

表3 プロポリスによるラット摘出大動脈の弛緩作用のEC50と最大弛緩率に対するL-NAMEの影響

		EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	最大弛緩率 (%)
Pro-Ba	Control	272.4 \pm 20.7	93.0 \pm 1.6
	L-NAME	456.1 \pm 37.2**	98.0 \pm 1.3
Pro-Bb	Control	258.6 \pm 31.9	97.1 \pm 2.8
	L-NAME	329.8 \pm 16.4 [#]	99.0 \pm 0.4
Pro-C	Control	180.2 \pm 7.0	101.9 \pm 0.8
	L-NAME	300.4 \pm 16.3 ⁺⁺	101.7 \pm 1.0

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 \pm 標準誤差。 **p<0.01 ; Pro-Ba の control との有意差。

[#]p<0.05 ; Pro-Bb の control との有意差。

⁺⁺p<0.01 ; Pro-C の control との有意差。

II. イチョウ葉エキスと医薬品の相互作用に関する検討

これまでの研究により、イチョウ葉エキス長期経口投与（4週間）が肝重量とチトクローム P-450 量を有意に増加させるとともに、グルタチオンS-トランスフェラーゼ活性を増加させることを明らかにし、更に増加しているチトクローム P-450 の分子種が CYP2B1/2、CYP3A1 および CYP3A2 であること明らかにした。これらの酵素が代謝する医薬品としてジヒドロピリジン系のカルシウム拮抗薬（ニカルジピンなど）とフェノバルピタールがよく知られている。

そこで、イチョウ葉エキスの長期投与と医薬品（ニカルジピンまたはフェノバルピタール）の相互作用を薬理学的および薬物動態学的に明らかにするために、医薬品の薬効とその血中濃度を検討した。

1. イチョウ葉エキスとニカルジピンの相互作用

(1) ニカルジピンの降圧作用におよぼす影響

図9は、コントロール群と0.5%GBE群（0.5%イチョウ葉エキスを2週間経口投与）に抗高血圧薬のニカルジピン（30 mg/kg）を経口投与した時の降圧作用を示したものである。0.5%GBE群におけるニカルジピンの降圧作用はコントロール群に比べ、有意に減弱していた。脈圧はニカルジピンにより影響されなかったが、コントロール群の心拍数はニカルジピンにより減少した。これは心筋のカルシウムチャンネルに対するニカルジピンの直接的な抑制作用に基づくものと思われる。この心機能抑制作用も GBE により有意に減弱した。

(2) 血中ニカルジピン濃度におよぼす影響

図10は、コントロール群と0.5%GBE群にニカルジピン（30 mg/kg）を経口投与した時の血漿中のニカルジピン濃度の変化を経時的に示したものである。0.5%GBE群ではコントロール群

に比べ、投与30分後から4時間後までの血漿中ニカルジピン濃度は有意に低下していた。血漿中ニカルジピンが最高濃度に達するまでの時間は両群ともに30分で、最高濃度 (Cmax) はコントロール群に比べ0.5%GBE群では有意な低下が認められた(表4)。また、投与後23時間までの血漿中ニカルジピン濃度-時間曲線下面積 (AUC₀₋₂₃) も0.5%GBE群はコントロール群に比べ有意に低下していた(表4)。

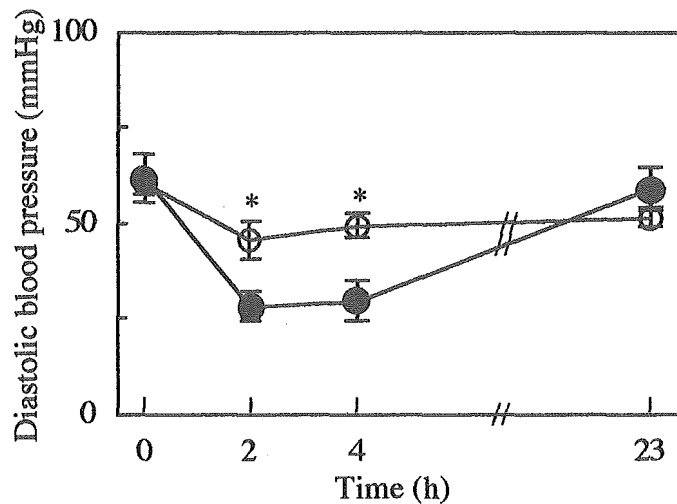


図9a 拡張期血圧 (Diastolic blood pressure) におけるニカルジピン (30 mg/kg 経口投与) の降圧作用に対するイチョウ葉エキス (0.5% GBE) 長期投与の影響

● ; Control (n=6)、○ ; 0.5% GBE (n=6). 平均±標準誤差.

*p<0.05 from control.

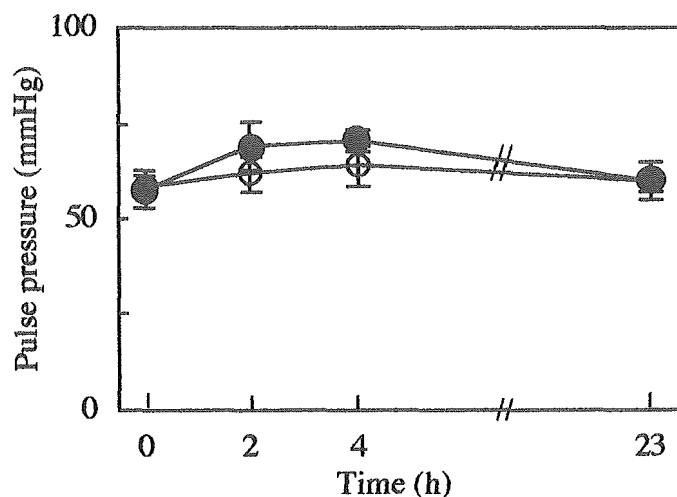


図9b 脈圧 (Pulse pressure) におけるニカルジピン (30 mg/kg 経口投与) の降圧作用に対するイチョウ葉エキス (0.5% GBE) 長期投与の影響

● ; Control (n=6)、○ ; 0.5% GBE (n=6).

平均±標準誤差.

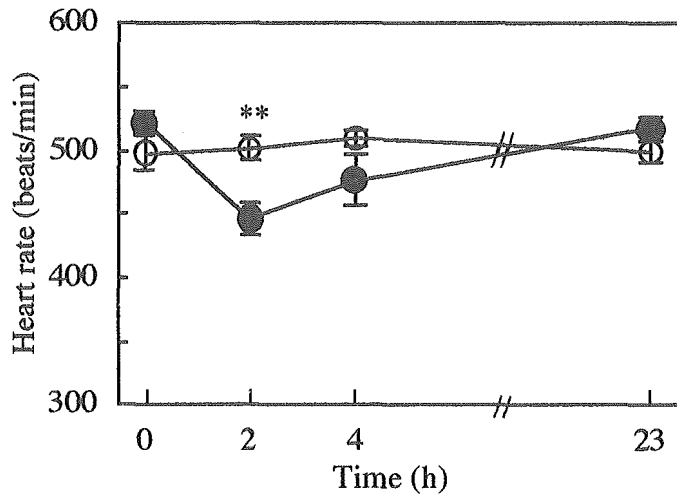


図9c 心拍数 (Heart rate) におけるニカルジピン (30 mg/kg 経口投与) の降圧作用に対するイチョウ葉エキス (0.5% GBE) 長期投与の影響

● ; Control (n=6)、○ ; 0.5% GBE (n=6).

平均±標準誤差. **p<0.01 from control.

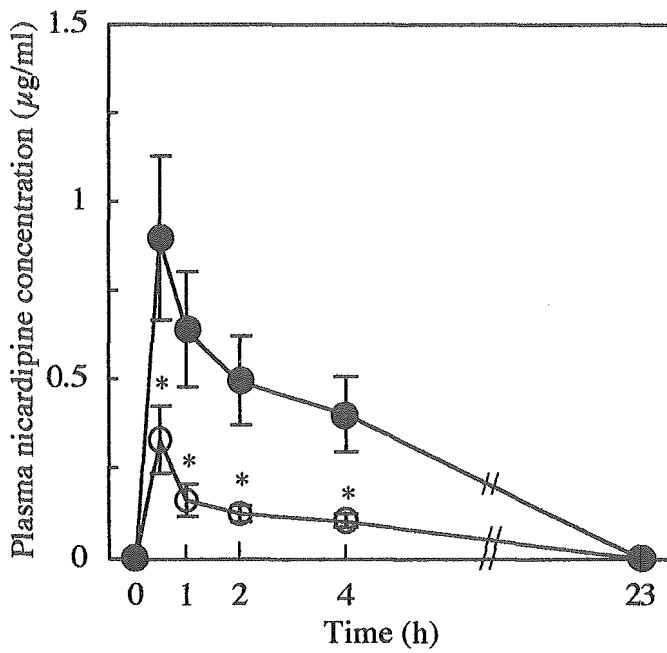


図10 ニカルジピン (30 mg/kg) 経口投与後の血漿中濃度の経時変化

● ; Control (n=6)、○ ; 0.5% GBE (n=6).

平均±標準誤差. *p<0.05 from control.

表 4 コントロール食またはイチヨウ葉エキス食長期投与ラットにおけるニカルジピン (30 mg/kg) 経口投与後のニカルジピン最高濃度 (C_{max}) と血中濃度-時間曲線下面積 (AUC₀₋₂₃)

	C _{max} (μg/ml)	AUC ₀₋₂₃ (μg·h/ml)
Control	0.95±0.23	5.30±1.26
0.5% GBE	0.33±0.10*	1.83±0.38*

Control : コントロール (n=6)、0.5% GBE : イチヨウ葉エキス (n=6)。平均±標準誤差。

* p<0.05 from control.

2. イチヨウ葉エキスとフェノバルピタールの相互作用

(1) フェノバルピタールの睡眠作用におよぼす影響

表 5 は、コントロール群と 0.1、0.5 および 1.0% GBE 群に催眠薬のフェノバルピタール (90 mg/kg) を経口投与した時の睡眠作用を示したものである。睡眠導入時間は、コントロール群に比べすべての GBE 群において有意に延長した。また、睡眠持続時間は、コントロール群に比べ 0.5 と 1.0% GBE 群において有意に短縮した。

表 5 コントロール食または 0.1、0.5、1.0% イチヨウ葉エキス食長期投与ラットにおけるフェノバルピタール経口投与後の睡眠導入時間と持続時間

	導入時間 (min)	持続時間 (min)
Control	44.3±1.8	479.0±41.9
0.1% GBE	87.0±5.1*	449.5±61.8
0.5% GBE	89.3±16.8*	168.8±86.9**
1.0% GBE	84.0±17.0*	178.3±34.0**

Control : コントロール (n=4)、0.1、0.5、1.0 % GBE : イチヨウ葉エキス (n=4)。

平均±標準誤差。 * p<0.05 from control. ** p<0.01 from control.

(2) 血中フェノバルピタール濃度におよぼす影響

図 11 は、コントロール群と 0.1、0.5 および 1.0% GBE 群にフェノバルピタール (90 mg/kg) を経口投与した後の血漿中フェノバルピタールの濃度変化を経時的に示したものである。0.5 および 1.0% GBE 群ではコントロール群に比べ投与 1、4、8 時間後において血漿中フェノバルピタール濃度が有意に減少していた。血漿中フェノバルピタールの最高濃度に達するまでの時間 (T_{max}) はコントロール群とすべての GBE 群間で有意な差は認められなかったが、最高濃度 (C_{max}) はコントロール群に比べ 0.5 および 1.0% GBE 群で有意な減少が認められた (表 6)。しかしながら、投与後 24 時間までの血漿中フェノバルピタール血中濃度-時間曲線下面積 (AUC₀₋₂₄) は、すべての GBE 群においてコントロール群に比べ減少傾向は認められたが、有意な差はなかった (表 6)。

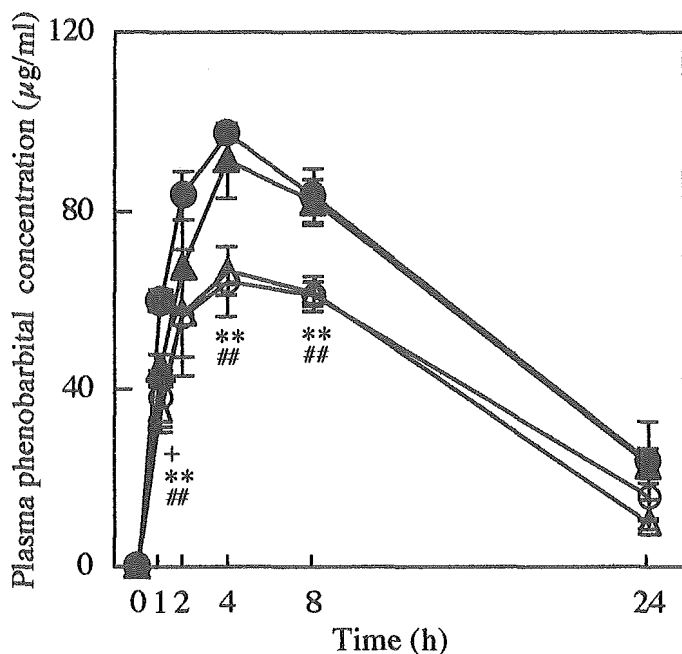


図 11 フェノバルビタール (90 mg/kg) 経口投与後の血漿中濃度の経時変化

● : コントロール (Control, n=4)、○ : 0.1% GBE (イチヨウ葉エキス, n=4) ,
▲ : 0.5% GBE (n=4) , △ : 1.0% GBE (n=4) . 平均±標準誤差.

+ p<0.05, 0.1% GBE from control. ** p<0.01, 0.5% GBE from control.

##p<0.01, 1.0% GBE from control.

表 6 コントロール食または 0.1、0.5、1.0% イチヨウ葉エキス食長期投与ラットにおけるフェノバルビタール (90 mg/kg) 経口投与後のフェノバルビタール最高濃度到達時間 (T_{max})、最高濃度 (C_{max}) と血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24})

	T_{max} (h)	C_{max} (µg/ml)	AUC_{0-24} (µg·h/ml)
Control	3.5±0.5	99.1±1.7	543.5±76.4
0.1% GBE	4.0±0	91.4±8.4	533.1±79.0
0.5% GBE	3.5±0.5	64.8±7.3**	446.4±78.1
1.0% GBE	4.5±1.3	70.1±3.3**	465.5±32.2

Control : コントロール (n=4)、0.1、0.5、1.0% GBE : イチヨウ葉エキス(n=4).

平均±標準誤差. ** p<0.01 from control.

【考 察】

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

プロポリスは、古くから東ヨーロッパでは民間薬として用いられてきたが、近年になってその生理機能に対する研究が試みられ、抗菌作用^{6,7)}、抗酸化作用^{8,9)}、抗腫瘍作用^{4,10,11)}、免疫力の増強作用¹²⁾などを示すことが明らかにされている。プロポリスは、蜜蜂の巣から得られる樹脂状の物質であるため原産地、蜜蜂が集める樹木の種類および抽出方法の違いによって含有成分が異なり、その効力に差が生じるという研究結果が報告されている⁷⁾。今回我々は、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) を同一の方法でエタノール抽出したエキス粉末を用い、生体に対するその影響や安全性を明らかにすることを最終目的として実験を行った。

3種のプロポリス (Pro-Ba、Pro-Bb、Pro-C) を0.3%添加した食餌を8週齢から4週間給餌したラットにおいて、その体重、肝臓、脾臓、心拍数および血圧に有意な変化は認められなかった。しかしながら、胸腺重量においては2種類のブラジル産プロポリス (Pro-Ba、Pro-Bb) による有意な増加作用が認められた。このような有意性は中国産プロポリス (Pro-C) では認められなかったが増加傾向は観察された。すでに報告されているように、プロポリスには免疫増強作用¹¹⁾を有することから、ブラジル産プロポリス (Pro-Ba、Pro-Bb) は中国産よりも強力な免疫機能促進作用を有する可能性が推察される。また、担癌マウスにおける抗癌剤による副作用の白血球減少症に対してプロポリスは、白血球数と赤血球数を上昇させる効果が報告¹⁰⁾されているが、今回使用したラットにおいては4週間投与後の血液成分に有意な変化は認められなかった。これは使用したラットが正常ラットであること、また使用したプロポリスの品質が異なることなどに起因すると考えられる。更に、3種類のプロポリスの4週間反復投与はラット摘出心房の拍動数、収縮力および摘出胸部大動脈の張力に有意な影響を示さなかった。即ち、経口的に摂取した場合プロポリスは循環機能に著しい影響は示さない可能性が大きいと言える。一方、*in vitro* 実験においては、摘出心房および胸部大動脈に対しブラジル産プロポリス (Pro-Ba、Pro-Bb) と中国プロポリス (Pro-C) との間で有意な相違が認められた。即ち前者は陽性変時作用を、後者は陰性変時作用を示した。このことは、同じプロポリスでも産地による違い、即ち起源植物とその成分の違いに基づくものと考えられ、今後これら有効成分について検討する必要がある。ただし、このような作用は共に高濃度の被検食品によって発現しているもので、常識的な量を経口的に摂取する限りにおいては、ヒトへ外挿すべき問題点はないものと思われる。しかし、循環器系治療薬との併用時における相互作用については、今後、検討する必要がある。

本実験において、4週間反復投与実験で用いた3種類のプロポリスのラットへの投与量は約20 mg/kg/dayであった。これをヒト (60 kg と想定して) における投与量に換算した場合、その投与量は1.2 g/dayとなる。プロポリス1日の摂取目安量はプロポリスエキスとして0.1-0.5 gであることから、幅はあるがヒトの使用量の2.4~12.0倍に相当する。従って本実験結果はこれら健康食品の1ヶ月の使用に関して著しく有害な影響はないことを示すものと思われる。しかしながら、薬物に対する動物の感受性はヒトのその1/10であるという報告¹³⁾もあることから、この摂取量は決して非現実的なものではない。特にこの投与量で胸腺重量が増加したことから、免疫抑制薬や免疫増強薬、さらに抗アレルギー薬や消炎剤との併用に伴う安全性について、即刻検

討する必要がある。

II. イチョウ葉エキスと医薬品の相互作用

イチョウ葉エキス長期経口投与により、肝臓中 CYP2B1/2、CYP3A1 および CYP3A2 の酵素が誘導されることはすでに報告³⁾した。CYP3A2 および CYP2B1/2 が代謝する医薬品としてはそれぞれニカルジピン¹³⁾ およびフェノバルピタール¹⁴⁾ がよく知られている。そこで、イチョウ葉エキスとニカルジピンおよびフェノバルピタールとの相互作用について検討した。なお、イチョウ葉エキスの投与期間と肝酵素誘導作用との関係を検討した結果、2週間の投与でも4週間とほぼ同等の酵素誘導が発現していることが明らかとなったので、投与期間は2週間とした。

実験の結果、経口投与されたニカルジピンによる降圧作用はイチョウ葉エキス長期投与により有意に減弱し、血中ニカルジピン濃度も有意に低下していた。また、経口投与されたフェノバルピタールによる催眠作用の導入時間はイチョウ葉エキス長期投与により有意に延長され、また持続時間はイチョウ葉エキス長期投与により有意に短縮された。この時の血漿中フェノバルピタール濃度もイチョウ葉エキス長期投与により有意に低下していた。イチョウ葉エキス投与群の血中濃度下面積とコントロール群のそれとの間に、ニカルジピンでは有意な差が認められたがフェノバルピタールでは低下傾向は観察されたものの有意差は認められなかった。これは、代謝量（誘導された酵素量）と、吸収量（消化管から血中に移行したニカルジピンおよびフェノバルピタールの量）のバランスの違いによるものと思われる。つまり、ニカルジピンの血中濃度はフェノバルピタールのその1/100ほどであり、吸収された量が少ないので肝代謝酵素の影響が大きく、一方、フェノバルピタールの吸収量は非常に大きいため肝代謝酵素の影響が少なく血中濃度下面積において有意差が認められなかったものと推察される。

本研究結果より、経口投与されたニカルジピンの降圧作用およびフェノバルピタールの催眠作用はイチョウ葉エキス長期投与により有意に減少、すなわち薬効の減弱が認められたが、このような相互作用は肝臓の薬物代謝酵素の誘導を介した現象であることが明らかにされた。

イチョウ葉エキスはドイツやフランスなどでは医薬品 (EGb761) として使用されているが、ヒトへの使用量は、慢性末梢動脈閉塞などの場合、120~320mg/day であり投与期間は4週間から1年間という報告^{16~20)}がある。本研究におけるイチョウ葉エキス摂取量は、0.5%含有飼料の場合、約375 mg/kg/day と概算される。この値を体重 60 kg に換算すると約 22.5 g/day となり、これはヒトでの服用量よりはるかに多い。しかしながら、前述したように動物に於ける薬物の感受性はヒトの1/10であるということ、また、ヒトにおいて x mg/60 kg の用量で経口投与された薬物の血中濃度と、動物において x mg/kg で経口投与された同薬物の血中濃度がほぼ等しいという報告¹³⁾からも、今回の実験で使用した投与量は決して非現実的なものではない。特定保健用食品以外の多くの新開発食品においては摂取量などに十分な指導や規制がなされていない現状を考えると、過剰摂取の危険性は十分考えられる。即ち今回観察された、肝酵素の誘導はヒトでも起こる可能性は否定できない。Cnivenne-Lavier ら²¹⁾は種々のフラボノイドの投与により、それぞれのフラボノイドの構造に関連した P-450 の誘導を起こすことをラットの実験で観察している。以上の知見より、本研究で用いたイチョウ葉エキスの長期・過剰摂取による肝臓薬物代謝の誘導は医薬品の代謝に影響し、治療に支障を来したり有害事象を引き起こす危険性が予想される。

一般的に「医薬品は副作用が起こるが、食品は安全で有害な作用は発現しない。」と考える人は多い。このような中で、保健機能食品、とりわけ特定保健用食品の制度が確立されたことは、数多くの健康食品の中から消費者が適切なものを選ぶ上で、正確な情報提供し、一つの指標を示すと言うことで意義深い。しかし、医薬品にかわる効能を食品に期待させる要因として考えた場合、その危険性については、今後注意深く見守って行く必要がある。特定保健用食品は身体の生理機能・組織機能の維持もしくは改善に役立つということでヒトにおける有効性を一応科学的な根拠のもとで明確化したものである。しかしどのくらい有効なのか、どのくらい食べれば効果がでてくるのか、そして長期間摂取しても副作用はでないのかなど、不明瞭な点が多い。さらにある疾患を有している患者が、医師から処方されている治療薬に加え、自己判断で特定保健用食品を使用した場合、結果として症状を悪化させたり予想もつかない相互作用による有害事象を引き起こす可能性は十分ある。実際臨床現場において入院患者が健康食品を保持使用していること、その有効性・安全についての情報不足のため薬剤師・医師も適切な指導ができないという状況がある。

このような背景のもとで、健康食品と医薬品の相互作用の可能性を薬理学的・薬物動態学的側面からスクリーニングする本研究は、消費者のみならず臨床現場で働く医療従事者にも有用な情報を提供するものであると考えられる。今後はさらに広範な食材についてスクリーニングし、重点的に精査すべき食品・食品素材を選別していく予定である。これまでは、明確な結果を出すことを優先したため、極力単一化合物に近い形の食品素材を選んで検討を加えてきたが、今後はより実際面での情報提供を重視する観点から、市販されている製品をも被検食材に加えて研究を進めていく予定である。

【要 旨】

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

健康食品として使用されている 3 種類のプロポリス (Pro-Ba、Pro-Bb、Pro-C) を被験食品として、Wistar ラットの 4 週間反復投与の影響について検討した。

1. 本研究に用いた 3 種類のプロポリスの 4 週間反復投与はラットの血圧と心拍に有意な影響を示さなかった。また、8 週齢から 12 週齢にかけての体重の変動にも影響しなかった。
2. 3 種類のプロポリスの 4 週間反復投与は肝臓、脾臓/体重比には影響しなかったが、2 種類のプロポリス (Pro-Ba、Pro-Bb) は胸腺/体重比を有意に増加させた。
3. 3 種類のプロポリスの 4 週間反復投与はラット摘出心房の拍動数および収縮力に有意な影響を示さず、また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による陰性変時変力作用にも影響しなかった。
4. 3 種類のプロポリスの 4 週間反復投与はラット摘出胸部大動脈の張力に影響せず、またノルアドレナリンの収縮作用や、アセチルコリンおよびニトロプルシッドナトリウムによる弛緩作用にも影響しなかった。
5. 摘出心房において、直接投与 (1 mg/ml) された 3 種類のプロポリスは、有意な変力作用を示さなかった。しかし、高濃度のブラジル産プロポリス (Pro-Ba、Pro-Bb) においては陽性変時作用を、中国産プロポリス (Pro-C) では陰性変時作用を示した。
6. 摘出胸部大動脈において、直接投与 (0.01-3 mg/ml) された 3 種類のプロポリスは弛緩作用を示し、特に中国産プロポリス (Pro-C) で著明であった。

本研究に用いた 3 種類のプロポリスはすべて、Wistar ラットの 4 週間反復投与において循環機能に有意な影響を示さなかった。しかし、2 種類のプロポリス (Pro-Ba、Pro-Bb) は胸腺/体重比を増加させたことから、プロポリス (Pro-C) に比べ免疫系への影響が強いことが示唆された。また、*in vitro* 実験における摘出心房および胸部大動脈への 3 種類のプロポリスの直接作用は、2 種類のプロポリス (Pro-Ba、Pro-Bb) とプロポリス (Pro-C) で違いが認められた。

II. イチョウ葉エキスと医薬品の相互作用

イチョウ葉エキス長期経口投与により、肝臓中 CYP2B1/2、CYP3A1 および CYP3A2 の酵素が誘導されることはすでに報告した。³⁾ CYP3A2 および CYP2B1/2 が代謝する医薬品としてはニカルジピンおよびフェノバルピタールが知られている。そこで、イチョウ葉エキスとニカルジピンおよびフェノバルピタールとの相互作用について検討した。

1. イチョウ葉エキス長期投与は、経口投与されたニカルジピンの血中濃度を減少させ、ニカルジピンの降圧作用を減弱させた。
2. イチョウ葉エキス長期投与は、経口投与されたフェノバルピタールの血中濃度を減少させ、催眠作用の睡眠導入時間を延長させるとともに、睡眠持続時間を減少させた。

本研究結果より、イチョウ葉エキス長期投与は経口投与されたニカルジピンの降圧作用およびフェノバルピタールの催眠作用の有意な減弱が認められた。

【参考文献】

- 1) 窪田洋子, 梅垣敬三, 林真知子, 篠塚和正, 国友 勝: ラット循環機能に及ぼすイチョウ葉エキスの影響, 日本食品化学学会誌, 7, 41-46 (2000)
- 2) 窪田洋子, 梅垣敬三, 田中直子, 水野英哉, 中村一基, 国友 勝, 篠塚和正: ラット循環機能に及ぼす各種健康食品の4週間反復投与の影響, 日本食品化学学会誌, 8, 149-154 (2001)
- 3) Shinozuka K., Umegaki K., Kubota Y., Tanaka N., Mizuno H., Yamauchi J., Nakamura K., Kunitomo M.: Feeding of Ginkgo biloba extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nifedipine in rats. *Life Sci.*, in press (2002)
- 4) 松野哲也: プロポリスに含まれる殺癌細胞物質の生物活性, 日本癌学会 50 回総会記事, 416 (1991)
- 5) Yritia M., Parra P., Iglesias E., Barbanoj J.M.: Quantitation of nifedipine in human plasma by on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 870, 115-119 (2000)
- 6) Aga H., Shibuya T., Sugimoto T., Kurimoto M., Nakajima S.: Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 945-946 (1994)
- 7) 河上洋一郎, 柳川 明, 水島 裕, 他: プロポリスの抗菌作用, 炎症, 17, 573-576 (1997)
- 8) Hayashi K., Komura S., Isaji N., Yagi K.: Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4,-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. *Chem. Pharm. Bull.*, 47, 1521-1524 (1999)
- 9) Sun F., Hayami S., Haruna S., Ogiri Y., Tanaka K., Yamada Y., Ikeda K., Yamada H., Sugimoto H., Kawai N., Kojo S.: In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1462-1465 (2000)
- 10) 高井英之, 山本 肇, 鈴木郁功: 水溶性プロポリスの抗癌剤(5-FU)との併用による抗腫瘍作用ならびに白血球減少症に対する効果. *医学と生物学.*, 132, 311-316 (1996)
- 11) Matsuno T., Jung S-K., Matsumoto Y., Saito M., Morikawa J.: Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res.*, 17, 3565-3568 (1997)
- 12) Ivanovska N.D., Dimov V.B., Bankova V.S., Popov S.S.: Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivate on complement activity in vivo. *J. Ethnopharmacology*, 47, 145-147 (1995)
- 13) 中島光好編: 続医薬品の開発第8巻薬効評価, pp.14 廣川書店
- 14) Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T and Waxman DJ: Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.*, 15; 261, 5051-5060 (1986)
- 15) 山寺博史: 抗てんかん薬の併用, 副作用 (相互作用). *医薬ジャーナル*, 33, 1927-1931 (1997)

- 16) Bulling B.: Konservative Behandlung der chronischen peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) im Stadium II b nach Fontaine mit physikalischem Training und Behandlung mit Ginkgo biloba-Extrakt EGB 761: Doppelblinde Studie im Placebo-Vergleich. Clinical Report, INTERSAN GmbH, Ettlingen, (1990)
- 17) Diehm C., Heinrich F., Morl H.: Clinical Res. Internal Rept., Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co., Karlsruhe (1990)
- 18) Mouren X., Caillard P., Schwartz F.: Advances in Ginkgo biloba Extract Reserch, vol. 3. Cardiovascular Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) (F. Clostre and F. V. DeFeudis, eds.), pp. 135-142. Elsevier, Paris (1994)
- 19) Witte S., Schanowki-Bouvier P., Artmann G.: Clin. Hemorheol. **15**, 566 (Abstr. No. P52) (1995)
- 20) Blume J., Kieser M., Holscher U.: Placebo-controlled double-blind study of the effectiveness of Ginkgo biloba special extract Egb 761 in trained patients with intermittent claudication VASA, **25**, 265-274 (1996)
- 21) Canivene-Lavier, M.C., et al., Toxicol., **114**, 19 (1996)

【研究発表】

論文発表

Ginkgo biloba extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelial intracellular calcium level

Life Sciences, 69(20), 2327-2336 (2001)

ラット循環器機能に対する各種健康食品の4週間反復投与の影響
日本食品化学学会誌, 8(3), 149-154 (2001)

Safety Dietary Supplement: Chronotropic and Inotropic Effects on Isolated Rat Atria

Biological Pharmaceutical & Bulletin, 25(2), 197-200 (2002)

Feeding of *Ginkgo biloba* extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nicardipine in rats

Life Sciences, in press (2002)

学会発表

Dahl食塩感受性ラットの循環器系に対するイチョウ葉エキス(GBE)の影響
第37回SHR学会、2001年10月5-6日、長崎

Induction of hepatic cytochrome P-450 by *Ginkgo biloba* extract (GBE) in rats

第75回日本薬理学会年会、2002年3月13-15日、熊本

特定保健用食品素材の安全性評価手法の検索

分担研究者 江頭 祐嘉合 千葉大学園芸学部

【研究目的】

高齢化社会の到来で人々の健康への関心が高まっている。高齢者だけでなく、働き盛りの中老年、またダイエットを考える若い世代も健康食品への関心が年々高まっている。いわゆる健康食品は医薬品と異なり食品であるため気軽に購入することが出来、また日常大量に摂取される可能性があるためその安全性に関しては十分検討しなければならない。特定保健用食品は、厚生労働省が安全性を確認し、認可した食品である。特定保健用食品は、その安全性は試験（微生物を用いた変異原性試験、ラット、ビーグル犬を用いた短期・長期の毒性試験、小核試験、血圧、心拍数試験等）で確認されている。しかし生体側の感受性など応答力の変化が予想される状態、例えば疾病にかかっている状態での安全性に関しては報告が少ない。米国の OTA (Office of Technology Assessment) のレポートによると食品の安全性を考える場合、食品中の有害物質が人間の健康に悪影響を与えるのは、その物質の毒性、食品中の濃度、その食品の摂取量、生体側の脆弱性が関与していると報告されている^{1,2)}。つまり健康なヒトや動物における一般の毒性試験から直ちに安全性が確定できるとは言い難い。ここで述べられているように食品の安全性を考える場合、生体側の脆弱性つまり応答力、感受性が変化している場合の安全性を試験することは重要である。そこで本研究ではラットを用い食品の安全性の評価手法を確立し、疾病に罹患している状態での特定保健用食品素材および健康食品が生体に及ぼす影響を検討することを目的とした。

本年度は

- 1) 各種疾病モデル動物の検索およびその作成・評価
- 2) 特定保健用食品素材および健康食品が短期および長期肝臓機能障害へ及ぼす影響について検討した。

疾病モデルとして、生活習慣病あるいは受療率、死因順位の比較的高い疾病として報告されている（平成 11 年）³⁾ 糖尿病、高脂血症、肝臓障害、腎臓障害モデルを作成した。

特定保健用食品素材として、特に広く使われている乳果オリゴ糖、フラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ラクチュロースを使用した。また健康食品として新聞やタウン誌広告にもっとも頻繁に広告されている⁴⁾ アガリクスを使用した。

【研究方法】

<研究 1>

安全性評価のための疾病モデルとして肝臓障害、腎臓障害、高脂血症、糖尿病のモデルを検索し、実験モデル動物の作成および評価を行った。

1) 動物実験および飼育方法

3・5 週齢の Wistar 系雄ラット（日本クレア）を用いた。ラットは室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ の環境下で飼育し、一定期間予備飼育後、実験に供した。飼料および水は自由に摂取させた。人工照明を用い 12 時間明(7:00-19:00)、12 時間暗(19:00-7:00)とした。薬剤などの感受性により一部の実験には SD 系雄ラットを用いた。動物実験に際しては、NIH ガイドラインそって十分な配慮のもとで行った⁵⁾。

2) 試薬

ラットへの投与試料として、フラクトオリゴ糖（和光純薬）、イソマルトオリゴ糖（和光純薬）、乳果オリゴ糖（横浜国際バイオ研究所）、ラクチュロース（森永乳業）、アガリクス（アイ・エム・ビー）を使用した。

市販の臨床測定キットは、コレステロールテストワコー、HDL・コレステロールワコー、トリグリセライド G テストワコー、アルブミン B テストワコー、クレアチニンテストワコー、尿素窒素 B テストワコー、グルコース B テストワコーを使用し、和光純薬工業より購入した。他にイアトロザイム TA・LQ（ヤترون）、アルカリ性ホスファターゼ測定用試薬 S（ヤترون）、デタミナー-T-BIL（協和メディックス）、デタミナー γ -GTP（協和メディックス）、NO₂/NO₃ Assay Kit・C（Colorimetric）（同仁化学）、ピューロマイシンアミノヌクレオシド(Sigma)、ガラクトサミン塩酸塩（Sigma）、 α -Naphthylisothiocyanate（Aldrich Chemical）を使用した。

1) 肝臓障害ラットの作成

1-1) ガラクトサミン肝臓障害⁶⁻⁸⁾

3 週齢 Wistar 系雄ラットを予備飼育後、標準飼料で一週間飼育した後に D・ガラクトサミン塩酸塩溶液を 300mg/ml(pH7.2 に調整)を滅菌フィルターで滅菌し、800mg/kg 体重の割合でラットの腹腔内に注射した。標準群には生理食塩水を同様に注射した。なお、D・ガラクトサミン投与の前後各 4 時間ずつ絶食させた。D・ガラクトサミン投与から 24 時間後にネンブタール麻酔下で開腹し、心臓より採血した。血清を分離後、トランスアミナーゼ活性を測定した。トランスアミナーゼ活性はイアトロザイム TA・LQ を用いて Lippi と Guidi の方法で測定した⁹⁾。

1-2) 四塩化炭素肝臓障害¹⁰⁾

3 週齢 Wistar 系雄ラットに標準飼料を与え、0.05%(w/v)のフェノバルビタールナトリウム水を自由摂取させると同時に四塩化炭素のオリーブ油溶液(50%(v/v))を背部皮下に週 2 回、12 週間注射し(1ml/kg 体重)、肝臓障害ラットを作成した。血清中のトランスアミナー

ゼ活性値の測定は実験 1 と同様に行った。

1-3) アセトアミノフェン肝障害¹¹⁻¹³⁾

5 週齢 Wistar 系雄ラットに標準飼料を与えた。標準飼料投与後 7 日目に滅菌した p-アセトアミドフェノール(和光純薬)溶液(35mg/ml) 700mg/kg 体重を腹腔内に注射した。標準群には生理食塩水を同様に注射した。p-アセトアミドフェノール投与前 18 時間および投与後 24 時間は絶食させた。p-アセトアミドフェノール投与から 24 時間後に解剖を行い、血液中のトランスアミナーゼ活性値の測定を実験 1 と同様に行った。

1-4) 胆汁うったい型肝障害¹⁴⁻¹⁶⁾

3 週齢の SD 系雄ラットを予備飼育後 10 日間標準飼料を与えた。10 日目に α -Naphthylisothiocyanate (ANIT) 150mg/kg 体重をオリーブ油に混ぜて、胃ゾンデを用い経口投与した。標準群には、試験群と同量のオリーブ油のみ経口投与した。ANIT 投与後 30 時間後から 18 時間絶食させた。解剖は ANIT 投与 48 時間後に行い、血清のビリルビン濃度、アルカリフォスファターゼ活性の測定を行った。

1-5) 慢性アルコール性脂肪肝

4 週齢 Wistar 系雄ラットに総カロリーの 35%アルコールを含む液体飼料を与え 35 日間飼育した。液体飼料は Thener ら¹⁷⁾の方法を参考に調製した。1,000Kcal/liter とした。各成分のエネルギー比は、タンパク質 18%、脂質 35%、しょ糖またはエタノール 35%、コーンスターチ 12%のものを用いた。一週間ごとに血清トランスアミナーゼ活性を測定した。解剖時には、血清トランスアミナーゼ活性、 γ -GTP、総コレステロール、トリグリセリド等を測定した。

2) 腎臓障害ラットの作成

ラットに腎臓障害を起こさせるには、アデニン添加食投与、腎臓摘出・切除、抗ラット腎糸球体基底膜ウサギ抗血清の注射、薬剤投与などの方法がある。本研究では腎臓障害を引き起こす薬剤としてピューロマイシンアミノヌクレオチド(PAN と略す)を使用した研究を行った。PAN をラットの腹腔に注射するとラット腎臓の糸球体、尿管に蓄積し、ダメージを与えネフローゼ症候群を発現させる。他にもレニン、サルファ剤、鎮痛解熱剤など腎臓障害を引き起こす薬物がある¹⁸⁾。

2-1) ピューロマイシンアミノヌクレオチド(PAN)誘導性腎臓障害¹⁸⁾

滅菌した生理食塩水に溶かした PAN (100mg/kg 体重) を予備飼育後の Wistar 系雄ラットの腹腔内に注射した。標準群には生理食塩水を同様に注射した。飼料は 40%カゼイン食を用いた。注射 8 日目に解剖を行い血液、尿のアルブミン、クレアチニン、尿素窒素、タンパク質等の測定を行った。

3) 糖尿病ラットの作成

3-1) ストレプトゾトシン誘導性糖尿病

SD系雄ラットに溶解したストレプトゾトシン溶液(pH4.5)を80mg/kg 体重を腹腔内に注射した。注射 11 日に尿中のグルコースをクリニカルテストペーパーでチェックし確実に糖尿病になったものを使用した。そして標準群と試験(糖尿病)群を標準食で 13 日間飼育し 13 日目に解剖を行い、血糖値等の測定を行った。

4) 高脂血症

4-1) 食餌性高コレステロール血症

SD系雄ラットにコレステロール1%、胆汁酸0.25%、ラード9%を含む食餌を10日間投与し、血清および肝臓のコレステロール値を上昇させた。10日目に解剖し血液および肝臓のコレステロール値等を測定した。

4-2) 薬剤性高コレステロール血症¹⁹⁾

Pluronic F-127(Sigma)を水に溶かしフィルター滅菌した溶液をSD系雄ラットの腹腔内に注射(1.5g/kg 体重)した。注射後1、2、3、4、7日後に尾静脈より採血し、血清コレステロール値を測定した。飼育期間中の飼料は標準飼料を用いた。

4-3) 高トリグリセリド血症

幾通りかの飼料組成を検討し(データは示していない)、SD系雄ラットに、果糖17.5%、ココナツ油20%を含む食餌を2週間投与した。2週間目に解剖し血清および肝臓脂質を測定した。

表1 飼料組成

	標準群	試験群
カゼイン	20	20
DLメチオニン	0.3	0.3
ミネラル	3.5	3.5
ビタミン	1.0	1.0
重酒石酸コリン	0.2	0.2
コーンスターチ	15	15
セルロース	5	5
しょ糖	50	17.5
フラクトース	0	17.5
ココナツ油	0	20
大豆油	5	0

<研究 2>

研究2では研究1のデータをもとに、特定保健用食品素材および健康食品を肝臓障害ラットに投与し成長、血液成分への影響について検討した。また、今回使用した特定保健用食品素材について書籍、学術論文等から情報を収集した。

特定保健用食品素材等が四塩化炭素肝障害ラットのトランスアミナーゼ活性等に及ぼす影響

1-1)実験飼料は AIN-93 の飼料に基づき調製した。特定保健用食品素材として乳果オリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ラクチュロース、イソマルトオリゴ糖を使用した。健康食品素材としてアガリクスを使用した。3週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。四塩化炭素(50%(v/v) オリーブ油溶液) 1ml/kg 体重 を背部皮下に注射した。飲料水はフェノバルビタール水(0.05%)を使用した。一ヶ月飼育後、ラットの尾静脈より採血し、血清中のトランスアミナーゼ活性値が等しくなるよう群分けをした。群分け後、試験試料を 10 日間投与し 10 日目に解剖した。

表 2 飼料組成 (%)

	標準群	オリゴ糖群	アガリクス群
Casein	20	20	20
L-Cystine	0.3	0.3	0.3
Sucrose	10	10	10
Dextrin	13.2	13.2	13.2
Soybean oil	7	7	7
Cellulose	5	5	5
Mineral mix, AIN-93	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix, AIN-93	1	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
Test substance	0	5	1
Tert-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
Cornstarch	100%になるようコーンスターチで調整		

Test substances: 乳果オリゴ糖 (LAC)、フラクトオリゴ糖 (FRU)、ラクチュロース (LTU)、イソマルトオリゴ糖 (ISO)、アガリクス (AGB) を添加した。

特定保健用食品素材等がガラクトサミン肝障害ラットのトランスアミナーゼ活性等に及ぼす影響

1-2) 5週齢の Wistar 系雄ラットを AIN-93 標準飼料で 10 日間予備飼育した後、平均体重が等しくなるように群分けした。ラットにガラクトサミン 600mg/kg 体重を腹腔内注射した。ガラクトサミン注射 24 時間後(最もトランスアミナーゼ活性が上昇する時間)に尾静脈から採血すると同時に、各試験試料を水に溶かし、オリゴ糖の群は 1g/head、アガリクスの群は 0.2g/head の試験試料を、胃ゾンデを用いて経口投与した。そしてガラクトサミン投与 24、48 時間後(試験試料投与 0, 24 時間後)の血清トランスアミナーゼ活性値を測定した。

統計処理

2 群間の比較は Student's t-test を行った。3 群以上の比較は、一元配置分散分析後、Scheffe の多重比較検定法に従って行い、危険率は 5 %とした。

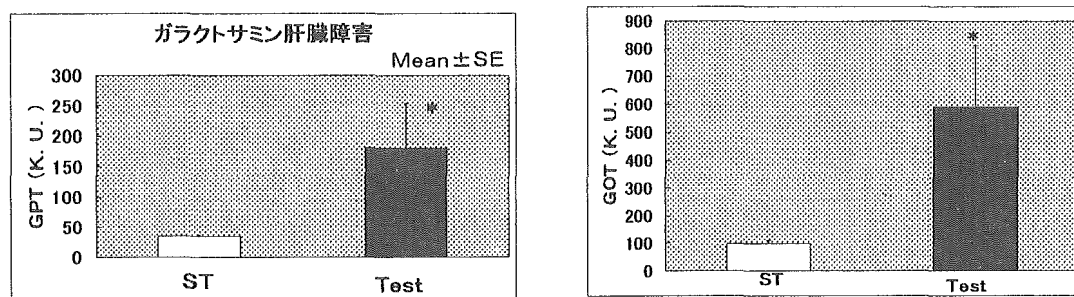
【実験結果】

<研究 1>

1-1) ガラクトサミン肝障害

本飼育期間中(8 日間)の体重増加量、飼料摂取量は、両群間で有意差は認められなかった。血清トランスアミナーゼ活性値は、肝臓障害(試験)群は標準群に比し有意に上昇した(図 1)。

図 1 ガラクトサミン投与が血清トランスアミナーゼ活性に及ぼす影響

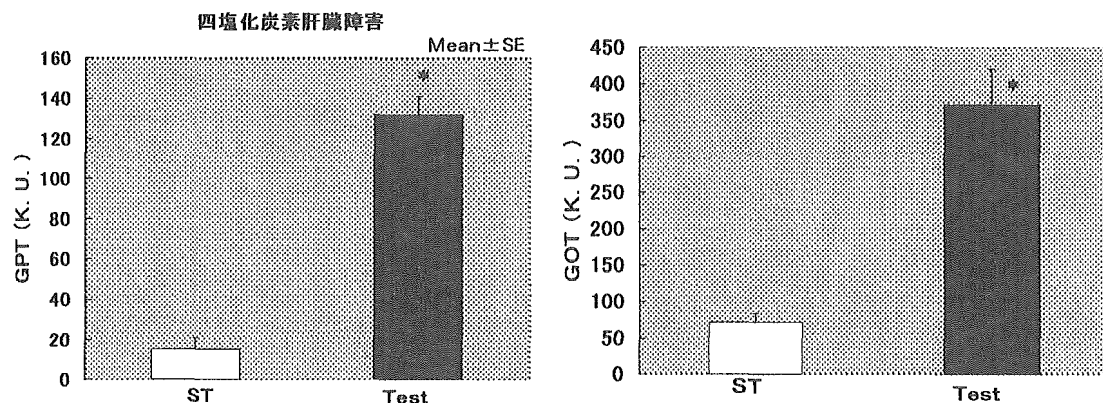


* : 有意差あり, ST, Test: n=8

1-2) 四塩化炭素肝臓障害

体重増加量は、肝臓障害群は標準群に比し有意に減少した。血清トランスアミナーゼ活性値は、肝臓障害群は標準群に比し有意に上昇した（図2）。

図2 四塩化炭素投与が血清トランスアミナーゼ活性に及ぼす影響



* : 有意差あり

ST, Test: n=6

1-3) アセトアミノフェン肝臓障害

アセトアミノフェン投与前の体重増加量および飼料摂取量に両群間で有意な差は認められなかった。アセトアミノフェン投与後（絶食）の体重減少量、肝臓重量は肝臓障害（試験）群で有意に高い値を示した。試験群のトランスアミナーゼ活性値は有意に高い値を示した（表3）。

表3 成長結果とトランスアミナーゼ活性値

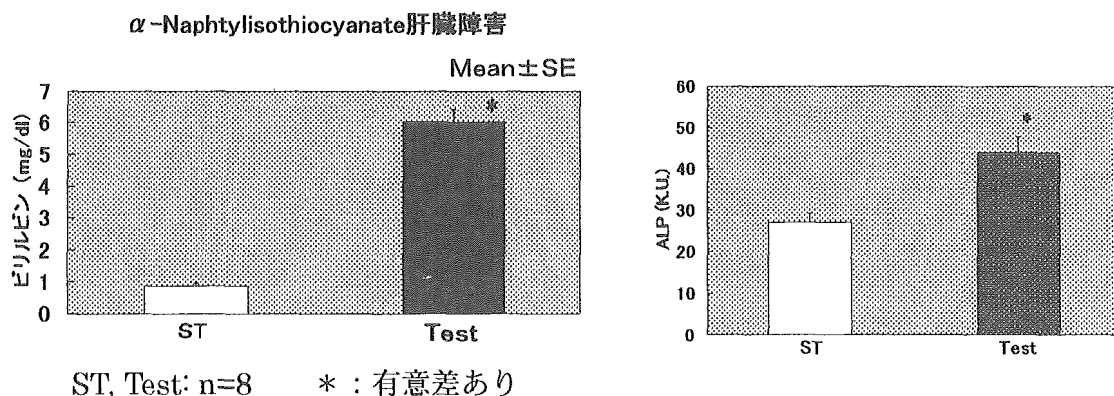
	標準群	試験群
初体重 (g)	165 ± 2	165 ± 3
体重増加量(g/6 d)	41.8 ± 1.3	42.8 ± 2.0
飼料摂取量(g/6 d)	97.9 ± 2.9	100 ± 2
体重減少量 (g)	9.75 ± 0.25	17.7 ± 0.4*
内臓摘出屠体重 (g)	149 ± 3	141 ± 3
肝臓 (g)	5.76 ± 0.20	7.08 ± 0.15*
ALT(I.U./l)	6.10 ± 1.06	13.9 ± 1.3*
AST(I.U./l)	29.9 ± 1.5	81.8 ± 5.3*

標準群 : n=4 試験群 : n=5

1-4) 胆汁うったい型肝臓障害

体重増加量、飼料摂取量は、両群間で差は認められなかった。試験群では肝重量が有意に上昇した。血清ビリルビン値およびアルカリフォスファターゼ(ALP)活性値は、肝臓障害(試験)群は標準群に比し有意に上昇した(図3)。

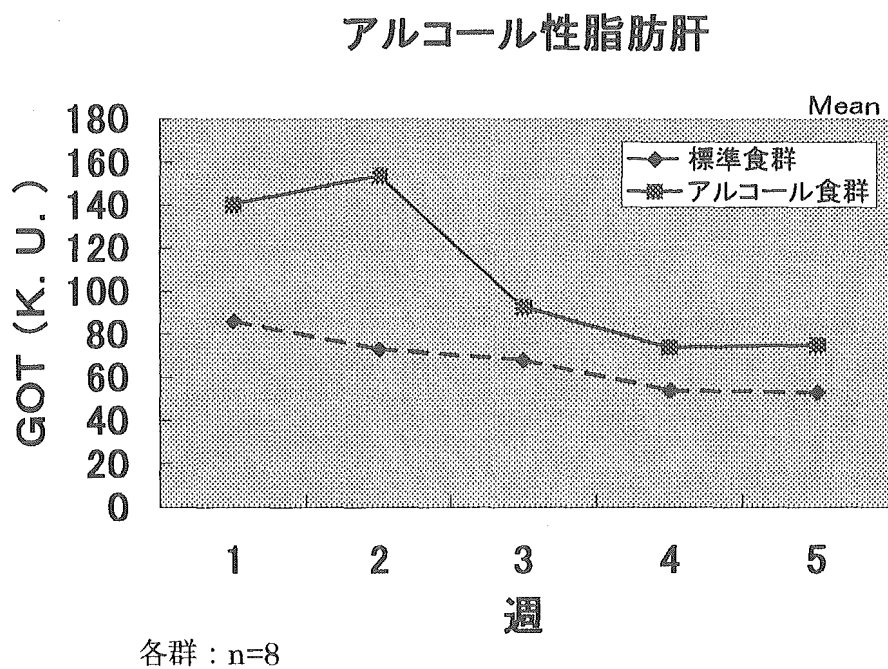
図3 ANIT投与が血清ビリルビン値およびALP活性に及ぼす影響



1-5) アルコール性肝臓障害

体重増加量、飼料摂取量はエタノール食群で有意に減少した(表4)。血清トランスアミナーゼ活性値は、肝臓障害群は2週目まで高い値を示したが3週目より徐々に減少していった(図4)。

図4 アルコール食投与が血清トランスアミナーゼ活性に及ぼす影響



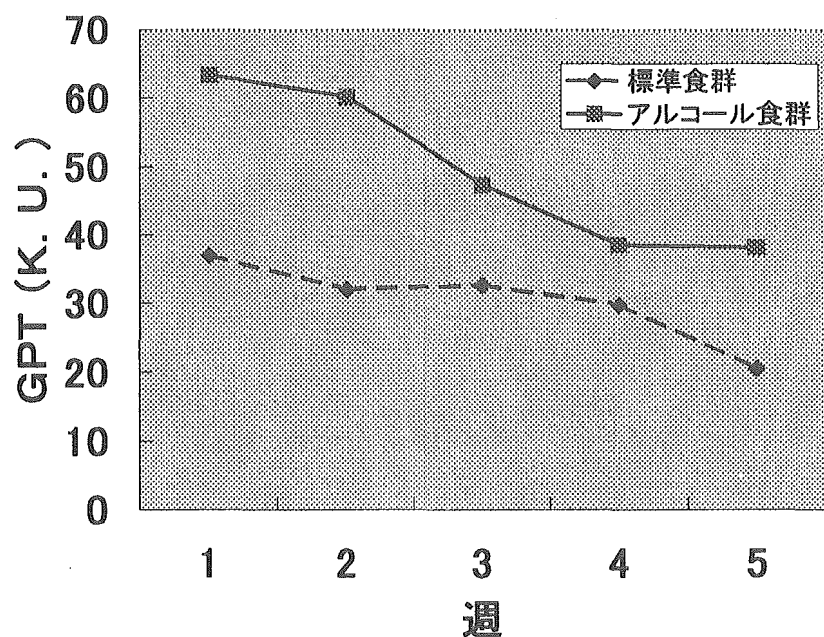


表 4 成長結果と血清成分

	標準群	試験群
初体重(g)	86.6 ± 1.0	87.1 ± 1.0
終体重(g)	271 ± 6	170 ± 3*
体重増加量(g/day)	5.26 ± 0.14	2.37 ± 0.09*
飼料摂取量(g/day)	67.6 ± 1.0	38.1 ± 0.8*
肝臓//内臓摘出屠体重(%)	4.93 ± 0.08	5.00 ± 0.06
血清成分		
Total Cholesterol (mg/dl)	95.0 ± 5.6	156 ± 5*
Endotoxin (pg/ml)	4.09 ± 1.81	4.53 ± 1.69
γ-GTP (IU/L)	0.71 ± 0.16	1.04 ± 0.12
Triglyceride (mg/dl)	52.4 ± 4.0	54.7 ± 4.4
Choline esterase (IU/L)	23.3 ± 1.3	43.6 ± 2.0*

* : 有意差あり