

たと言える。

E. 結論

網羅的遺伝子発現解析手法であるDNA microarray technologyによって、これまでほとんど行われてこなかった異なる栄養成分の違いを網羅的に捕らえる研究が可能となり、Nutrigenomicsという新しい栄養・食品機能解析分野が開拓しつつある。本研究では、SPI食とカゼイン食に対するnutrigenomicsを行うことにより、これらタンパク源の長期摂取(8週間)における生体への影響をglobalに観察することに成功した。

本研究の結果は、key enzymesに加えて、それら以外の酵素の遺伝子発現も大きく影響され、また、血中成分濃度を変動させることが明らかになった。

ニュートリゲノミクス解析からマグネシウム欠乏食投与により様々な代謝に関係する遺伝子の発現変動が生じ、その結果として生理生化学的変化が引き起こされていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. Nakajima, K., Asakura, T., Oike, H., Morita, Y., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport* in press.
3. Tamura, T., Terauchi, K., Kiyosaki, T., Asakura, T., Funaki, J., Matsumoto, I., Misaka, T., and Abe, K. Differential expression of wheat aspartic proteinases, WAP1 and WAP2, in germinating and maturing seeds. *J. Plant Physiol.* in press.
4. Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Terada, T., Asakura, T., Nakajima, K., Iwata, S., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity. *J. Mol. Biol.* in press.
5. Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, Y., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, A., Kitamoto, K., and Abe, K. Extracellular production of a heterodimeric protein, neoculin, with sweet-tasting and taste-modifying activities by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* in press.
6. Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. Stomach-specific calpain, nCL-2, localizes in mucus cells and proteolyzes the β -subunit of coatamer complex, β -cop. *J. Biol. Chem.* in press.
7. Terauchi, K., Asakura, T., Ueda, H., Tamura, T., Tamura, K., Matsumoto, I., Misaka, T., Hara-Nishimura, I. and Abe, K. Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAP1 and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. *J. Plant Physiol.* in press.
8. Oike, H., Matsumoto, I., and Abe, K. Group IIA phospholipase A2 is co-expressed with SNAP-25 in mature taste receptor cells of rat circumvallate papillae. *J. Comp. Neurol.* 494, 876-886 (2006).
9. Ishimaru Y., Okada S., Naito H., Yasuoka A., Matsumoto I. and Abe K. Two families of candidate taste receptors in fishes. *Mech. Dev.* 122, 1310-1321 (2005).
10. Tachibana, N., Matsumoto, I., Fukui, K., Arai, S., Kato, H., Abe, K., and Takamatsu, K. Intake of soy protein isolate alters hepatic gene expression in rats. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4253-4257 (2005).
11. Matsui, N., Ito, R., Nishimura, E., Yoshikawa, M., Kato, M., Kamei, M., Shibata, H., Matsumoto, I., Abe, K., and Hashizume, S. Ingested cocoa and prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition* 21, 594-601 (2005).
12. Tsuruoka, N., Kidokoro, A., Matsumoto, I., Abe, K., and Kiso, Y. Modulating Effect of Sesamin, a Functional Lignan in Sesame Seeds, on the Transcription Levels of Lipid- and Alcohol-Metabolizing Enzymes in Rat Liver: A DNA Microarray Study. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 179-188 (2005).
13. Nakai, Y., Hashida, H., Kadota, K., Minami, M., Shimizu, K., Matsumoto, I., Kato, H., and Abe, K. Up-regulation of Genes Related to the Ubiquitin-Proteasome System in the Brown Adipose Tissue of 24-h-fasted Rats.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 72, 139-148
(2008).

14. Fukasawa, T., Murashima, K.,
Matsumoto, I., Hosono, A., Ohara, H., Nojiri,
C., Koga, J., Kubota, H., Kanegae, M.,
Kaminogawa, S., Abe, K., and Kono, T.
Identification of marker genes for intestinal
immunomodulating effect of a
fructooligosaccharide by DNA microarray
analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 55,
3174-3179 (2007).

15. Tachibana, N., Matsumoto, I., Fukui, K.,
Arai, S., Kato, H., Abe, K., and Takamatsu,
K., Intake of soy protein isolate alters
hepatic gene expression in rats. *J. Agric.
Food Chem.* 53, 4253-4257 (2005).

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

	<i>n</i>	Diet groups			
		Casein		SPI	
		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 _b	(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

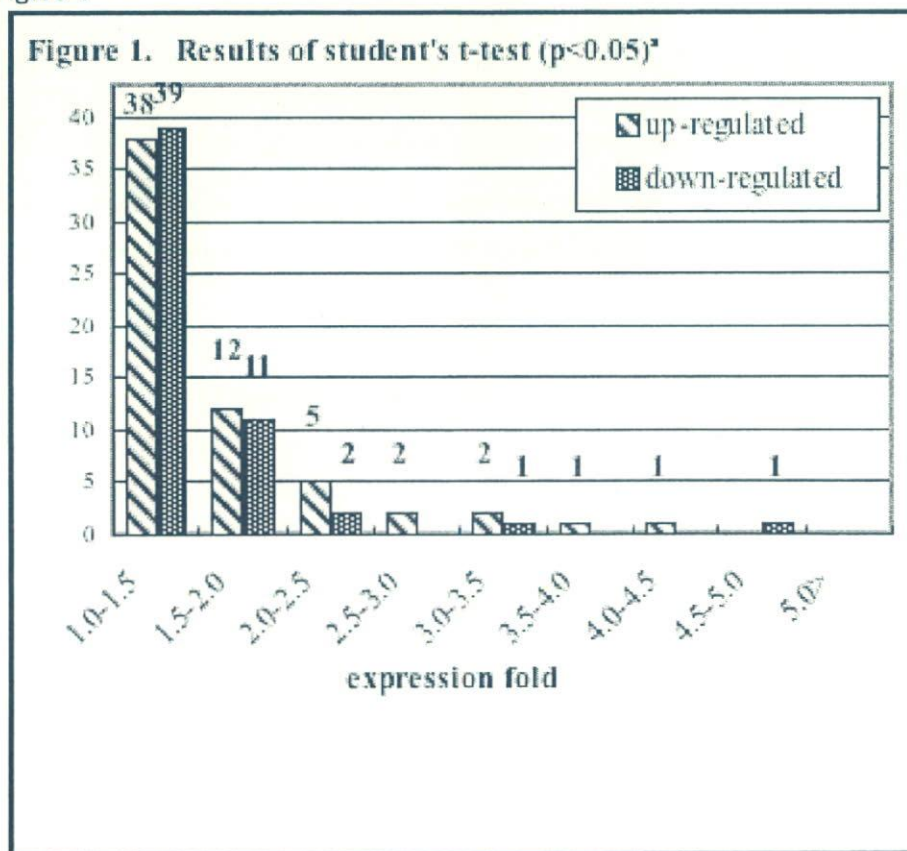


Table 4

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

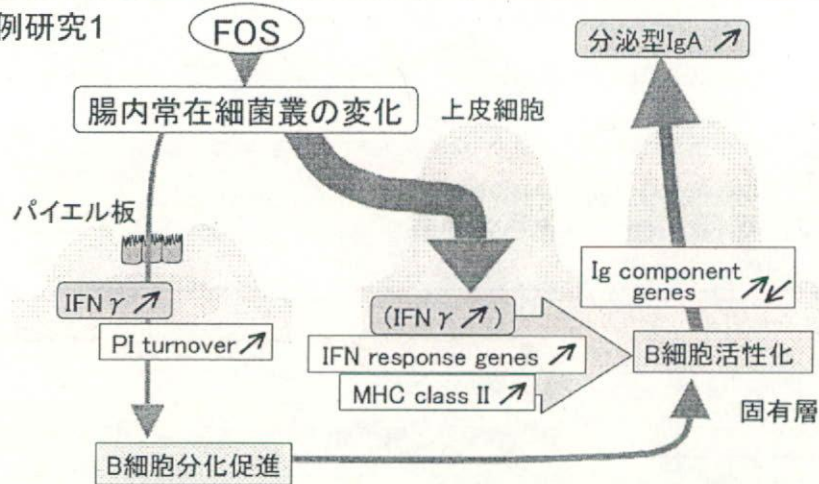
functions ^b	number of genes (over 1.5-fold)	
	up-regulated	down-regulated
amino acid metabolism	4 (1)	10 (2)
antioxidant	9 (6)	2 (0)
cell growth and/or maintenance	6 (2)	11 (3)
energy metabolism	4 (1)	7 (2)
fatty acid metabolism	0	9 (7)
immunity	3 (2)	0
signal transduction	7 (0)	6 (2*)
steroid metabolism	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.

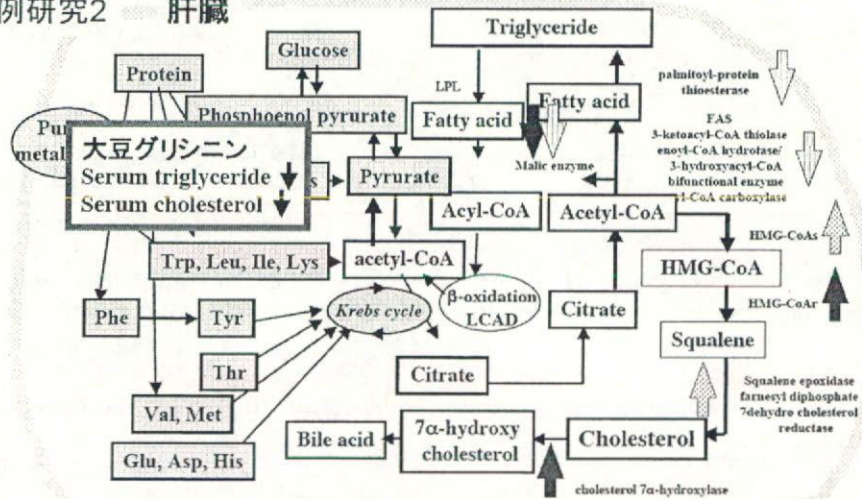
事例研究1



フラクトオリゴ糖摂取による腸内菌叢の変化と腸管免疫系が深く関与
 □→ プロ・プレバイオティクスとアレルギー

FOS摂取は腸内菌叢の変化を促し、回腸における免疫関連遺伝子の発現を制御した。プロバイオティクスとアレルギーの関連性を評価した。

事例研究2 肝臓



大豆タンパク質を摂取したラット肝臓において、脂肪酸合成、コレステロール合成、およびコレステロール異化に関わる遺伝子群がup-regulateした。この結果は大豆タンパク質による血中の中性脂肪酸・コレステロール濃度の低下を説明した。

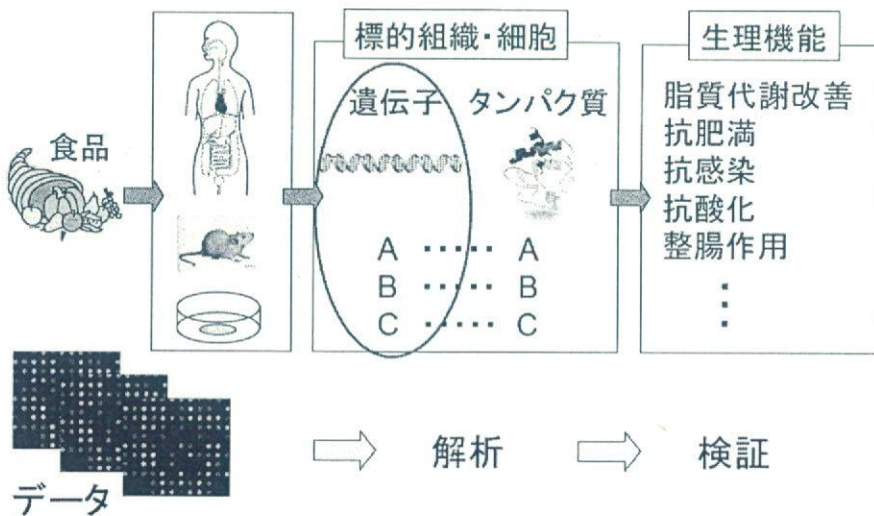
事例研究3

ラット肝臓での発現がMg欠乏食投与によって有意に変化した遺伝子の機能分類

	Up	Down	Total
糖代謝	4	7	11
脂質代謝	17	16	33
タンパク質代謝・アミノ酸代謝	4	18	22
イオン輸送	2	8	10
炎症応答・免疫応答	14	4	18
抗酸化	3	5	8
生体異物代謝・解毒	0	10	10
神経系発達・神経機能	10	11	21
細胞増殖・細胞分化	11	22	33
その他	25	39	64
EST	33	67	100
Total	123	207	330

マグネシウム欠乏食を摂取したラット肝臓では、タンパク質、糖、脂質などの栄養代謝全般に関わる遺伝子群の発現低下が見られた。ニュートリゲノミクスによるミネラルのトータルな生理機能を評価した。

特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究
研究目的: 食品に含まれる成分の機能性および安全性の評価解析



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 田邊宏樹 独立行政法人国立健康・栄養研究所

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

イチョウ葉エキスをモデル素材として取り上げ、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実施した。イチョウ葉エキスは医薬品の服用率が高い高齢者において摂取される可能性が高く、医薬品との相互作用が危惧される。本実験ではイチョウ葉エキス中の肝臓薬物代謝酵素の誘導作用にテルペノイド中のピロバライドが関与し、ギンコライドA,B,Cには誘導作用がほとんどないこと、ピロバライドによる肝臓薬物代謝酵素誘導は mRNA の発現と酵素活性の時間経過から推察して速やかに回復することを示した。この結果より、イチョウ葉エキスと医薬品との相互作用は、イチョウ葉エキスの素材中のピロバライドの含有量を明確に限定し、また製品の摂取を中断することにより回避できると考えられた。核内受容体転写因子 PPAR α と PPAR γ に対するピロバライド、ギンコライドA,B,Cのリガンド活性を検討したが、いずれも活性は検出できなかった。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。以上の研究結果から、多成分から構成される食品素材を特定保健用食品として許可するためには、少なくとも素材中で生理作用の強い成分を同定し、その体内動態を含めた生体影響を明確にし、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成分の規格基準作成が必要と考えられた。

A. 目的

いわゆる健康食品は、多成分から構成されるものが多い。そのような素材を特定保健用食品として許可するには、少なくとも素材レベルにおいて、有効性や安全性に影響を与える成分を同定し、その体内動態を明らかにしておくことが必要である。そしてその結果に基づき、素材

レベルならびに製品レベルで有効性や安全性に影響する成分の含有量を明確に規定して表示することが、製品の安全で効果的な利用につながる。

これまで多成分から構成される素材のモデルとして、人気のあるイチョウ葉エキスを取り上げ、医薬品との相互作用に焦点を当てた検討

を行ってきた。その結果、イチヨウ葉エキスは、投与量によっては肝臓の薬物代謝酵素を誘導し、経口血糖降下薬、降圧薬などと相互作用を起こす可能性を示した。昨年度はその詳細を検討し、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ヨ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、同じイチヨ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ヨ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ヨ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. イチヨ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

イチヨウ葉エキスについて種々の素材を入手し、それらの有効成分の分析を行った。イチヨウ葉エキスの有効成分としてはフラボノイド、テルペノイドがある。イチヨ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ので、酸加水分解反応を行った試料について、HPLC 分析を行った (図 1.)。その結果、主要なフラ

ボノイドであるクエルセチンに多少のばらつきが見られたが、ケンフェロールやイソラムネチンに差異はみられず、フラボノイド全体としては、あまり差異はなかった。

次に、イチョウ葉エキスのテルペノイド量を測定した(図2)。その結果、ギンコライドにはあまり差異はみられなかったが、主要なテルペノイドであるピロバライドには差異がみられ、大きなもので約2倍の差が確認された。

また、肝臓薬物代謝酵素を誘導するイチョウ葉エキス中の成分の解析を行った。種々の溶媒を用いてイチョウ葉エキスを6つのフラクションに分画し、マウスを用いた動物実験で検討し、その活性本体をピロバライドと推定した。

ウコンは、春ウコン5種類と秋ウコン11種類の計16種類について分析を行った。各種ウコン中のクルクミノイド量を測定した結果(図3)、クルクミノイド含有量が多いとされる秋ウコンにおいて、含有量の差が海外Y国と国内産で約6倍以上のものがあり、同一名称の各素材間での含有量に大きな差異が確認された。

また、春ウコン中にはミネラル分が多いとされているので、各種ウコンのミネラル含量を測定した結果(図4-1~3)、海外X国の秋ウコンのミネラル含量については同じような傾向がみられたが、国内の各素材間での差異が多くみられた。

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5)。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、ピロバライドが関与することを明確に示している。

次に、ピ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。ピロバライド投与後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6)。同時に測定した各CYPサブタイプの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7)。

2. テルペノイド類のPPRA α とPPRA 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8に示した。PPRA 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、ピロバライドは 10^{-9} M~ 10^{-5} Mの濃度で全く結合を示さなかった。ギンゴライド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、ピ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%、ピロバライド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的な名称の成分であり、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、必ずしもイチヨ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。

本研究からイチヨ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、事前にイチヨ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ヨ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 PPRA α と PPRA 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ヨ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、イチヨ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。

イチヨ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、過剰のイチヨ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。イチヨ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、健康者に 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、少なくとも健康者が規格品のイチヨ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。

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、個々の製品中のピ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。

このようなイチョ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。イチョ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).
- 3) 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.

宮市)

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

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

表1. イチョウ葉エキスサンプルの製造元と抽出方法

1	A社
2	B社
3	C社 EtOH抽出物
4	C社 Acetone抽出物
5	D社
6	E社
7	F社

表2. ウコンサンプルの製造元と産地

春ウコン1	G社	国内産
春ウコン2	H社	国内産
春ウコン3	I社	国内産
春ウコン4	J社	国内産
春ウコン5	K社	国内産
秋ウコン1	L社	国内産
秋ウコン2	H社	国内産
秋ウコン3	M社	国内産
秋ウコン4	K社	海外X国
秋ウコン5	N社	国内産
秋ウコン6	O社	海外Y国
秋ウコン7	P社	海外X国
秋ウコン8	Q社	国内産
秋ウコン9	R社	国内産
秋ウコン10	I社	国内産
秋ウコン11	J社	国内産

カラム: L-column ODS (4.6 mm ϕ \times 250 mm)
 オープン: 40°C
 移動相 A 86 mM NaH₂PO₄、11 mg/L SDS、12% CH₃CN、2% MeOH
 (pH 3.37 with H₃PO₄)
 B 30 mM NaH₂PO₄、15 mg/L SDS、60% CH₃CN、10% MeOH
 (pH 3.45 with H₃PO₄)
 0~5 min ; 0 \rightarrow 50%、5~15 min ; 50%、15~20 min ; 50 \rightarrow 100%、20~30 min ; 100%
 流速: 1.0 mL/min
 検出: 電気化学検出(0、50、100、150、200、300、400、500 mV)

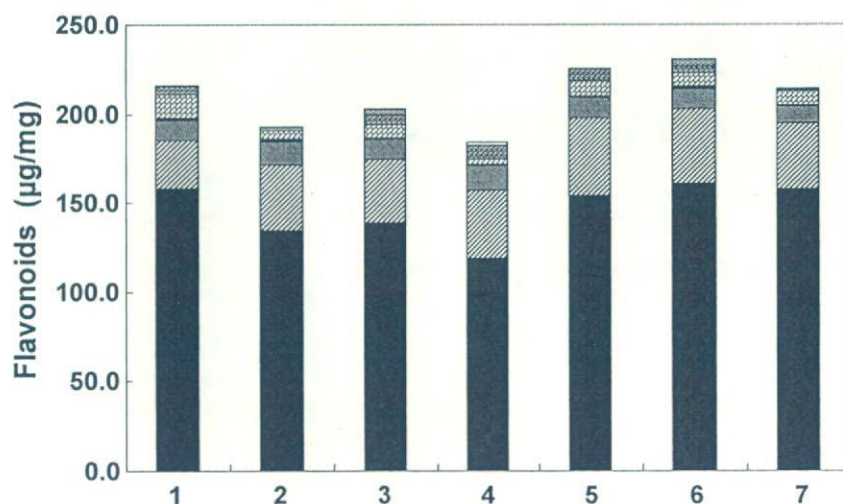


図1. イチョウ葉エキス中の各種フラボノイド測定条件と含有量
 ■: Quercetin、▨: Kaempferol、▩: Isorhamnetin、■: Luteolin、
 ▨: Myricetin、▨: Taxifolin、▩: Isorhamnetin、□: Ruin

カラム: Imtakt Cadenza CD-C18(4.6 mm φ × 250 mm)

オープン: 40°C

移動相: Bilobalide MeOH:H₂O = 25 / 75

Ginkgolides MeOH:H₂O = 40 / 60

流速: 0.8 mL/min

検出: 蒸発光散乱検出器 (40°C, 350 kPa)

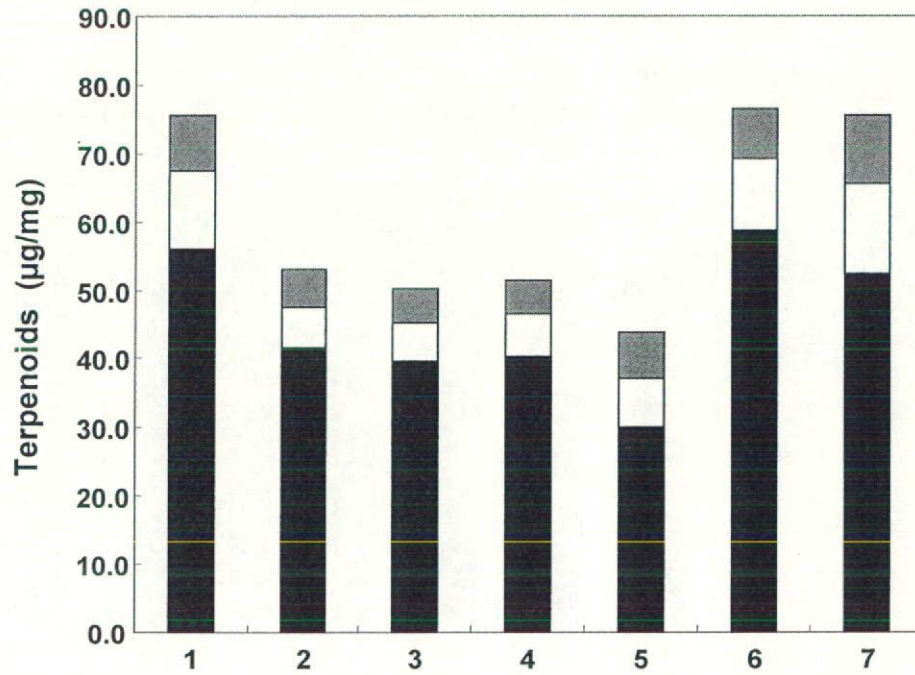
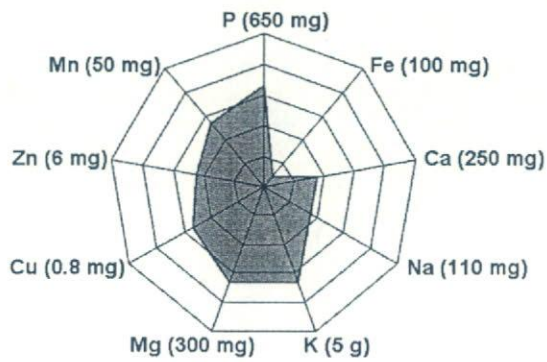
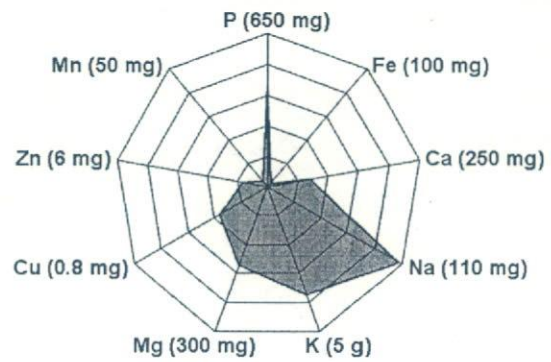


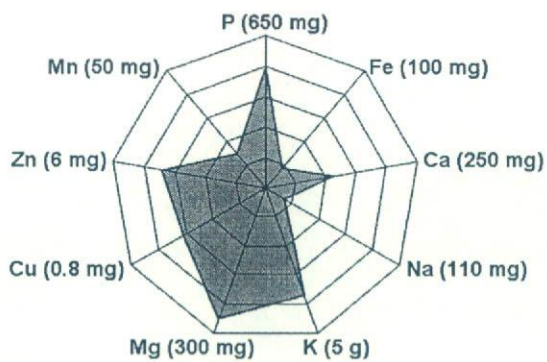
図2. イチョウ葉エキス中の各テルペノイド測定条件と含有量
■: Bilobalide、□: Ginkgolide A、■: Ginkgolide B



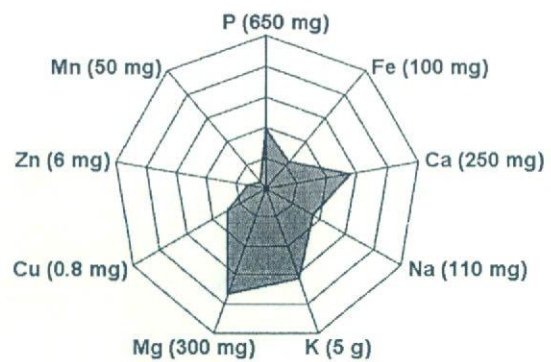
秋ウコン1



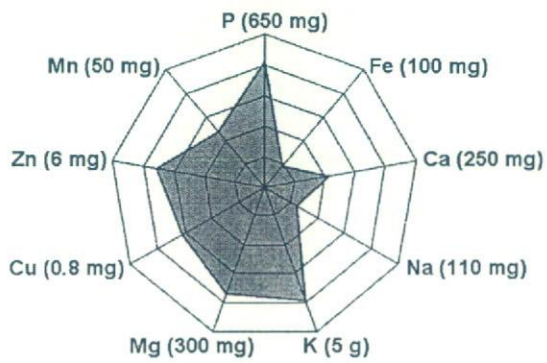
秋ウコン2



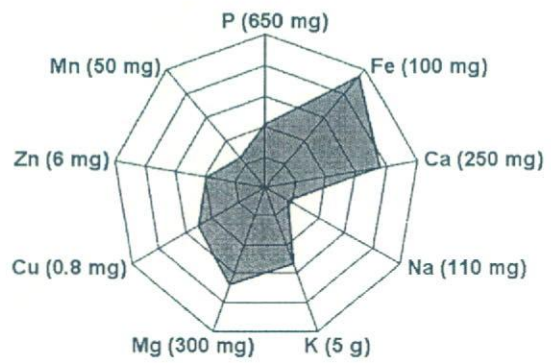
秋ウコン3



秋ウコン4



秋ウコン5



秋ウコン6

図4-2. 秋ウコン中の各ミネラル含有量

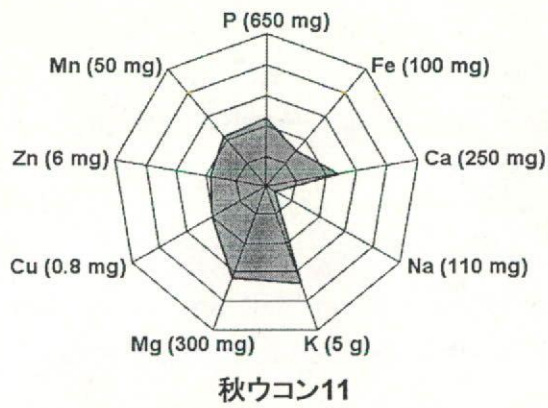
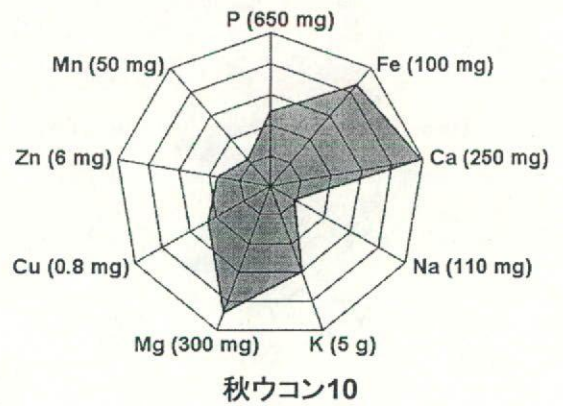
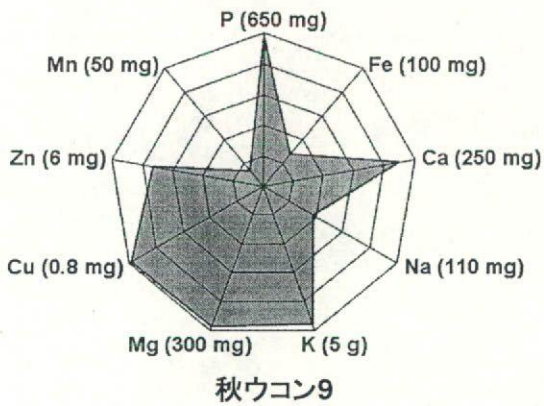
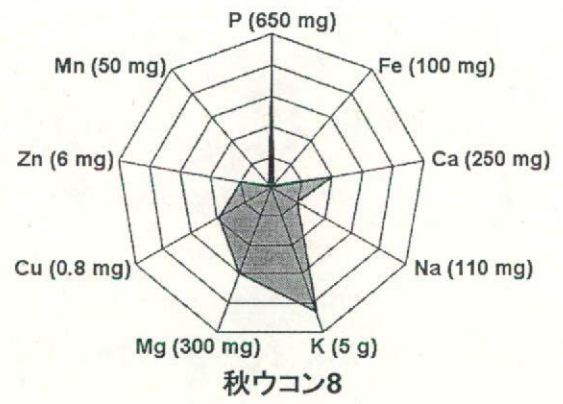
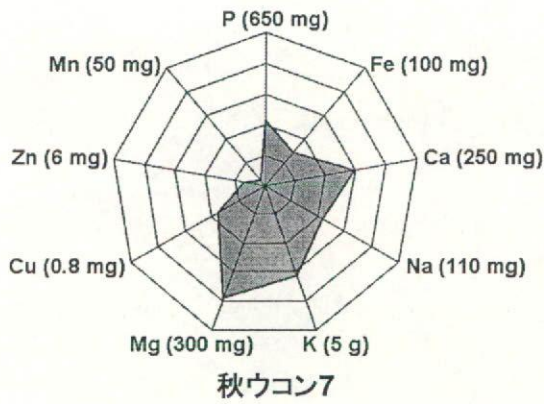
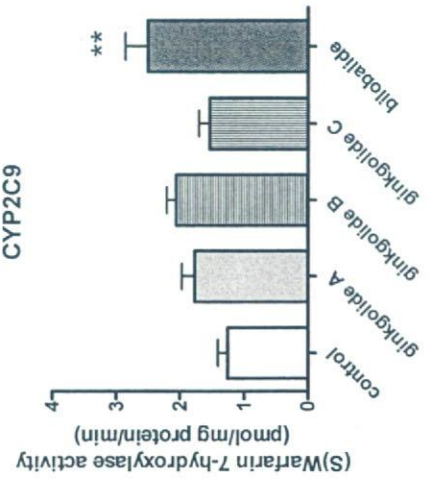
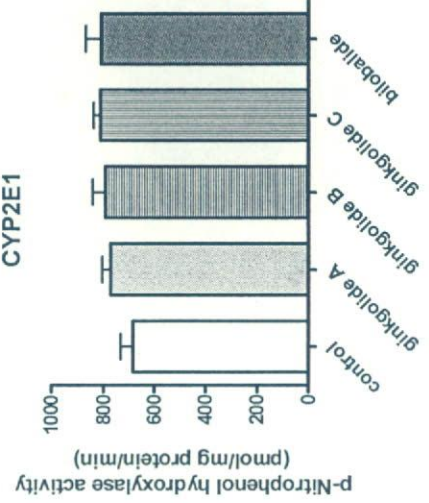
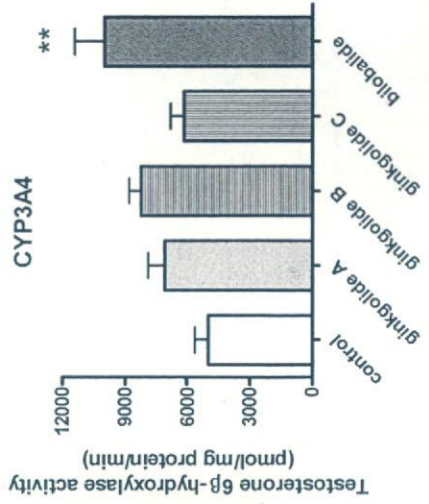
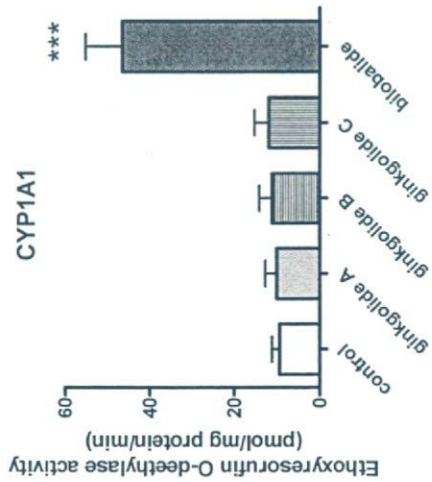
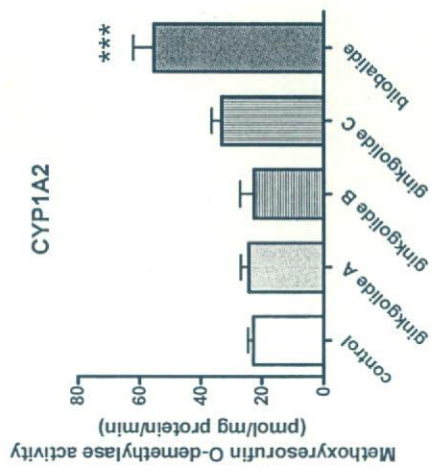
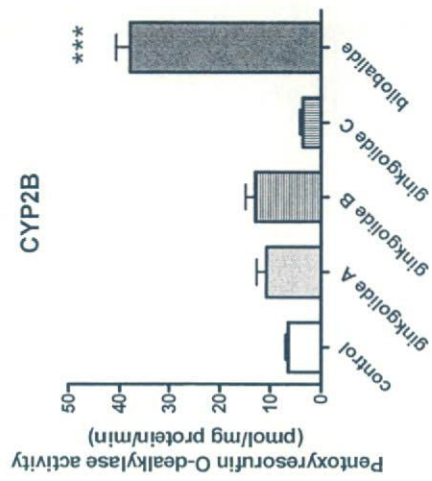
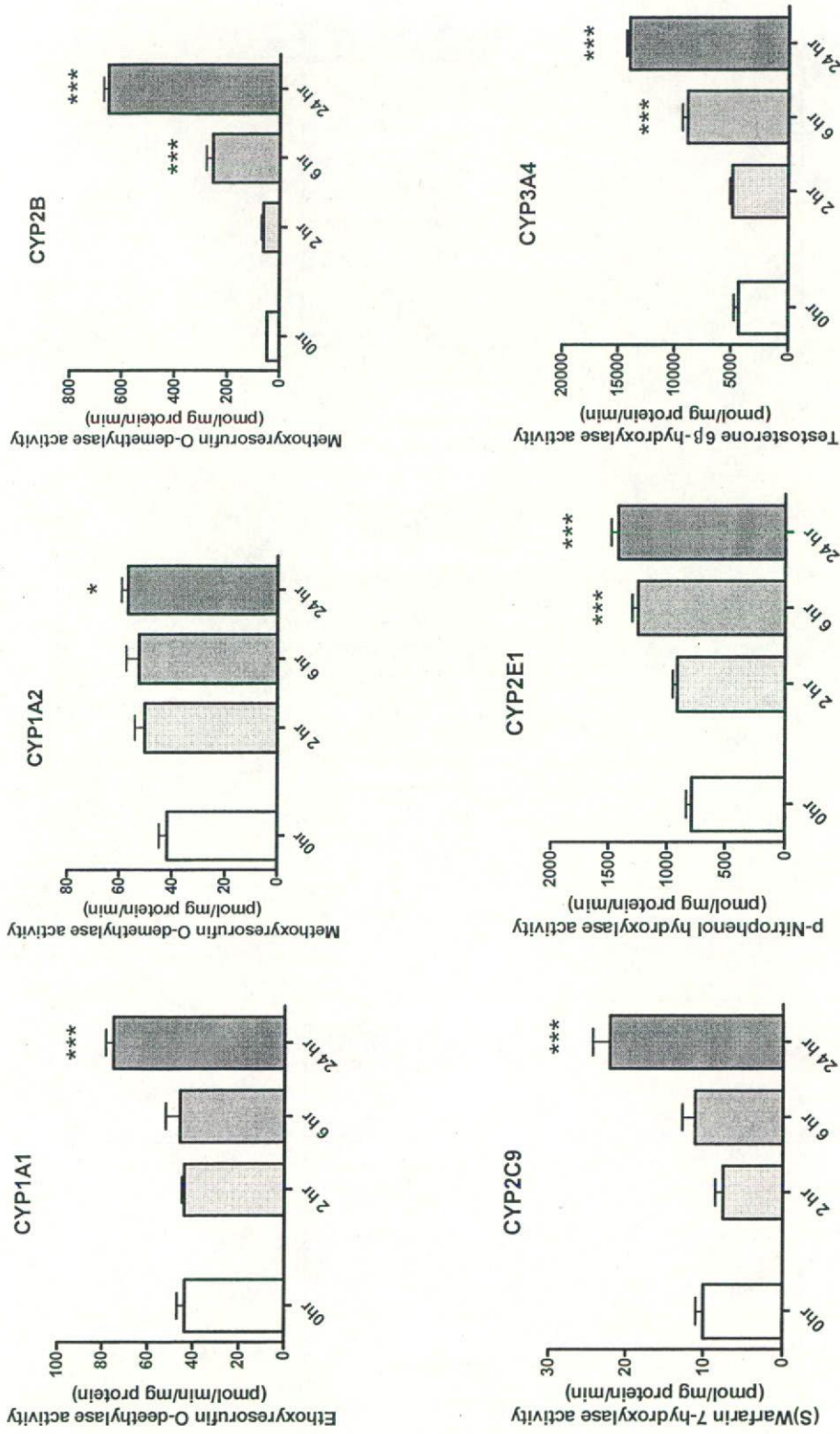


図4-3. 秋ウコン中の各ミネラル含有量



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5 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6 ビロバライド投与時のラット肝臓CYP活性の経時変化