

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32415

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K15795

研究課題名（和文）食品添加物の考え方に基づいたハーブサプリメント製品のリスク評価法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a risk assessment method for herbal supplement products based on the concept of food additives

研究代表者

山崎 優子（Yamazaki, Yuko）

十文字学園女子大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：70518117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ハーブサプリメント(HS)の安全性確保は、その多様性を鑑み製品ごとの評価が重要である。そこで食品添加物の安全性評価法を参考に、HSの個別評価に適した動物試験「一日推奨量に基づく安全性評価（SDI-SE）」を開発・命名した。SDI-SEは、添加物の一日摂取許容量(ADI)導出の逆算方式で、製品のSDIの100倍量をRatに投与し、肝薬物代謝酵素Cytochrome P450(CYP)の遺伝子発現を主要指標とする。

評価法の有用性を検証するためにButterburやColeus forskohliiを対象に、CYP誘導作用、製品間の差異を検出した。成分分析によるCYP誘導成分も検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、SDI-SEを実施してきた複数のHSについて、肝臓への作用を4つのカテゴリー（：肝肥大とCYP1A1の誘導，：肝肥大と医薬品代謝に関わるCYPの誘導，：肝肥大なしで、軽度なCYPの誘導，：肝臓への影響なし）に整理し、各カテゴリーの製品につき、安全性確保の方針も提案した。

この評価を行い肝肥大やCYPを誘導するものは、一日推奨量の変更、薬物相互作用のラベル明記、CYPを誘導する成分量の調節など、製品管理の見直しや商品開発等に活用できると考える。SDI-SEに基づく情報はHSの安全性確保に有用である。

研究成果の概要（英文）：To ensure the safety of herbal supplements (HS), individual evaluation for each product is important, reflecting their diversity. Therefore, based on the safety evaluation methods for food additives, we developed and named an animal test suitable for the individual evaluation of HS: the Suggested Daily Intake-Based Safety Evaluation (SDI-SE). The SDI-SE is a back-calculation analog of the acceptable daily intake (ADI) derivation; that is, rats were administered individual herbal supplement products at 100 times SDI for human use equivalents per body weight and signs of adverse effects on the gene expression of the hepatic drug metabolizing enzyme cytochrome P450 (CYP).

To verify the usefulness of the evaluation method, the SDI-SE was applied to the butterbur and the coleus forskohlii products, and the CYP induction effect on the liver was analyzed to detect differences in the effects between products. In addition, CYP-inducing ingredient was examined by component analysis.

研究分野：食品科学

キーワード：ハーブサプリメント製品 リスク評価 薬物代謝酵素

様式 C - 19 , F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。植物の抽出物を濃縮して利用されることが多いハーブサプリメント(HS)の成分特性は、多成分系の脂溶性生体異物である。安全性の前提となる品質は、起源植物の遺伝的・環境的な要因や製法の多様性を反映して、製品ごとにばらつくため安全性が変動する。HSのような健康食品は「素材」の安全性・有効性評価と「製品」における評価は一致するとは限らず、その判断は事業者任せられているが、安全性に関する検討が乏しい。実際に小腸から吸収されたあとに、肝臓で薬物代謝系への作用を介した有害性や腎臓への影響を示すものが少なくない。そこで、「製品」にも適切なリスク評価が必要であると考え、その評価法が確立し、事業者が自社製品に実施すれば、HSの安全性確保に結びつくことが期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食品添加物の考え方に基づいた HS のリスク評価の実施による有効性を示して方法を確立させることである。そのために、すでに下記 ~ について検証してきており、~ について検討することを目的とした。

- ・肝臓への有害作用 (SDI の不適切な設定による過剰摂取・薬物相互作用・環境化学物質の混入) のリスク低減に有効である。実際に本法で肝肥大を伴わず CYP の誘導がない製品は、重篤な有害作用の報告はない。
- ・CYP を評価指標とするため、血液検査よりも高感度に、また食品添加物の反復投与毒性試験 (28 日, 90 日) よりも短期間 (8 日間) で CYP 誘導作用を検出できる。
- ・同じハーブ素材でも製品で評価が異なる場合があるため、製品毎の評価が必要である。
- ・素材レベルで肝臓 CYP の誘導がある場合に、製品の評価は素材と同等か？
- ・肝臓での有害作用の検出だけでなく、本法による投与量で腎臓への有害作用が検出される場合には、腎臓 (他臓器) への影響も検出できるのか？
- ・本評価により有害作用 (肝肥大・CYP の誘導・または腎肥大や異変等) が認められた場合には、その成分特定のための検討を成分分析や細胞実験で検証する。

これらのことを検証し、商品設計の際の適切な SDI 設定、薬物相互作用等の情報発信、有害成分の特定、適切なラベル表示等に寄与に繋げる。事業者は自社製品の安全性確保に結び付く。本評価法を確立させ、実施することの意義は HS の安全性確保において大きい。

3. 研究の方法

(1) HS の安全性評価動物試験 (SDI-SE)

対象とした HS は、肝毒性の報告があったバターバー (*Petasites hybridus*) (3 製品) と食品衛生法で規定されている指定成分含有食品コレウス・フォルスコリ (*Coleus forskohlii*) (4 製品) とした。製品は、インターネット取引により購入した。

ハーブ製品の体重当たり、一日推奨量 (SDI) の 100 倍量をラット (n=6) に 8 日間、胃内投与し、臓器重量、肝臓の薬物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP) 遺伝子発現を調べた。異変のあった臓器は病理組織学的な検査を外部委託して実施した。CYP 遺伝子発現は、mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 法)、酵素活性 (alkoxyresorufin O-dealkylase)、タンパク質発現 (Western Blot 法) により解析した。

(2) 成分分析

LC-MS 分析は、一般財団法人 材料科学技術振興財団に委託した。LC は、ACQUITY UPLC システム (Water) を用いて、次の条件で行った。カラム; ACQUITY BEH C18 100×2.1 mm, 1.7 μm, Waters), 移動相; A. Milli-Q / B. 100% AcCN 45% -100% (23 min), 流速; 0.15 mL/min, カラム温度; 40 °C。MS は、Xevo G2-XS QToF MS (Waters) を用いて、エレクトロスプレーイオン化キャピラリーは、電圧; 3.0kV, コーン電圧; 30V の条件下で、フォトダイオードアレイ (PDA; 210nm) によりモニターした。

HPLC 分析は、NANOSPACE S1-1 装置 (shiseido) を用いて、次の条件で行った。カラム; Capcellpak C18 UG80 (1.5 mm×250 mm), 移動相; A. 50% AcCN/ B. 100% AcCN (Gradient program: mobile phase B; 0% (0-5 min), 100% (5-50 min), 100% (60-65min), 0% (65-100 min), 検出器; UV-Vis (210 nm), 流速; 120 μL/min, カラム温度; 40 °C, 注入量; 10 μL。

(3) 細胞実験

ヒト肝がん由来培養細胞 HepG2 細胞は 10% FBS と Penicillin Streptomycin を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 中で CO₂ インキュベーターにて培養した (37 °C, 5% CO₂)。1~2 日おきに DMEM を交換し、対数増殖期に継代を行った。細胞は、試験物質添加の 18 時間前に 12-well プレートに 10×10⁵ cells/cm² になるように播種した。試験物質添加時の培養液には Krebs-Henseleit-HEPES buffer (pH 7.4, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.7 mM KCl, 118.2 mM

NaCl ,2.5 mM CaCl₂ · 2H₂O ,25 mM NaHCO₃ ,10 mM HEPES ,0.1% 牛血清アルブミン :KHH buffer) を用いた . 試験物質を添加する 2 時間前にグルコースなしの KHH buffer でプレインキュベート し ,その後 ,グルコースを 11mM 含む試験物質を ,培養液中で 24 時間インキュベートして細胞 と培養液を回収した . 試験物質 (0.5-100 μg/ mL CFE , 0.1-10 μM 14-deoxycoleon U , 0.1-10 μM Forskolin) はすべて DMSO に溶解した .

薬物代謝酵素 CYP 遺伝子の mRNA 発現については ,回収した細胞から抽出した Total RNA について , One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Takara)を用いてリアルタイム RT-PCR により解析した . グルコースの取込み量は , Kawano らの方法に準じ , 培養前の培養液のグルコース量から , 培養後のグルコース量を差し引いた値をグルコース取りこみ量として , グルコース C-テストワコー (fujifilm wako) を用いて測定した . 中性脂肪の細胞内蓄積はトリグリセライド E-テストワコー (fujifilm wako) を用いて測定した .

4 . 研究成果

(1)HS の安全性評価動物試験 (Suggested Daily Intake-Based Safety Evaluation; SDI-SE) の開発・命名

本研究では ,健康被害の報告がほとんどない食品添加物の安全性試験の考え方に基づく HS のリスク評価法を実施していく中で , 本法を安全性評価動物試験法 [Suggested Daily Intake-Based Safety Evaluation (SDI-SE): J Nutr Sci Vitaminol.,2023] と独自に開発・命名した .

食品添加物の使用基準が , 一日許容摂取量 (ADI) をもとに定められること [図 1] に着目し , ADI 導出の逆算方式として考案した . SDI-SE は , ラットに個々の HS 製品を体重当たりでヒトの SDI の 100 倍相当量を 1 日 1 回 , 8 日間連日投与し , 薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP)アイソフォームの遺伝子発現を評価指標として , 肝臓への影響を調べる手法である [図 1] .

肝を標的とする HS の有害影響の主なメカニズムは , 薬物相互作用およびハーブ成分の代謝活性化であり , CYP が重要な役割を果たす . CYP 酵素は , 多彩な医薬品やハーブ成分の代謝に関わり , その基質の多くは代謝されて解毒される一方 , 一部は代謝活性化されて毒性が増す . また , 薬物およびハーブ成分には CYP 酵素を誘導するものがあり , 代謝活性化の促進や , 併用薬剤の治療効果の低下により , 健康リスクを生じる可能性がある . 既に , SDI-SE のプロトタイプとなる手法を重篤な肝障害事例への関与が疑われたカバ (*Piper methysticum*) 抽出物の市販製品に適用し , カバ投与が顕著な肝腫大とともに , 肝 CYP1A1 遺伝子の著しい発現増大を生じることを世界に先駆けて明らかにしている (Food Chem Toxicol., 2008) . SDI-SE にバターバー (*Petasites hybridus*) を適用して公表する際に命名した .

また , 本研究の対象製品を含む複数のハーブ製品に SDI-SE を実施して得られた , 肝 CYP 遺伝子発現への影響を 4 つのカテゴリーに整理し (I; 肝肥大と CYP1A1 の誘導 , II; 肝肥大と医薬品代謝に関わる CYP の誘導 , III; 肝肥大なしで軽度な CYP の誘導 , IV; 肝臓への影響なし) [表 1] , 各カテゴリーの製品につき , 安全性確保の方針も提案した . I に区分される CYP1A1 を誘導するハーブ製品は , 環境化学類似体が含まれている可能性があり注意が必要である . II に区分される CYP1A1 以外の医薬品の代謝に関わる CYPs を誘導する製品については , 薬物相互作用や代謝活性化による副作用に注意が必要である . III の影響を引き起こす製品は , 過剰摂取により常に安全であるとは限らないため , 事業者は CYPs 誘導に関連する悪影響のリスクを認識しておく必要がある . IV に分類される製品の場合 , 製品ラベルに記載されている SDI での短期摂取は , 肝臓の CYP 誘導による悪影響を引き起こす可能性は低い (J Nutr Sci Vitaminol.,2023) .

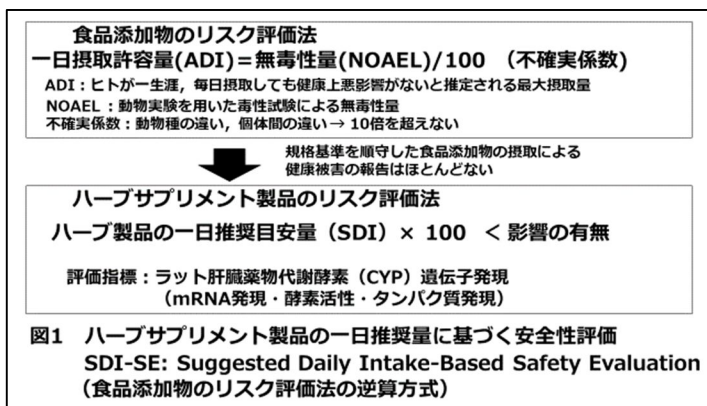


表1 ハーブサプリメント製品のSDI-SE実施によるカテゴリー分類 (製品SDIの100倍量投与による肝重量およびラット肝臓 薬物代謝酵素の遺伝子発現)

Category	Herbal supplement products	Relative liver weight	Hepatic CYPs mRNA gene expression						Relative kidney weight	Hyaline droplets in the renal tubular
			1A1	1A2	2B1	2B2	3A1	3A2		
I	Kava	1.41	74	3	17	21	9	-	-	N
	St. John's wort	1.12	-	-	-	-	44	4	-	N
	Ginkgo	1.12	-	-	18	5	-	-	-	N
	Butterbur (SGA)	1.14	-	2	14	12	4	2	1.07	++
	Butterbur (SGB)	1.07	-	-	21	11	3	-	1.15	++
II	(A)	1.10	-	-	4	-	6	4	-	N
	(B)	1.15	-	-	-	-	4	2	-	N
	(C)	1.15	-	-	-	-	3	2	-	N
	(D)	1.30	-	-	3	2	12	2	-	N
	CFE	1.37	-	-	3	4	14	3	-	N
III	Sweet tea vine	-	-	4	-	-	-	-	-	N
	Butterbur (HC)	-	-	-	-	-	-	-	-	N
IV	Valerian	-	-	-	-	-	-	-	-	N

* :数字はCont群の倍数で , 統計的な有意差があったものを示す ; -, 有意差なし .
 ** : ++, 陽性 (所見あり) ; N, 陰性 .

HS の SDI-SE の実施と肝臓への影響のカテゴリー化は、消費者による安全・安心な利用、また生産者の的確な製品管理・商品開発（SDI 設定、医薬品との相互作用のラベル表示、CYP 誘導成分量等）に寄与できる。

（２）バターバー（*Petasites hybridus*）製品の SDI-SE と成分分析

バターバー製品については英国の医薬品・ヘルスケア製品規制庁が肝毒性のリスクに関する警告を発しているが、肝毒性の機序は不明であった。ピロリジジナルカロイドを含まないバターバー-3 製品に SDI-SE を適用して、次の結果を得た。

２つの油性製品は、肝肥大とともに CYP2B の mRNA 発現を顕著に増強し（>10 倍）、CYP3A1 の mRNA 発現を中程度に増強した（<4 倍）。油性製品は、雄ラットの腎近位尿細管上皮に 2-ミクログロブリンの蓄積を引き起こしたが、このタンパク質はオスのラットに特異的なタンパク質であるため、ヒトの健康に外挿することは不要であった。油性製品とは異なり、粉末製品は、肝臓と腎臓に対して有意な影響を示さなかった。２つの油性製品は、カテゴリー に区分され、薬物相互作用や代謝活性化による肝臓への作用に注意が必要であった。粉末製品は に区分され、同素材であっても製品により評価が異なった。

製品により CYP の誘導差があったため、成分分析を実施した。油性製品の HPLC クロマトグラムは類似していたが、粉末製品はフラットで異なった。LC-MS 分析では、油性製品は、製品ラベルのとおり petasin と isopetasin が含有していたが、粉末製品には含まれていなかった。油状製品は安全性の点で、粉末状製品は有効性の点で注意が必要であった。バターバーによる CYP 誘導が肝毒性に関与する可能性を初めて示唆した。

（３）コレウス・フォルスコリ（*Coleus forskohlii*）製品の SDI-SE と成分分析

食品衛生法に規定される指定成分含有食品であるコレウス・フォルスコリ 4 製品（A～D）と素材であるコレウス・フォルスコリ抽出物（CFE）を用いて SDI-SE を適用し次の結果を得た。

4 製品とも、肝肥大を伴い、医薬品の代謝に関わる CYP2B や 3A を誘導することから、カテゴリー II に該当すると判断し、薬物相互作用や代謝活性化による肝臓への作用に注意が必要であった。特に D 製品は CFE と同等に肝臓への作用が強く、1.3 倍の肝肥大と CYP3A1 の 10 倍以上の強い誘導があり、製品ごとの作用の違いを検出し、製品は素材の評価と同じではないことも検証した。

CYP 誘導成分を検討するために、HPLC 分析を行った。有効成分フォルスコリン量がラベル表示よりも少ない製品が 2 製品あり、有効性への影響が懸念された。肝臓への作用が強い D 製品と CFE に共通して、ABC 製品よりも多く含有する成分を探し、14-deoxy coleonU を含む 4 つの成分が検出された。これらの成分と CYP 誘導との関連は、今後検討していく。

また、CYP 誘導成分と脂肪肝誘発因子の特定に向けて、HepG2 による検討を行い、細胞内へのグルコース取込み、中性脂肪蓄積作用を促進する候補成分が見つかり、同成分は CYP も誘導した。今後再現性を含め検討していく。成分が特定できればより安全な製品管理へと繋がる。

（４）HS の安全性評価動物試験（SDI-SE）実施による有効性

HS は、その成分特性（多成分・生体異物の濃縮物）により、製品ごとのリスク評価を確立させる必要があると考え、肝臓への影響が懸念される HS について、目的 と を検証し、上記（１）～（３）のように、同素材であっても製品ごとに評価は異なり、素材の評価と製品評価は異なることが明らかとなった。また、CYP を誘導した場合には、成分特定にむけた検討に発展できる。事業者が自社製品について製品評価を実施し、SDI-SE により肝肥大や CYP の誘導があった場合には、的確な製品管理や商品開発に繋げることができる。本評価を実施することの意義は HS の安全性確保において大きく、今後行政への認知・導入に繋げていくことで、公衆衛生・食品保健上の意義は大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiroko Hashida, Misaki Kurawaka, Haruka Tatehana, Anna Arita, Naho Sasaki, Fumio Shimura, Yuko Yamazaki	4. 巻 69(3)
2. 論文標題 Application to Butterbur Products of a Suggested Daily Intake-Based Safety Evaluation of Individual Herbal Supplements with Cytochrome P450 Expression as a Major Index	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 206-219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroko Hashida, Mayumi Okuma, Fumio Shimura, Yuko Yamazaki	4. 巻 4
2. 論文標題 Science-based Ratings of Safety and Effectiveness of Ingredients of Health Foods Distributed in Japan Differ among Health Food Categories	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian Journal of Dietetics	6. 最初と最後の頁 100-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaori Yokotani, Yuko Yamazaki, Fumio Shimura, Keizo Umegaki	4. 巻 43
2. 論文標題 Comparison of CYP Induction by Coleus Forskohlii Extract and Recovery in the Small Intestine and Liver of Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 116-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎優子、端田寛子、倉若美咲樹、佐々木菜穂、志村二三夫
2. 発表標題 一日推奨量に基づくハーブサプリメント製品の安全性評価：コレウス・フォルスコリ製品への適用
3. 学会等名 第78回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------