

梅酢ポリフェノール抽出物の安全性の検討

志賀 勇介¹, 土田 辰典², 原 雄大², 岸田 邦博¹, 前田 正信³,
宮下 和久³, 藤原 真紀⁴, 山西 妃早子⁴, 矢野 史子¹, 三谷 隆彦¹

要旨

梅酢ポリフェノール抽出物は梅干し加工過程の副産物である梅酢より得られた粉末で、高い抗酸化活性と多くの機能性を有し、健康維持のための新規素材としての利用が期待されている。そこで、梅酢ポリフェノール抽出物の安全性に関する情報を得るために、ラット及びマウスを用いて、単回経口投与試験、28日経口投与試験、90日経口投与試験を実施した。さらにUMU-テストおよび小核試験で変異原性を検討した。

ラット単回投与試験では梅酢ポリフェノール抽出物は5000mg/kg体重の投与でも、急性毒性はまったく確認されず、連続投与試験においても1000mg/kg体重で毒性は認められなかった。変異原性も認められず、梅酢ポリフェノール抽出物の安全性は高いものと思われた。

1. 結論

食品中のポリフェノールの機能性については、赤ワインポリフェノールによる心臓病の予防効果、緑茶ポリフェノールによる脂質代謝改善効果など、近年多くの研究成果が報告されている⁽¹⁻³⁾。

和歌山県が生産する主要な果実であるウメ(*Prunus mume* Sieb. et. Zucc)は、果実の中でもポリフェノール含量が比較的高く、抗酸化能も高いレベルであることが確認されている⁽⁴⁾。また我々は、梅干し加工過程で産生される梅酢にポリフェノールが含まれている事を認め、梅酢からのポリフェノール抽出方法を開発した。また、この梅酢ポリフェノール抽出物には没食子酸換算で10~12%のポリフェノールが含まれ、その組成は主としてフェノール酸誘導体であることも認めている⁽⁵⁾。さらに、実験動物(ラット・マウス)を用いた梅酢ポリフェノール抽出物の給与試験で、抗疲労効果⁽⁶⁾や骨粗しょう症軽減効果⁽⁷⁾、抗肥満効果⁽⁸⁾などの機能性を認めている。

梅酢ポリフェノールを新規機能性食品素材として利用するにあたり、我々はさらに工業的な抽出法を開発し、多量の梅酢ポリフェノール抽出物を得た⁽⁹⁾。本研究では工業的抽出法で得られた梅酢ポリフェノール抽出物の安全性を非臨床的に検討するため、単回経口投与毒性試験、亜急性毒性試験(28日間反復経口投与毒性試験、90日間長期投与毒性試験)、変異原性試験(小核試験、UMU-テスト)を実施した。

2. 方法

2. 1 梅酢ポリフェノール抽出物の調製方法

合成吸着樹脂カラムに梅酢を通過、吸着させた後、水洗浄を数回繰り返し、アルコールで溶出した。この溶出液を濾過・濃縮後乾燥して、粉末の梅酢ポリフェノール抽出物を得た。本試験では全て同一ロットの梅酢ポリフェノール抽出物を使用している。梅酢ポリフェノール抽出物は、没食子酸換算で約12%のポリフェノールが含まれている。

原稿受付 2011年6月27日

1. 近畿大学生物理工学部 食品安全工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 和歌山県立医科大学医学部, 〒641-8509 和歌山市紀三井寺 811-1
3. 和歌山県工業技術センター 食品産業部, 〒649-6261 和歌山市小倉 60

2. 2 ラット単回経口投与毒性試験

6週齢のSDラット(紀和実験動物研究所)をステンレス製金網ケージに各1頭収容し、市販飼料(MF粉末飼料 オリエンタル酵母工業(株))およびイオン交換水を自由摂取させた。試験区は対照区と投与区の2区とし、1区あたり動物数は雌雄各6頭とした。投与区には梅酢ポリフェノール抽出物を生理食塩水で溶解して5000mg/10ml/kg体重の被験液、対照区には生理食塩水をゾンデで胃内投与した。投与後14日間は一般状態観察、体重測定、摂食量測定を行い、14日目の翌日に剖検、主要臓器の観察および重量を測定した。

2. 3 ラット28日間反復経口投与毒性試験

6週齢のSDラット(紀和実験動物研究所)をステンレス製金網ケージに各1頭収容し、試験に用いた。飼育には市販飼料(MF粉末飼料 オリエンタル酵母工業)およびイオン交換水を自由摂取させた。試験区は雌雄ともに対照区と被験物質投与区3区(250、500、1000mg/kg体重投与区)の4区とし、動物数は雌雄ともに対照区8頭、投与区9頭とした。投与区には梅酢ポリフェノール抽出物を生理食塩水で溶解して500、1000、2000mg/5ml/kg体重の被験液を、対照区には生理食塩水をゾンデで胃内投与した。投与期間は28日間とし、投与期間中は一般状態観察、体重、摂食量の測定を行った。投与最終日の夕方から動物を一晩絶食した後、ペントバルビタール麻酔下で腹大動脈より採血(血液学的検査・血液生化学的検査用)した。採血後に動物を失血死させ、解剖して肉眼的観察を行った。さらに、各臓器(部位名は表2に示したとおりである。)を採取し重量を測定した後、病理組織学的検査用にホルマリン固定をした。

2. 3. 1 血液学的検査

血液はヘパリン入り真空採血管に集め、全血を分析に供した。測定には自動血球計算装置(PCE-170 エルマ)を使用した。(検査項目、標記については表1に記したとおりである。)

2. 3. 2 血液生化学的検査

生化学的検査には遠心分離で得た血清を分析に供した。測定には臨床化学自動分析装置(スポットケム SP-4430 アークレイ)を使用した。ただし、TG、IPについては分光光度計を用いて比色法で測定した。(検査項目、標記については表1に記したとおりである。)

表1 血液学的検査・血液生化学的検査の測定項目と標記

血液学的検査		血液生化学的検査	
パラメータ	標記	パラメータ	標記
赤血球数	RBC	グルコース	Glu
白血球数	WBC	総コレステロール	T-Cho
ヘモグロビン濃度	Hb	血中尿素窒素	BUN
ヘマトクリット値	Ht	総ビリルビン	T-Bil
平均赤血球容積	MCV	アスパラギン酸トランスフェラーゼ	AST
平均赤血球ヘモグロビン量	MCH	アラニンアミノトランスフェラーゼ	ALT
平均赤血球ヘモグロビン濃度	MCHC	総タンパク	T-Pro
血小板数	PL	アルブミン	Alb
		A/G比	A/G比
		カルシウム	Ca
		トリグリセリド	TG
		尿酸	UA
		乳酸脱水素酵素	LDH
		アルカリホスファターゼ	ALP
		クレアチニン	Cre
		無機リン	IP
		マグネシウム	Mg

2. 3. 3 組織学的検査

重量を測定した臓器を 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業)で固定・保存した。雌雄ともに対照区は 4 頭、1000mg/kg 体重投与区は 9 頭の臓器について組織標本を作製し、検査した。染色方法はヘマトキシリン・エオシン染色である。

2. 4 マウス 90 日間長期投与毒性試験

6 週齢の ICR マウス(紀和実験動物研究所)をプラスチック製ケージに各 8~9 頭収容し、市販飼料(MF 粉末飼料 オリエンタル酵母工業)およびイオン交換水を自由摂取させた。試験区は雌雄ともに対照区と 3 つの投与区(250、500、1000mg/kg 体重投与区)の 4 区とし、動物数は対照区 16 頭、投与区 18 頭とした。投与区にはマウスの平均摂食量から梅酢ポリフェノール抽出物の投与量を算出して粉末飼料に混合して給与した。対照区には通常の MF 粉末飼料を与えた。試験期間は 90 日間とし、期間中は一般状態観察を毎日、体重測定、摂食量測定を 5 日ごとに行った。30 日目(各 4 頭)、60 日目(各 4 頭)および 90 日目の翌日に採血(血液生化学的検査)、剖検、臓器重量測定を行った。

2. 5 小核試験

14 週齢の BALB/c 雄マウス 24 頭を用いて試験を行った。試験区はネガティブコントロール区、投与区、ポジティブコントロール区の計 3 区とし、動物数は各区 8 頭とした。投与区は梅酢ポリフェノール抽出物 2000mg/kg 体重、ネガティブコントロール区には生理食塩水、ポジティブコントロール区はシクロフオスファミド 50mg/kg 体重を経口投与した。経口投与 24 時間後、大腿骨から骨髓細胞を採取し、得られた骨髓細胞浮遊液をスライドガラスに塗抹してメイ・グリーンワルド液、ギムザ液で染色して標本を作製した。各個体の赤血球数に対する小核数を計測した。

2. 6 UMU-テスト

変異原性の評価には、変異原性試験キット(ウムラック AT 蛋白精製工場)を使用し、付属のマニュアルに従って行った。サルモネラ菌の培養液 100 μ l に、1.9ng/ml ~9.1mg/ml になるように調整した梅酢ポリフェノール抽出物 10 μ l を添加した。2 時間培養を行った後、発現した β -galactosidase 活性を測定した。陽性対照物質としてフリルフラマイド (AF-2) と 2-アミノアントラセン (2-AA) を使用し、また、代謝活性化の有無を検討するために、S9 (ラット肝ホモジネート) を添加した場合としない場合の両方について試験を行った。

2. 7 統計処理

試験で得られた測定値は平均値と標準偏差で示した。2 群間比較では F 検定により等分散性の確認を行い、Student の t 検定で行った。3 群間以上では Bartlett の検定法で等分散性を確認した。等分散の場合是一元配置分散分析で検定し、有意差が見られた場合は Dunnett の検定法を用いて対照区と比較した。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の検定法を行い、有意差が見られた場合は Steel の検定法を用いて対照区との比較を行った。

3. 結果

3. 1 ラット単回経口投与毒性試験

雌雄ともに梅酢ポリフェノール抽出物投与後 14 日間の間一般状態の異常や死亡例は確認されなかった。また最終体重、総摂食量においても雌雄ともに投与区と対照区の間有意な差は見られなかった(図 1、2)。

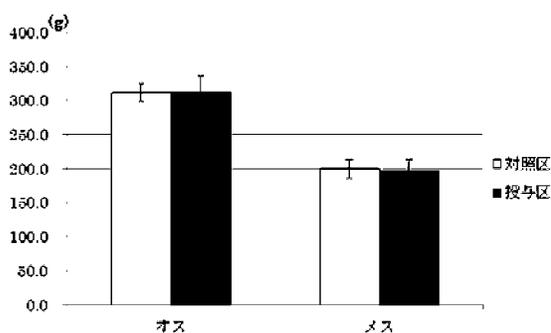


図 1 ラット単回経口投与毒性試験—最終体重

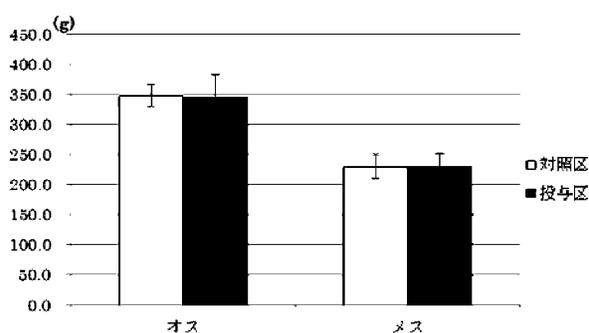


図 2 ラット単回経口投与毒性試験—総摂食量

表 2 ラット単回経口投与毒性試験—臓器重量

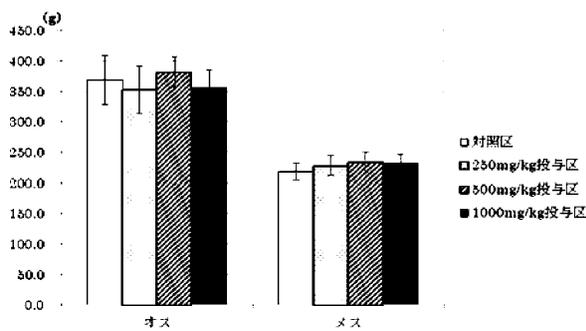
	オス		メス	
	対照区	投与区	対照区	投与区
脳 (g)	1.72 ± 0.07	1.73 ± 0.11	1.66 ± 0.05	1.62 ± 0.14
心臓 (g)	1.05 ± 0.12	1.05 ± 0.16	0.70 ± 0.17	0.69 ± 0.12
肺 (g)	1.20 ± 0.07	1.17 ± 0.12	0.97 ± 0.06	0.88 ± 0.13
肝臓 (g)	10.83 ± 0.77	10.13 ± 0.90	6.36 ± 0.51	6.01 ± 0.81
腎臓:左 (g)	1.26 ± 0.07	1.27 ± 0.12	0.83 ± 0.05	0.81 ± 0.14
腎臓:右 (g)	1.27 ± 0.08	1.29 ± 0.13	0.85 ± 0.05	0.84 ± 0.13
副腎:左 (mg)	24.6 ± 2.2	27.2 ± 4.8	28.3 ± 1.6	28.9 ± 7.6
副腎:右 (mg)	23.9 ± 4.2	24.2 ± 2.6	26.7 ± 2.9	28.1 ± 4.3
脾臓 (g)	0.66 ± 0.14	0.60 ± 0.14	0.47 ± 0.08	0.42 ± 0.05
精巣:左 (g)	1.36 ± 0.05	1.38 ± 0.12		
精巣:右 (g)	1.35 ± 0.06	1.41 ± 0.13		
卵巣:左 (mg)			46.0 ± 9.5	41.0 ± 6.0
卵巣:右 (mg)			45.4 ± 9.1	44.9 ± 8.1

*:p<0.05, **:p<0.01 (対照区と比較して有意差あり)

試験期間終了の翌日に全頭を剖検したが、脳、心臓、肝臓、腎臓、胃、小腸などで雌雄ともに異常は認められなかった。臓器重量においても雌雄ともに対照区、投与区で有意な差は見られなかった(表 2)。

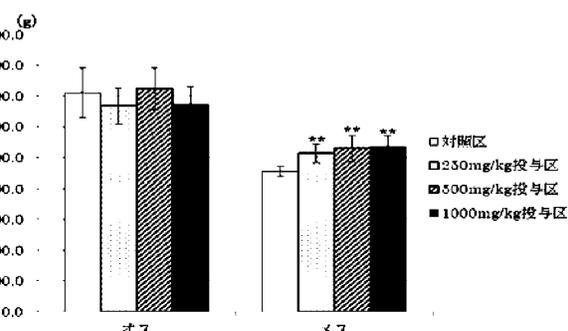
3. 2 ラット 28 日間反復経口投与毒性試験

28 日間反復経口投与毒性試験では、一般状態において雌雄ともに死亡例はなく、異常も確認されなかった。また最終体重においても雌雄ともに対照区との比較で有意差はなかった(図 3)。総摂食量では雄で差はなかったが、雌では対照区と比べ投与区において有意な差があった(図 4)。



*:p<0.05, **:p<0.01 (対照区と比較して有意差あり)

図 3 28 日間反復経口投与毒性試験—最終体重



*:p<0.05, **:p<0.01 (対照区と比較して有意差あり)

図 4 28 日間反復経口投与毒性試験—総摂食量

試験期間終了翌日の剖検では各臓器・器官で異常は確認されず、臓器重量でも各項目で対照区との比較で有意な差は見られなかった(表 3)。

表 3 28 日間反復経口毒性試験—臓器重量

	オス				メス			
	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
脳 (g)	2.01 ± 0.09	1.97 ± 0.07	1.94 ± 0.12	1.96 ± 0.06	1.85 ± 0.07	1.90 ± 0.09	1.84 ± 0.07	1.85 ± 0.04
心臓 (g)	1.17 ± 0.11	1.11 ± 0.18	1.21 ± 0.12	1.14 ± 0.10	0.81 ± 0.07	0.84 ± 0.07	0.84 ± 0.06	0.87 ± 0.08
肺 (g)	1.27 ± 0.12	1.23 ± 0.15	1.27 ± 0.11	1.26 ± 0.11	0.98 ± 0.08	1.03 ± 0.10	1.02 ± 0.07	1.04 ± 0.06
肝臓 (g)	11.42 ± 1.75	11.56 ± 2.35	12.02 ± 1.07	10.85 ± 1.46	6.63 ± 0.62	6.88 ± 0.53	7.07 ± 0.58	7.35 ± 0.48
腎臓:左 (g)	1.35 ± 0.19	1.39 ± 0.24	1.34 ± 0.10	1.33 ± 0.12	0.82 ± 0.07	0.92 ± 0.10	0.91 ± 0.06	0.92 ± 0.07
腎臓:右 (g)	1.34 ± 0.19	1.37 ± 0.21	1.37 ± 0.11	1.35 ± 0.12	0.84 ± 0.08	0.92 ± 0.12	0.92 ± 0.07	0.92 ± 0.07
副腎:左 (mg)	27.6 ± 4.7	26.0 ± 6.6	33.8 ± 6.5	26.2 ± 8.6	29.0 ± 2.9	31.1 ± 7.0	32.8 ± 3.9	37.0 ± 13.8
副腎:右 (mg)	26.1 ± 7.1	26.5 ± 4.9	30.4 ± 9.5	24.8 ± 5.8	25.7 ± 2.7	29.9 ± 4.2	30.9 ± 3.2	33.3 ± 11.1
脾臓 (g)	0.74 ± 0.18	0.67 ± 0.11	0.73 ± 0.07	0.61 ± 0.07	0.44 ± 0.09	0.46 ± 0.08	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.06
精巣:左 (g)	1.57 ± 0.16	1.54 ± 0.22	1.61 ± 0.09	1.60 ± 0.12				
精巣:右 (g)	1.66 ± 0.14	1.52 ± 0.24	1.62 ± 0.12	1.59 ± 0.12				
卵巣:左 (mg)					53.2 ± 14.2	57.3 ± 7.1	66.1 ± 17.4	61.3 ± 11.8
卵巣:右 (mg)					57.8 ± 4.7	56.3 ± 5.0	62.3 ± 11.2	67.2 ± 6.7
子宮 (g)					0.31 ± 0.02	0.34 ± 0.10	0.38 ± 0.10*	0.45 ± 0.11**

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (対照区と比較して有意差あり)

血液学的検査では雄の 250、1000mg/kg 体重投与区の PL、雌の 250mg/kg 体重投与区の Hb で対照区に比べて低値を示し、雌の 250、1000mg/kg 体重投与区の MCV と 500mg/kg 体重投与区の MCHC で高値を示した(表 4)。

血液生化学的検査では、雌雄の 1000mg/kg 体重投与区の TG で対照区と比較して値が用量依存的に低くなる傾向を示した。雌では 250mg/kg 体重投与区の T-Bil と IP において対照区に比べ高値、500mg/kg 体重投与区では ALT、T-Pro、Alb で有意に低値を示した(表 5)。

組織学的検査では、1000mg/kg 体重投与区の一部の子宮において子宮内膜の肥大、脱落が確認されたが、他の組織では異常は確認されなかった。

表 4 28 日間反復経口投与毒性試験—血液学的検査

	オス				メス			
	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.91 ± 0.68	6.66 ± 0.81	7.26 ± 1.31	7.23 ± 1.04	7.01 ± 0.82	6.47 ± 0.31	6.69 ± 0.65	7.04 ± 0.62
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.8 ± 1.1	5.9 ± 2.8	4.6 ± 1.5	5.4 ± 2.5	5.3 ± 1.8	5.1 ± 2.0	4.2 ± 1.5	4.6 ± 1.7
Hb (g/dL)	15.4 ± 0.7	14.7 ± 1.8	16.3 ± 2.4	15.6 ± 2.3	16.1 ± 1.6	14.6 ± 0.1*	16.2 ± 1.0	16.1 ± 1.1
Ht (%)	45.0 ± 2.2	43.6 ± 5.1	47.0 ± 9.4	48.1 ± 6.8	47.5 ± 10.4	42.9 ± 2.6	43.1 ± 4.0	46.5 ± 3.7
MCV (fL)	65.3 ± 3.3	65.5 ± 1.9	64.6 ± 2.4	66.8 ± 5.5	63.7 ± 1.3	66.3 ± 1.2**	64.5 ± 2.9	66.1 ± 3.0**
MCH (pg)	22.4 ± 1.9	22.1 ± 1.1	22.6 ± 1.7	21.6 ± 1.6	23.1 ± 2.0	22.5 ± 0.8	24.4 ± 1.9	22.8 ± 0.7
MCHC (g/dL)	34.3 ± 1.9	33.7 ± 1.4	35.0 ± 2.6	32.4 ± 1.4	36.3 ± 3.3	34.0 ± 1.1	37.8 ± 3.0**	34.6 ± 1.3
PL ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	454 ± 114	246 ± 217*	268 ± 147	243 ± 170*	314 ± 133	272 ± 249	228 ± 114	284 ± 142

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (対照区と比較して有意差あり)

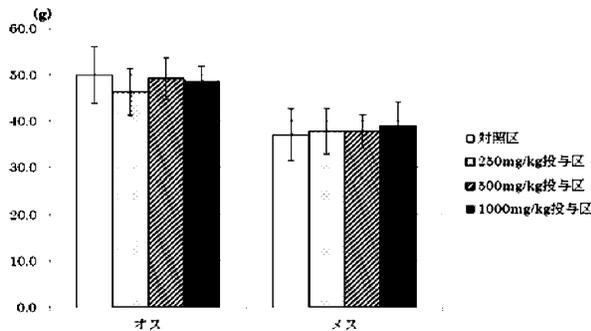
表 5 28 日間反復経口投与毒性試験—血液生化学的検査

	オス				メス			
	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
Glu (mg/dl)	194 ± 26	187 ± 55	178 ± 32	162 ± 18	147 ± 18	128 ± 13	129 ± 19	123 ± 16*
T-Cho (mg/dl)	62 ± 7	65 ± 12	63 ± 11	59 ± 6	81 ± 8	78 ± 9	76 ± 11	76 ± 11
BUN (mg/dl)	12.9 ± 1.2	14.8 ± 4.0	13.2 ± 1.0	12.0 ± 1.3	14.1 ± 1.6	13.2 ± 1.9	13.6 ± 1.9	12.8 ± 1.5
T-Bil (mg/dl)	0.26 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.32 ± 0.24	0.21 ± 0.03	0.31 ± 0.07	0.39 ± 0.20*	0.26 ± 0.05	0.23 ± 0.05
AST (IU/L)	70 ± 30	50 ± 10	61 ± 16	57 ± 10	46.3 ± 8.1	49.1 ± 10.7	49.0 ± 11.8	45.3 ± 8.3
ALT (IU/L)	18.1 ± 8.7	12.3 ± 2.5	13.9 ± 3.1	13.0 ± 3.2	12.6 ± 2.7	10.5 ± 1.4	10.2 ± 0.7*	10.6 ± 1.7
T-Pro (g/dl)	4.85 ± 0.27	4.95 ± 0.59	5.01 ± 0.37	5.12 ± 0.33	5.66 ± 0.36	5.56 ± 0.30	5.26 ± 0.25*	5.29 ± 0.30
Alb (g/dl)	3.06 ± 0.09	3.19 ± 0.32	3.17 ± 0.19	3.20 ± 0.19	3.59 ± 0.17	3.56 ± 0.22	3.30 ± 0.10*	3.39 ± 0.21
A/G比	1.75 ± 0.29	1.86 ± 0.36	1.75 ± 0.27	1.68 ± 0.19	1.76 ± 0.24	1.80 ± 0.25	1.71 ± 0.20	1.80 ± 0.23
Ca (g/dl)	10.6 ± 0.5	10.1 ± 0.9	10.2 ± 0.5	9.9 ± 0.3	10.2 ± 0.3	10.6 ± 0.6	10.4 ± 0.4	10.6 ± 0.4
TG (mg/dl)	78 ± 25	58 ± 22	58 ± 19	33 ± 16*	42 ± 20	50 ± 8	35 ± 19	12 ± 4*
UA (mg/dl)	1.19 ± 0.29	1.09 ± 0.11	1.29 ± 0.26	1.11 ± 0.16	1.24 ± 0.08	1.31 ± 0.29	1.16 ± 0.12	1.02 ± 0.07
LDH (IU/L)	267 ± 146	226 ± 112	168 ± 47	186 ± 63	313 ± 118	256 ± 92	250 ± 105	195 ± 83
ALP (IU/L)	362 ± 67	317 ± 55	355 ± 98	366 ± 89	199 ± 68	197 ± 51	236 ± 65	204 ± 27
Cre (mg/dl)	0.30 ± 0.00	0.31 ± 0.04	0.34 ± 0.07	0.31 ± 0.03	0.39 ± 0.07	0.38 ± 0.11	0.33 ± 0.07	0.31 ± 0.03
IP (mg/dl)	8.65 ± 0.80	8.65 ± 0.53	8.38 ± 0.60	7.89 ± 0.19	6.98 ± 0.46	7.61 ± 0.68*	6.98 ± 0.27	6.71 ± 0.43
Mg (mg/dl)	2.04 ± 0.11	2.04 ± 0.18	2.11 ± 0.19	1.91 ± 0.16	2.16 ± 0.11	2.21 ± 0.18	2.23 ± 0.11	2.28 ± 0.16

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (対照区と比較して有意差あり)

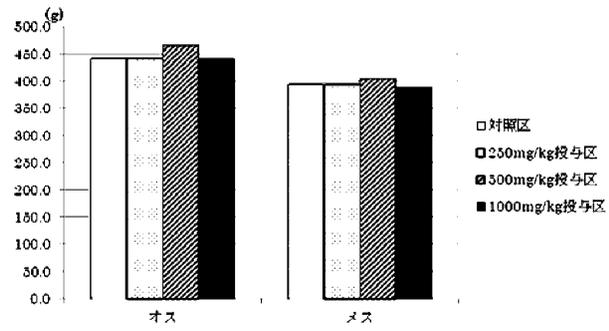
3. 3 マウス 90 日間長期投与毒性試験

梅酢ポリフェノール抽出物(250、500、1000mg/kg 体重)を飼料に添加し、90 日間マウスに長期投与を行った。一般状態の異常や死亡例は確認されなかった。また最終体重、摂食量において大きな差は見られなかった(図6、7)。30、60および90日の翌日の剖検において、各臓器で特記すべき異常は確認されなかった。臓器重量においても各区の雌雄ともに有意な差は見られなかった(表6)。



*:p<0.05, **:p<0.01 (対照区と比較して有意差あり)

図6 90日間長期投与毒性試験—最終体重



*:p<0.05, **:p<0.01 (対照区と比較して有意差あり)

図7 90日間長期投与毒性試験—総摂食量

血液生化学的検査では、雌雄の500、1000mg/kg 体重投与区のIPにおいて対照区に比べ高くなる傾向が確認された。雄では500mg/kg 体重投与区のAST、ALT、A/G比が対照区と比べ低く、1000mg/kg 体重投与区のALT、A/G比、UAで有意に低くなった。雌では250mg/kg 体重投与区のBUN、AST、ALT、UAで対照区に比べ高く、500mg/kg 体重投与区ではAST、UAが有意に高くなった。雌の1000mg/kg 体重投与区においてLDHが対照区と比較して有意に低くなった。IPでは雌雄ともに投与区が対照区に比べ高くなる傾向を示した。

表6 90日間長期投与毒性試験—臓器重量

	オス				メス			
	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
脳(g)	0.485 ± 0.021	0.487 ± 0.018	0.489 ± 0.018	0.475 ± 0.013	0.441 ± 0.010	0.443 ± 0.011	0.447 ± 0.020	0.446 ± 0.019
心臓(g)	0.198 ± 0.020	0.196 ± 0.021	0.201 ± 0.015	0.190 ± 0.020	0.139 ± 0.011	0.142 ± 0.013	0.146 ± 0.011	0.149 ± 0.014
肺(g)	0.190 ± 0.018	0.193 ± 0.014	0.208 ± 0.018	0.190 ± 0.020	0.169 ± 0.011	0.168 ± 0.011	0.177 ± 0.014	0.174 ± 0.015
肝臓(g)	1.927 ± 0.204	1.863 ± 0.239	1.767 ± 0.175	1.728 ± 0.188	1.381 ± 0.246	1.422 ± 0.118	1.452 ± 0.156	1.343 ± 0.151
腎臓:左(g)	0.317 ± 0.049	0.360 ± 0.031	0.362 ± 0.037	0.334 ± 0.038	0.186 ± 0.014	0.199 ± 0.021	0.192 ± 0.017	0.181 ± 0.023
腎臓:右(g)	0.341 ± 0.048	0.377 ± 0.031	0.368 ± 0.031	0.348 ± 0.031	0.193 ± 0.013	0.207 ± 0.026	0.201 ± 0.023	0.193 ± 0.022
副腎:左(mg)	2.28 ± 0.52	2.76 ± 0.70	2.68 ± 0.45	2.66 ± 0.73	3.87 ± 0.39	3.75 ± 0.53	3.83 ± 0.33	3.59 ± 0.71
副腎:右(mg)	2.21 ± 0.38	2.62 ± 0.41	2.65 ± 0.56	2.44 ± 0.60	3.13 ± 0.28	3.03 ± 0.61	3.14 ± 0.76	3.00 ± 0.75
脾臓(g)	0.107 ± 0.033	0.120 ± 0.026	0.130 ± 0.090	0.097 ± 0.025	0.099 ± 0.031	0.103 ± 0.020	0.122 ± 0.031	0.113 ± 0.022
精巣:左(g)	0.144 ± 0.015	0.154 ± 0.016	0.155 ± 0.021	0.150 ± 0.020				
精巣:右(g)	0.153 ± 0.015	0.160 ± 0.019	0.161 ± 0.023	0.153 ± 0.018				
卵巢:左(mg)					13.68 ± 1.61	13.02 ± 2.25	14.05 ± 1.69	15.44 ± 2.97
卵巢:右(mg)					15.23 ± 1.09	13.96 ± 3.62	15.42 ± 1.93	16.70 ± 4.16
子宮(g)					0.197 ± 0.040	0.144 ± 0.025	0.201 ± 0.093	0.201 ± 0.045

*:p<0.05, **:p<0.01 (対照区と比較して有意差あり)

表 7 90日間長期投与毒性試験—血液生化学的検査

	オス				メス			
	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	対照区	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
Glu (mg/dl)	101 ± 40	98 ± 31	102 ± 25	102 ± 15	131 ± 15	116 ± 28	132 ± 41	101 ± 16
T-Cho (mg/dl)	113 ± 24	104 ± 20	106 ± 19	117 ± 19	86 ± 13	84 ± 19	85 ± 12	82 ± 12
BUN (mg/dl)	32.1 ± 9.2	26.3 ± 7.4	30.2 ± 7.0	26.3 ± 9.1	22.3 ± 3.2	26.9 ± 6.6**	18.0 ± 2.7	16.6 ± 2.0
T-Bil (mg/dl)	0.45 ± 0.08	0.48 ± 0.19	0.38 ± 0.06	0.46 ± 0.12	0.81 ± 0.45	0.63 ± 0.23	0.46 ± 0.17	0.54 ± 0.13
AST (IU/L)	146 ± 68	148 ± 64	82 ± 37*	84 ± 48	52 ± 21	119 ± 49**	57 ± 27*	39 ± 10
ALT (IU/L)	62 ± 30	47 ± 25	22 ± 10**	18 ± 8**	24 ± 16	53 ± 32**	15 ± 4	11 ± 3
T-Pro (g/dl)	4.09 ± 0.27	3.84 ± 0.39	3.70 ± 0.32	3.67 ± 0.33	3.83 ± 0.30	3.84 ± 0.44	3.59 ± 0.41	3.57 ± 0.28
Alb (g/dl)	1.81 ± 0.15	1.78 ± 0.17	1.77 ± 0.13	1.86 ± 0.16	2.10 ± 0.13	2.05 ± 0.23	2.14 ± 0.42	2.03 ± 0.13
A/G比	0.80 ± 0.07	0.87 ± 0.10	0.93 ± 0.11*	1.03 ± 0.10**	1.22 ± 0.10	1.15 ± 0.11	1.30 ± 0.23	1.33 ± 0.13
Ca (g/dl)	9.7 ± 0.3	9.4 ± 0.7	9.4 ± 0.5	9.5 ± 0.5	9.4 ± 0.5	9.2 ± 0.4	9.6 ± 0.4	9.5 ± 0.7
TG (mg/dl)	139 ± 41	99 ± 51	86 ± 40	109 ± 33	123 ± 35	122 ± 37	102 ± 28	115 ± 26
UA (mg/dl)	2.29 ± 0.64	2.79 ± 0.59	2.01 ± 0.63	1.39 ± 0.27**	1.21 ± 0.23	1.63 ± 0.55**	1.39 ± 0.27**	1.07 ± 0.09
LDH (IU/L)	2320 ± 1005	2370 ± 1280	1417 ± 606	1365 ± 632	1162 ± 567	1523 ± 466	1110 ± 383	614 ± 202*
ALP (IU/L)	51 ± 2	54 ± 8	50 ± 0	56 ± 12	58 ± 8	59 ± 13	66 ± 19	54 ± 8
Cre (mg/dl)	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.34 ± 0.08	0.44 ± 0.20	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00
IP (mg/dl)	6.15 ± 0.87	6.24 ± 0.83	7.33 ± 0.84*	7.14 ± 0.79*	7.36 ± 0.61	9.38 ± 0.90**	7.42 ± 1.29*	7.83 ± 2.47**
Mg (mg/dl)	2.74 ± 0.13	2.82 ± 0.36	2.61 ± 0.26	2.60 ± 0.31	3.46 ± 1.42	2.81 ± 0.20	2.67 ± 0.25	2.49 ± 0.21

*: $p<0.05$ 、**: $p<0.01$ (対照区と比較して有意差あり)

3. 4 小核試験

梅酢ポリフェノール抽出物投与区における小核数および出現頻度はそれぞれ 4.6 ± 2.0 個および $0.23 \pm 0.10\%$ であり、ポジティブコントロールであるシクロフォスファミド投与区のそれら (47 ± 8.3 個および $2.3 \pm 0.42\%$) より有意に低く ($p < 0.01$)、ネガティブコントロールである生理食塩水投与区 (4.6 ± 2.0 個および $0.23 \pm 0.10\%$) と同水準であった。これらの結果より梅酢ポリフェノール抽出物は遺伝毒性を有さないものと考えられる(表 8)。

表 8 小核試験—小核数および小核出現頻度

投与物質	小核数	小核出現率(%)
生理食塩水	$3.9 \pm 2.4_a$	$0.19 \pm 0.12_a$
梅酢ポリフェノール	$4.6 \pm 2.0_a$	$0.23 \pm 0.10_a$
シクロフォスファミド	$47 \pm 8.3_b$	$2.3 \pm 0.42_b$

$p < 0.01$

3. 5 UMU-テスト

梅酢ポリフェノール抽出物の変異原性を評価した。今回試験に供した濃度範囲(最大 9.1mg/ml)においてサルモネラ菌の変異原性は陰性であった。また、代謝活性化法 (S9 を添加したもの) においても変異原性は陰性であった。

4. 考察

梅酢ポリフェノール抽出物の安全性情報を得るために、ラット、マウスおよび細胞を用いて試験を行った。

ラット単回経口投与試験では 5000mg/kg 体重の投与量で雌雄ともに毒性症状や死亡例は認められず、梅酢ポリフェノール抽出物は 5000mg/kg 体重の投与でも、急性毒性はまったく確認されず、安全性の高い物質と考えられる。

ラット 28 日間反復経口投与試験では、臓器重量において 500mg/kg 、 1000mg/kg 体重投与区で子宮重量が用量依存的に高くなる傾向を示した。我々は、梅酢ポリフェノール抽出物の 5 週間投与試験で雌ラットの子宮重量に影響がないという結果を得ている。また、子宮組織の病理学的検査では 1000mg/kg 体重投与

区で子宮内膜の肥大、脱落が確認され、正常な性周期を繰り返していることがうかがえた。今回の結果は子宮重量の偏差も大きく、正常な性周期による変化が偶発的な有意差をもたらしたものと考えられた。血液学的検査では、いくつかの項目において対照区と投与区で有意な差を示したが、いずれも正常の範囲内の値であり、梅酢ポリフェノールの影響とは考えられない。血液生化学的検査において雌では 250mg/kg 体重投与区の T-Bil と IP において対照区に比べ高く、500mg/kg 体重投与区では ALT、T-Pro、Alb で有意に低くなった。いくつかの項目において対照区と比較して有意な違いを示したが、いずれの項目においても正常の数値の範囲内である。上述したように梅酢ポリフェノール抽出物には抗疲労効果や骨粗しょう症の軽減効果、抗肥満効果などの諸機能が報告されており、これらの血液中の諸成分濃度の正常範囲内での有意な差は、梅酢ポリフェノール抽出物による生理機能改善の効果による可能性も示唆される。機能改善効果については、さらに詳細な解析を要す。なお、雌雄の 1000mg/kg 体重投与区の TG で濃度依存的に低値になる傾向が確認された。我々はマウス実験で梅酢ポリフェノール抽出物が TG、T-Cho に影響することを認めている。本試験での結果も脂質代謝改善効果と言えるであろう。以上の結果から本試験の条件下での無毒性量は雌雄ともに 1000mg/kg/day 以上と推察される。

マウス 90 日間長期投与試験では、30 日目の臓器重量で高値を示した区があったが、90 日目ではその差は認められなかった。血液生化学検査においてはいくつかの項目で対照区に比べて低値あるいは高値を示す区が見られたが、いずれも正常の範囲内であり用量依存性も認められなかった。上記と同様に、生理機能の改善効果であることが示唆されるが、詳細についてはさらに検討を要す。

変異原性試験(小核試験、UMU-テスト)においても毒性は認められなかった。

以上、複数の非臨床試験の結果、梅酢ポリフェノール抽出物は、ラットでは 5000mg/kg 体重の投与でも、急性毒性はまったく確認されず、安全性の高い素材であると言える。

謝辞

本試験は文部科学省・都市エリア産学連携促進事業(一般型)和歌山県紀北紀中エリア「和歌山の特産果実と独自技術を活用した新機能性食品・素材の開発」(2009~2011)の助成を受けて実施されたものである。

血液学的検査・血液生化学的検査には和歌山県紀北家畜保健所衛生所の分析機器を使用させていただいた。また、各種病理組織の診断には、獣医師松井望氏(和歌山県養鶏研究所)の助言を受けた。

参考文献

- (1) Wayne R.Leifert, Mahinda Y. Abeywardena, (2008) Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity. Nutrition Resaearch Vol.28 842-850.
- (2) Tomonori Nagao, Tadashi Hase, Ichiro Tokimitsu, (2007) A Green Tea Extract High in Catechins Reduces Body Fat and Cardiovascular Risks in Humans. Obesity Vol.15(6) 1473-1483.
- (3) Ji.Lin, Mary Anne Della-Fera, Clifton A.Balie (2005) Green Tea Polyphoenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptoxix in 3T3-L1 Adipocytes. Obesity Research Vol.13(6) 982-990.
- (4) 三谷隆彦、矢野史子 (2006) ウメとプラム 近畿大学生物理工学部紀要 11 号 1-13.
- (5) 菱本峻、佐藤尚也、矢野史子、稲葉伸也、赤木知裕、山西妃早子、阪井幸宏、大江孝明、尾崎嘉彦、三谷隆彦 (2009) 梅酢ポリフェノール画分の調整とその化学的性質 日本農芸化学会大会講演要旨集 P237.

- (6) 高橋齊、青柳正信、高田善浩、福西伸一、赤木知裕、山西妃早子、矢野史子、三谷隆彦 (2010) 梅果汁成分による抗疲労効果 果汁協会報 No.619 1-9.
- (7) 菱本峻、青谷佳緒留、佐藤夏生、船本悠以、三浦千春、前田千恵子、山西妃早子、木村美和子、尾崎嘉彦、三谷隆彦 (2009) 卵巣摘出ラットに及ぼす梅酢ポリフェノール画分の作用 日本農芸化学会大会講演要旨集 P237.
- (8) 河合良美、津田愛里、矢野史子、山西妃早子、赤木知裕、尾崎嘉彦、三谷隆彦 (2010) 高脂肪飼料の長期給与マウスに及ぼす梅酢ポリフェノールの作用 日本農芸化学会大会講演要旨集 P39.
- (9) 堀西朝子、赤木知裕、木村照雄、川端伴顕、木村好伸、田口あや、山西妃早子、稲葉申也、大江孝明、根来圭一、岸田邦博、矢野史子、三谷隆彦 (2011) 梅酢ポリフェノールの大量製造と安定性の検討 日本農芸化学会大会講演要旨集 P64.

英文抄録

Safety studies of Umezu Polyphenol Extract

Yu-suke Shiga¹, Tatsunori Tsuchida², Yu-dai Hara², Kunihiro Kishida¹, Masanabu Maeda³, Kazuhisa Miyashita³, Maki Fujiwara⁴, Hisako Yamanishi⁴, Fumiko Yano¹, Takahiko Mitani¹

Umezu, a liquid by-product of the pickling process in ume-boshi(salted plum fruits), is widely used as a food source or additives in Japan. Umezu Polyphenol Extract from the liquid has been found to have strong antioxidant activity and various physiological functions, which naturally has attracted attention as a novel food source beneficial for human health.

To assess the safety of the Umezu Polyphenol Extract, orally administered single and 28-day repeated dose studies were carried out in rats and 90-day subchronic study was carried out in mice. In the single dose study, an approximate lethal dose was found to be greater than 5000mg/kgBW. In the repeated oral dose studies, the extract showed no significant clinical, hematological, chemical or histopathological effect at a dose of 1000mg/kgBW. Furthermore, both the chromosomal aberration test and the micronucleus test showed no significant mutagenicity.

These results confirms that the Umezu Polyphenol Extract appears to be a safe food source without toxicity.