間の期間延長となった。この期間を活かし、機器共用化の推進に力を入れ、前年度（2,328 時間）に比べて著しい延伸（3,400 時間）を達成した。6 年間の活動を通じ、食品の機能性評価研究に関連する様々な装置の周知を図り、徐々に利用拡大に至った。今後も活動に力を入れ、評価センターの利用拡大に努める。

(3) 受託・共同研究

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）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の推進も目指した。

２．平成 30 年度の研究成果

(1)　食品機能性評価技術センター

(1)-1 動物とヒトのシームレス研究

(1)-1　自然薯ムカゴの機能性解析：動物実験

本研究はヒト試験で得られた結果を基に、動物でその作用メカニズムを明らかにする取り組みの例である。

これまでの基礎研究では代謝の要である肝臓に対する影響を明らかにし、ヒト試験においても同様の作用を見出している。一方、ヒト試験において、腸内細菌叢の変化の兆しを見出したことから、腸管に着目した作用とそのメカニズム解明のための研究に着手した。

本研究から、脂肪負荷時の自然薯ムカゴ摂取が小腸の遺伝子発現および腸内細菌に影響することが明らかとなった。小腸の遺伝子発現では免疫関係の遺伝子発現の変動が検出され、高脂肪と自然薯ムカゴの同時摂取は高脂肪による免疫関連遺伝子発現の低下を解消するように遺伝子発現を変動させた。このことから、自然薯ムカゴ摂取が高脂肪による腸管免疫の低下を抑制すると示唆された。また、自然薯ムカゴ摂取が動物の腸内細菌にも影響していたことから、摂取されたムカゴ成分がある種の細菌の生育を促進、あるいは、抑制することによって高脂肪の影響を解消する方向に作用すると考えられた。

小腸は栄養吸収の主要部位であり、遺伝子発現では栄養成分に対する応答に関与する遺伝子も改善方向に変動していたことから、吸収の段階でムカゴ摂取の効果は現れていると推察された。これまでの肝臓に対する効果と今回の結果を考慮すると、自然薯ムカゴの摂取は代謝のみならず免疫を含む生体機能を調節する可能性が示唆された。

(1)-2 メタボリックシンドロームへの作用から脳機能への作用まで

(1)-2-1　脳機能評価方法の導入：動物実験

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。

また、これらの方法については、より微細な変化を検出するために、高精度化の検討も重ねている。現在、認知、不安様行動測定について手法の改良を行い、これまでの手法よりもさらに詳細な解析とかつ顕著な差異の検出に成功しており、今後も他の行動測定方法についても高精度化を図る。

(1)-2-2　脳機能評価方法の導入：ヒト実験

ヒトを対象とした試験において、食品の単回摂取で脳機能（テスト成績や疲労度）の差異を検出可能であることを示し、脳機能に対する作用を明らかにするためのヒト試験の基盤を構築した。当グループでは、動物を対象とする脳機能測定のための手法の高精度化を検討しており、食品摂取によるわずかな差の検出を試みている。これまでは主にメタボリックシンドロームへの作用についての研究を積み重ねてきた実績があるが、脳機能に関しても同様に動物を対象とする試験（主にメカニズム解明）とヒト試験（現象）とを組み合わせ、両者を行き来しながら評価を進めていくことで、より効率的に、かつより詳細に食品の機能性を明らかにすることができると確信している。

(1)-3 未病改善食品の評価技術の開発（未病マーカー）

(1)-3-1　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。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、予備的な結果を得た。さらにその解析について検討を行い、細胞種毎のクラスター形成と飼育条件の差異の検出に至った。

(1)-3-2 生体ガス分析を利用した食品機能性の評価系の高精度化

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、食品機能性評価マーカーとして利用することを目指した。現時点で、食餌のわずかな組成変化に応答する変化を検出するに至っており、今後、さらなる精度化に努める。

(2) 地域イノベーション戦略支援プログラム事業ー機器の共用化

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）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、本グループの研究員も従事し、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、情報収集、開発研究を進めている。

また、平成30年3月に、本グループの研究手法を基盤とする「ワンストップ型食品機能性評価サービス」が神奈川県ME-BYO BRANDに認定された。今後、周知を図り、評価センターでの食品機能性評価の受託あるいは共同研究拡大を目指す。

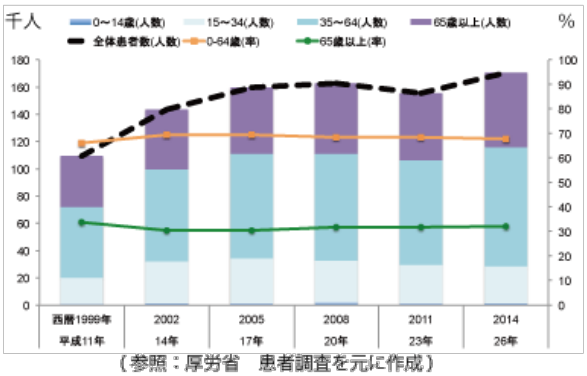
食品素材を対象とした脳機能評価系の導入

嶋田　耕育

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。

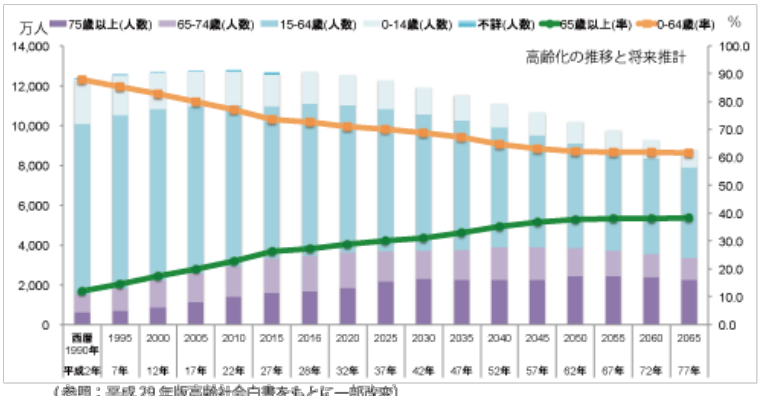
このように多様な効果を有し、穏やかな効果が見込まれる食品の機能性成分は、今後社会問題として憂慮されている超高齢化や深刻なストレス社会の分野においても、その効果を期待されている。未曾有の高齢化社会の到来に伴い、アルツハイマー病などに代表される認知症疾患の推定有病率の増加が危惧されている(図 1)。一方高齢化因子以外において、全年代を通してストレス起因性の疾患も近年増加傾向にある(図 2)。益々進む高齢化社会において認知機能低下を予防する効果、また深刻なストレス社会においてストレス軽減・予防効果、身体ロコモーション向上機能を有する食品機能性素材の探索は、生活の質(QOL)の向上を目指す上でも重要な課題である。食品によるこのような機能の多くは、食品ポリフェノールに代表される多面的作用によってその効果を発揮すると考えられている。しかしこれらの効果を検討する為には培養細胞を対象とする実験のみで評価することは困難である。一方で、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



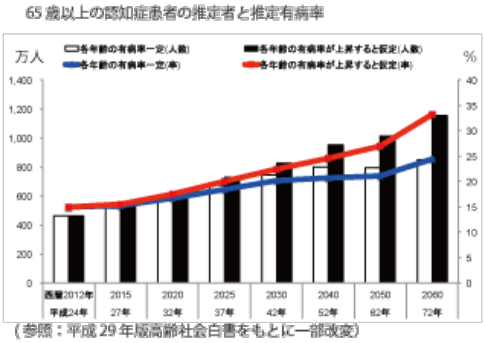
（参照：厚労省　患者調査を元に作成）

図 2 : ストレス関連性神経症性障害（躁鬱含む）の年次患者推移

などの複雑な機構に対する機能性効果を検証することが可能な重要なツールである。現在、薬物(医薬品など)の効果を対象とした動物実験系がいくつか存在し、脳機能、身体ロコモーション機能、ストレス抑制効果の検出のための検討が進められている。上記のような動物を対象とした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することによってなんらかのストレス起因性疾患を誘起するモデルが多い。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、作用点が複数存在し、また全体として緩やかな効果を期待す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、食品機能性成分による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(高侵襲ストレス)ものが多く使用されている(図３)。また高侵襲ストレス負荷を長期間や複数回もしくは複数の組み合わせで動物に対して実施する場合、従事する実



（参照：平成 29 年版高齢社会白書をもとに一部改変）



（参照：平成 29 年版高齢社会白書をもとに一部改変）

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

験者への負担も大きく、操作が煩雑となることから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(低侵襲ストレス)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。

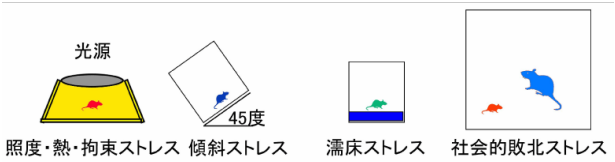


図 3：モデル動物作出に用いられる一般的なストレス源

以上のことから脳機能、身体ロコモーション機能、ストレス抑制効果を期待する食品や食品素材の探索を実現するためには、『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食品機能性解析を用いて、食品または機能性成分の脳機能を含めた網羅的・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　行動試験の導入（脳機能）

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。我々は複数の行動試験を実施し、総合的な行動指標の評価を目指している。複数の行動試験を実施するにあたり、既存の様々な行動試験項目から精神的・肉体的に負荷の少ない試験を選択する必要がある。このような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及び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評価する新規物体認識試験、④マウスの社会性行動の評価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精神的・肉体的への負荷は低く、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て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。

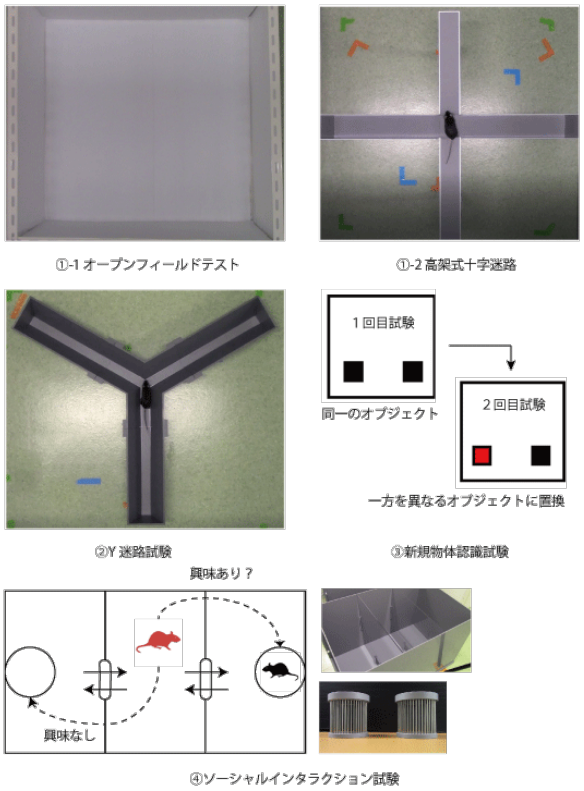


図 4：行動試験の導入

２．２　行動試験の導入（身体ロコモーション）

身体ロコモーションの評価として運動機能を測定する以下の２つの装置の導入を進めた。①マウス四肢筋力測定装置、②行動量測定装置(図５)。これらの装置を用いた測定はマウスに別段負荷をかけることなく連続的もしくは経時的な測定が可能である。これらの機器を用いて食品機能性成分による運動・身体機能への影響を評価をす

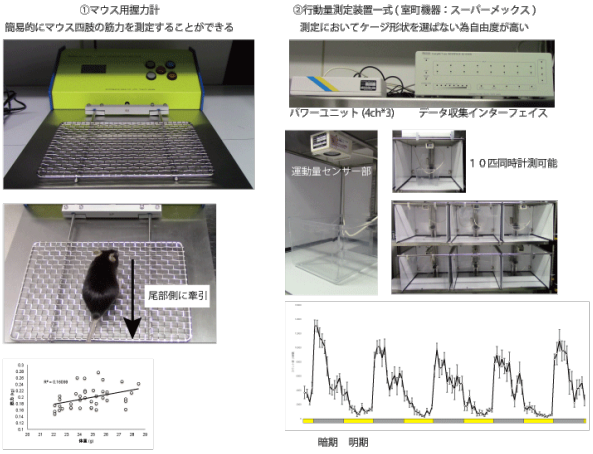


図 5：運動・身体機能測定装置の導入

べく現在、稼働に向け予備検討を鋭意重ねている。

２．３　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、室内騒音度など)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 6)。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、室内騒音度など)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。

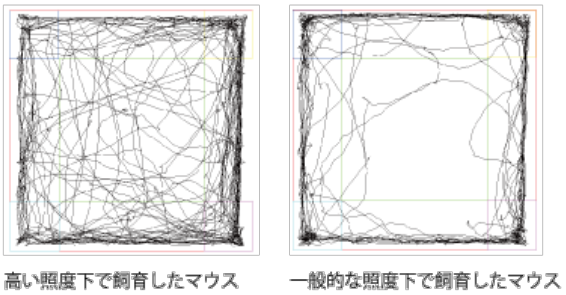


図 6：飼育環境の違いによる行動様式（オープンフィールドテスト）の変化

２．３　低侵襲ストレス負荷動物モデルの構築

食品による脳機能、身体ロコモーション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を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、低侵襲ストレスではあるが、短期間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、低侵襲ストレス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（図 7）。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実施している。

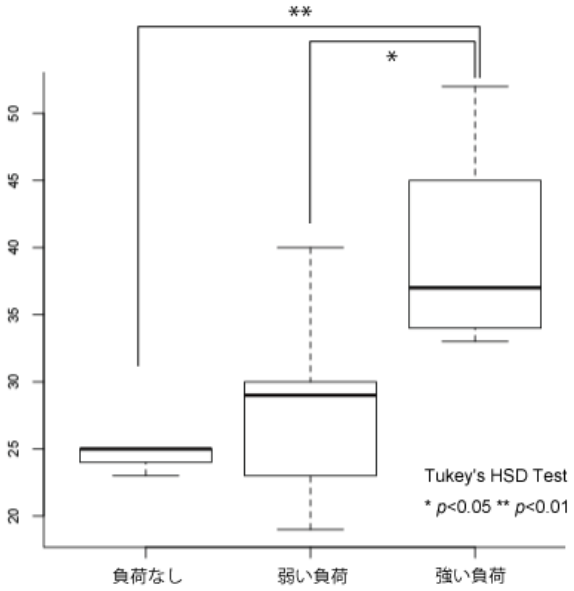


図７：負荷の異なるモデルマウスによる行動様式（Y 路迷路）の変化

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代謝ストレス、精神的ストレス抑制効果や緩和作用を期待するものである。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。我々はまず行動試験法自体において精神的・肉体的に負荷の少な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脳機能評価系を確立した。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環境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”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、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ストレス抑制・緩和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の解明にもつながることが期待される。我々は比較的低い精神ストレス源を短期間マウスに負荷することで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ストレス負荷に起因する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. F.J 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)

腸における自然薯ムカゴ投与の影響

食品機能性評価グループ
篠﨑　文夏

１．　はじめに

自然薯 *Dioscorea japonica* は日本に現存するヤマノイモ類の中で唯一の日本原産種で、8 世紀に編纂された出雲国風土記に登場するくらい古くから食べられている食物である。神奈川県では伊勢原市を中心とした地域で栽培されている。

通常は根の部分をイモとして食べる。粘りが強いことや、皮が非常にうすく皮ごと食べられるという特徴がある。食品としての自然薯は滋養強壮・血糖安定などに効果があるとされるが、その機能性については伝承によるものが多く、科学的エビデンスは乏しい。また、自然薯は通常食べる根の部分の他に葉の根元にできる零余子（ムカゴ）（図 1）も食用である。ムカゴも古くから親しまれている食材である。生産者の方からムカゴを摂取した翌日の体調が良いとの声を聞き、また、ムカゴの機能性に関してはほぼ事例がなかったことから、当グループではムカゴに注目して研究してきた。

図1 自然薯ムカゴ

これまでの基礎研究では代謝の要である肝臓に対する影響を明らかにしてきたが、本研究では摂取し消化された成分を体内に取り込むための主な器官である小腸をターゲットとした。

１．１　これまでの研究

ムカゴの機能性を探索するにあたり、*in vitro* の系で機能性を有する可能性を調べた上で、*in vivo* の系で摂取後、消化され体内に吸収された際の影響を調べた。

１．１．１　栄養成分および抗酸化能

自然薯ムカゴは皮ごと加熱して食べることが多いため、まず自然薯ムカゴを皮ごと加熱後凍結乾燥し粉末化したものについて栄養成分を測定した。その結果、カロテンやミネラルが多いことがわかった。また、ポリフェノールが比較的多く含まれ、粉 100 グラムあたり 680ｍｇであった。

ポリフェノール含量が多い場合には抗酸化活性が高いと言われていることから、生ムカゴと茹でたムカゴを用いて、抗酸化能として活性酸素除去能を測定したところ、生ムカゴの方が茹でムカゴよりも活性酸素除去能が高いが、茹でたムカゴでもキャベツくらいの活性酸素除去能があった。

以上、*in vitro* の結果から自然薯ムカゴは機能性食材の候補であることが推測された。次に、*in vivo* での機能性を検討した。

１．１．２　肝臓のトランスクリプトーム解析

マウスに高脂肪餌を与え、代謝負荷を与えた場合の肝臓の遺伝子発現変動を調べた。階層的クラスター解析では、おおまかにそれぞれの餌ごとに集団を形成していたことから、摂取する餌の違いが肝臓の遺伝子発現に影響していることが明らかとなった。

高脂肪負荷によって発現変動した遺伝子を通常の状態に近づける方向に変動した遺伝子を改善変動遺伝子として抽出した。それらの遺伝子を Gene Ontology に基づく生物学的機能性で分類したところ、脂質代謝に関わる遺伝子が多く、中でもステロイド生合成に関連するものが改善していることがわかった。ステロイド生合成経路の遺伝子は高脂肪負荷によって発現が上昇するが、自然薯ムカゴを同時に摂取すると高脂肪群よりもそれらの遺伝子発現が低かった。以上の結果から、自然薯ムカゴの摂取は肝臓における高脂肪負荷によるステロイド生合成の亢進を抑制する可能性が示唆された [1,2]。

２．　実験と結果

２．１．　材料と方法

２．１．　１　試料作製

本実験では神奈川県伊勢原市産の自然薯ムカゴを使用した。自然薯ムカゴの粉化は神奈川県農業技術センターで以下の手順で行われた。洗浄したムカゴはコンビオーブン（フジマック FCE-C）にて 100℃で 10 分間スチーム処理した後、圧縮粉砕した。その後、凍結乾燥し、石臼型粉砕器で冷却しながら粉末化した。

２．１．　２　動物実験

動物は C57BL6J 雄性マウスとした。マウスは 1 週間通常脂肪餌（LFD：脂質エネルギー比 10%）で環境馴化し、3 群に分けた。試験餌は LFD、高脂肪餌（HFD：脂質エネルギー比 45％）、高脂肪餌にムカゴ粉を添加した餌（HFD+P）の 3 種類用意し、4 週間または 8 週間飼育した。

ムカゴ粉はαコーンスターチと置き換えて５％となるように添加した。解剖前日は一晩絶食し、麻酔後採血および採材を行った。採材したサンプルは使用時まで－80℃で保存した。飼育期間中の餌と水は自由摂取とし、毎日体重測定と摂食量を測定した。動物実験は実験動物中央研究所の承認を得て実施した。

２．１．　３　遺伝子発現解析

採材した小腸からトータル RNA を抽出し、Affymetrix 社の GeneChip™ Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。得られた CEL データは正規化し、階層的クラスター解析を行った。また、LFD 群と HFD 群、HFD 群と HFD+P 群で二群間比較を行い、それぞれ変動遺伝子を得た。LFD 群と HFD 群の比較で発現が変動した遺伝子で、HFD 群と HFD+P 群の比較で HFD+P 群の方が LFD 群に近くなるように変動した遺伝子（LFD＜ HFD かつ HFD＞HFD+P、LFD＞ HFD かつ HFD＜ HFD+P）を“改善変動遺伝子”として抽出した。また、それらの変動遺伝子がどのような機能を有しているかを Gene Ontology に基づく生物学的機能で分類によって調べた。

２．１．　４　腸内菌叢解析

自然薯ムカゴにはオリゴ糖が多く含まれ腸内環境に影響を与えると推測されたため、試験餌を８週間与えたマウスから大腸内糞を回収し、次世代シーケンス解析による腸内菌叢解析を行った。取得したデータは、菌属レベルの占有率を算出し、三群間で比較した。

２．２．実験結果

２．２．　１　小腸の遺伝子発現

ムカゴ摂取は飼育期間中の体重増加や総摂取エネルギー量に影響しなかった。

階層的クラスター解析の結果、各群でクラスターを形成しており、群によって遺伝子発現に特徴があると考えられた（図２）。改善変動遺伝子を GO TERM 分類後、FDR 補正 p-value<$1x10^{-5}$ で階層図を作成し、最下層の GO Term を抽出したところ、代謝（脂肪酸代謝プロセス、小分子生合成プロセス）、制御（細胞内シグナルトランスダクション制御、細胞接着制御、獲得免疫応答制御など）、また、応答（バクテリアに対する応答、内因性刺激に対する応答、サイトカイン刺激に対する細胞応答、栄養レベルに対する応答など）が多いことがわかった（表１）。また、遺伝子発現変動の方向性を調べると、高脂肪負荷によって低下した免疫関連遺伝子がムカゴ摂取群では逆に変動していた。

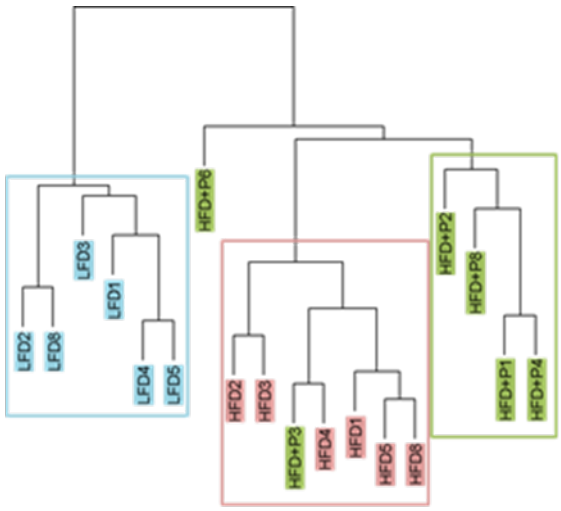


図２　階層的クラスター解析
LFD:　通常脂肪群, HFD:　高脂肪群、, HFD+P:　高脂肪ムカゴ群

表1　改善遺伝子のGO Term分類

Term	Count
fatty acid metabolic process	48
small molecule biosynthetic process	53
negative regulation of intracellular signal transduction	59
regulation of cell adhesion	70
regulation of adaptive immune response	28
regulation of B cell activation	25
positive regulation of apoptotic process	63
positive regulation of lymphocyte activation	35
regulation of inflammatory response	38
regulation of lymphocyte proliferation	32
negative regulation of apoptotic process	83
positive regulation of cell proliferation	84
homeostatic process	136
response to bacterium	62
response to endogenous stimulus	132
cellular response to cytokine stimulus	59
cellular response to oxygen-containing compound	89
response to nutrient levels	51
response to decreased oxygen levels	41
immunoglobulin mediated immune response	22
cell-cell adhesion	113
cell migration	109

FDR補正p-value<$1x10^{-5}$で階層図を作成した際の最下層を抽出

以上の結果から、高脂肪負荷時のムカゴ同時摂取は小腸遺伝子発現に影響することが明らかとなった。また、ムカゴ摂取によって高脂肪負荷による影響が改善された遺伝子は脂質代謝や免疫に関与するものが多く、ムカゴ摂取は小腸では代謝のみならず免疫にも大きな影響を与えると示唆された。

２．２．　２　腸内菌叢解析

大腸内糞の菌叢解析を実施した結果、顕著ではないが菌の多様性や均一性がムカゴを摂取した群で高い傾向にあった。また、主成分分析を行ったところ、高脂肪ムカゴ摂取群が通常脂肪および高脂肪群とは異なる分布をし、それぞれの群の摂取物が腸内細菌に影響していると考えられた（図３）。また、属レベルでの菌の占有率を比較すると図４に示すように、各群で腸内細菌の占有率が異なってお

り、ムカゴ摂取群で占有率が有意に高くなる、または、低くなる菌があった。変化した中には有用であると推定される細菌の仲間も含まれていたことから、生体の健常性に貢献すると示唆された。

３．　考察

以上、高脂肪負荷時の自然薯ムカゴ摂取が小腸の遺伝子発現および腸内細菌に影響することが明らかとなった。小腸の遺伝子発現では免疫関係の遺伝子発現の変動が検出され、高脂肪と自然薯ムカゴの同時摂取は高脂肪による免疫関連遺伝子発現の低下を解消するように遺伝子発現を変動させた。このことから、自然薯ムカゴ摂取が高脂肪による腸管免疫の低下を抑制すると示唆された。また、自然薯ムカゴ摂取が腸内細菌にも影響していたことから、摂取されたムカゴ成分がある種の細菌の生育を促進、あるいは、抑制することによって高脂肪の影響を解消する方向に作用すると考えられた。

小腸は栄養吸収の主要部位であり、遺伝子発現では栄養成分に対する応答に関与する遺伝子も改善方向に変動していたことから、吸収の段階でムカゴ摂取の効果は現れていると推察された。これまでの肝臓に対する効果と今回の結果を考慮すると、自然薯ムカゴの摂取は代謝のみならず免疫を含む生体機能を調節する可能性が示唆された。

【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

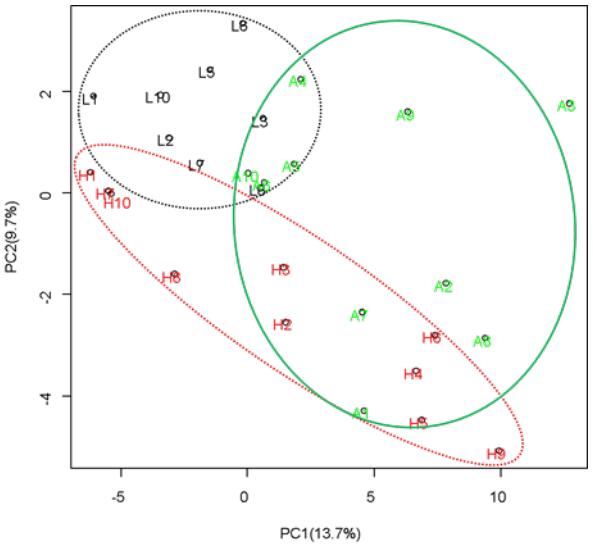


図3 主成分分析
L:通常脂肪群、H: 高脂肪群、A: 高脂肪ムカゴ群

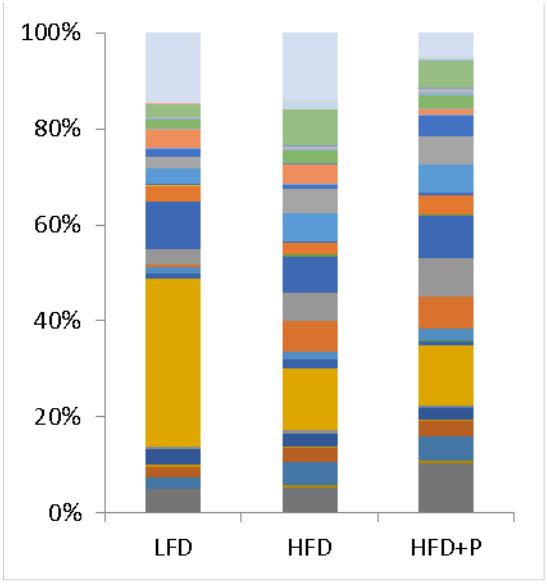


図4 菌属占有率
LFD:通常脂肪群、HFD: 高脂肪群、HFD+P: 高脂肪ムカゴ群

食品機能性評価研究　－脳機能評価

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。これまでの研究対象の多くは、メタボリックシンドロームの緩和・改善作用を期待し、その作用メカニズム等を明らかにすることを目指すものであった。一方、昨今ではメタボリックシンドロームに加えて、脳や運動機能に対する作用への期待も高まっている。例えば、機能性表示食品には、体脂肪等に加えて記憶、ストレス、疲労、関節といったキーワードが並ぶ。食品の多岐に亘る機能性について少しずつ解明し、その情報を活用して生活に取り入れることで、健康寿命の延伸や生活の質（QOL）の向上に繋がると期待される。本稿では、食品の機能性評価研究の一環として、脳機能、なかでもストレスや疲労に対する作用を評価する実験系の確立に向けての取り組みを紹介する。

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。

KISTEC ではこれまで、主にメタボリックシンドロームやその予備軍を想定した条件下において、食品による改善作用とその作用メカニズムを明らかにしてきた。いずれもトランスクリプトーム解析（網羅的な遺伝子発現解析）により実施してきた。例えば、桑の葉の脂質代謝に及ぼす作用 (1, 2)、サラシア属植物の免疫に及ぼす作用 (3, 4)、ビフィズス菌の脂質代謝に及ぼす作用(5, 6)、短鎖フルクトオリゴ糖の脂質代謝に及ぼす作用 (7)、アミノ酸混合液の作用 (8)、栄養素の一つである鉄の摂取量の違いが身体に及ぼす作用 (9, 10)などである。さらに、食品の機能性成分について、その効果を発揮する至適な量があることも明らかにした。これはメープルシロップの機能性評価研究において見出された（11, 12, 13）。

１．３　脳機能と食品

私たちは日常生活の中で様々なストレスを受けている。例えば厚生労働省の平成 28 年国民生活基礎調査の概況によると、世代に関わらず日本人の約半数がストレスを抱えながら生活をしているとあることからも、ストレスは非常に身近にあり、認識されていることがわかる。ストレスは必ずしも身体にとって負の影響を及ぼすものではなく、うまく活用することで健康維持に貢献するものでもあるが、それを逸脱するような過度のストレスや継続的なストレス負荷によって健康を損なうものでもある。また、ストレスと密接な関係にある疲労についても 2004 年の文部科学省の大阪地区を対象にした調査によれば、半数以上が疲労を感じているという結果であった。疲労は作業効率の低下やひいては病気の原因にもなり得る。すなわち、ストレスや疲労は脳の未病状態であり、その軽減は現代社会において急務である。そのためには生活習慣の改善が不可避であり、そこには食事が大いに貢献すると期待される。

本稿では、ヒトを対象とした食品の疲労・ストレス軽減作用の検出を試みた研究成果について報告する。

２．方法と結果

２．１ 方法

２．１．１ 試験食の選定

試験食として、複数の素材候補について調査を行い、主に海外にて動物およびヒトを対象とする脳機能評価研究が進んでいる食品を 1 つ、脳機能評価の研究の基礎的データが報告されている和食素材の食品を 1 つ選抜した。それぞれの食材に対してプラセボ食を設定し、プラセボ食と試験食との比較にて機能性を評価した。

２．１．２ 脳機能テストの作成

今回の試験では、脳機能テスト（計算や提示条件への反応）を反復実施し、それに伴う疲労度の変化と成績を測定

することにした（図 1）。脳機能テストは、各小課題 3 つから構成される大課題 3 つとし、大課題ごとに独立した試験対象者を募集して実施した。脳機能の適切な評価をするためには、試験問題や内容を試験対象者の母国言語に最適化して設定する必要があるため、いずれも日本人を対象に実施した実績のある脳機能テストであることを条件に選抜し、本試験に合わせて編成した。

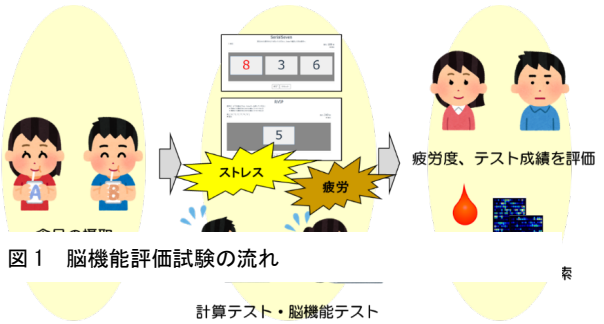


図 1　脳機能評価試験の流れ

2．1．3 試験実施

試験方法については KISTEC 立案とし、実施機関は東海大学とする共同研究にて実施した。本試験は、単回摂取の効果を測定すること、そのため効果を長期にわたって持ち越すことがないと想定されること、試験成績には個人差が大きいことが予備テストにより示されていたことから、単回摂取の二期クロスオーバー比較試験として実施した。長期的な持越しは想定されないものの、ウォッシュアウト期間として、2 回の試験の間を 3 日以上と設定した。

1 つの大課題に対し、20 名を集め、3 つの独立した大課題を設定、食品素材を 2 つ設定したために、20（名）×3（課題）×食材（2 つ）の合計 120 名を対象とする試験とした。

介入試験実施機関である東海大学では、伊勢原キャンパスおよび湘南キャンパスにて学生を対象に募集を行い、試験説明に同意を得た方に参加いただいた。

本試験を通して得られたデータを KISTEC にて集計し、東海大学の統計解析責任者を中心とする担当チームにて結論の確認を行った。

2．2 結果

両食材について、それぞれプラセボに対して有意に変動する評価項目が見出された。プラセボに対して優位に変動した項目について黄色でハイライトする（表 1）。すなわち、複数の項目において、試験食摂取によりプラセボ食摂取時とは異なる成績であることが示された。なお、食品 A と食品 B を比較した場合、プラセボ食摂取時と試験食摂取時とで有意な差を招じる試験項目が異なることも示された。ここから、食品によって、その機能を評価するのに適した脳機能テストがあることが示唆された。今後は、脳機能への作用を評価する場合に、どのような種類の食品にどの試験方法が適しているかを明らかにするとともに、血液トランスクリプトーム解析との組み合わせから脳機能評価マーカーの探索を試みる。

表 1　脳機能テスト結果

TEST	項目	食品A	食品B
TEST_A	項目A		
	項目B		
	項目C		
	項目D		
	項目E		
	項目F		
	項目G		
	項目H		
	項目I		
	項目J		
	項目K		
	項目L		
	項目M		
	項目N		
	項目O		
	項目P		
	項目Q		
	項目R		
	項目S		
	項目T		
	項目U		
TEST_B	項目V		
	項目W		
	項目X		
	項目Y		
	項目Z		
	項目AA		
	項目AB		
	項目AC		
	項目AD		
	項目AE		
	項目AF		
	項目AG		
	項目AH		
	項目AI		
	項目AJ		
	項目AK		
	項目AL		
	項目AM		
	項目AN		
TEST_C	項目AO		
	項目AP		
	項目AQ		
	項目AR		
	項目AS		
	項目AT		
	項目AU		
	項目AV		
	項目AW		
	項目AX		
	項目AY		
	項目AZ		
	項目BA		
	項目BB		
	項目BC		
	項目BD		
	項目BE		
	項目BF		
	項目BG		

3．考察と今後の展望

ヒトを対象とした試験において、食品の単回摂取で脳機能（テスト成績や疲労度）の差異を検出可能であることを示し、脳機能に対する作用を明らかにするためのヒト試験の基盤を構築した。

当グループでは、動物を対象とする脳機能測定のための手法の高精度化を検討しており、食品摂取によるわずかな差の検出を試みている。これまでは主にメタボリックシンドロームへの作用についての研究を積み重ねてきた実績があるが、脳機能に関しても同様に動物を対象とする試験（主にメカニズム解明）とヒト試験（現象）とを組み合わせ、両者を行き来しながら評価を進めていくことで、より効率的に、かつより詳細に食品の機能性を明らかにすることを目指す。

このプロジェクトの一部は、JSPS 科研費 15H05346、18K05514 の助成を受けて実施されました。

【参考文献】

1．Kobayashi Y, Miyazawa M, Araki M et al. (2015)

Effects of Morus alba L. (Mulberry) Leaf Extract in Hypercholesterolemic Mice on Suppression of Cholesterol Synthesis. J Pharmacogn Nat Prod 1:113.

2. Kobayashi Y, Miyazawa M, Kamei A et al. (2010) Ameliorative effects of mulberry (Morus alba L.) leaves on hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet: induction of fatty acid oxidation, inhibition of lipogenesis and suppression of oxidative stress. Biosci Biotechnol Biochem 74:2385-2395
3. Oda Y, Ueda F, Utsuyama M et al. (2015) Improvement in Human Immune Function with Changes in Intestinal Microbiota by Salacia reticulata Extract Ingestion: A Randomized Placebo-Controlled Trial. PLoS One 10:e0142909.
4. Oda Y, Ueda F, Kamei A et al. (2011) Biochemical investigation and gene expression analysis of the immunostimulatory functions of an edible Salacia extract in rat small intestine. BioFactors 37:31-39
5. Kondo S, Kamei A, Xiao JX et al. (2013) Bifidobacterium breve B-3 exerts metabolic syndrome-sippressing effects in the liver of diet-induced obese mice: a DNA microarray analysis. Beneficial Microbes 4:247-251
6. Kondo S, Xiao JZ, Satoh T et al. (2010) Antiobesity effects of bifidobacterium breve strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. Biosci Biotechnol Biochem 74:1656-1661
7. Fukasawa T, Kamei A, Watanabe Y et al. (2010) Short-chain fructooligosaccharide regulates hepatic PPARa and FXR target gene expression in rats. J Agric Food Chem 58:7007-7012
8. Shinozaki F, Abe T, Kamei A et al. (2016) Coordinated regulation of hepatic and adipose tissue transcriptomes by the oral administration of an amino acid mixture simulating the larval saliva of Vespa species. Genes Nutrition 11:21.
9. Kamei A, Watanabe Y, Kondo K et al. (2013) Influence of a short-term iron-deficient diet on hepatic gene expression profiles in rats. PLoS One 8:e65732
10. Kamei A, Watanabe Y, Ishijima T et al. (2010) Dietary iron deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. Physiol Genomics 42:149-156.
11. Watanabe Y, Kamei A, Shinozaki F et al. (2011) Ingested Maple syrup evokes a possible liver-protecting effort －physiologic and genomic investigations with rats. Biosci Biotechnol Biochem 75:2408-2410
12. Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F et al. (2015) Administration of a maple syrup extract to mitigate their hepatic inflammation induced by a high-fat diet: a transcriptome analysis. Biosci Biotechnol Biochem 79:1893-1897.
13. Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F et al. (2017) Quantitative deviating effects of maple syrup extract supplementation on the hepatic gene expression of mice fed a high-fat diet. Mol Nutr Food Res 61.

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、嶋田　耕育、亀井　飛鳥、篠﨑　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)。ヒトにおいて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用な細胞を貪食する。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。

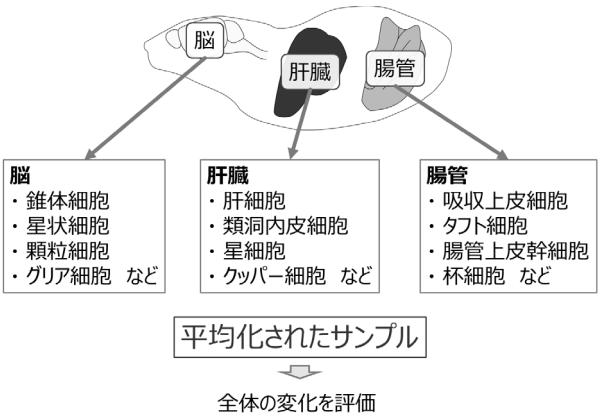


図 1 臓器・組織を構成する細胞の種類

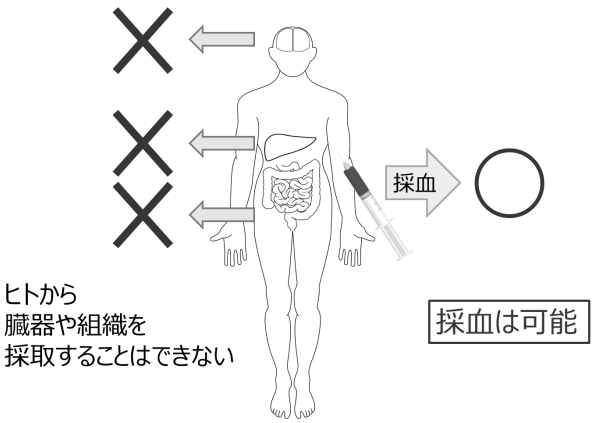


図 2 ヒトにおいて用いることが容易なサンプル

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/mm³	
白血球	顆粒球	好中球	白血球のうち 30〜70%	0.5 〜 1 万/mm³
		好酸球	1〜6%	
		好塩基球	0〜3%	
	リンパ球	Tリンパ球	30〜40%	
		Bリンパ球		
	単球マクロファージ		3〜10%	
赤血球			370〜570 万/mm³	

表 2 白血球の単一細胞補足率

	単一細胞	死細胞	≧ 2細胞	細胞なし	生細胞の割合 (%)
1回目 (条件B)	66	1	23	7	67.7
2回目 (条件A)	75	8	10	11	69.8
平均値	70.5	4.5	16.5	9.0	68.8

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。

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った。ついで、得られた白血球サンプルから単一細胞への分離を行い、そこで得られたシングルセルについて大規模塩基配列解析を行った。

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
⑦ 大規模塩基配列解析によるデータの取得

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 ㎜^{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。当初は白血球のほかに血小板も多く含むサンプルであったが、遠心分離の条件を検討し、細胞懸濁液の洗浄工程を経ることにより、細胞保存試薬と混和した血液から血小板をほとんど含まない白血球を分離することができた(図 4)。

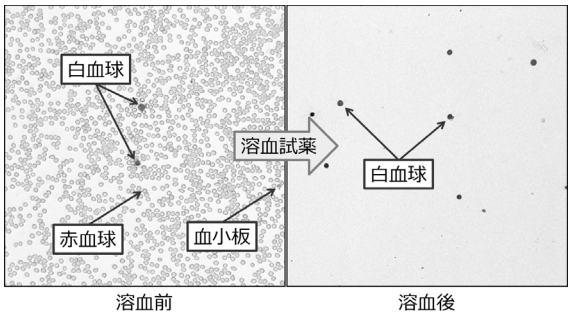


図 4 溶血試薬を用いた血液からの白血球分離の結果。採血した血液では多くの赤血球に囲まれた中にわずかな白血球が認められるが、溶血試薬を加えることで赤血球はなくなり、白血球のみとなった。

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。この実験では異なる飼育条件（条件 A、条件 B）で飼育をしたマウスの血液を用いて、単一細胞の分離と塩基破裂解析を行った。

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。

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 個の小さなチャンバーを通り、それぞれのチャンバーに 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，細胞のあるチャンバ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、細胞のないチャンバーからは、DNA のピークは認められなかった（図 5)。

この塩基配列解析用のサンプルについて大規模塩基配列解析を行い、t 分布型確率的近傍埋め込み法により、個々の細胞をクラスターに分類した。分類の結果、細胞は 3 つのクラスターに分けられ、クラスター1 およびクラスター2 は、飼育条件 A および飼育条件 B 由来の細胞がほぼ均一に分散する集団であることが明らかとなった（図 6)。一方クラスター3 に分類される細胞は、飼育条件 A の方が飼育条件 B よりも多く（図 7)、この特徴のあるクラスター3 について、現在解析を行っている。

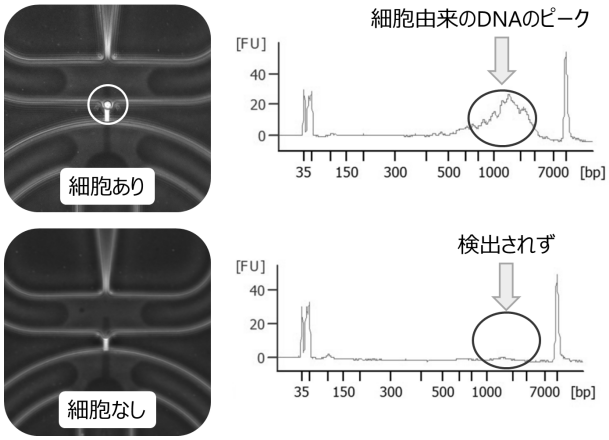


図 5 細胞由来 DNA の確認

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、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。そして、ここで得られた塩基配列用のサンプルについて解析を行ったところ、特徴のあるクラスターを得ることができた。

今後はヒト試験への実用化に向けて、飼育条件の違いや食品成分の効果などを示す普遍的なマーカーの選定を行うとともに、さらなる解析を進め、新たなマーカーとしての可能性を探る。

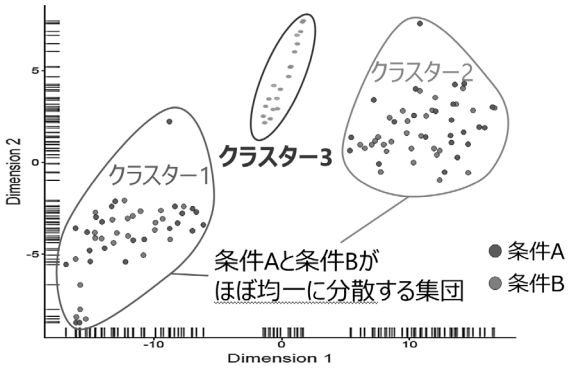


図 6 得られたーデータからクラスターに分類した結果

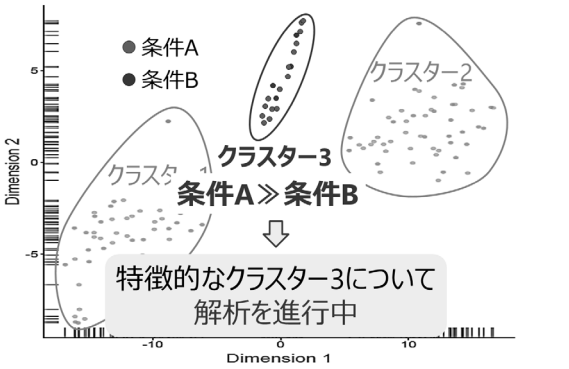


図 7 得られたーデータからクラスターに分類した結果

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」により実施されました。

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。

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
		リアルタイムPCR
	解析	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

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：2,328 時間
- 平成 30 年度共用時間実績：3,400 時間

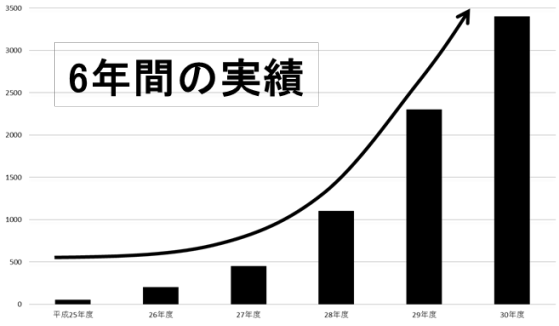


図３　共用化実績

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. Ogawa, M., Nagai, T., Saito, Y., Miyaguchi, H., Kumakura, K., Abe, K., and Asakura, T. Short-term mastication after weaning upregulates GABAergic signalling and reduces dendritic spine in thalamus. *Biochem Biophys Res Commun.* 498(3):621-626 (2018)

2. Tanaka, M., Yasuoka, A., Yoshinuma, H., Saito, Y., Asakura, T., and Tanabe, S. Seasoning ingredients in a medium-fat diet regulate lipid metabolism in peripheral tissues via the hypothalamic-pituitary axis in growing rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 82(3):497-506. (2018)

3. Yoshinaga, K., Nakai, Y., Izumi, H., Nagaosa, K., Ishijima, T., Nakano, T., and Abe, K. Oral Administration of Edible Wakame Seaweed Undaria pinnatifida (Wakame) Modifies Glucose and Lipid Metabolism in Rats: A DNA Microarray Analysis. *Mol Nutr Food Res.* 62(12) e1700828 (2018)

4. Hori, T., Ouchi, M., Otani, N., Nohara, M., Morita, A., Otsuka, Y., Jutabha, P., Shibasaki, I., Matsushita, Y., Fujita, T., Fukuda, H., and Anzai, N. The uricosuric effects of dihydropyridine calcium channel blockers in vivo using urate under-excretion animal models. *J Pharmacol Sci.* 136(4):196-202 (2018)

5. Izuchi, R., Ishijima, T., Okada, S., Abe, K., and Nakai, Y. Hepatic fatty acid biosynthesis in KK-Ay mice is modulated by administration of persimmon peel extract: A DNA microarray study *Food Sci Nutr* 6(6):1657-1663 (2018)

6. Kasahara, Y., Sakurai, T., Matsuda, R., Narukawa, M., Yasuoka, A., Mori, N., Watanabe, H., Okabe, T., Kojima, H., Abe, K., Misaka, T., and Asakura, T. Novel indole and benzothiophene ring derivatives showing differential modulatory activity against human epithelial sodium channel subunits, ENaC β and γ. *Biosci Biotechnol Biochem.* 83(2):243-250 (2018)

7. Shimazu, K., Fukumitsu, S., Ishijima, T., Toyoda, T., Nakai, Y., Abe, K., Aida, K., Okada, S., and Hino, A. The Anti-Arthritis Effect of Olive-Derived Maslinic Acid in mice is Due to its Promotion of Tissue Formation and its Anti-Inflammatory Effects. *Mol Nutr Food Res.* 63(3):e1800543 (2018)

【総説】

1. Abe, K., Misaka, T. Food functionality research as a new national project in special reference to improvement of cognitive and locomotive abilities. *Biosci Biotechnol Biochem.* 82(4):573-583 (2018)

2. 亀井飛鳥、「次世代機能性農林水産物・食品の開発」の成果と今後の展望、BioJapan2018 SIP 主催セミナー（2018.10.11）JBA 機関紙「B&I」(2018)

3. 篠﨑文夏、廣川隆彦、神奈川県発フードイノベーション 食品の機能性評価と機能性食品の開発、月刊誌 FOOD STYLE 21 (2018)

【口頭発表】

1. 豊田集、石島智子、亀井飛鳥、阿部啓子、岡田晋治、2 型糖尿病モデルマウスにおけるメープルシロップ抽出物の抗炎症作用、第 72 回日本栄養・食糧学会大会（2018 年 5 月 12 日、岡山）

2. Hazuki Maehata, Yodai Kobayashi, Kousuke Shimada, Eri Mitsuyama, Tetsuya Kuhara1, Akihito, Akihito Yasuoka, Takashi Kondo, Keiko Abe and Jin-zhong Xiao Bifidobacterium breve strain A1 has potential to improve cognitive dysfunction in the Alzheimer's disease model mice. IPC (international probiotics conference) 2018（2018 年 6 月 18-21 日、Hungary Budapest）

3. 亀井飛鳥、未病と食品 －食品の機能性評価研究－ 、鹿児島県工業技術センター 研究成果発表会（2018 年 7 月 19 日、鹿児島）

4. 阿部啓子、未病マーカーによる食のイノベーション、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」公開シンポジウム（2018 年 7 月 20 日、東京）

5. 阿部啓子、ILSI 寄付講座の成果、ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」主催シンポジウム 機能性食品科学の基盤から実用化に至る統合的成果と新たな息吹き（2018 年 9 月 18 日、東京）

6. 阿部啓子、パネルディスカッション“ 食品科学の産業的新展開 ”、ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」主催シンポジウム 機能性食品科学の基盤から実用化に至る統合的成果と新たな息吹き（2018 年 9 月 18 日、東京）

7. 亀井飛鳥、ヒトを対象とする食品機能性評価への取り組み、ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」主催シンポジウム　機能性食品科学の基盤から実用化に至る統合的成果と新たな息吹き（2018 年 9 月 18 日、東京）

8. 嶋田耕育、食品の機能性評価　抗メタボリックシンドロームから脳機能活性化へ　基盤研究を中心にして、食品開発展 2018（2018 年 10 月 5 日、東京）

9. 嶋田耕育、食品の機能性評価　抗メタボリックシンドロームから脳機能活性化へ　基盤研究を中心にして、食品開発展 2018 ポスターセッション（2018 年 10 月 3-5 日、東京）

10. 亀井飛鳥、科学的エビデンスに基づいた次世代農林水産物・食品の開発と社会実装事例、BioJapan2018 セミナー（2018 年 10 月 11 日、神奈川）

11. 亀井飛鳥、桑葉の機能性評価、BioJapan2018 ポスターセッション（2018 年 10 月 10-12 日、神奈川）

12. 篠﨑文夏、自然薯ムカゴの生理的機性、BioJapan2018 ポスターセッション（2018 年 10 月 10-12 日、神奈川）

13. Mizuki Honda, Mio Aida, Asuka Kamei, and Hideo Satsu Establishment of a stable NF□B-responsive cell line and analysis of anti-inflammatory food substances 日本動物細胞工学会国際会議(JAACT2018)（2018 年 11 月 8 日、つくば市）

14. 亀井飛鳥、食品の機能性を明らかにするために－研究事例と受託研究のご案内、アグリビジネス創出フェア（展示会）（2018 年 11 月 22 日、東京）

15. 亀井飛鳥、桑葉の機能性評価研究におけるマーカーとしてのトランスクリプトーム解析、JBA 平成 30 年度機能性食品研究会講演会・第 3 回研究会「miRNA と mRNA」（2018 年 12 月 10 日、東京）

16. 亀井飛鳥、食品の機能性評価事例、戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）自然免疫制御技術研究組合第 8 回シンポジウム『未来志向の次世代食品機能性と自然免疫』（2019 年 3 月 15 日、東京）

17. 本田瑞希、亀井飛鳥、相田美緒、薩　秀夫、1-Deoxynojirimycin による抗炎症作用の解析、日本農芸化学会 2019 年度大会（2019 年 3 月 24 日、東京）

18. 家山智子、長谷知輝 、山下玲 、嶋田耕育、濱口毅 、篠原もえ子 、山田 正仁、阿部啓子、小林彰子、ロスマリン酸摂食によるアルツハイマー病発症遅延に関与する血漿マイクロ RNA の探索とその機能の解析、日本農芸化学会 2019 年度大会（2019 年 3 月 26 日、東京）

19. 篠﨑文夏、山下治之、亀井飛鳥、嶋田耕育、野原正勝、荒井綜一、阿部啓子、肝臓遺伝子発現による自然薯ムカゴ粉末および抽出物摂取効果の検証、日本農芸化学会 2019 年度大会（2019 年 3 月 27 日、東京）

20. Keiko Abe, Asuka Kamei, Tsudoi Toyoda, Human intervention trial on maple syrup to evaluate its preclinical effects、the 257th ACS (American Chemical Society) National Meeting（2019 年 3 月 29 日、アメリカ、オーランド）