

まで, 薬事日報社 (2004)

- 10) <http://www.naturaldatabase.com./naturaldatabase/>
- 11) "Herbal Gram No. 55, P. 60 (2002)
- 12) ヘルスフード レポート, 山の下出版 (2003)
- 13) The Herb Society of America: Encyclopedia of Herbs & Their Uses, Dorling Kindersley, p.10 (1995)
- 14) 山田常雄ほか編: 生物学事典 第3版, 岩波書店, p.760 (1992)
- 15) 難波恒雄編: 生薬学概論, 南江堂 (1998)
- 16) <http://www.update-software.com/cochrane>
- 17) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>
- 18) <http://www.kenkou.metro.tokyo.jp/>
- 19) <http://www.mhlw.go.jp/topics/0102/tp0221-2.html>
- 20) <http://www.jhnfa.org/>
- 21) <http://www.kokusen.go.jp/>
- 22) Laemmli, U.K.: Nature 227, 680-685 (1970)
- 23) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354 (1979)
- 24) Shimura, F., Wasserman, R. H.: Endocrinology 115, 1964-1970 (1984)
- 25) Williamson, E. M.: Drug Saf. 26, 1075-1092 (2003)
- 26) Leonard, G. D., Fojo, T., Bates, S. E.: Oncologist. 5, 411-424 (2003)
- 27) Chan, L. M., Lowes, S., Hirst, B. H.: Eur. J. Pharm. Sci. 21, 25-51 (2004)
- 28) Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y.: Biochim. Biophys. Acta. 1619, 263-268 (2003).
- 29) Kolluri, S. K., Balduf, C., Hofmann, M., Gottlicher, M.: Cancer Res. 61, 8534-8539 (2001)
- 30) Gonzalez, F. J., Fernandez-Salguero, P.: Drug Metab. Dispos. 26, 1194-1198 (1998)
- 31) Shinozuka, K., Umegaki, K., Kubota, Y., Tanaka, N., Mizuno, H., Yamauchi, J., Nakamura, K., Kunitomo, M.: Life Sci. 70, 2783-92 (2002)
- 32) Jana, N.R., Sarkar, S., Yonemoto, J., Tohyama, C., Sone, H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 248, 554-558 (1998)

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】

近年、健康志向を目的とした食品（健康食品）が増加し、薬局、スーパー、専門店、インターネットなど至るところで販売され、繁用されている。しかしながら、その有用性、安全性に関する情報は販売側の一方的なものがほとんどで、中には過度の期待を与えるような表示や不適切な用量用法が表示されているものもある。一方、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、医師から処方された医薬品に加え、これらの健康食品を利用する可能性は十分考えられる。実際、複数の大学附属病院の調査で、通院患者の半数以上が健康食品を利用しており¹⁾、入院している患者でもその30%以上がなんらかの形で健康食品を利用していることが明らかにされている²⁾。また、これらの健康食品は医薬品的形状をしたものがほとんどであることから、大量摂取も可能であり、医薬品との相互作用の危険性が危惧される。このような現状において、科学的根拠に基づいた正確な健康食品に関する情報の提供は、消費者ばかりでなく医療従事者にとっても重要である。

我々はこれまでに、生体に対する各種健康食品の影響を高感度・多目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の応用を試み、若齢ラットの循環機能を中心に健康食品の有用性・安全性を薬物相互作用の観点からスクリーニングを行ってきた³⁻⁵⁾。その結果、イチヨウ葉エキスが肝臓の著明な肥大を起こすとともに肝代謝酵素の誘導を生じることを報告した⁶⁾。イチヨウ葉エキスは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を目的に医薬品⁷⁾として使用されているが、我が国においては健康食品として特に高齢者に使用されていると予想される。そこで、本研究では老齢ラットを用い、イチヨウ葉エキスの肝機能と循環機能に対する影響について検討した。更に、最近開発され注目されている生活習慣病モデルラットを用い、発病による神経伝達物質への影響について検討した。最後に、これまで用いた各種健康食品に対し高感度で反応した摘出胸部大動脈を用い、これに対する健康食材に対する影響を比較した。

今年度の検討項目

- (1) 老齢ラットの肝機能・循環機能におよぼす被験食材の影響
- (2) 生活習慣病ラットにおよぼす被験食材の影響（基礎データとしての神経伝達物質の変化）
- (3) 若齢症状ラットの摘出胸部大動脈に対する被験食材の比較

1. 老齢ラットに対するイチョウ葉エキスの安全性および有用性に関する検討

【研究の背景】

我々はこれまでに若齢ラットを用い各種健康食品の循環機能に対する影響を安全性・有効性の面からスクリーニングを行い³⁻⁵⁾、イチョウ葉エキスが肝臓の著明な肥大を起すとともに肝代謝酵素の誘導を生じることを報告した。イチョウ葉エキスはヨーロッパにおける医薬品としての効能から高齢者に利用されることが予想される。そこで、老齢ラットの肝機能と各種循環機能に対するイチョウ葉エキス 4 週間反復摂取の影響について検討した。

【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 (18 ヶ月齢、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 1 年間飼育した後に使用した (実験開始時体重 374 g—488 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。

ヘパトサルファイン注射液 (第一製薬、東京)、塩酸ニカルジピン製剤 (山之内製薬、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)、ニトロプルシッドナトリウム (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)。

2. 投与実験

(1) 4 週間反復投与実験

ラットは 1 群 5 匹としてコントロール食群と GBE 添加食群の 2 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) を、GBE 添加食群には 0.5% GBE を添加した市販粉末飼料を自由摂取させた。

3. 循環機能測定に関する実験手技

(1) ラット循環機能 (心拍数・血圧) におよぼす影響

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) 肝色素(BSP)排泄能、GOT および GPT におよぼす影響

4 週間後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下でスルホプロモフタレインナトリウム (BSP ;

へパトサルファイン注射液) 50 mg/kg を大腿静脈より負荷、20 分後に腹部大動脈から採血し実験に供した。血液を遠心分離 (3000 rpm、10 分間) して得られた血清中の BSP を定量するとともに GOT、GPT をトランスアミナーゼ C II-テストワコー (和光純薬、大阪) を用いて測定した。

(3) ラット摘出心房におよぼす影響

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ィ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 (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。

(4) ラット摘出胸部大動脈におよぼす影響

ラットから摘出した胸部大動脈より、幅 2~3mm 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°C 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。

4. 統計処理

データは全て 3 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】

1. 体重、肝臓および胸腺におよぼす影響

表 1 に示すように 0.5%イチョウ葉エキス 4 週間反復摂取後の体重、体重あたりの肝臓および胸腺の重量比に対し GBE 群は有意ではなかったが増加傾向が認められた。

表 1 体重、肝臓および胸腺に対するイチョウ葉エキス 4 週間反復投与の影響

	Control	GBE
体重 (g)	419.9±33.7	450.8±17.0
肝臓/100 g 体重	3.64±0.17	3.94±0.28
胸腺/100 g 体重	0.035±0.006	0.048±0.005

Control : コントロール (n=5), GBE : イチョウ葉エキス (n=5). 平均±標準誤差.

2. 肝色素(BSP)排泄能におよぼす影響

表2はBSP(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)静注20分後の血清中濃度を示したものである。コントロール群に比べGBE投与群において有意なBSP濃度の減少が認められた。

表2 BSPに対するイチヨウ葉エキス4週間反復投与の影響

	Control	GBE
BSP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	253.2 \pm 13.3	183.5 \pm 6.9**

Control: コントロール (n=5), GBE: イチヨウ葉エキス (n=5).

**コントロール群との有意差が危険率1%未満のもの。平均 \pm 標準誤差。

3. 血清中 GOT および GPT におよぼす影響

表3は、血清 GOT および GPT 濃度を示したものである。GOT および GPT ともにコントロール群と GBE 投与群との間に有意な差は認められなかった。

表3 GOT および GPT に対するイチヨウ葉エキス4週間反復投与の影響

	Control	GBE
GOT (Karmen)	28.4 \pm 5.2	37.2 \pm 2.0
GPT (Karmen)	140.3 \pm 8.3	125.3 \pm 4.1

Control: コントロール (n=3), GBE: イチヨウ葉エキス (n=3). 平均 \pm 標準誤差。

4. 血圧および心拍数におよぼす影響

4週間投与期間中の心拍数および血圧に対するGBEによる有意な変化は認められなかった(図1)。

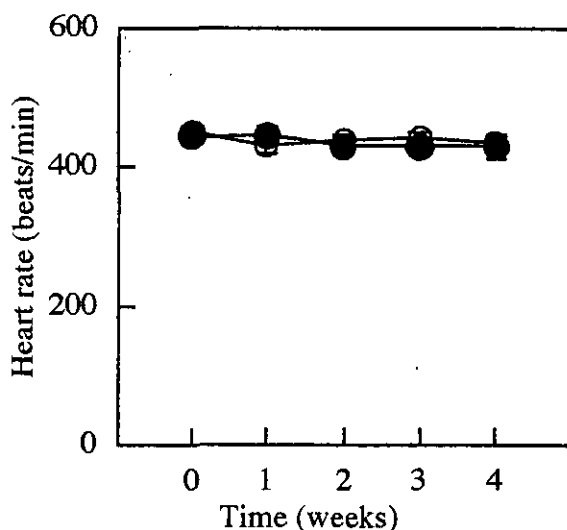


図1a 老齢ラットにおける心拍数(Heart rate)に対するイチヨウ葉エキス4週間反復投与の影響

●: コントロール (n=5), ○: イチヨウ葉エキス (n=5). 平均 \pm 標準誤差。

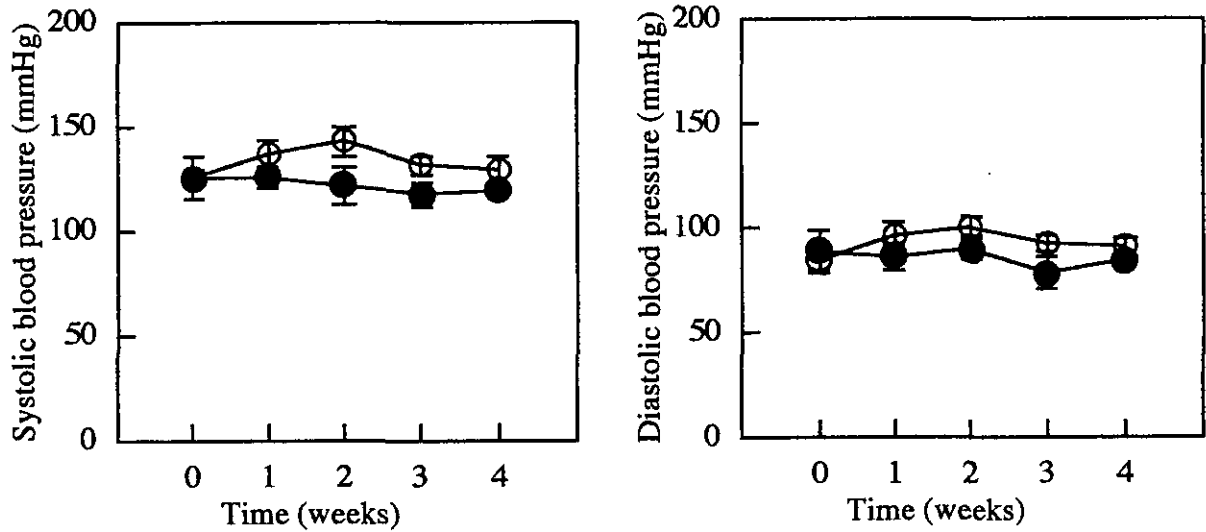


図 1b 老齢ラットにおける収縮期血圧(Systolic blood pressure)および拡張期血圧(Diastolic blood pressure)に対するイチョウ葉エキス 4 週間反復投与の影響
 ● : コントロール (n=5), ○ : イチョウ葉エキス (n=5). 平均±標準誤差.

5. ニカルジピンの降圧作用におよぼす影響

図 2 は、コントロール群と 0.5%GBE 群のラット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、4 時間後において有意な減弱が認められた。なお、脈圧および心拍数はニカルジピンにより影響されなかった。

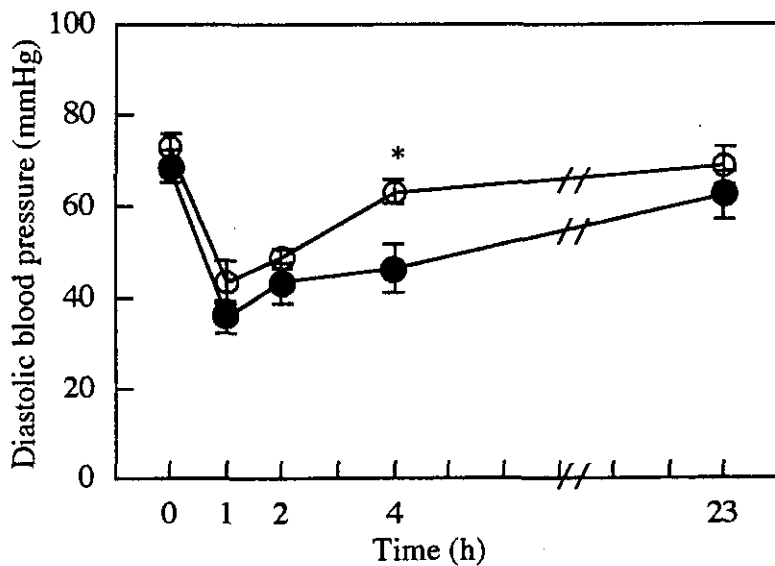


図 2 a 拡張期血圧 (Diastolic blood pressure) におけるニカルジピン (30 mg/kg 経口投与) の降圧作用に対するイチョウ葉エキス 4 週間反復投与の影響
 ● ; Control (n=5), ○ ; 0.5% GBE (n=5). 平均±標準誤差. *p<0.05 from control.

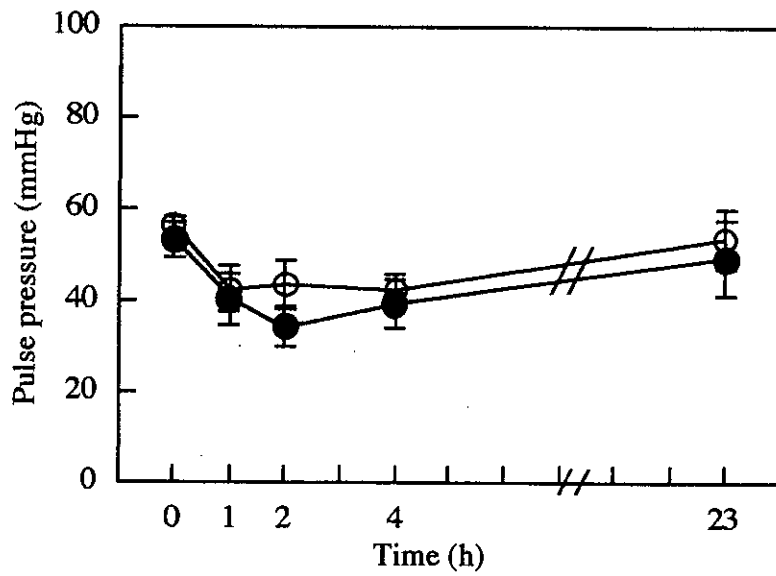


図2b 脈圧 (Pulse pressure) におけるニカルジピン (30 mg/kg 経口投与) の降圧作用に対するイチョウ葉エキス4週間反復投与の影響

● ; Control (n=5), ○ ; 0.5% GBE (n=5). 平均±標準誤差.

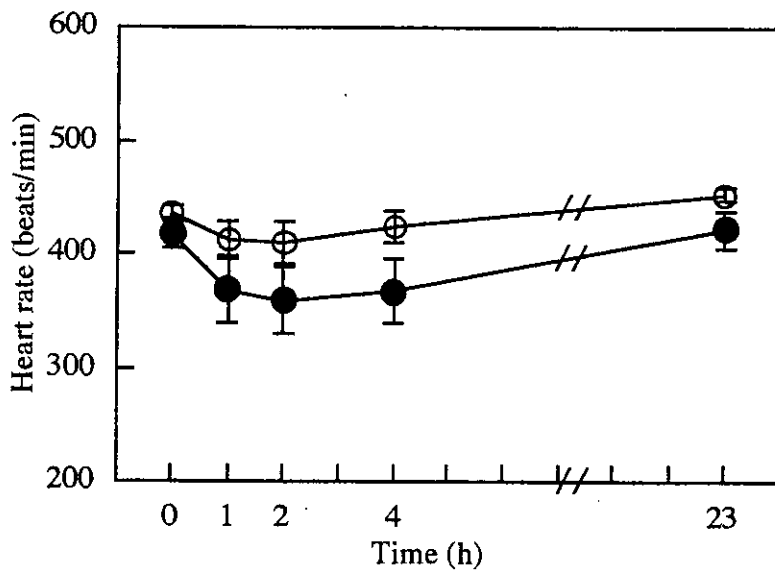


図2c 心拍数 (Heart rate) におけるニカルジピン (30 mg/kg 経口投与) の降圧作用に対するイチョウ葉エキス4週間反復投与の影響

● ; Control (n=5), ○ ; 0.5% GBE (n=5). 平均±標準誤差.

6. 摘出循環器系臓器におよぼす影響

(1) 心臓機能に対する影響 (in vitro 実験)

GBE を 4 週間投与した摘出心房において、イソプロテレノール (ISO) による陽性変時変力作用に、有意な変化は認められなかった (図 3)。さらに、アセチルコリン (ACh) による陰性変時変力作用にも有意な変化は認められなかった (図 3)。

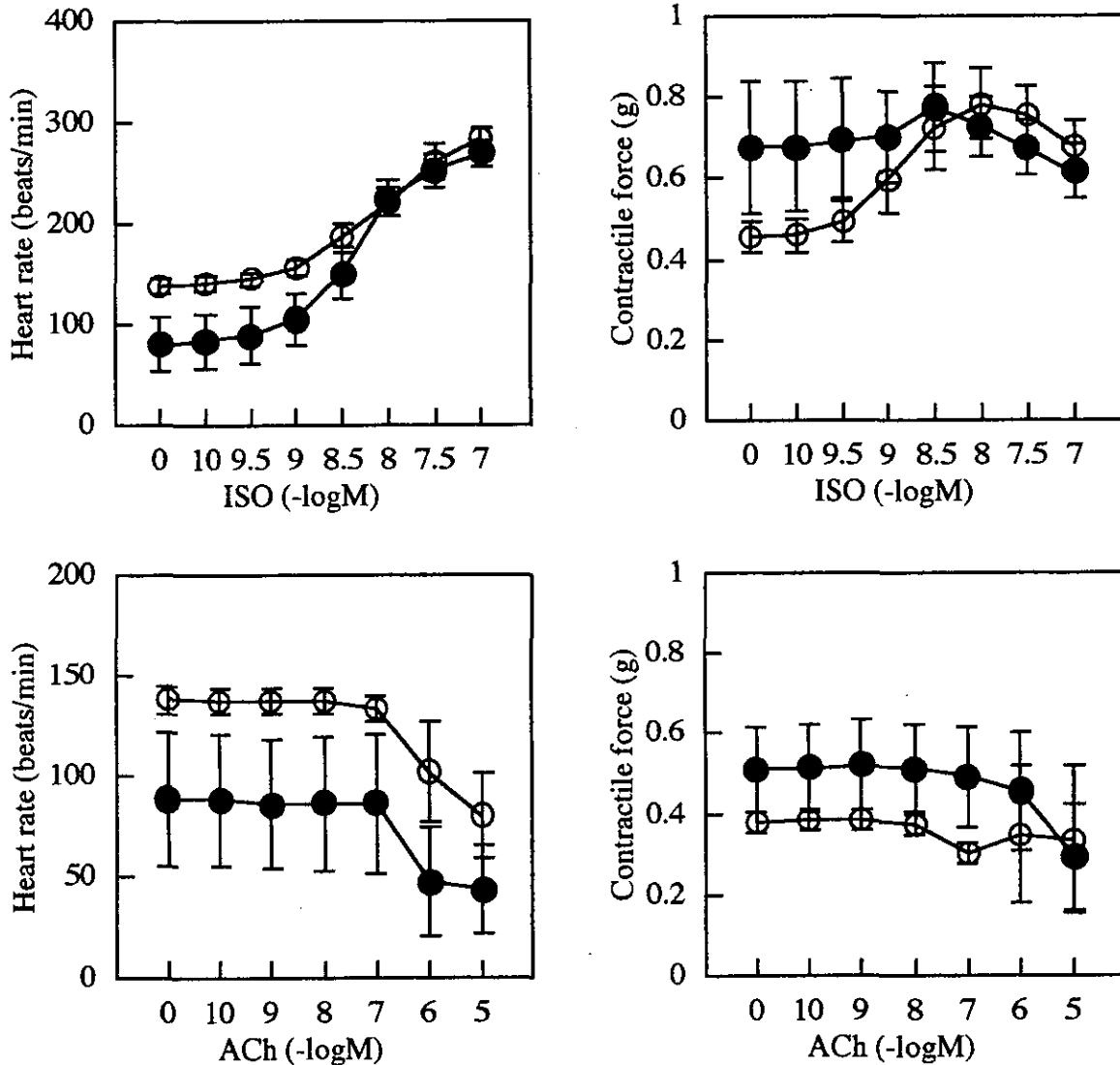


図 3 ラット摘出心房標本におけるイソプロテレノール (ISO) の陽性変時変力作用およびアセチルコリン (ACh) の陰性変時変力作用に対するイチョウ葉エキス 4 週間反復投与の影響

● : コントロール (n=5), ○ : イチョウ葉エキス (n=5). 平均±標準誤差.

(2) 血管機能に対する影響 (in vitro 実験)

GBE を 4 週間投与した Wistar ラットの摘出胸部大動脈において、ノルアドレナリンによる収縮反応の有意な増強作用が認められた (図 4)。また、図 5 に示したようにアセチルコリン (ACh) およびニトロプルシッドナトリウム (SNP) による弛緩反応の濃度反応曲線には有意な変化は認められなかった。

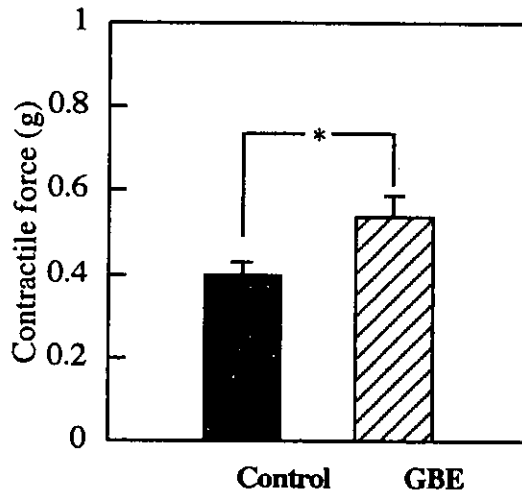


図4 ラット摘出大動脈標本におけるノルアドレナリン($10^{-7}M$)の収縮反応に対するイチヨウ葉エキス4週間反復投与の影響

Control: コントロール (n=10), GBE: イチヨウ葉エキス (n=10). 平均±標準誤差.

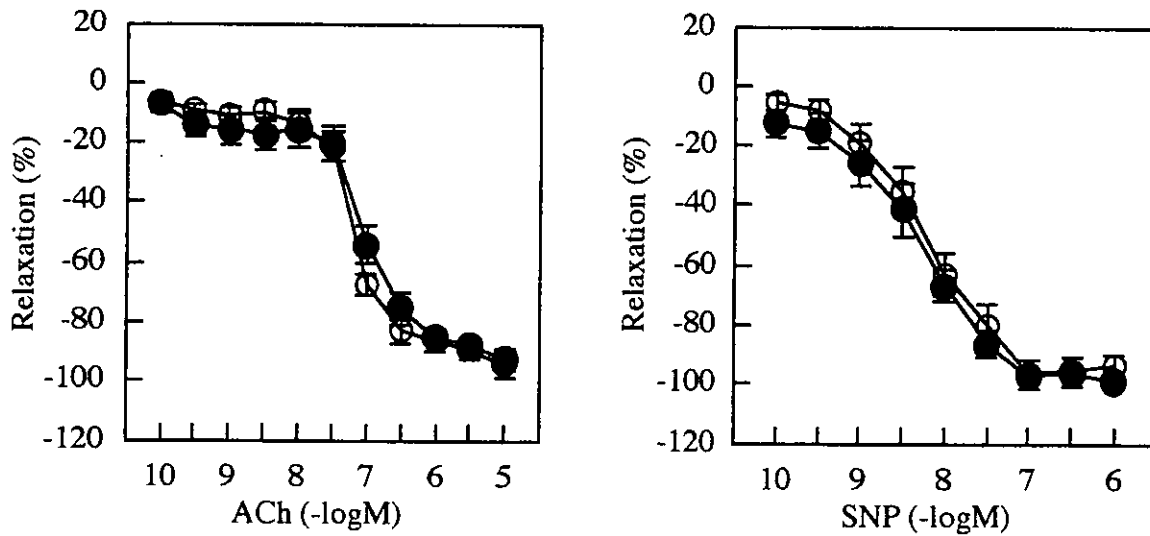


図5 ラット摘出大動脈標本におけるアセチルコリン (ACh) およびニトロプルシッドナトリウム (SNP) の弛緩作用に対するイチヨウ葉エキス4週間反復投与の影響

●: コントロール (n=10), ○: イチヨウ葉エキス (n=10). 平均±標準誤差.

【考察】

ラットの場合、寿命はだいたい3年で、これはヒトに換算すると約100歳くらいであることより、今回実験に使用した30ヶ月齢ラットは単純に計算すると約83歳くらいである。これまでに使用した若齢ラットは8週齢であることより16倍生存した老齢ラットである。

その結果、イチヨウ葉エキス反復投与による若齢ラットでの著明な肝臓重量の増加は、老齢ラットでは増加傾向は認められたものの有意ではなかった。

一方、肝機能検査薬であるBSPを静注後の血清中濃度は、コントロール群に比べGBE投与群において有意なBSP濃度の減少が認められた。若齢ラットにおける血清中濃度(47.8±8.2 µg/ml)⁹⁾までは回復していないものの老齢ラットにおける肝機能不全の有意な改善作用が認められた。

更に、老齢ラットにおけるイチヨウ葉エキスの長期投与と医薬品(ニカルジピン)の相互作用を調べるため、ニカルジピン経口投与後の降圧作用を測定したところ、拡張期血圧は若齢ラットの場合、イチヨウ葉エキス反復投与による減弱作用が2および4時間に認められた^{9,10)}のに対し、老齢ラットでは4時間において有意な降圧作用の減弱が認められただけであった。このことは、若齢ラットでの肝臓重量の著しい増加が老齢ラットでは認められなかったことから酵素誘導が減弱する事を示している。

一方、イチヨウ葉エキス反復投与後の摘出大動脈標本に対する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変化は、若齢ラットの場合と同様老齢ラットでも有意な弛緩作用は認められなかった。我々はすでに、イチヨウ葉エキスが高血圧ラット(SHR)の血圧を有意に低下させ、正常血圧動物には影響しないことを、若齢ラットを使用した実験で示している。また、この時の高血圧ラットの血管の弛緩機能は有意に促進されていることも見だし、これがイチヨウ葉エキスによる血管内皮細胞へのカルシウムイオンの取込促進作用と密接に関連していることも報告している⁶⁾。以上の知見を考え合わせると、老齢ラットではイチヨウ葉エキスの作用点である内皮細胞の機能低下が重要であることが推察される。

イチヨウ葉エキスには、脳循環改善作用とそれにとまなう痴呆への有用性が期待され、また末梢循環障害の改善も期待されていると思われる。このような機能は特に老人にとって必要性が高いものであり、その検討に際しても加齢という要因を加味した検討が大切である。その点で、本研究で得られた知見は、重要な情報を提供するものと思われる。イチヨウ葉エキスに関しては今後、薬物相互作用の観点から以下の点を解明し、その有用性を確立していく必要があると思われる。

1) 海馬の微小循環に対する影響：

前年度に発表した海馬生切片を使用した微小血管機能測定方法を確立し、これを用いて健康食材の脳循環促進作用を検討する。更に、脳循環改善薬との併用効果についても検討する。

2) 神経伝達機能に対する影響：

次項に記載された方法を確立し、これを用いて神経伝達機能。更に免疫機能に対する被験食材の影響を検討する。更に、神経機能改善薬・免疫作用薬との併用効果についても検討する。

3) 生活習慣病に対する影響：

次項に記載された病態モデル動物を使用し、上記スクリーニングにより有望と認められた被験食材の有用性を検討する。更に、臨床用医薬品との併用効果についても検討する。

II. 生活習慣病ラットにおける神経伝達物質の変化

【研究の背景】

ライフスタイルの変化により、高脂血症、高血圧、糖尿病、肥満に代表される生活習慣病を併せ持つ患者が増大している。現在、これら生活習慣病の改善を目的に多くの健康食品が市販されている。本研究ではこれらのモデル動物である生活習慣病ラットを用い、生活習慣病が自律神経系の伝達物質にどのような影響を及ぼすか、更に、これらの物質が健康食品の摂取による生活習慣病の改善を示す指標となりえないかどうかについて検討した。今回は生活習慣病モデルラットと比較するため、生活習慣病を有しない対照ラットである Wistar Kyoto ラットおよび高血圧のみを有する高血圧自然発症ラットについても検討した。神経伝達物質としては、胸腺および脳中のアセチルコリンの測定を行った。アセチルコリン神経系は記憶、学習等に深く関係しており、アルツハイマー病を含む痴呆症で著明な変化が見られる神経系である。シナプス間隙に放出されたアセチルコリンは速やかにアセチルコリンエステラーゼによりコリンに分解される。そのため、本実験ではアセチルコリンおよびコリン量を定量した。

【研究方法】

1. 実験材料

(1) 実験動物

実験には Wistar Kyoto ラット (WKY)、高血圧自然発症ラット (SHR) と生活習慣病モデルラット (SHR-*cp*) (18 週齢、雄性、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。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

以下の薬物を適宜溶解させて実験に供した。

塩化アセチルコリン (第一製薬、東京)、塩化コリン (シグマ、東京)、ペントバルビタールナトリウム (東京化成、東京)。

2. 胸腺および脳中コリンおよびアセチルコリンの HPLC 分析法

ラットから摘出した胸腺、脳から海馬、小脳、脳幹および大脳皮質を得、コリンおよびアセチルコリン量を定法に従って測定した¹¹⁾。

3. 統計処理

データは全て 3 例以上の平均値と標準誤差で示した。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】

1. 体重、心拍数および収縮期血圧の比較

実験開始時の体重、心拍数および収縮期血圧を表 4 に示す。SHR-cp は WKY および SHR 群に比べ、体重の有意な増加、心拍数の減少が認められた。更に、高血圧を発症している SHR および SHR-cp は WKY に比べ、有意な収縮期血圧の増大が認められた。

表 4 実験開始時体重、心拍数および収縮期血圧

	WKY	SHR	SHR-cp
体重 (g)	330.5±3.6	332.6±4.2	482.2±8.4**
心拍数 (beats/min)	442.0±9.9	445.4±14.9	399.4±12.6*
収縮期血圧 (mmHg)	117.9±3.0	190.8±4.3**	164.6±6.3**

WKY : Wistar Kyoto ラット (n=12), SHR : 高血圧自然発症ラット(n=12)、SHR-cp : 生活習慣病モデルラット (n=12). *,** WKY 群との有意差が危険率 5, 1%未満のもの。平均±標準誤差。

2. 胸腺中コリンおよびアセチルコリンの測定

胸腺重量を表 5 に示す。WKY 群に比べ、SHR および SHR-cp 群は有意な胸腺重量の減少が認められた。

表 5 胸腺重量

	WKY	SHR	SHR-cp
胸腺 (g)	0.174±0.009	0.146±0.008*	0.116±0.011**#

WKY : Wistar Kyoto ラット (n=12), SHR : 高血圧自然発症ラット(n=12)、SHR-cp : 生活習慣病モデルラット (n=12). *,** WKY 群との有意差が危険率 5, 1%未満のもの。# SHR 群との有意差が危険率 5%未満のもの。平均±標準誤差。

胸腺中コリン、アセチルコリンおよびその合計量を図 6 に示す。その結果、蛋白当たりのコリンおよびアセチルコリン量は WKY 群に比べ SHR および SHR-cp 群に有意な減少が認められた。

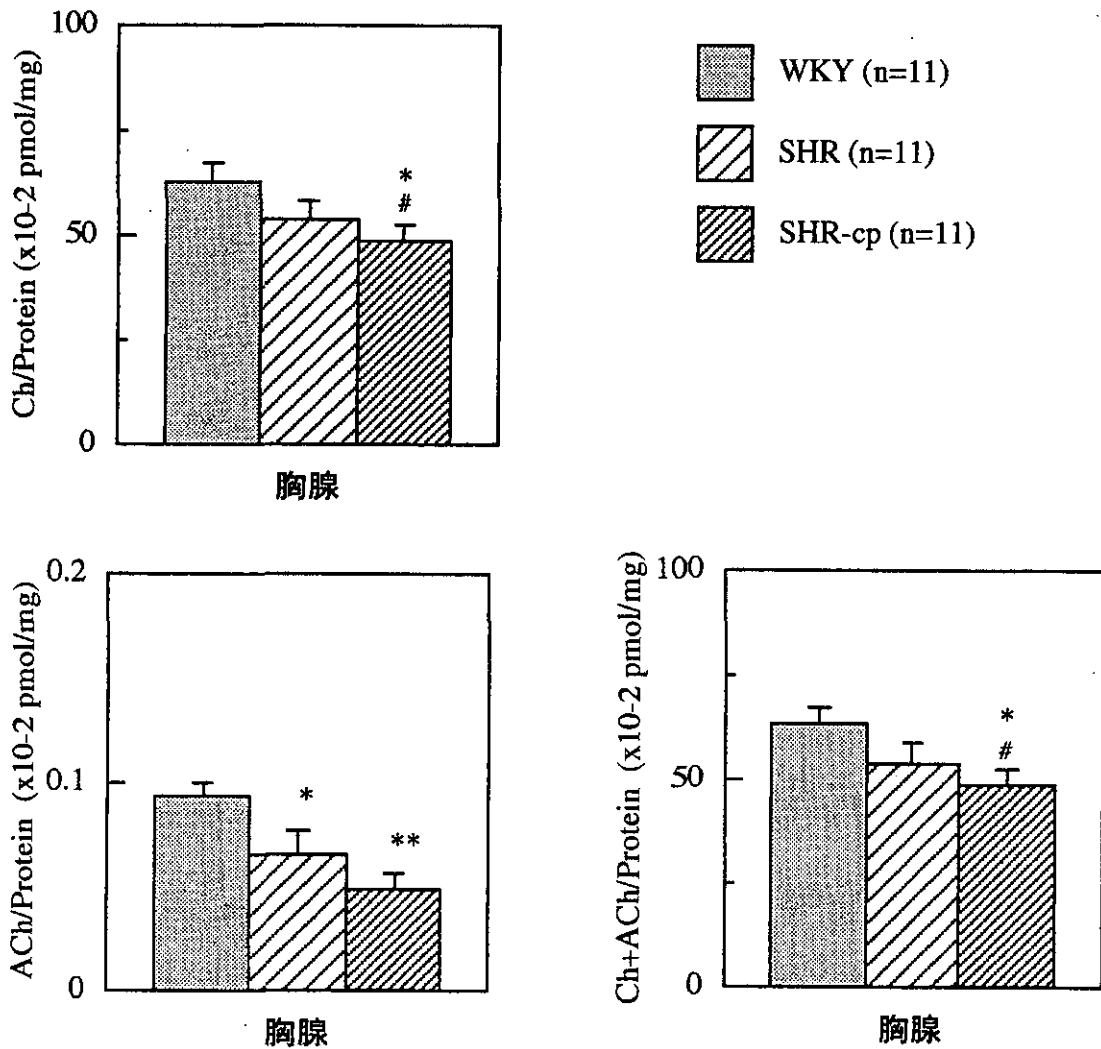


図6 胸腺中コリン(Ch)およびアセチルコリン(ACh)量

WKY : Wistar Kyoto ラット, SHR : 高血圧自然発症ラット, SHR-cp : 生活習慣病モデルラット.

*,** WKY 群との有意差が危険率 5,1%未満のもの. # SHR 群との有意差が危険率 5%未満のもの.
平均±標準誤差.

3. 脳中コリンおよびアセチルコリンの測定

脳中コリン、アセチルコリンおよびその合計量を図 7 に示す。その結果、海馬および脳幹において、蛋白当たりのコリンおよびアセチルコリン量は WKY、SHR および SHR-cp 群間に有意な変化は認められなかった。SHR-cp 群の大脳皮質中コリン量は、SHR 群に比べ有意な減少が認められ、また、SHR-cp 群の小脳中アセチルコリン量は、WKY 群に比べ有意な減少が認められた。

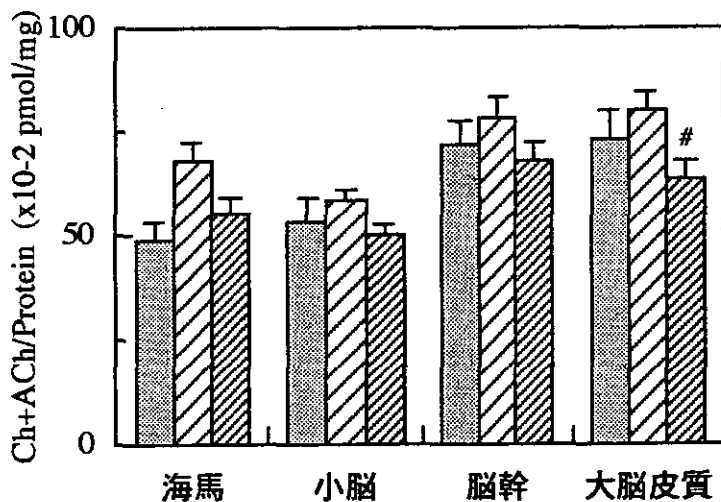
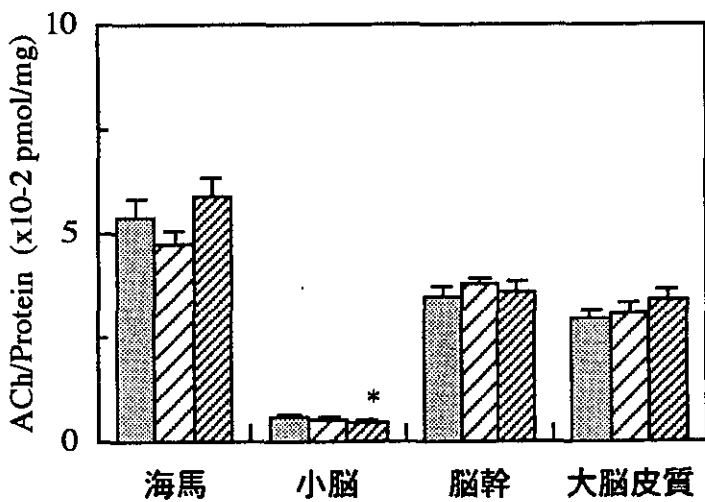
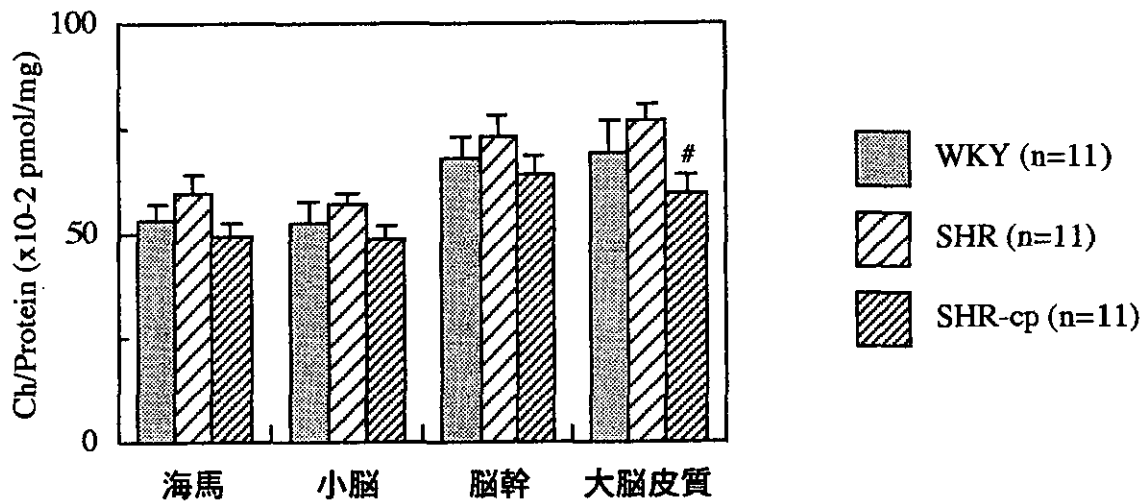


図7 脳中コリン(Ch)およびアセチルコリン(ACh)量

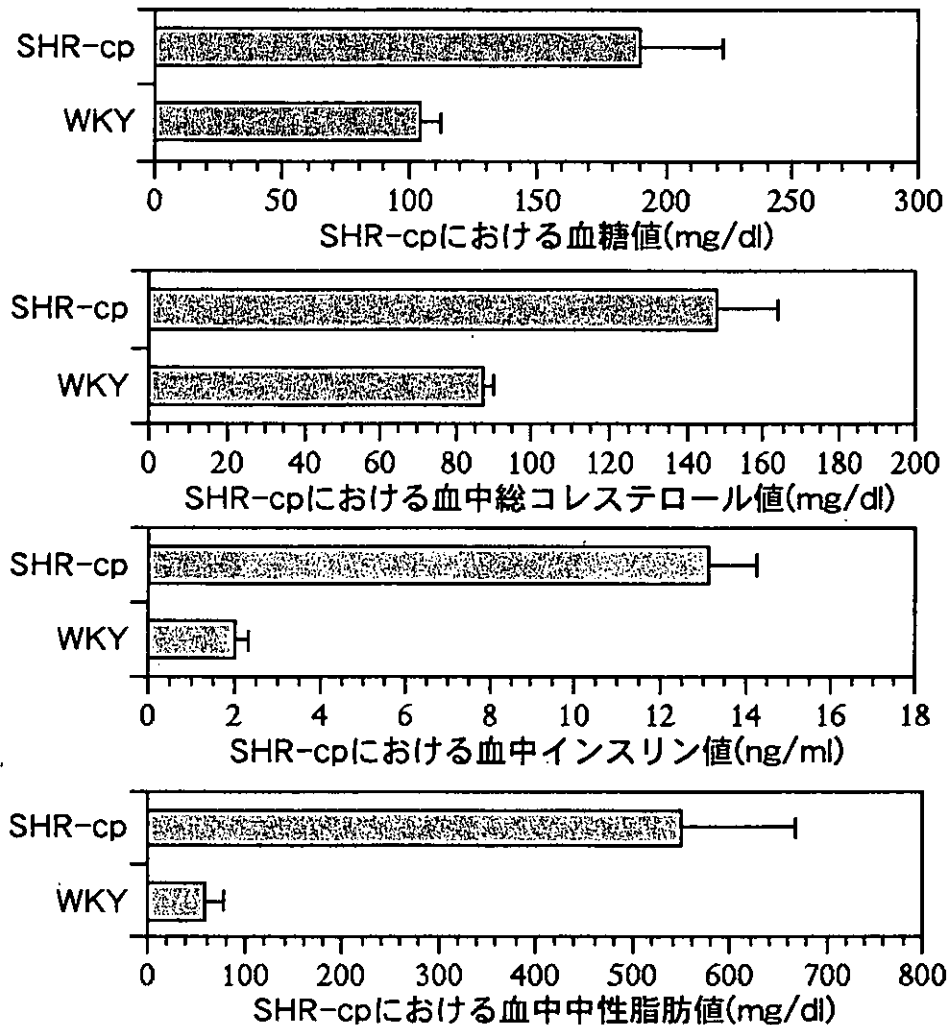
WKY : Wistar Kyoto ラット, SHR : 高血圧自然発症ラット, SHR-cp : 生活習慣病モデルラット.

* WKY 群との有意差が危険率5%未満のもの. # SHR 群との有意差が危険率5%未満のもの.

【考察】

胸腺は免疫機能の発達に極めて重要な働きをし、加齢とともに退縮して脂肪組織に置き変わって行くことが知られている。本実験において、生活習慣病ラットの胸腺重量はSHRおよびWKYに比べ有意な減少が認められた。更に、SHRにおいてWKYに比べ有意な胸腺重量当たりのアセチルコリン量の減少が報告されている¹²⁾。今回の実験結果においても、WKYに比べSHRおよび生活習慣病ラットにおいて、蛋白当たりのアセチルコリン量の減少が認められた。コリンおよびコリンとアセチルコリンの合計量にも減少傾向が認められ、生活習慣病ラットにおいてのみ有意差が認められた。

脑中コリンおよびアセチルコリンは、生活習慣病ラットの小脳においてのみアセチルコリンの有意な減少が認められた。一方、コリンおよびアセチルコリンの合計量は、生活習慣病ラットの大脳皮質においてのみ有意な減少が認められた。



上図は今回使用した生活習慣病ラット(SHR-cp)の病態の基本的パラメータを示したものであるが、高血糖、高脂血症および高インスリン血症を呈している。これに加え前述したように高血圧症状と肥満もあり、更に食事量も過食の状態にある。このような病態モデルを使用した健康食材の研究を行うことは、より実用的な知見を得るために必要不可欠であると思われる。

Ⅲ. 各種健康食材の抽出胸部大動脈に対する影響

【研究の背景】

これまでに循環器系におよぼすことが予想される健康食品食材をスクリーニングし、実際に検討したところ、ほぼすべての被験食材が抽出胸部大動脈において弛緩作用を示した。従って、抽出胸部大動脈は、比較的感度の高いスクリーニング用標本として使用することが可能であると推察される。

本研究では、これまでに検討対象としてきた被験食材の中から、特に有望な者を選別するために、胸部大動脈に対する各種健康食品（イチョウ葉エキス、カテキン類、イソフラボン類、杜仲茶、プロポリス）の弛緩作用の強さとその作用機序について比較検討した。

【研究方法】

1. 実験材料

(1) 実験動物

実験には主に Wistar 系雄性ラット（9～12 週齢、日本 SLC、静岡）を購入し、実験を通して恒温（ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ）、恒湿（ $55 \pm 2\%$ ）、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。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

被験食材としては、以下のような 7 種類の健康食材を使用した。

- 1) イチョウ葉エキス (GBE)；イチョウ葉エキス-F (タマ生化学、東京)
イチョウ葉をエタノール抽出後、粉末化したもの
- 2) カテキン類 (Tea)；茶抽出物 (脱カフェイン品) (タマ生化学、東京)
緑茶を抽出後、粉末化したもの
- 3) イソフラボン類 (Isofla)；イソフラボン (20.6%) (タマ生化学、東京)
大豆胚芽を抽出後、粉末化したもの
- 4) 杜仲茶 (Tochu)；杜仲茶 (日立造船、広島)
杜仲葉を水抽出後、粉末化したもの
- 5) ブラジル産プロポリス (Pro-Ba)；植物起源アレクリン (アピ、岐阜)
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
- 6) ブラジル産プロポリス (Pro-Bb)；植物起源不明 (アピ、岐阜)
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
- 7) 中国産プロポリス (Pro-C)；植物起源不明 (アピ、岐阜)
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

これらは、全て液体として、マグヌス管に直接投与してその作用を測定した。核被験食材の濃度はマグヌス管中の最終濃度をあらわした。

更に上記の被験食材の他に、以下の薬物を適宜溶解させて実験に供した。

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）、ニトロアルギニンメチルエステル（ナカライテスク、京都）、ニトロプルシッドナトリウム（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）。

2. ラット摘出胸部大動脈に対する影響

ペントバルビタール麻酔下ラットから摘出した胸部大動脈より、幅2～3mm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（pH7.4）を満たしたマグナス管中に懸垂した。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。

ノルアドレナリン（ 10^{-7} M）によりあらかじめ収縮させた標本に、各種健康食品を累積的に添加し、生じる弛緩の大きさを等尺性に記録した。一酸化窒素合成阻害薬のN^G-nitro-L-arginine methyl ester（L-NAME, 10^{-4} M）はノルアドレナリン添加前30分間作用させた。なお、弛緩反応の大きさはパパベリン（ 10^{-4} M）により生じる最大弛緩反応を100%とした時の弛緩率（%）で示した。

3. 統計処理

データは全て3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。

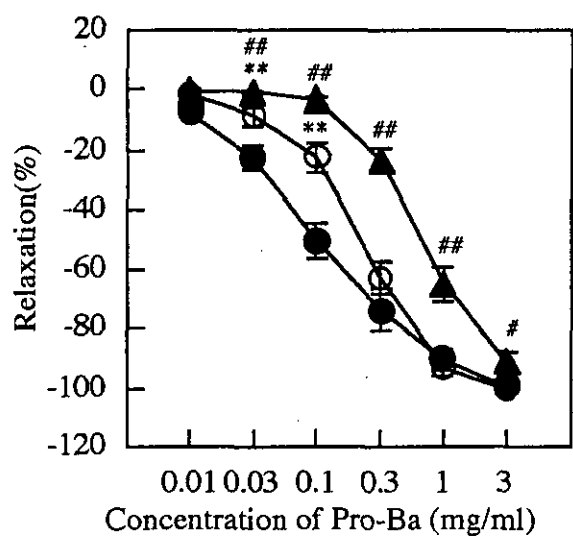
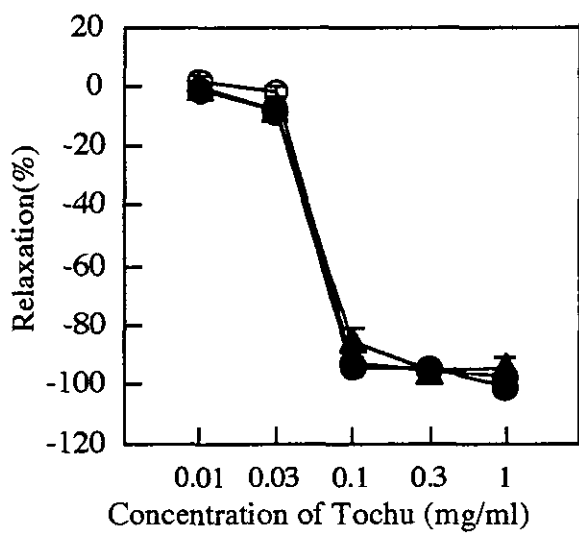
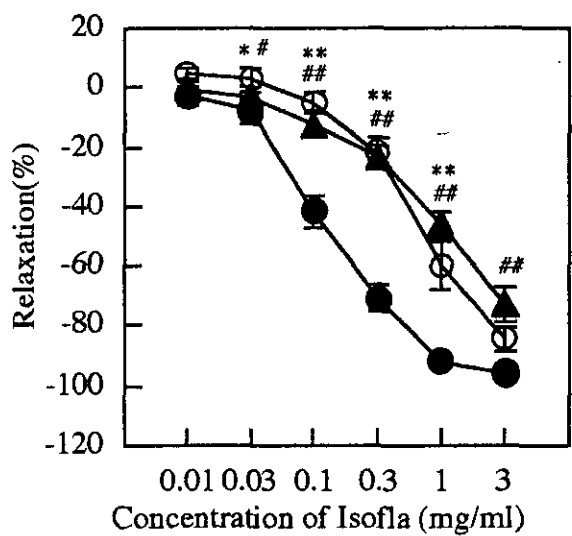
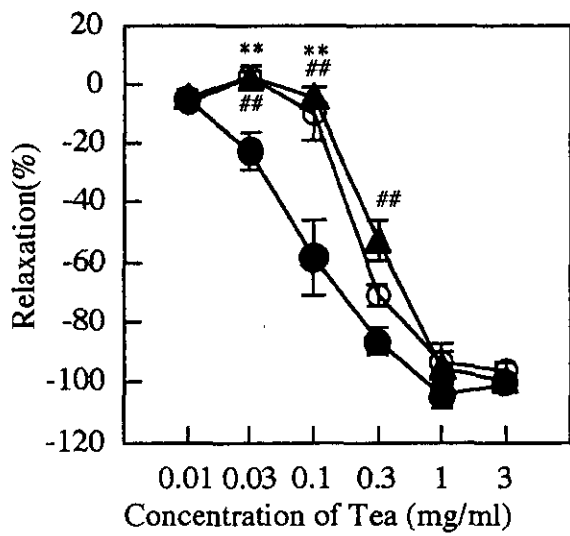
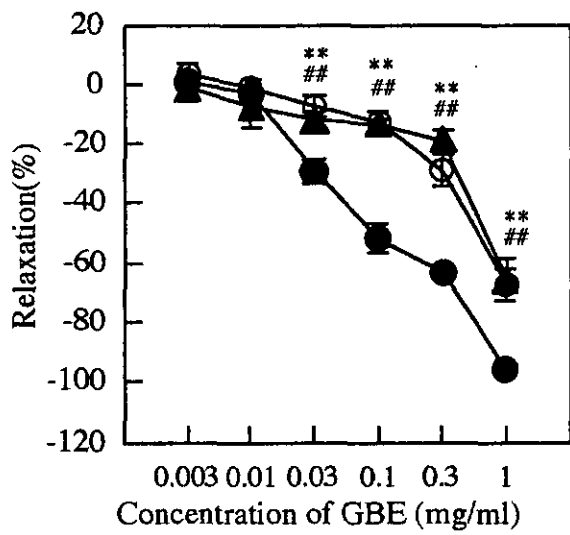
また、3群以上の群間有意差検定にはANOVA（Analysis of Variance）を用いた。計算処理はStat View-IIプログラム（Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA）を用いて行った。有意差検定の結果、危険率5%未満のものを有意差ありと判断した。

【研究結果】

1. ラット摘出胸部大動脈に対する影響（in vitro 実験）

図8は 10^{-7} Mのノルアドレナリンで収縮させた摘出胸部大動脈における各種健康食材の弛緩作用を濃度作用曲線を示した。その結果、内皮層存在下での弛緩作用の強さは、杜仲茶>イチョウ葉エキス>カテキン類>ブラジル産プロポリス(Pro-Ba)>イソフラボン類>中国産プロポリス(Pro-C)>ブラジル産プロポリス(Pro-Bb)の順であった。イチョウ葉エキス、カテキン類、イソフラボン類、ブラジル産プロポリス(Pro-Bb)は、NOを介した内皮依存性の弛緩作用を示した。更に、ブラジル産プロポリス(Pro-Ba)および中国産プロポリス(Pro-C)は、内皮依存性の弛緩作用と収縮作用を示した。一方、杜仲茶は、内皮非依存性の弛緩作用を示した。

なお、内皮除去標本は生理溶液で湿らした脱脂綿で血管内腔を擦ることにより、作製するとともにアセチルコリンによる弛緩反応の消失で、内皮除去の程度を確認した。



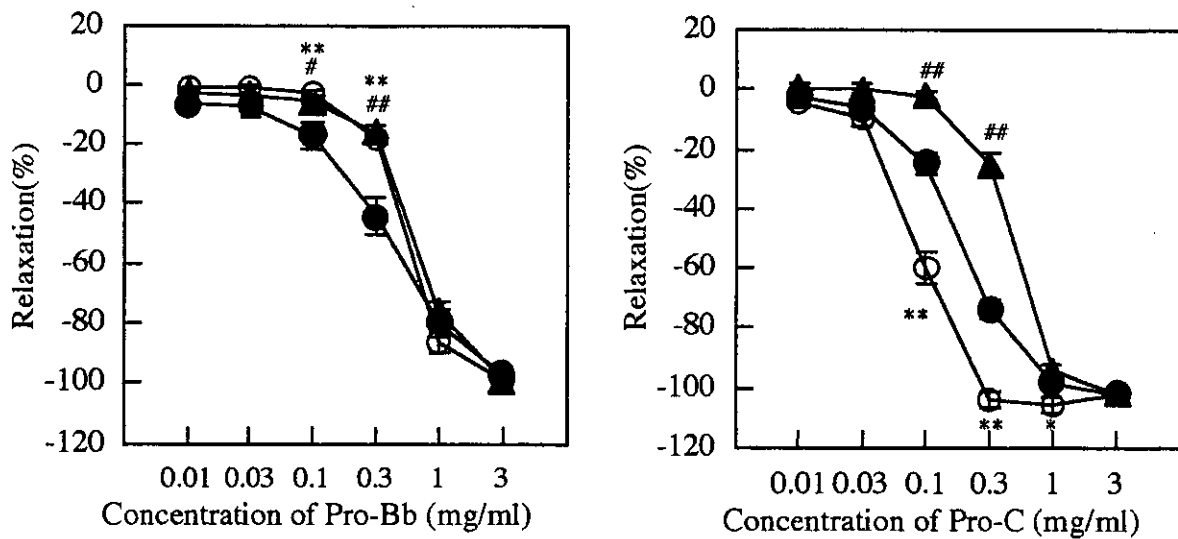


図8 ラット摘出大動脈標本における各種健康食材の弛緩作用

●；内皮層存在 (n=6-8)、○；内皮層非存在 (n=6-8)、▲；内皮層+L-NAME 存在 (n=6-8)。平均±標準誤差。GBE：イチヨウ葉エキス, Tea：カテキン類, Isofla：イソフラボン類, Tochu：杜仲茶, Pro-Ba：ブラジル産プロポリス(Pro-Bb), Pro-Bb：ブラジル産プロポリス, Pro-C：中国産プロポリス。

***p<0.05, 0.01；内皮層存在に対する内皮層非存在。

###p<0.05, 0.01；内皮層存在に対する内皮層+L-NAME 存在。

【考察】

杜仲茶は、「血圧が高めの方の食品」としてすでに特定保健用食品として認可されている。高血圧自然発症ラットにおいて血管内皮機能低下が知られているが、本実験において血管内皮非存在下においても血管内皮存在下と同様の血管弛緩作用を示した。

本研究で検討した7種の被験食材の弛緩反応をその濃度作用曲線の位置と EC_{50} の値で比較すると、その作用の強さは以下の順である。

すなわち、①杜仲茶>②茶カテキン>③イチヨウ葉エキス>④ブラジル産プロポリス a>⑤イソフラボン>⑥中国産プロポリス>⑦ブラジル産プロポリス b の順で強い弛緩作用を示した。

杜仲茶や茶カテキンはすでに、特定保健用食品として血圧への有用性が認知されておりその研究報告も多く出されている。一方、茶カテキンは体脂肪への改善を志向する食材として特定保健用食品の表示が許可されている。また、大豆イソフラボンは骨の健康にを志向する食材としてこれも特定保健用食品となっている。

本研究で検討した健康食材の茶カテキン、イチヨウ葉エキスとプロポリスは循環器系をターゲットした確認はなされていないことになる。従って、この3種の健康食材について循環器系における有用性を、検討することは重要と思われる。前項などで述べたように、脳循環や神経機能、さらに生活習慣病との関係について、検討してその有用性を明らかにすることが望まれる。

【参考文献】

- 1) 本間真人, 武田光志, 山田由里子, 須賀肇, 堀内学, 佐藤信一, 幸田幸直: 西洋オトギリソウ(St. John's Wort) と相互作用する薬剤を処方された外来患者に対する服薬指導と併用実態調査, 薬学雑誌, 120, 1435-1440 (2000)
- 2) 三村泰彦他, 足立伊佐雄: 医薬品と健康食品の相互作用に関する意識調査, 医薬ジャーナル, 36, 3356-3367 (2000)
- 3) 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)
- 4) 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, 149-154 (2001)
- 5) 窪田洋子, 梅垣敬三, 田中直子, 小林恭子, 中村一基, 国友 勝, 篠塚和正: ラット循環機能に対するプロポリスの4週間反復投与の影響, 日本食品化学学会誌, 9, 54-59 (2002)
- 6) 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 nicardipine in rats. Life Sci., 70, 2783-2792 (2002)
- 7) Kleijnen J., Knipschild P.: Ginkgo biloba, Lancet, 340, 1136-1139 (1992)
- 8) 篠塚和正: 特定保健用食品素材と医薬品の相互作用に関する研究, 厚生労働科学研究平成 14 年度報告書, P131 (2003)
- 9) 篠塚和正: 特定保健用食品素材と医薬品の相互作用に関する研究, 厚生労働科学研究平成 13 年度報告書, P139-141 (2002)
- 10) Kubota Y., Kobayashi K., Tanaka N., Nakamura K., Kunitomo M., Umegaki K., Shinozuka K.: Interaction of Ginkgo biloba extract (GBE) with hypotensive agent, nicardipine, in rats. In vivo, 17, 409-412 (2003)
- 11) エイコム情報 No.15 「アセチルコリン(ACh)、コリン(Ch)の分析」、エイコム株式会社、京都 (1997,9 改定)
- 12) Fujimoto K., Matsui M., Fijii T., Kawashima K.: Decreased acetylcholine content and choline acetyltransferase mRNA expression in circulating mononuclear leukocytes and lymphoid organs of the spontaneously hypertensive. Life Sci., 69, 1629-1638 (2001)