

報道関係各位

2012年12月4日
株式会社アルマード～ 東京大学及びアルマード 産学連携研究成果に関する
国際学会における発表のお知らせ ～**身近な食品ながら産業廃棄物とされる
卵の薄皮「卵殻膜」摂取によって肝機能改善効果**

国立大学法人東京大学（本部：東京都文京区、総長：濱田純一、以下 東京大学）と、株式会社アルマード（本社：東京都中野区、代表取締役社長：鈴江 由美、以下 アルマード）では、2007年より産学連携によって、卵殻膜摂取による消化吸収に関する研究を行ってまいりましたが、このたび、本研究成果を、「栄養補助食品・機能性食品国際学会（*The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods*、開催場所：アメリカ合衆国ハワイ州）」において、2012年12月5日（水）に発表いたしますので、下記の通りお知らせいたします。

今回の発表は、四塩化炭素誘導肝障害モデルラットが、微粉碎された卵殻膜の摂取により、肝障害の症状が改善され、炎症や肝繊維化形成が抑制されている方向の様々な変化が見られた、という成果に関するものです。卵殻膜は、従来、産業廃棄物とされてきましたが、その中から新たに機能性を見出したことは、今後、卵殻膜の有用性について研究を進めていくことで、新たな機能性食品や医療品等開発など、新規産業創造への貢献が期待できます。

■発表概要

東京大学総括プロジェクト機構「食と生命」総括寄付講座 加藤久典特任教授の研究グループは、四塩化炭素誘導肝障害モデルラットを用いた実験から、微粉碎された卵殻膜（注1参照、卵の薄皮部分）の摂取により肝障害の症状が改善され、さらに遺伝子レベルでの解析により炎症や肝繊維化形成が抑制される方向の変化が誘導されることを見出しました。四塩化炭素は肝臓に炎症を誘導し、長期間の投与では肝硬変のモデルとして動物実験において広く用いられています。肝臓機能に着目したのは、初期に行った正常ラットにおける遺伝子発現の網羅的解析により、肝線維化抑制に関わる変化が予想されていたためであり、本研究の成果から、従来、産業廃棄物とされていた卵殻膜の機能性を明らかにすることで、新たな機能性食品の創出や産業への貢献が期待できます。

なお、日本時間2012年12月5日（水）午前3時半以前の発表は禁じられています（米国ハワイ時間・4日（火）8時半に「栄養補助食品・機能性食品国際学会《*The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods*》（開催場所：アメリカ合衆国・ハワイ州）」にて発表予定のため）。

■研究内容**①研究の背景・先行研究における問題点**

東京大学総括プロジェクト機構「食と生命」総括寄付講座 加藤久典特任教授の研究グループで、これまでに卵殻膜成分の摂取が正常ラット肝遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析を行ったところ、肝線維化に深く関与するとされるI型コラーゲン（注2参照）の発現低下およびその周辺調節因子の顕著な発現変化が検出されました。また、最近 Benson らが末梢血単核球を用いた細胞実験において、卵殻膜添加により炎症を引き起こす因子であるTNF- α （注3参照）が減少したことを報告しています（*KF Benson, J Med Food. 2012 April*）。そこで、本研究では、四塩化炭素誘発性肝障害ラットにおいて、卵殻膜成分の摂取が肝障害の抑制などの肝機能改善作用に及ぼす影響を検討しました。

②研究方法

3週齢のラットを、1週間予備飼育後、無作為に1群を6匹として3群に分け、1、2群には標準食、3群には標準食および卵殻膜微粉末2%添加食を給餌しました。2、3群には50%四塩化炭素(1ml/kg)を週2回連続皮下投与し、肝障害を誘導したモデルを作製。一方、対照群である1群にはオリーブ油1ml/kgを同様に皮下投与し、期間中に、週2回体重、摂食量を測定しました。実験終了時にあらかじめ12時間絶食後、ペントバルビタールで深麻酔し、頸動脈放血により採血し、肝臓を摘出しました。

表：対照実験の方法

	1群	2群	3群
餌	標準食	標準食	標準食+卵殻膜
皮下投与	オリーブ油	四塩化炭素	四塩化炭素

各群における血漿生化学検査、肝機能指標、線維化指標、血漿および肝臓の脂質を比較検討し、さらに、DNAマイクロアレイを用い、炎症・線維化・酸化ストレス、脂質代謝関連遺伝子の発現を調べ、網羅的に検索することを試みました。以下は7週間の実験の結果ですが、より長期の飼育(13週間)実験を別に行った場合においても調べた指標に関して同様の結果が得られ、体重等への影響に関しては7週目前後で特に明確でした。

③研究結果

実験期間中の体重推移および肝臓重量の結果では、対照群(1群)に比べ、四塩化炭素のみ投与群(2群)では最終体重が有意に減少および肝臓重量が有意に増加しましたが、卵殻膜摂取群(3群)では体重減少および肝臓腫大の改善傾向がみられました。

生化学検査の結果では、四塩化炭素により肝障害を誘発させると、肝毒性および肝繊維化マーカーであるAST、ALTおよびコラーゲンの含量はともに著しく上昇しました。これに対し、卵殻膜摂取群(3群)においては、各値の上昇が抑えられました。一方、血中および肝臓中の脂質の測定結果では、四塩化炭素の投与により減少した血漿中脂質、および増加した肝組織脂質が、卵殻膜を摂取することによりいずれも改善傾向がみられましたが、有意差はありませんでした。これらの結果のメカニズムを解明するため、DNAマイクロアレイを用い、遺伝子発現レベルを比較検討しました。四塩化炭素のみの投与群(2群)と比べ、卵殻膜摂取群(3群)で1.5倍以上発現増加した22遺伝子、もしくは発現減少した93遺伝子を抽出し、解析ツールであるIngenuity Pathway Analysisを用い、脂質代謝、炎症、アポトーシス、酸化ストレスに関するネットワーク解析を行いました。その結果、肝臓繊維化に関わる細胞外マトリックス(ECM、注4参照)の成分であるI型コラーゲンやアスポリンなどの発現が有意に減少したので、卵殻膜摂取が繊維化形成を介するECMの増加を抑制することが示唆されました。さらに、肝星細胞(注5参照)活性及び繊維化に関連する増殖因子のPdgfra、Igfbp1、TgfbおよびVegf(注6参照)の発現が減少し、卵殻膜摂取により繊維化形成の抑制が示唆されました。これらの因子の変化が、本研究で卵殻膜摂取における肝機能保護作用の主機構である可能性が示されました。

以上の結果からラットにおいて卵殻膜摂取は、四塩化炭素により誘発した繊維化形成を抑えることで、結果的に肝臓の炎症拡大、さらに進行する肝障害を抑制している可能性が推察されました。

■社会的意義・今後の予定

卵殻膜は通常可食部とされないため、食品産業においてその大部分が副産物や産業廃棄物として廃棄されており、あまり利用されていないのが現状です。年間7,000トンあまりの廃棄が試算され、食品産業界では、その利用開発は環境問題などを含めて大きな課題となっています。一方で、卵殻膜は古くから炎症抑制作用を有するということが知られており、本研究ではこの卵殻膜を肝障害モデルラットに給餌し、繊維化形成さらに肝障害を抑制できたことを明らかにしました。ヒトでも同様の効果があるかについては今後の検討課題ですが、ヒトを対象とした試験も準備を進めており、結果を報告できるかと思えます。また、他の疾患モデルにおける検討も順次開始しています。

このように、今後も卵殻膜の有用性についての研究を進めることによって、新たな機能性食品の創出や産業への貢献が期待できます。

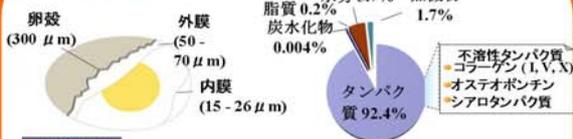
<添付資料>

卵殻膜摂取が四塩化炭素誘導肝障害モデルラットに及ぼす影響

1)東京大学総括プロジェクト機構 総括寄附講座「食と生命」 2) ㈱アルマード

【卵殻膜 (Egg Shell Membrane, ESM)】

構造と成分



先行研究

- ★ 卵殻膜成分を摂取したラット肝臓では線維化に深く関与するI型コラーゲンおよびその周辺調節因子 (Itgbl1, Decorin, Asporin) の顕著な発現低下
- ★ ESM の熱水抽出物は生体内抗酸化ベプチドと同等の抗酸化作用を持つ加水分解によりESMの抗酸化作用が増加した (特許ID:2008074196, イフジ産業㈱)
- ★ 末梢血単核球を用いた細胞実験では、ESM添加によりTNF-αが減少した (Benson, J Med Food 13 (4) 2012, 180-185)

本研究の目的

ESMの摂取による四塩化炭素誘発性肝障害の保護作用

【方法】

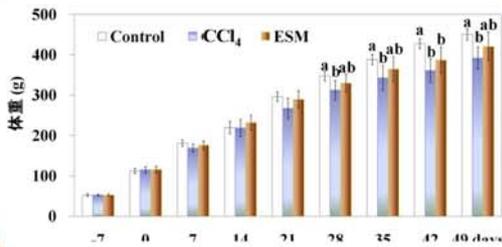
実験動物: 4週齢Wistar雄性ラット (N=6), 7週間

試験群	飼料	皮下投与 (1 ml/kg 体重、週2回)
Control	標準食 (AIN 93G)	オリーブオイル
CCl ₄	標準食	50% CCl ₄
ESM	標準食+卵殻膜2%	50% CCl ₄

分析

血漿: 脂質、ALT (alanine transaminase), AST (aspartate transaminase)
 肝臓: 脂質、コラーゲン、RT-PCR、マイクロアレイ (GeneChip Rat Genome 230 2.0, Affymetrix)

【結果1】



	Control	CCl ₄	ESM
Liver weight (%)	2.7 ± 0.07 ^a	3.2 ± 0.31 ^b	2.9 ± 0.17 ^{ab}
Abdominal fat (%)	5.5 ± 1.12	4.5 ± 0.76	5.5 ± 0.66
AST (Karmen)	56.1 ± 5.24 ^a	207.8 ± 62.47 ^b	111.7 ± 43.93 ^c
ALT (Karmen)	8.1 ± 2.10 ^a	38.4 ± 19.14 ^b	19.0 ± 11.34 ^b
Plasma TG (mg/dL)	82.7 ± 29.65	68.4 ± 19.19	86.8 ± 32.47
Hepatic TG (mg/g)	20.2 ± 3.43 ^a	63.0 ± 9.26 ^b	57.9 ± 13.93 ^b
Hepatic collagen (μg/mg protein)	21.9 ± 0.78 ^a	25.4 ± 1.46 ^b	22.5 ± 1.82 ^a

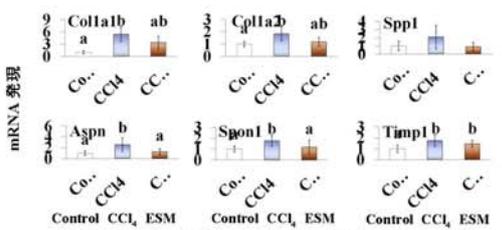
Mean ± SD, Tukey's test

【結果2】

変化した遺伝子数 (>1.5倍)

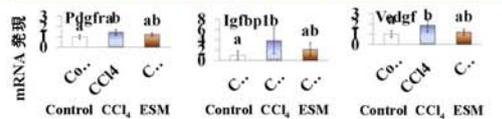
Comparison	Up	Down	Total
CCl ₄ vs. Con	386	58	444
ESM vs. Con	187	86	273
ESM vs. CCl ₄	22	93	115

線維化に関わる細胞外マトリックス(ECM)関連遺伝子の変化



ESMが線維化形成に介するECMの分解に関連することが示唆された

HSC活性および線維化に関連する増殖因子



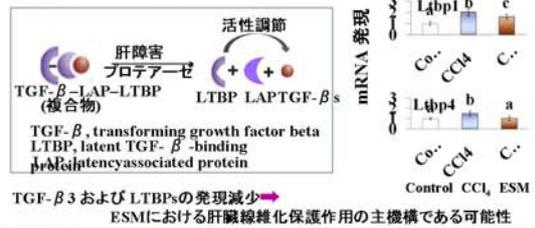
Platelet-derived growth factor receptor
ECM成分の増加を誘導するPDGFの受容体
 Insulin-like growth factor binding
P-細胞(HSC)を活性化
 Vascular endothelial growth factor
線維化形成関連の血管新生因子

増殖因子生成の抑制 → ESMの線維化形成抑制作用

線維化に関わるサイトカインTGF-βとその関連遺伝子の変化

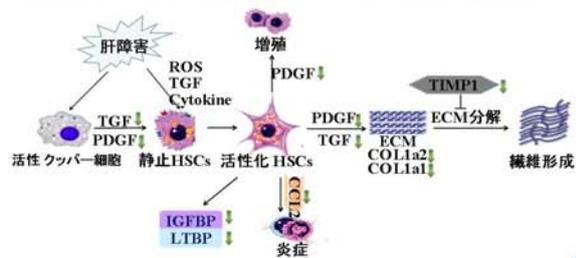
TGF-β family (70% 遺伝子配列相同)

- ★ TGF-β 1, 0.93 細胞増殖
- ★ TGF-β 2, 0.87 ECM合成
- ★ TGF-β 3, 0.54 免疫反応



TGF-β 3 および LTBP の発現減少 → ESMにおける肝臓線維化保護作用の主機構である可能性

肝臓線維化の各ステップにおける ESM の影響



増殖因子の抑制および HSCs の活性阻害 → ESM の線維化形成抑制作用

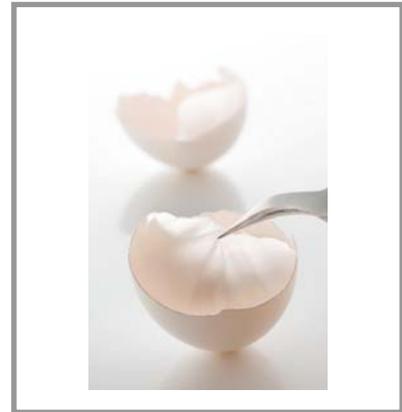
【まとめ】

ラットにおいてESMの摂取は肝臓線維化形成を抑制し、四塩化炭素誘発性肝障害を保護する

<用語解説>

注1…卵殻膜 (Eggshell Membrane)

卵殻と卵白の間にある不溶性の二重膜。内膜(厚さ約 0.05-0.07 mm)と外膜(厚さ約 0.02 mm)の2層から成る。どちらも線維が入り組んだメッシュのような構造だが、内膜の方が密。卵殻膜はニワトリ胎内での卵形成途中、バイオミネラルイゼーション(生体内鉱質形成)によって殻が作られ、その後産卵される前に輸卵管で作られる。卵殻膜は線維構造を有しているが、それは構成成分であるI型、V型、X型コラーゲン、グルコサミン、デスモシン、ヒアルロン酸などがリシルオキシダーゼの働きにより互いに結合してできる。卵殻膜は発生中の胚を保護するために抗菌活性を有するとともに、卵殻形成のための足場としての役目を果たしている。



注2…I型コラーゲン

細胞外マトリクス(注3参照)を構成する主要な分子であるコラーゲンには多くの種類がある。肝炎から肝硬変に進行する過程において、破壊された肝細胞の部分にコラーゲンなどの分子が増えた線維化という状態になる。I型コラーゲンはその多くを占める。

注3…TNF-α

体内で炎症が起こると、白血球などの細胞が様々な生理活性物質を出す。放出される物質をサイトカインと呼ぶが、TNF-αは炎症反応を誘導する働きを有する代表的なサイトカインである。

注4…細胞外マトリクス

組織中の細胞外の空間を満たしている生体高分子の複雑な集合体。全ての組織にあり、結合組織には多量に存在する。細胞外マトリクスは組織内の細胞を支え強度を与える構造的な機能を持つだけでなく、細胞-マトリクス間の相互作用を介した重要な細胞機能を有している(Bruckner, 2010)。組織や器官に独特の構造や特徴は細胞外マトリクスにより決定され、細胞がその細胞外マトリクスを産生している。細胞外マトリクスタンパク質は一般的に、コラーゲン、構造糖タンパク質、プロテオグリカン、エラスチンの4つに分類される(Tsang, et al., 2010)。皮膚ではI型、III型コラーゲンを含む異なる種類の様々な線維が細胞外マトリクスの主要な構成成分で、皮膚に強度と弾力性を与えている。細胞外マトリクスと細胞の接着はインテグリン分子による物理的な結合を介して行われ、細胞内へシグナルを伝達し、組織再生への重要な要素となっている。

注5…肝星細胞

肝臓に存在する細胞のうち、伊東細胞、ビタミンA貯蔵細胞等とも呼ばれる細胞である。コラーゲン産生を活発に行い、肝の線維化や肝硬変において主要な役割を担っている。

注6…Pdgfra、Igfbp1、TgfbおよびVegf

これらは動物の様々な組織で合成されて血液などに放出されるタンパク質性の因子に関わる遺伝子である。PDGFは、血小板由来成長因子と呼ばれ、組織が損傷を受けると放出されて、組織の修復や傷の治癒に関わる。肝の線維化を促進する因子でもある。Pdgfraは、PDGFの情報を受け取る側の細胞が持つPDGF受容体をコードする遺伝子のひとつである。Igfbp1は成長を抑制する働きが知られているIGFBP1(インスリン様成長因子結合タンパク質1)の遺伝子である。IGFBP1は肝星細胞を活性化させ、細胞外マトリクスの合成を促進する働きが知られている。TGF-βは、トランスフォーミング増殖因子のグループに属する因子であり、コラーゲンの合成を活発にする働きがよく知られているが、Tgfbはこの因子の遺伝子である。Vegf遺伝子の産物であるVEGFは、血管内皮増殖因子と呼ばれ、血管新生を促す因子である。肝線維化が起こる際、その部位に血管の新生も伴うことが知られている。

■発表概要

- 発表学会：栄養補助食品・機能性食品国際学会（開催場所：アメリカ合衆国ハワイ州）
（*The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods*）
- 発表日時：ハワイ時間…2012年12月4日（火）、午前8時半
（日本時間…2012年12月5日（水）、午前3時半）
- 発表タイトル：*Suppressive effects of eggshell membrane on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats*
- 研究者：賈慧娟 1)、斉藤憲司 1)、中澤京子 1)、長谷部由紀夫 2)、加藤久典 1)
（東京大学・総括 1)、株式会社アルマード 2))

■研究プロジェクト概要

【研究責任者】

東京大学 総括プロジェクト機構「食と生命」総括寄付講座 特任教授 加藤久典

【産学連携企業・株式会社アルマード 会社概要】

- 商号 株式会社アルマード
- 本店 東京都中野区本町 2-48-2
- 代表者 代表取締役社長 鈴江 由美
- 設立 2000年10月18日
- 資本金 60百万円
- 事業内容 卵殻膜を主要素材とした化粧品、サプリメント等の企画・開発・販売
- 株主 株式会社セシール（フジ・メディア・ホールディングスグループ）

<本資料に関する報道機関からのお問い合わせ先>

●本論文及び本研究プロジェクト全般について

国立大学法人東京大学 東京大学 総括プロジェクト機構「食と生命」総括寄付講座
特任教授 加藤久典

Tel : 03-5841-1607 / e-mail : akatoq@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

●その他産学連携企業について

株式会社アルマード 広報担当（株式会社セシール 広報室）

Tel : 03-6743-1114 / e-mail : pr@cecile.co.jp