

引用文献

- 1) Blumenthal (Senior Ed.): The Complete German Commission E Monographs, the American Botanical Council, Austin (1998)
- 2) Thompson, C. A.: Am. J. Health Syst. Pharm. 55, 527 (1998)
- 3) 厚生省医薬安全局長通知医薬発 344 号「いわゆるハーブ類の取り扱いについて」平成 10 年 3 月 31 日
- 4) 石和あづさ：日経ヘルス 2000 (4), 96-104
- 5) 志村二三夫：厚生科学研究「新開発食品素材の安全性評価に関する研究」平成 9 年度研究報告書, 主任研究者 池上幸江, 77-93
- 6) Voordouw, B. C., Euser, R., Verdonk, R. E., Alberda, B. T., de Jong, F. H., Drogendijk, C., Fauser, B. C., Cohen, M.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 74, 108-117
- 7) Alonso, R., Prieto, L., Hernandez, C., Mas, M.: J. Endocrinol. 79, 77-83 (1978)
- 8) Lang, U., Aubert, M. L., Conne, B. S., Bradtke, J. C., Sizonenko, P. C.: Endocrinology 112, 1578-1584 (1983)
- 9) Sizonenko, P. C., Lang, U., Rivest, R. W., Aubert, M. L.: Ciba Found. Symp.: 117, 208-230 (1985)
- 10) Lang, U., Aubert, M. L., Rivest, R. W., Vinas-Bradtke, J. C., Sizonenko, P. C.: Endocrinology 115, 2303-2310 (1984)
- 11) Laudon, M., Yaron, Z., Zisapel, N.: J. Endocrinol. 116, 43-53 (1988)
- 12) Badawi, H., Wilkinson, M.: J. Reprod. Fertil. 3, 273-278 (1988)
- 13) Aubert, M. L., Rivest, R. W., Lang, U., Winiger, P., Sizonenko, P. C.: Neuroendocrinology 48, 72-80 (1988)
- 14) Yamada, K.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 40, 1066-1068 (1992)
- 15) Oaknin-Bendahan, S., Anis, Y., Nir, I., Zisapel, N.: Neuroreport 6, 785-788 (1995)
- 16) Rasmussen, D. D., Boldt, B. M., Wilkinson, C. W., Yellon, S. M., Matsumoto, A. M.: Endocrinology 140, 1009-1012 (1999)
- 17) Weaver, D. R.: J. Biol. Rhythms 12, 682-689 (1997)
- 18) Williamson, B. L., Tomlinson, A. J., Mishra, P. K., Gleich, G. J., Naylor, S.: Chem. Res. Toxicol. 11, 234-240 (1998)
- 19) Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C.D., Pauls, A., Weidenhammer, W., Melchart, D.: Br. Med. J., 313, 253-256 (1996)
- 20) Nathan, P. J.: Molecular Psychiatry 4, 333-338 (1999)
- 21) Blumenthal, M.: Herbal Gram 47, 64-65 (1999)
- 22) Lieberman, S.: J. Women. Health 7, 177-182 (1988)
- 23) Bennett, D. A., Jr., Phun, L., Polk, J. F., Voglino, S. A., Zlotnik, V., Raffa, R. B.: Ann. Pharmacother. 32, 1201-1206 (1998)
- 24) 中根允文, 塚原美佐子, 道辻俊一郎：臨床精神医学, 23, 5-12, (1994)
- 25) 朝日新聞 平成 12 年 1 月 29 日朝刊
- 26) 週間朝日 平成 12 年 2 月 25 日号, pp 138-139
- 27) Kim, H. L., Streltzer, J., Goebert, D. J.: Nerv. Ment. Dis. 187, 532-538 (1999)
- 28) 志村二三夫：厚生科学研究「新開発食品等の安全性確保に関する研究」平成 10 年度

研究報告書, 主任研究者 池上幸江, 79-104

- 29) Lichtwer Pharma: Jarsin "Product Information" pp. 1-43 (1999)
- 30) Erdelmeier, C. A.: *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl. 1, 2-6 (1998)
- 31) Mauri, P., Pietta, P.: *Rapid Commun. Mass Spectrum*. 14, 95-99 (2000)
- 32) Freytag, W. E.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 123, 2383-2386 (1984)
- 33) Porsolt, R. D., Bertin, A., Jalfre, M.: *Eur. J. Pharmacol.* 51, 291-294 (1978)
- 34) 杉浦実, 村岡慎一郎, 吉澤豊吉, 渡部要, 村上理, 山口文雄: *神経精神薬理* 19, 287-291 (1997)
- 35) Pellow, S., Phillippe, C., File, E., Briley, M.: *J. Neurosci. Meth.* 14, 149-167 (1985)
- 36) Sahgal, A.: in *Behavioural Neuroscience I*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, pp. 1-8 (1993)
- 37) Gupta, B., Awasthi, A., Jaju, B. P.: *Indian J. Med. Res.* 96, 65-71 (1992)
- 38) Miller, S.: *Newsweek* 129 (18), 74 (1997)
- 39) Jewel, D.: *People Weekly* 48 (18), 85 (1997)
- 40) Vorbach, E. U., Arnoldt, K. H., Hubner, W. D.: *Pharmacopsychiatry*, 30 (Suppl.), 81-85 (1997)
- 41) Kasper, S.: *Pharmacopsychiatry* 30 (Suppl.) 89-93 (1997)
- 42) de Abajo, F. J., Rodriguez, L. A., Montero, D.: *Br. Med. J.* 319, 1106-1109 (1999)
- 43) Ernst, E., Rand, J. I., Barnes, J., Stevinson, C.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 54, 589-94 (1998)
- 44) Bombardelli, E., Morazzoni, P.: *Fitoterapia* 66, 43-68 (1995)
- 45) Bove, G. M.: *Lancet* 352, 1121-1122 (1998)
- 46) Nierenberg, A. A., Burt, T., Matthews, J., Weiss, A. P.: *Biol. Psychiatry* 46, 1707-8 (1999)
- 47) Vitiello, B.: *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 513-517 (1999)
- 48) Brockmoller, J., Reum, T., Bauer, S., Kerb, R., Hubner, W. D., Roots, I.: *Pharmacopsychiatry* 30, Suppl 2, 94-101 (1997)
- 49) Butterweck, V., Petereit, F., Winterhoff, H., Nahrstedt, A.: *Planta Med.* 64, 291-294 (1998)
- 50) Laakmann, G. Schule, C., Baghai, T., Kieser, M.: *Pharmacopsychiatry*, 31, Suppl. 1, 54-59 (1998)
- 51) Chatterjee, S. S., Noldner, M., Koch, E., Erdelmeier, C.: *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl 1, 7-15 (1988)
- 52) Singer, A., Wonnemann, M., Muller, W. E., J.: *Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1363-1368 (1999)
- 53) Johne, A., Brockmoller, J., Bauer, S., Maurer, A., Langheinrich, M., Roots, I.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 66, 338-345 (1999)

循環器系をターゲットとした新開発食品等の安全性に関する研究 心・血管系組織に対するイチョウ葉エキス長期投与の影響

分担研究者 篠塚 和正 武庫川女子大学薬学部
研究協力者 窪田 洋子 武庫川女子大学薬学部

【研究目的】

近年、我国では社会的ストレスの増大や高齢化社会への移行が進む中で、健康に対する国民の関心は非常に高まっており、健康維持や身体機能の改善を期待させるような食品が注目されている。実際の利用状況としては高齢者を中心にその利用が増加していると言われているが、若年層も関心をもっており、今後ともその利用がますます増えることが予想される。特に健康食品と呼ばれている新開発食品の中には、合成・抽出・濃縮などの技術により錠剤・カプセル等の形状で販売されており、大量摂取による弊害が危惧される。一方、食生活の欧米化などによって狭心症や心筋梗塞、脳血管障害などの循環器系疾患を有する人口が増加しているが、実際にこのような患者が医師の薬物治療を受けながら、疾病の改善を期待して健康食品を利用するというケースもあるものと予想される。この場合、健康食品の長期・大量摂取の危険性と共に、医薬品との相互作用による薬害事象の発生も心配される。

イチョウ葉エキスは健康食品として広範に販売・利用されているが、実際にいろいろな薬理作用を有することが、基礎・臨床レベルで報告^{1~16)}されており、ヨーロッパの一部の国では脳および末梢循環障害の改善などを目的に医薬品として使用されている。安全性は比較的高いと言われているが、有害作用に関する報告^{17,18)}も少なくない。

このようにイチョウ葉エキスは医薬品的な性格を有するが、日本では健康食品として汎用されていることから、その安全性の検証は重要である。商品としてのイチョウ葉エキスには、脳および末梢循環改善機能を表示しているものが多いので、本研究では循環器機能に対する安全性の検討に的を絞った。前年度はイチョウ葉エキス短期投与の影響を検討し、イチョウ葉エキスに陽性変時効果のあることを見いだすと共に、その他の循環器パラメータ、即ち血圧や末梢血流には著明な影響のないことを明らかにしている。

そこで今年度はイチョウ葉エキスの安全性をより高い感度で精査するために、以下の3点を検討課題とすることにした。

- 1) *in vitro*実験を行い、その作用の有無を組織・細胞レベルで明らかにする。
- 2) 長期経口投与の影響の有無とその詳細を明らかにする。
- 3) 病態動物（高血圧自然発症ラット）に対する影響の有無を明らかにする。

【研究方法】

1. 実験材料

1) 実験動物

実験にはWistar系雄性ラット（日本SLC、8～10週齢）を使用し、恒温（22±2℃）、恒湿（55±5%）、定時照明（7～19 時）の条件下で一定期間予備飼育した後、実験に供した。また、一部の実験には高血圧自然発症ラット（SHR；雄性、7週齢で購入）を用いた。なお、実験に際しては「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「武庫川女子大額動物実験指針」を遵守して、動物を取り扱った。

2) 使用薬物

イチョウ葉エキス粉末は、イチョウエキス-F（タマ生化学、東京）を使用した。その性状および組成については、タマ生化学による分析データを表1に示した。

表1 イチョウエキス-F：試験成績表（タマ生化学より提供）

規格項目	分析値
性状	黄褐色～褐色の粉末 特有の匂いと苦味がある
確認試験	適合
異物試験	適合
重金属	10 ppm 以下
ヒ素	2 ppm 以下
ギンコー酸含量	1 ppm 以下
乾燥減量	2.3 %
強熱残留物	0.6 %
フラボン配糖体	24.2 %
テルペンラクトン ギンコライドA含量 ギンコライドB含量 ギンコライドC含量 ピロバライド含量	2.7 % 1.1 % 1.7 % 3.9 %
一般生菌数	300 個/g 以下
大腸菌群	検出せず
判定	適合

更に、イチョウ葉エキス粉末含有成分の、Ginkgolide B (BIOMOL, USA)、Quercetin (和光純薬、大阪)、Amentoflavone (EXTRASYNTHÈSE, France) もイチョウ葉エキス粉末と同様にして実験に供した。即ち、被験化合物は使用直前に適宜温水 (蒸留水) に溶解させて使用した。また、以下の薬物も蒸留水に適宜溶解させて使用した。なお、結果の中ではイチョウ葉エキスをGBEと略した。

イソプロテレノール重酒石酸塩 (フナコシ、東京)、ウレタン (ナカライテスク、東京)、塩化アセチルコリン (第一製薬、東京)、ニトロアルギニンメチルエステル (ナカライテスク、京都)、ノルアドレナリン (三共、東京)、ペントバルビタールナトリウム (東京化成、東京)、Calcium Green-1-AM (Molecular Probes, Oregon, USA)。

in vitro 実験に際して以下の生理溶液を使用した。

摘出臓器を用いた実験 : Krebs-Henseleit Solution (NaCl 118.4 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 10 mM)。

培養細胞を用いた実験 : Physiological Salt Solution (NaCl 140.0 mM, KCl 4.0 mM, CaCl₂ 2.0 mM, MgCl₂ 2.0 mM, HEPES 10.0 mM, glucose 10.0 mM; pH 7.4 NaOH,)。

2. *in vitro* 実験

1) ラット摘出心房を用いた実験

ペントバルビタール麻酔下 (160 mg/kg, 腹腔内投与) でラットより心臓を摘出した後、心室を除去して左右心房とペースメーカーからなる心房標本を作製した。標本は左右心耳部をセルフインで挟んでマグヌス管中に懸垂した。マグヌス管には32°CのKrebs-Henseleit液 (pH 7.4) を満たし、95%酸素・5%二酸化炭素の混合ガスを通気した。標本に生じる張力変化は張カトランスデューサー (T-7, NEC 三栄、東京) 及び歪み圧カアンプ (AS1202, NEC 三栄、東京) を介して測定した。なお、記録と解析はパワーラブシステム (PowerLab/ 800, バイオリサーチセンター、名古屋) を用いて行った。

イチョウ葉エキス粉末は37°Cに暖めたクレブス液に用時溶解し、これをマグヌス管中に直接注入して作用させた。なお、結果の中で記載してある濃度はマグヌス管中の最終濃度とした。他の薬物に関しては前述した方法で実験に供した。

2) ラット摘出胸部大動脈を用いた実験

ペントバルビタール麻酔下 (160 mg/kg, 腹腔内投与) でラットより胸部大動脈を摘出した後、幅2~3mmのリング状標本を作成した。標本は95% O₂ および5% CO₂ の混合ガスを通気した37°CのKrebs-Henseleit液 (pH 7.4) を含むマグヌス管中に懸垂した。標本に生じる張力変化は張カトランスデューサー (T-7, NEC 三栄、東京) および歪み圧カアンプ (AS1202, NEC 三栄、東京) を介して測定した。なお、記録及び解析はパワーラブシステム (PowerLab/ 800, バイオリサーチ

センター、名古屋)を用いて行った。

イチヨウ葉エキス粉末は37℃に暖めたクレブス液に用時溶解し、これをマグヌス管中に直接注入して作用させた。なお、結果の中で記載してある濃度はマグヌス管中の最終濃度とした。他の薬物に関しては前述した方法で実験に供した。

3) ラット摘出胸部大動脈培養内皮細胞を用いた実験

ペントバルビタール麻酔下でラットから摘出した胸部大動脈 (2.0 mm²) を橋本らのExplant 法¹⁹⁾にて培養したものを、初代培養内皮細胞標本とした。この標本にCalcium Green-1-AM (5 μM) を37℃で30分間負荷し、その後、488 nm Ar レーザー励起により得られる 515~560 nm の共焦点蛍光画像を5秒間隔で取得し記録、解析した。顕微鏡画像解析装置としては図1に示すようなニポウ式共焦点スキャナユニット (CSU 10、横河電機、東京) を取り付けた倒立顕微鏡 (ECLIPSE TE 300、ニコン、東京) と画像解析装置 (ARGUS-50、浜松ホトニクス、浜松) を用いた。取得した画像の蛍光強度 (細胞内カルシウムイオンレベル) は、薬物刺激前 (F₀) と刺激後の最大強度 (F) を測定し、その比 (F/F₀) を算出して表示した。

3. 長期経口投与実験

日本SLC(株) および日本チャールスリバー (株) から8週齢の雄性Wistar ラットおよび雄性SHRを購入し実験に供した。Wistar ラットは1群5~6匹としてコントロール食群と0.5%イチヨウ葉エキス添加食群の2群に分け、それぞれの飼料を30日間自由摂取させた。SHRは1群5~6匹としてコントロール食群、0.05%、0.1%、0.5%、1.0%そして2.0%イチヨウ葉エキス添加食群の6群に分け、それぞれの飼料を30日間自由摂取させた。イチヨウ葉エキスは前述したように、タマ生化学工業から供与された粉末状エキスを使用し、市販粉末飼料 (CE-2、日本クレア株) に、上述した濃度になるよう添加した。

ラットは30日後にペントバルビタール麻酔下、心房と胸部大動脈を摘出し、前述した方法に従って実験に供した。また肝臓を摘出してその脂質をBlighとDyerの方法により抽出し、重量法により総脂質を算出した。さらに肝臓の薬物代謝酵素について (チロトクロームP 450含量、グルタチオンS-トランスフェラーゼ活性) も、既報²⁰⁾に従って測定した。

4. 統計処理

データは全て4例以上の平均値と標準誤差で示した。対応のない2群間の有意差検定にはStudent's t-test (分散が有意に異なる場合にはWelch test) を、対応のある2群間の有意差検定にはpaired t-testを用いた。また、3群以上の群間有意差検定にはANOVA(Analysis of Variance)を用いた。実際の計算はStat View-IIプログラム (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いて行った。有意差検定の結果、危険率5%未満のものを有意差ありと判断した。

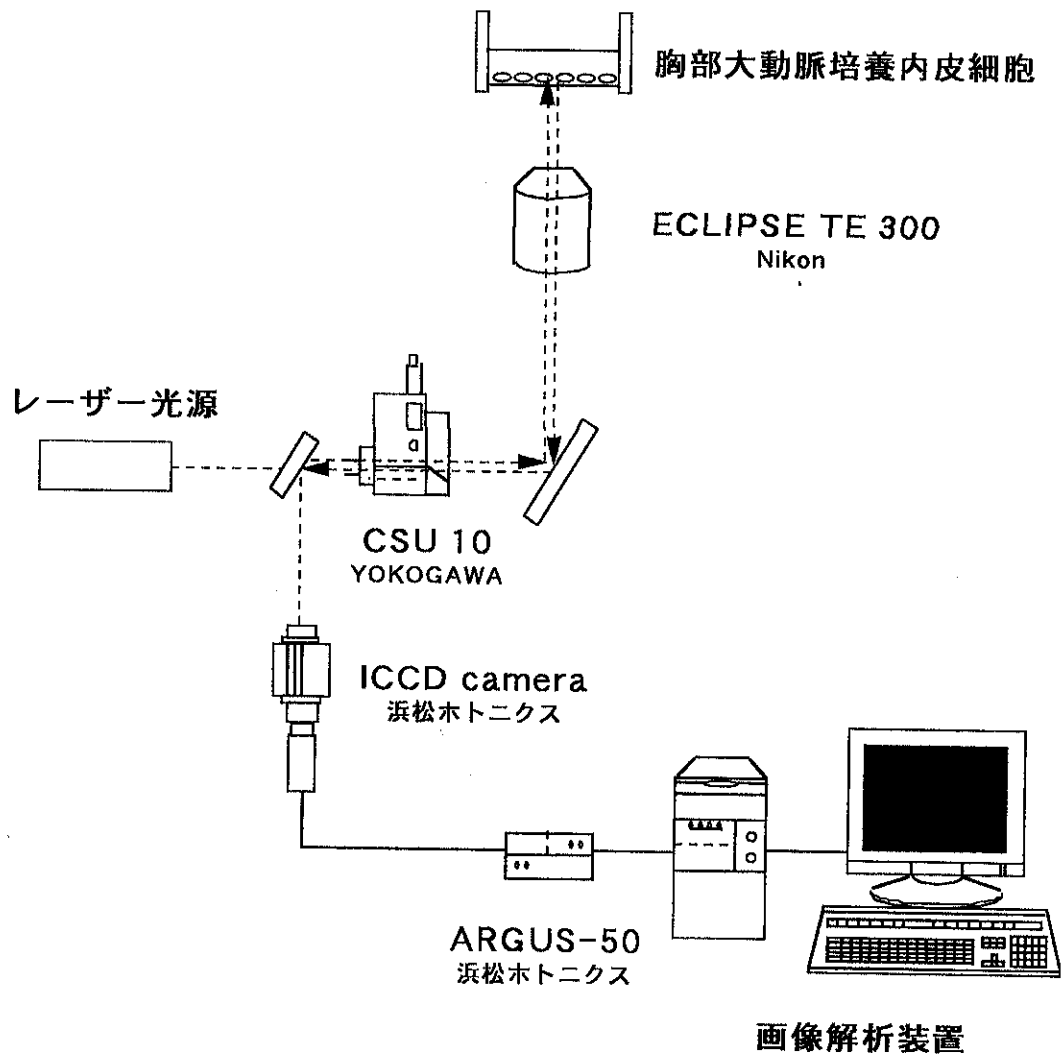


図1 システム構成図

【研究結果】

1. *in vitro* 実験におけるイチヨウ葉エキスの検討

1) 心房に対する影響

図2はラット心房標本の心拍数（拍動数/分）とその収縮力（律動的収縮運動の強さ）に対するイチヨウ葉エキス（GBE）の影響を示したものである。GBEは0.1mg/mlの濃度から有意な陽性変時作用（心拍数の増加）を示すとともに、0.1mg/mlの濃度においてのみ有意な陽性変力作用（心収縮力の増加）を示した。

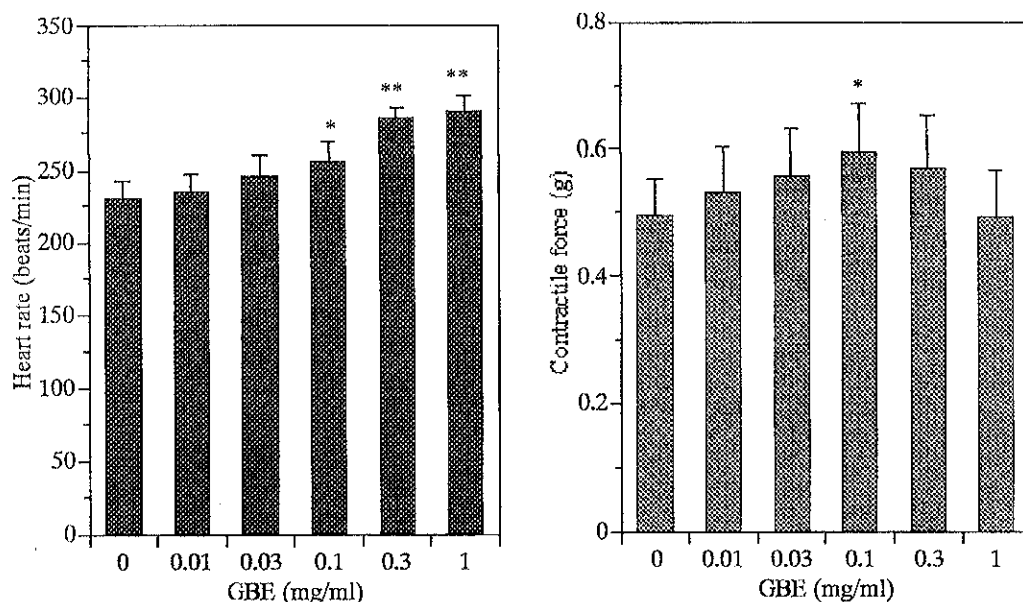


図2 ラット摘出心房の心拍数（左）と収縮力（右）に対するGBEの影響
* $p < 0.05$ vs. 0, ** $p < 0.01$ vs. 0 (n=7)

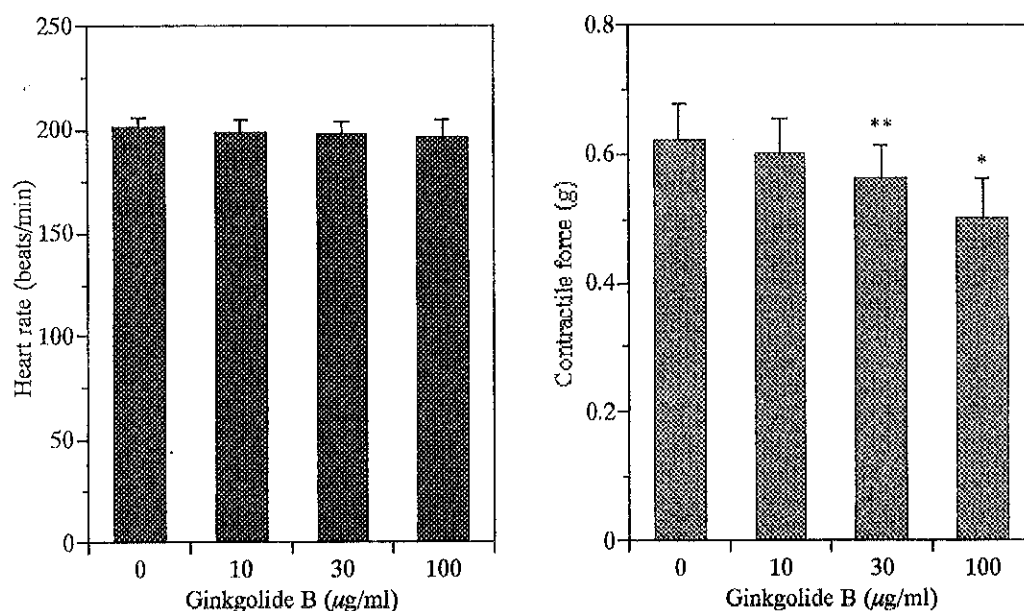


図3 ラット摘出心房の心拍数（左）と収縮力（右）に対する Ginkgolide B の影響

* $p < 0.05$ vs. 0, ** $p < 0.01$ vs. 0 (n=10)

図3はラット心房標本の心拍数とその収縮力に対するGinkgolide Bの影響を示したものである。Ginkgolide Bは心房の心拍数には影響しなかったが、30 $\mu\text{g/ml}$ の濃度から有意な陰性変力作用（心収縮力の減少）を示した。

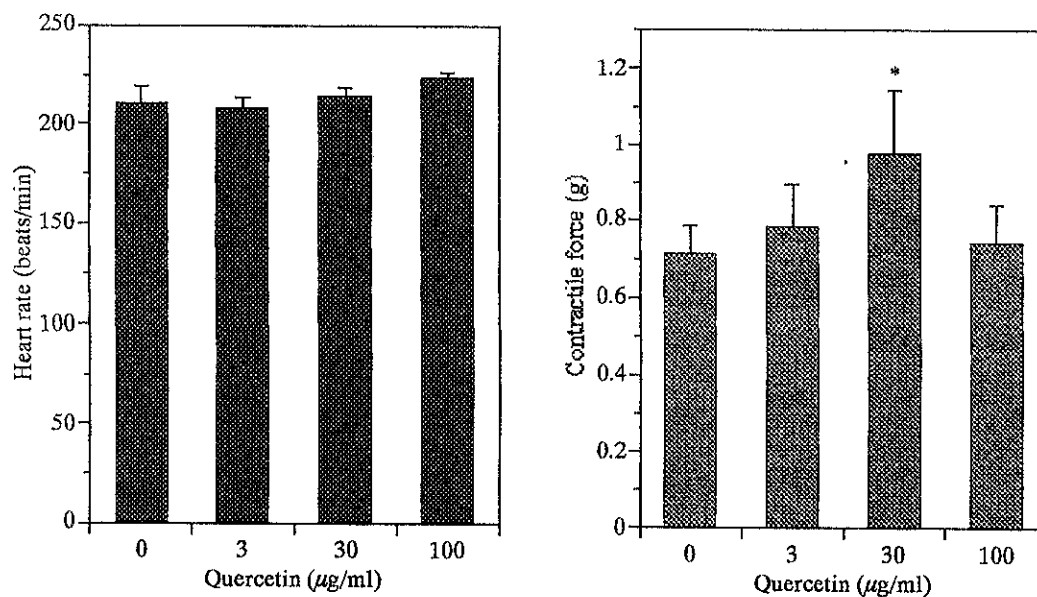


図4 ラット摘出心房の心拍数（左）と収縮力（右）に対する Quercetin の影響

* $p < 0.05$ vs. 0 (n=6)

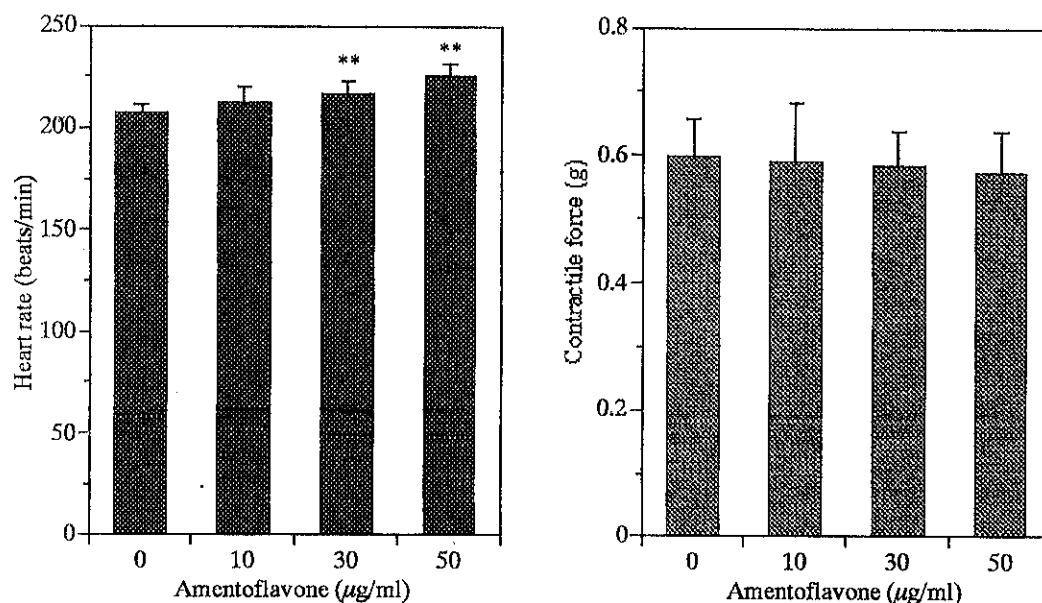


図5 ラット摘出心房の心拍数（左）と収縮力（右）に対するAmentoflavoneの影響

** $p < 0.01$ vs. 0 (n=6)

図4はラット心房標本の心拍数と収縮力に対するQuercetinの影響を示したものである。Quercetinは心拍数には影響しなかったが、30 μ g/mlの濃度において有意な陽性変力作用を示した。

図5は同様にラット心房標本の心拍数と収縮力に対するAmentoflavoneの影響を示したものである。Amentoflavoneは30 μ g/mlの濃度から有意な陽性変時作用を示したが、収縮力には影響しなかった。

2) 胸部大動脈に対する影響

ラット胸部大動脈リング状標本の静止張力に対し、GBE、Ginkgolide B、そしてQuercetinは有意な影響を示さなかった。図6は 10^{-7} Mのノルアドレナリンで収縮させた胸部大動脈に対する影響を示したものであるが、GBEは著明な弛緩作用を示し、その大きさはパパベリンによる最大弛緩作用の90%に達していた。しかし、弛緩の発現速度は緩慢で、最大弛緩に達するまで10分程度を要した。一方、Quercetinは強力な弛緩作用を示し、作用させてから3分で90%近い弛緩反応を起こし、パパベリンにほぼ匹敵する最大弛緩作用を示した。一方、Ginkgolide Bは軽度な弛緩作用を示しただけであった。

図7はラット摘出胸部大動脈におけるQuercetinの弛緩反応に対するN^o-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)の影響を示したものである。ノルアドレナリン(10^{-7} M)によりあらかじめ収縮させた大動脈リング状標本において、Quercetinは濃度に応じた弛緩反応を示し、この反応は一酸化窒素合成酵素阻害薬のL-NAME(10^{-4} M)により消失した。

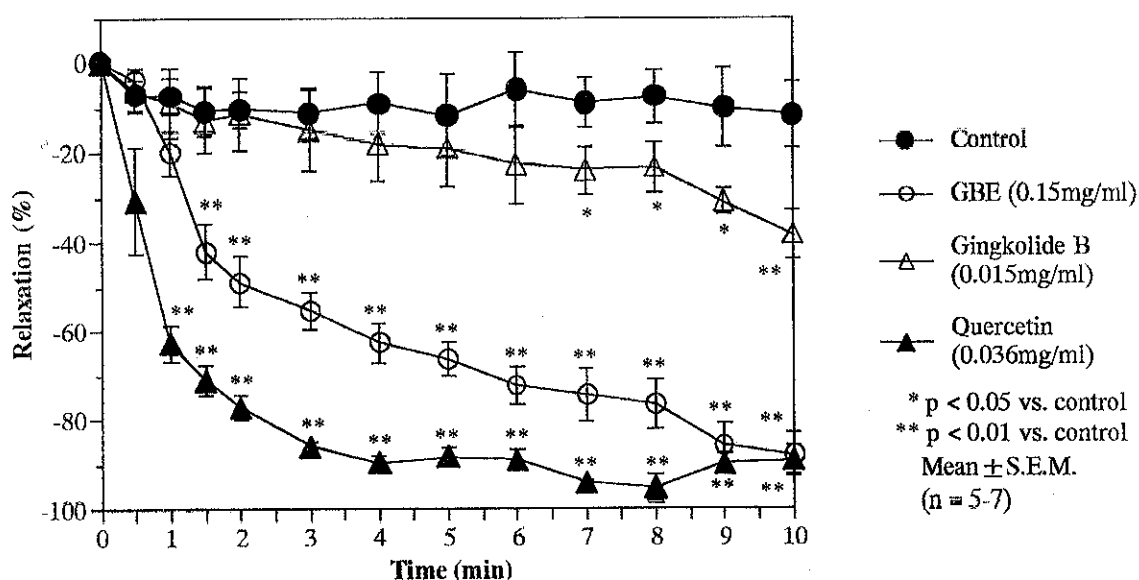


図6 ラット摘出胸部大動脈における GBE、Ginkgolide B、Quercetin の影響
ノルアドレナリン (10^{-7} M) によりあらかじめ収縮させた大動脈リング状標本において、GBE、Ginkgolide B、Quercetinは有意な弛緩反応を示した。

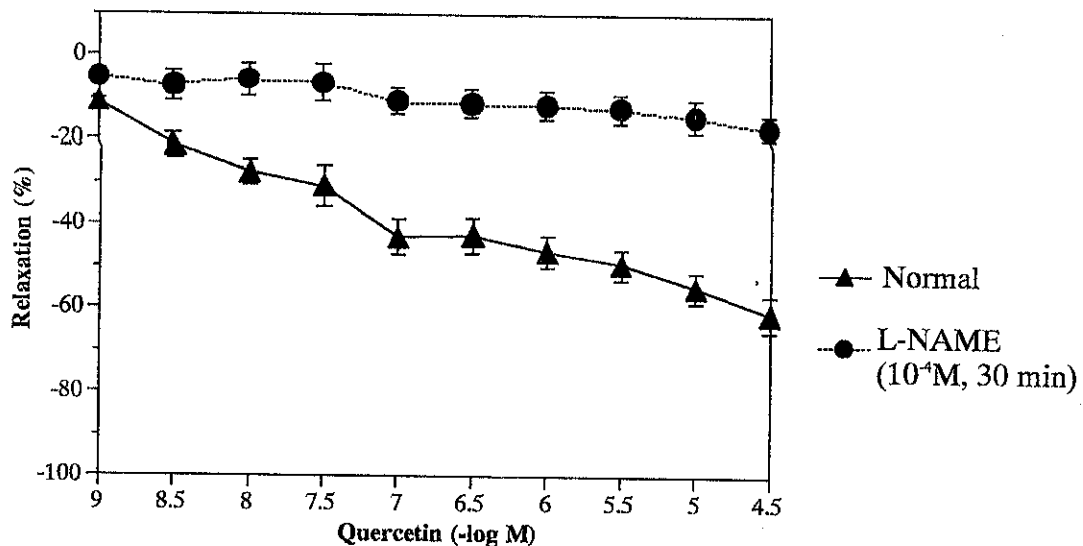


図7 ラット摘出胸部大動脈におけるQuercetinの弛緩反応に対するL-NAMEの影響

ノルアドレナリン (10^{-7} M) によりあらかじめ収縮させた大動脈リング状標本において、Quercetinは濃度に応じた弛緩反応を示し、この反応はL-NAMEにより消失した。

* $p < 0.05$ vs. Normal, ** $p < 0.01$ vs. Normal (n=6-8)

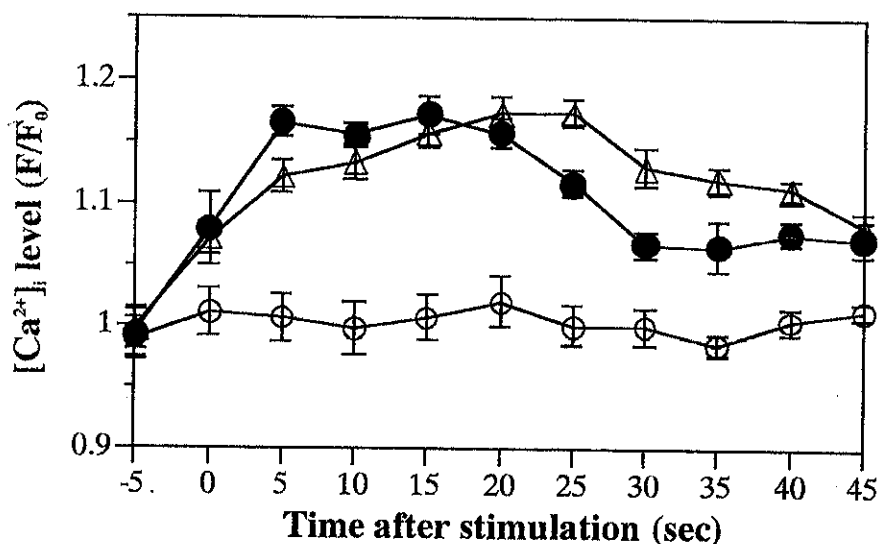


図8 ラット胸部大動脈培養内皮細胞における Quercetin の作用とこれに対する外液カルシウム除去およびThapsigarginの影響

● : Control, ○ : Ca²⁺ free, △ : Thapsigargin

3) 胸部大動脈培養内皮細胞に対する影響

図8は胸部大動脈培養内皮細胞の細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) レベルに対するQuercetinの作用とこれに対する外液カルシウム除去およびThapsigarginの影響を示したものである。Quercetinは内皮の $[Ca^{2+}]_i$ レベルを著明に上昇させた。その上昇は一過性であり、Quercetinの作用30秒後には、ほぼ作用前のレベルにまで低下した。このQuercetinによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はThapsigarginによっては影響されなかったが、外液カルシウム除去により完全に消失した。

図9は胸部大動脈培養内皮細胞におけるQuercetinの作用に対する外液カルシウムとThapsigarginの影響を示したものである。また、 P_2 -受容体を介してカルシウム動員機構に影響するATPの作用についても確認の為に比較検討した。QuercetinとATPは内皮の細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) レベルを著しく上昇させた。Quercetinによる $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇はThapsigarginによっては影響されなかったが、外液カルシウム除去により消失した。一方、ATPによる $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇は外液カルシウム除去によっては影響されなかったが、Thapsigarginにより消失した。即ち、QuercetinとATPによる内皮の細胞内カルシウムイオンレベル上昇作用は、異なるSourceのカルシウムに基づく事が示唆された。

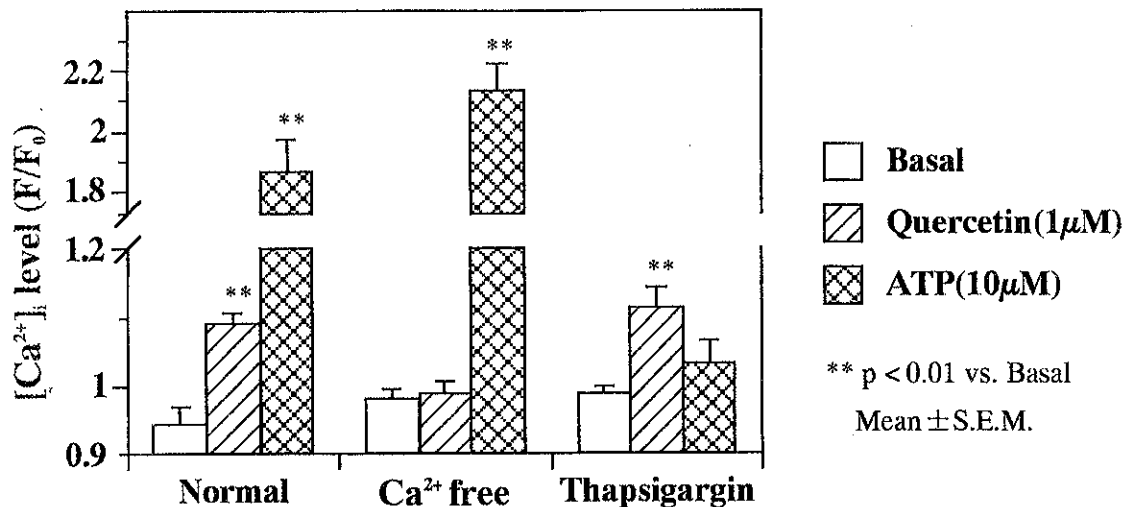


図9 ラット胸部大動脈培養内皮細胞におけるQuercetinとATPの作用の比較

QuercetinとATPは内皮の細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) レベルを著しく上昇させた。Quercetinによる $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇はThapsigarginによっては影響されなかったが、外液カルシウム除去により消失した。一方、ATPによる $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇は外液カルシウム除去によっては影響されなかったが、Thapsigarginにより消失した。

* $p < 0.05$ vs. Basal, ** $p < 0.01$ vs. Basal

2. Wistarラットへのイチヨウ葉エキス長期経口投与の影響

1) 心房に対する影響

図10はGBE長期経口投与したラットの摘出心房における心拍数と収縮力を比較したものである。0.5%GBE添加食で飼育したラット心房の心拍数は普通食のそれと全く同じであった。一方、収縮力はGBE投与により抑制される傾向を示したが、有意な変化ではなかった。

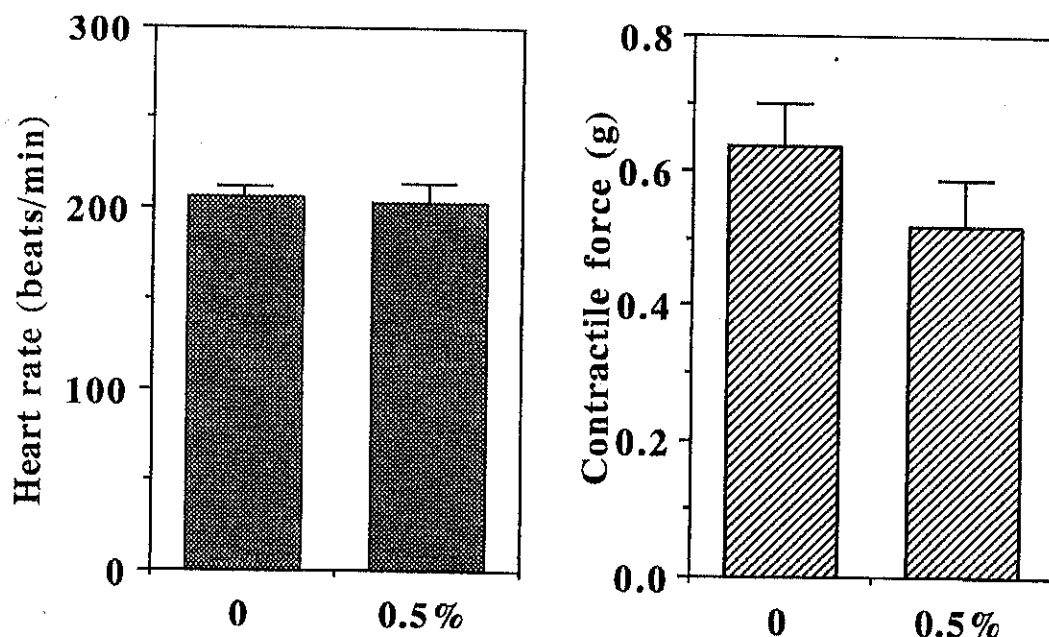


図10 ラット摘出心房の心拍数(左)と収縮力(右)に対するGBE 30日間経口投与の影響 横軸の数値は飼料中のGBEの量(%)を示す。

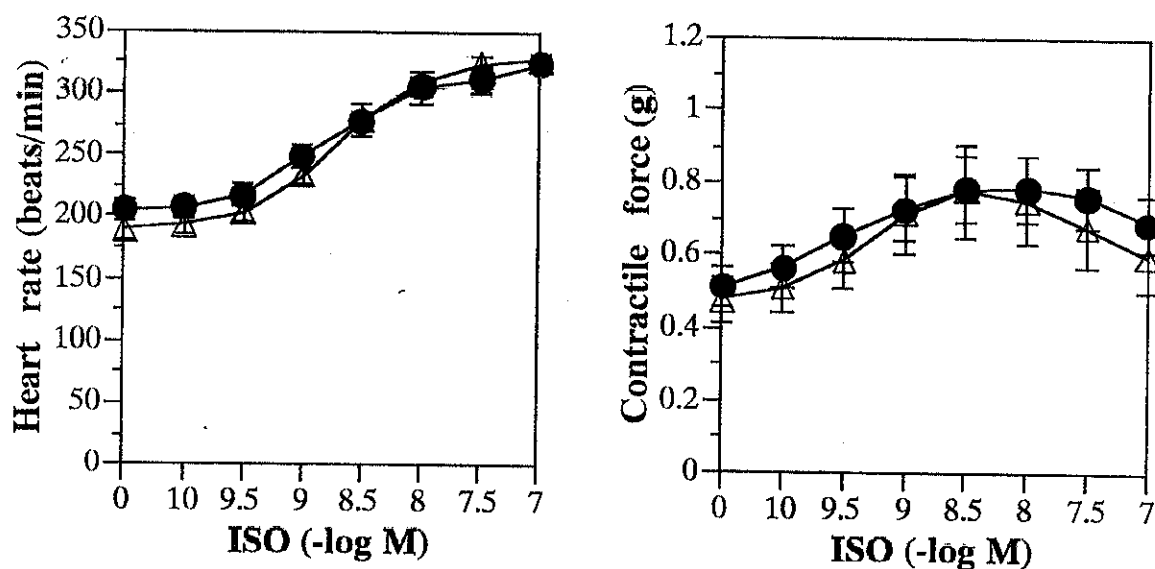


図11 ラット心房標本におけるイソプロテレノール(ISO)の陽性変時変力作用に対するGBE長期経口投与の影響

● : Control, △ : 0.5%GBE (n=6)、左図 : 心拍数、右図 : 収縮力

図11はラット摘出心房におけるイソプロテレノールの陽性変時変力作用（心拍数と収縮力の増加）に対するGBE長期経口投与の影響を示したものである。0.5% GBE添加食で飼育したラットの心房におけるイソプロテレノールの作用はコントロールのそれと有意な差はなかった。

図12はラット摘出心房におけるアセチルコリンの陰性変時変力作用（心拍数と収縮力の減少）に対するGBE長期経口投与の影響を示したものである。0.5% GBE添加食で飼育したラットの心房におけるアセチルコリンの作用はコントロールのそれと有意な差はなかった。

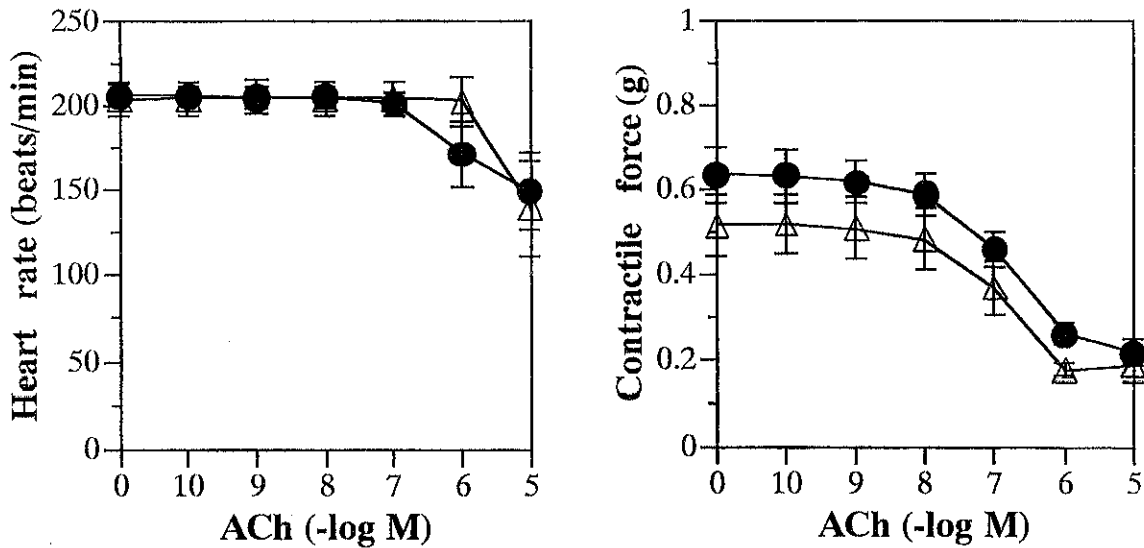


図12 ラット心房標本におけるアセチルコリン(ACh)の陰性変時変力作用に対するGBE長期経口投与の影響

● : Control, △ : 0.5%GBE (n=6)、左図 : 心拍数、右図 : 収縮力

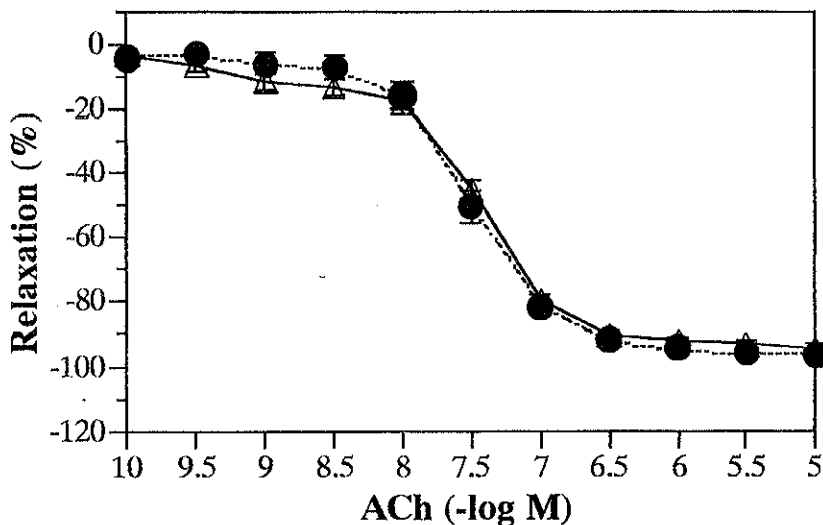


図13 ラット胸部大動脈標本におけるアセチルコリン(ACh)の弛緩反応に対するGBE長期経口投与の影響

● : Control, △ : 0.5%GBE (n=6)

2) 胸部大動脈に対する影響

ラット摘出胸部大動脈に対するGBE長期経口投与の影響について検討した。図13は 10^{-7} Mのノルアドレナリンで収縮させた胸部大動脈におけるアセチルコリンの弛緩作用を示したものであるが、0.5%GBE添加食で30日間飼育されたラット大動脈の弛緩作用はコントロールのそれと有意な差はなかった。

3) その他の影響

GBEの長期経口投与によりラットの体重に変化は認められなかった。しかしながら、肝重量は有意に増加した(表2)。

表2 体重および肝重量に対するGBE長期投与の影響

	Body Weight (g)	Liver Weight (g)
Control	260.5±2.5	9.5±0.2
0.5% GBE	253.2±5.2	13.4±0.4*

*p<0.05 vs. Control, (mean and SE)

3. 高血圧自然発症ラットに対するイチヨウ葉エキス長期経口投与の影響

1) 心房に対する影響

0.05%および0.5%のGBE添加食で飼育したラット心房の心拍数は普通食のそれに比べ軽度に減少していた。収縮力には有意な差は認められなかった(図14)。

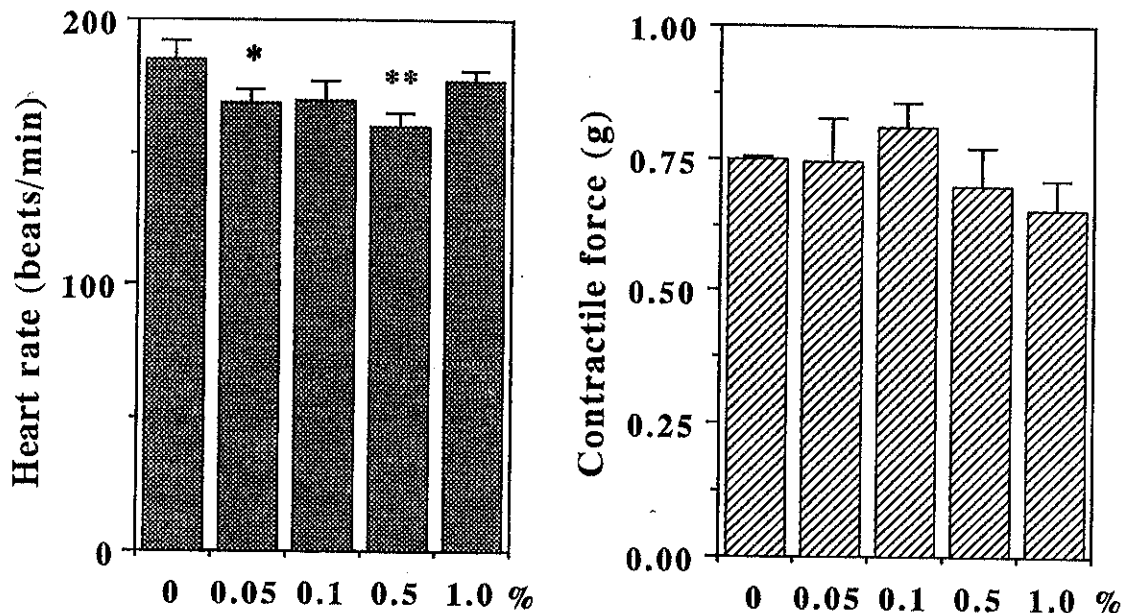


図14 SHR摘出心房の心拍数(左)と収縮力(右)に対するGBE長期経口投与の影響
横軸の数値は飼料中のイチヨウ葉エキスの量(%)を示す。

図15はSHR摘出心房におけるイソプロテレノールの陽性変時変力作用に対するGBE長期経口投与の影響を示したものである。GBE添加食で飼育したラットの心房におけるイソプロテレノールの作用はコントロールと有為な差はなかった。

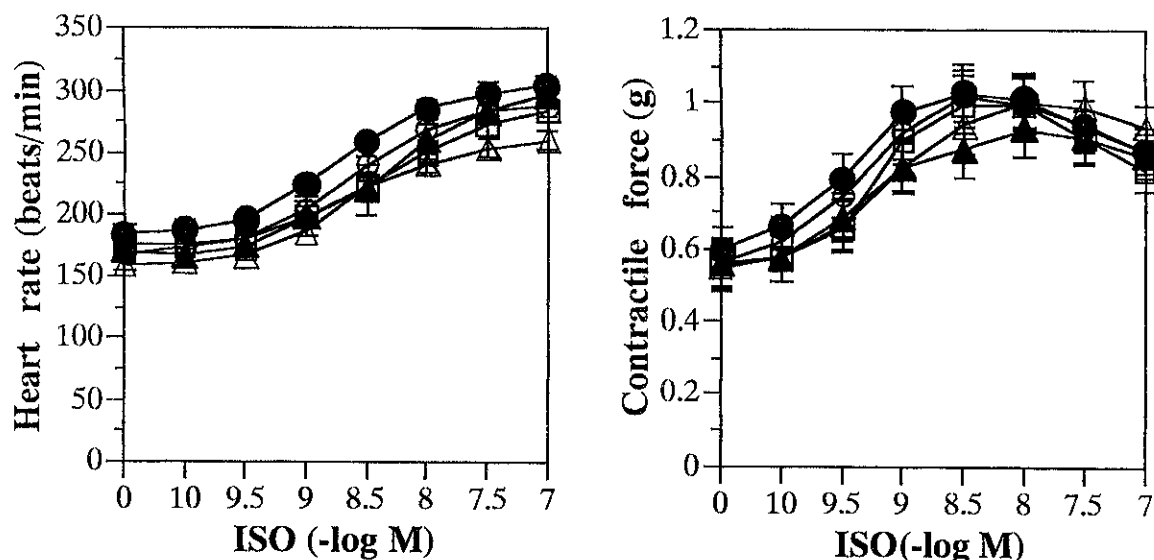


図15 SHR心房標本におけるイソプロテレノール(ISO)の陽性変時変力作用に対するGBE長期経口投与の影響

● : Control, ○ : 0.05%GBE, ▲ : 0.1% GBE, △ : 0.5%GBE, □ : 1.0%GBE (n=6)、 左図 : 心拍数、右図 : 収縮力

図16はSHR摘出心房におけるアセチルコリンの陰性変時変力作用に対するGBE長期経口投与の影響を示したものである。GBE添加食で飼育したラットの心房におけるアセチルコリンの作用はコントロールと著しい差はなかった。

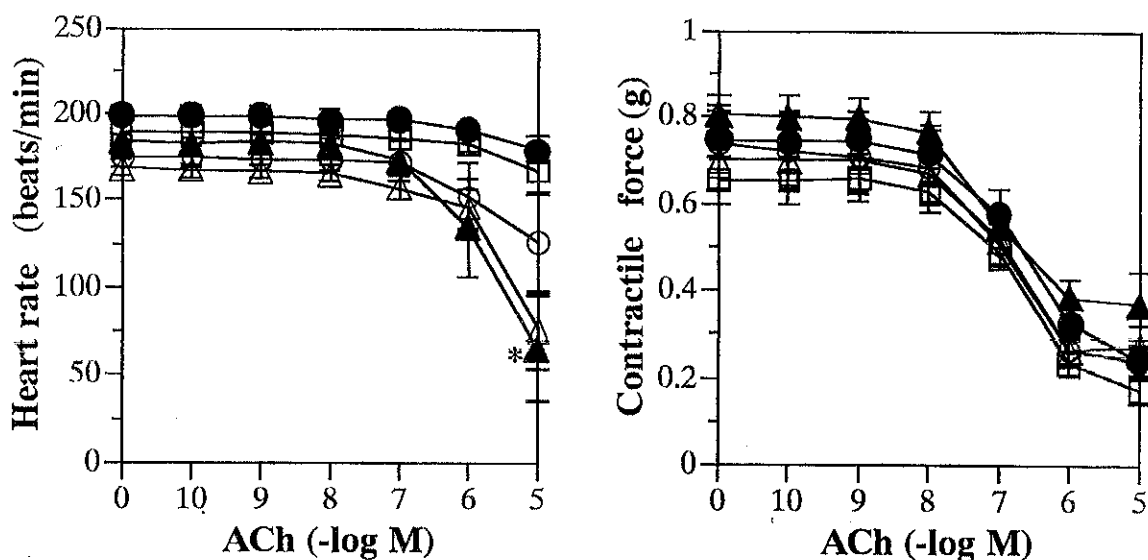


図16 SHR心房標本におけるアセチルコリン(ACh)の陰性変時変力作用に対するGBE長期経口投与の影響

● : Control, ○ : 0.05%GBE, ▲ : 0.1% GBE, △ : 0.5%GBE, □ : 1.0%GBE (n=6) *p<0.05 0.1%GBE vs. Control, 0.5% vs. Control
左図 : 心拍数、右図 : 収縮力

2) 胸部大動脈に対する影響

SHR摘出胸部大動脈に対するGBE長期経口投与の影響について検討した。図17は 10^{-7} Mのノルアドレナリンで収縮させた胸部大動脈におけるアセチルコリンの弛緩作用を示したものであるが、0.05~1.0%GBE添加食で飼育したSHR大動脈の弛緩作用はコントロールのそれに比べ増強されており、その程度はGBEの摂取量に依存的であった。

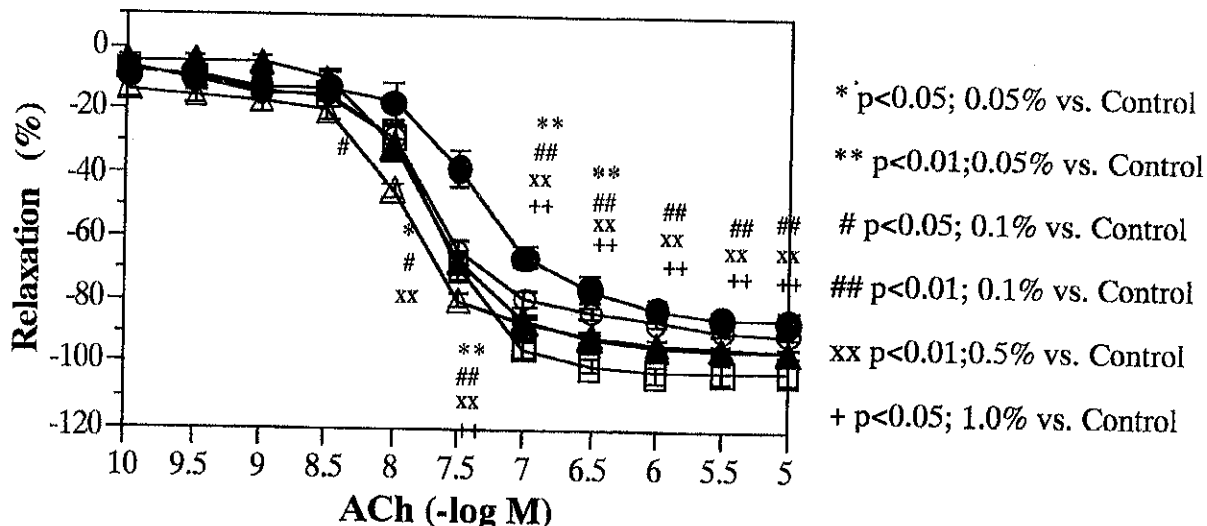


図17 SHR胸部大動脈標本におけるアセチルコリン(ACh)の弛緩作用に対するGBE長期経口投与の影響

● : Control, ○ : 0.05%GBE, ▲ : 0.1% GBE, △ : 0.5%GBE, □ : 1.0%GBE (n=6)

3) その他の影響

GBEの長期経口投与によりラットの体重に変化は認められなかった。しかしながら、肝重量は飼料中のGBEの濃度に応じて有意に増加した(表3)。一方、表4に示されるように、腎重量には有意な変化は認められなかった。心臓重量については低下作用が観察されたが、SHRにおいてGBEが降圧作用を示すことから²¹⁾、心臓の負担が軽減された結果に起因することも推察される。なお、血漿トランスアミナーゼ活性には有意な影響は認められなかった(表4)。

表3 体重および肝重量に対するGBE長期経口投与の影響

	Body Weight (g)	Liver Weight (g)
Control	281.3 ± 3.0	11.5 ± 0.2
0.05%GBE	285.4 ± 3.9	12.9 ± 0.2
0.1%GBE	287.0 ± 5.4	14.1 ± 0.4*
0.5% GBE	292.9 ± 2.1	16.4 ± 0.3*
1.0% GBE	275.9 ± 4.8	15.9 ± 0.3*

*p<0.05 vs. Control, (mean and SE)

表4 臓器重量およびトランスアミナーゼに対するGBE長期経口投与の影響

	Control	0.5 %	2.0%
Weight			
Heart (g)	1.17±0.04	1.09±0.02*	1.03±0.03*
Kidney (g)	1.11±0.01	1.08±0.02	1.05±0.04
Plasma Transaminase			
GOT(Karmen Unit)	79.3±3.2	75.3±3.3	70.2±3.7
GPT(Karmen Unit)	30.1±3.0	28.3±2.2	25.3±3.3

*p<0.05 vs. Control, (mean and SE)

表5は肝臓の脂質濃度を示したものであるが、GBEにより総脂質が増加し、この増加は主にリン脂質の増加に関係していた。トリグリセリドの量はGBEにより低下した。

表5 肝臓の脂質に対するGBE長期経口投与の影響

(mg/g liver)	Control	0.5 %	2.0%
Total lipids	42.0±2.0	52.4±1.8*	49.8±2.3*
Cholesterol	4.2±0.2	4.7±0.1	4.6±0.1
Phospholipids	31.0±0.9	42.4±1.3*	39.8±1.6*
Triglyceride	10.7±0.6	9.7±0.3	7.8±0.1*

*p<0.05 vs. Control, (mean and SE)

表6 肝臓のチトクロームP-450含量とグルタチオンS-トランスフェラーゼ活性に対するGBE長期経口投与の影響

	Control	0.5 %	2.0%
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.33±0.02	1.70±0.12*	1.76±0.08*
Glutathione S-Transferase (nmol/mg protein/min)	937±33.7	1775±74.3*	2161±63.1*

*p<0.05 vs. Control, (mean and SE)

表6は肝臓のチトクロームP-450含量とグルタチオンS-トランスフェラーゼ活性に及ぼすGBE長期経口投与の影響を示したものである。P-450含量はGBE投与群で約5倍に上昇していた。ただし、0.5%投与群と2.0%投与群の間に有意な差は認められなかった。一方、グルタチオンS-トランスフェラーゼ活性もGBEにより有意に増加し、その程度はGBEの投与量に依存的であった。

【考 察】

1. 循環器系の摘出臓器に対するイチヨウ葉エキスの影響

本研究では、循環器系に対するイチヨウ葉エキスの影響を、高感度で検出するために、摘出循環器系臓器を用いて詳細な検討を加えた。即ち、摘出心房と摘出胸部大動脈に対し、イチヨウ葉エキスとその構成成分であるGinkgolide B、QuercetinそしてAmentoflavoneを直接作用させて、その影響を観察した。

その結果、イチヨウ葉エキスは心房に対し陽性変時変力作用を示すことが明らかになった。一方、イチヨウ葉エキスの成分であるGinkgolide Bは陰性変力作用を有し、Quercetinは陽性変力作用を、また、Amentoflavoneは陽性変時作用を有することが明らかとなった。Ginkgolide Bが血小板活性化因子(PAF)に対しアンタゴニストとして作用することは良く知られており、心臓に対して陰性変力作用を示すことが報告されている^{22,23)}。本実験結果で観察されたGinkgolide Bの陰性変力作用にはこの作用が関係していることが推察される。一方、Amentoflavoneは、ラット脂肪組織のcAMPホスホジエステラーゼを阻害することが報告²⁴⁾されているので、心臓の刺激伝導系細胞のホスホジエステラーゼを阻害することにより、細胞内cAMPレベルの上昇を介して陽性変時効果を惹起することが、一つの可能性として推察できる。今後、この点を更に検討してその作用機序を解明する必要がある。

Quercetinの陽性変力作用の機序を示唆する報告は見あたらないが、培養内皮細胞においてQuercetinがカルシウムチャネル流入を促進するような作用を示したことから、心筋細胞のカルシウムチャネルに対しその開口を促進するような作用があるのかも知れない。いずれにしても、イチヨウ葉エキス中の各成分が、複雑に作用し合って、その陽性変時変力作用が引き起こされたものと考えられる。イチヨウ葉エキスの陽性作用は収縮力よりも心拍数のほうが顕著であった。前年度の実験結果では、イチヨウ葉エキスの短期間投与により陽性変時効果が認められたが、この効果には本実験結果で得られた作用も関与していることが推察される。

イチヨウ葉エキスが血管平滑筋を弛緩させること、その作用がプロスタサイクリンや一酸化窒素のような内皮細胞由来血管弛緩因子の遊離にもとづくことが報告されている²⁵⁾。しかしながら、その作用の詳細については不明な点が多い。本実験結果でも、イチヨウ葉エキスはラット胸部大動脈において著明な弛緩作用を示した。さらにイチヨウ葉エキスの成分のひとつであるQuercetinは強力な弛緩作用を引き起こした。この弛緩反応は一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害薬であるN^G-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)により完全に消失した。従って、Quercetinは血管内皮細胞のNOSを刺激して一酸化窒素を産生放出させ、この一酸化窒素が血管平滑筋を弛緩させたものと考えられる(図18)。そこで、次にQuercetinがどのようにしてNOSを刺激するのかを明らかにするために培養内皮細胞を用いて検討を加えた。細胞内カルシウムイオンの可視化蛍光プローブであるカルシウムグリーンを取り込ませた内皮細胞において、Quercetinはその蛍光強度を著明に増加させた。このことは、細胞内のカルシウムイオンレベルが上昇したことを示している。NOSはカルシウムによって活性化されること²⁶⁾はよく知られていることから、

Quercetinは細胞内カルシウムイオンを上昇させることによってNOSを活性化させているものと考えられる。Quercetinによる細胞内カルシウムイオンレベルの上昇は細胞外液のカルシウムを除去することにより消失したので、Quercetinは細胞外からのカルシウムイオンの流入を促進することによって、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるものと思われる。また、細胞内カルシウム貯蔵部位（カルシウムストア）中のカルシウムを枯渇させるThapsigarginがQuercetinの作用に全く影響しなかったため、ストア由来のカルシウムイオンは関与していないことが示唆された。この実験では、確認のためにATPの作用も比較検討した。ATPは P_2 受容体を介して血管内皮細胞のカルシウムストアを刺激し、細胞内カルシウムイオンレベルを上昇させる²⁷⁾。ATPによる細胞内カルシウムイオンレベルの上昇は、Thapsigarginでほぼ完全に抑制されたが、細胞外カルシウム除去の影響は受けなかった。このことから、前述したようにATPにより動員されるカルシウムイオンは主にストア由来であり、細胞外からの流入カルシウムイオンはほとんど関与していないことが確認できた。

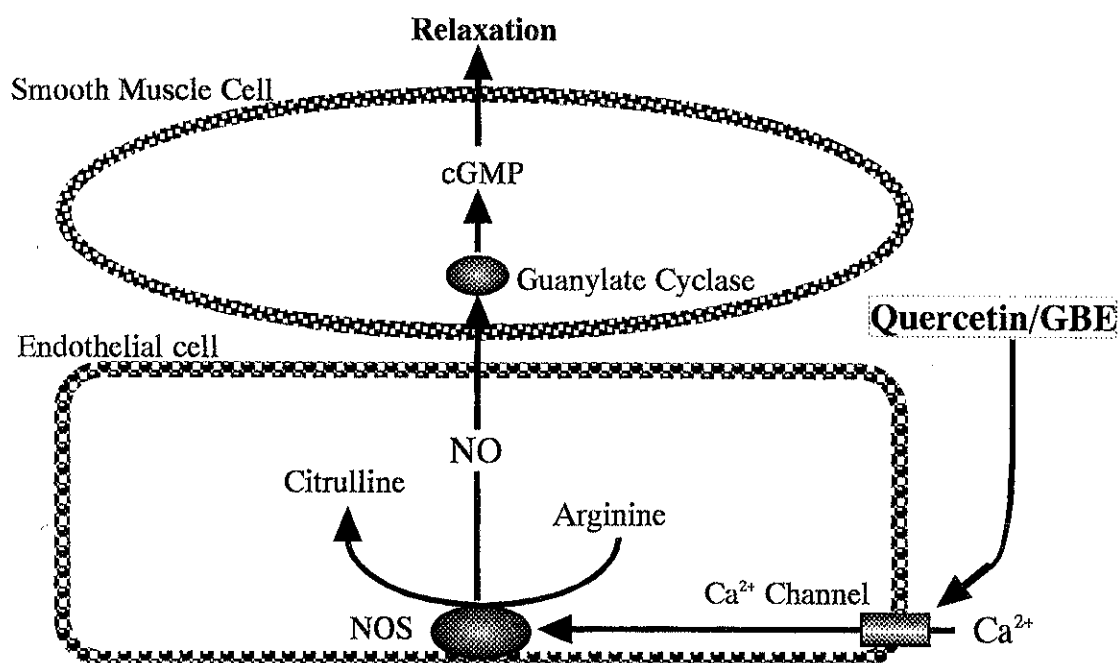


図18 Quercetinによる大動脈弛緩反応の作用機序に関する模式図
 NOS: Nitric Oxide Synthase, cGMP: cyclic GMP

以上の結果から、図18のようにQuercetinは血管内皮細胞のカルシウムチャネルを開口させ、流入カルシウムイオンを介して一酸化窒素を産生放出させて、血管を弛緩させることが示唆された。Quercetinはイチヨウ葉エキスより少ない量で、より強力な弛緩反応を起こしたことから、イチヨウ葉エキスの血管拡張作用にとって重要な成分であると思われる。

本実験によりイチヨウ葉エキスの成分中には血管内皮細胞のカルシウム動員機構に促進的な影響を示す物質のあることが明らかにされた。今後は、その機序をさら