

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	「受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用」（課題番号：０８０７）
主任研究者名	所属：静岡県公立大学法人 静岡県立大学薬学部 教授 氏名：山田 静雄 （研究課題番号：０８０７）

近年、わが国においては代替医療の普及と高齢者人口の増加に伴い、健康食品などの機能性を標榜した食品への関心が高まっている。これらに含有される天然物由来の生理活性物質の生体機能に及ぼす健康影響や、医薬品との併用による相互作用の有害事象が懸念されているが、現在、それらに関する科学的根拠が極めて乏しい。

本研究では、食品の機能性タンパク質に対する結合活性を基に生体機能に及ぼす影響の評価方法の開発を試みた。放射性標識リガンドを用いることで、高感度かつ高精度の受容体や血漿タンパクへの結合測定法を確立でき、インビボでの作用には食品成分の体内動態を考慮することが重要となることが示唆された。また、低栄養状態では併用医薬品の薬効および薬物動態への影響ならびに食品自身の作用が顕著であること、低栄養状態が危惧される素材として用いたコレウス・フォルスコリが代謝酵素を著しく誘導し、ワルファリンの薬効を減弱させることを明らかにした。光毒性リスク評価においてはセントジョーンズワート中の主要な光毒性化合物を強く示唆する確証を得たことに加え、一部のフラボノイドによるリスク低減の可能性を見いだした。消化管上皮細胞における吸収・排泄過程に対する食品の影響評価では、高感度かつ経時的に解析する手法を開発し、食品成分のP-糖タンパク質機能評価に応用できることを示唆した。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	「受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用」 (課題番号：0807) (研究期間：平成20年度～平成22年度)
主任研究者名	所属：静岡県公立大学法人 静岡県立大学薬学部 教授 氏名：山田 静雄 (研究課題番号：0807)

I 研究の全体計画

1 研究期間 平成20～22年度（3年間）

2 研究目的

近年、わが国においては代替医療の普及と高齢者人口の増加に伴い、健康増進や疾患の予防・治療を目的として、健康食品などの機能性を標榜した食品への関心が高まっている。これらに含有される天然物由来の生理活性物質の生体機能に及ぼす健康影響や、医薬品との併用による相互作用（相加作用、相乗作用、相殺作用）の有害事象が懸念されているが、現在、それらに関する科学的根拠が極めて乏しい。

そのような背景を踏まえ、本研究課題の目的は、新食品や食品成分が生体機能に及ぼす影響を、生体機能の根幹となる情報伝達物質（神経伝達物質、ホルモンなど）、薬物の作用部位、薬物の体内動態に関与する酵素や異物輸送担体などの機能性タンパク質に対する結合活性を指標として評価し、その応用性を検証することにより、有用な評価方法を開発することである。具体的には、受容体などの機能性タンパク質に特異的に結合する放射性標識リガンドによる高感度受容体結合測定法を応用した食品成分の生物活性（受容体結合活性）評価法を開発し、その方法の妥当性や応用性ととともに、限界について、インビボでの生体機能との関連性を精査することにより、健康影響評価への有用性を検証する。

生体内情報伝達物質や薬物の作用部位となる受容体に対する結合活性を指標として食品の健康影響評価系の構築を目指す本研究課題は極めて独創性が高い。実際に、インビトロ実験において得られた食品および食品成分の受容体に対する受容体結合活性の結果を踏まえ、食品や含有成分が生体の健康に与える影響を、インビボにおいて機能性タンパク質への結合活性や生理機能への作用性から検証することにより機構論的に評価する方法論の開発は、これまでに殆ど検討されていない。また、最近、特に化学物質の光毒性について注目されつつあるが、食品(成分)の健康影響の一つと考えられる光毒性については殆ど検討されていない。そこで、皮膚タンパク質への健康影響評価法を検討する光応答性を指標とした新規なアッセイ系を構築し、食品および食品成分の皮膚などに対する光毒性を検証する。これより、皮膚タンパク質への影響の評価法の開発を目指す。また、食品中の皮膚への光毒性寄与物質の特定も試みる。

3 研究内容及び方法等

(1) 研究内容及び方法

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

個別課題名：受容体結合活性の測定

生体機能、特に自律神経機能の維持において要となるムスカリン性受容体結合活性を指標として食品の健康影響評価系の構築を目指し、放射性標識リガンドを用いるラジオレセプターアッセイ法により受容体を測定し、食品成分の結合活性を評価する。ムスカリン性受容体の標識

リガンドにはアンタゴニスト性リガンドである $[^3\text{H}]$ NMS およびアゴニスト性リガンドである $[^3\text{H}]$ オキソトレモリン-Mを用い、各臓器より調製した膜標品を用いて各標識リガンドの特異的結合に対する食品成分の阻害作用より、食品成分の受容体結合活性を評価する。

個別課題名：各臓器受容体結合活性のインビトロとインビボでの測定

ムスカリン受容体刺激（ピロカルピン）による誘発唾液分泌に対する影響の評価系を用い、食品の唾液分泌に対する作用を評価する。また、放射性標識リガンドを用いるラジオレセプターアッセイ法により受容体を測定し、食品および食品成分のムスカリン受容体結合活性を評価する。さらに食品を経口投与した後に臓器を摘出し、摘出組織における受容体結合の有無を精査し、食品中成分の相加的・複合的作用や、生体内で生成する活性代謝物の寄与を推測する。

個別課題名：低栄養状態における検討

疾患時や高齢者では栄養状態の低下が起こり、若年者に比べ食品の有害事象が発現しやすいことが考えられる。従って低栄養状態での安全性評価系として、低タンパク質飼育動物において、受容体量や食品摂取時における生理作用の変化について評価する。

個別課題名：迅速かつ高感度な食品成分の光毒性リスク評価

機能性食品に含まれる一部の成分は、摂取後に太陽光照射によって体内で活性化され、皮膚タンパク質や脂質と反応して光毒性を示すことがある。本検討では化合物の光応答性を指標とした新規なアッセイ系を構築し、機能性食品の光毒性寄与物質の特定を試みる。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別課題名：血漿タンパク質結合と血液凝固の測定

血漿タンパク質結合の評価については、再現性と簡便性を考慮し、平衡透析ユニット(REDデバイス)と市販アルブミン、ならびにポジティブコントロールとしてワルファリンとインドメタシンの組み合わせで基礎実験を行った。次に、市販アルブミンをマウス血漿（食品成分投与あるいは低タンパク質食摂取）に置き換えて検討した。この実験系に実際に食品成分としてイチョウ葉エキスを適用し、ワルファリンの抗血液凝固作用を踏まえた相互作用の評価系を設定した。本研究結果より、評価しやすい方法論は提示できた。しかし、医薬品と食品の相互作用に関する寄与率を考えると低いと想定されること、ならびに中間評価結果による指摘から、最終年度における本課題は中止することとした。

個別課題名：実験動物での食品成分と医薬品の総合的な相互作用の測定

食品成分とワルファリンの相互作用について、健康被害が危惧される植物エキスと低栄養状態という条件の組み合わせで、抗血液凝固作用等の影響評価を重点的に実施する。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

個別課題名：ヒト細胞を用いた生体機能の測定

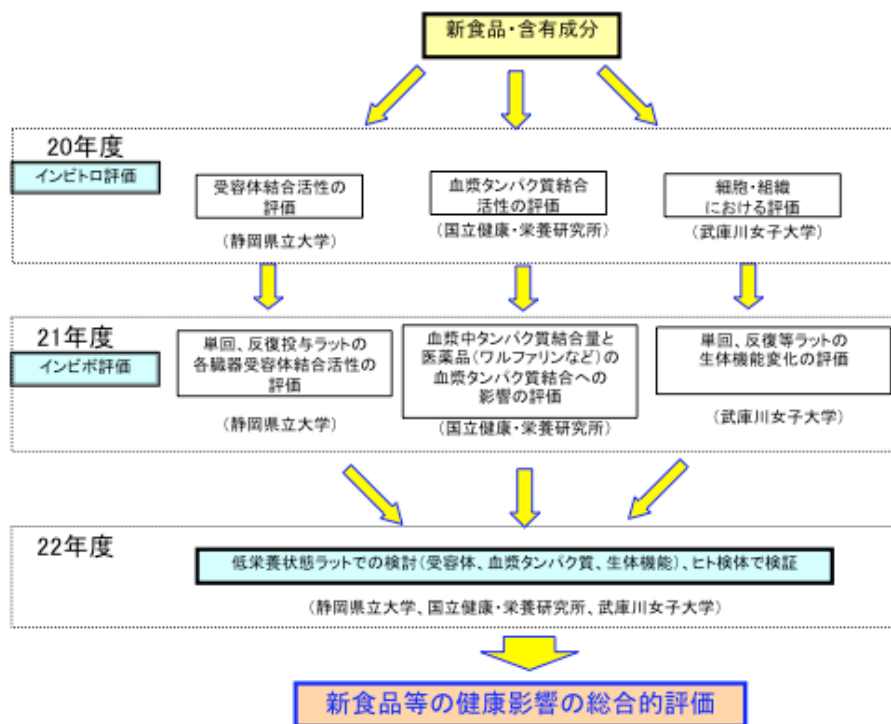
異物輸送担体に対する食品成分の作用(阻害および誘導作用)を明らかにするための評価系を構築する。従来の方法を用いて食品成分の作用を検証するとともに、共焦点レーザー顕微鏡画像解析システムを用いて、ヒト結腸由来細胞における薬物吸収排泄動態の微細な変化を経時的に測定する方法を開発し、これを食品成分の繊細な影響（阻害および誘導作用）の高感度評価システムとして完成させる。

個別課題名：動物組織を用いた生体機能の測定

動物組織における、異物輸送担体に対する作用（阻害作用および誘導作用）を明らかにするため、ラット消化管を用いて、被験食品と医薬品との P-糖タンパク質を介した相互作用を共焦点レーザー顕微鏡で観察および測定可能な実験系を確立する。

（２）研究体制

主任者と分担者は、各グループの担当者を交えた班会議およびメール会議により進捗状況を報告し、研究の方向性・内容を協議するとともに、今後の研究計画や役割分担を確認するなどして緊密な連携体制を取る。



4 倫理面への配慮について

動物実験を行う際には、動物愛護上の配慮から前もって当該研究機関長等に動物実験計画書等を提出し、承認を得てから行うものとする。臨床例の検体を用いる場合にも、ヘルシンキ宣言に則り、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント）に十分配慮し、当該研究機関の倫理委員会に研究計画書等を提出し、承認を得てから行うものとする。

II 平成20年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

20年度は、21年度以降の研究計画を見据え、まず食品や含有成分が健康に与える影響を、受容体や血漿タンパク質などの機能性タンパク質への結合活性や生体機能への作用性から、機構論的に評価できる方法論を検証し、その妥当性や応用性、そしてその限界を明確にする。

特に、ビタミン K 含有食品や他の医薬品との併用により重篤な相互作用を起こしやすい抗血液凝固薬のワルファリンをモデル薬物として、食品の健康影響や安全性を正確に評価できる方法論

の構築が、本年度の達成すべき最大の目標である。実際に、この方法論の確立により、次年度以降の生体機能への評価や、低栄養状態での健康影響などの評価が可能となるので、本年度の研究成果の達成度はきわめて重要となる。

2 平成20年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

研究項目名：受容体結合法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

個別課題名：受容体結合活性の測定

(担当：山田静雄)

○ 放射性リガンドによる受容体結合活性及び血漿タンパク質結合の測定

生体機能、特に自律神経機能の維持において要となるムスカリン性受容体結合活性を指標として食品の健康影響評価系の構築を目指した。放射性標識リガンドを用い、食品成分の受容体結合活性を測定した。その結果、検討した健康食品および食品成分の中で、ウコンの含有成分であるクルクミンがムスカリン性受容体結合活性を示し、自律神経機能に影響する可能性が示唆された。また、放射性標識ワルファリンを用いてアルブミン結合測定法を開発し、食品のケルセチンによってワルファリンのアルブミン結合阻害作用が認められた。本研究結果をもとに、実験条件の精査ならびに他の食品の影響も検証することにより、高感度かつ高精度の血漿タンパク質結合測定法を確立できるものと考えられる。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別課題名：実験動物での食品成分と医薬品の総合的な相互作用の測定（担当：梅垣敬三）

○ ワルファリンの抗血液凝固作用と食品成分の影響の検討

血液凝固系への影響は臨床的に重篤な健康影響をもたらすことから、食品成分自身ならびにワルファリンとの併用による血液凝固への影響が評価できる実験系の構築が重要である。そこで抗血液凝固薬のワルファリンに影響する食品素材として有害事例報告のあるイチョウ葉エキスを取り上げ、その相互作用を少量の試料で検討可能なマウスの実験系において検討した。ワルファリン投与により血液凝固パラメーター（プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、複合凝固因子）は延長した。一方、イチョウ葉エキスの血液凝固パラメーターへの影響は単独投与では認められず、ワルファリンとの併用では凝固パラメーターは短縮した。その相互作用の機序として、イチョウ葉エキス中の成分であるビロバライドが、肝臓薬物代謝酵素を誘導したことによるワルファリン代謝促進が示唆された。

○ ピロカルピン誘発唾液分泌に対する影響の評価

シソ科のハーブであるコレウス・フォルスコリ（CFK）エキスは脂肪分解を促進することから、多くのダイエット関連の健康食品に添加されているが、その医薬品との相互作用を含めた安全性が危惧される植物素材である。過去（2005年、イタリア）にCFK含有製品を摂取したことでアトロピン様の急性中毒症状が起き、アトロピン様物質を含有するナス科植物の混入が疑われた事例報告があるが、CFKエキス自体のアトロピン様作用の有無は明確でない。本研究の中で、最終年度にCFKエキスとワルファリンとの相互作用の検討を予定している。そこで、CFKエキスをムスカリン受容体刺激（ピロカルピン）により誘発した唾液分泌の評価系に適用して、アトロピン様作用の有無を明確にすることとした。その結果、利用したCFKエキスは、かなり高用量でのみ弱いアトロピン様作用を示すことが明らかとなった。このムスカリン受容体刺激により誘発した唾液分泌の評価系は、簡便であり、食品成分自体ならびにその医薬品との相互作用を介した口渴への影響評価系としても優れていると

考えられた。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

個別課題名：ヒト細胞を用いた生体機能の測定（担当：篠塚和正）

消化管上皮細胞における吸収・排泄過程に対する被験食品成分の影響を高感度且つ簡便にスクリーニングする方法の開発検討を行った。Caco-2 細胞を用い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞内のローダミン 123 の蛍光量を経時的且つ二次元的に測定した。今年度はローダミン 123 の経時的变化の測定方法を確立し、次いでセントジョーンズワートをポジティブコントロールとして、健康食品の影響の高感度検出方法の構築を試みた。本研究により、Caco-2 細胞に取り込まれたローダミン 123 は経時的に排泄され、ジゴキシン 48 時間処理後の直接阻害作用およびジゴキシン 7 日間処理 1 日無処置後の排泄機能促進作用（MDR1 の誘導）が観察出来た。また、セントジョーンズワート抽出物 7 日間処理後の阻害傾向も観察出来た。以上の結果より、本実験方法は消化管薬物動態に対する被験食品成分の影響を検出する方法としては有効であることが示された。

（2）全体の研究成果

1）全体の研究成果の要旨

機能性タンパク質への作用や結合性を基にした食品の健康影響の新たな評価方法の開発を目指す研究の妥当性と、研究成果の応用性・有用性を示唆する結果を得た。受容体結合活性及び血漿タンパク質結合の測定においては、これらの機能性タンパク質へ結合阻害作用を有する食品を高感度に検出できた。更なる精査・検証によりインビトロとインビボの作用を結びつけ、高感度かつ高精度の評価ツールになると考えられる。血液凝固に関する検討では、イチヨウ葉エキスがワルファリンの作用を減弱することを明らかにした。また、CFK の唾液分泌への影響を確認した。これらのことから、インビボにおいて相互作用ならびに生体影響を評価可能であることを示した。ヒト消化管上皮細胞を用いた実験では吸収・排泄過程に対する食品の影響を高感度かつ簡便にスクリーニングする方法の開発を検討し、セントジョーンズワートの影響を確認するとともに、評価方法の有用性を示した。

2）研究成果

研究項目名：受容体結合法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

生体機能、特に自律神経機能の維持において要となるムスカリン性受容体結合活性を指標として食品の健康影響評価系の構築を目指した。その結果、検討した食品のなかでクルクミンがムスカリン性受容体結合活性を示し、その IC₅₀ 値は 54.2 μM であった。これよりクルクミンは自律神経機能に影響することが示唆された。放射性ワルファリンを用いる血漿タンパク質の結合測定法の開発については、食品成分のケルセチンにより結合阻害作用が認められ、ケルセチンによるワルファリンのタンパク結合阻害の様式は競合阻害であることが示唆された。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別研究課題名：実験動物での食品成分と医薬品の総合的な相互作用の測定

○ ワルファリンの抗血液凝固作用と食品成分の影響の検討

マウスにおいてイチヨウ葉エキスならびに肝臓薬物代謝酵素の誘導作用を持つ含有成分であるビロバライドの併用により、ワルファリンの抗血液凝固作用が減弱することを示すことが明らかになった。

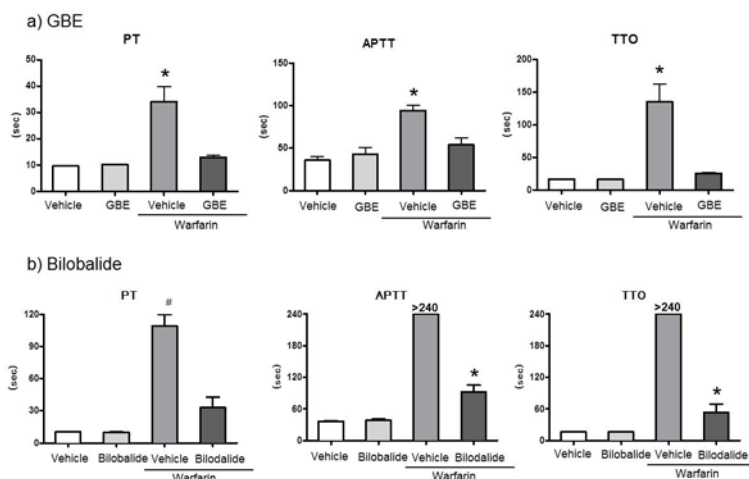


図1 マウスにおけるワルファリン投与後の血液凝固パラメーターに対するイチョウ葉エキス(a)ならびにその含有成分ビロバライド(b)摂取の影響.

(PT: プロトロンビン時間、APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間、TTO: トロンボテストとしての複合凝固因子) *: 他群との有意差, $p < 0.05$.

○ ピロカルピン誘発唾液分泌に対する影響の評価

本実験において、ラットのピロカルピン誘発唾液分泌に対する評価系が、有害事象の1つである口渴の簡便で有用な評価系であることが検証できた。また過去に CFK 含有製品でアトロピン様の急性中毒症状が起きたが、CFK にはアトロピン様の作用がほとんどないことが明らかとなった。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

Caco-2 細胞において、細胞内ローダミン 123 の蛍光強度の経時的低下に対する影響をポジティブコントロールであるジゴキシンを用いて検討した。その結果、排泄機能の直接阻害と誘導を評価出来た。また、食品(セントジョーンズワート)が排泄を抑制する傾向を認めた。

3) 考察及び結論

研究項目名：受容体結合法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

受容体結合に対する影響については、インビボでの作用を評価することで、インビトロ評価法の応用性を明確にできると考えられた。比較的簡便な方法で高感度かつ高精度の血漿タンパク質結合測定法を確立できるものと考えられた。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

食品成分と医薬品の相互作用について、インビボでの評価系によって薬物動態を含めた影響が評価できると考えられた。ムスカリン受容体刺激(ピロカルピン)による誘発唾液分泌の評価系が、食品成分による有害事象や医薬品との相互作用の検出にも利用可能と考えられる。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

Caco-2 細胞に取り込まれたローダミン 123 排泄を評価することで、被検物質の直接的な阻害作用に加えて、P-糖タンパク質の誘導を評価可能であることが示唆された。本手法は消化管薬物動態に対する被験食品成分の影響を検出する方法としては有効であると考えられる。

Ⅲ 平成21年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

食品や含有成分が健康に与える影響を、機能性タンパク質への結合活性や生体機能への作用性から、機構論的に評価できる方法論を確立する。その妥当性と応用性の限界を明確にし、インビボ実験により検証する。

ビタミン K 含有食品との併用により重篤な相互作用を起こしやすい抗血液凝固薬のワルファリンをモデル薬物として、食品の健康影響や安全性を正確に評価できる方法論を構築する。ワルファリンの出血や血液凝固阻害作用に対する食品成分の影響がインビボで評価できる条件設定についても検討する。P-糖タンパク質への評価系の妥当性と応用性を詳細に検証する。本年度に開始するインビボ評価により、22年度の生体機能への評価や、低栄養状態での健康影響などの評価が可能となるので、本年度の研究成果の達成度はきわめて重要となる。

得られた研究成果の学会発表と学術専門誌への論文発表を目指す。

2 平成21年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

個別課題名：各臓器受容体結合活性のインビトロとインビボでの評価（担当：山田静雄）

セントジョーンズワートおよびエキナセアの抽出物は、ラット組織の粗細胞膜標品を用いたインビトロ受容体結合実験において、ムスカリン受容体結合活性を示さなかった。また、両抽出物は、自律神経機能のコリン作動薬刺激によるラットの唾液分泌に対しても殆ど影響しなかった。亜鉛およびクルクミンは、インビトロにおいてラット組織のムスカリン受容体に対し濃度依存的な結合活性を示したが、薬効発現量のクルクミンを経口投与したラットの摘出組織において、ムスカリン受容体結合活性は認められなかった。同様に、クルクミンおよび亜鉛は、ラットに経口投与により、コリン作動薬刺激による唾液分泌に殆ど影響しなかった。亜鉛とクルクミンにおいてインビボでの結果とインビトロの結果が相違（ムスカリン受容体結合活性や唾液分泌への作用がインビボで認められなかった）した理由として、経口投与後の生物学的利用率が極めて低く、標的組織中での濃度が作用を示す濃度まで上昇しなかったことが考えられた。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別課題名：血漿タンパク質結合と血液凝固の測定（担当：梅垣敬三）

食品と医薬品の相互作用が起きる部位として、血漿タンパク質結合部位での評価はあまり実施されていない。そこで種々の食品成分を投与した条件でも評価可能なマウス血漿を利用した、簡便で検出しやすい測定条件を、相互作用が最も危惧されるワルファリンで設定した。またワルファリンの抗血液凝固作用の影響についても検討した。その結果、周知の事実とされているワルファリンとインドメタシンの血漿タンパク質結合における相互作用でも、その影響はかなり弱いことが明らかとなった。また、その評価系でイチヨウ葉エキスとワルファリンの抗血液凝固作用に対する影響を評価し、イチヨウ葉エキスは単独投与では血液凝固パラメーターに影響せず、前投与は肝薬物代謝酵素を誘導することでワルファリンの代謝を促進し、むしろワルファリンの抗血液凝固作用を減弱させることを明らかにした。この結果は、これまで報告されている有害事例報告とは逆の反応であった。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

個別課題名：ヒト細胞を用いた生体機能の測定（担当：篠塚和正）

LS-180 細胞における P-糖タンパク質に対する食品成分の影響を検討したところ、ピペリンとカプサイシンは阻害作用、ダイゼインとゲニステインは促進作用を示すことを明らかにし、本細胞系が食品成分の P-タンパク質機能評価に応用できることを示唆した。また、共焦点レーザー顕微鏡画像解析システムを用いて細胞内における薬物の動きとその増減を三次元的にリアルタイムで追跡した結果、Caco-2 細胞に対するジゴキシンおよびセントジョーンズワート(St. John's Wort: SJW) の阻害および誘導作用の検出に、この測定系が十分機能すること、P-糖タンパク質が局在する刷子縁膜直下のローダミンの動きのみを解析することにより、細胞全体のローダミンを測るよりも、さらに微細な変化を高感度で検出出来ることが判明した。このような特徴を応用することにより、薬物の消化管吸収過程に対する食品成分の影響をより高感度に検出することが可能となり、薬食相互作用の検出に適応可能である事を確認した。

（２）全体の研究成果

１）全体の研究成果の要旨

食品(成分)の健康影響の評価を行う上で重要な、インビトロからインビボへの予測やその関連性について検証した。ムスカリン性受容体への結合活性と生理作用(唾液分泌)は関連し、評価系として有用であるが、インビボでの食品成分の体内動態が重要になることが考えられた。血漿タンパク質との結合実験では、食品を投与した条件でも検討可能なマウス血漿を利用した評価系を検討した。その結果、イチョウ葉エキスとワルファリンの相互作用機序としてはワルファリンの血漿タンパク質結合への影響はほとんどないと考えられた。消化管上皮細胞実験では、共焦点レーザー顕微鏡画像解析システムを用いた三次元的解析により医薬品の消化管吸収に対する食品成分の影響をより高感度かつ連続的に検出することが可能となった。

本研究は、食品の機能性タンパク質への作用や結合性を基盤とし、インビボでの作用を考慮した解析を可能にする有用な評価ツール開発に繋がると考える。

２）研究成果

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

口内乾燥の報告があるセントジョーンズワートおよびエキナセアを用いて、ピロカルピン誘発唾液分泌に対する影響を測定した結果、投与 1, 3 時間後では変化がなく、6 時間後において僅かに減少傾向を認めた程度であった。また、顎下腺組織におけるムスカリン受容体結合活性は認められなかった。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

血漿タンパク質への結合に対する食品成分の影響評価に、試薬アルブミン等を利用した条件では影響は全く検出できなかったが、マウス血漿を利用して検討すると結合率に対するインドメタシンの影響が検出でき、無タンパク食摂取マウスの血漿ではその影響がより明確であった。このマウス血漿を利用した評価系において、マウス血漿にケルセチンやイチョウ葉エキスを直接添加した測定、ならびにイチョウ葉エキスを経口投与したマウス血漿を利用した測定のいずれにおいても、ワルファリンのタンパク質結合段階の相互作用の影響は検出できなかった。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

P-糖タンパク質による排出はピペリンとカプサイシンによって阻害され、ダイゼインとゲニ

ステインにより促進された。また、セントジョーンズワートは MDR1 誘導作用とともに、阻害作用も示すことが明らかとなった。本結果から、本測定方法は、食品成分の影響を検知するシステムとして有用であると考えられる。

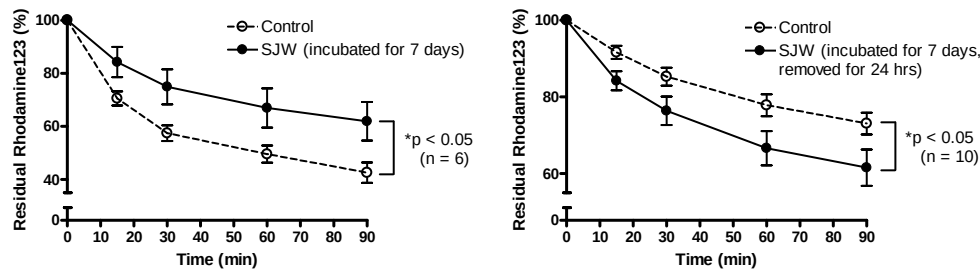


図2 Caco-2 細胞における細胞内ローダミン 123 の蛍光強度低下に対するセントジョーンズワート (1 $\mu\text{g/mL}$) の阻害作用(左)および誘導作用(右)

更に、刷子縁膜直下での測定が最も鋭敏に感度良く P-糖タンパク質への影響を測定出来ることが明らかとなり、セントジョーンズワートによる P-糖タンパク質に対する有意な阻害作用を検出出来た。

3) 考察及び結論

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

インビトロでの受容体結合活性はインビボでの生理作用と相関し評価系として有用であることが示唆された。ただし、1) 食品成分の投与量、2) 有効成分の体内動態、3) インビトロ実験で生理作用が発現した濃度にインビボでは到達しないことなどによりインビトロ作用とインビボ作用の不一致が起こることが考えられた。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

マウスおよびラット血漿を用いることで、ワルファリンのタンパク質結合率に対する食品成分の相互作用の影響を高感度に評価することが可能になった。ケルセチンおよびイチヨウ葉エキスはワルファリンの血漿タンパク質結合率にほとんど影響せず、イチヨウ葉エキスではワルファリンとの併用による出血促進という有害事例報告があるが、その現象において、イチヨウ葉エキス摂取による血漿の遊離型ワルファリン濃度の増加はほとんどないと考えられた。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

本システムを用いた検討について、以下のような知見を得た。1) MDR1 阻害作用および誘導作用の検出に、本測定系が十分機能すること。2) 刷子縁膜直下のローダミンの動きのみを解析することにより、さらに微細な変化を高感度で検出することが出来ること。3) 2)について連続的に測定することにより、被験食品成分の影響評価に、クロスオーバーテスト的な解析を適用することが出来ること。4) 細胞内のローダミン 123 の立体的な動きを解析することにより、細胞全体における薬物動態を網羅的に検出することが出来ること。このような特徴を応用することにより、医薬品の消化管吸収過程に対する食品成分の影響をより高感度に検出することが可能となり、薬食相互作用による弊害を未然に予防することができるものと期待される。

IV 平成22年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

若年者に比べ食品の有害事象が発現し易い高齢者での安全性評価系として、受容体量や血漿中タンパク質量をきたすと予想される低栄養状態や加齢状態において、受容体などの機能性タンパク質や生体機能に対する食品の影響を検証する。これらの結果を総合的に評価し、食品および食品成分の健康への影響を精度良く評価できる方法論の確立を目指す。また、患者や高齢者においては医薬品を長期服用して場合が多いので、機能性食品の摂取により相互作用が起こり、健康への悪影響を及ぼすことが考えられる。分担研究者の梅垣敬三氏の研究とも関連して、生体機能の低下状態の動物を用い、食品と重篤な相互作用を惹起する医薬品との薬食相互作用についても重点的に検証することにより、その高感度な測定法の開発を目指す。これまで設定した医薬品と食品や食品成分との相互作用の評価法に、イチヨウ葉エキス以外の他の食品成分（植物エキス）を適用する。特に、健康被害が危惧される低栄養状態と植物エキス摂取という条件において、医薬品（ワルファリン）の抗血液凝固作用を重点的に検討し、悪影響の発現の総合的な評価を実施する。この結果より、医薬品と食品成分の相互作用に関する評価法が実用的なものとなるようにする。

また、医薬品や食品成分の体内動態に影響する機能性タンパク質として異物排出担体のP-タンパク質に着目し、その機能の高感度測定法の確立とその応用を目指す。具体的には、昨年度までに開発した共焦点レーザー顕微鏡画像解析システムを用いた三次元的解析法を様々な食品成分のスクリーニングに適用することにより、その実用性の検証を行う。なお本年度からは、新規導入する高倍率油浸レンズによる高精細画像を使用することにより、更に高い感度の解析を行う。

本年度に新たに追加する検討課題として、食品および食品成分の健康影響において今後重大な課題となると考えられる光毒性について明らかにする目的で、皮膚タンパク質への影響を高感度に評価できる方法論について検証し、その開発を目指す。

以上の研究成果について、国内外の学会発表と学術専門誌への論文発表することにより、新規の食品の健康影響評価方法を広く情報公開することに努める。

2 平成22年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

個別研究課題名：低栄養状態における検討（担当：山田静雄）

有害事象や医薬品との相互作用が懸念される食品としてイチヨウ葉エキスおよびカフェインを用い、高齢者に起こる栄養状態の低下を想定した低タンパク質食飼育動物において薬食相互作用の評価系の確立を試みた。イチヨウ葉エキス投与時には併用薬物として血糖降下薬トルブタミドを用い、血糖値、血中トルブタミド濃度、肝薬物代謝酵素活性の測定を行った。その結果、通常食群ではイチヨウ葉エキスによる有意な変化は認められなかったが、低タンパク質飼育動物においてはイチヨウ葉エキスによって血中濃度、血糖降下作用が有意に低下することが示された。また、低栄養状態におけるカフェイン摂取では覚醒作用および痙攣作用の増強傾向が認められた。このことより、低栄養状態では食品併用による医薬品の薬効および薬物動態への影響および食品自身の作用が顕著であり、高齢者を想定した評価系としての有用性が期待出来る。

個別研究課題名：迅速かつ高感度な食品成分の光毒性リスク評価（担当：山田静雄）

本研究における作業仮説は光化学の第一法則に従って提案され、すなわち「光吸収に伴う

光化学的挙動が光毒性発現のトリガーである」というコンセプトのもと光毒性リスク評価を実施した。本年度は機能性食品素材としても注目を集めるセントジョーンズワートが光毒性を誘発することに着目し、本植物エキス中に含まれる主要成分を UPLC/ESI-MS を用いて定量し、特に高含量な 20 種類の天然物について光毒性リスクを精査した。その結果、**Hypericin, Pseudohypericin, Hyperforin** が主要な光毒性化合物であることをさらに強く示唆する確証を得ることが出来、これに加えて UV 吸収特性のある一部のフラボノイドを共存させることで若干光毒性リスクを低減させる可能性を新たに見出した。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別課題名：実験動物での食品成分と医薬品の総合的な相互作用の測定（担当：梅垣敬三）

ワルファリンは多くの食品成分等との相互作用が最も危惧される医薬品成分である。そこでワルファリンと食品成分の相互作用を、血液凝固、薬物代謝酵素、低タンパク質食との関連で検討した。その結果、ダイエット関連の植物成分であるコレウス・フォルスコリ (*Coleus forskohlii*, CFK) エキスが肝臓薬物代謝酵素 CYPs を著しく誘導することを初めて明確に示した。また、CFK エキスはワルファリン代謝酵素の誘導を介して、ワルファリンの抗血液凝固作用を減弱させることを示した。この結果と前年度に示したイチョウ葉エキスの研究結果より、ワルファリンの抗血液凝固作用と薬物代謝酵素の測定系が、インビボにおける医薬品と食品成分の相互作用を総合的に評価できる一つの実験系になりうる事が明らかになった。当初、低タンパク質食負荷は、CFK とワルファリンの相互作用をより顕著にすると想定していた。今回の検討の結果、低タンパク質食負荷はワルファリンによる一部の血液凝固パラメーターを低下させたが、一定した傾向は示さなかった。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

個別課題名：ヒト細胞を用いた生体機能の測定（担当：篠塚和正）

この2年間で開発した測定法を、様々な食品成分の健康影響評価に適用し、より簡便で再現性の良好な測定条件を精査すると共に、その実用性を検証した。その結果、ベルガモチンとリコペンは Caco-2 細胞内ローダミン 123 蛍光量の低下に有意な影響を示さず、P-糖タンパク質機能には影響しないことが示された。これらについては、既に P-糖タンパク質に影響しないことが報告されており本研究結果と一致した。一方、クルクミンを投与した場合は、ローダミン 123 排出が有意に抑制されたことから、P-糖タンパク質機能を低下させる作用のあることが示された。クルクミンの P-糖タンパク質阻害作用についても既に多くの報告があり、本研究結果と一致した。以上の結果から本測定方法は P-糖タンパク質の機能評価に有用であることが示された。そこで、次に、同様にシトルリン、フコイダン、*Lumbricus Rubellus* 末水溶性画分 (LR 末：ミミズ内蔵粉末)、β-カロテンおよびクリシンの作用について検討したところ、クリシンのみが P-糖タンパク質阻害作用を投与 60 分後に示した。一方、残りの4成分は有意な作用を示さなかった。P-糖タンパク質に対するこれらの成分の影響に関する報告はほとんどなく、以上の結果は本方法により明らかにされた新しい知見であると言える。

個別課題名：動物組織を用いた生体機能の測定（担当：篠塚和正）

Caco-2 細胞刷子縁膜直下のローダミン 123 動態高感度測定法をラット消化管上皮細胞に適用し、より簡便で再現性の良好な測定条件を精査するとともに、その実用性の検証を試みた。方法としては一日絶食したラットの回腸にローダミン 123 を取込ませた後、管腔側を外側にしてガラス管に固定した。そのガラス管を対物レンズ上のシャーレ内に装着固定した。

シャーレ内には 95%酸素を通気した 37 度の Tyrode 液を満たし、被験食品成分を投与して、組織内ローダミン 123 残存量に対する影響を、共焦点レーザー顕微鏡にて観察測定した。しかしながら、回腸から分泌される粘液により蛍光測定にバラツキが生じ、生理的な状態では高感度で正確な測定が出来ないという結論に達した。そこで、現在はアトロピンなど様々な消化管粘液分泌抑制薬と灌流装置を応用して、良好な画像取得の条件設定を試みている。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

高齢者を想定した安全性評価系として、低タンパク質食飼育動物において食品の影響を評価した結果、通常食群と比較して低タンパク質食群では併用医薬品の薬効および薬物動態への影響ならびに食品自身の作用が顕著であることが示された。また、光毒性リスク評価においてはセントジョーンズワート中の主要な光毒性化合物を強く示唆する確証を得たことに加え、一部のフラボノイドによるリスク低減の可能性を見いだした。食品と医薬品の総合的な相互作用の評価では、低栄養状態におけるが危惧される素材として用いた CFK が代謝酵素を著しく誘導し、ワルファリンの薬効を減弱させることを明らかにした。ヒト細胞を用いた消化管吸収・排泄過程に対する食品の影響評価では、様々な食品の評価に適用し、その実用性の検証を行った。その結果、P-糖タンパク質の機能評価に有用であることが示された。これらの結果は、食品の安全性に関する有用な評価ツールになると考えられた。

2) 研究成果

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

個別研究課題名：低栄養状態における検討

低栄養状態の作成には通常食 (20% カゼイン) および低タンパク質食 (7% カゼイン) を 21 日間与えた。低タンパク質食飼育により、体重、体重あたりの肝重量、血漿中アルブミン濃度の有意な低下が認められ、高齢者に多く認められる低栄養状態の 1 つである低タンパク質モデルが作成出来たと判断できた。

各々の食餌群に vehicle またはイチヨウ葉エキス (100 mg/kg) を 5 日間反復投与し、最終投与時にトルブタミド 40 mg/kg を経口投与し、トルブタミド投与前および投与 12 時間後までの血糖値および血漿中トルブタミド濃度を測定した結果、通常食群に比べ、低タンパク質食群においてトルブタミドの血糖降下作用が増強される傾向が認められた。また、通常食群では vehicle 投与群とイチヨウ葉エキス投与群の血糖降下作用に有意な差は認められなかったが、低タンパク質食群においてはイチヨウ葉エキス投与によりトルブタミドの血糖降下作用が有意に減弱した(図 3)。

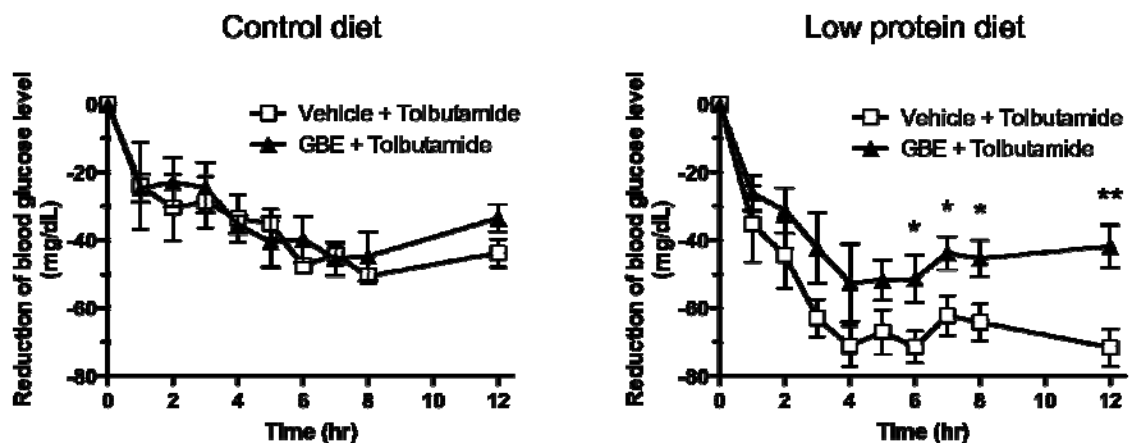


図 3 トルブタミドの血糖降下作用に対する低タンパク質食およびイチヨウ葉エキス投与の影響

Values are expressed as mean $\pm$ S.E. for 4-6 rats. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs Vehicle.

血糖値の測定と同じタイムポイントにおいて、血漿中トルブタミド濃度を測定した結果、血糖値と同様に通常食群と比較して低タンパク質食群において血漿中トルブタミド濃度が上昇する傾向が認められ、イチヨウ葉エキス投与による血漿中トルブタミド濃度の減少は、低タンパク質食群においてより顕著であった (図 4)。これらの値より算出した血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-12}) は、通常食群および低タンパク質食群のいずれにおいてもイチヨウ葉エキス投与により減少したが、その影響は低タンパク質食群において有意差が認められた (表 1)。

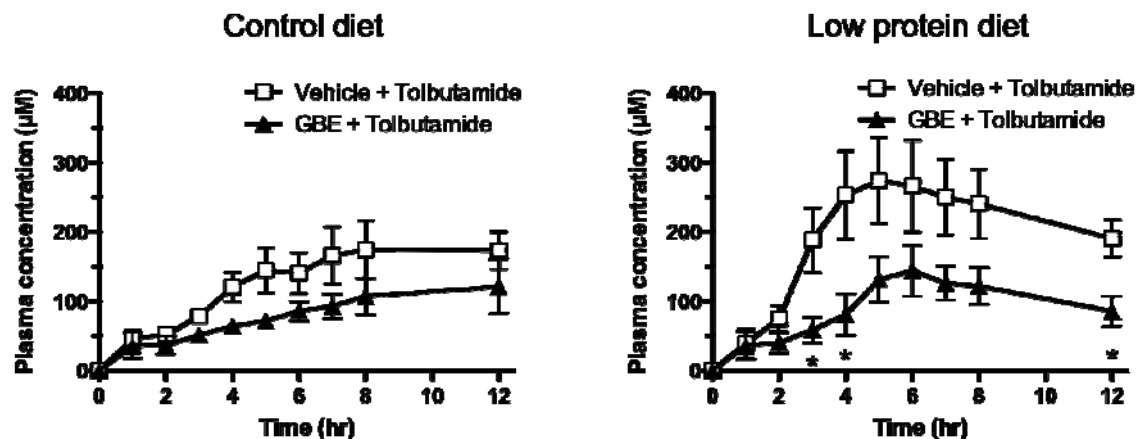


図 4 血漿中トルブタミド濃度に対する低タンパク質食飼育およびイチヨウ葉エキス投与の影響

Values are expressed as mean $\pm$ S.E. for 3-6 rats. *: $p < 0.05$ vs Vehicle.

表 1 トルブタミドの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-12}) に対する低タンパク質食飼育およびイチヨウ葉エキス投与の影響

	AUC_{0-12} ($\mu M \cdot hr$)	
	Vehicle	GBE
Control diet	1529 $\pm$ 273	947 $\pm$ 173
Low protein diet	2327 $\pm$ 464	1092 $\pm$ 202 *

Values are expressed as mean $\pm$ S.E. for 3-6 rats. *: $p < 0.05$ vs vehicle

トルブタミド投与 12 時間後に肝臓を摘出し、調製した肝ミクロソームを用いて主要な肝薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) 活性を測定した。イチヨウ葉エキスを 5 日間投与することにより、いずれの分子種においても有意な酵素活性の上昇が認められ、CYP2B および CYP2C については通常食群と比較し、低タンパク質食群において有意な活性の上昇が認められた (図 5)。

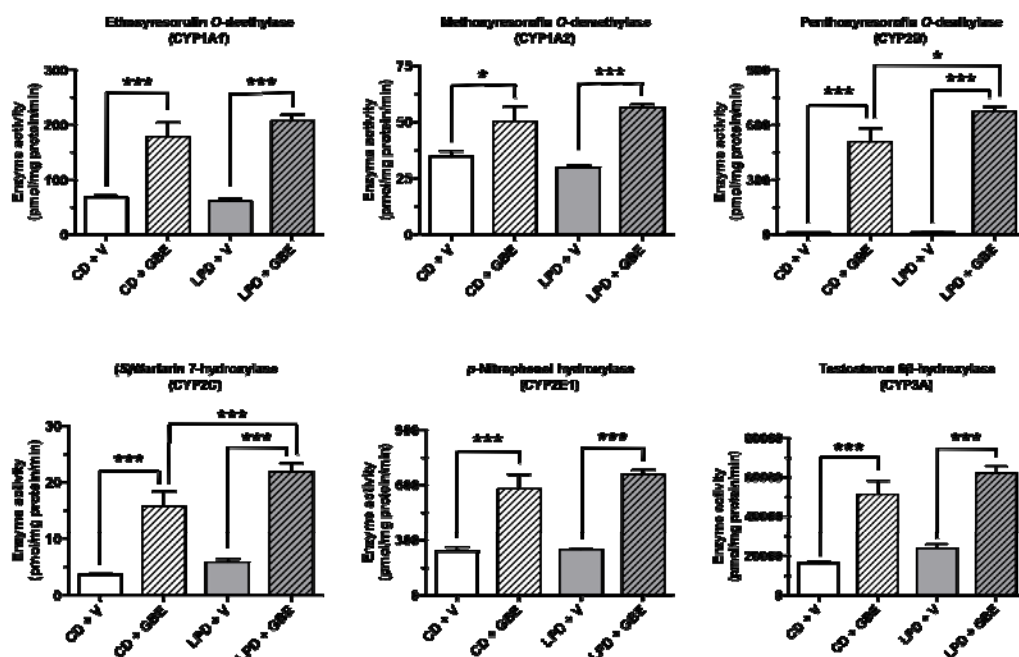


図 5 肝薬物代謝酵素活性に対する低タンパク質食飼育およびイチョウ葉エキス投与の影響
CD: control diet, LPD: low protein diet, V: vehicle. Each column represents mean±S.E. of 4-6 rats. *: $p<0.05$, ***: $p<0.001$ vs vehicle.

低タンパク質食飼育マウスにおいて、カフェイン 10 mg/kg または 300 mg/kg を経口単回投与後、30-90 分間の運動量および 300 mg/kg 投与時には痙攣回数を測定し、通常食群の場合と比較した。その結果、自発運動量はいずれの食餌摂取群においてもカフェイン 10 mg/kg 投与により有意に増加し、その影響は低タンパク質食群で大きい傾向を示した (図 6 左)。また、カフェイン 300 mg/kg 投与による痙攣回数については低タンパク質食群において増加した (図 6 右)。

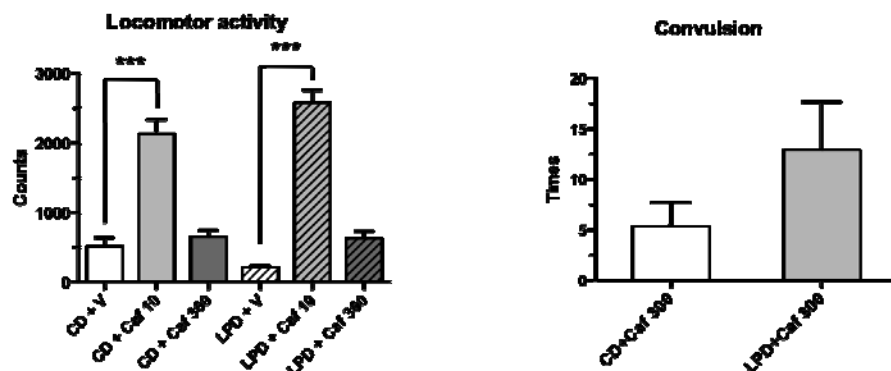


図 6 低栄養状態におけるカフェイン摂取時の自発運動量および痙攣に対する影響
CD: control diet, LPD: low protein diet. Each column represents mean±S.E. of 7-12 mice. ***: $p<0.001$ vs vehicle.

個別研究課題名：迅速かつ高感度な食品成分の光毒性リスク評価

UPLC/ESI-MS を用いて セントジョーンズワート エキス中の含有成分について網羅的に検証を行い、主要成分の特定に至った。特定した約 20 種類の主要成分について、UV 吸収特性、光反応性 (ラジカル産生能) を評価し、特に活性酸素種産生能が高かった成分については、インビトロ photoirritation assay とインビトロ photogenotoxicity assay を併せて実施し、誘発され得る光毒性の種類についても精査した。この結果、数種の化合物が強力な phototoxin であることを明らかにすると共に、既報の光毒性化合物との比較によってそ

の毒性リスクについても相対的に比較することが出来た。さらに、セントジョーンズワートエキス中に多く含まれる成分のなかで、**sunscreen** と同様の機能を有するポリフェノールを見出し、本品と光毒性が疑われる含有成分を共存させると有意に光毒性リスクが低下することを初めて明らかにした。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別課題名：実験動物での食品成分と医薬品の総合的な相互作用の測定

マウスに AIN93G 組成の CFK エキス添加食 (0-5.0% 添加) を 3 週間摂取させたところ、飼料中の CFK エキス濃度に依存した肝臓 CYP 含量の増加が認められ、有意な増加は 0.05% から検出できた。ワルファリン代謝に関与する CYP2C 活性も CFK エキスの飼料中濃度が 0.05% から有意に増加した (図 7)。CFK の活性成分としてアデニル酸シクラーゼを活性化するフォルスコリンが知られているが、フォルスコリンには肝臓薬物代謝酵素の誘導作用は認められず、CFK エキスに存在している別の物質が肝臓薬物代謝酵素誘導に関与していると考えられた。

低栄養モデルとした低タンパク質食 (7% カゼイン) または標準食 (20% カゼイン) に CFK エキスを添加 (0%, 0.05%, 0.15%) して 4 週間マウスに摂取させ、ワルファリンを最後の 2 日間投与 (0.25mg/kg 体重/日) して血液凝固パラメーターと肝臓薬物代謝酵素への影響を検討した。その結果、低タンパク質食負荷は、ワルファリンによる PT および TTO を低下させた。また、低タンパク質食負荷では肝臓の CYP 濃度ならびにワルファリンの代謝酵素が高かった (図 8、図 9)。一方、CFK エキス投与は飼料タンパク質レベルに関係なく、ワルファリンの抗血液凝固作用を減弱させ、同時にワルファリンの代謝酵素を著しく誘導した。なお、低タンパク質食負荷群では標準食群よりも体重増加は抑制されていたが、血清アルブミン濃度には影響しなかった。

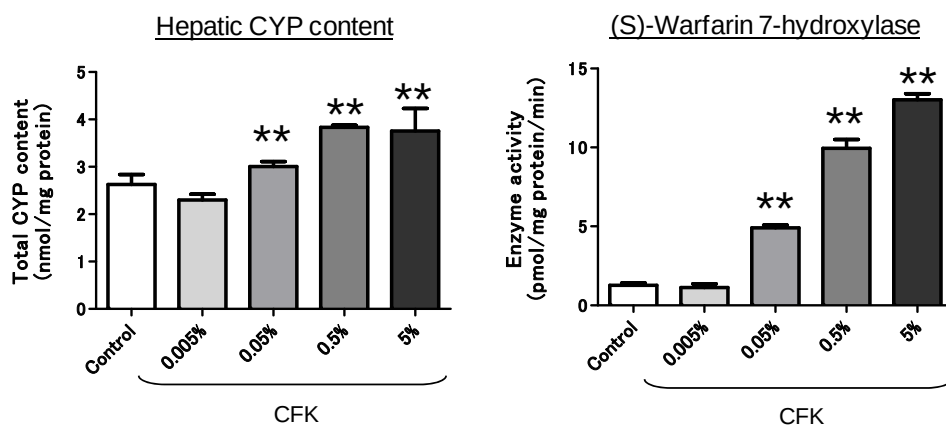


図 7 CFK エキスがマウス肝臓薬物代謝酵素に与える影響

ICR 系雄性マウスに CFK エキス 0-5.0% 含有食を 3 週間混餌投与した。値は 5-6 匹のマウスの平均値±標準誤差で示した。**: コントロール群からの有意差, $p < 0.01$ 。

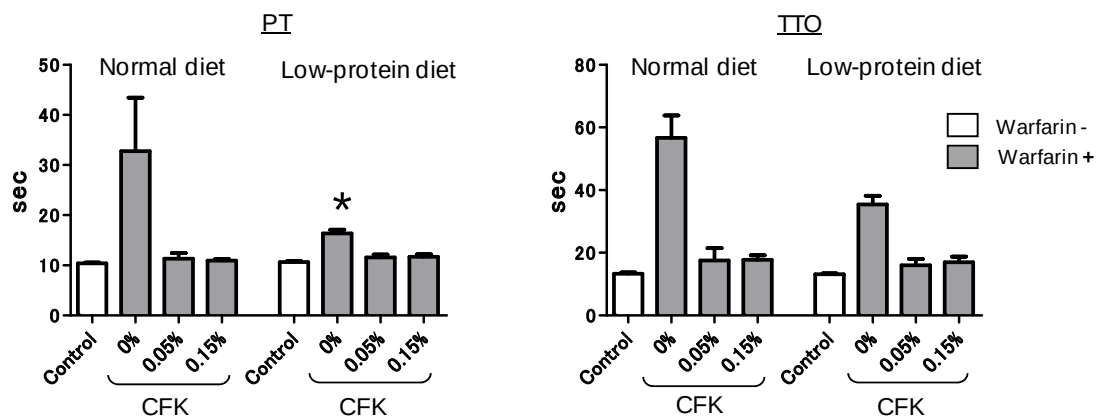


図8 ワルファリンの抗血液凝固作用に対する CFK エキスならびに低タンパク質食の影響
ICR 系雄性マウスに CFK エキス (0-0.15%) を添加した標準食 (20% カゼイン含有) または低タンパク質食 (7% カゼイン含有) を 4 週間混餌投与した。なお、ワルファリン (0.25mg/kg 体重) は 27 および 28 日目に胃内投与し、最終投与 18 時間後に採血した。プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、トロンボテストとしての複合凝固因子 (TTO)。値は 6 匹のマウスの平均値±標準誤差で示した。*: 同濃度の CFK エキスにおける標準食と低タンパク食の間の有意差, $p < 0.05$ 。

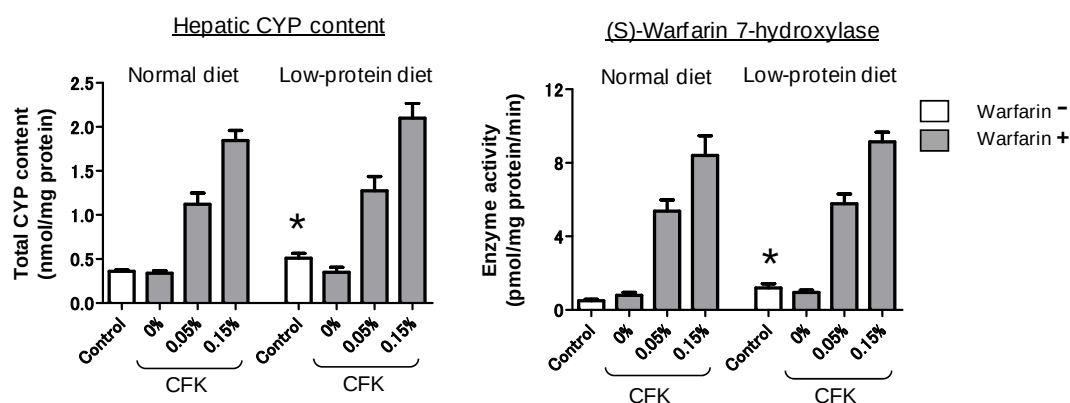


図9 CFK エキスと低タンパク食の併用がマウス肝臓薬物代謝酵素に与える影響
ICR 系雄性マウスに CFK エキス (0-0.15%) を添加した標準食 (20%カゼイン含有) または低タンパク質食 (7%カゼイン含有) を 4 週間混餌投与した。なお、ワルファリン (0.25mg/kg B.W.) は 27 および 28 日目に胃内投与した。値は 6 匹のマウスの平均値±標準誤差で示した。*: 同濃度の CFK エキスにおける標準食と低タンパク質食の間の有意差, $p < 0.05$ 。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

個別課題名：ヒト細胞を用いた生体機能の測定

ベルガモチン (10 μ M, 図 10.(a)) とリコペン (1 μ M, 図 10.(b)) は Caco-2 細胞内ローダミン 123 蛍光量の低下に有意な影響を示さなかった。一方、クルクミン (30 μ M, 図 11) を投与した場合は、ローダミン 123 排出が 10 分後から有意に抑制された。

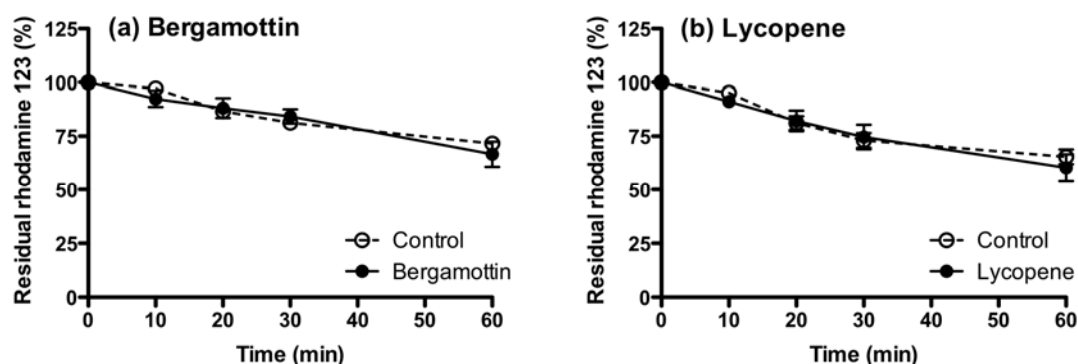


図 10. Caco-2 細胞における刷子縁膜直下ローダミン 123 蛍光強度低下に対するベルガモチン (a)およびリコペン(b)の影響

Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=8).

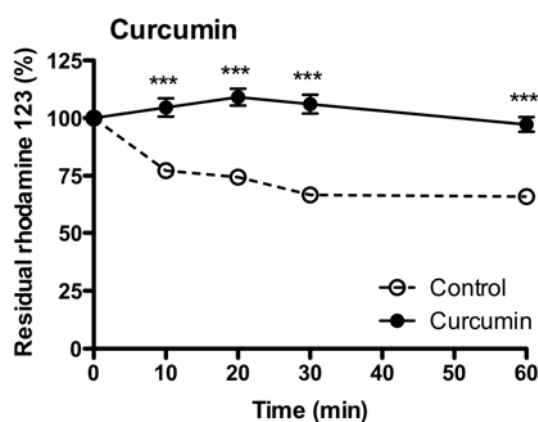
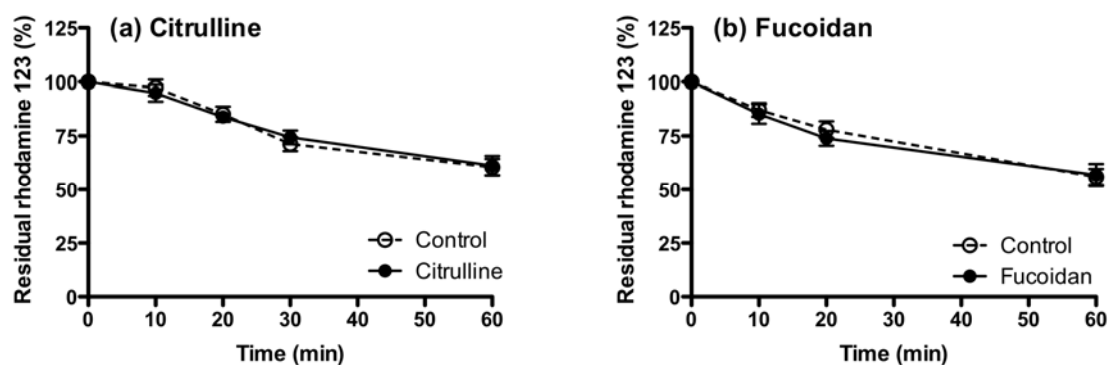


図 11. Caco-2 細胞における刷子縁膜直下ローダミン 123 蛍光強度低下に対するクルクミンの影響

Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). ***p < 0.001 vs control.

次に、同様に、シトルリン (50 μ M, 図 12.(a))、フコイダン (13 μ g/mL, 図 12.(b))、LR 末 (水溶性画分) (240 μ g/mL, 図 12.(c))、 β -カロテン (1.78 μ M, 図 12.(d)) およびクリシンの作用について検討したところ、シトルリン、フコイダン、LR 末 (水溶性画分)、 β -カロテンはコントロールと同様の推移を示し、有意な差を示さなかった。一方、クリシン (250 μ M, 図 13) を投与した場合は、60 分後においてコントロールと比べ、ローダミン 123 排出が有意に抑制された。



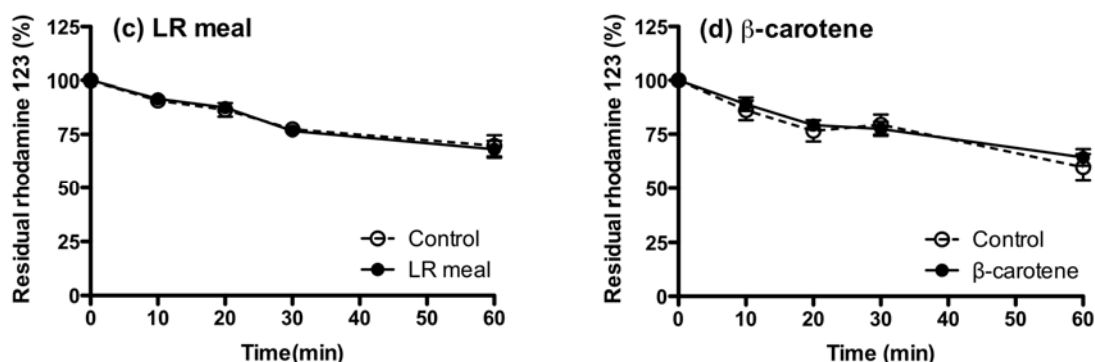


図 12. Caco-2 細胞における刷子縁膜直下ローダミン 123 蛍光強度低下に対するシトルリン(a)、フコイダン(b)、LR 末(水溶性画分)(c)および β-カロテン(d)の影響

Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. n=8 in plates (a) and (d). n=12 in plates (b) and (c).

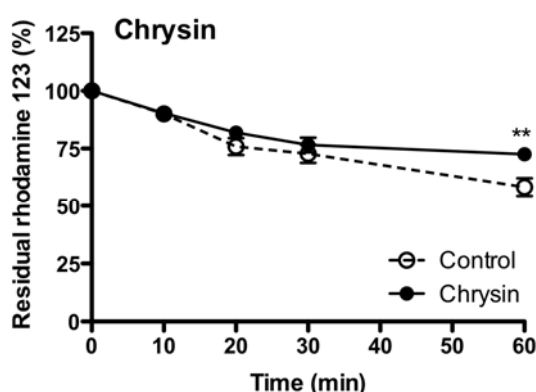


図 13. Caco-2 細胞における刷子縁膜直下ローダミン 123 蛍光強度低下に対するクリシンの影響

Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). **p<0.01 vs control.

個別課題名：動物組織を用いた生体機能の測定

測定値の再現性が悪く提示出来るようなデータを得ることが出来なかったが、消化管粘液分泌抑制薬と灌流装置を駆使することにより、再現性の向上に繋がるような測定条件の絞り込みがなされつつある。

3) 考察及び結論

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

個別研究課題名：低栄養状態における検討

若年者や健康時に比べ、高齢者や病態時には、生体機能や栄養状態の低下が起こり、若年者に比べ機能性食品や食品成分を摂取した場合の有害事象が発現しやすくなることが考えられる。高齢者においてはタンパク質由来のエネルギーが不足することが多いことより、高齢者に起こる栄養状態の低下を想定したモデルとして低タンパク質食飼育動物を用い、高齢者における薬食相互作用の評価系の確立を試みた。イチョウ葉エキスは過去に多くの医薬品との相互作用が報告されているが、その中でもトルブタミドはヒトおよびラットのいずれにおいても相互作用が報告されており、特に老齢ラットでは顕著に薬効を減弱したとの報告があることより、まず、低タンパク質食飼育動物においてイチョウ葉エキス投与がトルブタミドの薬効に与える影響について検討した。

低栄養状態の作成には低タンパク質食 (7% カゼイン含有) を 21 日間与え、低栄養を評価

するための一般的な指標である体重、体重あたりの肝重量および血漿中アルブミン濃度を比較したところ、いずれについても低タンパク質食群では通常食群と比較して有意な低下が認められ、低栄養状態の1つである低タンパク質モデルが作成出来たと判断した。

次に、低タンパク質食飼育およびイチョウ葉エキス投与がトルブタミドの血糖降下作用および血中濃度に与える影響を検討するために、ラットにイチョウ葉エキス 100 mg/kg を 5 日間反復経口投与し、最終投与時にトルブタミド 40 mg/kg を経口投与し、トルブタミド投与前および投与 12 時間後まで血糖値および血漿中トルブタミド濃度を測定した。低タンパク質食飼育の影響について、低タンパク質食群では通常食群と比較し、血糖降下作用の増強および血漿中トルブタミド濃度の上昇が認められた。この結果は、本実験で測定した各種 CYP 活性において、低タンパク質食飼育による変化は認められなかったが、低タンパク質食飼育により、ラットの肝 CYP 活性が低下していたとの報告があることより、低タンパク質食群においてトルブタミドの代謝が遅延し、血漿中トルブタミド濃度が上昇した結果、血糖降下作用を増強したのではないかと考えられた。ただし、本実験では全ての動物でトルブタミドを投与しており、投与 12 時間後に CYP 活性を測定していることから、低タンパク質食飼育自体による CYP 活性の変化については評価出来なかった。また、血糖降下作用は血中濃度の違いと比較し、低タンパク質食群と通常食群の差異が顕著であった。トルブタミドはタンパク結合率が 96% と非常に高く、主にアルブミンと結合することが知られていることより、低栄養状態ではアルブミン濃度が低下しているため、遊離型トルブタミド濃度が上昇し、血糖降下作用が強く現れた可能性が考えられる。

イチョウ葉エキス 5 日間反復投与においては、低タンパク質食群ではトルブタミドの血糖降下作用および血漿中濃度-時間曲線下面積 (the area under the concentration-time curve: AUC) は有意に低下したが、通常食群では AUC が低下する傾向がみられるのみで、血糖降下作用に有意な変化は認められなかった。また、イチョウ葉エキス 5 日間反復投与により今回測定した全ての分子種において CYP 酵素活性の有意な上昇が認められ、特にトルブタミド代謝の主要な酵素である CYP2C に関して、通常食群に比べ、低タンパク質食群において有意に活性が上昇していた。つまりイチョウ葉エキス反復投与による酵素誘導により、トルブタミドの代謝が促進され作用を減弱するが、その影響は低タンパク質食群において顕著であったといえる。老齢ラットにおいても、CYP 活性の basal level は若年ラットに比べ低値を示すが、イチョウ葉エキスによる誘導は老齢ラットにおいて 2-3 倍顕著であったという報告があることから、今回のモデルは老齢ラットと相関することが示唆された。

このことより、低タンパク質食飼育動物においては食品成分に対する感受性が増強し、健康への悪影響を及ぼすことが考えられるため、最も摂取されている向精神物質の1つであるカフェインを用い行動薬理的評価を行った。カフェインは低用量では覚醒作用などを示し、過剰量になると痙攣を起こすことより、カフェインの投与量を低用量と過剰量に設定し、情動性の指標である自発運動量の測定に併せ、過剰量投与時には痙攣回数を測定した。低タンパク質飼育による低栄養状態におけるカフェイン摂取の影響について、低用量投与時には自発運動量はいずれの食餌摂取群においてもカフェイン 10 mg/kg 投与により有意に増加し、その影響は低タンパク質食群で顕著であった。また、カフェイン 300 mg/kg 投与による痙攣回数については低タンパク質食群において増加傾向が認められた。このことより、低タンパク質状態ではカフェインに対する感受性が亢進しており、常用量でも有害事象が起こる可能性が示唆された。

以上より、通常食時と比較して低栄養状態において食品の生体機能への影響は顕著であること、また、食品の医薬品との薬物動態学的および薬力学的相互作用がより発現しやすいことが示唆された。イチョウ葉エキスとトルブタミド併用時の結果は、老齢ラットにおける研

究結果と同様の傾向を示し、高齢者を想定した評価系として低タンパク質食飼育動物の有用性が期待出来ると考えられた。

個別研究課題名：迅速かつ高感度な食品成分の光毒性リスク評価

本研究結果は近年注目を集めている光毒性リスクを予測する目的で先に我々が開発した新規手法を、機能性食品素材に適用できることを明らかにした初めての試みである。さらに、本アッセイ手法を用いることで光毒性リスクを軽減させるポテンシャルをもった含有成分の推定も併せて可能となり、すなわち、(i) 毒性成分の網羅的検証と (ii) 保護物質の推定により安全な セントジョーンズワート エキス開発に寄与できるものと期待する。本手法は セントジョーンズワート のみならず多くの天然あるいは合成機能性食品素材に適用可能であり、食品の安全性向上に貢献することが出来ると考える。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別課題名：実験動物での食品成分と医薬品の総合的な相互作用の測定

ワルファリンが多くの医薬品や食品成分と相互作用を起こすこと、また血液中ではワルファリンの大部分がアルブミンと結合していることから、低栄養状態などによる血漿アルブミンレベルの変化はワルファリンの抗血液凝固作用に影響することも知られている。そこで本研究ではダイエット効果を標榜した新食品に多用されている CFK エキスのワルファリンの抗血液凝固作用に対する影響を飼料タンパク質レベルならびに肝臓薬物代謝酵素との関連で検討した。その結果、CFK エキスが肝臓 CYPs を著しく誘導することを初めて明らかにした。CFK 中の CYPs を誘導する成分としてフォルスコリンが想定されたが、フォルスコリンに CYPs の誘導作用はなく、別の化合物が関与していると考えられた。一方、CFK エキスの負荷により、ワルファリンの抗血液凝固作用が減弱し、その作用メカニズムとしてワルファリンを代謝する CYP2C の誘導が関与していることが、マウスのインビボ実験で確認できた。このように評価したい食品成分をマウスに混餌投与し、その後にワルファリン処置して抗血液凝固作用と肝臓 CYP (特にワルファリン代謝に関与する CYP2C) 活性を測定し、ワルファリンと食品成分の相互作用を評価する実験系は、昨年度までに実施したイチョウ葉エキスに関する検討でも適用できた。これらの結果は、本実験で示した評価系がワルファリンと食品成分の相互作用を明らかにする一つの有用なモデルになることを示唆した。

低栄養状態は食品と医薬品の相互作用に影響する可能性が高い。そこで本研究では CFK エキスによるワルファリンの抗血液凝固作用に対する影響を低タンパク質食負荷の条件でも検討した。低タンパク質食負荷により体重増加は抑制されたが、血清アルブミンレベルには影響しなかった。一方、ワルファリンによる抗血液凝固作用は低タンパク質食負荷で減弱し、これには低タンパク質食負荷によるワルファリン代謝酵素の上昇が関連していると考えられた。低タンパク質状態では CYP 含量およびある種の CYP 活性が低下することが報告されていたが、本研究はこれまでの知見とは異なる結果となった。この原因として、本実験では減少させたタンパク質含量の代わりにスターチ含量を増量したこと、また食餌タンパク質レベルや摂取期間といった実験条件の違いなどが関連している可能性もある。今後食餌条件等の影響を検討する際には、飼料の摂取期間なども考慮したより緻密な条件設定が必要であろう。

昨年度までの検討において、ワルファリンの血漿タンパク質との結合については、明確な影響評価が困難であることを示した。本実験の 4 週間の 7%低タンパク質食負荷では血清アルブミン濃度にも影響は認められなかった。ワルファリンの薬理作用に対して、血漿タンパク質との結合型と遊離型の重要性は指摘されているが、血漿タンパク質と医薬品の結合に着

目した評価が難しいことは、本実験の結果でも示唆された。

本研究で示したワルファリンの抗血液凝固作用に焦点を当てた食品と医薬品の相互作用の評価法は、インビボにおいて非常に簡便かつ明確に相互作用を評価することが実験系である。この評価系は医薬品の一つのワルファリンに限定されるものであるが、ワルファリンが多くの食品成分や他の医薬品と相互作用を起こすこと、ワルファリンの利用者が多いことを考慮すると、この評価手法は、新食品と医薬品の相互作用をインビボで検討する一般的な方法として有益であろう。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

個別課題名：ヒト細胞を用いた生体機能の測定

P-糖タンパク質のはたらきにより、細胞内に負荷されたローダミン 123 は細胞外に排出されるため、その蛍光強度は時間とともに低下する。ベルガモチンとリコペンは Caco-2 細胞内ローダミン 123 蛍光量の低下に有意な影響を示さず、P-糖タンパク質機能には影響しないことが示された。これらについては、既に P-糖タンパク質に影響しないことが報告されており本研究結果と一致した。一方、クルクミンを投与した場合は、ローダミン 123 排出が有意に抑制されたことから、P-糖タンパク質機能を低下させる作用のあることが示された。クルクミンの P-糖タンパク質阻害作用についても既に多くの報告があり、本研究結果と一致した。以上の結果から本測定方法は P-糖タンパク質の機能評価に有用であることが示された。

そこで、次に、同様にシトルリン、フコイダン、LR 末（水溶性画分）、β-カロテンおよびクリシンの作用について検討したところ、クリシンのみが P-糖タンパク質阻害作用を投与 60 分後に示した。一方、残りの 4 成分は有意な作用を示さなかった。P-糖タンパク質に対するこれらの成分の影響に関する報告はほとんどなく、以上の結果は本方法により明らかにされた新しい知見であると言える。なおクルクミンについては P-糖タンパク質を阻害することが報告されているが、クリシンに関してはほとんど報告がなく、さらなる研究が必要とされる。今回の研究において、クルクミンおよびクリシンを摂取した場合、P-糖タンパク質の基質となる医薬品の効果が増強する可能性が示された。

個別課題名：動物組織を用いた生体機能の測定

ラット消化管を用いて、食品と医薬品との P-糖タンパク質を介した相互作用を共焦点レーザー顕微鏡で観察および測定可能な実験系の確立を試みたが、消化管から分泌される粘液や組織の収縮などにより焦点が定まらず、クリアな画像が取得不可能であることから、現在はアトロピンなど様々な消化管粘液分泌抑制薬と灌流装置を応用して、良好な画像取得の条件設定を試みている。

V 研究期間を通じた全体の研究成果

1 3年間（2年間）の主な研究成果

（1）研究項目ごとの研究成果の概要

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

個別課題名：放射性リガンドによる受容体結合活性及び血漿タンパク質結合の測定

（担当：山田静雄）

生体機能、特に自律神経機能の維持において要となるムスカリン性受容体結合活性を指標として食品の健康影響評価系の構築を目指した。放射性標識リガンドを用い、食品成分の受容体結合活性を測定した。その結果、検討した健康食品および食品成分の中で、ウコンの含有成分であるクルクミンがムスカリン性受容体結合活性を示し、自律神経機能に影響する可能性が示唆された。また、放射性標識ワルファリンを用いてアルブミン結合測定法を開発し、食品のケルセチンによってワルファリンのアルブミン結合阻害作用が認められた。本研究結果をもとに、実験条件の精査ならびに他の食品の影響も検証することにより、高感度かつ高精度の血漿タンパク質結合測定法を確立できるものと考えられる。

個別課題名：各臓器受容体結合活性のインビトロとインビボでの測定（担当：山田静雄）

セントジョーンズワートおよびエキナセアの抽出物は、ラット組織の粗細胞膜標品を用いたインビトロ受容体結合実験において、ムスカリン受容体結合活性を示さなかった。また、両抽出物は、自律神経機能のコリン作動薬刺激によるラットの唾液分泌に対しても殆ど影響しなかった。亜鉛およびクルクミンは、インビトロにおいてラット組織のムスカリン受容体に対し濃度依存的な結合活性を示したが、薬効発現量のクルクミンを経口投与ラット摘出組織において、ムスカリン受容体結合活性は認められなかった。同様に、クルクミンおよび亜鉛は、ラットに経口投与することにより、コリン作動薬刺激による唾液分泌に殆ど影響しなかった。亜鉛とクルクミンによるインビボでの結果がインビトロの結果が相違（ムスカリン受容体結合活性や唾液分泌への作用がインビボで認められなかった）した理由として、経口投与後の生物学的利用率が極めて低く、標的組織中濃度が薬効を示す濃度に到達しなかったことが考えられた。

個別課題名：低栄養状態における検討（担当：山田静雄）

有害事象や医薬品との相互作用が懸念される食品としてイチヨウ葉エキスおよびカフェインを用い、高齢者に起こる栄養状態の低下を想定した低タンパク質食飼育動物において薬食相互作用の評価系の確立を試みた。イチヨウ葉エキス投与時には併用薬物として血糖降下薬トルブタミドを用い、血糖値、血中トルブタミド濃度、肝薬物代謝酵素活性の測定を行った。その結果、通常食群ではイチヨウ葉エキスによる有意な変化は認められなかったが、低タンパク質飼育動物においてはイチヨウ葉エキスによって血中濃度、血糖降下作用が有意に低下することが示された。また、低栄養状態におけるカフェイン摂取では覚醒作用および痙攣作用の増強傾向が認められた。このことより、低栄養状態では食品併用による医薬品の薬効および薬物動態への影響および食品自身の作用が顕著であり、高齢者を想定した評価系としての有用性が期待出来る。

個別課題名：迅速かつ高感度な食品成分の光毒性リスク評価（担当：山田静雄）

本研究における作業仮説は光化学の第一法則に従って提案され、すなわち「光吸収に伴う光科学的挙動が光毒性発現のトリガーである」というコンセプトのもと光毒性リスク評価を

実施した。本年度は機能性食品素材としても注目を集める セントジョーンズワートが光毒性を誘発することに着目し、本植物エキス中に含まれる主要成分を UPLC/ESI-MS を用いて定量し、特に高含量な 20 種類の天然物について光毒性リスクを精査した。その結果、Hypericin, Pseudohypericin, Hyperforin が主要な光毒性化合物であることをさらに強く示唆する確証を得ることが出来、これに加えて UV 吸収特性のある一部のフラボノイドを共存させることで若干光毒性リスクを低減させる可能性を新たに見出した。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別課題名：血漿タンパク質結合と血液凝固の測定（担当：梅垣敬三）

ワルファリンは多様な食品成分等との相互作用を起こすことが知られており、血漿中の遊離型の増加は抗血液凝固作用の増強につながる。そこでワルファリンと血漿タンパク質結合段階に対する食品成分（特に植物成分）の影響系の構築を試みた。その結果、血漿タンパク質とワルファリンの結合段階に対する食品成分等の影響は極めて低いこと、また、インビボにおいてイチョウ葉エキスはワルファリンの抗血液凝固作用を減弱させるが、それにはワルファリンの血漿タンパク質結合レベルでの影響がほとんど関与しないことを示した。

個別課題名：実験動物での食品成分と医薬品の総合的な相互作用の測定（担当：梅垣敬三）

動物のインビボ実験では、食品成分の体内への吸収・分布を踏まえて医薬品と食品成分の相互作用の評価が可能である。そこで多様な食品成分等との相互作用が知られているワルファリンと、新開発食品に利用されている植物エキスとの相互作用の総合的な評価系の構築を試みた。イチョウ葉エキスならびにコレウス・フォルスコリ (*Coleus forskohlii* (CFK)) エキスは、マウス等の肝臓薬物代謝酵素 (CYP) を著しく誘導すること、ワルファリンとイチョウ葉エキスまたは CFK エキスの併用によりワルファリンの代謝が促進されてワルファリンの抗血液凝固作用が減弱することを示した。このマウスのインビボにおけるワルファリンの抗血液凝固作用を指標とした評価系は簡便で実用的であり、一般的な評価系として利用できることを明らかにした。また、この研究においてイチョウ葉エキス中の肝臓薬物代謝酵素 CYP を誘導する成分がピロバライドであることを明確にした。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

個別課題名：ヒト細胞を用いた生体機能の測定（担当：篠塚和正）

従来の方法を用いて食品成分の P-糖タンパク質に対する作用を本新規測定法の比較の対照として検証するとともに、共焦点レーザー顕微鏡画像解析システムを用いて、Caco-2 細胞における薬物吸収排泄動態の微細な変化を経時的に測定する方法を開発した。本新規測定法の実用性を検証するため、セントジョーンズワートやリコペン等既知成分に本方法を応用したところ、既報告と本測定結果は一致し、本方法の実用性が実証された。さらに本方法を用い 5 食品成分を検討し、新知見を含む結果が得られた。また、LS-180 細胞における P-糖タンパク質に対する食品成分の影響を検討したところ、ピペリンとカプサイシンは阻害作用、ダイゼインとゲニステインは促進作用を示すことを明らかにするとともに、本新規測定法が食品成分の P-タンパク質機能評価に応用できることを示唆した。

個別課題名：動物組織を用いた生体機能の測定（担当：篠塚和正）

Caco-2 細胞刷子縁膜直下のローダミン 123 動態高感度測定法をラット消化管上皮細胞に適用し、より簡便で再現性の良好な測定条件を精査するとともに、その実用性の検証を試みた。方法としては一日絶食したラットの回腸にローダミン 123 を取込ませた後、管腔側を外

側にして対物レンズ上のシャーレ内に装着固定した。シャーレ内には 95%酸素を通気した 37 度の Tyrode 液を満たし、被験食品成分を投与して、組織内ローダミン 123 残存量に対する影響を、共焦点レーザー顕微鏡にて観察測定した。しかしながら、回腸から分泌される粘液や組織の収縮により蛍光測定にバラツキが生じ、生理的な状態では高感度で正確な測定が出来ないという結論に達した。そこで、現在はアトロピンなど様々な消化管粘液分泌抑制薬と灌流装置を応用して、良好な画像取得の条件設定を試みている。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

本研究では、食品の機能性タンパク質に対する結合活性を基に生体機能に及ぼす影響の評価方法の開発を試みた。放射性標識リガンドを用いることで、高感度かつ高精度の受容体や血漿タンパクへの結合測定法を確立でき、インビボでの作用には食品成分の体内動態を考慮することが重要となることが示唆された。また、低栄養状態では併用医薬品の薬効および薬物動態への影響ならびに食品自身の作用が顕著であること、低栄養状態が危惧される素材として用いた CFK が代謝酵素を著しく誘導し、ワルファリンの薬効を減弱させることを明らかにした。光毒性リスク評価においてはセントジョーンズワート中の主要な光毒性化合物を強く示唆する確証を得たことに加え、一部のフラボノイドによるリスク低減の可能性を見いだした。消化管上皮細胞における吸収・排泄過程に対する食品の影響評価では、高感度かつ経時的に解析する手法を開発し、食品成分の P-糖タンパク質機能評価に応用できることを示唆した。

2) 研究成果

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

個別課題名：放射性リガンドによる受容体結合活性及び血漿タンパク質結合の測定

生体機能、特に自律神経機能の維持において要となるムスカリン性受容体結合活性を指標として食品の健康影響評価系の構築を目指した。放射性標識リガンドを用いるラジオレセプターアッセイ法により受容体を測定し、食品成分の結合活性を評価した。その結果、検討した 10 種類の健康食品及び食品成分のなかで、ウコンの成分のクルクミンがムスカリン性受容体結合活性（ムスカリン性受容体の選択的標識リガンドの $[^3\text{H}]$ オキソトレモリン-M 特異的結合阻害作用、図 14）を示し、その IC_{50} 値は $54.2 \mu\text{M}$ であった。これよりクルクミンは自律神経機能（唾液分泌など）に影響することが示唆された。

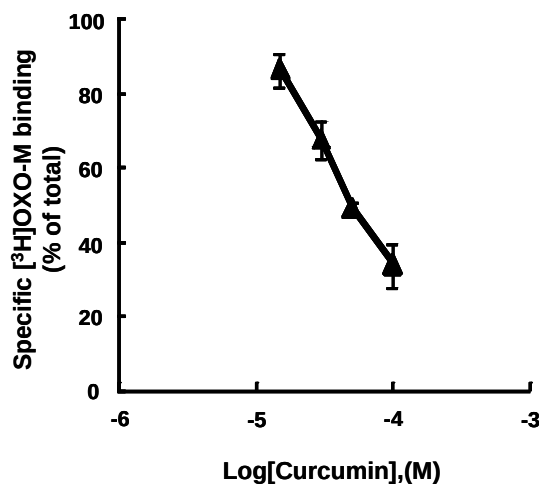


図 14. $[^3\text{H}]$ オキソトレモリン-M 特異的結合に対するクルクミンの影響

Each point represents mean $\pm$ S.E. of 3-5 rats.

放射性ワルファリンを用いる血漿タンパク質（アルブミン）の結合測定法を開発し、医薬品と食品の相互作用を高感度に検出することは、食品の健康影響への有用な評価法になると考えられる。 $[^3\text{H}]$ ワルファリンによるアルブミン結合を検出でき、食品成分のケルセチンにより結合阻害作用が認められた（図 15）。このことより、ケルセチンによるワルファリンのタンパク結合に対する影響を詳細に検討したところ、ワルファリンの結合定数を有意に減少し、ケルセチンによるワルファリンのタンパク結合阻害の様式は競合阻害であることが示唆された。

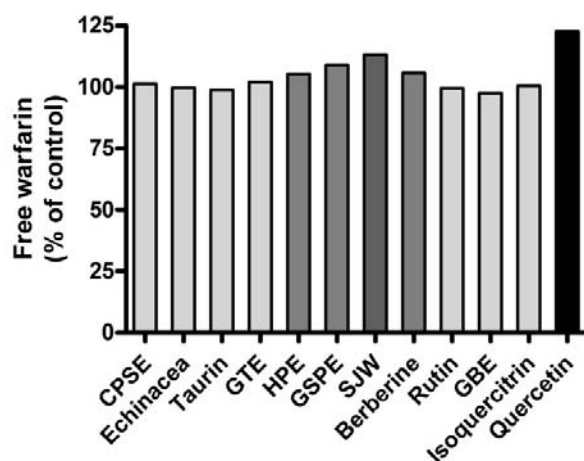


図 15. 食品および食品成分によるワルファリンタンパク結合への影響

Concentration of all samples was 50 $\mu\text{g/mL}$. Each column represents of 1 experiment.

個別課題名：各臓器受容体結合活性のインビトロとインビボでの測定

口内乾燥の報告がある食品としてセントジョーンズワートおよびエキナセアを用いて、ピロカルピン誘発唾液分泌に対する影響を測定した結果、ピロカルピン誘発唾液分泌は、投与 1, 3 時間後では変化がなく、6 時間後において僅かに減少傾向を認めた程度であった（図 16）。また、顎下腺組織より調製した受容体標品を用いてインビトロにおけるムスカリン受容体アンタゴニストリガンドである $[^3\text{H}]$ NMS 結合に対する阻害活性を測定したが、いずれも阻害活性は認められなかった（図 17）。

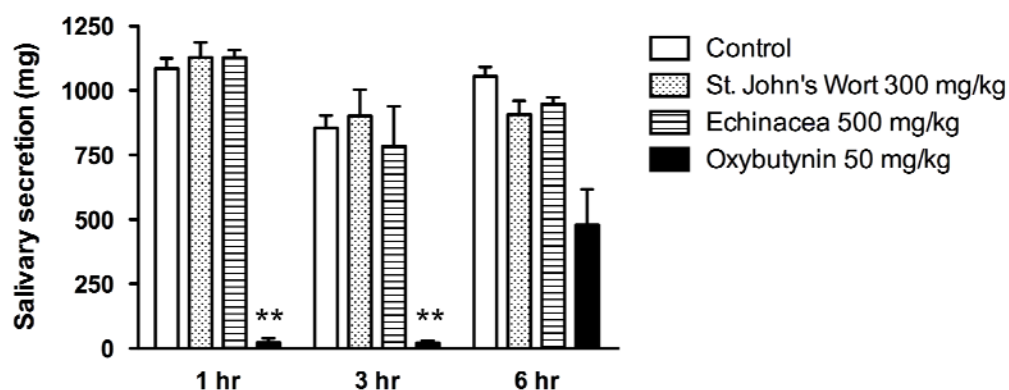


図 16 ピロカルピン誘発唾液分泌に対する影響

Each column represents mean $\pm$ S.E. of 3-5 rats. Asterisks show a significant difference from the control values, **: $P < 0.01$.

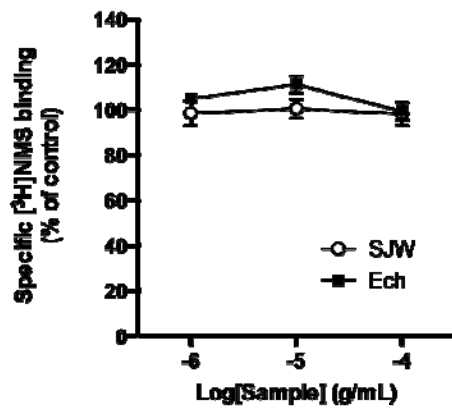


図 17
[³H]NMS 特異的結合に対する影響

Each point represents mean±S.E. of 3-4 rats.

前年度において、[³H]オキソトレモリン-M 特異的結合阻害作用が認められた食品(成分)である亜鉛およびクルクミンについて、ムスカリン受容体に対する作用を評価するために自発的唾液分泌に対する影響を検証した。亜鉛 (5, 50, 150 mg/kg) は投与 1, 3, 6 時間後に、クルクミン (60 mg/kg) は投与 80 分後から 10 分間の唾液分泌量を測定した結果、いずれも変化は認められなかった(図 18)。また、クルクミン投与群については同一個体において 90 分後に脳と顎下腺を摘出し、摘出組織における[³H]オキソトレモリン-M 結合パラメーターを算出したが変化は認められなかった。

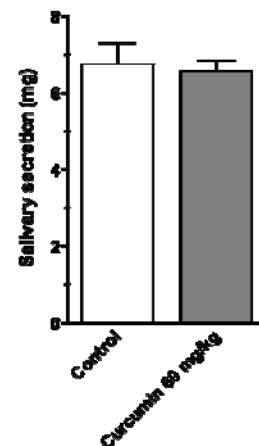
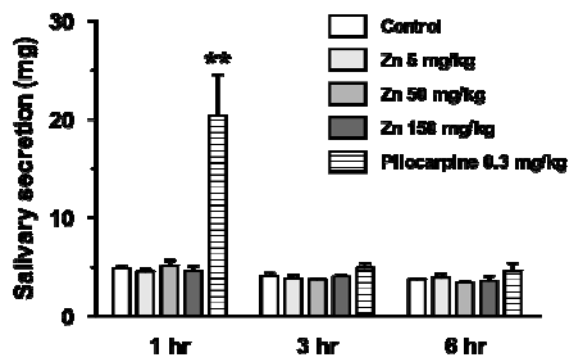


図 18 自発的唾液分泌に対する影響

Each column represents mean±S.E. of 3-6 rats. **: p<0.01 vs vehicle.

個別研究課題名：低栄養状態における検討

低栄養状態の作成には通常食 (20% カゼイン) および低タンパク質食 (7% カゼイン) を 21 日間与えた。低タンパク質食飼育により、体重、体重あたりの肝重量、血漿中アルブミン濃度の有意な低下が認められ、高齢者に多く認められる低栄養状態の 1 つである低タンパク質モデルが作成出来たと判断できた。

各々の食餌群に vehicle またはイチヨウ葉エキス (100 mg/kg) を 5 日間反復投与し、最終投与時にトルブタミド 40 mg/kg を経口投与し、トルブタミド投与前および投与 12 時間後までの血糖値および血漿中トルブタミド濃度を測定した結果、通常食群に比べ、低タンパク質食群においてトルブタミドの血糖降下作用が増強される傾向が認められた。また、通常食群では vehicle 投与群とイチヨウ葉エキス投与群の血糖降下作用に有意な差は認められなかったが、低タンパク質食群においてはイチヨウ葉エキス投与によりトルブタ

ミドの血糖降下作用が有意に減弱した(図 19)。

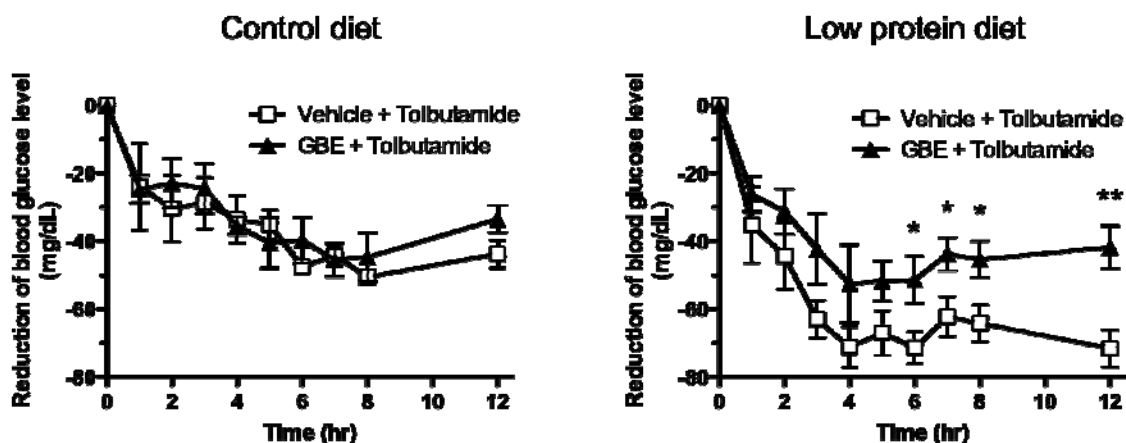


図 19 トルブタミドの血糖降下作用に対する低タンパク質食およびイチョウ葉エキス投与の影響
Values are expressed as mean $\pm$ S.E. for 4-6 rats. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs Vehicle.

血糖値の測定と同じタイムポイントにおいて、血漿中トルブタミド濃度を測定した結果、血糖値と同様に通常食群と比較して低タンパク質食群において血漿中トルブタミド濃度が上昇する傾向が認められ、イチョウ葉エキス投与による血漿中トルブタミド濃度の減少は、低タンパク質食群においてより顕著であった(図 20)。これらの値より算出した血中濃度-時間曲線下面積(AUC_{0-12})は、通常食群および低タンパク質食群のいずれにおいてもイチョウ葉エキス投与により減少したが、その影響は低タンパク質食群において有意差が認められた(表 2)。

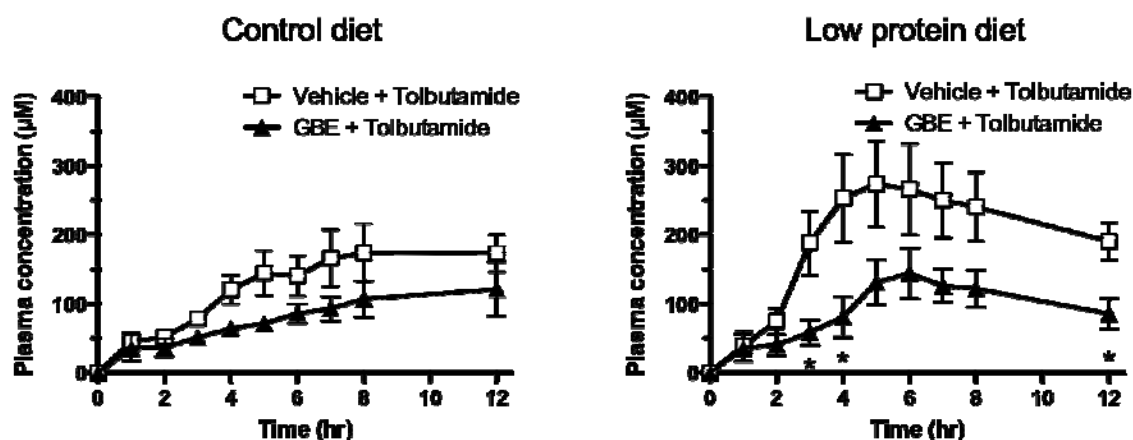


図 20 血漿中トルブタミド濃度に対する低タンパク質食飼育およびイチョウ葉エキス投与の影響
Values are expressed as mean $\pm$ S.E. for 3-6 rats. *: $p < 0.05$ vs Vehicle.

表 2 トルブタミドの血漿中濃度-時間曲線下面積(AUC_{0-12})に対する低タンパク質食飼育およびイチョウ葉エキス投与の影響

	AUC_{0-12} ($\mu M \cdot hr$)	
	Vehicle	GBE
Control diet	1529 $\pm$ 273	947 $\pm$ 173
Low protein diet	2327 $\pm$ 464	1092 $\pm$ 202 *

Values are expressed as mean $\pm$ S.E. for 3-6 rats. *: $p < 0.05$ vs vehicle

トルブタミド投与 12 時間後に肝臓を摘出し、調製した肝ミクロソームを用いて主要な肝薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) 活性を測定した。イチョウ葉エキスを 5 日間投与することにより、いずれの分子種においても有意な酵素活性の上昇が認められ、CYP2B および CYP2C については通常食群と比較し、低タンパク質食群において有意な活性の上昇が認められた (図 21)。

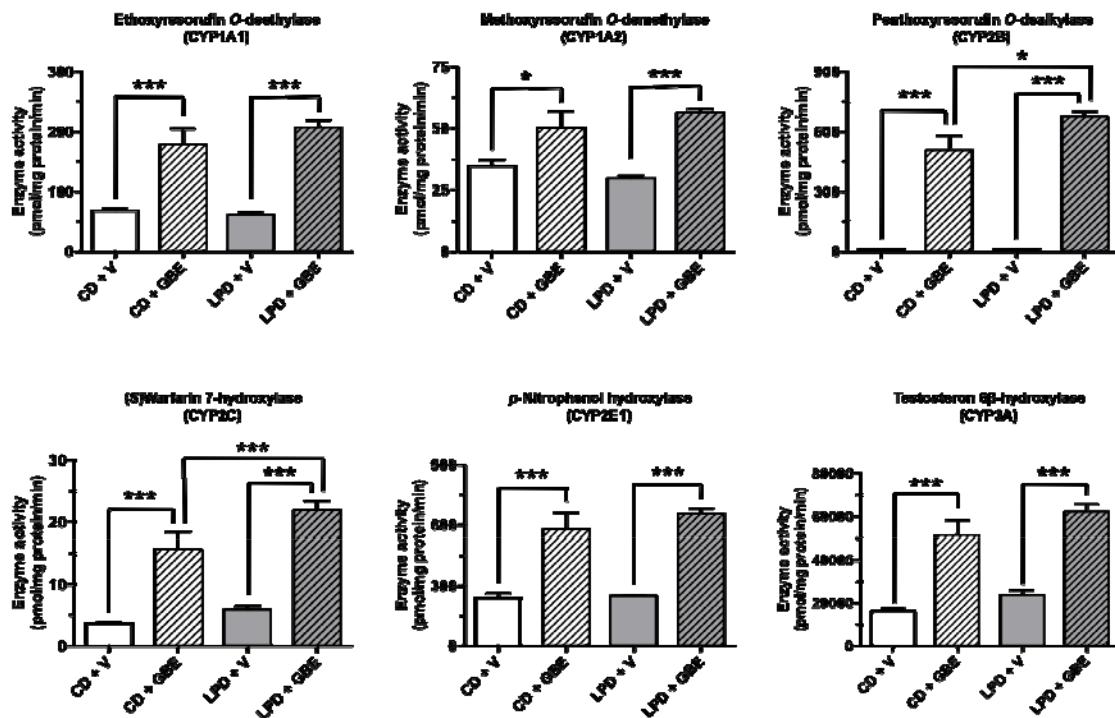


図 21 肝薬物代謝酵素活性に対する低タンパク質食飼育およびイチョウ葉エキス投与の影響
CD: control diet, LPD: low protein diet, V: vehicle. Each column represents mean±S.E. of 4-6 rats. *: $p<0.05$, ***: $p<0.001$ vs vehicle.

低タンパク質食飼育マウスにおいて、カフェイン 10 mg/kg または 300 mg/kg を経口単回投与後、30-90 分間の運動量および 300 mg/kg 投与時には痙攣回数を測定し、通常食群の場合と比較した。その結果、自発運動量はいずれの食餌摂取群においてもカフェイン 10 mg/kg 投与により有意に増加し、その影響は低タンパク質食群で大きい傾向を示した (図 22 左)。また、カフェイン 300 mg/kg 投与による痙攣回数については低タンパク質食群において増加した (図 22 右)。

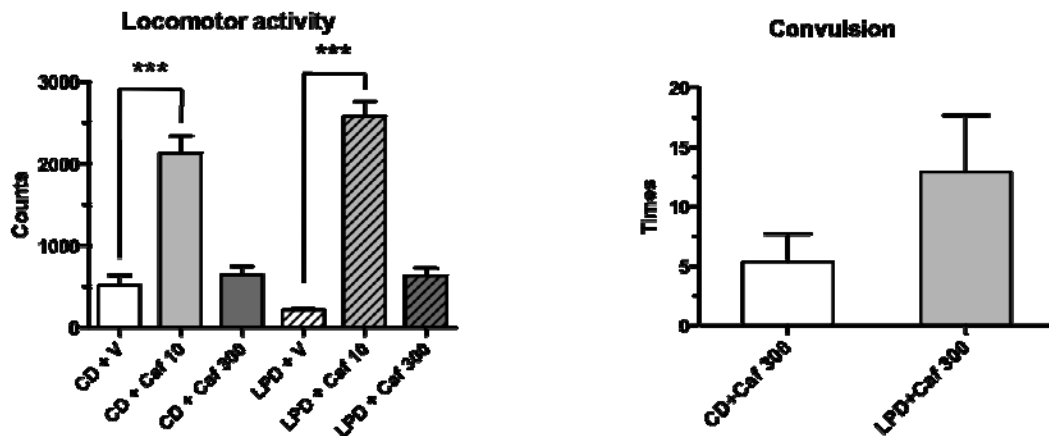


図 22 低栄養状態におけるカフェイン摂取時の自発運動量および痙攣に対する影響
CD: control diet, LPD: low protein diet. Each column represents mean±S.E. of 7-12 mice. ***: $p<0.001$ vs vehicle.

個別研究課題名：迅速かつ高感度な食品成分の光毒性リスク評価

UPLC/ESI-MS を用いてセントジョーンズワートエキス中の含有成分について網羅的に検証を行い、主要成分の特定に至った。特定した約 20 種類の主要成分について、UV 吸収特性、光反応性（ラジカル産生能）を評価し、特に活性酸素種産生能が高かった成分については、インビトロ photoirritation assay とインビトロ photogenotoxicity assay を併せて実施し、誘発され得る光毒性の種類についても精査した。この結果、数種の化合物が強力な phototoxin であることを明らかにすると共に、既報の光毒性化合物との比較によってその毒性リスクについても相対的に比較することが出来た。さらに、セントジョーンズワート エキス中に多く含まれる成分のなかで、sunscreen と同様の機能を有するポリフェノールを見出し、本品と光毒性が疑われる含有成分を共存させると有意に光毒性リスクが低下することを初めて明らかにした。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別課題名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

ワルファリンと血漿タンパク質の結合に対する食品成分の影響の評価系の構築について、多検体処理ができる平衡透析ユニット、試薬アルブミン、低タンパク質食摂取マウスの血漿等を利用して検討した。ワルファリンと血漿タンパク質結合率に影響するポジティブコントロールにインドメタシンを用い、評価系の妥当性を検討したところ、低タンパク質食負荷マウス血漿では、ワルファリンと血漿タンパク質の結合に対する影響が比較的検出しやすかったが、それでも影響は極めて低く、これを実用的な相互作用の評価系にすることは困難と考えられた。動物実験において 7%程度の低タンパク質食負荷では血漿アルブミンはほとんど変動せず、無タンパク質食負荷では変動したが、一つの食事因子の低下が他の因子の増加を招くこと、また食餌の摂取期間なども複雑に影響するため、このような手法を相互作用の影響評価系として取り入れることは、現実的には困難と考えられた。マウスのインビボ実験においてイチョウ葉エキスはワルファリンの抗血液凝固作用を抑制するが、イチョウ葉エキスはワルファリンと血漿タンパク質の結合率にほとんど影響しなかった。

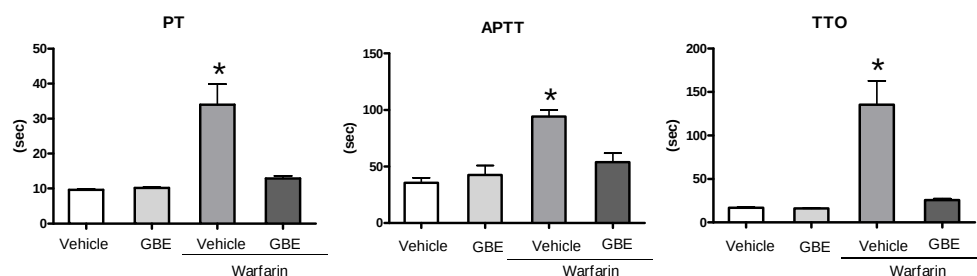
個別課題名：実験動物での食品成分と医薬品の総合的な相互作用の測定

マウスに一定期間食品成分を摂取させ、その後にワルファリンを投与して血液凝固とワルファリンの代謝酵素の変動を測定する評価系は、相互作用の評価系として実用的であった。本研究において、イチョウ葉エキスの摂取がワルファリンの抗血液凝固作用を減弱させ、その作用機序としてイチョウ葉エキス中のピロバライドによる著しいワルファリン代謝酵素の誘導が関係することを示した。また、イチョウ葉エキスの有害影響として出血促進の事例報告があるが、イチョウ葉エキスはむしろワルファリンの抗血液凝固作用を減弱させることを実験的に明確に示した。

ダイエット食品に多用されている CFK エキスについても、肝臓薬物代謝酵素を誘導してワルファリンの抗血液凝固作用を減弱させることを示した。CFK エキスが肝臓薬物代謝酵素の誘導作用を有することはこれまで知られていなかった。CFK エキスの有効成分はアデニル酸シンクラーゼを活性化するフォルスコリンであるが、フォルスコリンには薬物代謝酵素の誘導作用はなかった。CFK はシソ科のハーブであるが、過去（2005 年、イタリア）

に CFK 含有製品でアトロピン様の急性中毒症状の報告がある。そこで、ピロカルピン誘発唾液分泌をラットのインビゴ系において評価したが CFK には口渇作用はほとんどなく、アトロピン様作用もないと考えられた。医薬品の有害事象として口渇がある。このラットにおけるピロカルピン誘発唾液分泌の評価系も医薬品と食品成分の評価系として有用と考えられる。3 年間の研究において得られたマウスを用いたインビゴにおけるワルファリンと食品成分との相互作用の評価系の概要は下図に示したとおりである。この手法の妥当性については、イチョウ葉エキスならびに CFK エキスの検討で確認できた。食品成分と医薬品の相互作用の事例として、ワルファリンが多いことを考慮すると、この評価系は一般的な相互作用の評価系になりうると考えられる。

A. イチョウ葉エキス (GBE) を前処理



B. GBE 中の肝臓薬物代謝酵素の誘導成分 (bilobalide) を前処理

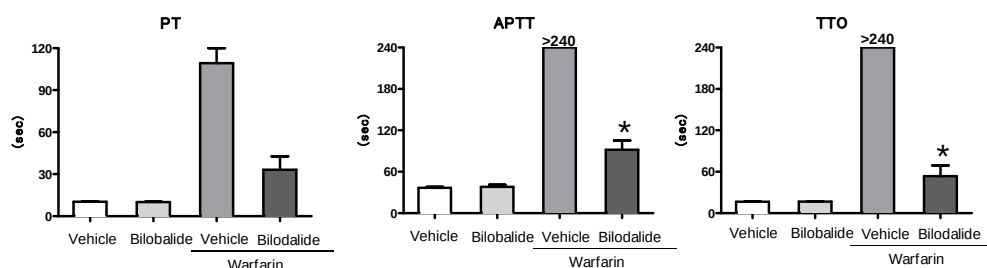


図 23. ワルファリンの抗血液凝固作用に対するイチョウ葉エキスの影響

イチョウ葉エキスまたはその成分である bilobalide は 5 日間投与した。ワルファリンは 3・5 日目に胃内投与して最終投与 2 時間後に採血し、血液凝固パラメーターを測定。PT はプロトロンビン時間、APTT は活性化部分トロンボプラスチン時間、TTO はトロンボテストとしての複合凝固因子を示す。値は 5・6 匹のマウスの平均値±標準誤差で示した。*: 他群との有意差, $p < 0.05$ 。

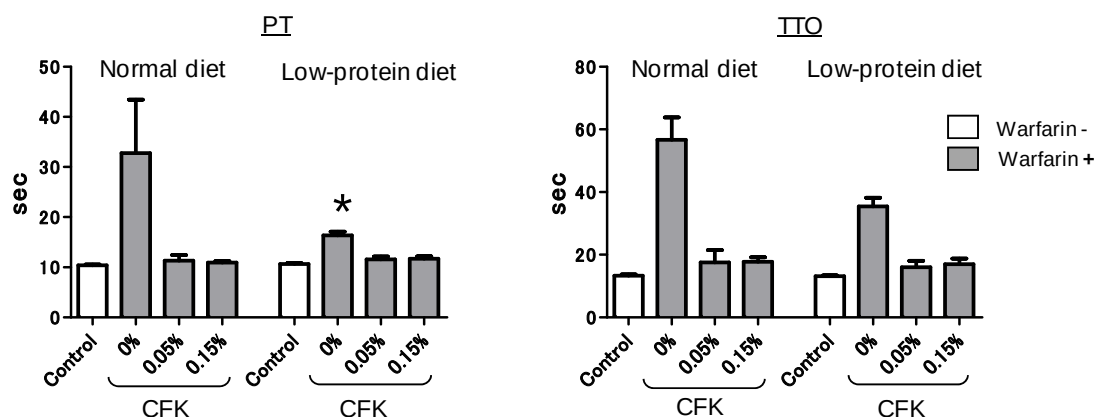


図 24 ワルファリンの抗血液凝固作用に対する CFK エキスならびに低タンパク質食の影響

ICR 系雄性マウスに CFK エキス (0-0.15%) を添加した標準食 (20% カゼイン含有) または低タンパク質食 (7% カゼイン含有) を 4 週間混餌投与した。ワルファリン (0.25mg/kg 体重) は 27 および 28 日目に胃内投与し、最終投与 18 時間後に採血した。値は 6 匹のマウスの平均値±標準誤差で示した。*: 同濃度の CFK エキスにおける標準食と低タンパク食の間の有意差, $p < 0.05$ 。

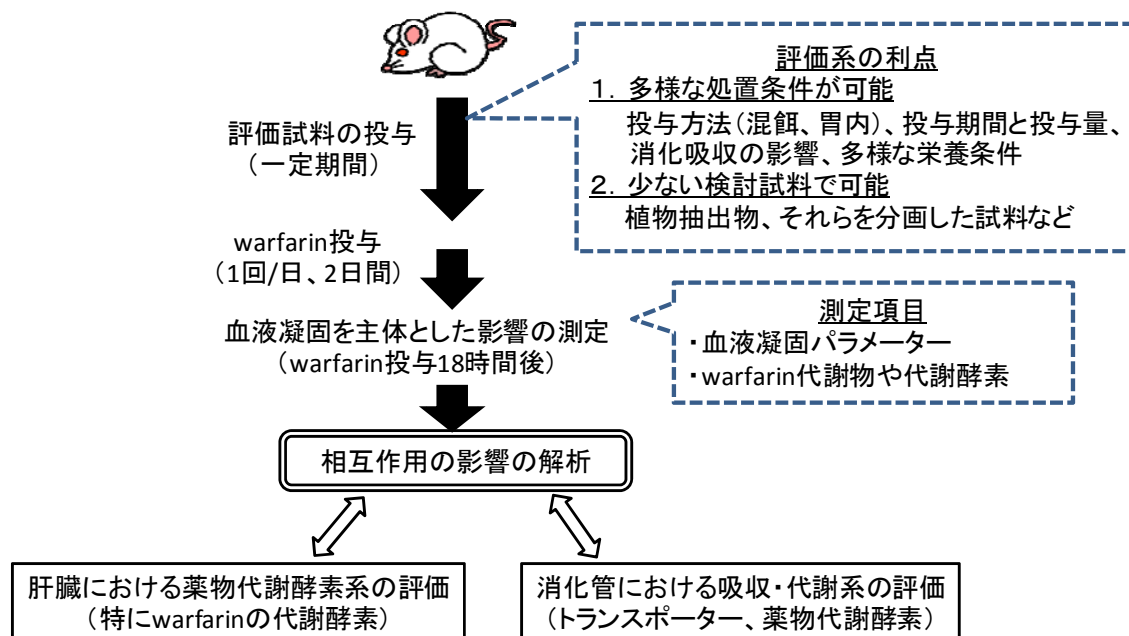


図 25 マウスを用いたインビボにおけるワルファリンと食品成分の相互作用の評価法

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

個別課題名：ヒト細胞を用いた生体機能の測定

初年度の研究では、ローダミン 123 の経時的变化の検出方法と測定条件を確立した。

Caco-2 細胞において、強心薬のジゴキシンが薬物トランスポーターの基質であることはよく知られている。そこで、細胞内ローダミン 123 の蛍光強度の経時的低下に対するジゴキシンの影響を検討し、本実験システムにおいて、薬物トランスポーターによる変化を検出しているか否か、確認実験を行った。その結果、以下のような結果を得た。(a) ローダミン 123 の蛍光量は経時的に低下したが、その低下の程度は細胞温度が 28 度では 90 分後に約 20%ほどであった。一方、31 度では 60%と著しい低下を示した。(b) ジゴキシン 48 時間処置した Caco-2 細胞において、31 度の条件下で実験を行ったところ、ローダミン 123 の蛍光量の減少は対照群のそれに比べて低い傾向を示した。一方、ジゴキシン 48 時間処置した後、ジゴキシンを含まない培養液中で 1 日培養した Caco-2 細胞では、ローダミン 123 の蛍光量の低下は対照群のそれとほぼ同程度で有意差はなかった。(c) ジゴキシン 7 日間処置した Caco-2 細胞において、31 度の条件下でのローダミン 123 蛍光量の低下は薬物処置の対照群のそれに比べて低い傾向を示した。一方、ジゴキシン 7 日間処置した後、ジゴキシンを含まない培養液中で 1 日培養した Caco-2 細胞では、31 度の条件下でのローダミン 123 蛍光量の低下は対照群に比べて有意に促進されていた。

このような低下は P-糖タンパク質の基質であるジゴキシン (1 μM) により完全に消失したことから、P-糖タンパク質による細胞外排出に基づくと考えられる。ローダミン 123 の排出はセントジョーンズワートにより、対照に比べ有意に抑制された。一方、セントジ

ヨーンズワート (1 $\mu\text{g/mL}$) を 7 日間処理した後、1 日間セントジョーンズワートを除いて培養した細胞では、ローダミン 123 の排出は逆に有意に増強された。(図 26)

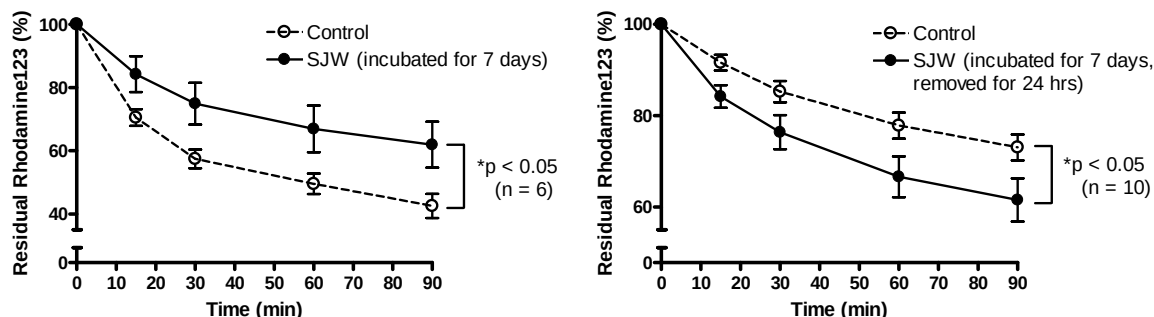


図 26. Caco-2 細胞におけるローダミン 123 の蛍光強度低下に対するセントジョーンズワートの阻害作用(左図)および誘導作用(右図)

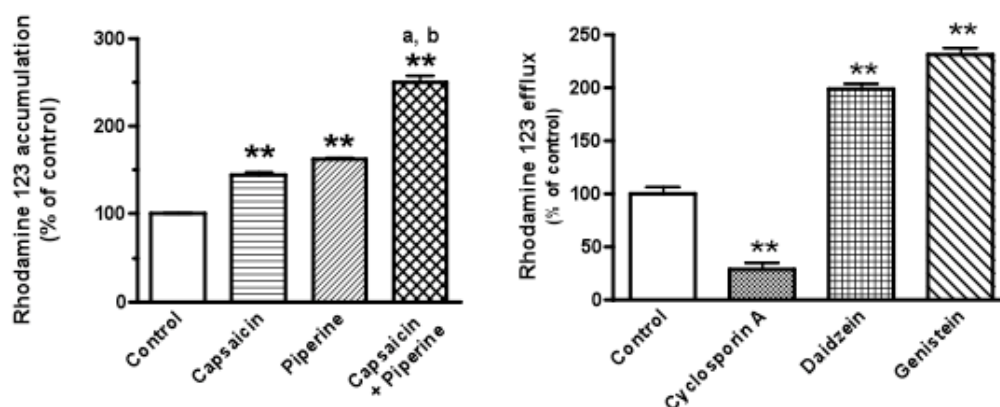


図 27. ローダミン 123 の取り込みおよび排泄に対する食品成分の影響

Each column represents the mean $\pm$ S.E. for three to six experiments. ** $p < 0.01$ vs control. ^a $p < 0.01$ vs capsaicin, ^b $p < 0.01$ vs piperine.

2 年目の研究では、被験食品成分を 48 時間処置した LS-180 細胞において、P-糖タンパク質の基質であるローダミン 123 (10 μM) の取り込みを蛍光検出器により測定した。排出の測定にはローダミンを負荷した LS-180 細胞に食品成分を処置した後、細胞内のローダミン 123 残存量を蛍光量により測定した。さらに、食品成分を処置した細胞において MDR1, MRP1, MRP2, MRP3 の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR 法により測定した。また、Caco-2 細胞において、リアルスペクトルイメージング共焦点レーザー顕微鏡システムを用い、アルゴンレーザー (励起波長 488 nm) を細胞の同一面上に集光させ、得られる蛍光波長 (515 nm) を画像化し細胞内ローダミンの蛍光像を得た。この光学的切片画像中の蛍光強度を細胞の薬物排出トランスポーター活性の指標とした。

その結果、LS-180 細胞における P-糖タンパク質に対する食品成分の影響を検討したところ、ペピリンとカプサイシンは阻害作用、ダイゼインとゲニステインは促進作用を示す (図 27) ことを明らかにし、カプサイシン、ダイゼイン、ペピリン、セサミンは MRP1 または MRP3 の mRNA 発現量を増加させた (図 28)。この結果から本細胞系が食品成分の P-タンパク質機能評価に応用できることが示唆された。

2年目の研究ではまた、共焦点レーザー顕微鏡画像解析システムを用いて細胞内におけるローダミン123の動きとその増減を三次元的にリアルタイムで追跡した結果、Caco-2細胞に対するジゴキシンおよびセントジョーンズワートの阻害および誘導作用の検出に、この測定系が十分機能すること、P-糖タンパク質が局在する刷子縁膜直下のローダミンの動きのみを解析することにより、細胞全体のローダミンを測るよりも、さらに微細な変化を高感度で検出出来ることを明らかにした(図29)。

三次元解析用の光学切片画像データの取得は以下のようにして行った。一つの細胞を刷子縁膜側から基底膜側に向かって(Z軸方向に)等間隔で20枚撮影するようプログラムし、1枚目(刷子縁膜直下)と10枚目(細胞中央部)の光学的切片をそれぞれ刷子縁膜直下および細胞中央部のデータとして取得し、それぞれに局在するローダミン123の蛍光強度の変化を比較した。

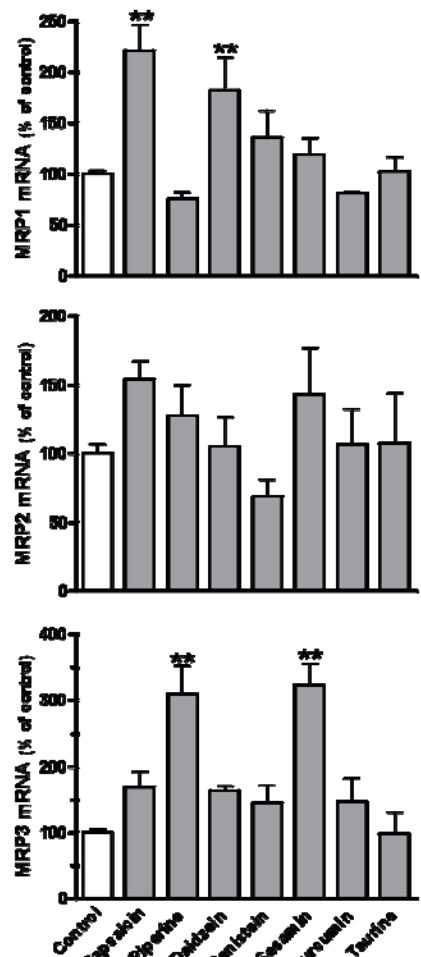
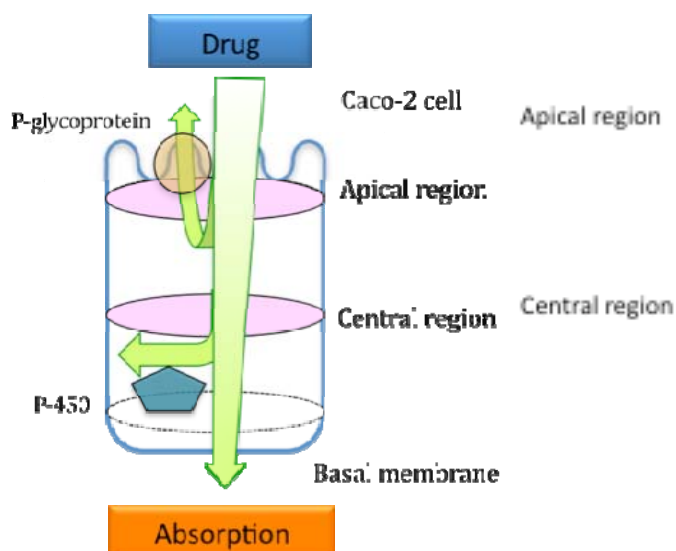
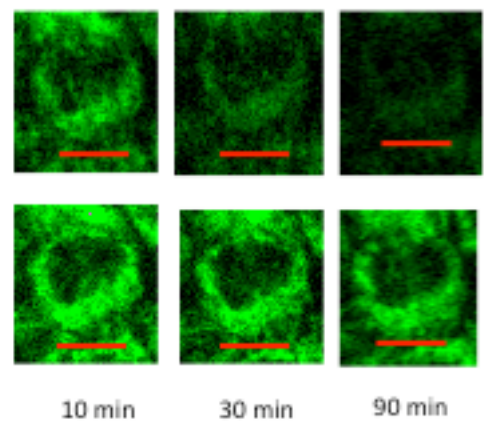


図28. MRP1, MRP2, MRP3 mRNA発現量に対する食品成分の影響

** $p < 0.01$ vs control.



Red bar shows 10 μ m.

図29. Caco-2細胞の模式図(左図)および細胞中央部と刷子縁膜直下のローダミン123の蛍光強度変化(右図)

この実験では部位毎の微妙な違いを検知しやすくするために対物レンズは新規導入した高倍率油浸レンズ（60 倍）を用いた。その結果、経時的变化は場所により、異なること、方向としては刷子縁膜側から基底膜側へ移動していることを見いだした。そこで次に、P-糖タンパク質が局在する刷子縁膜側と細胞中央部のローダミンの蛍光強度の変化について定量的に比較検討した。

ジゴキシン（10 μ M）を用い、Caco-2 細胞におけるローダミン 123 蛍光強度低下を共焦点レーザー顕微鏡により（a）細胞全体（断面における蛍光強度の合計）、（b）刷子縁膜直下、（c）細胞中央部を経時的に測定したところ、図 30 に示された通り、刷子縁膜直下を測定する方法においては 20 分後から有意な差が検出できた。一方、細胞全体を測定する方法では、90 分においても有意な差は検出できず、細胞中央部を測定する方法で 90 分においてのみ有意な差が検出できた。

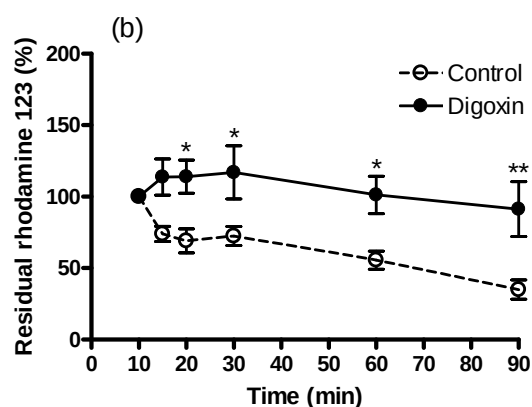
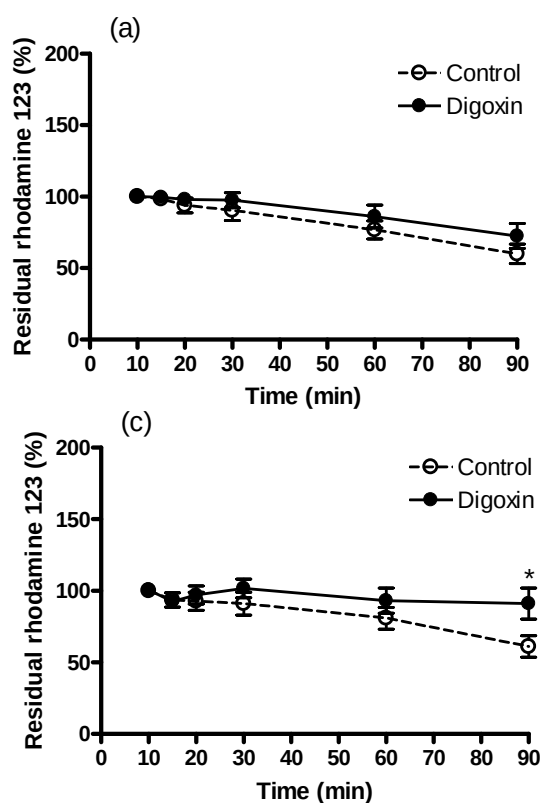
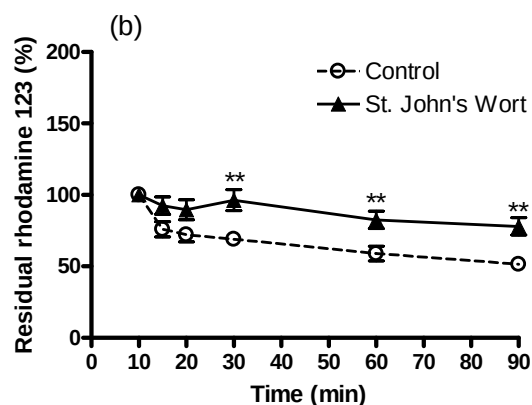
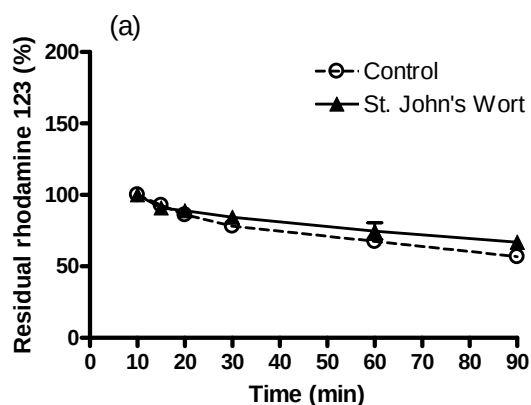


図 30. Caco-2 細胞におけるローダミン 123 蛍光強度低下に対するジゴキシン（10 μ M）の影響（a）細胞全体、（b）刷子縁膜直下、（c）細胞中央部を経時的に測定

Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). * p < 0.05, ** p < 0.01 vs control.



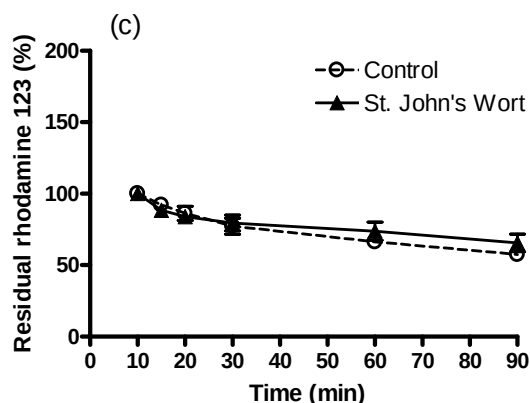


図 31. Caco-2 細胞におけるローダミン 123 蛍光強度低下に対するセントジョーンズワート (0.1 $\mu\text{g/mL}$) の影響 (a) 細胞全体、(b) 刷子縁膜直下、(c) 細胞中央部を経時的に測定 Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). ** $p < 0.01$ vs control.

セントジョーンズワート (0.1 $\mu\text{g/mL}$) を用い、同様の実験を行ったところ、ジゴキンの場合と同様に刷子縁膜直下を測定する方法においてのみ有意な差が検出出来た (図 31)。また、同方法と既存の方法 (マイクロプレートリーダー、蛍光顕微鏡) を比較検討した実験において、既存の方法では 90 分のみには有意な差が見られるだけであったが、共焦点レーザー顕微鏡を用いて刷子縁膜直下を測定する方法では 30 分から有意な差が検出可能であった (図 32)。

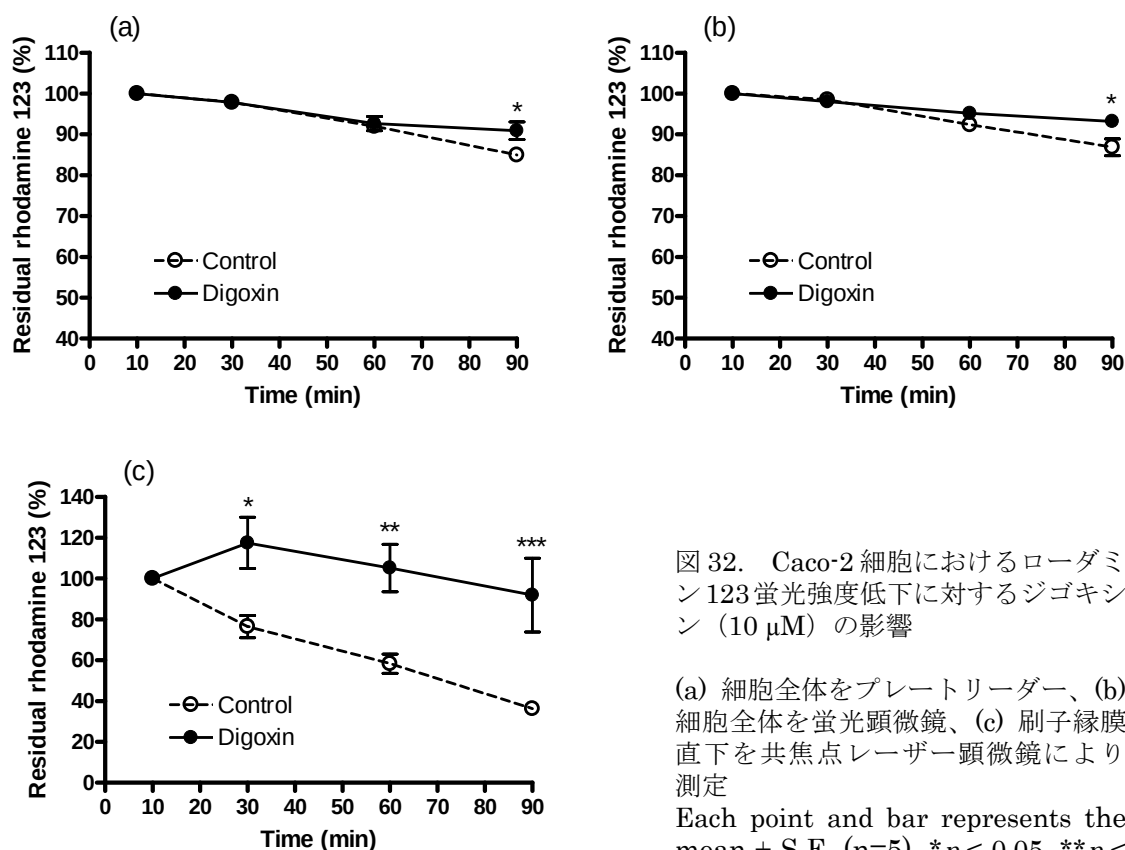


図 32. Caco-2 細胞におけるローダミン 123 蛍光強度低下に対するジゴキシン (10 μM) の影響

(a) 細胞全体をプレートリーダー、(b) 細胞全体を蛍光顕微鏡、(c) 刷子縁膜直下を共焦点レーザー顕微鏡により測定

Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=5). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control.

この 2 年間で開発した新規高感度測定法を様々な食品成分の健康影響評価に適用し、より簡便で再現性の良好な測定条件を確立すると共に、その実用性を検証した。その結果、ベルガモチン (10 μM , 図 33.(a)) とリコペン (1 μM , 図 33.(b)) は Caco-2 細胞内ローダミン 123 蛍光量の低下に有意な影響を示さなかった。一方、クルクミン (30 μM , 図 34) を投与した場合は、ローダミン 123 排出が 10 分後から有意に抑制された。

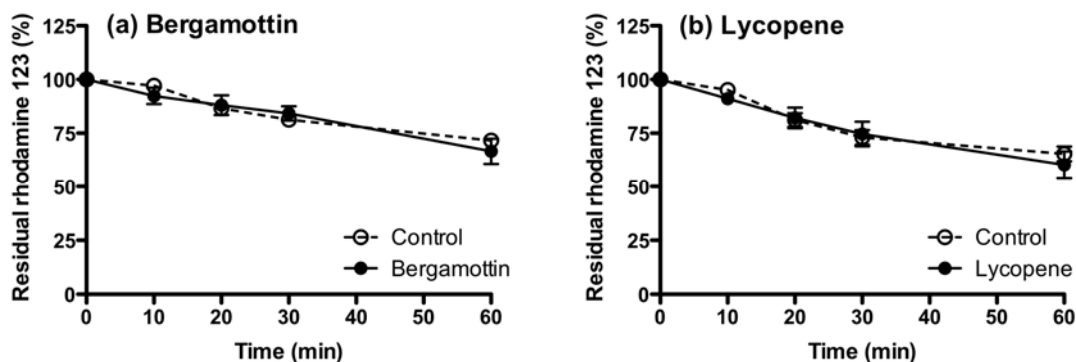


図 33. Caco-2 細胞における刷子縁膜直下ローダミン 123 蛍光強度低下に対するベルガモチン(a)およびリコペン(b)の影響
Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=8).

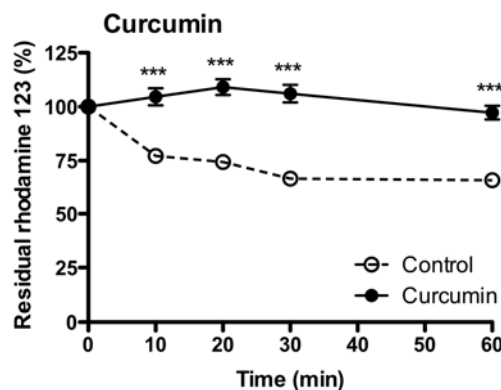


図 34. Caco-2 細胞における刷子縁膜直下ローダミン 123 蛍光強度低下に対するクルクミンの影響
Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). *** $p < 0.001$ vs control.

次に、同様にして、シトルリン (50 μ M, 図 35.(a))、フコイダン (13 μ g/mL, 図 35.(b))、LR 末 (水溶性画分) (240 μ g/mL, 図 35.(c))、 β -カロテン (1.78 μ M, 図 35.(d)) およびクリシンの作用について検討したところ、シトルリン、フコイダン、LR 末 (水溶性画分)、 β -カロテンはコントロールと同様の推移を示し、有意な影響を示さなかった。一方、クリシン (250 μ M, 図 36) を投与した場合は、60 分後においてコントロールと比べ、ローダミン 123 排出が有意に抑制された。P-糖タンパク質に対するこれらの成分の影響に関する報告はほとんどなく、以上の結果は本方法により明らかにされた新しい知見であると言える。なおクルクミンについては P-糖タンパク質を阻害することが報告されているが、クリシンに関してはほとんど報告がなく、クリシンについては更なる研究が必要とされる。今回の研究において、クルクミンおよびクリシンを P-糖タンパク質の基質となる医薬品と同時に摂取した場合、その医薬品の効果が増強する可能性が示された。

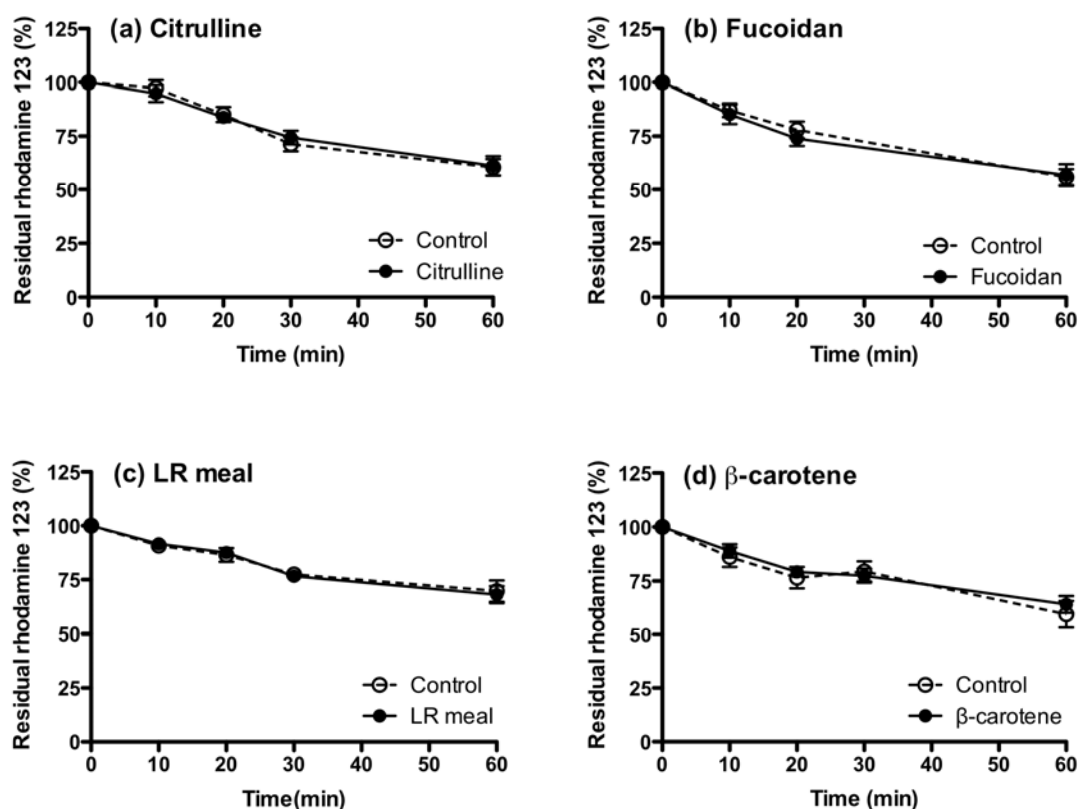


図 35. Caco-2 細胞における刷子縁膜直下ローダミン 123 蛍光強度低下に対するシトルリン(a)、フコイダン(b)、LR 末(水溶性画分)(c)およびβ-カロテン(d)の影響
Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. n=8 in plates (a) and (d). n=12 in plates (b) and (c).

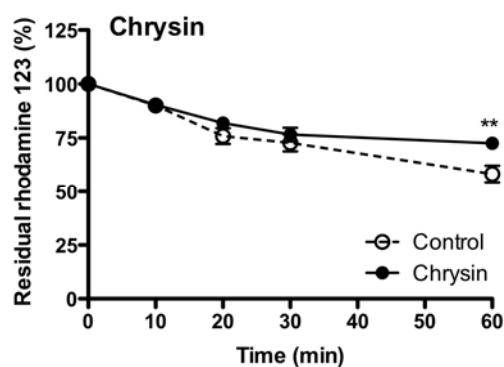


図 36. Caco-2 細胞における刷子縁膜直下ローダミン 123 蛍光強度低下に対するクリシンの影響
Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). ** $p < 0.01$ vs control.

個別課題名：動物組織を用いた生体機能の測定

ラット消化管を用いて、食品と医薬品との P-糖タンパク質を介した相互作用を共焦点レーザー顕微鏡で観察および測定可能な実験系の確立を試みたが、消化管から発せられる粘液によって焦点が定まらず、クリアな画像が取得不可能であることから、現在はアトロピンなど様々な消化管粘液分泌抑制薬と灌流装置を応用して、良好な画像取得の条件設定を試みている。

3) 考察及び結論

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発

個別課題名：受容体結合活性の測定

ムスカリン性受容体結合に対する影響については、他の食品（成分）について検討するとともに、実験動物を用いた自律神経機能（唾液分泌など）への作用の有無を調べることで、インビトロ評価法の応用性を明確にできると考えられた。また、血漿タンパク質結合への影響については、本研究結果を基に、実験条件を精査すること並びに他の食品の影響も検証することにより、比較的簡便な方法で高感度かつ高精度の血漿タンパク質結合測定法を確立できるものと考えられた。

個別課題名：各臓器受容体結合活性のインビトロとインビボでの測定

口内乾燥の報告がある食品としてセントジョーンズワートおよびエキナセアを選択し、ピロカルピン誘発唾液分泌に対する抑制効果およびムスカリン性受容体アンタゴニストリガンドである $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合に対する阻害活性を測定したが、いずれも阻害活性は認められなかった。また、唾液分泌促進作用に対するポジティブコントロールとして、ピロカルピン (0.3 mg/kg) 経口投与による促進作用を確認したことから、ムスカリン受容体刺激作用を有する薬物の生理作用（唾液分泌）を評価することが可能であると考えられた。これより、インビトロでの受容体結合活性はインビボでの生理作用と関連し評価系として有用であることが示唆された。

しかし、今回用いた亜鉛とクルクミンにおいてインビボでの生理作用が認められなかった理由として、使用した用量での経口投与後の生物学的利用率が極めて低いことなどが考えられ、標的組織中での濃度が薬効を示す濃度に到達しなかった可能性が考えられた。従って、食品やその成分を評価する場合に、インビトロ作用とインビボ作用の不一致が、1) 食品成分の投与量、2) 有効成分の体内動態、3) インビトロ実験で生理作用が発現した濃度にインビボでは到達しないことなどに起因するものと考えられた。これらの要因を十分に吟味した評価系の構築が所望される。

個別課題名：低栄養状態における検討

若年者や健康時に比べ、高齢者や病態時には、生体機能や栄養状態の低下が起こり、若年者に比べ機能性食品や食品成分を摂取した場合の有害事象が発現しやすくなることが考えられる。高齢者においてはタンパク質由来のエネルギーが不足することが多いことより、高齢者に起こる栄養状態の低下を想定したモデルとして低タンパク質食飼育動物を用い、高齢者における薬食相互作用の評価系の確立を試みた。イチョウ葉エキ스는過去に多くの医薬品との相互作用が報告されているが、その中でもトルブタミドはヒトおよびラットのいずれにおいても相互作用が報告されており、特に老齢ラットでは顕著に薬効を減弱したとの報告があることより、まず、低タンパク質食飼育動物においてイチョウ葉エキス投与がトルブタミドの薬効に与える影響について検討した。

低栄養状態の作成には低タンパク質食 (7% カゼイン含有) を 21 日間与え、低栄養を評価するための一般的な指標である体重、体重あたりの肝重量および血漿中アルブミン濃度を比較したところ、いずれについても低タンパク質食群では通常食群と比較して有意な低下が認められ、低栄養状態の 1 つである低タンパク質モデルが作成出来たと判断した。

次に、低タンパク質食飼育およびイチョウ葉エキス投与がトルブタミドの血糖降下作用

および血中濃度に与える影響を検討するために、ラットに イチョウ葉エキス 100 mg/kg を 5 日間反復経口投与し、最終投与時にトルブタミド 40 mg/kg を経口投与し、トルブタミド投与前および投与 12 時間後まで血糖値および血漿中トルブタミド濃度を測定した。低タンパク質食飼育の影響について、低タンパク質食群では通常食群と比較し、血糖降下作用の増強および血漿中トルブタミド濃度の上昇が認められた。この結果は、本実験で測定した各種 CYP 活性において、低タンパク質食飼育による変化は認められなかったが、低タンパク質食飼育により、ラットの肝 CYP 活性が低下していたとの報告があることより、低タンパク質食群においてトルブタミドの代謝が遅延し、血漿中トルブタミド濃度が上昇した結果、血糖降下作用を増強したのではないかと考えられた。ただし、本実験では全ての動物でトルブタミドを投与しており、投与 12 時間後に CYP 活性を測定していることから、低タンパク質食飼育自体による CYP 活性の変化については評価出来なかった。また、血糖降下作用は血中濃度の違いと比較し、低タンパク質食群と通常食群の差異が顕著であった。トルブタミドはタンパク結合率が 96% と非常に高く、主にアルブミンと結合することが知られていることより、低栄養状態ではアルブミン濃度が低下しているため、遊離型トルブタミド濃度が上昇し、血糖降下作用が強くなり現れた可能性が考えられる。

イチョウ葉エキス 5 日間反復投与においては、低タンパク質食群ではトルブタミドの血糖降下作用および血漿中濃度-時間曲線下面積 (the area under the concentration-time curve: AUC) は有意に低下したが、通常食群では AUC が低下する傾向がみられるのみで、血糖降下作用に有意な変化は認められなかった。また、イチョウ葉エキス 5 日間反復投与により今回測定した全ての分子種において CYP 酵素活性の有意な上昇が認められ、特にトルブタミド代謝の主要な酵素である CYP2C に関して、通常食群に比べ、低タンパク質食群において有意に活性が上昇していた。つまりイチョウ葉エキス反復投与による酵素誘導により、トルブタミドの代謝が促進され作用を減弱するが、その影響は低タンパク質食群において顕著であったといえる。老齢ラットにおいても、CYP 活性の basal level は若年ラットに比べ低値を示すが、イチョウ葉エキスによる誘導は老齢ラットにおいて 2-3 倍顕著であったという報告があることから、今回のモデルは老齢ラットと相関することが示唆された。

このことより、低タンパク質食飼育動物においては食品成分に対する感受性が増強し、健康への悪影響を及ぼすことが考えられるため、最も摂取されている向精神物質の 1 つであるカフェインを用い行動薬理的評価を行った。カフェインは低用量では覚醒作用などを示し、過剰量になると痙攣を起こすことより、カフェインの投与量を低用量と過剰量に設定し、情動性の指標である自発運動量の測定に併せ、過剰量投与時には痙攣回数を測定した。低栄養状態におけるカフェイン摂取の影響について、低用量投与時には自発運動量はいずれの食餌摂取群においてもカフェイン 10 mg/kg 投与により有意に増加し、その影響は低タンパク質食群で顕著であった。また、カフェイン 300 mg/kg 投与による痙攣回数については低タンパク質食群において増加傾向が認められた。このことより、低タンパク質状態ではカフェインに対する感受性が亢進しており、常用量でも有害事象が起こる可能性が示唆された。

以上より、通常食時と比較して低栄養状態において食品の生体機能への影響は顕著であること、また、食品の医薬品との薬物動態学的および薬力学的相互作用がより発現しやすいことが示唆された。イチョウ葉エキスとトルブタミド併用時の結果は、老齢ラットにおける研究結果と同様の傾向を示し、高齢者を想定した評価系として低タンパク質食飼育動物の有用性が期待出来ると考えられた。

個別課題名：迅速かつ高感度な食品成分の光毒性リスク評価

本研究結果は近年注目を集めている光毒性リスクを予測する目的で先に我々が開発した新規手法を、機能性食品素材に適用できることを明らかにした初めての試みである。さらに、本アッセイ手法を用いることで光毒性リスクを軽減させるポテンシャルをもった含有成分の推定も併せて可能となり、すなわち、(i) 毒性成分の網羅的検証と (ii) 保護物質の推定により安全な セントジョーンズワート エキス開発に寄与できるものと期待する。本手法は セントジョーンズワート のみならず多くの天然あるいは合成機能性食品素材に適用可能であり、食品の安全性向上に貢献することが出来ると考える。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

個別課題名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

血液中においてワルファリンはその大部分が血漿タンパク質（アルブミン）と結合しており、他の医薬品や食品成分による結合率の低下による遊離型ワルファリンの増加は、ワルファリンの抗血液凝固作用を増強すると考えられている。そこで、ワルファリンの血漿タンパク質の結合率に対する食品成分の影響が評価できる実験系の構築を試みた。その結果、低タンパク質食負荷マウスの血漿の利用など、比較的評価しやすい実験系はできたが、ポジティブコントロールとしたインドメタシンでもワルファリンとタンパク質結合に対する影響が極めて小さかった。この結果より、ワルファリンと血漿タンパク質の結合率に対する食品成分の影響も小さいと想定された。マウスのインビボ実験において、イチヨウ葉エキ스는ワルファリンの抗血液凝固作用を減弱させた。一方、イチヨウ葉エキスのワルファリンと血漿タンパク質の結合に対する影響はほとんど認められなかった。このことからワルファリンとイチヨウ葉エキスの相互作用の部位は、血漿タンパク質結合の部位ではないことが示唆された。

個別課題名：実験動物での食品成分と医薬品の総合的な相互作用の測定

食品成分と医薬品の相互作用において、血漿タンパク質結合部位での影響評価、薬物代謝酵素部位での影響評価がある。(1)の研究から血漿タンパク質レベルでの影響は小さく、その影響評価も難しいと考えられた。一方、肝臓薬物代謝酵素レベルでの評価については、食事因子による薬物代謝酵素の誘導作用が検出できれば、誘導される酵素のタイプによって相互作用の影響が評価できると考えられる。本実験において示したワルファリンは多くの医薬品や食品成分との相互作用を起こすことが示唆されており、また薬効としての血液凝固も血液凝固パラメーターの測定により容易に評価できる。ワルファリンの薬効は投与直後には発現しないため、相互作用を評価するタイミングが難しいと考えられる。イチヨウ葉エキスや CFK エキスの実験で設定したワルファリンの投与量と投与条件は、適切な評価条件と考えられる。本研究で示したマウスのインビボ実験における新食品とワルファリンの相互作用の有無の評価系は、他の食品成分にも適用可能な有用な評価系といえるであろう。食品因子に限ったことではないが、相互作用の影響は、被検物質の消化吸収や体内分布を踏まえた評価が必要である。そのような点がマウスのインビボ実験系では可能であり、また被検物質の投与量も少量で対応可能な実用性の高いものと考えられる。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

個別課題名：ヒト細胞を用いた生体機能の測定

1年目の結果より、Caco-2細胞に取り込まれたローダミン123は継時的に排泄されていること、この排泄に対しジゴキシン48時間処理は直接阻害作用を示すこと、1日ジゴキシ

ン無処置にするとこの阻害作用は消失すること、さらにジゴキシンを 7 日間処理し、1 日ジゴキシンの無処置にするとこの排泄機能は促進されること、すなわち P-糖タンパク質の誘導が起こっていることが示された。さらにセントジョーンズワート 7 日間処理は Caco-2 細胞において、ローダミン 123 の排出を有意に促進した。これは P-糖タンパク質の発現促進（誘導）に基づくものと考えられ、この結果はセントジョーンズワートに関わる多くの臨床報告とも一致した。一方、セントジョーンズワート存在下では、ローダミン 123 の排出が有意に抑制された。このような条件下では、測定中もセントジョーンズワートが細胞に作用しているので、セントジョーンズワートそのものが P-糖タンパク質を直接阻害した結果、排出率が低下したものと推察される。セントジョーンズワートの P-糖タンパク質阻害作用に関する報告は少ないが、セントジョーンズワートは摂取初期の段階ではそれ自身が P-糖タンパク質を阻害し、長期摂取の場合はその阻害に対する up-regulation のひとつとして遺伝子の発現等を介した誘導が起こるのかもしれない。このように、サプリメントの直接的な阻害作用と長期的な誘導を高感度で簡便に検出することを、本評価法は可能にした。

2 年目の研究において、LS-180 細胞における P-糖タンパク質に対する食品成分の影響を検討したところ、ピペリンとカプサイシンは阻害作用、ダイゼインとゲニス테인は促進作用を示すことを観察し、本細胞とマイクロプレートリーダーを用いた実験系が食品成分の P-タンパク質機能評価に応用できることが示された。また、共焦点レーザー顕微鏡画像解析システムを用いて細胞内における薬物の動きとその増減を三次元的にリアルタイムで追跡した結果、Caco-2 細胞に対するジゴキシンの阻害および誘導作用の検出に、この新規測定系が十分機能すること、P-糖タンパク質が局在する刷子縁膜直下のローダミンの動きのみを解析することにより、細胞全体のローダミンを測るよりも、さらに微細な変化を高感度で検出出来ることが判明した。このような特徴を応用することにより、薬物の消化管吸収過程に対する食品成分の影響をより高感度に検出することが可能となり、薬食相互作用の検出に適応可能である事を確認した。

最終年度には、この 2 年間で開発した測定法を、様々な食品成分の健康影響評価に適用し、より簡便で再現性の良好な測定条件を精査すると共に、その実用性を検証した。その結果、ベルガモチンとリコペンは Caco-2 細胞内ローダミン 123 蛍光量の低下に有意な影響を示さず、P-糖タンパク質機能には影響しないことが示された。これらについては、既に P-糖タンパク質に影響しないことが報告されており本研究結果と一致した。一方、クルクミンを投与した場合は、ローダミン 123 排出が有意に抑制されたことから、P-糖タンパク質機能を低下させる作用のあることが示された。クルクミンの P-糖タンパク質阻害作用については既に多くの報告があり、本研究結果と一致した。以上の結果から本測定方法は P-糖タンパク質の機能評価に有用であることが示された。

そこで、次に、同様にシトルリン、フコイダン、LR 末（水溶性画分）、β-カロテンおよびクリシンの作用について検討したところ、クリシンのみが P-糖タンパク質阻害作用を投与 60 分後に示した。一方、残りの 4 成分は有意な作用を示さなかった。P-糖タンパク質に対するこれらの成分の影響に関する報告はほとんどなく、以上の結果は本方法により明らかにされた新しい知見であると言える。なおクルクミンについては P-糖タンパク質を阻害することが報告されているが、クリシンに関してはほとんど報告がなく、クリシンについては更なる研究が必要とされる。今回の研究において、クルクミンおよびクリシンを摂取した場合、P-糖タンパク質の基質となる医薬品の効果が増強する可能性が示された。

個別課題名：動物組織を用いた生体機能の測定

ラット消化管を用いて、食品と医薬品との P-糖タンパク質を介した相互作用を共焦点レーザー顕微鏡で観察および測定可能な実験系の確立を試みたが、消化管から発せられる粘液によって焦点が定まらず、クリアな画像が取得不可能であることから、現在はアトロピンなど様々な消化管粘液分泌抑制薬と灌流装置を応用して、良好な画像取得の条件設定を試みている。

2 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（論文は添付すること）

- (1) Tse-Chou Cheng, Chih-Cheng Lu, Hsien-Hui Chung, Chih-Chieh Hsu, Nozomi Kakizawa, Shizuo Yamada and Juei-Tang Cheng. Activation of muscarinic M-1 cholinceptors by curcumin to increase contractility in urinary bladder isolated from Wistar rats. *Neurosci Lett.* **473**: 107-109 (2010)
- (2) Satomi Onoue, Masanori Ochi, Graham Gandy, Yoshiki Seto, Naoko Igarashi, Yukinori Yamauchi and Shizuo Yamada: High-throughput screening system for identifying phototoxic potential of drug candidates based on derivatives of reactive oxygen metabolites. *Pharmaceutical Research*, **27**: 1610-1619 (2010)
- (3) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: High-throughput screening strategy for photogenotoxic potential of pharmaceutical substances using fluorescent intercalating dye. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **52**: 781-786 (2010)
- (4) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Naoko Igarashi, Ryo Inoue, Ami Oishi, Toshihiko Toida, Shizuo Yamada, Satomi Onoue: *In Vitro* Photobiochemical Characterization of Sulfobutylether- β -cyclodextrin Formulation of Bufexamac. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **55**: 591-596 (2011)
- (5) 尾上 誠良「最前線：薬剤性光線過敏症」 *ファルマシア*（日本薬学会）, **47**(4): 295-300 (2011)
- (6) 尾上 誠良, 中村 和市「光毒性」 *創薬研究のストラテジー*（日本薬理学会編集）下巻, pp. 231-238.
- (7) Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Ryo Inoue, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano and Shizuo Yamada: *In Vitro* Photochemical and Phototoxicological Characterization of Major Constituents in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) Extracts. *Phytochemistry*, **72**: 1814-1820 (2011)
- (8) Yoshiki Seto, Ryo Inoue, Masanori Ochi, Graham Gandy, Shizuo Yamada and Satomi Onoue: Combined Use of *In Vitro* Phototoxic Assessments and Cassette Dosing Pharmacokinetic Study for Phototoxicity Characterization of Fluoroquinolones. *AAPS Journal*, **13**: 482-492 (2011)
- (9) Yuko Taki, Eri Hagiwara, Chiemi Hirose, Kazumasa Shinozuka, Keizo Umegaki and Shizuo Yamada: Effects of *Ginkgo biloba* extract on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolbutamide in protein-restricted rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, **63**, 1238-43 (2011)
- (10) 窪田 洋子, 渡邊 泰雄, 脇 能広, 瀧 優子, 山田 静雄, 篠塚 和正, 梅垣 敬三. ワルファリンの血漿タンパク質結合に及ぼすイチョウ葉エキスの影響. *応用薬理* **80**; 21-26 (2011)

- (11) Yuko Taki, Kaori Yokotani, Shizuo Yamada, Kazumasa Shinozuka, Yoko Kubota, Yasuo Watanabe and Keizo Umegaki: *Ginkgo biloba* extract attenuates warfarin-mediated anticoagulation through induction of hepatic cytochrome P450 enzymes by bilobalide in mice. *Phytomedicine*, 2011 in press.
- (12) Kaori Yokotani, Nantiga Virgona, Yuko Yamazaki, Fumio Shimura, Tsuyoshi Chiba, Yuko Taki, Shizuo Yamada, Kazumasa Shinozuka, Masatune Murata, and Keizo Umegaki : Inductory effect of *Coleus forskohlii* extract on the hepatic cytochrome P450 enzymes in mice. *Food Chemical Toxicology* (submitted)
- (13) Takashi Okura, Michiko Ibe, Keizo Umegaki, Kazumasa Shinozuka and Shizuo Yamada. Effects of Dietary Ingredients on Function and Expression of P-Glycoprotein in Human Intestinal Epithelial Cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 33, 255-259 (2010).
- (14) 和久田 浩一, 禰占 奈美江, 多田 有加里, 籠田 智美, 梅垣 敬三, 山田 静雄, 篠塚 和正. リアルタイムライブセルイメージングを応用したサプリメント・医薬品相互作用の高感度評価法の開発と展望. *New Diet Therapy*, 99, 11-16 (2010).
- (15) Hirokazu Wakuda, Namie Nejime, Yukari Tada, Satomi Kagota, Keizo Umegaki, Shizuo Yamada and Kazumasa Shinozuka. Highly sensitive measurement of P-glycoprotein-mediated transport activity in Caco-2 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 33, 1238-1241 (2010).
- (16) Hirokazu Wakuda, Namie Nejime, Yukari Tada, Satomi Kagota, Odette A. Fahmi, Keizo Umegaki, Shizuo Yamada and Kazumasa Shinozuka. A novel method using confocal laser scanning microscopy for sensitive measurement of P-glycoprotein-mediated transport activity in Caco-2 cells. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 63, 1015-1021 (2011).
- (17) Hirokazu Wakuda, Shino Miyauchi, Mayuko Iwai, Asami Nakajima, Yukari Tada, Satomi Kagota, Keizo Umegaki, Shizuo Yamada, and Kazumasa Shinozuka. Effects of functional food constituents on P-glycoprotein activity in Caco-2 cells determined by a novel method using confocal laser scanning microscopy. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. (Submitting).

3 本研究を基にした学会発表の実績

- (1) 柿澤希美、和久田浩一、萩原えり、瀧 優子、伊藤由彦、山田静雄：ワルファリンのタンパク結合に対する食品成分の影響。第11回応用薬理シンポジウム(静岡)，要旨集 p.60, 2009年9月19日
- (2) 瀧 優子、萩原えり、和久田 浩一、伊藤由彦、山田静雄：ワルファリンの血清アルブミン結合に対する食品成分の影響評価。日本薬学会 第130年会(岡山)，要旨集(4) p 201, 2010年3月30日
- (3) 世戸孝樹，越智幹訓，尾上誠良，山田静雄：創薬支援のための光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究(8)-新規 in vitro 光遺伝毒性リスク評価ツールの開発-，日本薬剤学会第25年会(徳島)，要旨集 p.233, 2010年5月14日
- (4) 瀧 優子、萩原えり、廣瀬智恵美、山田静雄：Tolbutamideの薬効に対する低栄養状態およびイチョウ葉エキス併用の影響。第12回応用薬理シンポジウム(横浜)，講演要旨集 p.75, 2010年9月19日

- (5) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Tyo Inoue, Graham Gandy, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: Combined use of photobiochemical and cassette dosing pharmacokinetic data for predicting phototoxic potential of pharmaceutical chemicals., 25th JSSX Annual Meeting in Tokyo. (Tokyo), Abstr. P.238, Oct7-9, 2010
- (6) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: Safety assessments on nutraceuticals: Phototoxic potential of St. John's Wort. 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences. (Shizuoka), Abstr. p. 34, Oct 16, 2010
- (7) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Gandy Graham, Satomi Onoue, and Shizuo Yamada: New screening strategy for predicting in vivo phototoxic risk of fluoroquinolones using photobiochemical and cassette dosing pharmacokinetic data, FIP PSWC 2010/AAPS Annual Meeting and Exposition (New Orleans, US), Nov 14-18, 2010
- (8) 井上僚、世戸孝樹、越智幹記、尾上誠良、山田静雄： 光毒性リスク回避を指向した Bufexamac のサイクロデキストリン製剤開発, 日本薬学会東海支部例会(静岡), 講演要旨集 p.93, 2010 年 11 月 28 日
- (9) 萩原えり、廣瀬智恵美、瀧 優子、山田静雄： 低栄養状態における tolbutamide とイチョウ葉エキスの相互作用の評価. 日本薬学会東海支部例会(静岡), 講演要旨集 p.96, 2010 年 11 月 28 日
- (10) 瀧 優子、梅垣敬三、佐藤陽子、山田静雄： イチョウ葉エキスの抗凝固能と warfarin との相互作用. 第 11 回 応用薬理シンポジウム(静岡), 要旨集 p .59, 2009 年 9 月 19 日
- (11) 梅垣敬三. 植物成分を利用した健康食品の現状と問題点. 第 18 回天然薬物の開発と応用シンポジウム (東京) 2010 年 11 月 11 日
- (12) 横谷馨倫、瀧 優子、山崎優子、志村二三夫、篠塚和正、山田静雄、村田容常、梅垣敬三： *Coleus forskohlii* エキスのマウス肝臓薬物代謝酵素系に対する影響. 日本薬学会 第 131 年会、2011 年 3 月 30 日
- (13) 禰占 奈美江, 和久田 浩一, 多田 有加里, 中村 一基, 篠塚 和正. 腸管上皮細胞における P-glycoprotein 機能を指標とした健康食品の評価法開発に関する研究. 第 11 回 応用薬理シンポジウム 2009 年 9 月 18-19 日
- (14) Hirokazu Wakuda, Yukari Tada, Namie Nejime, Satomi Kagota, Kazuki Nakamura, Keizo Umegaki, Shizuo Yamada and Kazumasa Shinozuka: Highly sensitive and rapid assessment of P-glycoprotein activity in Caco-2 cells. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Copenhagen, Denmark) 17-23 July 2010.
- (15) 和久田 浩一, 禰占 奈美江, 多田 有加里, 籠田 智美, 中村 一基, 梅垣 敬三, 山田 静雄, 篠塚 和正. 共焦点レーザー顕微鏡および Caco-2 細胞を用いた P-糖タンパク質に対する影響の高感度評価法. 第 131 回 日本薬学会年会 2011 年 3 月 28-31 日

4 特許及び特許出願の数と概要

なし

5 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績

ICH S10 (Fukuoka, 2010) にて ROS assay 法を用いた光毒性リスク予測について提案

6 今後の問題点等

3年間の研究成果を通じて、以下の問題点が挙げられたので、今後の研究課題と考えられた。

研究項目名：受容体結合測定法を応用した新食品等の健康影響評価法の開発と応用

個別研究課題名：各受容体結合活性のインビトロとインビボでの測定

今回の研究では、インビトロにおいてムスカリン受容体結合活性を示した食品(成分)について、インビボでは有意な生理作用を示さなかったが、この理由として、食品の経口投与した場合における、有効成分の低吸収率、有効組織内濃度に達していない可能性あるいは代謝による活性の消失などの体内動態、受容体サブタイプの違いなどが考えられる。また、インビトロでの評価の際に溶解度が問題となり、凝集などの非特異的な結合による標識リガンドの結合阻害が起こっていた可能性が否定出来ない。従って、溶媒の再検討を行うと共に、インビトロとインビボの乖離を説明するために、組織内濃度を測定するなどの体内動態を踏まえた評価や考察をする必要があると考えられた。

個別研究課題名：低栄養状態における検討

本研究では高齢者における食品および食品成分の健康への影響を評価するために低タンパク質食飼育動物において検証を行ったが、低タンパク質食飼育動物と老齢動物あるいは高齢者との相関については今後更なる検証が必要である。また、他の食品についても評価を行い、食品成分の安全性の評価系としての更なる確立を目指したいと考えている。

個別課題名：迅速かつ高感度な食品成分の光毒性リスク評価

本手法の頑健性についてはすでに予備検討を終了しているが、実際の運用に際しては施設間バリデーションが必須であり、国立医薬品食品衛生研究所、日本製薬工業協会 毒性部会、欧州代替法評価センター（ECVAM）と共同で検討を実施中である。

研究項目名：血漿タンパク質結合量と血液凝固の測定

本実験において、血漿タンパク質と医薬品の結合率に対する食品成分の影響は、実際に想定されているほど大きいとは考えられなかった。しかし、食品成分ならびに医薬品の種類や組み合わせによっては、血漿タンパク質結合レベルでの影響が大きい可能性もある。そのため臨床的に報告されている事例を踏まえて、タンパク質結合レベルにおける医薬品と食品の相互作用の更なる検証が必要であろう。食品成分と医薬品の相互作用としては、薬物代謝酵素系の関与が大きい、その薬物代謝酵素系の関与が消化管または肝臓のいずれの部位で大きいかを明らかにする検討が必要である。また薬物代謝酵素には種差があるため、動物実験で得られた結果のヒトへの外挿の可否についても検討が必要である。

研究項目名：細胞と組織を用いた生体機能の測定

動物組織を用いた生体機能の測定として、ラット消化管を用いて、食品と医薬品との P-糖タンパク質を介した相互作用を共焦点レーザー顕微鏡で観察および測定可能な実験系の確立を試みたが、消化管から分泌される粘液や組織の収縮などにより焦点が定まらず、鮮明な画像が取得不可能であることから、現在はアトロピンなど様々な消化管粘液分泌抑制薬と灌流装置を応用して、良好な画像取得の条件設定を試みている。