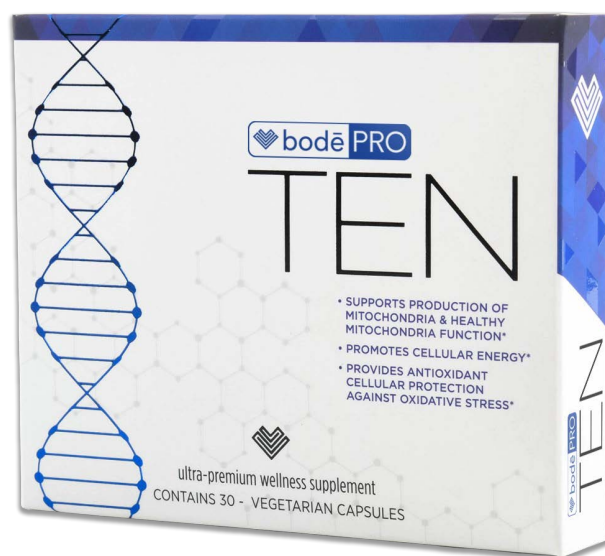


臨床概要



ミトコンドリアの産生と健全なミトコンドリア機能の増大

試験管内、及び人体の

臨床研究 概要

第1 及び 第2の試験予備計画

要旨

ここに報告する研究の目的は、Bod•ē Pro, Inc.の新しい栄養補助食品の、細胞レベルでの人体ミトコンドリアに対する効果について予備臨床試験を実施し、臨床実証試験の計画を立てるのに役立つことである。栄養補助食品 TEN は、ミトコンドリアの機能を補助することで知られている複数の成分を含んでいる。ミトコンドリアは細胞エネルギーを産生する役割を持つ細胞内小器官である。それらは、楕円体として見えるか、または相互に連結された蜘蛛の巣様の管状として現れる膜状体からなる。したがって、細胞中のミトコンドリア量を評価する場合、細胞当たりのミトコンドリア数ではなく、細胞当たりのミトコンドリア質量として論じられる。

TEN 栄養補助食品の水溶液で処理した細胞の中で2時間後にミトコンドリアの質量は著しく増加した。このタイミング(2時間)は、計画されている将来の人体臨床試験におけるミトコンドリア質量の試験に用いることが期待できる。*

TEN 栄養補助食品の水溶液中に存在する抗酸化物質のレベルを記述するために、TENの総抗酸化能(TAC)についても予備試験を実施した。これは、将来の臨床試験でヒトが摂取した後に、評価・測定に利用が期待される抗酸化物質に関連する。

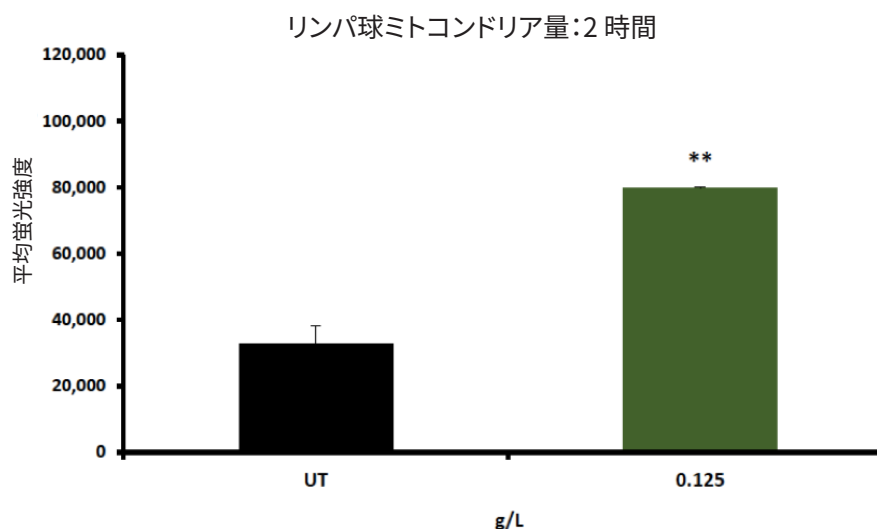
結果

2つの主要な研究評価項目

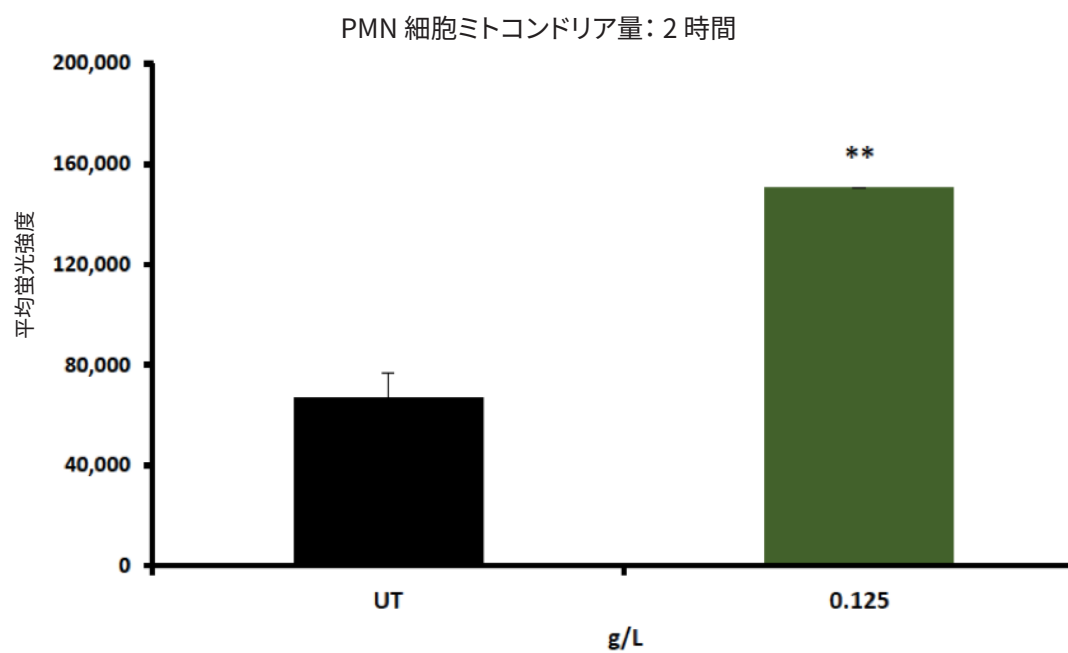
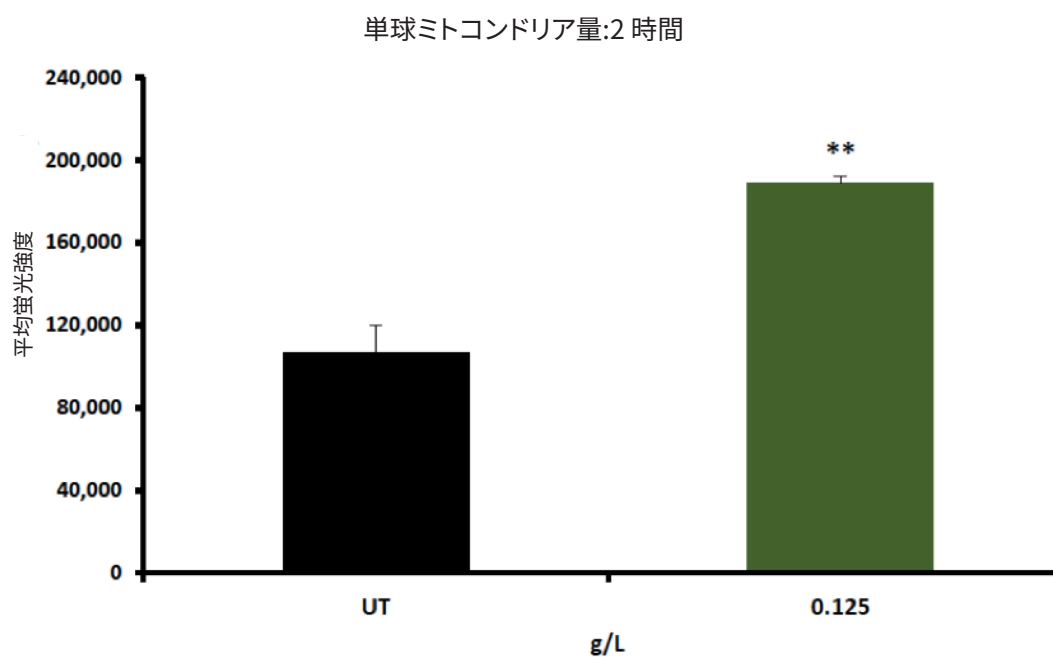
1. 細胞当たりのミトコンドリア質量(MMPC): 人体の白血球内のミトコンドリア小器官数の増加を誘導する化合物の能力と定義される。
2. 総抗酸化能(TAC): 人体の白血球のフリーラジカルによる損傷に対する化合物の保護能力と定義される。

評価項目:

1. 細胞当たりのミトコンドリア質量:
 - 細胞のTEN 栄養補助食品 摂取後 2 時間での MMPC の増加を検出した(下のグラフ参照)。
 - TEN 栄養補助食品の 0.125 g/L の投与により、3つの異なる白血球濃度において MMPCが 80–140% 増加した。このことはTEN栄養補助食品の相対的な効力を示しており、これは、TEN 栄養補助食品を摂取する前後の被験者からの血液サンプルで細胞当たりのミトコンドリア質量を試験する将来の臨床研究に期待が持てる。

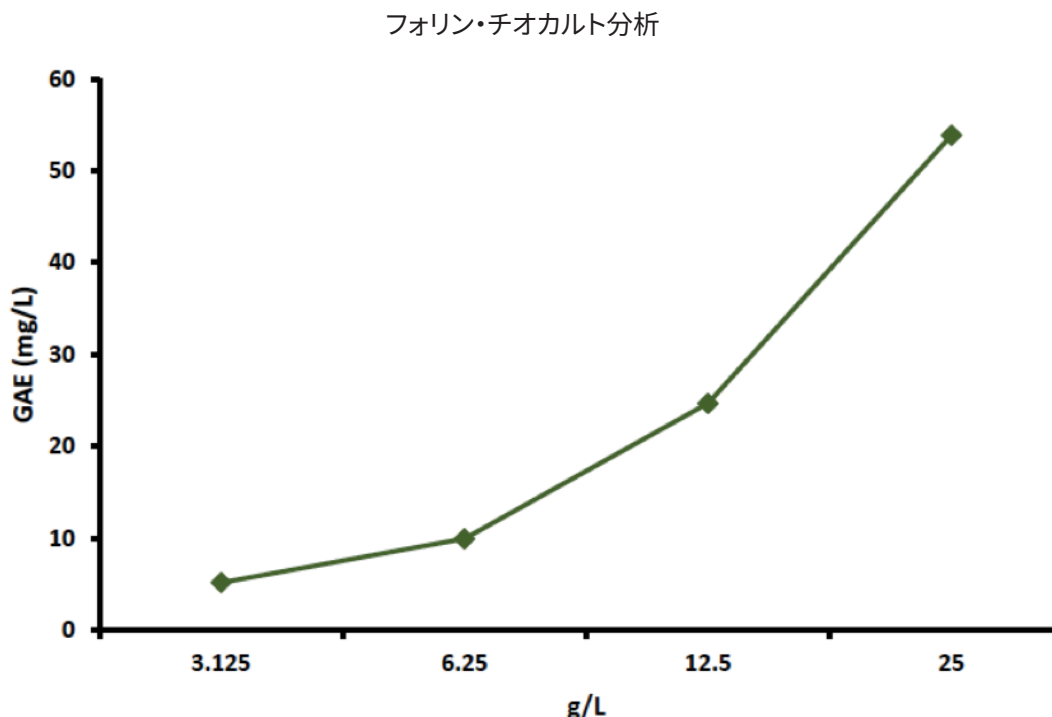


*本見解について米国食品医薬品局による評価はされていない。本製品は病気の診断、治療、予防を意図するものではない。



2. 総抗酸化能：

- TEN 調合は強力な抗酸化能を示している。このことは、TEN 調合に含まれる水溶性化合物の多くが、ヒトの摂取後に直ぐに得ることが可能であることが期待されるので、重要である。
- 下のグラフは没食子酸等価体として表示。

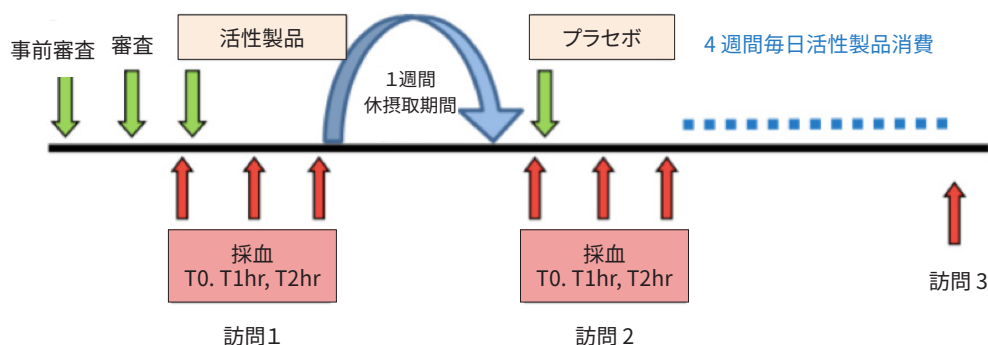


人体臨床研究 デザイン

A 以前の天然産物の細胞効果に関する人体臨床試験によるデザインに続いて、急性効果の試験にプラセボ対照クロスオーバー試験デザインを用いた。

このプロジェクトには 12 名が参加し、活性物質に対する各人の急性反応をプラセボ(対照物質)と比較して試験した。これに続いて 4 週間の非盲検試験を行った。

被験者の試験は試験日の間に 7 日の摂取休止 (ウォッシュアウト) 期間を置いた別々の日に行った。急性効果の研究参加者への製品供給の順序は無作為化していたので、以下に示す TEN 調合とプラセボの急性効果試験の順序は一例に過ぎない：



対象者：

本研究のために 12名の志願者を募集した

選択基準：

- 男女を問わない健康な成人志願者
- 45～70 歳
- BMI が 25～40
- 静脈が両腕で見やすいこと

事前 的確審査：

事前 的確審査には、性別、年齢、BMI、医 療/手術歴、ダイエット/ライフスタイル、現在の健康問題、投薬、およびサプリメントの使用を記録するための問診が含まれた。

試験 来院：

各試験日に、TEN 調合の急性効果の確認のために我々が事前に確立した手順を適用した。これには、被験者 および試験環境の慎重な管理と基線採血の前の実質 1時間の安静が含まれた。

各来院日の朝の到着後、参加者は基線採血の前 1時間、着席姿勢で安静に休息した。この休息時間は代表的な基線のデータを取得するために不可欠である。この間、被験者は前の食事、間食、運動、ストレス要因、および最近の病気を観察するためのアンケートに記入した。基線採血に続いてすぐに被験者に製品を投与し、引き続き安静を保たせた。TEN 調合の摂取後 2時間に再度採血を行った。各採血の前に、血圧および精神状態に関する簡単なアンケートへの回答を記録した。

血液サンプルについて、各来院日にミトコンドリアの質量と活性の試験を行った。血液サンプルはまた基準および4週目の来院の際、全代謝パネル (CMP)および全血球計算 (CBC)の試験に送られ、各来院日および 4週目来院の採血で高感度 C 反応性蛋白(hcCRP)試験を行った。

炎症性サイトカインのパネルの試験 (本報告) および将来の試験のための保管用にすべての採血からの血清を採取した。

各来院時にアンケートを実施した。このアンケートには、一般健康および生活状態についてのアンケート(29 質問) および疲労に関わるアンケート (14 質問) を含めた。

被験者の人口統計

表 1 被験者の人口統計

女性:	7
平均年齢*	59.1 ± 5.0
年齢範囲	53.7 - 66.9
平均 BMI	27.5 ± 4.9
BMI 範囲	22.9 - 33.0
男性:	5
平均年齢*	57.7 ± 9.6
年齢範囲	47.1 - 65.8
平均 BMI	30.2 ± 2.3
BMI 範囲	27.3 - 33.0

*平均 ± 標準偏差を示す

摂取遵守：

摂取遵守は、試験の 4週間オープンラベル部分の終わりに返却された製品のカプセル数で評価した。試験中の平均摂取遵守率は 96%(範囲は 84～100%) であった。

試験製品の供給源

活性製品は治験依頼者から提供された。TEN 調合は、ミトコンドリアの質量と機能を向上させるように設計されたビタミンと栄養成分との混合物である。被験者に 4 週間分の試験製品を提供した。この製品は試験のプラセボ対照クロスオーバー部分にも使用された。

プラセボ (研究の急性段階に用いた) は、野菜カプセルを用いた米粉のカプセル製品であった。

急性効果試験のための製品とプラセボとの混合：

急性効果を測定した各来院において、被験者の半数にプラセボを与え、残りの半数に活性製品を与えるように被験者を無作為化した。次の急性効果測定のため来院の際に、被験者に前回与えられなかった残りの製品(プラセボ 又は 製品) を与えた。急性試験日の前に、TEN 製品とプラセボとを盲検化し、各志願者の 1 回目または 2 回目の急性試験日に無作為に割り当てた。被験者への製品投与に直接に関与しなかった二人がこれに立会った。クリニックの職員及び試験参加者は、それぞれの試験日に投与された製品の中身を知らなかった。

長期使用のための消耗品の表示：

治験依頼者から受け取った製品はラベルのない瓶であった。製品の使用法を示すラベルを各々の瓶に貼るように検査室でラベルを印刷した。電話番号および試験番号もラベルに記載した。

二回目の急性効果試験外来の終わりに、持ち帰って28日間服用するように活性製品を被験者に与えた。

方法およびデータ解析

ここに記述する試験は、摂取前、摂取後2時間、および4週間の摂取の後に試験参加者から採血した抹消血から単離された白血球で行われた。研究には3つの異なる細胞株を用いた。

血液細胞集団：

- リンパ球は、球状の核を有する球状の白血球で細胞の大部分を占める。3種の細胞がリンパ球のクラスに属する。これらは、ナチュラルキラー細胞、Tリンパ球、およびBリンパ球である。
- 単球は、最も大きい種類の白血球である。これは血液循環内に存在し、血液を離れて組織に移行したのちマクロファージになり自然免疫応答と適応免疫応答の間の不可欠なリンクの働きをする。
- 好中球は、形状(姿)が不規則で多くの突起を含む核を有するため多形核 (PMN) 細胞とも称される。これは最も豊富な種類の白血球で、細菌感染に対する防御の最前線である。好中球は細菌を取り込み、細胞内顆粒内に蓄えられている酵素を放出することによって殺す。好中球は炎症にも関与し、たとえば化学信号に応答して組織の損傷部位に移行する。

グループ平均および各データセットの平均値の標準偏 (SEM) は MICROSOFT エクセルを用いて計算した。ベースラインから後の評価への変化の統計的有意性は、両側T検定を用いた「被験者内」分析を用いる処置間分析を用いて評価した。

確率 (P) 値は、本研究に特有の「処置」、すなわち栄養補助食品の摂取が統計的に有意であると考えられることができることの証拠の強さを表す。表とデータグラフで、統計的有意性のレベルは以下の形式に従い*印で示される。有意性レベル：

- 研究における変化が $P < 0.01$ (誤差のリスク1%、統計信頼区間 99%) で定義される高レベルの統計的有意性に達した時、「**」で示される。

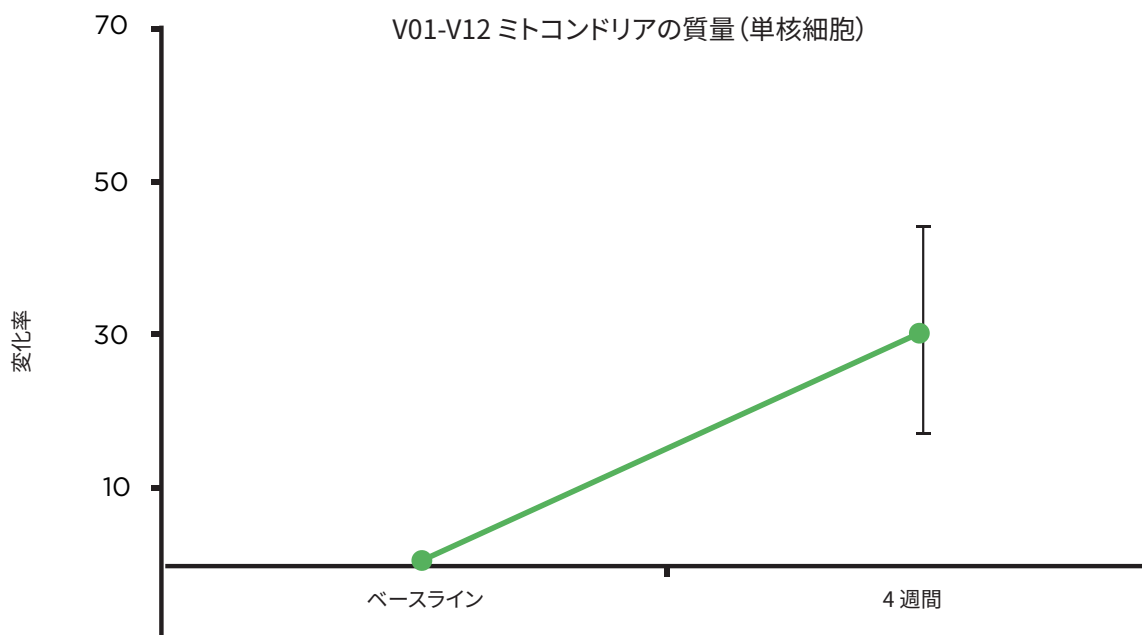
- 研究における変化が $P < 0.05$ (誤差のリスク5%、統計信頼区間 95%) で定義される統計的有意性に達した時、「*」で示される。

- 研究における変化がわずかの効果しか示さないことが分かった時、統計的傾向として示される。「傾向」は $P < 0.10$ (誤差のリスク10%、統計信頼区間90%) で定義され、「(*)」で示される。

結果

4つの主要な研究評価項目：

- 3.ミトコンドリアのバイオジェネシス/質量：人体内で自然合成またはミトコンドリア細胞小器官の量の増加を誘導する化合物の能力として定義される。
- 4.ミトコンドリアのエネルギー産出/機能：人体内でミトコンドリア細胞小器官内にATP またはエネルギー合成を誘導する化合物の能力として定義される。
- 5.研究参加者のエネルギーアンケート：プラセボに対して化合物を摂取した後の参加者の体力、集中力、および精神的機能の評価に用いられる標準化された試験方法として定義される。
- 6.安全性パラメーターおよび炎症マーカー：全血球計算 (CBC)、全代謝プロファイル (CMP)、および内因性炎症性サイトカインとして定義される。短期および長期の使用で人が摂取した時の化合物の相対的安全性を評価するために用いられる。



評価項目：

1. ミトコンドリアのバイオジェネシス/質量：

• 急性/短時間試験の結果 (2時間)：

○ 要約：

- 急性試験の日の 2 時間の安静休息中、TEN 調合を摂取した後のすべての血液細胞集団において、細胞あたりのミトコンドリア質量の増加が見られた。リンパ球集団には、TEN 調合摂取に関連して、ベースラインのレベルと比較し、統計的に増加の傾向 ($p < 0.10$) が認められた。

- ミトコンドリアの量がベースラインから急速に 20% 増加 (平均) し、プラセボに比し統計的に有意に 5% 増加した。

• 長期試験の結果 (4週間)

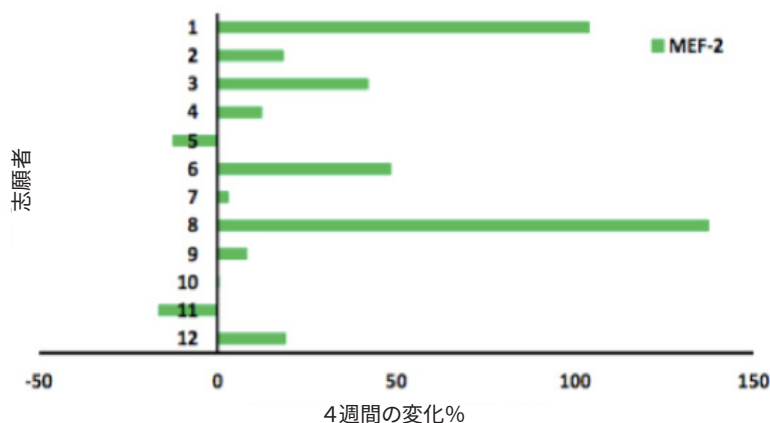
○ 要約：

- 4 週間の TEN 調合の摂取後、全ての血液細胞集団でミトコンドリア質量が増加した。この増加は統計的に、リンパ球集団で有意 ($p < 0.05$) であり、単核細胞および PMN 細胞集団 (上記の単核細胞グラフのみ) において統計的傾向 ($p < 0.10$) に達した

- 4 週間の摂取後のミトコンドリア数は約 32% 増加 (平均) した (上記のグラフに示すとおり)。

- 12 名の参加者のうち 10 名が、4 週間の摂取後にミトコンドリア数の全般的な増加を示した (下のグラフに示す)。

ミトコンドリア量への V01-V12 変化 (単球)



2. ミトコンドリアのエネルギー産出/機能：

- 急性/短時間試験の結果：

- 要約：

- PMN 細胞集団の場合、TEN 調合摂取後にミトコンドリアエネルギーの増加が見られた。これは、プラセボ摂取後の活動の低下とは対照的に、TEN 調合の摂取が代謝活動の増加を引き起こしたことを示唆している。

- ミトコンドリアの機能的な能力/エネルギーの14%の増加が2時間の摂取で見られた（下の表に示す）。プラセボと活性試験製品との間で差はなかった。この減少は、人が2時間静かに座っていることに関連している可能性がある。

表 3. PMN 細胞 (MTT アッセイ) におけるミトコンドリア機能に対する急性効果

プラセボ				有効試験製剤				
ベースライン ^a	2 時間 ^a	変化率	P 値	ベースライン ^a	2 時間 ^a	変化率	P 値	P 値 (プラセボ/MEF-2)
0.83 ± 0.10	0.72 ± 0.08	-14.05%	0.2757	0.67 ± 0.07	0.76 ± 0.07	13.62%	0.2757	0.1234

^a 平均 ± SEM

3. 試験参加者のエネルギー

- エネルギーアンケートで、現在の精神状態への作用を評価し、視覚アナログスケール (VAS) を 0~100 のスライディングスケールで使った。このアンケートは、すべての採血に先立って行われた。

- 急性/短時間試験の結果：

- 要約：

- この栄養補助食品を摂取してから2時間後に、身体的エネルギーレベルならびに精神的な集中力や精神的機能の改善が見られた。プラセボの摂取後には同様の増加は見られず、これらのスコアで若干の減少が見られた。TEN 調合とプラセボに対する個人の反応を比較すると、TEN 調合の摂取後の精神的な集中力と精神的機能の増加に統計的有意性 (p < 0.05) が得られた（下の表を参照）。

表 13. エネルギーアンケート - 急性効果

質問	プラセボ			MEF-2			プラセボ/MEF-2 比較 ^c
	ベースライン ^a	2 時間 ^a	P 値 ^b	ベースライン ^a	2 時間 ^a	P 値 ^b	P 値 ^b
あなたの現在のエネルギーレベルはどれくらいですか？	68.25 ± 7.96	65.00 ± 8.34	0.7460	65.75 ± 8.38	74.42 ± 8.03	0.0479*	0.1242
あなたはどれくらい集中できていると感じていますか？	82.17 ± 6.06	72.00 ± 8.53	0.2064	81.33 ± 5.56	85.00 ± 5.14	0.4870	0.0213*
あなたの現在の精神的機能のレベルはどれくらいですか？	80.00 ± 6.28	71.08 ± 7.61	0.2097	79.42 ± 6.08	82.58 ± 5.92	0.5926	0.0247*
現在のストレスレベルはどれくらいですか？	8.08 ± 2.61	1.67 ± 0.74	0.0253*	1.50 ± 0.62	1.58 ± 0.56	0.7774	0.8864
現在のリラックス状況のレベルはどれくらいですか？	81.42 ± 4.98	78.25 ± 10.61	0.7769	81.58 ± 8.20	86.50 ± 7.90	0.6682	0.3514

^a 平均 ± SEM

^b p < 0.05 は「*」で示す。

^c 2 時間でのプラセボと MEF-2 との比較

- 長期間試験の結果

- 要約:

- 4週間のTEN 調合の摂取後に、エネルギーレベルならびに精神的な集中力/機能の若干の改善が見られた（下の表を参照）。

表 14. エネルギーアンケート - 長期的効果

質問	ベースライン 1 ^a	ベースライン 2 ^a	P 値	4 weeks ^a	P 値 ^{b,c}	P 値 ^d
あなたの現在のエネルギーレベルはどれぐらいですか？	61.50 ± 8.53	72.00 ± 7.45	0.2525	77.08 ± 6.67	0.0824(*)	0.04370
あなたはどれぐらい集中できていると感じていますか？	81.33 ± 6.27	82.00 ± 5.32	0.8628	82.25 ± 5.99	0.8262	0.9750
あなたの現在の精神的機能のレベルはどれぐらいですか？	78.58 ± 6.49	80.83 ± 5.83	0.6270	82.17 ± 5.20	0.3881	0.7106
現在のストレスレベルはどれぐらいですか？	4.92 ± 2.12	4.67 ± 2.16	0.9331	16.50 ± 6.66	0.1528	0.1171
現在のリラックス状況のレベルはどれぐらいですか？	83.33 ± 4.64	79.67 ± 8.37	0.6684	81.83 ± 4.91	0.8162	0.8164

^a 平均 ± SEM

^b p<0.1 は「*」で示す。

^c ベースラインとの比較: 1~4 週間

^d ベースラインとの比較: 2~4 週間

4. 安全性パラメーターおよび炎症 マーカー:

- 血液生化学および全血球計算値:

- 試験開始時および 4 週間の TEN 調合摂取後の値は正常範囲内だった。アルカリホスファターゼ、アルブミン、グロブリン、および総タンパク量について、わずかではあるが統計的に有意な増加が見られた。

- 安全性試験 - 炎症マーカーの短期的効果:

- 血清中の高感度 CRP レベルは、プラセボおよび MEF-2 摂取後のいずれにおいても一定のままであった。
 - サイトカイン IL-2、IL-4、IL-6、および IL-8 は、ベースライン血清サンプルにおいて検出不可能であり、プラセボまたは TEN 調合摂取の 2 時間後もそのままであった。
 - IL-1β レベル (1 人の被験者のみのベースラインで検出された) IFN-γ または TNF-α の有意な変化は、プラセボまたは TEN 調合摂取後のどちらにおいても見られなかった。
 - 全被験者の血清中の MCP-1 血清レベルの有意な減少は、プラセボ摂取後 (p < 0.01) に見られたが、TEN 調合摂取後では見られなかった。

- 安全性試験 - 炎症マーカーの長期的効果:

- 血清中の高感度 CRP レベルは、被験者の半数において非有意の減少を示し、4週間のTEN 調合の摂取後、他の半数で非有意の増加を示した。
 - サイトカイン IL-2、IL-4、IL-6、および IL-8 は、ベースラインの血清サンプルでは検出されず、TEN 調合の 4 週間の摂取後もそのままであった。
 - 血清中の IFN-γ レベルは一定のままであったが、IL-1β (1 人の被験者のみのベースラインで検出された)、TNF-α および MCP-1 レベルは 4 週間の TEN 調合の摂取後にわずかに減少した。TEN 調合摂取。

酸化ストレスおよび炎症からのミトコンドリア機能の保護についての要約。

試験管内 臨床研究 概要

第3回 試験予備計画 報告書 147-001.

要旨

Bod•ē Pro は健康のために細胞への栄養を与える超高品質の栄養補助食品を流通している。Bod•ē Pro は、ミトコンドリア機能の助けによる細胞エネルギーのサポートに焦点を当てた最新製品の TEN を提供している。この試験予備計画では、細胞レベルでの TEN の成果をサポートする結果が、特にストレスを受けた培養条件下で得られた。

TEN は細胞の抗酸化物質の保護をもたらす。それが細胞に浸透し、細胞がフリーラジカル性のストレスにさらされた時に内外から細胞を保護することができる抗酸化物質を TEN が含有することが示された。^{*}

細胞がフリーラジカルや炎症状態によってストレスを受けると、ミトコンドリアが損傷を受ける。TEN の保護能力をテストするために、試験で数種類のストレス因子を細胞に適用した。TEN は、生物学的試験法においてミトコンドリアに対する複数レベルのサポートを示した。

- TEN は正常状態下、酸化的ストレス下、および炎症を起こした培養条件下でのミトコンドリアの代謝活動をサポートした。^{*}
- TEN は、TEN 調合を使用した炎症状態下で細胞あたりの健全ミトコンドリアの質をサポートした。^{*}

このデータは、BodePro TENの第4臨床試験プロトコルの計画においても即座に有用である。ここに報告されたデータは、炎症がTENの保護効果を試験するための最も有用なストレス因子であることを指摘している。

目的

この試験予備計画の目的は、細胞の生物学的試験法を用いて、酸化ストレス、炎症、および酸素供給の低下の様々な実験条件下でのミトコンドリア機能に対する TEN の保護効果を試験することであった。

ミトコンドリア機能にストレスを引き起こす様々な培養条件の比較結果は、できるだけ早く開始する必要がある 後続の臨床試験においてどの試験条件を使用すべきかについての計画を立てるのに役立つと思われる。

付随

新しい栄養補助食品である TEN は、ミトコンドリア機能をサポートするために開発され、その成分は研究調査によって裏打ちされている。

主要成分はピロロキノリンキノン (PQQ) であり、ヒト被験者の炎症およびミトコンドリア関連の代謝に急速な効果を示し、ピーク血清レベルは摂取後 2 時間であった。ⁱ したがって、臨床研究計画では、プラセボと比較して 1 回投与量の製品を摂取してから 1~2 時間以内に効果を得ることを意図する。

もう一つの主要成分は、ストレスの多い条件下でミトコンドリア機能をサポートすることでもよく知られている コエンザイム Q10 である。^{ii iii}

特許申請中のミトコンドリア標的成分のブレンドの成果は、正常条件下においても、また、炎症だけでなく運動誘発性ストレスを模擬した状況を反映する特定の種類のストレス条件下においても記録することが求められる。



^{*}本見解について米国食品医薬品局による評価はされていない。本製品は病気の診断、治療、予防を意図するものではない。

実施状況

実施したテスト

この試験予備計画は、以下の事項について行われたいくつかの試験を比較したものである：

- 総抗酸化能
- 抗酸化化合物の取り込みによる、細胞の抗酸化保護。
- 細胞あたりのミトコンドリア容積：
 - 通常の培養環境下（非ストレス下）
 - 酸化ストレス下

- 炎症状態下
- ミトコンドリアの代謝活性：
 - 通常の培養環境下（非ストレス下）
 - 酸化ストレス下
 - 炎症状態下

製品の処理

TEN 調合は水溶性および非水溶性/ 難溶性化合物の混合物を含む。そのため、本試験予備計画は、細胞培養において細胞が増殖する富栄養液体培地で製品を用いる際の、異なる 3つの処理方法を比較した。

抽出/処理	ストック液作成のための溶媒	段階希釈	割合
TEN 水溶液の処理	生理食塩水	生理食塩水	
TEN エタノール溶液の処理	エタノール 95% (混合)	生理食塩水	
TEN 水溶液/エタノール混合	(混合)	生理食塩水	混合比 50:50

表1.製品の処理法

結果

総抗酸化能

表 1に示した 3つの抽出法は、フォリン-チオカルト・アッセイ（または総フェノール類アッセイとしても知られる）で試験を行った。この試験法（アッセイ）では、抗酸化剤の測定にフォリン-チオカルト試薬を用いる。試験法は、各抽出物の段階希釈液にフォリン-チオカルトのフェノール試薬を添加し、完全に混合させ、5分間培養する。その後、炭酸ナトリウムを加え

ると、

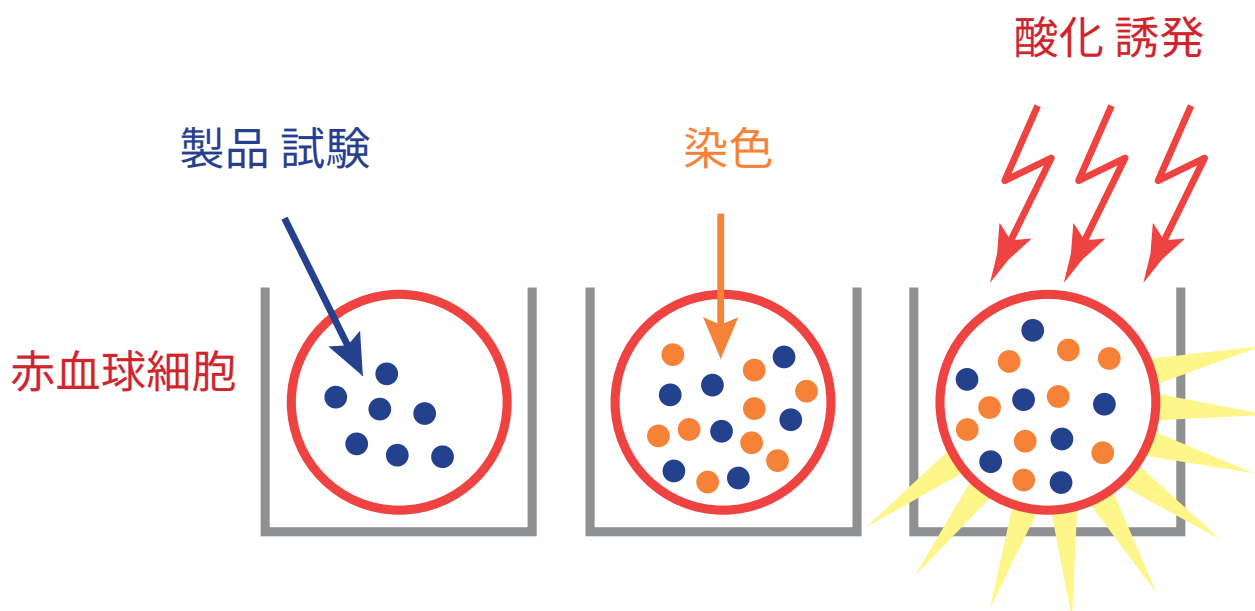
化学反応による色の変化が始まる。反応は、37°Cで 30 分間継続させる。765NM での光吸収を、比色分光プレートリーダーで測定する。参照標準として没食子酸を用い、データは製品 1G あたりの没食子酸当量で示した。本分析のデータは、以後の細胞抗酸化保護分析、およびミトコンドリア機能分析の解釈に有用となる。結果より、TEN が抗酸化物質を含有することが確認された。抗酸化能はエタノール画分より水溶性画分で大きかった。

細胞ベースの抗酸化保護 (CAP-E) アッセイ

我々が用いた方法の背後にある理論的根拠 IV は重要である：この方法は、ORAC 抗酸化試験と比較することのできる方法での抗酸化能の評価を可能にするが、脂質二重層からなる細胞膜を透過して細胞内に入ることができ、酸化ストレス下での生物学的に有意義な抗酸化保護をもたらす抗酸化物質の測定のみが可能である。

我々は、天然物由来の製品や成分に対して用いるための CAP-E バイオアッセイに特化した開発を行った。V 方法は、複数のタイプの天然由来の産物や成分を対象として用いられ、論文審査のある科学的文献に掲載されている。^{VI VII VIII IX XI}

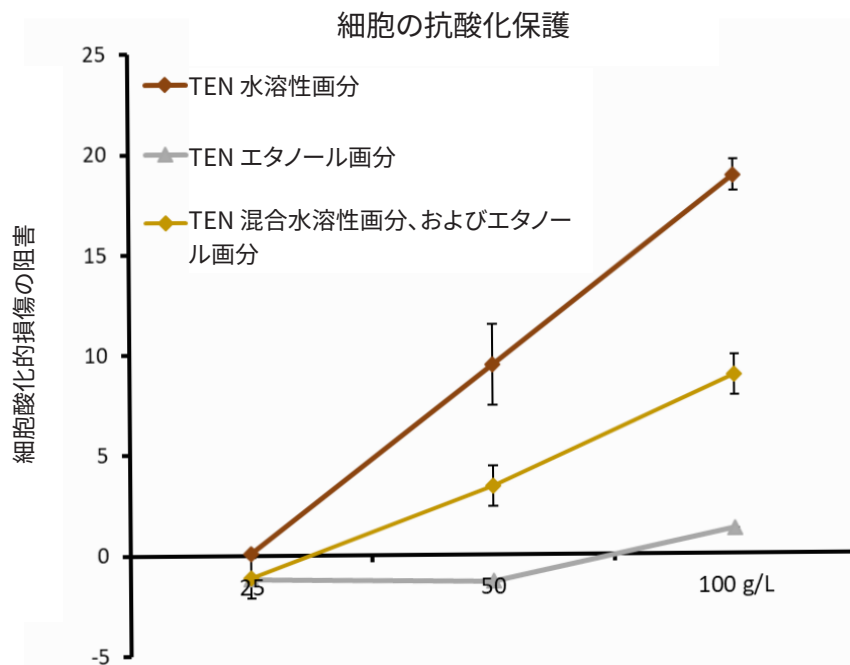
モデルとなる細胞型として、赤血球 (RBC) を用いた。これは、他の細胞型とは対照的に不活性な細胞型である。我々はこのアッセイを、複雑な天然由来産物から得られる抗酸化部物質を、細胞ベースの系内において評価することができるよう、特に開発した。



精製直後の人のRBCを生理食塩水で繰り返し洗浄し、次いで試験製品に曝露した。試験製品で培養中、細胞膜を透過できるあらゆる抗酸化化合物が、RBC内に入ることができた。その後、RBCを洗浄して細胞に吸収されなかった化合物を除き、DCF-DA染色を行ったが、これは活性酸素種に曝露すると蛍光性となる。酸化は、フェノール非含有のラジカル発生剤であるAAPHを添加することにより引き起こされた。蛍光強度が評価された。未処理の対照細胞での低い蛍光強度をベースラインとし、AAPHのみで処理されたRBCを、最大酸化損傷を示す陽性対照とした。

試験製品に曝露した後にAAPHに曝露したRBCで蛍光強度の低下が観察されたが、このことは、細胞内に浸透可能で、細胞を酸化損傷から保護する抗酸化物質が、試験製品に含まれることを示している。

この結果は、TENに含まれる水溶性抗酸化物質が細胞内に入り、酸化ストレス誘発性の細胞内損傷から細胞を保護できることを示した。



2. TEN による細胞の抗酸化保護
細胞の抗酸化保護 (CAP-e) グラフは、各操作法による酸化損傷の抑制 (%) を示す。抽出物の各用量における細胞の酸化障害の抑制 (%) は、没食子酸当量 (GAE) の平均 ± 標準偏差で示されているが、ここでは各用量について試験を2回反復して行った。

さまざまなストレス因子に曝露した時のミトコンドリア代謝活性

以下に示された試験は、健康なヒトから提供された、単離直後の末梢血単核細胞を用いて行われた。試験製品の段階希釈 (3つの操作法のすべてを並行して用いた) を細胞培養に添加し、培養細胞のミトコンドリア代謝活性を

MTT アッセイで試験した。精製直後の細胞を、TEN 存在下で24時間培養し、その後、ミトコンドリア機能に比例して発色させるために MTT 試薬を加えた。MTT バイオアッセイにおいて、化学反応は細胞機能に基づく特定の発色を引き起こす：

- 退色が測定される場合、それは直接的な殺傷の結果またはミトコンドリア機能の阻害の結果としての、細胞生存率の低下と関連する。
- 色の増強が測定される場合、これは複数の可能な説明を有する：1)細胞数の増加 (増殖) ;2)ミトコンドリア質量の増加、および 3)ミトコンドリア機能 (エネルギー産生) の上昇。

今回のプロジェクトで用いられた試験条件下では、細胞増殖は行われていないと考えられるため、変化はミトコンドリア質量の増加とミトコンドリア代謝活性の上昇の組合せに比例している。

培養条件：細胞培養の1セットは、いかなるストレス因子もない正常の細胞培養条件下に置かれた。(「正常培養」) 以下の4セットの細胞培養は、並行して作成された：

- 正常培養
- 酸化ストレス (H2O2 添加により誘発)
- 炎症 (LPS (高度炎症性の細胞性内毒素) により誘発)

結果は、TEN が非常に低用量で有効であることを示した。TEN は、正常の健康な培養環境、および酸化や炎症によるストレス状況の下で、ミトコンドリアを維持させた。

以下のページでは、各培養条件に関する2セットのグラフを示している。最初のグラフは、エタノール対照、および試験された全4種の用量についての、3つの試験画分全てにおけるTEN誘発性変化を示している。2番目のグラフは、3つの低用量について、水溶性画分と不溶性 (エタノール) 画分との比較を分かりやすくするため、修正されたスケールを用いて示している。

以下に、ミトコンドリア機能とエネルギー産生に関するグラフを追加した。示されているデータは、TENの最低用量（1.5mg/L）についてのものである。このグラフは、正常およびストレス負荷培養条件下での、ミトコンドリア機能の維持を示している。

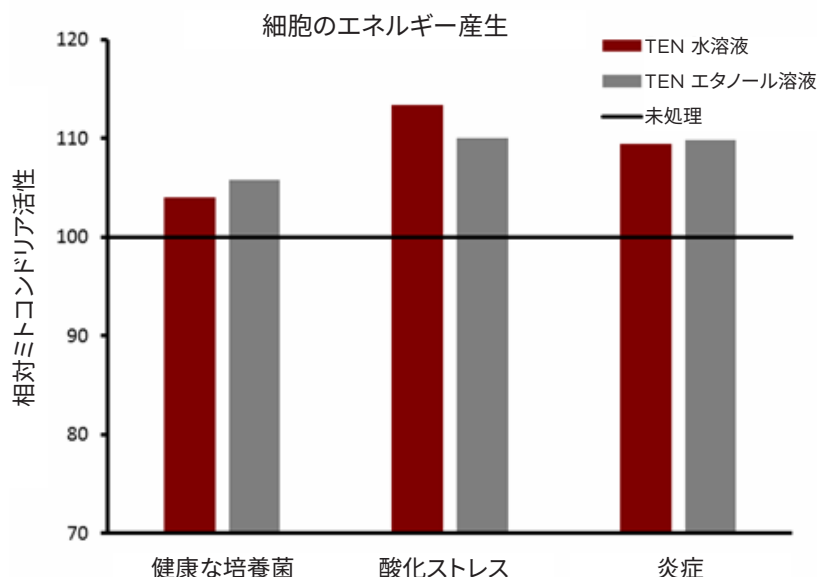


図6 細胞のエネルギー産生用量の最低値について、水溶液およびエタノール溶液としての操作を示している。黒の横線は、TEN 未処理の細胞培養の 100% 値を示す。

細胞あたりのミトコンドリア質量

下記の試験は、健康なヒト献血者から得られた精製直後の白血球を用いて行った。試験製品の段階希釈（3つの操作法のすべてを並行して用いた）を細胞培養に添加し、2時間培養後、培養細胞のミトコンドリア容量をMTTアッセイで試験した（臨床試験で計画される時間調整を模するため）。未処理の対照サンプルも並行して処理した。

細胞タイプ：異なる細胞タイプでは、対照およびストレス下のいずれにおいても、ミトコンドリアの活性レベルが異なっている。フローサイトメトリーによる分析では、以下の血液サンプル中の以下の3種類の細胞タイプについて、別々に分析を行った：

- リンパ球 (Ly)：ここで用いた培養細胞のタイプの中ではかなり不活性；
- 単球 (Mo)：活性は中程度で、ストレス因子に対する反応性は高い；
- 多形核細胞 (PMN)：活性の高い細胞で、ストレス因子に対する反応性は非常に高い。

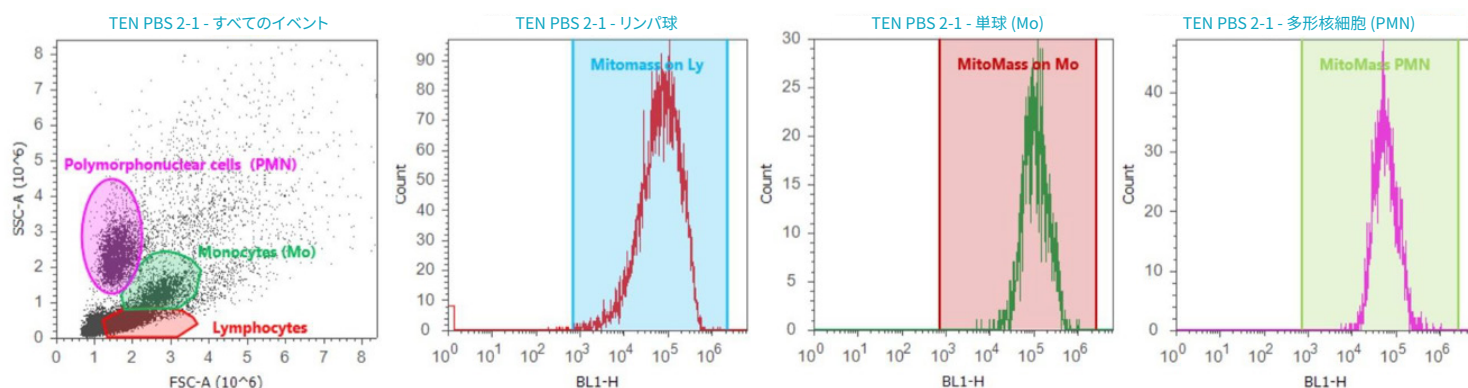


図8. 細胞あたりミトコンドリア量のフローサイトメトリーによる分析前方散乱（大きさ）および側方散乱（粒度）に基づいてリンパ球 (Ly)、単球 (Mo)、多形核細胞 (PMN) を明確にする目的で、電子ゲートを設定した。各細胞タイプについて緑色蛍光強度を測定した。

培養条件：細胞培養の1セットは、いかなるストレス因子もない正常の細胞培養条件下に置かれた。（「正常培養」）以下の4セットの細胞培養は、並行して作成された：

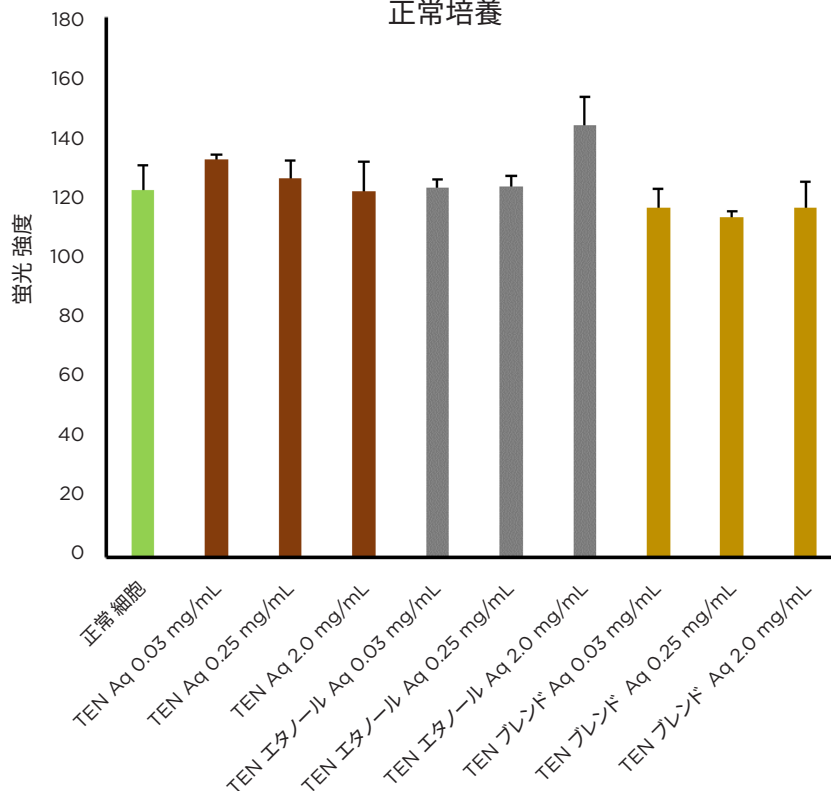
- 正常培養：細胞をTENの水およびエタノール抽出液で処理した場合に、細胞あたりミトコンドリア質量の増加は中程度であった。
- 酸化ストレス（H₂O₂添加により誘発）：MoおよびPMN細胞をTENのエタノール抽出液で処理した場合、細胞あたりミトコンドリア量の増加は軽度であった。
- 炎症（LPS（高炎症性の細胞性内毒素）により誘発）3種類の細胞タイプ全てにおいて、細胞あたりミトコンドリア質量に対するTENによる。

培養後、細胞あたりミトコンドリア容積に比例してミトコンドリアを染色する蛍光プローブで、細胞を染色した。細胞あたりの蛍光出力の総計が、細胞あたりのミトコンドリア容積の測定値である。Attune® アコースティック調整フローサイトメーターは、体積単位あたりの細胞数を求め、細胞あたりの蛍光強度の測定値を提供する。

以下のページでは、各培養条件および細胞タイプについての2セットのグラフを示している。最初のグラフは、試験された全3種の用量についての、3つの試験画分すべてにおけるTEN誘発性の変化を示している。

2番目のグラフは、未処理をストレス負荷細胞と比較した場合の、TENの効果を示している。

細胞あたりのミトコンドリア質量(Ly)
正常培養



1 細胞あたりミトコンドリア質量(Ly),
正常培養

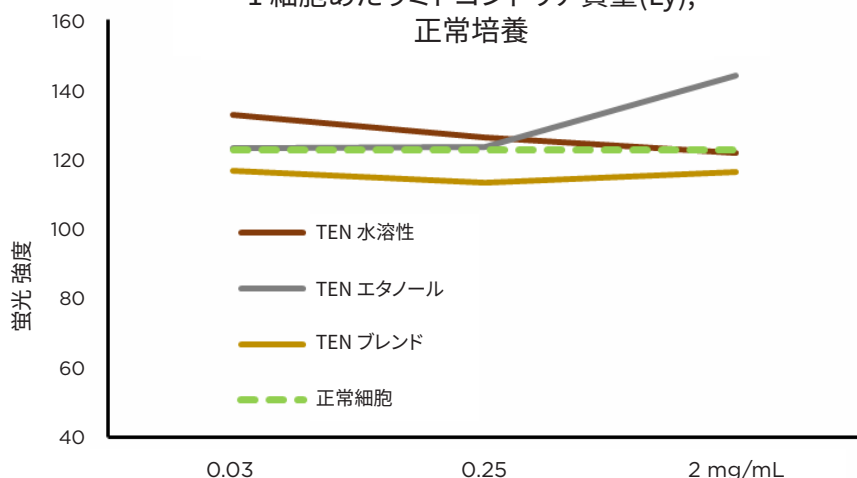


図9.リンパ細胞あたりのミトコンドリア質量(Ly)は緑色の蛍光強度として示されている。上のグラフは、3重培地の平均標準±標準偏差を示す。下のグラフは、非処置細胞についての同じデータを示す(緑の点線)。

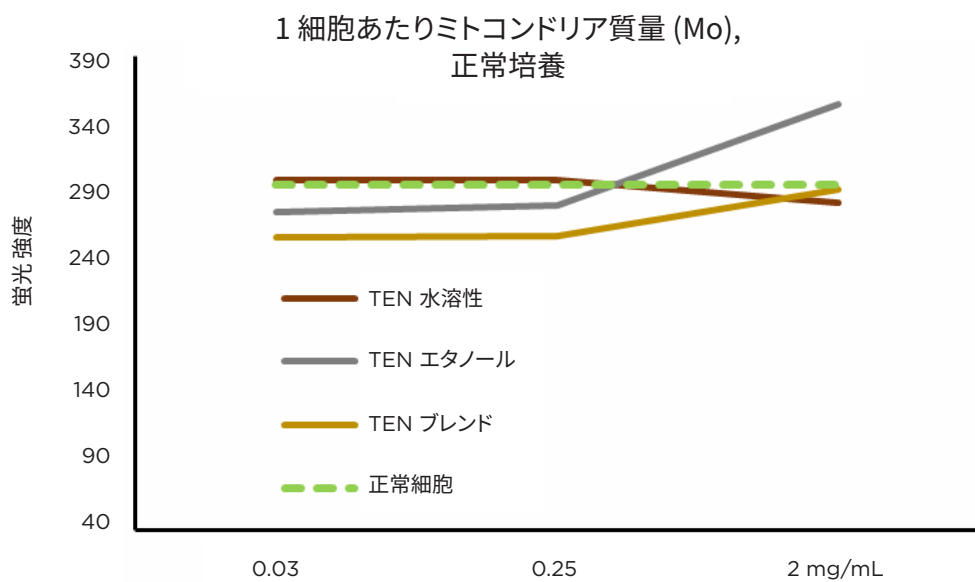
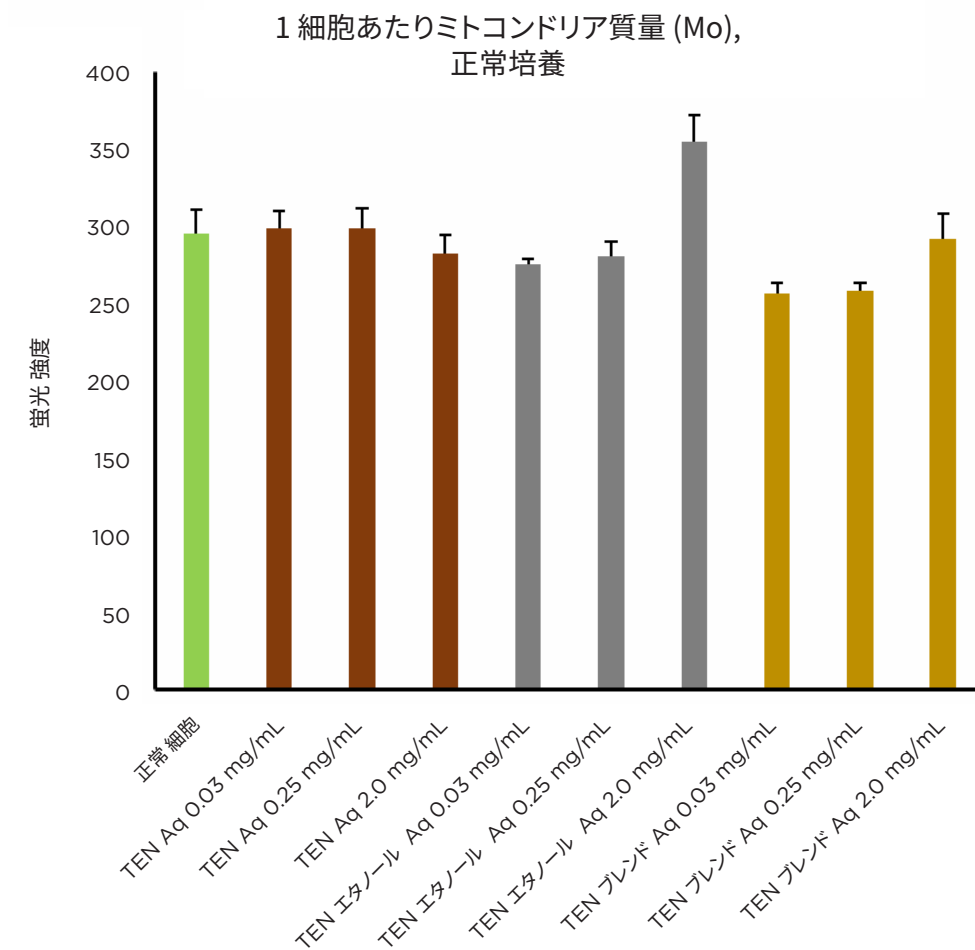


図 10. 単球あたりのミトコンドリア量 (Mo) は緑色の蛍光強度として示す。上のグラフは、TEN で処理された細胞の3重培養での平均標準±標準偏差を示す。下のグラフは、未処理細胞についての同じデータを示す(緑の点線)。

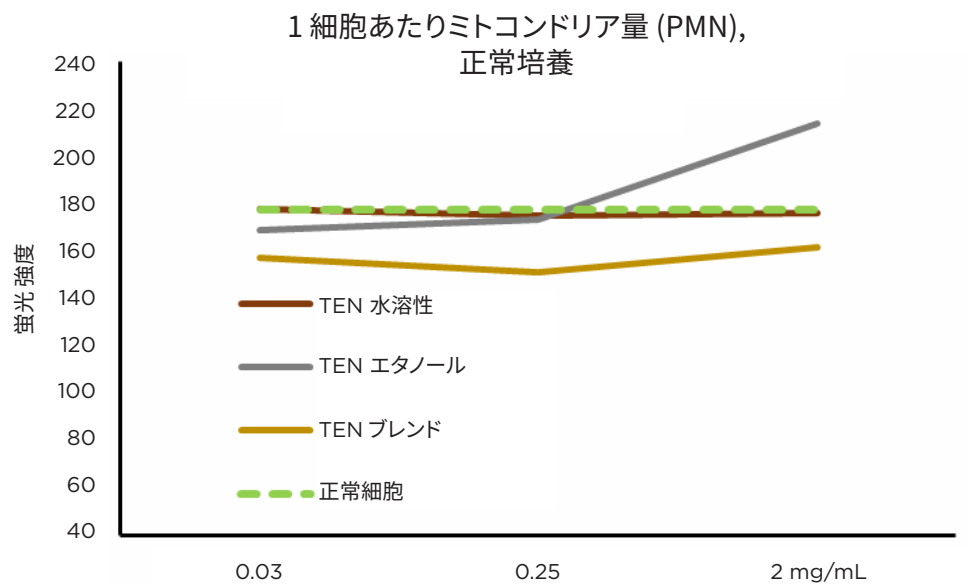
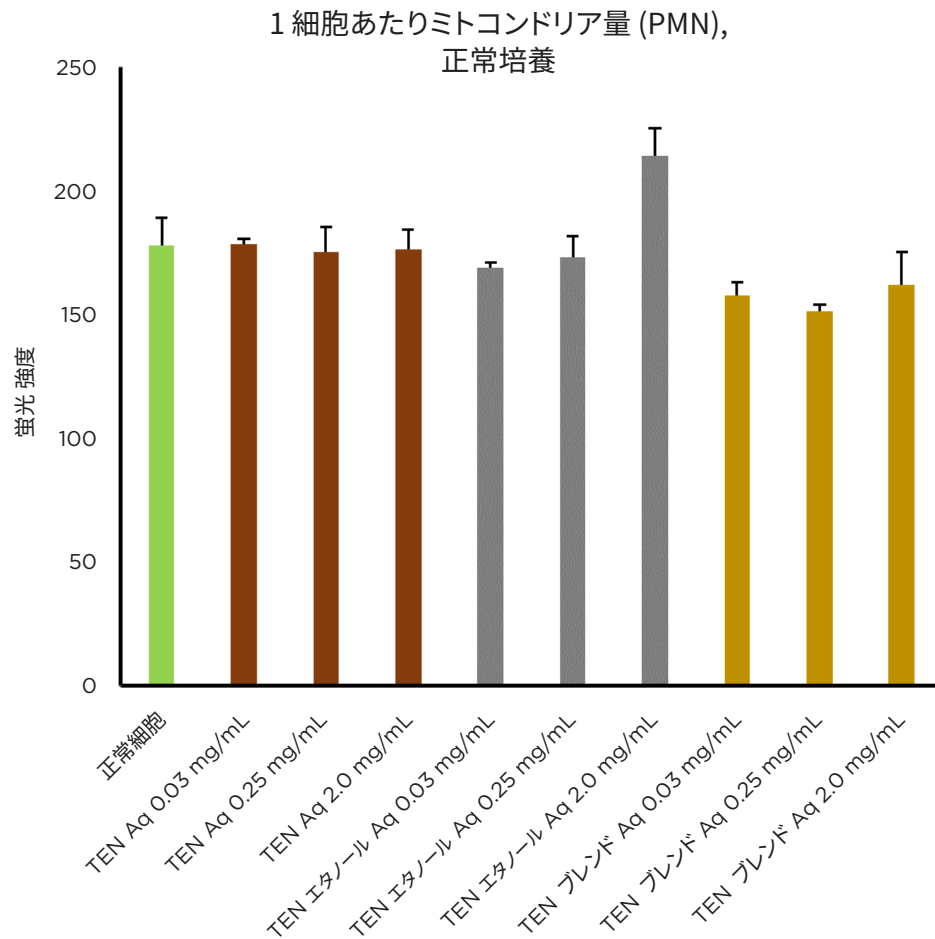


図 11. 多形核細胞 (PMN) あたりのミトコンドリア量は緑色の蛍光強度として示されている。上のグラフは、3重培養の平均標準土標準偏差を示す。下のグラフは、データを未処理細胞に施した場合を示す (緑の点線)。

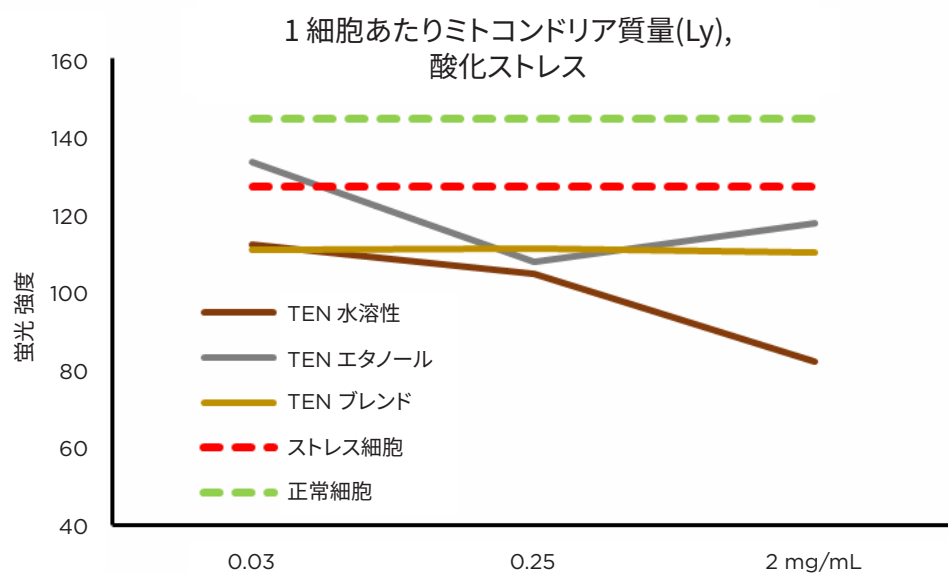
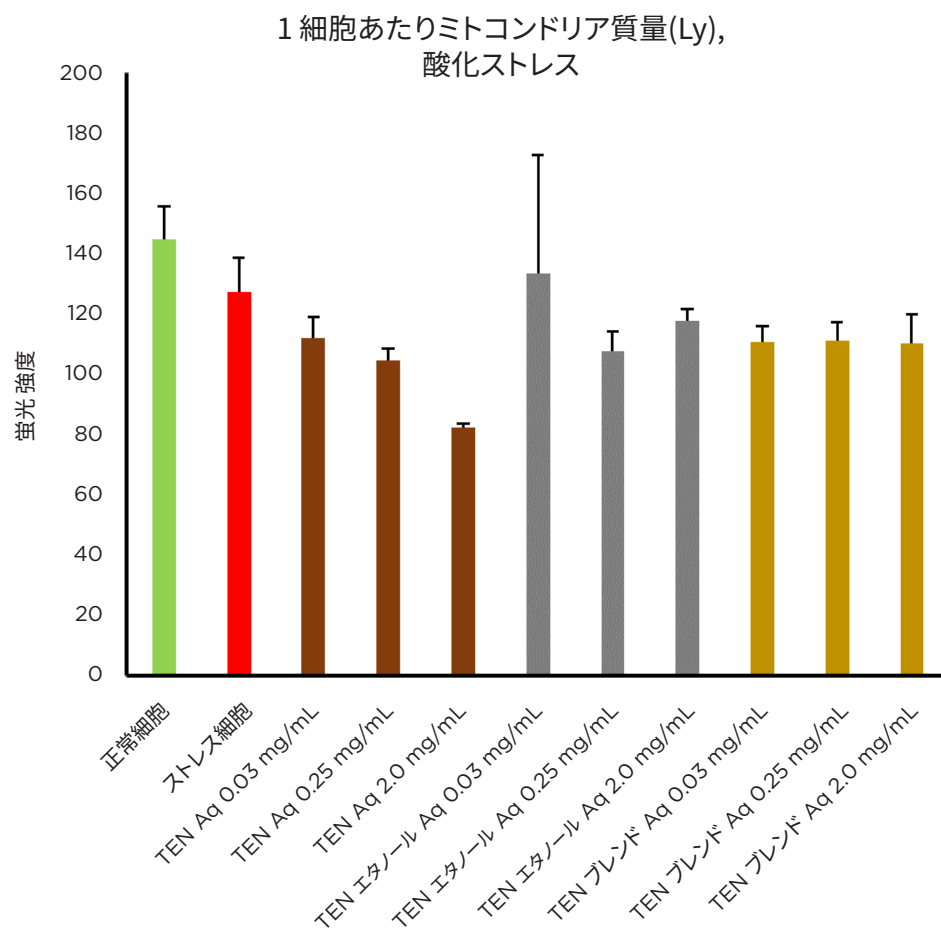


図 15. リンパ細胞あたりのミトコンドリア質量(Ly) は緑色の蛍光強度として示している。上のグラフは、3重培養の平均標準土標準偏差を示す。下のグラフは、未処理細胞 (緑の点線) とストレス細胞 (赤の点線) にデータを施した場合を示す

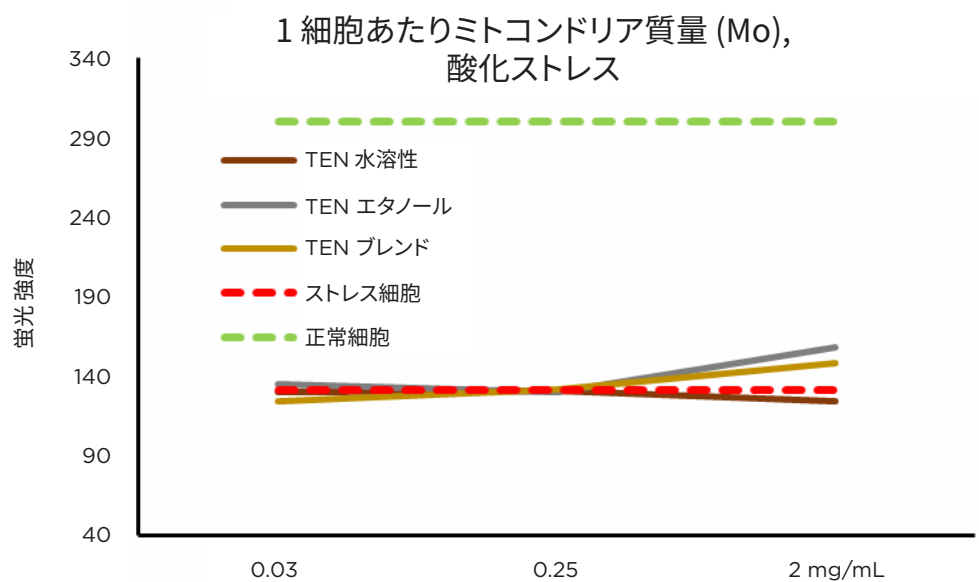
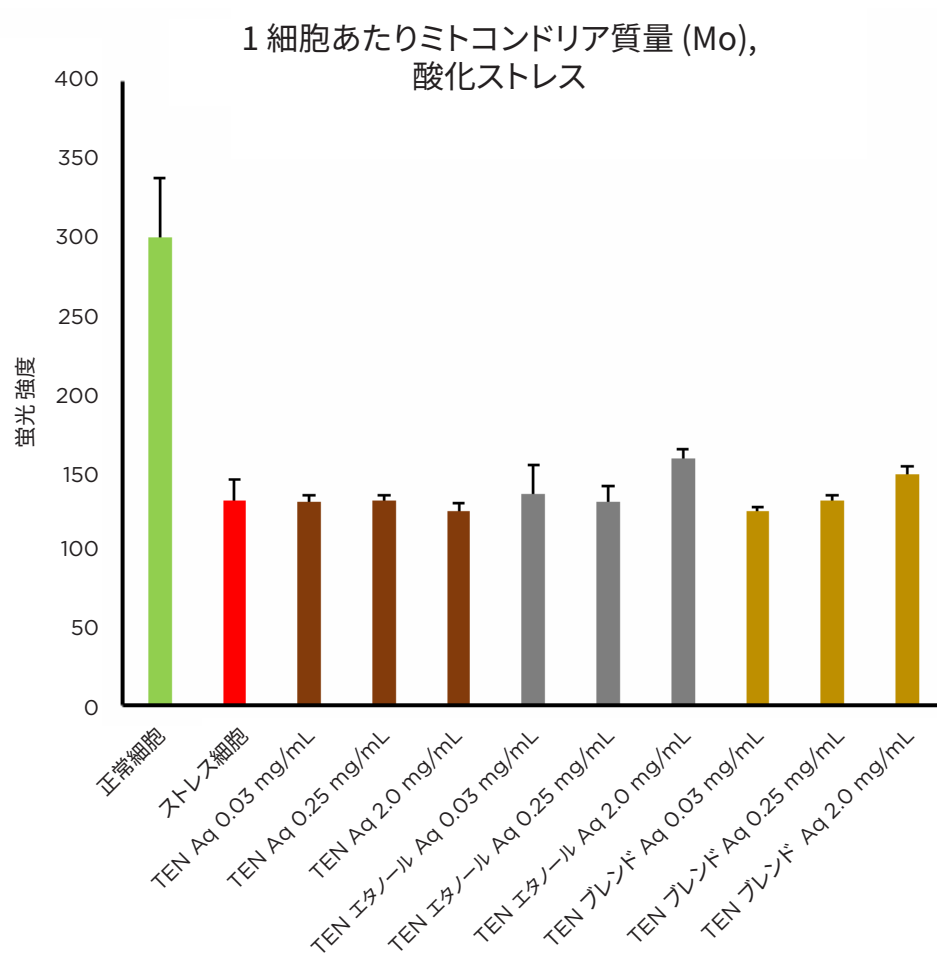


図 16. 単球あたりのミトコンドリア量 (Mo) は緑色の蛍光強度として示す。上のグラフは、3重培養の平均標準±標準偏差を示す。下のグラフは、未処理細胞 (緑の点線) とストレス細胞 (赤の点線) にデータを施した場合を示す。

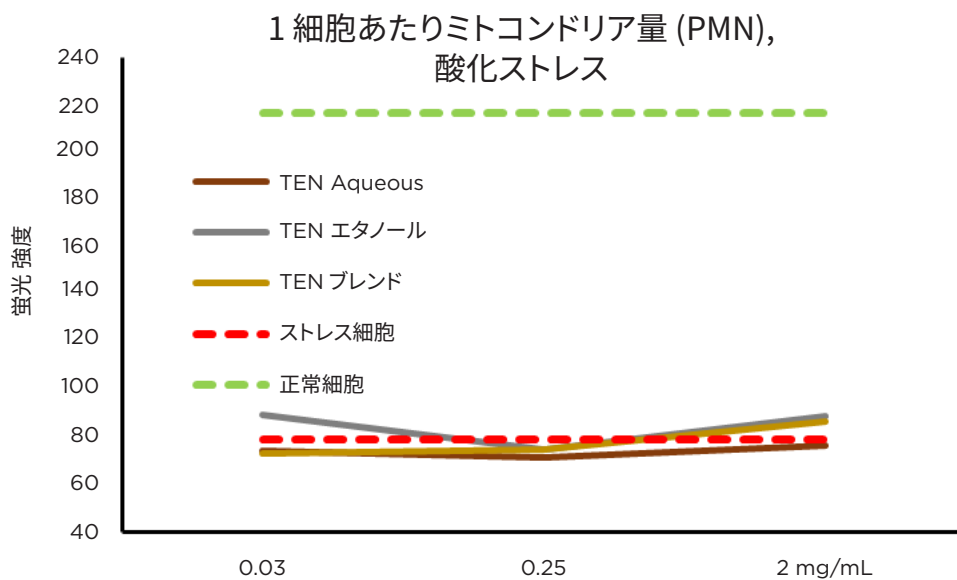
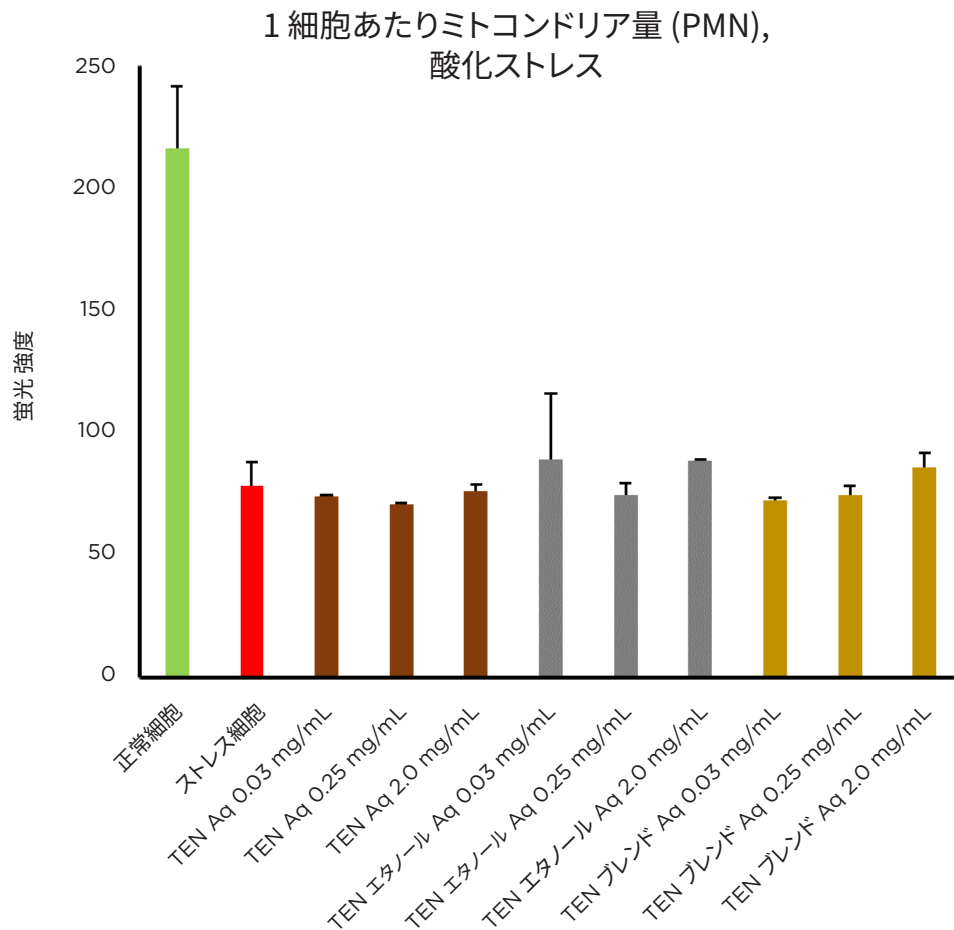
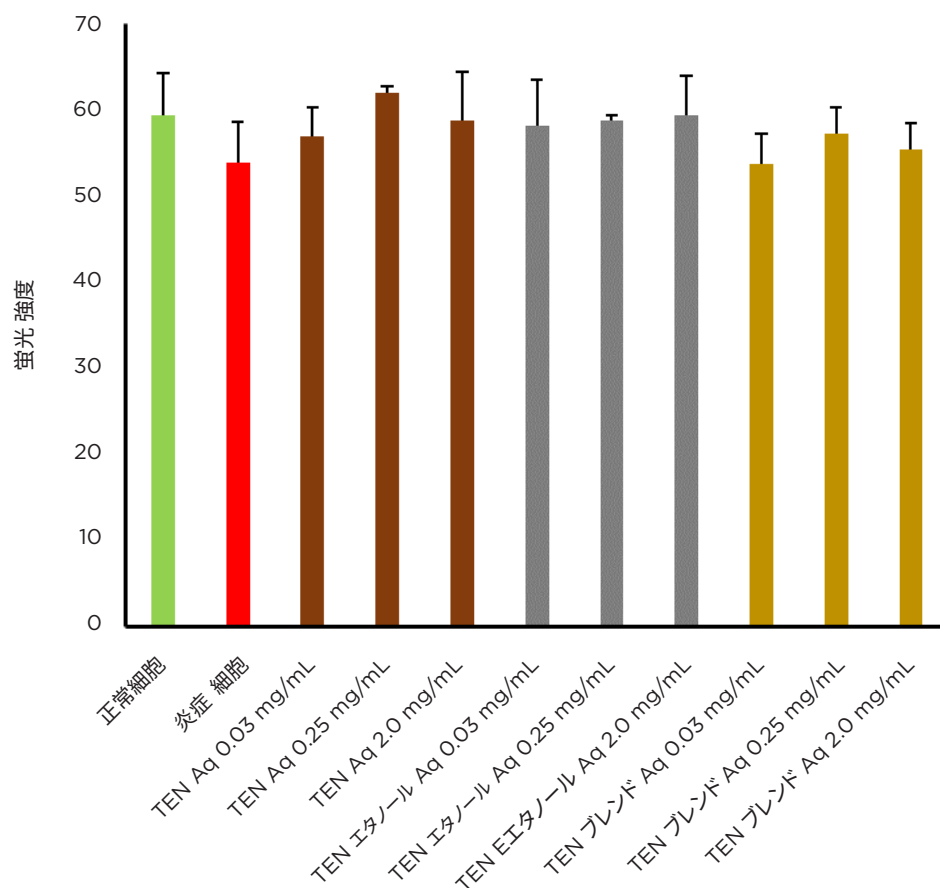


図 17. 多形核細胞 (PMN) あたりのミトコンドリア量は緑色の蛍光強度として示されている。上のグラフは、3重培養の平均標準土標準偏差を示す。下のグラフは、未処理細胞 (緑の点線) とストレス細胞 (赤の点線) にデータを施した場合を示す。

細胞 (Ly) あたりのミトコンドリア質量、炎症



細胞 (Ly) あたりのミトコンドリア質量、炎症

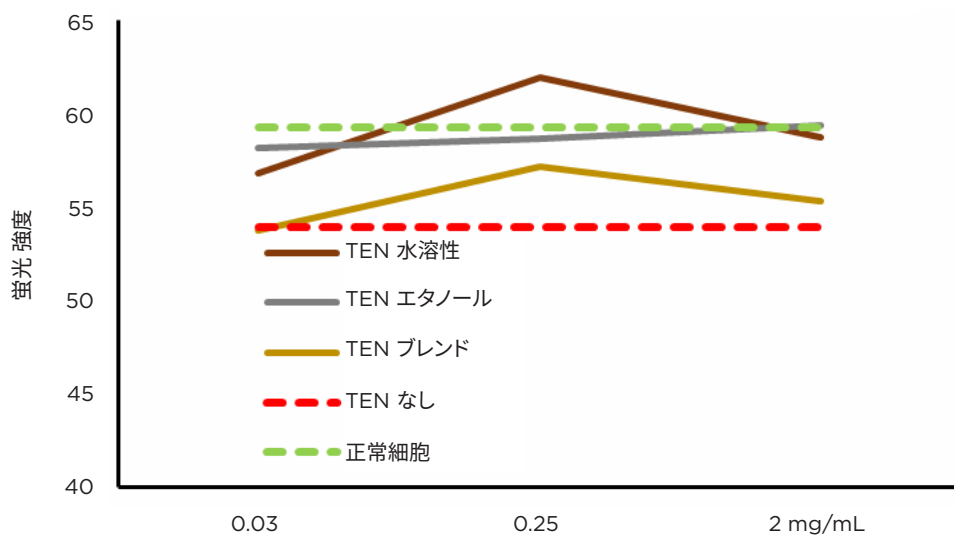


図 18.リンパ細胞あたりのミトコンドリア質量 (Ly) は緑色の蛍光強度として示している。上のグラフは、3 重培養の平均標準土標準偏差を示す。下のグラフは、未処理細胞 (緑の点線) と炎症細胞 (赤の点線) にデータを施した場合を示す。

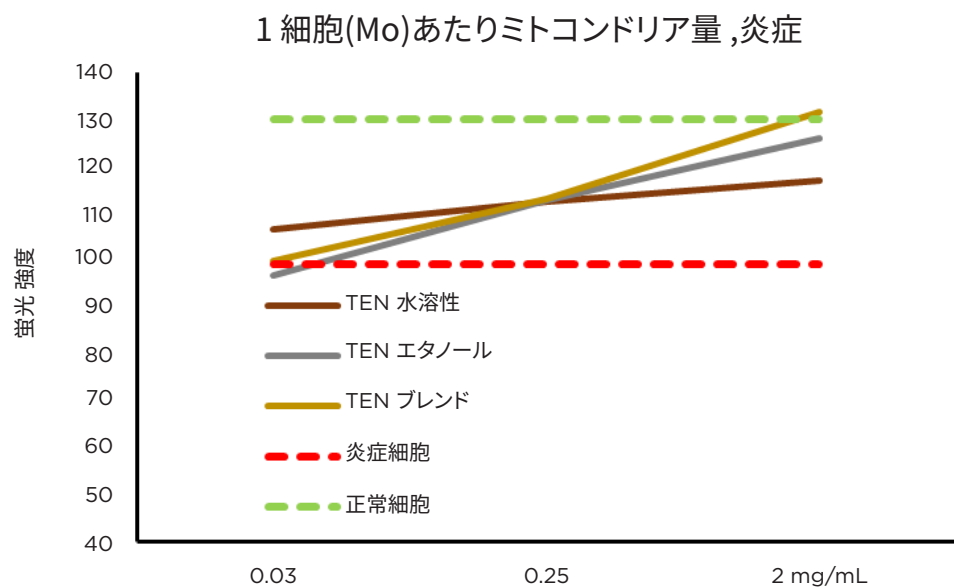
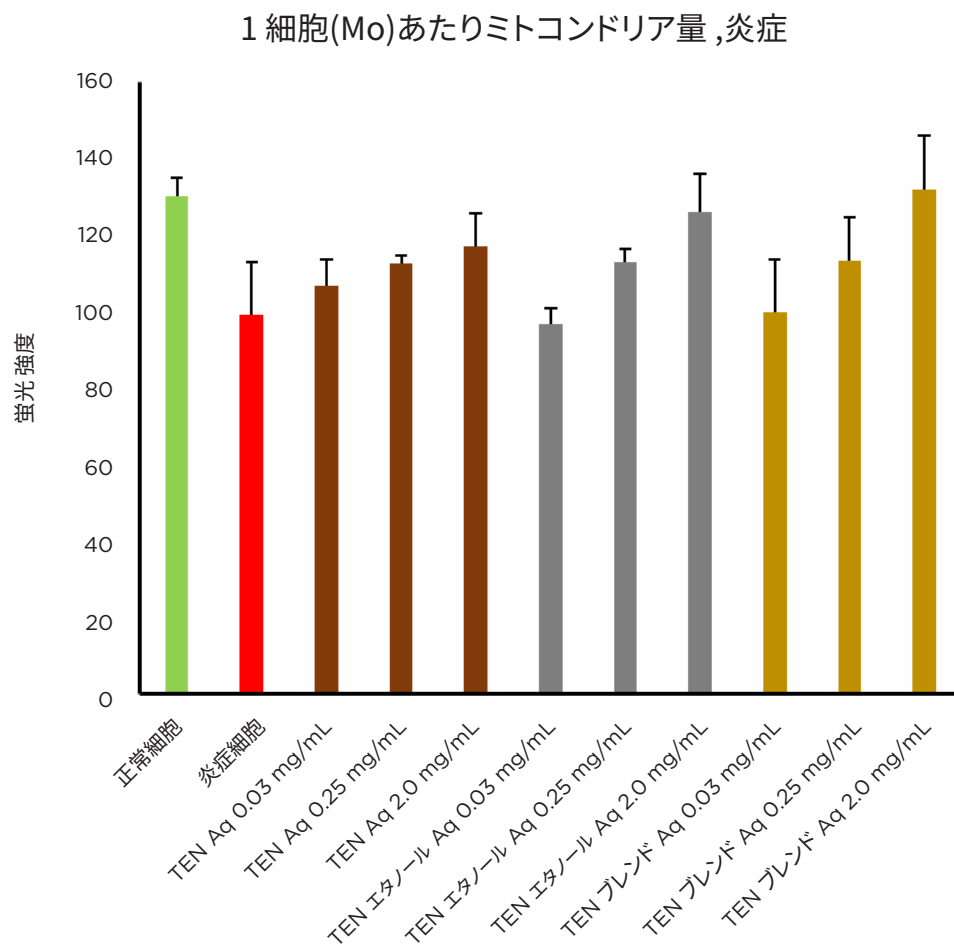


図 19.単球あたりのミトコンドリア量 (Mo) は緑色の蛍光強度として示す。上のグラフは、3重培養の平均標準±標準偏差を示す。下のグラフは、未処理細胞 (緑の点線) と炎症細胞 (赤の点線) にデータを施した場合を示す。

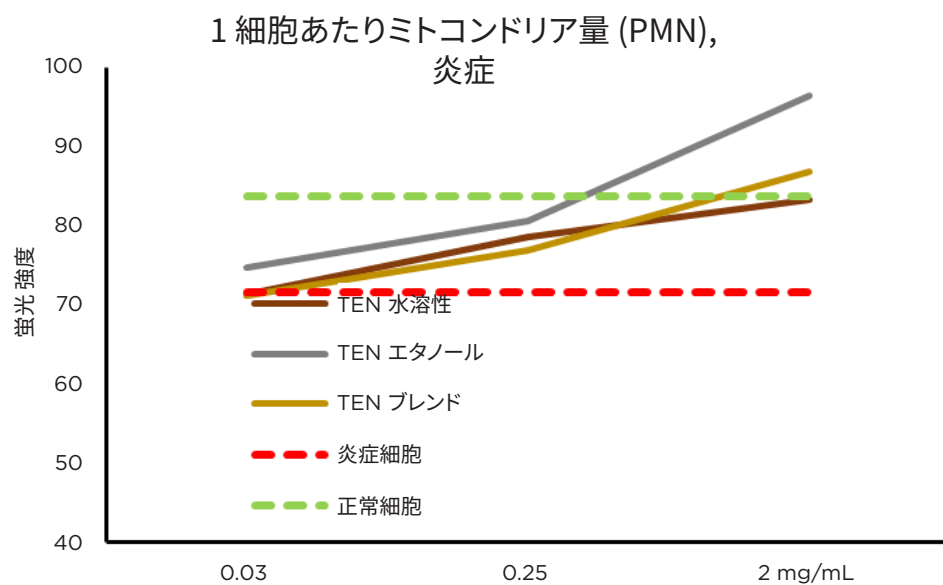
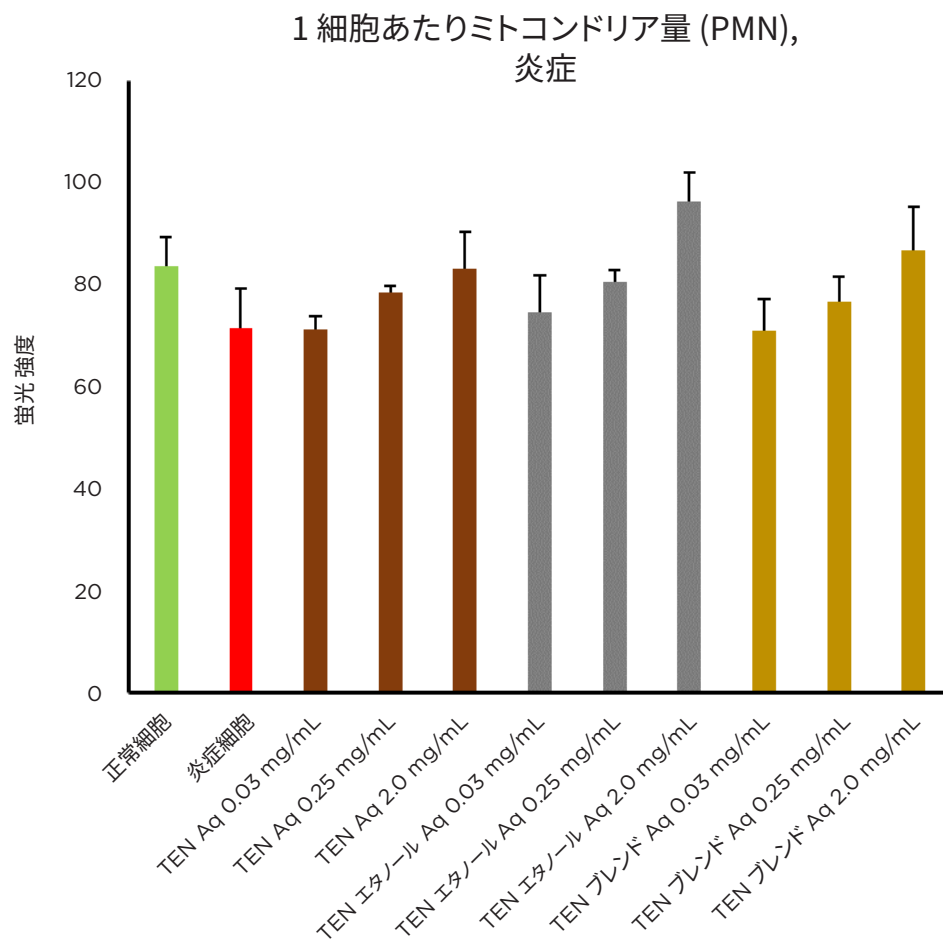


図 20. 多形核細胞 (PMN) あたりのミトコンドリア量は緑色の蛍光強度として示されている。上のグラフは、3重培養の平均標準土標準偏差を示す。未処理細胞 (緑の点線) と炎症細胞 (赤の点線) にデータを施した場合を示す。

結論

この3つのパイロットプロジェクトにより、特にストレスを受けたヒトの培養条件下で細胞レベルでのTEN の効果が発揮されることを確認する結果が得られた。

TEN 調合は、ヒトの白血球内のミトコンドリア細胞小器官を2時間後 著しく増加（急速に20%増加）もしくはさらに4週間後に大きな増加（32%）させる能力を有する*。

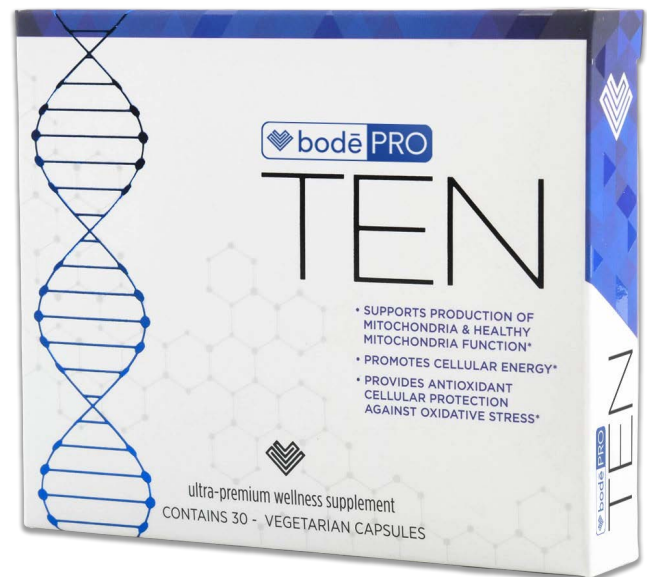
TEN により、摂取後2 時間でミトコンドリアの機能およびエネルギー産生の著しい増加（14%）が認められた*。

TEN 調合は、強力な抗酸化能を示し、フリーラジカルのストレスに細胞がさらされた時に、細胞に浸透して内側と外側から細胞を保護することが可能な抗酸化物質を含む*。

TEN は、正常およびに酸化ストレス、炎症等のヒト培養条件下で、正常なミトコンドリアの代謝活性をサポートした*。

特定の培養条件で、TEN は1 細胞当りの健康なミトコンドリア質量の増加を示した。TEN により、ミトコンドリア質量（1細胞当り）は、正常条件下では緩やかに増加し、炎症条件下では明確な増加が認められた。酸化ストレス下のヒト培養では、TEN の活発な細胞（単球および PMN 細胞）への効果がある程度確認できた。

これらの3つの研究は規模が小さく、決定的な所見は得られなかったものの、その結果は極めて有望である。Bodē Pro は、この最初の研究で得たデータを活用し、より大規模な人体臨床研究による予備的な研究結果の確認を計画している。



*本見解について米国食品医薬品局による評価はされていない。本製品は病気の診断、治療または予防を意図するものではない。