

博士論文

ホップ由来苦味成分と乳酸菌の
新規機能性に関する作用機序の検討
および健常人を対象とした有効性の検証

山崎 雄大

目次

〈略語一覧〉	3
〈序論〉	5
〈第1章 ホップ由来苦味成分による脂肪減少効果〉	11
第1節 消化管ホルモンを介したエネルギー消費促進の作用機序	12
1. 要約	12
2. 背景	13
3. 実験方法	14
4. 結果	18
5. 考察	21
第2節 消化管細胞における苦味受容体を介した消化管ホルモン分泌誘導作用機序	29
1. 要約	29
2. 背景	30
3. 実験方法	31
4. 結果	34
5. 考察	36
第3節 健常人における MHBA の脂肪減少効果の検証	42
1. 要約	42
2. 背景	43
3. 実験方法	45
4. 結果	49
5. 考察	52
〈第2章 乳酸菌による目の疲労感軽減効果〉	62
第1節 抗炎症性サイトカインを介した炎症抑制の作用機序	63

1. 要約	63
2. 背景	64
3. 実験方法	65
4. 結果	68
5. 考察	71
第2節 炎症性刺激による網膜色素上皮細胞老化に対する抑制作用機序.....	80
1. 要約	80
2. 背景	81
3. 実験方法	82
4. 結果	85
5. 考察	88
第3節 KW3110 乳酸菌摂取による健常人における日常的な目の疲労感軽減効果	96
1. 要約	96
2. 背景	97
3. 実験方法	98
4. 結果	101
5. 考察	103
〈総括〉	128
〈発表論文リスト〉	136
〈引用文献〉	137
〈謝辞〉	154
〈要旨〉	155

〈略語一覽〉

ALP	アルカリフォスファターゼ
ALT	アラニントランスアミナーゼ
ANCOVA	共分散分析
ANOVA	分散分析
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	アデノシン三リン酸
BAT	褐色脂肪組織
BAT-SNA	BAT に接続する交感神経活動
CCK	コレシストキニン
CFF	critical flicker frequency
DB	安息香酸デナトニウム
GLP-1	グルカゴン様ペプチド-1
DMSO	dimethyl sulfoxide
γ -GTP	γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ
Hb	ヘモグロビン量
HFC-1	調節微動高周波成分の出現頻度
Ht	ヘマトクリット値
IL-10	インターロイキン-10
KW3110 乳酸菌	<i>Lactobacillus paracasei</i> KW3110 株
LDH	乳酸脱水素酵素
LPS	リポ多糖
LSD	least squares difference
MHBA	熟成ホップ由来苦味酸
PI	ヨウ化プロピジウム
Plt	血小板数
POMS2	気分状態プロフィール 2 版
PYY	ペプチド YY
RBC	赤血球数
RFU	relative fluorescence units
SASP	老化関連分泌表現型
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
siRNAs	small interfering RNAs
TPPO	triphenylphosphine oxide
TRPM5	transient receptor potential cation channel subfamily M member 5
T2Rs	苦味受容体
VDT	visual display terminal
WBC	白血球数
ZO-1	zonula occludens-1

〈序論〉

食生活や生活環境の変化に伴い、現代病とも呼ばれる生活習慣病などの患者は年々増加の一途を辿っている。食品は疾病の予防や健康維持に貢献する機能を有しているため、食生活を健全化させ、生活習慣病をはじめとした様々な疾病を予防することが、食品機能の重要な課題の1つである。近年、数多くの食品由来成分に生体調節機能が存在することが報告され、それらを含む機能性食品が多数上市されている。機能性を表示した食品を販売するために、従来は、国による審査を経た上で保健機能の表示ができる「特定保健用食品制度」、もしくは栄養成分の機能性の表示ができる「栄養機能食品制度」が存在していた。これらの制度に加えて、2015年4月より、商品を販売する事業者の責任において食品の機能性を表示できる「機能性表示食品制度」が施行されたことも契機となり、機能性食品に対する科学的な関心がますます高まってきた。このような背景において、新規の機能性食品成分に関して作用機序の科学的根拠を明らかにするとともに、ヒトに対する有効性を検証する一貫した基礎研究が産業利用の観点から重要になってきた。

本研究では、数多くの食品素材の中から、ビールの主要な原料の1つであり、様々な健康機能が知られているホップ (*Humulus lupulus* L.) 由来の苦味成分である熟成ホップ由来苦味酸 (Matured hop bitter acids; MHBA)、および免疫システム向上機能などが知られておりプロバイオティクスの観点からも注目されている乳酸菌の1種であるラクトバチラス・パラカゼイ KW3110 株 (KW3110 乳酸菌) に着目した。そして、これらの新規機能性に関する作用機序の解明ならびにヒトに対する有効性の検証を目的として研究を行った。

1. 熟成ホップ由来苦味酸

ホップはアサ科のつる性植物であり、雌花につく毬花はビールの主要な原料の1つとして知られている (図 1)。ホップは特徴的な香りと爽快な苦味をビールに付与するために広く用いられている他、リラックス効果などを有するハーブの1つとしても用いられてきた歴史がある。ホップに含まれる成分については、これまでに様々な健康機能性があることが報告されている[1,2]。その中でも、ビールに含まれる主要な苦味成分であるイソ α 酸は、ホップの苦味成分である α 酸がビール醸造の煮沸工程において異性化して生成されるものである。このイソ α 酸については、エネルギー代謝調節や認知機能改善など様々な健康機能が明らかになっている[3,4]。特に、エネルギー代謝調節機能に関しては、イソ α 酸を主要な成分とする異性化ホップエキスが、肝臓における脂質酸化を調節すること、および腸管における脂質の吸収を阻害することにより食餌誘導性肥満

を予防する作用が報告されている[5]。以上のように、イソ α 酸には抗肥満作用をはじめとした様々な健康機能性が明らかになっているが、その非常に強い苦味のためにビール以外の食品に効果量を添加することは困難であった。一方で、熟成して酸化したホップを用いたビールではその苦味が低減していることが古くから知られている。貯蔵中のホップにおいて、苦味成分である α 酸および β 酸が酸化反応を受けて分解し、代わりに α 酸および β 酸に由来する多様な酸化化合物が生成され、それら化合物は総称して熟成ホップ由来苦味酸 (Matured hop bitter acids; MHBA) と命名された (図 2) [6,7]。近年、これらの酸化化合物のうち代表的なものの化学構造が同定され、これらは主に α 酸、 β 酸、イソ α 酸と共通した構造である β トリカルボニル構造を有することが明らかになった (図 3) [7-10]。MHBA は一般的なラガータイプのビールに 19-38 mg/L 含有され、長期間熟成を経て製造されるランビックタイプのビールには 100-151 mg/L、大量のホップを使用して醸造される India Pale Ale タイプのビールには 152-210 mg/L 含まれることが報告されている[7]。近年の研究において、 α 酸の酸化化合物群がイソ α 酸と比較して許容可能な苦味を呈することが報告されているため[11]、MHBA は様々な食品へ展開できる可能性が期待されている。



図 1. ホップの毬花

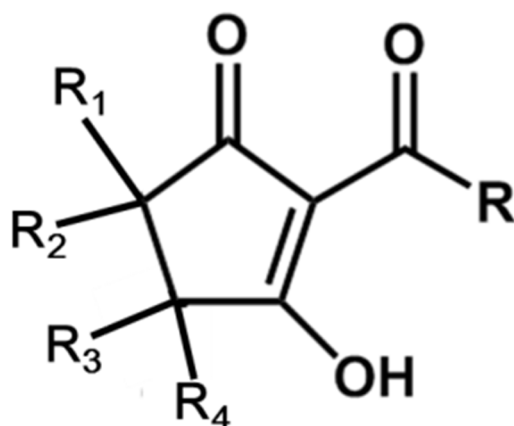


図 2. MHBA の構造式

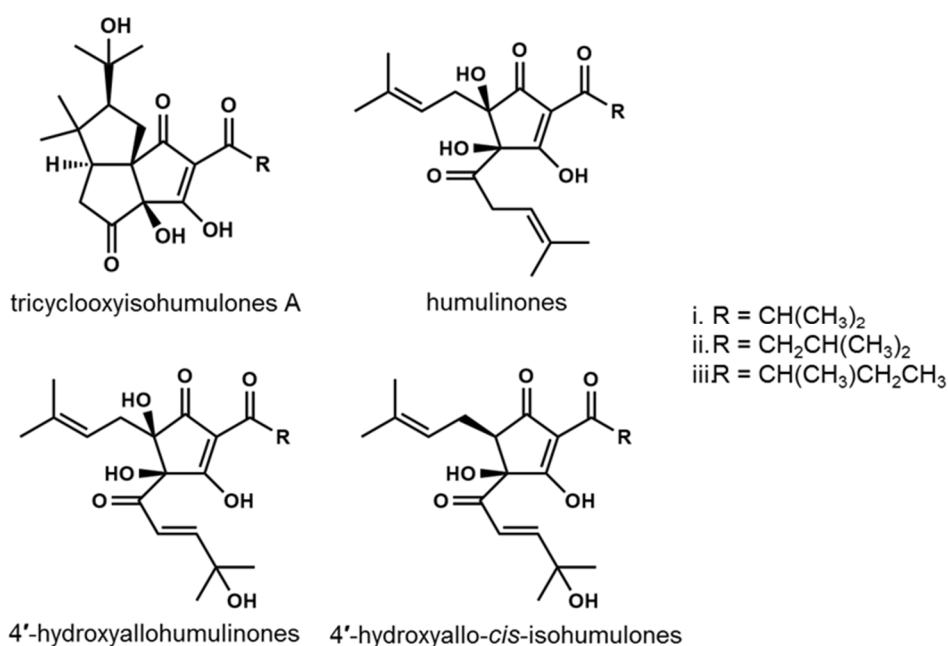


図 3. MHBA に含まれる代表的成分の構造式

これまでの研究において、MHBA は哺乳類動物において、自律神経系を介して褐色脂肪組織におけるエネルギー代謝を向上させ、抗肥満作用を発揮することが示されている[12]。一方で、MHBA の摂取がどのように自律神経系を介した褐色脂肪組織の活性化をもたらすか、その詳細な分子機序は明らかになっていない。本研究では、消化管における苦味受容と消化管ホルモンの働きに着目し、細胞および動物を用いてその作用機序の解明に取り組んだ。さらに、MHBA のヒトに対する有効性についても検証するため、

無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を行った。

2. ラクトバチラス・パラカゼイ KW3110 株

乳酸菌は、ヨーグルトやチーズなどの発酵乳製品をはじめとした様々な発酵食品の製造に古くから用いられ、食品への酸味の付与や長期保存化など、味や品質の向上に大きく寄与する機能を有している。それだけでなく、乳酸菌は植物やヒト腸管上皮などにも広く分布しており、特にヒト腸管においては多様な種類の細菌から構成される細菌叢の一部を形成することも知られている。腸管内に常在する乳酸菌は腸管バリア機能や免疫システムを向上させるなど、生体に有益な機能を有することから、乳酸菌はプロバイオティクス的手段として近年注目を浴びている[13]。近年の活発な研究によって、乳酸菌は腸内環境の改善作用の他にも、感染、腫瘍形成、アレルギーなど、様々な生体ストレスに対して効果を発揮することが明らかになっている[13-20]。また、これらのストレスに関連する生体応答である炎症は、感染などの外的要因だけでなく、加齢などの内的要因によっても引き起こされ、過剰もしくは慢性的な炎症状態が継続することで様々な疾患に繋がる可能性がある[21-24]。こうした炎症関連疾患を予防する戦略の1つとしても、乳酸菌などの免疫調節機能を有する食品素材の可能性が注目されている[25-27]。

乳酸菌の1種であるラクトバチラス・パラカゼイ KW3110 株 (KW3110 乳酸菌) はチーズなどの製造で使用されてきた経緯がある (図 4)。これまでの研究において、KW3110 乳酸菌は抗アレルギー作用や抗炎症作用を有することが明らかになっている[14,28-30]。抗アレルギー作用については、KW3110 乳酸菌がマクロファージに貪食され、インターロイキン (IL) -12 の産生誘導を介して Th1 有意な免疫応答を誘導し、マウスにおいてアトピー症状を抑制する作用が示されている。また、抗炎症作用については、KW3110 乳酸菌が抗炎症性の M2 マクロファージを活性化し、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生を誘導することで、マウスにおいて加齢に伴う慢性炎症を抑制する可能性が示唆されている[31]。また、KW3110 乳酸菌はマウスにおいてブルーライト照射による網膜での炎症を抑制すること、およびヒトにおいてディスプレイ端末を用いた (visual display terminal; VDT) 作業による急性的な目の疲労感を軽減することも示されている。しかしながら、KW3110 乳酸菌の抗炎症作用における詳細な分子機序については未だ明らかになっていない部分が多い。本研究では、マウスおよびヒトの免疫細胞を用いてその作用機序の解明に取り組んだ。さらに、KW3110 乳酸菌が慢性的なストレスによる目の疲労感に対しても有効性を発揮するか検証するため、網膜色素上皮細胞を用いた作用機序の検討、および無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を行った。

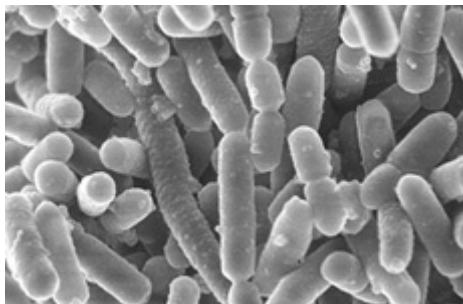


图 4. KW3110 乳酸菌

〈第 1 章 ホップ由来苦味成分による脂肪減少効果〉

第1節 消化管ホルモンを介したエネルギー消費促進の作用機序

1. 要約

ホップ中の苦味酸である α 酸、 β 酸はビールの貯蔵過程で酸化され、多様な苦味酸酸化物群である MHBA が生成される。近年、ラットへの MHBA 経口投与によりエネルギー消費促進機能を有する褐色脂肪組織 (brown adipose tissue; BAT) が交感神経を介して活性化され、熱産生が誘導されることが報告された。しかし MHBA がどのように交感神経に作用しうるか、という詳細な分子機序は不明であった。

そこで本研究では消化管内分泌細胞から産生される消化管ホルモンに着目した。消化管内分泌細胞に MHBA を投与すると、濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および消化管ホルモンであるコレシストキニン (CCK) の産生誘導が認められた。一方、これらの作用は培地中 Ca^{2+} の除去や L 型電位依存性カルシウムチャネル阻害剤の添加で消失した。また MHBA 投与による CCK 産生誘導はラット小腸でも確認されるとともに、ラットへの MHBA 経口投与により BAT に接続する交感神経活動の活性化および BAT の温度上昇が認められた。一方、これらの作用は CCK1 受容体阻害剤の投与によって阻害された。さらに、ラットへの CCK の腹腔内投与により BAT に接続する交感神経活動の上昇が認められ、その作用は迷走神経切離によって阻害された。

以上より、MHBA は消化管での CCK 産生を誘導し、CCK1 受容体および迷走神経を介して BAT に接続する交感神経活動を上昇させることが示唆された。これらの発見は、食品素材の抗肥満効果に関する新たな分子機序を見出したものと考えられる。

2. 背景

生物は食品や食品由来成分に関する情報を解釈するために、塩味、甘味、酸味、苦味、旨味といった 5 つの味を認識できる味覚システムを発達させてきた[32,33]。数多くの有毒物質は苦味を呈するため、苦味は一般的に負の感覚であり毒の危険を知らせるものとして考えられている一方、一部の苦味物質は抗肥満作用などの健康機能性を有することが動物実験により報告されている[34-37]。例えば、世界で最も苦味が強い物質として知られる安息香酸デナトニウム (denatonium benzoate; DB) は苦味受容体を活性化することにより、消化管ホルモンの 1 つであるグルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1; GLP-1) の分泌を誘導し、血糖値を低下させる作用が報告されている[36]。

消化管ホルモンは、ペプチドや脂肪酸、味物質などの食品由来成分をそれらに応答する受容体を介して認識することで、消化管ホルモンを分泌する[38-42]。コレシストキニン (CCK) や GLP-1、ペプチド YY (peptide YY; PYY) などいくつかの消化管ホルモンは神経伝達物質として働き、求心性迷走神経を介して中枢にシグナルを伝達し、食欲を抑制する作用が知られている[43-48]。CCK は十二指腸や空腸における消化管内分泌細胞より分泌される一方、GLP-1 および PYY は小腸下部や大腸の細胞より分泌される。これらのホルモンは DB、フェニルチオカルバミド、キニーネなどの苦味物質を含むリガンドの投与によって Ca^{2+} シグナルを介して分泌される[36,38,49]。消化管ホルモンはエネルギー代謝制御に関わることも示唆されているため、消化管において苦味物質がこれらのホルモン分泌を誘導する作用機序を明らかにすることは、代謝関連疾患の新たな治療、予防法の確立に貢献できることが期待される。

これまでに、他の様々な食品由来成分と同様に、ラットへの MHBA の経口投与により、熱産生を介してエネルギー消費を促進する働きを有する褐色脂肪組織 (brown adipose tissue; BAT) が活性化することが報告されている[12,50-53]。さらに、MHBA は BAT に接続する交感神経活動 (BAT-sympathetic nerve activity; BAT-SNA) を上昇させることで BAT を活性化することも知られている[12]。しかしながら、MHBA の経口投与がどのように BAT-SNA に作用しうるか、という詳細な分子機序は不明であった。

本研究では、MHBA が他の苦味物質と同様に消化管内分泌細胞における消化管ホルモンの分泌を誘導し、これらのホルモンが MHBA 投与による BAT-SNA の上昇に寄与しているという仮説を立てた。特に、抗肥満作用との関連が知られる代表的な消化管ホルモンである CCK、GLP-1、PYY に着目し、消化管内分泌細胞株として普及している STC-1 細胞を用いて MHBA の投与によるこれらのホルモンの分泌誘導について検証した。さらに、ラットへの MHBA の経口投与によってこれらのホルモンが分泌され、BAT-

SNA の上昇に寄与するか検証した。

3. 実験方法

1) 試薬

MHBA は既報に従い調製した[7]。ホップペレットを 60°C で 120 時間貯蔵して α 酸、 β 酸を酸化させた後、50°C の水で 1 時間抽出した。活性炭およびポリビニルポリピロリドンを加えて 2 時間処理した後、フィルター処理によりこれらを除去した。得られた溶液を 90°C で 4 時間加熱した後室温まで冷却し、凍結乾燥により粉末を得た。得られた粉末を水で溶解した後、塩酸添加による酸性条件下でジクロロメタン抽出を行い、無水硫酸ナトリウムによる脱水およびエバポレーターによる濃縮によって MHBA 画分を得た。

ジメチルスルホキシド (DMSO) (カタログ番号 043-07216)、KCl (カタログ番号 163-03545)、DB (カタログ番号 046-23561) は富士フィルム和光純薬社 (Osaka, Japan) より購入した。デバゼピド (CCK1 受容体阻害剤) (カタログ番号 D3821) および CCK-8 (CCK フラグメント) (カタログ番号 C2901) は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) より購入した。ジルチアゼム (L 型電位依存性カルシウムチャネル阻害剤) (カタログ番号 ALX-550-214-G001) は Enzo Life Sciences 社 (Farmingdale, NY, USA) より購入した。

2) 細胞

STC-1 細胞は、Simian virus 40 large T 抗原および Polyoma small T 抗原と繋がるラットインスリンプロモーターを有するダブルトランスジェニックマウスから、消化管内分泌腫瘍を抽出して確立した株である[54]。STC-1 細胞は ATCC 社 (Manassas, VA, USA) より購入し、10% ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン、および 100 μ g/mL ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Gibco 社, Grand Island, NY, USA) において 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

3) 蛍光顕微鏡による Ca²⁺イメージング

Ca²⁺イメージングは既報に基づき実施した[38]。STC-1 細胞を 6 cm ディッシュに置いた 12 mm のカバーガラス上で培養し、培地を除去した後に 1 μ M Fura-2AM (蛍光 Ca²⁺ 検出試薬) (同仁化学研究所、熊本、日本) (カタログ番号 F015) を含む bath 溶液 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、

2 mM MgCl₂、2 mM CaCl₂、10 mM glucose、pH 7.4) で 37°C、15 分間培養した。その後、カバーガラスを励起光波長 340 nm、387 nm、蛍光波長 510 nm に設定した蛍光顕微鏡（オリンパス社、東京、日本）に設置し、bath 溶液で灌流した後 100 µg/mL MHBA に切り替え、MHBA 投与前後の蛍光画像を取得した。

4) STC-1 細胞内の Ca²⁺濃度の測定

96 well black/clear プレート（CORNING 社、Kennebunk、ME、USA）に STC-1 細胞を 5×10⁴ cells/well で播種し、フェノールレッド不含 DMEM/F-12（Gibco 社、Watham、MA、USA）で一晩培養した。細胞内 Ca²⁺濃度の測定には Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit（Invitrogen 社、Carlsbad、CA、USA）を用い、細胞に Fluo-4 を添加して 25°C、30 分間培養し、プレートをイメージングプレートリーダーである FDSS/µCELL システム（浜松ホトニクス社、静岡、日本）に挿入した後、MHBA もしくは KCl 添加前後の Ca²⁺を検出した。励起光波長 480 nm および蛍光波長 540 nm に設定した際の蛍光変化を記録し、相対的な蛍光強度の最大値と最小値の差分 (Max - Min relative fluorescence units; ΔRFU) を算出した。細胞外 Ca²⁺除去条件下での測定においては、細胞を Ca²⁺不含 bath 溶液 (140 mM NaCl、5 mM KCl、10 mM HEPES、2 mM MgCl₂、10 mM glucose、5 mM ethylene glycol tetraacetic acid、pH 7.4) で洗浄した後、Fluo-4 を添加した。L 型電位依存性カルシウムチャネル阻害条件下での測定においては、Fluo-4 と共にジルチアゼムを細胞に添加し 25°C、30 分間培養した。

5) STC-1 細胞における消化管ホルモン分泌量の測定

STC-1 細胞による CCK、GLP-1、PYY 分泌量の測定は既報に基づき実施した[38,40]。CCK 測定においては 24 ウェルプレートに細胞を 5×10⁵ cells/well で播種して一晩培養し、GLP-1 および PYY 測定においては 6 ウェルプレートに細胞を 5×10⁵ cells/well で播種して 4 日間培養した。細胞を bath 溶液で 2 回洗浄した後、0.3% DMSO を含む bath 溶液で溶解した MHBA もしくは KCl を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 60 分間培養した。CCK についてはその分泌の時間依存性を確認するため、5、15、30、90 分間の培養時間についても検討した。細胞外 Ca²⁺除去条件下での測定においては Ca²⁺不含 bath 溶液を用い、L 型電位依存性カルシウムチャネル阻害条件下での測定においては、リガンド添加 30 分前にジルチアゼムを添加し培養した。培養後、各プレートから採取した上清を 125×g、4°C で 5 分間遠心し、酵素免疫測定キット（Phoenix Pharmaceuticals 社、Belmont、CA、USA）を用いて CCK、GLP-1、PYY を測定した。

6) 動物

雄性ウィスターラットを日本チャールス・リバー社（神奈川、日本）もしくは紀和実験動物研究所（和歌山、日本）より購入し、24℃、12 時間ごとの明暗サイクル（明期は 8:00 から 20:00）で飼育した。ラットは CE-2（日本クレア社、東京、日本）もしくはタイプ MF（オリエンタル酵母社、東京、日本）で 6 日間以上馴化し、馴化期間中は水および餌を自由摂取とした。BAT-SNA の測定に関するラットの取扱いについては、株式会社 ANBAS の動物実験倫理委員会の承認を得た後に、日本学術会議が策定した実験動物取扱規定を順守して行った（承認番号：ANBAS00440、ANBAS00471、ANBAS00496）。その他の実験については、キリンホールディングス株式会社の動物実験倫理委員会の承認を得た後に、実験動物取扱規定を順守して行った（承認番号：AN10385、AN10622、AN10627）。全ての施術は麻酔下で実施し、苦痛を最小限にするよう努めた。

7) ラット小腸における CCK 分泌量の測定

ラット小腸における CCK 分泌量の測定は既報に基づき実施した[55]。10 週齢の雄性ウィスターラットを 22 時間絶食させた後、幽門括約筋から 10 cm 下部の腸管を採取し、リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate-buffered saline; PBS）で内容物を優しく除去した後、腸管を反転させて 0.5 cm ごとの切片に切り分けた。過剰な粘液産生を防ぐため、腸管切片を Krebs 溶液（119 mM NaCl、4.7 mM KCl、2.5 mM CaCl₂、1.2 mM MgSO₄、1.2 mM KH₂PO₄、25 mM NaHCO₃、20 mM 2-Morpholinoethanesulfonic Acid、pH 6.5）に溶解した 0.5 mM ジチオスレイトールにおいて氷上で 30 分間、96 ウェルプレートで反応させた。それぞれの腸管切片を無作為に別の 96 ウェルプレートに移し、4% DMSO を含む Krebs 溶液に溶解した DB もしくは MHBA を添加して 37℃、5% CO₂ 条件下で 30 分間振盪しながら培養した。培養後、上清を採取して 5000×g、4℃、15 分間遠心し、酵素免疫測定キット（Phoenix Pharmaceuticals 社、Belmont、CA、USA）を用いて CCK を測定した。それぞれの腸管切片の重量を測定し、切片 1 g あたりの CCK 分泌量を算出した。

8) ラットにおける BAT-SNA の測定

BAT-SNA は既報に基づき測定した[12,56,57]。9 週齢の雄性ウィスターラットを 3 時間絶食させた後、ウレタンを 1 g/kg で腹腔内投与して麻酔を行い、口腔カニューレを胃内に挿入して開腹した。肩甲骨間の BAT に接続する交感神経の遠位端を露出させ、銀電極を接続して安定化させた後、電極からの電気信号を収集、増幅してオシロスコープ上

で記録した。ウィンドウ識別子を用いて生データをパルス信号に変換することで神経活動を解析した。体温は保温マットを用いて $35.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ もしくは $35.3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。その後、 1.08 mM CaCO_3 に溶解した MHBA もしくは DB を口腔カニューレを用いてラットに経口胃内投与し、コントロール群においては、MHBA もしくは DB 溶液と同じ pH 7 調整した 1.08 mM CaCO_3 を投与した。CCK1 受容体の阻害実験においては、MHBA もしくは DB の投与 15 分前に、5% DMSO および 5% Tween-80 を含む生理食塩水に溶解したデバゼピドを 1 mg/kg で腹腔内投与した。迷走神経伝達の阻害実験においては、BAT-SNA の記録前に横隔膜下の迷走神経を切除し、偽手術においては迷走神経を切除することなく開腹手術のみ実施した。その後、生理食塩水もしくは生理食塩水に溶解した CCK-8 をラットに腹腔内投与した。

9) ラットにおける BAT 温度の測定

BAT 温度の測定は既報の方法を一部改変して実施した[12]。9 週齢の雄性ウィスターラットを 3 時間絶食させた後、ウレタンを 1.5 g/kg で腹腔内投与して麻酔を行い、温度センサープローブ（立山科学工業社、富山、日本）を肩甲骨間の BAT および僧帽筋の間に挿入し、挿入部位を絹糸で縫合した。出力信号を温度デジタルシグナル変換機（立山科学工業社、富山、日本）を用いて処理し、得られたデータを Ds Sensor 10.7（立山科学工業社、富山、日本）を用いて解析した。MHBA の経口投与においては、ラットを 34°C に設定した保温マット上に設置した後、口腔カニューレを胃内に挿入することで投与を実施した。CCK1 受容体の阻害実験においては、5% DMSO および 5% Tween-80 を含む生理食塩水に溶解したデバゼピドを腹腔内投与し、15 分後に 1.08 mM CaCO_3 に溶解した MHBA を口腔カニューレを用いて経口胃内投与した。コントロール群においては、 1 N HCl を用いて MHBA 溶液と同じ pH 7 に調整した 1.08 mM CaCO_3 を投与した。MHBA 投与後、BAT 温度を 3 時間測定した。

10) 統計解析

各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計的有意差は、Student の t 検定、Mann-Whitney の U 検定、Dunnnett 法を事後検定とする分散分析 (analysis of variance; ANOVA)、および反復測定 ANOVA によって解析した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であると判断した。

4. 結果

1) MHBA は細胞外 Ca^{2+} の流入を介して STC-1 細胞内 Ca^{2+} の濃度を上昇させる

消化管内分泌細胞において、消化管ホルモンは細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して分泌される[38]。本研究では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して消化管ホルモンを分泌する STC-1 細胞株を用いて、MHBA が消化管内分泌細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させるか検討した[38,40-42,58,59]。蛍光顕微鏡を用いて MHBA 添加前後の Ca^{2+} イメージングを実施した結果、MHBA 添加によりほぼ全ての細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた(図 1-1-1A)。さらに、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化をリアルタイムで測定することにより、MHBA 添加濃度依存的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇も認められた(図 1-1-1B)。一方、細胞外 Ca^{2+} の非存在下では、MHBA 添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が有意に抑制された($P<0.01$) (図 1-1-1C)。MHBA 添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、L 型電位依存性カルシウムチャネルの阻害剤であるジルチアゼムの添加によっても有意に抑制された($P<0.01$) (図 1-1-1D)。この実験においては、脱分極剤である KCl をポジティブコントロールとして用い、KCl 添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇もジルチアゼムの添加によって有意に抑制された($P<0.01$)。以上の結果から、MHBA は細胞外 Ca^{2+} の流入を介して STC-1 細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることが示唆された。

2) MHBA は STC-1 細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を介して CCK 分泌を誘導する

次に、MHBA の添加によって STC-1 細胞における CCK、GLP-1、PYY の分泌が誘導されるか検討した。MHBA (50、100、200 $\mu\text{g/ml}$) を STC-1 細胞に添加し、60 分後のそれぞれの消化管ホルモンの分泌量を測定した。CCK の分泌量は MHBA 添加濃度依存的に上昇することが認められた(図 1-1-2A)。GLP-1 の分泌量は MHBA (200 $\mu\text{g/ml}$) の添加で有意に上昇したが($P<0.01$) (図 1-1-2B)、PYY の分泌量には変化が認められなかった(図 1-1-2C)。また、CCK の分泌量は MHBA 添加後 5 分で上昇し、60 分で最大値に達した(図 1-1-2D)。一方、細胞外 Ca^{2+} 非存在下では、MHBA 添加による CCK 分泌量の上昇は有意に抑制された($P<0.01$) (図 1-1-2E)。さらに、MHBA もしくは KCl 添加による CCK 分泌量の上昇も、ジルチアゼムの添加により有意に抑制された(MHBA 添加群では $P<0.05$ 、KCl 添加群では $P<0.01$) (図 1-1-2F)。以上の結果から、STC-1 細胞において、細胞外 Ca^{2+} の流入を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は MHBA による CCK 分泌量の上昇に重要な役割を担っていることが示唆された。

3) MHBA はラット小腸における CCK の分泌を誘導する

図 1-1-2 で示されたように、MHBA は STC-1 細胞における CCK の分泌を誘導した。MHBA によって消化管における CCK の分泌が誘導されるか検討するため、ラット小腸を単離し、MHBA 添加後 30 分における培養上清中の CCK 分泌量を測定した。その結果、MHBA 添加により CCK の分泌量の有意な上昇が認められた ($P<0.05$) (図 1-1-3)。また、ラット小腸に DB を添加することでも同様に CCK の分泌量の有意な上昇が認められた ($P<0.05$) (図 1-1-3)。以上の結果から、MHBA および DB はラット小腸における CCK の分泌を誘導することが示唆された。

4) ラットへの MHBA 投与による BAT-SNA の上昇に対する CCK1 受容体の関与

これまでに、ラットへの MHBA の経口投与により BAT-SNA が上昇することが報告されている[12]。MHBA の経口投与による BAT-SNA の上昇に CCK シグナリングが関与しているか検討するため、MHBA の経口投与前に、CCK1 受容体の阻害剤であるデバゼピドをラットに腹腔内投与した[60]。まず、MHBA を経口投与すると、コントロール群と比較して BAT-SNA の有意な上昇が認められた ($P<0.05$) (図 1-1-4A、C)。一方、デバゼピドを投与した場合、MHBA 投与による BAT-SNA の上昇は認められなかった (図 1-1-4B、C)。なお、コントロール群と MHBA 投与群、およびコントロール群とデバゼピド投与群の初期値に統計的有意差は認められなかった (Mann-Whitney の U 検定)。以上の結果から、MHBA の経口投与による BAT-SNA の上昇に CCK1 受容体が関与することが示唆された。

次に、他の苦味物質が MHBA と同様の作用機序を有するか検討するため、DB をラットに経口投与した結果、コントロール群と比較して BAT-SNA の有意な上昇が認められた ($P<0.05$) (図 1-1-4D、F)。一方、デバゼピドを投与した場合、DB 投与による BAT-SNA の上昇は認められなかった (図 1-1-4E、F)。なお、コントロール群と MHBA 投与群、およびコントロール群とデバゼピド投与群の初期値に統計的有意差は認められなかった (Mann-Whitney の U 検定)。以上の結果から、MHBA を用いた結果と同様、DB の経口投与による BAT-SNA の上昇に CCK1 受容体が関与することが示唆された。

5) ラットへの CCK-8 の投与は迷走神経求心枝を介して BAT-SNA を上昇させる

既報において、MHBA は迷走神経求心枝を介して BAT-SNA を上昇させる可能性が示唆されている[12]。本研究では、CCK が迷走神経求心枝に作用して BAT-SNA を上昇させるか検討した。CCK-8 をラットに腹腔内投与した結果、BAT-SNA の有意な上昇が認められた ($P<0.01$) (図 1-1-5A、C)。一方、横隔膜下の迷走神経切除により CCK-8 投与

による BAT-SNA の上昇は阻害された (図 1-1-5B、C)。なお、コントロール群と CCK-8 投与群、および偽手術群と迷走神経切除群の初期値に統計的有意差は認められなかった (Mann-Whitney の U 検定)。以上の結果から、MHBA と同様に、CCK-8 は迷走神経求心枝を介して BAT-SNA を上昇させることが示唆された。

6) ラットへの MHBA 投与による BAT 温度の上昇に対する CCK1 受容体の関与

これまでに、ラットへの MHBA の経口投与により BAT 温度が上昇することが報告されている[12]。MHBA の経口投与による BAT 温度の上昇に CCK シグナリングが関与しているか検討するため、MHBA の経口投与前にデバゼピドをラットに腹腔内投与した。まず、MHBA を経口投与すると、既報と同様にコントロール群と比較して BAT 温度の有意な上昇が認められた ($P<0.01$) (図 1-1-6A) [12]。一方、デバゼピドを投与した場合、MHBA 投与による BAT 温度の上昇は認められなかった (図 1-1-6B)。なお、コントロール群と MHBA 投与群、およびコントロール群とデバゼピド投与群の初期値に統計的有意差は認められなかった (Mann-Whitney の U 検定)。以上の結果から、MHBA の経口投与による BAT 温度の上昇に CCK1 受容体が関与することが示唆された。

5. 考察

既報において、MHBA がラットの BAT-SNA を上昇させることで BAT における熱産生を誘導することが示されてきた[12]。一方、MHBA が BAT-SNA にどのように作用するか、その詳細な分子機序が明らかになっていなかったため、本研究では MHBA の作用機序を解明するために消化管ホルモンに着目した一連の実験を実施した。

DB やフェニルチオカルバミド、キニーネのような一部の苦味物質は消化管内分泌細胞における消化管ホルモンの分泌を誘導することが報告されている[36,38,49,61,62]。STC-1 細胞においては、これらの苦味物質は CCK および GLP-1 の分泌を誘導するが、PYY の分泌については報告されておらず[38,61,62]、本研究で MHBA を用いて得られた結果と一致する。CCK の分泌は MHBA 添加後 5 分で既に確認され（図 1-1-2D）、それは BAT-SNA が MHBA もしくは CCK-8 の投与後まもなく上昇した結果とも時系列として妥当である（図 1-1-4、1-1-5）。従って、MHBA の投与後に迅速に CCK が分泌されることで、ラットの BAT-SNA が迅速に上昇する可能性が考えられる。

ラット小腸への MHBA もしくは DB の添加により、CCK の分泌が誘導された（図 1-1-3）。また、ラットへの MHBA もしくは DB の経口投与により BAT-SNA が上昇し、その作用は CCK1 受容体の阻害剤投与により抑制された（図 1-1-4）。MHBA もしくは DB を用いた結果と同様に、CCK-8 の腹腔内投与により BAT-SNA が上昇し、その作用は横隔膜下の迷走神経切除により阻害された（図 1-1-5）。さらに、MHBA の経口投与により誘導される BAT 温度の上昇も、CCK1 受容体の阻害剤投与により抑制された（図 1-1-6）。CCK1 受容体は消化管における迷走神経などの末梢組織に発現し、外部の栄養シグナルを中枢に伝達する役割を有する[63]。脂肪酸などの食品由来成分による末梢の CCK シグナリング活性化は BAT の活性化に関連する一方で、苦味物質が BAT を活性化する詳細な作用機序については明らかになっていない[64]。本研究により、MHBA が末梢の CCK1 受容体を介して BAT を活性化すること、および DB が末梢の CCK1 受容体を介して BAT-SNA を上昇させることが明らかになった。以上より、苦味物質は末梢における CCK の分泌および神経伝達を介して BAT を活性化する可能性が示唆された。

消化管ホルモンはリガンドに応答し、消化管内分泌細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を介して分泌される。本研究では、STC-1 細胞への MHBA 添加が、L 型電位依存性カルシウムチャネルを介した細胞内への Ca^{2+} 流入を促進し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して CCK の分泌を誘導することを明らかにした（図 1-1-1、1-1-2）。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇および消化管ホルモンの分泌は L 型電位依存性カルシウムチャネルの他にも transient receptor potential (TRP) チャネルや味受容体により制御されている可能性があるため、本研究で

示した MHBA の作用機序には複数のカルシウムチャネルや受容体が関与している可能性は否定できない[38,40,41,65]。STC-1 細胞にはいくつかの苦味受容体 (taste 2 receptors; T2Rs) が発現しており、苦味物質はこれらの T2Rs を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、消化管ホルモンの分泌を誘導している可能性が考えられる[38,66,67]。MHBA と共通の部分構造を有するイソ α 酸はいくつかの T2Rs に作用することが知られているため、MHBA も T2Rs に作用している可能性が考えられる[7,68]。MHBA が CCK の分泌を誘導する作用機序に関与している T2Rs を同定するためには、今後さらなる研究が求められる。

最近の研究により、哺乳類動物およびヒト幼児だけでなく、ヒト成人においても BAT の存在が報告されているが、代謝活性のある BAT は若齢者においては 5 割程度、そして高齢者および肥満者においてはさらに低い割合しか含まれていない[69]。しかしながら、交感神経の活性化により代謝活性のある BAT が誘導されてくることが哺乳類動物およびヒトの両方で報告されている。例えば、カプシノイド(カプサイシンのアナログ)の成分であるカプシエイトはラットへ単回投与することにより、BAT-SNA を上昇し BAT 温度を上昇させる[70]。また、BAT における熱産生因子である脱共役タンパク質 1 (UCP1) の発現レベルはマウスへのカプシエイトの継続投与により上昇する[71]。ヒトにおいては、カプシノイドの 6 週間にわたる継続摂取により、BAT の代謝活性が減少している被験者において代謝活性のある BAT が誘導されている[72]。MHBA についてはこれまでに、マウスへの継続投与により BAT における脱共役タンパク質 1 の発現上昇が認められている[12]。今後、ヒトにおける MHBA の BAT 活性化作用についてはさらなる研究が求められる。

本研究において、MHBA の投与により消化管における CCK の分泌が誘導され、CCK シグナリングが迷走神経求心枝を介して BAT-SNA へと伝達されることが明らかとなった。また、MHBA の投与は CCK1 受容体を介して BAT 温度を上昇させることも示された。以上の結果は、ビールの原料であるホップ由来の食品素材がエネルギー消費を促進する新たな作用機序を明らかにしたものである。

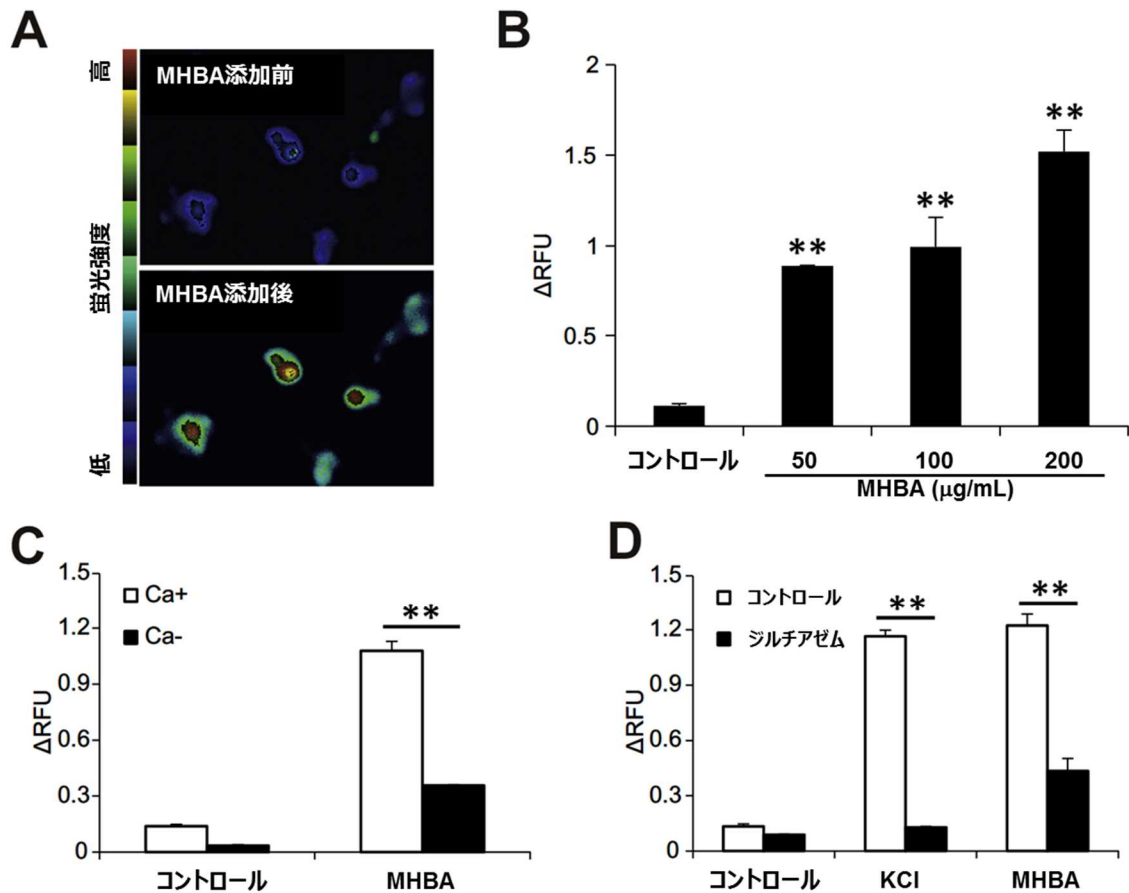


図 1-1-1. 細胞外 Ca^{2+} の有無もしくはジルチアゼムの添加条件において MHBA が細胞内 Ca^{2+} 濃度に与える影響

(A) STC-1 細胞への MHBA (100 $\mu\text{g/mL}$) 添加前後の Ca^{2+} イメージングを Fura-2AM (1 μM) を用いて実施した。(B) MHBA (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 添加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を FDSS/ μCELL を用いて測定した。(C) 細胞外 Ca^{2+} の存在もしくは非存在下における MHBA (100 $\mu\text{g/mL}$) 添加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した。(D) ジルチアゼム (1 mM) 添加 30 分後に、KCl (25 mM) もしくは MHBA (100 $\mu\text{g/mL}$) 添加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=3-5$ であった。統計的有意差は Dunnett 法を事後検定とする ANOVA (B) もしくは Student の t 検定 (C、D) により解析した。**は $P<0.01$ 、Ca+は細胞外 Ca^{2+} 存在条件、Ca-は細胞外 Ca^{2+} 非存在条件を表す。

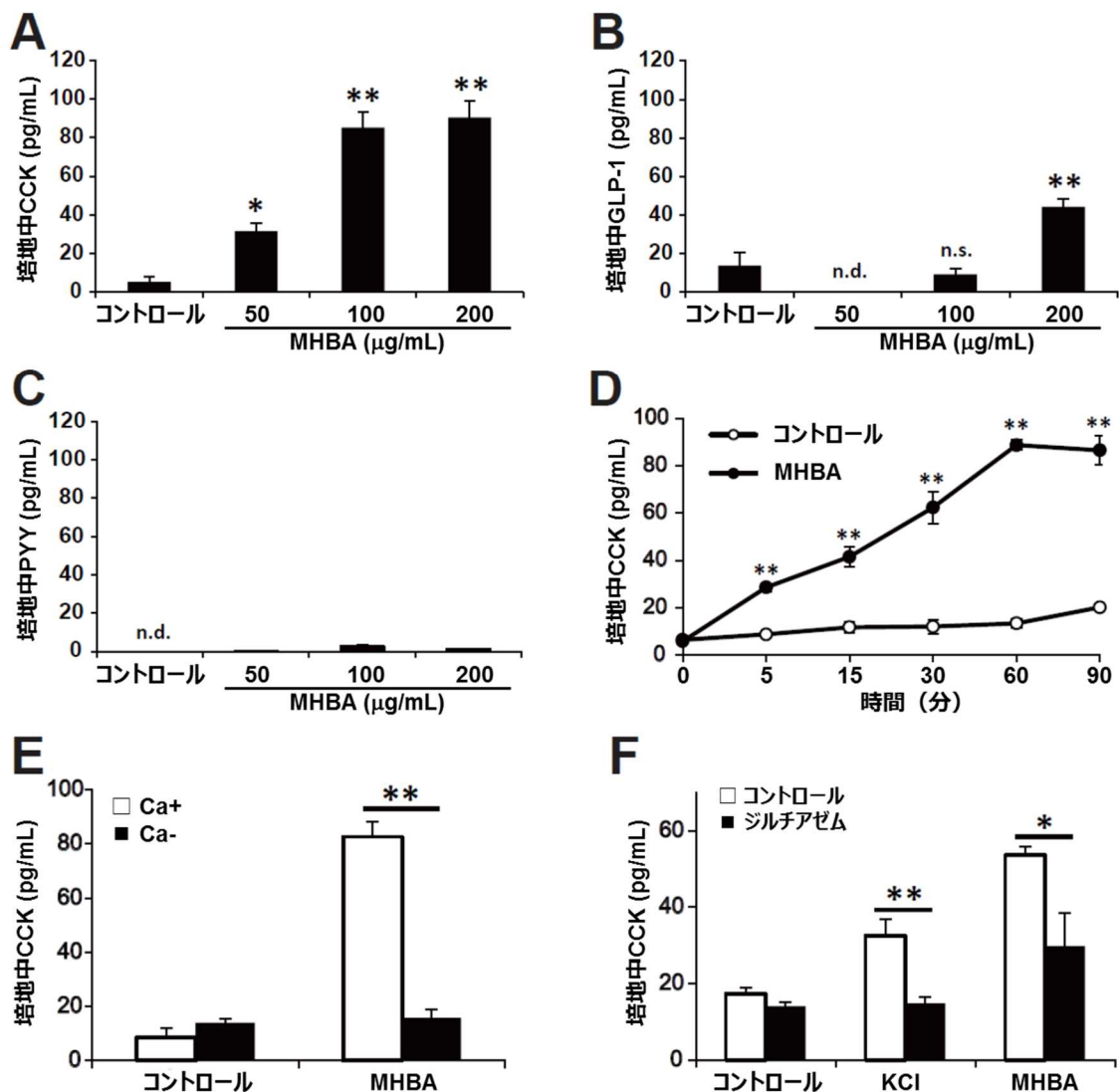


図 1-1-2. STC-1 細胞への MHBA 添加は消化管ホルモンの分泌を誘導する

(A-C) STC-1 細胞への MHBA (50、100、200 µg/ml) 添加後 60 分における CCK、GLP-1、PYY の分泌量を測定した。(D) MHBA (100 µg/ml) 添加後 0-90 分における CCK の分泌量を測定した。(E) 細胞外 Ca²⁺ の存在もしくは非存在下での MHBA (100 µg/ml) 添加後の CCK の分泌量を測定した。(F) ジルチアゼム (1 mM) 添加 30 分後に、KCl (25 mM) もしくは MHBA (100 µg/mL) 添加後の CCK の分泌量を測定した。各データの値は平均値±標準誤差で表した。サンプル数は n=3-5 (A、B、D-F)、n=1-4 (C) であった。統計的有意差は Dunnett 法を事後検定とする ANOVA (A、B) もしくは Student の *t* 検定 (D-F) により解析した。*は *P*<0.05、**は *P*<0.01、n.s.は有意差なし、n.d.は検出限界以下を表す。

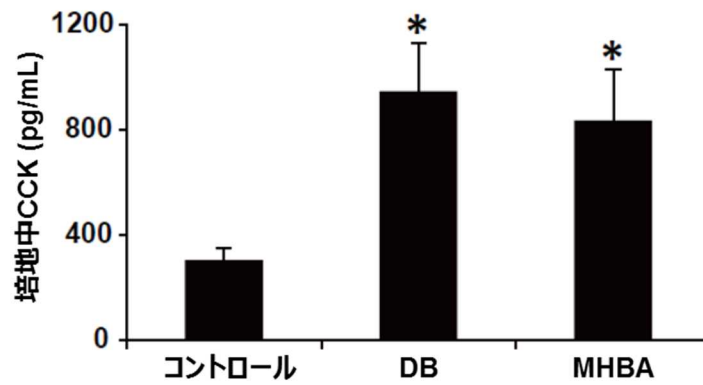


図 1-1-3. ラット小腸への MHBA の添加による CCK の分泌誘導

ラット小腸への DB (50 mM) もしくは MHBA (5 mg/mL) 添加後 30 分における CCK の分泌量を測定した。グラフの縦軸は腸管切片 1 g あたりの CCK 分泌量を表す。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=4-8$ であった。統計的有意差は Dunnett 法を事後検定とする ANOVA により解析した。*は $P<0.05$ を表す。

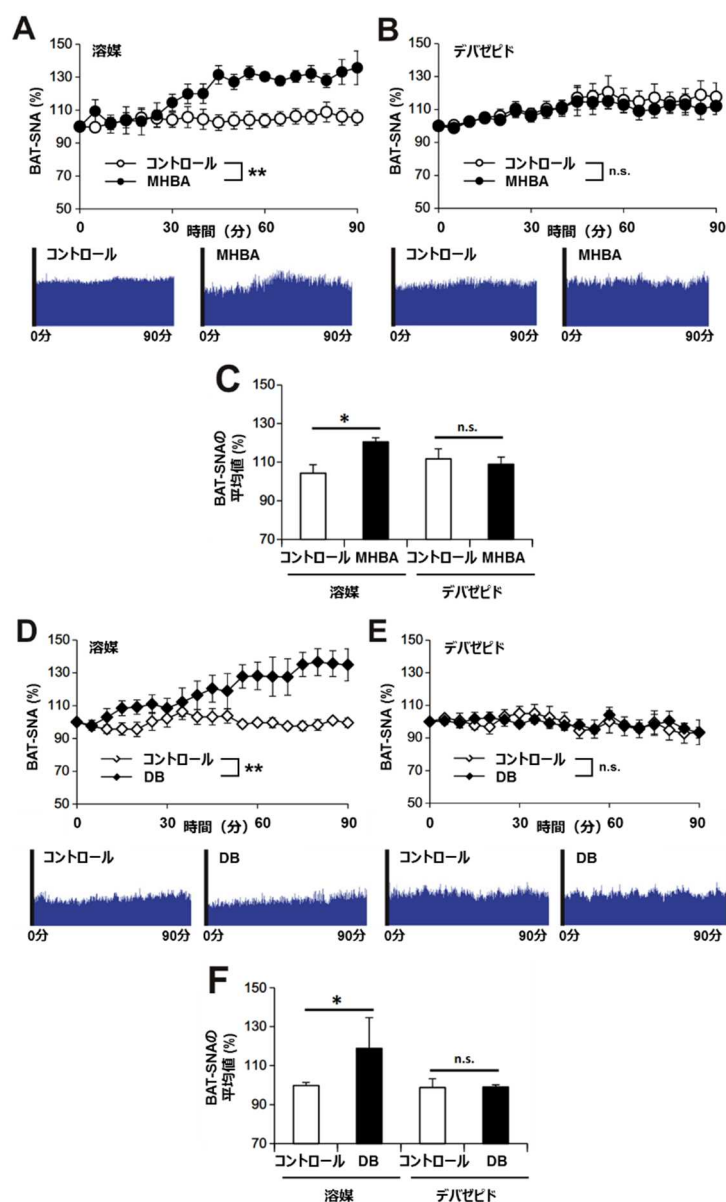


図 1-1-4. CCK1 受容体阻害剤は MHBA 投与によるラットの BAT-SNA 上昇を抑制する

5% DMSO、5% Tween-80 を含む生理食塩水もしくはデバゼピド (1 mg/kg) を投与して 15 分後、MHBA (2 mg/kg) もしくは DB (15 mg/kg) をラットに投与した。(A、B、D、E) 5 秒あたりのスパイク数の平均値を、DB もしくは MHBA 投与 5 分前の値を 100% とした相対値で表し、90 分間の変化を 5 分毎に測定した。それらのグラフの下に、BAT-SNA の実際の記録を各群一例ずつ示した。(C、F) 90 分間の BAT-SNA の平均値を算出した。各データの値は平均値±標準誤差で表した。サンプル数は n=4 であった。統計的有意差は反復測定 ANOVA (A、B、D、E) もしくは Student の *t* 検定 (C、F) により解析した。**は $P<0.01$ 、n.s.は有意差なしを表す。

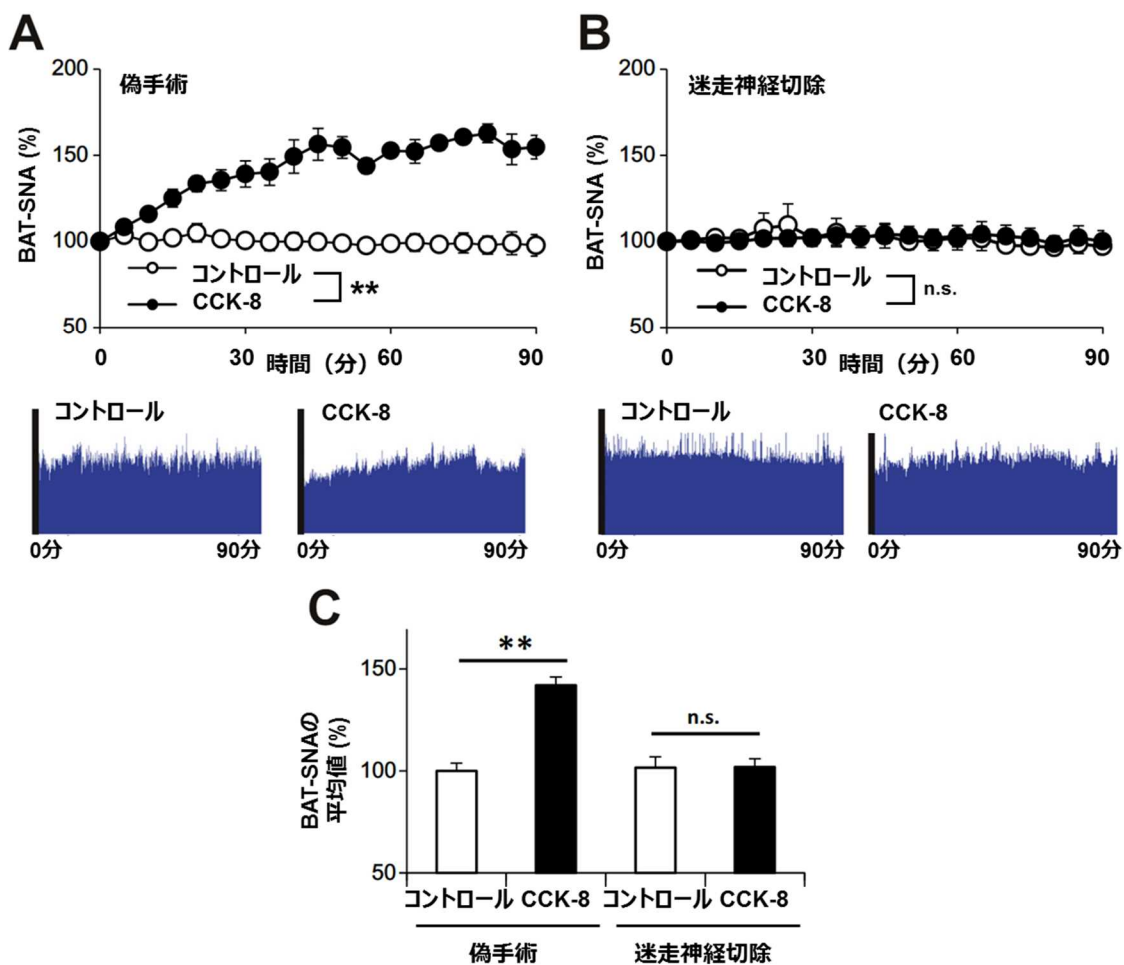


図 1-1-5. ラットへの CCK-8 投与は BAT-SNA を上昇させる

CCK-8 (100 $\mu\text{g/kg}$) を偽手術もしくは迷走神経切除ラットへ腹腔内投与した。(A、B) 5 秒あたりのスパイク数の平均値を、CCK-8 投与 5 分前の値を 100%とした相対値で表し、90 分間の変化を 5 分毎に測定した。それらのグラフの下に、BAT-SNA の実際の記録を各群一例ずつ示した。(C) 90 分間の BAT-SNA の平均値を算出した。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=3$ であった。統計的有意差は反復測定 ANOVA (A、B) もしくは Student の t 検定 (C) により解析した。**は $P<0.01$ 、n.s.は有意差なしを表す。

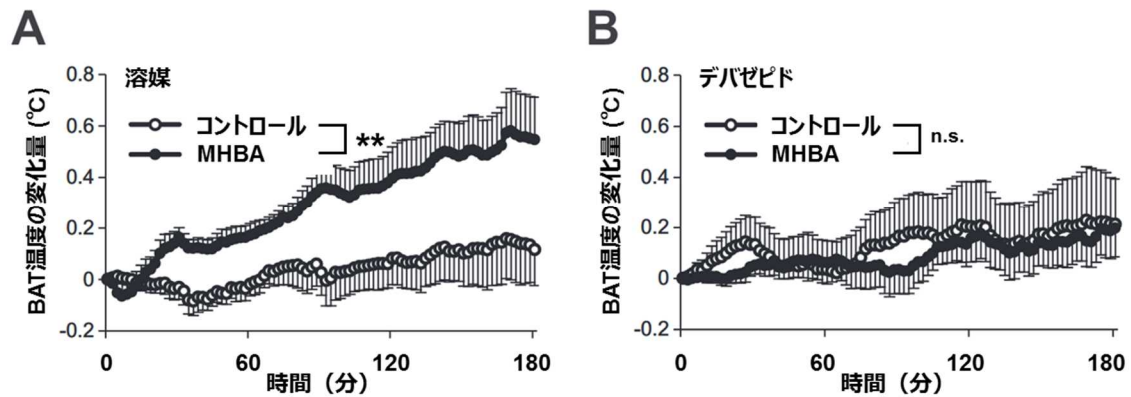


図 1-1-6. CCK1 受容体の阻害剤はラットへの MHBA 投与による BAT 温度の上昇を抑制する

5% DMSO および 5% Tween-80 を含む生理食塩水もしくはデバゼピド (1 mg/kg) を投与して 15 分後、MHBA (10 mg/kg) をラットに投与した。(A、B) MHBA 投与後の BAT 温度の 180 分間の変化を 2 分毎に測定した。各データの値は平均値±標準誤差で表した。サンプル数は n=7-8 であった。統計的有意差は反復測定 ANOVA により解析した。**は $P<0.01$ 、n.s.は有意差なしを表す。

第2節 消化管細胞における苦味受容体を介した消化管ホルモン分泌誘導作用機序

1. 要約

第1章第1節の結果から、MHBAは消化管におけるCCK産生を誘導し、自律神経を活性化する腸脳相関機序によりBATでの熱産生を誘導することが示唆されたが、MHBAが消化管細胞にどのように認識されるかについては不明であった。MHBAはホップ苦味成分に由来するため、本研究では消化管内分泌細胞で発現するT2Rsに着目した。

25種のヒト苦味受容体をそれぞれ発現させたHEK293T細胞にMHBAを投与した結果、TAS2R1、TAS2R8およびTAS2R10発現細胞で受容体活性化が認められた。これらの受容体に対してそれぞれ系統的に高度に保存されたマウス苦味受容体であるTas2r119、Tas2r130、およびTas2r105を発現させた細胞でも、MHBA投与に対する活性化が認められた。また、ヒトおよびマウス消化管内分泌細胞に対して、これらのT2Rsに対するsiRNAにより遺伝子発現抑制を行った結果、MHBA投与による細胞内Ca²⁺濃度上昇およびCCK産生誘導が抑制された。さらに、味覚受容体シグナル伝達に必須なイオンチャネルであるTRPM5を阻害した結果、MHBA投与による細胞内Ca²⁺濃度上昇およびCCK産生誘導が抑制された。

以上より、MHBAは消化管細胞の特定のT2Rsによって認識され、細胞内Ca²⁺応答およびCCK産生を誘導することが示唆された。

2. 背景

甘味、旨味、苦味、塩味、酸味を区別する味覚システムは、特定の食物成分を認識するためにヒトを含む様々な動物で進化的に保存されている[32,33]。多くの有毒物質は苦味を呈し、負の感覚として捉えられるため、苦味は毒の危険を知らせるものとして考えられている。一方で、最近の研究により、苦味物質が抗肥満作用や認知機能改善作用などの健康機能性を有することが報告されている[3,36,37]。

これまでの研究において、MHBA は消化管内分泌細胞に作用して消化管ホルモンである CCK の分泌を誘導し、自律神経を活性化させる腸脳相関機序により BAT を活性化させることが示されている[12]。しかしながら、消化管内分泌細胞において MHBA がどのように認識されるのかについては未だに明らかになっていない。

最近の研究において、舌に存在する味受容細胞と同様に、消化管に存在する細胞においても機能的な味受容機構が存在することが報告されている[73]。約 25 種のヒト苦味受容体 (TAS2Rs) および約 35 種のマウス苦味受容体 (Tas2rs) が味受容機能を持つと想定されており、そのうちいくつかの T2Rs は哺乳類動物およびヒトの小腸上皮の内分泌細胞に発現し、苦味物質を認識して内分泌細胞におけるカルシウム応答および CCK などの消化管ホルモンの分泌に寄与している[38,66,74-77]。しかしながら、MHBA が消化管内分泌細胞の T2Rs に認識されるのか、そして認識される場合、どの T2Rs に認識されてそのシグナルを消化管ホルモンの分泌へと伝達するのかについては不明である。

本研究では、MHBA がどの T2Rs に認識されるのか明らかにするために、各 T2R を強制発現した HEK293T 細胞を用いて Ca^{2+} イメージングを実施した。さらに、ヒトおよびマウスの消化管内分泌細胞における遺伝子発現抑制実験を行い、MHBA に対する消化管内分泌細胞の応答に T2Rs が関与しているか検討した。

3. 実験方法

1) 試薬

MHBA は第 1 章第 1 節に記載の通り調製した。triphenylphosphine oxide (TPPO) (カタログ番号 323-63482) は富士フィルム和光純薬社 (Osaka, Japan) より購入した。

2) 細胞

HEK293T 細胞株は、文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理化学研究所バイオリソース研究センターより譲受した。ヒト十二指腸細胞株である HuTu-80 およびマウス消化管内分泌細胞株である STC-1 細胞は、ATCC 社 (Manassas, VA, USA) より購入した。これらの細胞は 10%ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン、および 100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む DMEM (HEK293T および STC-1 細胞) もしくはイーグル最小必須培地 α 改変型 (MEM α) (HuTu-80 細胞) (Gibco 社, Grand Island, NY, USA) において 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

3) プラスミドの構築と導入

25 種のヒト TAS2Rs および 3 種のマウス Tas2rs の発現プラスミドを構築するため、TAS2R1 (アメリカ国立生物工学情報センターの遺伝子参照配列番号: NM_019599)、TAS2R3 (NM_016943)、TAS2R4 (NM_016944)、TAS2R5 (NM_018980)、TAS2R7 (NM_023919)、TAS2R8 (NM_023918)、TAS2R9 (NM_023917)、TAS2R10 (NM_023921)、TAS2R13 (NM_023920)、TAS2R14 (NM_023922)、TAS2R16 (NM_016945)、TAS2R38 (NM_176817)、TAS2R39 (NM_176881)、TAS2R40 (NM_176882)、TAS2R41 (NM_176883)、TAS2R42 (NM_181429)、TAS2R43 (NM_176884)、TAS2R44 (NM_176885)、TAS2R45 (NM_176886)、TAS2R46 (NM_176887)、TAS2R47 (NM_001097643)、TAS2R48 (NM_176888)、TAS2R49 (NM_176889)、TAS2R50 (NM_176890)、TAS2R60 (NM_177437)、Tas2r119 (NM_020503)、Tas2r130 (NM_199156)、Tas2r105 (NM_020501) をコードする DNA フラグメントを、ヒトゲノム DNA (BD Clontech 社, Mountain View, CA, USA) およびマウスゲノム DNA (C57BL/6J マウス) から PCR 増幅により入手した。また細胞膜発現量向上のため、ヒト TAS2R およびマウス Tas2r のタンパク質をコードする cDNA 断片の 5'側にはラットのソマトスタチン受容体タイプ 3 (sstr3) の N 末 45 残基分のアミノ酸配列をコードする配列を挿入し、pEAK10 発現ベクター (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD, USA) の *EcoR* I-*Not* I サイトに導入した。また、ヒト G タンパク質 α サブユニットである G α 16 の C 末端側の 44 アミノ酸残基をマウス G タンパク質であ

る Gustducin Gz の C 末端側の 44 アミノ酸残基に置換することで、キメラ G タンパク質 Gα16/Gz44 を設計した。そして、Gα16/Gz44 をコードする cDNA フラグメントを pEAK10 ベクターに導入した。HEK293T 細胞を 12 ウェルプレートに播種し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社、Carlsbad、CA、USA) (カタログ番号 11668019) を用いて各種 sstr3-TAS2R もしくは sstr3-Tas2r と Gα16/Gz44 を発現するプラスミドが 4:1 の比率となるように一過的に導入し、6 時間反応させた。

4) 蛍光顕微鏡による Ca^{2+} イメージング

Ca^{2+} イメージングは既報に基づき実施した[78]。プラスミド導入を行った HEK293T 細胞を 96 ウェルルモックスマルチウェルプレート (SARSTEDT AG 社、Nümbrecht、Germany) で培養し、5 μM Fura-2 AM (Invitrogen 社、Carlsbad、CA、USA) (カタログ番号 F1221) を添加した。その後、プレートを励起光波長 340 nm、380 nm、蛍光波長 510 nm に設定した倒立蛍光顕微鏡 (オリンパス社、東京、日本) に設置し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MHBA の添加前後の画像を取得し MetaFluor ソフトウェア (Molecular Devices、San Jose、CA、USA) を用いて解析した。

5) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

96 well black/clear プレート (CORNING 社、Kennebunk、ME、USA) に HuTu-80 細胞を 7.5×10^4 cells/well、STC-1 細胞を 1.5×10^4 cells/well で播種し、それぞれフェノールレッド不含 MEM α 、フェノールレッド不含 DMEM/F-12 (Gibco 社、Watham、MA、USA) で一晩培養した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は第 1 章第 1 節に記載の方法で実施し、相対的な蛍光強度の最大値と最小値の差分 (Max - Min relative fluorescence units; ΔRFU) を算出した。Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (TRPM5) 阻害条件下での測定においては、Fluo-4 と共に TPPO を細胞に添加し 25°C、30 分間培養した。

6) 消化管ホルモン分泌量の測定

STC-1 細胞による CCK 分泌量の測定は第 1 章第 1 節に記載の方法で実施した。TRPM5 阻害条件下での測定においては、リガンド添加 30 分前に TPPO を添加し培養した。

7) siRNA の導入

Small interfering RNAs (siRNAs) は全て Dharmacon 社 (Lafayette、CO、USA) より購入した siGENOME SMARTpool siRNA を使用した。本研究では、Non-targeting siRNA (*siNT*、

ネガティブコントロール)、ヒト *TAS2R* siRNAs (*siTAS2R1*、*siTAS2R8*、*siTAS2R10*)、マウス *Tas2r* siRNAs (*siTas2r119*、*siTas2r130*、*siTas2r105*) を使用した。HuTu-80 細胞もしくは STC-1 細胞を 6 ウェルプレートに 5×10^5 cells/well で播種し、DharmaFECT 1 トランスフェクション試薬 (Dharmacon 社、Lafayette、CO、USA) を用いて 100 nM siRNAs を導入し、48 時間反応させた。

8) 統計解析

各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計的有意差は、Student の *t* 検定、Tukey 法もしくは Dunnett 法を事後検定とする ANOVA によって解析した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であると判断した。

4. 結果

1) ヒト TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10 は MHBA に応答し、HuTu-80 細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇に關与する

本研究では、25 種のヒト TAS2R それぞれを発現する HEK293T 細胞の MHBA に対するカルシウム応答を評価するため、MHBA 添加前後で蛍光顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージングを実施した。その結果、ヒト TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10 を発現する細胞において、いずれの TAS2R も発現しない細胞と比較して細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた (図 1-2-1A)。一方、他の 22 種のヒト TAS2R を発現する細胞においては細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は認められなかった (図 1-2-1B)。次に、ヒト TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10 が MHBA による消化管内分泌細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に關与するか検討するために、ヒト十二指腸細胞株 HuTu-80 に対して siRNA 導入によるヒト TAS2R の遺伝子発現抑制を行った。細胞内 Ca^{2+} 濃度変化のリアルタイム測定により、non-targeting siRNA を導入した細胞において MHBA 添加後の有意な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められたが ($P < 0.01$)、その応答はヒト TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10 siRNA を導入した細胞において部分的であるが有意に抑制された ($P < 0.01$) (図 1-2-1C、D)。

2) マウス Tas2r119、Tas2r130、Tas2r105 は MHBA に応答し、STC-1 細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇に關与する

図 1-2-1 に示した結果から、ヒト TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10 が MHBA によるヒト消化管内分泌細胞のカルシウム応答に關与することが示唆された。ヒト TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10 はそれぞれマウス Tas2r119、Tas2r130、Tas2r105 を含むマウス Tas2rs の一部と系統発生的に高く保存されており、それぞれの組合せにおいて約 50% のアミノ酸配列相同性を有する (ヒト TAS2R1 vs マウス Tas2r119、51.17%; ヒト TAS2R8 vs マウス Tas2r130、42.39%; ヒト TAS2R10 vs マウス Tas2r105、53.75%) (図 1-2-2A-C) [75]。従って、本研究ではこれら 3 種のマウス Tas2rs に着目し、MHBA に対する応答性を検討した。その結果、マウス Tas2r119 および Tas2r105 を発現する HEK293T 細胞への MHBA 添加は濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ (マウス Tas2r119 vs コントロール、 $P < 0.01$ [150, 200 $\mu\text{g/mL}$]; マウス Tas2r105 vs コントロール、 $P < 0.01$ [150, 200 $\mu\text{g/mL}$])、マウス Tas2r130 を発現する細胞への MHBA 添加は細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる傾向を示した (図 1-2-2D)。さらに、マウス Tas2r119、Tas2r130、Tas2r105 が MHBA による消化管内分泌細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に關与するか検討するために、マウス消化管内分泌細胞株 STC-1 に対して siRNA 導入によるマウス Tas2r の遺伝子発現抑制を行った。Non-

targeting siRNA を導入した細胞において MHBA 添加濃度依存的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められたが、その応答はマウス *Tas2r119*、*Tas2r130*、*Tas2r105* siRNA を導入した細胞において有意に抑制された (*siNT* vs *siTas2r119*, $P < 0.01$ [150, 200 $\mu\text{g/mL}$]; *siNT* vs *siTas2r130*, $P < 0.01$ [100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$]; *siNT* vs *siTas2r105*, $P < 0.05$ [100 $\mu\text{g/mL}$], $P < 0.01$ [150, 200 $\mu\text{g/mL}$]) (図 1-2-2E)。

3) STC-1 細胞におけるマウス *Tas2rs* の遺伝子発現抑制により、MHBA 添加による CCK 分泌が抑制される

第 1 章第 1 節の結果において、STC-1 細胞への MHBA 添加により細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して CCK 分泌が誘導されることが示されたため、本節では STC-1 細胞におけるマウス *Tas2r119*、*Tas2r130*、*Tas2r105* が MHBA による CCK 分泌誘導に関与するか検討した。Non-targeting siRNA を導入した STC-1 細胞においては、MHBA 添加濃度依存的な CCK 分泌誘導が認められたが、その作用はマウス *Tas2r119*、*Tas2r130*、*Tas2r105* siRNA を導入した細胞において有意に抑制された (*siNT* vs *siTas2r119*, $P < 0.01$ [150 $\mu\text{g/mL}$], $P < 0.05$ [200 $\mu\text{g/mL}$]; *siNT* vs *siTas2r130*, $P < 0.01$ [150, 200 $\mu\text{g/mL}$]; *siNT* vs *siTas2r105*, $P < 0.01$ [150, 200 $\mu\text{g/mL}$]) (図 1-2-3)。

4) STC-1 細胞への MHBA 添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および CCK 分泌誘導に対する TRPM5 阻害剤の作用

本節では最後に、MHBA 添加によるカルシウム応答および CCK 分泌誘導に対する苦味伝達シグナル因子の関与について検討した。TRPM5 は苦味、甘味、旨味の伝達に必須なシグナル因子である[79,80]。そこで、STC-1 細胞への MHBA 添加によるカルシウム応答および CCK 分泌誘導機序に TRPM5 が関与するか検討するため、TRPM5 阻害剤である TPPO を用いた[81,82]。STC-1 細胞への TPPO 添加により、MHBA 添加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が有意に抑制された ($P < 0.01$) (図 1-2-4A)。さらに、STC-1 細胞への TPPO 添加により、MHBA 添加後の CCK 分泌誘導も有意に抑制された ($P < 0.01$) (図 1-1-4B)。

5. 考察

これまでの研究で、MHBA は消化管内分泌細胞に作用して CCK の分泌を促進し、自律神経を活性化させることで、エネルギー消費促進作用や認知機能改善作用を有することが明らかにされている[12,83-85]。しかしながら、MHBA がどのように消化管内分泌細胞に認識されているかは不明であった。本研究では各種 T2R を発現させた HEK293T 細胞を用い、MHBA が特定のヒトおよびマウス T2Rs に作用することを明らかにした。さらに、それらの T2Rs が MHBA に対する消化管内分泌細胞のカルシウム応答および CCK 分泌機構に関与することも明らかにした。

HEK293T 細胞を用いた各種 T2R の発現実験により、ヒト TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10 およびマウス Tas2r119、Tas2r130、Tas2r105 が MHBA を認識する T2Rs である可能性が示唆された (図 1-2-1、1-2-2)。これらの T2Rs は少なくとも 1 種以上の苦味物質を認識することが知られている[75,76]。例えばホップ由来の苦味酸で MHBA と部分的に共通の構造(β トリカルボニル骨格)を有する α 酸およびイソ α 酸は、それぞれマウス Tas2r105、ヒト TAS2R1 に認識されるため、 β トリカルボニル骨格がこれらの T2Rs の認識に重要である可能性が示唆されている[7]。MHBA を認識するその他の T2Rs (ヒト TAS2R8、TAS2R10、およびマウス Tas2r119、Tas2r130) が α 酸およびイソ α 酸を認識するかどうかは不明であるが、MHBA を認識しないヒト TAS2R14 および TAS2R40 はイソ α 酸を認識することが報告されている[75,76]。これらの結果から、様々な苦味酸の間で異なる側鎖構造が、T2Rs による受容幅の多様性を生み出していることが考えられる。MHBA はイソ α 酸と比較して穏やかな苦味を呈するため、様々な食品に対して期待する効果用量を搭載できる可能性がある[6]。

HuTu-80 細胞および STC-1 細胞への siRNA 導入による各種 T2R の遺伝子発現抑制により、MHBA 添加による細胞応答が部分的ではあるものの有意に抑制された (図 1-2-1、1-2-2、1-2-3)。同一細胞内において 3 種の T2Rs 全ての遺伝子発現抑制をすることは、siRNA 導入条件の観点から技術的に困難であるものの、MHBA 添加によるカルシウム応答や CCK 分泌を顕著に抑制する可能性が考えられる。さらに、STC-1 細胞への TPPO 添加により、MHBA 添加によるカルシウム応答および CCK 分泌がほぼ完全に抑制された (図 1-2-4)。これらの結果は、消化管内分泌細胞が、MHBA を認識する 3 種の T2Rs を含む味覚受容シグナリング経路を主に介して MHBA 添加に応答する可能性を示唆している。しかしながら、本研究ではヒト TAS2R1 および TAS2R8 と高い系統発生的な相同性を有するマウス Tas2r119 および Tas2r130、およびヒト TAS2R10 と高い系統発生的な相同性を有するクラスターの 1 つであるマウス Tas2r105 に着目して検討しており (図

1-2-2) [75]、その他のマウス Tas2rs が消化管内分泌細胞の MHBA 応答に関与していないとは言い切れない。MHBA は β トリカルボニル骨格や様々な側鎖構造を有する複数の成分群であるため、各単体が単一の T2R に認識される可能性はあると考えられる[7]。

第 1 章第 1 節の結果から、MHBA は STC-1 細胞に作用して細胞外からの L 型電位依存性カルシウムチャネルを介した Ca^{2+} 流入を促進し、CCK の分泌を誘導すること、および CCK1 受容体を介して自律神経活動を上昇し、BAT を活性化させることが示されている。本節で、STC-1 細胞における Tas2rs の遺伝子発現抑制により、MHBA 添加に対するカルシウム応答および CCK 分泌が抑制されることが示され、MHBA が T2Rs に認識されることで下流のカルシウム応答および CCK 分泌が誘導される可能性が示唆された (図 1-2-2、1-2-3)。CCK は迷走神経求心枝を介して中枢へシグナルを伝達するため[43]、MHBA は腸脳相関を作用機序として有する可能性が考えられる。

本研究により初めて、MHBA が消化管内分泌細胞における特定の T2Rs (ヒト TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10、およびマウス Tas2r119、Tas2r130、Tas2r105) に認識され、カルシウム応答および CCK 分泌を誘導することが明らかになった。これらの知見はビールの原料であるホップ由来の食品成分が有する腸脳相関機序に対する新たな発見であり、代謝性疾患や認知機能障害などに対する新たな予防、治療法の確立に貢献できることが期待される。

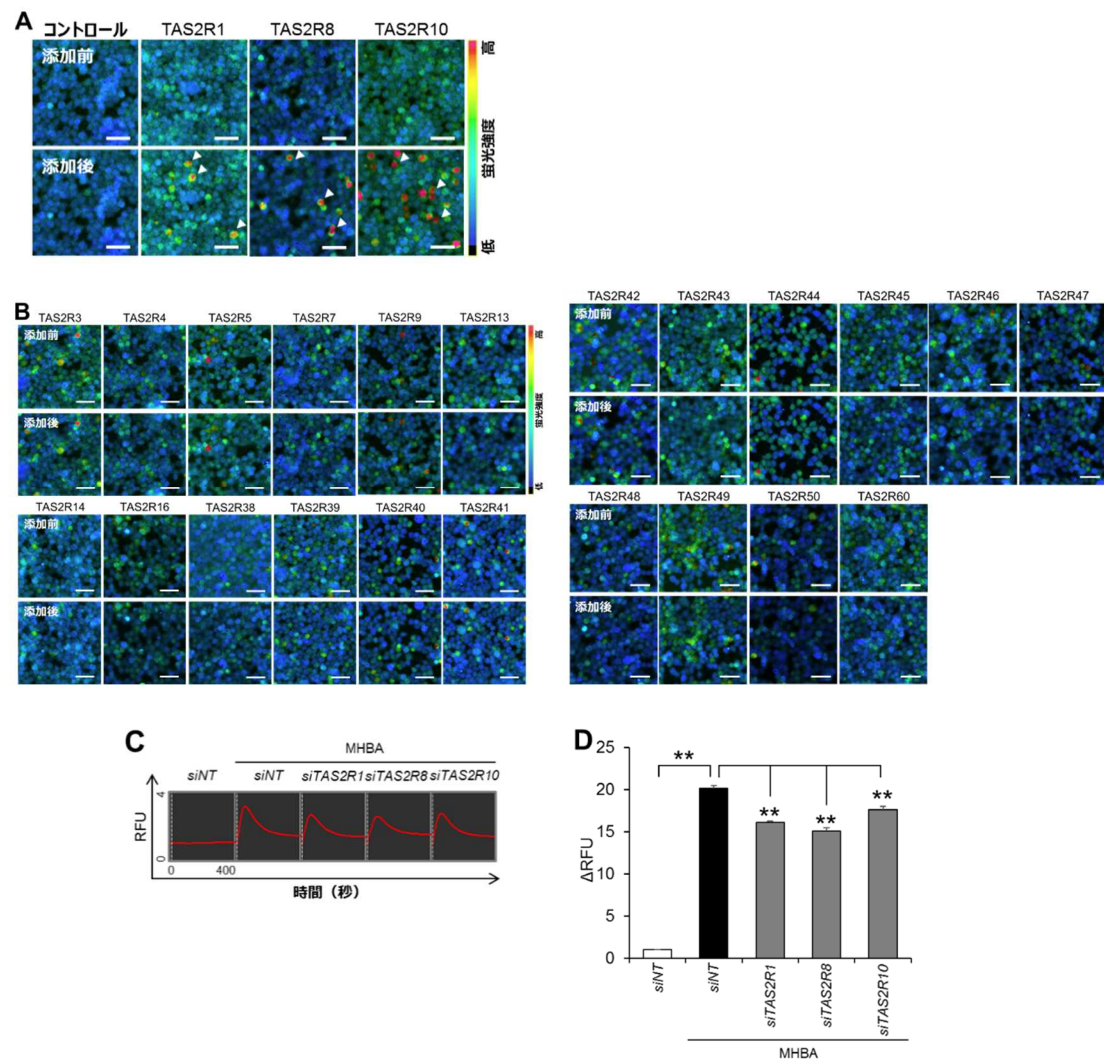


図 1-2-1. ヒト TAS2Rs を発現する HEK293T およびヒト *TAS2R* siRNAs を導入した HuTu-80 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に対する MHBA の作用

(A、B) 各種ヒト TAS2R を発現する HEK293T 細胞への MHBA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加前後における Ca^{2+} イメージングを、Fura-2 AM (5 μM) を用いて実施した。スケールバーは 50 μm を表す。(C、D) FDSS/ μCELL を用いて、ヒト *TAS2R1*、*TAS2R8*、*TAS2R10* siRNA を導入した HuTu-80 細胞における MHBA (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加後の RFU の変化を測定した。MHBA 添加前の蛍光強度を 1 として、MHBA 添加後 400 秒間の RFU の変化の記録を各群一例ずつ示した (C)。 ΔRFU を算出し、コントロール群に対する相対値で表した (D)。*siNT*、*siTAS2R1*、*siTAS2R8*、*siTAS2R10* はそれぞれ non-targeting、ヒト *TAS2R1*、*TAS2R8*、*TAS2R10* siRNA を導入した細胞群を表す。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=3$ であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。**は $P<0.01$ を表す。

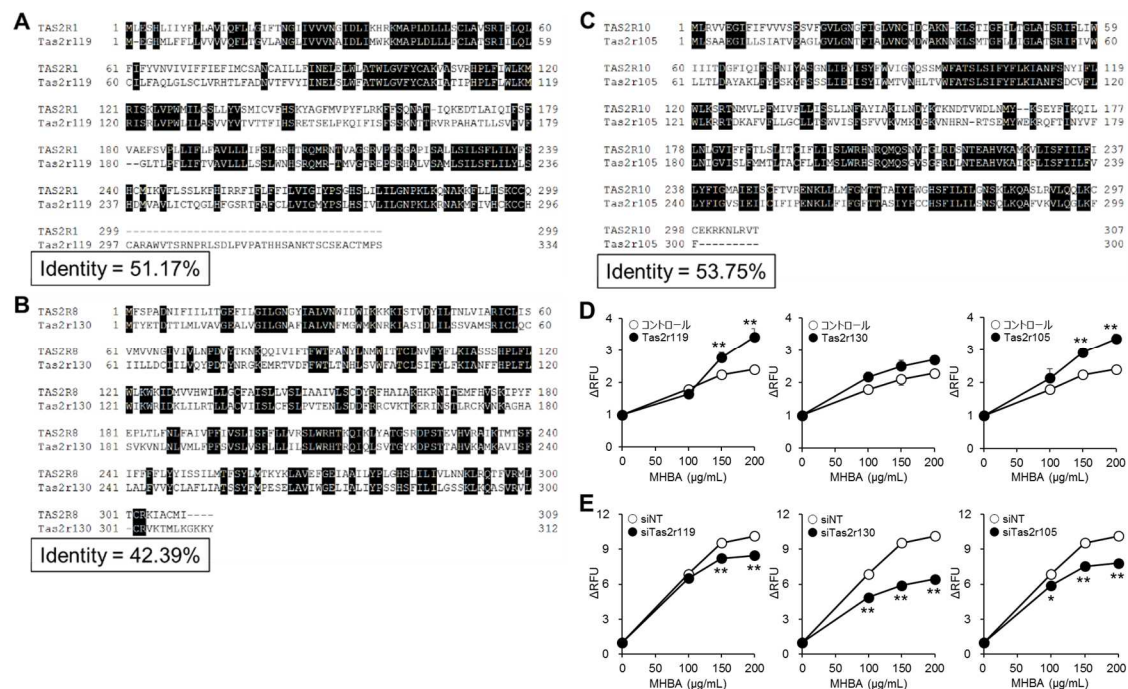


図 1-2-2. マウス *Tas2rs* を発現する HEK293T およびマウス *Tas2r* siRNAs を導入した STC-1 細胞の MHBA に対する応答性

(A-C) 比較対象とするヒトおよびマウス T2Rs のアミノ酸配列をアラインメントし (ヒト TAS2R1 vs マウス *Tas2r119* [A]; ヒト TAS2R8 vs マウス *Tas2r130* [B]; ヒト TAS2R10 vs マウス *Tas2r105* [C])、両者の一致しているアミノ酸を黒色背景で示した。一致しているアミノ酸の全体における割合をアミノ酸配列相同性 (%) として算出した。(D、E) FDSS/μCELL を用いて、マウス *Tas2r119*、*Tas2r130*、*Tas2r105* を発現する HEK293T 細胞 (D) もしくはマウス *Tas2r119*、*Tas2r130*、*Tas2r105* siRNA を導入した STC-1 細胞 (E) における MHBA (100、150、200 μg/mL) 添加後の RFU の変化を測定した。各サンプルの値は無添加細胞群の値に対する相対値で表した。siNT、si*Tas2r119*、si*Tas2r130*、si*Tas2r105* はそれぞれ non-targeting、マウス *Tas2r119*、*Tas2r130*、*Tas2r105* siRNA を導入した細胞群を表す。データの値は平均値±標準誤差で表した。サンプル数は n=4-10 であった。統計的有意差は Student の *t* 検定により解析した。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を表す (コントロール群もしくは siNT 群との比較)。

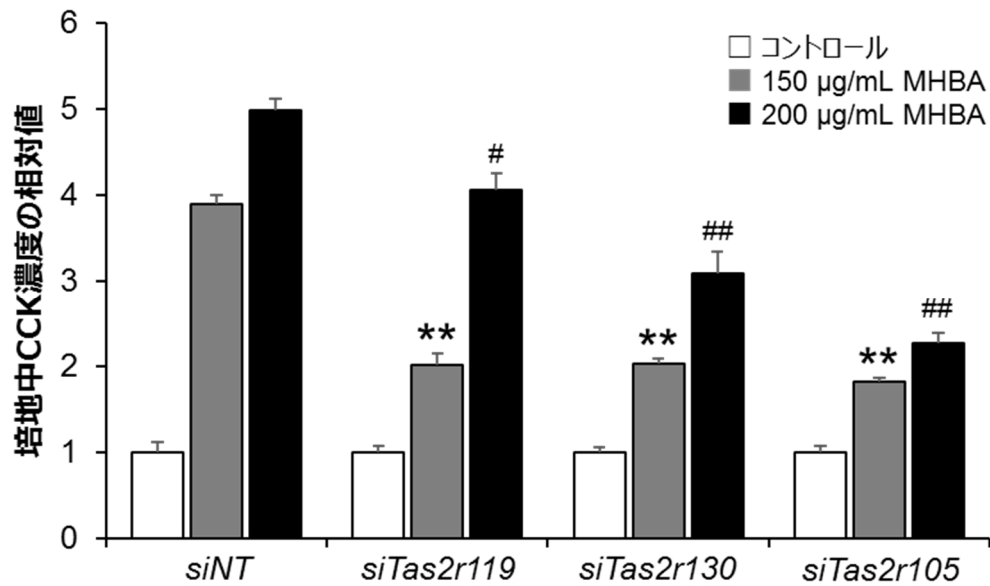


図 1-2-3. STC-1 細胞におけるマウス *Tas2rs* の遺伝子発現抑制により、MHBA 添加による CCK 分泌が抑制される

マウス *Tas2r119*、*Tas2r130*、*Tas2r105* siRNA を導入した STC-1 細胞における MHBA (150、200 µg/mL) 添加後 60 分での CCK 分泌量を測定した。各サンプルの値は無添加細胞群の値に対する相対値で表した。*siNT*、*siTas2r119*、*siTas2r130*、*siTas2r105* はそれぞれ non-targeting、マウス *Tas2r119*、*Tas2r130*、*Tas2r105* siRNA を導入した細胞群を表す。データの値は平均値±標準誤差で表した。サンプル数は n=3 であった。統計的有意差は Dunnett 法を事後検定とする ANOVA により解析した。**は $P<0.01$ (150 µg/mL MHBA を添加した *siNT* 群との比較)、#は $P<0.05$ 、##は $P<0.01$ (200 µg/mL MHBA を添加した *siNT* 群との比較) を表す。

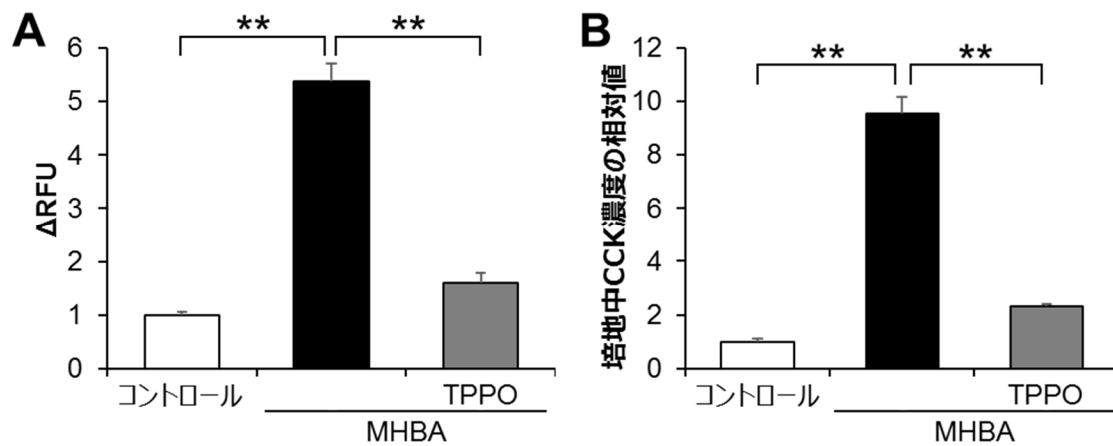


図 1-2-4. STC-1 細胞への MHBA 添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および CCK 分泌誘導に対する TRPM5 阻害剤の作用

(A、B) STC-1 細胞へ TPPO (400 μM) を添加した 30 分後、MHBA (100 $\mu\text{g/mL}$) 添加後の RFU の変化 (A) および CCK 分泌量 (B) を測定した。各サンプルの値はコントロール群の値に対する相対値で表した。データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=4$ であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。**は $P<0.01$ を表す。

第3節 健常人における MHBA の脂肪減少効果の検証

1. 要約

近年、高脂肪食負荷マウスへの継続的な MHBA 経口投与が脂肪蓄積抑制を示すことが報告されてきたが、ヒトに対する有効性に関しては不明であった。本節では、MHBA を含む熟成ホップエキスのヒトに対する有効性の検証を目的とし、BMI が 25 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満の健常な男女（20 歳以上 65 歳以下）を対象としたランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法による臨床試験を実施した。

132 名の被験者をランダムに 3 群に分け、35 mg もしくは 11.7 mg の MHBA を含む熟成ホップエキス含有飲料もしくはプラセボ飲料を、12 週間にわたって毎日摂取させた。その結果、腹部内臓脂肪面積の摂取開始後 0 週を起点とした変化量について、35 mg MHBA を含む熟成ホップエキス含有飲料摂取群においてプラセボ群と比較して有意な低値が認められた。

以上より、35 mg MHBA を含む熟成ホップエキス含有飲料は内臓脂肪減少効果があることが示され、MHBA はヒトでも脂肪減少効果を示すことが明らかになった。

2. 背景

現代の日本において生活習慣病は国民の健康を脅かす重要な問題と考えられている。そのため、国をあげての生活習慣病対策が行われており、平成 20 年 4 月からは生活習慣病の発症や重症化の予防を目的とした特定健康診査・特定保健指導が開始された。生活習慣病が発症する原因の一つとして、食生活を含む生活様式の欧米化により摂取エネルギー全体に占める脂肪エネルギーの摂取比率が高いことが挙げられている。「日本人の食事摂取基準[2015 年版]」では、総エネルギー量に対する脂肪由来のエネルギー量の比率（脂肪エネルギー比率）の基準を 1 歳以上で 20-30%と定めている[86]。しかし、平成 26 年の国民健康・栄養調査では、脂肪エネルギー比率が 30%を超える人の割合が成人男性で 23.8%、成人女性で 32.6%に達することが報告されている[87]。このように、脂肪エネルギー比率の高い食生活下では生活習慣病に罹患するリスクが増大することが考えられる。

生活習慣病の原因の 1 つとして挙げられる肥満は、日本では BMI が 25 kg/m^2 以上である状態と定義され、平成 26 年の国民健康・栄養調査では、成人男性の 28.7%、成人女性の 21.3%が肥満であると報告されている[87]。肥満には内臓脂肪型肥満と皮下脂肪型肥満の 2 種類が存在するが、なかでも内臓脂肪型肥満は糖尿病や脂質異常症、高血圧症などの生活習慣病を誘発することで動脈硬化性疾患などの疾患を進行させる。動脈硬化性疾患は現代の日本人の死因の約 30%を占める心疾患および脳血管疾患の原因であるため、その予防は重要な課題である。内臓脂肪の蓄積は特定健康診査・特定保健指導の中に取り入れられた内臓脂肪症候群（メタボリックシンドローム）の診断基準の必須項目であり、内臓脂肪を低減させることが、動脈硬化性疾患を予防する上で重要であると考えられる。

体脂肪低減のためには食生活などの生活習慣の改善が有効であるといわれており、現在、ケルセチン配糖体、茶カテキンなど、体脂肪低減作用を有する食品素材も報告されている[88,89]。MHBA については、これまでの研究から、消化管内分泌細胞へ作用し細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介して CCK の分泌を誘導すること、および CCK1 受容体を介して自律神経活動を向上させ、BAT を活性化させることが明らかになっている。さらに、高脂肪食負荷マウスへの MHBA の継続的な経口投与により、体重増加抑制および脂肪蓄積抑制も報告されている[12]。

本節では、MHBA を含む熟成ホップエキス含有食品のヒトにおける体脂肪減少効果を検討すること、およびその効果用量を検討することを目的として、BMI が 25 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満の健常な成人男女に対し MHBA 含有量の異なる熟成ホップエキス含有

食品を1日1回、12週間継続摂取させ、熟成ホップエキス含有食品の体脂肪減少効果を検討した。

3. 実験方法

1) 倫理

本試験はヘルシンキ宣言の趣旨にのっとり、公益財団法人愛世会 愛誠病院 上野クリニック倫理審査委員会(東京都台東区)および健昌会倫理審査委員会(大阪府大阪市)へ試験実施計画書(試験番号 25850)、試験食品概要書、同意説明文書および同意書等の関係資料を提出し、同委員会の承認を経て試験計画に準じて実施した。試験は公益財団法人愛世会 愛誠病院 上野クリニック(東京都台東区)、医療法人社団 生光会新宿追分クリニック(東京都新宿区)、医療法人健昌会 福島健康管理センター(大阪府大阪市)で実施した。

2) 被験者

被験者は、BMI が 25 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満である 20 歳以上 65 歳以下の健常な男女とした。ただし、ダイエットを目的とした運動およびダイエット用の健康食品を常用している者、体脂肪、血清脂質濃度、脂質代謝に影響を及ぼす可能性のある医薬品、健康食品、特定保健用食品を常用している者、ホップ成分を強化した食品を常用している者、適正飲酒を超えた飲酒を常に行っている者、治療中の疾患のある者、試験に関連してアレルギー発症の恐れがある者、糖尿病、肝疾患(肝炎)、腎疾患、心疾患などの重篤な疾患、甲状腺疾患、副腎疾患、その他代謝性疾患の既往歴を有する者、高度の貧血症状のある者、胃潰瘍、胃炎など消化器系の疾患のある者、妊娠中又は妊娠の可能性のある者、および授乳中の者、生活習慣アンケートの回答あるいは事前検査の結果から被験者として不適当と判断された者、同意取得日からさかのぼって 1 ヶ月以内に他の臨床試験に参加していた者、本試験期間中に他の臨床試験に参加する計画がある者、同意取得時からさかのぼって 1 ヶ月以内に 200 mL または 3 ヶ月以内に 400 mL を越える採血、成分献血をした者、その他、試験責任医師により不適当と判断された者は除外した。対象とした被験者は、シーテックス株式会社(東京都豊島区)および DRC 株式会社(大阪府大阪市)が公募した有償ボランティアとした。参加者の募集を 21 日間行い、被験者に対して、試験の目的、方法などについて十分に説明し、試験参加の同意を文書で得たうえで実施した。

3) 試験食品

熟成ホップエキ스는、ホップペレットを 60°C 、120 時間加熱後、水抽出、ろ過、濃縮し、その後殺菌して製造した。その後、熟成ホップエキスを噴霧乾燥させ、顆粒形態で

使用した。熟成ホップエキス中の MHBA 含量は 16.3%であった。本試験では、熟成ホップエキス 72 mg (MHBA として 11.7 mg) を含み酸味料、香料などで香味を調整した粉末顆粒 (熟成ホップエキス低含有食品) あるいは熟成ホップエキス 215 mg (MHBA として 35 mg) を含む粉末顆粒 (熟成ホップエキス高含有食品) を被験食品とした。また、熟成ホップエキスを含まない点を除き原材料および処方が同一である食品をプラセボ食品とし、被験食品と外観および風味に区別がつかないことを確認して試験に用いた。試験食品の栄養成分を表 1-3-1 に示した。

4) 試験方法

試験は、2 週間の事前観察期間および 12 週間のプラセボ食品あるいは被験食品を摂取する試験食品摂取期間を設け、無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法で実施した。事前検査で生活習慣アンケート、問診、理学的検査、身体計測、血液検査、尿検査および妊娠検査 (女性のみ) を行い、試験に適格な被験者を選択し、試験実施に関与しない割付担当者が乱数を用いて無作為に 3 群に割り付けた。割付表は割付担当者が封緘し、割付表開封時まで密封保管した。これにより、被験者、試験実施者、解析担当者など、試験実施に関与したものの盲検化を行った。試験食品摂取期間中、被験者には試験食品のいずれかを 1 日 1 回、摂取時間は限定せずに、粉末顆粒 2 g を 350 mL の水に溶かして 30 分以内に摂取させた。摂取前、摂取 4、8、12 週目に絶食状態 (水のみ可) で来院させ、検査測定を行った。

試験期間中、被験者には、試験参加前からの食事習慣、運動習慣、就寝リズム、喫煙習慣、飲酒習慣等の生活習慣を大きく変えないよう指導するとともに、適正飲酒を超えた飲酒をしないこと、通常よりも激しい運動をしないこと、新たに運動を始めないことを指導した。また、体脂肪、血清脂質濃度および脂質代謝に影響を及ぼす可能性のある医薬品、健康食品、特定保健用食品等の摂取を禁止するとともに、ホップ成分を強化した食品の摂取も禁止した。検査日の前日から禁酒させ、検査日前日の夜 10 時頃までに夕食を済ませ、それ以降、来院検査終了まで水以外の一切の飲食をしないよう指導した。主要評価項目を内臓脂肪面積、皮下脂肪面積、総脂肪面積および体脂肪率とし、体重、BMI、ウエスト周囲径およびヒップ周囲径を副次的評価項目とした。

5) 検査項目

5-1) 身体計測および理学的検査

身長は事前検査時のみ測定し、体重、ウエスト周囲径、ヒップ周囲径、体脂肪率、血

圧および脈拍数はすべての検査時に測定した。体脂肪率はインピーダンス法により測定した。体重および身長から BMI を、ウエスト周囲径およびヒップ周囲径からウエスト/ヒップ比を算出した。

5-2) 血液検査および尿検査

血液学的検査として、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、血小板数 (Plt) を、血液生化学的検査として、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP)、総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸、リン脂質、血糖、尿酸、尿素窒素、クレアチニン、Na、Cl および K を測定した。尿検査として、pH、蛋白定性、糖定性、潜血反応を測定した。全ての項目を全ての検査時に測定した。血液検査および尿検査は株式会社ビー・エム・エル (埼玉県川越市) で実施した。

5-3) 腹部脂肪面積

全身用 X 線 CT 診断装置 Robusto-Ei (株式会社日立メディコ、東京都千代田区) および Asteion Super4 Edition (TSX-021B) (東芝メディカルシステムズ株式会社、栃木県大田原市) を用いて、臍の位置で CT 断層撮影を行った。CT 画像から、新宿追分クリニックでは fatPointer (株式会社日立メディコ) を用いて、福島健康管理センターでは SlimVision5 (サイバネットシステム株式会社、東京都千代田区) を用いて、総脂肪面積、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積を算出した。腹部脂肪面積の測定は摂取前、摂取 8、12 週目に行った。

5-4) 食事調査、運動調査および問診

摂取前、摂取 4、8、12 週目検査日前の各 3 日間の食事内容を被験者に記録させ、エネルギー、蛋白質、脂質および炭水化物の摂取量を算出した。また、摂取前、摂取 4、8、12 週目検査日前の各 3 日間、万歩計により歩数を測定し、1 日の平均運動量 (歩行量) を算出した。医師による問診は全ての検査時に行い、体調の確認を行った。なお、試験食品の摂取状況、自覚症状、医薬品の服薬状況などに関しては、被験者各自が試験期間中毎日、日誌に記録した。

6) 統計解析

試験結果には各測定値または摂取前の測定値からの変化量 (本節では Δ を付記して表示した) を用い、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。各試験食品摂取開始後各時点におけるプ

ラセボ食品群と各被験食品群との群間比較については Dunnett 法を事後検定とする ANOVA による解析を行い、各試験食品群内の摂取前からの比較については対応のある t 検定を行った。また、主要評価項目および副次評価項目の試験食品摂取期間を通した群間比較については 2 元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行った後、有意差があった場合に Dunnett 法による事後検定を行い、群間差を解析した。 $P<0.05$ を統計学的に有意であると判断し、統計解析ソフトは PASW statistics 18 (IBM 社、Armonk、NY、USA) を用いた。

4. 結果

1) 被験者背景

本試験における被験者の組み入れから解析までの流れを図 1-3-1 に示した。296 名が事前検査を受けた。そのうち選択基準に合致しなかった 87 名、参加を辞退した 12 名、それ以外の理由で不参加となった 65 名を除いた 132 名（男性 66 名、女性 66 名）を適格と判断し、各群 44 名ずつ 3 群に無作為に割り付けた。そのうち、体調不良による本人からの申し出により 2 名が、自己都合により 2 名が試験期間中に脱落し、試験を完了した被験者は 128 名であった。試験を完了した被験者 128 名のうち、データ固定後、割付表開封前に事前に定めた棄却基準に該当した 17 名が解析対象外と判断され、解析対象者は 111 名（プラセボ食品群：34 名、熟成ホップエキス低含有食品群：43 名、熟成ホップエキス高含有食品群：34 名）となった。棄却基準に該当した被験者の内訳は、遵守事項の逸脱者が 7 名、試験結果に影響を及ぼす生活習慣の著しい変動があった者が 10 名、計 17 名であった。解析対象者（男性 55 名、女性 56 名）の背景を表 1-3-2 に示した。試験食品の摂取率は全被験者 85%以上であり、平均摂取率は各群いずれも 99%であった。

2) 主要評価項目

腹部脂肪面積の摂取前からの変化量の推移を図 1-3-2 に示した。内臓脂肪面積では、プラセボ食品群で摂取前に比べて摂取 8 週目および 12 週目において有意な高値 ($P<0.05$) が認められた。試験食品摂取期間を通した群間比較では、プラセボ食品群と比べて、熟成ホップエキス高含有食品群で内臓脂肪面積の有意な低値 ($P<0.05$) が認められた。また、摂取 8 週目および 12 週目それぞれの時点において、プラセボ食品群と比べて、熟成ホップエキス高含有食品群で内臓脂肪面積の低下傾向 (8 週: $P=0.058$ 、12 週: $P=0.090$) が認められた。皮下脂肪面積および総脂肪面積の変化量では、いずれの摂取群も有意な群内変動は認められず、群間有意差も認められなかった。参考として各脂肪面積の変化量について対応のない t 検定によって群間比較を行った結果、摂取 8 週目および 12 週目における内臓脂肪面積の変化量について、プラセボ食品群と比べて熟成ホップエキス高含有食品群で有意な低値 (8 週: $P<0.01$ 、12 週: $P<0.05$) が認められた (データ示さず)。体脂肪率の摂取前からの変化量の推移を表 1-3-3 に示した。体脂肪率では、熟成ホップエキス高含有食品群で摂取前に比べて摂取 8 週目において有意な高値 ($P<0.01$) が認められたが、群間有意差は認められなかった。なお、摂取前の主要評価項目の実測値について、群間有意差は認められなかった (データ示さず)。

3) 副次評価項目

体重、BMI、ウエスト周囲径、ヒップ周囲径、ウエスト/ヒップ比の摂取前からの変化量の推移を表 1-3-3 に示した。BMI について、プラセボ食品群において摂取前に比べて摂取 12 週目で有意な高値 ($P < 0.05$) が、ウエスト周囲径について、プラセボ食品群および熟成ホップエキスを低含有食品群において摂取 4、8、12 週目で有意な低値 (いずれも $P < 0.01$) が、熟成ホップエキスを高含有食品群において摂取 8、12 週目で有意な低値 (いずれも $P < 0.01$) が、ヒップ周囲径について、プラセボ食品群および熟成ホップエキスを高含有食品群において摂取 8、12 週目で有意な低値 (いずれも $P < 0.05$) が、熟成ホップエキスを低含有食品群において摂取 4、8、12 週目で有意な低値 (いずれも $P < 0.01$) が認められた。また、ウエスト/ヒップ比について、プラセボ食品群において摂取 4、12 週目で有意な低値 (いずれも $P < 0.05$) が、熟成ホップエキスを低含有食品群において摂取 8、12 週目で有意な低値 (いずれも $P < 0.01$) が、熟成ホップエキスを高含有食品群において摂取 8、12 週目で有意な低値 (いずれも $P < 0.05$) が認められた。いずれの項目についても群間有意差は認められなかった。なお、摂取前の副次評価項目の実測値について群間有意差は認められなかった。

4) 理学的検査

理学的検査値の推移を表 1-3-4 に示した。収縮期血圧および拡張期血圧では、いずれの摂取群も有意な変動は認められず、群間有意差も認められなかった。脈拍数では、摂取 4 週目において、プラセボ食品群および熟成ホップエキスを低含有食品群で摂取前に比べ有意な増加 (プラセボ食品群: $P < 0.05$ 、熟成ホップエキスを低含有食品群: $P < 0.01$) が認められたが、生理的変動の範囲内であり临床上問題となるものではないと試験責任医師により判断された。

5) 血液検査および尿検査

血液学的検査値の推移を表 1-3-5、血液生化学検査値の推移を表 1-3-6 に示した。血液学的検査項目および血液生化学検査項目について、各摂取群において摂取前と比べて有意な変動が散見されたが、いずれの変動も基準値内の変動であり临床上問題となるものではないと試験責任医師により判断された。また、いずれの項目も群間有意差は認められなかった。尿 pH 値の推移を表 1-3-7 に示した。いずれの摂取群も摂取前からの有意な変動は認められず、群間有意差も認められなかった。その他の尿定性検査項目につい

て、臨床上問題となる変動は認められないと試験責任医師により判断された（データ示さず）。

6) 食事調査、歩行量調査および問診

エネルギー、蛋白質、脂質、炭水化物の摂取量および歩行量の推移を表 1-3-8 に示した。いずれの摂取群においても摂取前からの有意な変動は認められず、群間有意差も認められなかった。試験期間中に認められた有害事象について、プラセボ食品群においては 20 名 34 件報告され、その内訳は感冒症状 14 件、腹痛 5 件、腹痛・下痢 1 件、頭痛 2 件、熱中症 1 件、アトピー性皮膚炎 1 件、歯肉炎 1 件、心窩部不快感 1 件、筋肉痛 1 件、副鼻腔炎 1 件、汗疹 1 件、軟便 1 件、機能性胃腸症 1 件、浮腫 1 件、貧血 1 件、めまい 1 件であった。熟成ホップエキス低含有食品群においては 24 名 39 件報告され、その内訳は感冒症状 15 件、頭痛 3 件、頭痛・悪寒 1 件、頭痛・鼻づまり 1 件、背部痛・頭痛 1 件、頭痛・熱 1 件、発疹・蕁麻疹 2 件、腹痛 2 件、腹痛・熱 1 件、胃痛 1 件、心窩部痛 1 件、倦怠感 1 件、食欲不振 1 件、蜂巣炎 1 件、気管支喘息 1 件、軟便 1 件、関節痛 1 件、打ち身 1 件、首・肩の強い張り 1 件、胸焼け 1 件、筋肉痛 1 件であった。熟成ホップエキス高含有食品群においては 17 名 37 件報告され、その内訳は感冒症状 6 件、下痢 4 件、胃痛 2 件、頭痛 3 件、嘔吐・吐気 2 件、筋肉痛 1 件、二日酔い 1 件、嘔吐・下痢 1 件、股関節症 1 件、心窩部痛 1 件、肺炎・腎炎 1 件、歯根嚢胞 1 件、鼓膜損傷 1 件、熱中症 1 件、胸焼け 1 件、胃部不快感 1 件、軟便 1 件、ぎっくり腰 1 件、頸椎捻挫・左手のしびれ 1 件、腹痛 1 件、脇腹の痛み 1 件、ハント症候群 1 件、倦怠感 1 件、頭痛・悪寒 1 件、腰痛 1 件であった。いずれの症状も試験食品との関連性はなく、臨床上問題となるものではないと試験責任医師により判断された。

5. 考察

本節では、20 歳以上 65 歳以下で BMI が 25 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満の健常な成人男女を対象とし、熟成ホップエキス含有食品摂取による体脂肪減少効果について検討を行った。熟成ホップエキス低含有食品、熟成ホップエキス高含有食品もしくはプラセボ食品を 1 日 1 回、12 週間摂取させた結果、プラセボ食品群と比較して熟成ホップエキス高含有食品群において内臓脂肪面積の変化量の有意な低下が認められた。被験者には試験期間中、試験参加前からの食事習慣、運動習慣、就寝リズム、喫煙習慣および飲酒習慣を大きく変えず、普段通りに生活するように指示した。実際に、試験期間を通してエネルギー摂取量および運動量に群間で有意な差は認められなかった。被験食品とプラセボ食品の違いは熟成ホップエキスの有無のみであることから、本節で認められた体脂肪減少効果は熟成ホップエキスによるものと考えられる。また、熟成ホップエキス高含有食品では熟成ホップエキス 215 mg (MHBA として 35 mg)、熟成ホップエキス低含有食品では熟成ホップエキス 72 mg (MHBA として 11.7 mg) が含まれているため、熟成ホップエキスの内臓脂肪減少効果の最低効果用量は熟成ホップエキス 215 mg (MHBA として 35 mg) と考えられる。

プラセボ食品群において、内臓脂肪面積の変化量が摂取前から有意に増加した。一般的に体重は季節変動することが報告されており[90]、プラセボ食品群の内臓脂肪面積の増加も季節変動による影響である可能性が考えられる。

これまでの研究で、ホップ由来のビール苦味成分であるイソ α 酸の 12 週間継続摂取が、糖尿病前症の被験者に対して内臓脂肪減少効果を有すること、およびその最低効果用量が 1 日あたり 48 mg であることが報告されている[91]。一方、熟成ホップエキス中のイソ α 酸含量は検出限界以下であることから、熟成ホップエキスによる体脂肪減少効果にイソ α 酸は寄与しないと考えられる。また、MHBA の継続摂取により高脂肪食負荷マウスの体重増加および脂肪蓄積が抑制されることも明らかになっている[12]。従って、本試験で確認された熟成ホップエキス高含有食品摂取による内臓脂肪減少効果は MHBA によるものであると考えられる。筆者のグループでは他にも、BMI が 25 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満の健常な成人男女を対象として、35 mg の MHBA を含有した熟成ホップエキス配合食品の 12 週間継続摂取による体脂肪減少効果を報告しており、本試験で得られた結果を支持するものであった[92,93]。

これまでの研究で、MHBA は BAT に接続する交感神経活動を上昇させることにより、BAT における熱産生を誘導することが明らかになっている[12]。BAT は寒冷刺激および食事摂取によって活性化し熱産生を行う主要な組織であり、近年、齧歯類だけでなく成

人においても活性化した BAT が存在することが報告されている[69]。また、成人における活性化した BAT の量は体脂肪量と負の相関があるため、活性化した BAT による熱産生によって体脂肪が燃焼し減少することが示唆されている[94]。齧歯類において BAT を活性化することが報告されている黒ショウガ抽出物が、ヒトにおいても BAT の活性化によりエネルギー消費を亢進させることも報告されている[95,96]。以上より、本節で確認された熟成ホップエキス高含有食品摂取による内臓脂肪減少効果は、MHBA により BAT における熱産生を介した脂肪燃焼の結果である可能性が考えられる。

肥満は高血圧症や糖尿病などの様々な代謝性疾患を引き起こすことが知られており、体重に関わらず腹部内臓脂肪の過剰な蓄積がこれらの疾患に繋がることが報告されている[97-102]。そのため、内臓脂肪量を低下させることは代謝性疾患の予防に非常に重要である。本節において熟成ホップエキス高含有食品がヒトの内臓脂肪面積を有意に低下させることが示されたことより、熟成ホップエキスが肥満の予防だけでなく代謝性疾患のリスク低減に寄与することが期待される。

安全性については、各群において複数の有害事象が報告されたが、いずれの症状も試験責任医師により試験食品との関連性はなく臨床上問題となるものではないと判断された。また、理学的検査および臨床検査において、摂取前からの有意な変動が認められた項目があったが、いずれも生理的変動の範囲内もしくは基準値内の変動であり、試験責任医師により臨床上問題はないと判断された。以上より、熟成ホップエキス含有食品の 12 週間摂取による安全性に問題は認められなかった。

以上より、熟成ホップエキス含有食品の 12 週間継続摂取が、20 歳以上 65 歳以下で BMI が 25 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満の健常な男女に対して、安全に内臓脂肪を減少することが確認された。また、熟成ホップエキスによる内臓脂肪減少効果の最低効果用量は MHBA として 35 mg であると考えられた。

表 1-3-1. 試験食品の栄養成分（1 本 2 g あたり）

項目	単位	熟成ホップエキス 低含有食品	熟成ホップエキス 高含有食品	プラセボ食品
エネルギー	(kcal)	6	6	6
蛋白質	(g)	0.0	0.1	0.0
脂質	(g)	0.0	0.0	0.0
炭水化物	(g)	1.8	1.8	1.9
熟成ホップエキス (MHBAとして)	(mg)	72 (11.7)	215 (35)	0 (0)

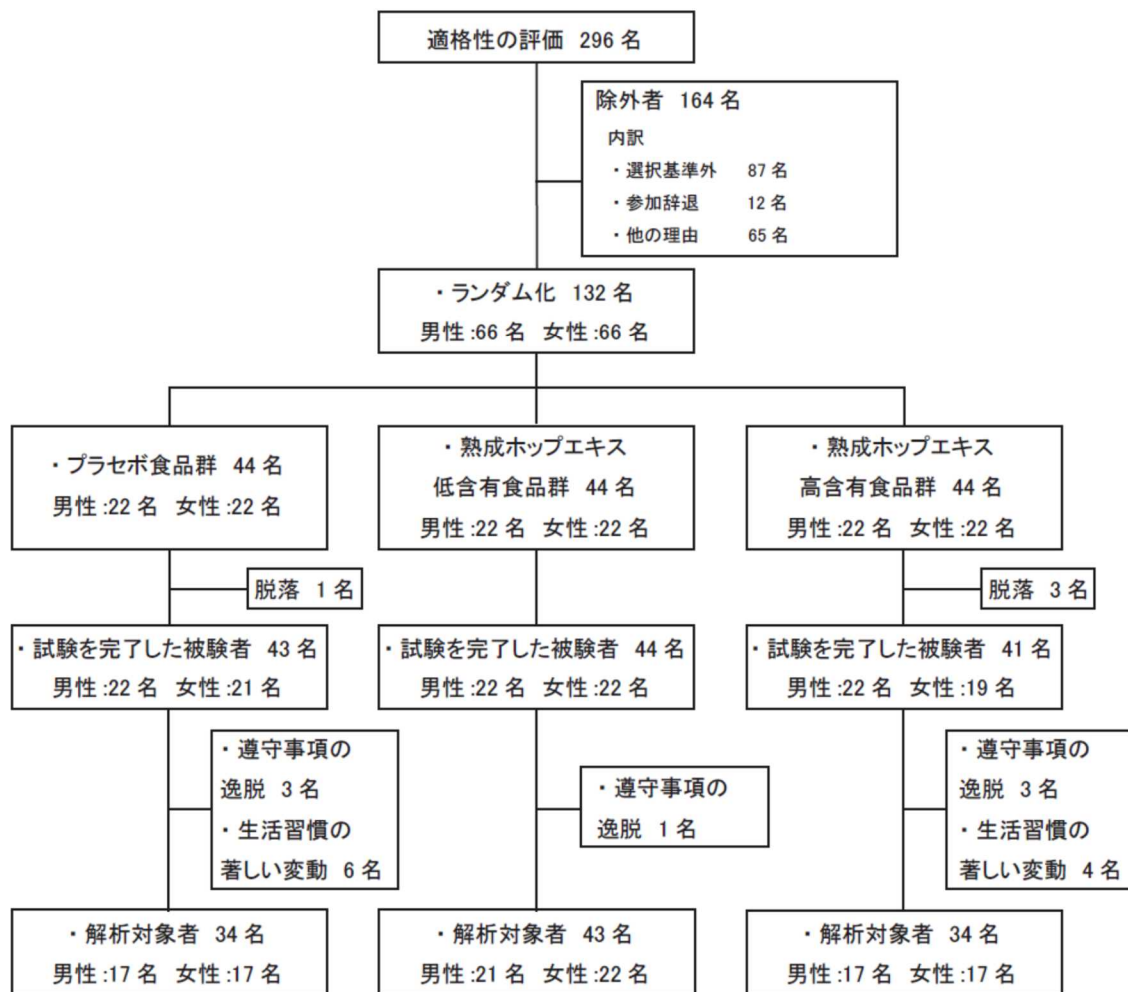


図 1-3-1. 被験者の組み入れから解析までの流れ

表 1-3-2. 被験者背景

項目	単位	L群 (n = 43)	H群 (n = 34)	P群 (n = 34)
年齢	(歳)	43.4 ± 1.8	42.2 ± 2.0	43.1 ± 1.9
身長	(cm)	165.08 ± 1.52	165.65 ± 1.16	164.96 ± 1.38
体重	(kg)	75.533 ± 1.443	75.356 ± 1.208	74.912 ± 1.276
BMI	(kg/m ²)	27.64 ± 0.20	27.42 ± 0.22	27.48 ± 0.20
体脂肪率	(%)	33.10 ± 1.07	32.32 ± 1.22	32.58 ± 1.18
ウエスト周囲径	(cm)	94.88 ± 0.91	94.83 ± 0.86	95.81 ± 0.71
ヒップ周囲径	(cm)	102.65 ± 0.60	102.30 ± 0.61	102.38 ± 0.74
ウエスト/ヒップ比	-	0.925 ± 0.008	0.927 ± 0.008	0.936 ± 0.006

P 群、L 群、H 群はそれぞれプラセボ食品群 (n=34)、熟成ホップエキス低含有食品群 (n=43)、熟成ホップエキス高含有食品群 (n=34) を表す。各データの値は平均値±標準誤差で表した。

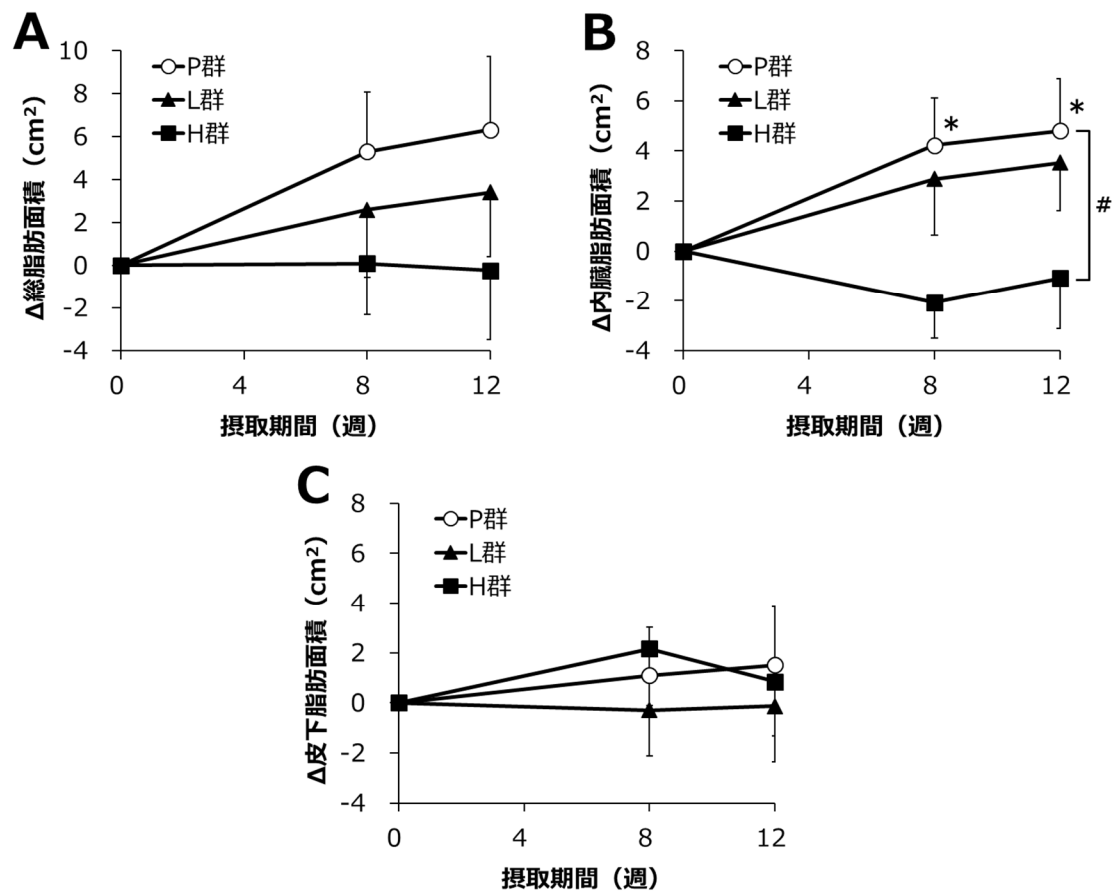


図 1-3-2. 腹部脂肪面積の変化量の推移

(A-C) 摂取開始前、摂取開始 8 週、および 12 週時点における腹部の総脂肪面積 (A)、内臓脂肪面積 (B)、および皮下脂肪面積 (C) を測定し、摂取開始前を起点とした変化量で表した。P 群、L 群、H 群はそれぞれプラセボ食品群 (n=34)、熟成ホップエキス低含有食品群 (n=43)、熟成ホップエキス高含有食品群 (n=34) を表す。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。群内の摂取前からの比較については対応のある *t* 検定を行った (*は $P<0.05$ を表す)。摂取期間を通した群間比較については Dunnett 法を事後検定とする two-way ANOVA により解析した (#は $P<0.05$ を表す)。

表 1-3-3. 身体測定項目変化量の推移

項目	試験食品	摂取4週目	摂取8週目	摂取12週目
△体脂肪率 (%)	P	-0.01 ± 0.14	0.23 ± 0.16	0.23 ± 0.18
	L	0.12 ± 0.16	0.31 ± 0.21	0.27 ± 0.26
	H	0.16 ± 0.21	0.42 ± 0.15 **	0.38 ± 0.21
△体重 (kg)	P	0.337 ± 0.200	0.326 ± 0.203	0.394 ± 0.203
	L	0.257 ± 0.189	0.293 ± 0.192	0.467 ± 0.253
	H	0.278 ± 0.176	0.406 ± 0.224	0.382 ± 0.258
△BMI (kg/m ²)	P	0.12 ± 0.07	0.12 ± 0.07	0.15 ± 0.07 *
	L	0.11 ± 0.07	0.11 ± 0.07	0.18 ± 0.09
	H	0.10 ± 0.06	0.15 ± 0.08	0.14 ± 0.09
△ウエスト周囲径 (cm)	P	-0.69 ± 0.21 **	-0.83 ± 0.22 **	-1.11 ± 0.24 **
	L	-0.52 ± 0.13 **	-0.95 ± 0.18 **	-1.17 ± 0.25 **
	H	-0.36 ± 0.19	-0.77 ± 0.24 **	-0.87 ± 0.26 **
△ヒップ周囲径 (cm)	P	-0.26 ± 0.13	-0.43 ± 0.19 *	-0.59 ± 0.22 *
	L	-0.33 ± 0.11 **	-0.49 ± 0.13 **	-0.68 ± 0.18 **
	H	-0.21 ± 0.13	-0.33 ± 0.13 *	-0.42 ± 0.16 *
△ウエスト/ヒップ比	P	-0.004 ± 0.002 *	-0.004 ± 0.002	-0.006 ± 0.002 *
	L	-0.002 ± 0.001	-0.005 ± 0.001 **	-0.005 ± 0.002 **
	H	-0.002 ± 0.002	-0.005 ± 0.002 *	-0.005 ± 0.002 *

P 群、L 群、H 群はそれぞれプラセボ食品群 (n=34)、熟成ホップエキス低含有食品群 (n=43)、熟成ホップエキス高含有食品群 (n=34) を表す。各データの値は平均値±標準誤差で表した。群内の摂取前からの比較については対応のある *t* 検定を行った。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を表す。

表 1-3-4. 理学的検査値の推移

項目	試験食品	摂取前 (0週目)	摂取4週目	摂取8週目	摂取12週目
収縮期血圧 (mmHg)	P	121.0 ± 2.5	122.0 ± 2.5	118.2 ± 2.2	122.3 ± 2.0
	L	122.3 ± 1.6	120.5 ± 1.8	121.3 ± 1.7	120.3 ± 1.8
	H	120.6 ± 2.4	123.1 ± 2.2	122.0 ± 2.2	121.1 ± 2.4
拡張期血圧 (mmHg)	P	75.1 ± 1.7	74.5 ± 1.6	74.7 ± 1.7	77.5 ± 1.7
	L	74.4 ± 1.5	73.2 ± 1.5	74.9 ± 1.5	75.5 ± 1.6
	H	73.8 ± 1.6	74.0 ± 1.7	74.6 ± 1.5	74.1 ± 1.7
脈拍数 (beats/min)	P	71.2 ± 1.6	75.1 ± 1.8 *	71.9 ± 1.3	72.7 ± 1.4
	L	70.1 ± 1.5	74.0 ± 1.5 **	70.5 ± 1.5	69.2 ± 1.4
	H	71.3 ± 1.9	72.9 ± 1.7	71.5 ± 1.5	72.9 ± 1.7

P 群、L 群、H 群はそれぞれプラセボ食品群 (n=34)、熟成ホップエキス低含有食品群 (n=43)、熟成ホップエキス高含有食品群 (n=34) を表す。各データの値は平均値±標準誤差で表した。群内の摂取前からの比較については対応のある *t* 検定を行った。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を表す。

表 1-3-5. 血液学的検査値の推移

	性別	基準値	試験食品	摂取前 (0週目)	摂取4週目	摂取8週目	摂取12週目
WBC (/mL)		3500-9700	P	6365.9 ± 311.0	6413.8 ± 266.9	6632.9 ± 266.9	6320.6 ± 310.9
			L	6010.5 ± 206.7	6286.0 ± 270.4	6236.3 ± 213.5	6164.4 ± 199.0
			H	6088.8 ± 276.7	6328.8 ± 292.4	6249.7 ± 287.5	6240.6 ± 309.1
RBC (×10 ⁴ /mL)	男	438-577	P	511.8 ± 7.6	515.0 ± 7.2	505.2 ± 5.8	516.4 ± 7.7
			L	497.8 ± 7.5	500.0 ± 8.1	497.4 ± 10.3	500.9 ± 10.4
			H	501.2 ± 7.6	503.2 ± 7.9	501.7 ± 7.8	505.2 ± 7.2
	女	376-516	P	458.4 ± 9.7	458.0 ± 9.7	454.5 ± 8.9	454.4 ± 8.6
			L	449.8 ± 6.3	450.5 ± 6.1	453.5 ± 5.9	455.1 ± 5.4
			H	441.8 ± 10.6	449.3 ± 9.2	442.5 ± 8.2	448.4 ± 9.0
Hb (g/dL)	男	13.6-18.3	P	15.58 ± 0.20	15.72 ± 0.19	15.49 ± 0.18	15.75 ± 0.17
			L	15.34 ± 0.22	15.36 ± 0.22	15.30 ± 0.29	15.41 ± 0.29
			H	15.52 ± 0.26	15.58 ± 0.25	15.54 ± 0.23	15.64 ± 0.24
	女	11.2-15.2	P	13.36 ± 0.30	13.36 ± 0.33	13.33 ± 0.29	13.28 ± 0.30
			L	13.19 ± 0.27	13.14 ± 0.27	13.33 ± 0.26	13.29 ± 0.24
			H	13.09 ± 0.29	13.33 ± 0.27	13.14 ± 0.25	13.35 ± 0.26
Ht (%)	男	40.4-51.9	P	47.54 ± 0.46	47.63 ± 0.52	46.25 ± 0.41 **	46.56 ± 0.40
			L	47.19 ± 0.59	46.84 ± 0.60	46.48 ± 0.81	46.23 ± 0.85
			H	47.62 ± 0.71	47.14 ± 0.59	46.64 ± 0.61	46.62 ± 0.58 *
	女	34.3-45.2	P	42.06 ± 0.78	41.78 ± 0.88	41.25 ± 0.79	40.96 ± 0.75 **
			L	41.55 ± 0.76	41.21 ± 0.66	41.16 ± 0.69	40.92 ± 0.67
			H	40.86 ± 0.80	41.38 ± 0.71	40.72 ± 0.64	40.65 ± 0.67
Plt (×10 ⁴ /mL)		14.0-37.9	P	25.48 ± 0.89	25.50 ± 0.89	25.80 ± 0.96	25.94 ± 0.93
			L	26.86 ± 0.97	26.64 ± 0.99	26.20 ± 0.89	26.56 ± 0.84
			H	25.04 ± 0.72	25.54 ± 0.81	25.34 ± 0.81	26.17 ± 0.74 *

P 群、L 群、H 群はそれぞれプラセボ食品群 (n=34)、熟成ホップエキス低含有食品群 (n=43)、熟成ホップエキス高含有食品群 (n=34) を表す。各データの値は平均値±標準誤差で表した。群内の摂取前からの比較については対応のある *t* 検定を行った。*は *P*<0.05、**は *P*<0.01 を表す。

表 1-3-6. 血液生化学的検査値の推移

	性別	基準値	試験食品	摂取前 (0週目)	摂取4週目	摂取8週目	摂取12週目
総蛋白 (g/dL)		6.5-8.2	P	7.38 ± 0.06	7.35 ± 0.05	7.28 ± 0.05 *	7.34 ± 0.06
			L	7.44 ± 0.05	7.44 ± 0.05	7.41 ± 0.05	7.43 ± 0.06
			H	7.27 ± 0.06	7.28 ± 0.06	7.22 ± 0.06	7.31 ± 0.05
アルブミン (g/dL)		3.7-5.5	P	4.49 ± 0.03	4.48 ± 0.04	4.39 ± 0.03 **	4.40 ± 0.04 *
			L	4.44 ± 0.04	4.47 ± 0.03	4.43 ± 0.04	4.41 ± 0.04
			H	4.45 ± 0.04	4.46 ± 0.03	4.41 ± 0.04	4.45 ± 0.04
総ビリルビン (mg/dL)		0.3-1.2	P	0.69 ± 0.05	0.68 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.66 ± 0.05
			L	0.71 ± 0.04	0.74 ± 0.05	0.72 ± 0.05	0.67 ± 0.04
			H	0.74 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.66 ± 0.04	0.65 ± 0.04
AST (U/L)		10-40	P	20.6 ± 1.1	21.2 ± 1.2	20.7 ± 1.2	21.6 ± 1.0
			L	22.4 ± 1.3	22.0 ± 1.4	22.2 ± 1.6	22.6 ± 1.0
			H	21.5 ± 1.1	21.4 ± 1.0	22.8 ± 1.6	24.9 ± 2.7
ALT (U/L)		5-45	P	24.0 ± 2.4	25.7 ± 2.5	24.9 ± 2.4	26.2 ± 2.3
			L	24.0 ± 2.3	25.1 ± 2.7	25.9 ± 3.5	26.7 ± 2.6 *
			H	24.1 ± 2.3	24.1 ± 2.0	26.2 ± 2.9	27.8 ± 3.5
LDH (U/L)		120-245	P	171.3 ± 5.0	175.1 ± 5.7	174.3 ± 5.2	176.6 ± 5.6
			L	173.7 ± 5.5	175.9 ± 4.6	174.0 ± 5.0	172.8 ± 5.0
			H	173.3 ± 3.8	175.8 ± 3.7	174.9 ± 3.3	182.7 ± 5.7 *
ALP (U/L)		104-338	P	205.0 ± 8.8	206.5 ± 8.9	202.7 ± 8.3	208.8 ± 9.0
			L	206.1 ± 8.6	210.3 ± 9.0	210.8 ± 9.6	212.7 ± 9.0
			H	191.9 ± 9.2	195.3 ± 8.9	193.5 ± 8.6	197.5 ± 8.5
g-GTP (U/L)	男	79以下	P	46.1 ± 5.4	49.7 ± 5.9	50.4 ± 7.2	46.1 ± 5.2
			L	53.8 ± 12.2	53.0 ± 12.0	55.8 ± 14.1	53.8 ± 12.1
			H	40.9 ± 3.8	40.4 ± 3.6	45.3 ± 6.3	45.1 ± 4.8
	女	48以下	P	21.8 ± 2.2	24.9 ± 3.6	23.1 ± 2.9	27.6 ± 4.8
			L	21.6 ± 2.6	22.0 ± 2.8	20.8 ± 2.4	21.1 ± 2.0
			H	19.8 ± 1.5	20.5 ± 1.4	19.7 ± 1.3	20.5 ± 1.5
総コレステロール (mg/dL)		150-219	P	199.6 ± 5.8	199.1 ± 6.0	193.8 ± 5.2 *	200.1 ± 5.2
			L	199.8 ± 6.0	201.6 ± 6.0	198.2 ± 6.0	201.1 ± 5.6
			H	202.1 ± 5.5	202.7 ± 5.4	201.1 ± 5.9	207.1 ± 5.5
LDL-コレステロール (mg/dL)		70-139	P	125.4 ± 5.4	127.6 ± 5.6	122.8 ± 5.3	130.1 ± 5.1
			L	125.5 ± 5.1	128.8 ± 5.1	124.5 ± 5.1	127.5 ± 5.2
			H	130.7 ± 5.4	128.9 ± 4.8	126.7 ± 5.4	133.1 ± 5.2
HDL-コレステロール (mg/dL)	男	40-80	P	47.2 ± 1.8	45.4 ± 1.9	47.4 ± 1.6	47.6 ± 2.2
			L	49.1 ± 3.2	48.8 ± 2.7	50.7 ± 3.1	50.5 ± 2.7
			H	45.5 ± 2.3	46.0 ± 2.5	48.0 ± 2.8	47.1 ± 2.6
	女	40-90	P	51.9 ± 2.1	51.2 ± 1.9	51.1 ± 2.1	52.6 ± 1.9
			L	54.4 ± 2.2	54.0 ± 2.1	54.2 ± 2.4	54.5 ± 2.2
			H	53.6 ± 2.8	54.8 ± 3.2	53.8 ± 3.1	56.5 ± 3.1
中性脂肪 (mg/dL)		50-149	P	127.8 ± 19.5	128.6 ± 13.6	113.0 ± 10.3	104.4 ± 9.1
			L	110.6 ± 8.9	114.5 ± 8.3	107.4 ± 9.9	108.3 ± 9.2
			H	106.6 ± 7.4	124.7 ± 11.2 *	123.4 ± 12.3	118.1 ± 13.2
遊離脂肪酸 (mEq/L)		0.10-0.81	P	0.563 ± 0.040	0.561 ± 0.038	0.531 ± 0.040	0.489 ± 0.038 *
			L	0.519 ± 0.024	0.565 ± 0.027	0.524 ± 0.028	0.527 ± 0.027
			H	0.559 ± 0.043	0.573 ± 0.040	0.533 ± 0.033	0.514 ± 0.030
リン脂質 (mg/dL)		150-250	P	212.3 ± 5.7	212.0 ± 4.4	207.6 ± 4.2	211.5 ± 4.0
			L	213.6 ± 5.2	216.3 ± 5.3	212.8 ± 5.4	215.0 ± 5.1
			H	210.6 ± 3.9	218.1 ± 4.8 *	216.6 ± 5.9	215.5 ± 5.0
血糖 (mg/dL)		70-109	P	94.7 ± 1.6	93.3 ± 1.3	92.4 ± 1.9 *	93.4 ± 1.6
			L	91.4 ± 1.1	90.7 ± 1.1	91.0 ± 1.1	91.3 ± 1.2
			H	92.4 ± 2.0	91.6 ± 1.8	91.5 ± 1.7	92.1 ± 1.4
尿酸 (mg/dL)	男	3.6-7.0	P	6.55 ± 0.27	6.68 ± 0.26	6.40 ± 0.23	6.68 ± 0.26
			L	6.89 ± 0.27	6.82 ± 0.26	6.76 ± 0.27	6.71 ± 0.25
			H	6.66 ± 0.23	6.71 ± 0.29	6.61 ± 0.24	6.57 ± 0.27
	女	2.7-7.0	P	5.24 ± 0.28	5.30 ± 0.31	5.29 ± 0.30	5.21 ± 0.27
			L	4.80 ± 0.21	4.84 ± 0.24	4.77 ± 0.23	4.84 ± 0.23
			H	5.06 ± 0.28	5.09 ± 0.27	4.94 ± 0.28	5.11 ± 0.32
尿素窒素 (mg/dL)		8.0-20.0	P	13.87 ± 0.59	12.96 ± 0.51	12.87 ± 0.49 *	13.43 ± 0.48
			L	13.44 ± 0.52	12.64 ± 0.42	12.73 ± 0.39	13.14 ± 0.52
			H	13.10 ± 0.60	12.85 ± 0.57	12.65 ± 0.66	12.65 ± 0.46
クレアチニン (mg/dL)	男	0.65-1.09	P	0.829 ± 0.014	0.830 ± 0.020	0.788 ± 0.017 **	0.805 ± 0.021
			L	0.868 ± 0.026	0.871 ± 0.023	0.858 ± 0.027	0.842 ± 0.024
			H	0.826 ± 0.024	0.810 ± 0.030	0.819 ± 0.034	0.791 ± 0.025
	女	0.46-0.82	P	0.678 ± 0.026	0.671 ± 0.024	0.651 ± 0.022	0.645 ± 0.022 **
			L	0.638 ± 0.016	0.634 ± 0.020	0.626 ± 0.018	0.621 ± 0.019
			H	0.642 ± 0.024	0.635 ± 0.022	0.621 ± 0.021	0.634 ± 0.024
Na (mEq/L)		135-145	P	140.9 ± 0.3	141.2 ± 0.3	140.7 ± 0.3	140.8 ± 0.3
			L	140.9 ± 0.2	141.3 ± 0.3	141.0 ± 0.2	141.1 ± 0.2
			H	141.3 ± 0.3	140.9 ± 0.3	140.8 ± 0.3	141.2 ± 0.3
Cl (mEq/L)		98-108	P	103.6 ± 0.3	104.3 ± 0.3 *	104.0 ± 0.3	104.4 ± 0.3 *
			L	103.8 ± 0.3	104.4 ± 0.2 *	104.0 ± 0.3	104.4 ± 0.3 *
			H	104.2 ± 0.4	104.1 ± 0.3	104.1 ± 0.3	104.1 ± 0.3
K (mEq/L)		3.5-5.0	P	4.13 ± 0.03	4.07 ± 0.04	4.12 ± 0.04	4.19 ± 0.06
			L	4.15 ± 0.04	4.08 ± 0.04 *	4.12 ± 0.06	4.13 ± 0.04
			H	4.13 ± 0.05	4.03 ± 0.05 *	4.06 ± 0.04	4.10 ± 0.05

P 群、L 群、H 群はそれぞれプラセボ食品群 (n=34)、熟成ホップエキス低含有食品群 (n=43)、熟成ホップエキス高含有食品群 (n=34) を表す。各データの値は平均値±標準誤差で表した。群内の摂取前からの比較については対応のある *t* 検定を行った。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を表す。

表 1-3-7. 尿 pH 値の推移

項目	試験食品	基準値	摂取前 (0週目)	摂取4週目	摂取8週目	摂取12週目
尿pH	P	4.8-7.5	5.76 ± 0.09	5.84 ± 0.11	5.87 ± 0.10	5.85 ± 0.10
	L		5.93 ± 0.10	5.87 ± 0.12	5.80 ± 0.10	5.78 ± 0.10
	H		5.93 ± 0.12	6.04 ± 0.11	5.91 ± 0.12	5.87 ± 0.12

P 群、L 群、H 群はそれぞれプラセボ食品群 (n=34)、熟成ホップエキス低含有食品群 (n=43)、熟成ホップエキス高含有食品群 (n=34) を表す。各データの値は平均値±標準誤差で表した。

表 1-3-8. 1 日あたりの栄養摂取量および歩行量の推移

項目	試験食品	摂取前 (0週目)	摂取4週目	摂取8週目	摂取12週目
エネルギー (kcal/day)	P	1853.7 ± 66.8	1881.6 ± 76.3	1741.8 ± 74.1	1885.0 ± 72.4
	L	1905.8 ± 60.7	1838.1 ± 68.0	1898.9 ± 73.9	1829.1 ± 61.2
	H	1877.9 ± 62.9	1827.4 ± 68.8	1835.3 ± 50.6	1870.6 ± 63.8
蛋白質 (g/day)	P	67.91 ± 2.16	65.45 ± 2.98	63.74 ± 3.60	69.64 ± 3.25
	L	69.30 ± 2.89	67.13 ± 2.72	67.21 ± 2.77	65.68 ± 2.21
	H	64.80 ± 2.61	64.46 ± 2.86	67.71 ± 2.85	67.11 ± 2.76
脂質 (g/day)	P	64.51 ± 3.15	67.38 ± 3.41	59.65 ± 2.96	64.08 ± 2.91
	L	65.78 ± 3.20	62.11 ± 2.82	68.19 ± 3.18	64.37 ± 2.27
	H	64.04 ± 2.87	64.05 ± 3.56	64.51 ± 2.63	65.09 ± 2.72
炭水化物 (g/day)	P	234.70 ± 10.57	238.00 ± 10.85	222.14 ± 10.31	243.14 ± 11.43
	L	246.84 ± 8.63	241.20 ± 10.01	241.28 ± 10.11	234.02 ± 10.53
	H	246.41 ± 9.24	236.59 ± 8.98	231.76 ± 7.49	240.07 ± 9.78
歩行量 (steps/day)	P	7019.0 ± 592.1	6782.4 ± 507.0	7160.8 ± 609.9	7368.1 ± 534.0
	L	8583.3 ± 589.2	8278.6 ± 492.1	8516.6 ± 585.1	8700.6 ± 673.6
	H	7412.9 ± 651.0	6823.5 ± 665.4	7794.7 ± 728.2	7326.9 ± 767.2

P 群、L 群、H 群はそれぞれプラセボ食品群 (n=34)、熟成ホップエキス低含有食品群 (n=43)、熟成ホップエキス高含有食品群 (n=34) を表す。各データの値は平均値±標準誤差で表した。

〈第2章 乳酸菌による目の疲労 感軽減効果〉

第1節 抗炎症性サイトカインを介した炎症抑制の作用機序

1. 要約

チーズなどの製造で使用されてきた乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* KW3110 (KW3110 乳酸菌) は抗炎症性 M2 マクロファージを活性化し、加齢に伴う慢性炎症状態を抑制することなどが報告されている。しかし、KW3110 乳酸菌に関する炎症抑制作用機序は不明な点が多い。そこで本研究では、マウスおよびヒト免疫細胞を用い、リポ多糖およびアデノシン三リン酸 (LPS/ATP) を使用した炎症性刺激による細胞炎症応答に対する KW3110 乳酸菌の抑制効果を検証した。

マウス由来マクロファージへの KW3110 乳酸菌添加は、他の乳酸菌株添加よりも抗炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -10 産生を増加させ、LPS/ATP 刺激による炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を抑制した。一方、これらの作用はマクロファージ食食阻害剤の添加や siRNA による IL-10 シグナル因子の発現抑制により阻害された。また KW3110 乳酸菌添加によって、LPS/ATP 刺激によるインフラマソーム活性本体 caspase-1 の活性化が抑制され、その作用は siRNA による IL-10 シグナル因子の発現抑制により阻害された。さらに、ヒト由来単球細胞への KW3110 乳酸菌添加は IL-10 産生を誘導した他、KW3110 乳酸菌あるいは IL-10 の添加によって LPS/ATP 刺激による caspase-1 活性化および IL-1 β 産生誘導が抑制された。

以上より、KW3110 乳酸菌はマウスおよびヒト免疫細胞において、IL-10 産生誘導を介して炎症性刺激による caspase-1 活性化および IL-1 β 産生誘導を抑制することが示唆された。これらの発見は乳酸菌の新たな炎症抑制機序の一端を示すものであり、食品素材を用いた炎症関連疾患に対する予防法への貢献が期待される。

2. 背景

生物はこれまでに、生体内外の抗原やその他のストレスに対する基本的な防御機構として、免疫応答を発達させてきた。その中でも炎症応答は、感染因子や損傷を受けた細胞もしくは組織を除去し、組織修復を開始することに必要であるため、免疫応答において重要な過程である。一方で、感染や老化などの様々なストレスにより、過剰な、もしくは慢性的な炎症が惹起され、深刻な障害や疾患へと繋がり多くの人々に影響を及ぼしている[21-24]。そのため、こうしたストレス状態を予防するための介入が必要不可欠である。

これまでの研究で、乳酸菌の 1 種である *Lactobacillus paracasei* KW3110 株 (KW3110) がマウスおよびヒトにおいて皮膚炎などの過剰な炎症応答を抑制することが報告されている[14,29,30,103]。KW3110 は抗炎症性の M2 マクロファージを活性化し、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -10 の産生を誘導する[104]。さらに、KW3110 はマウスにおいて加齢に関連する慢性炎症およびブルーライト刺激による網膜での炎症を抑制し、その作用機序には免疫細胞を活性化や IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生抑制が関与すると考えられている[31,104]。しかしながら、KW3110 が炎症抑制作用を発揮する詳細な分子機序については十分に明らかになっていない。

本節では、KW3110 の炎症抑制作用の詳細な分子機序を明らかにするため、様々な刺激に応答して炎症性もしくは抗炎症性サイトカインを産生するマウス由来マクロファージ様細胞株 J774A.1 を用いて検討を行った[105,106]。また、ヒトマクロファージの炎症応答およびその分子機序の研究にはヒト単球細胞が用いられてきたことから[107,108]、本節ではヒト単球細胞も用いて、KW3110 の炎症抑制作用機序がマウス細胞およびヒト細胞の間で保存されているか検討した。

3. 実験方法

1) 試薬

KW3110 は小岩井乳業社（東京、日本）で保管されているものを使用し、37℃で 48 時間培養した後、100℃で加熱殺菌、凍結乾燥し、PBS に溶解した[103]。また、リポ多糖（LPS）（カタログ番号 tlr1-3pelps）は Invivogen 社（San Diego, CA, USA）から、アデノシン三リン酸（ATP）（カタログ番号 A2383）およびサイトカラシン D（カタログ番号 C2618）は Sigma Aldrich 社（St. Louis, MO, USA）から、マウス由来 IL-10（カタログ番号 417-ML）およびヒト由来 IL-10（カタログ番号 217-IL）は R&D Systems 社、MN, USA から購入した。1 次抗体として、マウスモノクローナル抗マウスカスパーゼ-1 (p20) 抗体（カタログ番号 AG-20B-0042-C100）は Adipogen Life Sciences 社（San Diego, CA, USA）から、ウサギモノクローナル抗マウス IL-1 β 抗体（カタログ番号 12507S）およびマウスモノクローナル抗マウス β アクチン抗体（カタログ番号 3700）は Cell Signaling Technology 社（Danvers, MA, USA）から購入した。2 次抗体として、ヒツジ由来抗マウス IgG horseradish peroxidase 結合抗体（カタログ番号 NA931）およびロバ由来抗ウサギ IgG horseradish peroxidase 結合抗体（カタログ番号 NA934）は GE Healthcare 社（Chicago, IL, USA）から購入した。

2) 細胞

J774A.1 細胞は、細網細胞肉腫を有する雌性の成獣マウスの腹水から確立した細胞株（カタログ番号 TIB-67）（ATCC 社、Manassas, VA, USA）であり、10%胎児ウシ血清、100 U/mL ペニシリン、および 100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む DMEM（Gibco 社、Grand Island, NY, USA）を用いて 5%CO₂ 条件下、37℃で培養した。

3) ヒト単球細胞

健康なドナー由来の末梢血単核細胞は iQ Biosciences 社（Berkeley, CA, USA）（カタログ番号 IQB-PBMC103）から購入した。ウエスタン治験審査委員会により承認されたドナープログラムに参加する全てのドナーから同意書を取得し、匿名化を実施済みである。単球細胞は、クラシカルモノサイト単離キット（Miltenyi Biotec 社、Sunnyvale, CA, USA）を用いて単核細胞から単離した。

4) サイトカイン産生量の測定

細胞を 24 ウェルプレートに播種（J774A.1 細胞は 1 $\times$ 10⁵ cells/well、ヒト単球細胞は

2.5×10⁵ cells/well) して一晩培養し、KW3110 を添加 (J774A.1 細胞には 1.25-5 µg/mL、ヒト単球細胞には 100 µg/mL) して 37°C、24 時間培養した。IL-1β の測定においては、10 µg/mL LPS を添加して 4 時間反応させた後に 2 mM ATP を添加して 1 時間反応させた。1 µg/mL IL-10 を添加する場合は LPS と同時に添加した。図 2-1-1B に示す上清置換実験においては、KW3110 を添加した J774A.1 細胞から回収した上清を別の無添加 J774A.1 細胞の培地から置換し、10 µg/mL LPS で 4 時間、2 mM ATP で 1 時間反応させた。食害阻害実験においては、J774A.1 細胞への KW3110 添加 30 分前に、食害阻害剤であるサイトカラシン D を 1 µg/mL で添加した。上清を回収した後 5000 rpm で 2 分間遠心した。サイトカインの産生量は酵素免疫測定 (ELISA) キット (マウスおよびヒト IL-10、BD Biosciences 社、San Jose, CA, USA; マウス IL-1β、eBioscience 社、San Diego, CA, USA; ヒト IL-1β、R&D Systems、Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。

5) ウェスタンブロッティング

J774A.1 細胞を 24 ウェルプレートに 1×10⁵ cells/well で播種して一晩培養し、1%胎児ウシ血清を含む Opti-MEM (Gibco 社、Island, NY, USA) に溶解した 5 µg/mL KW3110 を添加して 37°C、24 時間培養した。その後、10 µg/mL LPS を添加して 4 時間反応させた後に 2 mM ATP を添加して 1 時間反応させた。細胞を放射性免疫沈降測定緩衝液で溶解し、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプル緩衝液内で 95°C、5 分間反応させた。メタノールおよびクロロホルムを用いて上清を沈澱させ、ペレットを SDS サンプル緩衝液に溶解して 95°C、5 分間反応させた。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離したサンプルをポリフッ化ビニルデンポリフッ化ビニリデン膜に転写し、1000 倍希釈した 1 次抗体により 4°Cで一晩反応させた後、10000 倍希釈した 2 次抗体により室温で 1 時間反応させた。ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare 社、Chicago, IL, USA) を用いてサンプルの画像を取得した。

6) カスパーゼ-1 活性測定

細胞を 24 ウェルプレートに播種 (J774A.1 細胞は 1×10⁵ cells/well、ヒト単球細胞は 2.5×10⁵ cells/well) して一晩培養し、KW3110 を添加 (J774A.1 細胞には 5 µg/mL、ヒト単球細胞には 100 µg/mL) して 37°C、24 時間培養した。その後、10 µg/mL LPS を添加して 4 時間反応させた後に 2 mM ATP を添加して 1 時間反応させた。1 µg/mL IL-10 を添加する場合は LPS と同時に添加した。上清を回収した後 5000 rpm で 2 分間遠心した。カスパーゼ-1 の活性は Caspase-Glo 1 インフラマソーム測定キット (Promega 社、Madison、

WI、USA) を用いて測定した。

7) リアルタイム PCR

J774A.1 細胞を 24 ウェルプレートに 3×10^5 cells/well で播種して一晩培養し、5 $\mu\text{g/mL}$ KW3110 を添加して 37°C、6 時間培養した。RNeasy mini kit (QIAGEN 社、Venlo、Netherlands) を用いて RNA を抽出し、SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Invivogen 社、Waltham、MA、USA) を用いて逆転写を行った。リアルタイム PCR は TB Green Premix Ex Taq (タカラバイオ社、滋賀、日本) および LightCycler 480 (Roche Diagnostics 社、Rotkreuz、Switzerland) を用いて行った。PCR 条件は、90°C 10 秒間の反応の後、95°C 5 秒間および 60°C 20 秒間の反応を 45 サイクル行った。各サンプルの値は *GAPDH* の発現レベルに対する相対値で表した。実験に使用した各種プライマーの塩基配列は次の通りである。*GAPDH* フォワード、5' TGTGTCCGTCGTGGATCTGA 3'、リバーズ、5' TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG 3'; *IL-10* フォワード、5' GCCAGAGCCACATGGTCCTA 3'、リバーズ、5' -GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA 3'; *IL-10* 受容体サブユニット α (*IL-10R*) フォワード、5' -CCAGTCTGAGAGCACCTACTATGAA 3'、リバーズ、5' -CCAGGGTGAACGTTGTGAGA 3'。

8) siRNA 導入

siRNAs は全て Dharmacon 社 (Lafayette、CO、USA) より購入した siGENOME SMARTpool siRNA である。本節では、Non-targeting siRNA (*siNT*、ネガティブコントロール)、マウス *IL-10* siRNA (*siIL-10*)、マウス *IL-10R* siRNA (*siIL-10R*) を使用した。J774A.1 細胞を 24 ウェルプレートに 3×10^5 cells/well で播種し、DharmaFECT 1 トランスフェクション試薬 (Dharmacon 社、Lafayette、CO、USA) を用いて 100 nM siRNAs を導入して 24 時間反応させた後、KW3110 を添加した。

9) 統計解析

各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計的有意差は、対応のない *t* 検定、Dunnnett 法もしくは Tukey 法を事後検定とする ANOVA によって解析した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であると判断した。

4. 結果

1) J774A.1 細胞への LPS/ATP 刺激による IL-1 β 産生は KW3110 の添加により抑制される

本節では、マウス由来マクロファージ様細胞株 J774A.1 を用いて、KW3110 がどのような機序でマクロファージにおける炎症応答を抑制するか検討した。IL-1 β の産生量は LPS/ATP 刺激を与えた細胞において、無刺激細胞と比較して有意に上昇した ($P<0.01$) (図 2-1-1A)。一方、KW3110 の添加濃度依存的に IL-1 β 産生量の上昇が抑制された (5 $\mu\text{g/mL}$ で $P<0.05$) (図 2-1-1A)。また、KW3110 を添加した細胞の上清を置換することにより、LPS/ATP 刺激を与えた細胞における IL-1 β の産生量は有意に抑制された ($P<0.01$) (図 2-1-1B)。

2) KW3110 は IL-10 シグナリングを介して J774A.1 細胞への LPS/ATP 刺激による IL-1 β 産生を抑制する

図 2-1-1B で示した上清置換実験の結果から、KW3110 を添加した J774A.1 細胞から分泌される因子が LPS/ATP 刺激細胞における IL-1 β の産生を抑制する可能性が示唆された。KW3110 は M2 マクロファージにおける IL-10 の産生を誘導するため、本節では KW3110 が IL-10 シグナリングを介してマクロファージにおける炎症応答を抑制する可能性を検証した[104,109]。まず、J774A.1 細胞へ KW3110 を添加した結果、添加濃度依存的に IL-10 産生量の増加が認められた (いずれの添加濃度でも $P<0.01$) (図 2-1-2A)。また、IL-10 の添加により LPS/ATP 刺激細胞における IL-1 β の産生量上昇が有意に抑制された ($P<0.01$) (図 2-1-2B)。次に、IL-10 シグナリングが KW3110 による LPS/ATP 刺激細胞の IL-1 β 産生抑制機序に関与するか検討するため、IL-10 シグナリング因子を標的とする siRNAs 導入による遺伝子発現抑制実験を実施した。KW3110 を添加した J774A.1 細胞への *IL-10* siRNA 導入により、IL-10 の mRNA およびタンパク質発現量のどちらも有意に減少し (いずれも $P<0.01$) (図 2-1-2C、D)、*IL-10R* siRNA 導入により *IL-10R* の mRNA 発現量が有意に減少した ($P<0.01$) (図 2-1-2E)。さらに、*IL-10* もしくは *IL-10R* siRNA の導入により、LPS/ATP 刺激細胞の IL-1 β 産生に対する KW3110 の抑制作用が有意に阻害された (いずれも $P<0.01$) (図 2-1-2F)。

3) J774A.1 細胞による貪食作用は、KW3110 添加による IL-10 の産生誘導および IL-1 β の産生抑制に必要である

マクロファージは乳酸菌などの微生物を認識、貪食して炎症性サイトカインや抗炎症

性サイトカインを産生する[28,110]。本節では、KW3110 がマクロファージの貪食作用を介して IL-10 の産生を誘導するか検討するため、貪食阻害剤であるサイトカラシン D を KW3110 添加前に用いた。その結果、サイトカラシン D の添加によって KW3110 添加細胞における IL-10 の mRNA およびタンパク質発現量のどちらも有意に減少した（いずれも $P<0.01$ ）（図 2-1-3A、B）。さらに、サイトカラシン D の添加によって、LPS/ATP 刺激細胞への KW3110 添加による IL-1 β の産生抑制作用が有意に阻害された（ $P<0.01$ ）（図 2-1-3C）。

4) KW3110 は IL-10 シグナリングを介して LPS/ATP 刺激した J774A.1 細胞における活性型カスパーゼ-1 の発現を抑制する

次に、KW3110 が LPS/ATP 刺激した J774A.1 細胞における IL-1 β の産生を抑制する詳細な分子機序について検討した。ウェスタンブロッティングによる IL-1 β タンパク質発現確認の結果、KW3110 添加により、LPS/ATP 刺激細胞の上清における成熟 IL-1 β の発現抑制が認められた（図 2-1-4A）。一方、細胞溶解物における IL-1 β 前駆体の発現レベルは KW3110 添加によって影響を受けなかった（図 2-1-4A）。IL-1 β 前駆体の成熟はインフラマソーム複合体を構成するシステインプロテアーゼであるカスパーゼ-1 の活性化によって促進されるため、本節ではマクロファージにおけるカスパーゼ-1 の活性化を KW3110 が抑制するか検討した。細胞上清中の活性型カスパーゼ-1 の発現レベルは LPS/ATP 刺激により上昇する一方で、KW3110 の添加によりその発現上昇が抑制された（図 2-1-4B）。さらに、IL-10 もしくは IL-10R siRNA の導入により、KW3110 添加による活性型カスパーゼ-1 の発現抑制作用が阻害された（図 2-1-4B）。

5) KW3110 もしくは IL-10 の添加により、LPS/ATP 刺激した J774A.1 細胞におけるカスパーゼ-1 の活性化が抑制される

本節ではさらに、KW3110 の添加により、LPS/ATP 刺激した J774A.1 細胞におけるカスパーゼ-1 の活性化が抑制されるか確認するため、Caspase-Glo 1 インフラマソーム測定を行いカスパーゼ-1 の活性を定量的に測定した。その結果、LPS/ATP 刺激により J774A.1 細胞上清中のカスパーゼ-1 の活性レベルが有意に上昇した（ $P<0.01$ ）（図 2-1-5A）一方、KW3110 の添加によりその活性レベル上昇が有意に抑制された（ $P<0.01$ ）（図 2-1-5A）。また、IL-10 の添加によっても LPS/ATP 刺激によるカスパーゼ-1 の活性レベル上昇は有意に抑制された（ $P<0.01$ ）（図 2-1-5B）。

6) ヒト単球細胞におけるカスパーゼ-1 活性および IL-1 β 産生に対する KW3110 の作用

本節では最後に、KW3110 がヒト細胞においても IL-10 シグナリングを介してカスパーゼ-1 活性および IL-1 β 産生を抑制するか検討するため、J774A.1 細胞と同様にインフラマソーム測定に用いられるヒト末梢血単核細胞から単離したヒト単球細胞を用いて検討を行った。その結果、KW3110 添加により、ヒト単球細胞において IL-10 産生量の有意な上昇が認められた ($P<0.01$) (図 2-1-6A)。また、LPS/ATP 刺激により IL-1 β 産生量の有意な上昇が認められた ($P<0.01$) (図 2-1-6B) 一方で、KW3110 の添加により IL-1 β 産生は有意に抑制された ($P<0.01$) (図 2-1-6B)。さらに、LPS/ATP 刺激によりカスパーゼ-1 活性レベルの有意な上昇が認められた ($P<0.05$) (図 2-1-6C) 一方で、KW3110 の添加によりカスパーゼ-1 活性レベルは有意に抑制された ($P<0.01$) (図 2-1-6C)。KW3110 を用いて得られた結果と同様に、ヒト IL-10 を添加した場合についても、LPS/ATP 刺激したヒト単球細胞における IL-1 β 産生およびカスパーゼ-1 活性化は有意に抑制された (いずれも $P<0.01$) (図 2-1-6B、C)。

5. 考察

これまでの研究において、乳酸菌の1種である KW3110 が M2 マクロファージを活性化し、IL-1 β の産生抑制などの炎症抑制作用を有することが明らかになっている。一方、その詳細な分子機序については未だに不明である。本節では、KW3110 がマウスのマクロファージにおける IL-10 産生促進を介して、LPS/ATP 刺激によるカスパーゼ-1 の活性化および IL-1 β の産生を抑制することを示した。さらに、KW3110 はヒト単球細胞においても同様の作用機序を有する可能性も見出した。

本節において、J774A.1 細胞への KW3110 の添加によって放出される何らかの分子が LPS/ATP 刺激細胞における IL-1 β 産生を抑制することを示した (図 2-1-1B)。KW3110 を添加した細胞において IL-10 の産生量が上昇する他 (図 2-1-2A)、siRNAs 導入による IL-10 シグナリング因子の遺伝子発現抑制により、LPS/ATP 刺激細胞における IL-1 β 産生に対する KW3110 の作用が抑制された (図 2-1-2E)。また、ヒト単球細胞においても、KW3110 の添加による IL-10 産生上昇が認められ (図 2-1-6A)、LPS/ATP 刺激細胞における IL-1 β の産生が KW3110 もしくは IL-10 の添加により抑制された (図 2-1-6B)。IL-10 は代表的な抗炎症性サイトカインであり、本節の図 2-1-2B で示したように IL-1 β 産生の抑制に関与している[111-113]。KW3110 はこれまでに腸管免疫細胞との相互作用を介してマクロファージを活性化し、IL-10 などのサイトカイン産生を誘導することが報告されている他、加齢マウスの血中やブルーライト照射を施したマウスの網膜における IL-1 β などの炎症性サイトカイン量を抑制することも報告されている[30,31,104,109]。以上の結果から、KW3110 はマウスおよびヒトのどちらにおいても、IL-10 シグナリングを介して、炎症性刺激を受けた免疫細胞における IL-1 β の産生を抑制する可能性が示唆された (図 2-1-7)。

食食阻害剤であるサイトカラシン D を J774A.1 細胞に添加した結果、KW3110 による IL-10 の産生誘導および IL-1 β の産生抑制作用はいずれも阻害された (図 2-1-3)。これらの結果は、乳酸菌などの微生物がマクロファージなどの免疫細胞によって認識、食食され、炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインの産生へと繋がるというこれまでの報告と一致している[28,110]。このことから、KW3110 はマクロファージの食食作用を介して炎症抑制作用を有すると考えられる。マクロファージの細胞膜にはスカベンジャー受容体や C 型レクチン、Toll 様受容体などの多様な自然免疫受容体が発現しており、細菌表面の構造の一部を認識して食食の実行に重要な役割を担っている[114,115]。以上より、KW3110 はその表面構造をマクロファージに認識され、食食されることにより、マクロファージに対する炎症抑制作用を発揮している可能性が考えられる。

LPS/ATP 刺激した J774A.1 細胞への KW3110 の添加により、上清中の成熟 IL-1 β の発現は抑制されたが、細胞溶解物中の IL-1 β 前駆体の発現は抑制されなかった(図 2-1-4A)。従って、KW3110 は IL-1 β の成熟過程に関与している可能性が考えられる。IL-1 β の成熟はインフラマソーム複合体の活性本体であるカスパーゼ-1 の活性化により促進されることが報告されている[116]。本節では、KW3110 の添加により、LPS/ATP 刺激した J774A.1 細胞上清のカスパーゼ-1 活性化が抑制され、その作用が *IL-10* もしくは *IL-10R* siRNA の導入により阻害されることを示した(図 2-1-4B、2-1-5A)。加えて、IL-10 の添加によっても LPS/ATP 刺激細胞の上清におけるカスパーゼ-1 活性化が抑制されることを示しており(図 2-1-5B)、IL-10 がインフラマソーム活性化の抑制に関与するというこれまでの報告と一致するものである[117,118]。インフラマソームの活性化はミトコンドリアの機能低下により産生される活性酸素種および酸化 DNA によって促進されることが知られている[119,120]。インフラマソームの活性化に対する IL-10 の抑制作用は、機能低下したミトコンドリアを除去する機構であるマイトファジーの誘導を介していると考えられているため、KW3110 も IL-10 シグナリングを介してマイトファジーを誘導している可能性が考えられる[113]。以上より、KW3110 は IL-10 シグナリングを介して、炎症性刺激を受けたマクロファージにおけるインフラマソームの活性化を抑制する可能性が示唆された。

本節において、KW3110 はマウスおよびヒト免疫細胞において IL-10 産生を誘導することにより、LPS/ATP 刺激によるカスパーゼ-1 の活性化および IL-1 β の産生を抑制することが明らかになった。カスパーゼ-1 の活性化に対する KW3110 の抑制作用は乳酸菌における新たな炎症抑制作用機序であり、これらの知見は炎症関連疾患に対する食品素材を用いた新たな予防法の確立に貢献できることが期待される。

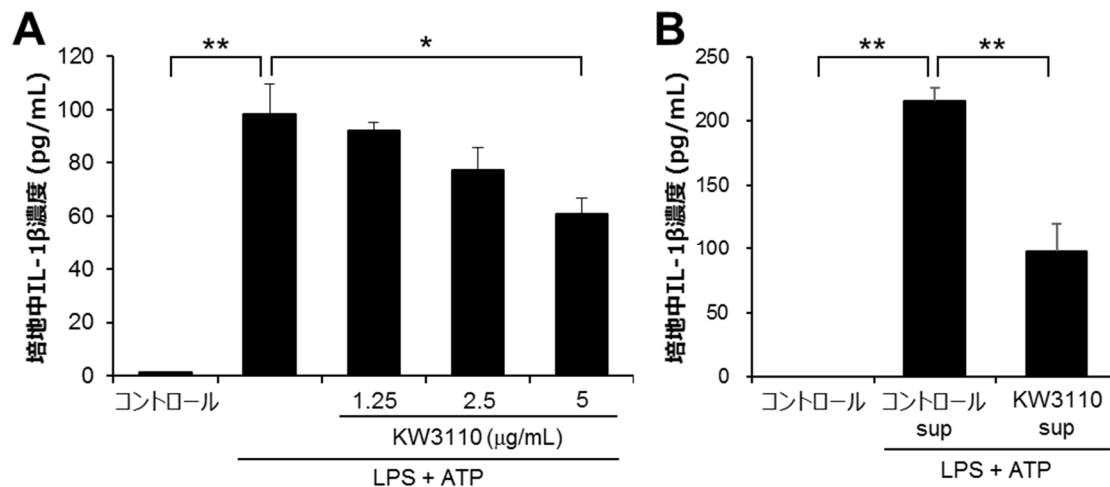


図 2-1-1. J774A.1 細胞への LPS/ATP 刺激による IL-1 β 産生は KW3110 の添加により抑制される

(A) J774A.1 細胞に KW3110 (1.25、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$) を添加した 24 時間後に LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) を 4 時間、ATP (2 mM) を 1 時間反応させ刺激した。IL-1 β の産生量は ELISA 法により測定した。(B) KW3110 を添加した細胞の上清を無刺激細胞に添加し、LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) を 4 時間、ATP (2 mM) を 1 時間反応させ刺激した。IL-1 β の産生量は ELISA 法により測定した。コントロール sup は無刺激細胞の上清で置換した群、KW3110 sup は KW3110 添加細胞の上清で置換した群を表す。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=3$ であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を表す。

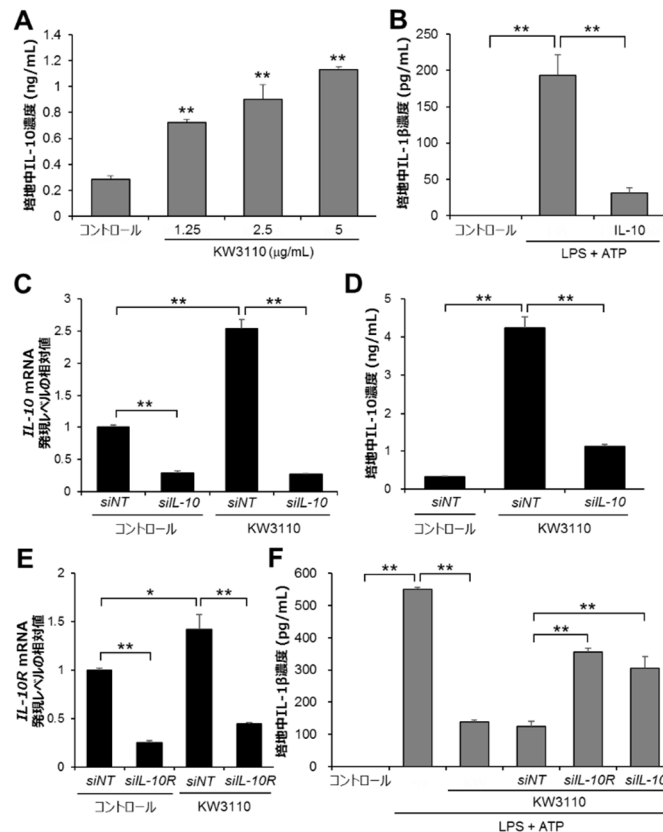


図 2-1-2. IL-10 シグナリング因子の遺伝子発現抑制により、LPS/ATP 刺激細胞への KW3110 添加による IL-1 β の産生抑制作用が阻害される

(A) J774A.1 細胞に KW3110 (1.25、2.5、5 μ g/mL) を添加した 24 時間後に、IL-10 の産生量を ELISA 法により測定した。(B) 細胞に IL-10 (1 μ g/mL) および LPS (10 μ g/mL) を 4 時間、ATP (2 mM) を 1 時間反応させ刺激した後に、IL-1 β の産生量を ELISA 法により測定した。(C、E) IL-10 もしくは IL-10R siRNA を導入した細胞に KW3110 (10 μ g/mL) を添加した 6 時間後、RNA を抽出して逆転写を行い、マウス *GAPDH* および IL-10 もしくは IL-10R 対象としたリアルタイム PCR を行った。IL-10 および IL-10R の測定値は *GAPDH* の発現量に対する相対値で表した。(D、F) IL-10 もしくは IL-10R siRNA を導入した細胞に KW3110 (10 μ g/mL) を添加した 24 時間後、IL-10 の産生量を ELISA 法により測定した (D)。細胞をさらに LPS (10 μ g/mL) で 4 時間、ATP (2 mM) で 1 時間反応させ刺激した後、IL-1 β の産生量を ELISA 法により測定した (F)。siNT、siIL-10、siIL-10R はそれぞれ non-targeting、IL-10、IL-10R siRNA を導入した細胞群を表す。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は n=3 であった。統計的有意差は Dunnett 法 (A) もしくは Tukey 法 (B-F) を事後検定とする ANOVA により解析した。* は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を表す。

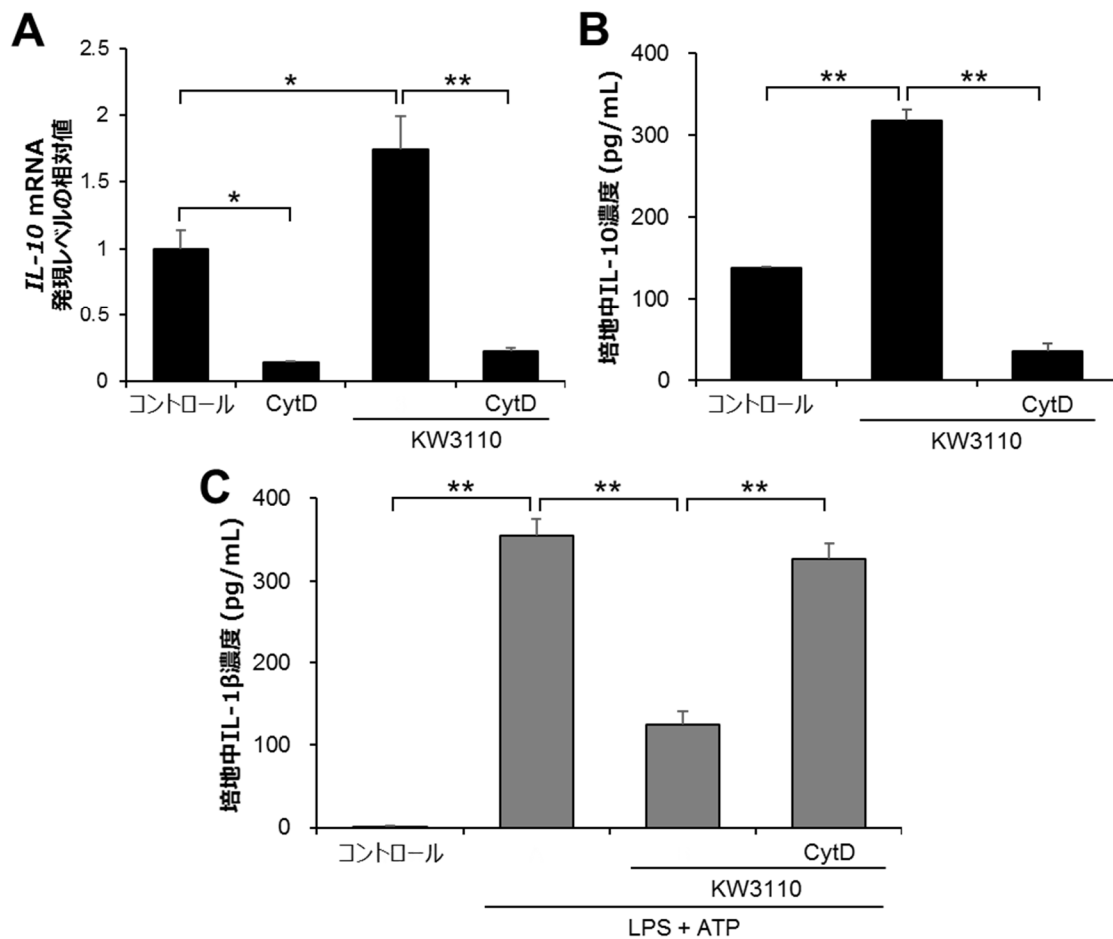


図 2-1-3. J774A.1 細胞への KW3110 添加による IL-10 産生誘導および IL-1 β 産生抑制に対する食食阻害剤の作用

(A) サイトカラシン D (1 μ g/mL) を 30 分間、KW3110 (5 μ g/mL) を 6 時間処理した J774A.1 細胞の RNA を抽出して逆転写を行い、マウス *GAPDH* および *IL-10* を対象としたリアルタイム PCR を行った。*IL-10* の測定値は *GAPDH* の発現量に対する相対値で表した。(B、C) サイトカラシン D (1 μ g/mL) を 30 分間処理した細胞に KW3110 (5 μ g/mL) を添加した 24 時間後、IL-10 の産生量を ELISA 法により測定した (B)。細胞をさらに LPS (10 μ g/mL) で 4 時間、ATP (2 mM) で 1 時間反応させ刺激した後、IL-1 β の産生量を ELISA 法により測定した (C)。CytD はサイトカラシン D 添加細胞群を表す。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=3$ であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。**は $P<0.01$ を表す。

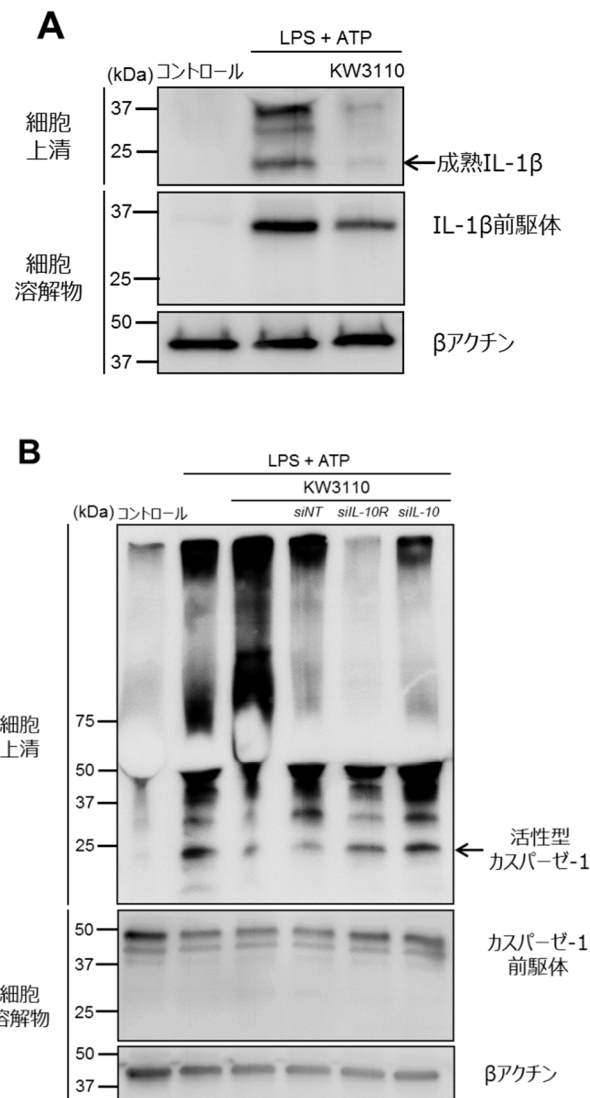


図 2-1-4. KW3110 は IL-10 シグナリングを介して LPS/ATP 刺激した J774A.1 細胞における活性型カスパーゼ-1 の発現を抑制する

(A) J774A.1 細胞に KW3110 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した 24 時間後、LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 4 時間、ATP (2 mM) で 1 時間反応させ刺激し、細胞の上清および溶解物における成熟 IL-1 β 、IL-1 β 前駆体、および β アクチンの発現レベルをウエスタンブロッティングにより解析した。(B) *IL-10* もしくは *IL-10R* siRNA を導入した J774A.1 細胞に KW3110 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した 24 時間後、LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 4 時間、ATP (2 mM) で 1 時間反応させ刺激し、細胞の上清および溶解物における活性型カスパーゼ-1、カスパーゼ-1 前駆体、および β アクチンの発現レベルをウエスタンブロッティングにより解析した。黒矢印は成熟 IL-1 β もしくは活性型カスパーゼ-1 のバンドを指す。全てのプロット画像は黒線に沿って切り取られている。

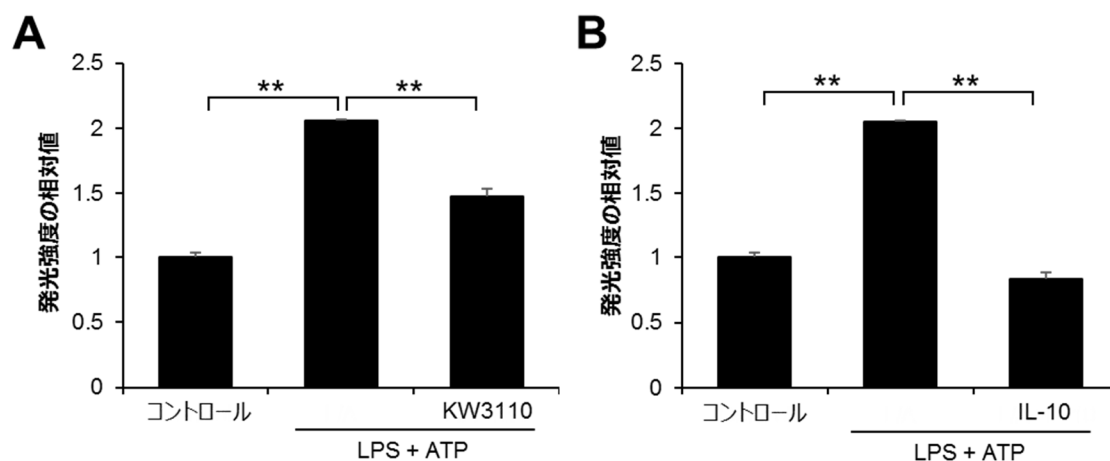


図 2-1-5. KW3110 もしくは IL-10 の添加により、LPS/ATP 刺激した J774A.1 細胞におけるカスパーゼ-1 の活性化が抑制される

(A) J774A.1 細胞に KW3110 (5 $\mu\text{g/mL}$) を添加した 24 時間後に LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) を 4 時間、ATP (2 mM) を 1 時間反応させ刺激した。(B) 細胞に IL-10 (1 $\mu\text{g/mL}$) および LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) を 4 時間、ATP (2 mM) を 1 時間反応させ刺激した。これらの細胞に対して Caspase Glo-1 インフラマソーム測定を行い、上清中のカスパーゼ-1 の活性を測定した。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=3$ であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。**は $P<0.01$ を表す。

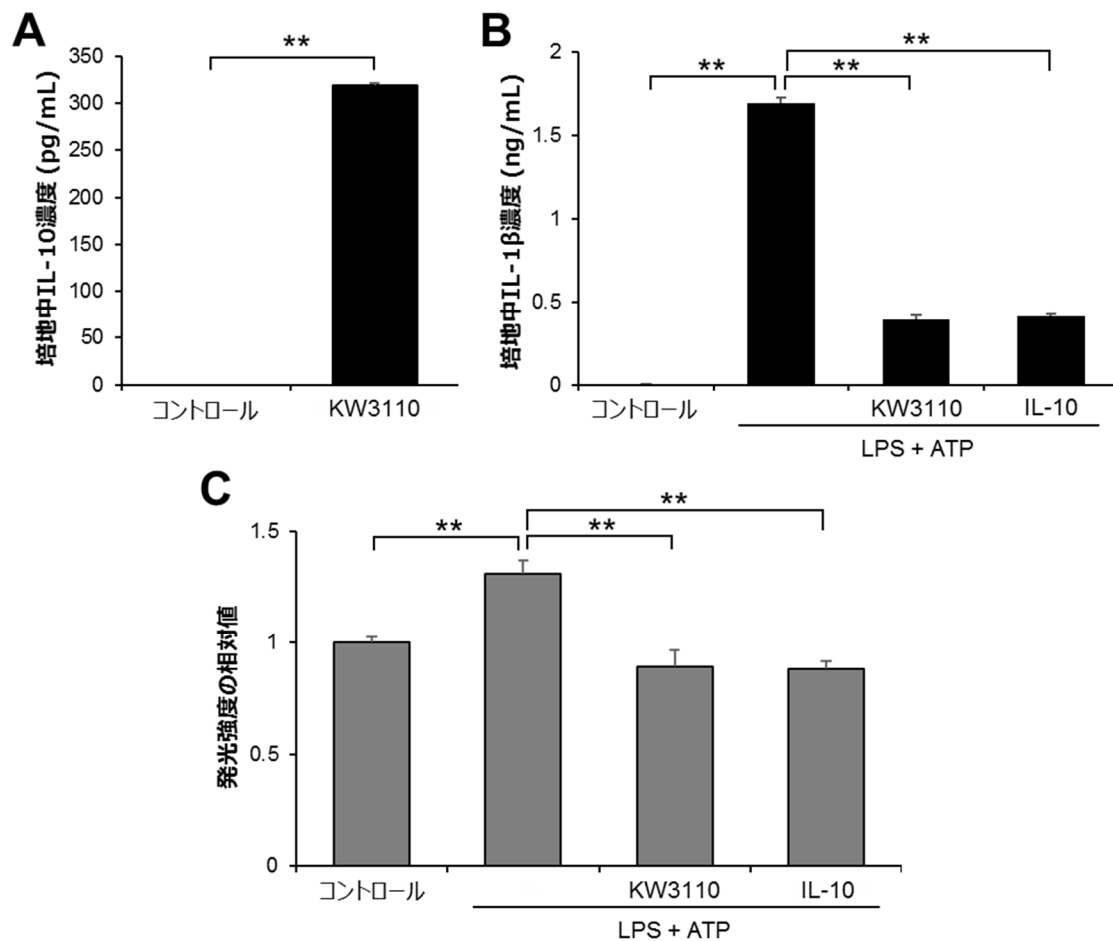


図 2-1-6. KW3110 はヒト単球細胞における IL-10 産生を誘導し、IL-1 β 産生およびカスパーゼ-1 活性を抑制する

(A-C) ヒト単球細胞に KW3110 (100 μ g/mL) を添加した 24 時間後に、IL-10 の産生量を ELISA 法により測定した (A)。細胞をさらに IL-10 (1 μ g/mL) および LPS (10 μ g/mL) で 4 時間、ATP (2 mM) で 1 時間反応させ刺激した後、IL-1 β の産生量を ELISA 法により測定 (B) するとともに、カスパーゼ-1 の活性レベルを Caspase-Glo 1 インフラマソーム測定により解析した (C)。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=3$ であった。統計的有意差は対応のない t 検定 (A) もしくは Tukey 法を事後検定とする ANOVA (B、C) により解析した。**は $P<0.01$ を表す。

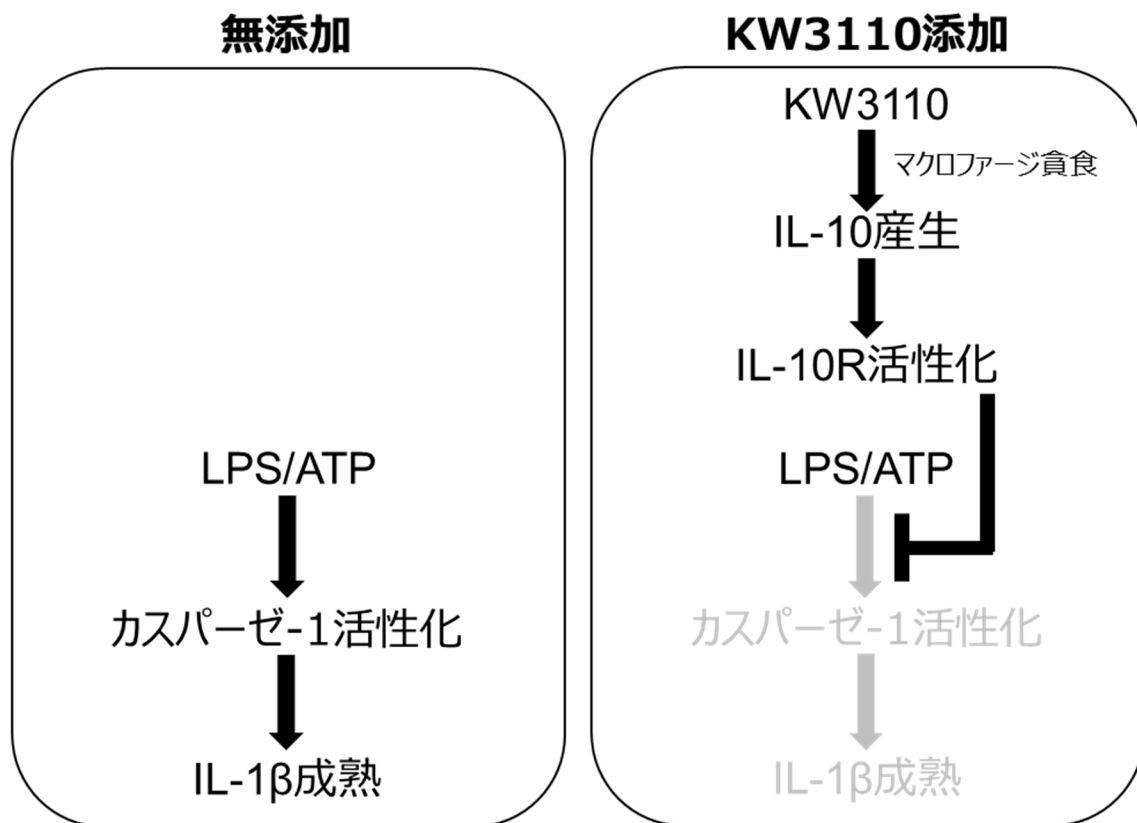


図 2-1-7. KW3110 の炎症抑制作用機序に関するシグナル経路図

無刺激の J774A.1 細胞に対する LPS/ATP 刺激により、カスパーゼ-1 の活性化および IL-1 β の成熟が誘導される。一方、KW3110 の添加により、これらの炎症応答は IL-10 の産生誘導を介して抑制される。

第2節 炎症性刺激による網膜色素上皮細胞老化に対する抑制作用機序

1. 要約

KW3110 は、ブルーライト照射による網膜色素上皮細胞の損傷を抑制し、網膜での炎症を抑制する作用も報告されている。そこで本節では、慢性的な炎症性刺激で網膜色素上皮細胞が受けるストレスを KW3110 が抑制するかについて、マクロファージおよび網膜色素上皮細胞を用いて検証した。

LPS/ATP 刺激をしたマクロファージ培養上清を網膜色素上皮細胞に添加して 24 時間または 48 時間培養した結果、細胞増殖抑制や肥大扁平化、細胞周期停止、およびサイトカイン発現上昇といった細胞老化に関連する表現型や、タイトジャンクション因子 claudin-1 の発現上昇が認められた。一方、LPS/ATP に加えて KW3110 を添加したマクロファージ培養上清を網膜色素上皮細胞に添加した結果、細胞老化関連表現型の発現や claudin-1 の発現上昇のいずれも抑制されることが確認された。

以上より、KW3110 乳酸菌は網膜色素上皮細胞に対して、慢性的な炎症性刺激による細胞老化やタイトジャンクション因子の発現変動を抑制することが示唆された。

2. 背景

生体内外の抗原やその他のストレスに対する防御機構として様々な生物が発達させてきた免疫応答機構の中でも、炎症応答は感染因子や損傷を受けた細胞もしくは組織を除去し、組織修復を開始するなど重要な役割を担っている。近年では、細菌やウイルス感染と同様に、加齢や精神的ストレスなどの日常の様々なストレスによって誘導される慢性炎症応答が、多様な疾患に繋がることが報告されている[22-24,121]。よって、このような日常のストレスに起因する状態を抑制するための予防もしくは治療法が求められている。

これまでの研究において、KW3110 はマウスにおいてブルーライト照射による網膜色素上皮細胞の損傷を抑制すること、およびヒトにおいてディスプレイ端末を用いた VDT 作業による目の疲労感を軽減することが明らかになっている[104,109]。これらのストレスの他にも、慢性的なストレスとして酸化剤を長期処理した場合にも、網膜色素上皮細胞の損傷が誘導されることが報告されている[122]。一方で、目の不調は網膜への直接的かつ慢性的なストレスによって生じるだけでなく、離れた組織から発信されるストレスシグナルによっても誘導される。例えば、加齢黄斑変性には全身の炎症性サイトカインレベルの上昇が関与している可能性が考えられることや、単純で退屈だが持続的な正確性が必要とされる連続加算作業による精神的ストレスが目の不調を誘発する可能性が考えられている[123-126]。しかしながら、全身性かつ慢性的なストレスによって誘導される目の不調に対する KW3110 の作用およびその機序については明らかになっていない。

本節では、マクロファージおよび網膜色素上皮細胞を用いて、免疫細胞の慢性炎症ストレスシグナリングによる網膜色素上皮細胞へのダメージを KW3110 が抑制するか検討した。

3. 実験方法

1) 試薬

KW3110 は第 2 章第 1 節に記載の通り調製した[103]。それ以外の 4 種の乳酸菌株（菌株 A-D）は日本の主要な市販ヨーグルト製品から単離培養することで調製した。LPS（カタログ番号 tlr1-3pelps）は Invivogen 社（San Diego, CA, USA）から、ATP（カタログ番号 A2383）は Sigma Aldrich 社（St. Louis, MO, USA）から、Hoechst 33342（カタログ番号 H342）およびヨウ化プロピジウム（PI）（カタログ番号 P378）は同仁化学研究所（東京、日本）から購入した。抗体については、ウサギ由来 Claudin-1 抗体（カタログ番号 ab211737）、ウサギ由来 zonula occludens-1 (ZO-1) 抗体（カタログ番号 ab216880）、およびヤギ由来ウサギ IgG H&L 抗体（Alexa Fluor 488）（カタログ番号 ab150077）を Abcam 社（Cambridge, UK）から購入した。

2) ヒト単球細胞

健康なドナー由来の末梢血単核細胞は iQ Biosciences 社（Berkeley, CA, USA）（カタログ番号 IQB-PBMC103）から購入した。ウエスタン治験審査委員会により承認されたドナープログラムに参加する全てのドナーから同意書を取得し、匿名化を実施済みである。単球細胞は、クラシカルモノサイト単離キット（Miltenyi Biotec 社、Sunnyvale, CA, USA）を用いて単核細胞から単離した。

3) 培養細胞

J774A.1 細胞は、細網細胞肉腫を有する雌性の成獣マウスの腹水から確立した細胞株（カタログ番号 TIB-67）（ATCC 社、Manassas, VA, USA）であり、ARPE-19 細胞は、19 歳男性の目に由来するヒト網膜色素上皮細胞株（カタログ番号 CRL-2302）（ATCC 社、Manassas, VA, USA）[127]。J774A.1 細胞および ARPE-19 細胞はそれぞれ 10%胎児ウシ血清、100 U/mL ペニシリン、および 100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM および DMEM:F-12（Gibco 社、Grand Island, NY, USA）を用いて 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。細胞上清の置換などの実験（図 2-2-2、3、4、5）においては、J774A.1 細胞を 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well で播種して一晩培養し、KW3110 を添加してさらに 24 時間培養した。回収した上清を、上清置換する 2 日前にあらかじめ 96 ウェルプレート（ 5×10^4 cells/well）、24 ウェルプレート（ 1×10^5 cells/well）、もしくは 35 mm ディッシュ（ 2.5×10^4 cells/well）に播種しておいた ARPE-19 細胞の上清から置換した。その後、ARPE-19 細胞を 0、24、もしくは 48 時間培養し、各種解析を行った。細胞周期

の解析においては、ARPE-19 細胞を J774A.1 細胞の上清とともに 24 ウェルプレートに 5×10^5 cells/well で播種した。

4) サイトカイン産生量の測定

細胞を 24 ウェルプレートに播種 (J774A.1 細胞は 1×10^5 cells/well、ヒト単球細胞は 2.5×10^5 cells/well) して一晩培養し、KW3110 もしくは菌株 A-D を添加 (J774A.1 細胞には $5 \mu\text{g/mL}$ 、ヒト単球細胞には $10 \mu\text{g/mL}$) して 37°C 、24 時間培養した。IL- 1β の測定においては、 $10 \mu\text{g/mL}$ LPS を添加して 4 時間反応させた後に 2 mM ATP を添加して 1 時間反応させた。上清を回収した後 5000 rpm で 2 分間遠心した。サイトカインの産生量は ELISA キット (マウスおよびヒト IL-10、BD Biosciences 社、San Jose、CA、USA; マウス IL- 1β 、eBioscience 社、San Diego、CA、USA) を用いて測定した。

5) 細胞数および細胞死の解析

上清置換後の ARPE-19 細胞を 96 ウェルプレートにおいて 0、24、もしくは 48 時間培養した後、 $1 \mu\text{g/mL}$ の Hoechst 33342 および PI 溶液中で 37°C 、30 分間染色した。Hoechst 33342 陽性細胞数を全細胞数として測定し、Hoechst 33342 陽性細胞に対する PI 陽性細胞の割合を死細胞率として算出した。解析には Operetta CLS system (PerkinElmer 社、Waltham、MA、USA) を用いた。

6) SPiDER- β Gal 染色

上清置換後の ARPE-19 細胞を 24 ウェルプレートにおいて 24 時間培養した後、バックグラウンドシグナルを抑制するために Bafilomycin A1 溶液中で 37°C 、1 時間処理した。その後、Hoechst 33342 を含む SPiDER- β Gal 溶液を添加して 37°C 、30 分間培養した。明視野および蛍光画像は蛍光顕微鏡 (キーエンス社、大阪、日本) を用いて取得し、それぞれの明視野画像における細胞サイズは ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health、Bethesda、MD、USA) を用いて解析した。また、それぞれの蛍光画像における SPiDER- β Gal 陽性細胞数を測定し、Hoechst 33342 陽性細胞に対する割合を算出した。一連の試薬は Cellular Senescence Detection Kit-SPiDER- β Gal (カタログ番号 SG03) (同仁化学研究所、東京、日本) に含まれるものである。

7) リアルタイム PCR

上清置換後の ARPE-19 細胞を 24 ウェルプレートにおいて 24 時間培養した後、RNeasy

mini kit (QIAGEN 社、Venlo、Netherlands) を用いて RNA を抽出し、SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Invivogen 社、Waltham、MA、USA) を用いて逆転写を行った。

リアルタイム PCR は TB Green Premix Ex Taq (タカラバイオ社、滋賀、日本) および LightCycler 480 (Roche Diagnostics 社、Rotkreuz、Switzerland) を用いて行った。PCR 条件は、95°C10 秒間の反応の後、95°C5 秒間および 60°C20 秒間の反応を 45 サイクル行った。各サンプルの値は *GAPDH* の発現レベルに対する相対値で表した。実験に使用した各種プライマーの塩基配列は表 2-2-1 に示した。

8) 細胞周期の測定

上清置換後の ARPE-19 細胞を 24 ウェルプレートにおいて 24 時間培養した後、1% Cell Cycle Assay Solution Deep Red (カタログ番号 C548) (同仁化学研究所、東京、日本) を用いて 37°C、15 分間処理し、DNA を染色した。FACS Canto II および FlowJo ソフトウェア (BD 社、Franklin Lakes、NJ、USA) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

9) 免疫細胞染色

上清置換後の ARPE-19 細胞を 35 mm ディッシュにおいて 24 時間培養した後、100% メタノール (カタログ番号 131-01826) (富士フイルム和光純薬社、大阪、日本) を用いて室温、5 分間処理して固定した。その後、10%ヤギ血清 (カタログ番号 594-29911)、0.3 M グリシン (カタログ番号 077-00735)、1%ウシ血清アルブミン (カタログ番号 011-15144) (富士フイルム和光純薬社、大阪、日本)、および 0.1% tween (カタログ番号 1706531) (Bio-Rad Laboratories 社、Hercules、CA、USA) を含む PBS を用いて室温、1 時間培養した。そして、細胞に 1 µg/mL のウサギ由来 Claudin-1 もしくは ZO-1 抗体を添加して 4°C、一晚反応させた後、1 µg/mL のヤギ由来ウサギ IgG H&L 抗体および 1 µg/mL の Hoechst 33342 を添加して室温、1 時間反応させた。細胞の蛍光画像は蛍光顕微鏡 (キーエンス社、大阪、日本) を用いて取得した。

10) 統計解析

各データの値は平均値±標準誤差で表した。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA によって解析した。 $P<0.05$ を統計学的に有意であると判断した。

4. 結果

1) KW3110 は市販製品由来の乳酸菌株と比較して強い炎症抑制作用を有する

KW3110 はマクロファージにおける IL-10 産生を誘導することが知られているが [104,109]、他の乳酸菌株と比較した誘導能力については明らかになっていない。そこで本節では、J774A.1 細胞における IL-10 産生の誘導能力について、KW3110 と他の乳酸菌株を比較検討した。その結果、J774A.1 細胞への KW3110 の添加により有意な IL-10 産生量の上昇が認められた ($P<0.01$) 一方、他の全ての乳酸菌株の添加後の IL-10 産生量は KW3110 添加細胞群と比較して有意な低値を示した (菌株 A、 $P<0.01$; 菌株 B、 $P<0.05$; 菌株 C、 $P<0.01$; 菌株 D、 $P<0.01$) (図 2-2-1A)。また、ヒト単球細胞を用いた場合においても、J774A.1 細胞を用いた場合の結果と同様に、KW3110 の添加により有意な IL-10 産生量の上昇が認められた ($P<0.01$) 一方、他の全ての乳酸菌株の添加後の IL-10 産生量は KW3110 添加細胞群と比較して有意な低値を示した (菌株 A、 $P<0.01$; 菌株 B、 $P<0.05$; 菌株 C、 $P<0.01$; 菌株 D、 $P<0.01$) (図 2-2-1B)。

IL-10 はマクロファージにおける IL-1 β 産生を抑制するため [111,113]、本節では J774A.1 細胞における IL-1 β 産生の抑制能力についても、KW3110 と他の乳酸菌株を比較検討した。その結果、J774A.1 細胞への LPS/ATP 刺激により IL-1 β 産生量の上昇が認められ、KW3110 の添加により IL-1 β 産生量の上昇は有意に抑制された ($P<0.01$) (図 2-2-1C)。一方で、他の全ての乳酸菌株の添加後の IL-1 β 産生量は KW3110 添加細胞群と比較して有意な高値を示した (菌株 A、 $P<0.01$; 菌株 B、 $P<0.05$; 菌株 C、 $P<0.01$; 菌株 D、 $P<0.01$) (図 2-2-1C)。

2) KW3110 もしくは LPS/ATP 刺激をしたマクロファージにより、ARPE-19 細胞死ではなく細胞増殖が影響を受ける

LPS/ATP 刺激をしたマクロファージが網膜色素上皮細胞へのストレスを誘導するか、およびその作用が KW3110 添加により抑制されるか検討するため、KW3110 を添加した J774A.1 細胞の上清が ARPE-19 細胞の増殖および細胞死に与える影響を評価した。その結果、LPS/ATP 刺激をした J774A.1 細胞上清置換群 (L/A sup 群) における細胞数の相対値が、無刺激細胞の上清置換群 (コントロール sup 群) の値と比較して、上清置換の 24 および 48 時間後に有意な低値を示した (24 時間、 $P<0.01$; 48 時間、 $P<0.01$) (図 2-2-2A)。また、KW3110 および LPS/ATP 刺激をした J774A.1 細胞上清置換群 (L/A+KW3110 sup 群) における細胞数の相対値は、L/A sup 群の値と比較して、上清置換の 24 時間後に高い傾向を示し、48 時間後に有意な高値を示した (24 時間、 $P=0.058$; 48 時間、 $P<0.01$)

(図 2-2-2A)。一方、全細胞数に対する PI 陽性細胞数の割合はいずれの群間、いずれの時間においても差が認められなかった (図 2-2-2B)。

3) 炎症性刺激を受けた ARPE-19 細胞の細胞老化表現型に対する KW3110 の作用

図 2-2-2 で示したような細胞増殖能の低下は、細胞老化の代表的な表現型の 1 つである[128]。本節では、網膜色素上皮細胞の細胞老化が LPS/ATP 刺激をしたマクロファージによって誘導されるか、およびその表現型が KW3110 によって抑制されるかについて検討した。その結果、明視野画像における ARPE-19 細胞について、コントロール sup 群と比較して L/A sup 群において、細胞老化に特徴的な表現型である肥大、扁平化状態が認められた (図 2-2-3A)。一方、L/A + KW3110 sup 群の細胞形態はコントロール sup 群と同様であった (図 2-2-3A)。また、定量的にも、L/A sup 群の細胞サイズはコントロール sup 群と比較して有意に大きく ($P<0.01$) (図 2-2-3B)、L/A + KW3110 sup 群において細胞サイズの上昇は有意に抑制された ($P<0.01$) (図 2-2-3B)。さらに、老化細胞マーカーである SPiDER- β Gal を用いて染色した結果、コントロール sup 群と比較して L/A sup 群において、SPiDER- β Gal シグナルの増強および SPiDER- β Gal 陽性細胞割合の有意な上昇が認められた ($P<0.01$) (図 2-2-3C、D)。一方、L/A sup 群におけるこれらの状態は L/A + KW3110 sup 群において有意に改善された ($P<0.01$) (図 2-2-3D)。

4) 炎症性刺激を受けた ARPE-19 細胞における、細胞周期停止および老化関連分泌表現型 (SASP) に関連する遺伝子発現上昇に対する KW3110 の作用

老化細胞の細胞周期は G2/M 期で停止することが知られているため[129]、本節では LPS/ATP 刺激をしたマクロファージに由来する炎症性シグナルが網膜色素上皮細胞の細胞周期停止を誘導するか、およびその作用が KW3110 によって抑制されるか検討した。その結果、全細胞数に対する G2/M 期細胞数の割合はコントロール sup 群と比較して L/A sup 群において高い傾向がある ($P=0.077$) (図 2-2-4A、B) 一方、L/A sup 群における割合の上昇は L/A + KW3110 sup 群において部分的に抑制された ($P=0.169$) (図 2-2-4A、B)。また、細胞周期停止に関連する遺伝子 *p53* および *p21* の発現レベルはコントロール sup 群と比較して L/A sup 群において上昇した (*p53*, $P=0.148$; *p21*, $P<0.01$) (図 2-2-4C) 一方、L/A sup 群におけるこれらの遺伝子発現上昇は L/A + KW3110 sup 群において抑制された (*p53*, $P=0.119$; *p21*, $P<0.01$) (図 2-2-4C)。本節ではさらに、LPS/ATP 刺激をしたマクロファージに由来する炎症性シグナルが、網膜色素上皮細胞における炎症性サイトカイン産生などの SASP を誘導するか、およびその作用が KW3110 によって

抑制されるか検討した。その結果、代表的な SASP 関連遺伝子 *IL-6*、*IL-8*、および *IL-1β* の発現レベルはコントロール sup 群と比較して L/A sup 群において有意に上昇した (*IL-6*、 $P<0.01$; *IL-8*、 $P<0.01$; *IL-1β*、 $P<0.01$) (図 2-2-4D) 一方、L/A sup 群におけるこれらの遺伝子発現上昇は L/A+KW3110 sup 群において抑制された (*IL-6*、 $P<0.01$; *IL-8*、 $P<0.05$; *IL-1β*、 $P<0.01$) (図 2-2-4D)。

5) 炎症性刺激を受けた ARPE-19 細胞のタイトジャンクション因子の発現に対する KW3110 の作用

網膜色素上皮細胞は血液網膜関門の形成に重要な役割を担っており、細胞間のタイトジャンクションによってその構造が支持されている[130]。本節では、LPS/ATP 刺激をしたマクロファージに由来する炎症性シグナルがタイトジャンクション因子の発現に与える影響について検討した。その結果、タイトジャンクションを形成する膜内在性タンパク質をコードする遺伝子である *claudin-1* および *ZO-1* の発現レベルが、コントロール sup 群と比較して L/A sup 群において、それぞれ有意に上昇、低下した (*claudin-1*、 $P<0.01$; *ZO-1*、 $P<0.01$) (図 2-2-5A、C)。L/A sup 群における *claudin-1* 遺伝子発現レベルの上昇は L/A+KW3110 sup 群において部分的ではあるものの有意に抑制された ($P<0.05$) (図 2-2-5A) 一方、*ZO-1* 遺伝子発現レベルについては変化が認められなかった ($P<0.479$) (図 2-2-5C)。これらの遺伝子発現レベルに対する KW3110 の作用は軽度であるものの、免疫細胞染色の結果、*claudin-1* および *ZO-1* タンパク質の発現を表すシグナルが、コントロール sup 群と比較して L/A sup 群においてそれぞれ上昇、低下したとともに、L/A+KW3110 sup 群においてそれらの変化が抑制された (図 2-2-5B、D)。

5. 考察

本節の結果から、乳酸菌の1種である KW3110 が、本節において使用した他の乳酸菌株よりも強くマクロファージにおける IL-10 産生を誘導し、IL-1 β 産生を抑制することが明らかになった。また、KW3110 は、マクロファージに由来する慢性的な炎症ストレスシグナルによって誘導される網膜色素上皮細胞老化、およびタイトジャンクション因子の発現変動を抑制することも示された。

KW3110 はマクロファージの貪食作用を介して IL-10 などのサイトカイン産生を誘導し、IL-10R シグナリングを通じて IL-1 β の産生を抑制することが報告されている[30,104,109,131]。これらの知見は、KW3110 が本節において使用した他の乳酸菌株と比較して、マウスおよびヒト免疫細胞における IL-10 産生をより強く誘導したという本節の結果を支持するものである(図 2-2-1A)。さらに、KW3110 は他の乳酸菌株と比較して、LPS/ATP 刺激をしたマクロファージにおける IL-1 β の産生をより強く抑制した(図 2-2-1B)。乳酸菌などの微生物はマクロファージなどの免疫細胞により認識、貪食され、炎症性もしくは抗炎症性サイトカインの産生を促進することが知られている[28,110]。これらの知見から、KW3110 は他の乳酸菌株と比較してマクロファージに貪食されやすいため、IL-10 の産生をより強く誘導する可能性が考えられる。マクロファージにおける IL-10 の産生誘導に KW3110 の貪食が関与しているか、および KW3110 のどのような微生物的特徴がマクロファージの貪食に重要であるかについて、今後の研究が期待される。IL-10 はマクロファージにおける IL-1 β の産生を抑制する作用を有するため[111,113]、本節において得られた結果から、KW3110 による IL-1 β 産生の強い抑制作用は IL-10 シグナリングを介している可能性が考えられる。

網膜色素上皮細胞は様々な慢性的ストレスによって損傷を受ける。例えば、ブルーライト照射による網膜色素上皮細胞の損傷は網膜機能低下の原因の1つであり、目の疲労感を誘導する可能性が報告されている[132,133]。また、これまでの研究において、KW3110 を添加したマクロファージによって産生される IL-10 が、ブルーライト照射による網膜色素上皮細胞の損傷を抑制することも示されている[104,109]。さらに、本節において、KW3110 が慢性的な炎症ストレスを受けた網膜色素上皮細胞の細胞老化表現型を抑制することも明らかになった(図 2-2-2、3、4)。ストレス刺激による網膜色素上皮細胞老化は酸化剤への暴露によっても誘導され、老化した網膜色素上皮細胞の集積は加齢したサル目の目においても認められている[134-136]。本節において、KW3110 が慢性的な炎症ストレスを受けた網膜色素上皮細胞における claudin-1 の発現変動を部分的に抑制することが示された(図 2-2-5)。免疫細胞染色のデータは定性的ではあるものの、

KW3110 が claudin-1 および ZO-1 の発現変動を抑制する作用を有する可能性があると考えられる。網膜色素上皮細胞層およびタイトジャンクションによって形成される血液網膜関門の維持には網膜色素上皮細胞が必須である[130]。また、上皮のタイトジャンクションを形成する重要な制御因子である claudin-1 および ZO-1 の発現レベルは網膜色素上皮細胞への酸化剤や炎症性サイトカインの刺激によってそれぞれ上昇、低下する[137-139]。Claudin-1 や ZO-1 などのタイトジャンクション因子はタイトジャンクション網を形成するために相互作用するため、これらの因子の発現変動は網膜色素上皮細胞におけるタイトジャンクションの崩壊に繋がる可能性がある[140]。

以上のことから、本節において、KW3110 がマクロファージおよび IL-10 シグナリングの活性化を介して、慢性的な炎症ストレスを受けた網膜色素上皮細胞の細胞老化、およびタイトジャンクション因子の発現変動を抑制する作用機序が初めて明らかになった。

表 2-2-1. リアルタイム PCR に用いた各種プライマーの塩基配列

遺伝子名	フォワードプライマー (5'-3')	リバースプライマー (5'-3')
<i>GAPDH</i>	AGGCTAGCTGGCCCGATTTC	TGGCAACAATATCCACTTTACCAGA
<i>p53</i>	CATCCTCACCATCATCACAC	CTCCATCCAGTGGTTTCTTC
<i>p21</i>	CGATGGAACCTTCGACTTTGT	AGGCACAAGGGTACAAGA
<i>IL-6</i>	CTCCAGAACAGATTTGAGAGTAG	GCGCAGAATGAGATGAGTT
<i>IL-8</i>	CTCTTGGCAGCCTTCCT	AGACAGAGCTCTCTTCCATC
<i>IL-1β</i>	CTGTCCTGCGTGTTGAAAGATG	TTCTGCTTGAGAGGTGCTGATG
<i>ZO-1</i>	GAAGCTGATGGTGTGGATAG	GTCTGGTTTGGACACTAAGG
<i>claudin-1</i>	GATGAGGTGCAGAAGATGAG	GGACAGGAACAGCAAAGTAG

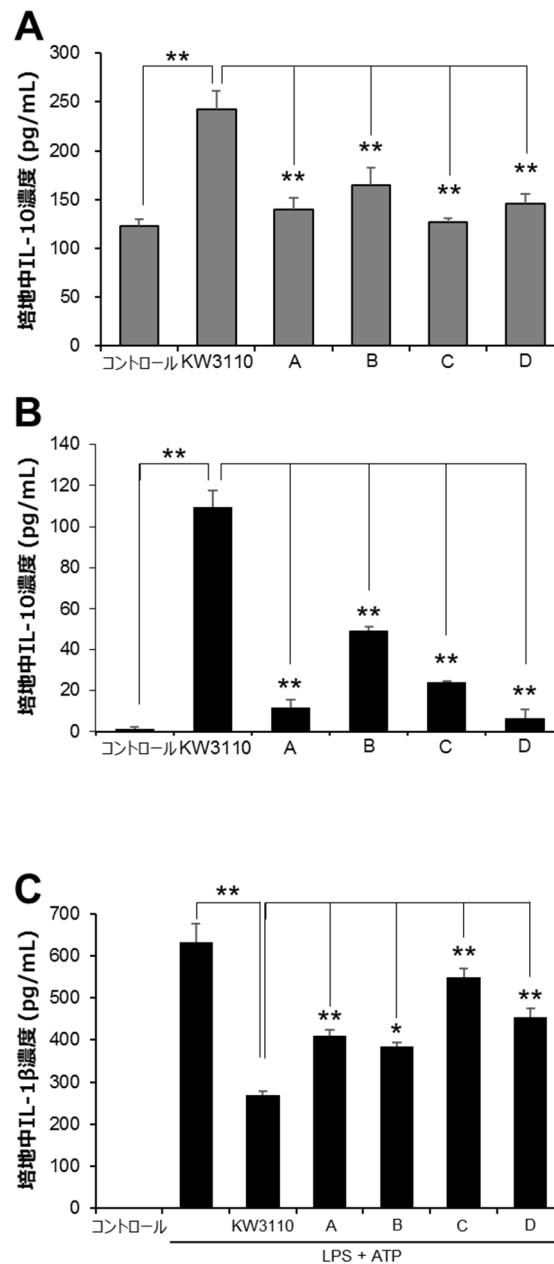


図 2-2-1. J774A.1 細胞およびヒト単球細胞におけるサイトカイン産生に対する各種乳酸菌株の作用の比較検討

(A、B) J774A.1 細胞 (A) もしくはヒト単球細胞 (B) に、KW3110 もしくは菌株 A-D (5 μ g/mL) を添加した 24 時間後に、IL-10 の産生量を ELISA 法により測定した。(C) J774A.1 細胞をさらに LPS (10 μ g/mL) で 4 時間、ATP (2 mM) で 1 時間反応させて刺激し、IL-1 β の産生量を ELISA 法により測定した。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は n=3 であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を表す。

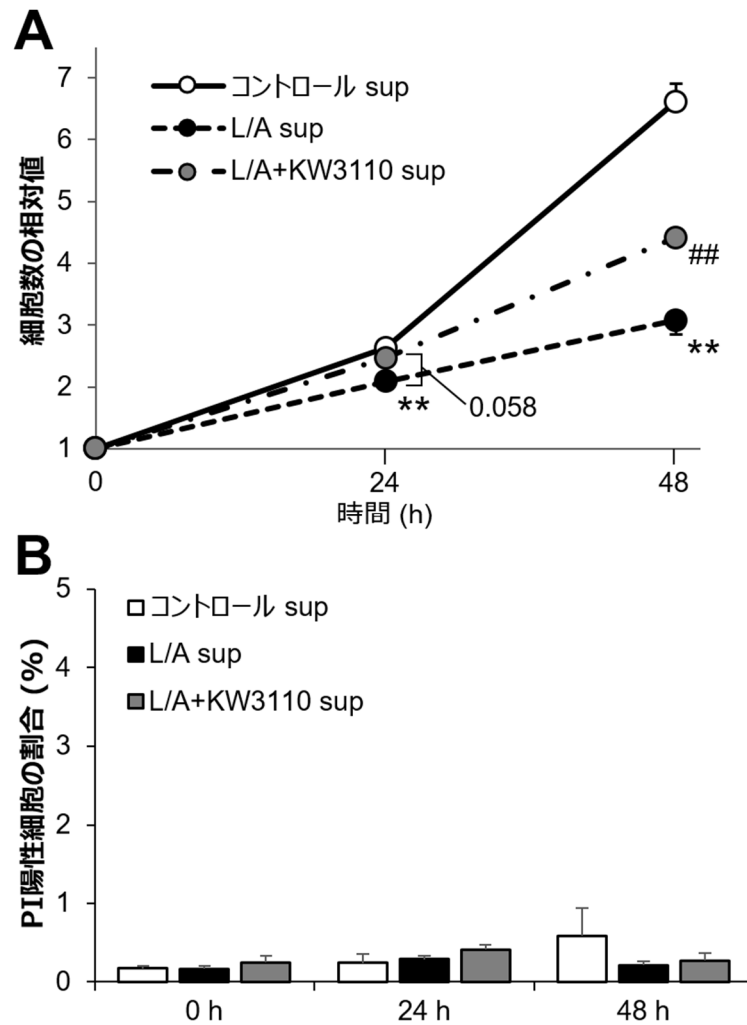


図 2-2-2. KW3110 もしくは LPS/ATP 刺激をした J774A.1 細胞の上清が ARPE-19 細胞の増殖および細胞死に与える影響

上清置換 0、24、48 時間後の ARPE-19 細胞を Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g/mL}$) および PI (1 $\mu\text{g/mL}$) 溶液で染色した。(A) 上清置換 0 時間後に対する 0、24、48 時間後の Hoechst 33342 陽性細胞数の相対値を算出した。(B) 上清置換 0、24、48 時間後の Hoechst 33342 陽性細胞数に対する PI 陽性細胞数の割合を算出した。各データの値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。サンプル数は $n=6-12$ であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。**は $P<0.01$ (コントロール sup 群との比較)、##は $P<0.01$ (L/A sup 群との比較) を表す。

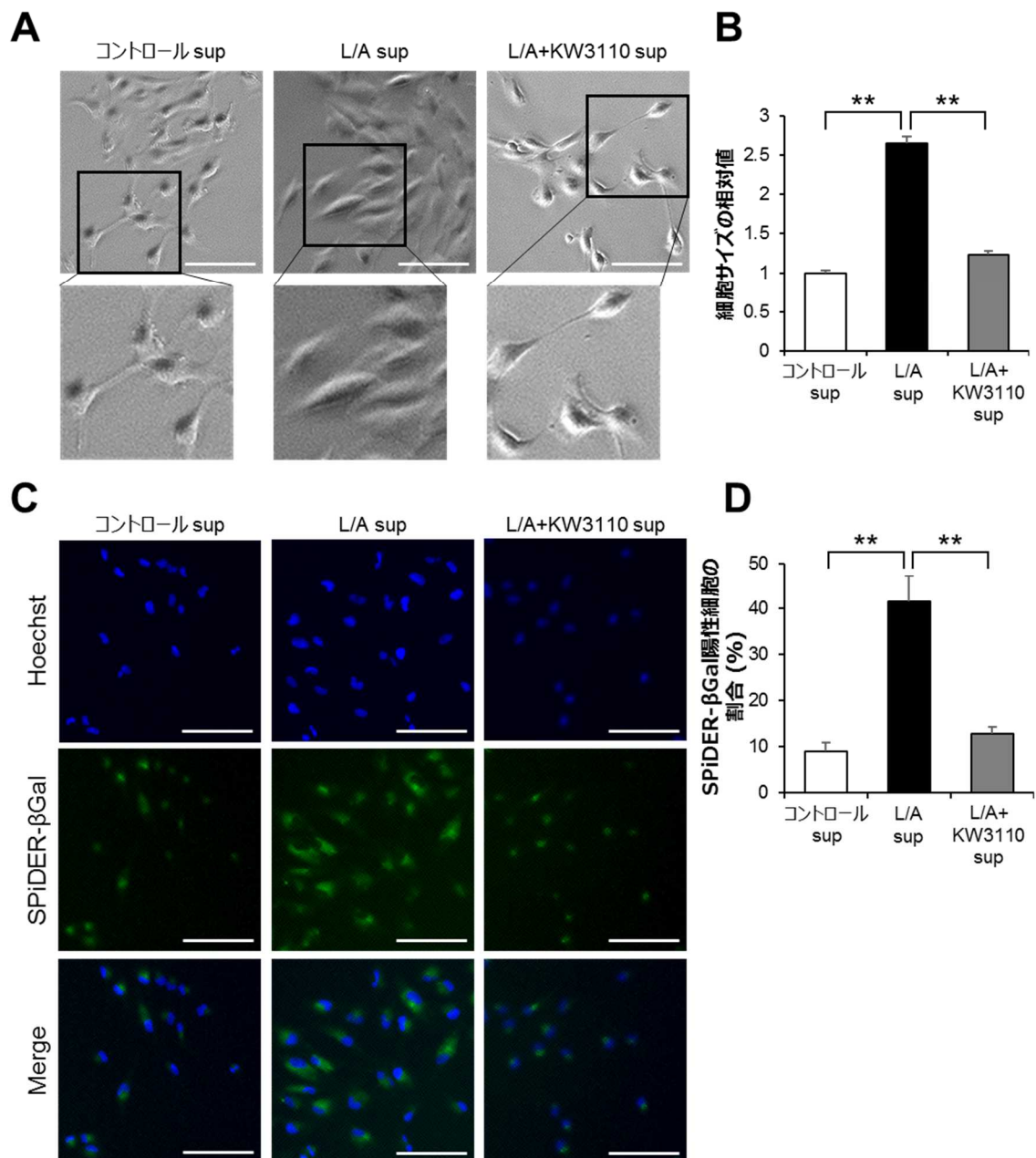


図 2-2-3. KW3110 もしくは LPS/ATP 刺激をした J774A.1 細胞の上清が ARPE-19 細胞の細胞老化に与える影響

上清置換 24 時間後の ARPE-19 細胞を Hoechst 33342 を含む SPiDER-βGal で染色し、明視野画像の解析 (A)、細胞サイズの比較 (B)、Hoechst 33342 および SPiDER-βGal シグナルの蛍光画像の解析 (C)、および Hoechst 33342 陽性細胞数に対する SPiDER-βGal 陽性細胞数の割合の比較 (D) を行った。スケールバーの全長は 100 μm を表す。各データの値は平均値±標準誤差で表した。サンプル数は n=3 であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。**は $P<0.01$ を表す。

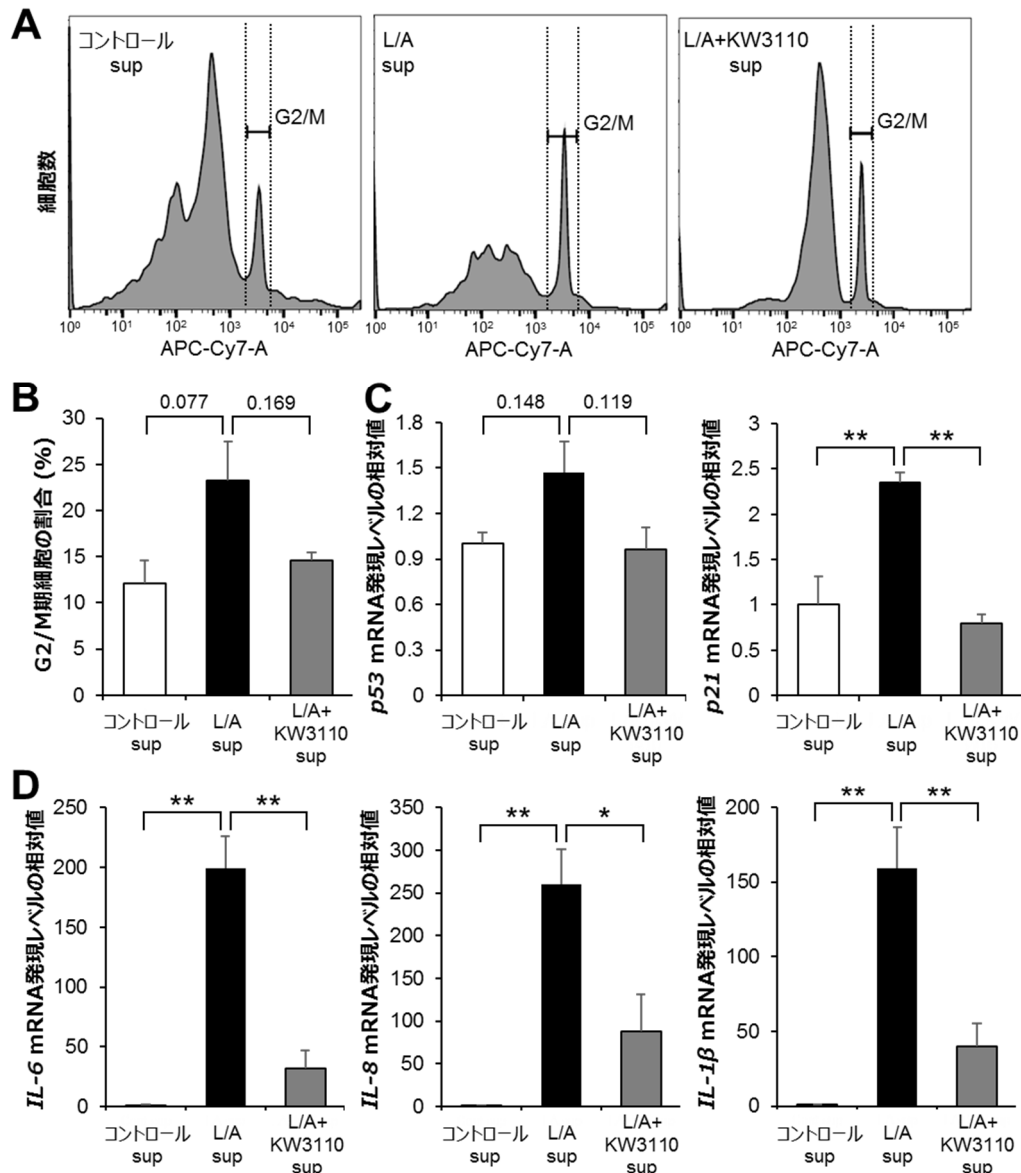


図 2-2-4. 炎症性刺激を受けた ARPE-19 細胞における、細胞周期停止および老化関連分泌表現型 (SASP) に関連する遺伝子発現上昇に対する KW3110 の作用

(A、B) 上清置換 24 時間後の ARPE-19 細胞を Cell Cycle Assay Solution Deep Red で染色し、各群 1 例ずつのフローサイトメトリーのチャート図 (A) および全細胞数に対する G2/M 期細胞数の割合 (B) を示した。(C、D) 上清置換 24 時間後の ARPE-19 細胞から RNA を抽出して逆転写を行い、ヒト *GAPDH*、*p53*、*p21*、*IL-6*、*IL-8*、および *IL-1β* を対象としたリアルタイム PCR を行った。各遺伝子発現レベルの測定値は *GAPDH* の発現量に対する相対値で表した。各データの値は平均値±標準誤差で表した。サンプル数は $n=3$ であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を表す。

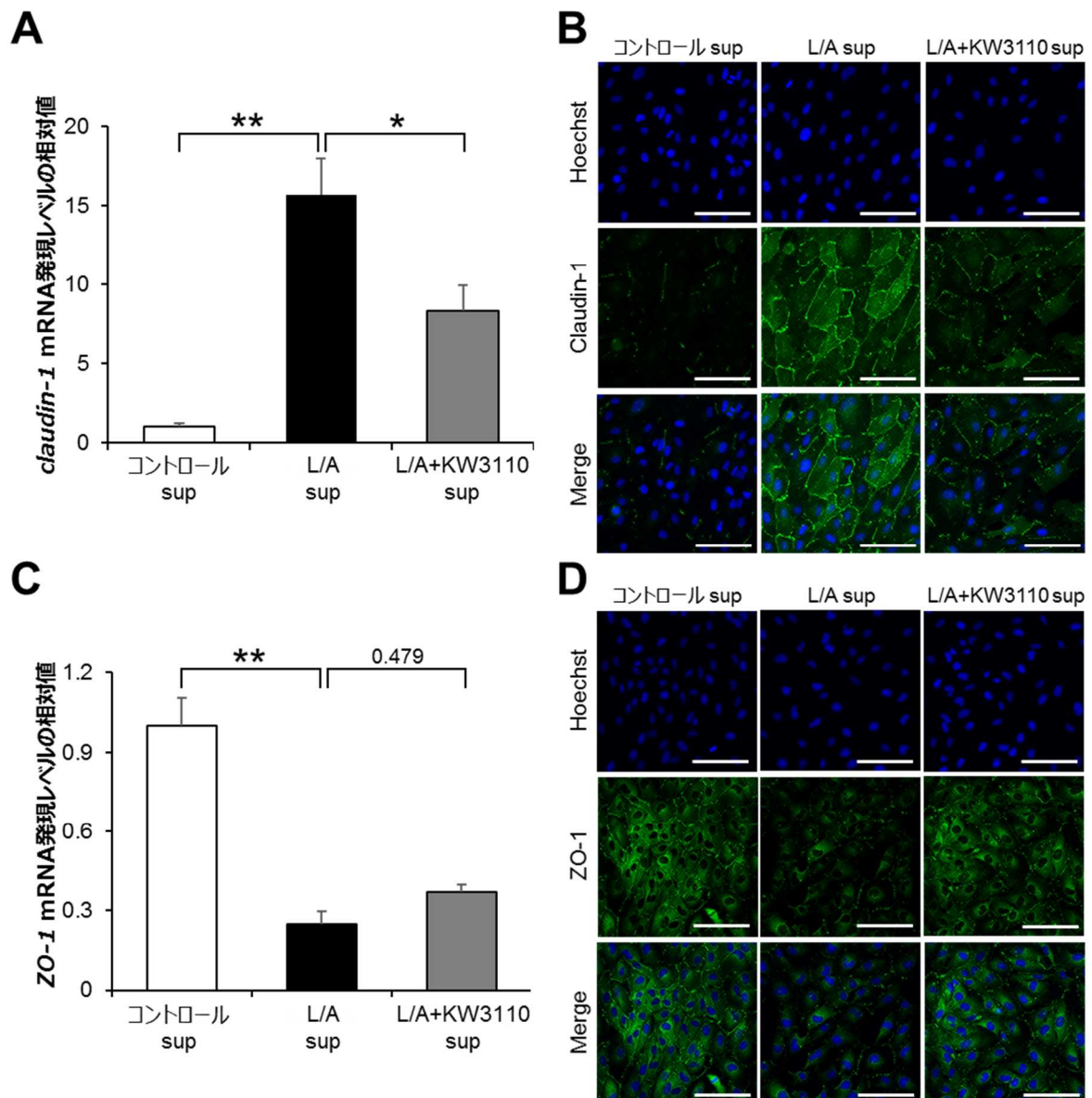


図 2-2-5. KW3110 もしくは LPS/ATP 刺激をした J774A.1 細胞の上清が ARPE-19 細胞のタイトジャンクション因子の発現に与える影響

(A、C) 上清置換 24 時間後の ARPE-19 細胞から RNA を抽出して逆転写を行い、ヒト *GAPDH*、*claudin-1*、および *ZO-1* を対象としたリアルタイム PCR を行った。各遺伝子発現レベルの測定値は *GAPDH* の発現量に対する相対値で表した。各データの値は平均値 ± 標準誤差で表した。サンプル数は $n=3$ であった。統計的有意差は Tukey 法を事後検定とする ANOVA により解析した。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を表す。(B、D) 上清置換 24 時間後の ARPE-19 細胞を *claudin-1* 抗体、*ZO-1* 抗体、および Hoechst 33342 で染色し、Hoechst 33342、*claudin-1*、および *ZO-1* シグナルの蛍光画像を取得した。スケールバーの全長は 100 μm を表す。

第3節 KW3110 乳酸菌摂取による健常人における日常的な目の疲労感軽減効果

1. 要約

KW3110 乳酸菌は慢性的な炎症性刺激による網膜色素上皮細胞へのストレス抑制作用を持つことが示されてきた。網膜色素上皮細胞へのストレスは目の疲労感を引き起こすと考えられているため、本研究では KW3110 乳酸菌のヒトでの有効性評価を目的として、日常的に目の疲れを感じている健常な男女（35 歳以上 50 歳未満）を対象としたランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法による臨床試験を実施した。

88 名の被験者をランダムに 2 群に分け、KW3110 乳酸菌を含むサプリメントもしくはプラセボサプリメントを 8 週間にわたって毎日摂取させた。その結果、目の疲労感の指標である critical flicker frequency (CFF) の摂取開始後 0 週を起点とした変化量について、摂取開始後 4 週および 8 週時点で KW3110 乳酸菌摂取群においてプラセボ群と比較して有意な高値が認められた。

以上より、KW3110 乳酸菌は日常的に目の疲れを感じているヒトの目の疲労感軽減効果があることが示され、網膜への慢性的なストレスに起因する目の不調や疾患予防への貢献が強く期待される。

2. 背景

近年、コンピューターやスマートフォン、タブレットなどの電子機器の使用や、脳の興奮水準を高めた状態で行われる精神、神経活動が長く続いたことで生じる精神的疲労によって、目の疲労感に関連する様々な不調を悩みとして抱える現代人が増加している[141-144]。厚生労働省「平成 20 年技術革新と労働に関する実態調査」においても、7 割の身体的疲労を感じる労働者のうち「眼の疲れ、痛み」の回答が約 90%にのぼる[145]。目の疲労感に関連する症状としては、目の痛み、目の霞み、ドライアイ、肩や腰の凝り、腰痛、頭痛などが挙げられ[146-150]、これらの症状が続くと視力低下などに繋がる可能性がある[151-153]。このような社会的背景からも、健康的な生活のためには眼の健康維持に関して日常的で簡便に対処できる方法が必要不可欠であるといえる。

これまでの研究において、KW3110 はマウスにおいてブルーライト照射による網膜色素上皮細胞の損傷を抑制すること、およびヒトにおいて VDT 作業による目の疲労感を軽減することが明らかになっている[104,109]。一方で、目の不調は網膜より離れた組織から発信されるストレスシグナルによっても誘導される。例えば、単純で退屈だが持続的な正確性が必要とされる連続加算作業による精神的ストレスが目の不調を誘発する可能性も考えられている[123,124]。しかしながら、慢性的なストレスによって誘導される目の不調に対する KW3110 の作用については明らかになっていない。

本節では、慢性的な目の不調に対する KW3110 の効果を検証することを目的として、88 名の健常な成人男女に対し KW3110 を含む食品を 8 週間継続摂取させる、無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法による試験を実施した。また、精神的ストレスによって誘導される目の不調に対する KW3110 の効果も併せて検証した。

3. 実験方法

1) 倫理

本試験はヘルシンキ宣言の精神に則り、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守し、医療法人社団盛心会 タカラクリニック倫理委員会（東京、日本）（承認番号：1807-1806-KR01-01-TC、承認日：2018 年 7 月 30 日）によって承認された。組み入れ前に試験に関する適切な情報を提供した全被験者から書面による同意を取得した。本試験は日本国内の臨床試験登録機関である大学病院医療情報ネットワークに登録し（登録番号：UMIN000033619、登録日：2018 年 8 月 3 日）、プロトコールに則って実施した。

2) 被験者

被験者は目の疲れを自覚する、35 歳以上 50 歳未満の健常な男女であった。選抜基準は（1）35 歳以上 50 歳未満の健常な日本人男女であること、（2）目の疲れを自覚している者であること、および（3）試験責任医師が本試験への参加に問題ないと判断した者であることと定めた。除外基準は表 2-3-1 に示した。

3) サンプルサイズ

本試験の介入がいずれかの主要評価項目に及ぼす影響による効果量 d を 0.65 と仮定し、サンプルサイズの設計を行った。有意水準を 5%、検出力を 80% とすると 1 群あたりのサンプルサイズは約 40 名であったため、目標のサンプルサイズは 80 名とした。試験参加中の脱落率は 10% 程度であると見込み、各群 4 名多く参加することとし、実施サンプルサイズを 88 名とした。

4) 試験食品

試験食品として 2 種類のハードカプセルを準備した。プラセボ食品は 200 mg の遺伝子組み換え品でないコーンスターチを含有し、KW3110 含有食品は 50 mg の加熱死菌体 KW3110 および 150 mg の遺伝子組み換え品でないコーンスターチを含有するものであった。2 種類の試験食品には外観、香味上識別可能な違いがないことが試験実施責任者により確認された。

5) 試験デザイン

本試験は受託臨床試験機関である株式会社オルトメディコ（東京、日本）により、2018 年 7 月から 2019 年 4 月までの期間で、アリオ西新井クリニック眼科（東京、日本）に

において、無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法により実施された。被験者は摂取開始に先立ち、選抜基準、除外基準、および試験責任医師による問診をもとに試験に組み入れられた。そして、被験者は割付責任者により、Statlight #11 Ver. 2.10 (Yukms 社、神奈川、日本) を用いて層別ランダム化法により、プラセボ群および KW3110 群の被験者数が 1 : 1 となるよう無作為に割り付けられた。その際、(1) スクリーニング検査時の内田クレペリンテスト負荷前後における critical flicker frequency (CFF) の変化量、(2) スクリーニング検査時の内田クレペリンテスト負荷前における視覚的評価スケール (VAS) の「目の疲労感」項目の値、および (3) 性別、年齢に偏りが生じないよう考慮した。なお、割付責任者は他の試験実施機関とは独立しており、被験者の組み入れ、データの収集もしくは解析には関与していなかった。

試験食品製造者は試験食品を封入した各容器に識別番号を印字し、割付表はデータ開示まで割付責任者によって密封状態で保管された。試験期間を通じて、被験者、全ての試験実施者、および試験関係者を盲検化した。被験者には毎日朝食後にプラセボ食品もしくは KW3110 含有食品を水とともに 1 粒、8 週間摂取し続けること、試験期間中はこれまで通りの生活習慣を継続すること、およびスクリーニング検査、摂取開始 0、4、および 8 週時点で検査のために来院することを指示した。なお、規程の遵守状況については問診および被験者日誌により都度確認した。

目の不調に関連する項目の評価は、内田クレペリンテストによる負荷前、負荷前後、および負荷後 30 分間の休息後において実施した。内田クレペリンテスト負荷は精神的ストレスによって誘導される目の不調を評価するために、既報に従い実施した[154]。

6) 主要評価項目

日常活動もしくは精神的ストレスによって誘導される目の不調に対する KW3110 の作用を評価する指標として、CFF、調節微動高周波成分の出現頻度 (HFC-1)、縮瞳率、および VAS (目の不調) を測定した。CFF (優位眼) は目の疲労感の指標として、ハンディフリッカー HF-II (ナイツ社、東京、日本) を用いて評価した[155,156]。HFC-1 および縮瞳率 (優位眼) は目のピント調節機能の指標として、それぞれオートレフケラトメーター (ニデック社、愛知、日本) およびトライイリス C9000 (浜松ホトニクス社、静岡、日本) を用いて評価した[124,157,158]。VAS (目の不調) は被験者が自身の目の状態をどのように感じているか評価するために用いた[159]。VAS における評価項目は表 2-3-4 に示した。以上の項目の測定は、スクリーニング検査、摂取開始 0、4、および 8 週時点における内田クレペリンテスト負荷前、負荷後、および負荷後 30 分間の休息後にお

いて実施した。

7) 副次評価項目

その他の状態に対する KW3110 の作用を評価する指標として、VAS（疲労感）、気分状態プロフィール 2 版 (POMS2)、および内田クレペリンテストの項目を測定した。VAS（疲労感）は被験者が自身の疲労状態をどのように感じているか評価するために用いた[160]。POMS2 は被験者の気分状態を評価するために用いた。POMS2 における評価項目は表 2-3-3 に示した。内田クレペリンテストは被験者の注意力および精神的作業能力の特性を評価するために実施した[154]。VAS および POMS2 における項目の測定は、スクリーニング検査、摂取開始 0、4、および 8 週時点における内田クレペリンテスト負荷前、負荷後、および負荷後 30 分間の休息後において実施した。内田クレペリンテストの項目の評価は、スクリーニング検査、摂取開始 0、4、および 8 週時点において実施した。

8) 安全性項目

理学検査、尿検査、末梢血液検査、眼科検査、および問診を実施した。全ての項目は内田クレペリンテスト負荷前に測定した。理学検査、尿検査、および末梢血液検査は摂取期間の前後に実施した。非特異的 IgE は摂取期間の前に測定した。眼科検査および問診はスクリーニング検査、摂取開始 0、4、および 8 週時点において実施した。

9) 統計解析

データは IBM SPSS Statistical software, version 23 (IBM 社、Armonk, NY, USA) を用いて、受託臨床試験機関の統計解析者が実施した。相互作用、摂取の主効果、および 2 群間の各種測定値は、least squares difference (LSD) 法を事後検定とする、摂取開始 0 週における測定値を共変量とした二元反復測定共分散分析 (ANCOVA) により解析した。また、摂取開始 0 週を起点とした変化量について、相互作用、摂取の主効果、および 2 群間の各種測定値は、LSD 法を事後検定とする二元反復測定 ANOVA により解析した。摂取開始 0 週、および摂取開始 4 週もしくは 8 週における群内比較は、LSD 法を事後検定とし、被験者と期間を固定因子とする ANOVA、もしくは LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により実施した。被験者背景における 2 群間の比較は、性別および優位眼の違いについてはカイ二乗検定を、その他の項目については対応のない t 検定を実施した (表 2-3-2)。 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。

4. 結果

1) 被験者背景

本試験における被験者の組み入れからデータ解析までのフローチャートを図 2-3-1 に示した。スクリーニング検査に参加した 160 名の被験者のうち、選抜基準および除外基準に従って 72 名が除外され、88 名（男性 30 名、女性 58 名）が試験責任医師により適格と判断されてプラセボ群もしくは KW3110 群に無作為に 44 名ずつ分けられた。群分け後、2 名の被験者が個人的な事情により介入を拒絶した。また、試験を終了した 86 名（各群 43 名）のうち 6 名が試験順守事項に従わなかったため、除外基準に従って、割付けの開示前に試験責任医師により主要評価項目および副次評価項目の評価から除外された。

その後、80 名（各群 40 名）の被験者を対象に、主要評価項目および副次評価項目のデータを解析した。スクリーニング検査で測定した被験者背景を表 2-3-2 に示した。いずれの項目についても群間差は認められなかった。

2) 主要評価項目

日常的な目の疲労感の指標として、内田クレペリンテストによる負荷前の CFF の結果を表 2-3-3 に示した。CFF は KW3110 群において摂取開始 4 週で摂取開始 0 週と比較して有意に増加した ($P<0.01$) 一方、プラセボ群においては摂取開始 8 週で摂取開始 0 週と比較して有意に減少した ($P<0.05$)。摂取開始 0 週を起点とした CFF の変化量については、プラセボ群と比較して KW3110 群において摂取開始 4 週および 8 週で有意な高値であった（いずれも $P<0.05$ ）（図 2-3-2）。また、摂取開始 0 週を起点とした、VAS 評価における「目が赤くなる」および「ピントが合わない」項目の変化量については、プラセボ群と比較して KW3110 群においてそれぞれ摂取開始 8 週および 4 週で有意な高値であった（いずれも $P<0.05$ ）（表 2-3-4）。その他の主要評価項目については、いずれの時点においても有意な群間差は認められなかった（表 2-3-4、5、6）。

次に、精神的ストレスによって誘導される目の不調を検討するため、CFF、HFC-1、縮瞳率に対する内田クレペリンテストの負荷の影響を評価した（表 2-3-7）。その結果、摂取開始 0 週における負荷前後の CFF の変化量に有意な群間差が認められた。また、摂取開始 0 週における負荷後の縮瞳率、および負荷前後の縮瞳率の変化量にも群間で有意な差が認められた。さらに、摂取開始 0 週の縮瞳率については負荷前と比較して負荷後において有意な上昇が認められた。これらの結果から、内田クレペリンテストは少なくとも本試験において精神的ストレスによる目の疲労感を誘導しなかった可能性が考

えられる。その結果、全ての評価項目について、慢性的な目の不調の指標として負荷前の値のみ評価すると試験責任医師により判断された。

3) 副次評価項目

VAS（疲労感）、POMS2、および内田クレペリンテストの結果を表 2-3-8、9、10 に示した。POMS2 評価において、抑うつ、落込みを表す DD 項目について、プラセボ群と比較して KW3110 群で摂取開始 4 週において有意な低値が認められた。その他の副次評価項目については、いずれの時点においても有意な群間差は認められなかった（表 2-3-8、9、10）。

4) 安全性項目

安全性項目は試験食品を一度でも摂取した被験者 86 名に対して評価し、その結果を表 2-3-11、12、13、14、15 に示した。理学検査において、摂取期間前の脈拍数はプラセボ群と比較して KW3110 群において有意な低値であった（表 2-3-11）。末梢血液検査において、摂取期間前の尿酸値プラセボ群と比較して KW3110 群において有意な高値であった一方、KW3110 群における好塩基球数および総蛋白は摂取期間前と比較して摂取期間後において有意に上昇した（表 2-3-13）。眼科検査において、摂取開始 4 週における眼圧（両眼平均、非優位眼、および右眼）はプラセボ群と比較して KW3110 群において有意な低値であり、プラセボ群における眼圧（左眼）はスクリーニング検査時と比較して摂取開始 8 週において有意に上昇した（表 2-3-14）。その他の安全性項目については有意な群間差は認められなかった（表 2-3-11、12、13、14、15）。また、試験期間を通して試験食品に関する有害事象は報告されなかった。

5. 考察

本節において実施した、目の疲れを自覚する健常人を対象とした無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験において、乳酸菌の 1 種である KW3110 の摂取が目の疲労感に関する客観指標および抑うつに関する主観指標の値を改善することが明らかになった。

近年、長期間のディスプレイ作業や精神的ストレスによって誘導される慢性的な目の不調により、多くの人々が悩まされている。これまでの臨床試験により、KW3110 の摂取が VDT 作業によって誘導される目の疲労感を抑制することが報告されている[109]。本節においては精神的ストレスによって誘導される目の不調を評価するため、内田クレペリンテストを用いた。いくつかの研究においては、VDT 作業を伴う内田クレペリンテストなどの連続計算作業によって誘導される精神的ストレスが CFF および瞳孔反応を低下させる可能性があることが報告されている[123,124,154]。一方で、内田クレペリンテストが精神的ストレスを評価するために適切な系でない可能性があるとの報告もある[161]。HFC-1 および縮瞳率はいずれも目の状態の指標として確立されたものであるが[162,163]、内田クレペリンテストを実施した場合に、これらの項目がどのように影響を受けるかについて検討した研究は見つかっていない。本節において得られた結果からも、内田クレペリンテストが精神的ストレスによる目の不調を誘導できなかった可能性が示唆された（表 2-3-7）。以上より、本節においては負荷前に測定された値のみが、慢性的な目の不調の評価項目として適切であると試験責任医師により判断された。

摂取開始 0 週を起点とした CFF の変化量は、プラセボ群と比較して KW3110 群において、摂取期間を通して有意な高値であった（図 2-3-2、表 2-3-3）。CFF は大脳皮質の興奮度を視覚系を通して捉えたものであり、精神的ストレスによる目の疲労感の指標として用いられている[155,156]。また、CFF の減少は視覚情報の処理能力の低下を表す[164]。本節において、負荷前の CFF に群間差が認められたことから、KW3110 の摂取により慢性的な目の疲労感が改善する可能性が考えられる。反対に、HFC-1 および縮瞳率についてはいずれの時点においても有意な群間差は認められなかった。HFC-1 は毛様体筋への負荷により上昇し、縮瞳率は調節機能の向上に伴い上昇するため[165-168]、KW3110 の摂取は毛様体筋や調節機能にほとんど影響を与えない可能性が考えられる。摂取開始 0 週を起点とした VAS における「目が赤くなる」および「ピントが合わない」の項目の変化量は、それぞれ摂取開始 4 週および 8 週で、プラセボ群と比較して KW3110 群において有意な高値であった（表 2-3-4）。VAS の各項目は主観的評価項目であり、低い値であるほど良い状態であることを表す[159]。調節機能は毛様体筋によって主に制御されて

いるが[169]、本節においては HFC-1 について有意な群間差は認められなかった。また、既報において KW3110 の摂取は「目が赤くなる」を改善した[109]。この症状は、寝不足からくる目の充血やハウスダストによるアレルギー反応によって悪化することが知られている[170]。POMS2 テストにおいては、DD の項目についてプラセボ群と比較して KW3110 群において、摂取開始 4 週で有意な低値が、摂取期間を通して低い傾向が認められた(表 2-3-9)。DD の項目が低値であることは良い気分状態であることを表すため、本節の結果は、KW3110 の摂取によって抑うつが抑制される可能性を示唆している。本節において DD の項目は副次評価項目であるため、抑うつに対する KW3110 の作用を結論づけるためには、抑うつに主に焦点を当てた研究が今後必要である。

安全性項目については、いくつかの項目において有意な群内差および群間差が認められた。しかしながら、これらの平均値は全て基準値内であったため[171]、これらの差は試験食品の摂取とは関連性がないと試験責任医師により判断された。以上より、本試験において KW3110 を 8 週間継続して摂取することは安全であることが明らかになった。

本節において、KW3110 の摂取が健常人の目の疲労感を表す客観的評価項目を改善すること、および KW3110 の 8 週間にわたる継続摂取が安全であることが明らかになった。本節において得られた結果は、乳酸菌が慢性的な目の不調を改善することを示した初めての知見であり、KW3110 は目の疲労感などの目の不調を改善するための有用かつ安全な方法として用いられることが強く期待される。

表 2-3-1. 除外基準

1	悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞の治療中もしくは既往歴がある者
2	以下を含む慢性疾患で治療中もしくは既往歴がある者
3	不整脈、肝障害、腎障害、脳血管障害、リウマチ、糖尿病、脂質異常症、高血圧症、その他の慢性疾患
4	老眼と診断された者、または老眼を自覚している者
5	眼疾患、眼瞼内反症、睫毛乱生症、色覚異常のある者
6	眼精疲労と診断された者
7	眼疾患のために点眼薬を使用している者
8	屈折異常があり、適切な矯正を行っていない者
9	レーシック手術を受けた者
10	強度乱視がある者
11	弱視、斜視のある者
12	対象眼について、完全矯正視力が 1.0 未満の者
13	目の疲れの原因が、神経性や調節機能以外にあると診断された者
14	機能性食品を開発・製造する企業に勤めている者
15	適正飲酒 [1 日の平均飲酒量が純アルコールで約 20 g 程度の飲酒 (ビール中瓶で 1 本 500 mL、日本酒で 1 合 180 mL、焼酎で半合 90 mL、ウィスキーダブルで 1 杯 60 mL、ワイングラスで約 1.5 杯 180 mL、缶チューハイで約 1.5 缶 500 mL)] を超えた飲酒を常に行っている者
16	各検査の 2 日前から禁酒をすることができない者
17	眼に対する効果 (ピント調節機能改善、眼精疲労改善、コントラスト感度改善など) が期待される医薬品、食品、サプリメント、健康食品 (別紙 1 参照) を使用している、または、試験期間中に使用する予定のある者
18	免疫力に影響を及ぼす可能性がある医薬品、食品、サプリメント・健康食品 (特定保健用食品を含む) を止めることが出来ない者
19	本試験食品の関与成分 (KW3110) を強化している、または、乳酸菌・ビフィズス菌・オリゴ糖・生菌類を含む医薬品、食品、サプリメント、健康食品の摂取を試験期間中に止めることが出来ない者
20	乳製品を摂取すると下痢を起こしやすい者
21	試験食品の原材料 (コーンスターチなど) にアレルギー発症の恐れがある者、その他食品、医薬品に重篤なアレルギー症状を起こす恐れのある者
22	薬物依存やアレルギー依存のある者
23	花粉症と診断されている者
24	作業負荷検査を完遂できる見込みの無い者
25	生活習慣アンケートの回答から、被験者として不適切と判断される者
26	妊娠中、授乳中、あるいは試験期間中に妊娠する意思のある者
27	同意書取得日以前の 3 ヶ月間において他の臨床試験に参加していた者、あるいは試験期間中に参加予定のある者

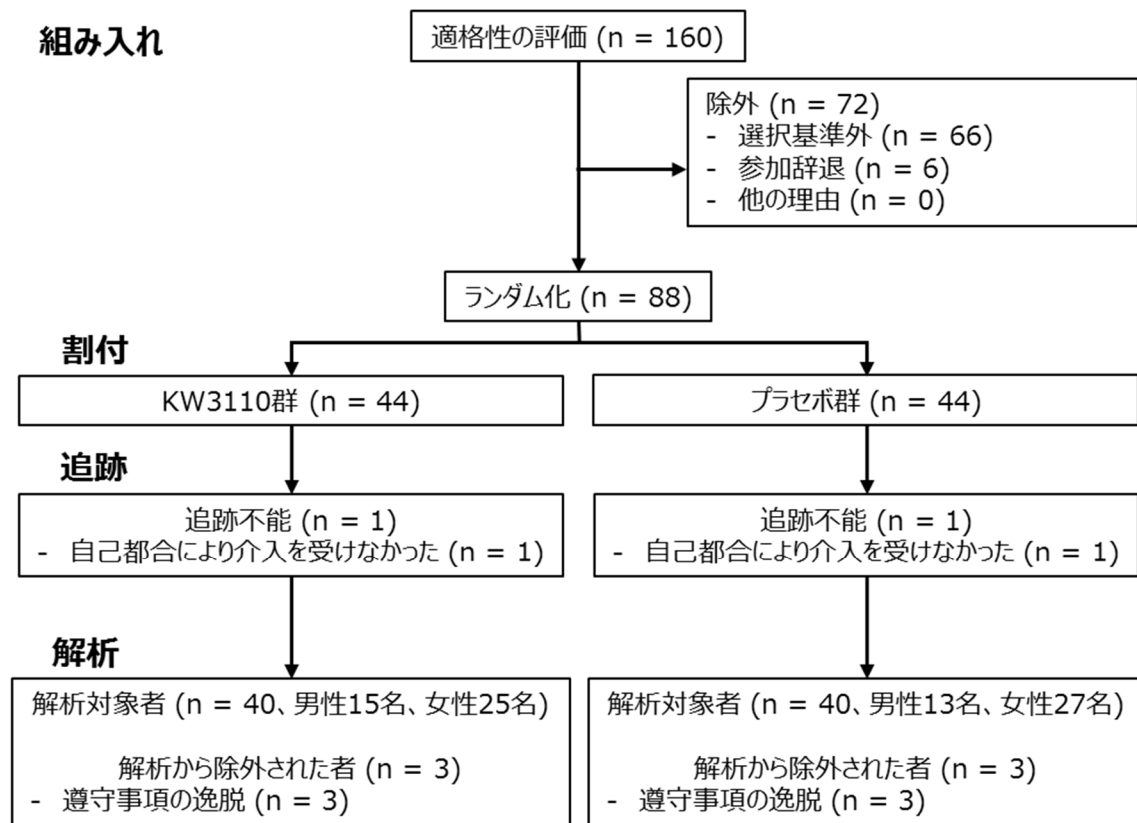


図 2-3-1. 被験者組み入れからデータ解析までのフローチャート

表 2-3-2. 被験者背景

項目	KW3110 群	プラセボ群		P 値
	平均値 ± 標準偏差	平均値 ± 標準偏差	平均値 ± 標準偏差	
被験者数 (男性/女性)	40 (15/25)	40 (13/27)		0.6487
年齢 (歳)	42.5 ± 3.9	42.4 ± 4.4		0.9150
身長 (cm)	165.0 ± 7.6	161.7 ± 8.9		0.0787
体重 (kg)	60.8 ± 10.2	59.5 ± 12.2		0.6059
BMI (kg/m ²)	22.3 ± 2.9	22.7 ± 4.0		0.5604
体脂肪率 (%)	24.8 ± 6.1	25.9 ± 8.5		0.4973
体温 (°C)	36.3 ± 0.3	36.4 ± 0.3		0.5964
非特異的 IgE (IU/mL)	105.1 ± 129.9	116.4 ± 177.9		0.7476
利目	右眼: 27 左眼: 13	右眼: 26 左眼: 14		1.0000

性別および利目以外の各データの値は平均値±標準偏差で表した。被験者数 (男性/女性) および利目の群間比較はカイ二乗検定により解析し、その他の項目の群間比較は対応のない *t* 検定により解析した。

表 2-3-3. CFF に対する KW3110 の作用

CFF (Hz)	0 週		4 週		8 週	
KW3110 群	34.32	± 1.79	35.51	± 1.80 ^{##}	34.41	± 2.10
	変化量 ^{\$}		1.19	± 1.40 ^{*##}	0.09	± 1.45 [*]
プラセボ群	35.33	± 3.14	35.65	± 2.43	34.43	± 2.88 [#]
	変化量		0.32	± 2.24	-0.90	± 2.54 [#]

各データの値は平均値±標準偏差で表した。摂取開始 0 週を起点とした CFF 変化量の群間比較は LSD 法を事後検定とする二元配置反復測定 ANOVA により解析した (摂取の主効果について\$を $P<0.05$ 、各時点での摂取の効果について*を $P<0.05$ として表した)。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により解析した (#を $P<0.05$ 、##を $P<0.01$ として表した)。

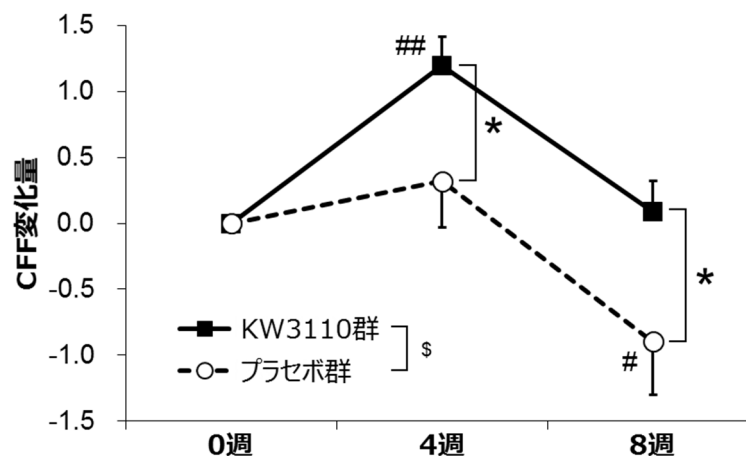


図 2-3-2. 摂取開始 0 週を起点とした CFF の変化量に対する KW3110 の作用

各群のデータは摂取開始 0 週を起点とした変化量として算出し、平均値±標準誤差で表した。2 群間の比較は LSD 法を事後検定とする二元配置反復測定 ANOVA により解析した（摂取の主効果について\$を $P<0.05$ 、各時点での摂取の効果について*を $P<0.05$ として表した）。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により解析した（#を $P<0.05$ 、##を $P<0.01$ として表した）。

表 2-3-4 (1/4). 目の状態に関する VAS 評価

項目			0 週			4 週			8 週		
目が疲 れる	KW3110		48.33	±	23.53	42.20	±	21.04	40.45	±	20.56 [#]
	群	変化量				-6.13	±	22.69	-7.88	±	23.40 [#]
	プラセボ		50.05	±	23.26	44.90	±	22.62	40.00	±	21.46 ^{##}
	群	変化量				-5.15	±	18.11	-10.05	±	19.80 ^{##}
目がか すむ	KW3110		41.55	±	22.28	36.25	±	22.62	37.40	±	21.94
	群	変化量				-5.30	±	22.94	-4.15	±	19.28
	プラセボ		46.98	±	24.49	39.58	±	25.00	36.60	±	21.79 ^{##}
	群	変化量				-7.40	±	24.03	-10.38	±	18.72 ^{##}
目が痛 む	KW3110		29.03	±	24.32	27.03	±	21.86	28.85	±	23.84
	群	変化量				-2.00	±	20.17	-0.18	±	19.21
	プラセボ		34.48	±	25.13	28.73	±	22.05	30.30	±	23.29
	群	変化量				-5.75	±	22.67	-4.18	±	18.97
目が乾 く	KW3110		46.00	±	26.22	39.10	±	22.71 [#]	37.23	±	24.54 ^{##}
	群	変化量				-6.90	±	20.23 [#]	-8.78	±	19.78 ^{##}
	プラセボ		50.53	±	25.02	41.68	±	25.27 ^{##}	42.13	±	22.30 [#]
	群	変化量				-8.85	±	20.63 ^{##}	-8.40	±	20.88 [#]
目が重 い	KW3110		36.80	±	25.45	32.58	±	23.09	34.93	±	24.18
	群	変化量				-4.23	±	24.25	-1.88	±	22.41
	プラセボ		42.65	±	24.28	38.10	±	25.65	38.18	±	24.92
	群	変化量				-4.55	±	21.36	-4.48	±	22.24

表 2-3-4 (2/4). 目の状態に関する VAS 評価

項目			0 週			4 週			8 週		
目がごろごろする	KW3110 群	変化量	29.68	±	23.37	26.65	±	22.56	30.50	±	25.10
	プラセボ 群	変化量	36.65	±	25.78	29.35	±	23.15	30.08	±	22.61
	変化量					-7.30	±	23.27	-6.58	±	27.06
	変化量					-3.03	±	17.35	0.83	±	18.92
目が赤くなる	KW3110 群	変化量	28.45	±	21.88	26.58	±	21.56	29.30	±	21.98
	プラセボ 群	変化量	33.28	±	21.16	23.83	±	20.95 ^{##}	24.10	±	19.54 [#]
	変化量					-9.45	±	20.81 ^{##}	-9.18	±	22.30 [#]
	変化量					-1.88	±	20.34	0.85	±	17.71 [*]
ものがちらついて見える	KW3110 群	変化量	27.35	±	20.52	25.30	±	20.40	28.23	±	22.53
	プラセボ 群	変化量	35.80	±	24.16	27.15	±	22.88 [#]	29.10	±	21.34
	変化量					-8.65	±	21.57 [#]	-6.70	±	21.99
	変化量					-2.05	±	16.54	0.88	±	21.55
ものが二重に見える	KW3110 群	変化量	28.38	±	23.11	24.70	±	20.28	27.13	±	21.99
	プラセボ 群	変化量	34.98	±	23.99	28.20	±	24.37	29.13	±	22.68
	変化量					-6.78	±	21.89	-5.85	±	22.30
	変化量					-3.68	±	17.97	-1.25	±	19.94
ものがぼやけて見える	KW3110 群	変化量	32.90	±	22.59	30.00	±	21.59	32.28	±	22.84
	プラセボ 群	変化量	39.73	±	25.90	29.40	±	25.19 ^{##}	30.18	±	22.43 [#]
	変化量					-10.33	±	21.21 ^{##}	-9.55	±	22.41 [#]
	変化量					-2.90	±	18.44	-0.63	±	18.10

表 2-3-4 (3/4). 目の状態に関する VAS 評価

項目			0 週			4 週			8 週		
ピント が合わ ない	KW3110		28.70	±	21.59	28.88	±	22.39	30.20	±	23.54
	群	変化量				0.18	±	19.69 *	1.50	±	21.07
	プラセボ		38.40	±	26.54	29.28	±	25.14 ^{##}	30.85	±	22.17 [#]
	群	変化量				-9.13	±	21.24 ^{##}	-7.55	±	23.61 [#]
肩・腰 がこる	KW3110		52.85	±	25.65	44.63	±	22.81 ^{##}	43.53	±	28.04 [#]
	群	変化量				-8.23	±	16.09 ^{##}	-9.33	±	23.50 [#]
	プラセボ		50.38	±	22.64	41.83	±	23.62 [#]	44.03	±	22.06
	群	変化量				-8.55	±	23.30 [#]	-6.35	±	24.36
頭が重 い	KW3110		33.93	±	23.43	32.08	±	22.43	31.98	±	25.72
	群	変化量				-1.85	±	14.43	-1.95	±	22.72
	プラセボ		37.85	±	22.46	32.43	±	23.48	34.55	±	21.91
	群	変化量				-5.43	±	21.47	-3.30	±	25.88
頭が痛 い	KW3110		28.30	±	25.28	23.83	±	22.71	25.23	±	23.54
	群	変化量				-4.48	±	18.96	-3.08	±	19.29
	プラセボ		29.08	±	22.92	25.83	±	21.82	24.33	±	20.87
	群	変化量				-3.25	±	18.81	-4.75	±	20.04

表 2-3-4 (4/4). 目の状態に関する VAS 評価

項目			0 週		4 週		8 週		
いらい らする	KW3110		28.53	± 24.70	26.23	± 22.88	25.28	± 23.08	
	群	変化量			-2.30	± 21.71	-3.25	± 18.93	
	プラセボ		32.13	± 24.39	26.93	± 21.45	25.23	± 21.18	
	群	変化量			-5.20	± 18.10	-6.90	± 22.91	

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は、摂取開始 0 週における値を共変量とする二元配置反復測定 ANCOVA により解析した。摂取開始 0 週を起点とした変化量の群間比較については、LSD 法を事後検定とする二元配置反復測定 ANOVA により解析した（摂取の主効果について\$を $P<0.05$ 、各時点での摂取の効果について*を $P<0.05$ として表した）。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により解析した（#を $P<0.05$ 、##を $P<0.01$ として表した）。

表 2-3-5. HFC-1 に対する KW3110 の作用

HFC-1 (Hz)	0 週			4 週			8 週		
KW3110 群	48.34	±	5.41	48.45	±	4.60	47.55	±	5.00
変化量				0.11	±	4.18	-0.78	±	4.04
プラセボ群	48.07	±	5.39	47.44	±	5.63	47.08	±	5.36
変化量				-0.63	±	3.23	-0.99	±	3.16

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は、摂取開始 0 週における値を共変量とする二元配置反復測定 ANCOVA により解析した。摂取開始 0 週を起点とした変化量の群間比較については、二元配置反復測定 ANOVA により解析した。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により解析した。

表 2-3-6. 縮瞳率に対する KW3110 の作用

縮瞳率 (%)	0 週			4 週			8 週		
KW3110 群	35.66	±	10.51	34.06	±	12.52	34.55	±	10.57
変化量				-1.60	±	11.00	-1.12	±	9.91
プラセボ群	34.97	±	11.74	37.17	±	13.29	35.60	±	11.07
変化量				2.20	±	13.00	0.63	±	13.23

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は、摂取開始 0 週における値を共変量とする二元配置反復測定 ANCOVA により解析した。摂取開始 0 週を起点とした変化量の群間比較については、二元配置反復測定 ANOVA により解析した。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により解析した。

表 2-3-7. 摂取開始 0 週における CFF、HFC-1、縮瞳率に対する内田クレペリンテストの負荷の影響

項目		KW3110 群	プラセボ群	P 値
		平均値±標準偏差	平均値±標準偏差	
CFF (Hz)	負荷前	34.32 ± 1.79	35.33 ± 3.14	0.0814
	負荷後	33.71 ± 2.11	34.18 ± 3.58	0.4756
	休息後	33.48 ± 2.31	33.66 ± 3.35	0.7815
	負荷前後差	-0.61 ± 1.23	-1.15 ± 1.19	0.0498
	休息前後差	-0.23 ± 1.27	-0.52 ± 1.44	0.3397
HFC-1 (Hz)	負荷前	48.34 ± 5.41	48.07 ± 5.39	0.8267
	負荷後	48.97 ± 8.05	48.39 ± 4.80	0.6937
	休息後	47.70 ± 5.00	48.20 ± 4.86	0.6520
	負荷前後差	0.63 ± 6.78	0.31 ± 2.96	0.7847
	休息前後差	-1.27 ± 6.91	-0.18 ± 4.20	0.3989
縮瞳率 (%)	負荷前	35.66 ± 10.51	34.97 ± 11.74	0.7812
	負荷後	33.06 ± 11.14	38.90 ± 11.20	0.0219
	休息後	33.13 ± 10.66	35.63 ± 11.85	0.3235
	負荷前後差	-2.61 ± 10.86	3.93 ± 10.27	0.0071
	休息前後差	0.07 ± 8.82	-3.27 ± 10.76	0.1331

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は対応のない *t* 検定により解析した。負荷前は内田クレペリンテストの負荷前の測定値を、負荷後は内田クレペリンテストの負荷後の測定値を、休息後は 30 分間の休息後の測定値を、負荷前後差は内田クレペリンテストの負荷前および負荷後の測定値の差を、休息前後差は内田クレペリンテストの負荷後および休息後の測定値の差を表す。

表 2-3-8. 疲労感に関する VAS 評価

疲労感	0 週		4 週		8 週	
KW3110 群	44.20	± 21.28	39.90	± 18.67	40.23	± 21.58
変化量			-4.30	± 25.63	-3.98	± 25.73
プラセボ群	47.43	± 15.75	46.25	± 18.25	38.18	± 17.77 ^{##}
変化量			-1.18	± 17.37	-9.25	± 16.77 ^{##}

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は、摂取開始 0 週における値を共変量とする二元配置反復測定 ANCOVA により解析した。摂取開始 0 週を起点とした変化量の群間比較については、二元配置反復測定 ANOVA により解析した。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により解析した（##を $P<0.01$ として表した）。

表 2-3-9 (1/2). POMS2 評価

項目		0 週			4 週			8 週		
TMD	KW3110	44.73	±	6.80	42.53	±	6.52 [#]	41.55	±	5.64 ^{##}
	群	変化量			-2.20	±	5.37 [#]	-3.18	±	6.18 ^{##}
	プラセボ	45.63	±	6.78	45.38	±	8.53	43.13	±	6.77 [#]
	群	変化量			-0.25	±	8.59	-2.50	±	5.86 [#]
AH	KW3110	44.13	±	5.64	42.70	±	5.78	40.73	±	4.27 ^{##}
	群	変化量			-1.43	±	6.02	-3.40	±	6.22 ^{##}
	プラセボ	46.08	±	7.89	45.28	±	10.13	43.60	±	8.58
	群	変化量			-0.80	±	10.69	-2.48	±	8.28
CB	KW3110	44.08	±	7.30	41.83	±	6.53 [#]	39.38	±	6.28 ^{##}
	群	変化量			-2.25	±	7.24 [#]	-4.70	±	7.96 ^{##}
	プラセボ	44.53	±	7.28	43.08	±	8.55	40.68	±	8.16 ^{##}
	群	変化量			-1.45	±	6.58	-3.85	±	5.76 ^{##}
DD	KW3110	45.75	±	6.46	43.58	±	4.78 ^{*,##}	42.65	±	4.32 ^{##}
	群	変化量 ^s			-2.18	±	4.76 ^{##}	-3.10	±	5.34 ^{##}
	プラセボ	46.08	±	6.62	46.43	±	8.00	44.43	±	5.10
	群	変化量			0.35	±	8.17	-1.65	±	5.11
FI	KW3110	47.08	±	8.40	44.50	±	9.14 [#]	42.95	±	7.99 ^{##}
	群	変化量			-2.58	±	8.34 [#]	-4.13	±	8.19 ^{##}
	プラセボ	45.98	±	6.83	45.35	±	8.70	43.03	±	7.86 [#]
	群	変化量			-0.63	±	9.45	-2.95	±	8.95 [#]

表 2-3-9 (2/2). POMS2 評価

項目		0 週			4 週			8 週		
TA	KW3110	46.85	±	8.11	42.53	±	7.55 ^{##}	42.38	±	8.37 ^{##}
	群	変化量			-4.33	±	7.49 ^{##}	-4.48	±	8.12 ^{##}
	プラセボ	46.83	±	9.03	45.40	±	10.06	42.58	±	9.45 ^{##}
	群	変化量			-1.43	±	9.54	-4.25	±	7.18 ^{##}
VA	KW3110	53.05	±	10.29	51.43	±	11.97	48.68	±	10.94 ^{##}
	群	変化量			-1.63	±	9.75	-4.38	±	9.51 ^{##}
	プラセボ	50.70	±	8.41	48.10	±	9.95 [#]	47.95	±	10.55 [#]
	群	変化量			-2.60	±	7.47 [#]	-2.75	±	8.60 [#]
F	KW3110	54.83	±	10.75	51.60	±	13.65 [#]	47.98	±	13.91 ^{##}
	群	変化量			-3.23	±	10.90 [#]	-6.85	±	11.41 ^{##}
	プラセボ	50.93	±	9.58	45.80	±	11.87 ^{##}	44.60	±	11.24 ^{##}
	群	変化量			-5.13	±	10.67 ^{##}	-6.33	±	9.95 ^{##}

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は、摂取開始 0 週における値を共変量とし、LSD 法を事後検定とする二元配置反復測定 ANCOVA により解析した（摂取の主効果について\$を $P<0.05$ 、各時点での摂取の効果について*を $P<0.05$ として表した）。摂取開始 0 週を起点とした変化量の群間比較については、二元配置反復測定 ANOVA により解析した。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により解析した（#を $P<0.05$ 、##を $P<0.01$ として表した）。TMD は総合感情障害、TA は緊張-不安、DD は抑うつ-落込み、AH は怒り-敵意、VA は活気-活力、FI は疲労-無気力、CB は混乱-当惑、F は有効を表す。

表 2-3-10 (1/2). 内田クレペリンテスト

項目			0 週			4 週			8 週		
総作業量	KW3110		114.48	±	31.96	120.32	±	33.12 ^{##}	119.94	±	36.95 [#]
	群	変化量				5.84	±	9.12 ^{##}	5.46	±	12.93 [#]
	プラセボ		107.76	±	29.79	111.00	±	28.08	111.02	±	29.21
	群	変化量				3.24	±	13.35	3.26	±	13.38
平均作業量	KW3110		57.24	±	15.98	60.16	±	16.56 ^{##}	59.97	±	18.48 [#]
	群	変化量				2.92	±	4.56 ^{##}	2.73	±	6.47 [#]
	プラセボ		53.88	±	14.90	55.50	±	14.04	55.51	±	14.60
	群	変化量				1.62	±	6.68	1.63	±	6.69
初頭効果率	KW3110		1.12	±	0.09	1.11	±	0.11	1.13	±	0.12
	群	変化量				-0.01	±	0.09	0.01	±	0.09
	プラセボ		1.11	±	0.09	1.11	±	0.08	1.11	±	0.09
	群	変化量				0.00	±	0.11	0.00	±	0.10
動揺率	KW3110		0.33	±	0.14	0.34	±	0.16	0.35	±	0.20
	群	変化量 ^s				0.01	±	0.11	0.02	±	0.16
	プラセボ		0.30	±	0.09	0.34	±	0.16	0.35	±	0.17 [#]
	群	変化量				0.04	±	0.16	0.05	±	0.15 [#]
正答率	KW3110		0.99	±	0.01	0.99	±	0.01	0.99	±	0.01
	群	変化量				0.00	±	0.01	0.00	±	0.01
	プラセボ		0.99	±	0.02	0.99	±	0.01 [#]	0.99	±	0.01
	群	変化量				0.00	±	0.01 [#]	0.00	±	0.02

表 2-3-10 (2/2). 内田クレペリンテスト

項目		0 週			4 週			8 週		
総正 答率	KW3110	0.99	±	0.01	0.99	±	0.01	0.99	±	0.01
	群 変化量				0.00	±	0.01	0.00	±	0.01
	プラセボ	0.99	±	0.02	0.99	±	0.01 [#]	0.99	±	0.01
	群 変化量				0.00	±	0.01 [#]	0.00	±	0.02
休憩 効果 率	KW3110	1.07	±	0.05	1.04	±	0.06 [#]	1.04	±	0.08
	群 変化量				-0.03	±	0.07 [#]	-0.03	±	0.10
	プラセボ	1.08	±	0.06	1.12	±	0.33	1.05	±	0.10
	群 変化量				0.04	±	0.33	-0.03	±	0.10
休憩 伸び 率	KW3110	0.07	±	0.05	0.04	±	0.06 [#]	0.04	±	0.08
	群 変化量				-0.03	±	0.07 [#]	-0.03	±	0.10
	プラセボ	0.08	±	0.06	0.12	±	0.33	0.05	±	0.10
	群 変化量				0.04	±	0.33	-0.03	±	0.10

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は、摂取開始 0 週における値を共変量とし、LSD 法を事後検定とする二元配置反復測定 ANCOVA により解析した。摂取開始 0 週を起点とした変化量の群間比較については、二元配置反復測定 ANOVA により解析した。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により解析した（#を $P<0.05$ 、##を $P<0.01$ として表した）。

表 2-3-11. 理学検査

項目		摂取期間前			摂取期間後		
収縮期 血圧 (mmHg)	KW3110 群		112.73	± 9.90	115.02	± 11.12	
		変化量			2.29	± 9.59	
	プラセボ群		113.52	± 15.62	115.91	± 14.20	
		変化量			2.38	± 8.26	
拡張期 血圧 (mmHg)	KW3110 群		72.19	± 8.36	74.05	± 9.00	
		変化量			1.86	± 7.60	
	プラセボ群		72.73	± 11.99	73.83	± 11.14	
		変化量			1.09	± 6.09	
脈拍数 (bpm)	KW3110 群		70.10	± 9.58 **	71.23	± 9.58	
		変化量			1.13	± 8.60	
	プラセボ群		76.05	± 11.12	77.65	± 13.31	
		変化量			1.60	± 13.30	

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は、摂取期間前における値を共変量とする二元配置反復測定 ANCOVA により解析した。摂取期間前における値、および摂取期間前を起点とした変化量の群間比較については、対応のない *t* 検定により解析した (**を $P<0.01$ として表した)。摂取期間前および摂取期間後に関する群内比較は対応のある *t* 検定により解析した。

表 2-3-12. 尿検査

項目	基準値		摂取期間前		摂取期間後	
			基準値内	基準値外	基準値内	基準値外
蛋白質	-	KW3110 群	42	1	38	5
		プラセボ群	37	6	41	2
ブドウ糖	-	KW3110 群	43	0	43	0
		プラセボ群	43	0	42	1
ウロビリノーゲン	±	KW3110 群	43	0	43	0
		プラセボ群	43	0	41	2
ビリルビン	-	KW3110 群	43	0	43	0
		プラセボ群	43	0	43	0
pH	5.0-7.5	KW3110 群	41	2	42	1
		プラセボ群	41	2	43	0
潜血	-	KW3110 群	39	4	39	4
		プラセボ群	34	9	37	6
ケトン体	-	KW3110 群	43	0	43	0
		プラセボ群	42	1	43	0

各群のデータは、各項目が基準値内もしくは基準値外である被験者数で表した。2 群間の比較はカイ二乗検定により解析した。摂取期間前および摂取期間後に関する群内比較は McNemar 検定により解析した。

表 2-3-13 (1/4). 末梢血液検査

項目	基準値			摂取期間前		摂取期間後		
白血球数 (/μL)	3300-9000	KW3110 群	変化量	5825.58	±	1457.18	5695.35	± 1148.70
		プラセボ群	変化量	5581.40	±	1269.09	-130.23	± 1162.41
赤血球数 (×10 ⁴ /μL)	男性： 430-570 女性： 380-500	KW3110 群	変化量	460.72	±	48.59	464.07	± 45.14
		プラセボ群	変化量	447.14	±	38.73	3.35	± 22.96
ヘモグロ ビン (g/dL)	男性： 13.5-17.5 女性： 11.5-15.0	KW3110 群	変化量	13.69	±	1.80	13.86	± 1.72
		プラセボ群	変化量	13.33	±	1.62	0.17	± 0.62
ヘマトク リット (%)	男性： 39.7-52.4 女性： 34.8-45.0	KW3110 群	変化量	42.57	±	4.33	42.89	± 4.05
		プラセボ群	変化量	41.50	±	3.97	0.32	± 1.81
血小板数 (×10 ⁴ /μL)	14.0-34.0	KW3110 群	変化量	27.95	±	6.55	41.51	± 4.14
		プラセボ群	変化量	30.75	±	6.55	0.01	± 1.80
MCV (fL)	85-102	KW3110 群	変化量	92.56	±	5.56	28.15	± 6.85
		プラセボ群	変化量	92.88	±	4.86	0.20	± 3.10
MCH (pg)	28.0-34.0	KW3110 群	変化量	29.73	±	2.37	30.60	± 6.80
		プラセボ群	変化量	29.79	±	2.35	-0.15	± 2.87
MCHC (%)	30.2-35.1	KW3110 群	変化量	32.08	±	1.24	92.65	± 5.11
		プラセボ群	変化量	32.04	±	1.25	0.09	± 2.17
好中球率 (%)	40.0-75.0	KW3110 群	変化量	61.04	±	8.31	92.63	± 5.06
		プラセボ群	変化量	58.95	±	7.68	-0.26	± 2.41
リンパ球 率 (%)	18.0-49.0	KW3110 群	変化量	30.62	±	7.48	29.87	± 2.36
		プラセボ群	変化量	32.79	±	7.16	0.14	± 0.70
単球率 (%)	2.0-10.0	KW3110 群	変化量	5.26	±	1.42	29.87	± 2.28
		プラセボ群	変化量	4.73	±	1.14	0.09	± 1.14
好酸球率 (%)	0.0-8.0	KW3110 群	変化量	2.43	±	2.35	0.16	± 1.25
		プラセボ群	変化量	2.82	±	2.01	0.20	± 1.13
好塩基球 率 (%)	0.0-2.0	KW3110 群	変化量	0.64	±	0.50	60.74	± 7.27
		プラセボ群	変化量	0.71	±	0.46	-0.30	± 6.26
好中球数 (/μL)	-	KW3110 群	変化量	3633.81	±	1299.09	60.10	± 8.43
		プラセボ群	変化量	3333.25	±	1047.81	1.15	± 6.78
リンパ球 数 (/μL)	-	KW3110 群	変化量	1712.99	±	329.63	30.46	± 6.09
		プラセボ群	変化量	1791.45	±	453.90	-0.16	± 5.91
							-1.40	± 7.99
							5.21	± 1.13
							-0.05	± 1.14
							4.78	± 1.21
							0.05	± 1.17
							2.84	± 2.28
							0.41	± 2.42
							3.07	± 2.46
							0.25	± 1.63
							0.75	± 0.45
							0.10	± 0.37
							0.67	± 0.49
							-0.04	± 0.38
							3502.98	± 986.83
							-130.83	± 978.72
							3566.33	± 1089.72
							233.08	± 1012.05
							1692.58	± 321.12
							-20.41	± 342.70
							1789.20	± 481.25
							-2.25	± 282.40

表 2-3-13 (2/4). 末梢血液検査

項目	基準値			摂取期間前			摂取期間後		
単球数 (μ L)	-	KW3110 群	変化量	303.39	±	104.52	295.78	±	83.12
		プラセボ群	変化量	263.33	±	81.69	-7.60	±	71.63
好酸球数 (μ L)	-	KW3110 群	変化量	139.90	±	135.12	275.02	±	83.43
		プラセボ群	変化量	155.50	±	115.01	11.69	±	87.77
好塩基球 数 (μ L)	-	KW3110 群	変化量	35.50	±	25.40	161.33	±	133.57
		プラセボ群	変化量	37.86	±	22.47	21.43	±	139.96
AST (U/L)	10-40	KW3110 群	変化量	20.09	±	4.82	178.36	±	150.22
		プラセボ群	変化量	19.58	±	5.27	22.86	±	90.77
ALT (U/L)	5-45	KW3110 群	変化量	17.09	±	6.83	42.67	±	25.19 [#]
		プラセボ群	変化量	18.40	±	10.78	7.17	±	20.75 [#]
γ -GTP (U/L)	男性：80 以下 女性：30 以下	KW3110 群	変化量	28.40	±	23.13	37.60	±	26.82
		プラセボ群	変化量	21.67	±	13.32	-0.26	±	18.49
ALP (U/L)	100-325	KW3110 群	変化量	173.37	±	44.40	20.28	±	6.29
		プラセボ群	変化量	180.72	±	63.69	0.19	±	3.92
LDH (U/L)	120-240	KW3110 群	変化量	170.26	±	23.97	18.98	±	6.40
		プラセボ群	変化量	173.28	±	24.49	-0.60	±	5.07
LAP (U/L)	男性： 45-81 女性： 37-61	KW3110 群	変化量	49.16	±	11.32	17.40	±	8.75
		プラセボ群	変化量	49.33	±	6.77	0.30	±	5.61
総ビリル ビン (mg/dL)	0.2-1.2	KW3110 群	変化量	0.86	±	0.31	16.95	±	9.90
		プラセボ群	変化量	0.80	±	0.30	-1.44	±	7.40
直接ビリ ルビン (mg/dL)	0.0-0.2	KW3110 群	変化量	0.07	±	0.05	29.02	±	23.79
		プラセボ群	変化量	0.06	±	0.05	0.63	±	13.08
間接ビリ ルビン (mg/dL)	0.2-1.0	KW3110 群	変化量	0.79	±	0.28	21.05	±	12.57
		プラセボ群	変化量	0.74	±	0.26	-0.63	±	5.80
コリンエ ステラー ゼ (U/L)	男性： 234-493 女性： 200-452	KW3110 群	変化量	314.23	±	69.36	174.84	±	61.10
		プラセボ群	変化量	298.70	±	65.30	1.47	±	28.72
総蛋白 (g/dL)	6.7-8.3	KW3110 群	変化量	6.97	±	0.43	175.77	±	59.42
		プラセボ群	変化量	7.02	±	0.44	-4.95	±	20.40
尿素窒素 (mg/dL)	8.0-20.0	KW3110 群	変化量	12.52	±	3.09	170.12	±	25.08
		プラセボ群	変化量	12.33	±	2.69	-0.14	±	10.28

表 2-3-13 (3/4). 末梢血液検査

項目	基準値			摂取期間前			摂取期間後		
クレアチニン (mg/dL)	男性： 0.61-1.04 女性： 0.47-0.79	KW3110 群	変化量	0.70	±	0.14	0.69	±	0.14
		プラセボ群	変化量	0.65	±	0.12	-0.01	±	0.05
尿酸 (mg/dL)	男性： 3.8-7.0 女性： 2.5-7.0	KW3110 群	変化量	5.04	±	1.34 *	0.65	±	0.13
		プラセボ群	変化量	4.46	±	1.31	0.00	±	0.05
CK (U/L)	男性： 60-270 女性： 40-150	KW3110 群	変化量	5.04	±	1.34 *	4.86	±	1.24
		プラセボ群	変化量	4.46	±	1.31	-0.18	±	0.59
ナトリウム (mEq/L)	137-147	KW3110 群	変化量	103.40	±	56.42	4.40	±	1.33
		プラセボ群	変化量	108.14	±	63.92	-0.06	±	0.52
カリウム (mEq/L)	3.5-5.0	KW3110 群	変化量	139.95	±	1.91	108.95	±	60.69
		プラセボ群	変化量	139.95	±	1.50	5.56	±	49.40
クロール (mEq/L)	98-108	KW3110 群	変化量	4.43	±	0.45	107.14	±	53.81
		プラセボ群	変化量	4.30	±	0.38	-1.00	±	48.77
カルシウム (mg/dL)	8.4-10.4	KW3110 群	変化量	101.47	±	1.68	4.37	±	0.34
		プラセボ群	変化量	101.74	±	1.60	-0.06	±	0.45
無機リン (mg/dL)	2.5-4.5	KW3110 群	変化量	9.09	±	0.36	4.31	±	0.33
		プラセボ群	変化量	9.06	±	0.26	0.00	±	0.37
血清鉄 (μg/dL)	男性： 50-200 女性： 40-180	KW3110 群	変化量	3.27	±	0.57	9.11	±	0.39
		プラセボ群	変化量	3.27	±	0.58	0.02	±	0.34
血清アミ ラーゼ (U/L)	40-122	KW3110 群	変化量	80.44	±	24.11	3.14	±	0.50
		プラセボ群	変化量	78.67	±	22.46	-0.13	±	0.55
総コレス テロール (mg/dL)	120-219	KW3110 群	変化量	201.72	±	31.97	3.28	±	0.44
		プラセボ群	変化量	210.93	±	35.55	0.01	±	0.49
HDL-コ レステロ ール (mg/dL)	男性： 40-85 女性： 40-95	KW3110 群	変化量	67.05	±	17.64	98.05	±	41.99
		プラセボ群	変化量	69.56	±	18.65	-2.19	±	51.95
LDL-コ レステロ ール (mg/dL)	65-139	KW3110 群	変化量	117.26	±	29.33	96.86	±	44.80
		プラセボ群	変化量	124.70	±	32.13	2.02	±	42.44
中性脂肪 (mg/dL)	30-149	KW3110 群	変化量	96.23	±	71.46	80.56	±	23.88
		プラセボ群	変化量	89.26	±	78.89	0.12	±	12.89
グルコー ス (mg/dL)	70-109	KW3110 群	変化量	81.35	±	6.55	77.51	±	20.83
		プラセボ群	変化量	83.44	±	7.58	-1.16	±	11.41

表 2-3-13 (4/4). 末梢血液検査

項目	基準値		摂取期間前			摂取期間後			
HbA1c (%)	4.6-6.2	KW3110 群	変化量	5.24	± 0.22	5.27	± 0.21	0.03	± 0.21
		プラセボ群	変化量	5.30	± 0.26	5.33	± 0.26	0.04	± 0.17
グリコアルブミン (%)	12.3-16.5	KW3110 群	変化量	13.71	± 1.13	13.79	± 1.26	0.08	± 0.60
		プラセボ群	変化量	13.94	± 1.24	13.93	± 1.12	-0.01	± 0.68

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は、摂取期間前における値を共変量とする二元配置反復測定 ANCOVA により解析した。摂取期間前における値、および摂取期間前を起点とした変化量の群間比較については、対応のない *t* 検定により解析した (*を $P<0.05$ として表した)。摂取期間前および摂取期間後に関する群内比較は対応のある *t* 検定により解析した (#を $P<0.05$ として表した)。

表 2-3-14. 眼科検査

項目			事前検査			0 週			4 週			8 週		
視力 (両眼 平均)	KW3110 群		0.61	±	0.54	0.55	±	0.51	0.59	±	0.57	0.63	±	0.58
		変化量							-0.02	±	0.27	0.02	±	0.43
	プラセボ 群		0.57	±	0.53	0.54	±	0.52	0.54	±	0.49	0.52	±	0.48
		変化量							-0.03	±	0.20	-0.05	±	0.20
視力 (優位 眼)	KW3110 群		0.61	±	0.53	0.55	±	0.51	0.60	±	0.59	0.68	±	0.84
		変化量							-0.01	±	0.32	0.07	±	0.78
	プラセボ 群		0.57	±	0.53	0.56	±	0.52	0.53	±	0.49	0.51	±	0.48
		変化量							-0.05	±	0.24	-0.07	±	0.22
視力 (非優 位眼)	KW3110 群		0.61	±	0.58	0.56	±	0.53	0.58	±	0.57	0.58	±	0.54
		変化量							-0.04	±	0.26	-0.03	±	0.24
	プラセボ 群		0.57	±	0.56	0.53	±	0.54	0.55	±	0.51	0.53	±	0.50
		変化量							-0.02	±	0.22	-0.04	±	0.25
視力 (右 眼)	KW3110 群		0.63	±	0.55	0.55	±	0.52	0.62	±	0.61	0.59	±	0.53
		変化量							-0.01	±	0.29	-0.04	±	0.20
	プラセボ 群		0.56	±	0.52	0.54	±	0.51	0.52	±	0.48	0.51	±	0.47
		変化量							-0.04	±	0.24	-0.05	±	0.20
視力 (左 眼)	KW3110 群		0.60	±	0.56	0.55	±	0.52	0.56	±	0.56	0.67	±	0.84
		変化量							-0.04	±	0.29	0.08	±	0.79
	プラセボ 群		0.59	±	0.56	0.54	±	0.55	0.57	±	0.52	0.53	±	0.50
		変化量							-0.02	±	0.22	-0.06	±	0.26
眼圧 (両眼 平均) (mmH g)	KW3110 群		13.93	±	2.44	13.86	±	2.38	13.44	±	2.88 *	13.97	±	2.75
		変化量							-0.49	±	1.98	0.03	±	2.07
	プラセボ 群		14.67	±	2.73	14.44	±	2.79	14.94	±	2.76	15.06	±	3.10
		変化量							0.26	±	1.84	0.39	±	1.89
眼圧 (優位 眼) (mmH g)	KW3110 群		13.89	±	2.84	14.21	±	3.16	13.47	±	3.50	14.07	±	3.25
		変化量							-0.43	±	2.47	0.18	±	2.36
	プラセボ 群		14.71	±	2.97	14.35	±	2.99	15.05	±	2.97	15.26	±	3.71
		変化量							0.34	±	2.15	0.54	±	2.48
眼圧 (非優 位眼) (mmH g)	KW3110 群		13.98	±	2.49	13.51	±	2.39	13.42	±	2.74 *	13.86	±	2.58
		変化量							-0.56	±	2.06	-0.12	±	2.28
	プラセボ 群		14.63	±	2.73	14.53	±	2.84	14.82	±	2.99	14.87	±	2.80
		変化量							0.19	±	2.27	0.23	±	2.10
眼圧 (右 眼) (mmH g)	KW3110 群		13.76	±	2.58	14.26	±	2.75	13.26	±	2.81 *	14.00	±	2.58
		変化量							-0.50	±	2.16	0.24	±	2.30
	プラセボ 群		14.77	±	2.88	14.40	±	2.95	14.98	±	3.08	14.81	±	3.22
		変化量							0.22	±	2.25	0.05	±	2.15
眼圧 (左 眼) (mmH g)	KW3110 群		14.11	±	2.76	13.47	±	2.84	13.63	±	3.43	13.93	±	3.25
		変化量							-0.48	±	2.39	-0.18	±	2.33
	プラセボ 群		14.58	±	2.82	14.49	±	2.89	14.89	±	2.88	15.31	±	3.34 #
		変化量							0.31	±	2.17	0.73	±	2.39 #

各群のデータは平均値±標準偏差で表した。2 群間の比較は、摂取開始 0 週における値を共変量とし、LSD 法を事後検定とする二元配置反復測定 ANCOVA により解析した(摂取の主効果について\$を $P<0.05$ 、各時点での摂取の効果について*を $P<0.05$ として表した)。摂取開始 0 週を起点とした変化量の群間比較については、二元配置反復測定 ANOVA により解析した。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は LSD 法を事後検定とする反復測定 ANOVA により解析した(#を $P<0.05$ として表した)。

表 2-3-15. 問診

項目		0 週		4 週		8 週	
		あり	なし	あり	なし	あり	なし
体調不良の自覚	KW3110 群	2	41	1	42	0	43
	プラセボ群	3	40	0	43	4	39
動悸・息切れ	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	0	43
だるい	KW3110 群	1	42	0	43	0	43
	プラセボ群	2	41	0	43	0	43
肌の不調	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	1	42
食欲不振	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	0	43
胃痛	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	0	43
下痢	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	0	43
便秘	KW3110 群	1	42	0	43	0	43
	プラセボ群	1	42	0	43	2	41
頭痛	KW3110 群	1	42	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	1	42	1	42
めまい	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	0	43
吐き気	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	0	43
むくみ	KW3110 群	1	42	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	1	42
汗をかきやすい	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	0	43
頻尿	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	1	42	0	43	0	43
のぼせ	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	0	43
睡眠不足	KW3110 群	1	42	0	43	0	43
	プラセボ群	1	42	0	43	1	42
口が乾く	KW3110 群	0	43	0	43	0	43
	プラセボ群	0	43	0	43	0	43
その他	KW3110 群	0	43	1	42	0	43
	プラセボ群	1	42	0	43	1	42

各群のデータは、各項目の回答が「あり」もしくは「なし」である被験者数で表した。

2 群間の比較はカイ二乗検定により解析した。摂取開始 0 週および、4 週もしくは 8 週に関する群内比較は McNemar 検定により解析した。

〈総括〉

現代病とも呼ばれる生活習慣病などの患者が年々増加していく状況において、疾病の予防や健康維持に貢献する機能を有する食品を日常生活で効果的に活用することは非常に重要である。近年、数多くの食品由来成分の機能性に関する研究が活発に行われた結果、それらの成分に様々な生体調節機能が存在することが報告され、それらを含む機能性食品が多数上市されている。

機能性を表示した食品を販売するために、2015 年 4 月より、商品を販売する事業者の責任において食品の機能性を表示できる「機能性表示食品制度」が新たに開始された。これにより、食品の機能性に対する科学的な関心がますます高まってきた。一方で、一般的に食品由来成分の有効性や安全性などの科学的知見は医薬品と比較して不足しており、機能性食品の摂取に不安を感じる消費者も少なくない。より確かな科学的根拠に基づいて機能性を表示した食品を消費者に提供していく観点から、新規の機能性食品成分に関して作用機序の科学的根拠を明らかにするとともに、ヒトに対する有効性および安全性を検証する一貫した基礎研究データの重要性が今後ますます注目されていくと考えられる。

本研究では数多くの食品素材の中から、ホップ由来苦味成分である MHBA および KW3110 に注目した。両素材のこれまでに知られていない新たな機能性として、MHBA については腸脳相関機序を介した脂肪減少作用、KW3110 については炎症抑制作用を介した日常的な目の疲労感軽減作用について知見を得た。

第 1 章では、MHBA について機能性を検証した。ホップ苦味成分である α 酸や、ビール醸造の煮沸過程で α 酸が異性化したイソ α 酸と比較して、MHBA は顕著に苦味が低減されており、多様な食品への応用が期待された。そのため、MHBA の機能性についてはこれまでも研究がなされており、MHBA の経口投与が食餌誘導性肥満マウスにおいて体重増加抑制作用および脂肪蓄積抑制作用を示すこと、およびその作用機序として自律神経系を介した BAT の活性化が重要な役割を果たす可能性が示唆されていた[12]。一方、MHBA の自律神経系に対する詳細な作用機序、およびヒトに対する有効性が未解明であったため、本研究では T2Rs および消化管ホルモンに着目した一連の検討を実施するとともに、ヒトにおける脂肪減少作用の検討を実施した。

第 1 章第 1 節では、消化管ホルモンの 1 つである CCK に着目した検討を実施した。CCK は消化管ホルモンとして消化管や周辺組織の消化活動を制御するほか、神経伝達物質として迷走神経末端に発現する CCK1 受容体に作用する。その結果、腸脳相関と呼ばれる組織間相互作用を介して中枢にシグナルを伝達し、食欲抑制作用などを発揮することが知られている[44]。本研究において、STC-1 細胞への MHBA 添加が、L 型電

位依存性カルシウムチャネルを介した細胞内への Ca^{2+} 流入を促進し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して CCK の分泌を誘導することが明らかになった。また、CCK1 受容体阻害剤を投与したラットでは、MHBA の経口胃内投与によって BAT-SNA および BAT 温度の上昇が認められなかった。さらに、CCK の腹腔内投与によっても BAT-SNA が上昇し、迷走神経の切除によりその作用が消失した。これらの一連の研究により、MHBA が消化管に作用し、腸脳相関を介して BAT の活性化作用を有する可能性が示唆され、その生理作用には CCK が重要な役割を果たす可能性を明らかにした。近年の研究において、BAT は哺乳類動物や小児だけではなく、成人においても存在することが報告されている[69]。成人において代謝活性のある BAT の割合は高いとは言えないものの、交感神経の活性化により代謝活性のある BAT が誘導されてくることが哺乳類動物およびヒトの両方で発見されるなど[70-72]、抗肥満研究の新たなターゲットとして注目を集めている。本研究において、MHBA が CCK を介した腸脳相関機序による BAT 活性化作用を有する可能性が見出されたことから、今後は MHBA のヒトにおける BAT 活性化作用の解明が期待される。

第 1 章第 2 節では、MHBA が消化管内分泌細胞に認識される機構として、T2Rs に着目した検討を実施した。HEK293T 細胞を用いた各種 T2R の発現実験により、ヒト TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10 およびマウス Tas2r119、Tas2r130、Tas2r105 が MHBA を認識する T2Rs である可能性が明らかになった。T2Rs は味蕾の味受容細胞だけでなく消化管の上皮細胞にも発現し[172]、全身の代謝調節など生体応答のトリガーとして機能している。STC-1 細胞において 3 種のマウス Tas2rs それぞれの遺伝子発現抑制を行った結果、MHBA 添加に対するカルシウム応答および CCK 産生促進が抑制されたことから、MHBA は消化管の複数の T2Rs に認識されて CCK 産生を促進する可能性が明らかになった。第 1 章第 1 節も含めた上記の結果から、本研究によりはじめて、MHBA が消化管内分泌細胞の複数の T2Rs に認識されることを起点として、細胞外からの L 型電位依存性カルシウムチャネルを介した Ca^{2+} 流入を促進し、CCK の産生を誘導すること、および CCK1 受容体を介して自律神経活動を上昇し、BAT を活性化させる可能性が明らかになった。MHBA を認識する T2Rs の一部は、MHBA と部分的に共通の構造を有する α 酸やイソ α 酸も認識する[7]。一方で、MHBA を認識するその他の T2Rs が α 酸およびイソ α 酸を認識する報告はなく、MHBA を認識しない T2Rs でイソ α 酸を認識するものも存在する[75,76]。以上より、様々な苦味物質の間で異なる構造が、T2Rs による受容幅の多様性を生み出している可能性が考えられる。こうした苦味受容の多様性が、MHBA がイソ α 酸と比較して顕著に低減された苦味を呈することと関連

しており、様々な食品に対して期待する効果用量を搭載できる利点に繋がっている可能性が考えられる。

第1章第3節では、MHBAのヒトに対する体脂肪減少効果について検討した。20歳以上65歳以下でBMIが25 kg/m²以上30 kg/m²未満の健常な成人男女200名を対象とし、熟成ホップエキス低含有食品（11.7 mgのMHBAを含有）、熟成ホップエキス高含有食品（35 mgのMHBAを含有）もしくはプラセボ食品を1日1回、12週間摂取させる無作為化二重盲検プラセボ並行群間比較試験を行った。その結果、プラセボ食品群と比較して熟成ホップエキス高含有食品群において内臓脂肪面積の変化量の有意な低下が認められたため、熟成ホップエキス215 mg（MHBAとして35 mg）を含む飲料の継続摂取により内臓脂肪が減少する可能性が明らかになった。また、安全性についても臨床上問題となる結果はないと試験責任医師により判断された。筆者のグループでは他にも、BMIが25 kg/m²以上30 kg/m²未満の健常な成人男女を対象として、35 mgのMHBAを含有した熟成ホップエキス配合食品の12週間継続摂取により安全に体脂肪が減少する結果を報告しており、本研究で得られた結果を支持するものであった[92,93]。成人における活性化したBATの量は体脂肪量と負の相関があるため、活性化したBATによる熱産生によって体脂肪が燃焼し減少することが示唆されている[94]。第1章第1節および第2節で得られた結果も含めると、熟成ホップエキス高含有食品摂取による内臓脂肪減少効果には、MHBAによる腸脳相関を介したBATの活性化作用が重要な役割を果たす可能性があることが明らかになった（図4）。腹部内臓脂肪の過剰な蓄積が高血圧症や糖尿病などの様々な代謝性疾患に繋がるため、内臓脂肪量を減らすことはそれらの疾患の予防に非常に重要である[97-102]。本研究においてMHBAを含む熟成ホップエキス含有食品が内臓脂肪減少効果を有することが明らかになったことから、熟成ホップエキスが肥満に伴う代謝性疾患のリスク低減に寄与することが強く期待される。

第2章では、KW3110について機能性を検証した。様々な炎症関連疾患の予防戦略として乳酸菌などの免疫調節機能性食品素材が注目されている[25-27]。その中で、炎症抑制作用を有するKW3110については、抗炎症性のM2マクロファージを活性化してIL-10の産生を誘導することで、マウスにおいて加齢に伴う慢性炎症の抑制およびブルーライト照射による網膜での炎症の抑制作用を有すること、およびヒトにおいてVDT作業負荷による急性的な目の疲労感を軽減する作用がこれまでの研究で明らかになっている[31,104,109]。一方、KW3110の詳細な炎症抑制作用機序や慢性的なストレスによる目の疲労感に対する有効性については未解明であったため、本研究ではマウスおよびヒトの免疫細胞を用いた作用機序の検討、およびヒトに対する有効性の検討を実施し

た。

第2章第1節では、KW3110の炎症抑制作用機序解明のために、マウスおよびヒトの免疫細胞を用いて検討を実施した。J774A.1細胞へのKW3110の添加により、IL-10の産生誘導、LPS/ATP刺激によるカスパーゼ-1の活性化およびIL-1 β の産生誘導の抑制が認められた。また、IL-10シグナリング因子の遺伝子発現抑制により、LPS/ATP刺激によるカスパーゼ-1の活性化およびIL-1 β の産生誘導に対するKW3110の作用が抑制された。さらに、KW3110の添加はヒト単球細胞においてもIL-10の産生を誘導し、LPS/ATP刺激によるカスパーゼ-1の活性化およびIL-1 β の産生誘導を抑制した。以上の結果から、KW3110はマウスおよびヒトのいずれにおいても、IL-10シグナリングを介して、炎症性刺激を受けた免疫細胞における炎症応答を抑制する可能性が明らかになった。カスパーゼ-1はインフラマソーム複合体の活性本体であり、IL-1 β の成熟を促進する作用が報告されているため[116]、KW3110はインフラマソーム活性化の抑制作用を有するとも言える。インフラマソームの活性化はミトコンドリアの機能低下により産生される活性酸素種および酸化DNAによって促進され[119,120]、IL-10は機能低下したミトコンドリアを除去する機構であるマイトファジーを誘導することでインフラマソーム活性化を抑制していると考えられている[113]。以上の知見から、KW3110はIL-10シグナリングを介してマイトファジーを誘導することでミトコンドリアの機能低下を調節し、インフラマソームを構成するカスパーゼ-1の活性を制御する可能性が考えられ、KW3110の炎症抑制作用機序については今後もさらなる研究が望まれる。カスパーゼ-1の活性化に対するKW3110の抑制作用は乳酸菌における新たな炎症抑制作用機序であり、これらの知見は炎症関連疾患に対する食品素材を用いた新たな予防法の確立に貢献できることが強く期待される。

第2章第2節では、網膜細胞への慢性的な炎症ストレスに対するKW3110の保護作用機序を明らかにするため、ヒト由来網膜色素上皮細胞を用いた検討を実施した。LPS/ATP刺激を与えたJ774A.1細胞の培養上清に長時間暴露することで、網膜色素上皮細胞は細胞老化表現型を示したことに加えて、タイトジャンクション因子の発現変動も認められた。一方、KW3110をJ774A.1細胞に添加することにより、同細胞の培養上清の長時間暴露によって引き起こされる網膜色素上皮細胞の反応が抑制された。本研究において実施した慢性的な炎症ストレスの他にも、酸化剤への暴露条件や老化したサル目の目においても網膜色素上皮細胞老化は誘導されている[134-136]。網膜色素上皮細胞層およびタイトジャンクションによって形成される血液網膜関門の維持には網膜色素上皮細胞が必須であり[130]、タイトジャンクション形成の重要な制御因子である

claudin-1 および ZO-1 の発現変動は網膜色素上皮細胞におけるタイトジャンクションの崩壊に繋がる可能性が報告されている[140]。定性的なデータのみではあるが、本研究において KW3110 が慢性的な炎症ストレスを受けた網膜色素上皮細胞における claudin-1 および ZO-1 の発現変動を抑制する可能性が示唆されたことから、KW3110 は慢性的な炎症ストレスによる網膜機能の低下にも抑制的な作用を発揮する可能性が考えられる。第 2 章第 1 節で得られた知見も含めると、KW3110 がマクロファージおよび IL-10 シグナリングの活性化を介して、慢性的な炎症ストレスによる網膜色素上皮細胞の細胞老化、およびタイトジャンクション因子の発現変動を抑制する作用機序が本研究で初めて明らかになった（図 5）。

第 2 章第 3 節では、日常的な目の疲労感に対する KW3110 の有効性を検討した。35 歳以上 50 歳未満の目の疲れを自覚する健常な成人男女 88 名を対象とし、KW3110 含有食品もしくはプラセボ食品を 1 日 1 回、8 週間摂取させる無作為化二重盲検プラセボ並行群間比較試験を行った。その結果、プラセボ食品群と比較して KW3110 含有食品群において、目の疲労感に関する客観指標である CFF の変化量の有意な改善が認められたため、KW3110 を含む食品の継続摂取により目の疲労感が軽減する可能性が明らかになった。また、安全性についても臨床上問題となる結果はないと試験責任医師により判断された。筆者のグループではこれまでに、35 歳以上 45 歳以下の目の疲れを自覚する健常な成人男女を対象とした臨床試験を行い、KW3110 含有食品の 8 週間継続摂取により、VDT 作業負荷前後の CFF の変化量について有意な群間差が認められたことを報告している[109]。一方、本研究においては作業負荷前の CFF に有意な群間差が認められたことから、KW3110 の継続摂取により慢性的な目の疲労感が軽減する可能性が考えられる。本研究において得られた結果は、乳酸菌が慢性的な目の不調を改善することを示した初めての知見である。KW3110 は、長期間のディスプレイ作業や精神的ストレスによって多くの人々が悩まされている慢性的な目の疲労感などの不調を改善するための有用かつ安全な方法として用いられることが強く期待される。

以上の検討より、食品由来成分の新規機能性として、MHBA の腸脳関連機序を介した脂肪減少作用、および KW3110 乳酸菌の炎症抑制作用を介した日常的な目の疲労感軽減作用を示すことができた（図 5、6）。さらに、近年これらの知見を活用し、体脂肪減少効果を表示した MHBA 含有ノンアルコール・ビールテイスト飲料、ならびに目の疲労感軽減効果を表示した KW3110 乳酸菌含有サプリメントが機能性表示食品として上市されるに至った。今後、本研究で得られた知見がさらに活用され、食を通じて人々の健康維持に貢献することが強く望まれる。

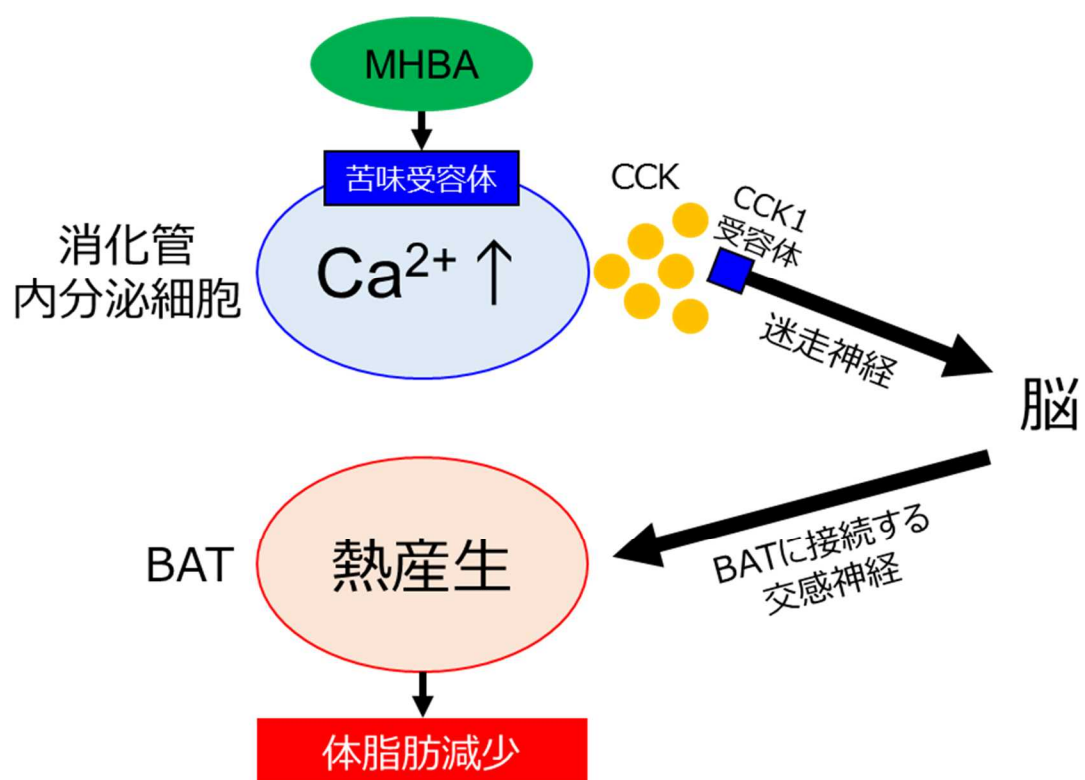


図 5. MHBA の体脂肪減少作用とその想定作用機序

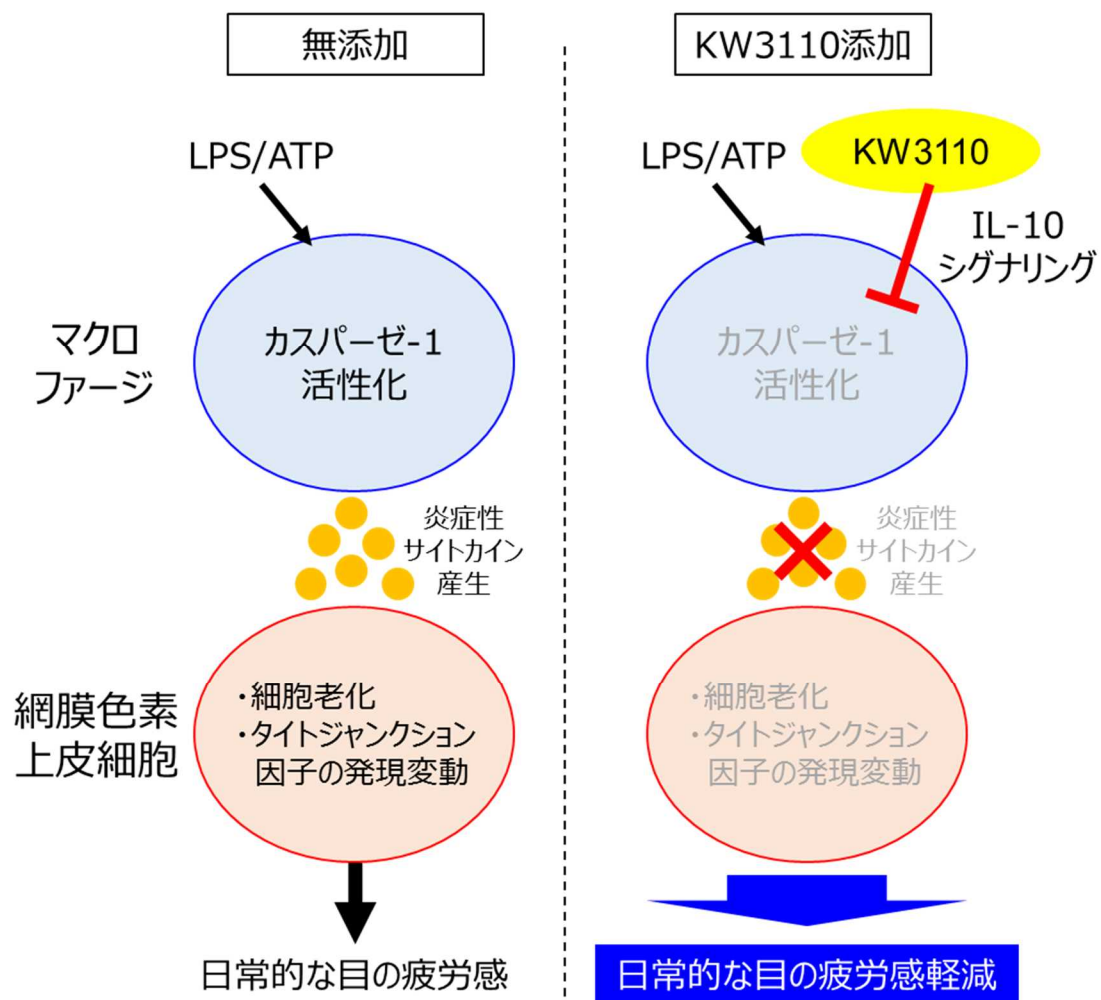


図 6. KW3110 の日常的な目の疲労感軽減作用とその想定作用機序

〈発表論文リスト〉

(第1章 第1節)

• Yamazaki T, Morimoto-Kobayashi Y, Koizumi K, Takahashi C, Nakajima S, Kitao S, Taniguchi Y, Katayama M, Ogawa Y. Secretion of a gastrointestinal hormone, cholecystokinin, by hop-derived bitter components activates sympathetic nerves in brown adipose tissue. *J Nutr Biochem*. 2019 Feb 64:80-87.

(第1章 第2節)

• Yamazaki T, Takahashi C, Taniguchi Y, Narukawa M, Misaka T, Ano Y. Bitter taste receptor activation by hop-derived bitter components induces gastrointestinal hormone production in enteroendocrine cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Dec 533(4):704-709.

(第1章 第3節)

• Yamazaki T, Morimoto-Kobayashi Y, Taniguchi Y, Manabe F, Katayama M, Kowatari Y, Kondo S. 熟成ホップエキスを含有食品の継続摂取による体脂肪低減効果—無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法—. *薬理と治療*. 2016 Aug 44(8):1193-1207.

(第2章 第1節)

• Yamazaki T, Ohshio K, Sugamata M, Morita Y. Lactic acid bacterium, *Lactobacillus paracasei* KW3110, suppresses inflammatory stress-induced caspase-1 activation by promoting interleukin-10 production in mouse and human immune cells. *PLoS ONE*. 2020 Aug 15(8):e0237754.

(第2章 第2節、第3節)

• Yamazaki T, Suzuki H, Yamada S, Ohshio K, Sugamata M, Yamada T, Morita Y. *Lactobacillus paracasei* KW3110 Suppresses Inflammatory Stress-Induced Premature Cellular Senescence of Human Retinal Pigment Epithelium Cells and Reduces Ocular Disorders in Healthy Humans. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 21(14):5091.

〈引用文献〉

1. Hirata, H.; Uto-Kondo, H.; Ogura, M.; Ayaori, M.; Shiotani, K.; Ota, A.; Tsuchiya, Y.; Ikewaki, K. Xanthohumol, a hop-derived prenylated flavonoid, promotes macrophage reverse cholesterol transport. *The Journal of nutritional biochemistry* **2017**, *47*, 29-34.
2. Rancán, L.; Paredes, S.D.; García, I.; Muñoz, P.; García, C.; de Hontanar, G.L.; de la Fuente, M.; Vara, E.; Tresguerres, J.A. Protective effect of xanthohumol against age-related brain damage. *The Journal of nutritional biochemistry* **2017**, *49*, 133-140.
3. Ano, Y.; Dohata, A.; Taniguchi, Y.; Hoshi, A.; Uchida, K.; Takashima, A.; Nakayama, H. Iso- α -acids, Bitter Components of Beer, Prevent Inflammation and Cognitive Decline Induced in a Mouse Model of Alzheimer's Disease*. *Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292*, 3720-3728, doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.763813>.
4. Yajima, H.; Ikeshima, E.; Shiraki, M.; Kanaya, T.; Fujiwara, D.; Odai, H.; Tsuboyama-Kasaoka, N.; Ezaki, O.; Oikawa, S.; Kondo, K. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor α and γ and reduce insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 33456-33462.
5. Yajima, H.; Noguchi, T.; Ikeshima, E.; Shiraki, M.; Kanaya, T.; Tsuboyama-Kasaoka, N.; Ezaki, O.; Oikawa, S.; Kondo, K. Prevention of diet-induced obesity by dietary isomerized hop extract containing isohumulones, in rodents. *International journal of obesity* **2005**, *29*, 991-997.
6. Ono, M.; Kakudo, Y.; Yamamoto, R.; Nagami, K.; Kumada, J. Simultaneous analysis of hop bittering components by high-performance liquid chromatography. II. Evaluation of hop deterioration. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **1987**, *45*, 61-69.
7. Taniguchi, Y.; Matsukura, Y.; Taniguchi, H.; Koizumi, H.; Katayama, M. Development of preparative and analytical methods of the hop bitter acid oxide fraction and chemical properties of its components. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2015**, *79*, 1684-1694.
8. Taniguchi, Y.; Matsukura, Y.; Ozaki, H.; Nishimura, K.; Shindo, K. Identification and Quantification of the Oxidation Products Derived from α -Acids and β -Acids During Storage of Hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 3121-3130, doi:10.1021/jf3047187.

9. Taniguchi, Y.; Taniguchi, H.; Matsukura, Y.; Kawachi, Y.; Shindo, K. Structural elucidation of humulone autoxidation products and analysis of their occurrence in stored hops. *Journal of natural products* **2014**, *77*, 1252-1261.
10. Taniguchi, Y.; Taniguchi, H.; Yamada, M.; Matsukura, Y.; Koizumi, H.; Furihata, K.; Shindo, K. Analysis of the components of hard resin in hops (*Humulus lupulus* L.) and structural elucidation of their transformation products formed during the brewing process. *Journal of agricultural and food chemistry* **2014**, *62*, 11602-11612.
11. Almaguer, C.; Gastl, M.; Arendt, E.; Becker, T. Contributions of hop hard resins to beer quality. *BrewingScience* **2012**, *65*, 118-129.
12. Morimoto-Kobayashi, Y.; Ohara, K.; Takahashi, C.; Kitao, S.; Wang, G.; Taniguchi, Y.; Katayama, M.; Nagai, K. Matured hop bittering components induce thermogenesis in brown adipose tissue via sympathetic nerve activity. *PloS one* **2015**, *10*, e0131042.
13. Fontana, L.; Bermudez-Brito, M.; Plaza-Diaz, J.; Munoz-Quezada, S.; Gil, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British journal of nutrition* **2013**, *109*, S35-S50.
14. Fujiwara, D.; Inoue, S.; Wakabayashi, H.; Fujii, T. The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *International archives of allergy and immunology* **2004**, *135*, 205-215.
15. Kim, M.; Furuzono, T.; Yamakuni, K.; Li, Y.; Kim, Y.I.; Takahashi, H.; Ohue - Kitano, R.; Jheng, H.F.; Takahashi, N.; Kano, Y. 10 - oxo - 12 (Z) - octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, enhances energy metabolism by activation of TRPV1. *The FASEB Journal* **2017**, *31*, 5036-5048.
16. Vieira, L.Q.; dos Santos, L.M.; Neumann, E.; da Silva, A.P.; Moura, L.N.; Nicoli, J.R. Probiotics protect mice against experimental infections. *Journal of clinical gastroenterology* **2008**, *42 Suppl 3 Pt 2*, S168-169, doi:10.1097/MCG.0b013e31818063d4.
17. Montalto, M.; Arancio, F.; Izzi, D.; Cuoco, L.; Curigliano, V.; Manna, R.; Gasbarrini, G. [Probiotics: history, definition, requirements and possible therapeutic applications]. *Annali italiani di medicina interna : organo ufficiale della Societa italiana di medicina interna* **2002**, *17*, 157-165.
18. Xiao, J.Z.; Kondo, S.; Yanagisawa, N.; Takahashi, N.; Odamaki, T.; Iwabuchi, N.;

- Miyaji, K.; Iwatsuki, K.; Togashi, H.; Enomoto, K., et al. Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **2006**, *36*, 1425-1435, doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02575.x.
19. Morita, H.; He, F.; Kawase, M.; Kubota, A.; Hiramatsu, M.; Kurisaki, J.; Salminen, S. Preliminary human study for possible alteration of serum immunoglobulin E production in perennial allergic rhinitis with fermented milk prepared with *Lactobacillus gasseri* TMC0356. *Microbiology and immunology* **2006**, *50*, 701-706, doi:10.1111/j.1348-0421.2006.tb03842.x.
 20. Matsuzaki, T.; Yamazaki, R.; Hashimoto, S.; Yokokura, T. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *Journal of dairy science* **1998**, *81*, 48-53, doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75549-3.
 21. Garlanda, C.; Di Liberto, D.; Vecchi, A.; La Manna, M.P.; Buracchi, C.; Caccamo, N.; Salerno, A.; Dieli, F.; Mantovani, A. Damping excessive inflammation and tissue damage in *Mycobacterium tuberculosis* infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *The Journal of Immunology* **2007**, *179*, 3119-3125.
 22. Calçada, D.; Vianello, D.; Giampieri, E.; Sala, C.; Castellani, G.; de Graaf, A.; Kremer, B.; van Ommen, B.; Feskens, E.; Santoro, A. The role of low-grade inflammation and metabolic flexibility in aging and nutritional modulation thereof: a systems biology approach. *Mechanisms of ageing and development* **2014**, *136*, 138-147.
 23. Finkel, T.; Serrano, M.; Blasco, M.A. The common biology of cancer and ageing. *Nature* **2007**, *448*, 767-774.
 24. Deleidi, M.; Jäggle, M.; Rubino, G. Immune aging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Frontiers in Neuroscience* **2015**, *9*, 172.
 25. Zhu, F.; Du, B.; Xu, B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Critical reviews in food science and nutrition* **2018**, *58*, 1260-1270.
 26. Mukherjee, S.; Das, S.K.; Vasudevan, D. Role of polyphenols in diet and nutrition-an updated review. *Current Nutrition & Food Science* **2009**, *5*, 149-159.
 27. Miguel, M.G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules* **2010**, *15*, 9252-9287.

28. Ichikawa, S.; Miyake, M.; Fujii, R.; Konishi, Y. MyD88 associated ROS generation is crucial for Lactobacillus induced IL-12 production in macrophage. *PLoS One* **2012**, *7*, e35880.
29. Wakabayashi, H.; Nariai, C.; Takemura, F.; Nakao, W.; Fujiwara, D. Dietary supplementation with lactic acid bacteria attenuates the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice in a strain-dependent manner. *International archives of allergy and immunology* **2008**, *145*, 141-151.
30. Ichikawa, S.; Miyake, M.; Fujii, R.; Konishi, Y. Orally administered Lactobacillus paracasei KW3110 induces in vivo IL-12 production. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2009**, *73*, 1561-1565.
31. Morita, Y.; Jounai, K.; Sakamoto, A.; Tomita, Y.; Sugihara, Y.; Suzuki, H.; Ohshio, K.; Otake, M.; Fujiwara, D.; Kanauchi, O. Long-term intake of Lactobacillus paracasei KW3110 prevents age-related chronic inflammation and retinal cell loss in physiologically aged mice. *Aging (Albany NY)* **2018**, *10*, 2723.
32. Zhao, G.Q.; Zhang, Y.; Hoon, M.A.; Chandrashekar, J.; Erlenbach, I.; Ryba, N.J.; Zuker, C.S. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **2003**, *115*, 255-266.
33. Scott, K. The sweet and the bitter of mammalian taste. *Current opinion in neurobiology* **2004**, *14*, 423-427.
34. Stefanello, N.; Schmatz, R.; Pereira, L.B.; Cardoso, A.M.; Passamonti, S.; Spanevello, R.M.; Thomé, G.; de Oliveira, G.M.T.; Kist, L.W.; Bogo, M.R. Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on components of the purinergic system of streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of nutritional biochemistry* **2016**, *38*, 145-153.
35. Sachan, D.S.; Hongu, N. Increases in VO₂max and metabolic markers of fat oxidation by caffeine, carnitine, and choline supplementation in rats. *The Journal of nutritional biochemistry* **2000**, *11*, 521-526.
36. Kim, K.-S.; Egan, J.M.; Jang, H.-J. Denatonium induces secretion of glucagon-like peptide-1 through activation of bitter taste receptor pathways. *Diabetologia* **2014**, *57*, 2117-2125.
37. Xu, Y.; Zhang, M.; Wu, T.; Dai, S.; Xu, J.; Zhou, Z. The anti-obesity effect of green tea polysaccharides, polyphenols and caffeine in rats fed with a high-fat diet. *Food & Function* **2015**, *6*, 296-303.

38. Chen, M.C.; Wu, S.V.; Reeve Jr, J.R.; Rozengurt, E. Bitter stimuli induce Ca²⁺ signaling and CCK release in enteroendocrine STC-1 cells: role of L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2006**, *291*, C726-C739.
39. Hirasawa, A.; Tsumaya, K.; Awaji, T.; Katsuma, S.; Adachi, T.; Yamada, M.; Sugimoto, Y.; Miyazaki, S.; Tsujimoto, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature medicine* **2005**, *11*, 90-94.
40. Kim, H.Y.; Park, M.; Kim, K.; Lee, Y.M.; Rhyu, M.R. Hesperetin stimulates cholecystokinin secretion in enteroendocrine STC-1 cells. *Biomolecules & therapeutics* **2013**, *21*, 121.
41. Park, M.; Kim, K.; Lee, Y.M.; Rhyu, M.R.; Kim, H.Y. Naringenin stimulates cholecystokinin secretion in STC-1 cells. *Nutrition research and practice* **2014**, *8*, 146-150.
42. Nakajima, S.; Hira, T.; Eto, Y.; Asano, K.; Hara, H. Soybean 851-63 peptide stimulates cholecystokinin secretion via a calcium-sensing receptor in enteroendocrine STC-1 cells. *Regulatory peptides* **2010**, *159*, 148-155.
43. Janssen, S.; Depoortere, I. Nutrient sensing in the gut: new roads to therapeutics? *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2013**, *24*, 92-100.
44. Raybould, H.E. Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Current opinion in pharmacology* **2007**, *7*, 570-574.
45. Chaudhri, O.; Small, C.; Bloom, S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2006**, *361*, 1187-1209.
46. Koda, S.; Date, Y.; Murakami, N.; Shimbara, T.; Hanada, T.; Toshinai, K.; Nijima, A.; Furuya, M.; Inomata, N.; Osuye, K. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology* **2005**, *146*, 2369-2375.
47. Abbott, C.R.; Monteiro, M.; Small, C.J.; Sajedi, A.; Smith, K.L.; Parkinson, J.R.C.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Research* **2005**, *1044*, 127-131, doi:<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.03.011>.
48. Whited, K.L.; Thao, D.; Lloyd, K.K.; Kopin, A.; Raybould, H.E. Targeted disruption of

- the murine CCK1 receptor gene reduces intestinal lipid-induced feedback inhibition of gastric function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2006**, *291*, G156-G162.
49. Jeon, T.-I.; Seo, Y.-K.; Osborne, T.F. Gut bitter taste receptor signalling induces ABCB1 through a mechanism involving CCK. *Biochemical Journal* **2011**, *438*, 33-37.
 50. Pahlavani, M.; Razafimanjato, F.; Ramalingam, L.; Kalupahana, N.S.; Moussa, H.; Scoggin, S.; Moustaid-Moussa, N. Eicosapentaenoic acid regulates brown adipose tissue metabolism in high-fat-fed mice and in clonal brown adipocytes. *The Journal of nutritional biochemistry* **2017**, *39*, 101-109.
 51. Oi-Kano, Y.; Iwasaki, Y.; Nakamura, T.; Watanabe, T.; Goto, T.; Kawada, T.; Watanabe, K.; Iwai, K. Oleuropein aglycone enhances UCP1 expression in brown adipose tissue in high-fat-diet-induced obese rats by activating β -adrenergic signaling. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2017**, *40*, 209-218.
 52. Choo, J. Green tea reduces body fat accretion caused by high-fat diet in rats through β -adrenoceptor activation of thermogenesis in brown adipose tissue. *The Journal of nutritional biochemistry* **2003**, *14*, 671-676.
 53. Choo, J.J. Green tea reduces body fat accretion caused by high-fat diet in rats through β -adrenoceptor activation of thermogenesis in brown adipose tissue. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2003**, *14*, 671-676, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.08.005>.
 54. Rindi, G.; Grant, S.; Yiangou, Y.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R.; Bautch, V.L.; Solcia, E.; Polak, J.M. Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *The American journal of pathology* **1990**, *136*, 1349.
 55. Le Nevé, B.; Foltz, M.; Daniel, H.; Gouka, R. The steroid glycoside Hg-12 from *Hoodia gordonii* activates the human bitter receptor TAS2R14 and induces CCK release from HuTu-80 cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2010**, *299*, G1368-G1375.
 56. Shen, J.; Nijijima, A.; Tanida, M.; Horii, Y.; Maeda, K.; Nagai, K. Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neuroscience letters* **2005**, *380*, 289-294.
 57. Shen, J.; Nakamura, H.; Fujisaki, Y.; Tanida, M.; Horii, Y.; Fuyuki, R.; Takumi, H.;

- Shiraishi, K.; Kometani, T.; Nagai, K. Effect of 4G- α -glucopyranosyl hesperidin on brown fat adipose tissue and cutaneous-sympathetic nerve activity and peripheral body temperature. *Neuroscience letters* **2009**, *461*, 30-35.
58. Katsuma, S.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochemical and biophysical research communications* **2005**, *329*, 386-390.
 59. Geraedts, M.C.; Troost, F.J.; Saris, W.H. Peptide - YY is released by the intestinal cell line STC - 1. *Journal of food science* **2009**, *74*, H79-H82.
 60. Eberle-Wang, K.; Simansky, K. The CCK-A receptor antagonist, devazepide, blocks the anorectic action of CCK but not peripheral serotonin in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **1992**, *43*, 943-947.
 61. Jeon, T.-I.; Zhu, B.; Larson, J.L.; Osborne, T.F. SREBP-2 regulates gut peptide secretion through intestinal bitter taste receptor signaling in mice. *The Journal of clinical investigation* **2008**, *118*, 3693-3700.
 62. Geraedts, M.C.; Troost, F.J.; Saris, W.H. Different tastants and low-caloric sweeteners induce differential effects on the release of satiety hormones. *Food chemistry* **2011**, *129*, 731-738.
 63. Cummings, D.E.; Overduin, J. Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of clinical investigation* **2007**, *117*, 13-23.
 64. Blouet, C.; Schwartz, G.J. Duodenal lipid sensing activates vagal afferents to regulate non-shivering brown fat thermogenesis in rats. *PloS one* **2012**, *7*, e51898.
 65. Jang, H.-J.; Kokrashvili, Z.; Theodorakis, M.J.; Carlson, O.D.; Kim, B.-J.; Zhou, J.; Kim, H.H.; Xu, X.; Chan, S.L.; Juhaszova, M. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 15069-15074.
 66. Wu, S.V.; Rozengurt, N.; Yang, M.; Young, S.H.; Sinnett-Smith, J.; Rozengurt, E. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 2392-2397.
 67. Masuho, I.; Tateyama, M.; Saitoh, O. Characterization of bitter taste responses of intestinal STC-1 cells. *Chemical senses* **2005**, *30*, 281-290.
 68. Intelmann, D.; Batram, C.; Kuhn, C.; Haseleu, G.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Three

- TAS2R bitter taste receptors mediate the psychophysical responses to bitter compounds of hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Chemosensory Perception* **2009**, *2*, 118-132.
69. Saito, M.; Okamatsu-Ogura, Y.; Matsushita, M.; Watanabe, K.; Yoneshiro, T.; Nio-Kobayashi, J.; Iwanaga, T.; Miyagawa, M.; Kameya, T.; Nakada, K. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **2009**, *58*, 1526-1531.
 70. Ono, K.; Tsukamoto-Yasui, M.; Hara-Kimura, Y.; Inoue, N.; Nogusa, Y.; Okabe, Y.; Nagashima, K.; Kato, F. Intragastric administration of capsiate, a transient receptor potential channel agonist, triggers thermogenic sympathetic responses. *Journal of Applied Physiology* **2011**, *110*, 789-798.
 71. Masuda, Y.; Haramizu, S.; Oki, K.; Ohnuki, K.; Watanabe, T.; Yazawa, S.; Kawada, T.; Hashizume, S.-i.; Fushiki, T. Upregulation of uncoupling proteins by oral administration of capsiate, a nonpungent capsaicin analog. *Journal of Applied Physiology* **2003**, *95*, 2408-2415.
 72. Yoneshiro, T.; Aita, S.; Matsushita, M.; Kayahara, T.; Kameya, T.; Kawai, Y.; Iwanaga, T.; Saito, M. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *The Journal of clinical investigation* **2013**, *123*, 3404-3408.
 73. Dotson, C.D.; Zhang, L.; Xu, H.; Shin, Y.-K.; Vignes, S.; Ott, S.H.; Elson, A.E.; Choi, H.J.; Shaw, H.; Egan, J.M. Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PloS one* **2008**, *3*, e3974.
 74. Go, Y.; Satta, Y.; Takenaka, O.; Takahata, N. Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics* **2005**, *170*, 313-326.
 75. Lossow, K.; Hübner, S.; Roudnitzky, N.; Slack, J.P.; Pollastro, F.; Behrens, M.; Meyerhof, W. Comprehensive analysis of mouse bitter taste receptors reveals different molecular receptive ranges for orthologous receptors in mice and humans. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, *291*, 15358-15377.
 76. Meyerhof, W.; Batram, C.; Kuhn, C.; Brockhoff, A.; Chudoba, E.; Bufe, B.; Appendino, G.; Behrens, M. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical senses* **2010**, *35*, 157-170.
 77. Kaji, I.; Karaki, S.-i.; Fukami, Y.; Terasaki, M.; Kuwahara, A. Secretory effects of a

- luminal bitter tastant and expressions of bitter taste receptors, T2Rs, in the human and rat large intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2009**, *296*, G971-G981.
78. Narukawa, M.; Noga, C.; Ueno, Y.; Sato, T.; Misaka, T.; Watanabe, T. Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39. *Biochemical and biophysical research communications* **2011**, *405*, 620-625.
 79. Zhang, Y.; Hoon, M.A.; Chandrashekar, J.; Mueller, K.L.; Cook, B.; Wu, D.; Zuker, C.S.; Ryba, N.J. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **2003**, *112*, 293-301.
 80. Pérez, C.A.; Huang, L.; Rong, M.; Kozak, J.A.; Preuss, A.K.; Zhang, H.; Max, M.; Margolskee, R.F. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nature neuroscience* **2002**, *5*, 1169-1176.
 81. Palmer, R.K.; Atwal, K.; Bakaj, I.; Carlucci-Derbyshire, S.; Buber, M.T.; Cerne, R.; Cortés, R.Y.; Devantier, H.R.; Jorgensen, V.; Pawlyk, A. Triphenylphosphine oxide is a potent and selective inhibitor of the transient receptor potential melastatin-5 ion channel. *Assay and drug development technologies* **2010**, *8*, 703-713.
 82. Vennekens, R.; Mesuere, M.; Philippaert, K. TRPM5 in the battle against diabetes and obesity. *Acta Physiologica* **2018**, *222*, e12949.
 83. Ayabe, T.; Ohya, R.; Taniguchi, Y.; Shindo, K.; Kondo, K.; Ano, Y. Matured hop-derived bitter components in beer improve hippocampus-dependent memory through activation of the vagus nerve. *Scientific reports* **2018**, *8*, 1-10.
 84. Fukuda, T.; Ohnuma, T.; Obara, K.; Kondo, S.; Arai, H.; Ano, Y. Supplementation with Matured Hop Bitter Acids Improves Cognitive Performance and Mood State in Healthy Older Adults with Subjective Cognitive Decline. *Journal of Alzheimer's Disease* **2020**, 1-12.
 85. Fukuda, T.; Obara, K.; Saito, J.; Umeda, S.; Ano, Y. Effects of hop bitter acids, bitter components in beer, on cognition in healthy adults: A randomized controlled trial. *Journal of agricultural and food chemistry* **2019**, *68*, 206-212.
 86. 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討会. 日本人の食事摂取基準[2015 年版]. 第一出版 **2015**.
 87. 厚生労働省. 平成 26 年国民健康・栄養調査結果報告書. **2015**.

88. 吉村麻紀子. ケルセチン配糖体 (酵素処理イソクエルシトリン) 配合飲料の継続摂取による肥満者の体脂肪低減効果. *薬理と治療* **2012**, *40*, 901-914.
89. 高瀬秀人; 長尾知紀; 大塚和弘; 高妻和哉; 片岡潔; 目黒真一; 小御門雅典; 時光一郎. 高濃度茶カテキンの継続摂取による内臓脂肪低減およびメタボリックシンドロームに及ぼす影響. *薬理と治療* **2008**, *36*, 509-514.
90. Ma, Y.; Olendzki, B.C.; Li, W.; Hafner, A.R.; Chiriboga, D.; Hebert, J.R.; Campbell, M.; Sarnie, M.; Ockene, I.S. Seasonal variation in food intake, physical activity, and body weight in a predominantly overweight population. *European journal of clinical nutrition* **2006**, *60*, 519-528.
91. Obara, K.; Mizutani, M.; Hitomi, Y.; Yajima, H.; Kondo, K. Isohumulones, the bitter component of beer, improve hyperglycemia and decrease body fat in Japanese subjects with prediabetes. *Clinical Nutrition* **2009**, *28*, 278-284.
92. Morimoto-Kobayashi, Y.; Ohara, K.; Ashigai, H.; Kanaya, T.; Koizumi, K.; Manabe, F.; Kaneko, Y.; Taniguchi, Y.; Katayama, M.; Kowatari, Y. Matured hop extract reduces body fat in healthy overweight humans: a randomized, double-blind, placebo-controlled parallel group study. *Nutrition journal* **2015**, *15*, 25.
93. 小泉久美子. 熟成ホップエタノール抽出物の継続摂取による体脂肪低減効果—二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験—. *薬理と治療* **2016**, *44*, 1179-1192.
94. Cypess, A.M.; Lehman, S.; Williams, G.; Tal, I.; Rodman, D.; Goldfine, A.B.; Kuo, F.C.; Palmer, E.L.; Tseng, Y.-H.; Doria, A. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine* **2009**, *360*, 1509-1517.
95. Yoshino, S.; Kim, M.; Awa, R.; Kuwahara, H.; Kano, Y.; Kawada, T. Kaempferia parviflora extract increases energy consumption through activation of BAT in mice. *Food science & nutrition* **2014**, *2*, 634-637.
96. Matsushita, M.; Yoneshiro, T.; Aita, S.; Kamiya, T.; Kusaba, N.; Yamaguchi, K.; Takagaki, K.; Kameya, T.; Sugie, H.; Saito, M. Kaempferia parviflora extract increases whole-body energy expenditure in humans: roles of brown adipose tissue. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **2015**, *61*, 79-83.
97. Mathieu, P.; Pibarot, P.; Després, J.P. Metabolic syndrome: the danger signal in atherosclerosis. *Vascular health and risk management* **2006**, *2*, 285-302, doi:10.2147/vhrm.2006.2.3.285.
98. Kahn, B.B.; Flier, J.S. Obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical*

- investigation* **2000**, *106*, 473-481.
99. Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z. The metabolic syndrome. *The lancet* **2005**, *365*, 1415-1428.
 100. Imbeault, P.; Lemieux, S.; Prud'Homme, D.; Tremblay, A.; Nadeau, A.; Després, J.-P.; Mauriege, P. Relationship of visceral adipose tissue to metabolic risk factors for coronary heart disease: is there a contribution of subcutaneous fat cell hypertrophy? *Metabolism* **1999**, *48*, 355-362.
 101. Smith, S.R.; Lovejoy, J.C.; Greenway, F.; Ryan, D.; deJonge, L.; de la Bretonne, J.; Volafova, J.; Bray, G.A. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism-Clinical and Experimental* **2001**, *50*, 425-435.
 102. Fox, C.S.; Massaro, J.M.; Hoffmann, U.; Pou, K.M.; Maurovich-Horvat, P.; Liu, C.Y.; Vasan, R.S.; Murabito, J.M.; Meigs, J.B.; Cupples, L.A., et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **2007**, *116*, 39-48, doi:10.1161/circulationaha.106.675355.
 103. Fujiwara, D.; Wakabayashi, H.; Watanabe, H.; Nishida, S.; Iino, H. A double-blind trial of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 administration for immunomodulation in patients with pollen allergy. *Allergology International* **2005**, *54*, 143-149.
 104. Morita, Y.; Miwa, Y.; Jounai, K.; Fujiwara, D.; Kurihara, T.; Kanauchi, O. *Lactobacillus paracasei* KW3110 prevents blue light-induced inflammation and degeneration in the retina. *Nutrients* **2018**, *10*, 1991.
 105. Wu, M.-H.; Pan, T.-M.; Wu, Y.-J.; Chang, S.-J.; Chang, M.-S.; Hu, C.-Y. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A. 1 macrophages) and antimicrobial properties. *International journal of food microbiology* **2010**, *144*, 104-110.
 106. Zhang, X.; Wang, G.; Gurley, E.C.; Zhou, H. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS One* **2014**, *9*, e107072.
 107. Wanidworanun, C.; Strober, W. Predominant role of tumor necrosis factor- α in human monocyte IL-10 synthesis. *The Journal of Immunology* **1993**, *151*, 6853-6861.

108. Hart, P.; Brand, C.; Carson, C.; Riley, T.; Prager, R.; Finlay-Jones, J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research* **2000**, *49*, 619-626.
109. Morita, Y.; Jounai, K.; Miyake, M.; Inaba, M.; Kanauchi, O. Effect of heat-killed *Lactobacillus paracasei* KW3110 ingestion on ocular disorders caused by visual display terminal (VDT) loads: a randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group study. *Nutrients* **2018**, *10*, 1058.
110. Underhill, D.M.; Ozinsky, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology* **2002**, *20*, 825-852.
111. Hara, K.; Shirasuna, K.; Usui, F.; Karasawa, T.; Mizushima, Y.; Kimura, H.; Kawashima, A.; Ohkuchi, A.; Matsuyama, S.; Kimura, K. Interferon-tau attenuates uptake of nanoparticles and secretion of interleukin-1 β in macrophages. *PLoS One* **2014**, *9*, e113974.
112. Ledebor, A.; Brevé, J.J.; Poole, S.; Tilders, F.J.; Van Dam, A.M. Interleukin - 10, interleukin - 4, and transforming growth factor - β differentially regulate lipopolysaccharide - induced production of pro - inflammatory cytokines and nitric oxide in co - cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* **2000**, *30*, 134-142.
113. Ip, W.E.; Hoshi, N.; Shouval, D.S.; Snapper, S.; Medzhitov, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* **2017**, *356*, 513-519.
114. Plüddemann, A.; Mukhopadhyay, S.; Gordon, S. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Expert reviews in molecular medicine* **2006**, *8*, 1.
115. Underhill, D.M.; Goodridge, H.S. Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews Immunology* **2012**, *12*, 492-502.
116. Lamkanfi, M.; Dixit, V.M. The inflammasomes. *PLoS Pathog* **2009**, *5*, e1000510.
117. Gurung, P.; Li, B.; Malireddi, R.S.; Lamkanfi, M.; Geiger, T.L.; Kanneganti, T.-D. Chronic TLR stimulation controls NLRP3 inflammasome activation through IL-10 mediated regulation of NLRP3 expression and caspase-8 activation. *Scientific reports* **2015**, *5*, 1-10.
118. Yao, Y.; Vent-Schmidt, J.; McGeough, M.D.; Wong, M.; Hoffman, H.M.; Steiner, T.S.; Levings, M.K. Tr1 cells, but not Foxp3+ Regulatory T cells, suppress NLRP3

- inflammasome activation via an IL-10-dependent mechanism. *The Journal of Immunology* **2015**, *195*, 488-497.
119. Zhou, R.; Yazdi, A.S.; Menu, P.; Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **2011**, *469*, 221-225.
 120. Zhong, Z.; Liang, S.; Sanchez-Lopez, E.; He, F.; Shalapour, S.; Lin, X.-j.; Wong, J.; Ding, S.; Seki, E.; Schnabl, B. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **2018**, *560*, 198-203.
 121. Miller, A.H.; Raison, C.L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature reviews immunology* **2016**, *16*, 22.
 122. Miceli, M.V.; Jazwinski, S.M. Nuclear gene expression changes due to mitochondrial dysfunction in ARPE-19 cells: implications for age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **2005**, *46*, 1765-1773.
 123. 神代, 雅.; 三上, 行.; 長谷川, 徹. V D T 作業における眼精疲労と中枢性ストレスの検討. *産業医学* **1984**, *26*, 105-111, doi:10.1539/joh1959.26.105.
 124. 星野, 聖.; 渡辺, 瞭.; 斎藤, 正. 精神疲労推定のための瞳孔対光反応の解析. *テレビジョン学会誌* **1995**, *00049*, 657-664, doi:10.3169/itej1978.49.657.
 125. Geerlings, M.J.; de Jong, E.K.; den Hollander, A.I. The complement system in age-related macular degeneration: a review of rare genetic variants and implications for personalized treatment. *Molecular immunology* **2017**, *84*, 65-76.
 126. Kauppinen, A.; Paterno, J.J.; Blasiak, J.; Salminen, A.; Kaarniranta, K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2016**, *73*, 1765-1786.
 127. Dunn, K.; Aotaki-Keen, A.; Putkey, F.; Hjelmeland, L.M. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental eye research* **1996**, *62*, 155-170.
 128. Serrano, M.; Lin, A.W.; McCurrach, M.E.; Beach, D.; Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **1997**, *88*, 593-602.
 129. Johmura, Y.; Shimada, M.; Misaki, T.; Naiki-Ito, A.; Miyoshi, H.; Motoyama, N.; Ohtani, N.; Hara, E.; Nakamura, M.; Morita, A. Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Molecular cell* **2014**, *55*, 73-84.
 130. Campbell, M.; Humphries, P. The blood-retina barrier. In *Biology and Regulation of*

Blood-Tissue Barriers, Springer: 2013; pp. 70-84.

131. Suzuki, H.; Yamazaki, T.; Ohshio, K.; Sugamata, M.; Yoshikawa, M.; Kanauchi, O.; Morita, Y. A specific strain of lactic acid bacteria, *Lactobacillus paracasei*, inhibits inflammasome activation in vitro and prevents inflammation-related disorders. *The Journal of Immunology* **2020**, *205*, 811-821.
132. Narimatsu, T.; Negishi, K.; Miyake, S.; Hirasawa, M.; Osada, H.; Kurihara, T.; Tsubota, K.; Ozawa, Y. Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo. *Experimental Eye Research* **2015**, *132*, 48-51.
133. Kubota, S.; Kurihara, T.; Ebinuma, M.; Kubota, M.; Yuki, K.; Sasaki, M.; Noda, K.; Ozawa, Y.; Oike, Y.; Ishida, S. Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation. *The American journal of pathology* **2010**, *177*, 1725-1731.
134. Glotin, A.-L.; Debacq-Chainiaux, F.; Brossas, J.-Y.; Faussat, A.-M.; Tréton, J.; Zubielewicz, A.; Toussaint, O.; Mascarelli, F. Prematurely senescent ARPE-19 cells display features of age-related macular degeneration. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, *44*, 1348-1361.
135. Zhu, D.; Wu, J.; Spee, C.; Ryan, S.J.; Hinton, D.R. BMP4 mediates oxidative stress-induced retinal pigment epithelial cell senescence and is overexpressed in age-related macular degeneration. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 9529-9539.
136. Mishima, K.; Handa, J.T.; Aotaki-Keen, A.; Luttly, G.A.; Morse, L.S.; Hjelmeland, L.M. Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye. *Investigative ophthalmology & visual science* **1999**, *40*, 1590-1593.
137. Hirata, J.; Ko, J.-A.; Mochizuki, H.; Funaishi, K.; Yamane, K.; Sonoda, K.-H.; Kiuchi, Y. Oxidative stress regulates expression of claudin-1 in human RPE cells. *Open Life Sciences* **2014**, *9*, 461-468.
138. Abe, T.; Sugano, E.; Saigo, Y.; Tamai, M. Interleukin-1 β and barrier function of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): aberrant expression of junctional complex molecules. *Investigative ophthalmology & visual science* **2003**, *44*, 4097-4104.
139. Narayan, S.; Prasanna, G.; Krishnamoorthy, R.R.; Zhang, X.; Yorio, T. Endothelin-1 synthesis and secretion in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): differential regulation by cholinergics and TNF- α . *Investigative ophthalmology &*

- visual science* **2003**, *44*, 4885-4894.
140. Rizzolo, L.J.; Peng, S.; Luo, Y.; Xiao, W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Progress in retinal and eye research* **2011**, *30*, 296-323.
 141. Bergqvist, U. Possible health effects of working with VDUs. *Occupational and Environmental Medicine* **1989**, *46*, 217-221.
 142. Knave, B.G.; Wibom, R.I.; Voss, M.; Hedström, L.D.; Bergqvist, U.O. Work with video display terminals among office employees: I. Subjective symptoms and discomfort. *Scandinavian journal of work, environment & health* **1985**, 457-466.
 143. Eltayeb, S.; Staal, J.B.; Hassan, A.; De Bie, R.A. Work related risk factors for neck, shoulder and arms complaints: a cohort study among Dutch computer office workers. *Journal of occupational rehabilitation* **2009**, *19*, 315.
 144. Parihar, J.; Jain, V.K.; Chaturvedi, P.; Kaushik, J.; Jain, G.; Parihar, A.K. Computer and visual display terminals (VDT) vision syndrome (CVDTS). *medical journal armed forces india* **2016**, *72*, 270-276.
 145. 厚生労働省. 平成 20 年 技術革新と労働に関する実態調査. **2008**.
 146. Aronsson, G.; Strömberg, A. Work content and eye discomfort in VDT work. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics* **1995**, *1*, 1-13.
 147. Murata, K.; Araki, S.; Kawakami, N.; Saito, Y.; Hino, E. Central nervous system effects and visual fatigue in VDT workers. *International archives of occupational and environmental health* **1991**, *63*, 109-113.
 148. MURATA, K.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; YAMASHITA, K.; OKUMATSU, T.; SAKOU, S. Accumulation of VDT work-related visual fatigue assessed by visual evoked potential, near point distance and critical flicker fusion. *Industrial health* **1996**, *34*, 61-69.
 149. Goto, E.; Yagi, Y.; Matsumoto, Y.; Tsubota, K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *American journal of ophthalmology* **2002**, *133*, 181-186.
 150. Uchino, M.; Schaumberg, D.A.; Dogru, M.; Uchino, Y.; Fukagawa, K.; Shimmura, S.; Satoh, T.; Takebayashi, T.; Tsubota, K. Prevalence of dry eye disease among Japanese visual display terminal users. *Ophthalmology* **2008**, *115*, 1982-1988.
 151. Thomson, W.D. Eye problems and visual display terminals—the facts and the fallacies. *Ophthalmic and physiological optics* **1998**, *18*, 111-119.

152. Ye, Z.; Abe, Y.; Kusano, Y.; Takamura, N.; Eida, K.; Takemoto, T.-i.; Aoyagi, K. The influence of visual display terminal use on the physical and mental conditions of administrative staff in Japan. *Journal of physiological anthropology* **2007**, *26*, 69-73.
153. Friedman, N.J. Impact of dry eye disease and treatment on quality of life. *Current opinion in ophthalmology* **2010**, *21*, 310-316.
154. 外岡豊彦. 内田クレペリン精神検査・基礎テキスト. 日本・精神技術研究所 **1973**, 1-16.
155. Kogi, K.; Kawamura, H. On the variation of flicker fusion frequencies of the visual pathway with special reference to the activating system of the brain. *J Sci Labour* **1960**, *36*, 459-473.
156. Nishimura, T.; Morimoto, K. Measurement method and condition of CFF as a reflection of psychic fatigue-relating to prolonged VDT work. *The Japanese Journal of Ergonomics* **1986**, *22*, 203-210.
157. 岩崎常人. 眼精疲労の測定方法と評価 CFF と AA-1. *眼科* **2009**, *51*, 387-395.
158. 和雄, 向.; 義章, 市.; 規子, 小.; 直人, 原. 眼科検査の理論と実技 調節・輻湊検査. *臨床眼科* **2017**, *71*, 79-84.
159. McCormack, H.M.; David, J.d.L.; Sheather, S. Clinical applications of visual analogue scales: a critical review. *Psychological medicine* **1988**, *18*, 1007-1019.
160. 日本疲労学会. 抗疲労臨床評価ガイドライン第5版. 日本疲労学会 **2011**.
161. Sugimoto, K.; Kanai, A.; Shoji, N. The effectiveness of the Uchida-Kraepelin test for psychological stress: an analysis of plasma and salivary stress substances. *BioPsychoSocial Medicine* **2009**, *3*, 5.
162. 井藤, 麻.; 中村, 友.; 吉田, 陽. 眼精疲労の診断・治療におけるトライイリスの有用性. *日本視能訓練士協会誌* **2007**, *36*, 73-80, doi:10.4263/jorthoptic.36.73.
163. 荻阪, 直. VDT の表示色, 視野, および明暗順応と眼精疲労の関係について. *人間工学* **1985**, *21*, 89-95, doi:10.5100/jje.21.89.
164. 労働基準調査会. 新装 産業疲労ハンドブック. 日本産業衛生学会・産業疲労研究会編集委員会. **1995**.
165. 塚田, 貴. 若年者向け累進屈折力レンズの調節微動による眼疲労の評価. *日本視能訓練士協会誌* **2016**, *45*, 25-37, doi:10.4263/jorthoptic.045F101.
166. 梶田, 雅.; 高橋, 奈.; 高橋, 文. 調節負荷とドライアイ : 関係の可能性について. *視覚の科学 = Japanese journal of visual science* **2004**, *25*, 40-45.
167. 藤原, 篤.; 田淵, 昭.; 藤原, 睦.; 守田, 真. TriIRIS C9000 における正常値の検討. *日本*

- 視能訓練士協会誌 **2007**, *36*, 67-72, doi:10.4263/jorthoptic.36.67.
168. 石川均. 見落としがちな近見反応とその異常. *臨床眼科* **2010**, *64*, 1670-1674.
169. 浅川, 賢.; 石川, 均. 調節力障害と眼精疲労 (特集 眼精疲労を科学する). *眼科* **2009**, *51*, 409-413.
170. Provine, R.R.; Cabrera, M.O.; Nave-Blodgett, J. Binocular symmetry/asymmetry of scleral redness as a cue for sadness, healthiness, and attractiveness in humans. *Evolutionary Psychology* **2013**, *11*, 147470491301100411.
171. 須永眞司. 白血球数と白血球分画. *臨床検査* **2015**, *59*, 166-172.
172. Gu, F.; Liu, X.; Liang, J.; Chen, J.; Chen, F.; Li, F. Bitter taste receptor mTas2r105 is expressed in small intestinal villus and crypts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *463*, 934-941, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.038>.

〈謝辞〉

本論文を執筆するにあたり、ご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 三坂巧准教授に深く感謝いたします。

MHBA の研究において、消化管ホルモンを介したエネルギー消費促進の作用機序解明にあたり、多大なるご助言、ご協力をいただいた九州大学大学院医学研究院病態制御内科学分野（第三内科） 小川佳宏教授に深く感謝いたします。また、MHBA を認識する苦味受容体の同定にあたり、苦味受容体プラスミドをご提供くださいました京都女子大学家政学部 成川真隆准教授、多大なるご協力をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命科学専攻生物機能開発化学研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後に、筆者に研究の機会を与えて下さいました麒麟ホールディングス株式会社 近藤恵二 R&D 本部副本部長、小川俊也健康技術研究所所長（当時）、出内桂二麒麟中央研究所所長、形山幹生主任研究員、森田悠治博士に深く御礼申し上げます。そして、本研究の遂行にあたり多大なるご助言、ご協力をいただいた麒麟ホールディングス株式会社麒麟中央研究所の皆様に深く感謝いたします。

〈要旨〉

序論

近年、数多くの食品由来成分に生体調節機能が存在することが報告され、それらを含む機能性食品が多数上市されている。従来から存在する特定保健用食品制度に加えて、2015 年 4 月より販売事業者の責任のもと食品の機能性を表示できる「機能性表示食品制度」が施行されたことも契機となり、機能性食品に対する科学的な関心がますます高まってきた。

このような背景のもと、新規機能性成分に関して作用機序の科学的根拠を明らかにするとともに、ヒトでの有効性を検証する一貫した基礎研究が産業利用の観点から重要になってきた。本研究では、ビールの主要な原料であり様々な健康機能性が知られているホップ (*Humulus lupulus* L.) 由来の苦味成分、および免疫システム向上機能などが知られておりプロバイオティクスの観点からも注目されている乳酸菌に着目し、両者の新規機能性に関する作用機序の解明ならびにヒトでの有効性の検証を実施した。

第 1 章 ホップ由来苦味成分による脂肪減少効果

第 1 節 消化管ホルモンを介したエネルギー消費促進の作用機序

ホップ中の苦味酸である α 酸、 β 酸はビールの貯蔵過程で酸化され、熟成ホップ由来苦味酸 (matured hop bitter acids; MHBA) と総称される多様な苦味酸酸化物群が生成される。近年、ラットへの MHBA 経口投与によりエネルギー消費促進機能を有する褐色脂肪組織 (brown adipose tissue; BAT) が交感神経を介して活性化され、熱産生が誘導されることが報告された。しかし MHBA がどのように交感神経に作用しうるか、という詳細な分子機序は不明であった。

そこで本研究では消化管内分泌細胞から産生される消化管ホルモンに着目した。消化管内分泌細胞に MHBA を投与すると、濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および消化管ホルモンであるコレシストキニン (CCK) の産生誘導が認められた。一方、これらの作用は培地中 Ca^{2+} の除去や L 型電位依存性カルシウムチャネル阻害剤の添加で消失した。また MHBA 投与による CCK 産生誘導はラット小腸でも確認されるとともに、ラットへの MHBA 経口投与により BAT に接続する交感神経活動の活性化および BAT の温度上昇が認められた。一方、これらの作用は CCK1 受容体阻害剤の投与によって阻害された。さらに、ラットへの CCK の腹腔内投与により BAT に接続する交感神経活動の上昇が認められ、その作用は迷走神経切離によって阻害された。

以上より、MHBA は消化管での CCK 産生を誘導し、CCK1 受容体および迷走神経を

介してBATに接続する交感神経活動を上昇させることが示唆された。これらの発見は、食品素材の抗肥満効果に関する新たな分子機序を見出したものと考えられる。

第2節 消化管細胞における苦味受容体を介した消化管ホルモン分泌誘導作用機序

MHBAは消化管でのCCK産生を誘導し、自律神経を活性化する腸脳相関機序によりBATでの熱産生を誘導することが示唆されたが、MHBAが消化管細胞にどのように認識されるかについては不明であった。MHBAはホップ苦味成分に由来するため、本研究では消化管内分泌細胞で発現する苦味受容体に着目した。

25種のヒト苦味受容体(TAS2Rs)をそれぞれ発現させたHEK293T細胞にMHBAを投与した結果、TAS2R1、TAS2R8およびTAS2R10発現細胞で受容体活性化が認められた。これらの受容体に対してそれぞれ系統的に高度に保存されたマウス苦味受容体であるTas2r119、Tas2r130、およびTas2r105を発現させた細胞でも、MHBA投与に対する活性化が認められた。またヒトおよびマウス消化管内分泌細胞に対して、これらの苦味受容体に対するsiRNAにより遺伝子発現抑制を行った結果、MHBA投与による細胞内Ca²⁺濃度上昇およびCCK産生誘導が抑制された。さらに、味覚受容体シグナル伝達に必須なイオンチャネルであるTRPM5を阻害した結果、MHBA投与による細胞内Ca²⁺濃度上昇およびCCK産生誘導が抑制された。

以上より、MHBAは消化管細胞の特定の苦味受容体によって認識され、細胞内Ca²⁺応答およびCCK産生を誘導することが示唆された。

第3節 健常人におけるMHBAの脂肪減少効果の検証

近年、高脂肪食負荷マウスへの継続的なMHBA経口投与が脂肪蓄積抑制を示すことが報告されてきたが、ヒトに対する有効性に関しては不明であった。本研究では、MHBAを含む熟成ホップエキスのヒトに対する有効性の検証を目的とし、BMIが25 kg/m²以上30 kg/m²未満の健常な男女(20歳以上65歳以下)を対象としたランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法による臨床試験を実施した。

132名の被験者をランダムに3群に分け、35 mgもしくは11.7 mgのMHBAを含む熟成ホップエキス含有飲料もしくはプラセボ飲料を、12週間にわたって毎日摂取させた。その結果、腹部内臓脂肪面積の摂取開始後0週を起点とした変化量について、35 mg MHBAを含む熟成ホップエキス含有飲料摂取群においてプラセボ群と比較して有意な低値が認められた。

以上より、35 mg MHBAを含む熟成ホップエキス含有飲料は内臓脂肪減少効果がある

ことが示され、MHBA はヒトでも脂肪減少効果を示すことが明らかになった。

第2章 乳酸菌による目の疲労感軽減効果

第1節 抗炎症性サイトカインを介した炎症抑制の作用機序

チーズなどの製造で使用されてきた乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* KW3110 (KW3110 乳酸菌) は抗炎症性 M2 マクロファージを活性化し、加齢に伴う慢性炎症状態を抑制することなどが報告されている。しかし、KW3110 乳酸菌に関する炎症抑制作用機序は不明な点が多い。そこで本研究では、マウスおよびヒト免疫細胞を用い、リポ多糖および ATP (LPS/ATP) を使用した炎症性刺激による細胞炎症応答に対する KW3110 乳酸菌の抑制効果を検証した。

マウス由来マクロファージへの KW3110 乳酸菌添加は、他の乳酸菌株添加よりも抗炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -10 産生を増加させ、LPS/ATP 刺激による炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を抑制した。一方、これらの作用はマクロファージ食食阻害剤の添加や siRNA による IL-10 シグナル因子の発現抑制により阻害された。また KW3110 乳酸菌添加によって、LPS/ATP 刺激によるインフラマソーム活性本体 caspase-1 の活性化が抑制され、その作用は siRNA による IL-10 シグナル因子の発現抑制により阻害された。さらに、ヒト由来単球細胞への KW3110 乳酸菌添加は IL-10 産生を誘導した他、KW3110 乳酸菌あるいは IL-10 の添加によって LPS/ATP 刺激による caspase-1 活性化および IL-1 β 産生誘導が抑制された。

以上より、KW3110 乳酸菌はマウスおよびヒト免疫細胞において、IL-10 産生誘導を介して炎症性刺激による caspase-1 活性化および IL-1 β 産生誘導を抑制することが示唆された。これらの発見は乳酸菌の新たな炎症抑制機序の一端を示すものであり、食品素材を用いた炎症関連疾患に対する予防法への貢献が期待される。

第2節 炎症性刺激による網膜色素上皮細胞老化に対する抑制作用機序

KW3110 乳酸菌は、ブルーライト照射による網膜色素上皮細胞の損傷を抑制し、網膜での炎症を抑制する作用も報告されている。そこで本研究では、慢性的な炎症性刺激で網膜色素上皮細胞が受けるストレスを KW3110 乳酸菌が抑制するかについて、マクロファージおよび網膜色素上皮細胞を用いて検証した。

LPS/ATP 刺激をしたマクロファージ培養上清を網膜色素上皮細胞に添加して 24 時間または 48 時間培養した結果、細胞増殖抑制や肥大扁平化、細胞周期停止、およびサイトカイン発現上昇といった細胞老化に関連する表現型や、タイトジャンクション因子

claudin-1 の発現上昇が認められた。一方、LPS/ATP に加えて KW3110 乳酸菌を添加したマクロファージ培養上清を網膜色素上皮細胞に添加した結果、細胞老化関連表現型の発現や claudin-1 の発現上昇のいずれも抑制されることが確認された。

以上より、KW3110 乳酸菌は網膜色素上皮細胞に対して、慢性的な炎症性刺激による細胞老化やタイトジャンクション因子の発現変動を抑制することが示唆された。

第3節 KW3110 乳酸菌摂取による健常人における日常的な目の疲労感軽減効果

KW3110 乳酸菌は慢性的な炎症性刺激による網膜色素上皮細胞へのストレス抑制作用を持つことが示されてきた。網膜色素上皮細胞へのストレスは目の疲労感を引き起こすと考えられているため、本研究では KW3110 乳酸菌のヒトでの有効性評価を目的として、日常的に目の疲れを感じている健常な男女（35 歳以上 50 歳未満）を対象としたランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較法による臨床試験を実施した。

88 名の被験者をランダムに 2 群に分け、KW3110 乳酸菌を含むサプリメントもしくはプラセボサプリメントを 8 週間にわたって毎日摂取させた。その結果、目の疲労感の指標である critical flicker frequency (CFF) の摂取開始後 0 週を起点とした変化量について、摂取開始後 4 週および 8 週時点で KW3110 乳酸菌摂取群においてプラセボ群と比較して有意な高値が認められた。

以上より、KW3110 乳酸菌は日常的に目の疲れを感じているヒトの目の疲労感軽減効果があることが示され、網膜への慢性的なストレスに起因する目の不調や疾患予防への貢献が強く期待される。

まとめ

食品の機能性に対する科学的な関心が高まる中、食品由来成分の機能性に関する科学的根拠の蓄積は急務である。本研究ではホップ由来苦味成分 MHBA、および KW3110 乳酸菌に注目し、両者について新たな知見を得ることに成功した。

MHBA は、消化管内分泌細胞の特定の苦味受容体によって認識された後、CCK 産生誘導および自律神経活性化を介した腸脳相関機序により BAT での熱産生を促進し、脂肪減少効果を発揮する可能性が明らかになった。一方、KW3110 乳酸菌は、マクロファージでの IL-10 産生誘導を介した炎症抑制作用により、慢性的な炎症性刺激による網膜色素上皮細胞へのストレスを抑制し、日常的な目の疲労感軽減効果を発揮する可能性が明らかになった。

近年これらの知見を活用し、脂肪減少効果を表示した MHBA 含有ノンアルコールビ

ール、ならびに目の疲労感軽減効果を表示した KW3110 乳酸菌含有サプリメントが機能性表示食品として上市されるに至った。今後、本研究で得られた知見がさらに活用され、食を通じて人々の健康維持に貢献することが強く望まれる。

以上