

Fig. 3 Mutagenic sensitivities of 8-OHG repair deficient *S.typhirium* strains to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 \* : Significantly different from the Spontaneous group (p<0.05)

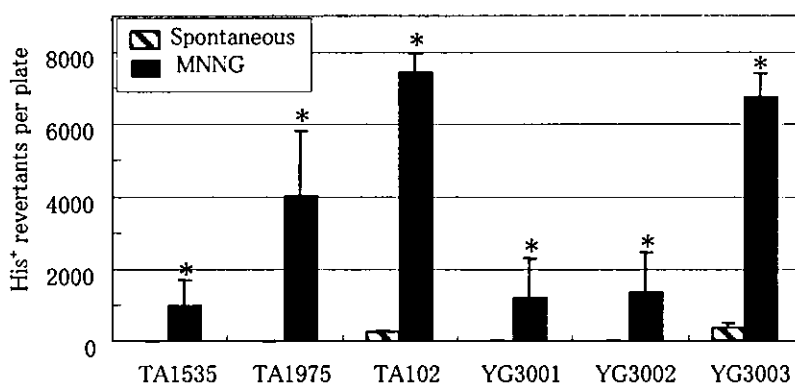


Fig. 4 Mutagenic sensitivities of 8-OHG repair deficient *S.typhirium* strains to MNNG  
 \* : Significantly different from the Spontaneous group (p<0.05)

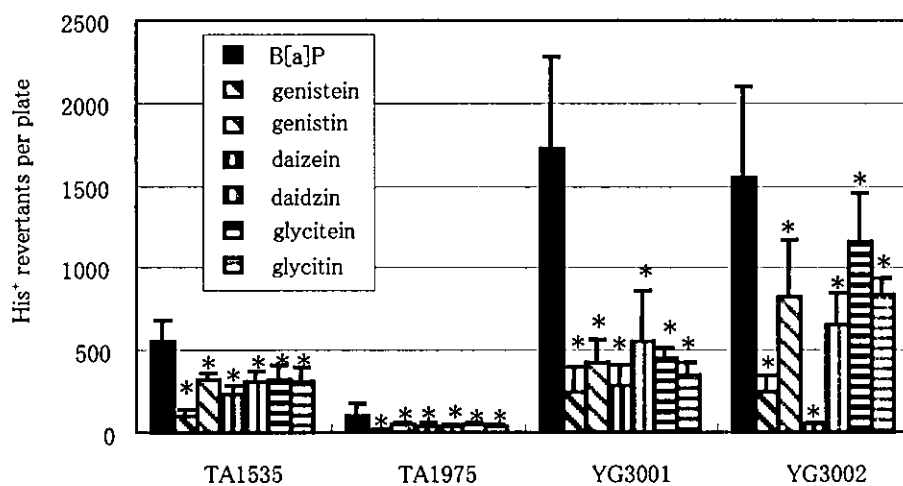


Fig. 5 Reductin of mutagenicities of B[a]P by the isoflavone  
 \* : Significantly different from the B[a]P group (p<0.05)

Table 6 Influences of ovariectomy and diet on body weight, food intake and food efficiency in rats.

	Sucrose diet		Fructose diet		Significance	
	OVX	Sham	OVX	Sham	OVX vs Sham	Sucrose vs Fructose
Initial weight(g)	324.1±14.5	311.5±16.5	312.9±18.6	312.8±17.2	NS.	NS.
Final weight(g)	366.2±11.4	337.8±15.9	343.0±23.7	320.5±13.5	P<0.05	P<0.05
Weight gain(g/d)	1.3±0.4	0.9±0.4	0.8±0.4	0.3±0.3	P<0.05	P<0.05
Food intake(g/d)	15.7±0.9	14.4±0.8	15.0±1.0	14.1±0.6	P<0.05	NS.
Food efficiency(%)	8.1±2.0	5.8±2.4	5.0±2.5	1.7±1.9	P<0.05	P<0.05

Values are means ±SD(n=8). NS.: Not Significant.

Table 7 Influences of ovariectomy and diet on weight of organs in rats (g).

	Sucrose diet		Fructose diet		Significance	
	OVX	Sham	OVX	Sham	OVX vs Sham	Sucrose vs Fructose
Liver	8.555±0.875	8.501±0.581	9.419±1.151	8.814±0.543	NS.	P=0.05
Uterus	0.170±0.038	0.603±0.115	0.179±0.040	0.623±0.131	P<0.05	NS.
Retroperitoneal fat	7.200±1.646	6.156±2.242	8.231±2.238	7.790±2.646	NS.	NS.
Gonadal fat	9.963±4.748	8.329±4.187	8.827±3.721	11.308±4.942	NS.	NS.

Values are means ±SD(n=8). NS.: Not Significant.

Table 8 Influences of ovariectomy and diet on serum lipid concentrations in rats(mg/dl).

	Sucrose diet		Fructose diet		Significance	
	OVX	Sham	OVX	Sham	OVX vs Sham	Sucrose vs Fructose
Total cholesterol	106.4±23.0	106.6±16.5	126.3±23.4	117.4±11.0	NS.	P<0.05
HDL-cholesterol	80.8±11.5	93.1±16.5	84.0±16.8	91.8±20.1	NS.	NS.
VLDL+LDL-chol	25.9±16.6	13.1±13.1	42.4±12.2	25.7±15.9	P<0.05	P<0.05
Triglyceride	82.1±19.7	73.2±40.1	42.1±13.7	56.2±23.9	NS.	P<0.05
Phospholipid	199.9±23.2	219.6±39.0	204.4±52.9	208.3±19.7	NS.	NS.

Values are means ±SD(n=8). NS.: Not Significant.

Table 9 Influences of ovariectomy and diet on liver lipid levels in rats (mg/liver).

	Sucrose diet		Fructose diet		Significance	
	OVX	Sham	OVX	Sham	OVX vs Sham	Sucrose vs Fructose
Total cholesterol	24.8±9.1	21.8±6.8	45.4±13.4	40.7±11.5	NS.	p<0.05
Triglyceride	338.7±162.0	272.2±107.5	664.8±230.9	498.4±112.9	NS.	P<0.05
Phospholipid	109.8±16.5	102.7±15.5	160.3±32.0	167.2±20.8	NS.	P<0.05

Values are means ±SD(n=8). NS.: Not Significant.

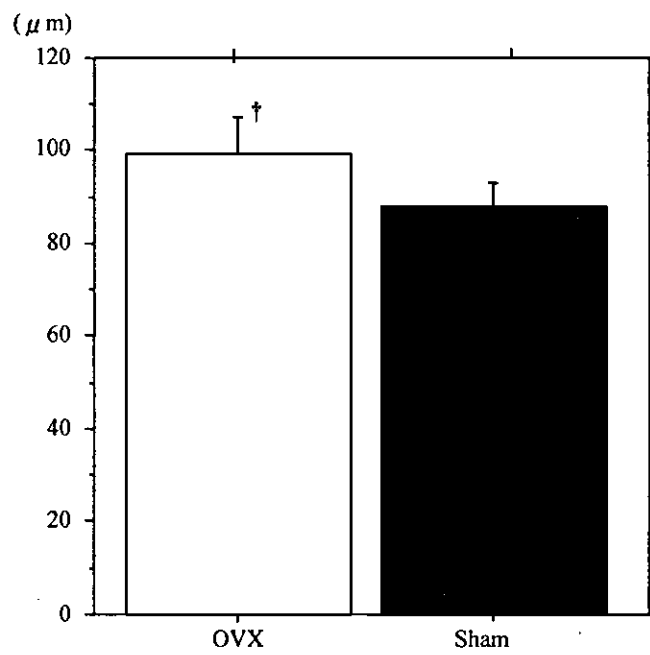


Fig 6 . Adipocyte size of retroperitoneal depot fat in OVX and Sham rats fed fructose diet

Bars represent 95% confidence intervals.  
†Significantly different from the Sham group ( $p < 0.05$ )  
□ OVX ■ Sham

健康食品成分の有効性を抗変異原性の面から評価する試験系を確立するために、まず各種変異原物質の突然変異誘発能を調べた。可視光線で活性化された B[a]P は G:C 塩基対に損傷を誘発するとともに、8-OHG の生成を介して突然変異を誘発した。特に *mutM<sub>5T</sub>* 株での突然変異誘発能が高かったことから、可視光線照射は活性酸素の生成を介して 8-OH-G を生成し、グアニン塩基の置換に伴う突然変異を固定したことが示唆された。B[a]P が共存する場合の誘発能はさらに高くなったことから、可視光線照射によって活性化された B[a]P が活性酸素を生じることによって、酸化された B[a]P が DNA 付加体を形成するとともに 8-OH-G を生成し、突然変異が誘発されることを示唆している。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は A:T 塩基対に損傷を誘発するとともに、8-OHG の生成を介して突然変異を誘発し、MNNG は G:C、および A:T 塩基対に損傷を誘発することが認められた。

なお、B[a]P の突然変異誘発能はイソフラボンにより減少した。これより本研究は、様々なタイプの突然変異を各種健康食品成分が抑制する効果を評価する方法として有効であることが示唆された。

### 3) 肥満・脂質代謝に関与する健康食品成分の有効性の評価

肥満発症モデル動物としてエストロゲンが欠乏した卵巣摘出ラットを用いて食餌因子の応答性を調べた。食餌因子として、AIN-76組成で用いられるスクロースに対し、吸収性が早く、脂肪合成を促進すると言われていたフルクトースを用いて比較することとした。高脂肪食を用いて通常食と比較する方法も考えられたが、後者は脂質の吸収を調節する健康食品成分の評価や摂取する脂質自身が体脂肪になりにくい素材の評価に有効であると考えられる。一方、本実験で用いた食餌組成は、主に体内で余剰の糖質が脂肪合成に回るため、内因性の脂質の代謝を見る上で有効であろう。

成長結果より、卵巣摘出により体重増加が促進されることが認められた。用いたラットはリタイア動物であるため、この時期の体重増加は主に脂肪の増加と考えられる。卵巣摘出により過食になることが知られており、本結果においてもペアフィーディングにより摂食量を調節したが、OVX群は給餌した飼料を全てのラットが食べ尽くしたため Sham群との間に有意差が認められた。したがって、体重増加の差の一部は飼料摂取量の差によるものと考えられる。しかし、飼料効率にも差が認められたことから一部はエストロゲン欠乏により代謝が変化し、脂肪蓄積が亢進したためと考えられる。

解剖時の臓器重量は肝臓においてフルクトース群で大きくなる傾向が認められたが、卵巣摘出による子宮の萎縮以外には有意差は認められなかった。脂肪組織重量に差が認められなかった理由として飼育期間が短かったことが考えられる。今後、2~3ヶ月の飼育期間を検討する必要がある。

血清コレステロール濃度は、食餌ならびに卵巣摘

出の影響が顕著であり、卵巣摘出ならびにフルクトース食により血清VLDL+LDLコレステロール濃度が上昇することが認められた。血清コレステロールの上昇はコレステロールの異化量の低下、すなわち胆汁酸合成量の低下によるものと考えられる。結果は示していないが、糞中への胆汁酸排泄が卵巣摘出したフルクトース群で低下していたことから推定される。

肝臓脂質量は、フルクトース群で有意に増加しており、肝臓において脂質合成が促進されたものと推定される。卵巣摘出によってもトリグリセリド量、コレステロール量ともに増加する傾向にあったが、有意差は認められなかった。脂肪組織重量と同様に、エストロゲン欠乏の影響が顕著に現れるには飼育期間をさらに長くする必要がある。

一方、重量に差はなかったが、脂肪細胞の大きさにはOVXの影響が認められた。脂肪細胞の肥大は生活習慣病の増悪因子となることが知られており、早期に評価する指標として脂肪細胞の大きさは有効な指標となりうる。

## E. 結論

本研究では、いわゆる健康食品として広く販売されているものから、がんの治療や予防、肥満改善、脂質代謝改善を標榜しているものを取り上げることとした。そこで今年度は、EUで取り組まれている健康強調表示に関するプロジェクトの報告書から関連項目の考え方を整理し、がん予防に関してはその評価法として簡便な *in vitro* の系の確立、肥満・脂質代謝評価のための動物実験の方法の確立を目指した。

PASSCLAIMでは食事に関連のあるがんに対して、多種の測定法を評価し、それらに対応した表示の可能性を示唆している。他方肥満に関しては専ら糖尿病予防を最終目標としているために、わが国におけるダイエット食品の評価の参考とはなりにくいことが明らかとなった。脂質代謝改善は心臓血管疾患の予防や改善を最終目標としているために、個別の評価マーカーに関する考え方の整理は大いに参考となった。

今回行った Ames 試験を応用した実験法は、様々な突然変異を引き起こす変異原物質の DNA への影響を検索し、健康食品成分の抗変異原性を評価するための簡便なスクリーニング法として有効であることが示唆された。今後は、ほかの評価法ともあわせて、健康食品成分の構造と抗変異原性との関連も検討する必要があると思われる。

リタイアラットに卵巣摘出術を施して食餌因子を変化させた場合、脂質代謝ならびに脂肪蓄積に及ぼす健康食品素材の影響を評価できると判断した。その指標として、血清VLDL+LDLコレステロール濃度、肝臓脂質の蓄積ならびに後腹壁脂肪の大きさや重量が有効であった。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

**G. 研究発表**

特記事項なし。

**H. 知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)。**

特記事項なし。

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

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究  
—食品のもつ生活習慣病（主にがん、循環器疾患、精神疾患）予防効果の評価方法の確立—  
食品のもつ生活習慣病（精神疾患）の予防効果の評価方法

研究分担者 志村 二三夫 十文字女子大学人間生活学部 教授

**研究要旨** 健康食品の有用性は安全性と有効性とのバランスの上に成り立つ。この観点から、ハーブを素材とすることの多い、精神保健・脳の健康への有用性を志向する製品の評価に適すと考えられる手順を提案し、その実地への適用を試みた。Natural Medicines Comprehensive Databaseを用いて一次スクリーニング・検索を行い、抗不安・催眠作用が期待されているバレリアンをモデル評価対象として選定した。二次スクリーニングのラットを用いた安全性試験では、バレリアンはヒトの1日摂取目安量の100倍の投与量であっても、臓器重量、肝臓チトクロムP450(CYP)の酵素活性、CYP分子種のmRNAレベルにおける遺伝子発現に、とくに影響を与えないことが判明した。ついで、対象素材の有用性に関する総合試験を、DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスによって実施し、ポジティブコントロールの抗不安・催眠薬ジアゼパム、またバレリアンのラットへの投与が、脳における遺伝子発現を変動しえるか否かを検討した。その結果、現時点の実験精度においても、このような遺伝子の存在を示すことが可能であった。とくに、ジアゼパムおよびバレリアンのいずれもが、海馬に特異性の高いことを見出した“solute carrier family 25, member 1 (Slc25a1)”の発現を抑制するという共通性が認められた。本実験は予備的段階にあり、断定はできないが、バレリアンはジアゼパムと少なくとも一部は重複する機序で脳に対して作用し、脳の健康・精神保健の用途に有用な効果をもたらす可能性が示唆される。以上より、DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスは、作用機序が明確ではない健康食品素材の有用性を評価において相当に有用性の高い手法であると結論される。

#### A. 研究目的

インターネットや健康情報誌等には、抑うつ、不安症状、認知症、睡眠障害、注意欠陥/多動障害、神経性食欲不振症等に関わる精神保健や脳の健康への有用性を示唆あるいは標榜している健康食品が少なくない。これらの中には、その科学的根拠に乏しいものが多い反面、ヒトを対象とした質の高いデザインの試験研究で、安全性・有効性が実証されているものもあるようである。こうした食品が、科学的根拠をもって実際に有効であり、また表示等による適正な情報提供を通じて安全・安心に利用され得るならば、国民の健康の保持増進および医療費削減への大きな効果が期待できる。

一方、この2月に改正された特定保健用食品制度では、条件付き特定保健用食品が新設され、許可のための審査基準が緩和された。とはいえ、当然のことながら、その審査基準で最も重視されているのは、ヒトを対象とした試験研究における研究デザインの質および得られた知見の有意水準である。しかし、これらをクリアした場

合であっても、作用機序が明確でなければ、高々条件付き特定保健用食品への道が残されているに過ぎない。

そこで、本研究では、ヒトを対象とした質の高いデザインの試験研究において、安全性・有効性が実証されてはいるが、作用機序が明確ではない健康食品の有用性の裏付けとなる知見を得るための評価方法の検討をめざした。対象品は、冒頭に述べたような精神保健や脳の健康への有用性を志向する健康食品の素材とし、食品の総合的な評価法として大きな可能性を秘めている、DNAマイクロアレイ法を用いるトランスクリプトミクス<sup>1)</sup>の技法に関する検討をおこなう。それには、ヒトを対象とした質の高いデザインの試験研究で、安全性・有効性の実証がなされている素材の現状を知る必要があるため、データベース等の利用による一次スクリーニング・検索を行い、評価の対象となるモデル素材を選定する。なお、精神保健や脳の健康への有用性を志向する健康食品の素材にはハーブが多い。ハーブには

肝臓障害をもたらしたり、薬物代謝系酵素に対する影響等を介して医薬品の薬効を修飾するものが少なくない<sup>2)</sup>。したがって、ハーブ素材については安全性試験による二次スクリーニングが欠かせない。これらのスクリーニングの手続きを経た上で、DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスへとステップを進め、検討評価を行う。

## B. 研究方法

### 1. 研究アプローチの概要

食品の有用性は、安全性と有効性とのバランスの上になり立つものであり、健康食品ではこの点がとくに重要となる。精神保健・脳の健康への有用性を志向する健康食品にはハーブを素材とするものが多いので、この点を考慮し、本分担研究では、原則として図1の概略にしたがって研究を進める。

まず、評価対象素材の一次スクリーニング・検索を行う。対象素材は、ヒト臨床試験において有用性の評価がある程度確定しているものの、作用機序や有効成分が明確とはなっていないものとする。ポジティブコントロールとなり得る既存医薬品も考慮する。

ついで、二次スクリーニングとして、当該素材についてラットを用いた安全性試験を実施する。ハーブ素材は肝臓への有害作用を示すことが多く薬物代謝酵素の誘導を介して、医薬品の有効性を低下させる等の作用を示す例が多いので、この点をとくに綿密に検討する。

これら二段階のスクリーニングを経た上で、対象素材の有用性に関する総合試験を、DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスによって実施する。ポジティブコントロールに採用した既存医薬品との比較、また場合によっては、実験動物を用いた行動解析・薬理学的試験の成績等も考慮して、総合評価へと進める。

### 2. 精神保健・脳の健康への有用性を志向する健康食品の有効性・安全性の科学的根拠に基づく評価の現状の調査

評価対象素材の一次スクリーニング・検索として、Natural Medicines Comprehensive Database<sup>3)</sup>を中心に、この調査を実施した。NMCDはDietary Supplement等の素材となる天然物を中心に、ヒト対象試験・研究に基づいて、その安全性については5段階、有効性については6段階の評定化を行っている。今年度は、不安症状、不眠、食欲不振、抑うつ、認知症、注意欠陥/多動障害、アルツハイマー病等への有用性を志向する素材について、このNMCDを広く検索し、安全性と有用性の評定

について検討した。

### 3. 安全性試験(とくに薬物代謝系酵素チトクロムP450の誘導作用の解析)

先の一次スクリーニング・検索の結果を踏まえた上で、抗不安作用や催眠作用があるとされるバレリアン(セイヨウカノコソウ: 学名 *Valeriana officinalis*) 抽出物を評価対象素材のモデルに選定し、これについて安全性試験を実施した。使用したバレリアン抽出物はインデナジャパン社より購入したもので、ヨーロッパ薬局方に適合した製品である(VARELIAN DRY EXTRACT Ph. Fr. X PWD: BATCH N. 05925/N1)。

実験動物にはWistar系雄ラット(体重約200g)を用い、ヒトの1日使用量の目安とされる15 mg/kg BWの1倍、10倍、あるいは100倍量のバレリアンを、フィーディングチューブを用いて8日間連日、それぞれの群のラットの胃内に投与した。ポジティブコントロールとして、複数のチトクロムP450(CYP)分子種を誘導する作用のあることを既に見出しているカバ製品(Kava “Nakamaru”: ECLECTIC INSTITUTE)を用いた。投与量はヒトの1日使用目安量の100倍に当たる2,125 mg/kg BWとし、やはり8日間連日胃内に投与した。また、ベンゾジアゼピン系抗不安薬ジアゼパム(2 mg/kg BW, 和光純薬)を8日間連日腹腔内投与した群も設定し、その影響を調べた。飼料(AIN-93M)および紫外線照射水は自由に摂取させた。

飼育終了時に肝臓を摘出し、速やかに定法にしたがってマイクロソームを調製した。また、RNA later RNA Stabilization Reagent(キアゲン)中に保存した肝臓小片を、Mixer Mill MM 300(キアゲン)を用いてホモジナイズした後、自動核酸抽出システム(QuickGene-800, 富士フィルム)を用い、マニュアルにしたがってトータルRNAを抽出した。

CYP分子種の誘導は、酵素活性の測定およびmRNAレベルでの遺伝子発現の両面から検討した。

CYP酵素活性は、リアルタイムPCR装置(Mx3000P: ストラタジーン)を蛍光マイクロプレートリーダーとして応用し、蛍光基質(ethoxyresorufin (ER), methoxyresorufin (MR), pentoxyresorufin (PR), benzyloxyresorufin (BR), dibenzylfluorescein (DBF))を用いるレートアッセイ法を確立して測定した。

mRNAレベルでのCYP分子種の遺伝子発現については、オリジナルプライマー(表1)を用いるリアルタイムRT-PCRにより、定量化を行った。測定用キットは、SYBR Greenベースのインターカレーション法による

Brilliant SYBR Green 1-Step QRT-PCR Master Mix (ストラタジーン) を用いた。反応液量は15  $\mu$  lとし、プライマーは100 nM, 試料RNAは5 ng/ $\mu$  lの濃度, その他は試薬キットのマニュアルに従い, リアルタイムPCR装置 (Mx3000P: ストラタジーン) を用いて測定を行った。反応温度と時間は次のように設定した: 50°C (30分), 95°C (10分), [95°C (30分), 60°C (1分), 72°C (30秒)] X 40サイクル, 72°C (5分), 95°C (10分)。標的遺伝子およびサイクロフィリン (ハウスキーピング遺伝子マーカー) について得られたCt値から, サイクロフィリンmRNAに対する標的遺伝子mRNAの量比を求め, バレリアン抽出物等の影響を評価した。

#### 4. DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスによる対象素材の有用性に関する総合試験

上記安全性試験に供したラットの脳より視床下部および海馬を摘出し, 肝臓の場合と同様に組織を保存し, またトータルRNAを抽出した。このトータルRNAのうち, バレリアン100倍量胃内投与群とその対照群の純水投与群より得たもの同士, およびジアゼパム腹腔内投与群とその対照群の溶媒 (5%エタノール/20%プロピレングリコール) 投与群より得たもの同士の比較により, DNAマイクロアレイによる解析を行った。また, 純水投与群より得た視床下部のトータルRNAと海馬のトータルRNAとの比較による解析も行った。解析の手順の概略は次のとおりである。

まず, トータルRNAをamino-allyl RNA amplification Kit (シグマジェノシス) を用いてマニュアルの通りに処理し, 増幅させるとともに, アミノアルルUTPを取り込ませてアミノアルルaRNAを作成した。つづいで, アミノアルルUTPの遊離アミノ基にCy3あるいはCy5をカップリングさせて, aRNAを蛍光標識した。比較を行う2つの試料はそれぞれ別の蛍光色素で標識した後, 等量を混合し, DNAマイクロアレイとハイブリダイズさせた (60°C, 18 h)。アレイを洗浄・乾燥後, FLA-8000スキャナー (富士フィルム) を用い, 5  $\mu$  mの解像度でCy3 (532 nm) およびCy5 (635 nm) の蛍光をスキャンして画像データを記録した。画像データ解析用のソフトウェアには Malti Guage Ver3.0およびArray Guage Ver2.0を用いた。

### C. 研究結果

#### 1. 精神保健・脳の健康への有用性を志向する健康食品素材の有効性・安全性の科学的根拠に基づく評価の現状の調査

評価対象素材の一次スクリーニング・検索として, 精神保健・脳の健康への有用性を志向する健康食品素材について, NMCDを広く検索した結果を表2に示す。方法の項に述べた症状・疾患等に対して, ヒトを対象とする試験研究において, ある程度の有効性および安全性が科学的に実証されている (考察の項に述べる) ものが, このマトリックス上の白地のセルに示されている。この部分は, 有効性の評価がPOSSIBLY EFFECTIVE以上であり, かつ安全性の評価がPOSSIBLY SAFE以上であるものに該当する。

これらは17品目あり, そのうちの7品目, すなわちセイヨウオトギリソウ, イチョウ葉, バレリアン, セージ, メリッサ, huperzine A (トウゲシバのアルカロイド), パッションフラワーがハーブ素材であった。本年度はこれらのハーブ素材のうち, 抗不安作用や催眠作用が人対象の試験研究である程度確認されており, NMCDにおいてもPOSSIBLY EFFECTIVEとの評定が行われているバレリアンを評価対象素材に選定し, 二次スクリーニングへと進めることとした。

#### 2. 安全性試験 (とくに薬物代謝系酵素チトクロムP450の誘導作用の解析)

本実験におけるポジティブコントロールであるカバ (100倍量) 投与群では, 肝臓の実重量および体重に対する相対重量が, 対照群に比べて有意かつ著明に増大していた (表3)。一方, バレリアンの場合は, 人の1日摂取目安量の100倍の投与量であっても, このような肝臓重量の増大, また他臓器への影響はまったく認められなかった。

肝臓ミクロソーム画分のCYP酵素活性に関しては, カバ (100倍量) 投与群において, PRを基質とした場合の活性は対照群に比べて上昇傾向にあったが, 有意差は認められなかった (図2)。一方, ER, MR, BR, DBFを基質に用いた場合には, カバ投与群における活性は対照群に比べて, 有意かつ著明な上昇を示した (図2)。しかしながら, バレリアン投与群においては, その投与量にかかわらず, いずれの基質を用いた場合にも, 対照群との間に有意差は認められなかった。また, 基質の種類にかかわらず, ジアゼパム投与群と対照の溶媒腹腔内投与群との間にCYP酵素活性の有意な差は認められなかった。

リアルタイムRT-PCRによるCYP分子種の発現の検討では, ポジティブコントロールのカバ投与群において, CYP1A1, CYP2B1, CYP3A1の発現が強く亢進していた (図3)。しかし, 今回検討した他の分子種の発現への



カバ投与の影響は認められなかった。また、バレリアン投与の場合は、たとえ人の使用目安量の100倍の投与であっても、今回調べたCYP分子種の遺伝子の発現に対する有意な影響は認められなかった(図3)。

### 3. DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスによる対象素材の有用性に関する総合試験

上記のように、バレリアンは、1日使用目安量の100倍という大量をラットに投与した場合においても、ポジティブコントロールに用いたカバとはまったく異なり、肝臓重量の増大や、肝臓ミクロソーム画分のCYP酵素活性の上昇、CYP分子種の遺伝子発現の亢進はもたらさなかった。したがって、バレリアンは当初に設定した二次スクリーニングをパスし得るものと判断されたので、DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスによる有用性の試験へと進めた。

この試験では、バレリアンと類似の作用を示すことが推測されている抗不安薬ジアゼパムをポジティブコントロールに用いることとした。また、脳の部位として、視床下部と海馬について検討することとした。

そこで、まず安全性試験に供したラットのうち、対照に用いた純水胃内投与群の脳より得た視床下部あるいは海馬をプールして得たトータルRNAを試料として、我々の技術力で両組織の遺伝子発現の差をDNAマイクロアレイで検出できるか否かを検討した。その結果、mRNAレベルでの発現が、海馬において視床下部の5倍以上の高値を示した遺伝子が5個、逆に1/5以下の低値を示したものが15個検出された(表4)。発現量が10倍以上の高値、あるいは1/10以下の低値であったものも、それぞれ1個および3個認められた。

次に、ジアゼパム投与の影響を見てみると、視床下部では、ジアゼパムの投与によって発現量が5倍以上に増加していたものは1個、1/5以下に低下していたものは0個であった(表5)。一方、海馬では、ジアゼパムの投与によって発現量が5倍以上に増加していたものが8個、1/5以下に低下していたものは1個検出された(表5)。このジアゼパム投与により発現が1/5以下に低下していた1個は、海馬における発現が視床下部のほぼ50倍に達していた“solute carrier family 25, member 1 (Slc25a1)”であった。

バレリアンの影響については、視床下部では、その投与によって発現量が5倍以上に増加していたものは1個、1/5以下に低下していたものは0個であった(表5)。一方、海馬では、バレリアンの投与によって発現量が5倍以上に増加していたものは1個であり、1/5以下に

低下していたものは5個見出された(表5)。このうちの1つは、海馬における発現がジアゼパム投与によって1/5以下に低下する“solute carrier family 25, member 1 (Slc25a1)”であった。

### D. 考察

この2月に特定保健用食品の制度が新しくなったが、そこでの審査基準で最も重視されているのは、ヒトを対象とした試験研究の研究デザインと有意水準である。しかし、これらをクリアした場合であっても、作用機序が明確でないと、高々条件付き特定保健用食品として認められにすぎない。そこで、本研究ではこのような作用機序が明確ではない食品の有用性の裏付けとなる知見を得るための方法論を検討することをめざした。

そのための手順として図1を提案し、これに沿って、評価対象となるモデル素材の検索・設定を行い、実際の評価作業を進め、上述の結果を得た。これらを踏まえて、以下各項目ごとに考察を加える。

#### 1. 精神保健・脳の健康への有用性を志向する健康食品素材の有効性・安全性の科学的根拠に基づく評価の現状の調査

NMCDは、Dietary Supplement等の素材の安全性・有用性について、科学的根拠に基づいて評定しているデータベースであり、同類のものの中で群を抜いている。

本研究では、このNMCDを広く検索し、不安症状、不眠、食欲不振、抑うつ、認知症、注意欠陥/多動障害、アルツハイマー病等への有用性を志向する素材について、安全性と有用性の評定にもとづいて、モデル素材の検索・設定をおこなった。その結果、ヒトを対象とする試験研究において、ある程度の有効性および安全性が科学的に実証されているものとして、17品目が収集され、そのうちの7品目はハーブ素材であった。この収集の目安としては、有効性の評価がPOSSIBLY EFFECTIVE以上であり、かつ安全性の評価がPOSSIBLY SAFE以上であるものとした。その根拠としては、NMCDのようなゴールドスタンダードともみなせるデータベースにおいて、有効性についてPOSSIBLY INEFFECTIVE以下であるもの、安全性についてPOSSIBLY UNSAFE以下と評定されているものは、EBMの理念が普及している昨今は、特定保健用食品の許可は得にくいと考えられるためである。

なお、NMCDにおける評定はおおよそ下記の基準(一部を抄出)によって行われている。

“EFFECTIVE” FDA, Health Canada, その他の政府機関によるレビューと同等の厳密な科学的評価を経

て、その製品は特定の適応に対して、OTC薬、オーファンドラッグ、処方薬製品と同様に有効であると判断される場合。

“LIKELY EFFECTIVE” 定評ある文献が、次に基づいて、その製品が特定の適応に対して有効であることに基本的に合意している場合：レフリーのいる、権威ある雑誌に公表された2件以上の無作為化比較試験（数百人～数千人の総被験者数）において得られた、臨床的意義のあるエンドポイントに対するポジティブな結果。

“POSSIBLY EFFECTIVE” 定評ある文献が、次に基づいて、その製品は特定の適応に対して有効であるかも知れないことを示唆している場合：1件以上の臨床試験における臨床的意義のあるエンドポイントに対するポジティブな結果。

“POSSIBLY UNSAFE” その製品の使用が危険であるかも知れないことを示唆する何らかの根拠がある場合。

“LIKELY UNSAFE” 定評ある文献が、次に基づいて、その製品が危険であり得ることに合意している場合：有意な有害作用を示す人対象研究や信頼のおける症例報告。

“UNSAFE” 厳密な科学的評価ないし信頼できる政府規制機関によるレビューを経て、その製品はしばしば臨床的に有意な危険を生じることが判明した場合。あるいは大規模市販後調査において、有意な有害作用の発生率が高いことが示された場合。

“INSUFFICIENT EVIDENCE” 安全性を評定化するための信頼できる科学的根拠が不十分。

こうした基準によって評定され、今回モデル評価対象物の候補に上がったものうち、まず、ハーブ素材を選定した。その理由としては、ハーブは多成分からなり、有効成分の特定が困難であるため、特定保健用食品とはなり難いハンディがあること。また、ハーブは本来ヒトにとっては生体異物であり、その処理のために肝臓の負担を大きくし、肝障害をもたらすリスクが小さくないこととともに、薬物代謝系酵素の誘導による医薬品の有効性低下を招来する可能性も考えられる<sup>2)</sup>ためである。

さらに、こうしたハーブのうち、セイヨウオトギリソウ<sup>4)</sup>やイチヨウ葉<sup>5)</sup>については作用機序の研究が進んでいるが、この点で立ち遅れが見られる点を考慮して、バレリアンをモデル評価対象物として、次のステップへと進めた。

## 2. 安全性試験（とくに薬物代謝系酵素チトクロム

### P450の誘導作用の解析)

我々は、ヒトの使用目安量の100倍量のカバをラットに投与すると、肝臓の重量が著明に増大するとともに、CYP1A1, CYP2B1, CYP3A1等のCYP分子種の遺伝子発現が強く促進されることを見出している<sup>2)</sup>。一方、カバの摂取にともなう肝障害の事例がヨーロッパを中心に数多く報告<sup>6)</sup>されており、カバ投与によるCYP分子種の遺伝子発現の亢進が、この肝障害の発生と関わっている可能性も示唆される。また、セイヨウオトギリソウの利用にともなう多くの医薬品の有効性の低下が知られているが、その主要な機序は、セイヨウオトギリソウの成分(hyperforin)によって肝臓におけるCYP3A4の誘導が亢進するためであると推定されている。また、イチヨウ葉は抽出物にもCYP分子種を誘導する作用が知られている。これらを鑑みて、健康食品としてのハーブ素材の有用性を評価する際には、肝臓におけるCYP分子種の誘導に対する影響を調べるのが重要であると考えている。そこで、モデル評価対象であるバレリアンについて検討してみたところ、ポジティブコントロールのカバとはまったく異なり、CYP酵素活性およびCYP分子種の遺伝子発現の双方とも、ヒトの使用目安量の100倍量であっても、バレリアン投与の影響をは認められなかった。この結果をもとに、評価手順を次のステップへと進めた。

### 3. DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスによる対象素材の有用性に関する総合試験

今回の検討では、ジアゼパムをポジティブコントロールとし、視床下部および海馬での遺伝子発現へのバレリアン投与の影響を調べた。

これに先立ち、実験技術上の妥当性を検討するために、視床下部と海馬との比較をおこなった。その結果、視床下部では“Pro-melanin-concentrating hormone”<sup>7)</sup>、“Arginine vasopressin”<sup>8)</sup>、“galanin”<sup>9)</sup>等の視床下部に特異性が高いとされている遺伝子の発現が高く、また海馬では“hippocalcin”<sup>10)</sup>のように、海馬に特異性が高いとされる遺伝子の発現が高く、妥当な結果が得られ、実験技術上の大きな問題点はないものと判断された。しかし、本実験は現時点ではあくまでも予備的な段階にあり、基礎的検討等に不十分な点のある可能性も否定できないことから、ジアゼパムやバレリアン投与による遺伝子発現の量的変化については、5倍以上、あるいは1/5以下の動きが見られたものに留めることとした。

この規定に従った場合にも、数は僅かであるが、ジアゼパムあるいはバレリアンの投与によって発現の変化する遺伝子が、視床下部あるいは海馬において検

出された。このことは、8日間という比較的短期の投与ではあるが、ジアゼパムあるいはバレリアンの作用を、その標的器官と推定される脳において検出することが可能であることを意味しており、本年度の研究課題の当初の目的はここに達成されたといえる。ただし、今回の検討では、ヒトの使用目安量の100倍のバレリアンを投与したラットにおける成績なので、今後、用量・再現性・精度等の検討を進めてゆく必要がある。

なお、今回の検討は予備的なものなので、断定的なことはいえないが、ジアゼパムおよびバレリアンの投与は、海馬に特異性が高いことが見出された“solute carrier family 25, member 1 (Slc25a1)”の発現を1/5以下に抑制するという知見が得られた。このことは、バレリアンがジアゼパムと少なくとも一部は重複する機序で脳に対して作用し、脳の健康・精神保健の用途に有用な効果をもたらしている可能性を示唆する。一方、これまで“solute carrier family 25, member 1 (Slc25a1)”の脳における機能についてはほとんど知られておらず、その発現がジアゼパムによって抑制される可能性が出てきたことは、このタンパク質の機能とともに、ベンゾジアゼピン系抗不安薬の作用機序を詳しく解明して行くにも有益な知見であると示唆される。

#### 文献およびURL

- 1) 上野川修一: イルシー 74, 15-19 (2003)
- 2) 志村二三夫: 平成15年度厚生労働科学研究報告書「特定保健用食材の安全性及び有用性に関する研究」主任研究者 池上幸江, pp 67-99
- 3) <http://www.naturaldatabase.com/naturaldatabase>
- 4) Mennini T, Gobbi M.: Life Sci. 75, 1021-1027 (2004)
- 5) Smith, J. V., Luo, Y.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 465-472 (2004)
- 6) Anke, J., Ramzan, I.: Planta Med. 70, 193-196 (2004)
- 7) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=176795>
- 8) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=192340>
- 9) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=137035>
- 10) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=142622>

#### E. 結論

本研究では、ヒトを対象とする試験・研究で有効性・安全性が示されているが、作用機序が明確ではない素材の有用性評価の方法として、動物実験におけるトランスクリプトミクスについて検討した。NMCDを用いた一次スクリーニング・検索によって、評価対象対照としてバレリアンを選定した。バレリアンは、カバをポジティブコントロールとし、CYP分子種の誘導作用を調べる二次スクリーニングをパスした。DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスでは、ポジティブコントロールのジアゼパムあるいはバレリアンのラットへの投与が、脳における遺伝子発現を変動しえるか否かを検討した。その結果、現時点の実験精度においても、このような遺伝子の存在が示された。とくに、ジアゼパムおよびバレリアンのいずれもが、海馬に特異性の高い“solute carrier family 25, member 1 (Slc25a1)”の発現を抑制するという共通性が認められた。本実験は予備的段階にあり、断定的なことはいえないが、バレリアンはジアゼパムと少なくとも一部は重複する機序で脳に対して作用し、脳の健康・精神保健の用途に有用な効果をもたらす可能性が示唆される。

以上より、DNAマイクロアレイを用いるトランスクリプトミクスは、作用機序が明確ではない健康食品素材の有用性を評価において相当に有用性の高い手法であると結論される。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 道川優子, 志村二三夫: ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして. I. ハーブとは何か. Food Style 21, 8 (10), 26-29 (2004)
- 2) 道川優子, 志村二三夫: ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして. II. ハーブサプリメントとは何か. Food Style 21, 8 (11), 20-22 (2004)
- 3) 道川優子, 志村二三夫: ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして. III. ハーブサプリメントの安全性・有効性の科学的根拠とその情報源(1). Food Style 21, 8 (12), 17-20 (2004)
- 4) 道川優子, 志村二三夫: ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして. IV. ハーブサプリメントの安全性・有効性の科学的根拠とその情報源(2). Food Style 21, 9 (1), 22-26 (2005)

- 5) 道川優子, 志村二三夫: ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして. V. セイヨウオトギリソウ. Food Style 21, 9 (2), 18-22 (2005)
- 6) 道川優子, 志村二三夫: ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして. バレリアン. VI. Food Style 21, 9 (3), 20-24 (2005)
- 7) 道川優子, 志村二三夫: ハーブサプリメントの安全・安心な利用をめざして. VII. バレリアン. Food Style 21, 9 (4), 印刷中 (2005)
- 8) 志村二三夫(分担執筆): 脳機能と栄養(横越英彦 編), pp. 125-149, 幸書房(2004)

## 2. 学会発表

- 1) 道川優子, 端田寛子, 伊東絵美, 二村綾子, 濱口恵子, 林 寛, 志村二三夫: Cytochrome P450 分子種の発現の系統的解析: ハーブサプリメント(HS)の健康影響試験への導入の可能性. 第59回日本栄養・食糧学会大会, 平成17年5月(予定).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

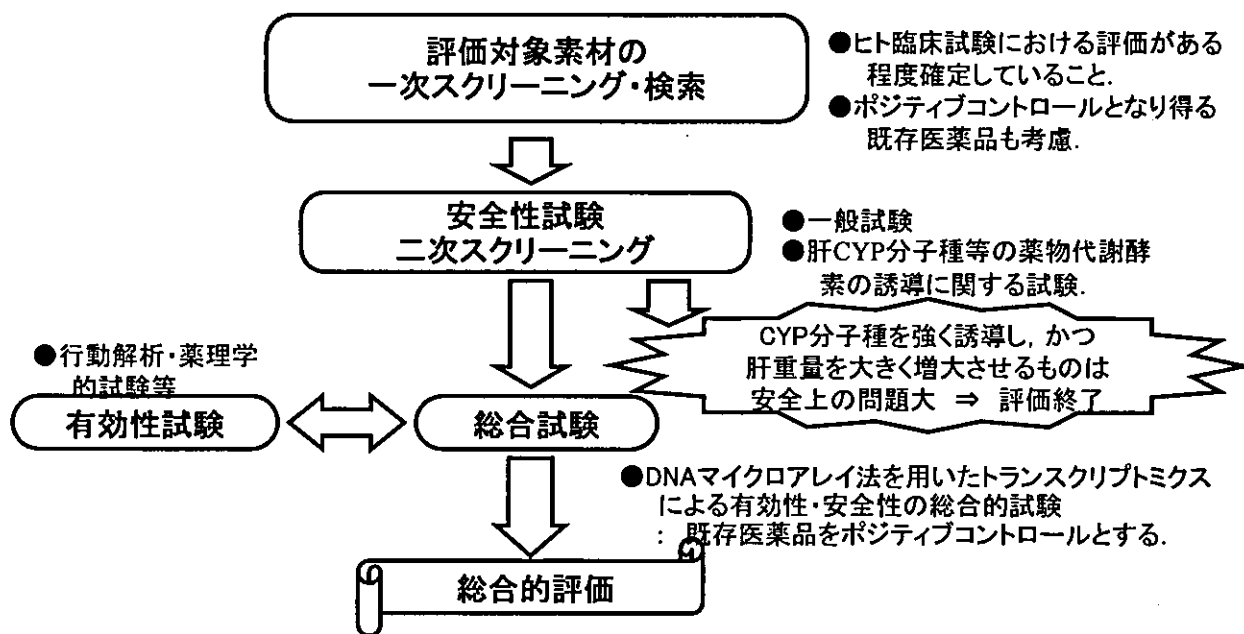


図1 ヒトを対象とする試験研究で有効性・安全性の実証がなされているが、作用機序が明確ではない健康食品（とくに精神保健・脳の健康を指向するハーブ）の有効性をトランスクリプトミクスによって検討・評価するための手順（提案）

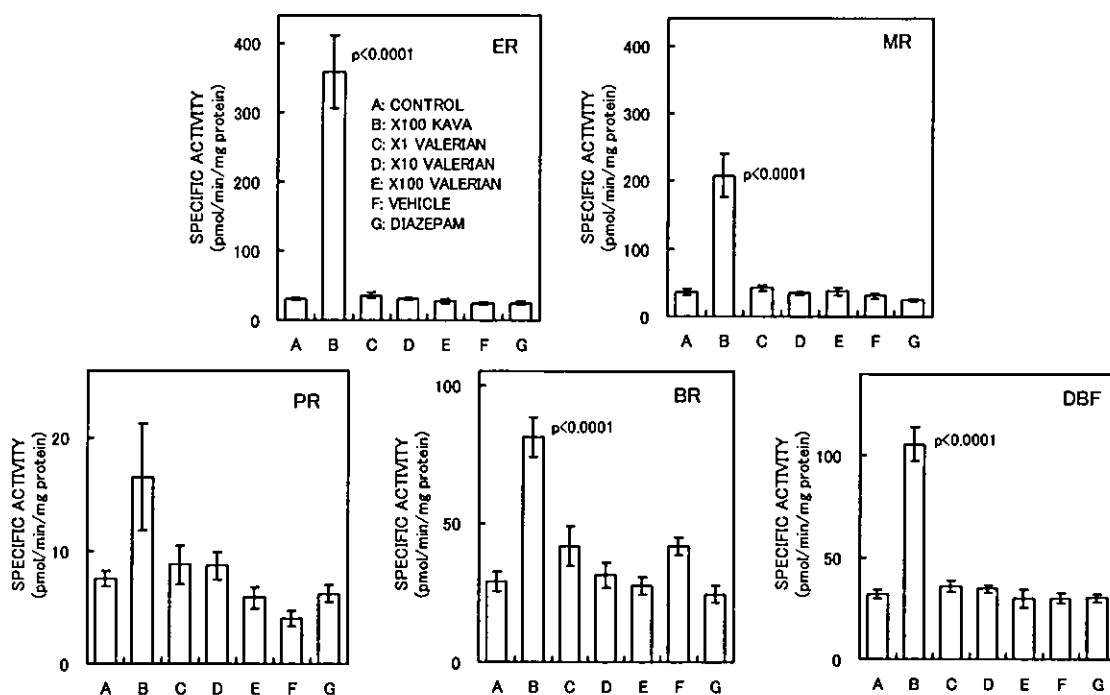


図2 ラット肝臓ミクロソームのCYP酵素活性へのバレリアン投与の影響

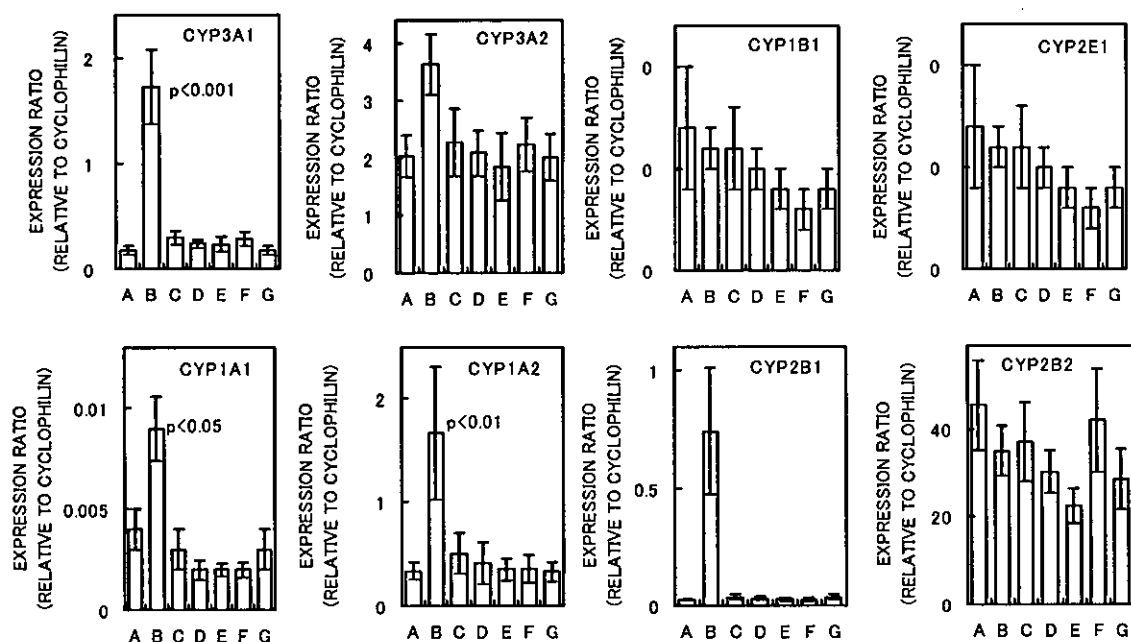


図3 ラット肝臓におけるCYP分子種の遺伝子発現へのバレリアン投与の影響 (A-G各群の処置は図2と同じ).

表1 リアルタイムRT-PCRに用いたプライマー

NAME	Genbank ACCESSION No.	Forward Primer	Reverse Primer	Product Size
Cyclophilin	NM 01 7101	5'-ATGGCAAATGCTGGACGAAAC-3'	5'-CCATGGCTTCCACAATGCTC-3'	130 bp
CYP1A1	NM 01 2540	5'-CTTTGTGAACAGTGGCAGGTTA-3'	5'-TCAGGCCGGAACTCGTTTG-3'	69 bp
CYP1A2	NM 01 2541	5'-AGAGCAGCAAGGACTTTGTGGAG-3'	5'-CGCCTGTGATGTCTGGATAC-3'	195 bp
CYP1B1	NM 01 2940	5'-TCACTGCAATTTAGACGGAACA-3'	5'-AGCTTCTGGCCTCTGCACAC-3'	148 bp
CYP2B1*	J 00719	5'-CAGGTGATCGGCTCACACC-3'	5'-GTCCTTGGTGACTCTGTGTGGTAC-3'	135 bp
CYP2B2*	XM 341808	5'-GATCAGGTGATTGGCTCTCACA-3'	5'-TGTCTTGGTGACTCTGTGTGGTAA-3'	139 bp
CYP2E1	NM 031543	5'-CACCTCAGTCACTGGACATCAAC-3'	5'-GAACAGGTGGCCAAAGTCA-3'	135 bp
CYP3A1*	NM 173144	5'-GGAGATCACAGCCCAGTCAA-3'	5'-GGGAAATGCAGGACAAAGGAA-3'	83 bp
CYP3A2*	NM 153312	5'-GGAAATACAAGACAAAGGAGAGTG-3'	5'-TGAAATCATAGCCCAGTCAAGT-3'	83 bp

\*オリジナルな配列をもつプライマーを設計した。

表2 Natural Medicines Comprehensive Databaseにおける安全性・有効性の評価  
 ー精神保健における用途を指向するDietary Supplement素材についてー

	EFFECTIVE	LIKELY EFFECTIVE	POSSIBLY EFFECTIVE	POSSIBLY INEFFECTIVE	LIKELY INEFFECTIVE	INEFFECTIVE	INSUFFICIENT EVIDENCE
LIKELY SAFE		抑うつ: S-アデノシルメチオニン, セイヨウオトギリソウ.	注意欠陥/多動性障害: 亜鉛, アルツハイマー病: アセチル-L-カルニチン, ナイアシン, ビタミンE, 神経性食欲不振症: 亜鉛, 不安症状: セイヨウオトギリソウ, 認知症: イチョウ葉, ビタミンE, 抑うつ: エイコサペンタエン酸, 魚油, 葉酸, 不眠: メラトニン, 術前不安・鎮静: メラトニン.	注意欠陥/多動性障害: カフェイン, ドコサヘキサエン酸, メマツヨイグサ油, アルツハイマー病: コリン, ビタミンC, 抑うつ: ドコサヘキサエン酸.	アルツハイマー病および認知症: レシチン, 抑うつ: メラトニン.		注意欠陥/多動性障害: 魚油, イチョウ葉, 鉄, L-カルニチン, マグネシウム, メラトニン, ナイアシン, パントテン酸, ビリドキシン, S-アデノシルメチオニン, アルツハイマー病: ビール, ワイン, 亜鉛, 不安症状: ビール, ワイン, 非定型うつ病: クロム, 認知症: L-アルギニン, 抑うつ: アセチル-L-
POSSIBLY SAFE			不安症状: バレリアン, アルツハイマー病: ホスファチジルセリン, セージ, メリッサ, 認知症: huperzine A (トウゲシバ <i>Huperzia Serrata</i> の成分のアルカロイド), 全般性不安障害: パッションフラワー, 不眠: バレリアン, メリッサ.	注意欠陥/多動性障害: フェニルニル, ピクノジェノール, アルツハイマー病: $\beta$ -カロテン, イノシトール, 認知症: NADH, 抑うつ: イノシトール, テロシン.			注意欠陥/多動性障害: アメリカニンジン, イノシトール, アルツハイマー病: GDP-コリン, $\alpha$ -グリセリルホスフォリルコリン, 不安症状: ベルガモット油, テアニン, 認知症: $\alpha$ -リボ酸, GDP-コリン, 抑うつ: ラベンダー, フェニルアラニン, ホスファチジルセリン, サフロニン.
POSSIBLY UNSAFE		不安症状: カバ.	ベンゾジアゼピン過剰薬症状: カバ, 抑うつ: 5-ヒドロキシトリプトファン, 更年期不安症状: カバ.	アルツハイマー病: 5-ヒドロキシトリプトファン.			不安症状: 5-ヒドロキシトリプトファン, 不眠: インドジャボク, 社会不安: カバ.
LIKELY UNSAFE							注意欠陥/多動性障害: L-トリプトファン, 抑うつ: L-トリプトファン.
UNSAFE							
INSUFFICIENT EVIDENCE							不安症状: スカルキャップ.

\* 本表は2005年2月の時点のデータに基づいて作成したごく概略的なものであり、消費者への情報提供には必ずしも適してはいない。  
 \*\* 安全性の評価については、通常の食用量以上(薬用量)の使用、またSELF MEDICATIONIについての場合の評価とした。  
 \*\*\* 本表には、日本では食品に用いることのできない医薬品成分(例えば、カバや5-ヒドロキシトリプトファン)も含まれているので、要注意。

表3 ラット臓器重量へのバレリアン投与の影響

		control	×100 keva	×1 valerian	×10 valerian	×100 valerian	vehicle	ジアゼパム
体重	終体重(g)	259.8 ± 6.7	260.1 ± 2.9	260.4 ± 4.6	261.8 ± 4.2	262.7 ± 6.0	261.2 ± 3.1	247.4 ± 4.8*
肝臓	実重量(g)	8.407 ± 0.304	11.335 ± 0.251***	8.316 ± 0.253	8.221 ± 0.184	8.396 ± 0.199	8.335 ± 0.161	7.444 ± 0.208**
	相対重量(g/100g)	3.234 ± 0.071	4.357 ± 0.077***	3.190 ± 0.058	3.139 ± 0.034	3.199 ± 0.048	3.194 ± 0.065	3.006 ± 0.034*
腎臓	実重量(g)	2.069 ± 0.071	2.190 ± 0.050	2.078 ± 0.058	1.983 ± 0.038	2.054 ± 0.044	2.032 ± 0.029	1.880 ± 0.029***
	相対重量(g/100g)	0.796 ± 0.016	0.843 ± 0.020	0.798 ± 0.020	0.757 ± 0.008	0.783 ± 0.010	0.779 ± 0.012	0.752 ± 0.008
副腎	実重量(g)	0.043 ± 0.004	0.048 ± 0.003	0.480 ± 0.004	0.380 ± 0.004	0.044 ± 0.003	0.043 ± 0.003	0.045 ± 0.003
	相対重量(g/100g)	0.017 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.015 ± 0.002	0.017 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.018 ± 0.001
胃	実重量(g)	1.444 ± 0.032	1.482 ± 0.026	1.405 ± 0.058	1.426 ± 0.030	1.399 ± 0.040	1.459 ± 0.035	1.457 ± 0.024
	相対重量(g/100g)	0.559 ± 0.019	0.570 ± 0.010	0.540 ± 0.020	0.545 ± 0.009	0.532 ± 0.006	0.559 ± 0.013	0.590 ± 0.010
小腸	実重量(g)	5.729 ± 0.181	6.109 ± 0.173	5.701 ± 0.149	5.464 ± 0.175	5.856 ± 0.213	5.185 ± 0.169	4.758 ± 0.149
	相対重量(g/100g)	2.208 ± 0.058	2.348 ± 0.060	2.191 ± 0.057	2.085 ± 0.044	2.227 ± 0.047	1.985 ± 0.058	1.921 ± 0.035
心臓	実重量(g)	1.143 ± 0.033	1.115 ± 0.051	1.095 ± 0.021	1.098 ± 0.035	1.095 ± 0.037	1.083 ± 0.028	1.043 ± 0.026
	相対重量(g/100g)	0.441 ± 0.012	0.428 ± 0.019	0.421 ± 0.006	0.419 ± 0.009	0.416 ± 0.007	0.415 ± 0.012	0.442 ± 0.007
胸腺	実重量(g)	0.072 ± 0.040	0.698 ± 0.029	0.679 ± 0.037	0.727 ± 0.019	0.710 ± 0.031	0.714 ± 0.032	0.650 ± 0.018
	相対重量(g/100g)	0.279 ± 0.018	0.268 ± 0.009	0.263 ± 0.018	0.278 ± 0.009	0.270 ± 0.009	0.273 ± 0.011	0.263 ± 0.005
脳	実重量(g)	1.959 ± 0.025	1.945 ± 0.026	1.951 ± 0.018	1.985 ± 0.036	1.980 ± 0.021	1.966 ± 0.033	1.982 ± 0.032
	相対重量(g/100g)	0.757 ± 0.020	0.748 ± 0.013	0.751 ± 0.014	0.759 ± 0.011	0.757 ± 0.019	0.753 ± 0.012	0.803 ± 0.019*
脾臓	実重量(g)	0.724 ± 0.026	0.759 ± 0.051	0.678 ± 0.019	0.717 ± 0.036	0.699 ± 0.026	0.727 ± 0.018	0.673 ± 0.038
	相対重量(g/100g)	0.279 ± 0.008	0.291 ± 0.018	0.261 ± 0.008	0.274 ± 0.012	0.267 ± 0.010	0.279 ± 0.007	0.272 ± 0.013

MEAN ± SE. \*, p < 0.05. \*\*, p < 0.01. \*\*\*, p < 0.001.

表4 視床下部と海馬の間で発現量に5倍以上の差が検出された遺伝子

Name	RATIO (Hippocampus/Hypothalamus)	Description
NM_012625	0.0092	Pro-melanin-concentrating hormone (Pmch), mRNA
NM_016992	0.0379	Arginine vasopressin (Diabetes insipidus), same as D (conflicting physical mapping) (Avp), mRNA
D00575	0.0697	mRNA for pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit precursor, complete cds.
NM_139326	0.1214	Proopiomelanocortin, beta (endorphin, beta) (Pomc2), mRNA
NM_017351	0.1332	pre-alpha-inhibitor, heavy chain 3 (PAlIC3), mRNA
J03624	0.135	galanin (a neuropeptide) mRNA, complete cds.
NM_012694	0.1361	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3 (Slc6a3), mRNA
NM_017139	0.1415	preproenkephalin 2 (Penk2), mRNA
U76997	0.1488	insulin-regulated membrane aminopeptidase IRAP mRNA, complete cds.
NM_017110	0.1597	cocaine and amphetamine regulated transcript (Cart), mRNA
AB010960	0.1601	mRNA for MIR, complete cds.
X66974	0.168	mRNA for calretinin.
AF322216	0.1817	inhibin binding protein long isoform mRNA, complete cds; alternatively spliced.
NM_013179	0.1896	Hypocretin (orexin) neuropeptide precursor (Hbrt), mRNA
NM_019278	0.1911	regulated endocrine-specific protein 18 (Respl8), mRNA
Y17328	5.0025	CDK108 mRNA
NM_017122	5.8817	hippocalcin (Hpcal), mRNA
M29787	5.9844	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase (Ipk3) mRNA, complete cds.
U25281	7.9177	SH3 domain binding protein (CR16) mRNA, complete cds.
NM_017307	52.6316	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter) member 1 (Slc25a1), mRNA

表5 ジアゼパムあるいはバレリアンの投与によって発現量が5倍以上または1/5以下に変化した遺伝子

	Name	Ratio (Treated/Control)	Description
Diazepam Hypothalamus	U56853	9.911	21-hydroxylase mRNA, complete cds.
Diazepam Hippocampus	AF302085	9.588	calcium-modulating cyclophilin ligand mRNA, complete cds.
	AF177430	6.552	3-O-sulfotransferase mRNA, complete cds.
	NM_019232	6.307	serum/glucocorticoid regulated kinase (Sgk), mRNA
	AF142759	5.523	Protein kinase C beta (Prkcb1), mRNA
	AF151367	5.368	Og-1 bHLH protein (olgl) mRNA, complete cds.
	AF231407	5.332	calmodulin III (Calmb) mRNA, 3' untranslated region.
	X76489	5.288	CD9 mRNA for cell surface glycoprotein.
	AF016252	5.007	Spinophilin mRNA, complete cds.
Valerian Hypothalamus	M60647	7.0258	tropoelastin mRNA, 3' end.
Valerian Hippocampus	L37380	5.0285	apical endosomal glycoprotein mRNA, complete cds.
	NM_134461	0.1208	calpain 5 (Capn5), mRNA
	NM_017307	0.1935	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter) member 1 (Slc25a1), mRNA
	L26288	0.1689	CaM-like protein kinase mRNA, complete cds.
	M97380	0.0924	chromaffin granule amine transporter (CGAT) mRNA, complete cds.



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

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究  
—食品のもつ生活習慣病（主にがん、循環器疾患、精神疾患）予防効果の評価方法の確立—  
食品のもつ生活習慣病（循環器疾患）の予防効果の評価方法

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

### 研究要旨

【目的】本研究は食品の持つ様々な有用性を検知し、評価するための高感度スクリーニングシステムの確立と応用を最終目標とする。基本的な研究戦略としては、被験食品の長期経口投与による生体機能変化を、生体レベル、組織レベル、細胞・分子レベルの3段階の項目にわたる探査を実施し、これにより食品素材の持つ繊細な作用を評価することを試みた。今年度は生活習慣病に対する有用性（予防効果）評価項目に関する検討を行った。実験動物には主に生活習慣病ラット（SHR/NDmcr-cp）を用い、被験食品としてはイチョウ葉エキス（GBE）を用いることにした。

【結果】GBEは経口摂取開始15週目より、加齢に伴う収縮期血圧の上昇を有意に抑制するとともに、血中ATPとその代謝産物レベルを有意に増加させた。しかし血中のカテコールアミンと一酸化窒素レベルには影響しなかった。また血漿HDLコレステロール値を有意に増加させたが、血糖値には影響しなかった。GBE16週間摂取後にSHR/NDmcr-cpから摘出した胸部大動脈標本において、アセチルコリンによる弛緩反応はコントロールのものに比べて有意に増強されていたが、ニトロプルシッドによる弛緩反応には変化は認められなかった。

【考察と展望】GBEの長期経口摂取は、SHR/NDmcr-cpの加齢にともなう血圧の上昇に対し軽度の抑制作用を示した。血管組織を使用した実験結果から、GBEは内皮細胞の一酸化窒素産生機能を促進的することにより、血圧に対し降圧的な影響を及ぼすものと推察される。今後はGBEの作用機序を分子レベルで解明するために、内皮細胞のムスカリン受容体と共役する細胞内シグナルに対する影響を、共焦点画像解析装置などを使って追求する。またテレメトリーによる連続無拘束循環動態測定を実施することにより、GBE長期投与による高血圧予防効果もしくは循環改善効果を検証したい。最終的には、GBEのスクリーニング完了後、そのデータを指針として他の健康食品のスクリーニングを行い、評価スクリーニングシステムを完成する。

### A. 目的

日本人の三大死因はがん、脳卒中、心臓病であるが、脳卒中や心臓病は高血圧、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病と深く関わっている。その原因には食生活習慣が大きく関与しているため、その治療や予防に食物栄養および健康食品からのアプローチは重要である。

本研究では、これら高血圧、高脂血症、糖尿病を有する生活習慣病モデル動物であるSHR/NDmcr-cp (cp/cp)(SHR-cp)を用い、日本では「いわゆる健康食品」として扱われているイチョウ葉エキスを投与し、その有効性を探索した。

また、ポジティブコントロールとして、特定保

健用食品として販売使用されている「杜仲茶」についても比較検討した。

## B. 研究方法

### 1. 目的を達成する為の基本的方略

食品の持つ様々な有用性を検知・評価するための高感度スクリーニングシステムの確立と応用を最終目標とし、今年度は生活習慣病に対する有用性（予防効果）評価項目の方法論的検証を行った。方法論的な研究戦略としては、被験食品の経口投与後による循環諸機能の変化を以下に示すように段階的に探査することとし、これにより食品素材の持つ緩徐で繊細な作用を網羅的に検出・評価することを試みた。

表1 網羅的スクリーニング項目

ステージ	評価対象	測定項目
生体レベル	循環動態	収縮期血圧(SP) 拡張期血圧(DP) 脈圧(PP) 心拍数(HR) 血流量(BF)
組織レベル	組織張力制御機能 赤血球変形能	血管張力変化 変時変力効果 赤血球小孔透過圧
細胞レベル 分子レベル	細胞内 Ca <sup>2+</sup> への影響	Ca <sup>2+</sup> レベルとその細胞内局在性変化

被験食品としては日本では「いわゆる健康食品」に属するイチョウ葉エキス (GBE) とすでに特定保健用食品として利用されている「杜仲茶」を用いることとし、イチョウ葉エキスの投与期間は4ヶ月とした。また実験動物には、高血圧・高脂血症・肥満・糖尿病を遺伝的に発症する生活習慣病ラット (SHR/NDmcr-cp) を用いた。また一部の実験で巣は ddY 系マウスを用いた。

### 2. 実験動物

実験には SHR/NDmcr-cp(cp/cp) (本文中では SHR-cp と略) 雄性ラット (6 週齢、日本 SLC、静岡) を購入し、全実験期間を通して恒温 (22±2℃)、恒湿 (55±2%)、定時照明 (7~19 時) の条件下で飼育し、1 週間馴化させた後に実験に使用した (実験開始時体重 197

g-233 g)。

また、ddY 系雄性マウス (5 週齢) は 2 週間、血圧・血流測定系に馴化した後、実験に供した。

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、実験に供された。

### 3. 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。また、杜仲茶は日立造船より供与されたものを用いた。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)、塩化アセチルコリン (第一製薬、東京)、フェニレフリン塩酸塩 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)、N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)、ニトロプルシッドナトリウム (SNP) (ナカライテスク、京都)、塩酸ニカルジピン製剤 (山之内製薬、東京)、その他の試薬 (和光純薬、大阪) は特級品を使用した。

### 4. イチョウ葉エキス反復摂取

SHR-cp ラットをコントロール食群 (8 匹) とイチョウ葉エキス添加食群 (7 匹) の 2 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イチョウ葉エキスを 0.5% の割合で添加した市販粉末飼料を 16 週間にわたって自由摂取させた。

### 5. 心拍数および血圧の測定法

ラットの血圧および心拍数は、被験食品摂取期間中、1 週間毎に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。

## 6. 血液中グルコースおよび尿中グルコース、蛋白量の測定

摂取期間中の血液中グルコース量の測定には、血糖測定機（グルテストエース R、三和化学研究所、名古屋）を用い、血液サンプルは尾動脈から採取した。尿中グルコースおよび蛋白量は、市販の測定キット（和光純薬、大阪）を用いて測定した。

イチョウ葉エキス摂取開始 12 週間後に、1 夜絶食させた後、20%グルコース液（投与量は 4 mL/kg 体重）を経口投与して糖負荷試験を行った。血糖値は、グルコース投与前、投与 30、60、120 分後に血糖測定機を用い尾動脈から採血、測定した。

## 7. ニカルジピンに対する相互作用に関する検討方法

15 週間後、コントロール食群とイチョウ葉エキス添加食群それぞれのラットにニカルジピン (30 mg/kg) を経口投与し、一定時間毎に血圧および心拍数を測定した。

## 8. 生化学検査値の測定方法

16 週間後にペントバルビタール麻酔下 (60 mg/kg, 腹腔内投与)、腹部大動脈より採血し、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、肝臓、胸腺、心臓、腎臓および副腎を摘出してその重量を測定した。生化学検査値は以下のようにして測定した。

### (1) 血液および尿中の各種パラメーターの測定方法

血液中 GOT、GPT、グルコース、総コレステロール、HDL-コレステロール、アルブミン、グロブリン、クレアチニン、総蛋白および尿中グルコース、総蛋白は市販の測定キット（和光純薬、大阪）を用いて測定した。

### (2) 血液中のインスリン量の測定

ラットから採取した血漿中のインスリン量を、市販の測定キット（超高感度ラットインス

リン測定キット、森永生科学研究所、横浜）を用いて測定した。

### (3) 血液中のカテコールアミン類の測定

ラットから採取した血漿に内標準物質 (3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide)、過塩素酸、Tris Buffer、アルミナを加え、カテコールアミン類を抽出し、高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器を用いて定法に従って測定した (Naunyn-Schmiedeber's Arch. Pharmacol., 338,221(1998))。

### (4) 血液中のプリン物質の測定方法

ラットから採取した血漿に 2 クロロセトアルデヒドと内標準物質 ( $\alpha, \beta$ -methylene ADP) を加え、80°C で 40 分間反応させてプリン物質をエテノ化し、高速液体クロマトグラフィー・蛍光検出器を用いて測定した (Anal. Biochem., 262,33-38(1998))。

### (5) 血液中の TBARS 量の測定方法

ラットから採取した血漿中過酸化脂質値は、八木法 (Biochem. Med., 8,403-414(1973)) を用いて測定し、チオバルビツール酸反応物である TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 量として算出した。

## 9. ラット摘出胸部大動脈弛緩作用の測定方法

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°C の Krebs-Henseleit 液（以下クレブス液と省略、NaCl 118.4 mM、KCl 4.7 mM、CaCl<sub>2</sub> 2.2 mM、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM、MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM、NaHCO<sub>3</sub> 25.0 mM、glucose 5.6 mM）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ジューサー (T-7、NEC-三栄、東京) および歪み圧カンプ (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、AD-Instruments Pty

Ltd., Australia) を用いて行った。胸部大動脈リング標本はフェニレフリン ( $10^{-7}$  M) によりあらかじめ収縮させ、アセチルコリン (ACh;  $10^{-10}$ ~ $10^{-5}$  M) 又はニトロプルシッドナトリウム (SNP;  $10^{-10}$ ~ $10^{-5}$  M) 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。なお、弛緩反応の大きさはパバペリン ( $10^{-4}$  M) により生じる最大弛緩反応を 100%とした時の弛緩率 (%) で表示した。

## 10. テレメトリーによる循環動態測定法

テレメトリー自動計測システムは、基本的に、1) データ取得分析システム、2) システム関連装置 (データ変換マトリックス、DEM, および大気圧校正装置 APR-1、プライムテック、東京)、3) 実験動物埋め込み型測定送信受信システムで構成された (図1)。

埋め込み型測定送信器 (TA11PA-C40、プライムテック、東京) のセンサーカニューレの先端部はラットの腹部大動脈に挿入固定した。その位置は腎動脈分岐部と総腸骨動脈分岐部の中間部とし、固定は外科手術用アロン $\alpha$ を使用した。送信機および電池部は腹壁縫合時に腹直筋に縫合固定した。位置は正中線上の腹部中央とした。尚、埋め込み手術は専用手術室にてペントバルビタールを (30 mg/kg, 腹腔内投与) 麻酔全量と薬として与え、術中はエーテルの吸入麻酔を施して麻酔深度をコントロールした。また、縫合前後に患部に抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン、ハンギゾン) を適宜適用した。

術後、ラットを受信ボード (RPC-1、プライムテック、東京) 上の専用ケージに一匹ずつ入れ、翌日から送信機のスイッチをオンにして活動量、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧などのイベント信号を解析装置に取り込んで、手術の回復とそれに引き続いて起こる病態的変動の測定を開始した。

なお、実験期間中は、循環動態に対するノイズ的な影響 (外部環境の変化による刺激) を極

力排除するために、水・餌の交換、その他の作業は午後1時から2時までの間に行い、その他の時間はいっさいの出入りを制限した。

測定は10分毎に一匹ずつ測定し、一匹に対する毎回の測定時間は30秒間とした。以後、連続的にこの条件で測定を行った。イチヨウ葉エキスの投与は、ゾンデを用いた経口投与とし、投与量は100mg/kgとした。なお、対照群のラットには同用量の溶媒 (生理食塩水) を同様に経口投与した。これらの投与は午後1時から2時の間に行った。

## 11. 共焦点顕微鏡画像解析装置による細胞内カルシウム動態の測定方法

標本を図2に示す共焦点顕微鏡システムに装着し、488 nm アルゴン (Ar) レーザー励起により得られる 515~560 nm の共焦点蛍光画像を5秒間隔で取得した。データの記録・解析はARGUS-50を用いて行った。顕微鏡画像取得にはニポウ式共焦点スキャナユニット (CSU 10、横河電機、東京) を取り付け、倒立顕微鏡 (ECLIPSE TE 300、ニコン、東京) と画像解析装置 (ARGUS-50、浜松ホトニクス、浜松) を用いた。取得した画像の蛍光強度 (細胞内カルシウムイオンレベル) は、薬物刺激前 ( $F_0$ ) と刺激後の最大強度 ( $F$ ) を測定し、その比 ( $F/F_0$ ) を算出して表示した。

## 12. 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) を用いた。有意差検定の結果、危険率5%未満のものを有意差ありとした。

また、3群以上の場合の有意差検定には、ANOVA (Analysis of Variance) の Bonferroni /Dunn 法を用いた。

実際の統計計算は Stat View II プログラム (Abacus Concept Inv. Berkeley, CA, USA) を用いた。