

博士論文

サラシア属植物エキス粉末の安全性確認と  
免疫機能に対する作用の解明

小田 由里子



# 目次

第 1 章	序論	1
1.1.	はじめに	2
1.2.	サラシア属植物について	3
1.3.	サラシアの既往研究について	4
1.4.	本研究の目的	5
第 2 章	サラシアエキス粉末の安全性評価（亜慢性毒性試験）	13
2.1.	背景および目的	14
2.2.	方法	15
2.2.1.	サラシアエキス粉末（被験食）	15
2.2.2.	動物	18
2.2.3.	投与量	19
2.2.4.	臨床所見	19
2.2.5.	血液検査および尿検査	20
2.2.6.	病理解剖学的検査並びに病理組織学的検査	21
2.2.7.	統計学的解析	22
2.3.	結果	22
2.3.1.	臨床所見	23
2.3.2.	体重	23
2.3.3.	摂餌量および摂水量	24
2.3.4.	血液検査および尿検査	24
2.3.5.	病理解剖学的検査並びに病理組織学的検査	25
2.4.	考察	26
2.5.	結論	27

第 3 章	ラット小腸粘膜におけるサラシアエキス粉末の作用解明と腸内細菌叢変化	45
3.1.	背景および目的	46
3.2.	方法	47
3.2.1.	動物	47
3.2.2.	投与量	48
3.2.3.	試験デザイン	48
3.2.4.	各種検査（血液検査、病理解剖学的検査、病理組織学的検査）	49
3.2.5.	RNA 抽出および遺伝子発現解析（DNA マイクロアレイ）	51
3.2.6.	腸内細菌叢解析（T-RFLP 法）	52
3.3.	結果	53
3.3.1.	体重	53
3.3.2.	各種検査（血液検査、病理解剖学的検査、病理組織学的検査）	53
3.3.3.	遺伝子発現解析	53
3.3.4.	腸内細菌叢解析	56
3.4.	考察	57
3.5.	結論	59
第 4 章	健常成人を対象にした二重盲検並行群間比較試験によるサラシアエキス粉末のヒト免疫機能に対する作用検証	71
4.1.	背景および目的	72
4.2.	方法	73
4.2.1.	研究デザイン	73
4.2.2.	被験食	74

4.2.3. 被験者 .....	74
4.2.4. 採血 .....	75
4.2.5. RNA 抽出および遺伝子発現解析 (DNA マイクロアレイ) ..	76
4.2.6. 免疫学的指標 .....	77
4.2.7. 腸内細菌叢解析 (T-RFLP 法) .....	79
4.2.8. 統計解析 .....	79
4.3. 結果 .....	80
4.3.1. 遺伝子発現解析 .....	81
4.3.2. 免疫学的指標 .....	83
4.3.3. 腸内細菌叢解析 .....	84
4.4. 考察 .....	86
4.5. 結論 .....	88
第 5 章 総合討論 .....	101
5.1. 研究総括 .....	102
5.2. 本研究の評価手法について .....	105
5.3. サラシアエキス粉末の作用について .....	108
5.4. 今後の展望 .....	116
【引用文献】 .....	119
【要旨】 .....	135
【謝辞】 .....	141

## 略語リスト

サラシア	サラシア属植物
サラシアエキス粉末	サラシア属植物エキス粉末（本研究では <i>Salacia reticulata</i> エキス粉末を使用した）
SGLT1	Sodium-dependent glucose cotransporters 1、 Sodium-glucose linked transporter 1
GLUT2	Glucose transporter type 2
GLUT5	Glucose transporter type 5
T-RFLP 法	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis（Nagashima 法）
FDR	False Discovery Rate
GO	Gene Ontology
OTU	Operational taxonomic unit
IL	Interleukin
IFN	Interferon
TNF	Tumor necrosis factor
FMT	Fecal Microbiota Transplantation （便微生物叢移植）
Th1 細胞	1 型ヘルパー T 細胞（T helper 1 cell、 細胞性免疫に関与）
Th2 細胞	2 型ヘルパー T 細胞（T helper 2 cell、 液性免疫に関与）
Th17 細胞	17 型ヘルパー T 細胞（T helper 17 cell）
Treg 細胞	制御性 T 細胞（regulatory T cell）

# 第 1 章

## 序論

### 1.1. はじめに

ヒトは有史以来、様々な工夫を積み重ねることにより技術を発展させ、生活の質の向上を目指してきた。医療技術の進歩による疾病罹患率・傷害死亡リスク低減や、栽培・養殖・畜産・保存等の技術開発による食材の安定供給および飢餓のリスク低下、産業の発展による安全性・快適性の改善などにより、長寿社会が現実のものとなった。しかし、その結果、大気汚染や紫外線、睡眠不足、人間関係の悩み等、多くのストレスに曝されることになり、ホメオスタシス（生体恒常性）が乱れ、生活習慣病やアレルギー、がんなど、食習慣や生活環境の変化に起因するとされる疾病に罹患することとなった。

これらの疾患に対応するために様々な薬が開発され、患者に使用されているが、そのために深刻になってきたのが医療費の増加である。厚生労働省が発表した『平成 26 年度 国民医療費の概況』によれば、2014 年の国民医療費は 40 兆 8,071 億円となっている<sup>1)</sup>。約 30 年前の 1985 年の 16 兆 0,159 億円に対し 2 倍以上であり、前年と比較しても 1.9%増加している。この医療費の増大を食い止めるべく注目されているのが、食品摂取を通じて健康維持および疾病予防を行う『機能性食品』である。『機能性食品』という概念は世界に先駆けて日本で提唱され、以降、日本において積極的に研究が進められてきた。

本研究においては、機能性食品素材の中から、糖吸収や血糖値上昇を抑える作用を有するサラシア属植物（以下、サラシア）を対象とした。サラシアは、日本で機能解明や有効成分同定などの研究が行われてきた食品素材であり、市場に流通しているサラシア製品の多くは、サラシアの原木から有効成分を抽出し粉末化したエキスパウダー（以下、サラシアエキスパウダー）を用いている。サラシアエキスパウダーの有効成分は、 $\alpha$ -グルコシダーゼ ( $\alpha$ -glucosidase) の作用を阻害することが明らかになっているが、糖の吸収抑制に関する研究

のみが先行し、その他の機能に関する検討はあまり行われていない。しかし、複雑に制御・維持されている生体において、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害により引き起こされる作用は、血糖値の上昇抑制だけではないのではないかと考えた。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害以外のサラシアエキス粉末の機能についても明らかにしたいと考えた。

そこで、本研究においては、糖の吸収抑制にとどまらないサラシアエキス粉末（*Salacia reticulata* エキス粉末）の新規機能を解明することを目的とした。サラシアエキス粉末の有効成分の作用部位である消化管、特に小腸におけるサラシアエキス粉末の作用を解明するとともに、亜慢性毒性試験によりサラシアエキス粉末の安全性確認を行った。さらに、ヒト摂取試験を実施し、サラシアエキス粉末のヒトにおける作用を検証した。

## 1.2. サラシア属植物について

サラシアは、デチンムル科のつる性の多年生木本の俗称である。インドやスリランカ、タイなどの東南アジアをはじめとする広い地域に自生しており、*Salacia reticulata*、*Salacia oblonga*、*Salacia chinensis* など複数の種類が存在することが知られている。

サラシアは、アーユルヴェーダの薬用植物として長く用いられてきた歴史がある。伝承によると、インドやスリランカ等の東南アジアの王侯貴族は、サラシアの木をくりぬいた容器（コップ）に水を入れ、サラシアの木から染み出してきたエキスを飲むことにより、糖尿病や肥満などの予防に用いていた、とされている<sup>2</sup>。

### 1.3. サラシアの既往研究について

サラシアは古来より糖尿病や肥満の予防に使われてきたという実績はあったが、どの成分が、いかにして作用するか、ということは不明であった。吉川、村岡らはサラシアエキスの分画を行い、主要有効成分であるサラシノール（Salacinol）、コタラノール（Kotalanol）、ネオサラシノール（Neosalacinol）、ネオコタラノール（Neokotalanol）の4種のチオ糖を分離し、構造決定した<sup>3-6</sup> [Fig. 1-1]。これらのチオ糖は、現時点でサラシア以外の植物からは見つかっていない。

明らかになっているサラシアエキス粉末の作用メカニズムを記す。食品として摂取された炭水化物や糖類は、唾液や膵液中に分泌されるアミラーゼにより、二糖やオリゴ糖に分解される。二糖やオリゴ糖は小腸上皮に発現する $\alpha$ -グルコシダーゼ（マルターゼ、スクラーゼ、イソマルターゼ等）により単糖に分解され、体内に吸収される [Fig. 1-2]。サラシアエキス粉末に含まれるサラシノール等のチオ糖は、 $\alpha$ -グルコシダーゼに結合し、酵素の作用を拮抗阻害することにより、消化管における二糖やオリゴ糖の分解および糖の吸収を抑制する<sup>3-7</sup>。

これまでの研究から、アーユルヴェーダで伝承されてきたサラシアの糖尿病予防作用は、サラシアエキス粉末に含まれるチオ糖が $\alpha$ -グルコシダーゼの作用を阻害するためであることが明らかになった。サラシアエキス粉末に含まれるチオ糖の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性（スクラーゼ、マルターゼ）は、サラシアエキス粉末と同様に糖吸収抑制作用を示し、糖尿病の治療薬として用いられているアカルボース（Acarbose）やボグリボース（Voglibose）等の医薬品に匹敵する<sup>8-10</sup> [Fig. 1-3]。また、サラシアエキス粉末に含まれるチオ糖は、スクラーゼ、マルターゼだけでなく、イソマルターゼに対しても阻害活性を有しているため、上記医薬品と比較して、同程度もしくはよ

り多くの種類の糖の吸収を抑制可能であると考えられる<sup>3, 11-14</sup>。

サラシアエキス粉末にはチオ糖に加えて、マンジフェリン（マンゴーの果皮に多く含まれる成分であり、サラシノールの100分の1程度の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有する。Mangiferin）やカテキン類などのポリフェノールが含まれていることが明らかにされている<sup>15, 16</sup>。Table 1-1 に本研究で使用了サラシアエキス粉末の成分分析結果を示す。

また、糖尿病予防とともに伝承されてきた肥満予防作用に関しても研究が行われており、サラシアエキス粉末のヒト摂取試験において、BMI (Body Mass Index) の低下など肥満軽減作用を有していることが確認されている<sup>8, 17-19</sup>。

#### 1.4. 本研究の目的

1.3. で示した既往研究は、近年増加している生活習慣病に対するサラシアエキス粉末の有効性を示すものであり、その作用メカニズムは糖吸収抑制作用によるものと考えられている。しかし、サラシアエキス粉末にはポリフェノールも含まれており、必ずしも糖の吸収抑制だけがサラシアエキス粉末の作用ではないのではないかと考えた。さらに、サラシアエキス粉末に含まれるチオ糖により分解・吸収を抑制され、消化管内に残された糖（オリゴ糖）に着目した研究はない。オリゴ糖は腸内環境改善作用が示されているため、サラシアエキス粉末は、間接的に腸内環境・腸内細菌に作用するのではないかと考えた。実際、サラシアエキス粉末を摂取することにより、腹部症状を呈することも報告されており、消化管に対する作用を詳細に調べる必要があると考えた<sup>20</sup>。

そこで、本研究においては、消化管に対する作用を中心に、糖の吸収抑制

にとどまらないサラシアエキス粉末の新規機能を解明することを目的とした。また考察では、他の食品や医薬品とサラシアエキス粉末の腸内細菌に対する作用の違いについても比較を行うこととした。比較対象としては、オリゴ糖に加え、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* などの菌体、食物繊維など腸内環境に作用する食品と、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有する医薬品を選択した<sup>21-25</sup>。

本研究の評価系について記載する。本研究においては、ラットまたはマウスを用いて、サラシアエキス粉末の消化管に対する作用を確認し、その後、ヒトでの効果検証を行いたいと考えた。このような機能性の研究を行う際は、疾患を発症するモデル動物を用いる場合が多いが、サラシアエキス粉末の作用は、糖の吸収抑制以外はほとんど未知であったため、特定のモデル動物を選択することができなかった。そこで、健常な動物（ラット）を対象としたのだが、健常な動物に食品であるサラシアエキス粉末を投与したのでは、表現型が出にくいのではないかと考えた。この問題を解決するため、表現型が現れる前の変化を網羅的に検出することができ、かつ動物とヒトの結果を比較可能な手法である、遺伝子発現解析（DNA マイクロアレイ）を中心に作用の検証を行うこととした。ラットでの遺伝子発現解析部位は、 $\alpha$ -グルコシダーゼが発現しており、サラシアエキス粉末に含まれるチオ糖の作用部位である小腸を対象とした。また、吸収抑制された糖が腸内環境に作用する可能性も考慮し、DNA マイクロアレイと同時に腸内細菌叢の解析を行うこととした。

次に、対象とした素材であるが、1.2.で示した通りサラシアエキス粉末といっても、基原植物は複数種ある。食品研究において、安全性の担保は非常に重要であるため、日本で最も流通しており、喫食実績等から安全性が高いと考えられた *Salacia reticulata* のエキス粉末を選択した。さらに文献調査

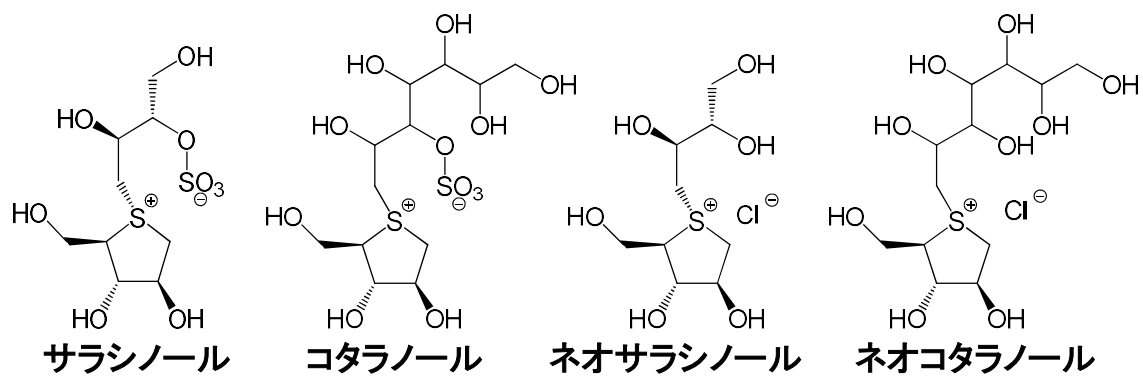
を行い、サラシアエキス粉末の安全性情報を収集した。不足分は独自に試験を実施し、安全性を確認した上で機能性の研究を行うこととした。

最後に本論文の構成について記載する。上記の文献調査の結果、サラシアエキス粉末の長期摂取による安全性を検証した既往研究がなかったため、まず第 2 章においてサラシアエキス粉末の亜慢性毒性試験を行うこととした。第 3 章では、 $\alpha$ -グルコシダーゼが発現している小腸の一部で、吸収、異物の排除などにおいて重要な役割を果たす回腸（回腸粘膜）の遺伝子発現解析と糞便の腸内細菌叢解析を行い、サラシアエキス粉末の消化管における作用を解明することとした。第 4 章では、第 3 章の結果を参考に、サラシアエキス粉末のヒト免疫機能に対する作用の検証を行った。第 5 章では、得られた結果に基づいて総合討論を行った。評価方法の妥当性とサラシアエキス粉末の作用（機能性およびメカニズム）について考察し、今後の展望を記載した。

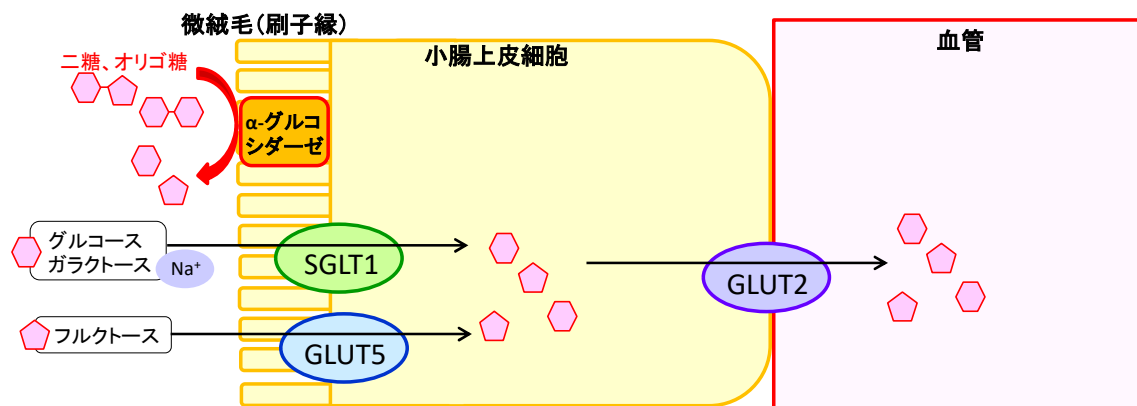
【表および図】

Table 1-1. Components of *Salacia reticulata* extract powder.

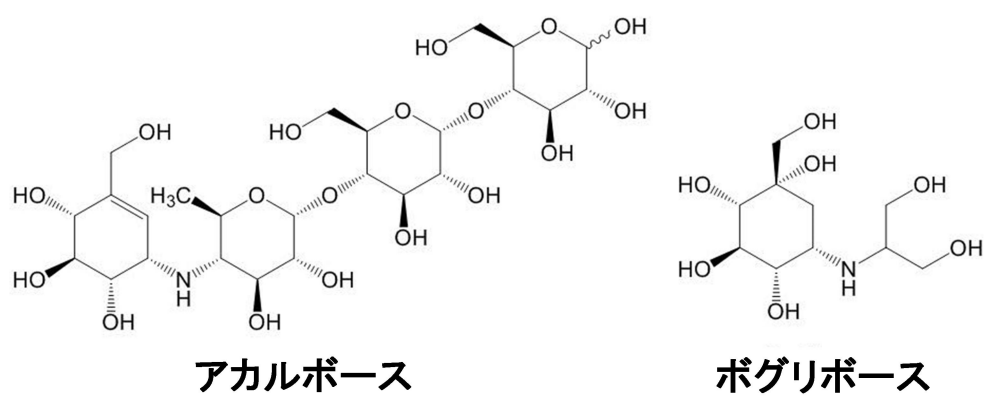
成分	含量〔重量%〕
炭水化物	60.9
ポリフェノール	17.4
灰分	14.7
水分	3.7
タンパク質	2.6
脂質	0.7
【少量成分】	
サラシノール	0.417
(コタラノール)	0.226
マンジフェリン	1.3
エピカテキン	0.011
エピカテキンガラート	検出されず
エピガロカテキン	0.051
エピガロカテキンガラート	検出されず



**Fig. 1-1.**  $\alpha$  - Glucosidase inhibitors derived from *Salacia*.



**Fig. 1-2.** Digestion and absorption of carbohydrates.



**Fig. 1-3.**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors.



## 第 2 章

### サラシアエキス粉末の安全性評価 (亜慢性毒性試験)

## 2.1. 背景および目的

サラシアはアーユルヴェーダの薬用植物として長く用いられてきた。その使用法は、コップのようなサラシアの器に水を入れ、抽出されてきた有効成分を飲用する、というものであり、低濃度のエキスの喫食実績はあるといえる。しかし、本研究で使用したサラシアエキス粉末は、サラシアの原木をチップ化して表面積を増やした上に、有効成分を熱水抽出しているため、古くから使用されてきたエキスと比較してエキス中のチオ糖等の濃度が高まっていると考えた。さらに、エキスを濃縮して粉末にする際に、賦形剤としてデキストリン等を配合する場合もあるが、本研究で用いたサラシアエキス粉末は賦形剤を使用せずに粉末化を行ったため、サラシノール等の成分濃度がより高くなり、生体に対する作用強化が期待される一方で、毒性物質が含まれていた場合、重篤な副作用をもたらす可能性も考えられた。本研究で対象とした *Salacia reticulata* は、サラシアエキス粉末として、日本で最も市場に流通しているものであり、これまでの喫食実績や安全性試験結果から安全性は高いと考えられたが、疾病予防食品として長期摂取を行う可能性も考慮し、より厳密な安全性確認が必要であると考えた。

そこで、まずサラシアエキス粉末の安全性に関する文献情報を調査した。その結果、急性毒性、変異原性や肝毒性に関する試験など、様々な安全性データが確認できた<sup>26-31</sup>。*Salacia reticulata* を熱水抽出したエキス粉末の既往研究としては、急性毒性、染色体異常、変異原性、抗原性、光毒性の試験がなされていたが、長期摂取を想定した安全性試験に関する研究報告はなかった。そこで、サラシアエキス粉末（*Salacia reticulata* のエキス粉末）の長期投与による安全性を評価することを目的に、0 mg/kg body weight/day(対照群)、10 mg/kg body weight/day、65 mg/kg body weight/day、400 mg/kg body weight/day のサラシアエキス粉末の 91 日間投与による亜慢性毒性試験を実

施した。用量は、最大投与量をヒト摂取量の 100 倍となるように設定した。

## 2.2. 方法

動物試験は、富士フイルム動物実験委員会の審査、承認を得て行った。『新規化学物質等に係る試験の方法について』（2003 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号、2003 年 11 月 13 日製局第 2 号、環保企発第 031121002 号）に定める『ほ乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験』および『OECD 408 Guidelines』に定める『Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity-Study in Rodents』（Test No.408, 21st September 1998）を参照して試験を行った。本試験は『医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令』（医薬品 GLP）には準拠しなかったが、『申請資料の信頼性の基準』（薬事法施行規則第 43 条）に従って実施した。

### 2.2.1. サラシアエキス粉末（被験食）

#### 2.2.1.1. サラシアエキス粉末の作製方法

本研究においては *Salacia reticulata* の幹と根から有効成分を熱水抽出して、乾燥固化したエキス粉末を試験に用いた（第 2～4 章共通のサンプルを使用した）。本試験に用いた *Salacia reticulata* は、Eco Tech Create 21 Co., Ltd.（Sri Lanka）によってスリランカで収穫されたものを、Eco Tech Create 21 Co., Ltd.（Japan）より購入した。スリランカの Industrial Technology Institute において、TLC フィンガープリント法を用いて植物標本室の基準試料と植物学的比較同定を行い、収穫された幹と根が *Salacia reticulata* であることを確認した。

エキス粉末の作製方法を記す。*Salacia reticulata* の幹と根の部分を乾燥

させて、チップ状にした。さらに十分に乾燥させたチップを熱水にて 1 時間抽出した。チップを濾過して除去した後、液体を冷却し、スプレードライヤーADL-310 (Yamato Science Co., Ltd., Tokyo, Japan) にてエキスを粉末化し、4℃で保存した。

作製したサラシアエキス粉末には、炭水化物が 60.9%、ポリフェノールが 17.4%、灰分が 14.7%、水分が 3.7%、タンパク質が 2.6%、脂質が 0.7% 含まれていた [Table 1-1]。

#### 2.2.1.2. サラシアエキス粉末中の主要有効成分 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害物質) 測定

サラシアエキス粉末に含まれる主要有効成分 (サラシノール、コタラノール、ネオサラシノール、ネオコタラノール) のうち、最も含有量が多いサラシノールのみ、標準物質が試薬として販売されていた。サラシアエキス粉末の総合的な活性評価指標である  $\alpha$ -グルコシダーゼ 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$  値) とエキス粉末中のサラシノール含有量が負の相関を示すことを確認した上で、サラシノール含有量を用いて、エキス粉末の品質管理を行うこととした。

サラシノールの定量方法は村岡らの手法を参考にし、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いて行った<sup>5)</sup>。 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害試験の方法は下記 2.2.1.3. に記す。

#### 2.2.1.3. サラシアエキス粉末の $\alpha$ -グルコシダーゼ (スクラーゼ) $IC_{50}$ 値の測定

- ① サンプル溶液の準備：チューブに 2 mg のサンプル (サラシアエキス粉末) を量り取り、水 2 ml を加えてよく懸濁し、1 mg/ml 濃度のサンプル溶液を作製した。これを 0、50、100、250、500  $\mu$ g/ml となるように水

- で希釈した。
- ② 基質液の準備：0.2 M マレイン酸バッファー (pH 6.0) に、スクロース濃度 100 mM となるようにスクロースを溶解し、基質液とした。
  - ③ 粗酵素液の準備：10 ml の生理食塩水に 1 g の Intestinal acetone powder from rat (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) を懸濁した後、遠心分離 (3000 rpm、4℃、5 min) した。上清を回収し、粗酵素液とした。
  - ④ 酵素反応および活性測定：①で作製した各濃度のサンプル溶液 500  $\mu$ l に対し、基質液 400  $\mu$ l を添加し、水浴中で 37℃にて 5 分間予備加温した。各サンプルに粗酵素液を 100  $\mu$ l 添加し、37℃にて 60 分間反応させた。反応終了後、95℃にて 2 分間加温することで酵素を失活させて反応を停止させた。生成したグルコース濃度を市販のキット (グルコース CII テストワコー (ムタロターゼ・グルコースオキシダーゼ法) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, JAPAN)) を使用して測定した。
  - ⑤ ブランクの準備：各濃度のサンプル溶液 250  $\mu$ l に対し、基質液 200  $\mu$ l、粗酵素液 50  $\mu$ l を添加し、直ちに 95℃にて 2 分間加温することで酵素を熱失活させ、ブランクとした。
  - ⑥ IC<sub>50</sub> 値算出：得られた値より検量線を作成し、酵素活性を 50% 阻害する濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を求めた。

#### 2.2.1.4. ヒト摂取量およびサラシアエキス粉末規格 (サラシノール含有量)

本研究を開始する前に、ヒトにおけるサラシアエキス粉末の摂取量を設定する必要があると考えた。文献調査と併せてモニター試験を実施し、効果が得られる量の検討を行った<sup>8</sup>。文献調査およびモニター試験の結果、サラシアエキス粉末量として、240 mg/day 以上あれば血糖値および腸内細菌 (デ

ータ未掲載) に対して十分な効果が得られると判断し、ヒト摂取量とした。この摂取量に対し、過剰摂取試験(5 倍量、1 か月)をヒトにおいて実施し、摂取により重篤な副作用が生じないことを確認した。

また、サラシアエキス粉末 240 mg 中のサラシノール含有量は 1.000 mg であったため、サラシアエキス粉末のサラシノール含有量の規格は、4.17 µg/mg 以上とし、品質管理を行うこととした。

### 2.2.2. 動物

生後 5 週齢の雌雄の Sprague-Dawley 系(Crl:CD (SD))ラット(Charles River Laboratories Japan, Inc., Kanagawa, Japan)を購入し、1 週間の検疫馴化を行った。飼育条件は、個別ケージで室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $50 \pm 10\%$ 、換気回数 15 回/時間、人工照明 1 日 12 時間に設定した。試験動物には飼料として放射線滅菌済みの固形飼料 CRF-1(Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)を自由摂取させ、飲水には、水道法水質基準(『水質基準に関する省令』(平成 15(2003)年 5 月 30 日厚生労働省令第 101 号))に適合した水道水をフィルター濾過(50 µm and 5 µm)(AION Co., Ltd., Osaka, Japan)後、紫外線照射により殺菌したものを自動給水ノズルで与え、自由摂取とした。検疫馴化期間中、一般症状に著変が認められず、かつ順調な発育を示した雌雄(雄:190~211 g、雌:150~181 g)を選んで試験を実施した。検疫馴化後、データ処理ソフト Dr.WinG (Human Life, Tokyo, Japan)を用い、体重が均一になるように無作為に 10 匹ごとの群に分けた。

### 2.2.3. 投与量

投与量は薬物動態学的データを用い、血中濃度から決定されることが多いが、以前行ったサラシアエキス粉末の薬物動態学的検討において、サラシアエキス粉末の主要有効成分であるサラシノール、コタラノール、ネオサラシノール、ネオコタラノールが吸収されないことを確認済みであった（未掲載データ）。そこで、特定保健用食品（Food for Specified Health Use (FOSHU, Japan)）の考え方を参考にし、2.2.1.4.で設定したヒト摂取量（240 mg/day）の100倍を最大投与量（サラシアエキス粉末 400 mg/kg body weight/day）とした。

試験は4群で実施することとした。サラシアエキス粉末を注射用水（Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan）に溶解し、サラシアエキス粉末重量にして0 mg/kg body weight/day、10 mg/kg body weight/day、65 mg/kg body weight/day、400 mg/kg body weight/dayになるように調整した。金属性胃ゾンデを用いて、1日1回、胃内に強制経口投与した。

### 2.2.4. 臨床所見

試験期間中は、毎日2回以上、動物の生死並びに行動、体位、その他一般状態の異常の有無、および発現した症状について観察、記録した。体重は、1～2週目は週3回、3週間目以降は週2回、電子天秤 PM4000（Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland）を用いて測定した。また、摂餌量は毎週1回、摂水量は試験1週目と13週目にそれぞれ電子天秤 PM4000を用いて測定した。

### 2.2.5. 血液検査および尿検査

試験期間中の尿を集めるために、相対日 85 日目にラットを代謝ケージ (Shinano Manufacturing, Tokyo, Japan) に収容し、新鮮尿 (4 時間尿 : 10:30-14:30) を採取して、pH、タンパク質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、亜硝酸塩、ウロビリノーゲンをエームス尿検査試験紙 N-Multistix (Bayer Medical Ltd., Osaka, Japan) およびエームス尿分析器クリニテック 100 (Bayer Medical Ltd., Osaka, Japan) を用いて半定量的に測定した。また、引き続いて採取した 24 時間尿について色調、混濁度を肉眼的に観察し、比重を尿比重屈折計ユリコン JE (Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan) により測定した。尿量は、尿重量と比重より算出した値に新鮮尿の量を加えて求めた。

13 週間反復投与後、投与最終日の夕刻から 16 時間の絶食を行い、ペントバルビタールナトリウム深麻酔下で後大静脈から採血を行った。採取した血液を用いて、血液学的検査と血液生化学的検査を行った。血液検査の項目は、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数 (PLT)、網赤血球率 (Reti)、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、総タンパク濃度 (TP)、アルブミン濃度 (ALB)、A/G、グルコース (Glu)、トリグリセライド (TG)、総コレステロール (T-CHO)、尿素窒素濃度 (BUN)、クレアチン (Cre)、カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ )、無機リン (IP)、AST 活性 (AST)、 $\gamma$ -GTP (GGT)、ALT 活性 (ALT)、ALP 活性 (ALP)、CPK 活性 (CPK)、総ビリルビン (T-BIL)、ナトリウム ( $\text{Na}^+$ )、カリウム ( $\text{K}^+$ )、塩素 ( $\text{Cl}^-$ ) である。WBC、RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC、PLT、Reti に関しては、血液に抗凝固剤として EDTA-2K を添加し、3000 rpm で 10 分間

遠心分離して得られた血漿を用いて総合血液学検査装置 XT-2000iV (Sysmex Co., Ltd., Hyogo, Japan) にて測定した。また、PT、APTT は抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを使用し、3000 rpm で 10 分間遠心分離して得られた血漿を全自動血液凝固線溶測定装置 STA コンパクト (Roche Diagnostics K.K. Tokyo, Japan) で測定した。TP、ALB、A/G、Glu、TG、T-CHO、BUN、Cre、Ca<sup>2+</sup>、IP、AST、GGT、ALT、ALP、CPK、T-Bil、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>はヘパリンナトリウムを抗凝固剤とし、3000 rpm で 10 分間遠心分離して得られた血漿を血液生化学自動分析装置 H 7070 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan) で測定した。

#### 2.2.6. 病理解剖学的検査並びに病理組織学的検査

採血後、ラットはペントバルビタールナトリウム麻酔 (1 ml/kg body weight, intraperitoneally (ip)) 下で安楽死させた。病理解剖学的検査および病理組織学的検査を行うために、諸臓器と組織を肉眼的に観察しながら解剖した。試験動物全例について、皮膚 (腹側)、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣・精巣上体・精囊・前立腺 (雄) または卵巣・子宮・膺 (雌)、顎下腺、舌下腺、頸部リンパ節、腋窩リンパ節、気管、甲状腺および上皮小体、胸腺、心臓、大動脈、肺、舌から肛門までの消化管、腸間膜リンパ節、大腿筋、坐骨神経、大腿骨および骨髓、耳介 (両側)、脳、脊髓、下垂体、眼球、ハーダー腺、胸骨を摘出した。試験動物全例について、ホルマリン固定する前に、脳、下垂体、胸腺、肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、副腎、精巣・精巣上体・精囊・前立腺 (腹葉) (雄)、卵巣・子宮 (雌) の実重量 (絶対重量) を電子天秤 AE-200 (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland) にて測定し、体重との比重量 (相対重量) を算出した。

摘出した臓器のうち、精巣はホルマリン、氷酢酸、蒸留水の混合固定液で

1 日固定した後、10% 中性緩衝ホルマリン液中で保存した。その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液中で固定・保存した。左肺については、臓器重量測定後に固定液に浸漬する前に 10% 中性緩衝ホルマリン液を注入した。全例の肝臓、腎臓、心臓、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸について、薄切標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を施して光学顕微鏡による観察を行った。

#### 2.2.7. 統計学的解析

各試験群の体重、摂餌量、摂水量、尿検査の数値データ、血液学的検査値、血液生化学的検査値、臓器重量（絶対重量および相対重量）に関して、各群間の検定を実施した。

最初に Bartlett の等分散検定を行い、等分散の場合は一元配置分散分析を実施し、その結果有意ならば Dunnett 法を用いて検定を行った。Bartlett の等分散検定で不等分散の場合は、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、有意ならば Dunnett 法を用いて順位検定を行った。これらの計算にはデータ処理ソフト Dr.WinG を使用した。なお一般状態、尿検査の段階評価データ、病理解剖学的検査結果、病理組織学的検査結果については、検定を行わなかった。

### 2.3. 結果

本研究においては、サラシアエキス粉末の亜慢性毒性試験を、雌雄の Sprague-Dawley 系 (CrI:CD (SD)) ラットにて行った。6 週齢のラット (雌雄各 40 匹) を 4 群に分け、各濃度あたり雄 10 匹、雌 10 匹で試験を行った。サラシアエキス粉末を 0 mg/ kg body weight/day (対照群)、10 mg/kg body

weight/day、65 mg/kg body weight/day、400 mg/kg body weight/day の用量で 13 週間（91 日間）強制経口反復投与した。試験期間中は、症状の観察、体重および摂餌量、摂水量の測定を行い、投与後は、血液検査、尿検査、病理解剖学的検査、病理組織学的検査を実施した。

### 2.3.1. 臨床所見

試験期間中は、毎日 2 回以上、動物の生死並びに行動、体位、その他一般状態の異常の有無、および発現した症状について観察、記録した。雌雄とも試験動物に途中死亡はなく、一般状態における変化も観察されなかった。雄の 400 mg/kg body weight/day 投与群において相対日 87 日目に 6 例、88 日目に 2 例に軟便が見られた。雌の 65 mg/kg body weight/day 投与群の相対日 85 日目に、1 例に前日からの糞便が観察されなかった。上記の変化は一過性のものであることから、10～400 mg/kg body weight/day のサラシアエキス粉末を投与しても臨床所見に異常は生じないことが示された。

また、動物飼育期間中にデータの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化は認められなかった。

### 2.3.2. 体重

試験期間中は定期的に体重測定を実施した〔Table 2-1、Fig. 2-1〕。サラシアエキス粉末投与各群の体重変化は、雌雄ともに対照群（0 mg/kg body weight/day）と同等であり、10～400 mg/kg body weight/day のサラシアエキス粉末を投与しても体重に変化は生じないことが明らかになった。

### 2.3.3. 摂餌量および摂水量

摂餌量は毎週 1 回、摂水量は 1 週目と 13 週目に測定を行った。摂餌量は、雌雄のいずれの群も対照群と差がなかった [Table 2-2、Fig. 2-2、2-3]。

雄の 10 mg/kg body weight/day 投与群の相対日 5～6 日目において、摂水量に有意な低値が見られた。また、雌のいずれの群も対照群との間に摂水量の差はみられなかった [Table 2-3]。上記の変化は一過性のものであることから、10～400 mg/kg body weight/day のサラシアエキス粉末を投与しても、摂餌量、摂水量に影響を及ぼさないことが明らかになった。

### 2.3.4. 血液検査および尿検査

#### 2.3.4.1. 血液学的検査／血液生化学的検査

解剖時に採取した血液を用いて血液学的検査と血液生化学的検査を実施した。血液学的検査においては、雌雄いずれの群にもサラシアエキス粉末の投与に起因すると思われる変化は認められなかった [Table 2-4]。また、血液生化学的検査では、雄の 400 mg/kg body weight/day 投与群において CPK 活性の有意な低値、雌の 400 mg/kg body weight/day 投与群においてグルコース濃度の有意な高値と総ビリルビン濃度の有意な低値が見られた [Table 2-5]。しかし、これらの変化は背景データの範囲内であった。

#### 2.3.4.2. 尿検査

尿検査は、相対日 85 日目にラットを代謝ケージに収容して採取した尿を用いて実施した。雌雄いずれの群にもサラシアエキス粉末の投与に起因すると思われる変化は認められなかった（雌の 400 mg/kg body weight/day 投与群 2 例については、水こぼしのため正確な尿量測定ができなかった）

[Table 2-6、2-7、2-8、2-9]。以上の結果から、10～400 mg/kg body

weight/day のサラシアエキス粉末を投与しても尿検査値に異常は生じないことが示された。

### 2.3.5. 病理解剖学的検査並びに病理組織学的検査

#### 2.3.5.1. 組織重量

解剖時に各臓器を採取し、臓器重量の測定を行った。雄の 10 mg/kg body weight/day 投与群に精巣絶対重量の有意な低値、雌の 65 mg/kg body weight/day 投与群に脾臓相対重量の有意な高値が見られた〔Table 2-10、2-11、2-12、2-13〕。しかし、用量依存性は確認できなかった。

#### 2.3.5.2. 病理解剖学的検査／病理組織学的検査

病理解剖学的検査では、諸臓器および組織を肉眼的に観察した。また、病理組織学的検査では、採取した各臓器をホルマリン固定し、薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）を施して光学顕微鏡による観察を行った。病理解剖学的検査において、雌の 10 mg/kg body weight/day 投与群 1 例の肝臓に嚢胞が見られた。また、雌の 400 mg/kg body weight/day 投与群 1 例の右腎臓に腎盂の拡張と轄面に散在性白色点が見られた。しかし、その後の病理組織学的検査においては、これらの個体について組織学的変化は確認されなかった。その他、空腸パイエル板の鉍質沈着、肝臓に肝細胞の空胞化、小肉芽巣、腎臓に尿細管上皮の好塩基性化、硝子円柱、好酸性小体、限局性リンパ球浸潤が見られたラットもいたが、対照群にもみられる変化であり、発生頻度も対照群と同等であったため、毒性変化ではないと判断した。

## 2.4. 考察

本研究においては、91 日間経口投与によるサラシアエキス粉末の亜慢性毒性試験を、雌雄の Sprague-Dawley 系 (CrI:CD (SD)) ラットにて行った。サラシアエキス粉末を 0~400 mg/kg body weight/day の用量で 13 週間 (91 日間) 強制経口反復投与したが、雌雄とも試験期間中の死亡はなく、一般状態における変化も観察されなかった。また、体重、摂餌量も雌雄の対照群とサラシアエキス粉末投与各群との間に差はなかった。尿検査、血液学的検査において、雌雄いずれの群にもサラシアエキス粉末の投与に起因すると思われる変化は認められなかった。摂水量に関しては、雄 10 mg/kg body weight/day 投与群の相対日 5~6 日目に有意な低値が見られたが、用量依存的でなく、また継続した変化でなかったため、サラシアエキス粉末の影響でないと判断した。臓器重量に関しては、雄 10 mg/kg body weight/day 投与群の精巣絶対重量に有意な低値、雌 65 mg/kg body weight/day 投与群の脾臓相対重量に有意な高値が見られたが、これらに関しても用量に依存した変化ではなく、サラシアエキス粉末投与による毒性ではないと考えている。雄の 400 mg/kg body weight/day 投与群 6 例に軟便が観察され、雌の 65 mg/kg body weight/day 投与群 1 例に排便が観察されなかったが一過性の変化であり、サラシアエキス粉末の影響でないと判断した。

血液生化学的検査で見られた雄 400 mg/kg body weight/day 投与群の CPK 活性の有意な低値と、雌 400 mg/kg body weight/day 投与群の総ビリルビン濃度の有意な低値については、背景データの範囲内であり、毒性学的意義が低いと考えた。また、サラシアエキス粉末は肝臓保護作用を有していることが報告されており、サラシアエキス粉末を投与した結果、肝機能が改善し、CPK 活性と総ビリルビン濃度が低値を示した可能性があると考えている<sup>32</sup>。雌の 400 mg/kg body weight/day 投与群の血中グルコース濃度の有

意な高値については、グルコース濃度が背景データの範囲内であること、病理組織学的検査で肝臓、腎臓に著変はみられなかったことから、毒性ではないと判断した。

また病理解剖学的検査および病理組織学的検査で見られた変化は、いずれも用量依存性がないか、対照群においても観察される変化であることから、サラシアエキス粉末投与に起因した変化ではないと考えた。

## **2.5. 結論**

91 日間のサラシアエキス粉末の亜慢性毒性試験において、サラシアエキス粉末投与に起因する毒性学的変化は観察されなかった。また、サラシアエキス粉末の無毒性量（No Observed Adverse Effect Level: NOAEL）は 400 mg/kg body weight/day であると考えられた。

【表および図】

**Table 2-1.** Body weights of male and female rats in each *Salacia reticulata* extract powder treatment group (n = 10 /sex).

		Dose (mg/kg body weight/day)	Day	1	3	5	8	12	15	19	22	26	29	33	36	40	43	47	50	54	57	61	64	68	71	75	78	82	85	89	91
Male	0	Mean	209.0	228.0	245.2	270.8	302.5	323.5	351.3	370.9	396.0	411.4	433.6	445.0	462.8	475.8	488.9	499.0	511.5	523.2	532.4	540.5	550.1	558.7	565.4	572.3	575.2	580.9	575.1	578.2	
		S.D.	5.5	8.1	8.9	13.2	19.3	23.8	28.9	30.3	32.2	35.7	38.6	42.1	43.3	48.6	50.4	54.5	59.0	63.5	65.1	67.8	70.9	72.1	74.8	75.7	77.6	77.8	76.1	76.0	
	10	Mean	209.3	277.1	244.5	269.2	298.3	319.7	341.6	359.2	376.6	392.5	407.4	420.3	435.0	446.0	459.6	467.7	475.0	489.2	497.2	504.8	511.3	517.9	525.5	531.8	537.4	546.1	539.1	541.2	
		S.D.	6.6	7.8	9.4	11.5	16.4	20.0	24.8	26.5	27.9	28.9	30.1	31.7	34.7	36.0	38.0	39.1	38.7	41.8	42.4	43.4	44.3	44.9	44.3	45.3	47.1	47.1	46.1	47.8	
	65	Mean	208.5	225.8	241.0	265.9	294.0	314.3	338.6	355.8	375.5	389.3	406.7	420.6	436.4	449.2	460.4	470.8	481.2	493.4	501.5	509.6	518.2	524.8	533.0	536.8	545.1	548.4	545.6	548.0	
		S.D.	6.7	8.8	11.5	15.2	19.4	24.7	29.0	32.3	35.4	36.6	38.8	41.5	41.4	44.2	44.6	46.3	46.8	47.3	47.5	50.2	50.4	51.4	51.6	52.9	52.5	53.8	50.6	51.1	
	400	Mean	209.0	225.2	241.1	265.8	294.4	315.9	338.5	356.9	376.5	390.3	410.6	422.5	437.1	450.0	463.3	473.0	480.6	495.2	501.1	510.3	517.6	524.1	530.0	539.3	541.7	549.9	540.6	540.9	
		S.D.	6.2	8.2	10.9	13.4	20.4	21.5	25.4	28.4	32.3	36.6	39.2	39.5	43.1	44.6	46.5	47.4	49.1	49.4	51.1	50.9	52.5	53.0	54.5	55.5	53.9	54.0	54.0	54.2	
Female	0	Mean	166.3	175.2	181.6	190.8	203.5	217.3	227.3	237.9	247.5	253.1	262.1	269.9	277.4	283.7	289.4	294.7	300.3	303.5	308.3	313.6	318.4	322.0	324.1	327.4	331.5	324.7	331.5	332.2	
		S.D.	10.2	10.5	12.3	13.2	14.5	17.6	19.6	18.7	21.3	21.0	22.0	23.1	23.7	27.3	28.6	25.9	26.9	27.3	26.6	27.1	26.3	30.0	28.2	25.3	26.7	25.6	26.9	27.4	
	10	Mean	167.3	177.6	182.2	192.2	206.4	221.8	233.8	241.1	251.4	258.3	265.9	271.5	277.8	287.4	293.3	297.6	303.4	307.1	311.2	312.4	316.1	321.5	323.3	327.3	328.4	324.2	329.0	333.1	
		S.D.	7.4	10.7	9.3	12.6	12.3	12.9	13.1	14.7	16.3	17.6	20.2	22.8	22.2	21.3	21.9	19.9	20.4	21.3	21.5	22.4	22.1	21.8	19.3	20.1	19.9	20.4	20.0	19.6	
	65	Mean	165.6	176.4	178.0	194.3	207.3	220.3	229.6	236.7	248.0	254.6	260.6	270.8	276.3	280.6	286.3	294.1	296.8	299.5	306.1	305.8	310.0	313.5	316.3	318.4	321.6	317.7	323.0	324.6	
		S.D.	8.2	7.9	9.1	10.0	11.4	11.9	13.2	14.0	16.7	18.0	19.5	20.5	20.7	20.2	20.7	18.6	19.3	22.4	20.9	24.5	21.9	20.1	20.5	20.0	20.2	20.2	20.9	20.3	
	400	Mean	167.6	174.7	183.1	194.8	207.6	217.0	227.4	237.8	248.5	254.6	263.3	270.0	276.2	281.5	287.7	292.1	296.4	300.9	304.6	305.8	308.7	310.9	312.4	315.6	318.8	314.1	320.5	318.6	
		S.D.	7.9	9.6	8.6	11.2	13.4	14.6	16.4	17.4	18.6	17.0	17.8	17.0	16.9	18.8	19.9	19.2	19.6	19.1	20.7	19.9	20.2	21.3	21.1	20.1	20.5	20.4	20.1	21.1	

**Table 2-2.** Food consumption of male and female rats in each *Salacia reticulata* extract powder treatment group (n = 10 /sex).

	Dose (mg/kg body weight/day)	Day	6	13	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90
Male	0	Mean	24.8	25.5	26.3	25.1	26.8	25.1	25.7	25.0	24.4	22.3	23.5	23.7	23.4
		S.D.	3.7	3.0	2.5	3.0	3.1	4.2	4.7	4.9	3.7	3.6	4.3	2.9	2.7
	10	Mean	24.3	24.8	24.7	25.1	25.4	22.4	24.1	24.2	23.8	21.9	23.0	22.3	23.3
		S.D.	0.9	1.9	2.7	3.1	2.2	3.2	2.1	2.9	2.4	3.0	2.3	2.0	2.7
	65	Mean	25.5	24.6	24.0	24.7	25.7	23.3	25.3	25.1	24.6	22.2	23.1	22.4	22.3
		S.D.	1.8	2.3	2.8	1.9	3.2	3.2	2.5	2.2	1.3	1.8	1.6	1.3	1.6
	400	Mean	24.0	24.7	25.3	26.0	26.7	23.5	24.1	24.7	25.4	23.4	22.8	23.3	22.8
		S.D.	1.8	2.4	2.3	3.1	2.3	2.5	2.8	2.7	1.6	2.6	2.5	1.3	1.9
Female	0	Mean	17.4	18.1	17.2	18.2	20.1	17.5	18.4	17.7	14.8	16.0	17.0	15.7	14.8
		S.D.	1.6	2.3	2.5	3.2	3.0	2.7	2.4	2.7	2.6	2.9	2.1	3.8	1.1
	10	Mean	17.4	19.5	15.8	20.1	19.7	19.2	16.1	16.8	18.7	15.3	15.2	17.5	16.1
		S.D.	2.4	3.0	3.0	2.8	2.2	2.9	2.8	4.5	5.1	2.8	2.4	1.4	3.1
	65	Mean	17.8	17.2	18.9	18.5	19.2	20.0	18.4	17.9	15.8	15.0	16.5	17.0	16.5
		S.D.	2.4	2.8	2.6	2.4	2.4	2.3	3.2	2.1	1.4	2.3	2.4	1.9	1.6
	400	Mean	16.9	18.8	19.3	18.7	20.2	19.8	19.3	17.6	14.8	15.2	16.4	15.6	15.3
		S.D.	2.5	2.3	2.1	3.3	2.5	3.5	2.2	2.9	3.1	2.8	2.7	2.2	2.6

**Table 2-3.** Water consumption of male and female rats in each *Salacia reticulata* extract powder treatment group (n = 10 /sex).

	Dose (mg/kg body weight/day)	Day	6	13
Male	0	Mean	38.2	46.0 (ml/day)
		S.D.	5.1	11.7
	10	Mean	32.2	37.6
		S.D.	5.3 *	10.3
	65	Mean	33.8	40.9
		S.D.	3.9	12.3
	400	Mean	36.3	40.9
		S.D.	3.5	7.1
	0	Mean	27.6	30.1
		S.D.	5.8	3.6
Female	10	Mean	27.6	34.7
		S.D.	6.3	11.7
	65	Mean	26.2	34.8
		S.D.	6.9	8.3
	400	Mean	26.6	30.0
		S.D.	6.4	6.8

\*Significantly different from the controls ( $p < 0.05$ ).

**Table 2-4.** Hematology of male and female rats treated with *Salacia reticulata* extract powder for 91 days (n = 10 /sex).

Dose (mg/kg body weight/day)		Male								Female							
		0	10	65	400	0	10	65	400	0	10	65	400	0	10	65	400
Leukocytes	(10 <sup>3</sup> /μL)	7.827 ± 2.701	7.405 ± 2.268	7.172 ± 1.872	6.474 ± 2.339	4.503 ± 2.035	4.847 ± 2.098	4.027 ± 1.768	4.173 ± 1.421								
Erythrocytes	(10 <sup>6</sup> /μL)	9.103 ± 0.523	9.150 ± 0.396	9.169 ± 0.176	8.848 ± 0.318	8.211 ± 0.426	8.157 ± 0.431	7.975 ± 0.408	7.826 ± 0.367								
Hemoglobin	(g/dL)	15.24 ± 0.49	15.54 ± 0.58	15.51 ± 0.55	15.41 ± 0.56	14.98 ± 0.70	15.00 ± 0.66	14.62 ± 0.65	14.75 ± 0.83								
Hematocrit	(%)	46.43 ± 1.01	47.43 ± 1.28	47.06 ± 1.26	46.28 ± 1.67	45.49 ± 1.93	45.52 ± 1.67	44.23 ± 1.64	44.66 ± 2.18								
MCV	(fL)	51.15 ± 2.86	51.91 ± 2.24	51.34 ± 1.63	52.38 ± 3.12	55.49 ± 2.53	55.90 ± 3.07	55.52 ± 2.07	57.08 ± 1.56								
MCH	(pg)	16.77 ± 0.57	17.00 ± 0.39	16.91 ± 0.65	17.45 ± 1.05	18.24 ± 0.36	18.40 ± 0.73	18.35 ± 0.38	18.84 ± 0.44								
MCHC	(g/dL)	32.84 ± 1.08	32.78 ± 1.06	32.96 ± 0.83	33.31 ± 0.82	32.94 ± 1.04	32.95 ± 1.06	33.06 ± 0.85	33.03 ± 0.73								
PLT	(10 <sup>3</sup> /μL)	1063.4 ± 163.5	1090.4 ± 104.4	1033.4 ± 90.5	1000.4 ± 110.2	1010.1 ± 88.6	1036.6 ± 91.0	1022.4 ± 93.9	1006.0 ± 84.0								
Lymphocytes	(%)	82.1 ± 3.6	83.3 ± 1.8	79.0 ± 5.1	79.5 ± 5.4	79.8 ± 6.2	82.2 ± 3.9	79.0 ± 4.1	79.5 ± 4.4								
Neutrophils	(%)	12.7 ± 3.9	11.9 ± 1.9	16.1 ± 4.5	15.3 ± 5.0	15.5 ± 5.5	13.4 ± 3.6	16.5 ± 3.2	15.3 ± 4.5								
Eosinophils	(%)	1.9 ± 0.6	1.6 ± 0.5	1.8 ± 0.6	1.9 ± 0.9	1.7 ± 0.5	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4	2.1 ± 0.6								
Monocytes	(%)	3.3 ± 1.3	3.4 ± 1.0	3.2 ± 1.0	3.4 ± 1.1	3.2 ± 1.2	3.0 ± 0.9	3.2 ± 0.8	3.5 ± 1.1								
Basophils	(%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0								
Reticulocytes	(%)	2.57 ± 0.19	2.59 ± 0.40	2.44 ± 0.30	2.76 ± 0.51	2.83 ± 0.48	2.78 ± 0.53	3.07 ± 0.51	2.89 ± 0.31								
PT	(s)	26.39 ± 9.59	25.16 ± 7.24	23.36 ± 6.63	28.06 ± 7.53	15.67 ± 0.48	15.20 ± 0.85	15.85 ± 0.61	15.39 ± 0.50								
APTT	(s)	30.55 ± 4.50	33.64 ± 6.10	28.94 ± 4.53	30.83 ± 4.05	26.33 ± 5.57	24.06 ± 3.16	22.53 ± 2.38	23.64 ± 2.06								

**Table 2-5.** Blood chemistry of male and female rats treated with *Salacia reticulata* extract powder for 91 days (n = 10 /sex).

		Male				Female			
Dose (mg/kg body weight/day)		0	10	65	400	0	10	65	400
TP	(g/dL)	6.03 ± 0.33	6.01 ± 0.30	6.09 ± 0.26	6.19 ± 0.44	6.96 ± 0.60	6.98 ± 0.40	6.66 ± 0.31	6.80 ± 0.35
ALB	(g/dL)	3.05 ± 0.14	3.09 ± 0.14	3.04 ± 0.11	3.06 ± 0.21	3.92 ± 0.34	3.97 ± 0.25	3.72 ± 0.22	3.88 ± 0.18
A/G	(-)	1.028 ± 0.076	1.061 ± 0.056	1.000 ± 0.070	0.988 ± 0.126	1.296 ± 0.110	1.323 ± 0.093	1.269 ± 0.106	1.339 ± 0.136
Glu	(mg/dL)	165.1 ± 20.8	158.8 ± 22.0	154.8 ± 20.2	163.5 ± 19.7	134.7 ± 15.1	143.8 ± 14.6	136.5 ± 16.3	155.6 ± 15.5*
BUN	(mg/dL)	17.29 ± 1.42	17.79 ± 2.69	16.03 ± 2.82	15.21 ± 3.66	20.95 ± 3.69	16.98 ± 2.92	18.17 ± 2.93	18.66 ± 3.15
Cre	(mg/dL)	0.320 ± 0.076	0.294 ± 0.038	0.274 ± 0.045	0.260 ± 0.054	0.508 ± 0.108	0.455 ± 0.091	0.421 ± 0.031	0.401 ± 0.076
Ca <sup>2+</sup>	(mg/dL)	9.54 ± 0.28	9.52 ± 0.20	9.60 ± 0.14	9.60 ± 0.32	10.04 ± 0.35	10.13 ± 0.34	10.12 ± 0.45	10.16 ± 0.25
IP	(mg/dL)	6.80 ± 0.53	6.56 ± 0.75	6.53 ± 0.53	6.34 ± 0.74	6.48 ± 1.89	6.19 ± 1.24	6.19 ± 1.19	5.87 ± 0.77
T-CHO	(mg/dL)	52.0 ± 12.7	48.9 ± 10.4	54.7 ± 8.5	58.4 ± 13.5	71.7 ± 18.8	73.1 ± 14.2	71.2 ± 18.2	79.8 ± 15.4
TG	(mg/dL)	49.9 ± 33.6	47.7 ± 29.6	45.5 ± 16.5	60.1 ± 22.1	19.2 ± 11.0	23.7 ± 8.9	19.8 ± 9.6	33.5 ± 23.9
T-BIL	(mg/dL)	0.232 ± 0.049	0.223 ± 0.064	0.240 ± 0.053	0.211 ± 0.067	0.226 ± 0.036	0.214 ± 0.025	0.207 ± 0.030	0.179 ± 0.030**
ALP	(U/L)	242.5 ± 41.6	258.5 ± 52.0	239.3 ± 27.8	227.3 ± 40.5	99.2 ± 23.4	108.4 ± 29.5	108.1 ± 21.2	97.3 ± 30.2
AST	(U/L)	61.0 ± 11.7	59.0 ± 4.5	55.5 ± 8.5	54.8 ± 6.8	92.9 ± 98.9	68.6 ± 25.1	72.6 ± 17.6	78.8 ± 25.1
ALT	(U/L)	24.6 ± 3.9	24.3 ± 6.2	22.8 ± 3.4	22.7 ± 4.9	28.6 ± 25.4	25.9 ± 14.1	29.3 ± 13.6	30.2 ± 13.2
GGT	(U/L)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.5
CPK	(U/L)	330.5 ± 300.7	280.1 ± 288.6	169.1 ± 36.5	151.1 ± 80.4*	316.0 ± 193.8	376.5 ± 295.3	462.7 ± 728.1	373.0 ± 224.5
Na <sup>+</sup>	(mEq/L)	141.66 ± 2.21	141.64 ± 1.80	142.42 ± 1.51	142.80 ± 1.92	142.59 ± 2.05	142.95 ± 1.69	144.16 ± 1.98	144.07 ± 2.05
K <sup>+</sup>	(mEq/L)	5.742 ± 1.136	5.888 ± 1.083	5.743 ± 1.103	5.983 ± 1.230	5.347 ± 0.966	5.377 ± 1.141	4.984 ± 1.071	5.221 ± 1.117
Cl <sup>-</sup>	(mEq/L)	104.42 ± 1.56	103.40 ± 1.62	103.91 ± 1.30	103.93 ± 1.32	105.48 ± 1.81	106.13 ± 1.37	105.52 ± 1.24	105.82 ± 1.00

\*Significantly different from the controls ( $p < 0.05$ ).

\*\*Significantly different from the controls ( $p < 0.01$ ).

**Table 2-6.** Urine volume of male and female rats in each *Salacia reticulata* extract powder treatment group (n = 10 /sex).

		Male											
Dose (mg/kg body weight/day)		0			10			65			400		
Volume	(mL/day)	11.5	±	7.1	9.4	±	3.3	14.1	±	5.4	9.9	±	3.2
Specific gravity		1.043	±	0.017	1.043	±	0.013	1.036	±	0.019	1.041	±	0.014

		Female											
Dose (mg/kg body weight/day)		0			10			65			400		
Volume	(mL/day)	12.3	±	4.1	12.7	±	5.4	12.1	±	3.7	12.5	±	4.1
Specific gravity		1.041	±	0.010	1.040	±	0.014	1.040	±	0.013	1.043	±	0.015

**Table 2-7.** Urinalysis of male and female rats in each *Salacia reticulata* extract powder treatment group (n = 10 /sex).

Dose (mg/kg body weight/day)		Male				Female			
		0	10	65	400	0	10	65	400
Color									
	Light Yellow	5	7	7	5	6	4	7	7
	Yellow	5	3	3	5	4	5	2	3
	Light Brown	0	0	0	0	0	1	1	0
	Brown	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dark Brown	0	0	0	0	0	0	0	0
	Red	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubidity									
	-	4	4	4	2	2	2	3	1
	+/-	3	4	6	4	4	6	5	2
	+	3	2	0	4	4	2	2	6
	++	0	0	0	0	0	0	0	1
Glucose									
	-	10	10	10	10	10	10	10	10
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilirubin									
	-	9	10	9	7	10	10	10	9
	+	1	0	1	3	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketones									
	-	1	0	1	0	7	6	4	4
	+/-	1	1	4	3	2	4	6	6
	+	6	8	5	3	0	0	0	0
	++	2	1	0	4	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
pH									
	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6.0	0	0	0	0	0	2	2	0
	6.5	0	0	0	0	0	1	0	0
	7.0	0	0	0	0	0	0	2	0
	7.5	0	0	0	1	2	0	3	1
	8.0	0	0	0	0	1	1	0	0
	8.5	3	3	3	0	6	5	2	4
	≥9.0	7	7	7	9	1	1	1	5
Protein									
	-	0	0	0	0	4	3	4	1
	+/-	0	0	2	0	3	2	0	2
	+	3	1	3	2	1	4	4	5
	++	6	9	5	5	2	1	2	2
	+++	1	0	0	3	0	0	0	0
Urobilinogen									
	0.1	8	4	7	2	8	7	5	5
	1	2	6	3	8	2	3	5	5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	>8	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrite									
	-	10	10	9	10	10	10	10	10
	+	0	0	1	0	0	0	0	0
Occult Blood									
	-	10	10	10	10	10	10	9	10
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	1	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Crystals									
	-	7	7	8	9	8	10	10	9
	+/-	3	3	0	0	2	0	0	1
	+	0	0	1	1	0	0	0	0
	++	0	0	1	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0

**Table 2-8.** Urinary spermatozoa of male rats in each *Salacia reticulata* extract powder treatment group (n = 10).

		Male			
Dose (mg/kg body weight/day)		0	10	65	400
Spermatozoa					
	-	2	4	5	5
	+/-	4	5	2	2
	+	2	1	3	2
	++	2	0	0	1
	+++	0	0	0	0

**Table 2-9.** Urinary bacteria of female rats in each *Salacia reticulata* extract powder treatment group (n = 10).

		Female			
Dose (mg/kg body weight/day)		0	10	65	400
Bacteria					
	-	10	9	10	10
	+/-	0	0	0	0
	+	0	1	0	0
	++	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0

**Table 2-10.** Absolute organ weights in male rats treated with *Salacia reticulata* extract powder for 91 days (n = 10).

Dose (mg/kg body weight/day)		Male											
		0			10			65			400		
Final body weight	(g)	551.4	±	73.3	515.8	±	45.6	520.7	±	51.1	515.2	±	52.3
Hypophysis	(mg)	10.9	±	2.7	10.1	±	1.2	10.0	±	1.4	9.1	±	1.6
Adrenals	(mg)	60.5	±	13.0	57.5	±	8.9	53.1	±	6.1	59.9	±	9.5
Spleen	(mg)	768.5	±	135.0	705.0	±	75.5	734.8	±	92.9	731.6	±	147.6
Thymus	(mg)	289.4	±	82.5	299.9	±	38.9	275.0	±	94.2	241.5	±	51.8
Lungs	(mg)	1343.9	±	108.5	1387.9	±	148.8	1305.4	±	63.3	1309.7	±	147.0
Kidneys	(mg)	3068.2	±	388.0	2881.9	±	276.4	3009.1	±	288.5	3047.0	±	317.2
Testes	(mg)	3440.2	±	91.1	3200.9	±	220.7*	3359.3	±	227.3	3430.5	±	242.6
Brain	(mg)	2005.5	±	93.9	2046.3	±	56.6	1997.5	±	101.1	2000.2	±	129.7
Liver	(g)	14.141	±	2.384	12.803	±	1.625	13.077	±	1.752	14.103	±	1.627
Heart	(mg)	1523.7	±	252.4	1460.7	±	176.8	1417.9	±	88.2	1414.3	±	136.9
Epididymis	(mg)	1275.4	±	100.5	1237.7	±	156.1	1223.7	±	89.4	1277.9	±	115.8
Prostate	(mg)	649.1	±	210.2	603.5	±	154.4	588.6	±	160.7	538.6	±	150.1
Seminal vesicle	(mg)	1614.7	±	270.5	1696.9	±	358.4	1693.9	±	258.5	1598.9	±	361.5

\*Significantly different from the controls ( $p < 0.05$ ).

**Table 2-11.** Absolute organ weights in female rats treated with *Salacia reticulata* extract powder for 91 days (n = 10).

Dose (mg/kg body weight/day)		Female											
		0			10			65			400		
Final body weight	(g)	315.9	±	25.1	313.9	±	18.4	307.6	±	19.6	303.2	±	18.9
Hypophysis	(mg)	15.1	±	2.7	14.1	±	2.0	14.9	±	1.7	14.4	±	1.7
Adrenals	(mg)	62.2	±	6.9	66.9	±	6.9	70.5	±	5.5	65.8	±	11.0
Ovaries	(mg)	80.6	±	15.1	89.3	±	17.9	91.7	±	15.5	84.3	±	8.5
Uterus	(mg)	634.0	±	286.9	679.1	±	266.3	730.9	±	238.1	635.1	±	162.6
Spleen	(mg)	496.4	±	90.2	467.2	±	71.4	597.7	±	154.3	478.2	±	109.7
Thymus	(mg)	269.2	±	73.9	294.8	±	85.8	283.4	±	64.9	271.2	±	47.0
Lungs	(mg)	1038.5	±	72.5	1009.6	±	79.2	1043.0	±	92.2	1053.2	±	121.4
Kidneys	(mg)	1803.2	±	220.2	1769.7	±	146.2	1901.6	±	146.1	1826.9	±	203.8
Brain	(mg)	1924.0	±	106.3	1831.8	±	104.0	1908.3	±	106.8	1870.3	±	69.7
Liver	(g)	7.595	±	0.890	7.456	±	0.500	7.720	±	0.608	7.688	±	0.878
Heart	(mg)	926.2	±	82.9	919.6	±	70.6	927.9	±	55.6	898.5	±	68.2

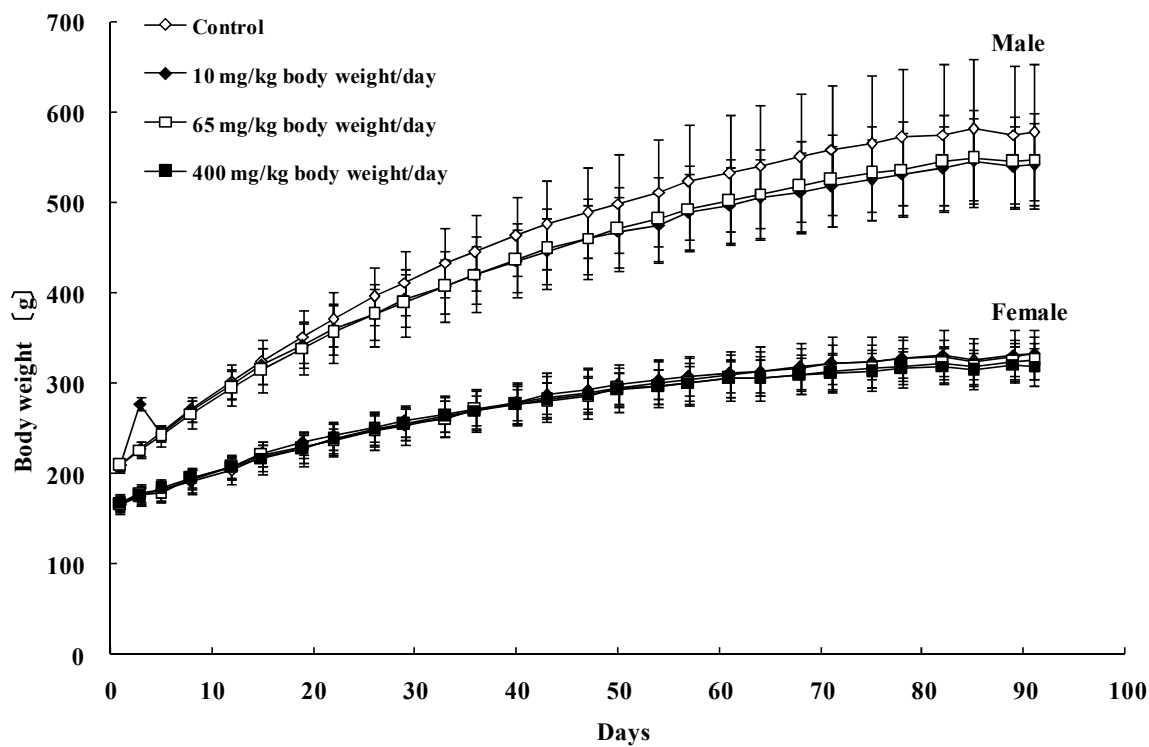
**Table 2-12.** Relative organ weights in male rats treated with *Salacia reticulata* extract powder for 91 days (n = 10).

Dose (mg/kg body weight/day)		Male											
		0			10			65			400		
Hypophysis	(%)	0.0020	±	0.0004	0.0020	±	0.0002	0.0019	±	0.0003	0.0018	±	0.0004
Adrenals	(%)	0.0110	±	0.0021	0.0111	±	0.0015	0.0103	±	0.0014	0.0118	±	0.0023
Spleen	(%)	0.141	±	0.028	0.138	±	0.019	0.142	±	0.018	0.142	±	0.024
Thymus	(%)	0.052	±	0.011	0.058	±	0.008	0.053	±	0.017	0.047	±	0.010
Lungs	(%)	0.245	±	0.018	0.270	±	0.023	0.252	±	0.021	0.255	±	0.020
Kidneys	(%)	0.559	±	0.048	0.560	±	0.037	0.581	±	0.063	0.594	±	0.059
Testes	(%)	0.634	±	0.085	0.623	±	0.048	0.652	±	0.089	0.673	±	0.090
Brain	(%)	0.369	±	0.051	0.400	±	0.040	0.386	±	0.034	0.392	±	0.045
Liver	(%)	2.561	±	0.235	2.479	±	0.209	2.510	±	0.220	2.744	±	0.237
Heart	(%)	0.276	±	0.026	0.284	±	0.025	0.275	±	0.032	0.276	±	0.029
Epididymis	(%)	0.237	±	0.047	0.242	±	0.036	0.238	±	0.036	0.251	±	0.039
Prostate	(%)	0.122	±	0.048	0.117	±	0.029	0.113	±	0.030	0.106	±	0.033
Seminal vesicle	(%)	0.299	±	0.074	0.332	±	0.079	0.328	±	0.060	0.317	±	0.091

**Table 2-13.** Relative organ weights in female rats treated with *Salacia reticulata* extract powder for 91 days (n = 10).

		Female											
Dose (mg/kg body weight/day)		0			10			65			400		
Hypophysis	(%)	0.0048	±	0.0007	0.0045	±	0.0006	0.0049	±	0.0006	0.0048	±	0.0005
Adrenals	(%)	0.0198	±	0.0027	0.0214	±	0.0030	0.0230	±	0.0021	0.0216	±	0.0030
Ovaries	(%)	0.0257	±	0.0056	0.0287	±	0.0066	0.0298	±	0.0048	0.0278	±	0.0025
Uterus	(%)	0.201	±	0.092	0.217	±	0.086	0.238	±	0.076	0.210	±	0.056
Spleen	(%)	0.157	±	0.025	0.149	±	0.020	0.194	±	0.046*	0.157	±	0.029
Thymus	(%)	0.085	±	0.020	0.094	±	0.026	0.092	±	0.019	0.090	±	0.016
Lungs	(%)	0.330	±	0.028	0.322	±	0.025	0.339	±	0.021	0.348	±	0.034
Kidneys	(%)	0.572	±	0.063	0.565	±	0.051	0.619	±	0.044	0.601	±	0.040
Brain	(%)	0.613	±	0.058	0.585	±	0.043	0.623	±	0.053	0.619	±	0.044
Liver	(%)	2.404	±	0.209	2.376	±	0.111	2.509	±	0.104	2.529	±	0.148
Heart	(%)	0.293	±	0.012	0.293	±	0.014	0.304	±	0.035	0.296	±	0.011

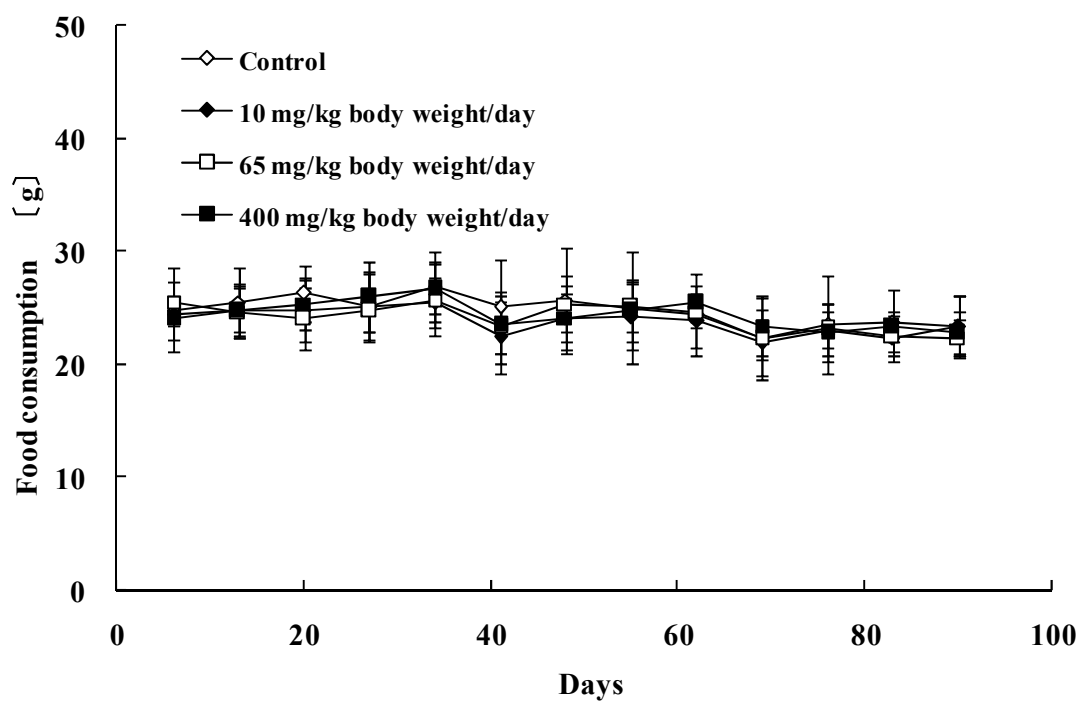
\*Significantly different from the controls ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2-1.** Body weights of male and female rats treated with *Salacia reticulata* extract powder via oral gavage for 91 days.

◇ : Control, ◆ : 10 mg/kg body weight/day,

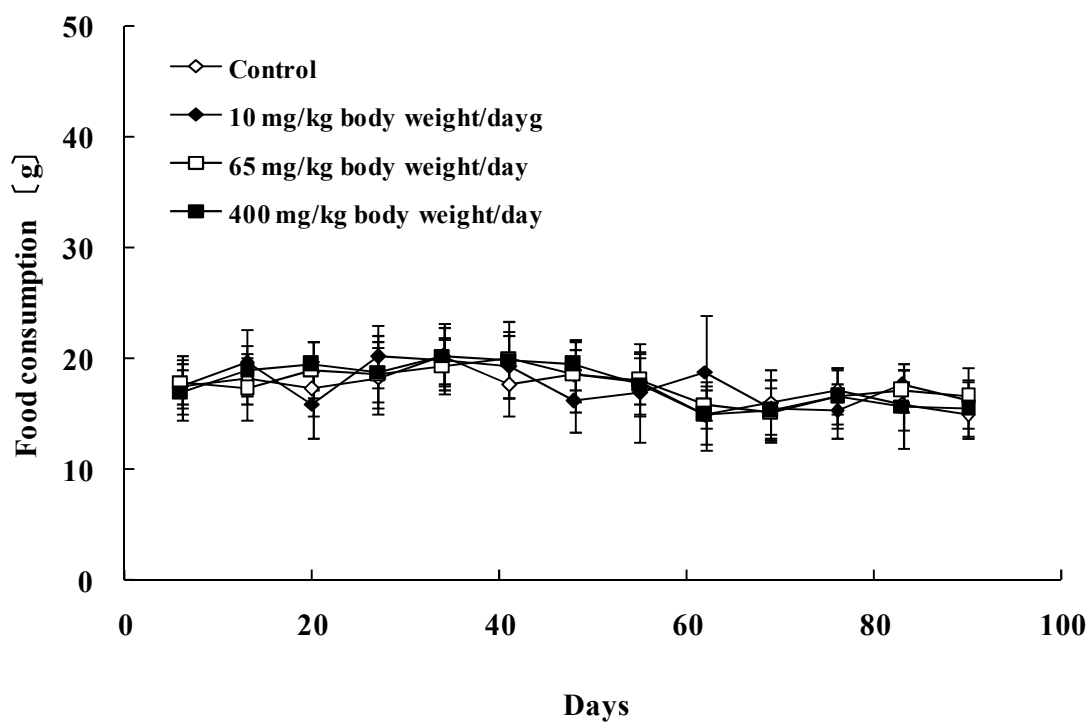
□ : 65 mg/kg body weight/day, ■ : 400 mg/kg body weight/day.



**Fig. 2-2.** Food consumption of male rats treated with *Salacia reticulata* extract powder via oral gavage for 91 days.

◇ : Control, ◆ : 10 mg/kg body weight/day,

□ : 65 mg/kg body weight/day, ■ : 400 mg/kg body weight/day.



**Fig. 2-3.** Food consumption of female rats treated with *Salacia reticulata* extract powder via oral gavage for 91 days.

◇ : Control, ◆ : 10 mg/kg body weight/day,

□ : 65 mg/kg body weight/day, ■ : 400 mg/kg body weight/day.



### 第 3 章

## ラット小腸粘膜におけるサラシアエキス 粉末の作用解明と腸内細菌叢変化

### 3.1. 背景および目的

サラシアエキス粉末の主要有効成分であるチオ糖は、小腸上皮において  $\alpha$ -グルコシダーゼの作用を阻害することにより、オリゴ糖から単糖への分解および糖の吸収を抑制する。その結果として、食後の血糖値上昇抑制に寄与すると考えられている<sup>9, 19, 20, 33, 34</sup>。サラシアエキス粉末の作用には血糖値の上昇抑制や肥満改善などがあるが、これらは  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害による糖の吸収抑制に付随した効果であり、糖吸収抑制以外の機能は未知であった<sup>8, 33, 34</sup>。本研究においては、サラシアエキス粉末摂取により吸収されずに消化管内に残されることになる糖（オリゴ糖）の作用に注目した。オリゴ糖（多糖）を摂取すると、腸内細菌叢が変化し、便性状や腸内 pH などの腸内環境が変化することが知られている<sup>35, 36</sup>。そのため、サラシアエキス粉末摂取により消化管内に残されるオリゴ糖も、食品として摂取したオリゴ糖と同様に腸内環境に作用する可能性があると考えた。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼが発現している小腸は、栄養成分の消化や吸収だけでなく、異物の排除など生体防御を司る非常に重要な器官である。しかし、小腸におけるサラシアエキス粉末の糖吸収抑制以外の作用について研究報告はなかった。

そこで本研究では、サラシアエキス粉末の小腸に対する作用を、腸内環境や免疫機能も含めて網羅的に評価したいと考えた。評価する部位は、 $\alpha$ -グルコシダーゼが発現している小腸の一部で、パイエル板を多く有し、吸収・異物の排除などにおいて重要な役割を果たす回腸（回腸粘膜）を対象とした。評価方法は、サラシアエキス粉末の作用を幅広く検出するために、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行うこととした。さらに、腸内環境に対するサラシアエキス粉末の作用を検討するため、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (Nagashima 法)（以下、T-RFLP 法）による腸内細菌叢解析を行うこととした。

試験期間は、長期的なサラシアエキス粉末投与による作用を評価するため、第 2 章の亜慢性毒性試験と同様に 91 日間投与とした。また、得られた結果をヒト試験の参考とするため、投与量はヒトでも安全性が確認されている量（ヒト摂取量の 5 倍、データ未掲載）に設定した。

### 3.2. 方法

動物試験は、富士フイルム動物実験委員会の審査、承認を得て行った。本試験は『医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令』（医薬品 GLP）には準拠しなかったが、『申請資料の信頼性の基準』（薬事法施行規則第 43 条）に従って実施した。

#### 3.2.1. 動物

生後 6 週齢の雄の Sprague-Dawley 系 (CrI:CD(SD)) ラット (CLEA Japan, Inc., Shizuoka, Japan) を購入し、1 週間の検疫馴化を行った。飼育条件は、個別ケージで室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $50 \pm 10\%$ 、換気回数 15 回／時間、人工照明 1 日 12 時間に設定した。試験動物には飼料として放射線滅菌済みの固形飼料 CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) [Table 3-1] を自由摂取させ、飲水には、水道法水質基準（『水質基準に関する省令』（平成 15（2003）年 5 月 30 日厚生労働省令第 101 号）に適合した水道水をフィルター濾過（ $50\ \mu\text{m}$  and  $5\ \mu\text{m}$ ）（AION Co., Ltd., Osaka, Japan）後、紫外線照射により殺菌したものを自動給水ノズルで与え、自由摂取とした。検疫馴化期間中、一般症状に著変が認められず、かつ順調な発育を示した個体を選んで試験を実施した。検疫馴化後、データ処理ソフト Dr.WinG (Human Life, Tokyo, Japan) を用い、体重が均一になるように無作為に 10 匹ごと

の群に分けた。

### 3.2.2. 投与量

20 mg/kg body weight/day（ヒト摂取量の 5 倍）のサラシアエキス粉末を投与する群をサラシアエキス粉末投与群、溶媒である注射用水のみを投与する群を対照群とし、2 群で試験を実施した。サラシアエキス粉末は、80 mg/ml の濃度になるように注射用水（Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan）に溶解し、投与サンプルとした。サラシアエキス粉末重量にして 0 mg/kg body weight/day（対照群）、20 mg/kg body weight/day（サラシアエキス粉末投与群）になるように、金属性胃ゾンデを用いて、1 日 1 回（午前 10 時）、胃内に強制経口投与した。

### 3.2.3. 試験デザイン

試験期間中は、毎日 2 回以上、動物の生死並びに行動、体位、その他一般状態の異常の有無、および発現した症状について観察、記録した。体重は、1～2 週目は週 3 回、3 週間目以降は週 2 回、電子天秤 PM4000（Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland）を用いて測定した。また、摂餌量は毎週 1 回、摂水量は試験 1 週目と 13 週目にそれぞれ電子天秤 PM4000 を用いて測定した。

サラシアエキス粉末を 1 日 1 回、13 週間投与した後、投与最終日の夕刻から 16 時間の絶食を行い、ペントバルビタールナトリウム深麻酔下で後大静脈から採血した。採取した血液を用いて、血液学的検査と血液生化学的検査を実施した。採血後、ラットはペントバルビタールナトリウム麻酔（1 ml/kg body weight, intraperitoneally (ip)）下で安楽死させた。解剖においては、諸臓器および組織を肉眼的に観察した後、病理組織学的検査を実施

した。遺伝子発現解析を行うために、ラットの回腸を摘出し、回腸粘膜を剥離し、ISOGEN (NIPPON GENE Co., Ltd., Tokyo, Japan) 中で保存した。また、腸内細菌叢解析のために大腸下部から便を採取し、ドライアイスにて凍結保存した。

#### 3.2.4. 各種検査（血液検査、病理解剖学的検査、病理組織学的検査）

後大静脈から採取した血液を用いて血液学的検査と血液生化学的検査を実施した。検査の項目は、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数 (PLT)、網赤血球率 (Reti)、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、総タンパク濃度 (TP)、アルブミン濃度 (ALB)、A/G、グルコース (Glu)、トリグリセライド (TG)、総コレステロール (T-CHO)、尿素窒素濃度 (BUN)、クレアチン (Cre)、カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ )、無機リン (IP)、AST 活性 (AST)、 $\gamma$ -GTP (GGT)、ALT 活性 (ALT)、ALP 活性 (ALP)、CPK 活性 (CPK)、総ビリルビン (T-BIL)、ナトリウム ( $\text{Na}^+$ )、カリウム ( $\text{K}^+$ )、塩素 ( $\text{Cl}^-$ ) である。WBC、RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC、PLT、Reti に関しては、血液に抗凝固剤として EDTA-2K を添加し、3000 rpm で 10 分間遠心分離して得られた血漿を用いて総合血液学検査装置 XT-2000iV (Sysmex Co., Ltd., Hyogo, Japan) にて測定した。また、PT、APTT は抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを使用し、3000 rpm で 10 分間遠心分離して得られた血漿を全自動血液凝固線溶測定装置 STA コンパクト (Roche Diagnostics K.K. Tokyo, Japan) で測定した。TP、ALB、A/G、Glu、TG、T-CHO、BUN、Cre、 $\text{Ca}^{2+}$ 、IP、AST、GGT、ALT、ALP、CPK、T-Bil、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  はヘパリンナトリウムを抗凝固剤とし、3000 rpm で

10 分間遠心分離して得られた血漿を血液生化学自動分析装置 H 7070 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan) で測定した。

解剖では諸臓器および組織を肉眼的に観察した。試験動物全例について、皮膚（腹側）、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、顎下腺、舌下腺、頸部リンパ節、腋窩リンパ節、気管、甲状腺および上皮小体、胸腺、心臓、大動脈、肺、舌から肛門までの消化管、腸間膜リンパ節、大腿筋、坐骨神経、大腿骨および骨髓、耳介（両側）、脳、脊髓、下垂体、眼球、ハーダー腺、胸骨を摘出した。試験動物全例について、ホルマリン固定する前に、脳、下垂体、胸腺、肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺（腹葉）（絶対重量）を電子天秤 AE-200 (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland) にて測定し、体重との比重量（相対重量）を算出した。摘出した臓器のうち、精巣はホルマリン、氷酢酸、蒸留水の混合固定液で 1 日固定した後、10% 中性緩衝ホルマリン液中で保存した。その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液中で固定・保存した。左肺については、臓器重量測定後に固定液に浸漬する前に 10% 中性緩衝ホルマリン液を注入した。全例の肝臓、腎臓、心臓、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸について、薄切標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）を施して光学顕微鏡による観察を行った。

各群の体重、摂餌量、摂水量、血液学的検査値、血液生化学的検査値、臓器重量（絶対重量および相対重量）に関しては、 $F$  test により分散分析を実施した後、Student's  $t$ -test（等分散の場合）または Welch's  $t$ -test（不等分散の場合）により有意差の検定を行った。一般状態、病理解剖学的検査結果、病理組織学的検査結果については、検定を行わなかった。

### 3.2.5. RNA 抽出および遺伝子発現解析 (DNA マイクロアレイ)

保存しておいたラット回腸粘膜から、ISOGEN の定法に従って total RNA を抽出した。その後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) で、total RNA の精製を行った。サラシアエキス粉末投与群および対照群から、体重が平均値に近い順に 4 個体ずつ選び、その後の操作を行った。回腸粘膜由来 total RNA からの cDNA 合成、cRNA の合成および標識化、標識 cRNA の断片化は、Affymetrix Inc. (Santa Clara, CA, USA) のキット (GeneChip® One-Cycle Target Labelling and Control Reagents) を用い、メーカープロトコルを参考にして行った。RNA の質チェックには Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用い、cRNA の伸張が十分であることを確認した。断片化した cRNA は Hybridization Oven 640 (Affymetrix Inc.) を用いて GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix Inc.) に 45°C で 16 時間ハイブリダイズし、洗浄 (GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix Inc.)) を行い、GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix Inc.) でスキャンし、遺伝子発現量の測定を行った。

得られたデータは R version 2.7.2 (<https://cran.r-project.org/>) と Bioconductor version 2.2 (<https://bioconductor.org/>) を用いて Distribution Free Weighted method (DFW 法) で正規化した。Rank products (RP) method で二群間比較を行い、発現変動が顕著なプローブセットとして、False Discovery Rate (FDR) < 0.05 のプローブセットを抽出した<sup>37-41</sup>。

抽出したプローブセットを、Gene Ontology (BiNGO2.3 (cytoscape 2.6)) (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/Home.html>) を参考に生物学的機能に応じて分類し、階層構造として示した<sup>42, 43</sup>。

### 3.2.6. 腸内細菌叢解析 (T-RFLP 法)

ラット糞便を用いた腸内細菌叢解析は、株式会社テクノスルガ・ラボ (Shizuoka, Japan) に委託し、T-RFLP 法を用いた<sup>44</sup>。解析には、DNA マイクロアレイに供した個体と同一個体の糞便を用いた。以下に参考文献からの改変部分を記載する。

凍結された便を、GTC Buffer (100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、40 mM Tris-EDTA (pH8.0)、4 M Guanidine Thiocyanate) に添加し、ジルコニアビーズで破碎 (5 m/s、5 分間、FastPrep FP100A Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) し、懸濁液とした。100  $\mu$ l の懸濁液から自動核酸抽出装置 (Precision System Science, Chiba, Japan) を用いて DNA 抽出を行った。自動核酸抽出時の試薬は GC series Genomic DNA whole blood (Precision System Science, Chiba, Japan) を使用した。PCR に用いたプライマーは、516F の標識を参考文献に用いられていた HEX から FAM に変更した。PCR 産物の精製には、MultiScreen-PCR <sub>$\mu$ 96</sub> filter plate (Millipore, Billerica, MA, USA) を使用した。

フラグメント解析は、ABI PRISM 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で行い、解析ソフトウェアは Gene mapper (Applied Biosystems) を用いた。なお、サイズスタンダードマーカには、MapMarkerR X-Rhodamine Labeled 50-1000bp (BioVentures, Murfreesboro, TN, USA) を使用した。総ピーク面積に対する各 OTU (operational taxonomic unit) ピーク面積の比率を用い、R version 2.7.2 で階層的クラスター解析 (pvclust 関数) を行い、菌叢構成比率の類似性比較を行った。各門および各 OTU の群間比較には、*F* test により分散分析を実施した後、Student's *t*-test (等分散の場合) または Welch's *t*-test (不等分散の場合) により有意差の検定を行った。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. 体重

試験期間中は定期的に体重の測定を行ったが、サラシアエキス粉末投与群と対照群において、体重の差は観察されなかった。また、一般状態、摂餌量、摂水量に関しても群間の差はなく、毒性と判断される変化は見られなかった。

#### 3.3.2. 各種検査（血液検査、病理解剖学的検査、病理組織学的検査）

試験期間中の異常の有無を確認することを目的として、各種検査を実施した。後大静脈から採取した血液を用いて行った各種血液学的検査および血液生化学的検査（WBC、RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC、PLT、Reti、PT、APTT、TP、ALB、A/G、Glu、TG、T-CHO、BUN、Cre、Ca、IP、AST、GGT、ALT、ALP、CPK、T-Bil、Na、K、Cl）の数値に、サラシアエキス粉末投与の有無による差は認められなかった。また、全個体において、解剖時に諸臓器および組織の肉眼的観察と、脳、下垂体、胸腺、肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺（腹葉）の重量測定を行ったが、サラシアエキス粉末投与の影響とみられる変化や群間の差はなかった。さらに、全個体の肝臓、腎臓、心臓、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸を 10% 中性緩衝ホルマリン液中で固定し、作製した薄切標本にヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）を施し、光学顕微鏡により観察を行ったが、毒性と判断されるような変化はなかった。

#### 3.3.3. 遺伝子発現解析

$\alpha$ -グルコシダーゼが発現している小腸の一部であり、吸収、異物の排除などにおいて重要な役割を果たす回腸におけるサラシアエキス粉末の作用を解明するために、回腸粘膜の遺伝子発現解析を実施した。解剖時に、全個

体の回腸粘膜を採取し、total RNA の抽出、精製を行い、サンプルを-80℃で保存した。血液検査、病理解剖学的検査、病理組織学的検査にて、毒性を示す所見がないことを確認した後、体重が平均値に近い順に 4 個体ずつ各群から選択し、DNA マイクロアレイを実施した。得られた結果を解析し、サラシアエキス粉末投与群で発現が増加した 237、発現が減少した 111 のプローブセット (FDR < 0.05) を抽出した。

#### 3.3.3.1. 発現増加遺伝子

抽出したプローブセットを、Gene Ontology を参考に生物学的機能に応じて分類した。発現増加遺伝子には、oligopeptide transport、defense response、response to nutrient levels、antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via major histocompatibility complex (MHC) class II に関わる遺伝子が濃縮されていることが明らかになった [Fig. 3-1]。上記の結果からサラシアエキス粉末投与により、免疫関連遺伝子 (defense response、response to nutrient levels 等) と、輸送や代謝に関わる遺伝子の一部 (oligopeptide transport) が発現増加することが示された。以下に、発現増加した遺伝子の詳細を記載する。

免疫関連では、抗原認識を行う MHC class II 関連の遺伝子として、Cathepsin E (*Ctse*、Gene symbol: *Ctse*)、RT1 class II, locus Ba (*RT1-Ba*、Gene symbol: *RT1-Ba*)、HLA class II histocompatibility antigen, DM beta chain precursor (MHC class II antigen DMb、*Hla-dmb*、Gene symbol: *Hla-dmb*) の発現が増加していた<sup>45</sup>。生体防御に関連する遺伝子としては、Tumor necrosis factor alpha (*Tnfα*、Gene symbol: *Tnfa*)、Clusterin (*Clu*、Gene symbol: *Clu*)、Chemokine (C-C motif) ligand 5 (*Ccl5*、*Rantes*、Gene symbol: *Ccl5*)、Adenosine deaminase (*Ada*、Gene symbol: *Ada*)、

Apolipoprotein A-IV (*Apoa4*, Gene symbol: *Apoa4*)、Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (*Cxcr4*, Gene symbol: *Cxcr4*)、Apolipoprotein H(*ApoH*, Gene symbol: *ApoH*)、Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1 (*Ms4a1*, Gene symbol: *Ma4a1*)、Dipeptidyl-peptidase 4 (*Dpp4*, *Cd26*, Gene symbol: *Dpp4*)、Protein tyrosine phosphatase (*Ptpnc*, *Cd45*, Gene symbol: *Ptpnc*)、T cell receptor beta locus (*Tcrb*, Gene symbol: *Tcrb*)、Apoptotic peptidase activating factor 1 (*Apaf1*, Gene symbol: *Apaf1*) などの発現が増加していた。

また、輸送や代謝に関わる遺伝子は、コレステロール、ケトン体代謝系では 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (*Hmgcs2*, Gene symbol: *Hmgcs2*)、輸送系である Oligopeptide transporter としては、Solute carrier family 15 (oligopeptide transporter) , member 1 (*Slc5a1*, Gene symbol: *Slc5a1*) が発現増加していた [Table3-2]。

### 3.3.3.2. 発現減少遺伝子

サラシアエキスポ末投与により、発現減少した遺伝子には Urea cycle, Lipid metabolic process が含まれていた。尿素サイクル関連の遺伝子は Arginase, type II (*Arg2*, Gene symbol: *Arg2*)、Ornithine carbamoyltransferase (*Otc*, Gene symbol: *Otc*)、carbamoyl-phosphate synthase 1 (*Cps1*, Gene symbol: *Cps1*) が発現減少しており、脂質の輸送や代謝に関わる遺伝子としては peroxiredoxin 6 (*Prdx6*, Gene symbol: *Prdx6*) や Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*Ppar*  $\gamma$ , Gene symbol: *Pparg*) が発現減少していた [Table 3-3、Fig. 3-2]

#### 3.3.4. 腸内細菌叢解析

サラシアエキス粉末の腸内環境への作用を評価するために、腸内細菌叢解析を実施した。腸内に多く存在する培養困難な菌も含めた菌叢把握のため、16S rRNA 遺伝子を用いて菌叢の構成比率を測定する T-RFLP 法で解析を行った。解析には、解剖時に大腸下部から採取し、冷凍保存しておいた糞便を用いた。腸内細菌叢の構成比データ（総ピーク面積に対する各 OTU ピーク面積の比率）を用いて階層的クラスター解析を行い、系統樹を作成し、各個体の腸内細菌叢構成比率の類似性を比較した。サラシアエキス粉末投与群と対照群を比較したところ、対照群の腸内細菌叢は個体ごとに大きく異なり、系統樹の距離も離れ、類似性が低かったのに対し、サラシアエキス粉末投与群では腸内細菌叢の構成比率が類似しており、系統樹の距離が近くなっていた。よって、サラシアエキス粉末投与により、個体ごとのばらつきが大きかった腸内細菌叢が類似してくることが明らかになった [Fig. 3-3]。

次に、比率が変化した菌を門ごとに見ていくと、サラシアエキス粉末投与により、Firmicutes (OTU: 106, 110, 168, 332, 338, 369, 423, 494, 505, 517, 520, 650, 657, 749, 754, 919, 940, 955, 990) の比率が顕著に低下していることが明らかになった。逆に、Bacteroidetes (OTU: 366, 469, 853) の比率は有意に上昇していた [Fig. 3-4、3-5]。

### 3.4. 考察

これまで知られていたサラシアエキス粉末の機能は、ほとんどが糖の吸収抑制をメカニズムとした血糖値や肥満に対する作用であった。そこで、糖の吸収抑制にとどまらないサラシアエキス粉末の新規機能を解明するため、本研究を行った。サラシアエキス粉末投与の結果、回腸粘膜において多数の遺伝子が発現変動しており、サラシアエキス粉末は消化管で様々な作用を有する可能性が示された。その中でも、免疫関連遺伝子の発現量変化は、本研究により初めて明らかになったものであり、非常に顕著な作用であったため、これ以降サラシアエキス粉末の免疫機能に対する作用に着目して議論を行う。

遺伝子発現解析の結果から、サラシアエキス粉末投与により発現増加した遺伝子を詳細に検討していくと、異物認識や生体防御など免疫機能に関わる遺伝子、特に細胞性免疫に関与する Th1 細胞関連遺伝子が多く含まれていることが明らかになった。具体的には、アレルギーなどを引き起こす IgE の産生を抑制すると言われている *Ptprc* (*Cd45*)、T 細胞表面抗原で Th1 細胞関連遺伝子である *Dpp4* (*Cd26*)、菌やウイルスなど病原体の進入を食い止め、アレルギー抑制作用を持つ *Igg2a* や、MHC class II 関連の遺伝子が含まれていた<sup>46-48</sup>。発現増加した遺伝子の機能から、Fig. 3-6 のような作用が Th1 細胞周辺で起きているのではないかと推測したが、本研究はあくまで小腸粘膜の遺伝子発現のみを評価したものであり、免疫細胞は全身を移動し生体防御に作用するため、感染部位や血液を用いた評価を今後行い、サラシアエキス粉末の免疫機能に対する作用を明らかにしていく必要があると考える<sup>49</sup>。また、発現減少した遺伝子には、尿素サイクル関連遺伝子 (*Cps1*, *Arg2*, *Otc*) が含まれていた<sup>50</sup>。以前行った検討で、サラシアエキス粉末にはヒト腸内の腐敗産物やアンモニアを減少させる効果があることが明らかになっ

ている（データ未掲載）。そのため、サラシアエキス粉末投与により、腸内アンモニアが減少し、尿素サイクル関連遺伝子の発現減少が起こったと考えられる。

腸内細菌叢の解析では、個体差が大きかった腸内細菌叢の構成比率がサラシアエキス粉末投与により変化し、類似してくる傾向が示された。本試験で用いた食餌には、炭水化物（粗繊維+可溶性無窒素物）が約 58%含まれていた。サラシアエキス粉末の主要有効成分であるチオ糖により、この炭水化物由来のオリゴ糖の分解および吸収が抑制され、腸内細菌叢が変化し、増加した菌および菌体成分が免疫機能に作用した可能性がある<sup>51</sup>。

腸内細菌叢解析で比率が変化した菌について調査を行った結果、サラシアエキス粉末投与により比率が上昇した *Bacteroidetes* は、免疫賦活作用が示されている *Lactobacillus* よりも強い作用を有し、IgA や生体防御に関わるサイトカインの産生量を増加させることが示されている菌であった<sup>52, 53</sup>。本研究において、特に比率上昇が見られた *Bacteroidetes* の OTU(OTU: 469) について、クローニングで得られた塩基配列から相同性を検討した結果、免疫賦活作用が強い *Bacteroides acidofaciens* が含まれている可能性が高いことが明らかになった。また、*Bacteroides* の細胞壁の構成成分であるリポ多糖（LPS、Lipo-Polysaccharides）も免疫賦活作用が示されている<sup>54</sup>。

以上のことから、サラシアエキス粉末は腸内細菌叢を変化させ、増加した菌が腸管免疫系に働きかける可能性が示された。その他の作用として、輸送や代謝関連の多くの遺伝子が発現変動していたが、これらは肝臓の働きにも連動する遺伝子であり、今後検討を行っていききたい。また、本研究では、長期的なサラシアエキス粉末投与による作用を評価するために、試験期間を 13 週間と設定したが、腸内細菌叢変化や免疫機能に対する作用はもっと短期間で起こっている可能性があるため、より短期の試験も行っていく必要が

あると考える。

本研究に用いたラットの腸内には、ヒトにおいて大量に存在する *Bifidobacterium* が存在しなかったため、一概にこの結果をヒトに置き換えることはできない<sup>55</sup>。しかし、ヒトにおいてもサラシアエキス粉末は腸内細菌叢変化を通じて、免疫機能に働きかける可能性は十分に考えられる。

サラシアはアーユルヴェーダにおいて古くから使用されてきたが、その機能を科学的に示したものは少なく、不明な部分が多い。しかし、本研究で明らかになった腸管免疫系を通じた生体調節作用は、サラシアエキス粉末が改善されている疾患の多くに影響を与えるものであり、サラシアエキス粉末の機能の一部を明らかにしたと確信している。

### 3.5. 結論

サラシアエキス粉末 20 mg/kg body weight/day をラットに 91 日間投与した結果、消化管（回腸粘膜）において異物認識や生体防御など免疫機能に関わる遺伝子、特に細胞性免疫に関与する Th1 細胞関連遺伝子の発現が増加した。また、腸内細菌叢解析では、腸内細菌叢の構成比率変化および免疫賦活作用を有する *Bacteroidetes* の比率上昇を確認した。以上の結果から、サラシアエキス粉末は、腸内細菌叢を変化させ、増加した菌や菌体成分が腸管免疫系を通じて生体機能を調節する可能性が示された。

【表および図】

Table 3-1. Ingredient composition of the diet (CRF-1).

成分	含量〔重量%〕
炭水化物	58.2
タンパク質	21.9
水分	8.2
灰分	6.3
脂質	5.4
熱量〔kcal/100 g〕	357

**Table 3-2.** Genes showing increased expression after *Salacia reticulata* extract powder treatment compared with control. ( $p < 0.001$ , Gene ontology categories extracted using BiNGO)

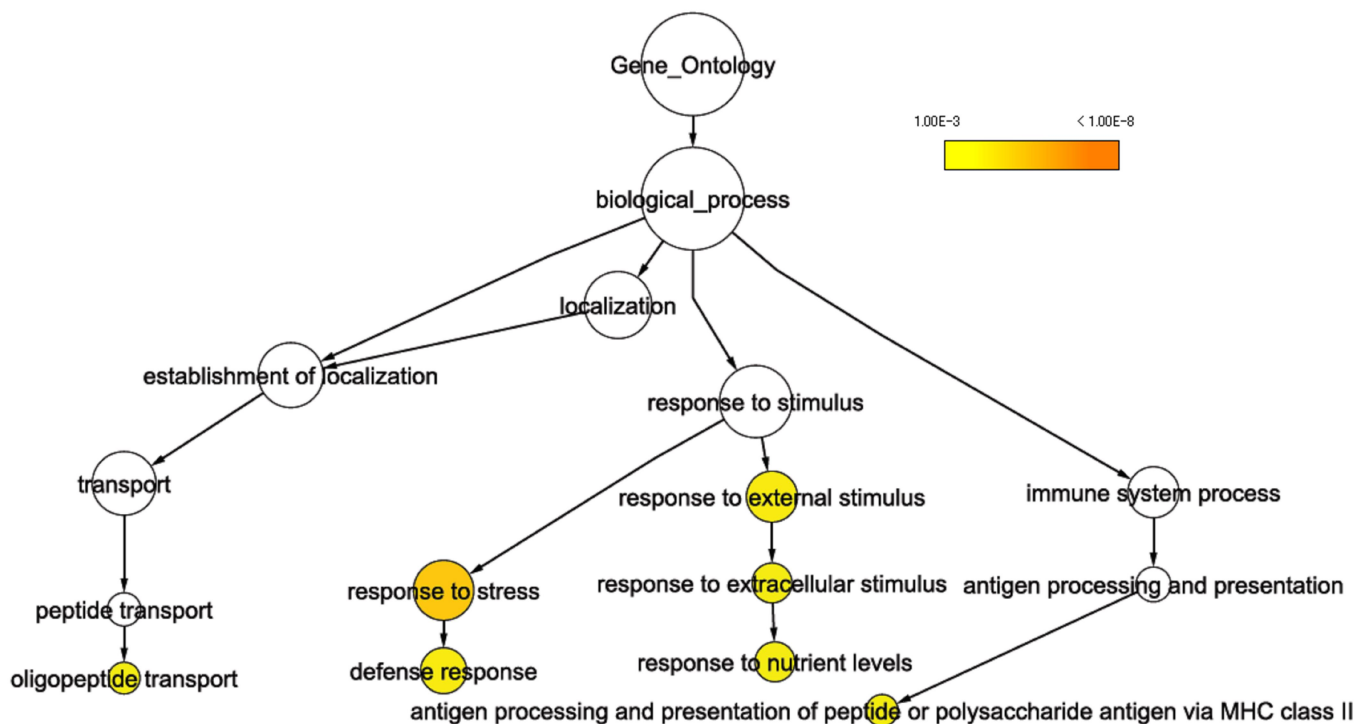
<b>[response to stress]</b>		
Gene name	Definition	UniGene ID
Tnf	tumor necrosis factor	Rn.2275
Aldob	aldolase B	Rn.98207
Clu	clusterin	Rn.1780
Atp6v1g2	ATPase	Rn.158467
Abhd2	abhydrolase domain containing 2	Rn.136611
Sfn	stratifin	Rn.145079
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	Rn.25717
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5,	Rn.8019
Hla-dmb	major histocompatibility complex	Rn.5892
Ada	adenosine deaminase	Rn.12689
RT1-Aw2	RT1 class Ib, locus Aw2	Rn.40130
Apoa4	apolipoprotein A-IV	Rn.15739
RatNP-3b	rat neutrophil peptide-1	Rn.114810
Alb	albumin	Rn.202968
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Rn.44431
Gsn	gelsolin	Rn.103770
ApoH	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	Rn.1824
Ms4a1	membrane-spanning 4-domains	Rn.16385
Creb3l3	cAMP responsive element binding protein 3-like 3	Rn.20059
Cfd	complement factor D (adipsin)	Rn.16172
Dpp4	dipeptidyl-peptidase 4 (CD26)	Rn.91364
Car3	carbonic anhydrase 3	Rn.1647
Ptpn22	protein tyrosine phosphatase	Rn.90166
Bmp2	bone morphogenetic protein 2	Rn.90931
Si	sucrase-isomaltase	Rn.10057
Ephx2	Epoxide hydrolase2	Rn.54495
Tcrb	T cell receptor beta locus	Rn.34871
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Rn.24299
Defa-rs1	defensin alpha-related sequence 1	Rn.122020
Cyp4f5	cytochrome P450 4F5	Rn.10171
Abcc2	ATP-binding cassette	Rn.10265
Apaf1	apoptotic peptidase activating factor 1	Rn.64522
Prnp	prion protein	Rn.3936
Ta4sf4	transmembrane 4 L six family member 4	Rn.13425
<b>[response to external stimulus]</b>		
Gene name	Definition	UniGene ID
Suox	sulfite oxidase	Rn.25720
Bmp2	bone morphogenetic protein 2	Rn.90931
Tnf	tumor necrosis factor	Rn.2275
Si	sucrase-isomaltase	Rn.10057
Clu	clusterin	Rn.1780
Aldob	aldolase B	Rn.98207
Ephx2	Epoxide hydrolase2	Rn.54495
Abhd2	abhydrolase domain containing 2	Rn.136611
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5,	Rn.8019
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Rn.24299
Ada	adenosine deaminase	Rn.12689
Apoa4	apolipoprotein A-IV	Rn.15739
Coro1a	coronin	Rn.6990
Apoa1	apolipoprotein A-I	Rn.10308
Cyp4f5	cytochrome P450 4F5	Rn.10171
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	Rn.29594
Gsn	gelsolin	Rn.103770
Alb	albumin	Rn.202968
Ms4a1	membrane-spanning 4-domains	Rn.16385
ApoH	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	Rn.1824
Cfd	complement factor D (adipsin)	Rn.16172
Tm4sf4	transmembrane 4 L six family member 4	Rn.13425
Smpd2	sphingomyelin phosphodiesterase 2	Rn.18572

Continued

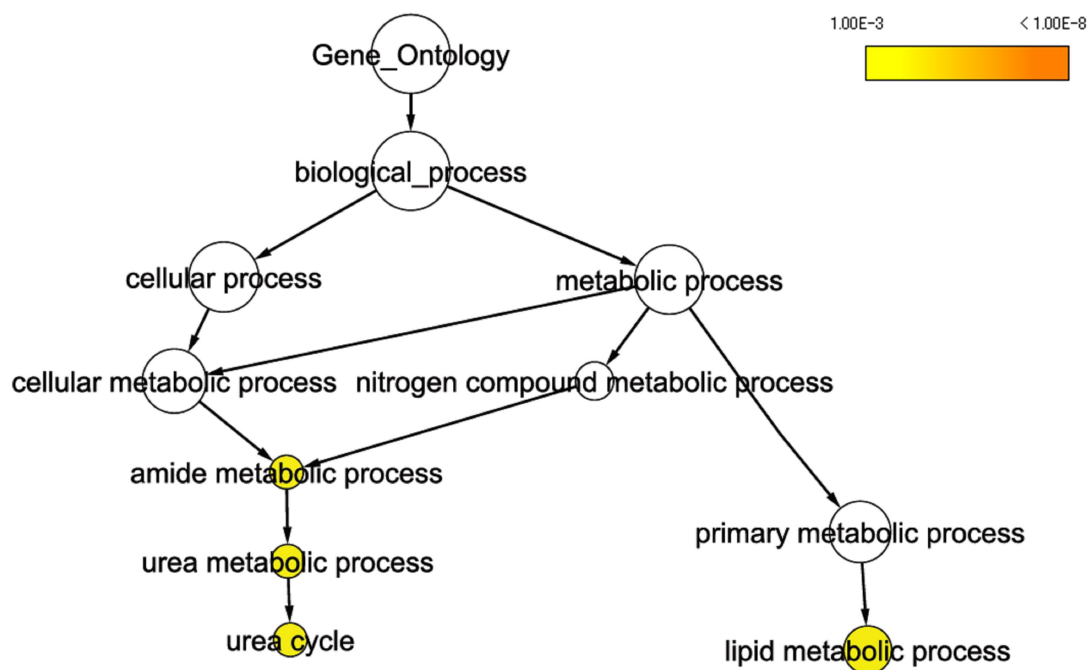
【defense response】		
Gene name	Definition	UniGene ID
Ptprc	protein tyrosine phosphatase	Rn.90166
Bmp2	bone morphogenetic protein 2	Rn.90931
Tnf	tumor necrosis factor	Rn.2275
Ephx2	Epoxide hydrolase2	Rn.54495
Tcrb	T cell receptor beta locus	Rn.34871
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	Rn.25717
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5,	Rn.8019
Hla-dmb	major histocompatibility complex	Rn.5892
Defa-rs1	defensin alpha-related sequence 1	Rn.122020
Ratnp-3b	rat neutrophil peptide-1	Rn.114810
Apoa4	apolipoprotein A-IV	Rn.15739
Cyp4f5	cytochrome P450 4F5	Rn.10171
Ms4a1	membrane-spanning 4-domains	Rn.16385
Apaf1	apoptotic peptidase activating factor 1	Rn.64522
Cfd	complement factor D (adipsin)	Rn.16172
【response to nutrient levels】		
Gene name	Definition	UniGene ID
Apoa4	apolipoprotein A-IV	Rn.15739
Suox	sulfite oxidase	Rn.25720
Bmp2	bone morphogenetic protein 2	Rn.90931
Apoa1	apolipoprotein A-I	Rn.10308
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	Rn.29594
Gsn	gelsolin	Rn.103770
Alb	albumin	Rn.202968
Si	sucrase-isomaltase	Rn.10057
Aldob	aldolase B	Rn.98207
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Rn.24299
Ada	adenosine deaminase	Rn.12689
【oligopeptide transport】		
Gene name	Definition	UniGene ID
Slc15a1	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter)	Rn.10500
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	Rn.25717
Hla-dmb	major histocompatibility complex	Rn.5892
【response to extracellular stimulus】		
Gene name	Definition	UniGene ID
Apoa4	apolipoprotein A-IV	Rn.15739
Suox	sulfite oxidase	Rn.25720
Bmp2	bone morphogenetic protein 2	Rn.90931
Apoa1	apolipoprotein A-I	Rn.10308
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	Rn.29594
Gsn	gelsolin	Rn.103770
Alb	albumin	Rn.202968
Si	sucrase-isomaltase	Rn.10057
Aldob	aldolase B	Rn.98207
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Rn.24299
Ada	adenosine deaminase	Rn.12689
【antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II】		
Gene name	Definition	UniGene ID
Ctse	cathepsin E	Rn.92738
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	Rn.25717
Hla-dmb	major histocompatibility complex	Rn.5892

**Table 3-3.** Genes showing decreased expression after *Salacia reticulata* extract powder treatment compared with control. ( $p < 0.001$ , Gene ontology categories extracted using BiNGO)

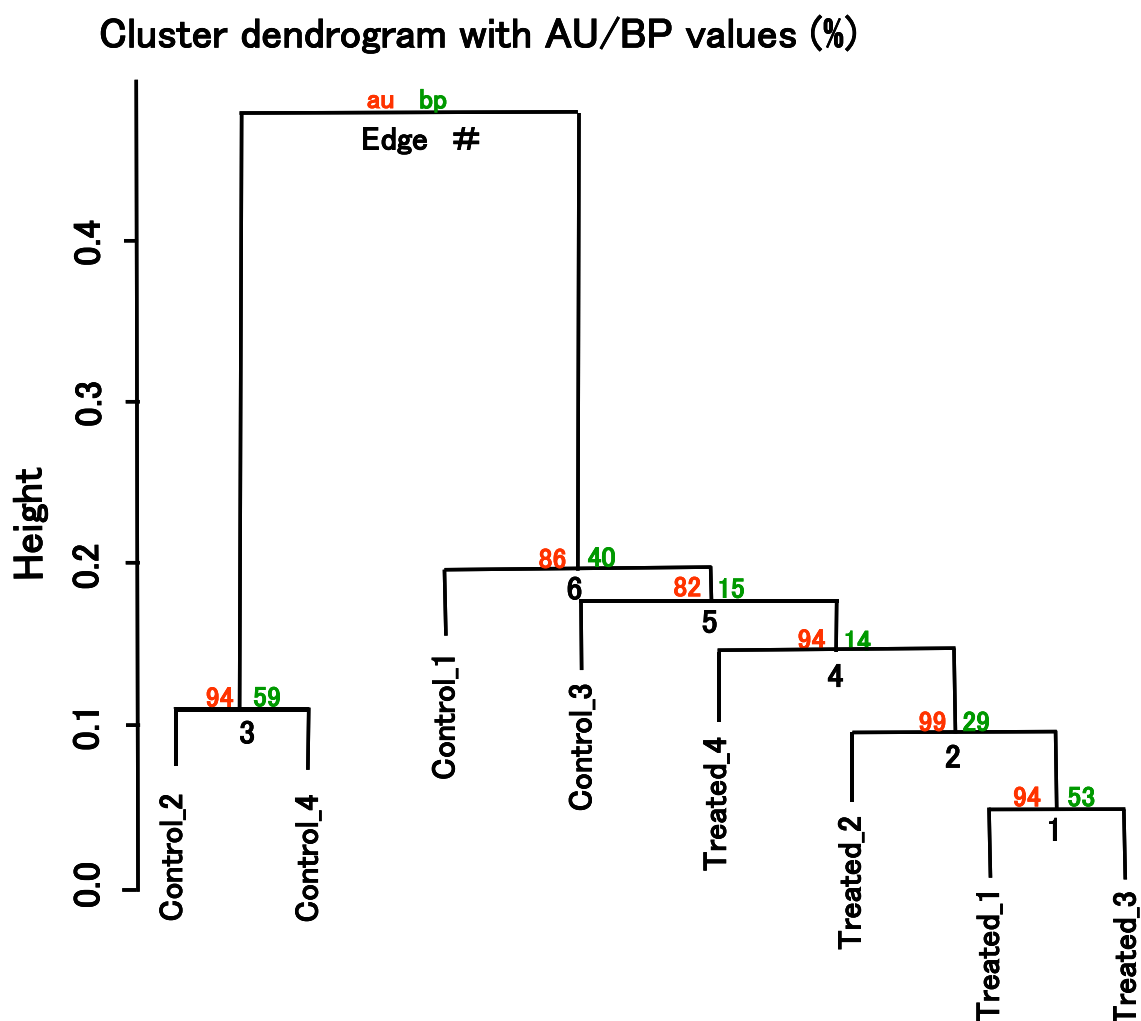
<b>[urea cycle]</b>		
Gene name	Definition	UniGene ID
Arg2	arginase	Rn.11055
Otc	ornithine carbamoyltransferase	Rn.2391
Cps1	carbamoyl-phosphate synthase 1	Rn.53968
<b>[urea matabolic process]</b>		
Gene name	Definition	UniGene ID
Arg2	arginase	Rn.11055
Otc	ornithine carbamoyltransferase	Rn.2391
Cps1	carbamoyl-phosphate synthase 1	Rn.53968
<b>[amide metabolic process]</b>		
Gene name	Definition	UniGene ID
Arg2	arginase	Rn.11055
Otc	ornithine carbamoyltransferase	Rn.2391
Cps1	carbamoyl-phosphate synthase 1	Rn.53968
<b>[lipid metabolic process]</b>		
Gene name	Definition	UniGene ID
Phlpb	phospholipase B	Rn.91079
Cubn	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	Rn.3236
Hsd3b6	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delt	Rn.109394
Prdx6	peroxiredoxin 6	Rn.42
Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Rn.23443
Hsd11b2	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	Rn.10186
Aldh1a7	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	Rn.74044
Srd5a1	steroid-5-alpha-reductase	Rn.4620
Comt	catechol-O-methyltransferase	Rn.220
Pcca	propionyl Coenzyme A carboxylase	Rn.6033
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	Rn.104376



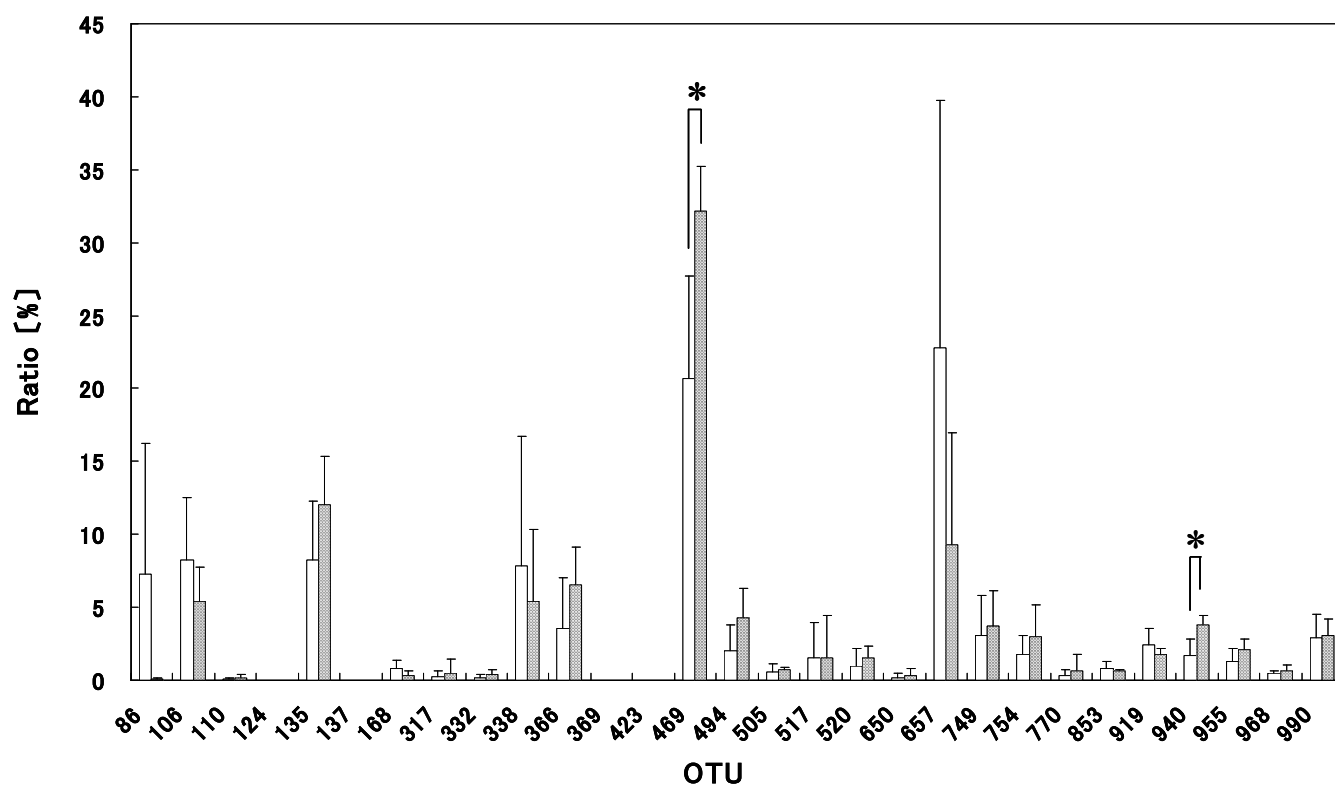
**Fig. 3-1.** Significant gene ontology categories ( $p < 0.001$ ) were extracted from 237 genes showing increased expression after *Salacia reticulata* extract powder treatment compared with control. Color indicates the size of the  $p$ -value of the hypergeometric distribution. The upper right corner of the color strips indicates  $0.001 < p < 10^{-8}$ .



**Fig. 3-2.** Significant gene ontology categories ( $p < 0.001$ ) were extracted from 111 genes showing decreased expression after *Salacia reticulata* extract powder treatment compared with control. Color indicates the size of the  $p$ -value of the hypergeometric distribution. The upper right corner of the color strips indicates  $0.001 < p < 10^{-8}$ .



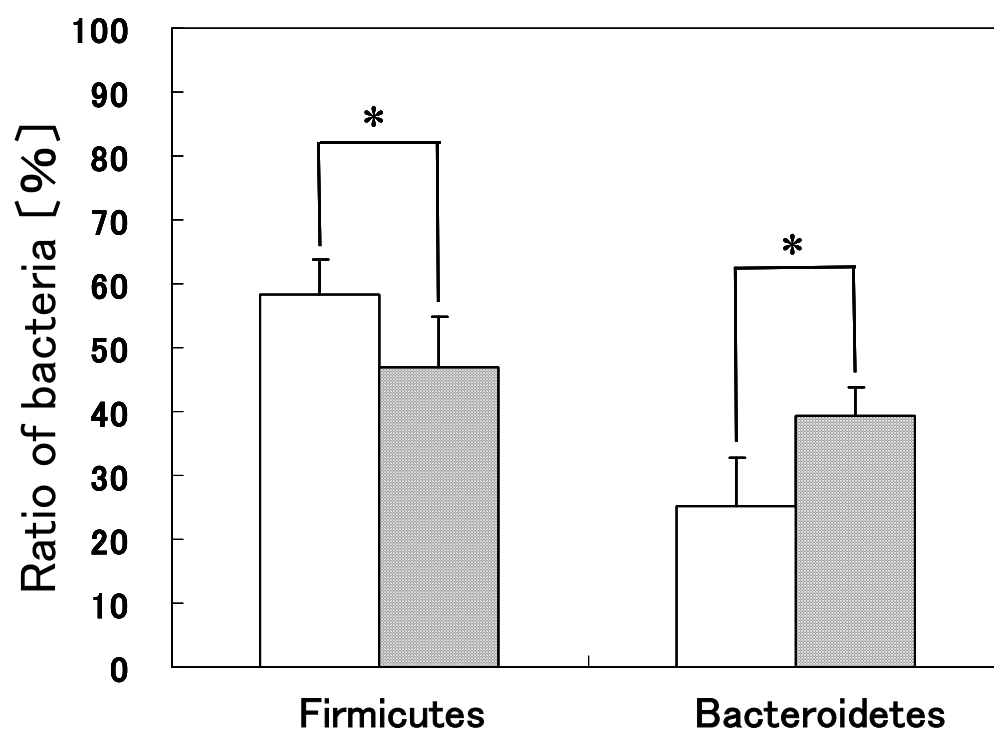
**Fig. 3-3.** Cluster analysis was performed on the intestinal microbiota composition data determined by T-RFLP analysis (Nagashima method) to construct a phylogenetic tree. (au = Approximately Unbiased, bp = Bootstrap Probability, Treated = *Salacia reticulata* extract powder treated group, Control = Control group).



**Fig. 3-4.** Fecal specimens were analyzed by T-RFLP (Nagashima method) and presented as the intestinal microbiota composition by OTU.

□ : Control group, ■ : *Salacia reticulata* extract powder treated group.

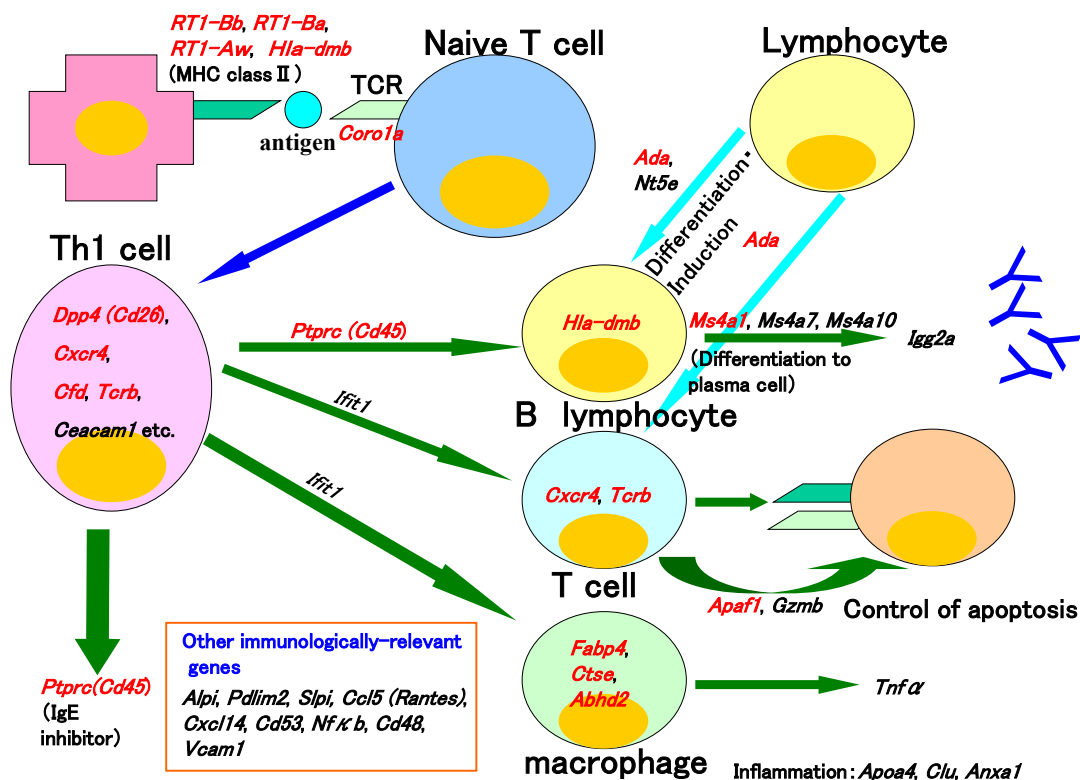
\*  $p < 0.05$ .



**Fig. 3-5.** Proportions of Firmicutes and Bacteroidetes relative to the entire intestinal microbiota population after *Salacia reticulata* extract powder treatment.

□ : Control group, ■ : *Salacia reticulata* extract powder treated group.

\*  $p < 0.05$ .



**Fig. 3-6.** Possible mechanism of action by *Salacia reticulata* extract powder speculated from the genes identified as showing increased expressions in the vicinity of Th1 cells (genes listed in Table 3-2 are shown in red, genes identified among the 237 genes showing increased expression but not used in the functional categorization by BiNGO are presented in black).



## 第 4 章

健常成人を対象にした二重盲検並行群間  
比較試験によるサラシアエキス粉末の  
ヒト免疫機能に対する作用検証

#### 4.1. 背景および目的

第3章では、ラットの試験において、サラシアエキス粉末が腸内細菌叢を変化させ、腸管免疫系を通じて生体調節作用を示す可能性を明らかにした<sup>56</sup>。免疫機能は生体の健康を維持する上で非常に重要であるが、ヒトにおける免疫機能は思春期を境に低下し始め、個人差はあるものの加齢に伴い減弱する。『平成25年（2013）人口動態統計（確定数）の概況』によれば、日本人の4大死因はがん、心疾患、脳血管疾患、感染症（肺炎）となっている<sup>57</sup>。これらの疾病の発症や症状の悪化は免疫機能の低下に関連しており、特に高齢者においては重篤な症状を呈する可能性があることから、免疫機能を回復させる方法や物質の研究が盛んに行われている。また最近の研究では、生体の免疫機能は腸内環境と密接に関連していることが示されている<sup>58, 59</sup>。さらに、生体全体および消化管の細菌叢は、年齢とともに変化していくことも明らかになっている<sup>60-62</sup>。そのため、ヨーグルトなどによるプロバイオティクス、食物繊維などのプレバイオティクス、その他腸内細菌に影響を与えるとされる多くの食品を用いて、免疫機能に対する効果の検証が行われている<sup>63-65</sup>。

第3章の結果はラットにおいて得られたものであるが、生物種が異なる場合、一貫した効果を示す食品は多くない<sup>66-69</sup>。ラットとヒトでは生活習慣、食性、消化管の構造（胆嚢の有無等）、腸内細菌叢などが大きく異なるため、ヒトの疾病予防にサラシアエキス粉末を活用していくためには、ヒトにおける効果実証が必要であると考えた。しかし、免疫機能および腸内細菌に対するサラシアエキス粉末の作用をヒトで評価した既往研究は存在しなかった。そこで、少人数の予備試験（サラシアエキス粉末摂取群のみの前後比較試験）を実施した（データ未掲載）。その結果、サラシアエキス粉末はヒトにおい

ても免疫機能および腸内細菌に作用しうる、との予備的知見を得、本試験の実施に至った。

本研究では、ヒト免疫機能に対するサラシアエキス粉末の作用を検証することを目的とした。サラシアエキス粉末の摂取試験は、免疫機能が低下した（加齢やストレスで低下する複数の免疫学的指標を総合的に評価した免疫カスコア（4.2.3.にて詳細説明）が低値（< IV）であった）健常成人を対象とし、二重盲検並行群間比較法にて実施した<sup>70, 71</sup>。ヒトを対象にした試験であるため、低侵襲で評価可能な手法を検討し、血液の各種免疫学的指標の評価および糞便を用いた腸内細菌叢解析を行うこととした。また、サラシアエキス粉末摂取群においては、DNA マイクロアレイによる血液の遺伝子発現解析も実施し、ヒトに対するサラシアエキス粉末の作用メカニズム解明を試みた。

## 4.2. 方法

### 4.2.1. 研究デザイン

本試験は、CONSORT2010 声明と『ヘルシンキ宣言』に準拠する形で、二重盲検並行群間比較法（randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled design）にて行った。試験期間は 2013 年 10 月 1 日から 28 日までの 4 週間で、日本の東京にて実施した。身長、体重、体脂肪率、血圧、脈拍数、血液生化学的検査、免疫学的指標、腸内細菌叢の測定を被験食摂取前後の全被験者に対して実施した。末梢血は遺伝子発現解析のために保存を行った。試験実施にあたり、芝パレスクリニック倫理審査委員会の承認を得、試験概要を UMIN Clinical Trials Registry（UMIN-CTR）に登録した（UMIN000011732）。

#### 4.2.2. 被験食

被験食およびプラセボ食の処方を Table 4-1 に記した。サラシアエキス粉末の摂取量は、日本人の食習慣や食事の量に合わせて、朝 60 mg（錠剤 1 粒）、昼 60 mg（錠剤 1 粒）、夜 120 mg（錠剤 2 粒）の計 240 mg/day とし、食前に水または白湯を用いて摂取することとした<sup>72-73</sup>。プラセボは、腸内環境および腸内細菌に影響を与えないエリスリトールを代替素材として設計した。プラセボ錠剤はサラシアエキス粉末含有錠剤と見分けがつかないように作製し、摂取方法もサラシアエキス粉末摂取群と同様にした。また、被験食摂取状況は web 日誌にて管理を行い、摂取率が 90% を切った被験者は解析対象から除外するものとした。

#### 4.2.3. 被験者

被験者の募集に際しては、健常者に対してアンケートを実施し、①年齢が 50 歳以上 60 歳未満の日本人（国籍ではなく、遺伝的素因を有している者）男性、②日ごろ疲労感があり、疲れが取れにくいと感じている者、③日勤労働を行っており、業務がデスクワークである者、④生活リズムが規則正しい者、という 4 項目のエントリー基準を満たす者を募集した。デスクワーク勤務者をエントリー基準に加えることで、被験者の生活習慣を合わせた。

試験開始前に、被験者に対し個別に書面にてインフォームドコンセントを実施し、同意が得られた 43 名のボランティアの中から免疫カスコアを用いてスクリーニングを実施した。

本研究で用いた免疫カスコアは、廣川らにより開発された方法である<sup>70, 71, 74</sup>。老化やストレス等で低下する T 細胞系の細胞の数や機能を複数測定し、種類や基準値の異なるデータをスコア化することにより、個人の免疫機能を総合的に評価するものである。評価では、血中の T 細胞数、T 細胞増殖係数、

CD4/CD8 細胞比、ナイーブ T 細胞数、ナイーブ/メモリー T 細胞比、B 細胞数、NK 細胞数、CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>T 細胞数の 8 パラメータを測定し、測定値データベース（年齢の異なる数千人の健常人において上記の 8 パラメータを測定したもの）から、高（3 点）、中（2 点）、低（1 点）の 3 段階に点数付けを行った。各項目の点数の合計値（免疫スコア）を用いて、5 段階（V：免疫スコアが充分高い（24 点）、IV：安全圏（23～21 点）、III：要観察圏（20～17 点）、II：要注意圏（16～13 点）、I：危険圏（12～8 点））に分類した<sup>70, 71, 74-77</sup>。この手法では、免疫スコア V および IV の者は免疫機能が正常であり、IV 未満は免疫機能が低下している者と判断される。

スクリーニングでは、免疫スコアが高値（IV 以上）の者、HbA1c が正常範囲（JDS（Japan Diabetes Society）値<5.8%）外の者を除外した上で、免疫スコア低値（<IV）の 32 名を選出した。免疫スコア、T 細胞数、T 細胞増殖能（T 細胞 1 つあたりの増殖能力）の 3 つの数値を指標とし、2 群で数値が均一になるように無作為割付を実施した。なお、割付表は割付責任者がキーオープンまで保管した。

試験期間中は、オリゴ糖、食物繊維、ヨーグルト、抗生物質など腸内細菌に影響を与える食品や医薬品の摂取のみ禁止したが、通常的生活（食事、生活リズム、睡眠時間）を維持するように指導した。また、医薬品を摂取した際は、web 日誌に記載することとした。

#### 4.2.4. 採血

2.5 ml の血液を PAXgene RNA 採血管（Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA）に採取し、遺伝子発現解析に使用した。

Ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA-2K）添加採血管に 2 ml の血液を採取し、フローサイトメトリー解析、全血球計算、白血球分画、リンパ球重

集団細胞数の測定に用いた。また、8 ml の血液を単核球分離用採血管（Becton-Dickinson）に採血し、免疫学的分析のための単核球（リンパ球と単球を合わせたもの）分離に用いた。また、別途スクリーニング（HbA1c）および安全性確認のため、血液生化学的検査を実施した。

#### 4.2.5. RNA 抽出および遺伝子発現解析（DNA マイクロアレイ）

##### 4.2.5.1. 遺伝子発現（DNA マイクロアレイ）

PAXgene RNA 採血管に採取した血液（末梢血）は $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。キーオープン後、サラシアエキス粉末摂取群の中から、ランダムに7名（14サンプル）を選定し、サラシアエキス粉末摂取前後の血液の遺伝子発現解析を行った。サンプルから PAXgene Blood RNA Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を用いて total RNA を抽出した。GLOBINclear Kit（Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA）により、グロビン RNA 除去を行ったサンプルで DNA マイクロアレイを実施した。血液由来 total RNA からの cDNA 合成、cRNA の合成および標識化、標識 cRNA の断片化は Affymetrix Inc.（Santa Clara, CA, USA）のキット（GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit）を用い、メーカープロトコルに従って行った。また、RNA の質チェックには Agilent 2100 バイオアナライザ（Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan）を用い、RNA の分解度、cRNA の伸長反応を確認した。断片化した cRNA は Hybridization Oven 640（Affymetrix Inc.）を用いて GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array（Affymetrix Inc.）に  $45^{\circ}\text{C}$  で 16 時間ハイブリダイズし、洗浄（GeneChip® Fluidics Station 450（Affymetrix Inc.））を行い、GeneChip® Scanner 3000（Affymetrix Inc.）でスキャンし、遺伝子発現量の測定を行

った。GeneChip® Operating Software ver1.4 (Affymetrix Inc.) を用いて、それぞれのプローブのイメージデータを強度値に変換した。

#### 4.2.5.2. DNA マイクロアレイデータ解析

得られたデータについて、R version 2.7.2 (<https://cran.r-project.org/>) を用いて、Distribution Free Weighted method (DFW) にて正規化を行った<sup>39)</sup>。R version 2.14.2 の Rank products (RP) method を用いて、DFW で正規化したデータの群間比較を行った<sup>41)</sup>。False Discovery Rate (FDR) < 0.05 のプローブセットを抽出し、The Database for Annotation,

Visualization and Integrated Discovery (DAVID ver. 6.7)

(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) の Jackknife Fisher exact test を用いて、生物学的機能に応じて Gene Ontology (GO) データに分類した。プローブセットの ID は、Affymetrix Inc. から提供されているものを入力データとして使用した。機能アノテーションチャートは、GO、GOTERM\_BP\_ALL における生物学的プロセスを基に分析をおこなった。また、FDR < 0.05 のプローブセットを用いて、Ingenuity Pathways Analysis (IPA)

(<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/>) にて、パスウェイ解析を実施した。

#### 4.2.6. 免疫学的指標

被験者スクリーニングおよびサラシアエキス粉末の免疫機能に対する作用評価に使用した血液の各種免疫学的指標(免疫細胞数、免疫細胞増殖係数、サイトカイン産生量等)の測定は、廣川らが以前報告した手法に基づき実施した<sup>70, 71, 74-77)</sup>。以下、参考文献と異なる部分のみ記載する。

#### 4.2.6.1. サイトカイン測定

単核球分離用採血管に採取した末梢血を 3000 rpm で 20 分間遠心 (TomyLC-230, TOMY SEIKO Co, Ltd., Tokyo, Japan) 後、ゲルバリア上の細胞層 (血中単核球) を回収し、生理食塩水で洗浄した。分離した単核球 ( $1 \times 10^6$ ) を、10% FBS、50 ng/ml PMA、500 ng/ml Ionomycin を加えた RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA) で培養した。48 時間後、Flowcytomix kit (eBioscience, San Diego, CA, USA) を用いてサイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ ) を染色し、フローサイトメーターNavios (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) でサイトカイン産生量の測定を行った。

#### 4.2.6.2. T 細胞増殖係数 (T cell proliferation index)

T 細胞増殖係数の算出は、下記の式に従って行った。T 細胞増殖能および T 細胞数の測定は、廣川らの報告を参考にした<sup>71</sup>。

$$\text{T 細胞増殖係数} = \text{T 細胞増殖能} \times (\text{T 細胞数} / \text{mm}^3) / 1000$$

#### 4.2.6.3. 免疫力年齢

免疫力年齢 (計算値年齢、Immunological age) は廣川らの報告に基づき、T 細胞増殖係数から算出 (次式) した<sup>75, 77</sup>。

$$\text{免疫力年齢} = (2.535 - \text{T 細胞増殖係数}) / 0.017$$

#### 4.2.7. 腸内細菌叢解析 (T-RFLP 法)

腸内細菌叢解析には、採便キット(株式会社テクノスルガ・ラボ, Shizuoka, Japan) を用いて採取、保存した糞便を用いた。測定は株式会社テクノスルガ・ラボ (Shizuoka, Japan) に委託し、T-RFLP 法で行った<sup>44</sup>。以下に参考文献からの改変部分を記載する。

凍結された便を、GTC Buffer (100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、40 mM Tris-EDTA (pH8.0)、4 M Guanidine Thiocyanate, 0.001% bromothymol blue) に添加し、ジルコニアビーズで破碎 (5 m/s、2 分間、FastPrep 24 Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)) し、懸濁液とした。100  $\mu$ l の懸濁液から自動核酸抽出装置 (Precision System Science, Chiba, Japan) を用いて DNA 抽出を行った。自動核酸抽出時の試薬は MagDEA® DNA 200 (GC) (Precision System Science, Chiba, Japan) を使用した。PCR に用いたプライマーは、516F の標識を参考文献に用いられていた HEX から FAM に変更した。PCR 産物の精製には、MultiScreen-PCR <sub>$\mu$ 96</sub> filter plate (Millipore, Billerica, MA, USA) を使用した。

フラグメント解析は、ABI PRISM 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で行い、解析ソフトウェアは Gene mapper (Applied Biosystems) を用いた。なお、サイズスタンダードマーカには、MapMarkerR X-Rhodamine Labeled 50-1000bp (BioVentures, Murfreesboro, TN, USA) を使用した。

#### 4.2.8. 統計解析

Kolmogorov-Smirnov test により、各種身体計測値、各種検査値、免疫学的指標、腸内細菌叢データの正規性を検討した。正規性が示されなかった場合は、被験食摂取前後の比較に Wilcoxon signed-rank test を用い、群間比

較（摂取後数値－摂取前数値）には Mann-Whitney *U*-test を用いることとした。正規性が示された場合には、摂取前後の比較に paired *t*-test を用い、群間比較は変化量を計算した上で、*F*test により分散分析を実施した。有意差の検定には、Student's *t*-test（等分散の場合）または Welch's *t*-test（不等分散の場合）を用いた。統計解析は、R version2.7.2 を用いて実施した。

### 4.3. 結果

Fig. 4-1 にスクリーニングから統計解析までの流れを記載した。本試験に参加した 32 名中 2 名が自己都合により辞退したため、30 名で統計解析を実施した。また、試験期間中に試験プロトコルの変更は生じなかった。以下の結果は、数値±標準誤差で示す。

被験者数（途中辞退者を除く）はサラシアエキス粉末摂取群、プラセボ群ともに 15 名で、年齢はサラシアエキス粉末摂取群 54.0 ± 0.6 歳、プラセボ群 54.1 ± 0.7 歳であり、群間差はなかった。また、身長、体重、体脂肪率、血圧、脈拍数、血液生化学的検査値、免疫学的指標、腸内細菌叢に関しても、摂取前の群間差は認められなかった。摂取率は両群とも 95%を上回り、web 日誌および血液生化学的検査値からサラシアエキス粉末摂取に起因すると考えられる有害事象は生じなかった。

以上の結果から、サラシアエキス粉末摂取群とプラセボ群の間に摂取前の群間差はなく、また、被験食摂取による副作用はなかったと判断した。

#### 4.3.1. 遺伝子発現解析

被験者の血液（末梢血）を PAXgene RNA 採血管に採取し、-80℃で保管した。キーオープン後、サラシアエキス粉末摂取群からランダムに 7 名（14 サンプル）を選定し、血液の RNA 抽出を行い、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現解析を実施した。遺伝子発現解析において、1017 プローブセットの発現増加と 1048 プローブセットの発現減少を確認した。DAVID を用いて発現変動したプローブセットを機能分類すると、GO ターム

（Benjamini and Hochberg  $FDR < 0.01$ ）は 59 あり、上位には免疫・生体防御に関わるタームが多く含まれていることが明らかになった。代表的なものとしては、immune system process（GO : 0002376）、immune response（GO : 0006955）、leukocyte activation（GO : 0045321）、lymphocyte activation（GO : 0046649）、response to biotic stimulus（GO : 0009607）、response to stress（GO : 0006950）、defense response（GO : 0006952）、response to stimulus（GO : 0050896）、T cell activation（GO : 0042110）が含まれていた〔Table 4-2〕。また、抽出された GO タームには、response to bacterium（GO : 0009617）、response to molecule of bacterial origin（GO : 0002237）、response to lipopolysaccharide（GO : 0032496）が含まれており、腸内細菌の作用と考えられる遺伝子発現変動も確認できた。

この結果を踏まえて、Ingenuity Pathway Analysis（IPA）を用いた詳細解析を行った。IPA による Canonical Pathway 解析では、Interferon（IFN）signaling に関連する遺伝子が発現変動遺伝子として濃縮されていることが明らかになった〔Fig. 4-2〕。JAK や STAT により仲介される IFN signaling を中心に見ていくと、関連する遺伝子の多くが発現増加していた。発現増加遺伝子には、Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1（*IFIT1*、Gene symbol: *IFIT1*）、Interferon-induced protein with

tetratricopeptide repeats 2 (*IFIT2*, Gene symbol: *IFIT2*)、Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (*IFIT3*, Gene symbol: *IFIT3*)、Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5 (*IFIT5*, Gene symbol: *IFIT5*)、Interferon-induced protein 44 (*IFI44*, Gene symbol: *IFI44*)、Interferon, alpha-inducible protein 6 (*IFI6*, Gene symbol: *IFI6*) などの IFN 誘導に関わる遺伝子が多く含まれていた。また、抗ウイルス作用に関わる myxovirus (influenza virus) resistance 1 (*MX1*, Gene symbol: *MX1*)、2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 (*OAS1*, Gene symbol: *OAS1*)、2'-5'-oligoadenylate synthetase 3 (*OAS3*, Gene symbol: *OAS3*) や、菌を認識する toll-like receptor 1 (*TLR1*, Gene symbol: *TLR1*)、toll-like receptor 5 (*TLR5*, Gene symbol: *TLR5*)、ヒスタミン分解に作用する Histamine N-methyltransferase (*HNMT*, Gene symbol: *HNMT*) も発現増加していた。

発現減少遺伝子には、IFN signaling 関連遺伝子を除く多数の炎症関連遺伝子が含まれていた。アレルギー反応に関わる prostaglandin D2 synthase (*PTGDS*, Gene symbol: *PTGDS*)、prostaglandin D2 receptor (*PTGDR*, Gene symbol: *PTGDR*) や、活性化された細胞傷害性 T 細胞 (CTL) や NK 細胞に発現する Granulysin (*GNLY*, Gene symbol: *GNLY*) などが発現減少していた。また、Janus kinase 1 (*JAK1*, Gene symbol: *JAK1*) や RAR-related orphan receptor A (*RORA*, Gene symbol: *RORA*) など T helper 17 (Th17) 細胞に関わる遺伝子の発現減少も見られた。

これらの結果からサラシアエキスポ末は、ラットに限らずヒトにおいても細胞性免疫に関与する Th1 細胞関連遺伝子 (IFN signaling 関連遺伝子) の発現を増加させることが明らかになった。

#### 4.3.2. 免疫学的指標

末梢血および分離した単核球を用いて、各種免疫学的指標（免疫細胞数、免疫細胞増殖係数、サイトカイン産生量等）の測定および算出を行った。以下、変化のあった項目のみ記載する。

T細胞増殖係数は、サラシアエキス粉末摂取群で摂取前  $1.44 \pm 0.14$  から摂取後  $1.68 \pm 0.17$  に有意に上昇（ $p = 0.0133$ ）したのに対し、プラセボ群では摂取前  $1.58 \pm 0.14$ 、摂取後  $1.53 \pm 0.11$  で有意な変化はなかった。群間比較（摂取前後の差（摂取後数値－摂取前数値）の比較）では、サラシアエキス粉末摂取群が  $0.24 \pm 0.08$  上昇したのに対し、プラセボ群は  $0.05 \pm 0.10$  低下し、プラセボ群と比較してサラシアエキス粉末摂取群は T細胞増殖係数が有意に上昇した（ $p = 0.0426$ ）〔Fig. 4-3〕。

CD4<sup>+</sup> naive T細胞数は、サラシアエキス粉末摂取群では摂取前  $245 \pm 34$  / $\mu$ l から摂取後  $301 \pm 42$  / $\mu$ l となり、有意に増加（ $p = 0.0005$ ）した。プラセボ群においては、摂取前  $267 \pm 33$  / $\mu$ l、摂取後  $287 \pm 29$  / $\mu$ l であり、有意な変化ではなかった。群間比較では、サラシアエキス粉末摂取群が  $56.80 \pm 12.50$  / $\mu$ l 増加したのに対し、プラセボ群の増加は  $19.67 \pm 14.26$  / $\mu$ l であり、プラセボ群と比較してサラシアエキス粉末摂取群は CD4<sup>+</sup> naive T細胞数が増加傾向を示した（ $p = 0.0602$ ）〔Fig. 4-4〕。

T細胞増殖係数を基に算出した免疫力年齢において、サラシアエキス粉末摂取群は摂取前  $60.1 \pm 1.6$  歳であったのに対し、摂取後は  $58.1 \pm 3.9$  歳となり、有意に低下（ $p = 0.0271$ ）した。一方プラセボ群では摂取前  $59.0 \pm 1.5$  歳、摂取後  $59.8 \pm 1.3$  歳で有意な変化は確認できなかった。群間比較では、サラシアエキス粉末摂取群では、 $2.00 \pm 0.81$  歳低下したのに対し、プラセボ群では  $0.80 \pm 0.99$  歳上昇し、プラセボ群と比較してサラシアエキス粉末摂取群は免疫力年齢が有意に低下した（ $p = 0.0373$ ）〔Fig. 4-5〕。

単核球における IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$  の産生量は、摂取前後、群間ともに変化がなかった。IL-6 産生量は、サラシアエキス粉末摂取群において摂取後に減少傾向 ( $p = 0.0566$ ) を示したが、プラセボ群では産生量の変化は見られなかった。群間比較では、プラセボ群と比較してサラシアエキス粉末摂取群は IL-6 産生量が減少傾向を示した ( $p = 0.0792$ ) [Fig. 4-6]。

各種免疫学的指標の評価結果から、サラシアエキス粉末は加齢に伴い低下した免疫機能を高める可能性が示された。

#### 4.3.3. 腸内細菌叢解析

ラットの結果との比較を行うため、第 3 章と同様に T-RFLP 法を用いて腸内細菌叢の解析を実施した。解析の結果、サラシアエキス粉末摂取により腸内細菌叢の構成比率が大きく変化していることが明らかになった。代表的な変化として、*Bifidobacterium* (OTU: 124) 比率は、サラシアエキス粉末摂取群において、摂取前は  $7.1 \pm 2.4\%$  であったのに対し、摂取後は  $36.2 \pm 6.1\%$  となり、大幅に上昇した ( $p = 0.0006$ )。一方プラセボ群においては、*Bifidobacterium* 比率が摂取前  $5.7 \pm 1.1\%$ 、摂取後  $6.6 \pm 1.1\%$  であり、有意な変化ではなかった。また、群間比較では、プラセボ群と比較してサラシアエキス粉末摂取群は *Bifidobacterium* 比率が有意に上昇していた ( $p = 0.0027$ ) [Fig. 4-7]。Lactobacillales (OTU: 332, 520, 657) 比率も、サラシアエキス粉末摂取群の摂取前  $2.9 \pm 0.7\%$  が摂取後は  $11.7 \pm 3.3\%$  となり、有意に上昇した ( $p = 0.0043$ )。プラセボ群は、摂取前  $4.6 \pm 2.6\%$ 、摂取後  $5.9 \pm 3.2\%$  であり有意差はなかった。群間比較において有意差はつかなかったものの、プラセボ群と比較してサラシアエキス粉末摂取群は Lactobacillales 比率が上昇傾向を示した ( $p = 0.0742$ )。

逆に比率が低下した菌としては、Clostridiaceae (OTU: 106, 168, 338, 369, 423, 494, 505, 517, 650, 749, 754, 955, 990、*Clostridium* cluster IV、*Clostridium* subcluster XIVa、*Clostridium* cluster XI、*Clostridium* cluster XVIII) 比率がサラシアエキス粉末摂取群の摂取前は  $32.7 \pm 2.6\%$ であったのに対し、摂取後は  $17.6 \pm 2.7\%$ となり、顕著に低下した ( $p = 0.0033$ )。プラセボ群では、摂取前  $33.6 \pm 3.4\%$ 、摂取後  $31.7 \pm 3.4\%$ で有意な変化はなかった。群間比較では、プラセボ群に対しサラシアエキス粉末摂取群は Clostridiaceae 比率が有意に低下した ( $p = 0.0114$ ) [Fig. 4-8]。

Bacteroidetes 比率はサラシアエキス粉末摂取群において摂取前は  $31.3 \pm 3.6\%$ 、摂取後は  $21.2 \pm 4.0\%$ となり、低下傾向を示した ( $p = 0.0777$ )。一方、プラセボ群では、摂取前は  $35.4 \pm 4.04\%$ 、摂取後は  $38.7 \pm 4.0\%$ であり、有意な変化はなかった。群間比較においては、プラセボ群に対しサラシアエキス粉末摂取群は Bacteroidetes 比率が有意に低下した ( $p = 0.0320$ )。

腸内細菌叢解析の結果から、サラシアエキス粉末はヒトにおいても腸内細菌叢を変化させることが明らかになった。

#### 4.4. 考察

本研究は、免疫機能が低下した（加齢やストレスで低下する複数の免疫学的指標を総合的に評価した免疫力スコアが低値（<IV）であった）健常成人において、血液の遺伝子発現および各種免疫学的指標、糞便の腸内細菌叢に対するサラシアエキス粉末の作用を評価した。

血液（末梢血）を用いた遺伝子発現解析では、細胞性免疫に関与する Th1 細胞関連遺伝子（IFN signaling 関連遺伝子）の発現が増加しており、IFN signaling 関連遺伝子を除く炎症関連遺伝子の発現が減少した。これらの結果はサラシアエキス粉末が、ヒト免疫機能に対して作用することを示すものであり、表現型としては、T 細胞増殖係数の向上や CD4<sup>+</sup> naive T 細胞数の増加傾向、IL-6 産生量の減少傾向が示された。T 細胞増殖係数や CD4<sup>+</sup> naive T 細胞数は、加齢に伴い低下する指標であるため、これらの指標の向上はサラシアエキス粉末が生体機能を若返らせることを示唆するものである<sup>70, 71</sup>。実際、T 細胞増殖係数から算出される免疫力年齢は、プラセボ群と比較して、サラシアエキス粉末摂取群で顕著に低下した。また、サラシアエキス粉末摂取により、加齢に伴い減少することが知られている *Bifidobacterium* 比率の上昇や、*Clostridiaceae* 比率の低下など、腸内細菌叢の変化が示された<sup>80</sup>。腸内細菌（腸内環境）は、全身の免疫機能に影響を及ぼすことが明らかになっている<sup>78, 79</sup>。本研究においてサラシアエキス粉末摂取群は、腸内細菌叢と（全身の免疫機能を示す）血液の免疫学的指標・免疫関連遺伝子発現がともに顕著に変化しており、腸内細菌と免疫機能の関連性を解明する足掛かりになると考える。

サラシアエキス粉末に含まれるチオ糖は、種々の  $\alpha$ -グルコシダーゼの作用を阻害し、多様な糖（オリゴ糖）の分解・吸収を抑制すると考えられている<sup>3, 4</sup>。本試験においては、サラシアエキス粉末摂取により腸内残存量が増

加した食事（炭水化物）由来の様々な糖（オリゴ糖）が、*Bifidobacterium* などオリゴ糖資化能を有する腸内細菌の生育を助け、増加した菌が生体の免疫機能に作用した可能性がある<sup>15, 21, 62</sup>。

本試験は男性を対象としたが、以前の検討において、サラシアエキス粉末摂取による腸内細菌叢の変化に男女差がなかった（データ未掲載）ことから、女性においてもサラシアエキス粉末が免疫機能に対して作用する可能性は高いと考える。また、サラシアエキス粉末摂取による糖の吸収抑制（腸内細菌へのオリゴ糖供給）が毎食時起こることや、菌の増殖速度等から、本試験期間（4週間）よりも短期間で腸内細菌叢および血液の免疫学的指標・遺伝子発現が変化している可能性がある。予備的な検討ではあるが、4週間より短期間のサラシアエキス粉末摂取により腸内細菌叢が変化することを確認しており（データ未掲載）、今後、効果が得られる最短摂取期間についても検証を行っていきたい。

血液の遺伝子発現解析結果を詳細に見ていくと、フラジェリン（Flagellin：菌の鞭毛を構成するタンパク質）認識に関与する *TLR5* 遺伝子の発現が増加していた。*TLR5* 刺激は *Th1* 細胞と *Th17* 細胞を誘導することが知られている<sup>81, 82</sup>。本研究においては、*IFN signaling* 等の *Th1* 細胞関連遺伝子の発現が増加した。一方、*JAK1* や *RORA* などの *Th17* 細胞に関わる遺伝子の発現は減少しており、*Th17* 細胞を誘導する *IL-6* の産生量も減少傾向を示した。以上の結果から、サラシアエキス粉末は *TLR5 signaling* を活性化して *Th1* 細胞を誘導することで、加齢やアレルギー等による過剰な炎症反応を抑え、生体調節機能の乱れを正す可能性が示された。本研究においては、*Th1* 細胞を誘導する *IL-12* の産生量の増加は見られなかったが、血液の遺伝子発現が変動したことから、今後表現型としても *Th1* 細胞誘導作用が示されるのではないかと考える。

#### 4.5. 結論

本研究により、サラシアエキス粉末は、加齢に伴い低下する血液の免疫学的指標（T 細胞増殖係数、CD4<sup>+</sup> naive T 細胞数）や腸内の *Bifidobacterium* 比率を回復させ、生体防御機能を高める可能性が示された。また本研究では、加齢に伴い低下する免疫機能を食品成分が改善できることを明らかにした。さらに本試験で示されたサラシアエキス粉末摂取による細胞性免疫の誘導は、第 3 章のラット試験結果と一致するものである。今後、サラシアエキス粉末に含まれる成分やサラシアエキス粉末摂取により比率が変化する菌について詳細な検討を行い、腸内細菌叢の構成異常である『dysbiosis』の改善や、疾病の予防に利用していきたい。また、複数の評価を組み合わせた食品の有用性試験は少ないため、本試験の手法および結果は、今後の機能性食品研究の試金石となり得ると考えている。

【表および図】

Table 4-1. Formulae of test and placebo tablet formulations.

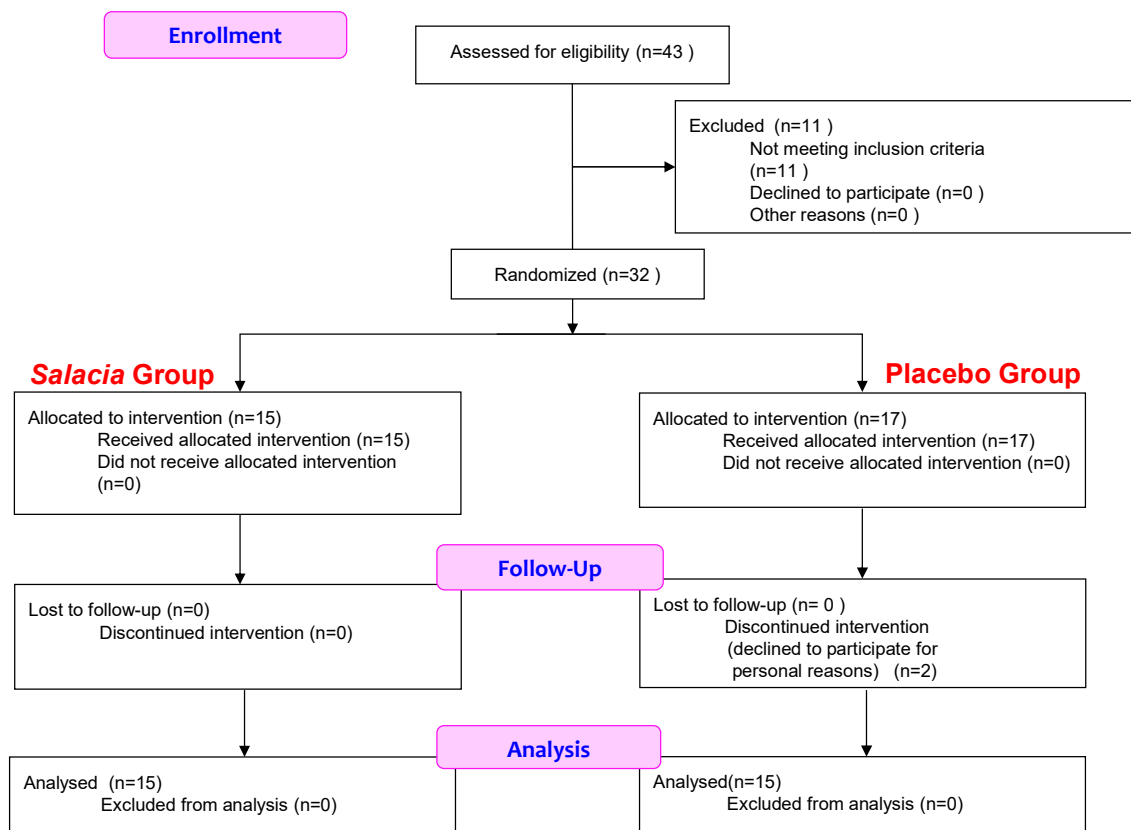
	Salacia (mg)	Placebo (mg)
Salacia reticulata extract	60.00	–
Calcium carbonate	6.00	–
Crystalline cellulose	172.75	175.00
Scrose fatty acid ester	7.50	–
Silica dioxide	3.75	2.50
Erythritol	–	50.00
Calcium stearate	–	2.50
Color adjuster	–	20.00

**Table 4-2.** GO terms with Benjamini and Hochberg FDR-corrected  $p$ -value of  $< 0.01$ .

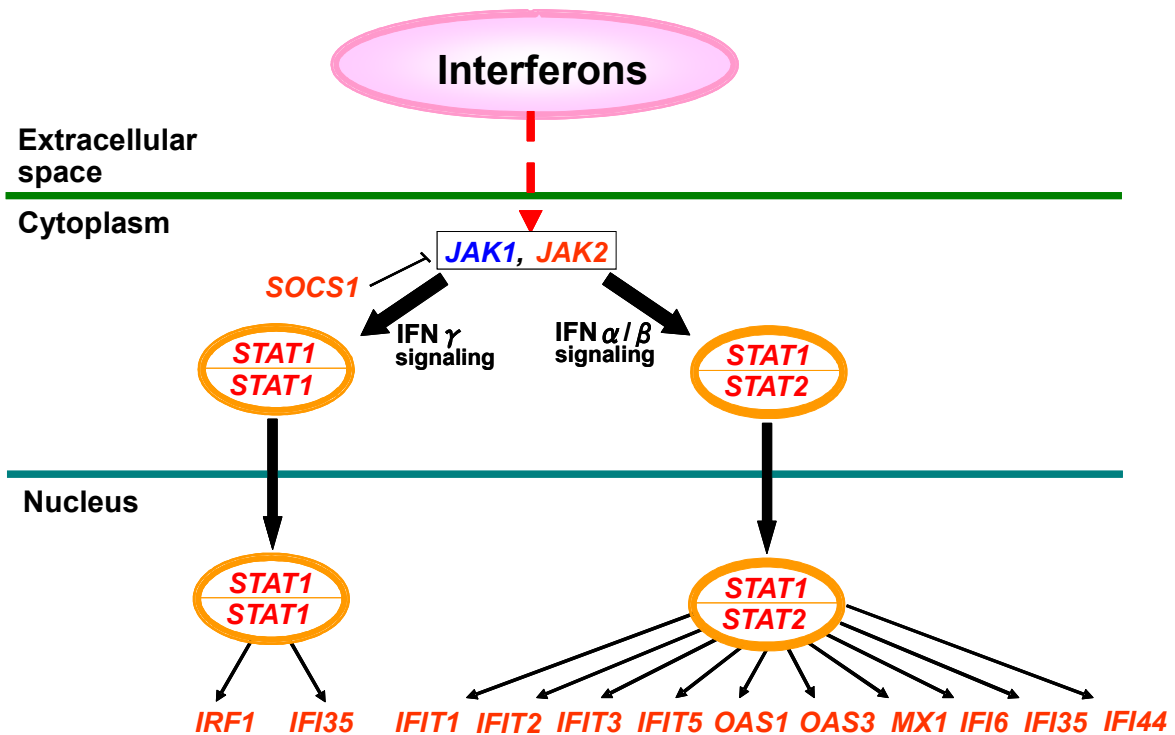
Term	Count	Benjamini
GO:0002376, immune system process	181	4.36E-27
GO:0006955, immune response	135	1.28E-22
GO:0045321, leukocyte activation	54	8.33E-10
GO:0006952, defense response	95	1.23E-08
GO:0001775, cell activation	57	1.54E-08
GO:0051707, response to other organism	56	6.11E-08
GO:0046649, lymphocyte activation	44	8.47E-08
GO:0009607, response to biotic stimulus	64	1.00E-06
GO:0006950, response to stress	189	1.88E-06
GO:0048518, positive regulation of biological process	219	2.30E-06
GO:0043067, regulation of programmed cell death	106	4.87E-06
GO:0042981, regulation of apoptosis	105	5.10E-06
GO:0010941, regulation of cell death	106	4.90E-06
GO:0006968, cellular defense response	20	1.24E-05
GO:0048522, positive regulation of cellular process	197	2.45E-05
GO:0051704, multi-organism process	90	2.72E-05
GO:0050896, response to stimulus	335	2.63E-05
GO:0042110, T cell activation	29	2.69E-05
GO:0002520, immune system development	47	3.89E-05
GO:0002682, regulation of immune system process	59	3.76E-05
GO:0048534, hemopoietic or lymphoid organ development	45	4.16E-05
GO:0009617, response to bacterium	37	4.34E-05
GO:0030097, hemopoiesis	42	4.72E-05
GO:0030098, lymphocyte differentiation	25	6.20E-05
GO:0006916, anti-apoptosis	38	6.99E-05
GO:0006954, inflammatory response	51	1.05E-04
GO:0030217, T cell differentiation	19	1.03E-04
GO:0006414, translational elongation	24	1.42E-04
GO:0043066, negative regulation of apoptosis	53	2.38E-04
GO:0002819, regulation of adaptive immune response	17	2.39E-04
GO:0043069, negative regulation of programmed cell death	53	3.39E-04
GO:0060548, negative regulation of cell death	53	3.56E-04
GO:0048872, homeostasis of number of cells	23	3.76E-04
GO:0002521, leukocyte differentiation	27	3.82E-04
GO:0009611, response to wounding	70	3.88E-04
GO:0002237, response to molecule of bacterial origin	21	3.85E-04
GO:0048523, negative regulation of cellular process	172	5.00E-04
GO:0048519, negative regulation of biological process	185	4.89E-04
GO:0007243, protein kinase cascade	53	6.53E-04

Continued

Term	Count	Benjamini
GO:0002822, regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	16	7.02E-04
GO:0032496, response to lipopolysaccharide	19	9.41E-04
GO:0009615, response to virus	23	0.00128
GO:0034097, response to cytokine stimulus	19	0.00131
GO:0002684, positive regulation of immune system process	38	0.00131
GO:0006915, apoptosis	73	0.0035
GO:0010033, response to organic substance	84	0.00362
GO:0016265, death	84	0.00412
GO:0050776, regulation of immune response	35	0.00513
GO:0008219, cell death	83	0.00515
GO:0012501, programmed cell death	73	0.0051
GO:0007259, JAK-STAT cascade	12	0.00631
GO:0006357, regulation of transcription from RNA polymerase II	83	0.00704
GO:0009893, positive regulation of metabolic process	100	0.00879
GO:0043068, positive regulation of programmed cell death	55	0.0089
GO:0002252, immune effector process	24	0.00902
GO:0007242, intracellular signaling cascade	129	0.00966
GO:0010942, positive regulation of cell death	55	0.00949
GO:0031325, positive regulation of cellular metabolic process	96	0.00945
GO:0009605, response to external stimulus	99	0.0094

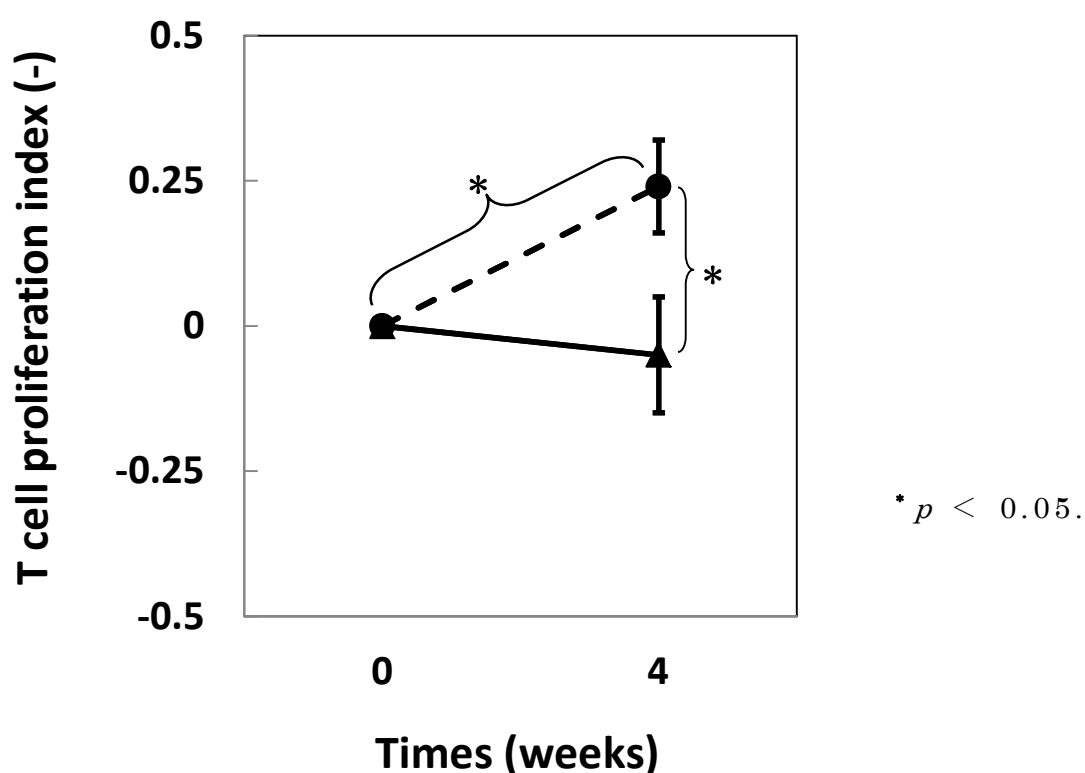


**Fig. 4-1.** Flow and number of subjects in each phase of the study.



**Fig. 4-2.** Genes whose expression was altered by *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

Probe sets acquired by the rank products method are shown (FDR < 0.05). Expression levels of multiple Interferon signaling-associated genes were altered, with levels of most genes being increased after *Salacia reticulata* extract powder ingestion. Red text: upregulated genes and blue text: downregulated genes.

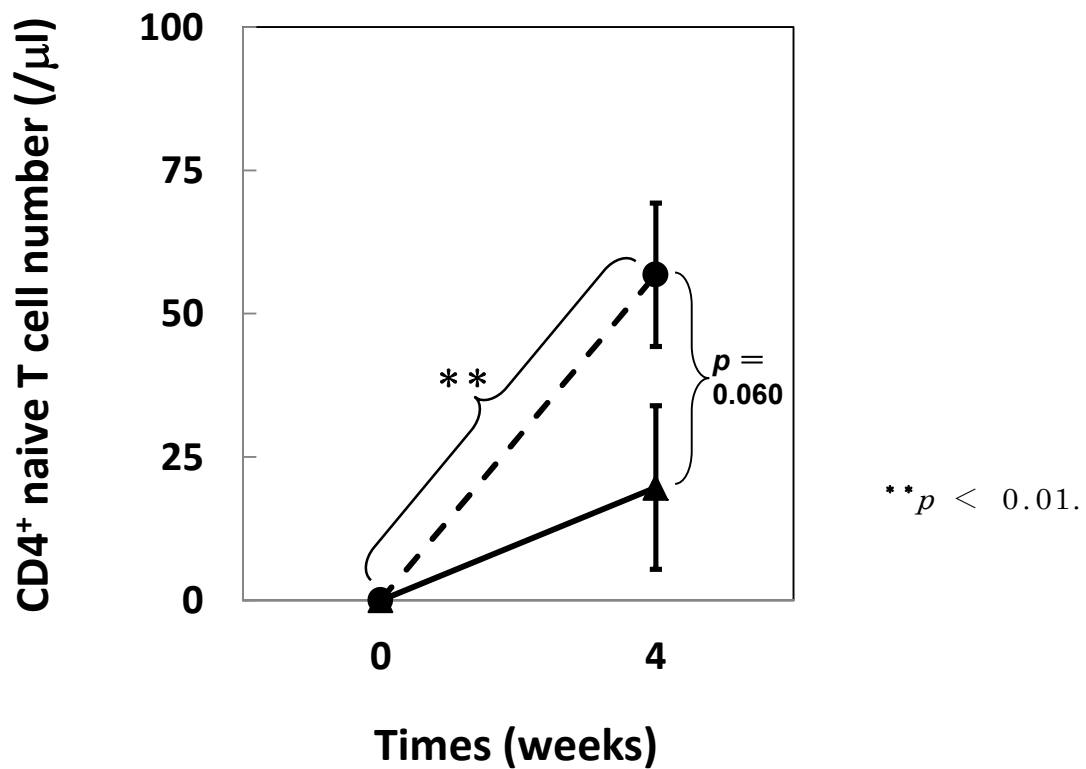


**Fig. 4-3.** Changes in T cell proliferation index after *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

Changes in the T cell proliferation index from the initial values to the values after 4 weeks are shown in the plot. Although the index decreased by  $0.05 \pm 0.10$  in the Placebo group, it increased by  $0.24 \pm 0.08$  in the *Salacia reticulata* extract powder ingestion group. The change in T cell proliferation index showed a statistically significant difference between the two groups ( $p < 0.05$ ).

( $p < 0.05$  for a comparison between pre- and post-ingestion in the *Salacia reticulata* extract powder ingestion group).

—▲— : Placebo, —●— : *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

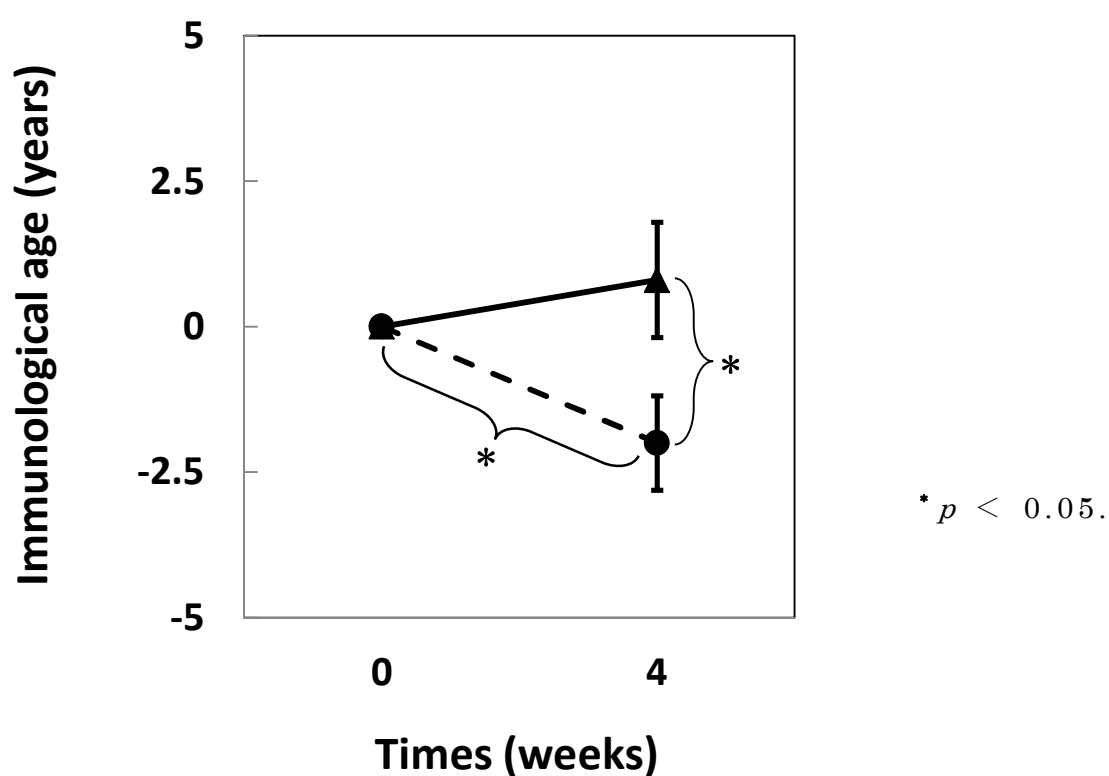


**Fig. 4-4.** Changes in CD4<sup>+</sup> naive T cell count after *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

Changes in the CD4<sup>+</sup> naive T cell count from the initial values to the values after 4 weeks are shown in the plot. The cell count increased by  $19.67 \pm 14.26$  /μl in the Placebo group, whereas it increased by  $56.80 \pm 12.50$  /μl in the *Salacia reticulata* extract powder ingestion *Salacia reticulata* extract powder ingestion group. The change in CD4<sup>+</sup> naive T cell count showed a trend toward a significant difference between the two groups.

( $p < 0.01$  for a comparison between pre- and post-ingestion in the *Salacia reticulata* extract powder ingestion group).

—▲— : Placebo, —●— : *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

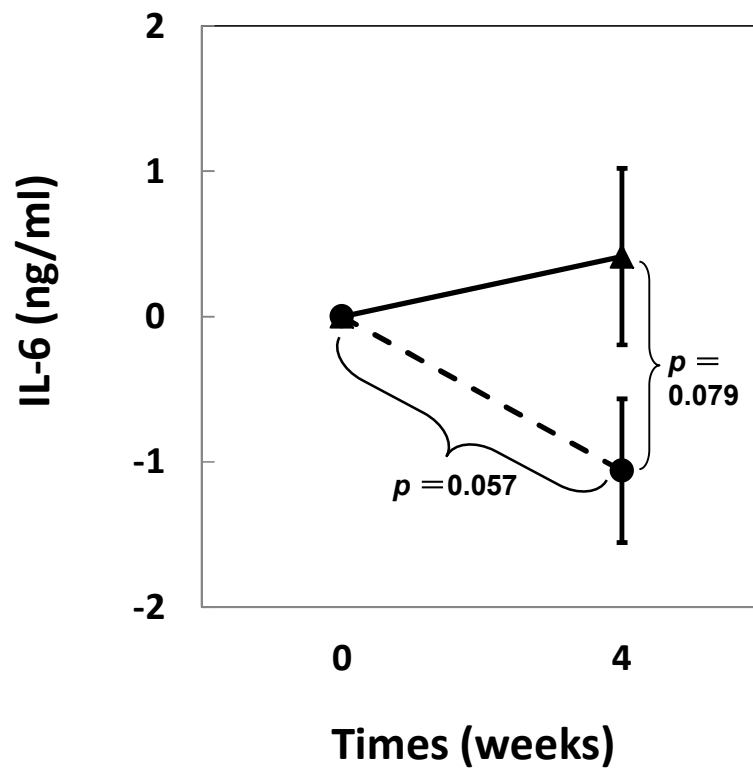


**Fig. 4-5.** Changes in immunological age after *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

Changes in the immunological age from the initial values to the values after 4 weeks are shown in the plot. The age increased by  $0.80 \pm 0.99$  years in the Placebo group, whereas it decreased by  $2.00 \pm 0.81$  years in the *Salacia reticulata* extract powder ingestion group. The change in immunological age showed a statistically significant difference between the two groups ( $p < 0.05$ ).

( $p < 0.05$  for a comparison between pre- and post-ingestion in the *Salacia reticulata* extract powder ingestion group).

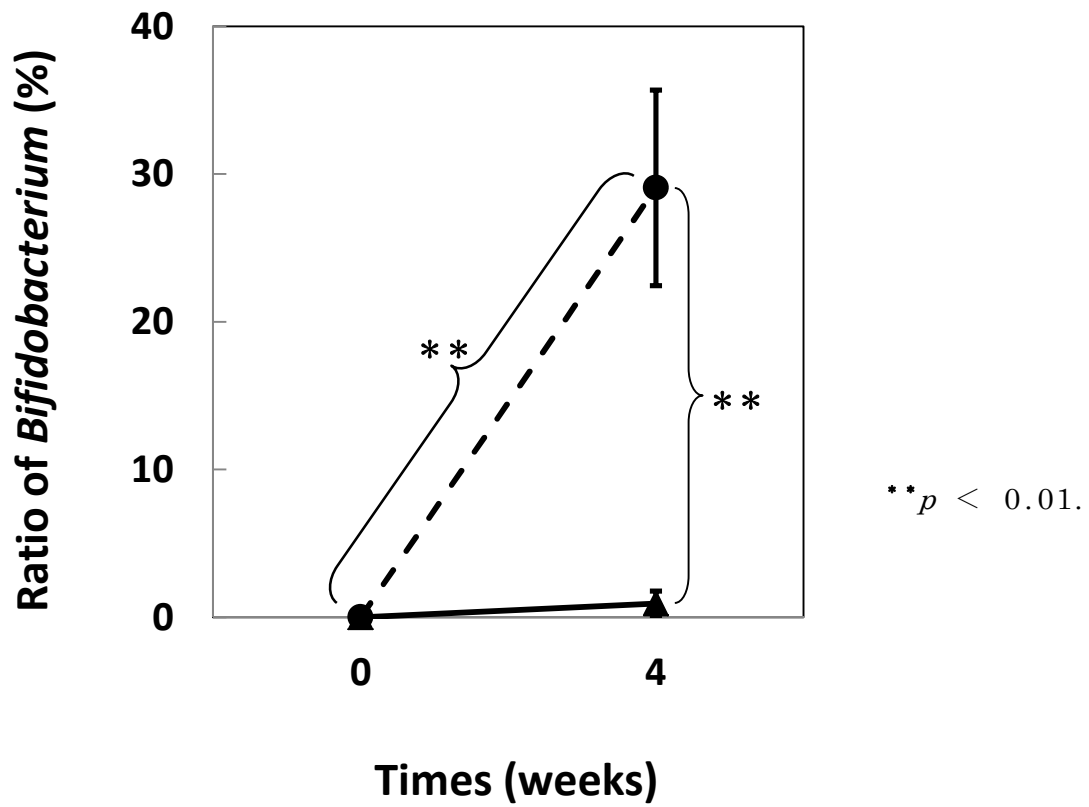
—▲— : Placebo, —●— : *Salacia reticulata* extract powder ingestion.



**Fig. 4-6.** Changes in IL-6 production after *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

The IL-6 production level showed a tendency to decrease in both pre-ingestion versus post-ingestion and intergroup comparisons.

—▲— : Placebo, —●— : *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

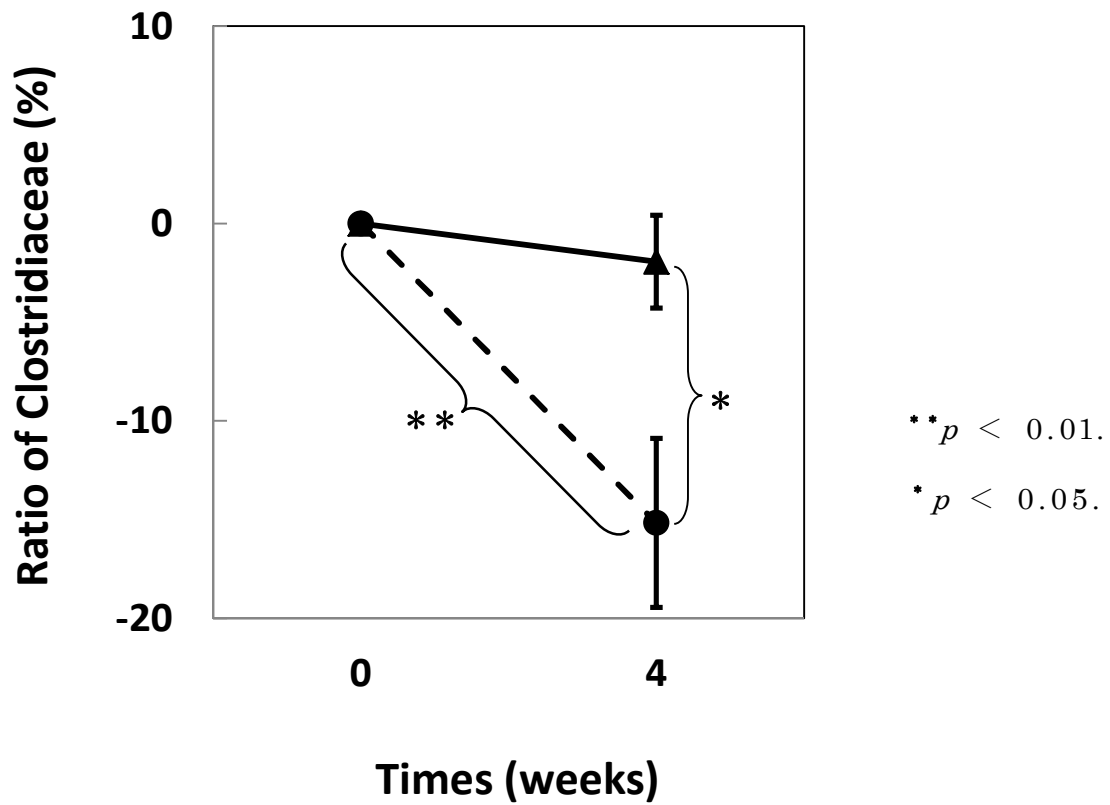


**Fig. 4-7.** Changes in the proportion of *Bifidobacterium* after *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

The change in *Bifidobacterium* showed a statistically significant difference between the two groups ( $p < 0.01$ ).

( $p < 0.01$  for a comparison between pre- and post-ingestion in the *Salacia reticulata* extract powder ingestion group).

—▲— : Placebo, —●— : *Salacia reticulata* extract powder ingestion.



**Fig. 4-8.** Changes in the proportion of Clostridiaceae after *Salacia reticulata* extract powder ingestion.

The change in Clostridiaceae showed a statistically significant difference between the two groups ( $p < 0.05$ ).

( $p < 0.01$  for a comparison between pre- and post-ingestion in the *Salacia reticulata* extract powder ingestion group).

—▲— : Placebo, —●— : *Salacia reticulata* extract powder ingestion.



## 第 5 章

### 総合討論

### 5.1. 研究総括

サラシアは、インドやスリランカの薬用植物として珍重されてきた。伝統医学アーユルヴェーダにおいては、サラシアの木で作製したコップに水を入れ、染み出してきた有効成分を摂取することにより、糖尿病や肥満の予防に用いてきたと言われている。サラシアの幹や根を抽出し作製したサラシアエキス粉末は、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有するサラシノール、コタラノール等のチオ糖を含むことから、糖の吸収抑制作用と、それに付随する血糖値や肥満改善作用についての研究が盛んに行われてきた<sup>8, 16, 83</sup>。本研究開始前に、サラシアエキス粉末の機能について既往研究調査を実施したが、その多くは糖の吸収抑制に関するもので、それ以外の機能についてはほとんど研究されていなかった。しかし、複雑に制御・維持されている生体において、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害により引き起こされる作用は、血糖値の上昇抑制だけではないのではないかと考えた。また、サラシアエキス粉末の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害以外の機能についても明らかにしたいと考えた。

そこで本研究においては、糖の吸収抑制にとどまらないサラシアエキス粉末の新規機能を解明することを目的とした。研究を始めるにあたり、サラシアエキス粉末の主要有効成分（チオ糖）が作用する消化管に着目した。糖の吸収が抑制されれば、消化管内に吸収されなかった糖（オリゴ糖）が残されることになる。オリゴ糖は *Bifidobacterium* などの腸内細菌により資化され、腸内環境を整えることが知られている<sup>23, 66, 84</sup>。サラシアエキス粉末も腸内環境に対して作用を示すのではないかという仮説を立て、検証を行うこととした。

また、機能性研究を行う前に重要なのが安全性の確認である。日本で一般的に流通しているサラシア製品は、サラシアの原木を破砕して表面積を増やしたチップを熱水で抽出し、得られたエキスをさらに濃縮して粉末化したエ

キス粉末を使用している。このエキスパウダーは、アーユルヴェーダで用いられてきたサラシアエキスと比較して、チオ糖等の成分濃度がかなり高いと考えた。そこで機能性研究に着手する前に、日本で最も流通している *Salacia reticulata* の幹と根を熱水抽出して作製したサラシアエキスパウダーについて、安全性情報を収集した。調査の結果、サラシアエキスパウダーの既往研究としては、急性毒性、染色体異常、変異原性、抗原性、光毒性の試験がなされていたが、長期摂取を想定した安全性試験に関する研究報告はなかった<sup>26-31</sup>。そのため本研究においては、最初に長期投与によるサラシアエキスパウダーの安全性を確認した上で、動物試験にて消化管（回腸粘膜および腸内細菌叢）への作用を解明し、最後にヒトに対する効果の検証を行った。

第2章では、長期摂取を想定した安全性確認として、サラシアエキスパウダーの亜慢性毒性試験を行った。SD ラットを対象にした3か月間の亜慢性毒性試験の結果、ヒト摂取量の100倍量（400 mg/kg body weight/day）投与においても、毒性を示す所見がないことを確認し、サラシアエキスパウダーの無毒性量（No Observed Adverse Effect Level : NOAEL）は400 mg/kg body weight/day であると結論付けた<sup>85</sup>。

第3章では、 $\alpha$ -グルコシダーゼ発現部位である小腸におけるサラシアエキスパウダーの作用を包括的に解明することを目的とした。SD ラットを対象とし、DNA マイクロアレイを用いて、 $\alpha$ -グルコシダーゼが発現している小腸の一部で、パイエル板を多く有し、吸収・異物の排除などにおいて重要な役割を果たす回腸（回腸粘膜）の遺伝子発現解析を実施した。また、吸収されずに消化管内に残されたオリゴ糖の作用を解明するため、T-RFLP 法による腸内細菌叢の解析も併せて実施した。サラシアエキスパウダー投与量はヒトの摂取量の5倍量である20 mg/kg body weight/day に設定し、投与期間は亜慢性毒性試験と同様の3か月（91日）間とした。遺伝子発現解析の結果、サラ

シアエキス粉末は、回腸粘膜において異物認識や生体防御など免疫機能に関わる遺伝子、特に細胞性免疫に関与する Th1 細胞関連遺伝子の発現を増加させた。また腸内細菌叢解析では、腸内細菌叢の構成比率を変化させ、免疫賦活作用を有する細菌（*Bacteroidetes*）の比率を上昇させた。これらの結果から、サラシアエキス粉末が、腸内細菌叢を変化させ、腸管免疫系を通じて生体機能を調節する可能性を示した<sup>56</sup>。

第4章では、第3章の結果を受け、ヒト免疫機能に対するサラシアエキス粉末の作用を検証するため、免疫機能が低下した（加齢やストレスで低下する複数の免疫学的指標を総合的に評価した免疫カスコアが低値（<IV）であった）健康成人を対象とし、28日間の摂取試験を二重盲検並行群間比較法にて実施した。測定項目は、血液の各種免疫学的指標（免疫細胞数、免疫細胞増殖係数、サイトカイン産生量等）評価、血液（末梢血）の遺伝子発現解析（DNA マイクロアレイ）、糞便を用いた腸内細菌叢解析（T-RFLP 法）とした。4週間のサラシアエキス粉末摂取の結果、T細胞増殖係数の向上、CD4<sup>+</sup> naive T細胞数の増加傾向、Th1細胞関連遺伝子（IFN signaling 関連遺伝子）の発現増加、腸内細菌叢の大幅な変化（*Bifidobacterium* 比率の上昇、*Clostridiaceae* 比率の低下）等が示された。以上の結果より、サラシアエキス粉末が、加齢に伴い低下する血液の免疫学的指標（T細胞増殖係数、CD4<sup>+</sup> naive T細胞数）や腸内の *Bifidobacterium* 比率を回復させ、生体防御機能を高める可能性を示した。また、加齢に伴い低下する免疫機能を食品成分が改善できることを明らかにした。さらに、サラシアエキス粉末摂取による細胞性免疫の誘導は、ラット、ヒトともに示される作用であることを確認した<sup>86</sup>。

## 5.2. 本研究の評価手法について

本研究においては、サラシアエキス粉末の消化管に対する作用をラットで明らかにした後に、ヒトで検証試験を行った。ラットとヒトは腸内細菌や、胆嚢をはじめとする消化管の構造等が異なることから、ラットで示された作用がヒトにおいて再現できるか不明であった。実際、動物で得られた効果がヒトでは再現できないことは間々あることである<sup>87)</sup>。本研究で、ラットの試験結果がヒトにおいても再現できた要因としては、①動物試験の投与量を低めに設定したこと、②特定の細菌の増減のみにこだわらず、菌叢全体の動きをとらえたこと、が大きかったのではないかと考えている。

①ラットやマウスに対する医薬品や食品の投与試験では、通常、吸収動態等のデータから用量を設定する。しかし、サラシアエキス粉末の主要有効成分であるチオ糖は体内に吸収されないため、用量の設定が困難であった。また、サラシアエキス粉末中の既知ポリフェノール含有量は、作用を示さないほど少量であったため、チオ糖以外の成分の吸収動態データから用量設定を行うのは適切でないと考えた。用量の設定が困難な場合、医薬品と比較して作用が穏やかな食品においては、高用量投与試験を行うことがある。だが、本研究ではその後のヒト試験を想定し、できるだけヒト摂取量に近い量で動物試験を行いたいと考えた。しかし、健常な動物に低用量のサラシアエキス粉末を投与したのでは表現型が出にくいのではないかと推測し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を評価法として選択した。DNA マイクロアレイは、遺伝子発現を高感度で網羅的に解析することにより、表現型として示される前の生体内の動きを追う手法である。そのため、低用量投与でもサラシアエキス粉末の作用を検出できるのではないかと考え、ラットへの投与量はヒトにおいても安全性が確認されている量（ヒト摂取量の 5 倍量）とした。上記の投与量で実施したラット試験（第 3 章）では、高用量投与によ

る副次的作用を検出しなかったため、ヒト試験に向けた効果見積りの精度が向上した可能性がある。

また第3章のラット試験は、投与の刺激による短期的な影響を排除することと、長期的な食品投与による作用を評価することを目的として、13週間のサラシアエキス粉末投与を実施した。のちに行った感染モデルを用いた試験では、2週間のサラシアエキス粉末投与によりインフルエンザ症状軽減作用が確認できたことから、免疫機能に対する作用の検討には13週間の投与期間は長すぎた可能性がある<sup>88</sup>。しかし、本研究のように作用が明らかになっていない食品の機能性研究初期には、副次的作用を検出しないという観点において、投与期間を長めに設定することも重要であると考える。

②従来腸内細菌の菌数測定および同定は、個々の菌を培養することにより行われてきた。しかし、現状で培養できる腸内細菌は30%程度であると言われており、70%が培養困難な菌であるとされている<sup>89</sup>。近年開発された菌のDNAを用いた菌叢解析により、培養困難な菌を含めた菌叢全体の把握が可能となった。本研究においては、T-RFLP法によって腸内細菌叢の解析を行った。T-RFLP法による菌叢解析の流れは以下の通りである。糞便サンプル中の菌DNAを抽出し、蛍光標識したプライマーを用いて全細菌に共通に保存されている16S rRNA領域をPCR (polymerase chain reaction) にて増幅し、増幅されたDNA断片を数種の制限酵素で切断し、フラグメント解析を行う。フラグメント解析は、制限酵素切断部位が塩基配列の違いにより異なることを利用して、検出ピークの強度や位置等で評価する解析法である。Nagashima法は、従来のT-RFLP法の問題点(得られるパターンの複雑性)を解決するために開発された手法であり、ほぼ同じサイズのフラグメント長のものをOTU (Operational Taxonomic Unit) としてまとめ、腸内細菌の

各系統分類群の相対比を示すものである<sup>44</sup>。この手法により、サラシアエキス粉末摂取による腸内細菌叢変化を容易に把握することが可能となった。

ラットとヒトは、胆嚢の有無、盲腸の発達、食性など、相違点が多い。腸内細菌に関しても、例えば *Bifidobacterium* は、ヒト、特に日本人の腸内に多く存在しているが、本研究で用いたラットの腸内からは検出されなかった<sup>86, 90</sup>。第3章の研究を行うにあたり、事前検討でサラシアエキス粉末がヒト腸内の *Bifidobacterium* 比率を上昇させることを確認していた（データ未掲載）ため、*Bifidobacterium* を有する動物を用いた試験を行うことも検討した。しかし、上述したように動物種間の相違点が多いため、1つの菌にこだわるより菌叢全体の変化の把握が重要であると考え、副次的作用を検出する可能性を下げることを最優先とし、第2章で安全性が示された（SD）ラットを用いて試験を実施した<sup>91</sup>。*Bifidobacterium* を有する動物を用いた方が顕著な作用を示した可能性は否定できないが、個々の菌の増減のみに着目した検証では生体全体に対する作用を見逃し、ヒト試験の方向性を見誤った可能性がある。本研究においては、菌叢全体を大局的にとらえたことにより、『サラシアエキス粉末摂取による腸内細菌叢変化』という共通項を見出せたと考えている。

腸内細菌に関しては、多様な機能性が明らかになりつつある<sup>92, 93</sup>。最近では、菌叢全体と個々の菌の動きを詳細に把握できる次世代シーケンサーが腸内細菌叢解析に多用されるようになり、疾患の有無や年齢、人種による違いなど様々な観点で解析が行われている<sup>90, 94-96</sup>。また、菌自体の機能だけでなく、その構成成分や代謝産物等の機能性についても研究が進められており、今後生体に及ぼす菌の作用がより詳細に解明されていくと考えられる<sup>97-99</sup>。さらに、多数の低分子代謝物質から反応経路の検討を行うメタボロミクスや、タンパク質の構造・機能を総合的に解析するプロテオミクスなどの

各種オミクス解析を組み合わせることにより、生体内作用を把握することが可能となってきた<sup>98, 100-101</sup>。上記の解析法を適切に組み合わせることにより、サラシアエキス粉末の作用を明確にすることができると考えている。

ここからは、ヒト試験の評価手法について論じたい。ヒト試験では、マウスやラットなどの試験とは異なり、臓器自体を用いた機能評価はほとんど不可能である。また、食品研究では健常者を対象にした試験が多く、より侵襲性の低いサンプルによる効果検証が必要となる。そこで本研究においては、健康診断レベルの低侵襲のサンプルを用いて、血液の免疫学的指標（免疫細胞数、免疫細胞増殖係数、サイトカイン産生量等）評価、血液の遺伝子発現解析、糞便を用いた腸内細菌叢解析を実施した。サラシアエキス粉末の摂取試験の結果、加齢に伴い低下する指標の回復などが示され、侵襲性の低いサンプルであっても生体機能を評価できることが明らかになった。加えて、オミクス解析を行うことにより、複合成分含有食品であるサラシアエキス粉末の様々な作用を検証することが可能となった。

### 5.3. サラシアエキス粉末の作用について

本研究においてサラシアエキス粉末は、ヒトおよびラットの免疫機能を調節する作用を示した。この作用については、①サラシアエキス粉末成分が $\alpha$ -グルコシダーゼの作用を阻害し、吸収されなかったオリゴ糖が腸内細菌叢を変化させ、菌や菌の代謝産物が免疫機能を高めた、②サラシアエキス粉末成分が直接腸内細菌や免疫機能に作用した、③サラシアエキス粉末摂取により変化した腸内細菌叢が、サラシアエキス粉末成分や食品由来成分の吸収・代謝を変化させ、免疫機能を高めた、④サラシアエキス粉末成分または変化した腸内細菌叢が、生体に傷害を与える物質を減少させ、減弱していた免疫

機能が元に戻った（回復した）、という 4 つの可能性があると考えている。

以下、この 4 つの可能性について説明したい。

①プロバイオティクス（菌摂取）やプレバイオティクス（菌に資化されるオリゴ糖や食物繊維摂取）による腸管免疫系を通じた免疫賦活作用については多くの研究が行われている<sup>102-104</sup>。これらの研究から、サラシアエキス粉末の主要有効成分であるチオ糖が $\alpha$ -グルコシダーゼの作用を阻害し、吸収されなかった糖が腸内細菌叢を変化させ、増加した菌や菌の代謝産物が生体の免疫機能を高めた、という可能性は十分に考えられる。サラシアエキス粉末摂取により、比率上昇や上昇傾向を示した *Bifidobacterium* や *Lactobacillales* は生体の免疫機能を調節することが明らかになっている<sup>21, 105</sup>。また本研究では、T 細胞増殖係数の向上や IFN signaling 関連遺伝子の発現増加が見られたが、*Lactobacillus plantarum* や *Tetragenococcus halophilus* 摂取により T 細胞増殖能の向上や IFN- $\beta$  の産生促進が起こることが確認されている<sup>51, 60</sup>。上述した理由から、サラシアエキス粉末摂取により増加した菌が免疫機能を向上させた可能性が高いが、4 週間という短期間でヒトにおいて免疫賦活作用を示す食品は多くないため、慎重に検討を行う必要がある。本研究においては、サラシアエキス粉末摂取による腸内細菌叢全体の変化を簡便に把握するために、T-RFLP 法を用いた腸内細菌叢解析を行ったが、他の食品と比較すると、サラシアエキス粉末摂取による腸内細菌叢の変化は大きく、免疫賦活作用も強いため、今後は次世代シーケンサーを用いた菌の詳細解析を行い、未知の菌が作用している可能性も含めて検討を行っていきたい<sup>105</sup>。また、本研究ではサラシアエキス粉末が腸内細菌叢を変化させることを示したが、実際に消化管内に残されているオリゴ糖の詳細は明らかになっていない。ヒトで検証を行うことは難しいが、無菌マウス

にサラシアエキス粉末を投与し、排泄される糖の量や構造解析を行うことで、ヒト消化管における作用の推定は可能だと考える。

医薬品として使用されている $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬（アカルボース、ボグリボース等）とサラシアエキス粉末の作用には、炎症抑制や

*Bifidobacterium* 比率の上昇といった共通点はあるものの、*Bifidobacterium* の上昇率や *Clostridiaceae* 比率の低下など異なる点も多く、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害だけでここまで顕著な腸内細菌叢変化や免疫賦活作用が示されるのかは疑問である<sup>106-108</sup>。しかし、サラシアエキス粉末を摂取したほとんどの被験者の腸内細菌叢が変化したこと、試験期間中被験者に菌叢を変える可能性のある食品や医薬品の摂取を禁止したことから、腸内細菌叢を変えたのはサラシアエキス粉末成分以外考えられない。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬とサラシアエキス粉末に含まれるチオ糖は、体内動態や阻害できる $\alpha$ -グルコシダーゼの種類が異なるため、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬の既往研究だけでサラシアエキス粉末の腸内細菌に対する作用を検証することは難しい。今後、サラシアエキス粉末、サラシアエキス粉末に含まれるチオ糖（化合物のみ）、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬の腸内細菌に対する作用を比較し、サラシアエキス粉末の機能を明確にした上で、作用を補強できる組み合わせ等の研究も進めていきたいと考えている。

②サラシアエキス粉末成分が、直接腸内細菌や免疫機能に作用した可能性について検討する。サラシアエキス粉末に含まれるポリフェノール（マンジフェリン等）や水溶性食物繊維は免疫賦活作用を示すことが報告されている<sup>109-117</sup>。しかしながら、上記の成分の有効量（マンジフェリンの場合 100 mg/kg 程度）は、サラシアエキス粉末に含まれる量よりも格段に多く、免疫機能の調節を助ける作用はあるかもしれないが、単独で顕著な効果は得られないと考える。しかし、サラシアエキス粉末に含まれる成分同士の相乗効果

や未知成分が関与する可能性も否定できないため、炭水化物源をグルコースのみにした（チオ糖による糖吸収抑制が生じない）状態での菌叢変化の確認や、サラシアエキス粉末添加による *Bifidobacterium* の増殖促進能の評価など、吸収抑制されるオリゴ糖の影響を排した検証が必要であると考えている。また、未知成分に関しては、サラシアエキス粉末中にポリフェノールが17.4%含まれていることから、ポリフェノールを中心に成分の探索・同定に取り組んでいきたい。

③サラシアエキス粉末摂取により変化した腸内細菌叢が、サラシアエキス粉末成分や食品由来成分の吸収・代謝を変化させ、免疫機能を高めた可能性について考えてみる。サラシアエキス粉末に含まれるサラシノール、コタラノール等のチオ糖は吸収されず、また消化管を通過しても構造変化が起きない（データ未掲載）。そのため、菌叢変化に伴う腸内 pH や酵素量・酵素活性の変動により、チオ糖の吸収や代謝が変わる可能性は低い。しかし、その他成分の同定や動態解析は十分に行われておらず、サラシアエキス粉末成分の吸収や代謝が変化している可能性を考慮して、今後の検討を進めていく必要がある。

また、腸内細菌叢変化（腸内 pH 低下）に伴い、ミネラル吸収率は増加する<sup>118</sup>。ミネラルは免疫機能において重要な物質であるが、サラシアエキス粉末中には少量（ヒトのサラシアエキス粉末 1 日摂取量 240 mg 中、灰分として 35 mg 程度）しか含まれていない<sup>119</sup>。だがサラシアエキス粉末摂取により、他食品由来のミネラルの吸収が高まり、免疫機能調節に作用した可能性はあると考える。

④サラシアエキス粉末成分または変化した腸内細菌叢が、生体に傷害を与える物質を減少させ、減弱していた免疫機能が回復した可能性について考察する。第 4 章のヒト試験では健常者を対象としたため、顕著な抗炎症作用は

見られなかったものの、血液を用いた評価では炎症性サイトカイン IL-6 産生量の減少傾向および炎症関連遺伝子の発現減少を確認した<sup>120</sup>。『平成 25 年 国民生活基礎調査』によれば、便秘の自覚症状を有する者の割合は加齢とともに上昇する<sup>121</sup>。便秘の原因としては筋力の低下や食事量の減少などが考えられるが、便秘が続くことで腸内に蓄積された糞便中のフェノール、*p*-クレゾール、インドール、スカトール等の腐敗産物は、消化管にダメージを与え、腸管のバリア機能を低下させる。そして、透過性が亢進した消化管から生体内に異物が侵入し、全身に炎症を引き起こすと考えられている<sup>122</sup>。以前の検討では、サラシアエキス粉末がヒト糞便中の腐敗産物を減少させることを確認している（データ未掲載）。また、サラシアエキス粉末摂取により比率が低下した Clostridiaceae に含まれる *Clostridium* の一部は、炎症を引き起こすことが知られている<sup>123</sup>。上述した理由から、サラシアエキス粉末摂取により炎症が抑制され、生体が持つ本来の免疫機能が回復し、結果として免疫賦活作用を示した可能性は高いと考える。

生体の免疫機能維持において重要な免疫細胞は、加齢の影響を受けることが知られている。例えば、各種ヘルパー T 細胞への分化能を有するナイーブ T (CD4<sup>+</sup> naive T) 細胞数は、加齢とともに減少する<sup>124, 125</sup>。本研究においては、サラシアエキス粉末摂取により、このナイーブ T 細胞数が増加傾向を示すことを確認した。ナイーブ T 細胞は、抗原の刺激（抗原提示）を受けたことがない細胞であり、Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、Treg 細胞（制御性 T 細胞）に分化し、分化した各種ヘルパー T 細胞は互いに抑制作用を示す<sup>126</sup>。サラシアエキス粉末を摂取した健常成人の血液遺伝子発現解析〔Fig. 4-2〕およびラットの小腸粘膜遺伝子発現解析〔Fig. 3-6〕では、IFN signaling を始めとする多数の Th1 細胞関連遺伝子の発現が増加していたため、今後生体内では Th1 (T helper 1) 細胞への分化が誘導されていくと考えられる。

その結果、アレルギーなどの過剰な炎症に起因する生体機能の損傷を抑制する可能性がある<sup>127</sup>。近年の腸内細菌の研究では、特定の菌が **Treg** 細胞の活性化を行うことや、小腸に **Th17** 細胞が流入し生体防御作用を示すことが明らかになってきた<sup>128-130</sup>。各種ヘルパーT細胞に腸内細菌（腸内環境）が作用するにも拘らず、サラシアエキス粉末が **Th1** 細胞関連遺伝子の発現のみを増加させた理由については、今後 *in vitro* や *ex vivo* の評価系等も活用しつつ明らかにしていきたい。

上述した①～④は複合的に作用している可能性が高く、今後様々な角度から検証を行っていく必要があると考える〔Fig. 5-1〕。

本研究で明らかになったサラシアエキス粉末の作用について、より詳細に検討する。パイエル板にある **M** 細胞から菌体成分を取り込み、抗原提示により免疫機能を向上させる仕組みはラットとヒトで共通している<sup>131</sup>。サラシアエキス粉末摂取によって、ヒトで比率が上昇した *Bifidobacterium* や上昇傾向を示した *Lactobacillales*、そしてラットで比率が上昇した

*Bacteroidetes* は免疫賦活作用を有する菌であることから、菌種は異なるものの腸管免疫調節作用は類似している可能性がある<sup>21, 52-54, 60, 105</sup>。しかし、*Bacteroidetes* 比率はラットで上昇したが、ヒトでは低下していた。この違いは、*Bifidobacterium*、*Lactobacillales*、*Bacteroidetes* のオリゴ糖資化能と生育環境が影響していると考えられる。*Bifidobacterium*、*Lactobacillales*、*Bacteroidetes* はオリゴ糖に対する資化能を有しているが、3糖以上の種々のオリゴ糖に対しても資化能を有しているのは *Bifidobacterium* だけである<sup>132,133</sup>。また、*Bifidobacterium* や *Lactobacillales* は強い耐酸性を有している<sup>134, 135</sup>。*Bacteroidetes* は、*Bifidobacterium* がいないラット腸内では糖を資化し増殖できたが、ヒトでは *Bifidobacterium* にオリゴ糖を資化され

てしまい、さらに *Bifidobacterium* や *Lactobacillales* が産生する乳酸や酢酸により pH が低下した腸内で生存できなかった可能性がある。

ラットやマウスとヒトは、上述した腸内細菌やポリフェノール等による免疫機能調節作用は共通しているが、腸内細菌叢や胆汁酸分泌、消化管の構造などが異なる<sup>136-138</sup>。そのため、サラシアエキス粉末の作用を *in vivo* で検証する際は、ヒト腸内細菌を移植した動物や成年・老年動物を用いる、餌の炭水化物量や種類を検討する等、試験系をヒト腸内環境に近づける工夫が必要である。さらに、酵素量や pH、温度等の状態が変動する *in vivo* の試験だけでなく、再現性の高い *in vitro* の試験系を活用することで、精度の高いメカニズム解析が可能だと考える。これまで用いられてきた腸管上皮細胞（Caco-2 等）は、トランスポーターなどのタンパク質の発現や形状が異なるため、消化管の機能を模倣することが困難であったが、近年 iPS 細胞を消化管細胞に分化誘導する技術が開発されつつある<sup>139, 140</sup>。また、小腸の陰窩（crypt）を立体的に培養（オルガノイド）し、生体抗菌ペプチドの分泌促進能を測定できる系など、*in vitro* の評価法開発も盛んに行われており、複数の試験系を臨機応変に用いていきたい。<sup>141, 142</sup>

生体の応答性は、年齢、性別、人種、生活環境、食習慣、疾患の有無などの影響を受ける。第 4 章のヒト試験の被験者である日本人は米を主食としているため、サラシアエキス粉末摂取により吸収抑制されるオリゴ糖の量が多く、腸内細菌叢および免疫機能に対する作用が顕著であった可能性がある。試験は成人男性を対象に実施したが、女性においてもサラシアエキス粉末摂取により腸内細菌叢が変化することを確認しており（データ未掲載）、女性でも免疫機能に対する作用を示す可能性が高いと考えている。また、サラシアエキス粉末摂取により向上または増加した T 細胞増殖係数や CD4<sup>+</sup> Naive T 細胞数は加齢に伴い低下もしくは減少することが知られており、減少傾向

を示した IL-6 は加齢により増加するサイトカインである<sup>102, 124, 143</sup>。さらに、腸内環境は加齢とともに悪化し、*Bifidobacterium* も減少するため、サラシアエキス粉末の効果は、高齢者に対してより顕著に現れ、抗老化作用を示すことが考えられる<sup>144, 145</sup>。試験期間中は、腸内細菌に影響を与える食品や医薬品の摂取は禁止したが、行動や食事内容に対する制限は設けなかった。生活環境や食習慣の異なる健常者で、類似した効果が得られたことは非常に興味深い。そして、CD4<sup>+</sup> naive T 細胞の増殖促進効果については、*ex vivo* において *Lactobacillus* の作用が示されているのみで、ヒトにおいて CD4<sup>+</sup> naive T 細胞の増殖促進作用が確認されたのは、本研究が初めてである<sup>146, 147</sup>。

本研究では、動物で示された食品の免疫賦活作用を、ヒト摂取試験で検証し、種を越えて一致した結果を得ることができた。さらに、メカニズム解明や腸内細菌叢解析を行うことで、食品の有用性を総合的に証明した。食品作用を多面的に評価するというのは類がなく、研究手法としても参考になるものである。また、本研究で得られた成果は、今後の食品の機能性研究において、非常に重要なものであると考えている。そして、本研究の評価系は、複数の成分が混在した食品でも用いることができるため、他食品の研究に活用していきたい。

#### 5.4. 今後の展望

サラシアエキス粉末の作用の全体像を把握するためには、5.3.で記したように、比率変動した菌の詳細解析や $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬との作用比較、消化管内に残されるオリゴ糖とその作用の検証、腸内細菌の代謝産物である有機酸・腐敗産物の分析、新規成分の探索等、行うべき研究は多い。

しかし本研究で得られた知見は、疾病予防食品としてのサラシアエキス粉末の可能性を示すものであり、今後サラシアエキス粉末の作用を人々の生活に役立てていくための展望を記す。

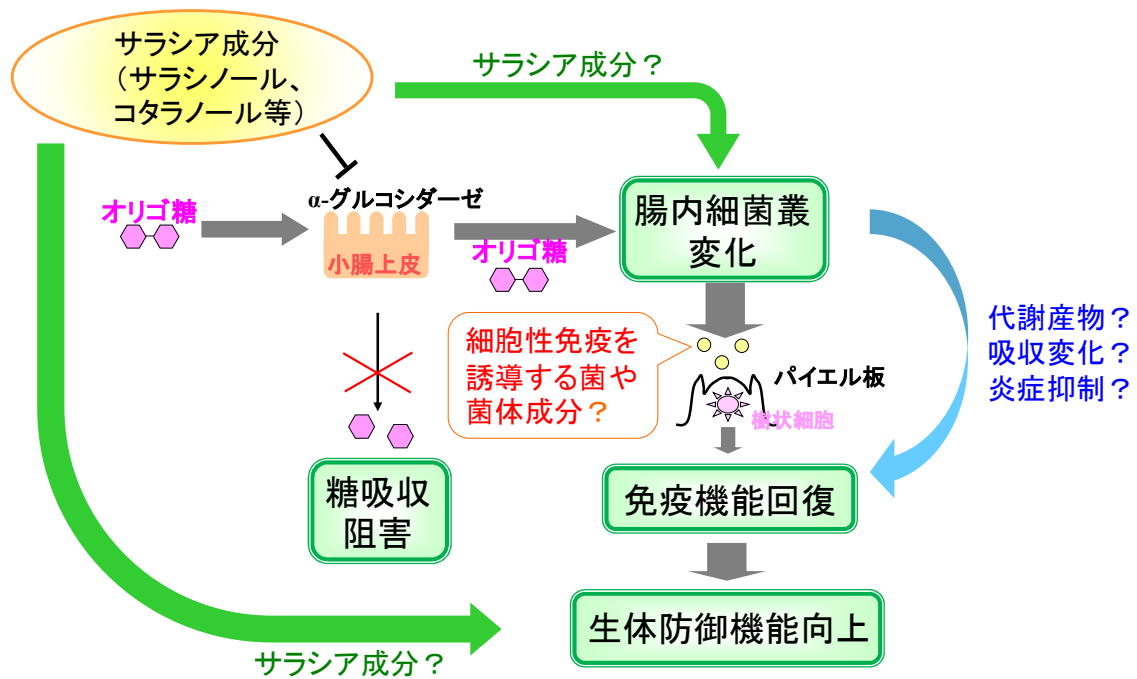
本研究においては、サラシアエキス粉末摂取により、生体防御機能が向上することが示唆されたため、感染症に対するサラシアエキス粉末の作用について検討を行った。インフルエンザ感染モデルを用いた試験では、サラシアエキス粉末投与によりインフルエンザ症状の軽減やNK細胞活性の向上が確認できた<sup>88</sup>。NK細胞活性の向上は、抗生物質を投与し、腸内細菌を死滅させたマウスでも程度の差はあるが起きており、サラシアエキス粉末の免疫機能に対する作用に未知成分が寄与している可能性が高まった<sup>148</sup>。

また、『平成 25 年 国民生活基礎調査』では加齢に伴い便秘の悩みが増加することが報告されていたが、病院や介護の現場では便臭が介護者や要介護者の大きな悩みとなっている<sup>121</sup>。予備的検討では、サラシアエキス粉末が便臭の元となる腐敗産物量を減らすことを確認している（データ未掲載）ため、サラシアエキス粉末は病院や介護施設の環境改善および精神的・身体的負担軽減に貢献できるのではないかと考えている。

さらに、厚生労働省が実施する難治性疾患克服研究事業の臨床調査研究分野の対象疾患（特定疾患）である潰瘍性大腸炎やクローン病の罹患者は年々増加しており、平成 26 年末時点で潰瘍性大腸炎の患者数（特定疾患医療受給証の所持者数）は 170,781 名（134.4 人／10 万人）、クローン病の患者数

は 40,885 名（32.2 人／10 万人）に上る<sup>149</sup>。潰瘍性大腸炎やクローン病を含む炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease: IBD）には、腸内細菌が密接に関わっていることが報告されている<sup>150, 151</sup>。そのため、健常者の糞便を移植する便微生物叢移植（Fecal Microbiota Transplantation: FMT）という治療法も実施されているが、効果にはばらつきがある<sup>152, 153</sup>。また近年、脳と腸が相互に影響を及ぼしあう脳腸相関についての研究が盛んに行われており、上記の腸疾患が精神状態の影響を受けることや、腸内細菌がストレス症状を軽減することが明らかになってきた<sup>154, 155</sup>。経口摂取した菌は腸内に定着しないことが知られているが、FMT に関しても移植された他者の菌が腸内に定着しにくく、望ましい菌叢変化が起こらなかったため治療が奏効しなかった可能性がある<sup>62</sup>。本研究でサラシアエキス粉末は、自分自身の菌を増やし、腸内細菌叢を大幅に変化させること、血液中の炎症関連遺伝子の発現を減少させることが示された。また、予備的な検討においてサラシアエキス粉末は、腸内細菌に影響を与える他食品と比較して、同等以上の腸内細菌叢変化をもたらすことを確認している（データ未掲載）。以上のことから、腸内細菌叢や炎症を制御するための食品としてもサラシアエキス粉末は有望であり、炎症性腸疾患や精神疾患の予防および治療に効果を示すのではないかと期待し、研究を進めている。

本研究の結果は端緒にすぎないが、糖の吸収抑制素材として使用されてきたサラシアエキス粉末の新たな可能性を示すものとなった。また、本研究の安全性試験結果および既往研究から、サラシアエキス粉末は安全性の高い食品であることが示された。医薬品は主に疾病罹患後しか使用できず、精神的にも身体的にも負担がかかるが、サラシアエキス粉末は安全な食品として予防的に使用できる。早急に人々の QOL（Quality of Life）向上に貢献するため、よりいっそう積極的に研究に取り組んでいきたい。



**Fig. 5-1.** Mechanisms of action of *Salacia reticulata* extract powder to immune function (Presumption).

## 【引用文献】

1. 厚生労働省, 結果の概要 1 国民医療費の状況. 平成 26 年度 国民医療費の概況 **2016**, pp. 3.
2. Serasinghe, S.; Serasinghe, P.; Yamazaki, H.; Nishiguchi, K.; Hombhanje, F.; Nakanishi, S.; Sawa, K.; Hattori, M.; Namba, T., Oral hypoglycemic effect of *Salacia reticulata* in the streptozotocin induced diabetic rat. *Phytotherapy Research* **1990**, *4*, 205-206.
3. Yoshikawa, M.; Morikawa, T.; Matsuda, H.; Tanabe, G.; Muraoka, O., Absolute Stereostructure of Potent  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor, Salacinol, with Unique Thiosugar Sulfonium Sulfate Inner Salt Structure from *Salacia reticulata*. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2002**, *10*, 1547-1554.
4. Yoshikawa, M.; Murakami, T.; Shimada, H.; Matsuda, H.; Yamahara, J.; Tanabe, G.; Muraoka, O., Salacinol, potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the Ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata* in Sri Lanka and India. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 8367-8370.
5. Muraoka, O.; Morikawa, T.; Miyake, S.; Akaki, J.; Ninomiya, K.; Yoshikawa, M., Quantitative determination of potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, salacinol and kotalanol, in *Salacia* species using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2010**, *52*, 770-773.
6. Muraoka, O.; Morikawa, T.; Miyake, S.; Akaki, J.; Ninomiya, K.; Pongpiriyadacha, Y.; Yoshikawa, M., Quantitative analysis of neosalacinol and neokotalanol, another two potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Salacia* species, by LC-MS with ion pair chromatography. *Journal of natural medicines* **2011**, *65*, 142-148.
7. Nakamura, S.; Takahira, K.; Tanabe, G.; Morikawa, T.; Sakano, M.; Ninomiya, K.; Yoshikawa, M.; Muraoka, O.; Nakanishi, I., Docking and SAR studies of salacinol derivatives as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010**, *20*, 4420-4423.
8. 梶本修身; 川守秀輔; 下田博司; 川原有三; 平田洋; 高橋丈生, *Salacia reticulata* 水抽出物における境界型および軽症 2 型糖尿病症例に対する臨床効果. 日本栄養・食糧学会誌 **2000**, *53*, 199-205.
9. 松浦寿喜; 吉川友佳子; 升井洋至; 佐野満昭, 各種健康茶のラットにおける糖質吸収抑制作用. *YAKUGAKU ZASSHI* **2004**, *124*, 217-223.

10. Radha, R.; Amrithaveni, M., Role of medicinal plant *Salacia Reticulata* in the management of type II diabetic subjects. *Ancient science of life* **2009**, *29*, 14-16.
11. Coniff, R. F.; Shapiro, J. A.; Seaton, T. B.; Bray, G. A., Multicenter, placebo-controlled trial comparing acarbose (BAY g 5421) with placebo, tolbutamide, and tolbutamide-plus-acarbose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The American journal of medicine* **1995**, *98*, 443-451.
12. Scheen, A., Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. *Diabetes & metabolism* **1998**, *24*, 311-320.
13. Vichayanrat, A.; Ploybutr, S.; Tunlakit, M.; Watanakejorn, P., Efficacy and safety of voglibose in comparison with acarbose in type 2 diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice* **2002**, *55*, 99-103.
14. Kawamori, R.; Tajima, N.; Iwamoto, Y.; Kashiwagi, A.; Shimamoto, K.; Kaku, K.; Voglibose Ph-3 Study Group, Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus: a randomised, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance for prevention of type 2 diabetes mellitus: a randomised, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance. *Lancet* **2009**, *373*, 1607-1614.
15. 吉川雅之; 西田典永; 下田博司; 高田美紀; 河原有三; 松田久司, *Salacia* 属植物のポリフェノール成分:  $\alpha$ -グルコシダーゼ及びアルドースレダクターゼ阻害活性成分, Mangiferin, の定量分析. *YAKUGAKU ZASSHI* **2001**, *121*, 371-378.
16. Yoshikawa, M.; Shimoda, H.; Nishida, N.; Takada, M.; Matsuda, H., *Salacia reticulata* and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. *The Journal of nutrition* **2002**, *132*, 1819-1824.
17. Kishino, E.; Ito, T.; Fujita, K.; Kiuchi, Y., A mixture of *Salacia reticulata* (Kotala himbutu) aqueous extract and cyclodextrin reduces body weight gain, visceral fat accumulation, and total cholesterol and insulin increases in male Wistar fatty rats. *Nutrition Research* **2009**, *29*, 55-63.
18. Shivaprasad, H.; Bhanumathy, M.; Sushma, G.; Midhun, T.; Raveendra, K.; Sushma, K.; Venkateshwarlu, K., *Salacia reticulata* Improves Serum Lipid Profiles and Glycemic Control in Patients with Prediabetes and Mild to Moderate Hyperlipidemia: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial. *Journal of medicinal food* **2013**, *16*, 564-568.
19. Heacock, P. M.; Hertzler, S. R.; Williams, J. A.; Wolf, B. W., Effects of a medical food

- containing an herbal  $\alpha$ -glucosidase inhibitor on postprandial glycemia and insulinemia in healthy adults. *Journal of the American Dietetic Association* **2005**, *105*, 65-71.
20. 別府秀彦; 鹿野昌彦; 藤田孝輝, Kothala himbutu 抽出物を配合したコトラヒム顆粒品の単回および 3 か月連続摂取のヒト糖代謝に及ぼす影響. *日本食品新素材研究会誌* **2005**, *8*, 105-117.
  21. Odamaki, T.; Xiao, J.-Z.; Iwabuchi, N.; Sakamoto, M.; Takahashi, N.; Kondo, S.; Miyaji, K.; Iwatsuki, K.; Togashi, H.; Enomoto, T.; Benno, Y., Influence of *Bifidobacterium longum* BB536 intake on faecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season. *Journal of medical microbiology* **2007**, *56*, 1301-1308.
  22. Savard, P.; Lamarche, B.; Paradis, M.-E.; Thiboutot, H.; Laurin, É.; Roy, D., Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International journal of food microbiology* **2011**, *149*, 50-57.
  23. Depeint, F.; Tzortzis, G.; Vulevic, J.; I'Anson, K.; Gibson, G. R., Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *The American journal of clinical nutrition* **2008**, *87*, 785-791.
  24. Collins, J. K.; Dunne, C.; Murphy, L.; Morrissey, D.; O'Mahony, L.; O'Sullivan, E.; Fitzgerald, G.; Kiely, B.; O'Sullivan, G. C.; Daly, C., Marteau, P.; Shanahan, F., A randomised controlled trial of a probiotic *Lactobacillus* strain in healthy adults: assessment of its delivery, transit and influence on microbial flora and enteric immunity. *Microbial Ecology in Health and Disease* **2002**, *14*, 81-89.
  25. Trompette, A.; Gollwitzer, E. S.; Yadava, K.; Sichelstiel, A. K.; Sprenger, N.; Ngom-Bru, C.; Blanchard, C.; Junt, T.; Nicod, L. P.; Harris, N. L.; Marsland, B. J., Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature medicine* **2014**, *20*, 159-166.
  26. Flammang, A.; Erexson, G.; Mecchi, M.; Murli, H., Genotoxicity testing of a *Salacia oblonga* extract. *Food and chemical toxicology* **2006**, *44*, 1868-1874.
  27. Im, R.; Mano, H.; Nakatani, S.; Shimizu, J.; Wada, M., Safety evaluation of the aqueous extract Kothala himbutu (*Salacia reticulata*) stem in the hepatic gene expression profile of

- normal mice using DNA microarrays. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2008**, *72*, 3075-3083.
28. Jayawardena, M.; de Alwis, N.; Hettigoda, V.; Fernando, D., A double blind randomised placebo controlled cross over study of a herbal preparation containing *Salacia reticulata* in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of ethnopharmacology* **2005**, *97*, 215-218.
  29. Wolf, B.; Weisbrode, S., Safety evaluation of an extract from *Salacia oblonga*. *Food and chemical toxicology* **2003**, *41*, 867-874.
  30. 下田博司; 藤村高志; 牧野浩平; 吉島賢一; 内藤一嘉; 井保田尋美; 三輪芳久, ニシキギ科植物サラシア幹抽出エキスの安全性. *食品衛生学雑誌* **1999**, *40*, 198-205.
  31. 下田博司; 浅野育子; 山田恭史, ニシキギ科植物サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*) 水抽出エキスの抗原性及び光毒性. *食品衛生学雑誌* **2001**, *42*, 144-147.
  32. Yoshikawa, M.; Ninomiya, K.; Shimoda, H.; Nishida, N.; Matsuda, H., Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata*: preventive effects of phenolic constituents on CCl<sub>4</sub>- induced liver injury in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2002**, *25*, 72-76.
  33. 谷村千華; 寺田伊都子; 平松喜美子, *Salacia reticulata* (Kotala himbutu) 水抽出物とサイクロデキストリン混合物による血糖値, 血中インスリン値上昇抑制効果および過量摂取における血糖値変化と腹部状態へおよぼす作用. *米子医学雑誌* **2005**, *56*, 85-93.
  34. 別府秀彦; 木内吉寛; 岸野恵理子; 伊藤哲也; 藤田孝輝; 新保寛; 尾崎清香; 千原猛; 井谷功典; 園田茂; 東口高志, サラシア・レティキュラータ(*Salacia reticulata*)熱水抽出物のマウス、ラットおよびヒトの経口糖負荷試験に及ぼす影響—サイクロデキストリン混合物の血糖値上昇抑制効果および経口糖尿病薬併用による血糖値の変動. *機能性食品と薬理栄養* **2005**, *3*, 25-30.
  35. 遠山清; 小林洋一, *Bifidobacterium breve* による腸内腐敗の抑制. *ビフィズス* **1993**, *6*, 151-160.
  36. Ishizuka, A.; Tomizuka, K.; Aoki, R.; Nishijima, T.; Saito, Y.; Inoue, R.; Ushida, K.; Mawatari, T.; Ikeda, T., Effects of administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 on defecation frequency and bifidobacterial microbiota composition in humans. *Journal of bioscience and bioengineering* **2012**, *113*, 587-591.
  37. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing* **2016**.
  38. Gentleman, R. C.; Carey, V. J.; Bates, D. M.; Bolstad, B.; Dettling, M.; Dudoit, S.; Ellis, B.; Gautier, L.; Ge, Y.; Gentry, J.; Hornik, K.; Hothorn, T.; Huber, W.; Iacus, S.; Irizarry, R.;

- Leisch, F.; Li, C.; Maechler, M.; Rossini, A.J.; Sawitzki, G.; Smith, C.; Smyth, G.; Tierney, L.; Yang, J.Y.; Zhang, J., Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* **2004**, *5*, R80.
39. Chen, Z.; McGee, M.; Liu, Q.; Scheuermann, R. H., A distribution free summarization method for Affymetrix GeneChip® arrays. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 321-327.
40. Motoyama, K.; Nakai, Y.; Miyashita, T.; Fukui, Y.; Morita, M.; Sanmiya, K.; Sakakibara, H.; Matsumoto, I.; Abe, K.; Yakabe, T.; Yajima, N.; Shimoi, K., Isolation stress for 30 days alters hepatic gene expression profiles, especially with reference to lipid metabolism in mice. *Physiological genomics* **2009**, *37*, 79-87.
41. Breitling, R.; Armengaud, P.; Amtmann, A.; Herzyk, P., Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS letters* **2004**, *573*, 83-92.
42. Maere, S.; Heymans, K.; Kuiper, M., BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3448-3449.
43. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T., Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **2003**, *13*, 2498-2504.
44. Nagashima, K.; Mochizuki, J.; Hisada, T.; Suzuki, S.; Shimomura, K., Phylogenetic analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences from human fecal microbiota and improved utility of terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Bioscience and microflora* **2006**, *25*, 99-107.
45. Renard, C.; Hart, E.; Sehra, H.; Beasley, H.; Coghill, P.; Howe, K.; Harrow, J.; Gilbert, J.; Sims, S.; Rogers, J.; Ando, A.; Shigenari, A.; Shiina, T.; Inoko, H.; Chardon, P.; Beck, S., The genomic sequence and analysis of the swine major histocompatibility complex. *Genomics* **2006**, *88*, 96-110.
46. Yamada, T.; Zhu, D.; Saxon, A.; Zhang, K., CD45 controls interleukin-4-mediated IgE class switch recombination in human B cells through its function as a Janus kinase phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 28830-28835.
47. Hoshimoto, K.; Ohta, N.; Ohkura, T.; Inaba, N., Changes in plasma soluble CD26 and CD30 during pregnancy: markers of Th1/Th2 balance? *Gynecologic and obstetric investigation*

- 2000, 50, 260-263.
48. Hovden, A. O.; Cox, R.; Haaheim, L., Whole influenza virus vaccine is more immunogenic than split influenza virus vaccine and induces primarily an IgG2a response in BALB/c mice. *Scandinavian journal of immunology* **2005**, 62, 36-44.
  49. Umesaki, Y.; Okada, Y.; Matsumoto, S.; Imaoka, A.; Setoyama, H., Segmented Filamentous Bacteria Are Indigenous Intestinal Bacteria That Activate Intraepithelial Lymphocytes and Induce MHC Class II Molecules and Fucosyl Asialo GM1 Glycolipids on the Small Intestinal Epithelial Cells in the Ex - Germ - Free Mouse. *Microbiology and immunology* **1995**, 39, 555-562.
  50. Mouillé, B.; Robert, V.; Blachier, F., Adaptative increase of ornithine production and decrease of ammonia metabolism in rat colonocytes after hyperproteic diet ingestion. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **2004**, 287, G344-G351.
  51. Kawashima, T.; Kosaka, A.; Yan, H.; Guo, Z.; Uchiyama, R.; Fukui, R.; Kaneko, D.; Kumagai, Y.; You, D. J.; Carreras, J.; Uematsu, S.; Jang, M. H.; Takeuchi, O.; Kaisho, T.; Akira, S.; Miyake, K.; Tsutsui, H.; Saito, T.; Nishimura, I.; Tsuji, N. M., Double-Stranded RNA of Intestinal Commensal but Not Pathogenic Bacteria Triggers Production of Protective Interferon- $\beta$ . *Immunity* **2013**, 38, 1187-1197
  52. Tsuda, M.; Hosono, A.; Yanagibashi, T.; Hachimura, S.; Hirayama, K.; Itoh, K.; Takahashi, K.; Kaminogawa, S., Prior stimulation of antigen-presenting cells with *Lactobacillus* regulates excessive antigen-specific cytokine responses *in vitro* when compared with *Bacteroides*. *Cytotechnology* **2007**, 55, 89-101.
  53. Yanagibashi, T.; Hosono, A.; Oyama, A.; Tsuda, M.; Hachimura, S.; Takahashi, Y.; Itoh, K.; Hirayama, K.; Takahashi, K.; Kaminogawa, S., *Bacteroides* induce higher IgA production than *Lactobacillus* by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in B cells in murine Peyer's patches. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2009**, 73, 372-377.
  54. Humphries, H. E.; Triantafilou, M.; Makepeace, B. L.; Heckels, J. E.; Triantafilou, K.; Christodoulides, M., Activation of human meningeal cells is modulated by lipopolysaccharide (LPS) and non - LPS components of *Neisseria meningitidis* and is independent of Toll - like receptor (TLR) 4 and TLR2 signalling. *Cellular microbiology* **2005**,

- 7, 415-430.
55. Bouhnik, Y.; Raskine, L.; Simoneau, G.; Paineau, D.; Bornet, F., The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutrition journal* **2006**, *5*, 8
  56. Oda, Y.; Ueda, F.; Kamei, A.; Kakinuma, C.; Abe, K., Biochemical investigation and gene expression analysis of the immunostimulatory functions of an edible *Salacia* extract in rat small intestine. *Biofactors* **2011**, *37*, 31-39.
  57. 厚生労働省, 第 6 表 性別にみた死因順位 (第 10 位まで) 別 死亡数・死亡率 (人口 10 万対)・構成割合. 平成 25 年 (2013) 人口動態統計 (確定数) の概況 **2014**, pp. 15.
  58. Salzman, N. H., Microbiota-immune system interaction: an uneasy alliance. *Current opinion in microbiology* **2011**, *14*, 99-105.
  59. Round, J. L.; Mazmanian, S. K., The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* **2009**, *9*, 313-323.
  60. Hirose, Y.; Yamamoto, Y.; Yoshikai, Y.; Murosaki, S., Oral intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 decreases the incidence of upper respiratory tract infection in healthy subjects with high levels of psychological stress. *Journal of Nutritional Science* **2013**, *2*, e39.
  61. Makino, S.; Ikegami, S.; Kume, A.; Horiuchi, H.; Sasaki, H.; Orii, N., Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *The British journal of nutrition* **2010**, *104*, 998-1006.
  62. Mitsuoka, T., Development of functional foods. *Bioscience of microbiota, food and health* **2014**, *33*, 117-128.
  63. Roller, M.; Rechkemmer, G.; Watzl, B., Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *The Journal of nutrition* **2004**, *134*, 153-156.
  64. Chan, G. C.-F.; Chan, W. K.; Sze, D. M.-Y., The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of hematology & oncology* **2009**, *2*, 25.
  65. McCracken, V. J.; Gaskins, H. R.; Tannock, G. W., Probiotics and the immune system (Probiotics: a critical review, Edited by Gerald W. T.). *Horizon Scientific Press* **1999**, 85-111.
  66. Kukkonen, K.; Savilahti, E.; Haahtela, T.; Juntunen-Backman, K.; Korpela, R.; Poussa, T.;

- Tuure, T.; Kuitunen, M., Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2007**, *119*, 192-198.
67. de Vrese, M.; Winkler, P.; Rautenberg, P.; Harder, T.; Noah, C.; Laue, C.; Ott, S.; Hampe, J.; Schreiber, S.; Heller, K.; Schrezenmeir, J., Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. *Clinical Nutrition* **2005**, *24*, 481-491.
68. Underwood, M. A.; Salzman, N. H.; Bennett, S. H.; Barman, M.; Mills, D.; Marcobal, A.; Tancredi, D. J.; Bevins, C. L.; Sherman, M. P., A Randomized placebo-controlled comparison of two prebiotic/probiotic combinations in preterm infants: impact on weight gain, intestinal microbiota, and fecal short chain fatty acids. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **2009**, *48*, 216-225.
69. Lehne, G.; Haneberg, B.; Gaustad, P.; Johansen, P.; Preus, H.; Abrahamsen, T., Oral administration of a new soluble branched  $\beta$  - 1, 3 - D - glucan is well tolerated and can lead to increased salivary concentrations of immunoglobulin A in healthy volunteers. *Clinical & Experimental Immunology* **2006**, *143*, 65-69.
70. 廣川勝昱, 私の老化基礎研究. 基礎老化研究 **2016**, *40*, 3-9.
71. Hirokawa, K.; Utsuyama, M.; Hayashi, Y.; Kitagawa, M.; Makinodan, T.; Fulop, T., Slower immune system aging in women versus men in the Japanese population. *Immunity & Ageing* **2013**, *10*, 19.
72. 厚生労働省, 第 1 部 栄養素等摂取状況調査の結果. 平成 24 年 国民健康・栄養調査 **2012**, pp. 54-107.
73. 高橋孝子; 富澤真美; 伊藤公江; 森野眞由美; 上西一弘; 石田裕美, 首都圏在住の既婚勤労男性の 1 日のエネルギー摂取量の配分の実態. 日本栄養・食糧学会誌 **2008**, *61*, 273-283.
74. Hirokawa, K.; Utsuyama, M.; Kikuchi, Y.; Kitagawa, M., Assessment of Age-related Decline of Immunological Function and Possible Methods for Immunological Restoration in Elderly. *Handbook on Immunosenescence* **2009**, 1548-1569.
75. Hirokawa, K.; Utsuyama, M.; Kitagawa, M., Immunity evaluation method, Immunity evaluation apparatus, Immunity evaluation program and data recording medium having the immunity evaluation program stored therein. *Japan Patent* **2007**, P4608704.
76. Hirokawa, K.; Utsuyama, M.; Ishikawa, T.; Kikuchi, Y.; Kitagawa, M.; Fujii, Y.; Nariuchi, H.;

- Uetake, H.; Sugihara, K., Decline of T cell-related immune functions in cancer patients and an attempt to restore them through infusion of activated autologous T cells. *Mechanisms of ageing and development* **2009**, *130*, 86-91.
77. Hirokawa, K.; Utsuyama, M.; Kitagawa, M., Immunity evaluation method, immunity evaluation apparatus, immunity evaluation program and data recording medium having the immunity evaluation program stored therein *U.S. Patent* **2014**, *8815524*.
78. Kawamoto, S.; Tran, T. H.; Maruya, M.; Suzuki, K.; Doi, Y.; Tsutsui, Y.; Kato, L. M.; Fagarasan, S., The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* **2012**, *336*, 485-489.
79. 大野博司, 特殊な腸管上皮細胞, M 細胞の生物学. *生化学* **2011**, *83*, 13-22.
80. Hopkins, M.; Sharp, R.; Macfarlane, G., Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* **2001**, *48*, 198-205.
81. Uematsu, S.; Fujimoto, K.; Jang, M. H.; Yang, B. G.; Jung, Y. J.; Nishiyama, M.; Sato, S.; Tsujimura, T.; Yamamoto, M.; Yokota, Y.; Kiyono, H.; Miyasaka, M.; Ishii, K. J.; Akira, S., Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature immunology* **2008**, *9*, 769-776.
82. Fujimoto, K.; Karuppuhamy, T.; Takemura, N.; Shimohigoshi, M.; Machida, T.; Haseda, Y.; Aoshi, T.; Ishii, K. J.; Akira, S.; Uematsu, S., A new subset of CD103<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells in the small Intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *The Journal of Immunology* **2011**, *186*, 6287-6295.
83. 下田博司; 川守秀輔; 河原有三, スリランカ有用植物サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*) 水抽出物のラットおよびヒトの食後過血糖に及ぼす作用. *日本栄養・食糧学会誌* **1998**, *51*, 279-287.
84. Tuohy, K.; Kolida, S.; Lustenberger, A.; Gibson, G., The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides – a human volunteer study. *British Journal of Nutrition* **2001**, *86*, 341-348.
85. Oda, Y.; Yuasa, A.; Ueda, F.; Kakinuma, C., A subchronic oral toxicity study of *Salacia reticulata* extract powder in rats. *Toxicology Reports* **2015**, *2*, 1136-1144.
86. Oda, Y.; Ueda, F.; Utsuyama, M.; Kamei, A.; Kakinuma, C.; Abe, K.; Hirokawa, K., Improvement in Human Immune Function with Changes in Intestinal Microbiota by *Salacia*

- reticulata* Extract Ingestion: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0142909.
87. 石川文彦, ヒト化マウスを用いたヒト免疫・疾患解析. *生化学* **2012**, *84*, 216-221.
88. Romero-Pérez, G. A.; Egashira, M.; Harada, Y.; Tsuruta, T.; Oda, Y.; Ueda, F.; Tsukahara, T.; Tsukamoto, Y.; Inoue, R., Orally administered *Salacia reticulata* extract reduces H1N1 influenza clinical symptoms in murine lung tissues putatively due to enhanced natural killer cell activity. *Frontiers in immunology* **2016**, *7*, 115
89. 工藤俊章; 大熊盛也, 難培養微生物の利用技術. シーエムシー出版 **2010**.
90. Nishijima, S.; Suda, W.; Oshima, K.; Kim, S. W.; Hirose, Y.; Morita, H.; Hattori, M., The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Research* **2016**, *23*, 125-133.
91. 久枝一, マラリアにおける腸内細菌叢と病態の関連性. *生化学* **2016**, *88*, 649-653.
92. Engel, P.; Moran, N. A., The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews* **2013**, *37*, 699-735.
93. Collins, S. M.; Bercik, P., The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 2003-2014.
94. Mäkituokko, H.; Tiitonen, K.; Tynkkynen, S.; Paulin, L.; Rautonen, N., The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *British Journal of Nutrition* **2010**, *103*, 227-234.
95. Manichanh, C.; Rigottier-Gois, L.; Bonnaud, E.; Gloux, K.; Pelletier, E.; Frangeul, L.; Nalin, R.; Jarrin, C.; Chardon, P.; Marteau, P.; Roca, J.; Dore, J., Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **2006**, *55*, 205-211.
96. Claesson, M. J.; Jeffery, I. B.; Conde, S.; Power, S. E.; O'Connor, E. M.; Cusack, S.; Harris, H. M.; Coakley, M.; Lakshminarayanan, B.; O'Sullivan, O.; Fitzgerald, G.F.; Deane, J.; O'Connor, M.; Harnedy, N.; O'Connor, K.; O'Mahony, D.; van Sinderen, D.; Wallace, M.; Brennan, L.; Stanton, C.; Marchesi, J. R.; Fitzgerald, A. P.; Shanahan, F.; Hill, C.; Ross, R. P.; O'Toole, P. W., Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* **2012**, *488*, 178-184.
97. Marcobal, A.; Kashyap, P. C.; Nelson, T. A.; Aronov, P. A.; Donia, M. S.; Spormann, A.; Fischbach, M. A.; Sonnenburg, J. L., A metabolomic view of how the human gut microbiota

- impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. *The ISME journal* **2013**, *7*, 1933-1943.
98. Le Gall, G.; Noor, S. O.; Ridgway, K.; Scovell, L.; Jamieson, C.; Johnson, I. T.; Colquhoun, I. J.; Kemsley, E. K.; Narbad, A., Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Journal of proteome research* **2011**, *10*, 4208-4218.
  99. Jacobs, D. M.; Gaudier, E.; van Duynhoven, J.; Vaughan, E. E., Non-digestible food ingredients, colonic microbiota and the impact on gut health and immunity: a role for metabolomics. *Current drug metabolism* **2009**, *10*, 41-54.
  100. Ursell, L. K.; Haiser, H. J.; Van Treuren, W.; Garg, N.; Reddivari, L.; Vanamala, J.; Dorrestein, P. C.; Turnbaugh, P. J.; Knight, R., The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1470-1476.
  101. Lichtman, J. S.; Marcobal, A.; Sonnenburg, J. L.; Elias, J. E., Host-centric proteomics of stool: a novel strategy focused on intestinal responses to the gut microbiota. *Molecular & Cellular Proteomics* **2013**, *12*, 3310-3318.
  102. Vulevic, J.; Drakoularakou, A.; Yaqoob, P.; Tzortzis, G.; Gibson, G. R., Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *The American journal of clinical nutrition* **2008**, *88*, 1438-1446.
  103. Nagao, F.; Nakayama, M.; Muto, T.; Okumura, K., Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2000**, *64*, 2706-2708.
  104. Dong, H.; Rowland, I.; Thomas, L. V.; Yaqoob, P., Immunomodulatory effects of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* Shirota in healthy older volunteers. *European journal of nutrition* **2013**, *52*, 1853-1863
  105. Klein, A.; Friedrich, U.; Vogelsang, H.; Jahreis, G., *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. *European journal of clinical nutrition* **2008**, *62*, 584-593.
  106. Maruhama, Y.; Nagasaki, A.; Kanazawa, Y.; Hirakawa, H.; Goto, Y.; Nishiyama, H.; Kishimoto, Y.; Shimoyama, T., Effects of a glucoside-hydrolase inhibitor (Bay g 5421) on serum lipids, lipoproteins and bile acids, fecal fat and bacterial flora, and intestinal gas

- production in hyperlipidemic patients. *The Tohoku journal of experimental medicine* **1980**, *132*, 453-462.
107. Su, B.; Liu, H.; Li, J.; Sunli, Y.; Liu, B.; Liu, D.; Zhang, P.; Meng, X., Acarbose treatment affects the serum levels of inflammatory cytokines and the gut content of bifidobacteria in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes* **2015**, *7*, 729-739.
  108. Chen, H. H.; Chen, D. Y.; Chao, Y. H.; Chen, Y. M.; Wu, C. L.; Lai, K. L.; Lin, C. H.; Lin, C. C., Acarbose Decreases the Rheumatoid Arthritis Risk of Diabetic Patients and Attenuates the Incidence and Severity of Collagen-induced Arthritis in Mice. *Scientific reports* **2015**, *5*, 18288.
  109. Lee, H. C.; Jenner, A. M.; Low, C. S.; Lee, Y. K., Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in microbiology* **2006**, *157*, 876-884.
  110. Yamakoshi, J.; Tokutake, S.; Kikuchi, M.; Kubota, Y.; Konishi, H.; Mitsuoka, T., Effect of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on human fecal flora and fecal odor. *Microbial Ecology in Health and Disease* **2001**, *13*, 25-31.
  111. Cherbut, C.; Michel, C.; Raison, V.; Kravtchenko, T.; Severine, M., Acacia gum is a bifidogenic dietary fibre with high digestive tolerance in healthy humans. *Microbial Ecology in Health and Disease* **2003**, *15*, 43-50.
  112. Schley, P.; Field, C., The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *British Journal of Nutrition* **2002**, *87*, S221-S230.
  113. Garcia, D.; Leiro, J.; Delgado, R.; Sanmartin, M. L.; Ubeira, F. M., Mangifera indica L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. *Phytotherapy Research* **2003**, *17*, 1182-1187.
  114. Rivera, D. G.; Hernández, I.; Merino, N.; Luque, Y.; Álvarez, A.; Martín, Y.; Amador, A.; Nuevas, L.; Delgado, R., Mangifera indica L. extract (Vimang) and mangiferin reduce the airway inflammation and Th2 cytokines in murine model of allergic asthma. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2011**, *63*, 1336-1345.
  115. Wong, C. P.; Nguyen, L. P.; Noh, S. K.; Bray, T. M.; Bruno, R. S.; Ho, E., Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol EGCG. *Immunology letters* **2011**, *139*, 7-13.
  116. Cao, H.; Urban, J. F.; Anderson, R. A., Cinnamon polyphenol extract affects immune responses by regulating anti-and proinflammatory and glucose transporter gene expression

- in mouse macrophages. *The Journal of nutrition* **2008**, *138*, 833-840.
117. Yamada, K.; Tokunaga, Y.; Ikeda, A.; Ohkura, K.; Kaku-Ohkura, S.; Mamiya, S.; Lim, B. O.; Tachibana, H., Effect of dietary fiber on the lipid metabolism and immune function of aged Sprague-Dawley rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2003**, *67*, 429-433.
118. Weaver, C. M.; Martin, B. R.; Nakatsu, C. H.; Armstrong, A. P.; Clavijo, A.; McCabe, L. D.; McCabe, G. P.; Duignan, S.; Schoterman, M. H.; van den Heuvel, E. G., Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, *59*, 6501-6510.
119. Ahluwalia, N.; Sun, J.; Krause, D.; Mastro, A.; Handte, G., Immune function is impaired in iron-deficient, homebound, older women. *The American journal of clinical nutrition* **2004**, *79*, 516-521.
120. Shiba, T.; Kawakami, K.; Sasaki, T.; Makino, I.; Kato, I.; Kobayashi, T.; Uchida, K.; Kaneko, K., Effects of intestinal bacteria-derived p-cresyl sulfate on Th1-type immune response *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2014**, *274*, 191-199.
121. 厚生労働省, 統計表 第9表 性・年齢階級・症状(複数回答)別にみた有訴者率(人口千対). 平成25年 国民生活基礎調査 **2014**, pp. 45.
122. 光岡知足, 腸内菌叢研究の歩み. 腸内細菌学雑誌 **2011**, *25*, 113-124.
123. Ng, J.; Hirota, S. A.; Gross, O.; Li, Y.; Ulke-Lemee, A.; Potentier, M. S.; Schenck, L. P.; Vilaysane, A.; Seamone, M. E.; Feng, H.; Armstrong, G. D.; Tschopp, J.; McDonald, J. A.; Muruve, D. A.; Beck, P. L., *Clostridium difficile* Toxin-Induced Inflammation and Intestinal Injury Are Mediated by the Inflammasome. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 542-552.
124. Utsuyama, M.; Hirokawa, K.; Kurashima, C.; Fukayama, M.; Inamatsu, T.; Suzuki, K.; Hashimoto, W.; Sato, K., Differential age-change in the numbers of CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> DC4<sup>+</sup> CD29<sup>+</sup> T cell subsets in human peripheral blood. *Mechanisms of ageing and development* **1992**, *63*, 57-68.
125. Kyoizumi, S.; Kubo, Y.; Kajimura, J.; Yoshida, K.; Imai, K.; Hayashi, T.; Nakachi, K.; Young, L. F.; Moore, M. A.; van den Brink, M. R.; Kusunoki, Y., Age-associated changes in the differentiation potentials of human circulating hematopoietic progenitors to T or NK-lineage cells. *The Journal of Immunology* **2013**, *190*, 6164-6172.
126. Nurieva, R. I.; Chung, Y., Understanding the development and function of T follicular helper cells. *Cellular & molecular immunology* **2010**, *7*, 190-197.

127. Lee, Y. C., Synergistic effect of various regulatory factors in Th1/Th2 balance; immunotherapeutic approaches in asthma. *International journal of biomedical science* **2008**, *4*, 8-13.
128. Atarashi, K.; Tanoue, T.; Shima, T.; Imaoka, A.; Kuwahara, T.; Momose, Y.; Cheng, G.; Yamasaki, S.; Saito, T.; Ohba, Y.; Taniguchi, T.; Takeda, K.; Hori, S.; Ivanov, I. I.; Umesaki, Y.; Itoh, K.; Honda, K., Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **2011**, *331*, 337-341.
129. Furusawa, Y.; Obata, Y.; Fukuda, S.; Endo, T. A.; Nakato, G.; Takahashi, D.; Nakanishi, Y.; Uetake, C.; Kato, K.; Kato, T.; Takahashi, M.; Fukuda, N. N.; Murakami, S.; Miyauchi, E.; Hino, S.; Atarashi, K.; Onawa, S.; Fujimura, Y.; Lockett, T.; Clarke, J. M.; Topping, D. L.; Tomita, M.; Hori, S.; Ohara, O.; Morita, T.; Koseki, H.; Kikuchi, J.; Honda, K.; Hase, K.; Ohno, H., Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **2013**, *504*, 446-450.
130. Esplugues, E.; Huber, S.; Gagliani, N.; Hauser, A. E.; Town, T.; Wan, Y. Y.; O'Connor, W.; Rongvaux, A.; Van Rooijen, N.; Haberman, A. M.; Iwakura, Y.; Kuchroo, V. K.; Kolls, J. K.; Bluestone, J. A.; Herold, K. C.; Flavell, R. A., Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* **2011**, *475*, 514-518.
131. Cerf-Bensussan, N.; Gaboriau-Routhiau, V., The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology* **2010**, *10*, 735-744.
132. 日高秀昌; 原哲郎; 柴田利章; 岡田淳; 島田馨; 光岡知足, フラクトオリゴ糖の腸内フローラに及ぼす影響 (理研腸内フローラシンポジウム 4 腸内フローラと食物因子, 光岡知足 編). 学会出版センター, **1984**, 39-67
133. 山田哲也; 秋山拓哉; 旗野博; 木村一雅, 種々のオリゴ糖の腸内嫌気性細菌による *in vitro* 資化性試験. *ミルクサイエンス* **2015**, *64*, 87-98.
134. 三橋重之; 村田信子, *Bifidobacterium* の他細菌の増殖に対する抑制作用について. *日本栄養・食糧学会誌* **1991**, *44*, 365-372.
135. 磯部由香; 松井宏樹; 安見真帆; 成田美代, 耐酸性を有する乳酸菌の検索. *日本家政学会誌* **2007**, *58*, 337-341.
136. Hamer, M., The beneficial effects of tea on immune function and inflammation: a review of evidence from *in vitro*, animal, and human research. *Nutrition Research* **2007**, *27*, 373-379.
137. Singh, B. N.; Shankar, S.; Srivastava, R. K., Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate

- (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical pharmacology* **2011**, *82*, 1807-1821.
138. 山本万里, 抗アレルギー作用, がん転移抑制を中心とした茶ポリフェノールの機能性. *日本調理科学会誌* **2004**, *37*, 93-97.
139. 岩尾岳洋; 松永民秀, 個別化 (オーダーメイド) 医療を志向した薬物動態研究および毒性試験へのヒト iPS 細胞の利用. *Organ Biology* **2015**, *22*, 39-48.
140. Iwao, T.; Toyota, M.; Miyagawa, Y.; Okita, H.; Kiyokawa, N.; Akutsu, H.; Umezawa, A.; Nagata, K.; Matsunaga, T., Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **2014**, *29*, 44-51.
141. Sato, T.; van Es, J. H.; Snippert, H. J.; Stange, D. E.; Vries, R. G.; van den Born, M.; Barker, N.; Shroyer, N. F.; van de Wetering, M.; Clevers, H., Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **2011**, *469*, 415-418.
142. Nakamura, K.; Sakuragi, N.; Takakuwa, A.; Ayabe, T., Paneth cell  $\alpha$ -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Bioscience of microbiota, food and health* **2016**, *35*, 57-67.
143. Fagiolo, U.; Cossarizza, A.; Scala, E.; Fanales - Belasio, E.; Ortolani, C.; Cozzi, E.; Monti, D.; Franceschi, C.; Paganelli, R., Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *European Journal of Immunology* **1993**, *23*, 2375-2378.
144. Odamaki, T.; Kato, K.; Sugahara, H.; Hashikura, N.; Takahashi, S.; Xiao, J.; Abe, F.; Osawa, R., Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiology* **2016**, *16*, 90.
145. 平山和宏, 腸内細菌叢の基礎. *モダンメデシア* **2014**, *60*, 307-311.
146. Braat, H.; van den Brande, J.; van Tol, E.; Hommes, D.; Peppelenbosch, M.; van Deventer, S., *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4<sup>+</sup> T cells via modulation of dendritic cell function. *The American journal of clinical nutrition* **2004**, *80*, 1618-1625.
147. Mohamadzadeh, M.; Olson, S.; Kalina, W. V.; Ruthel, G.; Demmin, G. L.; Warfield, K. L.; Bavari, S.; Klaenhammer, T. R., Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 2880-2885.
148. Yoshino, K.; Kawaguchi, T.; Yamazaki, K.; Sano, M., Preventive effects of

- (-)-epigallocatechin-3-O-gallate on mouse type IV allergy induced by oxazolone and its antiinflammatory activities. *Journal of Technology and Education* **2010**, *17*, 57-65.
149. 厚生労働省, 結果の概要 7 特定疾患 (難病) 関係 (1) 特定疾患医療受給者証所持者数. 平成 26 年度衛生行政報告例の概況 **2015**, pp. 11.
150. Hold, G. L.; Smith, M.; Grange, C.; Watt, E. R.; El-Omar, E. M.; Mukhopadhy, I., Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years. *World journal of gastroenterology* **2014**, *20*, 1192-1210.
151. Kostic, A. D.; Xavier, R. J.; Gevers, D., The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1489-1499.
152. Khoruts, A.; Rank, K. M.; Newman, K. M.; Viskocil, K.; Vaughn, B. P.; Hamilton, M. J.; Sadowsky, M. J., Inflammatory bowel disease affects the outcome of fecal microbiota transplantation for recurrent *clostridium difficile* infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2016**, *14*, 1433-1438
153. Anderson, J. L.; Edney, R. J.; Whelan, K., Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **2012**, *36*, 503-516.
154. 福土審, 脳腸相関とストレス. ストレス科学研究 **2013**, *28*, 16-19.
155. Sawada, D.; Kawai, T.; Nishida, K.; Kuwano, Y.; Fujiwara, S.; Rokutan, K., Daily intake of *Lactobacillus gasseri* CP2305 improves mental, physical, and sleep quality among Japanese medical students enrolled in a cadaver dissection course. *Journal of Functional Foods* **2017**, *31*, 188-197.

## 【要旨】

『サラシア属植物エキスパウダの安全性確認と免疫機能に対する作用の解明』

小田 由里子

技術の発展は食習慣や生活環境を変化させ、長寿社会を現実のものとした。しかし、その結果様々なストレスに曝されることとなり、生活習慣病やアレルギー、がんをはじめとする疾病の発症率および医療費は増加の一途を辿っている。これらの問題を解決するため、食品摂取を通じて健康維持および疾病予防を行う『機能性食品』が注目されている。本研究においては、疾病予防食品の開発を目指し、糖の吸収抑制作用を有するサラシア属植物を対象として、新規機能の探索を行った。

サラシア属植物（以下、サラシア）は、インドやスリランカ等の東南アジアで糖尿病や肥満の予防に用いられてきた伝承植物であり、幹や根の抽出物には $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有するサラシノール、コタラノール等のチオ糖が含まれている。1990年代からサラシアエキスの糖吸収抑制作用と、糖吸収抑制に付随する血糖値や肥満の改善作用に関する研究が盛んに行われてきたが、それ以外の作用はほとんど知られていない。また、サラシアエキスをを用いた製品が多く販売されているが、日本で最も流通している *Salacia reticulata* エキスパウダ（以下、サラシアエキスパウダ）の長期摂取を想定した安全性試験の報告はなかった。

本研究では、糖の吸収抑制にとどまらないサラシアエキスパウダの新規機能を解明することを目的とした。最初にサラシアエキスパウダの亜慢性毒性試験を実施し、長期投与によるサラシアエキスパウダの安全性を確認することにした。次に $\alpha$ -グルコシダーゼ発現部位である小腸におけるサラシアエキスパウダの作用解明を行うとともに、消化管内に残されたオリゴ糖に着目し腸内環

境に対する作用を検討することにした。最後に、動物試験結果を参考に、ヒト摂取試験を実施し、疾病予防食品開発に向けたサラシアエキス粉末の効果検証を行うこととした。

サラシアエキス粉末の亜慢性毒性試験では、6週齢の雌雄の Sprague-Dawley 系 (CrI:CD (SD)) ラットに、サラシアエキス粉末を 0～400 mg/kg body weight/day の用量で 13 週間 (91 日間) 強制経口反復投与し、安全性評価を行った。試験期間中、試験動物の一般状態、体重、摂餌量、摂水量にサラシアエキス粉末投与の影響と考えられる変化は生じなかった。また、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査において、サラシアエキス粉末の投与に起因すると思われる変化は認められなかった。さらに、臓器重量、病理解剖学的検査、病理組織学的検査においてもサラシアエキス粉末投与による毒性変化は見られなかった。以上の結果から、サラシアエキス粉末の無毒性量 (No Observed Adverse Effect Level: NOAEL) は、400 mg/kg body weight/day (ヒト摂取量の 100 倍量) であると結論付けた。

サラシアエキス粉末の消化管 (小腸) に対する作用解明では、7 週齢の雄の SD ラットに、サラシアエキス粉末を強制経口反復投与し評価を行った。長期的なサラシアエキス粉末投与による作用を評価するため、投与期間は亜慢性毒性試験と同様の 13 週間 (91 日間) とした。また、ラット試験の結果をヒト試験の参考とするため、投与量はヒトでも安全性が確認されている 20 mg/kg body weight/day (ヒト摂取量の 5 倍) に設定した。投与期間終了後、 $\alpha$ -グルコシダーゼが発現している小腸の一部で、パイエル板を多く有し、吸収・異物の排除などにおいて重要な役割を果たす回腸 (回腸粘膜) の遺伝子発現解析を DNA マイクロアレイにより実施し、回腸におけるサラシアエキス粉末の作用を網羅的に評価した。また、腸内環境に対するサラシアエキス粉末の作用を検討するため、Terminal Restriction Fragment Length

Polymorphism Analysis (Nagashima 法) (以下、T-RFLP 法) による糞便の腸内細菌叢解析を行った。回腸粘膜の遺伝子発現解析の結果、サラシアエキス粉末は免疫関連遺伝子、特に細胞性免疫に関与する Th1 細胞関連遺伝子の発現を増加させることが明らかになった。また、腸内細菌叢の解析では、サラシアエキス粉末投与により腸内細菌叢の構成比率が変化し、類似して行く傾向を示した。サラシアエキス粉末投与により比率が変化した菌について調査を行ったところ、比率が上昇した菌に免疫賦活作用が示されている *Bacteroidetes* が含まれていることが明らかになった。以上のことから、サラシアエキス粉末は腸内細菌叢を変化させ、増加した菌や菌体成分が腸管免疫系を通じて生体機能を調節する可能性を示した。

ヒト介入試験では、ヒト免疫機能に対するサラシアエキス粉末の作用を検証することを目的とした。スクリーニングにより選抜された、免疫機能が低下した(加齢やストレスで低下する複数の免疫学的指標を総合的に評価した免疫カスコアが低値(<IV)であった)50歳以上60歳未満の日本人健常男性30名を対象として、サラシアエキス粉末の摂取試験を二重盲検並行群間比較法にて行った。被験食として、サラシアエキス粉末を240 mg/day 含有する錠剤と、サラシアエキス粉末含有錠剤と見分けがつかないように設計したプラセボ錠剤を作製し、無作為割付を行った被検者(各群15名)に4週間(28日間)摂取させた。低侵襲で評価可能な手法の検討を行い、血液の遺伝子発現解析と免疫学的指標評価、糞便の腸内細菌叢解析を実施することとした。血液(末梢血)の遺伝子発現解析(DNA マイクロアレイ)は、ヒトに対するサラシアエキス粉末の作用メカニズム解明を目的として、サラシアエキス粉末摂取群で実施した。さらに免疫機能に対する作用検証を行うため、血液を用いて各種免疫学的指標(免疫細胞数、免疫細胞増殖係数、サイトカイン産生量等)評価を行った。また、ヒト腸内細菌に対するサラシアエ

キス粉末の作用を検討するため、糞便を用いて腸内細菌叢を解析（T-RFLP法）した。血液を用いた遺伝子発現解析では、免疫関連遺伝子、特に Th1 細胞に関わる遺伝子（Interferon signaling 関連遺伝子）の発現が増加しており、ラットだけではなく、ヒトにおいても、サラシアエキス粉末が細胞性免疫を誘導する可能性が示された。また、Interferon signaling 以外の炎症関連遺伝子の発現は減少していた。血液の免疫学的指標の評価では、加齢とともに低下する T 細胞増殖係数の向上や、各種ヘルパー T 細胞への分化能を有する CD4<sup>+</sup> naive T 細胞数の増加傾向、炎症性サイトカインである IL-6 産生量の減少傾向が確認され、表現型としても免疫賦活作用および炎症抑制作用が示された。腸内細菌叢解析では、*Bifidobacterium* 比率の上昇と Lactobacillales 比率の上昇傾向、Clostridiaceae 比率の低下が確認でき、サラシアエキス粉末がヒト腸内細菌叢を顕著に変化させることが明らかになった。サラシアエキス粉末摂取により比率が上昇した *Bifidobacterium* は加齢に伴い減少することが知られている。また、*Bifidobacterium* や Lactobacillales は免疫機能調節作用が確認されており、サラシアエキス粉末がヒトにおいて腸内細菌叢コントロールを通じて、加齢に伴い低下する免疫機能を回復させ、生体防御機能を高める可能性を示した。

以上の結果から、サラシアエキス粉末は糖の吸収抑制作用だけでなく、免疫機能を調節する作用を有していることが示唆された。

推定される作用メカニズムは、サラシアエキス粉末に含まれるチオ糖が小腸の  $\alpha$ -グルコシダーゼの作用を阻害し、吸収されなかった糖（オリゴ糖）が腸内細菌叢を変化させる。増加した菌や菌体成分が小腸パイエル板から取り込まれ、樹状細胞などを通じて抗原提示され、細胞性免疫を誘導するとともに、アレルギーなどの過剰な炎症反応を抑制することにより、免疫機能を調節するというものであるが、サラシアエキス粉末に含まれるチオ糖以外の

成分や代謝産物の分析も含めた、多面的な検証が必要である。

アレルギーやがん、炎症性腸疾患などの発症や増悪には、免疫機能の異常が関与することが示唆されている。また免疫機能が低下することにより、感染や重症化のリスクが高まる。サラシアエキスポ末は、加齢やストレス等により低下する免疫機能を回復させ、生体機能を調節する可能性が示されたことから、疾病予防効果が期待できる。今後、人々の QOL (Quality of Life) 向上に貢献するため、よりいっそう積極的に研究に取り組んでいきたい。



## 【謝辞】

2007 年の富士フイルム株式会社入社以来、多くの方々にご指導、ご助言を賜りながら、研究を行ってまいりました。10 年間の研究の集大成として、博士論文を作成できたことは、無上の喜びです。関わっていただいた皆様には感謝してもしきれませんが、少しでも気持ちをお伝えしたく、謝辞に代えさせていただきます。

本研究開始時から叱咤激励を含めたあたたかいご指導を賜り、食品研究の面白さと難しさ、そして常に新たな探究を行っていくことの大切さをご教示いただいた東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」 阿部啓子特任教授に、心より感謝申し上げます。主査をお引き受けくださっ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 ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」岡田晋治特任准教授には、本論文をまとめる際に様々なご指導とご配慮を賜り、さらに研究会等で本研究内容を発表する機会を与えていただきましたことを深謝申し上げます。また、本論文をご高覧くださり、鋭いご指摘や多数のご助言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 佐藤隆一郎教授、加藤久典特任教授、戸塚護准教授、三坂巧准教授に厚く御礼申し上げます。先生方にいただいたご指摘やご助言は、今後の研究に活かしてまいりたいと思っております。

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所 「食品機能性評価」グループ 亀井飛鳥博士には、本研究初期からご協力を賜り、遺伝子発現解析の実験手法やデータ解析について懇切丁寧にご指導いただくとともに、論文化に際しては何度も快く議論に応じてくださり、深く感謝申し上げます。また、地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所 「食品機能性評価」グループ 近藤隆博士、安岡顕人博士、篠崎文夏博士には、試験結果の考察

並びに論文化にあたり、多くの有益なご助言をいただきまして感謝申し上げます。さらに地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所「食品機能性評価」グループ 研究員 渡部由貴氏には、DNA マイクロアレイを行うにあたり、様々なサポートをいただきましたことを御礼申し上げます。

東京医科歯科大学 廣川勝昱名誉教授と東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 老化制御学系専攻 講師 宇津山正典博士には、ヒト試験の試験デザインや免疫学的指標の測定方法などをご指導賜り、論文化においても数多くのご助言をいただきましたことを厚く御礼申し上げます。

京都府立大学大学院生命環境科学研究科 応用生命科学専攻 塚本康浩教授と京都府立大学大学院生命環境科学研究科 応用生命科学専攻 講師 井上亮博士には、感染モデルを用いた試験やシーケンサー解析など多くの実験を行っていただいたことを御礼申し上げます。

富士フイルム株式会社および株式会社富士フイルム ヘルスケアラボラトリー社員の皆様には、研究を行う姿勢や論理的な考察の仕方など、社会人として、また研究者として、多くのことをご指導賜りました。入社時から現在に至るまで、常に親身なご指導および鋭いご指摘を賜り、研究者として好奇心とチャレンジ精神を持ち続けることの大切さをご教示いただいた植田文教氏に心より感謝申し上げます。また、柿沼千早博士、永田幸三氏、阪口博之氏、関忍氏には本論文の研究内容以外にも、既往研究調査、試験計画、研究発表など様々な場面でご指導いただき、研究者としての根幹を鍛えていただきましたことを厚く御礼申し上げます。さらに、研究員の皆様には、快く議論に応じていただき、多くのご助言とアイデアをいただきましたことを感謝申し上げます。

最後に、様々な面から力強く支え続けてくれた夫佳史、心の支えになってくれた息子祥太郎、愛犬はな、家族、友人に心より感謝申し上げます。