

ラフマ葉エキスの安全性試験

張 国平¹ 森 昌夫² 王 中³

1.復旦大学上海医学院 2.微小循環研究所 3.和漢生薬研究所

ラフマ (*Apocynum venetum*) はキョウチクトウ科多年生草本野生植物であり、中国からヨーロッパ、アジアの温帯にかけて自生する宿根草で、直立性灌木である。中国では特に新疆、青海、甘肅、河北などアルカリ性土壌と砂漠地区に分布する。この厳しい環境は、ラフマに独特な効用をもたらした^[1-4]。薬物化学分析によりラフマは中枢神経系、心臓血管系に作用する成分を多く含まれている^[5]。ラフマ花、葉は中国の上述地区で民間薬、お茶として利用される歴史は千年以上がある。新疆ラフマ産地住民のラフマ葉をお茶として飲用する習慣は、低い心、脳血管疾病の罹患率に関係することが疫学調査によって明らかにされた^[6]。

当研究室は新疆地区のラフマ葉エキスを用いて、ラフマ葉の服用安全性に毒理学研究を行い、安全性を確認し、ラフマ葉の薬用に必要な科学根拠を提供する。

キーワード ラフマ;安全性評価;毒理学

1 材料と方法

1.1 実験材料

実験原料:ラフマエキス、和漢生薬研究所提供。茶褐色。

1.2 実験動物

ICR マウス、SD ラット:復旦大学上海医学院実験動物センター提供。

1.3 実験方法

動物の組分け方法と実験データ結果処理は《食品安全性毒理学評価 Procedure (GB15193.3~1994)》に定められた基準で行われる^[7]。

1.3.1 急性経口投与毒性実験

ICR マウス 80 匹、体重 18~22g、SD ラット 80 匹、体重 180~210g、雌雄各半分。Dosage は人体最大推薦量 0.1g/kg.bw を参考し、Horn's 法をもとに、動物急性毒性試験経口投与 Dosage は 1.00、2.15、4.64、10.0/kg.bw にする。投与量は異なる濃度で 10ml/kg.bw にする。

1. 3. 2 マウス骨髄微小核試験

ICR マウス 50 匹、体重 25~30g、雌雄ランダムに 5 組に分け、10 匹/組。実験動物に人体最大推薦量の 25、50、100 倍の量、2.5、5.0、10.0/kg.bw の 3 Dosage 組、10ml/kg.bw の等容量で連続二回投与する。二回目投与後 6 時間、大腿骨から骨髄細胞を採取、PCE 1000/匹で微小核を検査。陰性対照組(生理食塩水)と陽性対照組(Endoxan40mg/kg 腹腔注射)も設ける。

1. 3. 3 精子奇形試験

雄 ICR マウス 50 匹、体重 25~30g、ランダムに 5 組に分け、10 匹/組。投与量は骨髄微小核試験と同じ、連続投与 5 日、投与後 30 日目、精巣上体から精子を採取、1000/匹の精子奇形率を検査する。

1. 3. 4 胎児奇形試験

SD ラット 120 匹、体重 210~350g、雌:雄 2:1、30 匹/組、4 組に分け、交配させる。各組には妊娠ラットが 10 匹以上ある。妊娠ラットを 2.5、5.0、10.0/kg.bw の 3 Dosage 組に分け、妊娠 7d~16d に 10ml/kg.bw 容量を投与する。陰性対照組(生理食塩水)も設ける。妊娠 20d に開腹し、子宮を取り出し、重量をはかり、死亡胎児数を確認。各胎児の体重、身長、外観以上の有無を記録。半分胎児を骨格検査、残り半分を内臓検査する。

1. 3. 5 30d 飼育試験

SD ラット 80 匹、体重 79~120g、雌雄各半分、ランダムに 4 組に分け、2.5、5.0、10.0/kg.bw の 3 Dosage 組と対照組。独房飼育。一週間一回体重をはかり、食べ物摂取量、食物利用率を記録。連続投与 30d 後眼窩から採血、血液ルーチン検査、生化学検査、肝臓、腎臓、脾臓解剖、病理検査する。

1. 4 実験データ統計

実験データを SAS ソフトで統計学の分析が行われる。

2. 結果

2. 1 急性経口投与毒性試験

2 週間実験期間内全ての動物には異常と死亡は見られなかった。ラフマエキス(和漢生薬研究所)の ICR マウス、SD ラットの経口投与 LD50 は >10.0g/kg。

2. 2 マウス骨髄微小核試験

表 1 の結果から、ラフマ各組マウスの PCE 細胞微小核発生率は、陰性対照組(生理食塩水組)と比べ、 χ^2 検定の結果 $P > 0.05$ であり、統計学の差がない、陽性対照組(Endoxan40mg/kg 腹腔注射)の微小核検出率はラフマ組、陰性組と比べて、 $P < 0.01$ 、大きな差があった。

2.3 精子奇形試験

表2の結果から、ラフマ各組マウス精子奇形率は陰性対照組(生理食塩水組)と比べ、 χ^2 検定の結果 $P>0.05$ であり、統計学の差がない、陽性対照組(Endoxan40mg/kg 腹腔注射)の精子奇形率はラフマ組、陰性対照組と比べて、 $P<0.01$ 、大きな差があったことを明らかにした。

2.4 胎児奇形試験

ラフマ各組ラットの胎児奇形試験結果により、妊娠ラットの奇形指標、生きていた胎児数、死亡胎児数及び胎児死亡率は対照組と比べ、 χ^2 検定、 $P>0.05$ であり、統計学の差がなかった。各組胎児の内臓、骨格検査も異常はなかった(表3)。

表1. ラフマ葉エキスの骨髓微小核試験 (平均値±標準誤差)

組分け	動物数	PGE 細胞数	微小核数	微小核率(%)
♂				
陰性対照	10	5000	3	0.6±0.89
ラフマ 2.5g/kg	10	5000	3	0.6±0.49
ラフマ 5.0g/kg	10	5000	2	0.4±0.80
ラフマ 10g/kg	10	5000	2	0.4±0.49
陽性対照	10	5000	68	13.6±1.82*
♀				
陰性対照	10	5000	3	0.8±1.10
ラフマ 2.5g/kg	10	5000	3	1.0±0.89
ラフマ 5.0g/kg	10	5000	2	1.2±0.98
ラフマ 10g/kg	10	5000	2	0.8±0.75
陽性対照	10	5000	67	13.4±1.82*

* $P<0.01$

表2. ラフマ葉エキスの精子奇形試験

組分け	動物数	精子数	奇形精子	奇形率(%)
陰性対照	10	5000	135	2.7
ラフマ 2.5g/kg	10	5000	145	2.88
ラフマ 5.0g/kg	10	5000	128	2.56
ラフマ 10g/kg	10	5000	154	3.08
陽性対照	10	5000	482	9.64*

* $P<0.01$

表3. ラフマ葉エキスのラット胎児奇形試験 (平均値±標準誤差)

組分け	妊娠数 /匹	妊娠ラット体重増 /g	子宮全重 /g	胎児身長 /cm	胎児尾長 /cm	胎児体重 /g
陰性対照	10	97.7±32.0	58.6±22.1	4.48±0.19	1.38±0.02	3.79±0.45
ラフマ 2.5g/kg	10	97.6±24.5	57.9±19.4	4.46±0.12	1.41±0.07	3.78±0.45
ラフマ 5.0g/kg	10	95.5±31.2	66.5±14.0	4.51±0.14	1.40±0.08	3.66±0.39
ラフマ 10g/kg	10	101.8±24.3	68.9±15.6	4.58±0.13	1.39±0.05	4.04±0.44

2. 5 30d 飼育試験結果

2. 5. 1 成長状態及び食物利用率

ラフマ葉エキスを 30d 飼育投与、各投与組動物の成長、発育状態は良好であり、対照組に比べ、活動性、摂食、排便の異常も見られなかった。各組の体重増加、食物利用率などの指標を分散分析、 X^2 検定し、 $P>0.05$ であり、差が無いことを表した。

2. 5. 2 血液学検査

各投与組の RBC、WBC、PLT、Hb、LYM、NEUT などルーチン検査の結果、陰性対照組と比べ、分散分析をし、統計学的な差がなかった。

2. 5. 3 生化学検査

TP、ALB、TG、TC、GPT、Cr、Bun、BG など項目検査は、各組の間に統計学的な差はなかった。

2. 5. 4 病理組織学検査

各組動物の肝臓、腎臓、胃、腸、辜丸、卵巣などの病理組織学検査結果、毒性作用による病変を見つけなかった。

3. 検討

食品安全性毒理学試験の結果、ラフマ葉エキス経口投与の $LD_{50}>10.0g/kg$ である。人間投与 Dosage の 100 倍に相当する投与量で微小核試験、精子奇形試験、胎児奇形試験は、すべて陰性である。30d 飼育試験も動物成長状態、血液、生化学指標、病理組織学の異常も見つからなかった。試験研究の結論から、ラフマ葉エキスは安全性高く、飲料食品或は健康食品として広範囲に利用できると考えている。

参考文献

- [1]左 風. ラフマ葉熱水抽出物のラット高コレステロール血症への作用[J]. 江西中医学院学报, 1999, 11(3):104.
- [2]Tagawa C, Kagawa T, Nakazawa Y, et al. Studies on antihypertensive effect of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) leaf extract (3) [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2004, 124(11):851–856.
- [3]周 本宏, 劉 剛, 胡 先明. ラフマの赤血球膜脂質過酸化損傷への保護作用[J]. 学院学报, 2004, 20(5):506–508.
- [4]香川 珠実. ラフマ葉エキスの血圧降下作用[J]. 賀 玉琢翻訳. 外国医学: 中医中薬分冊, 2005, 27(3):177–178
- [5]黄 湘蘭, 曾 凡. ラフマ葉化学成分の測定[J]. 時珍国医国薬誌, 1998, 9(6):539–540.
- [6]王 振勤. ラフマ葉の研究進展[J]. 中国中薬誌, 1996, 16(4):250–252.
- [7]安全基準:《食品安全性毒理学評価 Procedure(GB15193.3~1994)》[G]. 北 京: 国家標準出版社, 2000.

Food Safety Assessment on Extract of *Apocynum Venetum* Leaf

ABSTRACT: **Objective** To investigate and assess the bioavailability safety of *Apocynum venetum* leaf on human health for providing a direct research basis on medicine application of *Apocynum venetum* leaf extract. **Methods** Food toxic safety assessments on the extract of *Apocynum venetum* leaf including acute toxicity, genotoxic, teratology testing and short period animal feeding trial have been performed. The designs and decisions are strictly according to the national standard. **Results** Experimental data showed rat/mice acute oral toxicity of *Apocynum venetum* leaf extract both were $LD_{50} > 10g/kg$. Compare with control group, all of the *Apocynum venetum* groups have no genotoxic and teratogenic effect in micronucleus, teratospermia and teratotoxicity test. Furthermore, no significant toxic manifestation or physiological and biochemical influence was observed at the end of rats, one month short period of feeding trial. **Conclusion** The above toxicological data indicate *Apocynum venetum* leaf extract seems to be non-toxic natural herb and safe to be exploited as a salutary beverage and supplement for the benefit of human cardiovascular health.

KEY WORDS: *Apocynum Venetum* Leaf; food safety assessment; toxicity