

品ではなく、両事例ともに多数の成分が共存しており、カバの関与を特定することはできない。そのほかの例としては、過剰摂取の症状が多い(30例)。

“The Complete German Commission E monographs (CGCE)¹⁷⁾”は、通称 Commission E といわれる“a Special Expert Committee of the German Federal Institute for Drugs and Medical Devices”が作成したハーブのモノグラフ集で、治療用植物としてのハーブについてのバイブルともいえる。このCGCEに収録されているカバのモノグラフ(1990年1月1日付け)によれば、カバには副作用は特にないとされている。なお、長期大量摂取により、一時的に皮膚、毛髪、爪が黄色に変色する。このような場合は摂取を中止すること。まれに、アレルギー性の皮膚反応を生じる。また、瞳孔散大や動眼機能の変調などが見られることがあるなどの記載がある。ただし、CGCEのカバのモノグラフが作成されたのは10年以上前であり、カバの有効性・安全性に関する情報源としては多少古くなっている面を否定はできない。

“PDR for Herbal Medicines¹⁸⁾”では、一般的な有害作用として適正な用量を適切な方法で摂取している限りは、健康への危害は生じないとされている。ただし、まれにアレルギー反応や消化器症状の発生することがある。摂取開始近くに朝多少疲労を感じることもある。ハーブを摂取している時は、運転中の動作や判断が鈍る恐れがある。さらに、中枢神経系への有害作用として、カバ摂取により、ジスキネジアや、四肢、体幹、頸、顔面にアテトーゼ様の症状を見た例がある等の記載がなされている。

一方、カバ飲料の長期大量服用により魚鱗癬様の可逆的な皮膚症状を生ずることはよく知られている¹⁹⁾。かつて南太平洋の島々の伝統社会では、カバ飲料を常用できるのは特権者に限られており、この皮膚症状は一種のステータスシンボルとされた。このほかにも、カバの服用による全身性接触皮膚炎等の健康被害報告が見られる^{20, 21)}。

これらとは別に、カバ抽出物が錐体外路系への副作用を引き起こす可能性があるという症例報告²²⁾がなされている。それらの4症例のうちの1例について紹介する。28才の女性が不安と神経過敏に対して処方されたカバ抽出物(Laitan:抽出物100mg相当)を服用したところ、口や舌のもつれ等の口周部のジスキネジア、右側への頸部の回転運動、痛みを伴う軀体部の捻転運動を生じた。45分後、2.5mgのbiperiden(中枢性抗コリン作用薬)の静注を受けて、異緊張反応は速やかに解消した。という報告である。さらに最近、本態性振戦の家族例をもつ46歳の女性が不安症状の服用によって重度かつ持続性のパーキンソニズムを発症した例が報告されている²³⁾。症状は抗コリン薬の投与により改善した。カバは遺伝的な感受性が高い人にとっては重症のパーキンソニズムを引き起こすおそれがあることが指摘されている²³⁾。

ラットにおける実験ではカバはカタレプシー、すなわち錐体外路症状を抑制したが、ヒトではこのようにカバの摂取により錐体外路症状が誘発される可能性が指摘されている。この二つの相反現象の理由は現時点では不明である。

(4)カバ抽出物と肝障害

平成13年度厚生科学研究の報告書で、カバ抽出物に引き起こされた可能性のある肝障害の症例報告があること紹介した。すなわち、軽度の不安症状の改善のために二か月間ほぼ通常量のカバの摂取を続け、黄疸や疲労感を生じて医師を訪れた50歳の男性のケースである²⁴⁾。肝機能検査の成績は強い異常値を示し、超音波診断で肝腫大が認められ、最終的に肝臓移植によって一命を救われた症例である。

さらに、黄疸、疲労、体重減少等のために入院した 60 歳の女性の症例²⁵⁾では、進行性の肝不全、および腎不全と脳症を併発し、集中治療室に移された。肝機能検査は異常値を示したが、腹部 CT や超音波診断では異常は認められなかった。ただし、肝組織の生検では広範な肝細胞の壊死および肝内性のうっ滞性黄疸が認められた。この症例も最終的に肝臓移植を受けた。肝障害の原因として種々の要因を除外した結果、最後にカバが残されたとのことである。この症例はカバにより生じたと推定される肝障害としてヨーロッパの専門家グループに報告された例の 18 番目となった。

これら2例に加え、ドイツやスイスを中心にカバにより引き起こされた可能性のある肝障害の例数が 24 にもなり、うち1名は死亡し、3 名は肝臓移植を受けるという事態になったという事で、ドイツの BfArM (German Federal Institute for Drugs and Medical Devices) は昨年 11 月にカバの販売を禁止する動きを見せた。イギリスやフランスではすでにカバ製品の販売が禁止されている。ハーブの専門家の中には、各症例報告においてカバと肝障害の関連性は必ずしも明確ではないとする意見も根強い (<http://www.emersonecologics.com/EmersonUpdate/EmersonUpdate-Vol0-Kava%20Report-Misc2002.pdf>) が、米国の FDA は 2002 年 3 月 25 日付で“KAVA-CONTAINING DIETARY SUPPLEMENTS MAY BE ASSOCIATED WITH SEVERE LIVER INJURY”と題する文書をインターネット (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/addskava.html>) に掲載して消費者への注意喚起を行うとともに、医師や保健活動の専門家に肝障害やその他の障害にカバが関与している可能性がある症例が見られた場合には直ちに報告するよう呼びかけている。

本研究の実験の部では、KV(640)群において、Kava Pro の8日間の投与で対照群に比べ肝臓重量がほぼ 30%も増大することが明らかになっている。これはおそらく肝細胞の適応性変化²⁶⁾によるものと考えられる。フェノバルビタールや 3-メチルコラントレンは適応性変化をもたらす物質の代表格であり、CYP を誘導して滑面小胞体を増加させ、肝細胞の腫脹をもたらす。Kava Pro 投与による肝臓重量の増大の機序には、CYP の分子種のいくつかは Kava Pro によって誘導されることと関連すると考えられる。

(5) カバ抽出物やセイヨウトギリソウ抽出物による Cytochrome P450 分子種の遺伝子発現について

カバは薬物との相互作用を介して健康被害をもたらす可能性もある。例えば、中枢神経系に働くアルコール、抗うつ薬、バルビツール酸誘導体等の作用の増強されることが指摘されている^{27, 28)}。パーキンソン病患者において levodopa の効力がカバによって低下したことを示す報告もあるという²⁹⁾。

一方、セイヨウトギリソウが医薬品と相互作用を示し、医薬品の効果を減少させたり、逆に増強させることによる危険性が、近年広く認められるようになった^{12, 30-32)}。医薬品の効果を減少させる機序としては、セイヨウトギリソウが薬物代謝の第一相にあずかる CYP の発現を誘導したり、腸管から薬物を排出する作用をもつ P-糖タンパク質を誘導するなどの可能性が推定されている^{12, 33)}。しかし、CYP の誘導現象の最上流にある遺伝子発現に対するセイヨウトギリソウの作用を *in vivo* で検証した報告は現時点では見受けられない。

本研究では、ヒトの常用量の 100 倍という大量投与ではあるが、Jarsin300 が CYP3A1 の遺伝子発現を強力に亢進させることが明瞭であった。しかし、CYP の他の分子種の遺伝子

発現への Jarsin300 の作用はほとんどみとめられなかった。この点は、CYP の分子種のいくつかに対して遺伝子発現の亢進作用を示した Kava Pro とは全く異なっていた。なお、ラットの CYP3A1 はヒトの CYP3A4 と類似の基質特異性をもつと考えられている。ヒトの CYP3A4 は医薬品の半数以上の代謝に関わるとされている³⁴⁾。ヒトでは、indinavir 等の HIV プロテアーゼ阻害薬や cyclosporin のような CYP3A4 により代謝される薬物の血中濃度が、900 mg/day という通常量のセイヨウトギリソウ抽出物摂取により低下することから、同抽出物は CYP3A4 の酵素誘導を引き起こすと推定されている^{12, 30-32)}。また、尿中の 6 β -hydroxycortisol/cortisol 比は CYP3A4 の酵素誘導の指標とされているが、SJWext 摂取により同比が増加するというヒトにおける試験報告もなされている³⁵⁾。一方、Schwabe 社のグループはラットに 300mg/kg/day のセイヨウトギリソウ抽出物を 10 日間投与した場合に、肝臓の cytochrome P450 の含有量をはじめ、CYP 分子種に特異的な一連の基質を用いて測定した酵素活性にほとんど影響は見られなかったと報告している³⁶⁾。また、マウスに 435mg/kg/day のセイヨウトギリソウ抽出物を 4 日間投与した場合に、肝臓の cytochrome P450 含有量、および CYP1A2, CYP2E1, CYP3A の活性に変化はなかったとの報告もごく最近なされている³⁷⁾。これらの報告と筆者の結果との違いは、セイヨウトギリソウ抽出物の品質や投与量の差によるものと考えられる。筆者の結果から言えることは、Jarsin300 を常用量の 100 倍で投与すれば、ラット肝臓において CYP3A1 の mRNA レベルの発現を亢進させるという事実である。また、Jarsin300 はその原因物質を含むということである。

ヒトの初代培養肝細胞の系では、SJWext とともに、hyperforin が mRNA レベルでの CYP3A4 の発現を強く促進することが示されている³⁸⁾。その際、hyperforin は pregnane X receptor に高親和性に結合することにより、CYP3A4 遺伝子の転写を促進すると考えられている。一方、本研究では Jarsin300 に含まれる量と等量の hyperforin を投与した場合の CYP3A1 の遺伝子発現は、Jarsin300 を投与した場合に比べて相当に低かった。したがって、現時点においては Jarsin300 が示す CYP3A1 の遺伝子発現の促進作用を hyperforin に帰結させることはできない。

theophylline は CYP1A1 により代謝されることから、セイヨウトギリソウ抽出物がこの分子種の酵素誘導を促進する可能性が考えられており、とくにセイヨウトギリソウ抽出物中の多環性芳香族炭化水素である hypericin および pseudohypericin がその原因物質と推定されている¹²⁾。しかしながら、その推定のもとになる実験的根拠はまだ十分とはいえない。本研究で示されたように、少なくともラットにおいては、SJW (1500) の 8 日間の連続投与により CYP3A1 の mRNA レベルでの発現が著しく亢進している場合においても、CYP1A1 の mRNA を検出することはできなかった。セイヨウトギリソウ抽出物がラット肝臓において CYP1A1 の酵素誘導を促進する可能性は小さいと考えられる。

hyperforin は抗うつ成分の有力候補と推定されている。その根拠の一つとして、hyperforin 含有量が 5% の規格抽出物 WS5572 および 0.5% の WS5573 (Schwabe 社; ドイツ) を用いた無作為化対照試験を挙げられる³⁹⁾。この研究では、6 週間の試験期間中に低下した HAMD (Hamilton Depression Scale) のスコアでみても、また HAMD のスコアが 25% 以上減少した患者の割合でみても、hyperforin 含有量と抗うつ作用の間に用量-相が認められている。仮に hyperforin がセイヨウトギリソウの抗うつ作用の本体であり、また本研究で示されたように hyperforin 自体の CYP3A1 の誘導作用は小さいものであるならば、

hyperforin の濃縮分画は抗うつ性の食品素材として有望であるといえる。

本研究ではカバ抽出物がヒトの常用量の 100 倍という投与量であるとはいえ、CYP 分子種の遺伝子発現を亢進させるという新たな知見が得られた。ことに、CYP3A1 の誘導のほか、KV(640)群では CYP1A1 の発現が明瞭に認められた点はカバの安全性を考える上で重要なポイントになる可能性がある。CYP1A1 はベンゾ[a]ピレンやジベンゾ[a, h]アントラセン等の代表的ながん原性多環式芳香族炭化水素を代謝的活性化する⁴⁰⁾。Kava Pro の投与により CYP1A2 の発現も亢進した。CYP1A2 はがん原性複素環式アミンやアフラトキシン B1 等を代謝活性化することが知られている⁴⁰⁾。

(6) ハーブを利用した新開発食品の安全性確保において考慮すべきこと

カバは南太平洋の島々で 3,000 年以上にわたって利用されており、十分に長い食(飲)経験をもち、その安全性は一見自明のように思われる。また、“The Complete German Commission E monographs(CGCE)¹⁷⁾”や“PDR for Herbal Medicines¹⁸⁾”といった権威のある書物にも、摂取目安量を守っていれば、健康上問題となるような特段の障害は認められない旨が記載されている。しかし、カバの摂取が関与すると推定される重度の肝障害がヨーロッパを中心に発生している。FDA が本腰を入れて取り組む姿勢を見せていることから、事態はかなり深刻と捉えたほうがよいのかもしれない。

このカバの事例のようにハーブを利用した製品については一体何が起こるか予測のつかない怖さがある。伝統社会や民間療法として利用されてきたハーブを保健機能をもつ新型の食品として開発使用とするとき、大抵は有効成分を抽出したり、濃縮したりという操作が加わる。これによって、まずかたたり、有効量を摂ろうとするとあまりにかさばってしまうものが、カプセルや錠剤の形で利用できることになる。そうしてできた製品は、素材としては食経験が豊かなものであったとしても、全くの別物として扱うべきであると考え。有効成分とともに有害成分が同時に抽出あるいは濃縮されてくる可能性は小さくないはずである。

我が国の保健機能食品制度の枠組みの中では、ハーブは規格・基準型の栄養機能食品には馴染みそうもなく、当面個別審査型の特定保健用食品として対応せざるを得ないと考えられる。ハーブを利用した食品の場合は、カバの事例を教訓として、その審査に当たっては安全面をことのほか重視すべきであると考え。例えば、今回の研究で明らかになったカバ投与による肝臓重量の増大のように、保健機能に関与する成分の安全性試験として、種差と個体差を加味して、ヒトの常用量の 100 倍ほどの用量を実験動物に投与した場合の影響を調べることを審査の要件とするなどの対応も必要とされるのではないだろうか。カプセル入りや錠剤型のハーブ製品を常用量の 100 倍摂取することは並みの人間には不可能なことであり、現実には決して起こり得ない事態である。しかし、100 倍量を摂取したら一体何事が生じるのかを把握しておくことは安全性確保の上で重要と考える。仮に常用量の 100 倍を摂取したら確実に肝臓が 30%腫大することがわかっているならば、肝障害のある人や、アルコールや医薬品との併用の問題などへ思いが馳せることにもなる。

また、ハーブの抽出あるいは濃縮物はある種の生体異物として捉える観点も必要と思われる。したがって、その成分の代謝に関わる CYP の分子種や、100 倍量の関与成分の実験動物への投与で誘導される CYP 分子種についても把握しておくことなどが必要になってくるのではないであろうか。

一方、ハーブに強いアドバイザーの養成も急がれる。また、FDA の SN/AEMS のようなハ

ープの利用に伴う健康被害情報やその適切な利用法などの提示・公開も必要となろう。

最後に一つ付け加えると、赤ワインはある種のハーブである。最近、Tsunoda らは成人男女における試験により、赤ワインとともに cyclosporine を服用すると、血中 cyclosporine の AUC および最大濃度が低下することを報告している⁴¹⁾。赤ワインは血中での cyclosporine の半減期には大きな影響を与えないので、赤ワインによる吸収の阻害がこの cyclosporine のバイオアベイラビリティの低下の一因と推定されている。ハーブの扱いは難しい。

文 献

- 1) 志村二三夫: 栄養学雑誌 58, 151-160 (2000)
- 2) 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, 79-106
- 3) Volz, H. P., Kieser, M.: Pharmacopsychiatry 30, 1-5 (1997)
- 4) Pittler, M. H., Ernst, E.: J. Clin. Psychopharmacol. 20, 84-89 (2000)
- 5) 志村二三夫: 薬局 52, 1083-1091 (2001)
- 6) Hoffman, D. C., Donovan, H.: Psychopharmacology 120, 128-133 (1995)
- 7) Jamieson, D. D., Duffield, P. H.: Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 17, 495-507 (1990)
- 8) Gerlach, M., Riederer, P.: J. Neural. Transm. 103, 97-1041 (1996)
- 9) Sanberg, P. R., Bunsey, M. D., Giordano, M., Norman, A. B.: Behav. Neurosci. 102, 748-759 (1988)
- 10) 田中千香子, 加藤隆一(編): NEW 薬理学, 南江堂, 東京 (2000)
- 11) 高島英伍: 毒科学の基礎と実際, 日本毒科学会(編), 3-61, じほう, 東京 (1995)
- 12) 澤田康文: 薬局 52, 1093-1112 (2001)
- 13) Kilhan, C.: KAVA: Medicine Hunting in Paradise, Park Street Press, VM (1996)
- 14) Noldner, M., Chatterjee, S. S.: Phytomedicine 6, 285-286 (1999)
- 15) Young, K. A., Hicks, P. B., Randall, P. K., Wilcox, R. E.: J. Neural. Transm. Gen. Sect. 98, 119-132 (1994)
- 16) Shiozaki, S., Ichikawa, S., Nakamura, J., Kitamura, S., Yamada, K., Kuwana, Y.: Psychopharmacology 147, 90-95 (1999)
- 17) Blumenthal, M. (ed.): The Complete German Commission E monographs., American Botanical Council, TX. (1998)
- 18) PDR for Herbal Medicines. Gruenwald J. (ed.), Medical Economics Medical Economics (2000)
- 19) Norton, S. A., Ruze, P.: J. Am. Acad. Dermatol. 31, 89-97 (1994)
- 20) Biber, A., Fischer, H., Romer, A., Chatterjee, S. S.: Pharmacopsychiatry 31, Suppl 1, 36-43 (1998)
- 21) Nebel, A., Schneider, B. J., Baker, R. K., Kroll, D. J.: Ann. Pharmacother. 33,

- 502-503 (1999)
- 22) Schelosky, L., Raffauf, C., Jendroska, K., Poewe, W.: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 58, 639-640 (1995)
 - 23) Meseguer E, Taboada R, Sanchez V, Mena MA, Campos V, Garcia De Yebenes J.: *Mov. Disord.* 17, 195-196 (2002)
 - 24) Escher, M., Desmeules, J., Giostra, E., Mentha, G.: *BMJ* 5, 322 (2001)
 - 25) Kraft, M., Spahn, T. W., Menzel, J., Senninger, N., Dietl, K. H., Herbst, H., Domschke, W., Lerch, M. M.: *Dtsch. Med. Wochenschr.* 126, 970-972 (2001)
 - 26) 榎本眞: 毒科学の基礎と実際, 日本毒科学会(編), 111-143, じほう, 東京(1995)
 - 27) Almeida, J. C., Grimsley, E. W.: *Ann. Intern. Med.* 125, 940-941 (1996)
 - 28) Gold, J. L., Laxer, D. A., Dergal, J. M., Lanctot, K. L., Rochon, P. A.: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 4, 29-34 (2001)
 - 29) Brinker, F. J.: Sandy OR: Electric Medical (1998)
 - 30) Piscitelli, S. C., Burstein, A. H., Chaitt, D., Alfaro, R. M., Falloon, J.: *Lancet* 355, 547-548 (2000)
 - 31) Ruschitzka, F., Meier, P. J., Turina, M., Luscher, T. F., Noll, G.: *Lancet* 355, 548-549 (2000)
 - 32) Ernst, E.: *Lancet* 354, 2014-2016 (1999)
 - 33) Durr, D., Stieger, B., Kullak-Ublick, G. A., Rentsch, K. M., Steinert, H. C., Meier, P. J., Fattinger, K.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 598-604 (2000)
 - 34) Guengerich, F. P.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 1-17 (1999)
 - 35) Roby, C. A., Anderson, G., D., Kantor, E., Dryer, D., A., Burstein, A. H.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 451-457 (2000)
 - 36) Noldner, M., Chatterjee, S., *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1, S108-110 (2001)
 - 37) Bray, B. J., Brennan, N. J., Perry, N. B., Menkes, D. B., Rosengren, R. J.: *Life Sci.* 70, 1325-1335 (2002)
 - 38) Moore, L. B., Goodwin, B., Jones, S. A., Wisely, G. B., Serabjit-Singh, C. J., Willson, T. M., Collins, J. L., Kliewer, S. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97, 7500-7502 (2000)
 - 39) Laakmann, G., Schule, C., Baghai, T., Kieser, M.: *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl 1, 54-59 (1998)
 - 40) 加藤隆一, 鎌滝哲也(編): 薬物代謝学, 東京化学同人, 東京(2001)
 - 41) Tsunoda, S. M., Harris, R. Z., Christians, U., Velez, R. L., Freeman, R. B., Benet, L. Z., Warshaw, A.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 70, 462-467 (2001)

特定保健用食品素材と医薬品の相互作用に関する研究

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】

高齢化社会を迎え、高血圧、心臓病、糖尿病や肥満などの「生活習慣病」が増加し、健康食品に対する関心はますます高まっている。2001年4月から、従来の特定保健用食品と新設の栄養機能食品の2種類の類型からなる保健機能食品制度が施行され、それぞれ独自の表示を認めることにより、保健機能食品を他の食品と容易に区別して利用できるようになった。特に、特定保健用食品は申請された個々について審査し厚生労働省が許可したもので、現在289品目が特定保健用食品として販売されている（平成13年12月26日、日本健康栄養食品協会調べ）。この特定保健用食品は身体の生理学的機能などに影響を与える成分を含んだもので、健康の増進や特定の保健に有用な成分を含むことなど健康上の利点を表示することができる。しかし、現在健康食品として販売されているものの多くはこのような条件を満たすことなく、様々な方法で科学的裏付けのない過剰な効能を謳い、使用されているのが現状である。健康食品は基本的に長期的に利用するという考え方が一般的であり、またその効果を期待するあまり大量に摂取される傾向もある。特に適正な摂取量が明示されていないような場合は、このような長期・大量摂取による有害事象の発生が憂慮される。

ところで、何らかの疾患を有している患者が、症状の改善を期待して、医師から処方されている医薬品に加え、これら健康食品を利用する可能性は十分考えられる。健康食品の中には錠剤やカプセル、もしくは濃縮液の形で大量に摂取することが可能なものがありこのような場合、医薬品と食品の相互作用が起こる事も危惧される。我々はすでに、生体に対する各種健康食品の影響を高感度・多面的に検出する手段として薬理的及び薬物動態学的な手法を応用することを試み、循環機能を中心にその安全性を検討^{1,2)}してきた。現在までに、イチョウ葉エキス、茶カテキン、大豆イソフラボン類、オクタコサノール、鉄クロロフィリンナトリウムおよび銅クロロフィリンナトリウムの影響について検討し、その長期投与が正常な循環器系機能に薬理的な影響をおよぼさないことを報告した。一方、薬物動態学的にはイチョウ葉エキスと大豆イソフラボンの長期投与は、肝臓の著明なもしくは軽度の肥大をそれぞれ起こすこと、特にイチョウ葉エキスは肝代謝酵素の誘導を生じ、循環器系治療薬の抗高血圧薬の薬効を弱めることを明らかにした。³⁾

本年度は、特定保健用食品として最近その使用が増大しているプロポリスに着目し、この循環機能に対する影響を薬理的・薬物動態学的に検討するとともに、イチョウ葉エキスと医薬品との相互作用についてもさらに詳細な検討を加えた。今年度の研究項目は以下の2点とした。

- I. 循環器系に対するプロポリスの薬理的・薬物動態学的影響に関する検討
- II. イチョウ葉エキスと医薬品の相互作用に関する検討

【研究方法】

1. 循環器系に対するプロポリスの薬理的・薬物動態学的影響に関する検討

1. 実験材料

(1) 実験動物

実験にはWistar系雄性ラット(6週齢、日本SLC、静岡)を購入し、実験を通して恒温(22±2℃)、恒湿(55±2%)、定時照明(7~19時)の条件下で飼育し、実験には1週間馴化させた後に使用した(実験開始時体重160g~183g)。なお、実験に際し、動物は「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「武庫川女子大学動物実験指針」に基づいて取り扱われた。

(2) 使用薬物

被験食品としては、以下のような起源の異なる3種類のプロポリスをエタノール抽出後、90%乳糖で粉末化したもの(アビ、岐阜)を、実験に供した。

- 1) ブラジル産(アレクリン)；植物起源アレクリン(Pro-Baと省略)
- 2) ブラジル産；植物起源不明(Pro-Bbと省略)
- 3) 中国産；植物起源不明(Pro-Cと省略)

さらに、以下の薬物を適宜溶解させて実験に供した。

ペントバルビタールナトリウム(東京化成、東京)、イソプロテレノール重酒石酸塩(フナコシ、東京)、塩化アセチルコリン(第一製薬、東京)、ノルアドレナリン(三共、東京)。

2. 投与実験

Wistarラットをコントロール食群(6匹)と被験食品(Pro-Ba、Pro-Bb、Pro-C)添加食群の4群に分け、コントロール食群には市販粉末飼料(CE-2、日本クレア、東京)に乳糖を3.0%混合した飼料を、それぞれの被験食品群には10%プロポリスを3.0%の割合で添加した市販粉末飼料を4週間にわたって自由摂取させた。

ラット血圧および心拍数を投与期間中1週間毎に測定し、4週間後にペントバルビタール麻酔下(60mg/kg、腹腔内投与)、腹部大動脈より採血し、肝臓、脾臓、胸腺、心臓および胸部大動脈を摘出して後述する方法に従って実験に供した。なお、血液中の白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値および血小板数は多項目自動血球計数装置(K-4500、シスメックス、神戸)を用いて測定した。

3. 循環器系に関する実験手技

(1) ラット循環機能(心拍数・血圧)に対する影響

血圧と心拍数は、無加温型非観血式血圧計(MK-2000、室町機械、東京)を用いたテールカフ法で計測した。

(2) ラット摘出心房に対する影響

ラットから摘出した心臓より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。標本の左右心耳部をセルフインで挟んでマグナス管中に懸垂した。マグナス管には32℃

の Krebs-Henseleit 液（以下クレブス液と省略、NaCl 118.4 mM、KCl 4.7 mM、CaCl₂ 2.2 mM、KH₂PO₄ 1.2 mM、MgSO₄ 1.2 mM、NaHCO₃ 25.0 mM、glucose 5.6 mM）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等尺性トランスデューサー（T-7、NEC 三栄、東京）および歪み圧力アンプ（AS1202、NEC 三栄、東京）を介して測定した。なお、記録およびデータの解析はパワーラブシステム（PowerLab/800、ADInstruments Pty Ltd.、NSW、Australia）を用いて行った。

(3) ラット摘出胸部大動脈に対する影響

ラットから摘出した胸部大動脈より、幅 2～3 mm のリング状標本を作成した。標本は 95%酸素・5%二酸化炭素の混合ガスを通気した 37℃ のクレブス液を満たしたマグヌス管中に懸垂した。標本に生じる張力変化は張力トランスジューサー（T-7）および歪み圧力アンプ（AS1202）を介して測定した。なお、記録およびデータの解析はパワーラブシステム（PowerLab/800）を用いて行った。

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。計算処理は 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。

II. イチョウ葉エキスと医薬品の相互作用に関する検討

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 週齢）を購入し、実験を通して恒温（22±2℃）、恒湿（55±2%）、定時照明（7～19 時）の条件下で飼育し、実験には 1 週間馴化させた後に使用した（実験開始時体重 190 g–215 g）。なお、実験に際し、動物は「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「武庫川女子大学動物実験指針」に基づいて取り扱われた。

(2) 使用薬物

被験食品としては、イチョウ葉エキス粉末（イチョウエキス-F、タマ生化学、東京）を使用した。さらに、以下の薬物を適宜溶解させて実験に供した。

ペントバルビタールナトリウム（東京化成、東京）、塩酸ニカルジピン製剤（山之内製薬、東京）、フェノバルエリキシル（三共、東京）。

2. 投与実験

Wistar ラットをコントロール食群（6 匹）とイチョウ葉エキス（GBE）（6 匹）添加食群に分け、

コントロール食群には市販粉末飼料を、イチョウ葉エキス添加食群には 0.1、0.5、1.0%GBE の割合でイチョウ葉エキス粉末を添加した市販粉末飼料を 2 週間にわたって自由摂取させた。

3. イチョウ葉エキスと医薬品の相互作用に関する実験手技

(1) ニカルジピンに対する影響

2 週間後、コントロール食群と 0.5%GBE 添加食群それぞれのラットにニカルジピン (30 mg/kg) を経口投与、一定時間毎に血圧および心拍を測定しながら採血も行った。採血した血液から血漿を得、同量のアセトニトリルを加え除蛋白後、遠心分離を行った。その上澄みを 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、ろ液を高速液体クロマトグラフィーに注入しニカルジピンの定量を行った。

(2) フェノバルピタールに対する影響

2 週間後、コントロール食群と 0.1、0.5、1.0%GBE 添加食群それぞれのラットにフェノバルピタール (90 mg/kg) を経口投与し、睡眠作用を観察しながら一定時間毎に採血した。採血した血液から血漿を得、同量のアセトニトリルを加えて除蛋白した後、遠心分離を行った。その上澄みを 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、ろ液を高速液体クロマトグラフィーに注入しフェノバルピタールの定量を行った。

(3) 高速液体クロマトグラフィーによるニカルジピンの定量条件

分析条件は、Yritia M.ら⁴⁾の文献を参考に行った。高速液体クロマトグラフィー装置は、ポンプ LC-10A (島津、京都)、UV 検出器 SPD-6A (238 nm、島津) およびオートサンプラー AS-8020 (東ソー、東京) で構成され、データの解析・処理はワークステーション CLASS-LC10 (島津) を用いて行った。カラムは COSMOSIL 5C₁₈-MS (150×4.6 mm i.d.、ナカライテスク、京都) を 40℃カラムオープン (フロム、東京) 中で用いた。移動相は、アセトニトリル-13 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) (50 : 50) として、1 ml/min の流速で送液した。ニカルジピンの保持時間は、約 10.8 min であった。

(4) 高速液体クロマトグラフィーによるフェノバルピタールの定量条件

高速液体クロマトグラフィー装置は、ポンプ LC-10A (島津)、UV 検出器 SPD-6A (210 nm、島津) およびオートサンプラー AS-8020 (東ソー) で構成され、データの解析・処理はワークステーション CLASS-LC10 (島津) を用いて行った。カラムは COSMOSIL 5C₁₈-MS (150×4.6 mm i.d.、ナカライテスク) を 40℃カラムオープン (フロム) 中で用いた。移動相は、アセトニトリル-水 (20 : 80) として、1 ml/min の流速で送液した。フェノバルピタールの保持時間は、約 10.0 min であった。

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。計算処理は

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。

【研究結果】

I. 循環器系に対するプロポリスの薬理的・薬物動態学的影響に関する検討

日本においてプロポリスが注目され始めたのは、1985年に開催された国際養蜂会議においてプロポリスの有用性が報告され、更に1991年第50回日本癌学会総会において抗腫瘍作用が報告⁵⁾されてからである。プロポリスは、蜜蜂が植物から集めてきた樹脂状の物質で巣内部を守るための防御壁である。ブラジル、中国、ニュージーランド、東欧などで採取されているが、ブラジル産が香りが良く好まれている。ブラジルは、その植物分布に地域性があるため、蜜蜂が集める植物が特定されたプロポリスが入手可能である。そこで我々は、植物起源が判明しているブラジル産プロポリス(Pro-Ba)と植物起源が特定できないブラジル産プロポリス(Pro-Bb)、さらに植物起源が特定できない中国産プロポリス(Pro-C)を用いて循環器系に対する4週間反復投与の影響を検討し、その有用性と安全性について考察した。

1. プロポリス長期投与の影響

(1) 体重、肝臓、脾臓、胸腺重量に対する影響

表1は、ラットの体重および摘出肝臓、脾臓、胸腺重量におよぼす起源の異なるプロポリス3種(Pro-Ba、Pro-Bb、Pro-C)の4週間反復投与の影響を示したものである。ラット体重および体重100gあたりの肝臓、脾臓重量比において、被験食品による有意な変化は認められなかった。しかし、胸腺重量においてはPro-Ba、Pro-Bb長期投与による有意な増加が認められ、また、Pro-Cによっても有意ではなかったが、増加傾向が認められた。

表1 体重および肝臓、脾臓および胸腺重量に対するプロポリス長期投与の影響

	Control	Pro-Ba	Pro-Bb	Pro-C
体重 (g)	258.7±3.7	258.9±3.3	249.2±7.2	246.6±4.3
肝臓 (g) / 100 (g)体重	3.59±0.04	3.64±0.05	3.67±0.05	3.63±0.06
脾臓 (g) / 100 (g)体重	0.211±0.005	0.221±0.006	0.221±0.007	0.214±0.006
胸腺 (g) / 100 (g)体重	0.090±0.004	0.106±0.003*	0.106±0.004*	0.102±0.005

Control : コントロール (n=6)、Pro-Ba : ブラジル産(アレクリン) (n=5)、

Pro-Bb : ブラジル産 (n=5)、Pro-C : 中国産 (n=6)。平均±標準誤差。

*p<0.05 from control.

(2) 体重、肝臓、脾臓、胸腺重量に対する影響

表 2 は、ラットの白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値および血小板数に対するプロポリス 3 種の 4 週間反復投与の影響を示したものである。プロポリス 3 種の値とコントロールとの値に有意な変化は認められなかった。

表 2 白血球、赤血球、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値および血小板に対するプロポリス長期投与の影響

	Control	Pro-Ba	Pro-Bb	Pro-C
白血球 (×100/μl)	41.6±3.1	38.8±4.7	45.3±2.9	43.7±1.5
赤血球 (×100/μl)	666.2±19.4	674.8±9.4	684.6±12.9	676.1±2.1
ヘモグロビン量 (g/dl)	12.5±0.3	12.5±0.2	12.6±0.1	12.6±0.1
ヘマトクリット値 (%)	34.6±0.9	34.9±0.5	35.9±0.8	35.1±0.1
血小板 (×100/μl)	54.7±1.2	55.3±1.1	58.5±0.2	55.9±2.3

Control : コントロール (n=6)、Pro-Ba : ブラジル産(アレクリン) (n=5)、
Pro-Bb : ブラジル産 (n=5)、Pro-C : 中国産 (n=5)。平均±標準誤差。

(3) ラット循環機能に対する影響

① ラット血圧および心拍数に対する影響

ラット循環機能に対するプロポリス 3 種の 4 週間反復投与の影響を検討したところ、図 1 に示すように収縮期血圧、拡張期血圧および心拍数において有意な変化は認められなかった。

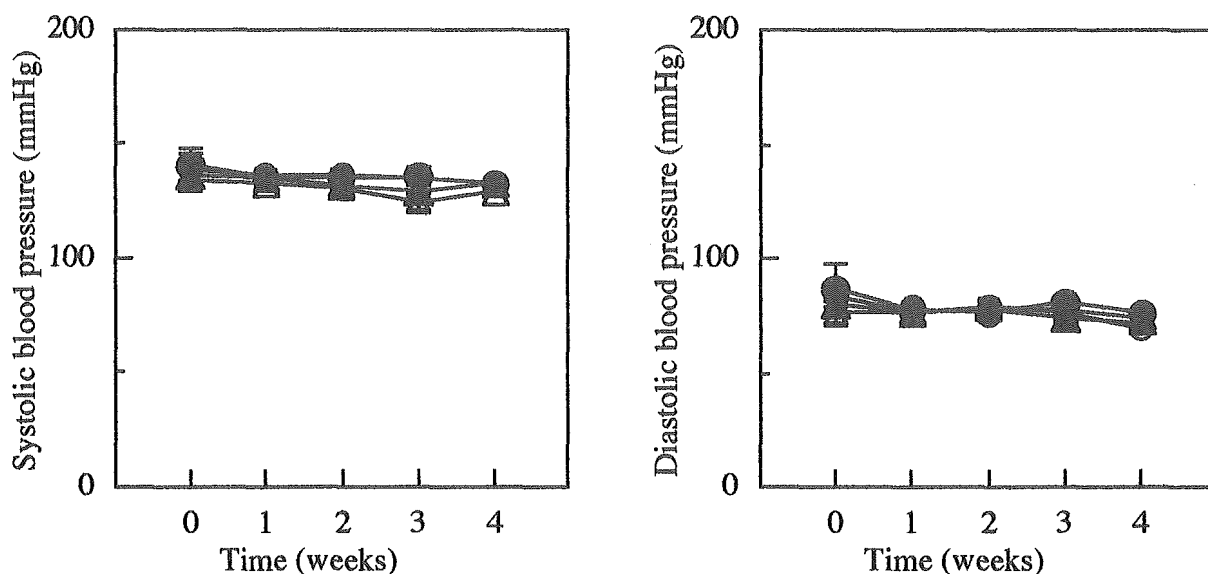


図 1 a ラット収縮期血圧 (Systolic blood pressure;左) および拡張期血圧 (Diastolic blood pressure; 右) におけるプロポリス長期投与の影響

● : Control : コントロール (n=6)、○ : Pro-Ba : ブラジル産(アレクリン) (n=6)、
▲ : Pro-Bb : ブラジル産 (n=6)、△ : Pro-C : 中国産 (n=6)。平均±標準誤差。

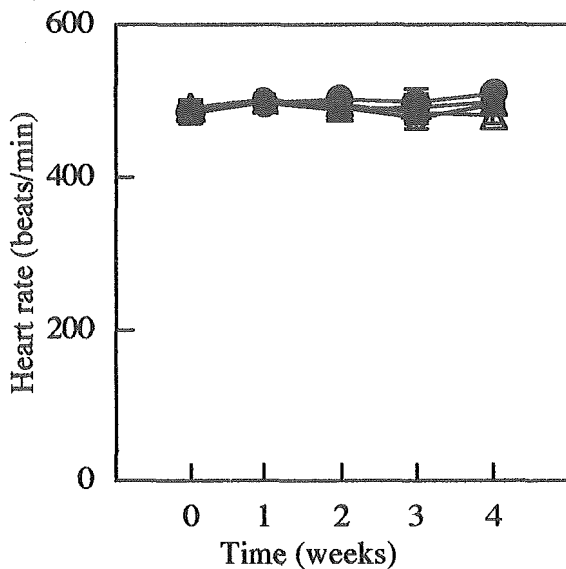


図1b ラット心拍数 (Heart rate) におけるプロポリス長期投与の影響

● : Control : コントロール (n=6)、○ : Pro-Ba : ブラジル産(アレクリン) (n=6)、
▲ : Pro-Bb : ブラジル産 (n=6)、△ : Pro-C : 中国産 (n=6). 平均±標準誤差.

② ラット摘出心房に対する影響

図2は、プロポリス3種を4週間反復投与したラットの摘出心房における心拍数と収縮力をコントロールのそれと比較したものである。Pro-Baにおいて、若干の陽性変力的な影響が認められたが有意ではなかった。その他のプロポリスを長期投与したラット心房の心拍数および収縮力はコントロール食群のそれとほとんど同じであった。

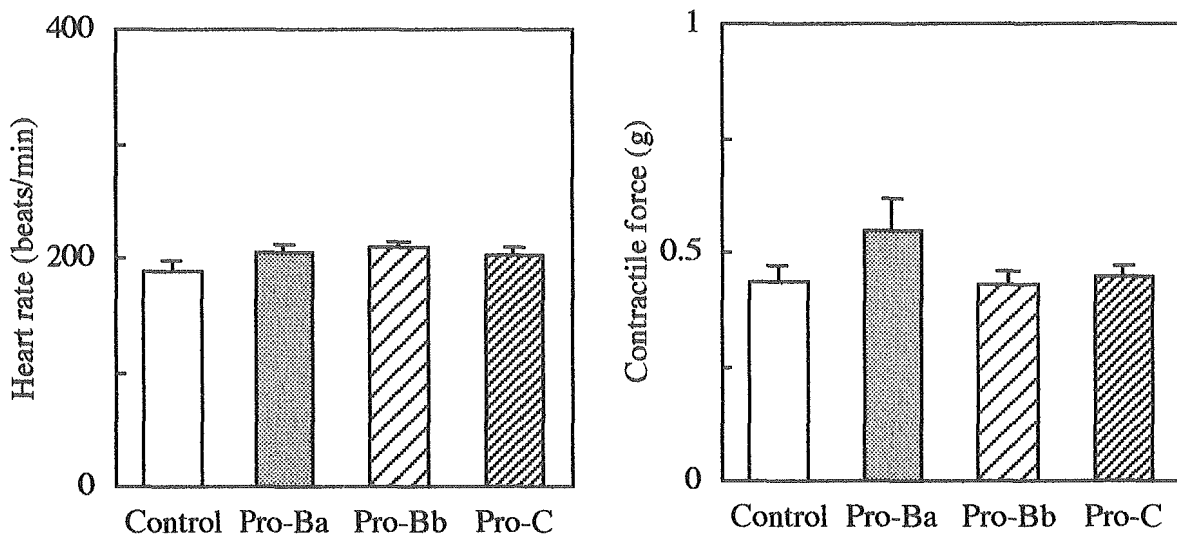


図2 ラット摘出心房標本の心拍数 (Heart rate;左) と収縮力 (Contractile force;右) に対するプロポリス長期投与の影響

Control : コントロール (n=5)、Pro-Ba : ブラジル産(アレクリン) (n=5)、
Pro-Bb : ブラジル産 (n=6)、Pro-C : 中国産 (n=6). 平均±標準誤差.

図3は、プロポリス3種を4週間反復投与したラットの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およびアセチルコリンの陰性変時変力作用を示したものである。Pro-Baにおいて、イソプロテレノールによる陽性変力作用を増強する傾向が影響が認められたが有意ではなかった。また、Pro-Baにはアセチルコリンの陰性変時変力作用を抑制する傾向も認められたがこれも有意ではなかった。その他のプロポリスで4週間飼育したラットの摘出心房におけるイソプロテレノールおよびアセチルコリンの変時変力作用とコントロール群のそれらとの間には有意な差は認められなかった。

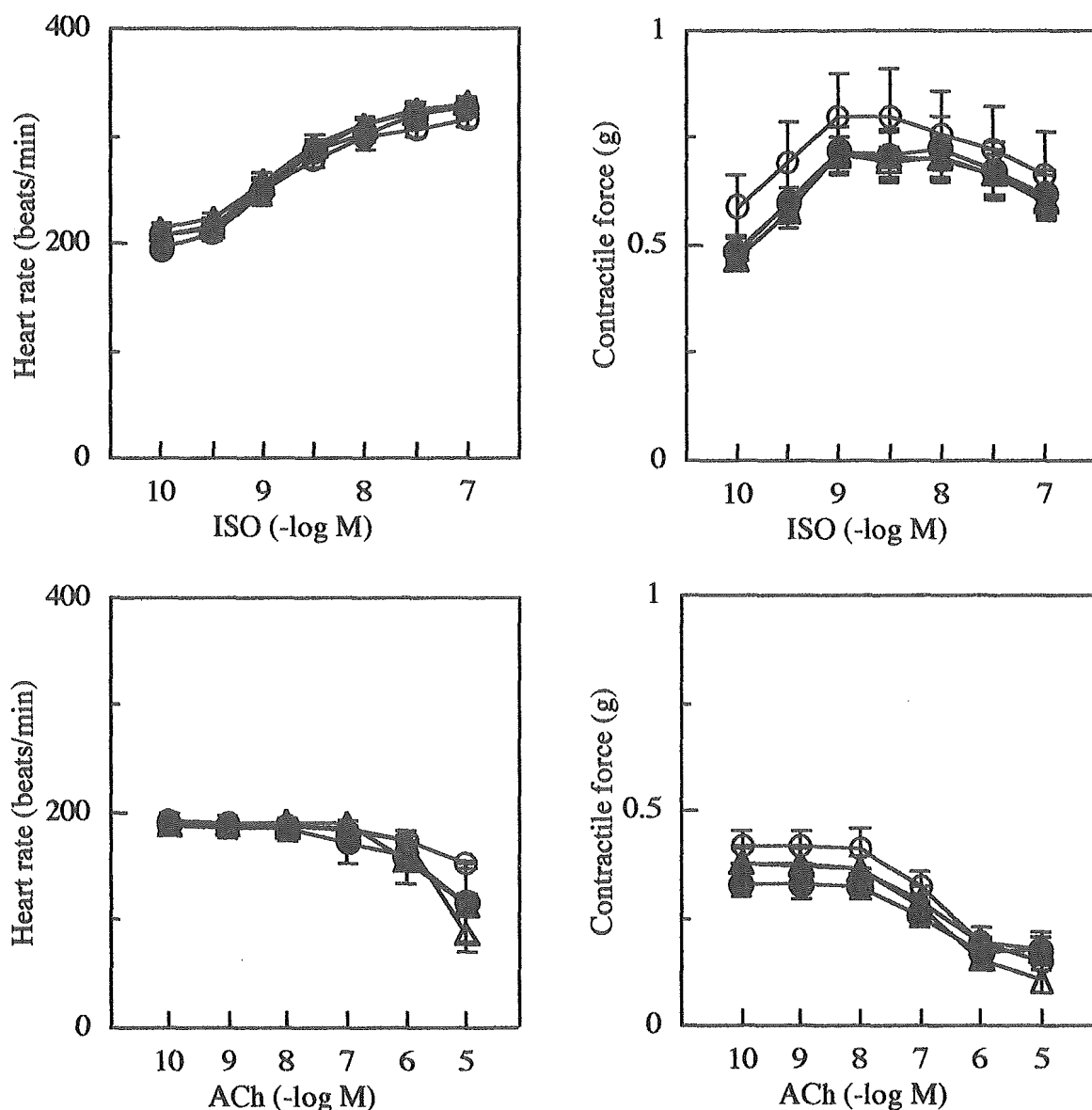


図3 ラット摘出心房標本におけるイソプロテレノール (ISO) の陽性変時変力作用およびアセチルコリン (ACh) の陰性変時変力作用に対するプロポリス長期投与の影響

変時作用 : Heart rate、変力作用 : Contractile force.

● : Control : コントロール (n=5)、○ : Pro-Ba : ブラジル産(アレクリン) (n=5)、

▲ : Pro-Bb : ブラジル産 (n=6)、△ : Pro-C : 中国産 (n=6). 平均±標準誤差.

③ 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プロポリス 3 種の 4 週間反復投与の影響について検討した。図 4 は胸部大動脈における 10^{-7} M のノルアドレナリンの収縮反応を 3 種のプロポリス群とコントロール群で比較したものである。その結果、Pro-Ba 投与ラットの胸部大動脈において、Pro-Ba が収縮を抑制する傾向が観察されたが有意な作用ではなかった。他のプロポリス 2 種による有意な影響は認められなかった。

図 5 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およびニトロプルシッドナトリウムの弛緩作用を 3 種のプロポリス群とコントロール群で比較したものである。その結果、プロポリス 3 種による有意な影響は認められなかった。

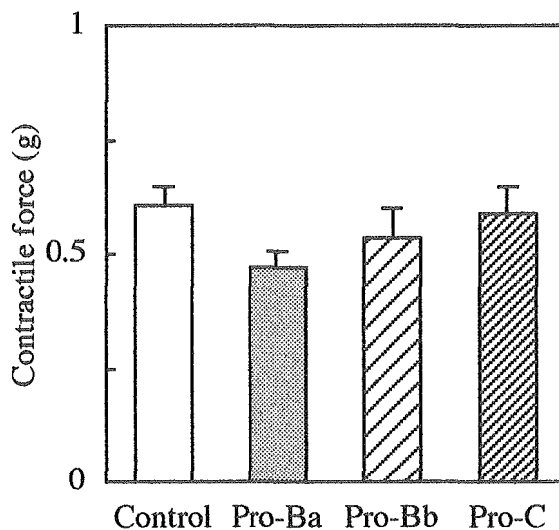


図 4 ラット摘出大動脈標本におけるノルアドレナリン (10^{-7} M) の収縮反応に対するプロポリス長期投与の影響

Control : コントロール (n=10)、Pro-Ba : ブラジル産(アレクリン) (n=10)、
Pro-Bb : ブラジル産 (n=10)、Pro-C : 中国産 (n=10). 平均±標準誤差.

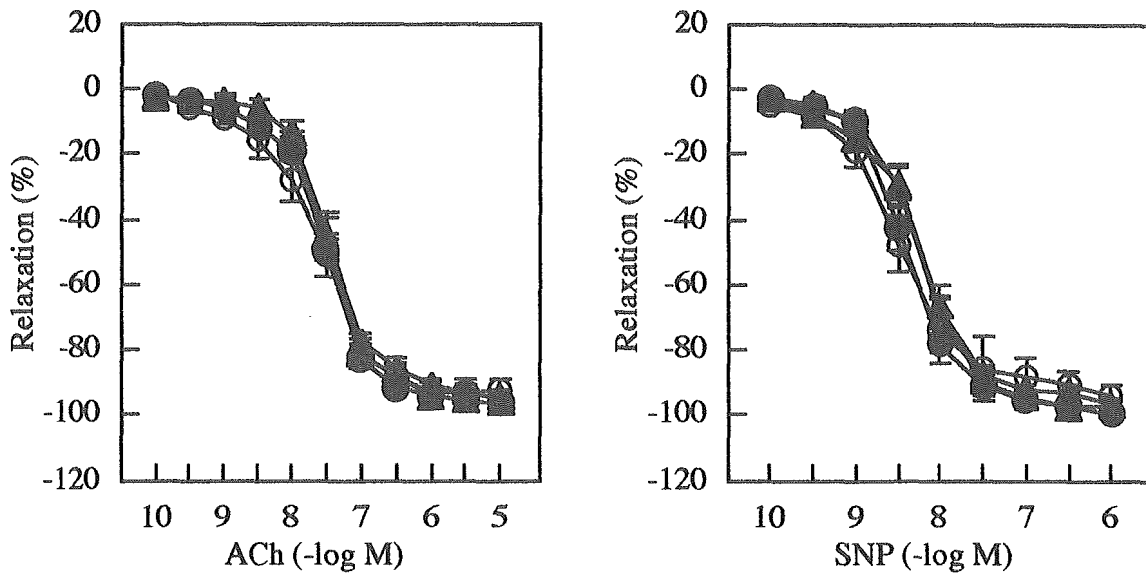


図 5 ラット摘出大動脈標本におけるアセチルコリン (ACh) およびニトロプルシッドナトリウム (SNP) の弛緩作用に対するプロポリス長期投与の影響

変時作用 : Heart rate、変力作用 : Contractile force.

● : Control : コントロール (n=5)、○ : Pro-Ba : ブラジル産(アレクリン) (n=5)、

▲ : Pro-Bb : ブラジル産 (n=5)、△ : Pro-C : 中国産 (n=5).

平均±標準誤差.

2. 循環機能および肝機能に対するプロポリスの直接投与の影響

(1) ラット摘出心房におよぼす影響

循環機能に関する上記 *in vivo* の実験結果では、プロポリス 3 種 4 週間反復投与後の心房に対しなんら影響は認められなかった。そこで、プロポリスが心臓に直接作用するかどうかを明らかにするため、摘出心房 (n=6) を懸垂したマグヌス管中にプロポリスの溶解液を直接投与して影響を検討した。その結果、Pro-Ba と Pro-Bb が 1 mg/ml の濃度において陽性変時作用 (心拍数増加) を示し、一方、Pro-C は陰性変時作用 (心拍数減少) を 1 mg/ml の濃度において示した。変力作用 (心収縮力) に対しては、すべてのプロポリスにおいてなんら影響は認められなかった (図 6)。

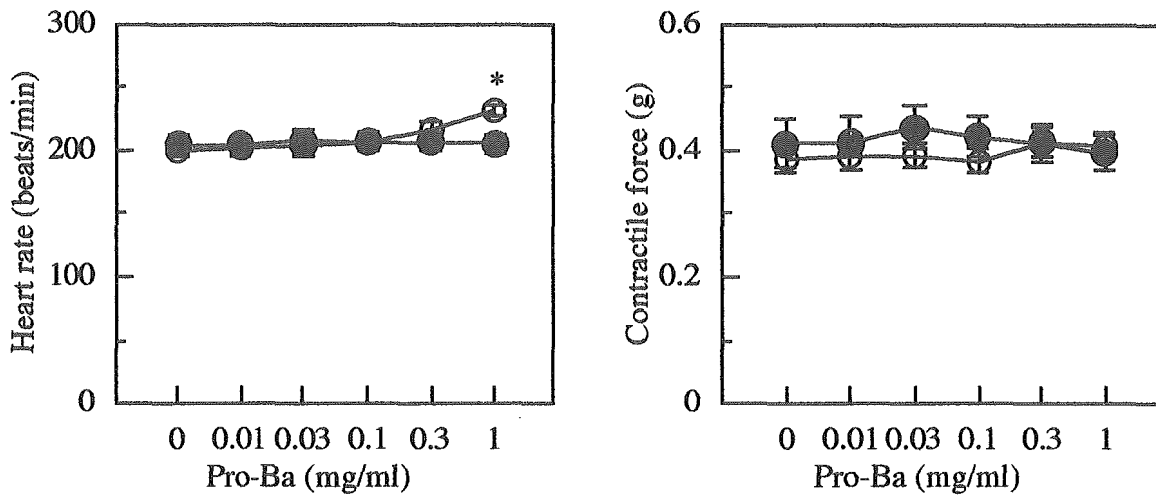


図6a ラット摘出心房の心拍数 (Heart rate;左) と収縮力 (Contractile force;右) に対するプロポリス直接投与の影響

● ; Control : コントロール (n=5)、○ ; Pro-Ba : ブラジル産(アレクリン)(n=6).
平均±標準誤差. * p<0.05 from control.

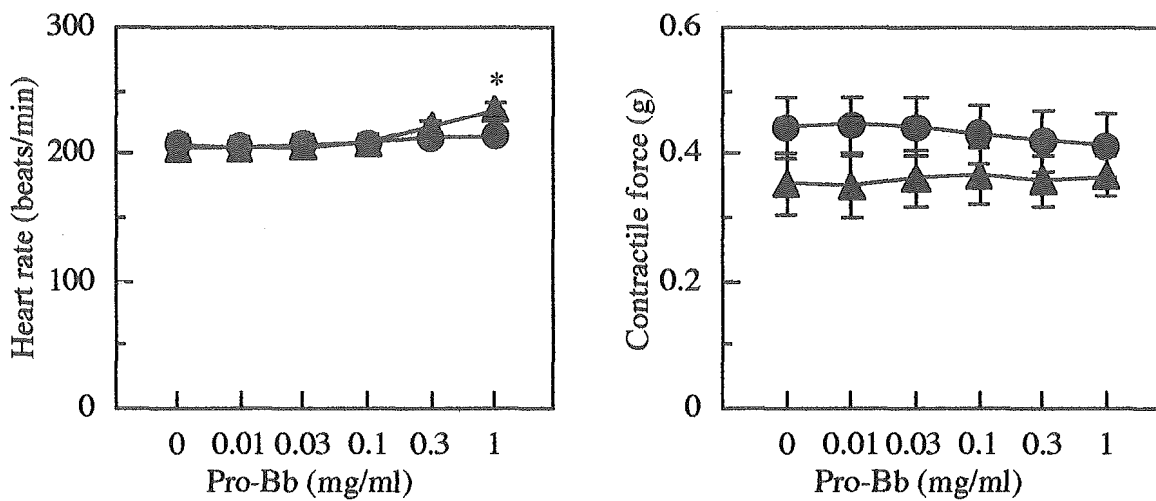


図6b ラット摘出心房の心拍数 (Heart rate;左) と収縮力 (Contractile force;右) に対するプロポリス直接投与の影響

● ; Control : コントロール (n=5)、▲ ; Pro-Bb : ブラジル産 (n=5).
平均±標準誤差. * p<0.05 from control.

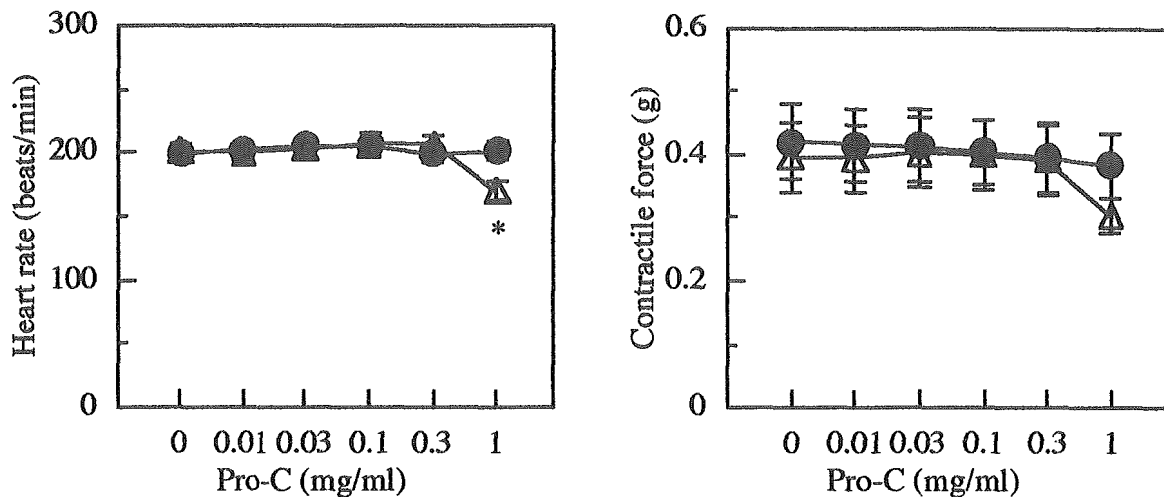


図6c ラット直接心房の心拍数 (Heart rate;左) と収縮力 (Contractile force;右) に対するプロポリスエキス長期投与の影響

● ; Control : コントロール (n=5)、△ ; Pro-C : 中国産 (n=5).
平均±標準誤差. * p<0.05 from control.

(2) ラット摘出胸部大動脈におよぼす影響

循環機能に関する上記 *in vivo* の実験結果では、プロポリス 4 週間反復投与は摘出胸部大動脈に対しなんら影響は認められなかった。そこで、プロポリスが血管へ直接作用するかどうかを明らかにするため、摘出胸部大動脈 (n=6) を懸垂したマグナス管中にプロポリスの溶解液を直接投与して影響を検討した。その結果、 10^{-7} M ノルアドレナリンで収縮させた標本においてすべてのプロポリスは 0.1 mg/ml から弛緩作用を示し始め、3 mg/ml でほぼ 100%弛緩した。Pro-C の弛緩作用は Pro-Ba と Pro-Bb に比べ有意に強かった (図 7)。

図 8 は摘出胸部大動脈におけるプロポリスの弛緩作用に対する一酸化窒素合成酵素阻害薬である N^G -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) の影響を示したものである。 10^{-7} M ノルアドレナリンによりあらかじめ収縮させた標本においてすべてのプロポリスの弛緩作用は L-NAME により有意な減弱が認められた。また、表 3 は各種プロポリスによる弛緩反応を EC_{50} 値と最大弛緩反応率で表し、L-NAME の影響を示したものであるが、L-NAME はいずれの弛緩反応に対してもその EC_{50} を有意に増大させた。なお、最大弛緩反応率は L-NAME により影響されなかった。

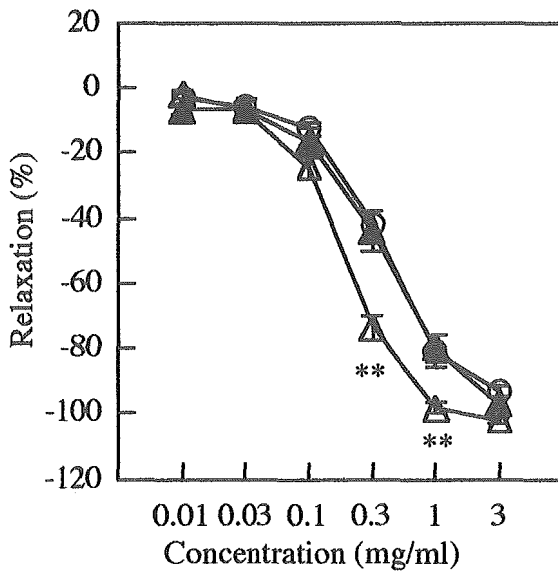


図7 ラット摘出大動脈におけるプロポリス直接投与の弛緩作用

○: Pro-Ba: ブラジル産(アレクリン) (n=6)、▲: Pro-Bb: ブラジル産 (n=6)、
 △: Pro-C: 中国産 (n=6). 平均±標準誤差. **p<0.01 from Pro-Ba.

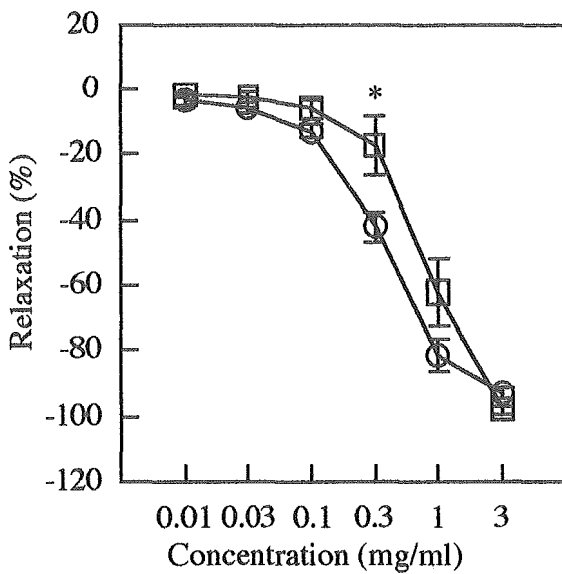


図8a ラット摘出大動脈における Pro-Ba の弛緩作用に対する L-NAME の影響

○: L-NAME 非共存下 Pro-Ba: ブラジル産(アレクリン) (n=6)、□: L-NAME 共存下 Pro-Ba (n=6).
 平均±標準誤差. *p<0.05 from L-NAME 非共存下 Pro-Ba.

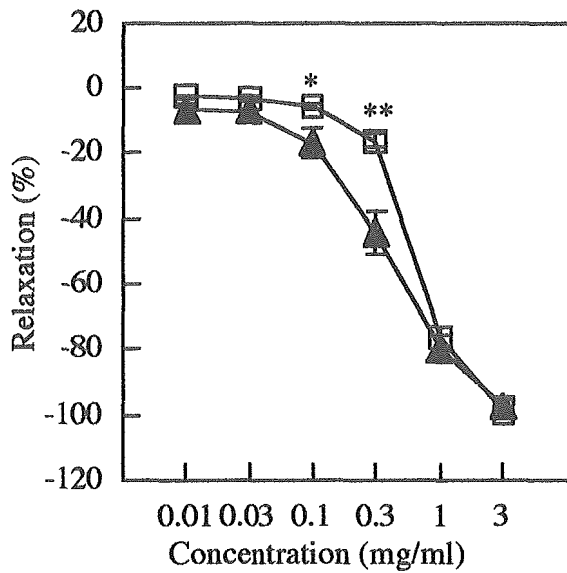


図 8b ラット摘出大動脈における Pro-Bb の弛緩作用に対する L-NAME の影響

▲ : L-NAME 非共存下 Pro-Bb : ブラジル産 (n=6)、□ : L-NAME 共存下 Pro-Bb (n=6).
 平均±標準誤差. *p<0.05 from L-NAME 非共存下 Pro-Bb.
 **p<0.01 from L-NAME 非共存下 Pro-Bb.

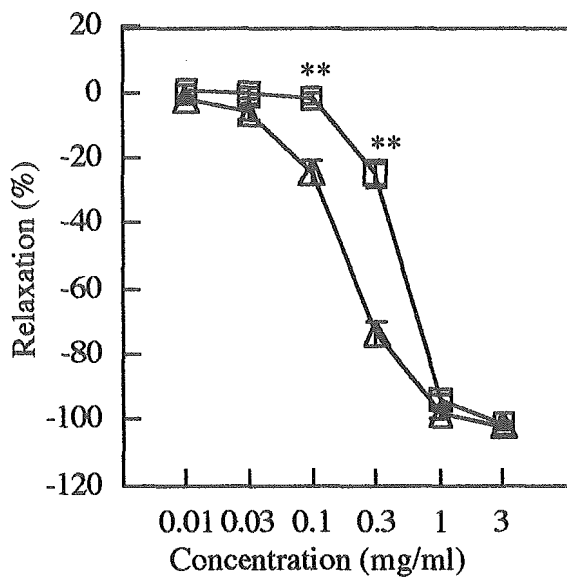


図 8c ラット摘出大動脈における Pro-C の弛緩作用に対する L-NAME の影響

△ : L-NAME 非共存下 Pro-C : 中国産 (n=6)、□ : L-NAME 共存下 Pro-C (n=6).
 平均±標準誤差. **p<0.01 from L-NAME 非共存下 Pro-C.