

研究課題の概要

研究課題名	いわゆる新開発食品等の安全性評価法の開発に資する生体反応メカニズム研究
主任研究者	菅野 純
所属機関	国立医薬品食品衛生研究所
研究成果の概要	<p>新開発食品の出現により「食品は安全」という常識の再検討が加速している。その評価を人ボランティアに頼ることには様々な限界がある。本研究では、食品中の特定の成分が実験動物に及ぼす生体反応から、人体でどの程度(定量的)、どの様(定性的)に影響するかを的確に推定するため、主任研究者らが推進中のトキシコゲノミクス(Percellome)プロジェクトを、国内で多用されるCoQ10、αリポ酸、フォルスコリン及びクルクミンに適用し、マウスに単回或いは反復投与した際の各臓器の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、CoQ10は正常な心臓に対する強心作用、αリポ酸はインスリン様作用及び心臓に対する作用、フォルスコリンは劇物相当の急性毒性及び消化管作用、クルクミンは肝臓に対する酸化ストレス作用等を認めた。これらを既存データベースと比較することで人影響を推定し、健康危惧に関する情報提供を示した。</p>

食品安全委員会 の本研究課題に 対する事後評価・ 総合コメント	<p>主任研究者の提唱するマウスを用いたトキシコゲノミクス(Percellome)を新開発食品等の安全性評価に活用するという当初目標は、概ね達成されたが、本手法を食品健康影響評価へ適用するためには、学術論文の公表が必須である。</p> <p>さらに、今回「健康危惧に関する情報提供」で示された結論は、本手法以外の実験結果を含め総合的かつ慎重に考察し、情報提供すべきである。</p>
------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	いわゆる新開発食品等の安全性評価法の開発に資する生体反応メカニズム研究
主任研究者名	所属： 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部 氏名： 菅野 純（研究課題番号 0607）

○研究要旨

本研究の目的は、食品中の問題となる特定の成分について実験動物での生体反応を観察し、それが人体にどの程度(定量的)、どの様(定性的)に再現されるかを的確に推定する為の、生体反応メカニズムに依拠した研究基盤を構築することにある。このために本研究では、申請者らが推進中のマウスキシコゲノミクス(Percellome プロジェクト)の実験プロトコルを対象食品成分に適用し、遺伝子発現を網羅的に解析することで、生体反応のメカニズムに基礎を置いた生体反応のプロファイリングを行う。具体的には、マウスに化学物質を経口投与した際の、諸臓器での初期の反応を経時的な遺伝子発現変動として、マイクロアレイ技術を用いて網羅的(約 45,000 プローブセット、約 33,000 遺伝子相当)にデータベース化するとともに、得られた遺伝子発現プロファイルを、そのデータベースと比較参照することで人影響の推定情報を得る。以て、安全性評価法に資する基礎を構築する。

天然食品由来の濃縮・抽出等よりなる新開発食品(サプリメント、健康食品を含む)は、その原料が「食経験」に基づく安全性を担保されたものであるとされるため、化学物質や医薬品等の毒性評価体系の領域外に置かれてきたのが実情である。しかし、特定成分について、従来の「食経験」を超えた量を容易に摂取することを可能にするものであることから、新たな健康被害の発生の可能性が想定されるに至り、毒性評価の必要性が出てきた。例えば、タマネギ中の成分による溶血性貧血は動物に対しては有名であるが、人に対しては、起こり得るものの問題視されて来なかった。これが、仮にタマネギの濃縮製剤が何らかの有効性を謳って市場に出回ったとすると、過剰摂取による溶血性貧血の発症が想定される。この様な、成分濃縮による健康被害の危惧は、大豆イソフラボン製剤をはじめ、種々の新開発食品に、特に謳われる効能の関与成分がはっきりしたものにはより明解に、存在し得る。

「食経験」に基づいた食品の安全性の担保は、「①現実的に可能な摂取量の上限」、「②常識的な調理法(水に晒すことや加熱による無毒化など)」、及び「③成分の配合バランス」という、少なくとも三つの要因から成り立っていると考えられる。そして食品由来のサプリメントを含む新開発食品は、たとえ原料が食品であったとしても、この三つが担保されない状況で消費者の口に入れることが可能となる。また、近年、食品や生体内に微量含まれている、場合によっては不純物のような微量成分のうち、ある特定の成分を大量に合成や抽出し、それを主成分とする食品が現れている。これらの製品は、おそらく有害性はないであろうと考えやすい成分のものがあるが、それでも、実際には、推奨摂取量が今までの摂取量に対して膨大であること、及び推奨摂取形態が異なることから、厳密には食経験が無い、あるいは、食経験に基づく安全性の担保が無いのである。

この様なものを対象とした安全性の評価の全てを、人体を用いた「ボランティア実験」に頼ることに幾つかの限界がある。まず、有害性が現れないことを示す実験としての過剰摂取試験を行うことが想定されるが、どの程度の負荷で有害性が現れるかが正確には予測できない点、また、疾病者(患者)、疾病予備軍、乳幼児、胎児、妊婦、老人などの高感受性グループを対象とした試験の実施が困難である点が挙げられる。

他方、ヒトの身代わりとしての実験動物を用いた従来型の毒性試験に頼る安全性評価を食品の成分に当てはめる際には、「安全係数:種差10x個体差10=100」の適用が不合理であるという問題が存在する。この様な方法は、製品の食品としての性質を変えずに含有量を調整できる食品添加物や残留物(残留農薬など)に対しては問題なく機能する。しかし、食品“そのもの”には適応できないのである。食品の場合、まず、評価対象が「主成分」(全体に対する比率の多寡はあるが)であるから、含有量を大幅に変えることができない。そして、現実的には人の推奨摂取量と動物試験での暴露量とがほぼ同じになり、有害性を示す作用量に大きな

差がつかない(マージンがとれない)。先のタマネギを例にとると、錠剤にしなくとも、普通の状態での動物での無作用量を求め、その100分の1を人の許容摂取量上限とした場合、人はタマネギを殆ど食べられないことになる。そうかと言って、実験動物に過剰摂取させて得られた所見をそのまま人に当てはめることも難しい。この2つの問題を言い換えると、食品を対象とした実験動物を用いて毒性試験を行う場合、種差を正確に勘案した上での、安全係数を使わない安全性評価法、が必要となるのである。ここで気づかれることは、食品の有害性評価は、食品添加物や残留物の評価よりも、むしろ、医薬品の評価に近いということである。薬の薬効成分に副作用があるからといって100分の1だけ服用しろ、という結論に至らないのと同じ原理が働くのである。

著者らが推進中の、人間の身代わりとしてのマウスを用いたトキシコゲノミクス(Percellome)プロジェクトを、食品成分に拡大することによって、そこから導かれる生体影響メカニズムからヒト影響の推定情報を獲得する試みが、本研究である。繰り返しになるが「食品」に対しては従来からの「安全係数」を適応する理屈が立たないことから、実験動物とヒトとの種差の分子解明が、今後、動物実験を必要とする新開発食品の安全性評価に関わる直接的な重要課題となり、これは正に Percellome プロジェクトの根源的命題と一致するものである。現段階で、種差を正確に勘案した安全性評価法は開発されていないことから、その開発に向けた生体反応メカニズムに基づいた基礎研究の積み上げを行う研究が健康食品を含む食品の安全確保には必要であり、本研究がこれに当たり、その必要性・妥当性は高いものと考えられる。

本研究では、平成18年度から平成20年度の3年間にわたって、いわゆる健康食品の成分の中で、国内で消費が多く利用者の年齢層も広く、一方で作用機序が不明な点の多い、CoQ10、 α リポ酸、フォルスコリンおよびクルクミンについて検討した。解析結果から、特に健康危惧情報に関することを以下に記載する。CoQ10は正常な心に対し強心作用を有しており、その摂取に際しては今後注意を要し、人での心機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。 α リポ酸は、インスリン様作用が示唆され、加えて心での強制的なエネルギー代謝亢進と酸化ストレスが示唆され、長期摂取による心線維化が懸念され、人での心機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。フォルスコリンでは、文献とは異なり急性毒性が強く劇物相当の物質であり、この際、消化管内の液貯留、下痢、胃内出血が認められ、加えて、大脳皮質における神経伝達の非選択的な興奮と酸化ストレスが示唆され、人での中枢神経機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。クルクミンでは、一般に標榜される抗酸化作用とは逆に、肝での酸化ストレス関連遺伝子の発現変動が低用量群でも認められ、また、いわゆる健康食品としての一日推奨摂取量とのマージン(MOE: Margin of exposure)が狭い(1.8倍)ことから、ヒトにおける有害作用の発現に注意が必要なものと考えられた。このように、それぞれの化学物質について特徴的なプロファイルを得、またこれをデータベースと比較参照することで人影響の推定情報を得ることができた。したがって、食品中の特定の成分についての安全性評価に際し、作用の分子機序の解明を通じた迅速・高精度な本アプローチ手法の基本的な部分は確立されたものと考えられる。

研究成果報告書

研究課題名	いわゆる新開発食品等の安全性評価法の開発に資する生体反応メカニズム研究
主任研究者名	所属： 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部 氏名： 菅野 純（研究課題番号 0607）

1. 研究の概要

本研究の目的は、食品中の問題となる特定の成分について実験動物での生体反応を観察し、それが人体にどの程度（定量的）、どの様（定性的）に再現されるかを的確に推定する為の、生体反応メカニズムに依拠した研究基盤を構築することにある。このために本研究では、申請者らが推進中のマウス・トキシコゲノミクス（Percellome プロジェクト）の実験プロトコルを対象食品成分に適用し、遺伝子発現を網羅的に解析することで、生体反応のメカニズムに基礎を置いた生体反応のプロファイリングを行う。具体的には、マウスに化学物質を経口投与した際の、諸臓器での初期の反応を経時的な遺伝子発現変動として、マイクロアレイ技術を用いて網羅的（約 45,000 プローブセット、約 33,000 遺伝子相当）にデータベース化するとともに、得られた遺伝子発現プロファイルを、そのデータベースと比較参照することで人影響の推定情報を得る。以て、安全性評価法に資する基礎を構築する。

新開発食品の出現により「食品は安全」という常識の再検討が加速している。その理由を整理すると、新開発食品には、食経験に含まれる「現実的に可能な摂取量の上限」、「常識的な調理法（水に晒すことや加熱による無毒化など）」及び「他の成分との配合バランス」という安全弁が利かないからである。そして、その評価を人の「ボランティア実験」に頼ることに様々な限界がある（特に、乳幼児、妊婦、老人等の高感受性グループの取り扱い）。人の身代わりとして動物実験に頼る安全性評価を食品の成分に当てはめる際には、従来の「安全係数：種差 10×個体差 10=100」の適用が不合理であるという問題がある。即ち、食品中の有害成分には、人と動物とで作用量に差が大きいものも多く、例えば、タマネギを例にとると、動物での無作用量の 100 分の 1 を人の上限とした場合、人はタマネギを殆ど食べられないことになる。かといって、安全係数を使わずに実験動物で得た所見をそのまま人に当てはめることも難しい。現段階で、種差を正確に勘案した安全性評価法は開発されていないことから、その開発に向けた生体反応メカニズムに基づいた基礎研究の積み上げを行う研究が必要であり、本研究がこれに当たり、その必要性・妥当性は高いものと考えられる。

Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトにおいては、経口的に摂取した各種の化学物質（一部食品成分を含む）が引き起こす、肝を主体とした諸臓器での初期の反応を遺伝子発現変動としてマイクロアレイ技術を用いて網羅的（約 45,000 プローブセット、約 33,000 遺伝子相当）にデータベース化するとともに、重要と判断されるメカニズムの解析研究を行っている。この標準的な単回投与実験プロトコルの概要は以下の通りである：雄 12 週令 C57BL/6 マウスに、溶媒及び 3 段階の用量にて被検物質を経口単回投与後 2、4、8 及び 24 時間後に検体採取する 4×4=16 群構成、各群 3 匹、1 実験 48 匹規模の実験である。個別別に遺伝子発現プロファイルを得る。

本研究では、平成 18 年度から平成 20 年度の 3 年間にわたり、いわゆる健康食品の成分の中で、国内で消費が多く利用者の年齢層も広く、一方で作用機序が不明な点の多い、CoQ10、 α リポ酸、フォルスコリンおよびクルクミンについて検討した。何れも、動物実験の実施及び毒性学的解析を関田が、マイクロアレイ解析及び遺伝子発現と毒性のリンケージ解析を北嶋が、実験総括及びプロファイル解析を菅野が分担した。

平成 18 年度は、CoQ10 とカフェインの 2 物質について以下の通り実施した。

実験 I : CoQ10 反復投与の中断時の影響（退薬症状の可能性）に関する遺伝子発現変動解析

実験 II : フォルスコリンの多臓器影響に関する遺伝子変動解析（カフェインとの対比を含む）

実験 I の目的は、一般に若返り・老化防止を標榜する健康食品 CoQ10 の反復投与の中断時の影響の有無及び誘発機序を生合成反応停止という予想も考慮した上で、分子レベルで探索することにある。CoQ10 は、ミトコンドリアの電子伝達系の水素受容体として働く因子と考えられている。反復投与により、生体内での CoQ10 生合成が抑制されることが予想された。そこで反復投与実験を検討することとした。この達成は、CoQ10 のみならず、本来生合成されている生体内物質の過剰摂取後の禁断症状（退薬症状）に関し、毒性防御対策の基本的な考え方、ならびに毒性メカニズム解析のアプローチ法を提供することにも反映されるものと考えている。健康食品としての CoQ10 の人一日摂取推奨量は、最大 100 mg/body/day が目安とされている（体重 50 kg 換算で 2 mg/kg/day）。各群 3 匹の雄性 C57BL/6 マウス（計 48 匹）に、人一日摂取推奨量を参考に用量設定した CoQ10（0、30、100 及び 300 mg/kg/day）（シグマ）を 15 日間強制経口投与し、15 日目の投与 2、8、24 及び 48 時間後の各臓器の RNA を経時的にサンプリングし、先ず、肝、心、海馬について解析した。サンプリングする臓器は、エネルギー産生が、CoQ10 が機能するミトコンドリアに大きく依存していると考えられる、心、肝、脳（大脳皮質、海馬、脳幹、小脳の 4 カ所）、腎及び精巣とした。解析の結果、退薬後も発現変動が認められた遺伝子として、肝では、CoQ10 の生合成系よりはむしろ、それが機能するミトコンドリア電子伝達系関連、および細胞増殖・アポトーシス関連遺伝子の発現変動が認められた。心では、心筋細胞へのストレスに対抗するような遺伝子の発現変動が認められた。脳の海馬においては、退薬後、投与直後まで変動していなかった睡眠誘発に関わる遺伝子の発現変動が認められた。剖検時、投与 2、8 及び 24 時間後に CoQ10 投与群において用量依存的な心の拍出力の増加が肉眼的観察で認められたため、平成 19 年度に、客観的に強心作用の有無を検討することとした。

実験 II の目的は、一般に痩身を標榜する健康食品コレウス・フォルスコリの成分であり、細胞内 cAMP 濃度上昇を誘発するアデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリンの生体影響を、遺伝子発現レベルで多臓器にわたり検討し明らかにすることにある。他方、当毒性部において所有する遺伝子発現データベース中に、細胞内 cAMP 濃度上昇を引き起こす化学物質によるデータを所有していないものと考えられた。そこで、フォルスコリンの比較対照化学物質として、ホスホジエステラーゼ酵素阻害により、フォルスコリンと同じく細胞内 cAMP 濃度上昇を誘発する食品由来成分であるカフェインの投与実験を先行しておこなった。マウスに、人一日通常摂取量を参考にカフェイン（0、3、10 及び 30mg/kg/day）を単回強制経口投与し、投与 2、4、8 及び 24 時間後の肝における RNA を経時的にサンプリングし、遺伝子発現変動を網羅的に解析した。肝で先ず検討したのは、肝が当毒性部の遺伝子発現データベースがもっとも整っている組織であるためである。

平成 19 年度は、 α -リポ酸と CoQ10 の 2 物質について以下の通り実施した。

実験 I : α -リポ酸単回投与時の肝における遺伝子発現変動解析

実験 II : α -リポ酸反復投与時の多臓器影響に関する遺伝子変動解析

実験 III : CoQ10 反復投与時の心エコー測定による強心作用の有無についての検証（前年度実験時の肉眼所見の確認）

実験 I の目的は、一般に痩身あるいは抗糖尿病を標榜する健康食品 α リポ酸の単回投与時の肝への影響の有無及び誘発機序について分子レベルで探索することにある。 α -リポ酸の遺伝子発現プロファイルを検討する目的で、当毒性部の遺伝子発現データベース（単回経口投与）と比較・検討するために、先ず、単回経口投与時における、当毒性部が所有する遺伝子発現データベースがもっとも整っている組織である肝について網羅的に遺伝子発現変動解析を検討した。 α リポ酸（別名：チオクト酸）は、抗酸化作用を有するビタミン様物質の一種で、ミトコンドリアに存在し、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体

の補酵素として、ピルビン酸がアセチル CoA に変化する反応を助けることにより TCA サイクルに関与するものと考えられている。 α リポ酸合成酵素は、ミトコンドリアに局在し(Morikawa et al., 2001)、この欠失マウス胚は、ホモ型では胎生 9.5 日に致死となり、ヘテロ型では赤血球グルタチオンの減少が認められている(Yi and Maeda, 2005)。健康食品としての α リポ酸の一日推奨摂取量は、100~200 mg(最大 1,800 mg)が目安とされている(体重 50 kg 換算で 2~4、最大 36 mg/kg/day)。また医薬品(チオクト酸注射液)として、内耳性難聴、亜急性壊死性脳脊髄炎などを対象に、成人 10~25 mg/day(体重 50 kg 換算で 0.2~0.5 mg/kg/day)を静脈内、筋肉内または皮下注射により使用されている。各群 3 匹の雄性マウス(C57BL/6CrSlc)(計 48 匹)に、人一日摂取推奨量および用量設定実験を参考に用量設定した、 α リポ酸(0、10、30 及び 100 mg/kg/day)を単回強制経口投与し、投与 2、4、8 及び 24 時間後の当毒性部の遺伝子発現データベースが整っている肝の RNA を経時的にサンプリングした。この実験とは別に、A)用量設定実験及びB)投与 2 時間後の血糖値及び血清インスリン値測定のためのサテライト実験をおこなった。用量設定試験において、500 mg/kg 単回投与群で 3 匹中 1 匹が死亡し、投与 60 分後には間代性けいれんが認められ、肝表面に白色斑が認められた。300 mg/kg 投与群でも 3 例全例において投与 24 時間後に肝において白色斑が認められた。このことより、 α リポ酸の半数致死量(LD₅₀)は、食品成分としては比較的低値であると考えられる。血糖値及び血清インスリン値測定実験では、投与群で溶媒投与群と比較し変化はなかったが、血糖値では用量依存性に増加傾向が認められた(有意差はなし)。解析の結果、 α リポ酸投与時、肝では PGC1/HNF4 シグナルが活性化され糖新生が促進される可能性が示唆された。糖新生が過度に促進された結果、サテライト実験で認められた血糖値増加傾向が引き起こされ、また脂肪合成促進を介し、用量設定実験で認められた肝小葉中心性の脂肪化が誘発されたものと考えられた。

実験 II の目的は、 α -リポ酸の反復投与時の生体影響を、遺伝子発現レベルで多臓器にわたり検討し明らかにすることにある。このために、実験 I の単回経口投与の際の肝での遺伝子発現プロファイルを参考にしつつ、肝、腎、肺ならびに α リポ酸が機能する TCA サイクルに依存、すなわちエネルギー依存性が高いと考えられる心及び脳(海馬、大脳皮質、脳幹、小脳の 4 部位)について、実験 I と同様に、各群 3 匹の雄性マウス(計 48 匹)に α リポ酸(0、10、30 及び 100 mg/kg/day)を 15 日間強制経口投与し、15 日目投与 2、4、8 及び 24 時間後の各組織の RNA を経時的にサンプリングし、遺伝子発現変動を網羅的に解析した。この実験とは別に、15 日間反復経口投与 2 時間後の血糖値及び血清インスリン値測定のためのサテライト実験をおこなった。血糖値及び血清インスリン値測定のためのサテライト実験では、 α リポ酸反復投与時、血中インスリン濃度が低下したが、この理由として、 α リポ酸が末梢組織でインスリン様作用を発揮した結果である可能性が考えられた。この α リポ酸のインスリンに対する代償性(インスリン感受性の増加)の証明には、今後、OGTT(経口ブドウ糖負荷試験)を実施する必要があるものと考えられた。解析の結果、 α リポ酸合成酵素(Lias)遺伝子の発現変動が認められ、 α リポ酸の摂取(反復)は、投与直後の抑制とリバウンドというかたちで、 α リポ酸の生体内合成に影響するものと考えられた。有害事象が懸念される遺伝子発現変動解析結果として、心において、GLUT4(糖輸送)遺伝子、TCA サイクル関連遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子(酸化的リン酸化)、酸化的ストレス関連遺伝子の発現増加が認められたことが挙げられる。 α リポ酸反復投与により心において、強制的なエネルギー代謝亢進が引き起こされ、酸化的ストレスが誘発され、その結果、細胞壊死、線維化が誘発される可能性が示唆された。このような遺伝子発現変動は、 α リポ酸が心においてインスリン様作用を発揮した結果である可能性が示唆された。したがって、人でも長期摂取による心線維化が懸念され、心機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。

実験 III の目的は、平成 18 年度の CoQ10 反復投与において、肉眼的に認められた強心作用を、客観化・数値化することにある。この達成は、これまで報告がない正常な生体における CoQ10 の強心作用を実証することとなり、人での安全性評価上重要となる。各群 6 匹の雄性 C57BL/6 マウス(計 24 匹)に、平成 18 年度の本研究と同様の用量である CoQ10(0、30、100 及び 300mg/kg/day)を 15 日間強制経口投与

し、15日目の投与2、24及び48時間後の心機能を非観血的に心エコー装置により測定し、1) 1回拍出量(SV: stroke volume [μ L])、2) 左室駆出率(LVEF: left ventricular ejection fraction [%])、3) 心拍出量(CO: cardiac output [mL/分])、及び4) 心拍数(HR: heart rate [回/分])を求めた。その結果、投与2時間後、心拍数の変化を伴わずに心拍出量の増加が引き起こされ強心作用が認められること、投与2時間後の左室駆出率では全ての投与群(30、100及び300mg/kg/day)で有意に増加すること、これらの作用は投与24時間後には消失すること、が明らかとなった。以上のことから、CoQ10の長期摂取が、正常な心機能を有する人に対し強心作用を発揮し、心肥大あるいは心線維化を引き起こす可能性が導かれた。今後、さらに1) CoQ10長期投与動物実験による心肥大、心線維化の検証、2) CoQ10を長期摂取している人の心機能に関する疫学調査等が必要であるものと考えられた。

平成20年度は、クルクミンとフォルスコリンの2物質について以下の通り実施した。

実験I: クルクミン単回投与時の肝における遺伝子発現変動解析

実験II: フォルスコリン単回投与時の多臓器影響に関する遺伝子変動解析

実験Iの目的は、抗腫瘍作用、抗酸化作用、抗炎症作用等を標榜する健康食品クルクミンの単回投与時の肝における影響及び誘発機序を分子レベルで感度よく明らかにすることにある。クルクミンの遺伝子発現プロファイルを検討する目的で、当毒性部の遺伝子発現データベース(単回経口投与)と比較・検討するために、先ず、単回経口投与時における、当毒性部が所有する遺伝子発現データベースがもっとも整っている組織である肝について網羅的に遺伝子発現変動解析を検討した。クルクミンはターメリック(ウコン)に含まれる黄色の色素で、カレー粉のスパイスや食品添加物(着色料、既存添加物)としても利用されている。健康食品としてのクルクミンの一日推奨摂取量は、200~2,000 mgが目安とされている(体重50 kg換算で4~40 mg/kg/day)。文献上の半数致死量は、マウスでの経口投与で2,000 mg/kg以上である。各群3匹の雄性マウス(C57BL/6CrSlc)(計48匹)に人一日摂取推奨量および用量設定実験を参考に用量設定した、クルクミン(0、70、200及び700mg/kg)を単回強制経口投与し、投与2、4、8、及び24時間後の肝のRNAを経時的にサンプリングした。その結果、クルクミン単回投与時、肝ではミトコンドリア電子伝達系が活性化し、また標榜される抗酸化作用とは逆の酸化的ストレスが引き起されている可能性が示唆された。また、エタノールの分解に関わる酵素2種の発現上昇が認められたが、この機序として、クルクミンあるいはこの代謝物がAdh酵素の基質として働く可能性が示唆された。

実験IIの目的は、痩身を標榜する健康食品コレウス・フォルスコリの成分でありアデニル酸シクラーゼ活性化剤である「フォルスコリン」単回投与時の生体影響を、標的臓器の探索を考慮しつつ多臓器にわたり分子レベルで感度よく明らかにすることにある。アデニル酸シクラーゼの活性化により、多くの細胞で、細胞内シグナル伝達分子であるサイクリックAMP(cAMP)の細胞内濃度が上昇する結果、神経系、循環器系、肝代謝系、内分泌系など様々な細胞において多様な作用が誘発されると予想された。フォルスコリンは、南アジアに自生するColeus forskohliiというシソ科植物の根に含まれる物質であり、薬理的に細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化し、多くの細胞で、(cAMP)の細胞内濃度が上昇する。その結果、神経系、循環器系、肝代謝系、内分泌系など様々な細胞に於いて多様な作用が誘発される。健康食品としてのフォルスコリンの一日推奨摂取量は、50~100 mgが目安とされている(体重50 kg換算で1~2 mg/kg/day)。またこの水溶性誘導体は、医薬品(アデル注)として、急性心不全を対象に、1分間に0.5 μ g/kgで最長72時間にて点滴静脈内投与により使用されている(720 μ g/kg/day)。文献上の半数致死量は、マウスでの経口投与で3,100 mg/kgである。用量設定実験の後、細胞内cAMP関連シグナルが主に関与すると考えられる、肝、腎、肺、心及び脳(海馬、大脳皮質、脳幹、小脳の4部位)について、各群3匹の雄性マウス(計48匹)にフォルスコリン(0、1、3及び10 mg/kg)を単回強制経口投与し、投与2、4、8及び24時間後の各組織のRNAを経時的にサンプリングし、先ず、肝、心、大脳皮質、肺、腎について遺伝子発現変動を網羅的に解析した。用量設定実験を検討した結果、フォルスコリンのマウスにおける急性毒性は、報告されているものよりもかなり強く、経口投与による半数致死量は、100~300 mg/kgであり「劇物」相当の化学物質であること、またおそらく同じく細胞内cAMP量を増加させるコレラ毒素と同様な機序により、消化管内に液体貯留が誘発されること、が明らかとなった。

多臓器における遺伝子発現変動解析の結果、有害事象として、特に脳神経系における酸化ストレスによる障害が懸念され、反復投与により、神経細胞死が誘発されることが懸念された。また各種神経伝達物質受容体の発現変動が認められたことから、比較的非選択的に神経伝達が活性化している可能性が示唆され、神経行動学的障害も懸念された。加えて肝から血液中にグルコースが放出され血糖値が上昇する可能性が示唆された。このことは、特に糖尿病患者がフォルスコリンを摂取する際に注意する必要があるものと考えられた。

「本研究全体のまとめ」本研究の目的は、食品中の問題となる特定の成分について実験動物での生体反応を観察し、それが人体にどの程度（定量的）、どの様（定性的）に再現されるかを的確に推定する為の、生体反応メカニズムに依拠した研究基盤を構築することにある。このために、平成18年度から平成20年度の3年間にわたり、いわゆる健康食品の成分の中で、国内で消費が多く利用者の年齢層も広く、一方で作用機序が不明な点の多い、CoQ10、 α リポ酸、フォルスコリンおよびクルクミンについて、申請者らが推進中のマウス・トキシコゲノミクス（Percellome プロジェクト）の実験プロトコルを適用し、マウスに単回あるいは反復投与した際の各臓器の遺伝子発現を網羅的に解析することで、生体反応のメカニズムに基礎を置いた生体反応のプロファイリングを行った。解析結果から、特に健康危険情報に関することとして以下のことが明らかとなった。すなわち、CoQ10は正常な心に対し強心作用を有しており、その摂取に際しては今後注意を要し、人での心機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。 α リポ酸は、インスリン様作用が示唆され、加えて心での強制的なエネルギー代謝亢進と酸化ストレスが示唆され、長期摂取による心線維化が懸念され、人での心機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。フォルスコリンでは、文献とは異なり急性毒性が強く劇物相当の物質であり、この際、消化管内の液貯留、下痢、胃内出血が認められ、加えて、大脳皮質における神経伝達の非選択的な興奮と酸化ストレスが示唆され、人での中枢神経機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。クルクミンでは、一般に標榜される抗酸化作用とは逆に、肝での酸化ストレス関連遺伝子の発現変動が低用量群でも認められ、また、いわゆる健康食品としての一日推奨摂取量とのマージン(MOE: Margin of exposure)が狭い(1.8倍)ことに注意が必要なものと考えられた。このように、それぞれの化学物質について特徴的なプロファイルを得、またこれをデータベースと比較参照することで人影響の推定情報を得た。加えて、次項目に示す通り健康危険情報に関する情報提供も出来た。したがって、食品中の問題となる特定の成分についての安全性評価に際し、作用の分子機序の解明を通じた迅速・高精度な本アプローチ手法の基本的な部分は確立されたものと考えられ、食品安全に役立つものとする。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

平成 18 年度・実験 I : CoQ10 反復投与の中断時の影響 (退薬症状の可能性) に関する遺伝子発現変動解析

「目的」実験 I の目的は、一般に若返り・老化防止を標榜する健康食品 CoQ10 の反復投与の中断時の影響の有無及び誘発機序を生合成反応停止という予想も考慮した上で、分子レベルで探索することにある。CoQ10 は、ミトコンドリアの電子伝達系の水素受容体として働く因子と考えられている。反復投与により、生体内での CoQ10 生合成が抑制されることが予想された。そこで反復投与実験を検討することとした。この達成は、CoQ10 のみならず、本来生合成されている生体内物質の過剰摂取後の禁断症状 (退薬症状) に関し、毒性防御対策の基本的な考え方、ならびに毒性メカニズム解析のアプローチ法を提供することにも反映されるものと考えている。健康食品としての CoQ10 の人一日摂取推奨量は、最大 100 mg/body/day) が目安とされている (体重 50 kg 換算で 2 mg/kg/day)。

「実験方法」各群 3 匹の雄性 C57BL/6CrSlc マウス (日本エスエルシー) (計 48 匹) に、人一日摂取推奨量 (最大 100 mg/body/day) ならびに用量設定実験を参考に用量設定した CoQ10 (0、30、100 及び 300 mg/kg/day) [Cas No 303-98-0] (シグマ) を 15 日間強制経口投与し、15 日目の投与 2、8、24 及び 48 時間後の各臓器の RNA を経時的にサンプリングし、先ず、肝、心、海馬について解析した。サンプリングする臓器は、エネルギー産生が、CoQ10 が機能するミトコンドリアに大きく依存していると考えられる、心、肝、脳 (大脳皮質、海馬、脳幹、小脳の 4 カ所)、腎及び精巣とした。人投与容量は、14 日目までは 5 (ml/kg) とし、15 日目はすでに得ている単回投与時のデータとの整合性から 10 (ml/kg) とした。溶媒はコーンオイル (C8267、シグマ) とし、メノウ鉢 (XJ-0941-190、城戸メノウ乳鉢製作所) を用いて CoQ10 懸濁液を作製し、毎朝、用時調整とした。コーンオイルは開封後 3 日以内のものを使用し開封後は遮光・冷蔵保存した。遺伝子発現変動解析にあたっては、マイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。以下に、遺伝子発現変動解析 (Percellome 手法) と病理組織検査についての方法の概略を記載する。

飼育条件

8 週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウスを購入し、2 週間馴化飼育後、体重別層化無作為抽出法により群分けをおこない、15 日間反復投与後の 12 週齢のマウスを実験に供した。マウスは、室温 24±1℃、湿度 50±5%、換気回数 18 回/時間、照明 12 時間 (8 時~20 時) 点灯、12 時間 (20 時~8 時) 消灯という飼育室の環境下、木屑製チップを敷いたマウス用ポリカーボネート製ケージ (W22×L33×H13cm) にて個別飼いにて飼育し、餌は CRF-1 固型飼料 (オリエンタル酵母工業) を与え、水は水道水を給水ビンにて自由摂取させた。

投与

遺伝子の日内変動を考慮し、また再現よく遺伝子発現データを取得するために、金属製経口ゾンデ (KN-348、夏目製作所) とガラス注射筒 (トップ社) を用いて、午前 10 時に強制経口投与 (計 48 匹分 20 分間以内) をおこなった。

解剖

マウスを、エーテル麻酔下で腋窩部の切断により放血屠殺し、遺伝子発現変動解析 (Percellome 法) と病理組織検査に供する組織を摘出した。解剖・臓器の摘出に際しては、RNA の分解をできるだけ避けるために、術者の唾液・汗や毛髪等による汚染、動物の被毛、消化管内容等による汚染が起きないように、手袋、マスクの着用などをおこない配慮した。加えて、投与後の時間にあわせて正確な時刻 (投与 2 時間後は 12 時等) 麻酔から各組織サンプリングまで、1 匹当たりの約 2 分 30 秒間隔 (12 匹で 30 分間以内) にて、迅速に解剖・サンプリングをおこなった。

用量設定実験

文献上の半数致死量を考慮しつつ、各種用量の被験物質について、単回投与による1群3匹による用量設定実験を検討した。投与8時間までの一般状態の観察(30分毎)、投与24時間後の剖検ならびに死亡の有無を確認した。用量設定に際しては、最高用量群において、死亡例はなく、投与後4時間以内に一般状態の変化が回復し、投与24時間後の剖検により各組織に著変が認められないことを確認した。変化が認められた組織については、10%中性緩衝ホルマリン水溶液で固定した後、HE標本を作製し病理組織検索をおこなった。

遺伝子発現解析用及び病理組織検索用サンプルの採取

マウス各組織を採取後すみやかにRNA later (Ambion社)の入ったRNA用サンプルチューブ(キアゲン社)に採取し、4℃で一晩浸漬し、RNaseを不活化した。以下、組織毎に概略を記載する。10%中性緩衝ホルマリン水溶液は、リン酸緩衝10%ホルマリン溶液(37152-64、ナカライテスク)を使用した。

肝は、5mm径の生検トレパンにより3ヶ所を各々RNA用サンプルチューブに採取した。また外側左葉を10%中性緩衝ホルマリン水溶液で固定した後、HE標本を作製し病理組織検索をおこなった。

心は、解析精度に影響を与える血液を吐出するため、摘出した心を室温の生理食塩水の入ったディッシュに移し5秒ほど静置し、その後、心室側を縦に2分割し、双方共にRNA用サンプルチューブに採取した。また心房側を10%中性緩衝ホルマリン水溶液で固定した後、HE標本を作製し病理組織検索をおこなった。

腎は、左腎を剃刀を用いて三分割し、この三片をRNA用サンプルチューブに採取した。

脳は、カミソリ刀により正中線で脳を切り左右に分け、左半分を小脳、脳幹、海馬、大脳皮質の順に摘出・部位分けし、それぞれをRNA用サンプルチューブに採取した。また右半分を10%中性緩衝ホルマリン水溶液で固定した後、HE標本を作製し病理組織検索をおこなった。

精巣は、左側精巣を摘出し、精巣白膜を精細管を傷つけないように除去し、精細管のかたまりをRNA用サンプルチューブに採取した。また右側精巣をブアン固定液で固定した後、HE標本を作製し病理組織検索をおこなった。

Total RNA の分離精製

Total RNAの抽出に当たっては、RNA laterを除いた後、RNeasyキット(キアゲン社)に添付されるRLT bufferを添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の10 µLを取り、DNA定量蛍光試薬Picogreenを用いてDNA含量を測定した。DNA含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合でSpike cocktail(Bacillus由来RNA5種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOLにより水層を得、RNeasyキットを用いて全RNAを抽出した。100ngを電気泳動しRNAの純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全RNA 5 µgを取り、Affymetrix社のプロトコールに従い、T7プロモーターが付加したオリゴdTプライマーを用いて逆転写しcDNAを合成し、得たcDNAをもとに第二鎖を合成し、二本鎖DNAとした。次にT7 RNAポリメラーゼ(ENZO社キット)を用い、ビオチン化UTP, CTPを共存させつつcRNAを合成した。cRNAはAffymetrix社キットにて精製後、300-500bpとなるよう断片化し、GeneChipターゲット液とした。GeneChipにはMouse Genome 430 2.0(マウス)を用いた。ハイブリダイゼーションは45℃にて18時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。この際、サンプルのDNA量に対する標準化をおこない、個々に全てのmRNAの細胞1個当たりの発現コピー数を得るPerCellome手法(Kanno J et al, BMC Genomics 7 64 2006)を適用した。このPerCellome手法により、遺伝子発現量が全mRNAに共通の尺度、即ち『コピー数/細

胞』で表現されることから、検体間、実験間、マイクロアレイのバージョン間、異なったプラットフォーム間等のデータ比較が直接的に行えるようになり、数年かけて蓄積したデータの有機的活用が可能となる。

以上、遺伝子発現変動解析(PerCellome 手法)と病理組織検査についての方法の概略を記載した。

統計処理

本研究では、有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差 (SD) にて示した。

加えて、行動学的検索を検討するために、サテライト群 (0、30、100 及び 300mg/kg/day) を設け (各群 3 匹)、15 日間反復強制経口投与後に、ロータロッド (RRA C-3002、小原医科産業) を用いた協調運動学習への影響、オープンフィールド法 (オープンフィールド実験箱、OF-3002、小原医科産業) による新規場面における探索行動への影響、明暗箱 (LD-3002D、小原医科産業) を用いた不安関連行動への影響、以上につき検討した。

「実験結果」実験方法に記載した通り、心の RNA サンプリングに際し、遺伝子発現変動解析の精度に影響を与える血液を吐出する目的で、摘出した心を室温の生理食塩水の入ったディッシュに移し 5 秒ほど静置させ、自らの拍動により心臓内の血液を吐出させている。この剖検時の肉眼的観察において、投与 2、8 及び 24 時間後の CoQ10 投与群において用量依存的な心の拍出力の増加が認められた。投与 48 時間後では明らかな変化は認められなかった。以下に肝、心、海馬における遺伝子発現変動解析の結果を示す。

平成 18 年度・実験 I-A：肝における遺伝子変動解析：

CoQ10 が機能的に関与するミトコンドリア電子伝達系の関連遺伝子について、当方で既に所有するデータベース上、単回投与の時には顕著な変動が認められなかったが、反復投与においては、用量依存的な発現上昇が認められた。また退薬後 24 時間後よりもむしろ 48 時間後において、Ndufb2 遺伝子及び Cox5b 遺伝子では用量依存的に発現上昇が認め

られた (図 1)。なお以降示す図はすべて、下記のように濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示し、加えて各平面の上下に標準偏差 (SD) 平面 (薄い色) をあわせて示した。

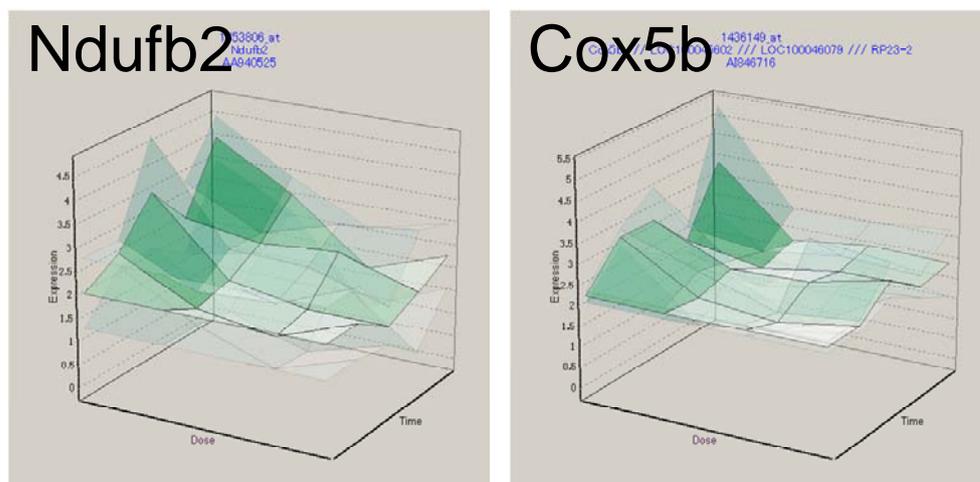
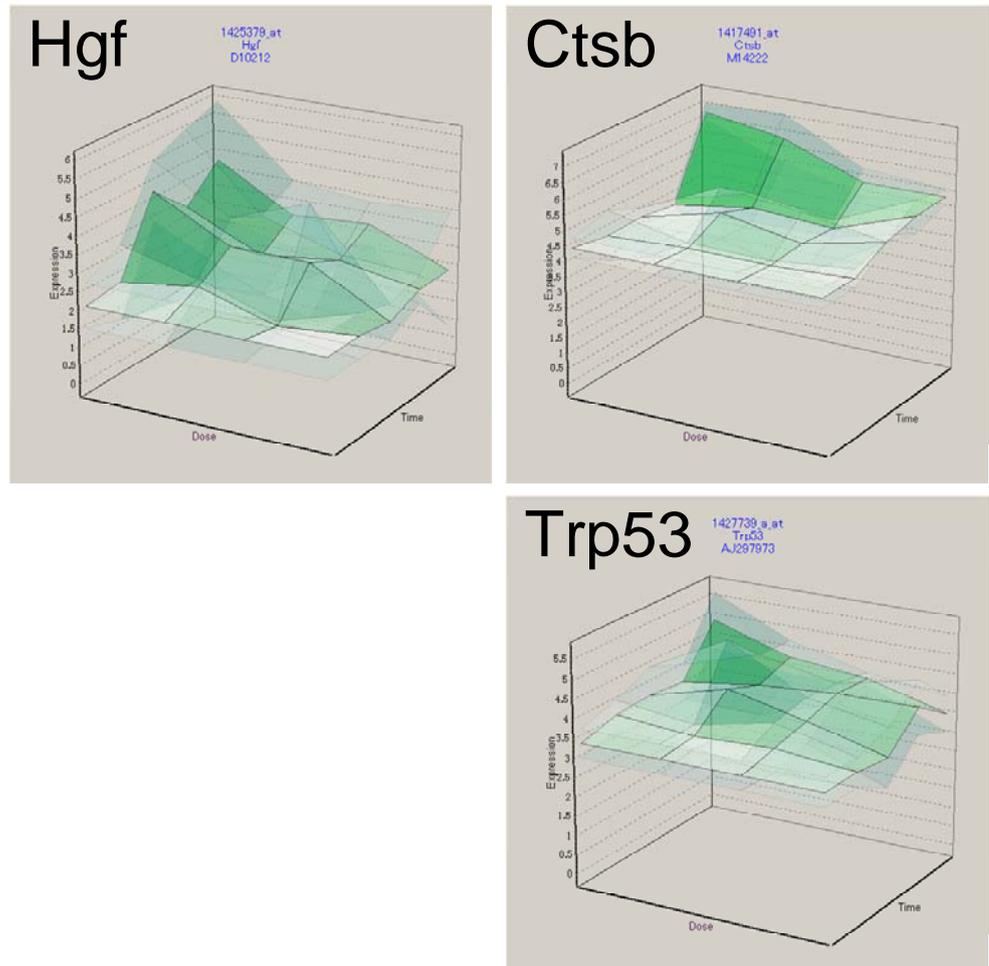


図 1 肝でのミトコンドリア電子伝達系の関連遺伝子 Ndufb2 遺伝子及び Cox5b 遺伝子の発現変動 (三次元表示)

この他に、発現変動が認められた遺伝子として、細胞増殖やアポトーシスに関連するものが見いだされた。多くのものが投与 2 時間後に高用量群で認められた。具体的には、Socs2 遺伝子、Mafk 遺伝子、Klf6 遺伝子、Cdkn1a 遺伝子、follistatin 遺伝子、Bcl2-like1 遺伝子、Bcl2-like11 遺伝子であった。加えて、退薬後むしろ投与 24 時間および投与 48 時間後に発現が用量依存的に増加してくる遺伝子として、細胞増殖(HGF、Rab13 遺伝子など)およびアポトーシスに関与する遺伝子 (cathepsinB 遺伝子、p53 遺伝子など) が抽出されてきた (図 2)。

図 2 肝での HGF、cathepsinB 遺伝子および p53 遺伝子の発現変動 (三次元表示)



人では CoQ10 はアセチル CoA から生合成されており、途中までコレステロールと同じ経路をたどっている (Folkers K et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8931-8934, 1990) が、CoQ10 合成に関わる遺伝子の発現変動解析の結果、退薬後も含め、顕著な変動は認められなかった。また、肝の HE 染色による組織学的な検索をおこなっているが、いずれの投与群においても変性像、壊死像は見いだされなかった。

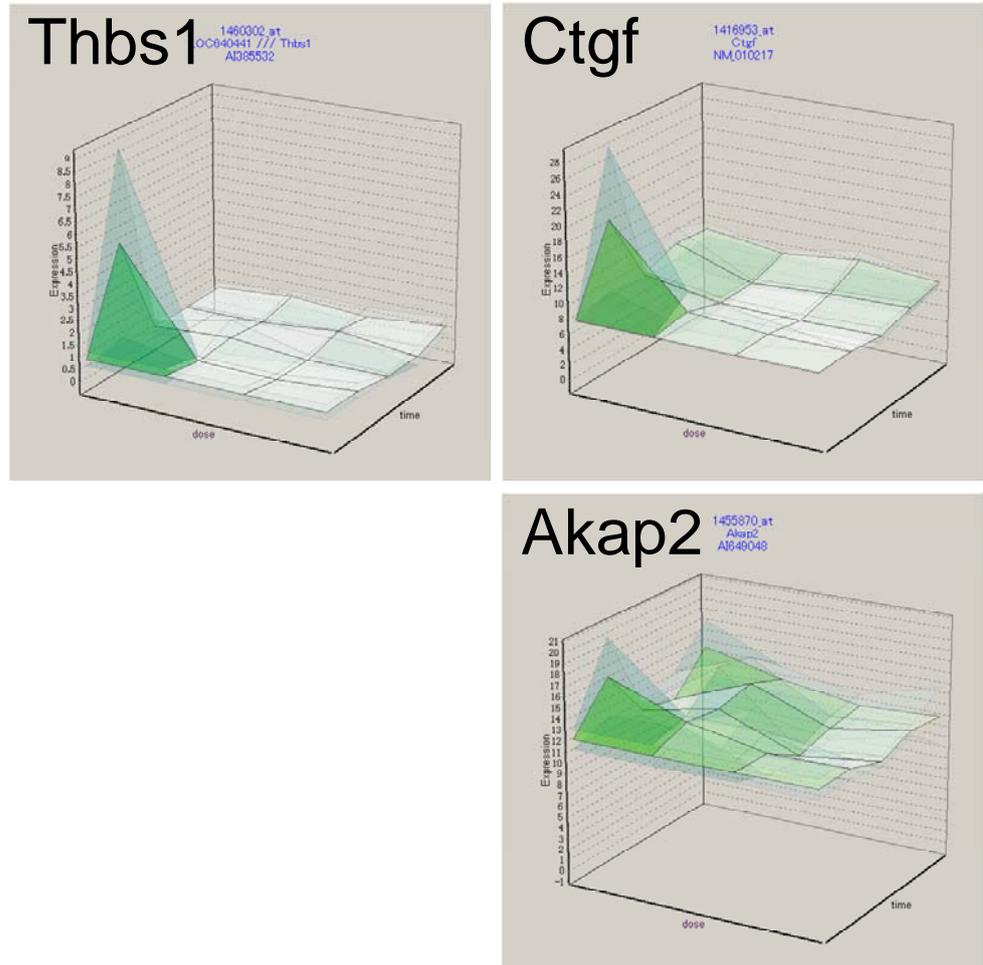
平成 18 年度・実験 I -B: 心における遺伝子変動解析:

心において CoQ10 反復投与により遺伝子発現変動が認められた遺伝子として、メカニカルストレス (Socs3 遺伝子)、炎症 (トロンボスポンジン: Thbs1 遺伝子あるいはケモカインリガンド: Ccl 遺伝子)、心線維化 (Ctgf 遺伝子) に関わる遺伝子発現に、投与 2 時間後に濃度依存的な増加が認められた。加えて、退薬後投与 48 時間後でも発現が用量依存的に増加してくる遺伝子として、強心作用に関与する cAMP シグナルの関連遺伝子の 1 つ Akap2 遺伝子及び、発現上昇は弱いながらも、糖や脂肪酸の細胞内への輸送

の効率化を通して代謝ストレスに拮抗する遺伝子 Prkab2 (AMP-activated protein kinase) の発現が抽出されてきた。Akap2 遺伝子については、投与後 2 時間後でも濃度依存性に発現が上昇していた (図 3)。

なお、心においては、電子伝達系関連遺伝子ならびに CoQ10 の合成に関わる遺伝子の発現は、退薬後も含め、顕著な変動は認められなかった。また、心の HE 染色による組織学的な検索をおこなっているが、いずれの投与群においても変性像、壊死像、線維化像は見いだされなかった。

図 3 心での Thbs1、Ctgf、Akap2 各遺伝子の発現変動



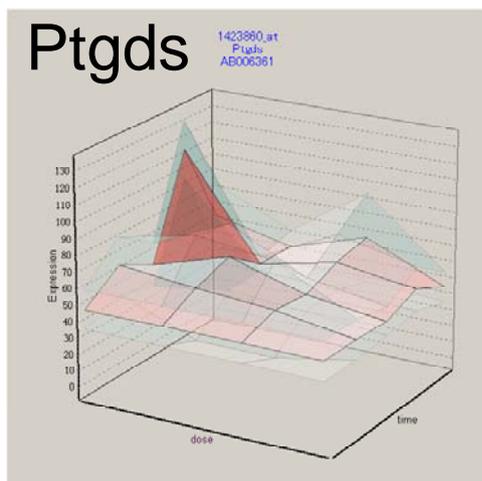
平成 18 年度・実験 I-C：海馬における遺伝子変動解析：

海馬について、投与後 48 時間後、すなわち退薬後、発現が誘導されてきたものとして特筆すべき遺伝子として、睡眠誘発作用が報告されている prostaglandinD2 の合成酵素 Ptgds 遺伝子を挙げられることができる (図 4 左)。

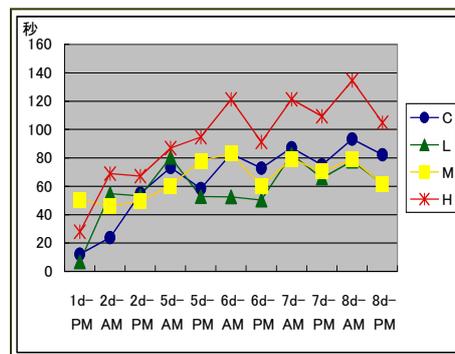
平成 18 年度・実験 I-D：サテライト群における行動学的検索：

ロータロッドを用いた協調運動量の測定では、CoQ10 高用量投与群において直後から退薬後までの成績向上傾向が認められ、また中、低用量群において退薬後、成績の低下傾向が認められた (図 4 右)。

図 4 海馬における Ptgds 遺伝子の発現変動 (左) とロータロッド実験の結果 (右) (横軸: CoQ10 投与終了後の日数 [毎日午前と午後 2 回測定]、縦軸: 落下までに要した時間 (秒)) (C: 溶媒投与群、L: 低用量投与群、M: 中用量投与群、H: 高用量投与群)



落下までに要した時間 (秒)



CoQ10 投与終了後の日数

その他、明暗往来試験において、「明所への初移動までに要した時間」が高用量、中用量群でより多くかかっていること、ホームケージアクティビティー解析 (昼夜を通した行動解析) において、高用量投与群において睡眠サイクルの乱れを示す結果が得られているが、これらの行動学的検索については、ロータロッド測定を行った後に検討したものであり、今後、追試による確認が必要なものと考えられた。

「平成 18 年度実験 I のまとめ」

本年度の主たる達成すべき目標である、生合成反応停止という予想も考慮した上で、CoQ10 反復投与後の遅延影響に関与するシグナルカスケードの探索、の観点から以下にまとめる。この達成は、CoQ10 のみならず、本来生合成されている生体内物質の過剰摂取後の禁断症状 (退薬症状) に関し、毒性防御対策の基本的な考え方、ならびに毒性メカニズム解析のアプローチ法を提供することにも反映されるものと考えている。1) 肝については、退薬後も、CoQ10 の生合成系よりはむしろ、機能に関わる電子伝達系に遺伝子発現変動が認められたことが注目に値し、また同時に、細胞増殖および細胞死に関するシグナルカスケード活性化も誘発されている可能性が示唆された点に新規性がある。2) 心については、退薬後も、電子伝達系に関わる遺伝子の顕著な変動が認められないにも関わらず、むしろ強心作用による心筋細胞へのストレスに対抗するような遺伝子の発現変動が認められた点が注目に値する。したがって、当初予想していなかった強心作用の機序を他の部位の解析をも考慮しつつ検討する必要がある。3) 脳の海馬においては、投与直後まで変動していなかった睡眠誘発に関わる遺伝子等の遺伝子発現変動が観察された点に新規性がある。

剖検時の肉眼的観察において、投与 2、8 及び 24 時間後の CoQ10 投与群のマウス心において用量依存的に拍出力の増加が認められた。客観的なデータを得るための実験を平成 19 年度におこなった。

最近になって、雌雄 Wistar ラットを用いた CoQ10 (溶媒: コーンオイル) の 28 日間強制経口反復投与毒性実験に関する下記の論文が報告された。この中では、0 と 1,000mg/kg 投与群の 2 群が存在するが、CoQ10 反復投与により、心を含め一般毒性学的な変化が認められていない。

Hatakeyama S, Kawase S, and Yoshimura I, Comparative oral toxicity of coenzyme Q10 and its (2Z)-isomer in rats: single and four-week repeated dose toxicity studies. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 52: 9-20, 2006. この報告と当研究の差異として、検体調整法の違いが挙げられる。CoQ10 を 60°C に加温融解後 コーンオイルに溶解し 4°C で保存、投与直前に再度 60°C に加温融解しているのに対して、我々は、コーンオイル懸濁液を室温にて用時調整しているという違いがある。すなわち、この文献では、「抗酸化作用を有するとされる」CoQ10 を 60°C に加温融解後「酸化しやすいと考えられる」コー

ンオイルに溶解していることから、この際、CoQ10 とコーンオイルが反応し CoQ10 が分解し、実際に投与している CoQ10 の量が少なくなっている可能性が考えられた。したがって今後、さらに我々と同様、検体の用時調整により、CoQ10 長期投与動物実験を検討する必要性が強く考えられた。

平成 18 年度・実験Ⅱ：フォルスコリンの多臓器影響に関する遺伝子変動解析（カフェインとの対比を含む）

「目的」実験Ⅱの目的は、一般に痩身を標榜する健康食品コレウス・フォルスコリの成分であり、細胞内 cAMP 濃度上昇を誘発するアデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリンの生体影響を、遺伝子発現レベルで多臓器にわたり検討し明らかにすることにある。他方、当毒性部において所有する遺伝子発現データベース中に、細胞内 cAMP 濃度上昇を引き起こす化学物質によるデータを所有していないものと考えられた。そこで、フォルスコリンの比較対照化学物質として、ホスホジエステラーゼ酵素阻害により、フォルスコリンと同じく細胞内 cAMP 濃度上昇を誘発する食品由来成分であるカフェインの投与実験を先行しておこなった。

「実験方法」フォルスコリン投与実験の比較対照として先ずカフェインについて検討した。マウス肝における単回投与時の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。肝で先ず検討したのは、肝が当毒性部の遺伝子発現データベースがもっとも整っている組織であるためである。具体的には、各群 3 匹の雄性マウス（計 48 匹）に通常摂取量（飲料水 1 瓶中に 50-80 mg）をもとに用量設定したカフェイン（0、3、10 及び 30mg/kg/day）[Cas No 1958-8-2]（Latoxan 社）を単回強制経口投与し、投与 2、4、8 及び 24 時間後の肝の RNA を経時的にサンプリングした。投与容量は 10(ml/kg)とした。溶媒は 0.5%のメチルセルロース（MC）（メトローズ、SM-400、信越化学工業）液とし、メノウ鉢（XJ-0941-190、城戸メノウ乳鉢製作所）を用いて懸濁液を用時調整した。遺伝子発現変動解析にあたっては、マイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いた。

遺伝子発現変動解析（Percellome 手法）と病理組織検査についての方法の概略は、平成 18 年度実験Ⅰ（反復投与）と同様である。ただし本実験では、溶媒が MC であり単回投与実験である。そのため、以下異なる 2 点を記載する。すなわち、1) マウスは 10 週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウスを購入し、2 週間馴化飼育後、体重別層化無作為抽出法により群分けをおこない 12 週齢のマウスを実験に供した。2) 溶媒が MC であるためガラス注射筒ではなく、プラスチック製注射筒（テルモ）を使用した。

「実験結果」肝におけるカフェイン単回投与時の遺伝子発現変動データを得た。その結果、cAMP カスケードの遺伝子である Creb1 (camp responsive element binding protein 1) の増加を投与 2、4 時間後に認め、このカスケードに対する影響を示唆するデータを得た他、解糖系に関与する、Ppargc1a (投与 2 時間後)、Hnf4a1alpha (投与 4 時間後) 遺伝子の発現増加を認め、血糖値が上昇する可能性が示唆された。その他、薬物代謝酵素では Cyp2b10 (投与 2、4 及び 8 時間後)、Cyp3a13 (投与 2、4 及び 8 時間後) の発現増加が認められた。

CoQ10 投与実験を当研究部としては退薬期間を非定型的に加えた反復投与実験として実施したため、前後の準備等を含め長時間を要し、その結果、フォルスコリン投与実験が当初の予定よりも遅れたが、研究期間中（平成 20 年度）に検討した。

平成 19 年度・実験Ⅰ： α -リポ酸単回投与時の肝における遺伝子発現変動解析

「目的」実験Ⅰの目的は、一般に痩身あるいは抗糖尿病を標榜する健康食品 α リポ酸の単回投与時の肝への影響の有無及び誘発機序について分子レベルで探索することにある。 α リポ酸（別名：チオクト酸）は、抗酸化作用を有するビタミン様物質の一種で、ミトコンドリアに存在し、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の補酵素として、ピルビン酸がアセチル CoA に変化する反応を助けることにより TCA サイク

ルに関与するものと考えられている。 α リポ酸合成酵素は、ミトコンドリアに局在し(Morikawa et al., 2001)、この欠失マウス胚は、ホモ型では胎生 9.5 日に致死となり、ヘテロ型では赤血球グルタチオンの減少が認められている(Yi and Maeda, 2005)。健康食品としての α リポ酸の一日推奨摂取量は、100~200 mg(最大1,800 mg)が目安とされている(体重 50 kg 換算で2~4、最大 36 mg/kg/day)。また医薬品(チオクト酸注射液)として、内耳性難聴、亜急性壊死性脳脊髄炎などを対象に、成人 10~25 mg/day(体重 50 kg 換算で 0.2~0.5 mg/kg/day)を静脈内、筋肉内または皮下注射により使用されている。

「実験方法」 α -リポ酸の遺伝子発現プロファイルを検討する目的で、当毒性部の遺伝子発現データベース(単回経口投与)と比較・検討するために、まず、単回経口投与時における、当毒性部が所有する遺伝子発現データベースがもっとも整っている組織である肝について網羅的に遺伝子発現変動解析を検討した。具体的には、各群 3 匹の雄性マウス(計 48 匹)に人一日摂取推奨量および用量設定実験を参考に、用量設定した α -リポ酸(0、10、30 及び 100mg/kg/day)[Cas No 1077-28-7](シグマ)を単回強制経口投与し、投与 2、4、8 及び 24 時間後の肝の RNA を経時的にサンプリングした。投与容量は 10(ml/kg)とした。溶媒は 0.5%のメチルセルロース(MC)(SM-400、信越化学工業)液とし、メノウ鉢(XJ-0941-190、城戸メノウ乳鉢製作所)を用いて懸濁液を用時調整した。遺伝子発現変動解析にあたっては、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いた。

遺伝子発現変動解析(Percellome 手法)と病理組織検査についての方法の概略は、溶媒が MC であることと単回投与実験であることは平成 18 年度実験 II(単回投与)と同様であり、その他は、平成 18 年度実験 I(反復投与)と同様である。

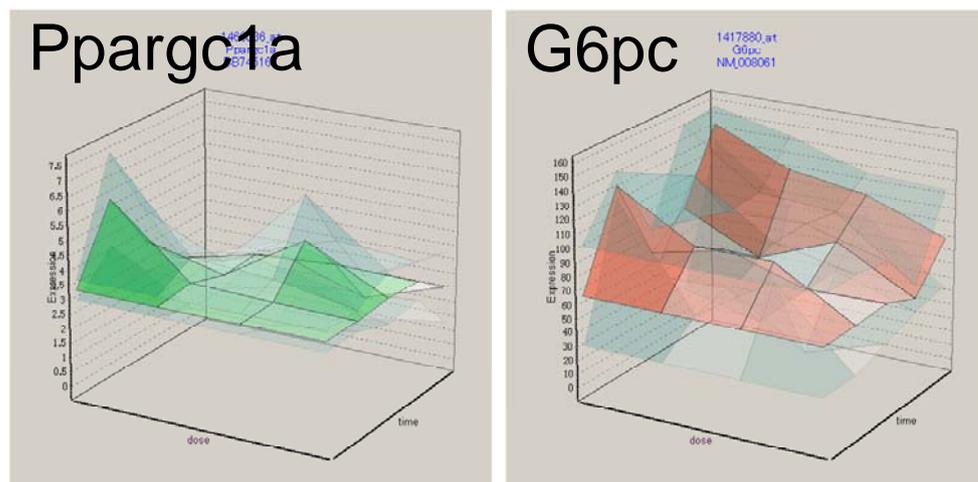
用量設定実験は、平成 18 年度実験 I(反復投与)と同様の方法だが、具体的には α -リポ酸(0、100、200、300 及び 500 mg/kg)を各群 3 匹につき単回強制経口投与をおこない、一般状態の観察、投与 24 時間後の剖検および死亡の有無を検討した。ただし、200 mg/kg 以上の投与群に、肝全葉にわたり門脈に沿って白色斑が認められたため、脂肪滴か否か検討するために、肝の凍結切片を作製し Oil Red O による染色をおこなった。

「実験結果」用量設定試験において、500 mg/kg 単回投与群で 3 匹中 1 匹が死亡し、投与 60 分後には間代性けいれんが認められ、肝表面に白色斑が認められた。300 mg/kg 投与群でも 3 例全例において投与 24 時間後に肝において白色斑が認められた。このことより、 α リポ酸の半数致死量(LD₅₀)は、食品成分としては比較的低値であると考えられる(文献では、マウス経口投与で 502 mg/kg[RTECS])。また、白色斑が認められた肝の凍結切片を作製し Oil Red O による染色をおこなったところ、陽性となったことから脂肪であることが確認された。

肝において網羅的に遺伝子変動を解析したところ、 α リポ酸合成酵素(Lias)遺伝子の発現は、いずれの採取時間、投与用量でも有意な変動は認められなかった。網羅的に遺伝子発現変動解析をしたところ、Ppargc1 α (PGC-1 α)、HNF4 α 、G6pc など PGC1/HNF4 シグナルカスケードに関与する遺伝子の発現上昇が用量依存的に認められた(図 1)。

Ppargc1 α は、飢餓状態及び低酸素状態で発現が誘導され、解糖系の鍵となる分子と報告され、肝ではインスリンシグナルと拮抗すると考えられている。他方、骨格筋にこの遺伝子を強制発現させると、ミトコンドリアが増え、筋肉が赤筋化してエネルギー代謝が亢進することが報告されている。なお、この遺伝子は、白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞に形質転換することも報告されている。

図 1 肝での PGC1/HNF4 シグナルカスケードに参与する遺伝子 (Ppargc1 及び G6pc) の発現変動



「平成 19 年度・実験 I のまとめ」

α リポ酸投与時、肝では PGC1/HNF4 シグナルが活性化され糖新生が促進される可能性が示唆された。糖新生が過度に促進された結果、サテライト実験で認められた血糖値増加傾向が引き起こされ、また脂肪合成促進を介し、用量設定実験で認められた肝小葉中心性の脂肪化が誘発されたものと考えられた。

平成 19 年度・実験 II： α -リポ酸反復投与時の多臓器影響に関する遺伝子変動解析

「目的」実験 II の目的は、 α -リポ酸の反復投与時の生体影響を、遺伝子発現レベルで多臓器にわたり検討し明らかにすることにある。

「実験方法」実験 I の単回経口投与の際の肝での遺伝子発現プロファイルを参考にしつつ、エネルギー産生が活発と考えられる組織である、心、肝、脳（大脳皮質、海馬、脳幹、小脳の 4 カ所）、腎及び肺につき、マウスに対する反復投与後の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。具体的には、各群 3 匹の雄性 C57BL/6 マウス（計 48 匹）に、用量設定実験ならびに実験 I の単回投与実験を参考に用量設定した α -リポ酸 (0、10、30 及び 100 mg/kg/day) [Cas No 1077-28-7] (シグマ) を 15 日間強制経口投与し、15 日目の投与 2、8、24 及び 48 時間後の各臓器の RNA を経時的にサンプリングした。投与容量は、14 日目までは 5 ml/kg とし 15 日目はすでに得ている単回投与時のデータとの整合性から 10 ml/kg とした。溶媒は 0.5% のメチルセルロース (MC) (SM-400、信越化学工業) 液とし、メノウ鉢 (XJ-0941-190、城戸メノウ乳鉢製作所) を用いて懸濁液を毎朝用時調整した。遺伝子発現変動解析にあたっては、マイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。

遺伝子発現変動解析 (PerceLLome 手法) と病理組織検査についての方法の概略は、溶媒が MC であることは平成 18 年度実験 II (単回投与) と同様であり、その他は、平成 18 年度実験 I (反復投与) と同様である。ただし、肺のサンプリングについては未記載であるため、以下に記載する。

肺は、胸腔に付けたままで気管から肺に RNA later を注入し、RNase の不活化を促した後、採取した左肺と右肺をそれぞれ体軸方向に二分割 (肺門側と末梢側) し、左肺と右肺の末梢側を RNA 用サンプルチューブに採取した。また、左肺と右肺の肺門側を 10% 中性緩衝ホルマリン水溶液で固定した後、HE 標本を作製し病理組織検索をおこなった。

上記の群に加えて、血糖値ならびに血中インスリン値を測定するために、サテライト群 (0、30、100 及び 300 mg/kg/day、各群 4 匹) を設け、15 日間反復強制経口投与 2 時間後 (飽食下) に眼窩静脈から採血した。血糖値の測定は、当毒性部の所有する 7180 形日立自動分析装置を用いておこなった。インスリン量の測定は、SRL 社に依頼し、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA: chemiluminescent enzyme immunoassay) によりおこなった。

「実験結果」サテライト実験（飽食下、投与2時間後）において、血糖値は投与群で溶媒投与群と比較し有意な変化はなかったが、血中インスリン値は、中用量、高用量投与群で有意に低下した（図2）。

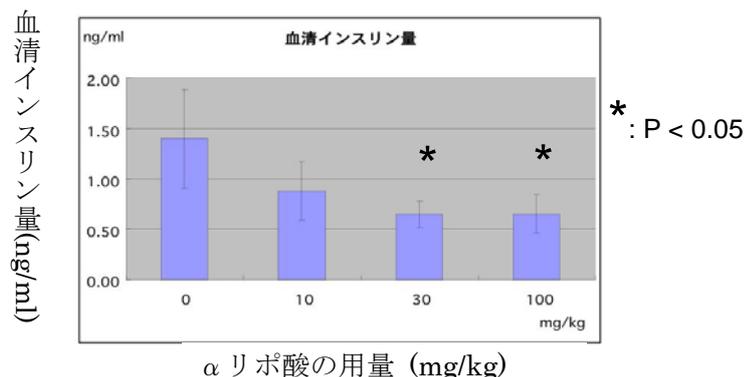


図2 αリポ酸15日間反復投与時、投与2時間後の血清インスリン値は（飽食下）、30mg/kg（中用量）及び100 mg/kg（高用量）投与群で有意に減少した。

平成19年度・実験II-A: 肝における遺伝子変動解析

αリポ酸合成酵素(Lias)遺伝子の発現は、高用量投与群において、投与4時間後に発現減少が、投与24時間後に発現増加が認められた。

次いで、αリポ酸単回投与時に肝で発現誘導が認められた「PGC1-HNF4」シグナル関連遺伝子の発現を検討したところ、いずれの採取時間、投与用量でも有意な変動は認められなかった。

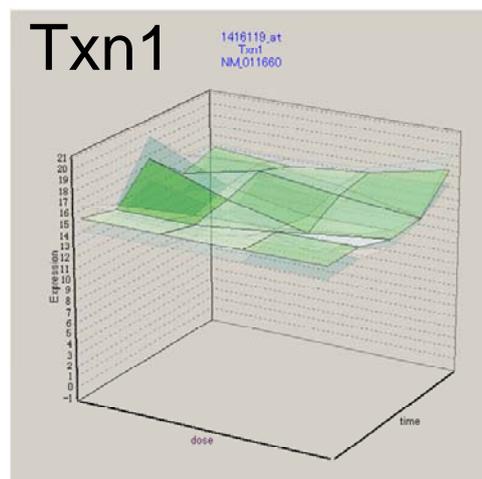
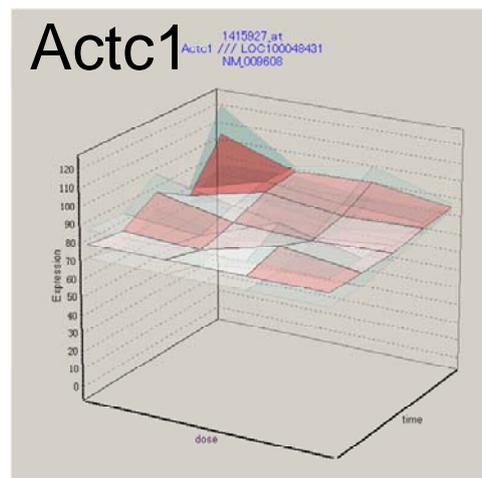
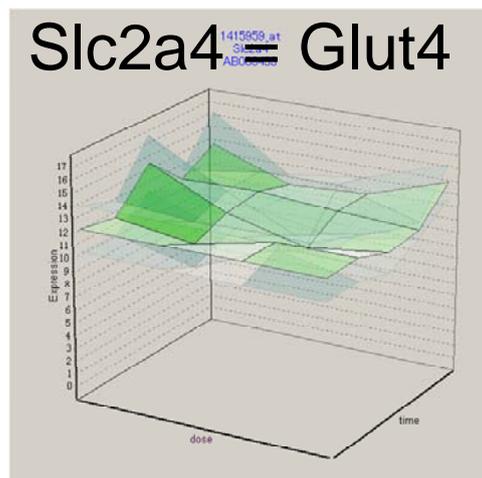
網羅的に遺伝子発現変動解析をしたところ、高用量投与群で、Ifit3 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3)、Isgf3g (interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma)、igp2 (interferon inducible GTPase 2)の各遺伝子などインターフェロンシグナル関連遺伝子の発現増加が認められた。

平成19年度・実験II-B: 心における遺伝子変動解析

αリポ酸単回投与時に肝で発現誘導が認められた「PGC1-HNF4」シグナル関連遺伝子の発現を検討したところ、いずれの採取時間、投与用量でも有意な変動は認められなかった。

そこで網羅的に遺伝子発現変動解析をしたところ、A) Glut4 遺伝子（糖輸送）、B) 解糖系やTCA回路関連遺伝子(Cs [クエン酸シンターゼ]、Gpi1[グルコースリン酸イソメラーゼ]、Gapdh[グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ]、Hk1[ヘキソキナーゼ]、Mdh2、Tpi1、Pgam2)、C) ミトコンドリア関連遺伝子（酸化リン酸化）(Ndufs8[NADH デヒドロゲナーゼ]、Ndufb5、Ndufa1、Ndufa3、Ndufb7、Ndufb11、Ndufa12、Ndufv1、Uqcrh、Cox5a、Cox5b、Cox6b1、Cox6a2、Cox8c、Atp5c1[H+ ポンプ]、Atp5j2、Atp5l、Atp5h)、D) 収縮蛋白系の遺伝子(Actc1[cardiac アクチン]、Tnnt2[トロポニン T2]、Pln[ホスホランバン]、Atp2a2[カルシウムポンプ]、Efcfbp2[EF ハンドカルシウム結合蛋白]、Mybpc3、Myl3)、E) 酸化的ストレス関連遺伝子(Txn1[チオレドキシ 1]、Srnl、Txnl1、Txnrd1、Prdx1)の発現増加が認められた（図3に抜粋したものを示す）。

図 3 心における Slc2a4、Actc1、Txn1 各遺伝子の発現変動



平成 19 年度・実験 II -C : 肺における遺伝子変動解析

網羅的に遺伝子発現変動解析をしたところ、熱ショック蛋白 (Hspb1、Hspala、Hspalb)、Cdkn1a (P21) をはじめとしたストレス応答が認められた。

平成 19 年度・実験 II -D : 海馬における遺伝子変動解析

神経興奮により、活性化したシナプス部位に蓄積する Arc 遺伝子 (activity regulated cytoskeletal-associated protein) が強く誘導され (投与 2、4、8 及び 24 時間後)、Tubb5 (tubulin beta5) (投与 4 時間後)、Gfap (投与 4 時間後) 遺伝子も増加したことから、神経活動が活性化している可能性が示唆された。酸化的ストレスやアポトーシスに関する遺伝子の発現については、顕著に変動するものは認められなかった。

「平成 19 年度・実験 II のまとめ」

- 1) α リポ酸反復投与時、血中インスリン濃度が低下したが、この理由として、 α リポ酸が末梢組織でインスリン様作用を発揮した結果である可能性が考えられた。この α リポ酸のインスリンに対する代償性 (インスリン感受性の増加) の証明には、今後、OGTT (経口ブドウ糖負荷試験) を実施する必要があるものと考えられた。
- 2) α リポ酸合成酵素 (Lias) 遺伝子の発現変動が認められた。したがって、 α リポ酸の摂取 (反復) は、投与直後の抑制とリバウンドというかたちで、 α リポ酸の生体内合成に影響するものと考えられた。
- 3) 有害事象が懸念される遺伝子発現変動解析結果として、心において、GLUT4 (糖輸送) 遺伝子、TCA

サイクル関連遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子（酸化リン酸化）、酸化ストレス関連遺伝子の発現増加が認められたことが挙げられる。 α リポ酸反復投与により心において、強制的なエネルギー代謝亢進が引き起こされ、酸化ストレスが誘発され、その結果、細胞壊死、線維化が誘発される可能性が示唆された。このような遺伝子発現変動は、 α リポ酸が心においてインスリン様作用を発揮した結果である可能性が示唆された。したがって、人でも長期摂取による心線維化が懸念され、心機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。PGC1 シグナル関連遺伝子の変動は認められなかったが、 α リポ酸反復投与時は肝でも認められなくなっていることを考慮すると、心においても単回投与時の遺伝子発現変動解析を検討する必要性が考えられた。

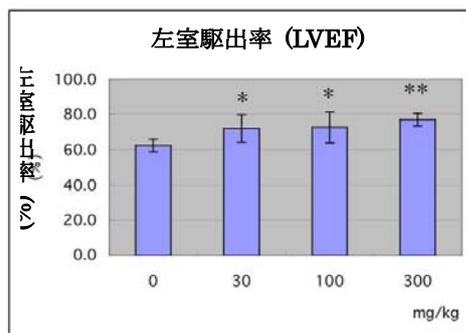
他方、雌雄 Sprague-Dawley ラットを用いた α リポ酸(0、20、60 及び 180 mg/kg/day) の 2 年間混餌投与毒性試験が報告されており、高用量群での摂餌量・体重の減少以外毒性学的変化は認められず、NOAEL(無毒性量)を 60 mg/kg/day と報告している(Cremer et al., Regul Toxicol Pharmacol 46:193-201, 2006)。この実験は、 α リポ酸を製造するドイツの医薬品メーカー degussa 社により行われている。我々は、0.5%MC を溶媒として α リポ酸投与液を用時調整しているが、この論文では、 α リポ酸を 1,2-プロピレングリコールに溶かした後に餌に混ぜ、混餌投与で検討している。 α リポ酸は抗酸化作用が報告されているにも関わらず、餌中での α リポ酸の安定性の検討はなされておらず、今後、この安定性の観点からこの論文については再評価する必要があるものと考えられた。

平成 19 年度・実験 III : CoQ10 反復投与時の心エコー測定による強心作用の有無についての検証

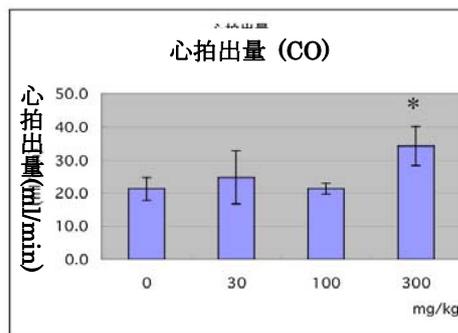
「目的」実験 III の目的は、平成 18 年度の CoQ10 反復投与において、肉眼的に認められた強心作用を、客観化・数値化することにある。この達成は、これまで報告がない正常な生体における CoQ10 の強心作用を実証することとなり、人での安全性評価上重要となる。

「実験方法」各群 6 匹の雄性 C57BL/6 マウス (計 24 匹) に、平成 18 年度の本研究と同様の用量である CoQ10(0、30、100 及び 300mg/kg/day) (シグマ) を 15 日間強制経口投与し (平成 18 年度実験 I (反復投与) と同様な方法)、15 日目の投与 2、24 及び 48 時間後の心機能を非観血的に心エコー装置 (超音波診断装置 : aplio、東芝メディカルシステムズ) により測定し、1) 1 回拍出量 (SV: stroke volume [μ L])、2) 左室駆出率 (LVEF: left ventricular ejection fraction [%])、3) 心拍出量 (CO: cardiac output [mL/分])、及び 4) 心拍数 (HR: heart rate [回/分]) を求めた。具体的には、胸部左側より心エコー装置を用いて心の二腔断層像をトレースし、拡張末期の心室中隔厚、左室内腔径、左室後壁厚及び収縮末期の左室内腔径を計測した。心エコー測定に際しては、2%イソフルラン (麻酔補助剤 ; 笑気 : 酸素 = 7 : 3) 吸入にて麻酔を行った。また、各測定時点で、全てのマウスを 2 時間以内に計測した。溶媒はコーンオイル (シグマ社製) とし、メノウ鉢を用いて CoQ10 懸濁液を作製し、毎朝用時調整とした。コーンオイルは開封後 3 日以内のものを使用し開封後は遮光・冷蔵保存した。心エコー測定については、パナファーム・ラボラトリーズ (熊本) (現、三菱化学メディエンス) に依頼した。

「実験結果」SV については、300 mg/kg 投与群で投与 2 時間後に、溶媒投与群と比較して約 1.6 倍有意に増加した。LVEF は、全ての投与群で投与 2 時間後に溶媒投与群と比較して用量依存的に増加した。CO は、300 mg/kg 投与群で投与 2 時間後に溶媒投与群と比較して約 1.6 倍、有意に増加した (図 4)。なお図には示さないが、HR については溶媒投与群と比較して投与群に有意な変化は認められなかった。投与 24 及び 48 時間後では、溶媒投与群と比較して投与群に有意な変化は認められなかった。



CoQ10 投与用量 (mg/kg)



CoQ10 投与用量 (mg/kg)

図4 CoQ10 15日間連続経口投与2時間後の心エコー測定結果。ここでは、左室駆出率、心拍出量のみを示す。心拍数には有意な影響を与えなかった (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)。

昨年度報告にある様に、CoQ10の15日間反復投与時、遺伝子発現変動解析の結果、心では、メカニカルストレス(Socs3)、炎症(thrombospondin 1)、線維化(connective tissue growth factor)に関わる遺伝子の用量依存的な発現増加が認められた。したがって、CoQ10反復投与により心肥大あるいは心線維化が誘発される可能性が示唆された。

「平成19年度・実験IIIのまとめ」

CoQ10の15日間強制経口投与により、投与2時間後、心拍数の変化を伴わずに心拍出量の増加が引き起こされ強心作用が認められること、投与2時間後の左室駆出率では全ての投与群(30、100及び300mg/kg/day)で有意に増加すること、これらの作用は投与24時間後には消失すること、が明らかとなった。以上のことから、CoQ10の長期摂取が、正常な心機能を有する人に対し強心作用を発揮し、心肥大あるいは心線維化を引き起こす可能性が導かれた。また昨年度報告では、心においてメカニカルストレス(Socs3)、炎症(thrombospondin 1)、線維化(connective tissue growth factor)に関わる遺伝子の用量依存的な発現増加が認められたことを報告している。今後、さらに1) CoQ10長期投与動物実験による心肥大、心線維化の検証、2) CoQ10を長期摂取している人の心機能に関する疫学調査等が必要であるものと考えられた。文献検索の結果、健康人(26名、62%男性、 24 ± 3 歳)に、CoQ10を50mg(体重50kg換算で1mg/kg/day)単回投与した際(対照群: プラセボ投与)、心拍出量の増加ならびに最大血圧の増加(最低血圧は変化なし)が認められたとする、すなわち心疾患者ではなく健康人においてCoQ10単回投与により強心作用が認められたという文献(Shah SA et al, Ann Pharmacother 41: 420-425, 2007)が見いだされた。したがって、人においてもCoQ10の長期摂取により強心作用が持続し、その結果、心での有害影響が誘発される可能性が十分に考えられた。

平成20年度・実験I: クルクミン単回投与時の肝における遺伝子発現変動解析

「目的」実験Iの目的は、抗腫瘍作用、抗酸化作用、抗炎症作用等を標榜する健康食品クルクミンの単回投与時の肝における影響及び誘発機序を分子レベルで感度よく明らかにすることにある。クルクミンはターメリック(ウコン)に含まれる黄色の色素で、カレー粉のスパイスや食品添加物(着色料、既存添加物)としても利用されている。健康食品としてのクルクミンの一日推奨摂取量は、200~2,000mgが目安とされている(体重50kg換算で4~40mg/kg/day)。文献上の半数致死量は、マウスでの経口投与で2,000mg/kg以上である。

「実験方法」クルクミンの遺伝子発現プロファイルを検討する目的で、当毒性部の遺伝子発現データベース(単回経口投与)と比較・検討するために、先ず、単回経口投与時における、当毒性部が所有す

る遺伝子発現データベースがもっとも整っている組織である肝について網羅的に遺伝子発現変動解析を検討した。用量設定実験の後、各群 3 匹の雄性マウス (C57BL/6CrSlc) (計 48 匹) にクルクミン (0、70、200 及び 700mg/kg) [458-37-7] (ナカライテスク) を単回強制経口投与し、投与 2、4、8 及び 24 時間後の肝の RNA を経時的にサンプリングした。投与容量は 10 (ml/kg) とした。溶媒はコーンオイル (C8267、シグマ) とし、メノウ鉢 (XJ-0941-190、城戸メノウ乳鉢製作所) を用いて懸濁液を用時調整した。遺伝子発現変動解析にあたっては、マイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いた。

遺伝子発現変動解析 (PerCellome 手法) と病理組織検査についての方法の概略は、単回投与実験であることは平成 18 年度実験 II (単回投与) と同様であり、その他は、平成 18 年度実験 I (反復投与) と同様である。

「実験結果」肝において網羅的に遺伝子発現変動を解析したところ、ATP アーゼ (Atp6v0a2) (8、24 時間後)、チトクロームオキシダーゼ (Cox7c) (24 時間後)、NADH デヒドロゲナーゼ (Ndufs7) (24 時間後) など、ミトコンドリア電子伝達系に關与する遺伝子の発現上昇が用量依存的に認められた (図 1)。

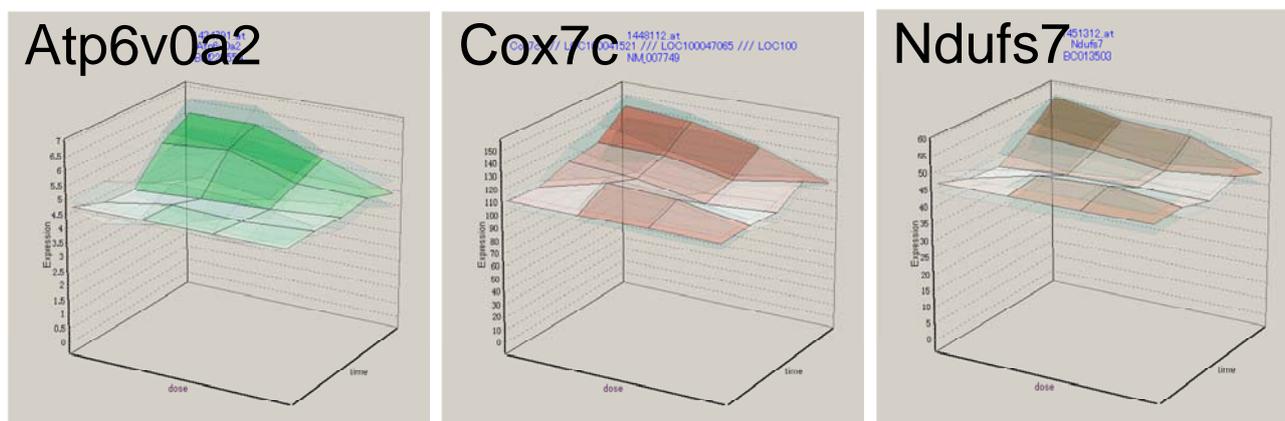


図1 肝でのミトコンドリア電子伝達系に關与する遺伝子 (左 : Atp6v0a2、中央 : Cox7c、右 : Ndufs7) の発現変動

加えて、ピルビン酸の合成に關与する嫌氣的解糖系酵素のピルビン酸キナーゼ (Pklr) (投与 2、8 時間後) および、エタノールから酢酸への代謝に關与するアルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 (Aldh2) (投与 24 時間後) とアルコールデヒドロゲナーゼ (Adh7) (投与 24 時間後) の遺伝子発現の増加が認められた (図 2)。

その他、酸化ストレスに關係するチオレドキシシン 1 (Txn1) (投与 24 時間)、グルタチオンペーパーオキシダーゼ 4 (Gpx4) (投与 24 時間後) の発現増加が認められた (図 3)。薬物代謝酵素では Cyp2d26 遺伝子の発現増加 (投与 24 時間後) が認められた。トランスポーターでは Slc20a2 (投与 24 時間後) および Slc9a3r2 (24 時間後) 遺伝子の発現増加が認められた。アポトーシスや細胞増殖に關係する遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。

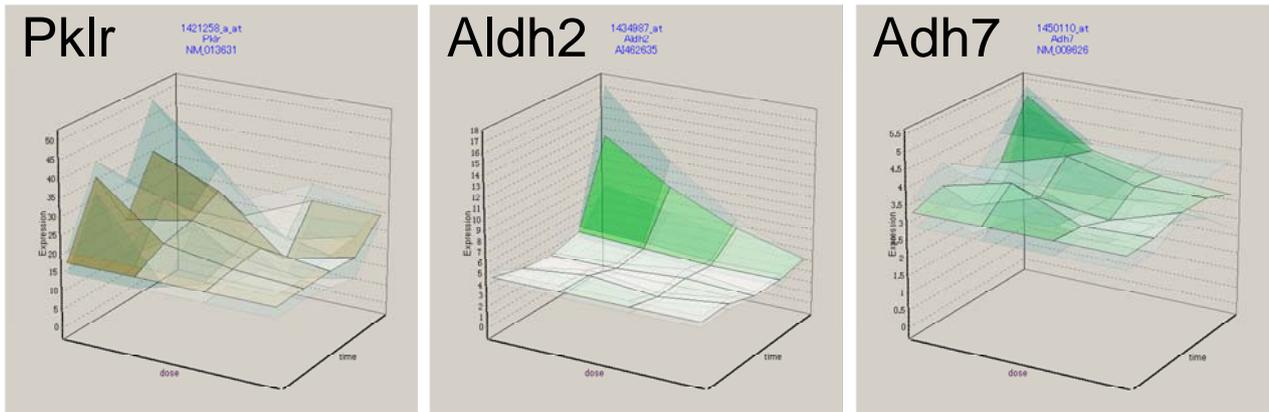
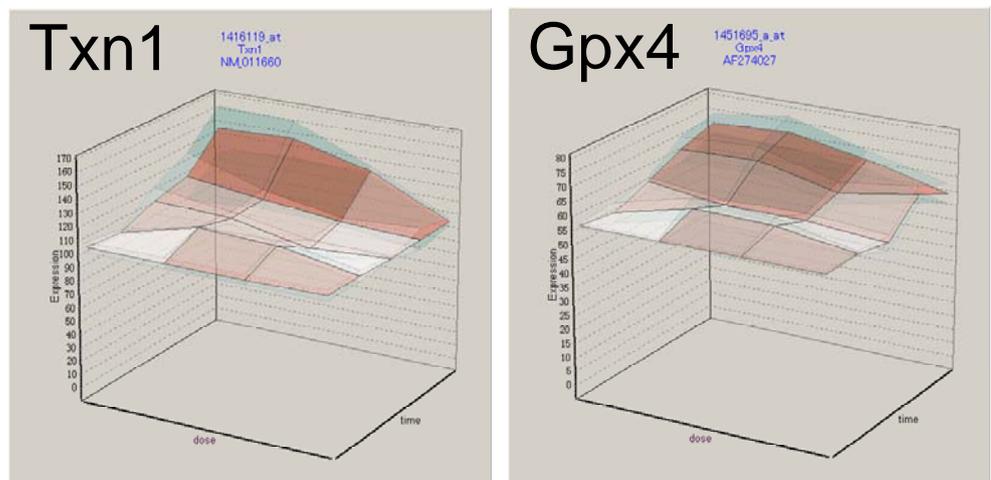


図 2 肝での嫌氣的解糖系およびアルコール代謝系に關する遺伝子 (左: Pklr、中央: Aldh2、右: Adh7) の発現變動

図 3 肝での酸化的ストレスに關する遺伝子 (左: Txn1、右: Gpx4) の発現變動



「平成 20 年度・実験 I のまとめ」

クルクミン単回投与時、肝ではミトコンドリア電子伝達系が活性化し、また標榜される抗酸化作用とは逆の酸化的ストレスが引き起されている可能性が示唆された。また、エタノールの分解に關する酵素 2 種の発現上昇が認められたが、この機序として、クルクミンあるいはこの代謝物が Adh 酵素の基質として働く可能性が示唆された。

平成 20 年度・実験 II：フォルスコリン単回投与時の多臓器影響に關する遺伝子變動解析

「目的」実験 II の目的は、瘦身を標榜する健康食品コレウス・フォルスコリの成分でありアデニル酸シクラーゼ活性化剤である「フォルスコリン」単回投与時の生体影響を、標的臓器の探索を考慮しつつ多臓器にわたり分子レベルで感度よく明らかにすることにある。アデニル酸シクラーゼの活性化により、多くの細胞で、AMP (cAMP) の細胞内濃度が上昇する結果、神経系、循環器系、肝代謝系、内分泌系など様々な細胞において多様な作用が誘発されると予想された。フォルスコリンは、南アジアに自生する *Coleus forskohlii* というシソ科植物の根に含まれる物質であり、薬理的に細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化し、多くの細胞で、(cAMP) の細胞内濃度が上昇する。その結果、神経系、循環器系、肝代謝系、内分泌系など様々な細胞に於いて多様な作用が誘発される。健康食品としてのフォルスコリンの一日推奨摂取量は、50~100 mg が目安とされている (体重 50 kg 換算で 1~2 mg/kg/day)。またこの水溶性誘導体は、医薬品 (アデール注) として、急性心不全を対象に、1 分間に 0.5 μg/kg で最長 72 時

間にて点滴静脈内投与により使用されている (720 μ g/kg/day)。文献上の半数致死量は、マウスでの経口投与で 3,100 mg/kg である。

「実験方法」用量設定実験の後、細胞内 cAMP 関連シグナルが主に関与すると考えられる、肝、腎、肺、心及び脳（海馬、大脳皮質、脳幹、小脳の 4 部位）について、各群 3 匹の雄性マウス（計 48 匹）にフォルスコリン(0、1、3 及び 10 mg/kg) [Cas No 66575-29-9] (バイオモル)を単回強制経口投与し、投与 2、4、8 及び 24 時間後の各組織の RNA を経時的にサンプリングし、先ず、肝、心、大脳皮質、肺、腎について遺伝子発現変動を網羅的に解析した。投与容量は 10(ml/kg)で、溶媒は 0.5%の MC (SM-400、信越化学工業) 液とし、メノウ鉢(XJ-0941-190、城戸メノウ乳鉢製作所)を用いて懸濁液を用時調整した。遺伝子発現変動解析にあたっては、マイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いた。

遺伝子発現変動解析(Percellome 手法)と病理組織検査についての方法の概略は、溶媒が MC であることと単回投与実験であることは平成 18 年度実験 II (単回投与)と同様であり、その他は、平成 18 年度実験 I (反復投与) (肺については平成 19 年度実験 II)と同様である。

用量設定実験は、平成 18 年度実験 I (反復投与)と同様の方法だが、具体的にはフォルスコリン(0、10、30、100 及び 300 mg/kg)を各群 3 匹につき単回強制経口投与をおこない、一般状態の観察、投与 24 時間後の剖検および死亡の有無を検討した。

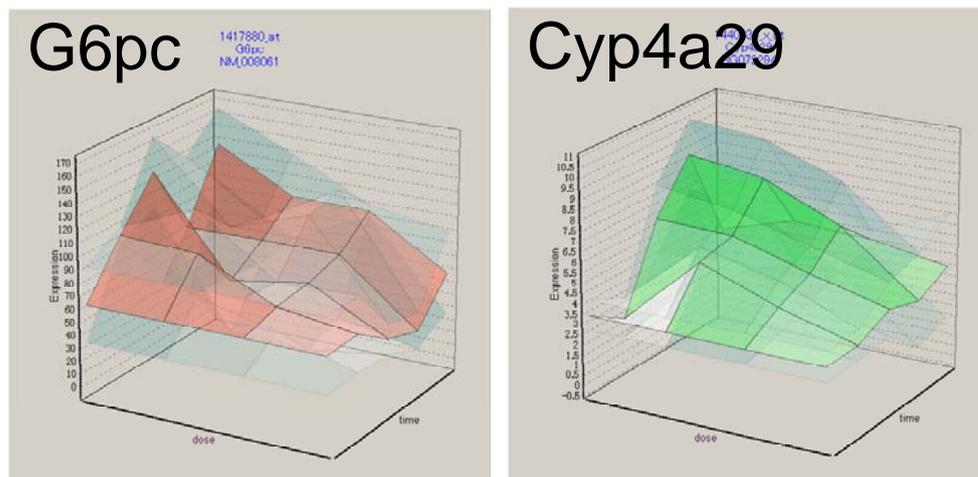
「実験結果」用量設定実験において、300 mg/kg のフォルスコリンの単回経口投与により下痢が認められ、3 匹中 2 匹 (1 匹は投与 3 時間後、他方は翌日) が死亡し、したがって半数致死量は、100~300 mg/kg となり、フォルスコリンは食品としては急性毒性が強く「劇物」に相当する化学物質であると考えられた。この点、文献値 (RTECS 情報) でのフォルスコリンの半数致死量は、マウス経口投与で 3,100 mg/kg であり、我々の検討結果とかなり異なり、安全性上、注意する必要があるものと考えられた。また投与 24 時間後の剖検では 100 mg/kg 以上の投与群で、消化管内に顕著な液体貯留や胃内出血が認められた。この機序に関し、コレラ毒素によるものと同様である可能性が考えられた。すなわち、コレラの毒素は激しい水様性の下痢を引き起すが、この機序として、フォルスコリンと同様に、消化管上皮細胞におけるアデニル酸シクラーゼの活性化と細胞内 cAMP 量の増加に続く各種イオンの輸送・吸収の障害が関与することが示唆されているためである。30 mg/kg 投与群でも消化管の弛緩傾向が認められた。以上の結果より、最高用量を 10 mg/kg と設定した。

平成 20 年度・実験 II-A : 肝における遺伝子変動解析

フォルスコリンの標的分子と考えられるアデニル酸シクラーゼは、肝では Adcy6 遺伝子の発現増加が、投与 8 時間後の中用量投与群で認められた。

網羅的に遺伝子発現変動解析をしたところ、グルコース-6-リン酸をグルコースにかえ、血中に放出させる酵素であるグルコース-6-ホスファターゼ (G6pc) (投与 2、24 時間後) 遺伝子の発現増加が認められた。したがって、血糖値が上昇する可能性が示唆された。薬物代謝酵素では Cyp4a29 遺伝子の発現増加 (投与 4、8 時間後) が認められた (図 4)。トランスポーターでは Slc41a3 の発現増加 (投与 8 時間後) が認められた。アポトーシス、細胞増殖や酸化的ストレスに関係する遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。

図4 肝での G6pc(左) および Cyp4a29(右) 遺伝子の発現変動

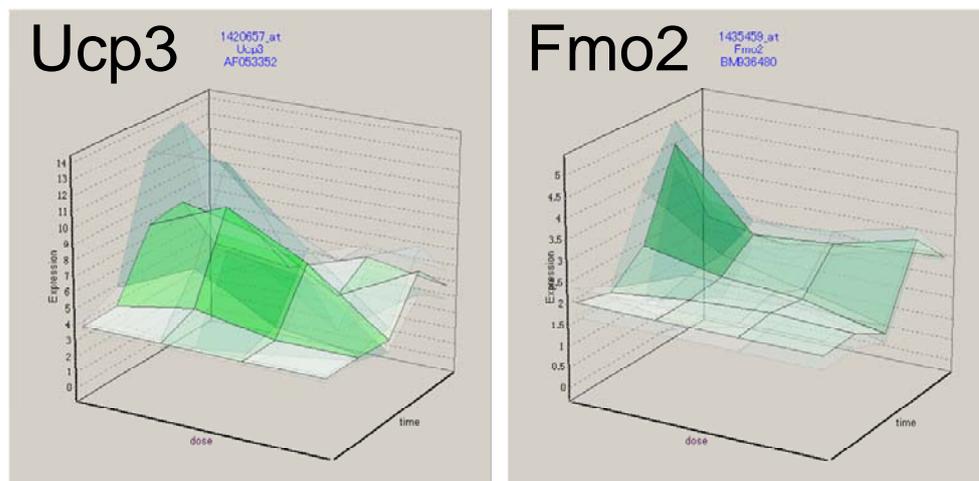


平成 20 年度・実験 II-B：心における遺伝子変動解析：

フォルスコリンの標的分子と考えられるアデニル酸シクラーゼは、心ではいずれのアイソフォームも顕著な変動は認められなかった。

網羅的に遺伝子発現変動解析をしたところ、脱共役蛋白質である UCP3 遺伝子の発現増加（投与 4 時間後）が認められた（図 5）。したがって、ミトコンドリア電子伝達系の活性化とそれに続く酸化ストレスが誘発される可能性が考えられたが、本実験では関連遺伝子の顕著な変動は認められなかった。薬物代謝酵素ではフラビン含有モノオキシゲナーゼ (Fmo2) 遺伝子の発現増加（投与 8 時間後）が認められた。アポトーシスや細胞増殖に関する遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。

図5 心での UCP3(左)、Fmo2(右) 遺伝子の発現変動



平成 20 年度・実験 II-C：大脳皮質における遺伝子変動解析：

フォルスコリンの標的分子と考えられるアデニル酸シクラーゼは、大脳皮質では Adcy3 および Adcy8 の発現増加（投与 24 時間後）が認められた。また、このシグナルの下流の遺伝子である Crebbp(投与 24 時間後)及び Crtc3(投与 24 時間後)の発現増加が認められた（図 6）。

網羅的に遺伝子発現変動解析をしたところ、神経伝達物質の受容体である GABA-A 受容体 (Gabra1) (Gabra2) (Gabra3) (Gabra5) (投与 24 時間後)、グルタミン酸受容体(Grik4) (投与 24 時間後)、ニューロペプチド Y(Npy5r) (投与 24 時間後)、プリン受容体(P2rx4) (投与 24 時間後)などの遺伝子の発現増加が認められた（図 7）。シナプスに関する Syap1 遺伝子の発現増加が認められた(投与 24 時間後)。またミトコンドリア電子伝達系に関与する ATP アーゼ(Atp6v1d) (投与 24 時間後)、チトクローム C

オキダーゼ (Cox11) (投与 24 時間後)、NADH デハイドロゲナーゼ (Ndufs3) (投与 24 時間後) などの遺伝子の発現増加が認められた (図 8)。加えて、スーパーオキシドディスムターゼ (Sod1) (投与 24 時間後)、チオレドキシン (Txn1, Txn2) (投与 24 時間後)、グルタチオンリダクターゼ (Gsr) (投与 24 時間後) など酸化ストレスに関与する遺伝子の発現増加が認められた (図 9)。薬物代謝酵素では Cyp46a1 遺伝子の発現増加 (投与 24 時間後) が認められた。トランスポーターでは Slc16a14 (投与 24 時間後) および Slc25a4、Slc25a39 や Slc25a44 の発現増加 (投与 24 時間後) が認められた。アポトーシスや細胞増殖に関係する遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。

フォルスコリン投与により、大脳皮質において、ミトコンドリア電子伝達系が活性化し、酸化ストレスが引き起されている可能性が示唆され、神経細胞への障害が懸念された。また、各種神経伝達物質の受容体の発現が増加していることから、神経伝達が興奮している可能性が示唆された。

図 6 大脳皮質でのアデニル酸シクラーゼ (Adcy3) (左) と Crebbp (右) 遺伝子の発現変動

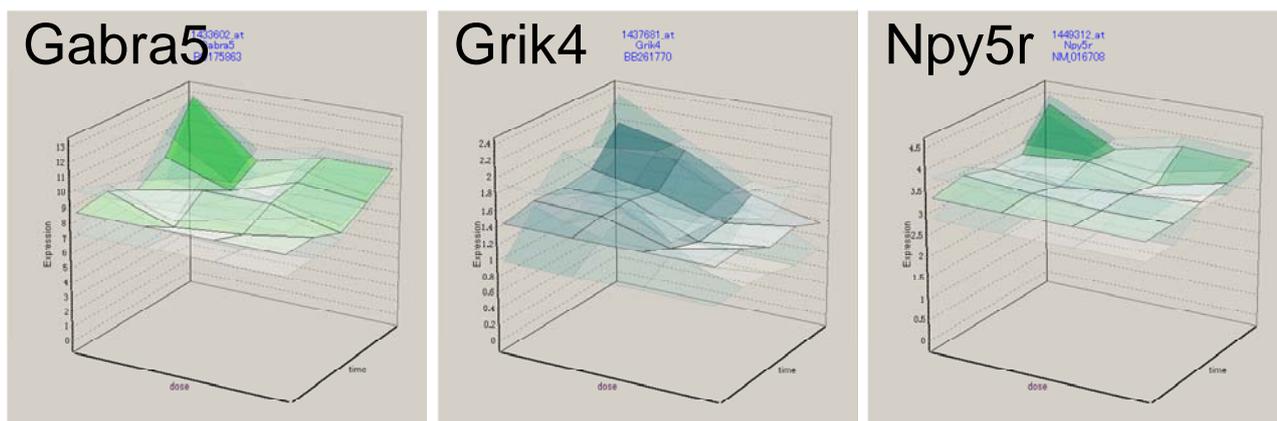
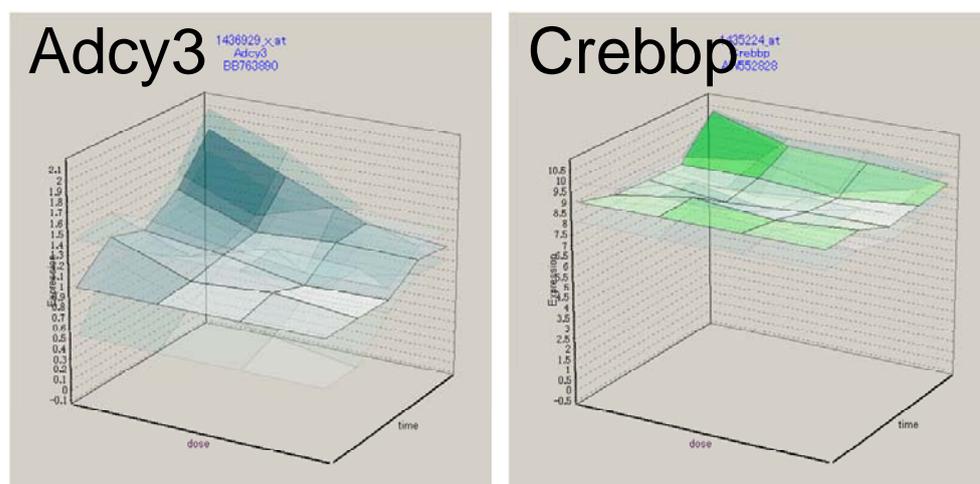


図 7 皮質での神経伝達物質受容体 Gabra5 (左)、Grik4 (中央)、Npy5r (右) 遺伝子の発現変動

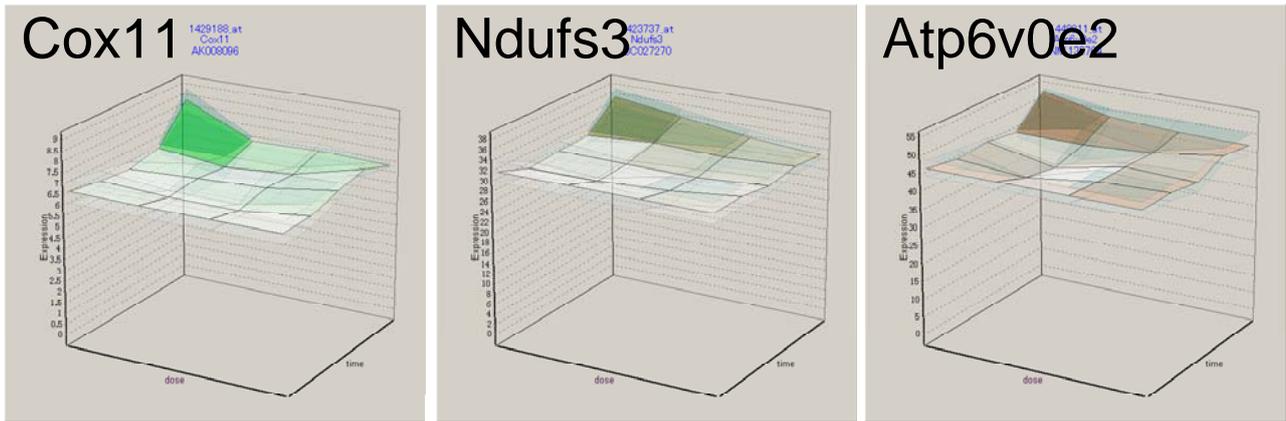


図8 大脳皮質でのミトコンドリア電子伝達系関連遺伝子 Cox11 (左)、 Ndufs3 (中央)、 Atp6v0e2 (右)の発現変動

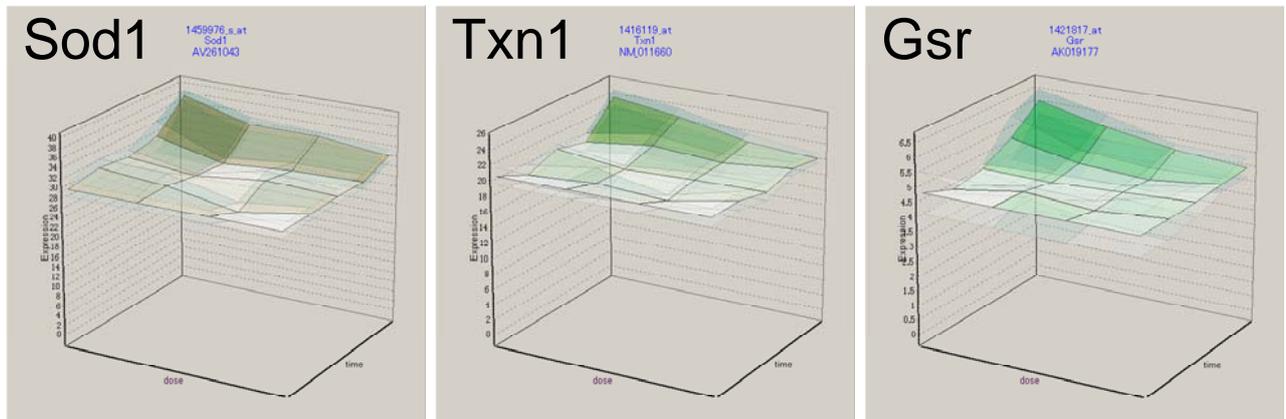


図9 大脳皮質での酸化ストレス関連遺伝子 Sod1(左)、Txn1(中央)、Gsr(右)の発現変動

平成 20 年度・実験 II-D：肺における遺伝子変動解析

フォルスコリンの標的分子と考えられるアデニル酸シクラーゼは、肺ではいずれのアイソフォームも顕著な変動は認められなかった。

網羅的に遺伝子発現変動解析をしたところ、がん遺伝子である Kras(投与 2 時間後)、Hras1(投与 4 時間後)遺伝子の発現増加が認められた (図 10)。また、酸化ストレス関連遺伝子であるパーオキシレドキシシン 1 と 4(Prdx1, Prdx4)(投与 4 時間後)遺伝子の発現増加が認められた。薬物代謝酵素では Cyp2b10 遺伝子の発現増加(投与 8 時間後)が認められた。アポトーシスや Ras 以外の細胞増殖に関する遺伝子、Prdx 以外の酸化ストレスに関する遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。この ras 遺伝子の発現増加と発がん性との関連は現時点では不明である。

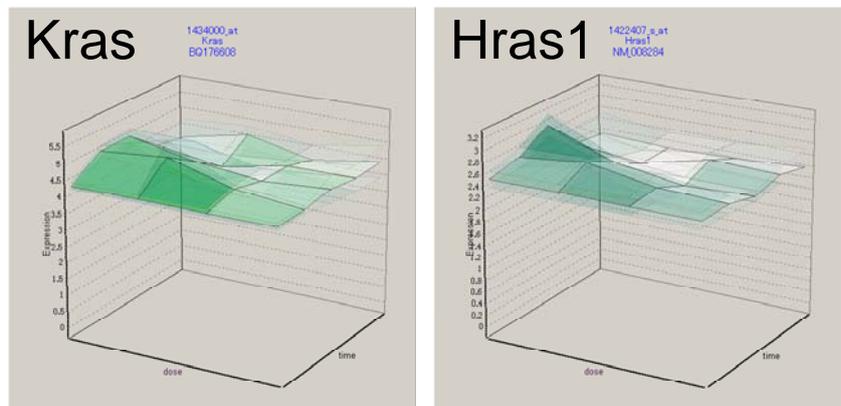


図 10 肺での Kras(左)、Hras1(右)遺伝子の発現変動

平成 20 年度・実験 II-E：腎における遺伝子変動解析

フォルスコリンの標的分子と考えられるアデニル酸シクラーゼは、肺ではいずれのアイソフォームも顕著な変動は認められなかった。

網羅的に遺伝子発現変動解析をしたところ、トランスポーターである Slc25a25(投与 4、8 時間後)遺伝子の発現増加が認められたが、アポトーシス、細胞増殖や酸化的ストレスに関係する遺伝子発現の顕著な変動は認められなかった。

「平成 20 年度・実験 II のまとめ」

フォルスコリンのマウスにおける急性毒性は、報告されているものよりもかなり強く、経口投与による半数致死量は、100～300 mg/kg であり「劇物」相当の化学物質であること、また、おそらく同じく細胞内 cAMP 量を増加させるコレラ毒素と同様な機序により、消化管内に液体貯留が誘発されることが明らかとなった。

肝、心、大脳皮質、肺、腎における遺伝子発現変動解析の結果、フォルスコリン単回経口投与により誘発される有害事象として、特に脳神経系における酸化的ストレスによる障害が懸念され、反復投与により、神経細胞死が誘発されることが懸念された。また、各種神経伝達物質受容体の発現変動が認められたことから、比較的選択的に神経伝達が活性化している可能性が示唆され、神経行動学的障害も懸念された。加えて肝から血液中にグルコースが放出され血糖値が上昇する可能性が示唆された。このことは、特に糖尿病患者がフォルスコリンを摂取する際に注意する必要があるものと考えられた。フォルスコリンの水溶性誘導体は、静脈投与により心不全治療薬として使用されることから、心の遺伝子に対して発現影響を及ぼす可能性が考えられたが、今回の実験結果からは、心における有害性を示唆する結果は得られなかった。

「本研究全体のまとめ」

本研究の目的は、食品中の問題となる特定の成分について実験動物での生体反応を観察し、それが人体にどの程度(定量的)、どの様(定性的)に再現されるかを的確に推定する為の、生体反応メカニズムに依拠した研究基盤を構築することにある。このために、平成 18 年度から平成 20 年度の 3 年間にわたり、いわゆる健康食品の成分の中で、国内で消費が多く利用者の年齢層も広く、一方で作用機序が不明な点の多い、CoQ10、 α リポ酸、フォルスコリンおよびクルクミンについて、申請者らが推進中のマウス・トキシコゲノミクス(Percellome プロジェクト)の実験プロトコルを適用し、マウスに単回あるいは反復投与した際の各臓器の遺伝子発現を網羅的に解析することで、生体反応のメカニズムに基礎を置いた生体反応のプロファイリングを行った。解析結果から、特に健康危惧情報に関することとして以下のことが明らかとなった。すなわち、CoQ10 は正常な心に対し強心作用を有しており、その摂取に際しては今後注意を要し、人での心機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。 α リポ酸は、インスリン様作用が示唆され、加えて心での強制的なエネルギー代謝亢進と酸化的ストレスが示唆され、長期摂取による心線維化が懸念され、人での心機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。フォルスコリンでは、文献とは異なり急性毒性が強く劇物相当の物質であり、この際、消化管内の液貯留、下痢、胃内出血が認められ、加えて、大脳皮質における神経伝達の非選択的な興奮と酸化的ストレスが示唆され、人での中枢神経機能障害に関する疫学調査が必要と考えられた。クルクミンでは、一般に標榜される抗酸化作用とは逆に、肝での酸化的ストレス関連遺伝子の発現変動が低用量群でも認められ、また、いわゆる健康食品としての一日推奨摂取量とのマージン(MOE: Margin of exposure)が狭い(1.8 倍)ことに注意が必要なものと考えられた。このように、それぞれの化学物質について特徴的なプロファイルを得、これをデータベースと比較参照することで人影響の推定情報を得た。加えて、次項目に示す通り健康危惧情報に関する情報提供も出来た。したがって、食品中の問題となる特定の成分についての安全性評価に際し、作用の分子機序の解明を通じた迅速・高精度な本アプローチ手法の基本的な部分は確立されたものと考えられ、食品安全に役立つものとする。

- (2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（論文は、添付すること。）
「なし」
- (3) 特許及び特許出願の数と概要
「なし」
- (4) その他（各種賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）
「なし」

3 今後の問題点等

本研究期間を通じて、数種類のいわゆる健康食品について、マウスに単回あるいは反復投与した際の各臓器の遺伝子発現を網羅的に解析し、メカニズムに基礎を置いた生体反応のプロファイリングを検討した。健康危惧情報に関連する有害作用が特に懸念される事項を、下記に記載する。

「CoQ10」：15日間強制経口投与により、心拍数の変化を伴わずに心拍出量の増加が引き起こされ強心作用が認められたこと、この作用は左室駆出率での検討では低用量群の30mg/kg投与群でも認められたこと、が挙げられる。CoQ10の長期摂取が、正常な心機能を有する人に対し強心作用を発揮し、心肥大あるいは心線維化を引き起こす可能性が示唆されたため、今後、1) CoQ10長期投与動物実験による心肥大、心線維化の検証、2) CoQ10を長期摂取している人の心機能に関する疫学調査等が必要であるものと考えられた。

本実験での投与量は、低用量群(30 mg/kg)において、人における一日摂取推奨量の最大量(体重50 kg換算で2 mg/kg/day)に対して体重換算では15倍量、体表面積(BSA, body surface area)換算では1.3倍量にあたる(人体重50kg、マウス体重30g換算。人の体重あたりの体表面積を1とした場合、マウスは11.9)。したがって、今回実験に使用したCoQ10投与量における摂取量とのマージン(MOE: Margin of exposure)は狭く、日常生活においても非現実的な摂取量ではないものと考えられる。

「 α リポ酸」：500mg/kg単回経口投与により、間代性けいれんと死亡例が認められ、食品成分としては比較的強い急性毒性が認められる(ほぼ文献値:502mg/kgと合致)。有害作用が懸念される点として、反復投与時の心における強制的なエネルギー代謝亢進と酸化ストレスシグナル活性化が挙げられ心線維化が懸念された。したがって、 α リポ酸を長期摂取している人の心機能に関する疫学調査等が必要であるものと考えられた。また α リポ酸反復投与時、血糖値に有意な変化がないものの、血中インスリン濃度(飽食下)が低下したが、この理由として、 α リポ酸が末梢組織でインスリン様作用を発揮した結果である可能性が考えられた。この α リポ酸のインスリンに対する代償性(インスリン感受性の増加)の証明には、今後、OGTT(経口ブドウ糖負荷試験)を実施する必要があるものと考えられた。なお、肝においてPGC/HNF4シグナルを活性化し糖新生を促進する可能性を見いだした。

本実験での投与量は、低用量群(10mg/kg投与群)において、人における一日摂取推奨量の最大量(体重50kg換算で3 mg/kg/day)に対して体重換算では約3倍量、体表面積(BSA, body surface area)換算では0.25倍量あたり(人体重50kg、マウス体重30g換算。人の体重あたりの体表面積を1とした場合、マウスは11.9)、日常生活においても非現実的な摂取量ではないものと考えられる。

「フォルスコリン」：用量設定実験における半数致死量が100~300mg/kgであり、報告(RTECS情報:3,100 mg/kg;マウス経口投与)よりもかなり強く「劇物」に相当する化学物質であると考えられる。また100 mg/kg以上の投与群で、消化管内に顕著な液体貯留、下痢や胃内出血が認められた。この機序に関し、コレラ毒素と同様である可能性が示唆された。単回投与時の大脳皮質における遺伝子発現変動解析により、脳神経系における酸化ストレスと非選択的な神経伝達の活性化が示唆され、連用時での中枢神経系の障害が強く懸念された。今後、神経行動学的実験の検討および人の中枢機能への影響に関する疫学調査が必要なものと考えられた。

この大脳皮質における発現変動は高用量群(10 mg/kg)で認められているが、他方、いわゆる健康食品としての一日推奨摂取量は最大で2 mg/kgであるため、フォルスコリン投与量における摂取量とのマージン(MOE: Margin of exposure)は比較的狭い(5倍量)。体表面積(BSA, body surface area)換算では、約0.4倍量にあたる(人体重50kg、マウス体重30g換算。人の体重あたりの体表面積を1とした場合、マウスは11.9)。したがって、日常生活においても非現実的な摂取量ではないものと考えられる。

「クルクミン」：一般に標榜される抗酸化作用とは逆に、肝での酸化ストレス関連遺伝子の発現変動が低用量群(70mg/kg)でも認められ、一方、いわゆる健康食品としての一日推奨摂取量は最大で40 mg/kgであるため、摂取量とのマージン(MOE: Margin of exposure)が狭い(1.8倍)ことに注意が必要なものと考えられた。