明　細　書

発明の名称 ： 細胞老化抑制用組成物及び細胞老化を抑制する方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞老化抑制用組成物に関する。また、本発明は、細胞老化を抑制する方法等に関する。

背景技術

[0002] 細胞老化とは、細胞の増殖が不可逆的に停止した状態のことをいう。例えば、ヒト等の哺乳類の正常な体細胞には、分裂可能な回数に限界があり、ある一定の回数、細胞分裂を繰り返すと細胞分裂を不可逆的に停止する。

[0003] アポトーシスとは異なり、細胞老化を起こした細胞（老化細胞）は自ら死滅しない。このため加齢に伴い、老化細胞が組織及び器官に蓄積する（非特許文献１）。老化細胞は、細胞周期を停止しているだけではなく、その細胞としての機能も低下している。また、老化細胞から分泌される生理活性因子によって周囲の正常細胞に障害を与え、臓器の機能低下等を引き起こす。細胞老化を抑制するための技術として、例えば特許文献１には、アスタキサンチン及びニコチン酸トコフェロールを有効成分として含有する間葉系幹細胞の細胞老化抑制剤が記載されている。

[0004] 細胞老化に関するマーカーとして、老化関連酸性β－ガラクトシダーゼ（Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　β－ｇａｌａｃｔｏｓｉｄａｓｅ：ＳＡ－β－Ｇａｌ）等が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開２０１９－２１８３７７号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｈｅｒｂｉｇ　Ｕ，　Ｆｅｒｒｅｉｒａ　Ｍ，　Ｃｏｎｄｅｌ　Ｌ，　Ｃａｒｅｙ　Ｄ，　Ｓｅｄｉｖｙ　ＪＭ．　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ　ｉｎ　Ａｇｉｎｇ　Ｐｒｉｍａｔｅｓ．　Ｓｃｉｅｎ

ｃｅ． ２００６；３１１（５７６５）：１２５７－１２５７．

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、細胞老化を効果的に抑制することができる細胞老化抑制用組成物を提供することである。また、本発明は、細胞老化を抑制する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、セサミン類が細胞老化を抑制する作用を有することを見出した。

[0009] 本発明は、これらに限定されるものではないが、以下の細胞老化抑制用組成物、細胞老化を抑制する方法等を包含する。

〔１〕セサミン類の１種以上を有効成分として含有する細胞老化抑制用組成物。

〔２〕セサミン類の１種以上が、セサミン及び／又はエピセサミンである上記〔１〕に記載の組成物。

〔３〕経口用組成物である上記〔１〕又は〔２〕に記載の組成物。

〔４〕飲食品である上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の組成物。

〔５〕皮膚外用剤である上記〔１〕又は〔２〕に記載の組成物。

〔６〕化粧料である上記〔５〕に記載の組成物。

〔７〕「細胞老化抑制」、「老化細胞化抑制」、「細胞老化を予防する」、「老化細胞を作らせない」及び「老化細胞の増加を抑制する」からなる群より選択される１以上の表示を付した上記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の組成物。

〔８〕セサミン類の１種以上を投与する、細胞老化を抑制する方法。

〔９〕細胞老化を抑制するための、セサミン類の１種以上の使用。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、細胞老化を効果的に抑制することができる細胞老化抑制用

組成物を提供することができる。また、本発明によれば、細胞老化を抑制する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、過酸化水素で処理し、セサミン類添加培地又は非添加培地で培養した正常ヒト線維芽細胞のＳＡ－β－Ｇａｌ活性を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の細胞老化抑制用組成物（以下、単に本発明の組成物ということもある）は、セサミン類の１種以上を有効成分として含有する。

本発明において、セサミン類とは、セサミン及びその類縁体を含む化合物の総称である。セサミンは、ゴマに含まれる主要なリグナン化合物の一種である。セサミン類縁体としては、エピセサミンの他、例えば特開平４－９３３１号公報に記載されたジオキサビシクロ［３．３．０］オクタン誘導体が挙げられる。セサミン類の１種以上として、これらの化合物の１種を単独で用いてもよく、２種以上を用いてもよい。セサミン類の具体例としては、セサミン、エピセサミン、セサミノール、エピセサミノール、セサモール、セサモリン等を例示でき、これらの立体異性体又はラセミ体を単独で、または混合して使用することができる。本発明においては、セサミン類の１種以上として、セサミン及び／又はエピセサミンが好ましく、セサミン及びエピセサミンがより好ましい。セサミン及びエピセサミンを用いる場合、これらの比率は特に限定されないが、例えば、セサミン：エピセサミン（重量比）が１：０．１～１：９が好ましく、１：０．３～１：３がより好ましく、１：０．５～１：２がさらに好ましい。

[0013] 本発明で使用されるセサミン類は、その形態や製造方法等によって、何ら制限されるものではない。例えば、セサミンの場合は、ゴマ油から公知の方法（例えば、特開平４－９３３１号公報に記載された方法）によって抽出したセサミン（セサミン抽出物または精製物という）を用いることができる。また、市販のゴマ油（液状）をそのまま用いることもできる。しかしながら、ゴマ油を用いた場合には、ゴマ油特有の風味が官能的に好ましくないと評価

されることもあることから、ゴマ油から抽出された無味無臭であるセサミン抽出物（又はセサミン精製物）を用いることが好ましい。また、ゴマ油を用いた場合、セサミン含有量が低いため、好ましい量のセサミンを配合しようとすると、処方される組成物の単位投与当りの体積が大きくなり過ぎるため、摂取に不都合を生じることがある。特に、経口摂取用に製剤化した場合は、製剤（錠剤、カプセルなど）が大きくなり過ぎて摂取に支障が生じる。したがって、摂取量が少なくてよいという観点からもゴマ油からのセサミン抽出物（又はセサミン精製物）を用いることが好ましい。合成によりセサミン類を得ることもできる。その方法としては、例えば、セサミン、エピセサミンについては、Ｂｅｒｏｚａらの方法（Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，７８，１２４２（１９５６））で合成することができる。

[0014] 細胞老化とは、上記のように細胞の増殖が停止した状態をいう。個体の老化の要因は多岐にわたり、個体レベルの老化と細胞老化との関連は明らかになっていないが、老齢の動物において、加齢に伴い細胞老化を起こした細胞（老化細胞）が増加すること、また、ヒトの初代培養細胞を継代するといずれ分裂限界を迎え、老化細胞となることが見出されている。老化細胞から分泌される生理活性因子は、周囲の正常な細胞に悪影響を与えると考えられている。老化細胞は、その細胞としての機能も低下している。細胞老化を抑制することは、細胞老化又は老化細胞の増加に起因する状態又は疾患、例えば、細胞の機能低下、臓器の機能低下、全身の機能低下等の予防又は改善に有効である。対象において細胞老化を抑制して老化細胞の増加（蓄積）を抑制することより、細胞の機能維持、臓器の機能維持、全身の機能維持等の効果が得られることが期待される。

[0015] 後記の実施例に示されるように、セサミン類は、細胞老化の指標である老化関連酸性β－ガラクトシダーゼ（ＳＡ－β－Ｇａｌ）の活性上昇を抑制したことから、細胞老化を抑制する作用を有する。セサミン類は、対象において細胞老化を抑制するための有効成分として使用することができる。

セサミン類は、天然物や飲食品に含まれ、食経験がある化合物である。この

ため安全性の観点から、セサミン類は、例えば毎日摂取することにも問題が少ないと考えられる。本発明によれば、安全性が高い物質を有効成分として含み、細胞老化を抑制する作用を有する細胞老化抑制用組成物等を提供することができる。

[0016] 本発明における細胞老化抑制効果は、公知の細胞老化マーカーにより確認することができる。細胞老化に伴う現象としては、例えばＳＡ－β－Ｇａｌ活性の上昇等が挙げられる。一態様において、本発明の細胞老化抑制用組成物として、ＳＡ－β－Ｇａｌ活性の上昇を抑制するものが好ましい。

[0017] ヒト等の哺乳動物では、通常加齢に伴い代謝等が低下することから、加齢に伴い老化細胞の除去速度が遅くなることが推測される。細胞老化を抑制することは、例えば中高年者において老化細胞の増加を抑制するために特に有効であると考えられる。中高年者は、高齢者を含む。

[0018] ヒト等の対象において細胞老化を抑制することにより、対象における老化細胞の増加を抑制することができる。一態様において、本発明の組成物は、細胞の機能低下、臓器の機能低下、全身の機能低下等の状態又は疾患の予防又は改善のために使用することができる。一態様において、本発明の組成物は、細胞老化を抑制することによって、加齢に伴う臓器の機能低下、加齢に伴う全身の機能低下等を予防又は改善するために使用することができる。

本明細書で予防は、発症を防止すること、発症を遅延させること、発症率を低下させること、発症のリスクを軽減すること等を包含する。状態又は疾患の改善は、状態又は疾患から回復させること、状態又は疾患の症状を軽減すること、状態又は疾患の症状を好転させること、状態又は疾患の進行を遅延させること、防止すること等を包含する。

[0019] 本発明の細胞老化抑制用組成物は、治療的用途（医療用途）又は非治療的用途（非医療用途）のいずれにも適用することができる。非治療的とは、医療行為、すなわち人間の手術、治療又は診断を含まない概念である。

本発明の細胞老化抑制用組成物は、例えば、飲食品、化粧料、医薬品、医薬部外品、飼料等の形態とすることができる。本発明の組成物は、それ自体が

細胞老化抑制のために用いられる飲食品、化粧料、医薬品、医薬部外品、飼料等であってもよく、これらに配合して使用される素材又は製剤等であってもよい。

本発明の細胞老化抑制用組成物は、一例として、剤の形態で提供することができるが、本形態に限定されるものではない。当該剤をそのまま組成物として、又は、当該剤を含む組成物として提供することもできる。一態様において、本発明の組成物は、細胞老化抑制剤ということもできる。

[0020] 本発明の細胞老化抑制用組成物は、経口用組成物、非経口用組成物のいずれであってもよい。一態様において、本発明の組成物は、好ましくは経口用組成物である。経口用組成物としては、飲食品、経口用の医薬品、医薬部外品、飼料が挙げられ、好ましくは飲食品又は経口用医薬品であり、より好ましくは飲食品である。

別の一態様において、細胞老化抑制用組成物は、皮膚外用剤（皮膚外用組成物）として使用することができる。皮膚外用剤は、化粧料、医薬品、医薬部外品等を含み、好ましくは化粧料である。一態様において、本発明の組成物を皮膚の細胞老化を抑制するために使用する使用する場合、当該組成物を皮膚外用剤とすることが好ましく、化粧料がより好ましい。

[0021] 本発明の細胞老化抑制用組成物は、本発明の効果を損なわない限り、セサミン類の１種以上に加えて、任意の添加剤、任意の成分を含有することができる。これらの添加剤及び成分は、組成物の形態等に応じて選択することができ、一般的に飲食品、化粧料、医薬品、医薬部外品、飼料等に使用可能なものが使用できる。本発明の組成物を、飲食品、化粧料、医薬品、医薬部外品、飼料等とする場合、その製造方法は特に限定されず、一般的な方法により製造することができる。

[0022] 例えば本発明の細胞老化抑制用組成物を飲食品とする場合、セサミン類の１種以上に、飲食品に使用可能な成分（例えば、食品素材、必要に応じて使用される食品添加物等）を配合して、種々の飲食品とすることができる。飲食品は特に限定されず、例えば、一般的な飲食品、健康食品、健康飲料、機能

性表示食品、特定保健用食品、健康補助食品、病者用飲食品等が挙げられる。上記健康食品、機能性表示食品、特定保健用食品、健康補助食品等は、例えば、細粒剤、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、チュアブル剤、ドライシロップ剤、シロップ剤、液剤、飲料、ドリンク剤、流動食等の各種製剤形態として使用することができる。

[0023] 本発明の細胞老化抑制用組成物を化粧料とする場合、セサミン類の１種以上に、化粧料に使用可能な成分（例えば、化粧料に許容される担体、添加剤等）を配合して種々の化粧料とすることができる。化粧料の製品形態は特に限定されず、例えば、化粧水、美容液、パック、乳液、クリーム、日焼け止め等のスキンケア化粧料等が挙げられる。

[0024] 本発明の細胞老化抑制用組成物を医薬品又は医薬部外品とする場合、例えば、セサミン類の１種以上に、薬理学的に許容される担体、必要に応じて添加される添加剤等を配合して、各種剤形の医薬品又は医薬部外品とすることができる。そのような担体、添加剤等は、医薬品又は医薬部外品に使用可能な、薬理学的に許容されるものであればよく、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、着色剤等の１又は２以上が挙げられる。医薬品又は医薬部外品の投与（摂取）形態としては、経口又は非経口（経皮、経粘膜、経腸、注射等）投与の形態が挙げられる。一態様において、本発明の組成物を医薬品又は医薬部外品とする場合、経口用の医薬品又は医薬部外品とすることが好ましい。経口投与のための剤形としては、液剤、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、糖衣錠、カプセル剤、懸濁液、乳剤、チュアブル剤等が挙げられる。

別の一態様において、医薬品又は医薬部外品は、皮膚外用剤とすることが好ましい。皮膚外用剤の剤形等は特に限定されず、例えば溶液、乳液、クリーム、ゲル、粉末、エアゾール、ミスト、カプセル及びシート等任意の形態とすることができる。

医薬品は、非ヒト動物用医薬であってもよい。

[0025] 本発明の細胞老化抑制用組成物を飼料とする場合には、セサミン類の１種以

上を飼料に配合すればよい。飼料には飼料添加剤も含まれる。飼料としては、例えば、牛、豚、鶏、羊、馬等に用いる家畜用飼料；ウサギ、ラット、マウス等に用いる小動物用飼料；犬、猫、小鳥等に用いるペットフードなどが挙げられる。

[0026] 本発明の細胞老化抑制用組成物に含まれるセサミン類の含有量は特に限定されず、その形態等に応じて設定することができる。

本発明の組成物中のセサミン類の総含有量は、例えば、該組成物中に０．００１重量％以上が好ましく、０．０１重量％以上がより好ましく、０．０５重量％以上がさらに好ましく、また、１０重量％以下が好ましく、５重量％以下がより好ましい。一態様において、セサミン類の総含有量は、本発明の組成物中に０．００１～１０重量％が好ましく、０．０１～５重量％がより好ましく、０．０５～５重量％がさらに好ましい。上記総含有量は、セサミン類の化合物を２種以上含有する場合は、これらの合計含有量である。

[0027] 本発明の細胞老化抑制用組成物は、その形態又は剤形に応じて自体公知の種々の方法で摂取又は投与することができる。一態様において、本発明の組成物は、経口で摂取（経口投与）されることが好ましい。別の一態様において、本発明の組成物を皮膚外用剤とする場合は、皮膚に適用することができる。

本発明の細胞老化抑制用組成物の投与量（摂取量ということもできる）は特に限定されない。本発明の細胞老化抑制用組成物の投与量は、細胞老化抑制効果が得られるような量であればよく、投与形態、投与方法、対象の体重等に応じて適宜設定すればよい。

[0028] 一態様において、本発明の細胞老化抑制用組成物をヒト（成人）を対象に摂取させる又は投与する場合、セサミン類の総投与量は、１日当たり体重６０ｋｇで、好ましくは０．５ｍｇ以上、より好ましくは１ｍｇ以上、さらに好ましくは、３ｍｇ以上、また、好ましくは２００ｍｇ以下、より好ましくは１００ｍｇ以下、さらに好ましくは８０ｍｇ以下である。一態様において、セサミン類の総投与量は、ヒト（成人）であれば、１日当たり体重６０ｋｇ

で、好ましくは０．５～２００ｍｇ、より好ましくは１～１００ｍｇ、さらに好ましくは３～８０ｍｇである。上記量を、１日１回以上、例えば、１日１回又は数回（例えば２～３回）に分けて、摂取させる又は投与することが好ましい。一態様においては、上記量のセサミン類を、ヒトに経口で摂取させる又は投与することが好ましい。一態様においては、セサミン及び／又はエピセサミンを、セサミン及びエピセサミンの総投与量として１日当たり体重６０ｋｇで、好ましくは０．５～２００ｍｇ、より好ましくは１～１００ｍｇ、さらに好ましくは３～８０ｍｇ、ヒト（成人）に経口で摂取させる又は投与することが好ましい。一態様において、本発明の細胞老化抑制用組成物は、ヒトに、体重６０ｋｇあたり、１日あたり上記量のセサミン類を摂取させる又は投与するために使用することができる。上記総投与量は、セサミン類の化合物を２種以上使用する場合は、これらの合計量である。

[0029] 本発明の細胞老化抑制用組成物は、継続して摂取又は投与されるものであることが好ましい。セサミン類を、継続的に摂取又は投与することによって、より高い細胞老化抑制効果が得られることが期待される。一態様において、本発明の細胞老化抑制用組成物は、好ましくは１週間以上、より好ましくは４週間以上、さらに好ましくは８週間以上、特に好ましくは１２週間以上継続して摂取又は投与されることが好ましい。

[0030] 本発明の細胞老化抑制用組成物を摂取させる又は投与する対象（投与対象ということもできる）は、特に限定されない。好ましくはヒト又は非ヒト哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。

一態様において、投与対象として、細胞老化抑制を必要とする又は希望する対象等が挙げられる。このような対象として、例えば、中高年者等が挙げられる。一態様において、本発明の組成物は、中高年者用の細胞老化抑制用組成物として好適に使用される。中高年者は、例えば、４０歳以上のヒトであってよい。一態様において、中高年者の中でも、対象として高齢者が好ましい。高齢者は、例えば、６０歳以上又は６５歳以上のヒトであってよい。投与対象は、健常者であってよい。本発明の組成物は、例えば、細胞老化抑制

により予防又は改善が期待できる状態又は疾患の予防等を目的として、健常者に対して使用することもできる。

[0031] 細胞老化抑制の対象となる細胞の種類は特に限定されず、例えば、線維芽細胞、上皮細胞、表皮細胞、基底細胞、幹細胞、脂肪細胞、神経細胞、筋細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、筋線維芽細胞、筋衛星細胞、衛星細胞、骨芽細胞、肝細胞、肝星細胞、腎細胞、間質細胞、血液細胞、免疫系細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、周皮細胞、レンズ細胞、網膜細胞等が挙げられる。一態様において、本発明の細胞老化抑制用組成物は、線維芽細胞の細胞老化抑制のために好適に使用される。線維芽細胞はほぼ全ての臓器において組織の支持、構造の形成に必須な細胞である。

[0032] 本発明の細胞老化抑制用組成物には、例えば、「細胞老化抑制」、「老化細胞化抑制」、「細胞老化を予防する」、「老化細胞を作らせない」及び「老化細胞を減らす」からなる群より選択される１又は２以上の機能の表示等が付されていてもよい。

本発明の一態様において、本発明の組成物は、上記の表示が付された飲食品又は皮膚外用剤であることが好ましく、飲食品又は化粧料であることがより好ましく、飲食品であることがさらに好ましい。また上記の表示は、上記の機能を得るために用いる旨の表示であってもよい。上記の表示は、組成物自体に付されてもよいし、組成物の容器又は包装に付されていてもよい。

[0033] 本発明は、以下の方法も包含する。

セサミン類の１種以上を投与する、細胞老化を抑制する方法。

セサミン類の１種以上を対象に投与することにより、対象において細胞老化を抑制することが可能となる。

上記方法は、治療的な方法であってもよく、非治療的な方法であってもよい。

[0034] 本発明は、以下の使用も包含する。

細胞老化を抑制するための、セサミン類の１種以上の使用。

セサミン類の１種以上は、細胞老化を抑制するために使用することができる

。

上記使用は、治療的な使用であってもよく、非治療的な使用であってもよい。

[0035] 上記の方法及び使用において、セサミン類及びその好ましい態様は、上述した本発明の細胞老化抑制用組成物と同じである。セサミン類の１種以上として、セサミン類の化合物１種を使用してもよく、２種以上を使用してもよい。上記方法及び使用においては、１日に１回以上、例えば、１日１回～数回（例えば２～３回）、セサミン類の１種以上を対象に投与する（摂取させる）ことが好ましい。一態様において、上記方法及び使用においては、セサミン類を、経口投与（摂取）することが好ましい。別の一態様においては、例えば、セサミン類を皮膚の細胞老化を抑制するために使用する場合には、セサミン類の１種以上を皮膚に適用することが好ましい。

上記の使用は、好ましくはヒト又は非ヒト哺乳動物、より好ましくはヒトにおける使用である。

[0036] 上記方法及び使用においては、所望の作用が得られる量（有効量ということもできる）のセサミン類の１種以上を使用すればよい。セサミン類の好ましい投与量や投与対象等は上述した本発明の細胞老化抑制用組成物と同じである。セサミン類は、そのまま投与してもよく、これを含む組成物として投与してもよい。例えば、上述した本発明の細胞老化抑制用組成物を使用してもよい。一態様においては、細胞の機能低下、臓器の機能低下、全身の機能低下等の状態又は疾患の予防又は改善のために、セサミン類の１種以上を使用することができる。一態様においては、細胞老化を抑制することによって、加齢に伴う臓器の機能低下、加齢に伴う全身の機能低下等を予防又は改善するために、セサミン類の１種以上を使用することができる。

[0037] 本発明は、細胞老化抑制用組成物を製造するための、セサミン類の１種以上の使用も包含する。細胞老化抑制用組成物及びその好ましい態様等は、上記と同じである。

実施例

[0038] 以下、本発明を実施例に基づいてより具体的に説明する。尚、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0039] ＜実施例１＞

（被験物質調製）

セサミン類（セサミン：エピセサミンの比率（重量比）が１：１となるように作製したセサミン及びエピセサミン混合物、純度９８％）を、被験物質として使用した。セサミン類が１０ｍＭとなるようにジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に溶解し、セサミン類の終濃度が０．１、０．３、１、３又は１０μＭとなるように培地（１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、１％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ ｍｉｘｅｄ ｓｏｌｕｔｉｏｎ添加ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ））で希釈し、被験物質含有培地とした。ＤＭＳＯのみ溶解した培地を非添加培地とした。

[0040] （細胞培養）

正常ヒト線維芽細胞（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製, Ｃ０１３５Ｃ）は、培地（１０％ＦＢＳ、１％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ ｍｉｘｅｄ ｓｏｌｕｔｉｏｎ添加ＤＭＥＭ）を用いて９６ウェルｂｌａｃｋプレートに１０，０００ｃｅｌｌｓ／０．１ｍＬ／ウェルで播種し、CO_2インキュベーター（３７℃、５％ CO_2、以下同様）で培養した。２４時間後、培地を被験物質含有培地（セサミン類濃度：０．１、０．３、１、３又は１０μＭ）又は非添加培地（０．１ｍＬ）に交換し、CO_2インキュベーターで２４時間培養した。次に、１００μＭ H_2O_2（過酸化水素）添加ＤＭＥＭ又はH_2O_2非添加ＤＭＥＭに交換し、CO_2インキュベーターで１時間H_2O_2処理して細胞老化を誘導した。直接的な抗酸化作用による結果が得られることを避けるため、H_2O_2含有培地をリン酸緩衝液（ＰＢＳ）で洗浄した後、被験物質含有培地又は非添加培地（０．１ｍＬ）に交換し、CO_2インキュベーターで細胞を３日間培養し、解析に用いた。被験物質含有培地又は非添加培地は、H_2O_2処理前及び処理後で被験物質濃度が同じ培地を使用した。例えば、H_2O_2処理前にセサミン類

の濃度が０．１μＭの培地で培養した細胞は、H_2O_2処理後もセサミン類の濃度が０．１μＭの被験物質含有培地で培養した。H_2O_2処理前に被験物質非添加培地で培養した細胞は、H_2O_2処理後も被験物質非添加培地で培養した。

[0041]（ＳＡ－β－Ｇａｌ活性の測定）

細胞老化のマーカーであるＳＡ－β－Ｇａｌの活性を測定した。

まず、Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔ Ｎｏｒｍａｌｉｚａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（（株）同仁化学研究所）を用いて細胞数を測定した。Ｗｏｒｋｉｎｇ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｓｔａｉｎｉｎｇ ｓｏｌｕｔｉｏｎをＱｕｅｎｃｈｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒで５００倍希釈して調製）を各ウェルに１００μＬ添加し、CO_2インキュベーターで３０分間インキュベートして核染色し、蛍光プレートリーダーで蛍光強度（ｃｅｌｌ ｃｏｕｎｔ ＲＦＵ）を測定した（Ｅｘ：３５０ｎｍ，Ｅｍ：４６１ｎｍ）。次に、各ウェルをＰＢＳで洗浄後、Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ Ｐｌａｔｅ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（（株）同仁化学研究所）を用いてＳＡ－β－Ｇａｌ活性を測定した。Ｌｙｓｉｓ Ｂｕｆｆｅｒ ５０μＬを各ウェルに添加し、室温で１０分間インキュベートして細胞を溶解した。次にＳＰｉＤＥＲ－βＧａｌ Ｗｏｒｋｉｎｇ ｓｏｌｕｔｉｏｎ ５０μＬを各ウェルに添加し、３７℃で３０分間インキュベートした後、蛍光プレートリーダーで蛍光強度（ＳＡ－β－Ｇａｌ ＲＦＵ）を測定した（Ｅｘ：５３５ｎｍ，Ｅｍ：５８０ｎｍ）。ＳＰｉＤＥＲ－βＧａｌの蛍光値を核染色の蛍光値で補正し、ＳＡ－β－Ｇａｌ活性を算出した。有意差検定は、Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ ｔ－ｔｅｓｔ（ｖｓ H_2O_2非処理）又はＤｕｎｎｅｔ’ｓ ｔｅｓｔ（ｖｓ H_2O_2処理、被験物質非添加）により行った。結果を図１に示す。

[0042]（結果）

図１は、過酸化水素で処理し、被験物質（セサミン類）添加培地又は非添加培地で培養した正常ヒト線維芽細胞のＳＡ－β－Ｇａｌ活性を示すグラフである。図１に示す結果は、平均±標準誤差（Ｎ＝３）である。図１中、＃及

び＊は、有意差があったことを示す（＃ｐ＜０．０５，　Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔ　（ｖｓ　H_2O_2非処理）、＊ｐ＜０．０５，　Ｄｕｎｎｅｔ’ｓ　ｔｅｓｔ　（ｖｓ　H_2O_2処理、被験物質非添加））。縦軸（ＳＡ－β－Ｇａｌ　ＲＦＵ／ｃｅｌｌ　ｃｏｕｎｔ　ＲＦＵ）は、細胞あたりのＳＡ－β－Ｇａｌ活性を示す。非添加は、被験物質非添加培地で培養した細胞を示す。

H_2O_2処理により、ＳＡ－β－Ｇａｌ活性が有意に上昇した。セサミン類は、ＳＡ－β－Ｇａｌ活性の増加を有意に抑制した。これらの結果から、セサミン及びエピセサミンは細胞老化を抑制する効果を持つことが示された。