

学位論文要旨

小齊平 麻里衣

食品の機能は、1984年から1986年にかけて実施された文部省特定研究「食品機能の系統的解析と展開」によって3つに分類され、人間が生きていく上で必要最低限の「栄養」の機能が1次機能、感覚機能など「嗜好」の機能が2次機能、そして生活習慣病等の疾病の予防など「健康性・生体調節」の機能が3次機能と定義された。この食品の3次機能の特徴としている食品は、「健康食品」と呼ばれ、広く健康の保持増進に資する食品として販売・利用されている。この研究に続き「食の生体調節機能」の研究が推進された結果、多くの食品成分に3次機能があることが明らかとなり、日本の定義による機能性食品(Functional Food)が国際的に認知され世界中に広がった。1991年には特定保健用食品表示許可制度が施行され、行政に認可された特定保健用食品(トクホ)はその機能を表示することが可能となった。2001年には、特定の栄養成分(ビタミン・ミネラルなど)を含んでいることによって、国への許可申請や届出の必要なく、その栄養成分の機能を表示できる栄養機能食品制度が施行された。さらに、2015年4月に「機能性表示食品」制度が施行され、科学的根拠をもとに消費者庁長官へそれら必要な情報を届け出ることにより、事業者の責任において機能性の表示が可能となった。このような制度の影響もあり、健康食品の市場規模は年々増加傾向で、2018年には前年比1.7%増の1兆2,475億円に拡大している。

ビルベリー(英名: Bilberry、学名: *Vaccinium Myrtillus* L.)はツツジ科スノキ属(*Vaccinium*) *Myrtillus* 節に分類される、食用ベリーの一つで、北欧のスカンジナビア半島から北部ヨーロッパの森林の酸性度の高い土地に自生している野生種である。日本でもよく栽培されている一般的なブルーベリー(ツツジ科スノキ属 *Cyanococcus* 節)と比べると、ビルベリーの果実は小さく、アントシアニン(anthocyanin)が豊富に含まれていることが特徴である。ビルベリー果実には、5種類のアントシアニンジン(シアニジン(Cy)、デルフィニジン(Dp)、マルビジン(Mv)、ペオニジン(Pn)、ペチュニジン(Pt))と3種類の糖(グルコース(Glu)、ガラクトース(Gal)、アラビノース(Ara))の組み合わせからなるビルベリーに特有な15種アントシアニン(*Vaccinium myrtillus* anthocyanin, VMA)が含まれていることが知られており、夜間視力の向上など視機能に関わる医薬品として研究がなされている。しかしながら、使用されたビルベリーのVMAの抽出方法または成分組成、摂取量、摂取期間、さらに試験での評価項目、評価方法が整理されておらず、一貫性のある結果に至っていない。

第1章では、選別によって枝葉他の不純物がほぼ完全に除去され、採取後24時間以内を目安に凍結保存された成熟したビルベリー果実(色素換算アントシアニン>0.30%(含水比率))を基原とする管理されたエタノール抽出物である特定のビルベリーエキスをを用い、エキス中に含まれているVMA含有量を指標とし、VMAの摂取量と血中移行性を確認することとした。アントシアニンは生体内では代謝が早いため、酸加水分解処理を行い代謝物も含めたアントシアニンとして定量した。アントシアニン量が、 $Dp > Cy > Pt > Mv > Pn$ であるビルベリーエキスを摂取量160 mg、320 mg および480 mgの3段階に設定し試験を

実施した結果、各摂取量のときの血漿中アントシアニン濃度の AUC は、Dp より Cy の濃度が高く、それ以外はエキス中の順と同じであった。摂取量 160 mg に比べて 320 mg、480 mg では、総アントシアニンの C_{max} は 2.0 倍、3.4 倍、AUC は 2.2 倍、3.5 倍と摂取量依存的に増加した。全ての摂取量において、総アントシアニンの T_{max} は 1.5 時間後であり、摂取 3 時間後でも血漿中濃度が有意に高く維持されることが確認できた。以下の検討では、本抽出方法にて得られたビルベリーエキスを用い、検討を行った。

次に、第 2 章ではビルベリーエキスの眼疲労に対する有効性を検証する臨床試験として、近見反応の 3 要素である縮瞳、輻輳、調節への効果を確認した。縮瞳、輻輳に対しては検査機器「トライイリス®」を用いビルベリーエキスの摂取量は 160 mg (VMA 59 mg) で被験者 30 名とし、調節に対しては「AA-2」を用い摂取量は 107 mg (VMA 40 mg) で被験者 24 名とし、摂取期間はどちらも 4 週間のランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間試験を実施した。眼疲労は近見反応時に起こりやすいため、検査前に VDT (Visual Display Terminals, ディスプレイを有するパソコンやスマートフォン等) 作業負荷を与え、一時的に眼疲労させた。眼精疲労時には、調節刺激に対する瞳孔反応が減衰し、縮瞳率が低下することが知られているが、ビルベリーエキス摂取 4 週間後には、VDT 作業負荷後の縮瞳率だけでなく、瞳孔移動距離より判別した輻輳に対する効果も確認できた。さらに、毛様体筋の調節過多による筋肉疲労が原因で生じる調節微動高周波成分の出現頻度も低下した。これらの結果より、縮瞳、輻輳、調節に対する眼の疲労回復にビルベリーエキスの摂取が有効であることが示唆された。筋疲労を生む原因の一つとして、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) が挙げられる。ビルベリーエキスは抗酸化作用を有していることから、摂取により眼球組織での酸化ストレスを減少させることで眼の疲労を軽減させることが示唆された。

第 3 章ではビルベリーエキスの安全性を確認し、摂取量 240 mg の 6 倍量の 1440 mg を 4 週間摂取しても安全性に問題がないことを確認した。

第 4 章では第 2 章で確認できていないビルベリーエキスの VDT 作業負荷後の調節による眼疲労の抑制効果を、眼疲労への有効性を確認している試験の中でも最大規模の 109 名で実施し、さらに摂取量 240 mg (VMA 89 mg) を 12 週間継続摂取とし、検査を 0、4、8 および 12 週目に実施した。これらの結果よりビルベリーエキス摂取 4 週目、8 週目および 12 週目で VDT 負荷に対する毛様体筋の調節緊張を抑制または緩和させたこと、12 週間という長期間継続的に摂取しても眼疲労に対する効果は減弱しないことが示された。

本研究ではビルベリーエキスの吸収性および眼疲労に対する有効性を科学的に検証し、機能性表示食品としての要件を満たすビルベリーエキスの研究開発を行った。超高齢社会が進む日本において国民の健康の維持増進は急務であり、健康食品の安全性、有効性の検証は今後必須となることが予想される。本研究は、健康食品の研究開発の一助となると考える。

Abstract

Marie Kosehira

Food functions were classified into three categories according to the "Systematic Analysis and Development of Food Functions" specified by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology carried out from 1984 to 1986. These were defined as follows: the functions of the minimum "Nutrition" required for living humans are defined as primary functions, the functions of "Preference", such as sensory functions, as secondary functions, and the functions of "Health and biological regulation", including the prevention of diseases such as lifestyle-related diseases, as tertiary functions. Foods categorized as this tertiary function of food are called "health foods" and are widely marketed and used as foods that contribute to the maintenance and promotion of health. It became clear that many food ingredients have tertiary functions, and the Japanese definition of "Functional Food" was internationally recognized and spread throughout the world.

The Food Labeling Licensing System for Specific Health Use was enforced in 1991, and it became possible to display the function of specified health foods (Tokuho) approved by regulators. In 2001, the Nutrition Function Food System was implemented, which allows the labeling of the functions of specific nutritional ingredients (vitamins, minerals, etc.) without the need to apply for permission or submit a notification to the government. Furthermore, in April 2015, the Functional Labeled Foods System came into effect, and by notifying the Commissioner of the Consumer Affairs Agency with the necessary information on the basis of scientific grounds, it became possible to label Functional Labeled Foods at the responsibility of the business operator. Due to the effects of such systems, the market scale of health foods has been increasing year on year, and it has increased by 1.7% to 1,247.5 billion yen in 2018 compared with the previous year.

Bilberry (English name: Bilberry, scientific name: *Vaccinium myrtillus* L.) is classified as a *V. myrtillus* node. It is a species of edible berry and is a wild species native to acidic lands in northern European forests from the Scandinavian Peninsula in Northern Europe. Compared with the common blueberry (Cyanococcus node of the family Tusidae), which is also commonly cultivated in Japan, the fruits of bilberries are smaller and are characterized by an abundance of anthocyanins (anthocyanin). Bilberry fruit contains a combination of five anthocyanins [cyanidin (Cy), delphinidin (Dp), malvidin (Mv), peonidin (Pn), and petunidin (Pt)] and three sugars [glucose (Glu), galactose (Gal), and arabinose (Ara)]. It is known that bilberry fruits contain 15 unique anthocyanins [*V. myrtillus* anthocyanins (VMA)], which have been studied as medicines for visual functions such as improving night vision. However, the method of extraction or composition, intake, and duration of consumption of VMA, as well as the endpoints and evaluation methods in the studies, have not been organized and have not resulted in consistent results.

In chapter 1, ethanol extracts of mature bilberry fruits (pigment equivalent anthocyanidins > 0.30%), which were frozen within 24 hours of collection, were used as bilberry extracts. The amount of VMA contained in the extract was used as an indicator to check the intake and blood-concentration profile of VMA. Anthocyanins are rapidly metabolized *in vivo*; therefore, these were quantified as anthocyanidins

including metabolites. Bilberry extracts with anthocyanin levels of Dp > Cy > Pt > Mv > Pn were tested at three doses: 160 mg, 320 mg, and 480 mg. The AUC calculated from the blood anthocyanidin concentration-time profiles at each intake dose was higher for Cy than Dp, and otherwise the same order as in the extract. The C_{\max} of total anthocyanidins increased 2.0-fold and 3.4-fold, and the AUC increased 2.2-fold and 3.5-fold in a dose-dependent manner when 320 mg and 480 mg were taken compared with 160 mg. At all intakes, the T_{\max} of total anthocyanidins was 1.5 hours after intake, and the plasma concentration was maintained at a significantly high level even at 3 hours after intake. The bilberry extract obtained using this extraction method was used in the following experiments.

In chapter 2, an exploratory clinical trial was conducted to evaluate the efficacy of bilberry extract on ocular fatigue. The effects of the extract on pupillary constriction, congestion, and regulation were confirmed. For constriction of the pupil and convergence, a Triiris[®] testing device was used. Bilberry extract was taken at a dose of 160 mg (59 mg of VMA). In addition, AA-2 was used for ocular accommodation, and the intake was set to be 107 mg (40 mg of VMA). A four-week trial was performed in both studies. VDTs (e.g., PCs and smartphones with Visual Display Terminals and displays) were applied prior to testing to temporarily fatigue the eyes, because eye fatigue is likely to occur during near vision responses. The number of subjects was 30. They took two to three hard capsules containing 53.5 mg of bilberry extract or capsules without bilberry extract (placebo). It is known that the pupillary response to regulatory stimuli is attenuated and the ratio of pupil constriction decreases during eye strain. After four weeks of taking bilberry extract, not only the pupillary constriction ratio after VDT workload, but also the effect on convergence, which was determined from the pupil movement distance was confirmed. In addition, high-frequency component (HFC) of accommodative microfluctuation caused by muscle fatigue due to hyperregulation of the ciliary muscles was also reduced. These results suggested that the consumption of bilberry extract may be effective for eye fatigue to constriction of the pupil, convergence, and accommodation. Reactive oxygen species (ROS) are one of the causes of muscle fatigue. Because bilberry extract has antioxidant properties, it is suggested that consumption of bilberry extract may reduce oxidative stress in ocular tissues, thereby alleviating eye fatigue. In Chapter 3, the safety of bilberry extract was confirmed. Even 1440 mg/day (six times higher dose than 240 mg/day) over 4 weeks was taken, no safety issues were confirmed. In Chapter 4, the efficacy of bilberry extract on ocular fatigue after VDT workload was tested in 109 subjects. The subjects took 240 mg/day (89 mg VMA) for 12 weeks, and testing was performed at 0, 4, 8, and 12 weeks. These results indicated that bilberry extract suppressed or alleviated the accommodation of ciliary muscles in response to VDT load at 4, 8, and 12 weeks. Furthermore, the effect on ocular fatigue did not diminish even after 12 weeks of continuous intake.

This study scientifically verified the absorbability of bilberry extract and its efficacy against eye fatigue. The maintenance and promotion of health of Japanese people is an urgent issue in an aging society. It is expected that verification of the safety and effectiveness of health foods will become essential in the future. This study will contribute to the research and development of health foods.

論文審査の結果の要旨

小齊平 麻里衣氏から提出された論文「機能性食品として利用されるビルベリーエキスの臨床開発研究」は、ビルベリー (*Vaccinium myrtillus* L.) エキスの眼疲労に対する有効性の検証を目指したもので、4章構成となっている。第1章では、研究に用いるビルベリーエキスのアントシアニン類 (*V. myrtillus* anthocyanin, VMA) の含有量を規定し、また、ヒトにおけるビルベリーエキス経口摂取後の血中移行性を調べている。第2章では、比較的低用量のビルベリーエキス経口摂取の小規模臨床試験を行い、画像表示端末 (Visual Display Terminals, VDT) 作業負荷による眼疲労の各種測定項目に対するビルベリーエキスの効果を検討している。第3章では、保健機能食品に求められる高用量の VMA におけるヒトでの安全性を確認している。第4章では、比較的高用量の VMA のビルベリーエキスについて比較的規模の大きな臨床試験を実施し、ビルベリーエキスの眼疲労抑制効果を検証している。

ビルベリーは、夜間視力の向上など視機能に関わる医薬品素材としての研究がなされている。その有効成分はビルベリー果実に含まれる VMA とされている。しかしながら、研究に使用されてきたビルベリーエキスの抽出方法、摂取量、摂取期間、VMA の成分組成、さらに試験での評価項目、評価方法が整理されておらず、一貫性のある結論に至っていないのが現状であった。第1章では、一定品質のビルベリー果実を基原とするビルベリーエキスを研究試料とし、HPLC 測定により 15 種類のアントシアニン類を定性・定量し、その総量を VMA と規定している。本研究での、以降のヒトにおける血中移行性試験、安全性試験、臨床試験に用いるビルベリーエキスの関与成分である VMA の成分組成、含有量が明確に規定されたことは、試験結果と VMA との関連性を考察する上で欠かせないという点で評価できる。次に、本ビルベリーエキスの摂取量を 3 段階に設定しヒトでの血中移行性試験を実施した結果、各摂取量の際の血漿中アントシアニン濃度の血中濃度-時間曲線下面積がビルベリーエキスの摂取量にほぼ比例して増加し、最高血中濃度 (C_{max}) も同様に増加することを示している。先行研究では血中へのアントシアニンの移行は摂取量のわずか 0.02% と報告されているが、本研究では、VMA の血中移行に関して、アントシアニンを酸加水分解して得られるアグリコンであるアントシアニンとして評価しており、その血中移行率は 0.3% を上回ることを明らかにしている。最も低用量の摂取における C_{max} でも、既報のビルベリーエキスの *in vitro* 抗酸化活性の EC_{50} を優に上回ることを見出しており、以降の臨床試験において十分に有効性を示す可能性を示唆している。以上の様に、ヒトにおけるビルベリーエキス摂取後の VMA の血中移行性を初めて詳細に示しており、また、十分な有効濃度が得られるといった有益な結果を含んでいる点で、本研究は高く評価できる。

第2章ではビルベリーエキスの眼疲労に対する有効性を検証するために、低用量における臨床試験として 30 名または 24 名の被験者によるランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間試験で、眼疲労度としては近見反応の 3 要素である縮瞳、輻輳 (瞳孔移動距離)、調節 (毛様体筋の調節過多に

よる筋肉疲労が原因で生じる調節微動高周波成分の出現頻度)への効果を確認している。縮瞳、輻輳は検査機器「トライリス®」を用いて、ビルベリーエキスの摂取量は上記血中移行性の低用量に相当する1日当たり160 mg (VMA 59 mg 相当)を毎日、4週間摂取させている。調節に関しては検査機器「AA-2」を用いており、摂取量は1日当たり107 mg (VMA 40 mg 相当)としている。摂取開始4週目に、VDT作業負荷を与えた際の眼疲労度、その後の休息による眼疲労からの回復度を測定した結果、ビルベリーエキス摂取により、VDT作業負荷後の縮瞳、輻輳に置いて疲労抑制効果が示され、また、縮瞳、輻輳、調節の全てで回復効果を確認している。以上より、比較的低用量のビルベリーエキスの摂取でも、特に眼の疲労回復に有効であり、視覚的評価スケール (VAS) 調査においても、眼疲労に対する自覚症状の有意な改善が認められている。以上、本章では、ビルベリーエキスが設定した中での低用量でも眼疲労の特に回復に対する効果を強く示唆する結果を得ることができており、最終的な高用量、長期間の臨床試験を行う上で有益な情報を収集するに至っていることが高く評価できる。

第3章では、高用量で長期間のビルベリーエキス摂取の効果を検証するための前段階として、高用量摂取のビルベリーエキス240 mgの6倍量について安全性試験を実施し、その安全性を確認している。通常、保健機能食品開発におけるヒトでの過剰摂取安全性試験では、通常の3~5倍での摂取における安全性が要求されるので、本研究の設定は妥当と判断できる。

第4章では、低用量のビルベリーエキス摂取では確認できなかった眼の調節の疲労抑制効果に焦点を当て、高用量のビルベリーエキス1日当たり240 mg (VMA 89 mg 相当)を12週間の長期継続摂取することによる、VDT作業負荷後の眼疲労、特に毛様体筋の調節への疲労抑制効果を調べるヒト臨床試験を実施している。その結果、ビルベリーエキス摂取後4週目、8週目および12週目でVDT負荷に対する毛様体筋の調節緊張を抑制または緩和させることを明らかにしている。これは、高用量のビルベリーエキス摂取により眼疲労抑制効果が示されたものである。本試験は、既報の同様の試験の中でも最大規模の109名で実施しており、ビルベリーエキスの抗眼疲労効果に質の高いエビデンスを与えたものとして評価できる。

毛様体筋の筋疲労を生む原因の一つとして、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) が挙げられる。本論文では、ビルベリーエキスのVMAが体内に取り込まれて抗酸化作用を発揮し、眼球組織でのROSを減少させることで眼の疲労を軽減させる可能性を考察している。

本研究は、ビルベリーエキスの吸収性および眼疲労に対する有効性を科学的に検証し、機能性表示食品としての要件を満たすビルベリーエキスの研究開発に質の高いエビデンスを提供したものである。超高齢社会となった日本において国民の健康の維持増進は急務であり、健康食品の安全性、有効性の検証は今後必須となることが予想される。本研究の成果は、機能性食品の開発研究分野において極めて意義深く、内容も新規性および創造性に富んでいると判断される。以上を総合的に考慮した結果、本論文は課程によらない博士(薬科学)の論文として十分価値のあるものと判断した。