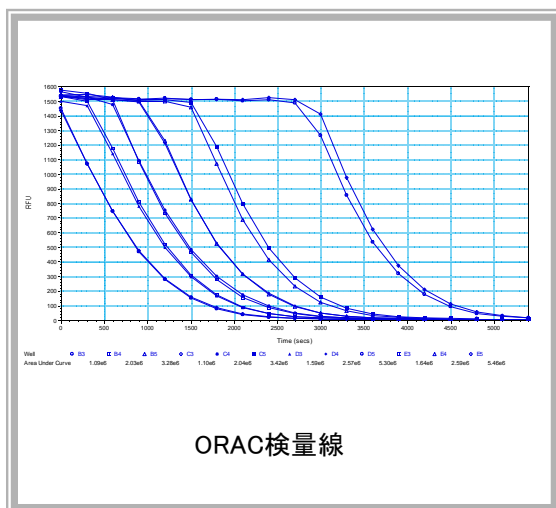
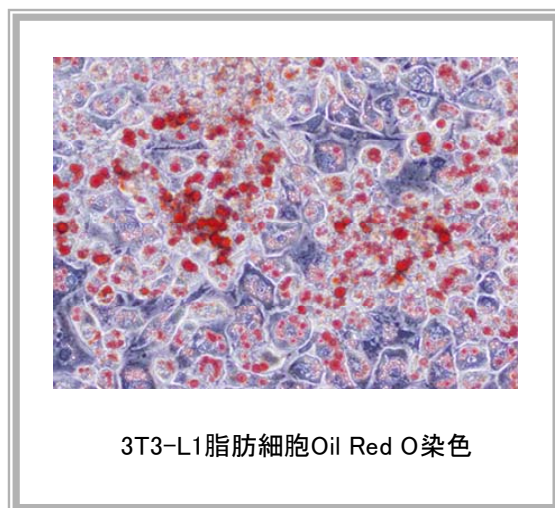


機能性評価試験のご案内

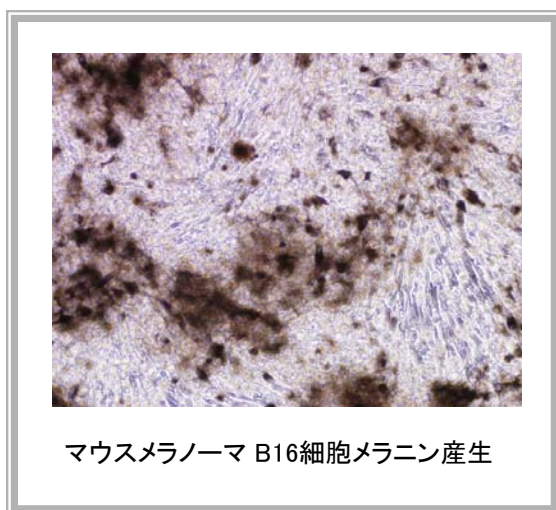
生化学，培養細胞から動物試験まで



ORAC検量線



3T3-L1脂肪細胞Oil Red O染色



マウスメラノーマ B16細胞メラニン産生



動物を用いた試験

機能性評価試験案内 目次

試験系の全体概要	1 Page
試験内容	
1. 生化学系	2
2. 培養細胞系	2
3. 実験動物系	3
機能別試験のご案内	
1. 抗酸化	4
2. 血圧上昇抑制	5
3. 糖分解・吸収抑制	6
個別試験のご案内	
(細胞試験)	
1. Caco-2 細胞糖吸収抑制： α -グルコシダーゼ活性阻害/グルコース吸収抑制	7
2. 抗肥満 1： 3T3-L1 細胞脂肪蓄積抑制	8
3. 抗肥満 2： 3T3-L1 細胞脂肪分解促進	9
4. 抗腫瘍： P388 白血病細胞増殖抑制	10
5. 抗アレルギー： RBL-2H3 細胞脱顆粒抑制	11
6. 免疫賦活・抗炎症： RAW264 細胞 NO 産生誘導・抑制	12
7. 色素沈着抑制： B16 細胞メラニン産生抑制	13
8. 機能性評価に用いる測定系： 測定装置を中心に	14
(動物試験)	
1. 動物を用いた機能性評価試験： 抗血圧・高血糖・高コレステロール抑制	15
評価試験の実例	
1. 黒ウコンのメトキシフラボノイド (機能性成分同定)	16
2. 桑の葉のノジリマイシン (糖吸収抑制試験)	17
機器分析による定量	
1. 定量可能成分の一覧	18

試験系の全体概要

昨今、食品は栄養的な側面だけでなく、いわゆる食品の三次機能として、生体機能の調節や成人病予防の機能が求められています。したがって、これらに関する食品（成分）の性質を知ることはその食品の価値を高めることに繋がります。

私どもでは、食品の機能性を調べるためのこれまでの機能性成分の定量分析に加え、機能性の評価試験やその作用機序の解明のための以下の試験を実施しています。

目的に合わせてご利用ください。

機能性	生化学	培養細胞	実験動物
抗酸化	SOD, DPPH, ORAC	CAA (細胞内抗酸化活性)	
高血圧抑制	ACE活性阻害	HUVEC ACE活性阻害	血圧上昇抑制 (自然高血圧ラット)
高血糖抑制	α -グルコシターゼ活性阻害	Caco-2 グルコース吸収抑制・ α -グルコシターゼ活性阻害	血糖上昇抑制 (マウス/ラット)
高コレステロール抑制			コレステロール上昇抑制 (ラット)
抗骨粗鬆			骨塩減少抑制 (卵巣摘出ラット)
抗肥満		3T3-L1 脂肪蓄積抑制 ・脂肪分解促進	脂肪蓄積抑制 (卵巣摘出ラット)
抗腫瘍		P388 増殖抑制・細胞毒性・アポトーシス誘導	抗腫瘍 (腫瘍細胞移植マウス)
抗アレルギー		RBL 脱顆粒抑制	抗アレルギー (アレルギーモデル動物)
免疫賦活・抗炎症		RAW NO産生誘導・抑制	免疫賦活 (マウス)
色素沈着抑制		B16メラニン産生抑制・チロシナーゼ活性阻害	
			準備中

枠で囲ってある試験については試験系が確立されております。

これ以外の試験についてもご相談ください。

【お問合せ先】

メールによるお問合せ

弊財団ホームページ < <http://www.jfrr.or.jp/> > 内の「お問い合わせ」コーナーからご利用ください。

お電話によるお問合せ

お客様相談室

- ・ 東京本部(代表) 03-3469-7131
- ・ 大阪支所(代表) 06-6386-1851

in vitro 機能性評価試験一覧

生化学系

試験名	評価機能	概要
スーパーオキシド (SOD) 消去活性	抗酸化	活性酸素の一つであるスーパーオキシドラジカルの消去能を ESR で測定。
DPPH ラジカル 消去活性	抗酸化	人工的に安定化させた DPPH ラジカルの消去能を吸光光度法により測定。
ORAC (オラック)	抗酸化	活性酸素の吸収能力を現す新たな抗酸化指標として欧米では食品への表示が普及しつつある ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 値を測定。
ACE 活性阻害	高血圧抑制	アンジオテンシ I から II への変換を通して血圧上昇に働く酵素 ACE(アンジオテンシン変換酵素) に対する阻害作用をウサギ肺由来酵素を用いて評価。
α -グルコシダーゼ 活性阻害	高血糖抑制	糖質を単糖(グルコース)へと分解し、小腸からの吸収に働く酵素 α -グルコシダーゼ活性に対する阻害作用をラット小腸由来酵素を用いて評価。

培養細胞系

試験名	評価機能	概要
CAA (細胞内抗酸化活性)	抗酸化	生体に近い条件でラジカルを発生させたときの、細胞内におけるラジカル補足能を抗酸化作用として評価 (ORAC の細胞版)。
HUVEC ACE 活性阻害	高血圧抑制	ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、アンジオテンシ I から II への変換を通して血圧上昇に働く酵素 ACE(アンジオテンシン変換酵素) に対する阻害作用を評価。
Caco-2 グルコース 吸収抑制	高血糖抑制	ヒト腸管細胞 (Caco-2) を用い、単糖(グルコース)の腸管吸収を抑制する作用を評価。
Caco-2 α -グルコシダーゼ活性阻害	高血糖抑制	ヒト腸管細胞 (Caco-2) を用い、糖質を単糖(グルコース)へと分解し、小腸からの吸収に働く酵素 α -グルコシダーゼ活性に対する阻害作用を評価。
P388 白血病細胞 増殖抑制	抗腫瘍	抗腫瘍作用の検定に用いられる標準細胞株の一つマウス白血病細胞 P388 に対する増殖抑制作用を生細胞由来の酸化還元酵素量を指標として評価。
RBL 細胞脱顆粒抑制	抗アレルギー	ラット肥満細胞 RBL-2H3 から IgE 刺激によって放出される顆粒中の β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定し、その抑制作用を評価。
3T3-L1 細胞脂肪蓄積 抑制	抗肥満	脂肪前駆細胞から脂肪細胞へと分化誘導される際に蓄積される脂肪量を Oil Red O 色素で染色し、その抑制作用を評価。
3T3-L1 細胞脂肪分解 促進	抗肥満	分化誘導後の脂肪細胞において、蓄積した脂肪に対する分解促進作用を遊離されるグリセロール量を測定することにより評価。
RAW NO 産生誘導・抑制	免疫賦活・抗炎症	マクロファージ活性化の指標として NO 産生誘導能(免疫賦活)を、またリポ多糖 (LPS) 刺激下の NO 産生に対する抑制作用(抗炎症)を、NO ₂ イオンとして測定し、それぞれ評価。
B16 メラニン産生抑制	色素沈着 抑制	マウス B16 メラノーマ細胞に対するメラニン産生抑制作用を、ホルモン(α -MSH) 刺激有無の 2 条件下で評価。
B16 チロシナーゼ活性 阻害	色素沈着 抑制	マウス B16 メラノーマ細胞を用い、メラニン合成経路の律速酵素チロシナーゼ活性に対する阻害作用を評価。

in vivo 機能性評価試験一覧

実験動物系

試験名	評価機能	概要
血圧上昇抑制 (自然高血圧ラット)	高血圧抑制	自然高血圧ラット(SHR)に、短期 and/or 長期的に検体を投与し、対照群との間で血圧上昇の差を評価。
血糖上昇抑制 (マウス/ラット)	高血糖抑制	正常マウス/ラットを絶食させ、検体とグルコース等の糖類を投与後、経時的に血糖値を測定し、対照群との差を評価。
コレステロール上昇抑制 (ラット)	高コレステロール抑制	正常ラットにコレステロール食を給餌し、検体を混餌させたときの、対照群に対する血中コレステロール濃度の差を評価。
脂肪蓄積抑制 (卵巣摘出ラット)	抗肥満	卵巣摘出ラットに検体を投与し、血中脂質及び体内の脂肪量に関して、対照群との差を評価。遺伝的肥満動物を用いる試験も可能。
骨塩減少抑制 (卵巣摘出ラット)	抗骨粗鬆	卵巣摘出ラットに検体を投与し、一定期間後の骨塩量、Ca 量、骨の脱灰及び非脱灰標本の観察や組織形態測定などから対照群との差を評価。
抗腫瘍作用 (マウス)	抗腫瘍	樹立培養腫瘍細胞をマウス皮下に移植し、検体を投与することにより移植腫瘍の進展について対照群との差を評価。

抗酸化作用の評価

□□□ 生化学・細胞試験 □□□

1. 抗酸化作用

空気中の酸素は紫外線、大気汚染等によりスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)やヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)などのいわゆる**活性酸素**に変化します。生体内でもストレスや虚血状態が活性酸素生成に関わることが知られています。

一方、生体内では**スーパーオキシドディスムターゼ**等の酵素系により活性酸素の消去を行っています。過剰の活性酸素は生体に損傷を与え、各種の疾病、老化、ひいてはガンの生成に繋がるものと考えられています。そこで、日常摂取する食品から活性酸素消去能力を持つ機能成分を摂取し、抗加齢、健康維持を図ることが期待されています。

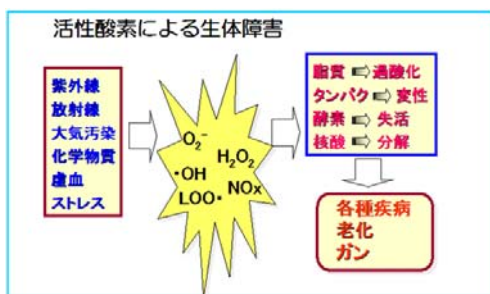
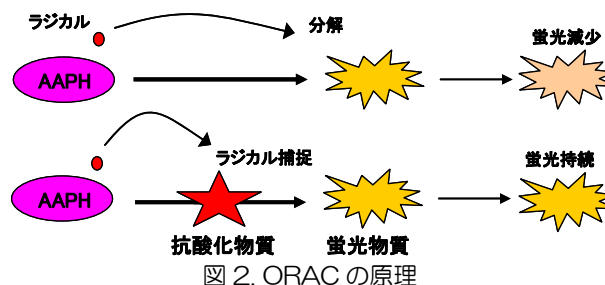


図 1. 活性酸素による生体障害

2. 生化学試験

ORAC (活性酸素吸収能)

ラジカル活性剤である AAPH が発生するフリーラジカルがフルオレセインを分解し、抗酸化物質が存在すれば分解反応の速度が遅くなります。この反応速度から抗酸化能を評価します。



スーパーオキシド消去活性能

スーパーオキシドアニオン(O_2^-)にターゲットを絞った電子スピン共鳴 (ESR) 装置を用いたスピントラップ法で測定します。

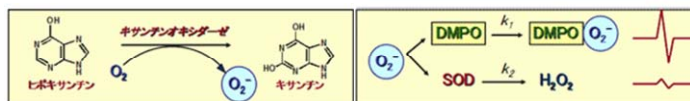


図 3. スーパーオキシド消去活性能の測定原理

DPPH ラジカル消去活性能

人工的に安定化させた DPPH ラジカル消去能を吸光光度法により評価する方法です。

3. 細胞試験

より生体に近い条件での検証を行うために、培養細胞 (正常ヒト皮膚線維芽細胞, NHDF) にラジカル発生剤である AAPH を作用させ、**細胞内におけるラジカル捕捉能**を抗酸化作用として評価します (Cellular Antioxidant Activity; CAA)。

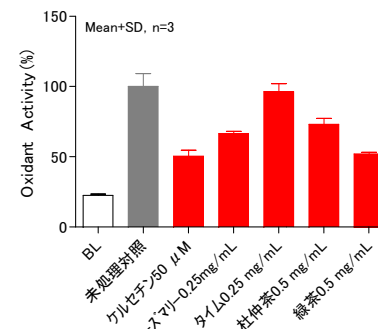
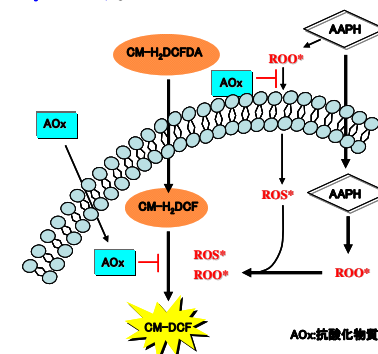


図 4. CAA の原理と測定例

血圧上昇抑制作用の評価

□□□ 酵素・細胞、動物試験 □□□

1. 高血圧と生活習慣病

糖尿病や脳卒中に代表される生活習慣病のひとつに高血圧があります。高血圧は動脈硬化をはじめとして、脳、心臓、腎臓などに悪影響を及ぼし、重症になると狭心症、心筋梗塞、心不全、腎不全などの病気を引き起こします。

生体内における重要な血圧調節系のひとつにレニン-アンジオテンシン系があります。肝臓から分泌される糖タンパク質であるアンジオテンシノーゲンとレニンによりアンジオテンシン I (AG I) が生成することが知られています。この AG I はアンジオテンシン変換酵素 (ACE) により、アンジオテンシン II (AG II) となりますが、AG II は受容体を介して血管の平滑筋を収縮させるとともに、アルドステロンの分泌促進を介してナトリウム蓄積に作用し、**血圧上昇に関与**します(図 1)。

従って、ACE の活性を阻害する成分には結果として**血圧上昇抑制効果**が期待されます。

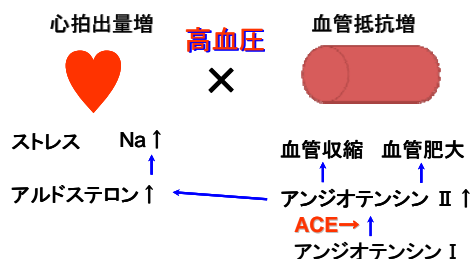


図 1. アンジオテンシンと血圧上昇

2. 酵素・細胞試験

ウサギ肺 ACE 活性阻害試験

ウサギ肺由来 ACE を用い、ACE 活性に対する阻害作用を調べます。トリペプチド (Benzoyl-Gly-His-Leu) を基質として、ACE への阻害活性を試験管内で測定しますが、具体的には酵素分解産物である His-Leu とオルトフタルアルデヒドを反応させることで生成する蛍光物質を指標とします。

HUVEC ACE 活性阻害試験

生化学レベルの評価から、より生体に近い条件での検証を行うために、培養細胞を用いて血圧上昇抑制作用を調べます。ヒト血管細胞モデル系として広く利用されているヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 膜上に結合している ACE への阻害活性を測定します。

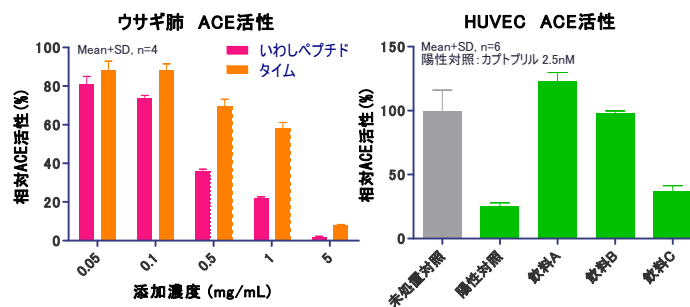


図 2. ACE 活性阻害試験例

3. 動物試験

高血圧自然発症ラット (SHR ラット) に検体を投与し、投与後の血圧の変化を探索します。血圧は tail-cuff 法にて収縮期血圧及び拡張期血圧を測定します。

検体の投与は単回または複数回、投与方法は強制経口投与、混餌による投与など、短期から中長期までニーズに合わせた試験設計が可能です。



図 3. ラット用 tail cuff 型血圧測定装置

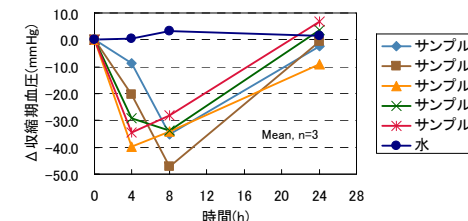


図 4. 血圧測定例

糖分解・吸収抑制作用の評価

□□□ 酵素, 細胞, 動物試験 □□□

1. 糖の分解と吸収

食事から摂取した高分子の糖(デンプンなど)は、唾液及び膵液中の α -アミラーゼの作用を受け、より低分子の糖に分解されます。これらは腸管細胞表面に存在する α -グルコシダーゼの作用により、単糖(グルコース)に分解された後、糖輸送体(SGLT1, GLUT2)によって、体内にはじめて吸収されます。最終的に門脈から肝臓への輸送を介して血糖の上昇をもたらすことになります(図1)。

従いまして、糖の分解に関するアミラーゼやグルコシダーゼ活性を阻害することにより、あるいは腸管からの糖輸送体を介したグルコースの吸収を抑制することにより、血糖値の上昇を緩和することが期待されます。

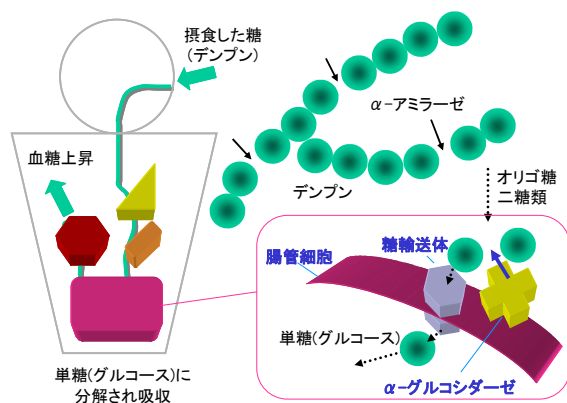


図1. 生体における糖の分解と吸収

2. 酵素・細胞試験

分解抑制

単糖への分解に関する酵素 α -グルコシダーゼ活性に対する阻害作用を調べます。酵素源として一般的に用いられているラット小腸凍結乾燥粉末とヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2 を用いる二通りの方法があります。

吸収抑制

Caco-2 細胞を用いてグルコースの腸管からの吸収を抑制する作用を調べます。Caco-2 細胞は元々結腸癌由来の株化細胞ですが、小腸上皮様に分化することが形態的にも分子レベルでも確認されており物質輸送など小腸上皮細胞のモデル系として広く利用されています。

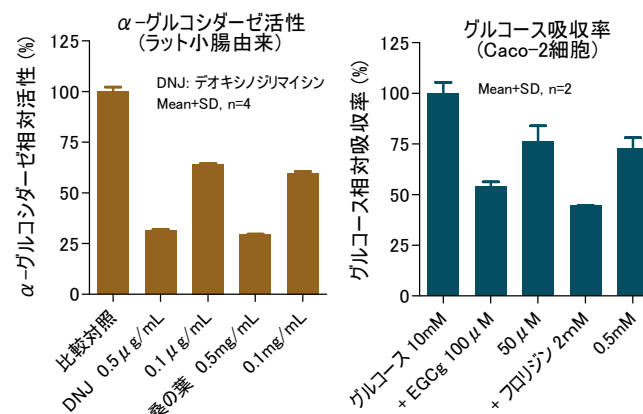


図2. α-グルコシダーゼ活性阻害・グルコース吸収抑制試験例

3. 動物試験

酵素・細胞レベルの評価から、より生体に近い条件での検証を行うために、*in vivo*において血糖上昇を抑制する作用を調べます。

絶食させた正常マウスまたはラットに、グルコースなどの糖類と検体を経口的に投与後、経時的に血糖値を測定し、対照群との差を評価します(図3)。

その他、糖尿病モデルなどの病態モデル動物を用いた検索も可能です。

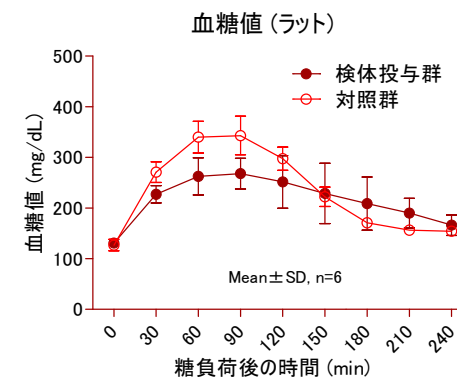


図3. ラット血糖上昇抑制試験例

Caco-2 細胞糖吸収抑制作用の評価

□□□ α-グルコシダーゼ活性阻害試験・グルコース吸収抑制試験 □□□

1. 糖の分解と吸収

食事から摂取した高分子の糖(デンプンなど)は、唾液及び膵液中のα-アミラーゼの作用を受け、より低分子の糖に分解されます。これらは腸管細胞表面に存在するα-グルコシダーゼの作用により、単糖(グルコース)に分解された後、糖輸送体(SGLT1, GLUT2)によって、体内にはじめて吸収されます。最終的に門脈から肝臓への輸送を介して血糖の上昇をもたらすこととなります(図1)。

従いまして、糖の分解に関するα-グルコシダーゼ活性を阻害することにより、また、腸管からの糖輸送体を介したグルコースの吸収を抑制することにより、血糖値の上昇を緩和することが期待されます。

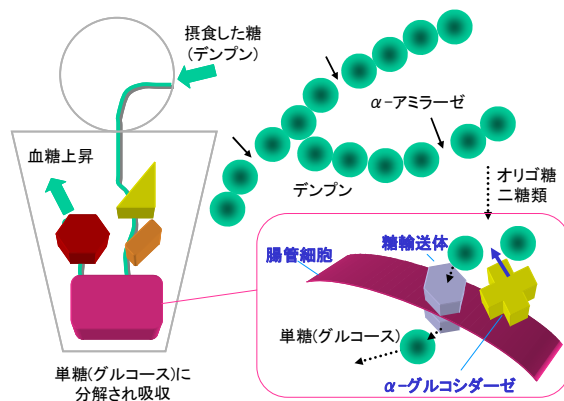


図 1. 生体における糖の分解と吸収

2. α-グルコシダーゼ活性阻害試験

ヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2 を用いて、単糖への分解に関する酵素 α-グルコシダーゼ活性に対する阻害作用を調べます。

本試験は、Caco-2 細胞を腸管上皮様に分化させ、α-グルコシダーゼを発現させた細胞を用いて、その活性を阻害する物質の評価を行う試験です。α-グルコシダーゼ活性は、マルトースから遊離するグルコースを酵素法により測定します。ヒト由来の腸管上皮様細胞に存在するα-グルコシダーゼの活性を利用して評価していますので、より信頼性の高い試験となります。試験法の概略及び結果例を図2に示しました。

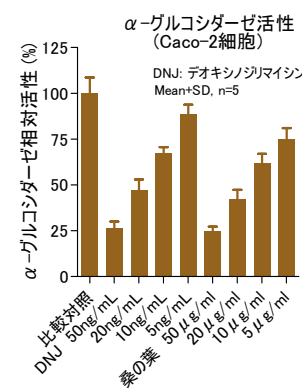
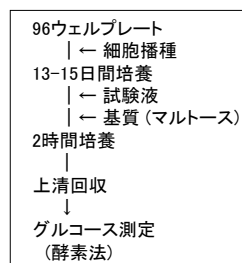


図 2. α-グルコシダーゼ活性阻害試験例

3. グルコース吸収抑制試験

Caco-2 細胞を用いて腸管からのグルコースの吸収を抑制する作用を調べます。

Caco-2 細胞を透過性膜上に培養すると、小腸上皮様に分化して単層膜を形成することが知られています。2-3 週間培養することにより酵素や輸送体の発現も確認されるため、物質吸収・輸送のモデル系としても広く利用されます。本試験では、管腔側に添加したグルコースが基底膜側に吸収されるのを抑制する物質を評価します(図3)。

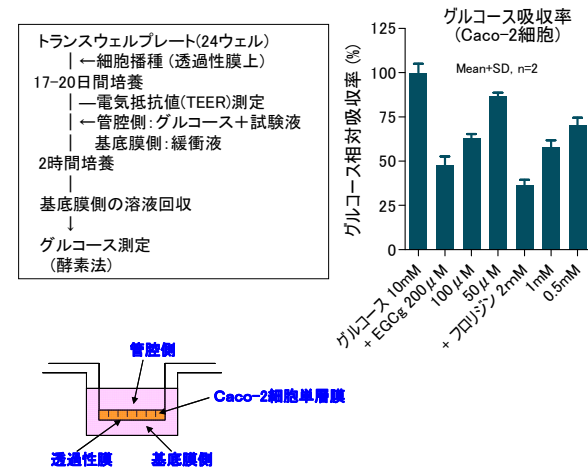


図 3. グルコース吸収抑制試験例

抗肥満作用の評価 1

□□□ 3T3-L1 細胞脂肪蓄積抑制試験 □□□

1. 脂肪細胞と生活習慣病

糖尿病や脳卒中に代表される生活習慣病の基礎疾患として、内臓肥満症候群(メタボリックシンドローム)の関与が、近年、特に重要視されています。

脂肪組織は生体エネルギーの貯蔵器官としての役割に加え、様々な生体調節因子(アディポカイン)を産生する内分泌器官としての大切な役割を担っていることが最近の研究からわかってきました。脂肪細胞に過剰な脂肪が蓄積した状態は、この生体調節機能に破綻を来たした炎症状態とされ、生活習慣病の発症を招くこととなります(図1)。

生活習慣及び食生活の改善により、**脂肪蓄積を抑制するとともに、過剰に蓄積した脂肪の分解利用を促進することにより、これら生体調節因子のバランスを保つことが、予防医学的見地からも極めて大切とされています。**

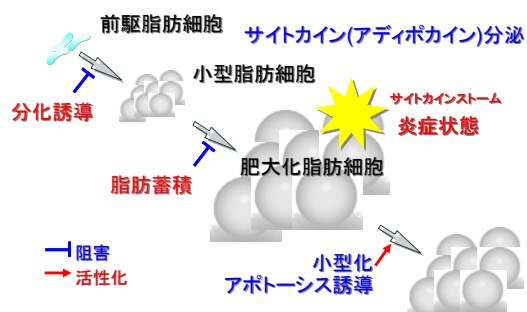


図1. 脂肪細胞への分化と脂肪蓄積・分解

2. スクリーニング試験

脂肪蓄積を評価する細胞系として最も汎用されています**マウス前駆脂肪細胞3T3-L1を用いて、検体成分に脂肪蓄積を抑制**する効果があるかどうかを調べます。

本試験は前駆脂肪細胞を脂肪細胞へと分化誘導するステップからそれに続く細胞内への脂肪蓄積の程度を評価するもので、脂肪細胞に蓄積した脂肪滴を親油性色素 Oil Red O を用いて染色します。**細胞内の脂肪蓄積状態の観察に加え蓄積した脂肪量を測定できるスクリーニング法として優れた方法**です(図2)。

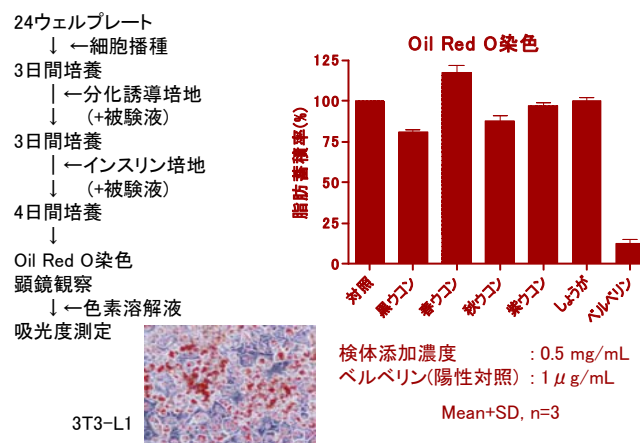


図2. 脂肪蓄積抑制試験の概略と結果例

3. 検証試験

スクリーニング試験において抗肥満作用を認めた場合、そのメカニズム(作用点)を検証することも重要となります。

脂肪細胞への分化誘導を制御する**転写因子 PPAR-γ**や**炎症性アディポカイン(TNF-α, IL-6, MCP-1 など)**あるいは**抗炎症性アディポカイン(Adiponectin)**のqRT-PCRによるmRNA発現解析及びマイクロビーズアレイによるタンパク分泌量の測定などを検証試験として行っています(図3)。

なお、脂肪分解促進作用の評価につきましても、別途、試験可能です。

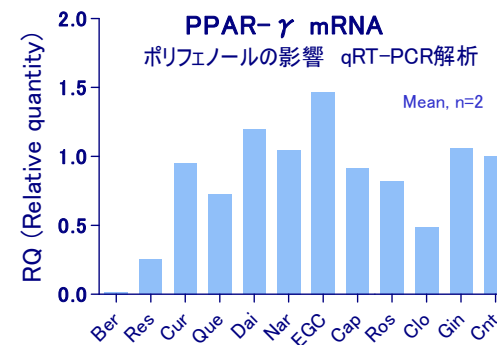


図3. 転写因子 mRNA の解析例

抗肥満作用の評価 2

□□□ 3T3-L1 細胞脂肪分解促進試験 □□□

1. 脂肪細胞と生活習慣病

糖尿病や脳卒中に代表される生活習慣病の基礎疾患として、内臓肥満症候群(メタボリックシンドローム)の関与が、近年、特に重要視されています。

脂肪組織は生体エネルギーの貯蔵器官としての役割に加え、様々な生体調節因子(アディポカイン)を産生する内分泌器官としての大切な役割を担っていることが最近の研究からわかってきました。脂肪細胞に過剰な脂肪が蓄積した状態は、この生体調節機能に破綻を来たした炎症状態とされ、生活習慣病の発症を招くこととなります(図1)。

生活習慣及び食生活の改善により、**脂肪蓄積を抑制するとともに、過剰に蓄積した脂肪の分解利用を促進することにより**、これら生体調節因子のバランスを保つことが、予防医学的見地からも極めて大切とされています。

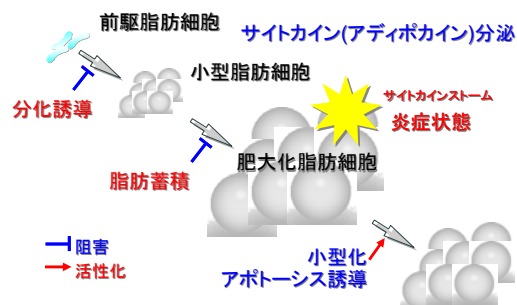


図 1. 脂肪細胞への分化と脂肪蓄積・分解

2. スクリーニング試験

抗肥満作用を評価する細胞系として最も汎用されています**マウス 3T3-L1 脂肪細胞を用います。前駆細胞から脂肪細胞へと分化誘導後、脂肪を蓄積した状態に対して、検体成分により脂肪分解が促進**されるかどうかを調べます。

本試験は脂肪細胞に蓄積した脂肪が、分解される際に生成する遊離グリセロールを酵素法により測定するもので、**脂肪の分解産物を直接測定することにより信頼性の高い評価が可能**となります(図2)。

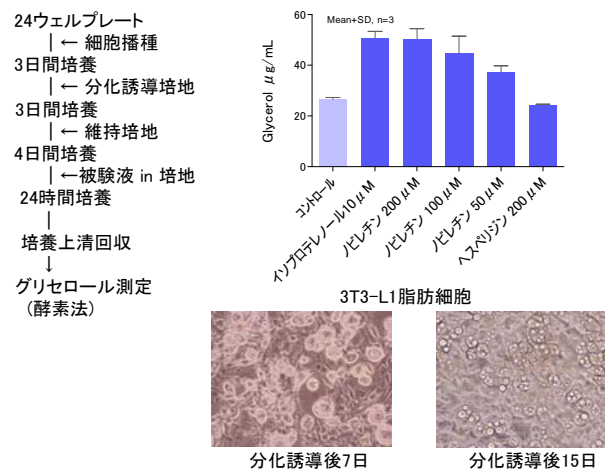


図 2. 脂肪分解促進試験の概略と結果例

3. 検証試験

スクリーニング試験において抗肥満作用を認めた場合、そのメカニズム(作用点)を検証することも重要となります。

脂肪分解の経路には**βアドレナリン受容体を介するものもあります。βアドレナリン受容体アゴニスト(イソプロテレンール)とアンタゴニスト(プロプラノロール)を用いて脂肪分解促進作用の検証試験**を行っています(図3)。また、脂肪分解に係わる遺伝子発現をqRT-PCRで調べています。

なお、脂肪蓄積抑制作用の評価につきましても、別途、試験可能です。

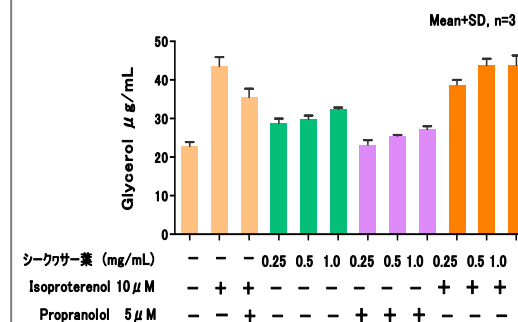


図 3. 脂肪分解促進効果の解析例

抗腫瘍作用の評価

□□□ P388 白血病細胞増殖抑制試験 □□□

1. 食品とがん予防

一般的に発がんの過程は、細胞の遺伝子変異、腫瘍化、悪性化（がん）から他組織へ転移に至る複雑な現象とされています(図1)。

現在、抗がん剤の開発も精力的に進められているところですが、がん細胞を特異的に攻撃することは難しく、常に副作用が問題となります。

一方、ある食品成分には、特定のがん予防効果があることが、これまで多くの疫学調査により報告されています。

抗がん剤でも治療が困難ながんを食品で治療することは現実的ではありませんが、日々摂取する食品により、がんの発生を未然に予防（危険因子の低減あるいは有用因子の増強）できれば理想的なことは明白です。

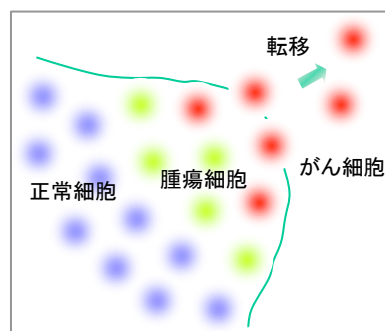


図 1. がん化の過程

2. スクリーニング試験

複雑な現象であるがんに対して、いくつかの限られた試験のみで抗がん効果を評価することには限界があります。ここでは**抗癌作用検定用の標準細胞株の一つであるマウス白血病細胞 P388**を用いて、**検体成分に腫瘍細胞の増殖を抑える効果があるかどうか**を調べます。

本試験は生細胞内の酵素によって生成するホルマザン色素の量を吸光度で測定し、コントロール(未処置群)に対する割合から細胞増殖抑制作用を評価するものです。この方法は比較的簡便であり、**一次スクリーニング法としては優れています**が、この試験結果のみでは腫瘍細胞に特異的な増殖抑制作用であるかどうかを判断することはできません。

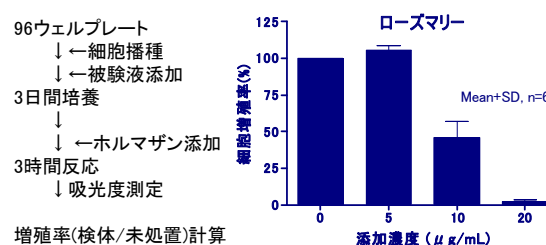


図 2. 細胞増殖抑制試験の概略と結果例

3. 検証試験

本試験においては、**細胞毒性による増殖抑制の程度**や細胞壊死に対する**アポトーシス誘導能**についての情報が不可欠です。

この点に関して**次の二つの検証試験**をご用意しています(図3)。

- A: 「死細胞由来プロテアーゼ測定による細胞毒性の評価」
- B: 「アポトーシス後期マーカー：カスパーゼ 3/7 活性測定あるいは断片化 DNA ラダー検出」

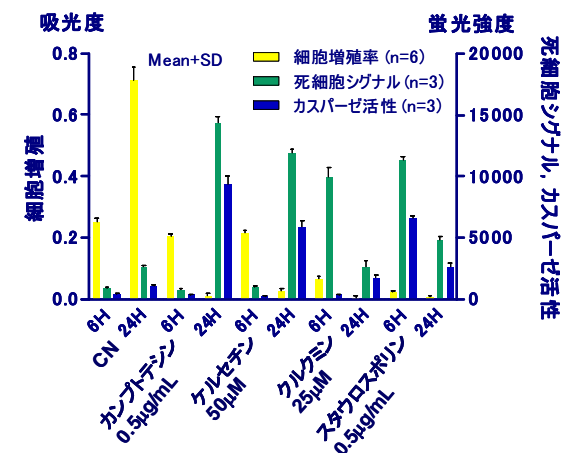


図 3. 細胞毒性およびアポトーシス評価試験の結果例

抗アレルギー作用の評価

□□□ RBL-2H3 細胞脱顆粒抑制試験 □□□

1. アレルギーと脱顆粒反応

花粉症や食物アレルギーに代表されるアレルギー性疾患の最近の増加傾向は大きな社会問題となっています。

これらの多くは **IgE 依存性アレルギー (I型)** と言われ、**食べ物や花粉中の特定タンパク質 (抗原) が、体内に侵入したときに、肥満細胞における生体防御機構 (抗原抗体反応) が過剰に反応して、鼻水や涙目などの炎症症状を起こす**ものです (図 1)。

この炎症反応を引き起こす、ヒスタミンなどの**炎症介在物質を含む顆粒球が細胞外へと放出される反応を抑える**ことにより、アレルギー症状の緩和が期待できるとされています。

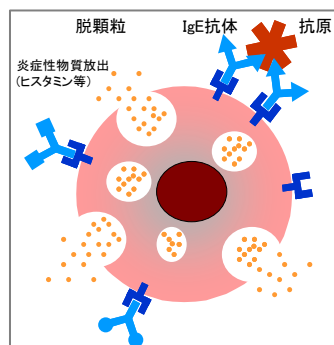


図 1. IgE 依存性アレルギーと脱顆粒反応

2. スクリーニング試験

食品中の成分に抗アレルギー作用があるかどうかについて、ラット肥満細胞様細胞株 RBL-2H3 を用いて脱顆粒抑制作用の有無を調べます。

試験法の概略及び結果例を図 2 に示しましたが、**細胞内及び培養上清中の顆粒に含まれる酵素 β -ヘキソサミニダーゼの活性を指標として、脱顆粒抑制作用を試験**するものです。ここで用いる方法は、より効率的かつ信頼性の高い試験ができるように独自に改良を加えたものです (食科工 2008;55:535-40)。

未処置対照に対する「**相対脱顆粒率**」として抗アレルギー効果を評価します。

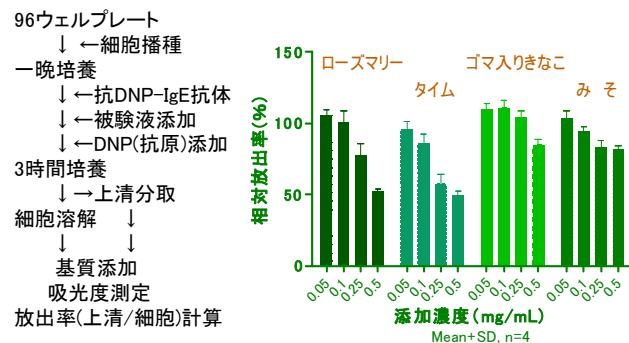


図 2. 脱顆粒抑制試験の概略と結果例

3. 検証試験

スクリーニング試験において脱顆粒抑制作用を認めた場合、そのメカニズムを検証することも重要となります。

脱顆粒反応の過程は複雑で、抗原の IgE 抗体への結合・架橋、細胞内シグナル伝達の活性化、Ca イオンの細胞内への流入、顆粒球の放出、サイトカイン等による炎症反応の促進などのステップからなります。

これら**作用点の情報を得るために、次の二つの検証試験をご用意**しています。

- A: 「IgE を介さない Ca 流入剤による脱顆粒反応の抑制効果」
- B: 「炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-4, MCP-1 等) の mRNA 発現量及びタンパク量測定」 (図 3)

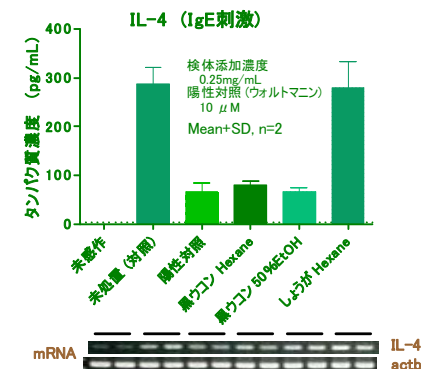


図 3. 炎症性サイトカインの測定

免疫賦活・抗炎症作用の評価

□□□ RAW264 細胞 NO 産生試験 □□□

1. マクロファージと免疫調節

外来性異物や病原微生物の生体内への侵入に対して、抗原抗体反応に先立って**速やかに働く自然免疫の生体防御機構としての重要性**が、最近、見直されてきています。

免疫細胞の中でもマクロファージは特に多彩な機能を持ち、異物の分解処理（食食作用）に加えて、抗体産生に基づく獲得免疫を担うT細胞の活性化と、それに続く細胞障害作用にも関係します。

このマクロファージ活性化マーカーの一つに**一酸化窒素(NO)**の産生が知られており、**NO産生を誘導する能力が免疫賦活性**として捉えられています。これに対して、**NO産生が過剰に亢進した状況は炎症状態に相当し**、この場合、**NO産生を抑制する効果が抗炎症作用**と考えられています。

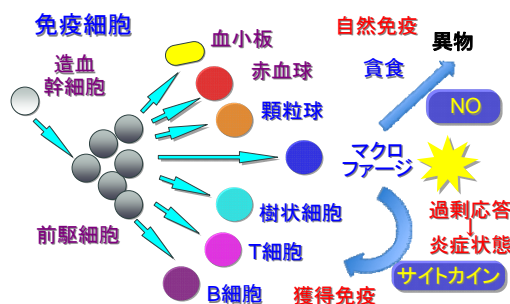


図 1. マクロファージの活性化と NO 産生

2. スクリーニング試験

試料の添加により、マクロファージから産生誘導された培養上清中の**NOを自然酸化産物のNO₂イオンとして比色測定**することで、**免疫賦活性**を評価します。

一方、リポ多糖(LPS)刺激により、**NO産生が亢進した状態に対するNO産生抑制効果を抗炎症作用として合わせて評価**することにより、より幅広い免疫調節系の機能性に関する情報を得ることができます。(図2)。

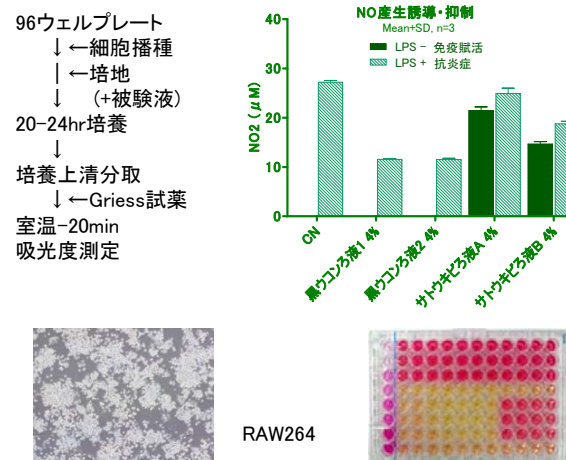


図 2. NO 産生試験の概要と結果例

3. 検証試験

スクリーニング試験において免疫調節作用を認めた場合、そのメカニズム(作用点)を検証することも重要となります。

細胞間の情報伝達を担う種々のサイトカインの変動を追うことにより、より詳細な評価が可能となります。**炎症介在物質(TNF-α, MCP-1, IL-6, etc)等のqRT-PCRによるmRNA発現解析及びマイクロビーズアレイによるタンパク分泌量の測定**などを検証試験として行っています(図3)。

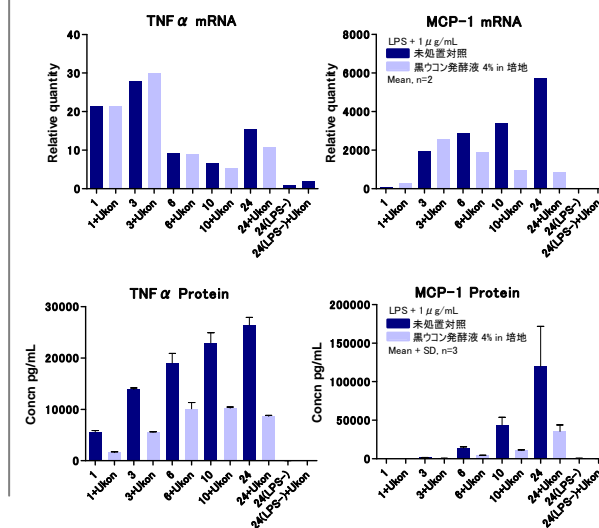


図 3. 炎症性サイトカインの測定

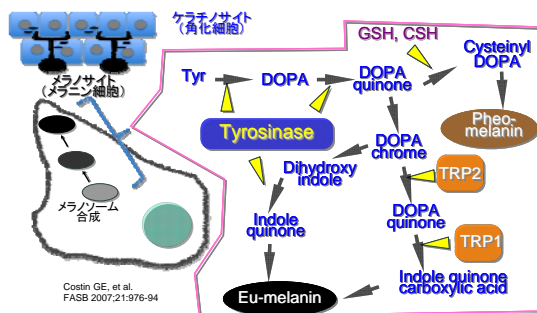
色素沈着抑制作用の評価

□□□ B16 細胞メラニン産生抑制試験 □□□

1. メラニン産生と色素沈着

メラニン色素は、本来、紫外線による皮膚障害を緩和するために大切な役割を果たしていますが、**過剰にメラニン産生が亢進した状態**の、しみ等の**局所的な色素沈着**は美容上の問題として大きな関心が寄せられています。メラニンはアミノ酸の一つチロシンを出発点として一連の酵素反応によりメラノサイト(メラニン細胞)において合成されケラチノサイト(角化細胞)へ移送される高分子色素の総称で黒色色素のユウメラニンと黄色色素のフェオメラニンの複合体として存在します。

メラニン合成反応における**律速酵素のチロシナーゼに対する阻害作用あるいは抗酸化作用等によってメラニンの産生が抑制**されることが知られています。



メラニンは重合を受けメラノソームとしてケラチノサイトへ移送

図 1. メラニン色素の産生

2. スクリーニング試験

24 穴プレートに播種培養した、B16 メラノーマ細胞において産生される**メラニン色素を、アルカリに加熱・溶解した後、比色測定する**もので、**色素沈着抑制作用のスクリーニング試験として最も良く用いられる方法**です。

試料を添加して培養した時のメラニン産生抑制作用について、**ホルモン誘導剤(α-MSH)を共存させた場合とさせない場合の 2 条件で測定**し、未処置対照に対する**相対産生率**として評価します。

- 24ウェルプレート
- ↓ ←細胞播種
- 24時間培養
- ↓ ←培地交換 (+被験液)
- 3日間培養
- ↓
- 培地除去・洗浄
- ↓ ←NaOH
- 加熱溶解
- 吸光度測定

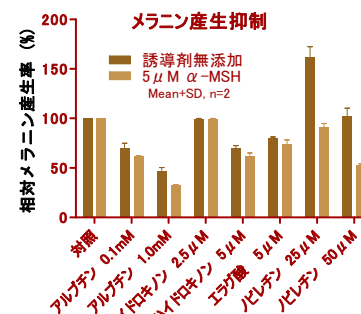


図 2. メラニン産生抑制試験の概要と結果例

3. 検証試験

スクリーニング試験において色素沈着抑止作用を認めた場合、そのメカニズム(作用点)を検証することも重要となります。

メラニン合成経路の律速酵素**チロシナーゼ**やその**関連タンパク質(TRP1, TRP2)**に対する**mRNA 発現量の qRT-PCR による解析**、**チロシナーゼ活性の阻害作用の測定(図 3)**、あるいは**細胞内の抗酸化作用の評価として Cellular Antioxidant Activity (CAA) の測定**も行っています。

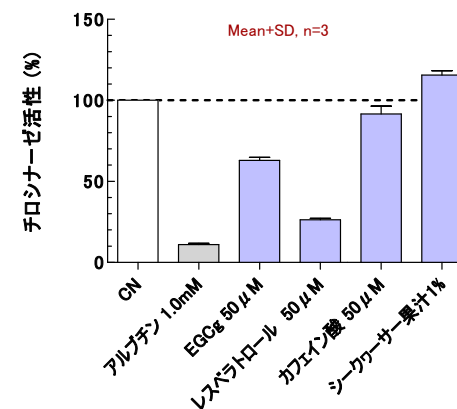


図 3. チロシナーゼ活性の測定

機能性評価に用いる測定系

□□□ 測定装置を中心に □□□

1. 代謝物・酵素活性 Microplate reader

抗酸化能、酵素活性の阻害作用や代謝産物の測定など、様々な用途にマイクロプレートリーダーを用います。比色とケイ光の両測定に対応し、反応から測定までを96穴フォーマットのウェル内で行えるため、簡便な操作性に加え微量の試薬スケールでの測定が可能な機能性評価における最も基本的な装置の一つです(図1)。

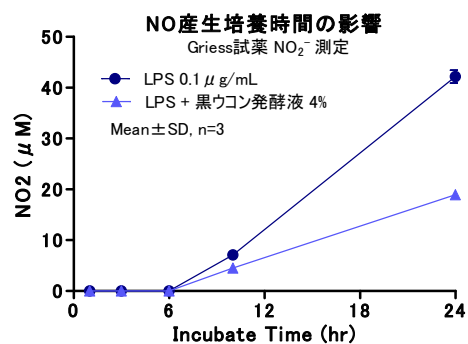


図1. マイクロプレートリーダーを用いたマクロファージ NO₂ 産生量の測定結果

2. mRNA 発現量 Real time PCR

ヒトには約3万の遺伝子が存在がし、これらの遺伝子が協調して生命活動を支えています。タンパク合成に先立ち、DNAからRNAへの発現の過程を追うことにより、より鋭敏な動的情報が得られる場合があります。mRNA発現量の変動をリアルタイムPCRを用いて追跡します(図2)。

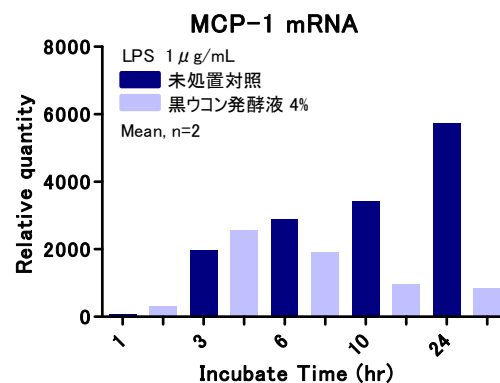


図2. リアルタイムPCRによるマクロファージ MCP-1 mRNA 発現量の解析結果

3. タンパク量 Microbeads array

細胞間の情報伝達物質サイトカインなどのタンパク量の測定は、作用機序の検証などにおいて重要な情報を与える場合があります。タンパク個々の定量にはELISAが汎用されていますが、複数のタンパクの同時測定には、マイクロビーズアレイが有効な手段となります(図3)。

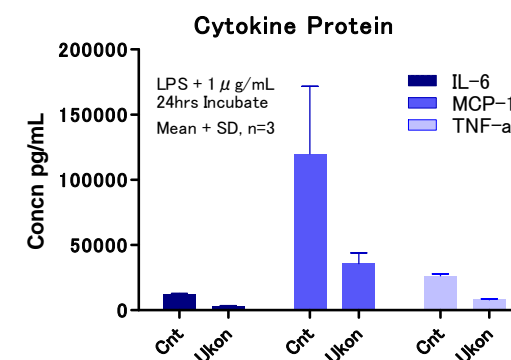


図3. マイクロビーズアレイによるマクロファージ サイトカイン産生量の測定結果

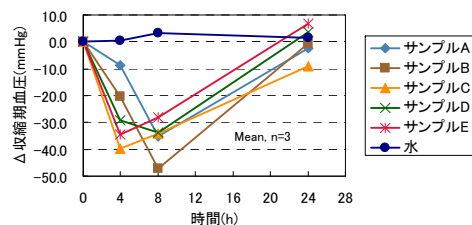
動物を用いた機能性評価試験

□□□ 高血圧・高血糖・高コレステロール抑制試験 □□□

1. 血圧降下作用

高血圧自然発症ラット(SHR ラット)に検体を投与し、投与後の血圧の変化を探索します。血圧は **tail-cuff 法にて収縮期血圧及び拡張期血圧を測定**します。

検体の投与は単回または複数回、投与方法は強制経口投与、混餌による投与など、短期から中長期までニーズに合わせた試験設計が可能です。



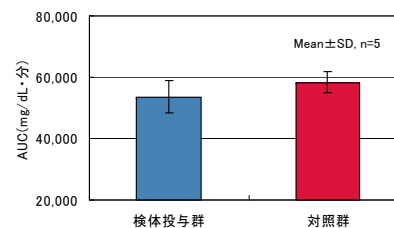
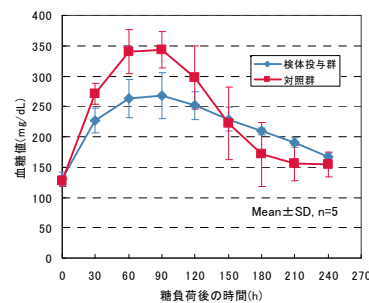
ラット用 tail-cuff 型血圧測定装置



2. 血糖上昇抑制

絶食後、検体及びグルコースを投与し、血糖値を経時的に測定します。**試験群と対照群の投与後の最大血糖値及び AUC(曲線下面積)を比較**します。

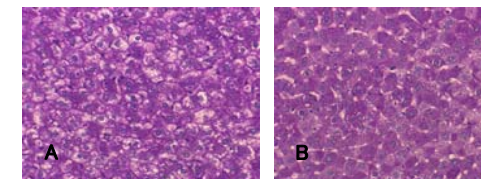
糖尿病モデルなどの病態モデル動物を用いた探索も可能です。



3. コレステロール上昇抑制

高コレステロール食を給餌することにより、ラットを高コレステロール状態にします。**検体を混餌または連続投与し、血中コレステロール量を測定し、対照群と比較して検体のコレステロール上昇抑制作用の有無を調べ**ます。

肝臓の組織標本の観察、肝臓中コレステロール量の測定、ニュートリゲノミクスによるコレステロール代謝酵素の変化を検索して、さらに詳細なメカニズム解析を行うことも可能です。



A: 高コレステロール食で飼育したラットの肝臓組織像, B: 正常肝

黒ウコンの機能性評価を例として

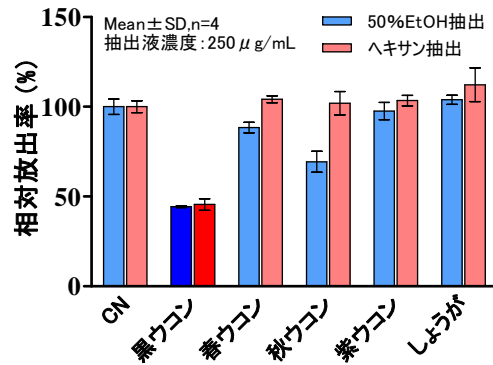


黒ウコンには、脱顆粒抑制作用や抗炎症作用などの機能性が知られています。そこで、黒ウコンに含まれる脱顆粒抑制成分の同定および抗炎症作用を検討した結果を示します。

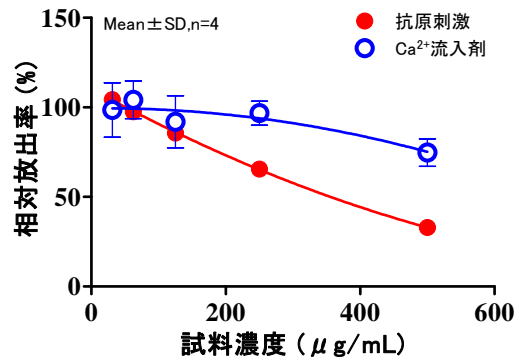
学名 : *Kaempferia parviflora*
 効果報告例 : 脱顆粒抑制作用 (Tewtrakul, S., et al. *J. Ethnopharmacol.*, 109, 535-538 (2007))
 使用細胞株 : ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3

1. 黒ウコンの脱顆粒抑制作用

黒ウコンと各試料の脱顆粒抑制作用

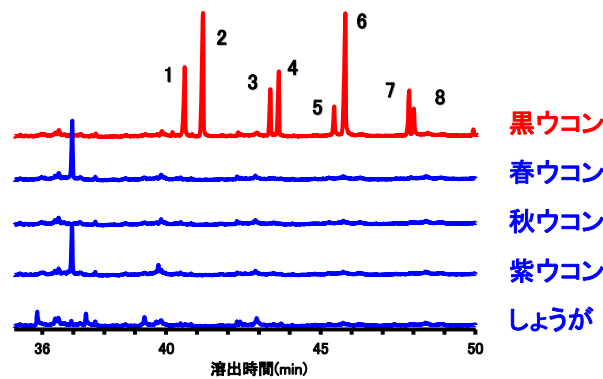


黒ウコンヘキサン抽出液の濃度依存性

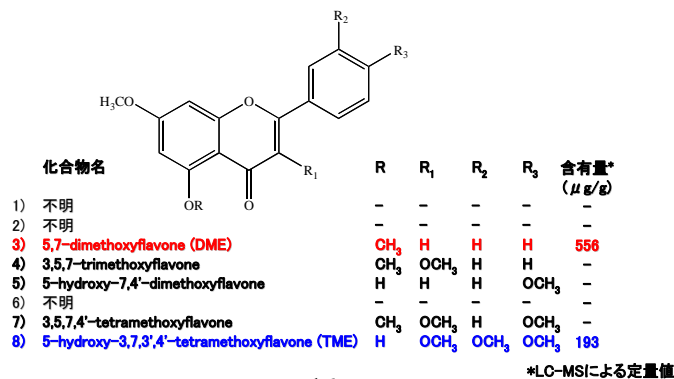


2. 黒ウコンの脱顆粒抑制成分の同定

黒ウコンと各試料ヘキサン抽出液のGC-MS分析結果(TIC)

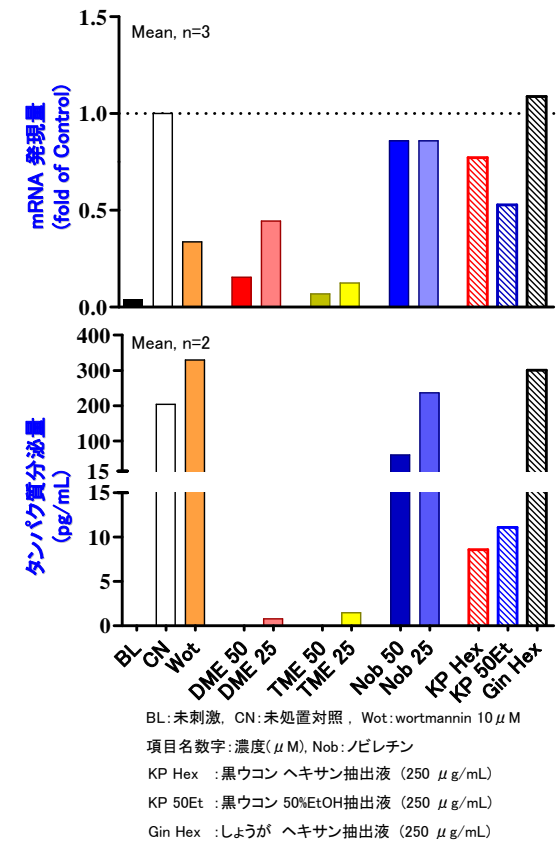


同定されたポリメトキシフラボノイド



3. ポリメトキシフラボノイドの抗炎症作用

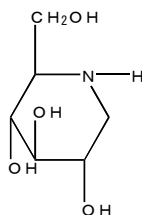
炎症性サイトカインTNF-αに対するmRNA発現およびタンパク質分泌抑制



桑の葉に含まれるデオキシノジリマイシンを例として



桑の葉に含まれるデオキシノジリマイシンには強い糖の吸収抑制作用が知られています。そこで、デオキシノジリマイシン並びに桑の葉茶に応用した結果を示します。



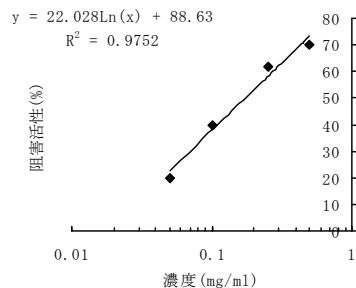
桑の葉中のデオキシノジリマイシン含量 約100mg/100g, LC/MS法

英語名: 1-Deoxynojirimycin 由来: 桑葉(Mulberry)

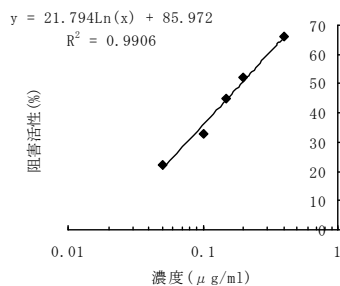
効果報告例: 血糖降下作用, 血糖値抑制, 糖尿病予防, 血糖値上昇抑制), α -グルコシダーゼ阻害効果

1. 小腸凍結乾燥粉末を用いた α -グルコシダーゼ阻害試験結果*

桑の葉: IC50 0.17mg/ml



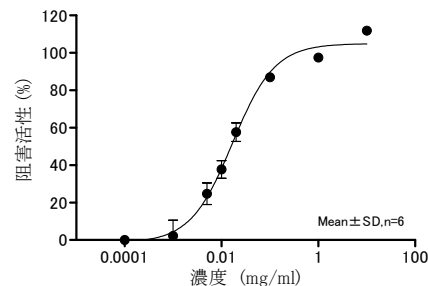
デオキシノジリマイシン: IC50 0.19 μ g/ml



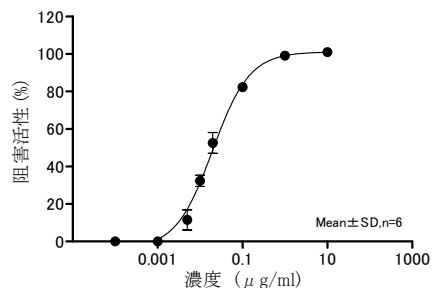
*5mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside を基質として使用

2. Caco-2細胞を用いた α -グルコシダーゼ阻害試験結果**

桑の葉: IC50 0.016mg/mL



デオキシノジリマイシン: IC50 0.016 μ g/mL

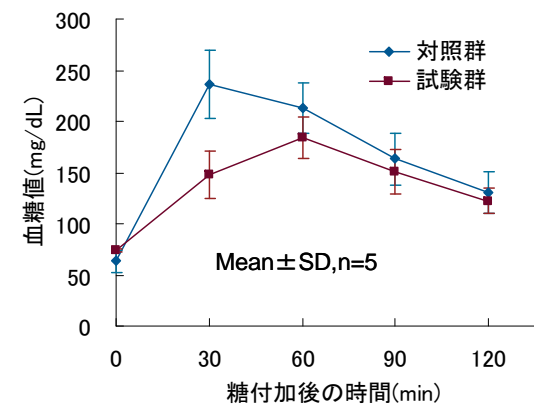


**20mM マルトースを基質として使用

3. 糖負荷したマウスに対する血糖値上昇抑制試験***

桑の葉

血糖値(マウス)



***可溶性デンプンを同時に経口投与した。

機器分析による定量可能成分の一覧

定量分析が可能な成分の一覧表をお示ししました。

(1, 3) (1, 4)- β -グルカン	カテキン類
1-デオキシノジリマイシン	(カテキン)
6-ジンゲロール	(エピカテキン)
p-クマル酸	(ガロカテキン)
β -クリプトキサンチン	(エピガロカテキン)
β -グルカン	(エピガロカテキンガレート)
β -シクロデキストリン	(ガロカテキンガレート)
γ -アミノ酪酸	(エピカテキンガレート)
アウクビン	(カテキンガレート)
アスタキサンチン	(メチル化カテキン)
アストラガリン	ガノデリン酸 A
アピゲニン	カフェイン酸
アリシン	カフェ酸フェネチルエステル
アリルイソチオシアネート	カプサイシノイド(カプサイシン類)
アルギン酸	(カプサイシン)
アルテピリン C	(デヒドロカプサイシン)
アロイン(バルバロイン)	ガラנגイン
アロエエモジン	カルニチン
アロエニン	キシロオリゴ糖 (キシロビオース, キシロトリオース)
アントシアニン(デルフィニジンとして)	ギンコール酸
イソクエルシトリン	クエルシトリン
イソフラキシジン	ククルビタシン
イソマルトオリゴ糖 (イソマルトース, パノース, イソマルトトリオース, イソマルトテトラオース)	(ククルビタシン E)
	(ククルビタシン I)
イソラムネチン	クマリン
ウルソール酸	クメステロール
エモジン	クリシン
エラグ酸	クリソファノール
エリタデニン	クルクミノイド(クルクミン類)
エルゴチオネイン	(クルクミン)
エレウテロサイド E	(デメトキシクルクミン)
オクタコサノール	(ビスデメトキシクルクミン)
オリザノール	グルコサミン, N-アセチルグルコサミン
オレアノール酸	クロロゲン酸
カカオポリフェノール	ケイ皮酸
カタルポール	クリソファノール

クルクミノイド(クルクミン類)	ネオヘスペリジン
(クルクミン)	ノビレチン
(デメトキシクルクミン)	バイカリン
(ビスデメトキシクルクミン)	ハイペリン
グルコサミン, N-アセチルグルコサミン	バニリン
クロロゲン酸	パラチノース
ケイ皮酸	バレレニック酸
ゲニポンド酸	ヒアルロン酸
ケルセチン	ビオカニン A
ゲンチオビオース	ビオプテリン
ケンフェライド	ビテキシン
ケンフェロール	ヒドロキシクエン酸
ケンフェロール 3 ルチノサイド	ピノセンブリン
サイコサポニン	ピペリン
(サイコサポニン a)	フィセチン
(サイコサポニン c)	プエラリン
(サイコサポニン d)	フェルラ酸
サポニンの定性	フォルスコリン
サリシン	フコキサンチン
シアニジン-3-グルコシド	フラクトオリゴ糖 (1-kestose, nystose, フラクトフラノシルニストース)
シネフリン	
ジヒドロカプサイシン	フロリジン
シリピン	ヘスペリジン
シナナムアルデヒド	ペオニフロリン
スコポレチン	ペクチン
セサミン類	ヘスペレチン
(セサミン)	ベルガモッチン
(セサモリン)	ベルゲニン
(セサモール)	ポリフェノール
セロビオース	ホルモノネチン
センノシド A, センノシド B	マンギフェリン
タンゲレチン	ミリセチン
テオプロミン	ムコ多糖
トリゴネリン	ラクチュロース
トレハロース	ラパコール
ナリルチン	リコピン
ナリングニン	リモニン
ナリンジン	ルチン

ルチン	大豆イソフラボン
ルテイン	大豆イソフラボンアグリコン(アグリコン当量)
ルテオリン	イソフラボン類 (個別成分の測定)
レイン	(ダイジン)
レジスタントスターチ	(グリシチン)
レスベラトロール	(ゲニスチン)
ロズマリン酸	(ダイゼイン)
人参サポニン	(グリシテイン)
人参サポニン (個別成分の測定)	(ゲニステイン)
(ジンセノサイド Rb1)	(マロニルダイジン)
(ジンセノサイド Rb2)	(マロニルグリシチン)
(ジンセノサイド Rc)	(マロニルゲニスチン)
(ジンセノサイド Rd)	(アセチルダイジン)
(ジンセノサイド Re)	(アセチルグリシチン)
(ジンセノサイド Rg1)	(アセチルゲニスチン)
総アントシアニン	大豆オリゴ糖(ラフィノース, スタキオース)
総フェルラ酸	大豆サポニン
総フラクタン	乳果オリゴ糖 (ラクトスクロース)