

植物スフィンゴ脂質の機能性素材化と
食品機能性に関する研究

2012. 3

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(帯広畜産大学)

宮下 留美子

目次

I. 緒言	1
II. 植物スフィンゴ脂質素材の安定性評価と化学的性状	12
実験方法	13
1. 植物スフィンゴ脂質素材の化学的性状	13
2. 食品素材としての植物スフィンゴ脂質の安定性評価	14
2-1 粉末製剤での温度に対する安定性	14
2-2 粉末製剤での経時安定性	15
2-3 乳化製剤中の経時安定性	16
2-4 水分散液での温度に対する安定性	17
2-5 水分散液での pH に対する安定性	18
2-6 統計解析	19
3. 市場における食品素材としてのスフィンゴ脂質の性状検討	19
実験結果	22
1. 植物スフィンゴ脂質素材の化学的性状	22
2. 食品素材としての植物スフィンゴ脂質の安定性評価	26
2-1 粉末製剤での温度に対する安定性	26
2-2 粉末製剤での経時安定性	28
2-3 乳化製剤中の経時安定性	31
2-4 水分散液での温度に対する安定性	33
2-5 水分散液での pH に対する安定性	34
3. 上市されている食品素材としてのスフィンゴ脂質の性状	36
考察	46

結語	50
Ⅲ. 植物スフィンゴ脂質素材の定量分析法に関する単一試験室による 妥当性確認	52
実験方法	53
1. 試薬	53
2. 標準溶液の調製	53
3. 植物スフィンゴ脂質含有食品素材からの検液の調製	53
4. HPLC-ELSD 分析	54
5. 分析能パラメータ	56
5-1 選択性 (Selectivity)	56
5-2 直線性 (Linearity)	56
5-3 真度 (回収率) (Trueness (Recovery))	56
5-4 併行精度 (Repeatability precision) 及び室内再現精度 (Intermediate precision)	57
6. 統計処理	57
実験結果	58
1. 選択性	58
2. 直線性	58
3. 真度	61
4. 併行精度及び室内再現精度	63
考察	65
要約	66

IV. 植物スフィンゴ脂質の経口摂取による皮膚保湿効果の検証・・・	67
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	69
1. 健常人に対する効果の検証（低用量）・・・・・・・・	69
1-1 被験者・・・・・・・・・・・・・・・・	69
1-2 試験試料・・・・・・・・・・・・・・・・	71
1-3 試験スケジュール・・・・・・・・	71
1-4 皮表角層水分量と経皮水分蒸散量の測定・・・・・・・・	74
1-5 皮膚状態の観察・・・・・・・・	75
1-6 血液検査と自己評価アンケート調査・・・・・・・・	75
1-7 統計解析・・・・・・・・	76
2. 健常人に対する効果の検証（高用量）・・・・・・・・	76
2-1 被験者・・・・・・・・・・・・・・・・	76
2-2 試験試料・・・・・・・・・・・・・・・・	76
2-3 試験スケジュール・・・・・・・・	78
2-4 皮表角層水分量と経皮水分蒸散量の測定・・・・・・・・	81
2-5 皮膚状態の観察・・・・・・・・	81
2-6 血液検査と自己評価アンケート調査・・・・・・・・	81
2-7 統計解析・・・・・・・・	81
2-8 脂質分析・・・・・・・・	82
3. 軽度アトピー性皮膚炎患者に対する効果の検証・・・・・・・・	82
3-1 被験者・・・・・・・・・・・・・・・・	82
3-2 試験試料・・・・・・・・・・・・・・・・	83
3-3 試験スケジュール・・・・・・・・	83
3-4 皮表角層水分量と経皮水分蒸散量の測定・・・・・・・・	86

3-5	皮膚状態の観察	88
3-6	SCORAD 指標による評価	88
3-7	統計解析	88
	実験結果	91
1.	供試した植物スフィンゴ脂質素材の化学的組成	91
2.	被験者の皮表角層水分量の推移	95
2-1	健常人（低用量）の場合	95
2-2	健常人（高用量）の場合	97
2-3	アトピー性皮膚炎患者の場合	97
3.	被験者の経皮水分蒸散量の推移	99
3-1	健常人（低用量）の場合	99
3-2	健常人（高用量）の場合	102
3-3	アトピー性皮膚炎患者の場合	104
4.	各被験者の皮表角層水分量と経皮水分蒸散量における増減率の散布図と初期値の影響（健常人、高用量の場合）	104
5.	皮膚状態の観察	107
5-1	健常人の場合	107
5-2	アトピー性皮膚炎患者の場合	109
6.	SCORAD 指標による全般改善度	111
7.	被験者の血液成分の生化学的データとアンケート所見	111
8.	日常的に摂取している食事中の構成スフィンゴイド塩基の組成	114
9.	ニワトリの各臓器における植物スフィンゴイド塩基の検索	116

考察	116
結語	120
V. 総合考察	122
VI. 参考文献	129

I. 緒言

セラミドは、長鎖スフィンゴイド塩基と長鎖脂肪酸が酸アミド結合した両親媒性物質であり、スフィンゴ糖脂質やスフィンゴリン脂質(スフィンゴミエリン)の基本骨格を担って広く生体に分布している¹⁻⁴⁾。特に遊離セラミドについては皮膚最外層を覆う角質細胞間脂質の主成分(約55%)として特異的に存在し、皮膚本来が持つ生体と外界とのバリア膜としての機能維持に重要な役割を果たしている⁵⁻⁹⁾。

皮膚のバリア機能の低下は、様々な内的要因(加齢、ストレス、栄養バランス等)・外的要因(紫外線、乾燥、環境汚染、化学物質等)によって引き起こされ、経皮水分蒸散量を増加させ、皮膚のかさつき、落屑、掻痒感などを誘起し、いわゆる乾燥肌(ドライスキン)状態に陥ることが知られている¹⁰⁻¹²⁾。このようなバリア機能障害は、更にサイトカイン産生を促して炎症を増大させ、外界からの様々な刺激に対する皮膚の防御機能を低下させるという悪循環に陥れる。これまでの研究では、加齢及びバリア機能障害として知られるアトピー性皮膚炎患者で、角層(細胞間脂質)中のセラミド成分の減少や組成変化が報告されており、バリア機能の維持や改善にセラミドが重要であることが広く認識されるようになった¹³⁻¹⁹⁾。こうした中で、バリア機能を改善する方法としては、セラミドを外部から補う方法や皮膚のセラミド産生能を高める方法²⁰⁻²³⁾が種々検討されている。

角層のバリア形成にセラミドが必須であることは、1980年代から皮膚科学者や化粧品科学者らによって報告されるようになったが²⁴⁻²⁷⁾、当初、利用可能な天然のセラミド(セブレロシド、グルコシルセラミ

ドを中心としたスフィンゴ糖脂質の混合物)は牛脳抽出物等に限られていた。1990年代に入ってセラミド類似物質(擬似セラミド)等が発酵法や有機合成法を組み合わせるなど、セラミド素材の開発が活発化した。このような合成セラミドは、外用(塗布)により角層のバリア機能の維持向上に有効であることは、種々の研究により明らかとなったが、食経験がないため、すぐさま経口摂取することは安全性等の面で難しく、内服への応用は進んでいない。また、1986年にイギリスで発見されたBSE²⁸⁾や、その後の鳥インフルエンザの影響により、セラミド素材に限らず、牛脳抽出物をはじめとした動物由来原料は、安全性の観点から世界的に敬遠されるようになった。

1990年代に入り、ラボラトワール・ラヴィファルム社(フランス)から、植物性化合物の分離方法についての国際特許が出願、登録された²⁹⁾。その中では全粒小麦を原料に糖脂質とスフィンゴ脂質を豊富に含有する化合物の分離方法が示されている。また、これを応用した化粧品や食品(健康食品)がフランス国内で販売されるに続き、数年遅れて2000年頃に日本にも輸入、販売されるようになったのが、角層のバリア機能の維持向上を目的としたセラミド素材の内服のはじまりと言える³⁰⁻³¹⁾。

2000年代に入り、わが国では高齢化が進み、また、食生活や生活習慣の乱れが原因のメタボリックシンドロームや生活習慣病患者の増加により、行政の医療費抑制やセルフメディケーションへの意識が高まった。これを背景にヘルスケア分野は今後も成長が期待される市場の1つに位置づけられている³²⁾。中でも、比較的手軽に有効成分を体に直接摂取できる健康食品では、天然物由来の素材を応用したヒット商

品が次々に誕生している。それら健康食品の具体的な訴求分野としては、メタボリックシンドロームの要素であるコレステロールコントロール、血圧及び血糖コントロール等に代表される「生活習慣病予防」、食べる美容素材として保湿、美白、アンチエイジング等の「美容」、更にストレス、疲労回復あるいはアレルギー改善、更年期症状の改善、そして最近ではロコモティブシンドローム（運動器症候群；運動器の障害による要介護の状態や要介護リスクの高い状態を表す）対策等の「QOL 向上」などが挙げられる³³⁻³⁵⁾ (Fig. 1 及び Table1)。

昨今、こうした健康食品市場で最も元気が良いと言われているのがセラミド [この場合は、植物スフィンゴ脂質（グルコシルセラミド）を指す] やコラーゲン、ヒアルロン酸に代表される「美容訴求」分野であり、消費者の認知度、体感性の良さ、価格等の面での利用のしやすさが商品開発を多様化させ、カプセルや錠剤形状のいわゆるサプリメントから飲料、デザート、菓子、惣菜類といった一般食品にまで幅広く浸透しつつある。市場規模としては 2006 年度 17.3 億円が 2010 年度 22 億円と微増ながら推移し、2011 年度は震災の影響で横ばいの見通しではあるものの 2016 年度には 24 億円になると予想されており、景気が悪化、低迷している中においては常に 100% を越える成長率であることから、数少ない成長市場と位置づけられている³⁵⁾。(Fig. 2) また、こうした現象、殊に植物スフィンゴ脂質を経口摂取することによる美容効果の訴求については、これまでは日本国内に限定されるブームであったが、昨今、これが韓国、台湾等のアジアにも波及しつつある。特に韓国では 2010 年に韓国版トクホ（特定保健用食品）として植物スフィンゴ脂質（グルコシルセラミド、GlcCer）含有食品素材

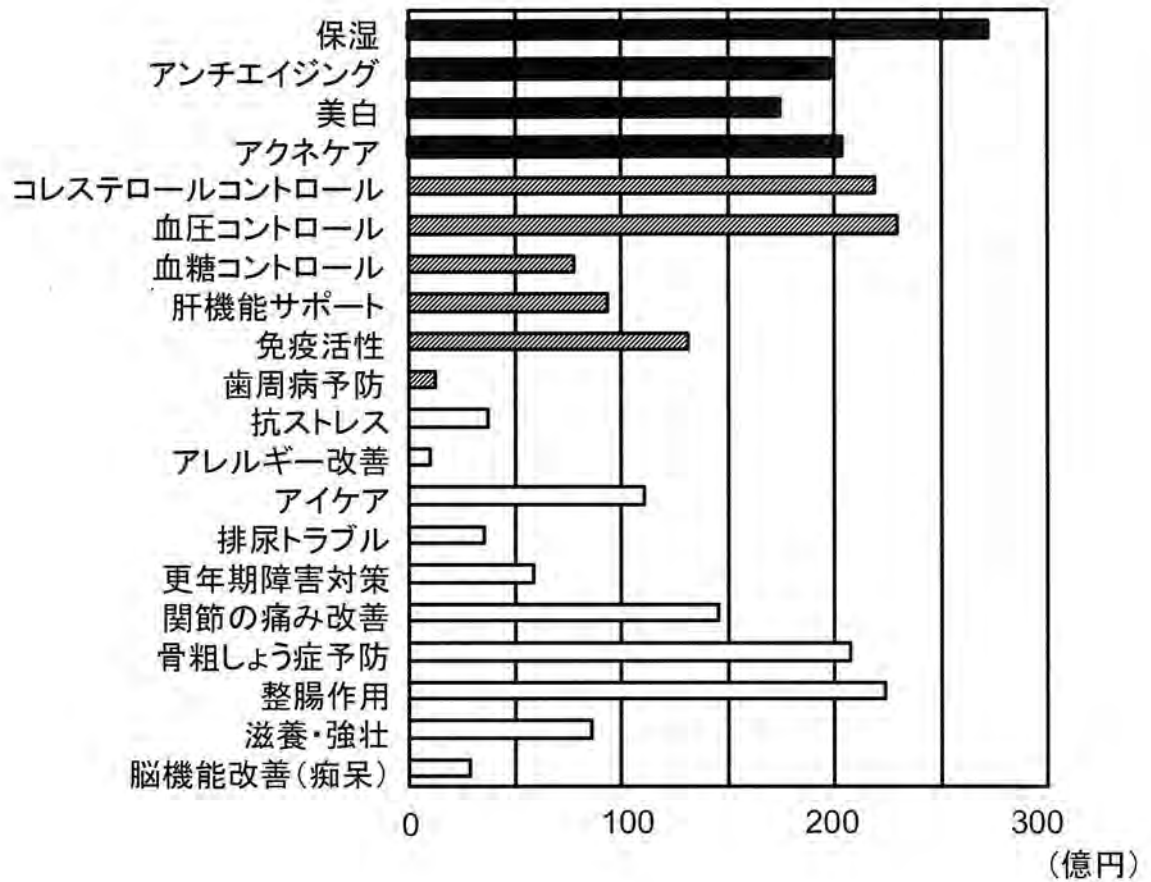


Fig . 1 日本における健康食品の訴求機能別売上高 (2006年)

Table 1 健康食品における訴求分野と具体的な訴求機能

訴求分野	具体的な訴求機能
美容訴求	保湿 アンチエイジング 美白 アクネケア
生活習慣病対策	コレステロールコントロール 血圧コントロール 血糖コントロール 肝機能サポート 免疫活性 歯周病予防
QOL向上	抗ストレス 疲労回復 アレルギー改善 アイケア 排尿トラブル 更年期障害対策 ロコモティブシンドローム対策 関節の痛み改善 骨粗しょう症予防 整腸作用 滋養・強壮 脳機能改善(痴呆)

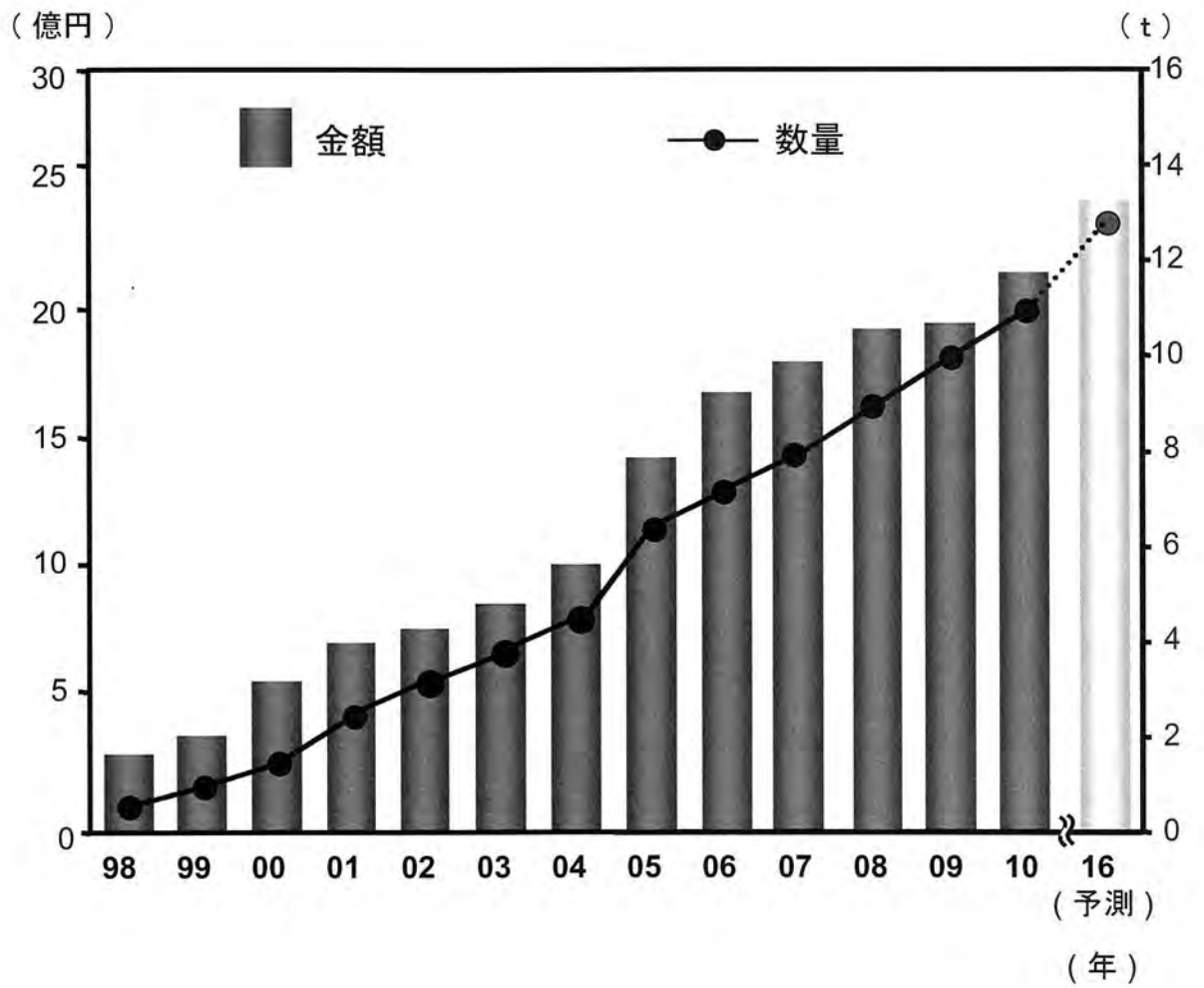


Fig. 2 日本におけるセラミド素材の市場規模

が認証を受け、これを配合したサプリメント等が市販されており、そのバラエティー化も進んでいる。

他方、先述した BSE や鳥インフルエンザなどの影響に端を発した、原料素材の植物由来への切り替え傾向はますます強まり、また、一部のダイエット食品等で見られた、中国をはじめとした粗悪品の流通などの影響による信頼性の低下、更には 2010 年の震災に端を発した福島原子力発電所事故による放射性物質の拡散などの問題も顕在化しており、市場では安全な製造体制で生産された安心のできる商品はもとより、科学的に効果の裏付けのある信頼性の高い商品が強く望まれている。

植物に含まれるセレブロシド（グルシルセラミド、GlcCer）は、スフィンゴイド塩基と脂肪酸からなるセラミドにグルコースが β -グリコシド結合した構造の β -グルコシルセラミドである（Fig. 3）。その構成スフィンゴイド塩基については、ジヒドロキシ型とトリヒドロキシ型が存在し、それぞれ 8 位のトランス - 型とシス - 型不飽和の異性体が存在しており、植物由来のスフィンゴイド塩基としては、C₁₈ の 9 種類が確認されている³⁶⁻³⁷⁾（Fig. 4）。また、酵母などの真菌には、スフィンゴイド塩基の 9 位にメチル基を持つタイプも存在し、植物にはない特徴とされる³⁸⁻⁴⁰⁾。動物のスフィンゴイド塩基は、通常、4 - トランス - スフィンゲニン（スフィンゴシン）が主体で、スフィンガニン（ジヒドロスフィンゴシン）や 4 - ヒドロキシスフィンガニン（フィトスフィンゴシン）は少量である。そのため、そこから生じるセラミド残基としては比較的単純であるのに比べて⁴¹⁾、植物及び真菌のそれは複雑なセラミド残基を構成している^{2, 3)}。構成脂肪酸については、

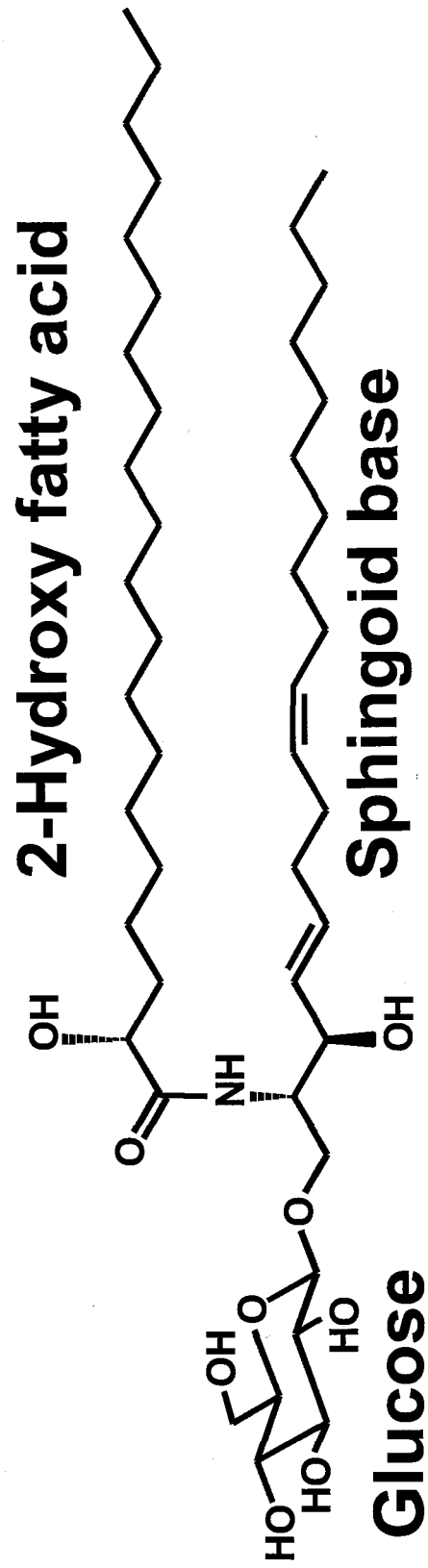


Fig . 3 代表的な植物由来スフィンゴ脂質(グルコシルセラミド)の構造

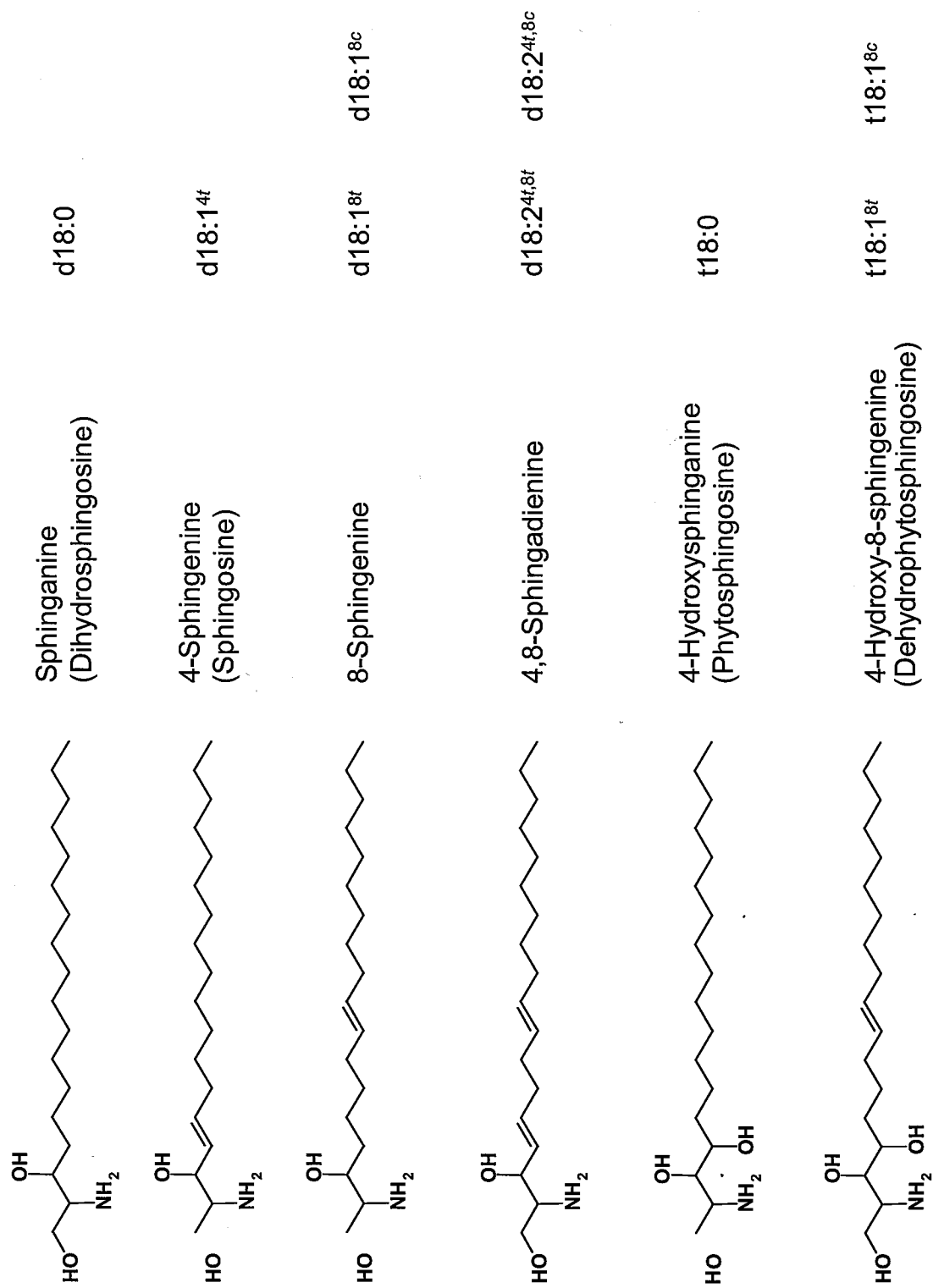


Fig. 4 植物中に見出されるスフィンゴイド塩基の種類

炭素数 14 から 26 の 2 - ヒドロキシ脂肪酸が主で、一部の耐寒性のある植物にはシス - 不飽和型が含まれる場合がある²⁾。

GlcCer は真核生物の膜脂質の構成成分として普遍的に存在していることから、植物由来 GlcCer についても、人類は古くから、そして生涯に亘って食事として摂取しているが、その食品機能性についての研究は発展途上であり、まだ分かっていないことも多い。これらのような背景から、植物由来 GlcCer は研究よりも産業、言い換えれば「科学的根拠よりも商業的イメージ」が先行している面があるが、そうした現象は科学、産業、そして消費者にとって望ましいことではない。

本研究では、機能性食品素材としての植物スフィンゴ脂質 (GlcCer) について、第Ⅱ章では比較的高濃度に濃縮された GlcCer 画分 (GlcCer 含量 50% 以上) を工業的に大量かつ安定的に製造する方法を確立し、その食品素材としての保存 (経時) 安定性及び熱或いは pH に対する安定性を確認することで食品素材としての有用性を示そうとした。更に、植物スフィンゴ脂質市場の現状を把握するため流通品を入手してそれらの精製度や性状を比較考察した。第Ⅲ章では植物由来 GlcCer について、最近市販された標準試薬品を用い、既報の蒸発光散乱検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ELSD) 分析の条件下での定量分析法の単一試験室による妥当性確認を行ない、本分析法の有用性を示そうとした。第Ⅳ章では健常人に対して低用量 (GlcCer として 0.6mg 或いは 1.2mg/日) での検証を実施することで、既報 (トウモロコシ由来 GlcCer を用いた浅井ら⁴²⁾) の効果について、それとは由来原料の異なる素材 (コメ由来) での効果の確認を試みた。また、健常人に対して高用量 (GlcCer として 2mg 或いは 10mg/日) での検証を実施する

ことで、GlcCerの皮膚保湿効果に対する有効摂取量を明らかにしようとした。また、軽度アトピー性皮膚炎患者に対してGlcCerとして2mgを経口摂取させた試験を実施してアトピー性皮膚炎患者に対しての効果について検証しようとした。更に日常的な食事中の植物性スフィンゴイド塩基の分析及びニワトリの各臓器における植物スフィンゴイド塩基の検索を行うことで、経口摂取した植物スフィンゴ脂質（GlcCer）と皮膚保湿効果の作用メカニズムの関係を考察しようとした。

Ⅱ. 植物スフィンゴ脂質素材の安定性評価と化学的性状

工業的に生産する食品素材原料としてのスフィンゴ脂質の供給源を考えたとき、安全性や消費者の受けるイメージ、世界的な潮流等から、著者らははじめに、既に日本で食経験のある植物をターゲットにすることを決めた。植物（可食部）の GlcCer 含量は数 mg~40mg 程度（平均 10.1mg）/100g (Fresh weight) であることが菅原ら⁴³⁾により報告されていたことから、原料候補とする植物の種属には拘らず、原料としての入手のし易さや扱い（処理）のし易さに優位性があり、入手する原料段階での GlcCer 含量がある程度濃縮されているような部位或いは形態を探索した。

検討の結果、植物油製造工程中の副生成物（油滓）に比較的条件を満たすことが可能な原料を見出した。この原料を使って、食品素材の製造に使用可能な抽出溶媒、製造加工助剤を選定、組み合わせ、種々条件（温度、時間、pH 等）を変化させて実験を重ね、最適な抽出・精製条件を実験室スケールで確立した。これを実製造レベルにスケールアップするため更に調節を繰り返し、比較的高濃度に濃縮された GlcCer 画分（GlcCer 含量 50%以上）を大量かつ安定的に製造する方法を確立した。

著者らは、これらの方法によって原料としてコメ及びトウモロコシを用いて得た比較的高濃度に濃縮された GlcCer 画分を、食品素材として健康食品や一般食品に利用及び加工しやすいように、賦形剤（粉末化担体）としてシクロデキストリンを用いて粉末製剤化し、或いは乳化剤を用いて乳化製剤の形態に仕上げ、それぞれを機能性食品素

材として上市した。なお、これらの製造方法については、著者が所属する企業独自のノウハウを含むため、本学位論文には著者の守秘義務として記述することはできない。

食品素材を製品化するにあたり、それらの保存安定性や二次加工処理環境での安定性を確認することは、素材を利用或いは加工して商品としていく上で必要不可欠な情報となる。本章では、食品素材として工業的に製造された植物スフィンゴ脂質 (GlcCer) 濃縮画分の、保存 (経時) 安定性及び熱或いは pH に対する安定性を確認した結果を記述する。更に、現在食品素材として上市されているスフィンゴ脂質は、由来としている原料が多種であり、その精製度は各社で異なり多様である。これらについて市場の現状を把握するため流通品を入手し、各素材の性状や品質、特徴等を比較検討、考察しようとした。

実験方法

1. 植物スフィンゴ脂質素材の化学的性状

著者らが開発し確立した方法で工業的に製造し、機能性食品素材として上市した製品をケイ酸 TLC 及び LC-MS 分析に供した。

ケイ酸 TLC は、コメ及びトウモロコシの油滓を原料とした「ニップンセラミド RPS」及び「ニップンセラミド CP」を用いて、それぞれ一定量をサンプリングし、そこにクロロホルム/メタノール (2 : 1, vol/vol) を加えて脂質画分を抽出[超音波処理 (室温、20 分間)]した。得られた脂質画分を一定量、ケイ酸 TLC (Silica gel 60, 20×20cm, Merck) にスポットし、クロロホルム/メタノール/

水（65：16：2, vol/vol/vol）で展開させた後、アンスロン硫酸を噴霧、110℃、10 分間乾燥させた^{44, 45)}。

LC-MS 分析は、ケイ酸 TLC に供したのと同じロットの各製品をソックスレー抽出[クロロホルム/メタノール（2：1, vol/vol）80℃、6 時間]に供して得られた全脂質画分を用いて行った。分析装置は、島津製 LC-20AD Prominence に質量分析計 LCMC-2020 を接続し、ESI（エレクトロスプレーイオン化）により測定した。移動相は A ポンプに 5mM メタノール性ギ酸アンモニウム（0.196ml/分）、B ポンプに 5mM ギ酸アンモニウム水溶液（0.004ml/分）とし、カラムは GL サインエス製 Inertsil ODS-4（2.1×150mm）を使用した。

2. 食品素材としての植物スフィンゴ脂質の安定性評価

2-1 粉末製剤での温度に対する安定性

トウモロコシを原料として工業的に製造された植物スフィンゴ脂質（GlcCer）濃縮画分（GlcCer 含量 50%以上）を、その製剤中に GlcCer として 3%含有するように賦形剤（シクロデキストリン）で希釈調整して粉末化した市販品「ニップンセラミド CP」を用いて、加熱時の GlcCer の安定性を検討した。

実験は、ガラス試験管にステロール等を含まない食用油（日清コーン油、日清オイリオ）3ml とニップンセラミド CP 100～150mg を精秤し、攪拌混合して懸濁液を調製、検液とした(n=2)。これをヒーティングブロック（HF-61、ヤマト科学）で所定時間加熱処理をした後、試験管内の内容物全量をソックスレー抽出[クロロホルム/メタノール（2：1, vol/vol）80℃、6 時間]に供して全脂質画分を得た後、常法

⁴⁴⁻⁴⁶⁾に従い 0.4 mol/L メタノール性水酸化カリウムを適量加え弱アルカリ分解後、フォルチ分配により得た脂質画分について既報^{47,48)}に準じ GlcCer 含量を HPLC-ELSD で測定した。安定性の評価は、各試験管内のニップンセラミド CP に含有される GlcCer 含量（計算値）を 100 としたときの各条件での加熱処理後の GlcCer 含量（実測値）を残存量として、その残存率を比較した。

2-2 粉末製剤での経時安定性

前述の「ニップンセラミド CP（トウモロコシ由来）」および、それと同様に食品素材として市販されている「ニップンセラミド RPS[コメを原料として工業的に製造された植物スフィンゴ脂質（GlcCer）濃縮画分（GlcCer 含量 50%以上）を、その製剤中に GlcCer として 6% 含有するように、賦形剤（シクロデキストリン）を用いて希釈調整して粉末化した市販品]」を用いて、粉末製剤形態での保存による GlcCer の経時安定性を検討した。

実験は、粉末製剤の製品包装袋と同素材の袋（セイニチラミジップ AL-12、サイズ 180×120+35^m/m、材質 PET/AL/PE、株生産日本社）に、ニップンセラミド CP 及び RPS を各々 50g ずつ密封し、厚生労働省医薬局審査管理課長通知（平成 15 年 6 月 3 日付医薬審発第 0603001 号「安全性試験ガイドラインの改定について」）⁴⁹⁾を参考に、長期保存試験として室温（20℃±15℃）並びに、加速試験として温度 40℃湿度 75%設定にした恒温恒湿器（IG-42M、ヤマト科学）を用いて最大 50 ヶ月間静置保管し検体とした。これらを所定の頻度で開封して各試験（GlcCer 含量測定、衛生検査、水分測定、性状観察）を行い、保存

による経時安定性を確認した。GlcCer 含量の分析は、ソックスレー抽出[1g 精秤、クロロホルム/メタノール(2 : 1, vol/vol) 、 80℃、 6 時間、 n=2]で得た脂質画分について既報に準じ GlcCer 含量を HPLC-ELSD で測定した。衛生検査は、一般生菌数及び大腸菌群について食品衛生検査指針 2004⁵⁰⁾に準じ、それぞれ標準寒天培地 (35℃、 48 時間培養、 日水製薬)、 デソキシコレート寒天培地 (35℃、 20 時間培養、 日水製薬) に供して培養し、 所定時間培養後に出現したコロニー数をカウントした。水分測定値は、 検体 1g を精秤後、 常圧加熱乾燥法により 105℃、 2 時間加熱乾燥後の減量から算出した (n=2)。また、 検体の性状 (粉末の概観観察、 色調、 香味) については、 コントロールとして同様に作成し冷蔵保存 (5℃) した検体を用意し、 2 名以上が参加してこれと目視等で官能的に比較することで安定性を評価した。

2-3 乳化製剤中の経時安定性

前述の「ニップンセラミド RPS」と同様に、 コメを原料として工業的に製造された植物スフィンゴ脂質 (GlcCer) 濃縮画分 (GlcCer 含量 50%以上) を、 その製剤中に GlcCer として 3%含有するように、 乳化剤等 (グリセリン 55.0%、 グリセリン脂肪酸エステル 18.75%、 エタノール 13.0%、 ショ糖脂肪酸エステル 0.5% (いずれも w/w)) で製剤化された市販品「ニップンセラミド RLG」を用いて、 乳化製剤形態での保存による GlcCer の経時安定性を確認した。

実験は、 乳化製剤をコニカルチューブ (50ml、 ポリプロピレン、 Falcon) に 30g ずつ密封し、 長期保存試験⁴⁹⁾として冷蔵 (5℃) 並び

に加速試験として温度 40℃、湿度 75% 設定の恒温恒湿器 (IG-42M、ヤマト科学) 内で最大 39 ヶ月間静置保管し検体とした。長期保存試験の温度帯を室温ではなく冷蔵としたのは、本品の製品設計上、保管及び流通の温度帯を冷蔵として設計したことによる。これらを所定の頻度で開封し、各試験 (GlcCer 含量測定、衛生検査、性状観察) を行い、保存による経時安定性を確認した。GlcCer 含量の分析は、常法⁴⁴⁻⁴⁶⁾に従いアルカリ分解物後フォルチ分配して得た脂質画分について既報⁴⁷⁻⁴⁸⁾に準じ GlcCer 含量を HPLC-ELSD で測定した。衛生検査は、一般性菌数及び大腸菌群について前述同様に常法⁵⁰⁾に準じ、所定時間培養後に出現したコロニー数をカウントした。また、恒温恒湿器中で保存した検体の性状 (概観観察、色調、香味) については、コントロールとして同様に作成し冷蔵保存 (5℃) した検体を用意し、2 名以上が参加してこれと目視等で官能的に比較することで評価した。

2-4 水分散液での温度に対する安定性

前述の「ニップンセラミド RLG」を用いて、乳化製剤の希釈水溶液状態での加熱時の GlcCer の安定性を確認した。

実験は、ニップンセラミド RLG 2.5g を精秤し純水で溶解後に 50ml にメスアップした希釈液を検液として、ガラス試験管にこれを 3ml ずつ分注し、100℃ 60 分及び 120 分、121℃ 10 分及び 60 分の加熱処理を行った (n=2)。GlcCer 含量の分析は、加熱処理を終えた各試験管に常法⁴⁴⁻⁴⁶⁾に従い弱アルカリ分解後、フォルチ分配により得た脂質画分について既報^{47,48)}に準じ GlcCer 含量を HPLC-ELSD で測定した。安定性の評価は、各試験管中のニップンセラミド RLG に含有される

GlcCer 含量（未処理品＝加熱なし）を 100 としたときの各条件での加熱処理後の GlcCer 含量（実測値）を残存量として、その残存率を比較した。加熱処理は、100℃については沸騰水浴中での湯煎とし、加熱時間は沸騰水浴投入直後からの時間とした。121℃についてはオートクレーブ（BS-245、トミー精工）を使用し、加熱時間は完全に温度が上昇してからの時間とした。

2-5 水分散液での pH に対する安定性

前述の「ニップンセラミド RLG」を用いて、乳化製剤の希釈水溶液中での GlcCer の pH 安定性を確認した。

実験は、ニップンセラミド RLG 10g を精秤し純水で溶解後に 200ml にメスアップした希釈液を検液として用意し、これを 30ml ずつ分けて塩酸或いは水酸化カリウムを用いて、所定の pH (pH2、4、8、10) に調整した。次に、ガラス試験管にこれらを各 3ml ずつ分注し、密栓後沸騰水浴中で 10 分間の加熱殺菌を施した。分注後加熱殺菌処理をしたうちの各 2 本については、常法に従いアルカリ分解物後フォルチ分配して得た脂質画分について、既報^{47,48)}に準じ GlcCer 含量を HPLC-ELSD で測定した (n=2)。その結果から、各試験管中のニップンセラミド RLG に含有される GlcCer 含量(未調整品＝pH 調整なし、加熱殺菌あり)を 100 としたときの各 pH での GlcCer 含量（実測値）を残存量として、その残存率を比較し安定性を評価した。また、残りの分注品（加熱殺菌処理済）については温度 40℃、湿度 75% の条件下で 4 週間保存した後、同様の処理を行い GlcCer 含量を測定した (n=2)。その結果から、各試験管中のニップンセラミド RLG に含有

される GlcCer 含量（40℃、湿度 75%、4 週間保存前の未調整品）を 100 としたときの各 pH 条件で 4 週間保存後の GlcCer 含量（実測値）を残存量として、その残存率を比較し安定性を評価した。

2-6 統計解析

各分析値は n=2 の平均値で示し、「2-1 粉末製剤での温度に対する安定性」、「2-4 水分散液での温度に対する安定性」、「2-5 水分散液での pH に対する安定性」については、統計解析は統計解析ソフト SPSS Ver.14.0（SPSS Japan Inc.）を使用して一元配置分散分析を行った後、未処理（コントロール）区と各処理区を Scheffe 法で比較した。有意水準は 5%とした。

3. 市場における食品素材としてのスフィンゴ脂質の性状検討

現在市場に流通する代表的な素材を入手し（Table 2）、これらについて、ケイ酸薄層クロマトグラフィーに供して精製度を調べた。GlcCer の含量分析は、抽出・前処理方法についてメーカー指定法がある場合はそれに従い、指定がない場合はソックスレー抽出で得た全脂質画分をアルカリ分解した後フォルチ分配して得た脂質画分について既報^{47,48)}に準じ HPLC-ELSD で測定、比較した。乳由来スフィンゴミエリン（Sphingomyelin, SM）を含む素材については、水に溶解後アルカリ分解した後フォルチ分配して得た脂質画分について、上記 GlcCer 素材同様に既報^{47,48)}の条件で HPLC-ELSD で測定した。

HPLC 装置には島津製 LC-10AD 型を用いて、これに ELSD としてポリマーラボラトリー製 PL-ELS2100 型を接続して使用した。

検出器はネブライザー温度 40℃、エバポレーター温度 70℃、圧縮空気流圧 1.0SLM に設定し、カラムは GLサイエンス製 Inertsil Sil 100-5 (内径 4.6mm、長さ 150mm) を、40℃に保温して分析した。溶出液には既報^{47,48)}と同様にクロロホルムとメタノール／水 (95:5, vol/vol) の両液の 2 液によるグラジエントを用いた。GlcCer 及び SM 標準品として、長良サイエンス製の各原料由来試薬 (純度 $\geq 99\%$ TLC) をそれぞれ用いて検量線を作成し定量分析に供した。

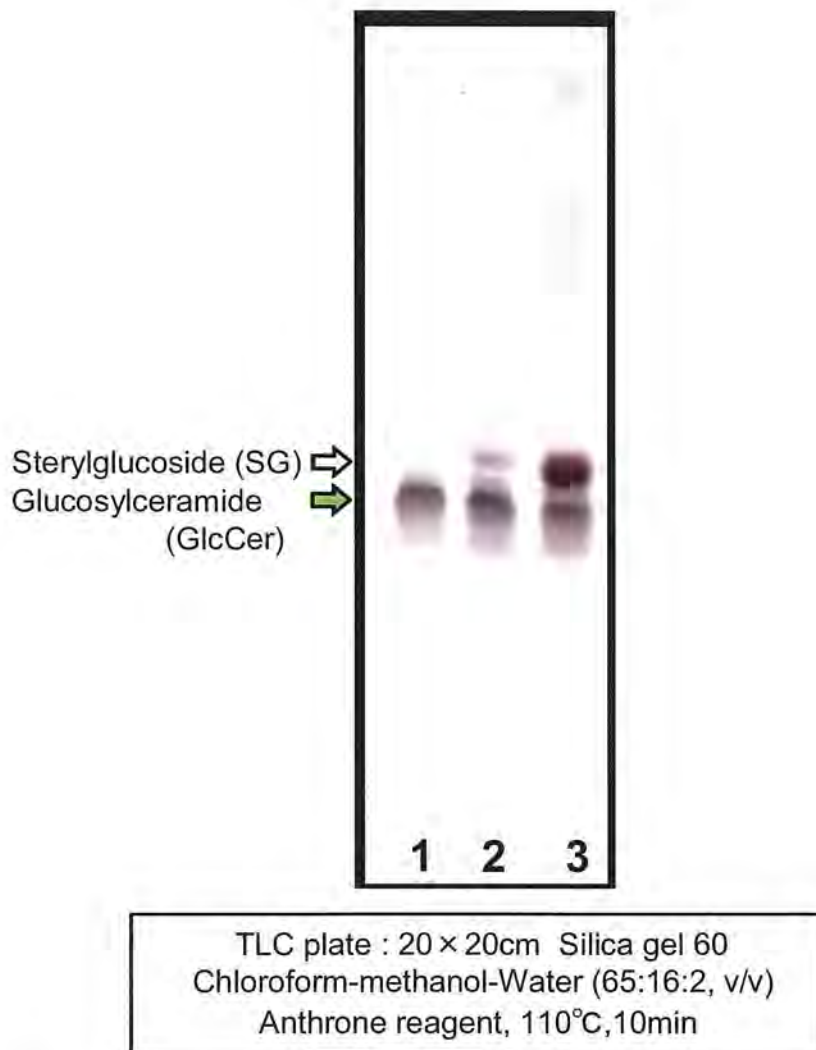
Table 2 食品素材として上市されている「セラミド素材」の一例（粉末形態）

発売元	製品名称	ロット番号	起源原料	製品規格	メーカー 設定価格 (円/製品1kg)	備考
日本製粉 株式会社	ニップンセラミド RPS	20140606	コム	GlcCer 6.0%以上	280,000	
	ニップンセラミド CP	20140707	トウモロコシ	GlcCer 3.0%以上	100,000	
一丸ファルコス 株式会社	フィットセラמיד (10%)	102664	コム	スフィンゴ糖脂質 10.0%以上	485,000	※分析の際の抽出・前処理法 はメーカー指定あり
オリザ油化 株式会社	オリザセラמיד -PCD	U-112	コム	スフィンゴ糖脂質 3.0%以上	110,000	
辻製油 株式会社	コーンセラמיד P-3	100721	トウモロコシ	スフィンゴ糖脂質 3.0%~	125,000	
株式会社 明治フード マテリア	ビートセラמיד	120311	ビート (甜菜)	GlcCer 3%以上	250,000	製造社 日本甜菜製糖 株式会社
ユニチカ 株式会社	こんにゃくセラミド (粉末タイプ)	P10Q2K	コンニャク	GlcCer 3.0%以上	240,000	
日油株式会社	ニッサン N-セラミド	101124A	コムギ	グリコシルセラミド 4±0.8% ジガラクトシルグリセリド(DGDG) 50±10%	50,000	製造場所 フランス
雪印メグミルク 株式会社	ミルクセラミド MC-5	K019	生乳	スフィンゴミエリン 5.0%以上	32,500	製造場所 ニュージーランド

実験結果

1. 植物スフィンゴ脂質素材の化学的性状

ケイ酸 TLC 及び LC-MS の結果を Fig. 5~7 に示す。ケイ酸 TLC (Fig.5) では、Lane1 の市販試薬 (Rice glucosylceramide, $\geq 99\%$ TLC, 長良サイエンス) と同等の位置に GlcCer のスポットが認められた。Lane2 のコメ由来の製品は GlcCer 以外には少量のステロール配糖体 (SG) と僅かに遊離脂肪酸 (FFA) が含まれていた。Lane3 のトウモロコシ由来の製品は GlcCer 以外には強い SG のスポットが認められ、少量のトリグリセライド (TG)、FFA、アシル化されたステロール配糖体 (ASG) が含まれていた。これら 2 製品の精製度の違いは、製品差別化のために製造工程を変えていることが影響していると考えられた。コメ由来製品の LC-MS 分析 (Fig.6) では、5 分~14 分の間に複数のピークが検出された。本条件では、d18:2-C18:0h (スフィンゴイド塩基として 4,8-Sphingadienine に脂肪酸として二重結合のない炭素数 18 のタイプ)、d18:2-C20:0h (4,8-Sphingadienine に炭素数 20、二重結合なし)、t18:1-C22:0h (4-Hydroxy-8-sphingenine に炭素数 22、二重結合なし)、d18:2-C22:0h (4,8-Sphingadienine に炭素数 22、二重結合なし)、d18:2-C24:0h (4,8-Sphingadienine に炭素数 24、二重結合なし) の GlcCer 分子種が分離し、判別された。トウモロコシ由来製品の LC-MS 分析 (Fig.7) では、2 分~16 分の間に複数のピークが検出された。本条件では、d18:2-C16:0h (4,8-Sphingadienine に炭素数 16、二重結合なし)、d18:2-C18:0h、d18:2-C20:0h、d18:2-C22:0h、d18:2-C24:0h の GlcCer 分子種が分離し判別された。



- Lane 1, Rice glucosylceramide standard (長良サイエンス)
 Lane 2, ニッポンセラミド RPS (コメ由来、日本製粉株式会社)
 Lane 3, ニッポンセラミド CP (トウモロコシ由来、日本製粉株式会社)

Fig. 5 植物油製造工程中の副生成物を原料に 著者らが確立した工業的製造方法によって製造されたグルコシルセラミド食品素材のケイ酸TLC

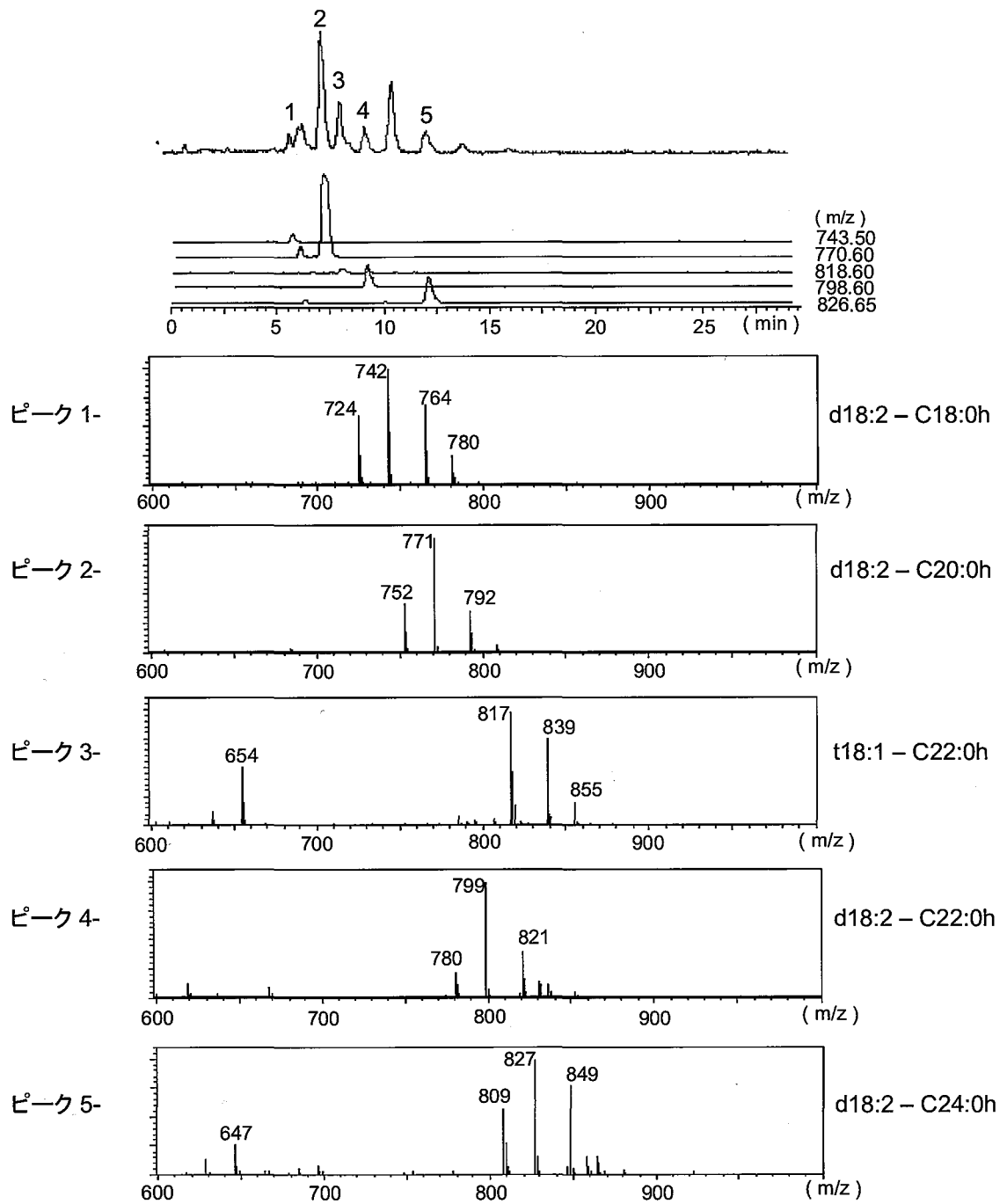


Fig. 6 植物油製造工程中の副生成物を原料に 著者らが確立した工業的製造方法によって製造されたグルコシルセラミド食品素材の LC/MS分析例 (コメ由来)

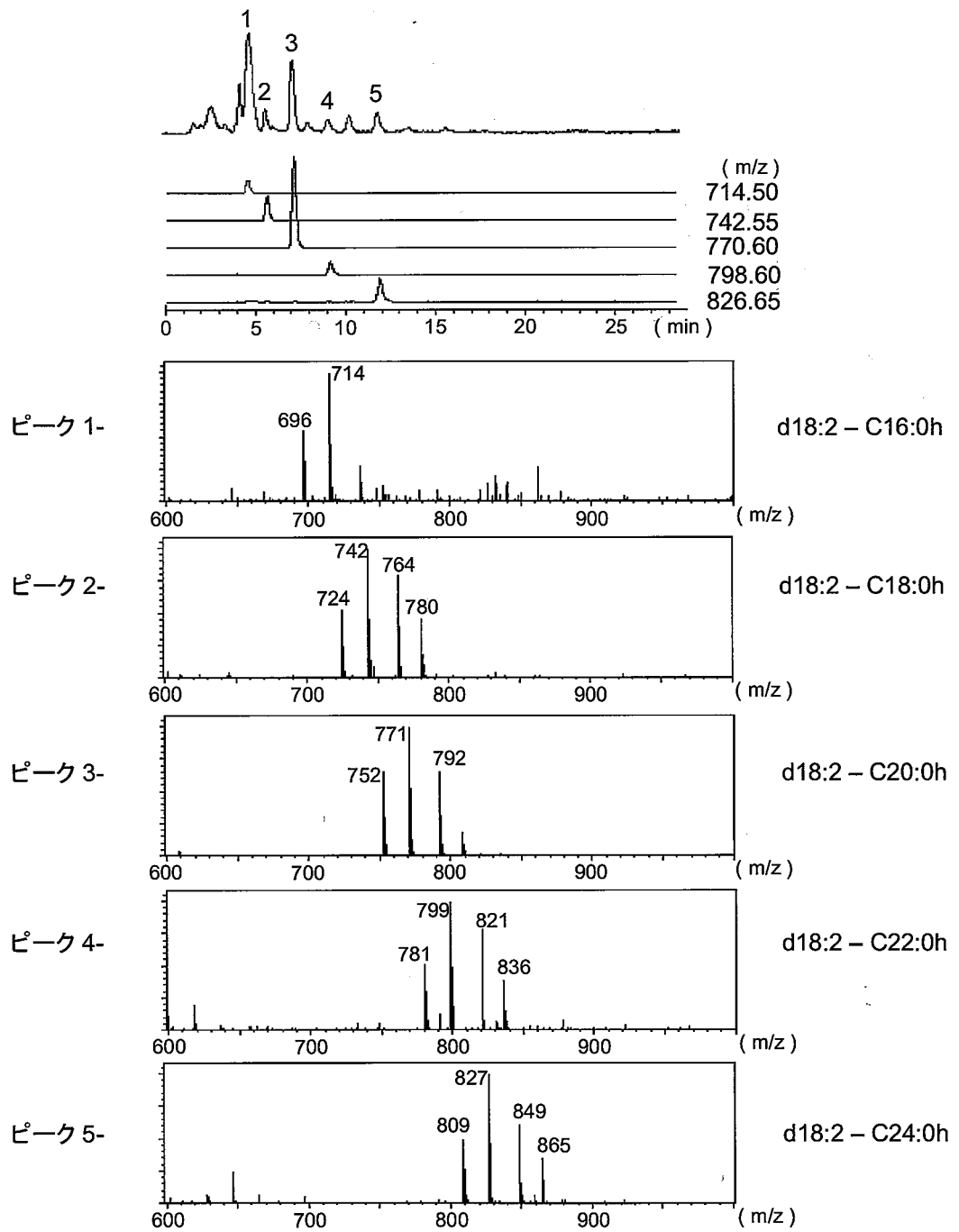


Fig. 7 植物油製造工程中の副生成物を原料に 著者らが確立した工業的製造方法によって製造されたグルコシルセラミド食品素材の LC/MS分析例 (トウモロコシ由来)

2. 食品素材としての植物スフィンゴ脂質の安定性評価

2-1 粉末製剤での温度に対する安定性

食用油に「ニップンセラミド CP」を添加して作った懸濁液を加熱処理した結果を Fig.8 (a)及び(b)に示す（各試験区 n=2）。100℃では、60 分処理で残存率 100%であったが、120 分処理では残存率が 68%（ $P<0.01$ ）と有意に減少した。140℃では 10 分処理では残存率が 98%（ $P>0.05$ ）と変化はなかったが、60 分処理では 89%（ $P<0.05$ ）と有意に減少した。また、180℃では 10 分処理で 98%（ $P>0.05$ ）と変化はなかった。これらから、粉末製剤中の GlcCer は高温（180℃）で短時間（10 分以内）の加熱処理には耐えるが、100℃程度でも長時間（120 分）の加熱処理では何らかの損傷或いは分解をうけることが判明した。しかしながら、本条件のような油中、高温、長時間加熱は、食品製造においては非常に特異なケースであり、通常の二次加工、調理、製造条件下においては粉末製剤中の GlcCer は安定であり、食品素材として問題ないと考えられる。

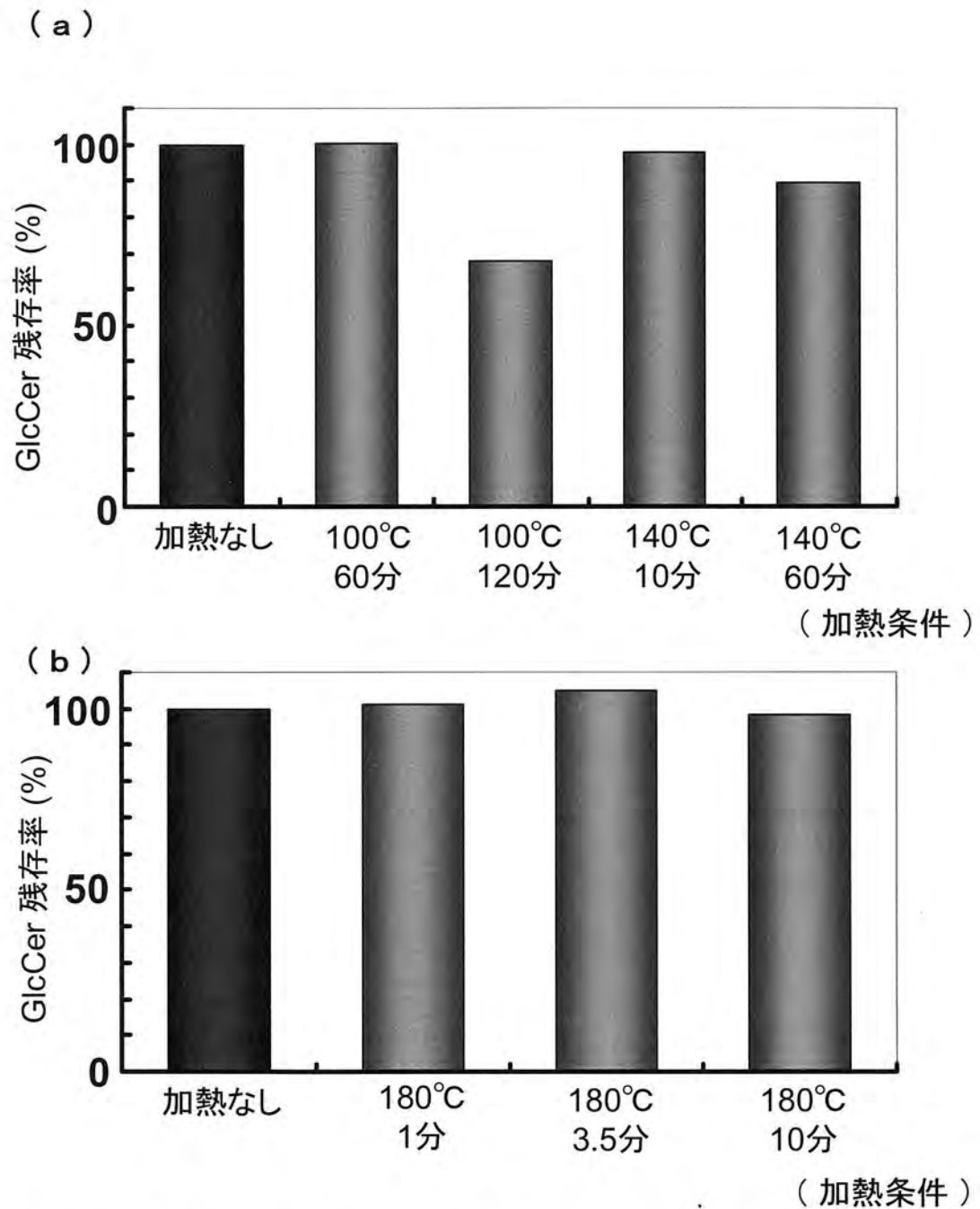


Fig. 8 「ニップンセラミドCP」粉末製剤での温度に対する安定性
(食用油中での加熱処理)

2-2 粉末製剤での経時安定性

「ニップンセラミド CP」及び「ニップンセラミド RPS」を用いて実施した粉末製剤形態での保存による GlcCer の経時安定性の試験結果を Table 3 及び Table 4 に示す（各試験区 n=2）。「ニップンセラミド CP」については、今回試験した項目において、コントロール（冷蔵保存）と比較して、長期保存試験（室温保存）39 ヶ月（今回設計した期間満了時）までは問題となる事象は確認されなかった。また、加速試験（40℃75%保存）では 6 ヶ月（室温保存の見なし 36 ヶ月分に相当⁴⁹⁾、今回設計した期間満了時）まで問題となる事象は確認されなかった。

「ニップンセラミド RPS」については、今回試験した項目において、コントロール（冷蔵保存）と比較して、長期保存試験（室温保存）50 ヶ月（今回設計した期間満了時）までは問題となる事象は確認されなかった。また、加速試験（40℃75%保存）では 6 ヶ月（室温保存の見なし 36 ヶ月分に相当⁴⁹⁾、今回設計した期間満了時）までは問題となる事象は確認されなかった。

以上の結果から、上記粉末製剤の経時安定性には問題がないと判断できることから、本製剤の賞味期限は未開封状態、常温保存下で製造後 36 ヶ月間と設定した。

Table 3 粉末製剤での経時安定性
(トウモロコシ由来GlcCer含有製品；ニッペンセラミドCP)

保存条件	性状	GlcCer 含量(%)	一般生菌数 (個/g)	大腸菌群	水分値(%)
製品規格	白色～淡黄色粉末で、 異物を認めない。 異味・異臭を認めない。	3.0 ≤	≤ 1000	陰性	≤ 12.0
初期値 (製造直後)	白色～淡黄色粉末 異物及び異味異臭なし	3.5	<300	陰性	3.4
室温保存10ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.5	実施せず	実施せず	4.5
室温保存18ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.4	<300	陰性	5.1
室温保存24ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.4	<300	陰性	5.8
室温保存36ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.5	<300	陰性	5.7
室温保存39ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.7	<300	陰性	3.7
40°C75%Rh 2ヶ月保存 (室温保存の見なし 12ヶ月相当分)	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.6	<300	陰性	4.9
40°C75%Rh 4ヶ月保存 (室温保存の見なし 24ヶ月相当分)	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.5	実施せず	実施せず	6.8
40°C75%Rh 6ヶ月保存 (室温保存の見なし 36ヶ月相当分)	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.6	実施せず	実施せず	7.2

コントロール：冷蔵保存(5°C)

性状の評価：2名以上の担当者による官能評価(目視等)による
 本製品は常温保管、常温流通の設計

**Table 4 粉末製剤での経時安定性
(コメ由来GlcCer含有製品；ニップンセラミドRPS)**

保存条件	性状	GlcCer 含量(%)	一般生菌 数 (個/g)	大腸菌 群	水分値(%)
製品規格	白色の粉末で、 異物を認めない。 異味・異臭を認めない。	6.0 ≤	≤ 1000	陰性	≤ 12.0
初期値 (製造直後)	白色粉末 異物及び異味異臭なし	6.1	<300	陰性	2.2
室温保存3ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	実施 せず	実施せず	実施せ ず	2.3
室温保存12ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	6.3	<300	陰性	3.5
室温保存24ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	6.2	<300	陰性	3.7
室温保存36ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	6.1	<300	陰性	4.9
室温保存50ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	6.1	<300	陰性	実施せず
40°C75%Rh 2ヶ月保存 (室温保存の見なし 12ヶ月相当分)	コントロールと変わらず 特に異常なし	実施 せず	<300	陰性	3.0
40°C75%Rh 4ヶ月保存 (室温保存の見なし 24ヶ月相当分)	コントロールと変わらず 特に異常なし	実施 せず	実施せず	実施せ ず	5.8
40°C75%Rh 6ヶ月保存 (室温保存の見なし 36ヶ月相当分)	コントロールと変わらず 特に異常なし	6.3	実施せず	実施せ ず	6.6

コントロール：冷蔵保存(5°C)

性状の評価：2名以上の担当者による官能評価(目視等)による

本製品は常温保管、常温流通の設計

2-3 乳化製剤中の経時安定性

「ニップンセラミド RLG」を用いて実施した乳化製剤形態での保存による GlcCer の経時安定性の試験結果を Table 5 (a)及び(b)に示す(各試験区 n=2)。今回試験した項目において、長期保存試験(冷蔵保存) 39 ヶ月(今回設計した期間満了時)までは問題となる事象は確認されなかった。また、冷蔵保存 6 ヶ月後の検体を用いた加速試験(40℃75% 保存) 5 ヶ月(室温保存の見なし 30 ヶ月分に相当⁴⁹⁾、今回設計した期間満了時)では、保存温度の上昇により乳化製剤の粘度低下と若干の過酸化物価値の変動が見られたものの、製剤中に含有される GlcCer 量に変化は確認されなかった。

以上の結果から、上記乳化製剤を当初設計した温度帯(冷蔵)で保存する場合においては経時安定性には問題がないと判断されることから、本製剤の賞味期限は未開封状態、冷蔵保存下で製造後 36 ヶ月間と設定した。

Table 5 乳化製剤での経時安定性
(コメ由来GlcCer含有製品；ニップンセラミドRLG)

(a)

保存条件	性状	GlcCer 含量(%)	一般生菌数 (個/g)	大腸菌群
製品規格	淡黄色～白色の液～ゾル状で 可視的異物を認めない。 異味・異臭を認めない。	3.0 ≤	≤ 1000	陰性
初期値 (製造直後)	淡黄色ゾル状 異物及び異味異臭なし	3.1	< 300	陰性
冷蔵保存6ヶ月	特に異常なし	2.8	実施せず	実施せず
冷蔵保存12ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.8	< 300	陰性
冷蔵保存24ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.9	実施せず	実施せず
冷蔵保存36ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.5	実施せず	実施せず
冷蔵保存39ヶ月	コントロールと変わらず 特に異常なし	3.5	< 300	陰性
冷蔵保存6ヶ月の後、 40°C75%Rh 1ヶ月保存 (室温保存の見なし6ヶ月相当分)	加温により粘度低下で液状化 それ以外は特に異常なし	実施 せず	< 300	陰性
冷蔵保存6ヶ月の後、 40°C75%Rh 3ヶ月保存 (室温保存の見なし18ヶ月相当分)	加温により粘度低下で液状化 それ以外は特に異常なし	実施 せず	実施せず	実施せず
冷蔵保存6ヶ月の後、 40°C75%Rh 5ヶ月保存 (室温保存の見なし30ヶ月相当分)	加温により粘度低下で液状化 それ以外は特に異常なし	3.0	実施せず	実施せず

(b)

保存条件	酸価	過酸化物価
冷蔵保存6ヶ月	0.5	0
冷蔵保存6ヶ月の後、 40°C75%Rh 5ヶ月保存 (室温保存の見なし30ヶ月相当分)	0.4	0.2

(酸価及び過酸化物価の測定は、基準油脂分析試験法2003年版に準じた)

コントロール：冷蔵保存(5°C)

性状の評価：2名以上の担当者による官能評価(目視等)による

本製品は冷蔵保管、冷蔵流通の設計

2-4 水分散液での温度に対する安定性

「ニップンセラミド RLG」を用いて実施した乳化製剤希釈水溶液の加熱時の GlcCer の安定性試験の結果を Fig. 9 に示す(各試験区 n=2)。100℃ 60 分及び 120 分処理では残存率が 103%及び 102%、121℃ 10 分及び 60 分処理では残存率が 104%及び 102%であり、いずれにおいても変化は見られなかった ($P>0.05$)。これらから、乳化製剤希釈水溶液中の GlcCer は高温 (121℃) で長時間 (1 時間程度) の加熱処理にも耐えることが確認された。食品の加工現場でもレトルト処理等は 120℃ 以上の温度が掛かる事があるが、多くの場合、高温処理は短時間 (数分～数 10 分) であることから、通常の二次加工、調理、製造条件下では乳化製剤希釈液中の GlcCer は安定であり、食品素材として問題ないと考えられる。

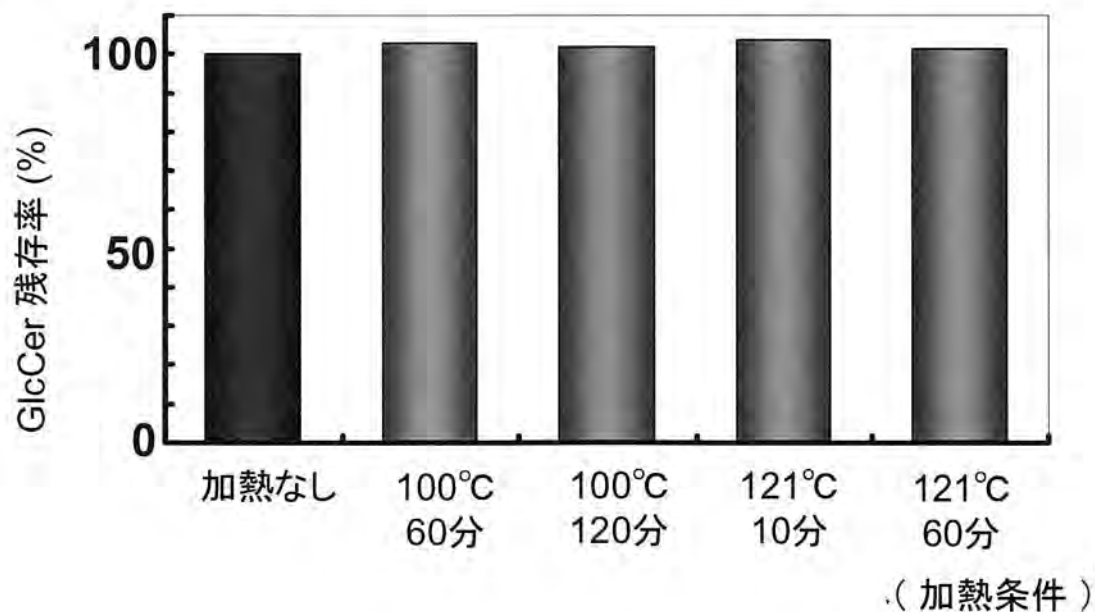


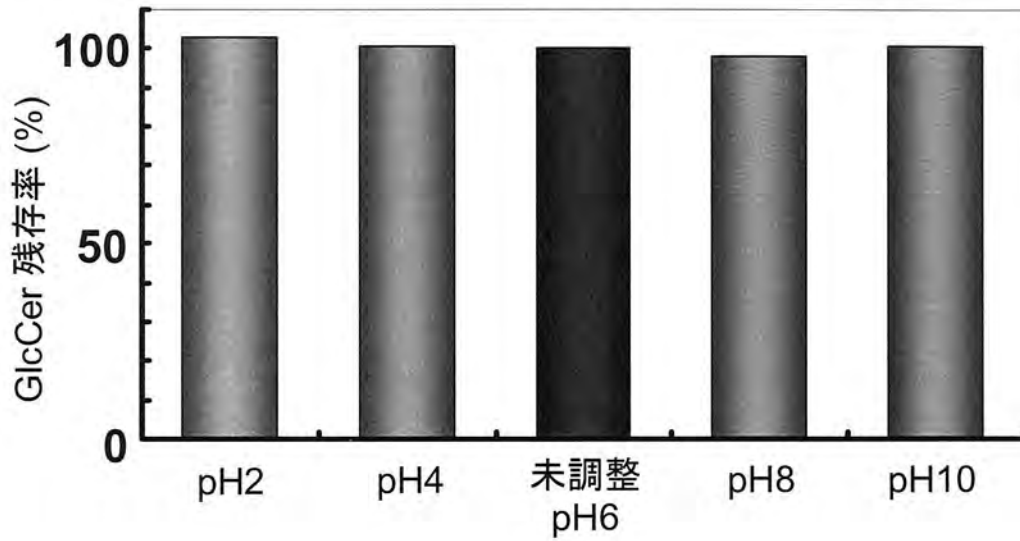
Fig. 9 「ニップンセラミドRLG」の水分散液での温度に対する安定性

2-5 水分散液での pH に対する安定性

「ニップンセラミド RLG」を用いて、乳化製剤の希釈水溶液中での GlcCer の pH 安定性試験の結果を Fig. 10 (a)及び(b)に示す（各試験区 n=2）。各 pH 調整、殺菌処理直後では、pH 未調整品を 100 とした場合の残存率は、pH2 調整液では 103%、pH4 では 101%、pH8 では 98%、pH10 では 100%であり、同様に調整、処理し加速試験（40℃75%湿度）条件下で4週間保存した液では、調整直後の pH 未調整品を 100 とした場合、保存後の未調整品（pH6）は 95%、pH2 調整液では 103%、pH4 では 100%、pH8 では 95%、pH10 では 100%であり、いずれにおいても変化は見られなかった（ $P>0.05$ ）。

これらから、乳化製剤の希釈水溶液中での GlcCer は pH 変動に対して安定であり、それらの液は室温保存の6ヶ月相当⁴⁹⁾の保存にも耐えうると判断できる。したがって、通常の二次加工、調理、製造条件下では乳化製剤希釈液中の GlcCer は安定であり、食品素材として問題ないと考えられる。

(a) 調整、加熱殺菌直後



(b) 加速試験(40°C75%Rh)4週間保存後

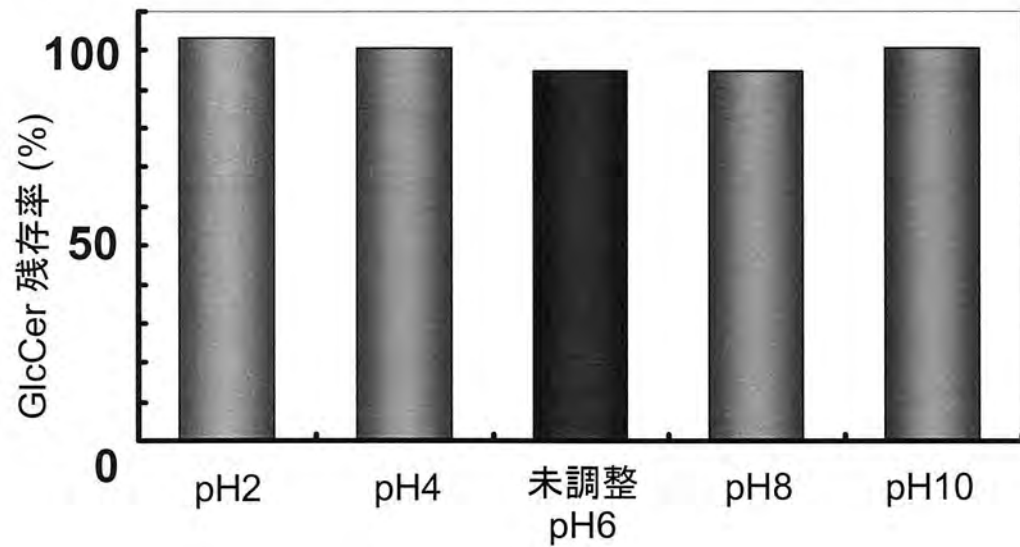


Fig. 10 「ニップンセラミドRLG」の水分散液でのpHに対する安定性

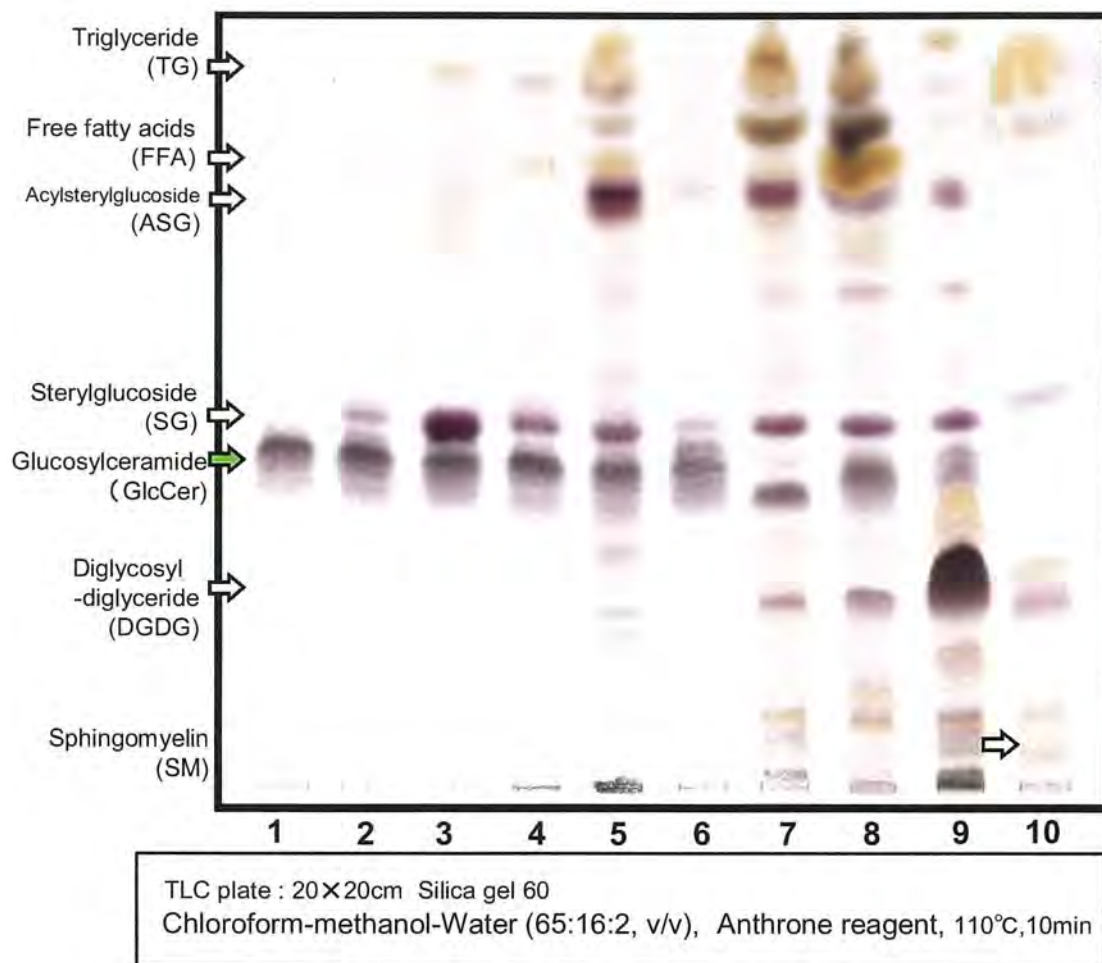
3. 上市されている食品素材としてのスフィンゴ脂質の性状

現在食品素材として市場に流通する代表的なスフィンゴ脂質製品（いずれも粉末製剤）をケイ酸薄層クロマトグラフィー（TLC）⁴⁴⁻⁴⁶に供した結果を Fig. 11 に示す。

Lane2（コメ由来；N社）及び6（トウモロコシ由来；C社）は、供試した試料の中では精製度が比較的高く GlcCer 以外には少量のステロール配糖体（SG）しか含まれていなかった。Lane2 の素材には粉末製剤の色や匂いが殆ど認められず、素材外観からも精製度の高さが観察されたが、Lane6 の素材は TLC 上では精製度が高いにも関わらず、特有の色や匂いが認められた。

Lane3（トウモロコシ由来；N社）及び4（コメ由来；A社）には GlcCer 以外に少量の遊離脂肪酸等の混入が認められ、Lane3 については SG の濃いスポットが確認された。Lane3 及び4については粉末製剤の色及び匂いは他と比べて薄く、外観からも精製度の高さが観察された。

Lane5（コメ由来；B社）、7（甜菜由来；D社）及び8（コンニャク由来；E社）は GlcCer 以外に遊離脂肪酸からリン脂質まで多彩な成分の発色が見られ、このようなパターンは由来原料からの粗抽出物と似ていることから精製度としては高くないと言える。Lane9（コムギ由来；F社）にはグリセロ糖脂質の強い発色が認められた。また、Lane5、7、8、9 は粉末製剤の外観観察でも特有で強い色や匂い、特有の風味を有していた。



- Lane 1, Rice glucosylceramide standard (長良サイエンス)
- Lane 2, コメ由来スフィンゴ脂質素材 (N社)
- Lane 3, トウモロコシ由来スフィンゴ脂質素材 (N社)
- Lane 4, コメ由来スフィンゴ脂質素材 (A社)
- Lane 5, コメ由来スフィンゴ脂質素材 (B社)
- Lane 6, トウモロコシ由来スフィンゴ脂質素材 (C社)
- Lane 7, ビート(甜菜)由来スフィンゴ脂質素材 (D社)
- Lane 8, コンニャク由来スフィンゴ脂質素材 (E社)
- Lane 9, コムギ由来スフィンゴ脂質素材 (F社)
- Lane 10, ミルク由来スフィンゴ脂質素材 (G社)

Fig. 11 食品素材として市場に流通する代表的なスフィンゴ脂質製品のケイ酸TLC

Lane10（乳由来；G社）からは GlcCer は検出されなかったが、スフィンゴミエリンが確認された。この粉末製剤は、均一で細かい粉末ではなく乾燥品の粗粉碎物と考えられ、乳特有の匂いと風味を有していた。

Table 6 及び Fig. 12~17 に各素材と由来が同じ GlcCer 標準品（長良サイエンス）と各素材から前述の処理を行って得た脂質画分の HPLC-ELSD によるスフィンゴ脂質含量の測定結果を示す。

コメ由来 GlcCer 標準品は、12.4 分付近に検出するピークがベースラインまで戻らないうちに、12.9 分付近に肩のようなピークが検出された（ピーク比率 81.7 : 18.3）。N 社及び B 社のコメを原料とした素材についても標準品と同様の時間に不完全に分離した 2 つのピークが検出され、そのピーク比率はそれぞれ 72.6 : 27.4 及び 76.1 : 23.9 であった（Fig. 12）。A 社のコメを原料とした素材については、粉末化の際に使用している賦形剤（デキストリン）の影響で、水やアルコールには比較的分散性が良いが、そこにクロロホルムを加えるとデキストリンが水飴状の固まりを生じる性質を持つため、他の素材とは異なりメーカー指定の抽出、前処理方法で HPLC-ELSD に供したところ、標準品と同様の時間に不完全に分離した 2 つのピークが検出され、そのピーク比率は 87.1 : 12.9 であった。先述の TLC ではこの素材から SG のスポットを確認しているが、HPLC-ELSD のクロマトグラムからは SG に相当するピークは極少量しか検出されていないことから、メーカー指定の方法では素材からの脂質画分の抽出効率が悪いことが推測された（Fig. 12）。このことが今回の分析値とメーカー分析値との差異にあたりと考えられる（Table 6）。

Table 6 市場に流通するスフィンゴ脂質素材中のGlcCer含量

検体名	製品中の GlcCer含量 (%) (実測値)	メーカー作成の 試験成績書記載 の含量(% (メーカー分析値)	参考	
			メーカーの 設定する GlcCer含量(% (規格値)	メーカーが 採用している 分析手法
N社 コメ由来	6.3	6.3	GlcCer 6.0%以上	HPLC-ELSD法
N社 トウモロコシ由来	3.3	3.3	GlcCer 3.0%以上	HPLC-ELSD法
A社 コメ由来	8.5	10.1	スフィンゴ糖脂質 10.0%以上	HPLC-ELSD法 ^{*2}
B社 コメ由来	3.1	3.3	スフィンゴ糖脂質 3.0%以上	HPLC-ELSD法 デンストメトリー法
C社 トウモロコシ由来	2.5	3.4	スフィンゴ糖脂質 3.0%~	デンストメトリー法
D社 ビート(甜菜)由来	4.5	3.6	GlcCer 3%以上	デンストメトリー法
E社 コンニャク由来	2.4	3.2	GlcCer 3.0%以上	HPLC-ELSD法
F社 コムギ由来	3.5	3.4	グリコシルセラミド 4±0.8% DGDG 50±10%	開示なし
G社 ミルク由来 ^{*1}	6.8	6.2	スフィンゴミエリン 5.0%以上	自社法(詳細不明)

表中(%)はすべて質量分率

*1 標準品に 乳由来スフィンゴミエリン(長良サイエンス)を使用し、製品中に含まれるスフィンゴミエリン含量を測定した。

*2 粉末製剤からの抽出、前処理方法は メーカー指定の方法に従った。
本品約50mgを精密に量り、水3mlを加えて溶かし、更にメタノール17mlを加え、超音波処理により均一な溶液とし、クロロホルムを加えて正確に50mlとし、0.45 μmのメンブランフィルターでろ過して、ろ液を検液とする。

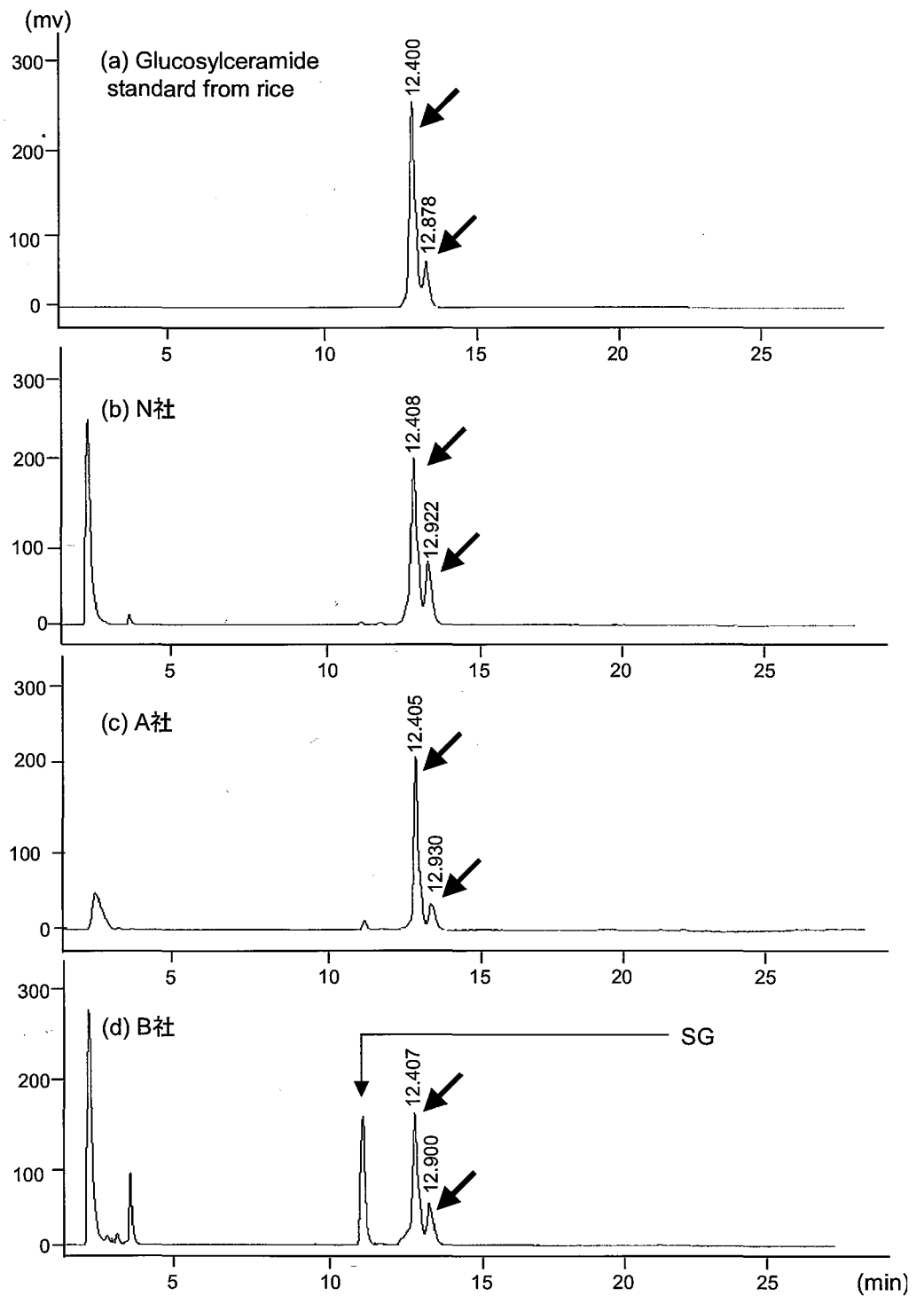


Fig. 12 市場に流通するスフィンゴ脂質素材中のHPLC-ELSDによるGlcCer定量分析(コメ由来)

トウモロコシ由来 GlcCer 標準品はコメ由来と同様に、12.5 分付近に検出するピークがベースラインまで戻らないうちに、13.0 分付近に肩のようなピークが検出された（ピーク比率 94.8 : 5.2）（Fig. 13）。N 社のトウモロコシを原料とした素材についても標準品と同様の時間に不完全に分離した 2 つのピークが検出され、そのピーク比率は 83.7 : 16.3 であった。C 社のトウモロコシを原料とした素材は 12.4 分付近を頂点とするピーク（ただし 12.2 分付近に肩を持つ）がベースラインまで戻らないうちに、12.9 分付近に肩のようなピークが検出され、そのピーク比率は 18.8 : 52.3 : 28.9 であり、使用した標準品と異なるものであったが、これは素材中に含まれる GlcCer の分子種組成（構成比）が標準品とは異なることを示すものであろう（Fig. 13）。

甜菜由来 GlcCer 標準品は 12.9 分付近に 1 つのピークとして検出された（Fig. 14）。D 社の甜菜を原料とした素材についても標準品と同様の時間に 1 つのピークを検出した。コンニャク由来 GlcCer 標準品は 12.5 分付近に検出するピークがベースラインまで戻らないうちに、13.0 分付近に肩のようなピークが検出された（ピーク比率 60.3 : 39.8）。E 社のコンニャクを原料とした素材についても標準品と同様の時間に不完全に分離した 2 つのピークが検出され、そのピーク比率は 69.9 : 30.1 であった（Fig. 15）。コムギ由来 GlcCer 標準品は 12.6 分と 12.7 分付近にほぼ同じ大きさのピークが不完全に分離し（近接して）検出された（ピーク比率 48.1 : 51.9）。F 社のコムギを原料とした素材についても標準品と同様の時間に不完全に分離した 2 つのピークが検出され、そのピーク比率は 51.0 : 49.0 であった（Fig. 16）。

乳由来 SM 標準品は 26.3 分付近に検出するピークがベースラインま

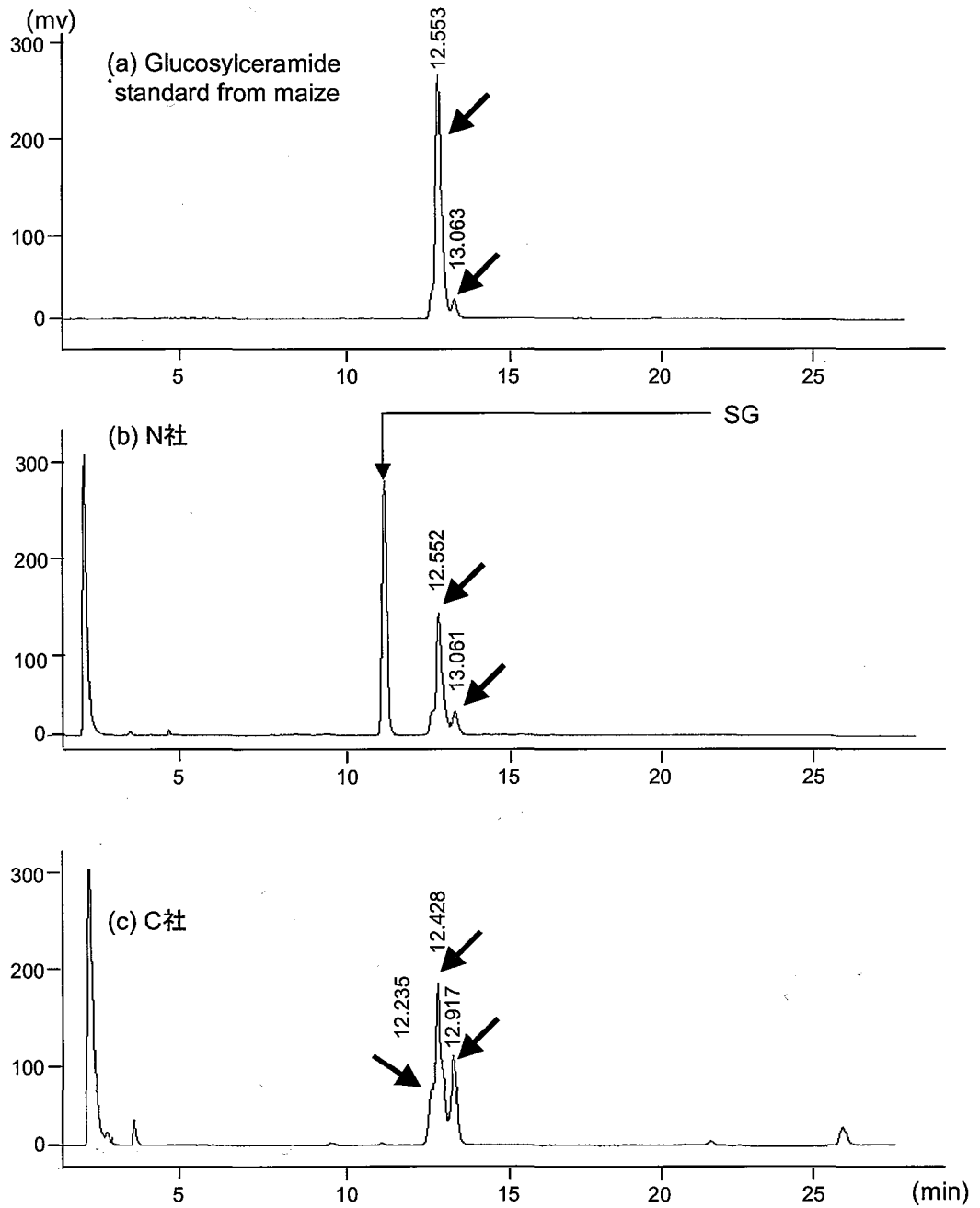


Fig. 13 市場に流通するスフィンゴ脂質素材中のHPLC-ELSDによるGlcCer定量分析(トウモロコシ由来)

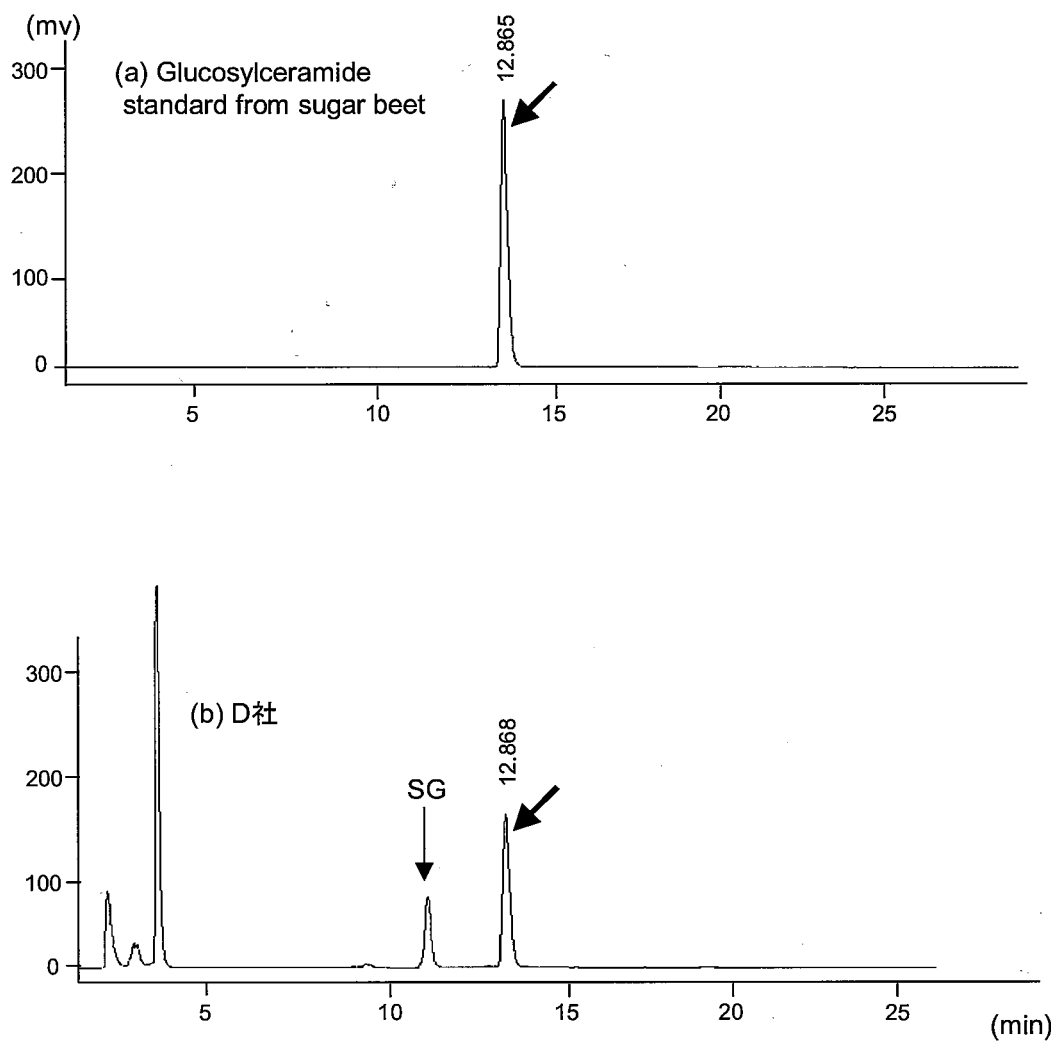


Fig. 14 市場に流通するスフィンゴ脂質素材中のHPLC-ELSDによるGlcCer定量分析(ビート(甜菜)由来)

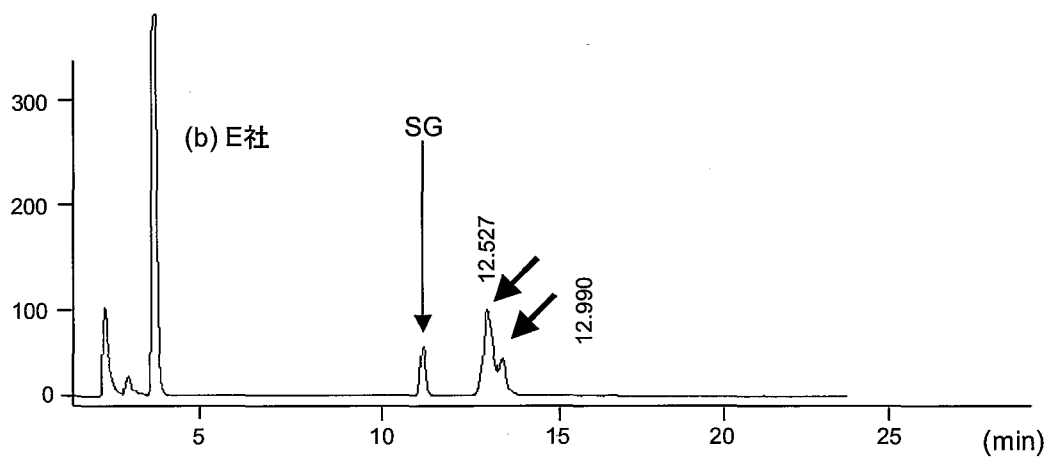
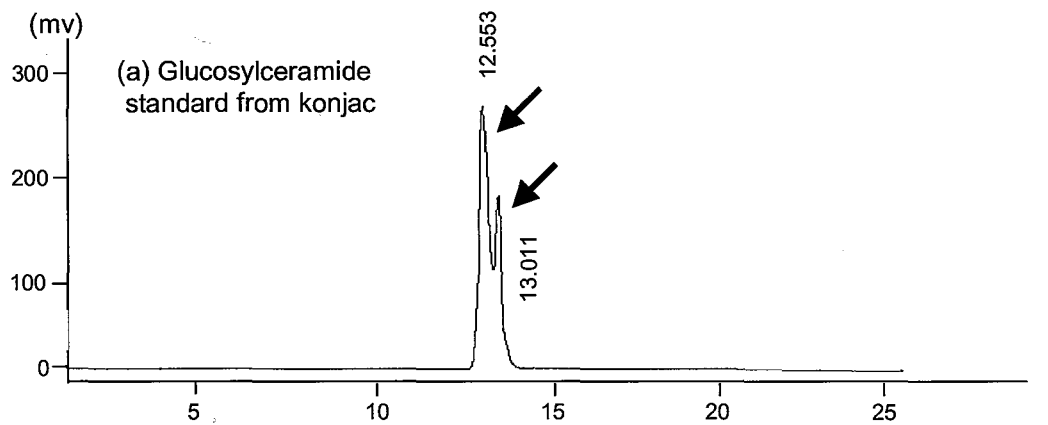


Fig. 15 市場に流通するスフィンゴ脂質素材中のHPLC-ELSDによるGlcCer定量分析(コンニャク由来)

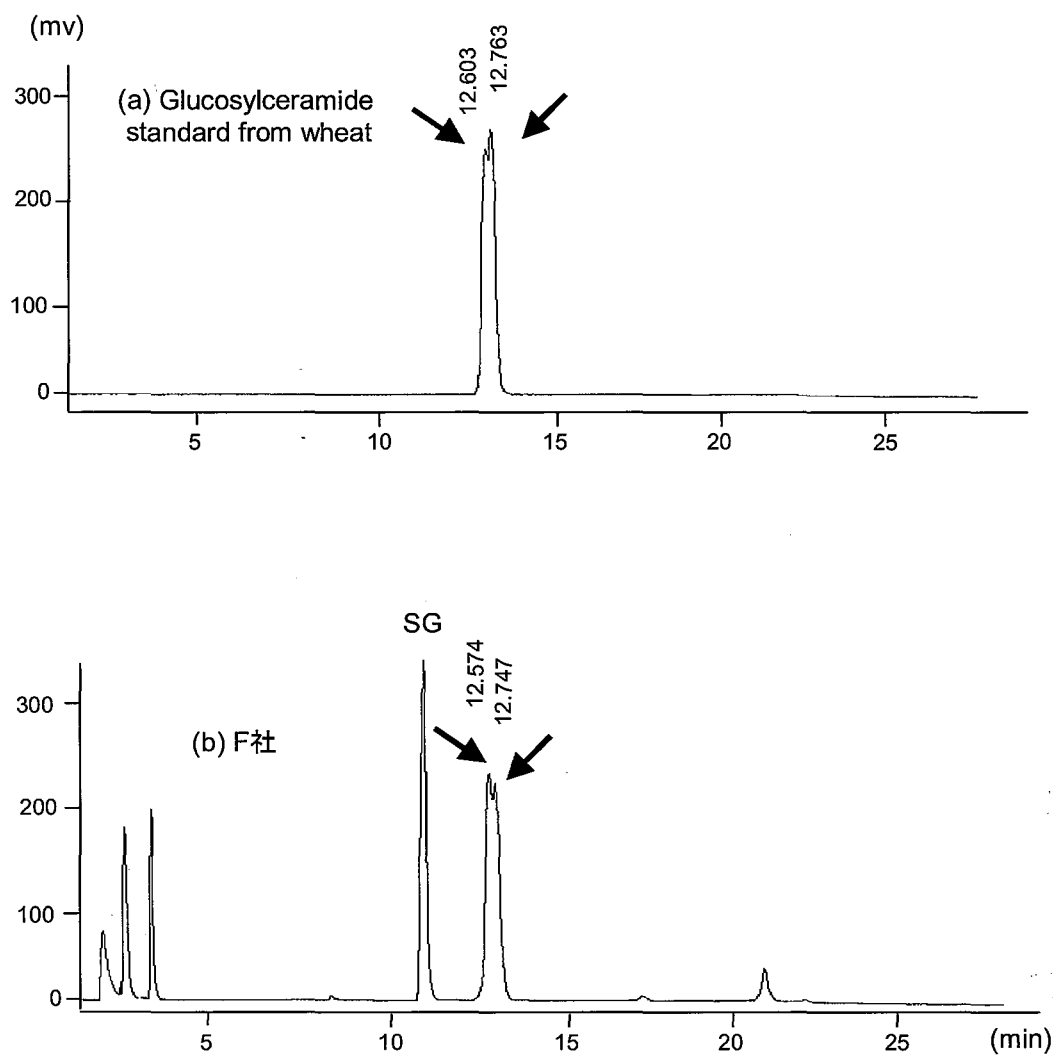


Fig. 16 市場に流通するスフィンゴ脂質素材中のHPLC-ELSDによるGlcCer定量分析(コムギ由来)

で戻らないうちに、26.7分付近に肩のようなピークが検出された（ピーク比率 80.0 : 20.0）（Fig. 17）。G社の生乳を原料とした素材についても標準品と同様の時間に不完全に分離した2つのピークが検出され、そのピーク比率は79.7 : 20.3であった。

上述したように、HPLC-ELSDによるGlcCerの定量分析において、今回観察された由来原料や製造メーカーの違いによるピークの検出時間や分離状態の違いは、含有されるGlcCerの分子種やその構成比率の違いに由来するものと考えられる¹⁻⁴⁾。また、同じ由来原料でも素材化されるまでの工程（原料からの抽出から製品製造まで）で原料に含まれるGlcCer分子種の構成比率に変化が生じる可能性が示された。

考 察

植物を原料としたスフィンゴ脂質（GlcCer）は、経口摂取することで皮膚に対して保湿効果を付与することが期待できる機能性素材として、2000年以降、知名度と出荷量を徐々に上げ、現在では日本国内に10社以上の製造・販売メーカーが林立するに至っている^{3,32-35)}。なお、経口摂取による皮膚保湿効果についてはIV章で記述する。

本研究において、食品素材として、コメ及びトウモロコシを原料に比較的高度かつ工業的に精製、製造された植物スフィンゴ脂質（GlcCer）濃縮画分（GlcCer含量50%以上）を使った製品（粉末製剤及び乳化製剤）の保存（経時）安定性、加熱に対する安定性、pHの変化に対する安定性について検討した。今回の条件では、食品素材として工業的に製造された素材中のGlcCerには大きな損傷や変化は

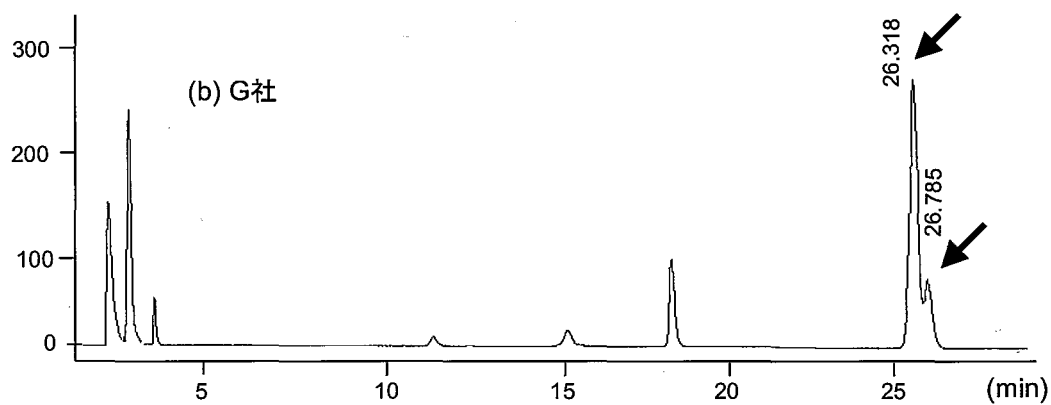
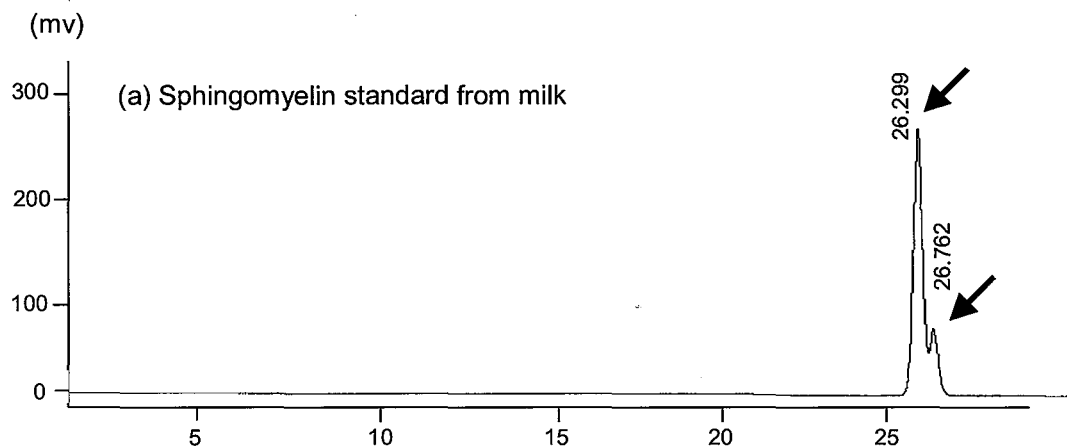


Fig. 17 市場に流通するスフィンゴ脂質素材中のHPLC-ELSDによるSphingomyelin定量分析(乳由来)

認められず、食品の二次加工や調理、製造で想定される利用範囲では問題がないと判断された。このように、製品の賞味期限を設計した温度条件（常温或いは冷蔵）下、未開封、遮光状態で製造後3年と設定する上での科学的根拠を提示することができた。しかし、実際の食品製造シーンでは GlcCer 素材以外に様々な食品素材が同時配合、混合され「想定外」の処理や保管がされる場合も予想されるので、それらの組み合わせや条件によっては素材単独では安定な GlcCer に何らかの影響を与える可能性も考えられる。従って、今後、今回の設定条件以上に過酷な状況や製品設計外の保管条件、或いは紫外線露光状態での品質劣化や有害物質生成の有無の確認を行ない、食品素材としての更なる安全、安心を担保する知見を得ることも重要であろう。

今回、代表的な GlcCer 素材を市場から買い集め、TLC と HPLC-ELSD 分析に供してそれらの精製度や性状を比較した。乳由来を除く全ての商品が製品規格として「スフィンゴ糖脂質または GlcCer 含量」を設定（保証）していたことから、これらは“GlcCer 供給素材”と言い換えることもできるが、今回の TLC の結果から観察された GlcCer 供給素材としての品質（GlcCer の純度、夾雑物の有無）と、その販売価格（メーカー設定価格、Table 2）には関係は見られず、必ずしも精製度が高いと高価、精製度が低ければ安価という構図ではないことが明らかとなった。また、HPLC-ELSD による定量分析では、各商品に添付された試験成績書（各メーカーが発行）記載の値と一部異なる値を得た（Table 6）。各製品の詳細な製造法は現段階では開示されていないため推測の域を出ないが、このような製品を製造する際には、“ある程度濃縮された画分を、粉末化基材を用いて各製品規格として設定した

GlcCer 含有量に合致するように希釈して製剤化する”という手法が一般的に用いられることが多く、それを適用している場合には粉末化の次工程での混合を徹底しないと粉末中に GlcCer の偏り（不均一）が生じている可能性が考えられる。また、今回調査した 8 社 9 品目では、GlcCer 含量分析方法として、HPLC-ELSD 法のみ採用が 3 社、デンストメトリー法のみ採用が 2 社、両法採用が 1 社、不明（情報なし）が 2 社であった（Table 6）。今回の著者らの定量分析値とメーカー発行の試験成績書記載の値との差は、デンストメトリー法のみ採用の 2 社及び HPLC-ELSD 法のみ採用の 1 社で認められた。一般に、分析方法が異なれば得られる値が異なることはあり得るが、これらの商品は高額であり、購入者（消費者）は含有される GlcCer に対して代金を支払っていると考えれば、製品（粉末）不均一の可能性も含めて、これらは過小評価されるべきではないと考える。早急に、統一した分析法が広く採用され、正しく運用されることが望まれる。なお、GlcCer 分析法についてはⅢ章で記述する。

一方、先述の TLC による市場流通品の比較では、今回買い集めた製品間で品質（GlcCer の純度や夾雑物の有無）に差異が認められたが、製品中に遊離脂肪酸やリン脂質等が多く混入する場合、GlcCer 自体は安定でも夾雑する物質の酸化や劣化等の影響が危惧される。今回、TLC (Fig.11) 上で TG や FFA の混入が目立って観察された素材（Lane 5, 7, 8, 10）について基準油脂分析試験法（日本油化学会編）に基づき、素材中に含有される油脂成分の劣化の指標として酸価（AV）及び過酸化物価（POV）を測定した。それぞれ（Lane 5, 7, 8, 10）の素材からの抽出油の値は AV が 21.4、19.7、80.6、17.2 であり、POV (meq/kg

)が2.9、80.6、28.3、0.7であり、先述の各素材の外観観察で挙げられた強い匂いや風味とも符号することが確認された。食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）」では、今回のような機能性食品素材についての記載は直接的にはないものの、例えば「菓子指導要領（昭和52年11月16日環食第248号）」では、「その製品に含まれる油脂の酸価が3を超え、かつ過酸化物価が30を超えるものであってはならない」或いは「酸価が5を超え、又は過酸化物価が50を越えるものであってはならない」とされており、また「弁当及びそうざいの衛生規範（総和54年6月29日環食第161号）」では、「油脂は酸価1以下、過酸化物価10以下に適合するものを原材料として使用すること」とされているが、今回測定した4素材は、これらの値から外れていることが確認された。

機能性食品素材は、様々な状態の人が健康や美しさを求めて、微量でも毎日継続摂取されるという特徴を持つため、有効成分の含有量だけでなくそれ以外の物質（いわゆる夾雑物など）にも注目することが必要であろう。即ち、夾雑物が有効成分の期待される効果の発現のしやすさ、効果の強弱にも影響を及ぼす可能性が考えられ、そのことは食品としての安全性の面でも検討すべき課題であろう。

結 語

工業的に生産する食品素材原料としてのスフィンゴ脂質の供給源として、筆者らは原料候補とする植物の種属には拘らず探索した結果、植物油製造工程中の副生成物（コメ及びトウモロコシ油の油滓）に比

較的条件を満たすことが可能な原料を見出した。種々条件検討を繰り返して、比較的高濃度に濃縮された GlcCer 画分 (GlcCer 含量 50%以上) を大量に安定的に製造する方法を確立し、食品素材として賦形剤 (粉末化担体) にシクロデキストリンを用いて粉末製剤化し、或いは乳化剤を用いて乳化製剤の形態に仕上げ、それぞれを機能性食品素材として上市した。

本章では、食品素材として工業的に製造された植物スフィンゴ脂質 (GlcCer) 濃縮画分の保存 (経時) 及び熱或いは pH に対する安定性を検討したところ、素材中の GlcCer には大きな損傷や変化は認められなかった。このことから、食品の二次加工で想定される範囲では問題がないと判断し、製品の賞味期限を製造後 3 年と設定した。

また、市場の現状を把握するため流通品を入手し、TLC や HPLC-ELSD に供してそれらの精製度や性状を比較したところ、GlcCer 供給素材としての品質 (GlcCer の純度、夾雑物の有無) に差異が認められた。また、夾雑物の程度と販売価格 (メーカー設定価格) との間には関係が見られなかった。HPLC-ELSD による定量分析では、各メーカーが担保する含有量と一部異なる値が得られた。この理由としては、素材中の GlcCer 含量の分析方法が統一されていないことによると考えられる。また、機能性食品素材中の夾雑物は有効成分の効果発現に影響することが推測されるので、機能性成分の含有量だけでなく、今後は品質 (純度、夾雑物) も考慮すべきであろう。

Ⅲ. 植物スフィンゴ脂質素材の定量分析法に関する単一試験室による妥当性確認

植物GlcCerは、細胞膜や液胞膜を構築する主要な脂質成分として両膜が関わる生物現象に深く関与することが示唆されているが、一方、経口摂取した場合には様々な食品機能性が期待できることが明らかになってきている^{3-4,51-61)}。特に2000年以降、美容分野へのニーズの高まりと共に、これを配合したサプリメントに代表される健康食品や一般食品、飲料などに機能性食品素材として広く利用、販売されている^{3,32-35)}。現在、工業レベルで生産されている植物GlcCerの原料は、トウモロコシ、コメ、コムギ、コンニャク、ダイズ、食用キノコ類、ビート（甜菜）等、多種多様であり、機能性食品素材としてはGlcCerを2~20%（質量分率）含有すると表示された製品が上市されている³²⁻³⁵⁾。このように各種起源の植物性GlcCer素材の利用が進むと、その製品の品質を保証する上でこれらのGlcCer濃度を正確に把握する必要性が出てくる。植物GlcCer素材中のGlcCer分析法に関しては、先に鹿島らがコムギ抽出物について蒸発光散乱検出器付き高性能液体クロマトグラフィー（HPLC-ELSD）による分析法を報告しているが⁴⁷⁾、標準品として入手可能な高純度品が試薬として市販されていなかったため、この分析法が広く利用されるには至っていない。本研究では、マトリックスの拡張を目的に、コムギで開発された既報のHPLC-ELSD分析条件のプロトコル⁴⁷⁾について最近市販された植物（トウモロコシ及びコメ）由来の単離精製GlcCerを標準品とし

て使用して、ICHのガイドラインⁱ⁾、AOACの単一試験室による妥当性確認のガイドラインⁱⁱ⁾、IUPACの単一試験室による妥当性確認及び回収率ガイドライン⁶²⁻⁶³⁾に基づき、単一試験室による妥当性確認を行った。

実験方法

1. 試薬

実験に使用した試薬や溶媒は、全て市販の特級品あるいはHPLCグレードのものを用いた。GlcCer標準品としては、長良サイエンス製のトウモロコシ及びコメ由来のGlcCer（純度 \geq 99%TLC）を用いた。

2. 標準溶液の調製

GlcCer標準品 50.0mg を秤量後、クロロホルム／メタノール混液（2：1, vol／vol）に溶解し正確に 20ml として標準溶液とした。これを適宜希釈した後、内標準物質として 3mmol／L 飽和型ホスファチジルエタノールアミン（PE, Dipalmitoyl タイプ, 和光純薬製）を正確に一定量加えた溶液を調製し、GlcCer 量として 2.0～12.0 μ g を HPLC-ELSD に供した。

3. 植物スフィンゴ脂質含有食品素材からの検液の調製

市販のトウモロコシ及びコメ由来の各 GlcCer 素材（日本製粉製、賦形剤としてシクロデキストリンを使用）ならびに GlcCer

を含まない賦形剤のみからなるプラセボについて、各 1g をクロロホルム／メタノール (2 : 1, vol / vol) を用いて加熱還流抽出 (6 時間) を行い、抽出液をロータリーエバポレーターによって減圧下で留去、乾固した。得られた脂質抽出物を精秤後、クロロホルム／メタノール (2 : 1, vol / vol) に再溶解し、これに適量の内標準溶液を混合してから HPLC-ELSD に供した。

4. HPLC-ELSD 分析

HPLC装置には島津製LC-10AD型を用い、これにELSDとしてポリマーラボラトリー製PL-ELS2100型 (システム I) あるいは同社製PL-ELS1000型 (システム II) をそれぞれ接続して分析した⁴⁷⁻⁴⁸⁾。既報では検出器の可変パラメータとして、ドリフトチューブ温度85℃、ガス流量3.2SLPMに設定したとされているが⁴⁷⁾、本試験ではネブライザー温度40℃、エバポレーター温度70℃、圧縮空気流圧1.0SLMに設定して行った⁴⁸⁾。なお、本試験の両検出器の主な違いは、光源ランプがLEDとタングステン、検出部分がフォトマルチプライヤーとフォトダイオードである点であった⁴⁸⁾。分析カラムにはいずれの場合も既報と同じGLサイエンス製Inertsil Sil 100-5 (内径4.6mm、長さ150mm) を用い⁴⁷⁻⁴⁸⁾、それを既報では35℃設定のところを⁴⁷⁾、より安定化させるため40℃に保温して分析した⁴⁸⁾。溶出液には既報と同様にクロロホルムとメタノール／水 (95 : 5, vol / vol) の両液の2液によるグラジエントを用いたが⁴⁷⁻⁴⁸⁾、連続分析でも安定した値が得られるようTable 7 に記載した混合比に改変して用いた⁴⁸⁾。

Table 7 HPLC 移動相のグラジエント条件

時間 (min)	Solvent (%)	
	A	B
0	9	1
1	7	2
2	1	9
2	0	10
2	0	10
26.0	9	1
3	9	1

Solvents: (A)chloroform: (B)methanol-water (95:5. vol

5. 分析能パラメータ

5-1 選択性 (Selectivity)

市販 GlcCer 食品素材およびそのプラセボからの脂質抽出物、植物由来 GlcCer 標準品、GlcCer 食品素材中に夾雑するステリルグルコシド (SG, 大豆由来, フナコシ製) および PE について、それぞれ単体及び混合溶液を HPLC-ELSD に供し、それらのピーク分離度については第十六改正日本薬局方 一般試験法 液体クロマトグラフィーに規定されている完全分離 1.5 以上を、HPLC のピーク分離度の基準として選択性を確認したⁱⁱⁱ⁾。

5-2 直線性 (Linearity)

既報に基づき⁴⁷⁻⁴⁸⁾、GlcCerとして2.0~12.0 μ gの各濃度の検量線標準溶液を5点用いて、各濃度で3反復したときの検出器応答の直線性について検討した。

5-3 真度 (回収率) (Trueness (Recovery))

GlcCer食品素材の賦形剤として使用されているシクロデキストリンに植物由来GlcCer標準品を添加して回収試験を行った。本試験では、ガイドラインを参考にⁱ⁾、現在市販されているGlcCer食品素材のメーカーにより製品規格として自主表示されている、一般的なGlcCer濃度である3%(質量分率)を100%濃度と設定し、異なる3濃度(30%、60%、120%濃度)を調製した。これら3濃度の回収率については、すべて同一日に併行条件下で3反復測定

し、真度を求めた。

5 - 4 併行精度 (Repeatability precision) 及び室内再現精度 (Intermediate precision)

トウモロコシ及びコメ由来 GlcCer 標準品をそれぞれ試料に用い、分析結果に影響を与える試験室内の主な変動要因として試験日 (6日)、試験者 (2名)、検出器 (システム I と II)、使用頻度の異なるカラム (2本) を取り上げ、試験日に他の要因をランダムに割り付け、各試験日に 2 反復測定の実験を行って併行精度と室内再現精度を求めた。

6. 統計処理

真度 (回収率) については、3濃度3反復測定した回収率データを一元配置分散分析で解析し、平均回収率とその95%信頼区間を求めた。併行精度及び室内再現精度については、基準品を6日間に各2反復測定したデータを一元配置分散分析で解析し、併行標準偏差、併行相対標準偏差、室内再現標準偏差、室内再現相対標準偏差を求めた。検量線の累乗関数 $y=a \cdot x^b$ については、5検量線標準を各3反復した値 y と濃度 x を対数変換したデータに $\log y = \log a + b \cdot \log x$ の式を当てはめ、単回帰分析を用いてパラメータ a と b を求めた。データ解析にはExcel統計2004 (社会情報サービス製) を用いた。

実験結果

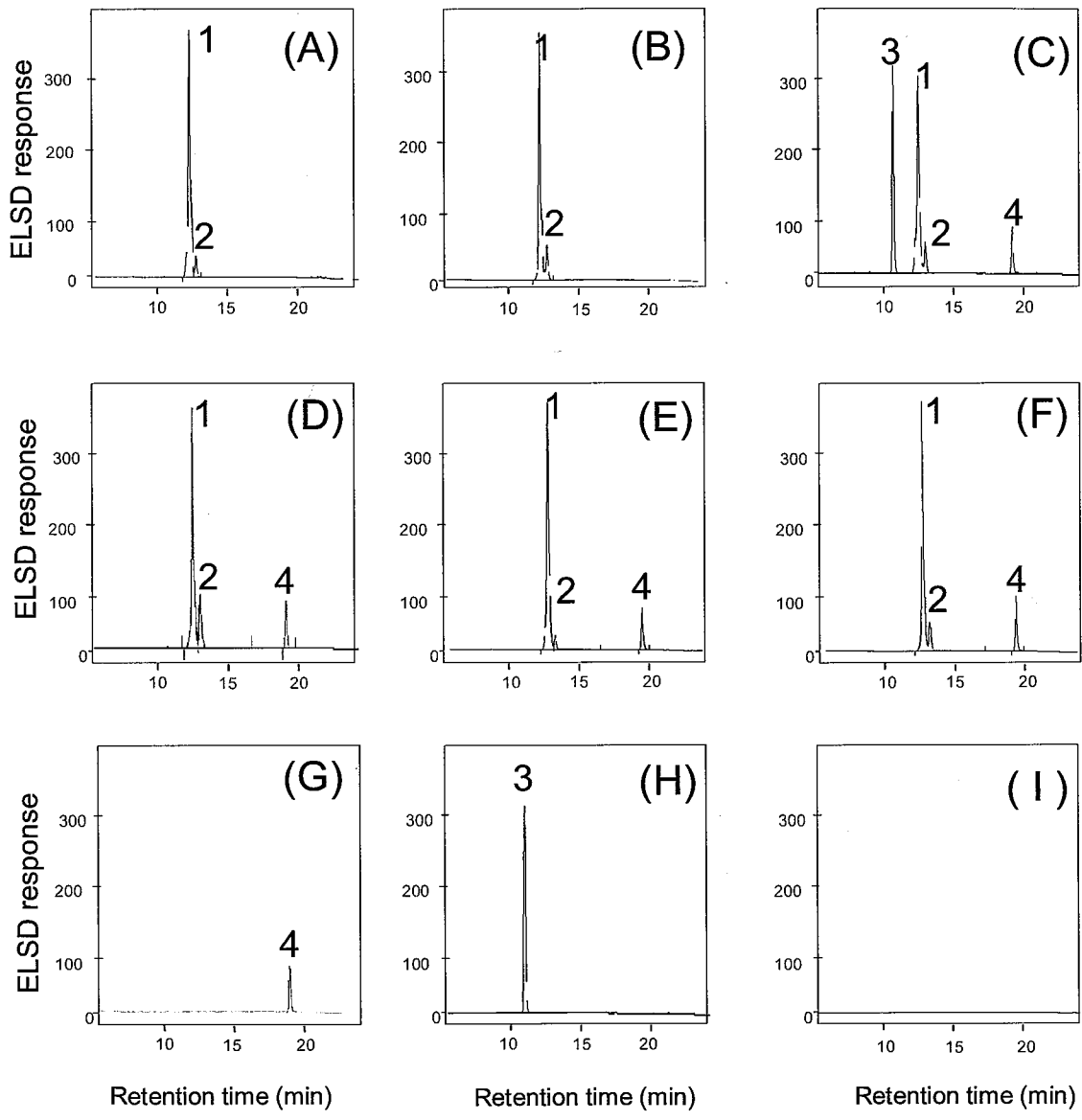
1. 選択性

トウモロコシおよびコメ由来のGlcCer標準品単体及び両成分を含有する食品素材からの脂質抽出物(内標準物質のPEを含む)、SG標準品ならびにそれらの混合物をHPLCに供した結果をFig. 18に示す。

両GlcCer標準品はいずれも2つのピーク(ピーク1と2)に分離されたが、GlcCer及びGlcCer食品素材に夾雑物として存在するSG(ピーク3)ならびに内標準物質のPE(ピーク4)はそれぞれカラムから分離して溶出された。これらの成分の分離は、HPLCのピークの判断基準ⁱⁱⁱ⁾から、ピーク3とピーク1は分離度2.0に、ピーク1とピーク4は分離度6.7となり、十分な選択性があることが確認された。なお、賦形剤のみからの脂質抽出物の場合(Fig. 18の(I)のクロマトグラム)はGlcCerとSGの両成分に由来するピークはまったく検出されなかった。また、溶出液のグラジエント条件を既報⁴⁷⁾からTable 7に改変した結果、分離が良くなるとともに、連続分析でも安定した値が得られるようになった⁴⁸⁾。

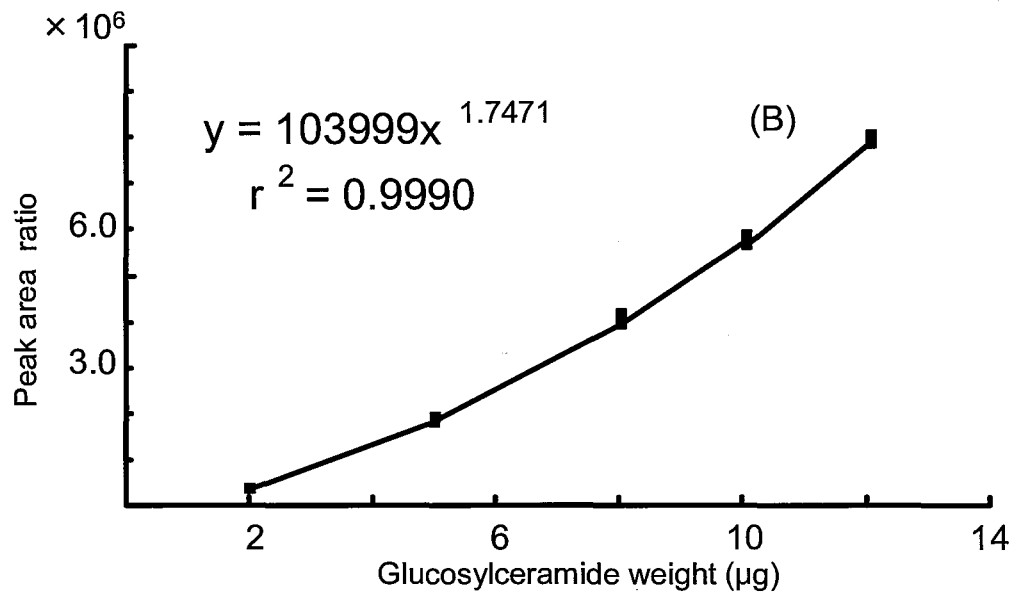
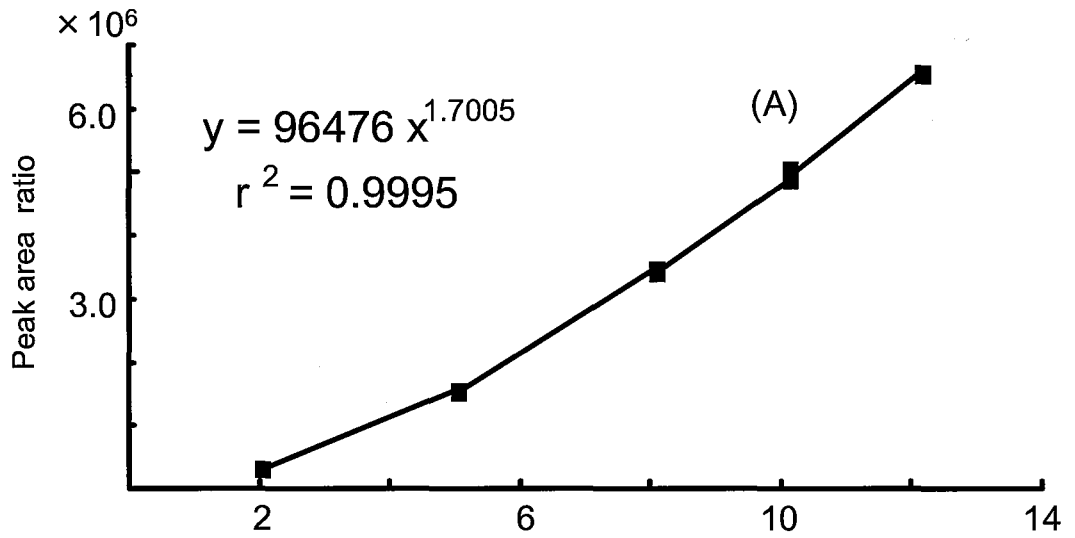
2. 直線性

既報⁴⁷⁾を基に、トウモロコシ及びコメ由来GlcCer標準品を2.0 μ gから12.0 μ gの範囲でHPLCに供し、分析(注入)量(x)とピーク面積(y)との関係を累乗関数($y = ax^b$)で近似したところ、Fig. 19に示すように両GlcCerとも作成した検量線はデータに



- (A) Glucosylceramide standard (トウモロコシ由来)
- (B) Glucosylceramide standard (コメ由来)
- (C) 及び (D) 食品素材から抽出した脂質画分
- (E) 及び (F) Glucosylceramide standard と PE
- (G) 内標準物質 (PE: L- α -phosphatidylethanolamine, dipalmitoyl (和光純薬))
- (H) Sterylglucoside (大豆由来)
- (I) シクロデキストリンから抽出した脂質画分

Fig. 18 HPLC-ELSD によるクロマトグラム



- (A) Glucosylceramide standard (トウモロコシ由来)
 (B) Glucosylceramide standard (コメ由来)

Fig. 19 HPLC-ELSD による検量線

よく適合することが確認できた⁴⁸⁾。

また、 x と y の値を対数変換したデータに $\log y = \log a + b \cdot \log x$ の式を当てはめ、単回帰分析を用いてパラメータ a と b を求め、この直線性の結果から、定量限界濃度 (QL) と検出限界濃度 (DL) を算出したところ^り、トウモロコシ由来については、QLが $0.09\mu\text{g}/\text{注入量}(20\mu\text{L})$ 、DLが $0.03\mu\text{g}/\text{注入量}(20\mu\text{L})$ であった。コメ由来については、QLが $0.12\mu\text{g}/\text{注入量}(20\mu\text{L})$ 、DLが $0.04\mu\text{g}/\text{注入量}(20\mu\text{L})$ であった。なお、トウモロコシ由来とコメ由来の検量線 $\log y = \log a + b \cdot \log x$ の傾きと切片には、共分散分析の結果、有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

3. 真度

トウモロコシとコメ由来GlcCer標準品を用い、添加量の異なる各試料におけるGlcCerの回収率を算出して本分析法の真度を検討した結果をTable 8に示す。なお、本試験では標準品を用いたため、試料の均質性確認試験は省略した。

トウモロコシ由来GlcCer標準品については、30%、60%及び120%濃度に相当する、1%、2%及び4%(質量分率)の各添加量における繰り返し分析 ($n=3$) では、平均回収率は100.1%、95%信頼区間が96.2~104.0%であった。また、コメ由来GlcCerについては、平均回収率は100.7%で、95%信頼区間は98.7~102.8%であった。このように、本試験での回収率は、ガイドラインⁱⁱ⁾の濃度1%(質量分率)の回収率許容範囲(92~105%)から、いずれも良好であると判断された。

Table 8 GlcCerの回収率（真度）

添加量 (%) (質量分率)	回収率 (%)	
	Maize	Rice
1.0	109.1	103.8
	98.6	100.8
	96.6	98.5
2.0	104.7	99.2
	97.6	102.8
	97.4	96.2
4.0	97.0	101.0
	101.5	101.1
	98.4	103.2
平均回収率 (%)	100.1	100.7
回収率の信頼区間 (95%)	96.2 ~ 104.0	98.7 ~ 102.8

4. 併行精度及び室内再現精度

トウモロコシ由来GlcCer標準品で実施した併行精度についてTable 9に示す。併行標準偏差(S_r)0.04、併行相対標準偏差(RSD_r)1.2%、室内再現精度については、室内再現標準偏差(S_{IM})0.06、室内再現相対標準偏差(RSD_{IM})1.8%であった。コメ由来GlcCerで実施した併行精度については、 S_r が0.08、 RSD_r が1.2%、室内再現精度については、 S_{IM} が0.15、 RSD_{IM} が2.4%であった(Table 9)。

併行精度(RSD_r)については、ガイドラインⁱⁱ⁾の受入基準からHorRatが2以下の場合に受入可能と判断すると、それぞれの受入許容範囲はトウモロコシ由来では<3.3%、コメ由来では<3.0%となり、いずれも良好と判断された。また、室内精度(RSD_{IM})については、受入可能の目安をHorwitzの式で求めた室間再現精度の1/1.6以下^{iv)}として同様に計算したところ、それぞれの受入許容範囲はトウモロコシ由来では<4.2%、コメ由来では<3.8%となり、いずれも良好と判断された。

以上の結果から、市販の機能性食品素材中のGlcCerをHPLC-ELSD法で定量分析することについては、コムギで開発された既報のHPLC-ELSD分析条件のプロトコル⁴⁷⁾は異なるマトリックスにも適用が可能であることが確認された⁴⁸⁾。

Table 9 併行精度及び室内再現精度

日		1	2	3	4	5	6	
分析者		P1	P2	P1	P2	P1	P2	
システム*		I	II	I	I	II	II	
カラム**		New	Old	Old	New	Old	New	
濃度(%) (質量分率)		分析値 (%) (質量分率)						
Maize	3.3	1	3.4	3.2	3.2	3.2	3.3	3.2
		2	3.3	3.3	3.2	3.3	3.3	3.2
Rice	6.2	1	6.2	6.3	6.3	6.5	6.3	6.2
		2	6.2	6.4	6.1	6.6	6.3	6.1
					Maize	Rice		
併行標準偏差 (S_r)					0.04	0.08		
併行相対標準偏差(RSD_r %)					1.2	1.2		
室内再現標準偏差(S_{IM})					0.06	0.15		
室内再現相対標準偏差(RSD_{IM} %)					1.8	2.4		

* システム I と II は別々の検出器を使用。

** カラムについては 'New' は分析回数が100回以下のカラム、'Old' は1000回以上インジェクションしたカラムとした。

考 察

今回、試験に供したトウモロコシとコメでは、GlcCer分子種のスフィンゴイド塩基や脂肪酸の構成比率が似ている⁶⁴⁾ため、本条件でのピーク形状や保持時間はほぼ等しく、またそれぞれのGlcCer標準品で作成した検量線 $\log y = \log a + b \cdot \log x$ の傾きと切片には有意差は認めらなかったことから、これらは相互に利用が可能であると考えられる。しかし、上記構成比がトウモロコシやコメと異なる植物（たとえばコムギ、コンニャク、ダイズ、キノコ等）^{1-4,65)}についてはピーク形状や保持時間がトウモロコシやコメのそれとは異なる（第Ⅱ章に記載）。本研究での結果と、既報⁴⁷⁾でコムギを用いたプロトコルの妥当性確認がされていることを考えると、それぞれの由来原料に対応した、すなわちマトリックスと一致する標準品を用いて検量線を作成することで、本法はトウモロコシ、コメ、コムギ以外の他のマトリックスへの拡張も可能であることが示唆される。今後は本試験で用いた以外の異なるマトリックスについても同様に分析されることが期待される。同時に、ELSDでは脂質クラスによって散乱光強度が異なることが予想されることから、GlcCerの構成脂肪酸の鎖長やスフィンゴイド塩基の違い（水酸基の数および二重結合の有無と立体配置）が検出感度にどの程度、影響を与えるかについても、主要な植物GlcCer分子種を単一成分として分離精製して検討する必要があるだろう。なお、今回は測定条件をずらしたときの測定結果への影響など頑健性試験を行っていないが、カラムの温度、溶離液の流速などの変動要因についても、今後さらに検討を進

める必要がある。

要 約

本研究では、美容分野へのニーズと共に、健康食品や一般食品、飲料等に広く利用、販売されるようになった食品素材としての植物由来グルコシルセラミド（GlcCer）について、最近市販された標準試薬品（トウモロコシ及びコメからそれぞれ分離された精製GlcCer）を用い、既報の蒸発光散乱検出器付き高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ELSD）分析の条件下での定量分析法の単一試験室による妥当性確認を行った。その結果、今回評価したパラメータ（選択性、直線性、真度、併行精度及び室内再現精度）においてはいずれも良好な結果が得られた。このように、市販の機能性食品素材中のGlcCerをHPLC-ELSD法で定量分析することについて、コムギで開発された既報の分析条件プロトコルは、異なるマトリックスにおいても適用が可能であることが確認された。また、植物GlcCerには分子種多様性が見られるが、既報及び本研究の結果から、測定する試料ごとに、マトリックスと一致する標準品を用いて検量線を作成することで、本法は他のマトリックスへの拡張が可能であると考えられた。

IV. 植物スフィンゴ脂質の経口摂取による皮膚保湿効果の検証

近年、皮膚保湿効果を目的とした医薬品あるいは健康（美容）食品が開発され、普及している。特に、植物由来のスフィンゴ脂質は「セラミド」の通称名で、皮膚保湿を期待する食品素材としてスキンケア分野を中心に広く利用されるようになってきている^{32-35,66)}。スフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基に脂肪酸が酸アミド結合したセラミド（*N*-アシルスフィンゴイド塩基）を基本骨格とする脂質の一群で、ヒト皮膚では遊離セラミドが角質層の細胞間脂質の過半を占めている⁷⁻⁹⁾。しかし、現在、市販されている植物セラミド素材に含まれる機能性因子のほとんどはセラミドにグルコースが β -グルコシド結合したグルコシルセラミド（GlcCer）である^{48,56,65)}。

皮膚角質層の遊離セラミドは、細胞同士の接着や外界からの刺激に対する防御に関与しており、同時に、細胞間に水を保持する働きを持ち、過剰な水分の透過に対するバリアとして機能を担って皮膚の保湿作用を有することが明らかになっている^{7,9,67)}。機能性素材として利用されている天然のスフィンゴ脂質には動物由来と植物由来のものがあり、以前は豊富に含まれる牛脳を中心とした動物由来のセレブロシド（ガラクトシルセラミド）が多く使用されてきた。しかし、1986年の牛海綿状脳症（いわゆる狂牛病）²⁸⁾の発生以来、動物の脳や神経組織由来のスフィンゴ脂質の使用はプリオンなどの病原体の感染リスクが問題視されており、最近では天然の植物素材を原料とするスフィンゴ糖脂質（GlcCer）および牛乳や鶏皮由来のスフィンゴリン脂質（スフィンゴミエリン、SM）に安全性の点から注目が集まっている

植物の主要なスフィンゴ脂質であるGlcCerは、その構成成分、特に構成スフィンゴイド塩基の組成が動物起源のそれとは大きく異なり、8-不飽和タイプのスフィンゴイド塩基が主要成分であるが^{56,65)}、上述したように皮膚の保湿性向上や美肌効果を訴求した機能性素材として利用されるようになってきている。最近では特に、美容を目的とした機能性食品素材として、植物由来のGlcCerを主成分とした「セラミド素材」の市場が徐々に伸長している³⁴⁻³⁵⁾。一方、皮膚に塗布した場合のスフィンゴ脂質の保湿効果についても確認されているが⁴²⁾、外用の場合は価格面で合成セラミドに劣ることから、まだ十分には普及していない。

これまでの経口摂取した植物由来「セラミド素材」の皮膚保湿効果に関するヒトでの研究では、低濃度GlcCer濃縮物（3～6%の純度）を用いて評価している場合もあるが、1日当たり1mg程度のGlcCerの摂取で皮膚保湿性が認められると報告されている^{42,72-75)}。しかし、スフィンゴ脂質は動植物体に広く分布する脂質成分であり、一般の食品からの1日のスフィンゴ脂質摂取量は300mg以上と考えられている⁷⁶⁾。本研究では、“健常人を対象に、夾雑する脂質成分を極力除いて比較的高濃度に濃縮されたコメ由来GlcCerをコーン油に乳化させて作製したソフトカプセルをGlcCerとして0.6mgあるいは1.2mgを経口摂取させた試験（健常人に対する効果の検証・低用量）”を実施することで、トウモロコシ由来GlcCerを用いた既報⁴²⁾の効果と原料が異なるコメ由来でも確認しようとした⁷²⁾。また“健常人を対象に、比較的高濃度に濃縮されたトウモロコシ由来GlcCerを乳化させて作製したソ

フトカプセルをGlcCerとして2mgあるいは10mgを経口摂取させた試験（健常人に対する効果の検証・高用量）”を実施することで、皮表角層水分量、経皮水分蒸散量ならびに皮膚状態を評価してGlcCerの皮膚保湿効果に対する有効摂取量を明らかにしようとした。また“軽度アトピー性皮膚炎患者に対して比較的高濃度に濃縮されたコメ及びトウモロコシ由来GlcCerを乳化させて作製したソフトカプセルをGlcCerとして2mgを経口摂取させた試験（軽度アトピー性皮膚炎患者に対する効果の検証）”を実施してアトピー性皮膚炎患者に対しての効果について検証しようとした。それらの結果に加えて、更に日常的な食事中の植物性スフィンゴイド塩基の分析及びニワトリの各臓器における植物スフィンゴイド塩基の検索を行うことで、経口摂取した植物スフィンゴ脂質（GlcCer）と皮膚保湿効果の作用メカニズムの関係を考察しようとした。

実験方法

1. 健常人に対する効果の検証（低用量）

1-1 被験者

被験者としては、試験前及び試験期間中に医師による経口または塗布の薬剤、特に肌の保湿を目的とするような薬剤の投与の制限及び類似の健康食品の摂取制限を条件に日本製粉株式会社中央研究所に勤務する者から参加者を募り、22～52歳の健常成人ボランティア30名（男性8名、女性22名、平均年齢33.4歳）を対象として試験を行った（Table

10)。なお、本試験は日本製粉㈱内のボランティア試験実施規定に基づいて倫理審査委員会の承認を得た後、「ヘルシンキ宣言」の精神を遵守し、被験者には事前に試験内容を十分に説明して文書による本試験参加の同意を得た上で実施した。

Table 10 被験者背景（健常人・低用量）

項目	プラセボ群	コメ由来GlcCer 0.6mg/day群	コメ由来GlcCer 1.2mg/day群
被験者数 (名)	10	10	10
男:女比	3:7	3:7	2:8
年齢(歳)	32.5 ± 9.2	34.0 ± 9.6	33.8 ± 10.0
身長(cm)	163.5 ± 7.4	163.8 ± 11.1	161.3 ± 6.2
体重(kg)	54.0 ± 6.0	57.9 ± 13.3	55.9 ± 8.9
肥満指数 (BMI)	20.2 ± 1.5	21.5 ± 3.8	21.5 ± 3.2

Means ± SD, 群間で有意差なし : $P < 0.05$ (Bonferroni's test)

1-2 試験試料

コメ由来 GlcCer としては、胚芽部から分離調製されたニッポンセラミド RPS（日本製粉株式会社）を用いた。これは、コメ胚芽油の油滓から濃縮された GlcCer に賦形剤として β -シクロデキストリン（ β -CD）を加えて粉末化した食品素材で、粉末中に GlcCer として 6.0% 含有するものである。試験試料の組成を Table 11 に示す。試験試料としたカプセルは 1 粒あたりの重量が 400mg で、各カプセルにはコメ由来 GlcCer として 0mg 及び 0.6mg をコーン油に分散させてゼラチンでカプセル化し、それぞれプラセボ（対照）カプセル及び試験カプセルとした。なお、プラセボ（対照）カプセルは GlcCer を含まず、ニッポンセラミドの代わりに β -CD のみを添加する以外は試験カプセルと同様の調製方法に従い、試験対象者が外見的に試験カプセルと判別のでつかないように作製した。

1-3 試験スケジュール

試験はプラセボを対照とした二重盲検法で行った。被験者30名をプラセボ群、GlcCer 0.6mg 摂取群および GlcCer 1.2mg 摂取群に各10名ずつ無作為に分け、摂取期間はいずれも乾燥期である11月～3月の間の6週間とした(Fig.20)。カプセルは、プラセボ群にはプラセボカプセルを1日2個、GlcCer 0.6mg 摂取群にはプラセボカプセル1個と試験カプ

Table 11 カプセルの組成 (健康人・低用量)

(1 カプセルあたり)

成分	プラセボ	試験カプセル
皮膜		
ゼラチン (豚皮由来)	111.1 mg	111.1 mg
グリセリン	38.9 mg	38.9 mg
トウモロコシ油 (安定化剤を含む)	240.0 mg	240.0 mg
ニッポンセラミド RPS (Glucosylceramide)	—	10.0 mg (0.6 mg)
β-シクロデキストリン	10.0 mg	—
GlcCer 含量	0 mg	0.6 mg

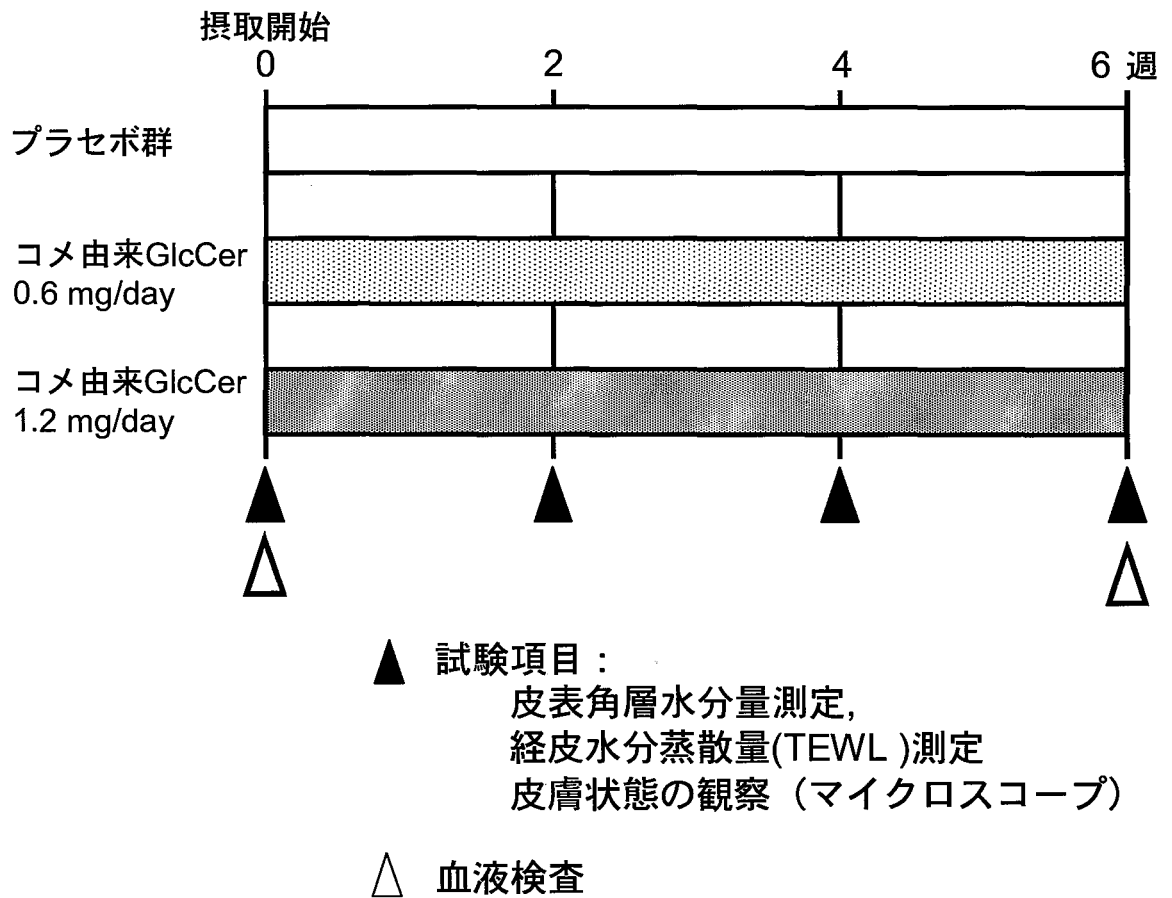


Fig. 20 試験スケジュール（健常人、低用量）

セル1個、GlcCer 1.2mg摂取群には試験カプセル2個を、それぞれ1日あたり摂取させた。

被験者には、試験期間中、試験カプセルまたはプラセボカプセルを毎日摂取することを除いては、食生活、肌の手入れおよび運動などの日常生活をそれまでと変えないように指導した。下項に記述した検査は摂取開始直前、摂取開始2週間後、4週間後および6週間後の計4回とした。また、機器による測定は室温と湿度を一定に保った部屋（室温 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $45\pm 5\%$ ）で行った。被験者には測定の20分前に入室して測定部位を露出させた状態で20分間安静に待機してもらうことで、試験部位を環境に馴化させた後に各測定を行った。なお、4回の検査はいずれもできる限り同一の時間帯に実施した。

1-4 皮表角層水分量と経皮水分蒸散量の測定

被験者の皮表角層水分量は、Skicon-200 (アイ・ビー・エス、浜松) を用いて皮膚表面から $20\mu\text{m}$ 程度までの深度の角層の電気伝導度を測定し、それを間接的に角層水分量とした^{42,76)}。また、経皮水分蒸散量 (Transepidermal water loss: TEWL) は、Tewameter TM210 (Courage+Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) を用い、プローブに内蔵された2個の湿度センサーの湿度差を測定して近似的に算出した⁴²⁾。この測定値は、角層を透過して蒸散してくる水分量に相当し、皮膚のバリア機能を表すものである^{42,77)}。なお、いずれの測定においても前腕内側部および下腿内側部（ふくらはぎ上部）の左右いずれか一方の部位に決めて、毎回同一箇所で行った。測定部位を顔面ではなくこれらの部位に設定した理由は、第1にこれらの部位は比較

的体毛が少ないため剃毛処理が不要であり、それによる肌荒れ等の影響がないこと、第2に顔面での測定の場合に必要な「洗顔による化粧の除去やそれによる影響」を考慮する必要がなく、被験者に対しても拘束時間を含めた負担が軽減できること、第3に本試験に協力する被験者は美容意識が高いことが予想され、試験に際しては事前に十分な注意事項の説明を行なってはいるものの、それでもなお顔面の場合には被験者が日常使用する化粧品やスキンケアによる影響を試験者側が把握、コントロールしきれないと判断したこと、第4に設定した2箇所は比較的直射日光や外気に曝され難い箇所であり、試験期間中にそれらの影響を受けにくいこと等が挙げられる。

1-5 皮膚状態の観察

被験者の皮膚状態は、USBマイクロスコープ (Scalar, 東京)を用い、皮表角層水分量や経皮水分蒸散量の測定箇所と同じ部位で観察した。

1-6 血液検査と自己評価アンケート調査

被験者の血液の生化学的データは、東名厚木病院（株式会社保健科学研究所）に委託し、試験開始前と試験終了時に上腕の静脈より採血して検査した。

また、被験者には生活習慣維持を目的とした生活管理日誌（カプセル摂取の有無、食事回数、飲酒、旅行、スポーツ等の生活パターンの変化を毎日記述）の記載ならびに、試験期間終了時に肌状態（変化の有無と時期）や有害事象に関する自己評価の実施を義務付けた。

1-7 統計解析

各測定値は平均値±標準偏差で示し、統計解析は統計解析ソフトSPSS Ver.14.0 (SPSS Japan Inc.) を使用して行った。血液の生化学的データは、群間比較はDunnett検定を採用し、摂取前後の推移はpaired-t-test検定を採用して有意差検定を行った。肌状態についての機器分析は、群間比較については、被験者の皮表角層水分量と経皮水分蒸散量の各初期値を100%として、処方量と摂取期間(週)を因子とした二元配置分散分析でDunnett検定を採用して評価した。摂取前後の推移については、一元配置分散分析でpaired-t-test検定を採用し、測定時点間の比較を行なって評価した。いずれの場合も有意水準は5%とした。

2. 健常人に対する効果の検証 (高用量)

2-1 被験者

被験者としては「1 健常人に対する効果の検証 (低用量)」と同様の要領で、日本製粉株式会社中央研究所に勤務する24~62歳の健常成人ボランティア30名(男性12名、女性18名、平均年齢36.6歳)を対象として、日本製粉(株)内のボランティア試験実施規定に基づき倫理審査委員会の承認を得た後、被験者には事前に試験内容を十分に説明して文書による本試験参加の同意を得た上で実施した (Table 12)。

2-2 試験試料

トウモロコシ由来GlcCerとしては、胚芽部から分離調製されたニップンセラミドCPa (日本製粉株式会社) を用いた。これは、トウモロコシ胚芽油の油滓から濃縮されたGlcCerに賦形剤として α -シクロデ

Table 12 被験者背景（健常人・高用量）

項目	プラセボ群	トウモロコシ由来 GlcCer 2mg/day群	トウモロコシ由来 GlcCer 10mg/day群
被験者数 (名)	10	10	10
男:女比	4:6	4:6	4:6
年齢(歳)	35.7±10.4	36.6±9.1	37.5±12.4
身長(cm)	163.0±8.5	162.3±8.4	165.5±8.5
体重(kg)	54.6±9.3	57.1±8.0	58.8±11.5
肥満指数 (BMI)	20.5±2.4	21.7±2.7	21.3±2.5

Means±SD, 群間で有意差なし : $P < 0.05$ (Bonferroni's test)

キストリン (α -CD) を加えて粉末化した食品素材で、粉末中にGlcCerとして6.0%含有するものである。試験試料の組成をTable 13に示す。試験試料としたカプセルは1粒あたりの重量が400mgで、各カプセルにはトウモロコシ由来GlcCerとして0mg、2mg及び5mgをコーン油に分散させてゼラチンでカプセル化し、それぞれプラセボカプセル、試験カプセルA及び試験カプセルBとした。なお、プラセボ（対照）カプセルはGlcCerを含まず、ニップンセラミドの代わりに α -CDのみを添加する以外は試験カプセルと同様の調製方法に従い、試験対象者が外見的に試験カプセルと判別のつかないように作製した。

2-3 試験スケジュール

試験はプラセボを対照とした二重盲検法で行った。被験者30名をプラセボ群、GlcCer 2mg摂取群およびGlcCer 10mg群に各10名ずつ無作為に分け、摂取期間はいずれも乾燥期である11月～3月の間の6週間とした(Fig. 21)。カプセルは、プラセボ群にはプラセボカプセルを1日2個、GlcCer 2mg摂取群にはプラセボカプセル1個と試験カプセルA 1個、GlcCer 10mg摂取群には試験カプセルB 2個を、それぞれ1日当たり摂取させた。

被験者には「1 健常人に対する効果の検証（低用量）」と同様の要領で、試験期間中、試験カプセルまたはプラセボカプセルを毎日摂取することを除いて日常生活を変えないように指導し、機器による測定は室温と湿度を一定に保った部屋（室温 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 3\%$ ）で前述と同様の項目、部位及びタイミングで、摂取開始直前、摂取開始2週間後、4週間後および6週間後の計4回とした。

Table 13 カプセルの組成 (健常人・高用量)

(1 カプセルあたり)

成分	プラセボ	試験 カプセルA	試験 カプセルB
皮膜			
ゼラチン (豚皮由来)	111.1mg	111.1mg	111.1mg
グリセリン	38.9mg	38.9mg	38.9mg
トウモロコシ油 (安定化剤を含む)	138.6mg	138.6mg	138.6mg
ミツロウ	14.0mg	14.0mg	14.0mg
グリセリン脂肪酸エステル	14.0mg	14.0mg	14.0mg
ニップンセラミド CP α (Glucosylceramide)	—	33.4mg (2.0mg)	83.4mg (5.0mg)
α -シクロデキストリン	83.4mg	50.0mg	—
GlcCer 含量	0mg	2.0mg	5.0mg

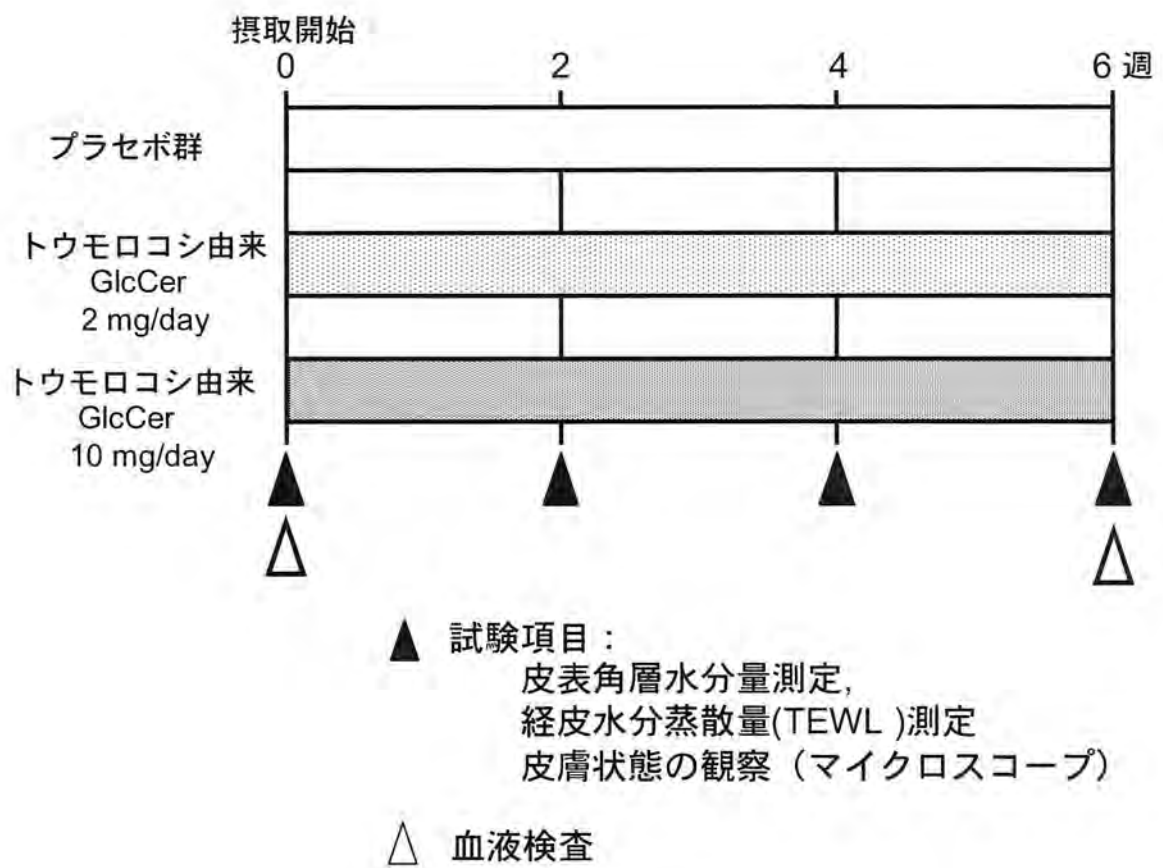


Fig. 21 試験スケジュール (健常人、高用量)

2-4 皮表角層水分量と経皮水分蒸散量の測定

被験者の皮表角層水分量及び経皮水分蒸散量の測定は、前述の「1 健康人に対する効果の検証（低用量）」に準じて同様の機器を用いて行った。

2-5 皮膚状態の観察

被験者の皮膚状態は、マイクロスコープ Macromax EV-4N (GOKO GROUP Co., 川崎)を用い、皮表角層水分量や経皮水分蒸散量の測定箇所と同じ部位で観察した。

2-6 血液検査と自己評価アンケート調査

被験者の血液の生化学的データは「1 健康人に対する効果の検証（低用量）」と同様に、東名厚木病院（株式会社保健科学研究所）に委託し、試験開始前と試験終了時に上腕の静脈より採血して検査した。

また、被験者には前述同様、生活習慣維持を目的とした生活管理日誌の記載ならびに、試験期間終了時に肌状態や有害事象に関する自己評価の実施を義務付けた。

2-7 統計解析

各測定値は平均値±標準偏差で示し、統計解析は統計解析ソフト SPSS Ver.14.0 (SPSS Japan Inc.) を使用して行った。血液の生化学的データは、群間比較はDunnett検定を採用し、摂取前後の推移は paired-t-test検定を採用して有意差検定を行った。肌状態についての機器分析は、群間比較については、被験者の皮表角層水分量と経皮水分

蒸散量の各初期値を100%として、処方量と摂取期間（週）を因子とした二元配置分散分析でDunnett検定を採用し評価した。摂取前後の推移については、一元配置分散分析でpaired-t-test検定を採用し、測定時点間の比較を行なって評価した。角層水分量と経皮水分蒸散量の初期値と両測定値の変動率との相関については、多重比較分散（MANOVA）分析によって検討した。いずれの場合も有意水準は5%とした。

2-8 脂質分析

試験カプセルの作製に使用したニップンセラミドCPαからBligh-Dyer法に準じて脂質を抽出し⁴⁶⁾、クロロホルム／メタノール／水（65：16：2, v/v/v）によるケイ酸TLCに供してアンスロン硫酸試薬で発色させることによって脂質クラスを分析した⁷⁸⁾。また、脂質抽出物を順相HPLCに供して蒸発光散乱検出器（ELSD）でピークを検出してGlcCerの濃度を測定した⁴⁸⁾。検量線の作成には、トウモロコシ由来GlcCer（長良サイエンス、岐阜）標準品を用いて行った。GlcCerの構成成分（脂肪酸とスフィンゴイド塩基）の組成は、既報に準じて分析した⁵⁶⁾。

3. 軽度アトピー性皮膚炎患者に対する効果の検証

3-1 被験者

被験者は、浜松医科大学皮膚科外来及びエルム内科クリニック（浜松）に定期的に通院して専門医の診療並びに投薬を受けている軽度アトピー性皮膚炎患者36名（男性17名、女性19名、11～77歳、平均年齢30.5歳）を対象として、日本製粉(株)並びに浜松医科大学のそれぞれの

試験実施規定に基づき倫理審査委員会の承認を得た後、被験者には事前に試験内容を十分に説明して文書による本試験参加の同意を得た上で実施した (Table 14)。

3-2 試験試料

トウモロコシ由来 GlcCer としては、胚芽部から分離調製されたニッポンセラミド CP (日本製粉株式会社) を用いた。これは、トウモロコシ胚芽油の油滓から濃縮された GlcCer に賦形剤として β -シクロデキストリン (β -CD) を加えて粉末化した食品素材で、粉末中に GlcCer として 3.0%含有するものである。また、コメ由来 GlcCer としては、前述の「1 健常人に対する効果の検証 (低用量)」で使用したニッポンセラミド RPS (日本製粉株式会社) を用いた。試験試料の組成を Table 15 に示す。試験試料としたカプセルは 1 粒あたりの重量が 400mg で、各カプセルにはトウモロコシ由来 GlcCer として 2.0mg あるいは コメ由来 GlcCer として 2.0mg をコーン油に分散させてゼラチンでカプセル化し、それぞれプラセボ (対照) カプセル、カプセル M (Maize GlcCer) およびカプセル R (Rice GlcCer) とした。なお、プラセボ (対照) カプセルは GlcCer を含まず、ニッポンセラミドの代わりに β -CD のみを添加する以外は試験カプセルと同様の調製方法に従い、試験対象者が外見的に試験カプセルと判別のつかないように作製した。

3-3 試験スケジュール

試験はプラセボを対照とした二重盲検法で行った。被験者36名をプ

Table 14 被験者背景（軽度アトピー性皮膚炎患者）

項目	プラセボ群	トウモロコシ 由来 GlcCer 2mg/day群	コメ 由来 GlcCer 2mg/day群
被験者数 (名)	12	11	13
男:女比	5:7	7:4	5:8
年齢(歳)	32.7±10.4	30.5±11.1	30.7±16.5

Means±SD, 群間で有意差なし : $P < 0.05$ (Bonferroni's test)

Table 15 カプセルの組成 (軽度アトピー性皮膚炎患者)

(1カプセルあたり)

成分		プラセボ	カプセルM	カプセルR
皮膜	ゼラチン (豚皮由来)	111.1mg	111.1mg	111.1mg
	グリセリン	38.9mg	38.9mg	38.9mg
	トウモロコシ油 (安定化剤を含む)	183.3mg	183.3mg	183.3mg
	ニップンセラミド CP (Glucosylceramide)	—	66.7mg (2.0mg)	—
	ニップンセラミド RPS (Glucosylceramide)	—	—	33.4mg (2.0mg)
	β-シクロデキストリン	66.7mg	—	33.3mg
GlcCer 含量		0mg	2.0mg	2.0mg

ラセボ群、トウモロコシ由来GlcCer 2mg摂取群およびコメ由来GlcCer 2mg摂取群に無作為に分けた結果、各群はそれぞれ12名、11名、13名となった (Table 14)。摂取期間はいずれも乾燥期である11月～1月の間の4週間とした(Fig. 22)。カプセルは、プラセボ群にはプラセボカプセルを1日1個、トウモロコシ由来GlcCer 2mg摂取群にはカプセルMを1個、コメ由来GlcCer 2mg摂取群にはカプセルRを1個、それぞれ1日当たり摂取させた。

被験者には試験期間中、試験カプセルまたはプラセボを毎日摂取することを除いて日常生活を変えないように指導し、医師から処方される薬剤（経口及び塗布）についても、それまでと変更せず同様に継続使用するよう指導した。機器による測定は診察室の空調温度を25℃設定としたが湿度については制御せずに、摂取開始直前と摂取開始4週間後の計2回とした。被験者は病院に着いたら待合室で安静に待機してもらい、診察後に測定を行った。なお、2回の検査は可能な限り同一の時間帯に実施するようにした。

3-4 皮表角層水分量と経皮水分蒸散量の測定

被験者の皮表角層水分量は、Corneometer CM825 (Courage+Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)を用いて、皮膚表面から30～40μmの深度の静電容量（キャパシタンス、角層の水分量に応じて異なる）を測定することで角層水分量を間接的に算出した⁷⁹⁻⁸⁰。本機は前述の試験で使用したSkicon-200とは測定原理が異なり、皮膚への塗布物に含まれる塩の影響を受けにくく、乾癬のように極端に乾燥した皮膚の測定には有用とされていることからこの機

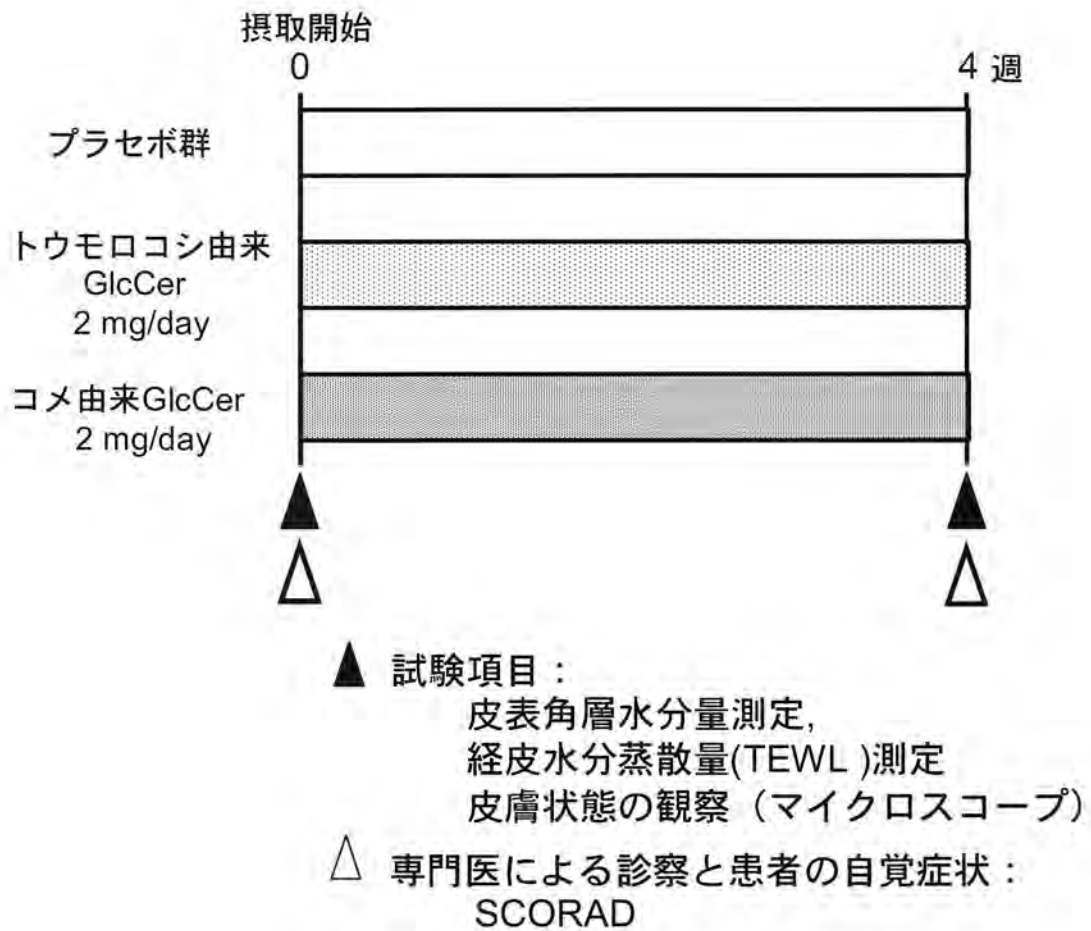


Fig. 22 試験スケジュール (軽度アトピー性皮膚炎患者)

種を選択した⁷⁹⁻⁸⁰⁾。経皮水分蒸散量(Transepidermal water loss: TEWL)は、前述の試験と同様に Tewameter TM210 (Courage+Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)を用いた。なお、いずれの測定においても左右前腕内側部或いは左右下腿内側部（ふくらはぎ上部）のうちのいずれか1箇所（目視）で実施した。

3-5 皮膚状態の観察

被験者の皮膚状態は、前述の「1 健常人に対する効果の検証（低用量）」と同様に、USBマイクロスコープを用い、皮表角層水分量や経皮水分蒸散量の測定箇所と同じ部位で観察した。

3-6 SCORAD 指標による評価

評価は、アトピー性皮膚炎の臨床評価を容易にするために世界各国の専門家により確立された手法である SCORAD 指標を用いた⁸¹⁻⁸³⁾ (Table 16)。医師並びに患者本人によって摂取前並びに摂取後の状態について各項目をスコア化し、Table 16 の計算式によって導かれた値を用いて、更に Fig. 23 の計算式によって全般改善度を算出し、得られた数字を Fig. 23 の区分けによって評価した。

3-7 統計解析

各測定値は平均値±標準偏差で示し、統計解析は統計解析ソフト SPSS Ver.14.0 (SPSS Japan Inc.) を使用して行った。肌状態についての機器分析は、群間比較については、被験者の皮表角層水分量と経皮水分蒸散量の各初期値を100%として、処方量と摂取期間(週)を因

Table 16 SCORAD指標 (軽度アトピー皮膚炎患者)

A 炎症部位の範囲	医師の診断により、軽度以上の症状を認める各部位の面積%の合計 (頭部、上肢部、体感前面部、体感背面部、下肢部、陰部)
B 重症度スコア	医師の診断により、各項目における重症度を数値化した値の合計 0 = なし、1 = 軽度、2 = 中等度、3 = 重度 (紅斑、浮腫/丘疹、浸潤/痂皮、表皮剥離、苔癬化、皮膚乾燥)
C 患者による評価	自覚症状の強弱を患者本人が10段階で表現した値の合計 (痒み、睡眠障害)
(計算式)	
$\text{SCORAD指標} = A/5 + 7B/2 + C$	

(計算式)

$$\text{全般改善度数}(a) = 100 - \left(\frac{\text{4週間摂取後のSCORAD指標値}}{\text{初期値のSCORAD指標値}} \times 100 \right)$$

(区分け)

全般改善度	
悪化	$a < -10$
不変	$-10 \leq a < 10$
やや改善	$10 \leq a < 30$
かなり改善	$30 \leq a < 60$
著しく改善	$60 \leq a$

Fig. 23 SCORAD指標から導かれる全般改善度
(軽度アトピー皮膚炎患者)

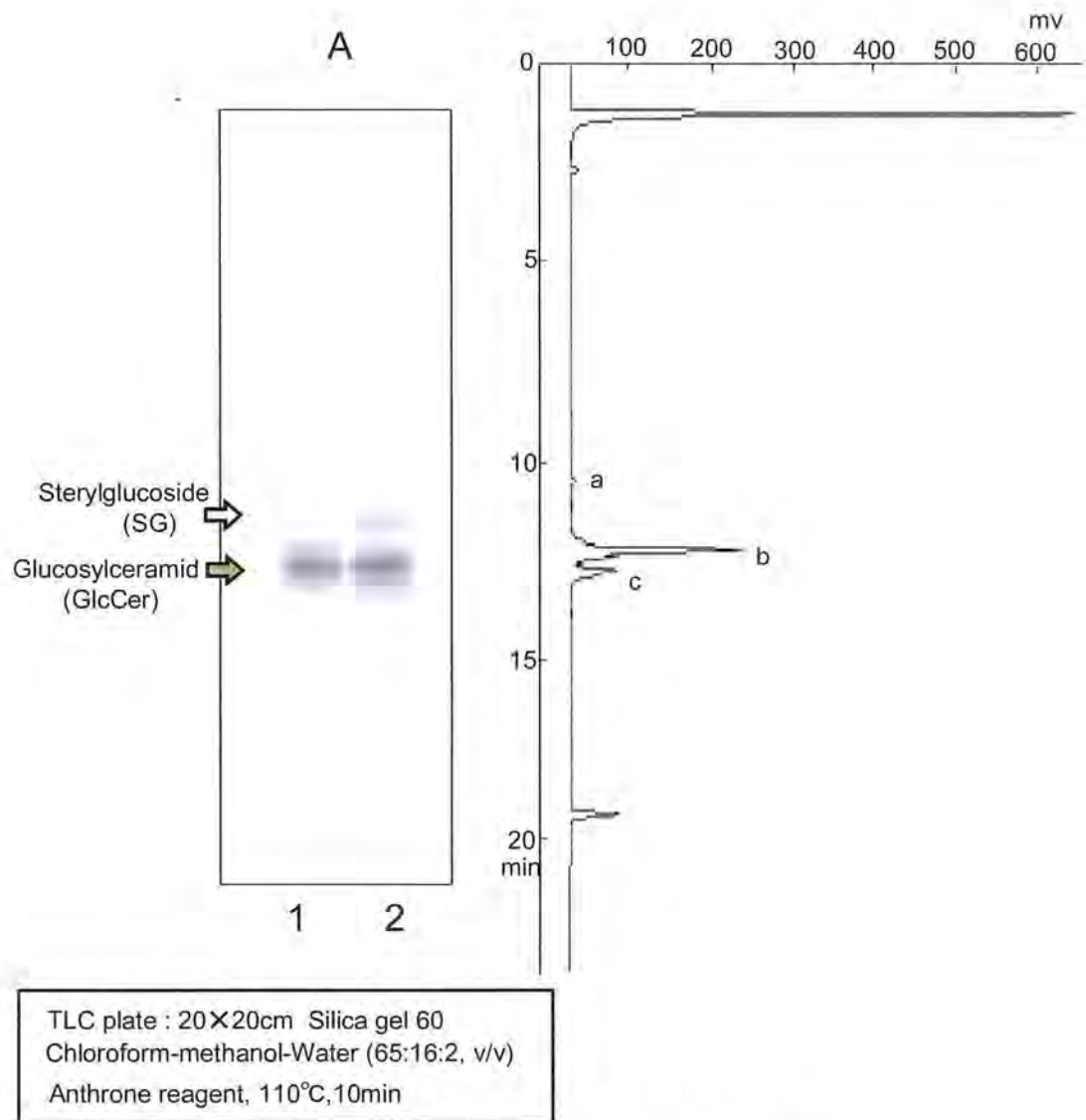
子とした二元配置分散分析でFisher's検定を採用し評価した。摂取前後の推移については、一元配置分散分析でpaired-t-test検定を採用し、測定時点間の比較を行なって評価した。いずれの場合も有意水準は5%とした。

実験結果

1. 供試した植物スフィンゴ脂質素材の化学的組成

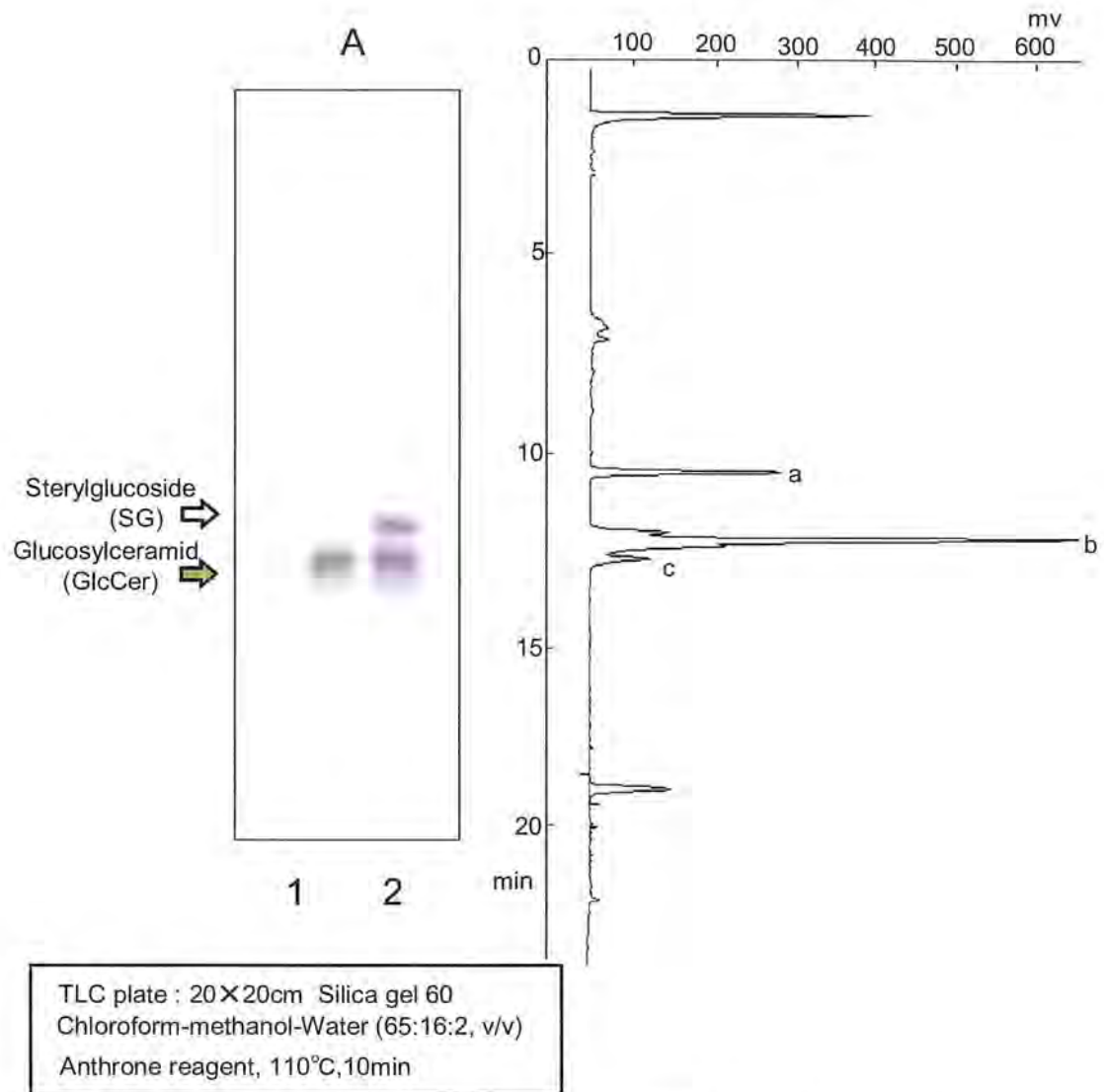
ニッポンセラミドRPS、CP α 、CPからそれぞれ抽出した脂質をケイ酸TLCおよびHPLCに供した結果をFig. 24~26に示す。脂質成分としては、ケイ酸TLC上で標準のコメ由来GlcCer及びトウモロコシ由来GlcCerに相当するスポット (b及びc) の他にステロール配糖体のスポット (a) が検出された。また、GlcCerの含量をHPLC分析から求めたところ、コメ由来は約70%、トウモロコシ由来は約50%であった。

供試したトウモロコシ由来GlcCerの主要な構成スフィンゴイド塩基は、多い順に4-*trans*,8-*cis*-sphingadienine (d18:2^{4t,8c})、4-hydroxy-8-*cis*-sphingenine (t18:1^{8c}) および4-*trans*,8-*trans*-sphingadienine (d18:2^{4t,8t}) で、それぞれ全体の53%、22%および17%を占めていた。その他に、4-hydroxy-sphinganine (t18:0) などの6種のスフィンゴイド塩基が<1%~3%の割合で検出された。一方、主要な構成脂肪酸は2-ヒドロキシタイプのC20(39%)、C22(13%) およびC24(22%) の飽和脂肪酸であった。



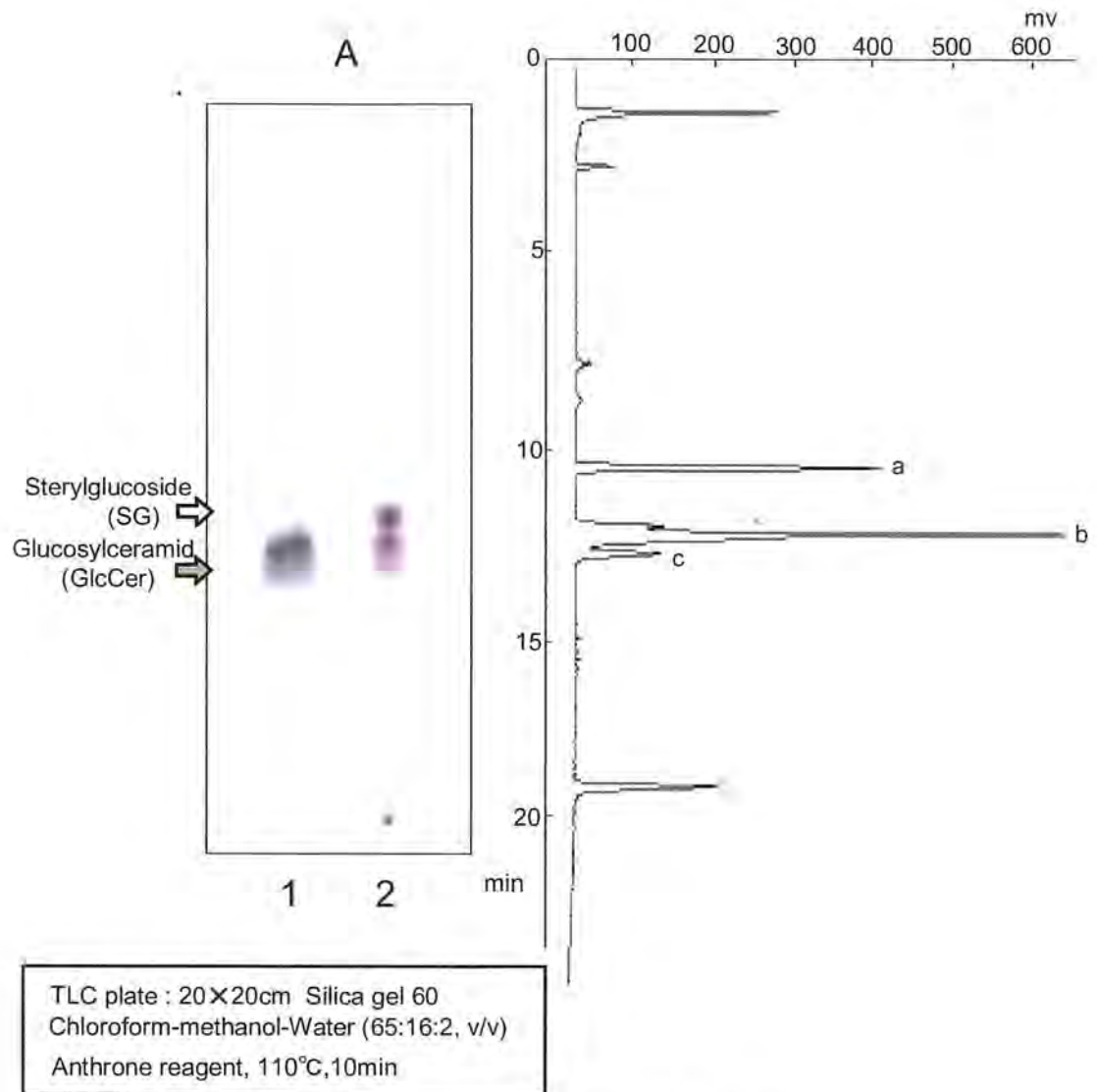
- A, ケイ酸薄層クロマトグラフィーによる展開パターン
 Lane 1, Glucosylceramide standard (コメ由来)
 Lane 2, ニッポンセラミドRPSから抽出した脂質画分
- B, HPLC-ELSDによるニッポンセラミドRPSのクロマトグラム
 Peak a, ステロール配糖体
 Peak b 及びc, GlcCer.

Fig. 24 試験に供したグルコシルセラミドの化学的性質
 (健康人・低用量 及び 軽度アトピー性皮膚炎患者)



- A, ケイ酸薄層クロマトグラフィーによる展開パターン
 Lane 1, Glucosylceramide standard (トウモロコシ由来)
 Lane 2, ニップンセラミドCP α から抽出した脂質画分
 B, HPLC-ELSDによるニップンセラミドCP α のクロマトグラム
 Peak a, ステロール配糖体
 Peak b 及びc, GlcCer.

Fig. 25 試験に供したグルコシルセラミドの化学的性質
 (健常人・高用量)



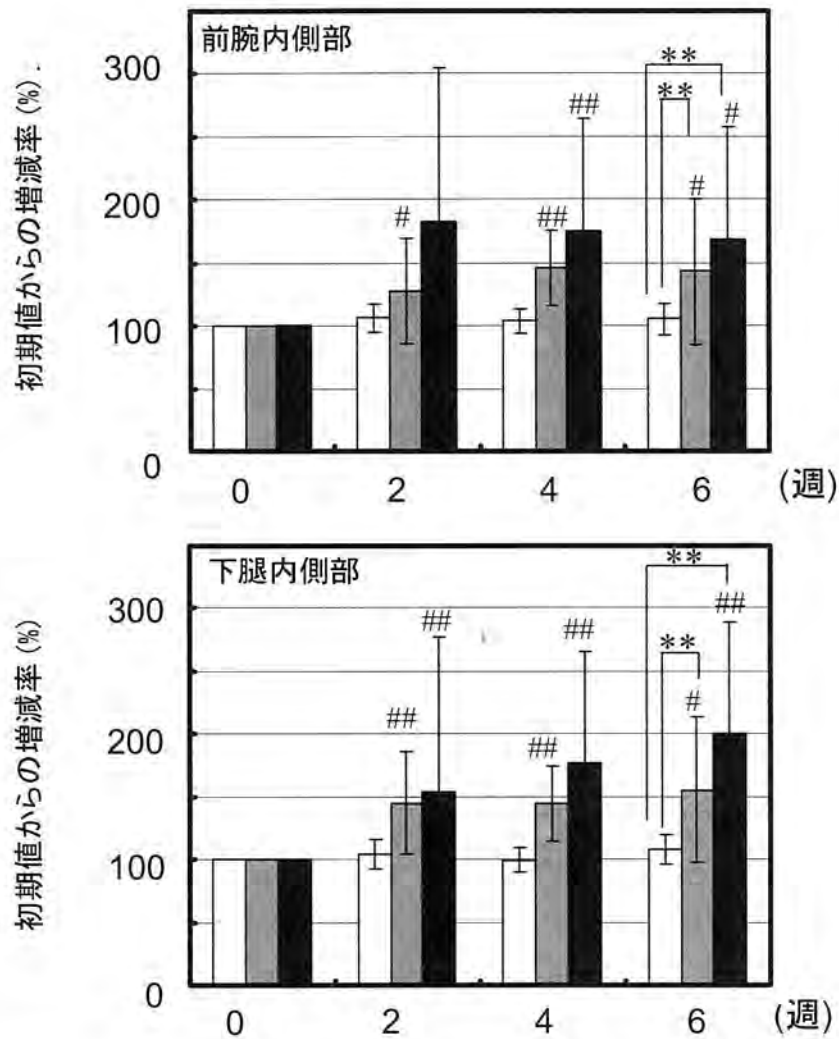
A, ケイ酸薄層クロマトグラフィーによる展開パターン
 Lane 1, Glucosylceramide standard (トウモロコシ由来)
 Lane 2, ニップンセラミドCPから抽出した脂質画分
 B, HPLC-ELSDによるニップンセラミドCPのクロマトグラム
 Peak a, ステロール配糖体
 Peak b, 及び c, GlcCer.

Fig. 26 試験に供したグルコシルセラミドの化学的性質
 (軽度アトピー性皮膚炎患者)

2. 被験者の皮表角層水分量の推移

2-1 健常人（低用量）の場合

両 GlcCer 摂取群およびプラセボ群のいずれにおいても摂取期間中に試験中断が必要な事例や脱落者は現れなかった。被験者の摂取前の角層水分量は 5.6~146.2 μ S（各被験者各測定箇所 n=10 の平均値）の範囲であったが、3 群間では有意な差は認められなかった ($P>0.05$)。各摂取群における摂取開始時期での測定値を 100 として摂取 6 週間までの推移を測定した結果を Fig. 27 に示す。プラセボ群では、前腕内側部、下腿内側部とも角層水分量には変化は見られなかった ($P>0.05$)。コメ由来 GlcCer 0.6mg 摂取群においては、前腕内側部の摂取 2 週間目 ($P<0.05$)、4 週間目 ($P<0.01$)、6 週間目 ($P<0.05$) 及び下腿内側部の摂取 2 週間目 ($P<0.01$)、4 週間目 ($P<0.01$)、6 週間目 ($P<0.05$) の全てにおいて初期値と比べて角層水分量が有意に増加し、プラセボ群と比べても角層水分量が有意に増加した ($P<0.01$)。1.2mg 摂取群では、前腕内側部の摂取 4 週間目 ($P<0.01$)、6 週間目 ($P<0.05$) 及び下腿内側部の 2 週間目 ($P<0.01$)、4 週間目 ($P<0.01$)、6 週間目 ($P<0.01$) で初期値と比べて角層水分量が有意に増加し、プラセボ群と比べて試験期間を通して角層水分量が有意に増加した ($P<0.01$)。なお、0.6mg と 1.2mg の摂取では、GlcCer 摂取量と角層水分量の増加の度合いには有意差は見られなかったが、濃度依存的な傾向は見られた ($P=0.103$)。



□ プラセボ群 ■ GlcCer 0.6mg/ day 群 ■ GlcCer 1.2mg/ day 群

初期値を100とした百分率で表した (means±SE, n=10)

試験期間を通して群間に有意差あり * $P<0.05$ ** $P<0.01$ (Dunnett's test)

初期値と比べて有意差あり # $P<0.05$ ## $P<0.01$ (Paired- t-test)

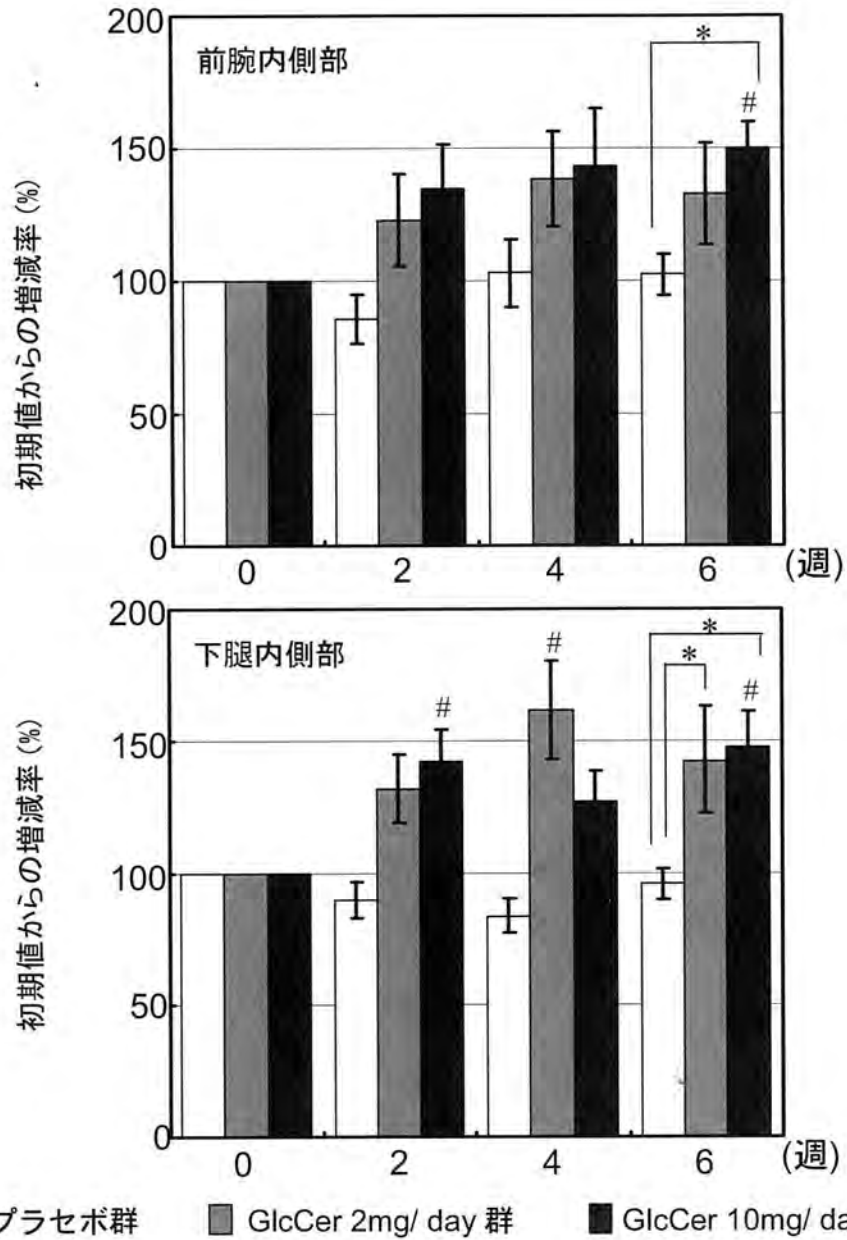
Fig. 27 皮表角層水分量の推移 (健常人・低用量)

2-2 健常人（高容量）の場合

両 GlcCer 摂取群およびプラセボ群のいずれにおいても摂取期間中に試験中断が必要な事例や脱落者は現れなかった。被験者の摂取前の角層水分量は 10.3~102.0 μ S（各被験者各測定箇所 n=10 の平均値）の範囲であったが、3 群間では有意な差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。各摂取群における摂取開始時期での測定値を 100 として摂取 6 週間までの推移を測定した結果を Fig. 28 に示す。プラセボ群では、前腕内側部、下腿内側部とも角層水分量には変化は見られなかった（ $P>0.05$ ）。トウモロコシ由来 GlcCer 2mg 摂取群においては、下腿内側部で摂取 4 週間後に初期値と比べて角層水分量が有意に増加し（ $P<0.05$ ）、プラセボ群と比べて試験期間を通して角層水分量が有意に増加した（ $P<0.05$ ）。しかし、前腕内側部では初期値に対して増加傾向が見られたが、有意な変動ではなかった（ $P>0.05$ ）。一方、10mg 摂取群では、前腕内側部では 6 週間目（ $P<0.05$ ）に、下腿内側部では 2 週間目、6 週間目に初期値と比べて角層水分量が有意に増加し（ $P<0.05$ ）、いずれの箇所においてもプラセボ群と比べても試験期間を通して角層水分量が有意に増加した（ $P<0.05$ ）。このように、GlcCer の摂取によって皮表角層水分量が増加することが確認されたが、皮表角層水分量の GlcCer 摂取による増加効果については、2mg 摂取群と 10mg 摂取群の間では差がなかった（ $P>0.05$ ）。

2-3 アトピー性皮膚炎患者の場合

本試験では、試験中断が必要な事例や脱落者は現れなかったが、摂取 4 週間後の診察並びに測定時の聞き取り調査から、摂取期間中の摂



初期値を100とした百分率で表した (means±SE, n=10)

試験期間を通して群間に有意差あり * $P < 0.05$ (Dunnett's test)

初期値と比べて有意差あり # $P < 0.05$ (Paired- t-test)

Fig. 28 皮表角層水分量の推移 (健康人・高用量)

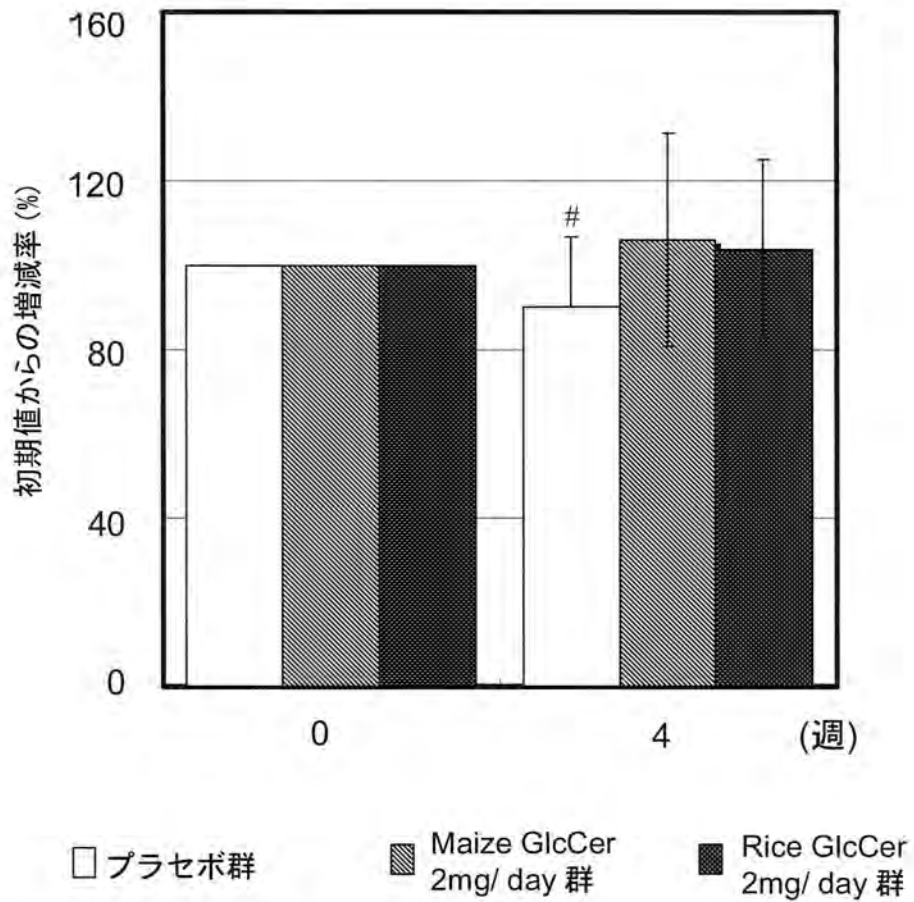
取欠損が著しく多い者（合計 7 日以上の欠損）及び摂取 4 週間後の受診日が著しく遅れた者（2 週間以上）については、医師と相談の上、集計対象から外した結果、プラセボ群 11 名、トウモロコシ由来 GlcCer 摂取群 9 名、コメ由来 GlcCer 摂取群 11 名で評価した。被験者の摂取前の角層水分量は 13.6~43.5AU（各被験者 n=10 の平均値）の範囲であったが、3 群間では有意な差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。各摂取群における摂取開始時期での測定値を 100 として摂取 4 週間後の推移測定した結果を Fig. 29 に示す。プラセボ群では摂取 4 週間後は初期値と比べて角層水分量が有意に減少した（ $P<0.05$ ）。この理由としては試験期間が冬季（低温乾燥期）であったこと、すなわち、これまでの健常人での試験と比較して軽度アトピー性皮膚炎患者では、より外気の影響を受けやすいことがと推測された。トウモロコシ及びコメ由来 GlcCer 摂取群では摂取 4 週間後は初期値と比べて角層水分量の有意な変動はなかった（ $P>0.05$ ）。また、プラセボ群と GlcCer 摂取群では試験期間を通して有意な差はなかった（ $P>0.05$ ）。

3. 被験者の経皮水分蒸散量の推移

3-1 健常人（低用量）の場合

被験者の摂取前の経皮水分蒸散量は $6.0\sim 14.3\text{g/m}^2/\text{h}$ （各被験者各測定箇所 n=2 の平均値）の範囲で、3 群間では有意な差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。各カプセル摂取群における経皮水分蒸散量の推移を、初期値（摂取前の測定値）を 100 として見てみると（Fig. 30）、プラセボ群では経皮水分蒸散量に変化は見られなかった（ $P>0.05$ ）。

GlcCer0.6mg 摂取群では、前腕内側部及び下腿内側部で経皮水分蒸散

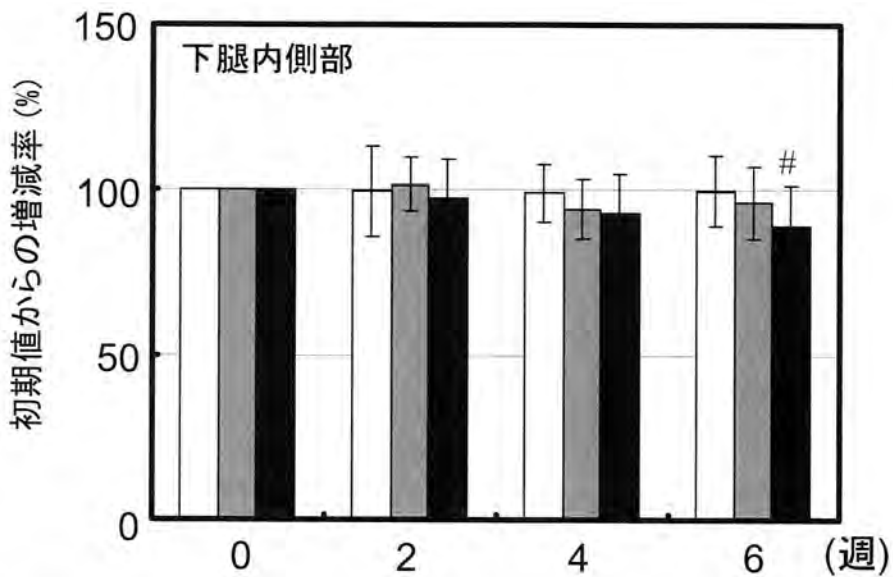
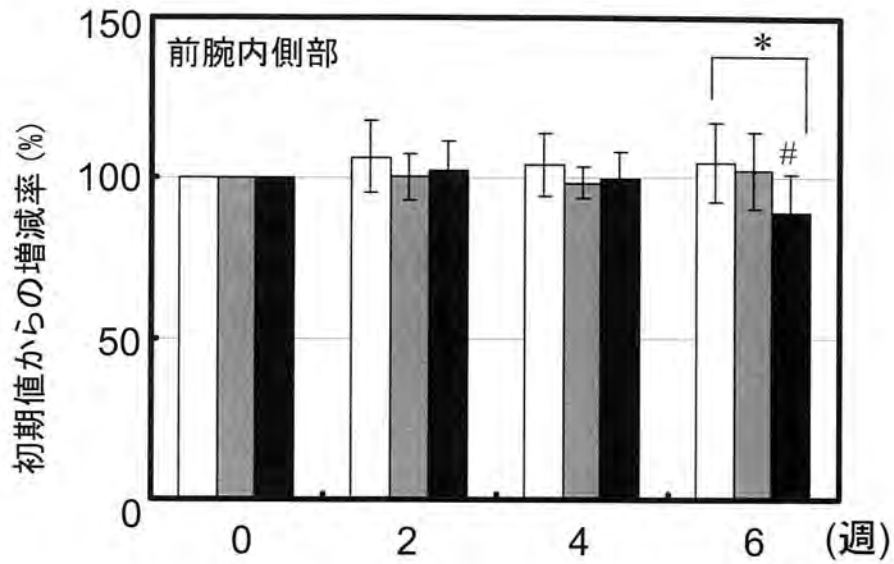


初期値を100とした百分率で表した (means±SE, n=11, 9, 11)

試験期間を通して群間に有意差あり * $P < 0.05$ (Fisher's test)

初期値と比べて有意差あり # $P < 0.05$ (Paired- *t*-test)

Fig. 29 皮膚角層水分量の推移 (軽度アトピー性皮膚炎患者)



□ プラセボ群 ■ GlcCer 0.6mg/ day群 ■ GlcCer 1.2mg/ day 群

初期値を100とした百分率で表した (means±SE, n=10)

試験期間を通して群間に有意差あり * $P < 0.05$ (Dunnett's test)

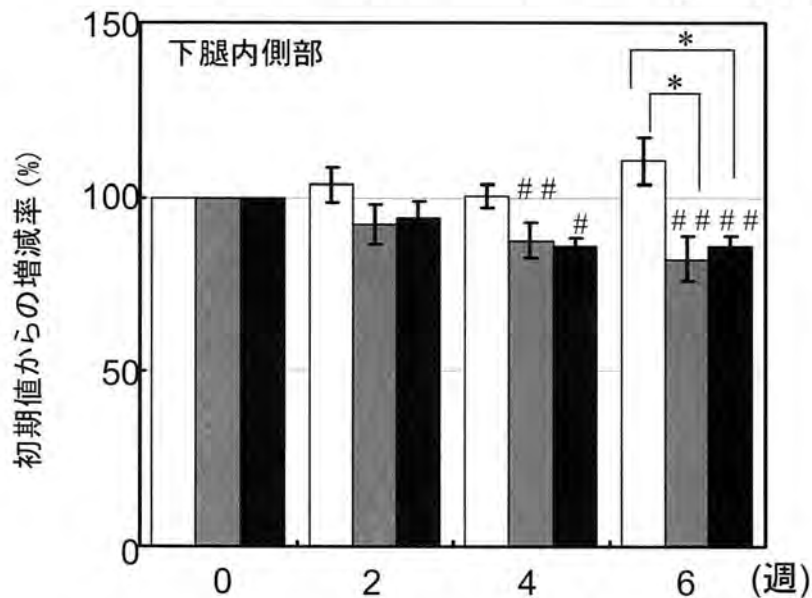
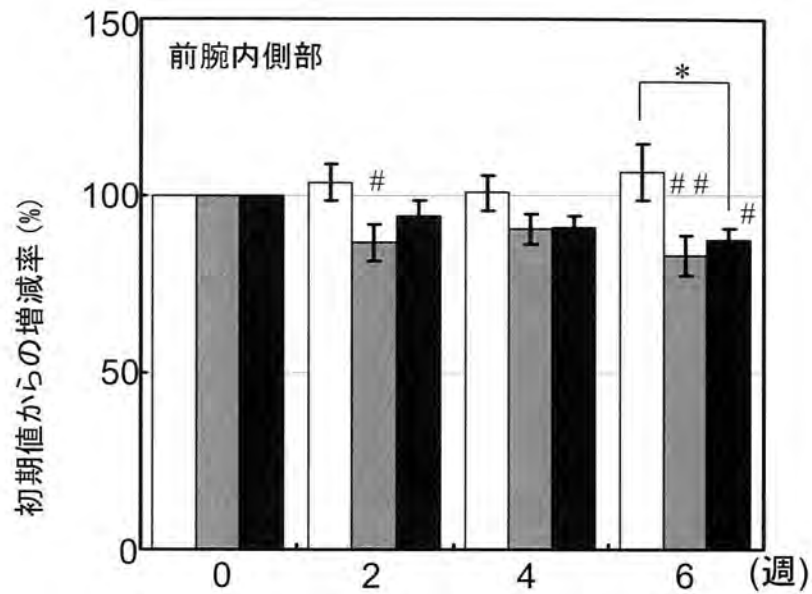
初期値と比べて有意差あり # $P < 0.05$ (Paired- t-test)

Fig. 30 経皮水分蒸散量の推移 (健常人・低用量)

量に有意な増減は見られなかった ($P>0.05$)。GlcCer1.2mg摂取群では前腕内側部及び下腿内側部のいずれの箇所でも、摂取6週間後で各初期値に対して経皮水分蒸散量が有意に低下し ($P<0.05$)、前腕内側部ではプラセボ群と比べても試験期間を通して経皮水分蒸散を有意に抑えた ($P<0.05$)。経皮水分蒸散量のGlcCer摂取による抑制効果については、1.2mg摂取によって皮膚のバリア機能が改善することが確認された。

3-2 健常人（高用量）の場合

被験者の摂取前の経皮水分蒸散量は $6.6\sim 15.9\text{g/m}^2/\text{h}$ （各被験者各測定箇所 $n=2$ の平均値）の範囲で、3群間では有意な差は認められなかった ($P>0.05$)。各カプセル摂取群における経皮水分蒸散量の推移を、初期値（摂取前の測定値）を100として見てみると（Fig. 31）、プラセボ群では経皮水分蒸散量に有意な変化は見られなかった ($P>0.05$)。前腕内側部では、GlcCer 2mg摂取群では2週間目 ($P<0.05$)、6週間目 ($P<0.01$) に、10mg摂取群では6週間目 ($P<0.05$) で各初期値に対して経皮水分蒸散量が有意に低下し、10mg摂取群ではプラセボ群と比べても試験期間を通して経皮水分蒸散を有意に抑えた ($P<0.05$)。下腿内側部では、GlcCer 2mg摂取群の摂取4週間目 ($P<0.01$)、6週間目 ($P<0.01$) 及び、10mg摂取群の摂取4週間目 ($P<0.05$)、6週間目 ($P<0.01$) で各初期値に対して経皮水分蒸散量が有意に低下し、いずれの群においてもプラセボ群と比べても試験期間を通して経皮水分蒸散を有意に抑えた ($P<0.01$)。しかし下腿内側部での経皮水分蒸散量のGlcCer摂取による抑制効果については、2mg摂取群と10mg



□ プラセボ群 ■ GlcCer 2mg/ day 群 ■ GlcCer 10mg/ day 群

初期値を100とした百分率で表した (means±SE, n=10)

試験期間を通して群間に有意差あり * $P<0.05$ (Dunnett's test)

初期値と比べて有意差あり # $P<0.05$ ## $P<0.01$ (Paired- *t*-test)

Fig. 31 経皮水分蒸散量の推移 (健常人・高用量)

摂取群の間では差がなかった ($P>0.05$)。このように、GlcCerの摂取によって皮膚のバリア機能が改善することが確認された。

3-3 アトピー性皮膚炎患者の場合

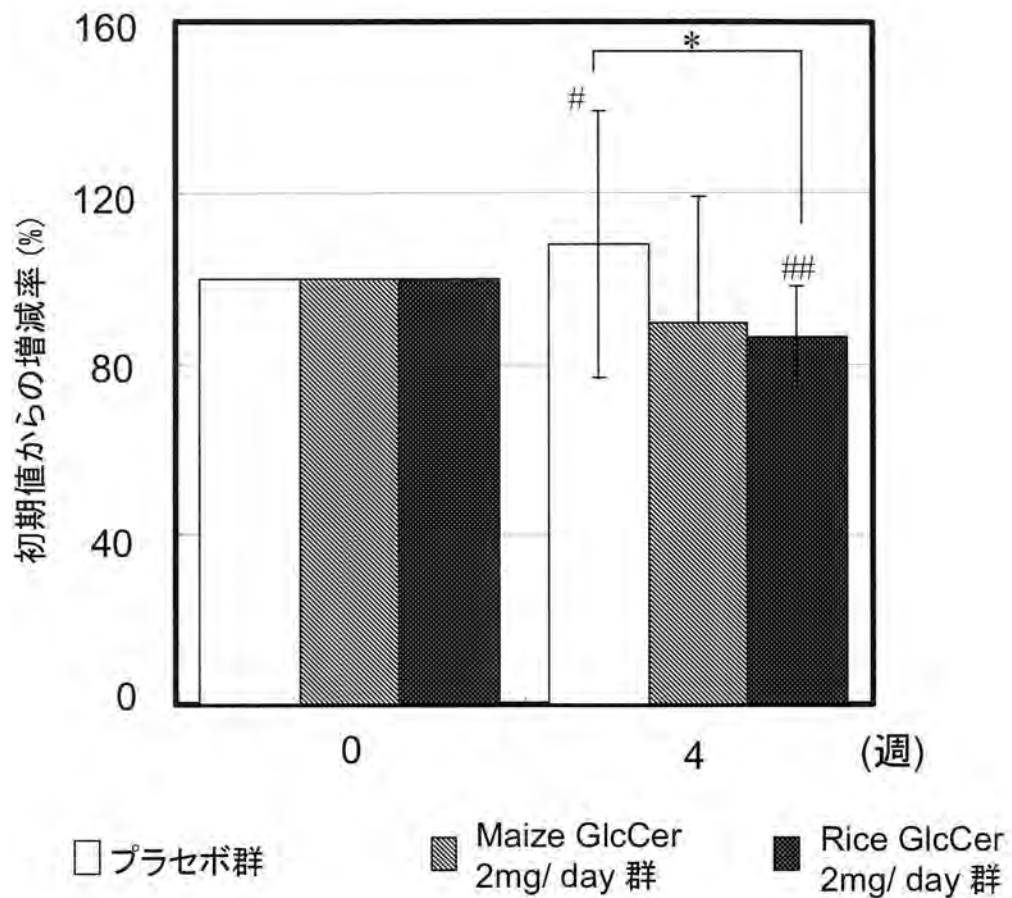
被験者の摂取前の経皮水分蒸散量は $6.5\sim 50.1\text{g/m}^2/\text{h}$ (各被験者 $n=2$ の平均値)の範囲で、3群間では有意な差は認められなかった

($P>0.05$)。各カプセル摂取群における経皮水分蒸散量の推移を、初期値(摂取前の測定値)を100として見てみると(Fig. 32)、プラセボ群では摂取4週間後に経皮水分蒸散量が有意に上昇した($P<0.05$)。この理由については先の皮表角層水分量の推移の項で述べた通り、外気環境(低温乾燥期)による影響と推測した。トウモロコシ由来GlcCer 2mg摂取群では経皮水分蒸散量に有意な変化は見られなかった

($P>0.05$)。コメ由来GlcCer 2mg摂取群では4週間目に経皮水分蒸散量を有意に抑え($P<0.01$)、プラセボ群と比べても試験期間を通して経皮水分蒸散を有意に抑えた($P<0.05$)。このように、コメ由来のGlcCerについては経口摂取による軽度アトピー性皮膚炎患者でのバリア機能の改善が確認された。

4. 各被験者の皮表角層水分量と経皮水分蒸散量における増減率の散布図と初期値の影響(健常人、高用量の場合)

摂取6週間後での皮表角層水分量と経皮水分蒸散量に関する個人データ(いずれも前腕内側部)の散布図を作成したところ(Fig. 33)、GlcCer摂取群では、20名中11名の被験者で角層水分量とバリア機能のいずれも増加することが示された。一方、GlcCerを摂

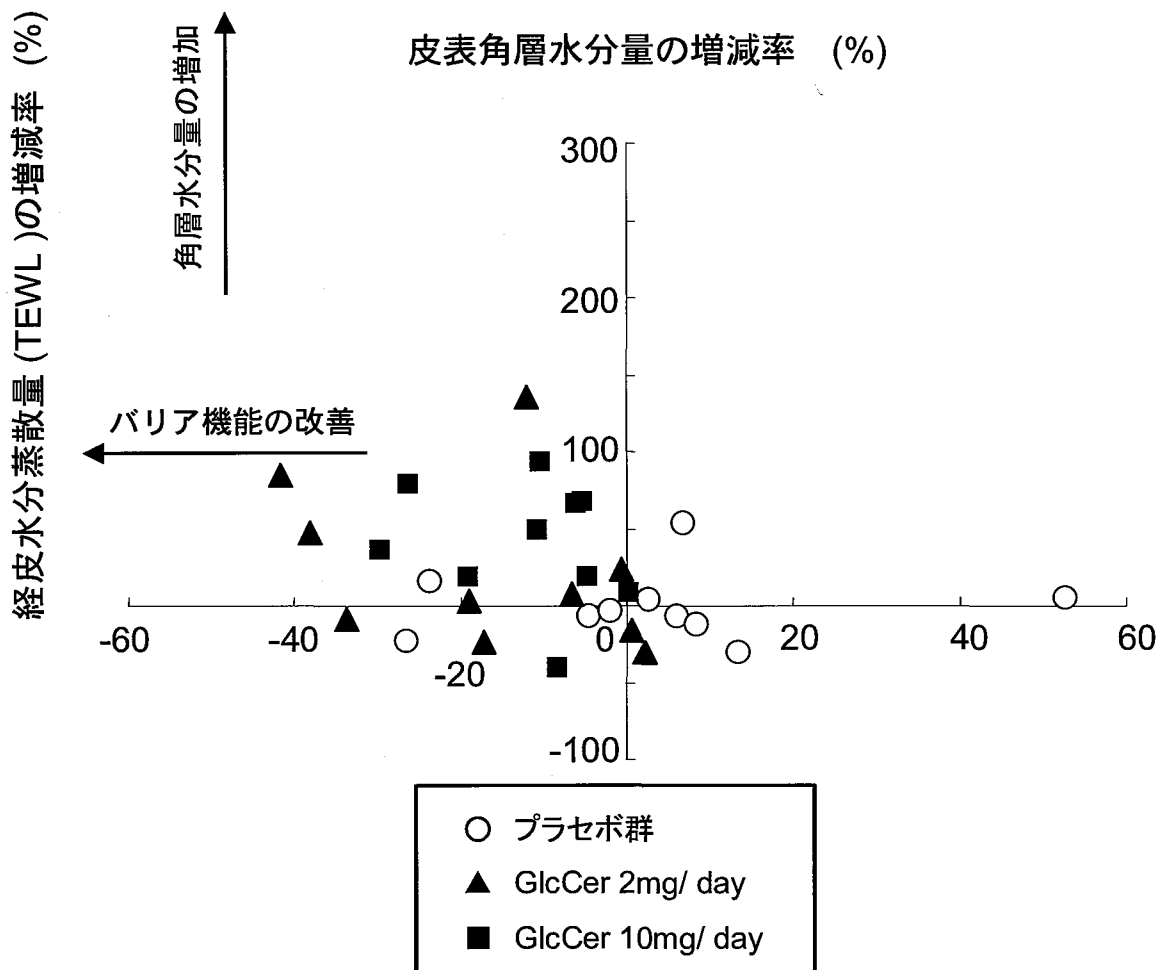


初期値を100とした百分率で表した (means±SE, n=11, 9, 11)

試験期間を通して群間に有意差あり * $P < 0.05$ (Fisher's test)

初期値と比べて有意差あり # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ (Paired- t-test)

Fig. 32 経皮水分蒸散量の推移 (軽度アトピー性皮膚炎患者)



各被験者の初期値を基準に 6週間後のそれぞれの増減率をプロットした。

Fig. 33 GlcCer経口摂取による皮膚保湿効果 (健常人・高用量)

取しても皮表角層水分量の増加や経皮水分蒸散量の減少が認められない被験者も見られ (Fig. 33)、被験者の体質によってはGlcCer摂取による皮膚への効果が現れにくいタイプがあることが推測された。また、被験者の初期値 (GlcCer摂取前の段階での測定値) が皮表角層水分量や経皮水分蒸散量の増減率に影響を与えることが考えられたが、多重比較分散 (MANOVA) 分析では初期値と皮表角層水分量や経皮水分蒸散量の増減率との間には相関が認められなかった (データ非掲載)。このことは、試験以前の被験者の皮膚の状態 (皮表角層水分量や経皮水分蒸散量の程度) が異なってもGlcCer摂取による皮膚の改善効果には影響を与えないことを意味するものであろう。

5. 皮膚状態の観察

5-1 健常人の場合

高用量試験 (トウモロコシ由来GlcCer 2mg及び10mg摂取) での被験者の皮膚状態のマイクロスコープでの観察 (被験者並びに群などの情報を伏せた盲検状態での目視評価) では、プラセボ群では、10例中7例において摂取前後でほとんど変化が見られなかった。具体的には試験開始前から比較的皮膚状態の良好な例もあったが、摂取前後で皮膚の表面がかさつき、皮丘が平坦で一方向に流れてきめが粗い例

(Fig.34の34歳女性) がいくつか観察された。一方、GlcCer 2mg摂取群では、摂取前は皮溝や皮丘が不鮮明であったのが、摂取後ではそれらが鮮明になって網目状に整い、同時にきめが細かくなった事例が10例中8例で観察された (Fig. 34の36歳男性と30歳女性)。GlcCer 10mg

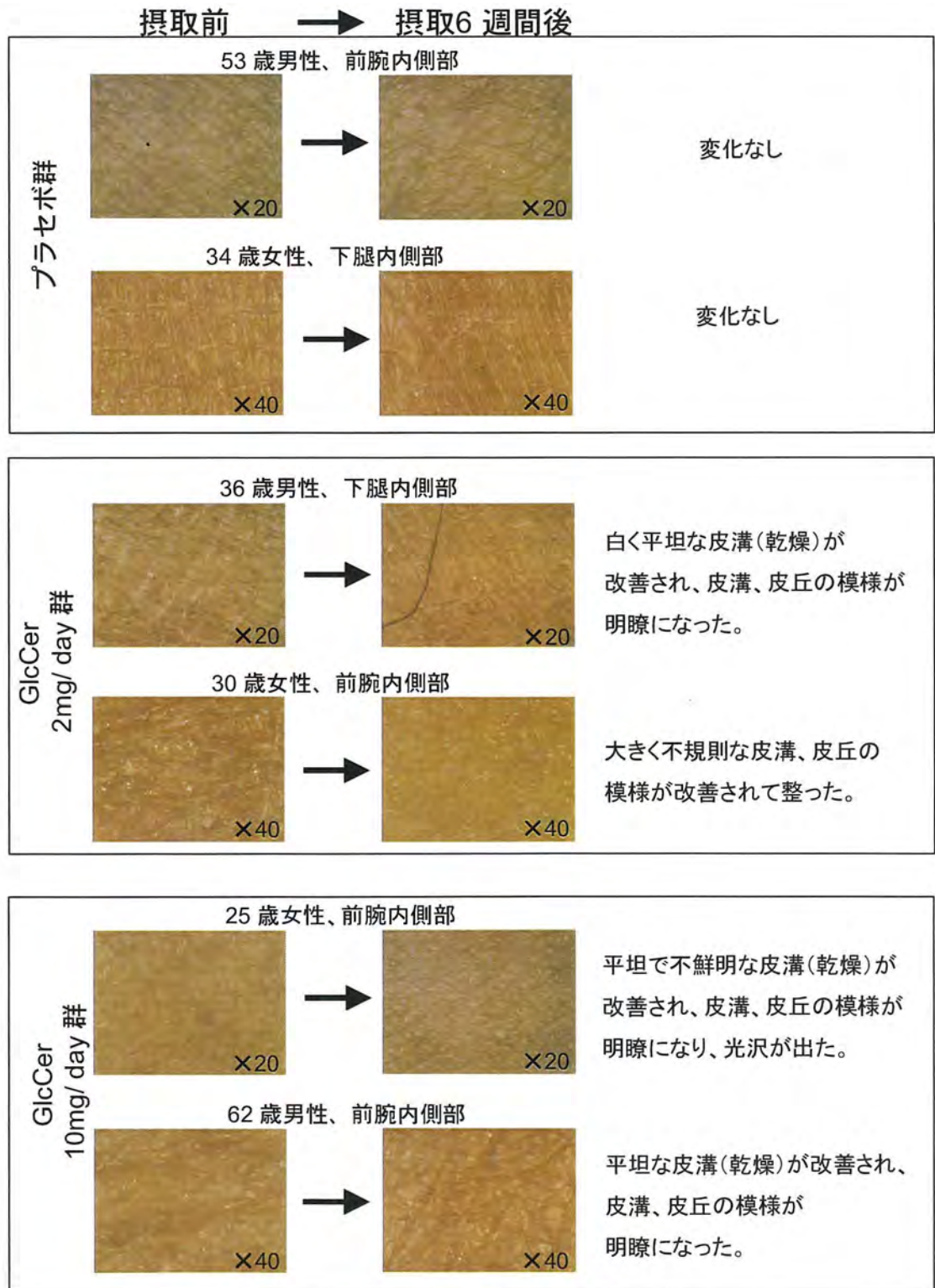


Fig. 34 肌状態の変化 (健常人・高用量)

摂取群では、2mg摂取群と同様な改善例が10例中9例で観察され、中には平坦で不鮮明な皮溝や乾燥状態が改善され、皮溝と皮丘の模様が明瞭になって光沢が出た事例も観察された（Fig. 34の62歳男性と25歳女性）。このように、健常人のGlcCer摂取群においては6週間後には総じて肌のきめが整うことが確認された。

5-2 アトピー性皮膚炎患者の場合

被験者の皮膚状態のマイクロスコープでの観察（被験者並びに群などの情報を伏せた盲検状態での目視評価）では、プラセボ群では、11例中5例において摂取前後でほとんど変化が見られず、2例で皮膚表面の状態の悪化が観察された。具体的には試験開始前から見られた皮膚乾燥に伴う軽度の表皮剥離や落屑、掻破痕、丘疹、紅斑が摂取後にも変わらず観察される例（Fig. 35の被験者No. 4とNo. 41）があった。一方、トウモロコシ由来GlcCer 2mg摂取群では9例中6例において、摂取前に見られた皮膚乾燥に伴う上記の状態が摂取後には改善されて、皮溝と皮丘の模様が鮮明になって網目状に整い、きめが細かくなった事例が観察された（Fig. 35の被験者No. 5とNo. 31）。コメ由来GlcCer 2mg摂取群では11例中8例において、摂取後にトウモロコシ由来GlcCer摂取群と同様に改善された例が観察された。（Fig. 35の被験者No. 16とNo. 28）。このように、軽度アトピー性皮膚炎患者のGlcCer摂取群においては、4週間後には皮膚表面の状態が改善し、肌のきめが整う様子が多くの被験者で確認された。

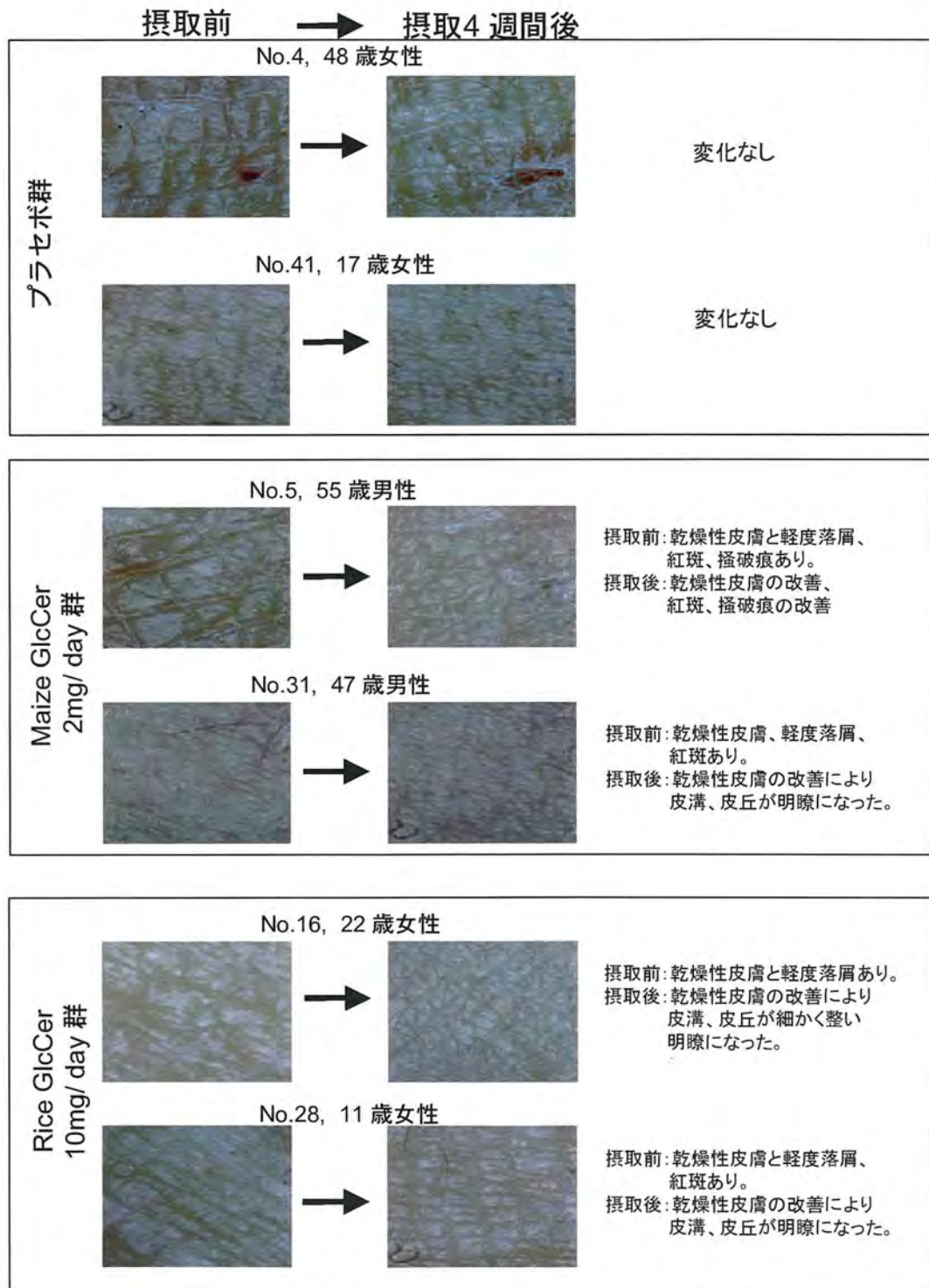


Fig. 35 肌状態の変化 (軽度アトピー性皮膚炎患者)

6. SCORAD 指標による全般改善度

カプセル摂取前とカプセル摂取4週間後の受診時における医師による診察並びに患者本人による評価を Table 16 の手法でスコア化し Fig. 23 の計算式によって得られた全般改善度を Fig. 36 に示す。プラセボ群では「著しく改善」区分に該当する者はおらず、「かなり改善」2名、「やや改善」5名、「不変」1名、「悪化」3名であった。トウモロコシ由来 GlcCer 摂取群でも「著しく改善」区分に該当する者はおらず、「かなり改善」2名、「やや改善」4名、「不変」3名、「悪化」0名であった。コメ由来 GlcCer 摂取群でも「著しく改善」区分に該当する者はおらず、「かなり改善」1名、「やや改善」8名、「不変」2名、「悪化」0名であった。このようにプラセボ群で見られた「悪化」区分該当者（27.3%）が、GlcCer 摂取群ではいずれにおいても見られなかった。また「かなり改善」、「やや改善」を合わせた割合は、プラセボ群 63.6%、トウモロコシ由来 GlcCer 摂取群 66.7%、コメ由来 GlcCer 摂取群 81.8%であり、この結果は先述の経皮水分蒸散量測定結果と符合していた。

7. 被験者の血液成分の生化学的データとアンケート所見

高用量試験（トウモロコシ由来GlcCer 2mg及び10mg摂取）での被験者の血液成分の生化学検査では、いずれの群でもカプセル摂取前後での異常変動は見られなかった（Table 17）。また、被験者のアンケート結果では、有害な事象は観察されなかった。肌状態の改善効果については、GlcCer 10mg摂取群では10例中4例が改善と回答し、4例が分

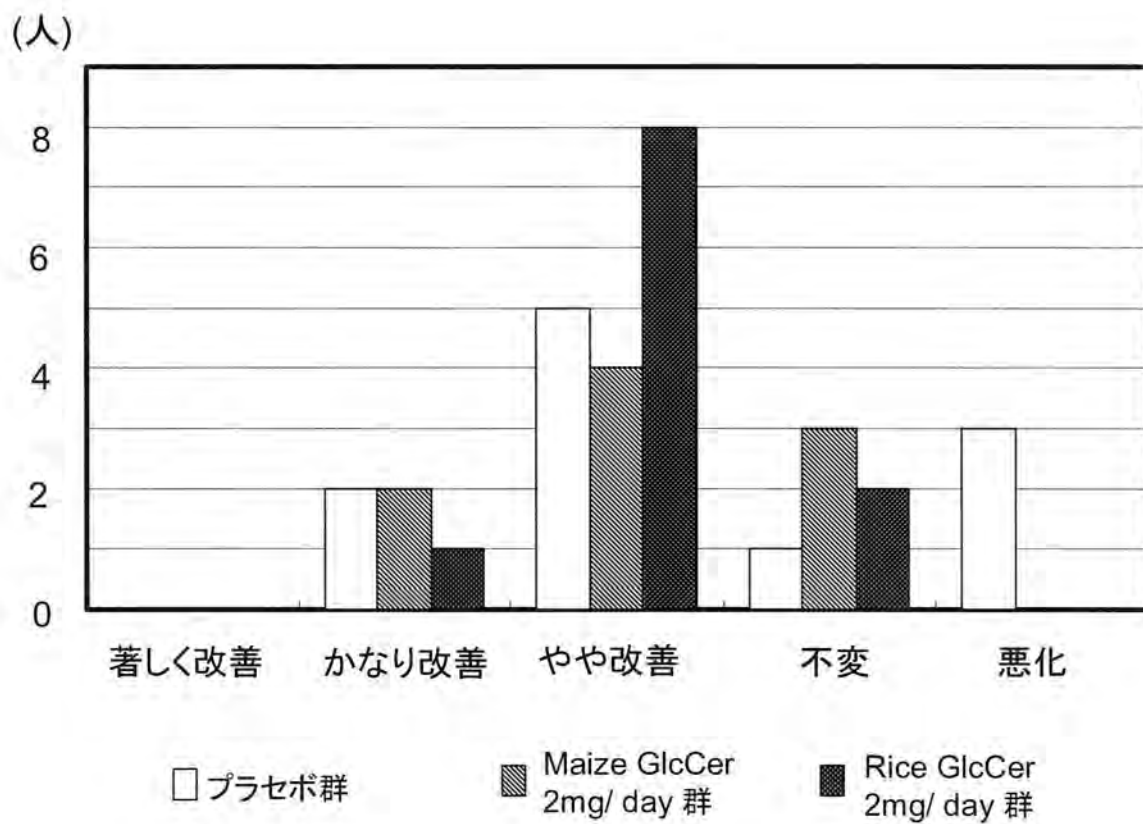


Fig. 36 SCORAD指標から導かれた全般改善度 (軽度アトピー皮膚炎患者)

Table 17 血液の生化学検査（健常人・高用量）

検査項目	単位	基準値 (日本)	群	試験開始前	摂取6週間後
Total cholesterol	mg/dL	140-219	プラセボ群	198.7±33.4	206.8±35.3 **
			GlcCer 2mg/ day	205.4±43.9	199.2±32.1
			GlcCer 10mg/ day	205.8±43.1	204.8±48.6
Triglycerides	mg/dL	35-149	プラセボ群	87.7±67.4	79.0±38.7
			GlcCer 2mg/ day	94.4±57.0	93.4±62.6
			GlcCer 10mg/ day	104.5±66.3	108.4±68.8
HDL-cholesterol	mg/dL	40-85	プラセボ群	78.0±17.1	85.7±19.6
			GlcCer 2mg/ day	71.8±11.6	74.3±19.2
			GlcCer 10mg/ day	78.3±22.2	79.0±19.9
LDL-cholesterol	mg/dL	70-139	プラセボ群	103.4±28.8	105.1±30.7 **
			GlcCer 2mg/ day	114.1±34.7	106.7±23.0
			GlcCer 10mg/ day	109.0±43.5	107.6±49.0
GOT	IU/L	10-40	プラセボ群	18.9±4.8	24.8±13.8
			GlcCer 2mg/ day	21.6±10.1	21.6±9.3
			GlcCer 10mg/ day	22.5±9.4	20.7±6.8
GPT	IU/L	5-45	プラセボ群	18.3±7.0	23.1±11.4 *
			GlcCer 2mg/ day	23.0±16.8	22.7±13.1
			GlcCer 10mg/ day	18.7±7.7	16.9±7.9
γ-GTP	IU/L	M: ≥70 F: ≥30	プラセボ群	24.4±12.9	24.9±14.5
			GlcCer 2mg/ day	33.9±44.2	28.9±24.6
			GlcCer 10mg/ day	62.2±82.5	52.8±71.7
Uric acid	mg/dL	M: 3.7-7.0 F: 2.5-7.0	プラセボ群	4.4±1.9	4.6±1.9
			GlcCer 2mg/ day	4.1±1.3	4.3±1.4
			GlcCer 10mg/ day	4.9±1.6	4.9±1.7

means±SE, n=10

試験開始日との比較

* P<0.05, **P<0.01 (Paired t-test)

プラセボとの群間比較

P<0.05 (Dunnett's test)

からない、2例が変化なしと回答した。GlcCer 2mg摂取群では10例中1例が改善と回答し、7例が分からない、2例が変化なしと回答した。プラセボ群では10例中8例が改善と回答し、分からない、変化なしと回答した者が各1例だった。

8. 日常的に摂取している食事の構成スフィンゴイド塩基の組成先に、著者らは供試した2日間の自衛隊食に含まれるスフィンゴ脂質量は、朝食では26.5と67.2mg/meal、昼食では58.0と32.7mg/meal、夕食では207.9と27.9mg/mealであったことを報告している⁷⁸⁾。今回、各食事から分離調製したスフィンゴ脂質画分の構成スフィンゴイド塩基の組成を分析したところ、少なくとも11種のスフィンゴイド塩基の存在が認められた (Table 18)。1日目の夕食では著量の、C16-4-*trans*-sphingene (d16:1^{4t}) が検出されたが、これは副食に用いられたイカやエビなどの海産物のスフィンゴリン脂質に由来すると推測される⁸⁴⁻⁸⁶⁾。また9-methyl-*trans*-4,*trans*-8-sphingadienine (9-Me d18:2^{4t,8t}) はキノコや酵母中のGlcCerに由来するものであろう³⁹⁻⁴⁰⁾。植物に特徴的な8-不飽和型 [*trans*-8-sphingene (d18:1^{8t})、*cis*-8-sphingene (d18:1^{8c})、d18:2^{4t,8t}、d18:2^{4t,8t}、4-hydroxy-*trans*-8-sphingene (t18:1^{8t}) および t18:1^{8c}] の占める割合は、合計で朝食では73%と52%、昼食では61%と63%、夕食では17%と82%であった。このように、植物由来スフィンゴイド塩基の割合は食事メニューによって変動するが、通常の食事に含まれるスフィンゴ脂質の少なくとも半量程度は植物性GlcCerに由来すると推測される。各食事の植物起源のスフィンゴ脂質の概量は、今回の分析値から算

Table 18 自衛隊の食事におけるスフィンゴ脂質中の
スフィンゴイド塩基組成

	(mol%)					
	1 日目			2 日目		
	朝	昼	夜	朝	昼	夜
Sphinganine	2	5	3	4	2	2
<i>trans</i> -4-Sphingenine	7	16	20	7	16	7
<i>trans</i> -8-Sphingenine	2	4	2	2	2	6
<i>cis</i> -8-Sphingenine	1	7	1	1	1	9
<i>trans</i> -4, <i>trans</i> -8-Sphingadienine	19	10	2	16	10	10
<i>trans</i> -4, <i>cis</i> -8-Sphingadienine	14	15	3	6	8	9
4-Hydroxyshinganine	9	12	7	8	12	8
4-Hydroxy- <i>trans</i> -8-shingenine	23	14	3	16	31	30
4-Hydroxy- <i>cis</i> -8-shingenine	14	11	6	11	11	18
9-Methyl- <i>trans</i> -4, <i>trans</i> -8-shingadienine	2	4	6	0	0	1
C16-shingosine (Marine origin)	7	2	47	7	2	0

出すると、1食当たり朝食では19mgと35mg、昼食では35mgと21mg、夕食では35mgと23mgとなった。また、1日当たりの植物由来GlcCer摂取量は供試した自衛隊食の場合79~89mgであった。

9. ニワトリの各臓器における植物スフィンゴイド塩基の検索

植物性飼料で飼育されているニワトリの餌中及び臓器中から分離調製したスフィンゴ脂質画分の構成スフィンゴイド塩基の組成を分析したところ、少なくとも11種のスフィンゴイド塩基の存在が認められた(Table 19)。餌中からは著量の植物由来のスフィンゴイド塩基が検出されたが、それを日常的に摂取しているニワトリの臓器からは、植物由来に特有の8-不飽和型[*trans*-8-sphingenine (d18:1^{8t})、*cis*-8-sphingenine (d18:1^{8c})、d18:2^{4t,8t}、d18:2^{4t,8c}、4-hydroxy-*trans*-8-sphingenine (t18:1^{8t}) および t18:1^{8c}]は検出されなかった。

考察

これまでに植物やキノコのGlcCer、あるいは牛乳脂肪球皮膜中のスフィンゴ脂質(主としてSM)を含有する画分の経口摂取によって皮表角層水分量の増加やバリア機能の向上が観察されることが報告されている(42,69,71-74,77,87-89)。それらにはスフィンゴ脂質以外に他の夾雑脂質成分やタンパク質が混在する試料あるいはそれを利用した応用製品を用いて評価した研究も含まれるが、Uchiyamaらはマウスに純度100%のGlcCerを30µg/dayを2週間経口摂取させ、SDS(sodium dodecyl

Table 19 ニワトリの飼料及びその臓器中でのスフィンゴイド塩基組成

	ニワトリ各臓器			
	ニワトリ飼料	心臓	肝臓	腸
Sphinganine	5.3	4.6	4.0	4.0
<i>trans</i> -4-Sphinganine	1.4	93.8	94.0	94.0
<i>trans</i> -8-Sphinganine	1.9	0	0	0
<i>cis</i> -8-Sphinganine	1.4	0	0	0
<i>trans</i> -4, <i>trans</i> -8-Sphingadienine	6.0	0	0	0
<i>trans</i> -4, <i>cis</i> -8-Sphingadienine	11.5	0	0	0
4-Hydroxysphinganine	23.6	0.3	0.9	0.9
4-Hydroxy- <i>trans</i> -8-shingenine	13.0	0	0	0
4-Hydroxy- <i>cis</i> -8-shingenine	14.4	0	0	0
C20-shingosine (<i>trans</i> -4-sphinganineのC20同族体)	0	0.6	1.0	0.6
C16-shingosine	1.6	0.8	0.1	0.1

(mol%)

sulfate) 処理した皮膚での経皮水分蒸散量がコントロール群と比べて有意に減少することを報告している⁷³⁾。今回、試験に供試したコメ及びトウモロコシ由来のGlcCerに共存する脂質成分は実質的にステロール配糖体のみで、その純度は約70%及び約50%であった。先にAsai & Miyachiは、本研究と同じトウモロコシ由来GlcCerを用いて、健常人に対して経口摂取による表皮角層水分量と経皮水分蒸散量の変動を1日当たりの摂取量0.6mgと1.2mgで評価し、0.6mg摂取群では皮膚保湿効果が1.2mg摂取群と比べて低いと報告されている⁴²⁾。本研究において筆者らも低用量試験としてトウモロコシ由来GlcCerと組成が類似するコメ由来GlcCer (純度約70%)を用いて、健常人に対して同様の結果を得たが、一方、高用量試験として行った2mgと10mgのGlcCer摂取群との間では表皮角層水分量の増加や経皮水分蒸散量の減少には濃度依存性は見られなかった。また、健常人および軽度アトピー性皮膚炎患者の皮膚の表面画像の観察においては、由来原料(コメ及びトウモロコシ) 或いは、摂取量(0.6mg, 1.2mg, 2mg及び10mg)が異なる群でもGlcCerの経口摂取後ではキメが細かく整って肌状態が改善されている様子が観察された。これらのデータと既往の文献中の結果^{73,89)}を考え合わせると、食事性のGlcCerが皮膚のバリア機能を向上させて皮膚の状態を改善させる成分であることを裏付けるものであろう。また、本研究の結果からサプリメントとして経口摂取する植物由来のGlcCerの有効摂取量は1日当たり1~2mgが適当であると判断される。

一方、今回、保湿効果が認められた2mgの5倍量(10mg)のGlcCerを摂取しても6週間後の血液成分の生化学的データには異変は見られなかった。また、自覚症状の増悪を訴える被験者も試験期間を通して

いなかったが、植物起源のGlcCerの過剰摂取に対する安全性の確認についてはさらに長期間での検討が必要であろう^{66,90)}。

以前に筆者らは、栄養士によって管理された典型的な食事の1例として、自衛隊（高カロリー食）と老人ホーム（低カロリー食）の給食を分析し、1日当たりそれぞれ128~292mgと45~81mgのスフィンゴ脂質が食事に含まれることを報告している⁷⁸⁾。その分析試料を用いて、今回、構成スフィンゴイド塩基を分析した結果、食事性スフィンゴ脂質としては、特別な食事構成（イカなどの海産物の多食など）でない限り、動物性食品よりも植物性食品に由来する割合が高いことが明らかとなった。また、植物性飼料のみで飼育されるニワトリについて、その餌中及び臓器中の構成スフィンゴイド塩基の組成を分析したところ、餌中からは著量の植物由来のスフィンゴイド塩基が検出されたが、それを日常的に摂取しているニワトリの臓器からは、植物由来に特有の8-不飽和型スフィンゴイド塩基は検出されなかった。また、牛の精肉を分離する際の筋や腱等の部位についても調査したが、意味ある量の植物型（8-不飽和型スフィンゴイド塩基）は存在しなかった（データ非掲載）。更に、本研究以外でも植物スフィンゴ脂質を含む食餌を実験動物に投与しても皮膚中にはd18:2^{4,8}などの植物由来のスフィンゴイド塩基はこれまでに検出されていない。植物性GlcCerはd18:1^{4t}含有の動物型スフィンゴ脂質と同様に消化管や腸内細菌の作用で分解されることが明らかになっているが、遊離したd18:1^{4t}は腸管から吸収されて利用されるのに対して、8-不飽和型の植物性スフィンゴイド塩基は体内にはほとんど吸収はされないと考えられている⁹¹⁻⁹⁴⁾。これらのことから、経口摂取した植物性スフィンゴ脂質の皮

膚に対する効用の面では、食材中に膜成分として存在するスフィンゴ脂質は十分に生理機能が発現できない形態となっており、分離濃縮された脂質として摂取することが重要であると推測される。また、食餌由来の植物性スフィンゴ脂質構成成分が皮膚に移行し、それを材料とした皮膚でのセラミド量の増加によって皮膚状態が改善される⁹⁵⁻⁹⁶⁾とは言えないであろう。

また、今回の軽度アトピー性皮膚炎患者に対して実施した試験に使用したトウモロコシ由来とコメ由来の GlcCer の構成分子種は似ていたが (Fig. 6 及び Fig. 7)、カプセルに配合した各 GlcCer 含有食品素材中に含まれるステロール配糖体 (SG) の量は異なっていたと推測される (Table 15 及び Fig. 24、26)。このことが今回の試験において両 GlcCer 摂取群の結果で見られた差 (Fig. 32 及び Fig. 36) に影響している可能性が示唆された。GlcCer 摂取による皮膚への効果については SG をはじめたとした夾雑物の影響についても、今後更なる検証が必要と考える。

結 語

植物由来の GlcCer を主成分とした「セラミド素材」は、皮膚の保湿性向上や美肌効果を訴求した機能性素材として利用されている。これまでの経口摂取した植物由来「セラミド素材」の皮膚保湿効果に関するヒトでの研究では、低濃度 GlcCer 濃縮物を用いて、1日当たり 1mg 程度の GlcCer の摂取で皮膚保湿性が認められると報告されているが^{42,71-74)}、スフィンゴ脂質は動植物体に広く分布する脂質成分であり、

一般の食品からの1日のスフィンゴ脂質摂取量は300mg以上と考えられている⁷⁵⁾。本研究では、“健常人を対象に、夾雑する脂質成分を極力除いて比較的高濃度に濃縮された植物由来GlcCerを油に乳化させて作製したソフトカプセルをGlcCerとして0.6mgあるいは1.2mgを経口摂取させた試験（健常人に対する効果の検証・低容量）”を実施することで、既報⁴²⁾のトウモロコシとは異なるコメ原料由来GlcCerについてもその効果が確認された。また“健常人を対象にGlcCer濃縮画分を用いてGlcCerとして2mg或いは10mgを経口摂取させた試験（健常人に対する効果の検証・高容量）”を実施し、GlcCerの皮膚保湿効果に対する有効摂取量を明らかにした。さらに本研究において、“軽度アトピー性皮膚炎患者に対しても植物由来GlcCerを用いてGlcCerとして2mgを経口摂取させた試験（軽度アトピー性皮膚炎患者に対する効果の検証）”を実施し、軽度アトピー性皮膚炎患者に対しての効果についても検証した。今回の結果と既往の文献中の結果^{73,89)}を考え合わせると、GlcCerは経口摂取によって皮膚のバリア機能を向上させて皮膚の状態を改善させる成分であると結論づけることができよう。サプリメントとして経口摂取する植物由来のGlcCerの有効摂取量は、1日当たり1~2mgが適当であると判断された。一方、皮膚に対する効用の発現メカニズムについては未詳で、今後の研究が期待される。しかし、その効果が摂取した植物性スフィンゴイド塩基の皮膚への移行と皮膚セラミドの成分としての利用によるという通説は妥当性に欠けるものであろう。

V. 総合考察

「内外美容」という言葉が生まれたことで、それまでは「美容」と言えば“成人女性が化粧品や施術によって外側から磨き上げること”であった時代から、現在は老若男女問わず心身の健康とリンクしてよりよく生きるためには、体の表面（外）だけでなく食を通して体の内側からの働きかけも重要であるという認識を持つ人が増えている。生活様式や価値観も多様化し、機能性食品素材はサプリメントという一部愛好家のための特殊な嗜好品から、もっと身近で一般的ないわゆる食品のレベルにその位置づけも変化し、消費者の選択の幅も広がっている。こうした傾向は今後ますます波及しながら、世論は良品悪品の見極めに厳しさを増すと考える。本研究で取り上げた機能性食品素材としての植物スフィンゴ脂質（GlcCer）についても例外ではなく、科学的実証に基づいた議論とそれに裏打ちされた産業が望ましいスタイルであると考え、著者らはこれを様々な角度から取り組んだ。

第Ⅱ章では、比較的高濃度に濃縮された GlcCer 画分（GlcCer 含量 50%以上）を工業的に大量かつ安定的に製造する方法を確立し、その食品素材としての保存（経時）安定性及び熱或いは pH に対する安定性を確認することで食品素材としての有用性を示そうとした。そうして製造した食品素材中の GlcCer は本研究の加熱や pH 変動範囲では大きな損傷や変化は認められず、食品の二次加工シーンでは問題がないことを確認した。更に、市場の現状を把握するため流通品を入手し、TLC や HPLC-ELSD 分析に供してそれらの精製度や性状を比較検討したところ、GlcCer 供給素材としての品質に差異が認められた。これと

メーカー設定の販売価格には関係が見られず、また HPLC-ELSD による定量分析では、各メーカーが担保する含有量と一部異なる値を得た。機能性食品素材は、有効成分の含有量だけでなく、品質（純度、夾雑物）にも注目することが必要であり、効果の発現のしやすさ等にも影響を及ぼす可能性が考えられた。

第Ⅲ章では、植物由来 GlcCer について、最近市販された標準試薬品を用い、既報の蒸発光散乱検出器付き高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ELSD）分析の条件下での定量分析法の単一試験室による妥当性確認を行ない、本分析法の有用性を示そうとした。その結果、今回評価したパラメータ（選択性、直線性、真度、併行精度及び室内再現精度）においてはいずれも良好な結果が得られたことから、コムギで開発された既報の分析条件プロトコルは、異なるマトリックスにおいても適用が可能であることを確認した。

第Ⅳ章では、まずはじめに、健常人に対して低用量（GlcCer として 0.6mg 或いは 1.2mg/日）試験を実施することで、既報（浅井らのトウモロコシ由来 GlcCer を用いた試験）とは由来原料の異なる素材での効果を検証、確認した。次に、健常人に対して高用量（GlcCer として 2mg あるいは 10mg/日）試験を実施することで、GlcCer の皮膚保湿効果に対する有効摂取量を明らかにしようとした。その結果、サプリメントとして経口摂取する植物由来の GlcCer の有効摂取量は 1 日当たり 1~2mg が適当であると判断した。また、軽度アトピー性皮膚炎患者に対して GlcCer として 2mg を経口摂取させる試験を実施することで、健常人のみならずアトピー性皮膚炎患者に対してのバリア機能改善効果についても検証、確認をした。

これまでのスフィンゴ脂質濃縮物摂取による皮膚保湿効果や乾燥肌の症状緩和作用についての研究では、大部分がヒトとはスフィンゴイド塩基組成が異なる植物やキノコ起源の GlcCer を使用しているが、4-*trans*-sphinganine (d18:1^{4t}) を主成分とする SM を含む牛乳脂肪球皮膜成分についても皮膚に対する効果が認められている^{69,77)}。したがって、構成スフィンゴイド塩基の違い(8-不飽和結合や9-メチル基の有無)は少なくとも皮膚に対する生理作用には影響しないと考えられる。経口摂取による皮膚保湿効果の発現メカニズムについてはいずれのスフィンゴ脂質でも明らかになっていないが、最近、コルニフィドエンヴェロープ(cornified envelope)とタイトジャンクションの形成に関わる遺伝子群が発現上昇することによって皮膚バリア機能が改善することが報告されている⁸⁹⁾。また、牛乳スフィンゴ脂質画分の摂取によって皮膚角層の遊離セラミドが増加することは動物実験では報告されているが⁶⁹⁾、これまでのヒト試験では皮膚表皮部のスフィンゴ脂質組成の変動については詳細に分析されていない。また、本研究第IV章で報告したニワトリ臓器からのスフィンゴイド塩基の分析、あるいは本研究以外で植物スフィンゴ脂質を含む食餌を実験動物に投与した実験でも皮膚中には d18:2^{4,8}などの植物由来のスフィンゴイド塩基はこれまでに検出されていない。したがって、食餌由来の植物性スフィンゴ脂質構成成分が皮膚に移行し、それを材料とした皮膚でのセラミド量の増加によって皮膚状態が改善される⁹⁵⁻⁹⁶⁾とは言えないであろう。

植物性 GlcCer は d18:1^{4t} 含有の動物型スフィンゴ脂質と同様に消化管や腸内細菌の作用で分解されることが明らかになっているが、遊離

した d18:1^{4t} は少量でも腸管から吸収されて利用されるのに対して、8-不飽和型の植物性スフィンゴイド塩基は体内にはほとんど吸収はされないと考えられている⁹¹⁻⁹⁴)。本研究第IV章の日常的な食事の中の植物性スフィンゴイド塩基の分析結果から、我々は通常の食事から少なくとも 20mg 以上の植物性スフィンゴ脂質 (GlcCer) を毎日摂取していることがわかった。それにも関わらず第IV章の経口摂取による皮膚保湿効果の検証結果からは、植物から抽出した GlcCer 濃縮物を 1日 1~2mg、油脂に分散させたサプリメントの形態で摂取することで、皮膚バリア機能の向上による皮膚保湿状態が改善されることを意味している。この一見矛盾した事実は、食事 (食材) に含まれるスフィンゴ脂質の存在形態が生体利用性に影響することを示唆するのかもしれない。即ち、我々が食事を摂取し、咀嚼・消化吸収の過程では、各食材中に存在するスフィンゴ脂質を効率的に消化分解できるような形態にすることが困難であり、食事性スフィンゴ脂質の皮膚に対する生理機能の発現には分離・濃縮した後に油脂に分散させた形態での摂取が重要であると考えられる。膜脂質であるスフィンゴ脂質は、生体膜中の固く充填されているドメインであるラフト構造に局在すると言われて⁹⁷)。今後、消化モデル系を用いて、食品マトリックス中に含まれるスフィンゴ脂質の消化吸収における動態を詳細に検討する必要があるだろうと考える。

本研究第IV章では、GlcCer の摂取 2 週間後でも皮膚状態の改善が観察されたが (Fig. 27 及び Fig. 31)、角質層のターンオーバーは約 28 日とされており⁹⁸)、このことから食事 (餌) 由来のスフィンゴ脂質が体内に取り込まれて皮膚でのセラミドやガラクトシルセラミド合成

に利用されるとする推論とは符合しないであろう⁹⁹⁾。食事性スフィンゴ脂質の皮膚への効果については、これまでの報告から、経口摂取されたスフィンゴ脂質は消化管や腸内細菌の作用で分解された後、遊離したスフィンゴイド塩基の極一部（動物型では0.02%未満程度、植物型では0.005%未満程度）は腸管吸収される⁹⁴⁾も、特に植物型についてはリンパ以降での検出が確認されていないことから、その先の利用のされ方については明らかにされておらず、動物実験⁵⁴⁾からも大半は糞便として排出されていると考えられる。また、草食動物の臓器や皮膚から意味ある量の植物型（8-不飽和型）のスフィンゴイド塩基は見つかっていないことから、これらを皮膚成分とした直接的な利用による皮膚への効果の発現という仮説は考えにくい。スフィンゴ脂質を経口摂取させたマウスの皮膚で皮膚の形成に関与する遺伝子群の発現が上昇したことにより皮膚バリア機能が改善するという報告⁸⁹⁾があるが、先述のスフィンゴイド塩基の吸収率と皮膚のターンオーバーとの時間的矛盾を鑑みると、吸収されたスフィンゴイド塩基が皮膚に作用して遺伝子発現を促すと推測するよりも、むしろ、腸管上皮においてグルコシルセラミドやその分解物が情報伝達系などに作用し、そのシグナルが皮膚でのコラーゲンやセラミドの合成促進につながって皮膚保湿性向上を引き起こしたことによると推測される（Fig. 37）。今後、機能性因子としてのスフィンゴ脂質の利用拡大を一層図るためには、経口摂取されたスフィンゴ脂質の体内動態を明らかにし、皮膚に対する生理機能発現のメカニズムを分子レベルで究明することが重要であろうと考える。

人類は洋の東西を問わず昔から“健康と長寿”を幸福のひとつの指

標としてきたが、近年の高齢化が進んでいるわが国では経済的、物質的な豊かさがこれに加わり、Agelessな（加齢を感じさせない）“美しさ”が様々な分野で望まれるようになった。また、「食」では、ただ空腹などの欲求を満たすための量と味覚中心の食事から、心身の健康と美しさを維持するための取捨選択を考えた食事へと、そのあり方や価値観が変化しつつある。そうした中で消費者はより良質で各自に有用なものを選択するための適切な情報と知識を持ち賢く利用する力を付けることが必要であり、一方、企業は科学的根拠と良心に基づいた情報発信と良品の製造、販売努力を惜しまないことで、機能性食品素材は今後も人々の健康に大いに貢献できるものとする。

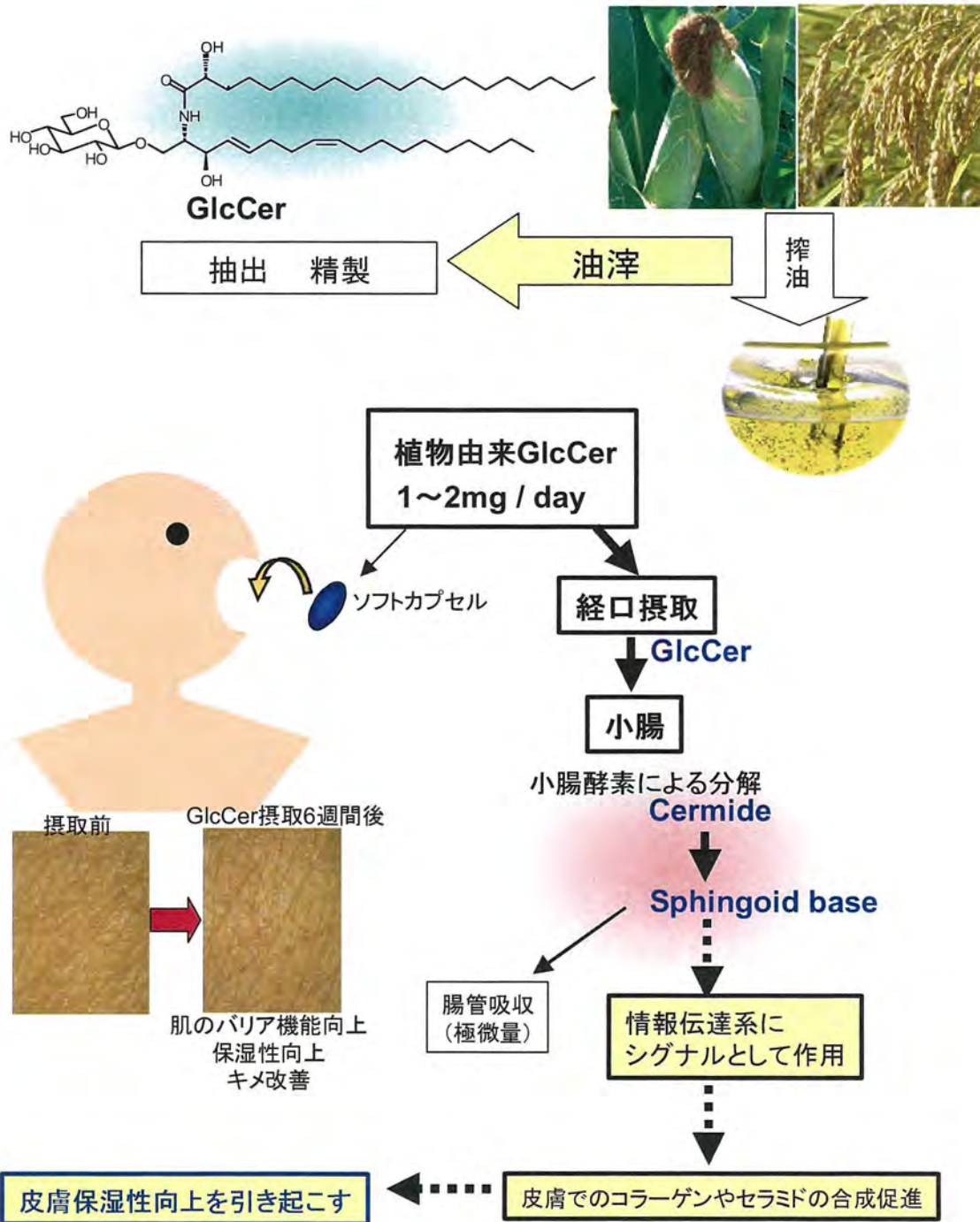


Fig. 37 植物スフィンゴ脂質(機能性食品素材)の経口摂取による皮膚保湿効果(推測)

VI. 参考文献

- 1) 藤野安彦, 農畜産物の脂質に関する基礎的研究, 農化, **56**, 353-367 (1982).
- 2) 大西正男, 伊藤精亮, 植物スフィンゴ脂質の構造特性と低温耐性, 油化学, **46**, 1213-1225 (1997).
- 3) 西川研次郎監修, 食品機能性の科学編集委員会編集, 食品機能性の科学 「第2節 スフィンゴ脂質」, 産業技術サービスセンター, pp. 576-592 (2008).
- 4) 大西正男, 植物および真菌の脂質、特にスフィンゴ脂質の分子種特性と機能解析に関する研究, オレオサイエンス, **9**, 543-551(2009).
- 5) Uchida, Y., Hara, M., Nishio, H., Sidransky, E., Inoue, S., Otsuka, F., Suzuki, A., Elias, PM., Holleran, WH. and Hamanaka, S., Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides, *J. Lipid Res.*, **41**, 2071-2082 (2000).
- 6) Imokawa, G., Akasaki, S., Kawamata, A., Yano, S. and Takaishi, N., Water-retaining function in the stratum corneum and its recovery properties by synthetic pseudoceramides, *J. Sci., Cosmetic. Chemists.*, **40**, 273-285 (1989).
- 7) Holleran, W. M., Takagi, Y. and Uchida, Y., Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders, *FEBS Lett.*, **580**, 5456-5466 (2006).
- 8) Masukawa, Y., Narita, H., Shimizu, E., Kondo, N., Sugai, Y., Oba,

- T., Homma, R., Ishikawa, J., Takagi, Y., Kitahara, T., Takema, Y. and Kita, K., Characterization of overall ceramide species in human *stratum corneum*, *J. Lipid Res.*, **49**, 1466-1476 (2008).
- 9) Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A. and Igarashi, Y., *Biochimie.*, **91**, 784-790 (2009).
- 10) 正木 仁, 手塚 正, 加齢によって表皮細胞および角層細胞にみられた変化, *日皮会誌*, **96**, 189-193 (1986).
- 11) Rogers, J., Harding, C., Mayo, A. and Banks, J., Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons, *Arch. Dermatol. Res.*, **288**, 765-770 (1996).
- 12) Denda, M., Koyama, J., Hori, J., Takahashi, M., Hara, M. and Tagami, H., Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids, *Arch. Dermatol. Res.*, **285**, 415-417 (1993).
- 13) 小川秀興, 新村真人, *皮膚科学*, 南山堂, pp. 13-51 (1998).
- 14) 瀧川雅浩, *皮膚科 STEP Series*, 海馬書房, pp. 4-104 (2005).
- 15) 高木 豊, 角層バリア機能から見たアトピー性皮膚炎と製品開発の展望, *フレグランスジャーナル*, **6**, 34-40 (2003).
- 16) Jin, K., Higaki, Y., Takagi, Y., Higuchi, K., Yada, Y., Kawashima, M. and Imokawa, G., Analysis of beta-glucocerebrosidase and ceramidase activities in atopic and aged dry skin, *Acta. Derm. Venereol.*, **74**, 337-340 (1994).
- 17) Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M. and Hidano, A., Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J. Invest.*

- Dermatol.*, **96**, 523-526 (1991).
- 18) 田上八郎, 角層バリア機能と皮膚保湿機能の研究, フレグランスジャーナル, **9**, 10-16 (2004).
 - 19) 谷川 浩子, 浅野 新, 角層・表皮に対する外的環境因子の影響と化粧品の使用効果, フレグランスジャーナル, **9**, 59-63 (2004).
 - 20) 鐘紡株式会社, 「セラミド合成促進剤」, 特許第 3129646 号, (2000).
 - 21) Hara, M., Uchida, Y., Haratake, A., Mimura, K. and Hamanaka, S., Galactocerebroside and not glucocerebroside or ceramide stimulate epidermal beta-glucocerebrosidase activity, *J. Dermatol. Sci.*, **16**, 111-119 (1998).
 - 22) Rawlings, A.V., Davies, A., Carlomusto, M., Pillai, S., Zhang, K., Kosturko, R., Verdejo, P., Feinberg, C., Nguten, L. and Chandar, P., Effect of lactic acid isomers on keratinocyte ceramide synthesis, stratum corneum lipid levels and stratum corneum barrier function, *Arch. Dermatol. Res.*, **288**, 383-390 (1996).
 - 23) Tanno, O., Ota, Y., Kitamura, N., Katsube, T. and Inoue, S., Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier, *Br. J. Dermatol.*, **143**, 524-531 (2000).
 - 24) Elias, P.M., Epidermal Lipids, barrier function, and desquamation, *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 44s-49s (1983).
 - 25) Wertz, P.W., Miethke, M.C., Long, S.A., Strauss, J.S. and Downing, D.T., The composition of the ceramides from human

- stratum corneum and from comedones, *J. Invest. Dermatol.*, **84**, 410-412 (1985).
- 26) Wertz, P.W. and Downing, D.T., Ceramides of pig epidermis: structure determination, *J. Lipid Res.*, **24**, 759-765 (1983).
- 27) Wertz, P.W., Cho, E.S. and Downing, D.T., Effect of essential fatty acid deficiency on the epidermal sphingolipids of the rat, *Biochim. Biophys. Acta.*, **753**, 350-355 (1983).
- 28) Adam, D., Review blames BSE outbreak on calf feed. *Nature*, **412**, 467 (2001).
- 29) ラボラトワール・ラヴィファルム, 「植物由来の糖脂質、リゾホスホリピド、スフィンゴ脂質、セラミドを含有する化合物の分離方法」, 特許第 3502990 号 (2003).
- 30) Lati, E., 植物性セラミドとその応用の現状, フレグランスジャーナル, **1**, 81-89 (1995).
- 31) INOCOSM, S.A., INOCOSM 植物性セラミド, フレグランスジャーナル, **4**, 91-94 (1994).
- 32) 株式会社富士経済, 生物由来有用成分・素材市場徹底調査 2006年度版 (2006).
- 33) 株式会社富士経済, 次世代市場を予感させる機能性素材の開発と将来展望 2007年版 (2007).
- 34) 株式会社富士経済, 生物由来有用成分・素材市場徹底調査 2008年度版 (2008).
- 35) 株式会社富士経済, 生物由来有用成分・素材市場徹底調査 2011年度版 (2011).

- 36) Ohnishi, M., Ito, S. and Fujino, Y., Characterization of sphingolipids in spinach leaves, *Biochim. Biophys. Acta*, **752**, 416-422 (1982).
- 37) Ohnishi, M. and Fujino, Y., Sphingolipids in immature and mature soybeans, *Lipids*, **17**, 803-810 (1982).
- 38) Fujino, Y. and Ohnishi, M., Structure of cerebroside in *Aspergillus oryzae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, 161-171(1976).
- 39) Ohnishi, M., Kawase, S., Kondo, Y., Fujino, Y. and Ito, S., Identification of major cerebroside species in seven mushrooms, *J. Jpn Oil Chem. Soc.*, **45**, 51-56 (1996).
- 40) Takakuwa, N., Kinoshita, M., Oda, Y. and Ohnishi, M., Existence of cerebroside in *Saccharomyces kluyveri* and its related species, *FEMS Yeast Res.*, **2**, 533-538 (2002).
- 41) Hannun, Y.A. and Linares, C.M., Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1154**, 223-236 (1993).
- 42) 浅井 さとみ, 宮地 勇人, 植物性セラミドの塗布および経口投与による皮膚保湿効果とその評価, *臨床病理*, **55**, 209-215 (2007).
- 43) Sugawara, T. and Miyazawa, T., Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection, *Lipids*, **34**, 1231-1237 (1999).
- 44) 藤野安彦, 生物化学実験法 9・脂質分析法入門, 学会出版センター, pp. 39-113 (1995).

- 45) 山田晃弘, 生物化学実験法 24・植物脂質代謝実験法, 学会出版センター, pp. 67-259 (1989).
- 46) Bligh, E.G. and Dyer, W.J., A rapid method for total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
- 47) Kashima, M., Nakagawa, K., Sugawara, T., Miyazawa, T., Murakami, C., Miyashita, R., Ono, J., Deschamp, F.S. and Chaminade, P., Method for quantitative determination of cerebroside in "Plant Ceramide" foodstuffs by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *J. Oleo Sci.*, **51**, 347-354 (2002).
- 48) 宮下留美子, 奈良昌代, 木下幹朗, 間 和彦, 中塚進一, 落合 潔, 大西正男, HPLC-ELSDによる植物由来グルコシルセラミド素材定量分析法の単一試験室妥当性確認, 日本食品科学工学会誌, **59**, 34-39 (2012).
- 49) 厚生労働省医薬局審査管理課長通知 (平成 15 年 6 月 3 日付医薬審発第 0603001 号「安全性試験ガイドラインの改定について」)
- 50) 厚生労働省監修, 社団法人日本食品衛生協会, 食品衛生検査指針 (微生物編) 2004, 116-144 (2004).
- 51) Tsuji, K., Mitsutake, S., Ishikawa, J., Takagi, Y., Akiyama, M., Shimizu, H., Tomiyama, T. and Igarashi, Y., Dietary glucosylceramide improves skin barrier function in hairless mice, *J. Dermatol.Sci.*, **44**, 101-107 (2006).
- 52) Duan, R.D. and Nilsson, A., Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development, *Prog.*

- Lipid Res.*, **48**, 62-72 (2009).
- 53) Schmelz, F.M., Sphingolipids in the chemoprevention of colon cancer, *Front. Biosci.*, **9**, 2632-2639 (2004).
- 54) Aida, K., Kinoshita, M., Tanji, M., Sugawara, Tamura, M., Ono, J., Ueno, N. and Ohnishi, M., Prevention of aberrant crypt foci formation by dietary maize and yeast cerebrosides in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice, *J. Oleo Sci.*, **54**, 45-49 (2005).
- 55) Kinoshita, M., Aida, K., Tokuji, Y., Sugawara, T. and Ohnishi, M., Effects of dietary plant cerebroside on gene expression in the large intestine of 1,2-dimethylhydrazine(DMH)-treated mice determined by DNA microarray, *J. Food Lipids*, **16**, 200-208 (2009).
- 56) Yunoki, K., Renaguli, M., Kinoshita, M., Matsuyama, H., Mawatari S., Fujino, T., Kodama, Y., Sugiyama, M. and Ohnishi, M., Dietary sphingolipids ameliorate disorders of lipid metabolism in Zucker fatty rats, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 7030-7035 (2010).
- 57) Ono, J., Kinoshita, M., Aida, K., Tamura, M. and Ohnishi, M., Effects of dietary glucosylceramide on dermatitis in atopic dermatitis model mice, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, 708-711 (2010).
- 58) Furuya, H., Ohkawara, S., Nagashima, K., Asanuma, N. and Hino, T., Dietary sphingomyelin alleviates experimental inflammatory bowel disease in mice, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **78**, 41-48 (2008).

- 59) Ohlsson, L., Burling, H., Duan, R-D. and Nilsson, A., Effect of a sphingolipid-enriched dairy formulation on postprandial lipid concentrations, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **64**, 1344-1349 (2010).
- 60) Nieuwenhuizen, W.F., Duivenvoorde, I., Voshol, P.J., Rensen, P.C.N., von Duyvenvoorde, W., Romijn, J.A. and Havekes, L., Dietary sphingolipids lower plasma cholesterol and triacylglycerol and prevent liver steatosis, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **109**, 994-997 (2007).
- 61) Duan, J., Sugawara, T., Sakai, S., Aida, K. and Hirata, T., Oral glucosylceramide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene induced inflammatory response in mice by reducing TNF-alpha levels and leukocyte infiltration, *Lipids*, **46**, 505-512 (2011).
- 62) Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R., Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure Appl. Chem.*, **74**, 5, 835-855(2002).
- 63) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Fajgelj, A., Willetts, P. and Wood, R., Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **71**, 337-348 (1999).
- 64) Sugawara, T., Aida, K., Duan, J. and Hirata, T., Analysis of glucosylceramides from various sources by lipid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Oleo Sci.* **59**, 387-394 (2010).
- 65) Aida, K., Takakuwa, N., Kinoshita, M., Sugawara, T., Imai, H.,

- Ono, J. and Ohnishi, M., Properties and physiological effects of plant cerebroside species as functional lipids, *Advanced Research on Plant Lipids*, pp.233-236, Kluwer Academic Publishers (2003).
- 66) Moto, M., Okamura, M., Watanabe, T., Kashida, Y. and Mitsumori, K., Thirteen-week repeated dose toxicity of rice bran glycosphingolipid in Wistar Hannover (GALAS) rats, *J. Toxicol. Sci.*, **29**, 73-80 (2004).
- 67) Coderch, L., Lopez, O., de la Maza, A. and Parra, J.L., Ceramides and skin function, *Am. J. Clin. Dermatol.*, **4**, 107-129 (2003).
- 68) Yunoki, K., Kukino, O., Nadachi, Y., Fujino, T. and Ohnishi, M., Separation and determination of functional complex lipids from chicken skin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **85**, 427-433 (2008).
- 69) Haruta, Y., Kato, K. and Yoshioka, T., Dietary phospholipid concentrate from bovine milk improves epidermal function in hairless mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2151-2157 (2008).
- 70) Burling, H., Nilsson, A. and Ohlsson, L., Milk phospholipids, a new ingredient for formulation of functional foods with bioactivity, *Inform*, **496**, 494-496 (2009).
- 71) 宮下留美子, 柚木恵太, 小川拓也, 小野治三郎, 木下幹朗, 間和彦 and 大西正男, 日本人のスフィンゴ脂質摂取量と植物セラブロシド濃縮物による美肌効果, *日本脂質生化学会*, **49**, 161-164 (2007).

- 72) 内山太郎, 深谷幸隆, 中野祐輔, 中島優哉, 野田 章, 石崎千秋
and 溝口昌子, コンニャクセラミド配合飲料の皮膚状態改善効果
, 応用薬理, **75**, 1-6 (2008).
- 73) Uchiyama, T., Nakano, Y., Ueda, O., Mori, H., Nakashima, M.,
Noda, A., Ishizaki C. and Mizoguchi, M., Oral intake of
glucosylceramide improves relatively high level of transepidermal
water loss in mice and healthy human subjects, *J. Health Sci.*, **54**,
559-566 (2008).
- 74) Guillou, S., Ghabri, S., Jannot, C., Gaillard, E., Lamour, I. and
Boisnic, S., The moisturizing effect of a wheat extract food
supplement on women's skin: a randomized, double-blind
placebo-controlled trial, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **33**, 138-143 (2011).
- 75) Vesper, H., Schmelz, E.-M., Nikolova-Karakashian, M. N., Dillehay,
D. L., Lynch, D. V. and Merrill, Jr. A. H., Sphingolipids in food and
the emerging importance of sphingolipids to nutrition, *J. Nutr.* **129**,
1239-1250 (1999).
- 76) O'goshi, K. and Serup, J., Skin conductance; validation of
Skicon-22EX[®] compared to the original model, Skincon-100[®],
Skin Res. Technol., **13**, 13-18 (2007).
- 77) 春田裕子, 上田典子, 加藤 健, 辻 秀一 and 吉岡俊満, 皮膚に
対する牛乳由来スフィンゴミエリン高含有素材の臨床効果, ミル
クサイエンス, **58**, 135-141 (2009).
- 78) Yunoki, K., Ogawa, T., Ono, J., Miyashita, R., Aida, K., Oda Y. and
Ohnishi, M., Analysis of sphingolipid classes and their contents

- in meals, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 222-225 (2008).
- 79) サイエンス&テクノロジー, 現場レベルでの皮膚測定・評価～トラブル事例・対策～, サイエンス&テクノロジー, 22-29, 72-83, 140-150, 245-257, 292-307 (2007).
- 80) 技術情報協会, 皮膚の測定・評価マニュアル集, 技術情報協会, 75-94 (2003).
- 81) Oranje, A. P., Glazenburg, E. J., Wolkerstorfer A. and de Waard-van der Spek, F. B., Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score, *Br. J. Dermatol.*, **157**, 645-648 (2007).
- 82) 古江増隆, 佐伯秀久, 古川福美, 秀道広, 大槻マミ太郎, 中村敏明, 佐々木りか子, 須藤一 and 竹原和彦, 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン, 日皮会誌, **118**, 325-342 (2008).
- 83) 石川 烈, 岡田 宏, 鴨井久一, 宮下 元, 上野和之, 原 耕二, 長谷川 明, 山田 了, 村井正大, 池田克己, 中村治郎, 堀 俊雄, 太田紀雄, 野口俊英, 岩山幸雄, 山岡 昭, 村山洋二, 岡本 莫 and 栗山欣弥, 二重盲検試験による塩化リゾチームの辺縁性歯周炎に対する臨床評価, 日歯周誌, **34**, 883-900 (1992).
- 84) 野崎仁崇, 山本雅子, 小島寿夫, 齋藤洋昭, 伊藤将弘, 糸乗 前 and 杉田陸海, スルメイカ *Todarodes pacificus* 内臓のスフィンゴリン脂質, 滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **59**, 29-37 (2009).
- 85) 糸乗 前, 野崎仁崇, 原 隼 鷹, 秋田悠里, 橋本恭平, 小島寿夫, 西尾 匠, 石川 哲, 齋藤洋昭, 伊藤将弘 and 杉田陸海, アメリ

- カオオアカイカ *Dosidicus gigas* のスフィンゴ脂質の構造決定,
滋賀大学教育学部紀要 自然科, **60**, 11-22 (2010).
- 86) Kojima, H., Inoue, T., Sugita, M., Itonori S. and Ito, M.,
Biochemical studies on sphingolipid of *Artemia franciscana* (I)
Isolation and characterization of sphinomyelin, *Lipids*, **45**,
635-643 (2010).
- 87) Miyanishi, K., Shiono, N., Shirai, H., Dombo M. and Kimata, H.,
Reduction of transepidermal water loss by oral intake of
glucosylceramide in patients with atopic eczema, *Allergy*, **60**,
1454-1455 (2005).
- 88) 富山隆広, 海方 忍, 石田真己, 西川英俊, 山崎則之, 辻 潔美,
光武 進, 五十嵐靖之, タモギタケエタノール抽出物のアトピー
性皮膚炎モデルマウスを用いた保湿作用およびアトピー様症状
に対する作用, 日本栄養・食糧学会誌, **61**, 21-26 (2008).
- 89) Ideta, R., Sakuta, T., Nakano Y. and Uchiyama, T., Orally
administered glycosylceramide improve the skin barrier function
by upregulating genes associated with the tight junction and
cornified envelope formation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**,
1516-1523 (2011).
- 90) 内山太郎, 中野祐輔, 中島優哉, 塩谷順彦, 由川英二, 野田 章
and 板倉弘重, こんにゃく芋粉抽出物配合飲料の健常者に対する
長期摂食時および過剰摂取時の安全性の検討, 薬理と治療., **36**,
303-314 (2008).
- 91) Schmelz, E. M., Crall, K. J., Larocque, R., Dillehay, D. L. and

- Merrill, A. H., Jr., Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated intestinal loops of mice, *J. Nutr.*, **124**, 702-712 (1994).
- 92) Sugawara, T., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Nagata J. and Saito, M., Digestion of maize sphingolipids in rats and uptake of sphingadienine by Caco-2 cells, *J. Nutr.*, **133**, 2777-2782 (2003).
- 93) Sugawara, T., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Tsuzuki, T., Miyazawa, T., Nagata, J., Hirata T. and Saito, M., Efflux of sphingoid bases by P-glycoprotein in human intestinal Caco-2 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2541-2546 (2004).
- 94) Sugawara, T., Tsuduki, T., Yano, S., Hirose, M., Duan, J., Aida, K., Ikeda I. and Hirata, T., Intestinal absorption of dietary maize glucosylceramide in lymphatic duct cannulated rats, *J.Lipid Res.*, **51**, 1761-1769 (2010).
- 95) Ishikawa, J., Takada, S., Takagi, Y., Hotta, M., Masukawa, Y. Mizutani, Y. and Igarashi, Y., Dietary glucosylceramide is absorbed into the lymph and increases levels of epidermal shingolipids, *J. Dermatol. Sci.*, **56**, 205-218 (2009).
- 96) Ueda, O., Uchiyama, T. and Nakashima, M., Distribution and metabolism of sphingosine in skin after oral administration to mice, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**, 456-465 (2010).
- 97) Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S. and Dupree, P., Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts, *Plant*

Physiol., **137**, 104-116 (2005).

- 98) Rothberg, S., Crouse, R. and Lee, J., Glycine-C¹⁴ incorporation into the proteins of normal stratum corneum and the abnormal stratum corneum of psoriasis, *J. Invest. Dermatol.*, **37**, 497-505 (1961).
- 99) Shimada, E., Aida, K., Sugawara, T. and Hirata, T., Inhibitory effect of topical maize glucosylceramide on skin photoaging in UV-irradiated hairless mice, *J. Oleo Sci.*, **60**, 321-325 (2011).

引用 URL

- i) http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
(2011.9.13).
- ii) http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf
(2011.7.20).
- iii) <http://jpdb.nihs.go.jp/jp16/YAKKYOKUHOU16.pdf>
(2011.9.13).
- iv) http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf (2011.7.20).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心にご指導いただきました帯広畜産大学食品科学研究部門教授・大西正男先生および帯広畜産大学食品科学研究部門准教授・木下幹朗先生、岩手大学農学部教授・長澤孝志先生、浜松医科大学教授・瀧川雅浩先生（現浜松医科大学医学部附属病院病院長）に心より厚く御礼申し上げます。また、研究の遂行にあたってご協力いただいた帯広畜産大学食品科学研究部門大西研究室の皆様には深く感謝いたします。多大なご助言・ご協力を賜りました京都大学農学研究科准教授・菅原達也先生、帯広畜産大学教授・小田有二先生、帯広畜産大学准教授・得字圭彦先生、日本甜菜製糖株式会社・田村雅彦博士に心よりお礼申し上げます。また、標準品の市販化を実現して下さいました長良サイエンス株式会社社長・中塚進一博士をはじめ皆様に感謝申し上げます。また、病院施設内の設備の借用を快くお許しく下さいましたエルム内科クリニック院長・中島様をはじめ皆様に感謝申し上げます。また、本論文の審査を引き受けて下さいました山形大学農学部教授・五十嵐喜治先生に謹んで感謝申し上げます。

最後に、本研究を遂行する機会を与えてくださった日本製粉株式会社、ならびにご支援頂いた歴代研究所長・豊田勝彦様、清水弘和様、落合 潔様をはじめとする中央研究所の皆様には厚く御礼申し上げます。

特に、会社業務と修士及び博士過程の両立を長きにわたりご支援して下さいました機能性素材チーム チームマネージャー・間 和彦様、機器分析で多くのご尽力を頂いた奈良昌代様をはじめ機能性素材チームの皆様には心より深謝申し上げます。