

表1 GABA投与に対する遺伝子発現応答の
大きな遺伝子(肝臓:0.5 mg/kg BW)

RATIO	NAME	DESCRIPTION
2.70765	NM_030845	Rattus norvegicus chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (Cxcl1), mRNA [NM_030845]
2.4916	NM_130741	Rattus norvegicus lipocalin 2 (Lcn2), mRNA [NM_130741]
2.2952	NM_012488	Rattus norvegicus alpha-2-macroglobulin (A2m), mRNA [NM_012488]
2.07985	NM_031332	Rattus norvegicus solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8 (Slc22a8), mRNA [NM_031332]
0.40285	XM_341949	PREDICTED: Rattus norvegicus forkhead box I2 (Foxi2), mRNA [XM_341949]
0.39275	AA819826	AA819826 UI-R-A0-ap-a-05-0-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-ap-a-05-0-UI 3', mRNA sequence [AA819826]
0.3893	NM_017171	Rattus norvegicus protein kinase C, epsilon (Prkce), mRNA [NM_017171]
0.38395	XM_341183	PREDICTED: Rattus norvegicus cell division cycle 7 (S. cerevisiae) (predicted) (Cdc7 predicted), mRNA [XM_341183]
0.37065	NM_001025017	Rattus norvegicus thioesterase superfamily member 4 (Them4), mRNA [NM_001025017]
0.36925	NM_001000703	Rattus norvegicus olfactory receptor 954 (predicted) (Olr954_predicted), mRNA [NM_001000703]
0.36545	BI276957	BI276957 UI-R-CW0-bxo-d-12-0-UI.s1 UI-R-CW0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CW0-bxo-d-12-0-UI 3', mRNA sequence [BI276957]
0.35855	AA799471	AA799471 EST188968 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHEAB42 3' end, mRNA sequence [AA799471]
0.33025	XM_227332	Rattus norvegicus similar to peptidoglycan recognition protein-I-alpha precursor (LOC295175), mRNA [XM_227332]
0.33015	AI231805	AI231805 EST228493 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHECO48 3' end, mRNA sequence [AI231805]
0.3225	AW521237	AW521237 UI-R-BO0-agk-g-12-0-UI.s1 UI-R-BO0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BO0-agk-g-12-0-UI 3', mRNA sequence [AW521237]
0.31545	XM_222474	Rattus norvegicus similar to KIAA1214 protein (LOC304642), mRNA [XM_222474]
0.3011	AF247818	Rattus norvegicus telomerase catalytic subunit mRNA, partial cds [AF247818]
0.30035	NM_001000427	Rattus norvegicus olfactory receptor 1139 (predicted) (Olr1139_predicted), mRNA [NM_001000427]
0.29815	XM_344681	PREDICTED: Rattus norvegicus toll-like receptor adaptor molecule 2 (predicted) (Ticam2 predicted), mRNA [XM_344681]
0.2877	NM_001000168	Rattus norvegicus olfactory receptor 155 (predicted) (Olr155_predicted), mRNA [NM_001000168]
0.28215	NM_019354	Rattus norvegicus uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (Ucp2), mRNA [NM_019354]
0.27435	NM_001014203	Rattus norvegicus similar to NYD-SP28 protein (LOC362994), mRNA [NM_001014203]
0.26435	NM_001000505	Rattus norvegicus olfactory receptor 318 (predicted) (Olr318_predicted), mRNA [NM_001000505]
0.21555	XM_001066817	PREDICTED: Rattus norvegicus procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide III (P4ha3), mRNA [XM_001066817]

表2 GABA投与に対する遺伝子発現応答の
大きな遺伝子(肝臓:5 mg/kg BW)

RATIO	NAME	DESCRIPTION
3.3039	NM_053469	Rattus norvegicus hepcidin antimicrobial peptide (Hamp), mRNA [NM_053469]
2.65795	NM_030845	Rattus norvegicus chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (Cxcl1), mRNA [NM_030845]
2.6123	AA963075	AA963075 UI-R-E1-fx-a-09-0-UI.s1 UI-R-E1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E1-fx-a-09-0-UI 3', mRNA sequence [AA963075]
2.4436	NM_057207	Rattus norvegicus synaptic vesicle glycoprotein 2b (Sv2b), mRNA [NM_057207]
2.40205	XM_238649	PREDICTED: Rattus norvegicus eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta) (Eif3s10), mRNA [XM_238649]
2.1447	NM_130741	Rattus norvegicus lipocalin 2 (Lcn2), mRNA [NM_130741]
0.4945	NM_001017467	Rattus norvegicus similar to lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LOC362934), mRNA [NM_001017467]
0.49155	NM_013112	Rattus norvegicus apolipoprotein A-II (Apoa2), mRNA [NM_013112]
0.4787	BM385216	BM385216 UI-R-CN1-cjs-n-04-0-UI.s2 UI-R-CN1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CN1-cjs-n-04-0-UI 3', mRNA sequence [BM385216]
0.46155	TC562707	Q7TQ12 (Q7TQ12) Aa1114, partial (9%) [TC562707]
0.45525	XM_001066409	PREDICTED: Rattus norvegicus nuclear receptor binding SET domain protein 1 (predicted) (Nsd1 predicted), mRNA [XM_001066409]
0.45325	CN544526	UI-R-EPO-cnx-p-03-0-UI.s1 UI-R-EPO Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-EPO-cnx-p-03-0-UI 3', mRNA sequence [CN544526]
0.4519	XM_229162	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to melanoma antigen family A, 10 (predicted) (RGD1561327 predicted), mRNA [XM_229162]
0.44765	XM_215351	PREDICTED: Rattus norvegicus protease inhibitor 16 (predicted) (Pi16 predicted), mRNA [XM_215351]
0.44275	AA955616	AA955616 UI-R-E1-fb-b-04-0-UI.s1 UI-R-E1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E1-fb-b-04-0-UI 3' similar to gi [AA955616]
0.44275	S79716	VI ADH=class VI alcohol dehydrogenase [rats, liver, mRNA Partial, 173 nt] [S79716]
0.4367	XM_223136	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to putative pheromone receptor Go-VN13C (predicted) (RGD1566389 predicted), mRNA [XM_223136]
0.4357	NM_012682	Rattus norvegicus uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier) (Ucp1), mRNA [NM_012682]
0.42625	NM_030852	Rattus norvegicus melanoma inhibitory activity 1 (Mia1), mRNA [NM_030852]
0.4252	AW521237	AW521237 UI-R-BO0-agk-g-12-0-UI.s1 UI-R-BO0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BO0-agk-g-12-0-UI 3', mRNA sequence [AW521237]
0.42175	XM_218148	Rattus norvegicus hypothetical LOC292508 (LOC292508), mRNA [XM_218148]
0.4202	NM_057105	Rattus norvegicus UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6 (Ugt1a6), transcript variant 2, mRNA [NM_057105]
0.41775	NM_001008362	Rattus norvegicus zinc finger protein 655 (Zfp655), mRNA [NM_001008362]
0.41715	XM_220834	PREDICTED: Rattus norvegicus eosinophil peroxidase (predicted) (Epx predicted), mRNA [XM_220834]
0.414	AI176229	AI176229 EST219810 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVBO85 3' end, mRNA sequence [AI176229]
0.4133	NM_001025017	Rattus norvegicus thioesterase superfamily member 4 (Them4), mRNA [NM_001025017]
0.41105	NM_001000164	Rattus norvegicus olfactory receptor 144 (predicted) (Olr144 predicted), mRNA [NM_001000164]
0.40775	AI177413	AI177413 EST221033 Normalized rat placenta, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RPLBY89 3' end, mRNA sequence [AI177413]
0.3985	NM_012546	Rattus norvegicus dopamine receptor D1A (Drd1a), mRNA [NM_012546]
0.3985	XM_577690	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to OTTHUMP0000040081 (predicted) (RGD1566403 predicted), mRNA [XM_577690]
0.39825	AA901341	AA901341 UI-R-A1-dw-b-04-0-UI.s1 UI-R-A1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A1-dw-b-04-0-UI 3' similar to gi [AA901341]
0.39655	AB007601	Rattus norvegicus mRNA for sproutin, partial sequence. [AB007601]
0.3931	XM_341183	PREDICTED: Rattus norvegicus cell division cycle 7 (S. cerevisiae) (predicted) (Cdc7 predicted), mRNA [XM_341183]
0.39165	DY471163	RVL22329 Wackym-Soares normalized rat vestibular cDNA library Rattus norvegicus cDNA 5', mRNA sequence [DY471163]
0.38105	NM_012751	Rattus norvegicus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (Slc2a4), mRNA [NM_012751]
0.37995	XM_220289	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein (predicted) (RGD1562576 predicted), mRNA [XM_220289]
0.3792	NM_001037201	Rattus norvegicus DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21a (Ddx21a), mRNA [NM_001037201]
0.37665	XM_235650	PREDICTED: Rattus norvegicus Rac GTPase-activating protein 1 (predicted) (Racgap1 predicted), mRNA [XM_235650]
0.3741	NM_130406	Rattus norvegicus Fas-associated factor 1 (Faf1), mRNA [NM_130406]
0.37235	AI639254	AI639254 rx01079s Rat mixed-tissue library Rattus norvegicus cDNA clone rx01079 3', mRNA sequence [AI639254]
0.3693	BF553214	BF553214 UI-R-C2-nk-b-07-0-UI.r1 UI-R-C2 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C2-nk-b-07-0-UI 5', mRNA sequence [BF553214]
0.36875	XM_234843	PREDICTED: Rattus norvegicus zinc finger protein 124 (HZF-16) (predicted) (Znf124 predicted), mRNA [XM_234843]
0.36845	XM_001076906	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Calponin-2 (Calponin H2, smooth muscle) (Neutral calponin) (LOC687057), mRNA [XM_001076906]
0.36845	BG665445	BG665445 DRACCH10 Rat DRG Library Rattus norvegicus cDNA clone DRACCH10 5', mRNA sequence [BG665445]

表3 GABA投与に対する遺伝子発現応答の
大きな遺伝子(小脳: 0.5 mg/kg BW)

RATIO	NAME	DESCRIPTION
0.49185	TC518066	Q9ERK2 (Q9ERK2) Neprilysin-like peptidase gamma, partial (3%) [TC518066]
0.45855	CA506147	CA506147 UI-R-FJ0-cqa-j-09-0-UI.s1 UI-R-FJ0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-FJ0-cqa-j-09-0-UI 3', mRNA sequence [CA506147]
0.45735	XM_215351	PREDICTED: Rattus norvegicus protease inhibitor 16 (predicted) (Pi16_predicted), mRNA [XM 215351]
0.4183	XM_220289	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein (predicted) (RGD1562576 predicted), mRNA [XM 220289]
0.3952	AA848804	AA848804 EST191565 Normalized rat lung, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLUAG63 3' end, mRNA sequence [AA848804]
0.3899	AI169682	AI169682 EST215575 Normalized rat liver, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLIAQ54 3' end, mRNA sequence [AI169682]
0.37295	XM_341183	PREDICTED: Rattus norvegicus cell division cycle 7 (S. cerevisiae) (predicted) (Cdc7_predicted), mRNA [XM 341183]
0.36335	NM_001001429	Rattus norvegicus olfactory receptor 1749 (predicted) (Olr1749_predicted), mRNA [NM 001001429]
0.33375	NM_022610	Rattus norvegicus inducible T-cell co-stimulator (Icos), mRNA [NM 022610]
0.27045	AI231033	AI231033 EST227721 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMDE45 3' end, mRNA sequence [AI231033]
0.20285	XM_001055850	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Annexin A9 (Annexin-31) (Annexin XXXI), transcript variant 1 (LOC681869), mRNA [XM 001055850]

表3 GABA投与に対する遺伝子発現応答の大きな遺伝子(小脳: 0.5 mg/kg BW)

RATIO	NAME	DESCRIPTION
0.492	TC518066	Q9ERK2 (Q9ERK2) Neprilysin-like peptidase gamma, partial (3%) [TC518066]
0.459	CA506147	CA506147 UI-R-FJ0-cqa-j-09-0-UI.s1 UI-R-FJ0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-FJ0-cqa-j-09-0-UI 3', mRNA sequence [CA506147]
0.457	XM_215351	PREDICTED: Rattus norvegicus protease inhibitor 16 (predicted) (Pi16_predicted), mRNA [XM_215351]
0.418	XM_220289	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein (predicted) (RGD1562576_predicted), mRNA [XM_220289]
0.395	AA848804	AA848804 EST191565 Normalized rat lung, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLUAG63 3' end, mRNA sequence [AA848804]
0.39	AI169682	AI169682 EST215575 Normalized rat liver, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLIAQ54 3' end, mRNA sequence [AI169682]
0.373	XM_341183	PREDICTED: Rattus norvegicus cell division cycle 7 (S. cerevisiae) (predicted) (Cdc7_predicted), mRNA [XM_341183]
0.363	M_00100142	Rattus norvegicus olfactory receptor 1749 (predicted) (Olr1749_predicted), mRNA [NM_001001429]
0.334	NM_022610	Rattus norvegicus inducible T-cell co-stimulator (Icos), mRNA [NM_022610]
0.27	AI231033	AI231033 EST227721 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMDE45 3' end, mRNA sequence [AI231033]
0.203	M_00105585	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Annexin A9 (Annexin-31) (Annexin XXXI), transcript variant 1 (LOC681869), mRNA [XM_001055850]

表4 GABA投与に対する遺伝子発現応答の大きな遺伝子(小脳: 5 mg/kg BW)

RATIO	NAME	DESCRIPTION
7.6629	NM_001013155	Rattus norvegicus soc-2 (suppressor of clear) homolog (C. elegans) (Shoc2), mRNA [NM_001013155]
7.4743	NM_133285	Rattus norvegicus H1 histone family, member 4 (H1f4), mRNA [NM_133285]
5.5265	XM_001055391	PREDICTED: Rattus norvegicus ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, X chromosome (predicted) (Utx_predicted), mRNA [XM_001055391]
4.6277	NM_012788	Rattus norvegicus discs, large homolog 1 (Drosophila) (Dlgh1), mRNA [NM_012788]
4.5939	XM_218352	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to KIAA1183 protein (predicted) (RGD1560435_predicted), mRNA [XM_218352]
4.5434	NM_020098	Rattus norvegicus piccolo (presynaptic cytomatrix protein) (Pclo), mRNA [NM_020098]
4.4356	XM_343446	PREDICTED: Rattus norvegicus synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein (Syncrip), mRNA [XM_343446]
4.3576	XM_237146	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to expressed sequence AW212394 (predicted) (RGD1562317_predicted), mRNA [XM_237146]
4.3387	XM_342277	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 2810403A07 (RGD1565775), mRNA [XM_342277]
4.0367	NM_031762	Rattus norvegicus cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (Cdkn1b), mRNA [NM_031762]
3.9222	XM_225864	PREDICTED: Rattus norvegicus spire homolog 1 (Drosophila) (predicted) (Spire1_predicted), mRNA [XM_225864]
3.752	NM_031828	Rattus norvegicus potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1 (Kcnma1), mRNA [NM_031828]
3.6827	NM_001024790	Rattus norvegicus ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated) (Usp7), mRNA [NM_001024790]
3.5604	XM_232354	PREDICTED: Rattus norvegicus chromodomain helicase DNA binding protein 4 (Chd4), mRNA [XM_232354]
3.5518	NM_001004446	Rattus norvegicus SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2 (Smarca2), mRNA [NM_001004446]
3.5231	XM_238649	PREDICTED: Rattus norvegicus eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta) (Eif3s10), mRNA [XM_238649]
3.5228	XM_575385	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to PHD finger protein 14 isoform 1 (predicted) (RGD1563764_predicted), mRNA [XM_575385]
3.5007	XM_224295	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to KIAA0853 protein (predicted) (RGD1307729_predicted), mRNA [XM_224295]
3.4914	NM_017263	Rattus norvegicus glutamate receptor, ionotropic, 4 (Gria4), mRNA [NM_017263]
3.4704	XM_220420	PREDICTED: Rattus norvegicus AF4/FMR2 family, member 4 (predicted) (Aff4_predicted), mRNA [XM_220420]
0.4446	BG668764	BG668764 DRNCGG12 Rat DRG Library Rattus norvegicus cDNA clone DRNCGG12 5', mRNA sequence [BG668764]
0.4409	NM_001008750	Rattus norvegicus type I keratin KA11 (Ka11), mRNA [NM_001008750]
0.4382	AA900262	AA900262 UI-R-E0-de-g-05-0-UI.s2 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-de-g-05-0-UI 3' similar to gi [AA900262]
0.4381	NM_030991	Rattus norvegicus synaptosomal-associated protein 25 (Snap25), mRNA [NM_030991]
0.4368	AI169682	AI169682 EST215575 Normalized rat liver, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLIAQ54 3' end, mRNA sequence [AI169682]
0.4219	AB033713	Rattus norvegicus mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds [AB033713]
0.4165	NM_133421	Rattus norvegicus limkain b1 (Lkap), mRNA [NM_133421]
0.4133	XM_239603	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 1300006M19 (LOC304282), mRNA [XM_239603]
0.4041	NM_153737	Rattus norvegicus sclerostin domain containing 1 (Sostdc1), mRNA [NM_153737]
0.3945	AA955748	AA955748 UI-R-E1-fg-d-10-0-UI.s1 UI-R-E1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E1-fg-d-10-0-UI 3' similar to gi [AA955748]
0.3895	NM_173307	Rattus norvegicus ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5 (Abca5), mRNA [NM_173307]
0.3718	NM_012628	Rattus norvegicus protein kinase C, gamma (Prkcc), mRNA [NM_012628]
0.3484	BI279326	BI279326 UI-R-DA0-byn-a-05-0-UI.s1 UI-R-DA0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-DA0-byn-a-05-0-UI 3', mRNA sequence [BI279326]
0.3144	XM_228607	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to MGC79482 protein (predicted) (RGD1563554_predicted), mRNA [XM_228607]
0.3091	NM_173319	Rattus norvegicus putative pheromone receptor (Go-VN7) (LOC286985), mRNA [NM_173319]
0.192	XM_001055850	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Annexin A9 (Annexin-31) (Annexin XXXI), transcript variant 1 (LOC681869), mRNA [XM_001055850]

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 籠田 智美 武庫川女子大学薬学部講師

研究協力者 多田有加里 武庫川女子大学薬学部副手

研究要旨

研究目的：関与成分の特定が困難な食品の有用性と安全性を総合的かつ高感度に評価可能なシステムの構築を目的とする。特に今年度は老齢自然発症高血圧ラット (SHR) および脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSP/IDmcr-fa/fa: SHRSPZF) などの病態モデルに対するイチョウ葉エキス (GBE) 長期経口投与の有用性安全性について検討し、さらに神経機能への影響についても検討を試みた。

研究結果：1) 老齢 SHR の血圧に対して GBE 4 週間摂取は有意な影響を与えなかったが、心拍数と末梢血流速度に対しては有意な減少作用を示した。また摘出血管組織の収縮弛緩反応と細胞内の eNOS/sGC タンパク発現量には有意な影響を示さなかった。一方、GBE 4 週間摂取したこのラットの体重には有意な変化が認められなかったが、肝重量の著明な増加と肝 CYP タンパク発現量の増加さらに血中 GPT の増加が観察された。2) SHRSPZF の循環器系機能(血圧、心拍、血管反応性)に対し GBE 5 週間摂取は有意な影響を示さなかった。

3) 摘出心房標本における収縮力は、GBE 処置により濃度依存的に増強し、3 mg/mL 処置では投与前の約 1.5 倍に増強した。一方、摘出心房標本における心拍数も、GBE 処置により濃度依存的に増加し、3 mg/mL 処置では投与前の約 1.2 倍に達した。4) 脳卒中易発性生活習慣病ラットの回腸において、神経刺激による反応は 1.5 分間の虚血様処置(無酸素・無ブドウ糖)により減弱したが、GBE 5 週間摂取したラットでは、その反応の減弱が軽減された。

3. 総括 循環改善効果が標榜されている GBE の 5 週間摂取は、老齢の SHR と SHRSPZF では降圧的な作用は認められず、逆に老齢の高血圧ラットでは心機能や肝機能の変化が認められた。一方、SHRSPZF の神経機能に対し、GBE の 5 週間摂取は虚血様の状態下で減弱した神経伝達機能を亢進するような影響を与えた。

A. 目的

我々はこれまで、関与成分の特定が困難な食品の有用性と安全性を、総合的かつ高感度に評価するシステムの確立とその応用を目標とし、生体に対する特定保健用食材や健康食品の有用性と安全性について、循環機能を中心に薬理学的および薬物動態的に検討してきた。特に、GBEの有用性としての末梢循環改善効果について、我々のシステムを用いて検討した結果、前年度までに、GBEには、血管拡張機能亢進を介した高血圧改善作用があること、肝酵素誘導作用のあることを明らかにしている（窪田ら、日本食品化学学会誌、7、41、2000 および 8、149、2001）。近年、GBEの有用性として、末梢循環の改善とともに循環改善等に基づく脳神経等機能改善もしくは保護的な作用のあることは良く知られている。

今年度は、GBEの有効性と安全性について、下記の4点について検討した。

- 1) 高血圧をもつ高齢者におけるGBEの有用性と安全性：老齢高血圧自然発症ラット（SHR）における循環機能に対するGBE長期経口摂取の影響
- 2) メタボリックシンドローム病態時におけるGBEの有用性と安全性：脳卒中易発性生活習慣病ラット（SHRSP/IDmcr-fa/fa:SHRSPZF）における循環機能に対するGBE長期経口摂取の影響
- 3) 心臓機能におけるGBEの有用性と安全性：摘出心房標本を用いた心収縮能および心拍動能に対するGBEの影響
- 4) GBEの脳神経等機能改善・保護作用：脳

のモデルとされている消化管神経叢を用いた虚血状態下におけるGBEの神経機能への影響

B. 研究方法

1. 実験動物

9週齢の雄性自然発症高血圧ラット（本文ではSHRと略）および12週齢の雄性脳卒中易発性生活習慣病ラット（本文ではSHRSPZFと略）を日本SLC（静岡）より購入し、それぞれ50週齢および15週齢になるまで市販固形飼料（CE-2、日本クレア、東京）および水道水を自由摂取させ飼育した後、実験に使用した。一部の実験には、9～11週齢の雄性Wistar系ラット、16週齢の雄性SHR/NDmcr-cpラット（本文ではSHR-cpと略）およびその正常対象である16週齢の雄性Wistar-Kyotoラット（本文ではWKYと略）、3週齢の雄性Hartley系モルモットをそれぞれ日本SLCより購入し、1週間以上の予備飼育を行った後実験に使用した。全実験期間を通して、恒温（ $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）、恒湿（ $55\pm 2\%$ ）、定時照明（7～19時）の条件下で動物を飼育した。

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、実験に供した。

2. GBEの反復摂取方法

SHRをコントロール食群（Control群、5匹）とGBE添加食群（GBE群、6匹）の2群に分け、Control群には市販粉末飼料を、GBE群には市販粉末飼料（CE-2、日本クレア）にGBEを0.5%の割合で添加し作成した

飼料を、それぞれ4週間自由摂取させた。また、SHRSPZFを同様に、コントロール食群(5匹)とG B E添加食群(5匹)の2群に分け、市販粉末飼料またはG B E 0.5%添加粉末飼料を5週間自由摂取させた。

3. ラットの血圧、心拍数および末梢循環機能の測定法

被験食品摂取期間中、週に1度の割合で、無加温型非観血式血圧計(MK-2000、室町機械、東京)を用いて、テイルカフ法により収縮期血圧、拡張期血圧および心拍数を測定した。また、レーザー組織血流計オメガフロー(FLO-C1、Neuroscience、東京)を用いて、laser Doppler法により尾動脈の組織血流量(blood flow)、組織血液量(blood mass)、血流速度(blood flow velocity)を測定した。

4. ラット摘出胸部大動脈および腸間膜動脈における収縮および弛緩反応の測定方法(Organ bath法)

ペントバルビタール麻酔下(60 mg/kg、腹腔内投与)で、ラットから胸部大動脈および腸間膜動脈を摘出し、2~3 mm幅のリング状標本を作成した。一部の標本は、血管内腔側を綿棒でこすることにより、内皮細胞除去標本とした。標本は、95%酸素・5%二酸化炭素の混合ガスを通気し37℃に保温したKrebs-Henseleit液(以下クレブス液と略、pH 7.4; 118.4 mM NaCl、4.7 mM KCl、1.2 mM MgSO₄-7H₂O、2.5 mM CaCl₂-2H₂O、25.0 mM NaHCO₃、1.2 mM KH₂PO₄、11.1 mM glucose) 10 mLで満たしたマグヌス管内に、静止張力(胸部大

動脈 1.0 g、腸間膜動脈 0.3 g)を負荷して懸垂した。

摘出胸部大動脈リング状標本に、フェニレフリンを累積的(10⁻¹⁰~10⁻⁶ M)に添加し、生じる収縮力の大きさを、張力トランスデューサー(T-7、NEC 三栄、東京)および二チャンネル記録計(8K21、NEC 三栄、東京)を用いて等尺性に記録した。また、標本をあらかじめフェニレフリン(10⁻⁷ M)により収縮させた後、アセチルコリン、ニトロプルシドナトリウム又はイソプロテレノールを累積的(10⁻¹⁰~10⁻⁶ M)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、パパベリン(10⁻⁴ M)により生じる最大弛緩反応を100%としたときの弛緩率(%)として表示した。

5. ラット摘出心房における収縮反応および心拍数の測定方法(Organ bath法)

ペントバルビタール麻酔下(60 mg/kg、腹腔内投与)でラットから心臓を摘出した。左右の心室を除去し、左右心房とペースメーカーからなる心房標本を作製した。標本は、左右心耳部をセルフインで挟み、95%酸素・5%二酸化炭素の混合ガスを通気した34℃に保温したクレブス液(上記)で満たしたマグヌス管中に、静止張力0.5 gにて懸垂した。

摘出心房標本に、イソプロテレノール 10⁻¹⁰~10⁻⁷ M、アセチルコリン 10⁻¹⁰~10⁻⁷ M、G B E 0.01~3 mg/mL、ギンコライド A および C 1~100 μg/mLを、それぞれ累積的に添加し、生じる張力変化を、張力トランスデューサー(T-7、NEC 三栄、東京)および二チャンネル記録計(8K21、NEC 三栄、東京)によ

り等尺性に記録した。また、得られたデータより心拍数 (beats/min) を算出した。

6. ラットおよびモルモットの摘出腸管における収縮反応の測定方法 (Organ bath 法)

ペントバルビタール麻酔下に、ラット (SHRSP/IDmcrfa/fa、以下 SHRSPZF と略す) およびモルモット (Hartley 系雄性モルモット、体重 250g) の回盲部より 3 cm の部位から口側へ 2 cm の長さの回腸を摘出し、標本として使用した。摘出回腸標本は、95%酸素・5%二酸化炭素の混合ガスを通気した 37°C に保温した Tyrode 液 (8 mM NaCl、0.2 mM KCl、0.1 mM MgCl₂、0.2 mM CaCl₂、0.05 mM NaH₂PO₄、1.0 mM NaHCO₃、1.0 mM glucose) で満たしたマグヌス管中に、静止張力 1.0 g にて懸垂した。腸管壁神経を刺激するため、腸管管腔内に陰極用白金電極を、外側に陽極用白金電極を装着し、アイソレータを接続した電気刺激装置 (DPS-122D、ダイヤモンドシステム) を用いて 0.1 Hz、0.5 msec、50 V の矩形波刺激を 6 分間加えて生じる収縮反応を、張力トランスデューサー (TD-122S、日本光電工業株式会社、東京)、多用途増幅器 (RMP-6004、日本光電工業株式会社) および記録器 (WT-645G、日本光電工業株式会社) により等張性に記録した。

Mdzinarishvili らの方法 (Neuroscience、5、217、2007) に準じて、回腸標本を 37°C に保温した酸素およびブドウ糖を除いた Tyrode 液 (無酸素無ブドウ糖 Tyrode 液) 中で 1 分 30 秒インキュベートすることにより、虚血状態に類似した処置 (虚血様処置) を施した。即ち、正常な Tyrode 液中で回腸標本

に電気刺激を与え、生じた収縮反応を測定し

(S1)、その後、虚血様処置として無酸素無ブドウ糖 Tyrode 液に交換し、その 1.5 分後に 2 回目の電気刺激を加えた (S2)。刺激の間隔は、31.5 分とした。また、虚血様処置が及ぼす収縮機能への影響に対するイチョウ葉成分の効果を検討するため、ピロバライド (1~100 μM)、ギンコライド A、B および C (1~100 μM) は、それぞれ 2 回目の電気刺激 30 分前にマグヌス管内に添加した。さらに、神経節刺激および平滑筋直接刺激に対する収縮反応に及ぼす虚血様処置の効果を検討するため、dimethyl phenyl piperazinium (DMPP、 3×10^{-5} M) またはアセチルコリン累積投与により生じる収縮反応を、虚血様処置前後に測定した。データは、1 回目の刺激による反応 (S1) に対する 2 回目の刺激による反応 (S2) の比 (S2/S1) で表した。

7. ラット胸部大動脈における内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) および可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 蛋白発現量の測定方法 (Western blot 法)

ペントバルビタール麻酔下 (60 mg/kg、腹腔内投与) でラットから胸部大動脈を摘出し、籠田らの方法 (2006) に準じて、胸部大動脈中の eNOS および sGC 蛋白の発現量を Western blot 法により測定した。データは、それぞれ、eNOS を β-アクチンで、sGC を α-アクチンで標準化した値として表した。

8. ラット肝臓におけるチトクローム P-450 (CYP) 蛋白発現量の測定方法 (Western blot 法)

ペントバルビタール麻酔下に、ラットより肝臓を摘出し、肝臓1 gを150 mM KCl溶液4 mL中にホモジナイズした後、遠心分離 (10,000 ×g、4°C、15 分) を行った。得られた上清から、肝ミクロソーム分画を超遠心法 (105,000 ×g、4°C、60 分) により分離し、得られる下層を150 mM KCl溶液500 μLに懸濁して測定試料とした。肝ミクロソーム中CYP 蛋白発現量の測定は、常法に従い、Western blot法により測定した。

9. 血清中の各種パラメーターの測定方法

ペントバルビタール麻酔下にラットの腹部大動脈より全血を採取し、血清を遠心分離 (3,000 ×g、4°C、10 分) した。血清中のグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、総コレステロール、高比重リポ蛋白 (HDL) -コレステロール、アルブミン、グロブリン、総蛋白およびグルコースを、市販のキット (和光純薬、大阪) を用いて測定した。

10. 使用薬物

被験食品として、イチョウ葉エキス粉末 (イチョウ葉エキス-F、タマ生化学、東京) を使用した。さらに、以下の薬物は、適宜溶解させ、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, MO, USA)、ニトロプルシッドナトリウム (SNP) (ナカライテスク、京都)、イソプロテレノール重酒石酸塩 (フナコシ、東京)、ギンコライド A、

ギンコライド B およびギンコライド C (タマ生化学、東京)、ピロバライド (フナコシ、東京)、その他の試薬は特級品 (和光純薬、大阪) を使用した。

また、Western blot 法には、下記の抗体を使用した。抗 endothelium NO synthase (eNOS) 抗体 (BD Transduction Laboratories, KY, USA)、抗 beta-actin 抗体 (Sigma Chemical, Co.)、抗 alpha-actin 抗体 (Progen GMBH, Heidelberg, Germany)、抗 soluble guanylate cyclase (sGC) 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (Vector Laboratories, CA, USA)、HRP-conjugated anti-rabbit IgG 抗体 (Vector Laboratories, CA, USA)、抗 CYP2B1/2B2 抗体 (第一化学、東京) および HRP-conjugated anti-goat IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)。

11. 統計処理

データは全て平均値±標準誤差で示した。対応のない2群間の有意差検定には paired *t*-test (分散が有意に異なる場合には Welch's test) を用いた。実際の統計計算は Stat View-II プログラム (Abacus Concept Inc, CA, USA) を用いて行い、危険率 5%未満のものを有意差ありと判断した。

C. 研究結果

1. 高血圧をもつ高齢者における GBE の有用性と安全性 : 老齡自然発症高血圧ラット (SHR) の循環パラメータに対する GBE 長期経口摂取の影響

(1) 1日摂餌量および飲水量、体重に対する影響

老齢 SHR の摂餌量および飲水量は、4週間の負荷期間中、G B E 摂取による有意な影響は認められなかった (data not shown)。また、実験期間中の体重には G B E 摂取による有意な影響は認められなかった。飼育最終週の体重は、コントロール群では 432.8 ± 7.5 g、G B E 投与群では 438.8 ± 3.4 g であった。

(2) 血圧に対する影響

老齢 SHR の血圧は、加齢とともに漸増した。飼育最終週 (摂取開始4週目) まで、収縮期血圧および拡張期血圧ともに、コントロール群と G B E 投与群との間に有意な差は認められなかった (図 1 A、B)。

(3) 心拍数および末梢血液循環に対する影響

G B E 投与4週目における老齢 SHR の心拍数は、コントロール群に比べ有意に減少した (図 2 A)。老齢 SHR の尾動脈の組織血流量および組織血液量においては、飼育期間中、コントロール群と G B E 投与群との間に有意な差は認められなかった。一方、G B E 投与群の血流速度は、投与4週目にはコントロール群に比べ有意に減少した (図 2 B)。

(4) 胸部大動脈における収縮および弛緩反応に対する影響

老齢 SHR の胸部大動脈におけるフェニレフリンに対する収縮反応は、G B E の長期摂取により影響されなかった (図 3 A)。また、アセチルコリン (図 3 B) およびイソプロテレノール (図 3 C) に対する弛緩反応に

おいても、両群間に差は認められなかった。

内皮除去標本、すなわち、血管平滑筋における反応性においても、フェニレフリンに対する収縮反応 (図 4 A)、ニトロプルシドナトリウムおよびイソプロテレノールに対する弛緩反応はともに、G B E の長期摂取による影響は認められなかった。

(5) 腸間膜動脈における収縮および弛緩反応に対する影響

老齢 SHR の腸間膜動脈におけるフェニレフリンに対する収縮反応 (図 5 A) およびアセチルコリンに対する弛緩反応 (図 5 B) は、ともに、G B E の長期摂取による影響は認められなかった。一方、ニトロプルシドナトリウムに対する弛緩反応は、 10^{-7} M という高濃度においてのみ、G B E 投与群で有意な弛緩反応の増大が観察された (図 5 C)。しかし、その程度は軽度であった。

(6) 胸部大動脈における eNOS および sGC 発現量に対する影響

老齢 SHR の胸部大動脈中において、NO 合成に関与する eNOS および NO の作用点である sGC の蛋白発現量はともに、G B E の長期摂取による影響は認められなかった。

(7) 肝重量、血清中 GOT および GPT に対する影響

G B E の長期摂取は、体重 100g あたりの相対肝重量に著しい増加が認められた (図 7 A)。一方、肝機能の指標となる血清中 GOT および GPT 値を測定したところ、GOT 値にはコントロール群と G B E 投与群との間に優位な差は認められなかったが (図 7 B)、GPT 値は G B E の長期摂取により有意

な増加が認められた (図 7C)。

(8) 肝ミクロソーム中 CYP 蛋白発現量に対する影響

これまでの研究により、G B E の長期摂取により、CYP 分子種のうち、特に、CYP2B1/2 の mRNA 誘導が起きることを明らかにしている (Shinozuka et al., 2002)。そこで今回は、CYP2B1/2 の蛋白発現量を Western blot 法で測定した。その結果、G B E の長期摂取により、CYP2B1/2 蛋白発現の著明な増加が認められた (図 8A、B)。

(9) 血清中の各種パラメータに対する影響

表 1 は G B E を長期摂取した老齢 SHR の血清中総コレステロール、HDL-コレステロール、総蛋白、アルブミン (A)、グロブリン (G)、A / G 比およびグルコース値を示したものである。G B E の長期摂取により、血中総コレステロール値は有意に減少、逆に、HDL-コレステロール値は有意に増加していた。また、アルブミン、グロブリン、総蛋白および A / G 比においては、コントロール群と G B E 投与群との間に有意な差は認められなかった。血糖値は、G B E 投与群で有意に減少していた。

2. メタボリックシンドローム病態時における G B E の有用性と安全性: 脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の循環パラメータに対する G B E 長期経口摂取の影響

(1) 体重、1 日摂餌量および飲水量に対する影響

SHRSPZF の体重は、5 週間の負荷期間中、G B E 摂取による影響は認められなかつ

た (図 9A)。しかしながら、摂餌量においては、G B E 投与開始直後はコントロール群に比べ有意に減少していたが、4 週目以降は有意な差は認められなくなった (図 9B)。また、飲水量においても、G B E 投与 1 週目より、コントロール群に比べ G B E 投与群で有意な減少が認められ、この減少は飼育終了時まで持続した (図 9C)。

(2) 心拍数および血圧に対する影響

SHRSPZF の心拍数に対して、G B E の長期摂取による有意な影響は認められなかった (図 10A)。一方、加齢とともに漸増する SHRSPZF の収縮期血圧および拡張期血圧に対し、G B E 摂取期間中は常に低い値を示す傾向が認められた。有意な差ではなかった (図 10B、C)。

(3) 胸部大動脈における収縮および弛緩反応に対する影響

SHRSPZF の胸部大動脈におけるフェニレフリンに対する収縮反応は、G B E の長期摂取により影響されなかった (図 11A)。また、アセチルコリン (図 11B) およびニトロプルシッドナトリウム (図 11C) に対する弛緩反応においても、G B E 長期摂取による有意な影響は認められなかった。

(4) 腸間膜動脈における収縮および弛緩反応に対する影響

SHRSPZF の腸間膜動脈におけるフェニレフリンに対する収縮反応 (図 12A)、アセチルコリン (図 12B) またはニトロプルシッドナトリウム (図 12C) に対する弛緩反応のいずれにおいても、G B E の長期摂取による有意な影響は認められなかった。

(5) 心房の収縮および弛緩機能に対する

影響

SHRSPZF の摘出心房における心拍数および収縮力は、コントロール群と G B E 投与群との間に差は認められなかった。また、イソプロテレノールによる陽性変時変力作用 (図 13A、B) およびアセチルコリンによる陰性変時変力作用 (図 14A、B) は、ともに、G B E の長期摂取による効果は認められなかった。

(6) 心臓および肝重量、血中 GOT および GPT 値に対する影響

心房重量および心室重量はともに、G B E の長期摂取により減少する傾向が認められた (図 15A、B)。一方、肝重量は、G B E 長期摂取により著明に増加した (図 16A)。血中 GOT および GPT 値には有意な差はみとめられなかった (図 16B、C)。

3. 心機能における G B E の有用性と安全性: 摘出心房標本を用いた心収縮能および心拍動能に対する G B E の直接効果

(1) 正常動物 Wistar 系ラットの心機能に及ぼす効果

Wistar 系ラットの摘出心房標本における心拍数に対し、G B E の添加は、1 mg/mL の濃度より濃度依存的に陽性変時効果 (心拍数の増加) を示し、3 mg/mL の添加により投与前に比べて心拍数が 1.2 倍増加した (図 17A)。一方、収縮力に対しては、G B E 1 mg/mL より濃度依存的に陽性変力効果 (収縮力の増強) を示し、3 mg/mL の添加により投与前に比べ収縮力が 1.5 倍増加した (図 17B)。

一方、G B E の一成分であるギンコライ

ド A の添加によっては心拍数に有意な変化は認められなかったが、収縮力に対しては 100 μ g/mL の濃度において有意な陰性変力作用 (収縮力の抑制) が認められた (図 17C、D)。一方、ギンコライド C においては、いずれの濃度においても心拍数および収縮力に対して有意な効果は認められなかった (図 17E、F)。

(2) 生活習慣病ラット (SHR-cp) の心機能に及ぼす効果

SHR-cp は、肥満と高血圧を自然発症するのに加え、高脂血症、高血糖、高インスリン血症を併発する、メタボリックシンドロームのモデル動物である。メタボリックシンドロームを発症した SHR-cp の摘出心房における心拍数は、正常対象動物である WKY に比べ有意に減少していた (図 18A)。WKY の心拍数は、G B E 添加により濃度依存的に減少し、3 mg/mL 処置では投与前の約 80% に達した (図 17A)。SHR-cp では逆に、濃度依存的な増加がみられ、3 mg/mL 処置では投与前の約 1.2 倍に達した (図 18A)。一方、G B E の一成分であるケルセチン添加によっては、両群ともに心拍数に影響はみられなかった (図 18C)。

SHR-cp 摘出心房の収縮力は、WKY に比べ減少する傾向がみられた (図 18D、before)。WKY および SHR-cp ともに、G B E 添加により濃度依存的に心房収縮力が増強する傾向がみられたが、動物間に有意な差はなかった (図 18B)。一方、ケルセチン添加によっては、両群ともに心房収縮力に対する効果はなかった (図 17B)。

4. 脳神経機能等に対するGBEの影響（虚血状態下の消化管神経叢の機能に対するGBEの作用）

(1) モルモット回腸の神経性収縮反応に対するピロバライドの影響

まず電氣的神経刺激による回腸の収縮反応に対しGBE成分のピロバライドおよびギンコライド A, B および C の直接的影響について検討した。神経刺激としては電気刺激もしくは神経節刺激薬である DMPP を用いた。電気刺激による収縮反応は、tetrodotoxin もしくは atropine によって消失した。したがってこの反応はコリン作動性神経の興奮に基づくものであることが確認された。このような反応に対してギンコライド A, B および C は、1-100 μ M の濃度で有意な影響を示さなかった。一方、ピロバライドは10 μ M の濃度から収縮増強作用を示した。なお、ACh の濃度収縮曲線に対しピロバライドは全く影響を与えなかった。

(2) 虚血様処置されたモルモット回腸の神経性収縮反応に対するピロバライドの影響

虚血様処置した回腸標本において、電氣的神経刺激による収縮反応は著しく減弱したが、その減弱はピロバライド(1 μ M) 前処置により有意に抑制された。さらに DMPP による収縮反応も虚血様処置により著しく減弱し、その減弱はピロバライド(1 μ M) 前処置によって抑制された。一方、ACh による収縮反応は虚血様処置による影響を全く受けなかった。

(3) 虚血様処置されたラット回腸の神経性

収縮反応に対するピロバライドの影響

ラット回腸標本において、電氣的神経刺激(0.1Hz, 0.5msec) による反応は tetrodotoxin により著明に抑制された。この反応は虚血様処置により有意に減弱したが、ピロバライドによりその減弱は軽減された(図 19)。

(4) ラットの神経伝達機能と循環機能に対するGBE長期摂取の影響

GBE の長期摂取が、上述したような低下した神経機能に影響するか否かを検討し、同時に循環機能への長期投与での影響についても検討した。その結果、体重、摂餌量、飲水量、収縮期血圧拡張期血圧および心拍数においてコントロール群と GBE 群の間に有意な差は見られなかった。0.5%GBE 投与群の回腸において、虚血時の電気刺激による反応の減弱はコントロール群に比べ有意に抑制された(図 20)

D. 考察

1. 高血圧をもつ高齢者におけるGBEの有用性と安全性：老齡自然発症高血圧ラット(SHR)の循環パラメータに対するGBE長期経口摂取の影響

昨年度までの若齡 SHR を用いた検討において、GBE には血圧上昇抑制作用および血管拡張機能改善作用があることが明らかとなっている (Kubota et al., 2006)。そこで今回は、医薬品高感受性グループと言われる高齢者に対する GBE の有用性と安全性について検討するため、老齡 SHR ラットを用いて循環機能および肝臓に対する GBE の影響について検討を行った。

その結果、若齢 SHR の場合とは異なり、老齢 SHR (50 週齢) においては、G B E 長期摂取による高血圧改善および血管拡張機能改善効果は全く認められず、むしろ、心機能を抑制し、末梢循環の低下を引き起こすことが明らかとなった。これまでの研究で、SHR に肥満遺伝子 cp が発現した 30 週齢の SHR-cp ラットにおいても G B E 摂取が心拍数を減少させることを見いだしている (H17 年度報告書)。近年、*in vitro* 実験において、G B E は、カルシウム流入を抑制することにより心臓ペースメーカー活性を低下することが明らかにされた (Sato, 2004 and 2005)。一方で、老齢 Wistar ラット (18 ヶ月齢) ではこのような心拍数減少作用は認められない (H15 年報告書)。また、正常ラットの摘出心房標本を用いた *in vitro* 実験において、G B E は陽性変時変力効果をもつことを明らかにしている (Kubota et al., 2002)。これらのことから、G B E の心拍抑制作用の発現には、加齢ではなくむしろ高血圧に強く影響される可能性が考えられる。

さらに、G B E の長期摂取は、肝臓の著明な肥大を生じるとともに、肝代謝酵素の誘導を引き起こすことを明らかにし、降圧薬や抗糖尿病薬などの医薬品との相互作用に注意することが必要であることを見いだしている (Shinozuka et al., 2002; Kubota et al., 2003; Sugiyama et al., 2004)。ヒトにおいても同様の効果が報告されている (Yoshioka et al., 2004)。今回の老齢 SHR においても、G B E 長期摂取により、肝重量の著明な増加と CYP2B1/2 蛋白発現量の著しい増加が生じることが明らかとなった。このことは、老齢

ラットにおいても若齢の場合と同様に、G B E が肝代謝酵素の誘導を引き起こすことを示している。しかし、若齢動物を用いたこれまでの検討とは異なり、老齢 SHR においては、血清中の GPT 値の上昇や、総コレステロール値の減少が認められた。これらの結果は、肝細胞の損傷および肝臓における脂質合成能の低下といった肝機能障害が関係している可能性を示唆するものである。

以上、老齢 SHR を用いた検討から、G B E の長期摂取は、循環パラメータに対する影響が期待できないこと、むしろ、心機能抑制を介した末梢循環低下、肝代謝酵素の誘導と肝機能変化を引き起こすことが明らかとなった。高齢者は、一般的に、代謝機能や心機能が低下している、さまざまな疾患を抱え、医薬品を服用している可能性が高いことも考えられる。高血圧をもつ高齢者における G B E の使用は、心拍数や肝機能に与える影響、医薬品との相互作用に十分注意しながら行う必要があると考えられる。今後は、G B E による末梢循環機能低下および肝機能変化の詳細を検討するとともに、このような効果は加齢に伴う変化であるのか、高血圧であることに起因するのか、その発症原因についても検討したい。

2. メタボリックシンドローム病態時における G B E の有用性と安全性: 脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の循環パラメータに対する G B E 長期経口摂取の影響

昨年度までに、加齢に伴い高血圧を自然発症する SHR を用いた検討において、G B E に循環機能改善効果があることを認めている

(Kubota et al., 2006)。そこで今回は、高血圧にさらに肥満を併発し発症した場合においても、G B E の循環機能改善効果が認められるか否かを検討した。

SHRSPZF は、重度の高血圧を自然発症するために脳卒中を易発症するラットである SHRSP に、Zucker fatty ラットの肥満遺伝子 *fa* を導入した新しい生活習慣病モデルラットである。今回、SHRSPZF においては、G B E の摂取により高血圧改善効果も血管拡張性機能亢進効果もみとめられず、循環機能改善という有効性は確認されなかった。一方で、高血圧と肥満を自然発症する SHR-*cp* ラットにおいては、G B E を若齢から摂取させた場合には循環機能改善効果を示すことを見いだしている (H16 年度報告書)。これらの結果は、肥満を伴う重度の高血圧を発症している患者においては、G B E の循環機能改善効果は期待できない、または、このような状態では G B E は影響しないこと示唆するものとする。今後は、G B E の投与濃度をあげて検討することにより、この疑問点を明らかにする必要があると考える。

また、SHRSPZF においては 12 週齢から 5 週間という G B E の摂取によっては、肝重量の増加は認められたものの、血清 GOT および GPT 値には有意な影響は認められなかった。このことは、これまでの若齢動物を用いた結果と同様に、若齢においては、G B E は肝代謝酵素の誘導はおこすが、肝機能障害は起きにくいことを示すものである。

3. 心機能における G B E の有用性と安全性: 摘出心房標本を用いた心収縮能および心

拍動能に対する G B E の直接効果

これまでの正常動物である Wistar ラット摘出心房標本を用いた検討により、G B E は陽性変力変時作用 (心収縮力および心拍数の増加) をもつこと、G B E の成分であるギンコライド B には軽度の陰性変力作用 (収縮力の抑制)、フラボノイド類の 1 つであるケルセチンには陽性変力作用、アメントフラボンには陽性変時作用があることを見いだした (Kubota et al., 2002)。今回は、ギンコライド B に比べ G B E 中に多く含まれるギンコライド A および C の効果について追加検討した。その結果、ギンコライド A および C には、ギンコライド B およびケルセチンと同様に、明らかな変時作用は認められなかった。今後、陽性変時効果をもつ G B E 中の成分を明らかにするため、さらなる検討が必要である。一方、ギンコライド A は陰性変力効果をもつこと、ギンコライド C にはそのような効果がないことが明らかとなった。ギンコライド B には陽性変力作用がないことをすでに明らかにしている (Kubota et al., 2002)。これらのことから、G B E 中のテルペンラクトン類は、G B E の陽性変力作用に関与しない可能性が高い。さらに、我々の心房筋を用いた検討では、G B E に陽性変力変時作用が認められたが、心室筋を用いた細胞レベルでの検討ではむしろ心拍数に対しても心収縮力に対しても、カルシウムチャンネル抑制を介して抑制的に作用する、すなわち陰性変力変時効果が認められている (Chen et al., 2005; Satoh, 2003)。これらのことから、G B E の心臓への効果は、心房と心室では異なる効果を有する可能性が示唆される。今後さ

らなる検討が必要である。

次いで、G B Eの陽性変時変力作用が、生活習慣病状態においても期待できる否かを検討するため、生活習慣病モデル動物であるSHR-cpの摘出心房を用いて検討した。SHR-cp摘出心房の収縮力は正常対象動物であるWKYに比べ減少傾向にあること、G B Eの陽性変力作用はSHR-cpにおいては弱いことが明らかとなった。一方、SHR-cp摘出心房の心拍数はWKYに比べ有意に減少していること、これに対してG B Eの陽性変時効果はWKYレベルにまで回復させる効果が期待できることが示された。これらの結果は、生活習慣病状態にみられる心房機能の低下に対し、G B Eが改善効果を示す可能性を示唆するものである。しかしながら、一方で、30週齢のSHR-cpを用いたin vivoの検討においては、G B Eの長期摂取はむしろ心拍数を減少させること(H17年度報告書)、また、本年度の新規生活習慣病モデル動物SHRSPZFを用いたin vivo検討においては、G B Eの長期摂取は心拍数に影響を示さないことも明らかである。これらのことから、心拍動機能が低下している肥満を伴う高血圧患者においては、G B Eの作用は現れにくいと考えられる。

4. G B Eの神経機能への影響：

Mdzinarishvili(2006)の方法に準じて行った虚血様処置により、神経性の反応が減弱することが明らかとなった。このような虚血様処置による神経機能の低下はピロバライドによって有意に抑制された。このことは、ピロバライドがラットの消化管神経叢におい

ても、神経伝達機能に対し、促進的な影響を有する可能性を示している。なお、atropine等の結果から、本実験で観察されたラットにおける反応は、非コリン性非アドレナリン性神経の興奮によるものであることが考えられ、ピロバライドの作用はコリン作動性神経に限定されたものではないことが伺える。また、0.5%G B Eを5週間投与したSHRspZFの回腸において、虚血様処置による神経性反応の減弱が軽度であったことから、G B Eの長期投与も神経機能の減弱を軽減するような作用を示す可能性が推察される。

G B Eは冒頭でも述べたように様々な構成成分が含まれているが、その中でも特にピロバライドが神経機能に影響することが知られている。例えば、Janssens(2000)らは、虚血状態で引き起こされる障害はミトコンドリアの電子伝達系に関する複合体の活動低下が主な原因であると述べている。Pierreらはピロバライドが虚血下で、ミトコンドリアのエネルギー産生能とナトリウムポンプ活性を保護することを報告しているが、Janssensらも虚血早期に大きく影響される複合体Iの活性を測定、虚血状態での複合体Iの活性の低下が対照群に比べイチョウ葉投与群で有意に抑制されていることを報告している。さらにDefeudisはピロバライドに関する総説の中で、ピロバライドにはチトクロームc酸化酵素のサブタイプであるCOX IIIサブユニットとNADHデヒドロゲナーゼのND1サブユニットの発現を増加させることなどが、その神経保護に関連する複数の機序の一部としている。このような知見が本研究で観察された虚血状態に

におけるピロバライドやG B Eの作用に関連するか否かを明らかにするためには、更に詳細な検討が必要である。

一般的に、ピロバライドやG B Eの神経作用に関する研究は、細胞レベルでの研究が多い。一方、本研究のようにマグヌス管を使って虚血状態下における神経伝達機能の変化を観察し、G B Eやピロバライドの影響を検討するという方法は、見あたらない。神経興奮による反応を収縮として観察する方法は、簡便で直接機能変化を観察できる点で、神経機能の変化と被験食品食材の影響を検討する上で有用なスクリーニング法であると考えられる。今後はこの方法を用い、様々な条件下でのG B Eとピロバライドの影響を検討し、その機序を解明するとともに臨床的有用性に繋がる情報を得たい。

「参考文献」

- Chen B, Cai J, Song LS, Wang X, Chen Z. Effects of ginkgo biloba extract on cation currents in rat ventricular myocytes. *Life Sci.* 2005; 76 (10): 1111-21.
- Defeudis FV. Bilobalide and neuroprotection *Pharmacol Res.* 46: 565-568 (2002)
- Janssens D., Delaive E., Remacle J., Michels C. Protection by bilobalide of the ischemia-induced alterations of the mitochondrial respiratory activity. *Clin Pharmacol.*, 14: 193-201 (2000)
- Kagota S, Yamaguchi Y, Tanaka N, Kubota Y, Kobayashi K, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci.* 2006; 78 (11): 1187-9.
- Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K. Effects of Ginkgo biloba extract on blood pressure and vascular endothelial response by acetylcholine in spontaneously hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol.* 2006; 58 (2): 243-9.
- Kubota Y, Umegaki K, Tanaka N, Mizuno H, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Safety of dietary supplements: chronotropic and inotropic effects on isolated rat atria. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25 (2): 197-200.
- Kubota Y, Kobayashi K, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K. Interaction of Ginkgo biloba extract (GBE) with hypotensive agent, nicardipine, in rats. *In Vivo.* 2003; 17 (5): 409-12.
- Mdzinarishvili A., Kiewert C., Kumar V., Hillert M., Klein J. Bilobalide prevents ischemia-induced edema formation in vitro and in vivo *Neuroscience Neuroscience.* 144(1):217-222. (2007)
- Pierre S, Jamme I, Droy-Lefaix MT, Nouvelot A, Maixent JM. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects Na,K-ATPase activity during cerebral

ischemia in mice. *Neuroreport*. 18; 47-51 (1999).

Satoh H. Effects of ginkgo biloba extract and bilobalide, a main constituent, on the ionic currents in guinea pig ventricular cardiomyocytes. *Arzneimittelforschung*. 2003; 53(6): 407-13.

Satoh H, Nishida S. Electropharmacological actions of Ginkgo biloba extract on vascular smooth and heart muscles. *Clin Chim Acta*. 2004;342 (1-2): 13-22.

Satoh H. Suppression of pacemaker activity by Ginkgo biloba extract and its main constituent, bilobalide in rat sino-atrial nodal cells. *Life Sci*. 2005; 78 (1): 67-73.

Shinozuka K, Umegaki K, Kubota Y, Tanaka N, Mizuno H, Yamauchi J, Nakamura K, Kunitomo M. Feeding of Ginkgo biloba extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nicardipine in rats. *Life Sci*. 2002; 70 (23): 2783-92.

Sugiyama T, Kubota Y, Shinozuka K, Yamada S, Wu J, Umegaki K. Ginkgo biloba extract modifies hypoglycemic action of tolbutamide via hepatic cytochrome P450 mediated mechanism in aged rats. *Life Sci*. 2004; 75 (9): 1113-22.

Yoshioka M, Ohnishi N, Koishi T, Obata Y, Nakagawa M, Matsumoto T, Tagagi K, Takara K, Ohkuni T, Yokoyama T, Kuroda K. Studies on interactions between functional foods or dietary supplements and medicines. IV. Effects of ginkgo biloba leaf extract on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of nifedipine in healthy volunteers. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27 (12): 2006-9.

E. 結論

1) GBE 4週間摂取は老齢 SHR の血圧に対して有意な影響を与えなかったが、心拍数と末梢血流速度に対しては有意な減少作用を示した。また摘出血管組織の収縮弛緩反応性と細胞内の eNOS/sGC タンパク発現量には有意な影響を示さなかった。一方、GBE 4週間摂取により、肝重量の著明な増加と肝 CYP タンパク発現量の増加、血中 GPT の増加が観察された。

2) GBE 5週間摂取は脳卒中易発性生活習慣病ラットの循環器系機能（血圧、心拍、血管反応性）に対し有意な影響を示さなかった。

3) 摘出心房標本における収縮力は、GBE 処置により濃度依存的に増強した。一方摘出心房標本における心拍数も、GBE 処置により濃度依存的に増加した。

4) 脳卒中易発性生活習慣病ラットの回腸において、神経刺激による反応は虚血様処置（無酸素・無ブドウ糖）により減弱したが、

GBE 4 週間摂取したラットでは、その反応の減弱が軽減された。

5) 以上の結果より、循環改善効果が標榜されている GBE の長期摂取は、老齢の高血圧動物と脳卒中易発性生活習慣病ラットでは降圧的な作用は認められず、逆に心機能や肝機能の変化が認められた。一方、神経機能に対し、GBE の長期摂取は虚血様の状態下で減弱した神経伝達機能を亢進するような影響を与えた。このような作用については、その機序や誘発成分の分析も含め今後詳細に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubota Y, Umegaki K, Kagota S, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods (without heating) in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.*; 29(8):1756-8, 2006
 - 2) Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K. Effects of Ginkgo biloba extract feeding on salt-induced hypertensive Dahl rats. *Biol Pharm Bull.* ; 29(2):266-9, 2006.
 - 3) Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K. Effects of Ginkgo biloba extract on blood pressure and vascular endothelial response by acetylcholine in spontaneously hypertensive rats *J Pharm Pharmacol*; 58(2):243-9, 2006
- 4) Kagota S, Yamaguchi Y, Tanaka N, Kubota Y, Kobayashi K, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci.*; 78(11):1187-96, 2006

2. 学会発表

- 1) 窪田洋子、梅垣敬三、籠田智美、禰占奈美江、中村一基、国友勝、篠塚和正 ラットにおけるニカルジピンの降圧作用に対するイチョウ葉エキス短期投与の影響 第79回日本薬理学会年会、横浜、3月2006年
- 2) Kubota Y., Kagota S., Tada Y., Nejime N., Nakamura K., Kunitomo M., Umegaki K., Shinozuka K. Influence of Ginkgo Biloba Extract Feeding on Heart rate, blood pressure and Various Blood parameters in Aged Spontaneously Hypertensive rats. The 12th International Symposium on SHR. October, 2006
- 3) Kubota Y., Kagota S., Tada Y., Nejime N., Nakamura K., Kunitomo M., Umegaki K., Shinozuka K. Effects of Ginkgo Biloba Extract Feeding on Aged Spontaneously Hypertensive rats. 2nd International Symposium on Lifestyle Related Diseases. October, 2006