

ベリー果実のアントシアニン分析と各種細胞障害に対する
ビルベリーの保護作用に関する薬理学的研究

小川 健二郎

目 次

序論	5 頁
第 1 章 ベリー果実含有アントシアニンの定性および定量	9 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料および方法	
2-1 実験材料	
2-2 実験方法	
2-2-1 各ベリー果実からのアントシアニン成分の抽出	
2-2-2 多波長検出器付き高速液体クロマトグラフィー分析 (HPLC-DAD)	
2-2-3 高速液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析 (HPLC-ESI-MS/MS)	
2-2-4 抗酸化能測定	
2-2-4-1 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル捕捉活性試験	
2-2-4-2 2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) ラジカル捕捉活性試験	
2-2-4-3 第二鉄還元力 (FRAP) 試験	
第 3 節 結果	
3-1 各ベリー果実抽出物中のアントシアニンの定性および定量	
3-2 各ベリー果実抽出物の抗酸化能測定	
第 4 節 考察	
第 2 章 紫外線誘発網膜視細胞障害に対するビルベリーおよびリンゴンベリーの保護作用	28 頁

第1節 緒言

第2節 実験方法

2-1 実験材料

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

2-2-2 紫外線誘発網膜視細胞死評価試験

2-2-3 紫外線誘発活性酸素種 (ROS) 産生量の測定

2-2-4 ウェスタンブロット法によるストレス関連タンパク質の測定

2-2-5 プロテインキナーゼ B (Akt) 阻害剤によるリンゴンベリーの作用 機序の検討

2-3 統計学的解析

第3節 結果

3-1 紫外線誘発網膜視細胞障害に対するビルベリーおよびリンゴンベリー とこれらの成分の作用

3-2 紫外線誘発網膜視細胞の活性酸素種 (ROS) 産生に対するビルベリー およびリンゴンベリーとこれらの成分の抑制作用

3-3 紫外線誘発網膜視細胞のストレス関連タンパク質に対するビルベリー およびリンゴンベリーの作用

3-4 紫外線誘発網膜視細胞死に対するプロテインキナーゼ B リン酸化を介した リンゴンベリーの作用

3-5 紫外線誘発網膜視細胞死に対するビルベリーとリンゴンベリーの相加 作用

第4節 考察

第3章 青色発光ダイオード（LED）光誘発網膜視細胞障害に対するビルベリー
ーおよびリンゴンベリーの保護作用 55 頁

第1節 緒言

第2節 実験方法

2-1 実験材料

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

2-2-2 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞死評価試験

2-2-3 青色発光ダイオード光誘発活性酸素種（ROS）産生量の測定

2-2-4 ウェスタンブロット法によるストレス関連タンパク質の測定

2-2-5 青色発光ダイオード光誘発視細胞カスパーゼ活性の測定

2-3 統計学的解析

第3節 結果

3-1 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞障害に対するビルベリーおよび
リンゴンベリーとそれらの成分の作用

3-2 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞の活性酸素種（ROS）産生に対す
るビルベリーおよびリンゴンベリーとそれらの成分の抑制作用

3-3 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞のストレス関連タンパク質に対す
るビルベリーおよびリンゴンベリーの作用

3-4 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞死誘発カスパーゼ上昇に対するビ
ルベリーおよびリンゴンベリーの作用

第4節 考察

第4章 マウス胃潰瘍に対するビルベリーエキスの抗潰瘍作用 77 頁

第1節 緒言

第2節 実験方法

2-1 実験材料

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

2-2-2 エタノール誘発マウス胃潰瘍モデル

2-2-3 組織評価

2-2-4 マウス胃ホモジネートを用いた脂質過酸化試験

2-2-5 電子スピン共鳴法 (ESR)

2-3 統計学的解析

第3節 結果

3-1 エタノール誘発マウス胃潰瘍に対するビルベリーエキスの作用

3-2 マウス胃ホモジネートの脂質過酸化に対するビルベリーエキスの作用

3-3 電子スピン共鳴装置を用いたスーパーオキシドアニオンラジカルおよび ヒドロキシルラジカルの測定

第4節 考察

総括および結論 91 頁

謝辞 93 頁

引用文献 94 頁

略語一覧表 107 頁

序論

高齢化社会、生活スタイルや食生活の変化、さらには社会的ストレスや環境ストレスの影響により、現在我が国の医療費は年々増加の一途をたどっている (Figure 1)。厚生労働省が平成 25 年 9 月に発表した「平成 24 年度 医療費の動向」によると、平成 24 年度の医療費は前年度比約 0.6 兆円増の 38.4 兆円であり、医療費の伸び率は 1.7%であった(厚生労働省 2013)。さらに平成 19 年から 5 年間では 5 兆円医療費は増加している。現代社会において特に問題視される疾病は生活習慣病であり、特に 50、60 歳代において高血圧、糖尿病、高脂血症を患う人が多い (データ分析推進グループ 2012)。これら生活習慣病は予防可能な疾病であるため、生活習慣の見直しや日常摂取する食品の重要性が指摘されている。

食品には三つの機能性が備わっている。すなわち、第一次機能は栄養機能であり、カロリー、タンパク質、脂肪、糖質、各種ビタミンやミネラルなど、我々の体に必要な栄養素の補給源としての役割である。つづく第二次機能は、嗜好性や食感機能であり、色、味、香り、歯触り、舌触りなどにあたる。そして第三次機能が健康機能や生体調節機能に当り、生体防御、体調リズム (ホルモン) 調節、老化制御、疾患予防、または疾病の回復調節

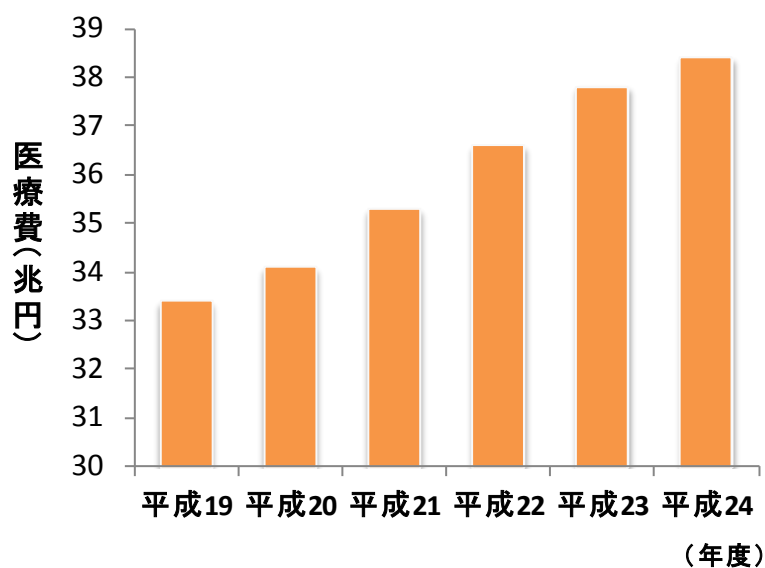


Figure 1. 概算医療費の年度集計結果
(出典：厚生労働省「平成 24 年度 医療費の動向 ～概算医療費の年度集計結果～,2013」より一部改編)

など、生体における健康状態を調節する機能性を指す。近年、食品の三次機能による動脈硬化や糖尿病、高血圧など生活習慣病の予防、ガンの予防、認知症やアルツハイマー病の予防あるいは改善に年々期待が高まっており、特定の食品成分による機能性を付与した食品として消費者庁が認可する特定保健用食品（トクホ）も市場に増えつつある。市場にみられる食品機能成分としては、緑茶に含まれるカテキン、大豆のイソフラボン、赤ワインやブドウのレスベラトロールなどポリフェノール成分がある。ポリフェノールの多くは抗酸化作用を有することが特徴であり、酸化ストレスが関与する疾病予防について様々な有用性が見出されている。中でも、ブルーベリー（英名：Blueberry、学名：*Vaccinium angustifolium*）やカシスなどベリー果実、黒米、紫イモに多く含まれる色素成分アントシアニンは、高い抗酸化作用、血糖上昇抑制作用（ α -グルコシダーゼ阻害作用）(Matsui et al. 2001a, 2001b)、動脈硬化予防(Ellingsen et al. 2008; Xia et al. 2006)、抗腫瘍作用(Harris et al. 2001; Lazze et al. 2004)など、多岐にわたる機能性が報告されている。

ベリー果実は、世界中でジャムや菓子類、料理の付け合わせとして広く好まれ食されてきた食経験豊かな食材であり、世界各地に様々なベリーが存在する。ベリー果実はビタミンやミネラルの含有量が比較的高いことに加え、アントシアニンなどポリフェノール成分を含むものが多い。中でもツツジ科スノキ属に属するビルベリー（英名：Bilberry、学名：*Vaccinium myrtillus*）はブルーベリーの近縁種に当たる果実である。特に北ヨーロッパ地方で収穫されるビルベリーは、白夜の時期に太陽光に長時間曝され育つことで果実内部にまでアントシアニン色素を蓄えるため、一般のブルーベリーより高い含有量を有している。ビルベリーはヨーロッパ諸国で従来伝統医療に用いられてきた。果実は下痢や赤痢、胃腸管の炎症、口腔感染症の治療、泌尿器系疾患の症状緩和にも使用され

た。さらにその葉は血糖降下作用を有し、糖尿病治療薬として使用すると共に、煎出した物質は眼と口腔の炎症、皮膚の感染症と火傷に対して局所適用されてきた(Morazzoni 1996)。ビルベリー果実より抽出したエキスについては、これまで血小板凝集抑制作用（血流改善作用）(Morazoni 1990)、毛細血管保護作用(Colantuoni et al. 1991; Lietti et al. 1976)、抗腫瘍作用(Lazze et al. 2004)、抗潰瘍作用(Magistretti et al. 1988)が報告されているが、近年は主に眼疾患予防効果や視機能改善作用に対する有用性が期待され、サプリメント素材として用いられている。富士経済発表の「H・B フーズマーケティング便覧 2013 No.2」によれば、2012年のサプリメントの市場は6,961億円であり、中でもアイケア訴求品の市場は451億円にも上る(株富士経済 2013)。ブルーベリー（またはビルベリー）は295億円で、アイケア市場の実に65%を占めており、眼の健康に対する消費者の関心と共にビルベリーに対する期待の高さが窺える。これまで視機能改善作用が報告されているアントシアニン素材は、ブルーベリー、ビルベリー、カシス、マキベリー、黒米などがあり、ロドプシンの再合成促進作用(Bastide et al. 1968)、網膜神経節細胞障害保護作用(Matsunaga et al. 2009)、血管新生抑制作用(Matsunaga et al. 2010)、網膜炎症抑制作用(Miyake et al. 2012)、毛様体筋弛緩作用(Matsumoto et al. 2005)、可視光誘発網膜視細胞障害抑制作用(Tanaka et al. 2011)などが明らかになっている。一方、臨床研究においては、眼精疲労軽減作用および近視改善作用(梶本修身、大谷寛成、小笠賢一 1998)、糖尿病網膜症における網膜出血の減少(Morazzoni 1996)、緑内障予防作用（松樹皮エキスまたは薬剤との併用による）(Steigerwalt et al. 2008)、白内障予防作用（ビタミンEとの併用による）(G 1989)などの報告がなされているが、未だ研究の数は少なく十分な知見は得られていない。したがって、新たなアントシアニン高含有食品の発掘並びに視機能改善作用に関するさらなる研究の必要性がある。

本研究では、10種類のベリー果実について同一条件での抽出およびアントシアニン成分の定量、定性分析、抗酸化作用の比較を行った。またサプリメントとして利用の多いビルベリーエキスの視機能改善作用を検討するため、紫外線および青色光誘発網膜視細胞障害に対する保護作用について実験を行った。最後に、ビルベリーエキスの消化管に対する効果として、エタノール誘発胃潰瘍保護作用とそのメカニズム解明を試みた。

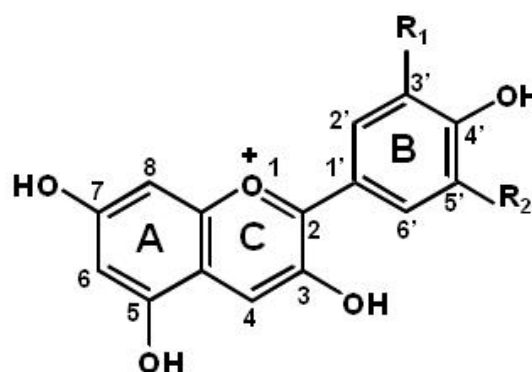
第1章 ベリー果実含有アントシアニンの定性および定量

第1節 緒言

アントシアニン (Anthocyanin) は植物界に広く存在する天然の色素成分で、フラボノイド骨格を有するポリフェノール成分の一種として野菜や果実には少なからず含まれる成分である。アントシアニンのアグリコンであるアントシアニジン (Anthocyanidin) は、通常植物内で確認される多くは、ペラルゴニジン (Pelargonidin)、シアニジン (Cyanidin)、デルフィニジン (Delphinidin)、ペオニジン (Peonidin)、ペチュニジン (Petunidin)、マルビジン (Malvidin) の6種である (Figure 2)。アントシアニジンは基本的に3,5,7,4'位に水酸基 (-OH) を有し、水酸基やメトキシ基 (-OCH₃) の数により性質に違いが生じる。一般的にアントシアニジンの形では不安定であるため、配糖体の形で植物中に存在する。結合糖は、D-グルコース (glucose)、D-ガラクトース (galactose)、L-ラムノース (rhamnose)、D-キシロース (xylose)、

L-アラビノース (arabinose) などがあり、これらが単独に、または2糖類、3糖類として、3, 5, 7位などに酸素原子を介してβ-グリコシド結合している。

さらに、アントシアニンの中には *p*-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸など芳香族有機酸やマロン酸、コハク酸、リンゴ酸など有機酸が結合したアシル化アントシアニン (Acylated



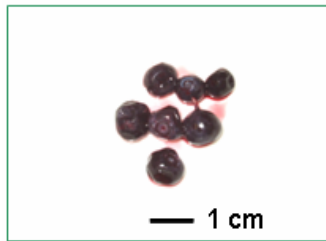
	R ₁	R ₂
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH

Figure 2. Structures of anthocyanidins

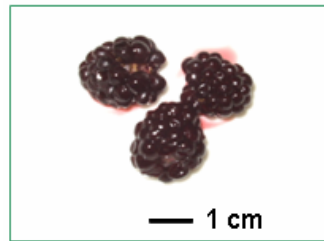
anthocyanin) が全体の約 45%を占めている(大庭理一郎, 五十嵐喜治, 津久井亜紀夫編 2000)。これら糖や有機酸が複雑に組み合わせることで 500 種以上ものアントシアニンが既に確認されている。

ベリー果実は赤や紫、藍色など特徴的な色合いを有するものが多く、その色素にアントシアニンが含まれる。ベリー果実は、最も一般的に知られているブルーベリーと、同じツツジ科スノキ属に分類されるビルベリー、クランベリー (英名: Cranberry、学名: *Vaccinium macrocarpon*)、ユキノシタ (アジサイ) 科スグリ属に分類されるカシス (英名: Black currant、学名: *Ribes nigrum*)、レッドカラント (英名: Red currant、学名: *Ribes rubrum*)、バラ科キイチゴ属に分類されるブラックベリー (英名: Blackberry、学名: *Rubus fruticosus*)、ラズベリー (英名: Raspberry、学名: *Rubus idaeus*)、バラ科オランダイチゴ属に分類されるストロベリー (英名: Strawberry、学名: *Fragaria x ananassa*)、ニワトコ属に分類されるエルダーベリー (英名: Elderberry、学名: *Sambucus nigra*)、また日本において古くから養蚕産業に用いられるクワ科クワ属の桑の実、マルベリー (英名: Mulberry、学名: *Morus nigra*) など多種多様に存在し、それぞれの科や属ごとに特徴的な形状をなす。アントシアニンの種類や含有量について、これまで個々の報告はなされているが、同一条件で複数の果実から抽出、分析し、含有量や抗酸化能を比較した報告は未だ少ない。

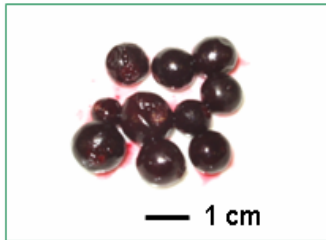
本章では、一般的に広く嗜好食品やサプリメントとして広く食されるベリー果実のうち、ビルベリー、ブラックベリー、カシス (ブラックカラント)、ブルーベリー、クランベリー、クローベリー、マルベリー、ラズベリー、レッドカラント、ストロベリーの計 10 種 (Figure 3) の凍結果実を入手し、同一条件にて抽出、精製、分析、抗酸化能測定を行い、各ベリー果実のアントシアニン組成、含有量、および抗酸化能を比較した。



Bilberry (ビルベリー)



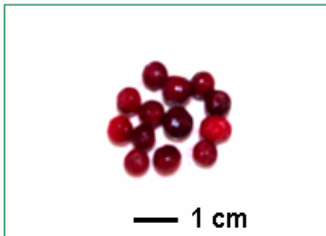
Blackberry (ブラックベリー)



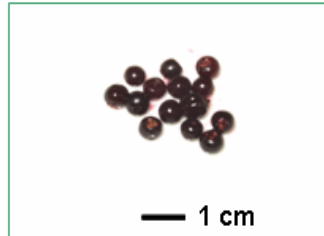
Black currant (カシス)



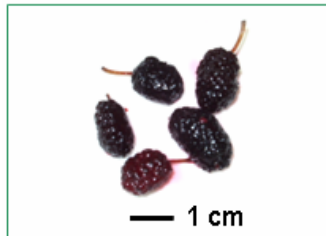
Blueberry (ブルーベリー)



Cranberry (クランベリー)



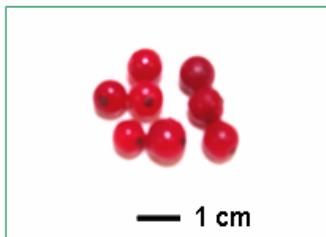
Crowberry (クローベリー)



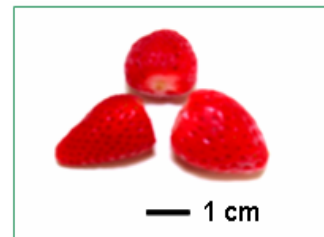
Mulberry (マルベリー)



Raspberry (ラズベリー)



Red currant (レッドカラント)



Strawberry (ストロベリー)

Figure 3. 本研究に用いた 10 種のベリー果実

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料

デルフィニジン (Delphinidin)、デルフィニジン-3-グルコシド (Delphinidin-3-glucoside)、シアニジン、シアニジン-3-ガラクトシド (Cyanidin-3-galactoside)、シアニジン-3-グルコシド (Cyanidin-3-glucoside)、シアニジン-3-ルチノシド (Cyanidin-3-rutinoside)、ペチュニジン (Petunidin)、ペオニジン (Peonidin)、ペオニジン-3-グルコシド (Peonidin-3-glucoside)、ペラルゴニジン (Pelargonidin)、ペラルゴニジン-3-グルコシド (Pelargonidin-3-glucoside)、マルビジン (Malvidin)、マルビジン-3-ガラクトシド (Malvidin-3-galactoside)、マルビジン-3-グルコシド (Malvidin-3-glucoside)、以上のアントシアニンおよびアントシアニン標準品は Extrasynthese (Genay, France) から、トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid : TFA)、ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]、TPTZ (2,4,6-tripyridyl-1,3,5-triazine)、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から、BHQ (*tert*-Butylhydroquinone) は Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) から購入した。以上は全てハイグレードを使用した。

クローベリー [Crowberry (*Empetrum nigrum*)] とビルベリー [bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.)] は Wakasa Seikatsu, Co., Ltd. (Kyoto, Japan) より供与された。ブラックベリー [Blackberry (*Rubus fruticosus*)]、カシス [Black currant (*Ribes nigrum*)]、クランベリー [Cranberry (*Vaccinium oxycoccus*)]、レッドカラント [Redcurrant (*Ribes rubrum*)] は Sicoly (St. Laurent d' Agny, France) から、ブルーベリー [Blueberry (*Vaccinium* spp.)] は Life Foods Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から、マルベリー [Mulberry (*Morus nigra*)] は Sakurae Kuwacha Seisan Kumiai (Shimane, Japan) から、ラズベリー [Raspberry (*Rubus idaeus*)] は Ocean Trading Co., Ltd.

(Kyoto, Japan)から、ストロベリー[Strawberry (*Fragaria×ananassa*)]はFarmhouse in Shizuoka City (Shizuoka, Japan) から購入した。それぞれ生果実は使用直前まで -80°C にて冷凍保存した。

2-2 実験方法

2-2-1 各ベリー果実からのアントシアニン成分の抽出

凍結したベリー果実 100 g を量りとり、液体窒素で凍結したまま粉砕処理した後、凍結乾燥機 EYELA FD-5N (Tokyo Rikakikai, Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて水分を除去し、果実乾燥粉末を得た。果実乾燥粉末はアントシアニン抽出の直前まで 4°C 、デシケーター内にて保管した。果実乾燥粉末 200 mg を試験管に量りとり、0.5%酢酸含有 80%メタノール水溶液 8 mL を加えて攪拌した後、超音波装置にて 1 分間処置した。 4°C 、4000 rpm にて 10 分間遠心分離を行った後に、上清の抽出溶液のみ別容器に移し換えた。沈殿した果実粉末に再度抽出溶媒を 8 mL 加え、同様の抽出工程を計 3 回行った。回収した抽出溶液はエバポレーターにてメタノールを除去し、その後凍結乾燥機にて水分を除去することで粉末状の果実抽出物を得た。果実抽出物は遮光し、 4°C にて保管した。

2-2-2 多波長検出器付き高速液体クロマトグラフィー分析 (HPLC-DAD)

各ベリー果実抽出物 10 mg を量りとり、50%エタノール(0.5%BHQ・0.5%TFA)水溶液 1 mL を加え溶解し、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター(Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)に通し、分析に用いた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システムは Jasco system control program HSS-1500 (Tokyo, Japan) を用い、これに解析用ソフト Jasco-Borwin chromatography data station、ポンプ PU-1580、オートサンプラーAS-1559、カラムオーブン CO-1565、多波長検出器 (DAD) システ

ム MD-1510 が備わっているため、200 から 600 nm の波長領域で観察した。カラムは Capcell Pak ACR (ϕ 4.6 mm \times 250 mm、S-5、5 μ m、Shiseido Co., Ltd., Tokyo、Japan) を使用し、カラムオープン温度は 40 °C に設定した。移動相は、(A) 0.5% TFA 水溶液、および (B) アセトニトリル (0.1% TFA) を用い、流量は 1 mL/min に設定した。各分析前に直線勾配溶出を 0 min : 0%(B) ; 15 min : 100%(B)で行った。グラジエント条件は、0 min : 92% (A) ; 50 min : 85% (A) ; 60 min : 70% (A) ; 65 min : 40% (A) ; 75 min : 40% (A)で行った。インジェクション量は 10 μ L とした。

2-2-3 高速液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析 (HPLC-ESI-MS/MS)

2-2-2 と同様に各ベリー果実抽出物を 50%エタノール (0.5%BHQ \cdot 0.5%TFA) 水溶液にて溶解し、1 mL溶液を調整した。カラムはCapcell Pak ACR (ϕ 2.0 mm \times 250 mm、S-5、5 μ m、Shiseido Co., Ltd., Tokyo、Japan) を用い、カラム温度は 40°Cに設定した。検出器はNanospace SI-1 HPLC system (Shiseido、Tokyo)、イオントラップ質量分析装置はESI (LCQ、Thermo Fisher Scientific K.K., San Jose、CA) を用いて分析を行った。移動相は、(A) 10%ギ酸水溶液、および (B) アセトニトリルを用い、流量は 0.2 mL/minに設定した。グラジエント条件は、0 min : 98% (A) ; 10 min : 93% (A) ; 35 min : 70% (A) ; 40 min : 40% (A) ; 50 min : 40% (A)で行った。質量分析条件は、Scan modeをMS/MS、Ion sourceをESI、極性を範囲 m/z 100—1000 でPositive ion mode、Sheath gasをN₂、Spray voltageを 50 kV、detector voltageを 5.0 kV、Capillary Temperatureを 200°C、Capillary Voltageを 10 V に設定して分析を行った。

2-2-4 抗酸化能測定

2-2-4-1 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去活性試験

DPPH 試薬は溶液中でアニオンラジカルを形成する。ラジカルはプロトンを受け取ると無色のヒドラジンへと変化するため、ラジカル消去能を有する物質との反応は DPPH ラジカルを還元させ、溶液を無色にする。DPPH ラジカル消去活性試験は Blois の報告に従って行った(Blois 1958)。各ベリー果実抽出物を 50%エタノール水溶液に 2 mg/mL の濃度で溶解し、100 μ L を 100 μ M の DPPH エタノール溶液 3 mL に加え、30 分間、室温放置した後、517 nm における吸光度を測定した。陽性対照として 0.1 mg/mL trolox を用いた。Blank には 50%エタノール水溶液を用いた。また、DPPH ラジカル測定波長である 517 nm はアントシアニンに特有の吸光波長でもあるため、別途各ベリー果実抽出物 50%エタノール水溶液 100 μ L とエタノール 3 mL の混合液を測定し、吸光度を差し引いて補正をかけた。各試料の吸光度測定結果と DPPH 溶液の吸光度の差から DPPH ラジカル消去活性率 (%) を算出し、抗酸化作用を評価した。

2-2-4-2 2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) ラジカル消去活性試験

ABTS は過硫酸カリウムとの反応により、カチオンラジカルを生じ深青色を呈する。ここにラジカル消去活性を有する物質を添加するとラジカルは消失し、無色の状態に戻る(Re et al. 1999)。100 mL の 7 mM ABTS ラジカルエタノール溶液を調製し、734 nm における吸光度が 0.80 から 0.90 となる用にエタノールを加え調製した。各ベリー果実抽出物 50%エタノール水溶液 (2 mg/mL)、陽性対照である trolox 0.1 mg/mL 溶液、または Blank として 50%エタノール水溶液 100 μ L を ABTS 溶液 3 mL に加え、5 分間、室温放置した後、734 nm における吸光度を測定した。各試料の吸光度測定結果と ABTS 溶液の吸光度の差から ABTS ラ

ジカル消去活性率 (%) を算出し、抗酸化作用を評価した。

2-2-4-3 第二鉄還元力 (FRAP) 試験

鉄イオンはヘモグロビンや酵素の活性中心基として生体内で利用される反面、細胞内または血中に存在する余剰な遊離鉄イオンはラジカル産生を促し、組織障害の原因となる。FRAP (ferric ion reducing antioxidant power) 試験は、物質の鉄イオン還元力を測定する抗酸化活性試験として広く用いられている。FRAP試験はBenzieらの方法を参考に用いた(Benzie and Strain 1996)。希酸性溶液中で遊離した3価の鉄イオン(Fe^{3+})が抗酸化物質から電子を受け取り還元され2価の Fe^{2+} となることで、TPTZとの反応により593 nmに吸収特性をもつ赤紫色を呈する。FRAP試薬は、10 mM TPTZ溶液 (40 mM塩酸水溶液にて調整) : 300 mM酢酸緩衝液 (pH 3.6) : 20 mM塩化鉄 (III) 水溶液を10 : 1 : 1 (v/v/v) の割合で混合し調整した。各ベリー果実抽出物50%エタノール溶液 (2 mg/mL) またはBlankとして50%エタノール水溶液100 μL をFRAP溶液3 mLに加え、3分間、室温放置した後、593 nmにおける吸光度を測定した。陽性対照としてtroloxを用い、各試料の吸光度測定結果からtrolox当量/mLを算出し、抗酸化作用を評価した。

第3節 結果

3-1 各ベリー果実抽出物中のアントシアニンの定性および定量

本研究で入手した10種類のベリー果実について、凍結乾燥後の乾燥果実重量より算出した水分量および抽出物重量をTable 1に示す。

Table 1. Berries used in this study

English name	Scientific name	Contents (g/100 g fresh berry) of	
		Water ^a	Extract ^b
Bilberry	<i>Vaccinium myrtillus</i>	85.4	5.7
Blackberry	<i>Rubus fruticosus</i>	85.0	5.0
Blackcurrant	<i>Ribes nigrum</i>	77.0	8.8
Blueberry	<i>Vaccinium</i> spp.	85.4	6.7
Cranberry	<i>Vaccinium oxycoccus</i>	84.5	6.6
Crowberry	<i>Empetrum nigrum</i>	87.3	3.0
Mulberry	<i>Morus nigra</i>	81.9	6.3
Raspberry	<i>Rubus idaeus</i>	84.2	5.5
Redcurrant	<i>Ribes rubrum</i>	83.4	6.6
Strawberry	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	88.4	5.2

^aCalculated after freeze drying of fresh berry. ^bRemainder extracted by 80% methanol containing 0.5% acetic acid from freeze-dried berry powder.

生ベリー果実 100 g 中の水分量は 77.0-88.4 g、抽出物重量は 3.0-8.8 g であった。得られた各ベリー果実抽出物の中で代表的な 6 つのベリー果実(クローベリー、カシス、ラズベリー、ビルベリー、ブラックベリー、レッドカラント) の 520 nm の波長における HPLC クロマトグラムを Figure 4 に示す。10 種類のベリー果実から、520 nm に吸収特性をもつ合計 29 種類のピークが検出された。

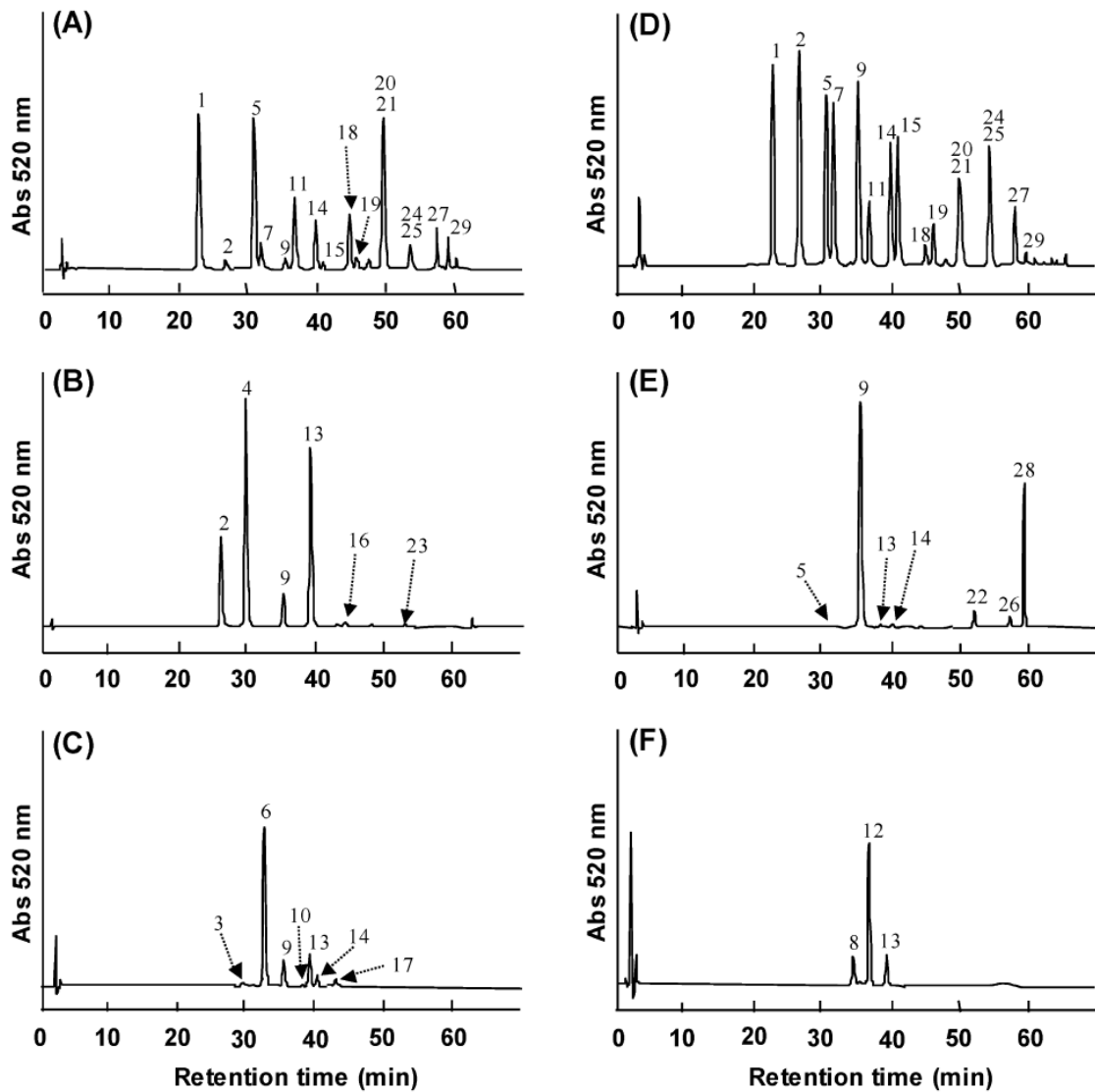


Figure 4. HPLC profiles of berry extracts at 520 nm. Each berry was extracted with 80% methanol containing 0.5% acetic acid as described in the Materials and Methods. (A) Crowberry, (B) blackcurrant, (C) raspberry, (D) bilberry, (E) blackberry, and (F) redcurrant. Peak numbers refer to Table 2.

ベリー果実に含まれるアントシアニンは、標準品として入手できないものも多く存在するため、すべてのアントシアニン同定を HPLC-DAD のリテンションタイムのみでは行えない。そこで、著者はアントシアニンのアグリコンの同定を、各種アントシアニジンの標準品を用いて吸光スペクトルから同定した。さ

らに HPLC-ESI-MS/MS 分析および過去に報告されたベリー類のアントシアニン分析結果(Aaby et al. 2007; Faria et al. 2005; Maatta-Riihinen et al. 2004; Nakajima et al. 2004; Seeram et al. 2006; X. Wu et al. 2006)を参照した結果、10 種類のベリー果実に含まれる計 28 種のアントシアニン（および 1 種のアントシアニンジンを）を推測した。結果を Table 2 にまとめる。

Table 2. Identified anthocyanins in berries

Peak	RT (min) ^a	Anthocyanins	[M] ⁺ (<i>m/z</i>)	Fragment ions (<i>m/z</i>)
1	23.1	Delphinidin-3-galactoside	465	303
2	26.8	Delphinidin-3-glucoside	465	303
3	29.4	Cyanidin-3-sophoroside	611	449, 287
4	29.7	Delphinidin-3-rutinoside	611	465, 303
5	31.1	Cyanidin-3-galactoside	449	287
6	32.0	Cyanidin-3-sophoroside-5-rhamnoside	757	611, 433, 287
7	32.1	Delphinidin-3-arabinoside	435	303
8	35.0	Cyanidin-3-sambubioside	581	287
9	35.6	Cyanidin-3-glucoside	449	287
10	36.1	Cyanidin-3-sambubioside-5-rhamnoside	727	581, 433, 287
11	37.1	Petunidin-3-galactoside	479	317
12	38.0	Cyanidin-3-xylosylrutinoside	727	581, 287
13	39.3	Cyanidin-3-rutinoside	595	449, 287
14	40.4	Cyanidin-3-arabinoside	419	287
15	41.4	Petunidin-3-glucoside	479	317
16	43.3	Petunidin-3-rutinoside	625	479, 317
17	44.8	Pelargonidin-3-rutinoside	578	431, 271
18	45.3	Peonidin-3-galactoside	463	301
19	46.4	Petunidin-3-arabinoside	449	317
20	50.2	Peonidin-3-glucoside	463	301
21	50.2	Malvidin-3-galactoside	493	331
22	51.9	Cyanidin-3-xyloside	419	287
23	53.7	Peonidin-3-rutinoside	609	463, 301
24	54.7	Peonidin-3-arabinoside	433	301
25	54.7	Malvidin-3-glucoside	493	331
26	57.1	Cyanidin-3-(6'-malonyl)glucoside	535	449, 287
27	58.3	Malvidin-3-arabinoside	463	331
28	59.1	Cyanidin-3-dioxaloylglucoside	593	287

^a Retention time of HPLC.

ここで、Figure 3 において (A) クローベリーおよび (D) ビルベリーのクロマトグラムに見られるピーク 20 と 21、そしてピーク 24 と 25 は、2 種類のアントシアニンが同一のリテンションタイムに重なって表れた。Table 2 で示す HPLC-ESI-MS/MS 分析による $[M]^+$ (m/z) の結果および過去文献より、ピーク 20、21 は peonidin-3-glucoside および malvidin-3-galactoside であり、ピーク 24、25 は peonidin-3-arabinoside および malvidin-3-glucoside であると同定した。しかしながら、これら 2 つのピークは本研究で用いたアントシアニン分析条件では分離が困難であったため、つづく定量解析では peonidin-3-glucoside/malvidin-3-glucoside として算出した。6 種のアントシアニン標準品について、同様の溶媒条件にて濃度を振り分け調製し、HPLC-DAD 分析にて検量線を作成し、各果実抽出物中のアントシアニンを定量した。Table 3 に HPLC-DAD および HPLC-ESI-MS/MS 分析にて同定した各ベリー果実に含まれるアントシアニンの種類並びにそれぞれの定量結果 (mg/g-果実抽出物) を示す。

Table 3. Anthocyanin content in each berry extract

Berries	Anthocyanins	mg/g extract ^a
Bilberry	Cyanidin-3-galactoside	3.70
	Cyanidin-3-glucoside	4.05
	Cyanidin-3-arabinoside	2.54
	Delphinidin-3-galactoside	4.58
	Delphinidin-3-glucoside	4.73
	Delphinidin-3-arabinoside	3.53
	Peonidin-3-galactoside	0.46
	Petunidin-3-galactoside	1.52
	Petunidin-3-glucoside	2.94
	Petunidin-3-arabinoside	0.84
	Malvidin-3-arabinoside	0.81
	Peonidin-3-glucoside / Malvidin-3-galactoside	3.48
	Peonidin-3-arabinoside / Malvidin-3-glucoside	3.62
	Blackberry	Cyanidin-3-glucoside
Cyanidin-3-rutinoside		0.06
Cyanidin-3-arabinoside		0.05
Cyanidin-3-xyloside		0.47
Cyanidin-3-(6'-malonyl)glucoside		0.30
Cyanidin-3-dioxaloylglucoside		2.05
Blackcurrant	Cyanidin-3-glucoside	1.10
	Cyanidin-3-rutinoside	7.08
	Delphinidin-3-glucoside	2.94
	Delphinidin-3-rutinoside	9.79
	Peonidin-3-rutinoside	0.11
	Petunidin-3-rutinoside	0.18
Blueberry	Cyanidin-3-galactoside	0.28
	Cyanidin-3-glucoside	0.04
	Cyanidin-3-arabinoside	0.12
	Delphinidin-3-galactoside	1.37
	Delphinidin-3-glucoside	0.13
	Delphinidin-3-arabinoside	0.74
	Peonidin-3-galactoside	0.15
	Petunidin-3-galactoside	1.07
	Petunidin-3-glucoside	0.11
	Petunidin-3-arabinoside	0.46
	Malvidin-3-arabinoside	1.75
	Peonidin-3-glucoside / Malvidin-3-galactoside	3.65
	Peonidin-3-arabinoside / Malvidin-3-glucoside	0.43
Cranberry	Cyanidin-3-galactoside	3.86
	Cyanidin-3-glucoside	0.27
	Cyanidin-3-arabinoside	0.62
	Peonidin-3-glucoside	0.05

Crowberry	Cyanidin-3-galactoside	8.04
	Cyanidin-3-glucoside	0.55
	Cyanidin-3-arabinoside	2.34
	Delphinidin-3-galactoside	8.62
	Delphinidin-3-glucoside	0.43
	Delphinidin-3-arabinoside	1.36
	Peonidin-3-galactoside	2.57
	Petunidin-3-galactoside	3.81
	Petunidin-3-glucoside	0.24
	Petunidin-3-arabinoside	0.52
	Malvidin-3-arabinoside	1.41
	Peonidin-3-glucoside / Malvidin-3-galactoside	10.37
	Peonidin-3-arabinoside / Malvidin-3-glucoside	1.55
Mulberry	Cyanidin-3-galactoside	0.03
	Cyanidin-3-glucoside	9.61
	Cyanidin-3-rutinoside	4.22
	Pelargonidin-3-glucoside	1.74
	Pelargonidin-3-rutinoside	0.54
Raspberry	Cyanidin-3-sophoroside	6.73
	Cyanidin-3-sophoroside-5-rhamnoside	1.21
	Cyanidin-3-glucoside	0.98
	Cyanidin-3-sambubioside-5-rhamnoside	0.46
	Cyanidin-3-rutinoside	0.30
	Pelargonidin-3-glucoside	0.66
Redcurrant	Cyanidin-3-sambubioside	0.31
	Cyanidin-3-xylosylrutinoside	1.82
	Cyanidin-3-rutinoside	0.36
Strawberry	Cyanidin-3-glucoside	0.09
	Pelargonidin-3-glucoside	5.07

^a Values are expressed as mean of triplicate analyses for each sample.

10種のベリー果実中に含まれるアントシアニンを同定した結果、delphinidin および cyanidin のアグリコン基本骨格を有するアントシアニンが多く認められた。この結果は過去の報告と類似していた(Aaby et al. 2007; Faria et al. 2005; Maatta-Riihinen et al. 2004; Nakajima et al. 2004; Seeram et al. 2006; X. Wu et al. 2006)。サプリメントとして利用されるビルベリー、ブルーベリーおよびクロー

ベリーからは、同じ 15 種類のアントシアニンが検出された。カシスおよびマルベリーからは、cyanidin-3-rutinoside、delphinidin-3-rutinoside、penidin-3-rutinoside および petunidin-3-rutinoside など、ルチノースを配糖体にもつ特徴的なアントシアニンが検出された。バラ科に属するブラックベリーおよびラズベリーからは cyanidin を基本骨格とする cyanidin-3-xyloside、cyanidin-3-(6'-malonoyl)glucoside、cyanidin-3-dioxaloylglucoside、cyanidin-3-sophoroside、cyanidin-3-sophoroside-5-rhamnoside、cyanidin-3-sambubioside-5-rhamnoside など、特徴的な配糖体を有するアントシアニンが検出された。

3-2 各ベリー果実抽出物の抗酸化能測定

10 種のベリー果実抽出物について、総アントシアニン含量 (mg/g-抽出物)、DPPH ラジカル消去作用、ABTS ラジカル消去作用、FRAP 鉄還元力を測定した結果を Table 4 に示す。

Table 4. Antioxidant potency of berry extracts

Berries	Total anthocyanins ^a	Antioxidant potencies ^{b, c} by		
		DPPH	ABTS	FRAP
Bilberry	38.8	61 ± 0.3	38 ± 0.3	193 ± 1.1
Blackberry	10.1	51 ± 0.4	26 ± 0.4	124 ± 1.0
Blackcurrant	21.2	52 ± 1.0	31 ± 0.1	131 ± 4.3
Blueberry	10.2	28 ± 0.6	14 ± 0.1	56 ± 2.3
Cranberry	4.8	36 ± 0.4	23 ± 0.3	94 ± 1.3
Crowberry	41.8	90 ± 0.4	64 ± 0.7	317 ± 1.9
Mulberry	16.1	40 ± 0.4	17 ± 0.2	89 ± 0.3
Raspberry	10.3	46 ± 0.5	23 ± 0.2	94 ± 1.7
Redcurrant	2.5	50 ± 0.4	27 ± 0.8	95 ± 0.2
Strawberry	5.2	25 ± 0.1	11 ± 0.2	40 ± 0.3
Trolox		47 ± 0.4	20 ± 0.1	

^a mg/g extract. ^b Berry extracts (2 mg/mL) and trolox (0.1 mg/mL) were used for each method. ^c Antioxidant potencies were indicated as % of radical quenching activity (DPPH and ABTS) and mg trolox equivalent/mL (FRAP) as described in the Materials and Methods.

本試験で用いた 10 種の果実抽出物において最もアントシアニン含有量が高かったのはクローベリー抽出物であり、ついでビルベリー、カシス抽出物の順であった。DPPH アニオンラジカル、ABTS カチオンラジカル消去作用および FRAP 鉄還元力の測定結果についても同様にクローベリー、ビルベリー、カシス抽出物の順に高い抗酸化作用が認められたが、アントシアニン含有量において差が少ないにも関わらず、クローベリー抽出物はビルベリー抽出物と比べて非常に高い抗酸化作用を示した。

第4節 考察

本研究では10種類のベリー果実から同一溶媒条件を用いて果実抽出物を得た。生果実100gから得られたベリー果実抽出物の重量はTable 1に示されたように、最も多いカシスで8.8 g/100 g-生果実であり、少ないクローベリーで3.0 g/100 g-生果実であった。本試験の条件で得られた抽出物の構成成分の多くは糖質であり、HPLC分析の定量結果から抽出物中のアントシアニン含有量は2.5-41.8 mg/g-抽出物当りであった。ここで過去の報告によるアントシアニン含有量と比較するため、本分析結果から算出した生果実および乾燥果実重量当りのアントシアニン含有量をTable 5に示す。

Table 5. Anthocyanin contents in fresh berries

English name	Contents of anthocyanin (mg/100 g-fresh berry) ^a	Contents of anthocyanin (mg/100 g-dry berry) ^b
Bilberry	221.2	1514.8
Blackberry	50.5	336.7
Blackcurrant	186.6	811.1
Blueberry	68.3	468.1
Cranberry	31.7	204.4
Crowberry	125.4	987.4
Mulberry	101.4	560.4
Raspberry	56.7	358.5
Redcurrant	16.5	99.4
Strawberry	27.0	233.1

^{a, b} Values are calculated by contents of water and extraction in fresh berry and anthocyanin contents in the extract (Table 1, 4, 5).

入手した各ベリー果実10種において、生果実におけるアントシアニン含有量が最も高かったのはビルベリー(221.2 mg/100 g-生果実、1514.8 mg/100 g-乾燥果実)

であり、ついでカシス（186.6 mg/100 g-生果実、811.1 mg/100 g-乾燥果実）とクローベリー（125.4 mg/100 g-生果実、987.4 mg/100 g-乾燥果実）の順であった。Kahkonen M. K.らの報告によれば、ベリー果実のアントシアニン含有量は、ビルベリーが 599.7 mg/100 g-生果実および 2298-3090 mg/100 g-乾燥果実、カシスが 235.6 mg/100 g-生果実および 756-1064 mg/100 g-乾燥果実、クローベリーが 2473 mg/100 g-乾燥果実（生果実におけるアントシアニン含有量は報告なし）であり、本研究と同様にビルベリー、カシス、クローベリーが他のベリー果実に比べアントシアニン含有量が高いことが示されている(Kahkonen et al. 2001; Kahkonen et al. 2003)。

一方、ベリー果実に含まれるアントシアニンの種類の違いも機能性に影響する要因となる。アントシアニンの基本骨格や配糖体、有機酸の違いは、抗酸化作用や薬理作用、生体内への吸収率や体内動態に影響する。アントシアニンはフラボノイド骨格を有するポリフェノールとして知られているが、Figure 2 に示すアントシアニンの構造において、B 環に配位する水酸基の位置と数が抗酸化作用の強弱に影響すると考えられている。過去の報告において、スーパーオキシドアニオンラジカルやヒドロキシルラジカルなど脂質過酸化を引き起こすラジカルに対する消去作用は、delphinidin (3',4',5'-OH) > cyanidin (3'4'-OH) > peralgonidin (4'-OH) と配位する水酸基の数が多いほど高いことが分かっている(Noda et al. 2002)。これらのアントシアニンは電子の偏りにより複数のカテコール構造を有し、生成ラジカルが多くの共鳴構造をもつことで安定化するためと考えられている(Bors et al. 2004)。また、アントシアニンの配糖体の数も共鳴構造の安定化に寄与し、3-配糖体は 3,5-ジ配糖体より生成ラジカルがより多くの共鳴体をもつために、高い抗酸化作用を有する(Bors et al. 2004)。Table 4 で示される各ベリー果実抽出物の DPPH、ABTS ラジカル消去活性および FRAP 鉄還元作

用の測定結果において、高い抗酸化能を示したクローベリー、ビルベリー、カシス、ブラックベリー抽出物は、いずれも delphinidin および cyanidin 骨格のアントシアニンが多く含まれていた。特に高い抗酸化作用を示したクローベリー抽出物からは、主にガラクトース配糖体のアントシアニンの含有率が高いことが確認されたが、配糖体の違いが抗酸化作用に及ぼす影響については今後の検討課題である。一方、ベリー果実はアントシアニン以外のポリフェノール成分として、quercetin (ケルセチン)、myricetin (ミリセチン) および kaempferol (ケンフェロール) を含有し、特にクランベリー、カシス、クローベリーはビルベリーよりそれらポリフェノール含有量が高いとの報告がある(Hakkinen et al. 1999)。したがって、本試験で用いた 10 種のベリー果実抽出物の中で、アントシアニンおよびその他のポリフェノール含有量が高く、さらに比較的抗酸化作用の高い delphinidin、cyanidin の含有量の高いクローベリー、ビルベリー、カシスは、薬理活性においても高い機能性を示す可能性が示唆された。

本研究では、アントシアニンを含有するベリー果実を中心に、同一条件にてアントシアニンの抽出、分析、および抗酸化能測定を行うことで、その特徴や有用性について比較した。アントシアニン含有量および抗酸化能において高い有用性を示したのは、クローベリー、ビルベリー、カシスであった。ビルベリーおよびカシスは、すでに抽出物 (エキス) を主原料としたサプリメントが市場でも見られ、主に視機能改善を目的とした製品が広く飲用されている。一方、クローベリーは未だ原料としての利用はなされていない。しかしながら、本研究結果から新たな研究開発が進むものと思われる。

以上より、以降においてはアントシアニンを含有するベリー果実の中からビルベリーの薬理的プロファイルを明らかにするとともに、第 2 章以降においてはその薬理的プロファイルを明らかにするとともに、サプリメント (健康

志向食品) としての有効性についても検討を行った。

第2章 紫外線誘発網膜視細胞障害に対するビルベリーおよびリンゴンベリーの保護作用

第1節 緒言

視覚は我々が外部から得る情報のおよそ8割を占めている感覚器官であり、その情報は光を感受した情報が脳に伝わることで得られる。外部から発せられた光信号は、前眼部の角膜（Cornea）と水晶体（Crystalline lens）で屈折し、眼内容物である硝子体（Vitreous body）を通過して後眼部の網膜（Retina）または黄斑部（Macular area）で感受される。毛様体筋（Ciliary body）は水晶体の厚み

を変化させ、網膜に到達する光のピント調節を担っている。網膜は組織学的にさらに視神経（Optic nerve）、網膜神経節細胞

（Retinal ganglion cell）、アマクリン細胞（Amacrine cell）、双極細胞（Bipolar cell）、水平細胞（Horizontal cell）、視細胞・光受容体（Photoreceptor cell）、網膜色素上皮細胞

（Retinal pigment

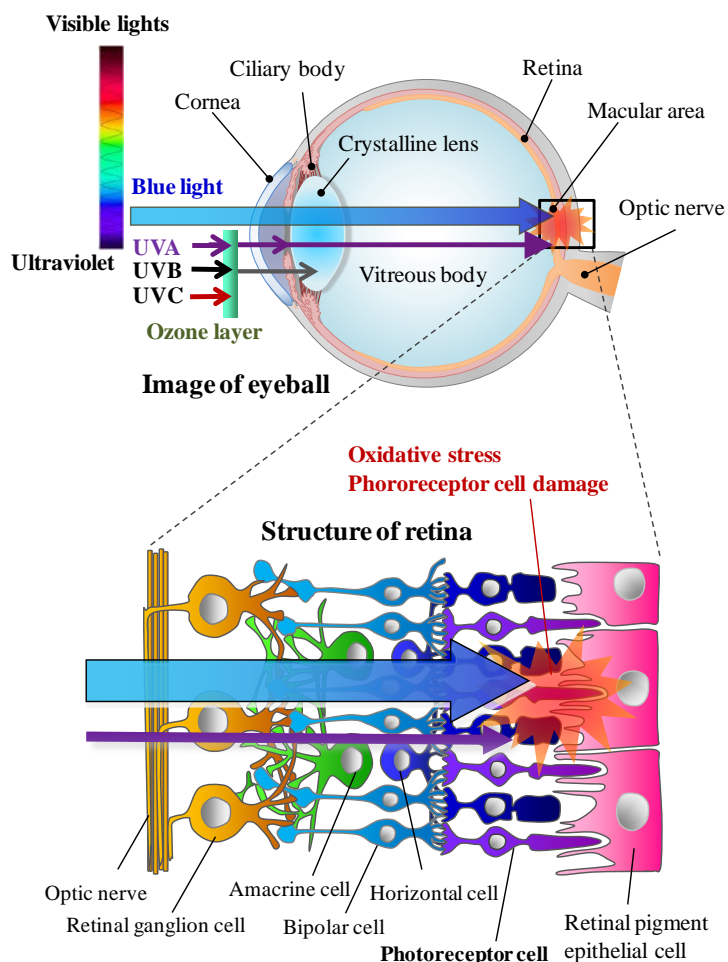


Figure 5. Structure of ocular tissues and light damage.

epithelial cell) からなる (Figure 5)。光刺激は網膜の光受容細胞である視細胞により感受される。視細胞は錐体細胞と桿体細胞に分けられ、錐体細胞は視力や色覚を担い、一方の桿体細胞はロドプシタンパク質により暗い視野での光感受に関わっている。視細胞で感受された光刺激は神経刺激に変換され、水平細胞、双極細胞およびアマクリン細胞を経て、網膜の内側に存在する神経節細胞層に到達する。視覚信号は網膜神経線維から視神経を通じて、最終的に脳の視覚野へと視覚情報は伝えられる。

紫外線 (Ultraviolet : UV) は太陽光に含まれる光の一種である。紫外線はその波長領域の違いにより、UVA (315–380 nm)、UVB (280–315 nm)、UVC (200–280 nm) の3種類に分類されるが、オゾン層により UVC および UVB の大半は吸収され、地表には UVA と UVB の一部のみ到達する。一般的に、紫外線は皮膚の日焼けやシミ、シワの原因として知られているが、同じく外部に突出した器官である眼に対しても強い障害性をもつ。UVB は、主に角膜や水晶体など前眼部において吸収されるが、その際に活性酸素を発生させ組織障害を引き起こす。代表的な疾患例として、角膜炎、翼状片、白内障などがある。一方、UVA も角膜や水晶体で多くは吸収されるが、一部は透過して後眼部の網膜内層に到達し、障害を与えることが示唆されている (Figure 5)。近年では、可視光の一種である青色光暴露による網膜障害も懸念されている (詳細を第3章で述べる)。UVA 照射は、ロドプシンのブリーチング (光を受けたロドプシンが、11-*trans*-retinal とオプシタンパク質とに分解される反応) を進行し再生の遅延を招き、ミトコンドリアの構造を歪め、視細胞の代謝に影響を与える (Rapp et al. 1990; Rapp and Ghalayini 1999; Verna et al. 2000)。加えて、網膜組織の DNA 損傷を招き、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) を発生させ網膜視細胞障害を引き起こす (Zhang et al. 1997)。長期的な UVA 暴露による網膜障害は、加齢黄斑変性症や網

膜色素変性症の進行にも関与する可能性がある。UVA 照射後の活性酸素種 ROS 産生は、細胞アポトーシス誘導に関与する Mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路である p38 MAPK と c-Jun N-terminal kinase (JNK) および細胞生存に関与する Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt) シグナル経路にも影響を与える(McCubrey et al. 2006)。

ビルベリー (*Vaccinium myrtillus* L.) とリンゴンベリー (*Vaccinium vitis-idaea* L.) は、同じツツジ科スノキ属に属するベリー果実であり、北ヨーロッパの森林や湖周囲に自生している。ビルベリーは果実内部にまでアントシアニンを含有している。健康食品に広く用いられるビルベリーエキスは、アントシアニン (delphinidin、cyanidin、malvidin、peonidin、petunidin とその配糖体) を 36% 以上含有している。リンゴンベリーはビルベリーとはほぼ同時期に果実が実り、現地の人々により採取され、ジャムや肉料理のソースとして従来食されてきた食経験豊かな果実である。濃紫色のビルベリーに対し、リンゴンベリーの果実は鮮やかな赤色を呈しているが (Figure 6)、それは果皮に Cyanidin 系のアントシアニン (Cyanidin-3-galactoside、Cyanidin-3-glucoside、Cyanidin-3-arabinoside) が含まれているためである。リンゴンベリー果実からは、他にもアルブチン、プロシアニジン、レスベラトロール、ケルセチン、カテキンなどの有用なポリフェノール成分が含まれており、尿路感染症、歯痛、炎症などに対する伝統療法に用いられてきた(Leduc et al. 2006)。本研究で用いたリンゴンベリーエキスは、主にレスベラトロールとプロシアニジンを高含有するものである。これまでにレスベラトロールの機能性は多岐にわたり報告されているが、眼に関する報告では網膜炎抑制作用(Kubota et al. 2009)、可視光誘発網膜障害保護作用(Kubota et al. 2010)および網膜剥離による視細胞障害抑制作用(Huang et al. 2013)などがある。一方、リンゴンベリーについての視機能に関する研究報告はなされていない。

い。本研究では、ビルベリーエキスと、同様に抗酸化作用を有するポリフェノールを含有したリンゴンベリーエキスについて、視機能改善作用を検討することにした。第二章では、紫外線誘発網膜視細胞障害に対し、ビルベリーおよびリンゴンベリーエキスに含まれるポリフェノール成分の抗酸化作用による薬理活性評価を目的とした。

A



Bilberry

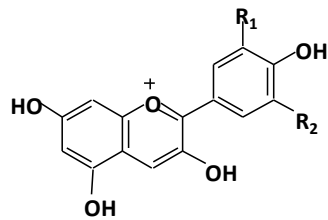


Lingonberry

B

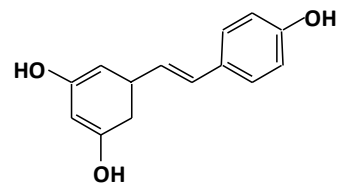


C

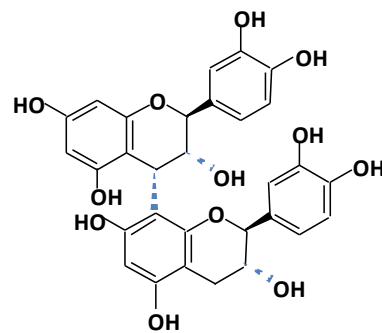


	R ₁	R ₂
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Anthocyanin



trans-Resveratrol



Procyanidin B2

Figure 6. Bilberry and lingonberry extracts and constituents in both extracts. (A) Fruits of bilberry and lingonberry in Finland, (B) bilberry (left) and lingonberry (right) extracts, (C) structures of active constituents in bilberry and lingonberry extracts.

第2節 実験方法

2-1 実験材料

ビルベリーエキス (B-ext)、リンゴンベリーエキス (L-ext) は、Beijing Ginkgo Group Japan Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から供与された。両エキスの主な活性成分は、HPLC 分析および紫外可視分光光度計を用いて定量しており、B-ext は Delphinidin 14.1%、Cyanidin 9.1%、Malvidin 6.1% (残りは Peonidin と Petunidin を併せて 9.1%)、全体としてアントシアニンを 38.4% 含有していた。L-ext は、Proanthocyanidin 43.0%、*trans*-Resveratrol 10.6% を含有していた。その他、両エキスの主要成分以外は、糖質や炭水化物であった。両エキスの主要成分組成を Table 6 に示す。

Table 6. The active constituents of bilberry and lingonberry extracts

Extracts	Constituents	% of extract
Bilberry extract	Delphinidin	14.1
	Cyanidin	9.1
	Malvidin	6.1
	Peonidin and Petunidin	9.1
	Total anthocyanin	38.4
Lingonberry extract	Proanthocyanidin	43.0
	<i>Trans</i> -Resveratrol	10.6

デルフィニジン (Delphinidin)、シアニジン (Cyanidin)、マルビジン (Malvidin)、プロシアニジン B2 (Procyanidin B2) は Extrasynthese (Genay Cedex, France) から、トランス・レスベラトロール (*trans*-Resveratrol) は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から、*N*-acetyl-L-cystein (NAC) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から、PI3-kinase inhibitor (LY294002) は Calbiochem (Merck AG,

Darmstadt, Germany) から、Cell counting Kit-8 (CCK-8) は Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan) から、Hoechst 33342、propidium iodide (PI)、5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA) は Invitrogen (Eugene, OR, USA) から、phosphorylated p38 MAPK抗体は Promega (Madison, WI, USA) から、total p38 MAPK抗体、phosphorylated JNK抗体、phosphorylated Akt抗体、total Akt抗体、β-actin抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) から、total JNK1抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) は Dr. Muayyad R. Al-Ubaidi (University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK, USA) より譲与された。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) は 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL ペニシリン (Penicillin), 100 μg/mL ストレプトマイシン (Streptomycin) を含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM培地) にて、37°C、5% CO₂条件下で培養した。マウス由来網膜視細胞は 2~3 日おきにトリプシン処理により継代した。

2-2-2 紫外線誘発網膜視細胞死評価試験

マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) を 5×10^3 cells/100 μL ずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した。その後、1% FBS含有DMEM培地に置換し、各試料 (NAC 0.1~3 mM、B-ext 1~30 μg/mL、L-ext 1~30 μg/mL、B-ext 3~30 μg/mLとL-ext 3~30 μg/mLの同時添加、delphinidin 1~30 μM、cyanidin 1~

30 μM 、malvidin 1~30 μM 、*trans-resveratrol* 1~30 μM 、procyanidin B2 1~30 μM) を同じく 1% FBS含有DMEM培地に溶解して細胞に添加し、1時間処置した。1% FBS含有DMEM培地のみを添加した群を対照群 (vehicle group) とした。Akt阻害剤 LY293002 は 3 mMの濃度で培地に溶解し、L-ext添加 1時間前に細胞に処置した。マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) にUVA照射装置 (CL-1000 ultraviolet cross-linker; UVP Inc., Upland, CA, USA) を用いて 4 J/cm²、約 20 分間UVAを照射し (Figure 7)、37°Cで 24 時間さらにインキュベートした。

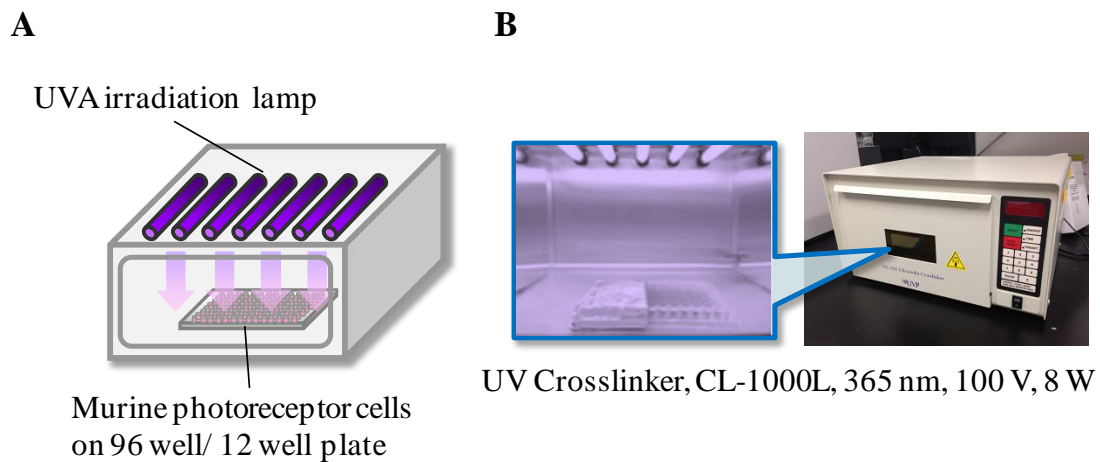


Figure 7. Methods of UVA irradiation to murine 661W photoreceptor cells.

(A) Image of UVA irradiation, (B) image of UV Crosslinker, CL-1000L. 365 nm.

細胞代謝活性は water-soluble tetrazolium salt 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-8) を発色試薬として採用した CCK-8 を用いて測定した。CCK-8 を 10 μL /well ずつ各ウェルに添加し、37°C で 2 時間インキュベートした後、492 nm (および参考波長 660 nm) における吸光度を SkanIt Re for Varioskan Flash 2.4 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) で測定し、細胞代謝活性および正常細胞数

を対照群と比較した。

死細胞率の評価は、Hoechst 33342 (8 μM) および PI (1.5 μM) を添加し、37°C、15 分間インキュベートし核染色した後、蛍光顕微鏡 (DP30BW; Olympus Co., Tokyo, Japan) による撮影を行った。細胞核を染色した Hoechst 33342 (U-MWU; Olympus Co.) を全細胞とし、死細胞を染色した PI (U-MWIG; Olympus Co.) をカウントし、全細胞における死細胞率を算出した。

2-2-3 紫外線誘発活性酸素種 (ROS) 産生量の測定

マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) を 5×10^3 cells/100 μL ずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した。その後、1% FBS含有DMEM培地に置換し、各試料を添加し 1 時間処置した。UVA 4 J/cm²を照射した後、直ちに CM-H₂DCFDAを終濃度 10 μM となるよう添加し、37°C、1 時間インキュベートした。CM-H₂DCFDAは細胞透過性の非蛍光性物質であるが、細胞内のエステラーゼによりジアセテート部位が分解されCM-H₂DCFとなることで細胞外へ放出されない性質をもつ。その後、細胞内で産生されるROSとの反応により緑色の蛍光を発することから、この蛍光強度をSkanIt Re for Varioskan Flash 2.4 を用いて励起波長 488 nm、蛍光波長 525 nmにてROS産生量を測定した。さらに細胞数の違いによる補正を加えるため、Hoechstによる核染色にて細胞核を染色し、各ウェル 2 か所撮影後に画像内マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) をカウントした結果を元に、細胞当たりのROS産生量を算出した。

2-2-4 ウェスタンブロット法によるストレス関連タンパク質の測定

マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) を 5×10^4 cells/1 mLずつ 12 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した。その後、1% FBS含有DMEM培地に置換

し、各試料を添加し1時間処置した。UVA 4 J/cm²を照射した後、phosphatase inhibitor cocktails 2 (P5726; Sigma-Aldrich)、phosphatase inhibitor cocktails 3 (P0044; Sigma-Aldrich)、protease inhibitor (P8340; Sigma-Aldrich)を混合したcell lysis buffer (Ripa buffer)を細胞に添加し、直ちに細胞を回収した。細胞回収液は12,000g、20分間遠心分離し、上清を分離した。牛血清アルブミン標準品を用いてBCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)にてタンパク質含有量を測定した後、各サンプルのタンパク質量が一定となるようRipa bufferおよび10% 2-mercaptoethanolにて調製した。調製したサンプルは10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelを用いた電気泳動にて、分子量の違いによりタンパク質を分離し、polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)に分離タンパク質を転写した。Rabbit anti-phospho-p38 MAPK抗体(1:1000; Promega)、rabbit anti-p38 MAPK抗体(1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-phospho-Akt抗体(1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-Akt抗体(1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-phospho-JNK抗体(1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-JNK1抗体(1:1000; Santa Cruz Biotechnology)、mouse anti-β-actin抗体(1:5000; Sigma-Aldrich)にて免疫ブロットし、二次抗体はgoat anti-rabbit HRP-conjugated IgG抗体(1:2000)およびgoat anti-mouse HRP-conjugated IgG抗体(1:2000)にて処置した。免疫反応のバンドを蛍光基質 (ImmunoStarLD; Wako Pure Chem. Inc., Osaka, Japan)にて検出した。検出バンドの密度は、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan)で画像撮影し、ゲル解析ソフトウェア (Image Reader LAS-4000; Fujifilm)と検出バンド解析ソフトウェア (Multi Gauge; Fujifilm)で解析することで、各タンパク質量の半定量を行った。

2-2-5 プロテインキナーゼ B (Akt) 阻害剤によるリンゴンベリーの作用機序の検討

マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) を 5×10^3 cells/100 μ L ずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した後、1% FBS 含有 DMEM 培地に置換した。Akt 阻害剤 LY293002 を終濃度 3 mM で培地に添加し 1 時間処置した後、L-ext を終濃度 10 μ g/mL となるよう細胞に添加し、1 時間処置した。UVA 4 J/cm²、約 20 分間照射し、37°C で 24 時間インキュベートした。細胞代謝活性は CCK-8 を用いて測定し、死細胞率の評価は Hoechst 33342 (8 μ M) および PI (1.5 μ M) の核染色による死細胞カウントから算出した。

2-3 統計学的解析

実験結果はすべて平均±標準誤差で表し、危険率 (p) 5% 以下を有意差ありとした。統計学的解析は Dunnett's test および Student's *t*-test を用いて行った。

第3節 結果

3-1 紫外線誘発網膜視細胞障害に対するビルベリーおよびリンゴンベリーとこれらの成分の作用

著者は、はじめにUVA照射誘発網膜視細胞障害*in vitro*モデルを作成し、ビルベリーエキス (B-ext)、リンゴンベリーエキス (L-ext)、および陽性対照である酸化剤*N*-acetyl-L-cystein (NAC) の視細胞保護作用を、CCK-8 (WST-8 assay) を用いた細胞代謝活性の測定並びにHoechstおよびPI核染色による死細胞率より検討した。UVA 4 J/cm²の照射 24 時間後、マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) は明らかな形態異常、増殖能の低下および死細胞数 (PI染色細胞) の増加が認められたが、B-ext 30 μg/mL、L-ext 10 μg/mLまたはNAC 1 mMにて事前に処置した群では、それらの障害が軽減していた (Figure 8A)。CCK-8 による細胞代謝活性の測定において、UVA 4 J/cm²の照射によりマウス由来網膜視細胞 (661W細胞) の細胞代謝活性は約 40%に低下したが、事前にB-ext 10、30 μg/mL、L-ext 10 μg/mLまたはNAC 0.1~1 mMを処置した群では、濃度依存的に有意な細胞代謝活性の低下を抑制した (Figures 8B-D)。HoechstおよびPI核染色による死細胞率のカウントの結果、UVA 4 J/cm²の照射 24 時間後に死細胞数が 9~18%検出されたが、B-ext 3~30 μg/mL、L-ext 3~10 μg/mLまたはNAC 0.1~1 mMを処置した群では濃度依存的に有意な死細胞数の減少が認められた (Figure 8E-G)。さらにB-extおよびL-ext両エキスの活性成分の特定を行うため、主要活性成分の保護作用を検討した結果、delphinidin (10, 30 μM)、cyanidin (1~30 μM)、malvidin (10, 30 μM)、*trans*-resveratrol (3, 10 μM)およびprocyanidin B2 (3~30 μM) において、それぞれ濃度依存的に死細胞率の減少が認められた (Figure 8H-L)。

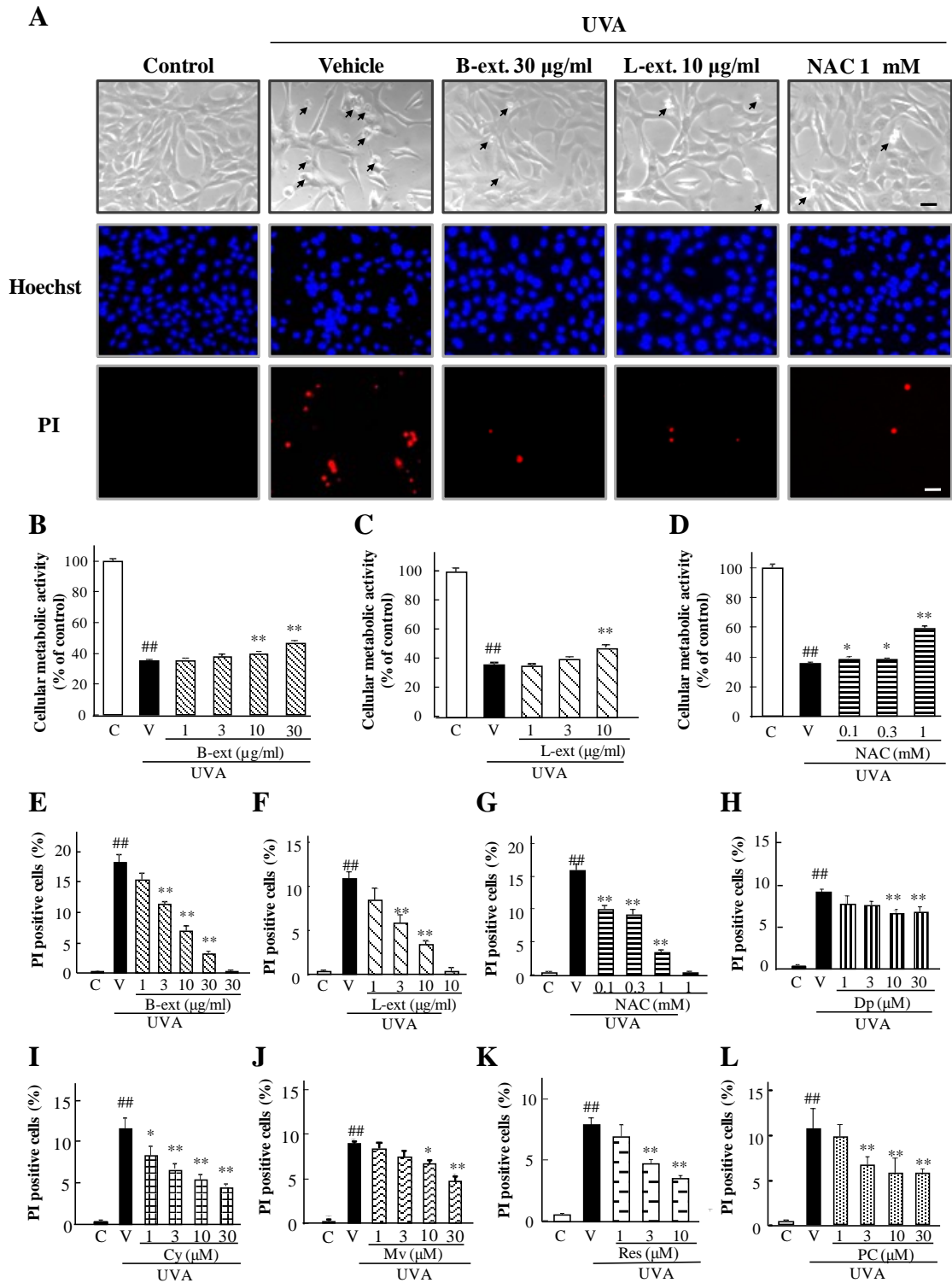


Figure 8. Protective effects of B-ext, L-ext, NAC, and their constituents against UVA-induced 661W cell damage.

(A) Cytomorphology of 661W cells and representative fluorescence microscopy of Hoechst 33342 and propidium iodide (PI) staining after 24 h of UVA light exposure. Small arrows indicate apoptotic cells. The scale bar represents 50 μm . Inhibitory effects of B-ext

(B), L-ext (C), and NAC (D) on UVA-induced reduction of metabolic activity in 661W cells. Metabolic activity was assessed by incubating the cells in CCK-8 reagent for 2 h at 37°C, and then photometric data were obtained at 492/660 nm. Inhibitory effects of B-ext (E), L-ext (F), NAC (G), delphinidin (H), cyanidin (I), malvidin (J), resveratrol (K), and procyanidin B2 (L) on UVA-induced retinal cell death of 661W cells. The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted, and positive cells are expressed as the percentage of PI-positive to Hoechst 33342-positive cells. Cells were treated with B-ext, L-ext, NAC, delphinidin, cyanidin, malvidin, trans-resveratrol and procyanidin B2 for 1 h, and then exposed to 4 J/cm² UVA light. Data are the mean ± SEM (n = 6). C, control; V, vehicle; B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract; NAC, N-acetyl-L-cysteine; Dp, delphinidin; Cy, cyanidin; Mv, malvidin; Res, trans-resveratrol; PC, procyanidin B2. ##p < 0.01 vs. control, *p < 0.05, **p < 0.01 vs. vehicle-treated group; Dunnett's multiple comparison test or Student's t-test.

3-2 紫外線誘発網膜視細胞の活性酸素種（ROS）産生に対するビルベリーおよびリンゴンベリーとその成分の抑制作用

B-ext、L-extおよびその主要成分delphinidin、cyanidin、malvidin、*trans*-resveratrol、procyanidin B2のUVA誘発網膜視細胞障害に対する保護作用の機序解明を目的とし、CM-H₂DCFDA蛍光試薬を用いてROS産生量を測定した。UVA 4 J/cm²照射によりマウス由来網膜視細胞（661W細胞）内におけるROS産生は、約150～230%に増加したが、B-ext 10, 30 μg/mL、L-ext 1～10 μg/mL、delphinidin 10, 30 μM、cyanidin 3～30 μM、malvidin 30 μM、*trans*-resveratrol 10 μMおよびprocyanidin B2 3～30 μMの各試料処置群では、濃度依存的にROS産生の抑制作用が認められた（Figure 9）。

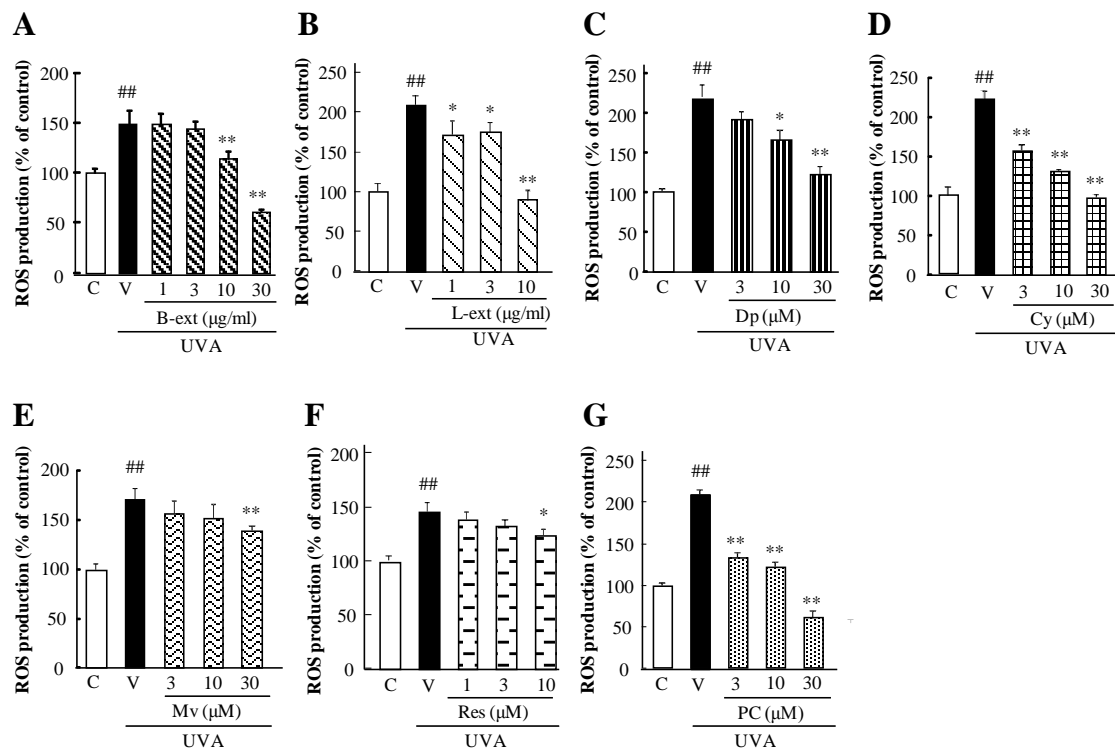


Figure 9. Inhibitory effects of B-ext, L-ext, and their constituents on UVA-induced production of ROS in the 661W cells.

The cells were pretreated with B-ext, L-ext, delphinidin, cyanidin, malvidin, trans-resveratrol, and procyanidin B2 for 1 h, and then exposed to 4 J/cm² UVA light. B-ext (A), L-ext (B), delphinidin (C), cyanidin (D), malvidin (E), *trans*-resveratrol (F), and procyanidin B2 (G) inhibited ROS production in cells induced by UVA light exposure in a concentration-dependent manner. Intracellular ROS levels were determined by measuring the fluorescence of CM-H2DCFDA (excitation, 488 nm; emission, 525 nm) after UVA exposure for 1 h. Data are the mean \pm SEM (n = 5 or 6). C, control; V, vehicle; B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract; Dp, delphinidin; Cy, cyanidin; Mv, malvidin; Res, *trans*-resveratrol; PC, procyanidin B2. ##p < 0.01 vs. control, *p < 0.05, **p < 0.01 vs. vehicle-treated group; Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test.

3-3 紫外線誘発網膜視細胞のストレス関連タンパク質に対するビルベリーおよびリンゴンベリーの作用

UVA照射によるマウス由来網膜視細胞 (661W細胞) 障害における、B-ext、L-ext および両エキスの主要活性成分について細胞内シグナル伝達因子の変動をウェスタンブロット法を用いて解析した。細胞アポトーシス誘導に關与するp38 MAPKは、UVA 4 J/cm²照射によりリン酸化p38 MAPKの発現上昇がみられたが、B-ext 30 µg/mLによる前処置にてリン酸化は有意に抑制された (Figure 10A)。さらに活性成分の特定を行うため、死細胞率およびROS産生量において、ともに抑制作用の強かったcyanidinについて同様の検討を行った結果、cyanidin 10 µMにて有意なp38 MAPKリン酸化抑制作用が認められた (Figure 10B)。しかし、L-ext 10 µg/mL処置ではp38 MAPKリン酸化抑制作用は認められなかった (Figure 10C)。

つづいて、細胞生存因子として知られるAktについて検討した結果、UVA 4 J/cm²照射によりAktのリン酸化低下が認められた (Figures 10D–F)。そこで同様にB-ext 30 µg/mLまたはL-ext 10 µg/mLを前処置した結果、L-extでのみAktのリン酸化低下を改善した (Figures 10DおよびE)。そこでさらにL-extの主要活性成分について検討したところ、*trans-resveratrol* 10 µMおよび*procyanidin B2* 30 µM処置において、UVA照射によるAktのリン酸化低下を有意に抑制し、UVA無処置においても*trans-resveratrol*はAktリン酸化を上昇させた (Figure 10F)。

p38 MAPKと同じく細胞死誘導に關与することで知られるJNKのリン酸化について検討した結果、UVA照射によりJNKのリン酸化上昇が認められた。これに対しB-ext 30 µg/mL処置にてJNKリン酸化の有意な抑制作用が認められたが、L-ext 10 µg/mL処置ではJNKリン酸化の抑制作用は認められなかった (Figure 10G および H)。

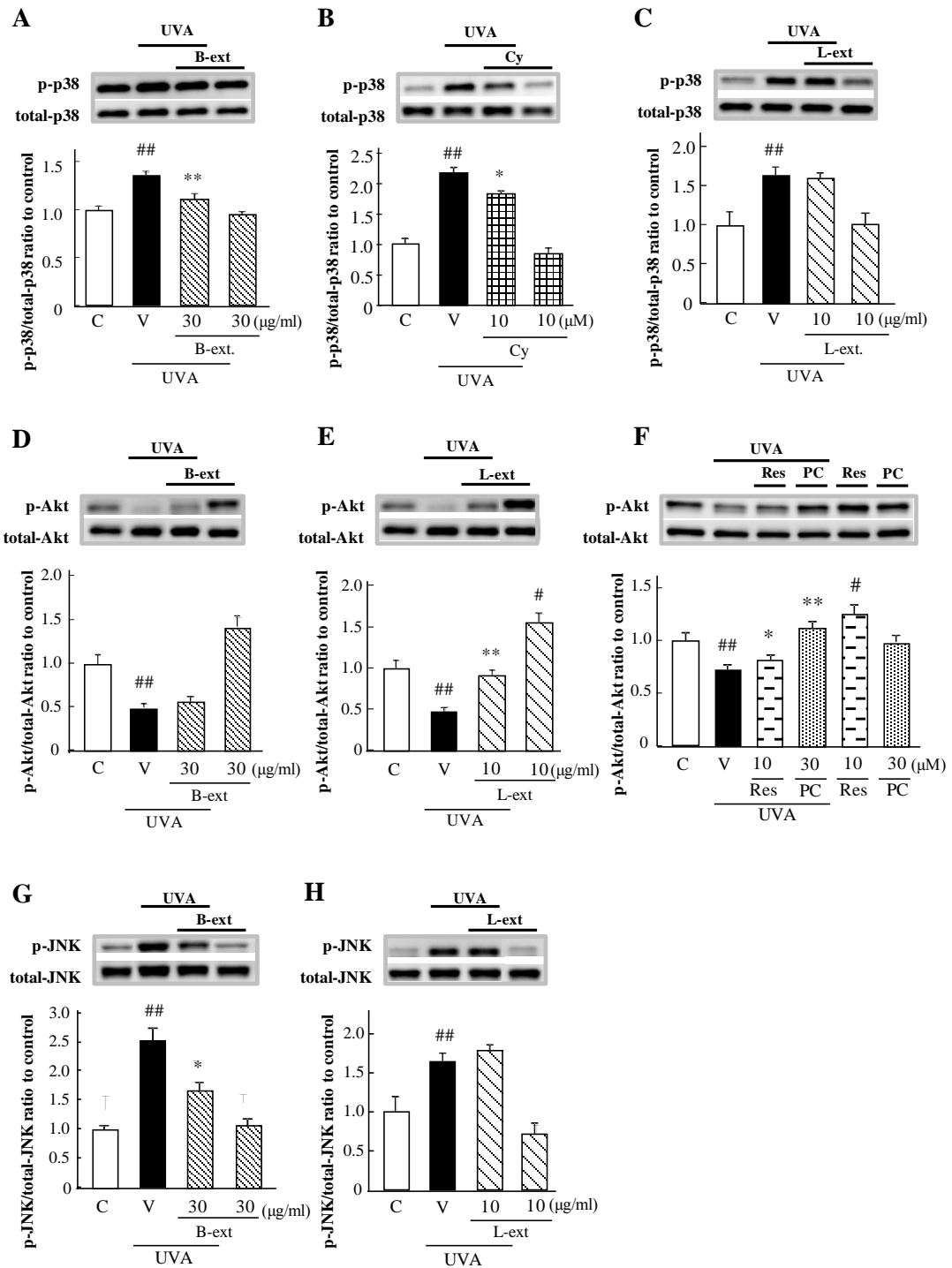


Figure 10. Effects of B-ext, L-ext, and their active constituents, cyanidin, *trans*-resveratrol, and procyanidin B2, on UVA-induced changes of phosphorylated p38 MAPK, Akt, and JNK levels in 661W cells.

Cells were pretreated with B-ext, L-ext, cyanidin, *trans*-resveratrol and/or procyanidin B2 for 1

h, and then exposed to 4 J/cm² UVA light. Then, the cells were collected and lysates were analyzed using western blotting. Data are the mean ± SEM (n = 5 or 6). C, control; V, vehicle; B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract; Cy, cyanidin; Res, trans-resveratrol; PC, procyanidin B2. ^{##}p < 0.01 vs. control, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. vehicle-treated group; Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test.

3-4 紫外線誘発網膜視細胞死に対するプロテインキナーゼ B (Akt) リン酸化を介したリンゴンベリーの作用

3-3 においてウェスタンブロットにて解析した結果、UVA 照射による Akt リン酸化の低下に対し、L-ext は Akt リン酸化の低下を抑制した。そこで Akt 阻害剤である LY294002 を用いて PI3K/Akt 経路を阻害し、L-ext の細胞保護作用における Akt 活性化の関与を調べた。評価は CCK-8 による細胞代謝活性の測定および Hoechst、PI 核染色による死細胞率の測定により行った。LY294002

3 mM 単独処置による明らかな副作用は認められなかった。UVA 照射による細胞代謝活性の低下および死細胞率の増加に対し、L-ext 10 μg/mL の細胞保護作用は LY294002 3 mM 前処置により細胞代謝活性および死細胞率ともに有意に低下した (Figure 11)。

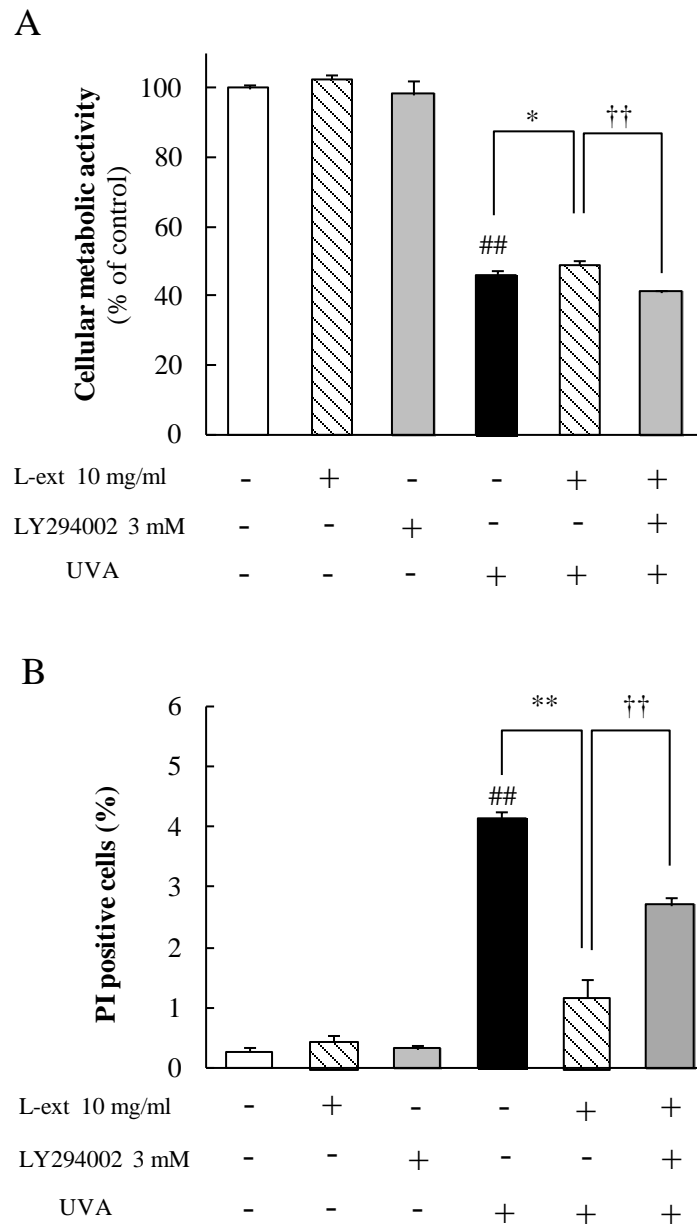


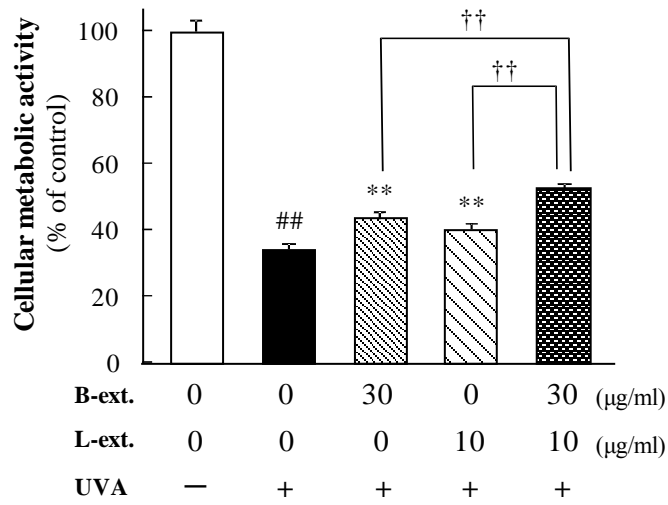
Figure 11. Protective effects of L-ext against UVA-induced 661W cell damage are inhibited by LY294002.

The improvement of cellular metabolic activity (A) and prevention of cell death (B) by treatment with 10 μ g/ml L-ext were inhibited by 3 mM LY294002 (a PI3K-Akt inhibitor). Cells were pretreated with L-ext and LY294002 for 1 h, and then exposed to 4 J/cm² UVA light. Cellular metabolic activity was assessed by incubating the cells in CCK-8 reagent for 2 h at 37°C, and then photometric data were obtained at 492/660 nm. The number of cells exhibiting

PI fluorescence was counted, and positive cells are expressed as the percentage of PI-positive to Hoechst 33342-positive cells. Data are the mean \pm SEM (n = 6). C, control; V, vehicle; L-ext, lingonberry extract. ^{##}p < 0.01 vs. non-treatment, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. vehicle-treated group, ^{††}p < 0.01 vs. 10 μ g/ml L-ext -treated group; Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test.

3-5 紫外線誘発網膜視細胞死に対するビルベリーとリンゴンベリーの協力作用
ウェスタンブロット解析（結果 3-3）および Akt 阻害剤 LY29402 を用いた
PI3K/Akt 経路の関与の検討結果（結果 3-4）より、B-ext と L-ext は異なる作用機
序により UVA 誘発網膜視細胞障害に対する細胞保護作用を有することが示唆さ
れた。そこで、B-ext および L-ext を同時に添加した場合の UVA 誘発網膜視細胞
障害に対する協力作用を検討した。評価は CCK-8 による細胞代謝活性の測定お
よび Hoechst、PI 核染色による死細胞率の測定により行った。その結果、B-ext 30
 μ g/mL と L-ext 10 μ g/mL 同時添加により、それぞれの単独処置と比較して細胞代
謝活性の有意な上昇並びに死細胞率の有意な減少が認められた (Figure 12A およ
び B)。

A



B

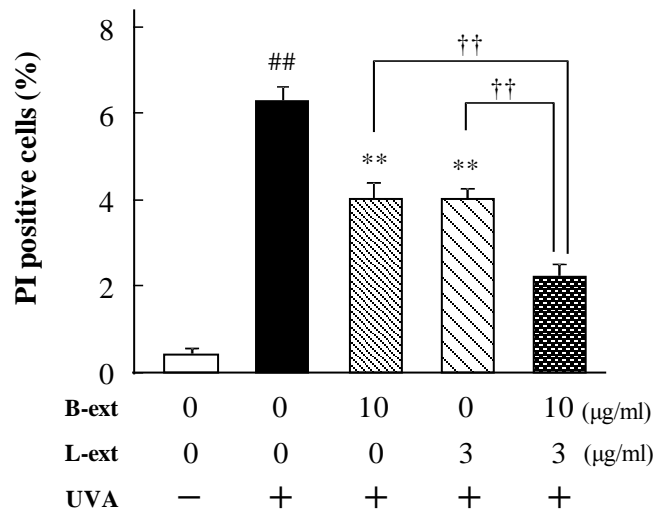


Figure 12. Additive effects of both B-ext and L-ext on UVA-induced 661W cell damage.

B-ext and L-ext were coapplied to inhibit the reduction of cellular metabolic activity (A) and cell death (B) induced by UVA light exposure. Cells were pretreated with B-ext, L-ext, and coapplied for 1 h, and then exposed to 4 J/cm² UVA light. Cellular metabolic activity was assessed by incubating the cells in the CCK-8 reagent for 2 h at 37°C, and then photometric data were obtained at 492/660 nm. The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted, and positive cells were expressed as the percentage of PI-positive to Hoechst 33342-positive cells. Data are the mean ± SEM (n = 6). B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract. ##p < 0.01 vs. non-treated group, *p < 0.05, **p < 0.01 vs. UVA-treated group, ††p < 0.01 vs. only B-ext- or L-ext-treated groups; Dunnett's multiple comparison test or Student's

t-test.

第4節 考察

ビルベリーを始め、ブルーベリーやカシスの視機能改善作用を検討した過去の研究報告において、果実に含まれるアントシアニンの抗酸化作用が白内障、糖尿病網膜症、緑内障など眼疾患の動物モデルにおいて有用であることが報告されている(Fursova et al. 2005; Matsunaga et al. 2009; Matsunaga et al. 2010)。本研究では、ビルベリー、リンゴンベリーおよび両果実に含まれる anthocyanin、*trans-resveratrol*、procyanidin B2 などポリフェノール成分の紫外線誘発網膜視細胞障害に対する保護作用を検討した。

著者は初めにビルベリーエキス (B-ext)、リンゴンベリー (L-ext) および主要活性成分である delphinidin、cyanidin、malvidin、*trans-resveratrol* および procyanidin B2 について、UVA 照射によるマウス由来網膜視細胞 (661W 細胞) 障害に対する細胞保護作用を検討した。なお B-ext (10 µg/mL) は、delphinidin 1.41 µg/mL (4.65 µM)、cyanidin 0.91 µg/mL (3.17 µM) および malvidin 0.61 µg/mL (1.84 µM) を含有している。また、L-ext (10 µg/mL) は、*trans-resveratrol* 1.06 µg/mL (4.64 µM)、procyanidin 4.30 µg/mL (7.43 µM) を含有している (Table 6)。Figure 8 および Figure 9 の結果から、B-ext および L-ext において、cyanidin、*trans-resveratrol*、procyanidin はそれぞれ 1~30 µM、3~10 µM、3~30 µM の濃度で UVA 誘発 ROS 産生および細胞死を抑制しており、両エキスにおける主要な活性成分であることが示唆された。Delphinidin は B-ext において最も多く含まれる anthocyanin であり、cyanidin について細胞死抑制作用並びに ROS 産生抑制作用が認められたことから、B-ext における主要な活性成分の 1 つであることが示唆された。

ビルベリーには delphinidin、cyanidin、malvidin、petunidin および peonidin の 5 種類のアントシアニンに、glucose、galactose および arabinose の 3 種類の糖が付

加した合計 15 種類のアントシアニンが含まれる。著者は、すべてのアントシアニン標準品を入手することが不可能なため、本研究では含有量の多い 3 種のアントシアニンについてのみ検討し、その細胞保護作用を明らかにした (Figure 7)。アントシアニンは経口摂取後に体内では配糖体のまま一部が血中に移行することが知られており (Matsumoto et al. 2006; Milbury et al. 2010)、アントシアニン配糖体の薬理学的効果の評価は重要である。そこでビルベリーに含まれる cyanidin-3-glucoside について、同様に UVA 誘発マウス由来網膜視細胞 (661W 細胞) 障害に対する細胞保護作用を検討した。その結果、Cyanidin-3-glucoside は cyanidin アグリコンと同様に、UVA 4 J/cm² 照射による細胞代謝活性の低下および死細胞率の増加を抑制した (data not shown)。以上の結果より、配糖体はアグリコンと同様の活性を示すことが明らかになったが、アントシアニンは他の様々な代謝物が存在しており、今後は他のアントシアニン代謝物についても同様に検討することが必要であると思われる。

著者は UVA 照射による視細胞障害において、UVA 照射が視細胞内における活性酸素 ROS 産生を誘発し、抗酸化剤である NAC、B-ext、L-ext および両エキスの主要活性成分により細胞内 ROS 産生が抑制されることを明らかにした (Figure 9)。UVA をはじめ紫外線照射は、組織内においてヒドロキシルラジカル (hydroxyl radical)、スーパーオキシドアニオンラジカル (superoxide anion radical)、過酸化水素 (hydrogen peroxide)、そして一重項酸素 (singlet oxygen) を発生させる。酸素分子の基底状態である三重項酸素 (triplet oxygen; ³O₂) は、紫外線照射によるエネルギーを吸収し、一重項酸素を発生させる。つぎに、一重項酸素は電子を獲得することで、スーパーオキシドアニオンラジカルに変化する。スーパーオキシドアニオンラジカルは、細胞内ミトコンドリアにおける NADPH の活性化によっても発生する。さらにスーパーオキシドアニオンラジカルは、スーパーオ

キシドジスムターゼ (SOD) により代謝され、過酸化水素を生じる。最終的に、過酸化水素は鉄や銅イオンとの反応によりヒドロキシルラジカルを産生する。ヒドロキシルラジカルは、脂質過酸化、タンパク質の変性、DNA損傷をひき起こす。紫外線照射は抗酸化酵素の産生能を低下させる。したがって、UVA照射による細胞内フリーラジカルの産生は、細胞にアポトーシスを誘導する。本研究では、抗酸化剤であるグルタチオンの構成成分であるNACの処置により、過去の報告(Emonet-Piccardi et al. 1998)と同様にUVA誘発網膜視細胞障害が抑制されることを明らかにした (Figure 8)。また、著者はB-extの主要成分である delphinidin、cyanidin、malvidin などアントシアニンが、スーパーオキシドアニオンラジカル、またはヒドロキシルラジカル消去作用を有することを電子スピン共鳴法 (electron-spin resonance method) により明らかにした (詳細は第4章にて述べる)。さらに、L-ext、*trans-resveratrol* および *procyanidin B2* は細胞内グルタチオンやスーパーオキシドジスムターゼなど抗酸化酵素の活性を改善することから、細胞内ROS産生抑制だけでなく、ROS消去能の改善にも寄与している可能性が考えられる (Durukan et al. 2006; Milbury et al. 2007; Pintea et al. 2011)。

p38 MAPK および JNK は、紫外線照射または酸化ストレスなどのストレスに応じて活性化し、アポトーシス転写因子である activator protein-1 (AP-1) を誘導する (Hildesheim et al. 2004; Klotz et al. 1997; Minden and Karin 1997)。p38 MAPK および JNK の活性化は、紫外線照射により発生した一重項酸素により引き起こされる (Klotz et al. 1999)。B-ext に含まれるアントシアニン、L-ext に含まれる *trans-resveratrol*、*procyanidin B2* は一重項酸素に対する抗酸化能を有する (Ariga 2004; Sparrow et al. 2003)。しかしながら、本研究の結果では、B-ext のみ p38 MAPK および JNK の活性化を抑制し、L-ext は明らかな抑制作用を示さなかった。

Delphinidin と cyanidin は、紫外線照射で引き起こされる MKK4 のリン酸化およ

び JNK MAPK キナーゼ活性に対して、MAP kinase kinase (MKK) 4 の ATP への拮抗阻害により抑制する(Kwon et al. 2009; Lim et al. 2011)。紫外線刺激による p38 MAPK 活性化は、MKK3 および MKK6 だけでなく MKK4 を介して引き起こされることが知られている(Brancho et al. 2003)。したがって、本研究において B-ext が含有する delphinidin および cyanidin は、UVA 刺激による p38 MAPK と JNK の活性化を直接阻害した可能性が考えられる。また、p38 MAPK および JNK 特異的な阻害剤は、紫外線刺激による c-Jun と c-Fos のリン酸化を介した AP-1 活性化を抑制し、細胞アポトーシスを改善する(Roduit and Schorderet 2008; Tanos et al. 2005)。以上、UVA 誘発細胞障害に対する B-ext とそのアントシアニジンの作用のメカニズムの一つとして、ROS 産生の減少並びに p38 MAPK と JNK のリン酸化を阻害することが示唆された。

PI3K/Akt シグナル経路は、網膜神経節細胞、内網状層、内顆粒層、視細胞外節など網膜組織において、細胞生存を調節する役割を担うことが知られている(Nakazawa et al. 2003)。本研究において、著者は UVA 照射直後の網膜視細胞において Akt リン酸化レベルが低下すること、同時に L-ext、*trans-resveratrol* または *procyanidin B2* の処置により Akt リン酸化レベルの低下が軽減されることを明らかにした (Figure 10D-F)。Resveratrol は、アデノシン A1 および A3 受容体を介して Akt 活性化することにより、心筋細胞のアポトーシスを予防する(S. Das et al. 2005)。本研究において、PI3K/Akt 阻害剤である LY294002 は、L-ext の UVA 誘発細胞障害に対する抑制作用を有意に低下した (Figure 11)。したがって、L-ext 処置による Akt リン酸化の改善作用は、UVA 誘発網膜視細胞死に対する抑制作用に寄与していることが示唆された。

最後に、B-ext および L-ext はそれぞれ異なる作用機序により UVA 誘発網膜視細胞障害を抑制したことが示唆されたため (Figure 13)、両エキスの併用処置を

検討した。個々の単独処置と比較して、併用処置により、UVA 誘発網膜視細胞障害が有意に改善されることを明らかにした (Figure 12)。

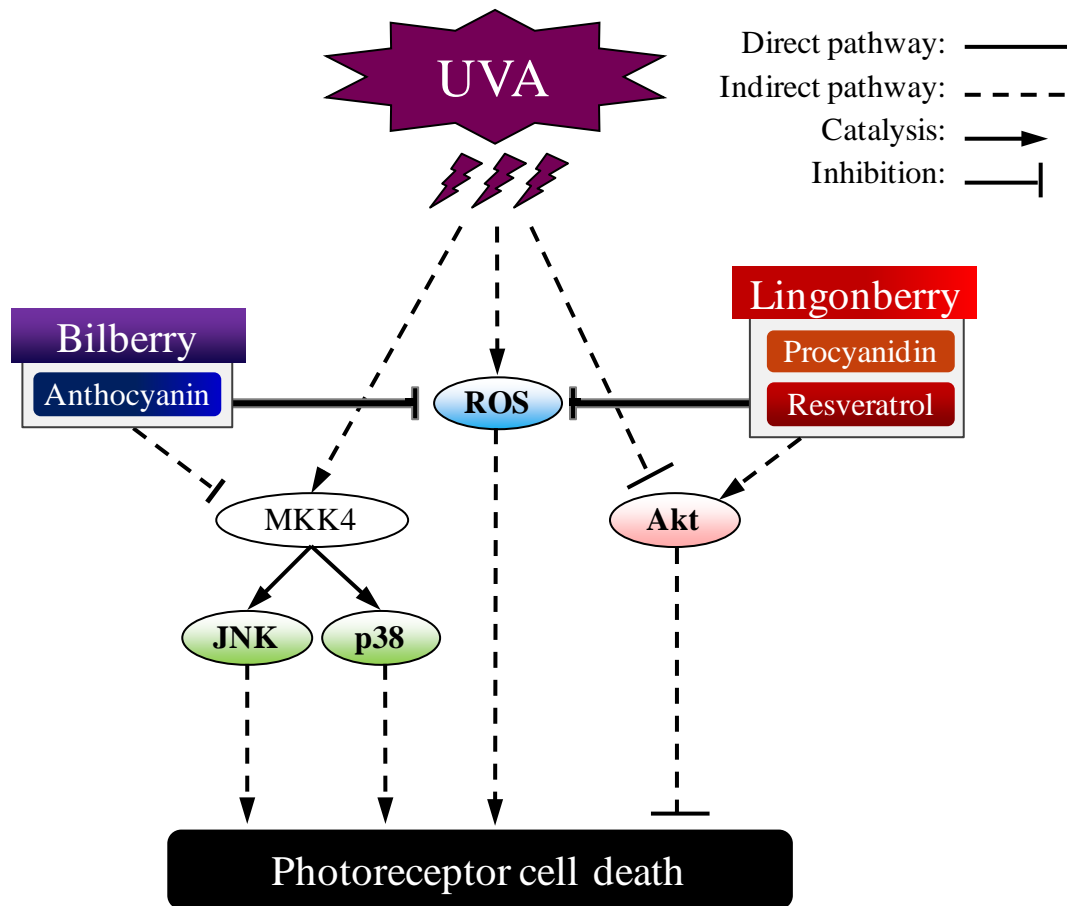


Figure 13. Putative mechanism of B-ext, L-ext, and their constituents against UVA-induced 661W cell damage.

UVA irradiation increased production of ROS, phosphorylation of p38 MAPK and JNK, and downregulated the phosphorylation of Akt that induces photoreceptor cell death through the activation of c-Jun, AP-1, and caspase-3. B-ext including anthocyanins reduces ROS production and activation of both p38 MAPK and JNK by UVA light exposure via inhibition of MKK4. L-ext including procyanidin and resveratrol reduces ROS production and downregulation of Akt by UVA light exposure. Reactions are represented by direct (solid line) and indirect (dotted line) pathways, catalysis arrows (arrow-headed line), and inhibition arrows (bar-headed line).

Anthocyanin 類、resveratrol および procyanidin 類を経口摂取した場合の体内動態は、動物およびヒト試験により報告がなされている。ヒト試験においては、15 人の被験者に対し、94.47 mg のアントシアニンを含むクランベリージュースを経口摂取させた時、血漿中におけるアントシアニンの検出濃度は0.56から4.46 nmol/L であることが報告されている(Milbury et al. 2010)。動物を用いた試験で、豚にブルーベリー粉末の4週間経口摂取により、肝臓、脳および眼からアントシアニンが検出されている(Kalt et al. 2008)。また、カシスアントシアニンをラットに108 mg/kg で腹腔内投与した結果、硝子体において6.72 µg/mL、網膜において6.89 µg/g、血漿中において2.30 µg/g の最高濃度が得られたことから、アントシアニンが血液を介して眼組織に移行することが報告されている(Matsumoto et al. 2006)。マウス網膜ブドウ膜炎モデルにおいて、B-ext 500 mg/kg 体重量、4週間の経口摂取により、炎症による網膜の酸化、ロドプシンの減少および視機能低下を有意に改善することが報告されている(Miyake et al. 2012)。本研究において著者が示した *in vitro* 試験における有効濃度は、ラットにおける動態実験の結果から考えると(108 mg/kg 投与で網膜濃度6.89 µg/g)、各種 *in vitro* 実験においてアントシアニンが効果を表した濃度(約10 µM)をヒトにおけるアントシアニン摂取で得ることは難しいと考えられるが、アントシアニンを長期摂取することで一定量のアントシアニンが眼組織に到達し、眼疾患予防に寄与する可能性は十分考えられる。Resveratrol および procyanidin は、*in vivo* 試験において体内動態および安全性が示されている(Boocock et al. 2007; Cottart et al. 2010; Holt et al. 2002; Stoupi et al. 2010)。健常人に対する resveratrol 0.5、1.0、2.5 および 5.0 g の単回経口摂取による明らかな毒性は認められず、血漿中における最大濃度はそれぞれ72.6、117.0、268.0 および 538.8 ng/mL であった。一方 procyanidin B2 に

ついて、323 mg のモノマーprocyanidin 類を含む 26.4 g のココアをヒトが単回経口摂取した場合、血漿中 procyanidin B2 最高濃度は平均して 5.92 μM であった (Holt et al. 2002)。これら濃度は、本研究における resveratrol の有効濃度である 3 ~10 μM および procyanidin B2 3~30 μM と一致している。しかしながら、resveratrol および procyanidin のヒトにおける眼組織への移行については明らかではなく、今後さらに検討が必要である。

以上第 2 章では、ビルベリー、リンゴンベリーおよびその主要活性成分である anthocyanidin、*trans*-resveratrol および procyanidin B2 が、紫外線 UVA 誘発網膜視細胞障害に対して、ROS 産生を抑制し、p38 MAPK、JNK および Akt のリン酸化レベルを調節することによって細胞障害を抑制することを明らかにした。次章では、最近、液晶テレビやスマートフォンなどの開発によって注目されるようになってきた青色発光ダイオード (LED) 光によって誘発される網膜視細胞障害に対するビルベリーおよびリンゴンベリーの細胞保護作用について検討を行った。

第3章 青色発光ダイオード (LED) 光誘発網膜視細胞障害に対するビルベリー ーおよびリンゴンベリーの保護作用

第1節 緒言

高エネルギー可視光線は 380 から 530 nm の波長領域の光を指し、太陽光、蛍光灯、発光ダイオード (light-emitting diode; LED) などの光源から少なからず発せられている。中でも青色光 (450~495 nm 波長領域) は波長が短く強いエネルギーを有しており、さらに可視光線として紫外線よりも網膜への到達率は高い。加齢黄斑変性症 (age-related macular degeneration : AMD) や網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa : RP) など眼疾患発症への関与が示唆されている (Glazer-Hockstein and Dunaief 2006; Margrain et al. 2004)。近年、エネルギー問題の観点から室内灯を始めとする照明機器に LED 灯が用いられるようになった。LED 灯は蛍光灯と比較し、消費電力が少なく寿命が長いという利便性をもつ。しかし、LED 灯から発せられる白色光は青色光と黄色光で構成されており、特に青色光が占める割合が高い。LED はその他液晶モニターの光源として利用されており、これら LED 照明灯や液晶モニター機器が発する青色光が人体に及ぼす影響について問題視されている。青色光が体に及ぼす影響として、メラトニン分泌抑制による睡眠障害およびサーカディアンリズムの変調 (Lockley et al. 2003; West et al. 2011)、眼精疲労に繋がることが知られている (南青山アイクリニック東京 HP より)。ラット *in vivo* モデルにおいて 379 から 559 nm までの光の波長による網膜障害は、波長の長さに反比例して障害性が高まり、青色光で障害性が高い (van Norren and Schellekens 1990)。アカゲザルを用いた研究において、青色 LED 光を網膜に照射することで、網膜色素上皮細胞 (RPE 細胞) および視細胞外節において浮腫が認められている (Koide et al. 2001)。青色光は RPE 細胞における *bis-retinoid* や *N-retinylidene-N-retinylethanolamine* (A2E) などのリポフスチ

ン (lipofuscin) の蓄積を惹起し、その結果ミトコンドリアにおける活性酸素種 ROS の産生を促し、RPE 細胞の脂質過酸化を引き起こし障害を惹起する(Sparrow et al. 2002)。青色光照射による RPE 細胞死は、細胞死誘導因子である caspase-3 の活性化を通じて引き起こされ、caspase-3 阻害剤 Z-DEVD-fmk によりアポトーシスは抑制される(Sparrow and Cai 2001)。網膜視細胞障害においても同様に、caspase-3 の誘導およびロドプシンのブリーチングの加速や凝集により、細胞死が引き起こされる(J. Wu et al. 2002)。

そこで、紫外線 UVA に対する保護作用を示したビルベリーエキス (B-ext)、リンゴンベリーエキス (L-ext) 並びに両エキスの主要活性成分である anthocyanidin (delphinidin, cyanidin, malvidin)、*trans*-resveratrol および procyanidin について、青色 LED 光誘発網膜視細胞障害に対する保護作用を検討した。

第 2 節 実験方法

2-1 実験材料

ビルベリーエキス (B-ext)、リンゴンベリーエキス (L-ext) は、Beijing Ginkgo Group Japan Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から供与された。両エキスの主な活性成分は HPLC 分析および紫外可視分光光度計を用いて定量した (Table 6)。デルフィニジン (Delphinidin)、シアニジン (Cyanidin)、マルビジン (Malvidin)、プロシアニジン B2 (Procyanidin B2) は Extrasynthese (Genay Cedex, France) から、トランス・レスベラトロール (*trans*-Resveratrol) は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から、*N*-acetyl-L-cystein (NAC) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から、Cell counting Kit-8 (CCK-8) は Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan) から、Hoechst 33342、propidium iodide (PI)、5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA) は Invitrogen

(Eugene, OR, USA) から、phosphorylated p38 MAPK抗体、total p38 MAPK抗体、activated NF- κ B抗体、total NF- κ B抗体、LC3 抗体はCell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) から、 β -actin抗体はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から、Caspase-Glo® 3/7 assay kitはPromega Co. (Madison, Wisconsin, USA)から購入した。マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) はDr. Muayyad R. Al-Ubaidi (University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK, USA) より譲与された。青色LED光源は、青色LED (波長 460~470 nm) を 12 球備えた照射装置はM-trust Co., Ltd. (Hyogo, Japan)から、電源変圧装置LM-332 はAS ONE Co., Ltd. (Osaka, Japan)から購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) は 10% fetal bovine serum (FBS)、100 U/mL ペニシリン (Penicillin)、100 μ g/mL ストレプトマイシン (Streptomycin) を含有するDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM培地) にて 37°C、5% CO₂条件下で培養した。マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) は 2~3 日おきにトリプシン処理により継代した。

2-2-2 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞死評価試験

661W細胞を 3×10^3 cells/100 μ Lずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した。その後、1% FBS含有DMEM培地に置換し、37°C、3 時間インキュベートした。終濃度が 2.5 μ Mとなるよう 9-*cis*-retinal含有 1%FBS DMEM培地を全ウェルに添加し、37°C、4 時間インキュベートした。各試料(NAC 0.3~1 mM、B-ext 1~10 μ g/mL、L-ext 1~10 μ g/mL、delphinidin 1~10 μ M、cyanidin 1~10 μ M、

malvidin 1~10 μM 、*trans-resveratrol* 1~10 μM 、procyanidin B2 1~10 μM) を同じく 1% FBS含有DMEM培地に溶解して細胞に添加し、1時間処置した。1% FBS含有DMEM培地のみを添加した群を対照群 (vehicle group) とした。マウス由来網膜視細胞 (661W細胞) に青色LED光照射装置にて 2,500 lx、6時間青色光を照射した (Figure 14)。直ちに細胞代謝活性をwater-soluble tetrazolium salt 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H*-tetrazolium monosodium salt (WST-8) を発色試薬として採用したCCK-8にて測定した。CCK-8を10 μL /wellずつ各ウェルに添加し、37°Cで2時間インキュベートした後、492 nm (および参考波長 660 nm) における吸光度をSkanIt Re for Varioskan Flash 2.4 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) で測定し、細胞代謝活性および正常細胞数を対照群と比較した。死細胞率の評価は、青色LED光照射終了から12時間後、Hoechst 33342 (8 μM) およびPI (1.5 μM) を添加し、37°C、15分間インキュベートし核染色した後、蛍光顕微鏡 (DP30BW; Olympus) で撮影した。細胞核を染色したHoechst 33342 (U-MWU; Olympus) を全細胞とし、死細胞を染色したPI (U-MWIG; Olympus) をカウントし、死細胞率を算出した。

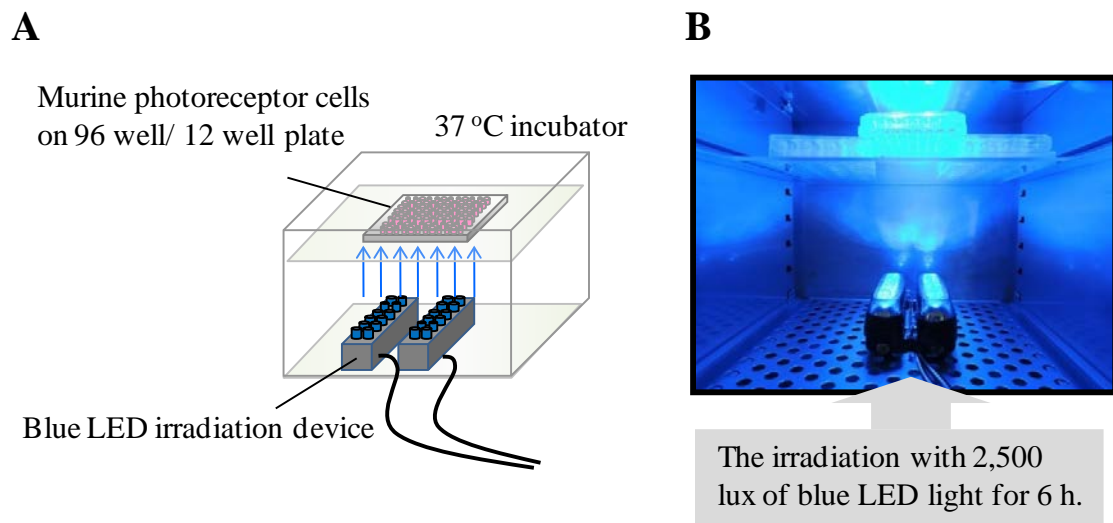


Figure 14. Model of the blue LED light irradiation-induced murine photoreceptor (661W) cell damage.

(A) 661W cells on a 96- or 12-well plate were exposed to blue LED light irradiation at the bottom of a 37°C incubator. (B) A magnified view of the Blue LED light irradiation with 2,500 lx at the bottom.

2-2-3 青色発光ダイオード光誘発活性酸素種（ROS）産生量の測定

マウス由来網膜視細胞（661W細胞）を 3×10^3 cells/100 μ Lずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した。その後、1% FBS含有DMEM培地に置換し、37°C、3 時間インキュベートした。終濃度が 2.5 μ Mとなるよう 9-*cis*-retinal 含有 1%FBS DMEM培地を全ウェルに添加し、37°C、4 時間インキュベートした。青色LED光 2500 lx、6 時間照射した後、直ちにCM-H₂DCFDAを終濃度 10 μ Mとなるよう添加し、37°C、1 時間インキュベートした。蛍光強度をSkanIt Re for Varioskan Flash 2.4 を用いて励起波長 488 nm、蛍光波長 525 nmにてROS産生量を測定した。さらに細胞数の違いによる補正を加えるため、Hoechstによる核染色

にて細胞核を染色し、各ウェル2か所撮影後に画像内マウス由来網膜視細胞(661W細胞)数をカウントした結果から、細胞当たりのROS産生量を算出した。

2-2-4 ウェスタンブロット法によるストレス関連タンパク質の測定

マウス由来網膜視細胞(661W細胞)を 3×10^4 cells/1 mLずつ12ウェルプレートに播種し、37°C、24時間培養した。その後、1% FBS含有DMEM培地に置換し、37°C、3時間インキュベートした。終濃度が2.5 μ Mとなるよう9-*cis*-retinal含有1%FBS DMEM培地を全ウェルに添加し、37°C、4時間インキュベートした。青色LED光 2,500 lx、6時間照射した後、phosphatase inhibitor cocktails 2 (P5726; Sigma-Aldrich)、phosphatase inhibitor cocktails 3 (P0044; Sigma-Aldrich)、protease inhibitor (P8340; Sigma-Aldrich)を混合したcell lysis buffer (Ripa buffer)を細胞に添加し、直ちに細胞を回収した。細胞回収液は12000g、20分間遠心分離し、上清を分離した。牛血清アルブミン標準品を用いてBCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)にてタンパク質含有量を測定した後、各サンプルのタンパク質量が一定となるようRipa bufferおよび10% 2-mercaptoethanolにて調製した。調製したサンプルは10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelを用いた電気泳動にて、分子量の違いによりタンパク質を分離し、polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)に分離タンパク質を転写した。Rabbit anti-phospho-p38 MAPK抗体(1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-p38 MAPK抗体(1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-activated- NF- κ B抗体(1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti- NF- κ B抗体(1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-LC3抗体(1:1000; Cell Signaling Technology)、mouse anti- β -actin抗体(1:5000; Sigma-Aldrich)にて免疫ブロットし、二次抗体HRP-conjugated goat anti-rabbit抗体またはgoat anti-mouse抗

体(1:2000; ThermoFisher Scientific Inc.)にて処置した。免疫反応のバンドを蛍光基質 (ImmunoStarLD; Wako Pure Chem. Inc., Osaka, Japan) にて検出した。検出バンドの密度は、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) で画像撮影し、ゲル解析ソフトウェア (Image Reader LAS-4000; Fujifilm) と検出バンド解析ソフトウェア (Multi Gauge; Fujifilm) で解析することで、各タンパク質量の半定量を行った。

2-2-5 青色発光ダイオード光誘発視細胞カスパーゼ活性の測定

青色LED光照射によるマウス由来網膜視細胞 (661W細胞) におけるカスパーゼ (Caspase-3/7) 活性は、caspase-3/7 assay kitを用いて測定した。青色LED光照射 12 時間後、Caspase-Glo® 3/7 試薬を各ウェルに添加し、37°C、1 時間インキュベートした。インキュベート後、蛍光強度をSkanIt Re for Varioskan Flash 2.4を用いて測定し、caspase-3/7 活性を測定した。さらに細胞数の違いによる補正を加えるため、Hoechstによる核染色にて細胞核を染色し、各ウェル2か所撮影後に画像内 661W細胞数をカウントした結果を元に、細胞当たりのcaspase-3/7 活性を算出した。

2-3 統計学的解析

実験結果はすべて平均±標準誤差で表し、危険率 (p) 5%以下を有意差ありとした。統計学的解析は Dunnett's test および Student's *t*-test を用いて行った。

第3節 結果

3-1 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞障害に対するビルベリーおよびリンゴンベリーとそれらの成分の作用

我々は初めに青色 LED 光誘発マウス由来網膜視細胞 (661W 細胞) 障害 *in vitro* モデルを作成した (Figure 14)。その後、B-ext、L-ext、両エキスの主要活性成分である delphinidin、cyanidin、malvidin、*trans-resveratrol*、procyanidin B2 および陽性対照である抗酸化剤 NAC について、青色 LED 光誘発マウス由来網膜視細胞 (661W 細胞) 障害に対する保護作用を検討した。青色 LED 光 2,500 lx、6 時間の照射により、コントロール群では細胞形態の明らかな異常と細胞増殖能の低下が認められたが、B-ext 10 µg/mL、L-ext 10 µg/mL または NAC 1 mM の前処置により、それら細胞障害は軽減された (Figure 15A)。CCK-8 を用いた細胞代謝活性の測定において、青色 LED 光照射は細胞代謝活性を約 60% にまで低下したが、B-ext 10 µg/mL、L-ext 3、10 µg/mL、NAC 0.3、1 mM、delphinidin 10 µM、cyanidin 10 µM、malvidin 10 µM、procyanidin B2 10 µM または *trans-resveratrol* 3、10 µM の処置はこれを有意に改善した (Figure 15B–F)。さらに、B-ext 10 µg/mL および L-ext 10 µg/mL の同時処置により、青色 LED 光照射による細胞代謝活性の低下は、それぞれ単独処置と比較して有意に改善された (Figure 16)。

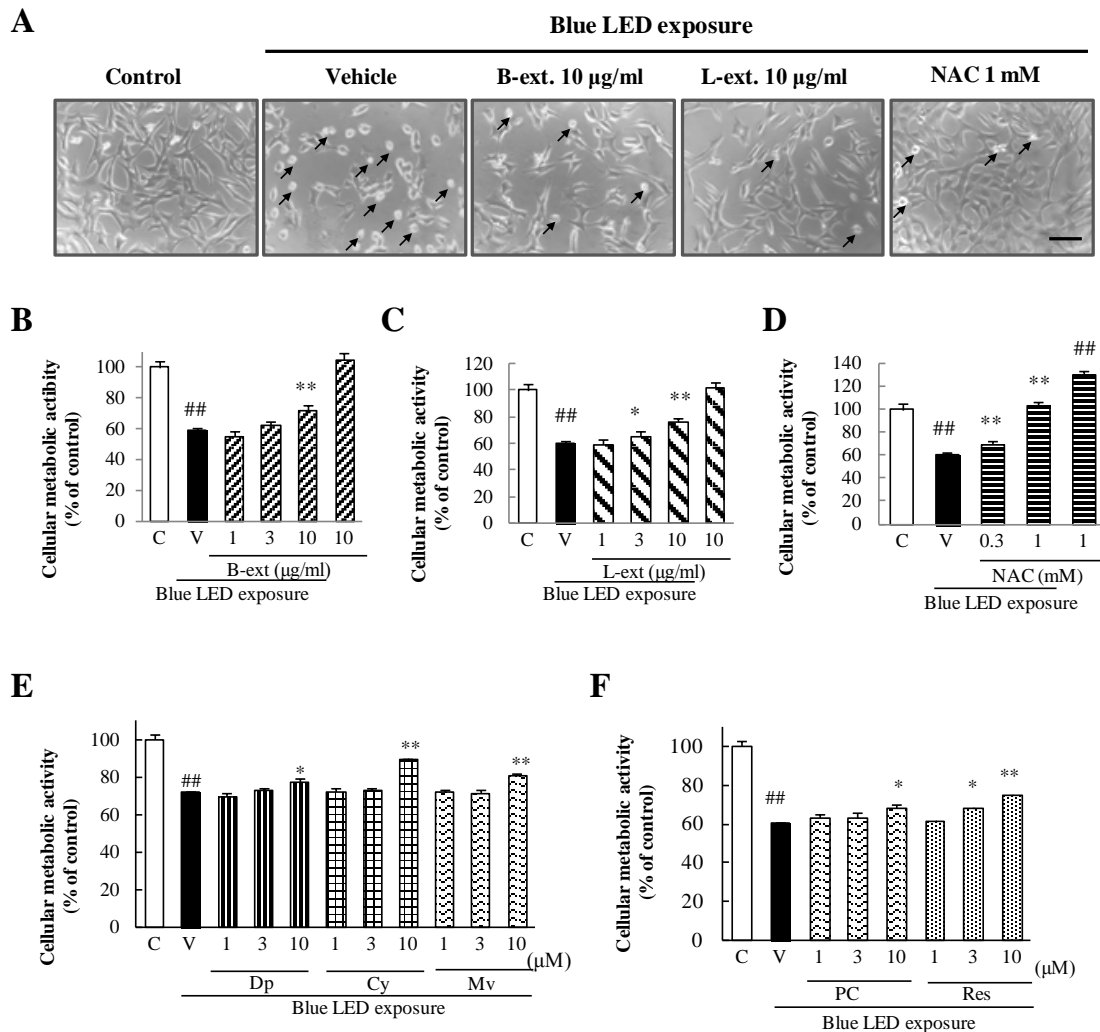


Figure 15. Protective effects of B-ext, L-ext, their active components, and NAC against metabolic activity reduction induced by blue light in 661W cells.

(A) Cytomorphology of 661W cells after 24 h of blue LED light exposure. Small arrows indicate apoptotic cells. Scale bar, 50 µm. Inhibitory effects of B-ext (B), L-ext (C), and NAC (D) on blue LED light-induced reduction of metabolic activity in 661W cells. Metabolic activity was assessed by incubating the cells with CCK-8 reagent for 2 h at 37°C; photometric data were obtained at 492/660 nm. Cells were treated with B-ext, L-ext, NAC, delphinidin, cyanidin, malvidin, trans-resveratrol, and procyanidin B2 for 1 h, and then exposed to 2,500 lx of blue LED light for 6 h. Data are means ± SEM (n = 6). C, control; V, vehicle; B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine; Dp, delphinidin; Cy, cyanidin; Mv, malvidin; Res, trans-resveratrol; PC, procyanidin B2. ^{##}p < 0.01 vs. control; *p < 0.05, **p < 0.01 vs. the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test).

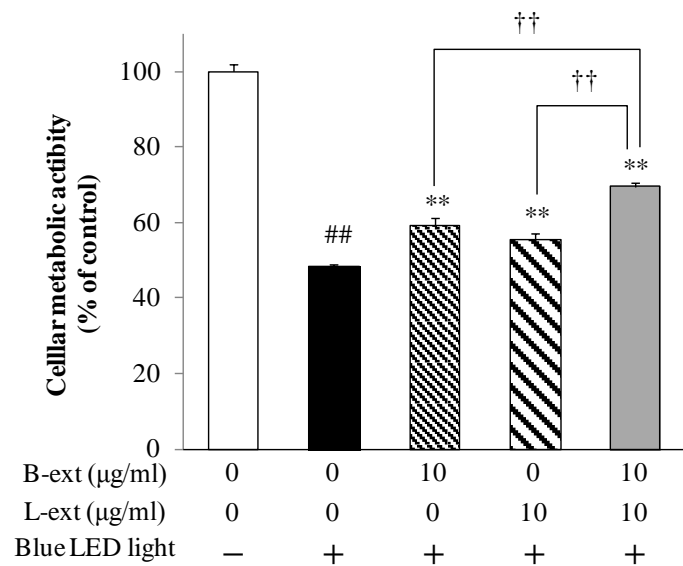


Figure 16. Additive effects of both B-ext and L-ext on blue LED light-induced 661W cell damage.

B-ext and L-ext were coapplied to inhibit the reduction of cellular metabolic activity induced by blue LED light exposure. Cells were pretreated with B-ext 10 μg/mL, L-ext 10 μg/mL, and coapplied for 1 h, and then exposed to 2,500 lx blue LED light for 6 h. Cellular metabolic activity was assessed by incubating the cells in the CCK-8 reagent for 2 h at 37°C. Data are the mean ± SEM (n = 6). B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract. ##p < 0.01 vs. non-treated group, *p < 0.01 vs. blue LED light-treated group, ††p < 0.01 vs. only B-ext- or L-ext-treated groups; Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test.

つぎに、青色 LED 光照射により誘発される 661W 細胞の細胞死を、Hoechst、PI 核染色により評価した。青色 LED 光 2,500 lx、6 時間照射により、全細胞 (Hoechst 核染色) 数における死細胞 (PI 染色細胞) 数の割合が増加したが、B-ext 10 μg/mL、L-ext 10 μg/mL または NAC 1 mM による前処置にて PI 染色細胞は減少した

(Figure 17A)。さらに死細胞数をカウントし、死細胞率を算出した結果、青色 LED 光照射により死細胞率は有意に上昇したが、B-ext 10 μg/mL、L-ext 10 μg/mL、

NAC 1 mM、delphinidin 10 μ M、cyanidin 3、10 μ M、malvidin 10 μ M、*trans*-resveratrol 1~10 μ M または procyanidin B2 1~10 μ M の処置により死細胞率は有意に減少した (Figure 17B–F)。

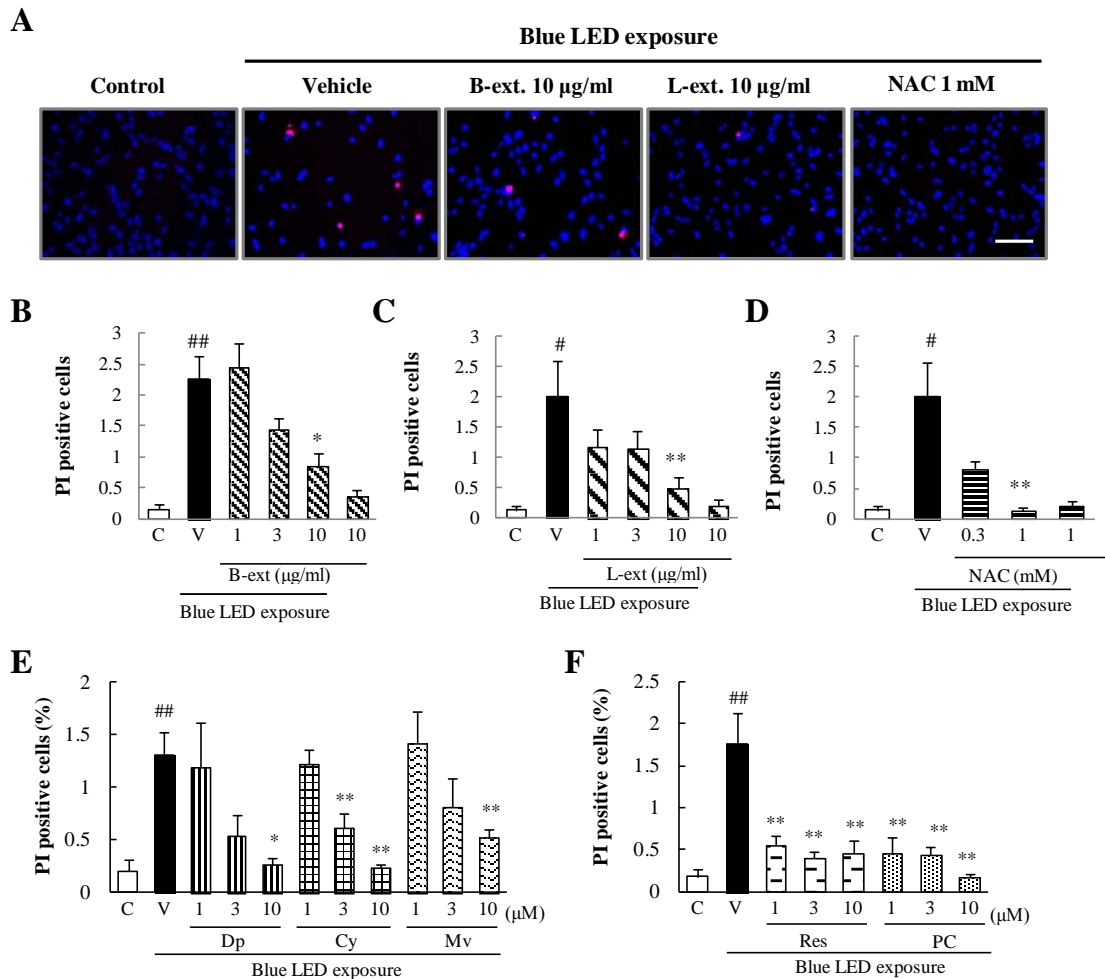


Figure 17. Protective effects of B-ext, L-ext, their active components, and NAC against blue light-induced cell death in 661W cells.

(A) Representative fluorescence microscopy images of Hoechst 33342 (blue color) and propidium iodide (PI) (red color) staining after 12 h of blue LED light exposure. Scale bar, 50 µm. Inhibitory effects of B-ext (B), L-ext (C), NAC (D), delphinidin, cyanidin, malvidin (E), resveratrol, and procyanidin B2 (E) on blue LED light-induced retinal cell death in 661W cells. The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted and expressed as a percentage of Hoechst 33342-positive cells. Cells were treated with B-ext, L-ext, NAC, delphinidin, cyanidin, malvidin, *trans*-resveratrol, and procyanidin B2 for 1 h, and then exposed to 2500 lx of blue LED light for 6 h. Data are means ± SEM ($n = 6$). C, control; V, vehicle; B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine; Dp, delphinidin; Cy, cyanidin; Mv, malvidin; Res, *trans*-resveratrol; PC, procyanidin B2. ^{##} $p < 0.01$ vs. control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test).

3-2 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞の活性酸素種（ROS）産生に対する ビルベリーおよびリンゴンベリーとそれらの成分の抑制作用

B-ext、L-extおよびその主要成分delphinidin、cyanidin、malvidin、*trans-resveratrol*、*procyanidin B2* について、青色LED光誘発網膜視細胞障害に対する保護作用の機序を解明するため、CM-H₂DCFDA蛍光試薬を用いてROS産生量を測定した。青色LED光 2,500 lx、6時間の照射により、マウス由来網膜視細胞（661W細胞）内におけるROS産生は150～250%に増加したが、B-ext 10 µg/mL、L-ext 1～10 µg/mL、NAC 0.3, 1 mM、delphinidin 3, 10 µM、cyanidin 3, 10 µM、malvidin 10 µM、*trans-resveratrol* 3, 10 µMまたは*procyanidin B2* 1～10 µMの各処置群は濃度依存的にROS産生を抑制した（Figure 18）。

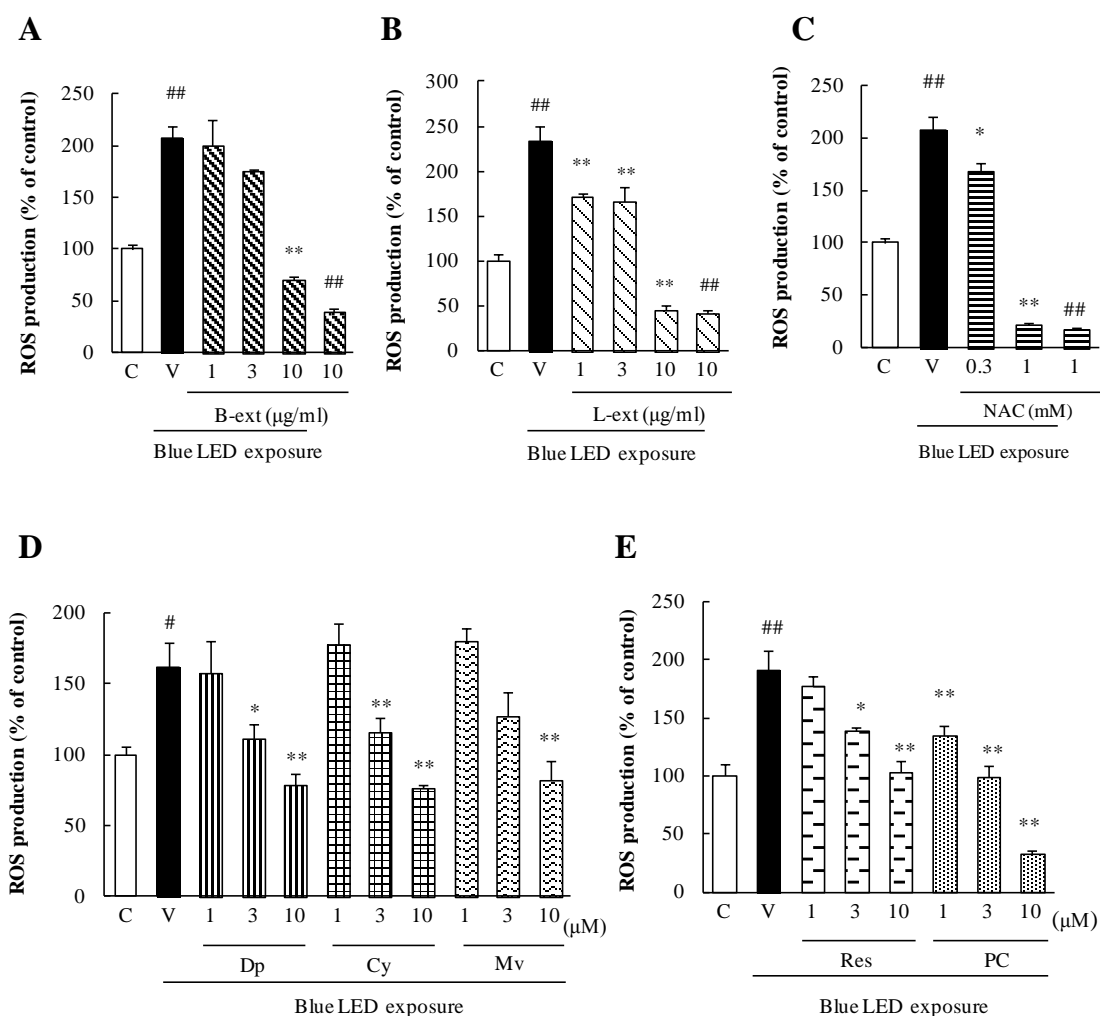


Figure 18. Inhibitory effects of B-ext and L-ext and their components on blue LED light-induced production of ROS in 661W cells. The cells were pretreated with B-ext, L-ext, delphinidin, cyanidin, malvidin, trans-resveratrol, and procyanidin B2 for 1 h, and then exposed to 2500 lx of blue LED light for 6 h. B-ext (A), L-ext (B), NAC (C), delphinidin, cyanidin, malvidin (D), trans-resveratrol, and procyanidin B2 (E) inhibited ROS production in cells induced by blue LED light exposure in a concentration-dependent manner. Intracellular ROS levels were determined by measuring the fluorescence of CM-H₂DCFDA (excitation, 488 nm; emission, 525 nm) after blue LED light exposure for 1 h. Data are represented as means ± SEM (n = 6). C, control; V, vehicle; B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine; Dp, delphinidin; Cy, cyanidin; Mv, malvidin; Res, trans-resveratrol; PC, procyanidin B2. #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. control; *p < 0.05, **p < 0.01 vs. the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test).

3-3 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞のストレス関連タンパク質に対する ビルベリーおよびリンゴンベリーの作用

青色 LED 光照射誘発網膜視細胞障害に対する B-ext および L-ext のさらなる作用機序解明を目的とし、著者は細胞内シグナル伝達因子の変動をウェスタンブロット法により検討した。核内転写因子である NF- κ B は、炎症や腫瘍形成などに関与する因子である。青色 LED 光 2,500 lx 照射開始 3 時間で活性化 (active-) NF- κ B の発現は有意に上昇したが、これに対し B-ext 10 μ g/mL、L-ext 10 μ g/mL または NAC 1 mM の前処置は NF- κ B の活性化を有意に抑制した (Figures 19A および B)。

細胞アポトーシス誘導に関与する p38 MAPK は、青色 LED 光 2500 lx 照射開始 3 時間で最もリン酸化の発現が上昇したが、B-ext 10 μ g/mL および L-ext 10 μ g/mL による前処置にて、p38 MAPK のリン酸化は有意に抑制された (Figure 19A および C)。一方、抗酸化剤 NAC 1 mM は、p38 MAPK のリン酸化の抑制作用は認められなかった。

オートファジー機構は、細胞内恒常性維持に働く一方で、アポトーシスと同様に細胞死を誘導する。オートファジーの活性化は、オートファゴソーム形成時に LC3-I が LC3-II に変換する機構から、LC3-II タンパク質を定量することで評価した。青色 LED 光 2,500 lx 照射開始 6 時間において、LC3-II/LC3-I 比および LC3-II/actin 比は有意に上昇した (Figure 19D-E)。これに対し、B-ext 10 μ g/mL 処置により LC3-II/LC3-I 比が、L-ext 10 μ g/mL および NAC 1 mM 処置により LC3-II/actin 比が有意に減少した。

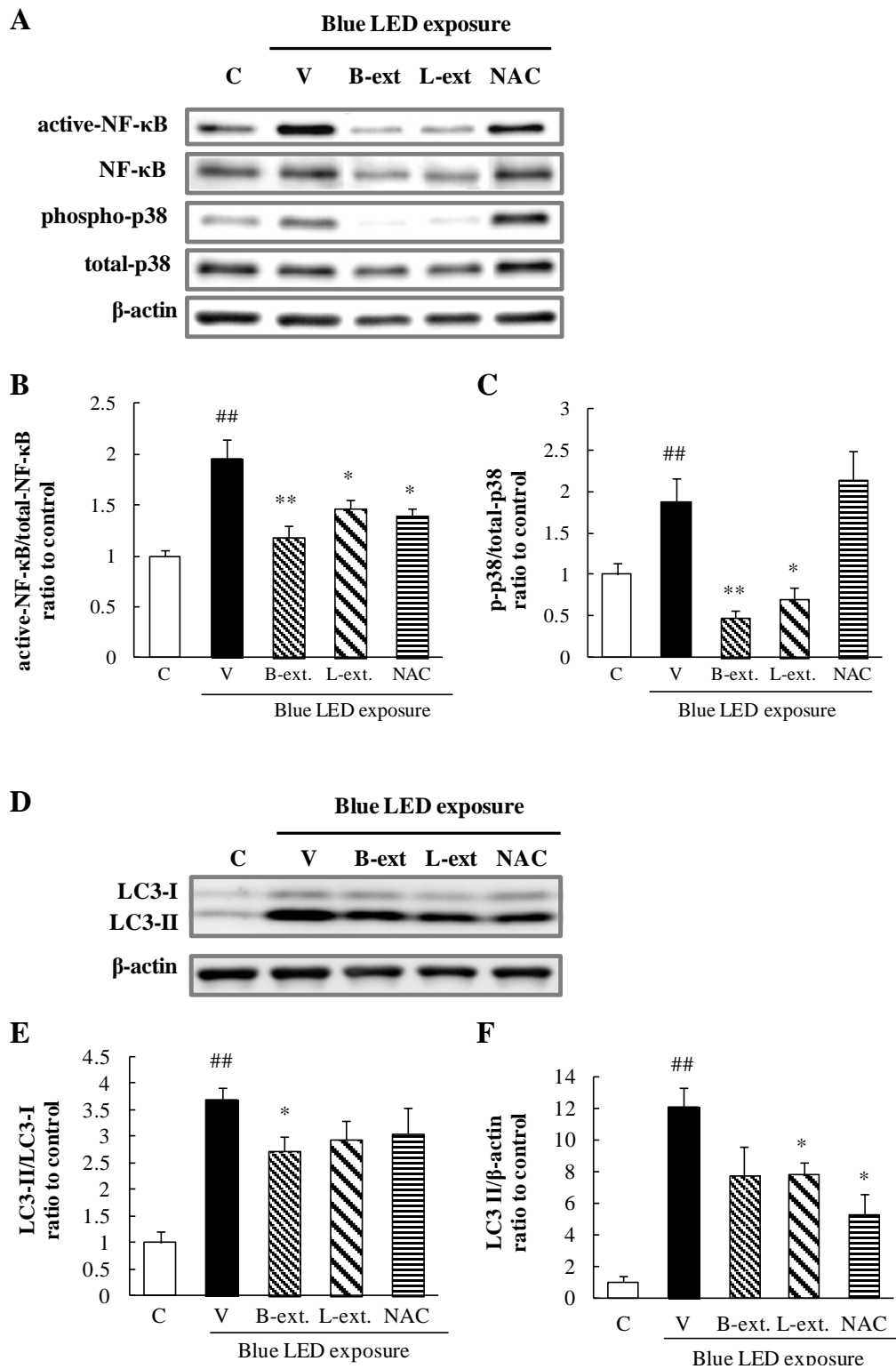


Figure 19. The effects of B-ext, L-ext, and NAC on Western blot analysis. Western blots showing the effects of B-ext, L-ext, and NAC on blue LED light-induced activation of NF- κ B, phosphorylation of p38 MAPK, and conversion of LC3-I to LC3-II in

661W cells. Cells were pretreated with B-ext, L-ext, or NAC for 1 h, and then exposed to 2,500 lx of blue LED light for 3 h. Then, the cells were collected, and lysates were analyzed by western blotting. (A) Representative band images show immunoreactivities against activated NF- κ B, NF- κ B, phospho-p38, and total p38. (B and C) Quantitative analysis of band densities. (D) Representative band images show immunoreactivities against LC3-I and LC3-II. (E and F) Quantitative analysis of band densities. Data are represented as means \pm SEM (n = 5–6). C, control; V, vehicle; B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine. ^{##}p < 0.01 vs. control; *p < 0.05, **p < 0.01 vs. the vehicle-treated group (Student's *t*-test).

3-4 青色発光ダイオード光誘発網膜視細胞死誘発カスパーゼ上昇に対するビルベリーおよびリンゴンベリーの作用

細胞アポトーシス誘導因子であるカスパーゼ(Caspase)-3/7 は、caspase-3/7 assay kit を用いて評価した。青色 LED 光 2500 lx、6 時間照射 12 時間後、caspase-3/7 活性は有意に上昇したが、B-ext 10 μ g/mL、L-ext 10 μ g/mL または NAC 1 mM の添加により、青色 LED 光照射による caspase-3/7 活性の上昇は有意に減少した (Figure 20)。

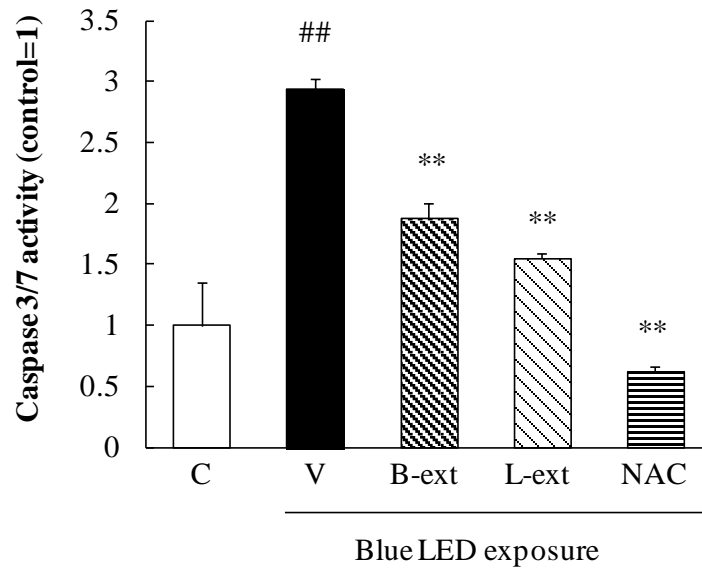


Figure 20. Effects of B-ext, L-ext, and NAC on caspase 3/7 activation in 661W cells. Cells were pretreated with B-ext, L-ext, or NAC for 1 h, and then exposed to 2,500 lx of blue LED light for 6 h. The luminescence and fluorescence of the cells cultured in a 96-well plate were measured with a spectrophotometer, and the caspase-3/7 activity per cell was calculated. Data are represented as means \pm SEM ($n = 6$). C, control; V, vehicle; B-ext, bilberry extract; L-ext, lingonberry extract; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine. ## $p < 0.01$ vs. control; ** $p < 0.01$ vs. the vehicle-treated group (Student's *t*-test).

第4節 考察

本研究では、第3章の紫外線（UVA）誘発網膜視細胞障害と同じく高エネルギー光線に属する青色発光ダイオード（LED）光について、ビルベリーエキス（B-ext）およびリンゴンベリーエキス（L-ext）とその主要活性成分の有用性を検討した。著者は初めに、B-ext、L-ext、両エキスの主要活性成分である delphinidin、cyanidin、malvidin、*trans-resveratrol* および procyanidin B2 について、青色 LED 光誘発網膜視細胞障害および青色 LED 光で誘発される活性酸素種（ROS）産生に対する作用を検討した。なお B-ext（10 µg/mL）では、delphinidin が 1.41 µg/mL（4.65 µM）、cyanidin が 0.91 µg/mL（3.17 µM）、malvidin が 0.61 µg/mL（1.84 µM）を含んでおり、L-ext（10 µg/mL）は、*trans-resveratrol* を 1.06 µg/mL（4.64 µM）、procyanidin を 4.30 µg/mL（7.43 µM）含有していた（Figures 15–17）。Figure 16 において、各成分の ROS 産生抑制作用が認められたが、中でも青色 LED 光誘発 ROS 産生量を大幅に減少させたのは、cyanidin（3～10 µM）、*trans-resveratrol*（3～10 µM）および procyanidins（1～10 µM）であり、これら成分の ROS 産生抑制作用が主に細胞保護作用に寄与していることが示唆された。青色蛍光灯はミトコンドリア DNA 損傷並びに網膜細胞においてフリーラジカルを発生させることが知られている（Godley et al. 2005）。第2章 第4節 考察で述べたように、フリーラジカルは細胞の脂質過酸化、タンパク質の変性を引き起こし、細胞死を惹起する原因の一つと考えられている。本研究において、青色 LED 光をマウス由来網膜視細胞（661W 細胞）に照射することで ROS 産生量は有意に増加し、これに対し抗酸化剤 NAC は視細胞障害を改善したことから、ROS と細胞死の関連が示唆された（Figures 15、17 および 18）。著者は B-ext および含有する anthocyanidin について、ヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドアニオンラジカルなど、脂質過酸化に関与するフリーラジカルに対する消去作用を第4章において明らか

にした。L-ext、*trans-resveratrol* および *procyanidin B2* は、フリーラジカル消去作用が既に報告されている(Jorge M. Ricardo Da Silva 1991; Leonard et al. 2003)。さらに *anthocyanin*、*procyanidin B2* および *trans-resveratrol* は細胞内グルタチオンやスーパーオキシドジスムターゼなど抗酸化酵素の発現を高めることが知られている(Durukan et al. 2006; Hildesheim et al. 2004; Pinteá et al. 2011)。

B-ext および L-ext に含有される活性成分は、抗酸化作用以外の薬理作用として、ストレス応答タンパク質の発現に影響を及ぼすことが知られている。そこで、著者は ROS 産生抑制作用以外の薬理作用を明らかにするため、ウェスタンブロット法を用いて、光障害や炎症に関与する核内転写因子 NF- κ B、細胞アポトーシス誘導因子 p38 MAPK、細胞死誘導に関与するオートファジー機構関連因子 LC3 の変動を調べた。青色 LED 光照射は、マウス由来網膜視細胞 (661W 細胞) における NF- κ B の活性化、p38 MAPK のリン酸化並びに LC3-II の発現上昇 (オートファジー活性化) を誘導した (Figure 19)。

NF- κ B はフリーラジカル、炎症刺激因子、発癌プロモーター、紫外線や X-線照射などにより活性化される転写因子である(Doyle and O'Neill 2006; Gloire et al. 2006)。光刺激により惹起される酸化ストレスは NF- κ B の活性化を促し、細胞の炎症、ガン化、アポトーシスを誘導する。また、光照射誘発マウス網膜視細胞障害において、NF- κ B と TUNEL 染色したアポトーシス細胞との共局在が観察され、光刺激後に誘発される網膜視細胞変性は NF- κ B/caspase 経路を介して引き起こされる(T. Wu et al. 2003)。本研究において、B-ext、L-ext、および抗酸化剤 NAC 処置すべてにおいて青色 LED 光照射が引き起こす NF- κ B の活性化を抑制したことから (Figure 19A および B)、青色 LED 光で誘発される ROS 産生の抑制作用が関与していることが示唆された。さらに、アントシアニンは NF- κ B の活性化に重要な I κ B の分解を抑制することが知られている(Afaq et al. 2005)。

p38 MAPK の活性化は、青色光誘発網膜障害において一重項酸素の産生を介して引き起こされる(Rozanowska et al. 1998)。さらに 661W 細胞において、光照射で活性化した p38 MAPK はアポトーシス転写因子 (AP-1) を誘導し、最終的に細胞死を惹起する(Yang et al. 2007)。Anthocyanin、resveratrol および procyanidin は、一重項酸素消去作用を有する(Arigo 2004; De Rosso et al. 2008; Olas et al. 1999)。さらに、B-ext の主要成分である delphinidin および cyanidin は、p38 MAPK 経路の上流に位置する MKK4 の活性化を ATP への競合阻害により抑制する(Kwon et al. 2009; Lim et al. 2011)ことから、B-ext は L-ext と比較して強い p38 MAPK リン酸化抑制作用を示した可能性が考えられる。抗酸化剤 NAC (グルタチオンの構成成分) は、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオンラジカルに対する消去作用を有する一方、一重項酸素捕捉作用を有していない(Aruoma et al. 1989)。そのため、NAC は青色 LED 光照射により誘発される p38 MAPK のリン酸化を抑制しなかったことが示唆された (Figure 19C)。

オートファジーは、細胞内における異常なタンパク質蓄積の防止、過剰なタンパク質のリサイクルを担う機構であると同時に、I 型のアポトーシス、III 型のネクローシスと並び II 型プログラム細胞死を担っている(Nixon 2013)。過度なオートファジーの進行は、細胞内タンパク質の分解を加速させ、最終的に細胞死を引き起こす。網膜視細胞への酸化ストレスおよび光刺激によりオートファジーは活性化され、さらにオートファジー阻害剤 3-methyladenine 処置は、過酸化水素で誘発される caspase-3 の活性化並びに視細胞の細胞死を抑制する(Kunchithapautham and Rohrer 2007)。本研究において、青色 LED 光照射により視細胞内で発生した多量の ROS がオートファジーを活性化させ、視細胞の細胞死を誘導した可能性が示唆されたが、これに対し B-ext、L-ext および NAC は、LC3-I から LC3-II への変換を抑制した (Figure 19D-F)。同時に、青色 LED 光照射によ

り細胞アポトーシス誘導因子である caspase-3/7 の活性化が引き起こされたが、B-ext、L-ext および NAC により有意に抑制された (Figure 20)。Caspase-3/7 は視細胞アポトーシス誘導に関与し、酸化ストレスや p38 MAPK のリン酸化による活性化(Zhuang et al. 2000)および活性化した caspase-3, -7 および-8 はオートファジー誘導を促す役割を有する(Kang et al. 2011)。したがって、B-ext、L-ext、両エキスに含まれるポリフェノール成分および抗酸化剤 NAC は、主に青色 LED 光照射による ROS 産生の抑制を介して、NF- κ B の活性化、p38 MAPK のリン酸化およびオートファジーの活性化を抑制し、最終的に caspase-3/7 の活性化を抑制することで 661W 細胞死を抑制したことが示唆された。

最後に、著者は B-ext および L-ext の同時処置による作用を検討した (Figure 16)。B-ext 10 μ g/mL および L-ext 10 μ g/mL の同時処置により、細胞代謝活性は単独処置と比較し有意に改善されたが、今回の検討においては両エキスの作用機序の違いは認められず、今後更なる検討が必要である。

以上のことから、本章では青色 LED 光誘発網膜視細胞障害に対して、ビルベリー、リンゴンベリーおよびそれぞれに含まれるポリフェノール成分 (delphinidin、cyanidin、malvidin、*trans-resveratrol*、procyanidin B2) の抗酸化作用を介した細胞保護作用を明らかにした。ビルベリーは、昔からフィンランドなど北欧諸国において、胃腸障害に対する治療手段として用いられている。そこで、酸化ストレスが影響を及ぼす他の疾患として胃潰瘍に着目し、ビルベリーエキスの抗潰瘍作用について検討した。

第4章 マウス胃潰瘍モデルに対するビルベリーエキスの抗潰瘍作用

第1節 緒言

胃は食事で摂取した食品の消化を行う器官であり、摂取した食材に含まれる栄養素を吸収しやすい状態に分解する。胃の不調は体の健康にも大きな影響を及ぼす。胃に摂り込まれた食材あるいは薬剤の一部は胃に直接作用し、胃から体内に摂り込まれるものもある。ビルベリーに含まれるアントシアニンは酸性における安定性が高く、体内への取り込みは小腸だけでなく胃からも吸収される(Talavera et al. 2003)。

胃潰瘍は世界中で広く知られている疾患であり、日常的な様々なストレス、非ステロイド性抗炎症薬の長期服用、暴飲暴食、ヘリコバクター・ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) 感染、そしてアルコールの過剰摂取などで起こる。それら胃潰瘍の発症機序の一つとして、ヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドアニオンラジカルなどのフリーラジカルが胃粘膜の脂質過酸化を惹起し、障害を引き起こすことが知られている(D. Das and Banerjee 1993; Del Soldato et al. 1986; Terano et al. 1989)。中でもエタノール誘発胃潰瘍は、胃粘膜障害を惹起する原因として広く知られており、臨床治験や動物モデルの作成によく用いられている。エタノールの経口摂取は血流低下を招き、胃粘膜バリアーを減少させ、ヒスタミン遊離を促し胃粘膜細胞に炎症を引き起こす。さらには、粘膜透過性亢進、粘膜細胞のネクロシス誘導、浮腫の形成、粘膜および粘膜下出血を引き起こす(Eastwood and Kirchner 1974; Lulu and Dragstedt 1970; Szabo 1987; Tarnawski et al. 1981)。同様に、エタノール誘発胃潰瘍の発症においても、フリーラジカルおよび酸化ストレスと胃粘膜障害発症が関与することが知られており、ビタミンEやカテキン、ケルセチン、アスタキサンチンなどの抗酸化剤の摂取が、エタノールで誘発される脂質過酸化を抑制し、胃潰瘍を抑制することがマウスの実験

で報告されている(Hamaishi et al. 2006; Jaarin et al. 1999; Kim et al. 2005; Ömer C 2004; Tariq 1988)。

ビルベリーに含まれるアントシアニン類は高い抗酸化作用、血流改善作用を有しており、寒冷拘束ストレス、インドメタシン誘発、ヒスタミン誘発、酢酸誘発およびエタノール誘発胃潰瘍動物モデルに対する抑制作用が報告されている(Magistretti et al. 1988)。しかしながら、これまでビルベリーエキスの抗潰瘍作用の作用機序に関する詳細な報告は見当たらない。

そこで、著者はマウスを用いたエタノール誘発マウス胃潰瘍モデルを作成し、ビルベリーエキスの抗潰瘍作用を検討するとともに、ビルベリーエキスの抗潰瘍作用における作用機序について検討した。

第2節 実験方法

2-1 実験材料

ビルベリーエキスは Wakasa Seikatsu Co., Ltd. (Kyoto, Japan) から供与された。ビルベリーエキスは 25%以上のアントシアニジンを含有しており、delphinidin 9.0%、cyanidin 5.4%、malvidin 3.4%を含有する。アントシアニン標準品デルフィニジン (delphinidin)、シアニジン (cyanidin)、マルビジン (malvidin)は Extrasynthese (Genay Cedex, France) から、スクラルファート (sucralfate)、trolox は Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) から、 α -tocopherol、carboxymethylcellulose は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

すべての動物実験は、岐阜薬科大学動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、

許可を得て実施した。6 週齢雄性 ddY マウス；体重 29–31 g は Japan SLC Ltd. (Shizuoka, Japan) より購入した。動物は自由給水下に固形飼料(CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) を用い、室温 24±2°C で 12 h の明暗サイクル環境下で育成した。

2-2-2 エタノール誘発マウス胃潰瘍モデル

マウスは 24 時間絶食させた後 7 群に分け、各試料は 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) 水溶液に分散して、マウスに 0.1 mL/10 g 体重量で経口投与した。対照群 (vehicle) は、0.5% carboxymethylcellulose 水溶液のみを投与した。各群、ビルベリーエキス (3、10、30、100 mg/kg 体重)、陽性対照として胃粘膜保護作用をもつ sucralfate (100 mg/kg 体重) または抗酸化剤 α -tocopherol (100 mg/kg 体重) を経口投与した 1 時間後、150 mM HCl/ethanol (0.1 mL/20 g 体重) をマウスに経口投与し胃潰瘍を惹起させた。150 mM HCl/ethanol の代わりに生理食塩水を投与した群を control とした。150 mM HCl/ethanol 投与 1 時間後にマウスを頸椎脱臼にて屠殺した。胃を摘出し、1%ホルマリン 1 mL を胃内部に注入し、食道および幽門側をクリップした状態で 1%ホルマリンに 30 分間固定した。固定した胃を大弯に沿って切り開き、生理食塩水にて静かに洗浄し、内容物を除去した。開いた胃内壁を撮影し、画像の胃潰瘍部位は血管新生画像解析ソフト (Angiogenesis Image Analyzer, Kurabo, Osaka, Japan) を用いて面積を解析した。

2-2-3 組織評価

マウスから胃を摘出し、10%ホルマリンにて 24 時間固定した。固定した胃を大弯に沿って切り開き、70%エタノール 2 時間、90%エタノール 2 時間、95%エ

タノール 2 時間、99%エタノール 12 時間、無水エタノール 2 時間を 2 回、キシレン 2 時間を 3 回、融解パラフィン 2 時間を 2 回、融解パラフィン 24 時間の順に浸透させた。その後、胃を上下に 2 分割し、パラフィンにて胃を包埋し、ミクロトーム (Leica, Tokyo, Japan) を用いて 5 μm のパラフィン切片を作成し、カバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に載せ 37°C にて一晩乾燥し、室温にて保存した。ヘマトキシリン-エオジン染色は、初めにパラフィン切片をキシレンに浸してパラフィンを除去し、つぎにアルコール濃度を下げた溶液に浸し、蒸留水に浸透した後、ヘマトキシリン液に 2 分間、エオジン液に 5 分間浸し、段階的にアルコールで脱水した。キシレンで透徹しオイキットを用いて封入した後、胃の大弯部内壁に発症した潰瘍は顕微鏡を用いて観察した。

2-2-4 マウス胃ホモジネートを用いた脂質過酸化試験

健康マウスの胃を摘出し、30% w/v 塩化カリウム水溶液を加えホモジナイザー (Physoctron NS-51, Microtec Co., Ltd, Chiba, Japan) を用い、氷中で冷却しながらホモジネートした。ホモジネート液を 4°C、3000 rpm、10 分間遠心分離し、上清 945 μL を取り分け、ビルベリーエキス溶液 (0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 5 μL 、1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 μL を添加して 37°C にて 1 時間インキュベートした。35% HClO_4 を 200 μL 加え、10°C、3000 rpm、10 分間遠心分離した。上清 500 μL に 8.1% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate; SDS) 100 μL および 0.8% チオバルビツール酸 (thiobarbituric acid; TBA) 含有 20% 酢酸緩衝液 (pH 3.6) 500 μL を加え、100°C で 1 時間インキュベートし、脂質過酸化を惹起した。その後、氷水にて冷却し、ブタノールとピリジン (15 : 1) 混合液 1 mL を加え、静かに 5 分間攪拌した。室温、4000 rpm、10 分間遠心分離して得たブタノール-ピリジン上清に含まれる脂質過酸化反応物 (thiobarbituric acid reactive substance; TBARS)

について、532 nmにおける吸光度を測定した。

2-2-5 電子スピン共鳴法 (ESR)

スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) はhypoxanthine-xanthine oxidase反応により生成した(Noda et al. 1997)。各試料溶液 [ビルベリーエキス、アントシアニン標準品、troloxを、1% dimethyl sulfoxide含有 0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解] 50 μL 、5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド (DMPO) (0.5 M) 50 μL 、hypoxanthine (5 mM) 50 μL およびxanthine oxidase (0.4 units/mL) 50 μL を混合した。混合液を電子スピン共鳴装置測定用セルに移し取り、電子スピン共鳴スペクトル (DMPO-OOH) の測定を行った。スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) の測定は、xanthine oxidaseを添加し反応を起こした1分後に開始した。

ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) はFenton反応により生成した(Noda et al. 1997)。各試料溶液 [ビルベリーエキス、アントシアニン標準品、troloxを1% dimethyl sulfoxide含有 0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解] 50 μL 、DMPO (1.8 mM) 50 μL 、過酸化水素 (2 mM) 50 μL および FeSO_4 (0.2 mM) 50 μL を混合した。混合液を電子スピン共鳴装置測定用セルに移し取り、電子スピン共鳴スペクトル (DMPO-OH) の測定を行った。ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の測定は、 FeSO_4 を加え反応を起こした1分後に開始した。

電子スピン共鳴装置 (JES-FA 200, JEOL, Tokyo, Japan) の測定条件は、center field 330 mT、sweep width 1.5×10 mT、sweep time 4 min、field modulation width 2×0.1 mT、amplitude 5.0×100 、time constant 0.3 s、microwave power 8.0 mWに設定した。また、電子スピン共鳴装置の測定ピークは標準物質であるマンガンの電子スピン共鳴スペクトルで補正した。スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) および ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の存

在量は電子スピン共鳴スペクトルの面積から算出し、各試料の 50%阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration: IC₅₀) を算出した。

2-3 統計学的解析

実験結果はすべて平均±標準誤差で表し、危険率 (p) 5%以下を有意とした。

統計学的解析は Dunnett's test および Student's *t*-test を用いて行った。

第3節 結果

3-1 エタノール誘発マウス胃潰瘍に対するビルベリーエキスの作用

著者は初めにエタノール誘発マウス胃潰瘍モデルを作成し、ビルベリーエキスの抗胃潰瘍作用を検討した。健常マウス胃内壁と比較し、塩酸エタノール投与1時間後に胃内壁に胃潰瘍（浮腫）が発症した（Figure 21A および B）。ビルベリーエキス 3～100 mg/kg のエタノール投与1時間前経口投与により、用量依存的に有意な胃潰瘍抑制作用が認められた（Figure 21C–E）。また、陽性対照として用いた胃粘膜保護剤スクラルファート 100 mg/kg および抗酸化剤 α -tocopherol 100 mg/kg の経口投与も同様に潰瘍抑制作用を示した（Figure 21E）。

ヘマトキシリン-エオジン組織染色を用いた組織の観察において、健常マウスと比較し、エタノールを経口投与したマウス胃内壁で、胃粘膜剥離および浮腫形成などの胃潰瘍症状が観察された（Figure 22B および F）。一方、ビルベリーエキス 10 mg/kg または 100 mg/kg の経口投与により、用量依存的に組織学的胃潰瘍変化は軽減された（Figure 22C、D、G および H）。

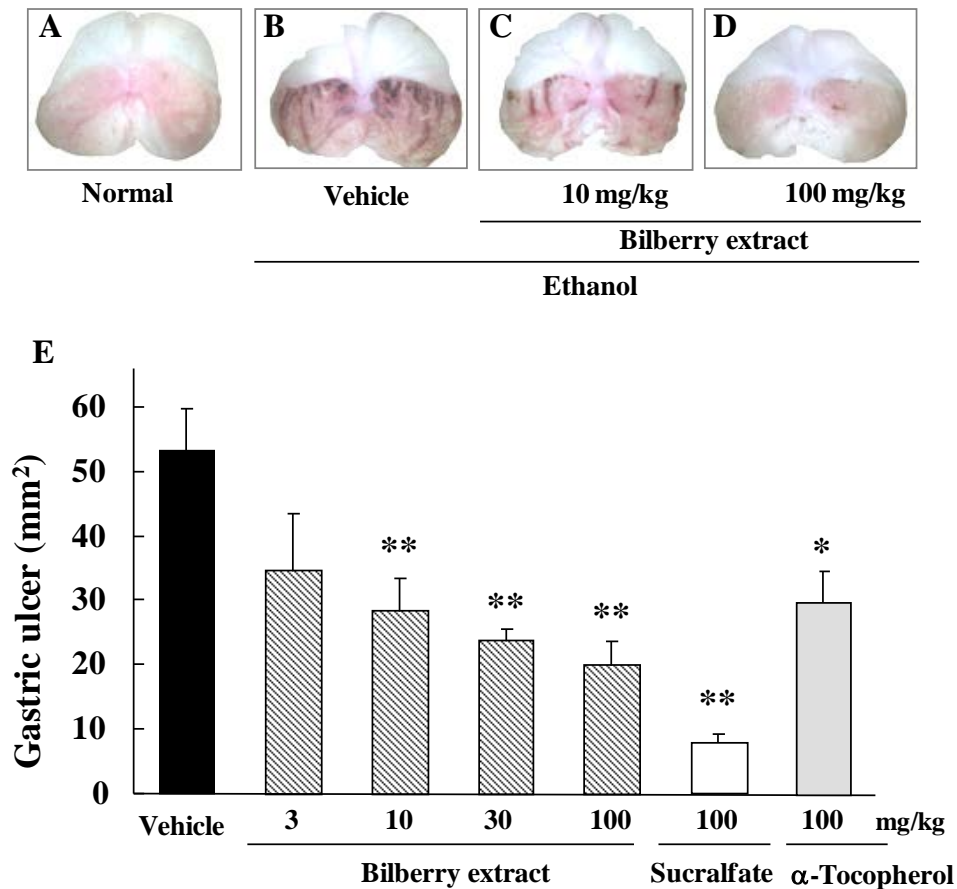


Figure 21. The protective effects of bilberry extract on HCl/ethanol-induced gastric ulcer in mice.

Normal stomach (A), glandular stomach treated with vehicle (B), bilberry extract (10 mg/kg, p.o.) (C) and bilberry extract (100 mg/kg, p.o.) (D) 1 h before administration of 150mM HCl/ethanol. Quantitative analysis of bilberry extract, sucralfate, and α -tocopherol on the ulcer area (mm²) induced by HCl/ethanol (E). Data are shown as mean \pm SEM, n=6 to 8, * p<0.05, ** p<0.01 vs vehicle-treated group, Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test.

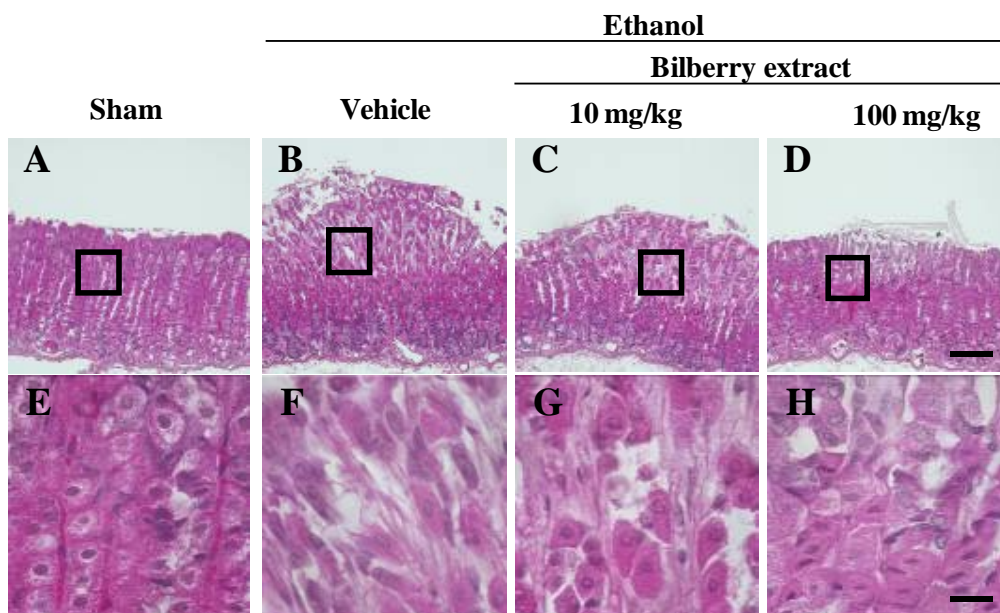


Figure 22. The protective effects of bilberry extract on histological evaluation in an HCl/ethanol-induced ulcer model.

Sections of hematoxylin and eosin (HE) staining. Section through gastric mucosa in the sham-treated group (A). Microscopic appearance of lesions induced by HCl/ethanol in gastric mucosa pretreated with vehicle (B), 10 mg/kg (C) and 100 mg/kg (D) of bilberry extract. Scale bars show 150 μ m (upper micrograph) and 10 μ m (lower micrograph).

3-2 マウス胃ホモジネートの脂質過酸化に対するビルベリーエキスの作用

胃潰瘍の発症機序の1つに酸化ストレスによる脂質過酸化反応が知られているため、著者は次にビルベリーエキスの作用機序解明を目的とし、マウス胃ホモジネートの脂質自動過酸化反応に対するビルベリーエキスの抑制作用を検討した。脂質過酸化反応物 (TBARS) 量は、ビルベリーエキス 0.1~100 μ g/mLにて濃度依存的に有意に減少した (Figure 23)。IC₅₀値は 4.0 μ g/mL (95%信頼区間: 1.7~10.3 μ g/mL) であった。

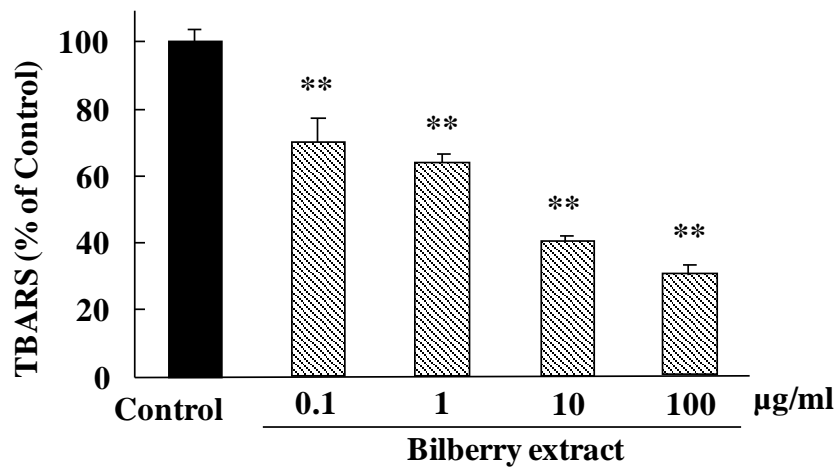


Figure 23. The inhibition effects of VMA against production of TBARS in the murine stomach tissue homogenates. The values of TBARS are shown at a rate of control. Data are shown as mean \pm SEM, $n=3$, ** $p<0.01$ vs control. TBARS, thiobarbituric acid reactive substances. Dunnett's multiple comparison test.

3-3 電子スピン共鳴装置を用いたスーパーオキシドアニオンラジカル ($\bullet\text{O}_2^-$) およびヒドロキシルラジカル ($\bullet\text{OH}$) の測定

ビルベリーエキスおよび主要活性成分であるアントシアニン (delphinidin、cyanidin、malvidin) について、 $\bullet\text{O}_2^-$ および $\bullet\text{OH}$ に対するラジカル消去作用をESR法により測定した。ビルベリーエキス、は $\bullet\text{O}_2^-$ および $\bullet\text{OH}$ 両ラジカルに対し強い消去作用を示した (Figure 24)。さらに、delphinidin、cyanidin、malvidin および trolox は、 $\bullet\text{O}_2^-$ に対し濃度依存的なラジカル消去作用を示した。一方、 $\bullet\text{OH}$ に対するラジカル消去作用においては、delphinidin および trolox のみ濃度依存的に有意なラジカル消去作用を示し、cyanidin および malvidin は本研究で用いた濃度 (0.1 ~ 1 mM) において、明らかなラジカル消去作用を示さなかった (Figure 24B)。

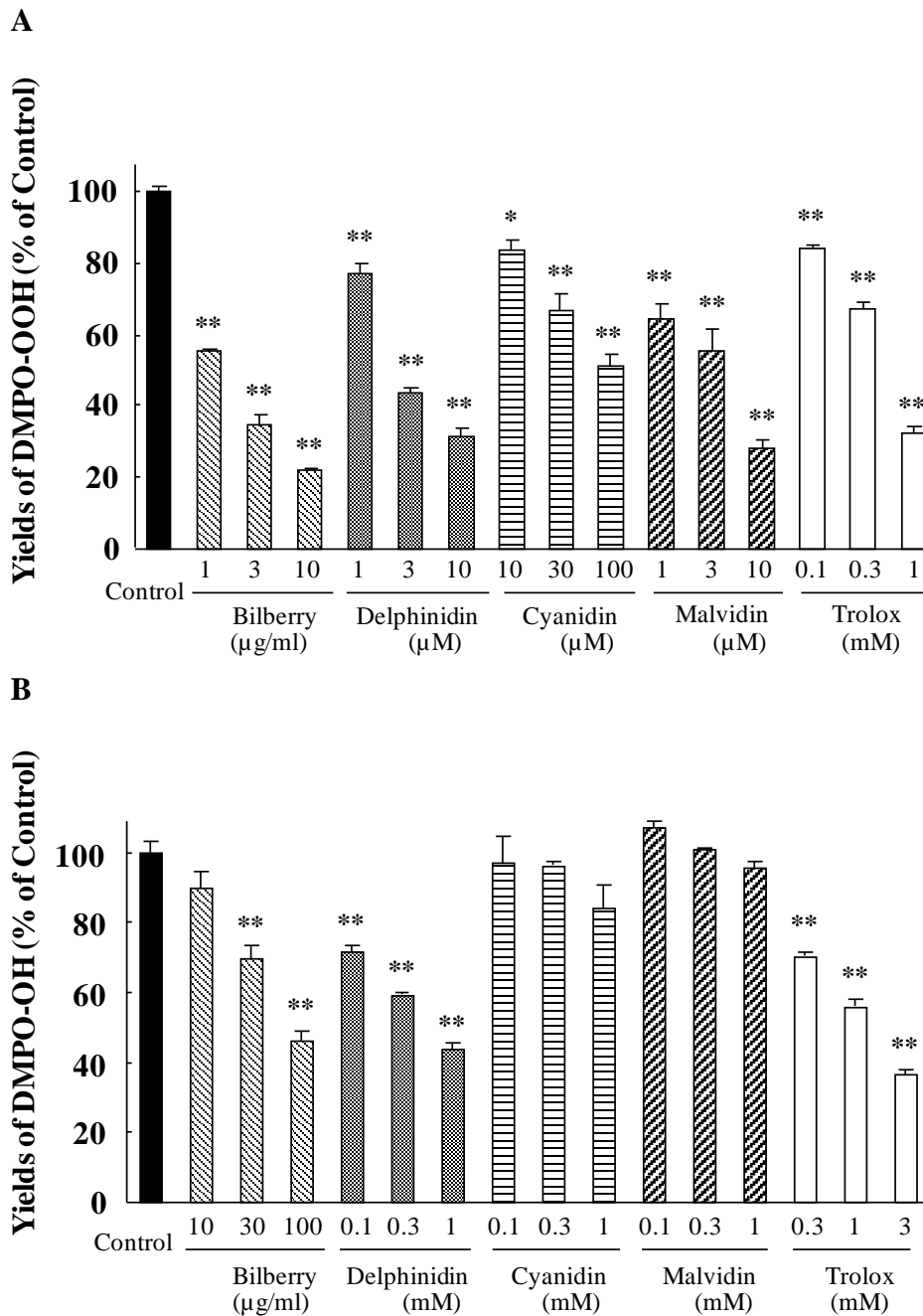


Figure 24. The radical scavenging activities of bilberry extract and its main anthocyanidins against the superoxide anion radical and the hydroxyl radical. Bilberry extract, delphinidin, cyanidin, malvidin and trolox were measured for superoxide anion radical scavenging activity (A) and hydroxyl radical scavenging activity (B) by ESR. The values of radical (DMPO-OOH and DMPO-OH) are shown at a rate of control. Data are shown as mean \pm SEM, n=3. *p<0.05, **p<0.01 vs control. Dunnett's multiple comparison test.

また、ビルベリーエキス、delphinidin、cyanidin、malvidinおよびtroloxの $\bullet\text{O}_2^-$ および $\bullet\text{OH}$ に対するラジカル消去作用の IC_{50} 値を算出した (Tables 7 および 8)。

Table 7. Superoxide anion radical scavenging activity of bilberry extract and its main anthocyanidins (delphinidin, cyanidin, and malvidin) measured by ESR.

Compounds	IC_{50}			
	$\mu\text{g/ml}$		mM	
Bilberry extract	1.2	(1.0 – 1.5)		
Delphinidin	1.2	(0.9 – 1.6)	3.5	(2.5 – 4.7)
Cyanidin	31.8	(21.8 – 50.9)	98.4	(67.5 – 157.8)
Malvidin	1.0	(0.7 – 1.4)	2.8	(2.0 – 3.8)
Trolox	130.8	(113.4 – 154.9)	522.4	(453.1 – 615.1)

IC_{50} : 50% inhibitory concentration. The parentheses show 95% confidence limits.

Table 8. Hydroxyl radical scavenging activity of bilberry extract and its main anthocyanidins (delphinidin, cyanidin, and malvidin) measured by ESR.

Compounds	IC_{50}			
	$\mu\text{g/ml}$		mM	
Bilberry extract	116	(80 - 192)		
Delphinidin	237	(203 - 305)	0.7	(0.6 - 0.9)
Cyanidin	>323		>1.0	
Malvidin	>367		>1.0	
Trolox	325	(275 - 400)	1.3	(1.1 - 1.6)

IC_{50} : 50% inhibitory concentration. The parentheses show 95% confidence limits.

第4節 考察

本研究では、著者ははじめにエタノール誘発マウス胃潰瘍モデルを作成し、ビルベリーエキスの抗潰瘍作用を検討した。ラットを用いた過去の研究において、ビルベリーエキス 200 および 400 mg/kg 体重量の投与によりエタノール誘発胃潰瘍はそれぞれ 36 および 24%抑制されたが、用量依存的な作用は認められていなかった(Magistretti et al. 1988)。本研究では、ビルベリーエキス 10~300 mg/kg の用量において、それぞれ 47、56 および 63%エタノール誘発潰瘍面積の減少が認められており (Figures 21 および 22)、ラットモデルと比較しマウスモデルにおいてビルベリーエキスは強い抗潰瘍作用を示した。

これまで、ビルベリーエキスおよびアントシアニンは、肝臓、脳および腎臓など各種疾患における脂質過酸化を抑制することが知られている(Bao et al. 2008; Matsunaga et al. 2009; Rahman et al. 2008)。高濃度のエタノール摂取は、胃組織においてスーパーオキシドアニオンラジカルおよびヒドロキシルラジカルを発生させ、ついでスーパーオキシドアニオンラジカルはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の代謝を受けて過酸化水素を発生させる。これら酸化ストレスにより、胃粘膜の脂質過酸化が誘発され、組織障害が引き起こされる(Huh et al. 1996; Novak et al. 1991)。本研究では、マウス胃ホモジネートにおいて、ビルベリーエキスは濃度依存的に胃組織における脂質過酸化反応を抑制することを明らかにした (Figure 23)。抗酸化物であるビタミンE、アスコルビン酸、ケルセチンや茶カテキンなどのポリフェノール成分において、胃粘膜細胞の脂質過酸化抑制作用が認められている(Hamaishi et al. 2006; Jaarin et al. 1999; Kim et al. 2005; Ömer C 2004; Tariq 1988)。本研究においても、陽性対照として用いた抗酸化剤 α -tocopherol は、明らかな潰瘍抑制作用および脂質過酸化抑制作用を示した (Figures 21E および 23)。

つぎに、ビルベリーエキスおよびビルベリーのアントシアニン (*delphinidin*、*cyanidin*、*malvidin*) について、脂質過酸化の要因であるフリーラジカル ($\bullet\text{O}_2^-$ および $\bullet\text{OH}$) に対する消去作用を検討した。これまで、ビルベリーエキスについてDPPHラジカル消去活性並びにORAC測定において強い抗酸化作用を有することが明らかにされている(Faria et al. 2005; Martín-Aragón et al. 1998; Prior et al. 1998)。そこで、つぎにESR法を用いて、 $\bullet\text{O}_2^-$ および $\bullet\text{OH}$ それぞれに対するビルベリーエキスおよび主要なアントシアニンのラジカル消去作用について検討し、ビルベリーエキスおよびアントシアニンの両ラジカル消去作用を明らかにした (Figure 24 およびTables 7、8)。一方、 $\bullet\text{OH}$ 消去能においてはアントシアニンの種類により消去活性強度は異なり、*delphinidin*にのみ有意な抑制作用が認められた。さらに、ビルベリーエキスに含まれる*cyanidin-3-glucoside*は、ラットにおけるエタノール誘発潰瘍において、抗酸化酵素であるグルタチオン (*glutathione*)、SODおよびカタラーゼ (*catalase*) の組織発現レベルの低下を抑制し、脂質過酸化を抑制することが知られている(Parks 1989)。

ビルベリーエキスおよび含有する各種アントシアニンは、エタノール摂取により惹起される胃潰瘍障害において、フリーラジカル消去作用を介した胃粘膜の脂質過酸化を抑制することで、抗潰瘍作用を示したことが示唆された。

総括および結論

ツツジ科スノキ属にするブルーベリーやビルベリー (*Vaccinium myrtillus* L.) は、欧州や米国を初め食経験豊富な果実であり、アントシアニンを豊富に含む。アントシアニンは、これまでに抗酸化作用、抗炎症作用、抗ガン作用、視機能改善作用などの生理活性が知られている。本研究では、10種類のベリー果実についてアントシアニン成分の定性定量分析並びに抗酸化作用を測定した。さらにビルベリーエキスについて、紫外線や青色 LED 光など有害光に対する網膜保護作用並びにマウス胃潰瘍に対する保護作用を検討した。

第1章では、ビルベリー、ブルーベリー、カシス並びにクローベリー (*Empetrum nigrum*) を始めとする計10種の果実を選択し、同条件にてアントシアニンを抽出し、HPLC-ESI-MS/MSによるアントシアニンの定性定量、ラジカル捕捉活性および第二鉄還元酸化防止力 (FRAP) を測定した。抽出物において、総アントシアニン量および各抗酸化作用において最も高い数値を示したのはクローベリーであり、ついでビルベリーの順であった。一方、生果実換算ではビルベリーが最も高い総アントシアニン量を示した。

第2章では、紫外線が網膜に及ぼす影響を調べるため、マウス由来網膜視細胞培養系を用いた ultraviolet A (UVA) 誘発視細胞障害 *in vitro* モデルを作成し、ビルベリーエキスおよびリンゴンベリーエキスについて有効性を検討した。ビルベリー、リンゴンベリーエキス並びに主要成分であるアントシアニン、レスベラトロールおよびプロシアニジンは、UVAによる活性酸素種 (reactive oxygen species :ROS) 産生および細胞障害を抑制した。ビルベリーはアポトーシス誘導に関わる p38 MAPK の活性化を抑制し、一方、リンゴンベリーは細胞生存に関

わる Akt のリン酸化低下を抑制した。さらに、両エキスの同時添加で細胞保護作用はより強く認められた。

第 3 章では、可視光の中で高エネルギー可視光線と呼ばれる青色光について、マウス由来網膜視細胞を用いた青色 LED 光誘発視細胞障害 *in vitro* モデルを作成し、ビルベリーおよびリンゴンベリーエキスの有効性を検討した。ビルベリー、リンゴンベリーエキスは、青色 LED 光照射による ROS 産生、炎症に関与する NF- κ B 活性化、細胞死誘導に関わる p38 MAPK、caspase-3/7、オートファジーの活性化を抑制した。

第 4 章では、酸化ストレスが強く影響を及ぼす疾患であるエタノール誘発マウス胃潰瘍モデルを作成し、ビルベリーエキスの抗潰瘍作用の検討並びにその作用機序解明を行った。塩酸エタノール誘発胃潰瘍は、ビルベリーエキスの経口投与により用量依存的に改善された。さらにマウス胃ホモジネートを用いた脂質過酸化反応 (TBARS 法) および電子スピン共鳴法 (ESR 法) により、ビルベリーエキスおよび主要なアントシアニジンは、強い過酸化脂質抑制作用並びにスーパーオキシドアニオンラジカルおよびヒドロキシラジカル捕捉活性を有していた。

以上、本研究からアントシアニンを高含有するビルベリーは、高い抗酸化作用により紫外線および青色 LED 光誘発網膜視細胞障害保護作用並びにマウス胃潰瘍保護作用を有することを明らかにした。

謝 辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

また、本研究に際して終始御懇切なるご助言を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士並びに助教 鶴間一寛博士に深謝致します。また、種々のご協力を頂きました薬効解析学研究室諸氏に心から感謝致します。さらに、ESR の測定において有益な御助言およびご指導を賜りました岐阜薬科大学薬物送達学大講座薬品物理化学研究室教授 近藤伸一博士に心より感謝致します。

本論文の審査を務めて頂き、有益な御助言を賜りました機能分子学大講座 薬理学研究室教授 稲垣 直樹博士、医療薬剤学大講座 薬物動態学研究室教授 北市 清幸博士、機能分子学大講座 生薬学研究室教授 大山 雅義博士に深謝致します。

最後に、本研究の遂行並びに本論文の作成の機会を与えて頂きました株式会社わかさ生活代表取締役社長 角谷建耀知氏、商品部部署長 小林沙織氏に深く感謝致します。あわせて種々のご協力を頂きました株式会社わかさ生活商品部研究所グループ諸氏並びに同社従業員の皆様に心から感謝致します。

引用文献

- Aaby, K., et al. (2007), 'Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees: impact of achene level and storage', *J Agric Food Chem*, 55 (13), 5156-66.
- Afaq, F., et al. (2005), 'Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice', *Int J Cancer*, 113 (3), 423-33.
- Ariga, T. (2004), 'The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins', *Biofactors*, 21 (1-4), 197-201.
- Aruoma, O. I., et al. (1989), 'The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid', *Free Radic Biol Med*, 6 (6), 593-7.
- Bao, L., et al. (2008), 'Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on KBrO₃-induced kidney damage in mice', *J Agric Food Chem*, 56 (2), 420-5.
- Bastide, P., Rouher, F., and Tronche, P. (1968), [Rhodopsin and anthocyanosides. Apropos of various experimental facts], *Bull Soc Ophtalmol Fr*, 68 (9), 801-7.
- Benzie, I. F. and Strain, J. J. (1996), 'The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay', *Anal Biochem*, 239 (1), 70-6.
- Blois, M. S. (1958), 'Antioxidant determination by the use of a stable free radical', *Nature*, 181, 1199-200.
- Boocock, D. J., et al. (2007), 'Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16 (6), 1246-52.
- Bors, W., et al. (2004), 'Antioxidant mechanisms of polyphenolic caffeic acid oligomers, constituents of *Salvia officinalis*', *Biol Res*, 37 (2), 301-11.

- Brancho, D., et al. (2003), 'Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo', *Genes Dev*, 17 (16), 1969-78.
- Colantuoni, A., et al. (1991), 'Effects of Vaccinium Myrtillus anthocyanosides on arterial vasomotion', *Arzneimittelforschung*, 41 (9), 905-9.
- Cottart, C. H., et al. (2010), 'Resveratrol bioavailability and toxicity in humans', *Mol Nutr Food Res*, 54 (1), 7-16.
- Das, D. and Banerjee, R. K. (1993), 'Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration', *Mol Cell Biochem*, 125 (2), 115-25.
- Das, S., et al. (2005), 'Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288 (1), H328-35.
- De Rosso, V. V., et al. (2008), 'Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations', *Free Radic Res*, 42 (10), 885-91.
- Del Soldato, P., et al. (1986), 'Oxygen free radicals interact with indomethacin to cause gastrointestinal injury', *Agents Actions*, 17 (5-6), 484-8.
- Doyle, S. L. and O'Neill, L. A. (2006), 'Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity', *Biochem Pharmacol*, 72 (9), 1102-13.
- Durukan, A. H., et al. (2006), 'Ingestion of IH636 grape seed proanthocyanidin extract to prevent selenite-induced oxidative stress in experimental cataract', *J Cataract Refract Surg*, 32 (6), 1041-5.
- Eastwood, G. L. and Kirchner, J. P. (1974), 'Changes in the fine structure of mouse gastric epithelium produced by ethanol and urea', *Gastroenterology*, 67 (1), 71-84.
- Ellingsen, I., et al. (2008), 'Consumption of fruit and berries is inversely associated with

- carotid atherosclerosis in elderly men', *Br J Nutr*, 99 (3), 674-81.
- Emonet-Piccardi, N., et al. (1998), 'Protective effects of antioxidants against UVA-induced DNA damage in human skin fibroblasts in culture', *Free Radic Res*, 29 (4), 307-13.
- Faria, A., et al. (2005), 'Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts', *J Agric Food Chem*, 53 (17), 6896-902.
- Fursova, AZh, et al. (2005), '[Dietary supplementation with bilberry extract prevents macular degeneration and cataracts in senesce-accelerated OXYS rats]', *Adv Gerontol*, 16, 76-9.
- G, Bravetti (1989), 'Preventive medical treatment of senile cataract with vitamin E and anthocyanosides: Clinical evaluation', *Ann Ottalmol Clin Ocul*, 115, 109.
- Glazer-Hockstein, C. and Dunaief, J. L. (2006), 'Could blue light-blocking lenses decrease the risk of age-related macular degeneration?', *Retina*, 26 (1), 1-4.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., and Piette, J. (2006), 'NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later', *Biochem Pharmacol*, 72 (11), 1493-505.
- Godley, B. F., et al. (2005), 'Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells', *J Biol Chem*, 280 (22), 21061-6.
- Hakkinen, S. H., et al. (1999), 'Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries', *J Agric Food Chem*, 47 (6), 2274-9.
- Hamaishi, K., Kojima, R., and Ito, M. (2006), 'Anti-ulcer effect of tea catechin in rats', *Biol Pharm Bull*, 29 (11), 2206-13.
- Harris, G. K., et al. (2001), 'Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane-induced colon cancer and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the Fischer 344 rat', *Nutr Cancer*, 40 (2), 125-33.
- Hildesheim, J., Awwad, R. T., and Fornace, A. J., Jr. (2004), 'p38 Mitogen-activated protein

- kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses', *J Invest Dermatol*, 122 (2), 497-502.
- Holt, R. R., et al. (2002), 'Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa', *Am J Clin Nutr*, 76 (4), 798-804.
- Huang, W., et al. (2013), 'Protective effects of resveratrol in experimental retinal detachment', *PLoS One*, 8 (9), e75735.
- Huh, K., Shin, U. S., and Lee, S. H. (1996), 'The effect of rebamipide on gastric xanthine oxidase activity and type conversion in ethanol-treated rats', *Free Radic Biol Med*, 20 (7), 967-71.
- Jaarin, K., et al. (1999), 'Comparative effect of palm vitamin E and ranitidine on the healing of ethanol-induced gastric lesions in rats', *Int J Exp Pathol*, 80 (5), 259-63.
- Jorge M. Ricardo Da Silva , Nicole Darmon , Yvette Fernandez , Salvador Mitjavila (1991), 'Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds', *J Agric Food Chem*, 39 (9), 1549-52.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., and Heinonen, M. (2001), 'Berry phenolics and their antioxidant activity', *J Agric Food Chem*, 49 (8), 4076-82.
- Kahkonen, M. P., et al. (2003), 'Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities', *J Sci Food Agric*, 83, 1403-11.
- Kalt, W., et al. (2008), 'Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs', *J Agric Food Chem*, 56 (3), 705-12.
- Kang, R., et al. (2011), 'The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis', *Cell Death Differ*, 18 (4), 571-80.

- Kim, J. H., et al. (2005), 'Suppressive effect of astaxanthin isolated from the Xanthophyllomyces dendrorhous mutant on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats', *Biosci Biotechnol Biochem*, 69 (7), 1300-5.
- Klotz, L. O., Briviba, K., and Sies, H. (1997), 'Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts', *FEBS Lett*, 408 (3), 289-91.
- Klotz, L. O., et al. (1999), 'Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA', *Eur J Biochem*, 260 (3), 917-22.
- Koide, R., et al. (2001), '[Retinal hazard from blue light emitting diode]', *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*, 105 (10), 687-95.
- Kubota, S., et al. (2009), 'Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50 (7), 3512-9.
- Kubota, S., et al. (2010), 'Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation', *Am J Pathol*, 177 (4), 1725-31.
- Kunchithapautham, K. and Rohrer, B. (2007), 'Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress', *Autophagy*, 3 (5), 433-41.
- Kwon, J. Y., et al. (2009), 'Delphinidin suppresses ultraviolet B-induced cyclooxygenases-2 expression through inhibition of MAPKK4 and PI-3 kinase', *Carcinogenesis*, 30 (11), 1932-40.
- Lazze, M. C., et al. (2004), 'Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines', *Carcinogenesis*, 25 (8), 1427-33.
- Leduc, C., et al. (2006), 'Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany', *J*

- Ethnopharmacol*, 105 (1-2), 55-63.
- Leonard, S. S., et al. (2003), 'Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses', *Biochem Biophys Res Commun*, 309 (4), 1017-26.
- Lietti, A., Cristoni, A., and Picci, M. (1976), 'Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. Vasoprotective and antiinflammatory activity', *Arzneimittelforschung*, 26 (5), 829-32.
- Lim, T. G., et al. (2011), 'Cyanidin-3-glucoside suppresses B[a]PDE-induced cyclooxygenase-2 expression by directly inhibiting Fyn kinase activity', *Biochem Pharmacol*, 82 (2), 167-74.
- Lockley, S. W., Brainard, G. C., and Czeisler, C. A. (2003), 'High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light', *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (9), 4502-5.
- Lulu, D. J. and Dragstedt, L. R., 2nd (1970), 'Massive bleeding due to acute hemorrhagic gastritis', *Arch Surg*, 101 (5), 550-4.
- Maatta-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., and Torronen, A. R. (2004), 'Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae)', *J Agric Food Chem*, 52 (20), 6178-87.
- Magistretti, M. J., Conti, M., and Cristoni, A. (1988), 'Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*', *Arzneimittelforschung*, 38 (5), 686-90.
- Margrain, T. H., et al. (2004), 'Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration?', *Prog Retin Eye Res*, 23 (5), 523-31.
- Martín-Aragón, S, et al. (1998), 'Antioxidant action of *Vaccinium myrtillus* L.', *Phytother Res*, 12, 104-06.
- Matsui, T., et al. (2001a), 'alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated

- anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity', *J Agric Food Chem*, 49 (4), 1948-51.
- (2001b), 'alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins', *J Agric Food Chem*, 49 (4), 1952-6.
- Matsumoto, H., et al. (2005), 'Delphinidin-3-rutinoside relaxes the bovine ciliary smooth muscle through activation of ETB receptor and NO/cGMP pathway', *Exp Eye Res*, 80 (3), 313-22.
- Matsumoto, H., et al. (2006), 'Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues', *Exp Eye Res*, 83 (2), 348-56.
- Matsunaga, N., et al. (2010), 'Vaccinium myrtillus (Bilberry) Extracts Reduce Angiogenesis In Vitro and In Vivo', *Evid Based Complement Alternat Med*, 7 (1), 47-56.
- Matsunaga, N., et al. (2009), 'Bilberry and its main constituents have neuroprotective effects against retinal neuronal damage in vitro and in vivo', *Mol Nutr Food Res*, 53 (7), 869-77.
- McCubrey, J. A., Lahair, M. M., and Franklin, R. A. (2006), 'Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways', *Antioxid Redox Signal*, 8 (9-10), 1775-89.
- Milbury, P. E., Vita, J. A., and Blumberg, J. B. (2010), 'Anthocyanins are bioavailable in humans following an acute dose of cranberry juice', *J Nutr*, 140 (6), 1099-104.
- Milbury, P. E., et al. (2007), 'Bilberry (Vaccinium myrtillus) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 (5), 2343-9.
- Minden, A. and Karin, M. (1997), 'Regulation and function of the JNK subgroup of MAP

- kinases', *Biochim Biophys Acta*, 1333 (2), F85-104.
- Miyake, S., et al. (2012), 'Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism', *Lab Invest*, 92 (1), 102-9.
- Morazoni, P. M., M. J. (1990), 'Activity of myrtocyan®, an anthocyanoside complex from *Vaccinium myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness', *Fitoterapia*, 61, 13-21.
- Morazzoni, P. B., E. (1996), '*Vaccinium myrtillus*', *Fitoterapia*, 67, 3-29.
- Nakajima, J. I., et al. (2004), 'LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries', *J Biomed Biotechnol*, 2004 (5), 241-47.
- Nakazawa, T., et al. (2003), 'Intrinsic activation of PI3K/Akt signaling pathway and its neuroprotective effect against retinal injury', *Curr Eye Res*, 26 (1), 55-63.
- Nixon, R. A. (2013), 'The role of autophagy in neurodegenerative disease', *Nat Med*, 19 (8), 983-97.
- Noda, Y., et al. (2002), 'Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin', *J Agric Food Chem*, 50 (1), 166-71.
- Noda, Y., et al. (1997), 'Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system', *Biochem Mol Biol Int*, 42 (1), 35-44.
- Novak, L., et al. (1991), 'Plasma xanthine oxidase and resistance to hypoxia: effect of purines and alcohol administration', *Drug Metabol Drug Interact*, 9 (3-4), 311-20.
- Olas, B., et al. (1999), 'Inhibitory effect of resveratrol on free radical generation in blood platelets', *Acta Biochim Pol*, 46 (4), 961-6.

- Ömer C, Mehmet K, Ferah A, Kurtulus I. (2004), 'Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute ethanol-induced acute gastric ulcer', *Eur J Gen Med*, 1, 37-42.
- Parks, D. A. (1989), 'Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology', *Gut*, 30 (3), 293-8.
- Pintea, A., et al. (2011), 'Antioxidant effect of trans-resveratrol in cultured human retinal pigment epithelial cells', *J Ocul Pharmacol Ther*, 27 (4), 315-21.
- Prior, R. L., et al. (1998), 'Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species.', *J Agric Food Chem*, (46), 2686-93.
- Rahman, M. M., et al. (2008), 'Effects of anthocyanins on psychological stress-induced oxidative stress and neurotransmitter status', *J Agric Food Chem*, 56 (16), 7545-50.
- Rapp, L. M. and Ghalayini, A. J. (1999), 'Influence of UVA light stress on photoreceptor cell metabolism: decreased rates of rhodopsin regeneration and opsin synthesis', *Exp Eye Res*, 68 (6), 757-64.
- Rapp, L. M., Tolman, B. L., and Dhindsa, H. S. (1990), 'Separate mechanisms for retinal damage by ultraviolet-A and mid-visible light', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 31 (6), 1186-90.
- Re, R., et al. (1999), 'Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay', *Free Radic Biol Med*, 26 (9-10), 1231-7.
- Roduit, R. and Schorderet, D. F. (2008), 'MAP kinase pathways in UV-induced apoptosis of retinal pigment epithelium ARPE19 cells', *Apoptosis*, 13 (3), 343-53.
- Rozanowska, M., et al. (1998), 'Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media', *Free Radic Biol Med*, 24 (7-8), 1107-12.

- Seeram, N. P., et al. (2006), 'Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro', *J Agric Food Chem*, 54 (25), 9329-39.
- Sparrow, J. R. and Cai, B. (2001), 'Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 (6), 1356-62.
- Sparrow, J. R., et al. (2002), 'Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (4), 1222-7.
- Sparrow, J. R., et al. (2003), 'A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation', *J Biol Chem*, 278 (20), 18207-13.
- Steigerwalt, R. D., et al. (2008), 'Effects of Mirtogenol on ocular blood flow and intraocular hypertension in asymptomatic subjects', *Mol Vis*, 14, 1288-92.
- Stoupi, S., et al. (2010), 'In vivo bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [14C]procyanidin B2 in male rats', *Drug Metab Dispos*, 38 (2), 287-91.
- Szabo, S. (1987), 'Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies', *Scand J Gastroenterol Suppl*, 127, 21-8.
- Talavera, S., et al. (2003), 'Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats', *J Nutr*, 133 (12), 4178-82.
- Tanaka, J., et al. (2011), 'Purple rice extract and anthocyanidins of the constituents protect against light-induced retinal damage in vitro and in vivo', *J Agric Food Chem*, 59 (2), 528-36.
- Tanos, T., et al. (2005), 'Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role

- in the AP-1 response to UV light', *J Biol Chem*, 280 (19), 18842-52.
- Tariq, M. (1988), 'Gastric anti-ulcer and cytoprotective effect of vitamin E in rats', *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 60 (1), 87-96.
- Tarnawski, A., et al. (1981), 'Ethanol induced duodenal lesions in man. Protective effect of prostaglandin', *Prostaglandins*, 21 Suppl, 147-53.
- Terano, A., et al. (1989), 'Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol', *Gastroenterol Jpn*, 24 (5), 488-93.
- van Norren, D. and Schellekens, P. (1990), 'Blue light hazard in rat', *Vision Res*, 30 (10), 1517-20.
- Verna, L. K., et al. (2000), 'UVA-induced oxidative damage in retinal pigment epithelial cells after H₂O₂ or sparfloxacin exposure', *Cell Biol Toxicol*, 16 (5), 303-12.
- West, K. E., et al. (2011), 'Blue light from light-emitting diodes elicits a dose-dependent suppression of melatonin in humans', *J Appl Physiol (1985)*, 110 (3), 619-26.
- Wu, J., et al. (2002), 'Involvement of caspase-3 in photoreceptor cell apoptosis induced by in vivo blue light exposure', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (10), 3349-54.
- Wu, T., et al. (2003), 'Light-induced photoreceptor degeneration may involve the NF kappa B/caspase-1 pathway in vivo', *Brain Res*, 967 (1-2), 19-26.
- Wu, X., et al. (2006), 'Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption', *J Agric Food Chem*, 54 (11), 4069-75.
- Xia, X., et al. (2006), 'An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice', *J Nutr*, 136 (8), 2220-5.
- Yang, L. P., Zhu, X. A., and Tso, M. O. (2007), 'Role of NF-kappaB and MAPKs in light-induced photoreceptor apoptosis', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 (10), 4766-76.
- Zhang, X., et al. (1997), 'Identification of possible reactive oxygen species involved in

ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage', *Free Radic Biol Med*, 23 (7), 980-5.

Zhuang, S., Demirs, J. T., and Kochevar, I. E. (2000), 'p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide', *J Biol Chem*, 275 (34), 25939-48.

データ分析推進グループ, 健康保険組合連合会 IT 推進部 (2012), '平成 23 年度 生活習慣病関連 医療費の動向に関する調査分析報告'.

梶本修身、大谷寛成、小笠賢一 (1998), 'ブルーベリーエキスにおける精神疲労及び眼精疲労に 及ぼす作用の臨床的検討—総合医科学研究所共同研究報告', *食品工業*, 41, 29-35.

㈱富士経済 (2013), 'H・B フーズマーケティング便覧 2013 No.2'.

厚生労働省 (2013), '平成 24 年度 医療費の動向 ～概算医療費の年度集計結果～'.

大庭理一郎, 五十嵐喜治, 津久井亜紀夫編 (2000), 'アントシアニン -食品の色と健康-', *建帛社*.
南青山アイクリニック東京 HP より 'パソコン作業による目の疲れと、保護グラスの効果'.

略語一覽

A2E:	<i>N</i> -retinylidene- <i>N</i> -retinylethanolamine
ABTS:	2,2'-azinobis(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ATP:	adenosine triphosphate
B-ext:	bilberry extract
BHQ:	<i>tert</i> -Butylhydroquinone
CCK-8:	Cell counting Kit-8
CM-H2DCFDA:	5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMPO:	5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide
DPPH:	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ESI:	electrospray ionization
ESR:	electron spin resonance
FBA:	fetal bovine serum
FRAP:	ferric ion reducing antioxidant power
HPLC-DAD:	High performance liquid chromatography
IC ₅₀ :	half maximal inhibitory concentration
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
L-ext:	lingonberry extract
LED:	light-emitting diode
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MKK:	MAP kinase kinase
MS:	mass spectrum

NAC:	<i>N</i> -acetyl-L-cystein
NF-κB:	nuclear factor-kappaB
ORAC:	oxygen radical absorbance capacity
PI3K:	phosphatidylinositol 3-kinase
PI:	propidium iodide
ROS:	reactive oxygen species
RPE:	retinal pigment epithelial
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SOD:	super oxide dismutase
TBA:	thiobarbituric acid
TBARS:	thiobarbituric acid reactive substance
TFA:	trifluoroacetic acid
TPTZ:	2,4,6-tripyridyl-1,3,5-triazine
TUNEL:	TdT-mediated dUTP nick end labeling
UV:	ultraviolet