

—クロスオーバー試験—

鈴木 直子 (SUZUKI Naoko)^{1*} 田中 瑞穂 (TANAKA Mizuho)¹ 佐野 友紀 (SANO Yuki)¹
柿沼 俊光 (KAKINUMA Toshihiro)¹ 馬場 亜沙美 (BABA Asami)¹ 山本 和雄 (YAMAMOTO Kazuo)¹

Key Words：ヒト試験，健康食品，特定保健用食品，機能性表示食品，クロスオーバー試験

Current Status and Issues of Clinical Trials for Efficacy and Safety Evaluation of Health Foods
—Crossover trial—

Keywords: clinical trials, health food, Foods for Specified Health Uses (FOSHU), Foods with Function Claims, crossover trial

Authors:

Naoko Suzuki^{1)*}, Mizuho Tanaka¹⁾, Yuki Sano¹⁾, Toshihiro Kakinuma¹⁾, Asami Baba¹⁾, Kazuo Yamamoto¹⁾

*Correspondence author: Naoko Suzuki

Affiliated institution

¹⁾ ORTHOMEDICO Inc.

2F Sumitomo Fudosan Korakuen Bldg., 1-4-1 Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-0002, Japan.

はじめに

第2回，第3回では，健康食品の有効性・安全性評価によく用いられる試験デザインの1つであるランダム化並行群間比較試験の試験例や統計解析における注意点を解説した。今回は，並行群間比較試験と同様に臨床試験でよく用いられるクロスオーバー試験について概要と試験例を紹介する。

1. クロスオーバー試験の概要

ランダム化比較試験 (RCT) は，第2回，第3回で紹介してきた並行群間比較試験で実施されることがほとんどであるが，クロスオーバー試験 (CO) を実施する場合がある。医薬品の臨床試験では，生物学的同等性試験や薬物動態試験で用いられてきたほか，牧畜業やバイオアッセイの分野にも適用され

てきた¹⁾。COは，生理状態に生じる反応を得るために介入を持続させる必要があることから，一般的には短期的に変化する事象の研究への適用に限られる²⁾。また，複数の介入を順に行うという試験デザインの都合上，介入は一定期間の休止により元の状態に戻り，被験者の疾患や身体機能を恒久的に変化させないものでなければならない²⁾。

COでは並行群間試験と同様に，対象集団をまずランダムに複数の群 (シーケンス) に分ける。この際RCTと同様に被験者背景に差が生じないように注意する必要がある (割付方法の詳細は第2回を参照のこと)。図1は，2群，2期のクロスオーバーデザイン (2×2デザイン) で実施する場合の模式図である。この例では，対象集団を群1および群2にランダムに割り付けた後，群1は第I期で被験食

¹⁾ 株式会社オルトメディコ * 責任著者

〒112-0002 東京都文京区小石川 1-4-1 住友不動産後楽園ビル 2 階

Tel: 03-3818-0610 / Fax: 03-3812-0670

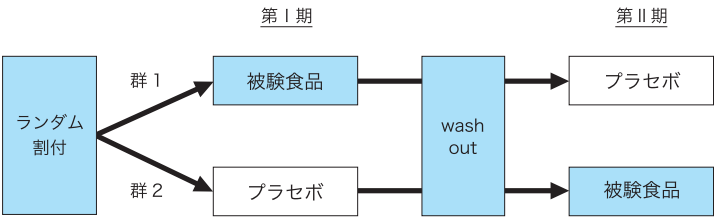


図1 クロスオーバー試験の模式図（2×2デザイン）

品を摂取し、第Ⅱ期ではプラセボを摂取する。一方の群2はその逆であり、第Ⅰ期でプラセボを摂取し、第Ⅱ期では被験食品を摂取する。このように、COでは各被験者が全種類の介入を受け、介入効果を個人ごとに比較するため、介入効果の個人差によ

る影響を取り除くことができ、比較の精度が上がる点がCOの長所である。各被験者が1つの介入のみを受ける並行群間比較試験よりも、同じ症例数で実施するCOの方が、理論上は介入効果をより正確に評価できると言われている²⁾。また、COでは各被験者が全種類の介入を受けるため、並行群間比較試験よりも必要な症例数が少なく済むことが長所の一つである。一方COの短所の一つとして、複数の介入を連続して実施するため、並行群間比較試験よりも試験期間が長くなる場合があるため、被験者の負担が大きくなる可能性がある。また、途中脱落や

表 1-1 CONSORT2010 拡張版における報告事項チェックリスト（抄録）⁵⁾

	項目 (Item)	記述 (Description)	記載箇所 (Reported on ...)
	タイトル (Title)	ランダム化クロスオーバー試験であることを明示。	
	試験デザイン (Trial design)	試験デザインの説明（クロスオーバー試験と期間数）。	
方法 (Method)	参加者 (Participant)	参加者の適格基準（eligibility criteria）とデータが収集されたセッティング（setting）。	
	介入 (Intervention)	参加者に意図された介入。	
	目的 (Objective)	特定の目的または仮説。	
	アウトカム (Outcome)	この報告のために明確に定義された主要アウトカム。	
	ランダム化 (Randomisation)	参加者を各シーケンスに割り振った方法。	
	ブラインディング（マスキング） (Blinding [masking])	参加者、ケア提供者、アウトカム評価者に対し介入の状況がブラインド化（盲検化）されていたかどうか。	
結果 (Results)	ランダム割付けされた人数 (Numbers randomised)	各シーケンスにランダム割付けされた参加者数。	
	募集（Recruitment）	試験進行上のステータス（trial status）。	
	解析された人数 (Numbers analysed)	解析された参加者数。	
	アウトカム (Outcome)	主要アウトカムに関する参加者内比較に基づいて推定された効果量とその精度。	
	害 (Harm)	重要な有害事象（adverse events）ないし副作用（side-effects）。	
	結論 (Conclusion)	結果の一般的解釈。	
	試験登録 (Trial registration)	試験登録番号（registration number）および試験登録名（name of trial register）。	
	資金 (Funding)	資金提供者（source of funding）。	

表 1-2 CONSORT2010 拡張版における報告事項チェックリスト (本文)⁵⁾

章 (Section)	トピック (Topic)	項目番号 (Item No.)	チェックリスト項目 (Checklist Item)	記載箇所 (Reported on ...)
タイトル・抄録 (Title and Abstract)		1a	タイトルにランダム化比較試験であることを記載。	
		1b	クロスオーバーデザインを指定し、「抄録シート」に概説されているすべての情報を報告。	
はじめに (Introduction)	背景・目的 (Background and Objective)	2a	科学的背景と論拠 (rationale) の説明。	
		2b	特定の目的または仮説 (hypothesis)。	
方法 (Method)	試験デザイン (Trial Design)	3a	次の項目について説明。クロスオーバーデザインの根拠、割当比率、介入の数およびその期間、ウォッシュアウト期間、持越効果の検討。	
		3b	試験開始後の方法上の重要な変更 (適格基準 eligibility criteria など) とその理由。	
	参加者 (Participant)	4a	参加者の適格基準 (eligibility criteria)	
		4b	データが収集されたセッティング (setting) と場所。	
	介入 (Intervention)	5	再現可能となるような詳細な介入の記述。実際にいつどのように実施されたかを含む。	
	アウトカム (Outcome)	6a	事前に特定され明確に定義された主要・副次的アウトカム評価項目。いつどのように評価されたかを含む。	
		6b	試験開始後のアウトカムの変更とその理由。	
	症例数 (Sample size)	7a	どのように目標症例数が決められたか。	
		7b	あてはまる場合には、中間解析と中止基準の説明。	
	ランダム化 (Randomization)	8a	割振り (allocation) 順番を作成 (generate) した方法。	
		8b	割振りのタイプ: 制限の詳細 (ブロック化、ブロックサイズなど)。	
		9	ランダム割振り順番の実施に用いられた機構 (番号付き容器など)、シーケンスへの割付けが終了するまで割振り順番が隠蔽されていたかどうかの記述。	
		10	誰が割振り順番を作成したか、誰が参加者を組入れ (enrollment) したか、誰が参加者を各群に割付けた (assign) か。	
	ブラインディング (Blinding)	11a	ブラインド化されていた場合、介入に割付け後、誰がどのようにブラインド化されていたか (参加者、介入実施者、アウトカムの評価者など)。	
		11b	関連する場合、介入の類似性の記述。	
	統計学的手法 (Statistical method)	12a	クロスオーバーデザインに適した (すなわち、参加者内比較に基づく) 主要・副次的アウトカムの介入比較に用いられた統計学的手法。	
		12b	サブグループ解析や調整解析のような追加的解析の手法。	

表 1-2 CONSORT2010 拡張版における報告事項チェックリスト (本文)⁵⁾ (前ページつづき)

章 (Section)	トピック (Topic)	項目番号 (Item No.)	チェックリスト項目 (Checklist Item)	記載箇所 (Reported on ...)
結果 (Results)	参加者の流れ (Participant flow) ※フローチャートを強く推奨	13a	各シーケンスおよび期間について、ランダム割付けされた人数、意図された治療を受けた人数、主要アウトカムの解析に用いられた人数の記述。	
		13b	各段階で除外された参加者の数 (理由付き) をシーケンスと期間ごとに分けて記載。	
	募集 (Recruitment)	14a	参加者の募集期間と追跡期間を特定する日付。	
		14b	試験が終了または中止した理由。	
	ベースラインデータ (Baseline data)	15	各シーケンスおよび期間のベースラインにおける人口統計学的 (demographic)、臨床的な特性を示す表。	
	解析された人数 (Number analyzed)	16	各グループについて、各解析における参加者数 (分母)、解析が元の割付けグループによるものであるか。	
	アウトカムと推定 (Outcome and estimation)	17a	主要・副次的アウトカムのそれぞれについて、推定効果量およびその精度 (95%信頼区間など) を含む結果は、参加者内比較に基づくべきである。	
		17b	2 項アウトカムについては、絶対エフェクト・サイズと相対エフェクト・サイズの両方を記載することが推奨される。	
	補助的解析 (Ancillary analysis)	18	サブグループ解析や調整解析を含む、実施した他の解析の結果。事前に特定された解析と探索的解析を区別する。	
	害 (Harm)	19	各グループのすべての重要な害 (harm) または意図しない効果。	
考察 (Discussion)	限界 (Limitation)	20	試験の限界、可能性のあるバイアスや精度低下の原因、関連する場合は解析の多重性の原因を記載。可能性のある持越効果を考慮する。	
	一般化可能 (Generalisability)	21	試験結果の一般化可能性 (外的妥当性、適用性)。	
	解釈 (Interpretation)	22	結果の解釈、有益性と有害性のバランス、他の関連するエビデンス。	
その他の情報 (Other information)	登録 (Registration)	23	登録番号と試験登録名。	
	プロトコル (Protocol)	24	可能であれば、完全なプロトコルの入手方法。	
	資金提供者 (Funding)	25	資金提供者と他の支援者 (薬剤の供給者など)、資金提供者の役割。	

欠測によってすべての介入を完遂できなかった者は解析から除外することが望ましいため、並行群間比較試験よりも脱落や欠測による影響は大きい。さらに、CO では 1 つの介入の効果が持ち越され、後続の介入への反応に影響を及ぼす可能性があることも短所である。これを防ぐため、通常は連続する介入の間にウォッシュアウト (wash out; 休薬) 期間を

導入する。これは介入の効果を消失させるのに十分な長さでなければならないため、事前にウォッシュアウト期間の長さの妥当性を検討しておく必要がある²⁾。例えばアメリカ食品医薬品局 (FDA) が定める生物学的同等性試験ガイドラインでは、ウォッシュアウト期間は消失半減期の 5 倍以上の期間、または血中濃度がすべての被験者の最高血中濃度の

5% 以下になるような期間とすることが推奨されている³⁾。検討の結果、ウォッシュアウト期間の設定が合理的でないと考えられる場合は、CO を断念し、他のデザインでの試験実施も視野に入れる必要がある。その他、評価項目の測定を各介入期間の後半に限定するという対策も有効である²⁾。この場合、見たい介入の効果が発揮されている期間と、他の介入との相互作用が存在する可能性がある期間を明確に区別して結果を解釈する必要がある²⁾。

CO の結果を解釈する際には、持越効果、時期効果、介入効果という3つの効果が重要となる。持越効果は、前の介入の効果が後続の介入まで持ち越されることを表し、先述したように連続した介入の相互作用を減らす工夫をすることで影響を少なくすることができる。時期効果は、摂取時期の違いによる差を表す。たとえば、第Ⅰ期を夏、第Ⅱ期を冬に実施した場合、2つの期間では飲水量や発汗量などの生理状態の違いが生じることが予想され、結果に影響が現れる可能性がある。介入効果は持越効果や時期効果による影響を調整した上で、介入の真の効果を表したものである。CO の解析を行う際は、被験者背景に差がないことを確認するだけでなく、持越効果が統計学的に有意でないかも確認する必要がある。そのため、初めに持越効果を含めた分散分析を行い、持越効果が無視できることを確認した上で、介入と時期の交互作用を検証することが望ましい。これら統計解析の詳細については、次回解説する。

対象の選定や割付方法、選択バイアスは並行群間比較試験と同様であるため、詳しくは第2回を参照されたい。サンプルサイズの算出方法も並行群間比較試験と同様であるが、データ変動を示す分散の見積りが異なり、並行群間比較試験と同じ事象を評価する場合、CO ではサンプルサイズを1/5～1/9に削減することができ、個人差が大きい事象ほどその効果は大きいとされている¹⁾。また、公表(出版)バイアス防止のため、ランダム化並行群間比較試験の報告事項に関するガイドラインとして CONSORT2010⁴⁾ が制定されているが、2019年にはCOに対応した CONSORT2010 の拡張版が発表された⁵⁾。抄録および本文での報告事項チェックリストを表1-1、表1-2に示した。ランダム化並行群間比較試験のチェックリストと共通している部分も多いが、CO デザインを採用した根拠や設定したウォッ

シュアウト期間の妥当性、持越効果についての事前検討など、CO 特有の項目が含まれている。

2. CO を用いた試験例

弊社でこれまでに実施してきたヒト試験の中で、CO を用いた試験系の事例として、食後血中濃度測定試験、睡眠の質改善効果検証試験、ストレス改善効果検証試験、むくみ改善効果検証試験の4つを紹介する。

食後血中濃度測定試験

本セクションでは、血糖値、中性脂肪、尿酸値など生活習慣病に関連する指標の測定方法のほか、ミネラルやアミノ酸等の栄養素の吸収促進作用、アルコールや塩分等の吸収抑制・排出促進作用の評価方法について紹介する。

食生活の欧米化、慢性的な運動不足などにより、日本におけるメタボリックシンドロームをはじめとした生活習慣病の患者数が増加している。生活習慣病の中でも、心筋梗塞や脳梗塞等の動脈硬化性疾患を主とする心疾患や脳血管疾患は日本人の死因の上位を占めており、動脈硬化性疾患への対策を行うことは、国民の健康維持にとって非常に重要な課題である。動脈硬化性疾患の危険因子として、高血圧や脂質異常症、糖尿病、喫煙、メタボリックシンドロームなどが挙げられている⁶⁾。とりわけ糖尿病の患者数の増加は、高齢化社会である日本において深刻な問題の一つである。健康診断で血糖値に異常があった者は、異常がなかった者と比較して、7～8年後の糖尿病罹患率が有意に高く、平均医療費も高くなる傾向にあるという報告もあり⁷⁾、糖尿病に罹患することによる経済的な影響も大きいと考えられる。糖尿病の罹患を予防するには、食事療法などにより血糖値をコントロールすることが重要であり、食後血糖値は糖尿病に関する指標として注目されている。

肥満は摂取エネルギーが消費エネルギーを上回ることが原因であり、脂肪の過剰摂取だけが肥満に直結する訳ではなく、タンパク質や糖質の過剰摂取も肥満の原因となる⁸⁾。また、脂肪はタンパク質や糖質と比較してエネルギー密度が高く、「病み付きになる味」であることから、一旦摂取量が増えてしまうと削減することが難しく、過剰摂取、さらには肥

表2 食後血中濃度測定試験の対象者^{15, 16)}

ヘルスクレーム	測定項目	境界域	軽症域
食後の血中中性脂肪の上昇関係	血中中性脂肪	120~149 mg/dL	150~199 mg/dL
食後の血糖上昇関係	空腹時血糖値	110~125 mg/dL	—
	75gOGTT 2 時間値	140~199 mg/dL	—
	随時血糖値	—	140~199 mg/dL
食後の血清尿酸値の上昇関係	血清尿酸値	7.0mg/dL 以下	7.1~7.9 mg/dL

満につながりやすい⁸⁾。2020年の日本人の食事摂取基準では、脂質の総エネルギーに占める割合（脂肪エネルギー比率）の目標量は、成人男女において20～30%とされている⁹⁾。しかし、2018年の国民健康・栄養調査では、脂肪エネルギー比率が30%以上の者の割合は男性で35.3%、女性で42.8%であり、目標量を超過して脂肪を摂取している者は3割を超えている¹⁰⁾。脂肪の過剰摂取が続くと高トリグリセリド血症を生じるが、2018年の国民健康・栄養調査¹⁰⁾では、高トリグリセリド血症と診断される血中中性脂肪が150 mg/dL以上の割合が男性で38.4%、女性で25.1%であった。高トリグリセリド血症をはじめとする脂質異常症は、心血管イベントのリスク因子となることが知られており^{11, 12)}、食後血中中性脂肪の上昇も心血管イベントのリスク因子であることが報告されている^{11, 13)}。脂質の摂取量と心血管イベントのリスクを調査したメタアナリシスでは、脂質摂取量そのものは心血管イベントの発症や死亡に有意な相関がないものの、心血管イベントの発症予防には飽和脂肪酸摂取量の削減および不飽和脂肪酸による代替を継続することが望ましいとしている¹⁴⁾。以上より、食後血糖値や食後中性脂肪を低減させる食品の開発は生活習慣病予防をはじめとする健康的な生活の実現に向けて重要な取り組みである。

機能性表示食品の届出において、最終製品を用いたヒト試験の結果を科学的根拠として用いる場合、原則として「特定保健用食品の表示許可等について」の別添2「特定保健用食品申請に係る申請書作成上の留意事項」（以後、別添2）に示されている、特定保健用食品（トクホ）に用いられるヒト試験のデザイン（規格基準型、疾病リスク低減表示および条件付き特定保健用食品に係る試験方法を除く）に準拠する必要がある。食後の血中濃度を評価する試験系では、「食後の血中中性脂肪の上昇関係」と「食

後の血糖上昇関係」の2つの保健用途について、別添2に試験の留意事項が示されている¹⁵⁾。

対象者の選択基準に関しては、機能性表示食品制度では健常域（境界域まで）者が対象であり、原則として軽症域者（疾病に罹患しているが軽症であり、機能性の科学的根拠としてデータの使用が認められる範囲の者）は含まれていないが、別添2では一部軽症域者を対象とすることが認められている（表2）。機能性表示食品においても軽症域者の取り扱いについて検討が行われ、2019年に公表された「機能性表示食品における軽症者データの取扱いに関する調査・検討事業報告書」では、食後の血清尿酸値の上昇関係について血清尿酸値が7.1～7.9 mg/dLの軽症域者のデータ使用が認められている¹⁶⁾。上述の血糖値、中性脂肪、尿酸値以外の食後血中濃度のヘルスクレームに関しては、機能性表示食品ガイドラインにおける「疾病に罹患していない者」とは、その疾病について広くコンセンサスの得られた診断基準に基づき疾病がないと分類される者、もしくは医師の判定により疾病がないと認められた者が対象となる¹⁷⁾。なお、上述の「対象者」とはあくまで「統計解析上の対象者」であることに注意が必要である。科学的根拠として用いたヒト試験のデータに軽症域者が含まれていても、機能性表示食品としての表示上の対象者は疾病に罹患していない者に限られ、軽症域の人にも有効であると表示することはできない。

また、疾病の有無以外に他の食品や医薬品成分との相互作用を避けるため、特定保健用食品、機能性表示食品、その他の機能性が考えられる食品/飲料を日頃から摂取している者や、医薬品（漢方薬を含む）・サプリメントを常用している者、同意書取得日以前の3か月間において他の臨床試験に参加していた者を除外する必要がある。さらに、体質による影響を考慮し、医薬品・試験食品関連食品にアレルギー

表3 クロスオーバー試験による食後血中濃度測定試験のスケジュール

		スクリーニング			本試験	
		説明会	Scr	組入	第Ⅰ期	第Ⅱ期
登録	適格基準による選抜	X		X		
	I.C.	X				
	その他の手続き	X				
介入	被験食品 / プラセボ				X	X
	主要アウトカム				X	X
評価	身体測定	X	X			
	理学検査		X		X	X
	尿検査		X			
	末梢血液検査		X			
	問診		X		X	X

I.C. : インフォームドコンセント

Scr : スクリーニング検査

w/o : ウォッシュアウト期間 (1 週間以上)

ギーがある者や、妊娠・授乳中あるいは試験期間中に妊娠する意思のある者を除外する。

表3にクロスオーバー試験による食後血中濃度測定試験のスケジュール例を示した。試験参加者は、本試験①または本試験②で被験食品またはプラセボを1回ずつ摂取することになる。別添2に示された「食後の血中中性脂肪の上昇関係」と「食後の血糖上昇関係」の試験デザインも、二重盲検並行群間比較試験または二重盲検クロスオーバー比較試験を用いることとされており、原則として、負荷食とともに被験食品またはプラセボをそれぞれ単回摂取する。評価指標は、中性脂肪、血糖値ともに、原則として血中濃度の曲線下面積 (AUC) および各測定ポイントにおける測定値を用いる。また、測定ポイントに関しては、血糖値では被験食品およびプラセボの摂取後 30, 60, 90, 120 分後、中性脂肪では被験食品およびプラセボの摂取後 2, 3, 4, 6 時間後など、食後血中濃度の推移を測定できる適切な期間を設けることとされている。

近年は、ミネラルやアミノ酸等の栄養素の吸収効率アップ、あるいはアルコールや塩分等を吸収抑制、排出促進する機能性を謳う健康食品も発売されている。ミネラルや塩分の収支を測定する場合は、各試験参加者のミネラル摂取量が均一になるよう、試験前日から規定食を摂取させることや、飲水量の制限を加えることが必要である。測定項目は、ナトリウムやカルシウム、マグネシウム、鉄、カリウム、リ

ン、銅、亜鉛などが一般的である。血液検査では、体内でのミネラル濃度を測定することは可能であるが、ミネラルは尿および便より随時排出されていくため、試験当日は尿や便の採取を行い、体外に排出される量も併せて測定する。ナトリウム、カリウム、リンなどの主な排出ルートは尿であることから、入院施設等で実施する 24 時間蓄尿調査は、これらのミネラルの摂取量および排出量の把握において適切な方法と考えられている¹⁸⁾。

アルコール代謝に対する作用を測定する場合は、試験食品の摂取前に水で希釈したウイスキー等を摂取させ、試験参加者の体重あたり一定量のエタノールを負荷する^{19, 20)}。アルコール摂取後 30, 60, 120, 180 分後など経時的に、エタノールやエタノールの代謝物であり、酔いの原因となるアセトアルデヒドの濃度の血中や呼気中の濃度を測定する。また、お酒に酔いやすいと感じる者を対象とすることで、被験食品の摂取によるほてりや酔いなどの自覚症状に対する被験食品の効果を評価できる。

睡眠の質改善効果検証試験

現代社会では、睡眠の質の低下が重要な社会問題となっている。2017 年に実施された国民健康・栄養調査において、睡眠で休養が充分とれていないと回答した者の割合は 20.2% にのぼり、その割合は年々増加している²¹⁾。日本や欧米で行われた疫学調査では、日常的に睡眠時間が短い者におい

て死亡リスクが高まると報告されている^{22, 23)}。また、短時間睡眠や不眠は肥満²⁴⁾や高血圧²⁵⁾、耐糖能障害²⁶⁾、メタボリックシンドローム²⁷⁾などの生活習慣病の発症リスクを高めるとの報告もある。さらに、睡眠の質が低いと日中に眠気が出て仕事に集中できなくなり、事故の発生や仕事のパフォーマンスの低下につながる可能性がある。健常成人男女を対象とした先行研究では、1週間睡眠不足が続くと、その後3日間十分な睡眠時間を確保しても、日中の作業能率は十分に回復しないと報告されている²⁸⁾。実際に睡眠不足による人為的ミスが原因となって発生した重大事故として、スリーマイル島原子力発電所事故(1979年)やスペースシャトルチャレンジャー号事故(1986年)、関越自動車道高速バス居眠り運転事故(2012年)、軽井沢スキーバス転落事故(2016年)などが有名である。したがって、睡眠の質の向上に対して有効とされる食品やサプリメントなどを摂取することは、健康の維持・増進だけでなく生産性向上においても重要な取り組みと言える。

対象者は、日頃の睡眠の質に不満を感じている健常者となる。後述するが、睡眠の客観的評価では脳波や体動などの生体指標の計測を行うため、生活環境による影響を排除できるよう、家庭内に1歳未満

の乳児がいる者や幼児(おおむね満1歳から小学校に就学するまでの子供)とともに就寝している者、要介護者と共に生活している者、1つの寝具に複数人で就寝している者は対象から除外する必要がある。また、試験参加者本人の体調や生活リズムが不規則な場合も、被験食品の効果が正確に評価できない可能性があるため、夜勤等で睡眠時間や睡眠習慣が不規則な者や夜間頻尿の者、花粉症や喘息等の発作に悩まされている者、睡眠時無呼吸症候群のリスクが高まるBMIが25 kg/m²以上の者も除外することが望ましい。

試験スケジュールの例を表4に示す。睡眠の客観的な評価方法として、試験参加者の自宅で簡便に実施できる小型脳波計による脳波測定²⁹⁾や睡眠計^{30, 31)}、活動量計³²⁾による体動測定などが用いられることが多い。脳波の測定では頭部に電極を装着し、ノンレム睡眠(深い眠り)時に出現するデルタ波や覚醒時間などを測定するが、睡眠計や活動量計では、寝具の下に設置したり腕に装着したりすることで体動や呼吸、脈拍を計測し、睡眠の深さやリズムを測定する。

睡眠の質の評価は客観的な指標ではなく、被験者の起床時の睡眠内省に帰着するとも言われていることから³³⁾、客観的指標に加えて、自覚症状も改善

表4 クロスオーバー試験による睡眠の質改善効果検証試験のスケジュール

		スクリーニング				第Ⅰ期			第Ⅱ期			
		説明会	- 1w (Scr)	Scr	組入	0w	1w	w/o	- 1w (摂取前検査)	摂取前検査	0w	1w
	適格基準による選抜	X			X							
登録	I.C.	X										
	その他の手続き	X										
介入	被験食品 / プラセボ					◆—◆					◆—◆	
	睡眠検査		◆—◆			◆—◆			◆—◆		◆—◆	
	OSA 睡眠調査票			X			X			X		X
	身体測定	X		X			X			X		X
評価	理学検査			X			X			X		X
	尿検査			X			X			X		X
	末梢血液検査			X			X			X		X
	問診			X			X			X		X
	日誌		◆—◆			◆—◆			◆—◆		◆—◆	

I.C.: インフォームドコンセント

- 1w (Scr): スクリーニング兼摂取前検査 1週間前

Scr: スクリーニング兼摂取前検査

0w: 試験食品の摂取開始日

1w: 摂取 1週間後検査

w/o: ウォッシュアウト期間(1週間以上)

することが重要であると考えられる。自覚症状の評価には、過去1ヶ月間の睡眠の状態を評価するピッツバーグ睡眠質問票³⁴⁾や不眠症の自己評価に用いられるアテネ不眠尺度³⁵⁾、日中の眠気の程度を調べるエプワース眠気尺度³⁶⁾、起床時の眠気や睡眠の内省といった主観的な睡眠感を測定するOSA睡眠調査票MA版^{33, 37)}など妥当性が確認された質問紙を用いることが望ましい。また、全般的な生活の質(QOL)への影響を評価する際には、健康関連QOL評価ツールであるMOS Short-Form 36-Item Health Survey (SF-36)^{38, 39)}など妥当性が確立されている質問紙を用いることが望ましい。

ストレス改善効果検証試験

現代は「ストレス社会」と言われ、多くの人が何らかのストレスを感じている。ストレスから抑うつ状態に陥る人も多く、うつ病をはじめとする精神疾患は世界的に社会問題となりつつある。世界保健機関(WHO)の推計によると、2015年の全世界のうつ病患者数は3億2,200万人にのぼり、2005年と比較して18%以上増加している^{40, 41)}。精神疾患は中枢神経系に病変を形成することもあるため、ストレスは精神疾患を介して中枢神経系に影響を与える可能性がある。そのため、長期にわたる慢性的なストレスは認知機能の低下につながり、アルツハイマー型認知症の潜在的な危険因子であるとも言われている⁴²⁾。また、その他にも肥満⁴³⁾、過敏性腸症候群や逆流性食道炎、胃がんをはじめとする消化器疾患や⁴⁴⁾、高血圧および虚血性心疾患といった循環器系の疾患など⁴⁵⁾、様々な疾病の発症や悪化の原因の一つにストレスが挙げられている。したがって、早期の段階からストレスを解消していくことは、心の健康を保つだけでなく、重大な疾患の予防にも繋がると考えられる。

対象者は、日頃ストレスを感じている健常者となる。機能性表示食品は疾病に罹患していない者が対象であり、継続的・慢性的でない一時的な体調の変化に対する機能性を表示することが可能となっているため、うつや気分障害の診断を受けている者や慢性的・継続的にストレスを感じている者は除外し、表示しようとする機能性は「一時的な」ものに対する効果に限定することが望ましい。

ストレスの客観的な評価方法として、自律神経検査(加速度脈波測定)や唾液中のアミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンAの測定が挙げられる。自律神経検査では、心電位データからRRI(心拍間隔)を抽出するが、RRIの時系列データのうち低周波成分(LF)は交感神経と副交感神経の活動性を、高周波成分(HF)は副交感神経の活動性を反映する⁴⁶⁾。また自律神経機能は交感神経と副交感神経のバランスが重要とされることから⁴⁷⁾、LF/HF比が自律神経機能を評価する指標として用いられる。唾液アミラーゼは、他のストレスマーカーに比べて反応性が速く、非侵襲的に簡便かつ短時間で測定できることが特徴である⁴⁸⁾。低コストで測定することができ、携帯型アミラーゼ測定器を利用すれば、その場で結果を患者にフィードバックできることから、看護分野など臨床でも広く活用されている⁴⁹⁾。コルチゾールはストレス指標のゴールドスタンダードとして古くから用いられている⁵⁰⁾。血液検査でも測定可能だが、血中濃度が他のストレスマーカーよりも比較的高いことから、免疫測定法(ELISA)やマイクロ電気泳動など高感度な分析法を用いることで唾液でも分析できる⁵⁰⁾。クロモグラニンAは副腎髄質クロム親和性細胞や交感神経から分泌されるタンパク質の一種で、精神的ストレスを反映することが知られており、ELISAを用いて測定することができる⁵⁰⁾。

主観的評価指標としては、現在の気分状態を評価するProfile of Mood States 2nd Edition (POMS2 日本語版)⁵¹⁾が広く用いられている。また、客観的指標である自律神経活動との相関が認められている評価指標として、場面や状況の変化などのストレスに起因する状態不安と、状況要因に影響されず長期的に感じている特性不安の両方を評価する質問紙であるthe state-trait anxiety inventory (STAI; 状態-特性不安尺度)⁵²⁾がある。その他、任意の自覚症状を調査したい場合は、リッカートスケール法⁵³⁾やvisual analog scale (VAS)⁵⁴⁾が用いられることが多い。ただし、主観的な指標を機能性表示食品の科学的根拠として用いる場合は、日本人において妥当性が得られており、当該分野において学術的に広くコンセンサスが得られたものである必要があるため、注意が必要である¹⁷⁾。

表5 クロスオーバー試験によるむくみ改善効果検証試験のスケジュール

		スクリーニング			第Ⅰ期				w/o	第Ⅱ期			
		説明会	Scr	組入	0w		2w			0w		2w	
					朝	夕	朝	夕		朝	夕	朝	夕
登録	適格基準による選抜	X		X									
	I.C.	X											
	その他の手続き	X											
介入	被験食品 / プラセボ				◆————◆				◆————◆				
評価	顔水分 (むくみ) ※				X	X	X	X		X	X	X	X
	3D スキャン※				X	X	X	X		X	X	X	X
	アンケート※		X		X	X	X	X		X	X	X	X
	脚体積※				X	X	X	X		X	X	X	X
	身体測定		X				X					X	
	理学検査		X		X		X			X		X	
	尿検査		X				X					X	
	血液検査		X				X					X	
	日誌				◆————◆				◆————◆				
	問診		X		X		X			X		X	

I.C.: インフォームドコンセント

Scr: スクリーニング兼摂取前検査

0w: 試験食品の摂取開始日

2w: 摂取 2 週間後検査

w/o: ウォッシュアウト期間 (2 週間以上)

※朝の起床後 2 時間 30 分以内に測定を行い、夕方 18:00~20:00 に再度来院し測定する。

むくみ改善効果検証試験

むくみは、日常生活で一時的な症状として確認される状態の一つであり、毛細血管壁における水分移行の異常や、腎臓における体液量の調節機能低下など、体液循環の恒常性が乱れることが原因となる⁵⁵⁾。人体を構成する細胞は細胞外液と呼ばれる間質液に浸されおり、血管内皮を介して血液との間で酸素や栄養素の受け取り、老廃物の排出を行っている⁵⁶⁾。血管内皮を介した物質の交換は、血管内と間質の各々における静水圧と膠質浸透圧によって規定される (Starling の法則)⁵⁷⁾。体液浸透圧を生み出しているナトリウムイオンや塩化物イオンの濃度は体内で制御されており、腎臓ではナトリウムイオン濃度に応じて水分調整が行われている⁵⁶⁾。しかし、末梢血流量が低下すると間質における水分が過剰となるため、むくみが生じるとともに、毛細血管全体の有効循環血漿量が減少してしまう⁵⁸⁾。有効循環血漿量が減少すると、腎臓では尿細管でのナトリウムイオンの再吸収が亢進し、ナトリウムイオンと水分を間質へと輸送することで、体液循環の恒常性が維持される⁵⁸⁾。したがって、むくみの改善、すなわち体液循環の恒常性維持には、

血管機能の向上や末梢血流量の増加、腎臓における体液調整機能の正常化が重要なアプローチとなる。

一般的に、女性は男性と比較して筋肉量が少ないため⁵⁹⁾、筋ポンプ作用が弱く、全身の体液循環が滞りやすい。そのため、女性の「むくみ」に関する悩みを解消する製品は需要が高く、これまでに筋ポンプ作用を補助する健康器具 (マッサージ器) やストッキングなどが多数開発されてきた。近年、食品成分によるむくみ改善効果も研究が行われており、ブドウやレモンに含まれるポリフェノールは、血管機能や血流を改善することで体液循環を制御し、むくみの軽減に寄与することが明らかとなっていることから、むくみ軽減効果を有する健康食品も発売されている。飲酒後などの顔のむくみについては、未だに解決方法が時間の経過やシャワー入浴などに限られていることから、健康器具による物理的なアプローチに加え、食品成分の分子レベルのアプローチによる全身的なむくみ改善効果が期待されており、注目を集めている。

試験スケジュールの例を表5に示す。ヒトは睡眠以外の時間を立位または座位で生活しているため、間質液および血液は重力の影響を受け、むくみの

状態には日内変動が生じる。顔面部においては、就寝時の臥位姿勢によって水分および血液が頭部に滞り、日中の立位姿勢によって身体下部へ水分および血液が移動することから、朝にむくみが生じ、夕方には解消される。一方下腿では、間質液および血液が重力の影響を受けてふくらはぎに滞り、午後にかけて下腿から心臓への静脈還流が減少するため⁶⁰⁾、毛細血管から間質へと水分が移動し、夕方に向けてふくらはぎの周囲径や容積の増大などの形態変化が生じる。したがって、朝と夕方の2回測定を行い、その差をむくみ量として評価する必要がある。

対象者は、日頃から顔や下腿のむくみが気になる健常者となる。むくみは睡眠に伴う体位の変化による影響を受けることから、夜勤等で生活リズムが不規則な者は被験食品の効果が正確に評価できない可能性があるため、除外するべきである。弊社で実施した先行研究では、朝の測定を起床後2時間30分以内もしくは午前11時まで、夕方の測定を午後6時～午後8時もしくは朝の測定の6時間後に再度来院し測定している^{61, 62)}。また、体液循環が正常でない恐れがあるため、尿検査で腎機能異常が認められた者や高血圧が疑われる者（収縮期血圧が130 mmHg以上）も除外することが望ましい。

むくみの客観的な評価方法として、顔や下腿の体積測定が挙げられる。先述の通り、むくみ量は朝と夕方の測定値の差より算出されるため、顔のむくみについては、朝の顔の体積から夕方の顔の体積を減算した体積、下腿のむくみについては、夕方の下腿の体積から朝の下腿の体積を減算した体積を評価す

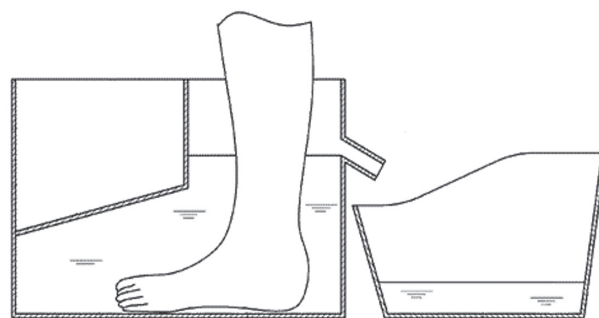


図2 足部体積測定器⁶³⁾

る。顔の体積測定には3Dカメラを用い、ほぼ（右目尻から垂直に下した線と鼻中心から地面に平行に伸ばした線との交点）の隆起部の体積を測定する⁶¹⁾。また、下腿の体積測定には水槽排水法が用いられる。この方法では、足部体積測定器⁶³⁾に片側下腿を浸し、排出される水の量1gを1cm³と換算して下腿体積を測定する⁶¹⁻⁶⁴⁾（図2）。下腿に関しては、体積に加えて立位におけるふくらはぎの周囲径（下腿最大囲）を測定する。主観的評価指標としては、むくみに関して学術的に広くコンセンサスが得られた質問紙は存在しないため、リッカートスケール法⁵³⁾やVAS⁵⁴⁾を用いて、顔や下腿のむくみの自覚症状の他、「靴や靴下がきつく感じる」など生活における支障度を調査する。

おわりに

本稿では、クロスオーバー試験の概要および試験例を紹介した。次回はクロスオーバー試験の統計解析手法について、実例を交えながら紹介する予定である。

参考文献

1. 折笠秀樹：クロスオーバー試験の計画および解析。薬理と治療 **44** (9): 1261-1276, 2016.
2. Sibbald B, Roberts C: Understanding controlled trials: Crossover trials. *BMJ* **316** (7146): 1719-1720, 1998.
3. US Food and Drug Administration: Bioavailability Studies Submitted in NDAs or INDs – General Considerations Guidance for Industry. 2019.
4. Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, *et al.*: CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* **340** c869, 2010.
5. Dwan K, Li T, Altman DG, Elbourne D. CONSORT 2010 statement: extension to randomised crossover trials. *BMJ* 366 14378, 2019
6. 山下静也：2. 動脈硬化の病態と予防・治療。日内会誌 **108** (Suppl): 96a-103a, 2019.
7. 日高秀樹, 辻中克昌, 山崎義光：糖尿病一次予防の対象者と医療費軽減の可能性—経年的成績と医療費からの推計—。糖尿病 **48** (12): 841-847, 2005.
8. 田中幸久, 岡野淳, 関根一則, 野村蘭, 湯浅麻奈美他：日本人の脂肪摂取と肥満。Oleoscience **10** (10): 383-392, 2010.
9. 「日本人の食事摂取基準」策定検討会：日本人の食事摂取基準（2020年版）。2019.
10. 厚生労働省。平成30年国民健康・栄養調査報告。2020.
11. Iso H, Naito Y, Sato S, Kitamura A, Okamura T, *et al.*: Serum Triglycerides and Risk of Coronary Heart Disease among Japanese Men and Women. *Am. J. Epidemiol.* **153** (5): 490-499, 2001.
12. Satoh H, Nishino T, Tomita K, Tsutsui H: Fasting Triglyceride is a Significant Risk Factor for Coronary Artery Disease in Middle-Aged Japanese Men. *Circ. J.* **70** (3): 227-231, 2006.
13. Harchaoui K, Visser M, Kastelein J, Stroes E, Dallinga-Thie G: Triglycerides and Cardiovascular Risk. *Curr. Cardiol. Rev.* **5** (3): 216-222, 2009.
14. Hooper L, Summerbell CD, Higgins JP, Thompson RL, Clements G, *et al.*: Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2** CD002137, 2000.
15. 特定保健用食品の表示許可等について（平成26年10月30日消食表第259号）。改正令和元年7月1日消食表第141号：別添2 特定保健用食品申請に係る申請書作成上の留意事項。2019.
16. 消費者庁。機能性表示食品における軽症者データの取扱いに関する調査・検討事業報告書。2019.
17. 機能性表示食品の届出等に関するガイドライン（平成27年3月30日消食表第141号）。改正令和元年7月1日消食表第131号。2019.
18. Zhang J, Temme EHM, Sasaki S, Kesteloot H. Under- and Overreporting of Energy Intake using Urinary Cations as Biomarkers: Relation to Body Mass Index. *Am. J. Epidemiol.* **152** (5): 453-462, 2000.
19. 浜野拓也, 西学, 伊藤慎司, 海老原淑子, 渡邊泰雄。ウコン抽出物が健康成人のアルコール代謝に及ぼす影響の検討。応用薬理 **72** (1): 31-38, 2007.
20. 中島希望, 間田英里, 赤岡一志, 横川勝一, 鈴木直子他：牛樟芝菌糸体粉末および穀物発酵エキス含有飲料摂取によるアルコール代謝促進効果—ランダム化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較試験—。薬理と治療 **46** (3): 363-373, 2018.
21. 厚生労働省：平成29年国民健康・栄養調査結果の概要。2018.
22. Kojima M, Wakai K, Kawamura T, Tamakoshi A, Aoki R, *et al.*: Sleep Patterns and Total Mortality: A 12-Year Follow-up Study in Japan. *J. Epidemiol.* **10** (2): 87-93, 2000.
23. Kim Y, Wilkens LR, Schembre SM, Henderson BE, Kolonel LN, *et al.*: Insufficient and excessive amounts of sleep increase the risk of premature death from cardiovascular and other diseases: *The Multiethnic Cohort Study*. *Prev. Med.* (Baltim). **57** (4): 377-385, 2013.
24. Kobayashi D, Takahashi O, Deshpande GA, Shimbo T, Fukui T: Association between weight gain, obesity, and sleep duration: a large-scale 3-year cohort study. *Sleep Breath.* **16** (3): 829-833, 2012.
25. Gangwisch JE, Malaspina D, Posner K, Babiss LA, Heymsfield SB, *et al.*: Insomnia and Sleep Duration as Mediators of the Relationship Between Depression and Hypertension Incidence. *Am. J. Hypertens.* **23** (1): 62-69, 2010.
26. Gottlieb DJ, Punjabi NM, Newman AB, Resnick HE, Redline S, *et al.*: Association of Sleep Time With Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance. *Arch. Intern. Med.* **165** (8): 863, 2005.
27. Troxel WM, Buysse DJ, Matthews KA, Kip KE, Strollo PJ, *et al.*: Sleep Symptoms Predict the Development of the Metabolic Syndrome. *Sleep* **33** (12): 1633-1640, 2010.
28. Belenky G, Wesensten NJ, Thorne DR, Thomas ML, Sing HC, *et al.*: Patterns of performance degradation and restoration during sleep restriction and subsequent recovery: a sleep dose-response study. *J. Sleep Res.* **12** (1): 1-12, 2003.
29. Matsuo M, Masuda F, Sumi Y, Takahashi M, Yamada N, *et al.*: Comparisons of portable sleep monitors of different modalities: Potential as naturalistic sleep recorders. *Front. Neurol.* **7**: 110, 2016.
30. 山本学, 伊賀富栄, 清水美衣, 小原さおり, 浦野哲哉他：マット型睡眠計の有用性に関する検討。睡眠医療 **6** (3): 473-480, 2012.
31. 吉井文均, 山本学, 伊賀富栄, 清水美衣, 小原さおり他：マット型睡眠計の開発と睡眠点数を用いた睡眠状態の評価。睡眠医療 **6** (2): 361-365, 2012.
32. Sadeh A, Hauri PJ, Kripke DF, Lavie P: The Role of Actigraphy in the Evaluation of Sleep Disorders. *Sleep* **18** (4): 288-302, 1995.
33. 山本由華吏, 田中秀樹, 高瀬美紀, 山崎勝男, 阿住一雄他。中高年・高齢者を対象としたOSA睡眠調査票（MA版）の開

- 発と標準化. 脳と精の医 **10** (4): 401-409, 1999.
34. Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ: The Pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* **28** (2): 193-213, 1989.
35. Soldatos CR, Dikeos DG, Paparrigopoulos TJ: Athens Insomnia Scale: validation of an instrument based on ICD-10 criteria. *J. Psychosom. Res.* **48** (6): 555-560, 2000.
36. Johns MW. A New Method for Measuring Daytime Sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* **14** (6): 540-545, 1991.
37. 山本由華吏, 田中秀樹, 前田素子, 山崎勝男, 白川修一郎: 睡眠感に影響を及ぼす性格特性 —神経症傾向, 外向性・内向性についての検討—. 健康心理研 **13** (1): 13-22, 2000.
38. Fukuhara S, Bito S, Green J, Hsiao A, Kurokawa K: Translation, Adaptation, and Validation of the SF-36 Health Survey for Use in Japan. *J. Clin. Epidemiol.* **51** (11): 1037-1044, 1998.
39. Fukuhara S, Ware JE, Kosinski M, Wada S, Gandek B. Psychometric and Clinical Tests of Validity of the Japanese SF-36 Health Survey. *J. Clin. Epidemiol.* **51** (11): 1045-1053, 1998.
40. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. World Health Organization, Geneva, 2017.
41. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **388** (10053): 1545-1602, 2016.
42. Rothman SM, Mattson MP: Adverse Stress, Hippocampal Networks, and Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Med.* **12** (1): 56-70, 2010.
43. Sinha R, Jastreboff AM: Stress as a Common Risk Factor for Obesity and Addiction. *Biol. Psychiatry* **73** (9): 827-835, 2013.
44. Lee SP, Sung I-K, Kim JH, Lee S-Y, Park HS, *et al.*: The Effect of Emotional Stress and Depression on the Prevalence of Digestive Diseases. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **21** (2): 273-282, 2015.
45. Yuenyongchaiwat K: Cardiovascular response to mental stress tests and the prediction of blood pressure. *Indian J. Psychol. Med.* **39** (4): 413, 2017.
46. 高田晴子, 高田幹夫, 金山愛: 心拍変動周波数解析の LF 成分・HF 成分と心拍変動係数の意義 - 加速度脈波測定システムによる自律神経機能評価 -. 総合健診 **32** (6): 504-512, 2005.
47. 厚生労働省 e-ヘルスネット. 自律神経失調症, <https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/dictionary/heart/yk-082.html> 2020 年 6 月 30 日閲覧
48. 山口昌樹, 花輪尚子, 吉田博: 唾液アミラーゼ式交感神経モニタの基礎的性能. 生体医工学 **45** (2): 161-168, 2007.
49. 小林しのぶ, 柳奈津子, 小坂橋喜久代: 携帯型唾液アミラーゼ測定器を用いた リラックス反応評価に関する検討. 日看技会誌 **9** (3): 40-44, 2010.
50. 山口昌樹: 唾液マーカーでストレスを測る. 日薬理誌 **129** (2): 80-84, 2007
51. Heuchert JP, McNair DM: POMS2 日本語版 成人用 - 全項目版. 金子書房, 東京, 2015.
52. 肥田野直, 福原真知子, 岩脇三良, 曾我祥子, Spielberger CD: 新版 STAI 状態 - 特性不安検査. 実務教育出版, 東京, 2000.
53. Likert R: A technique for the Measurement of Attittitudes. *Achives Psychol.* **22**: 5-55, 1932.
54. McCormack HM, de L. Horne DJ, Sheather S: Clinical applications of visual analogue scales: a critical review. *Psychol. Med.* **18** (4): 1007-1019, 1988
55. 福田洋之, 安田寿一: むくみ. 現代医療 **20**(1): 21-25, 1988.
56. 貴邑富久子, 根来英雄: シンプル生理学 改訂第 7 版. 株式会社南江堂, 東京, 2016.
57. Taylor AE: Capillary Fluid Filtration. Starling forces and lymph flow. *Circ. Res.* **49** (3): 557-575, 1981.
58. 玉置清志, 奥田誠也: I. 水・電解質と臨床的把握法 2. ナトリウム代謝調節障害. 日内会誌 **92**: 720-727, 2003.
59. 谷本芳美, 渡辺美鈴, 河野令, 広田千賀, 高崎恭輔他: 日本人筋肉量の加齢による特徴. 日老医誌 **47**: 52-57, 2010.
60. Verma AK, Garg A, Xu D, Bruner M, Fazel-Rezai R, *et al.*: Skeletal Muscle Pump Drives Control of Cardiovascular and Postural Systems. *Sci. Rep.* **7**: 45301, 2017.
61. 中村寧子, 吉川和彦, 中村剛, 星野智宏, 山下慎一郎他: 健康な日本人男女を対象としたレモン由来酵素処理ヘスペリジンによる顔のむくみ低減効果の検証—ランダム化プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較試験—. 薬理と治療 **47** (2): 211-228, 2019.
62. 風間亜紀, 藤井文隆, 橋本俊嗣, Verbruggen M, 鈴木直子他. 赤ブドウ葉乾燥エキス含有製剤の経口摂取による下肢のむくみ軽減効果. 応用薬理 **83** (1/2): 1-7, 2012.
63. 株式会社オルトメディコ, 株式会社ナノサイエンス, 国立大学法人 東京医科歯科大学. 特開 2012-061083
64. 椎塚詔仁, 柳下和慶, 加藤剛, 外川誠一郎, 鈴木直子他: 足関節体積測定器の再現性評価と, 新たな足関節体積測定器の開発. 体力科学 **59** (6): 769, 2010.