



シルクフィブロインの HDL コレステロール増加作用の検証： 無作為化二重盲検クロスオーバー試験サブグループ解析

渡會伸治¹⁾／渡會雪絵²⁾／吉川育矢³⁾／長島孝行⁴⁾／板倉弘重⁵⁾

はじめに

コレステロールは、体内にある脂質（脂肪）の一種で、血管の強化や維持、副腎皮質ホルモンや性ホルモンの原料、また、脂肪の消化を助ける胆汁酸の主成分としてヒトの体には必要不可欠の物質である。また、コレステロールは元々体内で合成されるもので、食事から摂取される量は体内で作られるコレステロール量の1/3～1/7とされている。しかし、食生活の乱れや運動不足、食事の欧米化などによって血液中のコレステロールが過剰になると、血管の壁に付着して血管を詰まらせる動脈硬化症など血管障害を中心とする生活習慣病の原因となる。生活習慣の改善を行わずにこの状態を放置していると、心筋梗塞や脳梗塞を発症するリスクが高まることが知られている。日本動脈硬化学会は、動脈硬化性疾患へのリスクを減らすような生活習慣、運動、食事を改善する包括的管理が大切であることを提唱している¹⁾。

総コレステロール（TC）には、LDL コレステロール（LDL-C）、HDL コレステロール（HDL-C）、その他のコレステロールがすべて含まれている。Sugiyama ら²⁾は、24年間のコホートスタディーで、日本人の心血管疾患予防のためには、TC 値の管理が重要であると結論し、TC は、動脈硬化や心

臓病などの循環器障害の診断や経過の判定に重要な役割を果たしている。

HDL-C は増えすぎたコレステロールを回収して血管壁に入り込んだコレステロールを取り除き、肝臓へもどして最終的に胆汁→糞便に排泄する働きを担い、その血中濃度が高いほど動脈硬化性疾患にかかりにくいということから「善玉コレステロール」と呼ばれている。HDL-C は、喫煙、肥満、運動不足のそれぞれによって低下し、HDL-C の不足によるリスクは、動脈硬化の原因となることが知られている。コレステロールが高いと心血管疾患のリスクを増加させることは疑う余地のない事実であるが、HDL-C の低値もまた、LDL-C の高値以上に心血管疾患のリスクを増加させることが Framingham 試験³⁾ を代表とする多くの大規模疫学研究・臨床試験によって明らかにされている。また、HDL-C は組織の過剰なコレステロールを引き抜くこと以外に多面的な抗動脈硬化作用が多く認められている⁴⁾⁵⁾。HDL-C を増やすには、バランスのとれた食事、運動、禁煙を心がけて経過を観察し、健康の維持・増進を期待する目的で健康食品をうまく取り入れることが求められ、近年、HDL-C を増やす機能を持った健康食品や食品成分が上市されている^{6)~8)}。

シルクフィブロインには、これまでの臨床試験で、その多孔性、難消化性の特長によって、脂質代謝能を改善する効果が確認されている⁹⁾¹⁰⁾。筆者らは、中性脂肪（TG）を基準として選択した被験者を対象とした無作為化二重盲検クロスオーバー試験で、シルクフィブロインには有意な TG 低下作用および HDL-C 増加作用があることを報告している¹¹⁾

1) 石川町内科クリニック 院長
2) 石川町内科クリニック 医師
3) ドクターセラム株式会社 代表取締役
4) 東京農業大学農学部農学科 教授
5) 芝浦スリーワンクリニック 名誉院長

表1 被験食品の原材料および栄養成分

原 材 料	シルクフィブロイン (シルクタンパク質), 果糖ぶどう糖液糖, 還元澱粉糖化物, ピーチ濃縮果汁, 米胚芽・大豆発酵抽出エキス, ゲル化剤 (キサンタンガム, ローカストビーンガム, カラギーナン, ペクチン), 酸味料, 香料
栄養成分 (1包10g当たり)	エネルギー 8.6 kcal, タンパク質 0.19 g, 脂質 0.01 g, 炭水化物 2 g, ナトリウム 14.4 mg

(以下, 「当該試験」という)。

本研究では, シルクフィブロインによる HDL-C の増加作用に着目し, その作用を検証するために 150 万人のメガスタディーで定義された健康人の男女別, 年齢階級別 TC の基準範囲¹²⁾に基づいて, 「当該試験」の被験者の中から本研究の被験者を選択した。主要アウトカムに HDL-C を設定し, TC, LDL-C および TG を副次的アウトカムとしてサブグループ解析をしたので報告する。

対象と試験方法

1. 被験者選択

被験者は, 石川町内科クリニック倫理審査委員会での審査および承認を得て, ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守した当該試験の実施前に, 臨床試験責任医師から試験の目的と方法について十分な説明を受け, 書面による同意を得ている年齢が 20 歳以上の男女である。対象は, 当該試験で合併症や服薬経験並びに被験食品にアレルギー反応がなく臨床試験責任医師が「適格」と総合的に判断し, A 群, B 群とも摂取前期の試験食品摂取前の TC の基準範囲を満たし, かつ以下の除外基準に該当しない A 群 8 名, B 群 9 名の合計 17 名を選択した。

【除外基準】

- ① 本試験開始前 4 カ月 (120 日) 以内に他の治療, 臨床試験に参加した者
- ② 薬物乱用の既往または疑いがある者
- ③ 中性脂肪値およびコレステロール値を下げる薬を服用している者
- ④ 1 カ月 (30 日) 以内に中性脂肪値を下げる特定保健用食品を摂取している者
- ⑤ 臨床試験責任医師によって過度のアルコールおよびカフェインを摂取していると判断された者
- ⑥ 被験食品の原材料等アレルギーの既往また

は疑いがある者

- ⑦ スクリーニング検査及び摂食前検査のバイタルサイン値が, 最高血圧 150 mmHg \leq または最低血圧 90 mmHg \leq , 心拍数 100 bpm $<$ または $<$ 40 bpm に該当する者
- ⑧ 急性疾患を有する者
- ⑨ 腎機能障害を有する者 (血清クレアチニンが 1.2 mg/dL 以上または無尿症)
- ⑩ 臨床的に重大な肝疾患を有する者
- ⑪ スクリーニング検査, 摂食前検査で貧血傾向がみられる者
- ⑫ 被験食品摂食前 1 カ月以内または 4 カ月以内にそれぞれ 200 mL および 400 mL を超える採血 (献血など) をされた者
- ⑬ 臨床試験中に試験責任医師の指示に従えない者, または臨床試験を完了させることがないと疑われる者
- ⑭ 臨床試験終了時まで禁煙ができない者
- ⑮ その他, 臨床試験責任医師が本試験参加に「不適」と判断された者

なお, 石川町内科クリニックで, 診察 (問診), 身体計測, 血圧, 脈拍, 体温測定, 採血, 採尿, 心電図検査を実施し, 被験者管理等の試験実施体制を整備した。

2. 試験食品および摂取方法

被験食品は, 長島らの方法 (製法特許第 4074923 号) に従って作製した 1 包宛内容量 10 g のゼリータイプで, シルクフィブロインとして 200 mg を含有したものをを用いた。被験食品の原材料および栄養成分を表 1 に示した。プラセボ食品は, 被験食品と外見上見分けがつかないように調整し, 味, 香り, 色調, 内容を被験食品に合わせた。試験食品の摂取方法は, 1 回 1 包を 1 日 3 回毎食前に 8 週間連続摂取とした。

表2 試験デザイン

	摂取前	摂取前期				摂取休止 期間 (2週間)	摂取後期				摂取休止 期間 (2週間)	終了
		0W	2W	4W	8W		0W	2W	4W	8W		
同意の取得	○											
スクリーニング検査	○											
問診, 身体測定, 血液・尿検査		○	○	○	○		○	○	○	○		
試験食品 摂取	A群	← 被験食品 →					← プラセボ食品 →					
	B群	← プラセボ食品 →					← 被験食品 →					
症状日誌記録		← →					← →					
フォローアップ(電話)												○

3. 試験デザイン

試験は、無作為化二重盲検クロスオーバー試験とした。すなわち、第三者が作成した割付け表に従って無作為に被験者をA群とB群の2群に分け、摂取前期ではA群に被験食品、B群にはプラセボ食品を摂取させた。2週間の摂取休止期間の後、摂取後期として、A群にはプラセボ食品を、B群に被験食品を摂取させた(表2)。

スクリーニング検査では、身長・体重測定、血圧・脈拍・体温測定、心電図測定、胸部X線検査、採血、採尿、問診の後、対象者全員に被験食品1包を摂取させて、アレルギー反応の有無を確認した。また、血液検査は、株式会社保健科学、尿検査は石川町内科クリニックにてそれぞれ実施した。

試験期間中、被験者には食事、運動等通常の生活習慣を維持することを義務づけ、症状日誌に、発現した自覚症状および暴飲暴食や過度の運動、医薬品や健康食品の摂取の有無などを記録させ、来院時に臨床試験責任医師が問診により確認した。また、試験食品摂取終了後に経過観察期間を設け、2週間後に電話で自覚症状の有無を確認するためのフォローアップを実施した。

4. 有効性評価

1) 主要評価項目

HDL-Cを試験食品摂取前後の変化量で評価した。

2) 副次的評価項目

TC, LDL-C, TGを試験食品摂取前後の変化量で評価した。

5. 安全性評価

医師による問診、症状日誌および血液検査値(白血球数、赤血球、血色素量、ヘマトクリット、血小板数、リンパ球、白血球分画、空腹時血糖値、AST, ALT, γ -GTP, ALP, 総ビリルビン, 総タンパク, アルブミン, 尿酸, クレアチニン, 尿素窒素), ならびに尿検査値(ウロビリノーゲン, 蛋白, 糖, 潜血)から有害事象を評価した。

6. 統計解析

数値は、平均値±標準誤差で示し、検定の有意水準は $P < 0.05$ および $P < 0.01$ とした。統計解析ソフトは、JMP12.0.1 (SAS Institute Inc.)を用いた。

被験食品の効果は摂取前値と各時点の変化量について、群効果、時期効果を考慮した分散分析、被験食品の摂取前値と各時点の効果および各時点における被験食品とプラセボ食品間の効果についてはそれぞれ、対応のあるt検定、スチューデントのt検定を用いて比較し評価した。

結 果

1. 被験者

被験者は、同意を取得した20歳以上の男女で、試験食品前期摂取前のTCの基準範囲を満たし、臨床試験責任医師によって最終的に「適格」と判断された17名(A群8名, B群9名)で、この17名を解析対象被験者として確定した。表3に解析対象被験者の背景を示した。解析対象被験者は、いずれの項目においてもA群とB群の間に有意な差を認

表3 解析対象被験者の背景

検査項目	単位	全体 (n = 17)	A群 (n = 8)	B群 (n = 9)	P値
人数 (男/女 [※])	名	(12/5)	(5/3)	(7/2)	0.4902
年齢	歳	47 ± 3	47 ± 5	46 ± 5	0.9052
身長	cm	165.9 ± 2.6	163.9 ± 2.9	168.0 ± 4.3	0.3967
体重	kg	75.5 ± 4.2	77.3 ± 6.1	73.9 ± 6.4	0.6985
BMI	kg/m ²	27.3 ± 1.2	28.7 ± 1.7	26.0 ± 1.7	0.2561
HDL コレステロール	mg/dL	53 ± 5	49 ± 6	57 ± 9	0.4744
総コレステロール	mg/dL	206 ± 4	209 ± 7	204 ± 6	0.5184
LDL コレステロール	mg/dL	119 ± 6	129 ± 7	111 ± 9	0.1331
中性脂肪	mg/dL	211 ± 22	197 ± 27	223 ± 38	0.5702

数値は平均値 ± 標準誤差 スチューデントのt-検定 (*: χ^2 検定)

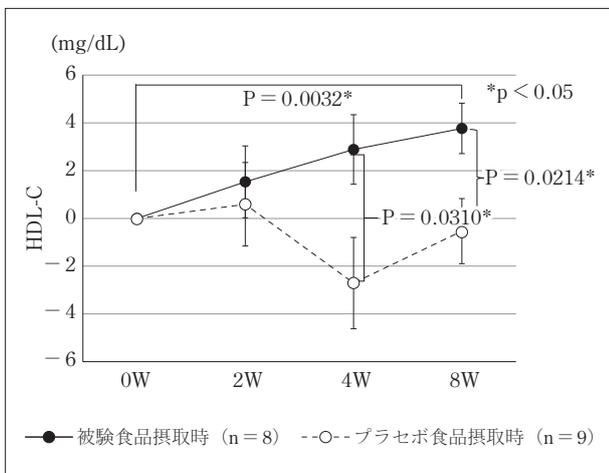


図1 HDL-C 変化量推移

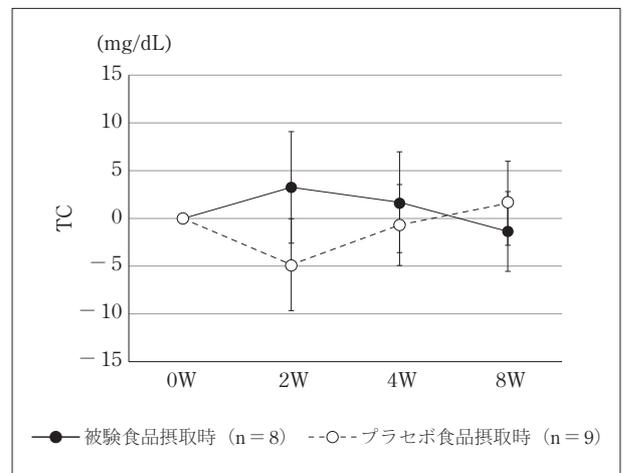


図2 TC 変化量推移

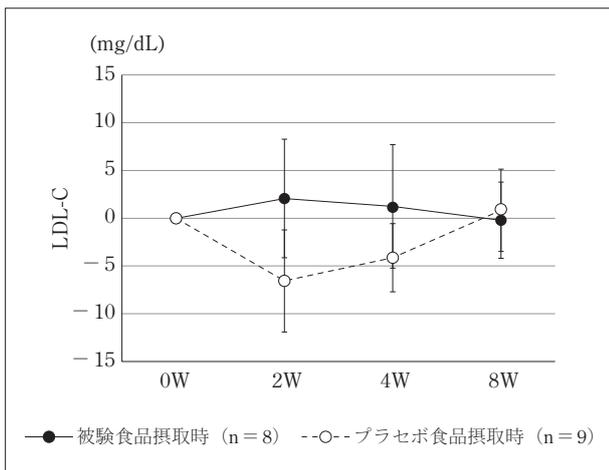


図3 LDL-C 変化量推移

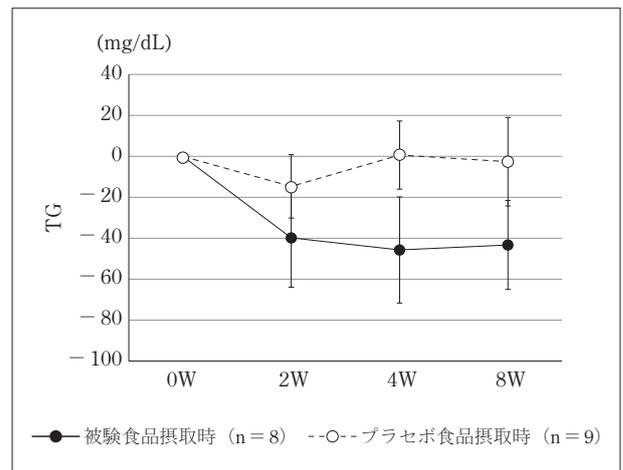


図4 TG 変化量推移

めなかった。

2. 無作為化二重盲検クロスオーバー法の妥当性
摂取前期と後期のそれぞれの摂取前 (0 W) の総

コレステロール値について群効果と時期効果を検定したところ、P値はそれぞれ P = 0.5148 および P = 0.0823 でいずれも有意ではなく、したがって、

本研究は「当該試験」と同様にクロスオーバーデザインとして適切に評価できるものと判断された。

3. 有効性評価

HDL-C 変化量は、被験食品の摂取によって時間の経過と共に増加し、摂取8週間後では、摂取前と比べて統計学的に有意な増加が確認された ($P = 0.0032$)。またプラセボ食品摂取時と比べても摂取4週間後、摂取8週間後にそれぞれ統計学的に有意な増加が確認された ($P = 0.0310$, $P = 0.0214$) (図1)。TC および LDL-C 変化量では、プラセボ食品摂取時との間で有意ではなかったが、それぞれ上昇抑制・減少傾向がみられた (図2, 図3)。TG 変化量は、プラセボ食品摂取時との間で有意ではなかったが、被験食品の摂取によって摂取2週間後には減少し、その減少は摂取8週間後まで持続した (図4)。

4. 安全性評価

試験食品摂取時のすべての解析対象被験者に臨床上的問題となるような他覚的所見および自覚症状は認められなかった。また、肝・腎機能などの血液検査値ならびに尿検査値に異常所見は観察されなかった。

考 察

シルクフィブロインは、蚕の繭からとれるシルクプロテインのフィブロインのみを特殊な製法により健康食品として分離精製したものである^{13)~15)}。シルクフィブロインには、電子顕微鏡レベルでは多孔質の非常に複雑な形状をしたナノレベルの基本構造 (写真1) および体内で消化されにくい難消化性の性質があり、18種類の必須アミノ酸が含まれている¹⁶⁾。この複雑な多孔性の空間には吸脂性があるため、体内の余分なコレステロールや脂肪を閉じ込めて、また、難消化性という性質から吸着したまま乳化させた状態で体外に排出させる機能がある。

一般に、生活習慣病の発症リスクは、人間ドックや健康診断による血液検査の結果に基づいて評価され、他に合併症や多剤服用などの危険因子がない場合は、食事や運動など生活習慣を見直しなが経過観察をすることが求められ、健康維持・増進を期待する目的でいわゆる健康食品を摂取するケースもある。

本研究では、150万人のメガスタディーで定義された健康人の男女別、年齢階級別 TC の基準範囲¹²⁾

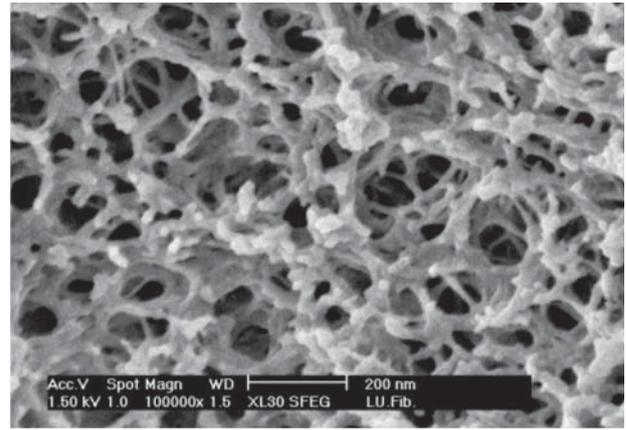


写真1 シルクフィブロインの脂肪吸着多孔性構造 (電顕)

に基づいて選択された被験者にシルクフィブロインを摂取させた。その結果、HDL-C の有意な増加作用が明らかとなり、また有意ではなかったが TG の低下作用も確認された。小林ら¹⁷⁾ は、シルクパウダーには腸管への吸収阻害による中性脂肪と胆汁酸の糞中排出促進作用があることをラットの実験で報告している。また、Umら¹⁸⁾ は、マウスの実験でシルクフィブロインによる顕著な HDL-C の増加、TG の減少、糞中 TG の有意な増加が観察されたことにより、シルクフィブロインには脂質代謝を改善する作用があると結論しており、本結果との一致が示唆された。阿部ら¹⁹⁾²⁰⁾ は、シルクフィブロインの難消化性について、シルクフィブロインの主な組成アミノ酸であるセリン (SER)、グリシン (GLY)、アラニン (ALA) を指標としてヒト小腸透過性試験モデルを用いた腸管内吸収試験を実施したところ、シルクフィブロインの吸収率は約3%であったことを確認し、その約97%が便より排泄されること、また、そのメカニズムは多孔性の吸着構造にあることを報告している。一般に TG が低くなると HDL-C が増えることが知られており、本研究で確認された HDL-C の増加および TG の減少は、シルクフィブロインの持つ脂肪吸着排泄機能の働きによるものと考えられた。

陳ら²¹⁾ は、ラットで確認されたシルクフィブロインの顕著な血中コレステロール増加抑制効果は、シルクフィブロインの消化過程で生成する未消化ペプチドが胆汁酸と相互作用をすることで腸管循環を阻害するためであると予想した。また平尾ら²²⁾ はフィブロインによる血清 TC の低下は、消化過程でペプチドと結合した胆汁酸を糞便として排泄するこ

とで腸肝循環を阻害して血中コレステロールを低下させるのではないかと推察している。本研究では、プラセボ食品摂取時に比べて有意ではなかったが、TCの増加抑制・減少作用が確認されたことは、シルクフィブロインの持つ多孔性、難消化性の特長によるものと考えられた。一般にTGが低くなるとLDL-Cが減ることが知られている。本研究で確認されたLDL-C増加抑制・減少作用は、TGの低下作用とのバランスで得られた結果であることが示唆された。

以上、シルクフィブロインの摂取によってHDL-Cが有意に増加することが検証された。これは、シルクフィブロインの持つ脂肪吸着多孔性構造ならびに体内で消化されにくい難消化性の性質によって、TC、LDL-CおよびTGがそれぞれの代謝の過程でバランス良く複合的に作用した結果と考えられ、シルクフィブロインがHDL-Cを増やすことで健康の維持・増進に貢献できる可能性が示唆された。また、本研究において有害事象の発現はなく、肝機能、腎機能などの血液検査値、尿検査値に異常所見はなく、本研究の条件下でのシルクフィブロイン摂取による安全性が確認されたものと考えられた。

結 論

本研究では、これまでの臨床試験の結果からシルクフィブロインのHDL-C増加作用に着目して、150万人のメガスタディーの結果から健康人の男女別、年齢階層別TCの基準範囲に基づいて被験者を選択し、無作為化二重盲検クロスオーバー試験のサブグループ解析によって、シルクフィブロインのHDL-C増加作用を検証した。その結果、シルクフィブロインの有意なHDL-C増加作用が明らかとなった($P=0.0032$)。また、TCおよびLDL-Cの増加抑制・低下作用ならびにTG低下作用が確認された。このことは、シルクフィブロインの脂肪吸着多孔性構造および難消化性の性質によって脂質代謝が改善された結果と考えられた。安全性については、有害事象は発現せず、また、理化学的、血液生化学的検査、尿検査の結果に臨床問題となる異常は観察されなかった。

以上、シルクフィブロインの摂取によってHDL-Cの有意な増加が明らかとなったことは、よ

り健康的な方向に数値が動いていることを示すものであり、シルクフィブロインがHDL-C低値によるリスクの軽減に寄与し、「HDL-Cが低めの人」の健康の維持・増進に貢献できる可能性が示唆された。

利 益 相 反

本研究の費用は、ドクターセラム株式会社が負担した。

参 考 文 献

- 1) 日本動脈硬化学会：動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版。
- 2) Sugiyama D, Okamura T, Watanabe M, et al: Risk of Hypercholesterolemia for Cardiovascular Disease and the Population Attributable Fraction in a 24-year Japanese Cohort Study. *Atheroscler Thromb* 2015; **22**: 95-107.
- 3) Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al: High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; **62**: 707-14
- 4) 朔啓二郎, 上原吉就, 三浦伸一郎, 他; 新規動脈硬化分子イメージングの開発. 福岡大学研究部論集 F2 2015.
- 5) Barter P: The role of HDL-cholesterol in preventing atherosclerotic disease. *Eur Heart J Suppl* 2005; **7** (Supplement F), F4-F8.
- 6) Blum A, Merei M, Karem A, et al: Effects of tomatoes on the lipid profile. *Clin Invest Med* 2006; **29**: 298-300.
- 7) Shen YC, Chen SL, Wang CK; Contribution of tomato phenolics to antioxidation and down-regulation of blood lipids. *J Agric Food Chem* 2007; **55**: 6475-6481.
- 8) Azantsa B, Kuate D, Chakokam R, et al: The effect of extracts of *Irvingia gabonensis* (IGOB131) and *Dichrostachys glomerata* (DyglomeraTM) on body weight and lipid parameters of healthy overweight participants. *Functional Foods in Health and Disease*. 2015; **5**: 200-208.
- 9) 上野紘郁, 長島孝行, 吉川育也: 血糖および脂質に対するシルクフィブロインの臨床的効果. *FOOD Style* 2015; **19**: 20-24.
- 10) Ueno H, Nagashima T, Yoshikawa I: Effect of silk fibroin on improvement of lipid and glucose metabolism in humans. *Int J Integ Medicine*, 2011; 25-31.
- 11) 渡會伸治, 渡會雪絵, 吉川育矢, 他: シルクフィブロイン長期摂取による脂質代謝改善効果の検証. *診療と新薬* 2017; **54**: 586-592.
- 12) 日本人間ドック学会: 新たな健診の基本検査の基準範囲 日本人間ドック学会と健保連による150万人のメガスタディー. 2014年4月
- 13) Nagashima T, Akai H: Ultrastructure of liquid fibroin in the silk glands of silkworm, *Bombyx mori*. *Int J Wild*

- Silkmoth & Silk 1993; **13**: 35-38.
- 14) Akai H, Nagashima T, Aoyagi S: Ultrastructure of posterior silk gland cells and liquid silk in indian tasar silkworm, *antheraea mylitta drury* (Lepidoptera: saturnidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 1993; **22**: 497-506.
 - 15) Hess S, van Beek J, Pannell LK: Acid hydrolysis of silk fibroins determination of the enrichment of isotopically labeled amino acids using precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, *Analytic Biochem* **311**: 19-26, 2002.
 - 16) 社内資料「シルクフィブロインのアミノ酸組成」
 - 17) 小林謙一, 松本雄宇, 廣田弥里, 他: 脂肪食ラットにおけるシルク(家蚕・野蚕)パウダーの排便促進効果および糞中脂質排泄促進効果. *日本食生活学会誌* 2014; **25**: 185-190.
 - 18) Um IC, Rico Catherine W, Kweon KY, et al: Enhancement of Lipid Metabolism and Antioxidant Defense Status in Mice Fed with High Fat Diet Supplemented with *Antheraea pernyi* Silk Fibroin Powder. *Int J Indust Entomol* 2011; **22**: 95-100.
 - 19) 阿部博幸, 長島孝行, 吉川育矢: シルクフィブロインによる糖尿病腎症における腎機能低下抑制作用の研究. 第16回国際個別化医療学会学術集会(2013年5月).
 - 20) Hidalgo IJ, Hillgren KM, Grass GM, et al: Characterization of the Unstirred Water Layer in Caco-2 Cell Monolayers Using a Novel Diffusion Apparatus. *Pharmaceutical Research*, 1991; **8**: 222-227.
 - 21) 陳 開利, 井浦克弘, 高野 亮, 他: ラットの血中コレステロール濃度低下に対するフィブロイン投与の効果, *日蚕雑* 1993; **62**: 56-60.
 - 22) 平尾和子, 五十嵐喜治, シルクフィブロインの特性と食品への利用. *日本調理科学会誌* 2013; **46**: 54-58.
-