

受けて化学構造の異なる活性型に変換された後に作用を発揮するもの(例えば大部分のビタミン)と、こうした代謝活性化を経ずに作用を発現するもの(例えばミネラル)とに分けられる(図1)。加えて、このような体内動態や作用機序に応じて、消化・吸収系、血中輸送タンパク質、薬物代謝系、細胞膜輸送体やイオンチャンネル、標的酵素・受容体等々の機能素子の阻害・賦活化や誘導・抑制等の現象が引き起こされる。こうして、食品成分同士あるいは医薬品と相互作用を生じる可能性もある。

したがって、作用機序の解明は、確かに、“作用機序が明確ではない食品”が別格の健康食品に昇格するための王道に相違はないが、たとえそこには到達しないにしても、関与成分の体内動態や標的部位を特定する作業は極めて重要といえる。

このことと関連するが、EUとILSI ヨーロッパ(特定非営利活動法人国際生命科学協会ヨーロッパ支部の共同プロジェクトであるFUFOSE (Functional Food Science in Europe: 1996~1999) は、健康機能表示として一般に認められている栄養機能を超えた“高度機能強調表示”と“疾病リスク低減表示”に関する概念と科学的根拠に基づくマーカーについての提示を行っている(図2)<sup>3,4)</sup>。これらいずれの表示も適切な科学研究に基づく場合に限り、正当と認められるとされ、とりわけ、食品成分への曝露、高度標的機能、疾病リスク低減のマーカーが重要とされている。

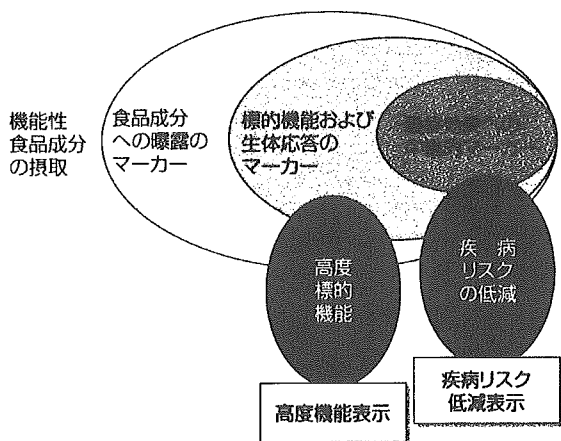


図2 健康機能表示とその裏づけとして求められる科学的根拠に基づくマーカーとの関係(FUFOSEの提示による)。文献3の図を引用。

したがって、関与成分の体内動態や標的部位を特定する作業は、“高度機能強調表示”へとつながり得るマーカーの探索作業の一環であるといえる。なお、この作業の実施に関しては、消化管で吸収されて真の体内に取り込まれるが、体内での化学変化を受けない成分、例えばミネラルについては、標的部位の探索の際に避腸的な投与法を採用することが原理的に可能である。こうすることで、経口摂取させた場合に生じる吸収過程等における実験動物の個体差によるバラツキを除外でき、実験の精度をより高くできるものと推定される。

これらの作業課題がクリアされるならば、構造活性相関に関する知見等も考慮することで、有効性のもとより、安全性に関する科学的根拠も充実することになり、作用機序が明確な食品に準ずるものとして扱うことも可能になると考えられる。

## 2. 作用機序は明確ではないが、脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されている食品素材の探索

脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験で検討されている食品素材(米国でDietary Supplement素材として用いられているもの)について、Natural Medicines Comprehensive Database (NMCD)を中心に探索した結果を表2に示す。これらのうち、有効性の評価がPossibly Effective以上、かつ安全性の評価がPossibly Safe以上であるものが、上記1に基づいて下記3を進めるのに値する素材と推定される。これらに該当するものは20品目あったが、そのうち、標的部位の探索の際に避腸的な投与法を採用が可能なものとして亜鉛を選定した。亜鉛は、脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性に関しては、注意欠陥/多動性障害および神経性食欲不振症に対する有効性が人試験においてある程度実証されているといえる。しかしながら、その作用機序が不明確であることはもとより、これらの用途における効果に関連して、脳が直接の作用部位となっていることを示した報告は見当たらなかった。

表 1 脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験で検討されている食品素材—Dietary Supplement素材(日本では医薬品に区分されるものも含む)に関するNMCDにおける評価—

	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. パーキンソン病: 紅茶, 緑茶, カフェイン, ビタミンE.	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: 亜鉛, ビール, ワイン. 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-強迫性障害: セイヨウトギリソウ. パーキンソン病: フェニルアラニン.
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. リチウムの副作用: イノシトール. 強迫性障害: イノシトール. パニック障害: イノシトール.	注意欠陥/多動性障害: フェニルニン, ビクノジェノール. 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. 統合失調症: イノシトール. 自閉症: イノシトール.	糖尿性ニューロパシー: イノシトール.	注意欠陥/多動性障害: アメリカンジン, 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ルコリン. 不安症状: ベルガモット油, テアニン. 認知症: $\alpha$ -リポ酸, 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, サフラン. パーキンソン病: GDP-コリン, ムクナ, NADH, オクタコサノール.	
POSSIBLY UNSAFE		不安症状: カバ.	ベンゾジアゼピン退薬症状: 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.

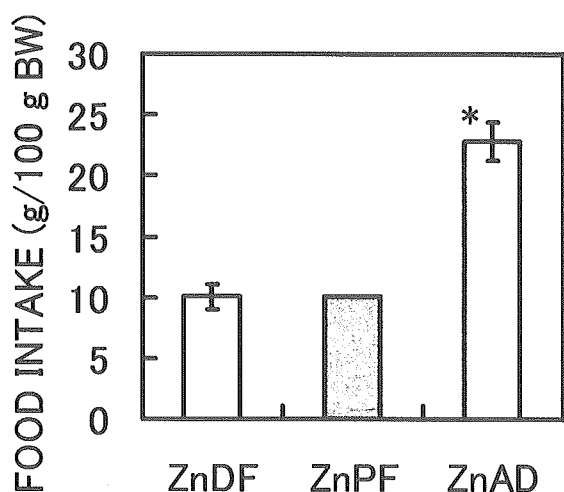


図 2 亜鉛欠乏食群 (ZnDF), ペアフィーディング群 (ZnPF), 亜鉛添加食群 (ZnAD) における摂食量の比較。\*,  $p < 0.05$ .

### 3. “作用機序が明確ではない食品”から“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へと変容させるための作業事例

上記1および2を踏まえ、亜鉛について“作用機序が明確ではない食品”から“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へと変容させるための作業事例を示すこととした。

亜鉛が食欲の維持・増進に重要な役割を果たす栄養素であることは、古くから知られている。例えば、成長期のラットを亜鉛欠乏食で飼育すると、数日以内に摂食量が低下し、体重増加が抑えられる<sup>5, 6)</sup>。また、摂食量の低下にともない、3-4日の周期をもつ摂食量の変動、すなわちサイクリック・フィーディングという特異な摂食行動パターンが発現する<sup>5-7)</sup>。一方、亜鉛欠乏状態における食欲の低下は亜鉛の補給により割合に速やかに回復するとされる<sup>8)</sup>。しかし、亜鉛の食欲増進作用の機序を探るために重要なこの摂食量増大のタイミング、またこの変化にともなう生理的変化等を時間単位で把握した報告は見当たらない。これらの背景の下に、下記の検討を行った。

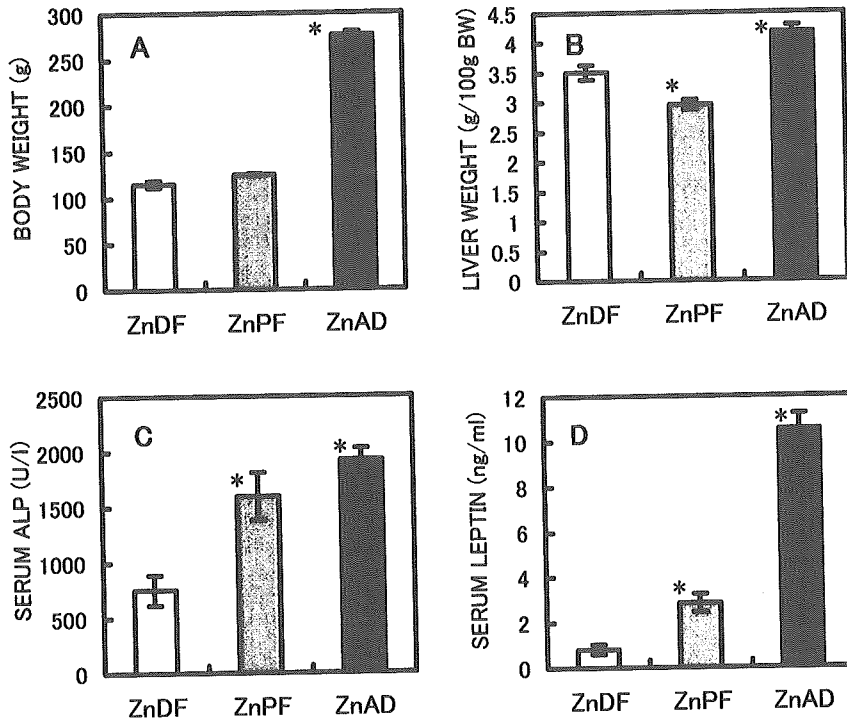


図 3 亜鉛欠乏食群 (ZnDF), ペアフィーディング群 (ZnPF), 亜鉛添加食群 (ZnAD) の比較. \*,  $p < 0.05$ .

亜鉛欠乏食摂取群では、亜鉛添加食摂取群に比べ、摂食量、体重、肝臓相対重量、血清ALP活性、血清LEP濃度が有意に低下していた(図3, 4)。また、血清ALP活性、血清LEP濃度については、ペアフィーディング群と比べても、有意な低下が認められた(図4)。このように、食餌性の亜鉛は食欲の維持・増進に重要な役割を果たすという従来からの説が確認された。

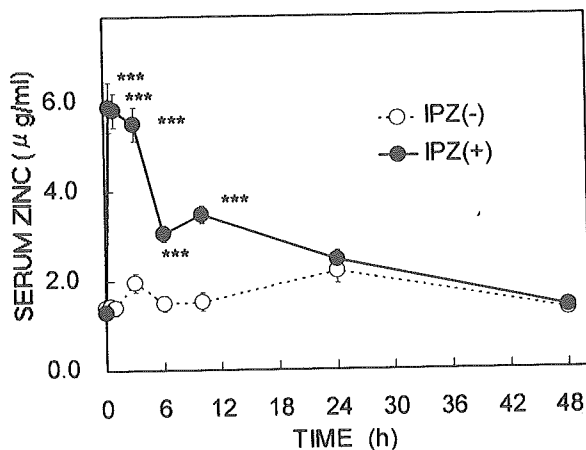


図 4 亜鉛欠乏ラットへの亜鉛腹腔内投与(IP)後の血清亜鉛濃度の推移

一方、このような亜鉛欠乏ラットに亜鉛を腹腔内投与すると、血清亜鉛濃度は速やかに上昇し、24時間後には対照群のレベルにまで低下した(図5)。この間、体重や脳の相対重量には亜鉛投与の影響は認められないが、摂食量、また肝臓ならびに小腸粘膜の相対重量は、亜鉛投与にともなって有意に増大することが明らかになった(図6)。さらに、血清ALP活性や血清LEP濃度も亜鉛投与に対して速やかに応答し、投与後24時間以内に上昇することが判明した(図7)。これらの結果より、腹腔内投与された亜鉛は、今回調べた指標に関し、食事性亜鉛と同等の効果を有するものと推定された。

なお、亜鉛投与にともなう血清LEP濃度の上昇は、ラットを絶食条件下におくと認められなかった(図7)。また、亜鉛欠乏食を強制投与した場合にも血清LEP濃度の上昇がもたらされる(図8)。しかし、亜鉛投与後の血清LEP濃度の上昇は摂食量の増大に先行しているため、亜鉛による摂食量の増大の二次的な効果として血清LEP濃度の上昇がもたらされるという単純な機序は考え難い。

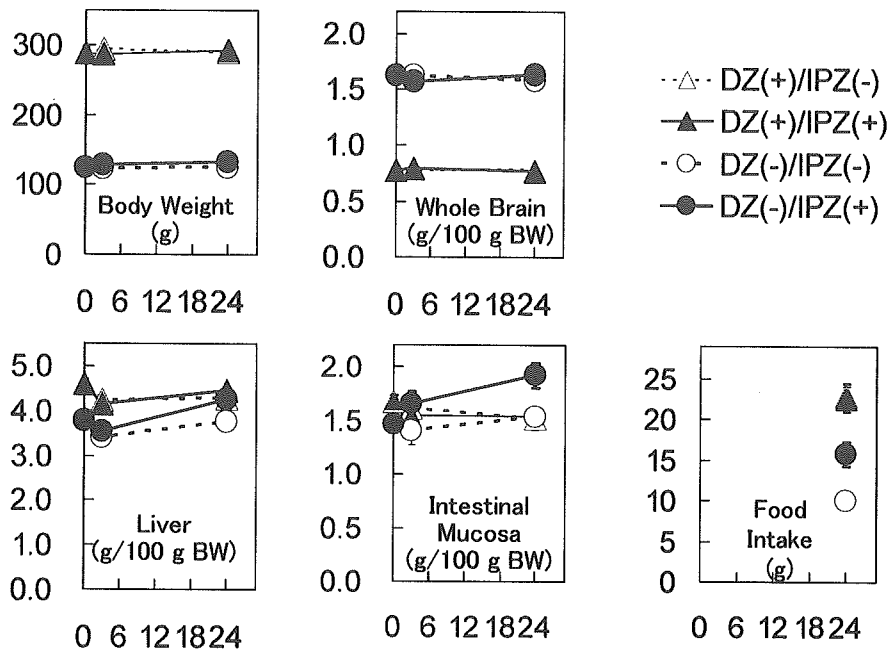


図 4 亜鉛欠乏ラット[DZ(-)]ならびに亜鉛添加食摂取ラット[DZ(+)]への亜鉛腹腔内投与(IP)の影響。

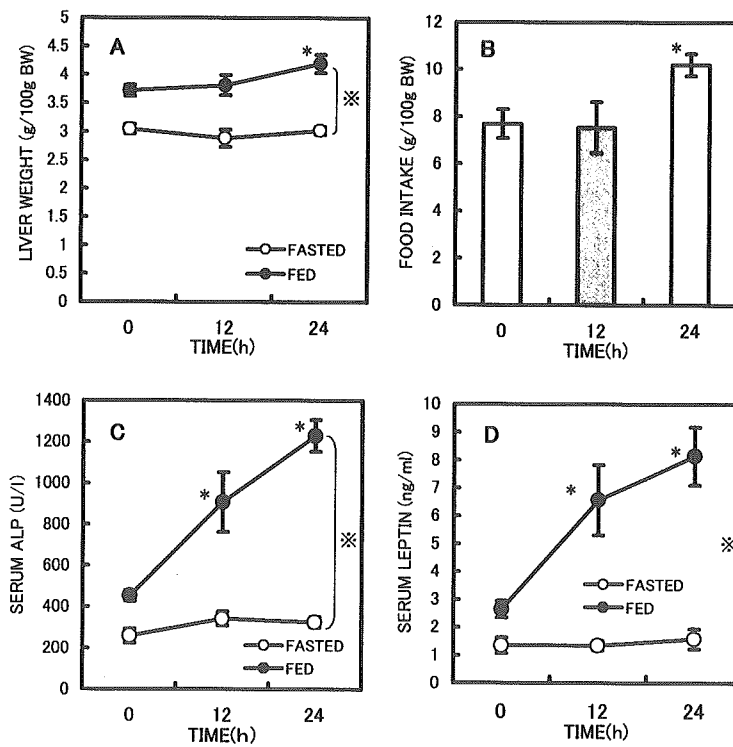


図 5 摂食状況の異なる亜鉛欠乏ラットへの亜鉛投与の影響. \*,  $p < 0.05$

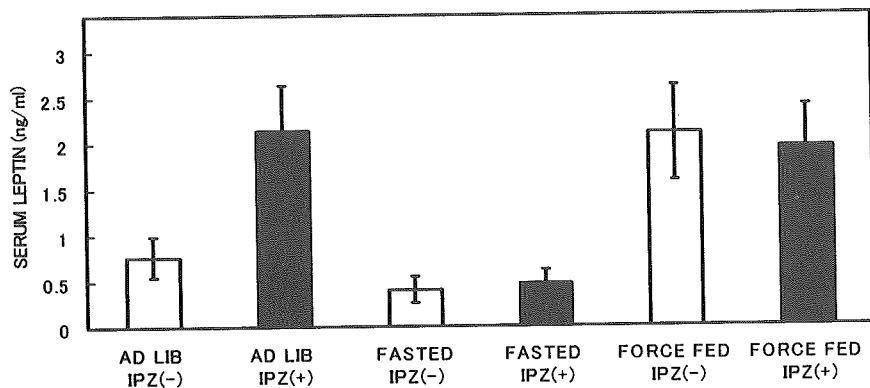


図 5 亜鉛欠乏ラットの血清レプチン濃度に対する亜鉛腹腔内投与および食餌摂取状況の影響.

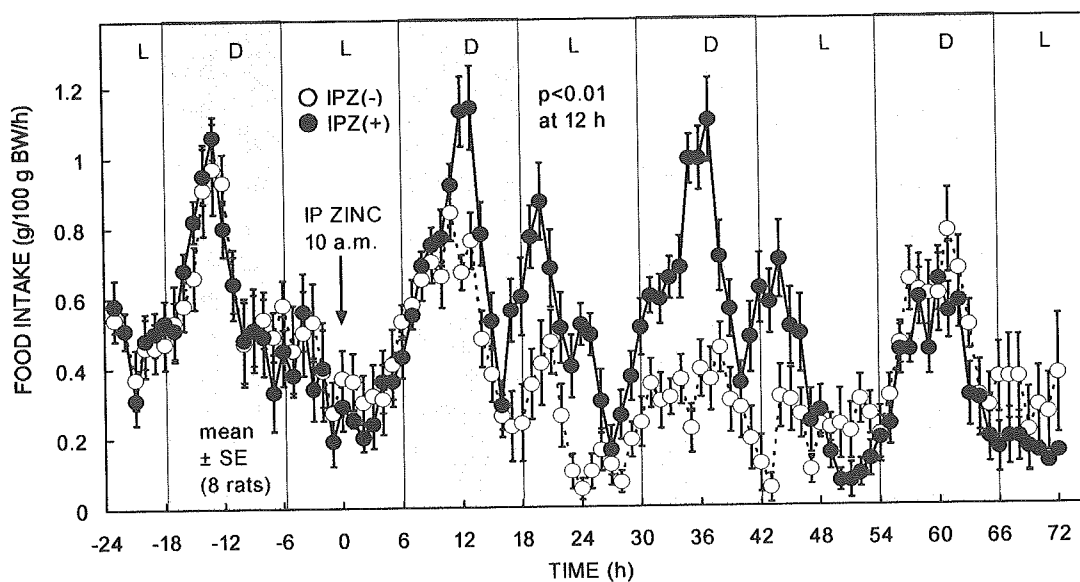


図 6 亜鉛欠乏ラットの摂食量への亜鉛腹腔内投与の影響.

これまで述べたように、亜鉛の腹腔内投与24時間以内に、摂食量が増大した。このことより、亜鉛の食欲維持・増進作用は、消化管内腔や消化管壁への影響を介して内分泌系や神経系が刺激されて生じる間接作用というよりは、亜鉛が食欲の中樞制御部位に対して直接的に作用している可能性を示唆している。この点の検討には、食欲中枢の存在部位とされる視床下部における遺伝子発現に対する亜鉛の作用を網羅的に解析することが効果的であると考えられる。その前提として、亜鉛欠乏ラットに亜鉛を投与した後の摂食量の増大のタイミングを時間単位で捉えておくことが必須である。

そこで、亜鉛投与前後の摂食量を96時間にわたり、1時間ごとに測定する実験を行ったところ、亜鉛投与12時間以後に投与群の摂食量は対照群に比べて有

意に増大していることが判明した(図9)。

この結果をもとに、摂食量増大をもたらされる亜鉛投与12時間後以前、また亜鉛の血中濃度の急騰が回復しつつある時点ということで、投与6時間後の亜鉛に対する応答をDNAマイクロアレイ法を用いて検討した。まず、肝臓について調べてみた結果、MT1の遺伝子発現が亜鉛投与によって強く促進されることが確認された(表3)。MT1は亜鉛・銅などに対して親和性を示し、またこれらミネラルの投与によって、肝臓においてその合成が誘導されるとされている。その他、構造タンパク質(XM\_214400)、リボソームタンパク質(XM\_226370)、転写調節因子(NM\_012543, TC568136)などの遺伝子の発現亢進が認められた。また、MT1遺伝子の転写活性化因子の発現も軽度亢進していたが、MT3遺伝子の発現には変化が見られなかった。亜鉛投与によって発

現が抑制されるものとしては、いくつかの急性期タンパク質遺伝子が検出された(NM\_130741, TC543377, NM\_M\_012488, NM\_053288). 亜鉛投与24時間後には、恐らく摂食量の増加を反映して、肝臓重量の増大が観察されるが、これに先行して、多くの遺伝子の発現が亢進ないし抑制されていることが判明した. MT1の遺伝子発現に対する亜鉛の作用については、リアルタイムRT-PCRによっても、強かつ一過性に促進されることが確認された(図10).

表 2 肝臓における遺伝子発現に対する亜鉛腹腔内投与の影響.

	GENE	EXPRESSION RATIO (6 h/0 h)
UP-REGULATED	Rattus norvegicus Metallothionein (Mt1a), mRNA [NM_138826]	21.064
	NIF1_HUMAN (O15194) Nuclear LIM interactor-interacting factor 1 (NLI-interacting factor 1) (NIF-like protein) (YA22 protein) (HYA22), partial (6%) [TC569136]	5.190
	PREDICTED: Rattus norvegicus procollagen, type IV, alpha 1 (predicted) (Col4a1_predicted), mRNA [XM_214400]	4.684
	Rattus norvegicus D site albumin promoter binding protein (Dbp), mRNA [NM_012543]	4.612
	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L21 (LOC291943), mRNA [XM_226370]	4.003
DOWN-REGULATED	PREDICTED: Rattus norvegicus B-cell leukemia/lymphoma 6 (predicted) (Bcl6_predicted), mRNA [XM_221333]	0.672
	Rattus norvegicus orosomucoid 1 (Orm1), mRNA [NM_053288]	0.614
	Rattus norvegicus alpha-2-macroglobulin (A2m), mRNA [NM_012488]	0.484
	P97374 (P97374) Serum amyloid A protein isoform 1, partial (51%) [TC543377]	0.376
MT-RELATED	Rattus norvegicus lipocalin 2 (Lcn2), mRNA [NM_130741]	0.213
	AW144706 EST290453 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIAI64 5' end similar to metallothionein-I gene transcription activator, mRNA sequence	2.116
	Rattus norvegicus metallothionein 3 (Mt3), mRNA [NM_053968]	0.928

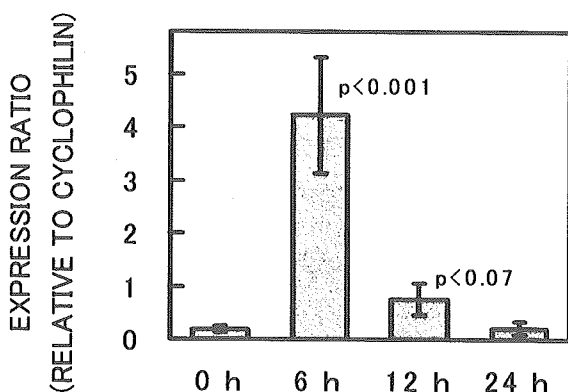


図 7 肝臓におけるMT1遺伝子の発現に対する亜鉛腹腔内投与の影響.

視床下部においては、androgen-induced proliferation inhibitor (XM\_221833), transcription elongation factor B polypeptide 3 binding protein 1 (XM\_576183), olfactory receptor 49 (NM\_001000132), SR Y-box containing gene 10 (NM\_019193)等の発現の亢進, またolfactory receptor 1488 (NM\_001000719), kidney specific organic anion transporter (NM\_030837), branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide (XM\_343439), molybdenum cofactor sulfurase (XM\_341584), holocarboxylase synthetase gene (XM\_221630)等の発現の抑制が認められた(表4). これらとともに、MT1の遺伝子発現に対する亜鉛の促進効果も認められた. リアルタイムRT-PCRで検討した場合にも、亜鉛投与6時間後におけるこのMT1遺伝子の発現亢進が確認されたが、MT2およびMT3の遺伝子発現に対する有意な影響は認められなかった(図11).

表 3 視床下部における遺伝子発現に対する亜鉛腹腔内投与の影響.

	GENE	EXPRESSION RATIO (6 h/0 h)
UP-REGULATED	PREDICTED: Rattus norvegicus androgen-induced proliferation inhibitor (predicted) (Aprin_predicted), mRNA [XM_221833]	1.991
	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to golgi autoantigen golgin subtype a4; tGolgin-1 (LOC501069), mRNA [XM_236718]	1.927
	PREDICTED: Rattus norvegicus transcription elongation factor B polypeptide 3 binding protein 1 (predicted) (Tceb3bp1_predicted), mRNA [XM_576183]	1.856
	Rattus norvegicus olfactory receptor 49 (predicted) (Olr49_predicted), mRNA	1.822
	Rattus norvegicus SRY-box containing gene 10 (Sox10), mRNA [NM_019193]	1.763
DOWN-REGULATED	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to homolog of Human holocarboxylase synthetase gene HLCS (LOC288240), mRNA [XM_221630]	0.375
	Rattus norvegicus similar to molybdenum cofactor sulfurase (LOC361300), mRNA	0.363
	PREDICTED: Rattus norvegicus branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide (Bckdhhb), mRNA [XM_343439]	0.361
	Rattus norvegicus kidney specific organic anion transporter (Slc21a4), mRNA [NM_030837]	0.314
	Rattus norvegicus olfactory receptor 1488 (predicted) (Olr1488_predicted), mRNA [NM_001000719]	0.304
MT-RELATED	Rattus norvegicus Metallothionein (Mt1a), mRNA [NM_138826]	1.582
	AW144706 EST290453 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIAI64 5' end similar to metallothionein-I gene transcription activator, mRNA sequence	1.077
	Rattus norvegicus metallothionein 3 (Mt3), mRNA [NM_053968]	1.023

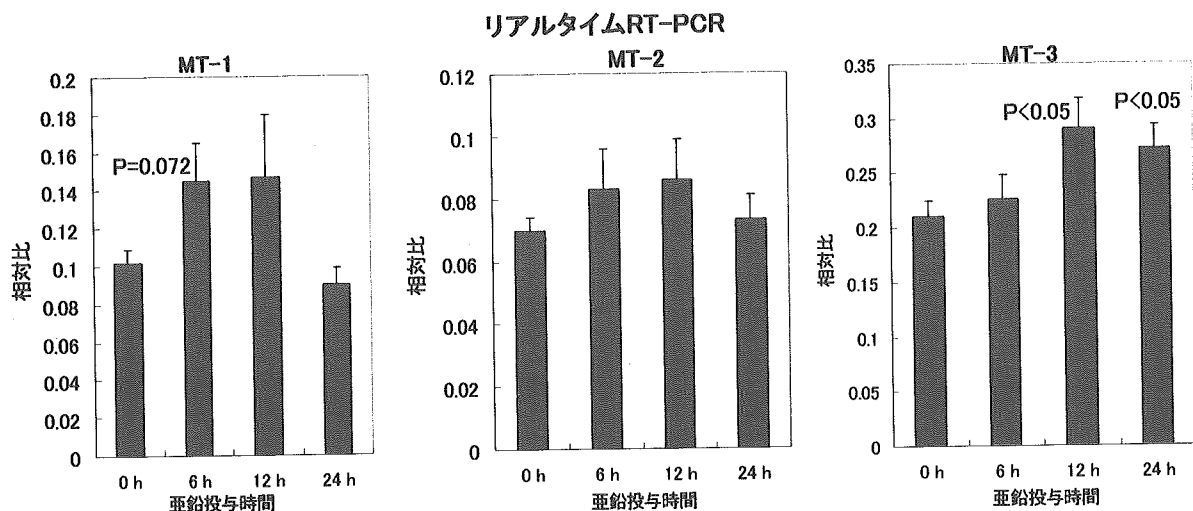


図 8 視床下部におけるMT遺伝子の発現に対する亜鉛腹腔内投与の影響

本研究では、亜鉛欠乏ラットへの亜鉛腹腔内投与という独特の実験アプローチを採用することで、図12に示すような一連の応答が経時的に引き起こされることが明らかになった。

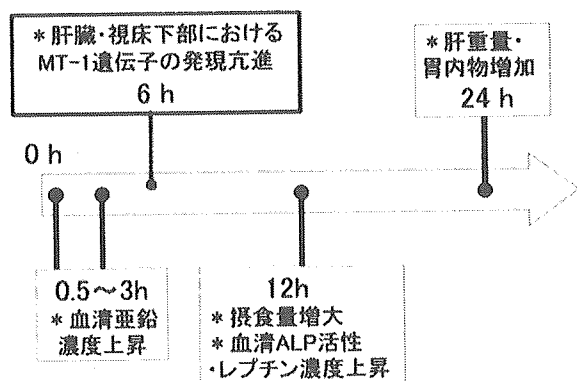


図 9 亜鉛欠乏ラットへの亜鉛腹腔内投与後の生体応答.

### C. 考察

本分担課題では、“いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究”の一環として、“作用機序が明確ではない食品の有効性の評価”に関する基本的な考え方・方針やそのための方法に関する調査・研究を行うことを主目的としている。

「いわゆる健康食品は食品であるのだから、安全性や品質が確保されていればよく、有効性の科学的根拠を詮議する必要はない」とする考え方も一部にはあるようである。しかし、健康食品等と銘打ち、何ら

かの効能・効果を示唆・標榜するからには、それらに見合う有効性の科学的根拠が求められるのは当然である。その利用にとまらぬ適切な医療機会の逸失という健康被害、また経済被害を回避し、食薬相互作用等による医薬品の作用の増強・減弱等を防ぐためにも、“作用機序が明確ではない食品の有効性の評価”に関する取り組みは重要である。

これらの観点から、本年度は、(1)“作用機序が明確ではない食品”を“作用機序が明確な食品ないしはそれに準ずる食品”へと変容させることの重要性やそのための要件・方法を検討し、(2)脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されているが、作用機序が明確ではない食品素材をデータベース等で探索し、(3)この種の1つに関する実験を通して“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へと変容させる作業事例を示すことをめざした。

(1)に関しては、現行の保健機能食品制度では、いわゆる健康食品が条件付き特定保健用食品、さらに従来型の特定保健用食品等へと昇格するためには、その作用機序の解明が求められる。しかし、これには大きな困難がともなう。一方、FUFUSEの中間報告では、食品成分への曝露、高度標的機能に関して、科学的根拠に基づき正当と認められるマーカーが得られれば、“高度機能強調表示”が可能であると提言されている<sup>3,4)</sup>。したがって、国際動向の将来も見据えると、“作用機序が明確ではない食品”の体内動態や標的部位を特定する作業を通して、まずは“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へと変容させ

ることが重要かつ賢明かと思われる。

体内動態や標的部位を特定する作業に際しては、食品成分が身体の構造・機能に対する作用を発現する過程(図1)を考慮すると、消化管で吸収されて真の体内に取り込まれるが、体内での化学変化を受けない成分については、避腸的な投与方法を採用することが原理的に可能であると考えられた。これにより、経口摂取させた場合に生じる吸収過程等における実験動物の個体差によるバラツキを除外でき、実験の精度をより高められると推定した。

(2)に関しては、脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されているものをNMCDを検索して調べた。健康日本21は、壮年期死亡の低減、健康寿命の延伸、QOLの向上をめざすこととしているが、これらを損ねる可能性のあるものとして、脳・神経系の不健康や精神障害は大きな部分を占めている。こうした状況と合致するように、Dietary Supplementやいわゆる健康食品の中には、脳・神経系の健康や精神保健の用途を指向したものが多数見られる。また、FUFOSEを受け継いだプロジェクトであるPASSCLAIM(Process for the Assessment of Scientific Support for the Claims on Foods)の中間報告では、その個別テーマグループの課題として“ITG(G): 精神機能と目的遂行能力”が取り上げられている<sup>9)</sup>。そして、仮に適切なマーカー・評価法による科学的根拠が得られるならば、例えば、食品の記憶機能に係る表示として、記憶を改善します、短期記憶を改善します、長期記憶を改善します、記憶低下を軽減しますというように、相当に踏み込んだ内容も将来的には可能となり得る方向性が示されている<sup>4, 9)</sup>。

今回のNMCDの検索では、幅広い用途、すなわち、注意欠陥/多動性障害、神経性食欲不振症、不安症状、認知症、抑うつ、不眠、鎮静、パーキンソン病を取り上げた。これらに関し、有効性の評価がPossibly Effective以上で、安全性の評価がPossibly Safe以上の素材はであるものは20品目あったが、その多くはハーブであった(表2)。ハーブは多成分系素材であり、その機能性関与成分の特定が難しく、また薬物代謝系酵素に対する阻害や誘導等を生じる恐れのあるものが少なくない。一方、アセチル-L-カルニチン、ナイアシン、ビタミンE、カフェイン、亜鉛等は単一成分であり、ハーブに比べると、体内動態や標的部位を特定する作業を進めやすいと考えられる。ことに、亜鉛に関しては、注意欠陥/多動性障害や神経性食欲不振

症に対する有効性が人試験においてある程度認められてはいる(表3)が、その作用機序はもとより、果たして脳がその標的部位であるか否かも明確ではない。さらに、亜鉛に関しては、避腸的な投与方法によって標的部位を検討することが原理的に可能なので、これを対象に、次のステップの取り組みへと進んだ。

(3)に関しては、亜鉛が注意欠陥/多動性障害および神経性食欲不振症に有効であるとした場合に、亜鉛の標的部位が脳であるのか末梢部位であるかの明確化は重要である。この点を実験的に検証した。まず、亜鉛欠乏ラットでは、対照群に比べて食欲が強く抑制されている。このようなラットに、亜鉛を避腸的(腹腔内)に投与すると、ほぼ12時間後に摂食量が増大し、食事性亜鉛と避腸投与された亜鉛とは、食欲の維持・増進作用に関して同等と考えられた。亜鉛投与24時間後には、肝臓や小腸粘膜の重量が増大していたが、これらの変化は摂食量の増大にともなう亜鉛の二次的効果である可能性があるが、亜鉛自体がそのためのパーミッシブな(許容的)効果を有している可能性も考えられる。

実際、DNAマイクロアレイを用いた網羅的解析では、亜鉛投与による摂食量増大に先行して、亜鉛投与6時間後に多くの遺伝子(構造タンパク質や転写活性化タンパク質、リボソームRNA等)の発現が亢進しており、またいくつかの急性期タンパク質遺伝子の発現が抑制されていた。ことに、亜鉛結合タンパク質であるmetallothionein 1(MT1)遺伝子の強くかつ一過性の発現亢進が認められ、MT1遺伝子の発現の変動は亜鉛への曝露、高度標的機能のマーカーとなり得る可能性が考えられた。この観点に基づき、食欲中枢の存在部位とされる視床下部について検討した結果、軽度ではあるが亜鉛投与6時間後にのMT1遺伝子の発現亢進が認められ、この点はリアルタイムRT-PCRによっても確認された。よって、亜鉛の食欲維持・増進作用は、末梢部位および内分泌・求心神経系を介する間接的な作用ではなく、脳を標的部位とする直接的な作用によってもたらされる可能性が高いと推定される。

これらの結果より、亜鉛への曝露、高度標的機能のマーカーの探索を行うことで、“作用機序が明確ではない食品”の体内動態や標的部位を特定できる可能性があり、“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へと変容させ得る1つの方向性を提示し得たと考えられる。このマーカー探索の手法として、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現の解析は極めて有用であった。



なお、食欲の維持・増進に係る亜鉛の高度機能のマーカーとして、MT1遺伝子よりもさらに適格なマーカーは、食欲調節に関わるとされる諸神経伝達物質や神経ホルモン等であろう。本研究では、亜鉛投与6時間後の視床下部で亜鉛に対する応答が示されたことより、この時点以前の同部位における亜鉛への応答性を精査することのラショナルが得られた。MT1を含め、これら諸因子の発現をマーカーとして、免疫組織化学や*in situ*ハイブリダイゼーション等の手法で探求することにより、亜鉛の食欲維持・増進の機序を明確化できる可能性が開かれたと考える。

#### 文献およびURL

- 1) <http://www.naturaldatabase.com/naturaldatabase>
- 2) 志村二三夫: アンチ・エイジング (日本抗加齢医学会雑誌) 1, 23-30 (2005)
- 3) Asp, N. G., Contor, L.: Eur. J. Nutr. 42 Suppl 1, 13-15 (2003).
- 4) 道川優子, 志村二三夫: FOOD STYLE 21 9 (9), 134-139 (2005)
- 5) Mills, C. F., Quarterman, J., Chesters, J. K., Williams, R. B., Dalgarno, A. C.: Am. J. Clin. Nutr. 22, 1240-1249 (1969)
- 6) Wallwork, J. C., Fosmire, G. J., Sandstead, H. H.: Br. J. Nutr. 45, 127-136 (1981)
- 7) Aiba, K., Kimura, M., Sakata, S., Matsuda, K., Kaneko, M., Onosaka, S., Yamaoka, Y., Tamaki N; J.Nutr.Sci.Vitaminol. 43, 327-343 (1997)
- 8) Shay, NF., Mangian, H. F.: J. Nutr. 130, 1493S-1499S (2000)
- 9) Westenhofer, J.: Eur. J. Nutr. 43, Suppl 2, II85-II117 (2004)

#### D. 結論

“作用機序が明確ではない食品の有効性の評価”に関する調査・研究を次の方針で実施した。(1) “作用機序が明確ではない食品”を“作用機序が明確な食品ないしはそれに準ずる食品”へと変容させることの重要性やそのための要件・方法を検討し、(2) 脳・神経系の健康や精神保健の用途における有効性が人対象試験である程度実証されてはいるが、作用機序が明確ではない食品素材をデータベース等で探索し、(3)これに該当する亜鉛に関する実験を

通して、“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へと変容させる作業事例を示した。すなわち、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析等により、亜鉛結合タンパク質metallothionein 1 (MT1) 遺伝子の発現は、亜鉛への曝露、高度標的機能のマーカーとなる可能性が示され、食欲中枢の存在部位とされる視床下部が、亜鉛の標的部位となっていると推定された。この体内動態や標的部位を特定する作業を通して、“作用機序が明確ではない食品”を“作用機序が明確な食品に準ずる食品”へと変容させる取り組み方の1つを提示し得た。

以上、冒頭に示した(1)、(2)、(3)の当初の目的が概ね達成され、“作用機序が明確ではない食品の有効性の評価”に関する新たな進展に寄与する成果が得られたと結論される。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 志村二三夫: ハーブサプリメントの現状と展望, アンチ・エイジング (日本抗加齢医学会雑誌) 1, 23-30 (2005)
- 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, FOOD STYLE 21 9(9), 134-139 (2005)

##### 2. 学会発表

- 1) 山田敦子, 塚田明香, 船橋ひとみ, 渡邊愛子, 道川優子, 志村二三夫: ラット肝臓における亜鉛による遺伝子発現の誘導—DNAマイクロアレイによる検討, 第52日本栄養改善学会, 平成17年9月, 徳島.
- 2) 佐野 涼子, 相原 直美, 竹内 宏美, 戸澤 佳恵, 道川 優子, 志村 二三夫: 亜鉛欠乏ラットにおける亜鉛投与への応答—視床下部における遺伝子発現, 第60回日本栄養・食糧学会大会, 平成18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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
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

食品の持つ生活習慣病予防効果の評価方法の検討（薬理学的方法による健康食品の有用性の評価）

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] 食品の有用性を高感度で検知する網羅的スクリーニングシステムの確立と応用方法の構築

[実験方法] 被験食品素材 4 週間経口摂取後の循環諸機能変化を以下の手法で網羅的に探索

- 1) 生体レベルにおける循環（収縮期血圧:SP・心拍数:HR）パラメータの測定。使用機器は非加温テイルカフ法による非観血式血圧測定装置、テレメトリーによる非侵襲性・無拘束血圧測定装置
- 2) 組織レベルにおける機能変化（血管緊張度）の測定。使用測定機器は張力トランスデューサー
- 3) 細胞レベルにおける細胞内カルシウムレベルの測定。使用測定機器は共焦点レーザー顕微鏡画像解析装置

[実験動物] 自然発症高血圧ラット(SHR) および Wistar Kyoto rat (WKY)

[被験食材] イチョウ葉エキス (GBE:末梢循環改善作用等を適応とする欧州の医薬品)、杜仲茶 (Tochu:血圧の健康を志向する特定保健用食品)、プロポリス (Prop:循環に対する標榜のない“いわゆる健康食品”)

[実験結果]

- 1) 生体レベルでの影響: SHR の循環パラメータに対する被験食品素材 4 週間経口摂取の影響  
SHR には加齢に伴う血圧の上昇が認められたが、この血圧上昇に対し Tochu および GBE は有意な抑制作用を示した。Prop はこのような抑制作用は示さなかった。一方、WKY では加齢に伴う血圧上昇は観察されず、いずれの被験食品素材も有意な影響を示さなかった。
- 2) 組織レベルでの影響: 被験食品素材 4 週間経口摂取した SHR の血管反応の変化  
GBE を摂取した SHR の胸部大動脈のアセチルコリンによる弛緩反応は、対照群のそれに比べて有意に増強されていた。また Tochu も軽度ではあるが有意な増強作用を示した。このような増強作用は WKY では認められなかった。Prop を 4 週間摂取したラットにおいてはこのような変化は観察されなかった。一方、ニトロプルシドによる血管弛緩反応に対しては、いずれの被験食品素材も有意な影響を示さなかった。
- 3) 細胞レベルでの影響: GBE 4 週間経口摂取した SHR の血管内皮細胞の  $Ca^{2+}$  動員機構の変化  
GBE を摂取した SHR の胸部大動脈内皮細胞の細胞内カルシウムレベルはアセチルコリンの投与により有意に上昇した。このカルシウムレベルの上昇の程度は、対照群のそれに比べて GBE 4 週間経口摂取した SHR で有意に高い値を示した。

[総括と今後の展開]

- 1) 血圧の健康を志向した特定保健用食品である Tochu の 4 週間経口摂取は加齢ともなう SHR の

血圧上昇に対し有意な抑制作用を示すとともに、SHR の血管の内皮依存性弛緩反応を軽度促進した。

2) 末梢循環障害の改善が報告されている GBE の 4 週間経口摂取も、加齢にともなう SHR の血圧上昇に対し有意な抑制作用を示すとともに、その血管の内皮依存性弛緩反応を著明に促進した。さらに内皮細胞の細胞内カルシウム動員機構も対照に比べて促進されていた。

3) 循環器系への有用性が標榜されていないプロポリスはどのレベルでも影響を示さなかった。以上の結果から、被験食品素材が有すると考えられる有用性と本研究結果は一致しており、本評価法の実践性が示された。さらに、各レベルでの知見を総合的に解析することにより機序を類推する手がかりも得られることが示唆された。

## A. 目的

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の患者は年々増加しており、日本の三大死因と深く関わっている。このような疾患原因には食生活習慣が大きく関与しているため、その治療や予防には運動・休養は元より、食物栄養および健康食品からのアプローチが非常に重要であると考えられる。

前年度の研究により、イチヨウ葉エキス (GBE) の長期経口投与は加齢にともなう生活習慣病ラット (SHR/NDmcr-cp(cp/cp)) の血圧上昇に対し、軽度の抑制作用を示すことを明らかにされると共に、GBE を長期経口投与されたラットの摘出血管において、内皮依存性弛緩反応が増強されることも明らかにした。即ち、GBE は内皮細胞の一酸化窒素産生機能に対し、促進的な影響を及ぼすこと、これが降圧機序の一因をなしているものと推察された。

そこで今年度の研究では、自然発症高血圧モデル動物である SHR 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ヨウ葉エキス、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」、そして循環器系に対する機能性の標榜のない「プロポリス」を取り上げ、これらを被験食材として、本スクリーニング法で検出される作用を比較検討した。

## 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、今年度は主に高血圧（一部生活習慣病も含めて検討したが）に対する有用性（予防効果）評価の方法論的検証を行った。その研究戦略としては、被験食品の経口摂取後の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

### 2. 実験動物

実験には Wistar Kyoto ラット (WKY) , と自然発症高血圧ラット (本文中では SHR と略) を購入 (6 週齢、雄性、日本 SLC、静岡) 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、テレメトリーの実験では雄性の生活習慣病ラット (SHR/NDmcr-cp、本文中では SHRcp と略) を使用するとともに、一部の in vitro 実験では雄性 Wistar rat (6 週齢、雄性、日本 SLC、静岡) も使用した。

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、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、プロポリスは株式会社アピより供与されたものを使用した。また、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.)、 $N^G$ -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)、その他の試薬 (和光純薬、大阪) は特級品を使用した。

### 4. 被験食品素材反復投与方法

SHR と WKY ラットをコントロール食群 (6 匹) と被験食材添加食群 (6 匹) の 2 群に分け、コントロール食群には市販粉末飼料を、被験食品

素材添加食群には表 2 の割合で添加した市販粉末飼料を 4 週間にわたって自由摂取させた。飼料中の濃度は各動物の摂餌量を予め測定し、そこから投与量を設定し、その結果表 2 のような投与量が算出された。

### 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、被験食品素材摂取期間中、2 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. ラット摘出胸部大動脈の弛緩反応の測定方法

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) を満たしたマグヌス管中に懸垂した。標本に生じる張力変化は張力トランスジューサー (T-7、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、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ンプベリン ( $10^{-4}$  M) により生じる最大弛緩反応を 100% とした時の弛緩率 (%) で表示した。実験によっては被験食品素材そのものを精製水に溶解して標本に適用し、その作用を直接検討した。

### 7. 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

表 2 被験食品素材の投与量

	GBE	杜仲茶	プロポリス
飼料中濃度	0.5%	5%	0.5%
投与量/day	325mg/kg	3250mg/kg	325mg/kg
ラット週齢	7 週齢	7 週齢	7 週齢
投与期間	4 週間	4 週間	4 週間

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る。

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（図1）、固定は外科手術用アロンアルファを使用した。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。

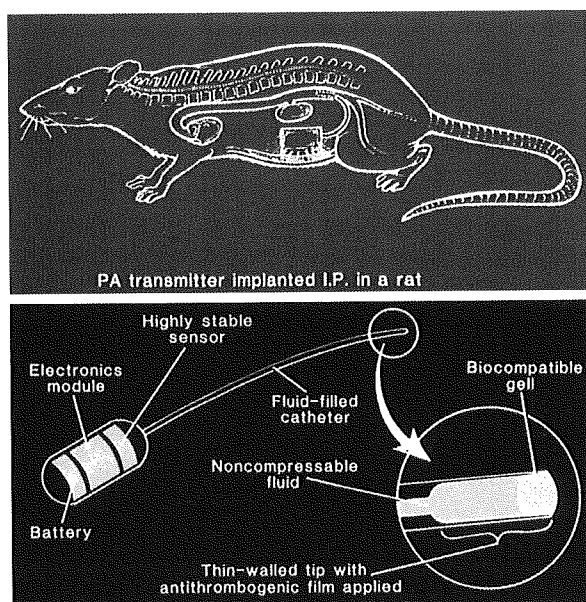


図1 テレメトリー送信機の埋め込みと構造

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。イチョウ葉エキスの投与は前述したように、飼料中に0.5%になるように調整し、自由摂取させた。なお、ラットは27週齢の雄性SHRcpを用いた。

## 8. 共焦点顕微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（CSU10、横河電機、東京）を取り付けた倒立顕微鏡（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、アセチルコリンの刺激前（ $F_0$ ）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。

胸部大動脈及び尾動脈の内皮細胞内カルシウムレベルの変化をリアルタイムで経時的に検出するとともに、血管径変化も同時に観察するために、図のようなWindow標本を作製した。即ち、血管標本に適宜、細孔（観察窓：Window）を開け、血管内腔にV字型ステンレススチールワイヤーを挿入して内径を伸展拡張させて内膜部内皮細胞を容易に観察できるような標本を作製した。観察・測定は本標本のWindowを対物レンズに対面するように下向きにガラスボトムシャーレに装着し

て行った。シャーレには生理溶液を満たし、薬物はこの溶液中に投与した(図3)。

### 9. 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。

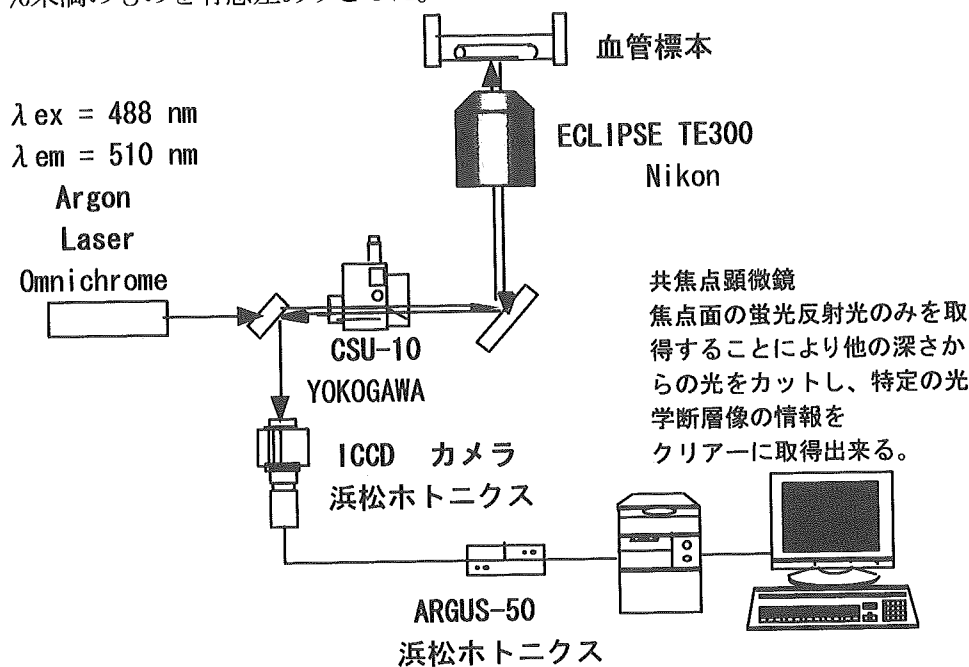


図2 共焦点顕微画像解析システム(細胞内カルシウムレベル測定法)

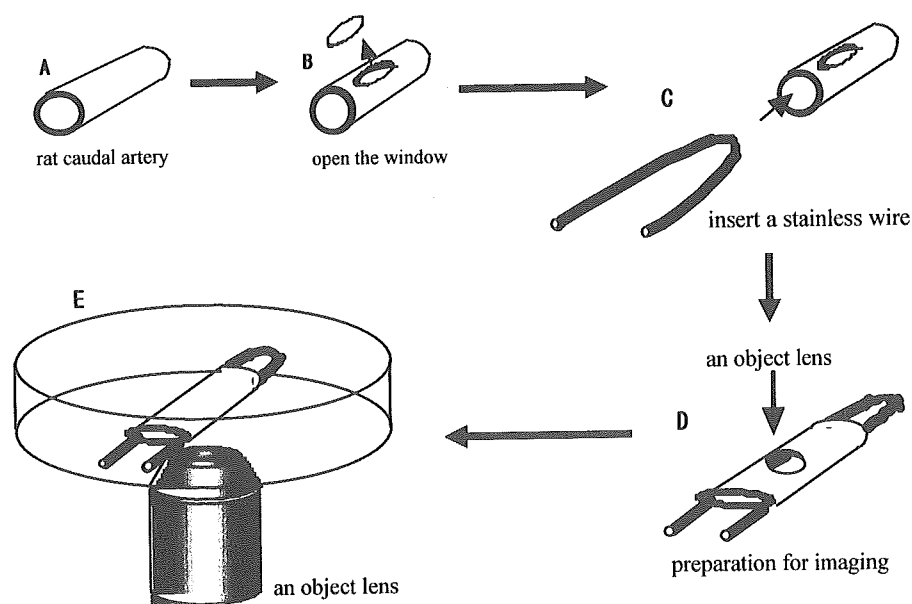


図3 標本作成方法: 血管標本の作製と観察窓(Window)の作製

## C. 研究結果

### 1. Wistar Kyoto Rat (WKY) と自然発症高血圧ラット (SHR) の循環パラメータに対する被験食品素材長期経口摂取の影響

#### (1) 心拍数に対する被験食品素材の影響

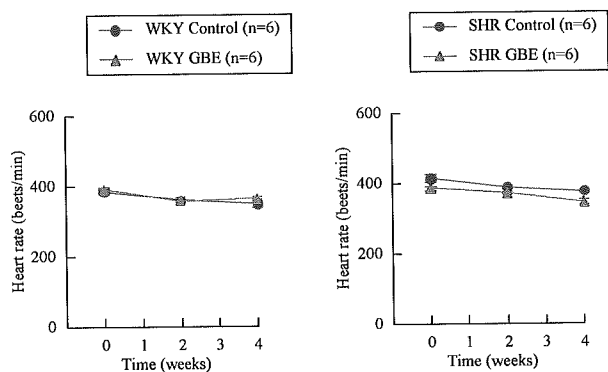


図4 WKY と SHR の心拍数に対するイチョウ葉エキス長期摂取の影響

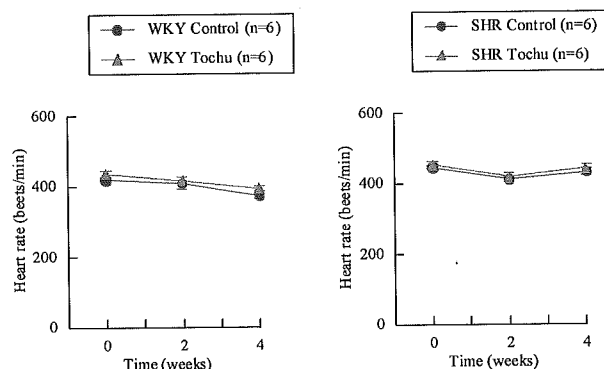


図5 WKY と SHR の心拍数に対する杜仲茶長期摂取の影響

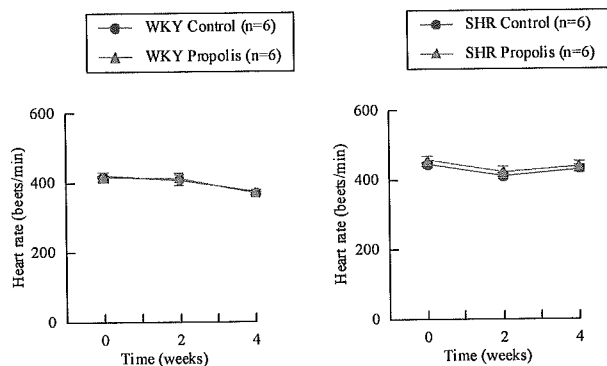


図6 WKY と SHR の心拍数に対するプロポリス長期摂取の影響

いずれの被験食品の 4 週間摂取も SHR および WKY の心拍数には影響しなかった (図4-6)。

#### (2) 血圧に対する被験食品素材の影響

SHR の収縮期血圧は実験期間中、加齢とともに漸増したが、この加齢に伴う収縮期血圧の上昇に対し、イチョウ葉エキスは摂取4週目より有意な抑制作用を示した (図7)。しかしながら、WKY の血圧にはイチョウ葉エキスによる有意な影響は認められなかった (図7)。

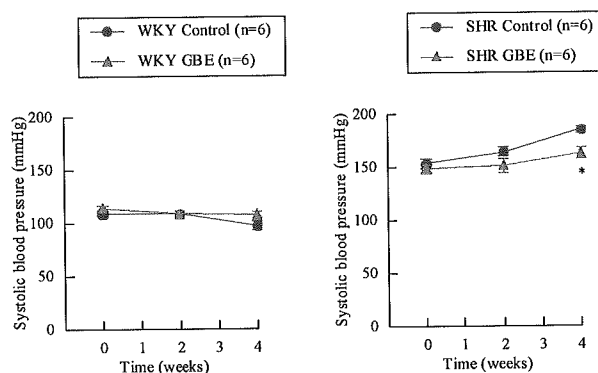


図7 WKY と SHR の収縮期血圧に対するイチョウ葉エキス長期摂取の影響

SHR の収縮期血圧は実験期間中、加齢とともに漸増したが、この加齢に伴う収縮期血圧の上昇に対し、杜仲茶は摂取開始4週目に有意な抑制作用を示した (図8)。しかしながら、WKY の血圧には杜仲茶による有意な影響は認められなかった (図8)。

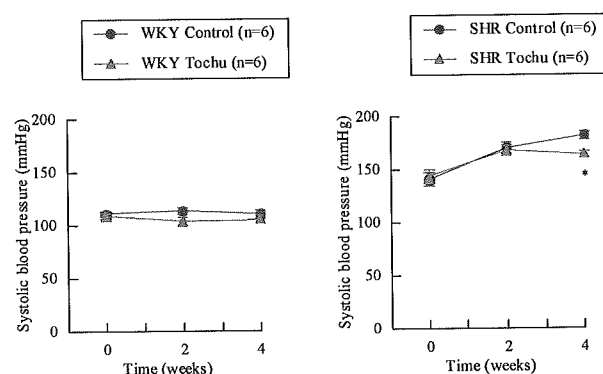


図8 WKY と SHR の収縮期血圧に対する杜仲茶長期摂取の影響

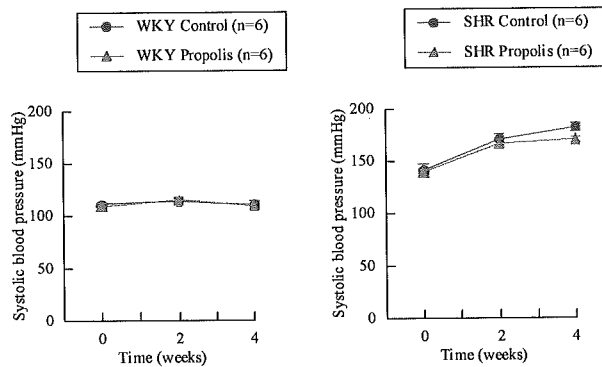


図9 WKY と SHR の収縮期血圧に対するプロポリス長期摂取の影響

SHR の収縮期血圧は実験期間中、加齢とともに漸増したが、この加齢に伴う収縮期血圧の上昇に対し、プロポリスは投与4週目に抑制傾向は示したが、有意ではなかった。さらに、WKY の血圧にもプロポリスによる有意な影響は認められなかった(図9)。

## 2. 自然発症高血圧ラット (SHR) と Wistar Kyoto Rat (WKY) の胸部大動脈の弛緩反応に対する被験食品素材長期経口摂取の影響

### (1) 被験食品素材を長期経口摂取した WKY 及び SHR の胸部大動脈における内皮依存性弛緩反応

図10は、ラットから摘出した胸部大動脈を、予めノルアドレナリン  $10^{-7}M$  で収縮させ、収縮に伴う発生張力が一定になったところで、アセ

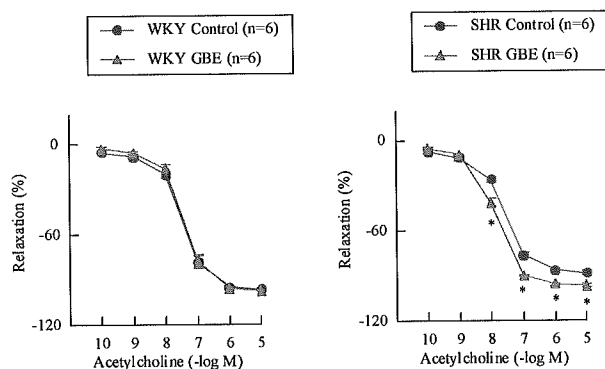


図10 イチョウ葉エキス長期経口摂取した WKY および SHR の胸部大動脈におけるアセチルコリンの弛緩反応

チルコリンを加えてその弛緩反応を濃度作用

曲線で示したものである。WKY の胸部大動脈におけるアセチルコリンの濃度弛緩曲線はイチョウ葉エキス4週間経口摂取により変化しなかった。しかし、SHR の濃度弛緩曲線はイチョウ葉エキスにより左にシフトすると共に、その最大弛緩反応は有意に増強された。(図10)。

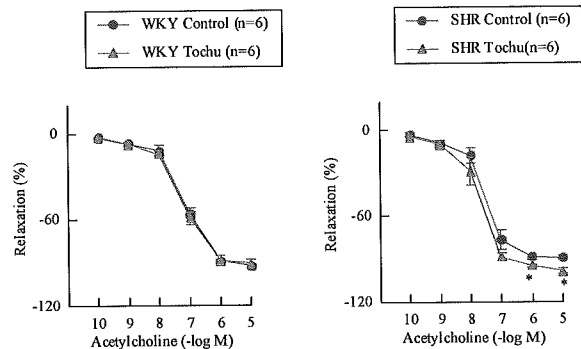


図11 杜仲茶長期経口摂取した WKY および SHR の胸部大動脈におけるアセチルコリンの弛緩反応

図11は、WKY と SHR の胸部大動脈をにおけるアセチルコリンの弛緩反応の濃度作用曲線に対する杜仲茶長期摂取の影響を示したものである。WKY の胸部大動脈におけるアセチルコリンの濃度弛緩曲線は杜仲茶4週間経口摂取により変化しなかった。しかし、SHR の濃度弛緩曲線は、その最大弛緩反応が杜仲茶により有意に増強された。

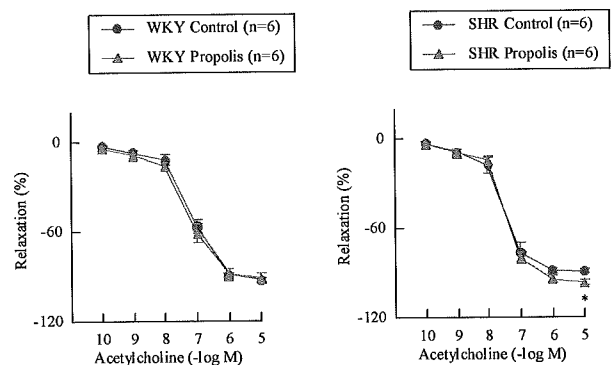


図12 プロポリス長期経口摂取した WKY 及び SHR の胸部大動脈におけるアセチルコリンの弛緩反応



WKY の胸部大動脈におけるアセチルコリンの濃度弛緩曲線はプロポリス4週間経口摂取により変化しなかった。一方、SHR の濃度弛緩曲線最高濃度の反応のみが、プロポリスにより有意に増強された (図12)。

## (2) 被験食品長期経口摂取したWKY及びSHRの胸部大動脈における内皮非依存性弛緩反応

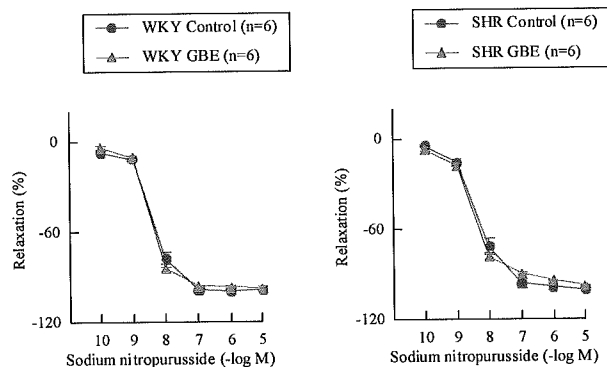


図13 イチョウ葉エキス長期経口摂取したWKYおよびSHRの胸部大動脈におけるニトロプルシドの弛緩反応

WKY の胸部大動脈におけるニトロプルシドの濃度弛緩曲線はイチョウ葉エキス4週間経口摂取により変化しなかった。またSHR の濃度弛緩曲線も、イチョウ葉エキスによりまったく変化しなかった (図13)。

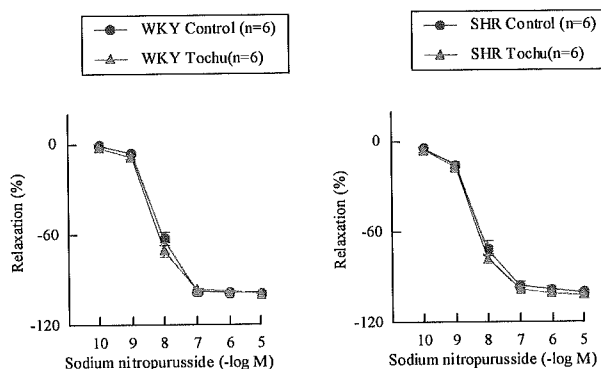


図14 杜仲茶長期経口摂取したWKYおよびSHRの胸部大動脈におけるニトロプルシドの弛緩反応

WKY の胸部大動脈におけるニトロプルシドの

濃度弛緩曲線は杜仲茶4週間経口摂取により変化しなかった。またSHRの濃度弛緩曲線も、杜仲茶によりまったく変化しなかった (図14)。

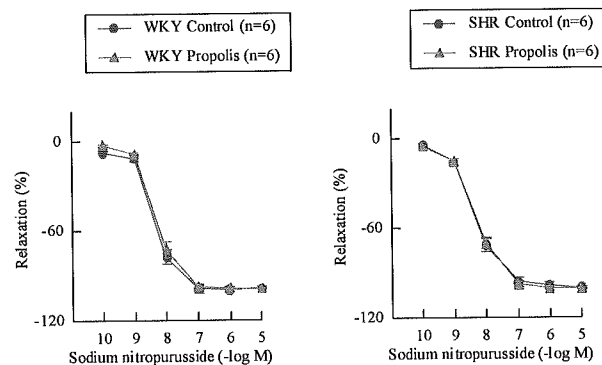


図15 杜仲茶長期経口摂取したWKYおよびSHRの胸部大動脈におけるニトロプルシドの弛緩反応

WKY の胸部大動脈におけるニトロプルシドの濃度弛緩曲線はプロポリス4週間経口摂取により変化しなかった。一方、SHR の濃度弛緩曲線も、プロポリスにより影響されることはなかった (図15)。

## (2) 被験食品長期経口摂取したWKYおよびSHRの血管内皮細胞における細胞内カルシウムイオン動態

図16は尾動脈内皮細胞のカルシウムレベルと血管径変化を撮影したもので、可視像からワイヤー間隔とWindowが確認できる(左側)。実際のWindowは効率よく観察するために、蛍光像のように大きくしてある。中央はノルアドレナリンにより血管を収縮させた像で、収縮によりワイヤー間隔が狭くなった

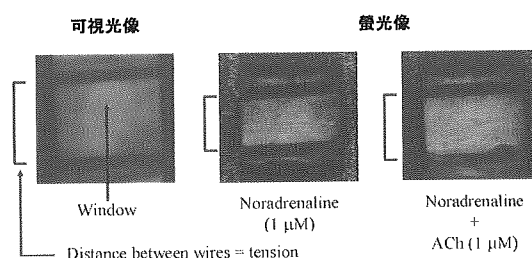


図16 Wistar ratの尾動脈の内皮細胞内カルシウムイオンレベルに対するアセチルコリンの影響

ているのがわかる。この標本にアセチルコリンを加えるとワイヤーの間隔が拡大すると共に、蛍光輝度が増大しているのがわかる。共焦点レーザー顕微鏡の焦点は皮腔表面の内皮細胞層に固定されているので、この輝度の上昇は内皮細胞内のカルシウムレベルの増加によることが推察される。

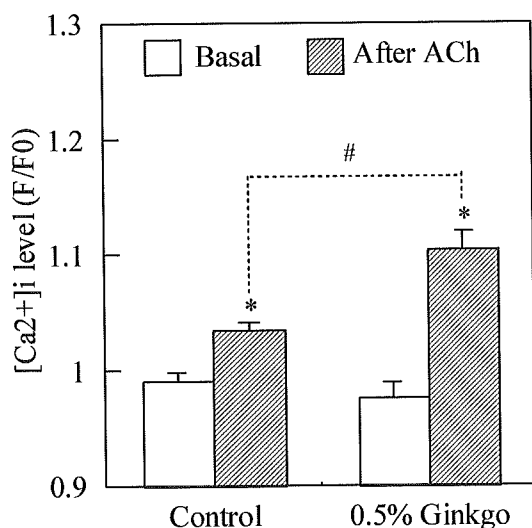


図 17 イチョウ葉エキス長期経口摂取した WKY および SHR の尾動脈の内皮細胞内カルシウムイオンレベルに対するアセチルコリンの影響

図 17 は図 16 の実験を統計的にまとめたものである。血管内皮細胞のアセチルコリンによる細胞内カルシウムレベルの上昇の大きさは、イチョウ葉エキス 4 週間摂取により有意に増強された。非刺激時のカルシウムレベルには変化は認められなかった。したがって、イチョウ葉エキス 4 週間摂取は血管内皮細胞のカルシウム動員機構に促進的な影響を与えることが示された。なお、胸部大動脈においても同様の結果が得られた。

### 3. Wistar Rat の胸部大動脈に対する被験食品素材の直接添加の影響

追加的な実験として、ラット胸部大動脈に対する被験食品素材の直接作用について検討した。

イチョウ葉エキスは 0.03 mg/ml の濃度から著明な血管弛緩反応を示した。この濃度弛緩曲線は内皮除去により有意に高濃度側にシフトした。また、L-NAME (L-N-アルギニンメチルエステル) を処置しても、同程度のシフトが認められた(図 18)。即ち、内皮除去およびアルギニンメチルエステルはこの弛緩反応に対し抑制的に影響したといえる。したがって、イチョウ葉エキスの血管弛緩反応には内皮細胞および一酸化窒素が関与していることが示唆された。

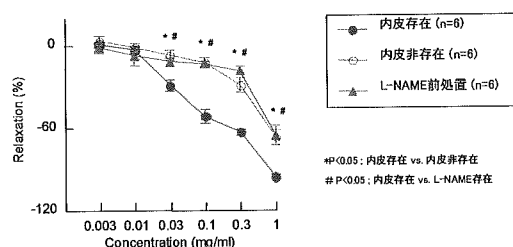


図 18 Wistar rat の胸部大動脈に対するイチョウ葉エキスの直接作用の影響

杜仲茶は 0.1 mg/ml の濃度から著明な血管弛緩反応を示した。この弛緩反応は内皮除去や、一酸化窒素合成酵素阻害薬 L-NAME (L-N-アルギニンメチルエステル) により影響されなかった(図 19)。

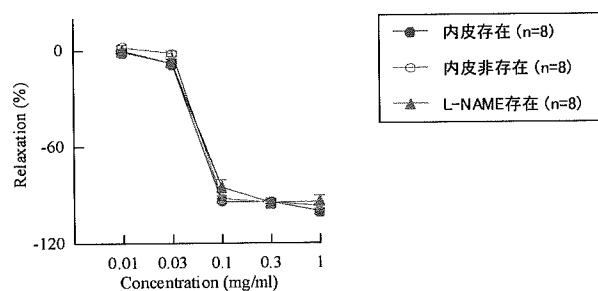


図 19 Wistar rat の胸部大動脈に対する杜仲茶の直接作用の影響

図 20 に示すようにプロポリスは 0.03 mg/ml の濃度から著明な血管弛緩反応を示した。この濃度弛緩曲線は内皮除去により有意に高濃度側にシフトした。一方、L-NAME (L

—N—アルギニンメチルエステル) を処置すると、さらに高濃度側にシフトした。即ち、内皮除去およびアルギニンメチルエステルはこの弛緩反応に対し抑制的に影響したといえる。したがって、プロボリスの血管弛緩反応には内皮細胞および一酸化窒素が関与していることが示唆された。

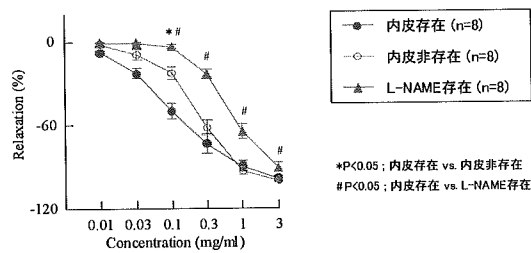


図20 Wistar ratの胸部大動脈に対するプロボリスの直接作用の影響

#### 4. 生活習慣病ラット(SHR/NDmcr-cp)の循環パラメータに対するイチヨウ葉エキス長期経口摂取の影響

SHRを用いた実験結果より、イチヨウ葉エキス長期摂取が加齢に伴う血圧の上昇を抑制すること、その抑制に内皮依存性弛緩反応の亢進

が関与している結果を得た。そこで、次にテレメトリー装置を用いてSHR-cpの循環パラメータに対するイチヨウ葉エキス3週間経口摂取の影響を検討した。

図21にテレメトリー法により測定した心拍数の結果を示した。GBE投与前一週間、投与して一週間、2週間、3週間目の値の変移をコントロールと比較して示している。測定時間は9:00と21:00なっているが、これは予備測定した時に日内リズムの変化が一番明瞭に認められた時間帯だったので、9:00と21:00の値を採用した。実際に、この時間を中心に明期に低く暗期に高い、典型的な日内リズムが測定期間中観察された。このような心拍数に対し、GBEは投与直後からcontrol群に比べ心拍数を有意に低下させていた。なお、このような心機能の変化は、昨年のテイルカフを用いた実験では観察されていない。なお、図22は、活動量を図21と同様な様式で示したものである。活動量については、比較的明瞭な日内変動が観察された。しかしながら、これに対し、イチヨウ葉エキスは有意な影響を示さなかった。

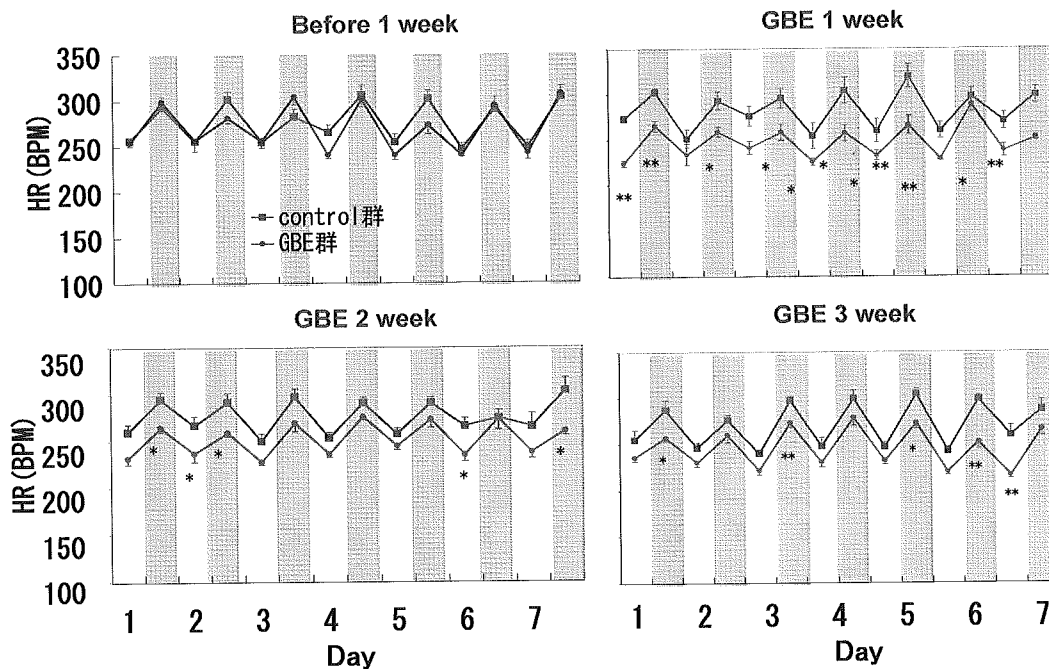


図21 SHRcpの心拍数(HR)に対するイチヨウ葉エキス(GBE)3週間経口摂取の影響

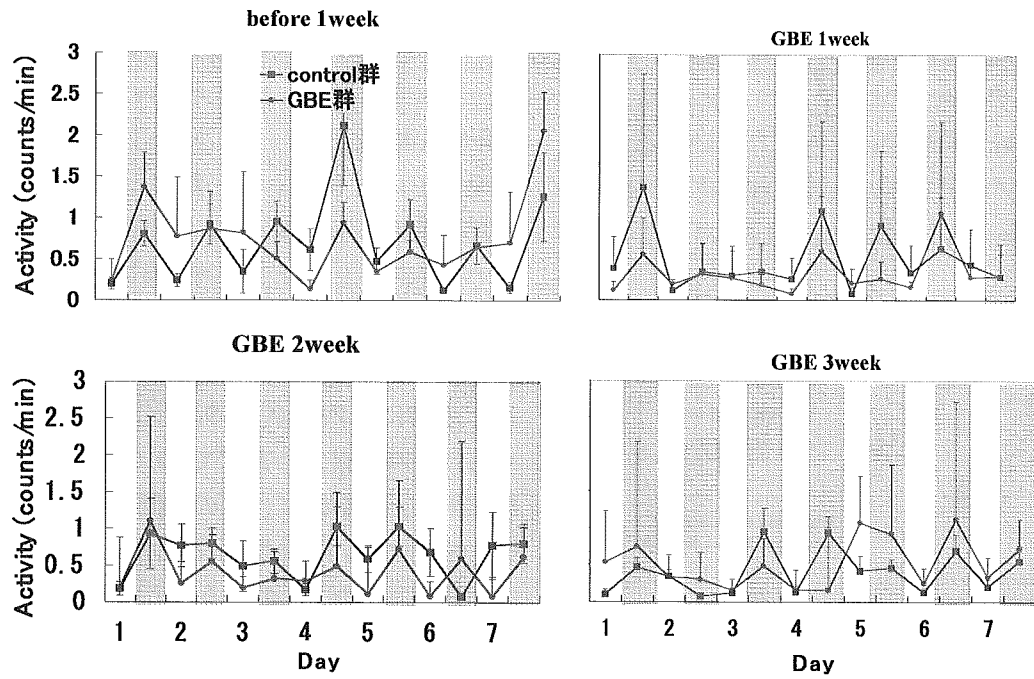


図22 SHRcp の活動量(Activity)に対するイチヨウ葉エキス(GBE)3週間経口摂取の影響

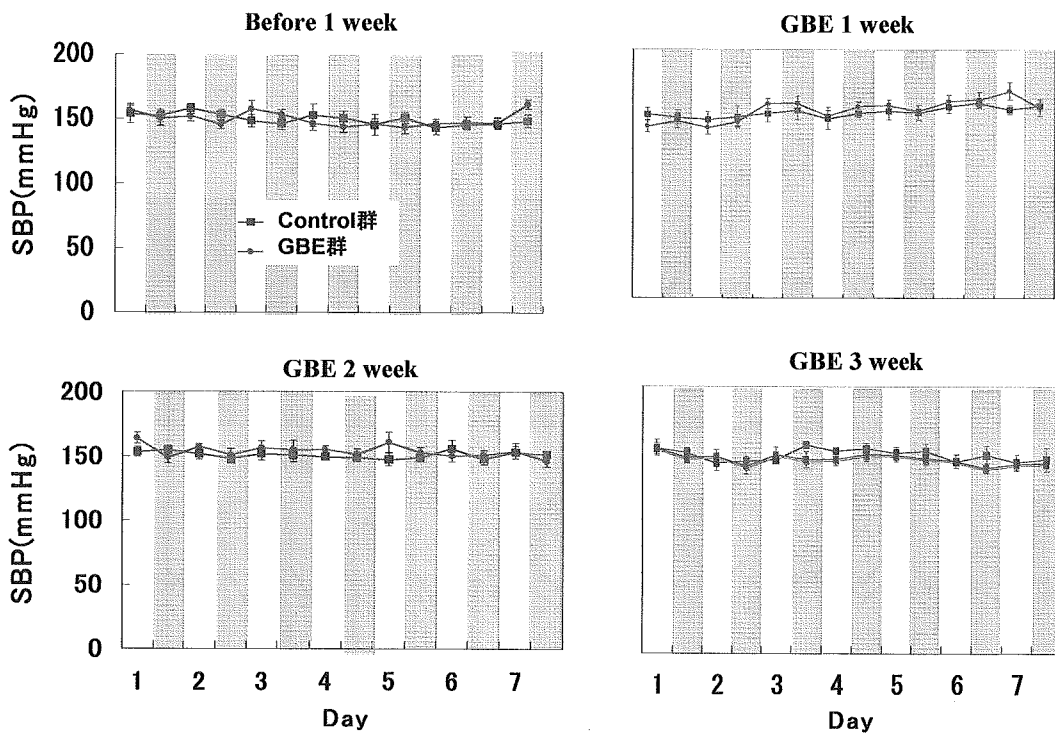


図23 SHRcp の収縮期血圧(SBP)に対するイチヨウ葉エキス(GBE)3週間経口摂取の影響