

平成24年度 博士論文

アントシアニンの抗搔痒作用と
サプリメントの品質評価に関する研究

2013年

千葉大学大学院 医学薬学府 創薬生命科学専攻
高齢者薬物学講座 高齢者薬剤学研究室

山本 正雄

目次

	頁
目次.....	1
略語一覧.....	2
序章.....	3
第 1 章 ビルベリーエキスのアレルギー性皮膚炎への効果.....	8
緒言.....	8
第 1 節 アントシアニンの体内動態.....	11
第 2 節 ビルベリーエキスのマウス急性皮膚炎モデルに対する作用.....	15
第 3 節 ビルベリーエキスのマウス慢性皮膚炎モデルに対する作用.....	20
考察.....	29
小括.....	33
第 2 章 ビルベリーエキスの劣化に伴う慢性アレルギー性皮膚炎への影響.....	34
緒言.....	34
第 1 節 ビルベリーエキスの熱処理による分解.....	37
第 2 節 ビルベリーエキスの分解による掻痒作用への影響.....	39
考察.....	47
小括.....	50
第 3 章 市販ビルベリーサプリメントのアントシアニン摂取量の実態.....	51
緒言.....	51
第 1 節 市販ビルベリー含有サプリメントのラベル記載値の妥当性評価.....	54
第 2 節 アントシアニン高速分析法の設定.....	57
第 3 節 UHPLC 法による市販ビルベリー含有サプリメントの品質評価.....	62
考察.....	67
小括.....	69
第 4 章 サプリメントの劣化に対する新たな品質評価指標の創出.....	70
緒言.....	70
第 1 節 サプリメントの熱処理による劣化.....	72
第 2 節 Degradation Index の創出.....	77
考察.....	83
小括.....	86
総括.....	87
参考文献.....	89
主論文目録.....	97
謝辞.....	98
審査.....	99

略語一覧

本文中では、特に記載のない限り、以下の略語を用いた。

CoQ:	Coenzyme Q
DI:	Degradation Index
DSHEA:	The Dietary Supplement Health and Education Act
EFSA:	European Food Safety Authority
EP:	European Pharmacopoeia
EU:	The European Union
FDA:	Food and Drug Administration
HPLC:	high performance liquid chromatography
IFN- γ :	interferon- γ
IgE:	immunoglobulin E
IL:	interleukin
IL-4:	interleukin-4
JAS:	Japanese Agricultural Standard
JHFA:	Japan Health and Nutrition Food Association (公益財団法人 日本健康・栄養食品協会)
mRNA:	messenger ribonucleic acid
QOL:	Quality of life
RNA:	ribonucleic acid
TNCB:	2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene
UHPLC:	ultra high performance liquid chromatography
USP:	The United States Pharmacopeia
WTO:	World Trade Organization

序章

2012年、世界第一位である米国のサプリメント市場は、115億ドルに達すると予測されており、2017年までに155億ドルの規模にまで成長が見込まれている¹⁾。このような市場拡大の要因として、サプリメントは医師による診察や処方薬等といった医療と比較して低コストであることに加え、消費者が商品を自由に選択して購入できる手軽さが国民に広く受け入れられていることが背景にある。その一方で、1994年にDSHEA法(栄養補助食品健康教育法)が制定され、FDAはメーカーに商品の有効成分の表示を求め、市場に流通する製品の安全性に責任を負わせた。米国に続く世界第二位の中国は、2001年のWTO(世界貿易機関)加盟によって外資ブランドが多く進出し、さらに経済成長に伴って中間富裕層が増えた結果、その市場規模は2009年に日本を抜いた²⁾。安全面では、1995年には食品衛生法、2009年には食品安全法と食品の安全性確保に向けた法整備を進めている。問題は、これらの制度がいかに実効的に運営されるかであり、その結果が今後の中国の発展を左右すると思われる。世界第3位の日本は、1991年に制定された保健機能食品制度により、行政に認可された特定保健用食品(トクホ)には効能を表示できるようになった。また、栄養補助食品(Dietary supplement)制度を制定した米国が日本に規制緩和を要求し、これを受けて1996年3月26日に市場開放問題苦情処理対策本部より「基準・認証制度等に係る市場開放問題についての対応」が発出され、通常海外で食品として流通・販売されているもの(ビタミン、ミネラル、ハーブ類)が医薬品として規制されることなく、サプリメントとして販売できるようになった。これら認可制度と規制緩和により、2005年までは堅調に市場が拡大したが、アミノ酸やCoQ₁₀等のブームの終焉とトクホの食用油に代表される安全性の問題が発生し、以降は1.8兆円規模でプラトーに推移している³⁾。EUは単一国ではないものの、共同体全体では日本の1.5倍の市場がある。EUは、英国やドイツを中心に古くからハーブを健康維持に利用する伝統があり、通常の食事とは別に栄養や機能成分を摂取することが、その他の地域よりも習慣として根付いている。その一方で、EU域内の各国独自の健康食品等の制度が貿易障害となっており、欧州食品安全庁(EFSA)及び欧州委員会(EU commission)を中心としたEU全体の制度的枠組みが構築されつつある。以上のように、サプリメントは医薬品とは異なるため、各国で定義が異なり、その位置付けをどのようにするかはまだ議論されているところである。日本においても、サプリメントの明確な定義はなされておらず、法的には食品として分類されている。

現在の日本国内のサプリメントの流通状況に目を向けると、視覚改善、美肌効果、骨・関節サポート、肝機能改善、エチケット等を目的として、多種多様なサプリメントが消費者に提供されている。この中で、特にブルーベリー含有サプリメントは眼精疲労に良いとされ、1990年代以降のコンピュータの急速な普及を背景に、中高年層を中心に需要が拡大し、今やその市場規模は500億円にまで拡大している⁴⁾。

ブルーベリーの主有効成分であるアントシアニンは、アグリコンであるアントシアニジンが糖と結合した配糖体成分である。アントシアニジンは、Fig.1 に示した 2-phenylbenzopyrylium (flavylium cation) の誘導体であり、フラボノイドに属する化合物群の総称である。

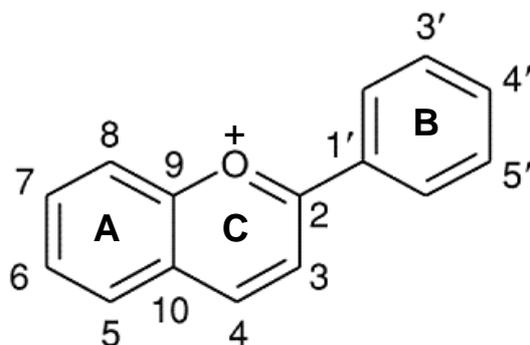


Fig.1 Chemical structure of 2-phenylbenzopyrylium

アントシアニン(anthocyanin)の語源は、「青い花」を意味するギリシャ語の anthos=「花」及び kyanos=「青」に由来する。その名の示す通り、植物界において広く存在する青色色素であるが、青色だけではなく、赤色、紫色など幅広い色調を持っている。このため、発がんリスクのある合成着色料に代わる安全な天然着色料⁵⁾としての開発も行われており、脂溶性のカロチノイド系色素とともに水溶性のアントシアニンが食品業界を中心に注目されている。

アントシアニンには、アントシアニジンに結合する糖の種類や位置、メチル化やアシル化の位置により、現在までに自然界で 635 種以上⁶⁾が確認されており、また、アグリコンであるアントシアニジンは 31 種⁷⁾が報告されている。これらアントシアニンの約 90% が 6 種のアントシアニジン、すなわち, pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin 及び malvidin 由来で占められているが、品種により含有率や含量が大きく異なっている。

ベリー類には 700 以上もの品種が存在する。この中で一般的にブルーベリーと言われるものには、ハイブッシュブルーベリー、ラビットアイブルーベリー、ローブッシュブルーベリー及びビルベリー等がある。これらのうち、日本ではハイブッシュブルーベリー及びラビットアイブルーベリーが品種改良されて大量に露地栽培されており、主に果物やジュースに用いられている。その一方、ビルベリー(学名:*Vaccinium Myrtillus* L.)は、ブルーベリーのツツジ科スキノ属 *Cyanococcus* 節とは節が異なる *Myrtillus* 節に属し、多年生落葉低木であり、北欧の森林や草原、北米やカナダの砂地に生育して黒紫色の果実をつける。野生種であるために、日本ではビルベリーを栽培することができず、海外より冷凍品として輸入される。ビルベリーとブルーベリーの果実の大きな違いは、ブルーベリーは果皮部分のみにアントシアニンを含むのに対し、

ビルベリーは果皮に加えて果肉にもアントシアニンを含有している点にある⁸⁾。アントシアニンの含量を果実 100 g 中で比較すると、ビルベリーでは 370 mg, ハイブッシュブルーベリーでは 80~120 mg, ラビットアイブルーベリーでは 210 mg, ローブッシュブルーベリーでは 90~260 mg であり⁹⁾, ビルベリーは他のブルーベリーよりもアントシアニンを豊富に含む。このため、ビルベリーは医薬品や健康食品の原料として多用されている。ビルベリーには 5 種のアントシアニン(cyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin 及び petunidin)とその配糖体(3-O-glucoside, 3-O-galactoside 及び 3-O-arabinoside) 15 種の計 20 種(Fig.2)が確認されている。

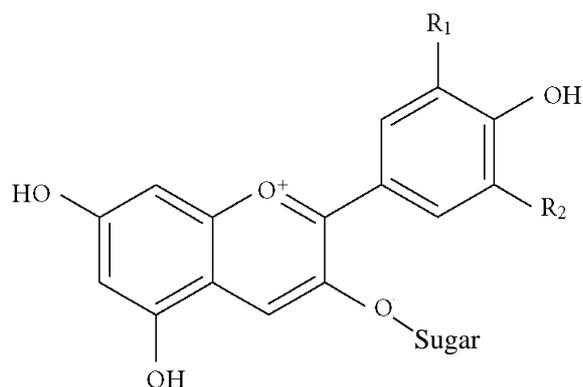


Fig.2 Chemical structure of anthocyanins in bilberry fruits

cyanidin, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$; delphinidin, $R_1 = R_2 = \text{OH}$;

peonidin, $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$; petunidin, $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$;

malvidin, $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$.

アントシアニンの作用については、1960年代にヨーロッパでアントシアニンに関する研究が盛んに行われ、1964年にウサギを用いて網膜のロドプシンの再合成促進効果と暗順応促進効果が見出されている¹⁰⁾。これまでに、アントシアニンには、血糖低下作用^{11),12)}, 消化管潰瘍に対する抗潰瘍作用¹³⁾, 急性冠症候群¹⁴⁾, 循環器機能改善作用¹⁵⁾, 抗腫瘍作用^{16),17)}, 抗炎症作用¹⁸⁾, 血小板凝集抑制作用¹⁹⁾, 認知症の予防効果²⁰⁾及び視覚機能改善作用^{21),22),23),24)}等が報告されている。アントシアニンには抗酸化作用があり、他にも重要な働きがあることが明らかにされつつある。

アントシアニンは、果実細胞の液胞に存在する。液包では、水が存在するものの pH が 4~6 と低いために、アントシアニンは配糖体として安定に存在することが可能である。しかしながら、果実より取り出されると、外界の様々な因子(pH, 温度, 光, 酸素, 溶媒, 他の酵素, 共存するフラボノイド, 蛋白及び金属イオン)により、アントシアニンの安定性は影響を受ける²⁵⁾。特に、熱及び pH に対しては安定性が悪く、熱を加えることによりアントシアニンからアントシアニンに分解する。さらに、生体の pH では、アントシアニンは C 環のヘテロ環を開環して分解する。

これまで、アントシアニンの化学構造に由来する特徴として、(1) 配糖体(アントシアニン)とアグリコン(アントシアニジン)の関係があること、(2) 非常に多種類のアントシアニン(635 種以上)及びアントシアニジン(31 種)が存在すること、(3) 熱及び pH に対する安定性が悪いことを述べた。このような化学的な特徴から派生する複雑さを考慮すると、製造、輸送や保存過程で劣化し、粗悪品が市場に流通する可能性も考えられる。

欧州では、伝統的な医療として果実を乾燥させて煎じたものを腸の疾病治療に用いたり、葉を煎じたものを糖尿病などの疾病治療に使ってきた。このような伝統医療の背景もあり、世界で最初に 1976 年にイタリアにて、ビルベリーのアントシアニン (TEGENS)が医薬品として承認された。TEGENS は、毛細血管の脆弱状態及び浸透性変化、胃潰瘍及び十二指腸潰瘍を適応としている。その後、ANTOCIN, MEMOVISUS, PRENIUM, FOTORETIN が医療用医薬品として承認され、フランスでも DIFRAREL FORTE が承認された。この他、ドイツ、ニュージーランド及び韓国においても医薬品として流通している。効能・効果は DIFRAREL FORTE の網膜症、近視、夜盲症状(昼盲、夜盲)、血管障害及び毛細管脆弱、MEMOVISUS の眼精疲労を伴う肉体的・精神的疲労といった眼科領域を中心としたものだけでなく、TEGENS(カプセル、顆粒)では毛細血管の脆弱状態及び浸透性変化、胃潰瘍及び十二指腸潰瘍、TEGENS(軟膏)では色素皮膚炎、床ずれなど皮膚の脆弱状態や浸透性変化と適応症は幅広い。

一方、日本や米国では、ビルベリー含有サプリメントは健康食品として分類される。健康食品は、服用が医師によって管理される医薬品とは異なり、消費者の自己管理に任せられ、消費者が手元において日常的に摂取するため、手軽に利用できるという利点がある。その一方、摂取までの時間管理が不十分となり、保存期間中の変質を防止する手立てが無いといった問題も生じている。また、医薬品と比較して、規制が緩和されているため、規制当局はラベルの記載をメーカーの自主判断に任せており、製品によって記載の有無や記載内容に大きなばらつきがあるのが現状である。

このように、アントシアニンの化学的特徴と規制の状況を考えると、消費者がサプリメントのラベルを見て購入したとしても、果たして消費者は求める品質のものを入手できているのか、という疑問が生じる。

この疑問を解決するため、本研究では第 1 章でアントシアニンの新たな薬理作用探索の一環として、アトピー性皮膚炎をはじめとする慢性掻痒性疾患に対するビルベリーエキスの抗掻痒作用を検討した。第 2 章では、アントシアニンは高温でアントシアニンからアントシアニジンへ分解するため、アントシアニンとアントシアニジンのいずれが抗掻痒作用において主要な効果を発揮するのかに関し、慢性アレルギー性皮膚炎モデルを用いて検討した。第 3 章では、消費者が摂取するビルベリー含有サプリメントに注目した。ビルベリーエキスは、日本やアメリカでは健康食品として分類されるために規制が緩く、アントシアニンからアントシアニジンに分解した劣化品の流

通が懸念される。そこで、ビルベリー含有サプリメントの用法に基づいたアントシアニン摂取量の実態を調査した。最後に、第4章では、アントシアニンの劣化度を適切に評価することは品質管理上重要であり、劣化度を迅速かつ簡便に検知するための新たな品質評価指標の創出を検討した。

第1章 ビルベリーエキスのアレルギー性皮膚炎への効果

緒言

アントシアニンは、序章で述べたように生体に対して様々な作用を有することが報告されている。これらの作用に加えて、2009年に黒米由来のアントシアニンに、急性掻痒に対する抗掻痒作用があることが新たに報告²⁶⁾された。このため、ビルベリー由来のアントシアニンにも、急性掻痒に対して抗掻痒作用があることが期待され、さらに慢性アトピー性皮膚炎に対しても抗掻痒作用を有する可能性が出てきた。

アトピー性皮膚炎は、皮膚疾患の中で頻度の高い疾患であり、世界規模で見るとアフリカ、東アジア及び西ヨーロッパで特に増え続けている²⁷⁾。日本での有症率は10%～20%と言われており、乳児や小児での有症率はさらに高くなっている^{28),29)}。日本皮膚科学会の「アトピー性皮膚炎の定義、診断基準」³⁰⁾によると、アトピー性皮膚炎の概念・定義は、「アトピー性皮膚炎は増悪・寛解を繰り返す掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を持つ」とされている。アトピー素因とは、気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎等の家族歴や自身に既往歴があり、IgE抗体を産生しやすい体質を言う。すなわち、アトピー性皮膚炎は、気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎を合併しやすく、これらの疾患と基本的なメカニズムは共通している。しかしながら、アトピー性皮膚炎の発症や悪化には、これらアトピー素因に加え、搔破やストレスなどの非アレルギー性要因も重要であり、特に搔破は最大の悪化因子である。

掻痒は、1660年に Haffnerffer S により「皮膚や粘膜を搔破したくなるような不快な感覚」と定義された³¹⁾。掻痒は致命的な症状ではないが、搔破行動はさらなる掻痒の原因となり、苔癬化といった二次的な皮膚病変を形成し、患者の QOL を著しく低下させる。掻痒には、末梢性と中枢性が存在する。中枢性掻痒は、内因性オピオイドがオピオイドレセプターに結合することにより生じ、腎透析や肝硬変等の全身性疾患に伴う掻痒が中枢性掻痒に該当する。末梢性掻痒は、ヒスタミン等のケミカルメディエーターが表皮と真皮の境界部に存在する一次求心性ニューロンを刺激することにより生じる。アトピー性皮膚炎は、末梢性掻痒に該当する。掻痒により引き起こされる搔破は機械的・物理的的刺激であり、搔破の刺激が掻痒を一時的に抑制する。しかしながら、搔破により皮膚バリア機能が破壊され、外部からの有害物質や刺激が体内に侵入しやすくなる。また、マスト細胞からは炎症性サイトカインが放出され、Substance P 等の起痒物質が神経末端より遊離されるため、かゆみと搔破の悪循環(itch-scratch cycle)により症状はさらに悪化する。

アトピー性皮膚炎の治療は、日本皮膚科学会のアトピー性皮膚炎治療ガイドライン³²⁾に沿って、皮膚の炎症、掻痒、皮膚の乾燥に対する治療、悪化因子の除去、心理的アプローチや生活指導などを中心に行われている。医薬品を使用した皮膚の炎症に対

する治療には、ステロイド外用剤、抗炎症薬や抗ヒスタミン薬等が用いられている。ステロイド外用剤には効果の強さに応じて5段階のランクがあり、重症度に応じて使い分けている。一般的に効果が強ければ副作用も強く、皮膚の萎縮、紅潮、毛細血管拡張及び多毛といった症状が発現する。特に、顔面への適用には制約がある。また、市販のステロイド外用剤を使用しても、すぐに治癒しない場合や症状の再発を繰り返す場合は、専門の皮膚科へ受診することが必要である。

このような医療の傍ら、皮膚科領域での使用を目的に、アレルギーに有用であるとして flavonoid の一種である quercetin を配合したサプリメントが存在する。しかしながら、その他は主に肌荒れ等にコラーゲンやビタミンB類、ビタミンCが販売されているのが現状である。

研究分野では、アトピー性皮膚炎に有効な物質の探索が進められている。探索では、掻痒に対する作用を客観的に評価するに際し、掻痒の強度や頻度を定量的に測定することが求められる。しかしながら、かゆみという主観を含む概念をどのように客観的に評価するかは難題である。掻痒に誘発される掻破行動は、実験動物を用いた基礎研究において有用な指標である。この掻破行動に着目し、1995年に倉石ら³³⁾は、マウスに compound 48/80 及び Substance P を投与することにより、掻痒を誘発する動物モデルを作成し、客観的に評価する方法を見出した。現在までに、アレルギー性皮膚炎の動物モデルとして、自然発症モデル及び人工的に誘発させるモデルが開発されている。自然発症モデルとしては、1997年に名古屋大学においてNCマウスにダニを寄生させることにより早い個体では6週齢より発症し、10~12週にかけて重症化するNC/Ngaマウスを開発した³⁴⁾。一方、人工発症モデルは、(1)受動感作モデル、(2)能動感作モデル、及び(3)遺伝子操作モデルの3つに分類される³⁵⁾。能動感作モデルでは、ハプテンとして2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)³⁶⁾、ovalbumin(OVA)³⁷⁾及びTNCB^{38),39)}をマウスの皮膚に塗布することにより、短期間で確実に皮膚炎を発症させることができる。これらのハプテンを反復塗布することにより、表皮及び真皮の肥厚、組織へのリンパ球やマスト細胞等の浸潤、血中IgEレベルの上昇、Th2サイトカインの優位な病態が観測され⁴⁰⁾、アトピー性皮膚炎^{41),42)}の代表的な疾患モデルとして用いられている。

これら実験動物を用いた最近の報告において、2010年にWuら⁴³⁾は、アサ科の一年草カナムグラ (*Humulus scandens*)の抽出物について、4-アミノピリジン及びクロロキノン誘発マウス皮膚炎モデルで有用性を示している。有効成分として、抽出物中の3種の flavonoids である vitexin, luteolin 及び cosmosiin を示唆している。また、2011年にChoiら⁴⁴⁾は、落葉高木のハンノキ (*Alnus japonica*)の抽出物について、アレルギー性皮膚炎モデルであるNC/Ngaマウスで有用性を確認している。有効成分として、Oregonin を示唆している。さらに、2012年にHanら⁴⁵⁾は、乳酸菌 (CJLP133)を用いて、アトピー性皮膚炎の患者で臨床試験を行い、乳酸菌サプリメントの有用性を示し

ている。

一方、ビルベリーエキスは、イタリア、フランス、ニュージーランド及び韓国等の国々で医薬品として承認されているが、その適応症としては、眼精疲労及び夜盲症状といった眼科領域や胃潰瘍及び十二指腸潰瘍等に留まっている。

近年、アントシアニンの抗搔痒作用についての報告がなされている。冒頭でも述べたように2009年に Han ら⁴⁶⁾は、histamine 及び compound 48/80 誘発急性皮膚炎モデルを用いて、黒米(black colored rice)より単離した cyanidin-3-O-beta-D-glucoside に抗搔痒作用があることを報告した。さらに、2012年に Kim ら²⁸⁾は、NC/Nga マウス DNCB 誘発慢性アレルギー性皮膚炎モデルを用いて、クロマメノキ (*Vaccinium uliginosum* L.) に含まれるポリフェノールとアントシアニンの混合物が症状を和らげることを報告した。しかしながら、ビルベリー由来のアントシアニンがアレルギー性皮膚炎に有効であるという報告は未だなされていない。

そこで本章では、ビルベリーアントシアニンのアレルギー性皮膚炎に対する抗搔痒作用について検討した。第1節では、マウスを用いてアントシアニンの体内動態を検討し、血中及び皮膚へのアントシアニンの分布について考察した。第2節では、急性搔痒モデルとして、Substance P 及び histamine 刺激によるマウス急性皮膚炎モデルを用いてビルベリーエキスの効果を検討した。第3節では、慢性モデルとしてアレルギー性皮膚炎と同様に Th2 型皮膚炎反応を示すことが知られている TNCB 誘発マウス慢性アレルギー性皮膚炎モデルを用いてビルベリーエキスの効果を検討した。

第1節 アントシアニンの体内動態

1.1 方法

(1) 被験薬物及び試薬

• 被験薬物

1) Bilberon-25 (ビルベリー抽出物, 株式会社常盤植物化学研究所より供与)

• 試薬

1) cyanidin 3-*O*-glucoside chloride (株式会社常盤植物化学研究所より供与)

2) acetone (Wako Pure Chemical Institute, Ltd., Osaka, Japan)

3) acetonitrile (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

4) diethyl ether (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

5) formic acid (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

6) methanol (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

(2) 実験動物

6週齢のICR系雄性マウスを日本エスエルシー株式会社 (Hamamatsu, Japan)より購入し, 約1週間の予備飼育期間を経て実験に使用した。予備飼育期間中は, 固形飼料MF (オリエンタル酵母工業 Tokyo, Japan)及び水道水を自由摂取させ, 定時照明 (7:00~19:00)下で温度 $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\%\pm 5\%$ にて飼育した。なお, この研究は事前に千葉大学動物実験委員会の承認を得た後に実施した。

(3) 被験薬物の投与及び試料の採取

マウスに Bilberon-25 を $2,000\text{ mg/kg}$ の用量で経口投与した。投与後15分, 30分, 60分及び240分後に, エーテル麻酔下にてヘマトクリット管を用いて眼底静脈洞より採血した。採血した血液を 4°C , $1,000\text{ g}$, 20分間遠心分離を行い, 血漿を得た。採血後, 頸椎脱臼によりマウスを犠殺し, あらかじめ毛刈りした背部及び腹部の皮膚を採取し, 筋肉や脂肪等を除去して皮膚重量を測定し, 皮膚検体を得た。

(4) 前処理方法

測定前処理は, Cooke ら⁴⁷⁾の方法に準じて実施した。血漿については, 試料 $300\text{ }\mu\text{L}$ に 10% ギ酸水溶液及び 2.4N 塩酸をそれぞれ $30\text{ }\mu\text{L}$ 加え, 混和した。この液を, あらかじめ 10% ギ酸/acetone 溶液, 10% ギ酸水溶液にてコンディショニングした Oasis HLB 固相抽出カートリッジ (10 mg/cc , Waters Corporation, Milford, MA, USA)にアプライし, 10% ギ酸/acetone 溶液により溶出させた。溶出液は, 遠心エバポレータにて濃縮乾固した。

皮膚については、背部及び腹部の試料に 10%ギ酸/acetone 溶液をそれぞれ 7 mL 及び 5 mL 加え、細胞破碎装置 POLYTRON PT 10-35(Central Scientific Commerce, Inc., Tokyo, Japan)を用いて、氷冷下にて 20 秒間破碎処理した。4°C, 9,000 g, 15 分間遠心分離し、得られた上清を遠心エバポレータにて濃縮乾固した。濃縮乾固した血漿及び皮膚の試料は、それぞれ 10%ギ酸水溶液 50 µL 及び 100 µL に溶解し、HPLC に注入した。

(5) HPLC 条件

- 機器 : SHISEIDO NANOSPACE SL-2 (SHISEIDO Co.,Ltd., Tokyo, Japan)
- カラム : YMC-Pack Pro C18 RS: 2.0 mmI.D.×250 mm, 5 µm
(YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)
- カラム温度: 30°C
- 流速 : 200 µL/min
- 注入量 : 10 µL
- 測定波長 : 535 nm
- 移動相 : A;10%ギ酸水溶液(v/v)
B;10%ギ酸, 22.5%アセトニトリル, 22.5%メタノール水溶液(v/v/v)
- グラジエント条件:

移動相	0-35min	35-45min	45-46min	46-50min
A	90%→65%	65%→35%	35%→0%	0%
B	10%→35%	35%→65%	65%→100%	100%

(6) 濃度の算出

cyanidin 3-*O*-glucoside の標準溶液を調製し、濃度に対する cyanidin 3-*O*-glucoside のピーク面積の回帰直線を求めた。得られた回帰式に各アントシアニンのピーク面積を代入し、アントシアニンの濃度を cyanidin 3-*O*-glucoside 相当量として算出した。

1.2 結果

Fig.3 に Bilberon-25 を HPLC にて測定した結果を示した. 本条件で, 15 種のアントシアニン及び 5 種のアントシアニジンの計 20 ピークを検出した. ピーク No.3(cyanidin 3-*O*-galactoside)及びピーク No.4(delphinidin 3-*O*-arabinoside)のピークが一部で重なっているものの, 各ピークの尖度及び強度が良好であることから定量上問題ないと判断した.

Fig.4 にマウスに Bilberon-25 を経口投与後の血漿中及び皮膚中アントシアニン濃度を測定した結果を示した. Bilberon-25 投与 15 分後より, 血漿及び皮膚検体の HPLC クロマトグラム上にアントシアニンのピークを認め, 配糖体として吸収されることを確認した. cyanidin 3-*O*-glucoside 相当量として算出したアントシアニンの血漿中濃度推移は, 投与 15 分後に Cmax 4.97 μ M を示し, その後速やかに減少した. 皮膚中濃度推移は, 緩やかに増加し, 投与 30 分後に Cmax 0.79 nmol/g tissue を示し, その後緩やかに減少した.

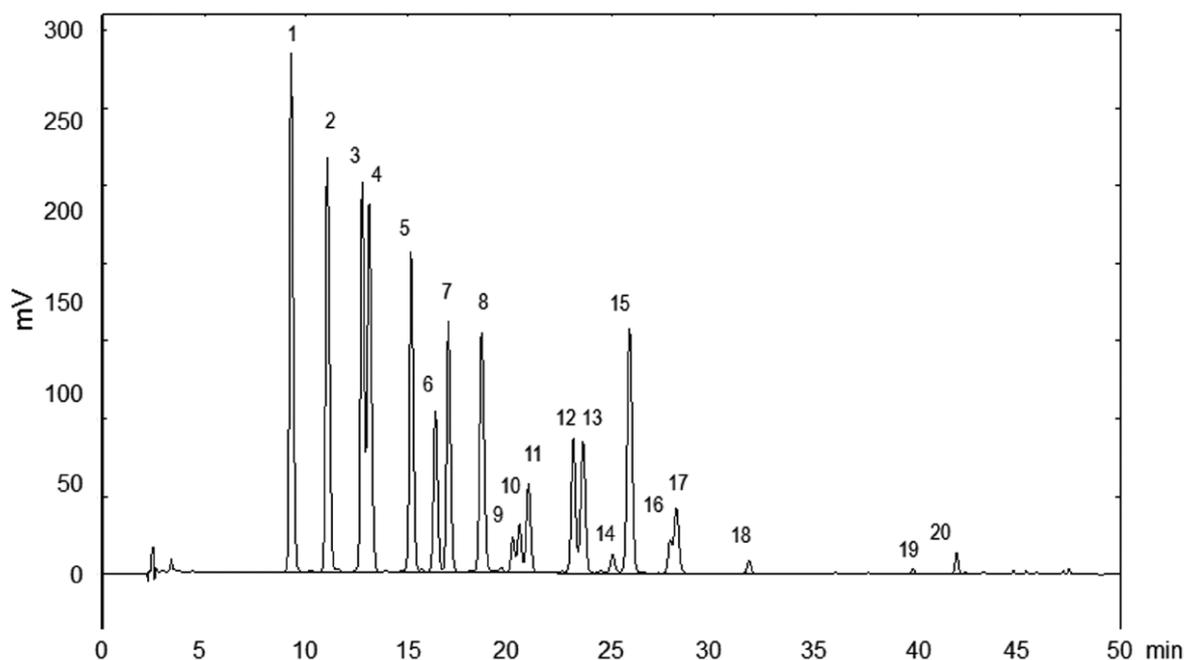


Fig.3 HPLC Chromatogram of Bilberon-25

Peak identities: (1) delphinidin 3-*O*-galactoside, (2) delphinidin 3-*O*-glucoside, (3) cyanidin 3-*O*-galactoside, (4) delphinidin 3-*O*-arabinoside, (5) cyanidin 3-*O*-glucoside, (6) petunidin 3-*O*-galactoside, (7) cyanidin 3-*O*-arabinoside, (8) petunidin 3-*O*-glucoside, (9) peonidin 3-*O*-galactoside, (10) delphinidin, (11) petunidin 3-*O*-arabinoside, (12) peonidin 3-*O*-glucoside, (13) malvidin 3-*O*-galactoside, (14) peonidin 3-*O*-arabinoside, (15) malvidin 3-*O*-glucoside, (16) cyanidin, (17) malvidin 3-*O*-arabinoside, (18) petunidin, (19) peonidin, (20) malvidin

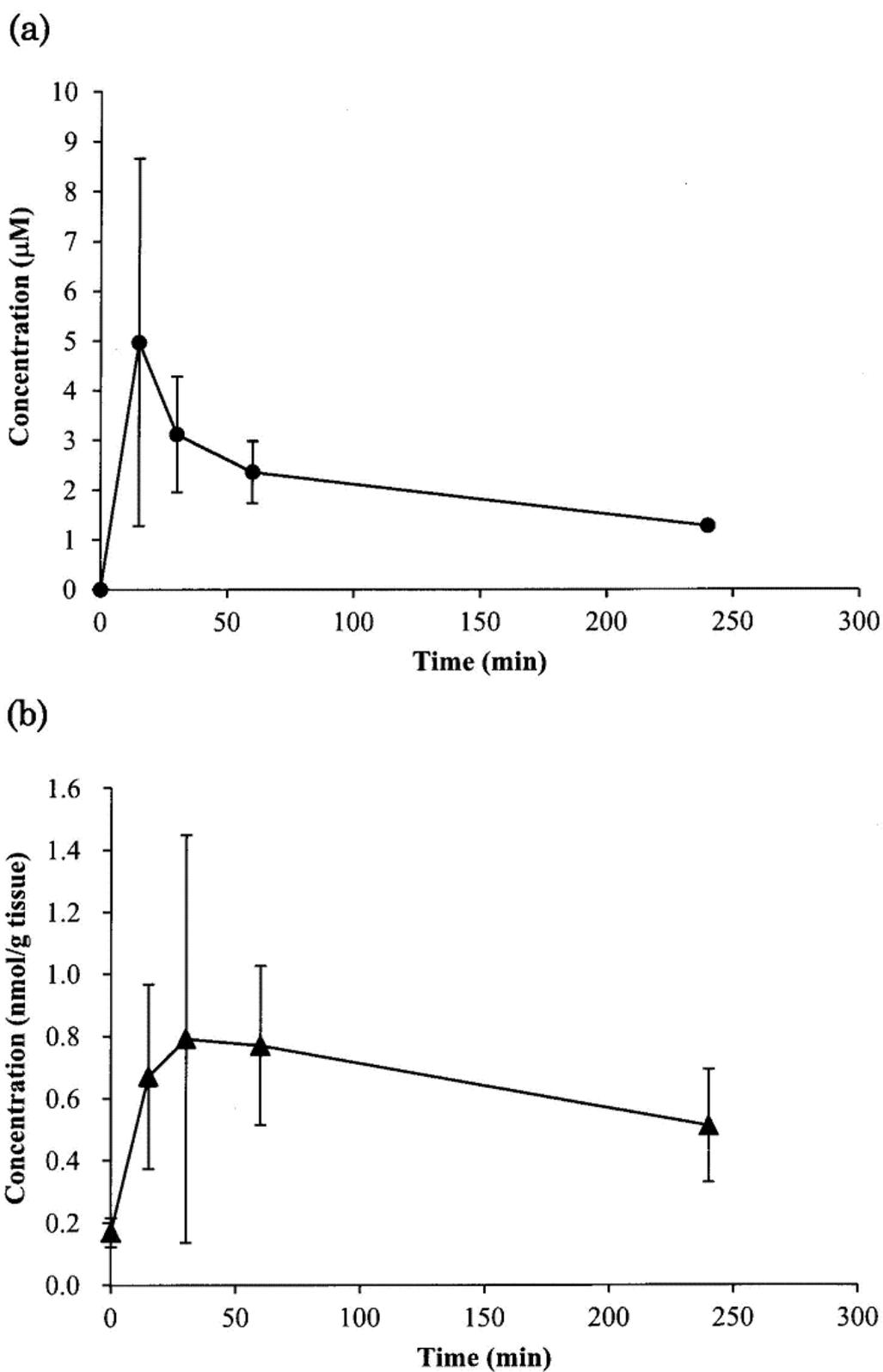


Fig.4 Anthocyanins concentration after oral administration of Bilberon-25 in mice (a) plasma, (b) skin. Values represent the mean±standard deviation (S.D.) for 3-4 mice.

第2節 ビルベリーエキスのマウス急性皮膚炎モデルに対する作用

本節では、マウス急性皮膚炎モデルを用いて、ビルベリーエキスの急性期の皮膚炎への効果を検討した。

抹消で作用するケミカルメディエーターに加え、中枢で作用するオピオイド系も掻痒には関与している。Substance P 誘発モデルでは、陽性対照として Naloxone を使用した。Naloxone は、臨床において、麻薬中毒治療薬として麻薬の呼吸抑制作用によって呼吸困難を起こしている場合に静脈内投与し、麻薬の作用と拮抗して呼吸を回復させる目的で使用される。大脳皮質や視床に存在するオピオイドレセプター(μ レセプター)と親和性が高く、レセプターとの結合により鎮痛作用を示すため、神経ペプチドの Substance P による神経刺激を抑制し、痒みを抑えることが報告⁴⁸⁾されている。また、histamine 誘発モデルでは、陽性対照として Diphenhydramine を使用した。Diphenhydramine は、ヒスタミン H1 受容体拮抗薬であり、末梢及び中枢の histamine と競合的に拮抗し、炎症、気道分泌の抑制、鎮静作用を示すことより、風邪薬や鼻炎薬として使用されている。

2.1 方法

(1) 被験薬物及び試薬

• 被験薬物

- 1) Bilberon-25 (ビルベリー抽出物, 株式会社常盤植物化学研究所より供与)
- 2) Naloxone hydrochloride (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)
- 3) Diphenhydramine (Sigma-Aldrich Corporation)

• 試薬

- 1) Substance P (Peptide Institute Inc., Osaka, Japan)
- 2) histamine dihydrochloride (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)
- 3) sodium chloride (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)
- 4) acetone (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)
- 5) acetonitrile (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)
- 6) diethyl ether (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

(2) 実験動物

6週齢の ICR 系雄性マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、使用した。飼料条件等は、「第1節 1.1 方法 (2)実験動物」に従った。なお、この研究は事前に千葉大学動物実験委員会の承認を得た後に実施した。

(3) Substance P 誘発皮膚炎モデル

1) モデルの作成準備

搔破行動測定の前日に、マウスをエーテル麻酔下において、頸部背側をバリカンで毛刈りした。測定前日に、マウスをエーテル麻酔下において、両後肢足蹠背部皮下にテフロンコーティングした専用マグネット (Neuroscience, Inc., Tokyo, Japan) を、注射針(18G SB)を用いて挿入した。

2) 被験薬物の投与

試験は、1群6匹にて Bilberon-25 投与群(400 mg/kg 及び 2,000 mg/kg), Naloxone 投与群及び Vehicle 群の4群で行った。

Bilberon-25 投与群には、蒸留水に溶解した Bilberon-25 を 400 mg/kg 及び 2,000 mg/kg の用量で5日間連日経口投与した。Naloxone 投与群には、生理食塩液に溶解した Naloxone を 10 mg/kg の用量で単回皮下投与した。なお、Vehicle 群には、同量の溶解液を投与した。

3) Substance P による搔痒の誘発

マウスを観察用アクリルチャンバーで1時間馴化後、Bilberon-25 投与群では Bilberon-25 の最終投与 20 分後に、Naloxone 投与群では Naloxone 投与 15 分後に、生理食塩液に溶解した Substance P を 100 nmol/20 µL/site の用量でエーテル麻酔下にて皮内投与した。

投与後、直ちに観察用アクリルチャンバーにマウスを移し、搔破行動を搔痒測定システム Micro Act (Neuroscience, Inc.)を用いて30分間観察した。

(4) Histamine 誘発皮膚炎モデル

1) モデルの作成準備

搔破行動測定の前日に、マウスをエーテル麻酔下において、頸部背側をバリカンで毛刈りした。測定前日に、マウスをエーテル麻酔下において、両後肢足蹠背部皮下にテフロンコーティングした専用マグネット (Neuroscience, Inc.) を注射針(18G SB)を用いて挿入した。

2) 被験薬物の投与

試験は、1群7-8匹にて Bilberon-25 投与群(2,000 mg/kg), Diphenhydramine 投与群及び Vehicle 群の3群で行った。

Bilberon-25 投与群には、蒸留水に溶解した Bilberon-25 を 2,000 mg/kg の用量で単回経口投与した。Diphenhydramine 投与群には、蒸留水に溶解した Diphenhydramine を 30 mg/kg の用量で単回経口投与した。なお、Vehicle 群に

は、同量の溶解液を投与した。

3) Histamine による搔痒の誘発

マウスを観察用アクリルチャンバーで1時間馴化後、Bilberon-25 及び Diphenhydramine 最終投与 20 分後に、生理食塩液に溶解した histamine を 300 nmol/20 μ L/site の用量でエーテル麻酔下にて皮内投与した。

投与後、直ちに観察用アクリルチャンバーにマウスを移し、搔破行動を搔痒測定システム Micro Act (Neuroscience Inc.)を用いて 30 分間観察した。

(5) 搔痒測定システム Micro Act による搔破行動の解析

Inagaki ら⁴⁹⁾の方法に従った。すなわち、3 回以上連続する後肢の動きを搔破行動として検出するために、抽出する波形の特徴を 0.05V 以上の振幅を有する連続波形のうち、5 Hz~20 Hz の周波数を持ち、0.25 秒以上連続するものとした。なお、0.05 秒以上離れた波形は、連続していない搔破とみなした。抽出した波形を搔破行動とし、痒みの定量的な指標として用いた。また、抽出した波形のうち、Peak 値が 0.5 以上のものは、偽陽性のカウントとして搔破回数から除いた。なお、Micro Act は、帝人ファーマ株式会社より貸与されたものを使用した。

(6) 統計処理

データは、平均値 \pm 標準誤差(S.E.)または平均値 \pm 標準偏差(S.D.)として表記した。2 群の検定には Student's t-test を、多群間の検定には Dunnett's test を用いた。P<0.05 を統計学的有意と判定した。なお、統計処理ソフトは Stat Light 1997(Yukms Co.Ltd., Tokyo, Japan)を用いた。

2.2 結果

(1) Substance P による急性掻痒に対する効果

Fig.5 に Substance P 誘発マウス急性皮膚炎モデルでの Bilberon-25 の抗掻痒作用を示した。Substance P により誘発したマウスの搔破行動に対して、Naloxone は抑制傾向を示したが、Bilberon-25 は 400 mg/kg 及び 2,000 mg/kg のいずれの用量でも抑制しなかった。

(2) Histamine による急性掻痒に対する効果

Fig.6 に histamine 誘発マウス急性皮膚炎モデルでの Bilberon-25 の抗掻痒作用を示した。histamine により誘発したマウスの搔破行動に対して、Diphenhydramine は有意に搔破行動を抑制し、Bilberon-25 は抑制傾向を示した。

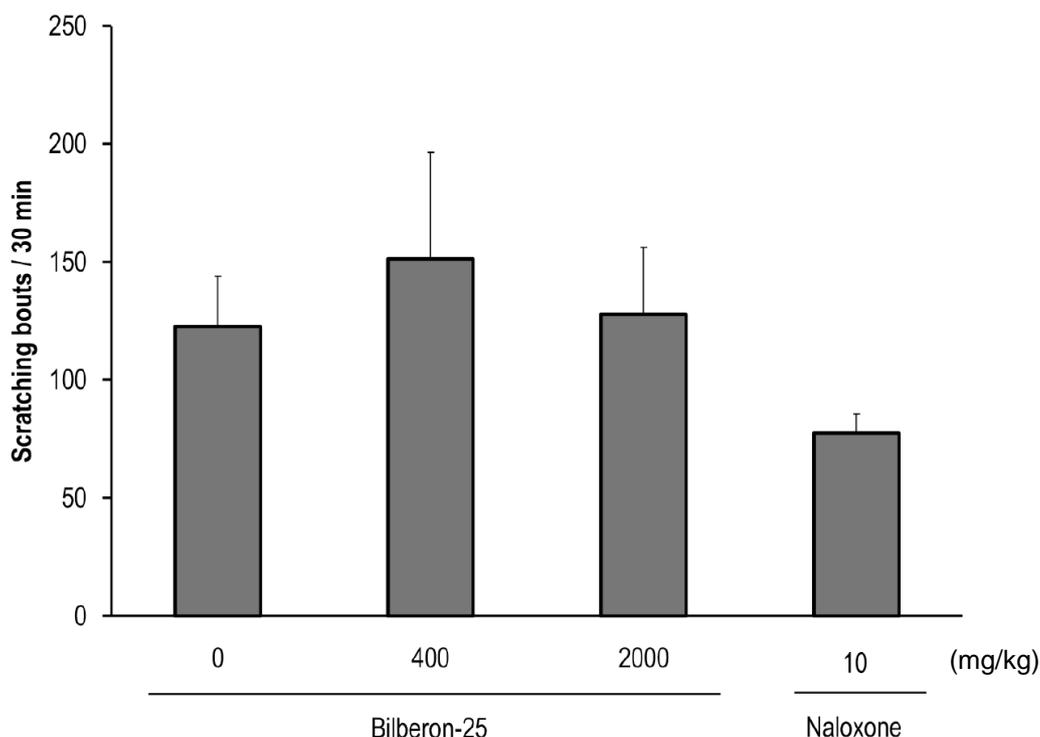


Fig.5 Effect of Bilberon-25 and Naloxone on Substance P-induced pruritus
Bilberon-25 was orally administered for 5 days, and after final administration, Substance P was injected intradermally. Naloxone was administered once subcutaneously 15 minutes before treatment with substance P. Scratching bouts were counted for 30 minutes using Micro Act. Values represent the mean±standard error (S.E.) of 6 mice.

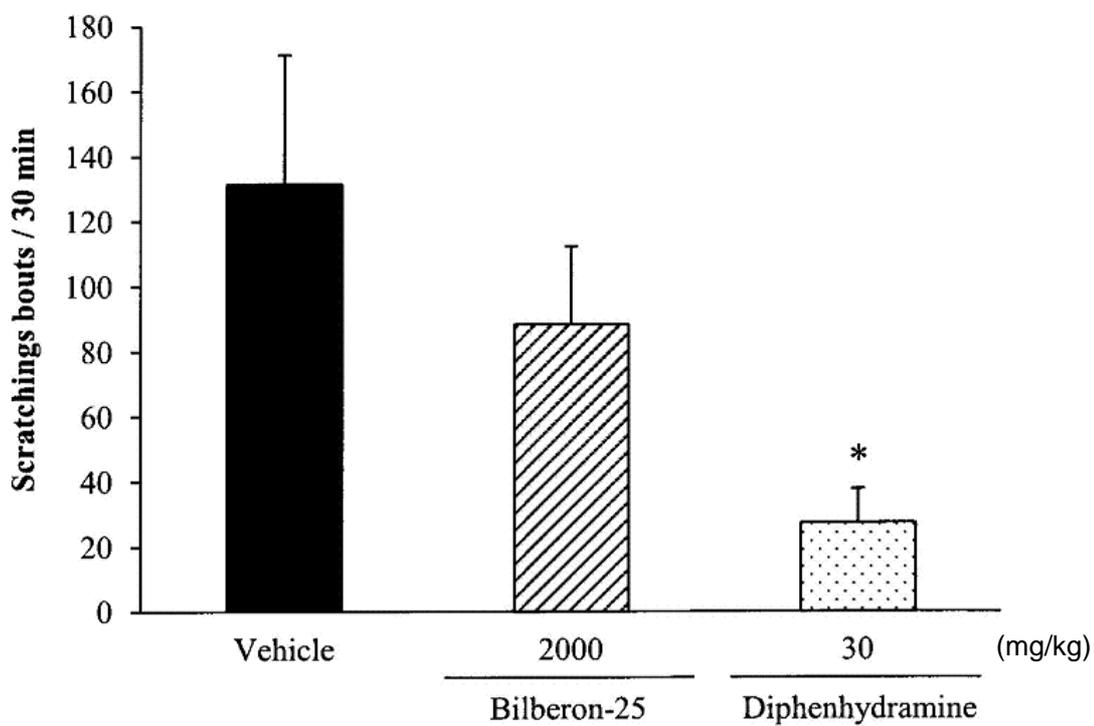


Fig.6 Effect of Bilberon-25 and Diphenhydramine on histamine-induced pruritus
 Bilberon-25 and Diphenhydramine were orally administered, and histamine was injected intradermally. Scratching bouts were counted for 30 minutes using Micro Act. Values represent the mean±S.E. of 7-8 mice.

第3節 ビルベリーエキスのマウス慢性皮膚炎モデルに対する作用

本節では、マウス慢性皮膚炎モデルを用いて、ビルベリーエキスの慢性皮膚炎への効果を検討した。陽性対照としてステロイド系抗炎症薬である Dexamethasone を使用した。

3.1 方法

(1) 被験薬物及び試薬

• 被験薬物

- 1) Bilberon-25 (ビルベリー抽出物, 株式会社常盤植物化学研究所より供与)
- 2) Dexamethasone (Sigma-Aldrich Corporation)

• 試薬

- 1) TNCB (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan)
- 2) acetone (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)
- 3) Prime Script[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)
- 4) RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)

(2) 実験動物

6週齢の BALB/c 系雌性マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、使用した。飼料条件等は、「第1節 1.1 方法 (2)実験動物」に従った。なお、この研究は事前に千葉大学動物実験委員会の承認を得た後に実施した。

(3) TNCB 誘発慢性アレルギー性皮膚炎モデル

Fig.7 に実験のスケジュールを示した。

1) TNCB による感作

感作前日にマウス腹部を毛刈りし、翌日 acetone に溶解した 1.1%TNCB 溶液 100 μ L を塗布し、感作させた。感作当日を Day -7 とした。感作7日後の Day 0 より Day 16 まで1週間に3回マウスの両耳介にエーテル麻酔下にて 1.1%TNCB 溶液 10 μ L を塗布した。無処理群(Nil)として、acetone を塗布した。

2) 被験薬物の投与

Bilberon-25 投与群は、蒸留水に溶解した Bilberon-25 を 400 mg/kg 及び 2,000 mg/kg の用量で感作当日(Day -7)より Day 17 まで、1日1回連日経口投与した。

陽性対照群として、蒸留水に溶解した Dexamethasone を 1.5 mg/kg の用量で day -7 より day -1 まで連日、Day 0 からは隔日経口投与した。無処理群及び対照群には、蒸留水を経口投与した。いずれも TNCB 塗布の4時間前に経口

投与した.

<群分け>

群	ハプテン	被験薬物及び投与量
無処理群(Nil)	acetone	蒸留水
対照群(Vehicle)	TNCB	蒸留水
Bilberon-25 投与群	TNCB	Bilberon-25 400 mg/kg, 2,000 mg/kg
陽性対照群(Dexamethasone)	TNCB	Dexamethasone 1.5 mg/kg

3) 搔破行動の測定

搔破行動測定の前日, マウスをエーテル麻酔下, 両後肢足蹠背部皮下にテフロンコーティングした専用マグネットを注射針(18G SB)を用いて挿入した. マウスを観察用アクリルチャンバーで30分間馴化後, 搔破行動をMicro Actを用いて2時間観察した. Day 15において, TNCB塗布24時間後に測定した.

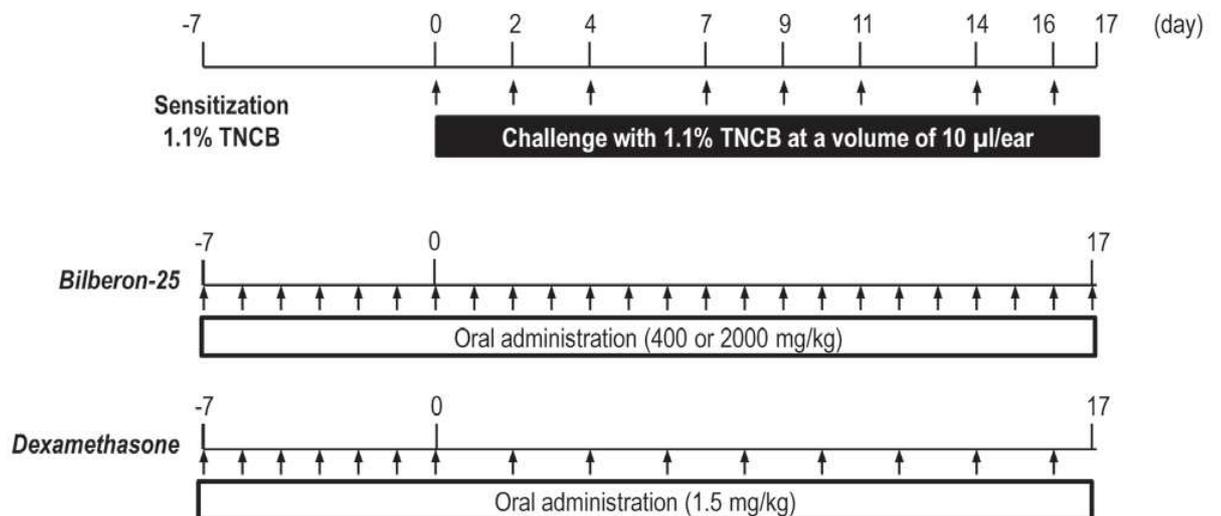


Fig.7 Schedule for the elicitation of chronic allergic contact dermatitis and application of reagents

4) 耳介腫脹の測定

TNCB 塗布より 24 時間後に、毎回耳介腫脹を測定した。エーテル麻酔下にてマイクロメーター (Mitsutoyo, kanagawa, Japan)を用いて、両耳介の厚さを測定し、左右の測定値の平均から反応惹起前の両耳介の測定値の平均を引いた値を測定値とした。

5) 血液及び耳介の採取

TNCB 最終塗布 24 時間後に、エーテル麻酔下で眼底静脈洞よりヘマトクリット管を用いて採血を行った。血液を 4°C, 1,000 g にて 20 分間遠心分離後、得られた血漿を-30°C にて凍結保存した。その後、マウスを頸椎脱臼により犠牲殺後、耳介を採取し、RNA 抽出を行うまで-80°C にて凍結保存した。

(4) 皮膚の mRNA の定量

Day 17 に搔破行動測定後に採取したマウスの耳介を用いて、IL-4 及び IFN- γ の mRNA 発現量を測定した。

• マウス耳介からの RNA 抽出

RNeasy[®] Mini kit を使用して RNA の抽出を行った。マウス耳介組織 30 mg を 2-mercaptoethanol を 6 μ L 添加した Buffer RLT 600 μ L 中でホモジナイズし、9,100 g で 3 分間遠心分離した。遠心分離後の上清に 70% Ethanol を加え、混合後、RNeasy スピンカラムにて 20°C, 9,100 g にて 15 秒間遠心分離した。カラムを Buffer RW1, Buffer RPE で洗浄後、乾燥させ、RNase free water を 30 μ L 添加して RNA を溶出させた。吸光度計 (BIO-RAD Smart SpecTM 3000)を用いて RNA を定量した。

• 逆転写反応

Prime Script[®] RT reagent kit (Perfect Real Time)を使用して逆転写反応を行った。

1) RNA サンプルの調製

mRNA より cDNA を作成するため、以下の組成になるように RNA サンプルを調製した。これを PCR Thermal Cycler (Takara Bio Inc.)を用いて逆転写し、cDNA を得た。

	μL/sample
5× Prime Script Buffer	6.0
Prime Script RT Enzyme Mix I	1.5
Oligo dT primer	1.5
Random 6 mers	1.5
RNase free dH ₂ O	19.5
Template RNA (final 25 ng/ μL)	
Total	30.0

2) 反応条件

37°C	15 min
85°C	5 s
4°C	—

• Real-time PCR

SYBR[®] Premix Ex Taq[™](Takara Bio Inc.)を使用して Real-time PCR を行った.

1) cDNA サンプルの調製

以下の組成になるように cDNA サンプルを調製し, Step One[™] Real Time PCR System(Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を用いて, Real-time PCR 反応を行った.

cDNA サンプルの組成

Reagent	μL/sample	
	IL-4, IFN-γ	β-actin
SYBR Premix Ex Taq	10.0	10.0
ROX	0.4	0.4
Primer	0.4	0.4
D.D.W.	7.6	8.2
cDNA(25 ng/ μL)	1.6	1.0
Total	20.0	20.0

2) Primer

- Mouse IL-4 F:AGATGGATGTGCCAAACGTCCTCA (24 mers)
(Product 88 bp) R:AATATGCGAAGCACCTTGGAAGCC (24 mers)
- Mouse IFN- γ F:CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA (22 mers)
(Product 199 bp) R:GTTGCTGATGGCCTGATTGTC (21 mers)
- Mouse β -actin F:TGTCCACCTTCCAGCAGATGT (21 mers)
(Product 101 bp) R:AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA (23 mers)

3) 反応条件

Enzyme activation	95°C	30 s
Denature	95°C	3 s
Annel/Extend	60°C	30 s
Melt curve	95°C	15 s
	60°C	60 s
	+0.5°C	-
	95°C	15 s

Denature-Annel/Extend

40 cycles (IL-4, IFN- γ)

35 cycles (β -actin)

(5) 統計処理

「第2節 2.1 方法 (6)統計処理」に従った.

3.2 結果

(1) 耳介腫脹

Fig.8 に TNCB 反復塗布による耳介腫脹に対する Bilberon-25 の効果を示した。対照群では, TNCB 塗布 1 日目より測定終了日まで無処理群と比較して有意な耳介腫脹が認められた。耳介は, TNCB 塗布 1 日目より経日的に厚さが増した。陽性対照群では, 対照群と比較して有意に耳介腫脹を抑制した。Bilberon-25 投与群では, 陽性対照群ほどではないものの, 経日的に認められた顕著な耳介腫脹を有意に抑制した。

(2) 搔破行動

Fig.9 に TNCB の反復塗布により誘発した搔破行動に対する Bilberon-25 の効果を示した。TNCB を反復塗布することにより, 対照群では, 無処理群と比較して有意に搔破行動が増加した。陽性対照群では, TNCB 反復投与により誘発した搔破行動を抑制しなかった。Bilberon-25 投与群では, 400 mg/kg 及び 2000 mg/kg のいずれの用量においても TNCB 反復塗布により誘発した搔破行動を有意に抑制した。

(3) 皮膚の mRNA

Table 1 に無処理群, 対照群, Bilberon-25 投与群及び陽性対照群について, TNCB を反復塗布した耳介における IL-4 及び IFN- γ の mRNA 発現量を示した。Th2 サイトカインである IL-4 の mRNA の発現量は, TNCB 反復塗布により無処理群と比較して 1,651 倍と顕著に増加した。Bilberon-25 及び Dexamethasone 投与により, TNCB により増加した IL-4 mRNA 発現量は抑制される傾向を示した。一方, Th1 サイトカインである IFN- γ の mRNA の発現量は, TNCB 反復塗布により無処理群と比較して約 3 倍増加した。さらに, Bilberon-25 (400 mg/kg)投与により対照群と比較して有意に増加した。

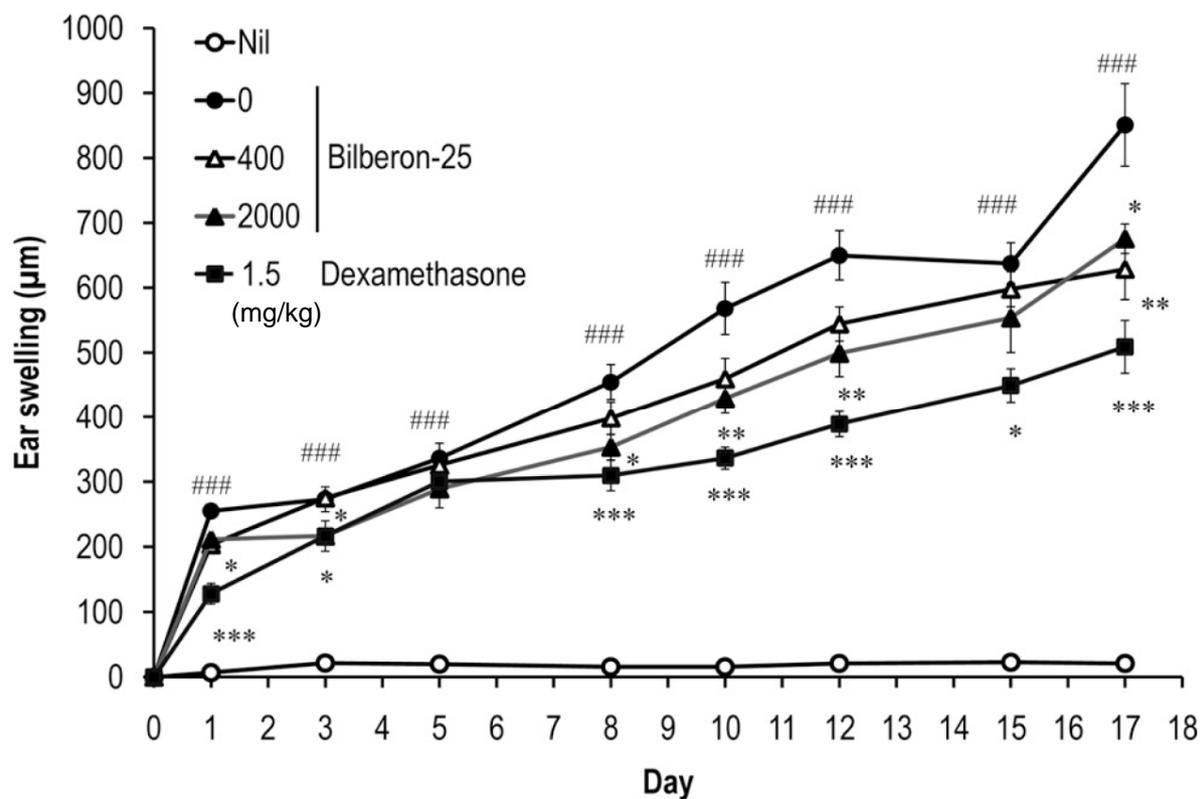


Fig.8 Effect of Bilberon-25 and Dexamethasone on ear swelling induced by repeated application of TNCB

Ear thickness was measured 24 hours after each TNCB challenge.

Values represent the mean±S.E. of mean for 4-7 mice.

*P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 vs 0 mg/kg Bilberon-25(Vehicle).

###P<0.001 vs Nil.

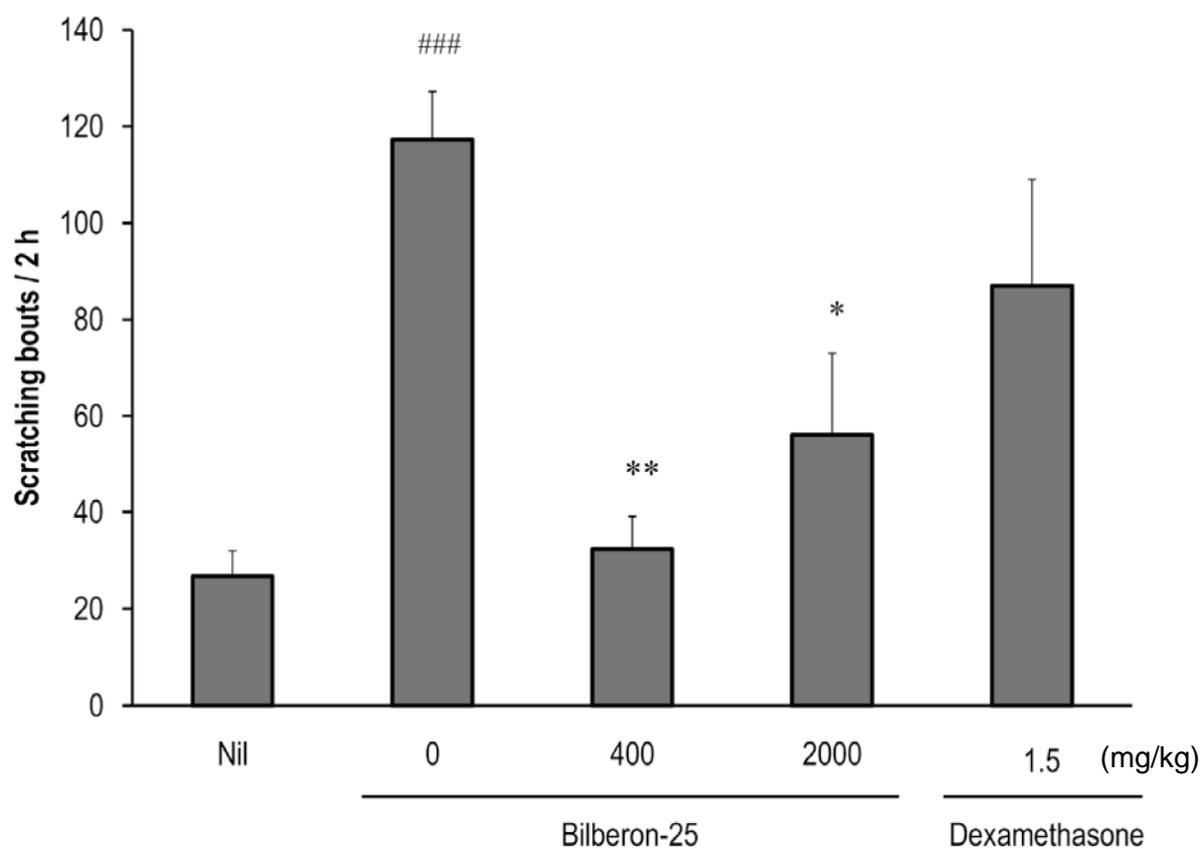


Fig.9 Effect of Bilberon-25 and Dexamethasone on scratching behavior induced by repeated application of TNCB

Scratching bouts were counted for 2 hours using MicroAct 24 hours after the application of TNCB on day 14.

Values represent the mean±S.E. of mean for 4-7 mice.

*P<0.05 and **P<0.01 vs 0 mg/kg Bilberon-25(Vehicle). ###P<0.001 vs Nil.

Table 1 Effect of Bilberon-25 and Dexamethasone on the expression of mRNA for IL-4 and IFN- γ in the lesions induced by repeated application of TNCB

	IL-4/ β -actin	IFN- γ / β -actin	IL-4/IFN- γ
Nil	1.0 \pm 0.4	1.0 \pm 1.0	1.0
Vehicle	1651.0 \pm 457.6 [#]	3.1 \pm 0.5 [#]	537.9
Bilberon-25			
400 mg/kg	1517.0 \pm 502.6	5.5 \pm 1.1 [*]	275.5
2,000 mg/kg	1079.0 \pm 316.6	3.5 \pm 0.5	309.1
Dexamethasone			
1.5 mg/kg	582.2 \pm 212.2	1.8 \pm 0.3	321.2

Total RNA was extracted from each ear 24 hours after the last TNCB challenge. Real-time quantitative PCR was performed using specific primers for IL-4 and IFN- γ . The mRNA levels of each cytokine were normalized to the corresponding β -actin mRNA levels and the mean value of Nil set to 1.0. Values represent the mean \pm S.E. for 4-7 mice. ^{*}P<0.05 vs Vehicle.

[#]P<0.05 vs Nil.

考察

第1節では、Bilberon-25の経口投与15分後より、血漿及び皮膚のHPLCクロマトグラム上にアントシアニンのピークを認め、アントシアニンが速やかに血液及び皮膚に分布することを確認した。

アントシアニンの血漿中濃度は、投与15分後に最高血漿中濃度約5 µMに達し、投与4時間後には約1.5 µMまで減少した。アントシアニンの体内動態については、これまでに多くの報告がなされている。2000年以前、アントシアニンは消化管内でアントシアニン加水分解されない限り吸収されないと考えられていた。しかしながら、2000年以降、アントシアニンは配糖体のまま吸収されるという報告が次々になされた⁵⁰⁾。ヒトへcyanidin 3-O-glycosideを経口投与すると、血中に配糖体として検出され、そのTmaxは3時間であり、吸収が早いことが確認されている⁵¹⁾。一方、Bioavailabilityに関しては報告によりばらつきがあり、アントシアニンがどの程度体内に吸収されるかは未だ明確になっていない。アントシアニンの消化管からの吸収に関しては、アントシアニンが小腸及び胃から配糖体のまま吸収されることから、グルコーストランスポーターを介した吸収過程が考えられている。FlavonoidのQuercetin glucosideの吸収には、ナトリウム-グルコース共輸送体SGLT-1の関与が報告されており⁵²⁾、Quercetin glucosideと類似の構造を有するアントシアニンについてもSGLT-1の関与が考えられる。また、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞を用いた膜透過試験⁵³⁾において、アントシアニンが糖の吸収を阻害すること、アントシアニンによりグルコーストランスポーターGLUT2の発現量が増加することより、アントシアニンの吸収にGLUT2の関与も示唆されている。これら腸管に存在するトランスポーターに加えて、ヒト及びラットに経口投与2~3分後に速やかに血中に配糖体として検出されることから⁵⁴⁾、胃上皮に発現している有機アニオントランスポーターBilitranslocaseを介して吸収されるという報告もなされている。今回、マウスに経口投与後15分には最高血漿中濃度に達したことから、消化管からのアントシアニンの吸収には、これらトランスポーターを介した吸収機構の関与が考えられた。

皮膚中アントシアニン濃度は、投与30分後に最高濃度に達した後、血漿中濃度と比較して緩やかに低下した。したがって、皮膚におけるアントシアニン濃度の変動は血中と比較して小さく、一度アントシアニンが皮膚に分布すると長時間皮膚に留まり、作用が持続する可能性が示唆された。

第2節では、Substance P及びhistamineにより誘発したマウス急性皮膚炎モデルを用いて、急性掻痒に対するBilberon-25の効果を検討した。Bilberon-25は、Substance Pにより誘発した掻痒に対しては抗掻痒作用を示さなかったが、histamineにより誘発した掻痒に対しては抗掻痒作用を示した。

Substance Pによる掻痒には、histamine H1受容体拮抗薬chlorpheniramineやketotifenが無効であること⁵⁵⁾、マスト細胞欠損マウスがSubstance Pにより掻痒を示すこと⁵⁶⁾

より、Substance Pにはマスト細胞からの histamine 放出を刺激する作用以外に、脊髄後根神経ニューロンに存在するニューロキニン1受容体を介した搔痒作用が考えられる。今回、Bilberon-25が Substance Pにより誘発した搔痒に対して、抗搔痒作用を示さなかったことより、Bilberon-25には Substance Pのニューロキニン1受容体を介しての抗搔痒作用は無いと考えられた。また、ヒトで痒みを誘発させる濃度の Substance Pをヒト皮膚マスト細胞に作用させても、histamineの遊離は起こらない⁵⁷⁾ことから、Substance P誘発の痒みにマスト細胞-histamine系は重要ではないことが推測される。一方、histamineにより誘発された搔痒に対して、Bilberon-25は有意ではないものの抑制傾向を示した。このため、Bilberon-25は、マスト細胞の脱顆粒による histamine が知覚神経終末に作用する経路に対して、作用することが示唆された。

第3節では、TNCBにより誘発したマウス慢性アレルギー性皮膚炎モデルを用いて、慢性搔痒に対する Bilberon-25の効果を検討した。Bilberon-25は、TNCBにより誘発した慢性搔痒に対して抗搔痒作用を示した。T細胞のうち、他の白血球の応答を増幅するヘルパーT細胞には、IFN- γ やIL-2を産生してマクロファージや細胞傷害性T細胞を活性化して捕食を促進するTh1細胞とIL-4やIL-5を産生してB細胞の増殖と抗体産生刺激を促すTh2細胞がある⁵⁸⁾。Th1細胞が分泌するサイトカインとTh2細胞が分泌するサイトカインは、互いの機能を抑制する作用を有し、健康な状態では、バランスを取りながら免疫をコントロールしている。このTh1とTh2のバランスが乱れると、アトピー性皮膚炎の悪化に重大な影響を及ぼす⁵⁹⁾。TNCBを塗布することにより、急性期にはTh1が有意であるが、慢性期にはTh2が有意な状態になることが報告⁶⁰⁾されている。第3節においても、TNCBを繰り返し塗布することにより、耳介のIL-4 mRNAは顕著に増加し、Th2有意な状態であることを確認した。Bilberon-25を2,000 mg/kg経口投与群では、増加したIL-4 mRNAの発現を抑制する傾向を示した。また、Bilberon-25を400 mg/kg経口投与群ではIFN- γ の発現が有意に増加した。したがって、Bilberon-25は、Th2優位となったTh1/Th2のバランス制御を行うことにより、アレルギーの状態から健常な状態へ是正する傾向を示し、このことが搔破行動の抑制に関与している可能性が示唆された。

アレルギー状態でTh2優位となり、Th2細胞より分泌されたIL-4によってB細胞からIgEが分泌され、IgEと抗原がマスト細胞に結合して起こるマスト細胞からの histamine の脱顆粒により搔痒が生じる⁶¹⁾。この過程において、IgEと抗原がマスト細胞表面に存在するIgE受容体であるFc ϵ RIに結合するが、アントシアニジンの delphinidinにFc ϵ RIの発現を抑制する作用があることが報告⁶²⁾された。catechin, anthocyanidin及びflavoneで構造活性相関を見たところ、delphinidinのB環にあるpyrogallol構造が本作用発現に必須であることが分かった(Fig.10)。Bilberon-25に含まれるアントシアニンのうち、delphinidinとその配糖体は約36.2%と最も多く含まれる(第4章第2節結果参照)。このため、delphinidinとその配糖体がFc ϵ RIの発現を抑制

することにより，マスト細胞からの脱顆粒を抑制し，抗搔痒作用の一部に寄与した可能性が考えられる．今後のさらなる機序説明が求められる．

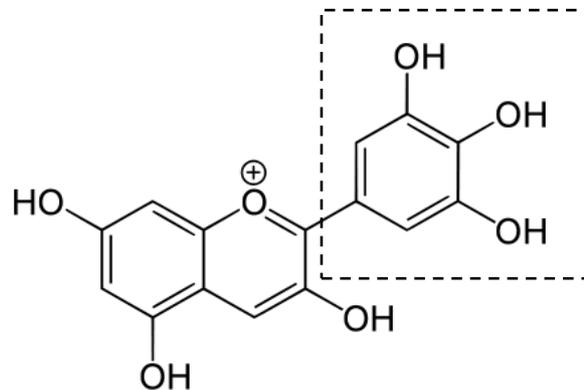


Fig.10 Chemical structure of delphinidin
Dashed line represents pyrogallol structure.

アントシアニンには，活性酸素種(reactive oxygen species;ROS)産生抑制作用⁶³⁾やフリーラジカル補足作用⁶⁴⁾等，様々な機序による抗酸化作用^{65),66),67),68)}が知られており，この抗酸化作用が他の多くの生理作用に関与していると推定されている．アントシアニンを含むアントシアニン以外に，Bilberon-25にはどのような物質が含まれているかについての情報は限定されている．Bilberon-25の原料であるビルベリー果実には，抗酸化作用を有する物質として，果実100g当たりアントシアニン370mg⁹⁾，ビタミンC3mg，quercetin3mg及びcatechin20mg⁶⁹⁾が含まれている．これらビルベリー果実よりBilberon-25を得るには，果実(アントシアニン0.1–0.25wt%⁷⁰⁾)を酸性水にて溶媒抽出後，固相樹脂へ吸着し，アルコールで溶出したものを乾固する．ビタミンCは，果実からBilberon-25を製造する抽出過程で除かれている可能性があるが，除かれていない場合でも果実中の含量が3mgと低いこと，ベリー類の抗酸化作用にほとんど寄与しないこと⁷¹⁾より，ビタミンCはBilberon-25の抗酸化作用にほとんど関与しないと考えられた．catechin及びquercetinについては，アントシアニンと同じフラボノイドに属し，構造が類似しているため，抽出操作では除かれず，Bilberon-25に含まれると考えられる．しかしながら，catechinの含有量はアントシアニンの1/10以下であり，生体のpHでは分解する可能性も示唆されている⁷²⁾．また，quercetinの含有量はアントシアニンの1/100以下と低いため，主にアントシアニンが抗酸化作用を示すと考えられる．抗酸化作用と本節で示した抗搔痒作用との関連は不明であるが，抗酸化作用を有するグルタチオンが生体内で低下するとTh1細胞よりTh2細胞が優位に働くこと⁷³⁾，また，トマトに含まれる抗酸化作用を有するリコピンにTh2を抑制する作用があること⁷⁴⁾，さらに，ナツミカン抽出物が酸化ストレスを低減し，抗アレルギー作

用を示すこと⁷⁵⁾が報告されており, 抗酸化作用を有するアントシアニンが Th1/Th2 のバランスを制御し, 抗搔痒作用を示すことが考えられた.

小括

- Bilberon-25 をマウスに経口投与後、アントシアニンは速やかに血液及び皮膚に分布することを確認した。
- Bilberon-25 は、マウスにおいて Substance P により誘発した急性掻痒に対する抗掻痒作用を示さなかった。一方、histamine により誘発した急性掻痒に対する抗掻痒作用を示した。このため、Bilberon-25 はマスト細胞から脱顆粒した histamine が関与する掻痒に有効である可能性が示唆された。
- Bilberon-25 は、マウスにおいて TNCB により誘発した慢性アレルギー性皮膚炎に対して抗掻痒作用を示した。Bilberon-25 は、TNCB 塗布により Th2 優位となったアレルギー状態から、Th1/Th2 バランスを調整して健康な状態へ是正する傾向を示した。

以上より、ビルベリーエキスのアレルギー性皮膚炎に対する新たな有用性が見出された。

第2章 ビルベリーエキスの劣化に伴う慢性アレルギー性皮膚炎への影響

緒言

第1章第1節において、ビルベリーエキスをマウスに経口投与後、アントシアニン配糖体として速やかに吸収され、皮膚に分布することを確認した。その一方、アントシアニジンのピークは、HPLCクロマトグラム上で明確に確認できなかった。これまでに、アントシアニンの体内動態について多くの報告がなされており、アントシアニン配糖体として吸収されることが報告されているが、アントシアニンとして吸収されたという報告は少ない。第1章第3節では、ビルベリーエキスがマウス慢性アレルギー性皮膚炎モデルに有効であることが示されたが、抗搔痒作用を發揮しているのはビルベリーエキス中のアントシアニンなのか、あるいはアントシアニンなのかは不明である。

そこで本章では、第1章で使用したビルベリーエキスを加熱処理し、アントシアニンからアントシアニンに強制分解させた劣化品を用いて試験を行った。すなわち、アントシアニンを豊富に含む劣化品とアントシアニンを豊富に含む未処理品を用いて、アントシアニンとアントシアニジンのいずれが抗搔痒作用において主要な効果を發揮するのかをマウス慢性アレルギー性皮膚炎モデルを用いて検討した。

アントシアニンは、他のフラボノイドと比較して不安定であり、その安定性はpH、保存温度、濃度、光、酸素、溶媒や酵素、他のフラボノイド、蛋白、金属イオン等多くの外部環境因子により影響を受ける^{25),76)}。特に、熱及びpHに対しては安定性が悪く、熱を加えることによりアントシアニンはアントシアニンに分解する。

アントシアニンの熱安定性に関して、ブルーベリージュース由来のアントシアニンを用いて40°C~80°Cの温度範囲での分解反応を比色法にて確認すると、40°Cでのアントシアニンの半減期は181時間であったが、80°Cでは5時間と顕著に低下し、高温で溶液中のアントシアニンは分解した⁷⁷⁾。これらアントシアニンの分解速度は、一次反応速度論^{78),79)}から求めることができる。アントシアニンの熱分解の第一ステップは、アントシアニンの加水分解による糖とアントシアニジンの生成である⁸⁰⁾。これについては、1973年にAdamsら⁸¹⁾が、加熱処理でアントシアニンと糖との結合部分が最も影響を受けやすいことを報告している。

一方、アントシアニジンは熱に対して安定である。Furtadoら⁸²⁾は、pelargonidin, delphinidin, malvidin及びcyanidinを酸性水溶液中で室温に放置すると、最終分解物としてchalconeを経由してA環由来のaldehyde及びB環由来のbenzoic acidの生成を確認した(Fig.11)。しかしながら、chalconeから最終分解物への不可逆的な反応速度は、可逆的なflavylium cationからchalconeへの反応速度よりも遅く、最終分解物の生成は数日間放置しないと確認できなかった。また、delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin及びmalvidinの5種のアントシアニジンを塩酸酸性メタノール中で30分間加熱還流

しても、アントシアニジンの分解は確認できなかった(Data not shown).

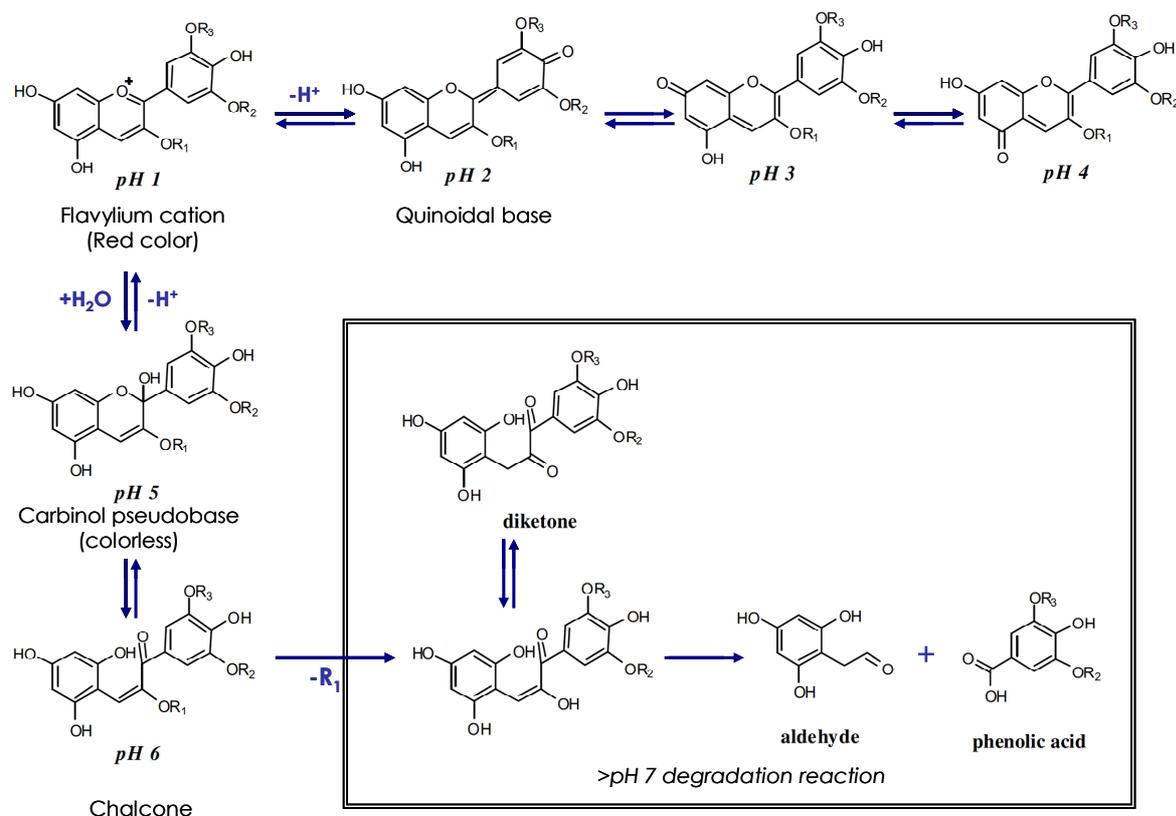


Fig.11 Degradation reaction for anthocyanins depending on pH²⁵⁾

pH に対する安定性に関しては、水溶液中のアントシアニジンは pH に依存して様々な化学構造で存在することが明らかとなっている。すなわち、pH 1 付近では flavylium cation を形成し、赤色～紫色を呈する。pH 2-4 付近では quinoidal base を形成し、青色を呈する。pH 1-4 では pH に依存して可逆的に構造を変換し、色調が変わる。pH 5-6 では flavylium cation に水分が付加して carbinol pseudobase となり、さらに C 環が開環して chalcone を形成して色調は無色になる²⁵⁾。pH 7 以上では、不可逆的に分解反応が進行し、aldehyde 及び phenolic acid を形成する。一方、構造中に糖が付加されているアントシアニンでは、aldehyde 及び phenolic acid を形成するための不安定中間体 α -diketone の分解が抑制されるため、アントシアニンと比較して安定であると報告⁸³⁾されている。

flavylium cation から chalcone 以降の変換には、(1) pH が中性～アルカリ性であること、(2) 水が存在すること、以上の 2 点が必要である。そのため、pH が高い水溶液中では不可逆的な分解が進行するが、pH が低い環境ではアントシアニジンは加熱しても安定である。すなわち、pH の低い水溶液を加熱すると、加熱によりアントシアニンからアントシアニンへ分解するが、生成したアントシアニンは pH が低いため

に分解せず、蓄積すると考えられる。Table 2 にアントシアニンとアントシアニジンの pH 及び熱に対する安定性の概要についてまとめた。

Table 2 Stability of anthocyanins and anthocyanidins

factor	anthocyanins	anthocyanidins
Low pH/ Low temperature	stable	stable
Low pH/ High temperature	unstable	stable
High pH/ Low temperature	unstable (more stable than anthocyanidins)	unstable
High pH/ High temperature	unstable	unstable

本章では、第 1 節において、ビルベリーエキス(Bilberon-25)を溶液状態(1%塩酸水溶液)で加熱処理し、アントシアニンとアントシアニジンの割合の変化を確認した。この場合、溶媒中に水は含まれているが pH が酸性領域のため、アントシアニンからアントシアニジンへは分解するが、アントシアニジンは安定であると考えて溶媒を設定した。アントシアニンの分解に伴い、抗酸化作用が減弱するとの報告⁷⁹⁾があるものの、抗搔痒作用を發揮しているのはアントシアニンなのかは不明である。そこで第 2 節では、第 1 節においてアントシアニンからアントシアニジンに分解した検体を使用し、TCNB 誘発慢性アレルギー性皮膚炎モデルでの抗搔痒作用を検討した。

第1節 ビルベリーエキスの熱処理による分解

本節では、ビルベリーエキス(Bilberon-25)を溶液状態で加熱処理し、アントシアニンとアントシアニジンの割合の変化を確認した。

1.1 方法

(1) 被験薬物及び試薬

- 被験薬物

- 1) Bilberon-25 (ビルベリー抽出物, 株式会社常盤植物化学研究所より供与)

- 試薬

- 1) hydrochloric acid (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

- 2) formic acid (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

- 3) acetonitrile (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

- 4) methanol (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

(2) Bilberon-25 の強制劣化

- 試料の調製

Bilberon-25 を 1%塩酸水溶液に溶解し、100°C に設定した水浴中で 0.5 時間、1 時間及び 2 時間加熱し、冷却後、「(3)HPLC 条件」に示した HPLC 条件にて分析した。

(3) HPLC 条件

- 機器: SHISEIDO NANOSPACE SL-2 (SHISEIDO Co.,Ltd.)

- カラム: YMC-Pack Pro C18 RS: 2.0 mmI.D.×250 mm, 5 µm
(YMC Co., Ltd.)

- カラム温度: 30°C

- 流速: 200 µL/min

- 注入量: 20 µL

- 測定波長: 535 nm

- 移動相: A 10% ギ酸水溶液(v/v)

- B 10% ギ酸, 22.5% アセトニトリル, 22.5% メタノール水溶液(v/v/v)

- グラジエント条件:

移動相	0-35 min	35-45 min	45-46 min	46-50 min
A	90%→65%	65%→35%	35%→0%	0%
B	10%→35%	35%→65%	65%→100%	100%

1.2 結果

Fig.12に Bilberon-25 を未処理, 並びに 0.5 時間, 1 時間及び 2 時間加熱した時の HPLC クロマトグラムを示した. 未処理では, アントシアニンのピーク面積と比較して, アントシアニジンのピーク面積は小さく, アントシアニンが豊富であることが確認された. アントシアニジンのピーク面積は, 加熱 0.5 時間で顕著に増加し, 加熱 1 時間, 2 時間と加熱時間が長くなるにつれて増加した. 加熱処理した劣化品では, アントシアニンのピーク面積よりもアントシアニジンのピーク面積が大きくなり, アントシアニンが豊富であることが確認された.

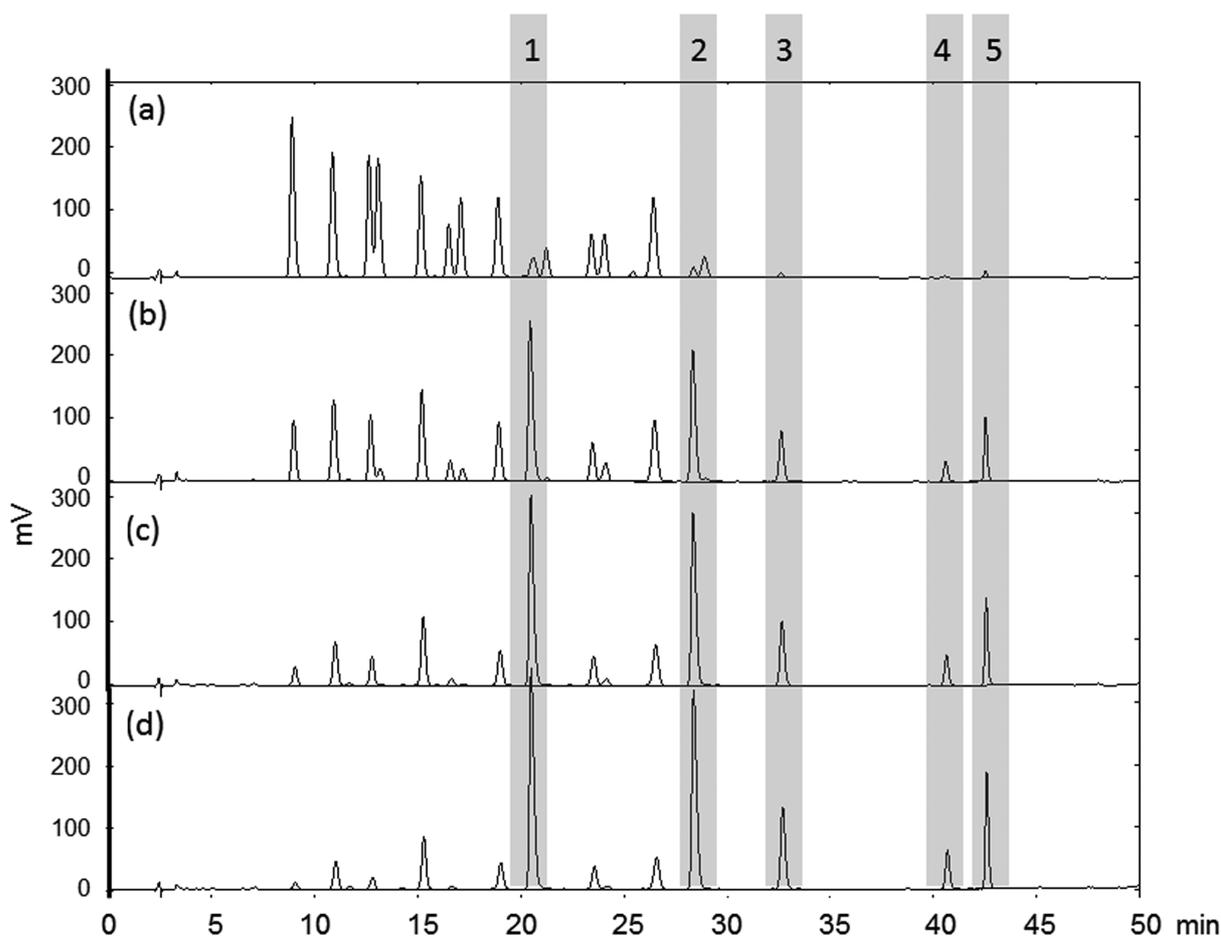


Fig.12 HPLC Chromatograms of non-treatment Bilberon-25 and Heated Bilberon-25
(a)non-treatment Bilberon-25 and Heated Bilberon-25 for (b)0.5 h,(c)1 h and (d)2 h
Peak identities: (1) delphinidin, (2) cyanidin, (3) petunidin, (4) peonidin, (5) malvidin.
Other peaks represent glycosides of these aglycones.

第2節 ビルベリーエキスの分解による搔痒作用への影響

第1節においてアントシアニンからアントシアニンに分解した検体を使用し、TCNB 誘発マウス慢性アレルギー性皮膚炎モデルでの抗搔痒作用を検討した。

2.1 方法

(1) 被験薬物及び試薬

• 被験薬物

- 1) Bilberon-25 (ビルベリー抽出物, 株式会社常盤植物化学研究所より供与)
- 2) Dexamethasone (Sigma-Aldrich Corporation)

• 試薬

- 1) TNCB (Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.)
- 2) hydrochloric acid (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)
- 3) acetone (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)
- 4) 0.25% Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich Corporation)
- 5) 4-Nitrophenyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma-Aldrich Corporation)
- 6) albumin, dinitrophenyl (Sigma-Aldrich Corporation)
- 7) CellTiter 96[®] AQueous MTS Reagent Powder: MTS (Promega, Madison, WI, USA)
- 8) citric acid (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)
- 9) compound 48/80 (Sigma-Aldrich Corporation)
- 10) Dulbecco's PBS(-) (Nissui pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)
- 11) Eagle's MEM "DAIGO" (Nissui pharmaceutical Co., Ltd.)
- 12) Eagle's MEM "Nissui" ② (Nissui pharmaceutical Co., Ltd.)
- 13) E-MEM with L-Glutamine and Phenol Red (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)
- 14) Fetal Bovine Serum: FBS (EQUITECH-BIO, Kerrville, TX, USA)
- 15) glycine (ICN Biochemicals, Aurora, OH, USA)
- 16) monoclonal anti-DNP, antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich Corporation)
- 17) penicillin-Streptomycin (Life Technologies Corporation)
- 18) phenazine methosulfate: PMS (Sigma-Aldrich Corporation)
- 19) polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether: Triton X-100 (Wako Pure Chemical Institute, Ltd.)

(2) 実験動物

6週齢のBALB/c系雌性マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、使用した。飼料条件等は、「第1章 第1節 1.1 方法 (2)実験動物」に従った。なお、この研究は事前に千葉大学動物実験委員会の承認を得た後に実施した。

(3) TCNB 誘発慢性アレルギー性皮膚炎モデル

1) TCNB による感作

Fig.13 に試験スケジュールを示した。感作前日にマウス腹部を毛刈りし、翌日 acetone に溶解した 1.1%TCNB 溶液 50 μ L を塗布し、感作させた。感作当日を Day -7 とした。感作 7 日後の Day 0 より Day 24 まで 1 週間に 3 回マウスの両耳介にエーテル麻酔下にて 1.1%TCNB 溶液 10 μ L を塗布した。無処理群(Nil)として、acetone を塗布した。

2) 被験薬物の投与

Bilberon-25 投与群は、1%塩酸水溶液に溶解した Bilberon-25、並びに「第 1 節ビルベリーエキスの特熱処理による分解」により 0.5 時間及び 2 時間加熱した Bilberon-25 を 400 mg/kg の用量で感作当日(Day -7)より Day 24 まで 1 日 1 回連日経口投与した。陽性対照群として、1%塩酸水溶液に溶解した Dexamethasone を 0.5 mg/kg の用量で、day -7 より day 24 まで 1 日 1 回連日経口投与した。無処理群及び対照群には、1%塩酸水溶液を経口投与した。いずれも TCNB 塗布の 4 時間前に経口投与した。

<群分け>

群	ハプテン	被験薬物及び投与量
無処理群(Nil)	acetone	1%塩酸水溶液
対照群(Vehicle)	TCNB	1%塩酸水溶液
未処理 Bilberon-25 投与群	TCNB	未処理 Bilberon-25 400 mg/kg
加熱処理 0.5 h Bilberon-25 投与群	TCNB	加熱 0.5 h Bilberon-25 400 mg/kg
加熱処理 2 h Bilberon-25 投与群	TCNB	加熱 2 h Bilberon-25 400 mg/kg
陽性対照群	TCNB	Dexamethasone 0.5 mg/kg

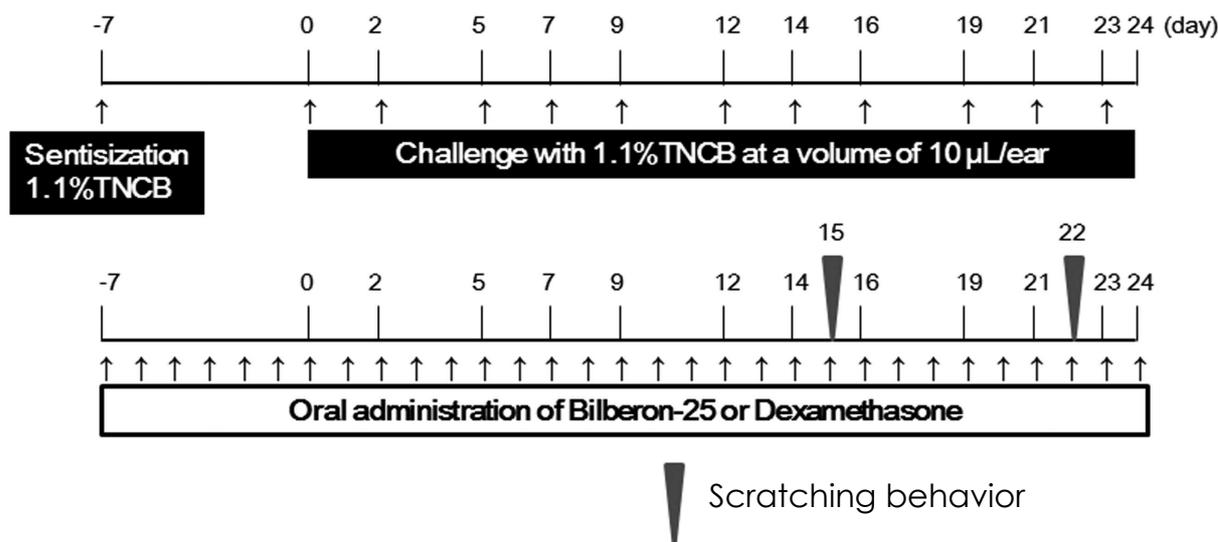


Fig.13 Schedule for the elicitation of chronic allergic contact dermatitis and application of reagents

(4) 搔破行動の測定

搔破行動測定の前日，マウス両後肢足蹠背部皮下にテフロンコーティングした専用マグネットをエーテル麻酔下，注射針(18G SB)を用いて挿入した．Day 15及びDay 22において，TNCB塗布24時間後，マウスを観察用アクリルチャンバーで30分間馴化した後，搔破行動を搔痒測定システム Micro Act を用いて2時間測定した．

(5) 培養細胞を用いた脱顆粒抑制活性の測定

ラット好塩基球性白血病細胞由来 RBL-2H3 細胞を RIKEN Bio Resource Center (Tsukuba, Japan)より購入した．10%FBS，1%ペニシリンーストレプトマイシン添加のEMEM培地にて37°C，5%CO₂で培養し，1週間に2回の頻度で継代した．RBL-2H3細胞を1×10⁵ cells/wellの濃度で24 well plateに播種し，37°C，5%CO₂で24時間培養した．24時間培養した後，EMEM培地に溶解した Bilberon-25 を50 µL/wellで細胞に添加し，30°C，5%CO₂で30分間インキュベートした．細胞をEMEMで洗浄後，compound 48/80 (30 µg/mL)を500 µL/wellで細胞に添加し，37°Cで30分間インキュベートした．compound 48/80により脱顆粒後，培養上清(細胞外液)及び0.1% Triton X-100を用いて細胞を溶解した cell lysate (細胞内液) 50 µLに4-nitrophenyl *N*-acetyl-β-D-glucosaminide (0.1 M citrate buffer, pH 4.5) 50 µLを加え，37°Cで2時間反応させた．反応液に0.25M glycine buffer (pH10.4) 100 µLを加えて反応を停止させ，405 nmでの吸光度を Multiscan JX microplate reader (Thermo LabSystems Inc., Beverly, MA, USA)にて測定した．以下の式により，β-hexosaminidaseの遊離率を求めた．

$$\% \text{ release of } \beta\text{-hexosaminidase} = \frac{\text{O.D.}_{\text{sup}}}{\text{O.D.}_{\text{sup}} - \text{O.D.}_{\text{lysate}}} \times 100$$

(6) 統計処理

「第 1 章 第 2 節 2.1 方法 (6)統計処理」に従った.

2.2 結果

(1) 体重変化

Fig.14 に、試験中のマウスの体重変化を示した。陽性対照群では、Dexamethasone の反復経口投与により、day 9 以降で有意に体重が減少した。対照群、未処理 Bilberon-25 投与群、加熱処理 0.5hr Bilberon-25 投与群及び加熱処理 2hr Bilberon-25 投与群では、マウスの体重に変化は認められなかった。

(2) 搔破行動

Fig.15 に、TNCB 反復塗布より誘発した搔痒に対する各投与群の搔破行動の結果を示した。day 15 において、対照群は、無処理群と比較して有意に搔破行動が増加した。陽性対照群では、搔破行動を抑制する傾向を示した。未処理 Bilberon-25 投与群では、搔破行動を有意に抑制した。加熱処理 0.5hr Bilberon-25 投与群及び加熱処理 2hr Bilberon-25 投与群では、搔破行動を抑制しなかった。day 22 において、対照群は、無処理群と比較して有意な差は無いものの、搔破行動が増加する傾向を示した。陽性対照群では、搔破行動を抑制する傾向を示した。未処理 Bilberon-25 投与群では、搔破行動を抑制する傾向を示した。加熱処理 0.5hr Bilberon-25 投与群及び加熱処理 2hr Bilberon-25 投与群では、搔破行動を抑制しなかった。

(3) 培養細胞を用いた脱顆粒抑制活性

Fig.16 に、ラット培養細胞を用いた脱顆粒抑制活性の結果を示した。未処理 Bilberon-25 投与群では、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までは compound 48/80 刺激による脱顆粒反応を抑制しなかったが、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において有意に抑制した。加熱処理 2hr Bilberon-25 投与群では、いずれの濃度でも脱顆粒反応を抑制しなかった。

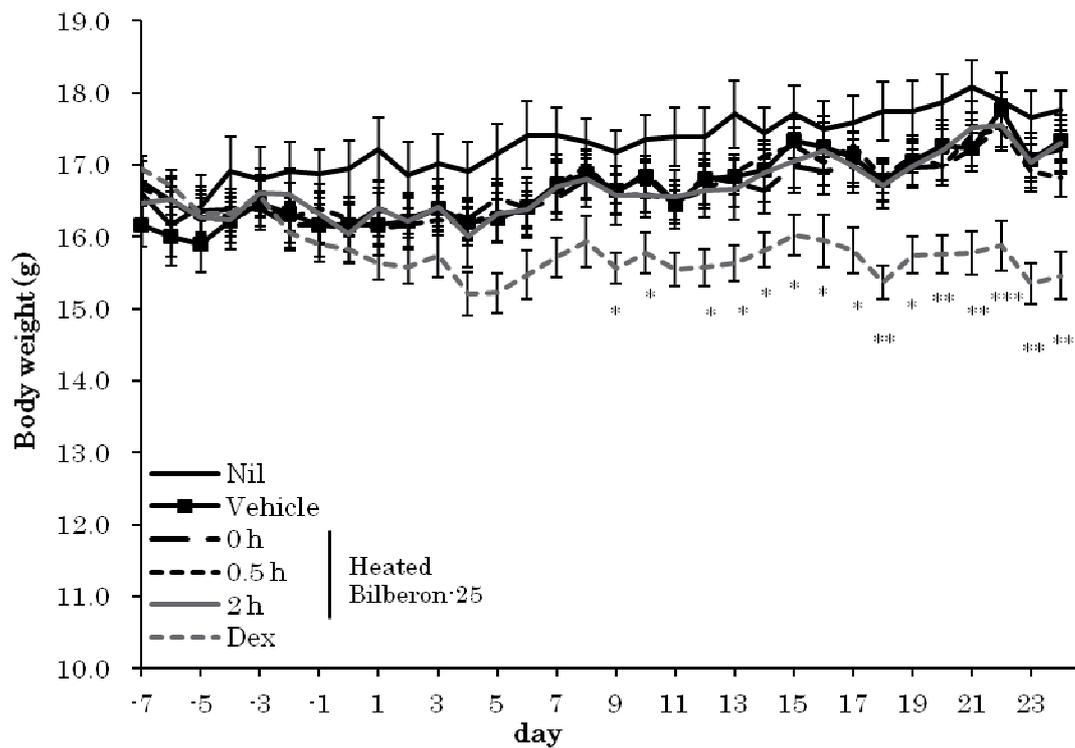


Fig.14 Effect of Bilberon-25 administration on the body weight in the mice repeatedly exposed to TNCB

Nil: Non-treatment

Vehicle: TNCB-treated

0 h: non-heated Bilberon-25 (400 mg/kg)

0.5 h and 2 h: Bilberon-25 heated for 0.5, 2 h (400 mg/kg)

Dex: dexamethasone (0.5 mg/kg).

Results are expressed as mean±S.E.(n=7).

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs Vehicle (Dunnett's test).

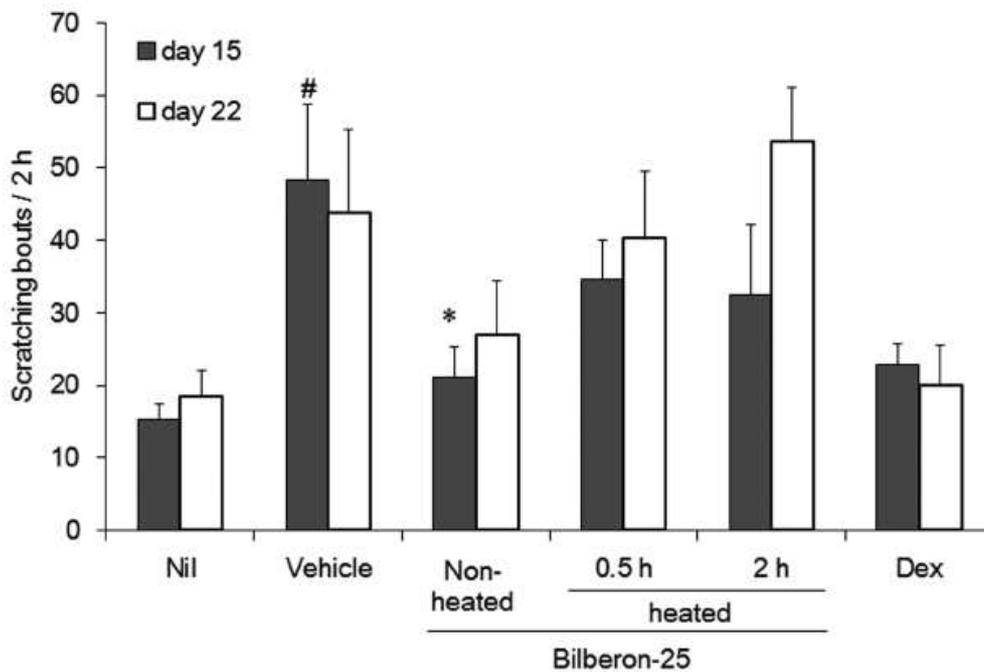


Fig.15 Effect of Bilberon-25 administration on the scratching behaviors in the mice repeatedly exposed to TNCB

Scratching bouts were counted for 2 hours using MicroAct at 24 hours after the application of TNCB on days 15 and 22.

Results are expressed as mean±S.E. (n=7).

[#]P<0.05 vs Nil (Student's t-test); ^{*}P <0.05 vs Vehicle (Dunnett's test).

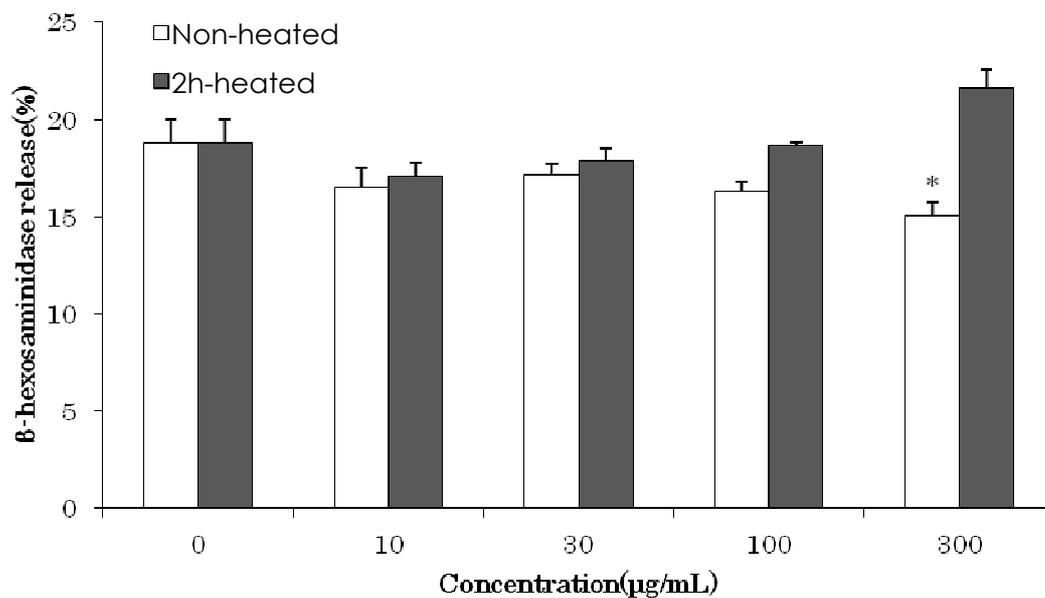


Fig.16 Effect of Bilberon-25 on degranulation in RBL-2H3 cells stimulated with compound 48/80.

RBL-2H3 cells were incubated with non-heated Bilberon-25 or 2 h-heated Bilberon-25 at the indicated concentrations for 30 min, and then stimulated with compound 48/80 (30 µg/mL) for 30 min at 37°C.

The data are expressed as percentages relative to the β-hexosaminidase activities. Values represent the mean±S.E. (n=4). *P<0.05 vs 0 µg/mL (Dunnett's test).

考察

第1章にて、ビルベリーエキスの抗搔痒作用を確認した。本章では、未処理のアントシアニンを含む Bilberon-25 と加熱処理したアントシアニジンを含む Bilberon-25 をマウスに経口投与し、TNCB により誘発した慢性アレルギー性皮膚炎モデルでの搔痒反応に対する作用を比較検討した。

第1節において、未処理 Bilberon-25 ではアントシアニンが豊富であり、加熱処理 Bilberon-25 ではアントシアニジンが豊富であることを確認した。これは、アントシアニンを加熱処理することにより、糖が外れて、それぞれに対応したアントシアニジンが生成することを示しており、既報⁸⁴⁾と同様の結果であった。生成したアントシアニジンは、主に熱以外の因子により影響を受け、分解する。特に(1) pH が中性～アルカリ性と高いこと、(2) 水が存在すること、以上の2条件が揃うと aldehyde 及び phenolic acid へと可逆的に分解する。しかしながら、今回使用した溶媒は1%塩酸水溶液であるため、上記(1)の条件を満たさず、アントシアニンの熱処理により生成したアントシアニジンは分解されずに蓄積し、薬理試験に供することができた。

第2節では、陽性対照の Dexamethasone、未処理及び加熱処理の Bilberon-25 の長期経口投与による毒性を評価するため、体重を経日測定した。その結果、Dexamethasone の連続投与により体重は減少し、ステロイドによる副作用の発現が示唆された。ステロイドの副作用の一つとして、長期間服用することによる副腎不全に伴う食欲不振から体重減少が起こる。この他、ステロイドの副作用として、脂質異常に伴うムーンフェイス、血糖値の上昇、感染症に対する抵抗力の低下がある。一方、未処理及び加熱処理の Bilberon-25 による体重への影響は認められなかった。

アントシアニンのヒトへの安全性に関して、これまでに明らかな副作用は報告されていない⁸⁵⁾。Aviram ら⁸⁶⁾は、19人の頸動脈閉塞症の患者へアントシアニン(delphinidin 3,5-diglucoside, cyanidin 3,5-diglucoside, delphinidin 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside 及び pelargonidine 3-glucoside) 384 mg/L を含むジュースを3年間摂取させたが、心臓、肝臓及び腎臓の血液学的検査では異常は認められなかった。また、安全性試験に関しては、アントシアニン単独ではほとんど行われておらず、その多くは果実より抽出されたアントシアニン混合物を用いて実施されている。果実抽出物によるマウス及びラットにおける LD₅₀ は、25 g/kg 及び 20 g/kg 以上との報告⁸⁷⁾があり、毒性が低いことが示されている⁸⁸⁾。Bagchi ら⁸⁹⁾は、wild blueberry, bilberry, cranberry, elderberry, raspberry seeds 及び strawberry の6種の食用ベリーの混合エキス”OptiBerry[®]”の安全性について報告しているが、ラットにおける LD₅₀ は 5g/kg 以上であり、体重変化は認められず、副作用も解剖所見では認められなかったとのことである。また、変異原性に関しては、Ames 試験において cyanidin⁹⁰⁾及び delphinidin⁹¹⁾は陰性であることが分かっており、催奇形性⁸⁷⁾及び生殖毒性⁹²⁾も確認されていない。The Joint FAO/WHO expert committee on Food Aditives(JECFA)の報告(Anthocyanins-WHO Food Aditives Series 17)に

においても、アントシアニンに明らかな毒性は確認されておらず、ビルベリーエキスは長期摂取における安全性が高いことが示唆される。

慢性搔痒に対しては、未処理 Bilberon-25 投与群において抗搔痒作用を示し、加熱処理 Bilberon-25 投与群では抗搔痒作用を示さなかった。このため、アントシアニジンではなく、アントシアニンが抗搔痒作用を示すことが示唆された。また、ラット培養細胞を用いて、マスト細胞からの脱顆粒反応に対する未処理及び加熱処理の Bilberon-25 の作用を検討したところ、Compound 48/80 により刺激したマスト細胞からの脱顆粒反応を未処理 Bilberon-25 が 300 µg/mL の濃度で有意に抑制することが確認された。一方、加熱処理 2hr Bilberon-25 投与群では、脱顆粒抑制作用を示さなかった。このことから、アントシアニンがマスト細胞からの脱顆粒反応の抑制に寄与することが示唆された。ラット RBL-2H3 細胞において、Bilberon-25 300 µg/mL の高濃度で脱顆粒を有意に抑制したが、Bilberon-25 300 µg/mL は、Bilberon-25 をアントシアニン 36% 含有物として計算すると、アントシアニン約 108 µg/mL に相当する。*in vivo* での抗搔痒作用の発現に、アントシアニン 108 µg/mL の濃度が必要かは不明である。第 1 章第 1 節にて、マウスに 2,000 mg/kg で経口投与したときの血漿中濃度の C_{max} は、cyanidin 3-*O*-glucoside 換算で約 2.2 µg/mL であった。このため、*in vitro* での脱顆粒に必要な濃度を *in vivo* で再現するには、多大な量のアントシアニンを摂取しなければならない。しかしながら、*in vitro* と *in vivo* の環境の違い、ラットとマウスの種差、マスト細胞と好塩基球性白血病細胞の差、IgE と compound 48/80 の脱顆粒の作用性の違いを考慮すると、*in vivo* と *in vitro* の濃度を直接比較することは困難であると思われた。

アントシアニンとアントシアニジンの作用の違いについて、抗搔痒作用の他に、血糖降下作用及び抗酸化作用で報告がある。血糖降下作用⁹³⁾について、アントシアニンは *in vitro* 膵臓 β 細胞(INS-1 832/13)にてインスリン分泌促進作用があるが、アントシアニジンには本効果を示さなかった。また、抗酸化作用については、ブラックベリーに含まれる 4 種のアントシアニン(cyanidin 3-*O*-glucoside, cyanidin 3-*O*-arabinoside, cyanidin 3-*O*-malonyl-glucoside 及び cyanidin 3-*O*-dioxalyl-glucoside)と 1 種のアントシアニジン(cyanidin)の熱に対する安定性と抗酸化作用との関係についての報告⁷⁹⁾がある。熱に対して、アントシアニンは速やかに分解するが、アントシアニジンはほとんど分解しなかった。これは、第 1 節で述べたビルベリーエキスの熱処理による分解の結果を支持する内容であった。さらに、アントシアニンの分解と抗酸化作用の減弱に相関が認められ、アントシアニジンにより抗酸化作用が補てんされることはなかった。このため、抗酸化作用を示すのはアントシアニジンではなく、アントシアニンであると報告している。第 1 章で述べたように、抗酸化作用を有する物質が Th1/Th2 のバランスを制御するとの報告がある。このため、抗酸化作用を有するアントシアニンが Th1/Th2 のバランス制御を介して抗搔痒作用に関与している可能性はあるが、抗酸化作用と抗搔痒作用の関連性についての明確なデータは無い。

アントシアニンとアントシアニジンの抗搔痒作用の違いについては、両化合物の物性を考慮すると、生体内での安定性の違いが起因しているのではないかと考えられた。すわなち、血漿中の pH ではアントシアニジンは速やかに分解されてしまい、生体内に吸収されたとしても効果を発現できないが、アントシアニンは、糖による立体障害⁸³⁾のため、分解が抑制され、効果を発揮している可能性が考えられた。このため、アントシアニジンではなく、アントシアニンが Th1/Th2 のバランスを制御し、マスト細胞からの脱顆粒反応を抑制して抗搔痒作用を示すことが推測された。

小括

- Bilberon-25 を熱処理することにより、アントシアニンは減少し、アントシアニジンが増加することを確認した。
- マウスを用いた TNCB 誘発慢性アレルギー性皮膚炎モデルに対して、未処理の Bilberon-25 は抗搔痒作用を示した。一方、強制劣化した Bilberon-25 は抗搔痒作用を示さなかった。
- ラット培養細胞において、未処理の Bilberon-25 は compound 48/80 刺激による脱顆粒反応を 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で有意に抑制した。一方、強制劣化した Bilberon-25 は、脱顆粒反応を抑制しなかった。このため、アントシアニンの含有量がマスト細胞の脱顆粒反応の抑制に寄与することが示唆された。

以上より、アントシアニジンではなく、アントシアニンがマスト細胞の脱顆粒反応の抑制を介して抗搔痒作用を示すことが示唆された。

第3章 市販ビルベリーサプリメントのアントシアニン摂取量の実態

緒言

1976年イタリアにおいて、世界で初めてビルベリーエキス含有製品「TEGENS」と「FORT MIRTILENE」が医薬品として承認された。その後、フランスで「DIFRAREL FORTE」が承認され、ドイツ、ニュージーランド及び韓国においてもビルベリーエキスは医薬品として承認されている。一方、日本やアメリカでは、ビルベリーエキスは医薬品としては承認されておらず、食品に分類されている。

人が摂取するものとして、日本では大きく医薬品と食品に分類される。さらに食品は、健康食品と健康食品以外の一般の食品に分類されるが、健康食品についての定義は法律上無く、厚生労働省によると「広く健康の保持増進に資する食品として販売、利用されるもの全般を指している」とされている。さらに健康食品を細かく見ると、特別保健用食品、栄養機能食品、いわゆる健康食品の3つに区分される。このうち、特定保健用食品及び栄養機能食品は、消費者庁が所管して認可あるいは成分を指定しており、ラベルへの記載内容に規制が関与している。

特別保健用食品は、「体調調節機能を有する成分を含み、食生活において特定の保健の目的で摂取をするものに対し、その摂取により当該保健の目的が期待できる旨の表示をする食品」として1991年に制度化され、平成24年11月までに1023種が認可されている。申請者は、有効性、安全性及び品質に関するデータを消費者庁へ提出し、内閣府の食品安全委員会による個別審査を受け、消費者庁長官に認可されることにより、ラベルに効能を表記することができる。

栄養機能食品は、「栄養成分(ビタミン・ミネラル)の補給のために利用される食品で、栄養成分の機能を表示して販売することができる食品」として2001年に制度化された。12種のビタミン類と5種のミネラルの計17種が定められ⁹⁴⁾、1日あたりの摂取目安量に含まれる栄養素量の基準を満たしていれば、栄養機能をラベルに表記することができる。特別保健用食品が認可制であるのに対し、栄養機能食品は認可申請や届出は必要ない。

いわゆる健康食品は、特別保健用食品や栄養機能食品とは異なり、規制当局による認可や成分の指定は無く、法令上の規定が無い。このため、販売業者等が独自の判断で「健康食品」等と称して販売しているが、薬事法の規制により効果や機能を表示することはできない。ビルベリーエキスは、いわゆる健康食品に分類される(Fig.17)。

健康食品に関する法規制については、食品衛生法、薬事法、健康増進法、景品表示法及び農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律(JAS法)等の法律が関与している⁹⁵⁾。

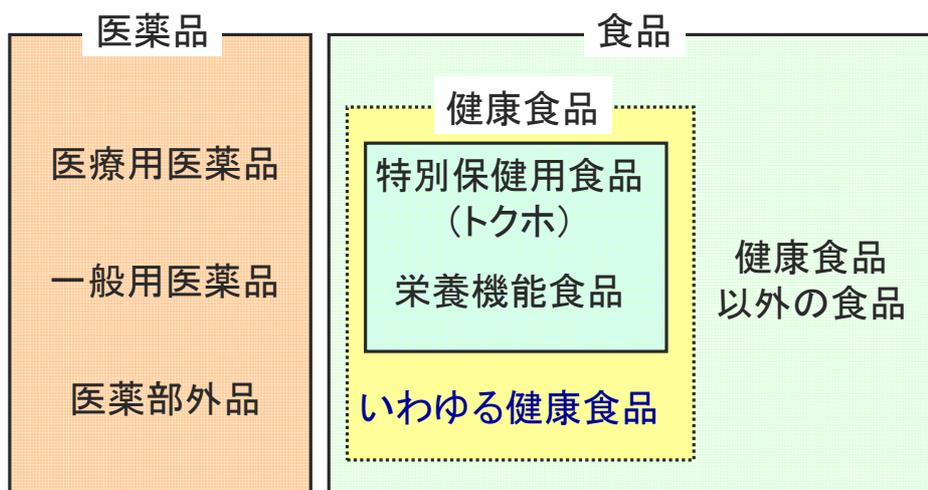


Fig.17 The category classification of health food in Japan

薬事法は、医薬品と食品(いわゆる健康食品)が混同されることがないように、健康食品に関わっている。健康食品は食品の一つとして分類されているため、食品衛生法により、健康食品も一般の食品と同じように製造から表示事項までを管理されている。JAS法は、一般消費者の商品選択に役立てることを目的とし、食品の品質に関する表示について基準を定めている。景品表示法は、不当な表示の禁止を規定し、ほとんど効果の期待できない健康食品への虚偽・誇大な表示は景品表示法に違反する。なお、景品表示法でいう「表示」とは、商品本体への表示、チラシ広告などに加えてテレビやインターネットによる広告も含まれる。

健康増進法は、国民保健の向上を図ることを目的とした法律であり、主に以下の5点で健康食品に関わっている。

- (1) 栄養成分や熱量に関する表示を行う場合の基準
- (2) 虚偽・誇大な表示の禁止
- (3) 特定保健用食品の許可・承認(トクホ)
- (4) 栄養成分の機能を表示する場合の基準(栄養機能食品)
- (5) 特別用途食品の許可・承認(病者用食品、嚥下困難者用食品、乳児用調製粉乳等)

このうち、サプリメントの梱包材には、食品衛生法による「原材料名」と健康増進法による「栄養成分表示」がなされている。入手したブルーベリー含有サプリメントのラベルの1例を以下に示す。

- 原材料名；乳糖，コーンスターチ，ブルーベリーエキス末(ホワートルベリー)，ショ糖エステル，セラック
- 栄養成分表示；熱量 11.69 kcal，炭水化物 2.751 g，たんぱく質 0.003 g，ナトリウム 4.38 mg，脂質 0.075 g

一方、業界団体である公益財団法人日本健康・栄養食品協会(JHFA)は、(旧)厚生省の指導により、独自に規格基準を設定している。2006年4月12日に、JHFAより「ビルベリーエキス食品 品質規格基準」が発行されており、2009年3月6日には改訂版が出されている。この品質規格基準の「C表示・広告基準」において、以下の記載がある。

- (1) 摂取量(召し上がり量)<1日摂取目安量>;アントシアニンとして20~120 mg
- (2) 摂取上の注意, (3) 保管上の注意, (4) その他

この規格基準に基づき JHFA が認定したものについて、1986年より「健康補助食品」の認定マーク(JHFA マーク)を発行している。しかしながら、2012年11月時点で、JHFA マークが付与されたビルベリー含有サプリメントは5製品に留まっている。

現状の法規制下では、ビルベリー含有サプリメント中のアントシアニン含量の法規制は存在せず、サプリメント中に加えられたビルベリーエキスの量の記載もメーカーの自主性に任されている。したがって、ビルベリーサプリメントと謳いながらも、ラベルにアントシアニンに関する情報が無ければ、消費者はサプリメントにどの程度アントシアニンが含まれているかについて知る術がない。海外では医薬品として流通している製品が、日本国内では健康食品として分類されているために規制が緩く、メーカーの自主性のみで頼った管理がなされている。このため、各製品の品質にどの程度のばらつきがあるかは不明であり、消費者がどのような製品を摂取しているかは明らかになっていない。

この疑問について、本章第1節にて、試買した市販のビルベリー含有サプリメント20種の含量について、比色法を用いて測定し、サプリメントのラベルに記載のアントシアニンが記載の通り含まれているかを解析した。また、第2節では、比色法よりも特異性があり、HPLCよりも高速分析が可能なUHPLC法の分析条件の最適化を行った。さらに、第3節では、この最適化されたUHPLC法にて、ビルベリー果実、20種のサプリメント及び基準となる Bilberon-25 を分析し、品質を解析することにより現状の問題点を把握し、市販サプリメントのアントシアニン摂取量の実態を調査した。

第1節 市販ビルベリー含有サプリメントのラベル記載値の妥当性評価

比色法は、簡便かつ迅速に測定が可能であり、品質規格基準に掲載されていることもあり、サプリメントの品質を管理するために広く用いられている。本節では、この比色法を用いて市販サプリメントの含量を測定し、アントシアニンがサプリメントのラベルに記載の通り含まれているかを解析した。

1.1 方法

(1) 試料及び試薬

• 試料

- 1) Bilberon-25 (ビルベリー抽出物, 株式会社常盤植物化学研究所より供与)
- 2) サプリメント; 店頭販売, 通信販売, 新聞広告及びインターネットを利用し, Table 3 に示した試料を入手した。

内訳: ソフトカプセル; n=9, ハードカプセル; n=3, 錠剤; n=7, 顆粒; n=1
国内; 18 種, 海外; 2 種

Table 3 Anthocyanins content of commercial dietary supplements

Sample No.	Label		Formulation
A	bilberry extract	anthocyanin 36%	tablet
	black currant	anthocyanin 10%	
B	bilberry extract	–	soft capsule
C	bilberry extract	anthocyanin 36%	soft capsule
D	blueberry extract	–	tablet
	black currant	–	
E	bilberry extract	anthocyanidin 25%	soft capsule
F	bilberry extract	anthocyanin 36%	soft capsule
G	bilberry extract	–	soft capsule
H	bilberry extract	–	soft capsule
I	bilberry extract	anthocyanin 36%	soft capsule
J	bilberry extract	anthocyanin 25%	hard capsule
	elderberry	–	
K	blueberry extract	–	tablet
L	blueberry extract	anthocyanidin 25%	tablet
	black currant	anthocyanin 10%	
M	bilberry extract	anthocyanidin 25%	hard capsule
	blueberry extract (5:1)	–	
N	blueberry extract	–	granule
O	bilberry extract	anthocyanin 25%	tablet
P	blueberry extract	–	soft capsule
Q	bilberry extract	anthocyanin 28%	tablet
R	blueberry extract	anthocyanin 36%	soft capsule
S	blueberry extract	anthocyanidin 25%	tablet
T	bilberry extract	–	hard capsule

• 試薬

- 1) methanol (Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)
- 2) hydrochloric acid (Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan)

(2) 前処理法

ソフトカプセル及びハードカプセルの内容物をカプセルより取り出し、試料とした。錠剤は乳鉢を用いて解砕し、試料とした。顆粒はそのまま試料として用いた。

それぞれの試料を 10 mg 秤量し、2%塩酸酸性メタノール(v/v)を 60 mL 程度加えて溶解し、30 分間水浴 TYPE 6 (AS ONE Co. Ltd., Osaka, Japan)上で加熱還流させた。還流後冷却し、2%塩酸酸性メタノール(v/v)を加えて 100 mL とした。必要に応じて、さらに 2%塩酸酸性メタノール(v/v)にて 10 倍に希釈した。

(3) 測定条件

UV spectrophotometer UV-2450 (Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan)を使用し、波長 200 nm～600 nm のスペクトルをスキャンした。

(4) 濃度の算出方法

λ_{\max} での吸光度 A を測定し、delphinidin 含量として、以下の式を用いてアントシアニン含量(wt%)を算出した。アントシアニン含量(wt%)は、希釈倍率で補正し、サプリメントの重量に対する wt%で表した。各試料につき、3 例で測定した。本法は、公益財団法人日本健康・栄養食品協会のビルベリーエキス食品品質規格基準に基づき実施した⁹⁶⁾。

$$\text{アントシアニン量(wt\%)} = \frac{A \times 1000}{1020} \times 100 \times \frac{10}{\text{本品の採取量(mg)}}$$

1020: delphinidin の比吸光度($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)

比色法で求めたアントシアニン量(wt%)をアントシアニン量(wt%)として用い、サプリメント 1 粒の重量を測定して、サプリメント 1 粒当たりのアントシアニン含有量を算出した。各製品のラベルに記載の用法に従い、計算で求めた 1 日当たりのアントシアニン摂取量を 100%としたときの比色法で求めたアントシアニン摂取量の割合(%)を求めた。

なお、製品のラベルに記載のアントシアニン摂取量と比色法で求めたアントシアニン摂取量が同等であるかの基準として、生物学的同等性試験における先行薬と後発剤の比較基準(100%±20%)を準用した。比色法で求めたアントシアニン摂取量が、製品のラベルに記載のアントシアニン摂取量の 80%～120%の範囲内であれば、ラベルに記載の通りにアントシアニンが含まれていると判断した。

1.2 結果

Fig.18 に、20 サプリメントについて、製品のラベルに記載のアントシアニン摂取量に対する比色法で求めたアントシアニン摂取量の割合(%)を示した。サンプル D ではラベル記載値の 21.6%，サンプル M では 155.9% であり，サンプル D とサンプル M のアントシアニンの 1 日摂取量には，ラベルの記載値に対して約 8 倍の差が認められた。記載値の 80%～120% の範囲内のものは，20 種中 14 種存在した。残りの 6 種 (サンプル B, D, J, K, M 及び O) は，記載値の 80%～120% の範囲外であった。

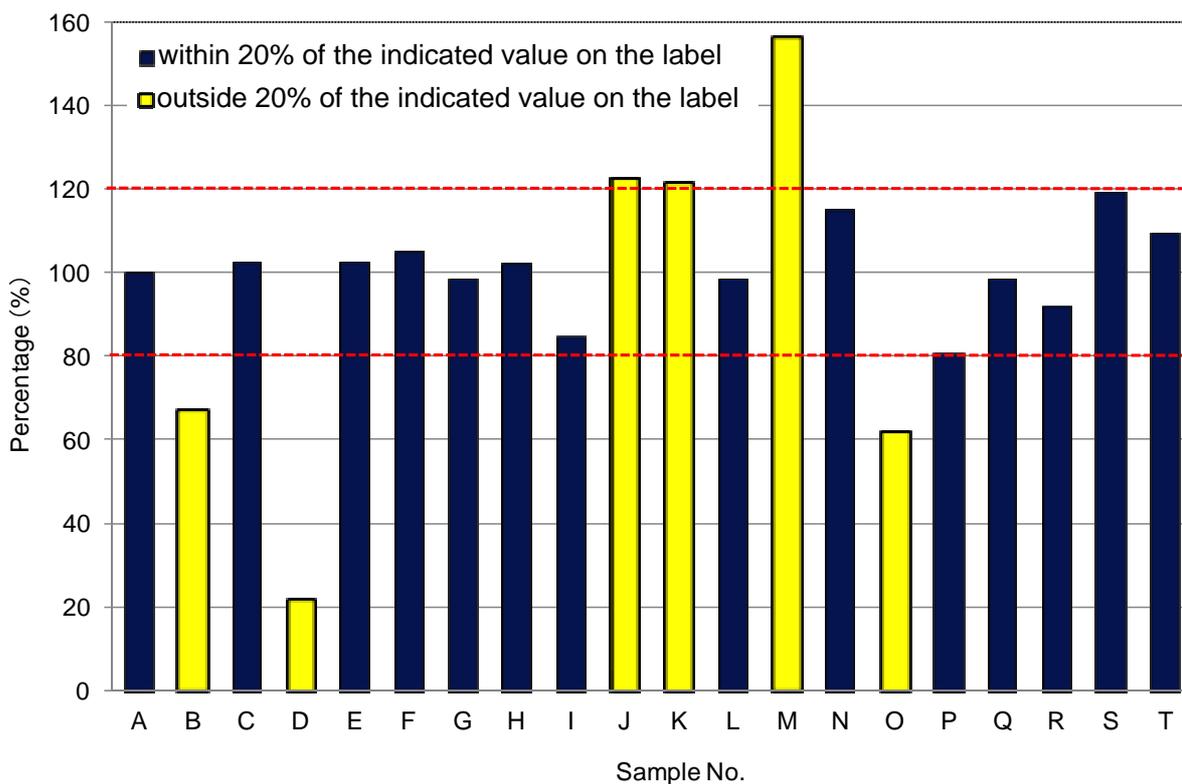


Fig.18 The percentage of actual measured total anthocyanins relative to the indicated value on the product label
Dashed lines represent 80% and 120%.

第2節 アントシアニン高速分析法の設定

第1節で用いた比色法は特異性がなく、個々のアントシアニンの定量はできない。そこで、特異性がある HPLC 法について、HPLC よりも高速分析が可能な UHPLC 法の分析条件の最適化を行った。

2.1 方法

(1) 試料及び試薬

• 試料

- 1) Bilberon-25 (ビルベリー抽出物, 株式会社常盤植物化学研究所より供与)

• 試薬

- 1) malvidin chloride (ChromaDex, Inc., Irvine, CA, USA)
- 2) cyanidin chloride (ChromaDex, Inc.)
- 3) peonidin chloride (ChromaDex, Inc.)
- 4) delphinidin chloride (ChromaDex, Inc.)
- 5) petunidin chloride (Tokiwa Phytochemical Co., Ltd., Chiba, Japan)
- 6) Idaein chloride (cyanidin 3-*O*-galactoside; Sigma-Aldrich Corporation)
- 7) cyanidin 3-*O*-glucoside (Fujicco Co., Ltd., Kobe, Japan)
- 8) cyanidin 3-*O*-arabinoside chloride (Extrasynthese, Genay, France)
- 9) acetonitrile (Junsei Chemical Co., Ltd.)
- 10) methanol (Junsei Chemical Co., Ltd.)
- 11) formic acid (Kanto Chemical Co., Inc.)
- 12) phosphoric acid (Kanto Chemical Co., Inc.)
- 13) MilliQ distilled-deionized water (Merck Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)

(2) 分析条件

• HPLC

Martinelli ら⁹⁷⁾の方法に若干の改良を加えた。

機器: LC-20A HPLC system (Shimadzu Co., Ltd.)

ポンプ : LC-20AD pump

オートサンプラー : SIL-20AC auto-injector

検出器 : SPD-20AV UV-VIS detector

カラムオーブン : CTO-20AC column heater

データ処理ソフト: LC Solution

カラム: YMC-Pack Pro C18 RS 4.6 mm I.D.×250 mm, 5 μm
(YMC Co., Ltd.)

カラム温度: 40°C

流速: 1.0 mL/min

注入量: 10 μ L

測定波長: 535 nm

移動相: A 10% ギ酸水溶液(v/v)

B 10% ギ酸, 22.5% アセトニトリル, 22.5% メタノール水溶液

グラジエント条件:

移動相	0-35 min	35-45 min	45-46 min	46-50 min
A	91% \rightarrow 75%	75% \rightarrow 35%	35% \rightarrow 0%	0%
B	9% \rightarrow 25%	25% \rightarrow 65%	65% \rightarrow 100%	100%

• UHPLC

機器: ACQUITY UPLC system (Waters Corporation)

ポンプ : Binary Solvent Manager pump

オートサンプラー : Sample Manager with column heater module

検出器 : PDA e λ detector

データ処理ソフト: Empower 3

カラム: YMC-UltraHT Pro C18 3.0 mmI.D. \times 100 mm, 2 μ m) column (YMC Co., Ltd.)

カラム温度: 40°C

流速: 0.43 mL/min

注入量: 4 μ L

測定波長: 535 nm

移動相: A 10% ギ酸水溶液(v/v)

B 10% ギ酸, 22.5% アセトニトリル, 22.5% メタノール水溶液

グラジエント条件:

移動相	0-6 min	6-14 min	14-18 min	18-18.04 min	18.04-20 min
A	100% \rightarrow 82%	82% \rightarrow 70%	70% \rightarrow 35%	35% \rightarrow 0%	0%
B	0% \rightarrow 18%	18% \rightarrow 30%	30% \rightarrow 65%	65% \rightarrow 100%	100%

• LC/MS

機器: Exactive (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

スプレー電圧: 3.5kV

デソルベーション温度: 275°C

スキャン(m/z): 200-550

キャピラリー電圧: 30V

チューブレンズ電圧: 130V

スキマー電圧: 20V

シースガス: 30

2.2 結果

サプリメント中のアントシアニンの含量及び各成分プロファイルを迅速に測定するために UHPLC を用いた分析法の検討を行った。Fig.19 に「(2)分析条件」で示した HPLC 法と UHPLC 法での Bilberon-25 のクロマトグラムを示した。いずれの分析法においても、Bilberon-25 に含まれる 20 種のアントシアニン及びアントシアニジンが同様のパターンで検出され、UHPLC 法においても HPLC 法と同等の結果を得ることが可能であった。

「(1)試料及び試薬」で示した 5 種のアントシアニジン(malvidin, cyanidin, peonidin, delphinidin 及び petunidin)及び 3 種のシアニジン配糖体(cyanidin 3-*O*-galactoside, cyanidin 3-*O*-glucoside 及び cyanidin 3-*O*-arabinoside)については、これらの保持時間よりピークの同定を行った。また、LC-MS によりピークの同定を行った。Fig.20 に示したように、LC-MS では 5 種のアントシアニジンそれぞれについて、3 種の配糖体(galactoside, glucoside 及び arabinoside)と 1 種のアグリコンが確認され、20 種すべてのピークについて分子量によりピークが同定された。

分析時間については、HPLC 法での分析時間 50 分と比較して、UHPLC 法では 20 分と 60%短縮した。使用する溶媒量は、UHPLC 法では HPLC 法の約 14%まで削減した。

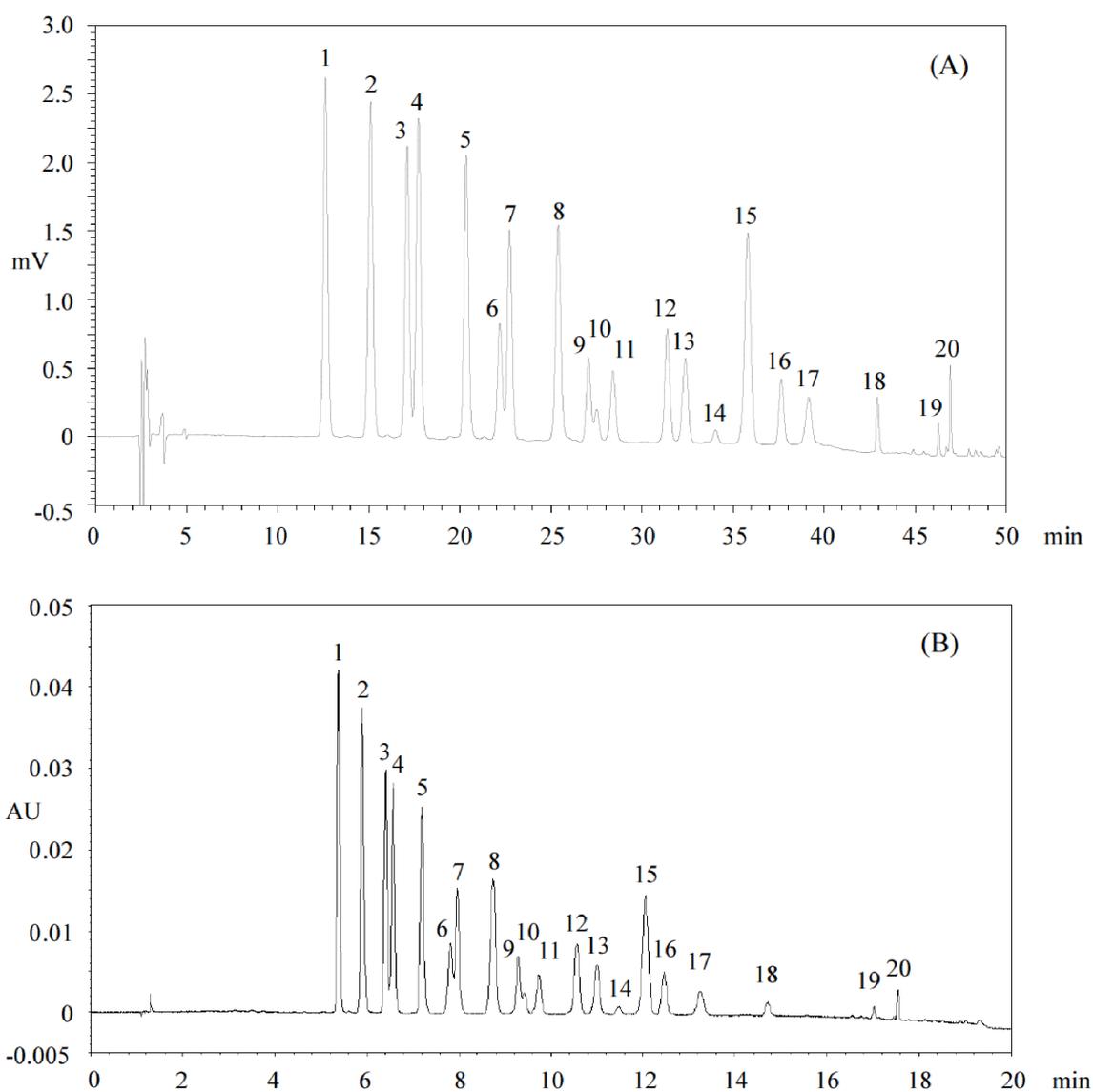


Fig.19 Chromatograms of Bilberon-25 using (A)HPLC and (B)UHPLC
Peak identities: (1) delphinidin 3-*O*-galactoside, (2) delphinidin 3-*O*-glucoside, (3) cyanidin 3-*O*-galactoside, (4) delphinidin 3-*O*-arabinoside, (5) cyanidin 3-*O*-glucoside, (6) petunidin 3-*O*-galactoside, (7) cyanidin 3-*O*-arabinoside, (8) petunidin 3-*O*-glucoside, (9) peonidin 3-*O*-galactoside, (10) delphinidin, (11) petunidin 3-*O*-arabinoside, (12) peonidin 3-*O*-glucoside, (13) malvidin 3-*O*-galactoside, (14) peonidin 3-*O*-arabinoside, (15) malvidin 3-*O*-glucoside, (16) cyanidin, (17) malvidin 3-*O*-arabinoside, (18) petunidin, (19) peonidin, (20) malvidin

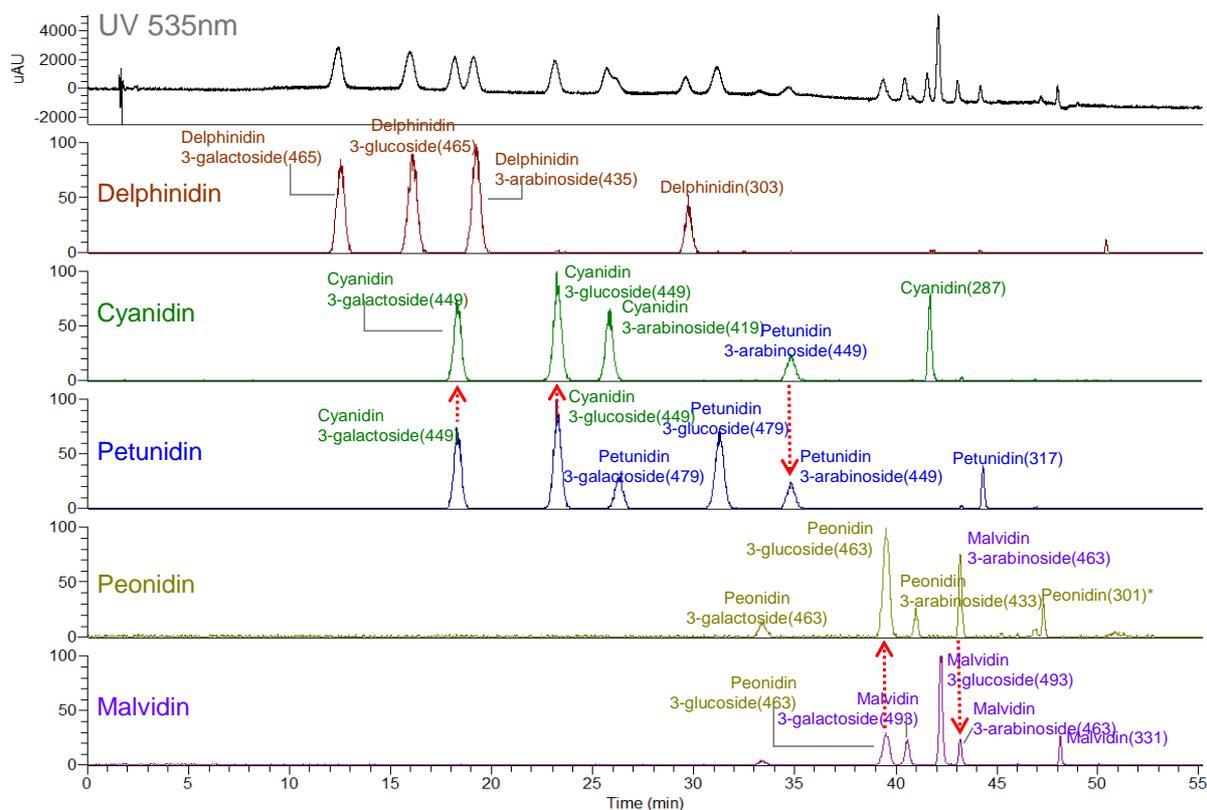


Fig.20 Peak identifications of Bilberon-25 using LC-MS

High-resolution Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) was used for peak identification. Electrospray ionisation was performed in positive ion mode under the following conditions: dry temperature 275°C; capillary voltage 30V; skimmer potential 20V; scan range m/z 200–550.

第3節 UHPLC 法による市販ビルベリー含有サプリメントの品質評価

第2節で最適化されたUHPLC法を用いて、ビルベリー果実、Bilberon-25及び20種のサプリメントを分析し、品質を解析することにより現状の問題点を把握し、市販サプリメントのアントシアニン摂取量の実態を調査した。

3.1 方法

(1) 試料及び試薬

• 試料

- 1) Bilberry fruits (ビルベリー果実, 株式会社常盤植物化学研究所より供与)
- 2) 「第1節 1.1 方法 (1)試料及び試薬」に示した20種のサプリメント

• 試薬

- 1) methanol (Junsei Chemical Co., Ltd.)
- 2) hydrochloric acid (Kanto Chemical Co., Inc.)
- 3) phosphoric acid (Kanto Chemical Co., Inc.)
- 4) MilliQ distilled-deionized water (Merck Millipore Corporation)

(2) 前処理法

1) ビルベリー果実

ビルベリー凍結果実を融解し、2%塩酸酸性メタノール(v/v)を加えて乳鉢中ですり潰した。この液をシリンジフィルター(0.2 µm, Whatman Ltd., Kent, UK)で濾過し、得られた濾液をUHPLCにて分析した。

2) サプリメント

20種のサプリメントについて、ソフトカプセル及びハードカプセルは、内容物をカプセルより取り出し、試料とした。錠剤は乳鉢を用いて解砕し、試料とした。顆粒はそのまま試料調製に使用した。

それぞれの試料及びBilberon-25を10 mg 秤量し、2%塩酸酸性メタノール(v/v)10 mLを加えて超音波処理を行い、溶解させた。この溶解液をシリンジフィルター(0.2 µm, Whatman Ltd.)で濾過し、得られた濾液をUHPLCにて分析した。各試料につき、3例で実施した。

3) 標品

5種のアントシアニン(malvidin, cyanidin, peonidin, delphinidin 及び petunidin)及び3種のシアニン配糖体(cyanidin 3-O-galactoside, cyanidin 3-O-glucoside 及び cyanidin 3-O-arabinoside)を外部標準として使用した。すなわち、これらの標品1.0 mgをそれぞれ秤量し、2%塩酸酸性メタノール(v/v)10 mLに溶解させ、ストックソリューションとした。このストックソリューションを2%塩酸酸性

メタノール(v/v)/11.5%リン酸水溶液(3:1)で25倍希釈し、標準溶液としてUHPLCにて分析した。

(3) 分析条件

「第2節 2.1 方法 (2)分析条件」に記載のUHPLCの分析条件に従い、分析を行った。

(4) 濃度の算出方法

5種のアントシアニン(malvidin, cyanidin, peonidin, delphinidin 及び petunidin), 3種のシアニン配糖体(cyanidin 3-*O*-galactoside, cyanidin 3-*O*-glucoside 及び cyanidin 3-*O*-arabinoside)のピークを標品の保持時間より同定した。また、LC-MSにより各ピークの同定を行った。

上記5種のアントシアニン及び3種のシアニン配糖体の含量(wt%)は、外部標準法により定量した。その他の12種のアントシアニンの含量(wt%)は、それぞれの感度係数を見積もることにより定量した。すなわち、標品を分析して得られたアントシアニンの感度係数にシアニン配糖体の感度係数を乗ずることにより算出した。例えば、malvidin 3-*O*-galactosideの感度係数は、malvidinの感度係数にcyanidin 3-*O*-galactosideの感度係数を乗じて算出した。サプリメント中のアントシアニン含量(wt%)は、個々のアントシアニン及びアントシアニンの含量(wt%)を合計して算出した。

20種のアントシアニン及びアントシアニンの相対的な量(% Area)は、全ピーク面積の合計値に対する各ピーク面積の百分率として求めた。

3.2 結果

Fig.21 に、ビルベリー果実及び Bilberon-25 の UHPLC クロマトグラムを示した。ビルベリー果実には、アントシアニジンのピークはほとんど認められず、検出されたピークは全てアントシアニンであった。アントシアニジンの含量(wt%)は、0.1%未満であった。また、Bilberon-25 についても、アントシアニジンはほとんど認められなかった。

Fig.22 に、20 種のサプリメントと Bilberon-25 中のアントシアニジンの含量(wt%)を示した。USP、イタリア薬局方及び EP では、ビルベリーエキス中のアントシアニジンの値は 1.0%を超えないことと規定されている。ビルベリー果実と同様に、Bilberon-25 のアントシアニジンの含量(wt%)は 1.0%未満であった。一方、サプリメントのアントシアニン含量(wt%)は、20 種中 8 種において 1.0%を超えた。最もアントシアニンが多かったのはサンプル M(ハードカプセル)であり、約 4.8%であった。

Fig.23 に、市販ビルベリー含有サプリメントのアントシアニンの 1 日摂取量を示した。20 種中最も摂取量が少なかったサンプルはサンプル D であり、1 日摂取量は 2.3 mg/day であった。最も摂取量が多かったサンプルはサンプル N であり、1 日摂取量は 151 mg/day であった。サンプル D とサンプル N の摂取量には約 66 倍の差が認められた。JHFA のアントシアニン換算の 1 日最低推奨量は 20 mg である⁹⁶⁾。これは、アントシアニンに換算すると約 29 mg に相当する。1 日最低推奨量未満のサンプルは、サンプル D、K、O、P、S 及び T であり、調査した 20 種中 6 種で 1 日最低推奨量を満たさなかった。

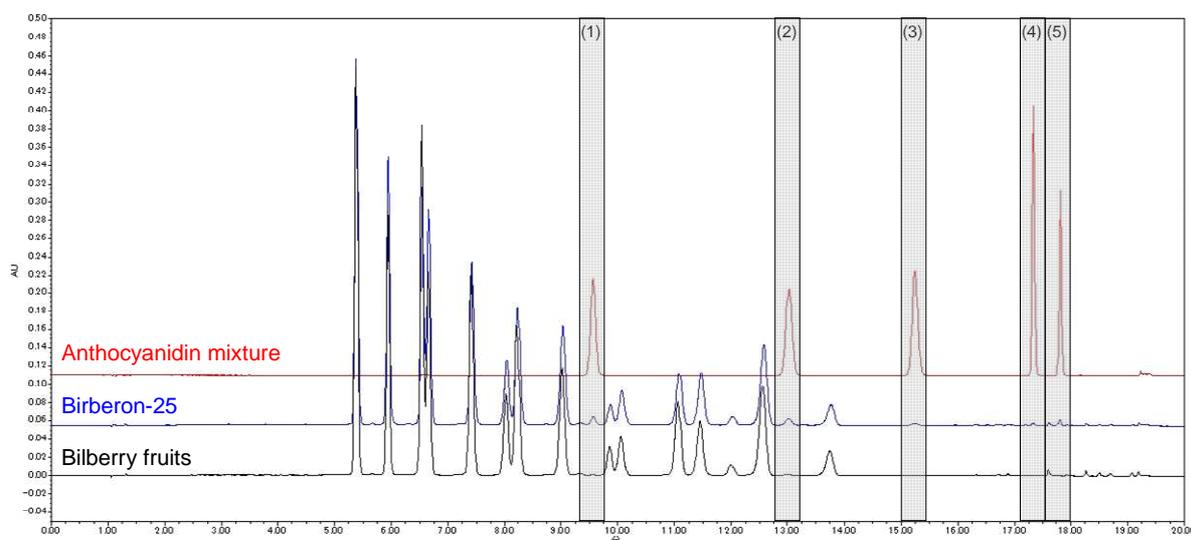


Fig.21 UHPLC chromatograms of bilberry fresh fruits and Bilberon-25
 Peak identities : (1) delphinidin, (2) cyanidin, (3) petunidin, (4) peonidin, and (5) malvidin

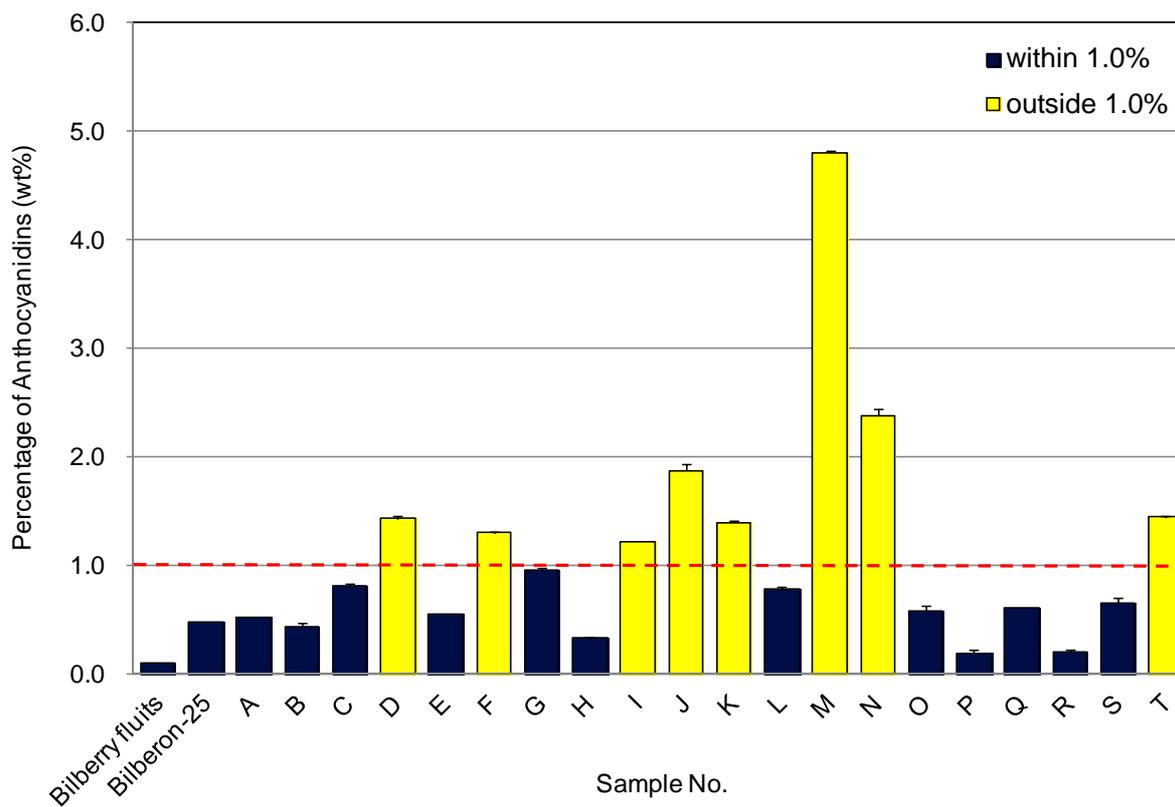


Fig.22 Anthocyanidin contents of commercial supplements
 Dashed line represents 1.0% anthocyanidins in a sample.
 Results are expressed as mean±S.D. (n=3).

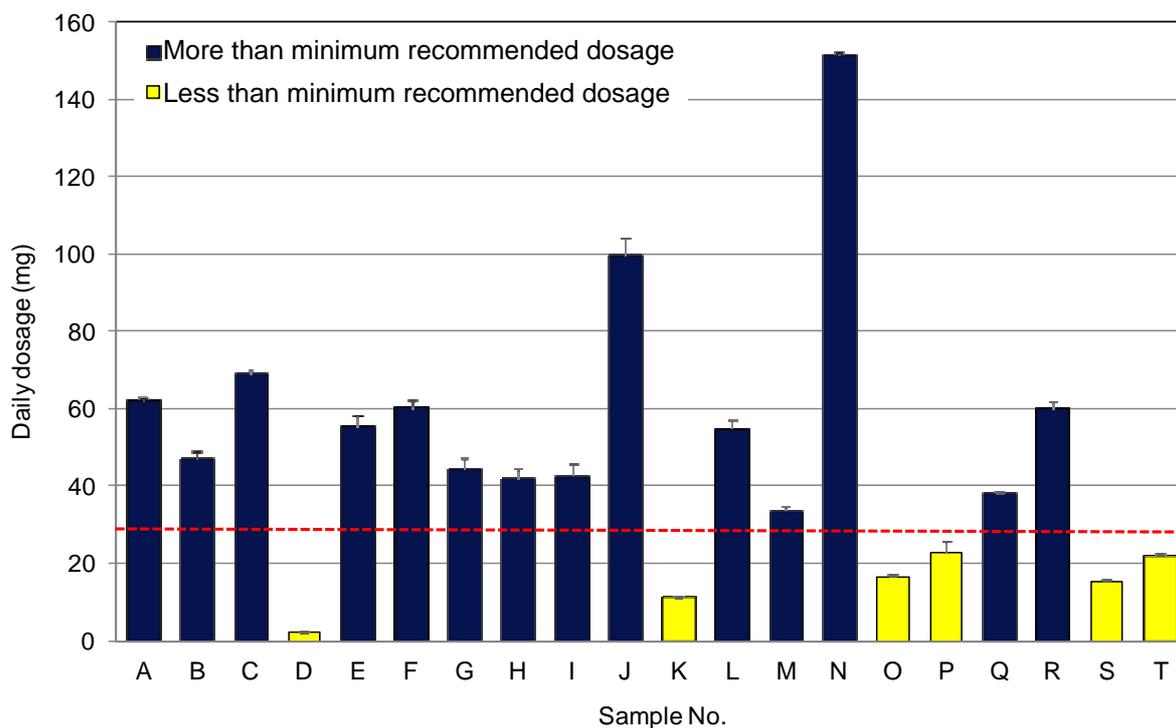


Fig.23 Actual daily dosage of total anthocyanins based on the indicated dosage printed on the product label
 Dashed line represents 29 mg as the minimum recommended dosage of anthocyanins by the JHFA. Results are expressed as mean±S.D. (n=3).

考察

第1節において、比色法を用いて市販のビルベリー含有サプリメント20種の含量を測定した。その結果、サンプルDではラベル記載値の21.6%、サンプルMでは155.9%であり、サンプルDとサンプルMのアントシアニンの1日摂取量には、ラベルの記載値に対して約8倍の差が認められた。記載値の80%~120%の範囲内のものは、20種中14種存在した。残りの6種(サンプルB, D, J, K, M及びO)は、記載値の80%~120%の範囲外であった。ラベルに記載の通りにアントシアニンが含まれているサプリメントが存在したが、20種中6種でラベルに記載の通りのアントシアニン含量が含まれていなかった。

本節で用いた比色法は、ビルベリーエキス食品の品質規格基準に記載され、迅速性と簡便性からアントシアニンの含量の測定に業界で広く利用されている。特異性のない比色法と特異性のあるHPLCを用いて、アントシアニン含有ジュース7検体の含量を測定すると、両試験法で得られた含量は $R \geq 0.925$ と相関が高く、同等の結果が得られている($p \leq 0.05$)⁹⁸。比色法を用いる利点としては、HPLCを保有していない施設での代替的な利用、あるいはspectrophotometerの代わりにmicroplate readerを使用することによりスループットが向上でき、多検体を簡易的に測定する場合に有利である点が挙げられる。その一方、比色法には、特異性がないことに起因する品質管理上の以下の重大な欠点が存在する。

- (1) 測定手順にある加熱操作により、アントシアニンをアントシアニンジンを分解して測定するため、求めるべき試料本来の組成が変わってしまう。
- (2) ビルベリーには複数のアントシアニンが含まれているが、個々のアントシアニンの同定と定量ができない。

このため、比色法では、ブルーベリーの品種の違いが見分けられない。すなわち、異なる品種のブルーベリー(例えば、ビルベリー、ブラックベリー、カシス、エルダーベリー等)のアントシアニンを測定しても、比色法で得られる結果はアントシアニンジンの含量(wt%)のみであり、得られたアントシアニンのプロファイル等から品種を特定することはできない。また、比色法では、個々のアントシアニンの存在やアントシアニンの分解の程度については、原理上測定することは不可能である。これは、加熱操作により、試料本来の組成を変えることに起因している。既に、欧米の薬局方(USP及びEP)では、特異性のあるHPLC法を採用している。

このような比色法の欠点を鑑みると、サプリメント20種中6種でラベルに記載の通りのアントシアニン含量が含まれていなかったが、これら含量にはアントシアニンに加えてアントシアニンジンも含まれており、含量を過大評価していることが分かる。

一方、HPLC法は個々のアントシアニンの同定と定量が可能であり、第2節では、HPLC法よりも高速に分析が可能なUHPLCでの分析を試みた。

UHPLC法は、カラムの粒径を従来の5 μm から1.7 μm 程度まで細かくすることによ

り、従来の HPLC と比較してピークの尖度を向上させ、より短時間で分析を行う方法である。カラムの粒径が細かいことにより機器内部の圧力が高まるため、装置本体に耐圧構造(100MPa 程度)が求められる。近年、UHPLC の普及に伴い、UHPLC は医薬品の研究開発段階から工場での品質管理にも利用されつつある。その際、研究部門から工場への技術移管や規格及び試験法の改訂時において、HPLC から UHPLC への変更が必要となってくる。医薬品分析における HPLC と UHPLC を使用した比較報告^{99),100)}は多々あり、HPLC と UHPLC で同様な結果が得られることを示している。今回、UHPLC 法でアントシアニンの分析法を最適化し、HPLC とほぼ同様のクロマトグラムが得られた。今後は、比色法に代わり、特異性のある HPLC 法が、標準的な分析法として統一されることはもとより、UHPLC 法が、機器の普及に伴って、より高速かつ精度の高い分析法として広まると推察される。

第3節では、UHPLC 法を用いてビルベリー果実、20種のサプリメント及び基準となる Bilberon-25 を分析し、品質を解析することにより現状の問題点を把握し、市販サプリメントのアントシアニン摂取量の実態を調査した。ビルベリー果実中には、アントシアニジンはほとんど含まれておらず(0.1 wt%未満)、検出された全てのピークはアントシアニンであった。ハイブッシュブルーベリーの果実についても同様に分析を行ったが、ビルベリー果実と同様にアントシアニジンはほとんど含まれていなかった(Data not shown)。これら結果は、これまでに発表されている報告^{8),80),101)}の内容と一致する。一方、サプリメント中には、ビルベリー果実と比較してアントシアニジンが多く含まれていた。この結果は、ビルベリー果実からビルベリーエキスを調製後、ビルベリーエキスを用いてサプリメントに製剤化する製造工程及びサプリメントの輸送過程や店舗での商品の陳列、摂取するまでの保存中に、アントシアニンが分解してアントシアニジンが生成していることを示唆している。

市販の20種のビルベリー含有サプリメントについて、アントシアニンの1日摂取量について解析した結果、サプリメントにより約66倍摂取量に差があった。日本における JHFA の1日摂取目安量(アントシアニジンとして20~120 mg)⁹⁶⁾をアントシアニンに換算すると、アントシアニンの1日最低推奨量は約29 mg である。20種中6種のサプリメントで、アントシアニンの1日摂取量は29 mg 未満であり、1日最低推奨量に満たなかった。この結果は、消費者がラベルに記載された用法に従って摂取したとしても、常に一定量の有効成分を摂取できていないことを意味している。すなわち、消費者が選択したサプリメントに依存して、期待した効果が発現するものと発現しないものが存在することを示している。

小括

- ビルベリー果実及び Bilberon-25 は、アントシアニジンをほとんど含んでいなかった。特に、果実のアントシアニン含有量は 0.1% 未満であり、ほとんど検出されなかった。一方、市販のサプリメントは、20 種中 8 種においてアントシアニジンを 1.0% 以上含んでいた。この結果は、サプリメントの製造工程、輸送及び保存中にアントシアニンからアントシアニジンに分解したことを示しており、消費者が劣化したサプリメントを摂取しているリスクがある。
- アントシアニンの 1 日摂取量は、サプリメントにより約 66 倍の違いがあった。また、評価したサプリメント 20 種中 6 種のアントシアニンの含量が、1 日摂取推奨量に満たなかった。この結果は、消費者がラベルに記載の用法に従って摂取したとしても、選択したサプリメントによって有効なものと無効なものが存在することを示しており、消費者は常に一定量の有効成分を摂取できていないことが明らかになった。

第4章 サプリメントの劣化に対する新たな品質評価指標の創出

緒言

第1章において Bilberon-25 が抗搔痒作用を示すこと¹⁰²⁾、第2章において抗搔痒作用を示すのは、アントシアニジンではなく、アントシアニンであることが示された。第3章では、アントシアニジンはビルベリー果実中にほとんど含まれていなかったが、サプリメントには含まれていた。このことは、果実を採取後、アントシアニンが果実より取り出された瞬間からサプリメントの製造中の外部環境、輸送及び保存中の温度等によってアントシアニジンに分解されることを意味している。第1章から第3章までの結果を踏まえると、サプリメント中のアントシアニンの劣化の程度を評価することは、消費者の立場からも、メーカーの品質管理上も必要かつ重要と思われる。

アントシアニンは、植物体内で合成され、果実中で分解されずに維持される。アグリコンであるアントシアニジンは、果実中でチロシン及びフェニルアラニンより、4-クマロイル CoA, テトラヒドロキシカルコン, ナリングニン, ロイコアントシアニジンを経由して生合成される。このように生合成されたアントシアニジンに glucosyltransferase 等の酵素により、糖が付加してアントシアニンが生成する。アントシアニンは、果実の細胞中では液胞の中に局在していることが報告¹⁰³⁾されている。液胞は成熟した細胞の大部分の体積を占めており、原形質や細胞小器官(葉緑体, ミトコンドリアなど)に比べると pH が低く、酸性(pH4-6)環境下にある¹⁰⁴⁾。また、ビルベリーの生育地は北欧や北米の寒冷地が多い。このような低温度の生育環境と液胞中の低い pH により、アントシアニンがアントシアニジンに分解することなく、配糖体として安定に保たれている。

しかしながら、一度アントシアニンが液胞中の環境より取り出されると、外界の苛酷な状況にさらされる。アントシアニンの安定性に影響する因子として、(1) pH, (2) 温度, (3) 光, (4) 酸素, (5) 溶媒, (6) 他の酵素, (7) 他のフラボノイド, (8) 蛋白, (9) 金属イオンが挙げられる²⁵⁾。メーカーは、外部環境因子よりアントシアニンを守るため、サプリメントの包装材料として、アルミラミネート袋や遮光瓶を用いて外界より遮蔽している。しかしながら、上記(1)~(9)の因子のうち、温度のみはこのような遮蔽には関係なく、アントシアニンの安定性に影響を及ぼす。

アントシアニンは、ジュースやワイン等の液体製品中に多く含まれており、液体での製造及び保存中の温度に対して、高温であるほどアントシアニンは分解することがこれまでに報告^{80),105),106),107),108)}されている。一方、サプリメント等の固体中のアントシアニンの安定性については、栄養補助食品のクランベリーアントシアニンの安定性について、ビタミンEやビタミンCとアントシアニンを混合すると安定性が向上する報告のみ¹⁰⁹⁾であり、固体状態における温度に関するの安定性情報はほとんど無い。

サプリメントの製造において、アントシアニンの安定性は抽出溶媒や製造工程数、

加熱温度とその時間により影響を受ける。特に、熱に対するアントシアニンの安定性についての知識が無い場合、アントシアニンを多量に濃縮する目的で安易に加熱操作を行うことは、アントシアニンの分解を増加させるために望ましくない。しかしながら、現状ではアントシアニンを高濃度に濃縮させた製品を製造するため、85°C~95°Cの高温水中で溶解させ、100 mg/mL以上に濃縮を行う方法についての特許も公開されている。アントシアニンを高温水中で加熱させると、アントシアニンからアントシアニジンに分解されるため、上記のような工程で製造されたサプリメントには、少なからずアントシアニジンが含まれることが推測される。このようなサプリメントの品質評価に比色法を採用した場合、劣化した製品が市場に出荷される危険がある。また、サプリメントが市場に流通する過程や消費者の購入後の保存方法にも、アントシアニンの安定性は大きく影響される。

本章では、第1節にてサプリメントの熱安定性を3種の異なる剤形を用いて確認した。ここで得られた知見を基に、第2節においては、迅速かつ簡便にアントシアニンの劣化を検知するための新たな指標を創出し、市販のビルベリー含有サプリメントに応用することにより、本指標の有用性について検証した。

第1節 サプリメントの熱処理による劣化

市販の3種の異なる剤形のブルーベリー含有サプリメントについて、加熱処理(70°C¹¹⁰、5日間)を行い、熱による品質への影響を検討した。剤形として、ソフトカプセル(サンプルI)、錠剤(サンプルL)及び顆粒(サンプルN)を選定した。

1.1 方法

(1) 試料

- サプリメント

Sample No.	Label		Formulation
I	bilberry extract	anthocyanin 36%	soft capsule
L	blueberry extract	anthocyanidin 25%	tablet
	black currant	anthocyanin 10%	
N	blueberry extract	—	granule

(2) 熱処理

恒温槽 WFO-400 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて、70°Cにて5日間熱処理を行った。

(3) 比色法による測定

1) 前処理法

「第3章 第1節 1.1 方法 (2)前処理法」に従い、前処理を行った。

測定条件

「第3章 第1節 1.1 方法 (3)測定条件」に従い、測定を行った。

2) 濃度の算出方法

「第3章 第1節 1.1 方法 (4)濃度の算出方法」に従い、濃度を算出した。

(4) UHPLCによる分析

1) 前処理法

「第3章 第3節 3.1 方法 (2)前処理法」に従い、前処理を行った。

2) 分析条件

「第3章 第3節 3.1 方法 (3)分析条件」に従い、測定を行った。

3) 濃度の算出方法

「第3章 第3節 3.1 方法 (4)濃度の算出方法」に従い、濃度を算出した。

1.2 結果

Fig.24 に、比色法による 3 種の市販ビルベリー含有サプリメントの未処理及び熱処理後の含量(wt%)を示した。サンプル I の含量は、未処理では 7.1%、加熱後では 6.1%と減少した。一方、サンプル L の含量は、未処理で 7.5%、加熱後では 7.4%であり、サンプル N の含量は、未処理及び加熱後でいずれも 1.9%であった。サンプル L 及びサンプル N の含量は、熱処理前後でほとんど変化は認められなかった。

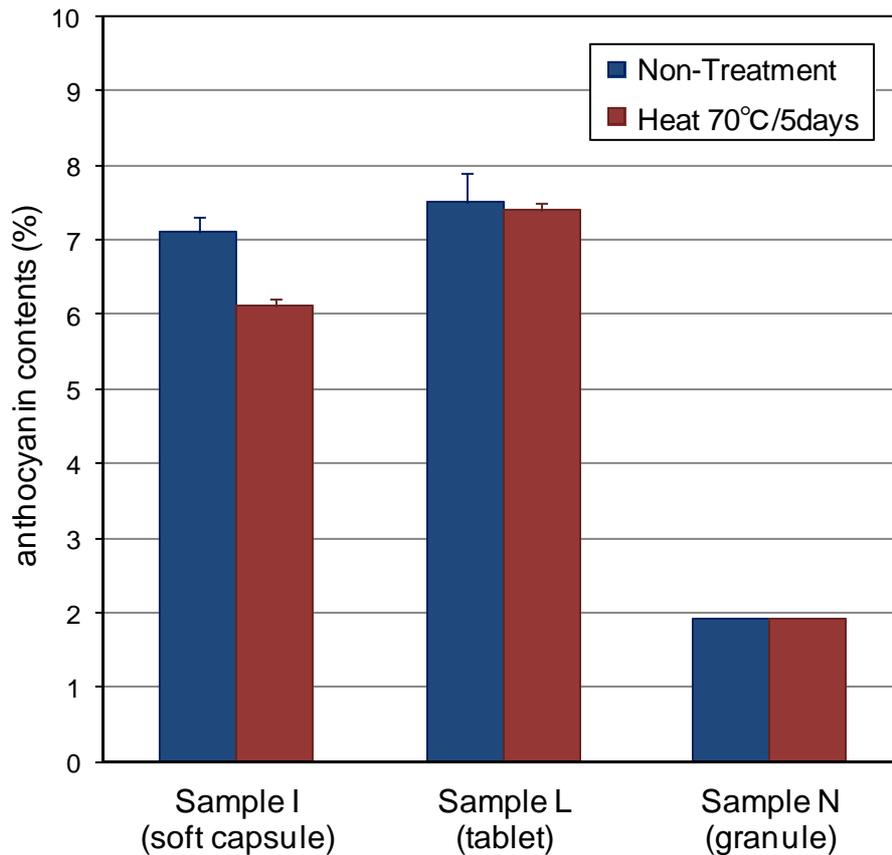


Fig.24 Anthocyanin contents in commercial supplements before and after heat treatment using spectrophotometric methods
Results are expressed as mean±S.D. (n=3).

Table 4 に UHPLC 法による未処理及び熱処理後の 3 種の市販ビルベリー含有サプリメントの UHPLC 法によるピーク面積百分率(% Area)及び UHPLC 法及び比色法による未処理及び熱処理後の 3 種の市販ビルベリー含有サプリメントの含量(wt%)を示した。

アントシアニジンのピーク面積百分率は、いずれの剤形でも熱処理により増加した。サンプル I において、delphinidin 及び cyanidin は 0.7%から 10.9%、1.9%から 7.1%と増加した。また、サンプル N において、delphinidin 及び cyanidin は 0.3%から 15.9%、4.4%から 13.5%と増加した。一方、サンプル L は、サンプル I 及びサンプル N と比較して熱処理前後において顕著な増加は認められなかった。

アントシアニンのピーク面積百分率は、いずれの剤形でも熱処理により減少した。サンプル I において、delphinidin 3-O-arabinoside は 10.4%から 5.3%に、サンプル N において 9.4%から 5.4%にそれぞれ減少した。一方、サンプル L においては、サンプル I 及びサンプル N と比較して熱処理前後において顕著な減少は認められなかった。

サンプル I の熱処理後の delphinidin 3-O-arabinoside のピーク面積百分率の減少率(%)は 49.0%であった。一方、delphinidin 3-O-galactoside では 25.9%、delphinidin 3-O-glucoside ではほとんど変化は認められず、delphinidin 3-O-arabinoside の減少率が最も大きかった。また、他の 4 種のアントシアニン、すなわち cyanidin, petunidin, peonidin 及び malvidin についても、各 arabinoside 配糖体の減少率は galactoside 配糖体及び glucoside 配糖体と比較して最も大きかった(Fig.25)。さらに、サンプル L 及びサンプル N についても、各 arabinoside 配糖体の減少率は galactoside 配糖体及び glucoside 配糖体と比較して最も大きかった。

UHPLC 法による未処理及び熱処理後の 3 種の市販ビルベリー含有サプリメントの含量(wt%)は、サンプル I で 11.2%から 7.1%に減少した。サンプル L の含量(wt%)は、未処理で 13.5%、加熱後では 13.4%であり、サンプル N の含量は、未処理で 2.8%、加熱後では 2.3%であった。サンプル L 及びサンプル N の含量(wt%)は、サンプル I と比較して、熱処理前後で顕著な変化は認められなかった。

Table 4 Stability of anthocyanin in commercial supplements

Anthocyanin	% area of anthocyanins in supplements											
	Sample I (soft capsule)				Sample L (tablet)				Sample N (granule)			
	Non-Treatment	Heat 70°C/5days	Percentage of decrease		Non-Treatment	Heat 70°C/5days	Percentage of decrease		Non-Treatment	Heat 70°C/5days	Percentage of decrease	
Delphinidin	0.7 ± 0.01	10.9 ± 1.52			1.1 ± 0.01	2.1 ± 0.04			0.3 ± 0.00	15.9 ± 0.25		
Delphinidin 3-O-arabinoside	10.4 ± 0.06	5.3 ± 0.39	49.0		11.8 ± 0.02	11.3 ± 0.04	4.2		9.4 ± 0.12	5.4 ± 0.09	42.6	
Delphinidin 3-O-galactoside	13.5 ± 0.02	10.0 ± 0.43	25.9		12.1 ± 0.01	11.9 ± 0.03	1.7		11.8 ± 0.12	7.6 ± 0.04	35.6	
Delphinidin 3-O-glucoside	13.4 ± 0.00	14.0 ± 0.68	-4.5		12.7 ± 0.03	12.5 ± 0.02	1.6		11.5 ± 0.04	9.4 ± 0.12	18.3	
Cyanidin	1.9 ± 0.01	7.1 ± 1.10			0.6 ± 0.02	1.5 ± 0.01			4.4 ± 0.05	13.5 ± 0.07		
Cyanidin 3-O-arabinoside	5.7 ± 0.06	2.2 ± 0.15	61.4		6.6 ± 0.03	6.2 ± 0.04	6.1		5.7 ± 0.22	2.3 ± 0.03	59.6	
Cyanidin 3-O-galactoside	7.8 ± 0.05	5.0 ± 0.14	35.9		8.8 ± 0.03	8.5 ± 0.03	3.4		8.8 ± 0.16	4.9 ± 0.19	44.3	
Cyanidin 3-O-glucoside	9.4 ± 0.04	9.0 ± 0.30	4.3		9.3 ± 0.03	9.1 ± 0.02	2.2		8.8 ± 0.03	6.8 ± 0.08	22.7	
Petunidin	1.0 ± 0.05	3.1 ± 0.73			0.2 ± 0.01	0.6 ± 0.01			1.5 ± 0.12	5.0 ± 0.15		
Petunidin 3-O-arabinoside	2.4 ± 0.03	1.6 ± 0.18	33.3		2.6 ± 0.02	2.4 ± 0.05	7.7		2.2 ± 0.12	1.1 ± 0.32	50.0	
Petunidin 3-O-galactoside	3.9 ± 0.01	3.5 ± 0.32	10.3		4.0 ± 0.04	3.8 ± 0.04	5.0		3.5 ± 0.08	2.1 ± 0.01	40.0	
Petunidin 3-O-glucoside	8.3 ± 0.02	8.9 ± 0.54	-7.2		8.1 ± 0.04	8.0 ± 0.01	1.2		7.4 ± 0.03	6.0 ± 0.04	18.9	
Peonidin	0.3 ± 0.01	0.9 ± 0.17			0.1 ± 0.00	0.3 ± 0.00			0.7 ± 0.07	2.1 ± 0.03		
Peonidin 3-O-arabinoside	0.4 ± 0.02	0.2 ± 0.04	50.0		0.5 ± 0.00	0.4 ± 0.01	20.0		0.4 ± 0.01	0.2 ± 0.04	50.0	
Peonidin 3-O-galactoside	3.0 ± 0.09	N.D.	N.A.		1.0 ± 0.03	0.9 ± 0.01	10.0		5.7 ± 0.38	N.D.	N.A.	
Peonidin 3-O-glucoside	3.3 ± 0.06	3.2 ± 0.20	3.0		4.1 ± 0.04	4.0 ± 0.00	2.4		3.6 ± 0.05	2.4 ± 0.04	33.3	
Malvidin	0.7 ± 0.01	2.7 ± 0.49			0.3 ± 0.00	0.7 ± 0.01			1.8 ± 0.01	5.1 ± 0.05		
Malvidin 3-O-arabinoside	1.6 ± 0.03	0.5 ± 0.05	68.8		2.0 ± 0.02	1.9 ± 0.02	5.0		1.5 ± 0.07	0.7 ± 0.07	53.3	
Malvidin 3-O-galactoside	3.3 ± 0.03	2.3 ± 0.03	30.3		3.3 ± 0.04	3.2 ± 0.01	3.0		3.2 ± 0.06	1.7 ± 0.07	46.9	
Malvidin 3-O-glucoside	7.9 ± 0.01	6.0 ± 0.05	24.1		8.7 ± 0.03	8.4 ± 0.01	3.4		7.7 ± 0.11	5.9 ± 0.10	23.4	
Degradation Index	16.1	240.0			9.2	20.6			31.1	381.8		
Absolute content by UHPLC (wt%)	11.2±0.5	7.1±1.0			13.5±0.2	13.4±0.1			2.8±0.0	2.3±0.0		
Anthocyanidin content by spectrophotometric method (wt%)	7.1±0.2	6.1±0.1			7.5±0.4	7.4±0.1			1.9±0.0	1.9±0.0		

Degradation Index: (% area of delphinidin + % area of cyanidin) / (% area of delphinidin 3-O-arabinoside + % area of cyanidin 3-O-arabinoside) × 100
 Percent decrease: (1 - % area of heat treatment / % area of non-treatment) × 100
 Results are presented as mean ± standard deviation (n=3), N.D.; not detected, N.A.; not applicable

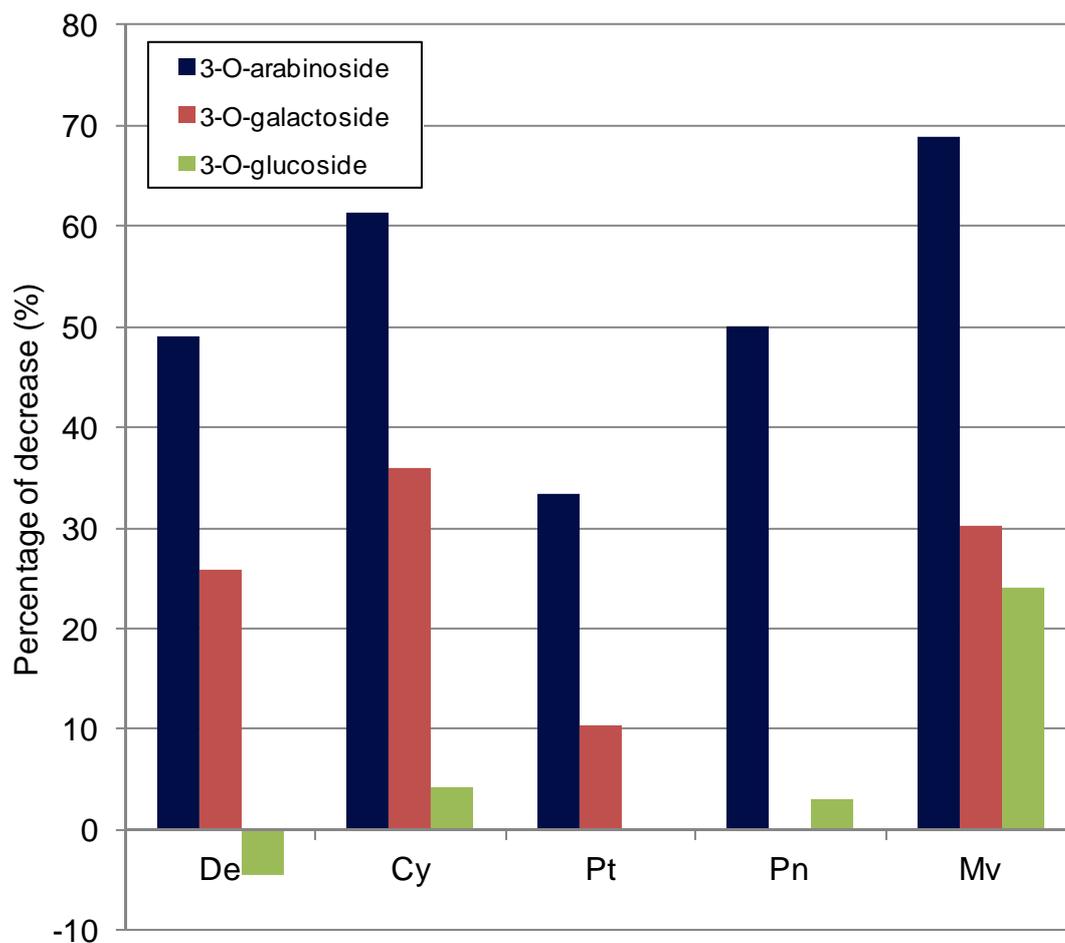


Fig.25 Percentage of decrease of anthocyanin glycosides after heat treatment about sample I
 Dp: delphinidin, Cy: cyanidin, Pt: petunidin, Pn: peonidin, and Mv: malvidin

第 2 節 Degradation Index の創出

2.1 方法

(1) 試料

- 1) ビルベリー(果実, 株式会社常盤植物化学研究所より供与)
- 2) 「第 3 章 第 1 節 1.1 方法 (1)試料及び試薬」に示した 20 種のサプリメント

(2) 前処理法, 分析条件及び濃度の算出方法

「第 3 章 第 3 節 3.1 方法 (2)前処理法」「第 3 章 第 2 節 2.1 方法 (2)分析条件」及び「第 3 章 第 3 節 3.1 方法 (4)濃度の算出方法」にて実施した値を基に解析を行った。

2.2 結果

Fig.26 に, Bilberon-25 のアントシアニン及びアントシアニジンのピーク面積百分率(% Area)を示した。delphinidin と 3 種の配糖体(arabinoside, galactoside 及び glucoside) のピーク面積百分率は, それぞれ 0.6%, 11.0%, 13.1% 及び 11.5% であり, 合計 36.2% であった。同様に, cyanidin と 3 種の配糖体のピーク面積百分率の合計は 27.7%, petunidin と 3 種の配糖体のピーク面積百分率の合計は 15.1%, peonidin と 3 種の配糖体の配糖体のピーク面積百分率の合計は 6.3%, malvidin と 3 種の配糖体の配糖体のピーク面積百分率の合計は 14.6% であった。

delphinidin 及び cyanidin とその 3 種の配糖体のピーク面積百分率の合計は 63.9% であり, petunidin, peonidin 及び malvidin とその 3 種の配糖体のピーク面積百分率の合計は 36.1% であった。Bilberon-25 には delphinidin とその配糖体及び cyanidin とその配糖体は, 他の 3 種のアントシアニジン(petunidin, peonidin 及び malvidin)とその配糖体と比較して多く含まれていた。

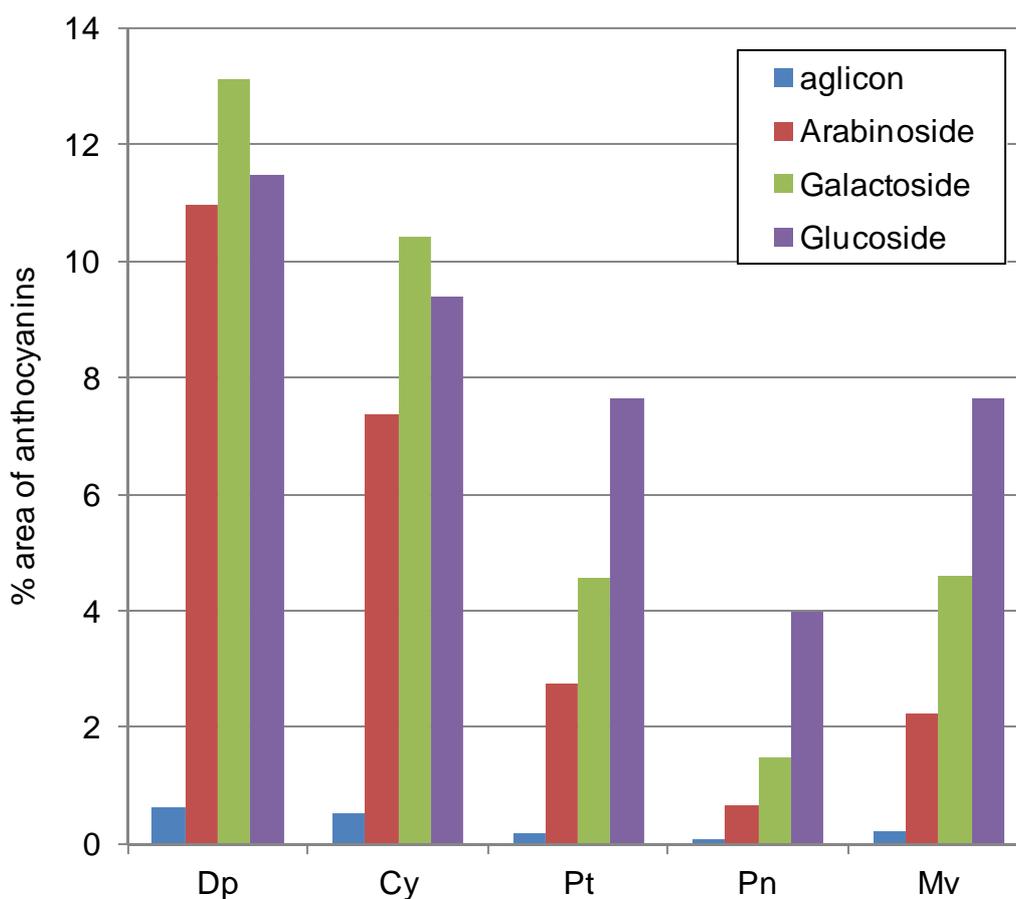


Fig.26 Peak area percentage of anthocyanins in bilberon-25 using UHPLC
 Dp: delphinidin, Cy: cyanidin, Pt: petunidin, Pn: peonidin, and Mv: malvidin

以上より(1)及び(2)に示した点を考慮し、アントシアニンの劣化の指標として Degradation Index (以下, DI)を定義した。

- (1) arabinoside 配糖体が, galactoside 配糖体及び glucoside 配糖体と比較して, 熱に対する感受性が高いこと(本章第 1 節).
- (2) delphinidin とその配糖体及び cyanidin とその配糖体は, 他の 3 種のアントシアニン(petunidin, peonidin 及び malvidin)とその配糖体と比較して多く含まれていること.

$$DI = \frac{\% \text{ Area of Delphinidin} + \% \text{ Area of Cyanidin}}{\% \text{ Area of Delphinidin 3-O-arabinoside} + \% \text{ Area of Cyanidin 3-O-arabinoside}} \times 100$$

第3章 第3節において、20種の市販ブルーベリー含有サプリメントを分析した。そこで得られた各サプリメント中のアントシアニジンの含量(wt%)とDIとの回帰直線を Fig.27 に示した。DI とアントシアニジンの含量(wt%)の回帰直線は、原点を通過し、相関係数は $R^2=0.984$ であった。

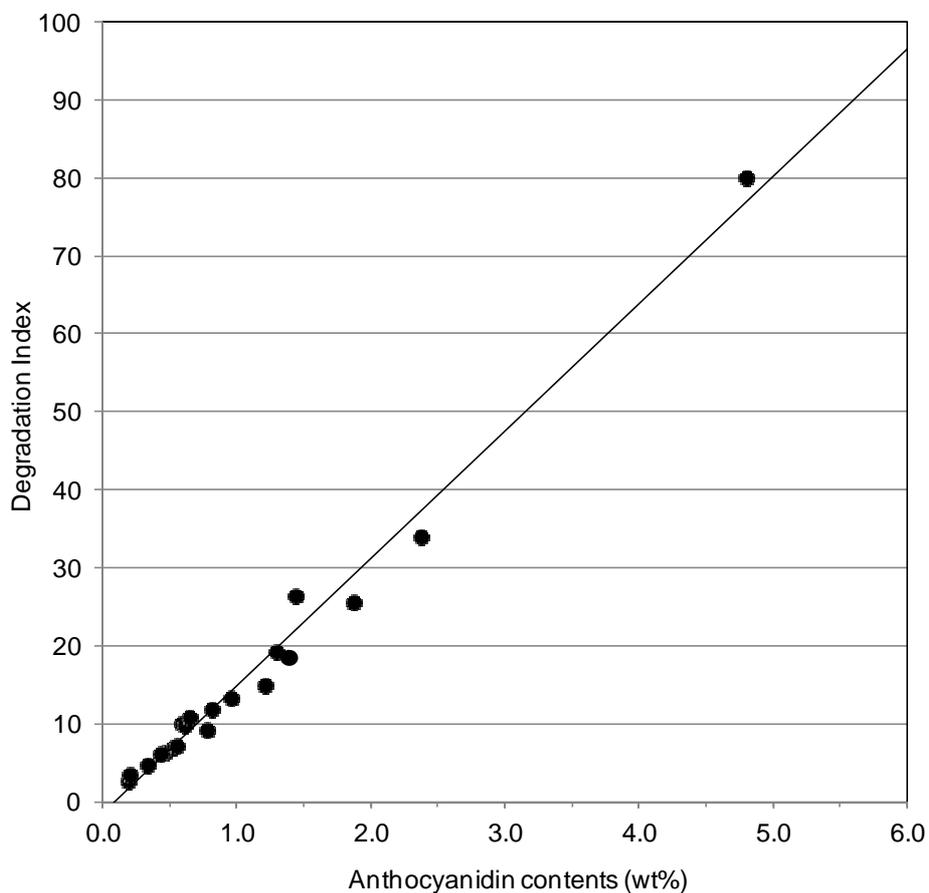


Fig.27 Relationship between DI and anthocyanidin contents

第1節において、3種の市販ビルベリー含有サプリメントの熱に対する安定性を検討した。Fig.28に3種のサプリメントの熱処理前後のDIを示した。サンプルIのDIは熱処理により16.1から240.0に、サンプルLは9.2から20.6に、サンプルNは31.1から381.8にそれぞれ顕著に増加した。

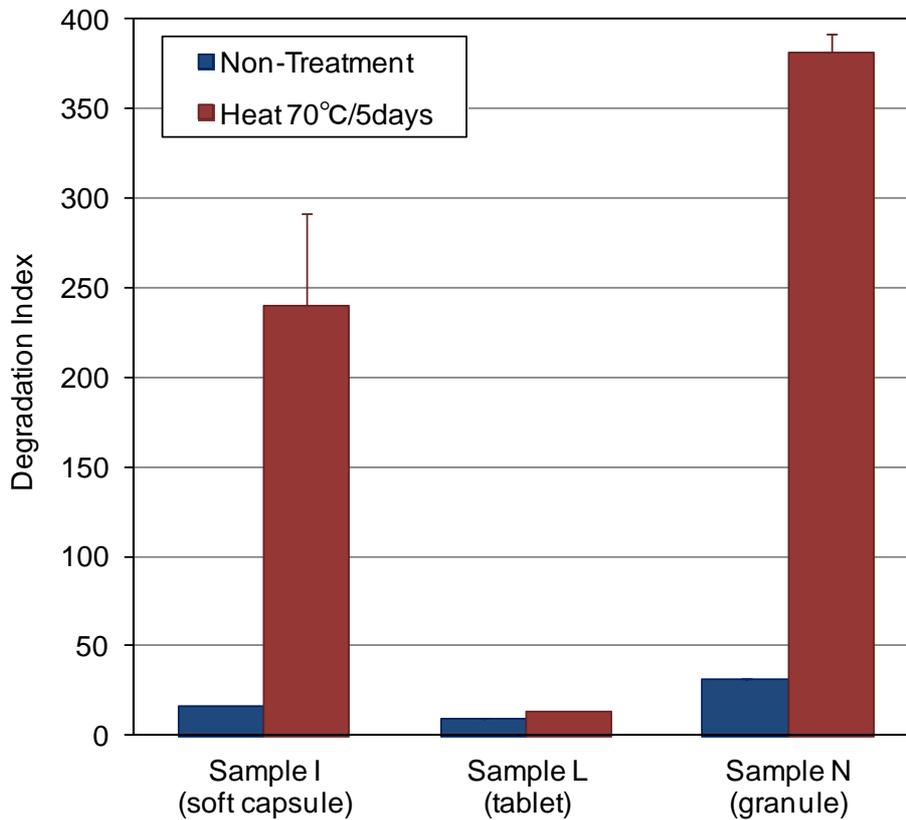


Fig.28 DI of commercial supplements before and after heat treatment
Results are expressed as mean±S.D. (n=3).

Fig.29 に 20 種の市販ビルベリー含有サプリメントの DI を示した. Table 5 に UHPLC 法による 20 種の市販ビルベリー含有サプリメントのピーク面積百分率(% Area)及び UHPLC 法及び比色法による 20 種の市販ビルベリー含有サプリメントの含量(wt%)を示した. Bilberon-25 の DI の 3 倍の値を超えるサンプルは, 20 種中 5 種(サンプル F, J, M, N 及び T)であった. なお, Bilberon-25 の DI の 3 倍の値を選択した理由として, USP 及び EP ではアントシアニン 1.0%を規格に定めており, アントシアニン 1.0%に相当する DI(16.4)が, およそ Bilberon-25 の DI の 3 倍の値(18.9)であったことより設定した. サンプル F, J, M, N 及び T の DI はそれぞれ 19.1, 25.6, 80.0, 33.9 及び 19.8 であった. サンプル D の UHPLC クロマトグラムにおいて, 4 本のピークが認められた. 4 ピークのうち 2 ピークは, 保持時間より delphinidin 3-glucoside 及び cyanidin 3-glucoside であることが分かったが, 残りの 2 ピークは不明であった.

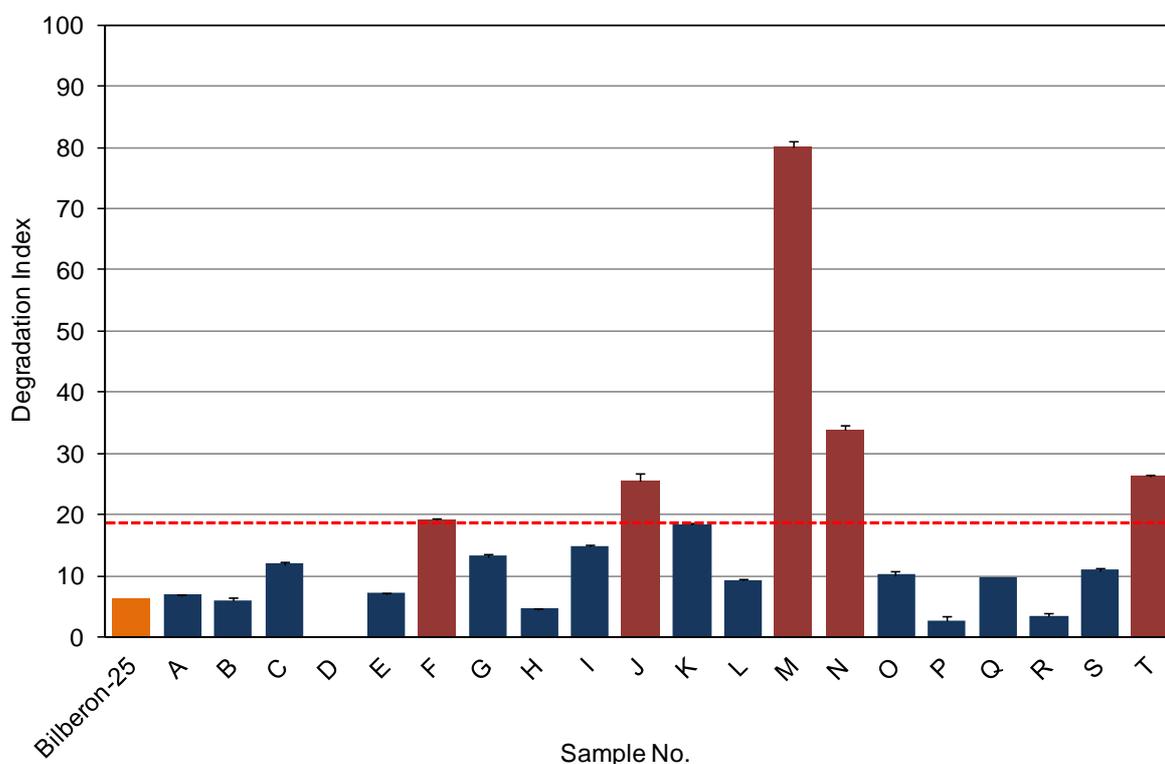


Fig.29 DI of 20 commercial supplements and Bilberon-25

Dashed line represents 29 mg as the minimum recommended dosage of anthocyanins by the JHFA. Results are expressed as mean±S.D. (n=3).

Table 5 Anthocyanin content of commercial supplements measured by UHPLC

Anthocyanin	Anthocyanin contents in supplements (% area)																					
	Bilberon-25	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	
Delphinidin	0.6	0.7	0.6	1.2	0.4	0.7	2.0	1.4	0.5	0.7	2.4	2.0	1.2	6.9	2.5	0.9	0.5	1.1	1.2	1.0	1.1	
Delphinidin 3-O-arabinoside	11.0	12.0	11.1	11.4	N.D.	10.7	11.3	12.0	11.2	10.5	11.3	11.9	14.1	9.1	10.5	11.2	13.4	12.0	10.2	12.9	10.0	
Delphinidin 3-O-galactoside	13.1	12.4	12.7	13.6	N.D.	11.5	14.2	13.4	13.0	13.8	13.8	13.7	12.9	10.5	13.1	12.9	15.5	13.9	12.1	13.8	12.6	
Delphinidin 3-O-glucoside	11.5	12.9	11.6	13.6	11.4	12.1	13.6	12.9	13.6	13.8	14.0	13.5	13.7	12.9	12.3	13.6	14.9	12.9	12.9	13.8	12.5	
Cyanidin	0.5	0.6	0.5	0.9	0.5	0.6	1.3	1.0	0.3	1.7	2.1	1.4	0.8	4.7	3.3	0.6	N.D.	0.7	0.3	0.8	1.6	
Cyanidin 3-O-arabinoside	7.4	6.7	7.3	6.5	N.D.	7.0	6.4	6.9	7.2	5.7	6.3	6.8	7.5	5.4	6.6	3.9	7.0	3.9	4.1	7.5	3.6	
Cyanidin 3-O-galactoside	10.4	8.8	9.6	8.4	N.D.	9.2	8.3	8.3	9.3	7.9	8.5	8.8	8.6	6.2	9.5	8.8	8.9	9.7	9.1	8.7	9.5	
Cyanidin 3-O-glucoside	9.4	9.3	10.4	10.0	16.1	9.5	9.2	9.4	9.8	9.5	8.8	9.2	9.3	10.7	9.3	9.8	9.1	9.4	9.6	9.3	9.8	
Petunidin	0.2	0.2	0.1	0.3	N.D.	0.2	0.5	0.4	0.1	1.1	0.9	0.5	0.3	2.1	0.8	0.2	N.D.	0.2	N.D.	0.1	0.6	
Petunidin 3-O-arabinoside	2.7	2.6	2.7	2.6	0.8	2.7	2.5	2.8	2.7	2.3	2.2	2.6	2.6	2.1	2.1	2.6	2.6	2.7	2.7	2.7	2.4	
Petunidin 3-O-galactoside	4.6	3.9	4.1	4.0	N.D.	4.0	3.9	8.4	8.7	3.9	3.7	3.7	3.3	3.1	3.7	6.8	3.8	7.5	7.0	3.6	6.8	
Petunidin 3-O-glucoside	7.6	8.1	8.0	8.7	N.D.	8.4	8.2	8.4	8.7	8.6	8.2	8.1	7.7	8.0	7.8	8.9	8.6	7.9	8.9	8.1	8.0	
Peonidin	0.1	0.1	0.1	0.1	N.D.	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.7	0.5	0.1	N.D.	0.1	0.1	0.1	0.3	
Peonidin 3-O-arabinoside	0.7	0.4	0.5	0.4	N.D.	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	N.D.	0.4	N.D.	0.5	0.5	0.3	0.4	
Peonidin 3-O-galactoside	1.5	1.1	1.2	0.9	N.D.	1.2	0.9	0.9	1.0	2.7	N.D.	0.8	0.8	N.D.	N.D.	0.9	0.5	1.1	1.2	0.8	1.1	
Peonidin 3-O-glucoside	4.0	4.0	4.1	3.4	0.5	4.5	3.3	3.5	3.8	3.4	3.1	3.3	3.2	3.4	3.7	3.8	3.0	3.5	4.5	3.2	4.1	
Malvidin	0.2	0.3	0.2	0.3	0.7	0.3	0.5	0.3	0.2	0.7	0.9	0.5	0.3	1.8	1.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.6	
Malvidin 3-O-arabinoside	2.2	2.0	2.1	1.8	N.D.	2.2	1.7	1.9	1.9	1.4	1.6	1.6	1.6	1.3	1.5	1.8	1.4	1.8	2.2	1.7	1.8	
Malvidin 3-O-galactoside	4.6	3.4	3.5	3.2	N.D.	3.7	3.2	3.2	3.0	3.4	3.3	3.0	2.7	2.8	3.3	3.2	2.8	3.2	3.8	3.0	3.0	
Malvidin 3-O-glucoside	7.6	8.6	8.5	8.2	0.4	9.4	7.7	8.0	8.5	7.7	7.7	7.6	7.0	6.8	8.1	8.6	7.8	7.3	9.6	7.5	8.3	
Unknown Peak 6.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	37.2	N.D.																
Unknown Peak 8.5	N.D.	1.3	N.D.	N.D.	30.1	0.7	0.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.4	N.D.								
Degradation Index	6.3	6.8	6.0	11.9	N.A.	7.0	19.1	13.2	4.5	14.8	25.6	18.4	9.2	80.0	33.9	10.2	2.6	10.9	10.1	8.8	19.8	

Results are presented as means of three measurements.

Degradation index: (% area of delphinidin + % area of cyanidin) / (% area of delphinidin 3-O-arabinoside + % area of cyanidin 3-O-arabinoside) × 100
 N.D.; not detected, N.A.; not applicable

考察

第1節において、比色法による3種の市販ブルーベリー含有サプリメントの熱処理前後の含量(wt%)を測定した。第3章の考察で述べたように、比色法では、方法にある加熱操作によりアントシアニンがアントシアニジンに分解して測定するため、サンプル中のアントシアニンがどの程度分解したかについては原理上測定することは不可能である。したがって、比色法を用いた場合、熱処理前後でアントシアニンの含量は変化しないと推察される。実際に、サンプルL及びサンプルNの含量に変化は認められなかった。一方、サンプルIについては、未処理では7.1%、加熱後では6.1%と含量の減少が認められた。UHPLC法にて、未処理及び熱処理後のサンプルIを測定したところ、280 nmにて分解物と思われるピークの増加が認められた(Data not shown)。比色法では530 nm付近の λ_{max} の吸光度より含量を求めているため、280 nm付近で吸収のある分解物は含量に反映されない。したがって、サンプルIの含量が7.1%から6.1%に減少した原因として、本分解物の生成が一因として考えられた。

UHPLC法によるピーク面積百分率の減少率(%)は、delphinidin 3-O-galactoside及びdelphinidin 3-O-glucosideと比較して、delphinidin 3-O-arabinosideの減少率が最も大きかった。このため、arabinoside配糖体はgalactoside配糖体及びglucoside配糖体と比較して熱に対する感受性が高いと考えられた。アントシアニンの分解メカニズムに関して、糖とアントシアニジンの結合の加水分解がアントシアニンの分解の第一ステップであるとの報告^{80,81)}がある。アントシアニンは、加熱により対応するアントシアニジンに分解する⁸⁴⁾。Martinelliら⁹⁷⁾は、*Vaccinium myrtillus* extractを用いた試験で、各配糖体の安定性についてglucosides>galactosides>arabinosideの順で安定であると述べている。また、Yueら⁸⁴⁾は、arabinosidesの活性化エネルギーは、galactosides及びglucosidesの活性化エネルギーよりも低いことを報告している。これらの報告は、arabinoside配糖体が熱に対して高感受性であることを支持するものである。

第2節において、arabinoside配糖体の熱に対する高感受性、cyanidin及びdelphinidinがpeonidin、petunidin及びmalvidinよりも含量が高いことより、ビルベリーアントシアニンの劣化の指標としてDIを定義した。第3章第3節において評価した20種の市販ブルーベリー含有サプリメント中のアントシアニジンの含量(wt%)とDIの回帰直線は、原点を通過し、その相関係数は $R^2=0.984$ と良好な相関を示した。また、第1節において検討した3種のサプリメントの熱処理前後のデータよりDIを算出したところ、サンプルIのDIは熱処理により16.1から240.0に、サンプルLは9.2から20.6に、サンプルNは31.1から381.8にそれぞれ顕著に増加した。このため、DIはアントシアニジンの含量(wt%)を反映し、アントシアニンの劣化の指標として適したパラメータであると考えられた。さらに、UHPLC法での結果(Table 4)を見ると、サンプルI(ソフトカプセル)及びサンプルN(顆粒)のcyanidin 3-O-arabinoside及びdelphinidin 3-O-arabinosideは、サンプルL(錠剤)と比較して顕著に分解していた。すなわち、錠剤

中のアントシアニン、ソフトカプセルや顆粒と比較して安定であった。そのため、アントシアニンの熱に対する安定性は、保存温度のみならず剤形や賦形剤にも影響されることが示唆された。

一方、UHPLCにて測定したサンプルIの含量(wt%)は、熱処理によって11.2%から7.1%に減少した。熱処理により、アントシアニンより糖が外れてアントシアニジンが生成される。すなわち、アントシアニンの分子量がアントシアニジンの分子量に減少する。例えば、delphinidin 3-*O*-arabinoside (M.W. 435)から delphinidin (M.W. 303)が生成する。この分子量の減少のため、含量(wt%)が低下すると考えられた。一方、サンプルL及びサンプルNの含量(wt%)は、サンプルIと比較して顕著な変化は見られなかった。このため、UHPLC法での含量(wt%)のみからは、アントシアニンの分解を検出することは困難であると思われた。

サプリメントに期待する効果は、アントシアニンの組成により影響を受ける。このアントシアニンの組成は、苛酷な外部環境、例えば真夏の車内に放置された状況等により影響される。近年の東京の猛暑日(最高気温が35度以上)の日数は、2011年では4日間、2012年では6日間であり、炎天下に駐車しているときの車内の温度は60°C、ダッシュボードは80°Cくらいまで上昇する。このような苛酷な環境下にサプリメントを放置した場合、アントシアニンがアントシアニジンに分解して、サプリメントは劣化する。消費者は、このような劣化したサプリメントを摂取したとしても、期待した効果を得ることはできない可能性がある。消費者は、ビルベリー含有サプリメントをどのように保存すべきか把握しているとは考えにくく、消費者が劣化したサプリメントを摂取しないために、メーカーは製品のラベルに保存条件等の温度管理情報を記載すべきと思われる。

サンプルDのラベルには、カシス及びブルーベリーエキスが含有されているとの記載がある。Nakajimaら¹¹¹⁾は、様々なベリー類のアントシアニンのプロファイルを調べており、カシスには delphinidin 3-*O*-glucoside, cyanidin 3-*O*-glucoside, delphinidin 3-*O*-rutinoside 及び cyanidin 3-*O*-rutinoside が含まれていることを報告している。この報告より、第2節の結果にて不明であった2ピークは、delphinidin 3-*O*-rutinoside 及び cyanidin 3-*O*-rutinoside であることが示唆された(Fig.30)。サンプルDには、ラベルに記載されているようにカシスが含まれていたが、他のブルーベリーエキスの成分は確認できなかった。したがって、サンプルDのラベルには記載に誤りがあることが分かった。

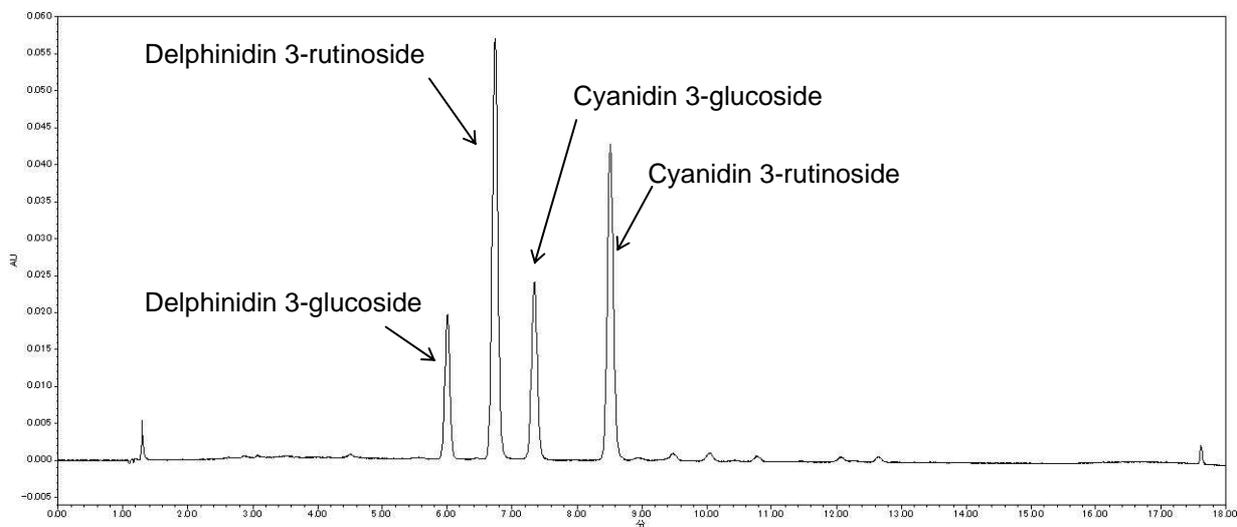


Fig.30 Chromatogram of sample D using UHPLC

第3章において、サプリメントの製造工程や輸送、保存中に、アントシアニンが分解することによりアントシアニジンが生成することを述べた。サプリメント中にアントシアニジンが多量に含まれている場合、アントシアニンがアントシアニジンに分解した可能性が考えられる。従来、USP及びEPでは、このような劣化を検出するために、HPLC法によりすべてのピーク面積を算出し、cyanidin標準品のピーク面積からアントシアニジンの含量(wt%)を求めて判定していた。この方法は、すべてのピーク面積を算出する手間を要する上にcyanidin標準品が必要であり、さらに規格値の1.0%付近で比較を行うために感度が低い。一方、本章で提案したDIは、delphinidin 3-O-arabinoside, cyanidin 3-O-arabinoside, delphinidin及びcyanidinの4化合物のピーク面積が分かれば、どの程度劣化しているかを簡便に評価できる。また、アントシアニジンの含量(wt%)と比較して10倍以上感度が高いといった利点がある。DIを用いて20種のサプリメントを評価すると、Bilberon-25のDIの3倍の値を超えるサンプルは、20種中5種(サンプルF, J, M, N及びT)であった。これらの5種は、いずれも第3章第3節で述べたアントシアニジン含量(wt%)1.0%を超えるものであった。以上より、DIはビルベリー含有サプリメントの品質評価のための有用な指標であると考えられ、DIを品質管理面で使用することにより、消費者へより良い品質のサプリメントが提供できることが期待された。

小括

- サプリメントを熱処理することにより、サプリメント中のアントシアニンが減少し、アントシアニジンが増加した。高温でサプリメントが劣化することを確認した。
- 従来法(比色法)では検出できなかった劣化について、新たな指標として **Degradation Index(DI)**を創出した。DIは、アントシアニジン含量(wt%)と良い相関を示し、迅速かつ簡便に劣化の評価が可能であることから、劣化に対する品質管理指標として有用と思われた、
- サプリメント 20 種中 5 種において、**Bilberon-25** の DI 値の 3 倍量を超え、劣化したサプリメントが市場に流通していることが確認された。これらのサプリメントが、製造から保存に至るどの過程で劣化したかは不明であるが、高温で劣化することが明らかであるため、製品ラベルに保存条件等の温度管理情報が必要と思われた。

総括

ビルベリーアントシアニンの特徴と規制の現状を考えると、果たして消費者に一定品質のサプリメントが届けられているのかという疑問が生じる。この疑問を解決することを本研究の目的とした。

第1章では、アントシアニンの新たな薬理作用探索の一環として、アトピー性皮膚炎をはじめとする慢性掻痒性疾患に対するビルベリーエキスの抗掻痒作用を検討した。ビルベリー果実より抽出したビルベリーエキスである **Bilberon-25** をマウスに経口投与すると、アントシアニンは速やかに血液及び皮膚に分布することを確認した。**Bilberon-25** は、マウス急性皮膚炎モデル及び慢性アレルギー性皮膚炎モデルで抗掻痒作用を示し、ビルベリーエキスの新たな作用として、慢性アレルギー性皮膚炎に対する抗掻痒作用が見出された。

第2章では、アントシアニンは高温でアントシアニンからアントシアニンジンへ分解するため、アントシアニンとアントシアニジンのいずれが抗掻痒作用において主要な効果を発揮するのかに関し、慢性アレルギー性皮膚炎モデルを用いて検討した。**Bilberon-25** を熱処理すると、アントシアニンは減少し、アントシアニンジンが増加することを確認した。このように劣化した **Bilberon-25** を慢性アレルギー性皮膚炎モデルで検討したところ、未処理 **Bilberon-25** は抗掻痒作用を示したが、劣化した **Bilberon-25** は本作用を示さなかった。ラット培養細胞を用いた *in vitro* 試験で、未処理の **Bilberon-25** は脱顆粒反応を抑制したが、劣化した **Bilberon-25** は抑制しなかった。以上より、アントシアニンではなく、アントシアニンがマスト細胞の脱顆粒反応の抑制を介して抗掻痒作用を示すことが示唆された。

第3章では、消費者が摂取するビルベリー含有サプリメントに焦点を当てた。ビルベリーエキスは、海外数カ国では医薬品として承認されているが、日本やアメリカでは健康食品として分類されるため規制は緩く、劣化品の流通も懸念される。そこで、サプリメントの用法に基づいたアントシアニン摂取量の実態を調査した。サプリメントの原料となるビルベリー果実及びビルベリーエキスには、アントシアニンジンがほとんど含まれていなかったが、市販のサプリメントは20種中8種においてアントシアニジンを1.0%以上含んでいた。この結果は、サプリメントの製造工程、輸送及び保存中にアントシアニンからアントシアニンジンに分解したことを意味しており、消費者がアントシアニジンを多く含む劣化したサプリメントを摂取しているリスクが示された。また、アントシアニンの1日摂取量はサプリメントにより約66倍と大きく異なり、アントシアニンの含量は20種中6種で1日摂取推奨量に満たなかった。この結果は、消費者がラベルに記載された用法に従って摂取したとしても、常に一定量の有効成分を摂取できていないことを示唆している。

第4章では、アントシアニンの劣化度を適切に評価する新たな品質評価指標の創出を検討した。3種の異なる剤形のサプリメントを熱処理すると、サプリメント中のア

ントシアニンが減少し、アントシアニジンが増加し、高温でサプリメントが劣化することを確認した。これら安定性の結果に基づき、ビルベリーアントシアニンの劣化の指標として Degradation Index (DI)を定義した。DIは、アントシアニジン含量(wt%)と良い相関を示し、DIにより従来 of 比色法では検出できなかったアントシアニンの劣化度を迅速かつ簡便に検出することが可能であった。

消費者に一定品質のアントシアニン含有サプリメントが届けられているのかという序章で発した疑問に対して、必ずしも消費者に一定品質のものが届けられてはいなかったというのが結論である。消費者は、市販ビルベリー含有サプリメントのラベルに記載の用法のみを頼りに摂取しても、一定のアントシアニンを摂取することは困難と思われた。この課題を克服するために規制当局と業界に対して提案を行いたい。

規制当局に対する提案として、ラベル表示の新たなルール作りが必要と思われる。具体的には、サプリメントのラベルに、アントシアニン、アントシアニジンあるいはブルーベリーエキスの記載が混在している現状から、アントシアニンへ記載を統一し、さらにアントシアニンの含有量を記載すべきである。健康増進法では、効果についての虚偽や誇大表示を禁止しているが、アントシアニン含有サプリメントであるため、アントシアニンの含有量は規定すべきと思われる。また、アントシアニンは高温でアントシアニジンに分解されるため、温度管理情報についても記載すべきと思われた。

メーカー及び業界に対する提案として、原理の異なる試験法(比色法及び HPLC 法)を個別定量可能な HPLC 法へ統一すべきである。少なくとも比色法より得られた結果からは、アントシアニンの劣化度が不明であり、比色法は規格試験法としては適切ではない。また、迅速かつ簡便に劣化の評価が可能な DI を品質管理で利用することにより、消費者へより良い品質のビルベリー含有サプリメントを提供できると思われる。

昨今の安全性の議論にはじまる法規制の運用強化への傾向、そして新製品の開発難とヒット商品のブームの終焉、健康食品業界に大きな責任と困難な課題が目前に迫る中、市場に以前のような勢いは見られない。その一方、今後の日本社会は、さらに高齢化が進むことに疑問の余地は無く、75歳以上の人の全人口に占める構成割合は現在の11.5%から2050年には25%と倍増し、4人に1人は75歳以上になると予測されている¹¹²⁾。また、国民医療費も2009年には36兆円を超えて2025年には104兆円になり、対所得比も11%から17%^{112),113)}に増加するとの試算もあり、国民生活への負担も多大になる。このままいくと、国の医療財政は破綻し、医療サービス制度が立ち行かなくなる。健康の維持と病気の予防は、消費者のみならず、行政からも切望されており、健康食品産業は医療業界をサポートするといった意味からもこの期待に応えていく社会的責任がある。そのためには、企業はコンプライアンス重視の立場から、ただ法規制を守れば良いというのではなく、より良いシステムにするために積極的に消費者の立場から社会に意見を発信していく姿勢が不可欠と考える。そして行政と業界が互いに協力して、日本が世界に自信の持てる制度を構築していくことを強く希望する。

参考文献

- 1) Nutritional Supplements in the U.S., 5th Edition. 2012.
- 2) Yano Research Institute Ltd. 2011.(2011.10.19)
- 3) 野村総合研究所 第 151 回 NRI メディアフォーラム(2011.05.31)
- 4) 健康食品新聞(2012.10.03) 食品化学新聞社ホームページ
<https://www.foodchemicalnews.co.jp/page/toppage.html>
- 5) Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. Trends Food Sci Technol 16:423-8.
- 6) He J, Giusti MM. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. Annu Rev Food Sci Technol 1:163-87.
- 7) Andersen ØM, Markham KR. 2006. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor and Francis.
- 8) Burdulis D, Sarkinas A, Jasutienė I, Stackevičienė E, Nikolajevs L, Janulis V. 2009. Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. Acta Pol Pharm 66:399-408.
- 9) Kalt W, McDonald JE, Ricker RD, Lu X. 1999. Anthocyanin content and profile within and among blueberry species. Can J Plant Sci 79:617-23.
- 10) Jayle GE, Aubert L. 1964. Action of anthocyanin glycosides on the scotopic and mesopic vision of the normal subject. Therapie 19:171-85.
- 11) Wilson T, Meyers SL, Singh AP, Limburg PJ, Vorsa N. 2008. Favorable glycemic response of type 2 diabetics to low-calorie cranberry juice. J Food Sci 73:H241-5.
- 12) Suzuki R, Tanaka M, Takanashi M, Hussain A, Yuan B, Toyoda H, Kuroda M. 2011. Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. Nutr Metab 8:14.
- 13) Kim SJ, Lee HJ, Kim BS, Lee D, Lee SJ, Yoo SH, Chang HI. 2011. Antiulcer activity of anthocyanins from *Rubus coreanus* via association with regulation of the activity of matrix metalloproteinase-2. J Agric Food Chem 59:11786-93.
- 14) Dohadwala MM, Holbrook M, Hamburg NM, Shenouda SM, Chung WB, Titas M, Kluge MA, Wang N, Palmisano J, Milbury PE, Blumberg JB, Vita JA. 2011. Effects of cranberry juice consumption on vascular function in patients with coronary artery disease. Am J Clin Nutr 93:934-40.
- 15) Herrera-Arellano A, Miranda-Sánchez J, Avila-Castro P, Herrera-Alvarez S, Jiménez-Ferrer JE, Zamilpa A, Román-Ramos R, Ponce-Monter H, Tortoriello J. 2007. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. Planta Med 73:6-12.
- 16) Wang LS, Stoner GD. 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Lett 269:281-90.
- 17) Hertog MG, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. 1993. Intake of potentially

- anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr Cancer* 20:21-9.
- 18) Lai YS, Hsu WH, Huang JJ, Wu SC. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effects of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) extracts on hydrogen peroxide- and lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages. *Food Funct* 3:1294-301.
- 19) Yang Y, Shi Z, Rehemani A, Jin JW, Li C, Wang Y, Andrews MC, Chen P, Zhu G, Ling W, Ni H. 2012. Plant food delphinidin-3-glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: novel protective roles against cardiovascular diseases. *PLoS One* 7: e37323 .
- 20) Shih PH, Chan YC, Liao JW, Wang MF, Yen GC. 2010. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 21:598-605.
- 21) Nakaishi H, Matsumoto H, Tominaga S, Hirayama M. 2000. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. *Altern Med Rev* 5:553-62.
- 22) Ghosh D, Konishi T. 2007. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr* 16:200-208.
- 23) Muth ER, Laurent JM, OD, Jasper P. 2000. The effect of bilberry nutritional supplementation on night visual acuity and contrast sensitivity. *Altern Med Rev* 5:164-173.
- 24) Ohguro H, Ohguro I, Katai M, Tanaka S. 2012. Two-year randomized, placebo-controlled study of black currant anthocyanins on visual field in glaucoma. *Ophthalmologica* 228:26-35.
- 25) Araceli CO, Ma de Lourdes PH, Ma Elena PH, José AR, Carlos Andrés GV. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem* 113:859-71.
- 26) Han SJ, Ryu SN, Trinh HT, Joh EH, Jang SY, Han MJ, Kim DH. 2009. Metabolism of cyanidin-3-O-beta-D-glucoside isolated from black colored rice and its antiscratching behavioral effect in mice. *J Food Sci* 74:H253-8.
- 27) Deckers IA, McLean S, Linssen S, Mommers M, van Schayck CP, Sheikh A. 2012. Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies. *PLoS One* 7:e39803.
- 28) Kim MJ, Choung SY. 2012. Mixture of polyphenols and anthocyanins from *Vaccinium uliginosum* L. alleviates DNCB-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Evid Based Complement Alternat Med*(in press)
- 29) Sugiura H, Umemoto N, Deguchi H, Murata Y, Tanaka K, Sawai T, Omoto M, Uchiyama M, Kiriya T, Uehara M. 1998. Prevalence of childhood and adolescent atopic dermatitis in a Japanese population: comparison with the disease frequency examined 20 years ago. *Acta Derm Venereol* 78:293-4.
- 30) 日本皮膚科学会学術委員会「アトピー性皮膚炎ワーキンググループ」編. 1994. ア

- トピー性皮膚炎の定義・診断基準. 日本皮膚科学会誌 104:68-9.
- 31)Rothman S. 1941. Physiology of itching. *Physiol Rev* 21:357-81.
- 32)日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン作成委員会. 2009. アトピー性皮膚炎診療ガイドライン. 日本皮膚科学会誌 119:1515-34.
- 33)Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. 1995. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesciogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol.* 275:229-33.
- 34)Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 9:461-6.
- 35)Inagaki N, Nagai H. 2009. Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment:mouse models for the development of remedies for human allergic dermatitis. *J Pharmacol Sci* 110:251-9.
- 36)Lee SJ, Oh SG, Seo SW, Ahn HJ, Geum D, Cho JJ, Park CS. 2007. Oral administration of *Astragalus membranaceus* inhibits the development of DNFB-induced dermatitis in NC/Nga mice. *Biol Pharm Bull* 30:1468-71.
- 37)Dahten A, Koch C, Ernst D, Schnöller C, Hartmann S, Worm M. 2008. Systemic PPARgamma ligation inhibits allergic immune response in the skin. *J Invest Dermatol* 128:2211-8.
- 38)Harada D, Takada C, Tsukumo Y, Takaba K, Manabe H. 2005. Analyses of a mouse model of the dermatitis caused by 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)-repeated application. *J Dermatol Sci* 37:159-67.
- 39)Seike M, Furuya K, Omura M, Hamada-Watanabe K, Matsushita A, Ohtsu H. 2009. Histamine H(4) receptor antagonist ameliorates chronic allergic contact dermatitis induced by repeated challenge. *Allergy* 65:319-26.
- 40)Kitagaki H, Ono N, Hayakawa K, Kitazawa T, Watanabe K, Shiohara T. 1997. Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J Immunol.*159:2484-91.
- 41)Jin H, He R, Oyoshi M, Geha RS. 2009. Animal models of atopic dermatitis. *Invest Dermatol* 129:31-40.
- 42)Kunikata T, Tatefuji T, Aga H, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. 2000. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. *Eur J Pharmacol* 410:93-100.
- 43)Wu G, Su X. 2010. Antipruritic activity of extracts of *Humulus scandens*, the combinations of bioactive flavonoids. *Fitoterapia* 81:1073-8.
- 44)Choi SE, Park KH, Jeong MS, Kim HH, Lee do I, Joo SS, Lee CS, Bang H, Choi YW, Lee MK, Seo SJ, Lee MW. 2011. Effect of *Alnus japonica* extract on a model of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol* 136:406-13.
- 45)Han Y, Kim B, Ban J, Lee J, Kim BJ, Choi BS, Hwang S, Ahn K, Kim J. 2012. A randomized trial of *Lactobacillus plantarum* CJLP133 for the treatment of atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 23:667-73.
- 46)Han SJ, Ryu SN, Trinh HT, Joh EH, Jang SY, Han MJ, Kim DH. 2009. Metabolism of

- cyanidin-3-O-beta-D-glucoside isolated from black colored rice and its antiscratching behavioral effect in mice. *J Food Sci* 74:H253-8.
- 47)Cooke DN, Thomasset S, Boocock DJ, Schwarz M, Winterhalter P, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo TH. 2006. Development of analyses by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/tandem mass spectrometry of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins in human plasma and urine. *J Agric Food Chem* 54:7009-13.
- 48)Bigliardi PL, Stammer H, Jost G, Ruffli T, Büchner S, Bigliardi-Qi M. 2007. Treatment of pruritus with topically applied opiate receptor antagonist. *J Am Acad Dermatol* 56:979-88.
- 49)Inagaki N, Igeta K, Shiraishi N, Kim JF, Nagao M, Nakamura N, Nagai H. 2003. Evaluation and characterization of mouse scratching behavior by a new apparatus, MicroAct. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16:165-75.
- 50)Wu X, Cao G, Prior RL. 2002. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr* 132:1865-71.
- 51)Kay CD, Mazza GJ, Holub BJ. 2005. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J Nutr* 135:2582-8.
- 52)Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJC, Johnson IT. 1998. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biol Med* 25:19-25.
- 53)Faria A, Pestana D, Azevedo J, Martel F, de Freitas V, Azevedo I, Mateus N, Calhau C. 2009. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2. *Mol Nutr Food Res* 53:1430-7.
- 54)Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. 2002. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem Biophys Res Commun* 296:631-6.
- 55)Togashi Y, Umeuchi H, Okano K, Ando N, Yoshizawa Y, Honda T, Kawamura K, Endoh T, Utsumi J, Kamei J, Tanaka T, Nagase H. 2002. Antipruritic activity of the kappa-opioid receptor agonist, TRK-820. *Eur J Pharmacol* 435:259-64.
- 56)Andoh T, Nagasawa T, Satoh M, Kuraishi Y. 1998. Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK1 tachykinin receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1140-5.
- 57)Ebertz JM, Hirshman CA, Kettelkamp NS, Uno H, Hanifin JM. 1987. Substance P-induced histamine release in human cutaneous mast cells. *J Invest Dermatol* 88:682-5.
- 58)Mosmann TR, Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-73.
- 59)Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. 2010. Sustained exogenous expression of therapeutic levels of IFN-gamma ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. *J Immunol* 184:2729-35.
- 60)Kitagaki H, Ono N, Hayakawa K, Kitazawa T, Watanabe K, Shiohara T. 1997. Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a

- T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J Immunol.*159:2484-91.
- 61) Yamashita H, Tasaki D, Makino T, Matsuoka K, Nose M, Inagaki N, Mizukami H. 2009. The role of IgE and repeated challenge in the induction of persistent increases in scratching behavior in a mouse model of allergic dermatitis. *Eur J Pharmacol* 605:153-7.
- 62) Tamura S, Yoshihira K, Fujiwara K, Murakami N. 2010. New inhibitors for expression of IgE receptor on human mast cell. *Bioorg Med Chem Lett* 20:2299-302.
- 63) Guerra MC, Galvano F, Bonsi L, Speroni E, Costa S, Renzulli C, Cervellati R. 2005. Cyanidin-3-*O*-beta-glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B1- and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo-2). *Br J Nutr* 94:211-20.
- 64) Acquaviva R, Russo A, Galvano F, Galvano G, Barcellona ML, Li Volti G, Vanella A. 2003. Cyanidin and cyanidin 3-*O*-beta-D -glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biol Toxicol* 19:243-52.
- 65) Kay CD, Holub BJ. 2002. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *Br J Nutr* 88:389-98.
- 66) Youdim KA, Shukitt-Hale B, MacKinnon S, Kalt W, Joseph JA. 2000. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1523:117-22.
- 67) Dulebohn RV, Yi W, Srivastava A, Akoh CC, Krewer G, Fischer JG. 2008. Effects of blueberry (*Vaccinium ashei*) on DNA damage, lipid peroxidation, and phase II enzyme activities in rats. *J Agric Food Chem* 56:11700-6.
- 68) Aiyer HS, Kichambare S, Gupta RC. 2008. Prevention of oxidative DNA damage by bioactive berry components. *Nutr Cancer* 60:36-42.
- 69) Benzie IFF, Wachtel-Galor S. 2011. *Herbal Medicine: Biomolecular and clinical aspect*. 2nd edition. Chapter 4 Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.)
- 70) Muth ER, Laurent JM, Jasper P. 2000. The effect of bilberry nutritional supplementation on night visual acuity and contrast sensitivity. *Altern Med Rev* 5:164-73.
- 71) Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J Agric Food Chem* 47:4638-44.
- 72) Komatsu Y, Suematsu S, Hisanobu Y, Saigo H, Matsuda R, Hara K. 1993. Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. *Biosci Biotech Biochem* 57:907-10.
- 73) Fraternali A, Paoletti MF, Casabianca A, Oiry J, Clayette P, Vogel JU, Cinatl J Jr, Palamara AT, Sgarbanti R, Garaci E, Millo E, Benatti U, Magnani M. 2006. Antiviral and immunomodulatory properties of new pro-glutathione (GSH) molecules. *Curr Med Chem* 13:1749-55.
- 74) Hazlewood LC, Wood LG, Hansbro PM, Foster PS. 2011. Dietary lycopene supplementation suppresses Th2 responses and lung eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Nutr Biochem* 22:95-100.

- 75) Nakayama N, Yamaura K, Shimada M, Ueno K. 2011. Extract from peel of Citrus natsudaidai alleviates experimental chronic allergic dermatitis in mice. *Pharmacognosy Res* 3:155-9.
- 76) Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles MAA. 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Res Intl* 44:499-509.
- 77) Kechinski CP, Guimarães PV, Noreña CP, Tessaro IC, Marczak LD. 2010. Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *J Food Sci* 75:C173-6.
- 78) Gradinaru G, Biliaderis CG, Kallithraka S, Kefalas P, Garcia-Viguera C. 2003. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chem* 83:423-36.
- 79) Zhang L, Zhou J, Liu H, Khan MA, Huang K, Gu Z. 2012. Compositions of anthocyanins in blackberry juice and their thermal degradation in relation to antioxidant activity. *Eur Food Res Technol* 235:637-45.
- 80) Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci Technol* 21:3-11.
- 81) Adams JB. 1973. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100 °C. *J Sci Food Agric* 24:747-762.
- 82) Furtado P, Figueiredo P, Neves HC, Pina F. 1993. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *J Photochem Photobiol A Chem* 75:113-118.
- 83) Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE. 2006. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr* 45:7-18.
- 84) Yue X, Xu Z. 2008. Changes of anthocyanins, anthocyanidins, and antioxidant activity in bilberry extract during dry heating. *J Food Sci* 73:C494-9.
- 85) Galati G, O'Brien PJ. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 37:287-303.
- 86) Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H, Hayek T. 2004. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr* 23:423-33.
- 87) Pourrat H, Bastide P, Dorier P, Tronche P. 1967. Préparation et activité thérapeutique de quelques glycosides. d'anthocyanes, *Chim. Thérap* 2:33-8.
- 88) Clifford MN. 2000. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 80:1063-72.
- 89) Bagchi D, Roy S, Patel V, He G, Khanna S, Ojha N, Phillips C, Ghosh S, Bagchi M, Sen CK. 2006. Safety and whole-body antioxidant potential of a novel anthocyanin-rich formulation of edible berries. *Mol Cell Biochem* 281:197-209.

- 90)MacGregor JT, Jurd L. 1978. Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 54:297-309.
- 91)Brown JP, Dietrich PS. 1979. Mutagenicity of plant flavonols in the Salmonella/mammalian microsome test: activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. *Mutat Res* 66:223-40.
- 92)Cox GE, Babish JC. 1978. Evaluation of the safety of dietary administration of special grape color powder (type BW-AT) on reproduction, lactation and maturation when fed to Sprague-Dawley rats. Unpublished report No. 5417 by Food and Drug Research Laboratories, Inc., submitted to the World Health Organization by FDA
- 93)Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK, Nair MG. 2005. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J Agric Food Chem* 53:28-31.
- 94)厚生労働省医薬食品局食品安全部 健康食品の正しい利用法 平成 23 年 3 月
- 95)健康食品ナビ(東京都ホームページ)
<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/anzen/supply/>
- 96)JHFA. 2009. Quality standard of Bilberry extract. 58 Tokyo Japan: Japan Health Food and Nutrition Food Association.
- 97)Martinelli EM, Scilingo A, Pifferi G. 1992. Computer-aided evaluation of the relative stability of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins. *Anal Chim Acta* 259:109-13.
- 98)Lee J, Rennaker C, Wrolstad RE. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem* 110:782–6.
- 99)Wren SA, Tchelitcheff P. 2006. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *J Chromatogr A* 1119 140-6.
- 100)Nováková L, Matysová L, Solich P. 2006. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 68:908-18.
- 101)Kähkönen MP, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M. 2003. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J Sci Food Agric* 83:1403–11.
- 102)Yamaura K, Shimada M, Ueno K. 2011. Anthocyanins from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) alleviate pruritus in a mouse model of chronic allergic contact dermatitis. *Pharmacognosy Res* 3 173-7.
- 103)Pourcel L, Irani NG, Lu Y, Riedl K, Schwartz S, Grotewold E. 2010. The formation of Anthocyanic Vacuolar Inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Mol Plant* 3:78-90.
- 104)Verweij W, Spelt C, Di Sansebastiano GP, Vermeer J, Reale L, Ferranti F, Koes R, Quattrocchio F. 2008. An H⁺ P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour. *Nat Cell Biol* 10:1456-62.
- 105)Harbourne N, Jacquier JC, Morgan DJ, Lyng JG. 2008. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chem* 111:204-8.
- 106)Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles MAA. 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Res Intl* 44:499-509.

- 107)Brownmiller C, Howard LR, Prior RL. 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *J Food Sci* 73:H72-9.
- 108)Fan G, Han Y, Gu Z, Gu F. 2008. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. *LWT Food Sci Technol* 41:1412-6.
- 109)Bononi M, Tateo F. 2007. Stabilization of cranberry anthocyanins in nutraceutical capsules. *Int J Food Sci Nutr* 58:142-9.
- 110)Havlikova L, Mikova K. 1985. Heat Stability of Anthocyanins. *Z Lebensm Unters Forsch* 181:427-32.
- 111)Nakajima J, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M, Saito K. 2004. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *J Biomed Biotechnol* 5:241-7.
- 112)アステラス製薬株式会社. 2012. 数字に見る医療と医薬品
- 113)坂本圭. 2005. 日本の医療財政の現状と課題. *川崎医療福祉学会誌* 14 249-59.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

- 1)Yamaura K, Ishiwatari M, **Yamamoto M**, Shimada M, Bi Y, Ueno K. 2012. Anthocyanins, but not Anthocyanidins, from Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) alleviate pruritus via inhibition of mast cell degranulation. J Food Sci 77:H262-7.
- 2)**Yamamoto M**, Yamaura K, Ishiwatari M, Ueno K. Difficulty for consumers in choosing commercial bilberry supplements by relying only on product label information. Pharmacognosy Res. (in press).
- 3)**Yamamoto M**, Yamaura K, Ishiwatari M, Shimada M, Kado S, Seki H, Shimada N, Ueno K. Degradation Index for Quality Evaluation of Commercial Dietary Supplements of Bilberry Extract. J Food Sci. (in press).

謝辞

本研究の遂行に際し、終始御指導、御鞭撻を賜り、本論文発表の機会と御校閲を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 高齢者薬剤学研究室 上野光一教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行する上で、適確なる御指導、御助言を賜り、また本論文の御校閲をいただきました千葉大学大学院薬学研究院 高齢者薬剤学研究室 山浦克典講師に謹んで感謝申し上げます。

本研究において、御指導、御助言を賜りました佐藤洋美助教に心より感謝致します。

本研究に際し、多くのご協力とご助言をいただきました千葉大学分析センター 関宏子特任准教授、並びに荷堂清香先生に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、試料を御提供頂きました株式会社常磐植物化学研究所、及び搔痒測定システム Micro Act を貸与いただきました帝人ファーマ株式会社に御礼申し上げます。

本研究において御協力いただきました高齢者薬剤学研究室の石渡万希子氏、島田茉莉季学士をはじめとする在校生、卒業生の皆様に心より感謝致します。

最後に、素志を理解し、終始心を支えてくれた妻及び子供達、並びに両親に心より感謝致します。

2013年2月15日
山本 正雄

審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 佐藤 信範

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 堀江 利治

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 戸井田 敏彦