神奈川工科大学　健康生命科学研究所
研究成果報告書

第　7　号

平成 28 年度

神奈川工科大学

工学教育研究推進機構

目　次

(1) ミネラルを架橋点とするリン酸含有ゲル微粒子の創製
健康生命科学研究所　清水秀信　・・・　1

(2) 力学的特性の異なるモデル具材を含む混合粥の食べやすさの評価
健康生命科学研究所　高橋智子　・・・　4

(3) カルシウムの生体利用性に対する生活リズムの乱れと飼料タンパク質量の影響に関する研究　−モデルラットを用いる検討−
健康生命科学研究所　花井美保　・・・　8

(4) ストレスを潜在要因とした味覚・嗅覚・痛覚の感覚間相互作用の基礎的検討
健康生命科学研究所　澤井明香　・・・　１２
情報メディア学科　坂内祐一
基礎・教養教育センター　竹田裕一

(5) 種横断的な健康寿命制御機構の解明
健康生命科学研究所　井上英樹　・・・　１７
栄養生命科学科　横山知永子

科
(6) 高齢者のサルコペニア予防・改善のための新規栄養食品の開発
健康生命科学研究所　佐々木一　・・・　２１
栄養生命科学科　澤井淳

(7) 動物実験モデルを用いた唾液の機能性に関する研究
健康生命科学研究所　栗原誠　・・・　２６

(8) プロスタサイクリン欠損が引き起こす動脈硬化のin vitro モデル実験系の確立とそれを用いた生活習慣病の予防・改善に向けた研究
健康生命科学研究所　横山知永子　・・・　３０

ミネラルを架橋点とするリン酸含有ゲル微粒子の創製

健康生命科学研究所　清水 秀信

1. 研究の目的

リン酸は，究極の高分子であるDNAの構成成分の一つであったり，タンパク質の機能を調節するためにタンパク質に修飾されたり，生命発生の触媒としてはたらいたりするなど，生体との関わりが非常に深い物質である。一方産業界においては，カルボキシ基やアミノ基などの官能基に比べ，リン酸基を含む材料については十分活用されていないのが現状である。本研究課題では，リン酸基の未知なる可能性や有用性を探索するために，リン酸基を有するモノマーを利用して，ミネラルを架橋点とするリン酸含有ゲル微粒子の創製を試みた。

亜鉛やカルシウムのようなミネラルイオンは陽イオンになることから，負電荷のリン酸イオンと正電荷のミネラルイオンの静電的相互作用を利用して，ミネラル存在下でリン酸基を有するモノマーを重合させることにより目的とするゲル微粒子が作製できる可能性があげられる。すなわち，重合反応の進行にともない，ポリマー鎖がミネラルにより橋かけされることを期待し，大きさが均一で水に安定に分散できるサブミクロンオーダーのゲル微粒子が作製できる条件について，特に添加するミネラルイオンの濃度に着目して検討を行った。

2. 研究の必要性及び従来の研究

生体内では有効に活用されているリン酸基であるが，現在までのところ、この優れた特性を活かしてリン酸基を工業的に十分活用できているとはいえない状況である。その理由の一つにリン酸基に関する基礎研究が不足していることが挙げられる。またミネラル含有量の高い粒子が作製できれば，現代人が不足がちなミネラルを補給できるサプリメントして有望な素材にもなると考えられる。

したがって，リン酸基に関する研究を推進することは，リン酸基の未知なる機能を引き出す可能性を秘めているという点で非常に重要であるといえる。

3. 期待される効果

ミネラルイオンを保持したリン酸基を有するゲル微粒子はこれまでに合成されたことのない材料であることから，新しい機能の発現が期待できる。すなわち，ミネラルを徐放で

きる担体やミネラルを効率的に補給できるサプリメントとしての応用があげられる。

4. 研究の経過及び結果

4.1　亜鉛イオンを架橋点とする粒子が得られる条件

本実験で使用したリン酸基を有するモノマー(ホスマーM, ユニケミカル社製)の構造式を図 1 に示す。ホスマーM は水溶性のモノマーであるため，ホスマーM のみを重合させても得られるポリマーは水溶性となる。これをゲル微粒子のかたちにするためには，通常エチレングリコールジクリシジルエーテルのような化学架橋剤によりポリマー鎖同士を橋かけする必要がある。ここで化学架橋剤を用いて共有結合で橋かけする代わりに，非共有結合によりポリマー鎖を架橋することができれば，粒子内部が動的に変化するゲル微粒子を得ることができる。

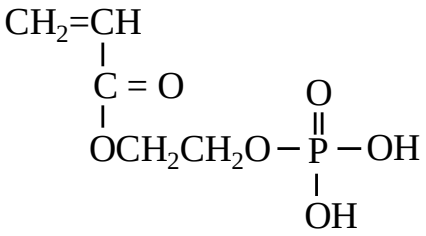

Fig.1. Structural formula of Phosmer M.

本研究では，非共有結合の 1 つである静電的相互作用を利用して，ゲル微粒子を作製できるかどうかの検討を行った。具体的には，リン酸基の負電荷と正電荷を有する陽イオンが静電的相互作用することを利用して，陽イオンを架橋点とするリン酸基含有粒子の作製を試みた。

200 mL の四つ口フラスコに，95 g の蒸留水，2.0 g のホスマーM，所定量の塩化亜鉛を加え，モノマーと塩化亜鉛を水に完全に溶解させた。この溶液の温度を 70 ℃にし，系内を窒素置換した後，開始剤として 0.020 g の過硫酸カリウムを系内に加え，重合を開始した。

塩化亜鉛の仕込み量を変化させて重合を行い，得られた分散液の様子を観察した結果を示す。ボスマーM に対して塩化亜鉛を 0.50 倍モル以上添加したときには，得られる重合生成物はすべて沈殿する様子が観察された。一方，塩化亜鉛の仕込み量を減らして 0.25 倍モルにすると，沈殿に加えてコロイド溶液が得られた。さらに塩化亜鉛の量を少なくして 0.125 倍モルにすると，沈殿は生成せずにコロイド溶液のみが得られた。また塩化亜鉛を添加せず，ホスマーのみで重合させた溶液は無色透明であり，コロイド粒子や沈殿物の生成は認められなかった。以上の結果から，ホスマーM に対する塩化亜鉛の量を下げることにより，亜鉛を架橋点とする水分散体が得られることがわかった。しかし，塩化亜鉛が 0.125 倍モルの条件で得られた粒子は，遠心分離により粒子を沈殿させることができなかった。

4.2　亜鉛イオンを架橋点とする粒子の転化率と亜鉛含有量

図 2 に，塩化亜鉛の仕込み量を変化させてホスマーM の転化率を測定した結果を示す。ホスマーM に対して塩化亜鉛を 0.50 倍モル以上添加したときには，転化率は 30 wt%弱までしか上がらなかった。一方，塩化亜鉛を 0.25 倍モル以上添加すると転化率が 86 %まで達するという結果が得られた。

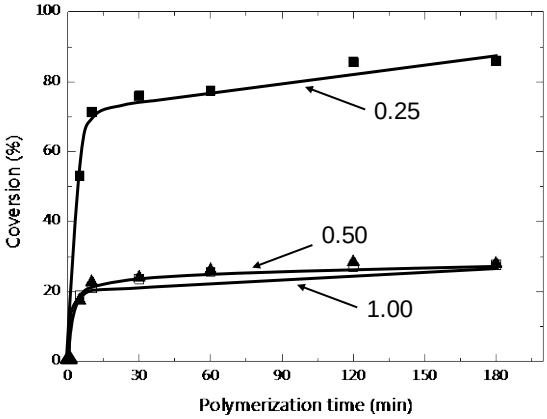

Fig. 2. Time-conversion curves for polymerization of phosphate-containing monomer in the presence of various concentrations of zinc chloride.

塩化亜鉛をホスマーM に対して 0.25 倍モル加えた系で得られた粒子に含まれる亜鉛含量をキレート滴定により測定したところ, 粒子 1 g あたり 571 mg の亜鉛を含んでいることがわかった。この結果から，塩化亜鉛を 0.25 倍モル含む系でホスマーM の重合を行うことにより，約 57 %の亜鉛を含む水分散性に優れた粒子が得られることがわかった。

5. 今後の計画

平成 28 年度内での検討過程を通して，塩化亜鉛の存在下でリン酸基を有するホスマーM を重合させることにより，亜鉛イオンを含むゲル微粒子が作製できることは確認できたが，リン酸基を有する新規機能性モノマーを合成して，ミネラル含有量が高い機能性ゲル微粒子を作製する研究に関しては十分検討の時間が取れなかった。今後合成条件の検討を行い，種々のリン酸基を有するモノマーを合成し，得られたモノマーを塩化亜鉛や塩化カルシウムの濃度を変えて重合を行い，粒子が得られる条件を明らかにする予定である。

6. 研究成果の発表

リン酸基を有する新規機能性モノマーの合成、並びに，これらのモノマーを重合し，得られたポリマー鎖を亜鉛イオンやカルシウムイオンにより橋かけしてゲル微粒子が作製できる条件を明らかにした後、得られた成果を論文としてまとめる予定である。

力学的特性の異なるモデル具材を含む混合粥の食べやすさの評価

健康生命科学研究所　　高橋　智子

１．研究の目的

本研究では、具材入り米粥の力学的特性とヒトの食べやすさの関係を検討した。この検討課題より得られた結果は、多くの高齢者施設、食品会社が欲するものとなると考える。介護食用市販具材入り米粥の中には、飲み込んだ後も口中や喉頭蓋谷に具材が残留することがある。このことは、摂食機能の低下した高齢者にとって、誤嚥・窒息の原因になる。具材の入った米粥を調製する際に施設の管理栄養士が一番知りたいことは、粥飯と具材の力学的特性の関係である。これまで経験的に粥飯と具材の力学的特性の関係（バランス）により、粥飯による具材のまとめやすさ、食塊形成のしやすさ、加えて食塊嚥下後の具材の口中、喉頭蓋谷における残留状態も異なると考えられていた。本研究では力学的特性の異なる具材を一定割合で全粥に加えて混合粥を調製し、ヒトが食べる時に粥飯によりまとめやすく、具材が残留しにくく、誤嚥しにくい混合粥について、具材と粥飯の力学的特性の関係を検討した。

２．研究の必要性及び従来の研究

日本介護食品協議会で策定したユニバーサルデザインフードの区分 3 舌でつぶせるの市販介護食品として、具材が入ったが粥が販売されている。刻んだ肉類、野菜類が具材として含まれているが、飲み込んだ後、肉類、野菜類などで硬い食感のものは具材が口中に残留してしまうことがある。高齢者では嚥下後口中で口中に残留した食品は、居眠りをしているときなど気管に入ってしまい誤嚥・窒息の原因となる。そこで、本研究では全粥の粥飯によりまとめることができて食塊形成しやすく、嚥下後口中に残留しにくい具材の力学的特性を把握し、全粥飯の力学的特性との関係を検討した。

３．期待される効果

米粥に具材が分散した状態である具材入り米粥の力学的特性と食べやすさの関係についての知見を得ることにより、安全に誤嚥することなく食べやすい具材入り米粥の調製が可能となると考える。

４．研究の経過及び結果

(1) 調製方法

1) 米粥の調製

平成 26 年度新潟県産コシヒカリの精白米を材料米として米粥を調製した。洗米中、および水切り中において米が吸水した水分重量を考慮して、米とイオン交換水の合計重量が 240g(米重量 40g、イオン交換水 200g)になるようにしたものを、真空包装し、95℃中の湯浴中にて 60 分間加熱した。加熱後、米粥試料は 45℃、20℃恒温器中において、品温が 45℃、

および20℃になるまで静置し、測定試料とした。

2）加熱人参試料の調製

人参の大きさは1本150～170g、長さ15～18cmのものとした。人参の中心部をより、縦、横、厚さ5mmの加熱用人参を切り出した。米粥と同様に真空包装後、95℃中の湯浴中にて60分間、90分間、120分間の3段階に加熱時間を変えて、加熱処理を行った。加熱人参試料のは、中心温度が45℃、20℃になるようの恒温器中で保存した。

3）米粥・加熱人参混合粥（以後混合粥と称す）の調製

45℃恒温器中で保存しておいた100ml ビーカーに、試料品温45℃の米粥試料21.0±0.5gに対し試料品温45℃の加熱時間の異なる加熱人参3種類を各々、混合粥全体重量の内割20%重量（5.2±0.2g）になるように加え、プラスチックスプーンで5回撹拌混合した。品温20℃の混合粥の調製も試料品温45℃と同様に行った。

（2）測定方法

1)粥液重量

米粥試料45℃、20℃各々20gをろ紙上に直径80mm円形に粥飯粒が重ならないように広げ、粥飯を広げた円形全体をガラスシャーレの蓋で覆った。常温で 1 時間放置後、ろ紙上の粥飯粒を一粒づつ取り除き、ろ紙重量を差し引き粥液重量とした。

2)粥飯粒の大きさ

粥飯1粒をガラス板上に置き、デジタルキャリパーにより、最長径、最短径（幅）、厚さの測定を行った

3）粥飯粒、および加熱人参の破断特性

粥飯粒の破断特性は、試料品温45℃、および20℃の米粥試料より粥飯1粒を抽出し、レオナーの試料台に横に置き、その高さを測定後、直径20mmの円柱状プランジャーにより圧縮率90%、圧縮速度0.5mm/secで定速1回圧縮測定を行った。加熱人参1粒の破断特性は、試料品温45℃および20℃の加熱人参より1粒を抽出し、加熱人参1粒ごとに試料高を測定後、直径20mmの円柱状プランジャーにより試料高の90%の圧縮率で破断特性の測定を行った。圧縮速度0.5mm/secである。

4）米粥、および混合粥のテクスチャー特性

レオナー(RE－33005,（株）山電)を用い、直径 40mm の試料容器に高さ 15mm に試料を充填し、直径20mmの円柱型プランジャーで圧縮速度10mm/s、クリアランス5mm(圧縮量10mm、圧縮率66.7%）で試料を2回圧縮して測定した。

5）米粥および混合粥の官能評価

シェッフェの一対比較法（原法）により口腔感覚の官能評価を行い、得られた評価結果を解析した。パネルは、訓練された健常な20～22歳の若年男女のべ36名とした。評価試料は、品温45℃米粥に品温45℃の60分間加熱人参、90分間加熱人参、120分間加熱人参を加えた混合粥3試料、および品温45℃米粥試料単独の計4試料について、官能評価を行った。品温20℃についても、同様に官能評価を行った。

(3) 結果および考察

本研究における粥液の採取方法では、粥液の粘度測定はできなかったが、粥液重量は試料品温 20℃が品温 45℃に比べ、少ないこと示された。また、保存時間が長く、品温が低い、試料品温 20℃粥飯粒の大きさは、品温 45℃粥飯粒よりも大きくなることが示された。これは、試料品温を低下させるのに保存時間が長くなったため、米粥の粥飯粒は粥液を吸収することで、膨潤したためと考えられる。本研究では具材のモデルとして、5mm 立方体の加熱人参を用いた。混合粥における粥飯粒と加熱人参の大きさの関係は、粥飯粒の長辺よりも加熱人参のほうが小さく、短辺とは同程度、厚さは粥飯粒のほうが薄いことが示された。粥飯粒の破断特性として、品温 20℃粥飯粒の最大荷重は 45℃粥飯粒に比べ、有意に大きいことが認められた。これは、保存温度が低く、保存時間が長い試料品温 20℃米粥が 45℃に比べ、米粥に含まれるでんぷん中のアミロースの老化が進行したためと考えられる。加熱時間が長くなるに従い、加熱人参の破断荷重、最大荷重は、いずれの試料品温においても小さくなる傾向を示した。中性水溶液中で 90℃前後の高温で加熱すると、人参の細胞壁に含まれるペクチンがトランスエリミネーション（β-脱離）により分解することで、細胞間の接着が弱くなり軟化が起こり、加えて、加熱時間が長くなるに従い、軟化は促進することが報告されている。一方、試料品温が 45℃から 20℃に低下することで加熱人参の硬化が見られ、破断特性も 20℃試料の方が大きくなった。官能評価において、試料品温 45℃、20℃ともに有意差が認められた評価項目は、口中で感じるかたさであった。そこで、粥飯粒、およびモデル具材としての加熱人参の最大荷重、破断荷重、テクスチャー特性の硬さと官能評価より得られた口中で感じるかたさの関係を検討した。ただし、粥飯粒は延性破断を示すため破断荷重を得ることができないので、最も破断荷重が小さい 120 分間加熱人参の破断ひずみ率における粥飯粒荷重を暫定的に粥飯粒の破断荷重とした。試料品温 45℃において、口中で感じるかたさと破断荷重との間に高い相関関係($r = -0.952$, $p<0.05$)が認められた。すなわち、混合粥に含まれる粥飯粒、加熱人参の破断荷重が大きくなるに従い、口中でかたく感じるという結果が得られた。しかし、米粥、および混合粥のテクスチャー特性の硬さと口中で感じるかたさとの間には、高い相関関係は得られなかった。試料品温 20℃において、口中で感じるかたさと最大荷重($r=-0.975$, $p<0.05$)、および破断荷重($r=-0.954$, $p<0.05$)との間に高い相関関係が得られた。すなわち、混合粥に含まれる粥飯粒、加熱人参の最大荷重、破断荷重が大きくなるに従い、口中でかたく感じるということが認められた。しかし、試料品温 45℃と同様、20℃においてもテクスチャー特性の硬さと口中で感じるかたさの間には高い相関関係は認められなかった。本研究における米粥、および混合粥のテクスチャー特性はユニバーサルデザインフード試験方法に従い、圧縮率 66.7%で測定した。前報において、粥の口中におけるかたさをあらわすことができるテクスチャー特性の硬さは、圧縮率 66.7%よりも変形が大きい圧縮率 90%で得られた硬さであることを報告した。本研究では、圧縮率 90%の硬さを測定していないが、具材入り混合粥のテクスチャー特性測定方法のさらなる検討が必要となる。

また、いずれの試料品温においても、加熱人参の破断荷重が大きくなるに従い、混合粥の口中においてかたく感じる傾向にあることが示された。これは、混合粥を口中に入れて咀嚼する際に、具材として含まれる加熱人参が破断する、すなわち咀嚼により加熱人参に亀裂が生じる時に、口中のかたさを感じていることが推測される。最大荷重は咀嚼時、大きく食品を変形させた際に感じる抵抗を表すパラメーターと考える。試料品温 45℃に比べ硬い品温 20℃の米粥、および混合粥では、咀嚼時に粥飯粒、加熱人参を大きく変形させることで得られる最大荷重が、口腔感覚のかたさに大きく影響を与えているものと推測する。

試料品温 45℃では、口中のべたつき感、口中でのまとまりやすさ、口中の残留感の評価に有意差は認められなかった。一方、試料品温 20℃では、口中で感じるかたさ以外にも口中のべたつき感、口中でのまとまりやすさ、口中の残留感の評価に有意差が認められたが、いずれの評価結果も、米粥と混合粥の間の有意差であった。すなわち、冷めた状態の試料品温 20℃では、具材としての加熱人参の力学的特性が異なっていても、加熱人参が混合されていることで、米粥に比べ、べたつきにくく、口中でまとまりにくく、口中の残留感も大きくなることが示された。試料品温 45℃の米粥は 20℃に比べ、含まれる粥液量は多く、テクスチャー特性において軟らかく、凝集性が大きいことが示されている。すなわち、試料品温 45℃では、米粥が加熱人参をまとめやすい状態にあることが推測される。また、試料品温 45℃加熱人参の破断荷重、最大荷重が 20℃に比べ小さく、ことに最大荷重は粥飯粒と同程度である。そのため、加熱人参は粥飯でまとめられることにより、口中のまとまりやすさ、嚥下後の口中の残留感において、米粥と混合粥の間に有意差が認められなかったものと考える。一方、試料品温 20℃では 45℃に比べ粥液量が少なく、米粥のテクスチャー特性は硬く、米粥が加熱人参をまとめることができない。そのため、加熱人参が混合されることで、米粥に比べ、混合粥は口中でまとまりにくく、口中の残留感も大きくなると評価されたと考える。これらのことより、具材を加えた混合粥の食べやすさの評価には、混合粥全体のテクスチャー特性だけではなく、基本となる米粥のテクスチャー特性、加えて米粥 1 粒、および具材 1 個の力学的特性について検討する必要があると考える。

５．今後の計画

米粥に加える具材の大きさを変えて、本研究の結果をふまえて引き続き検討する予定である。

６．研究成果の発表

日本摂食嚥下リハビリテーション学会誌投稿済み、2017 年度日本摂食嚥下リハビリテーション学会学術大会発表の予定である。

カルシウムの生体利用性に対する生活リズムの乱れと飼料タンパク質量の影響に関する研究-モデルラットを用いる検討-

健康生命科学研究所　　花井　美保

１．研究の目的

本研究では、生活リズムが 24 時間周期でないモデルとして連続暗黒下で飼育したラットを用い、カルシウム(Ca)の生体利用性に対する摂取タンパク質の影響を明らかにすることを目的とした。

２．研究の必要性及び従来の研究

現在の日本人のカルシウム(Ca)摂取量は約 500mg/日であり、日本人の食事摂取基準の推奨量 650mg/日の 80%にも達していない。特に若年女性の Ca 摂取量は少なく(400mg/日)、骨粗鬆症予備群といわれている。また、糖質制限ダイエットの流行により、高タンパク質食を選択する女性がいる一方、ご飯やパン、スナック菓子のみで食事をすませるなどタンパク質の摂取が不足している女性もいる。

生活スタイルの多様化により深夜も働いていたり、何らかの生活活動をしたりしている人々が増加していることが報告されている。すなわち、生活リズムが 24 時間周期でない人々が増加している。それゆえ、生活リズムと摂取タンパク質が骨粗鬆症の主因となる Ca の吸収・生体利用性の低下に関わっているか否かをあきらかにすることは、若年期からの骨粗鬆症予防に対する栄養政策の実施に必須である。

「生活リズムの乱れ」と「生活習慣病」の関連に関する研究は多くあるが、Ca 代謝に関する研究はなされていない。しかし、若年女性の生活スタイルおよび食事摂取状況を鑑みると、Ca の吸収や利用など Ca の生体利用性に関する研究は必要である。

ラットを連続暗黒下で飼育すると、24 時間周期の光情報がないため、生体が持つ体内時計が 24 時間にリセットされず、活動周期が 24 時間にならない。本研究では、この連続暗黒飼育ラットを生活リズムが 24 時間周期でないモデルとして使用する。

３．期待される効果

連続暗黒飼育が雌ラットの Ca の生体利用性に影響を与え、その影響がタンパク質摂取量により異なることが示されれば、生活リズムが 24 時間周期でない若年女性に対する栄養指導をする際の基礎データとしての利用が期待できる。

４．研究の経過及び結果

4-1. 研究方法

3週齢のフィッシャー系雌ラット36匹を1週間の予備飼育後、明暗飼育条件の違い(連続暗黒飼育(D群)または正常明暗飼育(12時間明期、12時間暗期、(N群))、飼料タンパク質量の違い(10%カゼイン食、20%カゼイン食、30%カゼイン食)により6群に群別し、4週齢から8週齢まで4週間飼育した。6群とは、連続暗黒飼育・10%カゼイン食群(D10%群)、連続暗黒飼育・20%カゼイン食群(D20%群)、連続暗黒飼育・30%カゼイン食群(D30%群)、正常明暗飼育・10%カゼイン食群(N10%群)、正常明暗飼育・20%カゼイン食群(N20%群)正常明暗飼育・30%カゼイン食群(N30%群)である。実験飼料は、AIN-93G飼料組成をもとにタンパク質源であるカゼインの添加量を10%、20%または30%と変化させ、他の組成はAIN-93G飼料組成と同様とした。AIN-93G飼料の標準カゼインレベルは20%であり、10%カゼイン食は、標準の1/2量の低タンパク質食、30%カゼイン食は標準の1.5倍量の高タンパク質食となる。飲料水には純水を与え、飼料・飲料水は自由摂取とした。飼育4週目に4日間の出納試験を実施し、糞尿を分離採取した。また、出納試験終了後、4時間毎に尿を採取した。4週間飼育後、血液および大腿骨を採取し、実験に供した。

4-2.Ca出納について

Ca摂取量には、飼料の影響がみられ、タンパク質量が増加するとCa摂取量は低下した。これは、飼料タンパク質量が高くなると摂食量が低下したためである。また、Ca摂取量に明暗飼育条件の影響はみられなかった。

Caの糞中排泄量には、明暗飼育条件の影響がみられ、D群で高値を示した。糞中排泄量に飼料タンパク質量の影響はみられなかった。

Ca 吸収量には、明暗飼育条件および飼料の影響、明暗飼育条件と飼料の交互作用がみられた。N群間では有意差はみられなかったが、D群間ではD30%群がD10%群より低値を示し、また D30%群は N30%群よりも低値を示した。10%および 20%カゼイン食では、N群とD群で差はみられなかった。Ca吸収率には、明暗飼育条件の違いがみられ、D群で低値を示した。また、吸収率に飼料タンパク質の影響はみられなかった(表1)。

Ca の尿中排泄量には、明暗飼育条件および飼料の影響、明暗飼育条件と飼料の交互作用がみられた。N群間ではN30%群がN10%群、N20%群より高値を示したが、D群間では有意差はみられなかった。また、D30%群は N30%群よりも低値を示した。しかし、吸収されたCa量に対する尿中排泄率には、明暗飼育条件の影響はみられなかった (表2)。

Ca 保留量には、明暗飼育条件および飼料の影響、明暗飼育条件と飼料の交互作用がみられた。N群間では有意差はみられなかったが、D群間ではD30%群がD10%群より低値を示し、また D30%群は N30%群よりも低値を示した。10%および 20%カゼイン食では、N群とD群で差はみられなかった。Ca保留率には、明暗飼育条件の違いがみられ、D群で低値を示した。また、吸収率に飼料タンパク質の影響はみられなかった。

4-3.尿中Ca排泄リズムについて

4 時間毎の尿中への Ca 排泄に関しては、N 群の N20%群および N30%群では日内リズムがみられ、活動期である暗期の後半から上昇し、休息期である明期の前半(7:00-11:00)にピークを示した。一方、D 群の D20%群および D30%群のピークは N 群より前に移行する傾向がみられた。また、N10%群、D10%群には、尿中 Ca 排泄に明確な日内リズムはみられなかった。

4-4. 血中 Ca 濃度について

血中 Ca 濃度に明暗飼育条件および飼料の影響はみられなかった。

4-5. 大腿骨 Ca 量について

大腿骨 Ca 量(mg/g)には、明暗飼育条件の影響と明暗飼育条件と飼料の交互作用がみられた。N 群間では飼料の差はみられなかったが、D 群間では D30%群が D10%群より低値を示し、また、D30%群は 30%群よりも低値を示した。

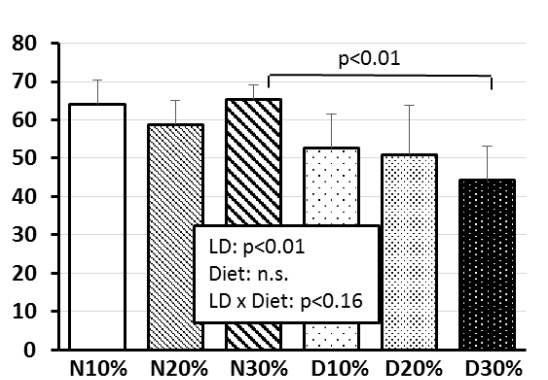

表1. Ca吸収率(%)

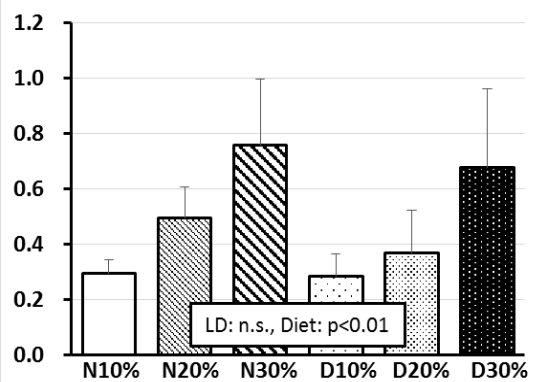

表2. 尿中Ca排泄率(%)

4-6. まとめ

ラットを連続暗黒下で飼育し、高たんぱく質食を給与することにより Ca 吸収率が低下することが示された。一方、尿中への排泄リズムは、連続暗黒飼育により変化するが、吸収された Ca が尿中へ排泄される割合は変化しないことが示された。Ca の吸収量の低下に伴い体内保留量も低下したため、血清 Ca 濃度を維持するために大腿骨から Ca が動員され、大腿骨の Ca 量も低下していた。

連続暗黒飼育は小腸における Ca の吸収を抑制する可能性が示唆された。

５． 今後の計画

小腸における Ca 吸収が連続暗黒飼育により抑制されるメカニズムについて Ca 輸送タンパク質について検討していく予定である。

６．　研究成果の発表

本研究の結果は、2016 年 9 月、第 63 回日本栄養改善学会学術総会で発表した。さらに研究結果を蓄積し、関連学会誌に投稿予定である。

ストレスを潜在要因とした味覚・嗅覚・痛覚の感覚間相互作用の基礎的検討

健康生命科学研究所　　澤井　明香
情報メディア学科　　坂内　祐一
基礎・教養教育センター　　竹田　裕一

1. 研究の目的

味覚、嗅覚、及び触覚の一部として扱われている痛覚は動物の進化の過程で最も古い感覚であり、ヒトの五感でも原始的な感覚と捕えられているが、我々の生活の質（QOL）を保つ上で重要な役割を担っている。一方、精神ストレスは生活習慣病や精神疾患の主因の１つであり、厚労省では平成 28 年より従業員のストレスの評価を企業に義務付けるなど、その社会的影響は無視できないものになっている。医療現場において患者は病気に伴う痛みや治療によるストレスがあるなかで病気の回復のために耐えながら治療を継続している。痛みは組織の障害や病気を認識させる重要な感覚であるが、その不快感にとどまらず機能障害をもたらすことが多く、QOL の低下に直結する。

本研究では、学科を横断する味覚・嗅覚・痛覚という感覚の研究者に統計の専門家を加えたチームにより、ストレスと味覚・嗅覚・痛覚の感覚受容との間の定量的な関係を明らかにし、感覚間相互作用に及ぼすストレス因子の影響を解明することを目的とした。

2. 研究の必要性および従来の研究

従来の研究では、音楽の聴取やアロマセラピーにより苦痛の緩和やストレス低減を図る試みは多数見られるが、刺激および苦痛・ストレスの度合いについて定量的な関係についての報告は殆ど成されていない。またストレスと味覚および舌で感じる辛味（痛覚に分類される）との関係を調べた研究例はきわめて少なく、ストレスと感覚受容との関係は断片的な知見に留まっている。また複数の感覚間相互作用に関する研究では、主に認知心理学の分野で嗅覚刺激による味覚の変化を調べた例は存在するが単純な刺激－反応モデルであり、本研究で想定する長時間にわたる嗅覚刺激による味覚受容の変化を調べる際に、刺激によるストレス変化が潜在的要因として味覚変化に影響することを考慮した系にはなっていない。

以上よりストレスと味覚・嗅覚・痛覚の感覚受容との間の定量的な関係を明らかにし、感覚間相互作用とストレス因子との関わりを追究することは、感覚受容とストレスの関係を解明するうえで重要である。

3. 期待される効果

ストレス要因の探求やストレス刺激による心理状態や行動の解析は、心理学や社会学の分野で広く行われているが、ストレスと五感の感覚受容との直接的な関係を調べた研究は

多くない。当研究により、ストレスと感覚受容の定量的な関係を求めたのと同様に、１つのモダリティ刺激と他のモダリティ応答という感覚間の関係も定量的に求めることができる。さらに単純な刺激－応答モデルではなく、刺激と応答の間にストレスなどの潜在的な要因を考慮したストレス評価が可能になると思われる。

4. 研究の経過および結果

本研究ではストレスが味覚・嗅覚・痛覚それぞれの感覚に及ぼす影響の定量化を試みるとともに、ストレスを潜在因子として、味覚・嗅覚・痛覚の感覚間相互作用の実験を行い、その知見を痛み緩和のための基礎データとすることを目的としている。

第１段階として、ストレス負荷による感覚（味覚・嗅覚・痛覚（舌の辛味・皮膚痛覚））受容への影響が定量的に明らかになっていないことから、精密制御可能な嗅覚提示装置、痛覚定量分析装置などを利用して、ストレス負荷前後の、味覚・嗅覚・痛覚受容の変化について定量的に調べ、統計的にその関係を明らかにする。

第２段階として、嗅覚による痛覚への影響や味覚による痛覚の影響を、ストレス負荷量をゼロから変化させながら実験を行う。ストレス負荷なしのパス（嗅覚刺激により直接的に痛覚応答するパス）とストレス負荷有りのパス（嗅覚刺激からストレスを経由して痛覚応答するパス）とについて統計的分析（パス解析）により、ストレス因子の影響についての解析を行う。

①１段階にかかわる実験条件の決定と予備実験　（担当：澤井、坂内、竹田）

澤井はまず初めに実験的に精神ストレスを負荷するための課題の選定をおこなった。本学男子大学生 20 名に①暗算、②顔再認課題、③人前スピーチの心拍変動を比較したところ、多くの被験者に広くストレスがかかるのは①暗算であったため、暗算を当研究の負荷課題に決めた。次に、舌の痛覚刺激を行うための辛味液（トウガラシ濃縮液）の濃度の検討を行った。辛味液は外国の先行論文に従い 10 段階の濃度に調整したものと、当濃度よりも低いものと高いものの各々5 段階を作成して調査した。辛味は個人差が大きいものの、先行論文と同濃度でも日本人の多くの被験者は対応が可能であるとわかったため、本実験では先行論文と同じ濃度での実施を決めた。また当試みにより研究では辛味閾値による分析の際は辛味嗜好を広くとらえた被験者募集を行い、ストレス負荷の影響を深く検討するには、同程度の辛味閾値を持つ者を集中的に集めて実験した方が良いとわかった。

②ストレス負荷時の感覚（味覚・嗅覚・痛覚（舌の辛味、皮膚痛覚））を調べる実験

痛覚刺激装置（PAIN VISION）を用いた痛覚の定量化の検討に取り組んだ。澤井は舌の痛覚と皮膚の痛覚の相関の可能性を利用した辛味刺激の電流による客観評価について取り組んだ。当実験は、具体的には舌で感じた各辛味濃度液の刺激と同程度の痛みを皮膚で感

じた到点を、当辛味濃度の電流値と捉える試みのことである。この実験は辛味嗜好が同程度の者を対象にしなければ詳細分析が難しいため、本年度は厳選された 10 名（辛味耐性中等度閾値者）を選別して実験をおこなった。被験者 10 名の結果では、舌で感じた辛味濃度の上昇に伴い、皮膚で感じた電流値は上昇しており、両者は正相関した。また、これら被験者に対して次の実験もおこなった。実際の調理や食事摂取においては、辛味刺激（舌で感じる痛覚刺激）を緩和させるために甘味を利用することが多い。このため辛味と甘味との組み合わせによる辛味刺激に感受の変化についても電流値に置き換えられるか検討した。甘味溶液にはショ糖液を利用し、被験者全員で同じ濃度の甘味溶液を使用した場合と、被験者個人が甘味溶液を利用することで辛味が中和された（感じなくなった）と申告した至点の両方の電流値を測定した。いずれも、辛味液単独よりも明らかに低い電流値を示しており、これは甘味の存在により辛味刺激による痛覚刺激が減退されたことを示す客観的結果を得たと考える。今後は被験者の人数を増やし統計学的見地からも当結果の妥当性を示したい。また Pain Vision を直接痛覚刺激装置として用いる検討も進展した。坂内は Pain Vision を用いて大学生を対象に実験を行い、微弱な電流刺激による触覚検知閾値から、より大きな電流により触覚が痛覚に変わる痛覚検知閾値の計測により、個人間のデータを調べた。同時に生理指標として脈派を計測し、痛覚閾値以上で心拍数の減少する傾向を確認した。また痛覚刺激の痕跡（抹消神経部）と記憶（中枢神経部）が実験後も長く残るため、実験インターバルを考慮しなければならないことがわかった。

被験者 25 名（大学生）に対して、ろ紙ディスクによる味覚検査（甘味、塩味、渋味、酸味）後に暗算ストレスを負荷すると、負荷後では味覚も痛覚（PainVision の測定値）も変化することがわかった。当結果を辛味閾値で、低閾・中閾・高閾の 3 群に分けると、安静値に差異はないが、ストレス後では高閾者は、他群よりも痛覚の認知が鈍い可能性が示唆された。当結果についても被験者の人数が不足しているため、統計解析に耐えうるように今後被験者の人数を増やしたい。

坂内は、本研究の対象となる味覚・嗅覚の定量的な刺激提示方法についての検討を行った。嗅覚の定量的な刺激提示方法については、すでに開発済みの嗅覚ディスプレイで嗅覚機能の計測は可能であるが、他感覚との同時刺激など異なる実験に対応するには改良が必要なため、その検討を行った。ろ紙ディスクに代わる味覚ディスプレイは、構想段階から試作を行うための設計に取り掛かった。

５. 今後の計画

①ストレス負荷時の感覚（味覚・嗅覚・痛覚（舌、皮膚痛覚））への影響を調べる実験

平成 28 年度の味覚・嗅覚・辛味受容能力の測定を継続して行う（担当：澤井、坂内）。

②上記第 1 段階の実験の統計解析（担当：竹田）第 1 段階の実験結果の総合的なまとめを行うとともに、第 2 段階のモデルの検討を行う。

③第 2 段階の実験の定量的感覚刺激のため味覚・嗅覚ディスプレイを開発（担当：坂内）

④第 2 段階にかかわる実験条件の決定と予備実験

④-1：第 2 段階の実験に当たり、具体的な(1)感覚刺激（味覚・嗅覚・痛覚）、(2)ストレス指標、(3)感覚受容能力（味覚・嗅覚・痛覚）計測方法を定める.

④-2：ストレス下の嗅覚提示、辛味応答の測定（担当：澤井、坂内）
様々なストレス条件化で嗅覚刺激提示を行ったときの辛味応答を測定する。

④-3：ストレス下の嗅覚提示、皮膚痛覚応答の測定（担当：坂内）
様々なストレス条件化で嗅覚刺激提示を行ったときの皮膚痛覚応答を測定する。

⑤統計解析（担当：竹田）
実験結果のパス解析を行い嗅覚提示や痛覚応答時のストレス因子の寄与度を求める。

６．研究成果の発表

1) Sawai A, Fujii H, Sato Y, Takuma A, Utsumi M, Sawai S, Ohno M, Tochikubo O. Gazzetta Medica Italiana Archivio per le Scienze Mediche 2016; 175(11): 442-51.

2) Sawai A, Igarashi R, Saitou M, Enami N, Sawai S, Fujikawa T, Takahashi K, Tochikubo O. Relationship between the risk of metabolic syndrome and the lifestyle index measured by the PULSENSE wristwatch-type stress-calorie monitor in middle-aged subjects, GMI, in press.

3）澤井明香，喜田元哉，三浦瑞希，山本華子．朝食内容が若年者の顔再認課題回答時の眼球運動に及ぼす影響，第 70 回　日本栄養食糧学会大会（武庫川女子大学中央キャンパス），2016 年 5 月.

4）澤井明香．和食と洋食の摂取が顔認知課題回答時の脳血流に及ぼす影響，第 63 回　日本栄養改善学会学術総会（リンクステーションホール　青森），平成 28 年 9 月.

5）五十嵐梨乃，澤井明香，杤久保修．健康腕時計を用いた身体活動と生活習慣病発症リスクの検討，第 38 回　臨床栄養学会総会（大阪国際会議場），2016 年 10 月，若手奨励賞（最優秀演題）受賞.

6）會澤祐希，澤井明香，八木雄斗．朝食の摂取習慣が顔認知課題回答時の脳血流に及ぼす影響，　第 38 回日本臨床栄養学会総会（大阪国際会議場），平成 28 年 10 月.

7）八木雄斗，澤井明香，五十嵐梨乃．欠食や咀嚼の有無が顔認知課題回答時の眼球運動に及ぼす影響について，　第 38 回日本臨床栄養学会総会（大阪国際会議場），平成 28 年 10 月.

8）澤井明香，齊藤美友，杤久保修．中高年に対応した健康腕時計の精度の検討，第 71 回日本栄養食糧学会大会（沖縄コンベンションセンター）2017 年 5 月

種横断的な健康寿命制御機構の解明

健康生命科学研究所　　井上　英樹
栄養生命科学科　　横山　知永子

１．研究の目的

日本は平均寿命が世界一であり、今後も延びることが予想されている。しかしながら高齢者が「健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間」（健康寿命）の延長は不十分である。本研究計画では線虫を用いて、植物由来生理活性物質によって活性化する健康寿命制御を行う細胞内シグナル伝達機構の詳細と、それによって調節される体内の代謝機構について明らかにする。続いて、線虫を用いた知見で得たシグナル伝達経路について、哺乳動物細胞を用いた生化学的な解析を行うことで植物由来の生理活性物質が活性化するシグナル伝達機構の解明を目指す。さらに、個体レベルでの健康寿命延長作用について解析を行う。以上により多細胞動物にみられる普遍的な健康寿命制御機構を明らかにするとともに、ヒトの健康寿命延長のための方法の探索を行う。

２．研究の必要性及び従来の研究

健康寿命を延長することは今後ますます高齢化社会を迎える日本にとって大きな課題と考えられ、「21 世紀における国民健康づくり運動」として国を挙げて取り組まれている。健康寿命の阻害要因は代謝能の低下によるメタボリックシンドロームと運動能低下によるロコモティブシンドロームの２つである。これらの機能低下を抑えることが健康寿命延長の鍵となるが、代謝能と運動能がどのような機構によって加齢に伴い機能低下し、健康寿命に影響が生じるかは十分に明らかとなっていない。このため、これらを明らかにすることで健康寿命を延長し、QOL を高めることが求められている。申請者はこれまでの先行研究で発見した植物由来の複数の成分がモデル動物である線虫 *C. elegans* の寿命延長、高齢時の運動能低下抑制、体脂肪蓄積等抑制、抗ストレスに作用することを見出した。

３．期待される効果

本研究により、健康に寿命を全うするための老化メカニズムの一端が明らかとなることが期待される。また、それら生理活性物質の合成、安全性等の研究を行い健康寿命の改善に寄与しうる機能性食品の開発が期待できる。

４．研究の経過及び結果

各植物含有成分単離については植物乾燥末を、ソックスレー抽出器を用いて乾燥末 10 倍量のメタノールにより加熱還流抽出を行った。得られた抽出液は減圧濃縮を行っ

たのち酢酸エチル/ブタノール/水を用いてそれぞれ脂溶性・両親媒性・水溶性画分を得た。

取得した各画分については線虫に対しては線虫寒天培地(NGMアガー培地)に適切な濃度で添加する、あるいは緩衝液に添加し、緩衝液中の線虫に直接刺激するという方法によって刺激を与えた。培養細胞に対してはシャーレ中の培養液に各画分を添加し、刺激を与えた。刺激を与えた線虫および培養細胞は実験方法に応じて測定サンプルとした。ガジュツ各抽出液中の成分の単離・同定のために薄層クロマトグラフィーによる分離、GC-MS による測定を行った。候補因子については純品を用いて個体への解析を行った。また、明日葉抽出液についても解析を行い、線虫およびヒト培養細胞に投与したときの作用について解析した。

線虫に対してガジュツ(Curcuma Zedoaria)抽出液を投与した場合、脂溶性画分および両親媒性画分で最大寿命および健康寿命が延長した。線虫の寿命制御は転写因子DAF-16を介したインスリンシグナルが中心的な役割を果たすが、ガジュツ抽出液はこのインスリンシグナルに依存して寿命延長をすることがわかった。寿命延長には抗ストレス遺伝子、代謝関連遺伝子の活性が重要であると考えられているため、当初の計画の通りリアルタイム PCR による測定を行った。その結果、ガジュツ抽出液の刺激により、抗ストレス遺伝子のほか、糖新生に関与する遺伝子の発現増加、および脂質合成に関与する転写因子、SREBP の線虫ホモログに関与する遺伝子の発現低下がみられた。ナイルレッド染色によって線虫個体の脂質染色を行った結果、対照線虫に対しガジュツ脂溶性画分を投与した線虫は体脂肪蓄積量が低下したが、これは脂質合成の機能低下によって生じたものと考えられる。続いて脂質合成経路のどこに作用するのかを調べるため、成虫１日目、４日目、７日目、および１４日目の野生型対照線虫およびガジュツ投与線虫の体内の炭素数 16 から 20 の脂肪酸組成について GC-MS を用いて測定を行った。その結果、野生型線虫では加齢に伴いC16パルミチン酸の減少とC20アラキドン酸の増加が観察されたが、それ以外の脂肪酸の組成は大きな変化がなかった。ガジュツ投与線虫は対照の野生型線虫と比較して大きな違いはなかったものの、C20 エイコサジエン酸が比較的増加していた。

ガジュツ抽出液の有効成分を明らかにするために分離・分析を行うとともに既報資料から含有成分を確認し、それらの純品で先行的に解析を進めた。ガジュツにはシネオールやアズレンのような精油成分を多く含むが、アズレン誘導体の一つグアイアズレン純品を線虫に投与した結果、抗ストレス、寿命延長および体脂肪蓄積の抑制が観察された。このことからガジュツ脂溶性画分の生理作用はグアイアズレンのようなアズレン誘導体が引き起こしていることが示唆される。

明日葉抽出液を線虫に投与した場合、脂溶性画分で寿命延長することが見出された。この寿命延長はインスリンシグナル DAF-16 を介して起きていることが分かった。また、

明日葉抽出液による遺伝子発現誘導では抗酸化酵素遺伝子のほか、コラーゲン遺伝子の顕著な発現誘導が観察された。近年、コラーゲン再構成が線虫の寿命に関与することが報告されており(Ewald et al, Nature, 519:97-101(2015))、表皮の状態が老化にとっても大きく関与することが考えられる。そこで、明日葉抽出液が哺乳動物にも同様の作用をもたらすかを検討するため培養細胞に明日葉抽出液を投与し、コラーゲン遺伝子等の発現を調べた。その結果、HeLa 細胞およびヒト正常線維芽細胞いずれにおいてもコラーゲンが転写およびタンパク質レベルで増加することを確認した。明日葉抽出液に含まれる既報の代表的な成分のうち、ポリフェノールの一種であるカルコン純品で細胞を刺激したところコラーゲン遺伝子の転写上昇が確認された。このことから明日葉中のカルコンがコラーゲン発現増加を誘導すると考えられる。また、明日葉抽出液およびカルコン投与により、アディポネクチンの発現量が増加した。

ガジュツの脂質蓄積抑制作用は脂肪酸組成に大きな影響を与えるよりも SREBP の発現に影響を与えることで全体的な脂肪酸合成酵素群の発現を低下させ、それによって体内の脂肪酸の総量を低下させることで脂質の蓄積を抑制していると考えられる。しかしながら、脂肪酸合成酵素群の発現および活性等の測定は完了していないため、引き続き測定を行う必要がある。また、エイコサジエン酸は多価不飽和脂肪酸の一つである。多価不飽和脂肪酸はコレステロール値を下げる等の作用があることが知られている。線虫においての多価不飽和脂肪酸の役割は十分に知られていないため、エイコサジエン酸投与による線虫の寿命への影響等について解析する必要がある。これに加えガジュツ脂溶性画分の有効成分がグアイアズレンであるかどうか決定を行う必要があるが、現時点での分離・分析条件が不十分であること、LC-MS が不調であったため詳細な解析を実行できなかった。引き続き分析方法の検討を行う必要がある。また、グアイアズレンによる脂肪蓄積抑制作用についても、生理的な作用点を明らかにするため GC-MS による脂肪酸測定および脂質代謝関連遺伝子群の発現を調べる必要がある。

明日葉抽出液に含まれる成分のうちカルコンがコラーゲン遺伝子発現増加に有効であることを確認するため、明日葉抽出画分から分離・分析を行う必要がある。明日葉抽出液はタカラバイオの研究により、アディポネクチンを増加させる作用があることが報告されている。アディポネクチンは様々な生理作用を惹起するが、コラーゲン遺伝子の発現増加を誘導しているという報告もある。しかしながら現時点ではその機序を明らかにできていないため、細胞レベルで明日葉抽出液あるいはカルコンがコラーゲン発現を誘導するための作用機序の解析を行う必要がある。また、ヒト正常線維芽細胞を用いて明日葉抽出液が細胞老化に関与することを示す必要がある。

５．今後の計画

2016 年度の成果を基に、今年度データを拡充させ学術論文への発表を行う。重要なポイ

ントは動物レベルで作用することの確認であるため、共同研究グループを立ち上げ次年度以降進めていきたい。

　また、以下の申請書および学会等に申請または発表を予定している。

・2017 年度科研費補助金
・2017 年度山田養蜂場みつばち研究助成基金申請(申請済)
・2017 年度東洋食品研究所　研究助成申請予定
・2017 年度神奈川県ものづくり技術交流会発表予定
・第 40 回日本分子生物学会年会(2017)発表予定

６．研究成果の発表

・穂坂友里、窪田瑞実、井上英樹　線虫（*C. elegans*）に対する明日葉抽出物の生理作用解析(ポスター) 第 39 回日本分子生物学会年会(2016)

高齢者のサルコペニア予防・改善のための新規栄養食品の開発

健康生命科学研究所　　佐々木　一

栄養生命科学科　　澤井　淳

1. 研究の目的

我が国では、高齢者人口は急激に増加している。平成 28 年 9 月の推計では、65 歳以上の高齢者人口は 3,461 万人であり、総人口に占める割合は 27.3％である。前年の 3,388 万人・26.7％と比較し、73 万人・0.6 ポイント増と大きく増加し、過去最高となっている（1)。主要国の中でも、高齢者の総人口に占める割合（2018 年）は、日本が最も高く、高齢化の進行速度も最も速い。

高齢化の進行に伴い、サルコペニアが大きな問題となっている。サルコペニアとは 1989 年に Rosenberg により提唱された概念であり、高齢になるに伴い、筋肉の質と量が低下する症候群である（2)。サルコペニアは、低栄養や免疫力の低下を引き起こし、虚弱の原因となり、最終的には健康寿命に影響する（3、4)。

サルコペニアの予防および進行の抑制は、高齢者の健康寿命を維持するために必要である。高齢者の健康の維持は、高齢者の構成率が高い社会にとって、国家の生産性を維持し、医療経済を健全化するために重要な課題である。高齢者の栄養状態を改善し、サルコペニアの予防および進行の抑制を図ることは、栄養学の分野の大きな研究課題である。当研究は、牛乳に含まれるたんぱく質の機能を応用したサルコペニアに対応した食品開発の科学的基盤を作ることを目的とする。

2. 研究の必要性および従来の研究

サルコペニア発症の原因は、老化による筋たんぱく質合成能の低下が要因となるが、高齢者が抱える問題である慢性炎症が、サルコペニアの進行を助長する。高齢者の慢性炎症は、骨格筋のたんぱく質分解系を活性化し筋分解を促進するためと考えられている（5)。そのため、高齢者の慢性炎症の抑制は、サルコペニアの進行抑制のために重要な課題である。

牛乳に多量に含まれるたんぱく質は、カゼインと乳清たんぱく質である。チーズ製造の過程で副産物として得られる乳清たんぱく質を分解して得られるペプチド（乳清ペプチド）に、極めて強い炎症抑制作用があることを、我々は独自の研究により発見した（6)。乳清ペプチドの炎症抑制効果は、単独のペプチドによるものではなく、分解ペプチドの集合体として働くことも明らかにした。

乳清ペプチドを配合した炎症抑制効果を持つ栄養食品（流動食「メイン」、㈱明治）（7）は臨床の現場で用いられている。ＣＯＰＤ患者では慢性炎症の抑制や栄養状態の改善の効果が確認されている（8)。また、外科領域では急性炎症や感染症の抑制が認められている（9)。ともに、患者のＱＯＬ改善に利する結果である。これらの結果は、乳清たんぱく質

は良質のたんぱく質源であり、炎症を抑制する機能素材として働くことを示す。

栄養学的手段により、サルコペニアの予防、進行の抑制を図ることは、最も自然な方法である。乳清ペプチドは、炎症抑制効果を有する良質なたんぱく質源として活用できる。高齢者が乳清ペプチドを摂取し、サルコペニアの予防および進行抑制効果を検討するには、動物実験での検討により臨床試験の基盤を作ることが必要である。

3. 期待される効果

当研究では、筋損傷ペプチド（Cardiotoxin、CTX）を筋注し筋損傷を誘発したマウスをモデルとして用い、乳清ペプチド摂取による筋損傷および炎症を抑制する効果について検討する。乳清ペプチドを摂取したマウスでは、CTX 誘発筋損傷および炎症は、他のたんぱく質を摂取した対照と比較し軽度になると期待される。

4. 研究の経過および結果

マウス腓腹筋に筋損傷ペプチド（Cardiotoxin：CTX）を筋注し誘発した筋損傷のレベルが、カゼインを摂取した対照と比較し、乳清ペプチドを摂取した群で有意に低いことを血中の筋逸脱酵素（クレアチンキナーゼ（CPK）、乳酸脱水素酵素（LDH））により確認した。この実験系を用いて筋損傷および損傷に伴う炎症の抑制効果の解析を進めた。

対照として、カゼインをカゼイン分解ペプチドに置き換えた場合の比較も行った。カゼイン分解ペプチド摂取群と比較しても、乳清ペプチド摂取により、血中の CPK、LDH レベルが有意に低下した（図 1）。

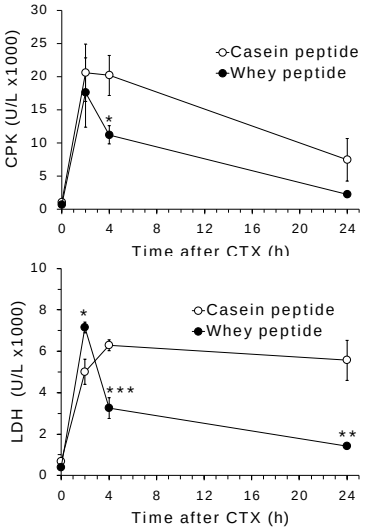

図 1. 筋逸脱酵素（CPK（上図）、LDH（下図））を指標に筋損傷レベルを判定した

炎症の発症に関係する炎症性サイトカインの血中濃度を測定した。その結果、CTX 筋注 2 時間後に IL-6 レベルが上昇した。カゼイン摂取群と比較し、乳清ペプチド摂取群では IL-6 は低レベルであった。一方、TNF-α レベルは、CTX 筋注後も上昇が認められなかった（図 2）。

肝臓などの炎症では、TNF-α レベルが上昇し、その後 IL-6 レベルが上昇する。その後、TNF-α は低下し、IL-6 は長時間にわたり高レベルが持続する。骨格筋が損傷した場合、炎症が伴うことは明らかであるが、他の臓器と異なる炎症性サイトカインパターンを示すものと思われる。筋損傷に伴う炎症反応が肝臓など他の臓器と異なる様相を示した。IL-6 は顕著な上昇を示したが、TNF-α の上昇は見られなかった。IL-6 や TNF-α は、主にマクロファージが産生するが、骨格筋組織内にマクロファージが少ないため、

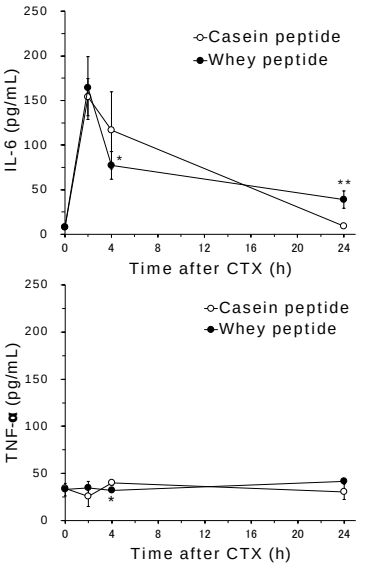

図 2. CTX 投与後の血中炎症性サイトカイン（IL-6（上図）、TNF-α（下図））を測定。

TNF-α産生が顕著でなかったと考えられる。IL-6 は、骨格筋細胞でも産生され、骨格筋の代謝促進作用を示すことが報告されている。しかし、炎症反応は、本来は生態防御反応であるが、過剰な炎症が誘発された場合は、炎症は組織破壊など負の効果を示す。骨格筋が損傷した際に産生する IL-6 も、損傷が軽度の場合は、筋再生に働くが、損傷が過度の場合は、筋組織破壊などを引き起こすと考えられる。

免疫系の調節に腸内細菌叢が関係していることが解明されつつある。そのため、乳清ペプチド摂取による炎症抑制効果に、腸内細菌叢の変化が関係するかについて検討した。カゼインペプチドまたは乳清ペプチドを 7 日間摂取させ、糞便中の細菌叢を解析した。菌叢の解析には、T-RFLP（Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism）法を用いた（10、11）。この方法は、16S r RNA 遺伝子を検出し量比を比較することを原理とする。16S r RNA 遺伝子は菌により異なるため、この遺伝子の解析により細菌叢内の菌の同定および量比の判定が可能となる。この方法を用いて、菌叢を比較した結果、カゼインペプチド摂取群、乳清ペプチド摂取群ともに摂取開始 5 日までに乳酸菌群の割合が低下した。その後、カゼインペプチド摂取群では、乳酸菌群の割合は低下したままであったが、乳清ペプチド摂取群では、乳酸菌群の構成割合が上昇し、カゼインペプチド摂取群とは異なる細菌叢の変化を示した。

腸内細菌層の主要な菌種である、乳酸菌(Lactobacillus)、バクテロイデス(Bacteroides)およびクロストリジウム(Clostridium)の構成割合を解析したところ、たんぱく質の違いにより、乳酸菌群とクロストリジウム群の構成比が顕著に異なることが明らかになった。乳清ペプチド摂取群では、乳酸菌の構成割合が上昇し、カゼインペプチド摂取群では、クロストリジウム群の構成割合が上昇した（図 3）。

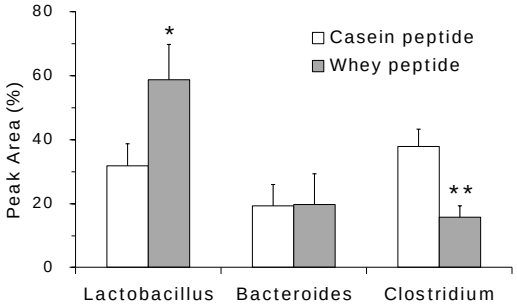

図 3. 乳清ペプチド、カゼインペプチドを摂取したマウスの糞便中の細菌叢の比較

腸内細菌は、生体の免疫系を制御する役割を持つことがわかっている。乳清ペプチドを摂取したマウスの腸内菌叢が、カゼインを摂取したマウスとは異なる菌叢を示す。これは、乳清ペプチドが骨格筋の損傷および炎症を抑制する効果を示す際に腸内細菌の関わりを検討することが必要であることを示す。

5. 今後の計画

平成 27、28 年度の研究により、乳清ペプチドが CTX 誘発筋損傷を軽減し、その際、炎症性サイトカインの産生を抑制していることが明らかになった。上記の結果をもとに、下記の課題を解決する計画である。

1. 損傷骨格筋組織内の炎症性サイトカインの遺伝子発現の分析

TNF-αが血中に検出できなかったが、文献によっては筋組織の TNF-α遺伝子発現が検出されている（12)。損傷骨格筋はTNF-αを産生しているが、血中に放出されないことが推測される。

2. 乳性ペプチドの炎症抑制効果と腸内細菌叢の変化の関連の解析

乳清ペプチド摂取により、マウスの腸内細菌叢が顕著に変化している。腸内細菌叢の変化が、炎症抑制に関係しているかを解析する。

3. 骨格筋の遺伝子発現パターンの網羅的解析

サルコペニアの予防および進行の抑制のためには、骨格筋のたんぱく質代謝が維持されていることが必要である。乳清ペプチドを摂取したマウスの骨格筋のたんぱく質代謝が影響を受けているかを知るために、遺伝子発現を網羅的に解析する。手法はRNAseq法を用いる。

6. 研究の発表

当研究は3年計画であるため、3年間に得られた結果を総合的にまとめ発表する予定である。

文献

1. 内閣府. 平成28年版高齢社会白書、
2. Rosenberg, I. Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. Am J Clin Nutr. 50:1231-1233, 1989.
3. Xue QL, Bandeen-Roche K, Varadhan R, Zhou J, Fried LP. Initial manifestations of frailty criteria and the development of frailty phenotype in the Women's Health and Aging Study II. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63:984-990, 2008.
4. 厚生労働省. 厚生労働省「日本人の食事摂取基準（2015年版)」策定検討会報告書
5. Petersen AM1, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. J Appl Physiol. 98:1154-1162, 2005.
6. Hajime Sasaki and Hisae Kume. Nutritional and physiological effects of peptides from whey: milk whey proteins/peptides, natural beneficial modulators of inflammation. Bull. Int. Dairy Fed. 417:43-50, 2007
7. Kume H, Okazaki K, Yamaji T, Sasaki H. A newly designed immunomodulating diet containing whey peptides protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by suppressing overproduction of TNF-α and IL-6. Clin Nutr. 31:283-289, 2012.
8. Sugawara K, Takahashi H, Sugawara T, Yamada K, Yanagida S, Homma M, Dairiki K, Sasaki H, Kawagoshi A, Satake M, Shioya T. Effect of anti-inflammatory supplementation with whey peptide and exercise therapy in patients with COPD. Respir Med. 106: 1526-1534, 2012.
9. Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Hata K, Yoshizawa A, Yagi S, Uemoto S. Effects of post-transplant enteral nutrition with an immunomodulating diet containing hydrolyzed whey peptide after liver transplantation. World J Surg. 36:1666-1671, 2012.
10. Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for analysis of complex bifidobacterial communities. Microbiol Immunol. 47:133–142, 2003.
11. Nagashima K, Hisada T, Sato M, Mochizuki J. Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. Appl Environ Microbiol. 69:1251–1262, 2003.
12. Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, Simeonova PP. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. FASEB J. 16:1630-1632, 2002.

動物実験モデルを用いた唾液の機能性に関する研究

健康生命科学研究所　　栗原　誠

１．研究の目的

唾液は口腔内環境を良好な状態に維持する重要な役割を担っている。唾液分泌能の低下は口腔乾燥症を招き，口内炎，う蝕などの様々な口腔トラブルの他，嚥下障害を招くことが知られている。唾液分泌能の評価は専ら唾液流量（単位時間当たりの唾液量）に基づいており，唾液流量は口腔乾燥症を診断する指標になっている。一方，ドライマウスの患者は少ないながらも唾液分泌能を有しており，通常，口腔乾燥症とは診断されないが，患者は口の渇き（ドライマウス）を訴える。ドライマウスは患者の主観的な要因が大きいと推察されるが，唾液の粘膜残留性が低いといった唾液の質的要因がある可能性も考えられる。また，口腔乾燥症に伴って発症した口内炎が極めて重篤化するケースもあれば，重篤化しないケースもある。このように，口腔内の乾燥に伴なって生じると考えられる口腔内トラブルは，唾液分泌量の低下のみでは説明できない場合がある。

申請者は，唾液の機能維持には「唾液の量」のみならず，「唾液の質」も重要ではないかとの仮説を立て，本研究に着手した。唾液には電解質，消化酵素，ホルモンの他，生体防御に関わるリゾチーム，分泌型 IgA，粘液糖タンパク質（ムチン）などが含まれており，これら成分の種類や濃度が唾液の質を左右すると考えられる。本研究ではムチンを主なターゲットとし，唾液におけるムチンの役割を精査し，唾液の質と口腔粘膜疾患との関連性の有無を明らかにすることを目指す。

２．研究の必要性及び従来の研究

申請者はモノクローナル抗体を用いて粘液の主要成分であるムチンを同定し，消化管の恒常性の維持や粘膜傷害からの治癒過程における各種ムチンの役割について研究している。これまでに，固有の糖鎖構造をもつムチンが消化管の部位や層に限局して発現していること（*Glycoconj J* 13: 857-864, 1996; *Biochem J* 318:409-416, 1996; *Biomed Res* 23:63-68, 2002; *J Biochem* 133:453-460, 2003 他），また，ラット急性胃粘膜傷害モデルの治癒過程においてある種のムチンが特異的に発現すること（*J. Gastroenterol.* 39:113-119, 2004）などを明らかにし，特定のムチンが生体内環境に応じて機能していることを示した。

唾液ムチンは唾液に粘性を付与することで粘膜残留性を高め，唾液による粘膜防御バリアの形成に寄与する他，抗菌作用を発揮して粘膜防御に働いていると考えられる。ヒト唾液に対するこれまでの研究では，唾液ムチンは MUC5B や MUC7 といったペプチドコアの違いの他，糖鎖構造の異なる様々なムチンの存在が示唆されている。唾液に含まれるムチン分子種の違いが唾液の粘膜防御能に影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。しかし，このような基礎研究をヒトを対象に行うのは，唾液分泌能の低下した患者から唾液を

採取するといった倫理面の問題があり，また，ヒトでの研究は要因が複雑で個体差が大きく，唾液腺組織の状態も把握できないなど，困難な課題が多い。そこで本研究では，実験動物としてラットを選定し，新たに動物実験モデルを構築して研究を進めることとした。

３．期待される効果

口腔乾燥症と唾液成分（sIgA，総タンパク質など）との関係については報告されているが，唾液ムチン，殊にムチン分子種の population の観点からその関連性を検討した例は見当たらない。動物実験モデルにて関連性を証明できれば，ムチン産生の観点から当該病態を捉えることができる。本研究はヒトロ腔粘膜傷害の発症機序の解明や，予防・治療法の開発研究に貢献できると考えている。

４．研究の経過及び結果

昨年度，ラット唾液ムチンの評価系の構築を目的として，ラット唾液腺より抽出，精製したムチンを免疫原に用いてモノクローナル抗体を 3 種（RSM2403，RSM2603，RSM2707）作製した。今年度は得られたモノクローナル抗体を用い，ラット唾液中のムチン測定系を開発した。また，昨年度，難治性口内炎の動物実験モデルの開発を目指し，ラットロ腔粘膜を酢酸暴露して経過を観察したが，リンパ球浸潤等の炎症像は確認できなかった。今年度はラットを 11 週齢から 58 週齢の高週齢なものとし，また，副作用として口内炎が問題となる抗癌剤の一つである 5-フルオロウラシル（5-FU）を投与したラットを用いて，口内炎の作製を試みた。

１）ラット唾液中ムチンの測定

ラットより唾液を採取し，モノクローナル抗体との反応性を検討したところ，RSM2403 と RSM2707 がラット唾液と比較的強く反応したため　これら 2 抗体を用いて検討した。測定系は，唾液（抗原）を ELISA プレートに吸着させ，モノクローナル抗体，次いで二次抗体として HRP 標識抗マウスイムノグロブリン抗体を作用させる indirect ELISA 法によった。ムチンを定量するためのスタンダードは，ラット唾液腺より抽出し，ゲル濾過，次いで，CsCl 密度勾配法により精製したムチンを用いた。

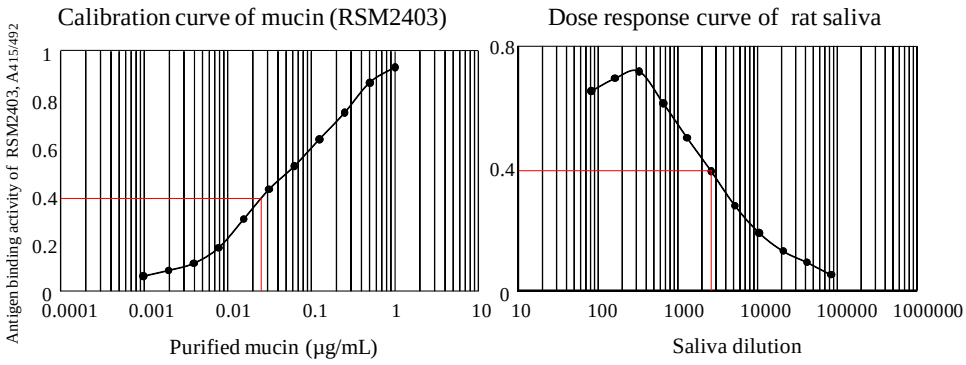

図１　ラット唾液ムチンの測定方法

RSM2403 抗原ムチンを測定した結果を図 1 に示す。精製ムチンを用いて RSM2403 抗

原ムチンの検量線を作成し（図 1 左），同時に唾液の希釈曲線を作成した（図 1 右）。用量応答性がみられる範囲内の同一吸光度を設定し，標準ムチンの濃度と唾液の希釈倍率から，唾液原液中のムチン濃度を算出した。

14 週齢の正常ラット 2 匹（SD rat A, SD rat B）より唾液を 3 時間おきに継時的に採取し，唾液ムチンの生理的変動を調べた。約 5 分間に吸引採取された唾液量と抗原ムチン濃度から単位時間あたりに分泌された抗原ムチン量を推定したところ，RSM2403 抗原ムチン，RSM2707 抗原ムチンは共に日内で産生量が変動していることがわかった。また，その変動パターンは個体によって異なることが示唆された（図 2，3）。本研究の課題の一つに掲げたこれら抗原ムチンの病態生理学的変動を見極めるためには，生理的条件下での変動を十分考慮する必要があることがわかった。

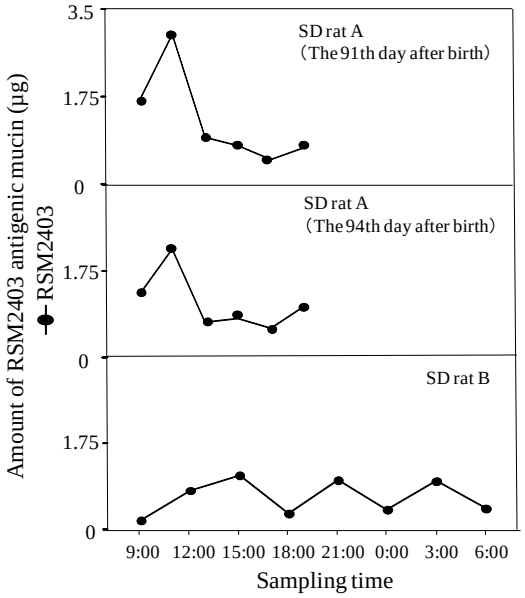

図 2.　唾液中 RSM2403 抗原ムチン量のモニタリング

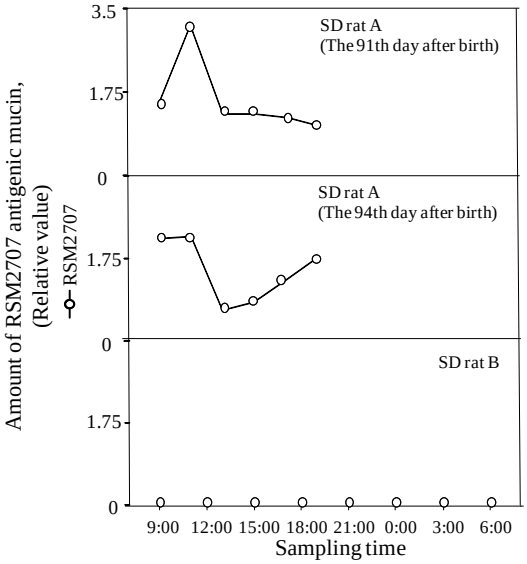

図 3.　唾液中 RSM2707 抗原ムチン量のモニタリング

２）実験口内炎モデルの作製検討

ラットの難治性口内炎病態モデルの作製を目指し，唾液分泌能が低下した 58 週齢の高週齢ラットを対象とし，消化管慢性潰瘍を発生する酢酸潰瘍モデルの適用[1)]を試みた。頬の口腔粘膜に 50%酢酸を染み込ませた綿球を 30 秒間押し当て，48 時間経過後に安楽死させて粘膜を観察したところ，潰瘍やびらん等の明らかな炎症病変はみられなかった。酢酸暴露させた左頬と，非暴露の右頬の粘膜をそれぞれ切除し，ホルマリン固定，HE 染色して，各組織像を比較した。その結果，酢酸暴露した粘膜の粘膜上皮には若干の委縮がみられ，また，一部に海綿状態（粘膜上皮の細胞間の浮腫により細胞間が離解している状態）がみられたが[2)]，酢酸に暴露させた面積から考えると，病変部位は限定的であった（図 4）。

左頬：50 %酢酸暴露　　右頬：コントロール

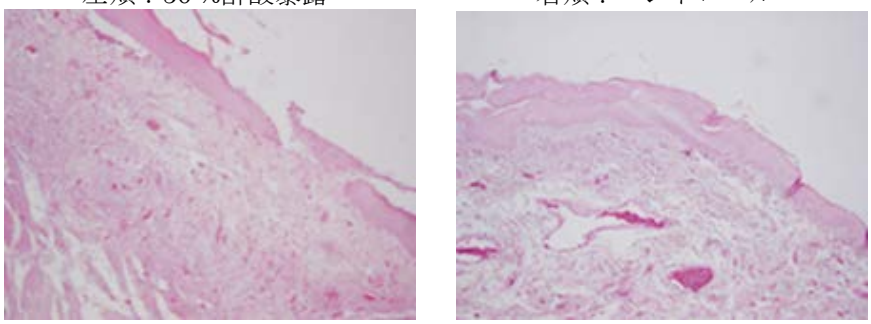

図 4.　58 週齢雄性ラット頬粘膜の HE 染色像　(x100)

口腔粘膜傷害を起こしやすい病態モデルとして，5-FU 投与ラットの適用を試みた。5-FU を 10 mg/ml になるように 0.5 %カルボキシメチルセルロース（CMC）に溶解し，17 週齢雄性 SD ラットの胃内に胃ゾンデを用いて 50 mg／kg（体重）／day 投与した。5-FU を 5 日間連続投与後，6 日目に 5-FU の投与を中止し，左頬粘膜に 60 %酢酸を染み込ませた綿球を 10 秒間押し当て，酢酸に暴露させた。酢酸暴露から 2 日後に安楽死させ，粘膜を観察した結果，潰瘍やびらん等の明らかな炎症病変はみられなかった。酢酸暴露させた頬の粘膜を切除し，ホルマリン固定，HE 染色した。5-FU／CMC 投与ラットと 5-FU／CMC 投与後酢酸暴露させたラットの各頬粘膜の組織像を比較した結果，5-FU／CMC 投与のみでは粘膜上皮は保持されているが，これに酢酸処理が加わると，粘膜上皮の委縮，一部欠損が起こることが示唆された（図 5）。

5-FU／CMC 投与，酢酸非暴露　　5-FU／CMC 投与，酢酸暴露

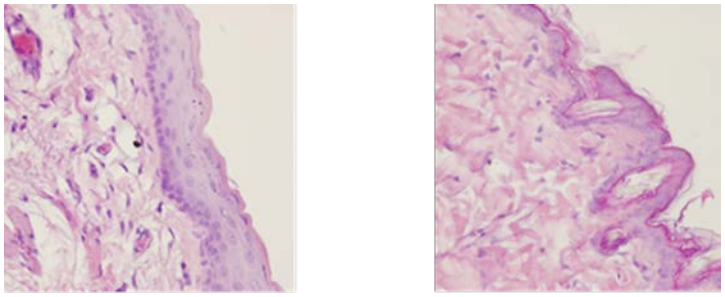

図 5.　ラット頬粘膜の HE 染色像

５．今後の計画

口内炎のラット病態モデルを作製できる可能性が示唆されたが，ラットは口腔粘膜の観察が難しく，病変の経時変化を追跡する実験にはあまり適していなかった。このような観点から，今後はこれまでの知見を生かし，ハムスターへの適用も試みる予定である。

６．研究成果の発表

口内炎発症時の唾液ムチンの変動、並びに、治癒過程のデータを収集し、発表する。

参考文献　1)　Hitomi S., et. al., *J Neurosci Methods,* 239：162-169, 2015.

2)　佐藤公則，口咽科，26：119-130, 2013.

プロスタサイクリン欠損が引き起こす動脈硬化の *in vitro* モデル実験系の確立とそれを用いた生活習慣病の予防・改善に向けた研究

健康生命科学研究所　　横山　知永子

１．研究の目的

プロスタサイクリン（PGI_2）による血管保護機構の詳細を明らかにするために、PGI_2欠損細胞を用いた動脈硬化の *in vitro* モデル実験系の確立し、慢性腎臓病を含め動脈硬化の予防・治療へ発展させるための基盤を整えることを目的とする。本年度は血管障害抑制効果評価システムの確立を目指し、炎症刺激の有無で細胞障害や線維化を起こす細胞培養系の探索を試みた。

２．研究の必要性及び従来の研究

近年我が国では平均寿命が延長しているが、必ずしも健康に過ごせる期間(健康寿命)が延びているわけではない。実際、生活習慣病が原因となる脳・心血管系の疾患による死亡率は、年々増加している。生活習慣病である肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧、そしてそれらが複数組み合わさったメタボリックシンドロームは、いずれも動脈硬化が生じて虚血性心疾患や脳梗塞などに進展するが、同時に慢性腎臓病や糖尿病性腎症などの腎障害を併発するリスクを非常に高め、透析治療を余儀なくされる患者数の上昇が大きな問題になっている。我々はこれまでに、PGI_2合成酵素遺伝子を欠失させ、血管系の恒常性維持に重要なPGI_2を産生できない遺伝子改変マウス(PGI_2欠損マウス)を作製し、このマウスが加齢に伴い慢性腎臓病様の病変を生じることを見出した。しかしながら、PGI_2欠損マウスにおいて腎臓だけに障害が認められる理由は不明である。

昨年度は、PGI_2合成酵素欠損マウスにおいて、生後 28 日までに腎臓に炎症が惹起されていること、さらに、この時に血管由来の炎症関連遺伝子の発現が変動していることを見出した。

３．期待される効果

PGI_2欠損による腎障害発症機序の詳細が明らかになれば、生活習慣病の合併症として発症する腎障害や動脈硬化の動脈硬化の予防・治療へ発展させるための基礎になるものと考える。また、動物実験により得られた結果をもとに細胞レベルでの実験系が確立できれば、施設、費用、時間、倫理面の問題が減少し、分子レベルでの詳細な研究が可能になる。

４．研究の経過及び結果

PGI_2は血管内皮細胞や血管平滑筋細胞でアラキドン酸（AA, n-6 系）から産生され、

血管壁を保護している。血管壁に何らかの刺激が加わると血管平滑筋細胞ではアラキドン酸からトロンボキサン(TX)A_2が産生されて血管が収縮する。PGI_2と TXA_2はどちらもPGH_2からそれぞれの合成酵素により産生されるため、PGI_2合成酵素が欠損するとTXA_2の生成量が高くなってより強く血管が収縮するとともに、血小板や白血球などからもTXA_2が産生されて炎症反応が亢進する。エイコサペンタエン酸などの n-3 系不飽和脂肪酸も同じ代謝系でTXA_3が産生されるが、この化合物にはTXA_3のような強力な生理活性はない。また、最近、エイコサペンタエン酸による抗動脈硬化作用には、エイコサペンタエン酸から産生される抗炎症作用を有する新たな生理活性脂質が関与する可能性が見出されている。一方、血清中には脂肪細胞から産生されるアディポサイトカインの１つであるアディポネクチンが高濃度に存在しており、このタンパク質に血管保護作用があることが明らかにされつつある。我々は炎症刺激で細胞障害や線維化を起こす細胞培養系を探索するうえで、脂肪細胞に分化し、その過程でアディポネクチンを発現する 3T3-L1 細胞を用いて、アラキドン酸とエイコサペンタエン酸の影響について検討した。細胞をアラキドン酸またはエイコサペンタエン酸を添加した培地で培養し、細胞膜に各脂肪酸を取り込ませながら、脂肪細胞の誘導をかけた結果、エイコサペンタエン酸処理細胞と比べアラキドン酸処理細胞では明らかな炎症惹起関連遺伝子の発現レベルの上昇が観察された。細胞への脂肪酸取り込みの条件について詳細な検討を行い、アディポネクチンや脂質生理活性物質の産生レベル等を調べる必要がある。

５．今後の計画

細胞膜への脂肪酸取り込み条件を検討するとともに、遺伝子の発現変動と生成物を測定する。さらに血管内皮細胞、単球・マクロファージ系細胞ならびに線維芽細胞を組み合わせ、動脈硬化の *in vitro* モデル実験系の確立をめざし、血管壁の恒常性維持に対する PGI_2とアディポサイトカインの関連を調べる。