
生化学研究部門

Division of Biochemistry

教授 新保 寛
准教授 別府 秀彦
講師 千原 猛
助教 水谷 謙明
助手 金児 孝晃
技術員 2名、研究生 1名、研究補助員 1名

〔研究の背景と内容〕

本研究部門は、隣接する藤田保健衛生大学七栗サナトリウムと緊密に連携し、診察に直結する各種基礎的研究を進めている。現在、リハビリテーション医学関係は、脳卒中の疾患モデルである脳梗塞ラットへのリハビリ効果や、神経難病のひとつである小脳変性症モデルマウスを用いた病態解析を行っている。一方、本研究部門は本大学の創設者、故藤田啓介総長の遺志に基づき、ユリ科植物（例えば、アロエ、ニンニクなど）の成分解析とそれらの薬効の解明を行い、機能的食品としての裏付けを行うべく研究を行っている。さらに、本研究部門では食品機能性に関する受託研究も行っている。

1. リハビリ訓練効果と血清中遊離アミノ酸から評価する解析法の確立

『リハビリ訓練患者に有用な訓練効果指標マーカーを生体成分から得ることを最終目的』とする研究のうちリハビリ訓練効果と血清中遊離アミノ酸から評価する解析法の確立をめざしている。23年度は、脳梗塞 19 名、脳出血 10 名の合計 29 名について、リハ項目[年齢、発症から退院日数、入院日数、FIM-00w（入院時 FIM 値）、FIM-99w（退院時 FIM 値）、FIM-gain（退院時 FIM 値から入院時 FIM 値を引いた値）、FIM-efft (FIM-gain を入院日数で割った値)]と遊離アミノ酸 (21 項目) との関連性について解析を行った。

24 年度は、FIM 値の、運動項目 13 項目、認知項目 5 項目それぞれについて、どのアミノ酸との相関が認められるかを検討した。入院時には、清拭、トイレ動作と相関のあったアミノ酸はなかったが、退院時には Glutamic Acid、Serine との正の相関が認められた。この表の退院時の FIM 項目すべてに Glutamic Acid、Serine との正の相関が認められた。運動項目も退院時の Glutamic Acid、Serine と正の相関が認められるものが多くみられた。全ての運動項目合計を見ると、入院時には Aspartic Acid、Serine、Tryptophan 退院時には Glutamic Acid、Serine との正の相関が認められた。

運動項目合計には歩行又は車椅子のどちらか主となる方を加えているが、運動統合合計は、退院時の Serine とのみ正の相関が認められた。現在なお詳細を検討中である。(分担研究者：別府秀彦、園田 茂、水谷謙明、岡崎英人、山口久美子、玉井育子)

2. 小脳変性マウス B6-wob/t の運動負荷訓練による協調運動の改善

我々は現在、後肢にふらつき、さらには転倒を繰り返す B6-wob/t mouse を維持している。先行研究では、12週齢における B6-wob/t の Rotarod test 等の運動失調の評価と脳重量について検討した結果、病因は小脳萎縮による小脳性運動失調であることが示唆された。今回の目的は、経時的な運動評価と小脳の萎縮を形態学的に解析することで発症の時期を確認することにある。まず、生後4～12週齢マウスに対し、Rotarod 試験で協調運動の評価を行った。3rpm/分の回転における B6-wob/t の落下時間は4週齢で36.58秒、12週齢で25.10秒となり、週齢における有意差は認めなかった。一方対照の C57BL/6 mouse は、いずれの週齢も180秒間以上を達成し落下することはなかった。この結果より B6-wob/t は筋協調運動失調であることが示唆された。次に両群の12週齢マウス小脳の解剖組織学的比較を Luxol FastBlue 染色と蛍光抗体法で行ったところ、B6-wob/t の小脳病変の主な原因は萎縮にあり、小脳 Purkinje 細胞の変性および脱落であることが判明した。さらに、

Purkinje細胞の変性と脱落の時期を特定するため、生後5日、10日、15日目のマウス小脳にHE 染色および抗Calbindin抗体を用いた免疫染色を施行した。その結果、B6-wob/tは生後10日齢から小脳Purkinje細胞の発達障害が起こり始め、15日齢でPurkinje細胞数の減少が明らかに認められた。一方C57BL/6では異常は認められなかった。以上の結果から、B6-wob/t は生後10日以降からPurkinje 細胞に異常が認められ、4 週齢で小脳性運動失調を発現することが判った。
分担研究者：(別府秀彦、新里昌功、水谷謙明、高柳尚貴、園田 茂、山口久美子、高橋久英；＜学外共同研究者（九州大学大学院医学研究院統合生理学分野）片渕俊彦、井福正隆＞)

3. 脳梗塞ラットへのリハビリ効果 ・ 症状の改善と脳内物質の変化・

リハビリ効果規定要因を脳梗塞モデルラットの基礎研究で特定することが目的である。ラットに適用可能な前肢麻痺評価法として我々が作成した Nanakuri Forepaw stage (NAF stage) および、運動協調性やバランス感覚などを複合的に評価する rotarod test を併用して、脳梗塞モデルラットに対して回転ケージを用いた自発運動訓練の有無による比較を行った結果、有意な麻痺および運動機能の改善が認められた。さらに現在、麻痺回復過程の大脳皮質および大脳基底核における生理活性物質の変動について解析を行っている。脳梗塞後の麻痺回復過程における機序やそれに関わる機能分子などが明らかになれば、麻痺改善に関するリハビリの効率的・効果的な治療方法がより明瞭なものとなることが予想される。(分担研究者：水谷謙明、園田 茂)

4. マウス大腸炎および発がんモデルに対する低用量アロエエモジンの修飾作用

〔背景と目的〕本邦で健康食品として広く普及しているキダチアロエ(*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger)を摂食すると、大腸で微量のアロエエモジン(AE)が産生される可能性がある。この AE は生理活性が強く in vitro では抗がん作用などが多数報告されているが、in vivo 実験での報告はほとんど見られない。申請者は最近、簡便に AE を精製する方法を確立し、マウスへの投与実験を試みた。その結果、500 ppm 投与群で大腸粘膜の細胞増殖能が亢進した。一方 in vitro 実験で AE が抗炎症作用を有することが報告された。本研究では低用量 AE 投与がマウス大腸炎及び大腸発がんの in vivo モデルにおいても抗炎症・発がん抑制作用を発揮するか否かを検討した。特に大腸発がんに対する抑制効果の有無は動物発がんモデルとして、*Apc* 遺伝子変異 Min マウスを用いて検討した。Min マウスは家族性大腸腺腫症(FAP)のモデルだけでなく、ヒトの大腸がん発生モデルとしても有用なことが知られている。しかしながら、Min マウスの腸管でのポリープの好発部位は主に小腸であり、大腸ではポリープの発生は少ない。そこで大腸炎モデル実験で用いたデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を処理したモデルでの発がん実験も検討した。

〔実験方法〕(1)DSS 誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルに対する低用量 AE の修飾作用：実験 1 は雄 C57BL/6 マウスに AE 混餌(2.5/5 ppm)を与え、14 日後飲水として 2% DSS 溶液を投与した。DSS 投与 7 日後に全てのマウスを解剖し、大腸長を測定した。実験 2 では同マウスに DSS 溶液を投与すると同時に AE 混餌(0.02%)を 12 日間投与した。実験 3 では同マウスに DSS 溶液 7 日間投与後、飲水を水として 0.02% AE 混餌を与える回復効果を検討した。(2)*Apc* 遺伝子変異 Min マウスを用いた腸管ポリープ形成に対する AE の修飾作用：実験は Perkins ら(2002)の報告に準じて行った。雄 Min マウスに AE 混餌(5/10 ppm)を 12 週間投与した。実験終了後マウスを解剖し、腸管（小腸と大腸）を摘出し、0.5 mm 以上のポリープ（腫瘍）数を測定した。実験終了後マウスを解剖し、腸管（小腸と大腸）を摘出し、0.5mm 以上のポリープ（腫瘍）数を測定した。(3)DSS 誘発炎症刺激による Min マウス大腸発がんおよび腸管ポリープ形成に対する AE の修飾作用：実験は Kohno ら(2007)の報告に従って行った。雌 Min マウスに、最初の 1 週間 1% DSS 混水を与え、同時に対照群に基礎飼料、実験群には AE 混餌(5/50 ppm)を 5 週間与えた。実験終了後マウスを解剖し、腸管（小腸と大腸）を摘出し、0.5 mm 以上のポリープ（腫瘍）数を測定した。

〔実験成績〕(1)DSS 誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルに対する低用量 AE の修飾作用：実験 1～3 のいずれにおいても AE による抑制効果は見られなかった。一方、AE 投与による大腸炎の促進作用も認めることができなかった。(2)*Apc* 遺伝子変異 Min マウスを用いた腸管ポリープ形成に対する AE の抑制効果：小腸腫瘍数は AE 混餌投与で有意な変化は見られなかったが、大腸腫瘍数で

は 5 ppm AE 群で有意な抑制効果が見られた。また、大腸粘膜の細胞増殖性マーカー(MIB-5 標識率)が 5 ppm AE 群と 10 ppm AE 群でともに有意に抑制した。(3)DSS 誘発炎症刺激による Min マウス大腸発がんに対する AE の抑制効果：小腸腫瘍数は DSS 処置の有無と AE 混餌投与で有意な変化は見られなかった。一方、大腸腫瘍数は DSS 処置で有意に増加し、それに対して 50 ppm AE 群で有意に抑制し、5 ppm AE 群でも抑制傾向を示した。また、MIB-5 標識率は DSS 処置で有意に増加し、それに対して 5 ppm AE 群で有意に抑制した。

〔結論〕本研究で著者らは、マウス大腸炎モデルにおいて、AE の抑制効果を見出すことはできなかった。しかし、Min マウス大腸発がんモデルでは、AE の低用量食餌性投与(5, 10, 50 ppm)で大腸腫瘍の発生を、DSS 処置の有無にかかわらず、抑制することを見出した。本研究は 2010-2012 年度科研費（基盤(C)）を受けて行われたので、本研究成果の概要は国立情報学研究所ホームページ内の「科学研究費助成事業データベース」を利用し閲覧することができる。また論文を現在作成中である。（分担研究者：新保 寛、千原 猛、金児孝晃、別府秀彦、園田 茂；(本学医療科学部) 若松一雅、新里昌功)

5. 高脂肪食飼育 Min マウスの腸管ポリープ形成に対するアロエベラゲル抽出物の食餌性投与による抑制効果

アロエベラ超臨界抽出物 (AVGE) に、抗糖尿病作用、体脂肪低減作用、PPARs 活性化作用などの新しい生理作用が見出されている。また、我々が飼育繁殖を行っている *Apc* 遺伝子変異 Min (multiple intestinal neoplasia) マウスは、ヒトの家族性大腸腺腫症のモデルマウスであり、加齢とともに腸管、特に小腸に多数の腺腫 (ポリープ) を形成する。また、高脂肪の負荷により、ポリープ形成が促進されることが報告されている。

これまでに我々は雄性 Min マウスに高脂肪食を負荷するとともに、AVGE を週 6 回 7 週間の経口投与により直径 2.5mm 以上のポリープ数が有意に抑制することを報告してきた。そこで今回は、AVGE 含有高脂肪食を 65 日間与える食餌性投与の影響を検討した。実験終了時に小腸と大腸のポリープ数とそのサイズを計測し、高脂肪食群と比較検討した。その結果、食餌性投与では直径 2.5 mm 以上のポリープとともに、小腸総ポリープ数も AVGE 群が高脂肪食群に対して有意に減少した。なお、本研究は森永乳業株式会社よりの受託研究費にて行われた。（分担研究者：新保 寛、千原 猛、別府秀彦、金児孝晃、戸松亜希子、園田 茂；学外共同研究者：〈森永乳業・食品基盤研〉田中美順、山内恒治、阿部文明）

6. 栄養補助食品 GFO (Glutamine-Fiber-Oligosaccharide) の基礎的研究 (3)

実験動物を用いての GFO の基礎的研究として、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルに対する修飾作用を検討した。DSS 溶液を飲水として投与するとともに GFO 溶液を 1 日 2 回経口投与し、実験開始 12 日後に本モデルの特徴である大腸萎縮度の指標である大腸長および肥厚度 (大腸重量と大腸長の比) を測定した。その結果、大腸長の短縮、肥厚度の増加は認められたが、それらは GFO 非経口投与群と比べ明らかに軽度であった。現在、このメカニズムの解明を目指し、病理組織学的検索とともに大腸粘膜の炎症性サイトカインの mRNA 発現レベルでの検討を行っている。（分担研究者：千原 猛、新保 寛、金児孝晃、戸松亜希子、東口高志、伊藤彰博、大原寛之、都築則正、中川理子、二村昭彦、村井美代、園田 茂）

〔論文-英文〕

1. Takahashi H, Kosino E, Mikuni K, Kiuchi Y, Beppu H, Okazaki H, Shimpo K, Sonoda S (2012). Effect of Different Types of Cyclodextrin on Gastrointestinal Absorption of α -Lipoic Acid in Rats and Humans. *Journal of Glycoscience*, 59(3), 97-103.
2. Chihara T, Shimpo K, Kaneko T, Tomatsu A, Beppu H, Higashiguchi T, Sonoda S (2013). The effect of preparatory conditions of high temperature- and pressure-treated garlic on 5-hydroxymethyl-2-furfural and S-allylcysteine formation. *Journal of Analytical Bio-Science*, 36, 186-192.
3. Kaneko T, Shimpo K, Chihara T, Beppu H, Tomatsu A, Shinzato M, Yanagida T, Ieike T, Sonoda S,

- Futamura A, Ito A, Higashiguchi T (2012). Inhibition of ENNG-induced pyloric stomach and small intestinal carcinogenesis in mice by high temperature- and pressure-treated garlic. *Asian Pac. J. Cancer Prev*, 13, 1983-1988.
4. Mizutani K, Sonoda S, Karasawa N, Yamada K, Shimpo K, Chihara T, Takeuchi T, Hasegawa Y, Kubo K (2013). Effects of exercise after focal cerebral cortex infarction on basal ganglion. *Neurol. Sci.*, 34(6), 861-867.
 5. Hidehiko Beppu, Kenmei Mizutani, Naoki Takayanagi, Masanori Shinzato, Shigeru Sonoda, Hisahide Takahashi. (2013). Characterization of ataxia shown by an abnormal behavior mouse derived from the C57BL/6-cpk mouse with infantile cystic kidney disease. *Structure and Function*, 11(2), 92-101.

[著書-和文]

1. 千原 猛、伊藤彰博、東口高志 (2012) . 必要エネルギーはどう決める? 「重症患者と栄養管理 Q&A」 (第3版) . (株) 総合医学社, 41-44.

[国際学会・会議・シンポジウム・特別講演]

1. Mizutani K, Sonoda S, Yamada K, Beppu H, Shimpo K (2012). Identification of proteins related to functional recovery in the perilesional cortex of rats with cerebral infarction. 7th World Congress Neurorehabilitation, Melbourne, 16-19 May.

[国内学会・会議・シンポジウム・特別講演]

1. 新保 寛、千原 猛、金児孝晃、戸松亜希子、別府秀彦、園田 茂、田中美順、山田宗夫、岩附慧二(2012). 高脂肪食飼育マウスの腸管腫瘍形成に及ぼすアロエベラゲル粉末・同抽出物の影響. 第66回日本栄養・食糧学会大会、仙台市、5月18-20日.
2. 別府秀彦、井上 孝、足立俊雄、新里俊子、伊藤哲也、岸野恵理子、三國克彦、山口久美子、土井直子、玉井育子、多田 伸 (2012). 4~6ヶ月の妊婦の便通改善を目的とした乳糖果糖オリゴ糖摂取試験. 第7回日本臨床検査学教育学会、名古屋市、8月22-24日.
3. 千原 猛、新保 寛、金児孝晃、戸松亜希子、別府秀彦、園田 茂、東口高志 (2012). 高温高圧処理ニンニクのがん予防食品を目指した作製条件の再検討. 第7回日本臨床検査学教育学会学術大会、名古屋市、8月22-24日.
4. 金児孝晃、新保 寛、千原 猛、別府秀彦、戸松亜希子、新里昌功、園田 茂、東口高志 (2012). マウス胃・小腸腫瘍形成に及ぼす高温高圧処理ニンニク混餌投与の影響. 第7回日本臨床検査学教育学会、名古屋市、8月22-24日.
5. 戸松亜希子、千原 猛、新保 寛、金児孝晃、別府秀彦、園田 茂 (2012). Min マウスにおける全血ポリアミン測定の有用性. 第7回日本臨床検査学教育学会、名古屋市、8月22-24日.
6. 新里昌功、別府秀彦、水谷謙明、山口久美子、中村政志、高柳尚貴、園田 茂、高崎昭彦、高橋久英 (2012). 運動失調マウス B6-wob/t の幼若期の組織細胞学・免疫組織化学染色の観察および LMD による小脳タンパク成分の同定. 第7回日本臨床検査学教育学会、名古屋市、8月22-24日.
7. 井上 孝、小塚 諭、大瀧瑞恵、伊藤哲也、別府秀彦、川井 薫、岸野恵理子、鈴木康司、土井直子、多田 伸 (2012). 妊婦の腸内細菌叢に及ぼす乳糖果糖オリゴ糖の効果. 第7回日本臨床検査学教育学会、名古屋市、8月22-24日.
8. 川井 薫、別府秀彦、井上 孝、鈴木康司、新保 寛、伊藤哲也、岸野恵理子、土井直子、多田 伸(2012). 5~7ヶ月の妊婦における乳糖果糖オリゴ糖摂取による便性状と有機物の解析. 第7回日本臨床検査学教育学会、名古屋市、8月22-24日.
9. 神野真司、島田陽子、秋山秀彦、松井太衛、勝田逸郎、別府秀彦、恵美宣彦 (2012). アガリチンの白血病細胞株に対する抗腫瘍効果. 第7回日本臨床検査学教育学会、名古屋市、8月22-24日.
10. 高柳 尚貴、園田 茂、別府 秀彦、水谷 謙明、山口 久美子、富田 豊、AbbasOrand、新里 昌

- 功、高橋 久英 (2012). 運動失調マウス B6-wob/t の歩行解析：運動負荷が失調歩行に及ぼす影響、第 11 回形態・機能学会学術集会、東京、9 月 14 日.
11. 別府 秀彦、水谷 謙明、園田 茂、高柳 尚貴、山口 久美子、高橋 久英 (2012). 運動失調マウス B6-wob/t の行動解析(8)強制歩行運動が運動協調性に与える影響、第 67 回日本体力医学会大、岐阜市、9 月 14-16 日
 12. 新保 寛、千原 猛、金児孝晃、別府秀彦、若松一雅、新里昌功、園田 茂 (2012). Min マウスの大腸腫瘍発生に対する低用量アロエエモジンの影響. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、9 月 19-21 日.
 13. 別府 秀彦、富田 豊、園田 茂、高柳 尚貴、水谷 謙明、山口 久美子、Abbas Orand、新里 昌功、高橋 久英 (2012). 小動物用重心動揺計の開発および運動失調マウス B6-wob/t の振戦の測定、第 11 回形態・機能学会学術集会、東京、9 月 22 日
 14. 千原 猛、新保 寛、戸松亜希子、金児孝晃、別府秀彦、園田 茂 (2012). 高脂肪食飼育 Min マウスの腸管ポリプ形成に対するアロエベラゲル抽出物の食餌性投与による抑制効果. 第 44 回藤田学園医学総会、豊明市、10 月 4-6 日.
 15. 金児孝晃、新保 寛、千原 猛、戸松亜希子、別府秀彦、園田 茂 (2012). 高脂肪食飼育マウスのアゾキシメタン誘発大腸前がん病変形成に対するアロエベラゲル粉末・同抽出物の食餌性投与による抑制効果. 第 44 回藤田学園医学会総会、豊明市、10 月 4-6 日.
 16. 山口久美子、別府秀彦、富田 豊、園田 茂、高柳尚貴、水谷謙明、Abbas Orand、新里昌功、高橋久英 (2012). 運動失調マウス B6-wob/t における小動物用重心動揺による測定条件の検討. 第 44 回藤田医学会、豊明市、10 月 4-5 日.
 17. 千原 猛、新保 寛、別府秀彦、戸松亜希子、金児孝晃、園田 茂、田中美順、山内恒治、阿部文明 (2012). アロエベラゲル粉末および同超臨界抽出物の食餌性投与による高脂肪食飼育マウスの腸管腫瘍形成に対する抑制効果. 第 10 回日本機能性食品医用学会総会、東京、12 月 15-16 日.
 18. 廣崎 賢、別府秀彦、根岸瑠美、Thanai P、米澤貴之、園田 茂、鄭 雄一、林 宣宏 (2012). ヒト血清プロテオミクス解析法の開発. 第 85 回日本生化学会大会、福岡市、12 月 14-16 日.
 19. 別府秀彦、水谷謙明、玉井育子、山口久美子、高柳尚貴、園田 茂(2013). UPLC-SQD を用いた小脳変性マウス大脳、小脳、橋・延髄内遊離アミノ酸量の検討. 第 23 回生物試料分析化学学会年次学術集会、大阪市、2 月 10-11 日.
 20. 別府秀彦、富田 豊、園田 茂、高柳尚貴、水谷謙明、Abbas Orand、山口久美子、新里昌功 (2013). 小動物用重心動揺計の開発および運動失調マウスの振戦の測定. 第 4 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、岡山市、2 月 17 日.
 21. 水谷謙明、園田 茂、別府秀彦、高柳尚貴 (2013). 脳梗塞ラットへの薬剤投与による訓練効果. 第 4 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、岡山市、2 月 17 日 (プログラム・抄録集、p177).
 22. 高柳尚貴、園田 茂、別府秀彦、水谷謙明、山口久美子、富田 豊、Abbas Orand (2013). 運動失調マウス B6-wob/t の歩行解析(3)：運動負荷が失調歩行に及ぼす影響. 第 4 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、岡山市、2 月 17 日.