

## 食品添加物の安全性評価の手法に準じた アマチャヅル製品の安全性の検討

Risk assessment of Sweet tea vine products based on the concept of safety  
securing of food additives

ブイ ティ ゴク ハー<sup>1, 2)</sup>

Bui Thi Ngoc Ha

端田 寛子<sup>1)</sup>

Hiroko HASHIDA

有田 安那<sup>4)</sup>

Anna ARITA

倉若 美咲樹<sup>1)</sup>

Misaki KURAWAKA

佐々木 菜穂<sup>4)</sup>

Naho SASAKI

山崎 優子<sup>\*5)</sup>

Yuko YAMAZAKI

舘花 春佳<sup>1, 3)</sup>

Haruka TATEHANA

志村 二三夫<sup>1)</sup>

Fumio SHIMURA

### 要旨

【目的】植物の二次代謝産物を用いるハーブサプリメント（HS）の利用に伴う健康被害例は少なくない。特に医薬品との相互作用に関わる薬物代謝酵素 cytochrome P450（CYP）の関与が指摘されている。そこで、HSの安全性確保には、適切なリスク評価が必要であると考え、これまで複数のHSについて食品添加物の安全性評価の手法に準じた肝CYPへの作用を指標とした製品対象動物試験を実施してきた。本研究では、アマチャヅル（学名 *Gynostemma pentaphyllum*：英名 Sweet tea vine（STV）、Jiaogulan）製品を対象とした。STVは、その成分ダンマラン系サポニンに健康効果が示唆され、ベトナム等で人気が高い。食経験は比較的豊富であり、近年ベトナム人を対象とした無作為化比較試験により、耐糖能効果が示され注目されている。しかしながら、医薬品等との相互作用は不明である。そこで、製品の安全性を検討した。【方法】米国A製品とベトナムブランドB製品は純水に懸濁し、一日推

<sup>1)</sup> 十文字学園女子大学大学院 人間生活学研究科食物栄養学専攻  
Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Human Life Sciences, Jumonji University  
graduate school

<sup>2)</sup> 株式会社ワールドエアープラン メディカル事業部  
Medical Division, World Air Plan Co.,Ltd

<sup>3)</sup> 青森県立保健大学 健康科学部栄養学科  
Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences, Aomori University of Health and Welfare

<sup>4)</sup> 十文字学園女子大学 人間生活学部健康栄養学科  
Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University

<sup>5)</sup> 十文字学園女子大学人間生活学部食物栄養学科  
Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University

\* 投稿責任者

キーワード：アマチャヅル、安全性、CYP、ハーブサプリメント

奨目安量の100倍量をSD系雄ラット（約200g）に8日間反復胃内投与した。系統差の検討ではGK（Ⅱ型糖尿病自然発症モデル）ラットおよびWistar系ラットを用いた。肝CYP分子種の遺伝子発現は、酵素活性、タンパク質、mRNAレベルで検討した。【結果】2種のSTV製品投与による肝臓重量への有意な影響はなく、共通してalkoxyresorufin O-dealkylase活性が上昇していたが、mRNA発現はCYP1A2が軽度上昇した。これはWistar系、GKラットでも同結果であった。なお、CYP1A1の発現に関しては、製品差と系統差がみられた。【結論】STV製品は品質等により、より強いCYP1A誘導作用を持つ可能性がある。本法のような試験を事業者が実施することは安全性確保に有用である。

## 緒言

植物の二次代謝産物を利用したハーブ成分は多様性に富み、人々は古来よりその成分を医薬品などに利用してきた。ハーブサプリメントの素材は、多成分系の脂溶性生体異物の濃縮物（カプセル、錠剤等）という特性を示し、脂溶性生体異物の主要処理器官である肝臓への作用を介して有害性を発現するものが少なくない<sup>1)</sup>。特に、肝臓では薬物代謝酵素cytochrome P450（CYP）への作用を介した作用が問題になることが多い<sup>2)</sup>。CYPは、薬物代謝第一相酵素であり、主に酸化反応（一原子酸素添加反応）等による極性化作用を通して、体外排出の初期過程における中心的な役割を担っている<sup>3)</sup>。ハーブサプリメント製品においては特に医薬品との相互作用に対して注意が必要であり、この相互作用の多くはCYP活性を介して起こることが知られている<sup>2)</sup>。しかしながら、ハーブを素材とするサプリメントの安全性には科学的根拠が不明確なものが多く<sup>1)</sup>、その安全性確保のためのリスク評価法が確立されていないことが一因であることも推定される。ハーブサプリメントの安全性確保には、これらを熟慮した適切なリスク評価手法の開発・確立が必要である。

食品添加物のリスク評価では、動物試験による無毒性量のNOAEL（No observed adverse effect level）を、不確実係数（通常100）で割って、一日摂取許容量ADI（Acceptable Daily Intake）を算出する（ $ADI = NOAEL/100$ ）<sup>4)</sup>。この不確実係数は、毒性の差が、動物種間、また個体間それぞれで10倍を超えない、という経験則をもとに設

定されており、このように定められたADIの範囲内では、食品添加物による健康被害例の報告はほとんど知られていない<sup>4)</sup>。そこで、この考え方にに基づき、ハーブサプリメント製品の一日推奨目安量（Suggested Daily Intake：SDI）の100倍量をラットに投与しNOAELを超えないか、すなわち、SDIがADI以下に相当するか、肝臓のCYP遺伝子発現を指標とした製品対象動物試験を検討してきた。

この手法により、重篤な肝障害を生じたコンショウ科のハーブであるカバ（学名*Piper methysticum*：英名kava）製品は、著しい肝肥大とともに、環境化学物質で誘導されるCYP1A1遺伝子の極めて強い発現亢進を生じることを他者に先駆けて見出した<sup>5)</sup>。また、医薬品との相互作用を示すイチヨウ葉（学名*Ginkgo biloba*：英名Ginkgo）<sup>6)</sup>やセイヨウオトギリソウ（学名*Hypericum perforatum*：英名St. John's wort）について検討した結果では、既報<sup>7-9)</sup>と同様に肝肥大を伴うCYP3AやCYP2Bの誘導作用を確認している（未発表データ）。一方、バレリアン（学名*Valeriana officinalis*：英名Valerian）はSDIの100倍量投与でも有意な影響は観察されなかった（未発表データ）。さらに、素材は同じでも影響が異なるバターバー（学名*Petasites hybridus*：英名Butterbur）製品もあり（投稿論文準備中）、製品ごとの評価が特に重要である。

そこで、本研究ではアマチャヅル（学名*Gynostemma pentaphyllum*：英名Sweet tea vine（STV）、Jiaogulan）製品を対象とした。アマチャヅルは、ウリ科アマチャヅル属のつる性多年草

で、日本、朝鮮半島、中国、東南アジアに分布する<sup>10)</sup>。日干しにした葉を薬用部分として使用する<sup>10)</sup>が、日本の食薬区分ではアマチャヅル全草が「医薬品の効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質（原材料）」に区分されている<sup>11)</sup>。アマチャヅルは中国では絞股藍（コウコラン）と呼ばれ、古くから消炎解毒、止咳去痰や慢性気管支炎の民間療法に使われてきたという<sup>12)</sup>。

アマチャヅルの名は葉の甘味に由来するが、その甘味物質の単離を目的とする研究を契機に、ギベノサイド (gypenoside) と命名された多種ダンマラン系サポニンが単離され、化学構造が決定された<sup>12)</sup>。さらに、オタネニンジン (*Panax ginseng* C.A. Meyer) のダンマラン系サポニンである20 (s)-プロトパナキサジオールを基本構造とする主要成分ジセンノサイドのうち、数種がアマチャヅルから見出されている<sup>12)</sup>。

オタネニンジンには100種以上のサポニンを含み、また多種多彩な生理作用・健康効果を示すと報告されており<sup>13, 14)</sup>、これをヒントにアマチャヅルの作用も注目されている<sup>12)</sup>。主に動物実験における知見として、アマチャヅルないしその成分には次のような作用があるとされている。脂質代謝（肥満ラット、高脂血症マウスに対する血中中性脂肪・総コレステロール低下<sup>15, 16)</sup>、循環機能（モルモットにおける冠動脈攣縮・不整脈・昇圧に対する保護作用<sup>15)</sup>、糖代謝（ラット睪島からのインスリン放出を刺激による血糖低下、耐糖能改善<sup>15, 16)</sup>、中枢神経機能（ウサギの脳虚血に対する保護作用、マウスにおける自発活動抑制・鎮痛作用・薬剤誘発性記憶障害の緩和<sup>15, 17)</sup>、免疫機能（血清IgG増加・免疫機能増強<sup>15)</sup>。しかしながら、ヒトでの評価はベトナム人を対象とする臨床試験において、耐糖能改善に有効であったとする報告<sup>18)</sup>のみであった。

ベトナムでは、1986年のドイモイ（刷新）政策導入を契機とした急速な経済発展にともない、肥満の増加が社会問題となっている<sup>19)</sup>。世界保健機

関（WHO）の“Global Body Mass Index”によれば、成人（18歳以上）の肥満（BMI 25以上）は、日本（2001年）の3.1%に対してベトナム（2000年）は0.5%であり、世界でもトップクラスのスリムな国であった<sup>20)</sup>。しかし、近年ではベトナムの肥満率は3.5%に上昇、日本の3.5%と同水準に達しており、特に男性は4.8%で日本の3.6%を上回っている。肥満は高血圧、糖尿病、心臓疾患などのリスクファクターでもあり、深刻な健康問題がクローズアップされている<sup>21)</sup>。食生活・栄養改善が進まない中で、様々なサプリメントも市場に出回り利用されている。アマチャヅルはそうしたサプリメントの一つで、糖尿病に対して伝統的に利用されてきた経緯がある<sup>22)</sup>。

本研究では、これらを背景に、ベトナムの店頭および米国からのインターネット通販で入手した2つの製品について、安全性評価試験を実施した。

## 方法

### 1. 実験動物ならびにアマチャヅル抽出物製品の投与

SD (Sprague-Dawley) 系雄ラットは、これまで実施してきた製品対象動物試験と同様に体重約200 g（7週齢）を（株）東京実験動物より入手した。系統差の検討で用いたGK雄ラット（Goto-Kakizaki：Ⅱ型糖尿病自然発症モデル）、およびその母系であるWistar系雄ラット（10週齢）は日本エスエルシー株式会社より入手した。なお、企業データによれば10週齢以降でWistar系ラットに比べてGKラットの血糖値が高くなることが示されている。飼育環境は6：00～18：00を明期、18：00～6：00を暗期とし、空調システムを23℃±2℃に設定した。飲用水ならびに飼料（AIN93G：オリエンタル酵母製）は自由に摂取させ、十文字学園女子大学の動物実験室でコンベンショナルな環境で飼育した。

評価対象としたアマチャヅル抽出物（STV）

製品の特長はTable 1に示した。米国ブランドのA製品 (STVA) は、ウェブサイトiHerb (<http://www.iherb.com/index.html>) よりインターネット通販で入手した。STVAのSDIは1カプセル (抽出物として250 mg) であり、抽出物は、30%のギベノサイド含有で規格化されていたが、その他の成分含量は不明であった。ベトナムブランドのB製品 (STVB) は現地の栄養学研究者がハノイの店頭で直接購入した。STVBのSDIは6カプセル (乾燥葉粉末3.6 g) であり、成分の規格化情報は明記されていなかった。なお、利益相反の観点より製造・販売者の明記は控える。

STV製品は、内容物をカプセルより取り出し、STVAは42 mg/mL、STVBは600 mg/mLの濃度になるように純水に懸濁させて、サフィード・フィーディングチューブFr.5 (テルモ) を用いて、1 mL/100 g Body Weightの割合となるよう胃内に投与した。投与量は、ヒトの体重を60 kgと設定し、ヒトのSDIの100倍量あるいは10倍量となるように設定し、1日1回 (午前10時-12時)、8日間反復投与した。

飼育最終日の前日より絶食 (~18時間) させいソフルラン麻酔下で、腹大動脈より全採血したのちに、速やかに肝臓、腎臓、副腎を摘出して実重量を測定した。肝臓は、組織病理検査用の試料と

して、外側左葉の中心部を約1 cm幅で短軸に沿って切断し、10%ホルマリン水中で固定させた。また、Total RNA調製用の試料として、内側左葉の中心部近傍の組織を約100 mg切り取り、1.5 mLのRNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen) に浸漬し、室温で一晩インキュベートした後、使用時まで-80℃に保存した。さらに、新鮮肝臓組織1gをマイクロソームの調製に供した。

なお、本実験は十文字学園女子大学動物実験委員会の承認を得て同大学で実施した (承認番号1304, 1305, 1404, 1406)。

## 2. 肝臓マイクロソーム画分におけるCYP分子種の酵素活性 (AROD法) の測定

肝臓マイクロソームは、新鮮肝臓組織を常法<sup>23)</sup>にて調製し0.5 mLの50 mM Tris-HCl/1 mM EDTA/1 mM DTT/20% (v/v) glycerol, pH 7.4に懸濁させてマイクロソーム画分とし、使用時まで-80℃に保存した。

CYP分子種の酵素活性は、resorufin誘導体の蛍光原基質alkoxyresorufin (7-ethoxyresorufin: ER, methoxyresorufin: MR, pentoxyresorufin: PR, benzyloxyresorufin: BR) を用いるalkoxyresorufin O-dealkylase (AROD: EROD,

Table 1 Characteristic of Sweet tea vine (STV) products

Product	STVA	STVB
Trade name	Jiaogulan	Jiaogulan
Purchase	Internet traded on the iherb in the United States*	A nutritionist purchased directly at a shop in Vietnam
Standardisation	Jiaogulan extract 12:1 (30% gypenosides):250mg	---
Ingredients	Capsule (plant cellulose). Contains no animal products, wheat, corn, soy, yeast, preservatives, artificial ingredients or common allergens. Non-gmo and naturally gluten free.	Dried extract of jiaogulan (containing triterpenoid saponin, flavonoids, amino acid, vitamins etc) :500mg Excipient:1 capsule
Effectiveness	Anti-aging, Powerful adaptogen, Antioxidant, Rejuvenator	Regulate the metabolism of lipid, Lower and stabilize the blood sugar, Antioxidant, Support the immune system etc
Suggested dosage for human use per day (upper limit / 60 kg)	1 capsules: 250 mg	6 capsules: 3600 mg
Gavege amounts: 100 times dose	25 mg/100g BW	600 mg/100g BW

\* : <http://www.iherb.com>



MROD, PROD, BROD) 活性を測定する Kennedy ら<sup>24)</sup> の方法, あるいは蛍光原基質 DBF を用いて dibenzylfluorescein-debenzylase (DBFDB) 活性を測定する Stresser らの方法<sup>25)</sup> に準じて測定した。ただし, それぞれの原法がエンドポイントアッセイ (終点分析法) であるのに対して, 本研究では Mx3000P リアルタイム PCR 装置 (Agilent) を蛍光マイクロプレートリーダーとして利用し, 反応産物の増加に伴う蛍光強度の増加を経時的にモニターするレートアッセイ (初速度分析法) に改良して測定した<sup>5)</sup>。酵素反応は基質にラット肝臓ミクロソーム画分を加え, NADPH 溶液を添加した後に, すみやかに 37°C に設定した Mx3000p リアルタイム PCR システムにセットして蛍光強度を 20 秒間隔で測定した。CYP による代謝産物の resorufin の測定には, ROX<sup>TM</sup>/Texas Red フィルター, fluorescein の測定には FAM<sup>TM</sup>/SYBR<sup>®</sup> Green I フィルターを用い, 比活性 (pmol resorufin/min/mg protein あるいは nmol fluorescein/min/mg protein) として算出した。なお, EROD 活性は CYP1A1 活性, MROD 活性は CYP1A2 活性, PROD 活性は CYP2B 活性, DBFDB 活性は CYP3A 活性をそれぞれ反映するとされている<sup>25, 26)</sup>。また, BROD 活性は, CYP2B 活性および CYP3A 活性の両方に特性があるとされている<sup>27, 28)</sup>。

### 3. 肝臓ミクロソーム画分における CYP 分子種のタンパク質発現 (Western blot 法) の測定

各群ラットの肝臓より調製したミクロソーム画分について, 10~50 µg protein/well として 15% アクリルアミドゲルを用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った<sup>29)</sup>。次いで, 分離されたタンパク質をゲルからイモビロントランスファーメンブレンにエレクトロトランスブロッティングにより転移・吸着させて免疫染色を行った。メンブレンをブロッキングした後に第 1 抗体 (anti-Rabbit Cytochrome P450 Enzyme CYP1A1 (CYP2B1/2, CYP3A1, CYP3A2) polyclonal

antibody, Millipore) と反応させた。次いで第 2 抗体 (Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch, Inc) と反応させた。化学発光は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (HE Healthcare) を用い, 添付マニュアルの操作法に従って染色し, ケミルミネッセンス撮影装置 (Light-Capture, アトー) にて画像データを記録した。

### 4. 肝臓 CYP 分子種の mRNA 発現量 (Real-time RT-PCR 法) の解析

Total RNA は, RNAlater Stabilization Reagent (Qiagen) 中に保存しておいた肝臓組織細片 20 mg を Mixer Mill MM300 (Qiagen) を用いてホモジナイズした後に, QuickGene RNA tissue kit SII (倉敷紡績社) の操作法に従い, 自動核酸抽出システム Quick gene-800 (Fuji film) を用いて抽出した。RNA 濃度および純度 (A260/A280 = 1.8~2.0) は, NanoDrop 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc) を用いて測定した。Real-time RT-PCR 法による CYP 分子種の mRNA 発現量は, SYBR Green ベースのインターカレーション法による One-Step SYBR RT-PCR kit (Takara Bio) を使用し, Mx3000P リアルタイム PCR システムを用いて測定した。Real-time RT-PCR に用いたプライマーの塩基配列は GenBank より得た対象遺伝子の DNA 塩基配列をもとに Roche Life Science の Universal ProbeLibrary Assay Design Center (<https://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>) で設計し, その合成は Sigma genosys に依頼した (Table 2)。なお, CYP2B1 と CYP2B2, および CYP3A1 と CYP3A2 は配列が類似しているため, Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research が公開しているソフトウェア (Primer3) を利用して分別が可能となるようにオリジナルに設計した。

Real-time RT-PCR による mRNA 発現量の解析では, 増幅が指数関数的に起こる領域で, 増幅産

Table 2 Primers used for real time RT-PCR analysis of CYP mRNA expression in rat liver

mRNA	Genbank Accession No.	Forward Primer (left)	Reverse Primer (right)	Product size
Gapdh	NM_017008.3	5'-TGGGAAGCTGGTCATCAAC-3'	5'-GCATCACCCCATTTGATGTT-3'	78 bp
CYP1A1	NM_012540	5'-TTCAGTTCAGTCCTCC-3'	5'-GAAGGCTGGGAATCCATACA-3'	73 bp
CYP1A2	NM_012541	5'-AGAGCAGCAAGGACTTTGTGGAG-3'	5'-CGCCTGTGATGTCTGGATAC-3'	195 bp
CYP1B1	NM_012940	5'-TCACTGCAATTTAGACGGAACA-3'	5'-AGCTTCTGGCCTCTGCACAC-3'	148 bp
CYP2B1 <sup>a</sup>	J00719	5'-CAGGTGATCGGCTCACACC-3'	5'-GTCCTTGGTGACTCTGTGTGGTAC-3'	135 bp
CYP2B2 <sup>a</sup>	XM_341808	5'-GATCAGGTGATTGGCTCTCACA-3'	5'-TGTCTTTGGTGACTCTGTGTGGTAA-3'	139 bp
CYP3A1 <sup>b</sup>	NM_173144	5'-GGAGATCACAGCCCAGTCAA-3'	5'-GGGAATGCAGGACAAAGGAA-3'	83 bp
CYP3A2 <sup>b</sup>	NM_153312	5'-GGAATAACAAGACAAAGGAGAGTG-3'	5'-TGAAATCATAGCCAGTCAGTT-3'	83 bp
CYP2E1	NM_031543	5'-CTGACTGTCTCCTCATAGAGATGG-3'	5'-TCACAGAAACATTTTCCATTGTGT-3'	135 bp
CYP2C6	XM_001066767	5'-AGCTTCCCAATCTCACTGCT-3'	5'-AATCATGGCATCTGTGTAGGG-3'	113 bp
CYP2C11	NM_019184.2	5'-GGAGGAACTGAGGAAGAGCA-3'	5'-AATGGAGCATATCACATTGCAG-3'	85 bp
CYP2C12	NM_031572.1	5'-AAGAAAAGTGACTACTTATGCCTTT-3'	5'-GCCCTCTCCCACACATTC-3'	60 bp
CYP2D1	NM_153313.1	5'-TCAGGATGGTAAACTAGTGGA-3'	5'-TGGGAACGTGTTAAGAACCCTC-3'	77 bp
CYP2D2	NM_012730.1	5'-GAAGGAGAGCTTTGGAGAGGA-3'	5'-AGAATTGGGATTGCGTTCAG-3'	63 bp
GSTM2	NM_177426	5'-GTGGATTTTCTTGTTCACGATGCC-3'	5'-CTCAAACCGAGCCACGAAG-3'	102 bp
GSTP1	NM_012577.2	5'-TGGTACCCTCATCTACACTAATATGA-3'	5'-CAGCAGGGTCTCAAAGGTT-3'	91 bp

a,b: Primers were designed to distinguish CYP2B1 from CYP2B2, and CYP3A1 from CYP3A2.

物が一定量に達するサイクル数 (threshold cycle ; Ct 値) を用いて算出し, ハウスキーピング遺伝子として Gapdh (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) を用いて Gapdh mRNA に対する標的遺伝子の mRNA の量比を算出し, 定量的に解析した。

## 5. 統計解析

データは平均値 ± 標準誤差で示した。統計ソフトは IBM SPSS Statistics 21 (アイ・ビー・エム株式会社, 東京) を用い, STVA 投与量の違いによる各群間における平均値の差の検定については, 一元配置分散分析ののち Dunnett's test, ラット系統差の検定は, 二元配置分散分析ののち Student's *t* test の下位検定, 2 群間の比較は *t* 検定を実施し, いずれも危険率が 5 % を有意水準として検定した。

## 結果

### 1. アマチャヅル抽出物 A 製品の投与量の違いによる SD 系ラットへの影響

米国ブランドの STVA 製品を, ヒト SDI の 10 倍量 (STVA (10) 群) および 100 倍量 (STVA (100) 群) で, SD 系雄ラットの胃内に 8 日間反復投与した場合の体重増加量 (Fig. 1A), 肝臓実重量 (Fig. 1B) および肝臓相対重量 (Fig. 1C) において, 有意な影響は認められなかった。また, 図には示していないが腎臓, 副腎における臓器重量にも影響はなかった。

肝臓ミクロソームの CYP 活性については, DBFDB に群間差はなかったが, EROD (5.4 倍), MROD (3.9 倍), PROD (4.3 倍), BROD (2.5 倍) は, STVA (100) 群において有意に高かった (Fig. 2A)。しかしながら, タンパク質発現については明瞭な影響は認められなかった (Fig. 2B)。なお, STVA (10) 群においても影響がなかった (Fig. 2A)。

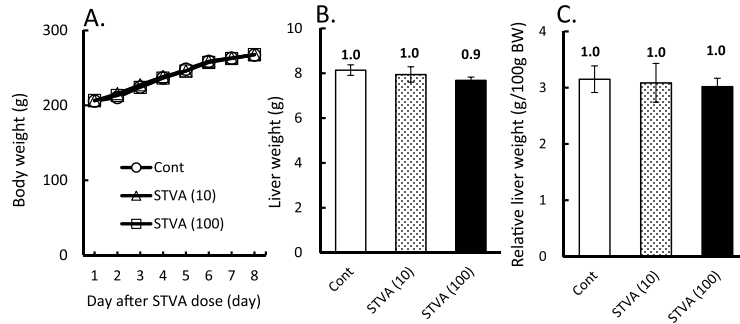


Fig. 1 Effects of Sweet tea vine product (STVA) on body weight and liver in SD rat

The STVA (10) and STVA (100) groups were given the powder content of the STVA with and without 1/10 dilution with water suspension at a dosage of 1 mL/100 g body weight for 8 days, respectively. The control group received water. Data were the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 6$ ). No significant difference were observed between control group and STVA dose groups by ANOVA followed by Dunnett's test ( $p < 0.05$ ). Values above bars represent enhancement ratios (fold increase above the control group). (A) Growth curve. (B) Liver weight. (C) Relative liver weight.

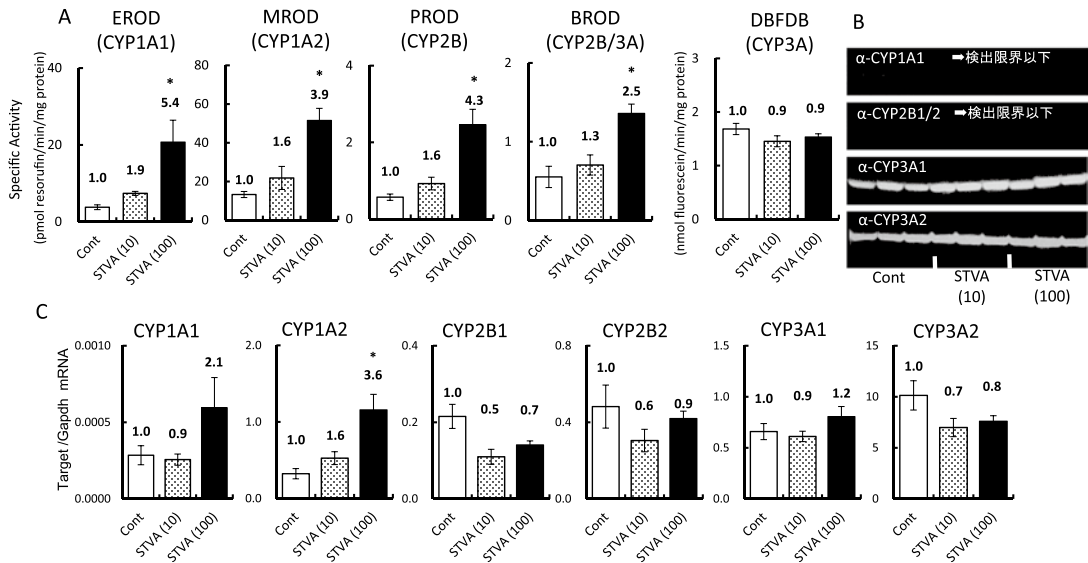


Fig. 2 Effects of Sweet tea vine product (STVA) on CYPs gene expression including enzyme activity, protein and mRNA levels in SD rat liver

The STVA group was treated essentially as described in the legend to Fig. 1. The control group was received water alone (1 mL/100 g body weight). Data were the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 6$ ). \*: Significant differences were observed between control group and STVA dose groups by ANOVA followed by Dunnett's test ( $p < 0.05$ ). Values above bars represent enhancement ratios (fold increase above the control group). (A) AROD activities in liver microsomes. (B) Liver microsomal proteins (10-50  $\mu$ g) from representative rats of each group were analyzed by Western blotting. (C) CYPs mRNA expression in liver as analyzed by real-time RT-PCR.

一方、CYP遺伝子のmRNAレベルにおいては、CYP1A2がSTVA (100) 群で対照群の3.6倍と有意に増大した。CYP1A1に上昇傾向があったが、酵素活性を誘導したCYP2BおよびCYP3A, その他の主要なCYP (Table 2) には群間差は認められなかった (Fig. 2C).

## 2. アマチャヅル抽出物A製品の100倍量投与におけるラット系統差の影響

アマチャヅルには耐糖能改善効果が報告されていることから、II型糖尿病自然発症モデルのGKラットおよびその母系統のWistar系ラットにおいてもSTVA製品の影響を検討した (Fig. 3)。いずれのラットにおいても、体重増加、臓器重量への影響は認められなかったが、EROD, MROD, PROD, BROD活性はSTVA (100) 投

与群で有意に高かった (Fig. 3A)。また、CYP1A2遺伝子のmRNAレベルでの発現もWistar系およびGKラットのいずれにおいても有意な増大を示しSD系ラットとほぼ同じ結果が得られた (Fig. 3B)。なお、CYP1A1 mRNA発現への影響はWistar系では認められなかったが、GKラットでは有意な増大を示した。GKラットは、CYP1A1 mRNAの発現に関し、SDラットやWistar系ラットに比べて、感受性が高いことが示唆された。

## 3. アマチャヅル抽出物B製品の100倍量投与におけるSDラットへの影響

ベトナムブランドのSTVB製品をSD系ラットに100倍量投与した肝臓CYP遺伝子発現への影響は、STVA製品とほぼ同じ結果が得られた。す

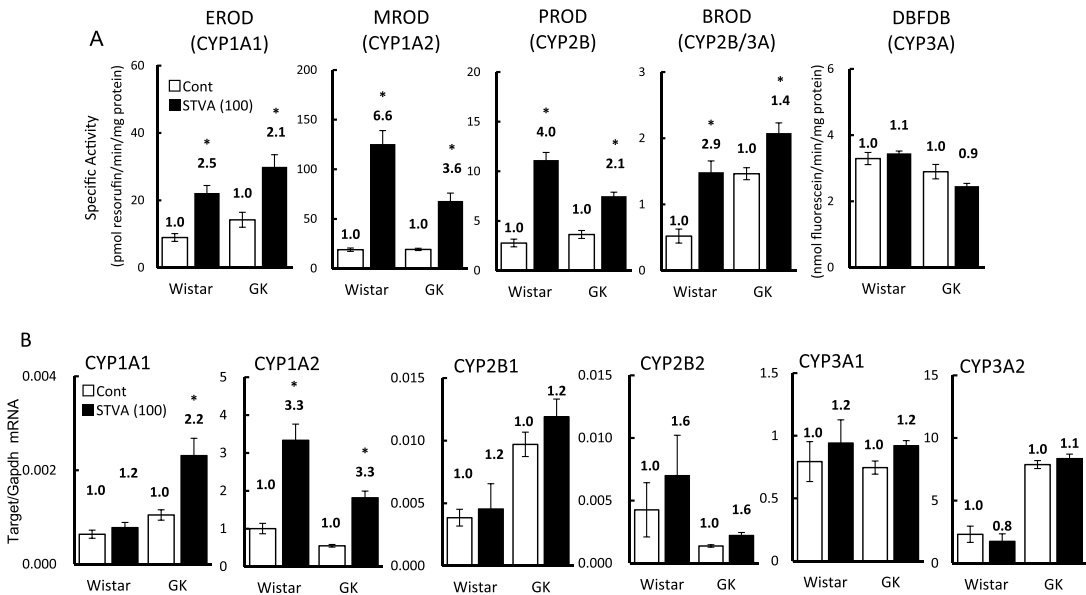


Fig. 3 Effects of Sweet tea vine (STVA) product in Wistar rat and GK rat liver on CYPs gene expression including enzyme activity and mRNA levels

Data are the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 6$ ). \*: Statistical analysis by two-way ANOVA followed by Bonferroni correction of each control group versus STVA(100) group ( $p < 0.05$ ). Values above bars represent enhancement ratios (fold increase above the control group).

(A) AROD activities in liver microsomes. (B) CYPs mRNA expression in liver as analyzed by real-time RT-PCR.

なわち、酵素活性はDBFDBに群間差がなかったがEROD (7.7倍), MROD (6.5倍), PROD (3.4倍) の活性が有意に増加し (Fig. 4A), CYP1A2 mRNA の有意な増大が認められた (Fig. 4B). また, STVB (100) 投与群はCYP1A1 mRNA も発現が亢進していた (Fig. 4B).

アマチャヅル製品のSDIの100倍量をラットに胃内投与した場合の肝臓重量およびCYP分子種

mRNA 発現の結果一覧は Table 3に示した. 肝臓重量および肝臓相対重量への影響はなく, CYP1A2 遺伝子発現が軽度上昇 (5倍以下) していたことは, 2つのアマチャヅル製品, またラットの系統によらず一貫しており再現性が得られた. しかし, CYP1A1遺伝子発現の亢進は製品差および系統差がみられた.

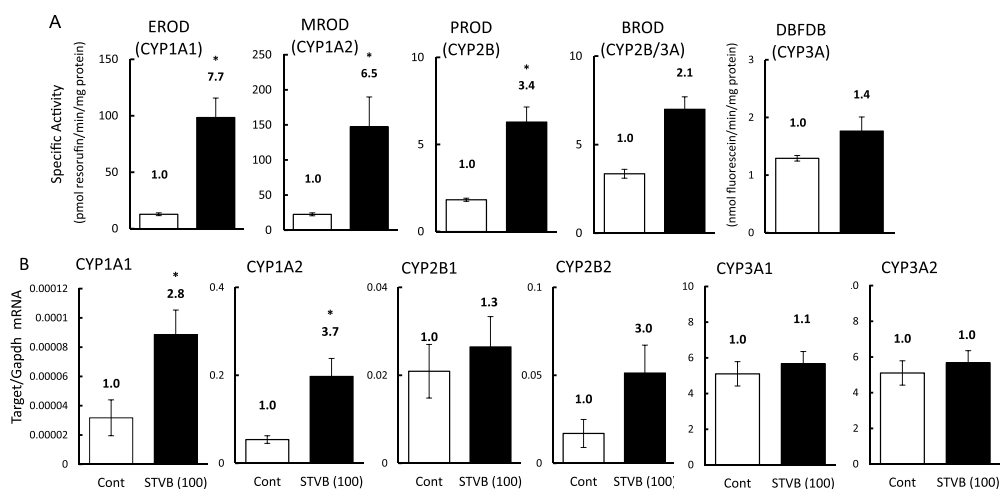


Fig. 4 Effects of Sweet tea vine made in Vietnam product (STVB) on CYPs gene expression including enzyme activity and mRNA levels

Data are the mean ± S.E. (n = 6). \*: Statistical analysis by Student's *t* test of each control group versus STVA(100) group (*p* < 0.05). Values above bars represent enhancement ratios (fold increase above the control group).

(A) AROD activities in liver microsomes. (B) CYPs mRNA expression in liver as analyzed by real-time RT-PCR.

Table 3 Effects of 100-times dose of Sweet tea vine products on hepatic CYPs mRNA expression and liver weight in rats

Product	Rat	Relative liver weight	1A1	1A2	1B1	2B1	2B2	2C6 2C11	2D1 2D2	3A1	3A2
STVA	SD	1.0	ns	3.6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
STVA	Wistar	1.0	ns	3.3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
STVA	GK	1.0	2.2	3.3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
STVB	SD	1.0	2.8	3.7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Each STV product was given to rats at 100-times the suggested dosage for human use and gene expression was determined as described in the text. Values were showed fold increase to the control group. ns: No significant difference were observed between control group and STV product dose groups.

## 考察

本研究では、アマチャヅル抽出物製品2種（米国ブランドのSTVA、ベトナムブランドのSTVB）について、食品添加物の安全性評価の手法に準じた我々の手法によるハーブサプリメントのリスク評価を実施した。米国ブランドの抽出物製品とベトナムブランドの乾燥葉粉末製品は、カプセル内容物の質また量が大きく異なっていた。しかし、ヒトSDIの100倍量を投与したラットにおける肝臓重量およびCYPの活性およびmRNA発現への影響は、製品間で若干の相違はあったが概ね同様であった。

特に、STVA (100) 投与群においてalkoxyresorufin *O*-dealkylase 活性 (EROD, MROD, PROD, BROD) およびCYP1A2 mRNA発現は、ラットの系統差によらず有意に増大していた。ERODはCYP1A1活性、MRODはCYP1A2活性、PRODはCYP2B活性として測定しているが、mRNA発現においてCYP2B1やCYP2B2の発現亢進は見られなかった。BRODはCYP2BおよびCYP3Aの両方の活性を反映しており、DBFDB (CYP3A活性) では有意差がなかったため、BROD活性の亢進はCYP2B活性の誘導を反映していると考えられる。CYP2B1およびCYP2B2のmRNA発現に関して、酵素活性が増大した理由を説明できる変化は、再現性良く認められなかった。CYP分子種mRNA発現と酵素活性の結果の相違が複数の系統の動物でみられるというような前例を検索したが、調べた限り見あたらなかった。関連する記載としては、CYP分子種のタンパク質の発現量と酵素活性は概ね相関することが知られている<sup>30)</sup>が、ヒトCYP3A4では非常に高い相関性が認められたのに対し、CYP2E1では全く相関がなく、必ずしも良好な相関性を示していないとの報告<sup>31)</sup>があった。この点においては、より詳細な検討が必要である。

CYP1A1 mRNA発現の誘導は、GKラットおよびSTVB製品で有意に上昇し、製品差および系

統差が見られた。CYP1A1酵素の誘導は、医薬品というよりはベンゾ [a] ピレンやダイオキシンのような脂溶性生体異物の環境化学物質の曝露によるため、CYP1A1酵素の誘導はがん原物質を含む環境化学物質の曝露の生体影響指標ともされている<sup>32)</sup>。CYP1A1が誘導されるということは、ハーブサプリメントを摂取したことにより環境化学物質を摂取したと同様の生体応答を示したことを意味する。GKラットは、CYP1A1の誘導に関して感受性が高い可能性が推定されるため、ヒトにおいてもSTV製品を摂取した場合にII型糖尿病患者で感受性が高い可能性がある。しかしながら、これらの増大は、肝障害との因果関係が指摘されているコショウ科のハーブであるカバ製品による発現（対照群の75~168倍の誘導）に比べると、小さいものであった<sup>5)</sup>。これまで検討してきた複数のハーブサプリメントの製品対象動物試験のうちCYP1A1を誘導したのは、カバ製品のみであり<sup>5)</sup> CYP1A1を誘導する場合にはCYPを誘導しないSDIの設定や誘導する成分を除去する等、特に注意が必要であると考えている。

これまで著者らが実施してきた、食品添加物の安全性評価の手法に準じたハーブサプリメントの製品対象動物試験によるハーブサプリメントの影響は4つに区分している。

- 区分1：肝肥大を伴い、環境化学物質の曝露評価指標CYP1A1を誘導する。
- 区分2：肝肥大を伴い、医薬品代謝関連のCYPを誘導する。
- 区分3：肝肥大はなく、医薬品代謝関連CYPを軽度誘導する。
- 区分4：肝肥大はなく、CYPを誘導しない。

区分1については環境化学物質曝露の指標であり、実際にカバは重篤な肝障害の事例がある<sup>5)</sup>。区分2については、医薬品との併用による薬物相互作用に注意が必要である。実際にセイヨウオトギリソウ製品は添付文書による利用上の注意喚起がすでになされている<sup>33)</sup>。区分4については、製品におけるヒトのSDIは、食品添加物というADI

以下であると考えられる。

米国およびベトナムブランドのアマチャヅル製品は、両者とも上記区分3に該当し、区分2ほど医薬品との相互作用は強くないがCYP1A2の遺伝子発現において軽度な増大があったため安全であるとは言い難いと考えられる。CYP1A2を誘導する医薬品成分としては、解熱鎮痛薬のアセトアミノフェン、喘息治療薬のテオフィリンなどが知られているため、これらの医薬品との併用には留意が必要である<sup>34)</sup>。また、食品成分で覚醒作用のあるカフェインや喫煙によってもCYP1A2が誘導することが知られているため、健康な人においてもこれらの成分とアマチャヅル製品を併用することで生体応答への感受性に影響がある可能性も推定される。アマチャヅル抽出物に含まれる成分のうち、CYP1A2を誘導する成分は特定されていない。アマチャヅルの有効成分の候補とされるゲンマラン系サポニンであるギベノサイドは、ヒト肝ミクロソームを用いた*in vitro*試験においてCYP2D6活性を強く阻害し、CYP2C8、CYP3A4、CYP2C9活性を軽微に阻害したが、CYP1A2との相互作用はなかったとの報告がある<sup>35)</sup>ため、ギベノサイドがCYP1A2を誘導する可能性は低いと推定される。さらに、両製品のラベルに記載されている含有成分の情報 (Table 1) は、アマチャヅル抽出物に含まれる成分の種類やその含量は明記されていない。CYP1A2を誘導する成分が、アマチャヅル植物自体に含有されている場合には、栽培地や品種によってもその含量は異なると推定される。あるいは、加工・保蔵の過程で新たに生じる成分である可能性もあり、原料や製法によって品質が異なることが推定される。そのため、本研究のような製品としての評価は重要と考える。また、事業者は、食品および医薬品成分との相互作用に配慮し、品質管理を適正に行う必要性を認識しておく必要があると考えられる。本法のような製品対象試験は、事業者が自社製品について実施することで、安全性確保に有用である。

本研究の一部は平成25～27年度プロジェクト研究「薬物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP) の遺伝子発現への影響を指標とするハーブ素材の安全性評価」および平成24～26年度厚生労働科学研究費補助金「食品の安心・安全確保推進研究事業：研究代表者 梅垣敬三」および平成25年度食・栄養・健康研究所の助成により行われたものである。

#### 参考文献

- 1) 山崎優子, 端田寛子, 志村二三夫 (2011) 人気の高いハーブサプリメント素材の Natural Medicines Comprehensive Database に基づく安全性および有効性の評価検討. 栄養学雑誌 69: 267-279.
- 2) Tanaka, E (1998) Clinically important pharmacokinetic drugdrug interactions: role of cytochrome P450 enzymes. J Clin Pharm Ther 23: 403-416.
- 3) 加藤隆一, 山添康, 横井毅 編 (2010) 薬物代謝学—医療薬学・医薬品開発の基礎として 第3版, pp.101-116. 東京化学同人, 東京.
- 4) 志村二三夫 (2013) 食品安全衛生学: NR・サプリメントアドバイザー必携 (一般社団法人日本臨床栄養協会編) pp.215-258. 第一出版, 東京.
- 5) Yamazaki Y, Hashida H, Arita A, Hamaguchi K, Shimura F (2008) High dose of commercial products of kava (*Piper methysticum*) markedly enhanced hepatic cytochrome P450 1A1 mRNA expression with liver enlargement in rats. Food Chem Toxicol 46: 3732-3738.
- 6) Taki Y, Yamazaki Y, Shimura F, Yamada S, Umegaki K (2009) Time-dependent induction of hepatic cytochrome P450 enzyme activity and mRNA expression by bilobalide in rats. J Pharmacol Sci 109: 459-462.
- 7) Zhou S, Chan E, Pan SQ, Huang M, Lee EJ (2004) Pharmacokinetic interactions of drugs with St

- John's wort. *J Psychopharmacol* 18: 262-276.
- 8) Dasgupta A (2008) Herbal supplements and therapeutic drug monitoring: focus on digoxin immunoassays and interactions with St. John's wort. *Ther Drug Monit* 30: 212-217.
  - 9) Johne A, Brockmoller J, Bauer S, Maurer A, Langheinrich M, Roots I (1999) Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clin Pharmacol Ther* 66: 338-345.
  - 10) 岡田稔 (監修) (2002) アマチャヅル: 牧野和漢薬草大図鑑 p.515, 北隆館.
  - 11) 厚生労働省医薬食品局長 (薬食発0401第2号平成27年4月1日): 「無承認無許可医薬品の指導取締りについて」の一部改正について 別添3.
  - 12) 吉川和子, 在原重信 (2014) わが国を含む諸国でのアマチャヅルの成分研究. *薬用植物研究* 36: 34-40.
  - 13) Shin B-K, Kwon SW, Park JH (2015) Chemical diversity of ginseng saponins from *Panax ginseng*. *J Ginseng Res* 39: 287-298.
  - 14) Kiefer D, Pantuso T (2003) *Panax ginseng*. *Am Fam Physician* 68: 1539-1542.
  - 15) H. Tran, G. Q. Li, C. C. D., B. D. Roufoglis (2005) Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochem Rev* 4: 197-219.
  - 16) S. Megall, N. M. Davies, B. D. Roufogalis (2006) Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences* 9: 281-291.
  - 17) H. S. Choi, T. T. Zhao, K. S. Shin, H. S. Kim, B. Y. Hwang, C. K. Lee, M. K. Lee (2013) Anxiolytic Effects of Herbal Ethanol Extract from *Gynostemma pentaphyllum* in Mice after Exposure to Chronic Stress. *Molecules* 18: 4342-4356.
  - 18) V. T. T. Huyen, D. V. Phan, P. Thang, N. K. Hoa, C. G. Östenson (2013) *Gynostemma pentaphyllum* Tea Improves Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Patients. *J Nutr Metab*: 1-7.
  - 19) 糖尿病ネットワーク: ベトナムの糖尿病事情 [http://www.dm-net.co.jp/asia\\_network/05/05.php](http://www.dm-net.co.jp/asia_network/05/05.php)
  - 20) アジアンインサイト: 急速な経済発展が生んだ影 [http://www.dir.co.jp/consulting/asian\\_insight/20150820\\_010032.html](http://www.dir.co.jp/consulting/asian_insight/20150820_010032.html)
  - 21) Hoa NK, Phan DV, Thuan ND, Ostenson C-G (2009) Screening of the hypoglycemic effect of eight Vietnamese herbal drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31: 165-169.
  - 22) Huyen VT1, Phan DV, Thang P, Ky PT, Hoa NK, Ostenson CG (2012) Antidiabetic Effects of Add-On *Gynostemma pentaphyllum* Extract Therapy with Sulfonylureas in Type 2 Diabetic Patients. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 7.
  - 23) Guengerich, F. P. (1982) Microsomal enzymes involved in toxicology- analysis and separation. In *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, A. W. ed.), Raven Press, New York: 609-634.
  - 24) Kennedy SW, Jones SP, Bastien LJ (1995) Efficient analysis of cytochrome P450 1A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence plate reader. *Anal Biochem* 226: 362-370.
  - 25) Stresser DM, Blanchard AP, Turner SD, Erve JC, Dandeneau AA, Miller VP, Crespi CL (2000) Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates. *Drug Metab Dispos* 28: 1440-1448.
  - 26) Ghosal A, Hapangama N, Yuan Y, Lu X, Horne D, Patrick JE, Zbaida S (2003) Rapid



- determination of enzyme activities of recombinant human cytochromes P450, human liver microsomes and hepatocytes. *Biopharm Drug Dispos* 240: 375-384.
- 27) Hagemeyer CE, Bürck C, Schwab R, Knoth R, Meyer RP (2010) 7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase activity as a marker for measuring cytochrome P450 CYP3A induction in mouse liver. *Anal Biochem* 398: 104-111.
- 28) Graham RA, Downey A, Mudra D, Krueger L, Carroll K, Chengelis C, Madan A, Parkinson A (2002) In vivo and in vitro induction of cytochrome P450 enzymes in beagle dogs. *Drug Metab Dispos* 30: 1206-1213.
- 29) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 30) 寺崎哲也 (2014) 薬剤学の新天地：タンパク質定量の大切さ *薬剤学*74 : 171
- 31) 福圓修一, 隅田昭彦, 木下香葉子, 猶原雅和, 福田剛史, 松田秀康, 山本勇, 稲葉忠信, 東純一 (2000) ヒト肝臓でCYPs mRNAと代謝活性は相関するか? *臨床薬理*31 : 299-300.
- 32) Ma Q, Lu AY (2007) CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos* 35: 1009-1016.
- 33) 厚生労働省報道発表資料：セント・ジョーンズ・ワート（セイヨウオトギリソウ）と医薬品の相互作用について（平成12年5月10日），[http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1205/h0510-1\\_15.html](http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1205/h0510-1_15.html).
- 34) 相良英憲, 北村佳久, 千堂年昭, 五味田裕 (2007) 薬物相互作用（9-喫煙と薬の相互作用）*岡山医学会雑誌*119 : 83-85.
- 35) He M1, Jiang J, Qiu F, Liu S, Peng P, Gao C, Miao P (2013) Inhibitory effects of gypenosides on seven human cytochrome P450 enzymes in vitro. *Food Chem Toxicol* 57:262-265.

