

# ブドウ種子由来プロアントシアニジンのヒトへの有用性研究

2017 年 1 月

佐 野 敦 志

ブドウ種子由来プロアントシアニジンの  
ヒトへの有用性研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物圏資源科学専攻

博士（農学）学位論文

佐 野 敦 志

## 目次

### 略語

第1章 序論	1
第2章 ブドウ種子抽出物（GSE）のヒト血中の酸化抵抗性と吸収	8
第1節 背景と目的	8
第2節 実験方法	11
2-2-1 GSE の調製	11
2-2-2 GSE 高分子画分と GSE 低分子画分の調製と 平均重合度の確認	12
2-2-3 プロシアニジン B-1 の精製と平均重合度の確認	12
2-2-4 その他の試験材料	13
2-2-5 ヒト酸化抵抗性試験の試験デザイン	17
2-2-6 ヒト血中 PA の分析	21
第3節 結果	22
2-3-1 ヒト血中酸化抵抗性	22
2-3-2 ヒト血中分析	22
第4節 考察	26
第3章 ブドウ種子抽出物（GSE）経口摂取による malondialdehyde-modified LDL 値への影響	31
第1節 背景と目的	31
第2節 実験方法	32
3-2-1 試験食品	32
3-2-2 被験者	33
3-2-3 試験方法	34
第3節 結果	35
3-3-1 評価対象とした被験者と除外者	35
3-3-2 GSE の 12 週間連続摂取による血中脂質への影響	35
3-3-3 GSE 摂取による安全性の評価	35
3-3-4 GSE の 12 週間連続摂取によるアディポネクチンへ の影響	36
第4節 考察	46

第4章 ブドウ種子抽出物（GSE）経口摂取による着座時における 下肢の抗むくみ効果	50
第1節 背景と目的	50
第2節 実験方法	52
4－2－1 健常男性6名による連続着座時における GSE 摂取の下肢むくみに対する影響	52
4－2－2 健常女性16名による連続着座時における GSE 摂取の下肢むくみに対する影響	54
第3節 結果	60
4－3－1 健常男性6名による連続着座時における GSE 摂取の下肢むくみに対する影響	60
4－3－2 健常女性16名による連続着座時における GSE 摂取の下肢むくみに対する影響	67
第4節 考察	81
第5章 ブドウ種子抽出物（GSE）のヒト経口摂取による安全性評価	87
第1節 背景と目的	87
第2節 実験方法	89
5－2－1 ブドウ種子抽出物（GSE）と試験錠剤、摂取方法	89
5－2－2 ヒト試験倫理委員会の承認、被験者と試験群、 摂取量の設定	90
5－2－3 試験スケジュールと検査項目と検査方法	91
5－2－4 血液検査項目	91
5－2－5 統計解析方法	92
第3節 結果	97
5－3－1 被験者の身体測定	97
5－3－2 有害事象	97
5－3－3 血液検査	100
第4節 考察	108
第6章 総合考察	112
研究概要	117
謝辞	119
引用文献	120
研究業績一覧	132

## 略語

AE: adverse event (有害事象)

A/G ratio: albumin-globulin ratio (アルブミン／グロブリン比)

ALT: alanine aminotransferase (アラニンアミノ基転移酵素)

ALP: alkaline phosphatase (アルカリフォスファターゼ)

AST: aspartate aminotransferase (アスパラギン酸アミノ基転移酵素)

BUN: blood urea nitrogen (血中尿素窒素)

ChE-OOH: cholesteryl ester hydroperoxides (コレステロールエステル過酸化物)

CPK: creatinine phosphokinase (クレアチニンフォスフォキナーゼ)

γ-GTP: gamma-glutamyl transpeptidase (ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ)

GSE: grape seed extract (ブドウ種子抽出物)

Hb: hemoglobin (ヘモグロビン)

HbA1c: hemoglobin A1c (ヘモグロビン HbA1C)

HDL: high-density lipoprotein (高密度リポタンパク)

Ht: hematocrit (ヘマトクリット)

LDH: lactate dehydrogenase (乳酸脱水素酵素)

LDL: low-density lipoprotein (低密度リポタンパク)

MCH: mean corpuscular hemoglobin (平均赤血球ヘモグロビン量)

MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration (平均赤血球ヘモグロビン濃度)

MCV: mean corpuscular volume (平均赤血球容積)

PA: proanthocyanidin (プロアントシアニジン)

Plt: blood platelet count (血小板数)

RBC: red blood cells (赤血球数)

UA: uric acid (尿酸)

WBC: white blood cells (白血球数)

## 第1章 序論

今や先進国では高齢者社会に突入し、増大する社会保障費の問題に各国の政府は直面している。日本は平均寿命で世界最長寿となり、この増大し続ける社会保障費の問題は、無視しては通れない課題となっている。日本では、平成13年には、今後迎える少子高齢化社会を健康で活力あるものにするため、生活習慣病などを予防することなどを盛り込んだ「健康日本21」（平成24年7月10日厚生労働省告示430号）を展開し国民に広く呼び掛ける運動を展開している。また、医薬品に頼らずに健康の維持増進を目的とした保健機能食品制度が拡充され、食生活の面からも医療費の低減を図る施策がとられている。この中で確かな機能性を有しかつ安全な機能性食品や食品素材を、消費者に提供することは、機能性食品研究に携わる者の使命といっても過言ではないであろう。このような社会環境の中で私の所属する研究チームでは、健康に積極的に寄与する食品やその成分の研究開発を進めてきた。人類は、有史以前から植物や植物が貯えたものを食品として利用してきたが、その主目的は、栄養機能（1次機能）、嗜好機能（2次機能）である。同時に無意識のうちに生体調節機能（3次機能）をも利用してきたが、その機能はここ半世紀ほどの天然物化学の発達と疫学調査から、野菜・果物・種子など植物体やその加工食品の摂取と生活習慣病との関連性が示され、その予防効果や治療効果が解明されてきている。その多彩な機能と効果効能の強さから代替医療のひとつと見なされてきた代表的なものがポリフェノールである。

ポリフェノールとは、「分子内に複数のフェノール性水酸基を有する植物成分の総称」と定義される（木村 et al., 1995）。ポリフェノールは、ほぼ全ての植物に分布しているが、過剰な太陽光線から植物細胞を守ったり、微生物の腐食や虫・動物の摂食から植物体そのものを守ったりする、いわば植物体における防御機構の一つとして生合成される。しかし、多彩な機能性を有することが農学分野や医学分野をはじめとする学会で次々と報告され、またマスコミにも繰り返し報道された結果、近年では5大栄養素（糖質、脂質、たんぱく質、ビタミン、ミネラル）と食物繊維に次ぐ、第7の栄養素とも提唱されている（大澤, 2007）。ポリフェノールに共通する最も重要な化学的性質は、活性酸素種を分子内で捕捉し酸化を抑制防止する働きである。ポリフェノールの化学構造は、フラバン骨格を有しない没食子酸など低分子のフェノール性化合物とフラバン骨格を有するフラボノイド類に大別され、さらに、果実の色素物質であるアントシアニン類に代表されるアントシアニン類、茶カテキンなどのフラバン類、タマネギ等のケルセチン類のフラボノール類などに分類される。これらの中でも酸化を抑制する働き、抗酸化性は、一分子あたりのフェノール性水酸基を豊富に有することから、縮合型タンニンのひとつであるプロアントシアニン（PA）が、とくに強力な活性を有している（Ariga et al., 2004; Plumb et al., 1998）。PAの基本構造を図1-1に示す。PAは、強力な抗酸化性を有する化合物の一つとして知られ、その活性は、ビタミンCやビタミンE、 $\beta$ カロテンより強力

である (Bagchi et al., 1997; Yamaguchi et al., 1999; Bagchi et al., 2000)。PA は種々の植物に見出されているが、私たちの食生活の中では、PA は種々の食品 (木村 et al., 1995)、例えばブドウ種子、リンゴ果実、柿果実、カカオ、松樹皮、クランベリーなどの果実類、大麦などの麦類、落花生、黒豆(Ariga et al., 1981)、小豆(Ariga & Asao, 1981)、豆類の渋皮、およびそれらの加工食品、例えば赤ワイン、チョコレート、ビール、シードルなどに含まれている (Santos-Buelga & Scalbert, 2000)。これらの食品を通じて、ほとんどの人は日常的に PA を摂取しているが、PA の最大かつ安価に入手できる供給源は、その含量と精製法の存在から、ブドウ種子といてよいであろう。ブドウは紀元前から人類が生食や干しブドウの他、ワイン等の加工食品として利用されてきた。赤ワインに含まれるフェノール化合物の大部分はブドウ種子由来であり、種子中のフェノール化合物は赤ワインの持つ健康効果において、重要な役割を担っていると考えられる。また、世界的に製造されているワインの製造残渣は膨大になるが、PA が局在しているブドウ種子もこの残渣の中に含まれており、このため、ブドウ種子抽出物 (Grape Seed Extract; GSE) に関する多くの研究が行われてきた。これまでに、GSE には様々な疾病予防効果が報告されており、その効果は主として PA を中心としたポリフェノールに起因する抗酸化活性である (Ariga, 2004; Bagchi et al., 2000 & 2003; Saito et al., 1998; Tyagi et al., 2003)。

本研究で用いる GSE は、前述の通り、フラバン-3-オールを構成単位とする 4,8 結合の重合体であり、MALDI-TOFMS 分析により、2 から 15 程度まで重合すること (Eberhardt et al., 1994) (図 1-2)、 $^{13}\text{C}$ -NMR 分析により平均重合度が約 7 であること、PA が 1 分子につき、1 つ弱の割合で没食子酸エステル構造を有することを確認している (図 1-3、図 1-4)。また、MALDI-TOFMS 分析より、各重合体 PA が、ジエステルやトリエステル構造はほぼ存在しないことが分かっている (図 1-2)。一方で、類似構造を有する松樹皮 PA やリンゴポリフェノール PA の MALDI-TOFMS によって 2 から 15 量体程度の PA の存在が知られているが (Ohnishi-Kameyama et al., 1997)、平均重合度が比較的小さく、また没食子酸エステルはほとんど存在しない。また、カカオ由来 PA は、平均重合度が 2~4 とブドウ種子由来 PA よりも低重合度である。なお、緑茶などに含まれるフラバノール類であるカテキン類 (例えば(-)-エピガロカテキンガレート) では、没食子酸エステル構造は、その抗酸化活性等、重要な役割を果たしていることが報告されている (Salar et al., 1995)。GSE の主成分である PA は、「血管保護作用」を有する物質として、1950 年頃から欧州を中心に研究が進められてきた。とくにフランスでは、1970 年代ころから、PA を主成分とする「ブドウ種子ポリフェノール」を医薬品として登録するための研究が盛んに行われてきた。その結果、PA の効能効果に加え、安全性や熱や酸に対する安定性、水溶性の高さから、医薬品として認可されるに至った。現在では、静脈瘤改善 (Thebaut et al., 1985)、毛細血管抵抗性改善 (Dartenuc et al., 1980)、網膜症改善 (Verin et al., 1978) などの薬効を有する医薬品としてフランスを中心とした欧州で利用されている。そのフランスでは、動物性脂肪を多く摂取するにもかかわらず、動脈硬化症や心

臓病やガンなどによる死亡率が、同じような食生活の他国よりも低い（フレンチ・パラドックス）ことが知られている（Renaud & De Lorgeril, 1992）。またポリフェノールなどの抗酸化物質を積極的に摂取する人は、アルツハイマー型認知症の発症が低いことも疫学的に明らかにされてきた（Engelhart et al., 2002）。これらはフランスで大量に消費される赤ワイン中に豊富に含まれるポリフェノールの抗酸化作用に起因すると報告され、また PA が量的にも抗酸化作用の強さからも、赤ワインポリフェノールの中心的役割を果たすこと（Rimm et al., 1996）が認められるようになっている。キッコーマン(株)では、PA が豊富な GSE が、動物実験（ウサギ）において動脈硬化症を予防すること（Yamakoshi et al., 1999）、マウスで大腸がん（Arii et al., 1998）、胃潰瘍（Saito et al., 1998）、関節症（Aini et al., 2012）を予防することを報告してきた。しかし、これらの研究報告は、試験管内や動物実験での結果であり、PA を活性中心とする GSE が、ヒトで確かに効果があるのか未確認であった。また、世界的に注目されていた赤ワインポリフェノールの中心である PA が、疫学調査で示唆されていた動脈硬化や心臓病などの血管疾患に有用であるのかは、病者を対象とした試験に基づくものであり、健康者での効果の確認は未だ不明な点が多く残されていた。

前述のような GSE の有用性報告にもかかわらず、PA の生体への吸収は、当時未確認であった。茶カテキン等の一量体に関し、Yang et al. (1998) は、緑茶摂取後に茶カテキン類が血中および尿中に検出され、Ferry et al. (1996) はケルセチンの血中移行を報告している。一方、PA は、Caco-2 細胞の消化管吸収モデルで 7 量体までが透過し、PA 重合度の低い分子の方がより透過することから生体での吸収が示唆される報告もあるが（Déprez, 1999）、生体では極めて吸収され難いとの報告（Scalbert & Williamson, 2000）、経口摂取した PA は生体内に吸収されないとする報告がある（Donnovan et al., 2002）。しかし、<sup>14</sup>C 標識した PA を経口摂取すると生体内への分布がニワトリ（Jimenez-Ramsey et al., 1994）とヒツジ（Terrill et al., 1994）で確認され、PA が何らかの形で生体内利用されていることが示されていた。一方で、経口摂取された PA は腸内細菌によって代謝を受け、安息香酸やフェニル酢酸やフェニルプロピオン酸などの各誘導体へ低分子化されるとの報告もある（Appeldoorn et al., 2009）。Koga et al. (1999) は、PA を豊富に含む GSE を経口摂取させた際に、血中に(+)-カテキンと(-)-エピカテキンが検出されると同時に、血漿の酸化抵抗性が高まることを報告している。GSE に数%から 10%含まれる一量体の効果だけでは酸化抵抗性の上昇を説明できず、また PA の重合度が高い程その抗酸化力も高くなるため（片岡・有賀, 1998）、GSE 中の PA が比較的構造を維持したままで生体利用されていると考えられていた。従って、PA の生体利用、とくに PA の生体内吸収の解明が待ち望まれていた。

GSE は上述のようにフランスにおいて血管疾患を治療する医薬品として利用されている。しかし、フレンチ・パラドックスに関連する動脈硬化症や冠動脈疾患への効能は疫学調査が主であり、ましてや代替医療の利用者である健康人に対するこれら疾患の予



防効果は未確認である。動脈硬化症は、マクロファージの蓄積により血管内膜が肥大充進し閉塞を起こすことで重篤な症状を来すが、そのマクロファージの蓄積には血中の酸化 LDL の増大が関与している。血中の酸化 LDL の増大は、動物性脂肪などを多く含む食品の多量摂取だけでなく生体が酸化ストレスを受けることでも誘発される。この酸化 LDL の増大を抑制できるならば、動脈硬化症などの生活習慣病を予防する一助となる。Vigna et al. (2003) は、喫煙者 24 人に 300 mg の GSE を 28 日間連続摂取させた結果、血漿の酸化抵抗性が上昇したと報告している。また Preuss et al. (2000) は、高コレステロール血症者 40 人に GSE を 100 mg、60 日間摂取させたときに酸化 LDL が減少したと報告している。これらの報告では、酸化ストレスが高めの喫煙者や高コレステロール血症者を対象としており、予防よりも治療を目的としている。しかし今後迎える超高齢化社会においては治療よりも予防により大きな努力が払われるべきであり、この観点からも、GSE の血管疾患を予防する効果はまだ報告されていない。さらに、医薬品としての治療対象は静脈瘤に対するものであるが (Thebaut et al., 1985)、予防に力点を置くならば、静脈瘤と類似メカニズムで生じる健常人のむくみで改善効果を発揮できるならば、疾病の前段階での代替医療として有益である。

一方で機能性食品としての GSE は、過去の豊富な食経験から、種々の有効性を目的としたヒト介入試験において安全と見なされてきた。ところが、その豊富な食経験は、赤ワインやココア、クランベリーなどのように食品にわずかに含まれるフィトケミカルとして摂取されており、近年の抽出・精製・濃縮され、かつ単独で摂取されるようになったのは最近のことである。この精製濃縮された GSE 等については細胞毒性のほか動物実験により無毒性量 (NOAEL) が 1,410~1,501 mg/kg b.w./day と報告され (Yamakoshi et al., 2002)、PA を含むリンゴポリフェノール (Shoji et al., 2004)、ライチ果実由来 PA (Fujii et al., 2007) でも安全性試験による報告がある。しかし、これらの報告はいずれも動物実験までであり、ヒトでの安全性を外挿し見積もることは可能であるが、検査値に現れないレベルの有害事象や、動物実験では判読できない主観的な苦痛等は、不明であり報告例がない。治療薬から代替医療を視野に入れた機能性食品としての発展を見据えたとき、食品としての副作用の有無を、想定される消費者 (健常者) で確認することは、必要不可欠な研究課題である。

本研究の目的は、PA を豊富に含む精製濃縮された GSE が、ヒトで確かに吸収されることを実証し、動脈硬化症や心臓病などの血管疾患のリスクを低減する効果がヒトでも確認できるのかを証明することを中心とした。さらに血管の機能不全に起因する症状である下肢のむくみを改善する効果を検証することで、PA の酸化障害を抑制する働きの有無を調べると共に、体系的な GSE の安全性試験に取り組み、人体への影響を客観的かつ主観的に評価することで、GSE 中の PA の有用性をヒトで実証することである。

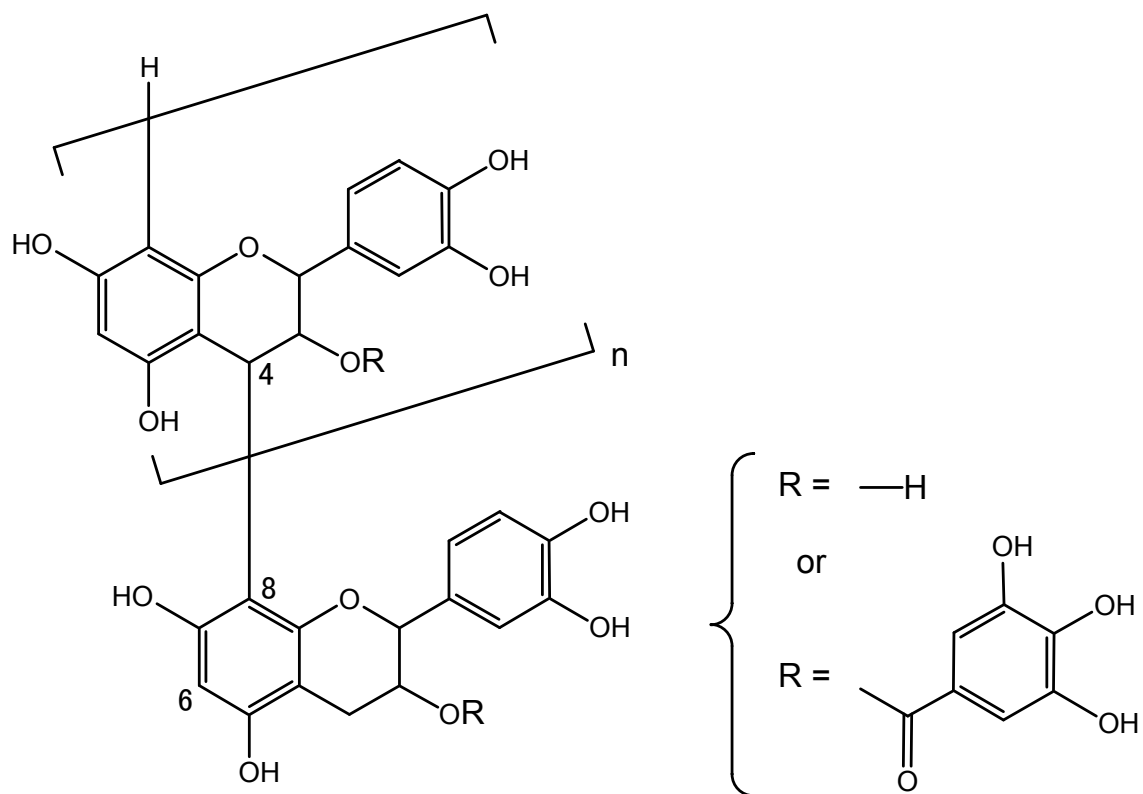


図 1-1 プロアントシアニジン (PA) の基本化学構造  
n = 1~14

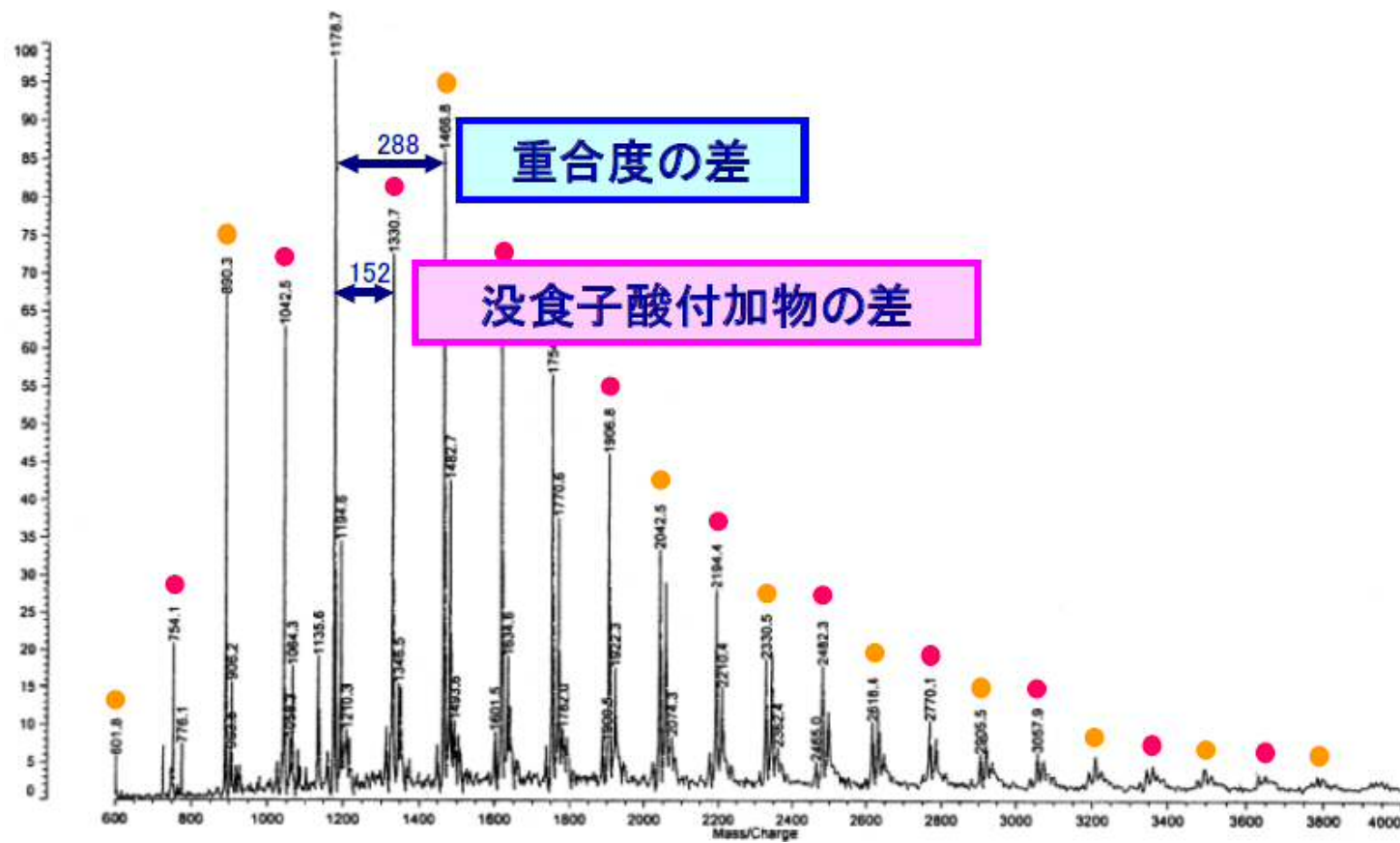


図 1-2 MALDI-TOF Mass によるブドウ種子抽出物（GSE）中に含まれるプロアントシアニジン（PA）の分子量分布  
 ● PA 重合体（没食子酸エステルなし）、● 没食子酸エステル付加した PA 重合体

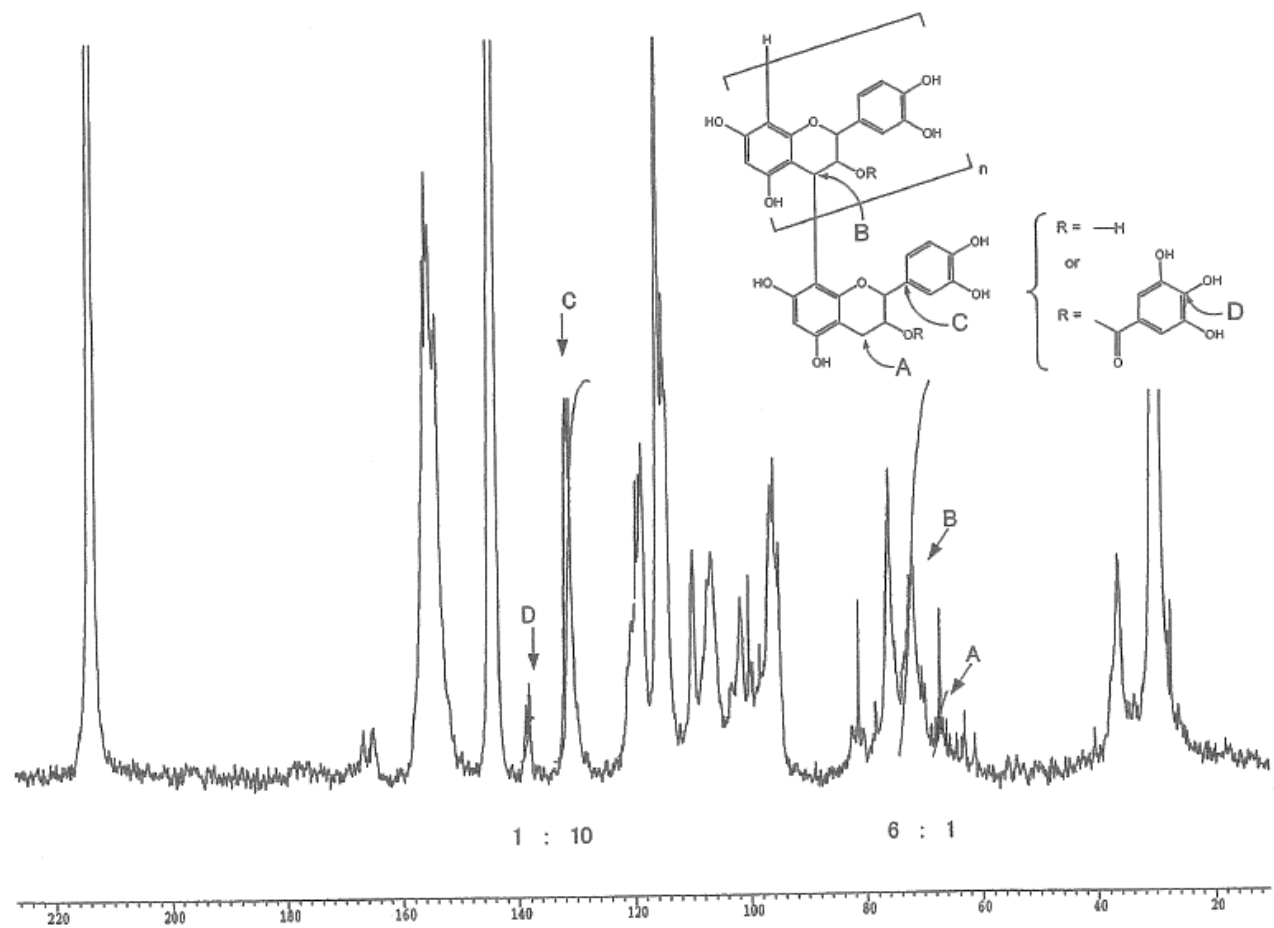


図 1-3  $^{13}\text{C}$ -NMR 分析によるブドウ種子抽出物 (GSE) に含まれるプロアントシアニジン (PA) の重合度の推定

## 第2章 ブドウ種子抽出物（GSE）のヒト血中の酸化抵抗性と吸収

### 第1節 背景と目的

強い抗酸化能を有する赤ワインポリフェノールの中心はプロアントシアニジン（PA）である。PAは赤ワインを醸造する過程（醸し工程）で、アルコールに対する親和性が高いためブドウ種子から徐々に抽出されてくることが分かっている。一方、醸し工程のない白ワイン中にはPAはほとんど含まれていない。キッコーマン研究所では、この赤ワイン製造過程を参考に、含水アルコールを用いた効率的なブドウ種子抽出物（GSE）抽出方法を考案、GSEを製品化し、商品名グラヴィノールとして1990年代から販売している。このGSEには、フラバン-3-オールを基本骨格とした4位と8位で結合した重合体の混合物であるが、その重合度は2～15量体、平均重合度は6～9であることがMALDI-TOFMS分析により確認されている（徳武・山越, 2001）。さらに、ブドウ種子中のフラバン-3-オール類（モノマー類）は、(+)-カテキンと(-)-エピカテキンが4位と8位で炭素-炭素結合し、さらにそれらの没食子酸エステル類であると、HPLC-UV分析とLC-MS分析で報告がある（Kennedy et al., 2000; Núñez et al., 2006）。

有賀 et al. (2000) は、ブドウ種子から抽出したPAの2量体から5量体において、その重合度が高いほど抗酸化活性が高まることを試験管内のデータで報告している（表 2-1）。山越らは、コレステロール食を負荷させたウサギで動脈硬化を惹起させる試験系において、PA主体のGSE投与によって、血中コレステロールの酸化を抑制したこと（Yamakoshi et al., 1999）、白内障モデルラットでも血中コレステロールの過酸化を抑制したこと（Yamakoshi et al., 2002）を示している。また、ラット経口投与により血中コレステロールの酸化抵抗性が高まることも報告されている（Koga et al., 1999）。しかし、ヒトにGSEを摂取させたときに血中コレステロールの酸化を抑制するのか、未だ明らかになっていない。とくにGSEのような混合物において、分子量の違いがヒト体内での抗酸化性や疾病リスクの変化を引き起こすのかも証明されていない。

そこで本研究は、PAが2～15量体に分布するGSEを分画し、高分子画分GSEと低分子画分GSEをヒトに14日間連続で摂取させたときに、血中の酸化抵抗性に影響を及ぼすのか、また、PAの分子量の差異で酸化抵抗性が異なるのかを評価した。さらに抗酸化物質として周知である脂溶性ビタミンE、水溶性ビタミンCをポジティブコントロールとし、GSEの抗酸化能をヒト経口摂取により確認した。

一方で、フレンチ・パラドックス以来、PA摂取による有用性研究は数多く報告されているが（Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Prior & Gu, 2005）、摂取されたPAがヒトで吸収されたとする報告は当時なかった。このことは、PAの化学的構造の複雑さと無縁ではない。例えば、茶カテキン類は全8化合物の混合物であるが全て標準品が購入可能あるいは精製可能であるため、分析が容易である。PAは前述のとおり、2～15量体かそれ以上の高分子にまで種々の重合度のPAの混合物である。さらに1分子あたり、没食子酸がエステル結合している場合もあるだけでなく、標準品が存在しなかったために、体内動態を追跡する対象としては極めて困難な分析研究だった。

以上のようなGSEとその主成分PAを取り巻く研究課題の中で、本研究では、前記のPA分子量の

違いによる生体内の抗酸化性の評価に加え、PA がヒトでコレステロールの酸化を抑制するのか、また PA がヒト体内に吸収されているのかを証明することを目的とした。

表 2-1 プロアントシアニン (PA) 重合度による抗酸化力の相対差 リノール酸- $\beta$ -カロテンの O/W 型乳化系での酸化速度 (Ariga et al., 1988 より引用) プロシアニン各量体混合物はアズキより抽出、粗精製したものが供試されている

化合物	相対抗酸化力
プロアントシアニン	
プロシアニン B-1	4.02
プロシアニン B-3	4.01
プロシアニン 2 量体混合物	4.00
プロシアニン 3 量体混合物	5.95
プロシアニン 4 量体混合物	6.50
プロシアニン 5 量体混合物	9.89
市販の抗酸化物質	
(+)-カテキン	2.50
没食子酸	1.06
L-アスコルビン酸	0.38
D- $\alpha$ -トコフェロール	2.17

## 第2節 材料と方法

### 2-2-1 GSE の調製方法

GSE は、先行研究 (Saito et al., 1998) に準じ、一部改変して、ブドウ種子 (*Vitis vinifera* L.) より抽出調製した。ブドウ種子は、アメリカ産のリースリング種で、白ワイン製造残渣を使用した。これは、白ワイン製造残渣は、赤ワインのように種子と果皮がアルコール発酵工程を経ることないために、種子中の PA が豊富に残存しているためである。この残渣を 80~90℃の温風で乾燥し、篩分けを繰り返し、種子のみを入手した。この乾燥種子 (400 kg) を 35℃の水 (800 L) でゆっくり 2 時間攪拌した後、水をろ別した。ついで 75%(v/v)エタノール水溶液 (800 L) を投入すると残水と合わせて約 70%(v/v)エタノール水溶液にブドウ種子が浸された状態となった後、加熱し、2 時間還流した。還流後、ろ別し、さらに 75%(v/v)エタノール水溶液 (200 L) で種子を洗浄ろ別し、集めた抽出液を 1/4 量以下まで減圧濃縮した。この濃縮液を樹脂にて精製した。樹脂には合成吸着剤アンバーライト XAD7HP (中間的極性、オルガノ社製) 2,000 L を使用した。前述の濃縮液を樹脂に吸着させ、水(3,000 L)で洗浄した後、70%(v/v)エタノール水溶液 (5,000 L) で溶出させ精製した。精製液をシャープレス連続遠心機 (CS79 型、巴工業社製) を用い、不溶物を除去し、減圧下 Brix30° まで濃縮し、スプレードライヤー (GAE プロセスエンジニアリング (株) 社製、入り口温度 130℃、排風温度 80℃、アトマイザー回転数 2,000 rpm) にて噴霧乾燥し、GSE 粉末を得た。

得られた GSE を、公知の方法により純度測定した (第 9 版食品添加物公定書、ブドウ種子抽出物、2014 年、厚生労働省)。各組成は、95%のフラバノール、89%のプロアントシアニジン (PA)、2.2%の(+)-カテキン、1.7%の(-)-エピカテキン、0.25%の没食子酸であった。また、PA の基本構成単位フラバン-3-オールの平均重合度は、<sup>13</sup>C- NMR 解析 (Bruker 社製 DIGITAL NMR AVANCE 500) によると約 7 であった (Eberhardt et al., 1994)。すなわち、A : B=1 : 6 は、末端のフラバノールの C4 位が 1 に対し、重合している C4 位が 6 を表すことから、この GSE は、7 量体である (図 1-3)。また、C : D=10 : 1 から、没食子酸エステルの存在が認められるが、プロアントシアニジン (PA) が 1 分子あたり 0.7 分のエステル結合の存在を示している (図 1-3)。



## 2-2-2 GSE 高分子画分と GSE 低分子画分の調製と平均重合度の確認方法

前述のとおり得られた GSE を膜分画により、GSE 高分子画分と GSE 低分子画分に分離した。セルロース UF 膜（分子量 5,000 カット CDUF001LC、ミリポア社製）を用い、25%(v/v)エタノールに溶解させた GSE (10 g) を膜透過画分 (3.7 g) と非膜透過画分 (5.8 g) とに分離した（表 2-2）。透過部を GSE 低分子画分、非透過部を GSE 高分子画分とした。膜処理によって分離されているかを薄層クロマトグラフィー（TLC）により確認した。各試料 200 mg を 50%(v/v)メタノール水溶液に溶かし、1 $\mu$ L を TLC 上にスポット、軽く乾燥させ吸着させた後、展開液（トルエン：アセトン：ギ酸=3：6：1）で展開後、発色液（メタノール：バニリン：塩酸=1,200 mL：48 g：600 mL）に浸し発色を観察した（図 2-1）。また得られた各画分の平均重合度を  $^{13}\text{C}$  NMR 解析（Bruker 社製 DIGITAL NMR AVANCE 500）により求めると（図 1-3）、GSE 低分子画分の平均重合度は約 2.5（A：B=1：1.5）、GSE 高分子画分の平均重合度は約 10（A：B=1：9）であった（Eberhardt et al., 1994）。次に、没食子酸の特徴的な 4 位の炭素に相当するスペクトルが観測されていることから没食子酸エステルの存在が認められるが、C：D=10：1 と平均重合度 7 から、PA が 1 分子に対し 0.7 のエステル結合の存在を示した（図 1-3）。また、用いた GSE のマスマスペクトルからは、PA の各量体に没食子酸エステルが結合していることが観測された（図 2-2）。例えば、PA2 量体（ $m/z$ 577.3[M-H] $^{-}$ ）、PA2 量体の没食子酸エステル（ $m/z$ 729.2[M-H] $^{-}$ ）、PA3 量体（ $m/z$ 865.2[M-H] $^{-}$ ）、PA3 量体の没食子酸エステル（ $m/z$ 1017.1[M-H] $^{-}$ ）などが観測されている。

## 2-2-3 プロシアニジン B-1 の精製と平均重合度の確認方法

ゲルろ過クロマトグラフィーによる粗精製に供した後、ODS クロマトグラフィーによる精製を繰り返し、プロシアニジン B-1 を得た。ゲルろ過クロマトグラフィー（Sephadex LH-20、Amersham Pharmacia Biotech 社製、3,000 mL）では、原料の GSE（50 g）から、アセトン／水の移動層により、2～3 量体の混合物（7 g）に粗精製した。C18 シリカゲル（ODS）クロマトグラフィー（3,000 mL）では、水とエタノールのグラジエントを緩やかに調節し、TLC と HPLC-UV で各フラクションを分析確認しながら純度の高いフラクションを選択濃縮し、純度 91%のプロシアニジン B-1（340 mg）を得た。プロシアニジン B-1（エピカテキン-（4 $\beta$ →8）-カテキン）の化学構造は、標準品（フナコシ株式会社製）と NMR 分析（ $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COSY、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC、Bruker 社製 DIGITAL NMR AVANCE 500）により比較確認した。

## 2-2-4 その他の試験材料

ビタミン C、ビタミン E は、エーザイ株式会社より、(+)-カテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキンガラート、(-)-エピガロカテキン、(-)-エピガロカテキンガラートは、フナコシ株式会社より、エタノール（食品グレード 95%品）、メタノール（和光純薬製、特級）、バニリン（和光純薬製、特級）、塩酸（和光純薬製、37%HCl）、トルエン（和光純薬製、一級）、ギ酸（和光純薬製、一級）はそれぞれ試薬メーカーより購入した。

表 2-2 ブドウ種子抽出物（GSE）の膜分離による分画、GSE 低分子画分と GSE 高分子画分の総フラバノール量（％）と平均重合度

	GSE（10 g）	
	透過画分 （GSE 低分子画分）	不透過画分 （GSE 高分子画分）
膜分離後の回収率	95％	
分画後の各重量	3.7 g	5.8 g
総フラバノール(%)	88%	83%
平均重合度	2.5～3	10～12

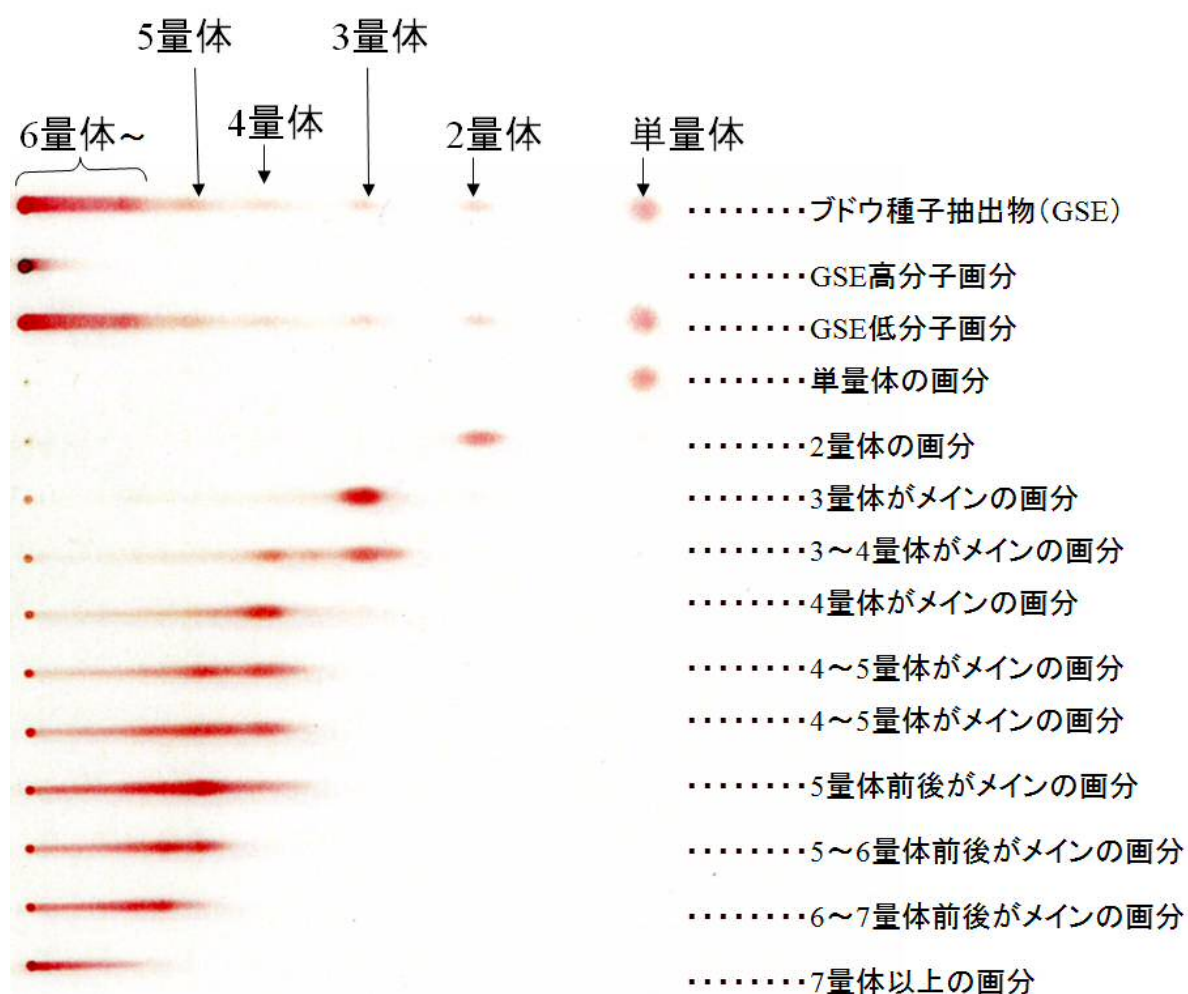


図 2-1 ブドウ種子抽出物 (GSE) と各分画物の TLC 展開図 (バニリン-塩酸発色)

サンプル調製 : 各 10mg / 250  $\mu$  L (50%エタノール水溶液, v/v)

TLC プレート : MERCK 社製 No. 1.05715., 20cm  $\times$  20cm, シリカゲル 60F254

展開溶媒 : トルエン : アセトン : ギ酸 = 3 : 6 : 1

発色剤 : バニリン発色液に浸漬後、乾燥させる

(メタノール : バニリン : 濃塩酸 = 1200ml : 48g : 600ml)

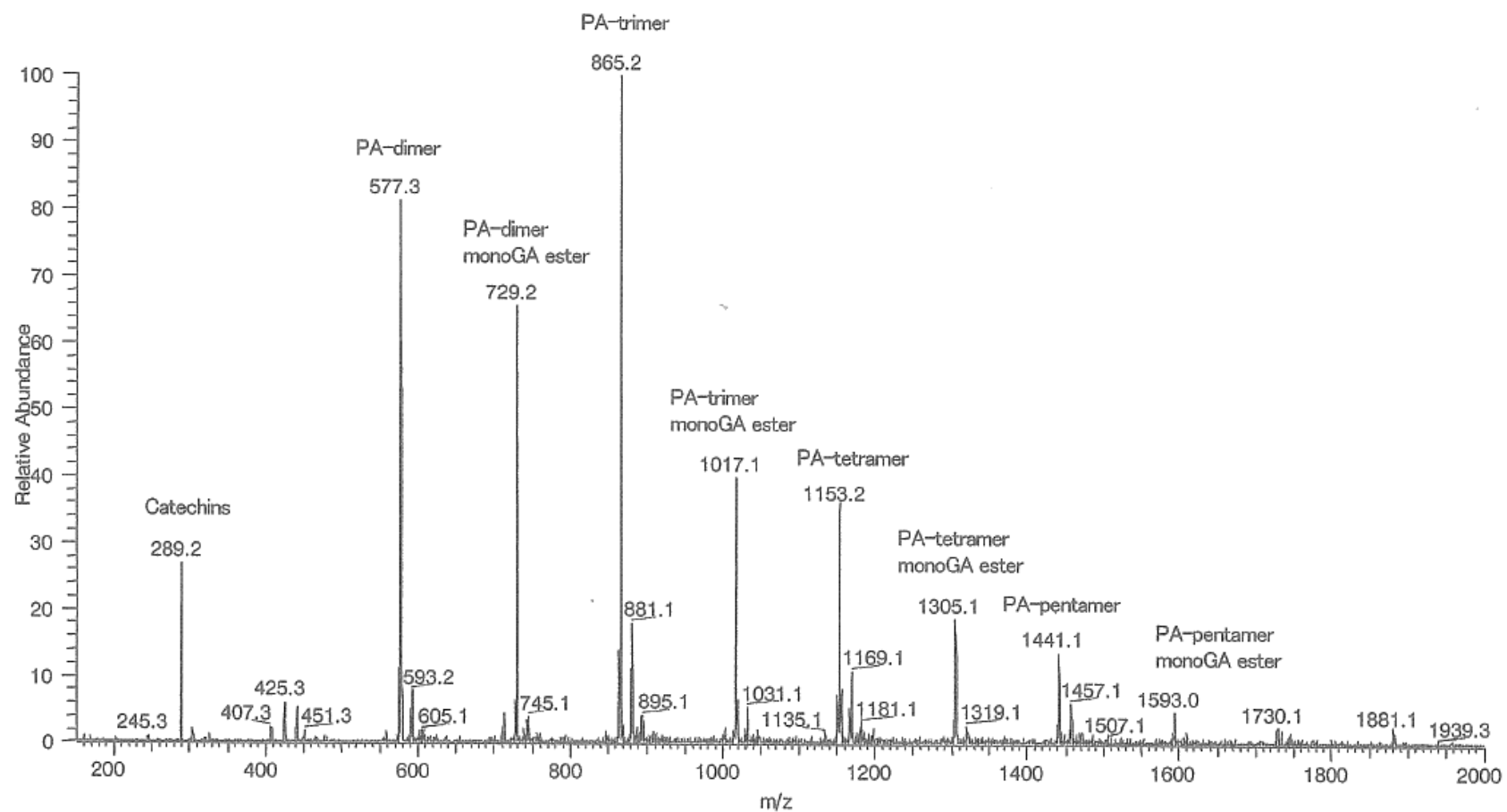


図 2-2 質量分析によるブドウ種子抽出物（GSE）の分子量分布の概要

## 2-2-5 ヒト試験倫理委員会の承認とヒト酸化抵抗性試験の試験方法

摂取品は、GSE カプセル (GSE として 400 mg 相当、PA として 360 mg 相当、第 3 章で用いた GSE 錠剤とは異なる、表 3-1 参照)、GSE 高分子画分カプセル (GSE として 400 mg 相当、PA として 332 mg 相当)、GSE 低分子画分カプセル (GSE として 400 mg 相当、PA として 352 mg 相当)、ビタミン C カプセル (400 mg)、ビタミン E カプセル (800 mg)、コントロール (グラニュー糖カプセル 400 mg) の 6 種類であった。

本試験は、キッコーマン総合病院に設けられた倫理委員会 (ヒト酸化抵抗性試験、ヒト血中移行確認試験) の承認を得て実施した。健常人 6~9 名を 1 群とし、各群 GSE・ビタミン E・グラニュー糖・GSE 高分子画分・GSE 低分子画分を 14 日間連続摂取させた。摂取前、3 日間摂取、及び 14 日間摂取後に各被験者から採血し、Koga ら (1999) の方法に従い、血中 LDL の過酸化物質 (コレステロール過酸化物質、ChE-OOH) が生成するまでの時間 (Lag-time) を測定した。被験者は、キッコーマン株式会社内の社員 25 歳から 47 歳までの男女 20 名のボランティアを集めた。試験開始に先立って、除外基準を以下に設定した。

1. 検査結果に影響する可能性のあると思われる薬の服用や健康食品の常食をしている者
2. 妊娠または妊娠している可能性のある婦人および授乳婦の者
3. アルコールを過度に摂取している者
4. アレルギー症状を示す恐れのある者
5. 赤ワインを常飲している者
6. 糖尿病、重篤な肝障害、腎障害、心筋梗塞の既往歴のある者
7. その他、試験助言医師が本試験を実施するのに不適当と判断した者

この除外基準および業務に支障のでないよう試験継続の可能性を考慮して 20 名のスクリーニングを行い、17 名の被験者を選抜した。試験に直接関与しないコントローラーが各クールの群分けを行った。1 日の前観察期間の後、第 1 クールとして 14 日間の連続摂取期間と 7 日間のウォッシュアウト期間を設けた。その後、群分けを行い、第 2 クール、第 3 クールと一重盲検試験を進めた (表 2-2)。試験品の摂取は毎朝朝食後とし、摂取期間中の食事は除外基準に抵触しない範囲で自由に摂らせた。試験期間中、何らかの体調不良を感じた場合は直ちに申し出るよう通知した。

各試験クールにおいて、0 日目（摂取前）、摂取 3 日後、摂取 14 日後にそれぞれ問診と採血を行った。問診では、体調不良がないかの聞き取り調査のみを行った。採血試料は、ヘパリン入りの採血管に取り、4℃下、1,500×g、10 分間遠心処理し、血漿を得た。得られた血漿は酸化抵抗性の試験実施まで-80℃で保存した。血漿コレステロールエステル（ChE）の酸化試験は、Koga et al.（1999）の方法に従い、銅イオン酸化誘導による血清中コレステロールエステルの過酸化物（ChE-OOH）の生成速度を継時的に記録し、GSE 等の摂取群でその生成速度に遅延（lag-time）が生じるかを評価指標とした。ChE-OOH の生成速度を記録した例を図 2-3 に示す。図中、45 分経過頃から ChE-OOH の増大が観察されている。60 分過ぎには直線的に増大し、この直線と x 軸との交点を、酸化開始時間、言い換えれば、血漿中 ChE が酸化されるまで抵抗した時間（lag-time）と定義し記録した。

得られたデータは、摂取前と摂取 3 日後、および摂取前と摂取 14 日後をそれぞれ比較し、student-t 検定による有意差検定を行い、危険率 5%未満を有意差ありとした。

表 2-2 被験者の群分けと各試験クールの摂取品

被験者	第 1 クール		第 2 クール		第 3 クール	
	14 日間 摂取	7 日間 非摂取	14 日間 摂取	7 日間 非摂取	14 日間 摂取	7 日間 非摂取
17 人男女 25－47 歳	A 群 (砂糖)	再 群分け	C 群 (VC)	再 群分け	E 群 (VE)	後観察 期間
	B 群 (GSE)		D 群 (高分子)		F 群 (低分子)	
介入日	0, 3, 14 日目	なし	0, 3, 14 日目	なし	0, 3, 14 日目	なし

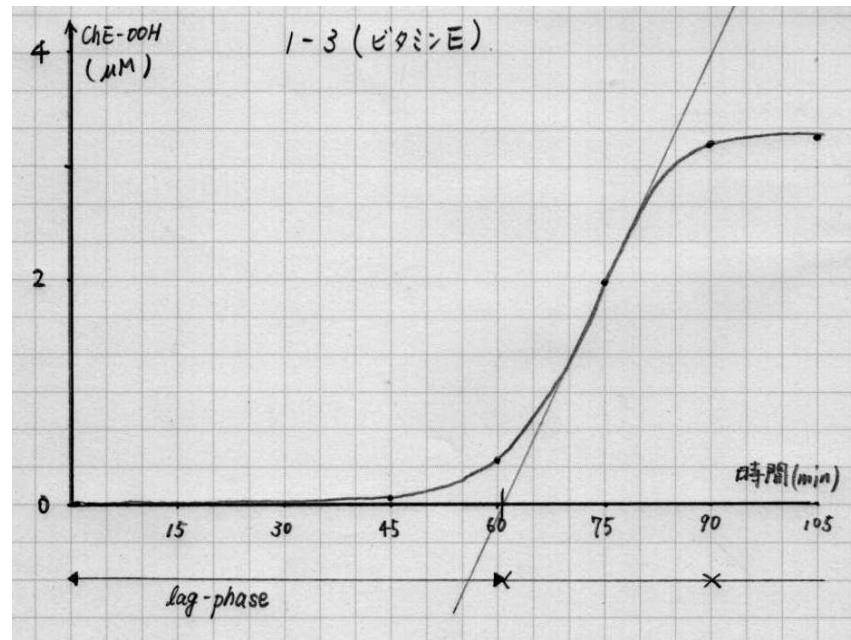


図 2-3 血漿中のコレステロールエステル (ChE) が銅イオンによる酸化誘導を受け、過酸化物 (ChE-OOH) へ酸化される時間を比色法により継時的にプロットした例



## 2-2-6 ヒト血中 PA の分析方法 (HPLC-ECD 法、LC-MS/MS 法)

2-2-5 で採取した血液サンプル (GSE 群の摂取前、GSE 群の摂取 14 日後) を、Koga et al. (1999) の方法に準じて血中カテキン類と PA 類の分析を行った。

2-2-5 の GSE 摂取試験とは別に、健常人 4 人を被験者とする GSE (2 g) の単回摂取試験を行った。摂取前、摂取 2 時間後に採血 (各 50 mL) を行い、血清中の成分を LC/MS 分析に供した。血中移行物 (カテキン類や PA) の測定のための前処理方法は、Koga et al. (1999) の方法に従って、Piskula et al. (1998) に記載の酵素処理 (Sulfatase type H-5) を追加して行った。血中移行物の測定には LC-MS-MS 法を用いた。分析条件は以下の通り。

HPLC 条件 :

装置: JMS-LCMATE LCMS system (日本電子製)

流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 28°C, 注入量: 5  $\mu$ L

カラム: 逆層 ODS (Wakosil-II 5C18 HG: 2.0×250 mm, 和光純薬工業製),

移動層 A: 0.01%(v/v) HCOOHaq, 移動層 B: CH<sub>3</sub>OH containing 0.01%(v/v)

HCOOH

Time(min)	A%	B%
0	100	0
60	50	50
115	0	100
120	100	0

MS 条件 : ESI-positive mode, orifice: 70°C, ring lens voltage: 50 V, Desolving plate: 220°C

MS 取り込み条件: Selected Ion Monitoring (SIR:  $m/z$  579, 731, 867 [M+H]<sup>+</sup>)

ここで質量分析器の指定分子量は、それぞれプロシアニジン 2 量体 ( $m/z$  579.2)、プロシアニジン 2 量体の没食子酸エステル( $m/z$  731.3)、プロシアニジン 3 量体( $m/z$  867.3)に相当する。

### 第3節 結果

#### 2-3-1 ヒト血漿の酸化抵抗性試験の結果 (400 mg、14 日間連続摂取試験)

GSE 摂取群、GSE 高分子画分群の血漿 ChE-OOH 生成までの lag-time は、摂取 14 日後で摂取前と比べると有意に延長した。また、GSE 低分子画分群においても、摂取 14 日後の試料は、lag-time の延長傾向 ( $P<0.06$ ) が観察された。一方、ビタミン C 摂取群やビタミン E 摂取群では、試験期間中の 3 回の血液試料間で有意な差を認めなかった。なお、対照群 (グラニュー糖摂取群) において、摂取前、摂取 3 日後、摂取 14 日後の lag-time に有意な変動はなかった (図 2-4)。

#### 2-3-2 ヒト血中 PA の測定結果

##### 2-3-2-1 400 mg の GSE14 日間連続摂取試験時の血中 PA の測定

摂取前と摂取 14 日後を電気化学検出器 (ECD) による HPLC 分析クロマトグラムで測定し比較した (図 2-5)。没食子酸 (保持時間 17.8 分)、(+)-カテキン (保持時間 56.8 分)、(-)-エピカテキン (保持時間 61.6 分) が被験者全員の血中に検出された (定性分析、定量せず)。これら 3 化合物は、標準品を血清試料に添加し一致することを確認している。この他、摂取 14 日後のクロマトグラムに、明らかに増大した不明成分 1 (保持時間 24.3 分)、不明成分 2 (保持時間 80.5 分) のピークが観察された。しかし、この 2 成分は、GSE 由来の二〜三量体のどれとも一致しなかった。また、この 2 成分の増大を確認した血清サンプルは、7 名中 2 名からのみであり、また前処理から再測定を行ったが分析結果に再現性が見られなかった。

##### 2-3-2-2 2,000 mg の GSE 単回摂取試験における血中 PA の測定

摂取前と摂取 2 時間後の試料を LC-MS/MS で SIM 分析したクロマトグラムを図 2-6 に示す。摂取 2 時間後のクロマトグラム B に、 $m/z$  579  $[M+H]^+$  を有する明らかなピークが検出され、没食子酸エステルを有しない PA の 2 量体と同一の分子量であった。検出された  $m/z$  579  $[M+H]^+$  が PA の 2 量体であることを確かめるために、GSE より単離精製した標準品を血漿サンプルに添加し再測定を行った。その結果、 $m/z$  579  $[M+H]^+$  はプロシアニジン B-1 (エピカテキン-(4 $\beta$ →8)-カテキン) と同定された。この成分の血中濃度は、2.0 g の GSE 摂取 2 時間後において  $10.6 \pm 2.5$  nmol/L ( $n = 4$ ,  $p < 0.01$ ) であった。

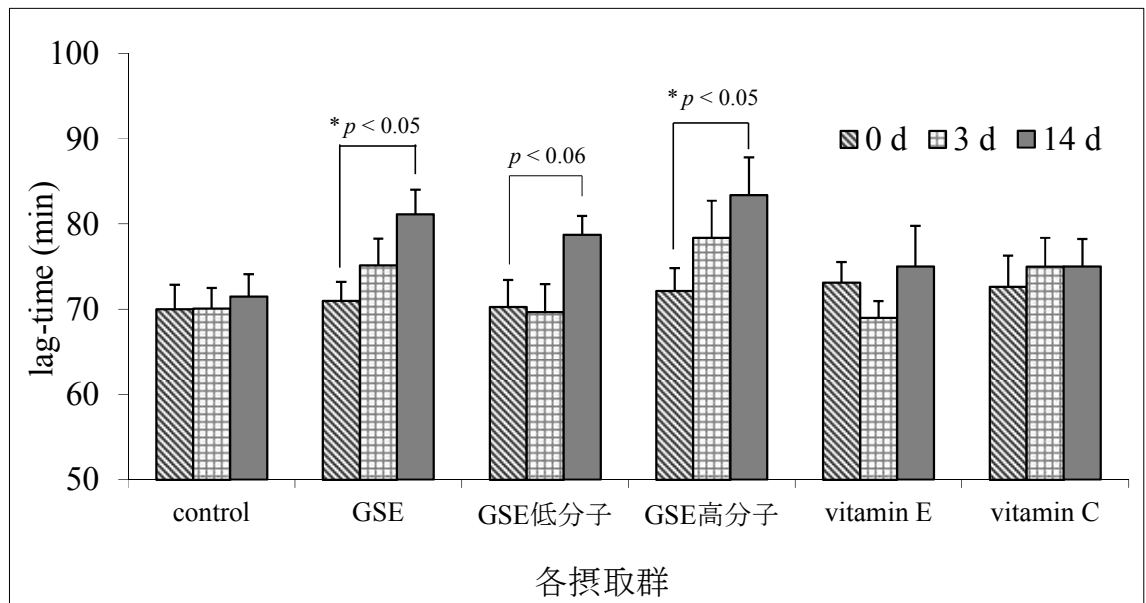


図 2-4 各抗酸化物質の摂取後の血中コレステロールエステルが酸化されるまでの時間 (lag-time)

\* 摂取前と 14 日後の比較で有意差あり ( $P < 0.05$ )

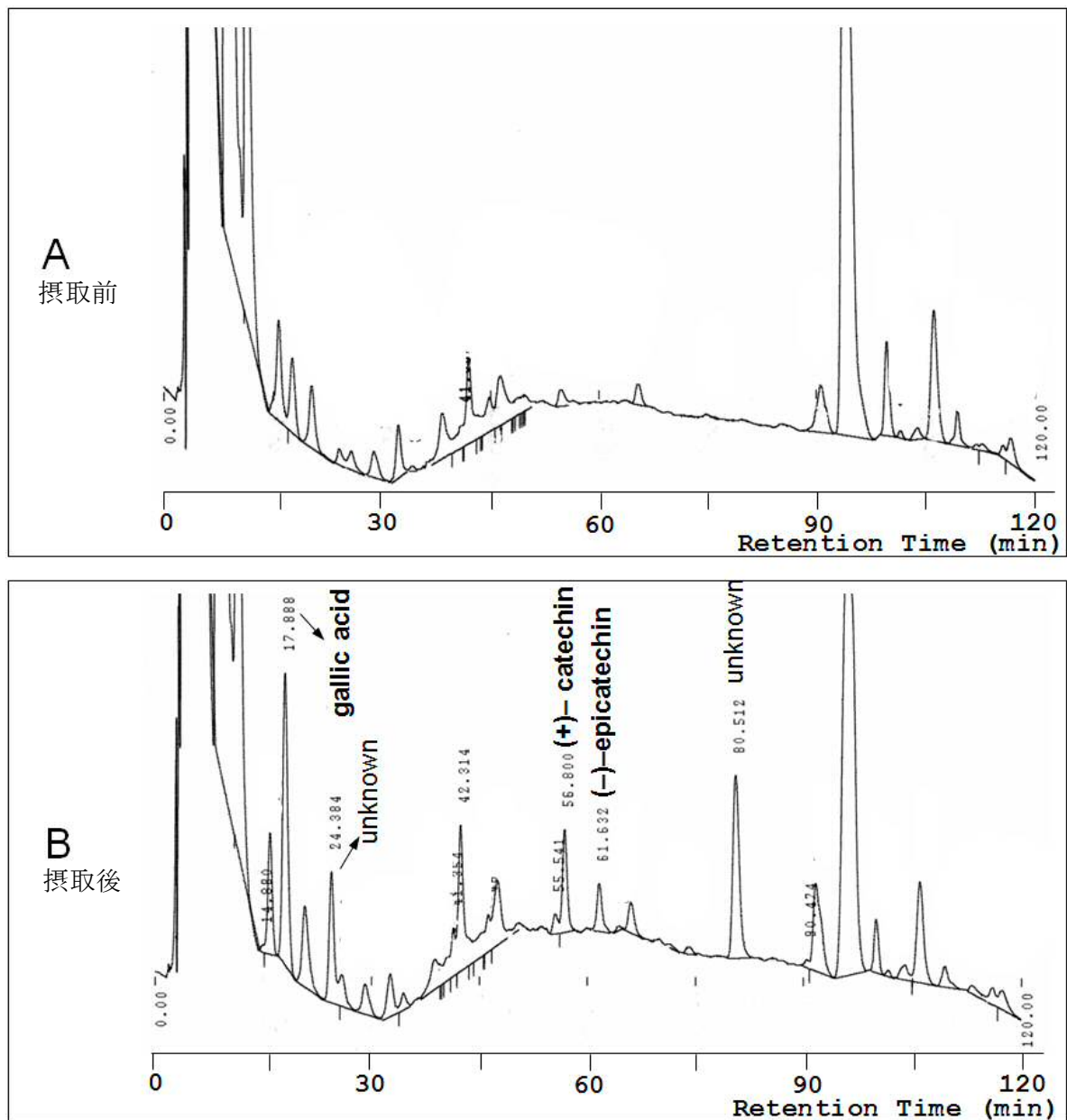


図 2-5 ブドウ種子抽出物 (GSE) 摂取前 (A) と摂取後 (B) の血清の HPLC-EDC クロマトグラム

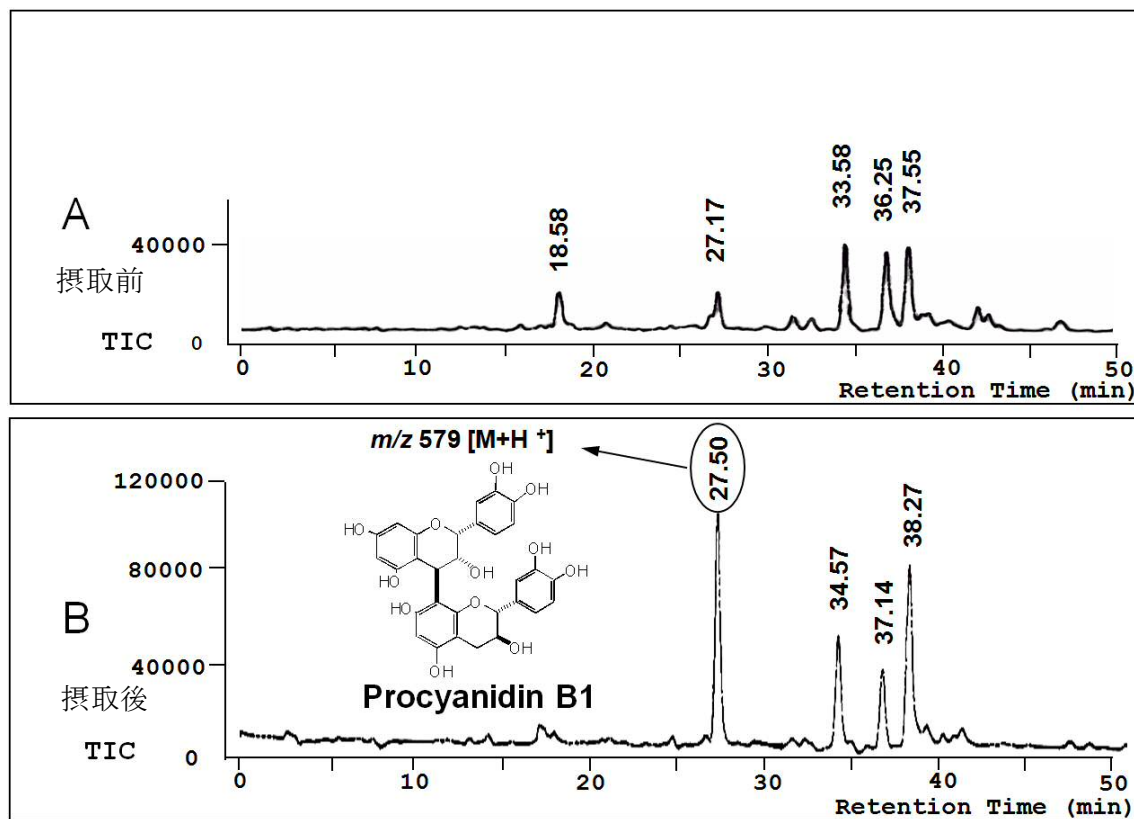


図 2-6 ブドウ種子抽出物 (GSE) 摂取前 (A) と摂取後 (B) の血清の LC-MS/MS クロマトグラム

## 第4節 考察

抗酸化物質を14日間摂取したヒトの血液で、とくにブドウ種子抽出物（GSE）高分子画分群の血漿の酸化抵抗性を高めること、また、2,000 mg の GSE 単回摂取後に2量体の PA であるプロシアニジン B-1 が検出されたことを初めて示した。

ヒト血漿酸化抵抗性試験において、摂取前（0日）から14日目で、GSE 群では有意に lag-time が延長（ $p < 0.05$ ）、また同様に GSE 高分子画分群でも延長（ $p < 0.05$ ）し、血漿の酸化抵抗性の上昇を認めた。この GSE 高分子画分のフラバン-3-オールを構成単位とした平均重合度は約10、また未分画の GSE の平均重合度は約7、GSE 低分子画分のそれは約2.5量体である（2—2—2参照、図1-3）。GSE 高分子画分にはカテキン類は痕跡程度しか含まれておらず重合体のみであること、また、GSE 低分子画分よりも GSE 高分子画分群により抗酸化性が強い傾向が見られることから（有賀 et al., 2000）、ヒト血漿の酸化抵抗性の活性本体は、PA である可能性が示唆された。GSE 群と GSE 高分子画分群で摂取3日目では lag-time の上昇傾向が見られたが有意差はなかった（それぞれ  $p < 0.29$  と  $p < 0.24$ ）。ヒトでの赤ワイン単回投与は脂質酸化に影響を及ぼさず（Abu-Amsheh et al., 2000）、茶のヒト抗酸化効果は長期摂取後に評価され（Van het Hof et al., 1997; Kondo et al., 1994）、紅茶の単回投与試験では血漿抗酸化活性効果が見られていない（Maxwell & Thorpe, 1996）ことから、GSE 摂取による血中酸化抵抗性を高めるためには、単回摂取ではなく一定期間の摂取が必要と考えられた。なお、抗酸化物質として知られるビタミン C 摂取群や E 摂取群では、摂取3、14日目で有意に各血中濃度が上昇していたが（データ未公表）、lag-time の延長、すなわち、血漿コレステロールの酸化を抑制する効果は見られなかった。

ヒト血漿酸化抵抗性の根拠をより明確化するためには、摂取した GSE 中の成分が血中移行を示す必要がある（Hollman & Katan, 1997）。経口摂取物のヒト体内への移行は、腸管から吸収され、門脈を経て肝臓へ入り、代謝を受けた後に、血液を介して全身へ分布する。GSE の主成分である PA はポリフェノールであり、過去の文献から腸管内で代謝分解を受けたり（Rowland & Tozer, 1995; Deprez et al., 2000）、肝臓において代謝され、グルクロン酸、メチル基および硫酸基などにより修飾や抱合されることが予測される（Koga et al., 1999）。比色法による血中ポリフェノール濃度測定は、複雑な構造を有し、代謝や分解を受け、多種多様な夾雑物を含む生体試料中のポリフェノールをまとめて測定するのに有益な方法と考えられる（Serafini et al., 1998）。今回、Folin-Ciocalteu 法、Porter 法およびバニリン塩酸法を適用して血中ポリフェノール分析を試みたが再現性がなく、いずれも定量も定性もできなかった（データ未公表）。原因として、微量の血中 PA を

検出できるほどの測定感度が無かったこと、タンパク質等の血中成分のバックグラウンドが高いために PA が埋没し検出できなかったこと、また発色系の検出方法では何らかの血中成分等による妨害物質の影響がでたこと等が考えられる。

血液サンプルからの PA 検出方法として、より高感度で再現性の高い電気化学検出による HPLC 法 (Izumi et al., 2000; Koga et al., 1999; Piskula et al., 1999) を試みた。その結果、比色法では検出できなかったカテキンとエピカテキンのピークを検出した。これは、赤ワインポリフェノール化合物抽出物摂取後のヒト血中吸収物を測定した過去の報告を裏付けるものである (Donovan et al., 1999; Bell et al., 2000)。検出された(+)-カテキンと(-)-エピカテキン量は、それぞれ 33–183 nmol/L、38–158 nmol/L であった。これは 120 mL の赤ワインを摂取後のヒト血中カテキン濃度を測定した報告 (Donovan et al 1999) の摂取 1 時間後の血中 Total カテキン濃度  $91 \pm 14$  nmol/L と近い値となった。また、GSE 低分子画分群における検出されたカテキンとエピカテキン濃度は 67–775 nmol/L と 32–530 nmol/L であり、GSE 摂取群よりも高値であったが、低分子の占める割合が元々多いことに起因している。一方、GSE 高分子画分群では吸収物と思われるピークは痕跡程度しか検出されなかった。しかし、分析系の問題、すなわち、逆相系カラムでは高分子 PA は吸着されて検出されないという特徴があり、実際には吸収されているかもしれない。また、腸内細菌などの働きによって低分子化した (Scalbert & Williamson, 2000) ものが痕跡ピークとして検出された可能性もある。しかし、血中の PA 移行は確認できなかった。

血中 PA の移行を確認するために、2,000 mg の過去報告例のない過剰量の GSE を摂取させ、電気化学検出器よりも高感度の LC/MS 手法を用いて血中の PA 検出を試みた結果、投与後 2 時間後の血中から一量体でも没食子酸でもない明確なピークを検出した。このピークは GSE より単離精製した二量体の各 NMR 解析結果によりプロシアニジン B-1 であることを同定した。検出された血中濃度は平均  $10.6 \pm 2.5$  nmol/L であった。これまで二量体以上の重合体の血流への吸収は確認されなかったが、我々の結果は PA (ポリフェノール一量体であるカテキンやエピカテキンのみならずポリフェノール重合体であるプロシアニジン 2 量体) が GSE の摂取後に吸収されたことを初めて示すものである。今まで、赤ワインまたはその抽出物を摂取させた過去の実験報告では、摂取後のフェノール性化合物の吸収に関して、単量体のような低分子化合物のみであって 2 量体以上の高分子化合物は報告されていないか (Donnovan et al., 1999; Bell et al., 2000)、または、発酵により低分子化されてから吸収される (Scalbert & Williamson, 2000) と考えられてきた。しかしながら、3 量体以上のポリフェノール化合物の重合体の吸収は未だ確認されていない以上、3 量体以上の化合物がヒトで吸収されるとは断定できず、ま

た、腸内細菌の代謝分解の可能性もある。今回のヒト血中に吸収された 2 量体も元々 2 量体そのもの、または 2 量体の没食子酸エステル付加体であったものが吸収されたのか、あるいは腸内細菌によって低分子化された結果なのかは推測の域を越えず、今後の研究が待たれる。その他のヒト血中への吸収物について、LC/MS 手法でいくつか認められている。例えば、カテキン代謝物であるカテキンのメチル体などは  $m/z$  305[M+H]<sup>+</sup> として検出されており（データ未公表）過去の報告（Abu-Amsha et al., 2000）を裏付けている。また、 $m/z$  731[M+H]<sup>+</sup> として検出されたピーク（データ未公表）はプロシアニジン二量体の没食子酸エステル体と考えられる。このエステル体はプロシアニジン二量体よりもさらに大きな分子に相当し、2 量体より大きい分子の重合体もヒト体内に吸収されることを示唆するものであった。腸内細菌により細かく切断されて吸収されている可能性を示唆する報告はあるが、これまでヒトでポリフェノール重合体（二量体以上）の吸収が確認されたという報告はない。2 量体の吸収が確認されたのは今回が初めてである。これはブドウ種子ポリフェノールの主成分であるプロアントシアニジンがそのままヒト体内に吸収されることを示唆するもので、赤ワインやブドウ種子抽出物が、動脈硬化、心疾患予防効果を有するメカニズムを解明する手がかりの 1 つとなるのではないかと期待される。

以上により、PA を豊富に含む GSE 摂取により、ヒト血中に PA2 量体が確かに吸収され、血中コレステロールの酸化を抑制することが確認された。この結果は、ヒトが PA の生体利用能を有することを示す有益な情報である。また、血漿 ChE 酸化抵抗性が確認されたことは、動脈硬化症などの血管疾患の予防や抑制に効果を有することを示唆するものであるが、よりリスクの高い酸化したコレステロールの抑制効果の有無を確認するならば、さらに血管疾患の予防的役割を示すものとなるであろう。



表 2-3 本研究で見出されたプロシアニジン B-1 の血中濃度。エピカテキンの血中濃度は各文献からの引用した数値。

投与物	摂取量*	血中濃度	引用文献
プロシアニジン B-1 (2 量体)	18 mg	10.6±2.5 nmol/L	本研究
エピカテキン (単量体)	230 mg	600–1,600 nmol/L	Lee et al, 1995.
エピカテキン (単量体)	82 mg	380 nmol/L	Richelle et al., 1999

\* 各摂取量は、混合物である GSE または茶抽出物中に含まれる単一化合物（プロシアニジン B-1、エピカテキン）の含量

## まとめ

抗酸化物質を 14 日間摂取したヒトの血液で、血漿の酸化抵抗性を高めることが確認された。GSE 中の PA 重合度が高い GSE 高分子画分群でより明確な酸化抵抗性を示した。その生体内の酸化抵抗性の上昇を裏付けるために、血中の PA のヒト血中移行の確認試験を別途行った。4 人の健常人に対し、過剰量の PA 高含有ぶどう種子抽出物(GSE) 2.0 g の摂取 2 時間後の血清サンプルを抱合体加水分解酵素処理を経て LC-MS/MS 分析に供した。その結果、摂取 2 時間後のヒト血液サンプルからプロシアニジン B-1 が検出された。また摂取 2 時間後の血中濃度は、単量体での報告例よりも 1 桁低い、 $10.6 \pm 2.5$  nmol/L であった。

### 第3章 ブドウ種子抽出物(GSE)経口摂取による malondialdehyde-modified LDL 値への影響

#### 第1節 背景と目的

フランス人は動物性脂肪の摂取量が多いにもかかわらず、動脈硬化起因の心筋梗塞による死亡率が低いという疫学調査結果(フレンチ・パラドックス)が報告されているが、その理由としてフランス人が頻繁に飲む赤ワインに含まれるポリフェノールの抗酸化作用によるものと考えられている(Renaud & Lorgeril, 1992)。これまでに、赤ワインのポリフェノールが試験管内で LDL-コレステロール(LDL-C)の酸化を抑制すること(Teissedre et al., 1996)や赤ワインを飲んだ人の血中 LDL-C が酸化に対して抗酸化性を示すこと(Kondo et al., 1994)が明らかとなっている。赤ワインのポリフェノールの内、プロアントシアニジン(PA)が最も含有量が高く、次いでカテキンと続く(Dixon et al., 2005)。また、PA は赤ワインに含まれるポリフェノールの中で最も抗酸化作用が強いことが知られている(Tanahashi et al., 1995)。第2章で、GSE(400 mg)の14日間連続摂取によって、血中のコレステロールの酸化に対する抵抗性が高まることが確認され、酸化ストレスに対する生体の防御機構に何らかの補助的役割を果たしている可能性が考えられるに至っている。しかし、赤ワインポリフェノールの中心である PA を豊富に含む GSE の摂取が、フレンチ・パラドックスを科学的に裏付けるには至っていない。酸化 LDL は、LDL が酸化的修飾を受けた物質であり、生体内において動脈硬化の形成、進展に中心的役割を果たしている(Steinberg et al., 1989; Witztum & Steinberg, 1991; Berliner et al., 1995; Navab et al., 1996)。また近年、アディポネクチンの濃度の低下と肥満(Arita et al., 1999)、糖尿病(Hotta et al., 2000)および動脈硬化(Ouchi et al., 1999)との関係が示されてきている。しかし、GSE がアディポネクチンに及ぼす影響に関する報告はない。

第2章において、GSE 摂取によりヒト血漿コレステロールエステルの酸化を抑制する効果をヒトで確認した。Vigna et al.(2003)も、喫煙者を対象としたヒト試験で血中コレステロールの酸化抵抗性が lag-time 延長により報告している。また、高コレステロール血症者に GSE を摂取させると LDL の酸化が抑制されたとの報告もある(Preuss et al., 2000)。しかし、年単位で進行悪化する動脈硬化症等の血管疾患の予防は、未病段階での対処が重要であることから、健常者での GSE 投与による血中コレステロールの酸化レベルを改善する必要がある。

本章では、ブドウ種子から高純度で精製した PA を主成分とする錠剤を用いて健康な成人男女に12週間経口摂取させ、酸化 LDL の一種で malondialdehyde-modified LDL に及ぼす影響と GSE 摂取とアディポネクチンの関係を検討することを目的とした。

## 第2節 試験方法

### 3—2—1 試験食品

使用した3種類の試験錠剤の組成を表3-1に示した。GSE錠剤は、1錠あたりPAが50 mg (GSEは69.5 mg)含まれている市販品(ヴィノパワー、キッコーマン株式会社製)を、後述する低用量群に用いた。またヴィノパワーと同様の製法でGSE配合量を2倍(1錠あたりPAが100 mg、GSEは139 mg)に増やした錠剤を、後述する高用量群に用いた。なお錠剤の形態として外からの判別はできないよう、プラセボ錠剤にはカラメル色素を添加した。また品質保持の目的で錠剤をセラックコーティングした。

表 3-1 試験に使用した3種類の試験錠剤の原材料組成 (単位: mg)

原材料構成 (mg)	対照群(プラセボ) (1日あたり4錠摂取)	GSE 278 mg/day群 (1日あたり4錠摂取)	GSE 555 mg/day群 (1日あたり4錠摂取)
GSE	0	69.5	139
うちPA	0	50	100
微粉セルロース	187.5	123	87.5
マルトース	55	50	16
ショ糖脂肪酸エステル	7.5	7.5	7.5
カラメル	微量	0	0
セラック	微量	微量	微量
合計(1錠)	250	250	250

### 3-2-2 ヒト試験倫理委員会の承認と被験者

本試験は、愛和クリニック倫理委員会の承認(KKM-001-01)のもとに行われ、ヘルシンキ宣言に基づく基本原則に従って行った。試験開始前に、以下の選択基準と除外基準に従って、試験に参加する被験者を選定した。

#### 選択基準:

- 1) 30 歳以上 70 歳未満の男女
- 2) スクリーニング時の LDL-C が日本人健常者の基準範囲である 100 mg/dL 以上 180 mg/dL 未満の者
- 3) 検査 2 日前から禁酒が可能な者
- 4) 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た者で、書面で本試験参加に同意の意思を提出した者
- 5) 試験責任医師により、本試験への参加が適当であると認められた者

#### 除外基準:

- 1) 高脂血症治療薬、降圧薬等脂質代謝に影響を及ぼす可能性がある医薬品服用者
- 2) 脂質や血圧に影響を及ぼす可能性がある健康食品摂取者
- 3) 抗酸化作用が強いといわれるブドウ種子を原料とする食品(例: グレープシードオイル)、健康食品、ビタミン剤(C、E)の常用者(健康茶の大量摂取も含む)
- 4) 赤ワインの常飲者(週にハーフボトル 1 本以上飲酒)
- 5) 糖尿病、顕著な肝機能障害者
- 6) 家族性高脂血症患者
- 7) 妊婦および妊娠の可能性のある者、授乳中の者
- 8) その他試験責任医師が被験者として不適当と判断した者

### 3-2-3 試験方法

130 名を対象にスクリーニング試験を行い、選択基準および除外基準から 61 名の被験者を選定した。コントローラ(聖マリアンナ医科大学 東海林 洋子 准教授)が被験者を無作為に 3 群に割り付けた。前観察期間を 2 週間設定した後、摂取期間を 12 週間および後観察期間を 2 週間とした。採血、身体検査および問診は、前観察期間、摂取 6 週間、摂取 12 週間に実施した。被験者は試験食品を毎日朝食後に 1 日分量(4 錠)を 12 週間摂取した。摂取時間は朝食後とし、朝食を摂らない場合は昼食後とした。ただし試験期間中の食事内容は、本試験の選択基準や除外基準に抵触しない限り、本人の自由とした。摂取開始 6 週、12 週後に問診と各測定を行った。

### 3-2-4 測定項目

身長・体重・Body Mass Index(BMI)、血圧・脈拍、問診所見。血液生化学的検査は総コレステロール、LDL-C、HDL-C、中性脂肪、白血球数、赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血小板数、総蛋白、アルブミン、A/G、総ビリルビン、AST(GOT)、ALT(GPT)、ALP、LDH、 $\gamma$ -GTP、CPK、尿酸、BUN、クレアチニン、空腹時血糖、ヘモグロビン<sub>A1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>)、酸化 LDL として malondialdehyde modified LDL (MDA-LDL あるいは酸化 LDL) (小谷, 2005)、アポ蛋白(免疫比濁法) (岡崎 et al, 1987)、アディポネクチン(ELISA 法) (Nishimura & Sawai, 2006) を測定した。また、尿は、蛋白、糖、潜血、沈査を検査項目とした。なお、MDA-LDL は EIA 法にて測定した(小谷, 2005)。

### 3-2-5 統計解析法

GSE による抗酸化能および安全性評価を群内比較には対応のある t 検定、群間比較は一元配置分散分析とその後の多重比較検定(Dunnett 検定)を用いて評価した。また、MDA-LDL/ApoB パラメーターについては、Kondo et al. (2003)の報告において Low HDL subjects (TG $\leq$ 1.69 mM, HDL $\leq$ 0.91 mM)の MDA-LDL/ApoB の値が 99 $\pm$ 49 mU/mL を示すことから、MDA-LDL/ApoB の値が 100 mU/mL 以上の群を High MDA-LDL/ApoB 群として評価した。さらにアディポネクチンと各測定値の関係について測定値を標準化し単回帰分析を行った。すべての測定値は、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。測定値は SPSS 株式会社 SPSS ver 13.0J により解析を行った。有意水準は両側検定で 5%未満とした。

### 第3節 結果

#### 3-3-1 評価対象とした被験者と除外者

被験者(対象者)の各検査値を表 3-2 に示した。3 群間で有意な差が見られる項目はなかった。なお試験期間中に本人の意思による離脱者 2 名、下痢や頭痛を伴う風邪をひいた 1 名(試験食品との関連なし)、喘息発作を生じた 1 名(試験食品との因果関係なし)、遵守事項の悪かった 4 名を除外した 53 名を試験評価対象として検討した。

#### 3-3-2 ブドウ種子抽出物(GSE)の 12 週間連続摂取による血中脂質への影響

GSE 摂取による血清脂質の推移を表 3-3 に示した。総コレステロール、LDL-C は対照群において前値(前観察期間)に比べ有意な上昇が見られたが、群間での有意な差は見られなかった。HDL-C は対照群、GSE 278 mg 群および GSE 555 mg 群において 12 週で前値に比べ有意な上昇が見られたが、群間の有意な差は見られなかった。中性脂肪は試験期間中に有意な変動を示さなかった。RLP-C は GSE 278 mg 群において 12 週で前値に比べ有意な低下が見られたが、対照群との有意な差は見られなかった。アポリポ蛋白 A1(ApoA1)は試験期間中に有意な変動は示さなかった。アポリポ蛋白 B(ApoB)は GSE 278 mg 群、GSE 555 mg 群において前値に比べ有意な低下が見られたが、対照群との有意な差は見られなかった。アポリポ蛋白 E(ApoE)は対照群において 6 週で有意な上昇が見られたが群間での有意な差は見られなかった。ApoB/A1 は、GSE 278 mg 群において 12 週で有意な低下が見られたが、対照群との有意な差は見られなかった。

MDA-LDL は 6 週で GSE 555 mg 群において前値に比べ有意な低下が見られ、12 週では GSE 278 mg 群、GSE 555 mg 群ともに前値に比べ有意な低下が見られた。MDA-LDL/ApoB は、GSE 278 mg 群において 6 週、GSE 555 mg 群において 12 週で前値に比べ有意な低下が見られた。さらに MDA-LDL/ApoB 値が 100 mU/ml 以上の High MDA-LDL/ApoB 者(プラセボ群 11 名、GSE 278 mg 群 12 名、GSE 555 mg 群 10 名)の血清 MDA-LDL 値の変動を図 3-1 に、MDA-LDL/ApoB 値の変動を図 3-2 に示した。血清 MDA-LDL では、6 週で GSE 555 mg 群において前値および対照群に比べ有意に低い値を示し、12 週で GSE 278 mg 群、GSE 555 mg 群ともに前値に比べ有意に低い値を示した。また、多重比較検定において両群とも対照群より低い傾向を示した。MDA-LDL/ApoB 値では、GSE 555 mg 群においては 6 週、12 週で前値に比べ有意な減少が見られ、対照群よりも低い傾向を示した。

#### 3-3-3 GSE 摂取による安全性の評価

試験を完了した被験者(対照品群 n=18、GSE 278 mg 群 n=18、GSE 555 mg 群 n=17)の身

体的検査および血液検査の結果を表 3-4、表 3-5 に示した。身体的検査および血液検査において異常値および異常変動は見られず、自他覚症状などの異常も認められなかった。

#### 3-3-4 GSE の 12 週間連続摂取によるアディポネクチンへの影響

GSE 摂取によるアディポネクチンの有意な変動は見られなかった。試験食摂取前のアディポネクチンと各測定値の関係について測定値を標準化し、単回帰分析を行った結果を表 3-6 に示した。アディポネクチンは年齢( $r = 0.352$ )、HDL-C( $r = 0.426$ )、ApoA1( $r = 0.371$ ) と有意な正の相関性を示し、体重( $r = -0.597$ )、BMI( $r = -0.470$ )、中性脂肪( $r = -0.368$ )、RLP-C( $r = -0.303$ )、ApoB/A1( $r = -0.395$ )と有意な負の相関性を示した。図 3-3 にアディポネクチンと体重(A)、BMI(B)、年齢(C)、HDL-C(D)の相関散布図を示した。そのうちアディポネクチンは体重と最も高い相関を示した。そこで、試験期間中の体重の変動が少なかった( $\pm 1$  kg 未満)被験者のみで GSE のアディポネクチンに及ぼす効果を解析し結果を表 3-7に示した。GSE 摂取により GSE 555 mg 群において 12 週で前値にくらべ上昇傾向( $p = 0.088$ )が見られた。



表3-2 被験者(対象者)の各検査値

items	unit	placebo群	GSE 276 mg群	GSE 555 mg群
sex	M / F	10 / 10	10 / 11	9 / 11
year age	age	53.2 ± 2.1	51.0 ± 2.4	52.9 ± 2.0
height	cm	161 ± 1.8	161 ± 2.0	160 ± 1.8
body weight	kg	63.1 ± 2.18	63.5 ± 2.68	62.3 ± 2.47
BMI		24.4 ± 0.59	24.2 ± 0.66	24.1 ± 0.62
systolic blood pressure	mmHg	126.4 ± 4.5	127.0 ± 3.2	125.2 ± 3.1
diastolic blood pressure	mmHg	78.6 ± 2.5	76.5 ± 1.8	79.1 ± 2.0
pulse	bpm	65.3 ± 1.3	64.9 ± 2.4	67.8 ± 1.9
white blood cell count	/μL	5725 ± 273	6100 ± 366	5975 ± 419
red blood cell count	×10 <sup>4</sup> /μL	442 ± 12	448 ± 9	449 ± 11
hemoglobin	/μL	13.7 ± 0.31	13.9 ± 0.31	13.9 ± 0.31
hematocrit	%	40.8 ± 1.01	41.4 ± 0.93	41.5 ± 1.03
platelet count	×10 <sup>4</sup> /μL	25.3 ± 0.87	24.5 ± 0.99	25.1 ± 1.38
LDL-cholesterol	mg/dL	133 ± 5.0	134 ± 3.7	133 ± 3.5
HDL-cholesterol	mg/dL	58 ± 2.6	63 ± 3.2	65 ± 2.9
total cholesterol	mg/dL	224 ± 5.7	225 ± 5.3	225 ± 4.4
triglyceride	mg/dL	135 ± 19.3	116 ± 11.9	119 ± 14.0
total protein	mg/dL	7.3 ± 0.10	7.3 ± 0.10	7.3 ± 0.09
albumin	mg/dL	4.4 ± 0.05	4.4 ± 0.05	4.6 ± 0.05
A/G	mg/dL	1.6 ± 0.03	1.6 ± 0.05	1.7 ± 0.04
total bilirubin	mg/dL	0.77 ± 0.05	0.68 ± 0.04	0.73 ± 0.04
AST (GOT)	IU/L/37°C	22.0 ± 1.97	20.2 ± 1.14	23.1 ± 1.54
ALT (GPT)	IU/L/37°C	25.3 ± 2.84	25.8 ± 3.45	27.9 ± 2.41
ALP	IU/L/37°C	214 ± 12.3	230 ± 14.3	212 ± 13.2
LDH	IU/L/37°C	171 ± 5.4	179 ± 4.5	172 ± 6.4
γ-GTP	IU/L/37°C	38.1 ± 7.33	29.3 ± 4.87	33.6 ± 4.59
CPK	IU/L/37°C	108 ± 7.6	108 ± 8.7	115 ± 9.3
uric acid	mg/dL	5.6 ± 0.31	5.2 ± 0.26	5.2 ± 0.33
blood urea nitrogen	mg/dL	13.5 ± 0.62	14.5 ± 0.77	12.7 ± 0.50
creatinine	mg/dL	0.76 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.69 ± 0.03
glucose	mg/dL	101 ± 2.9	96 ± 1.7	98 ± 1.7
HbA <sub>1c</sub>	%	4.94 ± 0.10	5.00 ± 0.07	5.03 ± 0.08

表3-3 対照品、GSE 278 mg群、GSE 555 mg群の血清脂質の推移

items	groups		before	Week 6		Week 12	
			mean ± SE	mean ± SE		mean ± SE	
T-Cho (mg/dl)	placebo	n=18	219 ± 4.9	231 ± 6.0	#	226 ± 5.1	#
	278 mg	n=18	226 ± 7.1	228 ± 7.9		225 ± 7.7	
	555 mg	n=17	222 ± 4.9	221 ± 6.0		229 ± 7.4	
LDL-C (mg/dl)	placebo	n=18	132 ± 4.6	143 ± 5.3	#	138 ± 4.5	
	278 mg	n=18	134 ± 4.9	138 ± 5.7		134 ± 5.4	
	555 mg	n=17	132 ± 4.4	132 ± 5.0		138 ± 6.1	
HDL-C (mg/dl)	placebo	n=18	58.3 ± 3.08	61.4 ± 2.92		64.2 ± 3.27	#
	278 mg	n=18	63.1 ± 4.10	64.9 ± 4.79		68.7 ± 4.86	#
	555 mg	n=17	61.4 ± 2.98	63.6 ± 3.18		67.1 ± 3.51	#
TG (mg/dl)	placebo	n=18	117 ± 14.4	132 ± 18.1		122 ± 14.1	
	278 mg	n=18	116 ± 10.7	148 ± 22.2		111 ± 14.5	
	555 mg	n=17	137 ± 20.9	120 ± 14.7		129 ± 19.5	
RLP-C (mg/dl)	placebo	n=18	6.4 ± 1.24	7.2 ± 1.19		6.0 ± 1.00	
	278 mg	n=18	6.0 ± 0.45	6.9 ± 0.82		5.2 ± 0.63	#
	555 mg	n=17	6.7 ± 1.18	5.7 ± 0.66		6.2 ± 1.21	
apoA1 (mg/dl)	placebo	n=18	145 ± 4.3	147 ± 4.5		147 ± 3.9	
	278 mg	n=18	153 ± 5.9	154 ± 6.9		154 ± 6.0	
	555 mg	n=17	151 ± 4.2	152 ± 4.7		153 ± 5.3	
apoB (mg/dl)	placebo	n=18	113 ± 3.8	115 ± 4.4		111 ± 3.7	
	278 mg	n=18	116 ± 3.5	113 ± 3.5		111 ± 3.3	#
	555 mg	n=17	115 ± 3.1	111 ± 3.4	#	112 ± 3.9	
apoE (mg/dl)	placebo	n=18	4.4 ± 0.38	4.7 ± 0.45	#	4.6 ± 0.35	
	278 mg	n=18	4.3 ± 0.20	4.4 ± 0.22		4.3 ± 0.22	
	555 mg	n=17	4.1 ± 0.17	4.2 ± 0.21		4.3 ± 0.17	
apoB/A1	placebo	n=18	0.80 ± 0.04	0.80 ± 0.04		0.77 ± 0.03	
	278 mg	n=18	0.78 ± 0.04	0.76 ± 0.04		0.74 ± 0.04	#
	555 mg	n=17	0.77 ± 0.03	0.74 ± 0.03		0.75 ± 0.03	
MDA-LDL (U/l)	placebo	n=18	122 ± 7.0	129 ± 8.6		113 ± 7.4	
	278 mg	n=18	122 ± 6.4	130 ± 6.8		107 ± 5.3	#
	555 mg	n=17	122 ± 7.9	108 ± 6.3	#	105 ± 6.5	#
MDA-LDL / Apo B (mU/mg)	placebo	n=18	107 ± 3.7	111 ± 4.6		102 ± 5.8	
	278 mg	n=18	105 ± 4.5	115 ± 5.1	#	97 ± 4.1	
	555 mg	n=17	105 ± 5.0	97 ± 3.8		93 ± 4.3	#

# 前観察期間(表中のbefore)と同群内で比較したときの有意差を示す ( $p < 0.05$ )。

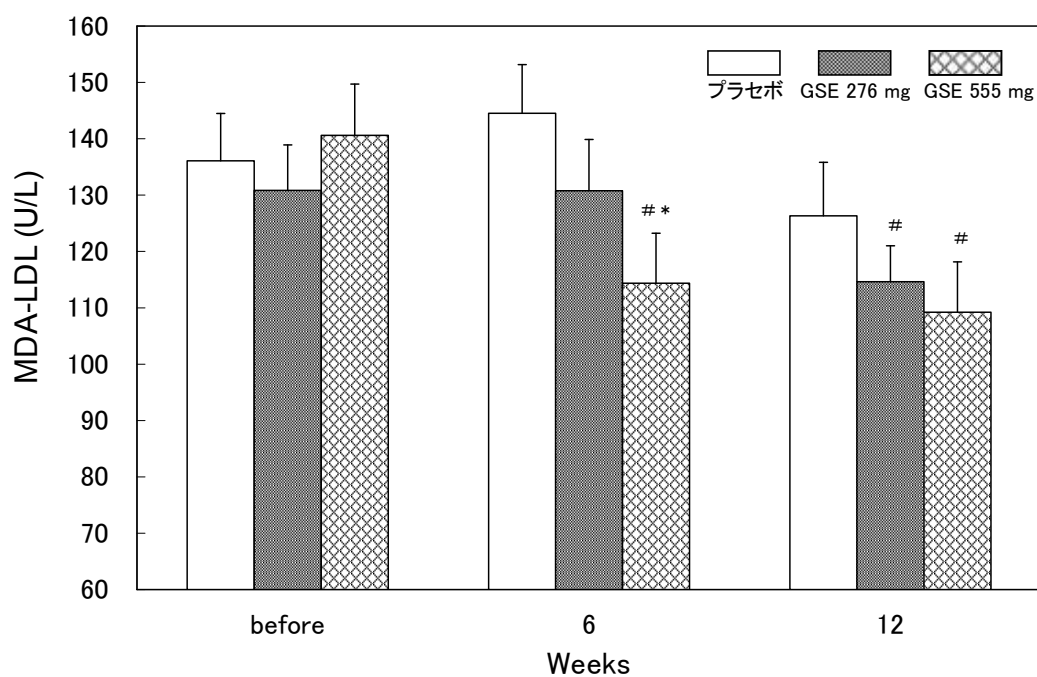


図 3-1 MDA-LDL/ApoB 値が 100 mU/mL 以上の高 MDA-LDL/ApoB 値の被験者(プラセボ群 11 名、GSE 278 mg 群 12 名、GSE 555 mg 群 10 名)の血清 MDA-LDL 値の変動

平均値±標準誤差

\*:  $p < 0.05$  プラセボ群と比較し有意

#:  $p < 0.05$  前観察期間 (before) と比較し有意

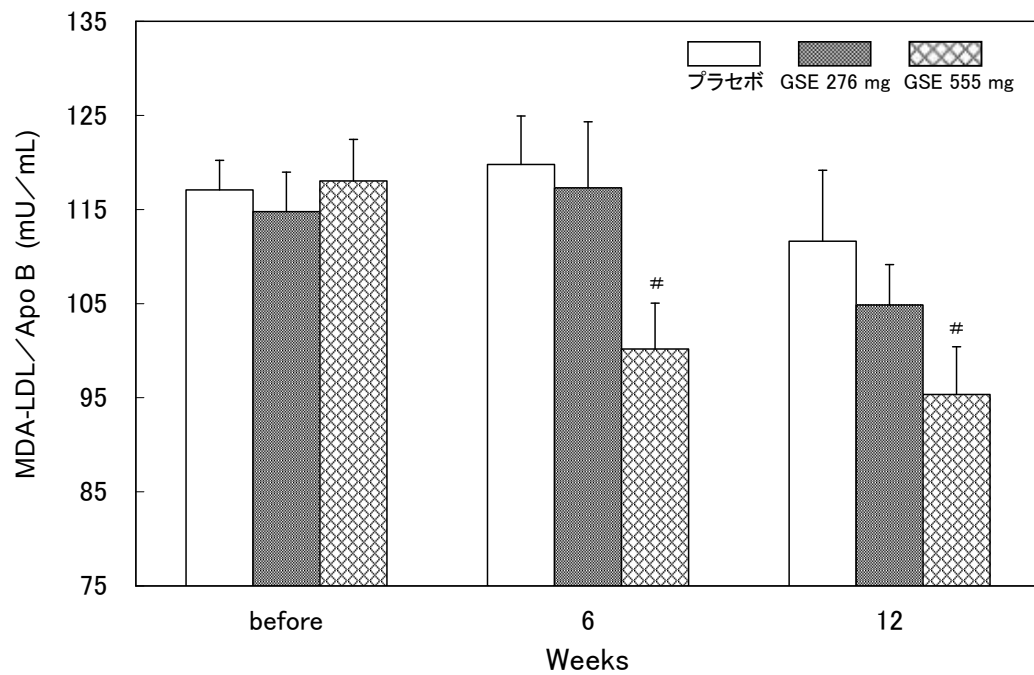


図 3-2 MDA-LDL/ApoB 値が 100 mU/ml 以上の高 MDA-LDL/ApoB 値の被験者(プラセボ群 11 名、GSE 278 mg 群 12 名、GSE 555 mg 群 10 名)の血清 MDA-LDL/ApoB 値の変動

平均値±標準誤差

\*:  $p < 0.05$  プラセボ群と比較し有意

#:  $p < 0.05$  前観察期間 (before) と比較し有意

表3-4 各試験群の被験者の身体的検査結果

item	group		before intake	6 week	12 week
			mean ± SE	mean ± SE	mean ± SE
body weight (kg)	placebo	n=18	62.1 ± 2.22	62.0 ± 2.19	62.5 ± 2.24
	276 mg	n=18	63.5 ± 2.71	64.0 ± 2.71	64.1 ± 2.70
	555 mg	n=17	62.3 ± 2.57	62.8 ± 2.56	62.4 ± 2.59
BMI	placebo	n=18	24.2 ± 0.63	24.2 ± 0.61	24.3 ± 0.64
	276 mg	n=18	24.4 ± 0.66	24.6 ± 0.66	24.6 ± 0.65
	555 mg	n=17	24.0 ± 0.65	24.2 ± 0.65	24.1 ± 0.64
systolic blood pressure (mmHg)	placebo	n=18	122.7 ± 4.39	124.2 ± 4.99	127.8 ± 4.84
	276 mg	n=18	126.4 ± 2.97	127.8 ± 3.22	129.2 ± 3.22
	555 mg	n=17	126.2 ± 3.98	126.9 ± 3.40	127.7 ± 3.00
diastolic blood pressure (mmHg)	placebo	n=18	77.1 ± 2.60	77.0 ± 2.87	81.1 ± 2.80
	276 mg	n=18	77.9 ± 1.66	80.1 ± 2.08	79.6 ± 2.00
	555 mg	n=17	78.0 ± 2.46	79.1 ± 2.39	79.5 ± 1.98
pulse (bpm)	placebo	n=18	67.9 ± 2.15	66.5 ± 2.44	68.8 ± 2.33
	276 mg	n=18	71.1 ± 2.40	70.6 ± 2.62	70.0 ± 2.40
	555 mg	n=17	72.8 ± 2.28	70.1 ± 1.83	73.0 ± 2.54

mean ± SE (平均値 ± 標準誤差)

before intake: 前観察期間時

表3-5 各試験群の被験者の血液検査結果

item	standard value	group		before intake	6 week	12 week
				mean $\pm$ SE	mean $\pm$ SE	mean $\pm$ SE
white blood cell count	M 3,900-9,800 /uL	placebo	n=18	5389 $\pm$ 217	5350 $\pm$ 225	5444 $\pm$ 211
	F 3,500-9,100 /uL	276 mg	n=18	5989 $\pm$ 385	5833 $\pm$ 409	5839 $\pm$ 320
		555 mg	n=17	5882 $\pm$ 439	5718 $\pm$ 592	5782 $\pm$ 452
red blood cell count	M 427-570 $\times 10^4$ /uL	placebo	n=18	435 $\pm$ 12	447 $\pm$ 12	438 $\pm$ 13
		276 mg	n=18	443 $\pm$ 11	453 $\pm$ 11	453 $\pm$ 10
	F 376-500 $\times 10^4$ /uL	555 mg	n=17	449 $\pm$ 13	450 $\pm$ 11	454 $\pm$ 11
hemoglobin	M 13.5-17.6 g/dL	placebo	n=18	13.6 $\pm$ 0.33	14.1 $\pm$ 0.35	13.8 $\pm$ 0.35
	F 11.3-15.2 g/dL	276 mg	n=18	13.7 $\pm$ 0.38	14.0 $\pm$ 0.36	13.9 $\pm$ 0.34
		555 mg	n=17	13.9 $\pm$ 0.36	14.0 $\pm$ 0.31	14.1 $\pm$ 0.31
hematocrit	M 39.8-51.8%	placebo	n=18	40.6 $\pm$ 1.06	41.9 $\pm$ 1.10	41.1 $\pm$ 1.20
	F 33.4-44.9%	276 mg	n=18	40.8 $\pm$ 1.13	41.8 $\pm$ 1.09	41.8 $\pm$ 1.04
		555 mg	n=17	41.5 $\pm$ 1.20	41.7 $\pm$ 1.06	42.0 $\pm$ 1.07
platelet count	M 13.1-36.2 $\times 10^4$ /uL	placebo	n=18	24.1 $\pm$ 0.98	24.9 $\pm$ 0.75	24.8 $\pm$ 0.93
		276 mg	n=18	24.5 $\pm$ 0.99	25.8 $\pm$ 1.13	26.0 $\pm$ 1.15
	F 13.0-36.9 $\times 10^4$ /uL	555 mg	n=17	25.4 $\pm$ 1.19	25.1 $\pm$ 1.30	25.8 $\pm$ 1.19
total protein	6.7-8.3 g/dL	placebo	n=18	7.2 $\pm$ 0.07	7.4 $\pm$ 0.09	7.3 $\pm$ 0.11
		276 mg	n=18	7.3 $\pm$ 0.07	7.4 $\pm$ 0.07	7.5 $\pm$ 0.07
		555 mg	n=17	7.2 $\pm$ 0.09	7.2 $\pm$ 0.08	7.4 $\pm$ 0.10
albumin	4.0-5.0 g/dL	placebo	n=18	4.3 $\pm$ 0.04	4.4 $\pm$ 0.04	4.4 $\pm$ 0.06
		276 mg	n=18	4.4 $\pm$ 0.05	4.4 $\pm$ 0.06	4.5 $\pm$ 0.04
		555 mg	n=17	4.4 $\pm$ 0.05	4.4 $\pm$ 0.05	4.5 $\pm$ 0.05
A/G	1.2-2.0	placebo	n=18	1.5 $\pm$ 0.04	1.5 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 0.04
		276 mg	n=18	1.5 $\pm$ 0.05	1.5 $\pm$ 0.05	1.5 $\pm$ 0.05
		555 mg	n=17	1.6 $\pm$ 0.05	1.6 $\pm$ 0.04	1.6 $\pm$ 0.05
total bilirubin	0.2-1.0 mg/dL	placebo	n=18	0.8 $\pm$ 0.05	0.8 $\pm$ 0.05	0.8 $\pm$ 0.06
		276 mg	n=18	0.7 $\pm$ 0.04	0.7 $\pm$ 0.05	0.7 $\pm$ 0.06
		555 mg	n=17	0.7 $\pm$ 0.06	0.7 $\pm$ 0.06	0.6 $\pm$ 0.05
AST(GOT)	10-40 IU/L/37°C	placebo	n=18	24.4 $\pm$ 2.94	23.1 $\pm$ 2.02	27.1 $\pm$ 3.21
		276 mg	n=18	22.2 $\pm$ 1.37	23.3 $\pm$ 1.02	25.2 $\pm$ 0.95
		555 mg	n=17	23.5 $\pm$ 1.41	22.7 $\pm$ 1.02	22.1 $\pm$ 1.07
ALT(GPT)	5-40 IU/L/37°C	placebo	n=18	24.9 $\pm$ 3.34	24.9 $\pm$ 3.56	31.2 $\pm$ 5.34
		276 mg	n=18	25.7 $\pm$ 3.72	27.7 $\pm$ 3.32	28.8 $\pm$ 2.86
		555 mg	n=17	26.5 $\pm$ 2.57	25.6 $\pm$ 2.34	25.0 $\pm$ 1.45
ALP	115-359 IU/L/37°C	placebo	n=18	205 $\pm$ 13	221 $\pm$ 13	224 $\pm$ 13
		276 mg	n=18	231 $\pm$ 12	243 $\pm$ 13	243 $\pm$ 15
		555 mg	n=17	207 $\pm$ 15	214 $\pm$ 16	213 $\pm$ 16
LDH	115-245 IU/L/37°C	placebo	n=18	171 $\pm$ 8	170 $\pm$ 6	170 $\pm$ 7
		276 mg	n=18	179 $\pm$ 4	182 $\pm$ 5	181 $\pm$ 5
		555 mg	n=17	164 $\pm$ 7	162 $\pm$ 7	160 $\pm$ 6
$\gamma$ -GTP	M $\leq 70$ IU/L/37°C	placebo	n=18	34.9 $\pm$ 7.22	40.1 $\pm$ 8.63	41.5 $\pm$ 8.53
	F $\leq 30$ IU/L/37°C	276 mg	n=18	27.8 $\pm$ 4.58	30.2 $\pm$ 4.54	30.6 $\pm$ 4.65
		555 mg	n=17	33.8 $\pm$ 4.71	33.6 $\pm$ 5.17	33.4 $\pm$ 5.07
CPK	M 57-197 IU/L/37°C	placebo	n=18	261 $\pm$ 152	102 $\pm$ 6	99 $\pm$ 11
	F 32-180 IU/L/37°C	276 mg	n=18	116 $\pm$ 9	123 $\pm$ 10	120 $\pm$ 13
		555 mg	n=17	124 $\pm$ 16	116 $\pm$ 11	107 $\pm$ 9
uric acid	M 3.7-7.0 mg/dL	placebo	n=18	5.5 $\pm$ 0.37	5.7 $\pm$ 0.39	5.4 $\pm$ 0.37
	F 2.5-7.0 mg/dL	276 mg	n=18	5.3 $\pm$ 0.23	5.4 $\pm$ 0.24	5.4 $\pm$ 0.24
		555 mg	n=17	5.2 $\pm$ 0.28	5.0 $\pm$ 0.30	4.9 $\pm$ 0.29
blood urea nitrogen	6-20 mg/dL	placebo	n=18	12.6 $\pm$ 0.80	12.5 $\pm$ 0.54	13.0 $\pm$ 0.73
		276 mg	n=18	14.1 $\pm$ 0.89	13.8 $\pm$ 0.73	13.1 $\pm$ 0.78
		555 mg	n=17	12.8 $\pm$ 0.69	11.9 $\pm$ 0.85	12.6 $\pm$ 0.75
creatinine	M 0.61-1.04 mg/dL	placebo	n=18	0.8 $\pm$ 0.04	0.8 $\pm$ 0.05	0.7 $\pm$ 0.04
	F 0.47-0.79 mg/dL	276 mg	n=18	0.8 $\pm$ 0.06	0.7 $\pm$ 0.04	0.7 $\pm$ 0.03
		555 mg	n=17	0.7 $\pm$ 0.04	0.7 $\pm$ 0.03	0.7 $\pm$ 0.03
glucose	70-109 mg/dL	placebo	n=18	97.8 $\pm$ 3.05	98.0 $\pm$ 2.71	100.3 $\pm$ 3.32
		276 mg	n=18	93.5 $\pm$ 1.96	96.1 $\pm$ 3.04	95.8 $\pm$ 2.38
		555 mg	n=17	94.2 $\pm$ 1.39	95.5 $\pm$ 2.61	96.9 $\pm$ 2.01
HbA <sub>1C</sub>	4.3-5.8%	placebo	n=18	4.9 $\pm$ 0.11	4.9 $\pm$ 0.11	4.9 $\pm$ 0.11
		276 mg	n=18	5.1 $\pm$ 0.08	5.0 $\pm$ 0.08	5.0 $\pm$ 0.08
		555 mg	n=17	5.1 $\pm$ 0.08	5.0 $\pm$ 0.08	5.0 $\pm$ 0.09

表 3-6 アディポネクチンと各検査値等との単回帰分析を行った相関性

item	r	p
age	0.352	0.010
body weight	-0.597	< 0.001
BMI	-0.470	< 0.001
LDL-C	0.052	0.714
MDA-LDL	-0.152	0.276
HDL-C	0.426	0.001
total cholesterol	0.154	0.270
triglyceride	-0.368	0.007
RLP-C	-0.303	0.027
ApoA1	0.371	0.006
ApoB	-0.241	0.083
ApoE	-0.106	0.449
ApoB/A1	-0.395	0.003
n=53		

全被験者(計 53 人)を単回帰分析に供した。

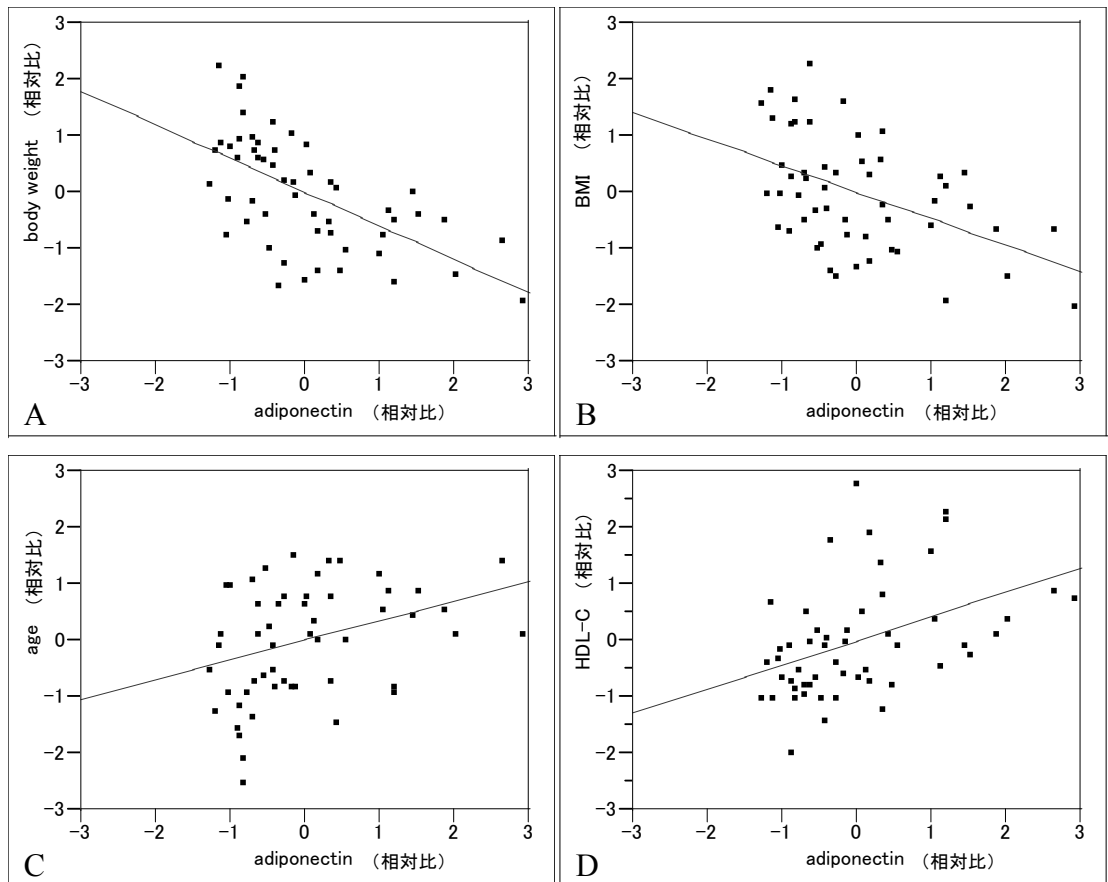


図3-3 アディポネクチンと体重(A)、BMI(B)、年齢(C)、HDL-C(D)の相関散布図(被験者53人分のデータ)

A: アディポネクチンと体重との相関,  $r^2$  0.356  $p < 0.0001$

B: アディポネクチンとBMIとの相関,  $r^2$  0.221  $p < 0.001$

C: アディポネクチンと年齢との相関,  $r^2$  0.124  $p < 0.01$

D: アディポネクチンとHDL-Cとの相関,  $r^2$  0.182  $p < 0.01$



表3-7 試験期間中の体重の変動が少なかった(±1 kg未満)被験者におけるアディポネクチンの変動

item	groups		before intake	Week 6		Week 12	
			mean ± SE	mean ± SE		mean ± SE	
adiponectin (µg/mL)	placebo	n=10	9.98 ± 1.30	10.91 ± 1.39	#	10.77 ± 1.39	
	276 mg	n=11	8.83 ± 0.87	9.13 ± 0.80		8.89 ± 0.86	
	555 mg	n=14	8.70 ± 1.06	8.93 ± 1.01		9.44 ± 1.06	\$

# compared to before intake ( $p < 0.05$ )

\$ compared to before intake ( $p = 0.088$ )

## 第4節 考察

本研究では、LDL-C 値が 100 mg/dL 以上 180 mg/dL 未満の 53 名を対象とし、GSE を用いて、摂取期間 12 週間の単盲検法による群間並行試験を実施した。GSE 摂取による酸化 LDL などの脂質レベルへの影響、またアディポネクチンに及ぼす影響、さらには安全性について検証した。

酸化 LDL が動脈硬化発症の一因であることは広く認められてきている。本研究において GSE 摂取により MDA-LDL および LDL-C の主要なアポタンパク質である ApoB の MDA modification の程度を示す指標である MDA-LDL/ApoB 値が低下することを明らかにした。特に High MDA-LDL/ApoB 者において顕著な MDA-LDL、MDA-LDL/ApoB 値の低下が見られた。我々は Low HDL 者の MDA-LDL/ApoB の値が  $99 \pm 49$  mU/mL を示したという報告 (Kondo et al., 2003) から MDA-LDL/ApoB 値が 100 mU/mL 以上の者を High MDA-LDL/ApoB として定義して動脈硬化症のリスクの高い者とした。その結果、GSE は High MDA-LDL/ApoB 者において 6 週では 555 mg 群で前値および対照群にくらべ有意に MDA-LDL を低下させ、12 週では GSE 278 mg 群および GSE 555 mg 群で前値にくらべ有意に MDA-LDL を低下させた。High MDA-LDL/ApoB 者の MDA-LDL/ApoB は 555 mg 群において 6 週、12 週で前値にくらべ有意な低下が見られた。また、GSE 278 mg 群でも前値にくらべ低下傾向が見られたが有意な低下ではなかった。これらの GSE による酸化 LDL の低減効果は用量依存的な傾向を示した。

赤ワイン摂取により癌での死亡率低下や認知症の発現率低下が報告 (Orgogozo et al., 1997) されており、ブドウ種子ポリフェノールが様々な生活習慣病に対して予防効果を持つことが期待されている。GSE 錠剤の主成分である PA は、種々の植物に含まれており、食品ではブドウなどの果実類、大麦などの麦類、小豆などの豆類及びそれらの加工食品に微量に含まれている。これらの食品を通じ、多くの人は PA を日常的に摂取している。PA は水系において著しい抗酸化力を示すことが明らかになっている (Ariga et al., 1990)。PA は、血管壁に特異的に蓄積され、血管壁の間質液中 (水系) で活性酵素を補足し、これにより酸化 LDL の生成を抑制し、泡沫細胞を減少させ動脈硬化発症を抑制すると考えられている (Laparra et al., 1977)。実際、ブドウ種子に含まれる PA は、コレステロール負荷食ウサギの動脈硬化抑制効果を有することが知られている (Yamakoshi et al., 1999)。また、GSE とともに食事をとることにより血漿中の抗酸化物レベルを増加させ酸化物を減少させることにより食後の酸化ストレスを低減させ、LDL の酸化修飾抵抗性を高めることが知られている (Natella et al., 2001; Natella et al., 2002; Preuss et al., 2000)。他の酸化 LDL 低減の指標として Preuss et al. (2000) は酸化 LDL 自己抗体を用いて評価している。その結果、8 週間 GSE を高脂血症患者に摂取させると酸化 LDL 自

己抗体が低下傾向を示すことを報告した。しかしながら、12 週間以上 GSE を摂取して酸化 LDL に及ぼす影響は報告されていない。GSE による血清脂質に及ぼす影響についても 12 週間以上 GSE を摂取させた報告はないが、8 週間 GSE を高脂血症患者に摂取により総コレステロール、LDL-C、中性脂肪には影響がないことが示されている (Preuss et al., 2000)。本試験においてもこれらの脂質は影響がなかった。本試験は GSE による酸化 LDL 低減効果を LDL の脂質過酸化物のうち最も代表的な MDA と ApoB のリジン残基がシッフ塩基の形で結合した MDA-LDL および MDA-LDL/ApoB を指標とした。その結果、2 週間の GSE 摂取には酸化 LDL を低減する効果があることを実証し、動脈硬化等の生活習慣病を予防する上で有用である可能性を明らかにした。

また、近年アディポネクチンと生活習慣病の関連性が指摘されており、本研究において GSE 555 mg 摂取により 12 週で前値に比べアディポネクチン濃度を上昇させる傾向にあった。しかし、対照群においても 6 週で前値に比べ有意な上昇がみられた。この原因は、アディポネクチンは HDL-C と正の相関が認められ、有意な差ではないが 6 週で対照群、GSE 278 mg 群、GSE 555 mg 群ともに HDL-C は上昇傾向を示し、そのうち対照群での HDL-C の上昇が最大であった(表 3-3)。この対照群における 6 週でのアディポネクチンの上昇は HDL-C の上昇に関連したものと推察されたので、対照群で 6 週での HDL-C が 5%以上の変動を示した者を除いた 6 名にて検討したところ、有意な上昇は見られなかった。

ヒトの血中アディポネクチンレベルについては、成人領域においては肥満者、2 型糖尿病患者および冠動脈疾患患者でその値が低下していることがすでに報告されており、抗動脈硬化作用の重要性が認められている (Funahashi et al., 2002)。また、Cnop et al. (2003) は、アディポネクチンが年齢、HDL-C と正の相関を示し、BMI、ウエスト/ヒップ、中性脂肪と負の相関を示すことを報告している。本試験において GSE 摂取前 (0 週時) の測定値を用いて相関性を調べた。相関性を調べる際に Cnop et al. (2003) の報告では測定値をそのまま用いているが、我々は単位の影響を取り除き正確な相関性を調べるために、測定値を標準化して回帰分析を行った。これは x 軸と y 軸の単位が異なるとアディポネクチンがどの項目と最も高い相関係数を示すのか比較できなくなるため、すべての測定値を標準化した。本試験において解析対象者全体では GSE のアディポネクチンに及ぼす効果ははっきりしなかったが、アディポネクチンは体重と最も高い相関性を示し、体重変動の影響を受けやすいものと考えられるため、試験期間中に体重の変動が小さかった被験者を対象として解析してみたところ GSE によるアディポネクチンの上昇傾向が見られた。アディポネクチンはマクロファージに対してスカベンジャー受容体や TNF $\alpha$  の発現を抑え、泡沫化や TNF $\alpha$  分泌を抑制することなどが報告 (Ouchi et al., 2001; Yokota et al., 2000) され、抗動脈硬化作用をもつ可能性が示されているが、GSE 摂取によるアディポネクチン上昇に関する報告は本研究が初めてであり、作用機構の解明は今後の課題で

ある。さらに本研究の結果および Cnop et al. (2003)の報告においても年齢とアディポネクチンに正の相関性が見られたが、加齢とアディポネクチンの上昇についても今後の研究課題である。また、ウーロン茶が冠動脈疾患患者の血漿アディポネクチンを増加させることが報告 (Shimada et al., 2004)されており、GSE にも同様の効果が期待されるため、年齢も加味した今後の研究の展開が期待される。さらに GSE の血流改善作用 (Yoshimura et al., 2002)が確認されていることから、生活習慣病を予防する上で有用な食品である可能性が示唆された。

試験期間中に GSE 含有錠剤に起因すると思われる有害事象は見られなかった。臨床検査においても、いずれの変動も基準値の範囲内での微小変化であり、GSE 含有錠剤の安全性が示された。

以上により、GSE 含有錠剤は安全性が高く、酸化 LDL の高いヒトにおいて特に酸化 LDL を低下させる効果およびアディポネクチンを上昇させる傾向があり、動脈硬化等の生活習慣病を予防する上で有用な食品であることが示された。

## まとめ

LDL-コレステロール(LDL-C) 100-180 mg/dL の 53 名を対象に GSE 含有錠剤の 12 週間連続摂取時における酸化物質の一つである malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL) とアディポネクチンに及ぼす影響を対照錠剤との単盲検法を用いて検討した。GSE 278 mg (PA としては 200 mg) 群において MDA-LDL は、前値にくらべ 12 週で有意に減少した。GSE 555 mg 群(PA としては 400 mg) では、前値とくらべ 6 週、12 週で有意に減少した。また、High MDA-LDL/ApoB 者(MDA-LDL/ApoB $\geq$ 100 mU/mL) の MDA-LDL において GSE 278 mg 群では前値にくらべ 12 週で有意に減少した。GSE 555 mg 群では前値にくらべ 6 週、12 週で有意に減少し、6 週では対照錠剤(PA として 0 mg) 群にくらべ有意に低い値を示した。アディポネクチンは、体重( $r = -0.597$ )、Body Mass Index (BMI) ( $r = -0.470$ )、中性脂肪 ( $r = -0.368$ )、remnant like particles-Cholesterol (RLP-C) ( $r = -0.303$ )、apolipoprotein B/A1 (ApoB/A1) ( $r = -0.395$ ) と有意な負の相関を示し、年齢( $r = 0.352$ )、HDL-コレステロール (HDL-C) ( $r = 0.426$ )、apolipoprotein A1 (ApoA1) ( $r = 0.371$ ) と有意な正の相関を示した。そのうちアディポネクチンは体重と最も高い相関性を示した。さらに、試験期間中の体重変化の少なかった被験者( $\pm 1.0$  kg 未満)において GSE 555 mg 群では、12 週でアディポネクチンの上昇傾向( $p = 0.088$ )が見られた。

試験期間中に GSE 含有錠剤に起因すると思われる有害事象は見られなかった。臨床検査においても、いずれの変動も基準値の範囲内であり、GSE 含有錠剤の安全性(GSE 555 mg/日、2 週間)が示された。

以上の結果より、GSE 含有錠剤は、酸化 LDL を低減する効果を有し、動脈硬化等の生活習慣病を予防する上で有用な食品であることが示唆された。

## 第4章 ブドウ種子抽出物（GSE）経口摂取による着座時における 下肢の抗むくみ効果

### 第1節 背景と目的

ブドウ種子抽出物は、欧州で古くから静脈瘤の治療やフレンチ・パラドックスで知られる低率な血管性疾患発症の中心物質として知られていることから、血管強化や血流維持に有効と考えられる（Renaud et al., 1992）。欧州では、GSE 中の PA に静脈瘤改善効果があることが示されてきた（Thebaut et al., 1985）。

血管脆弱、血行不良が一因と考えられる「むくみ」という悩みは、からだの動作を制限された現代のオフィスワーカーにとって特有な不快症状である。長時間の立ち仕事や座ったままの仕事に従事者において、血流およびリンパ液の不十分な循環から、下肢のむくみ、静脈瘤、皮膚潰瘍などが訴えられている（Winkel & Jørgensen, 1986a; Rys & Konz, 1994）。とくに先進国の働く女性は、長時間座ったままや立ったままだけでなく、美容のためのタイトな服装やブーツなどの着衣上の問題から、下肢むくみを起こしやすい身体環境である。このように身体的に制限された状態下では、健康であるにも関わらず、重力の影響や筋肉使用の低下から、全身とくに下肢の水分バランスが崩れ、一過性のむくみが生じやすい。対処法として弾性ストッキングの使用が一例として挙げられるが、発汗の多い夏季には不適であるだけでなく、外見上の制約を受けることから必ずしも十分ではない。今のところ、こうした一過性のむくみに対する適切な処置は不十分であり、私たちの生活の質（QOL）向上のためにも解決すべき社会問題である。

むくみの形成メカニズムは、静脈血圧の異常上昇（Starling 1896）、静脈弁の不全やエラスチン成分の破壊（Bocking & Roach, 1974）、血管内皮機能の低下など多くの因子の影響が報告されている。一方で、毛細血管機能不全の進行は、酸化ストレス、老化、活性酸素、フリーラジカルなどによる攻撃の関与が示されている（Higashi et al., 2002; Lubran, 1995）。フリーラジカルは血管内皮透過性に異常を起こしたり、浮腫を引き起こしたりすると考えられている（McQuaid & Keenan, 1997）。活性酸素は、外因的、内因的要素によって体内に発生するが、過度の活性酸素は生体防御システムでは防ぎきれない。

フラボノイドは強力な抗酸化剤として、例えば活性酸素種（Robac & Gryglewski, 1988）や一重項酸素（Husain et al., 1987）、脂質過酸化（Sorata et al., 1982）に対しての効果を有することから注目されてきた。中でも PA、特に高分子（高重合度）PA は強力な抗酸化能を有していることが報告されている（Lotito et al., 2000; Castillo et al., 2001; 片岡・有賀,

1998)。PA は GSE に高含有し、多くの *in vivo* 試験でその有効性が証明されている (Santos-Buelga & Scalbert, 2000)。PA は静脈瘤治療薬として欧州で用いられてきている (Thebaut et al., 1985)。100 mg/day のブドウ由来 PA の連続的な摂取によって、臨床的および毛細血管精査評価によって慢性静脈疾患を治療十日後に軽減した報告がある (Constantini et al., 1999)。また、数ヶ月に亘って毎日 GSE を含む 320 mg の PA を摂取させた女性では月経性浮腫対する軽減効果がアンケートを通じて確認されているが、客観的な下肢周囲長の改善は認められていない (Christie et al., 2004)。これまでのところ、GSE 投与による下肢容積増大 (むくみ) の直接的かつ客観的な検証は不十分であり、下肢容積増大を抑制するような働く現代の健常人に適した即効性を有する代替医療になり得る食品の提案が求められている。さらに、現代人に特徴的な短期間 (一過性) のむくみについては、とくに健常人を対象とした GSE の有効性は未だ検証されていない。

本研究では、健常人に対する GSE の抗むくみ効果を検証することである。我々は健常人の男女を対象とし、着座状態モデル (Seo et al., 1996) で生じる下肢むくみに対する GSE の効果を、男性被験者 6 名の予備的な単回摂取試験、次いで女性を被験者を対象に単回摂取試験と 14 日間連続摂取試験でそれぞれ検証した。

## 第2節 実験方法

### 4-2-1 健康男性6名による4時間の連続着座姿勢時における、GSE摂取の下肢むくみに対する影響

#### 4-2-1-1 倫理委員会の承認と被験者、試験方法

Winkel et al. (1986b) の方法に準じ、強制着座・下肢運動制限方式で実施した。試験を実施するキッコーマン総合病院内のヒト試験倫理委員会の承認を受けた。被験者は健康男性6名(26~41歳)、個別に試験内容を十分説明後、ヘルシンキ宣言に則り本人の意思で参加させた。予め血液凝固能検査を実施し、試験担当医師の診断を受けた。前日夕食時より試験終了時まで食事制限を行ない、同一のものを飲食させた。

#### 4-2-1-2 試験スケジュール

試験期間は2日間とし、1日目はプラセボ錠剤を摂取、2日目はGSE錠剤を摂取させた。試験当日は、8~13時はデスクワークを主とする軽活動に制限し、自由昼食後、室温20℃に空調された室内で13時より着座を開始し、4時間連続で着座状態を維持させた(後述)。途中15時に5分間のトイレ休憩を取った。GSE錠剤は、4粒×3回(8、13、15時)摂取させた(PAとして600mg、GSEとして678mg)。プラセボ錠剤はGSEのみ不含であるが見た目や栄養成分は同等のものを調製し同じ錠剤数を摂取させた。服装は、被験者全員が男性であるため、短パン(ゆったりタイプ各自)、上着は作業着等、くるぶし丈の靴下、同一のサンダルを着用させた。・13~17時まで、床温度20℃の部屋に設置された椅子(後方に5度傾いた固定型の椅子で、シートを膝の高さより1cm低くなるようベニヤ板等で高さ調節し設定)に座らせ、膝と足首は90度に固定してもらい(動かさない)、脚の組み替え、貧乏ゆすり、足踏み、下肢の屈伸等をしないよう制限した。なお、15時のトイレ休憩時間の移動距離は100m以内とした。

#### 4-2-1-3 各測定方法と測定項目

以下の各項目につき、着座前、着座2時間後、着座4時間後に各計測を行なった。

- 1) 自覚症状の記録として、下肢のだるさ、下肢の痛み、下肢のしびれ、全身疲労度を5段階(1;全く感じない、2;かすかに感じる、3;やや感じる、4;感じる、5;強く感じる)にて回答させた。
- 2) 着座前と着座4時間後のみ、指から採血し、ヘマトクリットの測定
- 3) 膝下脚の容積測定は、Nilsson & Haugen (1981)の方法に従って水溢方式により、ひざ



下の脚の容積を測定した。

- 4) ふくらはぎ（最も太い部分）と足首（くるぶしのすぐ上の部分）の周囲長、メジャーを使って測定した。
- 5) 脚の水分量測定は、Uda et al. (1997) の方法に従い、日本光電社製インピーダンス測定装置 4000C を使用した。微弱な電流を両手と両足から流し、電気抵抗性を測定することによって、全身水分量と細胞内水分量と細胞外水分量を測定した。結果は、500 kHz と 5 kHz の比により、全身水分量に対する細胞外水分量の概算量を求めた。
- 6) 心拍数と血圧の測定は、手首血圧計により測定した。
- 7) 下肢（腿、膝、ふくらはぎ、足甲）の表面温度は、非接触式体温計にて測定した。

#### 4－2－2 健常女性 33 名による 4 時間の連続着座姿勢時における、下肢むくみに対する GSE 摂取の影響（単回摂取試験、14 日間連続摂取試験）

##### 4－2－2－1 ヒト倫理委員会の承認、被験者の選抜、試験中止基準、解析除外基準

本試験は、総研ヒト倫理委員会規定に基づく倫理委員会の承認を経て実施された。株式会社総合健康開発研究所登録被験者の中から、下記の選択基準を満たし、除外基準に抵触しない健常被験者を単回摂取試験では 16 名、14 日間摂取試験では 17 名を無作為に選定した。選定された女性被験者には実際にむくみを生じ易い者とそうでない者が混在していると考えられた。従って特にむくみを生じ易い被験者の下記の事前スクリーニングにより、単回摂取試験は 8 名を、14 日間摂取試験では 8 名を選抜して、本試験を実施した。

##### 選択基準

- 1) 年齢は 20 歳以上 50 歳以下の女性
- 2) 身長が 150 から 160 cm 程度の者
- 3) 自己診断書類等に記入が可能な者
- 4) 来院予定日に指定の施設に来られる者

##### 除外基準

- 1) 検査結果に影響する可能性のあると思われる薬を服用している者
- 2) 検査結果に影響する可能性のあると思われる健康食品を常食している者
- 3) 妊娠または妊娠している可能性のある婦人および授乳婦の者
- 4) アルコールを過度に摂取している者
- 5) アレルギー症状を示す恐れのある者
- 6) 血液凝固系検査に異常のある者
- 7) 重篤な肝障害、腎障害、心筋梗塞の既往歴のある者
- 8) その他、試験担当医師が本試験を実施するのに不相当と判断した者

##### 事前スクリーニング

Seo et al. (1996) の方法を参考に、背もたれ、肘掛けのない椅子に座わり、膝を 90° に折り、足の裏が完全に床につける程度に椅子を調整し、2 時間の着座姿勢を維持させた。2 時間後、後述する脚のむくみ測定 (3D デジタイザ、Danae100 :

NEC エンジニアリング社製を使用) および自覚症状から、下肢にむくみが観察された被験者を選択した。

#### 試験中止基準および試験データ除外基準

ヘルシンキ宣言の主旨に従い被験者の希望および以下に示す事項があった場合は、試験総括医師の医学的または倫理的判断により試験を打ち切ることができる基準を設定した。

- 1) 重篤な副作用・随伴症状が発現した場合
- 2) 他の疾患の併発、または合併疾患の悪化により試験を継続する事が困難な場合
- 3) 採血および検査行為が著しく困難となった場合
- 4) その他、試験総括医師が試験中止の必要を認めた場合

#### 試験解析対象からの除外基準

次に示す事項があった場合は、試験総括医師、試験受託社および依頼社協議の上、試験解析対象から除外した。

- 1) 本試験に全く無関係な理由で、観察日に1週間以上遅延した場合
- 2) 本試験に全く無関係な理由で、予定された観察日に来られない場合（長期出張、・転勤、転居、無断欠日、不慮の事故、被験食品と明らかに因果関係のない病気・入院など）
- 3) 被験食品摂取期間中、被験食品の未完食が全摂取日数の10%に達した場合
- 4) 試験期間中、禁止された非日常的な著しい暴飲暴食などの事実が判明した場合
- 5) 被験食に起因する有害事象以外の理由で、採血および検査行為が著しく困難となった場合
- 6) 検査上のトラブルなどでデータの信頼性に大きな問題が生じた場合
- 7) その他、脱落扱いすることが適当と考えられる明らかな理由がある場合

#### 4-2-2-2 被験食品

被験食品は GSE 入り錠剤と、外見上からは識別できないプラセボ品とした。試験食品の成分組成を表 4-1 に示す。摂取量は、先の男性 6 名での試験を参照し、GSE 450 mg (PA として 400 mg) の単回摂取試験および GSE 150 mg (PA として 133 mg) の 14 日間連続摂取試験を設定した。これらの摂取量は、市販されている GSE サプリメ

ントでの世界的な推奨摂取量 100～400 mg のほぼ範囲内でもあり、過剰量にも当たらないと判断した。単回摂取試験では摂取錠剤として 6 粒、14 日間摂取試験では摂取錠剤として 2 粒をそれぞれ設定した。

#### 4-2-2-3 試験方法

本試験に関与しない総合健康開発研究所のコントローラーが、摂取前のスクリーニング結果より、単回摂取、14 日間摂取それぞれ 8 名を選抜し、被験者背景ができるだけ同一になるように試験群 4 名、プラセボ群 4 名に均等に割り付け、試験をそれぞれ開始し、終了後 1 週間の休止期間（ウォッシュアウト期間）を設けた後、摂取する錠剤を入れ替えて再び試験をそれぞれ開始する、プラセボ対照二重盲検試験（クロスオーバー法）とした。その摂取方法は、単回摂取試験では、各観察日のみ、水 500 mL と一緒に被験食品 6 粒を経口摂取させた。14 日間連続摂取試験では、各観察日前の 13 日間は、2 粒を適宜水又はぬるま湯と一緒に摂取させ、14 日目の観察日は、水 500 mL と一緒に被験食品 2 粒を経口摂取させた。各観察日は、試験総括医師の指導下で、室温約 26℃、湿度 40～60%に設定された環境で、表 4-2 に示すタイムスケジュールにて実施した。9:30～11:30 A.M.までに摂取前の諸検査を行い、10:00～11:30 A.M.に被験食品を摂取させた。被験者への注意事項として、各試験（観察日）前日の 21:00 以降から試験（観察日）終了までは、支給したミネラルウォーター以外（アルコール類、お茶、紅茶、コーヒーなど）の摂取は厳禁とした。また、21:00 以降の水分摂取量は 500 mL までとし、観察日当日は起床時より朝食摂取までの水分摂取は禁止とした。また、試験期間中は、睡眠不足や暴飲及び非日常的な激しい運動を避け、通常通りの生活を心がけるよう指導した。

むくみの発生方法は、Seo et al. (1996) の方法を参考に、各観察日は、6 時間、背もたれや肘掛けのない椅子に座わり、膝を 90° に折り、足の裏が完全に床に付く程度に椅子の高さを調整し、75 cm の高さのテーブル上で読書等作業を行なった。なお、試験中は必要時以外動かないよう、特に下半身に動き（膝や足首の曲げ伸ばし、貧乏ゆすり、足指の屈伸等）を行わないよう指導した（表 4-2）。

測定項目および測定方法は、表 4-3 に示す項目と検査方法に基づいて実施した。尿検査、血液検査および血圧測定は、医療機関で行われている方法と同様に行った。体成分分析は、電気伝導度による抵抗性から、水分量、細胞内液、細胞外液を全身と四肢にて算出した。算出は、用いた機器 InBody3.2（株）バイオスペース製）に内蔵されたプログラムを利用した。また、ふくらはぎの周囲長は、足裏から高さ 23 cm の下腿周囲長と高さ 30 cm の下腿周囲長を、足の甲は最も高い足首の付け根部分の

周囲長を、それぞれ巻尺で測定した。下肢の体積測定は、非接触式で下肢に発生したむくみを物理的に干渉しない Danae 3D デジタイザ（NEC エンジニアリング）で、下腿を 120° ずつ 3 方向から撮影して実施した。得られた画像より専用ソフトを用い、ひざから足首までの容積を算出した。自覚症状の項目は、Seo et al. (1996) の方法に準じた。

#### 4-2-2-4 統計解析方法

統計解析ソフト Dr. S P S S II（株 S P S S 製）を用いて行った。正規性のあるデータについては Dunnett-t 検定を用いて行った。また、正規性のないものについては Wilcoxon の符号付順位検定を行い、Tukey の多重比較は Bonferoni の修正式にて行った。有意水準は両側検定で危険率 5 % 以下とした。

表 4-1 被験食品の成分および含量

原材料	GSE 錠剤（被験品）	プラセボ錠剤
ブドウ種子抽出物	41%	0%
セルロース	36%	72%
還元麦芽糖水飴	20%	22%
シヨ糖脂肪酸エステル	3%	3%
カラメル	0%	3%
セラック	微量	微量

表 4-2 観察日の試験手順（単回摂取・14 日間摂取 共通）

摂取前	摂取	摂取 1 時間後	摂取 2 時間後	昼食	摂取 4 時間後	摂取 6 時間後
集合および 諸検査、測定 および調査	朝食（サンドイッチとミネラルウォーター 500 mL）+GSE またはプラセボ品摂取	諸検査、測定 および調査	諸検査、測定 および調査	昼食（しゃけのおにぎり 1 個とミネラルウォーター 500 mL）	諸検査、測定 および調査	諸検査、測定 および調査

表 4-3 各検査項目と検査方法と実施時期

時間（時間） 諸検査、測定項目、調査	初回／2回目試験日（観察日）			
	摂取前	摂取 2 時間後	摂取 4 時間後	摂取 6 時間後
①尿検査 (Na・Cl、K、pH)	○	○	○	○
②血液検査 (WBC、RBC、Hb、Ht、MCV、 MCH、MCHC、血小板数、Na、Cl、K)	○	○	○	○
③血圧測定 (収縮期、拡張期血圧を 3 回 測定し、各々中央値を採用)	○	○	○	○
④体成分分析 (細胞外内液量、細胞内液 量、体水分量) 体成分分析装置 (インピ ーダンス法) : (株) バイオスペース製 InBody3.2	○	○	○	○
⑤脚の周囲長測定 (足裏から 23 cm 高、 30 cm 高の周囲長)				
⑥脚のむくみ測定 (3D デジタイザー Danae100 : N E C エンジニアリング 製) 両足膝 下ふくらはぎ全体の体積を測定	○	○	○	○
⑦自覚症状調査 (摂取前との比較) ・顔のむくみ、手のむくみ、脚のむくみ の自覚症状 (1 : むくみが強くある、2 : や やむくみがある、3 : ほとんどむくみはない 4 : 全くむくみがない) ・足のしびれ・脚の疲れ・脚のだるさ	○	○	○	○

### 第3節 結果

#### 4-3-1 健康男性6名による4時間の連続着座姿勢時における、GSE摂取の下肢むくみに対する影響

##### 4-3-1-1 問診による主観的な5段階評価

強制着座によって、4つすべての項目で、スコア平均が上昇した（図4-1）。GSE摂取は、プラセボ摂取時と比して、すべての問診項目スコア平均を下回った。「下肢のしびれ」および「全身疲労度」には、GSE摂取によって有意にスコア上昇を抑制した。「下肢のしびれ」においては、着座開始2および4時間後共に有意にスコア上昇を抑制した（それぞれ、 $p=0.035$ 、 $p=0.0079$ ）。また、「全身疲労度」は着座4時間後測定時に群間で有意差を生じた（ $p=0.0077$ ）。

##### 4-3-1-2 ヘマトクリット値の変化とGSE摂取の影響

強制着座時において、GSE摂取はヘマトクリット値上昇が有意に抑制した（図4-2、 $p=0.034$ ）。その効果は、着座開始4時間後に顕著であった。着座位を強制しない午前中の時間帯（着座前1：8時、着座前2：13時）は、GSE摂取の有無にかかわらずヘマトクリット値に変化は認められなかった。

##### 4-3-1-3 下肢容積の変化のGSE摂取の影響

4時間の連続着座は、時間経過と共に下肢容積が増大した（表4-4。GSE摂取時は下肢容積の増加が、僅かに低減化される傾向が観察されたが、有意差はなかった。両群間の比較では、着座2時間後よりも4時間後に差が大きくなる傾向が見られた（有意差なし）。

##### 4-3-1-4 ふくらはぎ、足首の周囲長の変化とGSE摂取の影響

連続着座によって ふくらはぎ周囲長は増加、下肢のむくみ形成が観察された（表4-5、表4-6）。このとき、GSE摂取群では周囲長の増加が抑制された。その群間の変化量は有意であり、左ふくらはぎで、2時間後に $p=0.18$ 、4時間後に $p=0.11$ 、右ふくらはぎで、2時間後に $p=0.064$ 、4時間後に $p=0.27$ であった。変化率でも同様に群間で有意な変化が観察された。プラセボ摂取時とGSE摂取時との間の有意差は、左ふくらはぎで、2時間後に $p=0.16$ 、4時間後に $p=0.10$ 、右ふくらはぎで、2時間後に $p=0.052$ 、4時間後に $p=0.22$ であった。足首周囲長では、



変化量および変化率共に有意な変化は認められなかった（データ未発表）。

#### 4－3－1－5 インピーダンス値比（500 kHz／5 kHz）への影響

4時間の連続着座によって、インピーダンス値比（500 kHz／5 kHz）が1～2%増加した（表 4-7、表 4-8）。この結果は、連続着座によって、相対的に細胞外水分量が増加したことを示すものである。なお、GSE 摂取によって、有意差はないものの、インピーダンス値比の増加率がやや低い数値が得られた。

#### 4－3－1－6 血圧、心拍数、下肢表面温度（腿、膝、ふくらはぎ、足甲）の変化と GSE 摂取の影響

血圧、心拍数、下肢表面温度は、GSE 摂取の有無にかかわらず試験期間中に大きな変化は見られなかった（データ未発表）。

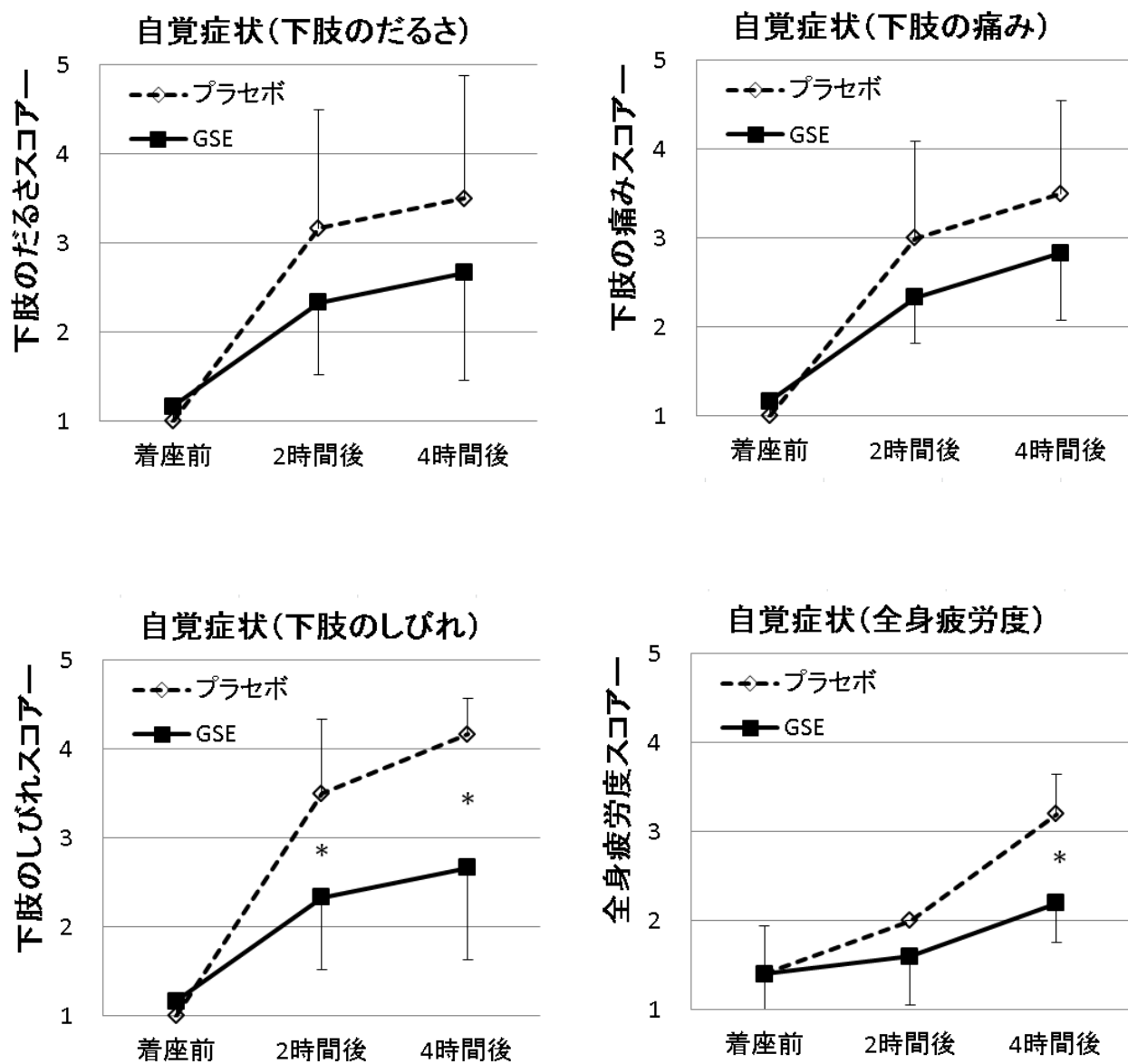


図 4-1 4時間の着座状態下における、各自覚症状の推移（ブドウ種子抽出物（GSE）単回摂取とプラセボ単回摂取、男性6名）  
各自覚症状スコアは、値が高い程、程度が強いことを示す。

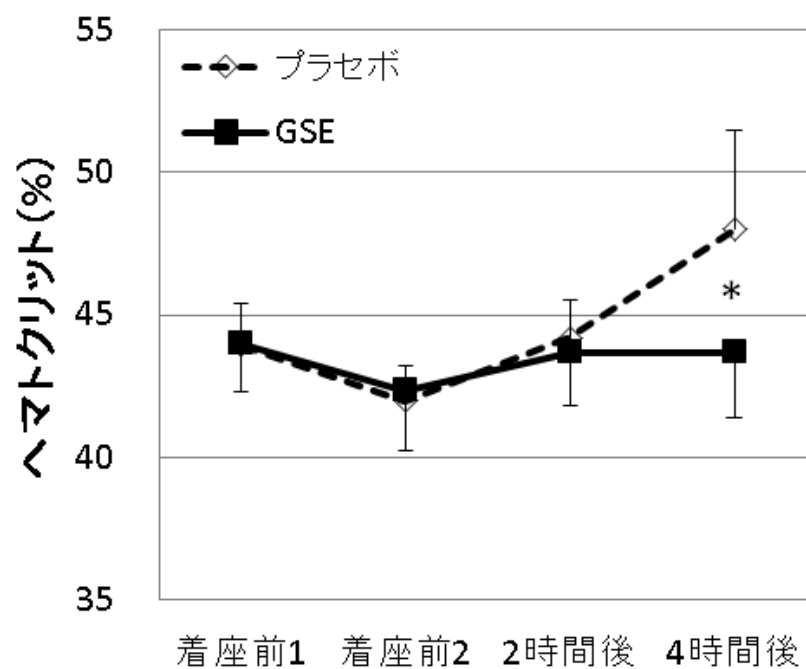


図 4-2 4時間の着座状態下における、ヘマトクリット値の変化(ブドウ種子抽出物(GSE)摂取とコントロール品摂取、男性6名)

ヘマトクリット：血液中の血球成分比（赤血球や白血球など）

表 4-4 4 時間の連続着座状態下の下肢容積 (cm<sup>3</sup>) の変化 (水溢れ方式による測定、試験方法を参照)

測定時	被験者 1	被験者 2	被験者 3	被験者 4	被験者 5	被験者 6	平均	SD	増減率
着座前	1,360	1,430	1,420	1,330	1,560	1,320	1,403	89	0.000%
着座 2 hr	1,390	1,420	1,400	1,340	1,620	1,320	1,415	107	0.831%
着座 4 hr	1,400	1,400	1,380	1,380	1,620	1,320	1,417	104	0.950%

表 4-5 4 時間の連続着座状態下の右足のふくらはぎ周囲長 (cm) の変化 (巻尺による計測)

測定時	被験者 1	被験者 2	被験者 3	被験者 4	被験者 5	被験者 6	平均	SD	増減率
開始時	39.2	37.4	37.3	34.5	41.5	33.8	37.3	2.9	0.00%
着座 2 hr	39.5	37.5	37.3	34.3	42.5	34.5	37.6	3.1	0.85%
着座 4 hr	39.6	37.6	37.4	34.6	42.8	34.5	37.8	3.1	1.25%

表 4-6 4 時間の連続着座状態下の左足のふくらはぎ周囲長 (cm) の変化 (巻尺による計測)

測定時	被験者 1	被験者 2	被験者 3	被験者 4	被験者 5	被験者 6	平均	SD	増減率
開始時	40.0	37.6	37.5	34.5	40.5	34.2	37.4	2.6	0.00%
着座 2 hr	40.4	37.4	36.8	34.5	41.6	34.6	37.6	2.9	0.45%
着座 4 hr	40.8	37.9	36.7	34.5	41.3	34.7	37.7	2.9	0.71%

表 4-7 左足のインピーダンス値 (500 kHz/5 kHz) の変化

測定時	被験者 1	被験者 2	被験者 3	被験者 4	被験者 5	被験者 6	平均	SD	変化率
開始時	0.752	0.717	0.744	0.742	0.743	0.740	0.739	0.0133	0.000%
着座 2 hr	0.757	0.735	0.752	0.755	0.747	0.746	0.747	0.0081	1.126%
着座 4 hr	0.762	0.736	0.752	0.758	0.747	0.750	0.750	0.0094	1.431%

表 4-8 右足のインピーダンス値（500 kHz／5 kHz）の変化

測定時	被験者 1	被験者 2	被験者 3	被験者 4	被験者 5	被験者 6	平均	SD	変化率
開始時	0.746	0.715	0.739	0.735	0.733	0.738	0.734	0.010	0.0%
着座 2 hr	0.746	0.728	0.747	0.755	0.739	0.745	0.744	0.009	1.3%
着座 4 hr	0.752	0.732	0.753	0.765	0.740	0.749	0.748	0.011	1.9%

#### 4-3-2 健常女性 33 名による 4 時間の連続着座姿勢時における、下肢むくみに対する GSE 摂取の影響（単回摂取試験、14 日間連続摂取試験）

##### 4-3-2-1 単回摂取試験結果

被験者は、選択基準と除外基準により選定された 16 名を事前スクリーニングした結果、8 名を選抜した。年齢は、 $41.0 \pm 3.1$  歳、身長  $154.4 \pm 2.7$  cm であった（平均値  $\pm$  標準誤差）。

電気伝導度インピーダンスによる体成分の測定結果を表 4-9 に示した。細胞内液は、群内の経時比較で GSE 群 ( $p = 0.013$ ) およびプラセボ品群 ( $p = 0.001$ ) とともに、摂取 6 時間後で有意な減少が見られた。細胞外液では、プラセボ品群のみ、摂取 2 時間後と摂取 4 時間後で有意な（共に  $p < 0.001$ ）増加が見られた。体水分量の経時比較では、プラセボ品群の摂取 6 週後 ( $p = 0.044$ ) で有意な減少が見られた。右足水分量、左足水分量とも GSE 群の経時比較では、摂取 4 時間後以降で有意な増加が見られたが、プラセボ品群は摂取 2 時間後以降と早い時点で有意な増加が見られた。群間比較では、すべて有意な差は認められなかった。

ふくらはぎ、足の甲の周囲長の測定結果を表 4-10 に示した。群内経時比較は、全ての項目で摂取前と比べ、摂取 2 時間後以降で有意に増加していた。群間の比較では有意な差は見られず、違いは認められなかった。

左足の容積を測定した結果を表 4-11 に示した。プラセボ品群の経時比較では、摂取前と比べ、摂取 2 時間後、摂取 4 時間後および摂取 6 時間後全ての時点で、有意な増加が見られた。それに対して GSE 群の経時比較では、有意な増加は摂取 6 時間後のみであった。この容積の変化を摂取前の測定値と比較したときの各測定時における変化率を求めた（表 4-12）。その結果、摂取 2 時間までは両群間の差異はなかったが、摂取 4 時間後および 6 時間後においてプラセボ群が有意に変化率が大きく、より下肢のむくみが進行していた（摂取 4 時間後： $p < 0.010$ 、摂取 6 時間後： $p < 0.002$ ）。

むくみに関する自覚症状を集計した結果を表 4-13 に示した。GSE 群およびプラセボ品群とも時間が経過するとともに、下肢の違和感を実感していた人数が増加し、「脚のだるさ」において、GSE 群で有意に抑制していた。しかし、「脚のむくみ感」、「脚の疲労感」やその他の自覚症状には、群間の有意差は見られなかった。

表 4-14 に、血液検査と尿中ミネラル排泄濃度の検査結果を示した。Na の経時比較では、プラセボ品群が摂取 6 時間後 ( $p = 0.028$ ) で有意に低下したが、GSE 群は有意な変化は見られなかった。Cl の経時比較では、摂取前と比べ、摂取 2 時間後で GSE 群 ( $p = 0.023$ ) とプラセボ品群 ( $p < 0.001$ ) とともに有意な低下が見られたが、摂取 4

時間後以降は有意な差は見られなかった。K の経時比較では、摂取 6 時間後で GSE 群 ( $p = 0.001$ ) とプラセボ品群 ( $p < 0.001$ ) とともに有意な低下が見られた。その他の項目でも、有意な変化が見られたものがあつたが、いずれも基準値内での変動であり、異常値は認められなかった。



表 4-9 むくみ測定結果（体成分、単回摂取試験）

平均値±標準偏差、n=8

測定項目	割付	摂取前			摂取 2 時間後			摂取 4 時間後			摂取 6 時間後		
		測定値			測定値			測定値			測定値		
細胞内液	GSE 450 mg 群	18.08	± 2.93		17.99	± 2.84	0.596	18.00	± 2.80	0.697	17.81	± 2.84	0.013*
	プラセボ群	18.20	± 2.80		18.08	± 2.84	0.841	17.96	± 2.77	0.626	17.83	± 2.82	0.001**
	群間比較 P 値	0.430			0.133			0.275			0.598		
細胞外液	GSE 450 mg 群	8.65	± 1.18		8.70	± 1.05	0.748	8.76	± 1.11	0.183	8.69	± 1.04	0.869
	プラセボ群	8.71	± 1.09		8.76	± 1.09	<0.001***	8.81	± 1.09	<0.001***	8.71	± 1.11	0.079
	群間比較 P 値	0.626			0.086			0.197			0.316		
体水分量	GSE 450 mg 群	26.70	± 4.09		26.65	± 3.86	0.966	26.75	± 3.90	0.966	26.49	± 3.88	0.291
	プラセボ群	26.89	± 3.89		26.83	± 3.93	0.871	26.80	± 3.86	0.802	26.55	± 3.90	0.044*
	群間比較 P 値	0.414			0.117			0.094			0.598		
体水分右足	GSE 450 mg 群	4.25	± 0.77		4.28	± 0.76	0.513	4.36	± 0.78	<0.001***	4.38	± 0.77	<0.001***
	プラセボ群	4.30	± 0.76		4.36	± 0.79	0.020*	4.39	± 0.80	<0.001***	4.41	± 0.80	<0.001***
	群間比較 P 値	0.090			0.089			0.163			0.313		
体水分左足	GSE 450 mg 群	4.27	± 0.76		4.30	± 0.75	0.355	4.38	± 0.76	<0.001***	4.40	± 0.75	<0.001***
	プラセボ群	4.32	± 0.76		4.38	± 0.78	0.009**	4.42	± 0.79	<0.001***	4.43	± 0.79	<0.001***
	群間比較 P 値	0.147			0.135			0.176			0.316		

\* 摂取前との群内比較において 5%有意差あり、\*\* 同 1%有意差あり、\*\*\* 同 0.1%有意差あり

表 4-10 むくみ測定結果（ふくらはぎ周囲長、単回摂取試験）

平均値±標準偏差、n=8

測定項目	割付	摂取前			摂取 2 時間後			摂取 4 時間後			摂取 6 時間後		
		測定値			測定値			測定値			測定値		
ふくらはぎ右23 cm	GSE 450 mg 群	34.43	± 3.16	35.10	± 3.22	<0.001***		35.01	± 3.10	<0.001***	35.09	± 3.17	<0.001***
	プラセボ群	34.51	± 3.14	35.03	± 3.03	0.024*		35.06	± 3.14	0.037*	35.13	± 3.11	0.005**
	群間比較 P 値	0.450			0.085			0.107			0.186		
ふくらはぎ左23 cm	GSE 450 mg 群	34.73	± 3.26	35.14	± 3.11	0.021*		35.39	± 3.25	<0.001***	35.46	± 3.22	<0.001***
	プラセボ群	34.69	± 3.11	35.31	± 3.01	0.001**		35.49	± 3.06	<0.001***	35.69	± 3.02	<0.001***
	群間比較 P 値	0.179			0.489			0.364			0.480		
ふくらはぎ23 cm平均	GSE 450 mg 群	34.58	± 3.20	35.12	± 3.16	<0.001***		35.20	± 3.16	<0.001***	35.28	± 3.18	<0.001***
	プラセボ群	34.60	± 3.11	35.17	± 3.01	0.001**		35.28	± 3.09	<0.001***	35.41	± 3.05	<0.001***
	群間比較 P 値	0.921			0.848			0.817			0.678		
ふくらはぎ右30 cm	GSE 450 mg 群	36.43	± 3.28	36.84	± 3.19	<0.001***		36.99	± 3.33	<0.001***	37.04	± 3.18	<0.001***
	プラセボ群	36.18	± 3.30	36.83	± 3.39	<0.001***		36.89	± 3.43	<0.001***	36.96	± 3.46	<0.001***
	群間比較 P 値	0.593			0.954			0.441			0.758		
ふくらはぎ左30 cm	GSE 450 mg 群	36.30	± 3.04	36.60	± 2.99	0.006**		36.89	± 3.08	<0.001***	36.83	± 2.87	<0.001***
	プラセボ群	35.96	± 3.20	36.51	± 2.99	<0.001***		36.76	± 2.99	<0.001***	36.84	± 3.06	<0.001***
	群間比較 P 値	0.554			0.285			0.170			0.557		
ふくらはぎ30 cm平均	GSE 450 mg 群	36.36	± 3.15	36.72	± 3.07	<0.001***		36.94	± 3.19	<0.001***	36.93	± 3.01	<0.001***
	プラセボ群	36.07	± 3.24	36.67	± 3.18	<0.001***		36.83	± 3.20	<0.001***	36.90	± 3.25	<0.001***
	群間比較 P 値	0.056			0.761			0.493			0.857		
足の甲右	GSE 450 mg 群	22.26	± 1.25	22.75	± 1.29	0.001**		22.73	± 1.19	0.001**	22.76	± 1.06	0.001**
	プラセボ群	22.19	± 1.16	22.66	± 1.20	<0.001***		22.79	± 1.24	<0.001***	22.75	± 1.19	<0.001***
	群間比較 P 値	0.871			0.798			0.801			0.751		
足の甲左	GSE 450 mg 群	22.23	± 1.18	22.60	± 1.20	<0.001***		22.60	± 1.10	<0.001***	22.58	± 1.16	<0.001***
	プラセボ群	22.10	± 1.24	22.50	± 1.28	<0.001***		22.64	± 1.28	<0.001***	22.51	± 1.29	<0.001***
	群間比較 P 値	0.100			0.718			0.732			0.381		

\* 摂取前との群内比較において 5%有意差あり、\*\* 同 1%有意差あり、\*\*\* 同 0.1%有意差あり

表 4-11 左足容積の変化（単回摂取試験）

割付	摂取前	摂取 2 時間後	摂取 4 時間後	摂取 6 時間後
GSE 450 mg 群	1,549 ± 341	1,563 ± 333 $P=$ 0.156	1,560 ± 325 $P=$ 0.236	1,563 ± 340 $P=$ 0.026*
プラセボ群	1,534 ± 336	1,556 ± 337 $P=$ 0.021*	1,580 ± 348 $P<$ 0.001***	1,580 ± 334 $P<$ 0.001***
群間比較 $P$ 値	0.129	0.649	0.235	0.164

平均値±標準偏差、n=8

(単位: cm<sup>3</sup>)

\* GSE 摂取群とプラセボ群との群間比較において 5%有意差あり、\*\*\* 同 0.1%有意差あり

表 4-12 連続着座姿勢下での各測定時における、左足容積の平均変化率（単回摂取試験）

割付	摂取前	摂取 2 時間後	摂取 4 時間後	摂取 6 時間後
GSE 450 mg 群	—	1.079 ± 0.625	0.911 ± 0.561	0.949 ± 0.361
プラセボ群	—	1.427 ± 0.426	2.944 ± 0.383	3.174 ± 0.453
群間比較 $P$ 値	—	0.732	0.010*	0.002**

平均値±標準偏差、n=8

(単位: %)

\* GSE 摂取群とプラセボ群との群間比較において 5%有意差あり、\*\* 同 1%有意差あり

表 4-13 自覚症状（単回摂取試験）

Subjective complaint	Placebo group				GSE group			
	0 h	2 h	4 h	6 h	0 h	2 h	4 h	6 h
Leg swelling								
5, aggravated	0	0	0	0	0	1	1	1
4, slightly aggravated	0	2	4	5	0	2	5	5
3, no change	8	6	4	3	8	5	2	2
2, slightly improved	0	0	0	0	0	0	0	0
1, improved	0	0	0	0	0	0	0	0
ANOVA/Tukey	a	ab	b	b	a	ab	b	b
Leg fatigue								
5, aggravated	0	0	1	1	0	0	1	1
4, slightly aggravated	0	4	4	6	0	5	4	4
3, no change	8	4	3	1	8	2	3	3
2, slightly improved	0	0	0	0	0	1	0	0
1, improved	0	0	0	0	0	0	0	0
ANOVA/Tukey	a	ab	b	b	a	ab	b	b
Leg listlessness								
5, aggravated	0	0	0	1	0	0	0	1
4, slightly aggravated	0	6	6	5	0	4	5	3
3, no change	8	1	1	2	8	3	2	4
2, slightly improved	0	1	1	0	0	1	1	0
1, improved	0	0	0	0	0	0	0	0
ANOVA/Tukey	a	b	b	b	a	a	a	a

Different letters (a, b) represent significant differences ( $p < 0.05$ ) after ANOVA and Tukey *post hoc* tests.

表 4-14 血液検査および尿中ミネラル濃度の検査結果（単回摂取試験）

測定項目	割付	摂取前		摂取2時間後			摂取4時間後			摂取6時間後		
		測定値		測定値		群内P値	測定値		群内P値	測定値		群内P値
赤血球数	GSE 450 mg群	423.75	± 31.31	423.00	± 26.46	0.989	420.88	± 29.04	0.666	429.00	± 29.24	0.226
	プラセボ群	429.13	± 30.06	425.50	± 35.44	0.430	429.75	± 30.96	0.992	432.38	± 35.48	0.514
	群間P値	0.357		0.695			0.120			0.493		
白血球数	GSE 450 mg群	5600	± 1511	7013	± 1748	0.001**	6638	± 1640	0.009**	6800	± 2050	0.003**
	プラセボ群	6100	± 2366	7425	± 2873	<0.001***	7238	± 2697	0.001**	7100	± 2749	0.002**
	群間P値	0.417		0.407			0.231			0.359		
K(尿)	GSE 450 mg群	89.15	± 30.27	40.66	± 21.62	0.001**	38.24	± 13.44	<0.001***	53.01	± 9.63	0.008**
	プラセボ群	79.75	± 30.52	37.34	± 16.32	<0.001***	39.48	± 14.20	<0.001***	61.54	± 16.06	0.119
	群間P値	0.177		0.512			0.859			0.181		
K(血清)	GSE 450 mg群	3.99	± 0.34	3.99	± 0.28	<0.001***	4.09	± 0.27	0.758	4.49	± 0.39	0.002**
	プラセボ群	4.03	± 0.22	3.91	± 0.38	0.583	3.99	± 0.19	0.969	4.34	± 0.23	0.019*
	群間P値	0.584		0.510			0.342			0.299		
Cl(尿)	GSE 450 mg群	202.25	± 45.17	124.63	± 76.36	0.009**	148.13	± 41.21	0.080	168.13	± 39.11	0.354
	プラセボ群	206.13	± 45.71	114.13	± 60.05	<0.001***	149.13	± 53.04	0.022*	196.75	± 40.31	0.933
	群間P値	0.665		0.526			0.951			0.021*		
Cl(血清)	GSE 450 mg群	101.75	± 0.89	100.88	± 0.64	0.076	101.63	± 1.06	0.975	101.50	± 1.07	0.845
	プラセボ群	102.38	± 1.69	101.50	± 1.20	0.084	101.88	± 1.73	0.438	102.38	± 1.06	<0.001***
	群間P値	0.370		0.305			0.749			0.213		
血小板数	GSE 450 mg群	28.96	± 4.64	28.76	± 4.57	0.863	28.41	± 4.15	0.225	29.28	± 4.68	0.641
	プラセボ群	27.43	± 4.14	27.26	± 3.66	0.942	26.64	± 3.22	0.098	27.39	± 4.06	0.999
	群間P値	0.125		0.100			0.050*			0.034*		
Na(尿)	GSE 450 mg群	122.38	± 46.44	85.38	± 54.89	0.063	113.38	± 42.47	0.885	134.25	± 49.82	0.780
	プラセボ群	145.25	± 48.21	87.13	± 55.58	0.002**	114.25	± 44.32	0.115	150.63	± 37.10	0.967
	群間P値	0.065		0.801			0.931			0.119		
Na(血清)	GSE 450 mg群	139.75	± 0.71	139.50	± 0.93	0.870	139.63	± 0.92	0.980	139.13	± 1.13	0.307
	プラセボ群	140.25	± 0.89	139.75	± 0.71	0.596	140.00	± 1.20	0.913	139.38	± 0.74	0.187
	群間P値	0.351		0.516			0.549			0.516		
平均赤血球 色素濃度	GSE 450 mg群	31.79	± 0.56	32.11	± 0.72	0.070	32.33	± 0.72	0.002**	32.58	± 0.57	<0.001***
	プラセボ群	31.95	± 0.71	32.24	± 0.69	0.068	32.46	± 0.61	0.001**	32.54	± 0.69	<0.001**
	群間P値	0.348		0.340			0.606			0.728		
平均赤血球 色素量	GSE 450 mg群	29.84	± 1.18	30.01	± 1.20	0.316	29.99	± 1.20	0.434	29.98	± 1.13	0.501
	プラセボ群	29.94	± 1.13	30.00	± 1.29	0.846	30.09	± 1.03	0.285	29.96	± 1.12	0.987
	群間P値	0.306		0.913			0.553			0.882		
平均赤血球 色素容積	GSE 450 mg群	93.86	± 2.93	93.45	± 2.88	0.093	92.76	± 2.91	<0.001***	92.05	± 3.15	<0.001***
	プラセボ群	93.70	± 2.88	93.10	± 2.93	0.002**	92.65	± 2.89	<0.001***	92.08	± 2.77	<0.001***
	群間P値	0.704		0.344			0.717			0.927		
ヘマトクリット	GSE 450 mg群	39.78	± 3.24	39.53	± 2.69	0.775	39.04	± 2.88	0.078	39.48	± 2.87	0.672
	プラセボ群	40.24	± 3.49	39.64	± 3.86	0.094	39.85	± 3.59	0.363	39.84	± 3.74	0.339
	群間P値	0.474		0.865			0.159			0.417		
ヘモグロビン	GSE 450 mg群	12.65	± 1.20	12.70	± 1.02	0.923	12.64	± 1.16	0.999	12.86	± 1.06	0.109
	プラセボ群	12.86	± 1.20	12.79	± 1.37	0.729	12.94	± 1.17	0.729	12.98	± 1.34	0.450
	群間P値	0.255		0.663			0.082			0.476		

\* 摂取前との比較（群内または群間）において 5%有意差あり、\*\* 同 1%有意差あり、\*\*\* 同 0.1%有意差あり

#### 4-3-2-2 14日間摂取試験結果

被験者は、選択基準と除外基準により選定された16名を事前スクリーニングした結果、8名を選抜した。年齢は、 $39.3 \pm 7.6$ 歳、身長  $155.5 \pm 3.4$  cmであった（平均値 $\pm$ 標準誤差）。

電気伝導度インピーダンスによる体成分の測定結果を表4-15に示した。群内経時比較では、細胞内液で、GSE群は摂取4時間後（ $p = 0.001$ ）、摂取6時間後（ $p < 0.001$ ）で有意な減少が見られ、プラセボ品群では、摂取6時間後（ $p = 0.035$ ）で有意な減少が見られたが、両群とも細胞外液では有意な変化は見られなかった。体水分量では、GSE群は、摂取4時間後（ $p = 0.007$ ）、摂取6時間後（ $p = 0.003$ ）で有意な減少が見られ、プラセボ品群では摂取6時間後（ $p = 0.039$ ）で有意な減少が見られた。右足および左足の水分量ともに、GSE群は摂取4時間後以降に有意な増加が見られたのに対し、プラセボ品群では摂取2時間後以降で有意な増加が見られ、GSE群より早い時点での増加が認められた。

ふくらはぎ及び足の甲の周囲長の測定結果を表4-16に示した。群内経時比較は、ほとんどの項目で、摂取前と比べ摂取2時間後以降で有意に増加していたが、左足のふくらはぎ30 cm高のGSE群では、プラセボ品群より遅い時点の摂取4時間後以降で有意な増加が見られた。群間の比較では有意な差は見られなかった。

左足の容積を測定した結果を表4-17に示した。群内の比較では、GSE群は摂取4時間後（ $p = 0.020$ ）、摂取6時間後（ $p = 0.012$ ）で有意な増加が認められたのに対し、プラセボ品群ではGSE群より早い時点の摂取2時間後（ $p = 0.006$ ）から、摂取4時間後（ $p = 0.002$ ）、摂取6時間後（ $p = 0.001$ ）で有意な増加が見られた。表4-18は表4-17の結果の摂取前値を基準としたときの変化率を求めた表である。群間の比較では、摂取6時間後で有意差があり（ $p = 0.046$ ）、プラセボ品群がGSE群より有意に左脚容積の増加率が高いことを示した。

むくみに関する自覚症状を集計した結果を表4-19に示した。GSE群およびプラセボ品群とも時間が経過するとともに、下肢の違和感を実感していた人数が増加し、「脚のむくみ感」において、GSE群で有意に抑制した測定時間（4時間後）があった。また、「脚の疲労感」においても、プラセボ群では摂取2時間後以降に有意な差が出たが、GSE群では摂取4時間後以降であった。しかし、「脚のだるさ」では、GSE群でむしろ早く有意差が出た。

表4-20に、血液検査と尿中ミネラル排泄濃度の検査結果を示した。Naの経時比較では、GSE群が摂取6時間後以降で有意に上昇したが、わずかな低下であった。Clの経時比較では、摂取前と比べGSE群は摂取2時間後以降で、プラセボ品群は摂取

4 時間後以降で有意な低下が見られた。その他の項目でも、有意な変化が見られたものがあつたが、いずれも基準値内での変動であり、異常値は認められなかった。

表 4-15 インピーダンスによる体成分の測定結果（14 日間連続摂取試験）

測定項目	割付	摂取前			摂取 2 時間後			摂取 4 時間後			摂取 6 時間後		
		測定値			測定値			測定値			測定値		
細胞内液	GSE 150 mg 群	18.04	± 1.25		17.95	± 1.24	0.311	17.79	± 1.32	0.001**	17.78	± 1.31	<0.001***
	プラセボ群	17.85	± 1.34		17.90	± 1.30	0.783	17.74	± 1.33	0.227	17.68	± 1.38	0.035*
	群間比較 P 値	0.049*			0.516			0.695			0.381		
細胞外液	GSE 150 mg 群	8.98	± 0.57		9.01	± 0.55	0.479	9.03	± 0.59	0.262	8.99	± 0.53	0.955
	プラセボ群	8.91	± 0.63		8.93	± 0.58	0.973	8.94	± 0.59	0.835	8.93	± 0.60	0.973
	群間比較 P 値	0.279			0.247			0.247			0.329		
体水分量	GSE 150 mg 群	27.01	± 1.76		26.95	± 1.73	0.671	26.79	± 1.85	0.007**	26.76	± 1.78	0.003**
	プラセボ群	26.80	± 1.96		26.84	± 1.82	0.925	26.71	± 1.90	0.526	26.60	± 1.95	0.039*
	群間比較 P 値	0.132			0.375			0.634			0.332		
右足水分量	GSE 150 mg 群	4.24	± 0.31		4.28	± 0.29	0.223	4.32	± 0.32	0.005**	4.35	± 0.29	<0.001***
	プラセボ群	4.23	± 0.33		4.29	± 0.31	0.021*	4.30	± 0.32	0.005**	4.35	± 0.32	<0.001***
	群間比較 P 値	0.893			0.608			0.692			0.761		
左足水分量	GSE 150 mg 群	4.28	± 0.28		4.31	± 0.27	0.208	4.33	± 0.30	0.018*	4.37	± 0.26	<0.001***
	プラセボ群	4.27	± 0.30		4.33	± 0.29	0.013*	4.35	± 0.31	0.002**	4.38	± 0.30	<0.001***
	群間比較 P 値	0.659			0.491			0.756			0.737		

\* 摂取前との比較（群内または群間）において 5%有意差あり、\*\* 同 1%有意差あり、\*\*\* 同 0.1%有意差あり



表 4-16 ふくらはぎ、足の甲の周囲長の測定結果（14 日間連続摂取試験）

測定項目	割付	摂取前			摂取 2 時間後			摂取 4 時間後			摂取 6 時間後		
		測定値			測定値		群内比較 P 値	測定値		群内比較 P 値	測定値		群内比較 P 値
ふくらはぎ右 23 cm	GSE 150 mg 群	33.48	± 1.87	34.30	± 1.87	<0.001***	34.36	± 1.89	<0.001***	34.34	± 1.93	<0.001***	
	プラセボ群	33.39	± 2.25	34.08	± 2.18	0.001**	34.13	± 2.21	<0.001***	34.21	± 2.32	<0.001***	
	群間比較 P 値	0.853			0.526			0.366			0.766		
ふくらはぎ左 23 cm	GSE 150 mg 群	33.64	± 1.94	34.15	± 1.96	0.004**	34.35	± 1.84	<0.001***	34.39	± 2.01	<0.001***	
	プラセボ群	33.60	± 1.94	34.08	± 1.97	0.005**	34.10	± 2.14	0.003**	34.34	± 2.08	<0.001***	
	群間比較 P 値	0.922			0.778			0.372			0.795		
ふくらはぎ 左右 23 cm 平均	GSE 150 mg 群	33.56	± 1.88	34.23	± 1.88	<0.001***	34.36	± 1.82	<0.001***	34.37	± 1.92	<0.001***	
	プラセボ群	33.49	± 2.07	34.08	± 2.07	<0.001***	34.11	± 2.15	<0.001***	34.28	± 2.18	<0.001***	
	群間比較 P 値	0.875			0.589			0.288			0.734		
ふくらはぎ右 30 cm	GSE 150 mg 群	35.81	± 2.11	36.25	± 2.14	<0.001***	36.38	± 2.09	<0.001***	36.35	± 1.98	<0.001***	
	プラセボ群	35.89	± 2.46	36.33	± 2.35	<0.001***	36.41	± 2.18	<0.001***	36.44	± 2.21	<0.001***	
	群間比較 P 値	0.758			0.664			0.820			0.547		
ふくらはぎ左 30 cm	GSE 150 mg 群	35.98	± 2.15	36.26	± 2.21	0.062	36.46	± 2.19	0.001**	36.63	± 2.20	<0.001***	
	プラセボ群	35.75	± 2.47	36.28	± 2.38	0.001**	36.46	± 2.06	<0.001***	36.46	± 2.28	<0.001***	
	群間比較 P 値	0.437			0.944			1.000			0.397		
ふくらはぎ 左右 30 cm 平均	GSE 150 mg 群	35.89	± 2.11	36.26	± 2.16	0.001**	36.42	± 2.13	<0.001***	36.49	± 2.08	<0.001***	
	プラセボ群	35.82	± 2.45	36.30	± 2.35	<0.001***	36.44	± 2.12	<0.001***	36.45	± 2.24	<0.001***	
	群間比較 P 値	0.773			0.800			0.917			0.810		
足の甲右	GSE 150 mg 群	22.03	± 0.69	22.33	± 0.82	0.005**	22.34	± 0.76	0.004**	22.35	± 0.91	0.003**	
	プラセボ群	22.18	± 0.94	22.39	± 0.78	0.139	22.45	± 0.75	0.043*	22.28	± 0.72	0.668	
	群間比較 P 値	0.307			0.405			0.135			0.623		
足の甲左	GSE 150 mg 群	22.01	± 0.63	22.25	± 0.69	0.008**	22.34	± 0.71	<0.001***	22.30	± 0.75	0.001**	
	プラセボ群	22.25	± 0.85	22.48	± 0.75	0.049*	22.48	± 0.68	0.049*	22.49	± 0.57	0.036*	
	群間比較 P 値	0.115			0.108			0.314			0.205		

\* 摂取前との比較（群内または群間）において 5%有意差あり、\*\* 同 1%有意差あり、\*\*\* 同 0.1%有意差あり

表 4-17 左足容積の変化(14 日間連続摂取試験)

群	摂取前	摂取 2 時間後	摂取 4 時間後	摂取 6 時間後
GSE 群	1,573 ± 221	1,595 ± 202 <i>P</i> = 0.181	1,608 ± 236 <i>P</i> = 0.020*	1,611 ± 208 <i>P</i> = 0.012*
プラセボ群	1,562 ± 193	1,611 ± 199 <i>P</i> = 0.006**	1,618 ± 225 <i>P</i> = 0.002**	1,624 ± 190 <i>P</i> = 0.001***
群間比較	<i>p</i> =0.382	<i>p</i> =0.225	<i>p</i> =0.488	<i>p</i> =0.423

平均値±標準偏差、n=8

(単位:cm<sup>3</sup>)

\* GSE 摂取群とプラセボ群との群間比較において 5%有意差あり、\*\* 同 1%有意差あり、\*\*\* 同 0.1%有意差あり

表 4-18 連続着座姿勢下での各測定時における、左足容積の平均変化率 (14 日間連続摂取試験)

群	摂取前	摂取 2 時間後	摂取 4 時間後	摂取 6 時間後
GSE 群	—	1.567 ± 0.636 <i>P</i> = 0.100	2.190 ± 0.671 <i>P</i> = 0.025*	2.522 ± 0.431 <i>P</i> = 0.008**
プラセボ群	—	3.190 ± 0.597 <i>P</i> = 0.007**	3.491 ± 0.734 <i>P</i> = 0.003**	4.062 ± 0.402 <i>P</i> = 0.001***
群間比較	—	<i>p</i> =0.101	<i>p</i> =0.111	<i>p</i> =0.048*

平均値±標準偏差、n=8

(単位:%)

\* GSE 摂取群とプラセボ群との群間比較において 5%有意差あり、\*\* 同 1%有意差あり、\*\*\* 同 0.1%有意差あり

表 4-15 自覚症状（14 日間連続摂取試験）

Subjective complaint	Placebo group				GSE group			
	0 h	2 h	4 h	6 h	0 h	2 h	4 h	6 h
Leg swelling								
5, aggravated	0	0	1	1	0	0	0	0
4, slightly aggravated	0	4	4	3	0	5	6	6
3, no change	8	4	3	4	8	3	2	1
2, slightly improved	0	0	0	0	0	0	0	0
1, improved	0	0	0	0	0	0	0	1
ANOVA/Tukey	a	ab	b	ab	a	a	a	a
Leg fatigue								
5, aggravated	0	1	3	3	0	0	1	2
4, slightly aggravated	0	5	4	5	0	5	4	4
3, no change	8	2	1	0	8	2	3	2
2, slightly improved	0	0	0	0	0	1	0	0
1, improved	0	0	0	0	0	0	0	0
ANOVA/Tukey	a	b	b	b	a	ab	b	b
Leg listlessness								
5, aggravated	0	0	3	3	0	1	1	1
4, slightly aggravated	0	4	2	3	0	4	5	6
3, no change	8	4	3	2	8	3	2	1
2, slightly improved	0	0	0	0	0	0	0	0
1, improved	0	0	0	0	0	0	0	0
ANOVA/Tukey	a	ab	b	b	a	b	b	b

Different letters (a, b) represent significant differences ( $p < 0.05$ ) after ANOVA and Tukey *post hoc* tests.

表 4-20 血液検査および尿中ミネラル濃度の検査結果（14 日間摂取試験）

測定項目	割付	摂取前		摂取2時間後			摂取4時間後			摂取6時間後		
		測定値		測定値		群内比較P値	測定値		群内比較P値	測定値		群内比較P値
赤血球数	GSE 150 mg群	436.25	± 19.85	432.88	± 17.86	0.512	427.86	± 12.88	0.026*	435.00	± 20.58	0.947
	プラセボ群	428.38	± 21.85	429.50	± 24.01	0.984	426.50	± 14.20	0.933	435.25	± 17.88	0.219
	群間比較P値	0.170		0.580			0.328			0.945		
白血球数	GSE 150 mg群	6125	± 1293	7213	± 1070	0.001**	7100	± 1169	0.004**	6763	± 1098	0.057
	プラセボ群	5563	± 784	6313	± 1204	0.036*	6288	± 1373	0.044*	6200	± 1431	0.083
	群間比較P値	0.222		0.037*			0.079			0.170		
K(尿)	GSE 150 mg群	25.99	± 4.78	26.28	± 5.00	0.716	26.64	± 5.65	0.162	26.08	± 5.03	0.987
	プラセボ群	27.01	± 4.61	26.83	± 4.78	0.928	27.36	± 5.02	0.689	27.49	± 5.00	0.474
	群間比較P値	0.206		0.592			0.394			0.079		
K(血清)	GSE 150 mg群	38.48	± 4.27	37.98	± 4.02	0.170	37.11	± 3.73	<0.001***	37.79	± 4.18	0.043*
	プラセボ群	37.94	± 3.94	37.88	± 4.38	<.996	37.34	± 3.85	0.234	37.88	± 3.83	0.996
	群間比較P値	0.288		0.861			0.678			0.779		
Cl(尿)	GSE 150 mg群	12.16	± 1.87	12.13	± 1.76	0.952	11.89	± 1.71	0.018*	12.20	± 1.80	0.952
	プラセボ群	11.98	± 1.90	12.00	± 2.00	0.993	11.95	± 1.84	0.993	12.19	± 1.86	0.185
	群間比較P値	0.291		0.541			0.480			0.917		
Cl(血清)	GSE 150 mg群	31.45	± 1.87	31.80	± 1.84	0.023*	31.90	± 1.96	0.005**	32.16	± 1.81	<0.001***
	プラセボ群	31.38	± 2.27	31.49	± 2.15	0.694	31.85	± 2.11	0.003**	32.01	± 2.29	<0.001***
	群間比較P値	0.770		0.298			0.531			0.638		
血小板数	GSE 150 mg群	27.83	± 3.73	27.99	± 3.72	0.139	27.80	± 4.01	0.982	28.03	± 3.77	0.056
	プラセボ群	27.93	± 4.14	27.88	± 4.15	0.924	27.98	± 4.12	0.924	28.00	± 4.19	0.795
	群間比較P値	0.721		0.706			0.743			0.930		
Na(尿)	GSE 150 mg群	88.09	± 7.89	87.68	± 8.05	0.127	86.77	± 8.74	<0.001***	86.79	± 8.16	<0.001***
	プラセボ群	88.53	± 7.96	88.09	± 8.24	0.005**	87.48	± 8.14	<0.001***	87.01	± 8.12	<0.001***
	群間比較P値	0.260		0.137			0.397			0.383		
Na(血清)	GSE 150 mg群	3.84	± 0.32	3.81	± 0.27	0.995	3.99	± 0.25	0.550	4.24	± 0.33	0.018*
	プラセボ群	3.88	± 0.32	3.89	± 0.43	0.999	3.83	± 0.15	0.961	4.13	± 0.44	0.155
	群間比較P値	0.685		0.679			0.122			0.174		
平均赤血球色素濃度	GSE 150 mg群	103.50	± 2.33	102.25	± 1.98	0.014*	103.25	± 1.58	0.869	103.25	± 1.91	0.869
	プラセボ群	103.63	± 1.51	102.63	± 0.92	0.019*	103.13	± 0.99	0.336	103.63	± 0.92	1.000
	群間比較P値	0.857		0.528			0.850			0.567		
平均赤血球色素量	GSE 150 mg群	141.50	± 2.07	140.38	± 1.51	0.063	140.75	± 1.16	0.276	140.25	± 1.16	0.036*
	プラセボ群	141.38	± 1.77	140.63	± 1.41	0.225	140.88	± 1.36	0.527	140.88	± 1.46	0.527
	群間比較P値	0.850		0.685			0.785			0.217		
平均赤血球色素容積	GSE 150 mg群	72.71	± 24.35	38.53	± 22.69	0.003**	40.76	± 16.31	0.005**	58.18	± 21.27	0.269
	プラセボ群	85.90	± 41.74	50.40	± 33.22	0.005**	52.66	± 19.03	0.008**	69.73	± 17.68	0.270
	群間比較P値	0.162		0.144			0.042*			0.141		
ヘマトクリット	GSE 150 mg群	183.50	± 52.27	134.25	± 78.52	0.087	152.50	± 49.27	0.370	176.38	± 40.61	0.976
	プラセボ群	175.50	± 43.24	126.00	± 60.39	0.043*	152.50	± 28.99	0.495	178.88	± 24.57	0.996
	群間比較P値	0.706		0.668			1.000			0.841		
ヘモグロビン	GSE 150 mg群	129.00	± 36.55	106.00	± 54.18	0.217	129.00	± 40.44	1.000	147.88	± 34.55	0.359
	プラセボ群	111.25	± 26.88	91.38	± 40.64	0.133	119.00	± 26.20	0.769	142.25	± 18.59	0.012*
	群間比較P値	0.140		0.437			0.372			0.489		

\* 摂取前との比較（群内または群間）において 5%有意差あり、\*\* 同 1%有意差あり、\*\*\* 同 0.1%有意差あり

## 第4節 考察

### 4-4-1 健康男性6名による4時間の連続着座姿勢時における、GSE摂取の下肢むくみに対する影響

男性6名による4時間の強制着座時におけるGSE摂取の影響を評価した。連続着座姿勢の結果、被験者の体感(問診による自覚症状)、下肢周囲長の増大が認められ、GSE摂取時、コントロール摂取時共に下肢のむくみが生じたと考えられる。

問診では、とくに「下肢のしびれ」および「全身疲労度」に有意なGSE摂取の有用性が示された。これらの体感効果は、GSE摂取による結果とも考えられるが、今回の試験は、1日目にプラセボ錠剤試験、2日目にGSE錠剤試験であったことから、着座状態の苦痛に対する「慣れ」を排除できていないと考えられ、再現性の期待されるクロスオーバー法など試験方法を改善し再評価する必要があると考えられた。

ヘマトクリット値について、連続4時間の着座による値上昇をGSE摂取が抑制した。ヘマトクリット値上昇は、血液中の血漿比率減少(血球比率増加)を表し、むくみによる血漿の細胞間質滞留、すなわち動脈から各細胞に向かって滲み出した血漿が静脈にもどらず細胞間に滞留した状態(大橋, 2007)が一因である。よって、cont.時のヘマトクリット値上昇をGSE摂取時には有意に抑えたことは、むくみ形成の抑制と関係がある可能性が考えられた。

下肢周囲長は、ふくらはぎ部においてGSE摂取によるむくみ抑制傾向が認められた( $p=0.064 \sim p=0.27$ ) が、足首部では変化量がわずかでありむくみ自体の数値化に至らなかった。これは、着座状態であったために重力影響が小さかったことが一因と考えられる。また、水溢れ方式(Nilsson & Haugen, 1981)で測定した下肢容積は、GSE摂取によって膝下の容積上昇(むくみ)が有意ではないが平均36%抑制される傾向が観察された。一方、Christie et al. (2004)は、女性被験者への320 mgのGSE摂取による、ふくらはぎ周囲長のむくみ(腫れ)は、体感効果は得られているものの、実測では抑制効果を認めなかったと報告している。この結果と本試験結果は、性差による差異の可能性は残るものの、測定方法の違いによるところが大きいと考えられる。本試験では、Nilsson & Haugen (1981)の着座状態を維持しつつ、溢れ出た水量から下肢容積を測ったために、測定のための歩行動作等の筋肉収縮によってもたらされる下肢水分の変化を最小化したことが下肢容積の正確な測定に結びついたものと考えられる。しかしながら、Nilsson & Haugen (1981)の測定方法は、水圧により圧迫された下肢容積を測定する問題点があるため、非接触式かつ短時間での

下肢容積の測定が、より正確で着実であろうと考えられた。

インピーダンス測定では、全身水分量（5 kHz 数値より算出）と細胞外水分量（500 kHz より算出）を比較した。4 時間の着座状態を維持することにより細胞外水分量の比率が上昇したが、GSE 摂取群でわずかに抑制傾向が観察され、GSE 摂取が何らかの下肢浮腫を抑制したことが示唆された。前記の下肢容積および下肢周囲長の抑制傾向をあわせて考察すると、インピーダンス測定によって示された下肢水分バランスの変動は、GSE 摂取の影響を示すものと考えられた。

その他の測定項目として、拡張期血圧に関して 4 時間の着座による上昇を抑制する傾向が見られた（心拍数に変化なし）が、GSE 摂取が全身の血行悪化を改善しているのかもしれない。また、下肢各部位の表面温度について、GSE 摂取時には表面温度低下をわずかに抑える傾向を示した。これは GSE 摂取と下肢における血行の関与を示唆するものかもしれない。

以上の結果から、GSE 摂取による、むくみの抑制的な効果が確認された。しかし、一重盲検試験であったこと、被験者数が 6 名と限られていたこと、むくみを主訴するのは女性であるが男性被験者のみで実施したこと、下肢容積の測定方法に改善の余地があること等、試験方法を見直す点があることが分かった。次節では、これらの課題点を改善した別の試験を計画実施した。

#### 4-4-2 健常女性 33 名による 4 時間の連続着座姿勢時における、下肢むくみに対する GSE 摂取の影響（単回摂取試験、14 日間連続摂取試験）

フラボノイドの抗浮腫効果は、仰向け姿勢での月経周期の女性での主観的効果 (Christie et al., 2004) や慢性単純静脈瘤 (Constantini et al., 1999) に対してであった。本実験で我々は、健常女性に対し、日常的に下肢のむくみが起こり得る座位姿勢で、GSE 摂取による抗むくみ効果を初めて検証した。

事前スクリーニングにより選抜された、むくみを生じやすい被験者において単回摂取試験、および 14 日間連続摂取試験で左下肢体積増加率を有意に抑制した (表 4-12、表 4-18)。これらの結果は、GSE の経口摂取が、健常人の中でもとくにむくみを起こしやすい女性にとって、軽度なむくみ形成を遅延または抑制することを示すものと考えられる。むくみを起こしやすい被験者（単回試験、および 14 日間）は、事前スクリーニングで選抜されなかった被験者よりも平均年齢、平均 BMI 値がやや高い傾向が認められ、老化や肥満による悪化した血管浸透性と間質液の再吸収能バランスを改善するはたらき (Valenci & Behar, 1995; Lubran, 1995) が、抗酸化活性を有する PA を豊富に含む GSE 摂取の結果で現れた可能性が考えられる。

プロシアニジン B-2 のラット経口投与 0.5 時間後から 3 時間後までの間に、プロシアニジン B-2 が血漿中に経時的に検出され (Baba et al., 2002)、PA 高含有 GSE をヒト経口摂取させると少なくとも 2 時間後の血中にプロシアニジン B1 が見出され (Sano et al., 2003)、ココアをヒトに経口摂取させた後、0.5 時間から 6 時間の間に有意にプロシアニジン B2 が検出され 2 時間後に血中最大濃度を迎えていることが報告されている (Holt et al., 2002)。本研究で経口投与された GSE 錠中の PA の一部が吸収され血中に存在すると見積もられ、経口摂取された PA は生体内で強力な酸化抵抗性を発していると考えられる (Natella et al., 2002; Baba et al., 2002; Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Koga et al., 1999; Yamakoshi et al., 1999)。

過去の報告によれば、疲労やストレスによって生じた活性酸素のダメージや老化による悪影響によって、血管は、その弾力性や正常な液体透過性が失われてしまう (Thorpe & Baynes, 1996)。この正常な機能が失われたままであると、血管組織を構成する微小血管の液体透過性の上昇が慢性的となり、浮腫を形成する結果となる (Christ et al., 2001; Haaverstad et al., 1997)。一方で、ダメージを受けた毛細血管や末梢リンパ管の液体透過性は、長期間の抗酸化剤投与で改善することが報告されている (Rodriguez-Porcel et al., 2004)。活性酸素で増加した酸化 LDL は、血管内皮細胞への沈着し、弾性繊維のエラスチンを修飾し、血管の浸透性バランスを崩してしまう。

PA はエラスチン線維と血管細胞（線維芽細胞と平滑筋細胞）との相互作用を増強させ血管壁の正常な機能維持を助けると考えられ（Robert et al., 1990a）、また、血管に炎症が起こっている場合や糖尿病患者では、血管透過性が異常上昇しているが、Robert et al. (1990b) によれば、PA 処理を施したラットの毛細血管は血管透過性上昇を抑制することが確かめられている。従って、今回の研究で GSE 投与 2 時間後から浮腫抑制効果が観察されていることは、PA が生体内に吸収され存在し、抗酸化活性を発揮すると共に血管細胞や弾性繊維に影響を与えた結果であることが示唆された。

PA を含む GSE の連続経口摂取による臨床試験では、摂取 6 ヶ月目に体質改善（Yamakoshi et al., 2004）ならびに摂取 4 週間後からの血管機能改善効果（Clifton, 2004）が見出されている。このように PA 摂取量が低く制限された試験で効果発現を見るためには一定期間が必要であることを暗示している。酸化ストレス（障害）からの長期的な開放は、抹消血管細胞（リンパ管細胞）を含む細胞の正常機能維持に寄与する（Robert et al., 1990a）。単回試験と比べると小さい効果であるが、本 14 日試験では抗むくみ効果が投与 2～6 時間後で見られた。この結果は、投与量が単回投与よりも 1/3 量ではあるが、継続的な摂取が生体の抗酸化レベルを上げたことが一因と考えられる。本試験において、抗むくみ効果を示す単回摂取時の有効目安量や継続的摂取時の有効目安量を提供できたことは有意義である。

下肢容積で客観的な有効性が現れているが主観的な体感効果が穏やかであったこと（表 4-8、表 4-14）は、試験デザインが裸足の状態でありブーツ等の靴を履かなかったことに起因している可能性が考えられる。また、連続 1 時間の着座で下肢の不快感が明確に上昇する（Seo et al., 1996）ことから、本実験の 6 時間連続着座は下肢容積変化などのむくみ抑制効果を上回る身体的負担を被験者へ与えていたために、GSE 摂取による自覚症状が穏やかであった可能性が考えられる。しかし、GSE 摂取により下肢のむくみを抑制する客観的かつ主観的データが得られたことは、代替医療の可能性を切り開く一歩であり、機能性食品の有用性を示すものである。

血圧測定および血液検査結果では、有意な変化が見られたものもあった（表 4-9、表 4-15）が、基準値内の変動であり異常値は見られず、試験担当医師の診察でも試験前後で被験者に異常を認めなかったことから、GSE 含有食品は安全性が高いと考えられた。

本研究の結果、PA を豊富に含む GSE の摂取は、フランスを中心とする欧州での静脈瘤などの血管疾患治療薬としての薬効に加え（Dartenuc et al., 1980; Baruch et al., 1984; Corbè et al., 1988）、日常社会における生活習慣や長時間の着座状態を強いられた現代の労働環境下で発生し得る軽度のむくみに対する抑制に有効であることが確



認された。

## まとめ

健常男性 6 名を連続着座させ、GSE 摂取・非摂取で下肢のむくみ度合を検証したところ、GSE の摂取は下肢のむくみを軽減させる効果を有することが観察された。具体的には、①自覚症状において下肢および全身の不快感を改善、②ヘマトクリット値の上昇を抑制、③下肢容積増加を抑制させる傾向、④インピーダンス値計測による細胞外液を抑制する傾向、⑤ふくらはぎ周囲長の増大を抑制する傾向、がそれぞれ観察された。

健常女性を対象として、プロアントシアニジン (PA) 高含有ブドウ種子抽出物 (GSE) 摂取による着座静止状態下の下肢浮腫の抑制効果を、プラセボ対象二重盲検による臨床試験（クロスオーバー法）により検証した。事前スクリーニングにより選抜した 16 人の健常日本人女性を対象とし、450 mg の GSE 単回 GSE 摂取試験（8 人）、および、150 mg の GSE 14 日間連続 GSE 摂取試験（8 人）を、ダブルブラインドクロスオーバーにて行った。単回摂取試験では、水分量（全身と足）、左足容積変化率、脚のだるさの自覚症状において GSE 摂取による抗むくみ効果が観察された。14 日間摂取では、足の水分量、左足容積変化率、自覚症状（脚のむくみ感、脚の疲れ）において GSE 摂取による効果が観察された。本結果から、GSE 摂取により着座静止状態下における健常な女性の下肢むくみ発生が、遅延または抑制されることが確認された。

## 第5章 経口摂取によるブドウ種子抽出物（GSE）の安全性評価

### 第1節 背景と目的

第4章まで、プロアントシアニジン（PA）を豊富に含むブドウ種子抽出物（GSE）のヒトでの経口摂取による吸収性と有効性を明らかにしてきた（Sano et al., 2007; Sano et al., 2013）。これらの各試験において、いずれも有害事象（AE）と認められる現象は起こっていない。しかし、GSE を食品素材として社会へ提案するにあたり、ヒトに対する安全性の担保はより明確化されなければならない課題である。

PA は、我々人間が日常摂取する多くの食品に含まれ、野菜や果物の生鮮品の他、これらの加工食品である赤ワイン、フルーツジュースやドライフルーツなど、私たちの食生活に幅広く分布している。これらの生鮮品や加工食品は、古くからヒトの食生活に登場している。例えば、ワインは中央アジアで少なくとも 5,000 年から 7,000 年前から摂取されていた記録がある（橘, 2000）。欧州へは、2,000 年以上前のローマ時代に広まったとされている。現在では欧州で確立されたワイン醸造技術が世界に広まったことから、現在のワインの食経験は少なくとも 2,000 年以上であるといえる。とくに赤ワインでは、その醸造過程で種子や果皮を残したままアルコール発酵させるため、PA が醸造中に自然に抽出され易く、平均すると PA が約 400 mg/L にも達している（山越・山次, 1999）。欧米におけるワインの消費量一日あたり 200 から 300 mL に換算すれば、およそ 100 mg の PA 食経験をワインの歴史と共に歩んできたといつてよい。その他、PA を豊富に含む食材として、柿を例に挙げることができる。柿の歴史は古代中国から始まり、日本へは 6 世紀の「斉民要術」に記載があり、少なくとも 1,000 年以上の食経験があることがわかる。柿には渋柿と甘柿があるが、いずれも PA を豊富に含んでおり、干し柿に加工される渋柿には PA が果汁に溶解しているために渋く感じ、甘柿の PA はタンパク質とも相互作用により不溶化しているために渋味を感じないだけであり、結果として、これらの柿の摂取は PA の食経験と言える。従って、これらの食経験から、PA 摂取による、ヒトに対する安全性は、問題ないとする研究者も多い。しかし、柿の実における PA 存在形態と比べ、製剤化された本研究材料の GSE は PA 分子の状態が同一ではないため、GSE の経口摂取による安全性の評価は、必ずしも十分ではない。GSE の安全性評価は、Yamakoshi et al. (2002) が細胞毒性のほか動物実験により無毒性量（NOAEL）が 1,410 ～1,501 mg/kg b.w./day と報告している。ヒトにおける GSE の安全性評価に焦点を当てた報告は過去に無いが、他の目的で GSE を使用した際に、特筆すべき有害事象はなか

ったとする報告がある (Ward et al., 2004; Sano et al., 2007; Yamakoshi et al., 2004)。一方で、GSE に代表されるポリフェノールを日々の健康維持の目的でサプリメント等の形態で摂取する市場は、とくに先進国で定着したと言ってよく、今後の途上国の発展に伴って益々の安全性の担保が求められている。

本研究では、PA を豊富に含む GSE の安全性をサプリメント形状で 4 週間の亜急性毒性試験を計画実施した。食経験および GSE サプリメントの一日推奨摂取量 100 から 400 mg に対し、最大 20 倍程度までの一日摂取量を設定し、ヒト経口摂取での安全性を評価することを目的とした。本研究により、GSE の活性中心である PA の機能性食品としての有用性を評価する一助となるであろう。

## 第2節 試験方法

### 5-2-1 ブドウ種子抽出物（GSE）と試験錠剤、摂取方法

本章で用いた GSE は、第2章第2節で示した方法により得られた同一の GSE である。

試験期間中、1錠あたりに 100 mg の PA を確実に含有するよう、125 mg の GSE を配合し打錠した。GSE 錠剤は、市販されている「ぶどうの恵み」（キッコーマンバイオケミファ株式会社製）を用いた。GSE 錠剤中に含まれる PA の安定性は、化粧品の有効期間を設定するときに用いられる条件（40℃、湿度 75%）における 3 倍加速試験（14 カ月間の保存期間中、常に規格値以上を維持）により、試験期間中に主要成分である PA が常温で少なくとも 3 年間は 90%以上劣化しないこと（フラバノール含量の他、PA 化学構造維持、褐変など無し等）が確認されている。GSE 錠剤は、4 週間の試験期間に各被験者が摂取する数量が、アルミ袋に入れられ配布した。アルミ袋には、一日あたり一袋ずつに小分けされ、摂取日も記載されており、摂取方法、異常を感じた時の連絡先を記した。

被験者は、毎日、朝食後と夕食後の 2 回に分けて、当日の日付が記されたアルミ小袋に入った GSE 錠剤を、水 100 mL 程度と一緒に摂取した（表 5-1）。もし、摂取し忘れた場合は、昼食後または夕食後に摂取するよう指導した。また、二日分を一日間に摂取するなどの、二重に摂取してしまった場合は、翌日に摂取しないように指導した。例えば、飲み忘れた日が発生したときは、翌日に当日分のみ摂取して調節し、また間違えて二日分を一日で摂取してしまった場合は、翌日は摂取しない調節をするよう指導した。これらの摂取実態は各自が日誌に記録することとした。

### 除外基準

- 1) 高脂血症治療薬、降圧剤等の脂質代謝に影響を及ぼす可能性がある薬剤および健康食品を服用（摂取）している方、その他の薬剤を常用している方
- 2) 家族性高脂血症と診断されたことがある方
- 3) 糖尿病、著明な肝機能障害のある方
- 4) 抗酸化作用があるといわれる健康食品を摂取している方（健康茶の大量摂取も含む）
- 5) 赤ワインを常飲している方
- 6) 妊娠している方、妊娠の可能性がある方、授乳中の方
- 7) 重篤な疾患既往歴がある方
- 8) 腎機能検査値に顕著な異常がみられる方

- 9) 心肺機能に顕著な障害を示す方
- 10) 食物および薬剤アレルギーのある方
- 11) 慢性あるいは急性の感染症の方
- 12) 本試験開始時に他の臨床試験に参加中の方
- 13) その他、試験責任医師が不適当と判断した方

#### 5-2-2 ヒト試験倫理委員会の承認、被験者と試験群、摂取量の設定

本研究では、被験者として、通院も服薬もしていない、20歳から64歳までの健康な日本人30名の男女を選抜した。選抜する前に除外基準を設けており、これらに該当する場合は除外した。試験に参加する被験者本人からの同意は以下の方法で試験前に確認した。試験責任医師から、試験開始前に、倫理委員会で承認された説明文書および同意書を手渡した上で十分な説明を行い、かつ質問に対して被験者が納得できるまで説明した。その上で、被験者の自由意思による同意を文書で得て、その文書（同意書）には試験責任医師および各被験者が署名または記名捺印し、日付を記入した。また、本試験は、試験実施計画書及びヘルシンキ宣言および「疫学研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省告示）」に基づく倫理的原則を厳守し実施した。

30名の男女は、無作為に10名ずつ3群に分けた。それぞれ、GSE摂取量を基準として、1,000 mg 群、1,500 mg 群および2,500 mg 群とした。なお、これらの各群は、PAとしては800 mg、1,200 mg および2,000 mg 摂取することとなる。本試験では、プラセボ群を設定しなかった。本試験は、健常人が被験者であり、評価方法が医師の問診と血液検査を中心とし、前者では普段の生活で異常が無かったかの主観的判断と医師からの客観的判断によるものであること、後者では健康診断や日本人で蓄積されてきた健常人の数値範囲（プラセボとみなせる）との比較をすることができることから、プラセボ群を設定せず、GSE摂取群のみで実施した。また、過去のGSE摂取試験(Yamakoshi et al., 2004; Sano et al., 2007; Ward et al., 2004)において、有害事象が報告されていないこと、また、20年以上にわたって、本試験の主原料GSEを食品素材として販売し続けている当社に対して、GSE摂取と関連する健康被害の報告が無いことから、プラセボ群を置く必要がないと考えられた。

試験中、各被験者に試験日誌を付けるよう指導した。試験日誌には、GSE錠剤の摂取状況、腹痛や風邪等の異常の有無、医薬品の摂取状況を記載するよう指導した。

試験の中止基準を予め以下の通り設定した。

- 1) 摂取期間中の試験錠剤の服用率が75%以下の場合。
- 2) 検査結果の信頼性を損なう行為が顕著に見られる場合。

- 3) 被験者の都合により来院が困難となった場合（来院忘れ、不慮の事故、試験食品と明らかに因果関係のない病気入院など）。
- 4) その他、試験責任医師が試験を中止することが適当と考える明らかな理由がある場合。
- 5) 被験者の自由意思による申し出。

### 5-2-3 試験スケジュールと検査項目と検査方法

前述の除外基準をクリアした被験者は、本人の同意で試験に参加した。試験開始日（0週間目）、摂取開始2週間目、摂取開始4週間目（摂取終了日）、そして摂取終了2週間後の4回、それぞれ通院し、身体検査と採血、問診を受けた（表5-2）。

各検査日には、体重、血圧、脈拍を測定し、医師による問診を受けさせた。これらは、6週間の試験期間中（うち試験錠剤の摂取期間は4週間）に、急激な身体的変化が起きていないかを確認するためでもある。また、試験期間中にこれらの検査項目で急激な変化が認められた場合は、まずは急性毒性などの影響を考慮する必要がある。次いで、別の要因、試験品の摂取とは関わりの無い、何か生活上の変化があるか、問診を通じて評価し、試験自体への影響が懸念される場合は、追加除外を検討するために測定を実施した。

### 安全性の評価と有害事象

本安全性試験における有害事象は、被験者の予期せぬ、または思いもよらない医学的な事象と定義した。本試験で定義した有害事象は、必ずしも GSE との因果関係を必要としないこととした。すべての有害事象は、試験期間中（0、2、4週間後）および後観察の試験終了2週間後について、GSE 摂取の関連性をその重篤性に応じて評価した。また、試験期間中、試験食（GSE 錠剤）に対する拒絶反応や体調不良、病気についても、記録し評価した。試験期間中に観察された全ての有害事象は、試験が終わった後まで追跡調査し、症状が完全に治まったり、安定するまで追跡調査を継続した。GSE 摂取との関連性が疑わしいか否かに関わらず、被験者に重い有害事象が報告されたときは、速やかに治験担当医師に報告するよう手配した。

### 5-2-4 血液検査項目

血液検査（血液学的検査、生化学的検査）は、血液学8項目、酵素等12項目、脂質糖代謝7項目、ミネラル類7項目の計34項目実施した。生化学検査は血清（血液を凝固させて遠心分離した上澄み）または血漿（血液を抗凝固剤で凝固させずに遠心分離した上澄み）を試料とした。

血液学検査項目：白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン（Hb）、ヘマトクリット（Ht）、平均赤血球容積（MCV）、平均ヘモグロビン容積（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、血小板数（Plt）

酵素類検査項目：アスパラギン酸アミノ基転移酵素（AST または GOT）、アラニンアミノ基転移酵素（ALT または GPT）、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ（ $\gamma$ -GTP）、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、A/G 比、クレアチニン、尿素窒素（BUN）、尿酸（UA）

脂質代謝系検査項目：総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、中性脂肪、グルコース（空腹時血糖）、ヘモグロビン Alc（HbA1c）、クレアチンホスホキナーゼ（CPK）

ミネラル類検査項目：ナトリウム（Na）、カリウム（K）、クロル（Cl）、カルシウム（Ca）、無機リン酸（P）、鉄（Fe）、フェリチン

これら一部の検査項目の臨床的な意義を書籍等を参考に表 5-3 にまとめた。これらの検査項目の中には、体調の変化や臓器の異常などに敏感に反応するものもあるため、GSE の摂取による安全性を評価するために実施した。

検査項目の評価は、日本人の基準値範囲よりも超えた場合、すなわち、基準値下限よりも下回ったとき、あるいは、基準値上限よりも上回ったときを異常値と定義し、GSE 摂取との関連性を治験担当医師が評価した。同時に、これらの検査項目の変化が GSE 摂取と因果関係がないかも確認した。

生体試料の採取は、本試験を実施した、やはたクリニック（東京都）と赤塚駅前クリニック（東京都）にて採血した。検査分析は、株式会社ティー・ティー・シーに委託した。

#### 5-2-5 統計解析方法

分析データは、平均値と標準誤差で示した。試験群内における摂取前後の比較を、t-test による検定を両側 5%有意にて評価した。



表 5-1 GSE 錠剤の摂取量と摂取方法

摂取量	1,000 mg 群	1,500 mg 群	2,500 mg 群
朝食後	4 錠	6 錠	10 錠
夕食後	4 錠	6 錠	10 錠
合計（一日あたり）	8 錠	12 錠	20 錠
摂取量（GSE として）	1,000 mg	1,500 mg	2,500 mg
摂取量（PA として）	800 mg	1,200 mg	2,000 mg

表 5-2 試験スケジュール



	摂取前	割付 (1 週間)	摂取 2 週後	摂取 4 週後	後観察 終了 2 週後
選別		○			
測定・問診	○		○	○	○
採血	○		○	○	○
日誌					
試験食品配布		○			
試験食品摂取					

表 5-3 検査項目と臨床的意義（参考）

検査項目	臨床的意義
ヘモグロビン A1c (HbA1c)	ヘモグロビンの $\beta$ 鎖の N 末端にグルコースが結合した糖化蛋白質である。ヘモグロビン A1c のヘモグロビンに対する割合は血中グルコース濃度(血糖値)に依存し、糖尿病治療における血糖コントロールの指標として用いられる。ヘモグロビンの生体内における平均寿命は約 120 日であり、ヘモグロビン A1c のヘモグロビンに対する割合は、過去 1 ヶ月から 2 ヶ月の血糖値の指標となる。なお、2999 人を対象とした 4 年の観察期間の研究結果から、値が 1%上昇すると心血管イベントリスクが 25%上昇するとする報告がある
血中尿素窒素 (BUN)	血中に存在する尿素の量を窒素の量で表したものの。蛋白質終末代謝産物で、腎臓から排出され、腎臓の働きが悪くなると高値となる。それ以外にタンパク質の取りすぎ、脱水、消化管出血等でも高値となる。
フェリチン	貯蔵鉄と結合しているタンパク質。血清フェリチン 1 ng/mL は貯蔵鉄 8~10 mg に相当する。体内で鉄が減少していくと潜在的鉄欠乏状態から鉄欠乏性貧血へと進展。このとき貯蔵鉄は早い段階から利用されて減少するが、血清鉄は貯蔵鉄からの補給により、比較的末期まで低下しない。よって、血清フェリチン値は早期に低下し、血清鉄値は末期まで低下しないことから、鉄欠乏状態を早期に診断するためには血清フェリチン測定は有用。また、血清鉄には日内変動があるため、血清鉄単独では鉄の過不足の指標とはならず、血清フェリチンとの組合せ測定は有用。
アルカリフォスファターゼ (ALP)	血清中の ALP 濃度が上昇する場合には、臓器の壊死や破壊に伴う修復活動として細胞再生が行われており、これに伴って ALP の合成亢進が行われ、

	<p>血中への放出が進んだものと考えられる。臨床検査では ALP は主として肝機能の指標の一つとして扱われることが多い。</p>
<p>乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)</p>	<p>LDH は逸脱酵素として知られ、臨床検査では重要な検査項目のひとつ。血中濃度の上昇は AST、ALT などとともに肝障害を示唆する。ただ、それ以外の面では心筋梗塞、溶血、感染症などでも上昇がみられるため、非特異的で診断の参考としての有用性はあまり高くない。ただ、単独で上昇しているとしたら悪性リンパ腫をはじめとした悪性腫瘍がかくれている可能性を考えられる。総じて、スクリーニング (精密検査必要者のふるい分け) のための検査項目と言える。</p>
<p><math>\gamma</math>-グルタミルトランスペプチダーゼ (<math>\gamma</math>-GTP)</p>	<p>肝臓の解毒作用に関係している酵素。肝臓や胆管の細胞がこわれると血液中に <math>\gamma</math>-GTP が血液の中に流れ出てくる (逸脱酵素)。そのため、<math>\gamma</math>-GTP の上昇は、肝臓や胆管の細胞がこわれたことの指標となる。</p>
<p>アラニンアミノ基転移酵素 (ALT)</p>	<p>ピルビン酸とグルタミン酸をアラニンと <math>\alpha</math>-ケトグルタル酸に相互変換する酵素で、グルタミン酸ピルビン酸転移酵素 (GPT) とも呼ばれる。人体のほとんどの組織に含まれている。とくに肝臓の細胞への分布が多い。したがって、肝細胞の破壊や細胞膜の透過性亢進の際には血中濃度が上昇する (逸脱酵素)。肝臓の逸脱酵素として ALT とともに知られる AST(GOT)よりも特異性 (肝臓以外の障害では上がりにくい) が高く、AST との比率も臨床的に意義がある。</p>
<p>クレアチン</p>	<p>血液中のクレアチニンの数値が高いのは、腎機能が低下していることを示唆し、低い場合は、筋肉に関わる異常が想定される。日本人間ドック学会の判定基準では、男性が 1.2~1.3 mg/dL、女性が 0.9~1.0 mg/dL は、場合により経過観察が必要とされて</p>

	<p>いる。一般に中程度の腎不全では 1.5 mg/dL を超え、重症では 2.4 mg/dL 以上。5 mg/dL を超えると回復は難しくなり、10 mg/dL が人工透析を始める一つの目安となる。</p>
<p>クレアチンホスホキナーゼ (CPK)</p>	<p>筋肉の収縮の際にエネルギー代謝に関与している。骨格筋・心筋が障害を受けた際に血液中へ流出する逸脱酵素として临床上重要である。心筋梗塞、筋炎、筋ジストロフィーなど心筋障害・筋疾患で血中濃度が上昇する。ただし、激しい運動などでも筋線維が壊れるため CK の上昇がみられることがある。</p>
<p>アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST)</p>	<p>アスパラギン酸と <math>\alpha</math>-ケトグルタル酸をオキサロ酢酸とグルタミン酸に相互変換する酵素である。人体では、肝細胞をはじめとして赤血球、心筋、骨格筋などに分布する。これらの細胞が破壊された場合には血液中に流出するため、肝機能障害の程度を評価する目的で血清中の AST 濃度測定が行われる。</p>

### 第3節 結果

#### 5-3-1 被験者の身体測定

本試験に当初登録された30人のうち、1人（GSEの1,500 mg摂取群）が個人的な理由で試験を継続できなかった。残る29人をバランスよく3グループに分割し、摂取前の身体検査は全項目について問題なかったため、4週間摂取試験および2週間の後観察試験を開始し、29人全員が試験を完了し、全ての検査結果を安全性評価に活用した。3つの各試験群の人数、男女比、平均年齢、平均体重、平均身長、平均血圧、平均心拍数を表5-4に示す。

#### 5-3-2 有害事象

GSE摂取量の異なる3つの全試験群で、6週間（摂取4週間と後観察2週間）の試験期間中、深刻な有害事象や身体的兆候、各種の検査データは認められないと、治験担当医は評価した。被験者全員が、有害事象や異常な身体的兆候、検査値の異常値を原因として、試験食（GSE錠剤）の摂取を中止することはなかった。しかし、29人中6人に軽度の有害事象が認められた。1人はGSE摂取1,000 mg群（全10人）に参加した被験者で、3人がGSE摂取1,500 mg群（全9人）に参加した被験者、2人がGSE摂取2,500 mg群（全10人）に参加した被験者であった（表5-5）。これらの有害事象は、吐き気、便秘、下痢、頭痛であり、試験期間中の通算では10回の記録となった。

表 5-4 各 GSE 試験群の被験者の身体的数値（値は平均値±標準誤差で示す）

試験群	GSE 摂取群 (mg)		
	1,000	1,500	2,500
(男性 / 女性)	( 4 / 6 )	( 4 / 5 )	( 5 / 5 )
平均年齢 (歳)	36.2 ± 3.2	39.9 ± 3.5	38.9 ± 4.5
平均体重 (kg)	60.4 ± 3.8	60.6 ± 3.6	60.5 ± 2.6
平均身長 (cm)	163.7 ± 3.2	164.9 ± 3.2	162.1 ± 2.4
収縮期血圧(mm Hg)	110.0 ± 6.0	113.3 ± 6.1	115.9 ± 3.5
拡張期血圧(mm Hg)	64.8 ± 5.0	63.6 ± 2.5	70.4 ± 4.3
心拍数 (回／分)	71.4 ± 2.9	76.6 ± 4.0	66.2 ± 2.8

表 5-5 有害事象のべ数 各数は1人または複数の被験者が試験期間中（4週間の摂取と2週間の後観察）に訴えた各症状の総数を合算

	GSE 摂取群 (mg)		
	1,000 (n = 10)	1,500 (n = 9)	2,500 (n = 10)
Total subjects with adverse events	1	3	2
Total adverse events	2	3	5
(Intervention-related)	(0)	(0)	(0)
Total serious adverse events	0	0	0
Adverse events observed (all causality):			
Headache	0	1	3
Nausea	0	1	2
Constipation	1	1	0
Diarrhea	1	0	0

### 5-3-3 血液検査

#### 5-3-3-1 血液検査における個別の異常値

表 5-6 に示す通り、GSE 摂取 1,000 mg 群において 1 人、GSE 摂取 2,500 mg 群において 3 人が、生化学検査で有意な変化を示した。GSE 摂取 1,000 mg 群の 1 人（被験者番号 A-12）は、後観察 2 週間後で、クレアチニンホスホキナーゼ（CPK）が日本男性の基準範囲である 50~230 IU/L を超えて 2,009 IU/L へ上昇した。また、GSE 摂取 2,500 mg 群の 3 人（被験者番号 A-004、A-017、A-010）に日本人男性の各基準範囲を超える検査結果が観察された。CPK および乳酸脱水素酵素（LDH）は、試験開始時に基準範囲内であったが、摂取 4 週間後には、被験者番号 A-004 の CPK が 333 IU/L、LDH が 254 IU/L へ、被験者番号 A-017 の CPK が 1,083 IU/L、LDH が 357 IU/L へそれぞれ上昇した。各数値は、2 週間後にはいずれも基準範囲内に戻った。

#### 5-3-3-2 血液学的検査 8 項目の結果

GSE 1,000 mg 群では、WBC、RBC、Hb、Ht、MCH、Plt のいずれも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、摂取終了 2 週後の MCV が有意 ( $p < 0.01$ ) に上昇（変化量は +1.7）した。

GSE 1,500 mg 群では、WBC、RBC、Hb、MCH、Plt のいずれも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、4 週目の Ht が有意 ( $p < 0.01$ ) に減少（変化量は -1.49）し、4 週目、摂取終了 2 週目の MCV がそれぞれ有意 ( $p < 0.01$ ) に減少（変化量は -2.33、-3.45）した。2 週目、4 週目、摂取終了 2 週目の MCHC がそれぞれ有意（2 週目、摂取終了 2 週目は  $p < 0.05$ 、4 週目は  $p < 0.01$ ）に上昇（変化量は 0.8、0.76、1.27）した。

GSE 2,500 mg 群では、Hb、MCV、MCH、MCHC が摂取前と比べて試験期間中に有意に変動した。Hb は摂取 2 週後に減少 ( $p < 0.05$ 、変化量 -0.4) した。MCV はそれぞれ増加し、摂取 2 週後 ( $p < 0.05$ 、変化量 +1.3)、摂取 4 週後 ( $p < 0.01$ 、変化量 +1.0)、摂取終了 2 週後 ( $p < 0.05$ 、変化量 +1.5) であった。MCH は摂取 2 週後に減少 ( $p < 0.05$ 、変化量 -0.4) した。MCHC はそれぞれ減少し摂取 2 週後 ( $p < 0.05$ 、変化量 -0.5)、摂取 4 週後 ( $p < 0.01$ 、変化量 -0.8)、摂取終了 2 週後 ( $p < 0.01$ 、変化量 -0.9) であった（表 5-7）。

#### 5-3-3-3 血液生化学的検査 12 項目の結果

GSE 1,000 mg 群の AST(GOT)、ALT(GPT)、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン、A/G



比のいずれも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、4 週目の総蛋白、アルブミンが有意（総蛋白は $p < 0.01$ 、アルブミンは $p < 0.05$ ）に上昇（変化量は総蛋白 $+0.22$  g/dL、アルブミン $+0.15$  g/dL）した。また、クレアチニン、尿酸のいずれも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、摂取終了 2 週後の尿素窒素が有意（ $p < 0.05$ ）に上昇（変化量は $+1.9$  mg/dL）した。

GSE 1,500 mg 群の AST(GOT)、ALT(GPT)、LDH、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、A/G 比のいずれも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、4 週目の  $\gamma$ -GTP が有意（ $p < 0.05$ ）に減少（変化量は $-3.11$  IU/L）した。ALP は 2 週目  $5.88$  U/L、4 週目  $13.55$  U/L、摂取終了 2 週目  $14.77$  U/L と減少する傾向がみられた。クレアチニン、尿素窒素は、いずれも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、4 週目、6 週目の尿酸がそれぞれ有意（4 週目は $p < 0.05$ 、摂取終了 2 週目は $p < 0.01$ ）に上昇（変化量は $+0.27$  mg/dL、 $+0.31$  mg/dL）した。

GSE 2,500 mg 群の ALP、総蛋白、アルブミン、尿酸で有意な変動が観察された。ALP は摂取 2 週後に上昇（ $p < 0.05$ 、変化量 $+7.6$  IU/L）、総蛋白は摂取 4 週後に低下（ $p < 0.01$ 、変化量 $-0.2$  g/dL）、アルブミンは摂取 4 週後に低下（ $p < 0.01$ 、変化量 $-0.2$  g/dL）、摂取終了 2 週後にも低下（ $p < 0.05$ 、変化量 $-0.1$  g/dL）、尿酸は摂取 4 週後に低下した（ $p < 0.01$ 、変化量 $-0.8$  mg/dL）（表 5-8）。

#### 5-3-3-4 脂質および糖代謝関係 7 項目の結果

GSE 1,000 mg 群は中性脂肪を除いて、いずれの項目にも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、中性脂肪が 2 週目  $18.8$  mg/dL、4 週目  $24.8$  mg/dL、摂取終了 2 週目  $28.8$  mg/dL と上昇傾向（摂取終了 2 週目で $p = 0.076$ ）がみられた。

GSE 1,500 mg 群は LDL-コレステロールを除いて、いずれも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、2 週目の LDL-コレステロールが有意（ $p < 0.05$ ）に上昇（変化量は $+6.33$  mg/dL）した。空腹時血糖値は摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、2 週目の HbA1C が有意（ $p < 0.05$ ）に減少（変化量は $-0.15\%$ ）した。

GSE 2,500 mg 群は、摂取 4 週後で総コレステロールと LDL-コレステロールが有意に低下した（ $p < 0.01$ 、変化量 $-16.6$  mg/dL）（ $p < 0.05$ 、変化量 $-11.2$  mg dL）。また、HbA1c が摂取 4 週後（ $p < 0.05$ 、変化量 $-0.1\%$ ）と摂取終了 2 週後（ $p < 0.05$ 、変化量 $-0.3\%$ ）

でそれぞれ低下した（表 5-9）。

#### 5-3-3-5 血中ミネラル（Na、K、Cl、Ca、P、Fe）およびフェリチンの 7 項目の結果

GSE 1,000 mg 群は血中 K、血中 P を除いて、いずれの項目にも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、4 週目の血中 K が有意 ( $p < 0.01$ ) に減少（変化量は  $-0.24 \text{ mEq/L}$ ）した。また、2 週目、4 週目、摂取終了 2 週目の血中 P がそれぞれ有意 ( $p < 0.01$ ) に上昇（変化量は  $0.52 \text{ mg/dL}$ 、 $0.78 \text{ mg/dL}$ 、 $1.04 \text{ mg/dL}$ ）した。

GSE 1,500 mg 群は血中 Na、血中 K、血中 P を除いて、いずれの項目にも摂取前、2 週後、4 週後、摂取終了 2 週後を通して大きな変動はみられなかったが、2 週目、4 週目、摂取終了 2 週目の血中 Na がそれぞれ有意（2 週目は  $p < 0.05$ 、4 週目、摂取終了 2 週目は  $p < 0.01$ ）に減少（変化量は  $-1.88 \text{ mEq/L}$ 、 $-2.77 \text{ mEq/L}$ 、 $-3.33 \text{ mEq/L}$ ）し、2 週目の血中 P が有意に ( $p < 0.05$ ) 減少（変化量は  $-0.30 \text{ mg/dL}$ ）した。また、2 週目、4 週目、摂取終了 2 週目の血中 K がそれぞれ有意（2 週目は  $p < 0.05$ 、4 週目、摂取終了 2 週目は  $p < 0.01$ ）に上昇（変化量は  $0.81 \text{ mEq/L}$ 、 $1.41 \text{ mEq/L}$ 、 $1.77 \text{ mEq/L}$ ）した。

GSE 2,500 mg 群は、フェリチンが 4 週後に摂取前から有意に低下した。鉄は、2 名で、摂取前が基準外の高値（ID010 :  $205 \text{ } \mu\text{g/dL}$ 、ID017 :  $182 \text{ } \mu\text{g/dL}$ ）であったが、摂取後に基準値外の低値（ID010 の 2 週後 :  $60 \text{ } \mu\text{g/dL}$ 、ID017 の 2 週後及び 4 週後 :  $61$  および  $49 \text{ } \mu\text{g/dL}$ ）がみられ、後観察では共に高値（ID010 :  $189 \text{ } \mu\text{g/dL}$ 、ID017 :  $210 \text{ } \mu\text{g/dL}$ ）に戻った。その他、Cl、Ca、P で有意な変化が観察されたが、極めて小さい変動であった（表 5-10）。

表 5-6 血液検査で有意差の観察された項目、その時の試験中止の必要性、GSE 摂取との関連性

Group	Subject no.	Sex•age (years)	Laboratory tests with abnormal results				Discontinuation or medical treatment	Caused by GSE
			Items	Reference values	Test values	Point in time of testing		
1,000 mg ( <i>n</i> = 10)	A-12	Male•22	CPK (IU/L)	50–230	2,009	Post-week 2 <sup>a</sup>	No	No
2,500 mg ( <i>n</i> = 10)	A-004	Male•57	CPK (IU/L)	50–230	333	Week 4	No	No
			LDH (IU/L)	60–240	254	Week 4	No	No
			CPK (IU/L)	50–230	1,083	Week 4	No	No
			LDH (IU/L)	60–240	357	Week 4	No	No
	A-017	Male•21			205	Week 0		
			Fe (μg/100 mL)	80–170	61	Week 2	No	Possible
					49	Week 4		
					210	Post-week 2		
			A-010	Male•55	Fe (μg/100 mL)	80–170	182	Week 0
	60	Week 2						
105	Week 4							
189	Post-week 2							

表 5-7 4 週間の GSE 摂取における血液学的検査 8 項目の結果

		GSE 1,000 mg group ( <i>n</i> = 10)			
Biological parameters		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
WBC	(per $\mu\text{L}$ )	4470 $\pm$ 408	3970 $\pm$ 238	4270 $\pm$ 372	4420 $\pm$ 359
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	439 $\pm$ 11	440 $\pm$ 10	442 $\pm$ 13	427 $\pm$ 8
Hb	(g/dL)	13.3 $\pm$ 0.5	13.2 $\pm$ 0.4	13.7 $\pm$ 0.7	13.0 $\pm$ 0.4
Ht	(%)	42.1 $\pm$ 1.3	41.9 $\pm$ 1.2	42.3 $\pm$ 1.3	41.7 $\pm$ 1.1
MCV	(fl)	96.0 $\pm$ 1.8	95.2 $\pm$ 2.0	96.0 $\pm$ 2.1	97.7 $\pm$ 2.0**
MCH	(pg)	30.2 $\pm$ 0.8	29.9 $\pm$ 0.7	30.3 $\pm$ 0.8	30.4 $\pm$ 0.7
MCHC	(%)	31.5 $\pm$ 0.5	31.4 $\pm$ 0.4	31.4 $\pm$ 0.3	31.1 $\pm$ 0.2
Plt	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	24.1 $\pm$ 1.2	23.4 $\pm$ 1.1	23.6 $\pm$ 1.2	23.5 $\pm$ 1.3
** Baselineと比較し1%有意差あり					
		GSE 1,500 mg group ( <i>n</i> = 9)			
Biological parameters		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
WBC	(per $\mu\text{L}$ )	4989 $\pm$ 389	4889 $\pm$ 383	5022 $\pm$ 372	4978 $\pm$ 388
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	437 $\pm$ 17	430 $\pm$ 16	432 $\pm$ 15	436 $\pm$ 19
Hb	(g/dL)	13.7 $\pm$ 0.6	13.6 $\pm$ 0.6	13.5 $\pm$ 0.5	13.7 $\pm$ 0.6
Ht	(%)	42.7 $\pm$ 1.5	41.4 $\pm$ 1.5	41.2 $\pm$ 1.4**	41.1 $\pm$ 1.6
MCV	(fl)	97.9 $\pm$ 1.4	96.1 $\pm$ 1.4	95.6 $\pm$ 1.3**	94.4 $\pm$ 1.4**
MCH	(pg)	31.3 $\pm$ 0.4	31.5 $\pm$ 0.4	31.2 $\pm$ 0.4	31.4 $\pm$ 0.5
MCHC	(%)	32.0 $\pm$ 0.3	32.8 $\pm$ 0.4*	32.7 $\pm$ 0.3**	33.2 $\pm$ 0.3
Plt	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	23.0 $\pm$ 0.9	24.1 $\pm$ 1.0	23.9 $\pm$ 0.7	23.7 $\pm$ 1.2
* Baselineと比較し5%有意差あり、** 同、1%有意差あり					
		GSE 2,500 mg group ( <i>n</i> = 10)			
Biological parameters		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
WBC	(per $\mu\text{L}$ )	5570 $\pm$ 599	5250 $\pm$ 473	5370 $\pm$ 548	5970 $\pm$ 610
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	461 $\pm$ 15	460 $\pm$ 14	456 $\pm$ 16	462 $\pm$ 16
Hb	(g/dL)	14.5 $\pm$ 0.5	14.4 $\pm$ 0.5	14.1 $\pm$ 0.5*	14.3 $\pm$ 0.5
Ht	(%)	43.8 $\pm$ 1.3	44.3 $\pm$ 1.4	43.7 $\pm$ 1.4	44.5 $\pm$ 1.5
MCV	(fl)	95.1 $\pm$ 2.2	96.4 $\pm$ 2.2*	96.1 $\pm$ 2.2**	96.6 $\pm$ 2.2*
MCH	(pg)	31.4 $\pm$ 0.7	31.3 $\pm$ 0.7	31.0 $\pm$ 0.6*	31.0 $\pm$ 0.6
MCHC	(%)	33.0 $\pm$ 0.2	32.5 $\pm$ 0.3*	32.2 $\pm$ 0.2**	32.1 $\pm$ 0.3**
Plt	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	24.1 $\pm$ 1.5	22.2 $\pm$ 1.6	22.8 $\pm$ 1.4	22.8 $\pm$ 1.0
* Baselineと比較し5%有意差あり、** 同、1%有意差あり					

表 5-8 4 週間の GSE 摂取における血液生化学的検査 12 項目の結果

Biological parameters		GSE 1,000 mg group (n = 10)			
		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
AST	(IU/L)	17.0 ± 1.3	17.1 ± 1.0	15.9 ± 0.6	19.7 ± 3.4
ALT	(IU/L)	13.2 ± 1.3	12.2 ± 1.4	12.5 ± 1.5	14.0 ± 1.4
LDH	(IU/L)	188.9 ± 9.1	203.8 ± 10.9	194.2 ± 7.7	212.8 ± 16.9
ALP	(IU/L)	177.9 ± 9.7	175.9 ± 10.0	183.1 ± 12.8	180.1 ± 12.1
γ-GTP	(IU/L)	29.5 ± 6.7	29.2 ± 10.1	33.0 ± 10.1	30.1 ± 7.4
Total bilirubin	(mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Total protein	(g/dL)	7.0 ± 0.1	6.9 ± 0.1	7.2 ± 0.1**	7.1 ± 0.1
Albumin	(g/dL)	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1*	4.5 ± 0.1
A/G ratio		1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Creatinine	(mg/dL)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
BUN	(mg/dL)	11.3 ± 0.5	11.5 ± 0.7	12.1 ± 1.0	13.2 ± 1.0
UA	(mg/dL)	4.8 ± 0.4	4.7 ± 0.4	4.8 ± 0.4	4.7 ± 0.5

\* Baselineと比較し5%有意差あり、\*\* 同、1%有意差あり

Biological parameters		GSE 1,500 mg group (n = 9)			
		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
AST	(IU/L)	19.3 ± 2.1	18.3 ± 1.7	18.4 ± 2.0	18.4 ± 1.5
ALT	(IU/L)	15.8 ± 1.6	14.8 ± 1.7	13.9 ± 1.6	14.3 ± 2.0
LDH	(IU/L)	201.6 ± 6.8	199.0 ± 6.6	201.0 ± 11.6	205.8 ± 9.1
ALP	(IU/L)	199.4 ± 18.4	193.6 ± 14.9	185.9 ± 11.9*	184.7 ± 11.9
γ-GTP	(IU/L)	25.8 ± 6.8	26.3 ± 7.9	22.7 ± 5.7*	22.7 ± 4.5
Total bilirubin	(mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Total protein	(g/dL)	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.3 ± 0.1
Albumin	(g/dL)	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1
A/G ratio		1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Creatinine	(mg/dL)	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0
BUN	(mg/dL)	13.7 ± 1.0	12.7 ± 0.9	13.6 ± 1.3	12.9 ± 1.1
UA	(mg/dL)	5.2 ± 0.5	5.2 ± 0.5	5.4 ± 0.5*	5.5 ± 0.5

\* Baselineと比較し5%有意差あり

Biological parameters		GSE 2,500 mg group (n = 10)			
		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
AST	(IU/L)	18.1 ± 1.7	17.1 ± 1.1	19.1 ± 2.1	17.1 ± 1.5
ALT	(IU/L)	16.8 ± 1.9	15.0 ± 1.1	18.1 ± 1.5	16.9 ± 1.9
LDH	(IU/L)	198.0 ± 8.1	196.1 ± 5.9	209.8 ± 18.7	191.6 ± 6.1
ALP	(IU/L)	183.1 ± 16.0	190.7 ± 17.9*	188.1 ± 16.5	191.1 ± 17.8
γ-GTP	(IU/L)	17.7 ± 3.8	17.3 ± 2.7	17.0 ± 2.7	16.7 ± 2.5
Total bilirubin	(mg/dL)	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Total protein	(g/dL)	7.4 ± 0.1	7.3 ± 0.1	7.2 ± 0.2**	7.3 ± 0.1
Albumin	(g/dL)	4.8 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1**	4.6 ± 0.1*
A/G ratio		1.8 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.0
Creatinine	(mg/dL)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0*	0.9 ± 0.1
BUN	(mg/dL)	13.5 ± 1.1	12.7 ± 1.5	12.3 ± 1.1	13.9 ± 1.8
UA	(mg/dL)	5.5 ± 0.5	4.9 ± 0.3	4.7 ± 0.3**	5.1 ± 0.4

\* Baselineと比較し5%有意差あり、\*\* 同、1%有意差あり

表 5-9 4 週間の GSE 摂取における脂質および糖代謝関係 7 項目の結果

Biological parameters		GSE 1,000 mg group (n = 10)			
		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
Total cholesterol	(mg/dL)	187.0 ± 8.4	181.1 ± 7.0	185.6 ± 7.6	185.2 ± 8.3
HDL-cholesterol	(mg/dL)	61.2 ± 4.1	59.1 ± 4.2	61.8 ± 3.9	59.1 ± 3.6
LDL-cholesterol	(mg/dL)	115.9 ± 7.8	109.8 ± 7.0	111.9 ± 8.1	110.5 ± 7.4
Triglycerides	(mg/dL)	122.1 ± 20.5	140.9 ± 30.5	146.9 ± 23.5	150.9 ± 28.4
Glucose	(mg/dL)	87.5 ± 2.4	86.8 ± 1.5	87.6 ± 2.3	89.7 ± 2.4
HbA1c	(%)	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.0 ± 0.1
CPK	(IU/L)	111.3 ± 18.9	135.9 ± 25.9	128.6 ± 13.8	123.6 ± 17.2

Biological parameters		GSE 1,500 mg group (n = 9)			
		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
Total cholesterol	(mg/dL)	190.1 ± 15.2	184.2 ± 11.6	181.1 ± 12.9	192.4 ± 12.8
HDL-cholesterol	(mg/dL)	66.7 ± 6.2	63.9 ± 5.8	61.4 ± 3.8	62.8 ± 4.6
LDL-cholesterol	(mg/dL)	102.7 ± 7.6	109.0 ± 8.2*	106.0 ± 11.0	111.2 ± 9.6
Triglycerides	(mg/dL)	149.1 ± 51.0	116.8 ± 22.9	104.4 ± 17.4	113.9 ± 25.5
Glucose	(mg/dL)	88.9 ± 3.0	87.2 ± 3.2	87.9 ± 3.1	88.4 ± 2.8
HbA1c	(%)	5.0 ± 0.1	4.9 ± 0.1*	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1
CPK	(IU/L)	124.0 ± 19.0	95.9 ± 13.6	102.9 ± 13.4	97.6 ± 15.4

\* Baseline と比較し 5%有意差あり

Biological parameters		GSE 2,500 mg group (n = 10)			
		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
Total cholesterol	(mg/dL)	204.2 ± 13.3	189.7 ± 15.1	187.6 ± 9.9**	189.5 ± 8.5
HDL-cholesterol	(mg/dL)	59.2 ± 3.8	59.6 ± 2.1	57.5 ± 4.4	57.8 ± 3.0
LDL-cholesterol	(mg/dL)	122.5 ± 11.4	118.7 ± 13.9	111.3 ± 9.1*	112.5 ± 7.9
Triglycerides	(mg/dL)	110.9 ± 20.6	110.4 ± 12.9	121.8 ± 22.4	121.4 ± 30.7
Glucose	(mg/dL)	88.0 ± 3.9	92.3 ± 3.2	92.0 ± 1.7	89.9 ± 2.5
HbA1c	(%)	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.1 ± 0.1*	4.9 ± 0.1**
CPK	(IU/L)	116.0 ± 11.6	127.2 ± 18.7	225.1 ± 98.6	113.8 ± 13.7

\* Baseline と比較し 5%有意差あり、\*\* 同、1%有意差あり

表 5-10 4 週間の GSE 摂取における血中ミネラルおよびフェリチン 7 項目の結果

		GSE 1,000 mg group (n = 10)			
Biological parameters		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
Na	(mEq/L)	142.8 ± 0.5	142.4 ± 0.5	141.8 ± 0.5	142.1 ± 0.5
K	(mEq/L)	3.9 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.1**	3.7 ± 0.1
Cl	(mEq/L)	103.4 ± 0.5	103.5 ± 0.4	103.7 ± 0.5	103.1 ± 0.3
Ca	(mg/dL)	8.7 ± 0.1	8.7 ± 0.1	8.7 ± 0.1	8.7 ± 0.1
Inorganic P	(mg/dL)	3.0 ± 0.1	3.5 ± 0.1**	3.8 ± 0.1**	4.1 ± 0.2**
Fe	(µg/dL)	107.6 ± 18.3	113.5 ± 13.7	113.8 ± 16.0	102.2 ± 17.1
Ferritin	(ng/mL)	82.2 ± 31.2	85.5 ± 34.1	92.9 ± 37.2	88.8 ± 36.7
** Baselineと比較し1%有意差あり					

		GSE 1,500 mg group (n = 9)			
Biological parameters		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
Na	(mEq/L)	142.4 ± 0.7	140.6 ± 0.5*	139.7 ± 0.5**	139.1 ± 0.6**
K	(mEq/L)	3.7 ± 0.1	4.5 ± 0.3*	5.1 ± 0.2**	5.4 ± 0.2**
Cl	(mEq/L)	103.6 ± 0.9	102.8 ± 0.6	104.0 ± 0.7	103.4 ± 0.7
Ca	(mg/dL)	9.0 ± 0.1	8.9 ± 0.1	9.0 ± 0.1	8.9 ± 0.2
Inorganic P	(mg/dL)	3.7 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.2
Fe	(µg/dL)	113.8 ± 16.2	114.9 ± 9.7	120.3 ± 16.5	113.2 ± 11.9
Ferritin	(ng/mL)	58.7 ± 15.7	66.1 ± 17.8	63.4 ± 18.9	56.9 ± 17.8
* Baselineと比較し5%有意差あり、** 同、1%有意差あり					

		GSE 2,500 mg group (n = 10)			
Biological parameters		Baseline	Week 2	Week 4	Post-week 2
Na	(mEq/L)	142.7 ± 0.4	143.5 ± 0.9	143.5 ± 0.5	142.5 ± 0.5
K	(mEq/L)	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1
Cl	(mEq/L)	103.0 ± 0.4	103.8 ± 0.7	104.4 ± 0.6*	103.4 ± 0.8
Ca	(mg/dL)	9.7 ± 0.1	9.2 ± 0.1**	9.2 ± 0.1**	9.1 ± 0.1**
Inorganic P	(mg/dL)	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1**	3.2 ± 0.2
Fe	(µg/dL)	127.0 ± 17.7	104.8 ± 10.7	121.5 ± 25.7	123.7 ± 21.1
Ferritin	(ng/mL)	87.4 ± 16.1	66.8 ± 12.7	64.0 ± 13.1*	69.1 ± 15.9
* Baselineと比較し5%有意差あり、** 同、1%有意差あり					

## 第4節 考察

被験者が自覚症状として訴えた6人の通算10回の有害事象は、GSE錠剤の摂取による影響の可能性を治験担当医によって指摘されたため、因果関係を詳しく検討した。吐き気と頭痛の原因を検討した結果、被験者の単なる体調不良、すなわち寝不足に起因することが自己申告と問診結果から判明したため、担当医は最終的にGSE錠剤の摂取とは関連性の無い事象であると判断した。次に便秘と下痢は、GSE摂取期間中に連続ないしは断続的に発生しておらず一過性であったことから、GSE錠剤の摂取に起因するのではなく、被験者の日常的な変動幅の範囲内で起こった事象であると担当医は判断した。これら全ての有害事象は軽度であり、一過性の症状であったことから、治験担当医は上記6人に対しGSE錠剤の摂取の中止や試験の中止、治療は指示せず、試験を継続させた。以上により、これら全ての自覚症状としての有害事象は、試験食と関連性が無いと判断した。

クレアチンホスホキナーゼ（CPK）または乳酸脱水素酵素（LDH）が上昇した被験者が、GSE摂取1,000 mg摂取群で1名、GSE摂取2,500 mg摂取群で2名、それぞれ観察された。CPKまたはLDHの異常値、本試験では日本人の基準範囲よりも高値を示したため、CPKの上昇では、骨格筋または心筋の障害が、LDHの上昇では、肝障害、心筋梗塞、溶血、感染症の疑いが考えられた。一方で、CPKとLDHの臨床的な意義は、前述のマーカーであるものの、特異性が高くないことが指摘されており、他の検査項目の変化とあわせて診断することが大切である。そこで、肝障害が生じた際に特異的な検査項目のアスパラギン酸アミノ基転移酵素（AST）およびアラニンアミノ基転移酵素（ALT）の数値変化をこの2名について確認した。その結果、AST、ALT共には有意な変動を来しておらず、上述のCPKまたはLDHのみの有意な上昇であったことから、肝障害を起こした可能性は除外された。ASTやALTの上昇が見られず、LDHやCPKの上昇のみが見られることから、筋肉に障害が起きたか、あるいは、溶血を起こしたかの可能性が生化学的検査から示唆された。これらの示唆に加え、被験者の日誌および医師の問診記録を確認したところ、上記2名は、少なくとも前日に、比較的激しい運動（ジョギング、テニス）を行っていたことが確認された。CPKおよびLDHは、運動によって損傷を受けた筋肉または赤血球より逸脱する。従って、当該被験者のCPKまたはLDHの上昇は、前日の運動に起因するものであって、摂取したGSE錠剤に起因するものではないと判定された。

血中の鉄濃度で有意な変動が2名の被験者で観察された。GSE摂取2,500 mg群の2名（被験者番号A-017、同A-010）において、試験開始日（0日目）の血中鉄濃度が205



μg/mL と 182 μg/mL であった数値(日本人基準範囲 80–170 μg/mL よりも高値であった)が、摂取 2 週間後には、61 μg/mL と 60 μg/mL へ、日本人基準範囲の下限値 80 μg/mL を超えて有意に低下した。摂取 4 週間後には、被験者 A-017 のみ 49 μg/mL と低値が続いたが、被験者 A-010 では 313 μg/mL であり、むしろ高値であった。4 週間の摂取後の後観察 2 週間後には、再び摂取前の高値域である 210 μg/mL と 189 μg/mL となった。これらの変動は、GSE 摂取が原因と考えられた。血中鉄濃度は、食べ物に影響を受ける。鉄を含む食材に、動物性由来と植物性由来とがある。前者は、肉や魚に含まれる鉄であり、ヘモグロビンを構成する 4 つのヘム中に鉄イオンが配位している(ポルフィリン誘導体)。ポルフィリン誘導体中の鉄、すなわちヘム鉄は、図 5-1 のように鉄イオンがペプチドに包まれたようなキレート構造となっている。後者の植物性由来の鉄は、ハウレンソウやコマツナ等の野菜類に含まれているが、遊離した鉄イオンの状態で存在しており(非ヘム鉄)、ヘム鉄のような構造とは異なる。ヘム鉄と非ヘム鉄で、ヒト血中への鉄の吸収率に差異があることが古くから報告されている。Björn-Rausumessen et al. (1974) は、ヘム鉄の吸収率 37% に対し非ヘム鉄の吸収率は 6% 余、Hallberg et al. (1979) の報告でも同様に、ヘム鉄が 25% に対し非ヘム鉄が 10% と、ヘム鉄の吸収率の方が、非ヘム鉄よりも高いことが知られている。また、非ヘム鉄の生体への吸収率は、フィチン酸やタンニン、塩化亜鉛(II)、緑茶抽出物によって阻害されることが、Caco-2 モデルを用いた腸管吸収モデルで示されている(Raymond et al., 2002; Samman et al., 2001)。これらのことから、本研究で観察された血中鉄濃度の有意な低下の原因は、タンニンの一種でもある PA によって鉄の吸収率が低下したことと考えられると同時に、該当する被験者の食生活が、非ヘム鉄を多く含むものであったために有意な低下が観察されたことが考えられる。被験者 A-017 では、GSE 摂取期間中の 2 回の検査において、いずれも低値を示したことから、普段から野菜中心の非ヘム鉄を多く含む食生活であったことが考えられる。次に被験者 A-010 では、摂取 2 週間後の検査では 60 μg/mL と有意な低値を示し、同様の食生活に起因することが考えられたが、摂取 4 週間後の検査では、むしろ 313 μg/mL と高値を示したことから、摂取 4 週間目に肉や魚介類を摂取したためと推測された。GSE 摂取終了 2 週間後の検査では、被験者 A-017、A-010 共に、摂取前の水準、日本人の基準範囲よりもやや高値域に戻ったことから、この両名の食生活は、基本的には野菜中心であったことがうかがえると同時に、GSE 摂取による鉄の吸収阻害の影響は、GSE 摂取期間中に生じる現象であって、恒久的な現象ではないことがわかる。この 2 名の血中鉄濃度に関連する他の検査項目を見てみると、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット、フェリチンは、後観察も含めた試験期間中、有意な変化も日本人基準値からの逸脱も観察されていなかった。これらの事実は、血液検査上の有害事象である貧

血は起こしていない。Akazome et al. (2005) は、リンゴポリフェノールを一日 1,500 mg まで投与させたときには、鉄の吸収阻害は観察されなかったと報告している。しかしながら、ポリフェノールの摂取はノンヘム鉄の吸収を阻害するため鉄不足の地域住民には注意喚起が必要である、と提唱されていることから（ポリフェノールと健康に関する国際会議, 2003）、摂取上の注意喚起としてサプリメントへの注意記載や啓蒙活動が大切である。

その他の検査項目において、表5-7～表5-10に示す通り試験期間中に有意差が出た項目がいくつかあった。しかし、これらの変動は日本人の基準範囲内の変動であり、GSE 摂取との関連性は認められないと判断した。

今回の試験は、GSE摂取量が1,000 mg、1,500 mg、2,500 mg、摂取期間が4週間の、従来報告にない安全性に焦点を置いた体系的な臨床試験である。しかし被験者の人数が1つの群あたり9～10人と限られた人数であり、十分な母集団とは言えない。今回の知見からPA を含むGSEの安全性は、被験者の食生活、投与量、人種など、それぞれの階層で分けた更なる評価を加えていくことが必要であろう。本試験では、この限られた人数が今後の課題ではあるが、安全性に焦点を当てた本研究は初めての試みであり、試験結果としては概ね安全と判定されており、一人の脱落者も出ることなく4週間連続摂取を含む試験を完了した。従来不明であったGSE摂取による有害事象や血液検査結果は、GSEやGSE由来PAを様々な食品へ利用する際の有益な安全性情報である。本研究結果は、動物実験で示されてきた安全性（Yamakoshi et al 2002）をヒトで立証しただけでなく、間接的なヒトでの安全性評価（Preuss et al., 2000; Vigna et al., 2003; Sano et al., 2007; Sano et al., 2013）を強く裏付けるものである。

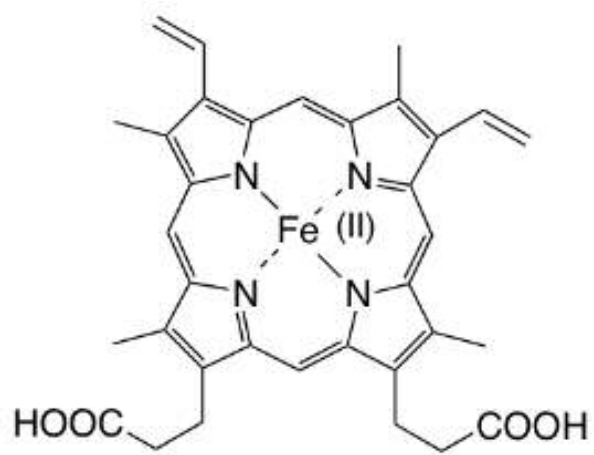


図5-1 ヘム鉄の構造

## 第6章 総合考察

本研究では、プロアントシアニジン (PA) を豊富に含むブドウ種子抽出物 (GSE) のヒトでの有用性を、血中移行分析、血中酸化 LDL の改善、血管機能の維持による下肢むくみ改善、大量摂取による安全性の確認を通じて検証した。これまで明確ではなかったポリフェノールの混合物である GSE を題材とした一連の研究で明らかにした内容は、安全で確かな食品機能を有する食品素材として、普段の日常生活の健康増進に寄与する代替医療としてその存在価値を高めることにつながっていくものと確信する。本研究で取り上げた GSE は、食品の製造工程でフラバノール純度 (GSE 中では単量体と多量体 PA に相当) が 80% を超え、また安価であることから、現時点では最も PA を効率的に摂取できる材料であると言えよう。強い収斂味を呈することで知られる渋柿もまた豊富な PA 源かつ古い食経験を有することが 6 世紀の「齊民要術」に記載されている。また、カカオポリフェノールとして知られる低分子の PA と (-)-エピカテキンを含む素材は、食経験の歴史では劣るもののチョコレートとして老若男女や国籍を問わず現代人の摂取量は大きなものとなっている (日本チョコレート・ココア協会資料)。さらに、ピクノジェノールとして知られる松樹皮由来 PA は、その化学的な構成が GSE 由来 PA と類似しており、製造工程や効能効果においても重複している部分が少なくない。しかし、本研究の GSE は、通常は廃棄する食品 (ワイン) の製造残渣を材料とするエコロジーな製造方法の特徴としている。また、チョコレートや松樹皮抽出物に匹敵するか、それ以上の PA 含量を有してもいる (Baydar et al., 2004)。本研究では、この確立された GSE の製造方法を基礎とし、機能性食品研究として重要不可欠な、ヒト生体内への吸収性を明らかにする研究から取り掛かった。

単量体である茶カテキン (Yang et al., 1998; Warden et al., 2001) やケルセチン (Ferry et al., 1996) の血中移行は、再現性があり確実なものと考えてよいであろう。PA オリゴマーを含むカカオポリフェノール (Rein et al., 2000; Baba et al., 2001) や赤ワインポリフェノール (Bell et al., 2000) においては、(+)-カテキンや (-)-エピカテキンの血中移行が報告されていたが、PA オリゴマーの吸収は不明であった。Rios et al. (2002) は、6 人の健康人にカカオポリフェノールを摂取させたが、胃内での PA は単量体や低分子のフェノール酸へ分解されなかったと報告している。経口摂取した PA オリゴマーが血中に検出されなかったことから、腸内細菌による分解代謝を受けた後に吸収され则认为る報告も相次いでいた (Tsang et al., 2005; Appeldoorn et al., 2009)。しかし、試験管内で PA の抗酸化活性は、重合度の大きさに依存的であること (片岡・有賀, 1998)、PA 平均重

合度の高い GSE と低い GSE の活性は同等かむしろ PA 平均重合度の高い GSE の方が活性が高いこと (Yamaguchi et al., 1999) から、何らかの形で生体利用されていると考えるのが自然であろうと考えられた。さらに分析技術の問題もある。当時ポリフェノールの定量は、専ら比色法が中心であった (Porter, 1986)。バニリンー塩酸法やフォーリン法などの比色法は、HPLC 分析技術のように一化合物対一化合物の定量分析はできない代わりに、生体で一部が代謝を受けていたとしてもフラバノール骨格やフェノール性水酸基を有してさえいれば濃度依存的に定量分析ができる利点がある。しかし、血液などの生体試料中の PA や PA 代謝物ポリフェノールを定量するには非選択的で低感度であるという課題があった。本研究においても、当初試みた比色検出では、再現性が得られず GSE 摂取後の血液試料からの PA を含むポリフェノールの有意な検出を達成できなかった。そこで、分析対象の化合物は GSE 中の 2 量体や 3 量体に限られるが、生体試料のような種々の成分の混合物の中から PA を選択的かつ高感度で検出可能な LC-MS/MS 法を用いた結果、ヒト血中で PA オリゴマーであるプロシアニジン B-1 の検出 ( $10.6 \pm 2.5$  nmol/L) に成功した。PA の一日摂取量である 0.1~0.5 g (Scalbert & Williamson, 2000) の 4~20 倍の投与量 (2.0 g) と照らし合わせると、その吸収率は (+)-カテキンや (-)-エピカテキンなどの単量体よりは 1 桁低かった。PA の化学的構造は、アルカリ性下では不安定であるが酸性下で安定であり、Rios et al. (2002) によれば、経口摂取された PA は、ヒトの胃内環境では単量体や低分子のポリフェノールに分解されない。Ward et al. (2004) は、腸内細菌のはたらきにより PA は低分子化され、例えば 3- (3-ヒドロキシフェニル) プロピオン酸や 4-*O*-メチル化没食子酸に分解された後に吸収されて尿中に見出されると報告している。PA オリゴマーは、消化器官や肝臓代謝系において、4-8 位の炭素-炭素結合が切断され、(+)-カテキンや (-)-エピカテキンなどの単量体へフラバノール骨格を維持しつつ低分子化しているのではないかと考察がいくつもある (Appeldoorn et al., 2009; Déprez et al., 2000; Ward et al., 2004; Tsang et al., 2005)。しかし、Donnovan et al. (2002) は、その動物実験結果から、PA は単量体へは分解しないと報告している。一方で、 $^{14}\text{C}$  標識したプロシアニジン B-2 を経口投与すると、尿などから最大 82% の生体への利用を示唆する報告がある (Stoupi et al., 2010)。従って、経口摂取された PA は、一部が化学構造を維持したまま吸収され血中へ移行し酸化抵抗性や他の有用性の発現に寄与するが、(+)-カテキンや (-)-エピカテキンなどの単量体とは吸収率が異なり、腸内環境下での代謝分解や肝臓での抱合を受けて、元の PA 構造とは異なる化合物として生体内に分布吸収され (すべては吸収されないと考えられるが)、数々の有用性報告に寄与していると考えるのが妥当であろう。

本研究の第2章と第3章では、GSE のヒト経口摂取試験を通じて血漿の酸化抵抗性の上昇および酸化 LDL の減少を確認したが、総コレステロール値や LDL コレステロール値など私たちの健康診断等で利用される身近な血中脂質レベルの改善は観察されなかった。本研究においても GSE の血中脂質を改善する効果は強いものではないことが分かる。さて、PA の血管疾患への予防的効果が提唱されてから半世紀にも満たない (Verin et al., 1978; Dartenuc et al., 1980)。これは紀元前にまでに遡る長い食経験に思いを致せば、PA の効能効果に我々研究者を含めた人類が気付いたのはごく最近ということになる。数多くの血管疾患への予防的報告があるが、ヒトでの効果は穏やかな内容である。例えば、24 人の喫煙者に 300 mg の GSE を 28 日間連続摂取させた試験では、血漿の酸化抵抗性のわずかな上昇と LDL の酸化抵抗性の上昇が確認されたが、総コレステロールや LDL や HDL は変動していない (Vigna et al., 2003)。高コレステロール血症者 40 人に GSE を 100 mg、60 日間連続摂取させた試験では、酸化 LDL の減少は認められたが、LDL/HDL コレステロール比や中性脂肪の改善は見られていない (Preuss et al., 2000)。本研究では、健常者を対象に 278 から 555 mg の GSE を 12 週間連続摂取させたときに、過去の報告と同様、酸化 LDL の改善が見られたが、総コレステロールや LDL/HDL コレステロール比等の改善は見られていない。しかし、過去報告と異なり、LDL コレステロールが高めの方 (100-180 mg/dL) ではあるものの病者ではない健常者を対象とした場合であっても、GSE の摂取により酸化 LDL の改善をみたことは特筆すべきであろう。その改善効果の発現は、GSE 555 mg 摂取した場合は 6 週間、同様に GSE を 278 mg 摂取した場合は 12 週間であり、医薬品のような即効性はなく、過去報告と同様、穏やかな血中脂質の改善効果である。酸化 LDL に起因する動脈硬化症等の血管疾患は、生活習慣病の代表的疾患であり、文字通り長期間に亘る食生活を中心とした日常生活の中に原因がある。酸化 LDL の血管内皮への蓄積は、自覚症状がなく、加齢と共に不可逆的に進行するケースが多く、いわゆる未病の段階を数年から十年単位で経過した後に甚大な症状を発生させる。GSE の摂取は、医薬品のような強い効果はないが食品素材であるために安全性が高く安価で長期間の利用が可能であるために、未病段階での利用に有効と考えられる。本研究で示された酸化 LDL の抑制やアディポネクチンの抑制傾向は、血管疾患に対する GSE の予防的効果を示唆するものであり、日本はもちろん先進国の間で進められている食生活による代替医療としてのエビデンスに寄与できるものと考えられる。

フランスでは、PA を豊富に含む GSE (医薬品エンドテロン) が静脈瘤の治療薬として認可処方されている (Dartenuc et al 1980)。エンドテロンは、毛細血管の体液浸潤機

能の低下した高血圧や糖尿病患者 13 人に対し、150 mg を 30 日から 60 日間の摂取により改善効果を示している (Corbé et al 1998)。毛細血管の機能低下は、静脈瘤や浮腫の疾病段階において顕著であるが、軽度または一過性の機能低下を来した未病段階では治療や投薬は通常行われていない。この未病段階は、女性ホルモンの影響を受ける女性においてしばしば見られるが、治療や投薬が施されないためにその対応が取り残された課題であった。一過性の下肢むくみは、疲労、酸化ストレスの蓄積により生じると考えられ、その程度は高血圧者や糖尿病患者のそれと比べると低レベルではあるが、毛細血管への酸化障害は同様のメカニズムである。GSE の投与は、この毛細血管の機能低下を抑制した。この抑制効果は、単回摂取でも効果が確認され、GSE が PA オリゴマーを含む何らかの形で吸収または相互作用を通じて毛細血管の酸化抵抗性を高めた結果と考えられる。単回投与量の 1/3 量を 14 日間摂取させた後においても同様の下肢むくみ抑制効果が観察された。この結果は、GSE やその代謝物の蓄積による影響を含んでいるのか明確にすることはできなかった。種々の動物実験において、経口投与後数時間で血中から代謝物を含めて検出されなくなったとする報告が多いが、<sup>14</sup>C 標識したプロシアニジン B-2 投与試験では、摂取後 96 時間まで合算しており (Stoupi et al., 2010)、詳細な PA 代謝物が明らかとなっていない現在ではその蓄積性の有無を断定することはできない。PA の他、食品素材によるむくみの抑制にクマリン系化合物がある。クマリン類は血小板抑制作用 (Jong et al., 1992; Okada et al., 1995) や抗糖尿病作用 (Lee et al., 2004) があり、クマリン類を含む食品素材であるセリ科植物ボタンボウフウには、健常女性の下肢むくみの抑制効果が報告されている (則松・森, 2012)。しかし、則松と森 (2012) は、この抗むくみ効果は毛細血管透過性を抑制する作用のあるヘスペリジンも含有することが有力と報告しており、黒田 et al. (2015) はリンパ浮腫の薬物治療としてのクマリンは複数のランダム化比較試験で再現性までは得られていないと報告している (黒田 et al., 2015)。この他、抗むくみ作用を有する食品素材として、 $\gamma$ -トコフェロール (杉田 et al., 2004) やメリロートエキスとウラジログシエキス (唐 et al., 2009) が報告されているが、GSE との比較研究は今後の課題であろう。

機能性食品素材として GSE は、30 年以上利用実績があると考えられる。その由来であるブドウ種子ポリフェノールに至ってはワイン醸造の歴史そのもの (少なくとも 2,000 年) が食経験である。そのため、過去の GSE 総説においても長い食経験の観点からも安全とされ (Scalbert & Williamson, 2000)、GSE の安全性研究がスポットライトを浴びることはなかった。今日、世界中で利用が拡大する GSE の市場性を考慮すれば、赤ワイン摂取では問題とならなかったサプリメント形状特有の過剰摂取の問題が新た

に生じ得る。今回明らかとなった GSE の安全性は、4 週間連続でヒトが経口摂取したときに、一日あたり 2,500 mg まで安全性が確認された。このとき、自覚症状として頭痛、吐き気、下痢、便秘を訴える被験者が記録されたが、いずれも GSE 摂取との因果関係は試験担当医師により否定され、GSE の摂取が日常生活に有害な影響を与えないことが確認された。また、血液学検査では多数の測定項目で有意な変動が認められたが、その変動域は日本人の基準範囲内であったが、唯一、鉄濃度の低下が GSE 摂取の影響と判断した。しかし、この有意な鉄濃度低下も非ヘム鉄の多い被験者の食生活に由来していた。非ヘム鉄は、PA などのポリフェノールによって吸収阻害を起こすことは、ポリフェノールと健康に関する国際会議（2003）においても提唱されており、PA を豊富に含む GSE などのポリフェノール素材を社会へ提案する際には、ラベル表示などの注意喚起に力を入れていくことが食品メーカーに、食品安全情報として消費者への啓蒙活動が政府公的機関に、それぞれ求められる責務であろう。これまで PA の安全性評価は動物実験に限られていた（Yamakoshi et al., 2002; Shoji et al., 2004; Fujii et al., 2007; Ray et al., 2001）。これらの報告では、客観的な評価によりヒトの安全性を考察するにとどまっておらず、また自覚症状を評価することもできない。本研究では、初めてヒトで体系的に行った試験であり、血液検査の客観的な評価に加え、自覚症状も細かく評価した。その結果は、鉄の吸収阻害の点では注意が必要であるが、その他は安全と評価される。現在、サプリメント界で推奨されている GSE の一日摂取目安量（100～400 mg）を大きく上回る 2,500 mg までの安全性をヒトで確認できたことは、日本における機能性表示食品制度や各国のヘルスクレームを付した機能性食品など、今後の機能性食品素材としての発展に利用できるリソースであると確信する。

以上本研究により、GSE の活性中心である PA のひとつプロシアニジン B-1 が確かに吸収され、動脈硬化症などの血管疾患に強く関係する血中の酸化コレステロールのひとつ MDA-LDL を低下させる機能を見出し、酸化障害によって亢進する毛細血管の機能低下を抑制したと考えられる結果としての下肢の抗むくみ効果を示し、従来動物実験でのみ科学的に証明されていた GSE の安全性を確認した。これらの研究成果は、すべてヒト経口摂取での試験に基づくものである。これまで生体内に吸収されないと考えられていた PA の吸収性をヒトで立証したことは、数々の PA の有用性を裏付ける研究成果であり、有用性と安全性を合わせ、機能性食品素材としての GSE 研究の発展に寄与するものである。今後、日本では、機能性表示食品としての発展性や第 7 の栄養素としての栄養機能食品への働きかけ、海外では各国の法令や食習慣にあわせたヘルスクレームの発信やラベル表示を通じて、本研究成果を社会に還元していきたい。



## 研究概要

多くの食品に含まれるポリフェノールには、その抗酸化力においてビタミン C やビタミン E などと比肩する活性を有するだけでなく、種々の疾病や健康維持に効果を発揮することが数多く報告されている。ポリフェノールの中でもカテキン類の基本構造であるフラバン-3-オールを構成単位とし、主として 4 位と 8 位で結合したプロアントシアニジン (PA) は、赤ワインポリフェノールの中心であり、とりわけ強力な抗酸化活性を有することが試験管内および動物実験において次々と報告されている。しかし、ヒトで PA が抗酸化能を有することや、疾病の治療や予防的効果を有したとする報告は限られており、フレンチ・パラドックスに端を発する一連の PA 研究において、ヒトでの有用性は未確認の部分が多かった。本研究は、PA を主成分とするブドウ種子抽出物 (GSE) を材料に、ヒトで確かに PA が吸収されるのか、そして動脈硬化症などの血管疾患の予防的影響がヒトで生じるのか、また健常者においても血管機能を維持する効果があるのかを検証すると共に、これまで体系的な評価が行われていなかった GSE のヒト安全性評価を確立することを目的とした。

PA を含む GSE の経口摂取によって、様々な効果を発揮することが報告されてきたが、有効成分と考えられている PA が血中に移行したことを証明した報告はなかった。本研究では、過剰量の 2,000 mg の GSE 経口摂取後の血中分析を高感度で選択性の高い LC-MS/MS 分析を試みた結果、PA の 2 量体プロシアニジン B-1 を GSE 摂取 2 時間後のヒト血中で初めて検出することに成功した ( $10.6 \pm 2.5$  nmol/L)。検出された血中濃度は、GSE 中のプロシアニジン B-1 から見積もった吸収率で考えると、単量体での過去報告と比べて 1 桁少なく、ヒトへの吸収性は、単量体よりは低い結果であった。PA は、腸内細菌や肝臓代謝系で分解や代謝を受けることが報告されており、化学構造を維持したまま生体利用されにくいと考えられる。しかし、GSE 摂取による数々の有用性報告と照らし合わせると、2 量体のほか様々な経路からの PA 生体利用が示唆され、GSE 摂取によるヒトでの有用性を示す裏付ける研究成果である。

動脈硬化症などの血管疾患への赤ワインポリフェノールの有効性は、疫学調査を中心に強く示唆され、動物実験を通じて動脈硬化症の抑制効果などが報告されていた。しかし、ヒトとくに健常者での GSE 経口摂取による有効性の証明はほとんど報告されていない。本研究では、動脈硬化症の進展と強い関連性のある血中コレステロールの酸化に着目し、2 週間摂取時と 12 週間摂取時における GSE の影響が健常者でも発揮されるのか検証した。2 週間の摂取によって、GSE はビタミン C やビタミン E よりも、血中コレステロールエステルの酸化抵抗性が増すこと、12 週間の摂取では、GSE は動脈硬化

症の進展と相関のある血中の酸化 LDL を減少させることが判明した。この結果は、患者だけでなく、未病段階の健常者にとって予防的効果を GSE は有することを示すものである。

生体は酸化ストレスによって様々な障害を受けるが、血管もまたその機能の低下を来し、毛細血管では体液循環に支障を起し、一過性のむくみを生じる。フランスにおいて GSE は静脈瘤の治療薬であるが、健常者に生じる一過性のむくみの抑制効果は不明である。むくみは女性の治したいからだの悩みであるため、GSE 摂取による改善効果の有無について女性を対象とした試験にて検証した。連続着座モデルによって発生する下肢のむくみを正確に計測するため、非接触式の測定方法を採用した。その結果、GSE の摂取により、毛細血管から過剰に滲み出た体液を抑制し、膝下の足の容積を減少させ、穏やかな体感効果が表れた。GSE 摂取は、健常者の血管機能の低下を抑制する働きがあることが証明され、機能性食品としての応用が期待された。

GSE はその成分が赤ワインポリフェノールの過半を占めるため、食経験があるとされてきた。しかし、赤ワインと異なり GSE は精製濃縮されており過剰摂取のリスクも考えられることから、食品としての GSE の安全性は担保されるべきものである。しかし、GSE の安全性に焦点を当てた研究は動物実験に限られており、ヒトでの安全性評価は行われていなかった。GSE の一日摂取目安量は、100～400 mg であるが、これを超過する 1,000～2,500 mg/日を 4 週間摂取させ、安全性の評価を行った。被験者全員が試験を完了でき、その期間中に有害事象や医師指導による脱落者は一人も出なかった。自覚症状による有害事象の申告がいくつか生じたが、いずれも GSE 摂取との関連性は否定された。しかし血中鉄濃度は GSE による低下を来した 2 人が観察されたが、貧血を起しておらず有害な水準ではないと判定された。GSE は、食生活によっては血中鉄濃度を低下させ得るため注意喚起が必要であるものの、総じて安全な食品であることが確認され、今後の機能性食品としての発展性が期待される。

強力な抗酸化力を有する PA を豊富に含む GSE について、これまで不明であったヒトでの有用性を明らかにした。GSE はワイン製造残渣から確立された製法により安価で私たちの健康維持に有効な機能を数多く有している。本研究で明らかとなった生体利用、血管疾患予防、血管機能保全ならびに安全性を通じ、機能性食品としてさらなる発展を遂げることを期待している。

## 謝辞

本論文を取りまとめるにあたり、ご指導ご鞭撻とご査読をいただきました筑波大学 生命環境科学研究科 生物圏資源科学専攻 江面 浩 教授、菅谷 純子 教授、生命産業科学専攻 繁森 英幸 教授ならびに生物圏資源科学専攻 有泉 亨 准教授に甚深なる感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたって、研究内容への深い理解と多大なる支援を賜りましたキッコーマン株式会社 研究開発本部長 常務執行役員 松山 旭 博士、前研究開発本部長 菊地 護 博士、元研究本部長 石井 茂孝 博士に甚深なる感謝の意を表します。

本研究を推進するにあたり、研究方針へ多大なご指導とご助言ならびに有意義なディスカッションをいただきましたキッコーマン株式会社 元研究開発本部 徳武 昌一 博士、山越 純 博士、研究開発本部 内田 理一郎 博士、生体試料中のポリフェノール抱合体の分析技術をご教示いただいたキッコーマンバイオケミファ株式会社 古賀 拓郎 博士、キッコーマンニュートリケア株式会社 和泉 亨 博士に厚く御礼と謝意を申し上げます。

ヒト介入試験方法のご助言と医療施設を提供いただきましたキッコーマン総合病院 長 久保田 芳郎 医師、採血等の医療行為にご協力いただいたキッコーマン総合病院 検診部の看護師の方々、下肢むくみの発生モデルと測定方法ならびにヒト介入試験に留意すべき数々の点をご教示ご指導いただきました首都大学東京大学院 システムデザイン研究科教授 瀬尾 明彦 医師に、深く感謝いたします。

本論文を取りまとめるにあたって、学位取得への理解を示し、また家庭生活を維持し終始温かく見守ってくれた妻 晴美、息子 憲之介に深い感謝の意を込めて、ここに筆を置きます。

## 引用文献

- Abu-Amsa R.C., Croft K.D., Beilin L.J., Puddey I.B. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect *ex vivo* lipoprotein oxidizability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 67-71(2000).
- Aini H., Ochi H., Iwata M., Okawa A., Koga D., Okazaki M., Sano A., Asou Y. Procyanidin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model. *PLoS One.*, 7(5), e37728(2012).
- Akazome N.Y., Kanda T., Ikeda M., Shimasaki H. Serum cholesterol-lowering effect of apple polyphenols in healthy subjects. *J. Oleo. Sci.*, 54, 143–151(2005).
- Appeldoorn M.M., Vincken J.P., Aura A.M., Hollman P.C., Gruppen H. Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 57(3), 1084-1092(2009).
- Ariga T. The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors*, 21, 197-201(2004).
- Ariga T., Asao Y., Sugimoto H., Yokotsuka T. Occurrence of astringent oligomeric proanthocyanidins in legume seeds. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2705-2708(1981).
- Ariga T., Asao Y. Isolation, identification and organoleptic astringency of dimeric proanthocyanidins occurring in Azuki beans. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2709-2712(1981).
- Ariga T., Koshiyama I., Fukushima D. Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from Azuki beans in aqueous systems. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2717-2722(1988).
- Ariga T., Hamano M. Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxy radicals. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2499-2504(1990).
- Arii M., Miki R., Hosoyama H., Ariga T., Yamaji N., Kataoka S. Abstract of Papers, Proc. 89<sup>th</sup> Annual Meeting of AACR, 20(1998)
- Arita Y., Kihara S., Ouchi N., Takahashi M., Maeda K., Miyagawa J., Hotta K., Shimomura I., Nakamura T., Miyaoka K., Kuriyama H., Nishida M., Yamashita S., Okubo K., Matsubara K., Kuraguchi M., Ohmoto Y., Funabashi T., Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257, 79-83(1999).
- Baba S., Osakabe N., Natsume M., Terao J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 142-148(2002).

- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A., Joshi S.S., Pruess H.G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148, 187-197(2000).
- Bagchi D., Garg A., Krohn R.L., Bagchi M., Tran M.X., Stohs S.J. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamin C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 95, 179-189(1997).
- Bagchi D., Sen C.K., Ray S.D., Das D.K., Bagchi M., Preuss H.G., Vinson J.A. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat. Res.*, 523-524, 87-97(2003).
- Baruch J. Effect of Endotelon in postoperative edema. Results of a double-blind study versus placebo in 32 female patients. *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, 29, 393-395(1984).
- Baydar N.G., Ozkan G., Sagdic O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15(5), 335–339(2004).
- Bell J.R., Donovan J.L., Wong R., Waterhouse A.L., German J.B., Walzem R.L., Kasim-Karakas S.E. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 103-108(2000).
- Berliner J.A., Navab M., Fogelam A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D., Lusis A.J. Atherosclerosis: basic mechanism. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, 91, 2488-2496(1995).
- Björn-Rasmussen E., Hallberg L., Isaksson B., Arvmsson B., Food Iron Absorption in Man., *The J. Clin. Invest.*, 53 247-255(1974).
- Bocking J.K., Roach M.R. The elastic properties of the human great saphenous vein in relation to primary varicose veins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 52, 153-157(1974).
- Castillo J., Benavente-García O., del Baño M.J., Lorente J., Alcaraz M., Dato M.J. Radioprotective effects against chromosomal damage induced in human lymphocytes by  $\gamma$ -rays as a function of polymerization grade of grape seed extracts. *J. Med. Food*, 4, 117-123(2001).
- Christ F., Gamble J., Baranov V., Kotov A., Chouker A., Thiel M., Gartside I.B., Moser C.M., Abicht J., Messmer K. Changes in microvascular fluid filtration capacity during 120 days of 6 degrees head-down tilt. *J. Appl. Physiol.*, 91, 2517-2522(2001).
- Christie S., Walker A.F., Hicks S.M., Abeyasekera S. Flavonoid supplement improves leg health and reduces fluid retention in pre-menopausal women in a double-blind, placebo-controlled study. *Phytomedicine*, 11, 11-17(2004).

- Clifton P.M. Effect of grape seed extract and quercetin on cardiovascular and endothelial parameters in high-risk subjects *J. Biomed. Biotechnol.*, 2004(5), 272–278(2004).
- Corbé C., Boissin J.P., Siou A. Sens lumineux et circulation chorio-rétinienne: étude de l'effet des O.P.C. (Endotélon). (Luminosity and chorioretic circulation: a study on the effects of O.P.C. (endothelium).) *J. Fr. Ophthalmol. (French)*, 11, 453–460(1998).
- Cnop M., Havel P.J., Utzschneider K.M., Carr D.B., Sinha M.K., Boyko E.J., Retzlaff B.M., Knopp R.H., Brunzell J.D., Kahn S.E. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*, 46, 459-469(2003).
- Costantini A., De Bernardi T., Gotti A. Clinical and capillaroscopic evaluation of chronic uncomplicated venous insufficiency with procyanidins extracted from *Vitis vinifera*. *Minerva Cardioangiol.*, 47, 39-46(1999).
- Dartenuc J.Y., Marache P., Choussat H. Capillary resistance in geriatrics: a study of microangioprotectors. *Endotélon Bord. Med. (French)*, 13, 903-907(1980).
- Déprez, S. Biomarqueur de Tanins Condensés et Étude de leur Biodisponibilité dans l'Organisme Humain (French). Paris, Institut National Agronomique Paris-Grignon(1999).
- Déprez S., Brezillon C., Rabot S., Philippe C., Mila I., Lapierre C., Scalbert A. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J. Nutr.*, 130(11), 2733-2738(2000).
- Dixon R.A., Xie D.Y., Sharma S.B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, 165, 9-28(2005).
- Donovan J.L., Bell J.R., Kasim-Karakas S., German J.B., Walzem R.L., Hansen R.J., Waterhouse A.L. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J. Nutr.*, 129(9), 1662-1668(1999).
- Donovan J.L., Manach C., Rios L., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3. *Br. J. Nutr.*, 87, 299 – 306(2002).
- Eberhardt T.L., Young R.A. Conifer Seed Cone Proanthocyanidin Polymers: Characterization by <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy and Determination of Antifungal. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1704-1708(1994).
- Engelhart M.J., Geerlings M.I., Ruitenberg A., van Swieten J.C., Hofman A., Witteman J.C., Breteler M.M. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA*, 287,

3223–3229(2002).

- Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D.W., deTakats P.G., Anderson D., Baker J., Kerr D.J. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clin. Cancer Res.*, 2(4), 659-668(1996).
- Fujii H., Sun B., Nishioka H., Hirose A., Aruoma O.I., Evaluation of the safety and toxicity of the oligomerized polyphenol Oligonol. *Food Chem. Toxicol.*, 45(3), 378-387(2007).
- Funahashi T., Matsuzawa Y. Adiponectin. *Nippon Rinsho*, 60, 583-592(2002).
- Haaverstad R., Romslo I., Myhre H.O. The concentration of high molecular weight compounds in interstitial tissue fluid: a study in patients with post-reconstructive leg oedema. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 13(4), 355-360(1997).
- Hallberg L., Björn-Rasmussen E., Howard L., Rossander L., Dietary Heme Iron Absorption. A discussion of possible mechanisms for the absorption-promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. *Scand. J. Gastroenterol.*, 14(7), 769-779(1979).
- Higashi Y., Sasaki S., Nakagawa K., Matsuura H., Oshima T., Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 346, 1954-1962(2002).
- Hollman P.C., Katan M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.*, 51(8), 305-310(1997).
- Holt R.R., Lazarus S.A., Sullards M.C., Zhu Q.Y., Schramm D.D., Hammerstone J.F., Fraga C.G., Schmitz H.H., Keen C.L. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of aflavanol-rich cocoa. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, 798-804(2002).
- Hotta K., Funahashi T., Arita Y., Takahashi M., Matsuda M., Okamoto Y., Iwahashi H., Kuriyama H., Ouchi N., Maeda K., Nishida M., Kihara S., Sakai N., Nakajima T., Hasegawa K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Nakamura T., Yamashita S., Hanafusa T., Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 1595-1599(2000).
- Husain S.R., Cillard J., Cillard P. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26, 2489-2492(1987).
- International Conference on Polyphenols and Health, held in Vichy, France, November (2003).
- Izumi T., Piskula M.K., Osawa S., Obata A., Tobe K., Saito M., Kataoka S., Kubota Y., Kikuchi M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.*, 130, 1695-1699(2000).

- Jimenez-Ramsey L.M., Rogler J.C., Housley T.L., Butler L.G., Robert G. Elkin absorption and distribution of <sup>14</sup>C-labeled condensed tannins and related Sorghum phenolics in chickens. *J. Agric. Food Chem.*, 42(4), 963–967(1994).
- Jong, T.T., Hwang, H.C., Jean, M.Y., Wu, T.S., Teng, C.M., An antiplatelet aggregation principle and x-ray structural analysis of cis-khellactone diester from *Peucedanum japonicum*. *J. Nat. Prod.*, 55, 1396-1401(1992).
- Kennedy J.A., Troup G.J., Pilbrow J.R., Hutton D.R., Hewitt D., Hunter C.R., Ristic R., Iland P.G., Jones G.P. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aus. J. Grape Wine Res.*, 6, 244-254(2000).
- Koga T., Moro K., Nakamori K., Yamakoshi J., Hosoyama H., Kataoka S., Ariga T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1892-1897(1999).
- Kondo A., Li J., Manabe M., Saito K., Kanno T., Maekawa M. Relationship between high-density lipoprotein-cholesterol and malondialdehyde-modified low-density lipoprotein concentrations. *J. Atheroscler. Thromb.*, 10, 72-78(2003).
- Kondo K., Matsumoto A., Kurata H., Takahashi H., Koda T., Amachi T., Itakura H. Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein with red wine. *Lancet*, 344, 1152(1994).
- Laparra J., Michaud J., Masquelier J. Pharmacokinetic study of flavanolic oligomers. *J. Plant Med. Phytother.*, 11, 133-142(1977).
- Lee M.J., Wang Z.Y., Li H., Chen L., Sun Y., Gobbo S., Balentine D.A., Young C.S. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 4, 393-399 (1995).
- Lee S.O., Choi S.Z., Lee J.H., Chung S.H., Park S.H., Kang H.C., Yang E.Y., Cho H.J., Lee K.R. Antidiabetic coumarin and cyclitol compounds from *Peucedanum japonicum*. *Arch. Pharm. Res.*, 27, 1207-1210(2004).
- Lotito S.B., Actis-Goretta L., Renart M.L., Caligiuri M., Rein D., Schmitz H.H., Steinberg F.M., Keen C.L., Fraga C.G. Expression of integrated hepatitis B virus X variants in human hepatocellular carcinomas and its significance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 945-951(2000).
- Lubran M.M. Renal function in the elderly. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 25, 122-133(1995).
- Maxwell S., Thorpe G. Tea flavonoids have little short term impact on serum antioxidant activity. *B.M.J.*, 313(7051), 229(1996).
- McQuaid K.E., Keenan A.K. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for



- nitric oxide? *Exp. Physiol.*, 82, 369-376(1997).
- Natella F., Belelli F., Gentili V., Ursini F., Scaccini C. Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7720-7725(2002).
- Natella F., Ghiselli A., Guidi A., Ursini F., Scaccini C. Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 1036-1044(2001).
- Navab M., Berliner J.A., Watson A.D., Hama S.Y., Territo M.C., Lusis A.J., Shih D.M., Van Lenten B.J., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Fogelman A.M. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 16, 831-842(1996).
- Nilsson S., Haugen B. Volumetry in the evaluation of swelling in the ankle and the foot. *J. Oslo City Hosp.*, 31, 11-15(1981).
- Nishimura A., Sawai T. Determination of adiponectin in serum using a latex particle-enhanced turbidimetric immunoassay with an automated analyzer. *Clin. Chim. Acta.*, 371(1-2), 163-168, (2006)
- Núñez V., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B., Hong Y.J., Mitchell A.E. Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 915-921(2006).
- Ohnishi-Kameyama M., Yanagida A., Kanda T., Nagata T. Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 11(1), 31-36(1997).
- Okada Y., Miyauchi N., Suzuki K., Kobayashi T., Tsutsui C., Mayuzumi K., Nishibe S., Okuyama T. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. *Chem. Pharm. Bull.*, 43(8), 1385-1387(1995).
- Orgogozo J.M., Dartigues J.F., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., Salamon R., Renaud S.C., Breteler M.B. Wine consumption and dementia in the elderly : a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev. Neurol.*, 153, 185-192(1997).
- Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Maeda K., Kuriyama H., Okamoto Y., Hotta K., Nishida M., Takahashi M., Nakamura T., Yamashita S., Funabashi T., Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin.

- Circulation*, 100, 2473-2476(1999).
- Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Nishida M., Matsuyama A., Okamoto Y., Ishigami M., Kuriyama H., Kishida K., Nishizawa H., Hotta K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Yamashita S., Funahashi T., Matsuzawa Y. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 103, 1057-1063(2001).
- Piskula M.K., Terao J., Accumulation of (–)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, 128, 1172-1178(1998).
- Plumb G.W., De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Cheynier V., Williamson G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation *Free Radic. Res.*, 29, 351-358(1998).
- Porter L.J., In: Harborne J.B. (Ed.). *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London, pp.23-55(1986).
- Preuss H.G., Wallerstedt D., Talpur N., Tutuncuoglu S.O., Echard B., Myers A., Bui M., Bagchi D. Effects of niacin-bound chromium and grape seed proanthocyanidin extract on the lipid profile of hypercholesterolemic subjects: a pilot study. *J. Med.*, 31, 227-246(2000).
- Prior R.L., Gu L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 66(18), 2264-2480(2005).
- Ray S., Bagchi D., Lim P.M., Bagchi M., Gross S.M., Kothari S.C., Preuss H.G., Stohs S.J. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 109(3-4), 165-197(2001).
- Raymond P.G., Gary M.W. Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid, and ZnCl<sub>2</sub>: studies using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell model. *J. Agric. Food Chem.*, 50(2), 390–395(2002).
- Renaud S., De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523-1526(1992).
- Richelle M., Tavazzi I., Enslen M., Offord E.A., Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 53, 22-26(1999).
- Rimm E.B., Klatsky A., Grobee D., Stampfer M.J. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits? *Br. Med. J.* 312, 731-736(1996).
- Rios L.Y., Bennett R.N., Lazarus S.A., Rémésy C., Scalbert A., Williamson G. Cocoa

- procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, 1106–1110(2002).
- Robak J., Gryglewski R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 37(5), 837-841(1988).
- Robert A.M., Groult N., Six C., Robert L. The effect of procyanidolic oligomers on mesenchymal cells in culture. II—Attachment of elastic fibers to the cells. *Pathol. Biol.*, 38, 601-607(1990a).
- Robert L., Godeau G., Gavignet-Jeannin C., Groult N., Six C., Robert A.M. The effect of procyanidolic oligomers on vascular permeability. A study using quantitative morphology. *Pathol. Biol.*, 38, 608-616(1990b).
- Rodriguez-Porcel M., Herrman J., Chade A.R., Krier J.D., Breen J.F., Lerman A., Lerman L.O. Long-term antioxidant intervention improves myocardial microvascular function in experimental hypertension. *Hypertension*, 43, 493-498(2004).
- Rowland M., Tozer T.N. In: Troy D.B.(Ed.). *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.*, Lippincott Williams,&Wilkins, USA, (2009).
- Rys M. & Konz S. Standing. *Ergonomics*, 37, 676-687(1994).
- Saito M., Hosoyama H., Ariga T., Kataoka S., Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1460–1464(1998).
- Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P., Riceevans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch.Biochem.Biophys.*, 322, 339-346(1995).
- Santos-Buelga C. & Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1094-1117(2000).
- Samman S., Sandström B., Toft M.B., Bukhave K., Jensen M., Sørensen S.S., Hansen M. Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 607-612(2001).
- Sano A., Tokutake S., Seo A. Proanthocyanidin-rich grape seed extract reduces leg swelling in healthy women during prolonged sitting. *J. Sci. Food Agric.*, 93, 457–462(2013).
- Sano A., Uchida R., Saito M., Shioya N., Komori Y., Tho Y., Hashizume N. Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-Modified LDL. *J. Nurt. Sci. Vitaminol.*, 53, 174–182(2007).
- Sano A., Yamakoshi J., Tokutake S., Tobe K., Kubota Y., Kikuchi M. Procyanidin B1 is detected

- in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 1140-1143(2003).
- Santos-Buelga C., Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1094-1117(2000).
- Scalbert A., Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130(8S Suppl), 2073S-2085S(2000).
- Seo A., Kakehashi M., Tsuru S., Yoshinaga F. Leg swelling during continuous standing and sitting work without restricting leg movement. *J. Occup. Health*, 38, 186-189(1996).
- Shimada K., Kawarabayashi T., Tanaka A., Fukuda D., Nakamura Y., Yoshiyama M., Takeuchi K., Sawaki T., Hosoda K., Yoshikawa J. Oolong tea increases plasma adiponectin levels and low-density lipoprotein particle size patients with coronary artery disease. *Diabetes. Res. Clin. Pract.*, 65, 227-234(2004).
- Shoji T., Akazome Y., Kanda T., Ikeda M. The toxicology and safety of apple polyphenol extract. *Food Chem. Toxicol.*, 42(6), 959-967(2004).
- Sorata Y., Yakahama U., Kimura M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochem. Biophys. Acta.*, 799, 313-317(1982).
- Starling E.H. On the absorption of fluids from the connective tissue space. *J. Physiol.*, 19, 312-326(1896).
- Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L. Modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320, 915-924(1989).
- Stoupi S., Williamson G., Viton F., Barron D., King L.J., Brown J.E., Clifford M.N. *In Vivo* Bioavailability, Absorption, Excretion, and Pharmacokinetics of [14C]Procyanidin B2 in Male Rats. *Drug Metab. Dispos.*, 38(2), 287-291(2010).
- Tanahashi H., Kondo K., Suwa Y., Zenibayashi Y., Toyoda Y., Kitamura K., Hosoda K., Amachi T., Matsumoto A., Itakura H. Component and clinical studies on antioxidative activity of red wine. *ASEV Jap. Rep.*, 6, 241(1995).
- Teissedre P.L., Frankel E.N., Waterhouse A.L., Peleg H., German J.B. Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.*, 70, 55-61(1996).
- Terrill T.H., Waghorn G.C., Woolley D.J., McNabb W.C., Barry T.N. Assay and digestion of 14C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *Br. J. Nutr.*, 72(3),

467-477(1994).

Thebaut J.F., Thebaut P., Vin F. Study of Endotelon in functional manifestations of peripheral venous insufficiency. *Gazette Medicale (France)*, 92, 96-100(1985).

Thorpe S.R., Baynes J.W. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs Aging*, 9, 69-77(1996).

Tsang C., Auger C., Mullen W., Bornet A., Rouanet J.M., Crozier A., Teissedre P.L. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br. J. Nutr.*, 94(2), 170-181(2005).

Tyagi A., Agarwal R., Agarwal C. Grape seed extract inhibits EGF-induced and constitutively active mitogenic signaling but activates JNK in human prostate carcinoma DU145 cells: possible role in antiproliferation and apoptosis. *Oncogene*, 22(9), 1302-1316(2003).

Uda S., Seo A., Yoshinaga F. Swell-preventing effect of intermittent exercise on lower leg during standing work. *Ind. Health*, 35(1), 36-40(1997).

Valenci P., Behar A. Clinical implications of impaired microcirculation. *Int. Angiol.*, 14, 26-31(1995).

van het Hof K.H., de Boer H.S., Wiseman S.A., Lien N., Westrate J.A., Tijburg L.B.

Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66(5), 1125-1132(1997).

Verin M.M.P., Vilda A., Maurin J.F. Therapeutic essay. Retin- opathy and OPC. *Bord. Med. (French)* , 11, 1467-1473 (1978).

Vigna G.B., Costantini F., Aldini G., Carini M., Catapano A., Schena F., Tangerini A., Zanca R., Bombardelli E., Morazzoni P., Mezzetti A., Fellin R., Maffei Facino R. Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers. *Metabolism*, 52, 1250 -1257(2003).

Ward N.C., Croft K.D., Pudley I.B., Hodgson J.M. Supplementation with grape seed polyphenols results in increased urinary excretion of 3-hydroxyphenylpropionic acid, an important metabolite of proanthocyanidins in humans. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5545-5549(2004).

Warden B.A., Smith L.S., Beecher G.R., Balentine D.A., Clevidence B.A. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J. Nutr.*, 131(6), 1731-1737(2001).

Winkel J., Jørgensen K. Swelling of the foot, its vascular volume and systemic hemoconcentration during long-term constrained sitting. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 55,

162-166(1986a).

Winkel J., Jørgensen K. Evaluation of foot swelling and lower-limb temperatures in relation to leg activity during long-term seated office work. *Ergonomics*, 29, 313-328(1986b).

Witztum J.L., Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 88, 1785-1792(1991).

Yamaguchi F., Yoshimura Y., Nakazawa H., Ariga T. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}/\text{DMSO}$  system. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2544-2548(1999).

Yamakoshi J., Saito M., Kataoka S., Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem. Toxicol.*, 40(5), 599-607(2002).

Yamakoshi J., Saito M., Kataoka S., Tokutake S. Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats. *J. Agric. Food Chem.*, 50(17), 4983-4988(2002).

Yamakoshi J., Sano A., Tokutake S., Saito M., Kikuchi M., Kubota Y., Kawachi Y., Otsuka F. Oral intake of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds improves chloasma. *Phytother. Res.*, 18, 895-899(2004).

Yamakoshi J., Kataoka S., Koga T., Ariga T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 142, 139-149(1999).

Yang C.S., Chen L., Lee M.J., Balentine D., Kuo M.C., Schantz S.P. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 7(4), 351-354(1998).

Yokota T., Oritani K., Takahashi I., Ishikawa J., Matsuyama A., Ouchi N., Kihara S., Funahashi T., Tenner A.J., Tomiyama Y., Matsuzawa Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelo-monocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*, 96, 1723-1732(2000).

Yoshimura M., Saito M., Tokutake S., Kikuchi M., Kikuchi Y. The effect of grape seed extracts on the fluidity of whole blood through capillary-model microchannels. *Hemorheol. Related Res.*, 5, 35-37(2002).

有賀敏明, 細山浩, 徳武昌一, 山越純. プロアントシアニジンの機能性解明と開発, *日本農芸化学会誌*, 74, 1-8 (2000).

大澤俊彦. ポリフェノールの生理作用 (第5章), 吉田隆志, 有井雅幸 (監修), “植物ポリフェノール含有素材の開発: その機能性と安全性”, シーエムシー出版, PP.

49-60 (2007).

大橋俊夫. むくみの生理学—バッキンガム宮殿の近衛兵が一定時間ごとに行進するわけ—, *日本生理学雑誌*, 69, 102-107(2007).

岡崎伸次, 松崎弘之, 物井恵一, 佐藤剛, 三巻弘, 高畑藤也. 日立 7150 形によるアポリポタンパクの検討, *日本臨床検査自動化学会会誌*, 12, 334-335(1987).

片岡茂博, 有賀敏明. 赤ワインの有効成分プロアントシアニジンなぜ赤ワインが体に良いのか, *ファルマシア*, 34 (10), 998-1002 (1998).

既存添加物名簿, 第 336 号 (平成 8 年 4 月 16 日、厚生省告示第 102 号).

木村進, 中林敏郎, 加藤博通編著. “食品の変色の化学”, 光琳, PP. 44-157(1995).

黒田昌男, 福本亮, 福井辰成. リンパ浮腫, *臨床泌尿器科*, 69 (4), 204-206 (2015).

小谷和夫. 酸化ストレスマーカー, 学術出版センター, PP.243~246 (2005).

杉田俊郎, 中村幸子, 花野貴子.  $\gamma$ -トコフェロール含有食品「キューオーエイチ」の摂取によるむくみおよび更年期障害改善効果の検討 (オープン試験), *薬理と治療*, 32, 501-509 (2004).

橘勝士. グルジアのワインと文化, *醸造協会誌*, 95 (9), 651-657 (2000).

唐亮, 西田和弘, 小池田崇史, 増田康. メリロートエキスとウラジログシエキスなどを含む栄養補助食品の摂取によるむくみ改善と安全性, *診療と新薬*, 46, 1278-1284 (2009).

徳武昌一, 山越純. ブドウ種子ポリフェノール機能性の応用, *New Food Industry*, 43, 1-9(2001).

日本チョコレート・ココア協会, 主要国チョコレート 1 人あたり消費量 (2006).

則松 (田村) 亜紀子, 森浩. 与那国島産ボタンボウフウを含有する飲料摂取による下肢むくみ改善効果, *日本食品科学工学会誌*, 59 (10), 509-514 (2012).

山越純, 山次信幸. 赤ワインの生理効果で注目されるブドウ種子ポリフェノール 主成分プロアントシアニジンは確かに動脈硬化を抑制する, *化学と生物*, 37, 4-5 (1999).

## 研究業績一覧

Sano A., Yamakoshi J., Tokutake S., Tobe K., Kubota Y., Kikuchi M. Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67(5), 1140-1143(2003).

Sano A., Uchida R., Saito M., Shioya N., Komori Y., Tho Y., Hashizume N. Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. *J Nutr Sci Vitaminol.* 53(2), 174-182(2007).

Sano A., Tokutake S., Seo A. Proanthocyanidin-rich grape seed extract reduces leg swelling in healthy women during prolonged sitting. *J Sci Food Agric.* 93(3), 457-462(2013).

Sano A., Safety assessment of 4-week oral intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract in healthy subjects. *Food Chem. Toxicol.* (In press).