

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：32415

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350160

研究課題名(和文)ハーブサプリメント素材が有する環境化学物質様作用の検証とそのリスク評価方法の構築

研究課題名(英文)Verification of environmental chemical-like action of herbal supplement materials and establishment of risk assessment methods

研究代表者

佐々木 菜穂 (SASAKI, Naho)

十文字学園女子大学・人間生活学部・講師

研究者番号：10571466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ハーブサプリメント(HS)素材には安全性が不明確なものが多く、肝薬物代謝系への作用を介して有害性を示すものが少なくない。本研究は、HSの安全性確保に向けたリスク評価法の構築を目的とし、重篤な肝障害事例のあるカバ(Piper methysticum)をモデル物質として、CYP1A1を発現誘導する環境化学物質様作用を酵素実験、細胞実験、動物実験により検証した。その結果、ハーブ成分には環境化学物質様の作用を有するものがあり、さらに環境化学物質との相互作用にも注意を要することが明らかになった。本研究より、環境化学物質様作用を指標としたリスク評価法の有用性および妥当性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The safety of herbal supplements (HS) remains uncertain, and their use occasionally bring adverse effects on the liver via hepatic drug-metabolizing system. We aimed to establish risk assessment methods to ensure safety of HS using kava (Piper methysticum) as a model substance of harmful products. In this study, we investigated the environmental chemical-like action inducing expression of CYP1A1 by analysis of interactions between herbal ingredients and CYP1A1, and measurement of enzyme activity and mRNA expression of CYP1A1 in vitro and in vivo. The results indicated that some herbal ingredients have actions similar to environmental chemical substances, and also attention must be paid to interaction between HS and environmental chemical substances. This study suggests the usefulness and validity of risk assessment methods based on environmental chemical-like action.

研究分野：栄養学、生活科学

キーワード：ハーブサプリメント 安全性評価 薬物代謝酵素 環境化学物質 カバ

1. 研究開始当初の背景

最近、我が国では規制緩和の流れを受け、いわゆる健康食品や保健機能食品などの制度の見直しが行われている。一方で、近年の健康ブームを背景にハーブサプリメントが多々流通しているが、安全性の科学的根拠が不明確なものが多い¹⁾。一般的にハーブサプリメント素材は抽出物を濃縮して利用されることが多い。植物の二次代謝産物は多様性に富み、人々は古来よりその成分を医薬品などに利用してきた。しかしながら、その成分は多成分系の脂溶性生体異物という特性を持つものがあり、処理部位である肝臓を標的とし、薬物代謝系への作用を介して有害性を示すものが少なくないと推定された。

申請者らのグループはハーブサプリメントの安全性確保のためのリスク評価方法を確立するために、実験動物肝における薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) の誘導を主な指標としてカバ (*Piper methysticum*)²⁾、イチヨウ葉³⁾、コレウスフォルスコリ⁴⁾等について検討してきた。カバに関しては、不安障害への有効性が報告⁵⁾されている一方、死亡を含む重篤な肝障害事例がドイツを中心に多数発生した経緯があった。カバ摂取にともなう肝障害の発症機序は解明されていない。

申請者らの研究グループは、一日摂取目安量の100倍量(体重1kg当たり)のカバ製品投与ラットにおいて、肝重量の著しい増大とともに、CYP1A1 遺伝子発現の極めて強い亢進を他者に先駆けて見出した²⁾。肝におけるCYP1A1 遺伝子の発現は、強力なCYP1A1 誘導作用を持つダイオキシン(TCDD)やベンゾ[a]ピレン(B[a]P)等の環境化学物質への曝露の鋭敏な指標とされている。また、B[a]PはCYP1A1 による代謝活性化をうけて発がん性を獲得する。

申請者らの実験では、ハーブサプリメント製品を一日摂取目安量の100倍量投与している。これは、食品添加物等の一日摂取許容量(ADI)は、毒性試験に基づく無毒性量(NOEL)を不確実係数(通常100)で割って算出することに立脚している。したがって、食品添加物の安全性確保の考え方を参考とし、またCYP1A1 遺伝子の極めて強い発現亢進を有害事象と捉えれば、カバ製品の一日摂取目安量はADIすなわち“生涯にわたり毎日摂取し続けても影響が出ないと考えられる一日当たりの量”を超えていると考えられる。また、カバは環境化学物質と類似の作用を持つという仮説も成り立つ。

そこで本研究は、ハーブサプリメントのリスク評価法を確立し、ハーブ素材の安全性確保に寄与することを目的とし、環境化学物質様の作用を指標とするハーブサプリメント素材のリスク評価法のアルゴリズムの構築をめざした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ハーブサプリメント素材

のモデルとして重篤な肝障害事例のあるカバを用い、環境化学物質様作用を指標とするハーブサプリメントのリスク評価法のアルゴリズムを構築することである。本課題はその達成に向け、まずはカバ成分が環境化学物質様作用を有するかどうかを検証し、さらに、同様の作用を検出・解析するための多面的手法(食品添加物の安全性評価を参考にした動物実験、CYP1A1 による分子認識の調査(酵素実験)、ヒト肝細胞に対する影響の調査(細胞実験))を開発・検討し、同作用の機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

カバの主要成分であるカバラクトンをモデル物質に取り上げ、カバが有する環境化学物質様作用の検証および検出・解析を多面的に行った。

【実験1】CYP1A1 酵素タンパク質によるカバラクトンの分子認識

1) 試薬

リコンビナントヒト CYP1A1 reductase 含有ミクロソーム(Sigma Aldrich)を用いた。CYP 酵素活性の測定には、蛍光源基質として7-ethoxyresorufin (ER)(Sigma Aldrich)を用いた。カバの主要成分であるカバラクトンはカワイン、メチスチシン、ヤングニン、ジヒドロキシカワイン、ジヒドロキシメチスチシン、デスメトキシヤングニン(DMY)(ChromaDex Co.)を用いた。

2) CYP1A1 酵素活性の測定

リコンビナントヒト CYP1A1 酵素活性は、Kennedy らの方法⁶⁾を改変した蛍光レートアッセイ法により、ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) 活性として測定した。

CYP1A1 とカバラクトンの相互作用を検討するために、Km 値に相当する基質濃度における酵素活性を100%とし、これに対するカバラクトンの影響を調べた。6種のカバラクトンのうちCYP1A1 に対する阻害作用が認められたものについてはその阻害様式を調べた。阻害様式の分析にはGraphPad Prism 5(GraphPad Software Inc.)を用いた。

3) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

DMYをリコンビナントヒトCYP1A1で処理した反応液をHPLC(NANOSPACE SI-1、(株)資生堂)により分析した。

【実験2】肝癌由来培養細胞におけるCYP1A1の遺伝子発現に対するカバラクトンと環境化学物質の相互作用

1) 試薬

カバラクトンはカワイン、メチスチシン、ヤングニン、ジヒドロキシカワイン、ジヒドロキシメチスチシン、DMY(ChromaDex Co.)

を用い、環境化学物質として B[a]P (東京化成工業) を使用した。また、B[a]P の CYP1A1 誘導作用を相殺することが報告されているレスベラトロール (RVT) を対照物質として使用した。

CYP 酵素活性の測定には、蛍光源基質として 7-ethoxyresorufin (ER) (Sigma Aldrich) を用いた。タンパク質量測定ではアミノ基蛍光ラベル化するためにフルオレスカミン (和光純薬工業 (株)) を用いた。

2) 細胞培養

ヒト肝癌由来培養細胞 HepG2 は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより入手した (Cell No. RCB1648)。培養は 5% CO₂、37 °C の条件下で行った。培地は、1 g/L グルコース、100 U/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、10% FBS を含む DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) を使用した。

実験は 24 well または 96 well 培養プレートを用いて行った。HepG2 の培養培地中に 100 nM カバラクトンまたは 100 nM B[a]P を加え 6 時間培養した。24 well 培養プレートの細胞は回収した後 total RNA を抽出し、遺伝子発現解析の試料とした。96 well 培養プレートの細胞は CYP1A1 酵素活性測定およびタンパク質量測定用試料として用いた。

3) 測定項目および測定方法

カバラクトンおよび B[a]P の HepG2 遺伝子発現に対する影響は realtime RT-PCR 法により解析した。CYP1A1、arylhydrocarbon receptor (AhR)、AhR repressor (AhRR)、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 発現量の測定は One Step SYBR RT-PCR Kit (タカラバイオ) を使用し、Mx3000p リアルタイム PCR システム (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いた。

CYP1A1 酵素活性は EROD 活性⁷⁾として測定し、たんぱく質量は蛍光法⁸⁾により測定した。

データは一元配置分散分析ののち下位検定を実施し、いずれも 5%未満を有意水準とした。

【実験 3】実験動物肝における CYP1A1 の遺伝子発現に対するカバラクトンの影響

1) 実験動物

実験動物は 7 週齢の ICR 雄性マウス (東京実験動物) を用い、標準飼料 AIN93G および飲料水は自由摂取させた。2 日間の予備飼育の後、CONT 群 (n=5)、DMY (10) 投与群 (n=5)、DMY (100) 投与群 (n=3) に分けた。

DMY (100) は、カバ製品に含有する DMY 相当量に換算して 1 日摂取目安量の 100 倍量を PEG400 に懸濁させ、7.5 mg/mL の濃度で 1 日 1 回、8 日間連続で 200 μ L/30 g BW となるように胃内投与した。DMY (10) は 1/10 希釈し

て投与した。飼育最終日の前日より絶食させ、解剖した。

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、同委員会のガイドラインを遵守して実施した。

2) 測定項目および測定方法

マウス肝臓は摘出後速やかに total RNA 抽出用の試料と肝臓ミクロソーム調製用試料を採取した。CYP 分子種の酵素活性測定用試料として用いた。

マウス肝における CYP 分子種の遺伝子発現に対する影響は realtime RT-PCR 法により解析した。CYP1A1、CYP1A2、GAPDH mRNA 発現量の測定は One Step SYBR RT-PCR Kit (タカラバイオ) を使用し、Mx3000p リアルタイム PCR システム (アジレント・テクノロジー (株)) を用いた。

マウス肝ミクロソーム画分の CYP1A1 酵素活性は、Kennedy らの方法⁶⁾を改変した蛍光レートアッセイ法により、EROD 活性として測定した。肝ミクロソーム画分のタンパク質量測定は、BCA Protein Assay Kit (Pierce) を使用した。

データは一元配置分散分析ののち下位検定を実施し、いずれも 5%未満を有意水準とした。

4. 研究成果

【実験 1】CYP1A1 酵素タンパク質によるカバラクトンの分子認識

6 種のカバラクトンのうち CYP1A1 に対する阻害作用を示すものは、B[a]P 型の環境化学物質様の作用をもつ可能性があるという仮説を立て、実験的に阻害強度および様式を調べた。その結果、カバラクトンのうち DMY とヤンゴニンは CYP1A1 活性を強く阻害し、その阻害の様式は競合阻害であることが示唆された。これより、両者は CYP1A1 の基質結合部位に強く結合する可能性が推定された。さらに、DMY あるいはヤンゴニンと CYP1A1 の反応液を HPLC で分析した結果、両者が CYP1A1 の基質となることが明らかになった。

以上の結果は、DMY とヤンゴニンが B[a]P と同様に CYP1A1 酵素に分子認識されることを示唆している。

【実験 2】肝癌由来培養細胞における CYP1A1 の遺伝子発現に対するカバラクトンと環境化学物質の相互作用

ヒト肝癌由来培養細胞 HepG2 を用いた実験では、まず、カバラクトンによる CYP1A1 mRNA 発現誘導作用について検証した。培養開始後 6 時間において DMY、ヤンゴニン、メチスチンに弱いながらも有意な CYP1A1 mRNA 発現誘導作用が確認された。これは実験 1 酵素実験の結果と一致した。

次に、カバラクトンあるいは RVT と B[a]P の共培養における相互作用を調べた。RVT は B[a]P の CYP1A1 mRNA 発現誘導作用を阻害するのに対し、カバラクトンのうち DMY は B[a]P により発現誘導された CYP1A1 mRNA を長時間にわたり高レベルに維持させることが明らかになった。CYP1A1 酵素活性に対しても同様の傾向が確認された。また、DMY と B[a]P の共培養により、CYP1A1 の発現を制御する AhR シグナル伝達系転写因子の遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆された。

これらの結果より、カバラクトンのうち DMY は環境化学物質様の作用を有し、B[a]P との相互作用にも注意を要することが示された。

【実験 3】実験動物肝における CYP1A1 の遺伝子発現に対するカバラクトンの影響

実験 1 でリコンビナントヒト CYP1A1 と DMY が強い相互作用を示し、実験 2 においても DMY の HepG2 細胞に対する CYP1A1 mRNA 発現誘導が認められたため、ICR マウス(雄)7 週齢に、カバ製品に含有する DMY 相当量に換算して 1 日摂取目安量の 100 倍量を胃内投与した。その結果、ラットにおける同様の実験で、カバ製品投与によって生じた肝肥大および CYP1A1 の誘導は、DMY 単独成分のマウスへの投与では肝肥大および CYP1A1 の誘導は生じなかった。CYP1A1 を誘導する成分は、DMY ではない、あるいは DMY 単独ではない可能性が推定された。今後、DMY と他のカバラクトンや環境化学物質等との相互作用や実験動物の種差についても検討したい。

申請者らの提案する環境化学物質様作用を指標とするハーブ素材のリスク評価法は、

B[a]P 型:AhR を介して CYP1A1 遺伝子発現を亢進させ、CYP1A1 酵素タンパク質により分子認識され、かつその基質となるもの、TCDD 型: AhR を介して CYP1A1 遺伝子発現を亢進させるが、CYP1A1 酵素タンパク質により分子認識されないもの、その他の型: AhR を介さずに CYP1A1 の遺伝子発現を亢進させるものとして分類する。このような整理に基づき、本実験結果をあてはめると、カバラクトンのうち DMY の環境化学物質様の作用は B[a]P 型であると評価された。しかしながら、マウスを用いた動物実験(実験 3)では酵素実験およびヒト培養肝細胞を用いた細胞実験の結果と一致しなかった。これより、今後の課題として本リスク評価法の評価項目に「種差」および「環境化学物質との相互作用」も検討が必要であると考えられた。

本研究では、重篤な肝障害事例のあるカバをモデル物質として、ハーブ成分の環境化学物質様作用を多面的な手法により検証した。その結果、ハーブ成分には CYP1A1 酵素に分子認識される環境化学物質様の作用を有するものがあること、また、B[a]P のような環

境化学物質との相互作用にも注意を要することが示され、本リスク評価法の有用性と妥当性を立証するエビデンスを得ることができた。この成果を活用して構築するリスク評価法は、ハーブサプリメント摂取による健康被害の未然防止のために寄与すると考えられる。

<引用文献>

- 1) 山崎 優子, 端田 寛子, 志村 二三夫. 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. 2011. 69 巻. 5 号. 267-279.
- 2) Yamazaki Y., Hashida H., Arita A., Hamaguchi K., Shimura F. 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.* 2008. Dec;46(12):3732-8.
- 3) Taki Y., Yamazaki Y., Shimura F., Yamada S., Umegaki K. Time-dependent induction of hepatic cytochrome P450 enzyme activity and mRNA expression by bilobalide in rats. *J Pharmacol Sci.* 2009. Mar;109(3):459-62.
- 4) Virgona N., Yokotani K., Yamazaki Y., Shimura F., Chiba T., Taki Y., Yamada S., Shinozuka K., Murata M., Umegaki K. *Coleus forskohlii* extract induces hepatic cytochrome P450 enzymes in mice. *Food Chem Toxicol.* 2012. Mar;50(3-4):750-5.
- 5) Pittler MH., Ernst E. Kava extract for treating anxiety. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013. (1):CD003383.
- 6) Kennedy SW., Jones SP., Bastien LJ. Efficient analysis of cytochrome P4501A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence plate reader. *Anal Biochem.* 1995. Apr 10;226(2):362-70.
- 7) Genies C., Maitre A., Lefebvre E., Jullien A., Chopard-Lallier M., Douki T. The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs. *PLoS One.* 2013. Nov 8;8(11):e78356.

- 8) Lorenzen A., Kennedy SW. A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. Anal Biochem. 1993. Oct; 214(1):346-8.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

ブイ ティ ゴク ハー、端田 寛子、倉若 美咲樹、館花 春佳、有田 安那、佐々木 菜穂、志村 二三夫、山崎 優子. 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. 十文字学園女子大学紀要. 2017. 48(2): 85-97

[学会発表](計8件)

国際学会

Naho Sasaki, Hiroko Hashida, Misaki Takeda, Ayako Fujiwara, Haruka Miyata, Yuko Yamazaki, Fumio Shimura. Environmental chemical-like action of kavalactones used in anxiolytic herbal supplements. 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015). 2015.

Misaki Kurawaka, Bui Ngoc Ha, Yumi Nemoto, Mizuho Hoashi, Naho Sasaki, Yuko Yamazaki, Fumio Shimura. Application of Hepatic Cytochrome P450 (CYP) Gene Expression as Index for Safety Assessment of Herbal Supplements. 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015). 2015.

国内学会

端田 寛子、館花 春佳、川崎 奈緒、有田 安那、佐々木 菜穂、山崎 優子、志村 二三夫. ハーブサプリメントの安全性評価: パターバー製品のラット肝臓・腎臓への影響. 第72回日本栄養・食糧学会大会. 2018.

山崎 優子、館花 春佳、倉若 美咲樹、端田 寛子、有田 安那、佐々木 菜穂、梅垣 敬三、志村 二三夫. 食品添加物の安全性確保の考え方に基づいたハーブサプリメント製品(HS)のリスク評価: コレウス・フォルスコリ(CF)製品の検討. 第71回日本栄養・食糧学会大会. 2017.

山崎 優子、館花 春佳、倉若 美咲樹、玉貫正菜、土屋 依理、野原 早加、羽田 美優、端田 寛子、有田 安那、佐々木 菜穂、志村 二三夫. 食品添加物のリスク評価の考え方に基づくハーブサプリメ

ント製品の安全性確保の提案: Cytochrome P450 遺伝子発現を指標として. 第70回日本栄養・食糧学会大会. 2016.

藤原 綾子、竹田 美沙希、宮田 花香、館花 春佳、倉若 美咲樹、端田 寛子、佐々木 菜穂、志村 二三夫. ハーブ成分カバラクトンの有する環境化学物質様作用の検証. 第62回日本栄養改善学会学術総会. 2015.

堀越 結希、畠山 優女、館花 春佳、倉若 美咲樹、端田 寛子、山崎 優子、志村 二三夫. ハーブを素材とする健康食品の安全性確保に向けた評価試験方法の提案. 第62回日本栄養改善学会学術総会. 2015.

慶野 千尋、倉若 美咲樹、浅見 まり子、Bui Thi Ngoc Ha、山崎 優子、佐々木 菜穂、志村 二三夫. ヒト肝細胞におけるベンゾ[a]ピレン誘導 CYP1A1 遺伝子発現に対するハーブ成分カバラクトンの影響. 第61回日本栄養改善学会学術総会. 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 菜穂 (SASAKI, Naho)
十文字学園女子大学・人間生活学部・講師
研究者番号: 10571466

(2) 研究分担者

志村 二三夫 (SHIMURA, Fumio)
十文字学園女子大学・学長
研究者番号: 70111523

山崎 優子 (YAMAZAKI, Yuko)
十文字学園女子大学・人間生活学部・講師
研究者番号: 70518117

有田 安那 (ARITA, Anna)
十文字学園女子大学・人間生活学部・助手
研究者番号: 20518104

(3) 連携研究者

端田 寛子 (HASHIDA, Hiroko)
帝京平成大学・健康メディカル学部・助教
研究者番号: 10461766

(4) 研究協力者

ブイ ティ ゴク ハー (Bui Ti Ngoc Ha)
倉若 美咲樹 (KURAWAKA, Misaki)
館花 春佳 (TATEHANA, Haruka)