

クチナシ果実由来カロテノイド類

クロセチンの眼機能障害に対する薬理学的研究

海貝 尚史

## 目次

序論	1 頁
第 1 章 光誘発網膜障害に対するクロセチンの作用	5 頁
第 1 節 諸言	
第 2 節 実験材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 2 章 血管新生に対するクロセチンの作用	27 頁
第 1 節 諸言	
第 2 節 実験材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 3 章 健常成人におけるクロセチンの薬物動態	43 頁
第 1 節 諸言	
第 2 節 実験材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 4 章 クロセチンの眼精疲労改善作用	53 頁
第 1 節 諸言	
第 2 節 実験材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
総括および結論	69 頁
謝辞	72 頁
引用文献	73 頁
略語一覧表	86 頁

## 序論

クロセチンは、アカネ科に属する常緑の灌木であるクチナシ (*Gardenia jasminoides* Ellis) の果実やアヤメ科の多年草であるサフラン (*Crocus sativus* L.) の雌しべに含まれる天然の色素成分である (Fig. 1)。クチナシは、中国、台湾、ベトナムなど温暖な東南アジア地域に広く分布しており、日本では本州から沖縄にかけて自生している。一方、サフランは西南アジアを原産とし、地中海沿岸部をはじめとするヨーロッパ各地に広まり、現在では、イランが最大の生産地となっている。カロテノイドの一種であるクロセチンは、鮮やかな黄色を呈することから、クチナシやサフランは古来より天然由来の着色料として食品や衣服への色付けに利用されてきた。さらに、生薬としての歴史も長く、現在の日本薬局方においてもそれぞれ「山梔子 (サンシシ)」、「サフラン」として収載されている。クチナシは鎮静、消炎、止血、解熱等に用いられており、サフランには、鎮痛、鎮静作用があるとされている。クロセチンは、サンシシやサフランの薬理成分の一つとして考えられており、両生薬にて共通する薬理作用には、共通した成分であるクロセチンが関与していると推測される。

A



B



**Fig. 1 Gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and Saffron (*Crocus sativus* L.)**  
(A) Gardenia fruits (B) Saffron

カロテノイドは、8個のイソプレレン (C<sub>5</sub>) 単位が結合した炭素数 40 (C<sub>40</sub>) の化合物を基本構造とする。中央部分に共役二重結合構造を有し、強い抗酸化作用を示すことが知られている。一方、クロセチンは、基本構造の両末端が欠落した炭素数が 20 (C<sub>20</sub>) のアポカロテノイドである (Fig. 2)。代表的なカロテノイドであるβ-カロテン (C<sub>40</sub>) に比べて小さな構造であり、分子量がおおよそ3分の2となる。また、欠落した両末端部分に親水性のカルボキシル基を有することから、大部分のカロテノイドが脂溶性を示すのに対し、クロセチンは、塩基性という条件が付くものの極性溶媒にも溶解する両親媒性を示す。このようなクロセチン特有の性質が他のカロテノイドとは一線を画した作用をもたらすと考えられている。

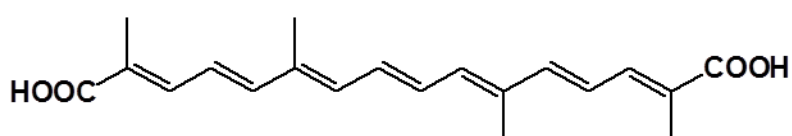


Fig.2 Chemical structure of crocetin

クロセチンは、抗がん作用 (Gutheil *et al.*, 2012)、アテローム性動脈硬化抑制作用 (Zheng *et al.*, 2006)、インスリン抵抗性改善作用 (Sheng *et al.*, 2008) および血中の酸素拡散増強による組織への酸素供給改善作用 (Holloway and Gainer, 1988) など多様な機能が報告されている。また、動物試験において記憶の改善作用 (Tashakori-Sabzevar *et al.*, 2013) や抗不安作用 (Pitsikas *et al.*, 2008)、抗うつ作用 (Vahdati Hassani *et al.*, 2014) が確認されているだけでなく、ヒトを対象とした試験において睡眠の質の改善作用 (Kuratsune *et al.*, 2010) を示すことから、クロセチンは中枢神経系へ作用することが強く示唆されている。

眼はその発生過程から脳の一部であるともいえる組織であり、中枢神経系に作用する薬理成分は眼にも作用することが期待される。実際にクロセチンでは、眼血流の改善作用

(Xuan *et al.*, 1999) や眼炎症の抑制作用 (Nagaki *et al.*, 2003) が動物試験により認められている。加えて、Bowmaker らは顕微分光測光法による測定により、旧世界サル<sup>1)</sup>の網膜錐体細胞内節部位にクロセチンと推定される色素が存在することを報告しており (Bowmaker *et al.*, 1991)、クロセチンが網膜において何らかの役割を果たしている可能性がある。しかしながら、クロセチンの眼に対する薬理作用については研究報告が少なく、眼機能障害に対する有用性は十分に明らかとなっていない。

ヒトは外部から得られる情報の多くを視覚に頼って取得している。そのため、視機能に障害が生じると、生活の質が大きく低下することになる。生活の質を維持するためには、視機能の低下を抑えることが重要となる。

近年、視覚障害の原因疾患として加齢黄斑変性症が注目されている。2005 年の厚生労働省の報告 (厚生労働省難治性疾患研究事業 網膜・脈絡膜・視神経萎縮に関する研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書) によると、加齢黄斑変性症を主とした黄斑変性症が視覚障害原因疾患の第 4 位となっている。過去の調査 (1988 年) よりも順位が上昇しており、患者数の増加が大きな問題となっている。加齢黄斑変性症は、加齢に伴い網膜の中心部である黄斑が変性することで、視覚障害を引き起こす疾患である。加齢黄斑変性症の進行・憎悪には、慢性の光曝露が関与することが指摘されている。網膜は、光を感受し、光刺激を電気信号へと変換し、視覚情報を伝達するという機能上、恒常的に光に曝されることになる。網膜にはチトクローム、フラビン、レチノイドなどの内在性光増感物質が多く存在しており、これらの物質が光を吸収することで発生した活性酸素が網膜を障害することが加齢黄斑変性症の原因の一つとして考えられている。さらに、光受容の場となる網膜の酸素消費は大きく、組織重量あたりの酸素消費量は脳やその他の組織を上回り、生体において最も酸素を必要とする組織とされており (Schmidt *et al.*, 2003)、酸素代謝亢進により発生した活性酸素も網膜障害に関与する。そのため、活性酸素による網膜障害を抑えることが加齢黄斑変性症の予防や進行抑制に寄与すると考えられる。また、滲出型の加齢黄斑変

性症の進行には、脈絡膜からの異常な血管新生が大きく関与しており、異常な血管新生を抑えることも加齢黄斑変性症への対応として重要となる。

一方、加齢黄斑変性症以外にも問題となっている眼機能障害がある。近年の情報技術の進展により、パソコンやスマートフォンなどの情報端末が職場・家庭を問わず広く普及し、パソコンのディスプレイに代表される情報表示機器（visual display terminal; VDT）を見る時間が増加している。それに伴い、眼精疲労を訴える人が急増しており、社会的な問題となっている。緑内障や加齢黄斑変性症といった網膜疾患と異なり失明につながる眼機能障害ではないものの、眼の重圧感、頭重感、視力低下、甚だしいときには悪心・嘔吐といった症状をもたらすため、勉学や仕事における作業効率を大きく低下させる。また、上記の網膜疾患は加齢とともに患者数が増加するのに対し、眼精疲労は、若年層を含む現役世代に症状を訴える人が多く、その対応が急務となっている。

このような背景から、本研究は、クロセチンの眼機能障害に対する薬理作用を検討することを目的とした。第 1 章にて、クロセチンの抗酸化活性を確認し、網膜光障害に対するクロセチンの網膜保護作用について検討した。第 2 章において、加齢黄斑変性症の進行にも関与する血管新生に対するクロセチンの作用を検討した。さらに、ヒトにおけるクロセチンの有用性を検討するため、第 3 章にて、ヒトにおけるクロセチンの吸収を確認した後、第 4 章にて眼精疲労改善作用を検討した。

## 第1章 光誘発網膜障害に対するクロセチンの作用

### 第1節 諸言

活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) とは、「基底状態で三重項の電子配置をとる酸素分子 ( $^3\text{O}_2$ ) が、より高い反応性を示す電子状態をとった化合物」であり、スーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2^-$ )、ヒドロキシラジカル ( $\text{HO}\cdot$ ) あるいは過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) などが含まれる。また、フリーラジカルは、「不対電子を一つまたはそれ以上持つ原子または分子をいう」と定義されており、 $\text{O}_2^-$ や  $\text{HO}\cdot$  は ROS であり、フリーラジカルの性質を有する (江頭ら, 2002)。ROS が引き起こす酸化ストレスが、多くの生活習慣病、加齢に伴って増える疾患の発症と深く関わることは広く認められている。

網膜は、光を感受し視覚情報を伝達するという機能上、恒常的に光に曝されることになる。光曝露は視細胞の変性を誘発し (Shahinfar *et al.*, 1991)、長期間にわたる光曝露と加齢黄斑変性症の発症との関連が疫学研究から指摘されている (Taylor *et al.*, 1992)。網膜は酸素消費量が多く (Schmidt *et al.*, 2003)、また、網膜中に存在する光増感物質の作用により ROS が容易に産生される環境にあるため、酸化ストレス障害を受けやすい。酸化ストレスは、ミトコンドリア膜上に局在する BCL-2 (B-cell lymphoma 2) タンパク質ファミリーに属する Bax を活性化し、膜電位を消失させる。その結果、細胞質中にシトクロム c が放出され、カスパーゼが活性化し、細胞死が生じる (Satoh *et al.*, 1997)。このように、照射による視細胞の変性 (細胞死) には酸化ストレスが関与していると考えられ、酸化ストレスの低減は、加齢黄斑変性症などの網膜光障害の予防につながることを期待される。

酸化ストレスの原因物質であるフリーラジカルの検出には、不対電子 (電子スピン) を特異的に検出する電子スピン共鳴 (electron spin resonance ; ESR) 法が用いられている。生体内フリーラジカルである  $\text{O}_2^-$ や  $\text{HO}\cdot$  などの ROS は極めて不安定であるが、これらをトラップするスピントラップ剤を用いて、安定なラジカル種に変換してから測定する ESR-スピントラップ法が開発されたことで、ROS に対する直接的な消去能を測定することが可能となった。クロセチンは、抗発がん作用 (Gutheil *et al.*, 2012)、アテローム性動脈硬化抑

制作用 (Zheng *et al.*, 2006)、インスリン抵抗性改善作用 (Sheng *et al.*, 2008) などが報告されている。とくに、アテローム性動脈硬化抑制やインスリン抵抗性改善において、クロセチンは脂質過酸化を抑えるなど酸化損傷を減弱させることが示されている。しかしながら、クロセチンの ROS に対する作用は、スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase ; SOD) や過酸化水素を還元するグルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase ; GPx) などの内因性の抗酸化酵素の活性化を伴う間接的な作用 (Shen and Qian, 2006) が報告されているものの、直接的な ROS に対する作用を証明したものはない。

そこで本章では、電子スピン共鳴法を用いてクロセチンの抗酸化能について検討した。つぎに、網膜神経節細胞およびマウス光障害モデルを用いて、クロセチンの網膜保護作用およびその作用機序について検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 1.2.1 実験材料

クロセチンは、理研ビタミン株式会社 (Tokyo, Japan) より提供された。過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。ヒドロキシラジカルのスピントラップ剤には、5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (CYPMPO ; ラジカルリサーチ株式会社, Tokyo, Japan) を使用した。2,2,5,5-tetramethyl-3-(methoxycarbonyl) pyrrolidin-1-oxyl (MC-PROXYL) は既報 (Lee *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2004) に従い、3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxyl (Carboxy-PROXYL ; 東京化成株式会社, Tokyo, Japan) より合成した。マウス由来網膜神経節細胞株 (retinal ganglion cells ; RGC-5) は、Dr. Neeraj Agarwal (UNT Health Science Center, Fort Worth, TX, USA) のご厚意により分与頂いた。Trolox は Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA) より購入した。Hoechst33342 および propidium iodide (PI) は Molecular Probes (Eugene, OR, USA) より購入した。



### 1.2.2 *In vitro* ESR 測定

ヒドロキシラジカルは既報 (Ogasawara *et al.*, 2007) に従い、過酸化水素に紫外線 (ultraviolet ; UV) 照射 (波長 : 310-400nm, 5 秒間, 40mW ; SUPERCURE203S, RU-360, ラジカルリサーチ株式会社, Tokyo, Japan) することで発生させた。クロセチンは、10% アルカリ緩衝液 (50 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10.0) に溶解して使用した。その他の溶液は超純水を用いて調製した。ヒドロキシラジカル捕捉剤として 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO) を用い、ヒドロキシラジカル消去活性の測定を行った。WIN-RAD ESR Data Analyzer (ラジカルリサーチ株式会社, Tokyo, Japan) に接続した JES-RE3X X-band spectrometer (日本電子株式会社, Tokyo, Japan) を用いて以下の測定条件にて ESR 測定を行った : microwave power, 8.00 mW ; magnetic field, 335.6 ± 7.5 mT ; field modulation width, 0.079 mT ; receiver gain, 200 ; sweep time, 1 分 および time constant, 0.03 秒。測定は 3 回以上繰り返して行った。また、ヒドロキシラジカル消去活性は、ESR スピンアダクトのシグナルの強度 (signal intensity) を計測し、コントロール比 (%) として示した。

### 1.2.3 細胞培養

マウス由来網膜神経節細胞株 (RGC-5) は、10% FBS (Fetal bovine serum) 、100 U/mL penicillin (Meiji Seika ファルマ株式会社, Tokyo, Japan) および 100 µg/mL streptomycin (Meiji Seika ファルマ株式会社) を含む Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) 培地中で、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。RGC-5 は既報 (Shimazawa *et al.*, 2005) に従い、3、4 日ごとにトリプシン処理して継代培養した。

### 1.2.4 過酸化水素誘発による細胞死試験

96 ウェルプレートに RGC-5 を播種 (1 × 10<sup>3</sup> cells/well) し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 24 時間培養した。ついで 0.5% もしくは 1.0% FBS を含む新しい培地に置換した。クロセチ

ンおよび Trolox で 1 時間の前処理を行った。その後、過酸化水素 (0.3 mM) を添加した。クロセチンおよび Trolox はジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide ; DMSO) に溶解し、1% DMSO を含む PBS で希釈して用いた (DMSO の終濃度は 0.1% とした)。Trolox (100  $\mu\text{M}$ ) は抗酸化剤の陽性対照として用いた。過酸化水素添加後、さらに 27 時間培養した。培養終了後、Hoechst33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} > 490 \text{ nm}$ ) および PI ( $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} > 617 \text{ nm}$ ) を終濃度がそれぞれ 8.1  $\mu\text{M}$  および 1.5  $\mu\text{M}$  となるように添加し、核染色した。細胞を Olympus IX70 inverted epifluorescence microscope (オリンパス株式会社, Tokyo, Japan) を用いて撮影し、画像を取得した。

#### 1.2.5 細胞内 ROS 除去活性の測定

96 ウェルプレートに RGC-5 を播種 ( $2 \times 10^3 \text{ cells/well}$ ) し、37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下にて 24 時間培養した。細胞を 1% FBS DMEM で洗浄した後、各試料を添加し 1 時間の前処理を行った。ついで  $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$  (Molecular Probes) を 10  $\mu\text{M}$  となるように添加した。20 分後、各試料を含む新しい 1% FBS DMEM に培地を置換し、細胞外の  $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$  を除去した。 $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$  は細胞内においてラジカルと反応することで強い蛍光を発する。ラジカルを発生させるため、1 mM の過酸化水素を添加した。マイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4 ; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて、蛍光強度 (励起 : 485 nm、発光 : 535nm) を継時的に測定した。ヒドロキシラジカルを検出するため、2-[6-(4'-amino) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid (APF ; 第一化学薬品株式会社, Tokyo, Japan) を使用した。APF (10  $\mu\text{M}$ ) を含む Hnks/Hepes buffer 溶液中で培養細胞を 20 分間インキュベート (37 °C) することで、APF を細胞内に取り込ませた。ついで iron (II) perchlorate hexahydrate (和光純薬工業株式会社) を添加した。マイクロプレートリーダーを用いて、蛍光強度 (励起 : 490 nm、発光 : 515nm) を継時的に測定した。

### 1.2.6 ミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\Psi_m$ )

ミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\Psi_m$ ) の測定には蛍光色素 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide ; Cell Technology Inc, Mountain View, CA, USA) を用いた。JC-1 は  $\Delta\Psi_m$  が高い状態では赤色蛍光を、低い状態では緑色蛍光を呈する。RGC-5 に過酸化水素および各試料を添加し 24 時間培養した後、トリプシン処理により細胞を回収、JC-1 を加え 37°C で 15 分間インキュベートした。その後、細胞を loading buffer で洗浄し、マイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4) を用いて、緑色蛍光 (励起 : 485 nm、発光 : 535 nm) および赤色蛍光 (励起 : 550 nm、発光 : 600 nm) 強度を測定した。

### 1.2.7 カスパーゼ - 9 活性

カスパーゼ - 9 活性を測定するため、Caspase-Glo 9 Assay (Promega Corp., Madison, WI, USA) を用いた。96 ウェルプレートに RGC-5 を播種 ( $1 \times 10^4$  cells/well) し、37 °C で 24 時間培養した。ついで、過酸化水素および各試料を添加し 15 分間処理した後、Caspase-Glo 9 Reagent を添加した。さらに 37 °C で 2 時間のインキュベートした後、マイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4) を用いて吸光度を測定した。

### 1.2.8 カスパーゼ - 3 活性

カスパーゼ - 3 活性を測定するため、CaspACE™ Assay System, Fluorometric (Promega Corp.) を用いた。10 cm ディッシュに RGC-5 を播種 ( $2 \times 10^6$  cells/dish) し、37 °C で 24 時間培養した。ついで、過酸化水素および各試料を添加し 24 時間培養した後、トリプシン処理により細胞を回収し、cell lysis buffer に懸濁した。細胞溶解物に CaspACE™ Assay substrates を混合し、37 °C で 1 時間インキュベートした。マイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4) を用いて蛍光強度 (励起 : 360 nm、発光 : 460 nm) を測定した。

### 1.2.9 *In vitro* プロテアーゼ活性

RGC-5 を PBS で洗浄した後、トリプシン処理し、遠心分離 (1000 × g, 5 分, 4 °C) により回収した。回収された細胞ペレットを PBS で洗浄し、5 分間の遠心分離 (1000 × g, 4 °C) を行った後、cell lysis bufer に懸濁した。20 分後、細胞溶解物にクロセチン (3 μM) を添加し、4 °C で 1 時間インキュベートした。ウシ心臓由来シトクロム c (Sigma) および 2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate sodium salt 溶液 (dATP ; Sigma) を添加し、37 °C で 30 分間インキュベートすることでカスパーゼ -9 を活性化した (Tsuruma *et al.*, 2006)。ついで、Caspase-Glo 9 Reagent を添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4) を用いて吸光度を測定した。

### 1.2.10 試験動物

ddY 雄性マウスおよび SD 雄性ラット (日本 LSC 株式会社, Hamamatsu, Japan) を、12 時間明期/12 時間暗期の明暗周期、自由摂取条件下で飼育した。動物実験は、岐阜薬科大学動物実験委員会の許可を受けた上で実施した。

### 1.2.11 クロセチンの分析

血漿および房水中のクロセチン濃度は、HPLC 法により定量した。クロセチンを 0.5% CMC-Na 溶液に懸濁し、マウスもしくはラットに胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与 1 時間後に、マウスを麻酔し採血を行った。血液を遠心分離 (3000 rpm, 10 分, 4 °C) することで得られた血漿は分析に供するまで -80 °C にて保存した。また、投与 1.5 時間後にラットに麻酔し、採血と房水の摂取を行った。採取した血漿および房水 (100 μM) に 2.0 ml のメタノールを混合、攪拌し遠心分離 (3000 rpm, 10 分) した。回収した上清 (1.7 ml) を窒素噴霧下で濃縮乾固した。濃縮物に 2.0 ml のアルカリ緩衝液を加え溶解した後、Oasis HLB Extraction Cartridge (日本ウォーターズ株式会社, Tokyo, Japan) を用いて固層抽出した。溶出液を窒素噴霧下で濃縮乾固した。濃縮物を 200 μl のメタノールに溶解した後、0.45 μm

のメンブランフィルターで濾過し、HPLC 分析に供した。クロセチンの分析は、Atlantis T3 カラム（日本ウォーターズ株式会社）を使用した逆相 HPLC 条件で行った。検出波長は、430 nm とし、クロセチン標準品とのピーク面積を比較することで各サンプル中の濃度を算出した。

#### 1.2.12 光照射

暗順応（24 時間）させたマウスに、1% cyclopentolate hydrochloride eye drops（参天製薬株式会社, Osaka, Japan）を光照射 30 分前に点眼し、散瞳させた。マウスを光障害モデル作製装置に入れ、8000 lx の白色蛍光（株式会社東芝, Tokyo, Japan）を 3 時間照射した。照射後、マウスは、通常の明暗周期条件下で飼育した。

クロセチンは、0.5% CMC-Na 溶液に懸濁し、光照射 1 時間前にマウスに経口投与（20 mg/kg もしくは 100 mg/kg）した。光照射後は、1 日 1 回、5 日間連続で投与した。

#### 1.2.13 網膜電位図記録

網膜電位図（electroretinogram ; ERG）は、ERG 装置（有限会社メイヨー, Aichi, Japan）を用いて、光照射 5 日後に記録した。マウスを 24 時間暗順応させた後、ketamin（120 mg/kg）および xylazine（6 mg/kg）を腹腔内投与し麻酔した。ついで 1% tropicamide および 2.5% phenylephrin（参天製薬株式会社）を点眼し、散瞳した。マウス左眼角膜に記録電極、舌に不関電極（日本光電株式会社, Tokyo, Japan）、尾部皮下にアース電極（日本光電株式会社）を設置し、左眼より ERG を記録した。すべての操作は暗赤色灯下、マウスの体温を維持した状態で行った。

#### 1.2.14 HE 染色による組織評価

マウスに sodium pentobarbital（Nembutal<sup>®</sup>, 大日本住友製薬株式会社, Tokyo, Japan）を腹腔内投与（80 mg/kg）し麻酔した後、眼球を摘出した。摘出した眼球を 4%

paraformaldehyde を含む固定液に浸し、24 時間以上、4 °C にて静置した。その後、自動固定包埋装置を用いて、脱水、脱アルコール、パラフィン浸透を行った。パラフィンにて包埋した後、網膜の薄切切片（厚さ 4 μm）を各個体 6 切片ずつ作成し、hematoxylin および eosin（HE）で染色した。HE 染色した網膜切片を顕微鏡下で観察し、写真を撮影した。光照射による網膜障害の評価は、作成した 6 切片より 3 切片をランダムに選択し、視神経乳頭から 240 μm の間隔で網膜外顆粒層（outer nuclear layer ; ONL）の厚さを計測することで行った。

#### 1.2.15 TUNEL 染色による組織評価

TUNEL 染色は、In situ Cell Death Detection Kit（Roche Biochemicals, Mannheim, Germany）を用いて、付属のプロトコルに従って行った。光照射を行った 48 時間後に、マウスに sodium pentobarbital を腔内投与（80 mg/kg）することで麻酔し、眼球を摘出した。摘出した眼球を 4% paraformaldehyde を含む固定液中に一晩静置した。その後、25% スクロースを含む PBS に 2 日間浸した。この眼球を凍結切片作製の包埋剤（OCT compound, Tissue-Tek ; Miles Laboratories, Naperville, IL, USA）にて包埋した。クリオスタットを用いて、-25 °C にて網膜切片（厚さ 10 μm）を作成し、染色するまで -80 °C にて保存した。PBS で 2 回洗浄した後、切片を terminal deoxyribonucleotidyl transferase（TdT）enzyme で処理し、37°C にて 1 時間インキュベートした。ついで、切片を PBS で 3 回洗浄した後、室温で 1 分間静置した。さらに、加湿チャンバー内で、切片に anti-fluorescein antibody-peroxidase（POD）conjugate を、室温で 30 分間反応させた。その後、diaminobenzidine（DAB）tetrahydrochloride peroxidase substrate を処理した。切片を顕微鏡下で観察し、写真を撮影した。視神経乳頭から 375 – 625 μm 間の ONL 中の TUNEL 陽性細胞数の数を計測し、光照射後の細胞死を評価した。

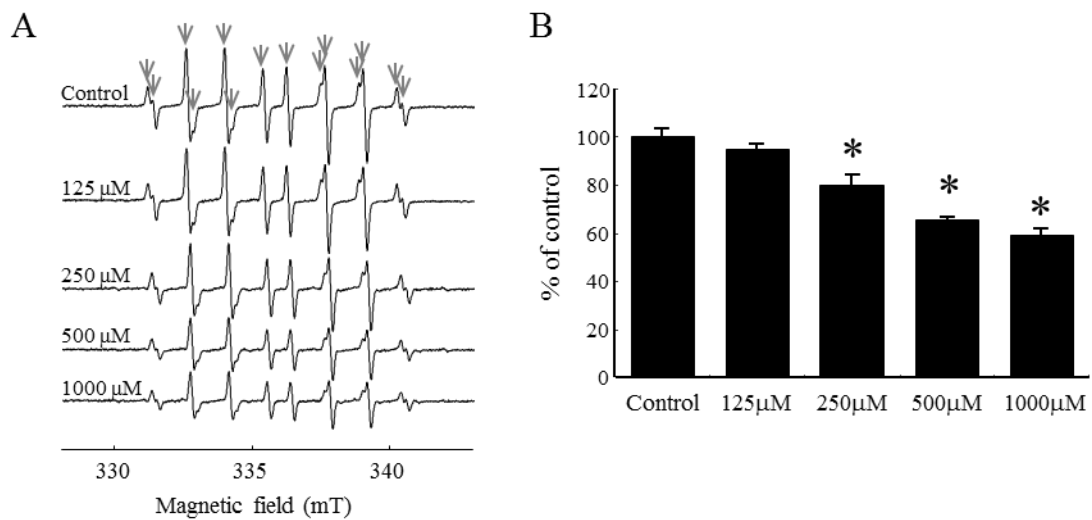
#### 1.2.16 統計解析

実験結果は、平均値±標準誤差 (S.E.M.) または標準偏差 (S.D.) で示した。統計解析は、Student の *t* 検定もしくは、一元配置分散分析 (ANOVA) を行った後、ダネットの多重比較検定 (Dunnett's multiple-comparison test) を実施した。何れの検定においても有意水準を 5%未満とした。

### 第3節 結果

#### 1.3.1 クロセチンのヒドロキシラジカル消去能

CYPMPO をスピントラップ剤とした ESR スピントラップ法を用いて、クロセチンのヒドロキシラジカル消去活性を測定した。CYPMPO が過酸化水素に UV 照射することで生じるヒドロキシラジカルをトラップして生成される CYPMPO-OH スピンアダクトを Fig. 3A に示した。なお、ヒドロキシラジカルの産生に対しては、溶媒 (10% アルカリ緩衝液) は明らかな作用を示さなかった。クロセチンは、濃度依存的に CYPMPO-OH アダクトの形成を減弱させ、250  $\mu\text{M}$  以上の濃度で有意であった。(Fig. 3B)。



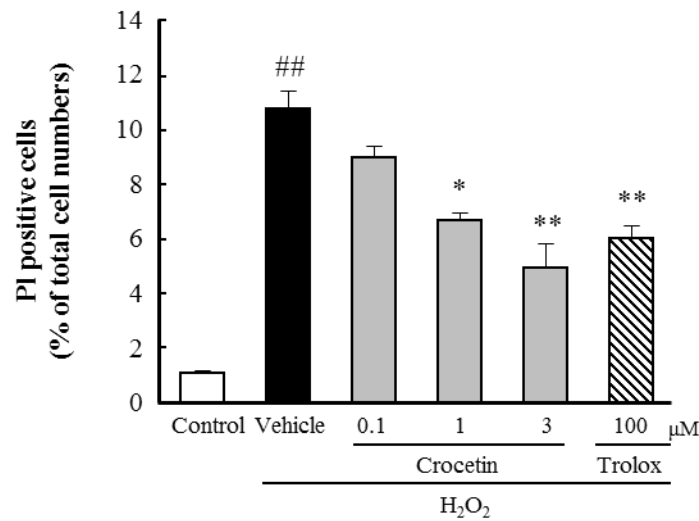
**Fig. 3 Effect of crocetin on HO• generation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with UV irradiation.**

(A) ESR spin trapping measurement of HO• generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with UV irradiation for 5 sec with CYPMPO (5.0 mM) as the spin trap in the presence of crocetin (0, 125, 250, 500, 1,000 μM). (B) The effects of crocetin on HO• generation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with UV irradiation. The signal intensity of the seventh peak of the spectrum was normalized as the relative height against the signal intensity of the control. Results are expressed as the percentage of the mean control value and are represented as mean ± S.D. \*p < 0.05 vs. control.

### 1.3.2 過酸化水素誘発網膜神経節細胞死に対するクロセチンの作用

過酸化水素の添加により PI 陽性細胞数（死細胞率）が有意に増加した。クロセチンの添加により、濃度依存的に死細胞率が減少し、1 および 3 μM の濃度で vehicle と比較して有意な細胞死の抑制が認められた。また陽性対照として用いた Trolox (100 μM) においても有意な細胞死の抑制が認められた (Fig. 4)。



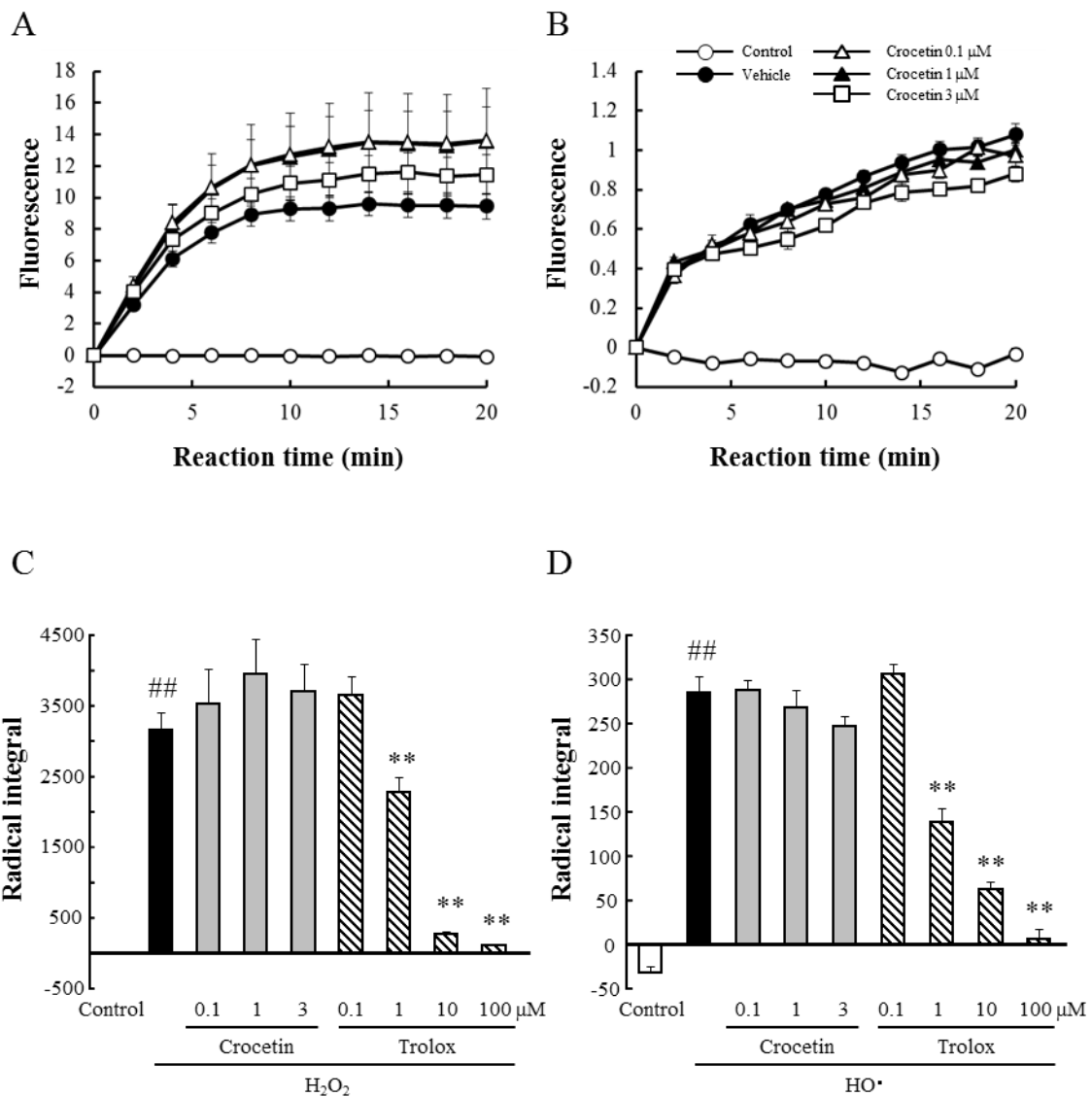


**Fig. 4 Effects of crocetin and trolox on cell damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in RGC-5 culture.**  
 The number of PI positive cells increased at 27 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Trolox was used as a typical antioxidant. Data are shown as mean ± S.E.M. (n = 8). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ##p < 0.01 vs. control.

### 1.3.3 細胞内 ROS 産生に対するクロセチンの作用

細胞内 ROS 産生に対するクロセチンのラジカル消去活性について、CM-H<sub>2</sub>DCFDA および APF を用いて検討した。CM-H<sub>2</sub>DCFDA は細胞内へ取り込まれると、細胞内のエステラーゼにより分解され、CM-H<sub>2</sub>DCF と変換される。この CM-H<sub>2</sub>DCF が ROS と反応すると緑色蛍光を発する。また、APF はヒドロキシラジカルと反応し、強蛍光性化合物であるフルオレセインを生成する。それぞれの蛍光強度を測定することで、RGC-5 内の ROS を測定した。

陽性対照である Trolox (1~100 μM) が濃度依存的に細胞内 ROS を消去する一方、クロセチンは、過酸化水素誘発による細胞死を抑制する濃度 (0.1~3 μM) (Fig. 4) において、過酸化水素より生成された細胞内 ROS および細胞内ヒドロキシラジカルを消去しなかった (Fig. 5)。

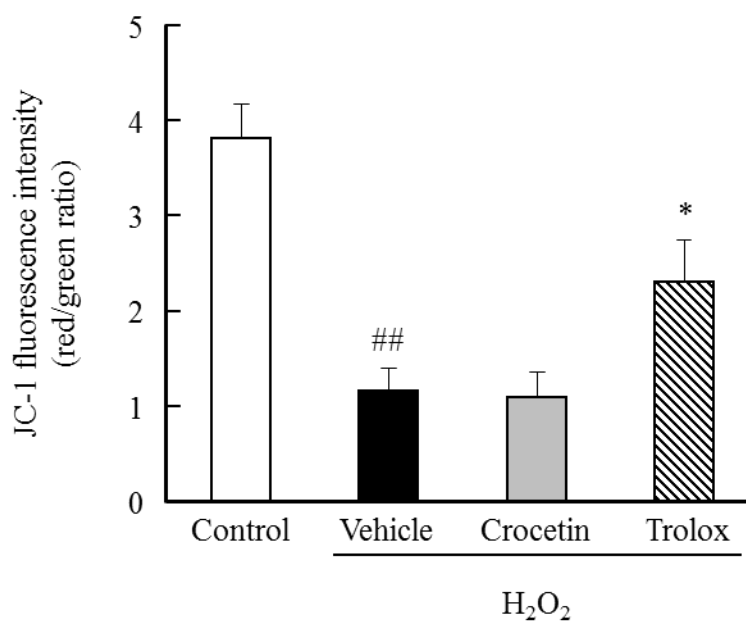


**Fig. 5** Effects of crocetin on the intracellular oxidation of DCFH induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or HO• in RGC-5 culture.

(A, B) Time-kinetics and concentration-response relationships crocetin's antioxidant activity. (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidation of DCFH in RGC-5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a concentration of 1 mM. (B) HO•-induced oxidation of APF in RGC-5. HO• production was stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a concentration of 1 mM plus ferrous perchlorate (II) at a concentration of 100 μM. (C, D) Integral of ROS production from time-kinetic curves. Radical species were (C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and (D) HO•. Data are shown as mean ± S.E.M. (n = 8). \*\*p < 0.01 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ##p < 0.01 vs. control.

### 1.3.4 ミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\Psi_m$ ) 変化に対するクロセチンの影響

過酸化水素誘発によるミトコンドリア膜電位変化に対するクロセチンの作用を検討した。過酸化水素の添加により、 $\Delta\Psi_m$  が有意に低下した。Trolox (100  $\mu\text{M}$ ) は過酸化水素誘発による  $\Delta\Psi_m$  の低下を抑制した。一方、クロセチン (3  $\mu\text{M}$ ) は  $\Delta\Psi_m$  の低下を抑制しなかった (Fig. 6)。

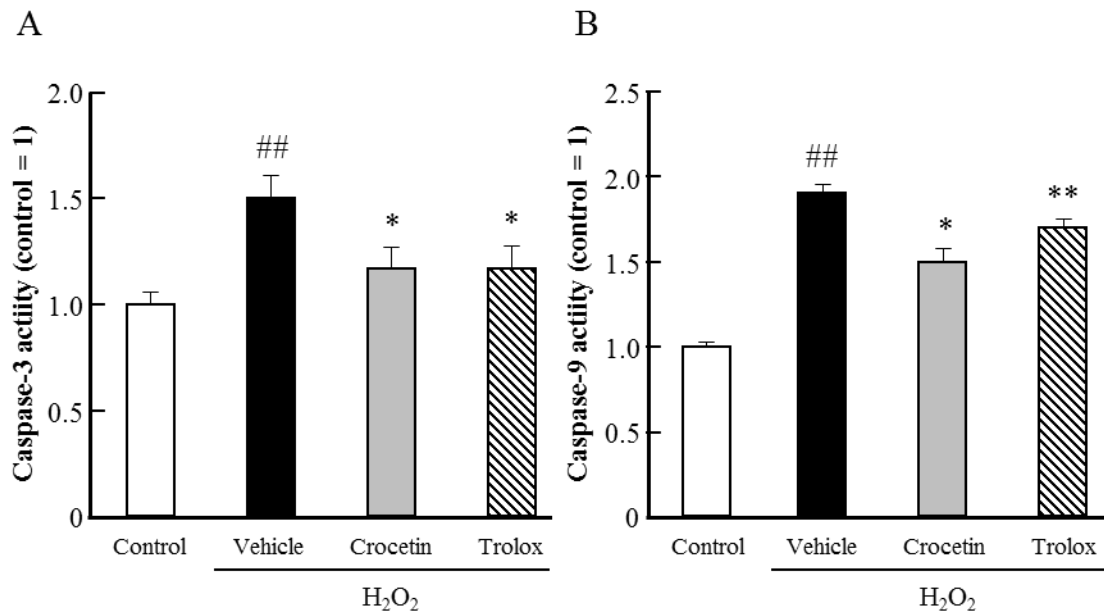


**Fig. 6 Effects of crocetin on depolarization on mitochondrial membrane potential in RGC-5.**

Cells with polarized mitochondrial membranes display red fluorescence within mitochondria. When the mitochondrial membrane is depolarized, JC-1 is released from the mitochondria and is then expressed as green fluorescence in the cytosol. From the red/green fluorescence ratio, we obtained the  $\Delta\Psi_m$  value. Concentrations of 3  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  of crocetin and trolox were used, respectively. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4 to 6). \*p < 0.05 vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ##p < 0.01 vs. control.

### 1.3.5 過酸化水素誘発カスパーゼ活性化に対するクロセチンの作用

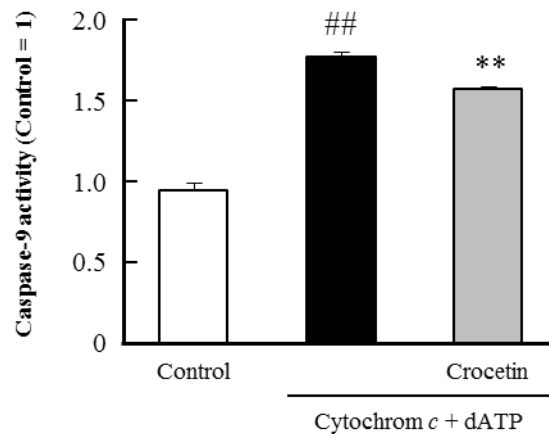
過酸化水素誘発によるカスパーゼ - 3 および 9 の活性化に対するクロセチンの作用を検討した。過酸化水素により、カスパーゼ - 3 および 9 の活性が対照と比較して有意に上昇した。クロセチン (3  $\mu\text{M}$ ) および Trolox (100  $\mu\text{M}$ ) は、過酸化水素によるカスパーゼの活性化を有意に抑制した (Fig. 7)。



**Fig. 7 Effects of crocetin against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced caspase-3 and -9 activity.**

(A) Caspase-3 activity was evaluated by using CaspACETM Assay System, Fluorometric. It was measured after 24 h of pretreatment H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3mM). (B) Caspase-9 activity was evaluated by using Caspase-Glo® 9 Assays. It was measured after 15 h of pretreatment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Concentrations of 3 μM and 100 μM of crocetin and trolox, respectively, were used. Data are shown as mean ± S.E.M. (n = 5 or 6). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ##p < 0.01 vs. control.

クロセチンのカスパーゼ - 9 活性化抑制作用について、無細胞試験系にて更に検討した。細胞溶解物にシトクロム c および dATP を添加することでカスパーゼ - 9 が活性化された。クロセチンは、シトクロム c および dATP 添加によるカスパーゼ - 9 の活性化を有意に抑制した (Fig. 8)。



**Fig. 8 Effects of crocetin on caspase-9 activity in a cell-free system.**

Caspase-9 activation was induced by the addition of cytochrome c and dATP. The effects of crocetin (3  $\mu$ M) on caspase-9 activation in the cell lysates of RGC-5 were evaluated with Caspase-Glo 9 Assays. The cell lysates were incubated for 2 h at 37  $^{\circ}$ C, and the luminescence was measured. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). \*\*p < 0.01 vs. cytochrome c and dATP, ##p < 0.01 vs. control.

### 1.3.6 経口投与後の血漿および房水中クロセチン濃度

マウスにおける経口投与 1 時間後の血中クロセチン濃度は、10 mg/kg 投与で  $4.5 \pm 1.0 \mu$ M (n = 4)、100 mg/kg 投与で  $109.6 \pm 13.7 \mu$ M (n = 5) となった。一方、ラットでは、50 mg/kg のクロセチン経口投与 1.5 時間後において、血中濃度が  $62.5 \pm 13.7 \mu$ M (n = 5)、房水中濃度が  $2.0 \pm 0.5 \mu$ M (n = 5) となった (Table 1)。

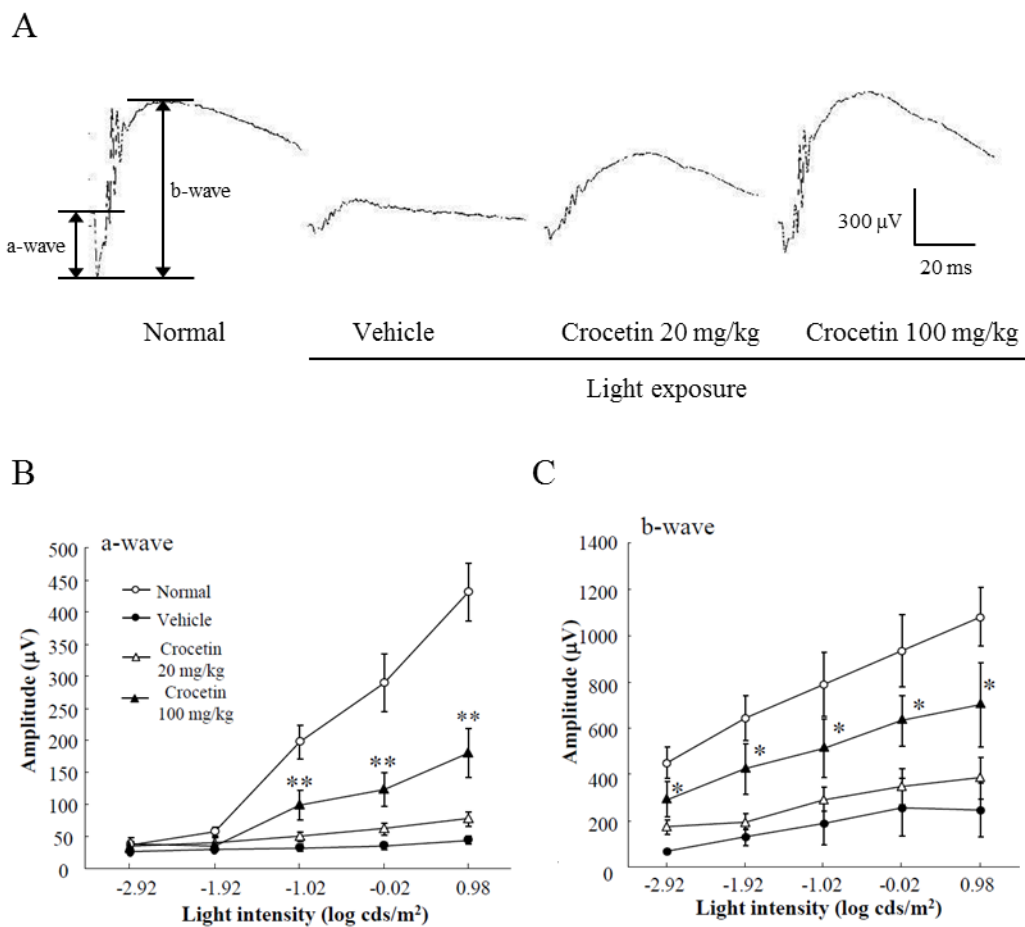
**Table 1 Plasma concentrations of crocetin after oral administration in mice and rat**

	Dose (mg/kg)	Time (h)	n	Concentration ( $\mu$ M)	
				Plasma	Aqueous humor
Mouse	10	1	4	4.5 $\pm$ 1.0	
	100	1	5	109.6 $\pm$ 13.7	
Rat	50	1.5	5	62.5 $\pm$ 13.7	2.0 $\pm$ 0.5

### 1.3.7 光誘発視機能低下に対すクロセチンの作用

光照射による視機能低下に対するクロセチンの影響を、網膜電位図 (ERG) を測定することで評価した。ERG において、a 波は視細胞の働きを、b 波は双極細胞やミュラー細胞

胞の働きを反映している。そのため、両波の低下は、網膜の機能障害を示す。光照射（8000 lux、3時間）から5日後にERG測定を行ったところ、非照射（normal）群と比較して光照射（vehicle）群は、a波およびb波が有意に低下し網膜機能の低下が認められた。一方、クロセチン投与群では用量依存的にa波およびb波の低下抑制が認められおり、vehicle群と比較して、100 mg/kg（p.o.）の投与量において、有意であった。（Fig. 9）。



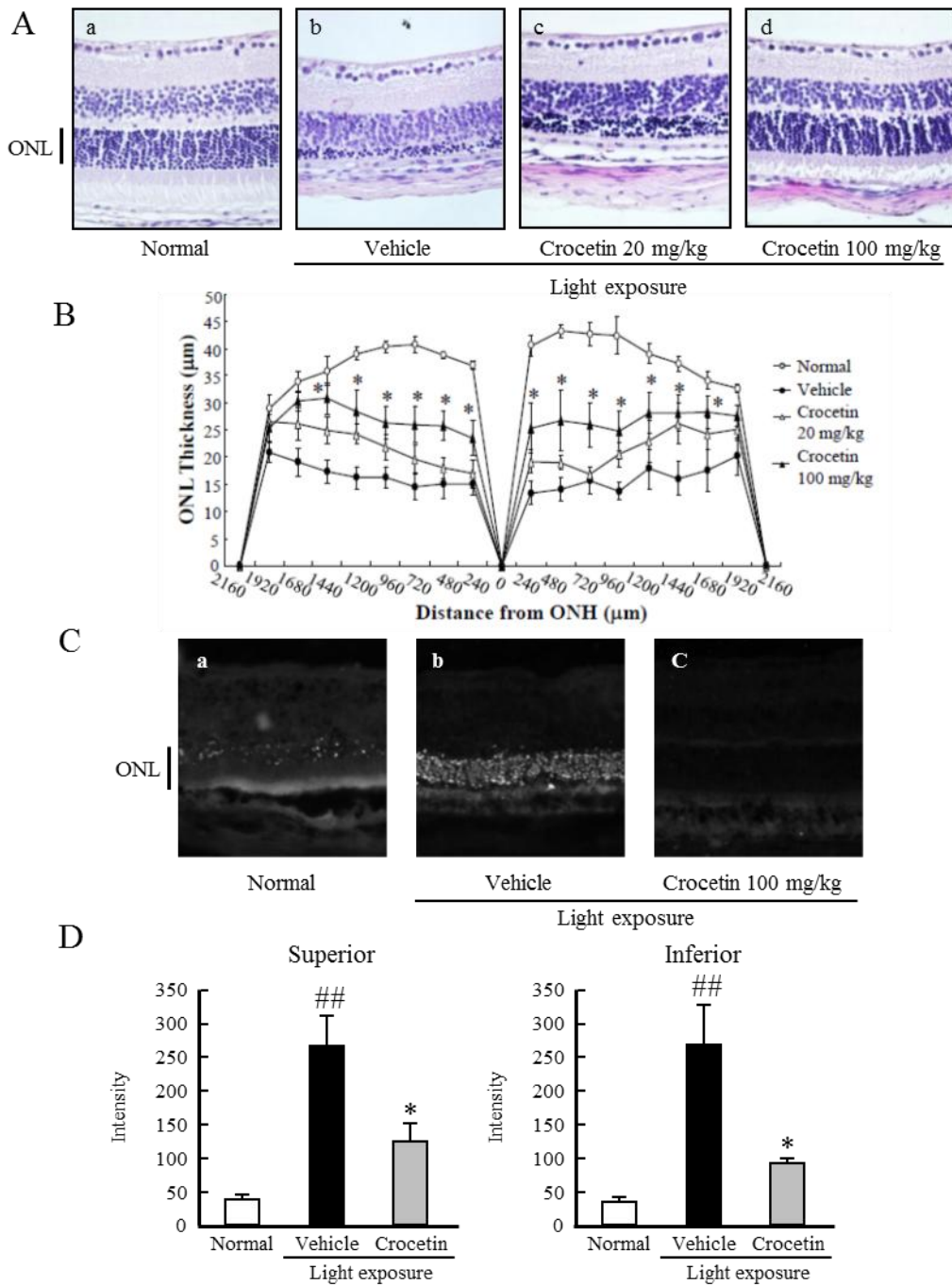
**Fig. 9** Effects of crocetin on light-induced retinal functional damage after light exposure.

The effects of crocetin were evaluated by recording the electroretinogram (ERG) at 5 days after exposure to light in mice. (A) Representative ERG recording in non-treated, light exposure (8,000 lux) plus vehicle-treated and light exposure plus crocetin (20 or 100 mg/kg, p.o.). (B, C) Intensity response functions for dark-adapted (B) a-wave and (C) b-wave amplitudes. The crocetin-treated (100 mg/kg, p.o.) group showed significantly preserved a- and b-wave amplitudes compared with the vehicle group. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6 to 9). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. light exposure plus the vehicle-treated group (vehicle).

### 1.3.8 光誘発による網膜形態学的変化に対するクロセチンの作用

光照射 5 日後の網膜断面画像を Fig. 10A に示した。光照射による網膜外顆粒層 (ONL) の顕著な萎縮が認められた。クロセチン投与群では、ONL の萎縮が抑制された。視神経乳頭より 240  $\mu\text{M}$  の間隔で網膜切片を作成し、ONL の厚さを測定したところ、クロセチンは、用量依存的に ONL の萎縮を抑制しており、100 mg/kg (p.o.) 投与群において、有意であった (Fig. 10B)。

光誘発によるアポトーシス様細胞死に対するクロセチンの作用を調べるため、光照射 48 時間後における TUNEL 陽性細胞数について検討した。光照射 (vehicle) 群では、ONL において TUNEL 陽性細胞が確認された。また、ONL 以外の層では陽性細胞は確認されなかった。一方、非照射 (normal) 群では、何れの層においても TUNEL 陽性細胞は認められなかった (Fig. 10C)。陽性細胞数を測定した結果、光照射により陽性細胞数は有意に増加した。一方、クロセチン投与群 (100 mg/kg, p.o.) は、vehicle 群と比較して有意に陽性細胞数を減少した (Fig. 10D)。



**Fig. 10 Effects of crocetin on light-induced retinal morphological change.**

(A) Representative photographs (hematoxylin and eosin staining of retinal sections) showing (a) non-treated, (b) light exposure (8,000 lux) plus vehicle-treated, (c) light exposure plus crocetin at 20 mg/kg, p.o. and (d) light exposure plus crocetin at 100 mg/kg, p.o. (B) Thickness of the ONL was measured at 5 days after light exposure. The ONL was measured at 240- $\mu\text{m}$  intervals from the optic disc. (C) Representative photographs (TUNEL staining of retinal sections) showing (a) non-treated, (b) light exposure (8,000 lux) plus vehicle-treated and (c) light exposure plus crocetin at a concentration of 100 mg/kg, p.o. (D) Quantitative analysis of the number of TUNEL-positive cells in the ONL at 48 h after light exposure. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. ( $n=6$  to 9). \* $p < 0.05$  vs. light exposure plus the vehicle-treated group (vehicle). ## $p < 0.01$  vs. non-treated group (normal). ONL: outer nuclear layer.



#### 第4節 考察

活性酸素種 (ROS) は、白血球の貪食作用における殺菌など生体防御反応に用いられる一方、過度の ROS による酸化ストレスが種々の疾患に関与することが知られている (吉川ら, 1995)。加齢黄斑変性症や緑内障などの網膜疾患においても、酸化ストレスが原因の一つとして考えられている (Chrysostomou *et al.*, 2013 ; Khandhadia *et al.*, 2010)。

クロセチンは、クチナシの果実やサフランに含まれるカロテノイドの一種である。カロテノイドは、強い一重項酸素消去活性を示すだけでなく、ラジカル消去能を示すことが報告されている (Krinsky, 1989)。しかしながら、クロセチンについては、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) や過酸化水素を還元するグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) といった内因性の抗酸化酵素の活性化による間接的な作用 (Ahmad *et al.*, 2005 ; Shen and Qian, 2006) が報告されているものの、直接的な消去活性については明らかとなっていなかった。そこで、*in vitro* X-band ESR 法を用いて、クロセチンのヒドロラジカル消去活性について検討した。過酸化水素に紫外線を照射することでヒドロキシラジカルを発生させる試験系において、クロセチンは、濃度依存的にヒドロキシラジカルの産生を抑制した (Fig. 3)。この結果から、クロセチンがヒドロキシラジカルに対する消去活性を有することが明らかとなった。

つぎに網膜神経節細胞 (RGC-5) を用いて、過酸化水素誘発細胞死に対するクロセチンの作用を検討した。クロセチン (3  $\mu\text{M}$ ) の前処理により、その細胞死が抑制され、クロセチンが酸化ストレスを低減し、神経細胞を保護することが明らかになった (Fig. 4)。その一方、細胞死を抑制する添加濃度において、クロセチン (0.1 ~ 3  $\mu\text{M}$ ) は細胞内 ROS の消去活性を示さなかった (Fig. 5)。これらの結果から、クロセチンはヒドロキシラジカル消去活性を示すものの、低濃度においてはラジカルの消去が不十分であり、直接的な活性酸素の除去以外の作用により、細胞死を抑制しているものと考えられた。

そこで、クロセチンの酸化ストレス誘発による細胞死 (アポトーシス) 抑制作用において、クロセチンがアポトーシス経路のどの段階に関与するのか検討した。RGC-5 を用いた

培養細胞系では、過酸化水素がミトコンドリアの膜透過性に関与しアポトーシスを促進する Bax の発現を 1.5 倍に、カスパーゼカスケードの下流に位置するカスパーゼ-3 の発現を 1.8 倍に増加させており (Koriyama *et al.*, 2009)、ミトコンドリアの膜透過性は酸化ストレスによる細胞死に関与すると考えられている。過酸化水素誘発ミトコンドリア膜電位変化に対するクロセチンの作用を検討したところ、クロセチンは、過酸化水素による膜電位の低下を抑制しなかった (Fig. 6)。そこで、アポトーシス経路において、ミトコンドリア膜電位消失よりさらに下流に位置するカスパーゼ-3 および 9 に対するクロセチンの影響について検討したところ、クロセチン (3  $\mu$ M) は、過酸化水素誘発によるカスパーゼ-3 および 9 の活性化を抑制した (Fig. 7)。また、シトクロム c および dATP によるカスパーゼ-9 活性化をクロセチンが抑制した (Fig. 8)。これらの結果からクロセチンがカスパーゼ-9 の酵素活性を阻害することが明らかとなった。一般的にカロテノイドは、細胞膜中に局在することが知られている。しかしながら、クロセチン配糖体であるクロシンは、大部分が膜中に局在するものの、継時的に細胞中に取り込まれることが報告されている (Ochiai *et al.*, 2004)。クロセチンも同様に細胞内に移行し、カスパーゼの活性化を直接阻害している可能性が示唆された。

網膜は、その機能上、恒常的な光曝露を避けることができない。しかしながら、過度の光曝露は、フリーラジカルを含む大量の ROS を網膜で発生させることになる。そのため、網膜は ROS に対する防御機構を備えている。例えば、ラットの網膜が強い光に曝されると SOD が誘導されることが報告されている (Yamamoto *et al.*, 1999)。また、SOD1 変異マウスは、光曝露による網膜変性に対し高い感受性を示す (Mittag *et al.*, 1999)。これらは、SOD の誘導が網膜光障害の抑制に関与することを示唆しており、光曝露により生じた酸化ストレスが、網膜を障害する原因となり得ることを示している。また、光曝露は ROS の産生だけでなく、カスパーゼの活性化にも関与する。Kanan らは、マウス網膜腫瘍由来の錐体細胞株 (661 W cells) を用いた試験において、光照射によりカスパーゼ-9 発現が 150% 以上増加することを報告している (Kanan *et al.*, 2007)。さらに、青色光を照射された網膜

ではカスパーゼ - 3 前駆タンパクが増加し、カスパーゼ - 3 の活性化が促され、それに伴い視細胞のアポトーシスが誘導される (Wu *et al.*, 2002)。そこで、光曝露による網膜障害に対するクロセチンの効果について、マウス光障害モデルを作製し検討した。

本研究では、マウスに 8000 lux の光を 3 時間照射することで、網膜機能障害を誘発した。ERG 測定において、光照射による視細胞の活動を反映した a 波およびミュラー細胞や双極細胞の活動を示す b 波の減少が認められ、網膜機能が障害されていることが確認された。クロセチンの経口投与 (100 mg/kg) により、a 波および b 波の低下が抑制された。これらの結果は、クロセチンが視細胞や網膜内層の機能障害を緩和したことを示唆している。加えて、クロセチンは、網膜外顆粒層の萎縮を抑制し、TUNEL 陽性細胞数を減少させた (Fig. 9 and 10)。クロセチンをラットに経口投与 (100 mg/kg) した時の房水中クロセチン濃度は 2  $\mu$ M であり、RGC-5 を用いた試験結果から、細胞死の抑制には十分な濃度であると考えられる (Table 1)。また経口投与後、クロセチンが房水中から検出されたことから、クロセチンは血液網膜関門を通過することが示唆された。

初期の加齢黄斑変性症患者にサフランを摂取させると、網膜機能が改善され、病状進行が抑制されることが報告されている (Falsini *et al.*, 2010 ; Piccardi *et al.*, 2012)。サフランには、クロセチン配糖体であるクロシンが多く含まれている。クロシンは経口摂取しても、血中ではアグリコンであるクロセチン (一部はクロセチンのグルクロン酸抱合体) の状態で存在するため、サフランの薬効の一部はクロセチンが担っているものと考えられる (Asai *et al.*, 2005)。本研究で明らかとなったクロセチンの光による網膜障害からの保護作用は、サフラン摂取が加齢黄斑変性症進行抑制効果を示すことと矛盾しておらず、これを支持するものである。つまり、摂取したサフランに含まれるクロシンが腸管で加水分解され、クロセチンとして吸収され網膜へと移行する。網膜へと移行したクロセチンがカスパーゼの活性化を阻害することにより、光曝露による視細胞の細胞死を抑制し、網膜機能の低下を抑制したものと考えられる。

本章において、クロセチンの抗酸化作用および光誘発による網膜障害に対するクロセチンの保護作用について検討した。クロセチンは抗酸化作用を示すものの、生体中の濃度は網膜細胞の保護には効果が不十分であり、細胞死に対しては、カスパーゼ阻害作用が寄与していることが明らかとなった。次章では、加齢黄斑変性症に対するクロセチンの有用性をさらに検討するため、光と同様に加齢黄斑変性症の進展に関与する血管新生に対するクロセチンの作用を検討した。

## 第2章 血管新生に対するクロセチンの作用

### 第1節 諸言

血管新生は既存の血管から新たな血管枝が分枝する現象である。胎児の生育、成体における子宮内膜および胎盤の増殖、あるいは創傷治癒等の過程において欠かせない生理的機能であり、血管形成は厳密に制御されている (Risau, 1997)。新たな血管が形成される過程にはいくつかの段階があり、細胞外マトリックスの再構成、血管内皮細胞の増殖ならびに遊走、周辺細胞の結合等の各段階は複数の制御因子によって進展が調節されている (Plank and Sleeman, 2003)。この制御機構の破綻は、過度の血管新生につながり、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化あるいは腫瘍の増殖等の疾患の進行に関与することが知られている (Folkman, 1995)。また、眼中における病的な血管新生は、加齢黄斑変性症や糖尿病網膜症など失明につながる疾患の発症と密接に関連している (Aiello *et al.*, 1994 ; Ferrara *et al.*, 2003)。

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF) は、血管新生を活性化させる代表的な因子であり、血管枝の形成や血管透過性を亢進する働きを持つ (Keck *et al.*, 1989)。VEGF は高血糖や低酸素により発現が誘導され、正常、病的を問わず血管新生に重要な役割を果たす (Millauer *et al.*, 1994 ; Sone *et al.*, 1996)。血管新生過程において、VEGF が血管内皮細胞表面にある VEGF 受容体と結合することで、内皮細胞内のシグナル伝達が活性化する。このとき、MAP キナーゼファミリーに属する ERK (extracellular signal-regulated kinase) や p38 (stress activated protein kinase-2) がリン酸化され活性化し内皮細胞の増殖と遊走が生じる (Wu *et al.*, 2000 ; Rousseau *et al.*, 1997)。

血管内腔の血管内皮細胞は、互いに接着することで血液成分が血管外へと漏出することを防いでおり、その周囲を血管平滑筋細胞などの壁細胞が覆うことで安定な血管構造が維持されている。通常、血管透過性は、内皮細胞間接着のバリアにより低い状態に保たれている。しかし、血管新生が誘導されるときには、血管のバリア機能が一時的に弱まり、血管透過性が亢進する。血管透過性を左右する内皮細胞間接着は、タイトジャンクション

(密着結合) およびアドヘレンスジャンクション (接着結合) の 2 つのタイプの接着装置からなる。密着結合は VE (vascular endothelial) -cadherin、接着結合は ZO-1、occludin 等のタンパク質で構成される。VE-cadherin 欠損マウスでの検討により、VE-cadherin が血管内皮細胞間接着を制御する血管新生に不可欠な分子であることが明らかとなっている (Carmeliet *et al.*, 1999)。また、VEGF は VE-cadherin の接着を弱め、血管透過性を増加させることが明らかになっている (Cai *et al.*, 2011)。

加齢黄斑変性症には 2 つのタイプ (萎縮型および滲出型) があり、滲出型は脈絡膜からの異常な血管新生が黄斑変性の主な原因である。第 1 章において、クロセチンが光曝露による視細胞の細胞死を抑制し網膜を保護することを明らかにした。このことからクロセチンが光曝露に起因する加齢黄斑変性症の予防に寄与する可能性が示唆されている。一方、クロセチンの血管新生に対する作用は明らかとなっていない。そこで、本章では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell ; HUVEC) およびヒト網膜毛細血管内皮細胞 (human retinal microvascular endothelial cell ; HRMEC) を用いて、VEGF 誘導による管腔形成、細胞増殖ならびに遊走に対するクロセチンの作用およびその作用機序について検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 2.2.1 実験材料

クロセチンは、理研ビタミン株式会社より提供された。Angiogenesis kit、5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitor blue tetrazolium (BCIP/NBT) および VEGF は倉敷紡績株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。CS-C 培地および culture boost は DS ファーマバイオメディカル株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 1 および phosphatase inhibitor cocktail 2 は Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) より購入した。Cell Counting Kit-8 (CCK-8) は株式会社同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan) より購入した。I 型コラーゲン

(Cellmatrix type I-C) は、新田ゼラチン株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。DMEM containing 25 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) は Invitrogen Co. (Eugen, OR, USA) より購入した。BCA Protein Assay Kit、SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate、goat anti-rabbit HRP-conjugated および goat anti-mouse HRP conjugated は Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA) より購入した。Phosphorylated-p38 rabbit モノクローナル抗体は Promega Co. (Madison, WI, USA) より購入した。P38 mouse モノクローナル抗体、ZO-1 rabbit ポリクローナル抗体および occludin rabbit ポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。VE-cadherin rabbit ポリクローナル抗体は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。

### 2.2.2 細胞培養

HRMEC (DS ファーマバイオメディカル) は、10% FBS、50 µg/mL gentamicin、50 ng/mL amphotericin B および Culture boost (growth factors) を含む CS-C 培地中で、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 2.2.3 HUVEC を用いた管腔形成試験

HUVEC *in vitro* angiogenesis kit を用いて内皮細胞の管腔形成を評価した。HUVEC および線維芽細胞を播種した。培養液中に VEGF (10 ng/mL) および各試料を添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 11 日間培養した。また培養中は 4 日ごとに VEGF および試料を置換した。11 日後、細胞を 70% エタノールで固定し、mouse anti-human CD31 抗体を反応 (37 °C、1 時間) させ、つぎに goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase-conjugate 抗体を用いて反応 (37 °C、1 時間) させた。その後、BCIP/NBT 溶液を添加し、内皮細胞を染色した。管腔形成は、各ウェルを CCD カメラ (HS all-in-one fluorescence microscope ; 株式会社キーエンス, Osaka, Japan) にて撮影 (100 cm<sup>2</sup> の範囲) し、血管新生解析ソフトウェア (angiogenesis image analyzer version 2, 倉敷紡績株式会社) を用いて、joints (分岐点数)、paths (管腔ネ

ネットワークを形成する枝数)、tube length (管腔の長さ) および tube area (管腔面積) を算出し、評価した。

#### 2.2.4 HRMEC を用いた細胞増殖試験

96 ウェルプレートに HRMEC を播種 ( $2 \times 10^4$  cells/mL) し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 24 時間培養した。ついで、10% FBS を含む CS-C 培地に置換し、24 時間培養した。その後、HRMEC を、VEGF (10 ng/mL) および各試料を含む培地に置換し、24 時間培養した。細胞数の計測は、CCK-8 を各ウェルに添加し、37 °C で 3 時間インキュベートした後、分光光度計 (Varioskan ; Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) を用いて 492 nm の吸光度 (参照波長 660 nm) を測定することで行った。

#### 2.2.5 HRMEC を用いた遊走試験

HRMEC の細胞遊走は、*in vitro* wound-healing assay により評価した。I 型コラーゲンでコートされた 12 ウェルプレートに HRMEC を播種 ( $4 \times 10^4$  cells/mL) し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 48 時間培養した。ついで PBS で 2 回洗浄した後、2% FBS を含む CS-C 培地で 6 時間 (37 °C) 培養した。その後、200-1000  $\mu$ L ピペットチップを用いて、ウェルの中央線上に存在する細胞を剥離した後、VEGF (10 ng/mL) および各試料を添加し、37 °C で 24 時間培養した。剥離部分に遊走した内皮細胞数を計測するため、剥離および 24 時間の培養直後に位相差顕微鏡 (オリンパス株式会社, Tokyo, Japan) を用いて各ウェル 4 か所ずつ撮影した。細胞遊走の評価は、剥離部位に遊走した細胞数を計測し、各ウェル 4 か所の平均をとり、算出することで行った。

#### 2.2.6 免疫ブロット

12 ウェルプレートに HRMEC を播種 ( $4 \times 10^4$  cells/mL) し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。ついで PBS で 2 回洗浄した後、2% FBS を含む CS-C 培地で 24 時間 (37 °C)



培養した。培地を 25 mM HEPES および 2% FBS を含む DMEM に置換し、さらに 37° C で 1 時間培養した。つぎに VEGF (10 もしくは 100 ng/mL) および各試料を含む上記の培地に交換し、5 分もしくは 1 時間インキュベートした。HRMEC を PBS で 2 回洗浄した後、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 1 および phosphatase inhibitor cocktail 2 を含む RIPA buffer を加え溶解し、細胞抽出液を回収した。回収した細胞抽出液は -80° C で保存した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準とした BCA protein Assay kit を使用して測定した。タンパクおよびサンプル buffer (10% 2-mercaptoethanol を添加) の混合液を 10% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動した。分離したタンパク質は、polyvinylidene difluoride membrane に転写した。免疫プロットには 1 次抗体として以下の抗体を用いた：phosphorylated-p38 rabbit モノクローナル抗体、p38 mouse モノクローナル抗体、VE-cadherin rabbit ポリクローナル抗体、ZO-1 rabbit ポリクローナル抗体、occludin rabbit ポリクローナル抗体および mouse anti- $\beta$ -actin 抗体。ついで 2 次抗体として、goat anti-rabbit HRP-conjugated 抗体もしくは goat anti-mouse HRP conjugated 抗体を用いた。免疫反応したバンドを SuperSignal<sup>®</sup> West Femto Maximun Sensitivity Substrate を用いて検出した。バンド強度は、Lumino Imaging Analyzer (LAS-4000 ; 富士フイルム株式会社, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

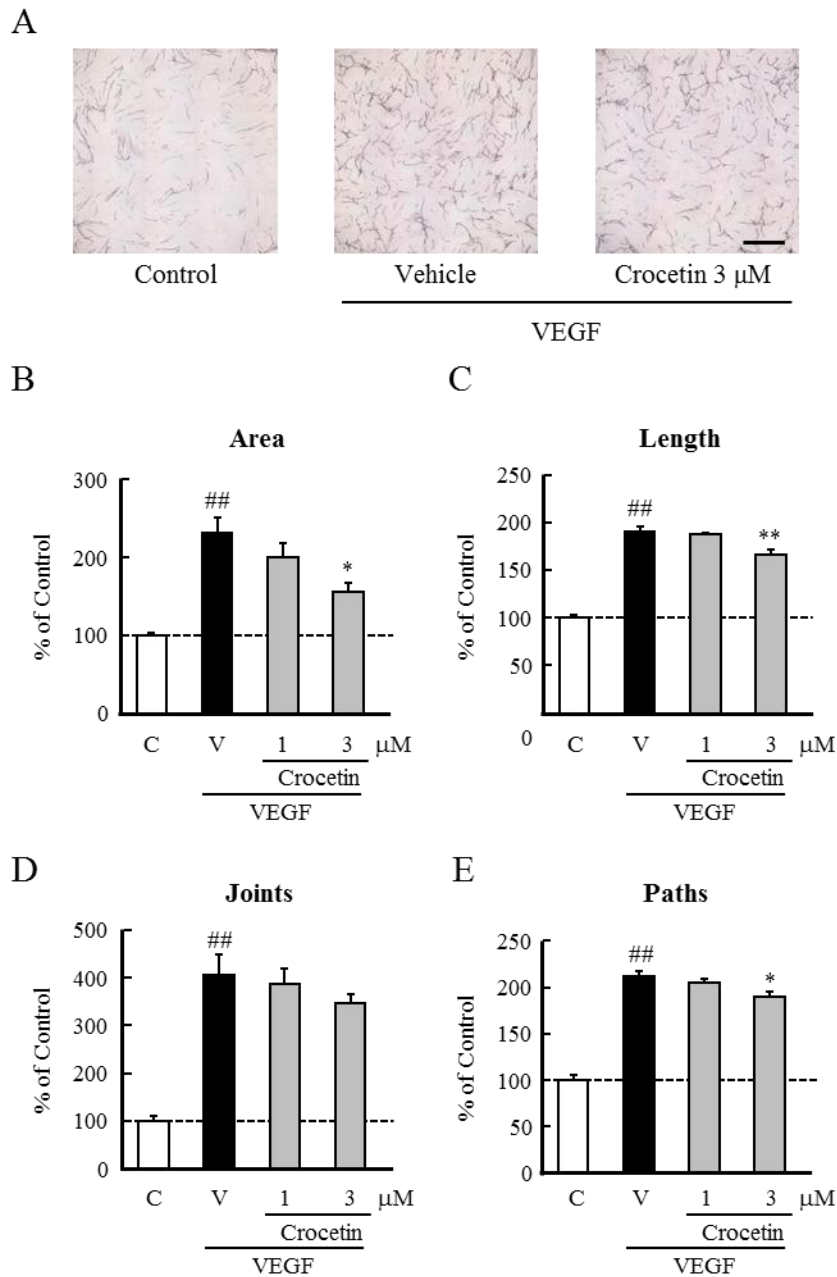
### 2.2.7 統計解析

実験結果は、すべて平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。統計解析は、Student の *t* 検定もしくは、一元配置分散分析 (ANOVA) を行った後、ダネットの多重比較検定 (Dunnett's multiple-comparison test) を実施した。何れの検定においても有意水準を 5% 未満とした。

### 第3節 結果

#### 2.3.1 VEGF 誘発 HUVEC 管腔形成に対するクロセチンの作用

VEGF の添加により、HUVEC の管腔形成が促進した。また、クロセチンの添加により、VEGF 誘発による管腔形成が抑制された (Fig. 11A)。画像解析により、joints (分岐点数)、paths (管腔ネットワークを形成する枝数)、tube length (管腔の長さ) および tube area (管腔面積) を定量化し、内皮細胞による管腔形成を評価した。VEGF の添加によりすべてのパラメータにおいて、Control と比較して 2 倍以上の有意な増加が認められた (Fig. 11B – E)。クロセチン (3  $\mu$ M) は VEGF 誘発による paths、tube length および tube area の増加を有意に抑制した (Fig. 11B, C, E)。また、joint の増加に対しては、有意ではないものの抑制傾向を示した (Fig. 11D)。

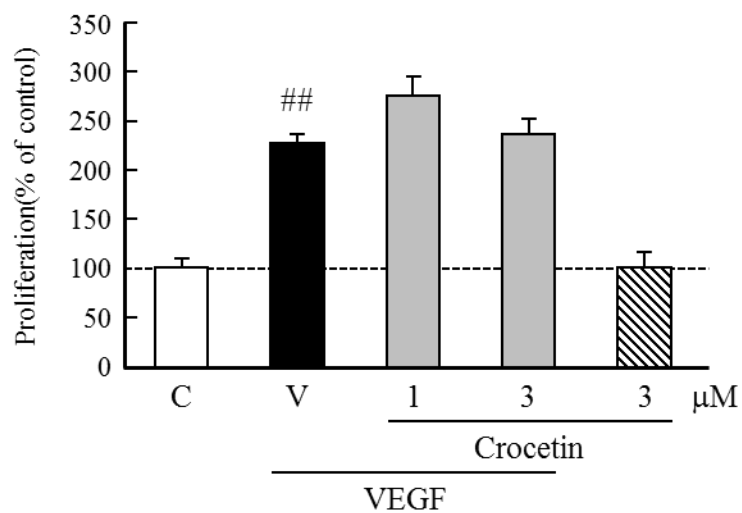


**Fig. 11 Effects of crocetin on tube formation induced by vascular endothelial growth factor (VEGF)**

(A) Representative photographs of tube formation. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were co-cultured with human fibroblasts, as described in the Methods section, and incubated for 11 days with or without the indicated concentrations of crocetin, with the concomitant addition of VEGF (10 ng/mL). Tube formation was evaluated by measurements of (B) tube area, (C) length, (D) joints, and (E) paths after treatment with crocetin. Data are shown as means  $\pm$  SEM ( $n = 6$  or  $9$ ). C: control; V: vehicle. <sup>##</sup> $p < 0.01$  versus control, and <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  versus vehicle. The scale bar indicates a 2 mm length.

### 2.3.2 VEGF 誘発 HRMEC 増殖促進に対するクロセチンの作用

VEGF の添加により、HRMEC の細胞数が Control と比較して、2.3 倍増加した。クロセチン (1 および 3  $\mu\text{M}$ ) は、VEGF 誘発による細胞増殖に対し、抑制作用を示さなかった。また、クロセチンのみを HRMEC に添加しても、細胞増殖に影響を及ぼさなかった (Fig. 12)。

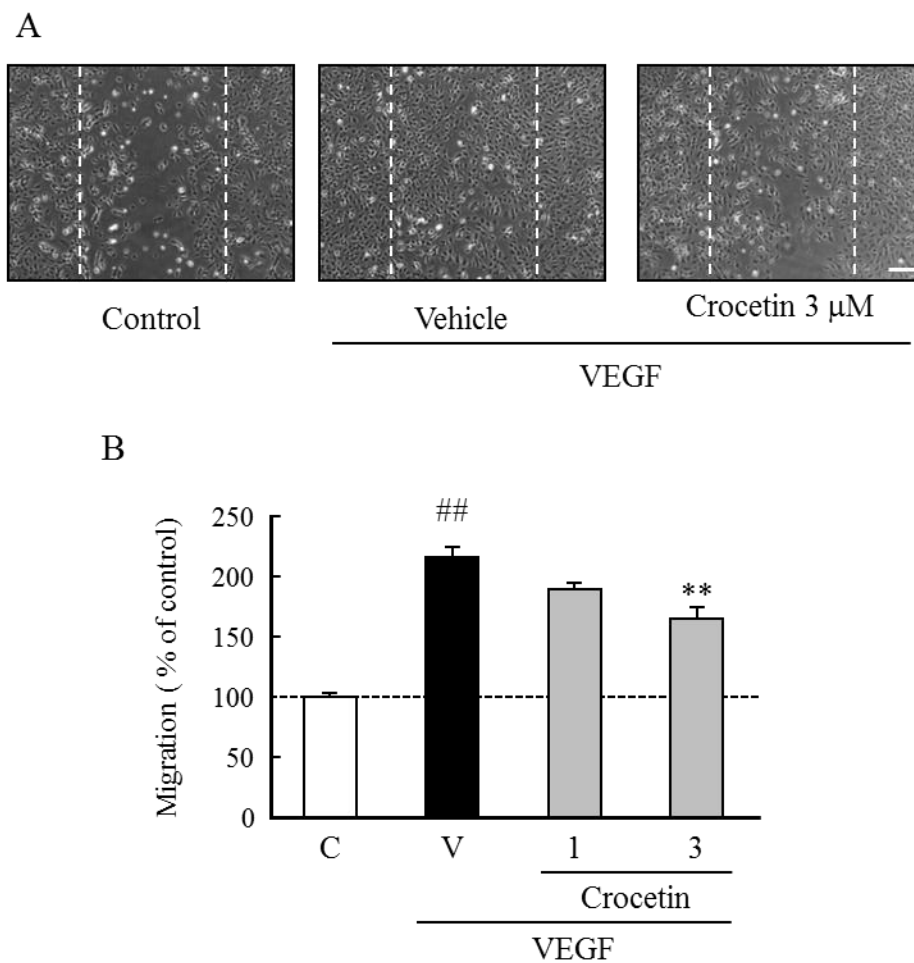


**Fig. 12 Effects of crocetin on proliferation of human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) induced by vascular endothelial growth factor (VEGF).**

HRMEC were incubated with the indicated concentrations of crocetin in the presence or absence of VEGF (10 ng/mL) for 24 h. Cell proliferation was estimated using a cell counting kit-8 (CCK-8). VEGF treatments increased cell viability vs. control. Crocetin (1 to 3  $\mu\text{M}$ ) had no effect on the proliferation. Data are shown as means  $\pm$  SEM (n = 6). C: control; V: vehicle. <sup>##</sup>p < 0.01 versus control.

### 2.3.3 VEGF 誘発 HRMEC 遊走に対するクロセチンの作用

VEGF の添加により、Control と比較して、剥離部位への遊走した細胞数が 2.2 倍増加した。クロセチン (3  $\mu\text{M}$ ) の添加により、VEGF 誘発による HRMEC の遊走が有意に抑制された (Fig. 13)

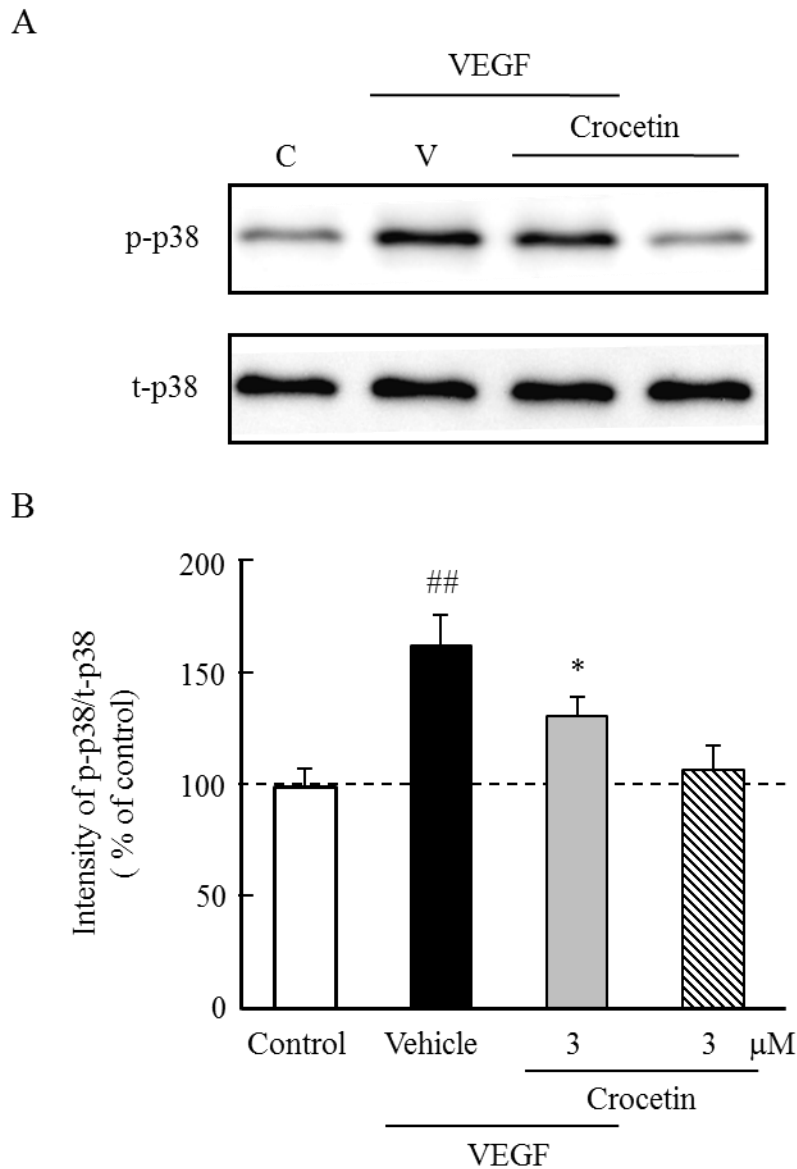


**Fig.13 Effects of croctetin on migration and in vitro wound healing of human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) induced by vascular endothelial growth factor (VEGF).**

(A) Images of wounded monolayers of HRMEC taken 24 h after treatment with control, VEGF alone (10 ng/mL), or VEGF plus croctetin (3  $\mu\text{M}$ ). Migration was estimated by measuring the cell numbers within the wounded region after treatment with VEGF plus: (B) croctetin. Data are shown as means  $\pm$  SEM (n = 4 or 6). C: control; V: vehicle. ##p < 0.01 versus control, and \*\*p < 0.01 versus vehicle. The scale bar indicates a 250  $\mu\text{m}$  length.

#### 2.3.4 VEGF 誘発 p38 活性化に対するクロセチンの作用

HRMEC を VEGF (10 ng/mL) で 5 分間処理することにより、リン酸化 p38 が 1.7 倍増加した。クロセチン (3  $\mu$ M) は、VEGF 誘発による p38 のリン酸化を有意に抑制した。また、クロセチンの単独添加は、p38 のリン酸化に影響を及ぼさなかった (Fig. 14)。



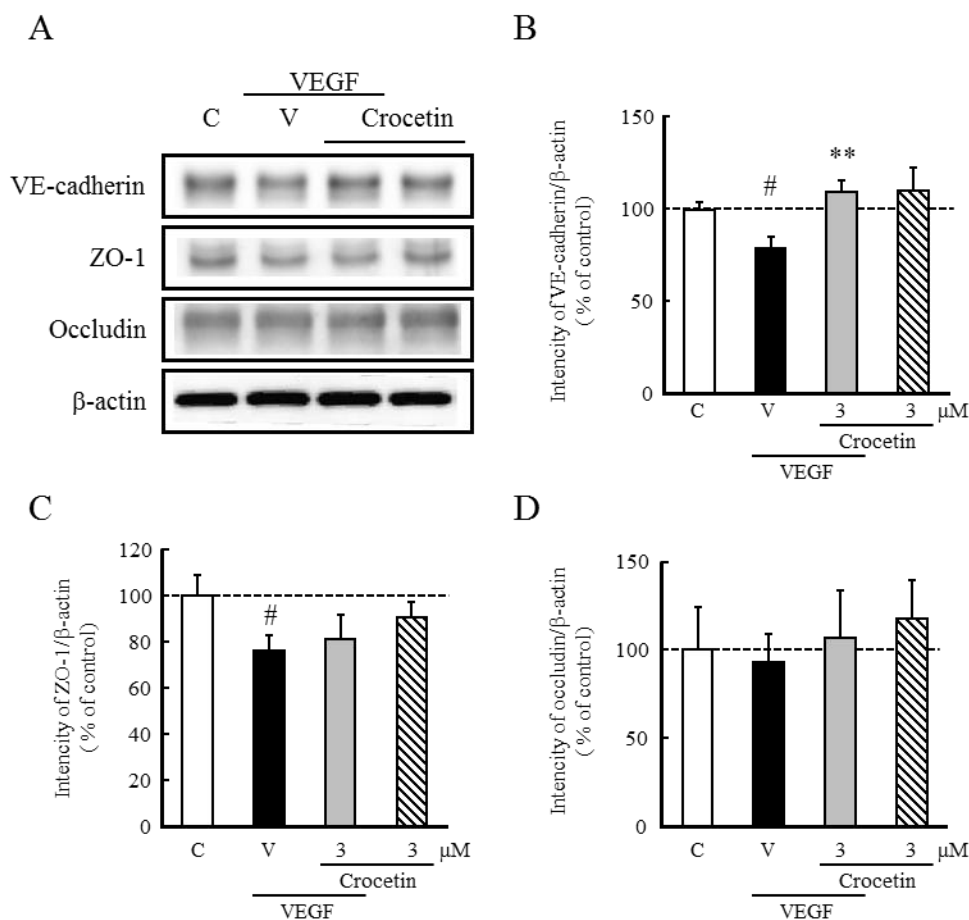
**Fig.14 Effects of crocetin on phosphorylation of p38 in human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) induced by vascular endothelial growth factor (VEGF).**

HRMEC were incubated in a medium consisting of 2% FBS DMEM containing HEPES for 1 h, and the medium was then changed to one containing VEGF (10 ng/mL) with or without crocetin (3  $\mu$ M) for 5 min. (A) Phosphorylation of p38 was determined by immunoblotting assays. (B) Blots were scanned and quantified by densitometric analysis, with the phosphorylated-p38 blots (p-p38) expressed relative to the total-p38 (t-p38). Data are shown as means  $\pm$  SEM (n = 12). C: control; V: vehicle. <sup>##</sup>p < 0.01 versus control, and <sup>\*</sup>p < 0.05 versus vehicle.

### 2.3.5 VEGF によるタイトジャンクションおよびアドヘレンスジャンクションタンパク質誘導に対するクロセチンの作用

VEGF により誘導されるタイトジャンクションタンパク質 (VE-cadherin) およびアドヘレンスジャンクションタンパク質 (ZO-1 および occludin) に対するクロセチンの作用を検討した。VE-cadherin、ZO-1 および occludin は血管内皮細胞のバリア機能の維持に重要であり、血管透過性に関与することが知られている (Dejana *et al.*, 2008)。HRMEC を VEGF (100 ng/mL) で 1 時間処理すると、VE-cadherin および ZO-1 の発現が有意に低下した。一方、occludin では変化が認められなかった (Fig. 15)。クロセチン (3  $\mu$ M) は VEGF による VE-cadherin の低下を有意に抑制したが、ZO-1 の低下に対しては抑制作用を示さなかった (Fig. 15B, C)。





**Fig. 15 Effects of crocetin on adherens junction and tight junction proteins in human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) induced by vascular endothelial growth factor (VEGF).**

HRMEC were incubated in a medium consisting of 2% FBS DMEM containing HEPES for 1 h, and the medium was then changed to one containing VEGF (100 ng/mL) with or without crocetin (3 μM) for 1 h. (A) Levels of VE-cadherin, ZO-1, and occludin were determined by immunoblotting assays. (B-D) Blots were scanned and quantified by densitometric analysis, with the VE-cadherin, ZO-1, and occludin blots expressed relative to the β-actin. Data are shown as means ± SEM (n = 5 or 7). C: control; V: vehicle. #p < 0.05 versus control, and \*\*p < 0.01 versus vehicle.

#### 第4節 考察

VEGFは、*in vitro* および *in vivo* の何れの試験系においても、血管新生に必要なとなる内皮細胞の増殖や遊走、細胞外マトリックスの再構成あるいは管腔形成を促進させる (Ferrara, 1995)。抗 VEGF 抗体の添加、可溶性 VEGF 受容体-1 (sVEGFR-1) の投与によって血管新生を阻害することが報告 (Kim *et al.*, 1993 ; Kendall *et al.*, 1993) されており、VEGF は血管

新生を制御する最も重要な因子の一つであると考えられている。そこで、本研究では、初めに VEGF 誘発による HUVEC の管腔形成に対するクロセチンの作用を検討した。

HUVEC およびヒト線維芽細胞共培養系における VEGF 誘発による管腔形成試験において、クロセチンは管腔の形成を阻害した (Fig. 11)。血管新生は、細胞外マトリックスの分解、血管内皮細胞の増殖ならびに遊走、細胞外マトリックスの再構成および周辺細胞との結合と段階を経て行われる。そこで、クロセチンの管腔形成抑制の作用機序を検討するため、HRMEC を用いて細胞増殖および細胞遊走に対するクロセチンの作用を検討した。その結果、クロセチンは VEGF 誘発による細胞増殖には影響を及ぼさず (Fig. 12)、VEGF 誘発による細胞遊走を有意に抑制した (Fig. 13)。このことから、クロセチンによる管腔形成阻害作用は、内皮細胞の遊走阻害によることが明らかとなった。

VEGF 誘発による内皮細胞の遊走は、ヒートショックプロテイン - 27 (HSP-27) が制御することが知られており、HSP-27 の活性化は p38 の働きにより誘導される (McMullen *et al.*, 2005)。また、p38 阻害剤である SB203580 は VEGF 誘導による HUVEC 増殖や ERK1/2 のリン酸化を阻害しない (Rousseau *et al.*, 1997)。そこで、HUVEC の増殖には関与せず、内皮細胞の遊走を抑制するクロセチンが、VEGF で誘導される p38 のリン酸化に関与するのか HRMEC を用いて検討した。クロセチンは、VEGF 誘導の p38 のリン酸化を有意に抑制する一方、単独添加では、p38 のリン酸化に影響を及ぼさなかった (Fig. 14)。この結果は、クロセチンが、p38 活性化シグナルの上流に直接的もしくは間接的に、あるいはその両方で作用することを示唆している。しかしながら、クロセチンが p38 経路にどのように作用するのかは本研究では明らかにすることはできなかった。

血管新生に対するクロセチンの作用については、Bie らがラットを用いた試験において、クロセチンが脳挫傷による損傷から組織を保護し、その後の血管新生が促進されることを報告している (Bie *et al.*, 2011)。しかしながら、これは損傷後の亜急性期における正常な血管新生を VEGFR-2 の発現で評価したものであり、損傷のない状態でクロセチンを投与した場合の血管新生に及ぼす影響については検討されていなかった。本研究における

HRMEC を用いた検討では、クロセチンの単独添加は、細胞増殖やリン酸化 p38 の発現に影響しておらず (Fig. 12、14)、クロセチンは、正常な血管新生には影響を及ぼさないことが示唆された。

酸化ストレスは、VEGF 産生を増強し血管新生を促すことが知られており、抗酸化剤である *N*-アセチル-*L*-システイン (NAC) は VEGF 誘発による血管新生を抑制する (Redondo *et al.*, 2000)。そのため、酸化ストレスを低減することは VEGF 誘発による血管新生の抑制につながると考えられる。第 1 章において、クロセチンはヒドロキシラジカルの消去活性を示すこと、過酸化水素誘発による網膜神経節細胞の細胞死を抑制し、カスパーゼ-3 および-9 の活性化を抑制することを明らかにしている。そのため、VEGF 誘導血管新生に対するクロセチンの阻害作用には、クロセチンの抗酸化作用も関与していると考えられる。

血管新生が誘導される際には、血管のバリア機能が一時的に弱まり、血管透過性が亢進する。血管透過性を左右する内皮細胞間の結合は、アドヘレンスジャンクション (接着結合) とタイトジャンクション (密着結合) により制御されており、VE-cadherin は接着結合に、ZO-1 と occludin は密着結合の形成に必要な不可欠な分子である (Dejana *et al.*, 2009)。VEGF による細胞外からの刺激は、VE-cadherin やその結合タンパクの機能の調節を通じて、血管透過性を亢進させることが知られている (Cai *et al.*, 2011)。また、VE-cadherin ノックアウトマウスでは、胚性致死を示し、発生時の血管新生において深刻な異常が認められる。そこで、血管透過性に関与するアドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションを構成する結合分子の発現に対するクロセチンの作用を検討した。HRMEC に VEGF を添加することで、VE-cadherin および ZO-1 のタンパク発現が低下する一方、occludin の発現には変化が認められなかった (Fig. 15)。糖尿病網膜症モデルマウスにおいて、血管透過性は ZO-1 の減少とともに亢進し、その後 occludin が低下することが報告されており (Kim *et al.*, 2010)、本研究で用いた試験系においては、occludin の発現低下まで至らなかったと考えられるが、クロセチンを添加することにより、VEGF 誘発の VE-cadherin 発現の低下が有意に抑制された。ZO-1 の発現に対しては、クロセチンの効果は認められなかった (Fig. 15)。

これらの結果から、クロセチンが VEGF による VE-cadherin 発現を抑制したことで、内皮細胞間の結合を維持され、血管透過性の亢進が抑えられたため、血管新生が抑制されたことが示唆された。

第 1 章において、クロセチンをラットに経口投与 (50 mg/kg) すると、投与 1.5 時間後には房水中のクロセチン濃度が約 2  $\mu\text{M}$  となることを明らかにした (Table 1)。この濃度は、本研究において明らかとなったように、クロセチンが血管新生を阻害するために十分な濃度といえる。そのため、動物においてもクロセチンが血管新生阻害作用を示すことが期待される。また、初期の加齢黄斑変性症 (age-related macular degeneration ; AMD) 患者が、クロセチンを含有するサフランを摂取することで、網膜機能の低下が抑えられることが報告されており (Falsini *et al.*, 2010 ; Piccardi *et al.*, 2012)、ヒトにおいてもクロセチンが網膜に作用することが示唆されている。クロセチンは、経口摂取後に血液網膜関門を通過すると考えられることから、糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症の進行に大きく関与する網膜における異常な血管新生の予防あるいは抑制に役立つものと考えられる。

第 1 章および第 2 章において、加齢黄斑変性症の発症や病状の進行に関わる光曝露による視細胞の細胞死や異常な血管新生に対するクロセチンの薬理作用について、動物や培養細胞を用いて明らかにした。次章においては、クロセチンのヒトへの作用を検討した。

### 第3章 健康成人におけるクロセチンの薬物動態

#### 第1節 諸言

動物はカロテノイド合成系を有してないため、カロテノイドを利用するためには、食物から摂取する必要がある。動物におけるカロテノイドの吸収と蓄積の能力は種によって大きく異なっており、また、カロテノイドの種類によっても吸収に違いがある。

クロセチンの生物学的、薬理学的作用については種々の報告があるが、薬物動態に関する報告は多くはない (Liu and Qian., 2002 ; Asai *et al.*, 2005) 。クロセチンは、短い炭素鎖 ( $C_{20}$  のアポカロテノイド) の両末端にカルボキシル基を有するカロテノイドであり、 $\beta$ -カロテンやルテイン等のより疎水的な一般的な炭素数を 40 ( $C_{40}$ ) とするカロテノイドとは構造が異なる (Fig. 2) 。これまでに、Asai らはマウスを用いた試験において、クロセチンは速やかに吸収されることおよびその一部がグルクロン酸抱合されることを報告している (Asai *et al.*, 2005) 。また、その吸収は、マウスで同様の試験を行った  $\beta$ -カロテンやルテインよりも早い (Baskaran *et al.*, 2003) 。

ヒトにおける経口摂取後の血中動態に関しては、 $\beta$ -カロテン、ルテイン、リコピン等の  $C_{40}$  のカロテノイドについて単回経口投与試験が行われている。投与量や投与方法に違いがあるものの、最高血中濃度到達時間は、 $\beta$ -カロテンで 30 時間以上 (Kostic *et al.*, 1995 ; Zhi *et al.*, 1996) 、ルテインで 16 から 30 時間程度 (Kostic *et al.*, 1995 ; Bowen *et al.*, 2002) 、リコピンで 15 から 33 時間 (Gustin *et al.*, 2004) となっており、これらのカロテノイドではピークに達するまでに半日以上の間を必要とする。一方、ヒトにおけるクロセチンの吸収 (血中動態) については明らかとなっていない。

本研究では、第 1 章および第 2 章において培養細胞や実験動物を用いて、クロセチンの薬理学的作用を検証し、その有用性を明らかにした。しかしながら、動物とヒトではカロテノイドの吸収に違いがあり、ヒトにおけるクロセチンの薬理学的作用を検討するためには、経口摂取後のクロセチン血中動態を理解することが重要となる。そこで、本章では、

クチナシの果実より抽出したクロセチンを用いて、健常な成人ボランティアを対象に単回経口投与後のクロセチンの血中動態について検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 3.2.1 対象

対象となる被験者は、INA RESEARCH PHILIPPINES, Inc. (INARP, Laguna, Philippines) の被験者バンクに登録しているボランティアの中から、本試験への参加を自発的に志願した、下記の選択基準を満たす 22 歳以上 55 歳以下の健常なフィリピン人男女 10 名（男性 5 名、女性 5 名）とした。選択基準は以下の通り：①成人男性もしくは妊娠をしていない成人女性であって、試験責任医師による問診および身体検査、試験前に実施された心肺機能、血液学および血液化学検査に基づき健康と判断された者、②非喫煙者、③マルチビタミンなどのサプリメントを摂取していない者。

なお、本試験は、「ベルモント・レポート (Belmont Report) : 研究における被験者の保護のための倫理原則と指針」に基づき計画され、INARP の施設内審査委員会／倫理委員会 (IRB/ERC) の承認の下に行われた。また、ヘルシンキ宣言の主旨に従い、被験者に対しては研究内容、方法などについて十分な説明を行い、文書による同意を得て実施した。

### 3.2.2 試験食

試験食は、理研ビタミン株式会社より提供されたクロセチンを高含有するクチナシ黄色素製剤（クロセチン含量 75%）を 10 mg 含むハードカプセルを使用した。

### 3.2.3 試験手順

本試験は、フィリピン国内にある INARP の治験センター (Clinical Pharmacology Center ; CPC) にて実施した。

試験は、非盲検法を採用し、投与量ごとに 1 週間のウォッシュアウト期間を設けた 3 用量単回投与試験とした。被験者には、各投与日の少なくとも 24 時間前からは、激しい運動およびアルコールの摂取を控え、通常の食事を摂取するように指導した。また、被験者に投与日前日の 21 時以降から飲料水以外の摂取を控えるよう指導した。

各投与日に、被験者に同一の朝食（約 300 kcal）を摂取させ、その 15 分後にクロセチンを含むカプセルを 1 カプセル（クロセチン 7.5 mg）、または 2 カプセル（クロセチン 15mg）、もしくは 3 カプセル（クロセチン 22.5 mg）投与した。カプセル投与後、6 時間が経過するまでは、飲料水以外の摂取を制限した。被験者は、投与 6 時間後の採血後に昼食（約 850 kcal）を、投与 10 時間後の採血後に夕食（約 850 kcal）を摂取した。投与日翌日、投与 24 時間後の採血前に、各被験者は自宅にて朝食を摂取した。試験期間中は、カロテノイドを多く含む食品の摂取を制限した。

採血は、投与前ならびに投与 1、2、4、6、8、10 および 24 時間後に行った。各被験者より 5 ml の全血を採取し、ヘパリン処理を行った後、遠心分離（3000 rpm、10 分、室温）により血漿を回収した。血漿サンプルは分析に供するまで -20° C で保管した。

### 3.2.4 血漿中クロセチンの分析方法

血漿中のクロセチン濃度は、逆相 HPLC 法により定量した。血漿（200  $\mu$ M）に 2.0 ml のメタノールを混合、攪拌し遠心分離（3000 rpm, 10 min）した。回収した上清を窒素噴霧下で濃縮乾固した。濃縮物に 2.0 ml のアルカリ緩衝液を加え溶解した後、メタノール（2.0 ml）およびアルカリ緩衝液（2.0 ml）により前処理した Oasis HLB Extraction Cartridge（日本ウォーターズ株式会社, Tokyo, Japan）を用いて固層抽出した。溶出液を窒素噴霧下で濃縮乾固した。濃縮物を 200  $\mu$ l のメタノールに溶解した後、0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターで濾過し、HPLC 分析に供した。クロセチンの分析は、Atlantis T3 カラム（2.1 mm I.d.  $\times$  150 mm ; 日本ウォーターズ株式会社）を使用した逆相 HPLC 条件で行った。検出波長は、

430 nm とし、クロセチン標準品とのピーク面積を比較することで各サンプル中の濃度を算出した。

### 3.2.5 薬物動態および統計解析

薬物動態パラメータ ( $AUC_{0-24}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $C_{max}$ 、 $T_{max}$ 、 $T_{1/2}$ 、 $CL/F$  および  $VD/F$ ) は薬物動態解析ソフト WinNonlin program (version 5.0.1; Pharsight Inc., Mountain View, CA) を用いて算出した。各薬物動態パラメータについて、シャピロ - ウィルク (Shapiro-Wilk) 検定およびコルモゴロフ - スミルノフ (Kolmogorov-Smirnov) 検定を行い、正規性を確認した。また、各動態パラメータについて、分散分析 (ANOVA) およびフリードマン (Friedman) 検定を行った。何れの検定においても有意水準を 5%未満とした。統計解析には、統計解析パッケージ SAS (SAS/STAT ver. 9.1 ; SAS Institute, Cary, NC) を使用した。

## 第3節 結果

### 3.3.1 被験者背景

被験者背景を Table 2 に示した。試験には男性 5 名および女性 5 名の計 10 名が参加した。それぞれの平均年齢は男性  $34 \pm 12$  歳および女性  $33 \pm 8$  歳であった。

**Table 2 Demographic data of 10 subjects**

	Males (5)		Females (5)	
<b>Characteristics</b>				
Age (years)	34	$\pm$ 12	33	$\pm$ 8
Height (cm)	167.8	$\pm$ 3.0	154.4	$\pm$ 3.2
Body weight (kg)	63.6	$\pm$ 7.2	56.6	$\pm$ 8.2
BMI*	22.61	$\pm$ 2.87	23.72	$\pm$ 3.25
<b>Vital signs</b>				
Temperature ( $^{\circ}$ C)	36.2	$\pm$ 0.3	36.6	$\pm$ 0.4
Heart rate (bpm)	67	$\pm$ 12	71	$\pm$ 4
Respiratory rate (breaths/min)	20	$\pm$ 3	20	$\pm$ 1
<b>Blood pressure</b>				
Systolic (mm Hg)	120	$\pm$ 6	117	$\pm$ 8
Diastolic (mm Hg)	74	$\pm$ 5	78	$\pm$ 4

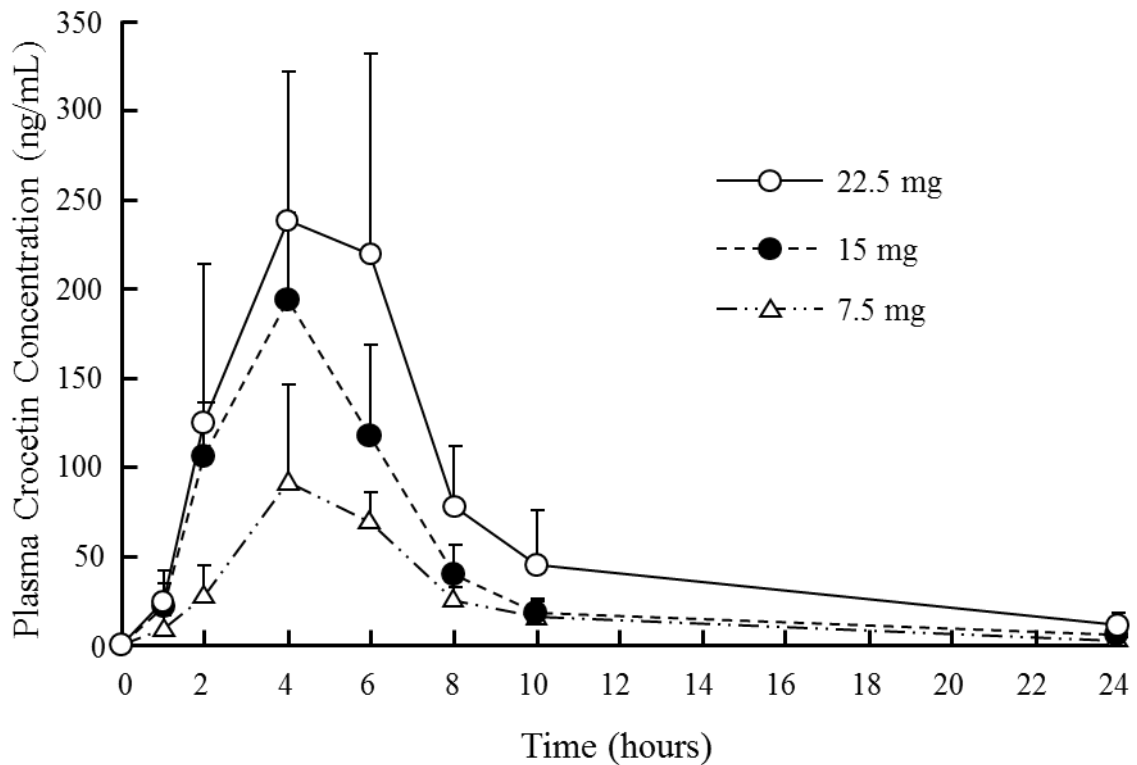
Data represent mean  $\pm$  SD (n = 5)

\*BMI = Body weight(kg) / height (m)<sup>2</sup>

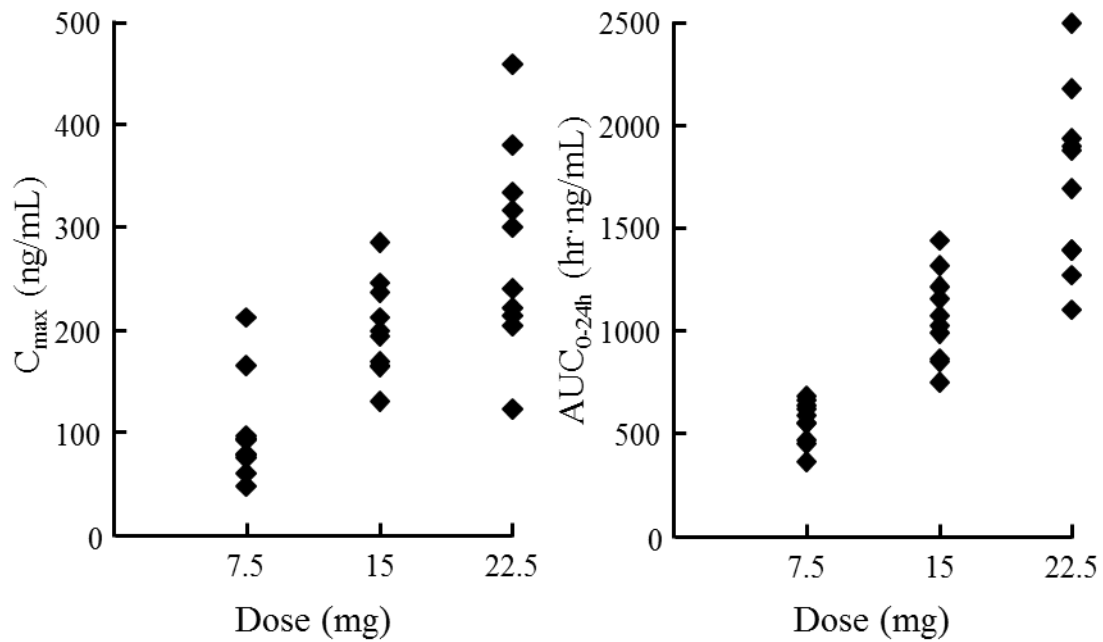


### 3.3.2 クロセチンの動態

クロセチン単回経口投与後の血漿中濃度推移を Fig. 16 に示した。クロセチンは、投与前には血漿中から検出されなかった。クロセチン濃度は投与 4 時間後まで上昇し、その後、徐々に減少し、投与 24 時間後には検出限界に近づいた。クロセチンの最高血中濃度 ( $C_{max}$ ) は、100.9 から 279.7 ng/ml であった。本試験のクロセチン投与量において、 $C_{max}$  および  $AUC_{0-\infty}$  は用量依存性を示した (Fig. 17)。



**Fig. 16** Time course of plasma concentration after a single administration dose of crocetin in doses of 7.5 mg, 15 mg and 22.5 mg. The values represent mean  $\pm$  S.D.



**Fig. 17 Individual scatter plots after a single administration of crocetin in doses of 7.5 mg, 15 mg and 22.5 mg/subject.**

単回投与後のクロセチン薬物動態パラメータを Table 3 に示した。3用量の比較において、 $AUC_{0-24h}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ および  $C_{max}$  は、分散分析、フリードマン検定の何れにおいても有意な差が認められた。その他のパラメータ ( $T_{max}$ ,  $T_{1/2}$ ,  $CL/F$ ,  $Vd/F$ ) については、投与量による違いは認められなかった。

### 3.3.3 有害事象

すべての投与量において、試験食が原因で起こったと思われる明らかな有害事象は認められなかった。

**Table 3 Pharmacokinetic parameters of crocetin**

Parameters	Doses of crocetin (mg)		
	7.5	15	22.5
C <sub>max</sub> (ng/mL)	100.9 ± 50.2 *†	200.6 ± 45.9 *†	279.7 ± 98.0 *†
T <sub>max</sub> (h)	4.8 ± 1.0	4.0 ± 0.9	4.6 ± 1.0
AUC <sub>0-24</sub> (hr·ng/mL)	556.5 ± 102.7 *†	1065.9 ± 217.5 *†	1720.8 ± 435.3 *†
AUC <sub>0-∞</sub> (hr·ng/mL)	667.5 ± 421.3 *†	1130.8 ± 206.2 *†	1837.9 ± 403.1 *†
T <sub>1/2</sub> (h)	6.1 ± 7.2	7.5 ± 2.8	6.5 ± 2.1
CL/F (L/hr)	13.8 ± 5.4	13.7 ± 2.4	12.8 ± 2.9
Vd/F (L)	82.8 ± 59.0	152.6 ± 80.1	124.2 ± 58.6

Note: Data -represent mean ± S.D. (n=10)

\*: Statistically significant at p < 0.01 using ANOVA

†: Statistically significant at p < 0.01 using Friedman test

## 第4節 考察

本試験では、健常な成人ボランティアを対象に単回経口投与時のクロセチンの薬物動態について検討した。これまでクロセチンでは、ヒトを対象とした単回投与後の薬物動態に関する報告はなく、その動態は明らかとなっていなかった。

クロセチンは、経口投与後速やかに吸収され、投与 1 時間後の時点で血中濃度の上昇が認められた。また、何れの投与量においても、投与後約 4 時間で血中濃度が最大となった。 $\beta$ -カロテン、ルテインおよびリコピンなど炭素数 40 で構成されるカロテノイドは、本試験とは試験条件が異なるものの、単回投与後の最高血中濃度到達時間 (T<sub>max</sub>) が、 $\beta$ -カロテンで 30 時間以上 (Kostic *et al.*, 1995 ; Zhi *et al.*, 1996) 、ルテインで 16 から 30 時間程度 (Kostic *et al.*, 1995 ; Bowen *et al.*, 2002) 、リコピンで 15 から 33 時間 (Gustin *et al.*, 2004) となっており、クロセチンの T<sub>max</sub> は、これらのカロテノイドよりも短い。そのため、クロ

セチンは、 $\beta$ -カロテンなど  $C_{40}$  のカロテノイドに比べ吸収が早く、投与後速やかに血中への移行することが明らかとなった。

一般的にカロテノイドは、胆汁酸、コレステロールや中性脂肪の分解産物であるモノグリセリド、長鎖脂肪酸などとともに混合ミセルを形成し、小腸上皮細胞で受動拡散により吸収される (Parker, 1996)。ついでリンパ管を介して、血流へと輸送されるため、血中濃度の上昇は緩やかである。一方、マウスを用いた吸収試験において、クロセチンの吸収性は高く、同様の実験を行った  $\beta$ -カロテンやルテイン (Baskaran *et al.*, 2003) に比べて短時間で吸収され、最高血中濃度が 10 倍程度高い値となることが報告されている (Asai *et al.*, 2005)。Asai らは、クロセチンはアポカロテノイドの一つであり、炭素数 40 を基本骨格とする  $\beta$ -カロテン、ルテインおよびリコピンなどと比較して分子量が小さく、親水性が高いため、クロセチンがリンパを介した吸収だけでなく、門脈を経由して血流へと輸送されたと推測している (Asai *et al.*, 2005)。ヒトを対象とした本試験の結果は、この仮説を支持するものであり、クロセチンは門脈を経由した吸収も行われていると考えられる。

また、クロセチンの迅速な吸収は、薬理活性にも影響を及ぼすと考えられる。Mizuma らは、クロセチンの抗疲労効果について、疲労を誘導するための身体運動を実施する 4 時間前にクロセチンを摂取しておくこと、身体疲労が緩和され、身体パフォーマンスの低下が抑制されたと報告している (Mizuma *et al.*, 2009)。筋肉運動により産生された活性酸素が筋疲労を引き起こす原因の一つとして考えられている (Alessio, 1993 ; Powers and Jackson, 2008 ; Tanskanen *et al.*, 2010)。第 1 章の研究や過去の研究から、クロセチンは、抗酸化活性を示し酸化ストレスを低減することが明らかとなっている。抗酸化物質であるクロセチンが迅速に吸収され、筋肉運動により発生した活性酸素を即座に消去したため、身体疲労が緩和されたと考えられる。しかしながら、第 1 章における培養細胞を用いた検討では、低濃度のクロセチン ( $0.1 \sim 3 \mu\text{M}$ ) では、活性酸素の除去は不十分であることも明らかにしている。クロセチンの身体疲労緩和作用は  $15 \text{ mg/日}$  の投与量で認められており、本試験よりこの時の血中濃度は、最大で  $0.6 \mu\text{M}$  ( $200 \text{ ng/mL}$ ) 程度と考えられる。この濃度では、

活性酸素の除去作用は小さく、クロセチンの疲労緩和作用には抗酸化作用以外の機能が関与している可能性も考えられる。

第 1 章、第 2 章における培養細胞を用いた試験では、クロセチンは  $1 \mu\text{M}$  を超える濃度で細胞死抑制作用や管腔形成抑制作用が認められている (Fig. 4 and 11)。これまでに報告されたヒトを対象とした試験におけるクロセチンの投与量は  $7.5 \sim 15 \text{ mg}$  であり、(Kuratsune *et al.*, 2010 ; Mizuma *et al.*, 2009)、本試験からこの投与量における血中濃度は  $0.3 \sim 0.6 \mu\text{M}$  程度と  $1 \mu\text{M}$  に満たない濃度であると推測される。この濃度は培養細胞で薬理活性が認められた濃度と比べると低い。この結果はクロセチンがヒトでは培養細胞で効果を示した濃度よりも低い濃度で薬理作用を示す可能性を、あるいは、クロセチンが培養細胞にて検討した作用以外に、低濃度で効果を示す別の作用を有する可能性を示唆している。

カロテノイドの吸収は種差が大きく、とくにげっ歯類 (ネズミ目) において吸収されにくいことが知られている (Lee *et al.*, 1999)。げっ歯類に属するラットにおけるクロセチンの吸収は、経口投与後約 1 時間で血中濃度が最大となることが報告されている (Liu and Qian., 2002)。第 1 章において、ラットにおけるクロセチン ( $50 \text{ mg/kg}$ ) の経口投与 1.5 時間後の血中濃度が、 $62.5 \mu\text{M}$  となることを明らかにした (Table. 1)。被験者背景から本試験におけるクロセチンの体重当たりの投与量はおおよそ  $0.125$ 、 $0.25$  および  $0.375 \text{ mg/kg}$  となり、最高血中濃度はそれぞれ  $100.9 \text{ ng/mL}$  ( $0.3 \mu\text{M}$ )、 $200.6 \text{ ng/mL}$  ( $0.6 \mu\text{M}$ ) および  $279.7 \text{ ng/mL}$  ( $0.9 \mu\text{M}$ ) であった (Table 3)。ヒトにおけるクロセチンの吸収は用量依存性を示すことから、仮にヒトに  $50 \text{ mg/kg}$  の用量でクロセチンを投与した場合、最高血中濃度は  $120 \mu\text{M}$  となり、ラットの 2 倍となる。そのため、他のカロテノイドとは異なり、クロセチンの吸収におけるラットとヒトとの種差は小さいと考えられる。

単回投与後のクロセチン血漿中濃度は、何れの投与量においても、ピークに到達した後、徐々に減少をはじめ、投与 24 時間後には検出限界に近い値まで低下した。クロセチンは、ヒト血清アルブミンとの結合性が弱いことが報告されている (Kanakis *et al.*, 2007)。血漿タンパクとの結合能が弱い物質は組織に移行しやすいことから、クロセチンも組織移行性

を示すと考えられ、本試験における分布容積 ( $V_d/F$ ) の値もクロセチンの組織移行性を反映したものと考えられる。しかしながら、本試験は、クロセチンの吸収に焦点をあてたものであり、組織分布や排出については、更なる検討が必要である。

本研究により、ヒトにおいても、クロセチンが他のカロテノイドに比べ迅速に吸収され、また、血中から消失することが明らかとなった。また、本研究の投与量において、クロセチン血漿中濃度は用量依存性を示すことが確認された。このことから、クロセチンは、動物試験と同様に、ヒトにおいても薬理活性を示す血中濃度に達していると考えられる。そこで、次章では、ヒトにおける眼機能障害である眼精疲労に対するクロセチンの薬理作用について検討した。

## 第4章 クロセチンの眼精疲労改善効果

### 第1節 諸言

眼精疲労とは、眼を持続的に使った時、健常者では疲れない程度でも疲れて、眼の重圧感、頭重感、視力低下、ときには複視などを訴え、甚だしい時には悪心・嘔吐まで来す状態を指す（所、吉田、2006）。近年における情報技術の進展により、パソコンやスマートフォンなどの情報端末が職場・家庭を問わず広く普及し、パソコンのディスプレイに代表される情報表示機器（visual display terminal ; VDT）を見ながら作業を行う時間が増加している。それに伴い、眼精疲労を訴える人が急増しており、社会的な問題となっている。厚生労働省が行った調査では、VDT 作業を行う労働者の 7 割が身体的な疲労や症状を自覚しており、その内容の 9 割が「目の疲れ・痛み」となっている（厚生労働省, 2009）。

疲労は、「過度の肉体的および精神的活動、または疾病によって生じた独特の不快感と休養の願望を伴う身体の活動能力の減退状態である」と定義される（日本疲労学会, 2012）。よって、眼精疲労は「見る」という活動、つまり、視覚を介した情報を処理する活動が過度であったために生じるといえる。視覚から情報を得るためには、網膜へと入力された視覚刺激が視神経を介し脳へと送られ、物体の動きや位置あるいは色や形といった情報が知覚された後、記憶との統合あるいは照会、選択された結果に基づいた認識が成立するまで処理される必要がある。成立した認識により、意志の決定がなされ、運動中枢への働きかけが行われることになる（中村, 2010）。視覚情報の処理は、脳への負荷が大きく、全身の酸素消費の 2 割を占める脳において、最もエネルギーを消費するシステムの一つとして位置づけられている（Wong-Riley, 2010）。また、VDT 作業を伴う労働では、視覚情報処理に加え、仕事に対する緊張感など、精神的な負荷も加わっていると考えられる。そのため、眼精疲労は、近くのディスプレイに焦点を合わせるために長時間に渡り緊張状態を維持することで生じる毛様体筋の疲労だけでなく、脳の興奮水準を高めた状態で行う精神・神経活動が長く続いたことで生じる精神疲労の要素が強い（梶本、天野, 2009 ; 中村, 2010）。

眼精疲労時には副交感神経の異常興奮による毛様体筋の調節緊張が認められ（西山、1992；Nakamura, 1996）、調節機能異常が生じる。そのため、眼精疲労の評価は、眼の調節機能を検査することで行われている。なお、眼の調節機能を担う毛様体筋は、自律神経系の支配を受けるため、調節は情動性の精神心理的刺激にも影響される。視覚情報処理にメンタルストレスや認知要求（cognitive demand）などの負荷が加味された場合には、調節はさらに緊張する方向へと反応することが報告（Bullimore *et al.*, 1992；Iwasaki, 1993；Wolffsohn *et al.*, 1998；Wolffsohn *et al.*, 1999）されており、このことは、眼精疲労には精神疲労が深く関わることを示唆している。近年になり、調節微動高周波成分の出現頻度（high frequency component；HFC）を測定することで、他覚的な調節機能の測定が可能な調節機能解析装置が開発された（梶田, 2006）。調節微動は、静止した指標を固視している時に生じる他覚屈折値の揺れであり、HFCは毛様体の活動状態を反映した指標である。眼の疲労症状を訴える被験者のHFCは、症状を訴えていない被験者と比較すると、調節負荷が少ない状態でも高値を示すことが明らかとなっている（鈴木ら, 2001）。HFCの変動を調べることで、毛様体筋の緊張度合いを知ることが出来ることから眼精疲労の評価にも適しているとされ、実際にHFCを指標に眼の疲労の評価が行われている（高橋ら, 2004；本多ら, 2006）。

クロセチンは、抗酸化作用を示すこと（第1章）、あるいは眼血流の改善作用（Xuan *et al.*, 1999）や眼炎症の抑制作用（Nagaki *et al.*, 2003）が報告されており、毛様体の緊張状態を緩和する可能性が考えられる。また、第1章にて、クロセチンをラットに経口摂取させた場合でも眼へと移行すること、第3章にてヒトにおいても血中に吸収されることを確認しており、ヒトにおいても効果が期待される。そこで、本章では、医師により眼精疲労と診断された成人ボランティアを対象に、調節機能解析装置を用いて、クロセチンの4週間連続摂取による眼精疲労改善効果確認試験を実施した。



## 第2節 実験材料および方法

### 4.2.1 対象

対象となる被験者は、株式会社総合医科学研究所（Osaka, Japan）の被験者バンクに登録している有償ボランティアの中から、本試験への参加を自発的に志願した眼精疲労の自覚がある 25 歳以上 40 歳以下の男女とした。試験開始前に実施した予備試験において、視力（矯正視力）検査、オートレフラクトメーターによる他覚的屈折検査、医師による診察（細隙燈顕微鏡検査および眼底検査）および問診（慢性的な目の疲れや、それに付随した頭痛、肩こりなどの自覚症状の有無）を行い、眼精疲労であると判断された 13 名（男性 4 名、女性 9 名）を選定した。ただし、試験開始前のアンケート調査を参考とし、Table 4 の除外基準に当てはまる者は選定対象から除外した。

**Table 4 被験者の除外基準**

---

・ 食品アレルギーの既往歴のある者
・ 眼瞼内反症や睫毛乱生症のある者
・ 器質的眼疾患のある者
・ 医薬品を投与されている者あるいは自ら常飲している者
・ 眼精疲労に影響のあるとされている健康食品を自ら常飲している者
・ 本試験開始前に他の臨床試験に参加中の者
・ 食生活が乱れている者
・ 乱視測定値が1.25D以上の者
・ 睡眠が充分でない者
・ 暴飲暴食が認められる者
・ 試験責任医師または試験分担医師により参加が不相当と判断された者

---

この 13 名 26 眼の VDT 負荷後の HFC-1 値（後述）および調節反応量を測定し、外部機関であるstattcom株式会社（Tokyo, Japan）が、年齢、性別、HFC-1 値、調節反応量の背景が揃うように 2 群に割付を行った ( $p > 0.2$ )。被験者の眼位は全員正位であり、年齢  $33.0 \pm 5.0$  歳、球面屈折値  $-2.1 \pm 2.1$  D (0.00 ~ -5.75 D に分布)、円柱屈折値  $-0.49 \pm 0.28$  D であった。また、検査習得時に医師が hole in card 法および問診により優位眼と判断した 13 眼を各被験者の優位眼とした。優位眼における球面屈折値は  $-2.2 \pm 2.1$  D、円柱屈折値は  $-0.52 \pm 0.24$  D であり、非優位眼における球面屈折値は  $-1.9 \pm 2.2$  D、円柱屈折値は  $-0.46$

± 0.32 D であった。本試験では各眼にそれぞれ処置を行ったのではなく、被験者毎の変動を調べているため、被験者数 = n とした。

なお、本試験は、総合医科学研究所および総医研クリニック合同臨床試験審査委員会の承認のもとに行なわれ、ヘルシンキ宣言の主旨に従い、被験者に対しては研究内容、方法などについて十分な説明を行ない、文書による同意を得て実施した。

#### 4.2.2 試験食

試験食は、理研ビタミン株式会社より提供された、クロセチンを高含有するクチナシ黄色素製剤（クロセチン含量 75%）を 10 mg 含むハードカプセル（被験食）およびクチナシ黄色素製剤を含まない、外見上識別不能な対照カプセル（プラセボ）とした。各試験食の原料組成を Table 5 に示した。また、試験実施前に、被験食とプラセボは官能面（外観、におい等）や性状において被験食と区別がつかないことを確認した。また、試験食は被験者毎に乱数を割り付けたコードを使用して配布し、試験が終了して、脱落・除外検討が終了するまでスタットコム株式会社にて厳重にキーを保管した。

**Table 5 試験食の原料組成 [1カプセル(180mg)当たり]**

	mg	
	被験食	プラセボ
クロセチン高含有クチナシ抽出物	10	0
デキストリン	170	180
合計	180	180
1カプセル中に含まれる関与成分（クロセチン）	7.5	0

#### 4.2.3 摂取方法とスケジュール

試験は、無作為割付による二重盲検法を採用したクロスオーバー2 群間比較試験とした。試験期間は、第 1 試験区の試験食摂取期間を 4 週間、ウォッシュアウト期間を 6 週間、第 2 試験区の試験食摂取期間を 4 週間と設定した。第 1 試験区の開始は 11 月 5 日、第 2 試験

区の終了は2月11日であった。第1試験区および第2試験区の摂取期間の前後にVDT負荷試験を実施した。試験の流れをFig. 18に示した。なお、被験者には試験食を毎日摂取することを除いて、それまでの睡眠時間、食生活、喫煙および運動などの日常生活を変えないように指導した。

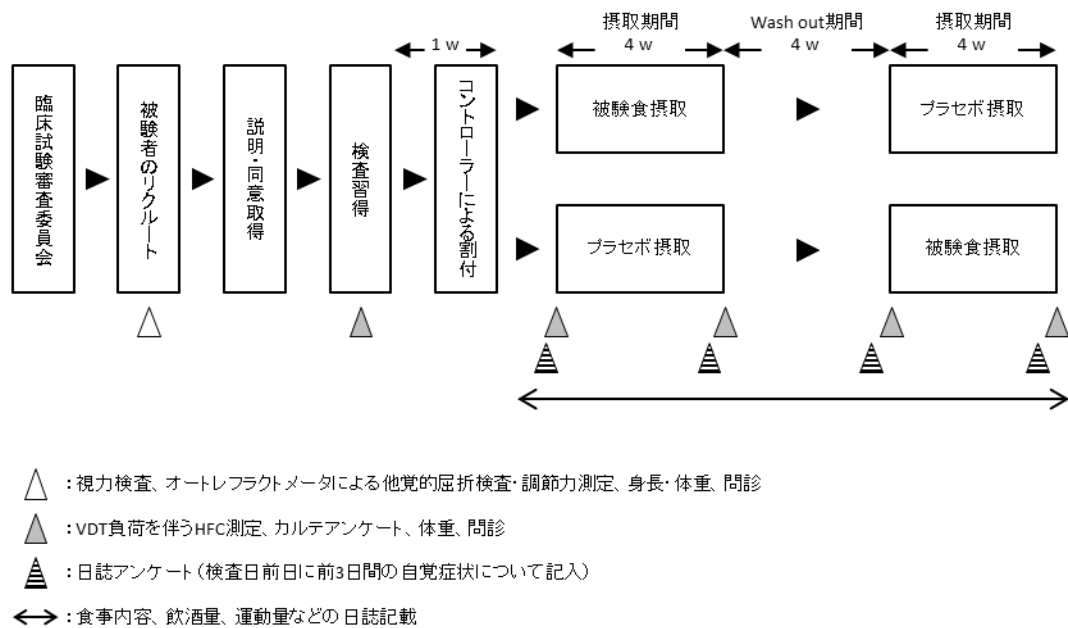


Fig. 18 試験スケジュール

#### 4.2.4 検査項目

##### 4.2.4.1 眼精疲労検査

各検査日に、調節機能解析装置 AA-1 (株式会社 NIDEK, Aichi, Japan) を用いて HFC を測定した。HFC の算出は、測定ごとに計測する最低屈折値を基準に、+0.5 から -3.0 D の間で、遠方から近方に 0.5 D ステップで視標の呈示位置を近づけ、調節応答波形を計測する。得られた波形を、高速フーリエ変換を用いて周波数分析を行い、パワースペクトル曲線 (PS 曲線) を求めた。この PS 曲線から周波数 1.0 ~ 2.3 Hz の区間の平均パワースペクトルを求め、HFC とした。本試験では、被験眼の最低屈折値から -0.75 D までの範囲のフラ

クシオンを HFC-1 領域とし、HFC-1 領域のフラクシオンにおける HFC 値の平均値を眼精疲労測定 の指標とした (鈴木ら, 2001 ; 梶田ら, 2004) 。

また、この装置は同時に調節反応量も測定することが可能であるため、同時に調節反応量も測定した。本試験では、調節負荷 +0.50 D ~ -3.00 D の範囲で検出された最低屈折値と最高屈折値との差を調節反応量として評価した。

HFC-1 および調節反応量の測定は、VDT 負荷の前後、および安静後の計 3 回行い、VDT 負荷前後および安静前後における変化量を調べた (Fig. 19) 。VDT 負荷前後および安静前後の HFC-1 変化量を調べることで毛様体筋の緊張の増減を、調節反応量変化量を調べることで調節力の増減を調べた。VDT 負荷としては Advanced Trail Making Test (精神検査方法および精神機能検査装置 ; ATMT) (梶本, 2003) を用いた 1 時間の負荷作業とした。今回試験に用いた ATMT は、ノートパソコン上の画面にランダムに表示される 26 個のアルファベットのうち、R のみを選択的にマウスで延々とクリックする探索作業であり、視覚的負荷のみならず、精神的負荷をかけることができる。このとき、被験者は眼鏡およびコンタクトレンズは外し、完全矯正に -0.5 D 負荷したレンズを試験枠に装着して作業を行った。VDT 負荷後の安静は、トイレ休憩時間の後に被験者をリクライニングベッドに移動させ、アイマスクを装着して 20 分間休息させた。その際、小さな音量でクラシック音楽を流した。ただし、睡眠は禁止した。AA-1 による測定は右眼、左眼の順で行い、測定に使用した機器は全試験を通して、被験者毎で同じ機体を割り振って使用した。なお、右眼での測定の影響が左眼の測定時に現れないよう、右眼の測定が終わってから左眼の測定に入るまでに、30 秒間の休憩時間を入れた。さらに探索的調査として、優位眼における HFC-1 変化量の、撮取前後での変動眼数についても調査した。

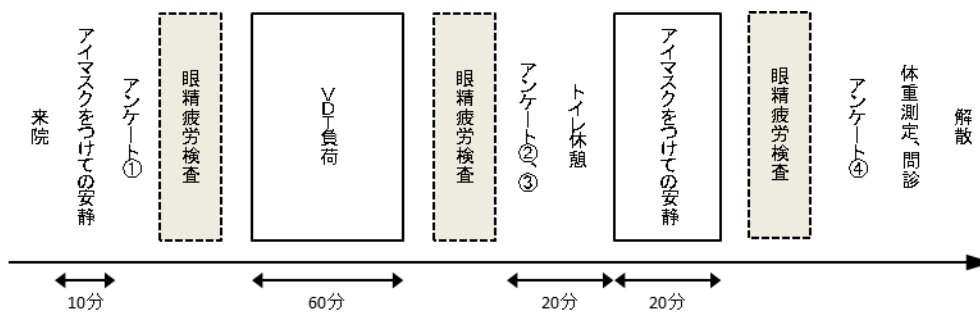


Fig. 19 検査当日の流れ

#### 4.2.4.2 カルテアンケート

各検査日の VDT 負荷前後、および VDT 負荷終了 60 分後に、自覚症状についてアンケートに記入させた。アンケートの項目を Table 6 に示した。

Table 6 カルテアンケート項目

項目	回答
① 眼は疲れやすいですか？	1.非常に疲れやすい 2.疲れやすい 3.時々疲れる 4.あまり疲れない 5.全く疲れない
② ATMTは楽しかったですか？	1.つまらなかった 2.あまり楽しなかった 3.少しは楽しめた 4.楽しかった 5.非常に楽しかった
③ ATMTで眼が疲れたような気がしますか？	1.非常に疲れた 2.疲れた 3.少し疲れた 4.あまり疲れない 5.全く疲れない
④ 休息後に眼の疲れが回復したような気がしますか？	1.かえて疲れが増した 2.全く変わらない 3.あまり変わらない 4.少し回復した 5.回復した 6.非常に回復した

#### 4.2.4.3 日誌アンケート

各検査日前 3 日間の自覚症状について、検査日前日にアンケートに記入させた。アンケートの項目を Table 7 に示した。

Table 7 日誌アンケート項目

項目	回答				
	1	2	3	4	5
① 眼が疲れる	とても疲れている	やや疲れている	ふつう	あまり疲れていない	全然疲れていない
② 眼がいたむ	とてもいたむ	少しいたむ	ふつう	あまりいたみを感じない	全くいたみを感じない
③ 眼がかすむ	とてもかすむ	ややかすむ	ふつう	あまりかすみを感じない	全くかすみを感じない
④ 眼が乾く	とても眼が乾く	やや眼が乾く	ふつう	あまり眼が乾かない	全く眼が乾かない
⑤ 眼が赤くなる	よく赤くなる	時々赤くなる	ふつう	あまり赤くならない	ほとんど赤くならない
⑥ ものがちらついて見える	とてもちらついて見える	ややちらついて見える	ふつう	あまりちらついて見えない	全くちらついて見えない
⑦ ものが二重に見える	とても二重に見える	やや二重に見える	ふつう	あまり二重に見えない	全く二重に見えない
⑧ 肩・腰がこる	とてもこる	ややこる	ふつう	あまりこらない	全くこらない
⑨ いらいらする	とてもいらいらする	ややいらいらする	ふつう	あまりいらいらしない	全然いらいらしない
⑩ 頭が重い	とても重い	やや重い	ふつう	あまり重くない	全く重くない
⑪ 頭が痛い	とてもいたむ	少しいたむ	ふつう	あまりいたみを感じない	全くいたみを感じない
⑫ 眠りの深さ	とても浅い	やや浅い	ふつう	やや深い	とても深い

#### 4.2.4.4 医師による診察および問診

各検査日の全検査終了後に、医師による診察および問診を行ない、眼の疲れ具合、肩の凝り具合、嘔吐、頭痛などの自覚症状や、その他の有害事象の出現について調査した。

#### 4.2.4.5 食事内容、飲酒量、運動量などの日誌記載

試験期間中の食事内容、飲酒量、運動量、排便などについて日誌に記載させ、生活習慣に変更がないかを確認する指標として用いた。

#### 4.2.5 統計解析

実験結果は、平均値±標準偏差 (S.D.) で示した。HFC 変化量の試験食群間比較ならびに試験食摂取前後の比較については、正規分布していることを確認した上で、対応のある  $t$  検定を実施した。また、HFC 変化量の優位眼における解析も行った。カルテアンケートおよび日誌アンケートの摂取前後の比較および試験食群間での比較は Wilcoxon の符号付順位和検定を実施した。なお、統計ソフトは、SPSS Ver. 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL) を使用し、何れの検定においても、有意水準は両側検定で 5%未満とした。

### 第3節 結果

#### 4.3.1 眼精疲労検査

##### 4.3.1.1 HFC-1 変化量

摂取前後の比較において、被験食群では、優位眼の安静前後の変化量が摂取後に有意に低下 [摂取前  $1.63 \pm 5.99$  ( $n = 13$ ) , 摂取後  $-2.91 \pm 5.46$  ( $n = 13$ ) ] した。群間比較では、摂取後の優位眼の安静前後の変化量において、被験食群は、プラセボ群より有意な低下 [被験食群  $-2.91 \pm 5.46$  ( $n = 13$ ) , プラセボ群  $0.48 \pm 7.25$  ( $n = 13$ ) ] が認められた (Table 8, Fig. 20) 。

Table 8 眼精疲労検査

項目	群	n	VDT負荷前後の変化量		安静前後の変化量					
			摂取前	摂取後	摂取前	摂取後				
HFC-1 変化量	C	13	-0.27	± 4.71	0.61	± 5.61	0.72	± 4.44	-1.10	± 3.45
			0.05	± 4.88	0.22	± 5.49	2.14	± 3.19	0.13	± 4.60
	P	13	-1.63	± 5.53	1.43	± 9.23	1.63	± 5.99	-2.91	± 5.46 *
			1.09	± 5.32	-0.05	± 6.80	3.78	± 6.68	0.48	± 7.25 ]##
調節反応量 (D)	C	13	-0.16	± 0.36	-0.14	± 0.58	0.14	± 0.32	0.03	± 0.70
			-0.13	± 0.34	-0.31	± 0.42	0.21	± 0.39	0.26	± 0.32
	P	13	-0.28	± 0.56	0.04	± 0.89	0.15	± 0.54	-0.02	± 1.07
			-0.16	± 0.65	-0.42	± 0.56	0.38	± 0.52	0.32	± 0.36

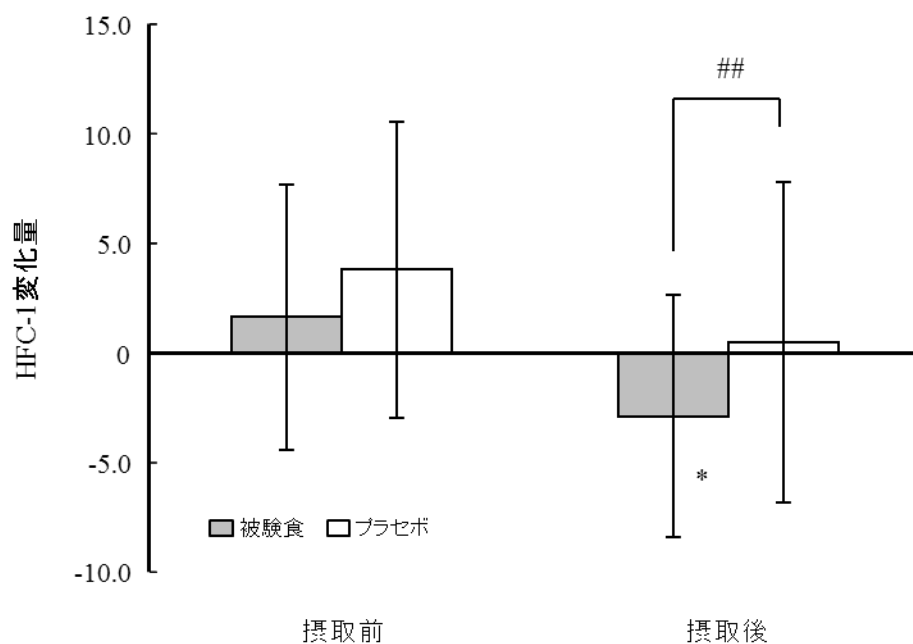
HFC : high frequency component、VDT : visual display terminal、C : クロセチン (被験食)、P : プラセボ

数値は平均値 ± 標準偏差

摂取前との比較 : \* p < 0.05

試験食群間での比較 : ## p < 0.01





**Fig. 20 安静前後の変化量(優位眼)**  
 摂取前との比較: \*  $p < 0.05$  (対応のある  $t$  検定)  
 試験食群間の比較: ##  $p < 0.01$  (対応のある  $t$  検定)

#### 4.3.1.2 調節反応量変化量

摂取前後の比較および群間での比較において、有意な差は認められなかった (Table 8)。

#### 4.3.1.3 優位眼での HFC-1 変化量変動眼数

安静前後の優位眼における HFC-1 変化量において、被験食群では摂取前は安静後増加 7 眼、減少 6 眼であったのに対し、摂取後に増加 3 眼、減少 10 眼と推移していた。プラセボ群では摂取前、摂取後ともに増加 9 眼、減少 4 眼であった (Table 9)。

**Table 9 優位眼での変動眼数**

項目	群	VDT負荷前後の変化量		安静前後の変化量		
		摂取前	摂取後	摂取前	摂取後	
HFC変化量	C	増加	4	6	7	3
		減少	9	7	6	10
	P	増加	6	6	9	9
		減少	7	7	4	4
調節反応量変化量	C	増加	4	6	8	9
		減少	9	7	5	4
	P	増加	5	3	11	11
		減少	8	10	2	2

HFC；high frequency component、VDT；visual display terminal、C；クロセチン（被験食）、P；プラセボ  
数値は優位眼の数

#### 4.3.2 カルテアンケート

摂取前後の比較および群間での比較において、有意な差は認められなかった（Table. 10）。

**Table 10 カルテアンケート**

検査項目	群	n	摂取前		摂取後	
			平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
① 眼は疲れやすいですか？	C	13	1.6	± 0.7	1.8	± 0.8
	P	13	1.8	± 0.7	2.0	± 1.0
② ATMTは楽しかったですか？	C	13	2.8	± 0.8	3.1	± 0.9
	P	13	3.1	± 1.0	3.0	± 1.2
③ ATMTで眼が疲れたような気がしますか？	C	13	2.2	± 1.1	2.1	± 1.2
	P	13	2.5	± 1.1	2.4	± 1.0
④ 休息後に眼の疲れが回復したような気がしますか？	C	13	4.1	± 0.9	3.9	± 1.3
	P	13	4.1	± 1.0	4.4	± 0.8

C；クロセチン（被験食）、P；プラセボ

数値は平均値±標準偏差

#### 4.3.3 日誌アンケート

摂取前後の比較において摂取後に、「12.眠りの深さ」の被験食群で有意な上昇が認められた。また群間での比較において、「5.眼が赤くなる」の摂取前に、被験食群がプラセボ群より有意に高値であった（Table 11）。

Table 11 日誌アンケート

検査項目	群	n	摂取前			摂取後		
			平均値	標準偏差	標準偏差	平均値	標準偏差	標準偏差
① 眼が疲れる	C	13	1.8	±	0.7	2.1	±	0.9
	P	13	1.9	±	0.6	2.0	±	0.9
② 眼がいたむ	C	13	3.4	±	1.2	3.2	±	1.1
	P	13	3.2	±	1.1	3.5	±	1.1
③ 眼がかすむ	C	13	3.0	±	1.1	2.9	±	1.1
	P	13	3.0	±	1.0	3.1	±	1.2
④ 眼が乾く	C	13	2.2	±	0.9	2.5	±	1.3
	P	13	2.0	±	0.8	2.5	±	1.0
⑤ 眼が赤くなる	C	13	2.9	±	1.1	3.2	±	1.1
	P	13	2.5	±	1.3	2.8	±	1.2
⑥ ものがちらついて見える	C	13	3.2	±	1.1	3.7	±	1.3
	P	13	3.5	±	1.4	3.6	±	1.3
⑦ ものが二重に見える	C	13	3.2	±	1.2	3.6	±	1.3
	P	13	3.3	±	1.3	3.5	±	1.3
⑧ 肩・腰がこる	C	13	1.8	±	0.7	2.0	±	0.9
	P	13	1.8	±	0.7	1.9	±	0.5
⑨ いらいらする	C	13	2.8	±	0.9	3.0	±	1.0
	P	13	2.8	±	0.8	2.9	±	1.0
⑩ 頭が重い	C	13	2.6	±	0.9	2.8	±	1.0
	P	13	2.9	±	1.1	2.6	±	1.0
⑪ 頭が痛い	C	13	3.2	±	0.7	3.4	±	1.0
	P	13	3.2	±	0.9	3.0	±	1.0
⑫ 眠りの深さ	C	13	2.5	±	0.7	2.9	±	1.0
	P	13	2.7	±	0.9	2.7	±	0.9

C：クロセチン（被験食）、P：プラセボ

数値は平均値±標準偏差

摂取開始日との比較：\* $p < 0.05$ （Wilcoxonの符号付順位検定）

試験食群間での比較：# $p < 0.05$ （Wilcoxonの符号付順位検定）

#### 4.3.4 有害事象および生活習慣

試験期間中に試験食が原因で起こったと思われる明らかな有害事象は認められなかった。

また、試験期間中に大きな生活習慣の変化が認められた被験者はいなかった。

#### 第4節 考察

眼精疲労時には調節機能の低下が認められるため、眼精疲労の評価には、調節機能検査が行われている。本試験で用いた調節機能解析装置は、毛様体筋の緊張状態と HFC の相関

に着目した装置であり、他覚的に毛様体筋の緊張を定量化することができる（鈴木ら、2001；高橋ら、2004）。そこで、本装置を用いてクロセチンの眼精疲労改善効果について、VDT 負荷作業による HFC の変化を指標として評価を行った。

眼精疲労には精神的な疲労も関与していると考えられていることから（Bullimore *et al.*, 1992；Iwasaki, 1993；Wolffsohn *et al.*, 1998；Wolffsohn *et al.*, 1999）、VDT 負荷には視覚的な負荷だけでなく、精神的な負荷もかけることのできる ATMT を用いた。また、本試験では、最低屈折値から -0.75 D までの範囲（HFC-1 領域）の HFC の値（HFC-1 値）を眼精疲労の指標とした。これは、視標が近方に近づき、調節負荷が大きくなると、調節異常の場合を除いて HFC 値は一様に高くなってしまい、HFC 値を用いた比較が困難になるためである。なお、HFC-1 値は前日の睡眠不足や、当日の精神状態、体調、気温や天候などにより変化する可能性があるため、本試験のような VDT 負荷および休息による HFC-1 値の変動を観察する試験の場合、VDT 負荷後にどれだけ HFC-1 値が上昇するか、また安静後にどれだけ下降するか等の変化量を用いた解析を行う必要があると考えられる。

安静前後における HFC-1 変化量の左右平均での解析において、有意ではないものの、被験食群で摂取後に改善する傾向を示した（ $p = 0.062$ ）。また、より酷使したと推測される優位眼での解析においては、摂取後に有意な改善が認められ、群間でも有意な差が認められた（Table 8）。このことから、被験食群では、VDT 作業によって生じた毛様体筋の緊張が素早く緩和されたことが考えられる。眼精疲労を訴える人の多くは、慢性的に眼が疲れた状態が持続しており、HFC-1 値を測定すると、健常人よりも高い値が計測される（鈴木ら、2001）。また、VDT 負荷作業を行い、負荷がかかった後に休息時間を与えても、HFC-1 の値が低下しないどころか、休息時間後にかえって数値が上昇し、毛様体筋がさらに緊張すること、つまり、眼の疲れが増加することが認められている（高橋ら、2004）。優位眼において安静前後の HFC-1 変化量が変動した眼数を調べたところ、被験食群において摂取後に HFC-1 変化量が減少した眼数が大きく増加しており、クロセチンの摂取が眼精疲労症状を緩和した可能性が考えられる。今回の試験では例数が 13 と少なかったため、

HFC-1 変化量の左右平均での解析では有意な差は認められなかったものの、優位眼における解析では摂取前後の比較および群間比較において有意な改善が認められ、クロセチンの連続摂取は、安静後における毛様体の緊張状態の緩和を促すことが示唆された。クロセチンはヒトにおいて経口摂取後、速やかに吸収され血中に移行し（第 3 章）、また、ラットではあるが血液網膜関門を通過することが示唆されることから（第 1 章）、毛様体筋にも直接作用していると考えられる。筋疲労には、活性酸素が関与することが知られており、抗酸化作用を有するクロセチンが存在することで、酸化ストレスが低減され、筋疲労が緩和された可能性がある。また、クロセチンの抗炎症作用、血流改善作用により、毛様体筋に栄養供給している微小循環動態を改善することで、毛様体筋の緊張が緩和されたと考えられる。

調節反応量の測定では摂取前後の比較においても、群間の比較においても有意な差は認められなかった。HFC-1 で有意な差が検出されたのに対して、調節反応量では有意差を認められなかったのは、調節力の測定では被験者が視標を見ようとする努力の僅かな差が測定結果に反映されてしまうため（丸尾, 1999）、調節機能に著しい差がない場合には、-3 D 程度の軽い調節負荷では被験者の調節努力の揺らぎに埋もれてしまった可能性がある。また、本試験において対象とした 40 歳以下の被験者では、調節反応量で変化を観察するには調節負荷が軽すぎた可能性も否定できない。

日誌アンケートにおいて、被験食群で摂取後に有意に改善が確認された項目に「眠りの深さ」がある。長時間の VDT 作業に従事している人は、身体的・精神的な症状と同時に、入眠障害や中途覚醒、早朝覚醒等の睡眠障害を自覚しているという報告がなされている（Nakazawa *et al.*, 2002）。眠りが深くなることで睡眠の質が向上すると、身体的および精神的な疲労感は改善すると考えられる。眼の疲れに関しては、HFC-1 では有意な完全が認められたのに対し、自覚症状においては有意な改善は認められなかった。本試験では例数が 13 と少なく、自覚症状の評価を 5 段階、もしくは 6 段階の評価で行ったため、自覚症状では結果がみえにくかった可能性も考えられる。

現在、眼精疲労症状を訴える人に対して、点眼による毛様体筋の緊張緩和や涙量調節などの治療が行われている。本試験の結果より、クロセチンの連続摂取は、VDT 作業によって生じる毛様体筋の緊張に対して、安静による緩和を促し、毛様体筋が慢性的な緊張状態に陥るのを防ぐ可能性が示唆された。また、深い睡眠をとることで身体的のみならず、精神的疲労が改善した可能性も示唆される。これらのことから、クロセチンは眼精疲労状態を改善し、また眼精疲労症状に陥りにくくする効果を有することが示唆された。

## 総括および結論

クチナシの果実やサフランに含まれるカロテノイドであるクロセチンは、種々の薬理作用を有することが報告されている。しかしながら、クロセチンの眼に対する薬理作用については研究報告が少なく、眼機能障害に対する有用性は十分に明らかとなっていない。そこで、本研究ではまず、クロセチンの抗酸化作用について確認し、酸化ストレスによる網膜神経細胞死に対するクロセチンの作用について検討した。ついで、マウスを用いて、光誘発網膜障害に対するクロセチンの網膜保護作用を検討した。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell ; HUVEC) およびヒト網膜毛細血管内皮細胞 (Human Retina Microvascular Endothelial Cell ; HRMEC) を用いて、VEGF 誘導による血管新生に対するクロセチンの作用およびその作用機序について検討した。さらに、ヒトにおける有用性を検討するために重要となるクロセチンの吸収に関する情報を得るため、ヒトにおける単回経口投与後のクロセチンの血中動態について検討した。最後に、現代社会になって大きな問題となっている眼機能障害の一つである眼精疲労に対するクロセチンの作用を調べるため、医師により眼精疲労と診断された成人ボランティアを対象に、クロセチンの眼精疲労改善効果確認試験を実施した。

第 1 章では、クロセチンの抗酸化活性と光誘発網膜障害に対する保護効果について検討した。

1. 電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いた抗酸化活性測定において、クロセチンはヒドロキシラジカルを直接的に消去する活性を示した。
2. クロセチンは、過酸化水素誘発による網膜神経節細胞の細胞死を抑制した。一方、細胞死を抑制する濃度では、活性酸素の産生を抑制しなかった。
3. クロセチンは、酸化ストレスで誘導されるカスパーゼの活性化を抑制したことにより細胞死を抑制すると考えられた。
4. クロセチンは、ラットに経口投与後、房水に移行した。

5. マウスを用いた光誘発網膜障害モデルにおいて、クロセチンは、光誘発による視機能障害を抑制した。また、網膜外顆粒層の萎縮を抑制し、死細胞数が減少した。

第 2 章では、クロセチンの血管新生に対する作用を *in vitro* 血管新生モデル（細胞増殖、細胞遊走、管腔形成試験）を用いて検討した。また、その作用機序を検討するため、MAPキナーゼ（p38）の活性化に対する作用を検討した。さらに血管透過性に関与する細胞接着分子に対する作用を検討した。

1. クロセチンは、VEGF 誘発による管腔形成を抑制した。
2. クロセチンは VEGF 誘発による細胞増殖を抑制しなかったが、細胞遊走を抑制した。
3. クロセチンは VEGF 誘発による p38 の活性化を抑制した。
4. VEGF により、細胞接着分子である VE-cadherin および ZO-1 の発現が低下した。クロセチンは、VEGF による VE-cadherin の発現低下を抑制したが、ZO-1 に対しては明らかな作用を示さなかった。

第 3 章では、ヒトにおけるクロセチンの吸収を調べるため、成人ボランティアを対象に、単回経口投与後のクロセチン血中動態について検討した。

1. クロセチンは、投与後、速やかに吸収され、約 4 時間で最高血中濃度に達し、用量依存性を示した。
2. 最高血中濃度に達した後、徐々に血中濃度は減少し、投与 24 時間後では、検出限界に近い濃度となり、速やかに血漿中から消失した。

第 4 章では、近年になり症状を訴える人が増大している眼機能障害の一つである眼精疲労に対するクロセチンの作用を、医師の診断により眼精疲労と診断された成人ボランティアを対象にプラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較試験により検討した。眼精疲労時に



は、調節機能異常が生じることから、毛様体の活動状態を反映した指標である調節微動高周波成分の出現頻度（high frequency component ; HFC）を測定することで評価した。

1. 4週間のクロセチン摂取により、ディスプレイを使用した作業により視覚に負荷をかけるVDT負荷後の安静休息後のHFC値が減少した。
2. 自覚アンケートにより眠りの深さが摂取後に改善した。

以上、本研究はクロセチンの眼機能障害に対する薬理学的作用について細胞、動物およびヒトを用いて明らかにした。クロセチンは、光誘発による視機能障害を抑制し、網膜を保護する作用を示した。また、異常な血管新生を抑制することを明らかにした。このことから、クロセチンは、加齢黄斑変性症の予防ならびに進展抑制に寄与する可能性が示唆された。また、クロセチンは、ヒトにおいて経口摂取後に速やかに吸収され、毛様体の緊張を緩和し、眼精疲労を改善する可能性が示唆された。

## 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と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。

本研究に際して終始御懇切なる御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 嶋澤雅光博士ならびに助教 鶴間一寛博士に深謝いたします。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。

また、本研究の遂行にあたり、有益な御助言およびご指導を賜りました梶田眼科院長 梶田雅義博士に深謝致します。

本論文の審査を務めていただき、有益な御助言を賜りました岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室教授 稲垣直樹博士、岐阜薬科大学実践薬学大講座医薬品情報学研究室教授 中村光浩博士および岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物動態学研究室教授 北市清幸博士に深謝致します。

最後に、本研究の遂行ならびに本論文の作成機会を与えて頂きました理研ビタミン株式会社代表取締役社長 堺美保氏、取締役 仲野隆久博士に深く感謝いたします。あわせて諸種のご協力を頂きましたヘルスケア事業部諸氏に心から感謝致します。

## 引用文献

Ahmad, A.S., Ansari, M.A., Ahmad, M., Saleem, S., Yousuf, S., Hoda, M.N., Islam, F. (2005) Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **81**, 805-813.

Aiello, L.P., Avery, R.L., Arrigg, P.G., Keyt, B.A., Jampel, H.D., Shah, S.T., Pasquale, L.R., Thieme, H., Iwamoto, M.A., Park, J.E., Nguyen, H.V., Aiello, L.M., Ferrara, N., King, G.L. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.*, **331**, 1480-1487.

Alessio, H.M. (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **25**, 218-224.

Asai, A., Nakano, T., Takahashi, M., Nagao, A. (2005) Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7302-7306.

Baskaran, V., Sugawara, T., Nagao, A. (2003) Phospholipids affect the intestinal absorption of carotenoids in mice. *Lipids*, **38**, 705-711.

Bie, X., Chen, Y., Zheng, X., Dai, H. (2011) The role of crocetin in protection following cerebral contusion and in the enhancement of angiogenesis in rats. *Fitoterapia*, **82**, 997-1002.

Bowen, P.E., Herbst-Espinosa, S.M., Hussain, E.A., Stacewicz-Sapuntzakis, M. (2002) Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. *J. Nutr.*, **132**, 3668-3673.

Bowmaker, J.K., Astell, S., Hunt, D.M., Mollon, J.D. (1991) Photosensitive and photostable pigments in the retinae of Old World monkeys. *J. Exp. Biol.*, **156**, 1-19.

Bullimore, M.A., Gilmartin, B., Royston, J.M. (1992) Steady-state accommodation and ocular biometry in late-onset myopia. *Doc. Ophthalmol.*, **80**, 143-155.

Cai, J., Wu, L., Qi, X., Li, Calzi S., Caballero, S., Shaw, L., Ruan, Q., Grant, M.B., Boulton, M.E. (2011) PEDF regulates vascular permeability by a  $\gamma$ -secretase-mediated pathway. *PLOS ONE*, **6**, e21164.

Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot. V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M.C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.M., Collen, D., Dejana, E. (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, **98**, 147-157.

Chrysostomou, V., Rezaia, F., Trounce, I.A., Crowston, J.G. (2013) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **13**, 12-15.

Dejana, E., Orsenigo, F., Lampugnani, M.G. (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.*, **121**, 2115-2122.

Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., Weinstein, B.M. (2009) The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Cev. Cell*, **16**, 209-221.

Falsini, B., Piccardi, M., Minnella, A., Savastano, C., Capoluongo, E., Fadda, A., Balestrazzi, E., Maccarone, R., Bisti, S. (2010) Influence of saffron supplementation on retinal flicker sensitivity in early age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 6118-6124.

Ferrara, N. (1995) The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.*, **36**, 127-137.

Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, **9**, 669-676.

Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, **1**, 27-31.

Gustin, D.M., Rodvold, K.A., Sosman, J.A., Diwadkar-Navsariwala, V., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Viana, M., Crowell, J.A., Murray, J., Tiller, P., Bowen, P.E. (2004) Single-dose pharmacokinetic study of lycopene delivered in a well-defined food-based lycopene delivery system (tomato paste-oil mixture) in healthy adult male subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13**, 850-860.

Gutheil, W.G., Reed, G., Ray, A., Anant, S., Dhar, A. (2012) Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **13**, 193-179.

Holloway, G.M., Gainer, J.L. (1988) The carotenoid crocetin enhances pulmonary oxygenation. *J. Appl. Physiol.*, **65**, 683-686.

Iwasaki, T. (1993) Effects of a visual task with cognitive demand on dynamic and steady-state accommodation. *Ophthalmic. Physiol. Opt.*, **13**, 285-290.

Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Tajmir-Riahi, H.A., Polissiou, M.G. (2007) Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: stability and antioxidative properties. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 65-70.

Kanan, Y., Moiseyev, G., Agarwal, N., Ma, J.X, Al-Ubaidi, M.R. (2007) Light induces programmed cell death by activating multiple independent proteases in a cone photoreceptor cell line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 40-51.

Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., Connolly, D.T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, **246**, 1309-1312.

Kendall, R.L., Thomas, K.A. (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 10705-10709.

Khandhadia, S., Lotery, A. (2010) Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert Rev. Mol. Med.*, **12**, e34.

Kim, J.H., Kim, J.H., Jun, H.O., Yu, Y.S., Kim, K.W. (2010) Inhibition of protein kinase C delta attenuates blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Am. J. Pathol.*, **176**, 1517-1524.

Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature*, **362**, 841-844.

Koriyama, Y., Ohno, M., Kimura, T., Kato, S. (2009) Neuroprotective effects of 5-S-GAD against oxidative stress-induced apoptosis in RGC-5 cells. *Brain Res.*, **1296**, 187-195.

Kostic, D., White, W.S., Olson, J.A. (1995) Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 604-610.

Krinsky, N.I. (1989) Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic. Biol. Med.*, **7**, 617-635.

Kuratsune, H., Umigai, N., Takeno, R., Kajimoto, Y., Nakano, T. (2010) Effect of crocetin from *Gardenia jasminoides* Ellis on sleep: a pilot study. *Phytomedicine*, **17**, 840-843.

Lee, C.M., Boileau, A.C., Boileau, T.W., Williams, A.W., Swanson, K.S., Heintz, K.A., Erdman, J.W. Jr. (1999) Review of animal models in carotenoid research. *J. Nutr.*, **129**, 2271-2277.

Lee, M.C., Shoji, H., Miyazaki, H., Yoshino, F., Hori, N., Miyake, S., Ikeda, Y., Anzai, K., Ozawa, T. (2003) Measurement of oxidative stress in the rodent brain using computerized electron spin resonance tomography. *Magn. Reson. Med. Sci.*, **2**, 79-84.

Lee, M.C., Shoji, H., Miyazaki, H., Yoshino, F., Hori, N., Toyoda, M., Ikeda, Y., Anzai, K., Ikota, N., Ozawa, T. (2004) Assessment of oxidative stress in the spontaneously hypertensive rat brain using electron spin resonance (ESR) imaging and in vivo L-Band ESR. *Hypertens. Res.*, **27**, 485-492

Liu, T.Z., Qian, Z.Y. (2002) Pharmacokinetics of crocetin in rats. *Acta Pharmacoeutica Sinica.*, **37**, 367-369. (In Chinese)

McMullen, M.E., Bryant, P.W., Glembotski, C.C., Vincent, P.A., Pumiglia, K.M. (2005) Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 20995-21003.

Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H., Risau, W., Ullrich, A. (1994) Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature*, **367**, 576-579.

Mittag, T.W., Bayer, A.U., La, VAIL, M.M. (1999) Light-induced retinal damage in mice carrying a mutated SOD I gene. *Exp. Eye Res.*, **69**, 677-683.

Nagaki, Y., Hayasaka, S., Abe, T., Zhang, X.Y., Hayasaka, Y., Terasawa, K. (2003) Effects of oral administration of Gardeniae fructus extract and intravenous injection of crocetin on lipopolysaccharide- and prostaglandin E2-induced elevation of aqueous flare in pigmented rabbits. *Am. J. Chin. Med.*, **31**, 729-738.

Nakamura, Y. (1996) Measurement of papillary unrest in eyestrain *Jpn. J. Ophthalmol.*, **40**, 533-539.



Nakazawa, T., Okubo, Y., Suwazono, Y., Kobayashi, E., Komine, S., Kato, N., Nogawa, K. (2002) Association between duration of daily VDT use and subjective symptoms. *Am. J. Ind. Med.*, **42**, 421-426.

Ochiai, T., Ohno, S., Soeda, S., Tanaka, H., Shoyama, Y., Shimeno, H. (2004) Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alpha-tocopherol. *Neurosci. Lett.*, **362**, 61-64.

Ogasawara, Y., Namai, T., Yoshino, F., Lee, M.C., Ishii, K. (2007) Sialic acid is an essential moiety of mucin as a hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.*, **581**, 2473-2477.

Parker, R.S. (1996) Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.*, **10**, 42-551.

Piccardi, M., Marangoni, D., Minnella, A.M., Savastano, M.C., Valentini, P., Ambrosio, L., Capoluongo, E., Maccarone, R., Bisti, S., Falsini, B. (2012) A longitudinal follow-up study of saffron supplementation in early age-related macular degeneration: sustained benefits to central retinal function. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2012**, 429124.

Pitsikas, N., Boultadakis, A., Georgiadou, G., Tarantilis, P.A., Sakellaridis, N. (2008) Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety. *Phytomedicine*, **15**, 1135-1139.

Plank, M.J., Sleeman, B.D. (2003) A reinforced random walk model of tumour angiogenesis and anti-angiogenic strategies. *Math. Med. Biol.*, **20**, 135-181.

Powers, S.K., Jackson, M.J. (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.*, **88**, 1243-1276.

Redondo, P., Bandrés, E., Solano, T., Okroujnov, I., García-Foncillas, J. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and melanoma. N-acetylcysteine downregulates VEGF production in vitro. *Cytokine*, **12**, 374-378.

Risau., W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-674.

Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., Huot, J. (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, **15**, 2169-2177.

Satoh, T., Enokido, Y., Aoshima, H., Uchiyama, Y., Hatanaka, H. (1997) Changes in mitochondrial membrane potential during oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.*, **50**, 413-420.

Schmidt, M., Giessel, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., Burmester, T. (2003) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J. Biol. Chem.*, **278**, 1932-1935.

Shahinfar, S., Edward, D.P., Tso, M.O. (1991) A pathologic study of photoreceptor cell death in retinal photic injury. *Curr. Eye. Res.*, **10**, 47-59.

Shen, X.C. and Qian, Z.Y. (2006) Effects of crocetin on antioxidant enzymatic activities in cardiac hypertrophy induced by norepinephrine in rats. *Pharmazie.*, **61**, 348-352.

Sheng, L., Qian, Z., Shi, Y., Yang, L., Xi, L., Zhao, B., Xu, X., Ji, H. (2008) Crocetin improves the insulin resistance induced by high-fat diet in rats. *Br. J. Pharmacol.*, **154**, 1016-1024.

Shimazawa, M., Yamashima, T., Agarwal, N., Hara, H. (2005) Neuroprotective effects of minocycline against in vitro and in vivo retinal ganglion cell damage. *Brain Res.*, **1053**, 185-194.

Sone, H., Kawakami, Y., Okuda, Y., Kondo, S., Hanatani, M., Suzuki, H., Yamashita, K. (1996) Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 193-198.

Tanskanen, M., Atalay, M., Uusitalo, A. (2010) Altered oxidative stress in overtrained athletes. *J. Sports Sci.*, **28**, 309-317.

Tashakori-Sabzevar, F., Hosseinzadeh, H., Motamedshariaty, V.S., Movassaghi, A.R., Mohajeri, S.A. (2013) Crocetin attenuates spatial learning dysfunction and hippocampal injury in a model of vascular dementia. *Curr. Neurovasc. Res.*, **10**, 325-334.

Taylor, H.R., West, S., Munoz, B., Rosenthal, F.S., Bressler, S.B., Bressler, N.M. (1992) The long-term effects of visible light on the eye. *Arch. Ophthalmol.*, **110**, 99-104.

Tsuruma, K., Nakagawa, T., Morimoto, N., Minami, M., Hara, H., Uehara, T., Nomura, Y. (2006) Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1 binds to initiator procaspases and inhibits ischemia-induced apoptosis and neuronal injury. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11397-11404.

Vahdati, Hassani, F., Naseri, V., Razavi, B.M., Mehri, S., Abnous, K., Hosseinzadeh, H. (2014) Antidepressant effects of crocin and its effects on transcript and protein levels of CREB, BDNF, and VGF in rat hippocampus. *Daru.*, **22**, 16

Wolffsohn, J.S., Edgar, G.K., Stone, H.E., Williams, M., McBrien, N.A. (1999) Does over-accommodation occur when using aircraft head-up display? *Aviat. Space Environ. Med.*, **70**, 666-673.

Wolffsohn, J.S., McBrien, N.A., Edgar, G.K., Stout, T. (1998) The influence of cognition and age on accommodation, detection rate and response times when using a car head-up display (HUD). *Ophthalmic. Physiol. Opt.*, **18**, 243-253.

Wong-Riley, M.T. (2010) Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain*, **2**, 99-116.

Wu, J., Gorman, A., Zhou, X., Sandra, C., Chen, E. (2002) Involvement of caspase-3 in photoreceptor cell apoptosis induced by in vivo blue light exposure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 3349-3354.

Wu, L.W., Mayo, L.D., Dunbar, J.D., Kessler, K.M., Baerwald, M.R., Jaffe, E.A., Wang, D., Warren, R.S., Donner, D.B. (2000) Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 5096-5103.

Xuan, B., Zhou, Y.H., Li, N., Min, Z.D., Chiou, G.C. (1999) Effects of crocin analogs on ocular blood flow and retinal function. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **15**, 143-152.

Yamamoto, M., Lidia, K., Gong, H., Onitsuka, S., Kotani, T., Ohira, A. (1999) Changes in manganese superoxide dismutase expression after exposure of the retina to intense light. *Histochem. J.*, **31**, 81-87.

Zheng, S., Qian, Z., Sheng, L., Wen, N. (2006) Crocetin attenuates atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits through inhibition of LDL oxidation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **47**, 70-76.

Zhi, J., Melia, A.T., Koss-Twardy, S.G., Arora, S., Patel, I.H. (1996) The effect of orlistat, an inhibitor of dietary fat absorption, on the pharmacokinetics of beta-carotene in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 152-159.

江頭亨, 高山房子. (2002) フリーラジカルと酸化ストレス - ESR による測定法を中心に -. *日薬理誌*, **120**, 229-236.

梶田雅義. (2006) 調節. *眼科*, **48**, 47-54.

梶田正義, 高橋奈々子, 高橋文男. (2004) 調節負荷とドライアイー関係の可能性について一. *視覚の科学*, **25**, 40-45.

梶本修身. (2003) ATMT を用いた疲労定量化法の開発. *疲労と休養の科学*, **18**, 13-19.

梶本修身, 天野浩之. (2009) ストレスと眼精疲労. *眼科*, **51**, 397-407.

厚生労働省. (2009) 平成 20 年技術革新と労働に関する実態調査結果の概況. 厚生労働省 Web サイト (<http://www.mhlw.go.jp/toukei/itiran/roudou/saigai/anzen/08/>)

鈴木節子, 梶田正義, 加藤桂一郎. (2001) 調節微動の高周波成分による調節機能の評価. *視覚の科学*, **22**, 93-97.

高橋奈々子, 加藤未央, 梶田正義. (2004) IT 機器使用後の休息と調節機能変化. *視覚の科学*, **25**, 78-81.

所敬, 吉田晃敏. (2006) 現代の眼科学 (改訂第 9 版), 53-54, 金原出版

中村芳子. (2010) 眼の疲れ総論. *あたらしい眼科*, **27**, 281-286.

西山文子. (1992) VDT 作業が調節機能に及ぼす影響について. *日眼会誌*, **96**, 209-216.

日本疲労学会. (2012) 抗疲労臨床評価ガイドライン. *日本疲労学会誌*, **7**, 1-13.

本多正史, 石崎太一, 梶本修身, 天野浩之, 梶田雅義, 黒田素央. (2006) 鰹節だし継続摂取が眼精疲労に及ぼす影響. *視覚の科学*, **27**, 95-101.

丸尾敏夫. (1999) 眼科検査法ハンドブック (第 3 版), 62-65. 医学書院

吉川敏一, 内藤裕二, 近藤元治. (1995) 活性酸素の基礎と臨床. *日本内科学雑誌*, **7**, 1186-1191.

## 略語一覧表

AMD	: age-related macular degeneration
ATMT	: advanced trail making test
BCL-2	: B-cell lymphoma 2
CPC	: Clinical Pharmacology Center
CYPMPO	: 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
ERG	: electroretinogram
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
ESR	: electron spin resonance
GPx	: glutathione peroxidase
HFC	: high frequency component
HPLC	: high-performance liquid chromatography
HRMEC	: human retina microvascular endothelial cell
HUVEC	: human umbilical vein endothelial cell
ONL	: outer nuclear layer
p38	: p38 mitogen activated protein kinase
PBS	: phosphate buffered saline
PI	: propidium iodide
ROS	: reactive oxygen species
SOD	: superoxide dismutase
UV	: ultraviolet
VDT	: visual display terminal
VEGF	: vascular endothelial growth factor
$\Delta\Psi_m$	: mitochondrial membrane potential