

Table 1

alpha-corn starch	13.2	13.2
sucrose	10.0	10.0
soybean oil ^c	7.0	7.0
cellulose powder	5.0	5.0
mineral mixture ^d	3.5	3.5
vitamin mixture ^e	1.0	1.0
choline bitartrate	0.25	0.25
total	100.0	100.0

^a crude protein / as is 89.1%. Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan.
^b crude protein / as is 86.2%. Fuji Oil Co., Osaka, Japan.
^c Soybean Oil contains 0.02% tert-butyl-hydro-oxyquinone.
^d AIN-93G Mixtures, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan.
^e AIN-93 Mixtures, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan.

Table 2

Table 2. Growth parameters of rats fed experimental diets for 8 weeks ^a						
		Diet groups				
		Casein			SPI	
<i>n</i>		6			6	
initial body weight	(g)	166.8	±	0.8	166.8	± 0.8
final body weight	(g)	456.2	±	15.4	421.6	± 8.7
food intake	(g/day)	21.7	±	0.7	20.3	± 0.3
<i>n</i>		4			4	
relative liver weight	(g/100g BW)	3.56	±	0.15	2.87	± 0.06 [*]

^a Values are means ± SEM for 6 rats. Means in the same line not sharing common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$) by student's t-test.
^b Values are means ± SEM for 4 rats. Means in the same line not sharing common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$) by student's t-test.

Table 3

		Diet groups			
		Casein		SPI	
	<i>n</i>	6		5	
glucose	(mmol/L)	14.2	± 1.0	14.1	± 0.4
triglyceride	(mmol/L)	2.12	± 0.24	1.18	± 0.16 *
cholesterol	(mmol/L)	3.15	± 0.23	1.74	± 0.07 *

^a Values are means ± SEM for 6 rats of casein and for 5 rats of SPI. Means in the same line not sharing common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$) by student's t-test.

Figure 1

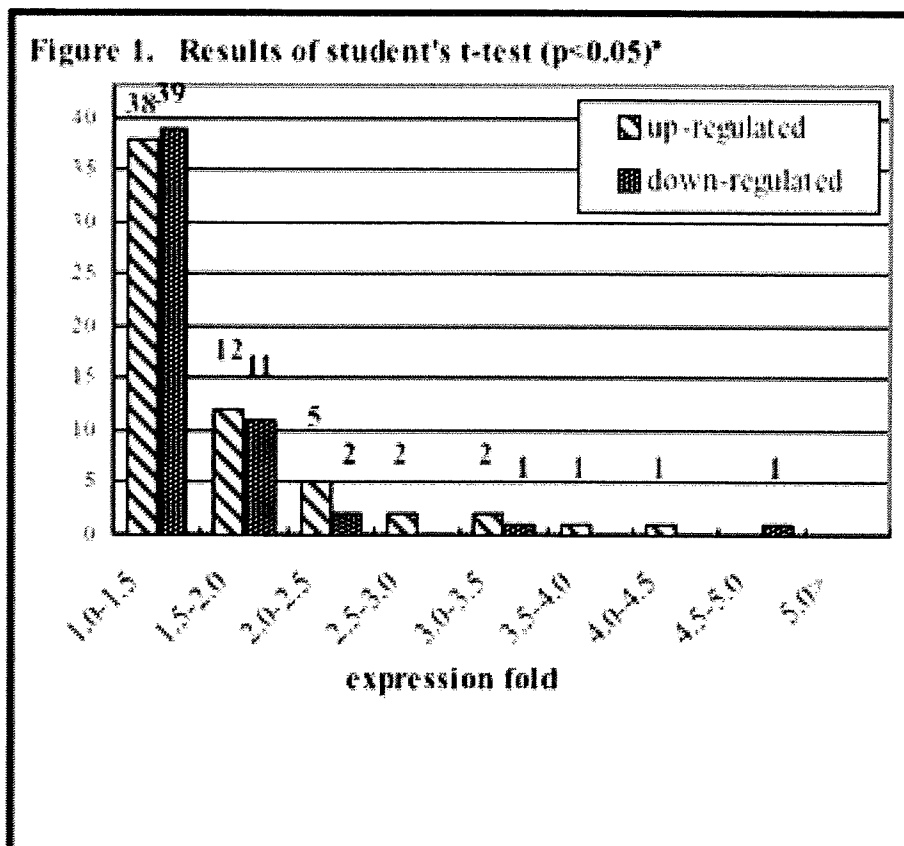


Table 4

Table 4. The classification of DNA microarray gene expression

Total genes		SPI			
		PPP	PPX	PXX	XXX
8740					
casein	PPP	2905	232	60	9 (3 ^a)
	PPX	92	131	92	43
	PXX	27	81	128	162
	XXX	5 (2 ^a)	38	192	4543 (4280 ^b)

Gene expression level represented the signature of "P", "M", and "A", which decided by Affymetrix Expression Algorithm. X represents M or A.

P; present expression level

M; marginal expression level

A; absent expression level

^a genes classified as AAA in either group.

^b genes classified as AAA in both group.

Table 5

Table 5. Functional classification of genes whose expressions were significantly different in the liver in rats fed experimental diets for 8 weeks ^a

functions ^b	number of genes (over 1.5-fold)	
	up-regulated	down-regulated
amino acid metabolism	4 (1)	10 (2)
antioxidant	9 (6)	2 (0)
cell growth and/or maintenance	6 (2)	11 (3)
energy metabolism	4 (1)	7 (2)
fatty acid metabolism	0	9 (7)
immunity	3 (2)	0
signal transduction	7 (0)	6 (2*)
steroid metabolism	13 (11*)	0
structural molecule	0	5 (0)
transcriptional regulator	4 (0)	4 (0)
others	13 (2*)	4 (2**)
total	63 (25**)	57 (18***)

^a The number of genes which mRNA levels were significantly different ($p < 0.05$) by student's t test and superior different between casein group and SPI group.

^b The genes were tentatively categorized according to their physiological functions.

*, **, and *** One, two, and three genes specifically expressed in one experimental group were included, respectively.

厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

（分担）研究報告書

特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究

健康食品成分体内動態解析による有効性評価基準の検討

分担研究者 梅垣敬三 独立行政法人国立健康・栄養研究所

研究協力者 井上 誠 愛知学院大学薬学部医療薬学科

瀧 優子 独立行政法人国立健康・栄養研究所

研究要旨

新しい特定保健用食品の規格基準を作成するための方向性を考える基礎的検討を行った。多成分から構成される健康食品素材としてイチョウ葉エキスをモデルとし、特に医薬品との併用による相互作用という視点で、イチョウ葉エキス中の重要な成分の特定とその体内吸収・排泄の関連を動物実験において検討した。その結果、肝臓薬物代謝酵素の誘導作用はテルペノイドの中のビロバライドで最も強く、その他のテルペノイドやフラボノイド類では弱いこと、イチョウ葉エキス投与によるビロバライドの血液中濃度は投与2時間後で検出できるが、投与24時間後にはほとんど血液中から消失することを示した。文献検索により、健常者が規格化されたイチョウ葉エキス240mg/日以下を摂取した条件では医薬品との相互作用の報告はなかった。以上のモデル実験から、多成分から構成されるハーブでは、少なくとも安全性に影響を与える製品中の特定成分の含有量、体内動態・蓄積性を明確にすることが規格基準化には必須であることが示唆された。新規の有効性・安全性の評価手法として、生体内モノアミンの測定による抗うつ作用が期待できるハーブの評価法、 β -クリプトキサンチンやアスタキサンチンをモデルとして核内レセプターの調節に着目した成分の評価法についても検討した。

A. 目的

いわゆる健康食品については、その効果発現に複数成分が関与していると考えられる場合が多い。有効性・安全性を明らかにするためには含有されている成分含量を明確にすることが重要であるが、食品中の全ての成分含量を明確に

することは現実的には困難で、一般的にはフラボノイドやカロテノイドといった一般的成分がある程度明らかにされている状況となっている。多成分から構成される食品を特定保健用食品として許可していくためには、少なくとも有効

性・安全性の観点から重要と考えられる特定成分（マーカーとなる成分）を明確にし、体内への吸収性や蓄積性について検討しておくことが重要である。重要と考えられる特定成分含量を明確にすることにより、効果が発現する摂取量や有害作用が発現する摂取量の推定が可能となり、該当製品を安全で有効に利用する環境ができる。

本研究では、まずヒトにおいて有効性が示唆され、しかも利用実績のあるイチョウ葉エキスをモデルとして取り上げ、イチョウ葉エキス中で有効性・安全性に重要と考えられ、医薬品との相互作用に影響する特定成分（マーカー成分）の特定と体内動態に関する検討を行うこととした。またヒトにおいて実施されたイチョウ葉エキスと医薬品との相互作用に関する文献調査も実施した。次に、新規の有効性・安全性評価の手法として、生体内モノアミンの測定による抗うつ作用が期待できる多成分系素材の評価法に関する基礎実験、 β -クリプトキサンチンやアスタキサンチンをモデルとして核内レセプターの調節に着目した成分の評価法についての検討も行った。

B. 研究方法

1. イチョウ葉エキスに関する検討

1-1 フラボノイドとテルペノイドの測定

イチョウ葉エキスのフラボノイドは配糖体になっているものが多いため、6% HCl 含有 60% メタノールに溶解後、90°C で 1 時間酸加水分解処理を行い HPLC 用試料とした。HPLC は紫外可視吸光度計を装着し、カラムに L-column ODS (4.6×250mm)、移動相に 0.5% クエ

ン酸:アセトニトリル:イソプロパノール=100:35:4 を用い、流速 1.0 mL/min、検出波長 360 nm とした。

イチョウ葉エキス粉末 30 mg に 50% エタノールを 0.2 mL を加え十分に混和した後、0.02M 塩酸を加え、十分に攪拌した。ここにジエチルエーテル 5 mL を加え抽出操作を 5 回繰り返す、得られた有機層を窒素乾固後、エタノール 0.5 mL × 4 回に溶解し再度窒素乾固し、0.5 mL メタノールに溶解し HPLC 用試料とした。HPLC は蒸発光散乱検出器 (ELSD) を装着し、カラムに ODS カラム (4.6×250mm)、移動相に 26% MeOH を用い、流速 0.8 mL/min、ネブライザー温度 40°C とした。

1-2. 肝薬物代謝酵素の測定

ICR 系雄性マウスに 0.5% カルボキシメチルセルロースに懸濁したイチョウ葉エキスおよび種々の溶媒を用いて分画した試料、またはビロバライドを 5 日間投与した。最終投与翌日に麻酔下で肝臓を摘出してチトクローム P450 (CYP) 濃度および活性の分析用試料を調整した。CYP 含有量の測定は Omura らの方法に従い、酵素活性は HPLC 法により測定した。

1-3. ビロバライドの体内動態測定

Wister 系雄性ラットにイチョウ葉エキスまたはビロバライドを投与し、下行大動脈より採血して調製した血清 200 μ L に対して 40% トリクロロ酢酸 50 μ L 添加し、よく攪拌し氷中に 5 分放置した後、12000×g、4°C、20 分遠心し、上清を測定試料とした。試料中のビロバライドは Tang らの方法に従い LC/MS で測定

した。

2. モノアミン類の測定

抗うつ効果の有効性評価生体マーカーとして、血中および脳内のモノアミン類(前駆体のアミノ酸および代謝物を含む)の測定の基礎的検討を米国 ESA 社の CoulArray システムを用いて行った。また、セロトニンの取り込みに関する検討はラットから調製した血小板を利用して実施した。

3. β -クリプトキサンチンやアスタキサンチンをモデルとした核内レセプターの調節

キサントフィルの RAR、RXR を介した転写活性は GAL4DBD-RAR α 、あるいは GAL4DBDRAR γ 、GAL4DBD-RXR α と GAL4AD-TIF2 を発現させた酵母 two-hybrid system を用いて解析した。 β -クリプトキサンチン、ルテインのリガンド活性は、リガンド依存的にレセプターと複合体を形成する転写因子 TIF2 とアルカリフォスファターゼとのキメラタンパクを利用した CoA-BAP system を用いて解析した。 β -クリプトキサンチンのマウス腹腔滲出マクロファージにおける ABC トランスポーター発現はマウスより腹腔滲出マクロファージを調製し、RT-real time PCR による mRNA、Western blot 法によるタンパクで評価した。

C. 研究結果

1. イチョウ葉エキス中の成分に関する検討

イチョウ葉エキスの一般的な有効成分としてはフラボノイド、テルペノイド

があるが、さらに詳細な成分分析を行い、図 1 に典型的なクロマトグラムを示した。フラボノイドは配糖体になっているため試料を酸加水分解した。イチョウ葉エキスにより肝臓薬物代謝酵素の誘導の詳細を検討するため、イチョウ葉エキスをさらに溶媒により 6 分画し、そこに含まれるフラボノイドとビロバライドを分析した。その結果、フラクション 1, 2 にはテルペノイド(ギンコライド A, B, C とビロバライド)が多く、テルペノイドの中でもビロバライドが多かった(表 1)。フラクション 2, 3, 4 にはフラボノイド(ケルセチン、ケンフェロール、イソラムネチン)が多かった。肝臓の薬物代謝酵素の誘導作用は、フラクション 1 で強く、その成分としてビロバライドが関連していると推定されたため、ビロバライドを投与したところ、イチョウ葉エキスと同様の酵素誘導を示した(表 2, 3)。イチョウ葉エキスとビロバライドとのみ、CYP2B に相当する Pentoxeresorufin O-dealkylase の誘導が最も強かった。

イチョウ葉エキス投与後の血液中のビロバライド含量の測定を試みた。ビロバライドの分析は UV-、ECD-、蛍光-のいずれの検出器でも測定できなかったことから、LC-MS 法によって分析することとした。イチョウ葉エキスを過剰に投与した条件においても、ビロバライドの血液中濃度の増加は極めてわずかであった。この原因として、ビロバライドが直ぐに体外排泄されている可能性が考えられたことから、イチョウ葉エキス 100mg/kg、1000mg/kg 単回投与 2 時間後と 24 時間後で検討し

たところ、投与2時間後では濃度依存的な増加を検出でき、1000mg/kgでは2000ng/ml以上の濃度に達していた。

一方、24時間後では、ほとんど検出できないレベルにまで低下した。市販のイチョウ葉エキスの原末を分析したところ、フラボノイドにもその含有量に幅があったが、ピロバライドについてもその含有量に2倍の差異が認められるものがあった。

イチョウ葉エキスはヒト試験論文が多い。そこで、医薬品との相互作用を起こす可能性について、2006年までに出版された論文を調査した。その結果、イチョウ葉エキスが医薬品との相互作用を示したという論文は若干あるが、それらは通常の推奨摂取量となっている240mg/日よりもより多い摂取量であった(表4)。また、240mg/日以下の量では、医薬品との相互作用を示した論文は認められなかった。ただし、調査できた研究は、有病者でなく健常者において検討されたもので、かなり長期間摂取したときの相互作用の有無について検討したものは見当たらなかった。

2. モノアミン類の測定

脳内および血中のモノアミン類の測定について、基礎的検討として標準サンプルを用いて前駆体のアミノ酸および代謝物を含む20種類の成分の同時測定が可能となった。血小板は多量のセロトニン含有し、セロトニンの取り込み、刺激分泌反応を持つ。ラット血小板を調製してセロトニンの取り込みが非標識でも評価できた。

3. β -クリプトキサンチンやアスタキサンチンをモデルとした核内レセプターの調節

β -クリプトキサンチンは細胞の分化、増殖の制御の他に、循環器系、免疫系での働きが注目されだした核内レセプターretinoic acid receptor (RAR)のアゴニストであることを見出した。そして、 β -クリプトキサンチンはコレステロールの排泄に関与しているマクロファージのATP-binding cassette transporter (ABC)A1のmRNAおよびタンパク質レベルを上昇させ、この作用はRARの特異的アンタゴニストであるLE540で阻害された。これらの結果より β -クリプトキサンチンは粥状動脈硬化発症の原因になっているマクロファージの泡沫化を抑制し、動脈硬化改善作用を示すことが期待された。

アスタキサンチンは肥満・インスリン抵抗性の改善に重要な働きをしているPPAR γ への結合能は示したが、脂肪細胞においては既存のPPAR γ アゴニスト(ロシグリタゾン)の作用を抑制するアンタゴニストとして働くことを見出した。さらに、アスタキサンチンは脂肪細胞に対して脂肪蓄積を減少させ、アディポネクチンの発現を上昇させる作用を示した。また、*in vivo*において経口摂取したアスタキサンチンは肥満・糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスの血糖低下作用、血中TG低下作用、血中アディポネクチン上昇作用を示し、*in vitro*の結果を支持する結果を得た。一方、アスタキサンチンはマクロファージに対してはPPAR γ アゴニストとして働き、PPAR γ およびRARの標的遺伝子であるABCA1のmRNAおよび蛋白質発現を増

加させ、この作用は PPAR γ 特異的アンタゴニストである GW9662 で完全に抑制された。これらの結果は、アスタキサンチンが細胞選択性を有する選択的 PPAR γ 調節因子であることを示唆していた。すなわち、アスタキサンチンが脂肪細胞の肥大化を抑制することにより肥満ならびにインスリン抵抗性を改善し、また、直接マクロファージの泡沫化を抑制することにより抗動脈硬化作用を示すことが期待された。

D. 考察

イチョウ葉エキスの有効成分としてはフラボノイド、テルペノイドという名称が一般的であり、日本健康・栄養食品協会の規格では「フラボノイド配糖体を 24%以上、テルペンラクトンを 6%以上含有し、ギンコール酸の含有量が 5ppm 以下のもの」とされている。フラボノイドやテルペノイドは一般名であり、個別の成分名ではない。このため、肝薬物代謝酵素を誘導する個別性分の特定やその含量、体内動態について個別に検討することが重要と考えられる。今回、種々の溶媒を用いて分画したフラクションについて個別のフラボノイドおよびテルペノイド量を定量し、投与後の肝臓薬物代謝酵素の活性を測定し、誘導を惹起する活性本体がビロバライドであることが推定された。昨年度の調査においてイチョウ葉エキス中のビロバライドは原材料によって大きくことなっていたことを示したが、もしビロバライドが一定でなければ併用医薬品との相互作用の有無も推定できないと考えられる。従って、イチョウ葉エキスを安全に使用するためにはビロバライドをマーカー成分

として、個々の製品中の含有量も明確にしておくことが重要であろう。

イチョウ葉エキスの連続過剰投与の条件においてもビロバライドの血漿中濃度は速やかに低下することが確認されたが、この結果よりビロバライドは蓄積性を示さず、その薬物代謝酵素による影響は摂取中止により速やかに消失することが示唆される。実際、過剰のイチョウ葉エキスを投与したラット肝臓薬物代謝酵素は著しく誘導されたが、摂取中断により誘導された酵素活性は速やかに投与前のレベルに回復することを確認している。イチョウ葉エキスについては、規格品で多くの検討が行われている。そこで、ヒトにおける医薬品との相互作用の有無の検討の論文検索を行ったところ、健常者に 240mg/日以下を投与した条件では相互作用は認められていない。この結果は、少なくとも健常者が規格品のイチョウ葉エキスを医薬品と併用しても、相互作用を危惧する必要はないことを示唆している。ただし、有病者における医薬品との相互作用の検討は少なく、その場合には注意する必要がある。

モノアミンは、うつ病への関与が大きい神経伝達物質とされている。一方、抗うつ作用が期待できるハーブが注目されている。抗うつ作用を有する多成分系のハーブの有効性がモノアミンを網羅的に測定することにより、評価できる可能性が考えられる。現在、モノアミンの前駆体から代謝物を含めて測定する目的で、脳および血液サンプルにおける測定を検討中である。

これまでにキサントフィルである β -クリプトキサンチンとアスタキサンチ

ンは抗酸化活性を始めいくつかの活性について報告はされているが、それらの分子標的は不明であった。両化合物はカロチノイドであるβ-カロチンと同様に脂溶性の高い化合物であり、同種の核内レセプターへの結合が予想されたため、核内レセプターへの結合能を調べることにより生体内分子標的を探索し、β-クリプトキサンチンとアスタキサンチンの生体内分子標的のひとつが核内レセプターRAR と PPAR γ であることを見出した。これらの研究は食品成分の新しい有効性評価に応用できるものと考えられた。

E. 結論

多成分から構成される健康食品素材としてイチョウ葉エキスをを用い、肝臓薬物代謝酵素誘導に焦点を当てて有効性・安全性評価にかかる検討を行った。その結果、医薬品との相互作用に影響する主要成分がピロバライドであること、その血液中からの消失は速く、蓄積性はないため、摂取中断により医薬品との相互作用を回避できる可能性を示した。文献検索により規格化されたイチョウ葉エキスを 240mg/日以下で健常者が摂取する条件では医薬品との相互作用の報告は見当たらなかった。以上のイチョウ葉エキスをモデルとした研究結果から、多成分から構成される食品素材では、少なくとも重要な特定成分の同定とその体内動態を明確にし、その結果を踏まえた製品の規格基準作成が、特定保健用食品の新たな審査基準に必要と考えられた。また抗うつ作用を期待させる多成分系の健康食品素材の評価法として、生体

内モノアミンの測定、β-クリプトキサンチンやアスタキサンチンをモデルとして核内レセプターの調節に着目した成分の評価法による新規の有効性・安全性評価の手法を検討した。これらについては次年度においてさらに検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sugiyama T, Nagata J, Yamagishi A, Endoh K, Saito M, Yamada K, Yamada S, Umegaki K. Selective protection of curcumin against carbon tetrachloride-induced inactivation of hepatic cytochrome P450 isozymes in rats. Life Sci. 2006 78(19):2188-93.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

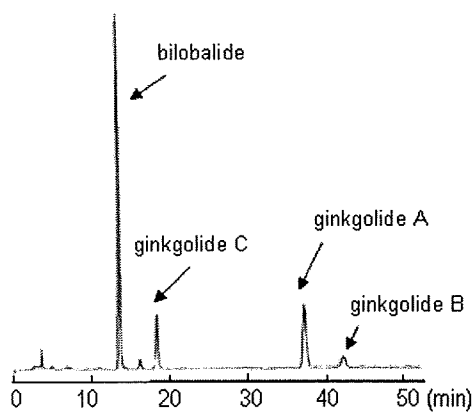
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

a) terpenoids



b) flavonoids

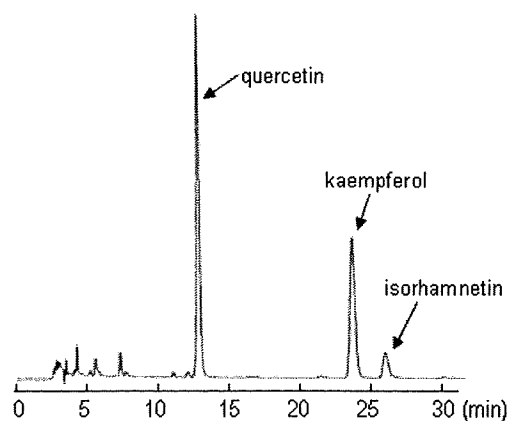


図 1. テルペノイドおよびフラボノイドの典型的なクロマトグラム

分析条件は下記の通り。

テルペノイド測定条件

カラム: ODS カラム (4.6 mm ϕ \times 250 mm)

カラム温度: 40°C

移動相: MeOH:H₂O = 26:74

流速: 0.8 mL/min

検出: ELSD (evaporative light scattering detection) 蒸発光散乱検出器

フラボノイド測定条件

カラム: L-column ODS (4.6 mm ϕ \times 250 mm)

カラム温度: 40°C

移動相: 0.5%クエン酸溶液: アセトニトリル: イソプロパノール=100:35:4

流速: 1.0 mL/min

検出: 紫外可視吸光度計 (測定波長: 360 nm)

表 1. 各フラクションの主なフラボノイド、テルペノイド

Fraction number	Amount in GBE (%)	Content in fractionated samples from GBE (%)									
		Flavonoids					Terpenoids				
		Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin	Ginkgolide A	Ginkgolide B	Ginkgolide C	Ginkgolide e	Bilobalide	Ginkgolide e	Bilobalide
Fr.1	12.11	2.93	0.42	0.34	0.34	7.64	5.36	3.33	15.33		
Fr.2	15.81	12.46	12.65	0.31	0.31	5.18	1.77	6.94	3.56		
Fr.3	21.79	15.42	10.92	2.6	2.6	ND	ND	0.1	ND		
Fr.4	38.15	14.05	9.32	1.74	1.74	ND	ND	ND	ND		
Fr.5	8.02	6.53	4.24	0.78	0.78	ND	ND	ND	ND		
Fr.6	1.84	2.43	2.52	0.06	0.06	ND	ND	ND	ND		

ND, not detected.

表 2. イチョウ葉エキスおよびフラクシオン投与時のマウス肝臓 CYP 活性

	Control		Fractionated GBE						GBE
	Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	Fr.6	GBE		
Dose (mg/kg)	0	158	218	382	80	18	1000		
	(pmol/mg protein/min)								
Ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A1)	42.9±8.6	123.6±37.3	64.8±21.6	56.9±11.8	35.6±15.4	31.4±7.7	33.0±8.9	101.1±39.3	
		[2.9] *NS	[1.5]	[1.3]	[0.8]	[0.7]	[0.8]	[2.4] *	
Methoxyresorufin O-demethylase (CYP1A2)	35.4±8.7	75.5±12.8	46.6±14.1	37.2±5.7	30.4±6.7	25.8±3.8	23.2±4.4	58.8±17.8	
		[2.1] *NS	[1.3]	[1.1]	[0.9]	[0.7]	[0.7]	[1.7] *	
Pentoxifyresorufin O-dealkylase (CYP2B)	6.8±2.3	113.5±41.2	34.8±13.4	8.7±3.3	6.4±1.3	5.5±1.4	8.1±1.7	116.1±32.0	
		[16.7] *NS	[5.1] *NS	[1.3]	[0.9]	[0.8]	[1.2]	[17.1] *	
(s)Warfarin 7-hydroxylase (CYP2C9)	1.12±0.22	3.25±1.32	1.79±0.54	1.52±0.48	1.11±0.31	1.04±0.13	1.41±0.31	3.24±1.42	
		[2.9] *NS	[1.6]	[1.4]	[1.0]	[0.9]	[1.3]	[2.9] *	
p-Nitrophenol hydroxylase (CYP2E1)	4710±549	6146±1069	4304±946	5316±740	5004±778	4967±888	5082±570	6619±1096	
		[1.3] *NS	[0.9]	[1.1]	[1.1]	[1.1]	[1.1]	[1.4] *	
Testosterone 6β-hydroxylase (CYP3A)	2560±433	5249±1724	3464±550	2428±586	2434±528	2092±171	3147±257	5509±2110	
		[2.1] *NS	[1.4]	[0.9]	[1.0]	[0.8]	[1.2]	[2.2] *	

Mice were given either GBE (1000 mg/kg) or fractionated GBE samples (Fr. 1 to 6) at the same amount of each constituent in GBE for 5 days. Each value is expressed as the mean ± SD for 5 mice. Number in bracket indicates the increase ratio for control. *: Significant ($P < 0.05$) versus control. NS: not significant versus GBE (1000 mg/kg).

表3. ビロバリドまたはイチョウ葉エキスを投与時のマウス肝臓CYP活性

Dose (mg/kg)	Control			Bilobalide			GBE
	0	10.5	21	21	42	1000	
	Activity (pmol/mg protein/min)						
Ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A1)	41.4 ± 5.6	96.5 ± 24.9 [2.3] *	133.2 ± 20.9 [3.2] * ^{NS}	147.0 ± 24.3 [3.6] * ^{NS}	147.0 ± 40.7 [3.6] *		
Methoxyresorufin O-demethylase (CYP1A2)	31.4 ± 3.0	76.9 ± 14.9 [2.4] *	108.6 ± 23.3 [3.5] * ^{NS}	136.7 ± 15.2 [4.4] * ^{NS}	124.7 ± 25.7 [4.0] *		
Pentoxoresorufin O-dealkylase (CYP2B)	6.1 ± 1.2	84. ± 12.63 [13.8] *	98.6 ± 6.7 [16.2] * ^{NS}	113.8 ± 2.6 [18.7] * ^{NS}	105.6 ± 13.5 [17.3] *		
(S)Warfarin7-hydroxylase (CYP2C9)	1.07 ± 0.22	2.31 ± 0.76 [2.2] *	3.18 ± 0.49 [3.0] * ^{NS}	4.41 ± 0.87 [4.1] * ^{NS}	3.83 ± 1.41 [3.6] *		
p-Nitrophenol hydroxylase (CYP2E1)	5253 ± 111	6594 ± 558 [1.3] *	7093 ± 504 [1.4] * ^{NS}	8107 ± 509 [1.5] * ^{NS}	7919 ± 1329 [1.5] *		
Testosterone6β-hydroxylase (CYP3A)	2242 ± 247	3596 ± 629 [1.6] *	4422 ± 616 [2.0] * ^{NS}	6603 ± 1144 [2.9] *	7875 ± 1120 [3.5] *		

Mice were administered either bilobalide (10.5 mg/kg, 21 mg/kg, 42 mg/kg) or GBE (1000 mg/kg as bilobalide) for 5 days. Each value is expressed as the mean ± SD for 5 mice. Number in bracket indicates the increase ratio for control. * Significant ($P < 0.05$) versus control. ^{NS} not significant versus GBE (1000 mg/kg).

表4 イチヨウ葉エキスと医薬品の相互作用についての文献検索結果 (2006年末の時点で調査)

対象者	投与方法	期間	評価方法	結果	出典・雑誌名
50-65歳の健康人(34)	120mgx2/日、 EGB761	28日間	尿ステロイドのパターンにより評価	影響は認められない	J Pharm Pharmacol 57(5): 641-50(2005).
20-44歳の健康人(男50)	120mgx2/日、 EGB761	7日間	acetylsalicylic acid による血液凝固、出血、血小板凝集に対する影響	影響は認められない	Drugs R D 7(3): 163-72(2006).
20-44歳の健康人(男6,女6)	120mgx2/日、 EGB761	14日間	dextromethorphan (CYP2D6) と alprazolam (CYP3A4)の投与による薬物動態パラメーターを評価	alprazolam の AUC はイチヨウ葉投与により低下するが、全体的には影響なしと解釈	J Clin Psychopharmacol 23(6): 576-81(2003).
20-44歳の健康人(男50)	120mgx2/日、 EGB762	7日間	血液凝固と血小板に対する影響を評価	影響は認められない	Blood Coagul Fibrinolysis 15(4): 303-9(2004).
19-40歳の健康人(男8,女4)	120mg	12時間毎に3回	flurbiprofen (CYP2C9) 投与による薬物動態パラメーターを評価	影響は認められない	J Clin Pharmacol 46(2): 214-21(2006).
20-35歳の健康人(8)	240mg・日	7日間	digoxin 投与後の薬物動態パラメーターを評価	影響は認められない	Am J Ther 10(4): 47-51(2003).
20-29歳の健康人(男4,女4)	120mg/日	3日間	ticlopidine 投与後の薬物動態パラメーターを評価	影響は認められない	J Clin Pharmacol 46(6): 628-34(2006).
20-36歳の健康人(男12)	80mgx3/日、 EGB762	7日間	warfarin 投与後の薬物動態パラメーターと血液凝固	影響は認められない	Br J Clin Pharmacol 59(4): 425-32(2005).
20-24歳の健康人(男18)	140mgx2/日	12日間	omeprazole (CYP2C19) 投与後の薬物動態パラメーター	omeprazole の代謝を促進した	Pharmacogenetics 14(12): 841-50(2004).
平均25歳の健康人(男10)	360mg/日	28日間	tolbutamide (CYP2C9) 投与後の薬物動態パラメーターと糖負荷試験による血糖値	tolbutamide の代謝を促進し、血糖降下作用を減弱した	J Clin Pharmacol 46(11): 1290-8(2006).
健康人 (男6,女5の11人)	240mg/日	14日間	内因性のステロイドの濃度に対する影響を評価	内因性のステロイドの代謝に対しては影響いしない	Pharmacotherapy 25(10): 1337-40(2005).

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）

特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究

分担研究報告書

植物成分を中心とした多成分解析による有効性基準の検討

分担研究者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部

研究協力者 酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所

近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所

米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所

菱田敦之 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

木内文之((独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター)

靛島淳子 財団法人残留農薬研究所神経毒性研究室

首藤康文(財団法人残留農薬研究所神経毒性研究室)

研究要旨：食品機能成分中で高分子物質のような消化管から吸収困難な健康食品の有効性の機序を解明することを試みた。今年度は機能成分の例としてコンドロイチン硫酸(CS)の抗アレルギー作用の検討を行った。血清中の抗原特異的IgE及びIgG₁抗体価の測定では、2%CS任意摂取群においては、コントロール群と比較してOVA特異的IgE及びIgG₁抗体価の有意な抑制が認められた。OVA感作マウスに抗原過剰投与によるアナフィラキシー反応を惹起させ、肥満細胞から血清中に遊離されたヒスタミン量を定量したところ、CS投与群は、コントロール群と比較して、血清中ヒスタミンの遊離を有意に抑制した。抗原誘発耳介浮腫に及ぼす影響では、CS経口投与群では1.5～2倍と、肥厚が有意に抑制された。腸管免疫細胞組成に及ぼす影響では、抗アレルギー活性が示されたマウスの免疫担当細胞のうち、粘膜免疫系に高頻度に存在するIELを単離し、抗アレルギー活性に関与する細胞表面抗原組成をFCMで解析した。2%CS任意摂取群のIELは、コントロール群と比較して、TCRαβ陽性細胞、CD4陽性細胞組成比の有意な増加が観察された。脾細胞に及ぼす影響では、2%CS任意摂取マウスの脾細胞は、コントロール群の脾細胞と比較して、成熟T細胞の指標であるCD3ε(145-2C11)陽生細胞組成比の増加、B細胞の指標であるCD45R/B220(RA3-6B2)陽性細胞組成比の減少が認められた。また、T細胞のサブセット解析においてはCD4(L3T4, H129.19)陽性細胞、CD8α(Ly-2, 53-6.7)陽性細胞及びCD25陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。また、CSの経口投与によるサイトカイン産生能へ及ぼす影響の解析では、コントロール群と比較して、2%CS任意摂取マウスの培養脾細胞はTh1型サイトカインであるIFN-γ及びIL-2の産生には変化が認められなかったものの、Th2型サイトカインであるIL-5、IL-10及びIL-13産生を有意に抑制することが明らかとなった。また、FCMで有意な増加が認められた抑制性T細胞から産生されると考えられるTGF-βは、コントロール群と比較して有意な増加が認められた。また生薬・薬用植物についてバイオマーカーを指標とした科学的評価法の開発と安全性の検証を行うことのために、本年度はウコンのラットに対する急性経口毒性試験を行い、その安全性を検証するとともに、血液(血漿)試料中のバイオマーカーを検索するための試料調製法およびESI-MS/MS分析の測定条件を検討した。ESI-MS/MSを用いたタンパク質の同定法では、アルブミンを除去することで、数種のタンパク質が同定できたが、適当なバイオマーカーの検索には、イオン交換クロマト等による前分画と、LC-MS/MS分析が必要であると考えられた。臨床試験において有効性の効果は評価可能であるが、有効性の腸管免疫系に関与するメカニズム解析はマーカー測定のための検体試料が血清・尿等に限られるので、困難であることが示唆される。そのため有効性のメカニズム解析は、今回の検討したように小動物を用いた*in vivo*試験による詳細な解析、培養細胞等の*in vitro*試験、で補完する必要があると思われた。

A. 研究目的

食品成分の中には高重合物質や多糖等の高分子物質のような消化管から吸収困難なものでも、有効性が効果を示すものがある。これら食品成分の有効性の機序を評価するには、従来の経口投与後の吸収、分布、排泄等の体内動態や代謝を評価する手法のみでは限界がある。そのため、高重合物質や多糖等の高分子物質のような消化管から吸収困難な健康食品の有効性の機序を解明することを試みる。またそれらの安全性と有効性を実験動物モデルや培養細胞に評価する手法を開発する共に、開発された評価系を用いて基準審査に関する基礎データを構築する。

B. 研究方法

I コンドロイチン硫酸の抗アレルギー作用に関する検討

実験動物

本実験は全て雌性 Balb/c マウス 6 週齢(日本チャールズリバー)を用い、1 週間以上国立医薬品食品衛生研究所動物舎において予備飼育した後、実験に供した。予備飼育から実験中を通して、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ に保たれた SPF 環境下のチップゲージで飼育した。

免疫及び計画

OVA 20 μg 及び ALUM 2 mg、もしくは DNP-OVA 10 μg 及び ALUM 4 mg を 400 μL の生理食塩水に溶解し、マウスに腹腔投与(1 次免疫)し、10 日後に同量の投与(2 次免疫)を施し、17 日後に採血した翌日に脾臓及び腸管を摘出した。

CS 経口投与は、1 次抗原感作から 400 mg/kg/day で行った群と、抗原 1 次感作の 1 週間前から、給水瓶中に 2%CS を入れてマウスに任意に摂取させた群を評価した。

抗原特異的抗体価測定法

Radioallergosorbent(RAST)法の原理に基づく EIA を応用して行った。抗原(OVA 及び DNP-OVA)を 0.05 M carbonate-bicarbonate で希釈し、96 well マイクロプレートに 50 μL /well 加え、 4°C で一晩静置して、抗原を固相化した。固相化の後に well 内を洗浄し、夾雑物をブロッキングするために 0.1% Casein-PBS を 200 μL /well 加え室温で

1 時間静置した。ブロッキングの後に well 内を洗浄し、0.1% Casein-PBS で希釈した血清試料を 50 μL /well 加え、 4°C で 1 日静置して、固相化抗原と血清中抗体(1 次抗体)を抗原抗体反応させた。抗原(1 次)抗体反応の後に well 内を洗浄し、ウサギ抗マウス抗体(2 次抗体)を 50 μL /well 加え、室温下 1 時間抗原抗体反応させた。抗原(2 次)抗体反応の後に well 内を洗浄し、 β -Gal-GAR IgG(3 次抗体)を 50 μL /well 加え、室温下抗原抗体反応させた。抗原(3 次)抗体反応の後に well 内を洗浄し、酵素反応の基質として 0.1 mM 4-MUG を 100 μL /well 加え、 37°C で 1 時間反応させた。酵素反応の後に 1 M 炭酸ナトリウム 25 μL /well 加え反応を停止させ、反応産物 4-methyl-umbelliferone の蛍光強度を励起波長 330 nm、蛍光波長 453 nm の吸収波長を蛍光プレートリーダーで測定した。各検体の抗体価は、コントロール群の血清中抗体の示した蛍光強度の 1/2 倍の値を示す希釈度(力価)で表した。

耳介肥厚測定法

塩化ピクリルが 1%となるようにアセトンに溶解したものを用いた。DNP-OVA による 2 次免疫応答後、血清中 IgE 抗体濃度の上昇を確認した後、塩化ピクリル塗布による抗原刺激を行った。測定は、耳の薄い部分の方が誤差が少ないこと、及び弾力性があるため測定中に目盛が徐々に低値を示すことから、耳の薄い部位に対して測定時間を 2 秒と一定して、耳介浮腫容積測定装置(Dial Thickness Gauge, Peacock)で測定した。塩化ピクリル 10 μL /匹をマウスの左耳の表裏に塗布した 1 時間後の左耳の肥厚を測定し、感作前の厚さとの差を腫脹とした。

血清中ヒスタミンの HPLC 分析

血清中遊離ヒスタミンの分析は蛍光ポストカラム検出法を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより行った。試料の分離は Shim-pack PAG-SP 及び Shim-pack ISC-05 カラムを用い、流速 0.6 mL/min、カラム温度 50°C で行った。カラムスイッチング分析のため、溶媒は A, 100 mM EDTA \cdot 2Na (pH 6.0) containing 10 mM SDS; B, 100 mM EDTA \cdot 2Na (pH 8.5) containing 1 M NaCl₄; C, 3.7 mM OPA dissolved in 6.0 mM NaH₂PO₄ containing 5%

CH₃CN (pH 2.8); D, 100 mM EDTA·2Na (pH 8.5) を用い、プレカラム: 4.0 分, A→D; 9.0 分, D→A 及びトラップカラム: 3.3 分, B→A; 7.0 分, D→B のタイムプログラムで 2 段カラムスイッチングを行い、初期条件で 20 分間平衡化した。ポストカラム試薬である OPA は 0.3 mL/min の一定流速で送液した。反応後は励起波長 360 nm, 蛍光波長 440 nm で蛍光検出した。

サイトカイン産生の測定法

測定は、PharMingen 社の OptEIA™ Set を用いて行った。抗マウス各種サイトカインモノクローナル抗体を固相化緩衝液(0.1 M carbonate, pH 9.5 もしくは 0.2 M sodium phosphate, pH 6.5)で至適濃度に希釈し、96 well マイクロプレートに 100 µL/well 加え、4°C で一晩静置して 1 次抗体を固相化した。固相化の後に well 内を洗浄し、共雑物をブロッキングするために 10% FCS 含有 PBS を 200 µL/well 加え、室温下 1 時間静置した。ブロッキングの後に well 内を洗浄し、脾細胞培養上清を 100 µL/well 加え、室温下 2 時間静置して、1 次抗体と上清中サイトカインを抗原抗体反応させた。抗原(1 次)抗体反応の後に well 内を洗浄し、ビオチン標識抗マウス各種サイトカインモノクローナル抗体及びアビジン標識 HRP を 10% FCS 含有 PBS で至適濃度に希釈し、100 µL/well 加え、室温下 1 時間静置して 1 次抗体と結合したサイトカインと 2 次抗体を抗原抗体反応させた。抗原(2 次)抗体反応の後に well 内を洗浄し、酵素反応の基質として、TMB 及び過酸化水素混合液を 100 µL/well 加え、暗中室温下 30 分間反応させた。酵素反応の後に 1 M リン酸 50 µL/well 加え反応を停止させ、450 nm の吸光波長を紫外可視マイクロプレートリーダー(E max, Molecular Devices 社)を用い、エンドポイントで測定した。サイトカイン量は濃度既知標準品を用いて検量線を作成して定量した。

フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の解析

2 × 10⁵ cells(100 µL PBS)の脾細胞を FACS チューブ(FALCON, 2054)に移し、チューブ内で 250 ng の抗マウス CD16/32(Fcγ III/II receptor, FcBlock™)と 4°C, 遮光下 5 分間抗原抗体反応させた。Fc 受容体をブロックした脾細胞を PBS で洗浄した後、蛍光標識抗体(FITC, fluorescein

isothiocyanate 標識抗体 250 ng, PE, phycoerythrin 標識抗体 100 ng, PerCP, peridinin chlorophyll protein 標識抗体 200 ng)をチューブ内に添加し 4°C, 遮光下 40 分間染色した。PBS で 2 回洗浄した後、500 µL の 2% FBS 含有 PBS に懸濁させ、FACS Calibur™(Becton Dickinson 社)で測定した。得られたデータは Cell Quest ソフトにより解析した。

II バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

供試材料

(独)医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター種子島研究部で栽培したウコン *Curcuma longa* L.(種子島在来, 0092-634)を 2006 年 3 月に収穫し、供試材料とした。ウコンの根茎をオートクレーブ(100°C, 無加圧)で 20 分間蒸し、陰干して通風乾燥機(50°C)で 3 日間乾燥後、ワイヤーブラシで表面を磨き、粉碎器で微粉末にし、投与試料とした。投与試料中のクルクミノイド含量は、HPLC 法により定量した。

ラットを用いた投与試験

動物実験は、急性経口毒性試験に準拠し、財団法人残留農薬研究所で実施した。試験は、農林水産省(59 農蚕第 4200 号, 1985 年)の試験指針に基づいて実施した。Wistar Hannover 系 SPF ラット(BriHan: WIST@Jcl(GALAS))を用い、実験中の飼育管理は、室温 22 ± 3°C, 湿度 50 ± 20%, 換気回数 10 回以上/時間, 照明時間 12 時間/日に制御された動物飼育室で行った。投与には、ウコンの粉末を 250 mg/mL になるようにコーンオイルと混合したものをを用い、1 回につき 10 mL/kg を胃ゾンデを用いて経口投与し、30 分間隔で 2 回投与して合計 5,000 mg/kg の単回投与とした。対照群には、同様にコーンオイルのみを 2 回投与した。各群は、剖検に 5 頭、採血用に 5 頭の合計 10 頭で試験した。投与日から 14 日間、動物の状態、行動および死亡の有無を観察し、急性毒性の有無を判断した。14 日目の観察終了後、ラットをエーテル麻酔下で安楽死させ剖検に供した。

採血と血漿画分の調製

エーテルの深麻酔下で開腹し、後大静脈より

ヘパリンナトリウム注射液(1000単位/mL)で内壁をぬらした(ヘパリンナトリウム注射液100 μ Lに対して血液が1.5~5 mLになるように処理)注射液を用いて採血した。採取血液を分離剤入り試験管に移し攪拌後、遠心分離(3000 rpm, 4°C, 10分)し、上清を血漿画分とした。

分析試料の調製

各群についてラット3個体の血漿画分を等量混合し、Qproteome Murine Albumin Depletion Kit (QIAGEN)を用いてアルブミンを除去してアルブミン除去血漿画分とし、これに4倍量の冷アセトンを加え、氷上で15分間放置後、遠心分離(12,000 x g, 4°C, 10分間)して沈殿物を回収した。

沈殿物は、0.1% SDSおよび2 mM DTTを含むトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶解し、60°Cで1時間加熱後、試料のタンパク質量とトリプシン量の比が100:1~20:1(w/w)になるようにトリプシン溶液を加え、37°Cで15時間反応させた。反応終了後、遠心エバポレーターで濃縮し、0.1%ギ酸を含む5% (v/v)アセトニトリルに溶解して分析試料とした。なお、トリプシン溶液は、12.5 ng/ μ L 濃度になるように trypsin (Promega, sequencing grade)を 5 mM 塩化カルシウムを含む50 mM重炭酸アンモニウム溶液で溶解した。

ESI-MS/MS によるタンパク質の同定

ESI-MS/MS分析は、Micromass Q-ToF Ultima Global mass spectrometerを用い positive ion条件で測定した。分析試料はメタルチップに注入し、直接イオンソースに導入した。装置条件は、イオンソース温度が80°C、コーン電圧が80 Vであった。なお、タンパク質の同定は、MS/MS解析のデータを元にNCBIのデータベースを検索して行った。

C. 研究結果

I コンドロイチン硫酸の抗アレルギー作用に関する検討

1) 血清中抗原特異的抗体価の測定

抗原として OVA 及びそのハプテン抗原である DNP-OVA の2種の抗原を用いて免疫感作を行い、2次免疫応答後にマウス眼底より採血し、血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG₁ 抗体価を測定した。

400 mg/kg/dayでCSを経口投与した群における血清中抗原特異的抗体価に及ぼす影響を Fig. 1 に示す。生理食塩水を投与したコントロール群の血清と比較したところ、CS 経口投与群の血清中抗原特異的 IgE 及び IgG₁ 抗体価が抑制される傾向が認められた。

一方、2%CS 任意摂取群においては、Fig. 2 に示すように、コントロール群と比較して OVA 特異的 IgE 及び IgG₁ 抗体価の有意な抑制が認められた。

2) 血清中遊離ヒスタミンの測定

CS 経口投与により血清中抗原特異的抗体価が抑制されたことをふまえ、OVA 感作マウスに抗原過剰投与によるアナフィラキシー反応を惹起させ、肥満細胞から血清中に遊離されたヒスタミン量を OPA(o-フタルアルデヒド)を蛍光誘導化試薬に用いた HPLC で定量した。その結果、Fig. 3 に示すように、CS 投与群は、コントロール群と比較して、血清中ヒスタミンの遊離を有意に抑制した。

3) 抗原誘発耳介浮腫に及ぼす影響

DNP-OVA による2次感作9日後のマウスの両耳介に DNP-OVA の擬似抗原として塩化ピクリルを塗布し、接触性アレルギーを惹起させた。Fig. 4 に CS 経口投与によるマウス耳介肥厚に及ぼす影響を示す。塩化ピクリルを塗布した1時間後の耳介肥厚を測定したところ、非免疫感作マウス(vehicle 群)の耳介の厚さと比較して、生理食塩水を経口投与したコントロール群の耳介が約4~5倍に上昇したのに対し、CS 経口投与群では1.5~2倍と、肥厚が有意に抑制された。

4) 腸管免疫細胞組成に及ぼす影響

抗アレルギー活性が示されたマウスの免疫担当細胞のうち、粘膜免疫系に高頻度に存在する IEL を単離し、抗アレルギー活性に関与する細胞表面抗原組成を FCM で解析した。2次免疫応答後の IEL の表面抗原組成比を Table 1 に示す。400 mg/kg/day 経口群の IEL は、コントロール群の IEL と比較して CD4 陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。更に、2%CS 任意摂取群の IEL は、コントロール群と比較して、TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞、CD4 陽性細胞組成比の有意な増加が観察された。

5) 脾細胞に及ぼす影響

OVA による2次免疫応答を確認した後、2%CSを任意に経口摂取させたマウスの脾臓を摘出し、脾細胞の表面抗原組成比をFCMで解析した。結果をTable 2に示す。2%CS任意摂取マウスの脾細胞は、コントロール群の脾細胞と比較して、成熟T細胞の指標であるCD3ε(145-2C11)陽性細胞組成比の増加、B細胞の指標であるCD45R/B220(RA3-6B2)陽性細胞組成比の減少が認められた。また、T細胞のサブセット解析においてはCD4(L3T4, H129.19)陽性細胞、CD8α(Ly-2, 53-6.7)陽性細胞及びCD25陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。

また、CSの経口投与によるサイトカイン産生能へ及ぼす影響を検討するため、2%CS任意摂取マウスの脾臓を2次感作後8日後に摘出してOVA存在下(最終濃度100 ppm)で培養し、培地中に産生される各種サイトカインをELISAで定量した。その結果、Fig. 5に示すように、コントロール群と比較して、2%CS任意摂取マウスの培養脾細胞はTh1型サイトカインであるIFN-γ及びIL-2の産生には変化が認められなかったものの、Th2型サイトカインであるIL-5、IL-10及びIL-13産生を有意に抑制することが明らかとなった。また、FCMで有意な増加が認められた抑制性T細胞から産生されると考えられるTGF-βは、コントロール群と比較して有意な増加が認められた。

II バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

投与試料にしたウコン中の3種のクルクミノイド含量を表1に示す。乾燥重量当たりの含量は、bisdemethoxycurcuminが0.23 mg/g、demethoxycurcuminが0.82 mg/g、curcuminが5.54 mg/gで、3種の合計は6.59 mg/gであった。

5匹の雌ラットにウコン5,000 mg/kgを単回投与した結果、全ての個体で臨床症状は認められず、体重も順調に増加した(表2)。観察期間終了時(投与後14日)に行った剖検で、対照群において左腎臓の腎盂拡張(1/5)および水腎症(1/5)が認められ、ウコン投与群でも、腎臓でHD結節(1/5)が認められたが、いずれも正常な動物でも認められる所見であることから、ウコンまたは溶媒

として用いたコーンオイルによるものではないと判断した。なお投与試験は、雄ラットについても実施したが、雌ラットと同様に死亡例はなかった。

ラット血液中のバイオマーカーを検索するために、まず市販のキットを用いて血漿中のアルブミンを除去した。アルブミンを除去した試料を用いることにより、以下に述べるように試料の直接導入によるESI-MS/MS分析でも数種のタンパク質が同定できた。

ESI-MS/MS分析法を用いたタンパク質同定法として、メタルチップに分析試料を注入し、直接イオンソースに導入する方法を検討した。ウコン投与群と対照群にそれぞれ含まれるタンパク質を同定した結果を表3および4に示す。なお、実験には感受性が高いとされる雌ラットの血液を用いた。対照群では、含まれるタンパク質の候補として25種類が示され、「hemopexin」、 「Alpha-1-inhibitor III precursor. 推定」および「Cc1-8」の3種が有意に同定された。一方、ウコンを5,000 mg/kg投与した群では、19種類の候補が示され、その中で「liver regeneration-related protein LRRG03」、 「transferrin, 推定」、 「hemopexin」および「serine protease inhibitor alpha 1」の4種が有意に同定された。

D. 考察

I コンドロイチン硫酸の抗アレルギー作用に関する検討

これまでの研究において、生体外から投与したCSの抗炎症活性の作用機序は、炎症局所における結合組織成分や軟骨基質の生合成刺激、タンパク質分解酵素の阻害、有害アミンの吸着捕捉効果によるものと考えられていた。また、外因性CSはヒアルロン酸と相まって大きな保水性を発揮し、軟骨滑液と軟骨組織中に適切な湿潤環境を与えることから、CSの関節炎治療を対象とした研究は生化学的、物理化学的な内容に終始し、CSの経口摂取による抗炎症活性を免疫学的な側面から考究した知見は得られていなかった。また、*in vitro*におけるCSの抗炎症効果を検討した実験において、CSがヒト白血球から得た中性プロテアーゼ、カ