

討し、少なくともピロバライドが薬物代謝酵素の誘導に関与すること、ピロバライドの体内濃度は投与後速やかに低下することを示した。また、市販の製品に添加されるイチョウ葉エキス葉エキスの素材レベルでのフラボノイド類とテルペノイド類の個別成分を分析し、フラボノイド類の各成分間にはそれほど著しい差異はないものの、ピロバライドについてはかなりの幅があることを明らかにした。すなわち製品レベルにすると、同じイチョウ葉エキスと称した製品でも、ピロバライド含量がさまざまな製品が市場に流通している可能性が示された。

多成分から構成される素材のイチョウ葉エキスを特定保健用食品として許可するためには、生体に対する影響が強い成分（例えば、ピロバライド）を少なくとも素材中で個別に同定し、その生体影響に対する特性を調べ、またその成分の有効あるいは有害な影響を発現する濃度を明確にし、それらの結果を踏まえて素材中ならびに製品中の重要な成分の規格基準を作成する必要があると考えられる。そのようにできれば、該当製品を適切に使用することも可能になる。

本研究では、昨年に引き続きイチョウ葉エキス中の成分としてテルペノイド類に着目し、その肝臓の薬物代謝酵素の誘導の詳細を検討した。また、テルペノイド類の核内レセプター PPAR のリガンド活性の有無についても検討した。

B. 研究方法

1. イチョウ葉エキスに関する検討

肝薬物代謝酵素誘導成分の同定：ICR 系雄性マウス(日本クレア)に 0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁したテルペノイド(ギンコライド A, B, C およびピロバライド)を各々 10 mg/kg、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製した。

CYP (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。

ピロバライドによる肝薬物代謝酵素活性の経時変化：Wister 系雄性ラット(日本クレア)に 0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁したピロバライド 30 mg/kg を単回投与後、2, 6, 24 時間後に麻酔下で肝臓を摘出し、前述と同様にチトクローム P450 濃度および活性を測定した。

ピロバライドによる肝薬物代謝酵素 mRNA 発現量の経時変化：前記で摘出したラット肝臓より total RNA を抽出し、One Step SYBER RT-PCR kit (Perfect Real Time; TaKaRa BIO Inc., Japan) を使用し、Mx3000P (STRATAGENE Co. CA, USA) にて mRNA 量を測定した。mRNA 量は Ct 値より算出し、ハウスキーピング遺伝子として cyclophilin で補正した。

2. テルペノイド類の PPAR α と γ に対するリガンド活性

PPAR γ 活性はロシグリタゾンを用いたポジティブコントロールとして用い CoA-BAP 法により測定した。PPAR α の活性は合成リガンドである GW7647 をポジティブコントロールとして使用し同様に測定した。

C. 研究結果

1. イチョウ葉エキスに関する検討

イチョウ葉エキスの代表的なテルペノイドであるギンコライド A, B, C およびピロバライドを 5 日間投与したところ、ギンコライド A, B, C 投与ではいずれも肝臓 CYP の誘導はほとんど認められなかったが、ピロバライドでは顕著な誘導が認められ、特に CYP2B に相当する Pentoxylresorufin O-dealkylase 活性の誘導が大きかった(図 1)。ピロバライドで強い誘導が認められた結果は、前年度に検討した結果と良く一致し、イチョウ葉エキスによる肝臓薬物代

謝酵素の誘導には、ビロバライドが関与することを明確に示している。

次に、ビロバライドによる酵素誘導を詳細に検討するため、経時変化を測定した。ビロバライド投与後 2, 6, 24 時間後の CYP 活性を測定した結果、誘導は 6 時間後から認められ、24 時間後も上昇していた(図 2)。同時に測定した各 CYP サイブタイプの mRNA 発現量については 6 時間でピークを迎え、24 時間後には回復した(図 3)。

2. テルペノイド類の PPAR α と PPAR γ に対するリガンド活性

テルペノイド類の PPAR のリガンド活性を測定して図 4 に示した。PPAR α のポジティブコントロールであるロシグリタゾン[®]は 10^{-8} M から用量依存的な結合の増加を示したが、ビロバライドは 10^{-9} M \sim 10^{-5} M の濃度で全く結合を示さなかった。ギンコライド A, B, C についても、1 濃度 (10^{-6} M) でのみ評価したが、いずれも結合活性が認められなかった。PPAR α への結合についてもポジティブコントロール GW7647 では活性の増加を示したが、ビロバライドならびにギンコライド A, B, C についても結合活性の増加は検出できなかった。

D. 考察

イチョウ葉エキスの使用者の多くは医薬品の服用率が高い高齢者と考えられ、医薬品との相互作用が懸念されている。現在、イチョウ葉エキスは、ヨーロッパでは医薬品として、「葉よりアセトン・水抽出したもので、フラボノイド配糖体 22-27%、テルペンラクトン 5-7% (ギンコライド 2.8-3.4%、ビロバライド 2.6-3.2%)、ギンコール酸 5ppm 以下」という規格がある。日本でも日本健康・栄養食品協会が、「水又は含水エタノールで抽出・精製した抽出物で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、かつギンコール酸の含有量が

5ppm 以下」という規格が作られている。このように、国内外で使われている規格基準は、フラボノイド類やテルペノイド類といった一般名称の成分であり、その中の安全性や有効性に影響する特定成分に関する規格は存在しない。より詳細な規格基準を作成しなければ、必ずしもイチョウ葉エキス製品の有効性や安全性が保証できるわけではないと考えられる。

本研究からイチョウ葉エキス中のテルペノイド類でも、ビロバライドに医薬品との相互作用を惹起する活性があることが明らかとなった。その体内濃度は投与後に速やかに低下することから、ビロバライドが酵素誘導を惹起しても、速やかに酵素誘導は元に戻る可能性が考えられた。実際、本研究においてビロバライドの単回投与による酵素活性および mRNA 発現量を経時的に測定した結果、酵素誘導は比較的短時間で回復するという結果であった。以上の結果は、医薬品との相互作用が危惧される場合、事前にイチョウ葉エキスの投与を中止することで肝薬物代謝酵素を介した医薬品との相互作用は避けられることを示唆する。

昨年度の研究においてイチョウ葉エキス中の酵素活性誘導成分としてビロバライドを特定したが、他のテルペノイドであるギンコライド A, B, C の影響については不明であった。本年の検討により、3種のギンコライドには肝臓の薬物代謝酵素の誘導作用がインビボではほとんど無いことが明らかとなった。また、ビロバライドは薬物代謝酵素の誘導作用は強かったが、核内受容体転写因子 PPAR α と PPAR γ に対するリガンド活性は認められなかった。

以上の結果より、医薬品との相互作用という視点でイチョウ葉エキスの規格基準を作成するときは、フラボノイド類やテルペノイド類といった一般名称の成分に加えて、テルペノイドを特定成分として規格基準に追加することが妥当と考えられる。またイチョウ葉エキス製品としても、個々の製品中のビロバライド含有量

も明確にしておくことが重要であろう。

このようなイチヨウ葉エキスで明らかにした検討方法は、医薬品との相互作用を視点にした他の多成分から構成される健康食品素材にも適用できると考えられる。すなわち、先ずインビボで酵素誘導の有無を調べ、誘導があればその成分の体内吸収や体内濃度、酵素誘導の特性を明らかにし、その成分の素材レベルでの含有量の変動を把握するといった方法である。そのような検討ができれば、他成分から構成される健康食品素材を特定保健用食品として許可していく可能性が高くなると思われる。

E. 結論

医薬品との相互作用が懸念される健康食品素材としてイチヨウ葉エキスを用い、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肝臓薬物代謝酵素を誘導する主要成分がピロバライドであり、他のテルペノイドのギンコライドA, B, Cでは誘導作用がないこと、ピロバライドによる酵素誘導の回復は比較的速く、事前の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。ピロバライドを含めたテルペノイド類には核内受容体転写因子 PPAR α と PPAR γ に対するリガンド活性は認められなかった。イチヨウ葉エキスをモデルとした本研究結果から、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含めた影響を明確にし、その結果を踏まえた素材レベルならびに製品レベルでの規格基準作成が、特定保健用食品の新たな審査基準に必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Umegaki K, Taki Y, Endoh K, Taku K, Tanabe H, Shinozuka K, Sugiyama T.: Bilobalide in Ginkgo biloba extract is a major substance

inducing hepatic CYPs. J Pharm Pharmacol, 59:871-7(2007).

2) 梅垣敬三:健康食品素材の品質と製品の有効性・安全性. 薬学雑誌 127(suppl.4); 89-92(2007).

2. 学会発表

1) 梅垣敬三:機能性食品の開発において留意すべき事項、第9回応用薬理シンポジウム、2007.9.11(東京)

2) 梅垣敬三:健康食品素材の品質と製品の有効性・安全性、第2回食品薬学シンポジウム(日本薬学会天然物部会)、2007.10.19(静岡市)

3) 梅垣敬三:健康食品・サプリメントの安全性と有用性—その問題点と対応を考える—健康食品・サプリメントの実態と問題点、第28回日本臨床薬理学会、2007.11.30(宇都宮市)

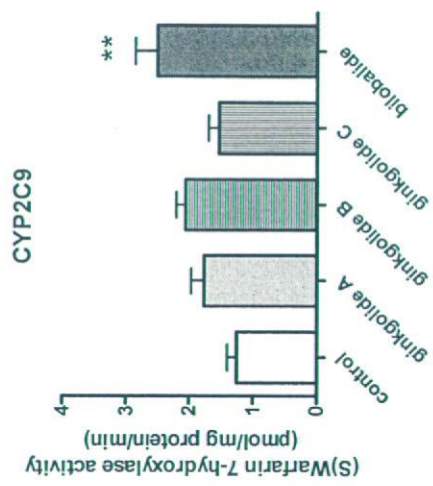
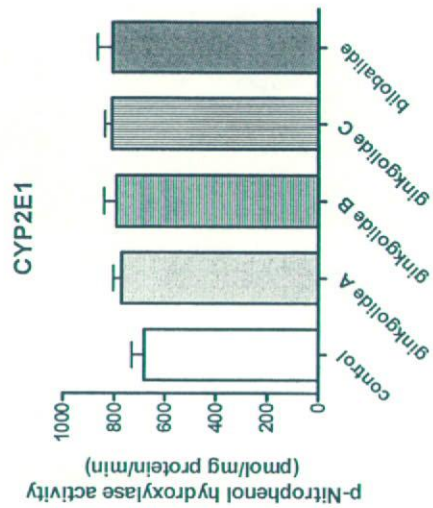
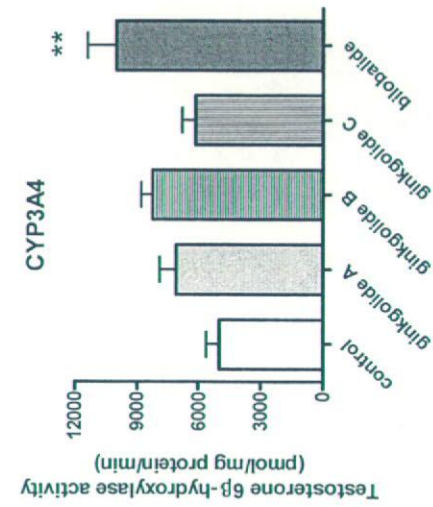
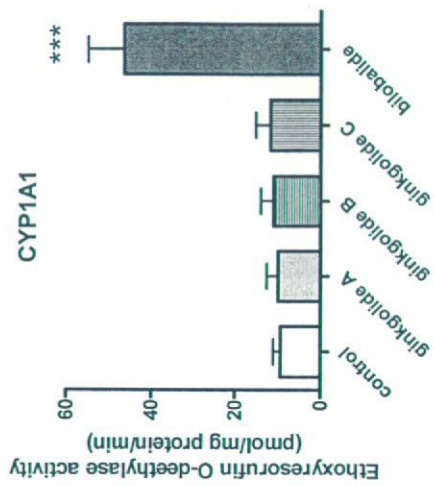
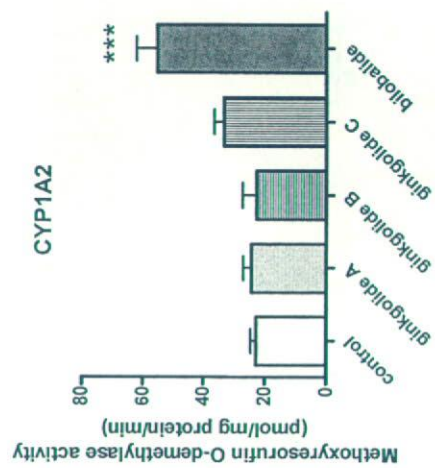
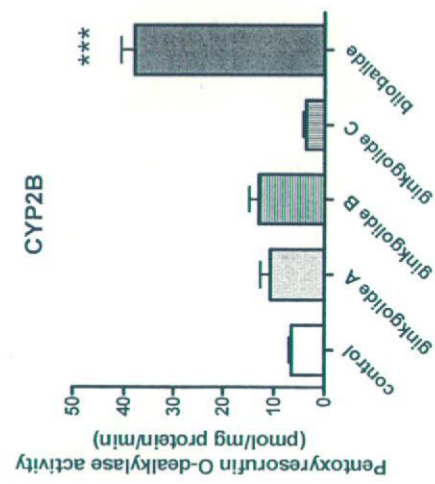
G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

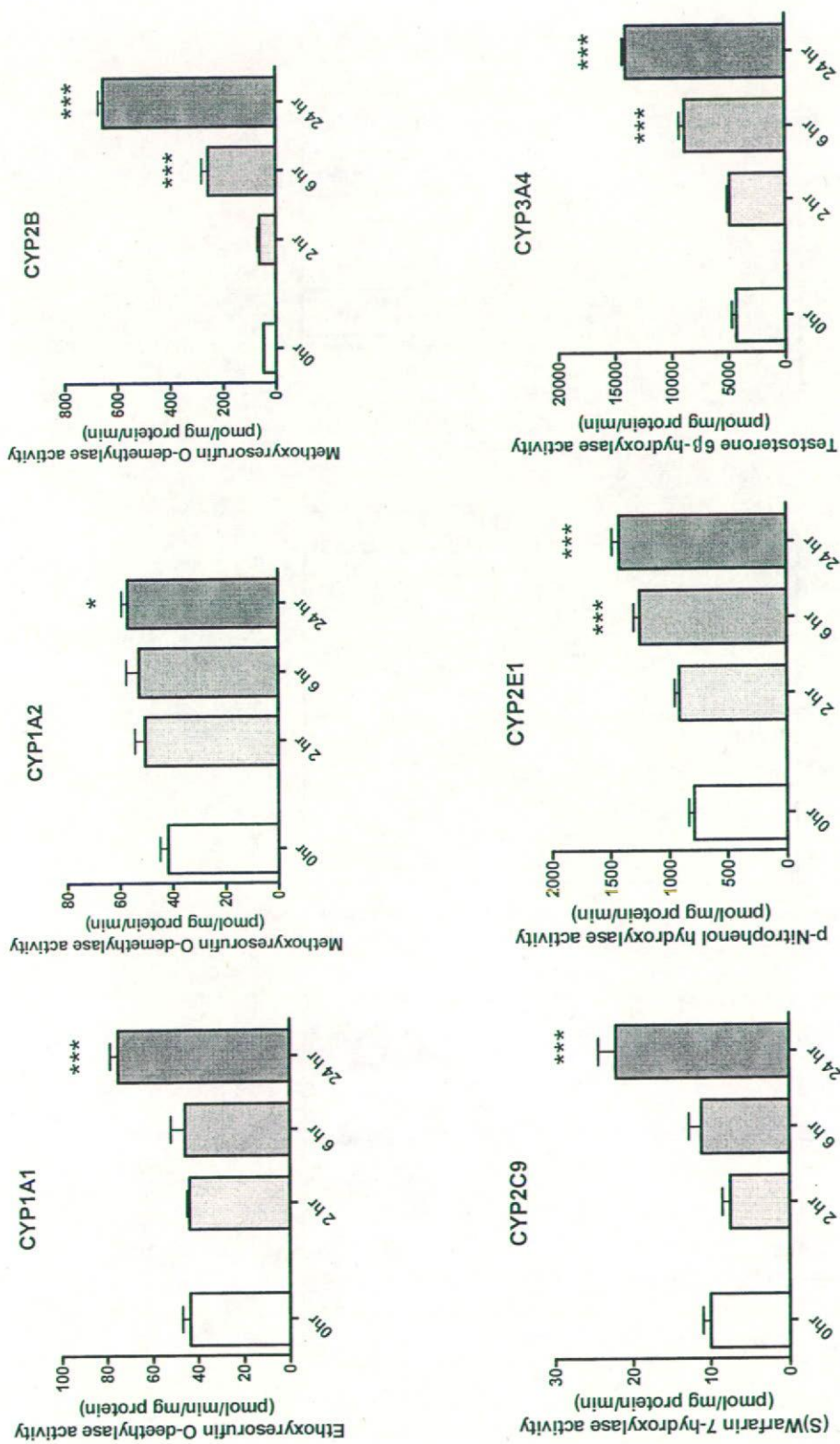
2. 実用新案登録

なし



Mice were given ginkgolide A, B, C or bilobalide (10 mg/kg) for 5 days. Each value is expressed as the mean \pm SE for 5 mice.
 ** : $P < 0.01$ *** : $P < 0.0001$ Significant versus control.

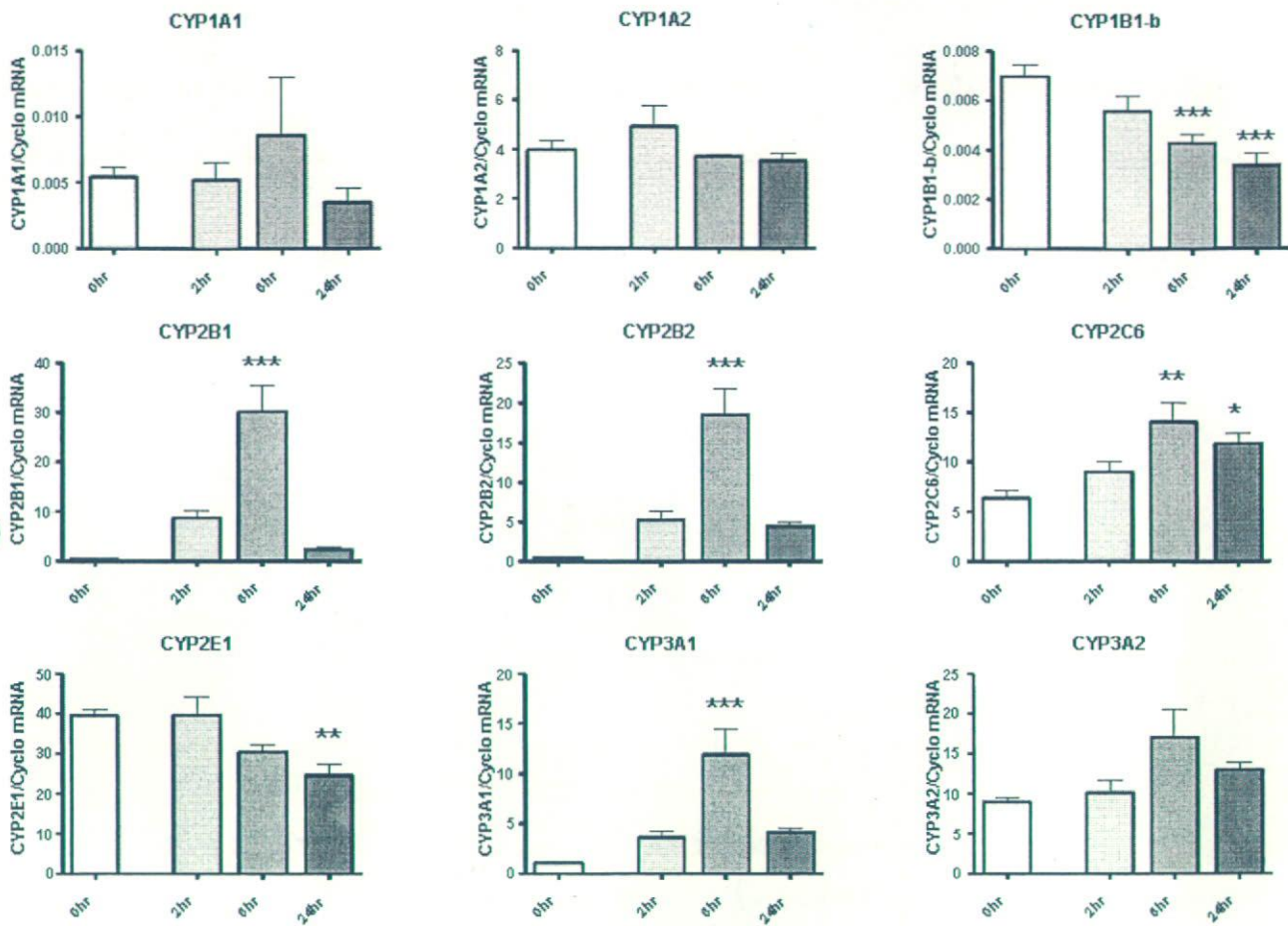
図1 ギンコライドおよびビロバライド投与時のマウス肝臓CYP活性



Rats were given bilobalide (30 mg/kg). Each value is expressed as the mean \pm SE for 4 rats.

* : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$ *** : $P < 0.0001$ Significant versus 0 hr.

図2 ビロバライド投与時のラット肝臓CYP活性の経時変化



Rats were given bilobalide (30 mg/kg). Each value is expressed as the mean \pm SE for 4 rats.
 * : P<0.05 ** : P<0.01 *** : P<0.0001 Significant *versus* 0 hr.

図3 ビロバライド投与時のラット肝臓CYP mRNA 発現量の経時変化

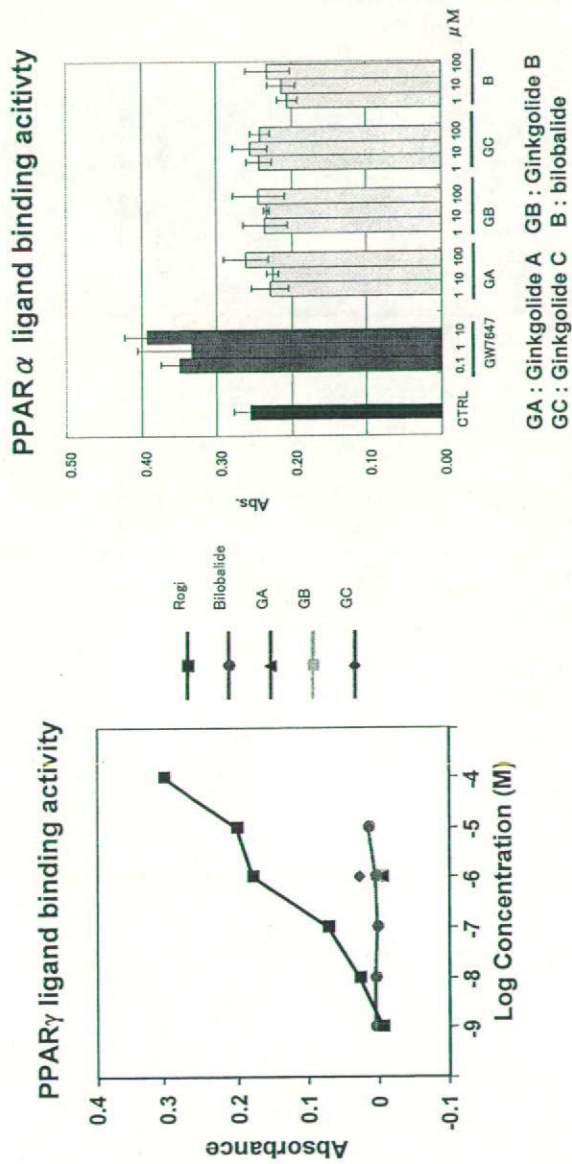


図4 テルペノイド類のPPAR γ ならびにPPAR α のリガンド活性
CoA-BAP法で測定。PPAR γ は、ロシゴライドは、10-6Mまで、ギンゴライドは、10-9M~10-5Mまで、ギンゴライドA、B、Cをそれぞれ1, 10, 100 μ Mで評価した。PPAR α はGW7647 (ジテ
イブコントロール)、ピロバライド、ギンコライドA、B、Cをそれぞれ1, 10, 100 μ Mで評価した。

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 近藤一成（国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部）

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が困難で、作用機序が明確でない化合物の健康食品としての有効性を評価するのに必要なパラメーターを明らかにすることを試みた。今年度は、リンゴおよびブドウプロアントシアニジンの有効性評価のために *in vitro* で種々検討した。重合度の違いにより分画したプロアントシアニジンについて、肥満細胞からの脱顆粒、ヒスタミン遊離抑制効果を検討したところ、平均分子量 3,000 以上の画分に活性が認められた。さらに高分子画分では脱顆粒抑制効果に違いはなく、一定の分子の大きさが必要と考えられた。細胞内シグナルの検討から、プロアントシアニジン抗原刺激による Syk, PLC, MAPK の各キナーゼリン酸化には影響しなかった。細胞骨格系であるアクチン、チューブリンについて検討したところ、プロアントシアニジンは抗原刺激で誘導される脱顆粒時に起きるアクチン再構成を阻害し、膜流動性を抑制することが分かった。また、多成分食品であるプロポリスの抗アレルギー評価系についても検討を行った。その結果、中国産プロポリスのエタノール抽出物が、肥満細胞からの脱顆粒抑制効果を示すことが分かった。TNF- α 産生抑制効果についても検討した。最後に、健康食品として用いられているウコン属植物の成分を LC-MS による分析で総体的に把握するとともに種間並びに種内での成分の変異の程度を明らかにするために、ウコン（秋ウコン、*Curcuma longa*）、キョウオウ（ハルウコン、*C. aromatica*）、クスリウコン（*C. xanthorrhiza*）、ガジュツ（紫ウコン、*C. zedoaria*）32 系統を実験に用いた。ウコンのラットにおける 14 日間反復経口投与毒性試験では 5,000 mg/kg の用量においても毒性学的意義のある変化は認められなかった。2,500 および 5,000 mg/kg/day 投与群において肝細胞の肥大が用量相関的に認められた。免疫組織化学法によって薬物代謝酵素の CYP2B6・CYP2B1/2 と CYP4A1 は、肥大した肝細胞または空胞が形成された肝細胞などに一致して発現した。また、ウコンの投与量と CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 が用量相関性を示した。

研究協力者:

手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所）、
菱田敦之、木内文之、飯田 修（(独)医薬基盤
研究所薬用植物資源研究センター）、
葩島淳子、首藤康文（財団法人残留農薬
研究所神経毒性研究室）

A. 研究目的

食品成分の中には高重合物質や多糖類など、
高分子物質のような消化管から吸収困難なも

のでも、有効性が示唆されるものがある。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、高重合物質や多糖類などの高分子物質のような消化管からの吸収が困難な健康食品の、有効性の機序を解明することを試みる。そして、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

る基礎データを構築する。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を目的とする。前年度に引き続き、国内で消費量の多い薬用植物ウコンおよびウコン属植物をラットに投与し、臨床および解剖学的検査に基づいて投与の影響を検証する。投与によって血液中に特異的に発現するタンパク質、ペプチドからバイオマーカーの候補を検索する。

B. 研究方法

I. プロアントシアニジンおよびプロポリスの抗アレルギー作用に関する検討

本年度は、ブドウ由来プロアントシアニジンを用いて、*in vitro*でその作用機序について検討した。プロポリスについては、中国産とブラジル産について抗アレルギー作用について検討した。

実験材料

本実験では、*in vitro* 抗アレルギー作用の検討には、ラット好塩基球細胞(RBL-2H3)およびヒトIgE受容体を導入したRBL-SX38細胞を用いた。

ブドウ種子由来プロアントシアニジンは、重合度の違いにより高分子画分(GSP-H)と低分子画分(GSP-L)に分離した。平均重合度は、NMR測定からそれぞれ10と3であると推定された。

ブラジル産・中国産プロポリスの水抽出物、エタノール抽出物を用いてβ-hexosaminidase release assay(脱顆粒)による抗アレルギー活性評価を行ったところ、エタノール抽出物が低濃度で抑制効果が見られたため、以後このエタノール抽出物を用いた。エタノール抽出物は、脱顆粒抑制効果を指標に、順相、逆相カラムクロマトグラフィーによる分画精製した。すなわち、2g/10mLとなるようクロロホルムに再溶解し、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル BW-820MH(富士シリシア)100gを用い、溶出溶媒はクロロホルム・メタノール混液を100:0 1L, 98:2 1L, 90:10 5L, 0:100 3Lと組成を変えて行った。その後、Chromatorex ODS DM1020T(富士シリシア)100gを用い、溶出溶媒

は水・メタノール混液を 50:50 0.5L, 30:70 1L, 0:100 1Lと組成を変えて分画精製を行った。

脱顆粒測定

感作および抗原刺激には、DNP 特異的マウスIgE抗体とDNP-HSA(ヒトアルブミン)あるいはNitrophenylacetyl (NP)特異的ヒトIgEとNP-BSA(ウシアルブミン)を用いた。脱顆粒の測定には、ヒスタミン測定(Histamine EIA kit)およびβ-hexosaminidase活性を指標に行った。

β-hexosaminidase活性は405 nmの吸光度を測定した。プロポリス試料は、それ自身の強い黄色のため正確に測定できなかった。そこで、基質にmethylumbelliferyl基の付いたものを用いた改良法、355 nm励起、460 nm蛍光測定で行った。

細胞骨格の染色

8-well培養チャンバー中に培養し、プロアントシアニジン処理した細胞をPBSで洗浄した後、ホルマリン固定、Triton X-100処理した。その後、アクチンの染色にはTexas-Red標識phalloidinを、チューブリン染色には、anti-tubulin抗体をTexas-RedあるいはFITC標識して用いた。

耳介肥厚測定法

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。

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・2Na (pH 6.0) containing 10 mM SDS; B, 100 mM EDTA・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。

ウェスタンブロットティング

10-cm 培養ディッシュ中でプロアントシアニジン処理した細胞をPBSで洗浄した後、Lysisバッファー(1% Triton X-100, 20 mM Tris, 1mM EDTA, 137 mM NaCl, protease inhibitors, phosphatase inhibitors)で可溶化し、遠心後上清を各種抗体(Syk, PLC, MAPK)を用いてウェスタンブロットティングを行った。

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

本年度は、ラットに対する14日間反復経口投与毒性試験を行い、ウコン投与による影響を血液学、血液生化学および病理学検査により評価し、その安全性を検討した。また、ラット肝臓組織に特異的に発現するタンパク質を免疫組織化学染色法によって検索した。

実験材料

(独)医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター

一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、実験試料とした。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、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(被験物質)とした。投与試料は、被験物質をコーンオイルに懸濁させて投与試料を調製した。投与試料の濃度は、1000mg/kg 用量が100mg/mL, 2500mg/kg 用量は250mg/mLとした。

ラット投与試験

動物実験は、14日間反復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(BrlHan: 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。

被験物質の投与方法は強制経口投与とし、14日間にわたって反復経口投与した。投与用量は、体重1kg当たり10mLとした。対照群の動物には溶媒のみを同様に投与した。なお、本被験物質の特性から、1回に投与可能な最高用量は2,500mg/kgであったことから、5,000mg/kg投与群では被験物質濃度2,500mg/kgを30分間隔で2回投与して、5,000mg/kgの用量とした。5000mg/kgに対する対照群では同様に溶媒のみを2回投与した。

血液学、血液生化学および病理学的検査

14日間反復投与試験終了後に各群の全生存動物について、エーテルの深麻酔下で後大静脈より採血した後、腹大動脈および後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。

血液学的検査は、採取した血液を総合血液学検査装置アドヴィア120(Bayer Corporation, NY, U.S.A.)で分析した。検査項目は、ヘマトクリツ

ト値 (Ht), 血色素量 (Hb), 赤血球数 (RBC), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球血色素量 (MCH), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC), 赤血球分布幅 (RDW), 赤血球血色素量分布幅 (HDW), 血小板数 (PLT), 平均血小板容積 (MPV), 血小板容積分布幅 (PDW), プレートレットクリット (PCT), 平均血小板成分濃度 (MPC), 血小板成分濃度分布幅 (PCDW), 平均血小板成分含量 (MPM), 血小板成分含量分布幅 (PMDW), 網赤血球数 (Retics), 平均網赤血球ヘモグロビン含量 (CHR, 平均網赤血球容積 (MCVr), 白血球数 (WBC), 好中球 (N), リンパ球 (L), 単球 (M), 好酸球 (E), 好塩基球 (B), 大型非染色球 (LUC) を測定した。

血液生化学検査は, 採取した血液をヘパリン処理して得られた血漿を用い, JCA-BM1250 自動分析装置 (日本電子株式会社, 東京都) で分析した。検査項目は, アルカリホスファターゼ (ALP), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP), クレアチニン (Creat), 尿素窒素 (BUN), 総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), グロブリン (Glob), アルブミン/グロブリン比 (A/G ration), 血糖 (Gluc), 総コレステロール (T.Chol), トリグリセライド (TG), 総ビリルビン (T.Bil), カルシウム (Ca), 無機リン (P), ナトリウム (Na), カリウム (K), 塩素 (Cl) を測定した。

臓器重量は, 採血及び剖検後, 各臓器の固定前の重量 (絶対重量) を測定した。これらの値と最終体重から比体重値 (相対重量) を測定した。

病理組織学的検査は, 常法に従って作成したパラフィン包埋切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン染色標本を施して光学顕微鏡下で観察した。

免疫組織化学染色法

剖検で採取した肝臓をホルマリン固定後, 常法に従いパラフィン包埋切片を作製した。免疫染色はストレプトアビジンビオチン法を用いて実施し, また賦活化処理として, 切片を 0.01N のクエン酸塩緩衝液に浸し, マイクロウェーブ (MW) (95°C, 5分を2回もしくは90°C, 10分を1回)による熱処理を実施した。発現タンパク質の検出には, CYP1A1 (Santa Cruz), CYP1A2 (Santa Cruz), anti-human CYP2B6 and rat CYP2B1/2 (Chemicon International), CYP4A1 (Biomol International) の4種の抗体を用いた。

C. 研究結果

I プロアントシアニジンおよびプロポリスの抗アレルギー作用に関する検討

ブドウ由来ブドウプロアントシアニジンは, 高分子画分と低分子画分について, RBL2H3細胞からの脱顆粒を検討したところ, 高分子画分 (GSP-H) にのみ脱顆粒抑制効果が見られた (図1)。RBL-2H3細胞にヒトIgE受容体各サブユニット ($\alpha, \beta, \gamma 2$) を組み込んだRBL-SX38細胞では, 若干効果は弱いものの, 同様に高分子に活性が見られた。マウス耳介肥厚測定においても, GSP-Hは有意に抑制効果が見られた。GSPのようなプロアントシアニジンは酵素やタンパク質に非特異的に吸着することが知られており, 今回の場合も脱顆粒そのものが抑制されているのか β -hexosaminidase活性測定を妨害しているだけなのかは不明であったことから, 測定原理の異なるヒスタミン遊離量と比較したところ β -hexosaminidase活性測定と同じ結果であった。このことから, GSP-Hは純粋に脱顆粒を押さえられていると考えられた。

脱顆粒抑制効果のメカニズムについて, まず

プロアントシアニジンのIgE受容体(FcεRI)を介したシグナル伝達に与える影響について検討した。その結果、DNP-HSA抗原刺激によるIgE受容体を介したSyk, PLCγ1, PLCγ2のリン酸化は、GSP-H前処理によって抑制されなかった(図2)。次に、プロアントシアニジンの細胞骨格系に与える影響について検討した。その結果、抗原刺激によって誘導されるアクチン再構成(膜ラッピング)がプロアントシアニジン(25-50 μg/mL)によって抑制されることが分かった。この効果は、低分子量画分には見られなかった(図3)。

ブラジル産および中国産プロポリスについて、水およびエタノール抽出物について脱顆粒抑制効果を検討した。その結果、中国産プロポリス(C)のエタノール抽出物に低濃度で活性が見られた。そこで、脱顆粒抑制を指標にさらに分画精製し、Fr.C-1~Fr.C-6を得た。これらについて同様に肥満細胞からの脱顆粒抑制効果(IC₅₀)を調べたところ、Fr.C-4, 5が強く(5.56, 1.69 μg/mL)、特にFr.C-5はCAPE単独より低濃度で有効であった。また、微量のcaffeic acid phenylester (CAPE)を含むことが分かった。(図4, 5, 6)

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

飼育の概要

一般状態の観察では、対照群および被験物質投与群において異常は認められなかった。死亡率は、試験期間中、5,000 mg/kg/day 投与群で投与ミスによる1例の死亡が認められたが、被験物質投与に起因する死亡は認められなかった。体重は、対照群と比較して、全ての被験物質投与群で有意な体重の変化は認められなかった。摂餌量も、対照群と比較して、全ての被験物質投与群で有意な摂餌量の変化は認められなかった。

血液学的検査(表1-1, 1-2および1-3)

2,500 mg/kg/day 投与群において、白血球数およ

び白血球ディファレンションカウントの好中球数の有意な増加が認められた。それ以外の試験群では、統計学的有意な変化は認められなかった。

血液生化学的検査(表2-1および2-2)

・被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目および関連項目を以下に示す。

・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)は、1,000 mg/kg/day と 2,500 mg/kg/day 投与群で減少傾向を示し、5,000 mg/kg/day 投与群では有意に減少した。

・総ビリルビン(T.Bil)は、1,000 mg/kg/day と 2,500 mg/kg/day 投与群で有意に減少したが、5,000 mg/kg/day 投与群では対照群との有意差は認められなかった。

・総蛋白、アルブミン(Alb)および総コレステロール(T.Chol)は、2,500 mg/kg/day 投与群で増加傾向を示し、5,000 mg/kg/day 投与群では有意に増加した。

・被験物質投与群では、カリウム(K)の増加傾向がみられたが、有意差が認められたのは1,000 mg/kg/day 投与群のみであった。

・リン(P)については、2,500 mg/kg/day 投与群で有意な増加が認められたが、5,000 mg/kg/day 投与群では対照群との差は認められなかった。

臓器重量(表3および4)

2,500 および 5,000 mg/kg/day 投与群では、対照群に対して肝臓の臓器重量の有意な増加が認められたが、1,000 mg/kg 用量群では、各臓器に統計学的有意差はなかった。

病理組織学的検査

2,500 mg/kg/day 投与群において2例、5,000 mg/kg/day 投与群では全生存例において小葉中心性肝細胞肥大が認められた。典型的な病理組織

像を写真図版に示す。最高用量におけるこの病理学的変化は統計学的にも有意な変化であった。またコーンオイルを2回投与した群では1例に小葉周辺性肝細胞の空胞化が認められた。

肝臓組織の薬物代謝酵素の発現

対照群においては、小葉中心性に CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 の軽微な発現が認められた。被験物質投与動物における CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 の発現は小葉中心性から瀰漫性に認められた。CYP2B6・CYP2B1/2 の発現は被験物質投与群で、用量相関性に強く発現し、投与した群において活性化を示唆する肥大した肝細胞と一致した発現を認めた。一方、CYP4A1 では用量相関性を示す発現は認められなかった。

D. 考察

I プロアントシアニジンおよびプロポリスの抗アレルギー作用に関する検討

プロアントシアニジンに関して、これまでの研究でリンゴ由来、ブドウ由来のものを用いて比較検討してきた。リンゴ由来同様に、ブドウ由来プロアントシアニジンは、肥満細胞からの脱顆粒を抑制した。その抑制効果のほぼ同じ強さであった。両者の構造上の相違点は、重合体構成単位である(エピ)カテキンの3'位に没食子酸がエステル結合しているか(ブドウ由来)していないか(リンゴ由来)である。Iv vivoでのブドウ由来プロアントシアニジンを用いた耳介肥厚試験においてもリンゴ由来プロアントシアニジン同様の抑制効果が見られたことから、プロアントシアニジンの抗アレルギー作用は、カテキンの部分構造は重要ではなくその重合度が重要であることが強く示唆された。そのメカニズムに関しては、肥満細胞を用いた *in vitro*での検討から、プロアントシアニジンは細胞内シグナルに影響しないものの抗原刺激により誘導される膜ラップリングを抑制することで脱顆粒を抑制することが分かった。しか

しながら、その脱顆粒抑制濃度は25 µg/mLと比較的高いこと、プロアントシアニジンの吸収性からそれ以外の基与も考えられた。初年度の *in vivo*実験からリンゴプロアントシアニジンは IL-2, IL-12, IFN- γ などTh1型サイトカイン産生には影響しなかったが、IL-5, IL-6のTh2型サイトカインを抑制され、Th2型分化が抑えられていることが分かった。これらの結果を総合すると、プロアントシアニジンは、腸管免疫系に作用しTh1/Th2バランスにおいてTh2抑制的に働き、一方微量の吸収されたプロアントシアニジンは肥満細胞などに作用しヒスタミン遊離を抑制するものと考えられた。

プロポリスに関しては、近年抗アレルギー作用が期待されることとして注目されていることから、その成分検索を行った。抗がん作用が期待されるartepillin Cなどプレニル側鎖を持つ桂皮酸が主成分のブラジル産に比較してchrisinなどフラボノイドが主成分と考えられる中国産では、中国産の方が、肥満細胞からの脱顆粒抑制効果は高かった。この中国産プロポリスにはすでに脱顆粒抑制効果が知られている caffeic acid phenyl ester (CAPE) が、活性画分である Fr-C-5にも微量含有しているが主成分はUV吸収などの結果から、CAPE以外のフラボノイドと考えられ、新たな抗アレルギー作用物質と考えられた。

アレルギー患者の数は、近年日本や欧米でも増加の一途を辿り、総人口の20%前後に達すると言われている。抗アレルギー薬の開発は多角的に検討され、特にIgE-肥満細胞系によって生じるI型のアレルギー応答に対する抗アレルギー薬として多くの薬剤が開発されてきた。古典的な抗ヒスタミン薬の開発に始まり、肥満細胞からの化学伝達物質遊離を広く抑制する化学伝達物質遊離抑制薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬やトロンボキサン合成阻害薬・受容体拮抗薬、サイトカイン産生抑制薬が開発されてきたが、全てのアレルギー反応において未だに十分に満足する薬が見出されていないのが現状である。今回検討したプロアントシアニジンやプロポリスは、作用機序や作用部位が明確でないものの明らかな効果が期待できる

可能性があることが、本研究で明らかにすることができた。

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

ウコンをラットに 14 日間反復経口投与した際の、生化学的、組織化学的变化を調べ、肝臓組織における免疫染色法を用いたバイオマーカー候補タンパク質の検索を行った。本試験は食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針を参考にして実施した。

試験期間中、5,000 mg/kg/day 投与群において、動物の死亡および一般状態の観察で異常は認められなかった。

体重は対照群と比較して全ての被験物質投与群で有意な変化は認められなかった。また摂餌量においても同様に統計学的有意差は認められなかった。ただし、全ての群における体重および摂餌量は増加したが、コーンオイルを2回投与した対照群および 5,000 mg/kg/day 投与群における摂餌量は他の群と比較して少なかった。これはコーンオイルまたは被験物質を2回投与することにより、満腹な状態が継続し、食欲が抑制されたためと考えた。

血液学的検査では白血球数および白血球のディファレンシャルカウントにおける好中球数が 2,500 mg/kg/day 投与群で対照群に比べて有意な増加を示した。また、血液生化学的検査では、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST)、総タンパク (TP)、アルブミン (Alb)、総コレステロール (T.Chol)、総ビリルビン (T.Bil)、リン(P)、カリウム (K) の各項目において、対照群に比べて有意な変化が認められた。5,000 mg/kg/day 投与群で有意な減少を示したアスパラギン酸アミノ基転移酵素は、肝障害の指標の一つであるが、心筋、骨格筋、赤血球などにも高濃度に分布していることから、肝臓特異性は低く、またその値が低い場合、臨床及び毒性学的意義は乏しいとされている。一方、5,000 mg/kg/day 投与群では総

タンパク(T.Chol)、アルブミン (Alb)、総コレステロール(T.Chol)値が有意に増加した。総タンパクおよびアルブミンは脱水などによる血液濃縮によって見かけ上増加する可能性があるが、実量が真に増加することはほとんどなく、減少が問題となるといわれている。本試験ではヘモグロビン、ヘマトクリット値が正常であったことから総タンパクおよびアルブミン値の増加は脱水などによるものではないと判断した。さらに総コレステロールが有意に増加していたことから、被験物質を2回投与したことによるものと考えた。しかし、コーンオイル2回投与の群と1回投与の群との間に差は認められなかったことから、コーンオイルによる影響を否定し、被験物質の影響であると考えた。つまり、高濃度のウコンを投与することにより肝臓におけるタンパクおよびコレステロール合成が亢進したためと考えた。観察期間終了後に行った最終解剖時の臓器重量の測定では、2,500、5,000 mg/kg/day 投与群で肝臓の絶対重量および相対重量が有意に増加した。剖検時の肉眼所見では異常は認められなかったが、病理組織学的検索では小葉中心性肝細胞肥大が 2,500 mg/kg/day (2/4 例)、5,000 mg/kg/day (3/3 例) 投与群で認められた。さらに、対照群および各投与群では肝細胞の空胞化が認められた。特にコーンオイルを2回投与した群では小葉周辺性肝細胞の空胞化が散見された(1/4 例)。対照群および各投与群で散見された空胞は、過剰なオイルを摂取したことにより、肝細胞に脂肪が蓄積されたと考えた。一方、2,500 および 5,000 mg/kg/day 投与群における肝細胞の肥大は用量相関的であること、また血液生化学的検査の結果と合わせると、被験物質投与による刺激で肝細胞が活性化されたため、細胞の大きさが増したと考えた。

バイオマーカーを検索する目的で、免疫組織化学染色法を用いウコン投与によって肝臓組織に特異的に発現するタンパク質を検索した。本

報告では薬物代謝酵素に着目し、CYP1A1、CYP1A2、anti-human CYP2B6 and rat CYP2B1/2、CYP4A1 の発現を確認した。特に、CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 は脂質代謝に関与することが知られている。本試験では、肝臓組織において、薬物代謝酵素である CYP1A1 および CYP1A2 の発現は認められなかった。一方、CYP2B6・CYP2B1/2 と CYP4A1 は、肥大した肝細胞または空胞が形成された肝細胞などに一致して発現した。また、CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 の発現は、被検物質投与群の間において用量相関性を示し、被検物質によって発現の程度が異なる結果が得られた。以上のことから、ウコンは肝臓の脂質代謝に何らかの影響に及ぼすことが示唆された。しかし、CYP1A1 および CYP1A2 の発現が認められなかった理由、また肝臓の脂質代謝に影響を及ぼす機序については詳細な検討が必要であると考えた。

E. 結論

I. プロアントシアニンおよびプロポリスの抗アレルギー作用に関する検討

繰り返し構成単位の部分構造がことなるカテキン重合体であるプロアントシアニンをを用いて *in vitro*, *in vivo* で比較検討した結果、部分構造よりも重合度が活性発現に重要であると考えられた。プロアントシアニンは細胞内シグナルにはほとんど影響を与えないものの、抗原刺激により誘導される膜ラフリングやアクチン再構成を抑制することで脱顆粒を抑制することが分かった。しかしながら、その脱顆粒抑制濃度は 25 µg/mL あるいはそれ以上と比較的高い。リンゴプロアントシアニンは Th1 型サイトカイン産生には影響しないが、ITh2 型サイトカインを抑制することから、腸管免疫系に作用し Th1/Th2 バランスにおいて Th2 抑制的に働き、一方微量の吸収されたプロアントシアニンは肥満細胞などに作用しヒスタミン遊離を抑制するものと考えられた。

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

ウコンの Wistar Hannover 系 SPF ラッ (BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)) における 14 日間反復経口投与毒性試験では 5,000 mg/kg の用量においても毒性学的意義のある変化は認められなかった。

2,500 および 5,000 mg/kg/day 投与群において肝細胞の肥大が用量相関的に認められた。肝細胞の肥大は、摂餌量、血液生化学的検査および病理組織学的検査においてウコンの投与による影響を示唆する結果であった。

免疫組織化学法によって薬物代謝酵素の CYP2B6・CYP2B1/2 と CYP4A1 は、肥大した肝細胞または空胞が形成された肝細胞などに一致して発現した。また、ウコンの投与量と CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 が用量相関性を示した。CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 は、バイオマーカーの候補として利用できると考えられるが、ウコン投与による因果関係や作用機作の解明にはさらに詳細な研究が必要であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表 :

1) Akiyama H, Kondo K. Agaritine and phenylhydrazine derivatives in *Agaricus bisporus* and *Agaricus blazei* Murrill. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. **48**, 397-401 (2007).

2) Kondo K, Watanabe A, Akiyama H, Maitani T. The metabolisms of agaritine, a mushroom hydrazine in mice.

Food Chem Toxicol., **46**, 854-62. (2008).

2. 学会発表 :

1) 近藤一成, 太田小夜香, 穂山 浩, 大野泰雄

“シヤンピニオン中のアガリチンについて”

第44回全国化学技術者協議会, 津, 2007, 11

2) Kondo K, Ohta, S, Amakura Y, Kasahara Y, Akiyama H, Ohno Y. “Analysis of cytotoxic conjugated-triene fatty acids in *Pleurocybella porrigens*”

3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague Czeck republic, 2007, 11

G. 知的財産権の出願・登録

なし

I プロアントシアニジンの抗アレルギー作用に関する検討

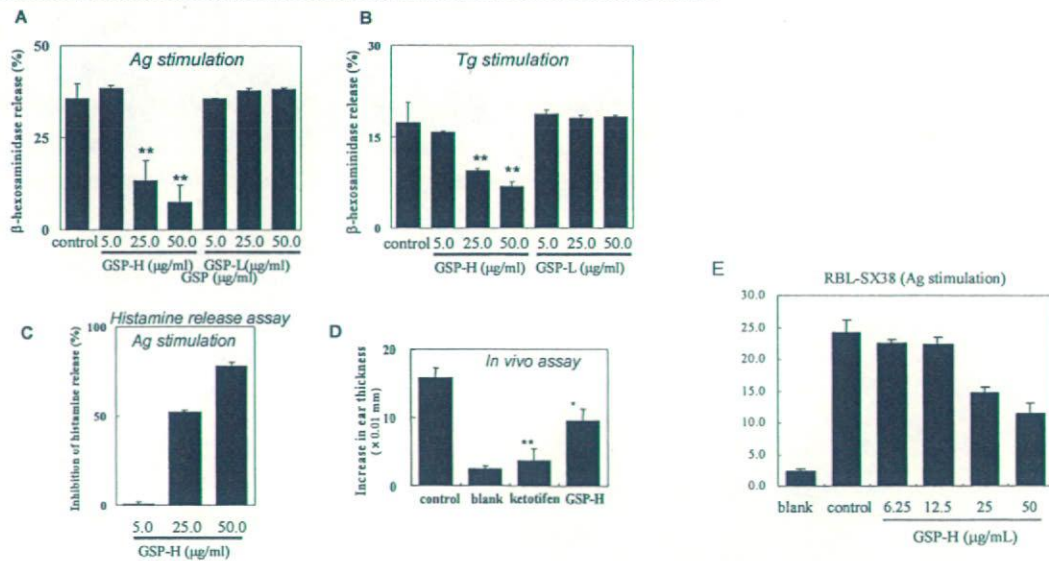


Fig. 1. Effects of GSP-H and GSP-L on degranulation. (A) The activity of β -hexosaminidase released into the culture media from RBL-2H3 cells treated with GSP samples was measured when stimulated with DNP₃₀-HSA (Ag). (B) β -hexosaminidase assay was performed when stimulated with Tg instead of Ag. The results are the percentage of the total β -hexosaminidase released in the supernatant after Ag stimulation, and are the mean \pm SD of three or four independent experiments. ($n = 3$ or 4 ; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). (C) Histamine release assay. The same experiment in A and B was done using DNP30-HSA. Histamine released from RBL cells was measured to ensure that GSP-H inhibit degranulation, not the enzyme reaction (β -hexosaminidase). The results show inhibition rate (%) ($n = 2$) (D) The ear-swelling response was tested in Balb/c mice (SLC, Japan) in order to determine the effects of GSP-H on the immediate-hypersensitivity reaction. Hybridoma cells (IGELa2) were injected subcutaneously into the back of the neck of each animal. After 10 days, ear thickness was measured using an upright thickness gauge. The ear-swelling response was then initiated by picryl-chloride challenge to the ventral side of the neck. Ear thickness was measured 1 h after the challenge. Ketotifen (0.2 mg/ml) was used as a positive control. GSP-H (10 mg/mouse) was orally administered to the mice before antigen stimulation.

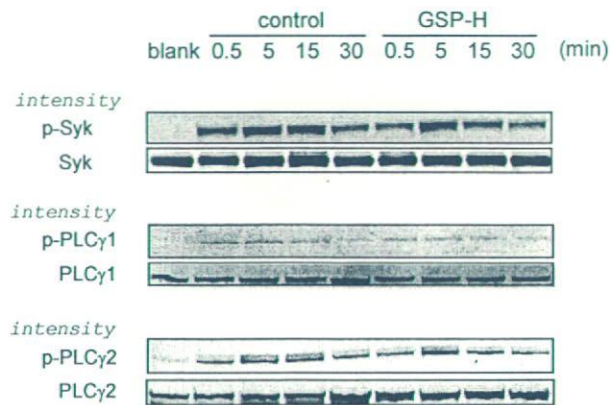


Fig. 2. Effect of GSP-H on IgE-mediated signaling. Fc ϵ RI-induced activation of Syk, PLC γ 1, and PLC γ 2 is not inhibited by GSP-H. RBL cells were sensitized with IgE (0.5 μ g/ml) overnight and then incubated with DNP30-HSA (0.2 μ g/ml) for the indicated time (0.5, 5, 15, or 30 min) after GSP-H (50 μ g/ml) treatment or buffer for 10 min. Cold lysis buffer was added to the cells in a 10-cm culture dish and prepared cell lysates. For Syk phosphorylation, cell lysates were immunoprecipitated with anti-Syk (N-19), followed by protein A-agarose at 4°C under gentle rotation. The immunoblot was probed with anti-phosphotyrosine Ab (4G10). For phosphorylation of PLC γ 1 and PLC γ 2, immunoblots were prepared from whole cell lysates and probed with polyclonal anti-PLC γ 1 (Tyr⁷⁸³), and PLC γ 2 (Tyr¹²¹⁷). Results are representative of three experiments. Similar results were obtained.

Fig. 3 The inhibition of IgE-induced membrane ruffling by GSP-H. RBL-2H3 cells were sensitized with IgE (0.5 $\mu\text{g/ml}$) overnight. After treated with GSP-H (50 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 10 min, the cells were stimulated with DNP30-HSA (0.2 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 5 min. After Ag stimulation, cells were fixed, permeabilized and stained with Texas Red-labeled phalloidin (F-actin). *blank*, no stimulation; *Ag*, DNP30-HSA stimulation alone; *GSP-H + Ag*, DNP30-HSA stimulation after GSP-H treatment; *GSP-H alone*, GSP-H treatment alone. F-actin was located around the cell periphery in resting cells (*blank*). Fc ϵ RI aggregation induced membrane ruffling and actin remodeling was observed (*Ag*). Fc ϵ RI-induced membrane ruffling was impaired by GSP-H (*GSP-H + Ag*). GSP-L showed no morphological changes (*GSP-L*). Arrow indicates F-actin accumulation.

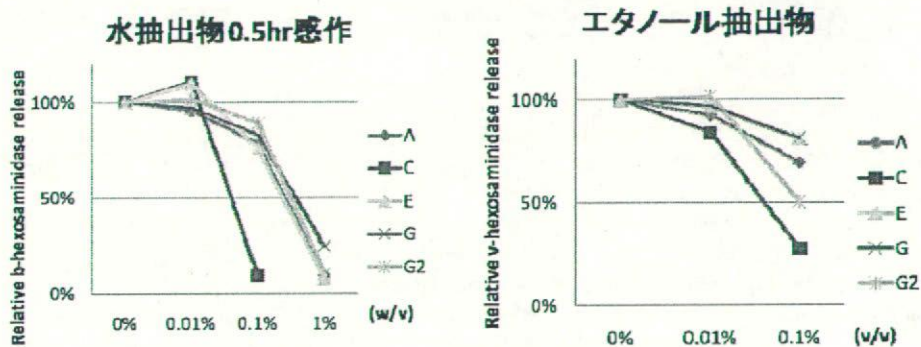
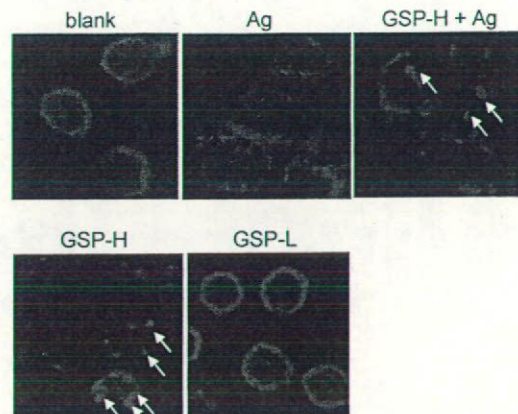


Fig.4 ブラジル産および中国産プロポリスの水抽出物およびエタノール抽出物の脱顆粒抑制作用。サンプル A, E, G, G2 がブラジル産, サンプル C

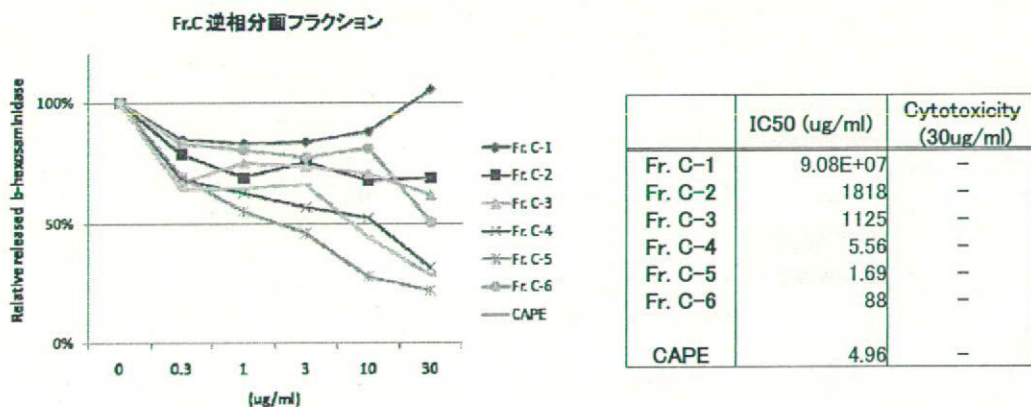
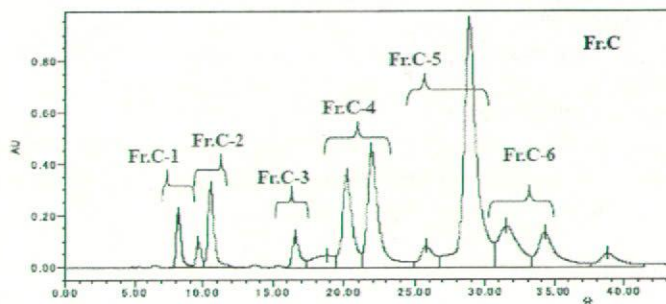


Fig.5 Fr.C-1~C-6 及び CAPE (positive control) の 50%脱顆粒抑制濃度並びに 30 $\mu\text{g/ml}$ における cytotoxicity の表

Fig.6 Fr.C の分画精製
Fr.C を逆相クロマトグラフィーで分画



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

Table 1-1a. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	Ht (%)	Hb (g/dL)	RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	HDW (g/dL)	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	MPV (fL)	PDW (%)
0	4	Mean 40.3 S.D. 2.1	14.0 0.7	7.24 0.25	55.7 1.0	19.3 0.4	34.7 0.2	12.5 0.5	2.04 0.10	1215 159	8.1 0.5	60.1 1.9
1000	4	Mean 40.1 S.D. 0.5	13.8 0.1	6.96 0.29	57.7 1.6	19.9 0.8	34.4 0.5	12.4 0.5	1.97 0.04	1308 157	7.8 0.5	59.1 2.4
2500	4	Mean 38.9 S.D. 1.2	13.5 0.5	6.83 0.30	56.9 1.2	19.8 0.5	34.7 0.3	12.4 0.4	2.05 0.12	1307 220	8.2 0.6	61.1 1.0

S.D. : Standard deviation.

Table 1-1b. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	Ht (%)	Hb (g/dL)	RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	HDW (g/dL)	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	MPV (fL)	PDW (%)
0 ^{a)}	4	Mean 40.1 S.D. 0.6	13.8 0.3	7.15 0.10	56.1 0.9	19.3 0.2	34.3 0.8	12.3 0.2	2.07 0.12	1335 236	8.3 0.7	61.0 2.7
5000 ^{b)}	3	Mean 39.5 S.D. 0.3	13.7 0.1	6.94 0.17	57.0 1.0	19.8 0.6	34.7 0.4	12.7 0.4	2.22 0.01	1302 128	7.7 0.9	60.7 2.2

S.D. : Standard deviation.

a), b): Animals were administered twice at interval of 30 minutes.

(a; the vehicle, b; the test substance)

Table 1-2a. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	PCT (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)	Retics ($10^3/\text{L}$)	%Retics (%)	Chf (pg)	MCV _r (fL)
0	4	Mean 0.98 S.D. 0.09	21.0 0.8	7.8 0.1	1.46 0.04	0.59 0.04	180.1 57.4	2.5 0.8	19.1 0.2	61.8 0.6
1000	4	Mean 1.02 S.D. 0.18	21.6 0.8	7.8 0.1	1.45 0.05	0.59 0.03	176.1 28.2	2.6 0.4	19.5 0.8	62.6 1.3
2500	4	Mean 1.06 S.D. 0.12	20.8 1.0	7.7 0.2	1.45 0.09	0.60 0.06	202.2 63.0	3.0 1.1	19.6 0.7	63.6 1.7

S.D. : Standard deviation.

Table 1-2b. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	PCT (%)	MPC (g/dL)	PCDW (g/dL)	MPM (pg)	PMDW (pg)	Retics ($10^3/\text{L}$)	%Retics (%)	Chf (pg)	MCV _r (fL)
0 ^{a)}	4	Mean 1.10 S.D. 0.13	20.9 0.7	7.8 0.3	1.48 0.16	0.62 0.10	239.8 70.5	3.4 1.0	19.0 0.3	62.3 1.7
5000 ^{b)}	3	Mean 1.00 S.D. 0.04	22.3 1.3	7.6 0.2	1.49 0.04	0.61 0.02	249.3 72.9	3.6 1.0	19.3 0.3	63.3 1.2

S.D. : Standard deviation.

a), b): Animals were administered twice at interval of 30 minutes.

(a; the vehicle, b; the test substance)

Table 1-3a. Hematology-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day	No. of animals examined	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	Differential leukocyte count ($10^3/\mu\text{L}$)					LUC
			L	N	M	E	B	
0	4	Mean 3.98 S.D. 0.11	3.24 0.23	0.59 0.22	0.08 0.04	0.04 0.01	0.02 0.01	0.03 0.01
1000	4	Mean 4.84 S.D. 0.70	3.83 0.70	0.83 0.08	0.09 0.03	0.05 0.03	0.01 0.01	0.04 0.03
2500	4	Mean 5.47 [*] S.D. 0.57	4.18 0.76	1.12 [*] 0.23	0.09 0.01	0.04 0.01	0.02 0.01	0.02 0.01

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from control : *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	WBC (10 ³ /μL)	Differential leukocyte count (10 ³ /μL)					
			L	N	M	E	B	LUC
0 ^{a)}	4	Mean 5.73 S.D. 0.61	4.48 0.05	1.05 0.59	0.10 0.03	0.05 0.02	0.02 0.01	0.04 0.02
5000 ^{b)}	3	Mean 5.53 S.D. 0.23	4.28 0.50	1.03 0.50	0.11 0.02	0.06 0.01	0.01 0.01	0.03 0.01

S.D. : Standard deviation.

a), b): Animals were administrated twice at interval of 30 minutes.

(a; the vehicle, b; the test substance)

Table 2-1a. Blood biochemistry-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGTP (U/L)	Creat (mg/dL)	BUN (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	Glob (g/dL)	A/G ratio	Gluc (mg/dL)
0	4	Mean 459 S.D. 145	58 9	16 1	1 1	0.30 0.06	15.5 1.4	5.78 0.25	4.38 0.22	1.40 0.12	3.15 0.31	112 19
1000	4	Mean 393 S.D. 161	56 3	15 2	0 1	0.26 0.02	14.8 1.0	5.76 0.15	4.29 0.15	1.47 0.08	2.93 0.22	114 18
2500	4	Mean 500 S.D. 144	55 3	16 1	1 1	0.28 0.01	15.5 2.7	5.98 0.14	4.51 0.15	1.47 0.05	3.09 0.17	106 21

S.D. : Standard deviation.

Table 2-1b. Blood biochemistry-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGTP (U/L)	Creat (mg/dL)	BUN (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	Glob (g/dL)	A/G ratio	Gluc (mg/dL)
0 ^{a)}	4	Mean 476 S.D. 76	62 4	18 1	0 0	0.29 0.03	8.9 3.1	5.62 0.14	4.31 0.13	1.31 0.06	3.31 0.18	117 25
5000 ^{b)}	3	Mean 588 S.D. 139	50 ** 4	18 2	1 1	0.23 0.02	8.7 2.6	5.92 * 0.14	4.62 * 0.12	1.30 0.02	3.56 0.06	121 10

S.D. : Standard deviation.

a), b): Animals were administrated twice at interval of 30 minutes.

(a; the vehicle, b; the test substance)

Significantly different from control : *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 2-2a. Blood biochemistry-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	T.Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	T.Bil (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	4	Mean 51 S.D. 6	17 3	0.07 0.01	9.7 0.3	5.5 0.5	144.5 1.4	2.88 0.08	109.6 1.7
1000	4	Mean 50 S.D. 2	19 3	0.06 * 0.01	9.8 0.1	6.1 0.6	144.7 1.0	3.04 * 0.07	109.5 1.8
2500	4	Mean 56 S.D. 9	19 5	0.05 * 0.01	10.0 0.3	6.4 * 0.5	144.7 1.0	3.02 0.21	107.9 0.7

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from control : *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 2-2b. Blood biochemistry-Group mean values in female rats after 2 weeks of treatment

Dose mg/kg/day)	No. of animals examined	T.Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	T.Bil (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0 ^{a)}	4	Mean 47 S.D. 8	25 7	0.06 0.01	10.0 0.3	6.4 0.5	144.5 1.1	3.15 0.26	107.4 2.5
5000 ^{b)}	3	Mean 61 * S.D. 5	24 3	0.07 0.02	10.3 0.1	6.4 0.4	144.5 1.7	3.26 0.12	105.7 2.5

S.D. : Standard deviation.

a), b): Animals were administrated twice at interval of 30 minutes.

(a; the vehicle, b; the test substance)

Significantly different from control : *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.