



Title	北海道産アスパラガス未利用資源の有効利用に関する研究
Author(s)	伊藤, 知洋
Citation	北海道大学. 博士(農学) 乙第7198号
Issue Date	2024-03-25
DOI	10.14943/doctoral.r7198
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/91868">http://hdl.handle.net/2115/91868</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	ITO_Tomohiro.pdf



[Instructions for use](#)

# 北海道産アスパラガス未利用資源の有効利用に関する研究

北海道大学大学院農学院

伊藤 知洋



## 目次

本博士論文の概要	1
総合緒論	3
第1節 熱ショックタンパク質 (heat shock protein : HSP)	3
第2節 HSP70 発現メカニズム	4
第3節 HSP70 誘導物質	6
第4節 温熱による HSP の誘導	10
第5節 ストレス	11
第6節 ストレス関連指標	13
第7節 抗ストレス剤	16
第8節 睡眠	17
第9節 本研究の目的	18
第1章 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の探索及び製造方法の確立	19
第1節 背景及び目的	19
第2節 結果	20
2-1 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の探索	20
2-2 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の製造方法の確立	21
2-3 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性を有する物質の探索	26
2-4 化合物 2 の <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性	35
第3節 考察	37
3-1 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の探索	37
3-2 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の製造方法の確立	37
3-3 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性を有する物質の探索	38
3-4 化合物 2 の <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性	39
第4節 実験部	40
4-1 一般事項	40
4-2 収集素材	40
4-3 細胞及び培地	41
4-4 道産農産物の熱水抽出物を用いた <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性試験 (半定量 PCR)	41
4-5 HL-60 細胞に対する細胞増殖抑制確認試験	43
4-6 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性試験 (リアルタイム PCR)	43
4-7 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の製造方法の確立	45
4-8 <i>Hsp70</i> mRNA の発現量の上昇活性を有する物質の探索	47

<b>第2章</b>	<b><i>In vitro</i> 及び <i>in vivo</i> における ETAS (イータス: enzyme treated asparagus extract) の HSP70 発現及びストレス指標に対する効果</b>	<b>55</b>
第1節	背景及び目的	55
第2節	結果	56
2-1	HSP70 mRNA 及びタンパク質発現	56
2-2	ストレス指標に対する効果	58
2-3	臓器別の HSP70 タンパク質発現	60
第3節	考察	61
第4節	実験部	63
4-1	実験動物	63
4-2	MTT アッセイ	63
4-3	<i>Hsp70</i> mRNA 発現量の評価 (半定量 PCR)	63
4-4	HSP70 タンパク質発現量の評価 (ELISA)	64
4-5	<i>In vivo</i> における HSP70 発現及びストレス指標に対する効果	64
4-6	統計解析	65
<b>第3章</b>	<b>健常成人における ETAS の <i>Hsp70</i> mRNA 発現、ストレス指標及び睡眠に対する効果</b>	<b>66</b>
第1節	背景及び目的	66
第2節	結果	68
2-1	ETAS の安全性評価	68
2-2	ヒトにおける血液細胞の <i>Hsp70</i> mRNA 発現 (非盲検試験) (試験 1)	84
2-3	ヒトにおける血液細胞の <i>Hsp70</i> mRNA 発現及び自律神経系 (ANS) に対する ETAS の効果 (無作為化二重盲検プラセボ対照試験) (試験 2)	85
2-4	ヒトにおけるストレス指標及び睡眠に対する ETAS の効果 (無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験) (試験 3)	88
第3節	考察	96
3-1	ETAS の安全性評価	96
3-2	ヒトにおける血液細胞の <i>Hsp70</i> mRNA 発現 (非盲検試験) (試験 1)	99
3-3	ヒトにおける血液細胞の <i>Hsp70</i> mRNA 発現及び自律神経系 (ANS) に対する ETAS の効果 (無作為化二重盲検プラセボ対照試験) (試験 2)	99
3-4	ヒトにおけるストレス指標及び睡眠に対する ETAS の効果 (無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験) (試験 3)	101

第4節 実験部	103
4-1 ETAS の安全性評価	103
4-2 ヒトにおける血液細胞の <i>Hsp70</i> mRNA 発現 (非盲検試験) (試験 1)	111
4-3 ヒトにおける血液細胞の <i>Hsp70</i> mRNA 発現及び自律神経系 (ANS) に対する ETAS の効果 (無作為化二重盲検プラセボ対照試験) (試験 2)	113
4-4 ヒトにおけるストレス指標及び睡眠に対する ETAS の効果 (無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験) (試験 3)	117
総括	121
参考文献	
化合物チャート集	
アンケート用紙	
謝辞	

## 略号表

AcOH	acetic acid
ACTH	adrenocorticotrophic hormone
ANOVA	analysis of variance
ANS	autonomic nervous system
B2M	$\beta$ 2-microglobulin
cDNA	complementary deoxyribo nucleic acid
CgA	chromogranin A
CMI	cornell medical index
CORT	cortisol
COSY	correrated spectroscopy
COX-2	cyclooxygenase-2
CRH	corticotropin-releasing hormone
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxide
EI	electron ionization
ETAS	enzyme treated asparagus extract
EtOAc	ethyl acetate
FBS	fetal bovine serum
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid
GGA	geranylgeranylacetone
HF	high frequency
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HPLC	high performance liquid chromatography
HRV	heart rate variability
HSE	heat shock element
HSF	heat shock factor
HSP	heat shock protein
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMF	5-hydroxymethyl-2-furfural
HR-MS	high resolution mass spectrometry
LF	low frequency
LPO	lipid peroxides
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol

MRM	multiple reaction monitoring
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NMR	nuclear magnetic resonance
NOAEL	no-observed-adverse-effect level
NOEL	no-observed-effect level
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PGE2	prostaglandin E2
PLSD	protected least significance difference
POMS	profile of mood state
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell park memorial institute medium
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SAM	sympathetic-adrenal-medullary axis
SCL	stress check list
SCL-90-R	symptom checklist-90-revised
SDNN	standard deviation of all NN interval
TBA	thiobarbituric acid
TG	triglyceride
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-propane-1,3-diol
UPLC	ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolet

注) Figure、Table 及び Scheme は各章における通し番号として表記した。  
参考文献は巻末にまとめて記載した。



## 本博士論文の概要

熱ショックタンパク質 (heat shock protein : HSP) は生物がストレスを受けた場合に細胞内に誘導されるタンパク質であり、熱及び細菌感染などの様々なストレス条件に曝された際に発現が上昇して細胞を保護する。本博士論文においては、HSP の中でも盛んに研究が行われている分子量 7 万程度の HSP70 に着目し、その発現を増強させる機能性食品の開発を目的とした研究を行った。

### 第1章 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の探索及び製造方法の確立

北海道産の農水産物を収集し、熱水抽出物を作製した。得られた抽出物を用いてヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) における *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を半定量 PCR により評価した。その結果、アスパラガス (*Asparagus officinalis*) 若茎熱水抽出物に最も高い活性が認められ、活性物質探索の結果、新規化合物である (S)-(2-formylfuran-5-yl)methyl 5-oxopyrrolidine-2-carboxylate を発見するに至った。また、原料としてのアスパラガスは、流通のために切り落とされる下端部が利用できることを明らかにした。さらに、酵素処理を行うことにより、この未利用資源を *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する素材として工業レベルで製造可能にした。

## 第2章 *In vitro*及び*in vivo*における酵素処理アスパラガス熱水抽出物(ETAS)の *Hsp70* 発現量及びストレス指標に対する効果

第1章で調製した酵素処理アスパラガス熱水抽出物(ETAS)について、*in vitro*で *Hsp70* mRNA 及び HSP70 タンパク質発現量を評価し、さらに *in vivo*でマウス断眠モデルを用いて抗ストレス効果を検討した。その結果、*in vitro*で ETAS は濃度依存的に *Hsp70* mRNA 及び HSP70 タンパク質の発現量を上昇させた。また、*in vivo*ではストレス指標であるコルチコステロン濃度を減少させた。

## 第3章 健常成人における ETAS の *Hsp70* mRNA 発現、ストレス指標及び睡眠に対する効果

ETAS の安全性を検討するため、Ames 試験、マウス骨髄小核試験、ラット急性及び亜慢性経口投与毒性試験を実施した。さらに、3つのヒト介入試験をデザインし、ETAS の血液細胞の *Hsp70* 発現、自律神経、ストレス指標及び睡眠への影響を評価した。

## 総合緒論

### 第1節 熱ショックタンパク質 (heat shock protein : HSP)

熱ショックタンパク質 (heat shock protein : HSP) は、ストレスタンパクとも呼ばれ、分子量が約数万から 15 万程度のタンパク質であり、分子量によりいくつかのサブグループに分類されている (HSP10、HSP27、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90、HSP110 など)。近年、HSP ファミリーに新しい命名法が用いられるようになったが (Kampinga *et al.*, 2009)、本論文では、より一般的な分子量に基づく命名を使用する。HSP は生物が物理的、化学的、生理的あるいは精神的ストレスを受けた場合に細胞内に誘導されるタンパク質の一群である (Kregel *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2010)。具体的には、熱、細菌感染、炎症、活性酸素、紫外線、飢餓及び低酸素状態などの様々なストレス条件に曝された際に発現が上昇して細胞を保護する (Singh *et al.*, 2013; Lennikov *et al.*, 2013; Feder *et al.*, 1999)。さらに、タンパク質のフォールディング制御や異常タンパク質 (狂牛病プリオンタンパク質、アルツハイマー病アミロイド β タンパク質など) の凝集抑制といった分子シャペロンとしての機能も有する (Wilhelmus *et al.*, 2007; Soo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012; Murshid *et al.*, 2013; Ellis, 2007)。HSP の中でも、特に HSP70 については盛んに研究がなされており、ヒトの *Hsp70* 遺伝子ファミリーは、HSP70、HSP72、HSP73 などのタンパク質をコードする少なくとも 11 の遺伝子が存在する (Tavaria *et al.*, 1996)。これまでに HSP70 は皮膚、消化管、肝臓や腎臓などの多くの組織に恒常的に発現していることが明らかになっている (Chang *et al.*, 2007; Senf *et al.*, 2008; Flohé *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Beck *et al.*, 2000; Tsukimi *et al.*, 2001)。最近、HSP70 はアポトーシス抑制効果 (Yoshihisa *et al.*, 2012; Ueng *et al.*, 2013; Wu

*et al.*, 2013) や抗炎症活性 (Huang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013) を示すことが報告され、これらは多様なストレスからの細胞保護作用に関与している (Hirata *et al.*, 2009; Nishida *et al.*, 2010)。

## 第2節 HSP70 発現メカニズム

真核細胞 *Hsp* 遺伝子の 5'上流のプロモーター領域には熱ショックエレメント (heat shock element: HSE) と呼ばれる共通の塩基配列が存在する。この HSE に特異的な転写因子 (heat shock factor: HSF) が結合することにより *Hsp* 遺伝子の転写が開始される (Fig. 1, Morimoto, 1993; Maugeri *et al.*, 2010; Silver *et al.*, 2012; Westerheide *et al.*, 2012)。通常、HSF は単量体として細胞質に存在し、HSP90、HSP70 や HSP40 などと結合して不活性な状態にある。そこに、熱などのストレスが加わると、細胞内のタンパク質が変性し、HSP70 などとはそれに結合する。HSP70 からはずれた HSF は三量体となって活性化状態となり (Baler *et al.*, 1993; Westwood, 1993)、核内に移行して HSE に結合する (Alastalo *et al.*, 2003; Jolly *et al.*, 2002; Sarge *et al.*, 1993)。このようにして *Hsp* 遺伝子の転写が促進される。熱ショック後に細胞内に HSP (特に HSP70) が増加すると、変性したタンパク質は修復され、HSF に再び HSP70 が結合して不活性化する。その結果 *Hsp* 遺伝子の転写が抑制される。このようにして一種のネガティブフィードバック機構によって HSP の発現が制御されている。さらに、細胞内に変性したタンパク質を注入するだけで HSP が合成されてくることから、変性したタンパク質が熱ショック応答の引きがねになっていると考えられている。第1節において、HSP は様々なストレスで誘導されてくることを述べたが、これらのストレスはいずれもタンパク質の構造を変化 (変性) させるものであり、タンパク質毒性 (proteotoxicity) をもっている。また、それら

のストレスは細胞内で不安定なタンパク質が増加するような生理的条件でもある。なお、*Hsp* 遺伝子のプロモーター領域には HSF 以外の転写因子が結合する塩基配列が存在し、正常温度での HSP の発現を制御している (Jordan *et al.*, 2012)。

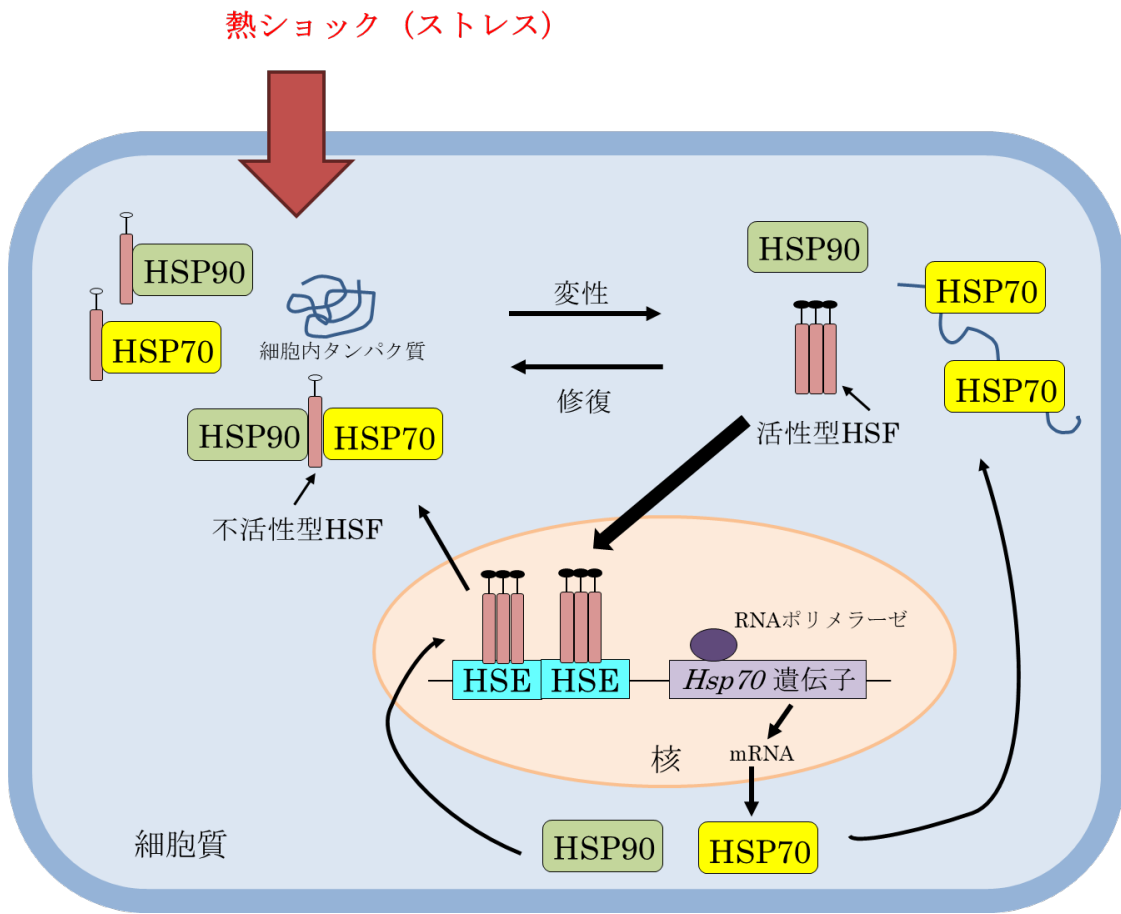


Fig. 1. 熱ショックによる HSP70 誘導メカニズム (Silver *et al.*, 2012 を改変)

### 第3節 HSP70 誘導物質

HSP70 が細胞保護作用や分子シャペロンとしての機能を有することから、無毒性で HSP70 を誘導する物質は、ストレス性潰瘍、虚血再灌流による障害、タンパク質の折りたたみ異常により発症する疾患（神経変性疾患）などの予防や治療に役立つものと期待される (Rokutan *et al.*, 1998; Ohtsuka *et al.*, 2005; Soti *et al.*, 2005; Westerheide and Morimoto, 2005)。これまでに、HSP70 を誘導する物質としてゲラニルゲラニルアセトン (GGA)、レバミピド、カルベノキソロンなどが知られており、天然物としてはシャクヤク (*Paeonia lactiflora*) の主成分であるペオニフロリンが報告されている (Yan *et al.*, 2004) (Fig. 2)。

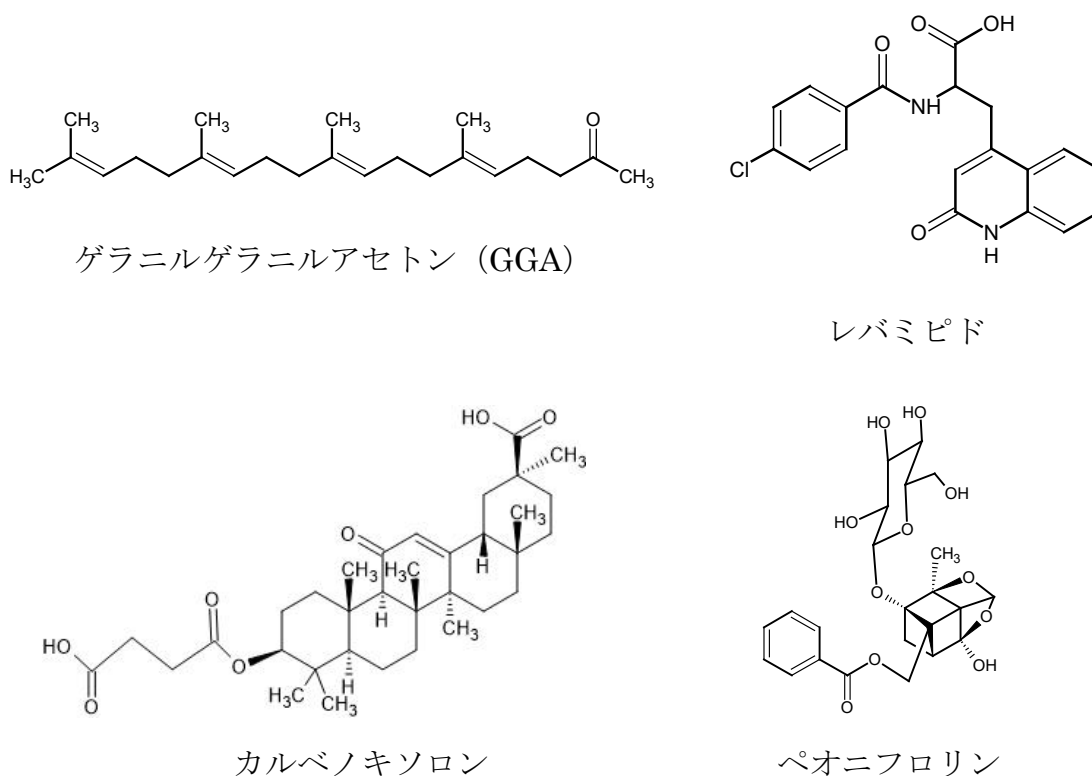


Fig. 2. GGA、レバミピド、カルベノキソロン及びペオニフロリンの化学構造

### 3-1 ゲラニルゲラニルアセトン (GGA)

GGAは胃炎・胃潰瘍治療剤として知られるセルベックス(エーザイ株式会社)の主成分であり、非環状イソプレノイド化合物である。GGAは薬剤を用いて胃粘膜にHSPの誘導効果を確認した初めての医薬品であり(Hirakawa *et al.*, 1996)、HSPと胃粘膜障害軽減効果のメカニズムなどについて研究されている。胃粘膜細胞に対しては、GGAがHSP70のC末端に結合することでそのシャペロン活性を不活性化し、その結果、HSF1を活性化させて、HSP70、HSP90及びHSP60を誘導することが報告されている(Yanaka *et al.*, 2007; Otaka *et al.*, 2007)。また、GGAはアスピリンやインドメタシンに代表される非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)による胃粘膜障害を抑制することが知られている(Ushijima *et al.*, 2005)。さらに胃粘膜細胞だけではなく、脳、心臓、肝臓、小腸、網膜など様々な臓器でHSPの誘導効果が確認されている(Katsuno *et al.*, 2005; Ooie *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2005; Ohkawara *et al.*, 2006; Ishii *et al.*, 2003)。このことは、GGAが胃以外の臓器におけるいくつかの疾患(例えば、虚血再灌流障害、外傷、炎症、感染、ストレス潰瘍及び臓器移植など)に対しても治療や予防の可能性を持つことを示唆している(Rokutan *et al.*, 1998)。また、ハンチントン舞踏病などに代表されるポリグルタミン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患に対しても、GGAはHSP70誘導作用によって、タンパク質のミスフォールディングとそれに伴った凝集体の形成を抑制し、症状を発生遅延、改善するとの報告がある(Katsuno *et al.*, 2005)。

### 3-2 レバミピド

レバミピドは大塚製薬株式会社で合成された新規化合物であり、1990年にムコスタ錠（大塚製薬株式会社）として発売されている。胃粘膜防御因子を増強する胃炎・胃潰瘍治療剤であり、ラット胃粘膜細胞（RGM-1細胞）においてHSP70を誘導し、活性酸素や軽度の熱ショックによる細胞死を抑制することが知られている（Hahm *et al.*, 1997; Tsukimi *et al.*, 2002）。また、レバミピドはシクロオキシゲナーゼ-2（cyclooxygenase-2: COX-2）の発現を誘導し、プロスタグランジン E2（prostaglandin E2: PGE2）レベルを増大させることでCOX-2依存的に胃粘膜防御を高めることが示されている（Sun *et al.*, 2000）。レバミピドは胃粘膜障害に対して、ラジカル産生抑制作用、好中球活性化抑制作用（Arakawa *et al.*, 1998）、ヘリコバクターピロリ（*Helicobacter pylori*）によるピロリ菌感染症に対する治療効果を持っている（Nebiki *et al.*, 1998）。さらに、レバミピドは胃粘膜だけではなく、結膜と角膜を被覆している涙液中のムチンを増加させるという全く新しい機序を持つ（Urashima *et al.*, 2004）。そのため、ドライアイの治療に有効であり、点眼剤としても利用されている。

### 3-3 カルベノキシロン

カルベノキシロンは生薬であるカンゾウ（*Glycyrrhiza uralensis* 又は *G. glabra*）成分中のグリチルリチンの加水分解物であるグリチルレチン酸及びその誘導體である（柴田ら, 2007）。カンゾウの抽出物及びその成分は、鎮痛鎮痙作用、鎮咳作用、抗消化性潰瘍作用、胆汁排泄促進作用、肝保護作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、ステロイドホルモン様作用及び抗変異原性作用など様々な薬理作用を有する（Chandler, 1985）。カルベノキシロンはPGE2量を増



加させ (Franco *et al.*, 1993; Rask-Madsen *et al.*, 1983)、また、胃粘液の分泌を増加させることによって 4°C 条件で誘導される低温ストレスによる胃潰瘍の発症を防ぐことが知られている (Koo *et al.*, 1986)。これまでの研究では HeLa 細胞において、カルベノキソロン処理により HSP70 のみが誘導され、HSP90 や HSP40 は誘導されないという報告があったが (Nagayama *et al.*, 2001)、その後、同じく HeLa 細胞に対してカルベノキソロン処理において HSP70 だけではなく、HSP40 や HSP27 も顕著に誘導され、また、その誘導メカニズムは HSF1 の HSE 結合によることが報告された (Kawashima *et al.*, 2009)。また、主成分のひとつであるグリチルリチン自体も HSP 誘導補助剤である (Yan *et al.*, 2004)。

#### 3-4 ペオニフロリン

ペオニフロリンは、中国、日本及び朝鮮などで利用されている生薬のシャクヤク (*Paeonia lactiflora*) の主成分のひとつであり、抗炎症作用 (Dong-Yi *et al.*, 2011)、血液凝固抑制作用 (Yean *et al.*, 2010) などの様々な薬理作用を有する。さらに、ペオニフロリンは血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) を急速に通過すること (He *et al.*, 2004)、ラットの学習機能障害抑制効果 (Liu, D *et al.*, 2006)、ドーパミン作用性神経変性の減少 (Liu, H *et al.*, 2006) や、Bacillus Calmette Guérin (BCG) とリポ多糖類による肝臓傷害からの保護 (Liu, J *et al.*, 2006)、紫外線による DNA 損傷からの防護とアンチエイジング効果 (Lee, S *et al.*, 2006) などが報告されている。これら論文では HSP の発現量は報告されていないが、効果の一部は HSP70 の発現によるタンパク質のミスフォールディングとそれに伴った凝集体の形成を抑制する作用、アポトーシスやネクローシスなどの細胞死抑制作用などによる可能性がある。

#### 第4節 温熱による HSP の誘導

日本では古くから「温浴」の習慣があり、長寿の秘訣とも言い伝えられてきた。また、遠赤外線による温熱効果で発汗を促し、体内の老廃物を排泄させることを目的とした「岩盤浴」や、がんの代替療法としての温熱療法 (Palazzi *et al.*, 2010) に至るまで、加温による健康への期待が高まっている。熱により HSP が誘導されることはすでに述べたが、加温がもたらす効果に HSP が携わることも少なくない (Frost, 2004; Marković *et al.*, 2009; Eppink *et al.*, 2012; Romero-Suarez *et al.*, 2012)。その代表として、40~42°C のマイルドな温度で全身を加温し、細胞に熱ストレスを与えることで HSP を誘導し、ストレスや疾患の防御や治療などの健康に役立てるマイルド加温療法があげられる (Itoh, 2009; 伊藤, 1998)。マイルド加温療法は、加温自体により白血球及びリンパ球が増加して自然免疫能が増強するとともに、加温により誘導される HSP により NK 細胞 (ナチュラルキラー細胞; 自然免疫の主要因子として働く細胞傷害性リンパ球) の活性化、樹状細胞の数及び活性の増強、がんワクチン作用など免疫能を高める作用があり、免疫系に深く関与している (Multhoff, 2002; Figueiredo *et al.*, 2009)。伊藤は、ストレスが加わる前にあらかじめ熱ストレスを与え、HSP を増加させておき、過大なストレスに備える予備加温療法 (プレコンディショニング) を提唱している (伊藤, 2002)。日本人が古くから行っている温浴でも、このマイルド加温が可能であり、40°C で 20 分、42°C で 10 分程度の温浴により HSP が増加すると言われている。

## 第5節 ストレス

第1節において、HSPは様々なストレスで誘導されてくることを述べたが、本論文においても、HSP70を誘導する素材の評価指標のひとつとしてストレスを用いる。そのため、本節においてストレスについて記述する。

現代はストレス過負荷の時代であり、「疲労大国」と言われる日本では疲労やストレスを感じている人は国民の約8割にのぼる。令和2年厚生労働省患者調査によると、精神疾患により医療機関にかかっている患者数は約500万人であり、近年大幅に増加している。また、不眠人口や自殺者の増加を背景にストレス対策が社会的な課題となっている。

Selyeは、ストレスを外部環境からの刺激によって起こる歪みに対する非特異的反応と考え、ストレス学説を体系化した(Selye, 1936)。その後、Chrousosは、ホメオスタシスを乱すかも知れないような内因性あるいは外因性の力をストレスラー、ホメオスタシスを乱す恐れがある状態のことをストレスと定義している(Chrousos, 1998)。生体は外界からのストレス刺激に対し、脳の視床下部を介して自律神経系、内分泌系、免疫系の応答をする。ストレス応答機序は、この3つの生体反応が相互作用し、複雑な生体防御反応をする(二木, 2008)。

### 5-1 自律神経系ストレス応答

厚生労働省健康用語辞典によると、一般内科で不定な症状を訴え、それに見合った所見の得られない病態を自律神経失調症といい、身体症状としては、全身倦怠感、めまい、頭痛、動悸などがある。自律神経は交感神経と副交感神経から成り立っており、過度のストレス負荷により交感神経と副交感神経のバランスが崩れたり、自律神経の活動度が低下したりすると自律神経失調症が誘発

される（東野，2006）。心拍の増加、心拍出量の増加や呼吸数の増加など、交感神経系が亢進されると同時に、視床下部－交感神経－副腎髄質系（SAM系）と呼ばれるシグナル伝達により、ノルアドレナリンなどのストレスホルモンが分泌され、ストレスに対して比較的急性な生体防御応答を示す（脇田ら，2013）。近年、いくつかの代謝経路がストレス性疾患に関わっていることが報告されている（Murrow and Debnath, 2013）。

## 5-2 内分泌系ストレス応答

脇田らによると、ストレス刺激が継続すると、自律神経系の急性ストレス応答に続いて、生体は内分泌系の変動を伴う生体防御反応を行う。このストレス応答は、視床下部－交感神経－副腎皮質系（HPA系）と呼ばれるシグナル伝達により、副腎皮質からコルチゾールや副腎髄質からアドレナリンなどのカテコールアミン類がストレスホルモンとして内分泌される。体温、血圧や血糖値が上昇し、交感神経系の活動が高まる（脇田ら，2013）。

## 5-3 免疫系ストレス応答

身体の抵抗力を示す免疫は、ストレス指標のひとつと考えられ、特に、非特異的に初期の生体防御機能を担う免疫タンパクなどがストレス指標となり、例えば、NK細胞の免疫活性があげられる（脇田ら，2013）。さらに、副腎皮質ホルモンによりNK細胞の免疫活性低下が認められるなど、免疫系のストレス応答は自律神経系及び内分泌系ストレス応答と複雑な相互作用が明らかにされている（Fink, 2010）。

## 第6節 ストレス関連指標

ストレス応答を評価する方法は、① 問診や心理テストなどによる主観評価法、② 血圧や心拍などの電気生理信号を統計的、動力学的に解析する手法、③ 血液や唾液などの生体試料中のストレス関連物質を計測する生化学手法がある。

### 6-1 主観評価法

①の主観評価法によく用いられる心理テストには、Profile of mood state (POMS：気分プロフィール検査)、Cornell medical index (CMI：コーネルメディカルインデックス) や Stress check list (SCL：ストレスチェックリスト) などがある。POMS は、緊張、抑うつ、怒り、活気、疲労及び混乱の6つの因子が同時に測定できる心理テストである。CMI は、臨床心理学的な観点から精神的な状態が関与する程度を測定する心理テストである。Symptom checklist-90-revised (SCL-90-R：症状チェックリスト) は、患者の心理的抑うつの概観を測定するチェックリストである。(脇田ら, 2004)

### 6-2 生理信号によるストレス計測法

②のストレス計測に用いられる生理信号は、心拍ゆらぎ、血圧、指尖脈波、呼吸活動、皮膚温及び発汗による皮膚電気活動、瞳孔径や胃電図などが用いられる。近年のセンサー工学の著しい進展により小型携帯化が可能になり、連続モニタリングによる時系列解析手法によるストレス評価研究が進展している。(脇田ら, 2004)

### 6-3 生化学指標によるストレス計測法

③の生化学指標に関しては、Selye がストレス学説を体系化した際に、ストレス刺激により脳下垂体から副腎皮質刺激ホルモンの放出が増し、副腎皮質ホルモン（コルチゾール）が増加し、副腎髄質ホルモン（アドレナリン）が血中で増加すると具体的な仮説を提唱していた（Fig. 3）。

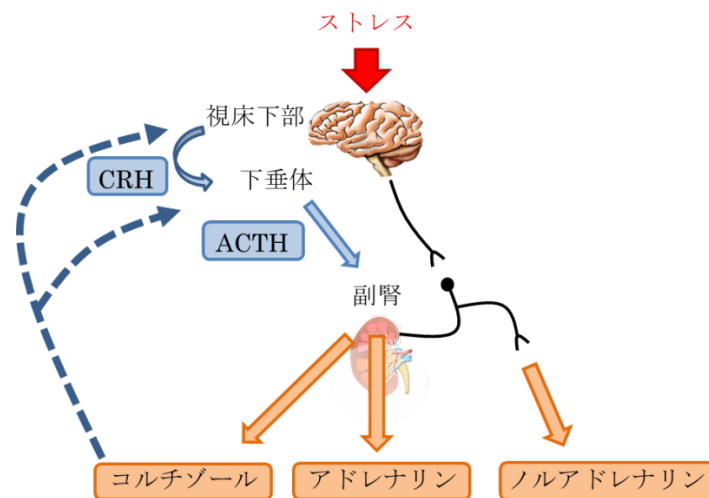


Fig. 3. ストレスとストレスホルモンの関係

#### 6-3-1 コルチゾール

コルチゾール（CORT）は副腎皮質から分泌されるホルモンで、糖質コルチコイドの一種である（PubChem）。ストレスを受けると、視床下部からコルチコトロピン放出ホルモン（CRH）が放出され、CRH は脳下垂体から副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）の放出を促し、最終的に副腎皮質からストレスホルモンであるコルチゾールの分泌が促進される（井澤ら, 2007）。副腎皮質からのコルチゾール分泌は、視床下部－下垂体－副腎皮質系のネガティブフィードバック機構により調節されている（柴田, 2008）。

### 6-3-2 アドレナリン

アドレナリンは、副腎髄質から交感神経刺激によって放出されるホルモンであり、ストレス刺激により血中に放出されると心拍数や血圧の上昇が起こる（吉岡, 2015）。交感神経系の興奮によって副交感神経が抑制されることで不眠症などの疾患となる恐れがある。

### 6-3-3 ノルアドレナリン

ノルアドレナリンは、交感神経の節後線維終末と支配する器官の間での情報伝達を行う神経伝達物質であり、交感神経刺激が伝導すると細胞外に放出され、シナプス後のアドレナリン受容体に到達する（鈴木, 2015）。覚醒、集中、記憶、積極性及び痛みをなくするなどの働きがあり、不足すると無気力、無関心、意欲の低下及びうつ病の原因となると言われ、過剰になると、血圧及び血糖を上昇させ、高血圧、高血糖を引き起こす（吉岡, 2015）。

### 6-3-4 クロモグラニン A

クロモグラニン A (CgA) は、副腎髄質クロム親和性細胞や交感神経ニューロンから分泌される主要なタンパク質であり、カテコールアミンとともに細胞外へ共放出されることが知られている（Blaschko *et al.*, 1967）。血中のカテコールアミン分泌を反映することから、交感神経－副腎系の活動を示す指標として利用されている（井澤ら, 2007）。また、CgA は顎下腺導管部に存在し、自律神経刺激により唾液中に放出されるため、精神的ストレスの指標として着目されている（Nakane *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2003; 井澤ら, 2007）。

### 6-3-5 アミラーゼ

アミラーゼは、主に交感神経系の刺激により耳下腺から分泌される。ストレスにより交感神経-副腎随質系が賦活されると、副腎髄質からアドレナリンやノルアドレナリンが血中へ分泌され、耳下腺からアミラーゼが分泌される (Robert *et al.*, 1996)。その結果、唾液中のアミラーゼ活性は高くなる。

## 第7節 抗ストレス剤

令和 3 年の厚生労働省「労働安全衛生調査」によると、仕事に関して強い不安やストレスを感じている人の割合は、およそ 5 割の状況にある。一方、メンタルヘルスケアに取り組んでいる事業所は、およそ 6 割であり、労働者のストレスに対するケアはいまだ不十分と思われる。近年、ストレスが密接に関与すると考えられているうつや不眠、自律神経失調症を訴える人が急増しているが、医療機関では抗不安薬や睡眠導入剤などの薬物療法で対処している。最もよく使用されるのが、ベンゾジアゼピン系の抗不安薬及び睡眠導入剤であり、脳内中枢神経を抑制する神経伝達物質であるガンマアミノ酪酸 (GABA) 受容体の活性を高める (Christiaan *et al.*, 2012)。しかし、一部の受診患者においては、医薬品摂取が引き起こす健忘や嗜眠などの副作用、さらには過剰投与や依存症の問題が指摘されている (Owen *et al.*, 1983)。一方、ストレス、うつ及びメンタルヘルス対策のサプリメントなども市販されている。一般社団法人日本サプリメント協会のサプリメントデータベースでは、神経伝達物質の合成に必須とされるビタミン B 群、ビタミン C 及びオメガ 3 脂肪酸などの栄養素や、コルチゾールの過剰な分泌を抑制すると考えられるサプリメント及び自律神経調節作用を有するアセチルコリンを上昇すると考えられるサプリメントなどがある。



## 第8節 睡眠

睡眠とストレスは密接に関わっており、前田は以下のように述べている。睡眠に関連したホルモンは、睡眠中に分泌されるホルモンとサーカディアンリズムに関連したホルモンの2つに大別できる。睡眠中に分泌されるホルモンの代表は、成長ホルモンやプロラクチンである。一方、サーカディアンリズムに関連したホルモンの代表は、メラトニンとコルチゾールである。成長ホルモンは身体の成長、修復及び疲労回復の役割を果たす。そして、睡眠初期のノンレム睡眠時に最大の分泌量を示す。プロラクチンは、睡眠開始直後から分泌され、朝方に向かって増大する。乳汁分泌促進、ストレス耐性の増加及び身体修復の作用があると言われている。睡眠時には自律神経の副交感神経が働き細動脈が弛緩し、成長ホルモンやプロラクチンが全身に運ばれる。

メラトニンは、習慣的就床時間の1~2時間前から分泌され始め、深部体温が最低になる1~2時間前にピークを迎える。メラトニンは、サーカディアンリズムに従い夜に分泌され、光刺激によって分泌が抑制される。一方、コルチゾールは睡眠初期のノンレム睡眠で分泌が抑制され、朝の起床前後で分泌は最大となる。これは、日中に活発に過ごすために使われ、夜に向けて減少する（前田, 2010）。近年、コルチゾールが亢進していると、睡眠の質が低下していることを証明する報告がなされ（Hori *et al.*, 2011）、ストレスによる睡眠の質の低下の生理的メカニズムが解明されつつある。

## 第9節 本研究の目的

これまで述べたとおり、HSPは様々なストレス条件下に曝された際に発現が上昇して細胞を保護する役割を果たす。

一方で、生体は外界からのストレス刺激に対して、自律神経系、内分泌系、免疫系の応答を示すことが知られており、ストレスを評価する指標としては、問診などによる主観評価法、血圧などの生理信号による評価法、ストレス関連物質による評価法がある。また、ストレスと睡眠は密接に関わっており、コルチゾールなどのストレスホルモンの睡眠に対する影響などが明らかとなっている。

しかし、これまでHSP70と睡眠の関係については詳細が明らかになっておらず、既存のHSP70誘導物質も睡眠への影響に関する研究は進んでいないため、これらを解明することは、ストレスや睡眠をコントロールするための一助になり得ると考える。

そこで本研究は、HSP70を誘導する素材がストレスを軽減し、良質な睡眠をもたらすために有益であるという仮説のもと、*Hsp70* mRNAの発現量の上昇活性を有する素材の探索、ヒトにおける*Hsp70* mRNA発現、自律神経、ストレス指標及び睡眠への影響を評価し、HSP70と睡眠の関係を解明することを目的に実施した。本研究の最終的な目標はHSP70発現増強活性を有する機能性食品を開発し、ストレスや睡眠に悩む人達に安らぎをもたらすことである。

## 第1章 *Hsp70* mRNAの発現量の上昇活性を有する素材の探索及び製造方法の 確立

### 第1節 背景及び目的

天然物由来の HSP70 誘導物質に関しては、シャクヤク (*Paeonia lactiflora*) の主成分であるペオニフロリンが報告されている (Yan *et al.*, 2004)。また、Yan らの論文において、ペオニフロリンは熱ショック転写因子である HSF1 のリン酸化や DNA 結合能を促進することで HSP70 を誘導すると述べられている。(Yan *et al.*, 2004)。総合緒論で述べたように、HSP70 はストレスに関連した様々な薬理作用が報告されており、その発現をコントロールすることは、ストレスが及ぼす疾患などの予防や治療の一助となる可能性があると考えられる。

本研究では、HSP70 の発現増強活性を有する機能性食品の開発を目的とし、本章ではその方法のひとつとして、*Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を指標とした研究を行った。北海道産農水産物について *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を評価し、活性が認められた素材について、製造方法の確立及び *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性物質の探索を行った。

## 第2節 結果

### 2-1 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の探索

HSP70 の発現増強活性を有する機能性食品を開発するため、北海道産の農水産物を収集し、その抽出物の HeLa 細胞における *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を半定量 PCR により評価した。その結果、アスパラガス若茎熱水抽出物に最も高い活性が認められた。Fig. 1-1 はコントロールの *Hsp70* mRNA 発現量を 100%とした時の値を示す。

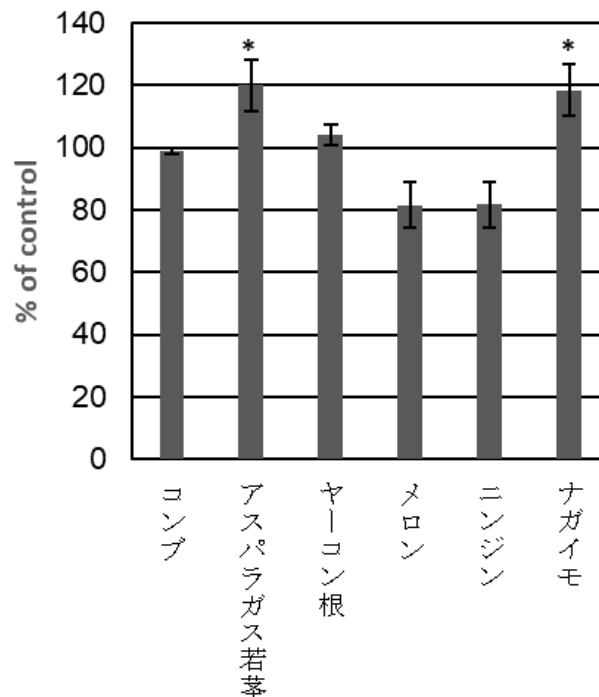


Fig. 1-1. *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性

HeLa 細胞における *Hsp70* mRNA 発現量は、サンプル 1 mg/mL 添加後、半定量 PCR で測定した。数値は平均値 ± 標準偏差 (SD) (n=3) で示した。\* $p < 0.05$  vs control (Student's *t*-test).

## 2-2 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の製造方法の確立

### 2-2-1 緒言

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は、日本においては北海道をはじめ全国各地で栽培されている野菜である。古くから利尿作用や抗疲労効果、新陳代謝促進作用を有するとされ、民間伝承薬として用いられてきた (Ye *et al.*, 1994; Hasani-Ranjbar *et al.*, 2009; Negi *et al.*, 2010; Guarrera and Savo, 2013)。また、アスパラガス抽出物が、糖尿病ラットにおいて血中インスリンレベルを増加させることや (Hafizur *et al.*, 2012)、脂質低下作用 (Zhu *et al.*, 2011)、酸化防御活性 (Kim *et al.*, 2009; Tiveron *et al.*, 2012) を有することが報告されている。アスパラガスは出荷される際、上端から長さ 25 cm 程度に切りそろえられ、下端部分が切れ端となって大量に廃棄される。この切れ端は一部家畜飼料などに利用されているが、ほとんどは未利用部位として畑に鋤き込んで処理されている。そこで、この未利用部位の切れ端を原料として、アスパラガス抽出物を工業レベルで製造する方法の確立を試みた。

### 2-2-2 アスパラガス熱水抽出物の調製

アスパラガスを熱水抽出 (121°C、20 分) し、濾過により抽出残渣を除き、賦形剤としてパインデックスを添加後、凍結乾燥してアスパラガス熱水抽出物を得た。加えた賦形剤の重量を差し引いて計算したところ、アスパラガス由来固形分の回収率は 3.5%であった。

### 2-2-3 酵素処理検討

アスパラガスは約 92%が水分であり、固形分としては約 8%である。熱水抽出での固形分は 3.5%と低く、回収率向上を目的として、各種酵素処理を検討した。熱水抽出後、各酵素をアスパラガス重量の 0.5%添加し、45~60°C（至適温度付近）、24 時間処理した。その結果、セルラーゼ（スクラーゼ C）+ペクチナーゼ（マセロチーム A）処理が最も高い回収率（5.7%）であった（Fig. 1-2）。

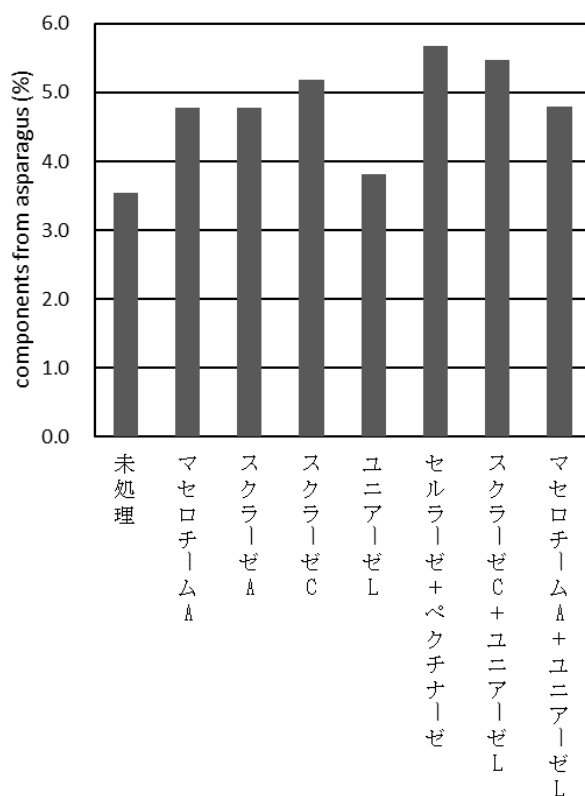


Fig. 1-2. 各酵素処理後のアスパラガス固形分回収率

アスパラガス（50 g、新鮮重）を熱水（100 mL）で 121°C、20 分抽出した。抽出後、45~60°C に放冷し、それぞれの酵素（0.25 g）で 24 時間反応した。反応後、121°C、20 分で失活し、濾過により残渣を除去した後、賦形剤としてパイロデックスを加えて凍結乾燥した。

次に、最も回収率が高かったセルラーゼ及びペクチナーゼ処理について、添加量の検討を行った。セルラーゼをアスパラガス重量の 0.04~1.2% 添加し、60°C、24 時間反応し、回収率を算出した。その結果、酵素添加量の増加に伴い、回収率も増加した (Fig. 1-3A)。また、ペクチナーゼをアスパラガス重量の 0.2~2.0% 添加し、45°C、24 時間反応させた結果、同様に回収率が増加した (Fig. 1-3B)。

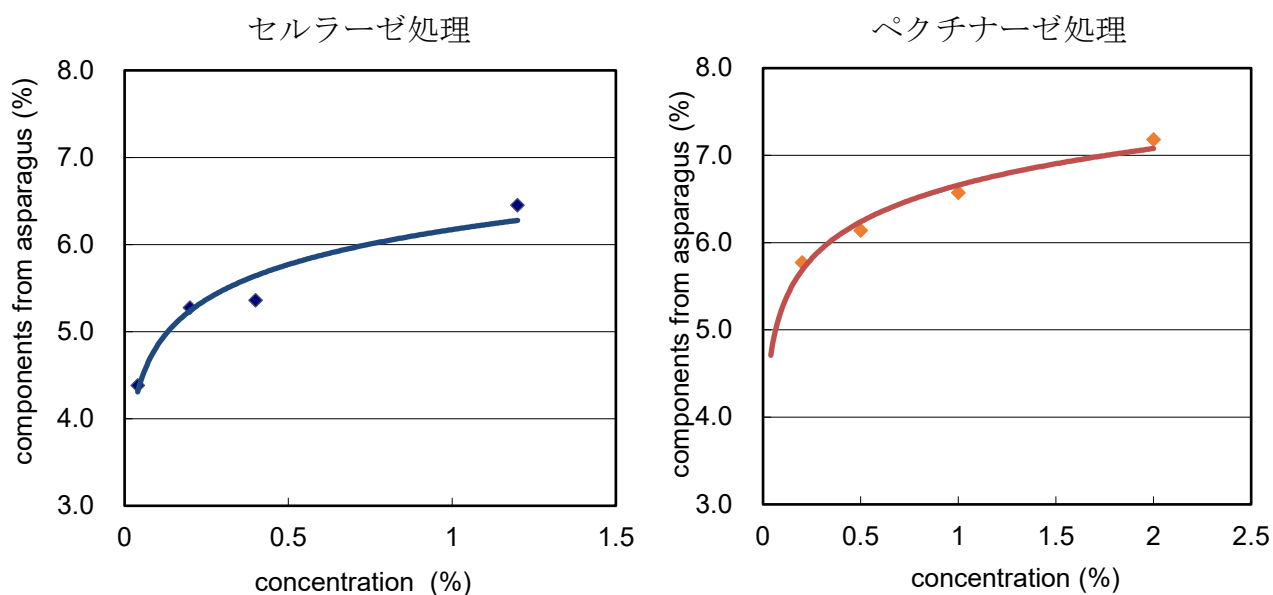


Fig. 1-3. セルラーゼ処理後(A)又はペクチナーゼ処理後(B)の回収率

アスパラガス (50 g、新鮮重) を熱水 (100 mL) で 121°C、20 分抽出した。抽出後、60°C に放冷しセルラーゼ (アスパラガスの 0.04~1.2%) を添加又は 45°C に放冷しペクチナーゼ (同 0.2~2.0%) を添加し 24 時間反応した。反応後、121°C、20 分で失活し、濾過により残渣を除去した後、賦形剤としてパインデックスを加えて凍結乾燥した。

次に、酵素反応時間の検討を行った。セルラーゼをアスパラガス重量の 0.5% 添加し、60°C、12~36 時間反応し、回収率を算出した。その結果、23 時間で回収率が最も高くなり、それ以降増加しなかった(Fig. 1-4)。

最後に、酵素反応温度の検討を行った。セルラーゼ、ペクチナーゼの至適温度は、それぞれ 60°C、45°C であるが、工業レベルでの生産を考慮すると、同一温度での反応が好ましいため、ペクチナーゼの至適温度である 45°C でセルラーゼ処理を行い、アスパラガス固形分の回収率を算出した。その結果、45°C でも回収率 5.4%を示し、60°C での回収率 5.2%と同等であった。

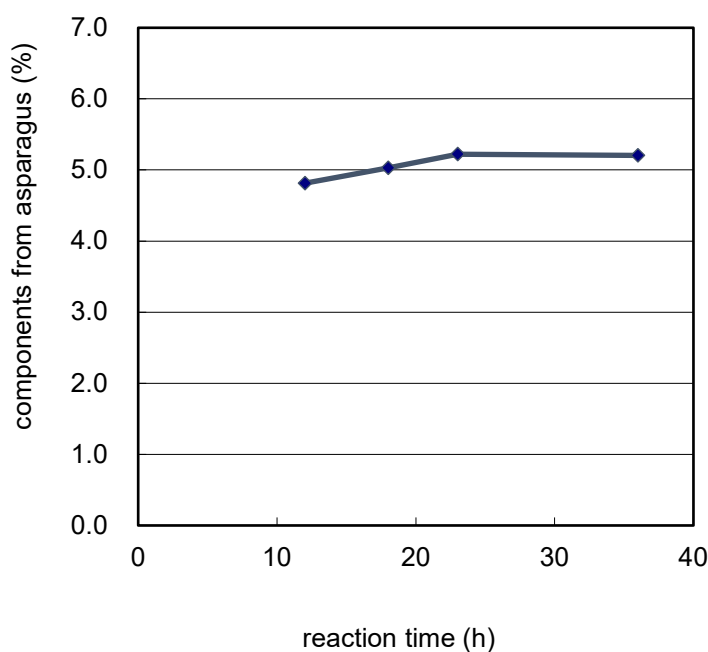


Fig. 1-4. セルラーゼ処理後の回収率

アスパラガス (50 g、新鮮重) を熱水 (100 mL) で 121°C、20 分抽出した。抽出後、60°C に放冷しセルラーゼ (0.25 g) を添加して 12~36 時間反応した。反応後、121°C、20 分で失活し、濾過により残渣を除去した後、賦形剤としてパインデックスを加えて凍結乾燥した。



#### 2-2-4 酵素処理アスパラガス抽出物の *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性

アスパラガス抽出物（未処理）及び酵素処理アスパラガス抽出物（セルラーゼ + ペクチナーゼ処理）の HeLa 細胞における *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を半定量 PCR により評価した。その結果、酵素処理、未処理間で有意な活性の差は認められなかった (Fig. 1-5)。

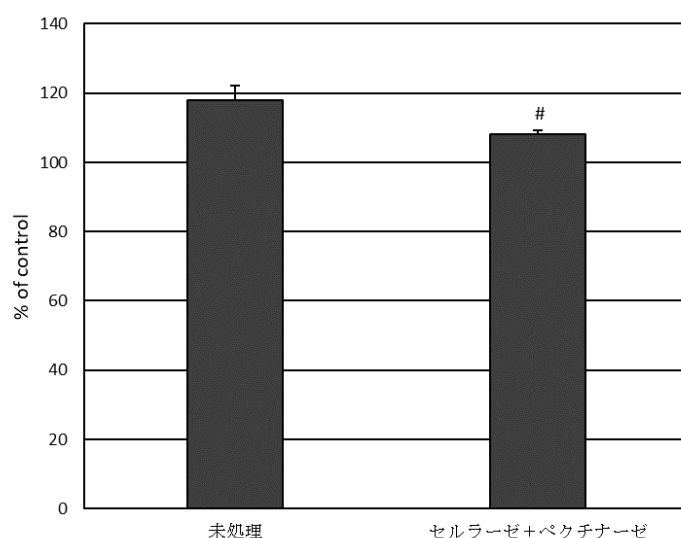


Fig. 1-5. 酵素処理アスパラガス抽出物の *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性  
HeLa 細胞における *Hsp70* mRNA 発現量は、サンプル 1 mg/mL 添加後、半定量 PCR で測定した。数値は平均値 ± 標準偏差 (SD) (n=3) で示した。# $p = 0.082$  vs 未処理 (Student's *t*-test).

以上の結果、セルラーゼ及びペクチナーゼをアスパラガス重量の 0.2% 以上添加し、45~60°C、約 24 時間反応することで、HeLa 細胞において、酵素未処理と同等の *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を維持したままアスパラガス固形分の回収率を上昇させることができた。次に酵素処理アスパラガス熱水抽出物を ETAS (イータス: enzyme treated asparagus extract) とし、工業レベルのスケールで調製を行い、活性物質の探索を行った。

## 2-3 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する物質の探索

### 2-3-1 ETAS の調製

アスパラガス（新鮮重 90 kg）に水 180 L を加え、121°C、45 分加熱し、熱水抽出した。得られた抽出液の温度が 60°C まで下がった段階でセルラーゼ (0.9 kg) を添加して攪拌した。さらに 45°C まで下がった段階でペクチナーゼ (0.9 kg) を添加し、24 時間反応した。得られた反応液を 121°C、20 分で加熱して酵素を失活させ、賦形剤としてパインデックス (9.0 kg) を添加した後、スプレードライヤーで乾燥粉末化して ETAS (14.5 kg) を得た (Lot.111104)。調製した ETAS の成分組成を Table 1-1 に示す。

Table 1-1. ETAS の組成 (Lot.111104)

Component	Lot.111104
Moisture (wt%)	2.5
Protein (wt%)	7.1
Total fat (wt%)	1.0
Ash (wt%)	2.9
Available carbohydrate and dietary fiber (wt%)	86.5

### 2-3-2 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する物質の単離

*Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する物質を同定するため、ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60 細胞) における *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性をリアルタイム PCR により評価し、その活性を指標に ETAS から生理活性物質の精製を行った。前述の 2-3-1 で調製した ETAS のうち 6 kg を DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーにより精製した。DIAION HP-20 カラム分画物の *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性試験結果を Fig. 1-6 に示す。

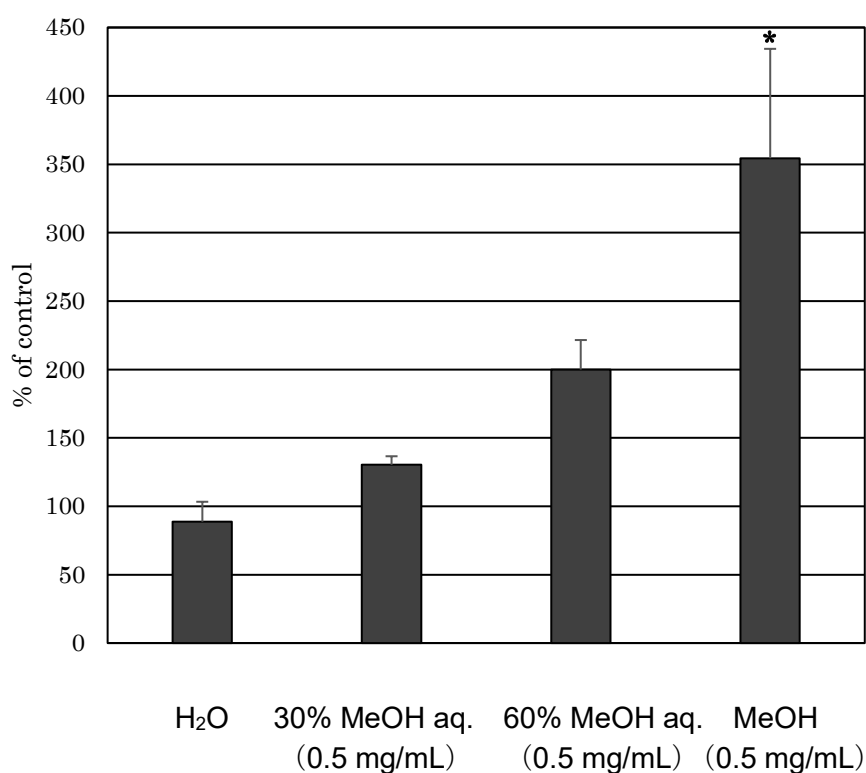
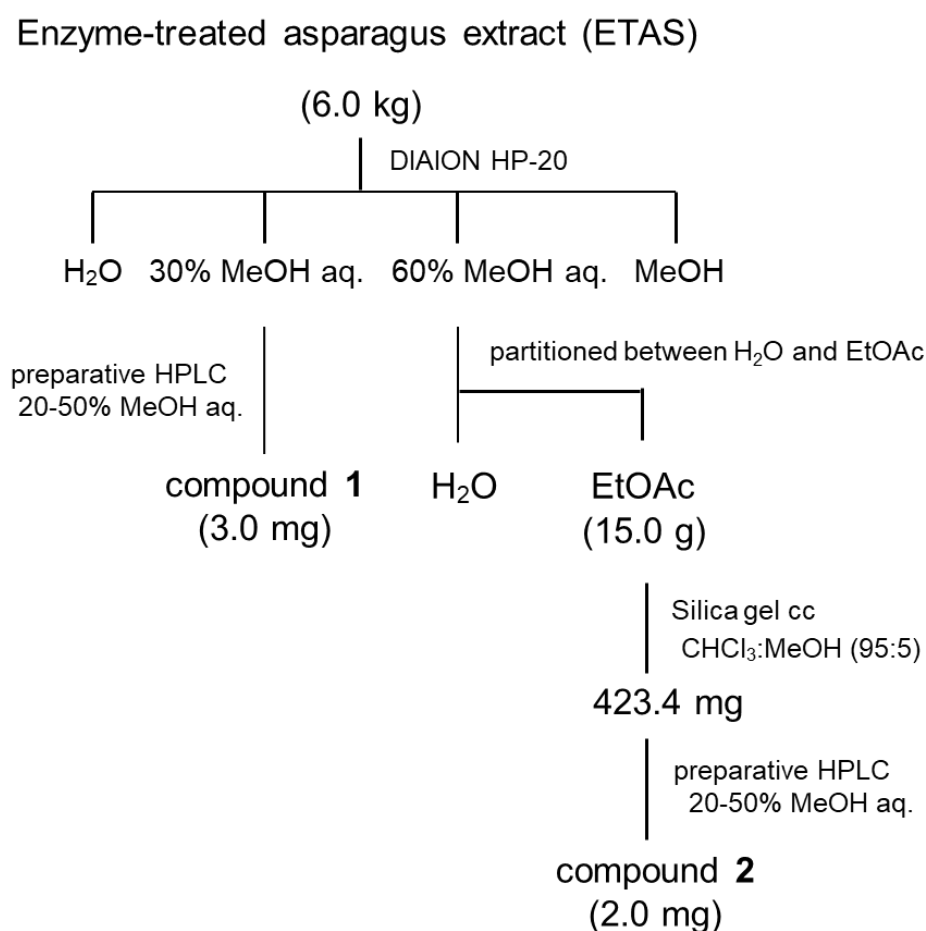


Fig. 1-6. DIAION HP-20 カラム分画物の *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性  
リアルタイム PCR により分画物の HL-60 細胞における *Hsp70* mRNA 発現量  
の上昇活性を評価した。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) (n=5) で示した。\* $p$   
< 0.05 vs control (Student's  $t$ -test).

活性試験の結果、メタノール溶出画分の活性が最も高く、統計学的有意差は認められなかったが、60%メタノール溶出画分、30%メタノール溶出画分にも *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性の傾向が認められた。水溶出画分には活性が認められなかった。30%メタノール溶出画分を HPLC により精製し、化合物 **1** (3.0 mg) を得た。60%メタノール溶出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及び HPLC により精製し、化合物 **2** (2.0 mg) を得た (Scheme 1-1)。



Scheme 1-1. 活性物質の精製スキーム

### 2-3-3 単離した化合物の構造決定

化合物 **1** は淡黄色を呈する油状物質として得られた。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルにおいて、 $\delta_{\text{H}}$  6.59 ppm (d,  $J = 3.4$  Hz,  $\delta_{\text{C}}$  109.7 ppm)、 $\delta_{\text{H}}$  7.47 ppm (d,  $J = 3.4$  Hz,  $\delta_{\text{C}}$  124.4 ppm)、 $\delta_{\text{C}}$  151.7 ppm 及び  $\delta_{\text{C}}$  162.1 ppm からフラン環を有することが推測され、 $\delta_{\text{H}}$  5.57 ppm (dd,  $J = 3.6, 3.6$  Hz)のヒドロキシメチル基及び  $\delta_{\text{H}}$  9.53 ppm (s)のアルデヒド基から 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) と予想された。さらに、HPLC による標準品との保持時間の一致から 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) と決定した (Vinas *et al.*, 1992)。

化合物 **2** は褐色を呈する油状物質として得られた。HREI-MS から  $m/z$  237.0612 (calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ , 237.0637) であり、分子式が  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_5$  と判明し不飽和度は 7 であった。 $^1\text{H-NMR}$  及び  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルは化合物 **1** と類似していたため、HMF の部分構造を持つことが推察された (Table 1-2)。COSY スペクトルにより H-2'/H-3'、及び H-3'/H-4'に  $^1\text{H-}^1\text{H}$  相関が観察されたことから、C2'-C3'-C-4'の部分構造を持つことが明らかとなった。また、NH/C-2'、NH/C-5'、H-3'/C-5'、H-4'/C-5'、H-2'/C-3'及び H-2'/C-6'に HMBC 相関が認められたことから、ピログルタミン酸の部分構造を持つことが明らかとなった。さらに、H-7/C-6'に HMBC 相関が認められたことから、化合物 **2** の平面構造は (2-formylfuran-5-yl)methyl 5-oxopyrrolidine-2-carboxylate と決定した (Figs. 1-7, 1-8)。

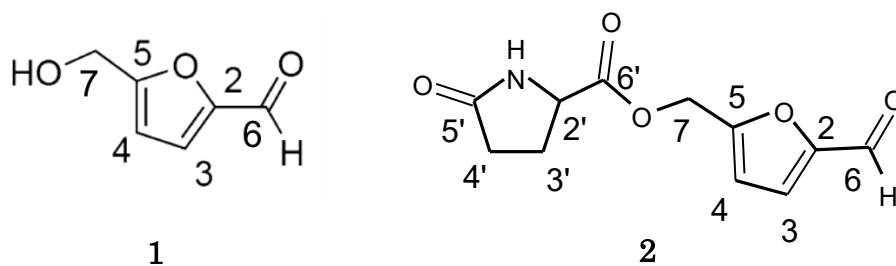


Fig. 1-7. 化合物 **1** 及び **2** の化学構造

Table 1-2. 化合物 1 及び 2 の  $^1\text{H}$ -及び  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $^{13}\text{C}$ ; 100 MHz,  $^1\text{H}$ ; 400 MHz)

position	compound 1		compound 2	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
2	151.7		152.5	
3	124.4	7.47 (d, $J = 3.4$ Hz)	124.0	7.52 (d, $J = 3.4$ Hz)
4	109.7	6.59 (d, $J = 3.4$ Hz)	113.3	6.82 (d, $J = 3.4$ Hz)
5	162.1		155.1	
6	177.9	9.53 (s)	178.7	9.58 (s)
7	55.9	4.50 (d, $J = 3.6$ Hz)	58.3	5.21 (d, $J = 13.6$ Hz) 5.26 (d, $J = 13.6$ Hz)
OH		5.57 (dd, $J = 3.6, 3.6$ Hz)		
NH				8.05 (s)
2'			54.7	4.24 (dd, $J = 3.9, 9.1$ Hz)
3'			24.6	1.98 (m) 2.34 (m)
4'			28.9	2.11 (m) 2.14 (m)
5'			177.3	
6'			172.6	

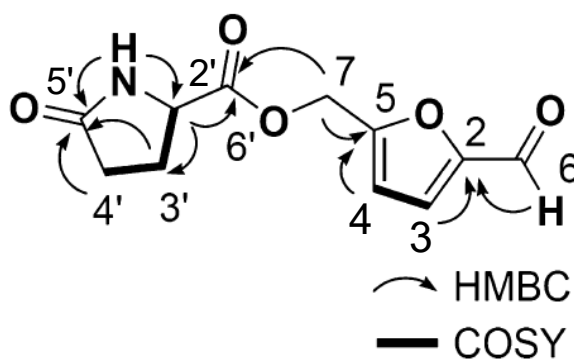
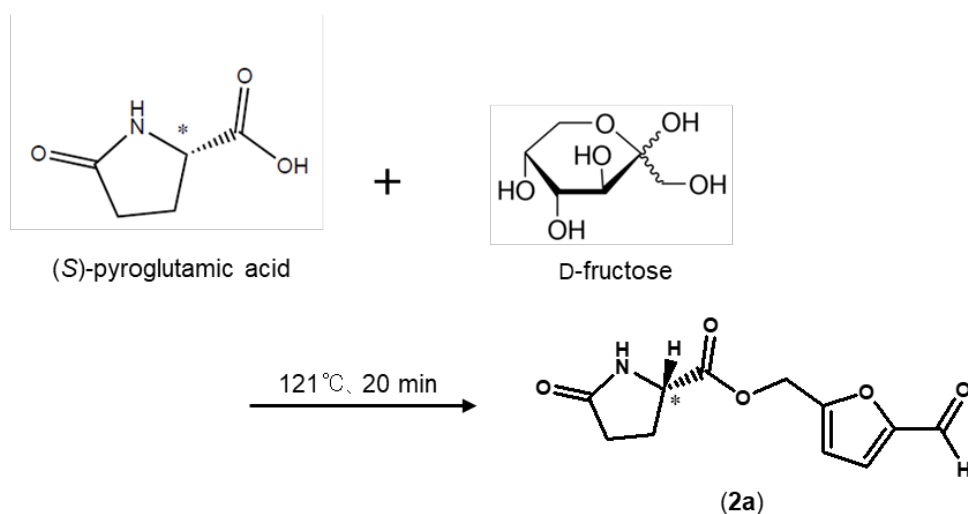


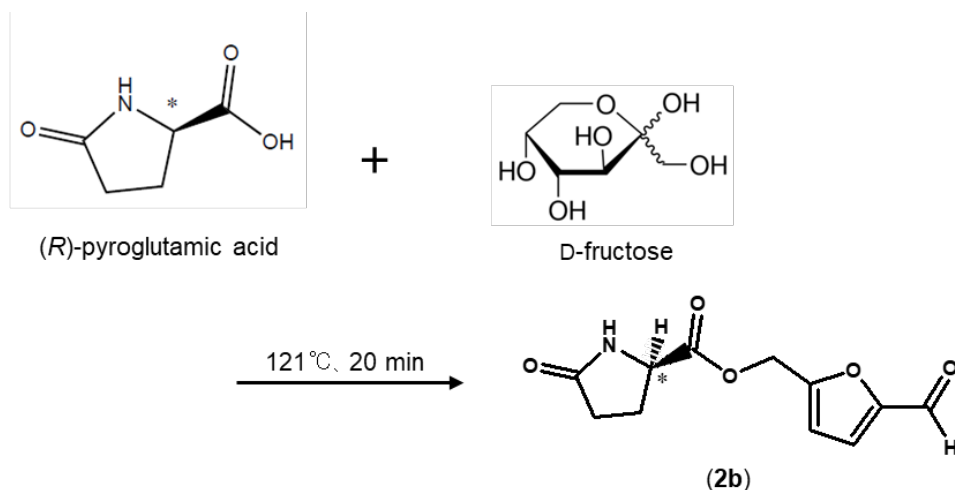
Fig. 1-8. 化合物 2 の COSY 及び主な HMBC 相関

#### 2-3-4 化合物 **2** の合成及び絶対配置の決定

化合物 **2** の C-2' の絶対配置の決定を目的とし、絶対配置が明らかとなっている (*S*)-pyroglutamic acid 及び (*R*)-pyroglutamic acid より化合物 **2a** 及び **2b** を合成した (小野ら, 1999; 高下ら, 2011) (Scheme 1-2, 1-3)。(*S*)-Pyroglutamic acid 又は (*R*)-pyroglutamic acid を D-fructose と neat の状態で加熱し、化合物 **2a** 及び **2b** を得た。化合物 **2a** 及び **2b** の構造は NMR により確認した。



Scheme 1-2. (*S*)-pyroglutamic acid と D-fructose から化合物 **2a** の合成



Scheme 1-3. (*R*)-pyroglutamic acid と D-fructose から化合物 **2b** の合成

ETAS から単離した化合物 **2**、合成した化合物 **2a** 及び **2b** の旋光度を測定した結果、化合物 **2** の旋光度が  $-12.2^\circ$ 、化合物 **2a** が  $-11.8^\circ$ 、化合物 **2b** が  $+11.3^\circ$  であった。さらに、HPLC により、キラルカラムを用いて ETAS から単離した化合物 **2**、合成した化合物 **2a** 及び **2b** を分析した。その結果、化合物 **2** の保持時間が 18.9 分、化合物 **2a** が 19.0 分、化合物 **2b** が 22.0 分であった (Fig. 1-9)。この結果より、化合物 **2** の C-2' の絶対配置は *S* 体であることが明らかとなった。

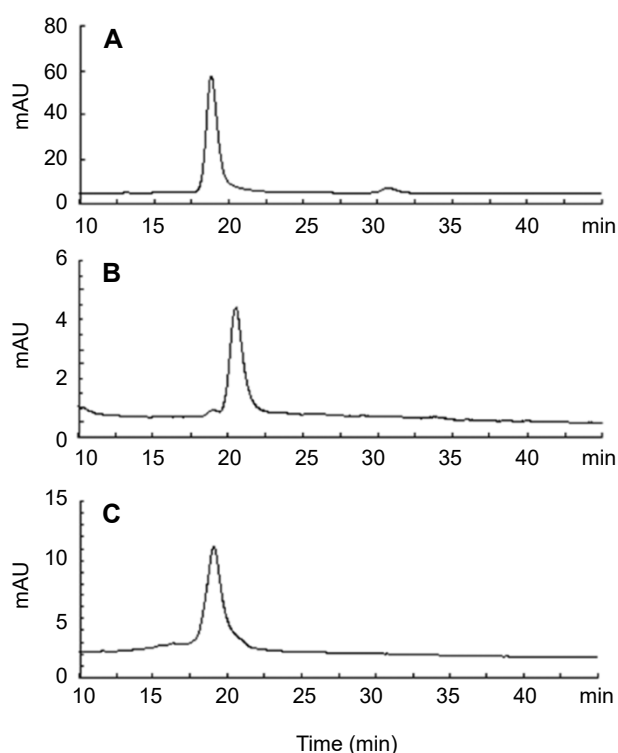


Fig. 1-9. 化合物 **2**、**2a** 及び **2b** の HPLC クロマトグラム ((A) 化合物 **2a**; (B) 化合物 **2b**; (C) 化合物 **2**)

HPLC は L-7100 series (HITACHI) を使用した。カラムは CHIRALPAK IA (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  150 mm) を使用し、カラム温度 40°C、流速 1.0 mL/min、波長 280 nm、移動相は solvent A (20 mM phosphate buffer, pH 2.3) 及び solvent B (MeCN) のグラジエントモード (0–5 min, 5% B; 5–20 min, 5–10% B; 20–60 min, 10% B) で分析した。



### 2-3-5 ETAS 中の化合物 1 の分析

生アスパラガス、アスパラガス熱水抽出物、ETAS 中の化合物 1 の含量を調べるため、それぞれサンプル調製し、HPLC で定量した。生アスパラガスは万力で圧搾し、濾過後、賦形剤としてパインデックスを添加したものを凍結乾燥した。アスパラガス熱水抽出物は 2-2-2 で調整したもの、ETAS は 2-3-1 で調整した Lot.111104 を使用した。定量に関しては、Table 1-3 の計測値をもとに作成した検量線を用いた。その結果、ETAS 中の化合物 1 が最も多く、アスパラガス熱水抽出物の約 35 倍であった (Table 1-4)。

Table 1-3. HMF (1)の検量線

mg/mL	Area		
0.0005	59594		
0.005	598573	Slope	8.33348E-09
0.01	1184911	Intercept	-2.38982E-05
0.05	6050209	Coefficient of determination	0.99997
0.1	11980694	Correlation coefficient	0.99999

Table 1-4. アスパラガス中の HMF (1)含量

	% (w/w)
Fresh asparagus	< 0.0005
Hot water extract	0.004
ETAS	0.14

### 2-3-6 生アスパラガス中の化合物 **2** の分析

化合物 **2** が生アスパラガスに含有されるかを調べるため、合成した化合物 **2a**、ETAS 及び生アスパラガス圧搾液を UPLC MS/MS により分析した (Sato *et al.*, 2009)。その結果、ETAS には化合物 **2a** が検出されたが、生アスパラガス圧搾液中には検出されなかった (Fig. 1-10)。この結果から、化合物 **2** は ETAS の調製過程で生成する成分であることが明らかとなった。

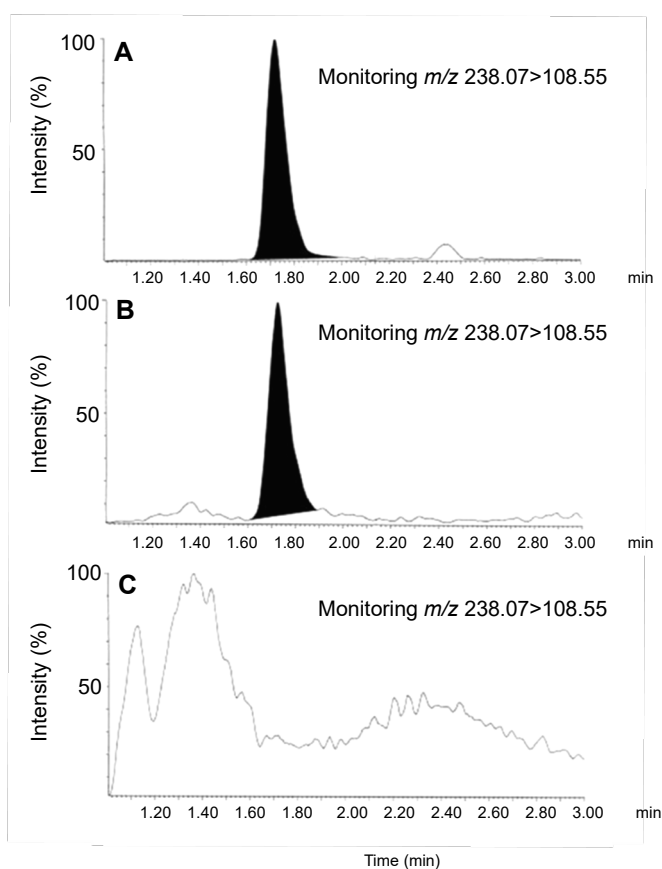


Fig. 1-10. UPLC MS/MS クロマトグラム: (A) 化合物 **2a**; (B) ETAS; (C) 生アスパラガス

カラム (Acquity BEH column, 1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  100 mm)、移動相は solvent A (20% MeOH aq. with 0.05% AcOH) 及び solvent B (MeOH with 0.05% AcOH) のグラジエントモード (0–0.2 min, 10% B; 0.2–2.5 min, 10–90% B; 2.5–2.6 min, 90–100% B; 2.6–4.5 min, 100% B)、流速 0.25 mL/min で分析した。

#### 2-4 化合物 **2** の *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性

単離した化合物 **2**、合成した化合物 **2a**、**2b** 及び HMF (**1**) の HL-60 細胞における *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性をリアルタイム PCR により評価した。まず、HL-60 細胞に各化合物を添加し、細胞増殖を評価した結果、0.5 mg/mL で化合物 **2b** のみ細胞増殖抑制が認められた。それ以外の化合物は細胞増殖抑制が認められなかった (Table 1-5)。

Table 1-5. トリパンプルー細胞増殖抑制確認試験 (n=2)

	cell viability (%)		
	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL	0.125 mg/mL
compound <b>2</b>	75.9	95.0	127.5
compound <b>2a</b>	106.6	114.6	130.8
compound <b>2b</b>	37.2	92.5	111.7
HMF( <b>1</b> )	94.9	85.8	120.8

次に、*Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を評価した結果、化合物 **2** 及び **2a** は濃度依存的に活性が認められた。その発現レベル (% of control) は、化合物 **2** では 0.25 mg/mL で 131%、0.5 mg/mL で 334%であった。同様に化合物 **2a** では 0.25 mg/mL で 207%、0.5 mg/mL で 286%であった。HMF (**1**) も 0.25 mg/mL で活性が認められた (Fig. 1-11)。

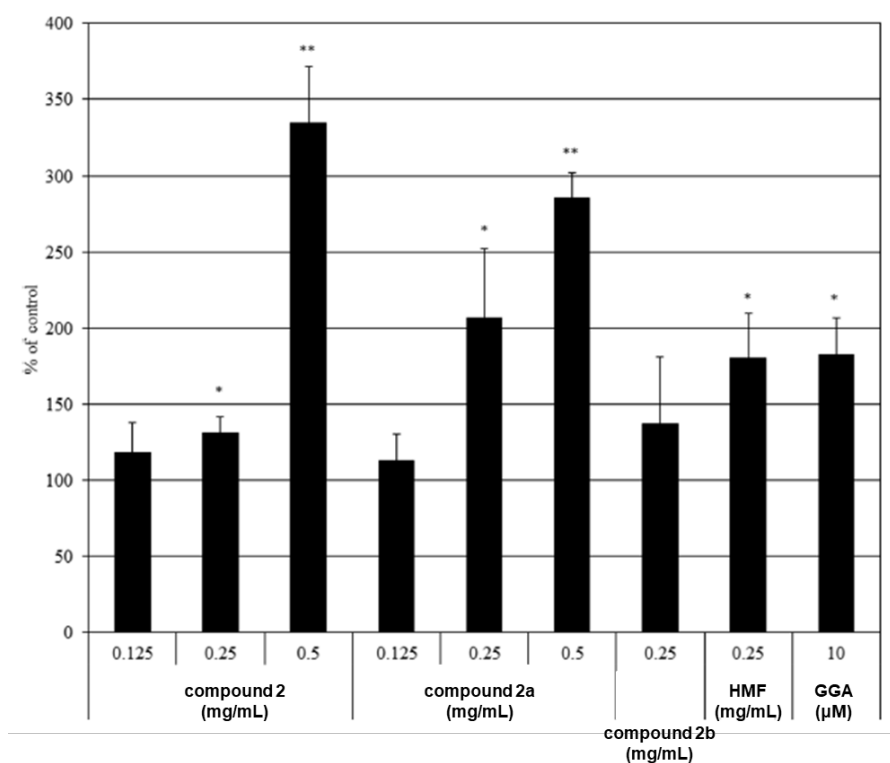


Fig. 1-11. *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性

リアルタイム PCR により各化合物の HL-60 細胞における *Hsp70* mRNA 発現量の上昇活性を評価した。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) (n=5)で示し、コントロールの発現量比を 100%としたときのサンプルの発現量比を%で示した。  
\* $p < 0.05$  vs control; \*\* $p < 0.01$  vs control (Student's *t*-test).

### 第3節 考察

#### 3-1 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の探索

HSP70 の発現増強活性を有する食品を開発するために、北海道産の農水産物を収集し、その熱水抽出物の HeLa 細胞における *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を評価した。その結果、アスパラガス若茎熱水抽出物、ナガイモ熱水抽出物に活性が認められた。ナガイモ熱水抽出物は粘性が高いため、工業レベルでの製造工程において濃縮が困難であり、さらにその乾燥粉末は吸湿性が高いことから製品の性状安定性が悪くなる欠点があった。そのため、開発素材としてはアスパラガスを選択した。

#### 3-2 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の製造方法の確立

アスパラガス固形分の回収率向上を目的とし、各種酵素処理を検討した結果、セルラーゼ+ペクチナーゼ処理が回収率の向上に有効であることを明らかとした。細胞壁分解酵素であるセルラーゼ及びペクチナーゼによりアスパラガスの細胞壁が分解された結果、固形分としての回収率向上につながったと考えられる。酵素添加濃度はアスパラガス重量の 0.2%以上で十分回収率の向上が認められるため、採算性等を考慮して適宜調整可能と考える。反応温度については、12 時間未満の検討は必要と考えるが、少なくとも 12 時間で十分回収率の向上は認められる。また、至適温度が 60°C のセルラーゼは、ペクチナーゼの至適温度である 45°C でも十分反応が進行し、回収率の向上が認められた。さらに、酵素反応後でも *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性が認められたことから、本研究により活性を維持したまま回収率を向上させる製造法を確立できた。

### 3-3 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する物質の探索

本研究で確立した製造方法により調製した ETAS に含まれる *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性物質を同定するため、HL-60 細胞における *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を指標に ETAS の精製を行い、既知化合物 **1** 及び新規化合物 **2** を単離した。化合物 **1** は各種スペクトルデータ及び HPLC による標準品との保持時間の比較から、5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) と決定した。化合物 **2** は HR-MS、1D-及び 2D-NMR スペクトルデータから平面構造を決定し、さらに合成した絶対配置の異なる化合物と旋光度及び HPLC の保持時間を比較し、(*S*)-(2-formylfuran-5-yl)methyl 5-oxopyrrolidine-2-carboxylate と決定した。

HMF はペントースやヘキソースの加熱により生成し、抗酸化作用や血流改善、虚血性心疾患改善作用等があることで知られている (Fu *et al.*, 2008; Kagami *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2009)。さらに、酸性条件下で HMF と有機酸を縮合させた様々な HMF 誘導体が報告されており、中でもウメ濃縮液から単離されたムメフラールは、HMF とクエン酸が加熱反応して生成する成分として知られている (Chuda *et al.*, 1999)。ムメフラールは血流改善作用等を有し (Chuda *et al.*, 1999)、今日ではサプリメントとしても知られている。これまでに、HMF とリンゴ酸、酒石酸、コハク酸等の有機酸が反応した HMF 誘導体が知られているが (小野ら, 1999)、今回 ETAS から単離した化合物 **2** は、HMF とピログルタミン酸が縮合して生成したと考えられる。

HPLC による定量の結果、ETAS 中の HMF はアスパラガス熱水抽出物の約 35 倍であった。しかし、酵素処理の有無で *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性に有意差がなかったことから、化合物 **1** は活性を有するが、大きく関与しない成分と考えられる。一方、UPLC/MS/MS 分析によると、化合物 **2** は生アスパラガスには含有されず、ETAS の調製過程で生成する成分であることが明らかと

なった。アスパラガスに含まれるグルコースやフルクトースから生成した HMF と、グルタミンから生成したピログルタミン酸が加熱条件下で縮合して化合物 **2** が生成すると考えられる。

いずれの化合物も活性は有するが、DIAION HP-20 を用いた精製の際、最も高活性であった画分はメタノール溶出画分であったことから、さらなる高活性成分の探索が望まれる。

#### 3-4 化合物 **2** の *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性

HL-60 細胞の培地に各化合物を添加し、細胞増殖を評価した結果、0.5 mg/mL で化合物 **2b** のみ細胞増殖抑制が認められた。立体異性体である化合物 **2a** には細胞増殖抑制が認められなかった。一方、HL-60 細胞における *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性をリアルタイム PCR により評価した結果、化合物 **2** 及び **2a** は濃度依存的に発現を増加させる有意な活性が認められた。化合物 **2** の *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性には2'位の絶対立体配置が関わっている可能性が示唆されたが、作用機序の詳細については不明であり、今後の研究が望まれる。

## 第4節 実験部

### 4-1 一般事項

施光度は JASCO P-2200 Polarimeter を用いて測定した。NMR は JEOL JNM-AL400 Spectrometer ( $^1\text{H}$ -NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMBC:400 MHz、 $^{13}\text{C}$ -NMR:100 MHz)で測定した (DMSO- $d_6$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )。化学シフトは溶媒として DMSO- $d_6$ を用いた場合、DMSO- $d_6$  = 2.49 ppm ( $^1\text{H}$ -NMR)、DMSO- $d_6$  = 39.5 ( $^{13}\text{C}$ -NMR)、 $\text{CD}_3\text{OD}$  の場合、 $\text{CH}_3\text{OD}$  = 3.30 ( $^1\text{H}$ -NMR)、 $\text{CD}_3\text{OD}$  = 49.0 ppm ( $^{13}\text{C}$ -NMR)を標準として ppm 値で与えた。EI-、HREI-MS は JEOL JMS AX-500 mass spectrometer を用いて測定した。IR は JASCO FTIR-4100 Spectrometer を用いて測定した。HPLC は L-7100 series (HITACHI) を使用した。UPLC は ACQUITY UPLC System (Waters) を使用し、MS/MS は Micromass Quattro Premie Tandem Quadrupole mass spectrometer (Waters) を使用した。

### 4-2 収集素材

素材	採集地
アスパラガス ( <i>Asparagus officinalis</i> L.)	虻田郡喜茂別町
リシリコンブ ( <i>Laminaria ochotensis</i> )	利尻郡利尻町
ヤーコン ( <i>Smallanthus sonchifolius</i> )	札幌市
メロン ( <i>Cucumis melo</i> )	岩内郡共和町
ニンジン ( <i>Daucus carota</i> L.)	札幌市
ナガイモ ( <i>Dioscorea batatas</i> )	帯広市川西町

いずれも株式会社アミノアップ化学 (現 株式会社アミノアップ) 保管の熟水抽出 (20 mL/g 乾燥重 121°C、20 分) サンプルを用いた。



#### 4-3 細胞及び培地

ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞; 独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター) は 10%ウシ胎児血清 (FBS) 及び抗生物質 (ペニシリン G 100 U/mL、ストレプトマイシン 100 µg/mL、アンフォテリシン B 0.25 µg/mL) 添加ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を使用し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。

ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60 細胞; 大日本住友製薬株式会社) は 10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加 RPMI-1640 培地 (ニッスイ) を使用し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した (Kondo *et al.*, 2000)。

#### 4-4 道産農水産物の熱水抽出物を用いた *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性試験 (半定量 PCR)

HeLa 細胞を 10%FBS 添加 DMEM に懸濁し、6 穴プレートに播種して ( $2 \times 10^6$  cells/2 mL/well)、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。翌日、フレッシュな DMEM (1.8 mL) に交換し、サンプルを終濃度が 1 mg/mL となるように 0.2 mL 添加した。コントロールには、イオン交換水 0.2 mL を添加した。6 時間培養後、細胞をセルスクレーパーで剥がし、RNA 抽出キット NucleoSpin RNA II (タカラバイオ株式会社) を使用してトータル RNA を抽出した。吸光度法により RNA 濃度を算出し 50 ng/µL に揃えた後、cDNA 合成キット PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis (タカラバイオ株式会社) 及びキット付属の Oligo dT primer を用いて cDNA を合成し、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水により 10 倍希釈したものを PCR のテンプレートとした。*Hsp70* (BC002453) に対する PCR 用のプライマーとして、5'-CAAGATCACCATCACCAACG-3' (forward primer) 及び 5'-CTCAAACCTCGTCCTTCTCGC-3' (reverse primer) を使用した。内部

標準遺伝子としては *beta 2 microglobulin* (*B2M*; AB021288) を選択し、そのプライマーとして、5'-TAGCTGTGCTCGCGCTACT-3' (forward primer) 及び 5'-AGTGGGGGTGAATTCAGTGT-3' (reverse primer) を使用した。PCR 用酵素には Takara Ex *Taq* (タカラバイオ株式会社) を使用した。PCR 反応液 (20  $\mu$ L) は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM デオキシヌクレオシド 3 リン酸、0.5 U Takara Ex *taq*、10 pmol 各プライマー、5  $\mu$ L cDNA から成る。Bio-Rad C1000 thermal cycler (Bio-Rad) により下記の方法で反応を行った。PCR 反応液を 94°C で 1 分間インキュベート (初期変性) し、その後 94°C で 30 秒の変性、57°C (*Hsp70*) 又は 59°C (*B2M*) で 30 秒のアニーリング及び、72°C で 30 秒の伸長を 32 サイクル (*Hsp70*) 又は 24 サイクル (*B2M*) 繰り返した。最後に 72°C で 30 秒の伸長反応を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動による分離後、エチジウムブロマイド (1 mg/L) により染色した。ゲルを UV (260 nm) 照射下でスキャンし、TIFF 形式で取込んだ画像をもとに、蛍光強度を ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)により測定した。最終的に、*Hsp70* と *B2M* のバンド蛍光強度の比 (*Hsp70* / *B2M*) を求めることで *Hsp70* の発現量とした。

#### 4-5 HL-60 細胞に対する細胞増殖抑制確認試験

各サンプルを 1.25~5 mg/mL となるようにイオン交換水で調製し、0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過滅菌し、0.05 mL を 1 mL マイクロチューブに加えた。ここに RPMI-1640 培地で  $5 \times 10^5$  cells/mL になるように調製した HL-60 細胞 0.45 mL を加え、37°C で 24 時間インキュベートした。ここから、無菌的に 10  $\mu\text{L}$  分取し、等量のトリパンプルーに懸濁して生細胞を計測した。

#### 4-6 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性試験 (リアルタイム PCR)

HL-60 細胞を、あらかじめ 37°C にした RPMI-1640 培地で  $5 \times 10^5$  cells/mL となるように調製し、0.9 mL を 1.5 mL マイクロチューブへ入れた。そこへ、化合物 **2** 及び **2a** については終濃度 0.5、0.25、0.125 mg/mL となるように、化合物 **1** 及び **2b** については終濃度 0.25 mg/mL となるように培地に溶解した各サンプル (0.1 mL) を添加した。コントロールにはイオン交換水 0.1 mL を添加した。ポジティブコントロールには 100  $\mu\text{M}$  の GGA (東京化成工業株式会社) を 0.1 mL 添加した。4 時間後、細胞を遠心分離 ( $1000 \times g$ ) により回収し、TRIzol 試薬 (Ambion, Austin) を用いて RNA を抽出した。RNA 濃度は NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) を用いて測定し、DEPC 水で 50 ng/ $\mu\text{L}$  に調製した。cDNA 合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて行った。逆転写反応は 10  $\mu\text{L}$  のスケールで行い、300 ng の RNA をテンプレートとして用いた。逆転写反応液は RNase-free water で 10 倍に希釈した後、リアルタイム PCR のテンプレートとした。PCR 用のプライマーとして、5'-GCATTTCCCTAGTATTTCTGTTTGT-3' (forward primer) 及び 5'-AATAGTCGTAAGATGGCAGTATA-3' (reverse primer) を使用した。内部

標準遺伝子としては *beta 2 microglobulin* (*B2M*) 遺伝子を選択し、そのプライマーとして、5'-TAGCTGTGCTCGCGCTACT-3' (forward primer) 及び 5'-AGTGGGGGTGAATTCAGTGT-3' (reverse primer) を使用した。リアルタイム PCR は SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を用いて CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad) により反応を行った。反応条件は 95°C、3 分の初期変性後、95°C (1 秒)、59°C (10 秒) を 40 サイクル行った。また、*B2M* をリファレンスとして使用した。

リアルタイム PCR 解析システム CFX Connect により得られた Cq 値を用い以下の計算式に基づいて *Hsp70* 遺伝子の発現量比を算出した ( $\Delta\Delta C_t$  法)。

サンプルの *Hsp70* の Cq 値 : A

サンプルの *B2M* の Cq 値 : B

$$\Delta C_q = A - B$$

$$\Delta (\Delta C_q) = \Delta C_q (\text{サンプル}) - \Delta C_q (\text{Day-2})$$

$$\text{発現量比} = 2^{-\Delta (\Delta C_q)}$$

コントロールの発現量比を 100%としたときのサンプルの発現量比を%で示した。

## 4-7 Hsp70 mRNA の発現量の上昇活性を有する素材の製造方法の確立

### 4-7-1 アスパラガス熱水抽出物の調製

アスパラガス 50 g (新鮮重) を秤量し、300 mL 三角フラスコに入れ、イオン交換水 100 mL を加えた。これを 121°C、20 分 (オートクレーブ) 抽出し、濾過した濾液に賦形剤としてパインデックス (1.68 g; 松谷化学工業株式会社) を加えた。これを凍結乾燥してアスパラガス熱水抽出物 (3.45 g) を得た (アスパラガス由来固形分 3.54%)。

### 4-7-2 酵素の選抜

アスパラガス 50 g (新鮮重) を秤量し、300 mL 三角フラスコに入れ、イオン交換水 100 mL を加えた。これを 121°C、20 分 (オートクレーブ) 抽出した後、下記酵素反応温度まで放冷した。その後、下記に示した各酵素をアスパラガス重量の 0.5% (0.25 g) 加え、各温度で 24 時間反応した。反応後、121°C、20 分 (オートクレーブ) で酵素を失活し、濾過により残渣を除去した。得られた濾液に賦形剤としてパインデックスを加え、オートクレーブにより滅菌 (121°C、20 分) した後、凍結乾燥して各酵素処理アスパラガス熱水抽出物を得た。

Table 1-6. 酵素処理後のアスパラガス固形分

種類	反応温度 (°C)	賦形剂量 (g)	固形分 (%)
マセロチーム A	45	2.49	4.78
スクラーゼ A	50	2.47	4.77
スクラーゼ C	60	2.95	5.19
ユニアーゼ L	55	2.50	3.81
スクラーゼ C + マセロチーム A	50	2.47	5.67
スクラーゼ C + ユニアーゼ L	55	4.97	5.47
マセロチーム A + ユニアーゼ L	45	4.92	4.80

#### 4-7-3 酵素添加量

アスパラガス 50 g (新鮮重) を秤量し、300 mL 三角フラスコに入れ、イオン交換水 100 mL を加えた。これを 121°C、20 分 (オートクレーブ) 抽出した後、60°C まで放冷した。その後、セルラーゼ (スクラーゼ C; 三菱化学フーズ株式会社) をアスパラガス重量の 0.04、0.2、0.4、1.2% 添加し、60°C、24 時間反応した。反応後、121°C、20 分 (オートクレーブ) で酵素を失活し、濾過により残渣を除去した。得られた濾液に賦形剤としてパインデックスを加え、オートクレーブにより滅菌 (121°C、20 分) した後、凍結乾燥して回収率を算出した。同様に、ペクチナーゼ (マセロチーム A; ヤクルト薬品工業株式会社) をアスパラガス重量の 0.2、0.5、1.0、2.0% 添加し、45°C、24 時間反応させた。

#### 4-7-4 酵素反応時間

アスパラガス 50 g (新鮮重) を秤量し、300 mL 三角フラスコに入れ、イオン交換水 100 mL を加えた。これを 121°C、20 分 (オートクレーブ) 抽出した後、60°C まで放冷した。その後、セルラーゼをアスパラガス重量の 0.5% 添加し、60°C、12、18、23 及び 36 時間反応した。反応後、121°C、20 分 (オートクレーブ) で酵素を失活し、濾過により残渣を除去した。得られた濾液に賦形剤としてパインデックスを加え、オートクレーブにより滅菌 (121°C、20 分) した後、凍結乾燥して回収率を算出した。

#### 4-7-5 酵素反応温度

アスパラガス 50 g (新鮮重) を秤量し、300 mL 三角フラスコに入れ、イオン交換水 100 mL を加えた。これを 121°C、20 分 (オートクレーブ) 抽出した後、45°C まで放冷した。セルラーゼ、ペクチナーゼをアスパラガス重量の 0.5% 添加し、45°C にて 24 時間反応した。反応後、121°C、20 分 (オートクレーブ) で酵素を失活し、濾過により残渣を除去した。得られた濾液に賦形剤としてパインデックスを加え、オートクレーブにより滅菌 (121°C、20 分) した後、凍結乾燥して回収率を算出した。

#### 4-8 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する物質の探索

##### 4-8-1 ETAS の調製

ETAS は、株式会社アミノアップ化学の健康補助食品 GMP、ISO9001 及び ISO22000 の認証工場で生産した。アスパラガス (新鮮重 90 kg) に水 180 L を加え、121°C、45 分加熱し、熱水抽出した。得られた抽出液の温度が 60°C まで下がった段階でセルラーゼ (0.9 kg) を添加して攪拌した。1.5 時間後、45°C まで下がった段階でペクチナーゼ (0.9 kg) を添加し、24 時間反応した。得られた反応液を 121°C、20 分で加熱して酵素を失活させ、7,200 rpm で遠心分離した後、上清に賦形剤としてパインデックス (9.0 kg) を添加した。この後、減圧濃縮し、121°C、45 分滅菌した。最後にこれをスプレードライヤーで乾燥粉末化して ETAS (14.5 kg) を得た (Lot.111104)。

#### 4-8-2 *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性を有する物質の単離

ETAS (Lot.111104; 1.0 kg) をイオン交換水に溶解し、DIAION HP-20 (10.5 × 48 cm; 三菱化学株式会社) カラムクロマトグラフィーに供し、イオン交換水 (12 L) で洗浄後、30%メタノール水溶液 (12 L)、60%メタノール水溶液 (15 L) 及びメタノール (10 L) で溶出した。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧濃縮し、画分 F1 (121.2 g) を得た。一方、60%メタノール水溶液溶出画分を減圧濃縮し、画分 F2 (14.1 g) を得た。

画分 F1 の一部 (100.0 mg) を HPLC (CAPCELL PAK C18 UG-120, 20 × 250 mm; 資生堂; solvent A, H<sub>2</sub>O; solvent B, MeOH; 0–10 min, 20% B; 10–30 min, 20–50% B; 30–40 min, 50% B; 40–41 min, 50–20% B; and 41–45 min, 20% B, 8 mL/min, A<sub>280</sub>) に供することにより淡黄色油状の化合物 **1** (3.0 mg) を得た。

画分 F2 をイオン交換水 (300 mL) に再溶解し、EtOAc で抽出した (300 mL × 5)。これを減圧濃縮して得られた濃縮物 (2.5 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (4.0 × 42 cm, 63–200 μm; メルク; CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 95:5) に供した。ETAS からここまでの精製を 6 回繰返し、シリカゲルカラム精製画分 (423.4 mg) を得た。これを HPLC (CAPCELL PAK C18 UG-120, 20 × 250 mm; solvent A, H<sub>2</sub>O; solvent B, MeOH; 0–10 min, 20% B; 10–30 min, 20–50% B; 30–40 min, 50% B; 40–41 min, 50–20% B; and 41–45 min, 20% B, 8 mL/min, A<sub>280</sub>) に供することにより褐色油状の化合物 **2** (2.0 mg) を得た。



### 4-8-3 単離した化合物の構造決定

単離した化合物 **2** のスペクトルデータを以下に示す。

旋光度  $[\alpha]_D^{25} -12.2^\circ$  ( $c$  0.69, MeOH)

EI-MS (rel. int.)  $m/z$  237  $[M]^+$  (5), 110 (12), 109 (27), 84 (100)

HREI-MS  $m/z$  237.0612 (calcd. for  $C_{11}H_{11}NO_5$ , 237.0637)

IR (neat)  $\nu$  max 3340, 3136, 1773, 1682, 1205  $cm^{-1}$

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 9.58 (1H, s, H-6), 8.05 (NH, s), 7.52 (1H, d,  $J$  = 3.4 Hz, H-3), 6.82 (1H, d,  $J$  = 3.4 Hz, H-4), 5.26 (1H, d,  $J$  = 13.6 Hz, H-7a), 5.21 (1H, d,  $J$  = 13.6 Hz, H-7b), 4.24 (1H, dd,  $J$  = 9.1, 3.9 Hz, H-2'), 2.34 (1H, m, H-3'a), 2.14 (1H, m, H-4'a), 2.11 (1H, m, H-4'b), 1.98 (1H, m, H-3'b)

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 178.7 (CH, C-6), 177.3 (C, C-5'), 172.6 (C, C-6'), 155.1 (C, C-5), 152.5 (C, C-2), 124.0 (CH, C-3), 113.3 (CH, C-4), 58.3 ( $CH_2$ , C-7), 54.7 (CH, C-2'), 28.9 ( $CH_2$ , C-4'), 24.6 ( $CH_2$ , C-3')

#### 4-8-4 化合物 **2a** の合成

(*S*)-Pyroglutamic acid (3.0 g, 23.2 mmol) と D-fructose (1.5 g) を三角フラスコに入れ、オートクレーブを用いて 121°C、20 分加熱した。その後、少量の水に溶解し、DIAION HP-20 (2.5 × 25 cm) カラムクロマトグラフィーに供し、イオン交換水 (600 mL) で洗浄後、30%メタノール水溶液 (500 mL)、メタノール (500 mL) で溶出した。メタノール溶出画分を減圧濃縮し (465.6 mg)、これを HPLC (CAPCELL PAK C18 UG-120, 20 × 250 mm; solvent A, H<sub>2</sub>O; solvent B, MeOH; 0–10 min, 20% B; 10–30 min, 20–50% B; 30–40 min, 50% B; 40–41 min, 50–20% B; and 41–45 min, 20% B, 8 mL/min, A<sub>280</sub>) に供することにより化合物 **2a** (24.4 mg, 0.10 mmol, 収率 0.43%) を得た。

旋光度  $[\alpha]_D^{25} -11.8^\circ$  ( $c$  0.88, MeOH)

EI-MS (rel.int.)  $m/z$  237 [M]<sup>+</sup> (14), 110 (10), 109 (21), 84 (100)

HREI-MS  $m/z$  237.0622 (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>, 237.0637)

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 9.57 (1H, s, H-6), 7.39 (1H, d,  $J$  = 3.4 Hz, H-3), 6.74 (1H, d,  $J$  = 3.4 Hz, H-4), 5.27 (1H, m, H-7a), 5.14 (1H, m, H-7b), 4.34 (1H, dd,  $J$  = 9.1, 3.9 Hz, H-2'), 2.47 (1H, m, H-3'a), 2.34 (1H, m, H-4'a), 2.30 (1H, m, H-4'b), 2.18 (1H, m, H-3'b)

<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 181.1 (CH, C-6), 179.6 (C, C-5'), 173.4 (C, C-6'), 156.7 (C, C-5), 154.5 (C, C-2), 124.0 (CH, C-3), 114.0 (CH, C-4), 59.6 (CH<sub>2</sub>, C-7), 57.0 (CH, C-2'), 30.2 (CH<sub>2</sub>, C-4'), 25.8 (CH<sub>2</sub>, C-3')

#### 4-8-5 化合物 **2b** の合成

(*R*)-Pyroglutamic acid (2.0 g, 15.5 mmol) と D-fructose (1.0 g) を三角フラスコに入れ、オートクレーブを用いて 121°C、20 分加熱した。その後、少量の水に溶解し、DIAION HP-20 (2.5 × 15 cm) カラムクロマトグラフィーに供し、イオン交換水 (300 mL) で洗浄後、30%メタノール水溶液 (300 mL)、60%メタノール水溶液 (400 mL) で溶出した。60%メタノール水溶液溶出画分を 50mL 程度まで減圧濃縮し、EtOAc (50 mL × 5) で抽出した。EtOAc 画分を減圧濃縮し (80.8 mg)、さらに DIAION HP-20 (1.5 × 4 cm) カラムクロマトグラフィーに供し、イオン交換水 (50 mL) で洗浄後、30%メタノール水溶液 (50 mL)、60%メタノール水溶液 (50 mL) で溶出した。60%メタノール水溶液溶出画分を減圧濃縮し、化合物 **2b** (24.6 mg, 0.10 mmol, 収率 0.65%) を得た。

旋光度  $[\alpha]_D^{25} +11.3^\circ$  ( $c$  0.16, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 9.57 (1H, s, H-6), 7.39 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz, H-3), 6.74 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz, H-4), 5.27 (1H, m, H-7a), 5.15 (1H, m, H-7b), 4.35 (1H, dd,  $J = 9.1, 3.9$  Hz, H-2'), 2.46 (1H, m, H-3'a), 2.35 (1H, m, H-4'a), 2.31 (1H, m, H-4'b), 2.19 (1H, m, H-3'b)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 181.1 (CH, C-6), 179.6 (C, C-5'), 173.4 (C, C-6'), 156.8 (C, C-5), 154.5 (C, C-2), 124.0 (CH, C-3), 114.0 (CH, C-4), 59.6 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 57.0 (CH, C-2'), 30.3 ( $\text{CH}_2$ , C-4'), 25.8 ( $\text{CH}_2$ , C-3')

4-8-6 化合物 **2**、**2a** 及び **2b** の保持時間比較に用いた HPLC 分析条件

以下に HPLC 条件を示す。

Column	CHIRALPAK IA (4.6 × 150 mm, 5 μm; ダイゼル)			
HPLC	HITACHI L-7100 series			
Column Temp.	40°C			
Mobile phase	A: 20 mM phosphate buffer (pH 2.3)			
	B: MeCN			
Time Program	Time(min)	A(%)	B(%)	Flow Rate
	0	95	5	1.0 mL/min
	5	95	5	
	20	90	10	
	60	90	10	
Inj.vol.	10 uL			
Detector	UV 280 nm			

#### 4-8-7 ETAS 中の化合物 1 の分析

アスパラガス 500 g (新鮮重) を万力で圧搾し、濾過後、賦形剤としてパインデックス 5 g を添加した。これを凍結乾燥し、生アスパラガスサンプルとした (12.3 g)。アスパラガス熱水抽出物は 2-2-2 で調整したもの、ETAS は 2-3-1 で調整した Lot.111104 を使用した。

以下に HPLC 条件を示す。

Column	SHISEIDO CAPCELL PAK UG-120 (4.6 × 150 mm, 5 μm; 資生堂)			
HPLC	HITACHI L-7100 series			
Column Temp.	40 °C			
Mobile phase	A: 20 mM phosphate buffer (pH 2.3) B: MeCN			
Time Program	Time(min)	A(%)	B(%)	Flow Rate 1.0 mL/min
	0	95	5	
	5	95	5	
	20	90	10	
	25	90	10	
	30	50	50	
	35	50	50	
	36	95	5	
Inj.vol.	10 uL			
Detector	UV 280 nm			

#### 4-8-8 生アスパラガス中の化合物 **2** の分析

分析サンプルは 4-8-7 で調整した生アスパラガスサンプルを使用した。カラムは ACQUITY ethylene-briged (BEH) C18 column (1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  100 mm) (Waters) を用い、以下の MS 条件、LC 条件、MRM 設定を用いて測定した。

##### MS 条件

Capillary Voltage (kV)	3.0
Cone Voltege (V)	80
Desolvation Temperature ( $^{\circ}$ C)	350
Source Temperature ( $^{\circ}$ C)	120
Cone Gas (L/h)	50
Desolvation Gas (L/h)	800

##### LC 条件

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B
0.0	0.25	90	10
0.2	0.25	90	10
2.5	0.25	10	90
2.6	0.25	0	100
4.5	0.25	0	100

A: 20% aq. MeOH + 0.05% AcOH

B: 100% MeOH + 0.05% AcOH

##### MRM 設定

[M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	transition ion ( <i>m/z</i> )	cone voltage (V)	collision energy (eV)
238.07	108.55	23.0	14.50

## 第2章 *In vitro* 及び *in vivo* における ETAS の HSP70 発現及びストレス指標 に対する効果

### 第1節 背景及び目的

第1章では、北海道産アスパラガス抽出物に HL-60 細胞の *Hsp70* mRNA の発現量の上昇活性があることを示し、さらに ETAS として工業レベルでの製造法を確立した。ETAS 中には複数の *Hsp70* mRNA の発現量上昇活性物質の存在が示唆されているが、第1章では、そのうち HMF (1) 及び (S)-(2-formylfuran-5-yl) methyl 5-oxopyrrolidine-2-carboxylate (2) を同定した。両化合物は、HL-60 細胞において *Hsp70* mRNA の発現量を上昇させた。細胞内で HSP の発現を上昇させることは、ストレスに適応するために有益と考えられる。これまでに、ETAS は老化促進マウスにおいて、神経保護効果を示すことや (Sakurai *et al.*, 2014)、神経細胞 PC12 においてアミロイドβ誘導性細胞障害を軽減すること (Ogasawara *et al.*, 2014) が報告されている。

本章では、ETAS の *in vitro* 及び *in vivo* での生物活性を検討した。*In vitro* の試験では、HeLa 細胞において ETAS が HSP70 mRNA 及びタンパク質発現量を上昇させるかを検討し、*in vivo* の試験ではマウス断眠モデルを用いて抗ストレス効果を検討した。

なお、本章の実験で用いた ETAS は第1章で調製した Lot.111104 を使用した。

## 第2節 結果

### 2-1 HSP70 mRNA 及びタンパク質発現

MTT アッセイにより、ETAS の細胞毒性を評価した結果、2.0 mg/mL において、12 時間後細胞生存率 73.4%、24 時間後で細胞生存率 71.3%であった。コントロールと比較して有意に細胞生存率が低下したが (Table 2-1)、ETAS が明確に毒性を示すとは判断できないため、HeLa 細胞における HSP70 mRNA 及びタンパク質発現量の上昇活性試験の濃度は 0.125~2.0 mg/mL で行うこととした。

Table 2-1. MTT アッセイ

ETAS	cell viability (%)			
	0 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	2.0 mg/mL
12h	100.0	87.3±0.02*	81.1±0.01*	73.4±0.01*
24h	100.0	77.7±0.00*	75.8±0.01*	71.3±0.01*

数値は平均値 ± 標準偏差 (SD) (n=3)で示した。(\* $p < 0.05$  vs control) (Student's  $t$ test).



ETAS の HeLa 細胞における HSP70 mRNA 及びタンパク質発現量の上昇活性を半定量 PCR 及び ELISA 法により評価した (Fig. 2-1)。その結果、ETAS は濃度依存的に HSP70 mRNA 及びタンパク質発現量を上昇させた。コントロール群と比較して mRNA では 0.125 mg/mL 以上で、タンパク質は 1.0 mg/mL 以上で有意に発現量の上昇が認められた。mRNA は 0.5 mg/mL で  $171.3 \pm 28.3\%$ 、タンパク質は 2.0 mg/mL で  $195.0 \pm 15.3\%$  の比で上昇を示した。

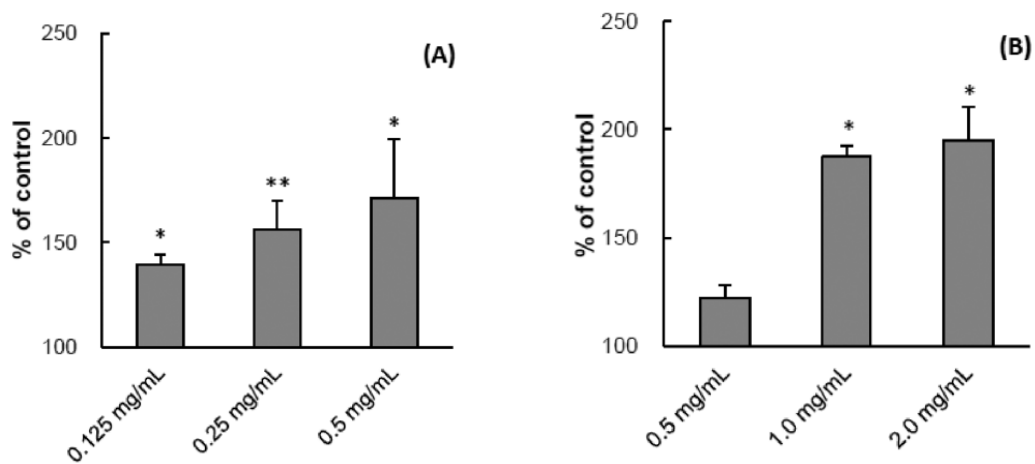


Fig. 2-1. HSP70 mRNA 及びタンパク質発現量の上昇活性  
HeLa 細胞に各種濃度の ETAS を添加し、HSP70 の発現量を mRNA (A) 及びタンパク質 (B) レベルで測定した。mRNA は半定量 PCR 法、タンパク質は ELISA 法により定量した。数値は平均値  $\pm$  標準誤差 (SEM) ( $n=3$ ) で示した。コントロールの HSP70 発現量を 100% とした場合の上昇率で示した。(\* $p < 0.05$  vs control, \*\* $p < 0.01$  vs control) (Student's  $t$ -test).

## 2-2 ストレス指標に対する効果

ETAS の抗ストレス効果をマウス断眠モデルにより評価した。断眠ストレスをげっ歯類に負荷すると、ストレスホルモンであるコルチコステロンの血中濃度が上昇することが報告されている (Mirescu *et al.*, 2006; Neto *et. al.*, 2010)。まず、6 週齢のマウス 32 匹をコントロール群、ETAS 非摂取群、低用量 ETAS 群 (200 mg/kg body weight: LD 群)、高用量 ETAS 群 (1,000 mg/kg body weight: HD 群) の 4 群 (各群 8 匹) に分けた。ETAS 非摂取群、低用量 (LD) 群及び高用量 (HD) 群には、3 日間にわたって 1 日 12 時間 (8:00~20:00) マウスを水浸させることにより、断眠ストレスを負荷した (Huang *et al.*, 2011)。コントロール群には、断眠ストレスを負荷しなかった。

その結果、ETAS 非摂取群では、ストレス負荷しなかったコントロール群と比較して血中コルチコステロン濃度が上昇した ( $124.4 \pm 14.5$  ng/mL)。一方、ETAS 摂取群では、低用量 (LD,  $60.8 \pm 16.8$  ng/mL) 群、高用量 (HD,  $26.7 \pm 5.0$  ng/mL) 群ともに有意に減少した (Fig. 2-2A)。

酸化ストレス指標としての血中の過酸化脂質量 (血清トリグリセライド (TG) 量に対する血清過酸化脂質 (LPO) 量比 (LPO/TG)) については、ETAS 非摂取群で上昇したが ( $6.57 \pm 0.98$  nmol/mg)、低用量 (LD) 群、高用量 (HD) 群ではそれぞれ  $4.31 \pm 1.13$ 、 $4.22 \pm 0.99$  nmol/mg であり、コントロール群の値 ( $3.96 \pm 0.26$  nmol/mg) 近くまで減少した (Fig. 2-2B)。

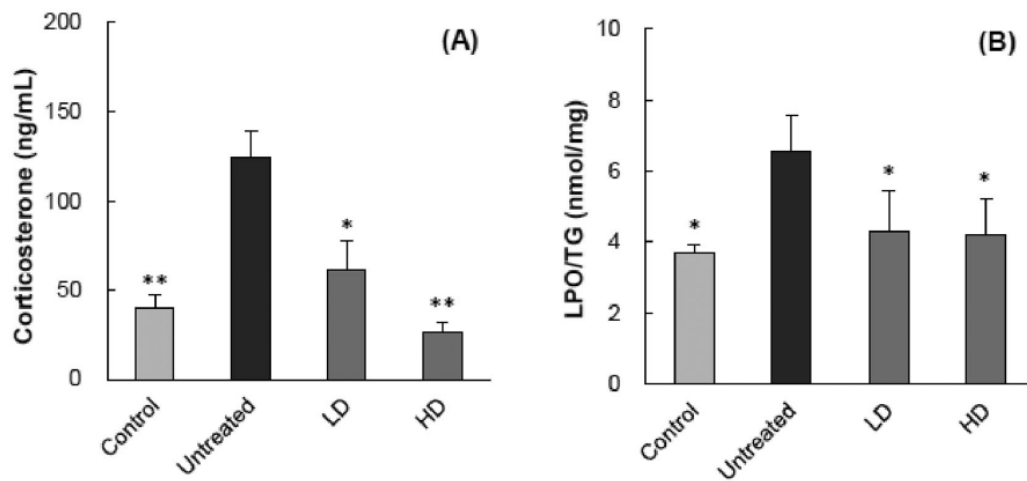


Fig. 2-2. コルチコステロン及び酸化ストレスレベル

マウスに断眠ストレスを負荷し、血中のコルチコステロン濃度 (A) 及び過酸化脂質量 (B) を指標に、ETAS の抗ストレス効果を検証した。マウスは、コントロール群 (Control)、ETAS 非摂取群 (Untreated)、低用量 ETAS 群 (LD) 及び高用量 ETAS 群 (HD) の 4 群に分け、コントロール群以外には断眠ストレスを負荷した。データは平均値 ± 標準誤差 (SEM) (n=8) で示した。(\* $p < 0.05$  vs untreated, \*\* $p < 0.01$  vs untreated) (Student's  $t$ -test).

さらに、脱毛マウスの出現率を評価した結果、コントロール群、ETAS 非摂取群、低用量 (LD) 群及び高用量 (HD) 群でそれぞれ、0%、75.0%、37.5% 及び 12.5% であり、低用量群及び高用量群では ETAS 非摂取群に比して脱毛発症率が低かった (Table 2-2)。

Table 2-2. 脱毛マウスの出現率

Group	n	Hair loss	Hair loss rate (%)
Control	8	0	0
Untreated	8	6	75.0
ETAS (LD)	8	3	37.5
ETAS (HD)	8	1	12.5

## 2-3 臓器別の HSP70 タンパク質発現

ETAS が断眠モデルマウスにおいて、血中コルチコステロン濃度及び酸化ストレス指標を減少させたため、同マウスにおける臓器別（胃、肝臓、腎臓）の HSP70 タンパク質発現量を ELISA 法によって評価した。コントロール群に対する各臓器の HSP70 タンパク質発現レベル（%）を Fig.2-3 に示す。胃では、ETAS 非摂取群で  $37.7 \pm 10.6\%$  まで減少したが、低用量（LD,  $80.6 \pm 8.9\%$ ）群及び高用量（HD,  $88.2 \pm 13.8\%$ ）群ではコントロール群と同程度であった。肝臓、腎臓においては、ETAS 非摂取群の HSP70 タンパク質発現レベルはコントロール群と同程度であった。一方、ETAS 摂取群ではコントロール群及び非摂取群より発現レベルが高かった。高用量（HD）群では、肝臓及び腎臓の発現レベルがそれぞれ  $194.5 \pm 39.8\%$ 、 $181.3 \pm 33.6\%$  であった。

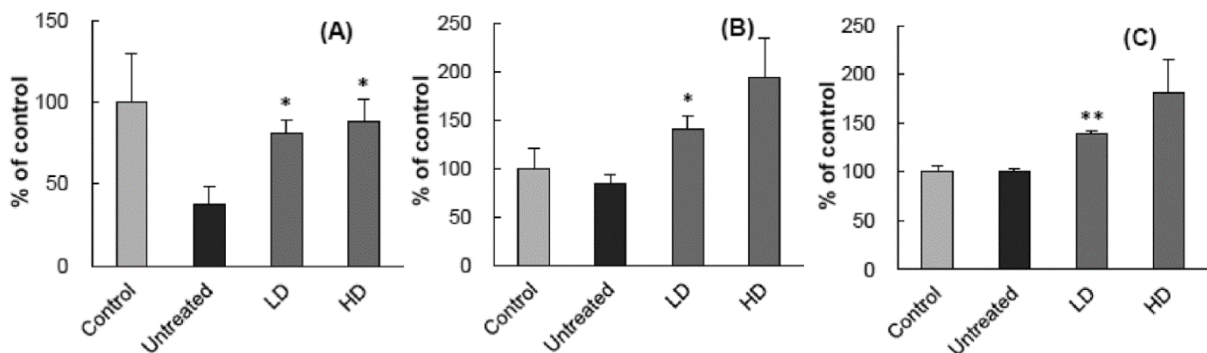


Fig. 2-3. 臓器別の HSP70 タンパク質発現

断眠モデルマウスにおいて、胃 (A)、肝臓 (B) 及び腎臓 (C) の HSP70 タンパク質発現量を測定した。マウスは、コントロール群 (Control)、ETAS 非摂取群 (Untreated)、低用量 ETAS 群 (LD) 及び高用量 ETAS 群 (HD) の 4 群に分け、コントロール群以外には断眠ストレスを負荷した。データは平均値 ± 標準誤差 (SEM) (n=8) で示しコントロール群の HSP70 タンパク質発現量を 100% とした場合の上昇率。(\* $p < 0.05$  vs untreated, \*\* $p < 0.01$  vs untreated) (Student's  $t$ -test).

### 第3節 考察

HSP70の研究で広く使用される HeLa 細胞を用い、ETAS の HSP70 mRNA 及びタンパク質発現量の上昇活性を評価した (Hayashi *et al.*, 1991)。その結果、ETAS は濃度依存的に HSP70 mRNA 及びタンパク質の発現量を上昇させた。

がん患者において HSP を誘導することに関しては議論の余地がある。がん細胞では放射線や化学療法に抵抗性を示すため、HSP が豊富に発現している (Murphy, 2013; Ischia and So, 2013)。そのため、HSP の機能を阻害することが、がん治療の効果を高めるとする見方もある。がん治療の分野では、HSP70、HSP90 の阻害剤開発や、HSP27 を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発も進められている。一方、HSP は腫瘍免疫の重要なメディエーターであるとも報告されている (Calderwood *et al.*, 2012)。分子シャペロンとしての機能から、HSP は腫瘍特異的なペプチドに結合し、抗原と認識されるよう抗原提示細胞へ導くことができる。ワクチンとしての HSP は、腫瘍特異的な免疫機能を活性化し、がん特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖と細胞毒性の活性化を導く。この場合、細胞内ではなく細胞外 HSP が腫瘍特異的な免疫機能に働きかける。ETAS が細胞内同様、細胞外での HSP70 量を増加させるか、また腫瘍の成長にどのように影響するかは、さらなる研究が必要である。HSP70 が疲労や、酸化ストレスを軽減し、また糖尿病などの疾患を改善するといった報告に基づく (Anand *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2003; Simar *et al.*, 2012)、ETAS が HSP70 の発現量を上昇させることにより様々な生物活性を導くことが期待される。

マウス断眠モデルを用いた実験において、ストレス指標に対する効果を示したが、マウスに対する ETAS の投与量 1,000 mg/kg は、ヒトに換算すると 5 g/60 kg となるため (Guidance for Industry, 2005)、投与量については検討の余地がある。特に、高用量群と低用量群の中間投与量、例えば 500 mg/kg での効果を

確認し、用量依存性を検討することも必要である。これまでの研究では、細胞内のいくつかのシグナル伝達経路がストレス性疾患と関わっていることが示されている (Zhang and Andersen, 2007)。この経路に HSP が関与していると考えられており、そのうち HSP70 は様々な組織で発現している。臓器別の HSP70 タンパク質発現を検討した結果、胃では、ETAS 非摂取群でコントロール群と比較して減少傾向を示した。これは、断眠によるストレスの負荷により HSP70 タンパク質発現が上昇するという当初の予想とは異なる結果と言える。胃は一般的に感受性が高い臓器であるため、ストレス負荷による何らかの影響があったものと考えられるが、詳細は不明であり、さらなる研究が必要と考える。また、肝臓及び腎臓においては、ETAS 非摂取群の HSP70 タンパク質発現上昇率はコントロール群と同程度であった。これらの臓器は胃ほど感受性が高くないため、今回のようなストレス負荷では HSP70 タンパク質発現は大きく変化しないのかもしれない。本研究において、ETAS がストレスホルモンであるコルチコステロンの上昇を抑制し、脱毛の発生率も抑制したという結果は、ETAS が抗ストレス効果を有し、身体的及び精神的ストレスを軽減することを示唆するものである。

## 第4節 実験部

### 4-1 実験動物

特定病原体未感染 (SPF) 雄 ddY マウス (日本 SLC 株式会社) を温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 55%~60% で飼育した。照明は 12 時間明期、12 時間暗期 (08:00 から 20:00 明期) とした。飼料は標準的なマウス用飼料 (CE-2; 日本クレア株式会社) を与え、自由給水として 1 週間馴化した。

### 4-2 MTT アッセイ

DMEM (10% FBS 添加) に懸濁させた HeLa 細胞を 96 穴プレートに播種し ( $5 \times 10^3$  cells/90  $\mu\text{L}$ /well)、 $37^\circ\text{C}$  で培養した。翌日、各 well に 10  $\mu\text{L}$  の MTT (株式会社同仁化学研究所) を加え、 $\text{CO}_2$  インキュベーターで 4 時間培養した。次に、各 well から培養液を抜き取り、100  $\mu\text{L}$  の ETAS (終濃度 0.5~2.0 mg/mL) を加え、 $37^\circ\text{C}$  で静置した。翌日、ホルマザンが完全に溶解したことを確認し、マイクロプレートリーダー (MTP-32 Microplate reader; Corona Electric) を用いて 550 nm の波長で吸光度を測定した。

### 4-3 *Hsp70* mRNA の発現量の評価 (半定量 PCR)

ETAS の終濃度を 0.125、0.25 及び 0.5 mg/mL とし、第 1 章の第 4 節、4-4 の手法により評価した。

#### 4-4 HSP70 タンパク質発現量の評価 (ELISA)

DMEM (10% FBS 添加) に懸濁させた HeLa 細胞を 12 穴プレートに播種し (1 × 10<sup>6</sup> cells/mL/well)、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。翌日、フレッシュな DMEM (0.9 mL) に交換し、種々の濃度の ETAS (終濃度 0.5、1.0、2.0 mg/mL) を 0.1 mL 添加した。コントロールには、イオン交換水 0.1 mL を添加した。24 時間培養後、培養上清を除去し、PBS (-) (リン酸緩衝生理食塩水) で洗浄した。その後、細胞をセルスクレーパーで剥離し、1.5 mL サンプルチューブに回収して、HSP70 タンパク質定量及び総タンパク質定量に供した。HSP70 タンパク質の定量については HSP70 ELISA キット (Enzo Life Science)、総タンパク質の定量については Micro BCA Protein Assay reagent キット (Pierce Biotechnology Inc.) を用いて行った。また、同条件で培養した細胞を用いて、サンプルが細胞増殖に与える影響を MTT 法により評価した。その後、総タンパク質量及び生細胞数で補正した値を HSP70 タンパク質量とした。

#### 4-5 *In vivo* における HSP70 発現及びストレス指標に対する効果

動物実験は株式会社アミノアップ化学 (札幌市) の倫理委員会の承認を受けて行った。6 週齢のマウス 32 匹をコントロール群、ETAS 非摂取群、低用量 ETAS 群 (200 mg/kg body weight: LD 群)、高用量 ETAS 群 (1,000 mg/kg body weight: HD 群) の 4 群 (各群 8 匹) に分けた。断眠ストレスを負荷する 7 日前から、ETAS は通常粉末餌 (CE-2; 日本クレア株式会社) に混餌し、コントロール群、ETAS 非摂取群には通常粉末餌を与えた。ETAS 非摂取群、低用量 (LD) 群及び高用量 (HD) 群には、3 日間にわたって 1 日 12 時間 (8:00~20:00) マウスを水浸させることにより、断眠ストレスを負荷した (Huang *et al.*, 2011)。コ



ントロール群には、断眠ストレスを負荷しなかった。断眠ストレス負荷終了の翌日、エーテル麻酔下で心臓から採血、臓器の摘出、脱毛の有無の確認を行った。血中コルチコステロン濃度の測定は、steroid-based index of stress in rodents (Wu *et al.*, 2011) に基づき測定し、また酸化ストレス指標としての血中過酸化脂質量(血清トリグリセライド(TG)量に対する血清過酸化脂質(LPO)量比(LPO/TG))も評価した。TG濃度は、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ-*N*-エチル-*N*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム(GPODAOS)法(Triglyceride E test Wako, 和光純薬工業株式会社)により算出した。LPOはチオバルビツール酸(TBA)法(Serafini-Cessi and Cessi, 1968)を参考に算出した。同マウスにおける胃、肝臓、腎臓のHSP70タンパク質発現レベルも評価した。各臓器(50 mg)を1.5 mLのサンプルチューブに入れ、キット付属の抽出試薬(プロテアーゼ阻害剤を含む)中ですり潰し遠心した後、その上清におけるHSP70タンパク質量及び総タンパク質量を4-4に記した方法により定量した。

#### 4-6 統計解析

データは、平均 ± 標準誤差(SEM)で示した。データは一元配置分散分析(ANOVA)により解析した。post hoc testとしてFisher's protected least significance difference (PLSD)を用いた。統計的有意水準は5% ( $p < 0.05$ )とした。

### 第3章 健常成人における ETAS の *Hsp70* mRNA 発現、ストレス指標及び睡眠に対する効果

#### 第1節 背景及び目的

ストレスや疲労は現代社会において大きな問題となっている。特に、慢性ストレスは、うつ、睡眠障害、神経症状などの様々な疾病と関連している (Han *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013)。ストレスは複雑な問題であり、ひとつの治療であらゆるストレスを取り除くことはできない。現在の治療方法は、潜在する身体的及び精神的問題が解決することを期待して、表面に現れる症状に対処しているため、新しい治療法が希求されている。全ての生命体は、様々なストレスから生き残るための防御機構を有している。そのひとつが HSP の発現である (Calabrese *et al.*, 2012)。

第1章で記述したように、*Hsp70* mRNA の発現量を上昇させる新しい植物性素材の探索において、アスパラガスに着目した。アスパラガスは北海道の代表的な農産物であり、何世紀もの間、伝統薬分野において機能性食品として使用されてきた。これまでの研究では、アスパラガス抽出物は糖尿病ラットにおいて血中グルコースレベルを調節し、酸化防御活性を有することなどが示されている (Hafizur *et al.*, 2012; Tiveron *et al.*, 2012)。第1章では、北海道で栽培されているアスパラガスの未利用部位から、新規な機能性素材である ETAS を調製したことを述べ、さらに、その活性成分及び工業レベルでの製造法について論じた。第2章では、HeLa 細胞において、ETAS が HSP70 の mRNA やタンパク質発現量を上昇させることを示した。また、動物実験では、ETAS が断眠モデルマウスにおいて血中コルチコステロンの上昇を抑制することを見出した。

本章では、まず、ETAS の安全性を証明するために実施した Ames 試験、マウス骨髄小核試験、ラット急性及び亜慢性経口投与毒性試験について論じる。さらに、ETAS の血中 *Hsp70* mRNA 発現に対する影響、自律神経やストレス指標に対する影響、睡眠状態に与える影響を評価するためにデザインした 3 つのヒト介入試験の結果について論じる。

## 第2節 結果

### 2-1 ETAS の安全性評価

#### 2-1-1 安全性評価試験用 ETAS の調製

安全性評価試験用の ETAS は2ロット調製した。

アスパラガス（新鮮重 12 kg）に水 24 L を加え、121°C、45 分加熱し、熱水抽出した。得られた抽出液の温度が 60°C まで下がった段階でセルラーゼ（0.12 kg）を添加して攪拌した。さらに 45°C まで下がった段階でペクチナーゼ（0.12 kg）を添加し、72 時間反応させた。得られた反応液を 121°C、20 分で加熱して酵素を失活させ、賦形剤としてパインデックス（1.2 kg）を添加した後、スプレードライヤーで乾燥粉末化して ETAS（2.1 kg）を得た（Lot.111021）。

同様に、アスパラガス（新鮮重 1,005 kg）に水 1,000 L を加え、100°C、45 分加熱し、熱水抽出した。得られた抽出液の温度が 60°C まで下がった段階でセルラーゼ（10.0 kg）を添加して攪拌した。さらに 45°C まで下がった段階でペクチナーゼ（10.0 kg）を添加し、24 時間反応した。得られた反応液を 121°C、20 分で加熱して酵素を失活させ、7,200 rpm で遠心分離した後、上清に賦形剤としてパインデックス（61.4 kg）を添加し、これをスプレードライヤーで乾燥粉末化して ETAS（123.7 kg）を得た（Lot.HSP1209s）。各ロットの成分組成を（Table 3-1）に示す。

Table 3-1. 安全性試験に使用した ETAS の成分組成

Component	Lot.	
	111021	HSP1209s
Moisture (wt%)	3.3	3.1
Protein (wt%)	7.0	10.9
Total fat (wt%)	0.2	0.8
Ash (wt%)	2.7	4.0
Available carbohydrate and dietary fiber (wt%)	86.8	81.2
Calorie (kcal/100 g)	377	376
HMF(1) ( $\mu\text{g/g}$ )	426.3	401.9
compound 2 ( $\mu\text{g/g}$ )	0.18	0.06

## 2-1-2 ラットにおける急性経口毒性試験

急性毒性試験として雌ラットに体重当たり 175、550、2,000 mg/kg の ETAS (Lot.111021) を経口投与したところ、全てのラットが投与後から試験終了までの 14 日目まで生存し、体重増加や剖検結果に対する異常は認められなかった (Fig. 3-1)。したがって ETAS の 50%致死量 (LD<sub>50</sub>) は 2,000 mg/kg 以上であると判断した。

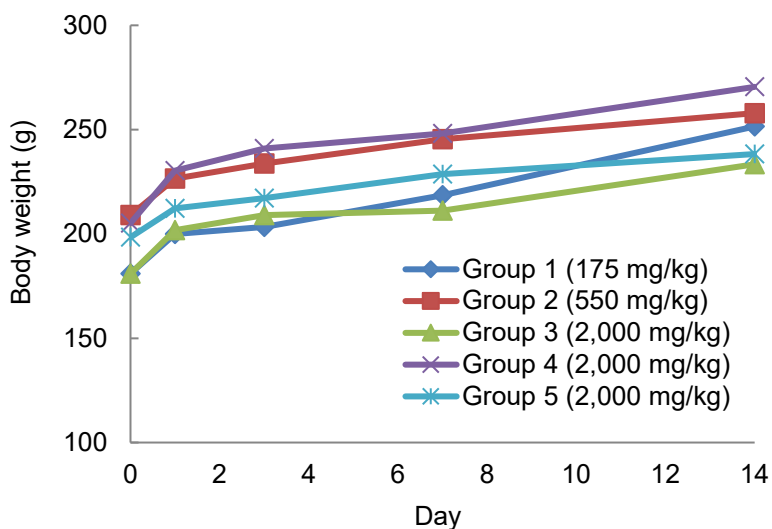


Fig. 3-1. ETAS の急性経口投与による体重変化

8 週齢の Crl:CD(SD)雌ラットに ETAS を単回、胃管投与した。まず Group 1 (n=1)に 175 mg/kg を投与し、48 時間経過を観察した。生存を確認した後、Group 2 (n=1)に 550 mg/kg を投与し、48 時間経過を観察した。その後、同様に Group 3~5 (各 n=1)に順次 2,000 mg/kg を投与した結果、14 日間、すべての Group が生存し、その体重に異常な変化は認められなかった。

### 2-1-3 ラットにおける 90 日間亜慢性毒性試験

ラット体重当たり 500、1,000 又は 2,000 mg/kg の ETAS (Lot.HSP1209s) の胃管投与による 90 日間の亜慢性毒性試験を行った。

#### 所見、体重、摂餌量

いずれのグループも試験サンプル摂取による異常行動や症状は認められなかった。コントロール群の雄ラット 2 匹と ETAS 1,000 mg/kg 投与群の雄ラット 1 匹で上部門歯が欠けていたが、いずれも飼育期間中における偶然の出来事であった。体重に関しては、500 mg/kg 投与群の雌ラットで、8 日目に有意な低下が認められたが、一時的な現象であり、試験サンプルの投与量とは無関係と判断した (Fig. 3-2)。摂餌量に関しても、500 mg/kg 投与群の雌ラットで、8 日目に有意な低下が認められ、1,000 mg/kg 投与群の雄ラットで 4 日目に有意な増加が認められたが、一時的な現象であり、試験サンプルの投与量とは無関係と判断した (Fig. 3-3)。

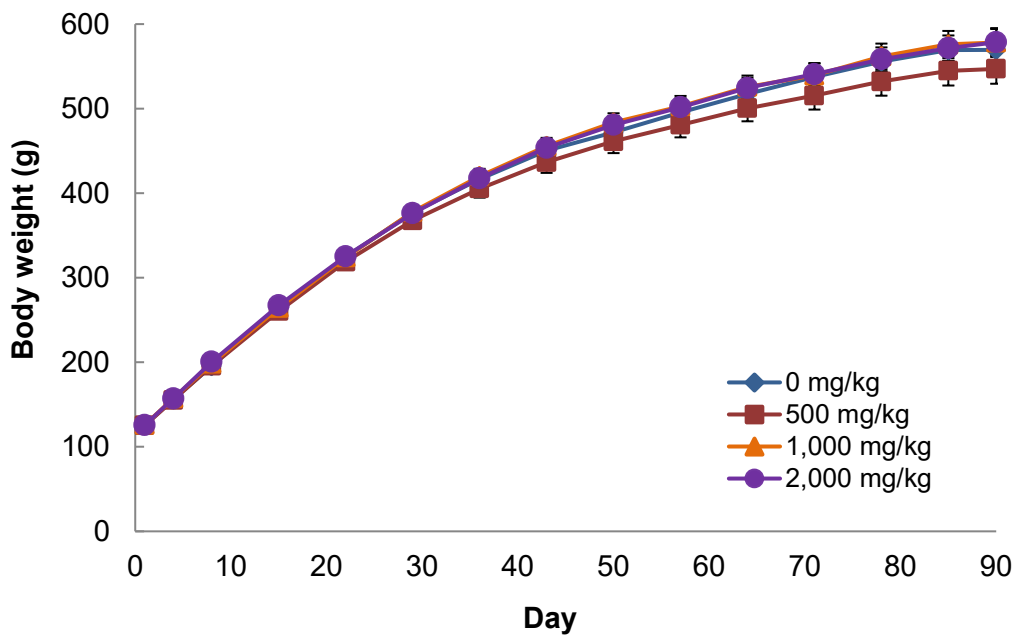


Fig. 3-2A. 雄ラットにおける体重変化

90日間、すべてのグループの体重に異常な変化は認められなかった。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) (n=10)で示した。

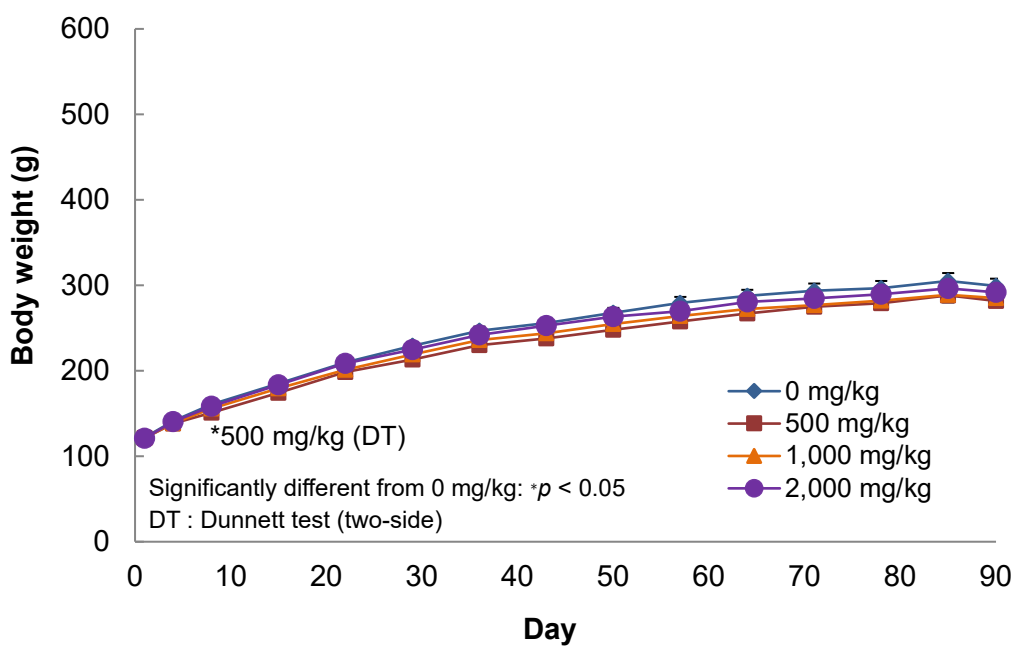


Fig. 3-2B. 雌ラットにおける体重変化

500 mg/kg 投与群で、8日目に有意な低下が認められたが、一時的な現象であり、試験サンプルの投与量とは無関係と判断した。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) (n=10)で示した。



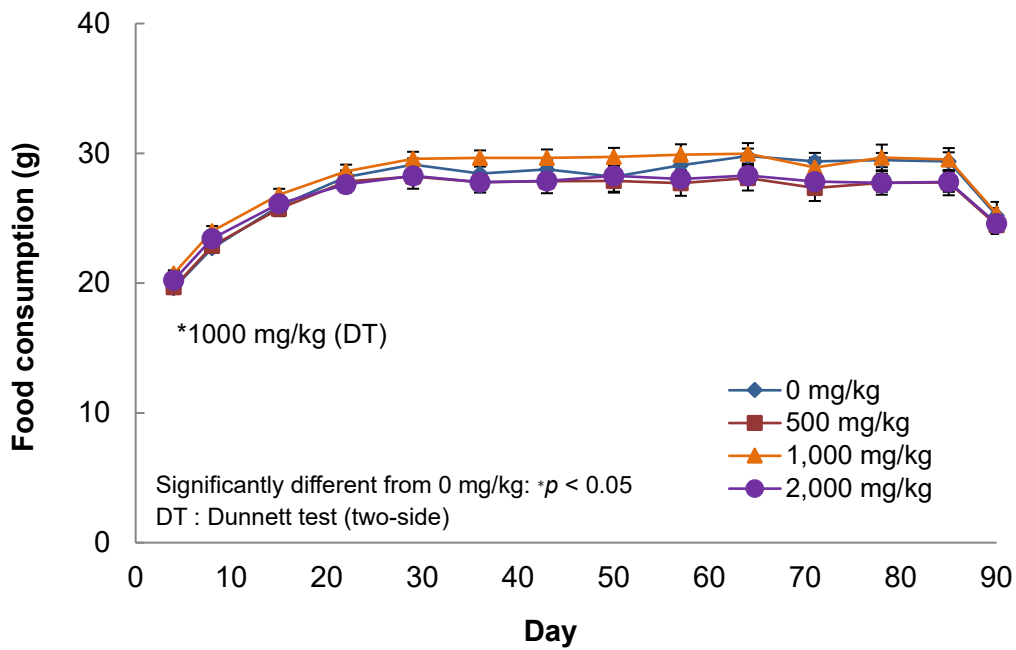


Fig. 3-3A. 雄ラットにおける摂餌量の変化

1,000 mg/kg 投与群で、4 日目に有意な増加が認められたが、一時的な現象であり、試験サンプルの投与量とは無関係と判断した。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) (n=10)で示した。

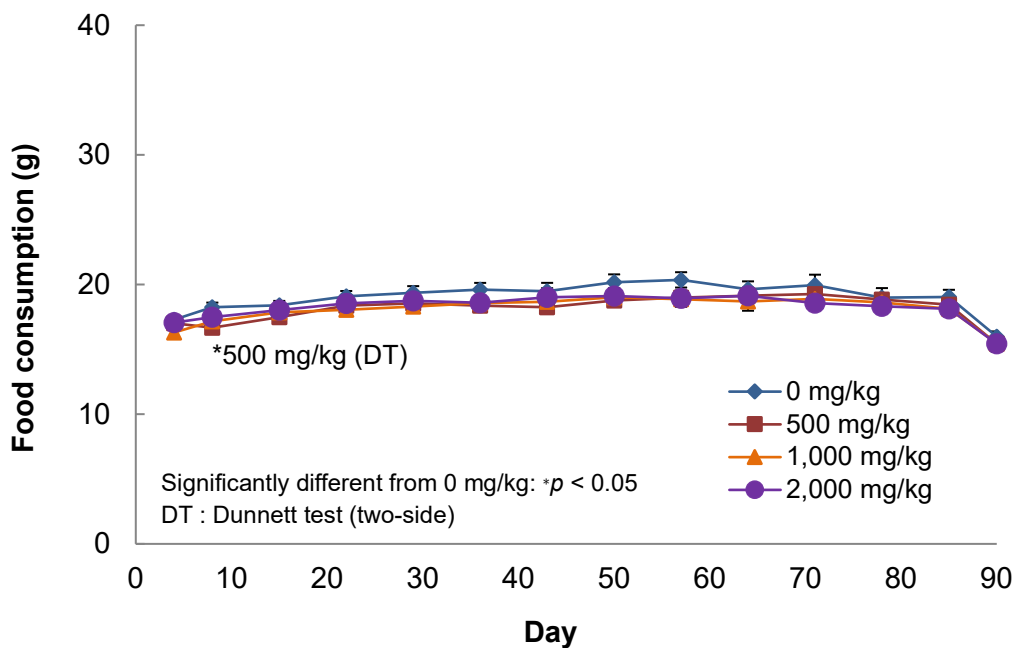


Fig. 3-3B. 雌ラットにおける摂餌量の変化

500 mg/kg 投与群で、8 日目に有意な低下が認められたが、一時的な現象であり、試験サンプルの投与量とは無関係と判断した。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) (n=10)で示した。

### 検尿、血液学的検査、生化学的検査

検尿の結果、500、1,000 mg/kg 投与群については、pH、タンパク、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血、尿量、比重等の項目に有意差は認められなかった。2,000 mg/kg 投与群では雌雄両群で有意なタンパク排出量の増加が認められたが (Table 3-2)、その他の項目ではコントロール群と比較して有意差は認められなかった。

Table 3-2. ETAS の 90 日間の反復経口投与による尿タンパク排出

Rats	Dose (mg/kg)	N	—	±	+	2+	3+
Male	0	10	4	4	2	0	0
	500	10	1	6	3	0	0
	1,000	10	0	6	3	1	0
	2,000*	10	0	3	7	0	0
Female	0	10	10	0	0	0	0
	500	10	9	1	0	0	0
	1,000	10	7	2	1	0	0
	2,000*	10	4	5	1	0	0

\*Significantly different from control group (0 mg/kg ETAS),  $p < 0.05$ .

血液学的検査の結果を (Table 3-3) に示す。500、1,000、2,000 mg/kg いずれの投与群でも、雄ラットでは有意差は認められなかった。雌ラットでは 1,000 mg/kg 投与群で平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) が有意に減少し、2,000 mg/kg 投与群で活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) が有意に増加した。MCHC の変化量は投与量非依存的であった。APTT の変化 ( $19.84 \pm 1.33$  s) はわずかな差であり、ヒストリカルコントロールデータ (15.8-22.4 s; N=60) の範囲内であった。

Table 3-3. ラット 90 日間亜慢性毒性試験における血液学的パラメーター

	Control 0 mg/kg	ETAS 500 mg/kg	ETAS 1,000 mg/kg	ETAS 2,000 mg/kg
<i>Male</i>				
RBC (10 <sup>4</sup> /μL)	924.7 ± 50.7	912.6 ± 30.8	886.5 ± 130.6	900.2 ± 50.9
HGB (g/dL)	16.09 ± 0.96	15.71 ± 0.50	15.15 ± 2.22	15.63 ± 0.96
HCT (%)	45.18 ± 2.50	44.09 ± 1.25	42.85 ± 5.38	44.24 ± 2.62
MCV (fL)	48.86 ± 1.03	48.34 ± 1.49	48.58 ± 2.30	49.16 ± 1.40
MCH (pg)	17.41 ± 0.49	17.23 ± 0.45	17.11 ± 0.27	17.35 ± 0.46
MCHC (g/dL)	35.60 ± 0.52	35.64 ± 0.61	35.24 ± 1.32	35.34 ± 0.22
Reticulocyte (%)	2.654 ± 0.463	2.569 ± 0.441	3.872 ± 3.637	3.032 ± 0.699
Platelet (10 <sup>4</sup> /μL)	117.52 ± 10.22	114.00 ± 12.74	117.03 ± 13.42	115.88 ± 13.57
WBC (10 <sup>2</sup> /μL)	68.76 ± 21.82	68.10 ± 14.19	70.99 ± 17.86	66.44 ± 20.40
Differential count of WBC				
Neutrophil (10 <sup>2</sup> /μL)	9.52 ± 5.07	9.14 ± 2.23	10.95 ± 8.22	11.12 ± 5.09
Lymphocyte (10 <sup>2</sup> /μL)	55.40 ± 16.76	55.65 ± 13.27	56.17 ± 16.33	52.07 ± 18.44
Monocyte (10 <sup>2</sup> /μL)	2.74 ± 1.29	2.33 ± 0.57	2.57 ± 0.79	2.30 ± 0.51
Eosinophil (10 <sup>2</sup> /μL)	1.10 ± 0.28	0.98 ± 0.38	1.27 ± 0.49	0.95 ± 0.33
Basophil (10 <sup>2</sup> /μL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.05	0.00 ± 0.00
PT (sec)	19.55 ± 3.91	18.84 ± 2.05	20.09 ± 6.37	18.15 ± 1.89
APTT (sec)	28.80 ± 2.52	29.04 ± 3.11	29.18 ± 4.05	27.65 ± 3.32
<i>Female</i>				
RBC (10 <sup>4</sup> /μL)	821.9 ± 34.9	818.1 ± 60.7	806.5 ± 24.6	790.4 ± 70.2
HGB (g/dL)	14.79 ± 0.37	14.93 ± 0.85	14.68 ± 0.43	14.52 ± 0.90
HCT (%)	41.58 ± 0.86	42.42 ± 2.11	42.06 ± 1.36	41.47 ± 2.19
MCV (fL)	50.66 ± 1.65	52.01 ± 2.74	52.16 ± 1.50	52.70 ± 3.25
MCH (pg)	18.01 ± 0.54	18.28 ± 0.79	18.22 ± 0.42	18.44 ± 0.82
MCHC (g/dL)	35.57 ± 0.44	35.20 ± 0.60	34.92 ± 0.38*	35.00 ± 0.65
Reticulocyte (%)	2.083 ± 0.351	2.720 ± 1.571	2.473 ± 0.323	2.818 ± 2.190
Platelet (10 <sup>4</sup> /μL)	104.09 ± 11.85	102.42 ± 7.50	102.34 ± 7.57	102.41 ± 12.45
WBC (10 <sup>2</sup> /μL)	32.56 ± 5.61	38.72 ± 11.17	34.46 ± 6.85	41.28 ± 10.80
Differential count of WBC				
Neutrophil (10 <sup>2</sup> /μL)	4.18 ± 1.02	4.80 ± 2.42	4.73 ± 1.61	6.30 ± 3.20
Lymphocyte (10 <sup>2</sup> /μL)	26.60 ± 5.15	31.99 ± 10.14	27.89 ± 6.40	32.95 ± 10.25
Monocyte (10 <sup>2</sup> /μL)	1.07 ± 0.27	1.26 ± 0.44	1.11 ± 0.34	1.33 ± 0.39
Eosinophil (10 <sup>2</sup> /μL)	0.71 ± 0.29	0.67 ± 0.30	0.73 ± 0.42	0.69 ± 0.47
Basophil (10 <sup>2</sup> /μL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.03
PT (sec)	16.56 ± 0.63	16.58 ± 0.41	16.43 ± 0.80	16.90 ± 1.04
APTT (sec)	17.95 ± 1.04	18.39 ± 2.43	18.05 ± 1.21	19.84 ± 1.33*

All values presented as means ± SD; N=10 rats per group.

\**p* < 0.05 vs Control

生化学的検査の結果、いずれの群のどの項目においても有意差は認められなかった (Table 3-4)。

Table 3-4. ラット 90 日間亜慢性毒性試験における生化学的検査結果

	Control 0 mg/kg	ETAS 500 mg/kg	ETAS 1,000 mg/kg	ETAS 2,000 mg/kg
<i>Male</i>				
AST (IU/L)	60.0 ± 10.8	61.8 ± 8.3	58.5 ± 6.9	55.8 ± 6.5
ALT (IU/L)	27.6 ± 4.3	28.8 ± 6.0	28.0 ± 5.6	26.1 ± 3.9
ALP (IU/L)	270.1 ± 36.2	289.2 ± 52.7	297.9 ± 42.2	286.1 ± 34.0
γ-GTP (IU/L)	0.48 ± 0.11	0.47 ± 0.13	0.42 ± 0.11	0.55 ± 0.39
T-Bil (mg/dL)	0.059 ± 0.012	0.061 ± 0.006	0.060 ± 0.014	0.062 ± 0.013
Glucose (mg/dL)	151.2 ± 15.8	151.5 ± 26.3	152.7 ± 14.8	142.4 ± 13.5
T-Cho (mg/dL)	58.4 ± 14.8	55.0 ± 9.8	63.4 ± 12.8	59.9 ± 14.5
TG (mg/dL)	55.1 ± 31.8	50.6 ± 25.4	51.1 ± 9.8	68.6 ± 35.4
TP (g/dL)	5.63 ± 0.21	5.41 ± 0.23	5.60 ± 0.24	5.61 ± 0.20
UN (mg/dL)	14.82 ± 1.52	16.06 ± 1.63	14.19 ± 1.08	14.00 ± 2.07
Crea (mg/dL)	0.296 ± 0.030	0.290 ± 0.039	0.279 ± 0.023	0.290 ± 0.052
Na (mEq/L)	144.4 ± 1.0	144.2 ± 0.8	144.6 ± 0.8	144.4 ± 0.8
K (mEq/L)	4.496 ± 0.189	4.436 ± 0.218	4.492 ± 0.290	4.533 ± 0.220
Cl (mEq/L)	104.8 ± 1.8	105.0 ± 1.2	104.4 ± 1.1	104.2 ± 1.8
Ca (mg/dL)	9.96 ± 0.30	9.92 ± 0.29	10.12 ± 0.09	10.05 ± 0.26
IP (mg/dL)	7.50 ± 0.62	7.16 ± 0.75	7.56 ± 0.73	7.67 ± 0.56
A/G	0.949 ± 0.054	0.995 ± 0.070	0.987 ± 0.050	0.957 ± 0.136
Albumin (%)	48.69 ± 1.37	49.80 ± 1.82	49.66 ± 1.21	48.68 ± 3.89
α1-G (%)	24.79 ± 1.57	24.22 ± 1.18	23.69 ± 1.43	23.90 ± 2.61
α2-G (%)	6.15 ± 0.35	6.44 ± 0.37	6.50 ± 0.44	6.38 ± 0.58
β-G (%)	16.26 ± 1.33	15.87 ± 0.73	16.29 ± 0.72	16.96 ± 1.78
γ-G (%)	4.11 ± 0.96	3.67 ± 0.58	3.86 ± 0.79	4.08 ± 0.69
<i>Female</i>				
AST (IU/L)	63.2 ± 14.7	99.9 ± 84.7	86.0 ± 82.6	59.9 ± 16.5
ALT (IU/L)	38.1 ± 38.0	56.4 ± 65.0	40.1 ± 37.3	28.9 ± 9.5
ALP (IU/L)	136.3 ± 45.4	150.1 ± 46.1	136.8 ± 33.4	124.8 ± 27.8
γ-GTP (IU/L)	0.85 ± 0.31	0.94 ± 0.27	1.05 ± 0.74	0.91 ± 0.57
T-Bil (mg/dL)	0.072 ± 0.012	0.079 ± 0.020	0.076 ± 0.012	0.061 ± 0.014
Glucose (mg/dL)	129.7 ± 5.5	134.6 ± 10.0	135.8 ± 15.2	128.3 ± 6.6
T-Cho (mg/dL)	68.4 ± 13.6	73.7 ± 22.2	74.5 ± 12.9	66.4 ± 13.2
TG (mg/dL)	28.8 ± 10.3	28.4 ± 11.0	33.5 ± 13.9	37.4 ± 11.8
TP (g/dL)	5.98 ± 0.27	6.08 ± 0.55	5.99 ± 0.31	5.97 ± 0.43
UN (mg/dL)	14.35 ± 1.74	15.64 ± 1.82	15.31 ± 1.44	15.50 ± 1.60
Crea (mg/dL)	0.327 ± 0.031	0.307 ± 0.040	0.317 ± 0.049	0.305 ± 0.037
Na (mEq/L)	143.0 ± 0.8	142.7 ± 1.1	143.1 ± 1.2	142.7 ± 1.1
K (mEq/L)	4.083 ± 0.223	3.992 ± 0.153	4.117 ± 0.235	4.083 ± 0.243
Cl (mEq/L)	104.6 ± 0.8	103.8 ± 1.7	104.2 ± 0.6	103.8 ± 1.4
Ca (mg/dL)	10.10 ± 0.28	10.23 ± 0.43	10.24 ± 0.30	10.12 ± 0.29
IP (mg/dL)	6.63 ± 1.05	6.59 ± 1.08	7.02 ± 0.57	6.76 ± 0.65
A/G	1.292 ± 0.114	1.362 ± 0.090	1.323 ± 0.084	1.361 ± 0.099
Albumin (%)	56.27 ± 2.13	57.59 ± 1.67	56.93 ± 1.62	57.54 ± 1.75
α1-G (%)	17.95 ± 1.05	17.79 ± 1.08	17.25 ± 0.62	17.68 ± 1.03
α2-G (%)	5.66 ± 0.30	5.75 ± 0.68	5.87 ± 0.65	5.85 ± 0.51
β-G (%)	14.45 ± 1.16	13.93 ± 1.04	14.50 ± 1.03	13.81 ± 0.90
γ-G (%)	5.67 ± 0.82	4.94 ± 0.78	5.45 ± 1.13	5.12 ± 1.22

All values presented as means ± SD; N=10 rats per group.

Not significantly different from the control group.

## 剖検所見、病理学的試験

剖検の結果、500、1,000 mg/kg の ETAS 投与群では、異常は認められなかった。2,000 mg/kg 投与群の雄ラット 1 匹について、精巢の縮小が認められたが、雌については異常が認められなかった。すべてのラットにおいて、組織の絶対及び相対重量に有意な変化は認められなかった (Table 3-5)。

Table 3-5. ラット 90 日間亜慢性毒性試験における組織の絶対及び相対重量

		Control 0 mg/kg	ETAS 500 mg/kg	ETAS 1,000 mg/kg	ETAS 2,000 mg/kg
<i>Male</i>					
Body weight	(g)	537.6 ± 39.8	517.6 ± 54.1	543.5 ± 52.4	545.6 ± 51.6
Liver	(g)	14.482 ± 2.192	13.484 ± 1.849	14.717 ± 1.856	15.511 ± 1.999
	(%)	2.684 ± 0.264	2.601 ± 0.174	2.703 ± 0.120	2.840 ± 0.234
Heart	(g)	1.618 ± 0.191	1.558 ± 0.163	1.614 ± 0.165	1.617 ± 0.176
	(%)	0.300 ± 0.016	0.302 ± 0.019	0.296 ± 0.023	0.299 ± 0.019
Kidney	(g)	3.372 ± 0.267	3.351 ± 0.415	3.630 ± 0.383	3.548 ± 0.364
	(%)	0.628 ± 0.029	0.649 ± 0.054	0.670 ± 0.059	0.654 ± 0.087
Testis	(g)	3.384 ± 0.301	3.522 ± 0.293	3.456 ± 0.404	3.355 ± 0.734
	(%)	0.630 ± 0.065	0.686 ± 0.081	0.642 ± 0.111	0.615 ± 0.141
Epididymis	(g)	1.361 ± 0.083	1.370 ± 0.091	1.317 ± 0.076	1.313 ± 0.176
	(%)	0.253 ± 0.021	0.267 ± 0.030	0.243 ± 0.016	0.243 ± 0.041
Brain	(g)	2.288 ± 0.062	2.235 ± 0.137	2.207 ± 0.075	2.195 ± 0.115
	(%)	0.427 ± 0.037	0.433 ± 0.025	0.408 ± 0.035	0.405 ± 0.038
Spleen	(mg)	770.2 ± 112.6	799.7 ± 119.9	829.1 ± 162.8	825.6 ± 182.6
	(10 <sup>-3%</sup> )	143.46 ± 19.54	154.07 ± 12.38	152.58 ± 27.94	152.83 ± 39.37
Thymus	(mg)	338.4 ± 95.5	281.7 ± 64.8	325.3 ± 102.0	365.0 ± 96.7
	(10 <sup>-3%</sup> )	62.79 ± 16.57	54.65 ± 12.71	59.76 ± 15.80	66.46 ± 14.52
Adrenal	(mg)	58.6 ± 13.9	58.9 ± 6.5	60.8 ± 6.7	60.8 ± 8.2
	(10 <sup>-3%</sup> )	10.97 ± 2.71	11.49 ± 1.76	11.22 ± 1.03	11.27 ± 2.09
<i>Female</i>					
Body weight	(g)	281.7 ± 27.3	265.9 ± 18.6	269.3 ± 26.0	275.3 ± 26.2
Liver	(g)	7.093 ± 0.720	6.962 ± 0.873	7.216 ± 0.866	7.302 ± 0.866
	(%)	2.523 ± 0.184	2.617 ± 0.238	2.678 ± 0.187	2.650 ± 0.155
Heart	(g)	0.940 ± 0.106	0.927 ± 0.058	0.935 ± 0.138	0.935 ± 0.063
	(%)	0.334 ± 0.021	0.349 ± 0.019	0.347 ± 0.023	0.342 ± 0.023
Kidney	(g)	1.853 ± 0.241	1.865 ± 0.198	1.913 ± 0.189	1.954 ± 0.153
	(%)	0.659 ± 0.080	0.701 ± 0.071	0.711 ± 0.050	0.713 ± 0.057
Ovary	(mg)	91.5 ± 8.4	84.6 ± 16.4	85.2 ± 10.4	95.7 ± 16.5
	(10 <sup>-3%</sup> )	32.75 ± 4.28	31.92 ± 6.24	31.95 ± 5.32	34.97 ± 6.60
Uterus	(mg)	604.9 ± 160.7	659.6 ± 192.6	684.9 ± 190.1	604.0 ± 237.7
	(10 <sup>-3%</sup> )	216.31 ± 57.40	251.49 ± 88.79	257.17 ± 81.06	219.07 ± 80.48
Brain	(g)	1.986 ± 0.054	2.011 ± 0.067	2.052 ± 0.111	2.028 ± 0.073
	(%)	0.711 ± 0.072	0.759 ± 0.046	0.766 ± 0.060	0.741 ± 0.062
Spleen	(mg)	509.4 ± 68.7	485.1 ± 54.6	511.0 ± 56.3	512.4 ± 83.3
	(10 <sup>-3%</sup> )	181.82 ± 27.00	182.75 ± 18.85	190.00 ± 14.61	185.82 ± 22.34
Thymus	(mg)	267.2 ± 56.1	259.1 ± 46.7	272.2 ± 57.7	286.9 ± 43.0
	(10 <sup>-3%</sup> )	94.96 ± 19.49	97.97 ± 19.37	100.96 ± 18.56	104.52 ± 13.70
Adrenal	(mg)	68.9 ± 10.4	62.1 ± 8.2	66.4 ± 12.5	94.8 ± 88.6
	(10 <sup>-3%</sup> )	24.55 ± 3.51	23.45 ± 3.35	24.85 ± 5.45	34.79 ± 33.36

All values presented as means ± SD; N=10 rats per group.

Not significantly different from the control group.

病理学的試験の結果、2,000 mg/kg 投与群では一部の雄ラットで胃、精巣に異常が認められた以外、大きな異常は観察されなかった。4匹の雄ラットにおいて、コントロール群 (Fig. 3-4A) と比較して前胃境界隆線にわずかな扁平上皮細胞異常 (過形成) が認められた (Fig. 3-4B)。雄ラット 1 匹において、コントロール群 (Fig. 3-4C) と比較して精細管の萎縮が認められた (Fig. 3-4D)。また同じラットにおいて、コントロール群 (Fig. 3-4E) と比較して精細管腔での部分的な細胞片の蓄積及び精子数の減少が認められた (Fig. 3-4F)。500、1,000 mg/kg 投与群でも同様の病理学的試験を行ったが、胃や精巣に異常は認められなかった。

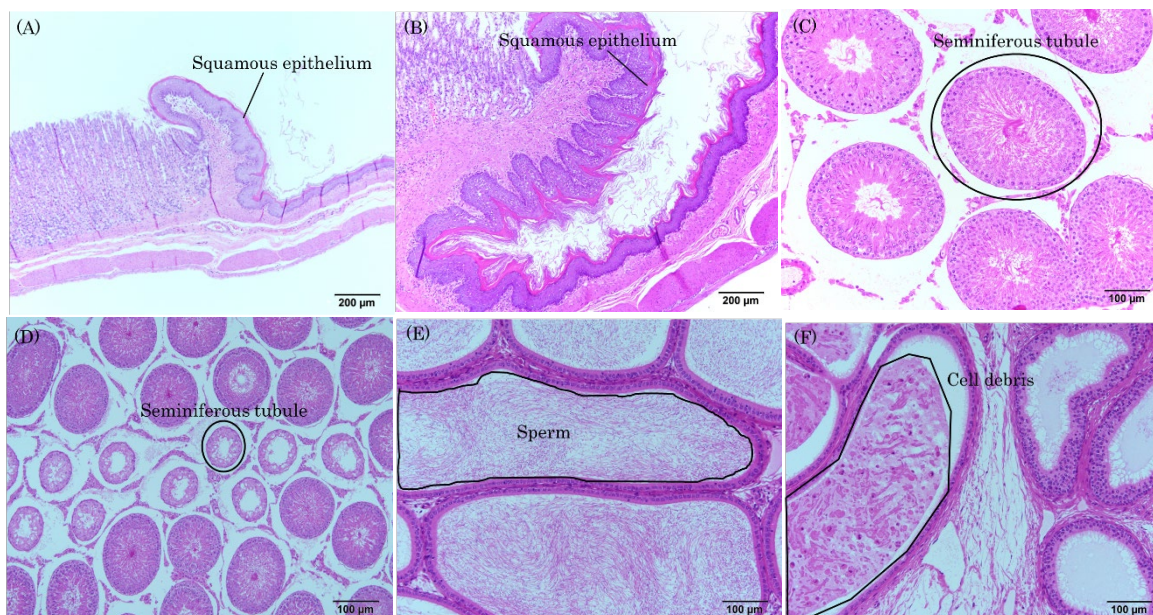


Fig. 3-4. 代表的な組織画像

雄のコントロール群(A)と 2,000 mg/kg 投与群(B)の前胃境界隆線。ETAS を 2,000 mg/kg 投与した雄ラット 4 匹で扁平上皮細胞過形成が認められた。

コントロール群(C)と 2,000 mg/kg 投与群(D)の精細管。ETAS を 2,000 mg/kg 投与した雄ラット 1 匹で精細管の萎縮が認められた。

コントロール群(E)と 2,000 mg/kg 投与群(F)の精巣管腔。ETAS を 2,000 mg/kg 投与した雄ラット 1 匹で細胞片の蓄積及び精子数の減少が認められた。

#### 2-1-4 マウスにおける小核試験

ETAS の染色体異常誘導を検証するため、雄マウスの骨髄細胞を用いて小核試験を行った。ネガティブコントロール群、ポジティブコントロール群、500、1,000 及び 2,000 mg/kg の ETAS (Lot.111021) 投与群において、一般所見については問題が認められなかった。平均体重はすべての群で安定していた。小核発生率 (incidence of micronuclei) (%MNIE) については、ネガティブコントロール群と ETAS 投与群間で、統計学的有意差は認められなかった (Table 3-6)。マイトマイシン C を投与したポジティブコントロール群における %MNIE は、ネガティブコントロール群と比較して有意に高かった ( $p < 0.01$ )。幼若赤血球 (immature erythrocytes) 割合 (%IE) に関しては、ネガティブコントロール群と ETAS 投与群間、ネガティブコントロール群とポジティブコントロール群で、統計学的有意差は認められなかった (Table 3-6)。

Table 3-6. 小核及び幼若赤血球の発生率

Compound	Dose <sup>a</sup> (mg/kg/day)	%MNIE <sup>b</sup>	%IE <sup>c</sup>
Control <sup>d</sup>	0	0.15 ± 0.09	48.5 ± 9.6
ETAS	500	0.18 ± 0.03	48.2 ± 6.3
ETAS	1,000	0.14 ± 0.07	47.0 ± 8.1
ETAS	2,000	0.21 ± 0.04	43.8 ± 4.6
Mitomycin C	1	3.86 ± 1.26 <sup>e</sup>	35.8 ± 8.6

<sup>a</sup> Two successive oral administration (24 h apart) except mitomycin C (single intraperitoneal injection).

<sup>b</sup> %MNIE: % of micronucleated immature erythrocyte (based on 2,000 immature erythrocytes per animal).

<sup>c</sup> %IE: % of immature erythrocyte (based on 500 erythrocytes per animal)

<sup>d</sup> The control group received vehicle (purified water).

<sup>e</sup> Statistically significant difference from the control,  $p < 0.01$ .



#### 2-1-5 細菌復帰突然変異試験

ヒスチジン要求性 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及びトリプトファン要求性 *Escherichia coli* WP2uvrA を使用して、ETAS の遺伝子変異誘導性を検証した。ETAS が生体内の酵素によって代謝され、その代謝産物が変異原性を示す可能性を考慮し、代謝酵素（代謝活性化系）の存在下と非存在下で試験を行った。各サンプルを 37°C、20 分振とうし、プレインキュベーションした後、37°C、48 時間培養し、復帰突然変異コロニーを計測した。復帰突然変異コロニー数が少なくとも 1 つ以上の濃度でネガティブコントロールと比較して 2 倍以上であれば、陽性と判断した。試験の結果、ETAS

(Lot.111021) 処理 (313、625、1,250、2,500 及び 5,000 µg/plate) の平均復帰突然変異コロニー数は代謝活性化系の有無に関わらず、ネガティブコントロールの値の 2 倍未満であった (Tables 3-7A,3-7B)。一方、ポジティブコントロールのコロニー数は、ネガティブコントロールの 2 倍以上であった (Tables 3-8A, 3-8B)。以上、Ames 試験の結果、ETAS は試験株に対して変異原性を示さなかった。

Table 3-7A. 代謝酵素非存在下での復帰突然変異コロニー数

Compound	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant per plate (Mean)				
		S9 (-)				
		TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 <i>uvrA</i>
Control	0	14, 12, 12 (13)	87, 68, 73 (76)	12, 8, 12 (11)	5, 2, 4 (4)	89, 110, 81 (93)
ETAS	313	17, 18, 9 (15)	85, 76, 88 (83)	14, 7, 11 (11)	4, 4, 3 (4)	125, 81, 114 (107)
ETAS	625	11, 16, 12 (13)	106, 80, 71 (86)	11, 14, 7 (11)	5, 5, 3 (4)	109, 103, 97 (103)
ETAS	1,250	8, 14, 12 (11)	64, 97, 90 (84)	9, 10, 12 (10)	3, 3, 5 (4)	113, 139, 142 (131)
ETAS	2,500	19, 18, 16 (18)	88, 76, 98 (87)	13, 13, 9 (12)	5, 5, 5 (5)	136, 126, 150 (137)
ETAS	5,000	15, 16, 20 (17)	84, 85, 86 (85)	5, 10, 11 (9)	4, 5, 3 (4)	166, 138, 148 (151)
Positive mutagens		2-NF	SA	SA	9-AA	AF2
Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		5.0	1.5	1.5	80.0	0.005
Revertant per plate (Mean)		537, 552, 516 (535)	264, 261, 247 (257)	610, 538, 481 (543)	355, 467, 476 (433)	666, 601, 571 (613)

2-NF: 2-nitrofluorene, SA: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, AF2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

Table 3-7B. 代謝酵素存在下での復帰突然変異コロニー数

Compound	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant per plate (Mean)				
		S9 (+)				
		TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 <i>uvrA</i>
Control	0	23, 20, 19 (21)	64, 92, 73 (76)	6, 6, 12 (8)	12, 13, 13 (13)	125, 115, 121 (120)
ETAS	313	20, 28, 32 (27)	79, 77, 86 (81)	11, 12, 7 (10)	6, 11, 11 (9)	132, 120, 135 (129)
ETAS	625	24, 18, 14 (19)	65, 81, 94 (80)	10, 11, 11 (11)	11, 16, 9 (12)	105, 132, 154 (130)
ETAS	1,250	25, 18, 25 (23)	71, 72, 79 (74)	9, 10, 10 (10)	9, 12, 10 (10)	139, 127, 129 (132)
ETAS	2,500	26, 21, 26 (24)	55, 78, 89 (74)	7, 7, 11 (8)	7, 8, 13 (9)	121, 137, 126 (128)
ETAS	5,000	29, 23, 22 (25)	82, 116, 97 (98)	7, 13, 8 (9)	15, 8, 9 (11)	137, 144, 147 (143)
Positive mutagens		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		1.0	2.0	3.0	3.0	2.0
Revertant per plate (Mean)		300, 310, 293 (301)	533, 555, 405 (498)	154, 139, 126 (140)	94, 115, 95 (101)	363, 406, 335 (368)

2-AA: 2-aminoanthracene

Table 3-8A. ネガティブコントロールの復帰突然変異コロニー数

Strain	S9mix	N	Mean $\pm$ SD	Range	
				Lower	Upper
TA98	-	112	15.5 $\pm$ 4.0	6.5	24.5
	+	112	22.0 $\pm$ 5.3	9.0	35.0
TA100	-	112	81.4 $\pm$ 12.5	52.9	110.0
	+	112	92.8 $\pm$ 12.7	57.1	128.4
TA1535	-	112	10.3 $\pm$ 2.4	4.2	16.5
	+	112	9.8 $\pm$ 2.5	2.1	17.6
TA1537	-	112	6.0 $\pm$ 1.9	1.0	11.0
	+	112	10.8 $\pm$ 3.0	2.6	19.0
WP2uvrA (pKM101)	-	112	125.0 $\pm$ 19.5	72.0	177.9
	+	112	149.4 $\pm$ 18.9	97.0	201.8

Table 3-8B. ポジティブコントロールの復帰突然変異コロニー数

Strain	S9mix	Positive control	Dose ( $\mu$ g/plate)	N	Mean $\pm$ SD	Range	
						Lower	Upper
TA98	-	2-NF	5.0	112	485.7 $\pm$ 103.6	236.1	735.3
	+	2-AA	1.0	110	229.9 $\pm$ 71.9	69.8	390.1
TA100	-	SA	1.5	112	436.8 $\pm$ 74.7	53.6	619.9
	+	2-AA	2.0	110	396.7 $\pm$ 133.2	73.7	719.8
TA1535	-	SA	1.5	112	440.9 $\pm$ 83.2	277.4	604.5
	+	2-AA	3.0	112	144.7 $\pm$ 38.6	54.4	235.0
TA1537	-	9-AA	80.0	112	316.6 $\pm$ 111.9	81.9	551.3
	+	2-AA	3.0	110	162.1 $\pm$ 48.4	54.9	269.2
WP2uvrA (pKM101)	-	AF2	0.005	110	977.6 $\pm$ 220.4	487.8	1,467.3
	+	2-AA	2.0	112	416.6 $\pm$ 85.9	187.1	646.1

## 2-2 ヒトにおける血液細胞の *Hsp70* mRNA 発現 (非盲検試験) (試験 1)

ヒトにおける ETAS の効果を検証するため、20 名の被験者から集めた血液サンプルを用いて、白血球中の *Hsp70* mRNA 量をリアルタイム PCR により評価した。ETAS (Lot.111104) を 75、100、150 mg/day 摂取させ、摂取前及び 7 日後を評価した。その結果、100、150 mg/日摂取群は摂取前と比較して有意に *Hsp70* mRNA 発現量が上昇した(154.9 ± 24.9%、159.2 ± 24.9%)。一方、75 mg/日摂取群では有意差が認められなかった(101.6 ± 8.8%) (Fig. 3-5)。

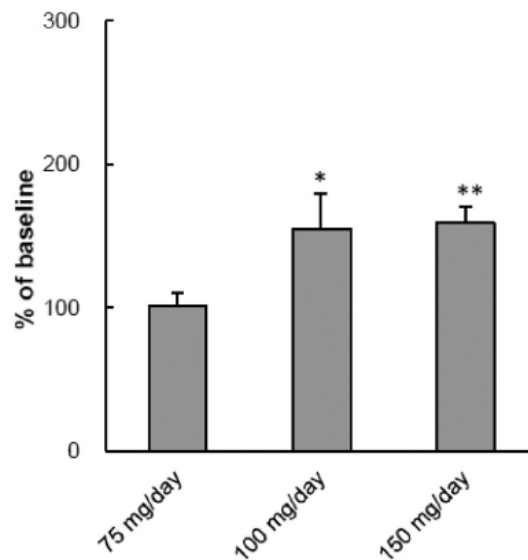


Fig. 3-5. 白血球中の *Hsp70* mRNA 発現量

健常人に ETAS を 75、100 又は 150 mg/day、7 日間摂取させ、*Hsp70* mRNA の発現量を評価した。摂取前後に全血から白血球を回収し、*Hsp70* mRNA の発現量をリアルタイム PCR で測定した。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) 及びベースラインに対する *Hsp70* mRNA 発現量の変化率 (%) を表し、\* $p < 0.05$  vs baseline、\*\* $p < 0.01$  vs baseline (Student's *t*-test) で示した。

## 2-3 ヒトにおける血液細胞の *Hsp70* mRNA 発現及び自律神経系 (ANS) に対する ETAS の効果 (無作為化二重盲検プラセボ対照試験) (試験 2)

### 2-3-1 血中の *Hsp70* mRNA 発現

20名の被験者をプラセボ群、ETAS群に10名ずつ割付けた。プラセボ群は賦形剤のみ、ETAS群は150 mg/dayを7日間摂取した。各群10名の被験者のうち8名から集めた血液サンプルを用いて、血中の *Hsp70* mRNA 発現量を半定量PCRにより評価した。各群2名の被験者は、激しい運動、40°C以上の湯温での入浴、アスピリンや抗ヒスタミン薬の服用を行ったため解析から除外した。Fig. 3-6に示すように、両群においてサンプル摂取後に *Hsp70* mRNA の発現量がベースラインに比べて上昇した。発現量比 (% of baseline) は、プラセボ群 ( $175.1 \pm 5.8\%$ ) に対し ETAS 群 ( $278.9 \pm 57.6\%$ ) で著しく高かったが、統計学的有意差は認められなかった ( $p = 0.098$ )。

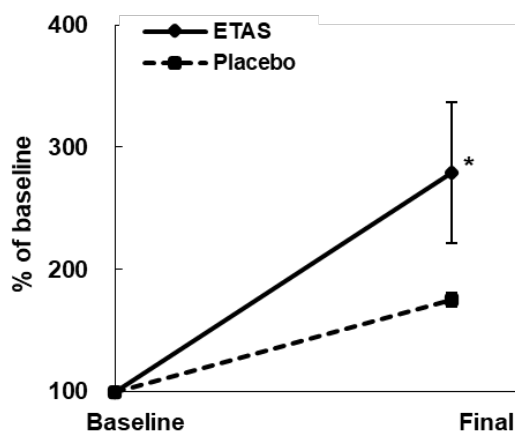


Fig. 3-6. 血中の *Hsp70* mRNA 量

血中の *Hsp70* mRNA 量は半定量PCRにより測定した。被験者はプラセボ群(破線)とETAS群(実線)に分けた。血液サンプルはベースライン (day 0) 及び最終日 (day 7) に収集した。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) 及びベースラインに対する *Hsp70* mRNA 発現量の変化率 (%) を表した。\* $p = 0.098$  vs Placebo (Student's *t*-test).

### 2-3-2 自律神経評価

*Hsp70* mRNA の評価を受けた各群 8 名の被験者において、パルアスアナライザープラス TAS9 を使用して自律神経評価測定を行った。プラセボ摂取前後 (pre-intake vs post-intake) の低周波 (LF) 値 ( $\text{ms}^2$ )、高周波 (HF) 値 ( $\text{ms}^2$ ) 及び LF/HF 比は、それぞれ、 $278.2 \pm 146.6$  vs  $166.4 \pm 140.4$  ( $p < 0.01$ )、 $183.4 \pm 135.0$  vs  $137.1 \pm 93.1$  ( $p = 0.074$ ) 及び  $1.82 \pm 1.02$  vs  $1.32 \pm 0.97$  であった。ETAS 群のそれらの値 (pre-intake vs post-intake) は、 $135.2 \pm 136.1$  vs  $401.8 \pm 697.4$  (LF;  $\text{ms}^2$ )、 $98.7 \pm 41.3$  vs  $92.8 \pm 37.7$  (HF;  $\text{ms}^2$ ) 及び  $1.30 \pm 1.01$  vs  $5.11 \pm 9.07$  (LF/HF 比) であった。摂取前後の測定値の差を (Fig. 3-7) に示す。ETAS 摂取により全ての自律神経状態指標が改善し、一方、プラセボ群では ANS バランス、SDNN、肉体的ストレス及び総合評価の項目が、ベースラインに比べ有意に減少 (悪化) していた。プラセボ群と ETAS 群の比較においては、トータルパワー ( $p = 0.048$ )、ANS バランス ( $p = 0.006$ ) 及び肉体的ストレス ( $p = 0.002$ ) 指標に有意な差が認められた。

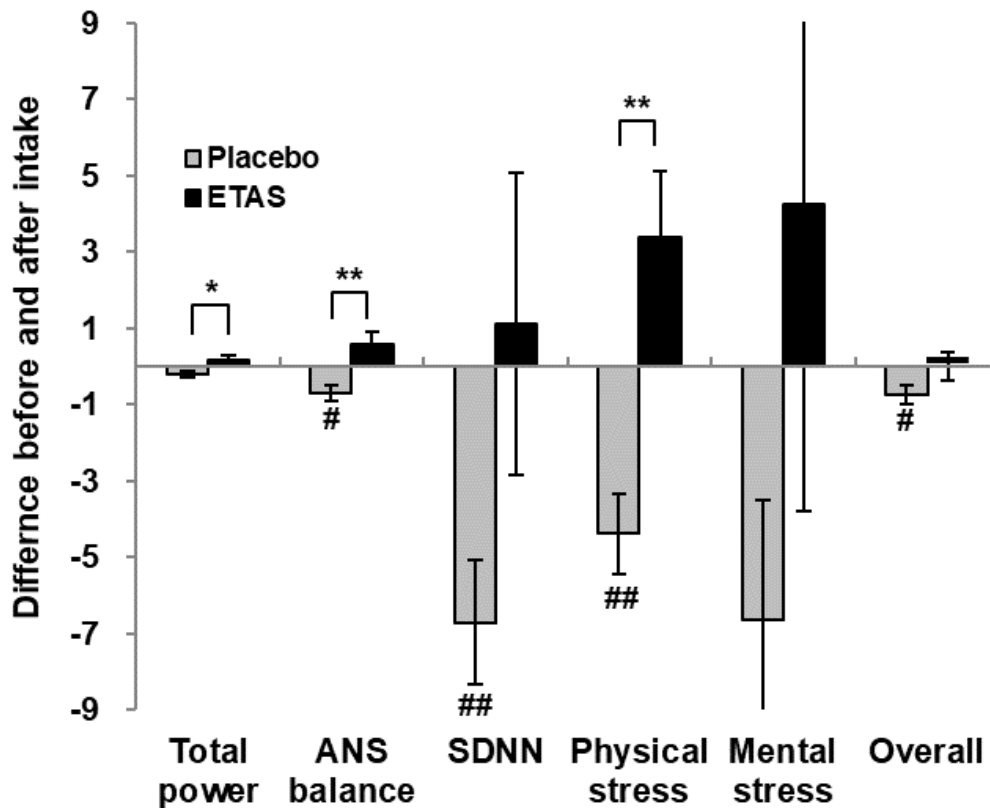


Fig. 3-7. 自律神経系（ANS）測定値の変化

医療用機器のパルスアナライザープラス TAS9 を使用して、指先からの加速度脈波を測定することにより心拍変動（HRV）を測定し、ANS 機能指標を計算した。数値は平均値 ± 標準誤差（SEM）（n=8）で示した。 $*p < 0.05$  vs Placebo,  $**p < 0.01$  vs Placebo,  $\#p < 0.05$  vs baseline,  $##p < 0.01$  vs baseline (Student's *t*-test).

## 2-4 ヒトにおけるストレス指標及び睡眠に対する ETAS の効果

(無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験) (試験 3)

### 2-4-1 ストレス指標評価

睡眠に問題を抱えている健常男性 18 名をプラセボ群、ETAS (150 mg/day) 群に 9 名ずつ割付けた。7 日間のプラセボ摂取後の血清及び唾液コルチゾール (CORT 及び s-CORT) レベルは、ベースラインと比較して有意に増加した (血清:  $4.9 \pm 0.5$  vs  $6.6 \pm 0.6$   $\mu\text{g/dL}$ ,  $p < 0.05$ 、唾液:  $0.08 \pm 0.01$  vs  $0.14 \pm 0.02$   $\mu\text{g/dL}$ ,  $p < 0.01$ )。一方、ETAS 摂取前後では著しい変化は認められなかった (血清:  $5.7 \pm 0.5$  vs  $6.3 \pm 0.6$   $\mu\text{g/dL}$ 、唾液:  $0.11 \pm 0.02$  vs  $0.13 \pm 0.01$   $\mu\text{g/dL}$ ) (Fig. 3-8A, 3-8B)。唾液中のクロモグラニン A (s-CgA) に関しては、ETAS の摂取前後で有意な減少が認められた ( $9.4 \pm 1.7$  vs  $5.7 \pm 0.8$   $\text{pmol/mL}$ ,  $p < 0.01$ ) が、プラセボ摂取による変化は認められなかった (Fig. 3-8C)。



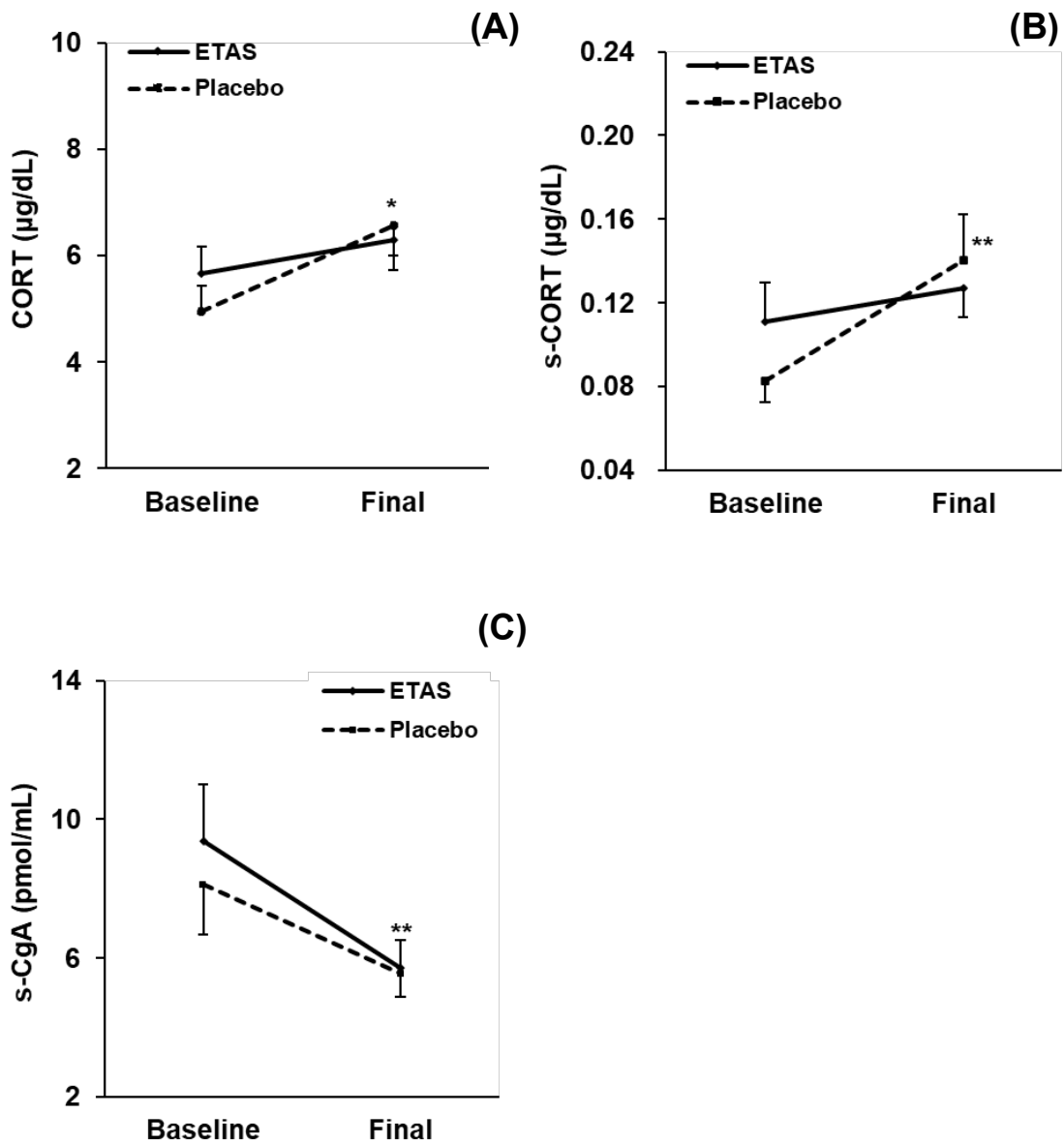


Fig. 3-8. ストレスホルモンに対する ETAS の効果  
 血清コルチゾール (CORT; A)、唾液コルチゾール (s-CORT; B) 及び唾液クロモグラニン A (s-CgA; C) をプラセボ (破線) 又は ETAS (実線) の摂取前後で測定した。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。\* $p < 0.05$  vs baseline, \*\* $p < 0.01$  vs baseline (Student's  $t$ -test).

#### 2-4-2 睡眠に対する効果（アクチグラフ分析）

プラセボ群と ETAS 群において、総睡眠時間（ $405.5 \pm 61.6$  vs  $399.3 \pm 44.6$  min）、実睡眠時間（ $383.7 \pm 13.8$  vs  $374.0 \pm 10.5$  min）、睡眠潜時（ $15.2 \pm 15.7$  vs  $15.4 \pm 10.9$  min）、睡眠効率（ $92.2 \pm 8.8$  vs  $91.3 \pm 11.0\%$ ）及び覚醒回数（ $5.9 \pm 2.8$  vs  $5.9 \pm 2.9$ ）を含むすべてのパラメーターに有意な差は認められなかった。しかし、被験者を睡眠効率により 2 つのグループに分類した時（90%以上かそれ以下）、ETAS 群はプラセボ群に比べ、睡眠効率が 90%以上の被験者の実睡眠時間を有意に減少させ（ $p < 0.05$ ）、90%以下の被験者の実睡眠時間を延長（改善）する傾向を示した（ $p = 0.093$ ）（Fig. 3-9A）。また、健常人の平均睡眠時間（395 min/night）で被験者を 2 つに分類した場合、ETAS は平均睡眠時間より睡眠時間が多い被験者の睡眠時間を有意に減少させた（ $p < 0.05$ ）（Fig. 3-9B）。

さらに、過剰な睡眠時間（ $>395$  min/night）を取っている被験者において、唾液中のストレスマーカーである s-CgA レベルは ETAS 摂取により有意に減少し、s-CORT レベルも減少傾向が認められたが、プラセボ摂取時では s-CORT 及び s-CgA のレベルは減少しなかった（Table 3-9）。

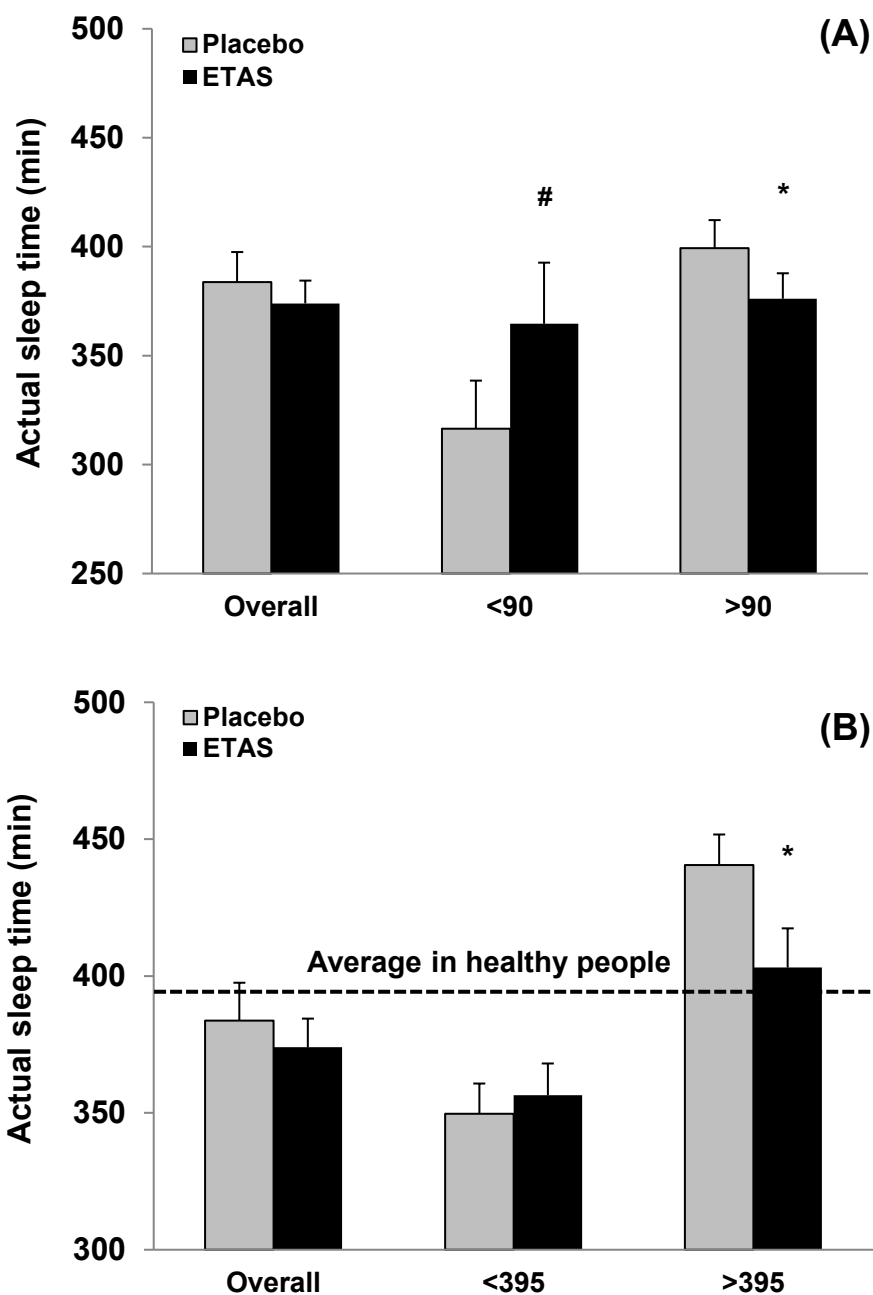


Fig. 3-9. 実睡眠に対する ETAS の影響

実睡眠はアクチグラフを使用して測定した。全ての被験者は、睡眠効率 (A) 及び平均夜間睡眠時間 (B) に基づき 2 グループに分類した。健常者の平均睡眠時間は 395 min/night (破線) である。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。# $p = 0.093$  vs Placebo, \* $p < 0.05$  vs Placebo.

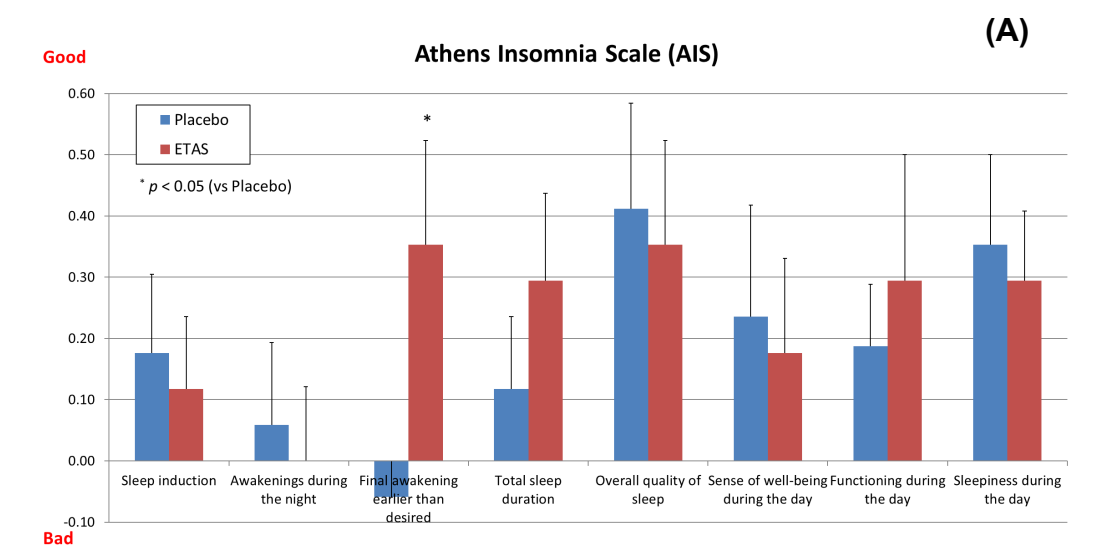
Table 3-9. 一晩の平均睡眠時間が 395 分未満又は以上における被験者のストレスホルモンレベル

Group	CORT ( $\mu\text{g/dL}$ )		s-CORT ( $\mu\text{g/dL}$ )		s-CgA ( $\text{pmol/mL}$ )	
	Baseline	Final	Baseline	Final	Baseline	Final
<i>Under 395 min/night</i>						
Placebo	5.4 $\pm$ 2.4	7.3 $\pm$ 2.4	0.093 $\pm$ 0.044	0.158 $\pm$ 0.105*	10.23 $\pm$ 6.40	6.11 $\pm$ 2.96
ETAS	6.0 $\pm$ 2.1	6.8 $\pm$ 2.3	0.094 $\pm$ 0.034	0.134 $\pm$ 0.068*	7.71 $\pm$ 8.76	5.80 $\pm$ 3.36
<i>Over 395 min/night</i>						
Placebo	4.6 $\pm$ 1.4	5.9 $\pm$ 2.0	0.072 $\pm$ 0.038	0.121 $\pm$ 0.061	4.87 $\pm$ 3.97	4.82 $\pm$ 2.26
ETAS	5.4 $\pm$ 1.8	6.0 $\pm$ 2.1	0.148 $\pm$ 0.117	0.125 $\pm$ 0.046	11.72 $\pm$ 8.76	5.89 $\pm$ 3.57*

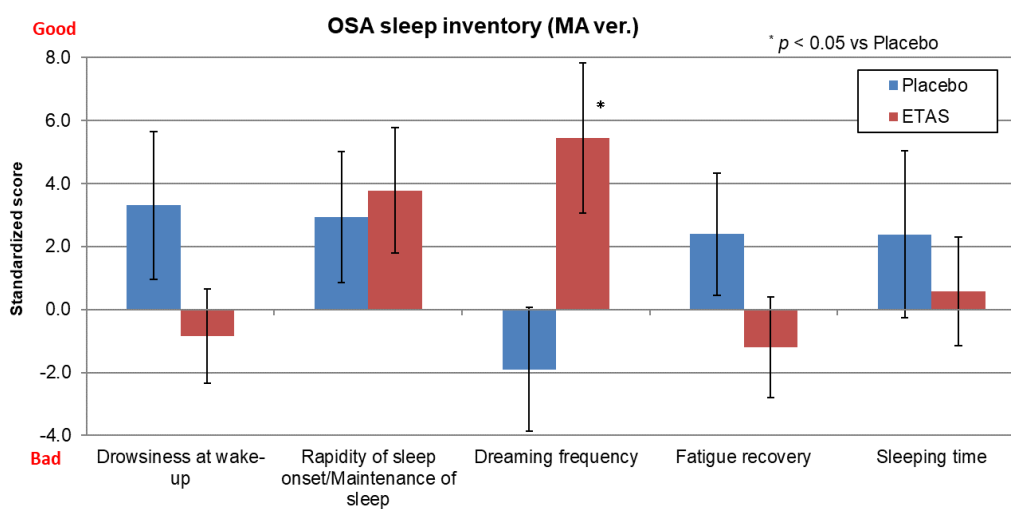
\* $p < 0.05$  vs each baseline (Student's  $t$ -test).

### 2-4-3 睡眠に対する効果（アンケート調査）

AIS アンケートにおいて、“予定の起床時間より早く目覚める（早朝覚醒）”のスコアが、ETAS 摂取によりプラセボ摂取に比べ有意に増加（早朝覚醒が減少）した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3-10A)。OSA-MA においては、“悪夢を見る頻度”のスコアが ETAS 摂取により有意に増加（悪夢を見る頻度が減少）することが明らかとなった ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3-10B)。VAS においては、“食欲”のスコアが ETAS により減少（食欲が増加）した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3-10C)。3つのアンケート調査において、これら以外の項目にはプラセボ群と ETAS 群に差は認められなかった。また、両群から副作用の報告はなかった。



(B)



(C)

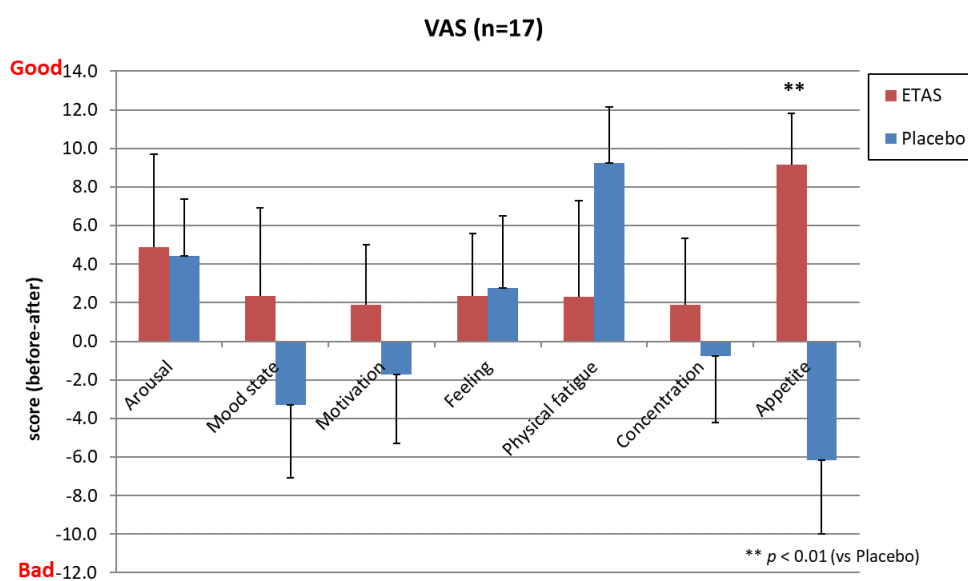


Fig. 3-10. 睡眠に関するアンケート調査

睡眠の質はアテネ不眠尺度 (AIS) (A)、OSA 睡眠調査票 MA 版 (OSA-MA) (B)、視覚的評価スケール (VAS) (C)で評価した。数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。\* $p < 0.05$  vs Placebo, \*\* $p < 0.01$  vs Placebo.

#### 2-4-4 血液学的及び生化学的検査

ETAS 及びプラセボを摂取した全ての被験者において、血液学的及び生化学的指標の全ての数値は正常であった (Table 3-10)。また、ETAS 群とプラセボ群、各サンプルの摂取前後で有意差は認められなかった。

Table 3-10. 血液学的及び生化学的指標

Parameter	Standard value	Placebo		ETAS	
		Baseline	Final	Baseline	Final
WBC	3.5~9.7 (x10 <sup>4</sup> /μL)	6.7 ± 1.8	6.9 ± 1.5	6.7 ± 1.5	7.3 ± 2.2
RBC	438~577 (x10 <sup>4</sup> /μL)	489 ± 21	495 ± 25	495 ± 23	500 ± 27
Hb	13.6~18.3 (g/dL)	15.1 ± 0.7	15.3 ± 0.8	15.2 ± 0.7	15.4 ± 0.9
Ht	40.4~51.9 (%)	44.2 ± 2.1	44.9 ± 2.4	44.5 ± 2.0	45.3 ± 2.4
Plt	14.0~37.9 (x10 <sup>4</sup> /μL)	26.7 ± 5.4	26.3 ± 5.9	27.8 ± 5.4	26.3 ± 5.6
AST	10~40 (U/L)	22.5 ± 6.6	23.1 ± 6.7	23.1 ± 6.4	23.2 ± 7.3
ALT	5~45 (U/L)	31.1 ± 20.3	31.7 ± 20.5	31.1 ± 18.6	32.2 ± 22.4
γ-GTP	1~79 (U/L)	40.9 ± 32.6	40.8 ± 34.0	42.5 ± 39.1	42.8 ± 38.3
BUN	8.0~20.0 (mg/dL)	13.0 ± 1.9	13.1 ± 3.1	13.4 ± 2.2	12.8 ± 2.1
CRE	0.65~1.09 (mg/dL)	0.88 ± 0.09	0.87 ± 0.09	0.90 ± 0.10	0.88 ± 0.09

ETAS 群とプラセボ群、各サンプルの摂取前後で有意差は認められなかった。

数値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。

## 第3節 考察

### 3-1 ETAS の安全性評価

野菜や果物には、がんや心疾患、糖尿病などの慢性疾患を改善する可能性がある様々な成分が含まれる (Martínez-Augustin *et al.*, 2012; Slavin and Lloyd, 2012; Lee *et al.*, 2013)。さらに、うつ等の精神疾患に有効な成分も報告されている (Herbison *et al.*, 2012; Hosseini *et al.*, 2012; Hurley *et al.*, 2013)。第1章及び第2章では、新たな機能性素材を探索し、ETAS に *Hsp70* mRNA 発現量の上昇活性が認められたことを報告した。本章では、その ETAS の安全性を急性、亜慢性及び遺伝毒性試験によって評価した。

急性毒性試験としてラットに体重当たり 2,000 mg/kg の ETAS を経口投与したところ、全てのラットが生存し、体重増加や剖検結果に対する異常は見られなかった。この結果から、ETAS の 50%致死量 (LD<sub>50</sub>) は 2,000 mg/kg 以上であると判断した。この値はヒトに換算すると、単純計算で 120 g/60 kg 以上、表面積計算で 20 g/60 kg 以上 (Guidance for Industry, 2005) となる。

また、90 日間の亜慢性毒性試験 (ラット体重当たり 500、1,000 又は 2,000 mg/kg の ETAS の胃管投与) を行ったところ、摂食量、体重、死亡率、血液検査、生化学検査、剖検及び臓器重量において有意な有害事象は認められなかった。検尿においては、2,000 mg/kg 投与群では雌雄両群で有意なタンパク排出量の増加が認められた。これは ETAS の影響と考えられるが、両群とも病理組織学的試験では腎臓に影響が認められなかったことから、毒性学的に重要ではないと判断される。一般的に、尿タンパク量は温浴後、一時的に上昇することが知られている。また、温浴により HSP70 が誘導されることも知られているため、ETAS 摂取による HSP70 の発現量の上昇と、尿タンパク量の排出に関連がない



とは言い切れない。病理学的試験においては、ETAS 2,000 mg/kg 投与群の雄ラットで前胃境界隆線にわずかな扁平上皮過形成が認められた。これは ETAS 中の *Hsp70* mRNA 発現量の上昇活性物質の1つである HMF の刺激性が原因とも考えられるが (Technical Resources International, Inc., 1994)、前胃境界隆線はげっ歯類に特有の組織であり、ヒトにおいては重篤な毒性がないと考えられる。剖検においては、ETAS 2,000 mg/kg 投与群の雄ラット 1 匹で両側の精巣が小さく、組織学的試験でも精細管の委縮が認められた。細管委縮は加齢やホルモン調節の乱れ、ストレス、薬物由来のダメージなどにより起こると報告されているが (Greaves, 2012)、CrI:CD(SD)ラットを用いた亜慢性試験では精細管委縮の自然発生率は 10~20%と報告されている (Perry and Finch, 1999; Sugimoto *et al.*, 2000)。さらに別の報告では、10~23 週齢の同ラットでは、その発生率は約 5%と述べられている。(Nagatani *et al.*, 2003)。本研究における組織学的試験では、セルトリ細胞へのダメージを伴わない委縮であったことから、ETAS 摂取による影響ではなく自然発生による委縮と判断した。また、両精巣上体の縮小や管腔の細胞片、精子数の減少は細管委縮による副次的な変化であると考えられる。以上のことから、ETAS の無影響量 (no-observed-effect level; NOEL) は 1,000 mg/kg/day、無毒性量 (no-observed-adverse-effect level; NOAEL) は 2,000 mg/kg/day と結論づけた。

マウスにおける小核試験の結果、ネガティブコントロール群及びポジティブコントロール群の平均小核発生率は、試験実施機関のヒストリカルコントロールデータ (ネガティブコントロール: 0.08 - 0.22% MNIE, N=39, 41.8 - 64.0% IE, N=39; ポジティブコントロール: 2.23 - 4.40% MNIE, N=38, 35.0 - 66.0% IE, N=38) の範囲内であった。Table 3-6 に示したように、マイトマイシン C を投与したポジティブコントロール群の小核発生率は明らかに増加したため、試験としては十分成立していることとなる。一方、ETAS 投与群 (500、1,000 又は

2,000 mg/kg/day の ETAS を 2 回に分け強制経口投与) の小核発生率は何も投与しなかったネガティブコントロール群と同等であったため、ETAS は小核形成や染色体異常を誘導しないと判断した。

復帰突然変異試験には 5 種の細菌を用いて代謝活性化系 (S9 mix) 存在、非存在下で評価した。すべての試験細菌株において、ETAS 処理群の平均復帰突然変異コロニー数は、ネガティブコントロール群と同等であり、変異原性を示さなかった (Tables 3-7A, 3-7B)。ネガティブコントロール群の平均復帰突然変異コロニー数は、試験実施機関のヒストリカルコントロールデータの範囲内であった。一方、ポジティブコントロール群のコロニー数は、ネガティブコントロール群の 2 倍以上であった (Tables 3-8A, 3-8B)。

以上の結果は、ETAS の機能性食品としての安全性を支持するものである。

### 3-2 ヒトにおける血液細胞の *Hsp70* mRNA 発現（非盲検試験）（試験 1）

ETAS を 100 又は 150 mg/day、7 日間摂取することにより、摂取前と比較して有意にヒト白血球中の *Hsp70* mRNA 発現量が上昇した。ヒトにおける 150 mg/60 kg body weight/day は、マウスにおいては 30 mg/kg/day に換算され（Guidance for Industry, 2005）、第 2 章での動物実験と比較すると、本試験の摂取量は非常に少ない。第 2 章での断眠モデルは、非常にストレスがかかった状態だが、本試験では過度のストレスがかかっていない健常人を対象とした。定常状態では細胞内に変性したタンパク質が少なく、修復に必要な HSP70 も少ないため、ETAS によって容易に *Hsp70* mRNA 発現量が上昇することを期待し、本試験では摂取量を低く設定した。本試験結果は、ETAS がヒトにおいても有益である可能性を示唆する結果と考える。

### 3-3 ヒトにおける血液細胞の *Hsp70* mRNA 発現及び自律神経系（ANS）に対する ETAS の効果（無作為化二重盲検プラセボ対照試験）（試験 2）

ETAS を 150 mg/day 摂取することで、血中の *Hsp70* mRNA 発現量が上昇する傾向が示されたが、その効果には有意差が認められなかった。一方、ETAS は自律神経系（ANS）状態を表すパラメーターのいくつかを改善した。

HSP70 は細胞保護において必要不可欠な役割を果たしており、また様々な有害状態に反応するうえで重要な生存機能を有しているが、第 2 章でも述べたように、特にがん治療において HSP70 の発現にはいくつかの懸念事項がある。その理由として、ほとんどのがん細胞は抗がん治療に抵抗性を示すために、基礎レベルにおいて HSP70 が豊富に発現しているからである（Goloudina *et al.*, 2012）。さらに、HSP70 の発現は典型的な予後不良のマーカーとなる（Murphy

*et al.*, 2013)。細胞から放出される HSP70 は免疫系とクロストークする伝達物質として作用し、臨床で使用される温熱療法は HSP70 の免疫学的活性を引き起こすことができる (Jolesch *et al.*, 2012)。また、細胞内 HSP70 は化学療法を含む様々な細胞毒性の脅威からがん細胞を保護する一方、細胞外 HSP70 はがん細胞に対する自然免疫や獲得免疫に関係する細胞のリクルートを助けると報告された (Guzhova *et al.*, 2013)。細胞内 HSP70 は誘導性 HSP70 と恒常性 HSP70 から成り、細胞の完全性を維持するために、その両者はお互いに相乗的に補完し合っている (Chong *et al.*, 2013)。試験 2 の結果は *Hsp70* mRNA のみに関する ETAS の発現量の上昇活性評価である。サンプルサイズのより大きなヒト介入試験において、ETAS が確かに HSP70 の発現量を上昇させることが証明されてからになるが、ETAS が細胞内 HSP70 及び/あるいは細胞外 HSP70 の量に影響を及ぼすかを評価する必要がある。

心拍間隔の変化の指標である心拍変動 (HRV) は、ANS 機能の非侵襲的評価手段である (Berntson *et al.*, 1997)。社会不安障害は HRV を減少させ、SDNN や LF 値を低下させる。ANS の機能障害は、精神的苦痛や飲酒頻度の増加に繋がり、症状の重症度と関連している (Alvares *et al.*, 2013)。他の研究では、トータルパワーや SDNN、LF 及び HF の数値は加齢とともに有意に減少することが報告されている (Kim *et al.*, 2011)。試験 2 において、プラセボ群では ANS バランス、SDNN、肉体的ストレス及び総合評価の項目が、ベースラインに比べ有意に減少 (悪化) していたが、これは試験を実施した時期が影響していると考えられる。試験 2 は 4 月 19 日から 5 月 11 日にかけて実施した。つまり、ゴールデンウィーク前後の繁忙期であったため、被験者は労働量が増加し、各種パラメーターが悪化したと考えられる。一方、ETAS は HRV に基づく ANS 測定値のいくつかを改善した。これは社会不安や高齢化社会の国々において、ETAS が重要な役割を果たす可能性を示唆するものである。

### 3-4 ヒトにおけるストレス指標及び睡眠に対する ETAS の効果

(無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験) (試験 3)

ETAS 摂取はプラセボ摂取に比べ、ストレス指標をポジティブに変化させ、さらに睡眠に問題のある被験者の睡眠の質を改善させる可能性を示している。ストレス指標については、7 日間のプラセボ摂取後の血清及び唾液コルチゾール (CORT 及び s-CORT) レベルが、ベースラインと比較して有意に増加した。これは試験を実施した季節が要因と考えられる。試験 3 は 10 月に実施したため、気温が下がりはじめ、寒さを感じる時期であった。寒さも一種のストレスであるため、プラセボ群でコルチゾールが増加したと考えられる。

また、試験 3 は、特に不眠症のような睡眠状態が悪いことを示す、90%以下という睡眠効率の低いヒトに対し、ETAS が睡眠状態を調節するのに効果的である可能性を示唆している。なぜならば、ETAS は睡眠効率の低い被験者において、実睡眠時間を延長させる傾向を示したからである。しかしながら、逆に 90%以上と睡眠効率の良い被験者においては有意に睡眠時間を減少させた。この理由は不明であるが、ETAS が REM 睡眠と non-REM 睡眠の間隔を調節し、質の良い睡眠やより適切な睡眠時間を導いたという仮説が立てられる。HSP70 誘導物質である GGA は、断眠モデルラットで REM 睡眠のリバウンドを軽減したと報告されている (Wada *et al.*, 2006)。また、シャクヤクの主成分であるペオニフロリンは HSP70 を誘導する天然物として発見され (Yan *et al.*, 2004)、その化合物はラットの non-REM 睡眠を調節することが示されている。これらのデータは、HSP70 の誘導が REM 及び non-REM 睡眠をコントロールすることにより、真に効率的な睡眠を引き起こす可能性を示唆するものである。仮に、被験者が質の悪い睡眠のため、過剰に不要な睡眠時間を費やしているとすれば、ETAS はストレスの軽減を通して睡眠の質を改善し、睡眠時間を短縮すること

を助けているのかもしれない。本研究で示された睡眠の質の改善は、部分的にはストレスホルモンの変化や HSP70 発現量の上昇が要因かもしれない。しかしながら、この関係を解明するためには更なる研究が必要とされる。

## 第4節 実験部

### 4-1 ETAS の安全性評価

#### 4-1-1 試験サンプルの調製

ETAS は、株式会社アミノアップ化学の健康補助食品 GMP、ISO9001 及び ISO22000 の認証工場生産した。

アスパラガス（新鮮重 12 kg）に水 24 L を加え、121°C、45 分加熱し、熱水抽出した。得られた抽出液の温度が 60°C まで下がった段階でセルラーゼ（0.12 kg）を添加して攪拌した。さらに 45°C まで下がった段階でペクチナーゼ（0.12 kg）を添加し、72 時間反応した。得られた反応液を 121°C、20 分で加熱して酵素を失活させ、賦形剤としてパインデックス（1.2 kg）を添加した後、スプレードライヤーで乾燥粉末化して ETAS（2.1 kg）を得た（Lot.111021）。

同様に、アスパラガス（新鮮重 1,005 kg）に水 1,000 L を加え、100°C、45 分加熱し、熱水抽出した。得られた抽出液の温度が 60°C まで下がった段階でセルラーゼ（10.0 kg）を添加して攪拌した。さらに 45°C まで下がった段階でペクチナーゼ（10.0 kg）を添加し、24 時間反応した。得られた反応液を 121°C、20 分で加熱して酵素を失活させ、7,200 rpm で遠心分離した後、上清に賦形剤としてパインデックス（61.4 kg）を添加し、これをスプレードライヤーで乾燥粉末化して ETAS（123.7 kg）を得た（Lot.HSP1209s）。

#### 4-1-2 ラットにおける急性経口毒性試験

本試験は Good Laboratory Practice (GLP)及び OECD425 ガイドラインに準拠し、動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committees of Biototech Co., Ltd) により承認を得た Biototech Co., Ltd.

(Chungcheongbukdo, Korea) で行った。7 週齢の Crl:CD(SD) 雌ラットは Orientbio, Inc. (Seongnam, Korea) から購入した。8 週齢で 5 匹を無作為に選抜し、馴化させた。初回の ETAS (Lot.111021) 投与は 175 mg/kg とした。まず、1 匹目に胃管投与して 48 時間経過観察を行い、生存を確認後、2 匹目は用量進行係数 3.2 として 550 mg/kg を投与した。48 時間経過観察を行い、生存を確認後、同様に 3、4、5 匹目は 2,000 mg/kg を投与した。投与量は “OECD Guideline for Testing of Chemicals 425, Acute Oral Toxicity-Up-and-Down Procedure.” に従い、AOT425StatPgm (Version 1.0, 2001) により算出した。ラットの飼育環境は温度 20~24°C、湿度 40~67%、照明は 12 時間明期、12 時間暗期 (07:00 から 19:00 明期)とした。飼料は標準的なラット用 (Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C; Harlan Laboratories, Inc., IN, USA) とし、自由給水とした。すべてのラットを投与後 30 分間観察し、その後、1、2、4 及び 6 時間後、さらに 1 日目から 14 日目まで 1 回/日観察した。体重は 0、1、3、7 及び 14 日目に測定した。14 日目、すべてのラットを CO<sub>2</sub> 麻酔下で腹部大動脈より採血し解剖した。50%致死量 (LD<sub>50</sub>) は AOT425StatPgm により算出した。



#### 4-1-3 ラットにおける 90 日間亜慢性毒性試験

##### 試験デザイン

本試験は GLP 及び OECD408 に準拠し、動物実験倫理委員会の承認を得た化合物安全性研究所（札幌市）で行った。雄雌 CrI:CD(SD)ラットは、日本チャールスリバー（横浜市）から購入した。雌雄 40 匹ずつの 5 週齢のラットを無作為に 4 群に分けた。ラットの飼育環境は温度 19～23°C、湿度 31～49%、照明は 12 時間明期、12 時間暗期（08:00 から 20:00 明期）とした。飼料は標準的なラット用飼料（CRF-1; オリエンタル酵母工業株式会社）とし、自由給水とした。雌雄 4 群ずつのラットにそれぞれ ETAS (Lot.HSP1209s) を 0、500、1,000 又は 2,000 mg/kg、1 日 1 回、90 日間強制経口投与した。試験期間中、2 回/日一般状態の観察を行い、体重及び摂餌量は 1 回/週及び解剖日に測定した。検尿サンプルは、投与直後から 13 週間、代謝ケージにより採取した。投与直後から 3 時間までの尿を pH、タンパク質、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血測定に使用した。測定には Multistix 試薬（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社）を用いた。残り 21 時間分の検尿サンプルは、尿量測定及び比重測定（Uricon-S; 株式会社アタゴ）に使用した。

##### 血液学的検査、生化学的検査

解剖日、16～21 時間絶食した後、ペントバルビタールナトリウムにより麻酔し、血液サンプルを腹部大動脈より採取した。約 1 mL の血液を EDTA-2K で処理し、Hematology analyzer XT-2000iV（シスメックス株式会社）を用いて、赤血球（RBC）数、ヘモグロビン（HGB）濃度、ヘマトクリット（HCT）、平

均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、網状赤血球数、血小板数、白血球 (WBC) 数及び白血球百分率を測定した。血液をクエン酸ナトリウムで処理して得た血漿中のプロトロンビン時間 (PT) 及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は Coagulometer KC4Δ (Trinity Biotech Plc., Co Wicklow, Ireland) を用いて測定した。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP)、糖は Hitachi 7080 automatic analyzer (株式会社日立ハイテクノロジーズ) により測定した。血清中の、総コレステロール (T-Cho)、トリグリセリド (TG)、総ビリルビン (T-Bil)、尿素窒素 (UN)、クレアチニン (Crea)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩化物 (Cl)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP) 及び総蛋白 (TP) は Hitachi 7080 automatic analyzer により測定した。タンパク画分についてはアルブミン/グロブリン比 (A/G ratio) を AES320 automatic electrophoresis system (三島オリンパス株式会社) により測定した。

## 剖検

投与期間終了後、解剖し、肉眼で組織の観察を行った。脳 (大脳、小脳、脳橋)、胸腺、副腎、脾臓、心臓、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体、子宮及び卵巣について組織重量を測定した。相対組織重量は、解剖日の体重に基づき算出した。上記の組織に加え、肺 (気管支を含む)、腸間膜リンパ節、脾臓、下顎リンパ節、唾液腺 (顎下腺と舌下腺)、乳腺 (右腹部)、下垂体、甲状腺 (副甲状腺を含む)、皮膚、眼球、右大腿骨 (骨髄を含む)、脊髄 (頸部)、骨格筋 (外側広筋)、胸部大動脈、気管、食道、胃 (前胃、胸胃、幽門部)、十二指腸、空腸、回腸 (パイ

エル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、膀胱、前立腺、精嚢 (凝固腺を含む)、膻及び末梢神経 (右坐骨神経) を採取し、さらに全ての病変を正常組織から切除した。眼球は Davidson 固定液で固定して保存した。精嚢及び精嚢上体は Bouin 固定液で固定し、70%エタノール溶液中で保存した。その他の組織は 10%ホルマリン溶液で固定した。

### 病理学的検査

すべての個体から採取した組織はパラフィンワックスで包埋し、切片化、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した。OECD408 ガイドラインに従い、まずコントロール群及び高用量群 (2,000 mg/kg 投与群) について検査した。高用量群で投与に関連する変化が認められた場合に、1,000 mg/kg 投与群及び 500 mg/kg 投与群について検査した。

### 統計解析

統計解析には毒性データ処理システム (MiTOX; 三井造船システム技研株式会社) を使用した。体重、摂餌量、尿量、血液検査、絶対及び相対組織重量については、平均及び標準偏差を算出し、等分散性の検定として Bartlett 検定を行った。等分散性が ( $p > 0.05$ ) で確認された場合、一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、コントロール群との有意差 ( $p < 0.10$ ) 検定は、Dunnett 多重比較検定を行った。等分散性が ( $p > 0.05$ ) で確認できない場合、Kruskal-Wallis 検定を行い、コントロール群との有意差 ( $p < 0.10$ ) 検定は、Steel 多重比較検定を行った。コントロール群との統計的有意水準は 5% ( $p < 0.05$ ) とした。

#### 4-1-4 マウスにおける小核試験

本試験は GLP 及び OECD474 ガイドラインに準拠し、動物実験倫理委員会の承認を得た化合物安全性研究所（札幌市）で行った。6 週齢の雄 Crlj:CD1(ICR) マウスは、日本チャールスリバー（横浜市）から購入した。マウスの飼育環境は温度 20～23°C、湿度 41～53%、照明は 12 時間明期、12 時間暗期（08:00 から 20:00 明期）とした。飼料は標準的なマウス用（CRF-1; オリエンタル酵母工業株式会社）とし、自由給水とした。1 週間の馴化後、30 匹のマウスを無作為に 5 群に分けた。群はネガティブコントロール群、ETAS (Lot.111021) 投与 (500、1,000、2,000 mg/kg/day) 群、ポジティブコントロール群とした。ネガティブコントロール（賦形剤）及び ETAS は、24 時間間隔で 2 回、強制経口投与した。ポジティブコントロール（マイトマイシン C; 協和発酵キリン株式会社）は 1 mg/kg/day を腹腔内注射した。ETAS の最高投与量は、ラット急性経口毒性試験の結果をもとに、ガイドラインの上限である 2,000 mg/kg とした。投与又は注射前後、約 6 時間後、22～23 時間後に一般所見を観察した。体重は、投与前、2 回目の投与から 22～23 時間後に測定した。分析サンプルは、各群 5 匹ずつ、各 4 サンプルを採取した。左右大腿骨から骨髓細胞を採取し、ウシ胎仔血清 (FBS) (GIBCO, Life Technologies Co., CA, USA) でフラッシングを行った。細胞懸濁液を遠心分離 (150 × g、5 分) し、一部をスライドグラスに塗布した。これを室温で一晩乾燥し、メタノールで固定した。各マウス 4 サンプル中 2 サンプルを 0.005% アクリジンオレンジ (和光純薬工業株式会社) で染色し、66.7 mM リン酸バッファー (pH 6.8, 三菱化学メディエンス株式会社) で洗浄した。これにカバーグラスをのせ、エナメル (株式会社石倉塗料店) で接着し、蛍光顕微鏡 (BX50: BX-FLA; オリンパス株式会社) サンプルとした。1 匹あたり 2,000 以上 (1 サンプルあたり 1,000 以上) の未熟赤血球を計測し、小核未熟赤血球発

生率 (%MNIE) を算出した。さらに、1 匹あたり 500 以上 (1 サンプルあたり 250 以上) の赤血球を計測し、全赤血球に対する未熟赤血球の比率 (%IE) を算出した。5 群で二項検定を実施し、有意水準 5% で小核発生率を比較した。また、体重と同様、未熟赤血球も Bartlett 検定により、ネガティブコントロール群と ETAS 投与群間比較を行った。すべての結果は等分散性を示し ( $p > 0.05$ )、ネガティブコントロール群と ETAS 投与群間で Dunnett 検定 (two-tailed) ( $p > 0.05$ ) を行った。未熟赤血球のネガティブコントロール群とポジティブコントロール群の比較は F 検定 (two-tailed) を行った。すべての結果は等分散性を示し ( $p > 0.05$ )、群間比較には Student's *t*-test (two-tailed) を行った ( $p > 0.05$ )。

#### 4-1-5 細菌復帰突然変異試験

本試験は GLP 及び OECD471 ガイドラインに準拠した Biototech Co., Ltd. で行った。

*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、*Escherichia coli* WP2uvrA を用い、プレインキュベーション法に従い実施した。代謝活性化系 (S9 mix) 存在下及び非存在下の状態で、ETAS (Lot.111021) に暴露させた。ネガティブコントロールには蒸留水を使用し、ポジティブコントロールにはアジ化ナトリウム (SA)、2-ニトロフルオレン (2-NF)、2-アミノアントラセン (2-AA)、9-アミノアクリジン (9-AA) (Sigma-Aldrich, MO, USA)、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF2) (和光純薬工業株式会社) を使用した。ETAS の濃度は 313、625、1,250、2,500 及び 5,000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  とした。試験は 3 反復で行った。代謝活性化系非存在下では、ETAS 溶液、ネガティブコントロール溶液、ポジティブコントロール溶液を 100  $\mu\text{L}$  ガラスチューブに入れた。そこへ 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.4) を 500  $\mu\text{L}$  加え、さらに

100  $\mu\text{L}$  の菌株懸濁液を加えた。これを 37°C、20 分振とう後、寒天 (2 mL) と混合し、ボルテックスミキサーで十分に攪拌した。その後、最小寒天培地に注ぎ、室温で固めた。代謝活性化系存在下では、0.1 M リン酸ナトリウムバッファの代わりに S9 mix を 500  $\mu\text{L}$  を加えて同様の処理をした。培地が固まった後、プレートを反転させ、37°C、48 時間培養した。培養後、復帰突然変異コロニーをコロニーカウンター (ProtoCOL; Synoptics Ltd., Cambridge, UK) により計測した。復帰突然変異コロニー数が少なくとも 1 つ以上の濃度でネガティブコントロールと比較して 2 倍以上であれば、陽性と判断した。

## 4-2 ヒトにおける血液細胞の *Hsp70* mRNA 発現（非盲検試験）（試験 1）

### 4-2-1 試験デザイン

本試験は血液中の *Hsp70* mRNA 発現に関する ETAS の効果を評価した非盲検試験である。試験計画書は、株式会社アミノアップ化学（札幌市）及び北海道情報大学（江別市）の倫理委員会の承認を受け（承認番号：AU130226、240806）、全ての参加者からは書面による同意書を得た。

### 4-2-2 被験者

健常な成人男性 20 名の被験者を無作為に ETAS（Lot.111104）75 mg/日摂取群（10 名、 $36.0 \pm 2.0$  歳）、ETAS 100 mg/日摂取群（5 名、 $33.6 \pm 2.7$  歳）又は ETAS 150 mg/日摂取群（5 名、 $33.2 \pm 2.4$  歳）に割付けた。被験者は 1 週間、所定量を摂取した。

### 4-2-3 白血球中の *Hsp70* mRNA 発現量の上昇活性（リアルタイム PCR）

白血球中の *Hsp70* mRNA 発現量の測定は、リアルタイム PCR を使用した。血液サンプルは、溪仁会円山クリニック（札幌市）において、ETAS の摂取前後（day 0 及び day 7）に被験者から採取したものを使用した。1 mL の全血を 10 mL の ACK 溶解緩衝液（0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM EDTA-2Na, pH 7.2~7.4）で溶解し、37°C、5 分間インキュベーションした。300 × *g* で 10 分間遠心分離した後、白血球を回収し、再び溶解した。回収した白血球から TRIzol 試薬（Ambion, Austin）を用いて RNA を抽出した。RNA

濃度は NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) を用いて測定し、DEPC 水で 50 ng/ $\mu$ L に調製した。cDNA 合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて行い、得られた cDNA は DEPC 水で 10 倍希釈した。反応は 4  $\mu$ L の cDNA、5  $\mu$ L の SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad)、0.5  $\mu$ L の 10  $\mu$ M プライマーを用いた。プライマー及び PCR 反応は第 1 章、第 4 節、4-6 と同様とした。

#### 4-2-4 統計解析

全てのデータは試験研究者とは独立して収集し、解析した。試験研究者は解析が終了するまで、データに触れることができなかった。データは、平均  $\pm$  標準誤差 (SEM) で示した。データは一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、post hoc test として Fisher's protected least significance difference (PLSD)、paired Student's *t*-test を用い、*p* 値が 0.05 以下の場合を統計学的に有意とした。



4-3 ヒトにおける血液細胞の *Hsp70* mRNA 発現及び自律神経系 (ANS) に対する ETAS の効果 (無作為化二重盲検プラセボ対照試験) (試験 2)

4-3-1 試験サンプル

ETAS は、株式会社アミノアップ化学の健康補助食品 GMP、ISO9001 及び ISO22000 の認証工場で生産した。第 1 章、第 4 節、4-8-1 で調製した Lot.111104 と、同様の手法で調製した Lot.120120 及び Lot.120127、さらに、造粒剤としてステアリン酸カルシウム、セオラスを混合して調製した (Lot.120328P) (Table 3-11)。プラセボカプセルはマルツエキス添加パインデックスとした。

Table 3-11. ETAS (Lot.120328P)の組成

	kg	%
ETAS (Lot.111104)	5.0	
ETAS (Lot.120120)	6.0	45.3
ETAS (Lot.120127)	6.0	
ステアリン酸 Ca	3.75	10.0
セオラス	16.75	44.7
Total	37.5	100

#### 4-3-2 試験デザイン

本試験は、血液細胞の *Hsp70* mRNA 発現及び自律神経系に関する ETAS の効果を評価した無作為化二重盲検プラセボ対照試験である。試験計画書は、株式会社アミノアップ化学（札幌市）の倫理委員会の承認を受け（承認番号：AU120413）、全ての参加者からは書面による同意書を得た。

#### 4-3-3 被験者

健康な成人男性をリクルートし、そのうち血液学的検査や生化学的検査において異常値を示す者は除外した。20名の被験者（25歳から56歳、平均年齢39.1歳）を無作為にプラセボ群（10名）とETAS群（10名）に割付けした。プラセボ群は賦形剤入りカプセル（1カプセル中250mg パインデックス；松谷化学工業株式会社）を、ETAS群はETASと賦形剤の混合物入りカプセル（1カプセル中ETAS 50mg、パインデックス 200mg）を、それぞれ3カプセルずつ夕食後の同時刻に毎日、1週間摂取した。ベースライン（摂取前）と7日目（摂取後）に、全被験者の血中 *Hsp70* mRNA 発現量の上昇活性と自律神経状態を評価した。試験期間中、被験者は激しい運動、湯温40°C以上での入浴やアスパラガスの摂取を控えるように指導し、さらに向精神薬、抗ヒスタミン薬、GGA、アスピリン、L-トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン、ガンマアミノ酪酸(GABA)、L-テアニン、L-チロシン及びグリシンの服用を避けるよう指示した。

#### 4-3-4 血中の *Hsp70* mRNA 発現量の上昇活性 (半定量 PCR)

血液サンプルは、溪仁会円山クリニック (札幌市) において、サンプルの採取前後 (day 0 及び day 7) に被験者から採取したものを使用した。血液 (400  $\mu$ L) から NucleoSpin RNA Blood キット (タカラバイオ株式会社) を使用して、トータル RNA (250 ng) を抽出した。次に、一本鎖 cDNA を PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis キット及び Oligo dT プライマー (タカラバイオ株式会社) により合成した。cDNA の増幅は Takara Ex *Taq* (タカラバイオ株式会社) により、次のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して行った。*Hsp70* 用は 5'-CAAGATCACCATCACCAACG-3' (forward primer) と 5'-CTCAAACCTCGTCCTTCTCGG-3' (reverse primer)、*B2M* 用として 5'-TAGCTGTGCTCGCGCTAC-3' (forward primer) と 5'-AGTGGGGGTGAATTCAGTGT-3' (reverse primer) を使用した。なお、*B2M* は内部標準遺伝子として用いた。PCR 溶液 (計 20  $\mu$ L) は次の 3 ステップで反応した。ステップ 1 ではサイクル前の熱変性 (94°C、1 分間) を行い、ステップ 2 では、*Hsp70* については 32 サイクルの熱変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (57°C、30 秒間)、伸長反応 (72°C、30 秒間)、*B2M* については 24 サイクルの熱変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (59°C、30 秒間)、伸長反応 (72°C、30 秒間) を行った。ステップ 3 では最後の伸長反応 (72°C、30 秒間) を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動による分離後、臭化エチジウムで染色した。PCR 産物量を定量するために *Hsp70* と *B2M* のバンド蛍光強度の比 (*Hsp70*/*B2M*) を求めることで *Hsp70* の発現量とした。

#### 4-3-5 自律神経評価

自律神経状態は、医療機器であるパルスアナライザープラス TAS9（株式会社 YKC、認可番号 13B3X00442I00001）により測定した。当該機器は、指先の加速度脈波を測定することにより心拍変動（HRV）を解析し、自律神経系（ANS）機能を評価する（Malik, 1996; Guidelines, 1996）。ANS バランスの観点から、交感神経活性（LF）と副交感神経活性（HF）を評価し、LF 値及び HF 値を二次元グラフの X 軸及び Y 軸にそれぞれプロットした。グラフ上、最も理想的なポイントから実測地点までの距離を算出した。トータルパワー、自律神経活動度（SDNN）、肉体的ストレス、精神的ストレス、総合評価などのパラメーターは HRV に基づき自動的に計算された。

#### 4-3-6 統計解析

データは、平均 ± 標準誤差（SEM）で示した。プラセボ群と ETAS 群の群間比較は一元配置または二元配置 ANOVA を用いて解析し、Bonferroni/Dunn test を post-hoc test として使用した。また、摂取前後の群内比較においては、paired Student's *t* test を使用した。全データは計画書に適合した対象集団について解析を行った。

#### 4-4 ヒトにおけるストレス指標及び睡眠に対する ETAS の効果 (無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験) (試験 3)

##### 4-4-1 試験サンプル

4-3-1 と同じ Lot.120328P を用いた。

##### 4-4-2 試験デザイン

本試験は、ストレス指標や睡眠への影響を評価した無作為化二重盲検プラセボ対照のクロスオーバー試験である。試験計画書は、北海道情報大学（江別市）の倫理委員会の承認を受け（承認番号：240806）、全ての参加者からは書面による同意書を得た。

##### 4-4-3 被験者

試験 3 においては睡眠に問題を抱えている健常男性を組入れ、そのうち夜間労働者、過度の喫煙あるいは飲酒者、12 週間以内の献血者、肝臓、腎臓、消化器官に疾患がある者、急性感染症や精神疾患に罹患している者、あるいは不眠症の治療を受けている者は除外した。18 名の健常男性（24 歳から 59 歳、平均年齢 38.8 歳）を無作為にグループ A（9 名）及びグループ B（9 名）に割付けた。グループ A は、最初にプラセボカプセル（1 カプセル中 250 mg パインデックス）を 3 カプセル、夕食後に 7 日間摂取した。2 週間の washout 期間後に、ETAS カプセル（1 カプセル中 ETAS 50 mg、パインデックス 200 mg）を 3 カプセル、夕食後に 7 日間摂取した。グループ B は、逆の方法により、7 日間の

ETAS 摂取、2 週間の washout、次いで 7 日間プラセボを摂取した。血中及び唾液中のストレスホルモン濃度、睡眠への影響、血液学的及び生化学的パラメーターを、各サンプルの摂取前後で評価した。同時に、アテネ不眠尺度 (AIS)、視覚的評価スケール (VAS) 及び OSA 睡眠調査票 MA 版 (OSA-MA) によるアンケート調査を行った。試験期間中、被験者は激しい運動、湯温 40°C 以上での入浴やアスパラガスの摂取を控えるように指導し、さらに向精神薬、抗ヒスタミン薬、GGA、アスピリン、L-トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン、ガンマアミノ酪酸 (GABA)、L-テアニン、L-チロシン及びグリシンの服用を避けるよう指示した。

#### 4-4-4 ストレス指標評価

プラセボあるいは ETAS サンプルの摂取前後に被験者から、北海道情報大学保健センター (江別市) にて、血液及び唾液を採取した。コルチゾールは概日リズムによる影響を受けるため、サンプリングは夕方の同時刻 (18 時から 20 時の間) に行った。血清と唾液のコルチゾールレベル及び唾液クロモグラニン A 濃度は、札幌臨床検査センター (札幌市) で測定した。

#### 4-4-5 アクチグラフ分析

ETAS の睡眠に対する効果は、アクチグラフ (MicroMini-Motionlogger Actigraph, Ambulatory Monitoring, Inc., New York, USA) を使用して測定した (Natale *et al.*, 2009; Tahmasian *et al.*, 2010)。当該測定機器は washout 期間を除き、試験期間中、各被験者の利き手でない手首に装着した。データは Action-W version 2 ソフトウェア (Ambulatory Monitoring, Inc.) で解析し、

総睡眠時間（睡眠開始から朝目覚めるまでの時間）、実睡眠時間（実際に眠った時間）、睡眠潜時、睡眠効率（総睡眠時間に対する実睡眠時間の割合）及び覚醒回数を算出した。

#### 4-4-6 アンケート調査

**アテネ不眠尺度 (AIS)**： AIS は ICD-10（疾病及び関連保健問題の国際統計分類第 10 版）に基づき、睡眠障害を定量化するためにデザインされ、8 項目で構成されている（Soldatos *et al.*, 2000）。

**視覚的評価スケール (VAS)**： 被験者の現在の状態が、長さ 100 mm の直線のどの位置にあるかを示す方法である（de Boer *et al.*, 2004）。VAS スコアは、直線の左端からマークを付したポイントまでの長さ（mm）を測定することにより決定する。本試験では、覚醒度、気分、意欲、気持ち、身体的疲労、集中力、食欲の 7 項目を評価した。

**OSA 睡眠調査票 MA 版 (OSA-MA)**： OSA-MA は、4 肢選択形式の 16 項目からなる自己評価質問票である。最終的には、“起床時眠気”、“入眠と睡眠維持”、“夢み”、“疲労回復”、“睡眠時間” の 5 因子に統合されて評価される（Kokubo *et al.*, 2013）。

#### 4-4-7 血液学的及び生化学的検査

ETAS 摂取による安全性を評価するために、血液学的及び生化学的検査を札幌臨床検査センターで行った。採血は、北海道情報大学保健センターにおいて、プラセボあるいは ETAS サンプル摂取前後の被験者から行った。評価項目は、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (Hb)、ヘマトクリット (Ht)、血小板 (Plt)、アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP)、血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE) とした。

#### 4-4-8 統計解析

全てのデータは試験研究者とは独立して収集、解析した。試験研究者は解析が終了するまで、データに触れることができなかった。データは、平均  $\pm$  標準誤差 (SEM) で示した。データには、SPSS (version 19, IBM Corp., New York, USA) を用いて、paired Student's *t*-test、Welch's *t*-test あるいは Mann-Whitney test を適宜使用した。*p* 値が 0.05 以下の場合を統計学的に有意とした。全データは計画書に適合した対象集団について解析を行った。



## 総括

本研究は、HSP70 発現増強活性を有する機能性食品を開発することを目的として遂行した。その結果、アスパラガス若茎熱水抽出物に *Hsp70* mRNA 発現量の上昇活性があることを発見し、さらに ETAS として工業レベルでの製造方法を確立した。また、ETAS 中の活性成分の 1 つとして、新規 HMF 誘導体を単離、構造決定した。

ETAS は、HeLa 細胞において、HSP70 の mRNA やタンパク質の発現量を上昇させ、動物実験においては、断眠マウスにおける血中コルチコステロンの上昇を抑制した。Ames テストやマウス骨髄小核試験、ラット急性及び亜慢性経口投与毒性試験において、ETAS は毒性を示さなかった。

健常成人における ETAS の *Hsp70* mRNA 発現、ストレス指標及び睡眠に対する効果を検討した結果、ETAS は *Hsp70* mRNA 発現量を上昇させる傾向が示された。また、ETAS は自律神経系 (ANS) 状態を表すパラメーターのいくつかを改善した。ETAS にはストレス関連ホルモンをポジティブに変化させ、さらに、被験者の睡眠の質を改善させる効果がある可能性が示された。

ETAS の作用機序は完全には解明されていないが、本論文のデータは ETAS が HSP70 を誘導してストレスを軽減し、良質な睡眠をもたらすために有益であるという仮説を支持するものである。

# 参 考 文 献

伊藤 知洋

Alastalo, TP., Hellesuo, M., Sandqvist, A. (2003) Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. *J. Cell Sci.* 116: 3557-3570. doi: org/10.1242/jcs.00671.

Alvares, GA., Quintana, DS., Kemp, AH., Van, Zwieten, A., Balleine, BW., Hickie, IB., Guastella, AJ. (2013) Reduced heart rate variability in social anxiety disorder: associations with gender and symptom severity. *PLoS One* 30: e70468. doi: 10.1371/journal.pone.0070468.

Anand, T., Phani, Kumar, G., Pandareesh, MD., Swamy, MS., Khanum, F., Bawa, AS. (2012) Effect of bacoside extract from *Bacopa monniera* on physical fatigue induced by forced swimming. *Phytother. Res.* 26: 587-593. doi: 10.1002/ptr.3611.

Arakawa, T., Kobayashi, K., Yoshikawa, T., Tarnawski, A. (1998) Rebamipide: overview of its mechanisms of action and efficacy in mucosal protection and ulcer healing. *Dig. Dis. Sci.* 9: 5S-13S.

Baler, R., Dahl, G., Voellmy, R. (1993) Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2486-2496. doi: org/10.1128/mcb.13.4.2486-2496.1993.

Beck, FX., Neuhofer, W., Müller, E. (2000) Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *Am. J. Physiol.* 279: 203-215. doi: 10.1152/ajprenal.2000.279.2.F203.

Berntson, GG., Bigger, JT Jr., Eckberg, DL., Grossman, P., Kaufmann, PG., Malik, M., Nagaraja, HN., Porges, SW., Saul, JP., Stone, PH., van, der, Molen, MW. (1997) Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. *Psychophysiology* 34: 623-648. doi: 10.1111/j.1469-8986.1997.tb02140.x.

- Blaschko, H., Comiline, R.S., Schneider, F.H., Silver, M., Smith, A.D. (1967) Secretion of a chromaffin granule protein, Chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature* 215: 58-59.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A.T., Iavicoli, I., Di, Paola, R., Koverech, A., Cuzzocrea, S., Rizzarelli, E., Calabrese, E.J. (2012) Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1822: 753-783. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.11.002.
- Calderwood, S.K., Stevenson, M.A., Murshid, A. (2012) Heat shock proteins, autoimmunity, and cancer treatment. *Autoimmune Dis*: Article ID 486069. doi: 10.1155/2012/486069.
- Chandler, R.F. (1985) Licorice, more than just a flavour. *Canadian Pharmaceutical Journal* 118: 420-424.
- Chang, X.R., Peng, L., Yi, S.X., Peng, Y., Yan, J. (2007) Association of high expression in rat gastric mucosal heat shock protein 70 induced by moxibustion pretreatment with protection against stress injury. *World J. Gastroenterol.* 13: 4355-4359. doi: 10.3748/wjg.v13.i32.4355.
- Chong, K.Y., Lai, C.C., Su, C.Y. (2013) Inducible and constitutive HSP70s confer synergistic resistance against metabolic challenges. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430: 774-779. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.072.
- Christiaan, H.V., Berend, O. (2012) Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA(A) Receptor Modulators? *Adv. Pharmacol. Sci.* doi:10.1155/2012/416864.
- Chrousos, G.P. (1998) Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann NY*

*Acad Sci.* 851: 311-335. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09006.x.

Chuda, Y., Ono, H., Ohnishi, M., Matsumoto, K., Nagata, T., Kikuchi, Y. (1999) Mumefural, citric acid derivative improving blood fluidity from fruit-juice concentrate of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *J. Agric. Food Chem.* 47: 828-831. doi: 10.1021/jf980960t.

de Boer, AG., van, Lanschot, JJ., Stalmeier, PF., van, Sandick, JW., Hulscher, JB., de Hase, JC., Sprangers, MA. (2004) Is a single-item visual analogue scale as valid, reliable and responsive as multi-item scales in measuring quality of life? *Qual. Life Res.* 13: 311-320. doi: 10.1023/B:QURE.0000018499.64574.1f.

Dong-Yi, He., Sheng-Ming. (2011) Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of paeonia lactiflora pall., a traditional chinese herbal medicine. *Front. Pharmacol.* doi: 10.3389/fphar.2011.00010.

Ellis, RJ. (2007) Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594: 1-13. doi: 10.1007/978-0-387-39975-1\_1.

Eppink, B., Krawczyk, PM., Stap, J., Kanaar, R. (2012) Hyperthermia-induced DNA repair deficiency suggests novel therapeutic anti-cancer strategies. *Int. J. Hyperthermia* 28: 509-517. doi: 10.3109/02656736.2012.695427.

Fan, N., Yang, GS., Lu, JH., Yang, N., Zhang, HB. (2005) Oral administration of geranylgeranylacetone plus local somatothermal stimulation: A simple, effective, safe and operable preconditioning combination for conferring tolerance against ischemia-reperfusion injury in rat livers. *World J. Gastroenterol.* 11: 5725-5731. doi: 10.3748/wjg.v11.i36.5725.

- Feder, ME., Hofmann, GE. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243-282. doi: 10.1146/annurev.physiol.61.1.243.
- Figueiredo, C., Wittmann, M., Wang, D., Dressel, R., Blasczyk, R., Eiz-Vesper, B. (2009) Heat shock protein 70 (HSP70) induces cytotoxicity of T-helper cell. *Blood.* 113: 3008-3016. doi: 10.1182/blood-2008-06-162727.
- Floh'e, S., Speidel, N., Flach, R., Lange, R., Erhard, J., Schade, FU. (1998) Expression of HSP 70 as a potential prognostic marker for acute rejection in human liver transplantation. *Transplant Intl.* 11: 89-94. doi: 10.1007/s001470050110.
- Franco, L., Manara, P., Erbeti, I., Velo, GP. (1993) Anti-ulcer activity of carbenoxolone and ISF 3401 on PGE2 release in rat gastric mucosa. *Pharmacol. Res.* 27: 141-150. doi: 10.1006/phrs.1993.1014.
- Frost, GJ. (2004) The spa as a model of an optimal healing environment. *J. Altern. Complement Med.* 10: 85-92. doi: 10.1089/1075553042245908.
- Fu, ZQ., Wang, MY., Cai, BC. (2008) Discussion of 5- hydroxymethylfurfural (5-HMF) in Chinese native medicine research present situation. *Chinese Arch. Tradit. Chinese Med.* 26: 508-510.
- Goloudina, AR., Demidov, ON., Garrido, C. (2012) Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett.* 325: 117-124. doi: org/10.1016/j.canlet.2012.06.003.
- Gong, NQ., Xiao, JS., Zeng, JS., Li, GX., GuoH, Zhang, WJ., YeQF. (2003) Role of mitogen activated protein kinase cascade pathway and anti-stress response in liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Intl.* 2: 191-195.

- Greaves, P. (2012) Male genital tract. In: *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies - Interpretation and Relevance in Drug Safety Studies*, fourth ed. Academic Press, Elsevier, pp. 615-666.
- Guarrera, PM., Savo, V. (2013) Perceived health properties of wild and cultivated food plants in local popular traditions of Italy: a review. *J. Ethnopharmacol.* 146: 659-680. doi: 10.1016/j.jep.2013.01.036.
- Guettouche, T., Boellmann, F., Lane, WS., Voellmy, R. (2005) Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* 6: 4. doi: 10.1186/1471-2091-6-4.
- Guidelines (1996) Heart rate variability. *Eur. Heart J.* 17: 354-381. doi: org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a014868
- Guzhova, IV., Shevtsov, MA., Abkin, SV., Pankratova, KM., Margulis, BA. (2013) Intracellular and extracellular Hsp70 chaperone as a target for cancer therapy. *Int. J. Hyperthermia* 29: 339-408. doi: 10.3109/02656736.2013.807439.
- Hahm, KB., Park, IS., Kim, YS., Kim, JH., Cho, SW., Lee, SI., Youn, JK. (1997) Role of rebamipide on induction of heat-shock proteins and protection against reactive oxygen metabolite-mediated cell damage in cultured gastric mucosal cells. *Free. Radic. Biol. Med.* 22: 711-716. doi: 10.1016/s0891-5849(96)00406-6.
- Hafizur, RM., Kabir, N., Chishti, S. (2012) *Asparagus officinalis* extract controls blood glucose by improving insulin secretion and  $\beta$ -cell function in streptozocin-induced type 2 diabetic rats. *Br. J. Nutr.* 108: 1586-1595. doi: 10.1017/S0007114511007148.
- Han, KS., Kim, L., Shim, I. (2012) Stress and sleep disorder. *Exp Neurobiol.* 21: 141-150. doi: 10.5607/en.2012.21.4.141.

- Hasani-Ranjbar, S., Nayebi, N., Larijani, B., Abdollahi, M. (2009) A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World J. Gastroenterol.* 15: 3073-3085. doi: 10.3748/wjg.15.3073.
- Hayashi, Y., Tohnai, I., Kaneda, T., Kobayashi, T., Ohtsuka, K. (1991) Translocation of hsp-70 and protein synthesis during continuous heating at mild temperatures in HeLa cells. *Radiat. Res.* 125: 80-88.
- He, X., Xing, D., Ding, Y., Li, Y., Xiang, L., Wang, W., Du, L. (2004) Determination of paeoniflorin in rat hippocampus by high-performance liquid chromatography after intravenous administration of Paeoniae Radix extract. *J. Chromatogr. B.* 802: 277-281. doi: 10.1016/j.jchromb.2003.11.040.
- Herbison, CE., Hickling, S., Allen, KL., O'Sullivan, TA., Robinson, M., Bremner, AP., Huang, RC., Beilin, L.J., Mori, TA., Oddy, WH. (2012) Low intake of B-vitamins is associated with poor adolescent mental health and behavior. *Prev. Med.* 55: 634-638. doi: 10.1016/j.ypmed.2012.09.014.
- Hirakawa, T., Rokutan, K., Nikawa, T., Kishi, K. (1996) Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterol.* 111: 345-357. doi: 10.1053/gast.1996.v111.pm8690199.
- Hirata, I., Naito, Y., Handa, O., Hayashi, N., Mizushima, K., Adachi, S., Omatsu, T., Okayama, T., Kishimoto, E., Ichikawa, H., Takagi, T., Kokura, S., Otaka, M., Yoshikawa, T. (2009) Heat-shock protein 70-overexpressing gastric epithelial cells are resistant to indomethacin-induced apoptosis. *Digestion* 79: 243-250. doi: 10.1159/000215352.



- Holmberg, C.I., Hietakangas, V., Mikhailov, A. (2001) Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* 20: 3800-3810. doi: 10.1093/emboj/20.14.3800.
- Hosseini, M., Zakeri, S., Khoshdast, S., Yousefian, FT., Rastegar, M., Vafae, F., Kahdouee, S., Ghorbani, F., Rakhshandeh, H., Kazemi, SA. (2012) The effects of *Nigella sativa* hydro-alcoholic extract and tymoquinone on lipopolysaccharide-induced depression like behavior in rats. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4: 219-225. doi: 10.4103/0975-7406.99052.
- Hori, H., Teraishi, T., Sasayama, D., Ozeki, Y., Matsuo, J., Kawamoto, Y., Kinoshita, Y., Hattori, K., Higuchi, T., Kunugi, H. (2011) Poor sleep is associated with exaggerated cortisol response to the combined dexamethasone/CRH test in a non-clinical population. *J. Psychiatr. Res.* 45: 1257-1263. doi: 10.1016/j.jpsychires.2011.04.001.
- Huang, F., Huang, J.P., Pan, J.Y., Bai, Z.L., Tang, L., Zhou, S.H. (2012) Intracellular heat shock protein 70: a possible therapeutic target for preventing postoperative atrial fibrillation. *Pharmazie* 67: 747-755.
- Huang, L.Z., Wei, L., Zhao, H.F., Huang, B.K., Rahman, K., Qin, L.P. (2011) The effect of Eleutheroside E on behavioral alterations in murine sleep deprivation stress model. *Eur. J. Pharmacol.* 658: 150-155. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.02.036.
- Hurley, L.L., Akinfiresoye, L., Nwulia, E., Kamiya, A., Kulkarni, A.A., Tizabi, Y. (2013) Antidepressant-like effects of curcumin in WKY rat model of depression is associated with an increase in hippocampal BDNF. *Behav. Brain Res.* 239: 27-30. doi: 10.1016/j.bbr.2012.10.049.
- Ischia, J., So, A.I. (2013) The role of heat shock proteins in bladder cancer. *Nat Rev. Urol.* 10: 386-395. doi: 10.1038/nrurol.2013.108.

- Ishii, Y., Kwong, JMK., Caprioli, J. (2003) Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 1982-1992.
- Itoh, Y. (2009) Induction of HSP by Mild Hyperthermia, and Prevention of Stress Injury by HSP. *J. J. A. Phys. M. Baln. Clim.* 73: 27-28.
- Jolesch, A., Elmer, K., Bendz, H., Issels, RD., Noessner, E. (2012) Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *Eur. J. Cell Biol.* 91: 48-52. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.02.001.
- Jolly, C., Konecny, L., Grady, DL. (2002) *In vivo* binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J. Cell Biol.* 156: 775-781. doi: 10.1083/jcb.200109018.
- Jordan, TS. and Earl, GN. (2012) Regulation of survival gene *hsp70*. *Cell Stress Chaperones* 17: 1-9. doi: 10.1007/s12192-011-0290-6.
- Kagami, K., Onda, K., Oka, K., Hirano, T. (2008) Suppression of blood lipid concentrations by volatile Maillard reaction products. *Nutrition* 24: 1159-1166. doi: 10.1016/j.nut.2008.05.010.
- Kampinga, HH., Hageman, J., Vos, MJ., Kubota, H., Tanguay, RM., Bruford, EA., Cheetham, ME., Chen, B., Hightower, LE. (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14: 105-111. doi: 10.1007/s12192-008-0068-7.
- Katsuno, M., Sang, C., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Tanaka, F., Doyu, M., Sobue, G. (2005) Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 16801-16806. doi: 10.1073/pnas.0506249102.

- Kawashima, D., Asai, M., Katagiri, K., Takeuchi, R., Ohtsuka, K. (2009) Reinvestigation of the effect of carbenoxolone on the induction of heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 14: 535-543. doi: 10.1007/s12192-009-0106-0.
- Kim, BY., Cui, ZG., Lee, SR., Kim, SJ., Kang, HK., Lee, YK., Park, DB. (2009) Effects of *Asparagus officinalis* extracts on liver cell toxicity and ethanol metabolism. *J. Food Sci.* 74: 204-208. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01263.x.
- Kim, GM., Woo, JM. (2011) Determinants for heart rate variability in a normal Korean population. *J. Korean Med. Sci.* 26: 1293-1298. doi: 10.3346/jkms.2011.26.10.1293.
- Kim, JY., Yenari, MA. (2013) The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anat. Cell Biol.* 46: 1-7. doi: 10.5115/acb.2013.46.1.1.
- Kokubo, T., Ikeshima, E., Kirisako, T., Miura, Y., Horiuchi, M., Tsuda A. (2013) A randomized, double-masked, placebo-controlled crossover trial on the effects of L-ornithine on salivary cortisol and feelings of fatigue of flushers the morning after alcohol consumption. *Biopsychosoc. Med.* 7: 6. doi: 10.1186/1751-0759-7-6.
- Kondo, T., Matsuda, T., Tashima, M., Umehara, H., Domae, N., Yokoyama, K., Uchiyama, T., Okazaki, T. (2000) Suppression of heat shock protein-70 by ceramide in heat shock-induced HL-60 cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 8872-8879. doi: 10.1074/jbc.275.12.8872.
- Koo, MW., Ogle, CW., Cho, CH. (1986) Effects of verapamil, carbenoxolone and N-acetylcysteine on gastric wall mucus and ulceration in stressed rats. *Pharmacol.* 32: 326-334. doi: 10.1159/000138188.

- Kregel, KC. (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92: 2177-2186. doi: 10.1152/jappphysiol.01267.2001.
- Kumar, A., Rinwa, P., Kaur, G., Machawal, L. (2013) Stress: Neurobiology, consequences and management. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 5: 91-97. doi: 10.4103/0975-7406.111818.
- Lee, JH., Khor, TO., Shu, L., Su, ZY., Fuentes, F., Kong, AN. (2013) Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol. Ther.* 137: 153-171. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.09.008.
- Lee, S., Lim, JM., Jin, MH., Park, HK., Lee, EJ., Kang, S., Kim, YS., Cho, WG. (2006) Partially purified paeoniflorin exerts protective effects on UV-induced DNA damage and reduces facial wrinkles in human skin. *J. Cosmet. Sci.* 57: 57-64.
- Lennikov, A., Kitaichi, N., Kase, S., Noda, K., Horie, Y., Nakai, A., Ohno, S., Ishida, S. (2013) Induction of heat shock protein 70 ameliorates ultraviolet-induced photokeratitis in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 2175-2189. doi: 10.3390/ijms14012175.
- Liu, DF., Wei, W., Song, LH. (2006) Protective effect of paeoniflorin on immunological liver injury induced by bacillus calmette-guerin plus lipopolysaccharide: modulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 mRNA. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33: 332-339. doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04371.x.
- Liu, HQ., Zhang, WY., Luo, XT., Ye, Y., Zhu, XZ. (2006) Paeoniflorin attenuates neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease by activation of adenosine A1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 148: 314-325. doi: 10.1038/sj.bjp.0706732.

- Liu, J., Jin, DZ., Xiao, L., Zhu, XZ. (2006) Paeoniflorin attenuates chronic cerebral hypoperfusion-induced learning dysfunction and brain damage in rats. *Brain Res.* 1089: 162-170. doi: 10.1016/j.brainres.2006.02.115.
- Luo, W., Zhao, MM., Yang, B., Shen, GL., Rao, GH. (2009) Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities. *Food Chem.* 114: 499-504. doi: org/10.1016/j.foodchem.2008.09.077.
- Malik, M. (1996) Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task force of the European society of cardiology and the North American society of pacing and electrophysiology. *Eur. Heart J.* 17: 354-381.
- Marković, M., Majkić-Singh, N., Ignjatović, S. (2009) Beneficial effects of cellular stress response in traditional spa treatment of rheumatoid arthritis. *Clin. Lab.* 55: 235-241.
- Martínez-Augustin, O., Aguilera, CM., Gil-Gampos, M., Sánchez de Medina, F., Gil, A. (2012) Bioactive anti-obesity food components. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 82: 148-156. doi: 10.1024/0300-9831/a000105.
- Maugeri, N., Radhakrishna, J., Knight, JC. (2010) Genetic determinants of HSP70 gene expression following heat shock. *Hum. Mol. Genet.* 19: 4939-4947. doi: 10.1093/hmg/ddq418.
- Mirescu, C., Peters, JD., Noiman, L., Gould, E. (2006) Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 19170-19175. doi: 10.1073/pnas.0608644103.
- Morimoto, RI. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409-1410. doi: 10.1126/science.8451637.

- Multhoff, G. (2002) Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *Int. J. Hyperthermia* 18: 576-585. doi: 10.1080/02656730902902001.
- Murphy, ME. (2013) The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* 34: 1181-1188. doi: 10.1093/carcin/bgt111.
- Murrow, L., Debnath, J. (2013) Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu. Rev. Pathol.* 24: 105-137. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-163918.
- Murshid, A., Eguchi, T., Calderwood, SK. (2013) Stress proteins in aging and life span. *Int. J. Hyperthermia* 29: 442-447. doi: 10.3109/02656736.2013.798873.
- Nagatani, M., Terada, A., Nakamura, A., Tamura, K. (2003) Morphological variability and frequency of spontaneous seminiferous tubular atrophy in Crj:CD(SD) IGS rats. *Biological Reference Data on CD(SD) IGS Rats-2002/2003*: 156-158.
- Nagayama, S., Jono, H., Suzaki, H., Sakai, K., Tsuruya, E., Yamatsu, I., Isohama, Y., Miyata, T., Kai, H. (2001) Carbenoxolone, a new inducer of heat shock protein 70. *Life Sci.* 69: 2867-2873. doi: 10.1016/s0024-3205(01)01362-5.
- Nakane, H., Asami, O., Yamada, Y., Ohira, H. (2002) Effect of negative air ions on computer operation, anxiety and salivary chromogranin A-like immunoreactivity. *Int. J. Psychophysiol.* 46: 85-89. doi: 10.1016/s0167-8760(02)00067-3.
- Natale, V., Plazzi, G., Martoni, M. (2009) Actigraphy in the assessment of insomnia: a quantitative approach. *Sleep* 32: 767-771. doi: org/10.1093/sleep/32.6.767.

- Nebiki, H., Higuchi, K., Arakawa, T., Ando, K., Uchida, T., Ito, H., Harihara, S., Kuroki, T., Kobayashi, K. (1998) Effect of rebamipide on *Helicobacter pylori* infection in patients with peptic ulcer. *Dig. Dis. Sci.* 43: 203S-206S.
- Negi, JS., Singh, P., Joshi, GP., Rawat, MS., Bisht, VK. (2010) Chemical constituents of *Asparagus*. *Pharmacogn. Rev.* 4: 215-220. doi: 10.4103/0973-7847.70921.
- Neto, JC., Lira, FS., Venancio, DP., Cunha, CA., Oyama, LM., Pimentel, GD., Tufik, S., Nascimento, C., Santos, RVT., Mello, MT. (2010) Sleep deprivation affects inflammatory marker expression in adipose tissue. *Lipids in Health and Disease* 9: 125. doi: 10.1186/1476-511X-9-125.
- Ng, V., Koh, D., Mok, BY., Chia, SE., Lim, LP. (2003) Salivary biomarkers associated with academic assessment stress among dental undergraduates. *J. Dent. Educ.* 67: 1091-1094.
- Nishida, T., Ohata, S., Kusumoto, C., Mochida, S., Nakada, J., Inagaki, Y., Ohta, Y., Matsuura, T. (2010) Zinc supplementation with polaprezinc protects mouse hepatocytes against acetaminophen-induced toxicity via induction of heat shock protein 70. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 46: 43-51. doi: 10.3164/jcbrn.09-60.
- Ogasawara, J., Ito, T., Wakame, K., Kitadate, K., Sakurai, T., Sato, S., Ishibashi, Y., Izawa, T., Takahashi, K., Ishida, H., Takabatake, I., Kizaki, T., Ohno, H. (2014) ETAS, an enzyme-treated asparagus extract, attenuates amyloid  $\beta$ -induced cellular disorder in PC12 cells. *Nat. Prod. Commun.* 9: 561-564.
- Ohkawara, T., Nishihira, J., Takeda, H., Kathurada, T., Kato, K., Yoshiki, T., Sugiyama, T., Asaka, M. (2006) Protective effect of geranylgeranylacetone on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Int. J. Mol. Med.* 17: 229-234.

- Ohtsuka, K., Kawashima, D., Gu, Y., Saito, K. (2005) Inducers and co-inducers of molecular chaperones. *Int. J. Hyperthermia* 21: 703-711. doi: 10.1080/02656730500384248.
- Ooie, T., Takahashi, N., Saikawa, T., Nawata, T., Arikawa, M., Yamanaka, K., Hara, M., Shimada, T., Sakata, T. (2001) Single oral dose of geranylgeranylacetone induces heat-shock protein 72 and renders protection against ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Circulation* 104: 1837-1843. doi: 10.1161/hc3901.095771.
- Otaka, M., Yamamoto, S., Ogasawara, K., Takaoka, Y., Noguch, S., Miyazaki, T., Nakai, A., Odashima, M., Matsushashi, T., Watanabe, S., Itoh, H. (2007) The induction mechanism of the molecular chaperone HSP70 in the gastric mucosa by geranylgeranylacetone (HSP-inducer). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353: 399-404. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.031.
- Owen RT., Tyrer P. (1983) Benzodiazepine dependence. A review of the evidence. *Drugs.* 25(4): 385–398. doi: 10.2165/00003495-198325040-00003.
- Palazzi, M., Maluta, S., Dall'Oglio, S., Romano, M. (2010) The role of hyperthermia in the battle against cancer. *Tumori.* 96: 902-910.
- Perry, CJ., Finch, JM. (1999) Background pathology data from carcinogenicity studies comparing Crl:CD(SD) IGS and Crl:CD rats - (2) non-neoplastic lesions. Biological Reference Data on CD(SD) IGS Rats-1999: 267-283.
- Rask-Madsen, J., Bukhave, K., Madsen, PE., Bekker, C. (1983) Effect of carbenoxolone on gastric prostaglandin E2 levels in patients with peptic ulcer disease following vagal and pentagastrin stimulation. *Eur. J. Clin. Invest.* 13: 351-356. doi: 10.1111/j.1365-2362.1983.tb00112.x.



Richter, K., Haslbeck, M., Buchner, J. (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell* 40: 253-266. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.006.

Robert, TC, Jr., Kirsten MV, Yu-cai L, Allison BE, Gerald AH. (1996) Salivary  $\alpha$ -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical Physiology*. 16: 433-448. doi: org/10.1111/j.1475-097X.1996.tb00731.x

Rokutan, K., Hirakawa, T., Teshima, S., Nakano, Y., Miyoshi, M., Kawai, T., Konda, E., Morinaga, H., Nikawa, T., Kishi, K. (1998) Implications of heat shock / stress proteins for medicine and disease. *J. Med. Invest.* 44: 137-147.

Romero-Suarez, S., Mo, C., Touchberry, C., Lara, N., Baker, K., Craig, R., Brotto, L., Andresen, J., Wacker, M., Kaja, S., Abreu, E., Dillmann, W., Mestril, R., Brotto, M., Nosek, T. (2012) Hyperthermia: from diagnostic and treatments to new discoveries. *Recent Patents Biotechnol.* 6: 172-83. doi: 10.2174/1872208311206030172.

Sakurai, T., Ito, T., Wakame, K., Kitadate, K., Arai, T., Ogasawara, J., Kizaki, T., Sato, S., Ishibashi, Y., Fujiwara, T., Akagawa, K., Ishida, H., Ohno, H. (2014) Enzyme-treated *Asparagus officinalis* extract shows neuroprotective effects and attenuates cognitive impairment in senescence-accelerated mice. *Nat. Prod. Commun.* 9: 101-106.

Sarge, KD., Murphy, SP., Morimoto, RI. (1993) Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1392-1407. doi: 10.1128/mcb.13.3.1392-1407.1993.

Sato, C., Seto, Y., Nabeta, K., Matsuura, H. (2009) Kinetics of the accumulation of jasmonic acid and its derivatives in systemic leaves of

tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) and translocation of deuterium-labeled jasmonic acid from the wounding site to the systemic site. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1962-1970. doi: 10.1271/bbb.90119.

Selye, H. (1936) A Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32. doi: 10.1176/jnp.10.2.230a.

Senf, SM., Dodd, SL., McClung, JM., Judge, AR. (2008) Hsp70 overexpression inhibits NF- $\kappa$ B and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB J.* 22: 3836-3845. doi: 10.1096/fj.08-110163. Epub 2008 Jul 21.

Serafini-Cessi, F., Cessi, C. (1968) Thiobarbituric acid test as an index of phospholipid peroxidation. *Sperimentale* 118: 371-378.

Silver, JT., Noble, EG. (2012) Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress Chaperones* 17: 1-9. doi: 10.1007/s12192-011-0290-6.

Simar, D., Jacques, A., Caillaud, C. (2012) Heat shock proteins induction reduces stress kinases activation, potentially improving insulin signalling in monocytes from obese subjects. *Cell Stress Chaperones* 17: 615-21. doi: 10.1007/s12192-012-0336-4.

Singh, IS., Hasday, JD. (2013) Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int. J. Hyperthermia* 29: 423-435. doi: 10.3109/02656736.2013.808766.

Slavin, JL., Lloyd, B. (2012) Health benefits of fruits and vegetables. *Adv. Nutr.* 3: 506-516. doi: 10.3945/an.112.002154.

Soldatos, CR., Dikeos, DG., Paparrigopoulos, TJ. (2000) Athens insomnia scale: validation of an instrument based on ICD-10 criteria. *J. Psychosom. Res.* 48: 555-560. doi: 10.1016/s0022-3999(00)00095-7.

- Soo, ET., Ng, YK., Bay, BH., Yip, GW. (2008) Heat shock proteins and neurodegenerative disorders. *Sci. World J.* 8: 270-274. doi: 10.1100/tsw.2008.48.
- Soti, C., Nagy, E., Giricz, Z., Vigh, L., Csermely, P., Ferdinandy, P. (2005) Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* 146: 769-780. doi: 10.1038/sj.bjp.0706396
- Sugimoto, K., Shibuya, K., Ihara, M., Saitoh, T., Itabashi, M., Nunoya, T. (2000) Background data on organ weights and histopathological lesions in Crj:CD(SD) IGS rats for 4-, 13- and 26-week repeated-dose toxicity studies. *Biological Reference Data on CD(SD) IGS Rats-2000*: 79-87.
- Sun, WH., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, ES., Kawai, N., Kimura, A., Kakiuchi, Y., Yasumaru, M., Iijima, H., Okuda, Y., Sasaki, Y., Hori, M., Kawano, S. (2000) Induction of cyclooxygenase-2 in rat gastric mucosa by rebamipide, a mucoprotective agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 447-452.
- Tahmasian, M., Khazaie, H., Sepehry, AA., Russo, MB. (2010) Ambulatory monitoring of sleep disorders. *J. Pak. Med. Assoc.* 60: 480-487.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., Anderson, RL. (1996) A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1: 23-28. doi: 10.1379/1466-1268(1996)001<0023:ahsgtt>2.3.co;2.
- Technical Resources International, Inc. (1994) 5-(hydroxymethyl)-2-furfural, CAS NO. 67-47-0, Prepared for NCI by Technical Resources International, Inc. under contract No. NO1-CP-56019 (12/94).
- Tiveron, AP., Melo, PS., Bergamaschi, KB., Vieira, TM., Regitano-d'Arce, MA., Alencar, SM. (2012) Antioxidant activity of Brazilian vegetables

and its relation with phenolic composition. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 8943-8957. doi: 10.3390/ijms13078943.

Tsukimi, Y., Okabe, S. (2001) Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 1-9. doi: 10.1248/bpb.24.1.

Tsukimi, Y., Fujishita, T., Nakajima, K., Okabe, S. (2002) Effect of rebamipide on cell death induced by combined treatment of mild heat shock and quercetin in RGM-1 cells: A role for HSP70 induction. *Pharmacol.* 64: 28-35. doi: 10.1159/000056147.

Ueng, SW., Yuan, LJ., Lin, SS., Niu, CC., Chan, YS., Wang, IC., Yang, CY., Chen, WJ. (2013) Hyperbaric oxygen treatment prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular cartilage injury via enhancement of the expression of heat shock protein 70. *J. Orthop. Res.* 31: 376-384. doi: 10.1002/jor.22235. Epub 2012 Sep 18.

Urashima, H., Okamoto, T., Takeji, Y., Shinohara, H., Fujisawa, S. (2004) Rebamipide increases the amount of mucin-like substances on the conjunctiva and cornea in the N-acetylcysteine-treated in vivo model. *Cornea.* 23: 613-619. doi: 10.1097/01.icc.0000126436.25751.fb.

Ushijima, H., Tanaka, K., Takeda, M., Katsu, T., Mima, S., Mizushima, T. (2005) Geranylgeranylacetone protects membranes against nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Mol. Pharmacol.* 68: 1156-1161. doi: 10.1124/mol.105.015784.

Vinas, P., Campillo, N., Cordoba, MH., Candela, ME. (1992) Simultaneous liquid chromatographic analysis of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde and methyl anthranilate in honey. *Food Chem.* 44: 67-72. doi: org/10.1016/0308-8146(92)90260-9.

- Wada, T., Sei, H., Kusumoto, K., Kitaoka, K., Chikahisa, S., Rokutan, K., Morita, Y. (2006) Geranylgeranylacetone, an inducer of HSP70, attenuates REM sleep rebound after sleep deprivation. *Brain Res. Bull.* 69: 388-392. doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.02.004.
- Westerheide, SD., Morimoto, RI. (2005) Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J. Biol. Chem.* 280: 33097-33100. doi: 10.1074/jbc.R500010200.
- Westerheide, SD., Raynes, R., Powell, C., Xue, B., Uversky, VN. (2012) HSF transcription factor family, heat shock response, and protein intrinsic disorder. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13: 86-103. doi: 10.2174/138920312799277956.
- Westwood, JT., Wu, C. (1993) Activation of Drosophila heat shock factor: conformational change associated with a monomer-to-trimer transition. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3481-3486. doi: 10.1128/mcb.13.6.3481-3486.1993.
- Wilhelmus, MM., de Waal, RM., Verbeek, MM. (2007) Heat shock proteins and amateur chaperones in amyloid- $\beta$  accumulation and clearance in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 35: 203-216. doi: 10.1007/s12035-007-0029-7.
- Wu, JL., Wu, RS., Yang, JG., Huang, CC., Chen, KB., Fang, KH., Tsai, HD. (2011) Effects of sleep deprivation on serum testosterone concentrations in the rat. *Neurosci. Lett.* 494: 124-129. doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.073.
- Wu, X., Zhang, Y., Yin, Y., Ruan, Z., Yu, H., Wu, Z., Wu, G. (2013) Roles of heat-shock protein 70 in protecting against intestinal mucosal damage. *Front. Biosci.* 18: 356-365. doi: 10.2741/4106.

- Yan, D., Saito, K., Ohmi, Y., Fujie, N., Ohtsuka, K. (2004) Paeoniflorin, a novel heat shock protein-inducing compound. *Cell Stress Chaperones* 9: 378-389. doi: 10.1379/csc-51r.1.
- Yanaka, A., Zhang, S., Sato, D., Tauchi, M., Suzuki, H., Shibahara, T., Matsui, H., Nakahara, A., Hyodo, I. (2007) Geranylgeranylacetone protects the human gastric mucosa from diclofenac-induced injury via induction of heat shock protein 70. *Digestion* 75: 148-155. doi: 10.1159/000106756.
- Ye, MR., Li, R., Liao, HF., Huang, GY. (1994) Pharmacological study on *Asparagus officinalis* Linn. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 19: 240-242.
- Yean, KK., Jeong, MK., Ja, YK., Sam, SK., KiHwan, B., Yeong, SK., Jin-Ho, C., Hye, SkYC. (2010) Platelet anti-aggregatory and blood anti-coagulant effects of compounds isolated from *Paeonia lactiflora* and *Paeonia suffruticosa*. *Pharmazie*. 65: 624-628.
- Yoshihisa, Y., Hassan, MA., Furusawa, Y., Tabuchi, Y., Kondo, T., Shimizu, T. (2012) Alkannin, HSP70 inducer, protects against UVB-induced apoptosis in human keratinocytes. *PLoS One* 7: e47903. doi: 10.1371/journal.pone.0047903.
- Zhang, J., Wang, K., Guo, Y., Shi, Q., Tian, C., Chen, C., Gao, C., Zhang, BY., Dong, XP. (2012) Heat shock protein 70 selectively mediates the degradation of cytosolic PrPs and restores the cytosolic PrP-induced cytotoxicity via a molecular interaction. *Virology* 9: 303. doi: 10.1186/1743-422X-9-303.
- Zhang, Q., Andersen, ME. (2007) Dose response relationship in anti-stress gene regulatory networks. *PLoS Comput. Biol.* 3: e24. doi: 10.1371/journal.pcbi.0030024.

Zhou, X., Tron, VA., Li, G., Trotter, MJ. (1998) Heat shock transcription factor-1 regulates heat shock protein-72 expression in human keratinocytes exposed to ultraviolet B light. *J. Invest. Dermatol.* 111: 194-198. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00266.x.

Zhu, X., Zhang, W., Pang, X., Wang, J., Zhao, J., Qu, W. (2011) Hypolipidemic effect of *n*-butanol extract from *Asparagus officinalis* L. in mice fed a high-fat diet. *Phytother. Res.* 25: 1119-1124. doi: 10.1002/ptr.3380.

井澤修平, 城月健太郎, 菅谷渚, 小川奈美子, 鈴木克彦, 野村忍 (2007) 日本補完代替医療学会誌, 第 4 巻, 第 3 号, 91-101.

伊藤要子 (1998) 温熱療法の新しい臨床応用 (予備加温) - 加温により誘導される HSP70 の生体防御作用 - 放射線生物研究 33: 381-397

伊藤要子 (2002) プレコンディショニングとしてのストレスタンパク (HSP70) - Heat (加温) と Exercise (運動) のすすめ - 放射線生物研究 37: 431-445.

小野裕嗣, 忠田吉弘, 春見隆文, 一色賢司 (1999) 5-ヒドロキシメチル-2-フルフラール有機酸エステル類とその製造法 特許第 3001095 号

柴田洋孝, 伊藤裕 (2007) 日本内科学会誌, 第 96 巻, 第 4 号, 153-158.

柴田洋孝 (2008) 日本内科学会誌, 第 97 巻, 702-707.

鈴木一博 (2015) 自律神経系による炎症の制御 *Jpn. J. Clin. Immunol.*, 39(2): 96-102.

高下崇, 山下明宏, 石原健夫 (2011) 血管新生阻害剤 特許第 4826696 号

二木鋭雄 (2008) ストレスの科学と健康 共立出版

東野英明 (2006) 日本良導絡自律神経学会雑誌, 51 巻, 3 号, 94-104.

doi:10.17119/ryodoraku1986.51.94

前田多章 (2010) 第 3 回「夜の過ごし方を変えて, 良質の睡眠を手に入れる!」,

[https://www.konan-u.ac.jp/special/vol\\_3.html](https://www.konan-u.ac.jp/special/vol_3.html)

吉岡成人 (2015) 副腎髄質系. 系統看護学講座 成人看護学 6 内分泌・代謝. 第 14 版, 医学出版, 37-40.

脇田慎一, 田中喜秀, 永井秀典 (2004) 日本分析化学会機関誌ぶんせき 6, 309-316.

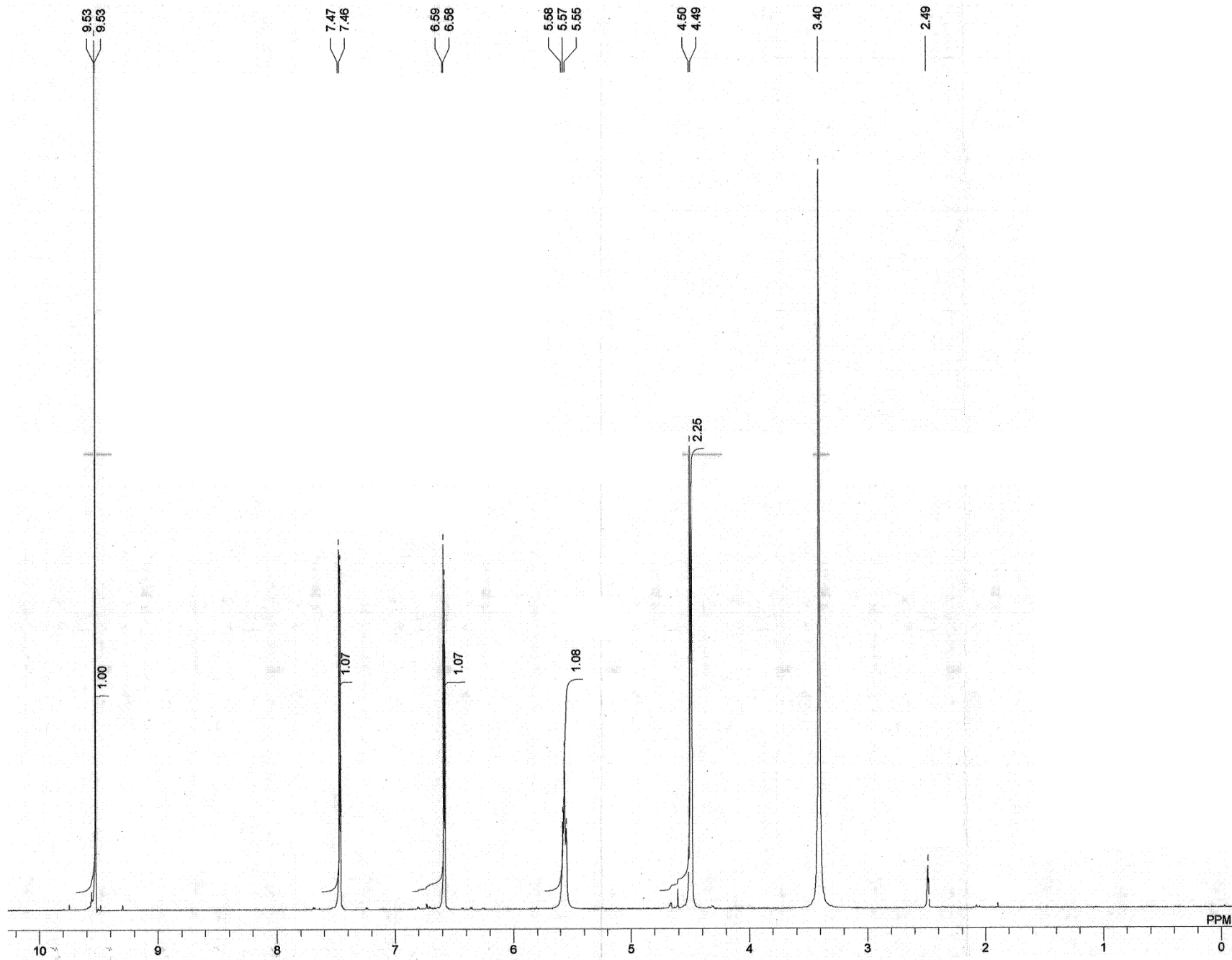
脇田慎一, 田中喜秀, 永井秀典 (2013) 日本薬理学雑誌 141, 296-301.

Fink, G. (2010) ストレス百科事典 丸善出版

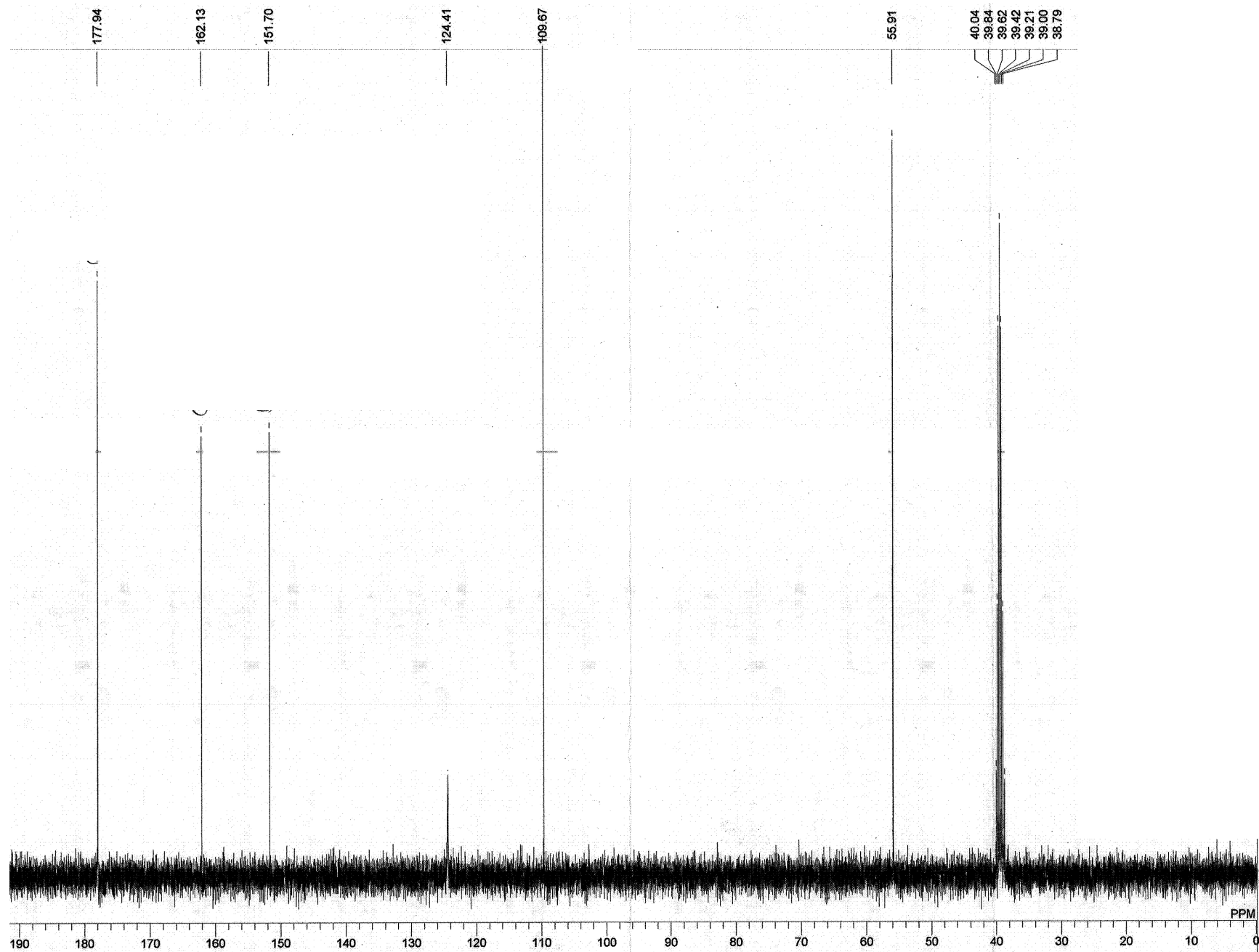
Guidance for Industry-Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (2005)



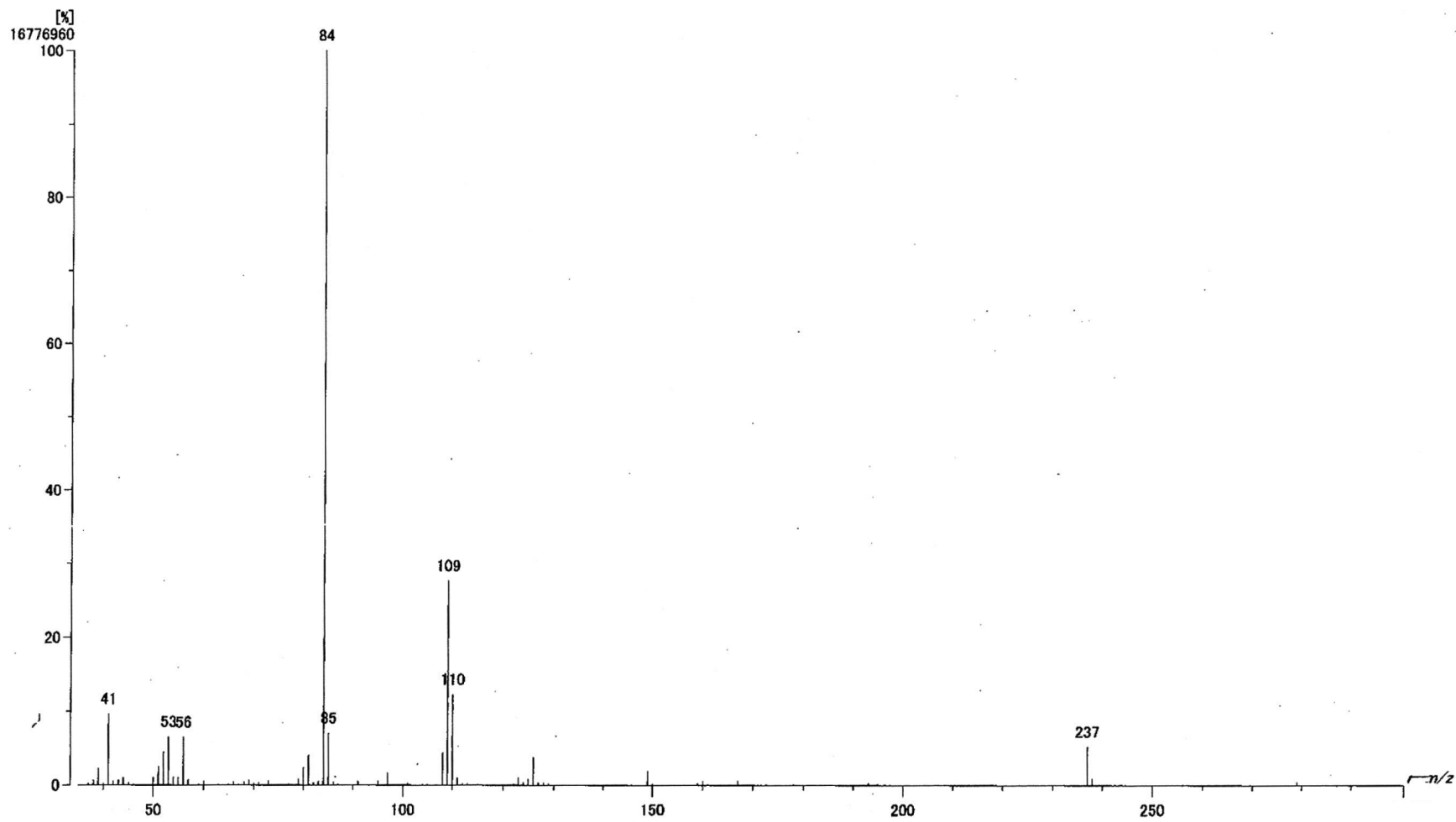
# 化合物チャート集



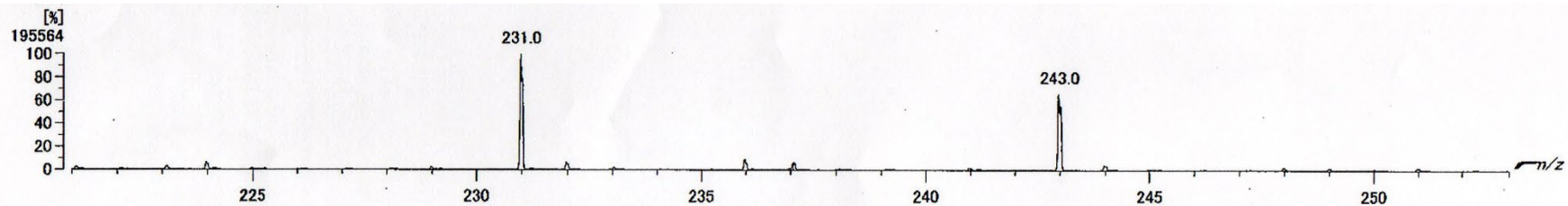
$^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 in  $\text{DMSO}-d_6$  at 400MHz.



$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 1 in  $\text{DMSO}-d_6$  at 100MHz.

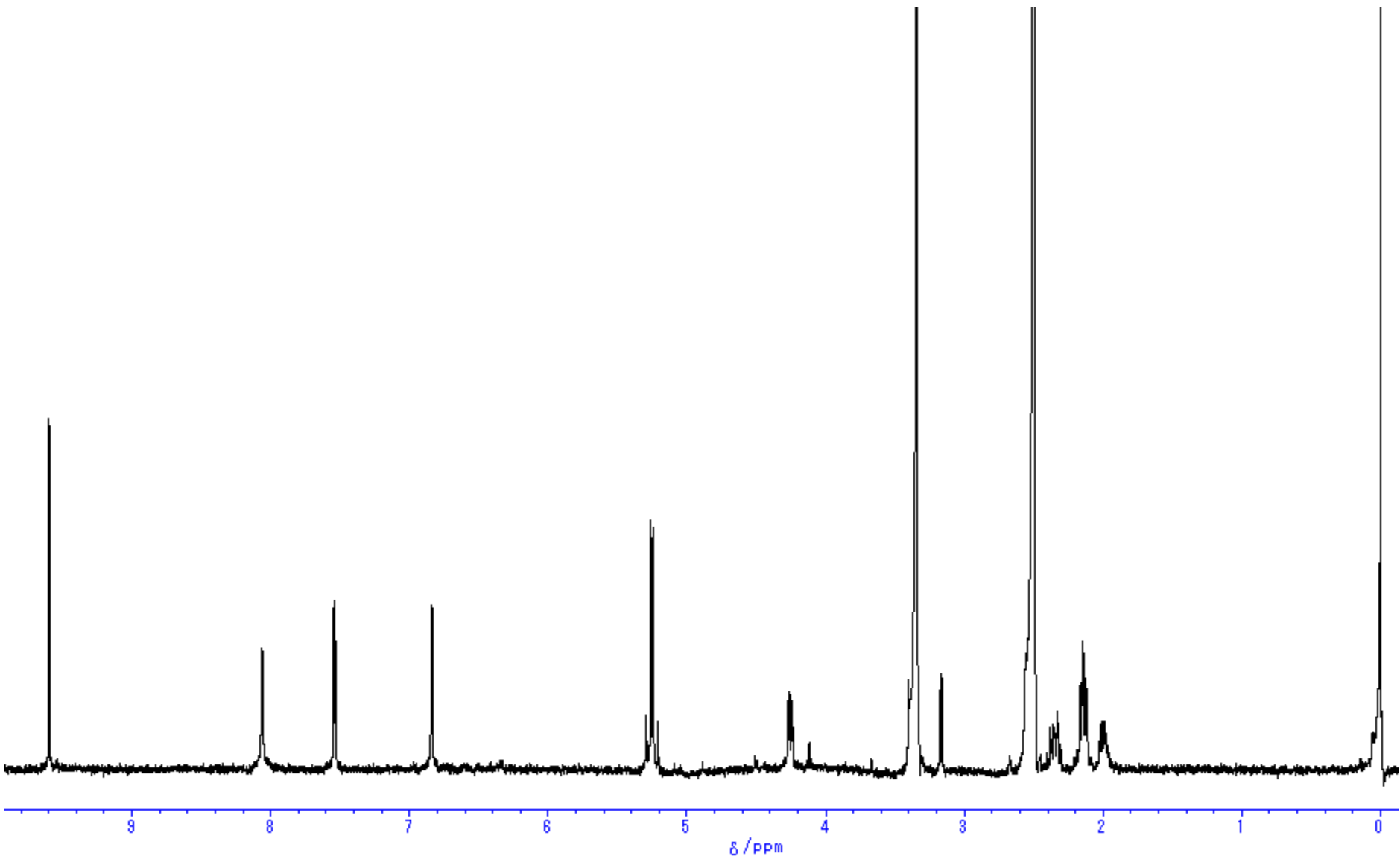


EI-MS spectrum of compound 2.

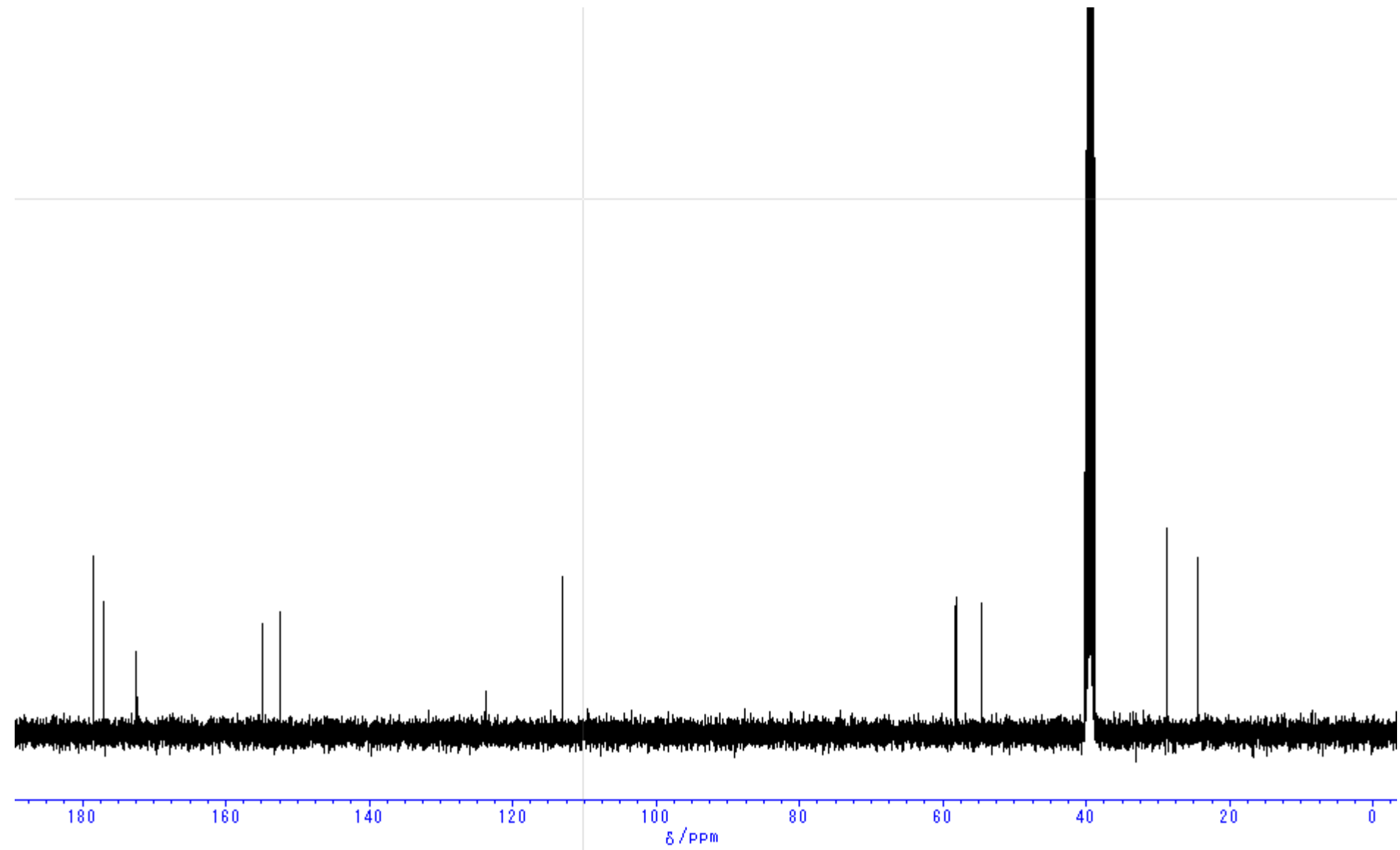


Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S. Composition
1 237.0612	6.85	-10.6 / -2.5	7.0 C11 H11 N O5
2		+0.7 / +0.2	2.5 C8 H13 O8
3		+12.2 / +2.9	6.5 C11 H13 O4 Si
4		-12.4 / -2.9	6.0 C10 H15 N O2 Si2
5		-1.1 / -0.3	1.5 C7 H17 O5 Si2
6		+10.4 / +2.5	5.5 C10 H17 O Si3

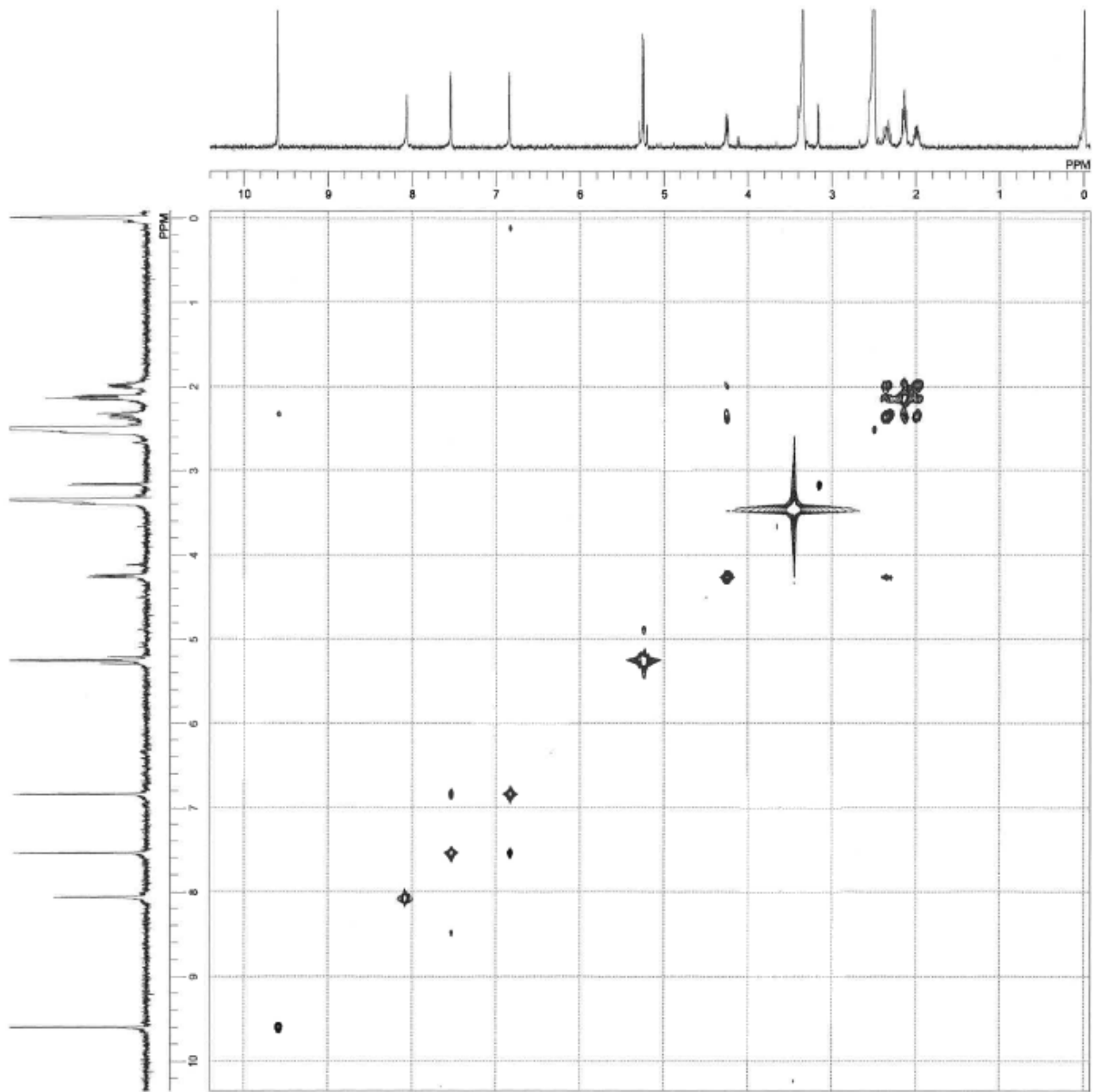
HREI-MS spectrum of compound 2.



$^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **2** in  $\text{DMSO-}d_6$  at 400 MHz.

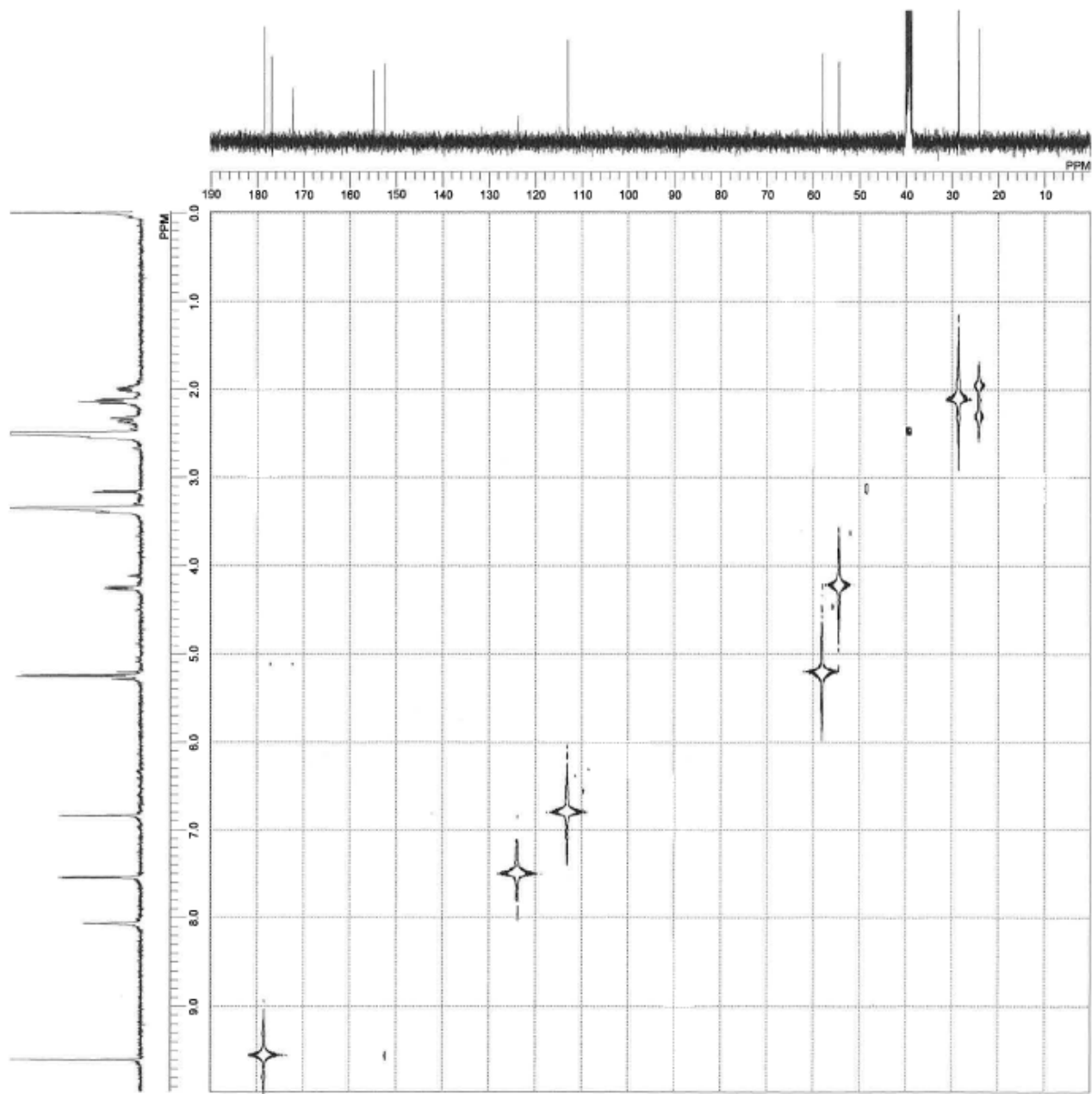


$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **2** in  $\text{DMSO-}d_6$  at 100 MHz.

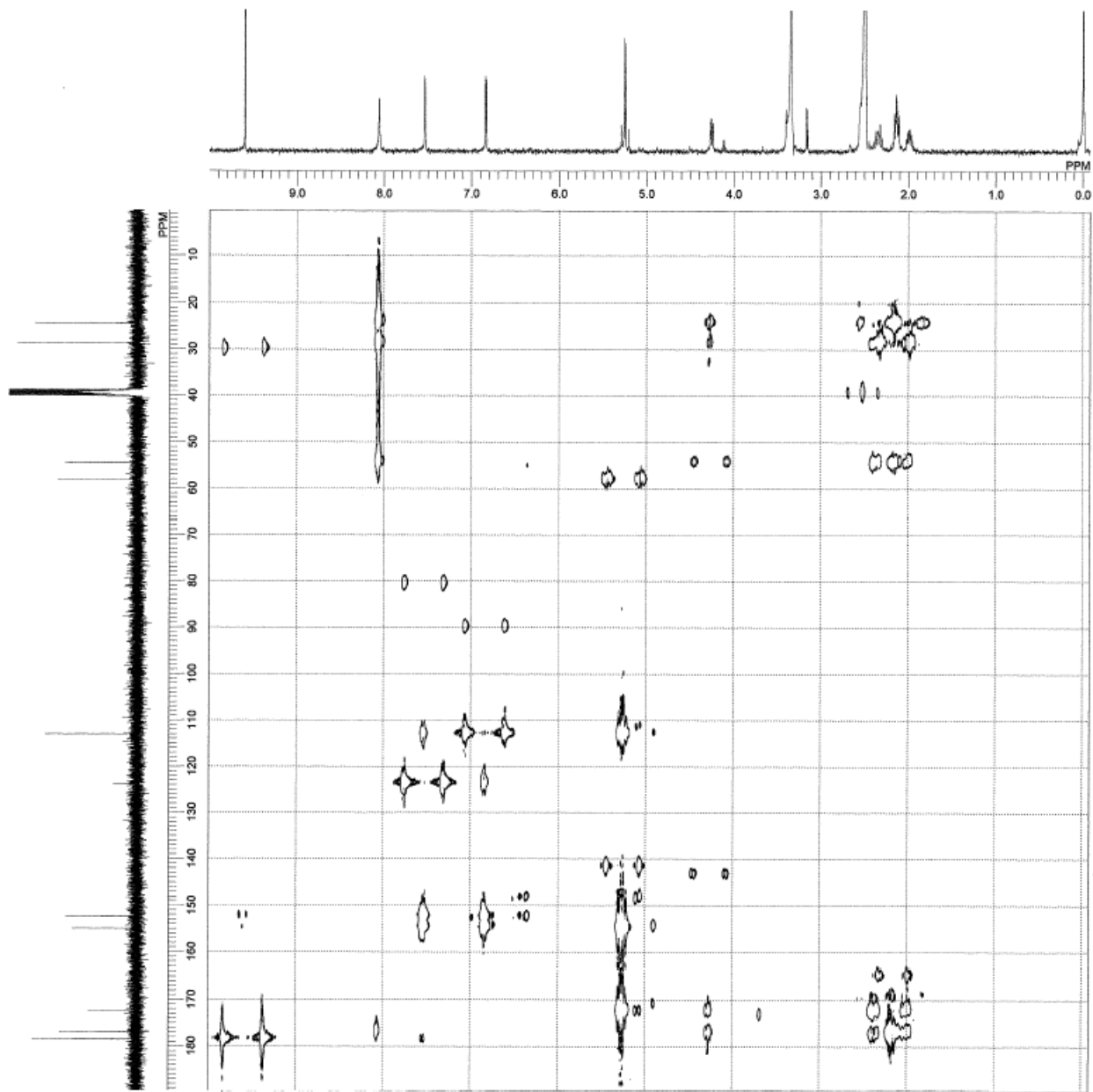


H-H COSY spectrum of compound **2** in DMSO- $d_6$

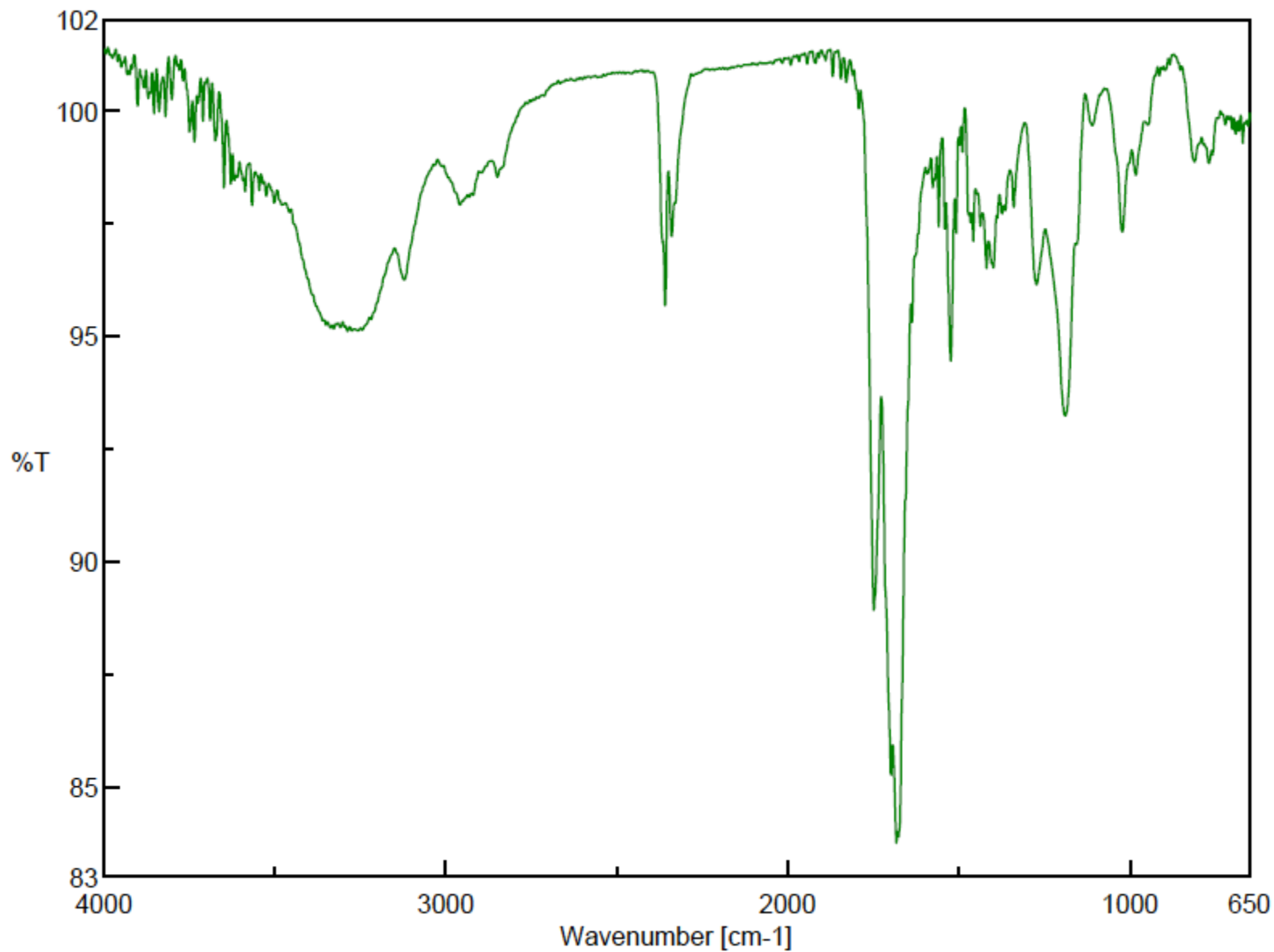




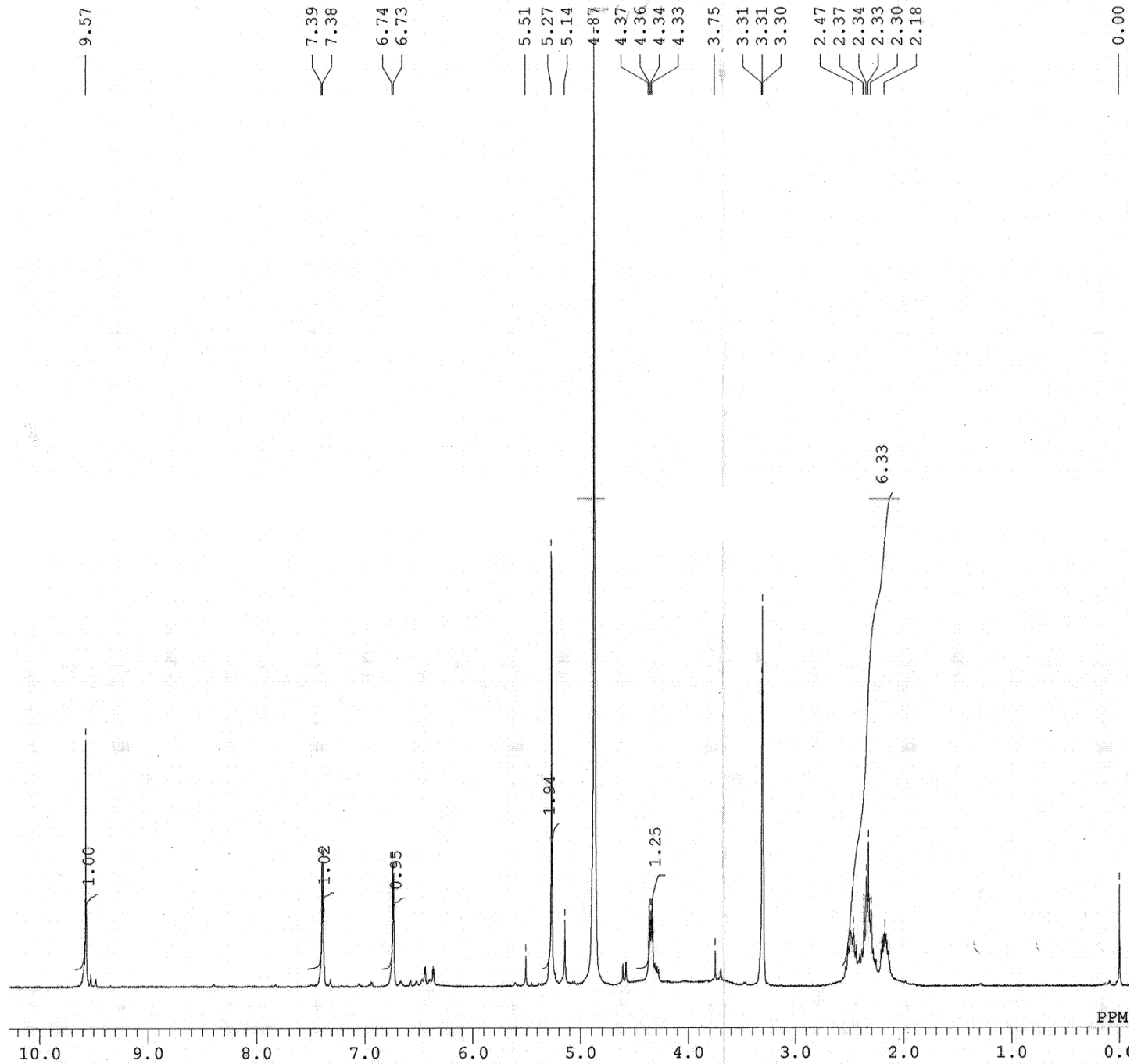
C-H COSY spectrum of compound **2** in DMSO-*d*<sub>6</sub>



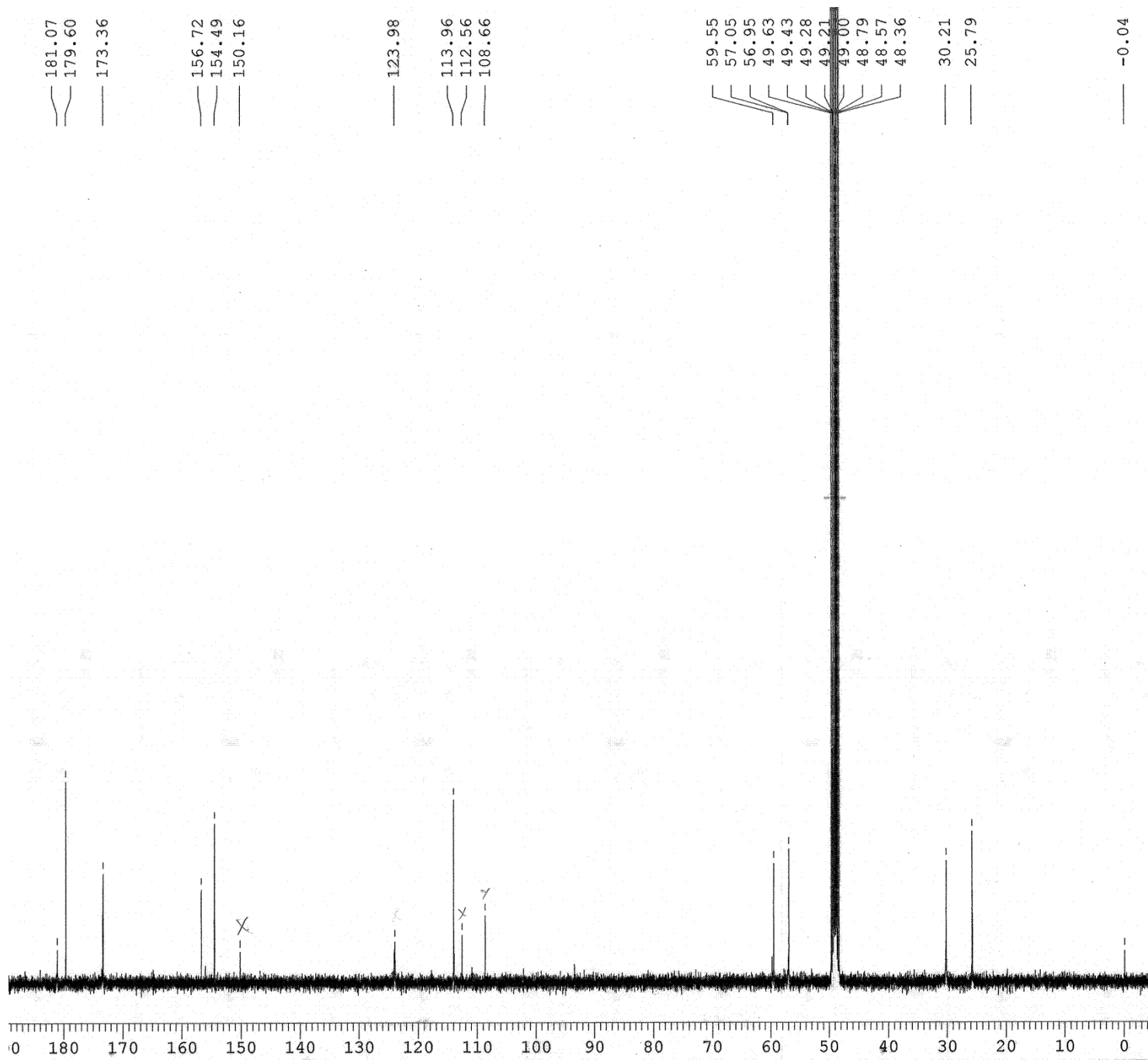
HMBC spectrum of compound **2** in DMSO-*d*<sub>6</sub>



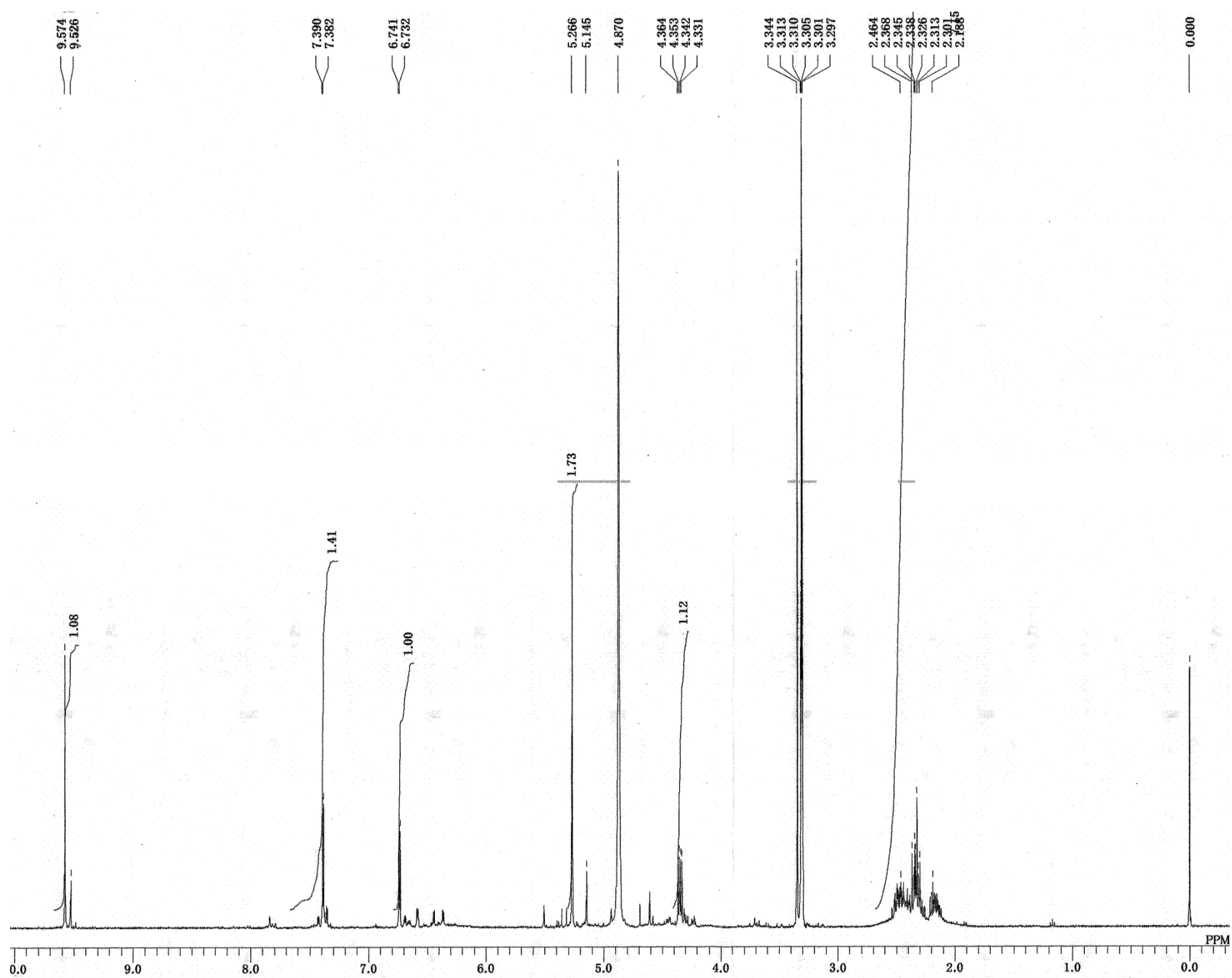
IR spectrum of compound 2



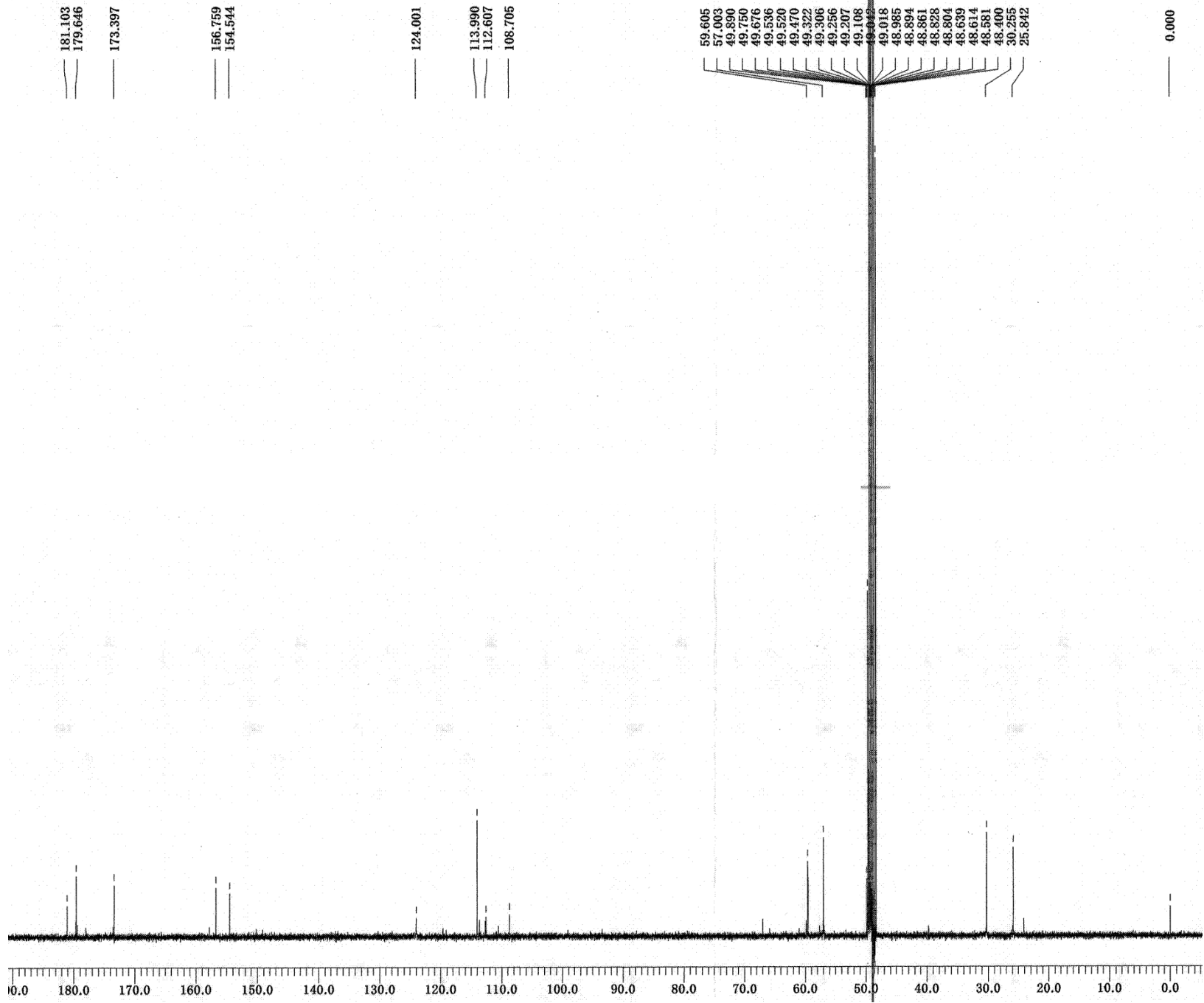
$^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **2a** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 400MHz.



<sup>13</sup>C NMR spectrum of compound **2a** in CD<sub>3</sub>OD at 100MHz.



$^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **2b** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 400MHz.



$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **2b** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 100MHz.

# アンケート用紙



# アテネ不眠尺度(AIS)

記入日 月 日

ボランティア番号

---

下記の A から H までの、8 つの質問に教えてください。  
過去 1 週間の状態に当てはまるものを、2 ページ目の下の欄に記載してください。

## A 寝つきについてお聞きします(布団に入ってから眠るまで要する時間)

- 0 いつも寝つきはよい
- 1 いつもより少し時間がかかった
- 2 いつもよりかなり時間がかかった
- 3 いつもより非常に時間がかかったか、全く眠れなかった

## B 夜間、睡眠途中で目が覚めることはありましたか？

- 0 問題になるほどではなかった
- 1 少し困ることがあった
- 2 かなり困っている
- 3 深刻な状態か、全く眠れなかった

## C 予定の起床時間より早く目覚めることがありましたか？

また、それ以上眠れなかったことがありましたか？

- 0 そのようなことはなかった
- 1 少し早かった
- 2 かなり早かった
- 3 非常に早かったか、全く眠れなかった

## D 総睡眠時間についてお聞きします

- 0 十分である
- 1 少し足りない
- 2 かなり足りない
- 3 全く足りないか、全く眠れなかった

E 全体的な睡眠の質についてお聞きします

- 0 満足している
- 1 少し不満
- 2 かなり不満
- 3 非常に不満か、全く眠れなかった

F 日中の気分についてお聞きします

- 0 いつも通り
- 1 少しめいった
- 2 かなりめいった
- 3 非常にめいった

G 日中の活動についてお聞きします（身体的及び精神的）

- 0 いつも通り
- 1 少し低下
- 2 かなり低下
- 3 非常に低下

H 日中の眠気についてお聞きします

- 0 全くない
- 1 少しある
- 2 かなりある
- 3 激しい

	A	B	C	D	E	F	G	H
回答								

ご協力ありがとうございました  
試験会場へ忘れずにお持ちください

# VAS

記入日時： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

匿名番号 \_\_\_\_\_

あなたが、**今、感じている気分や状況**を直線の左右両端に示した内容を参考に、直線上に×で示して下さい。ここ数週間や若いころとの比較ではなく現在感じている気分や状況で評価してください。

(線の外に×をつけることはできません)

- |           |             |               |             |
|-----------|-------------|---------------|-------------|
| (例) 気分    | 非常に悪い       | _____ × _____ | 非常に良い       |
| (1) 覚醒度   | たまらなく眠い     | _____         | 非常にすっきりしている |
| (2) 気分    | 非常に悪い       | _____         | 非常に良い       |
| (3) 意欲    | まったく何もしたくない | _____         | やる気満々       |
| (4) 気持ち   | 非常に悲観的      | _____         | 非常に楽観的      |
| (5) 身体的疲労 | 身体が非常に重い    | _____         | 身体が非常に軽い    |
| (6) 集中力   | まったく集中できない  | _____         | 非常に集中できる    |
| (7) 食欲    | まったく食欲がない   | _____         | 非常に食欲がある    |

**朝、目覚めたらすぐ記入してください**

**記入時刻 午前・午後 時 分**

この調査票は、あなたの睡眠の状態についてお聞きするものです。

睡眠の時刻等について記入してください。午前・午後はどちらかを○で囲んでください。

- ① 昨夜、おやすみになった時刻 (午前・午後) 時 分
- ② 今朝、目覚めた時刻 (午前・午後) 時 分
- ③ 昨夜の睡眠時間 およそ 時間 分

昨夜の睡眠の状態や現在の心身の状態についてお聞きします。4箇所の縦線は各質問項目の状態の程度を示しています。記入例を参考に、あなたの状態にあてはまる**線上**に○印で囲んでください。

**記入例**

1. 疲れが残っている 非常に や や 非常に 疲れがとれている

◎正しい書き方                      ×誤った書き方

	非常に	や	や	非常に	
1. 疲れが残っている					疲れがとれている
2. 集中力がある					集中力がない
3. ぐっすり眠れた					ぐっすり眠れなかった
4. 解放感がある					ストレスを感じる
5. 身体がだるい					身体がシャキッとしている
6. 食欲がある					食欲がない
7. 寝つくまでにウトウトしていた状態が多かった					寝つくまでにウトウトしていた状態が少なかった
8. 頭がはっきりしている					頭がボーとしている
9. 悪夢が多かった					悪夢はみなかった
10. 寝付きがよかった					寝付きが悪かった
11. 不快な気分である					さわやかな気分である
12. しょっちゅう夢をみた					夢をみなかった
13. 睡眠中にしょっちゅう目が覚めた					睡眠中に目が覚めなかった
14. いますぐ、調査にテキパキと答えられる					答えるのは、めんどろである
15. 睡眠時間が長かった					睡眠時間が短かった
16. 眠りが浅かった					眠りが深かった

## 謝辞

本研究の遂行に当たり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院農学研究院生物有機化学研究室 松浦英幸教授に感謝致します。

論文の御校閲、御助言を賜りました、北海道大学大学院農学研究院生物有機化学研究室 北岡直樹准教授、北海道大学大学院農学研究院食品栄養学研究室 石塚敏教授、比良徹准教授、北海道大学大学院農学研究院生態化学生物学研究室 橋本誠教授、並びに、東京農業大学大学院フードシステム管理学研究室 高橋公咲教授に感謝致します。

本博士論文研究は株式会社アミノアップに於いて為されたものであります。多大なる御助言、御指導を賜りました職員の皆様に深く感謝致します。

ヒト介入試験において御指導を賜りました、北海道情報大学 西平順学長に深く感謝致します。

論文の御校閲、御助言を賜りましたカリフォルニア大学デービス校のロバート・ハックマン教授に感謝致します。

本研究は（公財）北海道中小企業総合支援センター及び（公財）北海道科学技術総合振興センターからの補助を受けて行いました。感謝致します。

最後に、温かく見守ってくれた家族に感謝致します。

2024年1月  
伊藤 知洋