

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究

総合研究報告書

研究代表者 近藤 位旨

令和4年5月

目 次

I. 総括研究報告

健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究
近藤 位旨（医薬基盤・健康・栄養研究所）

--- 1

II. 各年度の研究報告

1. 健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究
—健康食品データベースを用いた肝臓毒性を呈する健康食品の解析—

----- 6

2. 健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究
—マウス肝初代培養細胞を用いた安全性評価系の検討—

----- 14

3. 健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究
—HepG2細胞およびレポーターアッセイを用いた安全性評価系の検討—

----- 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 28

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総合研究報告書

健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究

研究代表者 近藤 位旨

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 食品保健機能研究部 研究員

研究要旨

【研究目的】 これまでの厚生労働科学研究（厚生労働科学研究；平成27－29年度、梅垣；平成22－24年度、永田）から、健康食品による肝臓への影響が問題として提起されている。これら研究から健康食品の肝機能並びに肝臓薬物代謝に着目した安全性評価は急務と考えられる。そこで、本研究では健康食品による肝臓への影響を、有害性情報も含めた被害情報をもとに細胞実験または動物実験から検証し、健康食品と被害情報の因果関係を科学的に解析する。本研究の最終目的は、一連の研究から健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系を開発することである。

【研究方法】 1年目：健康食品に関するデータベースから成分および肝機能および肝臓薬物代謝を含めた肝臓への影響に関する情報を抽出し、肝臓への毒性が予測される成分の解析を行った。また、データベース解析から抽出された健康食品成分について、市販の健康食品を買いあげ、対象成分が含まれているのか否かを検討した。2年目：マウス初代培養細胞を用いて毒性および肝臓薬物代謝を評価する細胞実験系の構築を試みた。3年目：HepG2細胞を用いて毒性および肝臓薬物代謝を評価する細胞実験系の構築を試みた。

【結果および考察】 1年目：健康食品に関するデータベース解析の結果、肝機能指標および肝臓薬物代謝に影響をおよぼす原因物質として18成分が抽出された。その多くはポリフェノールであり、毒物としてピロリリジンアルカロイドなども抽出された。先の成分からLCMSでの分析が可能な10成分を対象に、市販の健康食品の分析を行った結果、製品の種類に関係なく、ルチン、クロロゲン酸、ケンフェロール、ケルセチンおよびロスマリン酸が検出され、多くの各含量は1mg/g（製品粉末）以下であった。2年目：マウス初代培養肝細胞の陽性対照成分への毒性応答および薬物代謝酵素への影響を検討した結果、肝臓を採取したマウスの個体差が大きく、十分な再現性を得ることができなかった。3年目：HepG2細胞を用いて、毒性試験およびCYP3A4レポーターアッセイ系を構築し、試験成分そのものの安全性を評価する系を構築することができた。

【結論】 健康食品は表示されている機能性を謳う成分だけでなく、研究1年目の結果が示すように表示されていない多くの成分を含んでいる。現在の問題として、国内外で健康食品に関する健康被害が報告されている。この問題に対して、本研究から構築されたin vitro法は有効であると考えられる。一方、安全性評価において、毒性試験を行う前に、健康食品に含まれる成分を十分に解析することが食品の安全性を担保するためには重要である。

研究分担者

鈴木 一平

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部

研究員

東泉 裕子

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部、

室長

A. 研究目的

2018年6月に食品衛生法が改正され、「特別の注意を必要とする成分等を含む食品による健康被害情報の収集」が定められた。しかし、健康食品に関する被害情報の収集、並びにその被害事象と健康食品との因果関係の評価を含めた安全性を確保する国の仕組みは整っていない。そのため、健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発は、行政上早急に対応すべき課題であると考えられる。申請者が所属している医薬基盤・健康・栄養研究所では、健康食品の安全性確保に関する研究を行っており（厚生労働科学研究：平成27－29年度、代表 梅垣；平成30年度開始、代表 千葉）、健康食品の安全性・有効性情報データベースを中心とした情報の収集と蓄積、並びに被害情報収集体制の構築に取り組んでいる。これまでの調査・研究において、健康食品の重篤な被害事例として、肝機能指標の悪化が最も多く、それを惹起した健康食品は抽出物を含む製品が多いことが報告されている。また、永田らも、健康食品と医薬品の併用は、肝臓薬物代謝を介した医薬品の重篤な副作用を引き起こす可能性を示唆している（厚生労働科学研究：平成22－24年度）。これらのことから、肝臓機能並びに肝臓薬物代謝に着目した健康食品の安全性評価は急務と言える。そこで、本研究は、健康食品素材による肝臓への影響を有害性情報も含めた被害情報をもとに細胞

実験ならびに動物実験から健康食品と被害情報の因果関係を科学的に解析する。この研究の最終目的は、一連の研究から健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発することである。

B. 研究方法

1. 健康食品データベースを用いた肝臓毒性を呈する健康食品の解析

健康食品に関するデータベースとして現在利用可能な機能性食品便覧、「健康食品」の安全性・有効性情報データベースおよびナチュラルメディシン・データベースから肝臓機能指標および肝臓薬物代謝への影響が報告されている健康食品および健康食品中成分を抽出し、肝臓機能並びに肝臓薬物代謝に影響を及ぼす健康食品成分の解析を行った。

2. マウス初代培養肝細胞を用いた安全性評価系の検討

ddY雄性マウスを細胞源として灌流法を用いて初代培養肝細胞を調製した。毒性に関する各陽性対照成分を調製した細胞に作用させ、安全性評価系への妥当性を検討し、さらに健康食品成分の毒性応答を検討した。

3. HepG2細胞およびレポーターアッセイを用いた安全性評価系の検討

HepG2細胞を用い、毒性試験および薬物代謝酵素(CYP)3A4を対象としたレポーターアッセイ系の安全性評価系への妥当性を検討し、さらに健康食品成分の毒性応答およびCYP3A4への影響を検討した。

C. 研究結果および考察

1. 健康食品データベースを用いた肝臓毒性を呈する健康食品の解析

健康食品に関するデータベースから 1316 の健康食品および健康食品素材が抽出され、211 素材で肝臓機能

への影響が報告されていた。これら 211 素材の成分ランキング（含有成分を含む素材数から集計）から、健康食品の肝機能指標および肝臓薬物代謝に影響をおよぼす原因物質として 18 成分が選定された。また、健康食品にはカフェイン以外のアルカロイドが含まれていることが明らかとなった。買い上げを行った健康食品の成分分析の結果、カフェ酸、クロロゲン酸、ケルセチン、ロスマリン酸およびルチンが種類に関係なく検出頻度が高いことが明らかとなった。

健康食品に関するデータベースは、安全性情報が欠落していることが多く、毒性成分であるアルカロイドを含む場合があることが明らかとなった。

2. マウス初代培養肝細胞を用いた安全性評価系の検討

毒性陽性対照成分のマウス初代培養肝細胞への影響を検討した結果、細胞活性は DMSO の濃度および時間に依存した低下応答が観察された。肝臓薬物代謝酵素 3A4 活性は、DMSO、リファンピシンおよびオメプラゾールにより誘導された。一方、いずれの応答も細胞を採取したマウスの個体差が観察された。

7 種類の水溶性健康食品成分の細胞活性および薬物代謝酵素 3A4 活性への影響を検討した。その結果、細胞活性は 100 μ M クマリンでのみ低下し、他の成分では変化は観察されなかった。薬物代謝酵素 3A4 活性は、クロロゲン酸、リナロールおよびルチンでは、対照に対して約 150-260% の増加が観察された。しかし、いずれもの応答も妥当性の検証と同様に、細胞を採取したマウスの個体差が観察された。

本研究では、ddY 雄性マウスから肝初代培養細胞を調製し、安全性評価系への妥当性および健康食品成分による影響を検討したものの細胞を採取したマウスによる応答性の差異があり、本試験系は普遍性が必須である安全性評価系に相当ではないことが明らかとなった。

3. HepG2細胞およびレポーターアッセイを用いた安

全性評価系の検討

DMSO を用いて HepG2 細胞の毒性成分への応答性を検証した結果、DMSO の濃度に依存した毒性応答が認められた。健康食品成分の毒性評価条件は、試験対象成分のヒト介入試験における最大血中濃度から必須処置条件は 10 μ M が適当であると考えられた。そこで、10 μ M を含む処置条件として 0.1-10 μ M または 1-100 μ M の条件を用い、14 種類健康食品成分の毒性応答を検討した。その結果、LU(100 μ M)でのみ毒性応答が認められた。

CYP3A4 レポーターベクターを構築し、14 種類の健康食品成分の CYP3A4 への影響を検討した。ケルセチンでのみルシフェラーゼ活性の増加が認められたものの、レポーターベクターの性質からその増加は 3A4 の増加とは考えられなかった。

HepG2 を基盤とした安全性評価系を検討した結果、データベースでの解析結果を説明する結果は得られなかった。一方、HepG2 の毒性応答性、CYP3A4 レポーターアッセイの特異性の検討および本細胞の代謝能から、本試験系は被験成分そのものの肝毒性および CYP3A4 への影響を検証することが可能であると考えられ、健康食品の *in vitro* 安全性評価系として提案することが可能となった。

D. 結論

健康食品に関するデータベースから、肝臓への毒性を呈する可能性がある成分を解析し、対象成分の毒性を細胞実験から検討し、その過程をもとに安全性評価系の開発を試みた。その結果、データベースの解析結果と細胞実験は必ずしも一致する結果ではなかった。一方、HepG2 を用いた評価系は、健康食品および健康食品成分そのものの毒性を評価することが可能であると考えられた。食品成分は肝臓で代謝を受けることで構造に変化が生じる。このことから、試験対象を肝臓ミクロソーム画分で代謝した後、本試験方法に適用することで、代謝能を有していない HepG2 細胞においても生体位を模倣した評価がある。したがって、

一連の研究から健康食品の肝臓毒性に着目した安全性評価系の基盤方法を構築することが達成された。

E. 健康危険情報

本研究から、健康食品に関する健康危険情報の提供はない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kondo T, Ishimi Y, Takebayashi J, Tousen Y. Assessment of safety and efficacy of pine bark extract in normal and ovariectomized mice. *Journal of Food Science*. 85,1956-1962, 2020.5

近藤位旨、東泉裕子、石見佳子. 肝臓を介した健康被害が予測される健康食品成分に関する情報解析. *栄養学雑誌*. 79 (5)、311-319、2021.

2. 学会発表

近藤位旨、東泉裕子、健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究、第67回日本栄養改善学会学術総会、2020年9月2日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

令和元年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

研究報告書

健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究

—健康食品データベースを用いた肝臓毒性を呈する健康食品の解析—

研究代表者 近藤 位旨

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部 研究員

研究要旨

食品衛生法が改正され、「特別の注意を必要とする成分等を含む食品による健康被害情報の収集」が定められた。しかし、健康食品に関する被害情報の収集、並びにその被害事象と健康食品との因果関係の評価を含めた安全性を確保する国の仕組みは整っていない。本研究は、健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発を最終目的とし、「健康被害（肝機能指標および肝臓薬物代謝に関する）の情報収集」→「原因の科学的解明」→「情報発信」の一連の体系構築を検討する。本年度は肝機能指標および肝臓薬物代謝に影響する健康食品を調査し、肝機能指標および肝臓薬物代謝に影響する健康食品中成分として18種を選定した。また、これらの内10成分を対象に市販の健康食品の成分分析を液体クロマトグラフィ質量分析計により行い、各成分が市販品に含まれている事実を明らかにした。今後は、選定した18成分の肝臓への影響を細胞および動物実験から検討し、一連の研究から安全性評価系の開発を試みる。

研究分担者

鈴木 一平

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部

研究員

東泉 裕子

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部、

室長

対応すべき課題であると考えられる。申請者が所属している医薬基盤・健康・栄養研究所では、健康食品の安全性確保に関する研究を行っており（厚生労働科学研究：平成27－29年度、代表 梅垣；平成30年度開始、代表 千葉）、健康食品の安全性・有効性情報データベースを中心とした情報の収集と蓄積、並びに被害情報収集体制の構築に取り組んでいる。これまでの調査・研究において、健康食品の重篤な被害事例として、肝機能指標の悪化が最も多く、それを惹起した健康食品は抽出物を含む製品が多いことが報告されている。また、永田らも、健康食品と医薬品の併用は、肝臓薬物代謝を介した医薬品の重篤な副作用を引き起こす可能性を示唆している（厚生労働科学研究：平成22－24年度）。これらのことから、肝臓機能並びに肝臓薬物代謝に着目した健康食品の安全性評価は急務と言える。そこで、本研究は、健康食品素材による肝臓への影響を有害性情報も含めた被害情報をもとに細胞実験ならびに動物実験から健康食品と被害情報の因果関係を科学的に解析する。この研究の最終目的は、一連の研究から健康食品による健康被害情報を踏ま

A. 研究目的

2018年6月に食品衛生法が改正され、「特別の注意を必要とする成分等を含む食品による健康被害情報の収集」が定められた。しかし、健康食品に関する被害情報の収集、並びにその被害事象と健康食品との因果関係の評価を含めた安全性を確保する国の仕組みは整っていない。そのため、健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発は、行政上早急に

えた安全性評価系の開発することである。

B. 研究方法

本研究は健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発を目的とし、「健康被害（肝機能指標および肝臓薬物代謝に関する）の情報収集」→「原因の科学的解明」→「情報発信」の一連の体系の構築を目的としている。本年度は肝機能指標および肝臓薬物代謝に影響する健康食品を調査し、調査から試験対象とした健康食品の成分を分析し、市販の健康食品に特徴的な成分の含量を検討する。

1. 肝機能指標ならびに肝臓薬物代謝に影響する健康食品および健康食品素材のデータベース調査

健康食品に関するデータベースとして現在利用可能な機能性食品便覧、「健康食品」の安全性・有効性情報データベースおよびナチュラルメディシン・データベースから肝機能指標および肝臓薬物代謝への影響が報告されている健康食品および健康食品中成分について調査を行った。データの抽出方法は以下の通りである。

データの抽出方法

スクリーニング①

データベースから、健康食品および健康食品素材の名前（和名、英名）、含有成分および肝機能指標ならびに肝臓薬物代謝への影響の有無を抽出した。

スクリーニング②

和名および英名をもとに重複しているデータの除去を行った。

スクリーニング③

肝機能指標ならびに肝臓薬物代謝への影響に関する情報を含む健康食品および健康食品から含有成分を抽出した。なお、アルカロイドなどの毒性が明らかにされている成分は試験対象外とした。

スクリーニング④

抽出された成分を含む健康食品および健康食品素材の数をカウントし、有害成分のランク付けを行った。カウント数が3以上の成分を肝機能指標ならびに肝臓薬物代謝に影響する可能性のある化学物質とし、試験対象成分とした。健康食品に含まれる成分は様々な総称（ポリフェール、タンニンなど）があり、これらは複数の成分を指すため、試験対象とした成分は化学的に同定できるものに限定した。また、成分の試薬が非常に高価な場合、細胞および動物実験が実行不可能なため除外した。

2. 実態調査（健康食品の買い上げおよび成分分析）

試験対象18成分のいずれかを含み、単一素材から製造され、市販されていることを条件に、先のデータベース調査から抽出された健康食品および健康食品素材を買い上げ、試験対象成分の分析を行った。分析は液体クロマトグラフィー質量分析計(LCMS)を用いて、LCMSで同時分析が可能な10成分（ケルセチン、ロスマリン酸、クロロゲン酸、クマリン、ルテオリン、クルクミン、カフェ酸、ケンフェロール、ルチン、エモジン）を対象とした。

分析の方法

①成分の抽出

ポリプロピレンチューブ（15 mL容）にサンプル0.5 gをはかり取り、ここに抽出溶媒（メタノール：ジメチルスルホキシド=9:1=v:v）10 mLを加え、超音波洗浄機を用いて30分の抽出を行った後、上澄を回収し、ここに抽出溶媒を10 mL加え先と同様に抽出を行った。同様の操作を計4回行った後、回収した抽出液を50 mLに定容し、フィルター濾過後（DISMIC13HP®、東洋濾紙株式会社）、LCMS分析サンプルとした。

②標準試料

10成分（ケルセチン、ロスマリン酸、クロロゲン酸、クマリン、ルテオリン、クルクミン、カフェ酸、ケンフェロール、ルチン、エモジン）すべてを先の抽出溶媒に溶かし、各成分を1-3ug/mL含む混合溶液を調製し、これを用いた10-3000 μg/mLの希釈系列から検量線を作成した。

③LCMS分析

LCMSの分析条件は以下に示した通りである。

1. 装置

高速液体クロマトグラフ

Prominence (株島津)

質量分析計

LCMS-2020 (株島津)

カラム

InertSustain®C18、3 μm、φ 2.1x100mm
(ジューエルサイエンス(株))

2. 測定条件

移動相

A; 0.1%ギ酸、B; メタノール (0.1%ギ酸含)

流速

0.2mL/min

カラム温度

40° C

グラジエント条件

B 10% (0 min)

B 10%→100% (0→5 min)

B 100% (5→10min)

B 100%→10% (10→10.5 min)

B 10% (10.5→15 min)

インターフェイス

エレクトロスプレーイオン化

m/z

ポジティブ

クマリン (147)

ネガティブ

カフェ酸 (179)、クロロゲン酸 (353)、
クルクミン (367)、エモジン (269)、
ケンフェロール (285)、
ルテオリン (285)、ケルセチン (301)、
ロスマリン酸 (359)、ルチン (609)

C. 研究結果

1. 肝機能指標ならびに肝臓薬物代謝に影響する健康食品および健康食品素材のデータベース調査

健康食品に関するデータベース（機能的食品便覧、「健康食品」の安全性・有効性情報データベース、ナチュラルメディシン・データベース）から1316の健康食品および健康食品素材が抽出された（データ省略）。これら1316素材のうち211素材で肝機能への影響が報告されていた。これら211素材には302種類の成分が含まれていた（データ省略）。表1に示したように、これら成分のランキング（含有成分を含む素材数から集計）からカウント数が3以上であり、成分が同定可能な物を、健康食品の肝機能指標および肝臓薬物代謝に影響をおよぼす原因物質として選定した（18成分；ケルセチン、ロスマリン酸、クロロゲン酸、リナロール、クマリン、ルテオリン、クルクミン、アントラキノン、リモネン、α-ピネン、シネオール、セスキテルペン、カフェ酸、β-カロテン、ケンフェロール、ルチン、エモジン）。なお、ポリフェノール類のカウント数は総数で示しているが、個々のカウントは3以上である。表1のリストから採用されていない成分（ジンゲロールやパナキシノールなど）は必要量の購入価格が単品で総予算を上回るため除外した。

本研究では食品成分であり毒性が知られていない物を試験対象としているが、データベースの成分情報から、健康食品にアルカロイドが含まれていることが

明らかとなった。

2. 実態調査（健康食品の買い上げおよび成分分析）

買い上げを行った健康食品の成分分析の結果を表2に示した。分析の結果、ルチン、クロロゲン酸、ケンフェロール、ケルセチンおよびロスマリン酸が種類に関係なく検出頻度が高いことが明らかとなった。これら成分は、ケルセチンと同様に植物に基本的に含まれている成分である可能性が高い。一方、検出された成分の含量は0.1%(1mg/g)以下が多く、すべて成分の含量を合わせた場合でも健康食品として摂取する量は少ない。

D. 考察

1. 肝機能指標ならびに肝臓薬物代謝に影響する健康食品および健康食品素材のデータベース調査

データベースの調査から健康食品および健康食品素材は、1000種を超え、その10%以上が肝臓へ影響を及ぼすことが報告されている。しかし、データベースの情報は、基本的な安全性情報が欠落していることが多い。これに加えて、健康食品は毒性成分であるアルカロイドを含む場合があることがデータベースから明らかとなった。本研究は肝臓への毒性にのみ着目しているが、基本的な毒性（臓器重量への影響や致死量LD50など）についても検討が必要であることを示す結果であった。つまり、天然物の食品であることは安全性を担保することに繋がらない。

2. 実態調査（健康食品の買い上げおよび成分分析）

成分分析の結果、ルチン、クロロゲン酸、ケンフェロール、ケルセチンやロスマリン酸など植物の多くに含まれる成分が検出された。また、植物由来成分の多くは配糖体であるが、アグリコンであるケルセチンも検出されている。本研究ではケルセチン配糖体である

ルチンが測定対象の一つであるため、酸処理によるアグリコン化を行っていない。そのため、対象成分の配糖体はほとんどが分析で検出されない。

天然物を用いた大半の健康食品では、配糖体により分析対象が多くなるため、それらすべてを定量するためには複雑な分析システムが必要となる。また、近年では健康食品中のポリフェール類などが腸内細菌により複数の化合物へと変換されることが明らかになっている。つまり、腸内細菌による分解から生じた化合物も健康食品に由来する。したがって、嫌気培養技術を用いた消化管内変換化合物も含めた成分分析が、健康食品の安全性評価における原因解析に必要なと考えられる。

E. 結論

肝機能指標ならびに肝臓薬物代謝に影響する健康食品および健康食品素材のデータベース調査から、肝臓への影響を及ぼす可能性のある化合物として18種が選定された。そのうち10種を対象に、上市されている健康食品の成分分析を行ったところ、いずれかの成分を含んでいることが明らかとなった。今後は、選定された成分の肝臓への影響を細胞および動物実験から検討し、一連の成果から、健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系を開発する予定である。

F. 健康危険情報

本研究から、健康食品中のポリフェールなどの成分に関する危険情報は発信することはできない。これら成分については細胞および動物実験の結果を含め情報を発信していく予定である。一方、本研究はポリフェールなどの成分を対象としているが、データベースの調査から健康食品には毒性成分であるアルカロイドが含まれることが明らかとなった。このことは健康食品によっては過剰摂取により毒性を呈する可能性を示唆している。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

Table 1 Ranking list of component in health foods

Target	Count
Polyphenols tannin, flavonoid, quercetin, kaempferol, rutin, catechin, emodin, anthocyanins, rosmarinic acid, chlorogenic acid, luteolin, curcumin, anthraquinones	97
Alkaloid pyrrolizidine alkaloid, berberine, caffeine	31
Saponin triterpene, ginsenoside	20
Monoterpen limonene, pinenes, linalol	12
β -Sitosterol	10
Coumarin	9
Cineol	6
Sesquiterpene, caffeic acid, gingerol	4
Panaxynol, glucosinolates, β -carotene	3

Table 2 Component analysis in health foods

ID	Product name	Coumarin	Caffeic acid	Emodin	Luteolin	Kaempferol	Quercetin	Rosmarinic acid	Chlorogenic acid	Curcumin	Rutin
mg/g sample											
1	Alfalfa	<0.01			<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		<0.01
2	Artichoke					<0.01			21.22		
3	Artichoke extract		0.10		0.18	0.07			15.45		
4	Bitter orange					<0.01			0.11		
5	Butcher's broom						<0.01	<0.01	<0.01		<0.01
6	Butcher's broom					<0.01		<0.01	<0.01		<0.01
7	Butterbur	<0.01	0.03		0.02	0.02	0.02	<0.01	1.04		0.01
8	Cascara sagrada			0.27					0.10		3.51
9	Cordyceps								<0.01		<0.01
10	Elenthero						<0.01	0.01	0.96		<0.01
11	Eyebright herb	0.01			0.03	<0.01	0.02	0.07	1.55		0.39
12	Eyebright herb				0.03				2.65		1.30
13	Fenugreek				<0.01	<0.01			<0.01		<0.01
14	Ginko Biloba					0.36	0.41				12.86
15	Ginko Biloba						0.32				4.84
16	Goji berry extract	0.01							0.02		0.01
17	Hawthorn berries						0.04	<0.01	0.13		0.04
18	Hawthorn berry				<0.01		0.12	<0.01	0.22		0.04
19	Horse chestnut	0.05				0.20	6.55				173.79
20	Horse chestnut	<0.01					0.02	0.04	<0.01		0.03
21	Horsetail grass		0.04		<0.01	<0.01	<0.01	0.02	0.05		0.05
22	Japanese turmeric									0.82	
23	Lutein										
24	Moringa leaf					0.01	0.02	<0.01	0.81		0.15
25	Moringa						0.02		0.21		0.08
26	Neem leaf								0.01		6.18
27	Noni				<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		0.17
28	Noni						<0.01	<0.01			1.50
29	Panax ginseng							<0.01	0.03		<0.01
30	Panax ginseng							0.00	<0.01		
31	Passion flower	<0.01			0.03	<0.01					0.02
32	Passion flower	<0.01			0.01		<0.01	0.01	0.01		
33	Pure melilot	0.07			<0.01	<0.01			0.01		0.01
34	Red yeast rice					<0.01					
35	Red yeast rice					<0.01					
36	Shatavari	0.01				<0.01	<0.01		0.01		0.01
37	Shatavari	<0.01						<0.01	0.05		0.03
38	Siberian ginseng		0.01						1.73		<0.01
39	Stinging nettle root extract		0.01		<0.01	<0.01		0.07	0.09		0.01
40	Ultra cordyceps				0.01					0.00	0.01
41	Valerian root					<0.01		<0.01	0.27		<0.01
42	Valerian root		0.01					0.06	1.79		0.03
43	Yellow dock			0.96							
44	Yellow dock			0.20	<0.01	0.03	<0.01		0.01		0.01
Detect number		11/44	6/44	3/44	14/44	21/44	19/44	19/44	33/44	2/44	34/44

研究報告書

健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究

マウス肝初代培養細胞を用いた安全性評価系の検討

研究代表者 近藤 位旨

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 食品保健機能研究部 研究員

研究要旨

昨年度の情報調査から選抜された健康食品成分の肝毒性および肝臓薬物代謝酵素(CYP)への影響を細胞試験から検証を行った。灌流法を用いてマウスの肝臓初代培養細胞を調製し、肝毒性およびCYP3A4への影響を評価する条件を検討した結果、本細胞においていずれも陽性対照成分への応答が観察された。次に、この細胞を用いて、健康食品成分の肝臓への影響を検討した結果、肝臓毒性はクマリンでのみ観察され、肝臓薬物代謝酵素3A4はクロロゲン酸およびリナロールにおいて誘導されることが観察された一方、細胞の調製に用いたマウスの個体差により再現性が得られなかった。以上から、マウス由来の肝初代細胞は安全性評価系に適さない可能性が考えられる。

研究分担者

である。

鈴木 一平

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部

研究員

東泉 裕子

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部、

室長

B. 研究方法

1. マウス肝臓初代培養細胞の調製

8-14週齢のddY雄性マウスを用い、灌流法により肝初代培養細胞を調製した。すなわち、マウスをイソフルラン麻酔下で開腹後、門脈に留置針(24G)を挿管し、留置針を手術糸で門脈ごと固定した。次に、腹部大静脈を切開したのち、留置針とペリスタルティックポンプを接続し、前灌流液(PBS、0.5 mM EDTA、10 mM HEPES、pH7.2)およびコラゲナーゼ液(HBS S、コラゲナーゼ100 units/mL*)を5mL/minの条件で、3または6分間送液した。前灌流液およびコラゲナーゼ液は37°Cに加熱し、送液を行った。その後、肝臓を摘出し、William's E 培地(no phenol red, gibco) 5 mLを加えたガラスシャーレ内で細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を濾過後(70 μm mesh)、濾液の遠心分離を行い(室温、100 x g、2 min)、沈殿した細胞に先と同様の培地を20 mL加え、懸濁後、再度、同じ条件で遠心分離を行った。この洗浄操作を3回行った後、沈殿した細胞を肝臓初代培養細胞として用いた。細胞

A. 研究目的

本研究は健康食品による肝臓への影響を有害性情報も含めた情報をもとに細胞実験ならびに動物実験から検証し、健康食品と被害情報の因果関係を科学的に解析し、一連の研究から健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発することである。

本年度の研究目的は、①研究計画1年目に選抜された健康食品成分の肝臓毒性および肝臓薬物代謝への影響を科学的に検討すること、②細胞実験が安全性評価系の1つとして利用可能なのか否かを検討すること

はトリパンブルー染色後、細胞数および生細胞は血球計算盤を用いて測定した。

*コラゲナーゼタイプIV

2. 細胞の播種および試験培養

細胞は播種培地**を用いて 1.5×10^5 cells/mLに調整後、96wellコラーゲンプレート(コラーゲンTypeI)に播種し(100 μ L/well、 1.5×10^4 cells/well)、CO₂インキュベーター内(37°C、CO₂ 5%)で培養した。培養6時間後、播種培地を交換し、さらに18時間の培養を行った。次いで、細胞をPBS(pH7.4)で2回洗浄後、試験培地***を加え(100 μ L/well)、先と同様の培養条件下で24-78時間の培養を行った。なお、培地は24時間毎に交換した。

**播種培地 (CM3000, Thermo Fisher Scientific)

下記の試薬①-④を混合後、酢酸セルロースフィルター(0.2 μ m)でろ過滅菌処理を行った。②-④はPrimary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements (Gibco™、CM3000)を用いた。

- ① William's E medium (no phenol red) , 500 mL
- ② Fatal bovine serum (FBS) , 25 mL
- ③ Cocktail A, 18 mL
 - Penicillin/streptomycin, 5/18 mL
(10000 U/mL / 10000 μ g/mL)
 - Human recombinant insulin 0.5/18 mL
(4 mg/mL)
 - GlutaMAX™, 5/18 mL (200 mM/100 X)
 - HEPES, 7.5/18 mL (1 M, pH 7.4)
- ④ Dexamethasone in DMSO (100 mM) 5 μ L

***試験培地

各培地は調製後、酢酸セルロースフィルター(0.2 μ m)でろ過滅菌処理を行った。

対照培地

William's E medium (no phenol red), 0.1% DMSO

試験対象成分(カフェ酸、クマリン、クロロゲン酸、

シネオール、リナロール、ルチン、ロスマリン酸)はDMSOを溶媒とし、1-100 mMの溶液として調製し、William's E mediumに添加した。試験対象成分の培地添加後濃度は1-100 μ Mとし、DMSOは終濃度0.1%となるように調製した。陽性対照成分は、肝臓毒性はDMSO(1-4%)、薬物代謝酵素3A4はDMSO(1-4%)、リファンピシン(12.5-25 μ M)およびオメプラゾール(25-50 μ M)を設定した。

3. 分析

3. 1 細胞活性の測定

試験培養終了後、PBS(pH7.4)を用いて2回洗浄後、MTS試薬*を加え(120 μ L/well)、37°Cで4時間反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて、490 nmの吸光度を測定した。

*MTS試薬

MTS試薬は、対照培地とMTS溶液(CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega)を10:2(v/v)の比率で混合し、調製した。

3. 2 薬物代謝酵素(CYP)3A4活性の測定

試験培養終了後、PBS(pH7.4)を用いて2回洗浄後、トリプシン・EDTA試薬を加え(100 μ L/well)、37°Cで加温し、細胞の剥離を経時的に観察した。細胞はプレートから剥離したことを確認した後、FBSを含む播種培地(100 μ L/well)を加えることでトリプシンの不活化を行い、2 mLチューブに回収した。次いで、遠心分離(4°C、2000 x g、5分)を行い、沈殿した細胞に50 mMトリスバッファー(pH 7.4)を500 μ L加え、氷冷下で細胞をホモジナイズし(25000 rpm、30秒)、このホモジナイズ液をCYP3A4活性測定に供した。CYP3A4活性の測定は、P450-Glo-CYP3A4-Assay-and-Screening-SystemおよびNADPH Regeneration Systemを用い、CYP3A4特異的な基質であるLuciferin-PPXEの分解により生じるルシフェリンにルシフェラーゼを作用させ、その時に生じる発光度を測定した。この発光度は、Lowry法により測定したたんぱく質量で除し、

播種により生じる細胞数のばらつきを補正した。

4. データの表示

データは平均値または、平均値±標準偏差で示した。後述するように、再現性の観点から、本データは統計解析を行っていない。

C. 研究結果

1. マウス肝初代培養細胞の調製

マウス肝初代培養細胞の調製に用いたマウスは、体重が 48.1 ± 10.2 g、肝臓の湿重量は 3.36 ± 0.63 gであった。この肝臓を用いて得られた細胞は、肝臓1g当たりの細胞数が $1.9 \times 10^7 \pm 4.9 \times 10^6$ 、肝臓当たりの細胞数が $6.4 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^7$ 、生細胞率は $56.0 \pm 4.0\%$ であった。

2. マウス肝初代培養細胞の陽性対照成分による影響

陽性対照成分による細胞への影響を、異なる2匹のマウスから調製した細胞を用いて、陽性対照成分の濃度および処置時間の検討を行った。その結果、細胞活性はマウスA、Bいずれも対照に比べ、DMSOにより低下し、濃度および時間に依存した応答が観察された (Table 1)。リファンピシンおよびオメプラゾールでは、細胞活性の増加が観察され、オメプラゾールでは対照の7-10倍の値を示した。

肝臓薬物代謝酵素3A4活性は、マウスBでは、対照に比べ、DMSO、リファンピシンおよびオメプラゾールにより200%以上の誘導が観察された (Table 2)。この誘導は処置48時間後に高値を示すが、処置72時間後には低下した。一方、マウスAの細胞では、マウスBと同様の誘導および処置時間による影響は観察されなかった。

3. 水溶性健康食品成分の細胞活性および薬物代謝酵素3A4活性への影響

陽性対照成分への影響を検討した結果をもとに、7種類の水溶性健康食品成分は、48時間の培養条件で、細胞活性および薬物代謝酵素3A4活性への影響を検

討した。その結果、細胞活性は対照に比べ、2%DMSOおよび100 μMクマリンでのみ低下し、他の成分では変化は観察されなかった (Table 3)。一方、両者の応答は、採取した細胞で差異があり、マウスCでは活性の低下は観察されなかった。

薬物代謝酵素3A4活性は、マウスCおよびDにおいては、陽性対照成分、カフェ酸、クマリン、シネオールおよびロスマリン酸では、誘導は観察されなかった。クロロゲン酸、リナロールおよびルチンでは、対照に対して約150-260%の増加が観察された。一方、マウスEは他のマウスとは異なる結果であり、活性の誘導は観察されなかった。

D. 考察

本研究では、ddY雄性マウスから肝初代培養細胞を調製し、肝毒性およびCYP3A4への影響を検討した。本細胞試験の安全性評価系への妥当性を、陽性対照成分への応答性から検証した。その結果、肝臓を採取したマウスによりその応答性に違いがあるものの、DMSOの処置により、細胞活性の低下、つまり、毒性による細胞死が観察された。また、CYP3A4は、DMSO、リファンピシンおよびオメプラゾールにより対照の200%以上の値を示した。肝初代培養細胞を用いた研究で報告されているように、個体差による応答性の差異が観察された一方、ddY雄性マウスから肝初代培養細胞を調製した場合でも、肝毒性およびCYP3A4の誘導が観察される結果が得られ、この細胞を用いて、健康食品成分による肝臓への影響を検討した。その結果、肝毒性はクマリンでのみ観察され、CYP3A4の誘導はクロロゲン酸およびリナロールで観察された。しかし、この時、陽性対照成分による応答は観察されなかった。本研究において、リファンピシンをCYP3A4活性の陽性対照として選択したが、CYP3ファミリーへの応答性はヒトと齧歯類では異なる (PMID、22467028)。そのため、リファンピシンをCYP3A4の陽性対照成分として用いること自体が不適切であると考えられる。

マウスから肝初代培養細胞を調製する方法は、多数

報告されており、(PMID: 22105762、33111119) その手法自体は成熟している。しかし、薬物代謝酵素活性に関しては、ヒト細胞であっても個体差が大きく、応答性を示す細胞を選択することが行われている(日薬理誌、134、330-333、2009)。肝臓への影響を細胞で検討する場合、このゴールドスタンダードはヒト由来の肝細胞が用いられている。前述のとおりヒト肝細胞であっても個体差があるため、その代替手法として、ヒト肝細胞様形態を示すHepaRGが積極的に用いられている(国会図書館；永続的識別子、info:ndljp/pid/11246077)。現在、肝毒性および肝臓薬物代謝酵素への影響は、新しい手法が開発され、ヒト由来肝細胞やヒト肝臓細胞を移植したキメラマウスなどを用いた手法が検討されている。

本研究から安全性評価系は構築できなかった。一方、本研究結果、現在の研究動向および文献の再調査から、健康食品の安全性評価系には、2つの方法が考えられる。1つ目は、従来の毒性評価試験を基盤に、健康食品の肝臓への影響に焦点を当てたin vivo評価系である。2つ目は、遺伝子発現を定量的かつ簡便に評価することで、因果関係を直接的に評価することを可能とするレポーターアッセイが挙げられる。つまり、安全性評価系は、1つの方法に絞ることはできない。

したがって、健康食品の安全性評価は、ヒトの健康被害を解析することを目的とした場合、ヒト細胞を用いたレポーターアッセイから因果関係を検証し、ヒトの肝臓を有するキメラマウスを用いて、その実証を行うことが直接的な解析手法として考えられる。

E. 結論

研究計画1年目に選抜された健康食品成分の肝臓毒性および肝臓薬物代謝への影響を科学的に検討することおよび、細胞実験が安全性評価系の1つとして利用可能なのか否かを検討することを目的に、ddY雄性マウスから肝初代培養細胞を調製し、健康食品成分による肝臓への影響を検討した。しかし、本細胞実験は、安全性評価として敵うものではないと考えられる。今

後は、ヒト細胞などを用いた手法から健康食品に特化した安全性評価系の検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

本研究から、健康食品に関する健康危険情報の提供はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kondo T, Ishimi Y, Takebayashi J, Tousen Y. Assessment of safety and efficacy of pine bark extract in normal and ovariectomized mice. *Journal of Food Science*. 85,1956-1962, 2020.5

2. 学会発表

近藤位旨、東泉裕子、健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究、第67回日本栄養改善学会学術総会、2020年9月2日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

Table 1 Cell viabilities treated by positive controls

		24 hours	48 hours	72 hours
		AU (vs. each control)		
Mouse A	Control	100 ± 19	100 ± 10	100 ± 9
	1%DMSO	99 ± 13	87 ± 6	60 ± 1
	2%DMSO	82 ± 10	95 ± 7	48 ± 5
	4%DMSO	96 ± 3	59 ± 13	42 ± 12
	Rifampicin 12.5 µM	100 ± 14	121 ± 1	101 ± 9
	Rifampicin 25 µM	120 ± 10	160 ± 17	90 ± 6
	Omeprazole 25 µM	146 ± 39	154 ± 16	78 ± 1
	Omeprazole 50 µM	99 ± 9	161 ± 25	97 ± 7
Mouse B	Control	100 ± 13	100 ± 10	100 ± 4
	1%DMSO	103 ± 2	87 ± 10	65 ± 2
	2%DMSO	87 ± 4	76 ± 4	54 ± 6
	4%DMSO	73 ± 5	45 ± 2	41 ± 8
	Rifampicin 12.5 µM	97 ± 2	116 ± 10	129 ± 16
	Rifampicin 25 µM	106 ± 4	113 ± 12	148 ± 21
	Omeprazole 25 µM	101 ± 11	764 ± 585	103 ± 11
	Omeprazole 50 µM	92 ± 4	1009 ± 67	95 ± 9

Values are expressed mean ± SD ($n = 3$).

Table 2 CYP3a4 activities treated by positive controls

		24 hours	48 hours	72 hours
		AU (vs. each control)		
Mouse A	Control	100 ± 9	100 ± 17	100 ± 19
	1%DMSO	137 ± 32	64 ± 9	51 ± 27
	2%DMSO	113 ± 34	86 ± 12	118 ± 24
	4%DMSO	120 ± 63	87 ± 21	133 ± 28
	Rifampicin 12.5 µM	131 ± 32	91 ± 23	126 ± 58
	Rifampicin 25 µM	136 ± 6	90 ± 11	136 ± 30
	Omeprazole 25 µM	118 ± 38	147 ± 18	176 ± 47
	Omeprazole 50 µM	95 ± 14	187 ± 66	125 ± 32
Mouse B	Control	100 ± 60	100 ± 22	100 ± 75
	1%DMSO	84 ± 7	162 ± 34	166 ± 39
	2%DMSO	134 ± 15	211 ± 11	141 ± 37
	4%DMSO	137 ± 23	221 ± 98	172 ± 68
	Rifampicin 12.5 µM	193 ± 42	314 ± 195	168 ± 29
	Rifampicin 25 µM	84 ± 44	241 ± 63	121 ± 70
	Omeprazole 25 µM	62 ± 54	307 ± 102	164 ± 29
	Omeprazole 50 µM	73 ± 63	333 ± 111	160 ± 96

Values are expressed mean ± SD ($n = 3$).

Table 3 Cell viabilities treated by health-food ingredients

	Mouse C	Mouse D	Mouse E
	AU (vs. each control)		
C	100 ± 16	100 ± 10	100 ± 12
2%DMSO	95 ± 17	68 ± 5	59 ± 3
Rifampicin 12.5 µM	113 ± 8	90 ± 6	113 ± 5
Omeprazole 25 µM	119 ± 5	102 ± 2	102 ± 10
Caffeic Acid 1 µM	97 ± 6	89 ± 7	91 ± 12
Caffeic Acid 10 µM	110 ± 13	111 ± 12	110 ± 16
Caffeic Acid 100 µM	126 ± 7	111 ± 8	120 ± 29
Coumarin 1 µM	119 ± 4	104 ± 3	97 ± 3
Coumarin 10 µM	107 ± 6	95 ± 8	88 ± 4
Coumarin 100 µM	91 ± 7	56 ± 6	40 ± 7
Chlorogenic acid 1 µM	110 ± 7	95 ± 3	104 ± 9
Chlorogenic acid 10 µM	93 ± 8	86 ± 11	95 ± 13
Chlorogenic acid 100 µM	137 ± 6	107 ± 1	138 ± 9
Cineole 1 µM	97 ± 18	103 ± 3	105 ± 13
Cineole 10 µM	108 ± 12	109 ± 6	105 ± 7
Cineole 100 µM	111 ± 5	106 ± 7	95 ± 11
Linalool 1 µM	122 ± 7	115 ± 3	111 ± 11
Linalool 10 µM	114 ± 14	99 ± 2	108 ± 8
Linalool 100 µM	110 ± 3	99 ± 2	102 ± 5
Rutin 1 µM	103 ± 20	107 ± 19	119 ± 9
Rutin 10 µM	123 ± 4	110 ± 12	119 ± 13
Rutin 100 µM	118 ± 6	95 ± 5	109 ± 9
Rosmarinic acid 1 µM	114 ± 7	105 ± 10	108 ± 3
Rosmarinic acid 10 µM	111 ± 13	93 ± 8	103 ± 2
Rosmarinic acid 100 µM	108 ± 10	90 ± 7	98 ± 12

Values are expressed mean ± SD ($n = 3$).

Table 4 CYP3A4 activities treated by health food ingredients

	Mouse C	Mouse D	Mouse E
	AU (vs. each control)		
C	100 ± 77	100 ± 5	100 ± 10
2%DMSO	97 ± 45	105 ± 7	67 ± 25
Rifampicin 12.5 µM	106 ± 40	126 ± 55	27 ± 7
Omeprazole 25 µM	68 ± 11	109 ± 28	19 ± 10
Caffeic Acid 1 µM	102 ± 48	75 ± 52	69 ± 20
Caffeic Acid 10 µM	80 ± 29	105 ± 24	49 ± 1
Caffeic Acid 100 µM	82 ± 33	74 ± 27	63 ± 23
Coumarin 1 µM	165 ± 55	65 ± 17	77 ± 6
Coumarin 10 µM	97 ± 12	145 ± 22	63 ± 8
Coumarin 100 µM	102 ± 50	147 ± 19	63 ± 10
Chlorogenic acid 1 µM	152 ± 57	146 ± 15	7 ± 2
Chlorogenic acid 10 µM	143 ± 47	225 ± 34	43 ± 28
Chlorogenic acid 100 µM	164 ± 62	192 ± 35	89 ± 20
Cineole 1 µM	53 ± 16	105 ± 6	104 ± 44
Cineole 10 µM	140 ± 51	145 ± 42	44 ± 14
Cineole 100 µM	133 ± 29	138 ± 30	90 ± 9
Linalool 1 µM	204 ± 40	218 ± 73	83 ± 24
Linalool 10 µM	262 ± 120	214 ± 26	129 ± 12
Linalool 100 µM	255 ± 45	178 ± 59	98 ± 12
Rutin 1 µM	139 ± 76	140 ± 81	70 ± 27
Rutin 10 µM	172 ± 48	110 ± 9	74 ± 17
Rutin 100 µM	213 ± 43	118 ± 9	137 ± 12
Rosmarinic acid 1 µM	110 ± 22	184 ± 53	28 ± 13
Rosmarinic acid 10 µM	73 ± 34	130 ± 33	57 ± 10
Rosmarinic acid 100 µM	105 ± 14	118 ± 43	52 ± 20

Values are expressed mean ± SD (*n* = 3).

研究報告書

健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究

-HepG2細胞およびレポーターアッセイを用いた安全性評価系の検討-

研究代表者 近藤 位旨

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 食品保健機能研究部 研究員

研究要旨

これまでの研究から、マウス初代培養肝細胞は再現性の問題から安全性評価系として適当ではなく、*in vitro*の安全性評価系を開発することができなかった。そこで、*in vitro*研究において汎用されているHepG2細胞を用いて、ヒトでの現象を評価する安全性評価系の検討を試みた。この研究では、HepG2を用いて、先の研究で選抜された健康食品成分の毒性を検討し、さらには薬物代謝酵素（CYP3A4）を対象としたレポーターアッセイを既存の報告から再構築し、CYP3A4への影響を評価した。その結果、試験対象14成分のうちルテオリンでのみ毒性が認められた。一方、対象成分はCYP3A4レポーターアッセイでは影響は認められなかった。HepG2は生体位で呈する代謝能を失っていることから、今回得られた結果は、対象成分そのものの作用を反映していると考えられる。つまり、本報告の方法は食品成分そのものの毒性およびCYP3A4への影響を評価することを可能とする。

研究分担者

鈴木 一平

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部

研究員

東泉 裕子

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部、

室長

A. 研究目的

本研究は健康食品による肝臓への影響を有害性情報も含めた情報をもとに細胞実験または動物実験から検証し、健康食品と被害情報の因果関係を科学的に解析し、一連の研究から健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発することである。

本年度の研究目的は、ヒト肝細胞として汎用されているHepG2を用いて、健康食品成分の毒性および薬物代謝酵素3A4への影響を評価する系を構築することである。

B. 研究方法

1. 試薬類

アントラキノン (A)、カフェ酸 (CA)、シネオール (CN)、リモネン (LM)、リナロール (LN)、ルテオリン (LU)、 α -ピネン (P)およびルチン (RU)は東京化成工業(株)から、 β -カロテン (BC)およびクマリン (CM)は富士フィルム和光(株)から、クロロゲン酸 (CH)はナカライテスクから、ケンフェロール (K)およびロスマリン酸 (RO)はCombi-Blocksから、ケルセチン (Q)はAlfa aesarから、カルバマゼピン (Carb)、デキサメタゾン (Dex)およびリファンピシン (Rif)はSigma-Aldrichから、ケトコナゾール (Ket)はLKT Laboratoriesから入手した。

2. 細胞培養

HepG2はJCRB細胞バンク(大阪)から供与された細胞を用いた。細胞培養は培養用培地 (Dulbecco's modified eagle medium with phenol red (DMEM)、ウシ胎

児血清10%添加)を用い、5%CO₂、37°Cの条件で行った。試験対象成分はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶かした後、DMEMに添加した。なお、DMSO (0.1%または0.5%)を添加した培地を対照とした。

3. 細胞毒性

HepG2を96wellプレートに6 × 10⁴ cells/0.1 mLの濃度で播種し、1日培養後、試験培地で1-3日間の培養を行った。培養終了後、培地は遠心分離後(室温、5,000 x g、5分間)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性の測定に供与した。LDH活性の測定には、LDH-Cytotoxic test (和光純薬)を用いた。培地採取後、PBS(pH7.4)で2回の洗浄後、MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay kit (Promega)を用い、細胞増殖活性の測定を行った。

4. レポーターベクターの調製

CYP3A4レポーターベクターにはNanoLuc® reporter vector (pNL1.1)およびfirefly luciferase vector (pGL4.54, TK)を用いた。CYP3A4レポーターベクターは、pNL1.1にCYP3A4 5'上流領域(NCBI Reference Sequence: NG_054901.1)を外挿することで調製した。各レポーターベクターは、pCYP3A4-0.5k、pCYP3A4-1.0k、pCYP3A4-2.0k、pCYP3A4-7.8kおよびpCYP3A4-0.4k-7.8kと名付け、外挿した各インサート領域(CYP3A4 5'上流領域)は-500 to +27 bp、-1000 to +27 bp、-2000 to +27 bp、-7822 to -7186 bp、and -400 to +27 bpおよび-7822 bp to -7186 bpである。なお、-500 to +27 bp、-1000 to +27 bp、-2000 to +27 bpはCYP3A4の近位プロモーター領域(CYP3A4PP)を-7822 to -7186 bpは異物応答領域(XREM)を含んでいる^{1,2)}。

pCYP3A4-0.5k、pCYP3A4-1.0k、pCYP3A4-2.0kおよびpCYP3A4-7.8kは以下の通り調製した。インサート領域はヒトゲノムテンプレートを鋳型に、対応するプライマーを用いて増幅した(500 to +27 bp、プライマー①、④; -1000 to +27 bp、プライマー②、④; -2

000 to +27 bp、プライマー③、④; -7822 to -7186 bp、プライマー⑤、⑥)。プライマーの配列は表1に示した。増幅したDNAフラグメントおよびpNL1.1は制限酵素(Kpn I、HindIII)により切断した後、DNAリガーゼで結合した。

pCYP3A4-0.4k-7.8kは先と同様にインサート領域を調製し(-1000 to +27 bp、プライマー②と④; -7822 to -7186 bpプライマー⑤と⑦)、インサート領域およびpNL1.1を制限酵素(Bgl II)で切断した。これらを先と同様にDNAリガーゼで結合した。

調製した各CYP3A4レポーターベクターはDH5αコンピテントセルを用いて増幅し、NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Takara)で精製した後、レポーターアッセイに供与した。

5. レポーターアッセイ

レポーターアッセイは以下の通りに行った。HepG2を24wellプレートに1 × 10⁵ cells/0.5 mLの濃度で播種し、1日培養後、TransIT®-LT1 reagent (Mirus)を用い、CYP3A4レポーターベクター15 ngおよびコントロールベクター(pGL4.54)250 ngを細胞にトランスフェクションした。次いで、試験培地を用いて2日間の培養を行った。培養終了後、細胞はpassive lyses solution (Promega)に溶解し、遠心上清(4°C、12,000 x g、1分間)をルシフェラーゼ活性の測定に供与した。NanoLucルシフェラーゼ活性(CYP3A4レポーターベクター)およびホタルルシフェラーゼ活性(pGL4.54)はNano-Glo Dual-Luciferase reporter assay system (Promega)を用いて測定した。NanoLucルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼ活性で除すことで、トランスフェクション効率の補正を行った。

レポーターベクターの妥当性はCYP3A4誘導薬(Carb、Dexamethasone、Rif)および阻害薬(Ket)への応答性から検証した。レポーターベクターの妥当性検証結果をもとに、pCYP3A4-0.4k-7.8kを用いて、試験対象のCYP3A4への影響を検討した。

6. 統計解析

データは平均±標準偏差で示した。データの解析は、non-paired t-test (vs. control)、Dunnnett's test (等分散データ)またはSteel's test (不等分散データ)から行った。

C. 研究結果

1. 健康食品成分の細胞毒性

DMSOを用いてHepG2細胞の毒性成分への応答性を検証した結果 (図1、A、B)、LDH活性は1%以上のDMSO処理によって増加した。一方、細胞増殖活性は4% DMSO処理でのみ低下した。

健康食品成分の毒性評価条件に関しては、ケルセチンなどの試験対象成分のヒト介入試験における最大血中濃度は0.1 μM から5 μM 程度であることから、ヒトを想定した必須処置条件は10 μM が適当であると考えられる³⁾。そこで、試験対象の培地への可溶性を踏まえ、毒性試験における健康食品成分の処置条件は10 μM を含む処置条件として0.1-10 μM 、可溶性が高い物は1-100 μM を用いた。健康食品成分の毒性を検討した結果 (図2、A、B)、LDH活性は毒性対照 (2%DMSO)およびLU(100 μM)の処置により増加し、A (1、10 μM)、CA (1、10、100 μM)、CN (1、10、100 μM)、CM (10、100 μM)、K (0.1 μM)、LN (1、10 μM)、P (1、10、100 μM)、Q (1、10、100 μM)、RU (10、100 μM) および RO (10、100 μM)の処置により低下した。細胞増殖活性はLU (100 μM)の処置により低下し、A (0.1、1、10 μM)、BC (0.1、1、10 μM)、CA (1、10、100 μM)、CH (1、10 μM)、CN (10、100 μM)、CM (1、10 μM)、K (0.1、1 μM)、LM (1、10 μM)、LN (1、10、100 μM)、LU (1、10 μM)、Q (10、100 μM)、RU (1、10、100 μM) and RO (10、100 μM)の処置により増加した。

2. CYP3A4レポーターベクターの妥当性検証

CYP3A4PP領域を含むレポーターベクター (pCYP3A4-0.5k、pCYP3A4-1.0k、pCYP3A4-2.0k)はCYP3A4誘

導薬であるRifの処置による影響はなかった (図3、A)。次に、異なるCYP3A4 5'上流領域を含むレポーターベクターにRifを作用させたところ、pCYP3A4-0.4k-7.8kおよびpCYP3A4-7.8kはRifの処置によりルシフェラーゼ活性が増加し、その増加はpCYP3A4-7.8kよりもpCYP3A4-0.4k-7.8kで強かった (図3、B)。さらに、pCYP3A4-0.4k-7.8kのCYP3A4誘導薬および阻害薬への応答性を詳細に検討した結果、Carb、Dex、RifおよびKetは濃度依存的にルシフェラーゼ活性を増加させた (図3、C)。

3. 健康食品成分のCY3A4への影響

pCYP3A4-0.4k-7.8kを用いて、健康食品成分のCYP3A4への影響をレポーターアッセイにより検討した。10 μM の濃度では、いずれもルシフェラーゼ活性に影響を与えなかった (図4、A)。そこで、処置濃度を可能な範囲で高め、CYP3A4への影響を検討したところ、Qでのみルシフェラーゼ活性が増加した (図4、B)。A、BCおよびKは可溶性が低いため、溶媒であるDMSOの細胞毒性が生じない0.5%に変更することで処置濃度を高め、50 μM 条件で試験を行ったもののルシフェラーゼ活性に影響はなかった (図4、C)。また、Rifの応答性は0.1%DMSOでの処置と同等であり、DMSOの濃度による影響は認められなかった。

D. 考察

HepG2は、細胞毒性が知られているDMSOによる処理から検討した結果のとおり毒性応答を示した。本細胞を用いて健康食品成分の毒性を検討したところ、ルテオリンでのみ毒性が観察された。しかし、この原因は不明である。昨年度のマウスの初代培養肝細胞では、肝毒性が知られているクマリンにおいて毒性応答が観察されていたものの、HepG2では毒性は観察されなかった。また、Takadaらの報告をもとにCYP3A4レポーターベクターを調製し、健康食品成分の影響を検討した結果、いずれの成分でもルシフェラーゼ活性の増加は観察されなかった⁴⁾。

レポーターアッセイの妥当性の検証結果が示すように、CYP3A4はCYP3A4PP領域だけでは誘導されず、XREM領域を含む場合にのみ、CYP3A4誘導薬によるルシフェラーゼ活性の増加が認められる。XREM領域にはCYP3A4の発現に関与するヒトプレグネンX受容体 (hPXR)の遺伝子領域が含まれており、これら両遺伝子発現の増加がCYP3A4の増加を決定すると考えられる。XREM領域のみでもCYP3A4誘導薬に応答性を示すものの、その応答性はRifの濃度に依存しない (データ省略)。CYP3A4の阻害薬であるKetはCYP3A4の遺伝子発現を増加させることが報告されており、レポーターアッセイは遺伝子発現を反映しているため、Ketでもルシフェラーゼ活性が増加したと考えられる。XREMのみを含むレポーターベクターの応答は対照の2倍であり、CarbおよびKetは2倍以下であることから、CarbおよびKetは異物として認識されるもののCYP3A4PP領域には影響せず、ルシフェラーゼ活性を増加させたと考えられる。一方、pCYP3A4-0.4k-7.8kは、Rif以外のCYP3A4誘導薬においてもルシフェラーゼ活性が増加することからCYP3A4特異的なレポーターベクターであると考えられる。

HepG2は初代培養肝細胞とは異なり、肝臓での代謝能を失活している。そのため、HepG2では細胞内に取り込まれた試験対象は変化せず細胞内に存在する。昨年の初代培養細胞の試験結果、本研究での毒性応答を比較すると、HepG2での毒性試験は試験対象成分そのものの毒性の有無を意味すると考えられる。これはレポーターアッセイについても同様である。以上から、本報告で示した試験系は試験対象成分そのものの肝毒性およびCYP3A4への影響を検証することが可能であると考えられる。また、肝臓での代謝は細胞内のCYP類によって行われるため、生体位での代謝を踏まえた試験を行うには、試験対象成分にヒトミクロソーム画分を肝臓代謝酵素源として作用させた後に本試験方法の処置成分として用いることで、肝臓代謝を考慮した*in vitro*の毒性評価が可能であると考えられる。ただし、試験対象成分の代謝物に関しては変

化体の同定が必要になる。

E. 結論

HepG2を基盤とした健康食品成分における肝臓毒性試験およびレポーターアッセイを用いたCYP3A4への影響を評価する系の構築を試みた。その結果、本報告で示した方法は試験対象成分そのものの毒性およびCYP3A4への影響を評価することが可能であり、安全性評価系の1つとして適応可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

本研究から、健康食品に関する健康危険情報の提供はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

近藤位旨, 東泉裕子, 石見佳子. 肝臓を介した健康被害が予測される健康食品成分に関する情報解析. 栄養学雑誌. 79 (5), 311-319, 2021.

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

参考文献

- 1) Hashimoto H *et. al.*, Gene structure of CYP 3A4, an adult-specific form of cytochrome P 450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur J Biochem.* 218 (2), 585-595, 1993.
- 2) Goodwin B *et. al.*, The orphan human preg

nane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol.* 56 (6), 1329-1339, 1999

- 3) Dabeek MD and Marra MV. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. *Nutrients.* 11 (10), p1-19, 2019
- 4) Takada T, *et. al.*, Differences in transcription between rat CYP3A4 and human CYP3A4 genes by human pregnane X receptor. *Drug Metab Pharmacokin.* 19 (2), 103-113, 2004.

表1 プライマー一覧

Primer no.	Primer name	Primer sequence 5' to 3'
①	5'-500-Kpn1	TTTTggtaccAAATGGTTACATCTGTGTGA
②	5'-1000-Kpn1	TTTTggtaccCCAGACATGCAGTATTCCA
③	5'-2000-Kpn1	TTTTggtaccTCACTGAGCCTCAGTTTCTA
④	3'-27-Hind3	TTTT aagctt TCTTTGCTGGGCTATGTGCA
⑤	5'-7822-Kpn1	TTTTggtaccTCTAGAGAGATGGTTCATTC
⑥	3'-7186-Hind3	TTTTaagcttGAATGATATCGTCAACAGG
⑦	3'-7186-Bgl2	TTTTagatctGAATGATATCGTCAACAGG

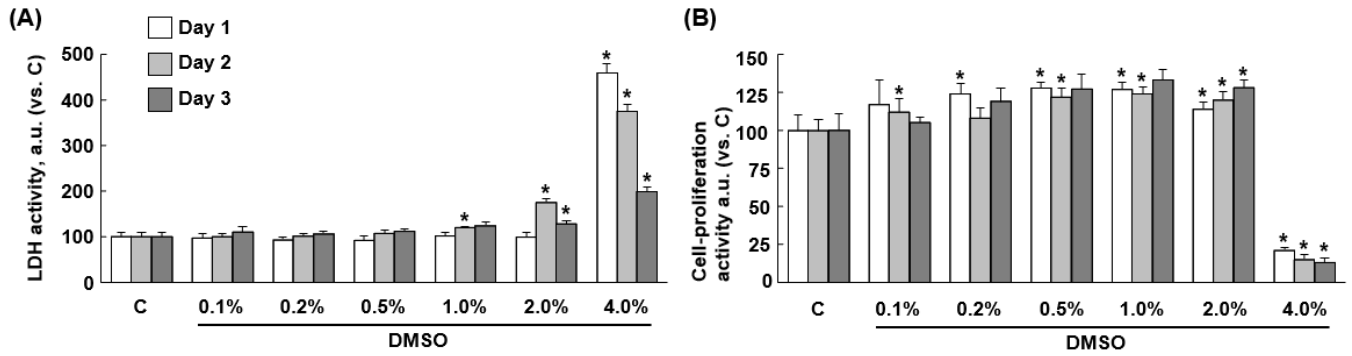


図1 HepG2のDMSOによるLDH活性および細胞増殖活性への影響

HepG2 cells were treated with control without DMSO (C) and 0.1 to 4.0 % DMSO for 1 to 3 days without medium change. Data are expressed as the means \pm standard deviations ($n = 3$). Data were analyzed by one-way analysis of variance. Differences between the control group and each of the treatment groups on each day were analyzed by Dunnett's test (parametric data). *Statistical significance was set at $p < 0.05$ (vs. c).

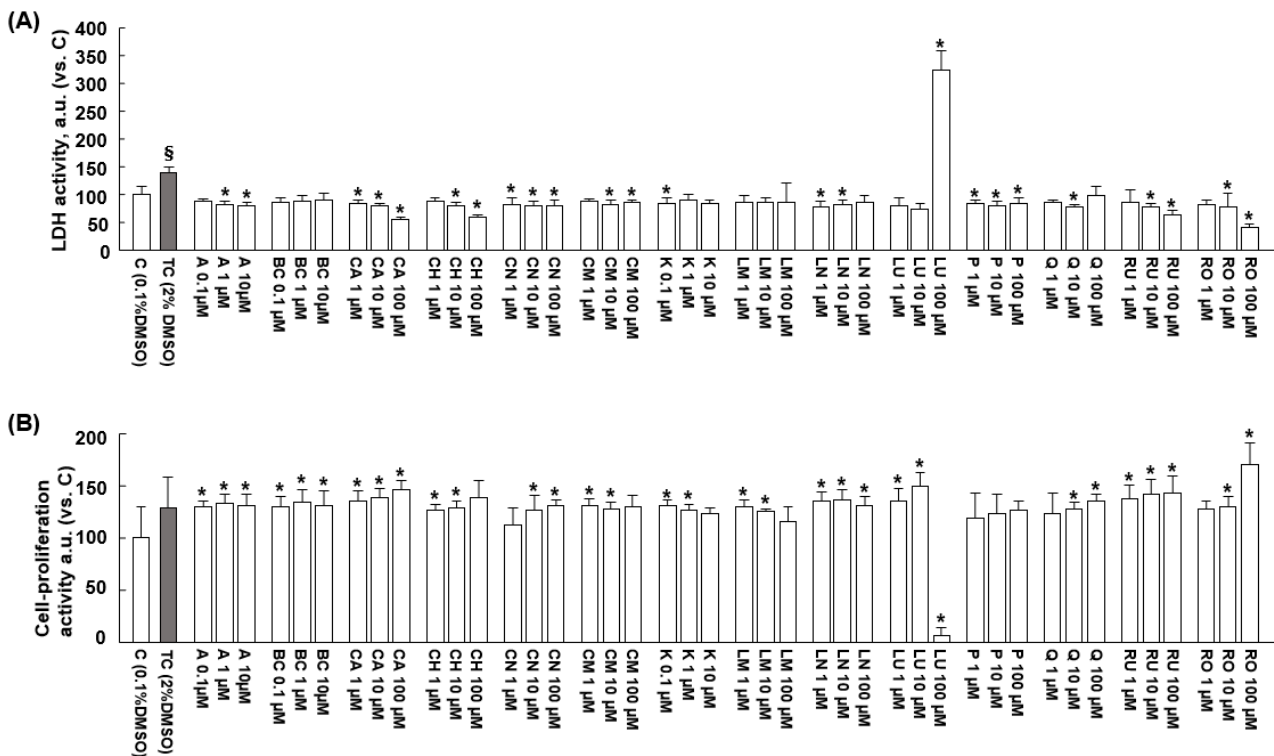


図2 健康食品成分のLDH活性および細胞増殖活性に及ぼす影響

HepG2 cells were treated with control (C, 0.1%DMSO), toxic control (TC, 2%DMSO), 0.1 to 10 μ M Anthraquinone (A), 0.1 to 10 μ M β -caroten (BC), 1 to 100 μ M caffeic acid (CA), 1 to 100 μ M Chlorogenic acid (CH), 1 to 100 μ M cineole (CN), 1 to 100 μ M coumarin (CM), 0.1 to 10 μ M kaempferol (K), 1 to 100 μ M limonene (LM), 1 to 100 μ M linalool (LN), 1 to 100 μ M luteolin (LU), 1 to 100 μ M α -pinene (P), 1 to 100 μ M Quercetin (Q), 1 to 100 μ M rutin (RU) and 1 to 100 μ M rosmarinic acid (RO) for 2 days.

Data are expressed as the means \pm standard deviations ($n = 3$). Data were analyzed by non-paired t-test between control and TC, or by one-way analysis of variance. Differences between the control group and each of the treatment groups were analyzed by Dunnett's test (parametric data) or Steel's test (non-parametric data) in multiple comparison. §, * Statistical significance was set at $p < 0.05$ (vs. c).

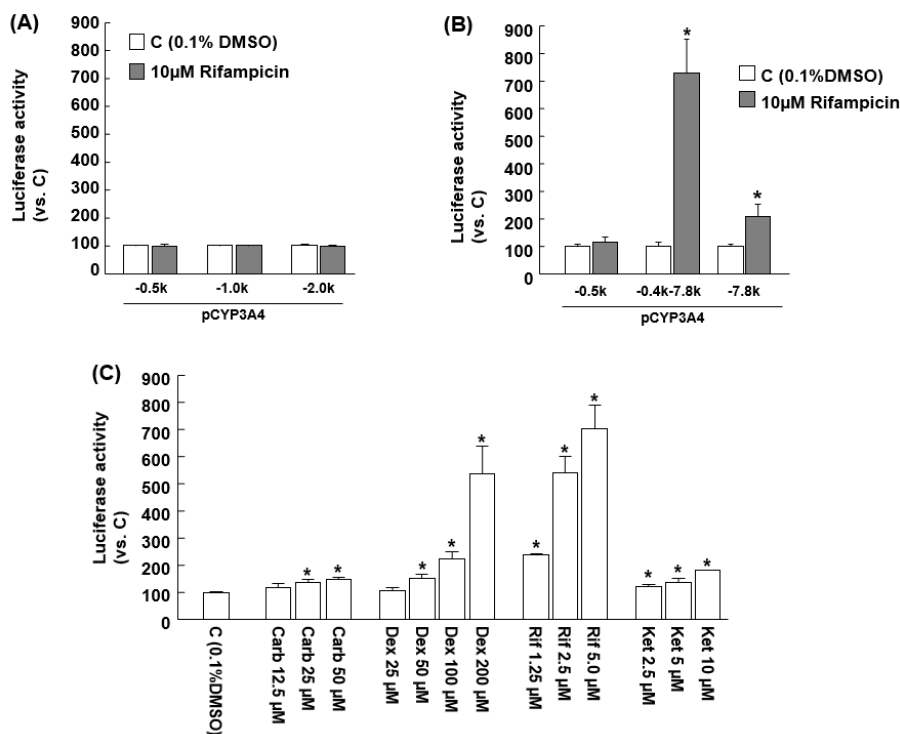


図3 (A) CYP3A4PP領域を含むレポーターベクターのリファンピシンへの応答性(B) CYP3A4PP、XREMおよび両遺伝子領域の組み合わせにおけるリファンピシンへの応答性(C) pCYP3A4-0.4k-7.8kのCYP3A4誘導薬および阻害薬への応答性

HepG2 cells were transfected each vector and treated with control (C, 0.1%DMSO), 12.5 to 50 μM carbamazepine (Carb), 25 to 100 μM dexamethasone (Dex), 1.25 to 10 μM rifampicin (Rif) and 2.5 to 10 μM ketoconazole (Ket) for 2 days. Data are expressed as the means ± standard deviations (n = 3). Data were analyzed by non-paired t-test, or by one-way analysis of variance. Differences between the control group and each of the treatment groups were analyzed by Dunnett's test (parametric data) §. * Statistical significance was set at p < 0.05 (vs. c).

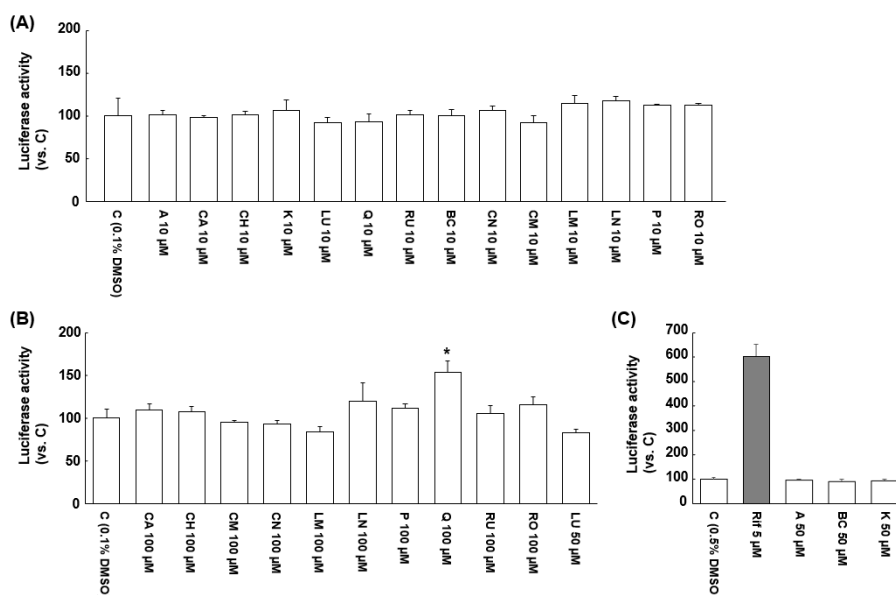


図4 (A) 10 μM条件における健康食品成分のCYP3A4に及ぼす影響(B, C) 50または100 μM条件における健康食品成分のCYP3A4に及ぼす影響

HepG2 cells were transfected the CYP3A4 reporter vector (pCYP3A4-0.4k-7.8k) and treated with control (C, 0.1% or 0.5% DMSO), 10, 50 or 100 μM of targets and 5 μM rifampicin (Rif) for 2 days. Data are expressed as the means ± standard deviations (n = 3). Data were analyzed by non-paired t-test between control and TC, or by one-way analysis of variance. Differences between the control group and each of the treatment groups were analyzed by Dunnett's test (parametric data) or Steel's test (non-parametric data) in multiple comparison. * Statistical significance was set at p < 0.05 (vs. c).

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kondo T, Ishimi Y, Takebayashi J, Tousen Y	Assessment of safety and efficacy of pine bark extract in normal and ovariectomized mice.	Journal of Food Science	85	1956-1962	2020
近藤位旨、石見佳子、東泉裕子	健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究	栄養学雑誌	79 (5)	311-319	2021