

健常成人男性における酵素処理アスパラガス抽出物の 熱ショックタンパク質 70、ストレス指標および睡眠に対する効果

伊藤 知洋¹⁾、後藤 一法¹⁾、高成 準¹⁾、三浦 健人¹⁾、若命 浩二¹⁾、
西岡 浩¹⁾、田中 藍子²⁾、西平 順²⁾

¹⁾ 株式会社アミノアップ化学 札幌市清田区真栄 363 番地 32 TEL 011-889-2233 FAX 011-889-2277

²⁾ 北海道情報大学医療情報部 江別市西野幌 59 番 2 TEL 011-385-4411 FAX 011-384-0134

要約

酵素処理アスパラガス抽出物(ETAS)は、アスパラガス由来の新規な抗ストレス機能性食品素材として開発された。今回、男性健常者を被験者として、ETAS に関する 2 つのヒト介入試験が行われた。試験 1 は無作為化二重盲検プラセボ対照試験で、血液細胞の熱ショックタンパク質 70(HSP70)mRNA 発現および自律神経系(ANS)に対する ETAS の効果を評価した。ETAS 摂取群はプラセボ摂取群と比較して、HSP70 mRNA 発現が増強される傾向にあることが示された。ANS 指標のいくつかは、プラセボ群に比べ ETAS 群で有意に改善された。試験 2 では無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験を行い、ストレス関連ホルモンや睡眠に対する影響を検討した。血清および唾液中のコルチゾールは、プラセボ摂取期間中はベースラインに比べ有意な上昇を示したが、ETAS 摂取期間中は上昇しなかった。唾液のクロモグラニン A は、ETAS 摂取によりベースラインに比較して有意に減少した。実際の睡眠時間に関しては、ETAS 群とプラセボ群では有意な差は認められなかった。しかしながら、被験者を睡眠効率あるいは夜間平均睡眠時間で分類したところ、睡眠効率の低い被験者や過剰に睡眠をとっている被験者に対し、ETAS 摂取は睡眠を調節するのに効果的であった。

背景

ストレスや疲労は現代社会において大きな問題になっている。特に、慢性ストレスは、うつ、睡眠障害、神経症状などのいろいろな疾病と関連している(1, 2)。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、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。そのひとつが熱ショックタンパク質群(HSPs)の発現である(3)。HSPsは、発熱、感染、炎症、活性酸素、紫外線、飢餓、低酸素状態などに起因する多くのストレスから細胞を防御する重要な役割を果たしている(4, 5)。HSPsは防御効果に加えて、タンパク質のフォールディングや機能的三次元構造の正確な設計を助け、一方で不正確なフォールディングやタンパク質凝集を防ぐ分子シャペロンの機能など、いろいろな生理的条件下で多様な機能性を示す(6)。HSPsは分子量により、いくつかのサブグループに分類されている(例えば、HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 および低分子量ファミリー)。ごく最近、新しい命名法がHSPファミリーに用いられるようになったが(7)、当該論文では、より一般的な分子量に基づく命名を使用している。HSP70ファミリーは最も有名でよく研究されたHSPファミリーであり、ヒトのHSP70グループは、HSP70、HSP72、HSP73を含む高度に相関するタンパク質のグループをコードしている、少なくとも11の遺伝子を網羅している(8)。最近、HSP70はアポトーシス抑制効果(9, 10)や抗炎症活性(11, 12)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通じている。

HSP70発現を増強する新しい植物性素材の探索において、我々は適切な候補としてアスパラガス(*Asparagus officinalis* L.)を発見した。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、アスパラガス種子のメタノール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(13)、若茎と擬葉はエタノール誘導性肝細胞毒性を軽減することが示されている(14)。我々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酵素処理アスパラガス抽出物(ETAS)を開発し、ヒト子宮頸部腺がんであるHeLa細胞において、ETASがHSP70のmRNAやタンパク質発現を増強することを示した(15)。また、他の研究からは、ETASには5-ヒドロキシメチル-2-フルフラールおよびその誘導体で新規物質であるアスフラール(図1)が含まれており、両物質ともにヒト前骨髄球性白血病細胞株のHL-60細胞にHSP70誘導活性があることが明らかになっている(16)。動物実験においては、

ETAS が断眠マウスの胃、肝臓および腎臓の HSP70 タンパクを上方制御することに加え、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(15)。他の研究者は、ETAS が *in vitro* において神経保護作用を示すこと、老化促進マウスにおいて認知機能障害を軽減することを報告している(17)。ETAS の毒性については、Ames テストやマウス骨髄小核試験、ラット急性および亜急性経口投与毒性試験において、毒性のないことが示されている(18)。

この論文では、ETAS が血液の HSP70 発現に影響を与えるか、自律神経やストレス関連ホルモンのレベルを調節するか、さらには睡眠状態に変化を与えるか、を検討するためにデザインされた 2 つのヒト介入試験の結果が報告されている。HSP70 は体全体に恒常的に発現されているので、比較的 low 侵襲性である血液を代表的組織として選択し、その HSP70 レベルを評価した。また、HSP70 発現上昇はストレス軽減を通して、自律神経や睡眠状態を改善できる可能性がある。

材料と方法

試験デザイン

試験 1 は、血液の HSP70 mRNA 発現およ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 2 は、ストレス関連ホルモン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 1 および試験 2 の計画書は、それぞれ株式会社アミノアップ化学(札幌市)および北海道情報大学(江別市)の倫理委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言の倫理原則に則って行われた。また、全ての参加者からは書面による同意書を得た。

被験者

試験 1 においては健常な成人男性がリクルートされ、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された。20 名の被験者(25 歳から 56 歳、平均年齢 39.1 歳)が無作為にプラセボ群(10 名)と ETAS 群(10 名)に割付けられた。プラセボ群はデキストリン入りカプセル(1 カプセル中 250 mg パインデックス含有;松谷化学工業株式会社製、伊丹市)を、ETAS 群は ETAS とデキ

ストリンの混合物入りカプセル(1カプセル中 ETAS 50 mg、パインデックス 200 mg 含有)を、それぞれ 3カプセルずつ毎夕食後の同時刻に 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 発現レベルと自律神経状態を評価した。

試験 2 には睡眠に問題を抱えている健常男性が組入れられ、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された。18名の健常男性(24歳から 59歳、平均年齢 38.8歳)が無作為にグループ A(9名)およびグループ B(9名)に割付けられた。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 パインデックス含有)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 含有)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。血中および唾液中のストレスホルモン濃度、睡眠への影響、血液学および生化学的パラメーターが、各サンプルの摂取前後で評価された。同時に、アテネ不眠尺度(AIS)、視覚的評価スケール(VAS)および OSA 睡眠調査票 MA 版(OSA-MA)によるアンケート調査が行われた。

両方の試験期間中、参加者は激しい運動、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され、さらに向精神薬、抗ヒスタミン薬、ゲラニルゲラニルアセトン、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-チロシンおよびグリシンの服用を避けるよう指示を受けた。

試験サンプル

酵素処理アスパラガス(ETAS)は、株式会社アミノアップ化学の健康補助食品 GMP、ISO9001 および ISO22000 の認証工場、アスパラガス(*Asparagus officinalis* L.)から生産された。北海道産の生アスパラガスを 121°C で 45 分間熱水抽出し、その後、スクラーゼ C(三菱化学フーズ株式会社製、東京都)およびマセロチーム A(ヤクルト薬品工業株式会社製、東京都)による酵素処理を 24 時間行っ

た。酵素を不活化し、遠心分離後、その上清を濃縮して、滅菌後にスプレードライにより粉末化した。

血中の HSP70 mRNA 発現レベル

血液の HSP70 mRNA の発現レベルは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を使用して検討された。血液サンプルは、溪仁会円山クリニック (札幌市) において、サンプルの摂取前後 (day 0 および day 7) に被験者から採取された。血液 (400 μ L) から NucleoSpin RNA Blood キット (タカラバイオ株式会社製、大津市) を使用して、トータル RNA (250 ng) が抽出された。次に、一本鎖 cDNA が PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis キットおよび Oligo dT プライマー (いずれもタカラバイオ株式会社製) により合成された。cDNA の増幅は Takara Ex Taq (タカラバイオ株式会社製) 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われた。HSP70 用は 5'-CAAGATCACCATCACCAACG-3' (forward primer) と 5'-CTCAAACCTCGTCCTTCTCGG-3' (reverse primer)、ベータ 2 ミクログロブリン (B2M) 用として 5'-TAGCTGTGCTCGCGCTAC-3' (forward primer) と 5'-AGTGGGGGTGAATTCAGTGT-3' (reverse primer) を使用した。尚、B2M 遺伝子は内部標準遺伝子として用いた。PCR 溶液 (計 20 μ L) は次の 3 ステップで反応が行われた。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) が行われた。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された。PCR 産物量を定量するために HSP70 バンドの蛍光強度が測定され、B2M バンドの蛍光強度で補正された。その強度比 (HSP70/B2M) をもって HSP70 mRNA の発現レベルとした。

自律神経評価

自律神経状態は、医療機器であるパルサアナライザープラス TAS9 (株式会社 YKC 製、東京都、

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(19)。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 値および HF 値を二次元グラフの X 軸および 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は HRV に基づき自動的に計算された。

ストレスホルモン評価

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、血液および唾液を採取した。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(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およ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)で測定された。

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)を使用して測定された(20, 21)。当該測定機器は試験 2 の 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された。データは Action-W version 2 ソフトウェア(Ambulatory Monitoring, Inc.)で解析され、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)および覚醒回数が算出された。

アンケート調査

アテネ不眠尺度(AIS): AIS は ICD-10(疾病およ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(22)。

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(23)。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。今回の調査では、覚醒度、気分、意欲、気持ち、身体的疲労、集中力、食欲の 7 項目が評価された。

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(24)。

血液学のおよび生化学的検査

ETAS 摂取による安全性を評価するために、血液学のおよび生化学的検査が札幌臨床検査センターで行われた。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われた。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)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP)、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)とした。

統計解析

全てのデータは試験研究者とは独立して収集され、解析された。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 標準偏差(SD)で示されている。試験 1 においては、プラセボ群と ETAS 群の群間比較は、StatView (version 4.58, Abacas Corp., Baltimore, USA)を用いて一元配置 ANOVA により解析され、Bonferroni/Dunn test が post-hoc test として使用された。また、摂取前後の群内比較においては、paired Student's t-test が使用された。試験 2 のデータには、SPSS (version 19, IBM Corp., New York, USA)を用いて、パラメトリックテストとして paired/unpaired Student's t-test、ノンパラメトリックテストとして Wilcoxon の符号付順位検定が使用

された。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。さらに、試験 1 および試験 2 の全データは計画書に適合した対象集団について解析が行われた。

結果

血中の HSP70 mRNA 発現レベル

試験 1 において、各群 10 名の被験者のうち 8 名から集められた血液サンプルを用いて、血中の HSP70 mRNA 発現レベルが評価された。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された。図 2 に示されているように、両群においてサンプル摂取後に HSP70 mRNA の発現レベルがベースラインに比べて上昇した。発現レベル(% of baseline)は、プラセボ群(175.1 ± 15.3)に対し ETAS 群(278.9 ± 152.3)で著しく高かったが、統計学的有意差には至らなかった(p=0.098)。

自律神経状態

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 を使用しての測定が行われた。プラセボ摂取前後(pre-intake vs post-intake)の LF 値(ms²)、HF 値(ms²)および LF/HF 比は、それぞれ、278.2 ± 146.6 vs 166.4 ± 140.4 (p<0.01)、183.4 ± 135.0 vs 137.1 ± 93.1 および 1.82 ± 1.02 vs 1.32 ± 0.97 であった。ETAS 群のそれらの値(pre-intake vs post-intake)は、135.2 ± 136.1 vs 401.8 ± 697.4 (LF; ms²)、98.7 ± 41.3 vs 92.8 ± 37.7 (HF; ms²)および 1.30 ± 1.01 vs 5.11 ± 9.07 (LF/HF ratio)であった。摂取前後の測定値の差が図 3 に示してある。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、肉体的ストレスおよ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<0.05)、ANS バランス(p<0.01)および肉体的ストレス(p<0.01)指標に有意な差が認められた。

ストレスホルモンレベル

試験 2 において、7 日間のプラセボ摂取後の血清および唾液コルチゾール (CORT および s-CORT) レベルは、ベースラインに比較して有意に増加した (血清: 4.9 ± 2.1 to 6.6 ± 2.3 $\mu\text{g/dL}$, $p < 0.05$, 唾液: 0.08 ± 0.04 to 0.14 ± 0.09 $\mu\text{g/dL}$, $p < 0.01$)。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 ± 1.9 vs 6.3 ± 2.3 $\mu\text{g/dL}$, 唾液: 0.11 ± 0.08 vs 0.13 ± 0.06 $\mu\text{g/dL}$) (図 4A および 4B)。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 ± 6.8 vs 5.7 ± 3.3 pmol/mL , $p < 0.01$) が、プラセボ摂取による変化は見られなかった (摂取前 8.1 ± 5.9 pmol/mL , 摂取後 5.7 ± 2.7 pmol/mL) (図 4C)。

睡眠への影響

プラセボ摂取時と ETAS 摂取時において、総睡眠時間 (405.5 ± 61.6 vs 399.3 ± 44.6 min)、実睡眠時間 (383.7 ± 55.2 vs 374.0 ± 41.9 min)、睡眠潜時 (15.2 ± 15.7 vs 15.4 ± 10.9 min)、睡眠効率 (92.2 ± 8.8 vs $91.3 \pm 11.0\%$) および覚醒回数 (5.9 ± 2.8 vs 5.9 ± 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。しかしながら、被験者を睡眠効率 (90% 以上かそれ以下) により 2 つのグループに分類した場合、ETAS はプラセボに比べ、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 (Placebo: 399.3 ± 46.6 min vs ETAS: 376.1 ± 42.1 min, $p < 0.05$)、また 90% 以下の被験者の実睡眠時間を延長する傾向を示した (Placebo: 316.5 ± 38.2 min vs ETAS: 364.6 ± 48.6 min, $p = 0.093$) (図 5A)。さらに、大阪市立大学病院 (大阪市) のデータを参考にして、健常人の夜間平均睡眠時間 (395 min/night) で被験者を 2 つに分類した場合、ETAS は夜間平均睡眠時間より睡眠時間が多い被験者の実睡眠時間を有意に減少させた (Placebo: 440.5 ± 27.3 min vs ETAS: 403.1 ± 35.1 min, $p < 0.05$) (図 5B)。

夜間平均睡眠時間に関する階層解析においては、表 1 に示すように夜間平均睡眠時間 (395 min/night) を上回るグループと下回るグループにおいて、ストレスホルモンレベルが再解析された。実睡眠時間 395 分以下の被験者においては、プラセボおよび ETAS 摂取時の CORT、s-CORT および

s-CgA 値は同じような推移を示した。しかしながら、実睡眠時間 395 分以上の被験者においては、プラセボ摂取時には s-CORT が上昇し、s-CgA にわずかな変化が認められたにすぎなかったが、ETAS 摂取により s-CORT および s-CgA レベルは減少し、特に s-CgA の減少は統計学的に有意であった ($p < 0.05$)。

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)”という項目が、ETAS 摂取によりプラセボ摂取に比べ有意に改善した ($p < 0.05$)。OSA-MA スコアでは、“悪夢を見る頻度”が ETAS 摂取により有意に少なくなることが明らかとなった ($p < 0.05$)。VAS においては、“食欲”の項目が ETAS により改善された ($p < 0.05$)。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摂取時と ETAS 摂取時に差は認められなかった。また、全ての被験者から副作用の報告はなかった。

安全性データ

試験 2 でプラセボおよび ETAS を摂取した全ての被験者において、血液学および生化学的指標の全ての数値は正常であった(表 2)。また、ETAS 摂取時とプラセボ摂取時、および各サンプルの摂取前後で有意な差は認められなかった。

考察

試験 1 では、酵素処理アスパラガス(ETAS)には熱ショックタンパク質 70(HSP70)を誘導する傾向があることが示されたが、その効果には有意差が認められなかった。これまでの研究では、マウスやヒトにおいて ETAS が HSP70 の発現レベルを有意に増加させることが示されていたので(15)、今回の分析方法においては、より多くの被験者数が必要であった可能性がある。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。試験 2 の結果は、ETAS 摂取はプラセボ摂取に比べ、ストレス関連ホルモン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。

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、またいろいろな有害状態に反応

するうえで重要な生存機能を有しているが、HSP70 の誘導には特にがん治療において、いくつかの懸念事項がある。その理由として、基礎レベルにおいて HSP70 が豊富に発現されているため、ほとんどのがん細胞は抗がん治療に抵抗性を示すからである(25)。さらに、HSP70 の発現は典型的な予後不良のマーカーとなる場合もある(26)。一方、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(27)。最近、細胞内 HSP70 は化学療法を含むいろいろな細胞毒性の脅威からがん細胞を保護することが報告され、反面、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られている(28)。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(29)。試験 1 の結果は HSP70 mRNA のみに関する ETAS の誘導活性評価である。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 を促進することが証明されてからになるが、ETAS が細胞内およびあるいは細胞外 HSP70 の発現に影響を及ぼすか評価する、さらなる研究が必要となる。

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(30)。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(31)。他の研究では、トータルパワーや SDNN、LF、HF の数値は加齢と伴に有意に減少することが報告されている(32)。試験 1 において、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。

試験 2 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 の誘導物質であるメラニルメラニルアセトン¹は、断眠ラットで

REM 睡眠のリバウンドを軽減したと報告されている(33)。また、芍薬(*Paeonia lactiflora*)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(34)、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 および 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。また、夜間の平均睡眠時間(395 min/night)で被験者を 2 グループに分けた場合、過剰な睡眠時間(>395 min/night)を取っている被験者に対し、ETAS は有意に実睡眠時間を短くした。そのような被験者における唾液中のストレスホルモン(s-CORT および s-CgA)レベルはETAS 摂取により減少した一方、プラセボ摂取時には s-CORT および s-CgA のレベルはほとんど減少しなかった。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の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 の誘導のためかもしれない。しかしながら、この関係を解明するためにはさらなる研究が必要とされる。

ストレスマネジメントは、長時間労働や社会不安などの要因によって引き起こされる肉体的および精神的苦痛にさらされているヒトに対しては重要な関心事である。HSP70 誘導に関連する一つのストレスマネジメント法が温熱による温泉療法を受けているヒトの間で報告されている(35, 36)。今回の試験では、ANS やストレス関連ホルモン、睡眠の質という観点から ETAS の潜在的利益が示されているので、温熱温泉療法の効果を ETAS と直接比較したり、対比させたりすることは興味深い。なぜなら、ストレスにさらされている全てのヒトが温泉療法を受けることができないからである。ETAS と温泉療法の潜在的な相加効果もまた興味深い。さらに、現在あるハーブやオメガ 3 脂肪酸(37, 38)といった他の抗ストレス剤との比較により、ETAS はストレスを経験しているヒトに対し、新しい天然素材の選択肢を与える可能性がある。

ETAS の作用機序は完全には研究されていないが、今回のデータは ETAS が ANS バランスを調節し、良質な睡眠をもたらすために有益であるかもしれないという期待を支持するものである。これらの結果は、部分的には HSP70 の発現増強やストレス関連ホルモンレベルの減少に由来しているか

もしれない。しかしながら、今回の2つの試験は共にサンプルサイズが小さく、短期間で行われ、さらに男性のみに限定されている。それ故、コンセプトの実証段階においては、女性や高齢者など多彩な被験者を交えて、より大規模な長期間の試験を行うべきである。

謝辞

我々は、有益な助言や編集に際してのコメントを与えていただいたカリフォルニア大学デービス校のロバート・ハックマン博士に感謝したい。また、本研究は、(公財)北海道中小企業総合支援センター(札幌市)および(公財)北海道科学技術総合振興センター(札幌市)からの研究費補助により行われた。

引用文献

- 1) Han KS, Kim L, Shim I. 2012. Stress and sleep disorder. *Exp Neurol* **21**: 141-150.
- 2) Kumar A, Rinwa P, Kaur G, Machawal L. 2013. Stress: Neurobiology, consequences and management. *J Pharm Bioallied Sci* **5**: 91-97.
- 3) Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Iavicoli I, Di Paola R, Koverech A, Cuzzocrea S, Rizzarelli E, Calabrese EJ. 2012. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* **1822**: 753-783.
- 4) Singh IS, Hasday JD. 2013. Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int J Hyperthermia* **29**: 423-435.
- 5) 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.
- 6) Murshid A, Eguchi T, Calderwood SK. 2013. Stress proteins in aging and life span. *Int J Hyperthermia* **29**: 442-447.
- 7) 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.
- 8) Tavaría M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* **1**: 23-28.
- 9) 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.

- 10) 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.
- 11) Huang F, Huang JP, Pan JY, Bai ZL, Tang L, Zhou SH. 2012. Intracellular heat shock protein 70: a possible therapeutic target for preventing postoperative atrial fibrillation. *Pharmazie* **67**: 747-755.
- 12) Kim JY, Yenari MA. 2013. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anat Cell Biol* **46**: 1-7.
- 13) Hafizur RM, Kabir N, Chishti S. 2012. Asparagus officinalis extract controls blood glucose by improving insulin secretion and β -cell function in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Br J Nutr* **108**: 1586-1595.
- 14) 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.
- 15) Ito T, Maeda T, Goto K, Miura T, Wakame K, Nishioka H, Sato A. 2014. Enzyme-treated asparagus extract promotes expression of heat shock protein and exerts anti-stress effects. *J Food Sci* **79**: 413-419.
- 16) Ito T, Sato A, Ono T, Goto K, Maeda T, Takanari J, Nishioka H, Komatsu K, Matsuura H. 2013. Isolation, structure elucidation, and biological evaluation of a 5-hydroxymethyl-2-furfural derivative, asfural, from enzyme-treated asparagus extract. *J Agric Food Chem* **61**: 9155-9159.
- 17) 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.
- 18) Ito T, Ono T, Sato A, Goto K, Miura T, Wakame K, Nishioka H, Maeda T. 2014. Toxicological assessment of enzyme-treated asparagus extract in rat acute and subchronic oral toxicity studies and genotoxicity tests. *Regul Toxicol Pharmacol* **68**: 240-249.
- 19) 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.
- 20) Natale V, Plazzi G, Martoni M. 2009. Actigraphy in the assessment of insomnia: a quantitative approach. *Sleep* **32**: 767-771.
- 21) Tahmasian M, Khazaie H, Sepehry AA, Russo MB. 2010. Ambulatory monitoring of sleep disorders. *J Pak Med Assoc* **60**: 480-487.

- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Goloudina AR, Demidov ON, Garrido C. 2012. Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett* **325**: 117-124.
- 26) Murphy ME. 2013. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* **34**: 1181-1188.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) Chong KY, Lai CC, Su CY. 2013. Inducible and constitutive HSP70s confer synergistic resistance against metabolic challenges. *Biochem Biophys Res Commun* **430**: 774-779.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) Kim GM, Woo JM. 2011. Determinants for heart rate variability in a normal Korean population. *J Korean Med Sci* **26**: 1293-1298.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) Frost GJ. 2004. The spa as a model of an optimal healing environment. *J Altern Complement Med* **10**: 85-92.
- 36) 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.

- 37) Singh N, Bhalla M, de Jager P, Gilca M. 2011. An overview on ashwagandha: a Rasayana (rejuvenator) of Ayurveda. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **8**: 208-213.
- 38) Pérez MA, Terreros G, Dagnino-Subiabre A. 2013. Long-term omega-3 fatty acid supplementation induces anti-stress effects and improves learning in rats. *Behav Brain Funct* **9**: 25.

表 1. 夜間睡眠時間 395 分を境にした場合のストレスホルモンレベル

グループ	CORT ($\mu\text{g/dL}$)		s-CORT ($\mu\text{g/dL}$)		s-CgA (pmol/mL)	
	摂取前	摂取後	摂取前	摂取後	摂取前	摂取後
395 min/night 以下						
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
395 min/night 以上						
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.

表 2. 血液学および生化学的パラメーター

検査項目	基準値	Placebo		ETAS	
		摂取前	摂取後	摂取前	摂取後
WBC	3.5~9.7 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.7 \pm 1.8	6.9 \pm 1.5	6.7 \pm 1.5	7.3 \pm 2.2
RBC	438~577 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	489 \pm 21	495 \pm 25	495 \pm 23	500 \pm 27
Hb	13.6~18.3 (g/dL)	15.1 \pm 0.7	15.3 \pm 0.8	15.2 \pm 0.7	15.4 \pm 0.9
Ht	40.4~51.9 (%)	44.2 \pm 2.1	44.9 \pm 2.4	44.5 \pm 2.0	45.3 \pm 2.4
Plt	14.0~37.9 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	26.7 \pm 5.4	26.3 \pm 5.9	27.8 \pm 5.4	26.3 \pm 5.6
AST	10~40 (U/L)	22.5 \pm 6.6	23.1 \pm 6.7	23.1 \pm 6.4	23.2 \pm 7.3
ALT	5~45 (U/L)	31.1 \pm 20.3	31.7 \pm 20.5	31.1 \pm 18.6	32.2 \pm 22.4
γ -GTP	1~79 (U/L)	40.9 \pm 32.6	40.8 \pm 34.0	42.5 \pm 39.1	42.8 \pm 38.3
BUN	8.0~20.0 (mg/dL)	13.0 \pm 1.9	13.1 \pm 3.1	13.4 \pm 2.2	12.8 \pm 2.1
CRE	0.65~1.09 (mg/dL)	0.88 \pm 0.09	0.87 \pm 0.09	0.90 \pm 0.10	0.88 \pm 0.09

プラセボ摂取と ETAS 摂取、および各摂取前後で有意差なし

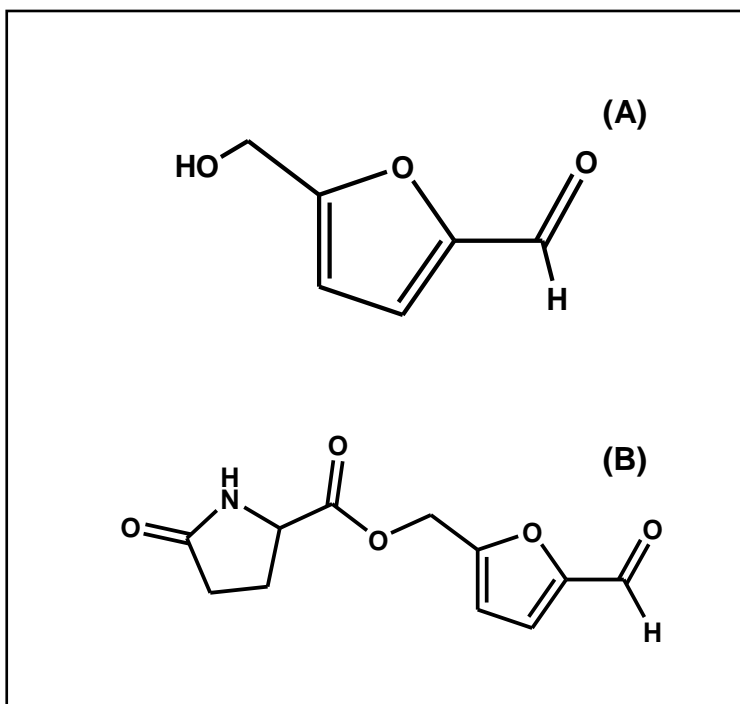


図 1. 5-ヒドロキシメチル-2-フルフラール(A)とアスフラール(B)の化学構造

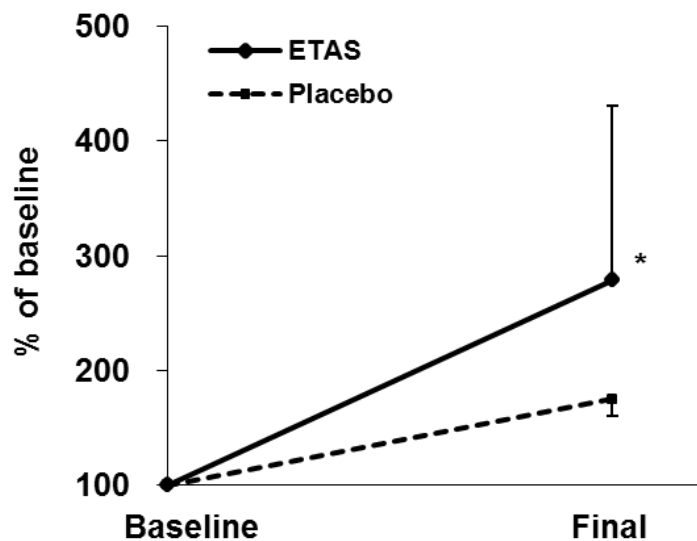


図 2. 血液中の HSP70 mRNA レベルの変化

血液中の HSP70 mRNA 発現レベルは半定量逆転写 PCR により測定された。被験者はプラセボ群 (破線) と ETAS 群 (実線) に分けられた。血液サンプルはベースライン (day 0) および最終日 (day 7) に集められた。数値は平均値 \pm 標準偏差 (SD) およびベースラインに対する HSP70 レベルのパーセントを示している。* $p=0.098$ vs Placebo.

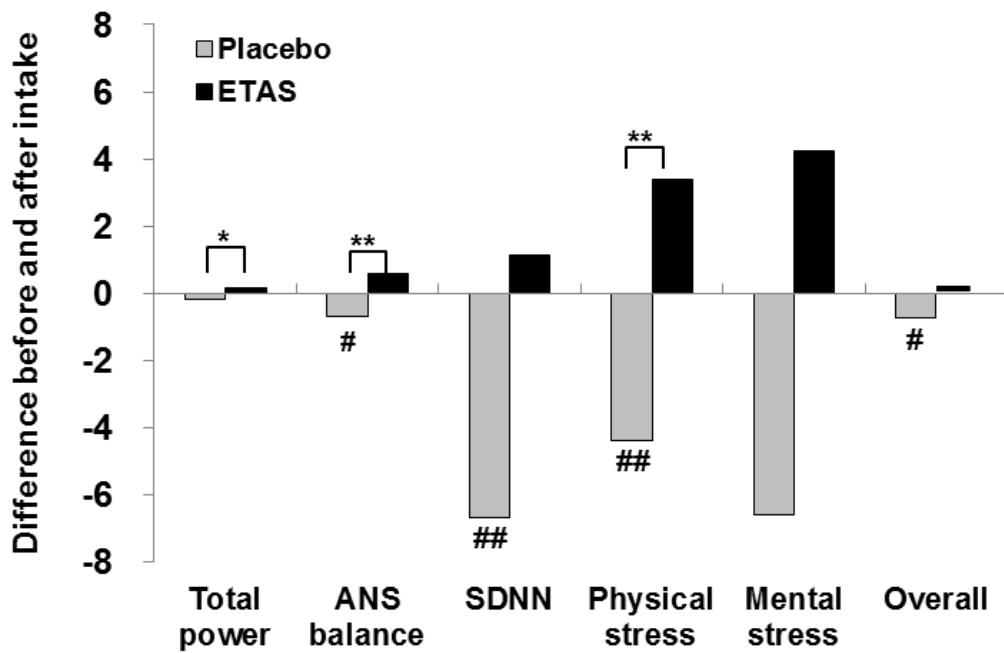


図 3. 自律神経系(ANS)測定値の変化

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、サンプル摂取前後の ANS 機能指標の差が計算された。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Placebo, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs baseline.

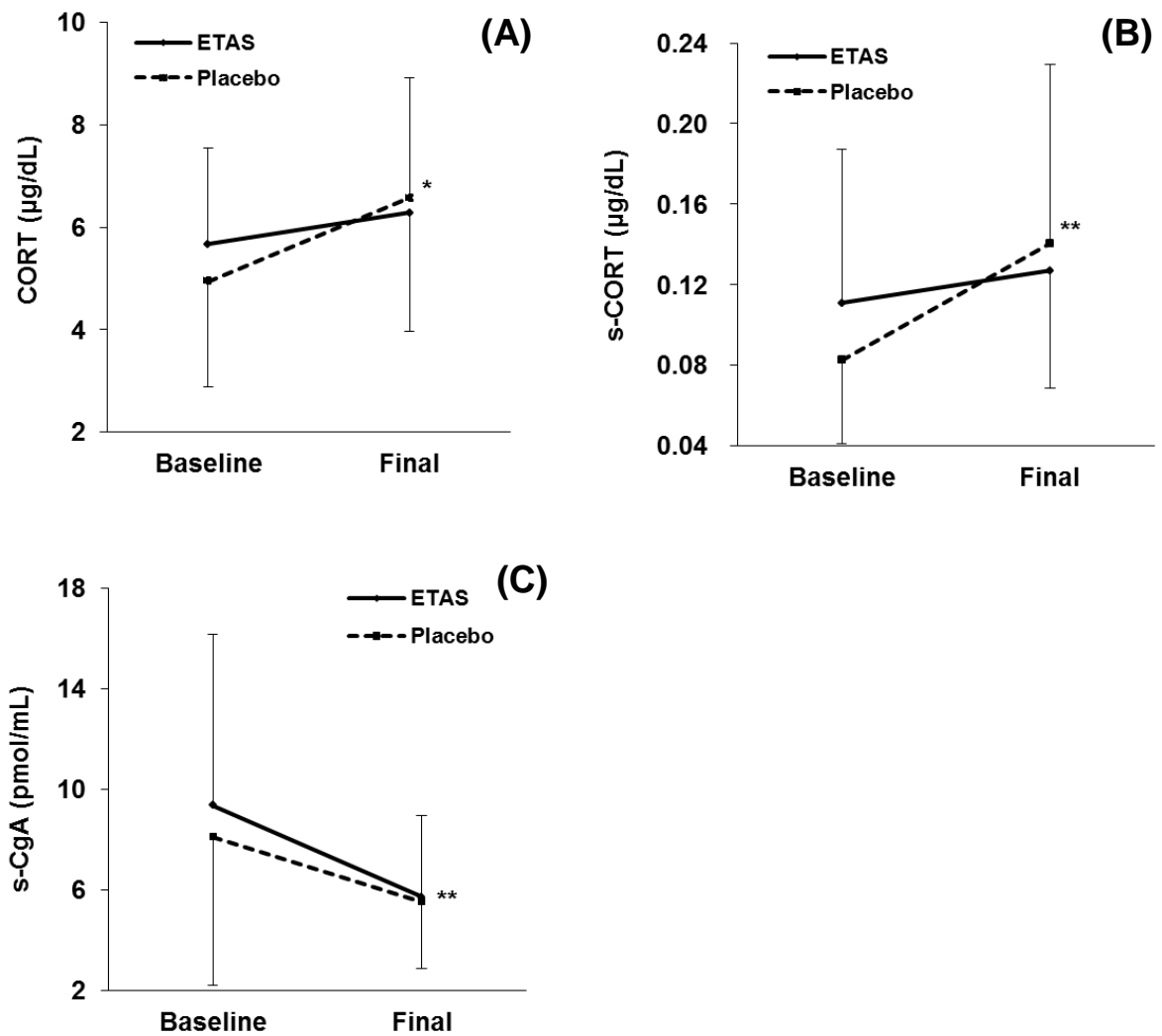


図 4. ストレスホルモンに対する ETAS の効果

血清コルチゾール(CORT; **A**)、唾液コルチゾール(s-CORT; **B**)および唾液クロモグラニン A(s-CgA; **C**)が、プラセボ(破線)あるいは ETAS(実線)の摂取前後で測定された。数値は平均値 ± 標準偏差 (SD)で示してある。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs baseline.

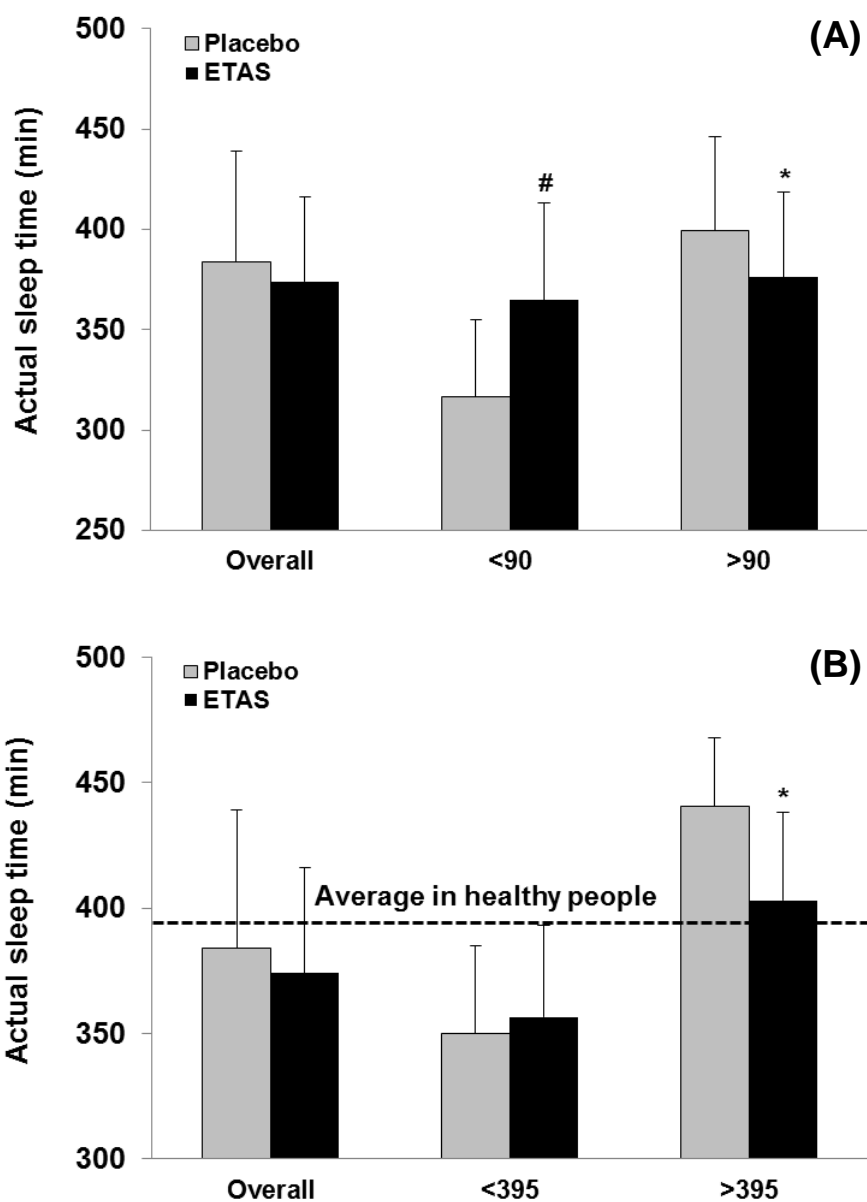


図 5. 実睡眠時間に対する ETAS の影響

実睡眠時間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)および夜間平均睡眠時間(B)に基づき 2 グループに分類された。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 ± 標準偏差(SD)で示してある。[#]p=0.093, ^{*}p<0.05 vs Placebo.

以上