

抗糖化機能性食品の基礎からヒト臨床研究への橋渡し： クロモジ

米井 嘉一^{1*}・伊賀瀬道也²・八木 雅之¹・高部 稚子¹

はじめに

筆者らの研究室は2014年度から「戦略的イノベーション創造プログラム (SIP)」に加わり、運動器の障害（ロコモティブシンドローム）に糖化ストレスの関与、新規抗糖化機能性食品について研究を行っている。ここでは、食品の新規機能として糖化ストレス軽減させる抗糖化作用に注目し、協力企業である養命酒製造株式会社（創業1602年）とともに研究を進めてきた。500種以上の野菜・果実・ハーブよりスクリーニングをした結果、日本固有の低木であるクロモジを主たる研究対象に選んだ。本稿ではクロモジに関する基礎研究からヒト臨床研究に至る一連の流れについて紹介する。

糖化ストレスとは

糖化ストレスとは、還元糖、脂質、アルコールに由来するさまざまなアルデヒド（^{ちやう}醛）が生体内で過剰に生成される状態を現わす。これらのアルデヒドはタンパク質など生体内物質と反応してカルボニル修飾蛋白や糖化最終生成物（advanced glycation end products : AGEs）を生成、AGEs/RAGE (receptor for AGEs) シグナルを刺激してさまざまな変化が生じ、老化に伴う退行性変化や認知症¹⁾をはじめとする疾病の病因となる^{2,3)}。

食品中における糖化反応と生体内における糖化反応の違いは、生体内では予想よりきわめて速い速度で糖化反応が進むことにある。狭義には、グルコースのアルデヒド基がタンパク質のリシン残基とイミンを作って結合し、アマドリ転移を起こした場合がメイラード反応（狭義の糖化反応）である。カルボニルタンパク質は、アミノ酸側鎖の酸化的分解や脂質過酸化反応によって生じるアルデヒド化合物の付加によって生成される。アルデヒド基を起因とする糖化反応もカルボニル化反応も、生体内では両者は同時に生じている。ここでは両者をひっくるめて糖化ストレスと呼ぶことにするが、実質的には醛化ストレスと言えよう。

糖化ストレスを引き起こす原因には①血糖スパイク、②脂質異常症（中性脂肪高値、LDLコレステロール高

値）、③過剰な飲酒がある。この三つに共通しているのがアルデヒドである。空腹時血糖の異常はなくても、食後に140 mg/dL以上の高血糖になる人は少なくない。このような食後高血糖は血糖スパイクと呼ばれ、動脈硬化の進行が早く、身体にさまざまな障害を惹起することがわかってきた。血糖スパイクは『アルデヒドスパーク』を引き起こす。連鎖反応によって多種のアルデヒドが同時に生成される（図1）⁴⁾。生体内ではグリセルアルデヒド（glyceraldehyde : GA）、グリコールアルデヒド（glycolaldehyde）、アセトアルデヒド（acetaldehyde : AA）、3-デオキシグルコソン（3-deoxyglucosone : 3-DG）、グリオキサール（glyoxal : GO）、メチルグリオキサール（methylglyoxal : MGO）、マロンジアルデヒド（malondialdehyde）が代表的なアルデヒドとして作用する。皮膚では糖化ストレスの要因アルデヒドとしてアクロレイン（acrolein）がもっとも重要な役割を果たしている。

アルデヒド基（-CHO）は反応性に富むため、反応をつかさどる酵素が特に存在しなくても反応は進む。反応の進行は基質濃度、温度、時間によって規定される。

グルコースは通常は環状構造（cyclic form）を示す。グルコースの一部が開環すると、直鎖構造（open-chain form）を呈しアルデヒド基（-CHO）が露出して、有害なアルデヒド作用を発揮する。血糖スパイクで問題となる直鎖型グルコースが生じるグルコースの開環率は0.002%と小さいため、通常の血糖範囲（90～140 mg/

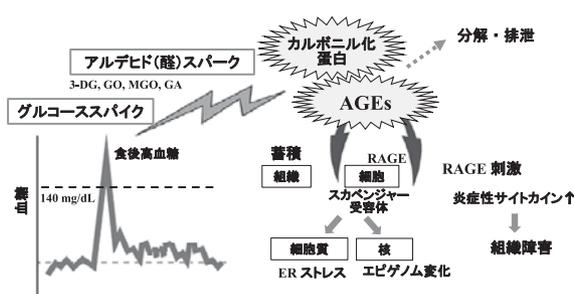


図1. 糖化ストレスによる組織障害：グルコーススパイク・アルデヒドスパークからAGEs生成へ

*著者紹介 同志社大学大学院生命医科学研究科 E-mail: yyonei@mail.doshisha.ac.jp

¹同志社大学大学院生命医科学研究科、²愛媛大学医学部附属病院抗加齢・予防医療センター
生物工学 第97巻 第11号 (2019)

dL)では、糖毒性と呼ばれる有害作用の頻度は低くなる。フルクトースの開環率は0.06%でグルコースの300倍もあることから、生体内での糖化反応性および毒性は強い。筆者らは「血糖スパイクは、直鎖型単糖類の露出アルデヒドが蛋白表面の糖鎖や血液・組織中に遊離した糖質と連鎖反応を起こして多種のアルデヒドが生成する」と仮説を立てている。

抗糖化機能

糖化ストレスを軽減する機序はいくつかの段階に分けられる。第一は血糖スパイクおよびアルデヒドスパイクの抑制、第二はAGEs生成反応の抑制、第三はAGEs分解の促進、第四はAGEs/RAGEシグナルの制御⁵⁾である。

第一段階の機序には α グルコシダーゼ阻害作用が含まれる。第二段階はAGEs指標として蛍光性AGEs、ペントシンジン、カルボキシメチルリジン(CML)が、陽性対照としてアミノグアニジン(aminoguanidine: AG)を用いて評価する。

第三段階ではAGEs架橋切断作用、酸化蛋白分解酵素(oxidized protein hydrolase: OPH)活性の増強作用を評価する。AGEs架橋切断作用は、AGEs架橋である α ジケトン構造(C-C結合)を有する1-phenyl-1,2-propanedione(PPD)を用いて、架橋切断によって生成する安息香酸を逆相HPLCにより定量評価する⁶⁾。陽性対照としてN-phenacylthiazolium bromide(PTB)を用いる。一方、OPHは蛋白のN末端アシル化アミノ酸を遊離するセリンプロテアーゼの一種で、AGEs分解活性を有する。OPH活性増強作用は、OPHと反応基質N-acetyl-L-alanine p-nitro-anilide(AAPA)を反応させ、反応産物を比色法により測定し評価する⁷⁾。

生体内ではこれらの機序がすべて起こりうること、機能性成分の吸収率や腸内細菌叢への影響も異なるため、機能性成分の総合的抗糖化作用はヒト臨床試験を実施して初めて明らかになる。

基礎研究

In vitro 実験 現状におけるクロモジ抽出物の抗糖

表1. AGEs・中間体アルデヒド生成抑制

IC ₅₀ (mg/mL)	クロモジ	AG
蛍光性AGEs	0.127	0.111
3DG	0.177	0.257
GO	0.145	0.108
MGO	0.262	0.409
CML	0.064	0.261

IC₅₀: 50%反応阻止濃度

化作用を以下に示す。

〈第一段階〉グルコーススパイク抑制については現在検証中である。

〈第二段階〉AGEs生成抑制についてはクロモジ抽出物が幅広くAGEsおよび中間体アルデヒド生成を抑制することがわかる(表1)⁸⁾。陽性対照AGに比較しても同等以上で、特にMGOとCMLの生成抑制作用が強い。

また、強い抗酸化活性を有し、AGEs生成反応を緩和する。クロモジ抽出物の抗酸化能はDPPH法12,900 mgTE/100 g, ORAC法376,000 mgTE/100 g, 電子スピン共法(ESR): スーパーオキシド除去能37,800 unit SOD/g, ヒドロキシラジカル除去能53,400 μ mol DMSO/g, 一重項酸素除去能218,000 μ mol His/gであった⁸⁾。このクロモジ精油の抗酸化能は、ヒノキ葉精油、ヒノキ枝葉精油、スギ葉精油とほぼ同程度である⁹⁾。

〈第三段階〉AGEs架橋切断作用とOPH活性増強作用はAGEs分解に関わる機能である。AGEs架橋切断作用は、クロモジ抽出物が陽性対照PTBと遜色のない活性を有する(表2)⁸⁾。クロモジ抽出物(5 mg/mL)のOPH活性増強率(146.3 \pm 1.1%)はすでに高いレベルにある。

これらの多岐にわたる機序からの機能性は糖化ストレス起因性のさまざまな疾病予防に貢献できると期待される。

免疫機能改善作用: クロモジ抽出物が免疫機能の改善および抗ウイルス作用を有することが確認されている¹⁰⁾。

糖尿病モデル動物における合併症予防効果 ストレプトゾトシン起因性1型糖尿病ラットに対してクロモジ抽出物を8週間投与し、糖化ストレス指標に及ぼす効果を検討した¹¹⁾。

糖尿病を発症すると、AGEs/RAGEシグナルが活発化し炎症性サイトカイン産生が刺激され腎組織中腫瘍壊死因子- α (TNF- α)・IL-6が増加、腎機能が障害されクレアチニンクリアランス(CCr)は低下する(図2)。クロモジ抽出物投与によりTNF- α , IL-6, CCrの変動が有意に改善した。糸球体基底膜蛋白の糖化ストレス障害

表2. AGEs分解促進

	濃度	架橋切断率(%)
クロモジ (mg/mL)	0.008	2.7 \pm 0.03
	0.04	2.9 \pm 0.02
	0.2	3.7 \pm 0.01
	1.0	8.1 \pm 0.04
	5.0	23.1 \pm 0.17
PTB (mmol/L)	5.0	23.9 \pm 0.10

PTB: N-phenacylthiazolium bromide, 分子量284.17

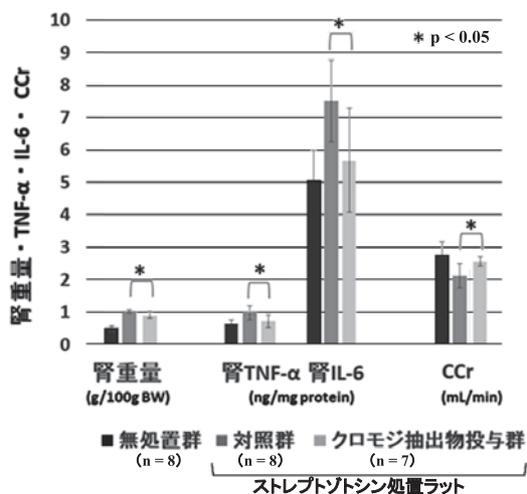


図2. クロモジ抽出物による糖尿病腎症進展予防

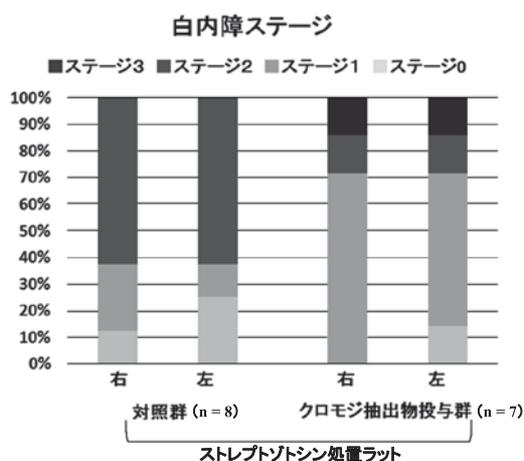


図3. クロモジ抽出物による糖尿病性白内障進展予防

が緩和された結果と考えている。白内障については、水晶体クリスタリン蛋白の糖化障害がクロモジ抽出物により緩和され、白内障ステージの進展が予防された(図3)。

臨床研究

臨床研究への橋渡し前に必要な手順として安全性の確認手続きがある。細菌を用いた復帰突然変異試験にて異常なし、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験にて染色体構造異常の誘発なし、ラット骨髄幼若赤血球に対する小核誘発作用および骨髄細胞への増殖抑制作用にて染色体異常の誘発なし・骨髄抑制なし、ラット13週間反復経口投与毒性試験(120,600および3,000 mg/kg/日)にて異常なしであることを確認した。これで初めてヒトへの投与が可能となり、倫理審査の承認の後、臨床試験が開始された。



図4. SIP研究成果産物:クロモジ飴(インフルエンザ感染予防)

臨床試験においても安全性評価は重要である。「クロモジエキス配合食品摂取による過剰摂取安全性試験」では12名の健常者を対象に想定5倍量(1000 mg/日)を4週間摂取していただき、試験品に起因する有害事象がないことを確認した。

クロモジ抽出物に免疫増強作用、抗ウイルス作用が確認されたため¹⁰⁾、クロモジ抽出物含有飴を用いたインフルエンザに対する予防効果を検証する臨床試験を行った¹²⁾。この試験は二重盲検ランダム化比較試験で行った。具体的にはすでにインフルエンザ予防ワクチンの接種を受けた135名の健常者(大学病院の看護スタッフ)を二群に分け、一方にはクロモジエキス入りのど飴、他方にはこれに含まないプラセボのど飴を12週間、毎食後に1個摂取させた。その結果67名のクロモジエキス入りのど飴摂取群からはインフルエンザ感染者が2名であったのに対し68名のプラセボ群からは9名がインフルエンザを発症し両群のインフルエンザ発症率に統計学的な有意差を認め、同時に安全性も確認された。この結果を踏まえ、クロモジエキス含有のど飴が製品化され上市された(図4)。

今後の展望

クロモジは日本固有の植物であり付加価値を賦与することによって世界レベルで競争力の強い製品に発展する可能性を秘めている。クロモジからはすでに生薬「烏樟(うしょう)」をはじめ、楊枝や箸、クロモジ茶、アロマセラピー用精油、クロモジ飴が上市されている。さらに研究を続け、クロモジに新規機能性を賦与し、魅力ある「クロモジ」製品を生み出すお手伝いをしたいと考えている。

2018年に農林水産省「『知』の集積と活用」の場」産学官連携協議会に「水質を改善することで抗糖化物質の含

量増加を目指した機能性農作物の栽培と循環型栽培方法の研究開発」プラットフォームを申請した。核となる技術は、特殊加工陶器片がシアノバクテリアの持続的増殖を促し、光合成により産生する酸素により、殺菌、消臭、土壌改善が示されたからである。現在のクロモジの特性（スベック）については本稿で示したが、特殊加工陶器片による土壌改善によってハイスベッククロモジが誕生するか否か検証してみたい。

クロモジの産地は北海道南端から本州・四国・九州まで広く自生している。筆者らの主導により全国規模の産業に発展する可能性があり、林業の活性化に大いに貢献できるだろう。

謝 辞

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議のSIP（戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号14533567）「次世代農林水産業創造技術」（農研機構生研センター委託研究）より支援を受け実施された。

利益相反申告

本研究を実施するにあたりSIP研究協力企業として養命酒製造株式会社より研究支援を受けた。

文 献

- 1) Igase, M. *et al.*: *Glycative Stress Res.*, **5**, 45 (2018).
- 2) Nagai, R. *et al.*: *Anti-Aging Med.*, **7**, 112 (2010).
- 3) Ichihashi, M. *et al.*: *Anti-Aging Med.*, **8**, 23 (2011).
- 4) Yonei, Y. *et al.*: *Prime: Int. J. Aesthet. & Anti-Ageing Med.*, **8**, 19 (2018).
- 5) Sato, K. *et al.*: *Glycative Stress Res.*, **2**, 191 (2015).
- 6) Yagi, M. *et al.*: *Glycative Stress Res.*, **2**, 58 (2015).
- 7) Yagi, M. *et al.*: *Glycative Stress Res.*, **4**, 184 (2017).
- 8) Yagi, M. *et al.*: *Glycative Stress Res.*, **4**, 329 (2017).
- 9) Tanaka, H. *et al.*: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3747 (1984).
- 10) 養命酒製造株式会社:特開2018-95594 (P2018-95594A) (2018/6/21).
- 11) Yagi, M. *et al.*: *Glycative Stress Res.*, **4**, 317 (2017).
- 12) Igase, M. *et al.*: *Glycative Stress Res.*, **6**, 68 (2019).