プロテオグリカンを主成分とする サケ鼻軟骨粉末の安全性評価

工藤重光^{1*}, 伊藤聖子², 吉原秀一³, 加藤陽治²

¹ 弘前大学地域共同研究センター

² 弘前大学教育学部食物学研究室

³ 弘前大学大学院医学研究科糖鎖医学講座

Safety Evaluation of Salmon Nasal Cartilage Powder
Containing Proteoglycan as a Major Constituent

Shigemitsu Kudo^{1*}, Seiko Ito², Shuichi Yoshihara³
and Yoji Kato²

¹ Center for Joint Research, Hirosaki University,
3 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036-8561

² Laboratory of Food Science, Faculty of Education,
Hirosaki University, 1 Bunkyo-cho, Hirosaki,
Aomori 036-8560

³ Department of Glycomedicine, Hirosaki University
Graduate School of Medicine, 5 Zaifu-cho,
Hirosaki, Aomori 036-8562

The safety of powder prepared from salmon nasal cartilage by drying and defatting processes was studied. The powder, named 'PGNP', contains ca. 40% proteoglycan (PG). Mutagenicity of PGNP was assessed by a reverse mutation test using *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, and an *in vitro* chromosomal aberration test using Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). No mutagenicity of PGNP was detected under these experimental conditions. Single dosing (2000 mg/kg) and 90 days repetitive dosing (1000 mg/kg/day) of PGNP to rats showed no abnormalities, suggesting the safety of PGNP by oral administration. In addition, 1500 mg/day of PGNP was administered orally to 10 adults for 5 days in order to assess its safety by conducting blood tests. There were no clinical problems observed with regard to blood test results, demonstrating that PGNP is a safe food material.

(Received Jun. 15, 2011; Accepted Aug. 17, 2011)

Keywords : salmon nasal cartilage, safety, proteoglycan

キーワード : サケ鼻軟骨, 安全性, プロテオグリカン

プロテオグリカン (PG) は, コアタンパク質と呼ばれる 1 本のタンパク質に糖鎖グリコサミノグリカン (GAG) が数本から数十本結合した生体高分子であり, 動物組織における細胞外マトリックスの重要な構成成分である。最近,

サケ鼻軟骨由来 PG の詳細な構造が, Kakizaki ら¹⁾ により報告された。それによると, サケ鼻軟骨由来 PG は, アグリカンに分類され, 1324 個のアミノ酸残基からなるコアタンパク質 (分子量 143276) を含んでいる。コアタンパク質には, 123 個のセリン残基があり, そのうち 46 個のセリンに糖鎖が結合している。また, 内沢ら²⁾ によると, 脱脂したサケ鼻軟骨からアクチナーゼ処理後に得た精製 GAG は, ほとんどがコンドロイチン硫酸であり, コンドロイチン-4 硫酸よりもコンドロイチン-6 硫酸を多く含み, 分子量が約 10 万であった。

高垣ら³⁾ は, サケ鼻軟骨を原料にし, 食酢およびエタノールだけを使用した単純な工程で安価で大量に PG を精製する方法を確立した。そのため, サケ由来 PG の生理的機能性に関する研究が飛躍的に進展し, 抗炎症反応⁴⁾, 炎症性大腸炎の改善⁵⁾, 抗肥満⁶⁾, 抗糖尿病⁷⁾, 皮膚線維芽細胞増殖促進⁸⁾, ヒアルロン酸合成促進⁹⁾, 変形性関節症改善⁹⁾, 皮膚アンチエイジング⁹⁾ など, PG の有効性が明らかになった。これらの研究成果を基に PG を含有した化粧品が数多く販売されるようになり, さらに, 巨大分子である PG を経口摂取しても, 関節症の改善や皮膚アンチエイジング効果を示すことが分かったことで, 美容や骨の健康を目的とした食品分野での実用化が急速に進んでいる。

一方, PG の機能性が明らかになるにつれて, より低価格の食品グレードの PG が望まれるようになった。そこで, 我々は, PG を主成分として含有するサケ鼻軟骨粉末を開発した¹⁰⁾。サケ鼻軟骨は, 東北・北海道地方では郷土料理「ひず (氷頭) なます」として長く食されてきたが, これまで科学的に安全性が評価されたことはなかった。本研究では, PG を主成分として含有するサケ鼻軟骨粉末を食品素材として普及するにあたり, その安全性の評価を行ったので報告する。

1. 実験方法

(1) 実験材料

サケ頭部から鼻軟骨部分を取り出し, 磨砕, 水洗浄, 乾燥, アルコール脱脂, 再乾燥および粉末化により, サケ鼻軟骨粉末 (商標登録; ひろだいプロテオグリカンナチュラルパウダー (PGNP)) を調製した¹⁰⁾。PGNP の収量は, 湿潤状態のサケ鼻軟骨 1kg から乾燥粉末状態で約 70g であった。PGNP の一般成分分析を財団法人日本食品分析センターに依頼した結果, 水分 8.3%, タンパク質 52.1% (窒素・タンパク質換算係数 6.25), 脂質 1.4%, 炭水化物 19.3%, 灰分 18.9% であった。畑江ら¹¹⁾ によると, サケ鼻軟骨中のタンパク質の約 50% がコラーゲンであることから, PGNP 中のコラーゲンは, 約 26% であると推定される。一方, PGNP 中には, PG が約 40% 含まれており, PG が PGNP 中で最も多い成分である。

尚, PGNP 中の PG の定量は, 財団法人日本健康・栄養食品協会が発行している健康補助食品規格基準集の「ムコ

¹ ☎036-8561 青森県弘前市文京町 3

² ☎036-8560 青森県弘前市文京町 1

³ ☎036-8562 青森県弘前市在府町 5

* 連絡先 (Corresponding author), shige-k@cc.hirosaki-u.ac.jp

多糖・たん白食品規格基準」に準拠し、カルバゾール硫酸法によりグルクロン酸の量を測定後、次式により算出した。

$$\text{コンドロイチン硫酸}(\%) = \text{グルクロン酸}(\%) \times 2.593$$
$$\text{PG}(\%) = \text{コンドロイチン硫酸}(\%) \times 1.075$$

式中の係数 2.593 は、コンドロイチン硫酸の分子量／グルクロン酸の分子量を示している。係数 1.075 は、精製 PG 中のタンパク質含量が約 7%⁵⁾ であることから、 $1/(1-0.07)$ により、コンドロイチン硫酸含量を PG 含量に換算している。

(2) 安全性試験

安全性試験は、以下のような項目に関して、株式会社化合物安全性研究所（札幌市）に委託した。動物実験等を実施する際は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「厚生労働省が所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」および「株式会社化合物安全性研究所動物実験倫理規定」を遵守して行った。

1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」（平成 11 年 11 月 1 日医薬審第 1604 号）に従い、試験菌株として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 および TA1537、ならびに *Escherichia coli* WP2uvrA を使用して行った。

試験は、各菌株の直接法（代謝活性化系 S9mix の非存在下）および代謝活性化法（代謝活性化系 S9mix の存在下）について、ブレインキューベーション法により行った。

PGNP の最高用量は 100 μg /プレートとし、以下公比 2 で低下させた計 7 用量の試験群（100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 および 1.56 μg /プレート）を設定した。

2) 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」（平成 11 年 11 月 1 日医薬審第 1604 号）に従い、*in vitro* における染色体異常誘発性を、チャイニーズハムスター肺由来細胞（CHL/IU）を用いて検討した。染色体異常誘発は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合（S6mix 非存在下）および代謝活性化による場合（S6mix 存在下）、ならびに、連続処理法の 3 系列について実施した。

3) ラットにおける経口投与毒性試験

試験には、日本チャールス・リバー株式会社の 5 週齢の Cr1:CD(SD)系ラット（SPF）を用いた。ラットは、室温 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、明暗各 12 時間サイクルで飼育し、飼料（オリエンタル酵母工業株式会社製 CRF-1）および飲水は自由摂取とした。

① 単回経口投与毒性試験

20 匹のラットを対照群（雄 5 匹、雌 5 匹）と PGNP 投与群（雄 5 匹、雌 5 匹）に分けた。PGNP は、一晩の絶食後（16～17 時間）、胃ゾンデを用いて強制的に胃内に経口投与

した。PGNP 投与液（25 mg/ml）の粘度が高いことから、投与は 2000 mg/kg を 4 分割とし、1 回につき 500 mg/kg を約 2 時間間隔で行った。

投与後 0, 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日目に体重測定を行った。また、投与後 14 日目にエーテル麻酔下で安楽死させ、全例について、体外表を観察後、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

② 90 日間反復経口投与毒性試験

ラットを対照群、低用量群、中用量群および高用量群の 4 群（各群とも雄 6 匹、雌 6 匹）に分け、それぞれに PGNP を体重 1 kg あたり 0, 100, 300 および 1000 mg/日を投与した。投与は、10:30 から 15:00 の間（尿検査時は 9:30 から 12:30 の間）に胃ゾンデおよびシリンジを用いて強制的に胃内に 1 日 2 回、2～3 時間間隔で、連続 90 日間経口投与した。

投与 1, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 および 90 日目の PGNP 投与前ならびに剖検日に体重を測定した。尿は、投与 13 週（投与 88～89 日）に非絶食下でラット用代謝ケージを用いて採取し、pH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血反応、沈渣、尿量、比重を測定した。投与 90 日目の翌日（剖検日）に約 16～22 時間の絶食下でラットをエーテル麻酔後、腹部大動脈から採血し、血液学的検査および血液化学的検査を行った。また、ラットは、採血後に安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察するとともに、器官の重量および病理学的組織学的検査を行った。

③ 統計学的方法

単回投与毒性試験における体重については、測定日毎に各群の平均および標準偏差を算出し、F 検定による等分散性の解析を行った。等分散（ $p > 0.05$ ）の場合は Student の t 検定、不等分散（ $p \leq 0.05$ ）の場合には Welch の検定を用いて対照群と検体群との比較を行った。有意水準は 5% とした。

90 日反復経口投与毒性試験における体重、摂餌量、尿量、血液学的検査、血液化学的検査、器官の絶対重量および相対重量の成績については、群平均および標準偏差を算出し、Bartlett の検定法を行い、等分散性を解析した。等分散（ $p > 0.05$ ）の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散（ $p \leq 0.05$ ）の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差が認められた場合（ $p \leq 0.10$ ）は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差が認められた場合（ $p \leq 0.10$ ）は Mann-Whitney の U 検定法を用いて対照群との比較を行った。尚、分散分析及び Kruskal-Wallis の順位和検定における有意水準は、第二種過誤の増加を防ぐため 10% とした。尿量を除く尿検査の成績については、Kruskal-Wallis の検定法で解析し、有意差が認められる場合（ $p \leq 0.05$ ）は Mann-Whitney の U 検定法を用いて対照

群との比較を行った。対照群との比較検定については、有意水準は5%とした。

(3) ヒトによる安全性試験

被験者は、本試験の目的、試験方法などについて十分説明を受け、書面による同意を示し、試験開始前の検査および問診で適格と判断された健康な成人10名(19~29歳、男5名、女5名)で行った。試験の実施に際しては、ヘルシンキ宣言の趣旨に則り、弘前大学倫理委員会の承認を経て行った。

PGNP錠剤を1日16錠(朝4錠、昼4錠、夕4錠、夜4錠)、5日間連続で服用した。PGNP錠剤は、1錠当たりの重量が125mgであり、16錠(2000mg)中にPGNPを1500mgとデキストリンを500mg含んでいる。PGNP中のPG含量は約40%であることから、16錠中にはPGを約600mg含んでいる。

実施期間は、2010年3月8日~16日であり、そのうち3月9日~13日の5日間、錠剤を経口摂取した。3月8日(前日)と16日(8日目)には、採血し、血液検査を実施した。測定値は、平均値±標準偏差として表した。統計解析は、Studentのt検定を用いて摂取前と摂取後との比較を行った。有意水準は5%とした。

2. 実験結果および考察

(1) 安全性試験

1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

TA100を用いた試験において、PGNP添加区(1.56~100 µg/プレート)の復帰突然変異コロニー数は、S9 mix 非存在下で114~129、S9 mix 存在下で131~142であり、陰性対照(S9 mix 非存在下121、S9 mix 存在下135)と同等の値であった。一方、陽性対照は、S9 mix 非存在下で697、S9 mix 存在下で1362の復帰突然変異コロニー数であった。TA98、TA1535、TA1537およびWP2uvrAを用いた試験においても同様に、全ての試験系列において、PGNP処理群の復帰突然変異コロニー数の平均値は、陽性判断の基準である陰性対照の2倍以上となることはなく、また、用量の増加にともなう復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上のことから、PGNPは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判定された。

2) ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合については、1250、2500および5000 µg/mlのPGNPを含む培地中で細胞を6時間培養してから、PGNPを含まない培地で18時間培養後、染色体標本を作製して検鏡し、染色体異常誘発性を検討した。連続処理法では、625、1250、2500および5000 µg/mlのPGNPを含む培地中で細胞を24時間連続処理後、同様に染色体異常誘発性を検討した。

その結果、5000 µg/mlのPGNP濃度における染色体の構造異常および数異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合がそれぞれ2.0および0.5%、短時間処理法の代謝活性化による場合がそれぞれ1.0および0.5%、連続処理法がそれぞれ1.5および0.0%であった。一方、陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が45.5%、短時間処理法の代謝活性化による場合が38.5%および連続処理法が49.0%であった。各系列のいずれのPGNP用量群においても陽性判定基準の5%以上になることがなく、陰性と判断された。

以上のことから、PGNPは、本試験条件においては乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないものと判断された。

3) ラットにおける単回経口投与毒性試験

1群につき雌雄各5匹のCr1:CD(SD)系ラットを用いて、PGNP投与量2000mg/kgと対照として精製水を単回投与したときの毒性発現の有無を調べた。その結果、対照群およびPGNP投与群(2000mg/kg)は、共に投与後14日間に死亡例や異常は認められなかった。体重は、順調に増加し、対照群とPGNP投与群との間で、投与後14日間に体重増加の有意差は認められなかった。解剖検査においては、雌雄いずれの群にも異常は認められなかった。

従って、本試験条件下において、PGNPの概略の致死量は2000mg/kgを超える量であると結論づけられた。投与量2000mg/kgは、ラットの体重1kg当たり湿潤状態のサケ鼻軟骨約29g分に相当するPGNPを投与したことになる。また、PGNP中にはPGが約40%含まれることからPGとしての致死量は800mg/kgを超える量であると考えられる。

4) ラットにおける90日間反復経口投与毒性試験

PGNPの投与量を100、300および1000mg/kg/日とし、1群につき12匹(雄6匹、雌6匹)のCr1:CD(SD)系ラットに90日間反復経口投与したときの毒性発現の有無を検討した。対照群には、精製水を投与した。表1および2には、それぞれ血液学的検査および血液化学的検査結果のうち、対照群と高用量群(1000mg/kg/日)の結果を示した。

一般状態は、すべての群において異常がなく、死亡例もなかった。体重推移および摂餌量は、雄雌のPGNP各投与群において、対照群とほぼ同様の推移を示し、いずれの測定日においても有意差が認められなかった。尿検査、血液化学的検査(表2)、剖検所見、器官重量においては、各投与群の雄雌ともにPGNP投与に関連した異常は認められなかった。

血液学的検査(表1)では、高用量群の雌でプロトロンビン時間の有意な短縮が認められたが、その他の凝固系項目(活性化部分トロンボプラスチン時間、血小板数)に変化がなく、また、肝機能項目や肝重量にも変化は認められてい

表 1 ラットにおける 90 日間反復経口投与によるサケ鼻軟骨粉末の毒性試験（血液学的検査）

項目（単位）	雄		雌	
	対照	1000mg/kg/日	対照	1000mg/kg/日
赤血球 ($10^4/\mu\text{L}$)	919 $\pm$ 46	887 $\pm$ 24	825 $\pm$ 23	841 $\pm$ 23
ヘモグロビン量 (g/dL)	16.4 $\pm$ 0.6	16.2 $\pm$ 0.4	15.7 $\pm$ 0.2	16.0 $\pm$ 0.5
ヘマトクリット値 (%)	47.4 $\pm$ 1.7	47.1 $\pm$ 1.7	45.4 $\pm$ 1.2	46.2 $\pm$ 1.9
MCV (fL)	51.6 $\pm$ 1.9	53.2 $\pm$ 0.8	55.1 $\pm$ 1.9	54.9 $\pm$ 1.6
MCH (pg)	17.8 $\pm$ 0.7	18.3 $\pm$ 0.2	19.1 $\pm$ 0.5	19.0 $\pm$ 0.6
MCHC (g/dL)	34.5 $\pm$ 0.5	34.4 $\pm$ 0.4	34.7 $\pm$ 0.6	34.6 $\pm$ 0.6
血小板数 ($10^4/\mu\text{L}$)	110 $\pm$ 10	106 $\pm$ 13	105 $\pm$ 7	104 $\pm$ 15
PT (sec.)	19.5 $\pm$ 1.6	18.0 $\pm$ 1.8	17.0 $\pm$ 0.4	16.0 $\pm$ 0.7*
APTT (sec.)	26.9 $\pm$ 2.5	25.2 $\pm$ 2.1	19.0 $\pm$ 1.0	18.9 $\pm$ 1.2
白血球 ($10^2/\mu\text{L}$)	110 $\pm$ 24	109 $\pm$ 30	61 $\pm$ 20	66 $\pm$ 13

平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=6$).

*: 対照と比較して有意差あり $p \leq 0.05$.

MCV: 平均赤血球容積, MCH: 平均赤血球ヘモグロビン量, MCHC: 平均赤血球ヘモグロビン濃度, PT: プロトロンビン時間, APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間.

表 2 ラットにおける 90 日間反復経口投与によるサケ鼻軟骨粉末の毒性試験（血液化学的検査）

項目（単位）	雄		雌	
	対照	1000mg/kg/日	対照	1000mg/kg/日
AST (IU/L)	77.0 $\pm$ 17.3	84.2 $\pm$ 25.4	79.7 $\pm$ 33.5	62.8 $\pm$ 7.5
ALT (IU/L)	35.2 $\pm$ 7.6	38.8 $\pm$ 13.9	41.0 $\pm$ 23.5	23.8 $\pm$ 6.1
ALP (IU/L)	335 $\pm$ 91	310 $\pm$ 50	126 $\pm$ 14	150 $\pm$ 12
TP (g/dL)	6.0 $\pm$ 0.1	5.7 $\pm$ 0.2	6.5 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.2
総タンパク質分画				
Alb (%)	48.8 $\pm$ 1.9	49.7 $\pm$ 2.7	55.0 $\pm$ 2.5	53.8 $\pm$ 3.1
α_1 -glb (%)	23.1 $\pm$ 2.4	22.4 $\pm$ 1.8	19.2 $\pm$ 0.7	17.8 $\pm$ 2.4
α_2 -glb (%)	6.6 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 0.5	6.2 $\pm$ 0.6
β -glb (%)	16.5 $\pm$ 1.0	16.6 $\pm$ 1.2	14.3 $\pm$ 1.2	15.6 $\pm$ 1.5
γ -glb (%)	5.0 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 0.9	5.5 $\pm$ 1.9	6.7 $\pm$ 1.2
A/G	0.96 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.10	1.23 $\pm$ 0.12	1.17 $\pm$ 0.15
T-Bil (mg/dL)	0.06 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.02
UN (mg/dL)	14.9 $\pm$ 1.3	14.3 $\pm$ 1.4	17.0 $\pm$ 2.8	15.4 $\pm$ 3.5
CRE (mg/dL)	0.56 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.05	0.61 $\pm$ 0.04
Glu (mg/dL)	170 $\pm$ 22	178 $\pm$ 20	151 $\pm$ 18	155 $\pm$ 14
T-Cho (mg/dL)	51.8 $\pm$ 8.5	60.3 $\pm$ 21.1	71.5 $\pm$ 10.0	79.5 $\pm$ 11.8
TG (mg/dL)	75.2 $\pm$ 30.5	57.7 $\pm$ 14.5	28.2 $\pm$ 13.1	24.8 $\pm$ 7.5
Na (mg/dL)	143 $\pm$ 1	142 $\pm$ 1	144 $\pm$ 1	143 $\pm$ 1
K (mg/dL)	4.73 $\pm$ 0.13	4.73 $\pm$ 0.08	4.40 $\pm$ 0.27	4.68 $\pm$ 0.34
Cl (mg/dL)	106 $\pm$ 2	107 $\pm$ 1	106 $\pm$ 1	108 $\pm$ 1
Ca (mg/dL)	9.6 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 0.1	10.0 $\pm$ 0.1	9.7 $\pm$ 0.3
IP (mg/dL)	7.12 $\pm$ 0.42	6.90 $\pm$ 0.50	6.80 $\pm$ 0.66	6.40 $\pm$ 0.67

平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=6$).

AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ, ALP: アルカリホスファターゼ, TP: 総タンパク質, Alb: アルブミン, glb: グロブリン, A/G: アルブミン/グロブリン比, T-Bil: 総ビリルビン, UN: 尿素窒素, CRE: クレアチン, Glu: グルコース, T-Cho: 総コレステロール, TG: トリグリセリド, IP: 無機リン.

ないことから、毒性学的な意義はないと考えられた。

病理組織学的所見では、毒性を示唆する特異的な所見や発現頻度の増加を示唆するものは認められないことから、

PGNP 投与に関連した変化はないと判断した。

以上のように、PGNP の 100, 300 および 1000mg/kg/日の 90 日間投与により、雄雌ともに PGNP 投与に関連し

表 3 ヒト経口摂取におけるサケ鼻軟骨粉末の安全性試験

項目 (単位)	摂取前	摂取後	有意差
総タンパク (g/dL)	7.2±0.4	7.2±0.5	n.s
尿素窒素 (mg/dL)	11.8±2.1	11.6±1.9	n.s
クレアチニン (mg/dL)	0.7±0.1	0.7±0.1	n.s
尿酸 (mg/dL)	5.3±1.6	4.8±1.3	n.s
総コレステロール (mg/dL)	180±37	174±34	n.s
HDL-コレステロール (mg/dL)	62±14	61±12	n.s
中性脂肪 (mg/dL)	95±39	95±52	n.s
AST (IU/L)	18±5	17±5	n.s
ALT (IU/L)	16±13	17±12	n.s
LDH (IU/L)	188±46	193±44	n.s
γ-GTP (IU/L)	26±22	25±23	n.s
クレアチンキナーゼ (IU/L)	108±51	100±52	n.s
白血球数 (千/μL)	5.7±1.6	6.3±2.4	n.s
赤血球数 (百万/μL)	4.71±0.46	4.64±0.44	n.s
ヘモグロビン (g/dL)	14.1±1.5	14.1±1.4	n.s
ヘマトクリット (%)	42.3±4.0	42.0±3.9	n.s
MCV (fL)	89.8±2.3	90.6±2.5	n.s
MCH (pg)	29.9±0.9	30.4±0.8	p<0.01
MCHC (%)	33.3±0.5	33.6±0.7	p<0.05
血小板 (万/μL)	26.1±4.8	27.0±5.4	n.s
好中球 (%)	51.1±10.6	55.9±11.4	n.s
リンパ球 (%)	38.6±10.0	34.3±8.7	n.s
単球 (%)	6.0±2.6	5.3±1.2	n.s
好酸球 (%)	4.1±3.0	4.3±3.4	n.s
好塩基球 (%)	0.2±0.1	0.2±0.1	n.s

平均値±標準偏差 (男5名, 女5名), n.s: 有意差なし.

AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ, LDH: 乳酸脱水素酵素, γ-GTP: ガンマ-グルタミルトランスペプチターゼ, MCV: 平均赤血球容積, MCH: 平均赤血球ヘモグロビン量, MCHC: 平均赤血球ヘモグロビン濃度.

た変化は認められなかった. 従って, 本試験条件下において, PGNP の無毒性量は, 1000mg/kg/ 日と考えられた. また, PGNP 中には PG が約 40% 含まれることから, PG としての無毒性量は少なくとも 400mg/kg/ 日であると考えられる.

5) ヒトによる安全性試験

血球検査および生化学検査の結果を表3に示した. PGNP 摂取前後の比較において, MCH および MCHC の平均値に有意差が認められた. しかし, 個人別にみると, 全ての被験者が, MCH (基準値 28.0~34.0pg) および MCHC (基準値 30.2~35.1%) の正常範囲内での軽微な変動であった. また, 赤血球数, ヘモグロビン量およびヘマトクリット値に差が認められなかったことから, 臨床上問題ないものと判断された. その他の検査項目においては, 有意差が認められなかった.

従って, PGNP を1日当たり1500mg (PG として600mg), 5日間継続摂取しても臨床上問題となる影響を与えることはないと考えられる.

3. 要 約

サケ鼻軟骨から調製した PGNP の安全性を確認するために, 細菌を用いた復帰突然変異試験, ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験, ラットにおける単回および90日間反復経口投与毒性試験, 並びに, ヒトによる安全性試験を実施した.

復帰突然変異試験および染色体異常試験において, PGNP は陰性であった.

ラットを用いた単回投与試験においては, PGNP の投与 (2000mg/kg) に関連した変化は認められず, PGNP の致死量は2000mg/kg を超える量であると結論づけられた. 従って, PG の致死量としては, 800mg/kg を超える量であると考えられる. また, 90日間反復経口投与毒性試験においては, PGNP の無毒性量が1000mg/kg/ 日であることから, PG としての無毒性量は少なくとも400mg/kg/ 日であると考えられる.

ヒト安全性試験においては, PGNP を1日当たり1500mg (PG として600mg), 5日間継続摂取しても臨床上問

題となることはなかった。

文 献

- 1) Kakizaki, I., Tatara, Y., Majima, M., Kato, Y. and Endo, M., Identification of proteoglycan from salmon nasal cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **506**, 58-65 (2011).
- 2) 内沢秀光, 高谷芳明, 奈良岡哲志, 市田淳治, 松江 一, 地域未利用資源の有効利用—海洋生物由来高機能性複合糖質の開発—, 青森県産業技術開発センター キープロジェクト研究報告書 Vol. 3 pp. 43-84 (1996).
- 3) 株式会社角弘, 高垣啓一, 軟骨型プロテオグリカンの精製方法, 特許第 3731150 号 (2005.10.21).
- 4) Sashinami, H., Takagaki, K. and Nakane, A., Salmon cartilage proteoglycan modulates cytokine responses to *Escherichia coli* in mouse macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 1005-1010 (2006).
- 5) Majima, M., Takagaki, K., Sudo, S., Yoshihara, S., Kudo, Y. and Yamagishi, S., Effect of Proteoglycan on Experimental Colitis, in New Developments in Glycomedicine, in: M. Endo, S. Harata, Y. Saito, A. Munakata, M. Sasaki, S. Tsuchida (Eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, the Netherlands, 2001, pp. 221-224.
- 6) Mitsui, T., Sashinami, H., Sato, Kijima, H., F., Ishiguro, Y., Fukuda, S., Yoshihara, S., Hakamada, K. and Nakane, A., Salmon cartilage proteoglycan suppresses mouse experimental colitis through induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 209-215 (2010).
- 7) 国立大学法人弘前大学, プロテオグリカンの医薬用途, 特開 2010-126461 (2010.6.10).
- 8) 国立大学法人弘前大学, サケ軟骨に含まれるプロテオグリカンの新規な薬理用途, 特開 2008-247803 (2008.10.16).
- 9) 榎谷晃明, 高橋達治, 坪井 誠, サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンのアンチエイジング効果, *FOOD STYLE* 21, **14**, 49-52 (2010).
- 10) 国立大学法人弘前大学, プロテオグリカンの抽出法, 特開 2009-173702 (2009.8.6).
- 11) 畑江敬子, 大沼葉子, 島田純子, サケ鼻軟骨のテクスチャーに及ぼす食酢浸漬の影響, *日食工誌*, **37**, 505-510 (1990). (平成 23 年 6 月 15 日受付, 平成 23 年 8 月 17 日受理)