

重合ポリフェノールの肌への健康効果と
そのメカニズム解明

筑波大学大学院
理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
生命農学学位プログラム
博士（生命農学）学位論文

土屋 貴嗣

目次

序章.....	2
第1章 重合ポリフェノールの <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 評価.....	12
第1節 序.....	12
第2節 材料および方法.....	13
第3節 結果.....	18
第4節 考察.....	23
第2章 重合ポリフェノールのヒトへの効果.....	35
第1節 序.....	35
第2節 材料と方法.....	35
第3節 結果.....	43
第4節 考察.....	47
第3章 重合ポリフェノールの健康効果のメカニズム解明.....	66
第1節 序.....	66
第2節 材料と方法.....	68
第3節 結果.....	76
第4節 考察.....	80
第4章 総括.....	92
総括.....	92
今後の展望.....	97
参考文献.....	101
謝辞.....	109

序章

現代社会では、医療の普及・高度化等により国民の平均寿命が伸びている一方で、健康寿命（心身ともに自立し健康的に生活できる期間）の伸びは限定的な状況にある。その結果、高齢時の健康に生活できない期間が伸び、医療・介護費の家計負担の増大やクオリティオブライフの低下という新たな問題が生じている。しかも、この医療費増加は国の社会保障費支出の拡大ももたらし、国家の財政を圧迫している。特に少子化が進行してきた現代社会では、社会保障負担の世代間格差や当該制度の仕組み的な持続可能性への懸念も含めて、深刻かつ重大な社会問題として顕在化している。この課題の根源的な解決策としては、病気になる前の未病の段階での対策を講じ、健康寿命を延伸していくことが最重要になる。より具体的には、病気の発症後に医薬品で治療する現状の社会的慣習から脱却し、食生活という日々の営みのレベルから健康維持・増進により有効な方法論・スタイルの開発・実現・普及を果たし、潜在的な疾患を未然に予防可能にする次世代型の社会像へとシフトしていくことが重要である。学術・産業分野の役割としては、多様な食品の健康改善効果の検証やその有効成分の探索・同定を進め、その詳細な分子メカニズムの解明等の科学的なエビデンスに基づく精確な知見の蓄積がまず必要と考えられる。日本では現在、特定保健用食品や機能性表示食品制度によって、機能性成分の科学的根

拠に基づいて食品に機能性を表示することが可能になっている。機能性成分としては、GABA、L-テアニンを代表とするアミノ酸や、難消化性デキストリン、イヌリン等の食物繊維、DHA や EPA などの脂肪酸、乳酸菌など多種多様な成分があるが、代表例としてポリフェノール類が挙げられる。代表的なポリフェノールとその効能としては、カテキン類やケルセチン配糖体による内臓脂肪低減効果、ルテインまたはアントシアニンによる眼精疲労改善、モノグルコシルヘスペリジンによる血流改善と体温維持などが挙げられる。一般にポリフェノールは抗酸化活性を有することは有名だが、全てのポリフェノール種が抗酸化作用のみで効果を発揮するわけではなく、様々な作用機序で様々な健康効果を発揮している（1）。このように、ポリフェノールによる健康効果は多様で、その分子メカニズムは複雑であり、現代科学はその全容の一端を検証・理解しているに過ぎず、未知の部分と未知の可能性が多く残されている。これを踏まえ、本研究では研究材料としてはポリフェノールに着目した。

ポリフェノールは、分子構造的にベンゼン環に複数の水酸基が結合した化合物の総称である。天然物として、これまでに 8,000 を超える化合物が同定され、これらはジフェニルプロパン構造をもつフラボノイド類や単純フェノール類、また加水分解型（ピロガロール型）タンニン類、縮合型（カテコール系）タンニン類に分類される（2）（図 1）。縮合型タンニンの中でも重合ポリフェ

ノールは、カテキン類の重合体であり、様々な健康改善効果が報告されている有望な機能性化合物である（図 2）。カテキン類のモノマーとしては、（-）-エピカテキン（EC）の B 環が没食子酸（ガレート基）に変換されたものは

（-）-エピガロカテキン（EGC）になり、（-）-エピカテキンに没食子酸が付加したものが（-）-エピカテキンガレート（ECg）になり、（-）-エピガロカテキンに没食子酸が付加したものが（-）-エピガロカテキンガレート

（EGCg）になり、EC、EGC、ECg および EGCg の 4 種が存在している。また、カテキンのモノマーは大きく、エピ体と非エピ体の異性体が存在しており、例えばカテキンを例にすると 2,3-シスアイソマーは（-）-エピカテキンで、2,3-トランスアイソマーが（+）-カテキンになる。上述の 4 種のカテキン類に加えて、異性体がそれぞれ存在するため、カテキン類のモノマーは 8 種存在することになる。重合ポリフェノールは、そのモノマーのカテキン類が結合・重合し、形成された化合物であり、その結合様式によりアイソマーが 2 つに大別され、C4-C8 あるいは C4-C6 結合したものを B-タイプと称し、C2-O-C7 結合したものは A-タイプと称す。自然界に存在するプロシアニジン、

（-）-エピカテキンからなるもののほうが、（+）-カテキンから構成されるものより多く発見されており、主に B-タイプである。例えば、ダイマーのプロシアニジン B1 は（-）-エピカテキンと（+）-カテキンが C4-C8 結合したもの

になる。この重合度はダイマーだけでなく、トリマー、テトラマーと重合度を重ねて存在しており、その総称をここでは重合ポリフェノールとしている（図2）。この重合ポリフェノールは様々な食品に含まれており、特に柿、松樹皮（松の樹皮から抽出したエキス）、ブドウ種子や赤ワインに多く含まれる。その中でも、赤ワインには多くの種類のポリフェノールが含まれているが、量的に主要なものはアントシアニンとプロアントシアニジンである。赤ワインのプロアントシアニジンは、唾液タンパク質に親和することによりワインの渋味、収斂性（エグ味）に寄与すること（4）、アントシアニン類と相互作用することで赤ワインの色の安定性にも寄与すること（5）が報告されている。プロアントシアニジンの中でも低重合度の oligomeric proanthocyanidin (OPC) は様々な生理活性の報告がある。例えば、未熟なリンゴ果実 (*Rosaceae, Malus spp.*) 由来の procyanidin C1 を含む OPC はマウスへの経口投与により抗アレルギー作用を示す（6）。また松樹皮由来の OPC であるフラバンジェノール®はレトロウイルス感染またはエタノール負荷したマウスに対して免疫賦活作用を示す（7）。さらに OPC はヒトでも種々の健康効能が調べられており、OPC を含むセイヨウサンザシの経口摂取による抗高血圧作用（8）や、ブドウ種子由来 OPC であるロイコセレクト®の摂取によるヒト血清の抗酸化作用（9）などが報告されている。一方、OPC の特性として、モノマーのフラボノイドと比較し

ても吸収性が極めて低く、これが一因となり、上記の健康改善効果における生理学的な分子メカニズムは未だ解明されていない（3）（図 2）。本研究では、日常摂取する食品でもあり、重合ポリフェノールも多く含まれているブドウ、赤ワインに着目し、特にその重合ポリフェノールに焦点を当て、新たな健康効果とメカニズムについて検証を進めることとした。

様々な健康効果の中でも、肌への健康効果は見た目でもわかりやすく、摂取した時の体感が得られやすい現象であることに着目し、本研究における健康効果の検証対象とした。皮膚は大きく3層構造になっており、表皮、真皮および皮下脂肪の3つに分けられる。その中でも表皮は細胞の層状構造（角化細胞層）になり、基底細胞層、有棘細胞層、顆粒細胞層および角質細胞層の4層で構成され、それに介在する形で樹枝状細胞が存在している。最下層の基底細胞層が細胞分裂して表層に向かって成熟・分化し、最終的には垢として脱落する（10）。また、肌には血管が網目構造の形で張り巡らされており、栄養供給することで細胞のターンオーバーに影響している。肌のシミを形成する上で重要な細胞は、樹枝状細胞である色素細胞（メラノサイト）であり、アミノ酸からメラニン（色素）が合成され、それを角化細胞（ケラチノサイト）に受け渡すことでメラニンが沈着し、シミが形成される。また、肌の潤いの調節には大きく2つの機能が関与しており、1つは表皮のバリア機能を高め水分を逃がさ

ない機能、もう1つは体内から水分を供給する機能で、両者のバランスで肌の水分コントロールをしている。肌のシミと潤いの改善には、化粧水等の外用剤が使われているが、表皮は高いバリア機能を有しており、水溶性化合物などは表皮の透過が妨げられることから、肌の表面から表皮や真皮の細胞に届く化合物は限定される。シミの原因となる樹枝状細胞のチロシナーゼ活性を阻害する仕組みで、シミを改善する医薬品も開発されているが、食生活レベルで摂取可能な自然食品による肌への健康効果を持つ食品素材が望まれている。

シミを改善する化合物としては、ビタミンC（アスコルビン酸）がよく知られており、肌のコラーゲンの合成を促進しその抗酸化作用を補助的に高めることで、紫外線の光損傷で生じるシミの形成を抑制している（11）。自然食品では、リンゴポリフェノール摂取によるシミの沈着抑制効果の報告がある（12）。さらに本研究で注目する重合ポリフェノールに関しては、松樹皮抽出物（フラバンジェノール[®]）のヒトでの経口摂取試験において、皮膚の光老化に対する改善作用が確認されている（13）。肌の潤いに関しては、SC-2 乳酸菌、コラーゲンペプチドおよびスフィンゴミエリン含有食品による角層水分量の増加の報告がある（14）。その他にも外用剤としてアルブチンやフラボノイドなどのシミを改善した報告はある（15）が、ヒト試験において明確にシミと潤いの両者を同時に改善可能な化合物の報告はない。そこで、本研究で

は、シミと潤いの両者を同時に改善するという点で世界初の自然素材の実証を目的として、重合ポリフェノールに着目して研究を行った。

本研究の先行研究において、種々ワインの成分分析の結果から、*Vitis vinifera* CV. *Ancellotta* (以下、*Ancellotta*) のワイン品種に OPC が多いことがわかっている (16)。シミが生じるメカニズムとして、肌のメラノサイトにおいて、UV などの影響によりチロシナーゼによってチロシンからメラニンの合成が行われ、シミが沈着する。先行研究において、このチロシナーゼ活性の阻害活性を検討した結果、OPC が豊富に含まれる *Ancelotta* 種で高いチロシナーゼ阻害活性を確認した (16)。更に、細胞でのメラニンの蓄積抑制効果を検討した結果、*Ancelotta* 種で高い活性を有し、OPC 量とメラニン蓄積抑制効果に相関があることを確認した (16)。

今回は、この健康研究を受けて、重合ポリフェノールである OPC に着目し、OPC が豊富に含まれる赤ワインポリフェノール素材を中心に、その健康効果とメカニズム解明を行った研究内容について報告する。第 1 章では、重合ポリフェノール投与における肌のシミや潤いに対する効果を *in vitro* (ヒト表皮の培養細胞系) 更には *in vivo* (マウス) のレベルで実験的に検証した。これを踏まえ、第 2 章ではヒトの臨床試験系 (100 名) によって、重合ポリフェノール摂取時の肌のシミや潤いに対する効果を検証した。第 3 章では、第 1 及び 2 章

で判明した肌のシミや潤いにおける改善効果のデータをもとに、その分子メカニズムの詳細を追究すべく、血流の改善や血管新生が肌の細胞のターンオーバーを高め、上記効果の発現に寄与するという作業仮説を立て、培養細胞系やラットによる動物試験にて、重合ポリフェノール摂取時の肌における効果を実験的に検証した。第4章では、第1～3章で得られたデータを横断的に再比較・検討し、その整合性等について、また可能性の高いメカニズムやその他のありえる可能性について総合的に考察した。同時に、本研究の周辺分野も含めた他の最新の研究データとの比較・考察を行い、本研究の意義を執筆時点の最新情報から位置づけ、本研究を今後より深めるための展望や、産業的な実用化（商品化）に向けた道筋についても言及する。

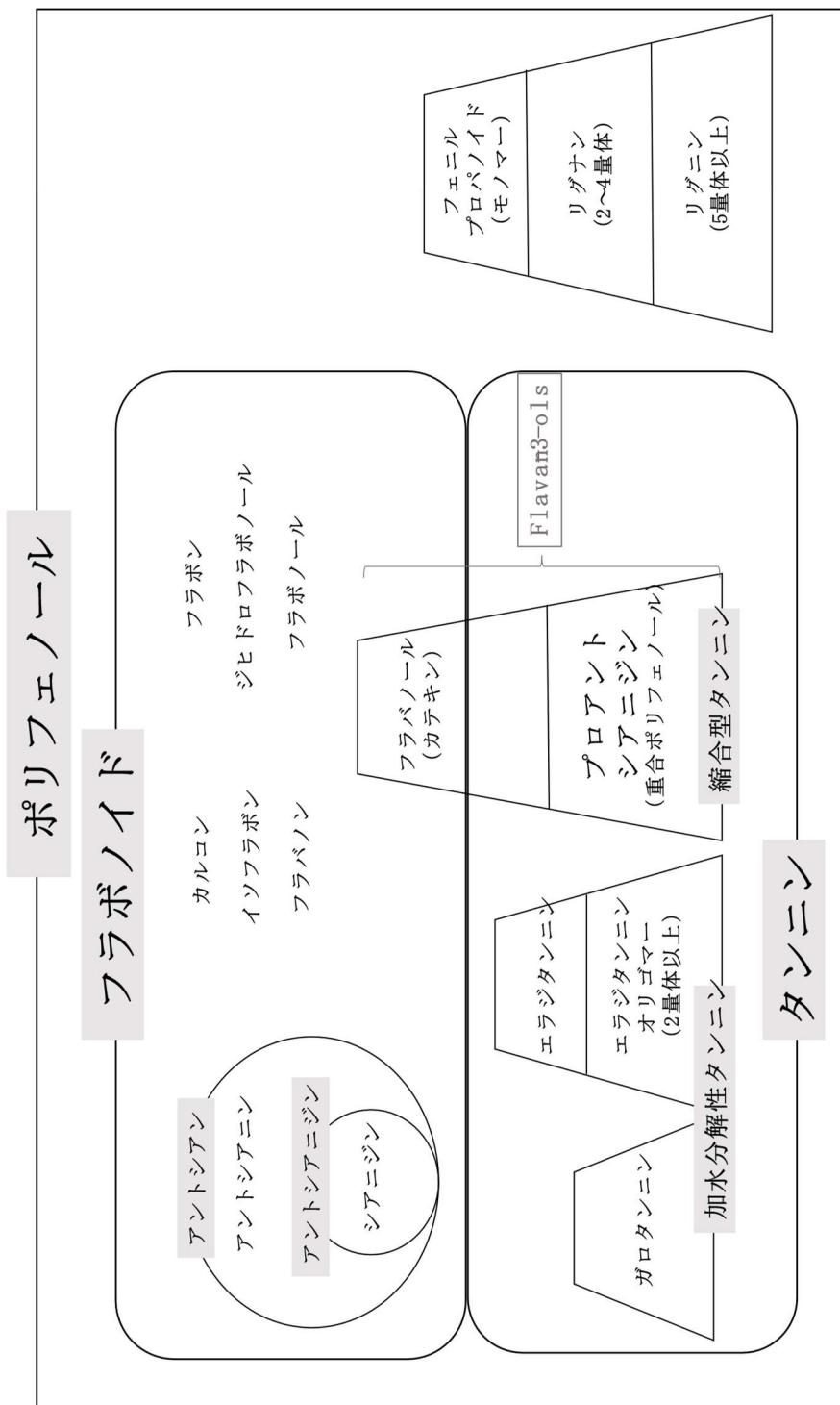


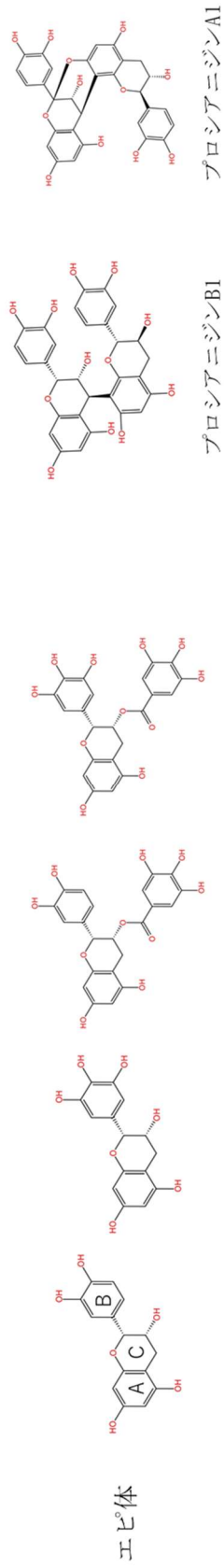
図 1 ポリフェノールの分類

フラバノール
(カテキン)

プロアントシアニジン
(重合ポリフェノール)

➤ モノマー

➤ ダイマー



➤ オリゴマー (OPC)、ポリマー

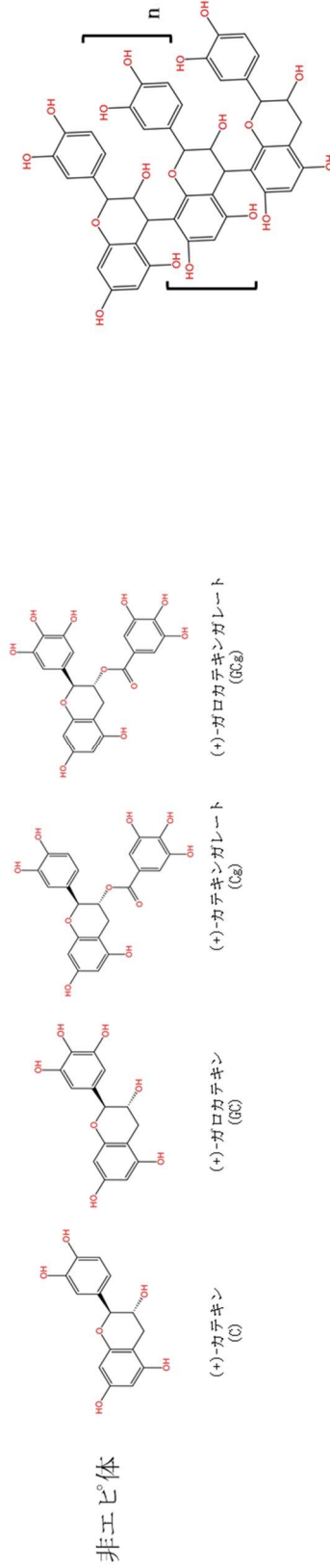


図 2 カテキンと重合ポリフェノールの関係性

第1章 重合ポリフェノールの *in vitro* および *in vivo* 評価

第1節 序

赤ワインの中でも *Ancellotta* の品種に豊富な OPC が含まれていることが確認されており、OPC を多く含むフラクションに強いチロシナーゼ阻害活性が報告されている (16)。その中でも、OPC トリマーやガレート基を有するダイマーに高いチロシナーゼ阻害活性とメラニン産生抑制活性が認められている (16)。この知見を元に、OPC を経口摂取する場合においても効果を示すか確認する目的で、動物を使った *in vivo* 試験でのシミの改善効果を検討した。モデルとしては、UV 照射によってシミの形成を誘導し、その沈着を OPC が抑制するか検討を行った。

また、肌のシミの改善だけでなく、肌の潤いにも作用する可能性があるか検討を行った。肌の潤いを向上させ得るタンパク質としてアクアポリン

(Aquaporin、AQP) が知られている。AQP は水を速く大量に通すチャンネルとして 1992 年に発見されたタンパク質であり、ヒトでは 13 種類 (AQP0–AQP12) の存在が確認されている。これらの AQP は細胞や組織の種類に応じて特異的に分布する。AQP はヒトのほぼ全ての臓器に分布し、腎臓などの水輸送が盛んな臓器には特に多く、尿の産生、消化液の分泌、乾燥からの保護、さらには細胞同士の結合を含む多彩な機能を担っている (17)。角層には水の

供給源である血管が存在しないが、AQP3 が細胞膜に発現して細胞間隙の水分を取り込むことで水の通り道となって角質に水をあまねく行き渡らせることができる。実際、AQP3 を欠損させたマウスの皮膚では、野生型マウスの皮膚に比べ、角層水分量と皮膚の弾力性が顕著に低下しており、肌の潤い維持に AQP3 が重要な役割を果たしていると考えられている（18）。また、肌荒れ等の創傷を負った場合の回復能にも大きな影響を及ぼしていることから AQP3 産生を増強することで、様々な皮膚トラブルを改善できると考えられてきた（19）。皮膚上皮細胞においては上皮細胞の細胞膜に AQP3 が発現しており、AQP3 の発現量が増加すると、皮膚組織の含水量が増加し、皮膚が若返って見えることや、皮膚弾力性が増し、創傷治癒能力が高まることが知られている（20）。一方で、AQP3 の発現が欠損すると、皮膚組織の弾力性低下及び乾燥を招き、さらに傷の治癒が遅くなることが報告されている（21）。そこで、本研究では、OPC が豊富に含まれる *Ancellotta* 種のワインにおいて、AQP3 に対する作用があるか検討し、潤いに対する可能性を見極める目的で検討を行った。

第2節 材料および方法

1.基本情報

(-)-カテキン (C), (-)-エピカテキン (EC), (-)-エピカテキンガレート (ECg), (-)-エピガロカテキン (EGCg) は, 和光純薬工業株式会社から購入した。Procyanidin B1 (EC-C)は Extrasynthese 社、Procyanidin B2 (EC-EC) は Toronto Research Chemicals 社から購入した。Procyanidin C1 (EC-EC-EC) およびレチノイン酸は, Sigma-Aldrich 社から購入した。没食子酸 (GA) は, フナコシ株式会社 (東京、日本) から購入した。すべての化学物質はさらに精製せずに使用した。Procyanidin B3 (C-C)、Procyanidin B4 (C-EC)、Procyanidin B4-GA (C-ECg)、EC-CG、C-C-C、C-C-ECg は、我々の過去の研究に従って合成した (16)。

2. *Ancellotta* 種のワインのサンプルの調製 (ワインポリフェノール画分)

Ancellotta 種のワイン (12 L) を蒸発させてエタノールを除去後、10 L の Diaion HP-2MG (Supelco, USA) カラムクロマトグラフィーを通過させた。20 L の H₂O で溶出後、70% (v/v) エタノールで溶出した画分を集め、蒸発させて赤ワインポリフェノール画分 (総ポリフェノール含有量: 52.73% (w/w)、OPC 含有量: 28.34% (w/w)) を得た (赤ワインポリフェノール画分収量: 108.18g)。赤ワインポリフェノール画分 500mg の一部を Sephadex LH-20 (1L, GE Healthcare, UK Ltd., Little Chalfont, UK) カラムに透過させ、10, 20, 30, 40, 50, 60% メタノール/H₂O (1%ギ酸含有), 50% acetone の 4L で順次溶出した。各画分を蒸発させて凍結乾燥し、

実験に使用した。

3. LC-TOF-MS 分析解析

ワイン抽出物および精製化合物の LC/ESI-Q-TOF MS 分析は、プロミネンス UFLC システム（島津製作所，日本）に接続された Z-spray エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 源およびロイシン-エンケファリンを標準物質とするロックマシリファレンススプレー（Micromass，マンチェスター，イギリス）エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 源を備えた Q-TOF プレミア質量分析計を用いて行った。

4. ブドウ果汁の調製方法

果汁 A は、凍結した *Ancellotta* 果実を自然解凍後、絞った果汁を使用した。果汁 B は、*Ancellotta* 果実を液体窒素で凍結粉碎後、絞った果汁を使用した。

5. 細胞株と培養

正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) は、倉敷紡績株式会社より入手した。NHEK を 60 mm ディッシュに 1×10^5 個の密度で播種し、HuMedia-KG2（倉敷紡績株式会社、大阪）で 37°C、5%CO₂ の加湿環境下で培養した。細胞がセミコンフルエントになるまで培養した後、培地を各画分や化合物を含む新鮮な培地に交換し、

RT-PCR は 24 時間培養した。ポジティブコントロールとして、レチノイン酸 (RA, Sigma-Aldrich Co. LLC (St.Louis, MO) を加えた。

6. リアルタイム PCR 解析

NHEK から ISOGEN (NIPPON GENE Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出した。逆転写のために, Superscript VILO master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて, 1 g の RNA から cDNA を合成した。表 1 に示したプライマーを用いて, リアルタイム PCR により標的遺伝子の発現を解析した。mRNA 量レベルは GAPDH に対して正規化した。

7. 動物実験

7 週齢の褐色モルモット (日本クレア株式会社) を購入し、以下の実験に供した。試験期間中、食餌と水は自由摂取とし、制限を行わなかった。飼育環境として、23°C [許容範囲 : 20.0~26.0°C (実測値 : 21.7~23.5°C)]、設定湿度 : 55% [許容範囲 : 40.0~70.0% (実測値 : 45.2~82.6%)]、明暗各 12 時間 (照明 : 午前 6 時~午後 6 時)、換気回数 12 回/時に維持された飼育室で動物を飼育した。入手した動物は 5 日間の検疫期間、その後 3 日間以上の馴化期間を設けた。体重に基づいて 3 つの群に群分けを行った (1 群につき n=5)。各群の構成はそれぞれ、

被験物質を投与しない①Vehicle群、被験物質を投与する②Wine OPC Fraction(100 mg/kg)群、③L-ascorbic acid (300 mg/kg)群(陽性対照)とした。Wine OPC Fraction (100 mg/kg)群には上述のワインポリフェノール画分を用いた。Vehicle群には0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC、関東化学株式会社)溶液を投与し、被験物質の群は食品素材または化合物をCMC-Na 0.5 w/w%水溶液に懸濁し、経口ゾンデを用いて1日1回28日間反復経口投与を行った。群分け日に、照射部位を電気バリカン(ER807P、パナソニック株式会社)で剪毛し、電気シェーバー(Series7750cc-7、プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン株式会社)で剃毛した。翌日に固定板を用いて、モルモットを無麻酔で腹位に固定した。紫外線照射部位は、モルモット背部正中線をはさんだ左右どちらかの2 cm×2 cmの正方形の1ヵ所とした。粘着性布伸縮包帯(エラストポア、No.50、ニチバン、製本用テープを貼り、照射部位を切りぬいたエラストポア)を背部に貼って遮光し、眼にもエラストポア(No.50、ニチバン)を用いて貼付することで紫外線を遮光した。その後、紫外線照射装置(Y-798-II、オリオン電機株式会社)に取り付けたSEランプ(波長250～350 nm、FL20S・E、東芝製)5本を用いて40 cmの距離から最小紅斑量の紫外線(UVB)照射を行った。紫外線照射は、初回投与日(この日を0日とした)と、以降は初回投与後2日及び4日の計3回行った。照射時間は、最小紅斑量である12分15秒とした。初回投与日の照射前、初回投

与後 14 日、21 日、28 日に、照射部位を色彩色差計（CR-300、ミノルタ株式会社）を用いて L*、a*、b*値を測定し、 Δ L*値（観察日の L*値-照射前の L*値）を求めた。なお、測定機器の立上げの都度、白色校正板を用いて 1 点補正を行った。測定前に照射部位を電気バリカンで剪毛し、電気シェーバーで剃毛後約 5 分に測定した。測定部位は照射部位の中心と、対角線上の角 4 ヶ所の計 5 ヶ所とし平均値を各個体の値とした。本試験を含めた全ての動物試験 (*in vivo* 試験) は、動物愛護管理法に基づき、動物愛護に関わる 3R の観点を遵守の上、実施された。

8. 統計解析

In vitro 試験における統計解析は、JMP ver.14.0.0（SAS Institute Inc., Cary NC, USA）を用いて行った。数値データは、mRNA については平均値 \pm 標準偏差で表した。有意性は Dunnett's test で解析し、 $p < 0.05$ の差を統計的に有意であるとみなした。

In vivo 試験では、各群の Δ L*値について各観察時点の平均値及び標準誤差を算出した。有意性は Dunnett's test で解析し、 $p < 0.05$ の差を統計的に有意であるとみなした。

第 3 節 結果

1. *in vitro* 評価

1.1. *Ancellotta* 種のワインのフラクション別の成分分析

先行研究において、15 種類のワインを分析したところ、全ポリフェノール濃度は 1800-7157 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であり、*Ancellotta* 種が最高値 (7157 $\mu\text{g/ml}$) を示した。また、OPC 濃度は 359-3033 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であり、OPC 濃度においても *Ancellotta* 種が最高値 (3033 $\mu\text{g/ml}$) を示した報告がある (16)。この *Ancellotta* 種のワインのポリフェノールをクロマトグラフィー法で以下の各溶液で順次溶出させたフラクション毎の AQP3 発現亢進効果を調べた。その結果、10%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.1)、20%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.2) 30%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.3) と 50%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.5)、60%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.6) に有意な活性亢進効果が認められた (図 3A)。

それぞれのポリフェノール画分は、LC-TOF-MS で解析した。各フラクションのアントシアニン含有量を測定したところ、アントシアニンは Fr.1 と 2 に集中していた。LC-TOF-MS 分析の結果、*Ancellotta* 種のワインに含まれる主要なアントシアニンは malvidin 3-O-glucoside、副次的なものは petunidin 3-O-glucoside であり、これらは LH-20 10% メタノール画分に含まれていた (Fr.1)。OPC は、図 3B に示すように、Fr.4 から 6 に濃縮されていた。最も高い OPC 含有量を示したのは Fr.6 であった。Fr.5 にはガロイル基を含む flavan-3-ol 2 量体 (ダイマー) が、Fr.6 にはガロイル基を含む flavan-3-ol 3 量体 (トリマー) が存在した (図 3B)。

1.2. flavan-3-ol の構造活性相関

Ancellotta 種のワインの fraction の中でもガロイル基（以下、GA）が付いた flavan-3-ol 重合体を含む fractions で AQP3 遺伝子発現亢進効果が認められたことから、flavan-3-ol のモノマー、ダイマー、トリマーについて構造活性相関を調べた。その結果、モノマーでは、構造にガロイル基が付いた ECg と EGCg で、いずれも 30 μ M 以上で AQP3 mRNA 量 が有意に上昇した（図 4A）。ダイマーも同様に、GA が付いた C-ECG、EC-CG が 30 μ M 以上で有意な活性を示した（図 4B）。トリマーは、GA が付いていない EC-EC-EC でも有意な発現上昇が認められたが、GA が付いた C-C-ECG では EC-EC-EC と比較してより顕著に AQP3 mRNA 量 の上昇効果を示した（図 4C）。また、GA が付いた化合物の中でも同じ 30 μ M の濃度では、モノマーと比較して、ダイマー以上の化合物でより上昇効果があった。（図 5）。以上から、GA を有する flavan-3-ol に活性が認められ、特にダイマー以上で強い AQP3 発現亢進効果を示した。

1.3. 没食子酸の活性評価

上記検討から、GA が付いた flavan-3-ol が AQP3 mRNA 量 の上昇効果を有することが分かった。そこで、GA である没食子酸単独でも効果があるかどうか検

討した。その結果、没食子酸単独でも用量に応じて AQP3 発現亢進効果を示した (図 6A)。しかし、没食子酸添加後、24 時間インキュベーションすると細胞有無にかかわらず没食子酸が入った溶液が濃度依存的に褐変しており、LC-TOF-MS analysis でもインキュベーション前とは異なるピークが検出されたことから、何らかの分解物が生成された可能性がある。没食子酸そのものか、インキュベーション中に生成された分解物が活性成分であったかは不明である。

1.4. ブドウ果汁の活性評価

Ancellotta 種のブドウ果汁の効果を調べた。これまでの検討から、*Ancellotta* 種のワインは 400 倍希釈で AQP3 mRNA 量を 1.82 ± 0.19 倍上昇する効果が認められた (data not shown)。*Ancellotta* ブドウ果汁の効果は、凍結した *Ancellotta* 果実を自然解凍後に絞った *Ancellotta* ブドウ果汁 (果汁 A) では、効果は無かったが、*Ancellotta* 果実を液体窒素で凍結粉碎後に絞った *Ancellotta* 果汁 (果汁 B) では容量に応じて AQP3 mRNA 量の上昇効果を示した (図 6B)。赤ワインは、ブドウ果実の発酵段階でエタノールによって種子も含めて徐々に成分が溶出してくる。果汁 B は果実を粉碎したことで、ワインと同じ OPC が溶出されたことによって効果を示した可能性がある。

1.5. アントシアニンとレスベラトロールの活性評価

図3に示すようにアントシアニンが多く含まれる Fr.2 に活性があったことから、アントシアニンおよびレスベラトロールの AQP3 mRNA に与える影響を検討した。試験には Fr.2 に多く含まれるアントシアニンである malvidin-3-monoglucoside (以下、Mal-3-G) および peonidin-3-monoglucoside (以下、Pet-3-G) を用いた。また、レスベラトロールには trans-resveratrol を用いた。各化合物による AQP3 mRNA の発現変化を確認した結果、アントシアニンおよびレスベラトロールによる AQP3 mRNA 量の増加は確認できなかった (図7)。N数が少ない影響もあるが、アントシアニンやレスベラトロール以外の他の成分が効果を示している可能性がある。

2. *in vivo* 評価

2.1 紫外線照射試験

紫外線照射による皮膚明度低下に対する *Ancellota* 種のワインポリフェノール画分 (総ポリフェノール含有量: 52.73% (w/w)、OPC 含有量: 28.34% (w/w)) のシミの抑制効果を検討した。紫外線照射後、被験物質投与 21 日から陽性対照である L-ascorbic acid (300 mg/kg) 投与群および Wine OPC Fraction (100 mg/kg) において、Vehicle 群と比較して有意な L 値低下の抑制効果を示した (図8)。

Vehicle 群と比較して、実数値および変化量の両者において有意な L 値低下の抑制効果を示し、経口摂取においてもワイン OPC によるシミの改善効果を見出した。

第 4 節 考察

肌の潤いを向上させるメカニズムとして、ケラチノサイトにおける AQP3 の発現制御に着目した。本試験において、ヒトケラチノサイト細胞を用いた *in vitro* の検討で、Ancellotta 種のワインが AQP3 mRNA 量の上昇効果を有することを見つけ、Ancellotta 種のワインが肌の潤いにも効果を示す可能性がわかった。そこで、Ancellotta 種ワインの成分から AQP3 発現亢進効果を示す関与成分の特定を試みた。

まず、Ancellotta 種ワインの分画物で活性を調べたところ、OPC を多く含む画分とアントシアニンを多く含む画分で AQP3 発現亢進活性が認められた。OPC を多く含む画分からは、flavan-3-ol のモノマー、ダイマー、トリマーで検討を進めた。その結果、GA 付の flavan-3-ol、特にダイマー以上の OPC に強い活性がみられた。30 μ M 以上でその効果は顕著であった。以上から、AQP3 発現亢進効果の関与成分が、GA 付の flavan-3-ol であることがわかった。OPC 以外のポリフェノール類については、アントシアニン色素やレスベラトロール類を検討したが、いずれも活性を示さなかった。

Ancellotta 種のワインに含まれる OPC 量を調べたところ、3030 $\mu\text{g/mL}$ であり、他のワインと比較して、*Ancellotta* 種のワインは OPC 量が多いことが特徴である (16)。*Ancellotta* 種のワインの OPC に含まれる各成分の割合を LC/MS を用いて解析した結果、procyanidin B1 (PB1, EC-C)、procyanidin B2 (PB2, EC-EC)、procyanidin B3 (PB3, C-C)、procyanidin B4 (PB4, C-EC)、および procyanidin B4-GA (PB4-GA, C-ECg) はそれぞれ 1.085、0.594、0.232、0.101 および 0.039 % であった。ワインに多く含まれる PB1、PB2、PB3 および PB4 については、活性は認められず、一方、ワイン中の存在量が少ない GA 付きの化合物で活性を有していた。他のワインと比較して *Ancellotta* 種のワインが GA 付の化合物が多いかどうかは調べていないが、OPC 量が多いことで GA 付きの化合物の量も多くなっていると考えられる。

ブドウ果汁は、凍結した *Ancellotta* 果実を自然解凍後に絞った果汁 (果汁 A) では活性を示さなかったが、*Ancellotta* 果実を液体窒素で凍結粉碎後に絞った果汁 (果汁 B) では用量に応じた AQP3 発現亢進効果を示した。搾汁では果皮、果肉の成分しか抽出されないが、粉碎によって種子が細かくなったことで種子に多く含まれることが知られている低分子の OPC が抽出されたことで AQP3 発現が亢進された可能性がある。特に、GA 付の化合物は種子に多く含まれるため、ワイン作成過程で種子から溶出されて活性を示したと考えられる。

OPC が AQP3 mRNA 量を上昇したメカニズムは今後さらなる検討が必要であるが、ポリフェノールによって AQP3 の転写を活性化したと考えている。推察されるメカニズムとして、flavan-3-ol によって Peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) や Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) の活性化を介して AQP3 の転写が活性化した可能性が考えられる。ポリフェノール化合物 (22) や flavan-3-ol やフラバノール画分 (23) によって PPAR γ や HIF-1 の活性化が報告されている。PPAR γ は、核ホルモン受容体ファミリーに属する脂肪酸活性化転写因子である。PPAR は、脂質や糖代謝の転写制御因子としてよく知られているが、皮膚のホメオスタシスにおける重要性も明らかにされている (24)。PPAR の 3 つのアイソタイプは、ネズミやヒトの皮膚に発現している。PPAR は、良性表皮腫瘍、乳頭腫、尋常性ざ瘡、乾癬など、多くの皮膚疾患の理解と治療に寄与している。ブドウのポリフェノール画分を 16 週間投与した C57BL/6J mice で肝臓の PPAR γ の発現上昇が報告されている (24)。さらに、PPAR γ を活性化する化合物はケラチノサイトにおける AQP3 を活性化する報告もある (25)。HIF-1 も転写因子である。低酸素状態では、L929 線維肉腫細胞における AQP3 の mRNA の発現レベルが知られており、マウス AQP3 遺伝子の *in silico* 解析では、翻訳開始点の近くに、HIF-1 応答要素 (HRE) の 2 つのコア配列を含む領域が同定された (26)。マウス由来の線維肉腫細胞では、低酸素により AQP3 の発現

が増加し、その効果は HIF-1a のノックダウンにより消失した (27)。

今回活性が示された GA 付のダイマー以上の化合物による転写因子の発現量の変化を今後調べた上でメカニズムを確認する必要がある。また、皮膚でこれらの転写因子の活性を介して AQP3 mRNA の転写をコントロールしているかどうかは、今後さらなる検討が必要である。

AQP3 は、水以外にもグリセロールや尿素などの低分子を通過させるアクアグリセロポリンに分類される (28)。AQP3 は、細胞増殖にも関与することから、老化や UV などの皮膚ダメージからの肌の修復にも期待されている。AQP3 による肌の潤い効果や細胞増殖効果は、グリセロール輸送を介して機能していることが示されているため (18)、今回見出した AQP3 mRNA 量を上昇させた化合物は、グリセロール輸送の上昇を経由している可能性がある。

肌のシミの抑制に関して、*in vivo* での紫外線照射によるシミ沈着の抑制効果を検討した結果、*Ancellota* 種のワイン OPC 画分においてシミの沈着抑制効果を示した。先行研究において、*Ancelotta* 種のワインのチロシナーゼ活性の阻害活性を検討した結果、高いチロシナーゼ阻害活性を確認しており、OPC 量とメラニン蓄積抑制効果に相関があることがわかっている。OPC に関しては、細胞を使った *in vitro* 試験において細胞に非特異的に付着することによる偽陽性を生じる報告がある。この影響で重合度の高い OPC を含む場合は、細胞を用いた *in vitro*

試験だけでなく、動物を用いた *in vivo* 試験での確認が重要になる。今回、細胞を用いた *in vitro* でのメラニン蓄積抑制に加え、*in vivo* 試験でもシミの沈着抑制効果を示したことから、OPC のシミの改善効果に対しては確度が高いと考えられる。

以上により、重合ポリフェノールの肌の健康への活性について *in vitro* および *in vivo* 試験で検討した結果、肌の潤いについては細胞を用いた *in vitro* 試験で AQP3 発現上昇を示し、肌のシミの改善については *in vitro* 試験でチロシナーゼ阻害活性および *in vivo* 試験にてシミの改善効果を示した。本結果からヒトにおける効果を確認するため、第 2 章に述べるヒト試験を実施し、ヒトでの *Ancellota* 種のワイン OPC の肌への効果を検討した。

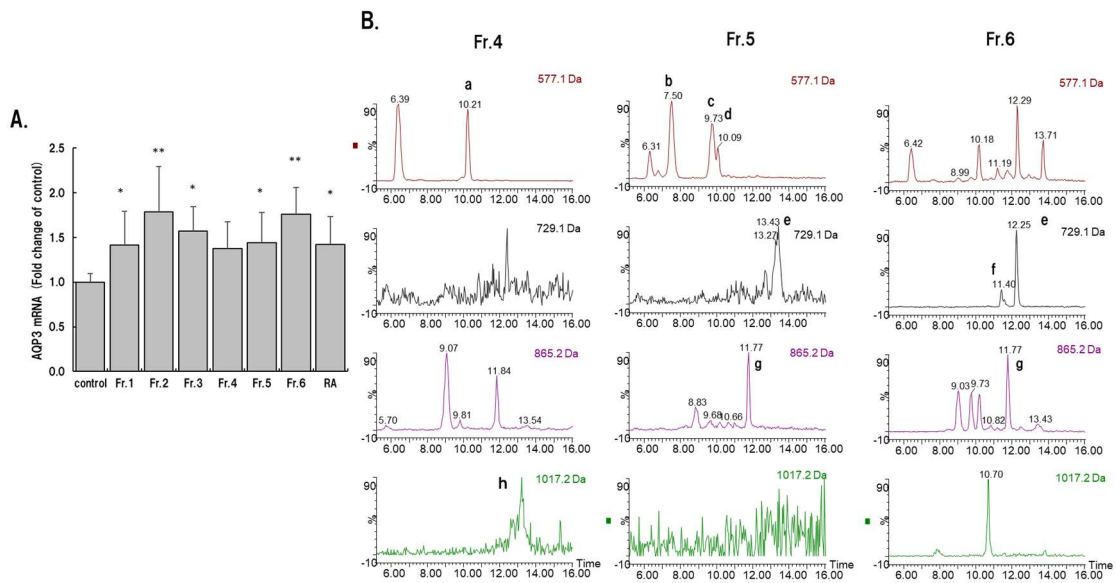


図 3. *Ancellotta* 種ワインのポリフェノール画分の各フラクションの AQP3 量と各 fraction に含まれる化合物

(A) *Ancellotta* 種ワインのポリフェノール画分の各フラクションの AQP3 mRNA 量。10%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.1)、20%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.2) 30%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.3) と 40%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.4) 50%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.5)、60%メタノール/水+1%ギ酸 (Fr.6)、レチノイン酸 2 μ M (RA)。データは、6-8 回の実験の平均値 \pm SD として表し、有意差は Dunnett's-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs. control) で検定を行った。(B) *Ancellotta* 種のワインの LH-20 分画物の LC-TOF-MS によるマスクロマトグラム (各検出 m/z は図内に表記)。 a: PB2 (EC-EC) , b: PB3 (C-C) , c: PB1 (EC-C) , d: PB4 (E-EC) , e: EC-ECG, f: C-ECG, g: EC-EC-EC, h: C-C-ECG。

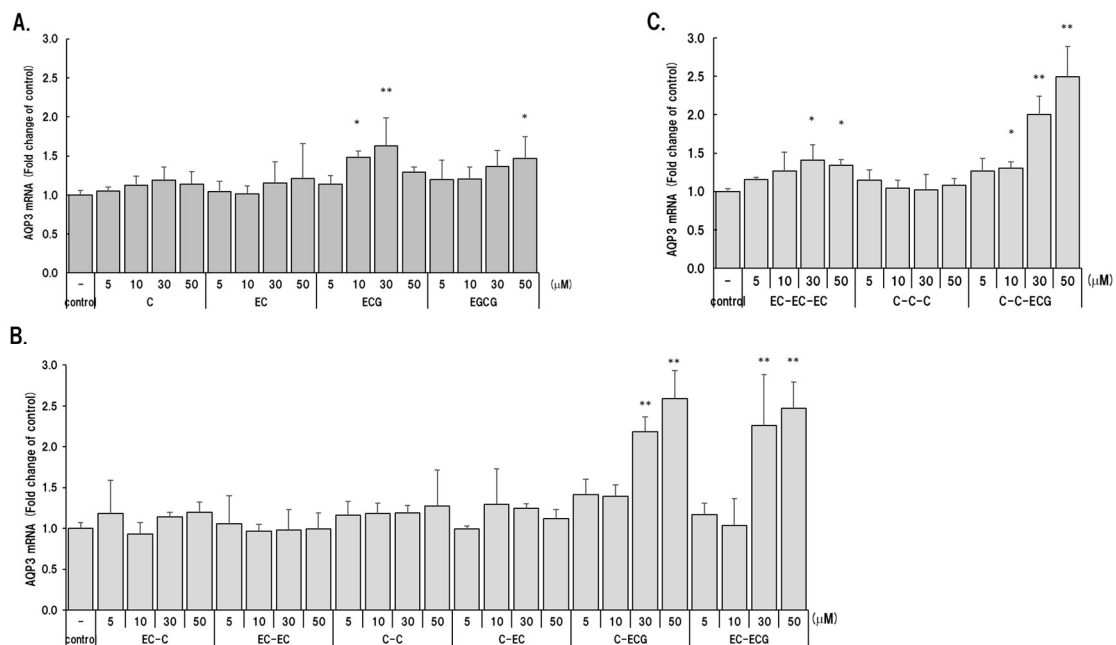


図 4. Flavan-3-ol による NHEK 細胞における AQP3 発現調節効果

(A) モノマー, (B) ダイマー, (C) トリマーでの結果。データは、n=3-7 の平均値±SD として表し、有意差は Dunnett't-test (*P<0.05, **P<0.001 vs. control) で検定を行った。

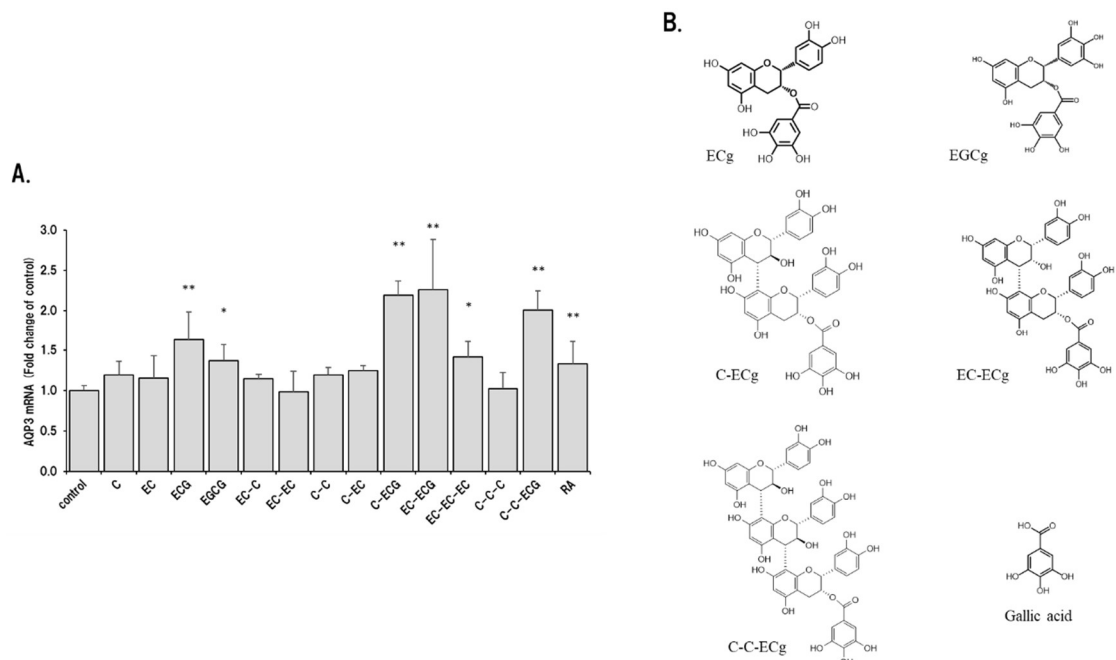


図 5. (A) 各化合物での AQP3 発現調節の活性比較 (B) 各化合物の構造

Flavan-3-ol 化合物は 30 μ M、RA は 2 μ M で試験を実施した。データは、n=3-7 の平均値 \pm SD として表し、有意差は Dunnett't-test (*P<0.05, **P<0.001 vs. control) で検定を行った。

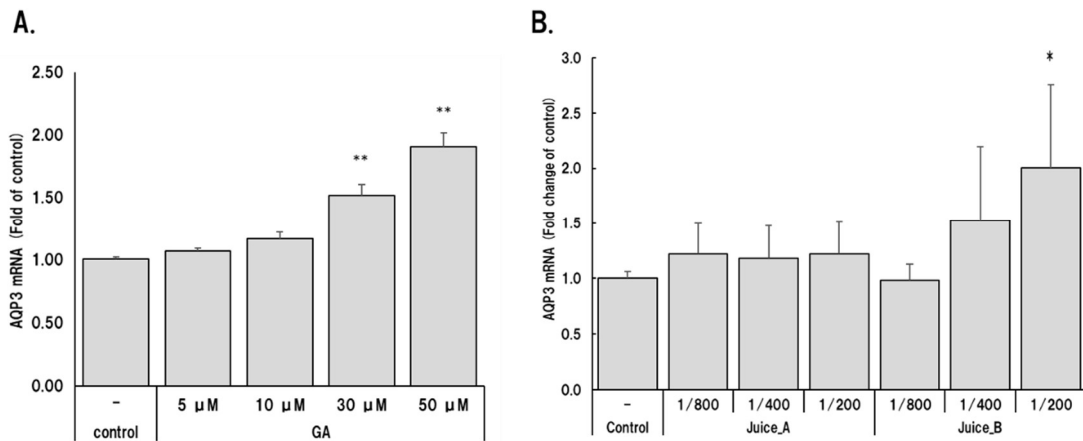
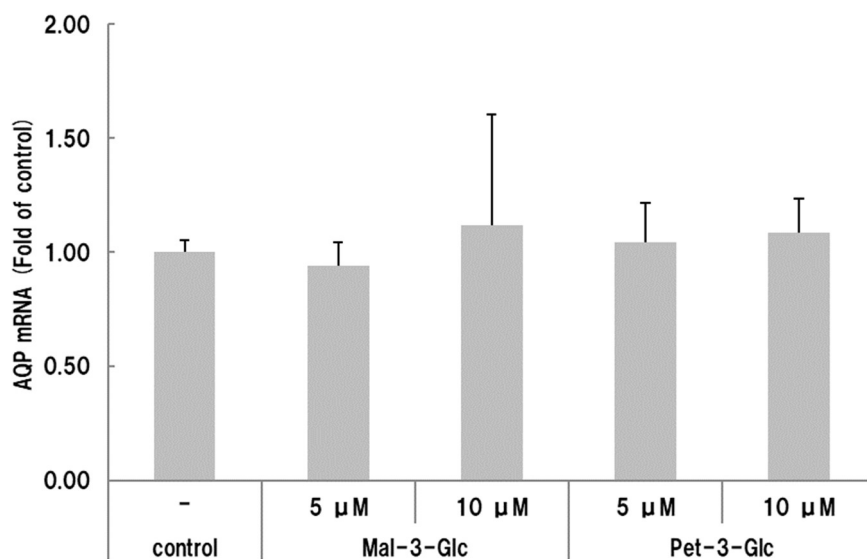


図 6. 没食子酸 (GA) と *Ancellotta* 果汁による AQP3 mRNA 発現調節効果

(A) 没食子酸 (B) *Ancellotta* 果汁。データは、n=3-7 の平均値±SD として表し、

有意差は Dunnett't-test (*P<0.05, **P<0.001 vs. control) で検定を行った。

(A)



(B)

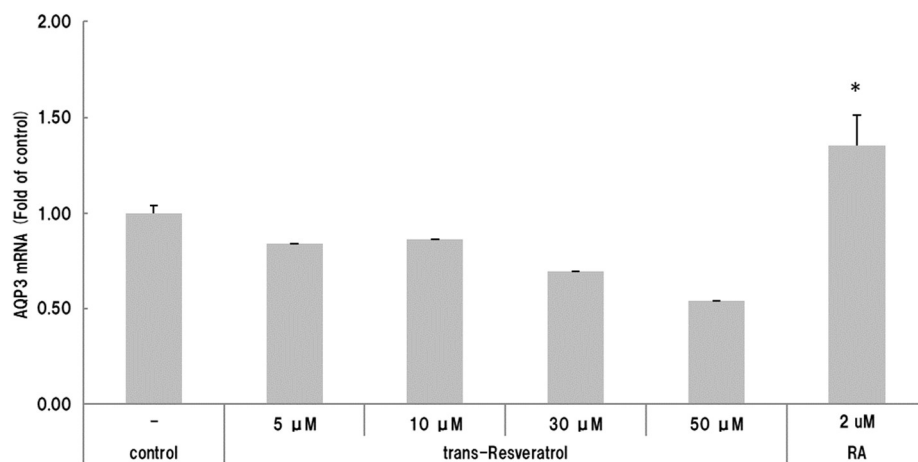
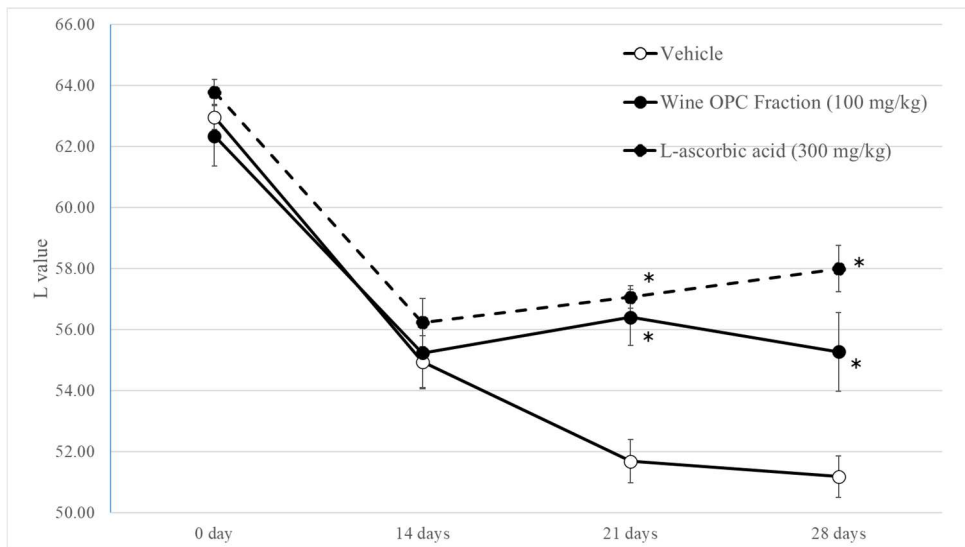


図 7. アントシアニンとレスベラトロールの AQP3 発現調節効果

(A) アントシアニン、(B) レスベラトロールの AQP3 発現効果を示す。データは、n=1-6 の平均値±SE として表し、有意差は Dunnett't-test (*P<0.05, **P<0.001 vs. control) で検定を行った。

(A)



(B)

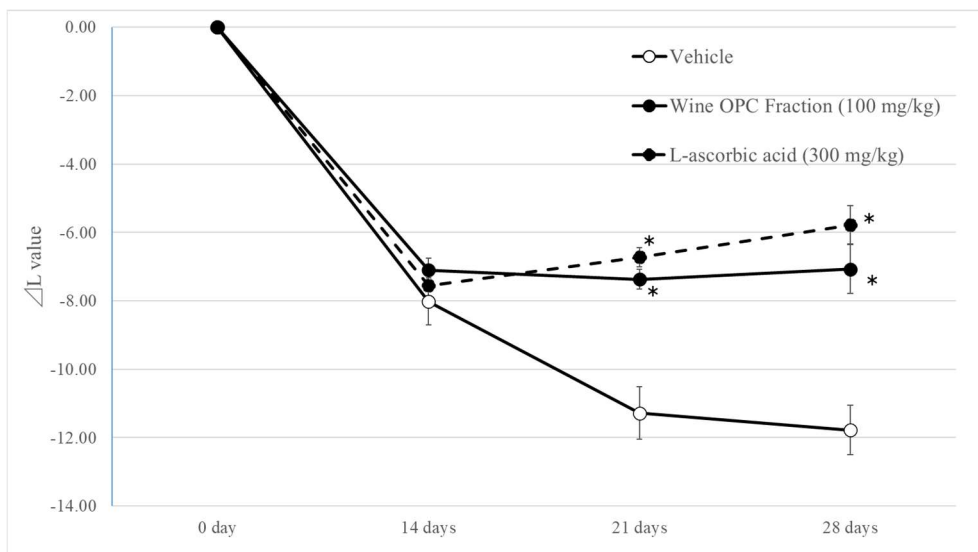


図 8. *In vivo* 評価におけるワイン OPC 画分によるシミ沈着の抑制効果

(A) は実測値、(B) は変化量を表す。データは、n-5 の平均値±SE として表し、有意差は Dunnett't-test (*P<0.05 vs. Vehicle) で検定を行った。

表 1. Real-time PCR のプライマーの配列

Genes	Primers	Sequences (5'-3')
AQP3	Forward	5'-CTGGGGACCCTCATCCTGGTGATG-3'
	Reverse	5'-CACGATAAGGGAGGCTGTGCCTATG-3'
GAPDH	Forward	5'-ACTGGTGTCTTCACCACCATGGAGAAGGC-3'
	Reverse	5'-CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGC-3'

第2章 重合ポリフェノールのヒトへの効果

第1節 序

近年、シミ・くすみ等に対する改善作用や乾燥に対する保湿作用を有する天然の食品素材が望まれている。赤ワイン OPC は、B16 メラノーマ細胞でのメラニン生成抑制作用が確認されており（16）、*in vivo* 評価においてシミ沈着の抑制効果を見出した。また、ヒトケラチノサイト細胞での AQP3 の発現上昇効果を確認し、赤ワイン OPC による肌のシミ沈着の抑制と潤いの改善効果が期待されるが、ヒトにおける効果は未だ確認されていない。

そこで本研究では赤ワイン OPC を含有する飲料の長期摂取が女性の皮膚色や角層の潤いに及ぼす効果をプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験により検証した。

第2節 材料と方法

1 試験体制

本試験は、サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社が株式会社ケイ・エス・オーに業務委託し、株式会社インフォワード恵比寿スキンリサーチセンターにて実施したものである。試験責任医師はクイーンズスクエア皮膚科・アレルギー科 沼野香代子医師が担当した。

試験は「ヘルシンキ宣言」(2013年10月改訂)および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)を遵守し、「特定非営利活動法人日本美容皮膚研究会 倫理審査委員会(IRB番号:11001096)」の審議、承認のもとに実施した。本試験の概要は、大学病院医療情報ネットワーク臨床試験登録システム(UMIN-CTR)に登録した(UMINID:UMIN000024478)。尚、本試験はインフォームドコンセントを文書で取得した上で実施した。

2 被験者

応募者250例に対してスクリーニング検査を実施し、選抜基準に適合し、かつ除外基準に該当しない100例を選抜して、本試験の被験者とした。選択基準としては、①30歳以上60歳未満の健常女性、②日光性のシミでかつ判定可能な頬のシミがあると判断された者、③本試験の目的・内容について十分な説明を受け、同意能力があり、よく理解した上で自発的に参加を志願し、書面で本試験参加に同意した者を設定した。除外基準としては、①皮膚の治療目的での医薬品を使用している者、②アトピー性皮膚炎の症状を有する者、③被験部位(顔面)の皮膚状態に顕著な異常がある者、④食物アレルギーおよび花粉症を有する者、⑤妊娠している者及び試験期間中に妊娠の意思がある者、及び授乳中の者、⑥他の

食品の摂取や薬剤を使用する試験、化粧品及び薬剤等を塗布する試験に参加中の者、参加の意志がある者、試験終了4週間以内の者、⑦日常的に赤ワインを大量に摂取している者、⑧ワインエキスを含有する化粧品を使用している者、⑨その他、試験責任医師が試験対象者として不相当と判断した者を設定した。

試験開始前に、書面により被験者毎、試験内容及び本試験への参加は自由意思であること、同意しなくても不利益を受けないこと等を十分に説明した上で、試験同意書への被験者本人の署名をもって同意取得とした。

3 試験食品

試験食品はサントリースピリッツ株式会社が製造した。被験食品は関与成分として、赤ワイン OPC 200 mg を配合した飲料（スクラロース、無水クエン酸、発酵セルロース、オレンジ果汁、ブドウ由来 OPC エキス）（200 mL）とし、対照食品は赤ワイン OPC を配合していない飲料（アセスルファムK、スクラロース、ショ糖、無水クエン酸、リンゴ酸、発酵セルロース、難消化性デキストリン、オレンジ果汁）（200 mL）とした（組成は表 2 に示す）。対照食品は、外観、風味、色等からは被験食品と区別ができないように調製した。なお、試験食品は、試験実施機関が外見上識別できないように包装し、試験実施機関は識別をランダムに A 群、B 群に変換した。割付責任者は、試験食品割付表（キーコード）

を作成し、試験食品の識別不能性を確認後、症例固定まで封印した試験食品割付表（キーコード）を厳重に保管し、盲検性を維持した。

赤ワイン（*Vitis vinifera*, Cv.*Ancellotta* 種ブドウ）を減圧濃縮しエタノールを溜去したエキスを作成し、OPC 濃度を測定した後、飲料中の濃度が 1000ppm となるように赤ワイン OPC を含むエキスを配合した。

関与成分である赤ワイン OPC の分析は、以下のように行った。被験食品飲料 1ml を Sep-pak-C18 Environmental cartridge (2cc、Waters) に負荷し、6ml の水で洗浄後、6ml の 70%エタノールで溶出した画分を濃縮し、2ml のメスフラスコで定容し、そのうち 1ml を試験管内で乾固した。対照食品は同様に固相抽出した 70%エタノールで溶出した画分全量を乾固した。乾固した物を 1ml の 0.6N 塩酸を含むブタノールで溶解し、90℃で 2 時間加熱した。標準物質として procyanidinB1（フナコシ）0.5mg を 1ml の 0.6N 塩酸を含むブタノールで同様に加熱した物を用いた。加熱後、HPLC で分析を行い、生成した cyanidin を定量した。

HPLC 条件

カラム : YMC-Pack ODS-A, 6 mm φ x 150 mm (ワイエムシイ株式会社)

移動相 : acetic acid : Methanol : H₂O=15 : 17.5 : 67.5

流速 : 1ml/min

検出 : A520nm

分析時間 : 12分

カラム温度 : 40℃

注入量 : 5 µl

分析に供した溶液中の Cyanidin 濃度を Cyanidin chloride (Funakoshi) で作成した検量線を用いて計算し、以下の式で試験飲料中の OPC 濃度を算出した。

OPC 濃度 (µg/ml) = 500 × (HPLC サンプルの Cyanidin 濃度 × 2) / (PB1 の Cyanidin 濃度)

この結果、3 連で分析した被験食品の OPC 濃度は 1042µg/ml で、1 本あたりの OPC 量は 208 mg/本 (200 mL/本) であり、また逆相の LC-MS で分析したプロシアニジン B1 は 2.26 mg/本、プロシアニジン B2 は 1.19 mg/本、プロシアニジン B3 は 0.46 mg/本、プロシアニジン B4 は 0.20 mg/本であった。なお、対照食品には OPC は含まれていなかった。

4 ヒト試験デザインおよびスケジュール

試験デザインは、対照食品を用いたランダム化二重盲検並行群間比較試験とした。本試験はスクリーニング検査、3週間の前観察期間、12週間の摂取期間、4週間の後観察期間より構成され、試験期間は、スクリーニング検査開始日から12週間の摂取終了翌日の4週間後までとした。被験食品の摂取期間は2016年11月24日から2017年2月19日の間の12週間とし、被験者は一日一回、任意の時間に、被験食品または対照食品1本（200 mL）を一時間以内に摂取することとした。主要評価項目は、医師によるシミの診断スコア、シミのメラニン値および色彩色差値による肌色とし、副次評価項目は、角層水分量、皮膚肌粘弾性、シワ深さおよびVAS（Visual Analog Scale）アンケート（シミ、くすみおよび潤い）とした。安全性評価項目は医師問診、血圧・脈拍数および臨床検査値を元に有害事象発生率および副作用発生率とした。検査は、スクリーニング時、摂取0週目、4週目、8週目および12週目に実施した（表3）。

割付方法については、割付責任者が、スクリーニング検査により本試験参加が適格であると判断された試験対象者を対象に、年齢、医師によるシミの診断スコアおよびBMIの背景因子により試験食品群間で偏り（有意水準15%）を示さないように2群に分けて試験食品割付表（キーコード）を作成した。割付責任者は、問題のないことを確認した上で、試験食品割付表を封印し、本封筒に試験課題IDおよび封印日を記載した。割付責任者は、症例固定まで封印した試験食品

割付表を厳重に保管し、開封まで盲検性を維持した。

被験者には、試験食品摂取開始日より試験終了まで毎日、試験対象者日誌（試験食品の摂取の有無、体調変化の有無、生活状況の変化の有無、アルコールの摂取状況、健康食品等の摂取の有無、医薬品使用の有無、主要化粧品の変更の有無など）を記録させ、試験期間中は①試験食品は試験責任医師または試験分担医師の指示通りに摂取する、②試験対象者日誌は指定の期間、毎日記入する、③試験期間中、化粧品は現在使用中のものを継続して使用し、使用経験の少ない品や新規の化粧品の使用を禁止する。また、皮膚科医の診察部位（目尻）への目元専用美容液の新たな使用は禁止する、④試験期間中は、新たなサプリメント、または肌のシミの改善効果を示し得る化粧品類の摂取・使用を禁止する、⑤試験期間中は、赤ブドウ成分、ポリフェノール成分を含む食品および肌への機能が製品の特徴として記載されている食品の摂取は禁止する、⑥試験期間中は、皮膚に著しい影響を及ぼす可能性のある治療（外科的治療や美容術）や医薬品の使用は禁止する、⑦試験期間中は、直接日光に曝されないように日焼けを起こすような行為は禁止することを遵守するよう指導した。

5 測定方法

測定部位は引っかき傷や皮膚炎などの皮膚症状が無い部位とし、試験期間中

変更しなかった。なお、皮膚評価は顔とし、洗面所でメイク落としと洗顔を行い、恒温恒湿室（温度： $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度： $50\% \pm 5\%$ ）に安静な状態で 20 分馴化させた後に検査を実施した。

医師によるシミの診断スコアは、頬部を医師所見による目視でのチャートとの比較での客観的数値化（0.25 きざみの 1 点から 5 点のスコア）で判断した。角層水分量は、目尻と小鼻の交点を Corneometer CM825（Courage Khazaka 製）を用いて同一箇所を 5 回測定し、最上値・最下値を削除した 3 回測定値の平均値を使用した。皮膚粘弾性も同様に目尻と小鼻の交点を測定部位とし、Cutometer MPA580（Courage Khazaka 製）で同一箇所を 3 回測定し、その平均値を使用した。メラニン値はシミ部と近傍部を Mexameter MX18（Courage Khazaka 製）でそれぞれ 2 回測定し、その平均値を採用した。色彩色差もシミ部と近傍部を色彩色差計 CR400（コニカミノルタ製）にてそれぞれ 2 回測定し、その平均値を採用した。VAS アンケートはシミ、くすみおよび潤いの項目に関して、10 cm のスケールに対して 0.01 cm 単位で測定を行った。

6 統計解析

統計解析は、IBM SPSS Statistics 24 を用いて行い、有意水準は 5%、検定は両側検定とした。連続変量については、基本統計量として、平均値及び標準偏差を

有効桁数より 1 桁以下まで、四捨五入法にて算出した。カテゴリかる変数については、その頻度と割合 (%) を算出し、割合 (%) は、四捨五入法にて小数第 1 位まで表示した。また、欠損データに対し、代替値は用いなかった。

医師によるシミの診断スコアは、摂取前 (0 週) からの変化量に対する群内比較は Wilcoxon の符号付順位検定を、群間比較は Wilcoxon の順位和検定を行った。メラニン値、色彩色差、角層水分量、皮膚粘弾性、レプリカによるシワの深さおよび VAS アンケートについては、群内比較は対応のある t 検定を、群間比較は対応のない t 検定を行った。

有効性解析対象者は、割り付けられた被験者の中から解析除外基準に該当する被験者を除いた者とした。解析除外者は、盲検開示前に試験責任医師が決定した。

第 3 節 結果

1 被験者背景および解析対象集団

被験者の内訳およびフローを図 9 に示す。すべての被験者 (被験食品群 50 例、対照食品群 50 例) が試験を完了した。

解析除外基準に該当する 3 例 (いずれも対照食品群) を除いた 97 例 (被験食品群 50 例、対照食品群 47 例) を有効性解析対象とした。安全性については試験食

品を摂取した全例（被験食品摂取群 50 例、対照食品摂取群 50 例）を解析対象とした。

被験者の一般背景を表 4 に示す。年齢、シミの診断スコア、BMI については両群間に偏りは認められなかった。

2 医師によるシミの診断スコア

医師によるシミの診断スコア結果を表 5、図 10 に示した。群内の比較において、被験食品群では摂取後 8 週、12 週で摂取開始時に比べ有意に低く、対照食品群では摂取後 12 週で摂取開始時に比べ有意に低かった（表 5）。摂取開始時からの変化量を群間で比較すると、その変化量は摂取後 8 週、12 週で被験食品群は対照食品群と比較して有意に低下した（図 10）。

3 メラニン値

シミ部および近傍部（シミ周辺のシミのない部分）のメラニン値の解析結果を表 6、図 11 に示した。メラニン値は、被験食品群、対照食品群ともに摂取開始時と比較して摂取後 4 週、8 週、12 週で有意に低い値を示した（表 6）。摂取開始時からの変化量における群間比較では、シミ部では被験食品群の方が摂取後 4 週、8 週、12 週のいずれの時点でも対照食品群より有意に低下し、近傍部では摂

取後 8 週、12 週で対照食品群より有意に低下した (図 11)。

4 色彩色差による肌色

シミ部および近傍部の L*値 (明度) の結果を表 7、図 12 に示した。シミ部における L*値は、被験食品群において摂取後 4 週、8 週、12 週で摂取開始時にくらべ有意に高い値を示し、対照食品群においては摂取後 8 週、12 週で摂取開始時にくらべ有意に高い値を示した (表 7)。摂取開始時からの変化量を群間で比較すると、被験食品群は摂取後 12 週で対照食品群にくらべ高い値を示したが、有意な差ではなかった ($p = 0.059$) (図 12)。

近傍部における L*値は、被験食品群において摂取後 4 週、8 週、12 週で摂取開始時にくらべ有意に高い値を示し、対照食品群においては摂取後 8 週、12 週で摂取開始時にくらべ有意に高い値を示したが、摂取開始時からの変化量に関し、いずれの測定時点においても両群間に有意な差は認められなかった (表 7)。

5 角層水分量とその他副次評価項目

角層水分量の結果を表 8、図 13 に示した。角層水分量では、対照食品摂取群においては摂取後 4 週、8 週、12 週で摂取開始時にくらべ有意に低い

値を示した一方で、被験食品摂取群において4週、8週、12週で摂取開始時に比べ有意に高い値を示した（表8）。群間では、実測値において摂取後12週で被験食品摂取群は対照食品摂取群にくらべ有意に高い値を示し、摂取開始時からの変化量においても摂取後4、8、12週で被験食品摂取群は対照食品摂取群にくらべ有意に高い値を示した（図13）。

その他副次評価項目である皮膚粘弾性、シワ深さおよびVASアンケートの測定値と摂取前からの変化量を表9に示した。皮膚粘弾性、シワ深さおよびVASアンケートについては、両群とも摂取後12週で摂取開始時に比べ有意に低い値を示し、群間に差は認められなかった（表9）。

6 安全性項目

安全性評価項目として有害事象発生率を表10、副作用発生率を表11に示した。本試験期間中に“重篤な有害事象”の発現は認められなかった。試験期間中に認められた有害事象は、23例（被験食品群：13例、対照食品群：10例）であったが、いずれの有害事象も軽微であり数日以内に回復が確認された（表10）。副作用は被験食品群に1件（胃部膨満感）認められたが、4日後に転帰が確認された。カイ二乗検定の結果、被験食品群と対照食品群の間に有害事象および副作用の発現率に有意な差は認められなかった（表11）。

第4節 考察

赤ワイン OPC を含有する飲料の長期摂取は、健常女性のシミの明色化および肌の潤いの上昇に作用することが明らかになった。

肌色やシミにはメラニンが関与することが知られている。表皮細胞（ケラチノサイト）に存在するメラニン色素は褐色を呈し、肌色に大きく関与する。その中でも、シミは皮膚の中にメラニンが蓄積され地肌の色よりも濃く見える部位を示し、紫外線などによりメラノサイトが活性化することでメラニンの過剰産生を促し、それが蓄積されることでシミになることが知られている。赤ワイン OPC は *in vitro* 試験において、チロシナーゼ阻害活性および B16 メラノーマ細胞でのメラニン生成抑制作用が報告されており（16）、松樹皮由来 OPC やブドウ種子由来の OPC で血流改善作用が報告されている（10）。また、第1章記載の通りヒトケラチノサイト細胞での AQP3 の発現上昇効果が見出されたため、赤ワイン OPC による肌のシミ沈着の抑制と潤いの改善効果を期待し、ヒト試験を実施した。

ヒト試験では、シミに対する赤ワイン OPC の改善効果を、医師によるシミの診断スコア、シミ部のメラニン値および色彩色差計の明度による肌色によって評価した。医師による診断スコアでは、変化量において摂取後8週および12週

で赤ワイン OPC 摂取群（被験食品群）は対照食品群と比較して有意にスコアが低下した。一方、群内では、赤ワイン OPC 摂取群では摂取後 8 週および 12 週で摂取開始時に比べ有意に低下し、対照食品群では摂取後 12 週で摂取開始時に比べ有意に低くなった。これは、一般的に皮膚メラニン量は日照時間に依存して変化するため、11 月から 2 月にかけて行われた本試験では、日照時間の短縮および UV 照射量の減少に伴って両群ともメラニン量が低下したと考えられた。UV 照射量の減少に伴う影響は、メラニン値および肌色にも表れており、シミ部におけるメラニン値は両群で摂取開始時と比較して摂取後 4 週、8 週および 12 週で有意に低い値を示した。その中で、メラニン値の減少量は、シミ部では赤ワイン OPC 摂取群の方が摂取後 4 週、8 週および 12 週のいずれの時点でも対照食品群より有意に大きく、UV 照射量の減少によるメラニンの低減に加えて更に赤ワイン OPC 摂取によるシミの低減効果を示すことがわかった。また、肌色の指標とした明度；L*値は、シミ部における変化量において赤ワイン OPC 摂取群は摂取後 12 週で対照食品群に比べ高い値を示し、赤ワイン OPC がシミ部に効果を示すことがわかった。近傍部においては、赤ワイン OPC 摂取群において摂取後 4 週以降で摂取開始時に比べ有意に高い値を示し、対照食品群においては摂取後 8 週以降で摂取開始時に比べ有意に高い値を示しており、肌色については、両群ともに明色化しており、有意な群間差は認められなかった。これらの結果は、

赤ワイン OPC の皮膚のシミ部におけるチロシナーゼ阻害によるメラニンの生成抑制作用、血流改善による皮膚ターンオーバーの活性化作用、この 2 つの作用によりシミが薄くなったと考えられる。

一方、肌の潤いについては、乾燥期に行った試験にも関わらず、角層水分量が赤ワイン OPC 摂取群のみで上昇した。対照食品摂取群においては摂取後 4、8 および 12 週で摂取開始時と比較して有意に角層水分量の低下を示したのに対し、赤ワイン OPC 摂取群においては 4、8 および 12 週で摂取開始時と比較して有意に角層水分量の上昇が認められた。変化量の解析においても摂取後 4、8 および 12 週で被験食品摂取群は対照食品摂取群と比較して有意に角層水分量の上昇を示した。乾燥期に実施した影響で対照食品摂取群では角層水分量が低下している中、赤ワイン OPC 摂取による角層水分量の上昇を示し、赤ワイン OPC 摂取によって肌の乾燥を防ぐだけでなく潤いが向上することが示された。この結果は内美容におけるこれまでの報告と比較しても驚くべき効果であり、赤ワイン OPC は強い潤いの向上効果を有すると考えられる。

以上より、赤ワイン OPC を含有する飲料の長期摂取（1 日あたり OPC として 200mg）は、健常女性における医師によるシミの診断スコア、メラニン値および角層水分量を有意に改善する効果が認められ、シミの明色化および肌の潤いの上昇に作用することが明らかになった。赤ワインは肌色や肌の潤いを維持改善

する健康美容素材として有用であると考えられる。また、本試験ではワインよりアルコールを除去した物を用いていることから、食経験のある素材を用いており、本試験の結果からも安全性に問題は認められなかった。

表 2. 試験食品 1 本 (200 mL) 当たりの関与成分量および栄養成分値

	被験食品	対照食品
関与成分：赤ワイン OPC	200 mg	0 mg
エネルギー	14 kcal	14 kcal
たんぱく質	0 g	0 g
脂質	0 g	0 g
糖質	3.4 g	3.4 g
ナトリウム	40 mg	0 mg
食物繊維	0.04 g	0.64 g

表 3. 検査スケジュール

項目	前観察期間	摂取開始日	摂取期間		
			摂取4週後	摂取8週後	摂取12週後
時期	2~4週前	0週			
身長測定	●				
血圧(座)測定	●	●			●
脈拍測定	●	●			●
血液検査	血液学的検査	●			●
	血液生化学検査	●			●
	尿検査	●	●		●
角層水分量		●	●	●	●
皮膚粘弾性		●	●	●	●
シワ (レプリカ解析)		●	●	●	●
メラニン値	●	●	●	●	●
色彩色差		●	●	●	●
VAS アンケート		●	●	●	●

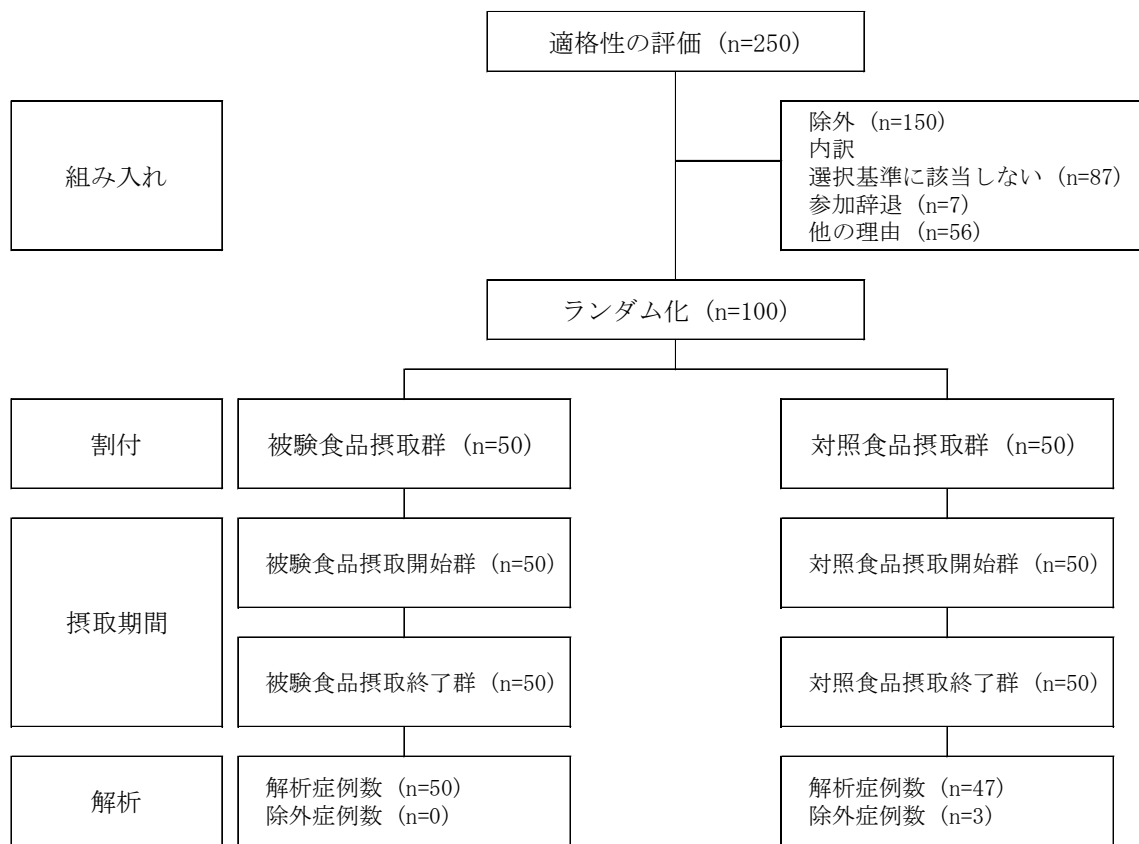


図 9. 被験者の内訳およびフロー

表 4. 一般背景

Parameter	単位	被験食品摂取群 (n=50)					対照食品摂取群 (n=50)					P
		mean	± SD	最小値	最大値	中央値	mean	± SD	最小値	最大値	中央値	
年齢	歳	44.28	± 6.50	30.0	57.0	45.00	44.66	± 5.93	33.0	57.0	44.50	0.761
BMI	-	21.07	± 1.78	17.9	26.5	20.95	21.08	± 2.59	17.3	31.0	20.80	0.982
シミの診断スコア	-	2.22	± 0.70	1.25	4.00	2.25	2.22	± 0.69	1.00	4.50	2.00	0.992

p value: Wilcoxon 順位和検定 (vs 対照食品摂取群)

表 5. 医師によるシミの診断スコアの解析結果

Parameter	群	n	0 W			4 W			8 W			12W		
			mean	± SD	<i>p</i> value	mean	± SD	<i>p</i> value	mean	± SD	<i>p</i> value	mean	± SD	<i>p</i> value
シミスコア	被験食品	50	2.24	± 0.66	0.807	2.24	± 0.66	0.841	2.15	± 0.68*	0.427	2.14	± 0.69*	0.445
	対照食品	47	2.29	± 0.70		2.29	± 0.71		2.28	± 0.70		2.24	± 0.72*	

摂取前との群内比較 * <0.05 対照食品と被験食品の群間比較は *P* 値で示した。

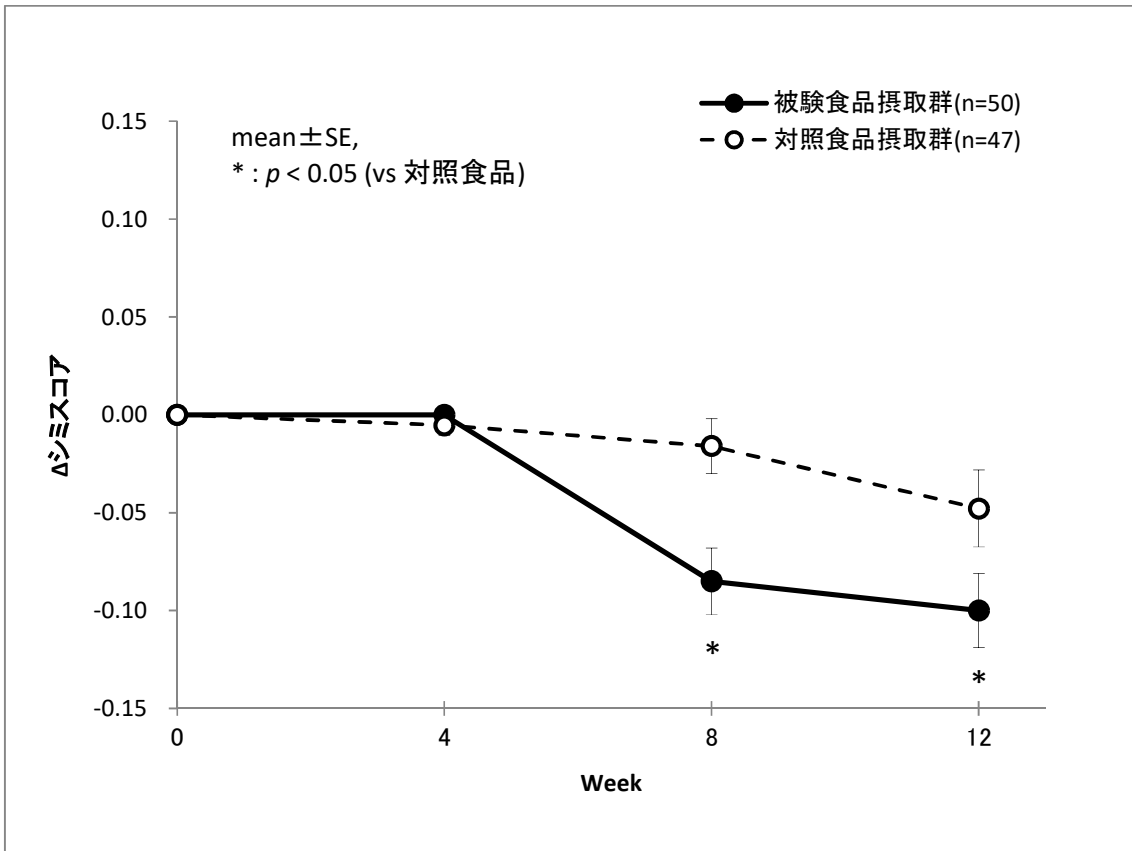


図 10. 医師によるシミの診断スコア（変化量）

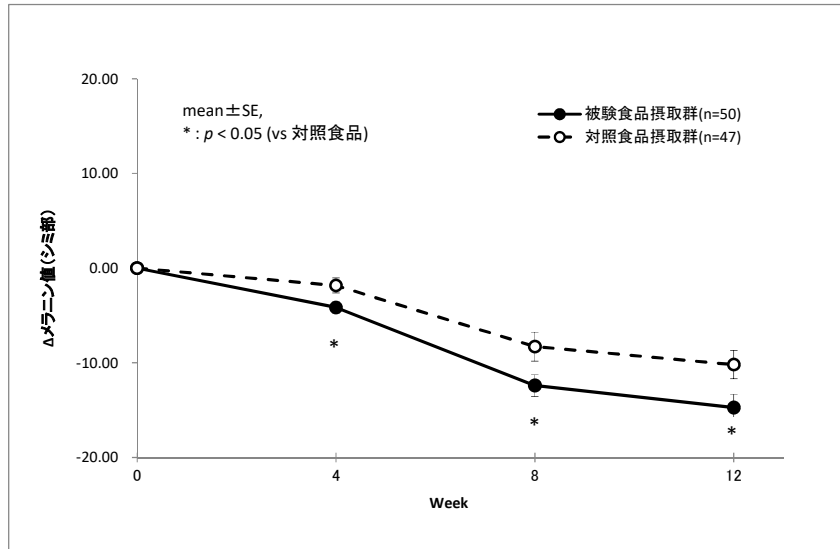
試験食品摂取前（0 週）を基準にして、摂取 4, 8, 12 週の値の変化量（ Δ ）を示した。

表 6. メラニン値の解析結果

Parameter	群	n	0 W			4 W			8 W			12W			
			mean	±	SD	mean	±	SD	mean	±	SD	mean	±	SD	P value
メラニン値 (シミ部)	被験食品	50	211.70	±	35.97	207.54	±	35.9*	199.30	±	36.5*	196.98	±	36.27*	0.888
	対照食品	47	208.17	±	34.64	206.34	±	33.97*	199.88	±	32.12*	197.98	±	33.23*	
メラニン値 (近傍部)	被験食品	50	146.63	±	24.15	142.85	±	25.08*	135.69	±	24.21*	132.91	±	23.21*	0.519
	対照食品	47	144.12	±	24.94	140.40	±	25.55*	137.67	±	25.67*	136.11	±	25.47*	

摂取前との群内比較 * <0.05 対照食品と被験食品の群間比較はP値で示した。

A



B

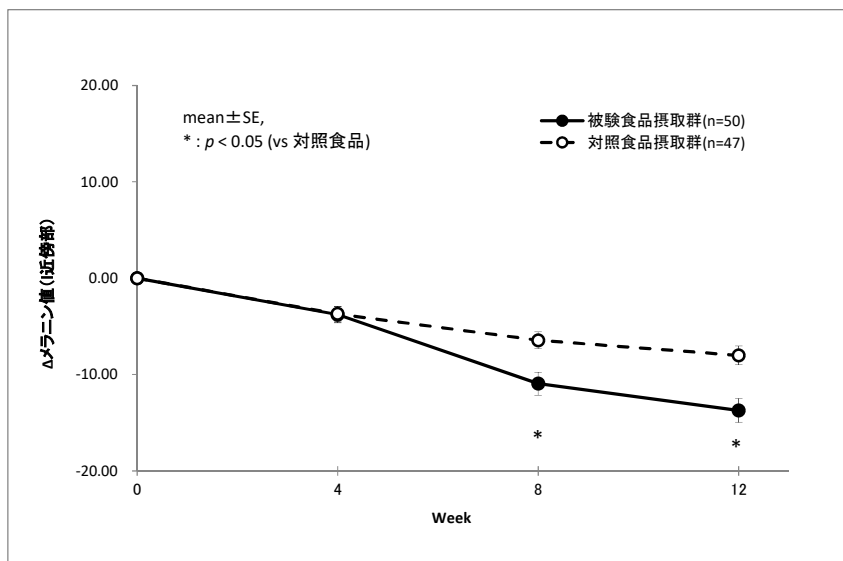


図 11. シミ部および近傍部のメラニン値 (変化量)

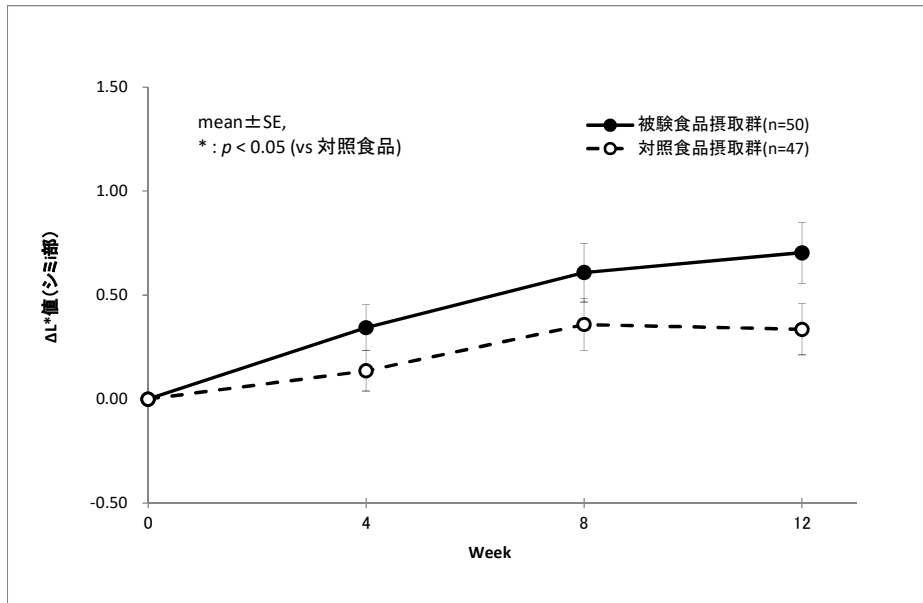
A はシミ部、B は近傍部におけるメラニン値の変化量の推移を示した。試験食品摂取前 (0 週) を基準にして、摂取 4, 8, 12 週の値の変化量 (Δ) を示した。

表 7. 色彩色差の解析結果

Parameter	群	n	0 W			4 W			8 W			12W		
			mean ±	SD	P value	mean ±	SD	P value	mean ±	SD	P value	mean ±	SD	P value
L*値_シミ部	被験食品	50	61.44 ±	2.53	0.605	61.78 ±	2.47*	0.901	62.04 ±	2.45*	0.966	62.14 ±	2.56*	0.853
	対照食品	47	61.71 ±	2.62		61.84 ±	2.59		62.07 ±	2.53*		62.04 ±	2.58*	
L*値_近傍部	被験食品	50	65.96 ±	2.04	0.324	66.11 ±	2.10*	0.359	66.27 ±	2.00*	0.403	66.32 ±	2.05*	0.341
	対照食品	47	66.40 ±	2.27		66.52 ±	2.24		66.63 ±	2.31*		66.75 ±	2.41*	

摂取前との群内比較 * <0.05 対照食品と被験食品の群間比較は P 値で示した。

A



B

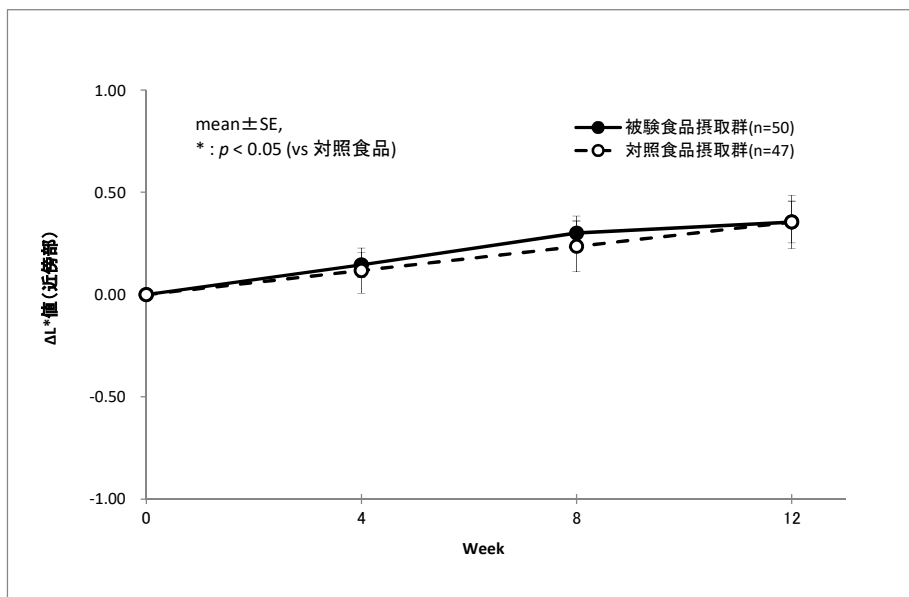


図 12. シミ部および近傍部の L*値 (変化量)

A はシミ部、B は近傍部の L*値の変化量の推移を示した。試験食品摂取前 (0 週) を基準にして、摂取 4, 8, 12 週の値の変化量 (Δ) を示した。

表 8. 角層水分量の解析結果

Parameter	群	n	0 W			4 W			8 W			12 W						
			mean	±	SD	<i>P</i> value	mean	±	SD	<i>P</i> value	mean	±	SD	<i>P</i> value				
角層水分量	被験食品	50	40.21	±	7.78	0.344	41.65	±	9.12*	0.255	42.73	±	10.35*	0.093	43.28	±	9.47*	0.040
	対照食品	47	41.78	±	8.44		39.72	±	7.37*		39.44	±	8.59*		39.51	±	8.25*	

摂取前との群内比較 * <0.05 対照食品と被験食品の群間比較は *P* 値で示した。

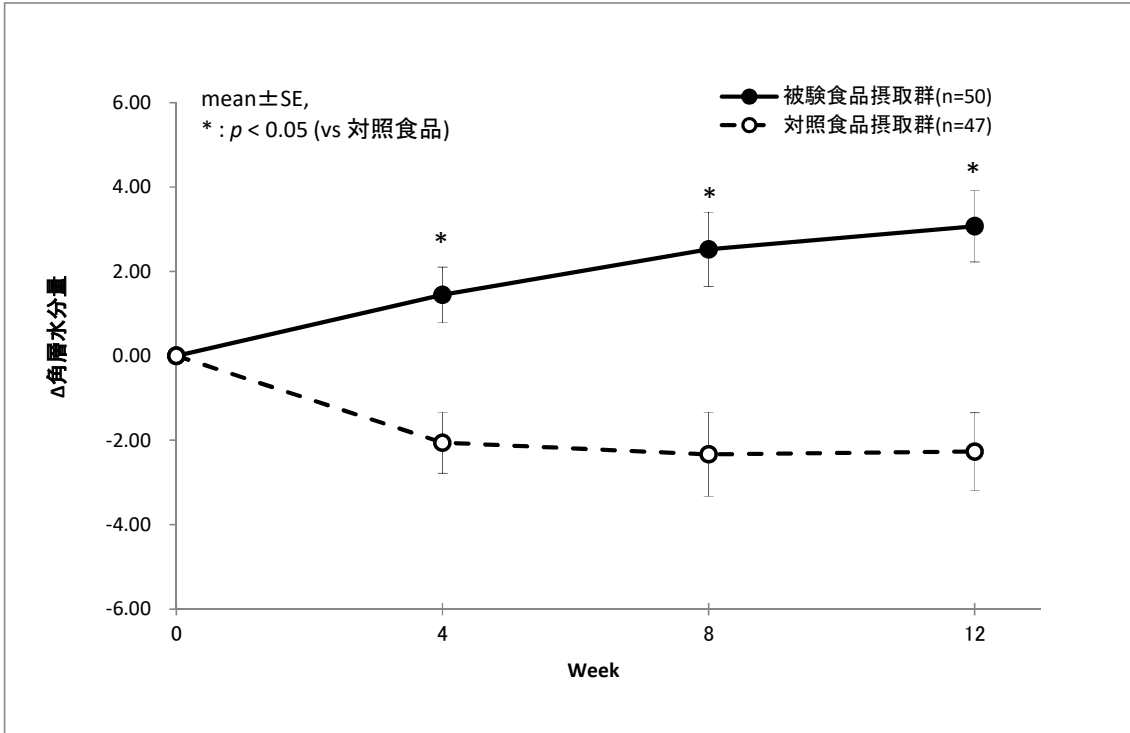


図 13. 角層水分量 (変化量)

試験食品摂取前 (0 週) を基準にして、摂取 4, 8, 12 週の値の変化量 (Δ) を示した。

表 9. 副次評価項目の皮膚計測機器による測定

Parameter	群	n	測定値				変化量 (Δ)			
			0 W		12 W		0 W		12 W	
			mean ± SD	p value	mean ± SD	p value	mean ± SD	p value	mean ± SD	p value
角層水分量	被験食品	50	40.21 ± 7.78	0.344	43.28 ± 9.47*	0.040	3.07 ± 5.99	0.000		
	対照食品	47	41.78 ± 8.44		39.51 ± 8.25*		-2.27 ± 6.30			
皮膚粘弾性	被験食品	50	0.66 ± 0.06	0.572	0.64 ± 0.06*	0.158	-0.02 ± 0.06	0.463		
	対照食品	47	0.65 ± 0.07		0.63 ± 0.05*		-0.03 ± 0.06			
R2	被験食品	50	0.35 ± 0.05	0.320	0.31 ± 0.05*	0.288	-0.04 ± 0.05	0.995		
	対照食品	47	0.34 ± 0.05		0.30 ± 0.04*		-0.04 ± 0.04			
シワ深さ	被験食品	50	4.16 ± 3.59	0.062	4.79 ± 3.93*	0.045	0.63 ± 2.09	0.422		
	対照食品	47	5.66 ± 4.23		6.73 ± 5.29*		1.07 ± 3.12			
シワ面積率 (%)	被験食品	50	52.48 ± 3.90	0.070	53.30 ± 4.05*	0.027	0.82 ± 2.18	0.322		
	対照食品	47	54.02 ± 4.38		55.30 ± 4.70*		1.28 ± 2.34			
総シワ平均深さ (mm)	被験食品	50	0.23 ± 0.22	0.073	0.27 ± 0.23*	0.040	0.04 ± 0.13	0.335		
	対照食品	47	0.32 ± 0.27		0.39 ± 0.34*		0.07 ± 0.20			
VASアンケート	被験食品	50	6.68 ± 2.44	0.511	5.36 ± 2.17*	0.526	-1.33 ± 2.31	0.211		
	対照食品	47	6.98 ± 1.90		5.06 ± 2.45*		-1.92 ± 2.32			
くすみ	被験食品	50	8.31 ± 2.12	0.183	6.41 ± 2.48*	0.978	-1.90 ± 2.47	0.324		
	対照食品	47	8.81 ± 1.46		6.40 ± 2.66*		-2.41 ± 2.62			
しみ	被験食品	50	6.69 ± 1.57	0.088	5.11 ± 1.97*	0.224	-1.58 ± 2.41	0.804		
	対照食品	47	6.10 ± 1.81		4.64 ± 1.81*		-1.46 ± 2.43			

摂取前との群内比較 * <0.05 対照食品と被験食品の群間比較は P 値で示した。

表 10. 有害事象発生率

有害事象	被験食品	対照食品	全体
なし	37	40	77
あり	13	10	23
合計	50	50	100
発生率	26%	20%	23%

p value 0.476

表 11. 副作用発生率

副作用	被験食品	対照食品	全体
なし	49	50	99
あり	1	0	1
合計	50	50	100
発生率	2%	0%	1%

p value 0.315

第3章 重合ポリフェノールの健康効果のメカニズム解明

第1節 序

ここまで赤ワインポリフェノールおよびその OPC 画分の *in vitro*、*in vivo* およびヒト試験での有効性を確認してきた。一方で、OPC に代表される重合ポリフェノールは吸収性が低いことが報告されている (29)。小腸での吸収のモデルとして Caco-2 細胞の単層を用いた *in vitro* 実験では、フラバノールの 2 量体と 3 量体のみが腸上皮を通過できることが報告されている (30)。ラットでの吸収がプロシアニジン B2 は非常に悪く、プロシアニジン B3 は吸収されないという報告もある (31、32)。また、ヒトにおいて、モノマーであるエピカテキンとダイマーであるプロシアニジン B1 の吸収性を比較した試験では、それぞれ平均値として、エピカテキンの C_{max} が 150 ng/mL、AUC (0-48 h) が 1000 ng・h/mL に対して、プロシアニジン B1 では C_{max} 1.6 ng/mL、AUC (0-48 h) が 10 ng・h/mL と 100 倍程度低くなることが報告されている (33)。ヒト試験に用いた飲料中のポリフェノール摂取量と既報から算出した血中濃度を試算すると、血中濃度と *in vitro* 試験では 1000 倍近く濃度の乖離が見られる。この濃度乖離から *in vitro* 試験で確認されたチロシナーゼ阻害および AQP3 上昇だけではメカニズムの説明が難しく、吸収されない経路が存在する可能性が考えられる。

吸収されない経路としては、①腸内細菌叢の改善による肌へ健康効果を及ぼ

した可能性、②腸内で重合ポリフェノールが分解され、代謝物が肌への健康効果を示す可能性、③腸からの自律神経を介した血流改善作用による可能性が考えられる。①腸内細菌叢の改善については、重合ポリフェノールによる腸内細菌の変化は報告されている（34）。一方、腸内細菌の結果は実験施設間、動物間、動物とヒトの間でも異なる結果が認められており（35）、腸内細菌の明確な作用を示すためにはまだ十分に研究がなされていないため、明確な寄与を説明するのは現状困難だと考えた。②重合ポリフェノールの腸内での代謝物による効果については、摂取したポリフェノールの種類に関わらず、糞便中にはほぼ同じ分解代謝物が検出されるため、重合ポリフェノールで確認できている作用を説明するのは難しい（36）。また、腸内細菌叢によって異化されてヒドロキシフェニル- γ -バレロラクトン（HGVL）を生成することがわかっているが、モノマーのエピカテキンより重合ポリフェノールは代謝されにくいという報告もあり、代謝物が効果を示していることは有力ではないと考えた（37）。一方、③の重合ポリフェノールによる自律神経を介した血流改善については、ポリフェノールの摂取により数時間後に血流改善が報告されている（38）。また、*in vivo* 試験において、エピカテキンおよびその重合ポリフェノールを投与により、血圧・心拍数は投与直後から上昇し60分後には投与前値に戻ることが報告されている（39）。また、flavan-3-ols 投与により血中アドレナリン濃度の有意な上昇、褐

色脂肪細胞の脱共役タンパク質 (UCP-1) および骨格筋のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ コアクチベーター-1 α (PGC-1 α) の増加が認められており、これらの変化は、アドレナリン受容体阻害剤の併用によって消失している (40)。以上のことから、重合ポリフェノールを含む flavan-3-ols の投与により交感神経が興奮し、一過的な血管収縮が起こり、この循環動態変化から、血管内皮による eNOS 活性化と NO 産生が起こり、血管が弛緩する。この反応が繰り返されることにより、血管の再構築や血管新生が生じ、血圧の低下が生じると考えられている (41)。この現象は肌や皮膚でも起こる可能性が高く、一過的な血管収縮と弛緩の繰り返しにより、血管再構築と血管新生を起こし、肌の細胞のターンオーバーが促進されて、肌のシミや潤いが改善する可能性があると考えた。そこで、メカニズム仮説として、自律神経を介した血流改善による効果のメカニズムに重点を置き、重合ポリフェノールのメカニズム仮説の検討を行った。

第2節 材料と方法

1. 基本情報

赤ワイン OPC 画分の調製は、*Ancellotta* 種のワインを蒸発させてエタノールを除去後、Diaion HP-2MG (Supelco, USA) カラムクロマトグラフィーを通過させた。H₂O で溶出後、70% (v/v) エタノールで溶出した画分を集め、蒸発させて赤

ワインポリフェノール画分を得た（総ポリフェノール含有量：52.73%（w/w）、OPC 含有量：28.34%（w/w））。Flavangenol[®]（以下、フラバンジェノール）は東洋新薬社の食品原料を使用した（総ポリフェノール含有量：71.4%（w/w）、OPC 含有量：59.82%（w/w））。フラバンジェノール OPC 画分は、フラバンジェノールを蒸留水に溶解し、EtOAc で 4 回抽出した後、水層を濃縮して凍結乾燥し、水抽出物を得た。その水抽出物をメタノール 2L とクロロホルム 2L の等量混合溶媒で溶解させ、遠心により固液分離した。液相に対して再度クロロホルム 1L を添加し、固液分離を行い、再度液相に対してクロロホルム 1.68L を追加添加し、沈殿物を濃縮、凍結乾燥してフラバンジェノール OPC 画分を得た（OPC 含有量 72.6%（w/w））。総ポリフェノール及び OPC の分析は第 2 章第 2 節 3.試験食品に記載の方法で分析を行った。自律神経活性化の動物実験には、重合ポリフェノール素材として、アサイー原料（フルッタフルッタ社製）を用いた。

2. 反復投与における血管内皮機能評価

9 週齢の雄性 SHR/Izm ラット（日本エスエルシー株式会社）を購入し、以下の実験に供した。試験期間中、食餌と水は自由摂取とし、制限を行わなかった。飼育環境として、温度：18.6～25.1℃、湿度：36～69%、明暗各 12 時間（照明：午前 7 時～午後 7 時）に維持された飼育室で動物を飼育した。入手した動物は 7 日

間の検疫馴化期間を設けた。馴化期間中の体重増加が順調で一般状態にも異常を認めない動物について、群分け時の血圧が各群で均一になるように、1群8匹の2群に群分けした。血圧測定は tail-cuff 法（株式会社ソフトロン製 非観血式自動血圧測定装置 BP-98A）を用いて実施し、動物を加温器に入れて約 36~38°C に加温し、動物の安定（心拍数の変動と外観上の動きで判断）を確認した後、血圧を3回測定してその平均値を測定値とする。測定項目は収縮期血圧（SBP）とした。各群の構成はそれぞれ、被験物質を投与しない①Vehicle 群、被験物質を投与する②wine OPC 200 mg/kg 投与群とした。①Vehicle 群には蒸留水を、②wine OPC 200 mg/kg 投与群には赤ワインポリフェノール画分（総ポリフェノール含有量：52.73%（w/w）、OPC 含有量：28.34%（w/w））を蒸留水に懸濁させて28日間連続で強制経口投与を行った。血圧測定は、群分け日および被験物質投与後7日目、14、21 および 28 日目に実施した。投与28日後、イソフルラン吸入麻酔下に後大静脈からヘパリン添加ディスポーザブル注射筒を用いて全採血して放血安楽死させ、心臓、左心室、肝臓、腎臓（左右）、胸部大動脈の重量を計測した。血管内皮機能の評価としては、胸部大動脈を用いて摘出血管試験（マグヌス試験）で行った。摘出した胸部大動脈からリング状標本（幅：3~4 mm）を1個体より1標本作製した。標本はオルガンバス（容量：10 mL、温度：37±1°C）に95%O₂+5%CO₂の混合ガスを通じた Krebs-Henseleit 液（組成、NaCl:118.0 mmol/L,

KCl : 4.7 mmol/L, CaCl₂ : 2.5 mmol/L, KH₂PO₄ : 1.2 mmol/L, MgSO₄ : 1.2 mmol/L, NaHCO₃ : 25.0 mmol/L, glucose : 11.1 mmol/L) を満たし, 約 1 g の負荷で懸垂した. 標本の反応は FD ピックアップ (TB-611T, 日本光電工業株) 及び高感度直流増幅器 (AD-611J, 日本光電工業株) を介してインク書き記録計 (サーボコーダー, SR6211 及び SR6221, グラフテック株) にて記録した.

標本を約 60 分平衡化 (10~20 分ごとに Krebs-Henseleit 液を交換する) させた後, KCl (最終濃度 50 mmol/L) を添加し収縮反応を記録した. KCl の最大収縮が得られた後, Krebs-Henseleit 液で標本を洗浄し約 40 分間休止した. 休止中は約 10 分間隔で計 3 回, Krebs-Henseleit 液を交換した. 休止後, phenylephrine (最終濃度 0.3 μ mol/L) を添加し収縮反応を記録した. phenylephrine の最大収縮が得られた後, Krebs-Henseleit 液で標本を洗浄し約 40 分間休止した. 休止後, 再度 phenylephrine 収縮を記録し, 最大収縮が得られた後, acetylcholine (以下 ACh, 最終濃度 1 nmol/L~10 μ mol/L) を低濃度より公比 3 で累積添加した. 最後に papaverine (最終濃度 : 100 μ mol/L) を添加して最大弛緩反応を確認した. 弛緩率の算出としては, ACh 各濃度及び papaverine の弛緩値 (mm) は, ACh の添加直前を基線として, ACh 各濃度及び papaverine の弛緩最大値までを定規で測定した. ACh 各濃度の弛緩率 (%) は以下の計算式により算出した.

①弛緩率 (%) = (ACh 各濃度の弛緩値 / papaverine の弛緩値) ×100

②弛緩率 (%) = (ACh 各濃度の弛緩値 / phenylephrine の収縮値) ×100

3. 単回投与における血圧上昇効果の評価試験

被験物質の単回投与試験では、9 週齢の雄性 SHR/Izm ラット（日本エスエルシー株式会社）を購入し、2.反復投与における血管内皮機能評価記載の方法に従って、馴化検疫、群分け、血圧測定を行った。各群の構成はそれぞれ、被験物質を投与しない①Vehicle 群、被験物質を投与する②wine OPC 200 mg/kg 投与群とした。①Vehicle 群には蒸留水を、②wine OPC 200 mg/kg 投与群には赤ワインポリフェノール画分（総ポリフェノール含有量:52.73%(w/w)、OPC 含有量:28.34% (w/w)) を蒸留水に懸濁させて単回投与後、1 時間、2 時間、4 時間および 8 時間後に血圧を測定した。

4. NO 産生の動物実験

6 週齢の雄性 SD ラット（日本 SLC 株式会社）を購入し、以下の実験に供した。試験期間中、食餌と水は自由摂取とし、制限を行わなかった。飼育環境として、室温は $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に、湿度は $60 \pm 5\%$ に維持されるよう調節し、12 時間毎に明期、暗期が交互に切り替わる条件で飼育を行った。1 週間馴化飼育を行った後、体重に基づいて 3 つの群に群分けを行った（1 群につき $n=9$ ）。各群の構成（群

番号) はそれぞれ、被験物質を投与しない①control 群、被験物質を投与する② Flavangenol 154 mg/kg 投与群 と、③Flavangenol OPC 100mg/kg 投与群とした。 Flavangenol 154 mg/kg 投与群はフラバンジェノール原料 (総ポリフェノール含有量 : 71.4% (w/w)、OPC 含有量 : 59.82% (w/w)) を用い、Flavangenol OPC 100mg/kg 投与群ではフラバンジェノール OPC 画分 (OPC 含有量 72.6% (w/w)) を用いた。被験物質は蒸留水に懸濁し、経口ゾンデを用いて強制経口投与を行った。群分け後、被験物質を投与し、4 時間後に微静脈採血を行い、ヘパリン血漿を取得し、血中 NO 産生量を測定した。血中の NO 濃度は R&D systems 社製 Total NO/Nitrite/Nitrate Assay Kit を用いて測定し、測定キットの方法に準じて測定を行った。

5. HUVEC を用いた重合ポリフェノールによる NO 産生効果

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) は、Life science technologies 社より入手した。HUVEC を T75 フラスコ (75cm²) に 1×10⁵ 個の密度で播種し、medium 200 (Life technologies 社) に Low Serum Growth Supplement (LSGS) (Life technologies 社) を添加し、37°C、5%CO₂ の加湿環境下で継代維持し、継代 1~8 回の細胞を用いて試験を実施した。前日に、3×10⁴ 個/well で細胞を播種し、翌日に血清無しの medium200 に交換し、被験物質を添加した。37°C、5%CO₂ の加湿環境下で 24 時

間培養後、上清中の NO 濃度を測定した。血中の NO 濃度は R&D systems 社製 Total NO/Nitrite/Nitrate Assay Kit を用いて測定し、測定キットの方法に準じて測定を行った。

6. 重合ポリフェノールによる血流改善効果

6 週齢の雄性マウス C57BL/6J (チャールズリバー株式会社) を購入し、以下の実験に供した。試験期間中、食餌と水は自由摂取とし、制限を行わなかった。飼育環境として、室温は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に、湿度は $60 \pm 5\%$ に維持されるよう調節し、12 時間毎に明期、暗期が交互に切り替わる条件で飼育を行った。1 週間馴化飼育を行った後、体重に基づいて 3 つの群に群分けを行った。各群の構成 (群番号) はそれぞれ、被験物質を投与しない①コントロール群 (n=8)、被験物質を投与する②フラバンジェノール 100 mg/kg 群 (n=6) と、③フラバンジェノール 300 mg/kg 群 (n=6) とした。コントロール群には蒸留水を投与し、被験物質投与群は、フラバンジェノールを蒸留水に懸濁し、経口ゾンデを用いて強制経口投与を行った。群分け後、被験物質を 10 mL/kg body weight 経口投与した。投与 30 分後にイソフルランの吸入麻酔を行い、維持麻酔下で血流測定台にセットし、30 分間静置した。Omegazone OZ-2 Pro (オメガウエーブ株式会社、測定原理：レーザードップラー法) により両下肢の血流量を 1 分間測定し、これをベース値とし

た。なお血流量は1秒あたりに1回の間隔で測定された。左下肢を5分間冷却した。冷却方法は、中空になっているマグナス管に8°Cの冷却水を循環させ、中空部分に下肢を入れこむことで、冷水に直接接触せずに冷却させた。この際、中空部分は約12°Cで安定した。Omegazone OZ-2 Proを用いて両下肢の血流測定を30分間行った。Control群血流はドップラー効果を利用して測定しているため、マウスの呼吸時に下肢が動くことで血流が増加する方向にノイズが発生する。そこで、10秒毎の血流量の最小値をつなぎあわせたものを正しい血流量として採用した。ベースラインは冷却刺激前の血流量の平均値とし、冷却後の最低血流量がベースラインに対して低下した割合を算出した。

7. 自律神経活性化の動物実験

本試験は株式会社 ANBAS に試験委託して実施した。実験には12時間毎の明暗周期（8時～20時まで点灯）下に24°Cの恒温動物室にて1週間以上飼育した体重約300gのWistar系雄ラット（約9週齢）を使用した。実験当日は3時間絶食させた後ウレタン麻酔し、十二指腸カニューレを挿入し、その後、腸迷走（副交感）神経求心枝を銀電極で吊り上げ、神経の電気活動を電気生理学的に測定した。この電気活動の測定値が落ち着いた時期（13時頃）に重合ポリフェノール素材の5つの濃度の懸濁液（1、3、10、30、100 mg/ml）を、それぞれ1 ml/300g体重、カニューレを用いて十二指腸投与し、その際生じる電気活動の変化を60

分間ずつ電気生理学的に測定した。なお、対照試験としては懸濁に用いた生理的食塩水溶液を 1 ml/300g 体重、十二指腸投与した時のこれらの自律神経活動の変化を測定した。また、手術開始から測定終了までチューブを気管に挿入して気道を確保し、保温装置にて体温（ラット直腸温）を $35.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保つようにした。これらの神経の活動データは 5 分間毎の 5 秒あたりの発火頻度（pulse/5 s）の平均値にて解析し十二指腸投与開始前 5 分間の値（0 分値）を 100% とした百分率で表した。

8. 統計解析

In vitro 試験では、NO 産生量については平均値 \pm 標準偏差で表した。有意性は Dunnett's test で調べた。 $p<0.05$ の差を統計的に有意であるとみなした。

In vivo 試験では、各観察時点の平均値及び標準誤差を算出した。検定は、2 群の試験では、student's t-test で control に対する有意性を解析し、3 群の試験では Dunnett's t-test で control に対する有意性を解析した。 $p<0.05$ の差を統計的に有意であるとみなした。

第 3 節 結果

1. 血管内皮機能改善の動物実験

被験物質を 28 日間反復経口投与し、Day 7、14、21 及び 28 の血圧を測定して

比較した。その結果、wine OPC 200 mg/kg 投与群では Day 7, 21 及び 28 の測定ポイントにおいて、Control 群と比較して統計学的に有意な血圧の低値を示した (図 14)。反復試験における Day 28 の血圧測定後に採取したラット胸部大動脈を用いてマグヌス試験を行い、血管内皮機能を評価した。その結果、papaverine の弛緩値を 100%とした場合の弛緩率は、wine OPC 200 mg/kg 投与群で Ach 濃度 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3 および 1 $\mu\text{mol/L}$ の滴下において、Control 群と比較して統計学的に有意な弛緩率の高値を示した (図 15)。次に、phenylephrine の収縮値を 100%とした場合の弛緩率は、wine OPC 200 mg/kg 投与群で Ach 濃度 0.001~0.3 $\mu\text{mol/L}$ の滴下において、Control 群と比較して統計学的に有意な弛緩率の高値を示した (data not shown)。Day 28 の血圧測定後に採取した心臓、左心室、肝臓、腎臓 (左右) 及び胸部大動脈の重量を測定し、心臓、肝臓、腎臓及び胸部大動脈は体重 1 g 辺りの重量を、左心室は心臓 1 g 辺りの重量を各々算出して比較した。その結果、wine OPC 200 mg/kg 投与群の胸部大動脈重量は Control 群と比較して有意な低値を示した (data not shown)。その他の器官重量については、Control 群とその他の群で有意な差は認めらなかった (data not shown)。

2. 単回投与の動物実験

被験物質を単回経口投与した 1, 2, 4 及び 8 時間後の血圧を測定して比較した。

その結果、wine OPC 200 mg/kg 投与群では投与 1, 2, 4 及び 8 時間後の全ての測

定ポイントにおいて、Control 群と比較して統計学的に有意な血圧の低値を示した (図 16)。

3. NO 産生の動物実験

被験物質を単回投与し、4時間後の血漿中の NO 産生量を比較した。その結果、Flavangenol 154 mg/kg 投与群および Flavangenol OPC 100mg/kg 投与群において、control 群と比較して有意な NO 産生量の増加を示した (図 17)。

5. *in vitro* の HUVEC 細胞添加試験

HUVEC に赤ワインポリフェノール画分またはフラバンジェノールを添加し、24 時間後の NO 産生量の比較を行った。その結果、control と比較して、wine OPC 10, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および Flavangenol 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した群において、有意な NO 産生の増加を示した。一方、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加では有意な NO 産生の上昇は確認されなかった。(図 18)

4. 重合ポリフェノールによる血流改善効果

冷却による下肢の血流低下を重合ポリフェノールにより抑制できるか評価した。その結果、コントロール群と比較して、フラバンジェノール 100 mg/kg 群において血流低下抑制作用の有意傾向を示した ($p=0.065$) (図 19)。有意差は確認

できなかったが、平均値として血流低下抑制方向に示しており、例数を増やすことで差が確認できると考えている。

6. 腸迷走（副交感）神経求心枝の活動に対する重合ポリフェノール素材の各濃度懸濁液の十二指腸投与効果の検討

重合ポリフェノール素材の懸濁液（1、3、10、30 または 100 mg/ml）を、それぞれ 1 ml/300g 体重、カニューレを用いて十二指腸投与した時の腸迷走（副交感）神経求心枝の活動（afferent intestinal vagal nerve activity、afferent-IVNA）における十二指腸投与前（0分）の afferent-IVNA を 100%とした百分率で表した afferent-IVNA の変化を図 20 に示す。対照実験として行った、生理食塩水 1 ml/300g 体重の十二指腸投与は afferent-IVNA をほとんど変化させず、afferent-IVNA 値を投与 20 分後に最低値 91.6%、投与 60 分後に最高値 108.7%とし、それ以外の測定期間中 afferent-IVNA 値をこれらの値の間の値に止めた。重合ポリフェノール素材の 1 mg/ml 懸濁液を 1 ml/300g 体重、十二指腸投与した時には afferent-IVNA は徐々に上昇して行き、afferent-IVNA 値は投与 60 分後に最高値 142.7%に増加した。重合ポリフェノール素材の 3 mg/ml 懸濁液を 1 ml/300g 体重、十二指腸投与した時にも afferent-IVNA は徐々に上昇して行き、afferent-IVNA 値は投与 50 分後に最高値 154.7%に増加し、その後その値の付近に止まった。重合ポリフェノール素材の 10 mg/ml 懸濁液を 1 ml/300g 体重、十二指腸投与した時には投与後

一時 afferent-IVNA は低下して、投与 40 分後に afferent-IVNA 値は最低値 91.3% に減少し、その後増加して投与 60 分後には afferent-IVNA 値は最高値 118.5% となった。重合ポリフェノール素材の 30 mg/ml 懸濁液を 1 ml/300g 体重、十二指腸投与した時にも投与後一時 afferent-IVNA はやや低下して、投与 30 分後に afferent-IVNA 値は最低値 98.7% となったが、その後やや上昇して投与 45 分後には最高値 119.4% に増加した。重合ポリフェノール素材の 100 mg/ml 懸濁液を 1 ml/300g 体重、十二指腸投与した時には afferent-IVNA はゆっくりとやや上昇して、投与 55 分後に最高値 115.4% に増加した (図 20)。

第 4 節 考察

第 1 章記載のようにメカニズムとしては、吸収される OPC 成分については、ガレート基を有するカテキン二量体が肌まで届き、チロシナーゼ阻害と AQP3 の発現向上によって、それぞれ肌のシミ低減と潤い向上効果を示したと考えられた。一方、重合ポリフェノールは吸収性が低く、ヒトにおいて、モノマーであるエピカテキンとダイマーであるプロシアニジン B1 の吸収性を比較した試験では、それぞれ平均値として、エピカテキンの C_{max} が 150 ng/mL、AUC (0-48 h) が 1000 ng · h/mL に対して、プロシアニジン B1 では C_{max} 1.6 ng/mL、AUC (0-48 h) が 10 ng · h/mL と 100 倍程度低くなることが報告されている (33)。今

回、ヒト試験に供した重合ポリフェノール量としては、200mg/man 程度であり、活性が確認されている GA 付の二量体については 0.08 mg/man 程度になる。今回の *in vitro* 試験は 30 μ M (約 18 μ g/mL 程度) で活性が確認されているため、体内動態を考慮すると、血中濃度と *in vitro* 試験では 1000 倍近く濃度の乖離が見られ、*in vitro* 試験での効果でメカニズムの説明は難しかった。また、重合ポリフェノールは非特異的に細胞に吸着する報告もあり (42)、擬陽性の結果が得られる可能性もあることから、吸収されて効果を示す作用は疑わしい。

今回、吸収されない経路として、①腸内細菌叢の改善による肌へ健康効果を及ぼした可能性、②腸内で重合ポリフェノールが分解され、代謝物が肌への健康効果を示す可能性、③腸からの自律神経を介した血流改善作用による可能性が考えられたが、前述したように③腸からの自律神経を介した血流改善作用に着目して研究を行った。

今回、重合ポリフェノールによる血流改善機能を検討した結果、長期投与によって血圧低下作用と血管内皮機能の改善効果を示した。驚くべきことに、吸収されにくい重合ポリフェノールが単回で血圧低下作用および NO 産生上昇作用を持つことから吸収されない経路が存在することを見出した。これまでの報告では、flavan-3-ol の投与直後からの血圧が上昇し 60 分後には投与前値に戻った報告があり (39)、その後の経過として血圧が低下したと考えられる。この現

象は、重合ポリフェノールの投与により交感神経が興奮し、一過的な血管収縮が起こり、この循環動態変化から、血管内皮による eNOS 活性化と NO 産生が起こり、血管が弛緩したフィードバック現象を捉えたと考えられる。今回実施した反復投与モデルにおいて、重合ポリフェノール投与群における胸部大動脈重量は Control 群と比較して有意な低値を示していた (data not shown)。この結果からも重合ポリフェノールの反復投与により、血管の再構築や新生が起こり、胸部大動脈の重量変化が少なかったと考えられる。食品素材によって eNOS 活性化または NO 産生上昇による血流改善作用の報告は多々あるが、ポリフェノールは従来の血流改善のメカニズムとは異なる点が興味深い。ポリフェノールは報告にもあるように、投与直後は血圧・心拍数の上昇が起こり、その後に血管弛緩による血圧低下が生じる。この血管の収縮・弛緩の繰り返しにより、血管の再構築や新生が起こり、組織全体の血流の恒常性維持に役立っていると考えられる。肌のシミ部には異常な毛細血管ネットワークが形成されており、その毛細血管のネットワーク異常を、ポリフェノールによる血管ネットワークの再構築作用によって正常に戻した可能性もある。

自律神経系の関与については、直接、腸からの自律神経の活性化を検討した結果、重合ポリフェノール素材による一部の濃度で腸からの自律神経の活性化を示した。ポリフェノールによる自律神経への作用に関しては、レスベラトロール

を投与することで腸からの迷走神経を活性化する報告もあり（43）、受容体を介した作用が考えられる。報告では、神経毒を大量投与して作成した除知覚神経モデルラットを用いて、flavan-3-ol を投与した結果、循環刺激作用やエネルギー代謝亢進作用は除知覚神経モデルラットにおいてすべて消失している（41）。この結果からも受容体の存在が示唆されるが、重合ポリフェノールが自律神経に作用する受容体は未だ明らかになっていない。ポリフェノールが結合する受容体としては、EGCg が 67kDa ラミニンレセプターと結合することが報告されている（44）。*In silico* で網羅的にポリフェノールとタンパク質の相互作用を解析した報告では、核内受容体である PPAR や G タンパク質共役型受容体など様々な受容体との相互作用が報告されている（45）。一方、自律神経や感覚神経などの消化管からの神経刺激を起こす受容体としては、温度感受性受容体の TRP チャンネルが有名であり、口腔内だけでなく消化管内でも発現が確認されている（46）。TRP チャンネルとポリフェノールの研究については、2020 年に TRPA1 や TRPV1 とポリフェノール類の結合が報告されている（47）。口腔内で TRP チャンネルを用いてポリフェノールを感知すると渋味が生じる可能性もあり、渋味と受容体と感覚神経の関係性は興味深い。ポリフェノールと自律神経や感覚神経の関係性の解明は新たな課題である。

以上により、今回の仮説に対する因果関係や肌の機能との関係性など、

まだ未解明な部分も大いにあるが、重合ポリフェノールによる自律神経活性化による血流改善という矛盾の無い仮説と検証結果が得られたと考える。

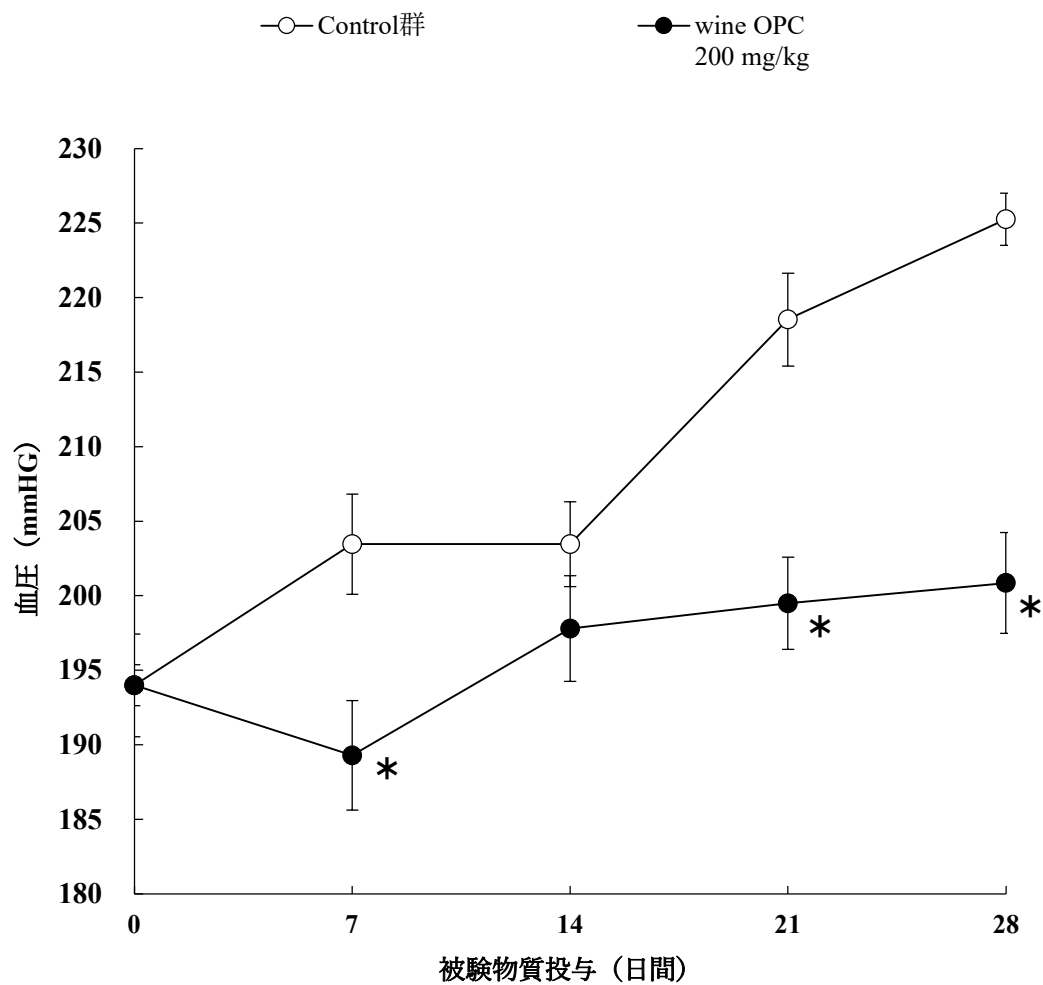


図 14. 赤ワイン OPC 画分 28 日間反復投与における血圧推移

28 日間の血圧の推移を表す。データは、n=10 の平均値±SE として表し、有意差は student't-test (*P<0.05 vs. control 群) で検定を行った。

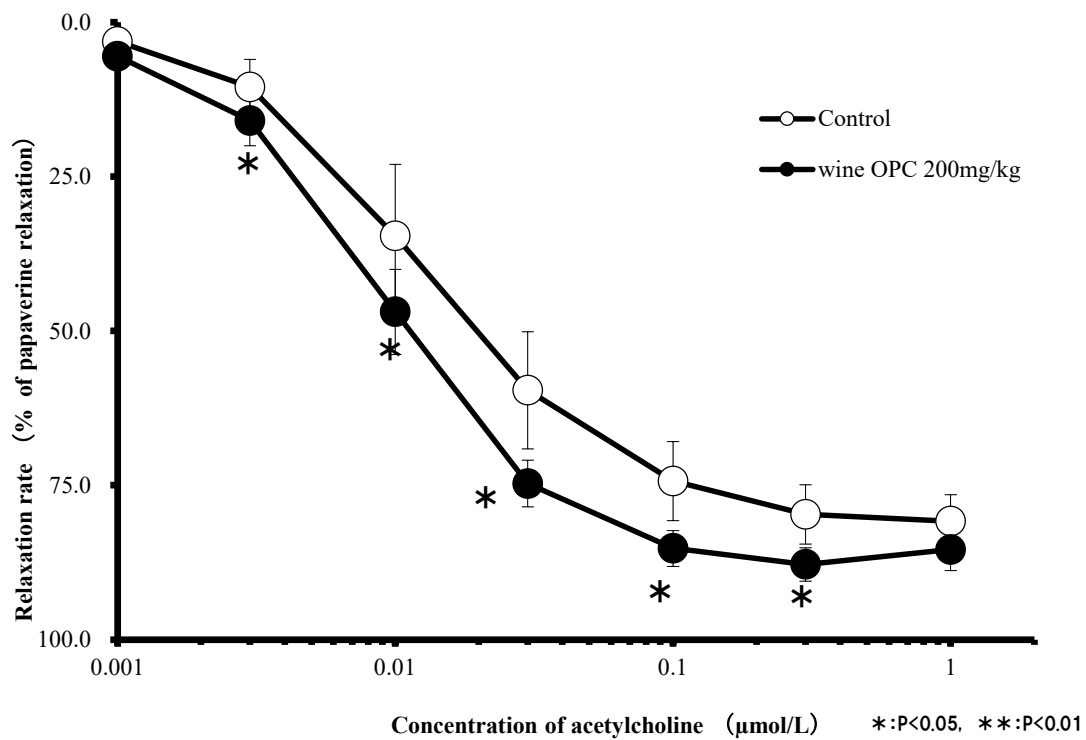


図 15. 赤ワイン OPC 画分反復投与における血管内皮機能評価

赤ワイン OPC 画分 28 日間投与後の血管マグヌスの結果を示す。phenylephrine による血管収縮後の各濃度の acetylcholine 添加による血管弛緩反応を張力で測定したデータになる。データは、n=10 の平均値±SE として表し、有意差は student's-t-test (*P<0.05 vs. control) で検定を行った。

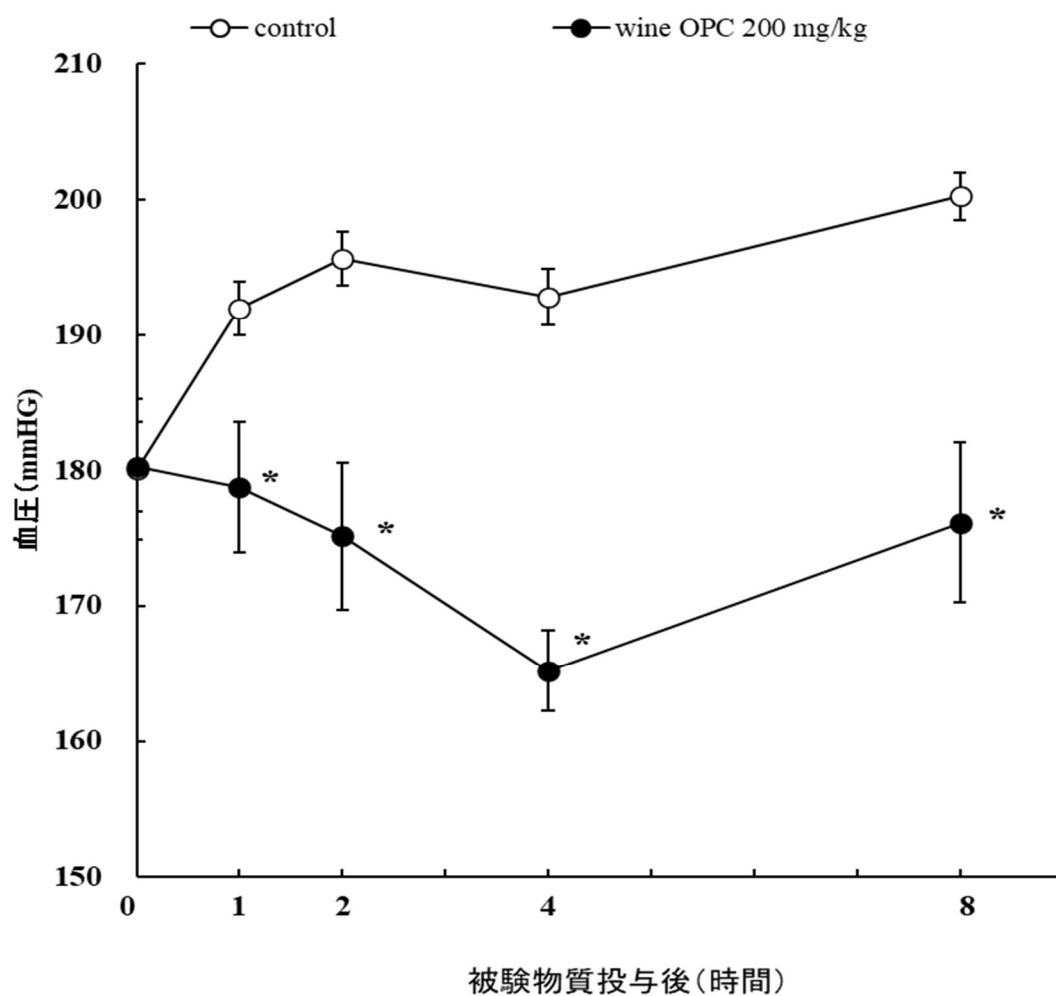


図 16. 赤ワイン OPC 画分単回投与における血圧推移

単回投与後 8 時間までの血圧の推移を表す。データは、n=10 の平均値±SE とし
て表し、有意差は student't-test (*P<0.05 vs. control) で検定を行った。

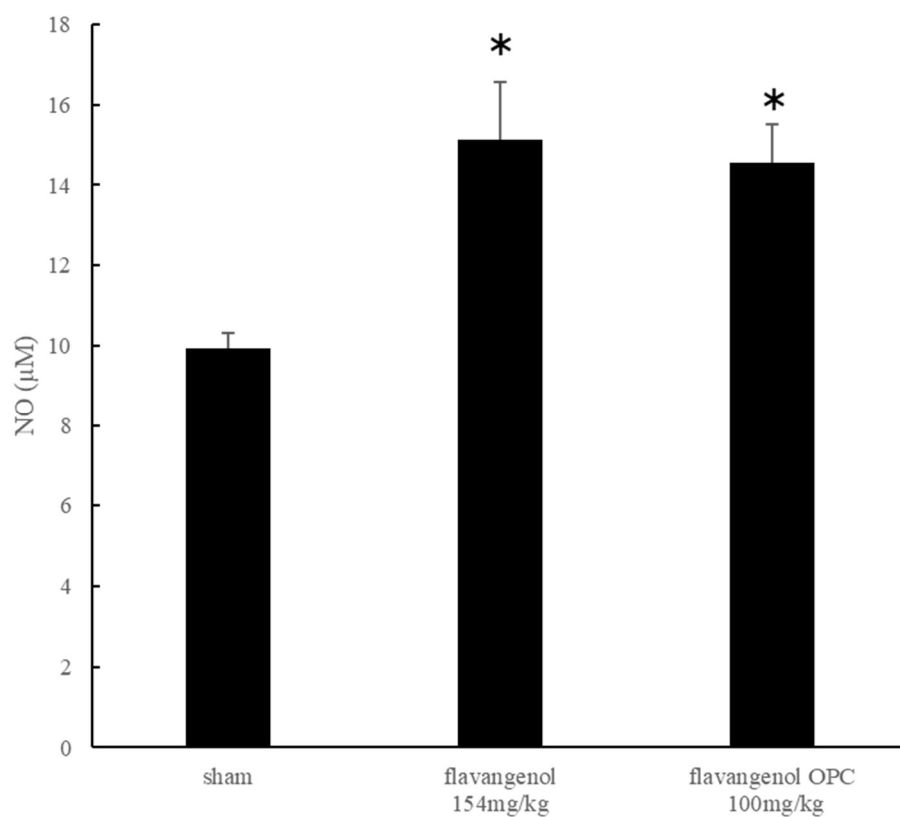


図 17. フラバンジェノールまたは OPC 画分単回投与による血中 NO 濃度

単回投与後 4 時間後の血中 NO 濃度を表す。データは、n=9 の平均値±SE として

表し、有意差は Dunnett't-test (*P<0.05 vs. sham) で検定を行った。

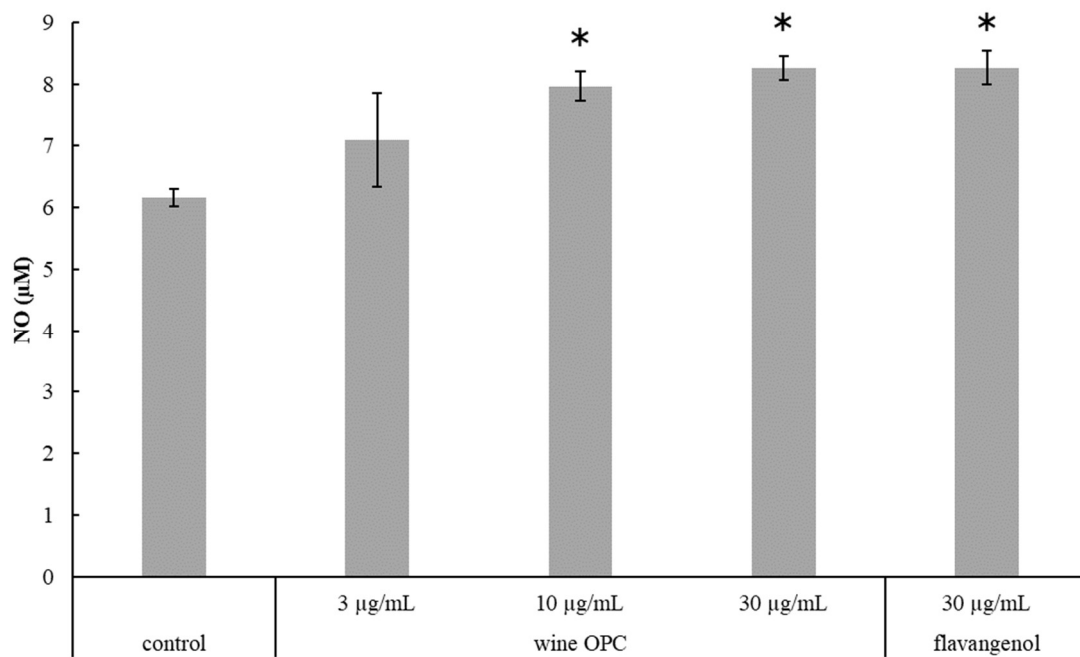


図 18. HUVEC を用いた重合ポリフェノールによる NO 産生効果

化合物添加後 24 時間後の HUVEC からの NO 産生濃度を示す。データは、n=3 ~6 の平均値±SE として表し、有意差は Dunnett't-test (*P<0.05 vs. control) で検定を行った。

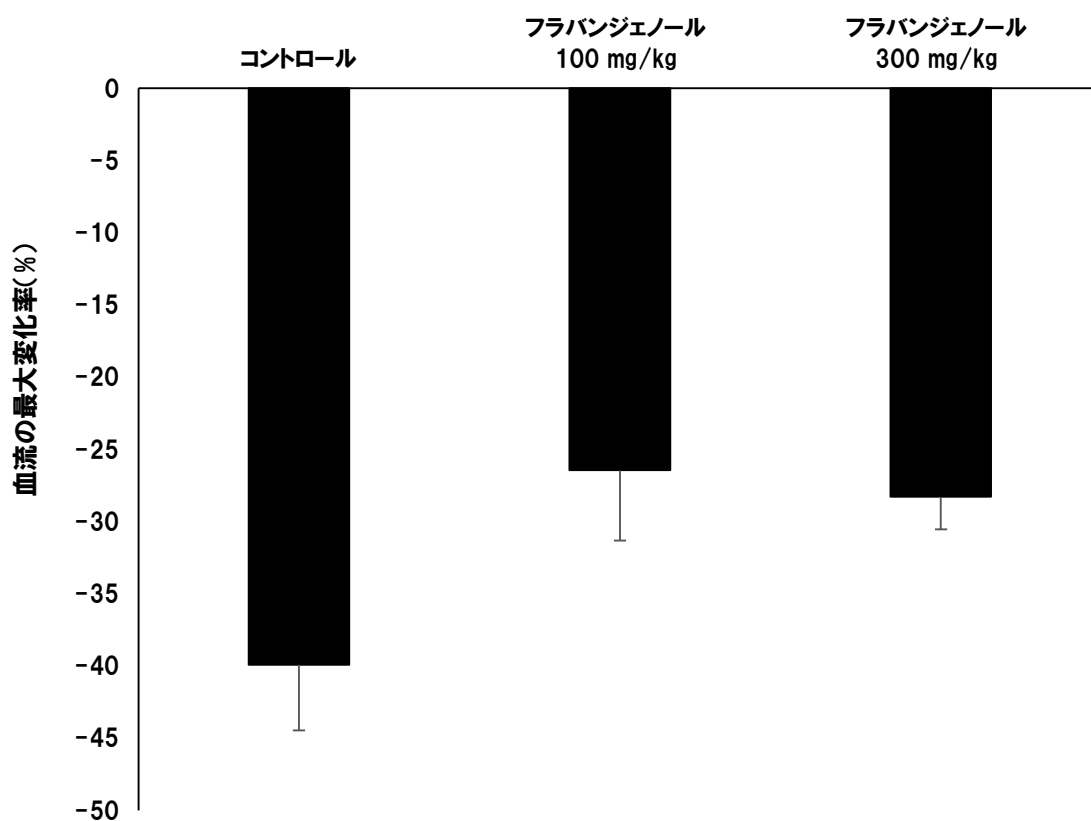


図 19. 重合ポリフェノール単回投与による血流改善効果

単回投与 30 分後に下肢 5 分間冷却した後の血流測定結果を示す。データは、n=6 ~8 の平均値±SE として表し、有意差は Dunnett't-test (*P<0.05 vs. コントロール) で検定を行った。

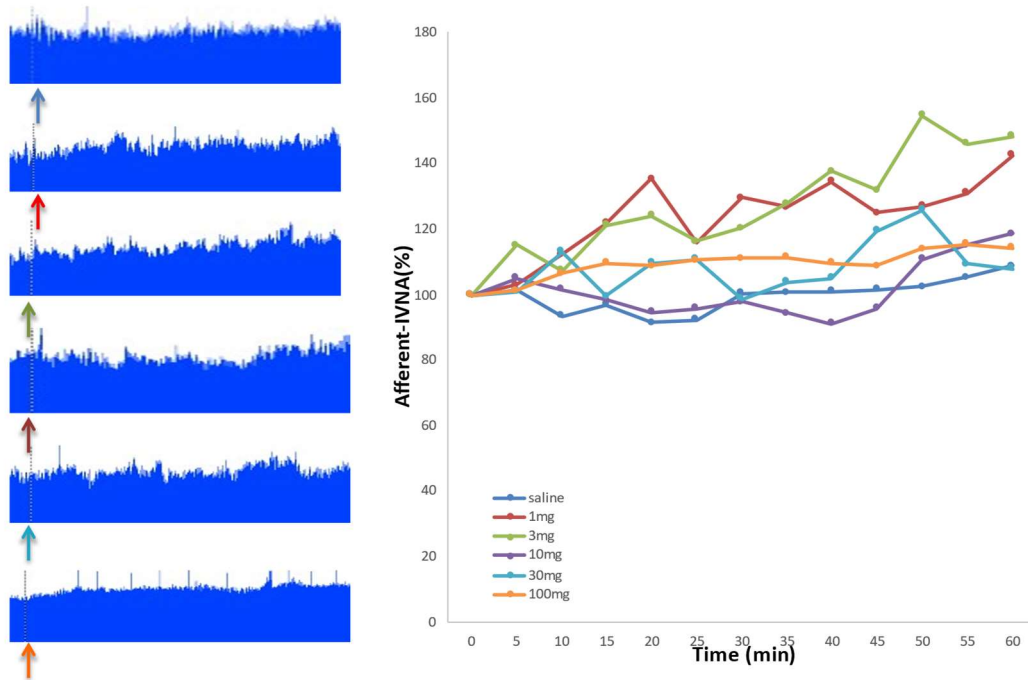


図 20. 重合ポリフェノール素材単回投与後の腸迷走神経求心枝の活動推移

単回投与後の腸迷走（副交感）神経求心枝の活動推移を表す。データは、n=1 の個体毎のデータを示す。左図には各被験物質毎の神経の活動データを示し、右図には神経の活動データを5分間毎の5秒あたりの発火頻度（pulse/5 s）の平均値にて解析し、十二指腸投与開始前5分間の値（0分値）を100%とした百分率で表した。

第4章 総括

総括

重合ポリフェノールの中でも OPC に着目し、その作用機序と健康効果について解明することで、重合ポリフェノールの健康素材の可能性について追究することを目的に研究を実施した。赤ワイン由来の OPC には多種多様な重合ポリフェノールが存在しており、その OPC 全体による肌への効果を *in vivo* 試験とヒトで検討した結果、シミの低減効果と潤いの向上効果の両者を示した。メカニズムとしては、吸収される OPC 成分については、ガレート基を有するカテキン二量体が肌まで届き、チロシナーゼ阻害と AQP3 の発現向上によって、それぞれ肌のシミ低減と潤い向上効果を示したことが考えられた。

一方、ヒトにおいて、モノマーであるエピカテキンとダイマーであるプロシアニジン B1 の吸収性を比較した試験では、それぞれ平均値として、エピカテキンの C_{max} が 150 ng/mL、AUC (0-48 h) が 1000 ng · h/mL に対して、プロシアニジン B1 では C_{max} 1.6 ng/mL、AUC (0-48 h) が 10 ng · h/mL と 100 倍程度低くなることが報告されている (31)。また、重合度が高くなればなるほど、吸収性は低くなることが報告されている (28)。今回、ヒト試験に供した重合ポリフェノール量としては、200 mg/man 程度であり、活性が確認されている GA 付の二量体については 0.08 mg/man 程度になる。報告では、二量体である PB1 の

吸収性が報告されており、50mg/man の摂取で、最大血漿濃度 (Cmax) は 1.6 ng/mL 程度になっている。今回の *in vitro* 試験は 30 μ M (約 18 μ g/mL 程度) で活性が確認されているため、体内動態を考えると *in vitro* 試験での効果でメカニズムの説明は難しい。

吸収されない経路としては、①腸内細菌叢による腸からの、②腸内で重合ポリフェノールが代謝物に分解され、代謝物が吸収されて効果、③腸からの自律神経を介した作用が考えられる。①腸内細菌叢の改善については、重合ポリフェノールによる腸内細菌の変化は報告されている (34)。一方、腸内細菌の結果は実験施設間、動物間、動物とヒトの間でも異なる結果が認められており (35)、腸内細菌の明確な作用を示すためにはまだ十分に研究がなされていないため、明確な寄与を説明するのは難しい。②重合ポリフェノールの腸内での代謝物による効果については、摂取したポリフェノールの種類に関わらず、糞便中にはほぼ同じ分解代謝物が検出されるため、重合ポリフェノールで確認できている作用を説明するのは難しい (36)。また、腸内細菌叢によって異化されてヒドロキシフェニル- γ -バレロラクトン (HGVL) を生成することがわかっているが、モノマーのエピカテキンより重合ポリフェノールは代謝されにくいという報告もあり、代謝物が効果を示していることは有力ではないと考えた (37)。一方、③の重合ポリフェノールによる自律神経を介した血流改善については、ポリフ

ェノールの摂取により数時間後に血流改善が報告されている（38）。重合ポリフェノールを含む flavan-3-ols の投与により交感神経が興奮し、一過的な血管収縮が起これ、この循環動態変化から、血管内皮による eNOS 活性化と NO 産生が起これ、血管が弛緩する。この反応が繰り返されることにより、血管の再構築や血管新生が生じ、血圧の低下が生じると考えられる（41）。

今回、重合ポリフェノールによる血流改善機能を検討した結果、長期投与によって血圧低下作用と血管内皮機能の改善効果を示した。驚くべきことに、吸収されにくい重合ポリフェノールが単回で血圧低下作用および NO 産生上昇作用を持つことから吸収されない経路が存在すると考えられた。これまでの報告では、flavan-3-ol の投与直後からの血圧が上昇し 60 分後には投与前値に戻った報告があり（39）、その後の経過として血圧が低下したと考えられる。この現象は、重合ポリフェノールの投与により交感神経が興奮し、一過的な血管収縮が起これ、この循環動態変化から、血管内皮による eNOS 活性化と NO 産生が起これ、血管が弛緩したフィードバック現象を捉えたと考えられる。食品素材によって eNOS 活性化または NO 産生上昇による血流改善作用の報告は多々あるが、ポリフェノールは従来の血流改善のメカニズムとは異なる点が興味深い。ポリフェノールは報告にもあるように、投与直後は血圧・心拍数の上昇が起これ、その後に血管弛緩による血圧低下が生じる。この血管の収縮・弛緩の繰り返しによ

り、血管の再構築や新生が起こり、組織全体の血流の恒常性維持に役立っていると考えられる。今回は肌という皮膚組織に着目して研究を行ったが、ポリフェノールによる血管のネットワークの再構築が全ての組織で生じるならば、様々な健康効果の根源をなすメカニズムになる可能性がある。

以上の結果により、重合ポリフェノールによるヒトでの肌の健康効果が確認され、メカニズムとしては、吸収される経路として肌のチロシナーゼ阻害によるシミ改善および AQP3 発現上昇による潤い上昇になる。また、吸収されない経路としては、自律神経を介した血流改善作用による肌のターンオーバー促進によって肌のシミと潤いの改善作用を示すと考えた (図 21)。重合ポリフェノールによってヒトにおけるシミと潤いの改善効果を確認したのは初めての報告になり、日常の食生活で摂取可能することで肌の健康が期待できる。また、重合ポリフェノールのメカニズムはまだ未解明な部分が多いが、もし血管のネットワークの再構築というポリフェノール特有のユニークなメカニズムが立証されれば、ポリフェノールの新しい可能性が広がるだろう。

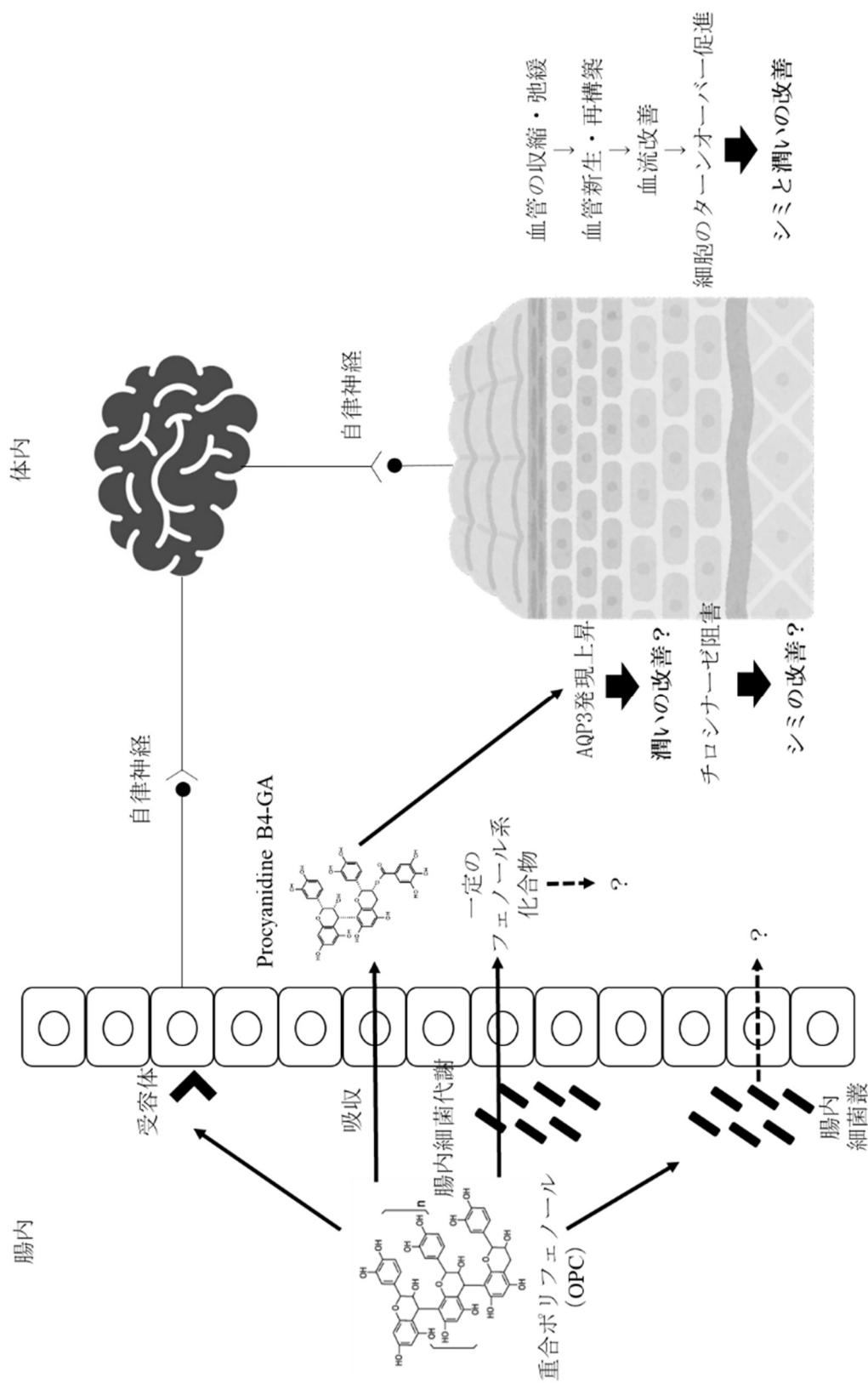


図 21. 重合同ポリフェノールの想定メカニズム

今後の展望

重合ポリフェノールは吸収されないにも関わらず、様々な健康効果を示す報告がある。重合ポリフェノールは抗酸化作用だけでなく、抗炎症・抗アレルギー作用、骨粗鬆症予防作用、視覚機能調節作用、また最近では認知機能維持作用などといった有効性が報告されている。その中でも重合ポリフェノールは、吸収性が低いにも関わらず、生体内での健康効果を示す報告がある。今回、ヒトにおいて自然食品では初めてシミと潤いの改善を重合ポリフェノールにより確認することができた。*Ancellotta* 種のワインには OPC が約 3 mg/ml の濃度で含まれているため、今回のヒト試験の OPC 200mg 摂取するには、67 mL とコップ 1 杯程度の摂取で効果を示すことになる。一方、今回はアルコールを含まない飲料で確認したため、アルコールを含む赤ワインでの結果は異なる可能性がある。

今回の肌のシミと潤いの改善のメカニズムとして、自律神経を介した血流改善作用を提唱したが、肌の健康含め様々な健康効果を示すメカニズムは多岐に渡り、おそらく複合的なメカニズムにより、健康効果を発揮しているに違いない。メカニズムの中でも吸収されないメカニズムが主体になり、その中でも自律神経を介した血流改善が最も濃厚であると考えられたが、この因果関係含め寄与がどの程度あるのかが今後見極めていくポイントになる。そのメカニズムもモノマーでの構造による違いや、重合度によっても異なることが予想されるため、

その構造特性にも繋げられるとまた一步解明に繋がるだろう。また、ポリフェノールの作用点としては、腸内の受容体との結合が起点になり、自律神経刺激に繋がっていると考えられる。その腸内受容体は未だ明らかになっていないため、その受容体の解明が重要になる。また、この受容体をノックアウトにした際に重合ポリフェノールの健康機能がキャンセルされるかが今後の研究課題になる。まだメカニズムの部分は解明する部分が多いが、今回の検討において、重合ポリフェノールによる肌の健康効果がヒトで確認され、そのメカニズムとして、自律神経を介した血流改善という矛盾の無い結果が得られたことは、重合ポリフェノールの新たな可能性を示せられたと考えている。今後、因果関係や寄与を証明しつつ、作用点を明確にすることで、重合ポリフェノールならではの価値創造に挑戦していきたい。

今後、重合ポリフェノールの研究が進むことで、重合ポリフェノールの食品からの摂取や商品の創出を介して、ヒトの健康長寿に貢献することができると考えている。一方、重合ポリフェノールは主に、柿、松樹皮、ブドウ種子、カカオなどが有名だが、基本的に食べないような木材などでリグナンの状態で存在している。普段の食生活から得られるのは少量であるため、健康食品や飲料で提供することも考えていく必要がある。重合ポリフェノールは比較的、水に溶解しやすく、飲料中などでも安定性も高い化合物であり、サプリメントのような健康

食品から飲料にも適応できる有用な化合物である。味としても、苦味・エグ味などはあるものの、有効量程度では大きな問題にならない。今回、赤ワインポリフェノール素材を使って、肌の健康飲料の創出を試みた。研究から商品に繋げる上では、研究のハードルの把握と商品の売り上げ見込みが重要になる。研究のハードルとしては、①適切な素材の選定、②細胞および動物での効果、③ヒトへの効果、④安全性、⑤商品適正があるが、今回はその研究ハードルを越えて商品化可能な状態まで繋げられた。研究の成功要因としては、細胞および動物における確かな健康効果の確認や適切なヒト試験設計があったからだと考えている。一方、商品の売り上げ見込みとして、今回の赤ワインポリフェノール素材は差別化が難しく、商品化までは至らなかった。世の中にはビタミンCを代表として美容飲料は既に多く出ており、その中で自然食品素材という価値だけでは差別化ができない。メカニズム研究から重合ポリフェノールならではの新しい価値を創出することが重要であり、これからの研究部門にはそれが求められると感じた。

現在、日本社会には、特定保健食品制度や機能性表示食品制度により、健康成分による機能性（健康効果）を表示できるようになっている。一方で、様々な健康食品や飲料があり、個人個人が何を摂取したらいいのかがわからないのが課題であり、オーダーメイドでの食品提供サービスも始まっている。私としては、栄養学的には個人個人に足りないものを明らかにして、その補充としてサプリ

メントや健康飲料を活用することは重要だと考えている。一方、栄養面ではなく機能面では、人間の基礎能力や機能を向上させるような健康食品や飲料を飲むことで、これさえ飲んでおけばいいような存在が重要だと思う。重合ポリフェノールによる血管ネットワークの再構成機能はその存在になれる可能性を秘めており、将来的には毎日1本重合ポリフェノールを飲むような文化創造に挑戦していきたい。

参考文献

1. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front Nutr.* 2018 Sep 21;5:87.
2. E. Haslam: "Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action," Cambridge University Press, 2005.
3. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy & L. Jimenez. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727 (2004).
4. Ma W, Waffo-Teguo P, Jourdes M, Li H, Teissedre P. L. Chemical Affinity between Tannin Size and Salivary Protein Binding Abilities: Implications for Wine Astringency. *PLoS One* 2016; 11 (8): e0161095.
5. Singleton V, Trousdale E. Anthocyanin-Tannin Interactions Explaining Differences in Polymeric Phenols Between White and Red Wines. *the American Society for Enology and Viticulture* 1992; 43: 63-70.
6. Nakano N, Nishiyama C, Tokura T, Nagasako-Akazome Y, Ohtake Y, Okumura K, Ogawa H. Procyanidin C1 from apple extracts inhibits Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147 (3): 213-221.
7. Cheshier J. E., Ardestani-Kaboudanian S, Liang B, Araghiniknam M, Chung S, Lane L, Castro A, Watson R. R.. Immunomodulation by pycnogenol in retrovirus-infected

- or ethanol-fed mice. *Life Sci* 1996; 58 (5): PL 87-96.
8. Asher G. N., Viera A. J., Weaver M. A., Dominik R, Caughey M, Hinderliter A. L..
Effect of hawthorn standardized extract on flow mediated dilation in prehypertensive and mildly hypertensive adults: a randomized, controlled cross-over trial. *BMC Complement Altern Med* 2012; 29: 12-26.
 9. Nuttall S. L., Kendall M. J., Bombardelli E, Morazzoni P. An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, Leucoselect. *J Clin Pharm Ther* 1998; 23 (5): 385-389.
 10. 土居 敏明. 皮膚の構造・特性と機能および血管の特性. *日本義肢装具学会誌* 1999 年 15 卷 3 号 p. 225-231.
 11. Pullar JM, Carr AC, Vissers MCM. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*. 2017 Aug 12;9(8):866.
 12. Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, Ohtake Y, Kanda T. Administration of Apple Polyphenol Supplements for Skin Conditions in Healthy Women: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*. 2020 Apr 13;12(4):1071.
 13. Furumura M, Sato N, Kusaba N, Takagaki K, Nakayama J. Oral administration of French maritime pine bark extract (Flavangenol(®)) improves clinical symptoms in photoaged facial skin. *Clin Interv Aging* 2012; 7: 275-86.

14. 木村育子、森藤雅史、市川聡美、伊藤恭子、深澤朝幸、山地健人、川島眞. SC-2 乳酸菌、コラーゲンペプチド、スフィンゴリエリン含有食品の摂取は肌の角層水分量を増加させる —ランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験—. 薬理と治療 45(6):929-938 (2017) .
15. Zhu W, Gao J. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2008 Apr;13(1):20-4.
16. T. Fujimaki, S. Mori, M. Horikawa, Y. Fukui. Isolation of proanthocyanidins from red wine, and their inhibitory effects on melanin synthesis in vitro. *Food Chem* 248 (2018) 61-69.
17. R. Sougrat, M. Morand, C. Gondran, P. Barre, R. Gobin, F. Bonte, M. Dumas, J.M. Verbavatz. Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* 118 (2002) 678-85.
18. M. Hara-Chikuma, A.S. Verkman. Roles of Aquaporin-3 in the Epidermis. *J Invest Dermatol* 128 (2008) 2145-2151.
19. T. Ma, M. Hara, R. Sougrat, J.M. Verbavatz, A.S. Verkman. Impaired Stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *J Biol Chem* 277(19) (2002) 17147-53.

20. M. Hara-Chikuma, A.S. Verkman. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med* 86 (2008) 221-231.
21. M. Dumas, N.S. Sadick, E. Noblesse, M. Juan, N. Lanchmann-Weber, M. Boury-Jamot, R. Sougrat, J.M. Verbavatz, S. Schnebert, F. Bonte. Hydrating skin by stimulation biosynthesis of aquaporins. *J Drugs Dermatol* 6 (2007) s20-4.
22. Z. Wu, H. Uchi, S. Morino-Koga, W. Shi, M. Furue, Resveratrol inhibition of human keratinocyte proliferation via SIRT1/ARNT/ERK dependent downregulation of aquaporin 3, *J Dermatol Sci* 75(1) (2014) 16-23.
23. C. Tsang, C. Auger, W. Mullen, A. Bornet, J.M. Rouanet, A. Crozier, P.L. Teissedre. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rat. *Br J Nutr* 94 (2005) 170-81.
24. J.A. Dominguez-Avila, G.A. Gonzalez-Aguilar, E. Alvarez-Parrilla, L.A. de la Rosa. Modulation of PPAR expression and activity in response to polyphenolic compounds in high fat diets. *Int J Mol Sci* 17 (2016) E1002.
25. K.S. Bhullar, H.P. Rupasinghe. Partridgeberry polyphenols protect rat primary cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-reperfusion-induced injury via suppression of inflammatory adipokines and regulation of HIF-1 and PPAR. *Nutr Neurosci* 19 (2016) 260-8.

26. L. Michalik, W. Wasli. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim Biophys Acta* 1771 (2007) 991-8.
27. Y.J. jiang, P. Kim, Y.F. Lu, K.R. Feingold, PPARgamma activators stimulate aquaporin 3 expression in keratinocyte/epidermis. *Exp. Dermatol* 20 (2011) 595-599.
28. D. Hoogewijs, M. Vogler, E. Zwenger, S. Krull, A. Zieseniss. Oxygen-dependent regulation of aquaporin-3 expression. *Hipoxia* 4 (2016) 91-97.
29. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):727-47.
30. Déprez S, Mila I, Huneau J-F, Tomé D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:957–67.
31. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in rats. *Free Radic Biol Med* 2002;33:142–8.
32. Donovan JL, Manach C, Rios L, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3. *Br J Nutr* 2002;87:299–306.
33. Wiese S, Esatbeyoglu T, Winterhalter P, Kruse HP, Winkler S, Bub A, Kulling

- SE.Comparative biokinetics and metabolism of pure monomeric, dimeric, and polymeric flavan-3-ols: a randomized cross-over study in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2015 Apr;59(4):610-21.
34. Wan MLY, Co VA, El-Nezami H. Dietary polyphenol impact on gut health and microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2021;61(4):690-711.
35. Chaplin A, Carpené C, Mercader J. Resveratrol, Metabolic Syndrome, and Gut Microbiota. *Nutrients.* 2018 Nov 3;10(11):1651.
36. Sofia Moco , François-Pierre J Martin, Serge Rezzi. Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. *J Proteome Res.* 2012 Oct 5;11(10):4781-90.
37. Hollands WJ, Philo M, Perez-Moral N, Needs PW, Savva GM, Kroon PA. Monomeric Flavanols Are More Efficient Substrates for Gut Microbiota Conversion to Hydroxyphenyl- γ -Valerolactone Metabolites Than Oligomeric Procyanidins: A Randomized, Placebo-Controlled Human Intervention Trial. *Mol Nutr Food Res.* 2020 May;64(10):e1901135.
38. H. Sies. Polyphenols and health: Update and perspectives. *Arch. Biochem. Biophys.*, 501, 2 (2010).
39. K. Inagawa, N. Aruga, Y. Matsumura, M. Shibata & N.Osakabe. Alteration of the

- Systemic and Microcirculation by a Single Oral Dose of Flavan-3-Ols. *PLoS ONE*, 9, e94853 (2014).
40. N. Kamio, R. Suzuki, Y. Watanabe, Y. Suhara & N. Osakabe. A single oral dose of flavan-3-ols enhances energy expenditure by sympathetic nerve stimulation in mice. *Free Radic. Biol. Med.*, 91, 256 (2016).
41. 越阪部奈緒美. ポリフェノールパラドックス-生体利用性と機能性の矛盾. *化学と生物* 154, 726-731, 2016.
42. Santons-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Science of Food and Agriculture* 2000, 80 (7), 1094-1117.
43. Reossi G, Das UN, Eynard AR. Molecular Basis of the Beneficial Actions of Resveratrol. *Arch Med Res.* 2020 Feb;51(2):105-114.
44. Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Apr;11(4):380-1.
45. Lacroix S, Klicic Badoux J, Scott-Boyer MP, Parolo S, Matone A, Priami C, Morine MJ, Kaput J, Moco S. A computationally driven analysis of the polyphenol-protein interactome. *Sci Rep.* 2018 Feb 2;8(1):2232.
46. 富永 真琴. 消化管における TRPV1 の発現と機能. *日薬理誌 (Folia Pharmacol.*

Jpn.) 128, 78~81 (2006) .

47. Takahashi S, Kurogi M, Saitoh O. The diversity in sensitivity of TRPA1 and TRPV1 of various animals to polyphenols. *Biomed Res.* 2021;42(2):43-51. doi: 10.2220/biomedres.42.43.

謝辞

本研究を実施するにあたり、多くの方にご協力を賜りました。ここに心より感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、指導教員として多大なご指導を賜りました、筑波大学生命環境系准教授大津巖生先生、河野祐介先生に心より感謝申し上げます。

本研究にご指導を賜りました、筑波大学生命環境系教授高谷直樹先生、筑波大学生命環境系准教授橋本義輝先生に心より感謝申し上げます。

本研究に多大なご指導、ご助言を賜りました、サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社中村友美博士、村山宣人博士、渡辺斉志博士、福井祐子博士、勝部享さん、土屋祐子さん、東京農業大学助教藤巻貴宏先生、慶應義塾大学教授安井正人先生、准教授竹馬真理子先生に心より感謝申し上げます。

また、筑波大学生命環境科学研究科応用微生物学研究室の皆様にも心より感謝申し上げます。