

トにおけるCAの1日摂取目安量は100～1,000mg/dayの範囲にあり、仮にヒトの体重を50kgとすると、2～20 mg/kg body weight/dayとなる。従って、実験1の最大CA摂取量(176.1 mg/kg/day)は1日摂取目安量の9倍から90倍の範囲に相当する。

しかし、最大CA摂取群の心臓に光学顕微鏡観察レベルにおいて組織病理学的な異常は観察されず、慢性ならびに急性の心臓麻痺の指標であるBNPの濃度にもほとんど変化が見られなかった。従って、一般的なCAのサプリメント製品に表示されている指示量に従うならば、そして、茶やコーヒーに含まれるカフェインなどの刺激物の過剰摂取を回避すれば、安全上の問題はないと考えられる。

一方、先行研究において、CA(6%シネフリン)をSD系オスラット(240～280g)に20 mg/kg body weight(1回/1日)、15日間胃経栄養法により経口投与した場合、8割のラットの心電図に異常が観察され、そのうち5割が死に至ることが報告されている[8]。さらに、MarcusとGrollman[7]は、シネフリンとカフェインの同時摂取は、エフェドラとカフェインの同時摂取の場合と同様に、心不整脈、高血圧、心臓発作などを引き起こす恐れがあることを警告している。また、CAを含有するサプリメントの摂取によって恐らく引き起こされた白人女性における急性の外壁心筋梗塞症のケースも報告されている[20]。従って、CA摂取と心臓毒性との関係について詳細に検討する必要があると考えられた。

本研究の実験1ではCAを含む飼料を自由摂取させたため、(シネフリンの腸管からの吸収率は高いが)血中濃度の急激な上

昇は起こりにくく、顕著な影響が観察されにくかったのかも知れない。よって、シネフリンとそれを含有する食品の有効性と安全性について、特にその摂取方法の面から検討する必要があると思われた。そこで実験2として、血中シネフリン濃度が急激に上昇して影響が出やすいと考えられるサプリメントとしての摂取を想定して胃管チューブ投与により検討した(30日間)。その結果、対照に比べて体重(kg)あたりCAを300mg(1日摂取目安量の約20倍量)ないし1,500mg(1日摂取目安量の約100倍量)投与した群で、尿中アドレナリンの増加が観察されたが、血漿カテコールアミン濃度、体重および脂肪組織重量には変化が認められず、心臓毒性も観察されなかった。

以上の結果から、CAの有効性には摂取期間及び投与方法が密接に関与することが示唆された。しかし、有効性としての体脂肪蓄積抑制効果は小さいことが推察された。また、その摂取方法の違いが有効性と安全性に特に影響を及ぼすことはなく、病理組織学的組織検査の結果からもCAの安全性は高いと考えられた。

## E. 結論

シネフリンを含有するCAの安全性は高いと推察されるが、有効性としての体脂肪蓄積抑制効果は小さいと考えられる。

## <参考文献>

- [1] Moro, C.O. and Basile, G.: Obesity and medicinal plants. *Fitoterapia*, 71, S73-S82, 2000.
- [2] Park, J.H. and Keeley, L.L.: The effect of biogenic amines and their analogs on

- carbohydrate metabolism in the fat body of the cockroach *Blaberus discoidalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **110**, 88-95, 1998.
- [3] Carpene, C., Galitzky, J., Fontana, E., Atgie, C., Lafontan, M. and Berlan, M.: Selective activation of  $\beta$ 3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **359**, 310-321, 1999.
- [4] Stewart, I., Newhall, W.F. and Edwards, G.J.: The isolation and identification of l-synephrine in the leaves and fruit of citrus. *J. Biol. Chem.* **239**, 930-932, 1964.
- [5] Wheaton, T.A. and Stewart, I.: The distribution of tyramine, N-methyltyramine, hordenine, octopamine, and synephrine in higher plants. *Lloydia*, **33**, 244-254, 1970.
- [6] Colker, C.M., Kalman, D.S., Torina, G.C., Perlis, T. and Street, C.: Effects of Citrus aurantium extract, caffeine, and St. John's wort on body fat loss, lipid levels, and mood states in over weight healthy adults. *Curr. Therap. Res.* **60**, 145-153, 1999.
- [7] Marcus, D.M. and Grollman, A.P.: Ephedra-free is not danger-free. *Science*, **301**, 1669-1671, 2003.
- [8] Calapai, G., Firenzuoli, F., Saitta, A., Francesco, S., Arlotta, M.R., Costantino, G. and Inferrera, G.: Antiobesity and cardiovascular effects of Citrus aurantium extracts in the rat: a preliminary report. *Fitoterapia*, **70**, 586-592, 1999.
- [9] Muzzin, P., Revelli, J.P., Kuhne, F., Gocayne, J.D., McCombie, W.R., Venter, J.C., Giacobino, J.P. and Fraser, C.M.: An adipose tissue-specific  $\beta$ -adrenergic receptor. Molecular cloning and down-regulation in obesity. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24053-24058, 1991.
- [10] Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Sutren, M.-M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C. and Strosberg, A.D.: Molecular characterization of the human  $\beta$ 3-adrenergic receptor. *Science*, **245**, 1118-1121, 1989.
- [11] Granneman, J.G., Lahners, K.N. and Chaudhry, A.: Molecular cloning and expression of the rat  $\beta$ 3-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.*, **40**, 895-899, 1991.
- [12] Nahmias, C., Blin, N., Elalouf, J.M., Mattei, M.G., Strosberg, A.D. and Emorine, L.J.: Molecular characterization of the mouse  $\beta$ 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J.*, **10**, 3721-3727, 1991.
- [13] Lelias, J.M., Kaghad, M., Rodriguez, M., Chalon, P., Bonnin, J., Dupre, I., Delpech, B., Bensaid, M., LeFur, G. and Ferrara, P.: Molecular cloning of a human  $\beta$ 3-adrenergic receptor cDNA. *FEBS Lett.*, **324**, 127-130, 1993.
- [14] Carpene, C., Bousquet-Melou, A., Galitzky, J., Berlan, M. and Lafontan, M.: Lipolytic effects of  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-, and  $\beta$ 3-adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **839**, 186-189, 1998.
- [15] Lafontan, M. and Berlan, M.: Fat cell adrenergic receptors and the control of

- white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.*, **34**, 1057-1091, 1993.
- [16] Ibrahim, K.E., Couch, M.W., Williams, C.M., Fregly, M.J. and Midgley, J.M.: m-Octopamine: normal occurrence with p-octopamine in mammalian sympathetic nerves. *J. Neurochem.*, **44**, 1862-1867, 1985.
- [17] Bristow, M.R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., Jamieson, S.:  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective  $\beta$ 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.*, **59**, 297-309, 1986.
- [18] Wheatley, A.M., Thandroyen, F.T. and Opie, L.H.: Catecholamine-induced myocardial cell damage: catecholamines or adrenochrome. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **17**, 349-359, 1985.
- [19] Logarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardinias, I. and Iglesias Buela, L.: Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, **8**, 395-400, 2001.
- [20] Nykamp, D.L., Fackih, M.N. and Compton, A.L.: Possible association of acute lateral-wall myocardial infarction and bitter orange supplement. *Ann. Pharmacother.*, **38**, 812-816, 2004.
- F. 研究発表
1. 論文発表
- Kazuhiro Kubo, Chikako Kiyose, Satomi Ogino & Morio Saito : Suppressive Effect of Citrus Aurantium Against Body Fat Accumulation and Its Safety. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **36** : 11-17, 2005.
2. 学会発表
- シトラスアウランチウムの肥満抑制、体脂肪蓄積抑制効果と安全性の検討. 久保和弘, 清瀬千佳子, 荻野聡美, 斎藤衛郎, 第 59 回日本栄養・食糧学会(東京農業大学), 2005, 東京 (予定)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

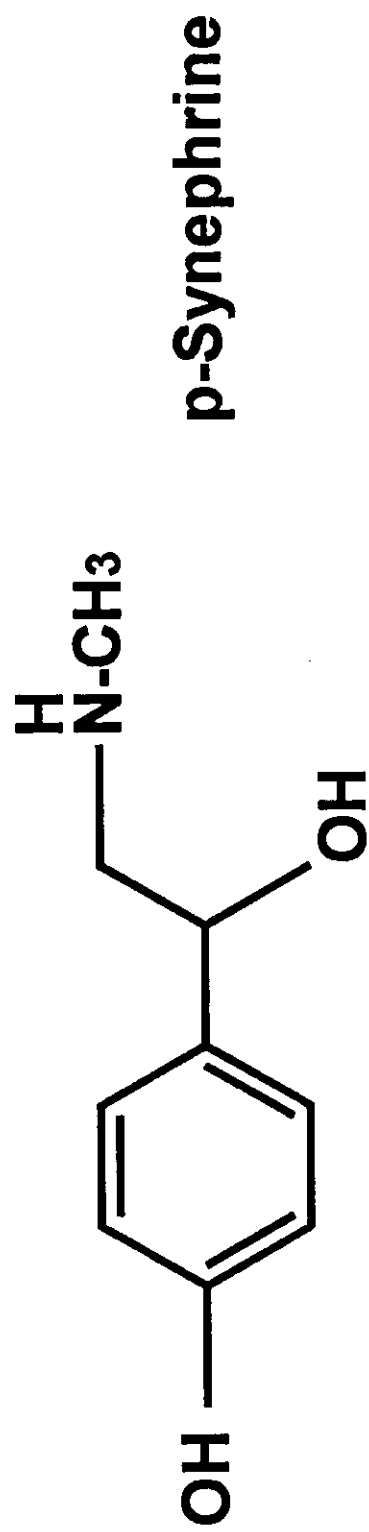


Fig. 1 Chemical structure of p-Syneprine.

Table 1. Influence of graded levels of dietary *Citrus aurantium* on food intake, body weight gain and tissue weights in rats (Exp.1).

Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
( <i>Citrus aurantium</i> (mg/kg diet))	(0)	(40)	(200)	(1,000)	(5,000)
Food intake (g/day)	18.8±1.0 <sup>NS</sup>	18.3±0.9 <sup>NS</sup>	18.8±1.1 <sup>NS</sup>	19.2±1.1 <sup>NS</sup>	18.8±1.1 <sup>NS</sup>
<i>Citrus aurantium</i> intake (mg/day)	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.7±0.03 <sup>ab</sup>	3.8±0.2 <sup>b</sup>	19.2±1.1 <sup>c</sup>	93.9±5.4 <sup>d</sup>
Synephrine intake (µg/day)	0±0 <sup>a</sup>	47±2 <sup>ab</sup>	244±15 <sup>b</sup>	1,228±71 <sup>c</sup>	6,008±344 <sup>d</sup>
Body weight gain (g)	271.8±18.2 <sup>NS</sup>	253.7±21.9 <sup>NS</sup>	266.6±27.6 <sup>NS</sup>	260.5±48.0 <sup>NS</sup>	241.3±31.0 <sup>NS</sup>
Initial body weight (g)	292.0±7.9 <sup>NS</sup>	292.7±9.2 <sup>NS</sup>	288.4±7.5 <sup>NS</sup>	293.3±10.9 <sup>NS</sup>	293.3±6.2 <sup>NS</sup>
Final body weight (g)	563.8±23.5 <sup>NS</sup>	546.3±22.3 <sup>NS</sup>	555.0±33.5 <sup>NS</sup>	553.8±51.9 <sup>NS</sup>	534.6±36.5 <sup>NS</sup>
Liver (g)	14.5±2.0 <sup>NS</sup>	15.0±1.1 <sup>NS</sup>	15.7±1.9 <sup>NS</sup>	14.8±2.8 <sup>NS</sup>	14.5±1.9 <sup>NS</sup>
Kidney (g)	2.73±0.19 <sup>NS</sup>	2.85±0.15 <sup>NS</sup>	2.89±0.11 <sup>NS</sup>	2.71±0.12 <sup>NS</sup>	2.65±0.10 <sup>NS</sup>
Heart (g)	1.38±0.09 <sup>a</sup>	1.32±0.03 <sup>ab</sup>	1.39±0.08 <sup>a</sup>	1.37±0.09 <sup>a</sup>	1.26±0.06 <sup>b</sup>
Testis (g)	3.78±0.14 <sup>NS</sup>	4.00±0.22 <sup>NS</sup>	3.72±0.53 <sup>NS</sup>	3.72±0.26 <sup>NS</sup>	3.92±0.14 <sup>NS</sup>
Spleen (g)	0.79±0.13 <sup>ab</sup>	0.85±0.10 <sup>ab</sup>	0.96±0.22 <sup>a</sup>	0.81±0.13 <sup>ab</sup>	0.76±0.08 <sup>b</sup>
Lung (g)	1.54±0.11 <sup>NS</sup>	1.66±0.17 <sup>NS</sup>	1.63±0.18 <sup>NS</sup>	1.69±0.13 <sup>NS</sup>	1.70±0.13 <sup>NS</sup>
Perirenal fat pad (g)	22.4±2.5 <sup>a</sup>	18.9±3.4 <sup>ab</sup>	22.8±4.2 <sup>a</sup>	18.2±4.4 <sup>ab</sup>	18.0±2.9 <sup>b</sup>
Epididymal fat pad (g)	15.3±1.7 <sup>NS</sup>	14.6±2.9 <sup>NS</sup>	15.7±2.9 <sup>NS</sup>	14.1±4.1 <sup>NS</sup>	12.5±3.5 <sup>NS</sup>

Each value is the mean ± SD of 6-7 animals in each group. Means in a row that are not followed by a common letter are different,  $p < 0.05$ . NS, not significant.

Table 2. Influence of graded levels of dietary *Citrus aurantium* on serum or plasma biochemical indicators in rats (Exp.1).

Group	Group 1 (0)	Group 2 (40)	Group 3 (200)	Group 4 (1,000)	Group 5 (5,000)
<i>Citrus aurantium</i> (mg/kg diet)					
Total protein (g/L)	59.0±2.1 <sup>NS</sup>	58.0±1.8 <sup>NS</sup>	57.4±2.7 <sup>NS</sup>	58.8±1.6 <sup>NS</sup>	59.3±3.0 <sup>NS</sup>
Albumin (g/L)	28.0±0.9 <sup>NS</sup>	27.8±0.8 <sup>NS</sup>	28.0±1.2 <sup>NS</sup>	28.7±0.5 <sup>NS</sup>	28.6±1.5 <sup>NS</sup>
Ratio of albumin/globulin (A/G)	0.90±0.00 <sup>NS</sup>	0.93±0.02 <sup>NS</sup>	0.96±0.02 <sup>NS</sup>	0.95±0.02 <sup>NS</sup>	0.91±0.01 <sup>NS</sup>
Asparate aminotransferase (U/L)	88.2±12.2 <sup>NS</sup>	111.0±19.7 <sup>NS</sup>	89.4±14.0 <sup>NS</sup>	85.8±16.8 <sup>NS</sup>	107.7±31.9 <sup>NS</sup>
Alanine aminotransferase (U/L)	29.8±11.5 <sup>NS</sup>	32.3±12.2 <sup>NS</sup>	29.2±9.3 <sup>NS</sup>	25.5±10.5 <sup>NS</sup>	34.1±19.1 <sup>NS</sup>
Alkaline phosphatase (U/L)	252.0±121.6 <sup>NS</sup>	253.8±112.8 <sup>NS</sup>	204.6±47.6 <sup>NS</sup>	233.3±46.1 <sup>NS</sup>	259.1±78.5 <sup>NS</sup>
Creatinine (µmol/L)	36.7±2.7 <sup>NS</sup>	34.6±2.1 <sup>NS</sup>	31.1±16.0 <sup>NS</sup>	38.0±4.7 <sup>NS</sup>	36.1±5.0 <sup>NS</sup>
Urea nitrogen (mmol/L)	3.0±0.2 <sup>NS</sup>	3.0±0.2 <sup>NS</sup>	2.6±0.3 <sup>NS</sup>	2.9±0.2 <sup>NS</sup>	3.0±0.5 <sup>NS</sup>
Glucose (mmol/L)	12.3±1.5 <sup>NS</sup>	11.8±0.4 <sup>NS</sup>	12.2±1.3 <sup>NS</sup>	12.4±1.9 <sup>NS</sup>	12.4±0.9 <sup>NS</sup>
Glycosylated albumin (%)	3.1±0.1 <sup>NS</sup>	2.9±0.3 <sup>NS</sup>	3.2±0.3 <sup>NS</sup>	3.2±0.3 <sup>NS</sup>	3.1±0.3 <sup>NS</sup>
Triacylglycerol (mmol/L)	0.85±0.21 <sup>NS</sup>	0.87±0.11 <sup>NS</sup>	0.89±0.51 <sup>NS</sup>	1.04±0.39 <sup>NS</sup>	1.05±0.31 <sup>NS</sup>
Phospholipid (mmol/L)	1.26±0.04 <sup>NS</sup>	1.34±0.14 <sup>NS</sup>	1.12±0.57 <sup>NS</sup>	1.21±0.11 <sup>NS</sup>	1.46±0.29 <sup>NS</sup>
Non-esterified fatty acid (mmol/L)	0.43±0.04 <sup>NS</sup>	0.36±0.06 <sup>NS</sup>	0.35±0.14 <sup>NS</sup>	0.42±0.08 <sup>NS</sup>	0.44±0.11 <sup>NS</sup>
Total cholesterol (mmol/L)	1.45±0.13 <sup>NS</sup>	1.58±0.35 <sup>NS</sup>	1.31±0.39 <sup>NS</sup>	1.16±0.20 <sup>NS</sup>	1.40±0.23 <sup>NS</sup>
HDL- Cholesterol (mmol/L)	0.53±0.07 <sup>NS</sup>	0.53±0.06 <sup>NS</sup>	0.48±0.09 <sup>NS</sup>	0.44±0.08 <sup>NS</sup>	0.54±0.11 <sup>NS</sup>
Total bilirubin (µmol/L)	2.00±0.29 <sup>NS</sup>	2.28±0.36 <sup>NS</sup>	1.71±0.00 <sup>NS</sup>	1.71±0.00 <sup>NS</sup>	1.72±0.36 <sup>NS</sup>
Insulin (ng/ml)	4.04±2.50 <sup>bc</sup>	4.63±1.65 <sup>bc</sup>	7.84±2.99 <sup>a</sup>	5.58±2.70 <sup>ab</sup>	2.75±0.71 <sup>c</sup>
Brain natriuretic peptide (µg/L)	4.13±0.16 <sup>b</sup>	4.36±0.18 <sup>a</sup>	4.17±0.15 <sup>b</sup>	4.30±0.09 <sup>ab</sup>	4.16±0.07 <sup>b</sup>
Triiodothyronine (nmol/L)	1.23±0.10 <sup>NS</sup>	1.32±0.13 <sup>NS</sup>	1.28±0.14 <sup>NS</sup>	1.29±0.26 <sup>NS</sup>	1.25±0.16 <sup>NS</sup>
Thyroxine (nmol/L)	46.3±4.4 <sup>NS</sup>	49.5±11.2 <sup>NS</sup>	49.4±7.5 <sup>NS</sup>	44.4±3.8 <sup>NS</sup>	43.2±9.3 <sup>NS</sup>

Each value is the mean ± SD of 6-7 animals in each group. Means in a row that are not followed by a common letter are different,  $p < 0.05$ . NS, not significant.

Table 3. Influence of graded levels of dietary *Citrus aurantium* on plasma concentrations of catecholamine in rats (Exp.1).

Group ( <i>Citrus aurantium</i> (mg/kg diet))	Group 1 (0)	Group 2 (40)	Group 3 (200)	Group 4 (1,000)	Group 5 (5,000)
Adrenaline (nmol/L)	53.85±25.40 <sup>a</sup>	59.95±16.63 <sup>a</sup>	69.97±23.80 <sup>ab</sup>	60.04±46.46 <sup>a</sup>	105.27±34.77 <sup>b</sup>
Noradrenaline (nmol/L)	53.99±29.11 <sup>NS</sup>	38.62±17.31 <sup>NS</sup>	53.08±26.29 <sup>NS</sup>	53.39±42.36 <sup>NS</sup>	68.06±31.74 <sup>NS</sup>
Dopamine (nmol/L)	1.29±1.19 <sup>a</sup>	0.90±0.57 <sup>a</sup>	1.20±0.33 <sup>ab</sup>	0.81±0.88 <sup>a</sup>	2.41±1.30 <sup>b</sup>

Each value is the mean ± SD of 6-7 animals in each group. Means in a row that are not followed by a common letter are different,  $p < 0.05$ . NS, not significant.

Table 4. Influence of graded levels of dietary *Citrus aurantium* on urinary concentrations of catecholamine and homovanillic acid in rats (Exp.1).

Group ( <i>Citrus aurantium</i> (mg/kg diet))	Group 1 (0)	Group 2 (40)	Group 3 (200)	Group 4 (1,000)	Group 5 (5,000)
Adrenaline (nmol/day)	1.26±0.58 <sup>a</sup>	1.32±0.74 <sup>a</sup>	1.08±0.19 <sup>a</sup>	2.13±1.09 <sup>a</sup>	4.22±2.77 <sup>b</sup>
Noradrenaline (nmol/day)	7.67±1.75 <sup>NS</sup>	9.11±1.70 <sup>NS</sup>	7.13±2.10 <sup>NS</sup>	9.45±1.78 <sup>NS</sup>	7.75±1.32 <sup>NS</sup>
Dopamine (nmol/day)	22.51±3.07 <sup>NS</sup>	20.82±2.07 <sup>NS</sup>	20.93±2.81 <sup>NS</sup>	23.81±3.73 <sup>NS</sup>	22.59±4.97 <sup>NS</sup>
Homovanillic acid (nmol/day)	146.0±7.5 <sup>NS</sup>	139.2±30.1 <sup>NS</sup>	133.7±22.1 <sup>NS</sup>	137.1±20.5 <sup>NS</sup>	137.8±36.9 <sup>NS</sup>

Each value is the mean ± SD of 6-7 animals in each group. Means in a row that are not followed by a common letter are different,  $p < 0.05$ . NS, not significant.

Table 5. Influence of graded levels of dietary citrus aurantium on food intake, body weight gain and tissue weights in rats (Exp.2).

Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Citrus aurantium (mg/kg body weight)	0	12	60	300	1,500
(Synephrine intake ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight))	(0)	(0.768)	(3.84)	(19.2)	(96)
Food intake (g/day)	39.3 $\pm$ 2.0 <sup>NS</sup>	40.0 $\pm$ 4.1 <sup>NS</sup>	39.4 $\pm$ 2.7 <sup>NS</sup>	41.4 $\pm$ 3.7 <sup>NS</sup>	39.5 $\pm$ 3.1 <sup>NS</sup>
Body weight gain (g)	127.5 $\pm$ 15.4 <sup>NS</sup>	139.8 $\pm$ 33.2 <sup>NS</sup>	129.8 $\pm$ 28.9 <sup>NS</sup>	143.2 $\pm$ 20.5 <sup>NS</sup>	134.7 $\pm$ 26.0 <sup>NS</sup>
Initial body weight (g)	279.5 $\pm$ 17.8 <sup>NS</sup>	280.2 $\pm$ 13.4 <sup>NS</sup>	280.0 $\pm$ 12.3 <sup>NS</sup>	280.3 $\pm$ 14.6 <sup>NS</sup>	279.6 $\pm$ 15.3 <sup>NS</sup>
Final body weight (g)	407.0 $\pm$ 31.2 <sup>NS</sup>	420.0 $\pm$ 28.8 <sup>NS</sup>	409.8 $\pm$ 21.9 <sup>NS</sup>	423.5 $\pm$ 20.5 <sup>NS</sup>	414.3 $\pm$ 18.9 <sup>NS</sup>
Liver (g)	16.0 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	16.8 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	14.9 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	15.5 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	15.4 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>
Kidney (g)	2.56 $\pm$ 0.35 <sup>NS</sup>	2.64 $\pm$ 0.32 <sup>NS</sup>	2.48 $\pm$ 0.24 <sup>NS</sup>	2.75 $\pm$ 0.26 <sup>NS</sup>	2.68 $\pm$ 0.23 <sup>NS</sup>
Heart (g)	1.14 $\pm$ 0.10 <sup>NS</sup>	1.16 $\pm$ 0.10 <sup>NS</sup>	1.14 $\pm$ 0.09 <sup>NS</sup>	1.13 $\pm$ 0.09 <sup>NS</sup>	1.19 $\pm$ 0.07 <sup>NS</sup>
Testis (g)	3.52 $\pm$ 0.20 <sup>NS</sup>	3.69 $\pm$ 0.20 <sup>NS</sup>	3.73 $\pm$ 0.20 <sup>NS</sup>	3.76 $\pm$ 0.30 <sup>NS</sup>	3.69 $\pm$ 0.20 <sup>NS</sup>
Spleen (g)	0.83 $\pm$ 0.06 <sup>NS</sup>	0.87 $\pm$ 0.13 <sup>NS</sup>	0.76 $\pm$ 0.09 <sup>NS</sup>	0.86 $\pm$ 0.16 <sup>NS</sup>	0.77 $\pm$ 0.86 <sup>NS</sup>
Lung (g)	1.40 $\pm$ 0.15 <sup>NS</sup>	1.39 $\pm$ 0.13 <sup>NS</sup>	1.54 $\pm$ 0.29 <sup>NS</sup>	1.40 $\pm$ 0.10 <sup>NS</sup>	1.44 $\pm$ 0.07 <sup>NS</sup>
Perirenal fat pad (g)	8.0 $\pm$ 2.4 <sup>NS</sup>	10.8 $\pm$ 5.5 <sup>NS</sup>	9.0 $\pm$ 3.0 <sup>NS</sup>	8.1 $\pm$ 2.1 <sup>NS</sup>	7.6 $\pm$ 1.9 <sup>NS</sup>
Epididymal fat pad (g)	6.3 $\pm$ 1.2 <sup>NS</sup>	7.8 $\pm$ 2.8 <sup>NS</sup>	6.4 $\pm$ 1.3 <sup>NS</sup>	7.3 $\pm$ 1.8 <sup>NS</sup>	6.8 $\pm$ 1.3 <sup>NS</sup>

Each value is the mean  $\pm$  SD of 6-7 animals in each group. Means in a row that are not followed by a common letter are different,  $p < 0.05$ . NS, not significant.



Table 6. Influence of graded levels of dietary citrus aurantium on serum or plasma biochemical indicators in rats (Exp.2).

Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Citrus aurantium (mg/kg body weight)	0	12	60	300	1,500
(Synephrine intake (µg/kg body weight))	(0)	(0.768)	(3.84)	(19.2)	(96)
Total protein (g/L)	57.0±2.1 <sup>NS</sup>	56.7±2.4 <sup>NS</sup>	55.8±0.8 <sup>NS</sup>	57.0±1.8 <sup>NS</sup>	56.0±1.7 <sup>NS</sup>
Albumin (g/L)	30.0±0.9 <sup>NS</sup>	29.5±1.6 <sup>NS</sup>	29.4±0.9 <sup>NS</sup>	29.5±1.0 <sup>NS</sup>	29.8±1.2 <sup>NS</sup>
Ratio of albumin/globulin	1.10±0.09 <sup>NS</sup>	1.10±0.06 <sup>NS</sup>	1.10±0.07 <sup>NS</sup>	1.08±0.08 <sup>NS</sup>	1.15±0.05 <sup>NS</sup>
Asparate aminotransferase (U/L)	74.2±9.3 <sup>ab</sup>	67.0±16.9 <sup>ab</sup>	93.0±66.2 <sup>a</sup>	57.2±5.9 <sup>ab</sup>	52.2±6.2 <sup>b</sup>
Alanine aminotransferase (U/L)	24.0±3.5 <sup>NS</sup>	23.0±9.2 <sup>NS</sup>	25.0±6.5 <sup>NS</sup>	19.8±2.0 <sup>NS</sup>	17.7±2.4 <sup>NS</sup>
Alkaline phosphatase (U/L)	252.0±121.6 <sup>NS</sup>	253.8±112.8 <sup>NS</sup>	204.6±47.6 <sup>NS</sup>	233.3±46.1 <sup>NS</sup>	259.1±78.5 <sup>NS</sup>
Lactate dehydrogenase (µkat/L)	4.85±1.46 <sup>a</sup>	4.10±3.14 <sup>ab</sup>	3.20±0.42 <sup>ab</sup>	2.36±0.75 <sup>b</sup>	2.65±1.03 <sup>b</sup>
Cholinesterase (µkat/L)	1.45±0.15 <sup>NS</sup>	1.49±0.42 <sup>NS</sup>	1.73±0.43 <sup>NS</sup>	1.66±0.62 <sup>NS</sup>	1.99±0.49 <sup>NS</sup>
Creatinine (µmol/L)	25.8±1.3 <sup>NS</sup>	24.6±2.4 <sup>NS</sup>	24.6±2.3 <sup>NS</sup>	23.6±2.3 <sup>NS</sup>	25.6±3.3 <sup>NS</sup>
Uric acid (µmol/L)	65.4±10.0 <sup>NS</sup>	70.4±7.9 <sup>NS</sup>	63.1±18.1 <sup>NS</sup>	60.5±20.4 <sup>NS</sup>	66.4±19.7 <sup>NS</sup>
Urea nitrogen (mmol/L)	5.2±0.8 <sup>ab</sup>	5.4±1.1 <sup>a</sup>	4.9±0.8 <sup>ab</sup>	4.3±0.7 <sup>bc</sup>	3.5±0.6 <sup>c</sup>
Glucose (mmol/L)	11.9±0.6 <sup>a</sup>	12.4±1.1 <sup>ab</sup>	12.3±0.5 <sup>ab</sup>	12.9±0.9 <sup>b</sup>	13.2±0.6 <sup>b</sup>
Triacylglycerol (mmol/L)	3.38±0.99 <sup>ab</sup>	3.43±1.75 <sup>ab</sup>	3.77±2.11 <sup>a</sup>	2.36±1.56 <sup>ab</sup>	1.58±0.20 <sup>b</sup>
Phospholipid (mmol/L)	1.81±0.26 <sup>ab</sup>	2.21±0.66 <sup>a</sup>	1.95±0.27 <sup>ab</sup>	1.71±0.24 <sup>b</sup>	1.63±0.19 <sup>b</sup>
Non-esterified fatty acid (mmol/L)	0.98±0.42 <sup>a</sup>	0.77±0.35 <sup>ab</sup>	0.82±0.39 <sup>ab</sup>	0.66±0.38 <sup>ab</sup>	0.51±0.10 <sup>b</sup>
Total cholesterol (mmol/L)	1.34±0.25 <sup>NS</sup>	1.66±0.57 <sup>NS</sup>	1.47±0.22 <sup>NS</sup>	1.37±0.17 <sup>NS</sup>	1.39±0.23 <sup>NS</sup>
HDL- Cholesterol (mmol/L)	0.76±0.12 <sup>ab</sup>	0.86±0.24 <sup>a</sup>	0.77±0.06 <sup>ab</sup>	0.68±0.12 <sup>b</sup>	0.75±0.08 <sup>ab</sup>
Sodium (mmol/L)	138.3±1.2 <sup>ab</sup>	138.0±0.9 <sup>a</sup>	139.2±0.8 <sup>ab</sup>	139.3±1.2 <sup>ab</sup>	139.5±1.0 <sup>b</sup>
Potassium (mmol/L)	8.17±0.32 <sup>a</sup>	8.08±0.40 <sup>a</sup>	7.44±0.40 <sup>b</sup>	7.12±0.52 <sup>b</sup>	6.93±0.39 <sup>b</sup>
Chloride (mmol/L)	99.2±1.2 <sup>bd</sup>	97.5±1.0 <sup>a</sup>	98.4±1.3 <sup>ab</sup>	100.7±1.5 <sup>cd</sup>	100.5±0.8 <sup>c</sup>
Magnesium (mmol/L)	0.84±0.04 <sup>NS</sup>	0.88±0.07 <sup>NS</sup>	0.85±0.05 <sup>NS</sup>	0.81±0.04 <sup>NS</sup>	0.84±0.06 <sup>NS</sup>

Table 6, continued.

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Calcium (mmol/L)	2.62±0.05 <sup>NS</sup>	2.64±0.08 <sup>NS</sup>	2.58±0.07 <sup>NS</sup>	2.59±0.08 <sup>NS</sup>	2.62±0.03 <sup>NS</sup>
Inorganic phosphate (mmol/L)	2.45±0.22 <sup>a</sup>	2.73±0.20 <sup>b</sup>	2.62±0.21 <sup>ab</sup>	2.72±0.18 <sup>b</sup>	2.70±0.13 <sup>b</sup>
Triiodothyronine (nmol/L)	1.31±0.11 <sup>a</sup>	1.25±0.08 <sup>ac</sup>	1.11±0.08 <sup>b</sup>	1.20±0.07 <sup>bc</sup>	1.27±0.05 <sup>ac</sup>
Thyroxine (nmol/L)	52.6±7.3 <sup>a</sup>	47.0±6.6 <sup>ab</sup>	39.9±3.6 <sup>b</sup>	42.0±6.4 <sup>b</sup>	46.8±6.5 <sup>ab</sup>

Each value is the mean ± SD of 6-7 animals in each group. Means in a row that are not followed by a common letter are different,  $p < 0.05$ . NS, not significant.

Table 7. Influence of graded levels of dietary citrus aurantium on plasma concentrations of catecholamine in rats (Exp.2).

Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Citrus aurantium (mg/kg body weight)	0	12	60	300	1,500
(Synephrine intake (µg/kg body weight))	(0)	(0.768)	(3.84)	(19.2)	(96)
Adrenaline (nmol/L)	36.30±11.48 <sup>NS</sup>	48.21±17.19 <sup>NS</sup>	34.06±8.53 <sup>NS</sup>	47.03±19.13 <sup>NS</sup>	46.94±25.26 <sup>NS</sup>
Noradrenaline (nmol/L)	26.70±10.87 <sup>NS</sup>	43.84±25.10 <sup>NS</sup>	19.74±6.79 <sup>NS</sup>	39.21±26.59 <sup>NS</sup>	31.41±23.60 <sup>NS</sup>
Dopamine (nmol/L)	0.78±0.15 <sup>ab</sup>	1.13±0.67 <sup>a</sup>	0.51±0.14 <sup>b</sup>	0.67±0.31 <sup>ab</sup>	0.77±0.55 <sup>ab</sup>

Each value is the mean ± SD of 6-7 animals in each group. Means in a row that are not followed by a common letter are different,  $p < 0.05$ . NS, not significant.

Table 8. Influence of graded levels of dietary citrus aurantium on urinary concentrations of catecholamine and homovanillic acid in rats (Exp.2).

Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Citrus aurantium (mg/kg body weight)	0	12	60	300	1,500
(Synephrine intake (µg/kg body weight))	(0)	(0.768)	(3.84)	(19.2)	(96)
Adrenaline (nmol/day)	1.67±0.45 <sup>a</sup>	2.28±1.06 <sup>a</sup>	4.63±2.42 <sup>a</sup>	16.39±2.75 <sup>b</sup>	55.28±11.49 <sup>c</sup>
Noradrenaline (nmol/day)	9.38±2.13 <sup>ab</sup>	7.73±2.17 <sup>a</sup>	7.51±1.07 <sup>a</sup>	9.23±2.37 <sup>ab</sup>	10.75±1.85 <sup>b</sup>
Dopamine (nmol/day)	24.89±4.49 <sup>ab</sup>	23.96±6.95 <sup>ab</sup>	21.03±3.72 <sup>a</sup>	23.41±2.23 <sup>ab</sup>	27.80±3.81 <sup>b</sup>
Homovanillic acid (nmol/day)	148.1±13.9 <sup>a</sup>	167.0±53.2 <sup>a</sup>	146.5±23.4 <sup>a</sup>	207.8±54.0 <sup>a</sup>	483.8±140.5 <sup>b</sup>

Each value is the mean ± SD of 6-7 animals in each group. Means in a row that are not followed by a common letter are different,  $p < 0.05$ . NS, not significant.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
分担研究報告書

いわゆる健康食品及び健康食品素材の健康影響の検討（2）  
—ガルシニア摂取による精巣毒性発現機序の解明—

主任研究者 斎藤衛郎 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 食品機能研究部長  
協力研究者 清瀬千佳子 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 食品機能研究部特別研究員

ダイエット食品素材の1つである、ガルシニアカンボジアエキスをラットにある一定量以上摂取させると精巣特異的に毒性が発現することが明らかとなり、この作用機序の1つとして、我々は精巣中のコレステロール生合成中間体である、FF-MAS、T-MASの蓄積阻害によるものである可能性を推測している。これまでの研究で使用したラットはすべて性成熟が著しい幼若ラットを用いたので、今回は性成熟が定常期に入った成熟ラットを用いても同様な精巣毒性が発現するかどうかについて検討を行った。その結果、幼若ラットではこれまでと同様な結果が得られたが、成熟ラットにおいては精巣関連ホルモンへの影響が見られなかった。しかし、7匹中2匹に精細胞の変性が認められ、精巣中のT-MASにガルシニア摂取群で有意な低下が見られたことから、28日間の比較的短期間においても、ガルシニア摂取による成熟ラット精巣への影響がはじまっていることが明らかとなった。また、MAS物質は卵母細胞の減数分裂のシグナル物質である可能性も示唆されていることから、雌ラットにおけるガルシニア摂取の卵巣ならびに性周期への影響についても検討を行った。その結果、2週間摂取グループならびに4週間摂取グループにおいても、対照群に比べて卵巣重量には差がなく、また卵巣関連ホルモン、FF-MAS量、T-MAS量もすべて対照群とガルシニア摂取群で有意な差は見られなかった。卵巣の組織学的検査では、2週間摂取グループ、4週間摂取グループで、それぞれガルシニア摂取群の1匹に黄体の減少、卵巣の萎縮が軽度に見られたが、偶発的な可能性が高いことが考えられた。従って、比較的短期間の摂取では雌においてガルシニアによる卵巣への影響は見られないことが明らかとなった。

実験Ⅰ. 幼若並びに成熟ラットにおけるガルシニア摂取による精巣毒性発現への影響

A. 研究目的

ダイエット食品素材として広く使用されているガルシニア・カンボジアエキスをラットにある一定量以上摂取させると精巣特異的に毒性が発現することが明らかとなっ

た。しかし、これまでの研究においては性成熟が活発に進行している幼若ラットを用いて行っているが、元来、このようなダイエット食品を摂取するのは、成人であることが多いことから、性成熟が完了して定常期に入った成熟ラットにガルシニアを摂取させた時の精巣に対する影響について検討することにした。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質

被験物質として、ガルシニアカンボジアの果皮抽出エキス（日本新薬ガルシニアパウダーS®；遊離型HCAとして41.2%の含量、遊離型：ラクトン型=36.6:63.4）を用いた。

### 2. 動物

3週齢並びに13週齢SD系雄ラット（SD: IGS、SPF、日本チャールズリバー株式会社）をそれぞれ12匹、13匹購入し、その後5日間標準飼料にて予備飼育後、群分けを行った。群分けは予備飼育終了時体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法によりそれぞれ対照群とガルシニア摂取群に分け、28日間飼育を行った。

動物は温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度50-60%、照12時間（7~19時点灯）に制御された飼育室内で個別に収容し、飼料及び水道水を自由に摂取させた。

### 3. 投与飼料の調製

ガルシニア添加粉末飼料の調製は独立行政法人国立健康・栄養研究所で実施した。標準飼料の組成はAIN-93Gを基本とする飼料（大豆油は5wt%）にガルシニアパウダーを均一になるように混合したものを用いた。ガルシニア投与量はSaitoらの報告[1]に基づき、最も高用量のHCAとして3.0wt%（154mmoles/kg diet）とし、対照食とガルシニア食の総エネルギーを統一し、ガルシニア食は対照食の $\alpha$ -コーンスターチをガルシニアパウダーに置き換え、他の栄養素はすべて同量とした（Table 1）。

4. 一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定  
一般状態の観察は投与期間を通じて1日1回とし、体重は投与開始直前より週3回の頻度で行った。摂餌量は2日に1回測定し、計算により、1日当たりの摂餌量を求めた。

### 5. 生化学及び病理組織学的検査

#### 1) 剖検および器官重量

試験終了前日にさらに前日の摂食量の75%量の餌を与えた。当日はネンプター麻酔下で、心臓採血にて血液を採取した後、剖検の実施と肝臓、精巣を左右別、精巣上体を左右別、脾臓、腎周囲脂肪組織、副腎丸周囲脂肪組織の重量をそれぞれ測定した。血液は直ちに遠心分離機（3,000rpm, 15min,  $4^{\circ}\text{C}$ ）にかけ、血清を得た。血清ならびに組織は測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。

#### 2) 組織学的検査

右精巣は器官重量を測定後、約半分量を、右精巣上体は全量をそれぞれ4%ホルマリン溶液（pH7.0-7.5）固定し、常法に従って、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。この標本については光学顕微鏡を用いて組織学的検査を行った。

#### 3) 一般血液性状

すべてのラットにおいて一般血液性状の測定を行った。分析項目は、総タンパク質（TP）、アルブミン（Alb）、A/G比、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRN）、グルコース（Glc）、遊離脂肪酸（NEFA）、リン脂質（PL）、トリグリセリド（TG）、総コレステロール（TCho）、アルカリフォスファタ

ーゼ (AIP)、トランスアミナーゼ (ALT, AST)、コリンエステラーゼ (CRE)、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、ケトン体(Ketone body)の 17 項目とした。

#### 4) 血清中各種ホルモンの測定

精巣関連ホルモンとして、テストステロン、間質細胞刺激ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン (FHS)、インヒビン-B の 4 項目について測定を行った。

#### 5) 精巣中 FF-MAS、T-MAS、コレステロールの測定

2002 年、Tacer ら[2]はコレステロール合成系の中間体である 4,4-dimethyl-cholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol (T-MAS ; testis-meiosis activating sterol)が他の組織と比較して精巣に特異的に蓄積することを明らかにし、この物質が精子形成における精母細胞の減数分裂のシグナル物質ではないかと示唆した。そこで、卵母細胞のシグナル物質ではないかと推察されている、4,4-dimethylcholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol(FF-MAS ; follicular fluid-meiosis activating sterol)と共に測定を試みた。方法は Tacer ら[2]の方法を一部改変して用いた。精巣をホモジネートした後、Bligh & Dyer 法にて脂質を抽出した後、一部をコレステロール量の測定に用い、残りの一定量を順相 HPLC にかけて、4,4-dimethyl sterol 類を分取した。分取した溶液を再度濃縮乾固した後、今度は逆相 HPLC にて測定し、FF-MAS、T-MAS を分離した。ラノステロールを標準として用い、各物質はラノステロール当量で示した。

精巣中コレステロール量はコレステロール C-テストワコー (和光純薬株式会社) にて測定を行った。

#### 6) 統計処理

すべての結果については平均±標準偏差にて示した。各週齢毎での対照群とガルシニア群との比較は 2 サンプル *t*test (Dr.SPSS for Windows) にて有意差を検定し、有意水準は危険率 5 %以下とした。

### C. 研究結果

#### 1. 体重並びに摂餌量

飼育期間終了後の最終体重は幼若グループ並びに成熟グループとも対照群とガルシニア摂取群でそれぞれ低い傾向が見られた (Table 2)。1 日当たりの摂餌量は両グループとも、対照群とガルシニア群の間で有意な差は見られなかった。

#### 2. 器官重量

幼若グループにおいては、精巣重量が左右とも対照群に比べてガルシニア摂取群で有意な低下が認められた (Table 2)。しかし、成熟グループにおいては対照群に比べてガルシニア摂取群で低い傾向が見られたものの有意な差は得られなかった。副睾丸周囲脂肪については、成熟グループにおいて、対照群に比べてガルシニア摂取群で有意な低下が認められた。

#### 3. 精巣及び精巣上体の組織学的検査

精巣の病理所見については、幼若グループで対照群の精細胞では異常が見られなかったが (Table 3, Fig. 1A)、ガルシニア群では軽～中程度の変性が認められた (Table

3, Fig. 1B)。一方、成熟グループでは対照群の精細胞は正常であった (Table 3, Fig. 1C)。しかし、ガルシニア群では、7匹中5匹は正常であったが、1匹が軽度、1匹が高度の精細胞変性が認められた (Table 3, Fig. 1D)。

精巣上体に関しては、幼若グループの対照群では異常が認められなかったが (Table 3, Fig. 2A)、ガルシニア摂取群で7匹中6匹が高度、1匹が軽度で管腔の精子減少が見られ、また異常細胞が出現していた (Table 3, Fig. 2B)。一方、成熟グループにおいては、対照群及びガルシニア摂取群ともほとんどが正常であったが、ガルシニア摂取群で1匹だけ精子減少が軽度に認められた (Table 3, Fig. 2C, 2D)。

#### 4. 一般血液性状

各群で一般血液性状を測定したところ、尿素窒素が幼若グループ並びに成熟グループで、対照群に比べてガルシニア摂取群で有意な上昇が見られた (Table 4)。また幼若グループでクレアチニンがガルシニア群で有意に低下した。脂質代謝に関連する項目については、幼若グループにおいて総コレステロール濃度がガルシニア群で対照群に比べて有意に高値を示した。また ALT が幼若グループにおいて、ガルシニア群で有意な低下が認められたが、それ以外の項目については、幼若グループ、成熟グループとも対照群とガルシニア摂取群で有意な差は見られなかった。

#### 5. 精巣関連ホルモン

精巣関連ホルモンの変動を見ると、幼若グループでは、ガルシニア摂取群でライデ

イチ細胞に関連するホルモン (テストステロン、LH) には変動が見られなかったが、セルトリ細胞に関連するホルモンに変動が認められた (インヒビンの低下、FSHの上昇) (Table 5)。成熟グループでは、すべてのホルモンにおいて対照群とガルシニア群で有意な差は見られなかった。

#### 6. 精巣中 FF-MAS、T-MAS、コレステロール量

幼若グループ、成熟グループとも FF-MAS、T-MAS は対照群に比べてガルシニア群で有意な低下が見られた (Fig. 3, 4)。精巣中コレステロール量は各グループとも対照群とガルシニア群で有意な差は見られなかった。

#### D. 考察

本研究は性成熟が完了して定常期に入った成熟ラットにガルシニアを投与した時の精巣毒性への影響について幼若ラットと比較した。

まず精巣重量であるが、幼若ラットではガルシニア摂取によって有意な低下がみられたが、成熟ラットでは有意な差は見られなかった。しかし、成熟ラットの精巣を病理組織学的に見ると、7匹中2匹に精細胞変性が認められた。精細胞変性が出た2匹のうち、特に高度の変性が認められた1匹については、左右の精巣重量は群内でも特に低く (左精巣重量の平均値が0.33gに対し、0.25g、右精巣重量の平均値が0.34gに対して0.23g)、インヒビン濃度も極端に低値を示していた (平均値が64.4pg/mLに対して26.6pg/mL)。また T-MAS も群内では低値を示していることから、これまでと同様な

ガルシニアによる影響が出始めていることが推察される。FF-MAS, T-MAS の全体の結果を見ると、両 MAS とも幼若、成熟グループともガルシニア摂取によって統計学的に有意な低下が認められた。セルトリ細胞の機能低下が障害に先行していることを推測させる。これは今後、さらにガルシニア摂取を続けると、成熟ラットにおいても精巣全体に影響が出る可能性があることを示唆している。従って、ガルシニア摂取による精巣毒性発現の進行は最初に精巣中の ATP クエン酸リアーゼの競合阻害によって、FF-MAS, T-MAS の蓄積阻害が起こり、その後精子形成へのシグナル伝達に影響して精細胞の分裂が停止することが推察される。精細胞から精子形成へのステップが阻止されることでやがて精細胞の変性が起こり、それに伴って精巣関連ホルモンの変動へと導かれることが推測された。

今回は一般血液性状も 17 項目について測定を行ったが、特徴としては尿素窒素が幼若グループ、成熟グループともガルシニア摂取群で有意な上昇が見られた。この現象は以前の報告と一致する。これは体内でのタンパク質分解、腎機能への影響などが考えられるが、Saito らの報告[1]からガルシニア最大投与群でのみ観察された現象であることから、高用量摂取の影響と考えられる。この影響の解明に関してはさらに検討が必要と思われる。一方、成熟ラットでは、Zucker 肥満ラットの場合と同様に、ガルシニア摂取で、副睾丸周囲脂肪の蓄積抑制が観察され、ガルシニアの体脂肪蓄積抑制にはラットの系統差は少ないと考えられる。

本研究は、28 日間という飼育期間で検討

した。この期間はちょうど成熟ラットで影響が出始めている段階であることが考えられるため、今後はさらに長期での検討を行い、明確な結論を得る必要があると思われる。

## E. 結論

本研究では、幼若ラット並びに成熟ラットでガルシニア摂取による精巣への影響について検討した。その結果、28 日間という短期の摂取期間では、成熟ラットへの影響はあまり見られなかったが、7 匹中 2 匹精細胞の変性が現れ、また精巣中 FF-MAS と共に T-MAS が有意に低下していたことから、成熟ラットでも精巣への影響が危惧される。今後、長期摂取による影響を検討して確証を得る必要があると思われる。

## 実験Ⅱ. 雌ラットにおけるガルシニア摂取による卵巣及び性周期への影響

### A. 研究目的

ガルシニア摂取による精巣毒性発現機序の 1 つとしてコレステロール中間体である、FF-MAS、T-MAS に着目し、ガルシニア摂取による精巣中の ATP クエン酸リアーゼの競合阻害によって、FF-MAS, T-MAS の蓄積阻害が起こり、その後精子形成へのシグナル伝達に影響して精細胞の分裂が停止することを推察した。MAS 物質は精子形成へのシグナル物質であると同時に卵母細胞の減数分裂開始のシグナル物質でもある可能性が示唆されている。この仮説に基づくとガルシニア摂取は卵巣へも影響を与える可能性が危惧される。そこで、雌ラット

にガルシニアを摂取させた時の卵巣および性周期への影響について検討することにした。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質

被験物質として、ガルシニアカンボジアの果皮抽出エキス（日本新薬ガルシニアパウダーS®；遊離型 HCA として 41.2%の含量、遊離型：ラクトン型=36.6:63.4）を用いた。

### 2. 動物

ラットは通常 4～5 日毎に性周期が変化することから、性周期を一致させた 7 週齢雌ラット (SD: IGS、SPF、日本チャールズリバー株式会社) をそれぞれ 25 匹購入し、5 日間標準飼料にて予備飼育後、群分けを行った。群分けは予備飼育終了時体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法によりそれぞれ 2 週間摂取グループと 4 週間摂取グループに分け、さらに各グループ内で対照群とガルシニア摂取群に分けた。

動物は温度 22±1℃、湿度 50-60%、照明 12 時間 (7～19 時点灯) に制御された飼育室内で個別に收容し、飼料及び水道水を自由に摂取させた。

### 3. 投与飼料の調製

ガルシニア添加粉末飼料の調製は独立行政法人国立健康・栄養研究所で実施した。標準飼料の組成は AIN-93G を基本とする飼料 (大豆油は 5wt%) にガルシニアパウダーを均一になるように混合したものを用いた。ガルシニア投与量は実験 I の結果に基づき、最も高用量の HCA として 3.0wt%

(154mmoles/kg diet) とし、対照食とガルシニア食の総エネルギーを統一し、ガルシニア食は対照食の  $\alpha$ -コーンスターチをガルシニアパウダーに置き換え、他の栄養素はすべて同量とした。

### 4. 一般状態の観察、体重、摂餌量及び膣インピーダンス値の測定

一般状態の観察は投与期間を通じて 1 日 1 回とし、体重は投与開始直前より週 3 回の頻度で行った。摂餌量は 2 日に 1 回測定し、計算により、1 日当たりの摂餌量を求めた。また性周期については膣インピーダンス法にて毎日午後 1 時～3 時の間に測定し記録した。

### 5. 生化学及び病理組織学的検査

#### 1) 剖検および器官重量

性周期のばらつきはその後の実験結果に大きく影響を与えることが危惧されるので、2 週間飼育グループならびに 4 週間飼育グループはそれぞれの終了週で発情前期を迎えた日に解剖することにした (3 日間で解剖を行った)。解剖当日の朝に食餌を抜いて、解剖までの時間を一定にした。ラットはネンブタール麻酔下で、腹部大動脈より採血した後、剖検の実施と肝臓、卵巣を左右別、子宮、腹腔内脂肪組織 (腎周囲脂肪と生殖器周囲脂肪) の重量をそれぞれ測定した。血液は直ちに遠心分離機 (3,000rpm, 15min, 4℃) にかけて、血清を得た。血清ならびに組織は測定まで -80℃にて凍結保存した。

#### 2) 組織学的検査

右卵巣は器官重量を測定後、約半分量を、



子宮は全量をそれぞれ 4%ホルマリン溶液 (pH7.0-7.5)固定し、常法に従って、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。この標本については光学顕微鏡を用いて組織学的検査を行った。

### 3) 一般血液性状

すべてのラットにおいて一般血液性状の測定を行った。分析項目は、総タンパク質 (TP)、アルブミン (Alb)、A/G比、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、グルコース (Glc)、遊離脂肪酸 (NEFA)、リン脂質 (PL)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (TCho)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、トランスアミナーゼ (ALT, AST)、コリンエステラーゼ (CRE)、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、ケトン体 (Ketone body) の 17 項目とした。

### 4) 血清中各種ホルモンの測定

卵巣関連ホルモンとして、エストラジオール、プロジェステロン、黄体ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH) の 4 項目について測定を行った。

### 5) 卵巣中 FF-MAS、T-MAS、コレステロールの測定

卵巣をホジネートした後、上記で示したと同様の方法にて抽出し、HPLCにて測定を行った。卵巣中コレステロール量はコレステロール C-テストワコーにて測定を行った。

### 6) 統計処理

すべての結果については平均±標準偏差

にて示した。各週齢毎での対照群とガルシニア群との比較は 2 サンプル *t* test (Dr.SPSS for Windows) にて有意差を決定し、有意水準は危険率 5%以下とした。

## C. 研究結果

### 1. 体重並びに摂餌量

飼育期間終了後の最終体重は 2 週間摂取グループ並びに 4 週間摂取グループとも対照群とガルシニア摂取群でそれぞれ有意な差は見られなかったものの、4 週間グループではガルシニア摂取群の方が有意に低値を示していた (Table 6)。1 日当たりの摂餌量は両グループとも、対照群とガルシニア群の間で有意な差は見られなかった。

### 2. 器官重量

両グループとも、左右の卵巣重量ならびに子宮重量は対照群とガルシニア摂取群で有意な差はみられなかった。また、腹腔内脂肪については、両グループとも、対照群に比べてガルシニア摂取群で有意な低下が認められた (Table 6)。

### 3. 卵巣及び子宮の組織学的検査

卵巣の病理所見については、2 週間摂取グループで対照群は異常が見られなかったが、ガルシニア摂取群では軽度の黄体の減少と卵巣の萎縮が 4 匹中 1 匹に見られた (Table 7)。一方、4 週間摂取グループでも対照群では異常が認められなかったが、ガルシニア摂取群では、6 匹中 1 匹に軽度な黄体の減少と卵巣の萎縮が見られた。しかし、これらは非常に軽度であること、また匹数も少ないことから、ガルシニア摂取による影響である可能性は少なく、偶発的な

所見である可能性が高い。

子宮に関しては、対照群ならびにガルシニア摂取群とも内腔の拡張、内膜の好酸球の浸潤が見られたが、これは両群とも見られていることから偶発的な所見であると考えられる(Table 7)。

#### 4. 一般血液性状

各群で一般血液性状を測定したところ、4週間摂取グループでAIP値ならびにLAP値でガルシニア摂取において有意な上昇が認められた(Table 8)。しかし、それ以外の指標についてはガルシニア摂取による変化は見られなかった。

#### 5. 卵巣関連ホルモン

卵巣関連ホルモンの変動を見ると、2週間摂取グループ及び4週間摂取グループともエストラジオール、プロジェステロン、FSH、LHすべての項目について、対照群とガルシニア摂取群で有意な差はみられなかった(Table 9)。

#### 5. 卵巣中FF-MAS、T-MAS、コレステロール量

2週間摂取グループ、4週間摂取グループともFF-MAS、T-MASは対照群とガルシニア群で有意な差は見られなかった(Fig.5,6)。また、卵巣中コレステロール量も各グループとも対照群とガルシニア群で有意な差は見られなかった。

#### D. 考察

ガルシニアカンボジアエキスを摂取すると精巣特異的に毒性が発現することが明らかとなった。この作用機序の1つとして

MAS物質が関連していると推察している。生体内でのコレステロール合成系で、卵巣の濾胞液中及び精巣中にFF-MASならびにT-MASが他の組織と比較して特異的に蓄積していることが報告され、現在、FF-MASは卵母細胞減数分裂の、またT-MASは精母細胞減数分裂の、それぞれシグナル物質ではないかと推測されている。雄ラットにガルシニアを摂取させるとFF-MAS及びT-MAS量が有意に低下することが明らかとなった。これらの結果より、雌においてもガルシニアを摂取することで卵巣への影響が危惧される。そこで、雌ラットへのガルシニア摂取による卵巣への影響について検討を行った。ラットの場合、雌の性周期は4～5日周期で、その間性ホルモンの激しい変動が考えられる。そこで、今回は膣インピーダンス法を用いて性周期の変化を見ることにし、ホルモンの変動を考慮して、すべてのラットを発情前期に解剖をすることにした。この膣インピーダンス法は性周期にともなって膣粘膜上皮の交流電気抵抗値が変化することを応用したもので、発情前期の判定に使用されている。そこでこの方法を用いて発情前期に現れる周期の変動について観察したところ、ガルシニア摂取による性周期の乱れは見られなかった。この結果より、ガルシニアを摂取しても排卵には影響が見られないことが推測されるので、性ホルモンも正常に分泌されている可能性が考えられた。事実、卵巣関連ホルモンとして、エストラジオール、プロジェステロン、LH、FSHの4つのホルモンを測定したが、ガルシニア摂取による影響は見られなかった。また、今回、卵巣中のFF-MASならびにT-MAS量を測定し

たが、対照群とガルシニア摂取群で有意な差は見られなかった。精巣中ではガルシニア摂取による FF-MAS、T-MAS の蓄積阻害が見られたが、卵巣に関しては MAS 蓄積には影響が見られなかった。この原因については、雌雄の生殖器におけるガルシニアの取り込みの違いなどが推察されるが現時点では明らかではない。

本来のガルシニアの有効性である、脂肪蓄積阻害に関しては、2週間摂取グループ、4週間摂取グループとも、ガルシニア摂取によって有意な低下が見られた。また、4週間飼育グループにおいては、終体重がガルシニア摂取群で有意な低下が認められた。摂食量に関しては、対照群とで有意な差が見られなかったことより、体重減少は腹腔内脂肪量の違いによるものであり、また腹腔内脂肪量の減少はガルシニア摂取による脂肪合成阻害の効果である可能性が推察された。

#### E. 結論

雌ラットでガルシニア摂取による影響について検討したところ、本来の有効性である脂肪蓄積については、ガルシニア摂取による蓄積抑制効果が認められた。卵巣及び性周期への影響については、28日間という比較的短期間では、病理組織学的そして生化学的にも卵巣への影響は見られなかった。

#### <参考文献>

[1] Satio M, Ueno M, Ogino S, Kubo K, Nagata J and Takeuchi M. High dose of *Garcinia cambogia* is effective in suppressing fat accumulation in

developing male Zucker obese rats, but highly toxic to the testis. *Food and Chem. Toxicol.*, 2005; 43: 411-419.

[2] Tacer KF, Haugen TB, Baltzen M, Debeljak N, Rozman Z. Tissue-specific transcriptional regulation of the cholesterol biosynthetic pathway leads to accumulation of testis meiosis-activating sterol (T-MAS). *J Lipid Res* 2002; 43: 82-89.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Saito M, Ueno M, Ogino S, Kubo K, Nagata J and Takeuchi M. High dose of *Garcinia cambogia* is effective in suppressing fat accumulation in developing male Zucker obese rats, but highly toxic to the testis. *Food and Chem. Toxicol.*, 2005; 43: 411-419.

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

Table 1 Composition of experimental diets

Dietary Component	Amount	
	Control	<i>Garcinia</i> (GA) <sup>3</sup>
alpha-Cornstarch	399.986	351.103
Casein	200.000	200.000
Glucose	152.000	152.000
Sucrose	100.000	100.000
Soybean oil	50.000	50.000
Cellulose	50.000	50.000
Mineral Mix (AIN-93) <sup>1</sup>	35.000	35.000
Vitamin Mix (AIN-93G)	10.000	10.000
L-Cystine	3.000	3.000
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014
<i>Garcinia cambogia</i> <sup>2</sup>	0	48.883

1. Vitamin Mix contained choline bitartrate at 2.5g/kg diet.

2. *Garcinia* powder S® (free form : lactone form=36.6:63.4)

3. The (-)-HCA content was 102mmoles/kg diet.