

トマトおよびブロッコリースプラウトの肝機能改善作用に関する研究

牛田, 悠介

<https://doi.org/10.15017/1785459>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（農学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済



トマトおよびブロッコリースプラウトの
肝機能改善作用に関する研究

牛田 悠介

2016

目次

第1章 緒論.....	1
第2章 トマトのアルコール代謝促進作用.....	7
第1節 緒言	7
第2節 材料および方法	8
第3節 結果.....	13
第4節 考察.....	18
第5節 小括.....	20
第3章 ブロッコリースプラウト由来スルフォラファンのアセトアルデヒド代謝促進作用.....	22
第1節 緒言	22
第2節 材料および方法	24
第3節 結果.....	30
第4節 考察.....	40
第5節 小括.....	41
第4章 腸管上皮におけるスルフォラファンの吸収機構.....	42
第1節 緒言	42
第2節 材料および方法	43
第3節 結果.....	47
第4節 考察.....	52
第5節 小括.....	54
第5章 ブロッコリースプラウトサプリメント摂取による第二相酵素誘導作用	55
第1節 緒言	55

第2節 材料および方法	56
第3節 結果	59
第4節 考察	64
第5節 小括	66
第6章 ブロッコリースプラウトサプリメント摂取による肝機能改善作用	68
第1節 緒言	68
第2節 材料および方法	69
第3節 結果	74
第4節 考察	82
第5節 小括	84
第7章 総括	86
謝辞	90
参考文献	91

略語表

ADH	Alcohol dehydrogenase
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
ALP	Alkali phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
ARE	Antioxidant Response Element
AST	Aspartate aminotransferase
BAES	Biphasic alcohol effects scale
BS	Broccoli sprout
CD	Concentration required to double the enzyme activity
ChE	Choline esterase
DTC	Dithiocarbamate
EGCg	Epigallocatechin gallate
FL	Fluorescein
GR	Glucoraphanin
GLS	Glucosinolate
GST	Glutathione <i>S</i> -transferase
γ -GTP	Gamma-glutamyl transpeptidase
ITC	Isothiocyanate
LDH	Lactate dehydrogenase
MCT	Monocarboxylic acid transporter
MEFs	Mouse embryo fibroblasts
NDMA	<i>N</i> -nitrosodimethylamine
NQO1	NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1

Nrf2	NF-E2-related factor 2
P_{app}	Apparent permeability
PCA	Perchloric acid
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
SFN	Sulforaphane
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TEER	Transepithelial electrical resistance
TS	Tomato serum
8-OHdG	8-hydroxydeoxyguanosine

第1章 緒論

野菜の摂取は人々の健康維持に不可欠である。野菜摂取の意義は、従来、栄養学的な見地から説明されてきた。すなわち、野菜はビタミン・ミネラル・食物繊維といった栄養成分の重要な供給源として位置づけられ、これらの栄養成分を必要量摂取することを主目的に、1日当たりの野菜摂取目標量は350 gと定められている¹⁾。この目標を達成するために様々な施策が講じられているが、日本国民の野菜摂取量は伸び悩み、近年では米国人の野菜摂取量を下回る結果となっている (Fig. 1-1)²⁾。米国における野菜摂取量の増加には、生産・流通システムの改善はもとより、1日5サービングの野菜や果物の摂取を推奨した5 A DAY運動など、官民一体となった啓発活動が大きく寄与している。また、1990年に米国国立がん研究所が「デザイナーズフード・ピラミッド」を作成し、がん予防が期待できる約40種類の植物性食品とそれらに含まれる成分（ファイトケミカル）を発表して以来、ファイトケミカルの恩恵を受けることもまた野菜を摂取する意義のひとつとして重要視されはじめた。また、その概念は2001年に更新された5 A DAYのキャンペーンメッセージ (5 A DAY THE COLOR WAY) にも盛り込まれた。「ファイトケミカル」は基本的には、いわゆる食品の三次機能、すなわち生体調節機能を担うとされる。これまでに世界各地の様々な植物性食品から多様なファイトケミカルが見出され、それらが人々の健康に寄与するという知見が蓄積されてきた^{3, 4)}。ファイトケミカルの生体調節機能を明らかにし、多数の疫学研究から示唆された、あるいは、民間伝承された野菜の様々な健康効果を正しく理解できるようになれば、野菜摂取の意義・動機がさらに強化されるものと期待される。

調理・加工だけでなく、生食されるトマト (*Solanum lycopersicum*) は古くから食卓を彩っており、現在では世界で最も消費される野菜のひとつとなっている。トマトの赤色色素である lycopene は強い一重項酸素消去能を有することが知られる⁵⁾。これまでに、多数の研究によって、トマトおよび lycopene の摂取はがんや種々の疾病の予防に有効で

あることが指摘されている^{6,7)}。また、近年ではトマトに含まれる lycopene 以外の成分にも注目が集まっており、抗アレルギー作用を示す naringenin chalcone⁸⁾や脂肪燃焼作用を示す 13-oxo-9,11-octadecadienoic acid (13-Oxo-ODA)⁹⁾ などのファイトケミカルが新たに見出されている。トマトはすでに全ゲノムの解明が終了しているため¹⁰⁾、ゲノム情報はトマトの品種・栽培法の開発はもとより、未知のファイトケミカルの探索を含むトマトの全成分解明に有用であり、トマトの健康効果に関する研究は今後さらに進展することが期待される。

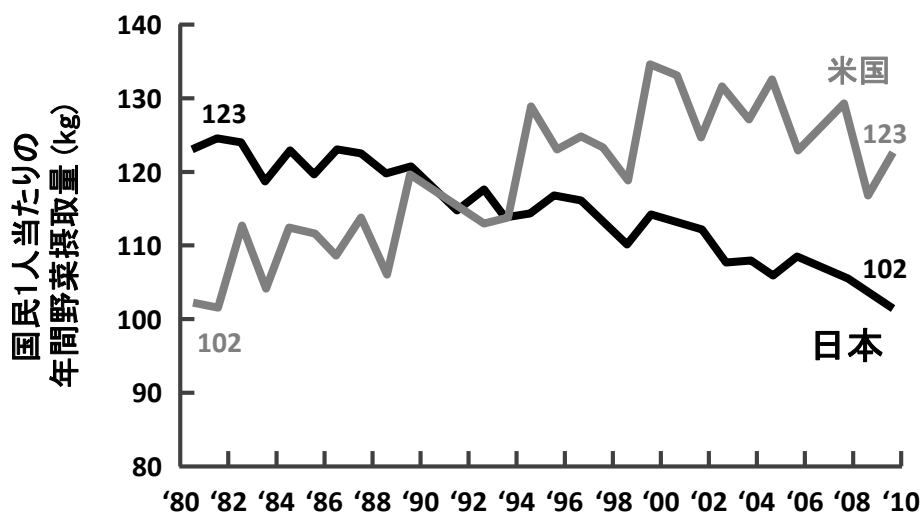


Fig. 1-1. 日本および米国における国民 1 人当たりの年間野菜摂取量の推移

[出典：農林水産省、平成 25 年 1 月「野菜の消費をめぐる状況」、データ：FAOSTAT]

ブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*) は、“Crown of Jewel Nutrition”という異名を持つほど栄養素（ビタミン類）を豊富に含む野菜であることが古くから認知されている¹¹⁾。さらに、前述のデザイナーズフード・ピラミッドに選抜されるとともに、がん予防効果が期待される成分としてスルフォラファン (sulforaphane: SFN) が Johns Hopkins (JH) 大学の Paul Talalay 博士らの研究チームにより見出された¹²⁾ことで、ブロッコリーの潜在的な健康効果への関心が一層高まっている。がん予防において重要な役割を担う第二相酵素を強力に誘導するファイトケミカルとして見出された SFN については、世

界中の研究者および医療従事者による研究が精力的に進められ、第二相酵素の誘導に基づく解毒作用のみならず^{13, 14)}、抗酸化作用や免疫調節作用、抗炎症作用など多彩な生理作用が明らかになっている^{15, 16)}。近年では、SFN ががんや慢性疾患の予防・改善に有効である可能性を示す臨床研究結果も多数報告されている¹⁷⁻²¹⁾。他方、JH 大学の研究チームにより、成熟体のブロッコリーよりもブロッコリーの新芽（ブロッコリースプラウト：BS）に SFN の前駆体（glucoraphanin: GR）が豊富に含まれることが報告され（Fig. 1-2）²²⁾、BS はブロッコリーと同様、もしくはそれ以上に潜在的な健康効果があるのではと期待されている。

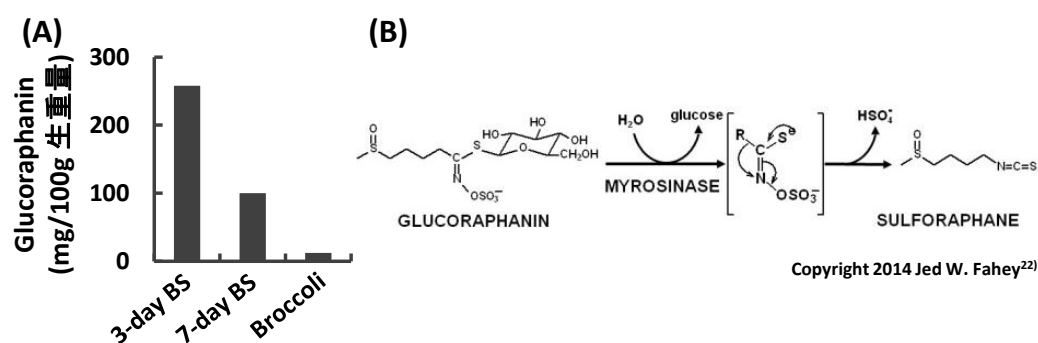


Fig. 1-2. 発芽3および7日後のブロッコリースプラウト (BS) ならびにブロッコリーの glucoraphanin 含量 (A) と、ミロシナーゼを介在した glucoraphanin から sulforaphane への変換反応 (B)²²⁾

「日本再興戦略」（平成 25 年 6 月 14 日閣議決定）の 1 つ「戦略市場創造プラン」の第 1 テーマに、「国民の『健康寿命』の延伸」が掲げられた。世界保健機関 (WHO) によると、健康寿命とは「健康な状態で生きられる寿命」(Healthy Life Expectancy: HALE) として定義され、従来の平均寿命とは異なり、生存の質も反映した指標である。「健康寿命の延伸」に向けた国民運動、通称「スマート・ライフ・プロジェクト」が厚生労働省および企業・自治体等の協力・連携により推進されている。このプロジェクトでは国民 1 人 1 人の自律的な健康管理や疾病予防を促すために、3 + 1 のアクションプラン (Fig.

1-3) が提案されている。はじめの 3 つのアクションプランは、適度な運動、適切な食生活、禁煙と、生活習慣改善の基本に沿った内容となっているが、残る+1 の「健診・検診」が重要な役割を担っている。「健診・検診」により、自らの身体の状態を定期的に把握・管理し、3 つのアクションに繋げる習慣を身につけることができれば、国民 1 人 1 人が自律的に健康寿命の延伸を達成できる社会基盤が形成される。



Copyright© Smart Life Project committee & Ministry of Health, Labour and Welfare

Fig. 1-3. スマート・ライフ・プロジェクトが推奨する 3 + 1 のアクションプラン

「2014 年人間ドックの現況」²³⁾によると、人間ドック受診者のうち肝機能異常と診断された人の割合は生活習慣病関連 6 項目（肥満、耐糖能異常、高血圧、高コレステロール、高中性脂肪、肝機能異常）の中で最も高く、過去 30 年間で 3 倍となっている (Fig. 1-4)。日本国内における衛生環境の改善ならびに治療法の確立によるウイルス性肝炎罹患者の減少と逆行していることから、生活習慣に起因する肝機能異常者が急増していると推察される。肝機能異常やさらに重篤な肝疾患（肝炎等）を引き起こす生活習慣として第一に挙げられるのが飲酒であり、体内に吸収されたエタノールやその一次代謝物であるアセトアルデヒドが肝毒性作用を示すと考えられる。また、近年では脂肪や糖質の

食べ過ぎにより肝機能異常となるケースが急増している²⁴⁾。その他、喫煙により体内に取り込まれる無数の化学物質が肝臓に大きな負荷を与え、酸化ストレスや炎症を起こし、肝機能異常を引き起こす。沈黙の臓器と呼ばれる肝臓は自覚症状がないまま重篤な状態に陥る。そのため、人間ドックや健康診断で容易に知ることができる血液検査値（肝機能マーカー）を参考に自らの肝臓の状態を知り、肝疾患の予防・改善に向けたアクションへ移すことが大切となる。しかしながら、肝機能保護効果や肝機能改善効果は、特定保健用食品のヘルスクレームとして成立しなかったことから、食品素材についての研究例は僅かである。

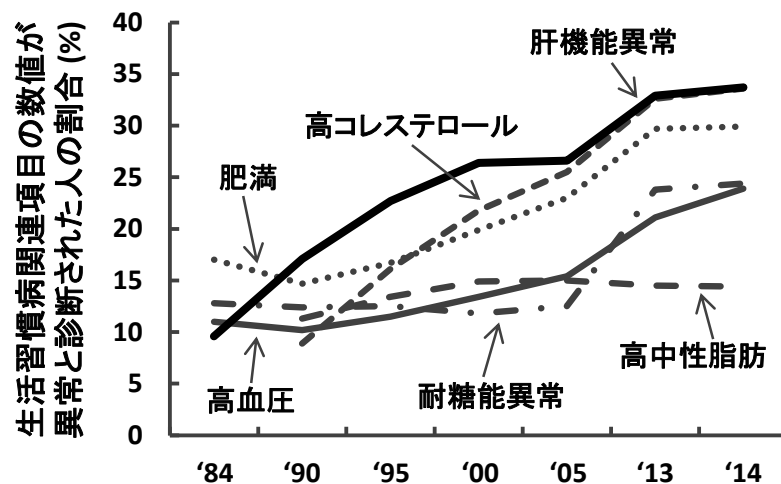


Fig. 1-4. 生活習慣病関連項目の数値に異常値が認められた人の割合²³⁾

そこで本研究では、トマトおよびブロッコリースプラウトの肝機能改善作用を明らかにするために、以下の検討を行った。

第2章では、トマトの摂取が飲酒後のアルコール代謝に及ぼす影響を健常な男性被験者を対象に検証した。また、動物試験によって、トマト中の有効成分の推定および作用メカニズムの解明を行った。

第3章では、生体防御機構を司る転写因子 Nrf2 (NF-E2-related factor 2)²⁵⁾を活性化することが知られる BS 由来の SFN が、アセトアルデヒド代謝の鍵を握るアルデヒド脱水

素酵素 (ALDH) に及ぼす効果を細胞試験および動物試験によって明らかにした。

第 4 章では、SFN の腸管上皮における吸収機構および経路を解明するために、Caco-2 細胞単層膜を用いた透過試験を行った。

第 5 章では、SFN の前駆体である GR を含む BS サプリメントを試作し、BS サプリメントの摂取が SFN の吸収や Nrf2 の下流に存在する第二相酵素の活性に及ぼす影響を、健常被験者を対象に評価した。

第 6 章では、BS サプリメントの肝機能改善作用を明らかにするために、肝機能異常と診断された男性被験者を対象に無作為化プラセボ対照二重盲検並行群間試験を行い、肝機能マーカー (ALT や γ -GTP) の数値に及ぼす効果を調べた。また、慢性肝障害モデルラットを用いて、作用機序の解明を行った。

第2章 トマトのアルコール代謝促進作用

第1節 緒言

適度な飲酒は心血管系に良い影響を与えるとされる一方で、過度の飲酒は我々の体に様々な悪影響を及ぼすことが報告されている²⁶⁾。飲酒による影響は、アルコールおよびその代謝産物に起因しており、アルコールの代謝を制御し、影響を緩和するための基礎的な知見が集積されつつある。しかしながら、アルコールの体内動態は多くの環境因子、すなわち個人の身体的条件や遺伝的形質、性差、飲酒習慣、飲酒量や酒類の違い等、実に多岐にわたる因子により影響を受けるため、飲酒がもたらす種々の影響を一律に制御することは困難である²⁷⁻²⁹⁾。

飲酒による影響を緩和する有効な方策のひとつとして食事が挙げられる。1925年に、飲酒時に食品を同時摂取することにより飲酒後の血中アルコール濃度の上昇が抑制されることが報告されているが³⁰⁾、その作用には、食品または食品由来の成分による **First-pass metabolism** (初回通過代謝, **FPM**) の亢進³¹⁾、または、肝臓でのアルコール代謝促進等の複数の機序が寄与していると考えられる³²⁾。また、必ずしも科学的根拠を伴うものではないが、我々人類は古来より本能的に、または経験則に基づいて飲酒時に摂取する食品を選択してきており、その習慣は今なお世界各地に伝承されている。

トマト (*Solanum lycopersicum*) は日常的に摂取される緑黄色野菜のひとつであるが、ビタミン・ミネラル・食物繊維などの栄養素に加え、カロテノイドの一種である **lycopene** を含み、多彩な生理作用が報告されている³³⁻³⁶⁾。欧米諸国では、古くからレッドアイやブラッディマリーといったトマトを加えた酒類が飲用されているが、その合目的性は明らかではない。そこで本章では、飲酒時のトマトの摂取がアルコール代謝に及ぼす効果について検証するとともに、飲酒後の酔い感に与える影響についても検討を加えた。

第2節 材料および方法

第1項 材料および試薬

米国産トマトペースト (Brix 20, Kagome USA Inc, CA, USA) を使用した。このトマトペーストを蒸留水で希釈した後、アルコール度数 25% (v/v) の甲類焼酎（アサヒビール社製）と混合し、5% (v/v) アルコール含有トマトジュース (TJAlc) を調製した。TJAlc の Brix は、市販のトマトジュースと同程度の 5.5 とした。対照飲料として、既述の甲類焼酎とミネラルウォーター（アサヒビール社製）を混合した 5% (v/v) アルコール飲料 (Alc) を用いた。両飲料の栄養成分組成を Table 2-1 に示す。

動物試験で使用したトマト漿液 (TS: Tomato Serum, トマトジュースの上澄み液であり、lycopene 等の脂溶性成分はほとんど含まず、水溶性成分を豊富に含む画分) は、上記のトマトペーストを遠心分離 (12,000 × g, 15 min) し、得られた上清をロータリーエバポレーターで濃縮 (Brix 35) することで得た。TS の成分組成を Table 2-2 に示した。

Table 2-1. 試験飲料の栄養成分組成

per 100 g of beverage	Alc	TJAlc
Energy (kcal)	29.4	46.9
Alcohol (g)	4.0	4.0
Proteins (g)	0	0.7
Fats (g)	0	0
Glucose (g)	0	1.8
Fructose (g)	0	1.7
Dietary fiber (g)	0	0.6
Sodium (mg)	0.30-0.61	0.6-9.8
Potassium (mg)	0.04-0.13	251.2
Magnesium (mg)	0.6	-
Vanadium (μg)	5.0	-
Citric acid (g)	-	0.4
Alanine (mg)	-	41.2
Glutamine (mg)	-	159.5
Lycopene (mg)	-	8.7

Alc: 5% alcohol

TJAlc: 5% alcohol in tomato juice

-: not measured.

Table 2-2. トマト漿液 (TS) の栄養成分組成

Compound	mg/10 mL
Saccharides	
Glucose	1132
Fructose	1066
Organic acids	
Citric acid	231.7
Malic acid	32.1
Lactic acid	17.3
Pyruvic acid	n.d.
Amino acids	
Alanine	26.2
Glutamine	101.6
Carotenoids	
Lycopene	0.4
n.d.: not detected	

第2項 男性被験者を対象とした飲酒試験

本試験は、アサヒグループホールディングス株式会社の臨床試験審査会およびカゴメ株式会社の研究倫理審査委員会による承認 (2011-R08) を得るとともに、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則および「疫学研究に関する倫理指針」(2004 年文部科学省) を遵守して実施した。

週に1回以上の日常的な飲酒習慣があり、適正飲酒範囲量(純アルコールとして1日20-50 g、健康日本21ならびに(社)アルコール健康医学協会)での飲酒が可能な健康成人男性12名を被験者とした(平均年齢:36.2 ± 11.3 歳, 平均体重:66.6 ± 6.2 kg)。この中に喫煙の習慣を持つ者は含まれなかった。被験者には、本試験内容について十分に説明し、自由意思による同意を書面により得た。

2種類(Alc および TJAlc)の飲料について非盲検クロスオーバー試験を実施した。すなわち、被験者を無作為に2群に分け、片方の群には TJAlc を、もう一方の群には Alc を単回摂取させた。1週間程度の間隔をあけた後、1回目の単回摂取試験において TJAlc を摂取した群には Alc を、Alc を摂取した群には TJAlc を単回摂取させた。試験期間中の生活習慣に関する制限は特に設けなかったが、試験前日のみ禁酒とした。試験当日は空腹のまま試験を開始し、アルコール量が0.4 g/kg 体重となるように TJAlc または Alc のいずれかを摂取させた。試験飲料摂取前および摂取30、60、120 および180分後に採血を実施し、血中エタノール、酢酸、乳酸およびピルビン酸濃度を測定した。さらに、両飲料の摂取前および摂取30、45、60、90、120 および180分後に『酔い感』についての自覚症状を調査した。すなわち、Martin らが考案し³⁷⁾、その後様々な人種および遺伝的背景を持つ人々への評価に使用されてきた Biphasic Alcohol Effects Scale (BAES) 法^{38, 39)}に基づき、ポジティブな酔い感を示す7項目:高揚感・何かしたい・元気・興奮・話したい・楽しい・活力あるおよびネガティブな酔い感を示す7項目:集中できない・落ち込み・頭重感・鎮静・眠い・思考力低下・疲れの計14項目の自覚症状について、それぞれ0-10点までのスコアを用紙に記入させた。

第3項 動物試験

動物試験はカゴメ株式会社総合研究所動物・生体試料実験施設管理運営委員会の承認(2010.001)を受け、「実験動物の飼育および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省)および「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議)を遵守した上で行った。

8 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラット (Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan) 9 匹を馴化させた後、3 種の試料：水 (Control)、TS、アルコール代謝に影響を及ぼすことが報告されているアラニン・グルタミン・クエン酸の混合物 (AGC)^{40, 41)}について 3 期のクロスオーバー試験を実施した。すなわち、SD 系ラットを無作為に A、B および C 群の 3 群に分け、第 1 期の試験では A 群にて水、B 群にて TS、C 群にて AGC がアルコール代謝に及ぼす効果を評価した。第 2 期および第 3 期では、A 群にて TS と AGC を、B 群にて AGC と水を、C 群にて水と TS をそれぞれ評価した。各試験期間には 1 週間以上のインターバルを設けた。各試験期において、一晩絶食させた SD 系ラットにいずれかの試料 (水、TS または AGC) を 10 mL/kg 体重となるように経口投与し、その 15 分後に 20% (v/v) エタノール水溶液を 2.0 g/kg 体重となるように経口投与した。エタノールの投与前および投与 60、120、180 および 240 分後に尾静脈より採血を行い、エタノールおよび有機酸濃度を測定した。なお、AGC の濃度は、TS (Table 2-2 参照) と同等となるように調製した。すなわち、26.2 mg のアラニン、101.6 mg のグルタミンおよび 231.7 mg のクエン酸を 10 mL の蒸留水に溶解した。

次に、トマトの水溶性成分が肝臓のアルコール代謝関連酵素の活性に及ぼす効果を調べた。上記の試験と同様に水または TS を投与した 15 分後にエタノールを SD 系ラットに経口投与した。その 1 時間後に SD 系ラットを安楽死させ、肝臓を摘出した。肝臓は生理食塩水で十分に洗浄した後、液体窒素にて凍結し、使用するまで -80°C で保存した。

第4項 ヒト試験および動物試験における血中指標の測定

2.5 mL の 4% (v/v) 過塩素酸 (PCA) を含むチューブに、採取した血液 (5 μ L) を速やかに添加し、攪拌後、遠心分離 ($3,000 \times g$, 10 min) を行った。その上清 2.0 mL を、0.5 g の NaCl を含むガスクロマトグラフ (GC) 用バイアルに入れ、水素炎イオン化検出器 (FID)–ヘッドスペース GC (6890N GC System, Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA) に供し、血中エタノール濃度 (mg/mL) を測定した⁴²⁾。ヘッドスペースサンプラーには G1888 Network Headspace Sampler (Agilent Technologies) を、カラムには DB-WAX (60 m $\times$ 0.25 mm, Agilent J&W GC Columns) を使用した。オーブン温度を 240°C、ガス流量を 20 mL/min に設定した。

0.2 mL の 4% (v/v) PCA を含むチューブに採取した血液 (100 μ L) を速やかに添加し、攪拌後、遠心分離 ($3,000 \times g$, 10 min) を行った。その上清を、pH 緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法⁴³⁾を用いた有機酸分析 HPLC システム (Prominence, Shimadzu Co., Ltd., Kyoto, Japan) に供し、血中有機酸濃度 (mg/dL) を測定した。カラムには 2 本直列に接続した Shim-pack SPR-H (250 $\times$ 7.8 mm, Shimadzu Co., Ltd.) を、検出器には電気伝導度検出器 (CDD-6A, Shimadzu Co., Ltd., polarity: +, temperature: 43°C) を用いた。移動相 (5 mM *p*-toluenesulfonic acid) および反応相 (20 mM bis-Tris and 0.1 mM EDTA/5 mM *p*-toluenesulfonic acid) の流速はそれぞれ 0.8 mL/min とした。

第5項 ラット肝臓中のアルコール代謝関連酵素活性の測定

肝臓の組織分画は Kishimoto らの方法⁴⁴⁾に準じて行った。すなわち、肝臓 0.5 g に対して、sucrose (0.25 M) および 2-mercaptoethanol (1 mM) を溶解した 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を 2.0 mL 添加し、ホモジナイズした。遠心分離 ($750 \times g$, 10 min) により細胞核などの沈殿物を除去した後、さらに遠心分離 ($10,000 \times g$, 20 min) を行い、上清と沈殿に分けた。沈殿を上記の緩衝液で洗浄し、再び遠心分離 ($10,000 \times g$, 10 min) を行い、得られた沈殿をミトコンドリア画分とした。一方、上清についてはさらに遠心分

離 ($100,000 \times g$, 60 min) した後、得られた上清を細胞質画分として回収した。沈殿物については、0.15 M KCl で洗浄した後に再び遠心分離 ($100,000 \times g$, 60 min) を行い、上清を除去してミクロソーム画分とした。全ての画分は使用するまで -80°C で保存した。

アルコール脱水素酵素 (ADH) の活性を測定するために、肝臓の細胞質画分および 1.6 mM NAD を含む 0.1 mM Glycine-NaOH buffer (pH 10.6) 200 μL に 10 μL の 2% (v/v) ethanol を添加することで反応を開始させた。単位時間当たりの 340 nm での NADH の吸光度変化 (NADH のモル吸光係数: $6.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) および細胞質画分のタンパク質濃度 (mg-protein) から ADH 活性 ($\text{nmol/min/mg-protein} = \text{mU/mg-protein}$) を算出した。

アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 活性を測定するために、反応溶液 (64 mM sodium pyrophosphate (pH 8.0) 100 μL , 100 mM NAD 8 μL , 10 mM pyrazole 2 μL , 10 mM EDTA 20 μL , dH_2O 40 μL) に各画分 20 μL を加え、室温で 3 分間インキュベートした後、80 mM propionaldehyde を 10 μL 添加して反応を開始させた。ADH 活性と同様に 340 nm における NADH の吸光度変化を測定し、ALDH 活性 ($\text{nmol/min/mg-protein} = \text{mU/mg-protein}$) を求めた。なお、ミクロソーム画分およびミトコンドリア画分は、沈殿物を 0.25 M sucrose で懸濁後、タンパク質濃度が 5 mg/mL となるように調製し、1% (w/v) sodium deoxycholate で可溶化した後、測定に供した。

乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定するために、2.0 mL の反応溶液 (2 mM NADH/100 μM phosphate buffer (pH 7.4)) に細胞質画分 (5 μL) を加え、室温で 3 分間インキュベートした後、20 mM sodium pyruvate を 100 μL 添加して反応を開始させた。ADH 活性および ALDH 活性と同様に 340 nm における単位時間当たりの NADH の吸光度変化から LDH 活性 ($\text{nmol/min/mg-protein} = \text{mU/mg-protein}$) を求めた。

第 6 項 統計解析

飲酒後の自覚症状の結果は、最小値、第 1 四分位点、中央値、第 3 四分位点および最大値から成る箱ひげ図で示し、Wilcoxon の符号順位検定により統計学的な有意差を算

出した。他の結果については全て平均値±標準偏差で示した。対応のない2群間の比較は Student's *t*-test で、対応のある2群間の比較は Paired *t*-test で有意差を算出し、3群以上の群間比較については一元配置分散分析 (ANOVA) の後、Tukey-Kramer 法による多重比較により有意差を算出し、異なる符号によって示した。有意水準は5%未満とした。

第3節 結果

第1項 男性被験者における TJAlc 摂取後の血中アルコール代謝関連指標

血中エタノール濃度は、5% アルコール飲料 (Alc) の摂取 60 分後に最大 (0.42 ± 0.08 mg/mL) に達した (Fig. 2-1A)。一方、5% アルコール含有トマトジュース (TJAlc) を摂取した場合、血中エタノール濃度の上昇は有意に抑制された。また、その後 180 分後まで Alc 摂取後と比べて有意に低く推移した。血中エタノール濃度曲線の消失相（試験飲料投与 60 分後から 180 分後にかけての直線部分）を外挿し、血中エタノールの消失時間を求めた結果、TJAlc 摂取後の血中エタノール消失時間は、Alc 摂取後と比べて1時間程度短縮された (Fig. 2-1B)。

次に、両飲料摂取後の血中有機酸濃度を測定した。TJAlc 摂取後において、血中エタノール濃度の低下に伴う血中酢酸濃度の上昇が認められ、摂取後 30 分から 120 分にかけて Alc 摂取後と比べて有意に高く推移した (Fig. 2-2)。血中ピルビン酸濃度は飲酒により低下したが、TJAlc 摂取後ではその低下が抑制される傾向が認められ、摂取 60 分および 180 分後において Alc 摂取後と比べて有意に高値を示した (Fig. 2-2)。TJAlc の摂取により血中乳酸濃度は Alc 摂取後と比べて顕著に上昇し、摂取後 30 分から 60 分にかけて統計学的に有意な差 ($p < 0.05$) が認められた (Fig. 2-2)。

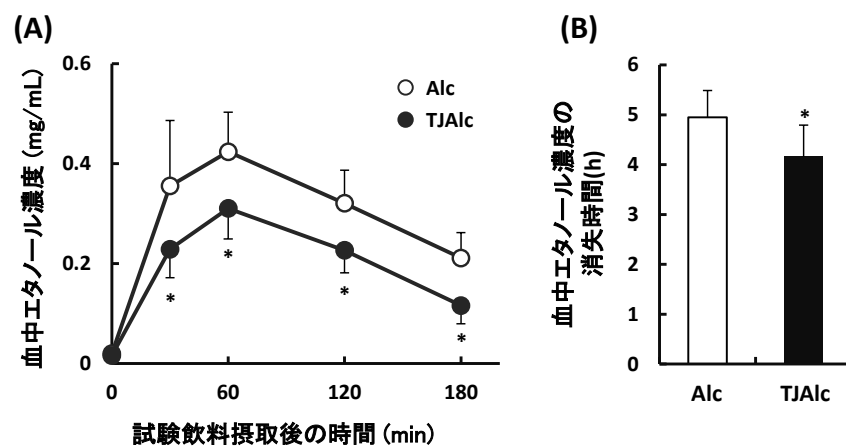


Fig. 2-1. 5%アルコール飲料 (Alc) および 5%アルコール含有トマトジュース (TJAlc) 摂取後の血中エタノール濃度変化 (A) と消失時間 (B) [平均値±標準偏差 (n = 12)、*: $p < 0.05$ vs. Alc (Paired t -test)]

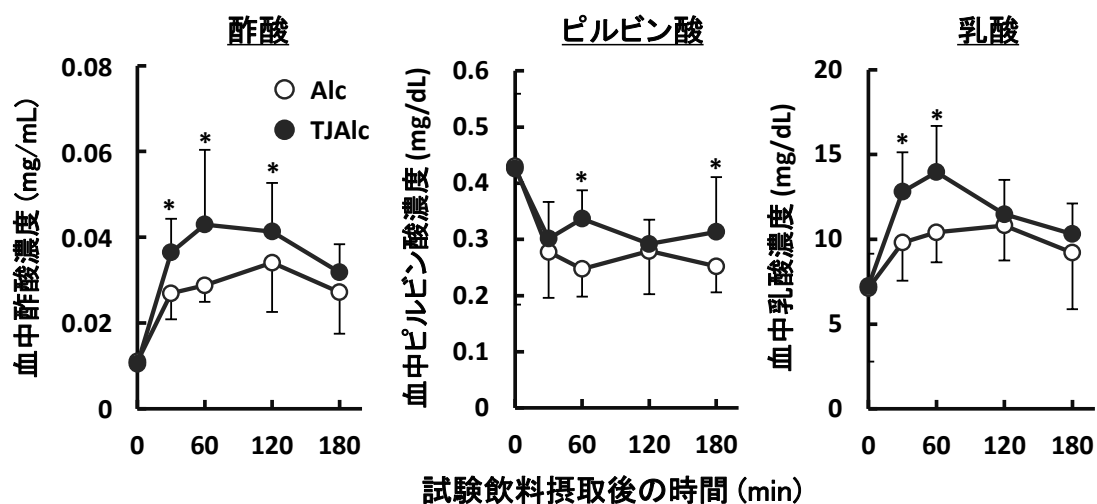


Fig. 2-2. 5%アルコール飲料 (Alc) および 5%アルコール含有トマトジュース (TJAlc) 摂取後の血中酢酸、ピルビン酸および乳酸濃度の変化 [平均値±標準偏差 (n = 12)、*: $p < 0.05$ vs. Alc (Paired t -test)]

第2項 男性被験者における TJAlc 摂取後の酔い感の主観的自覚症状

Alc および TJAlc 摂取後の酔いに関する自覚症状として、ポジティブな酔い感を示す 7 項目ならびにネガティブな酔い感を示す 7 項目のスコアについて経時変化を調べた。ポジティブな酔い感を示す 7 項目の合計値ならびにネガティブな酔い感を示す 7 項目の合計値の推移を Fig. 2-3 に示す。Wilcoxon の符号順位検定を行った結果、TJAlc 摂取後のポジティブな酔い感の合計値は高く推移し、摂取 45 および 90 分後に Alc 群と比べて有意な差 ($p < 0.05$) が認められた。「元気」 (Median @45 min: Alc 2.6, TJAlc 5.5, $p < 0.05$)、
「活力がある」 (Median @45 min: Alc 1.8, TJAlc 4.7, $p < 0.05$) および「何かしたい」 (Median @90 min: Alc 2.2, TJAlc 3.9, $p < 0.05$) の上昇がポジティブな酔い感の合計値の有意な上昇に大きく寄与していた。一方、TJAlc の摂取はネガティブな酔い感には影響を及ぼさなかった。

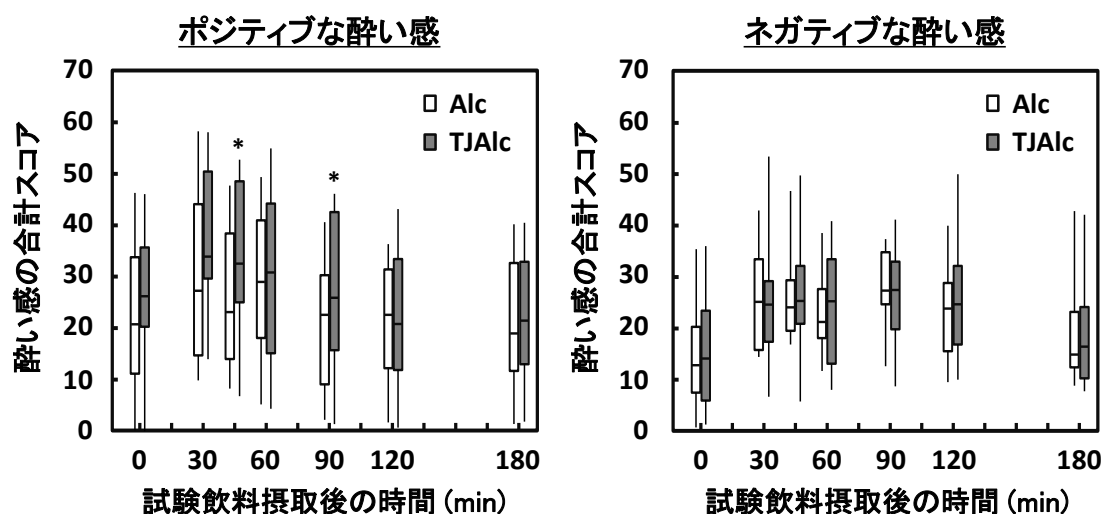


Fig. 2-3. 5%アルコール飲料 (Alc) および 5%アルコール含有トマトジュース (TJAlc) 摂取後のポジティブおよびネガティブな酔い感の合計値の推移 [箱ひげ図のエラーバーの下端と上端、箱の下端と上端および箱内の横線は、最小値、最大値、第1四分位点、第3四分位点および中央値を示す (n = 12)、*: $p < 0.05$ vs. Alc (Wilcoxon single rank test)]

第3項 トマトの水溶性成分によるアルコール代謝促進作用

カゴメ株式会社で過去に実施した予備試験の結果、トマトに含まれる lycopene などの脂溶性成分にはアルコール代謝促進作用が認められなかったことから、トマトの水溶性成分がアルコール代謝の促進に寄与していると考え、トマト漿液 (TS) 画分を用いて検討を行った。TS 中の代表的な水溶性成分、すなわち、糖類、アミノ酸類および有機酸類を測定した結果、アルコール代謝に影響を及ぼす可能性が示唆されるアラニン、グルタミンおよびクエン酸^{40, 41)}が TS 中に豊富に含まれていることが判明した (Table 2-2)。そこで、雄性 SD 系ラットを用いて TS と上記成分がアルコール代謝に及ぼす影響を評価した。SD 系ラットに TS を投与し、15 分後にエタノールを経口投与した結果、血中エタノール濃度の上昇は顕著に抑制された (Fig. 2-4)。TS 中の含量と同等となるように調製したアラニン、グルタミンおよびクエン酸混合物 (AGC) を投与した場合において、エタノール投与後の血中エタノール濃度の上昇は有意に抑制されたが、その効果は TS に匹敵するものではなかった。先述の男性被験者を対象とした試験結果と同様に、TS 投与による血中ピルビン酸および乳酸濃度の上昇が認められた (Fig. 2-4)。しかしながら、AGC を投与したラットにおいては血中有機酸濃度の上昇は認められなかった。なお、データには示していないが、TS に多量に含まれるグルコースやフルクトースについても同様の評価を実施したが、各血中指標に与える影響は認められなかった。

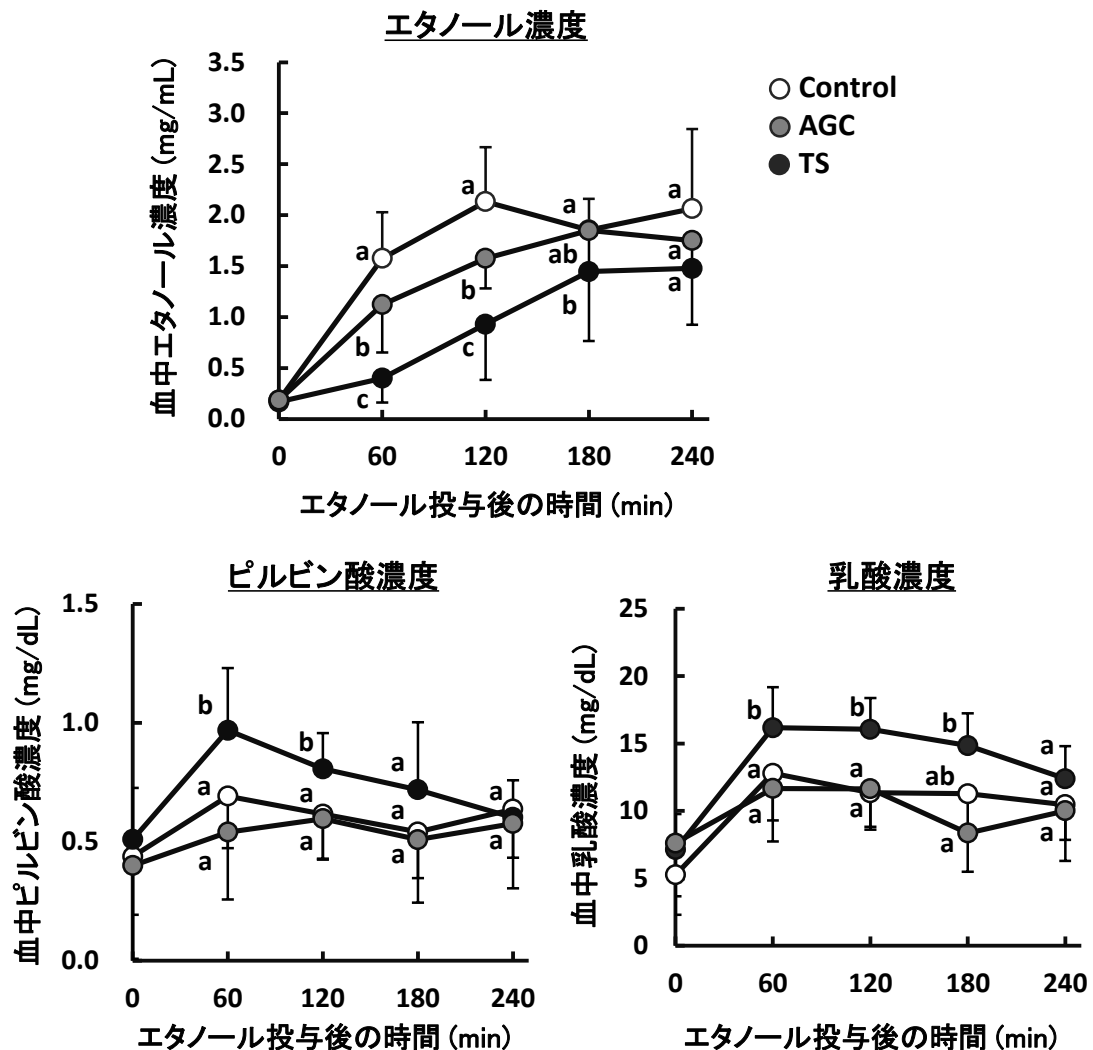


Fig. 2-4. トマト漿液 (TS) およびアラニン・グルタミン・クエン酸混合物 (AGC) がエタノール投与後の血中エタノール、ピルビン酸および乳酸濃度に及ぼす影響 [平均値±標準偏差 (n = 9)、測定時間における異符号間で有意差あり ($p < 0.05$, Tukey-Kramer)]

第4項 トマトの水溶性成分が肝臓のアルコール代謝関連酵素活性に及ぼす効果

ラットの肝臓細胞質画分に存在する ADH、ALDH、LDH および ALT の活性を測定した結果、TS の投与により ADH および ALDH の活性が上昇する傾向が認められた (Fig. 2-5)。さらに、ピルビン酸から乳酸への変換を触媒する LDH 活性を測定したところ、TS の投与による有意な ($p < 0.05$) 上昇が認められた。一方で、ALT 活性には変化が認

められなかった。なお、データには示していないが、肝臓のミクロソームおよびミトコンドリアに存在する ALDH 活性に及ぼす影響は認められなかった。

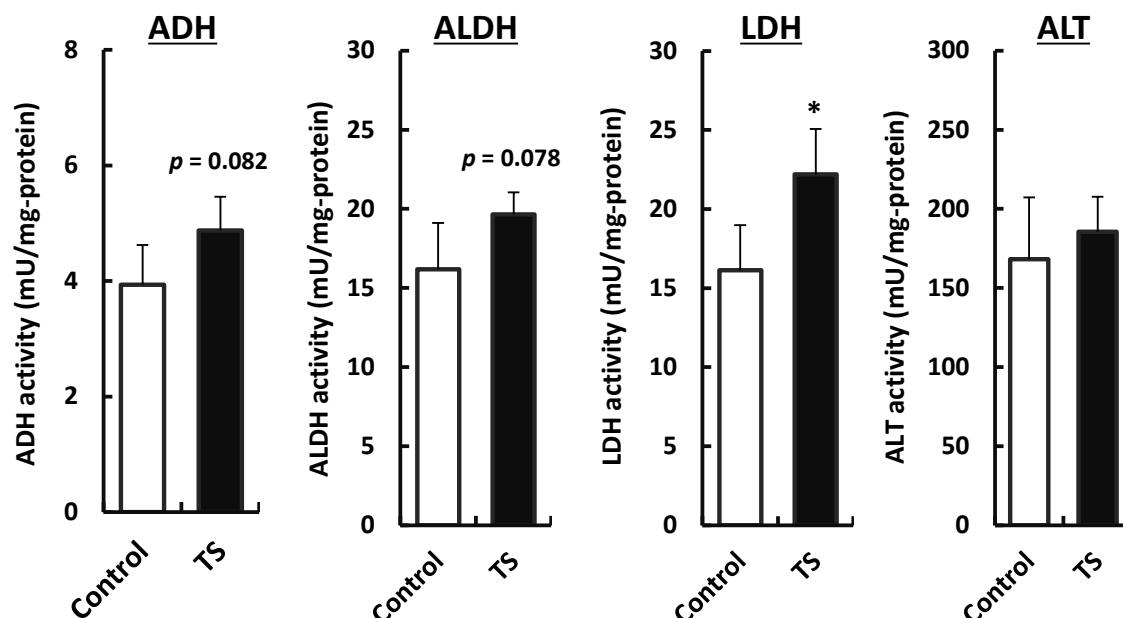


Fig. 2-5. トマト漿液 (TS) の投与がSD系ラットの肝臓細胞質画分におけるアルコール代謝関連酵素 (alcohol dehydrogenase: ADH, aldehyde dehydrogenase: ALDH, lactate dehydrogenase: LDH, alanine aminotransferase: ALT) の活性に及ぼす影響 [平均値±標準偏差 (n = 4-5)、*: $p < 0.05$ vs. Control (Student's *t*-test)]

第4節 考察

健常男性を対象に実施した試験において、トマトジュースとアルコールの同時摂取 (TJAlc) が、エタノールの血中濃度の上昇を緩やかにし、その後の血中からの消失時間を早めることを確認した。動物を用いた予備試験の結果、トマトジュースがアセトアルデヒドの代謝に影響を及ぼす可能性は低いと考えられたため、本研究では被験者の選定において ALDH 遺伝型を考慮せず、また、血液中のアセトアルデヒド濃度の測定も行わなかった。そのため、血中エタノール濃度の変化とその一次代謝産物であるアセトアルデヒドの血中濃度変化との関連性については不明である。しかしながら、本研究では、

トマトジュースの同時摂取により飲酒後の血中エタノール濃度が低く推移したことと合わせてエタノールの中間代謝産物である酢酸の血中濃度上昇が認められており、トマトジュースの摂取がアルコール代謝を促進したものと推察された。また、BAES 法による酔い感の評価を行った結果、トマトジュースとアルコールを同時摂取した被験者においてポジティブな酔い感が増強された。飲酒によるポジティブな酔い感は、血中エタノール濃度が低いときに高くなることが知られることから³⁷⁾、この結果もまた、トマトジュースの摂取がアルコール代謝を促進した、との考察を支持するものといえる。

トマトジュース摂取によるアルコール代謝促進作用は、強力な一重項酸素消去能⁵⁾に基づき多彩な生理作用が報告される³³⁻³⁶⁾ lycopene ではなく、水溶性成分に起因することが判明した。近年のメタボロミクス解析により、869 種の化合物がトマト果実中から同定されたが⁴⁵⁾、糖類、アミノ酸類、有機酸類およびポリフェノール類といった水溶性成分だけでも数 100 種類に上ると考えられる。多数の水溶性成分のうち、アラニン、グルタミンおよびクエン酸については、アルコール代謝に影響を及ぼす可能性が示唆されている^{41, 42)}。しかしながら、それら成分の効果は TS と比べて劣っていたことから (Fig. 2-4)、より強い効果を有する成分がトマト中に存在していると推察された。

食事の摂取が血中エタノール濃度を低下させるメカニズムについては様々な仮説が示されてきた。その中で、糖類や糖原生アミノ酸類の代謝過程において生じるピルビン酸が重要な役割を担っている可能性がある⁴⁶⁻⁴⁹⁾。ピルビン酸は、飲酒による一連の応答によって生じ、細胞内に蓄積した NADH の再酸化を促進することで NAD と NADH の比を是正し、その結果、多くのアルコール代謝関連酵素を含む NAD(H) 依存性酵素の活性を高める働きをする。本研究においては、アルコールとトマトジュースを同時摂取した被験者のみならず、アルコールと TS を投与した SD 系ラットにおいても血中ピルビン酸濃度の上昇が認められた。さらに、血中乳酸濃度と肝臓中 LDH 活性の上昇も同時に認められた。これら一連の結果から、トマトのアルコール代謝促進作用のメカニズムについて、以下の仮説が考えられる。i) トマトに含まれる成分が直接ピルビン酸の供

給源となる、もしくはピルビン酸の生合成系を高めることにより血中ないしは肝臓中のピルビン酸濃度を上昇させる。ii) これにより、肝臓の LDH 活性が高まりピルビン酸から乳酸への代謝が促進される。iii) LDH はピルビン酸から乳酸への代謝を行うと同時に NADH から NAD への再酸化に働き、アルコール代謝により消費された NAD を補うことで、iv) ADH ならびに ALDH の活性を亢進し、アルコール代謝を促進する。一連の機序において、第一段階となるピルビン酸濃度の上昇に関してはトマトに内在するピルビン酸の寄与が考えられる。しかしながら、Yin ら⁵⁰⁾が報告したように、トマトに含まれるピルビン酸は極めて微量であり、本試験においてもトマト試料からピルビン酸は検出されなかった。血中エタノール濃度に一定の効果を示したアラニンは代表的な糖原生アミノ酸として知られるが、アラニンを含む混合物の投与による血中ピルビン酸濃度の上昇は認められなかった (Fig. 2-4)。さらに、アラニンからピルビン酸への代謝に関わる肝臓の ALT 活性は TS 投与による上昇を示さなかった (Fig. 2-5)。以上のことから、本研究により観察された血中ピルビン酸濃度の上昇は、トマト中に含まれるアラニン以外の成分によるものと推察された。

第5節 小括

In Western countries, alcoholic beverages with tomato such as the beer-based “Red Eye” and the vodka-based “Bloody Mary” have been habitually taken, but the reason why tomato has been preferably consumed while drinking alcohol remains unclear. The aim of this Chapter was to investigate the effect of tomato on alcohol metabolism *in vivo* in humans. In a randomized, controlled, crossover study with 12 Japanese healthy men aged between 24 and 56 years, drinking tomato juice containing 5% (v/v) alcohol (TJAlc) significantly attenuated the elevation of blood ethanol level and subsequently increased the level of acetate, compared with 5% alcohol beverage (Alc). Significantly higher levels of blood pyruvate and lactate were also observed in subjects who had consumed TJAlc compared with those consumed Alc.

Additionally, a biphasic alcohol effects scale (BAES) method showed that subjective feelings for alcohol-induced stimulant effects were significantly enhanced by drinking TJAlc. Animal experiments in male Sprague-Dawley (SD) rats suggested that the effect on blood biomarkers was attributable to the serum fraction of tomato (TS), which largely consisted of aqueous compounds such as alanine, glutamine and citric acid, but not lipophilic compounds including the carotenoid lycopene. Administration of TS clearly increased the activity of NAD(H)-dependent enzymes such as lactate- (LDH), alcohol-, and aldehyde-dehydrogenase in SD rat liver cytosols. These findings suggest that aqueous compound(s) in tomato may promote alcohol metabolism, probably by increasing pyruvate level, enhancing LDH activity, and improving the ratio of NAD to NADH.

第3章 ブロッコリースプラウト由来スルフォラファンのアセトアルデヒド代謝促進作用

第1節 緒言

飲酒により体内に吸収されたアルコールは速やかにアルコール脱水素酵素 (ADH) による代謝を受け、アセトアルデヒドとなる。アセトアルデヒドは、飲酒後の顔面紅潮や頭痛、動悸といった不快症状を引き起こすとともに、高い変異原性や発がん性を有することから、種々の健康被害の原因となる。アセトアルデヒドは、主に肝臓において無害な物質である酢酸へと代謝されるが、その代謝には、アルデヒド脱水素酵素 (ALDH)、特にミトコンドリアに局在する ALDH2 が関与している⁵¹⁾。興味深いことに、日本や中国、韓国といった東アジアの国々において特徴的に ALDH2 遺伝子多型の存在が認められており、東アジアの国々の 40%以上の人々が変異型の ALDH2 遺伝子 (ALDH2*2) を保有することが知られる^{52, 53)}。ALDH2*2 の人々は、アルコール不耐性であるため、例えば少量の飲酒であっても上述の不快症状を呈しやすく、また、これまでに行われた疫学研究の結果から、通常の ALDH2 遺伝型 (ALDH2*1) を保有する人と比べて、がんや他の深刻な疾病を発症するリスクが高いことが指摘されている⁵⁴⁾。特に、日本人の中年男性によく見られる食道扁平上皮がんについては、ALDH2 遺伝子の変異や飲酒量の増加によって発症リスクが劇的に高まることが報告されており⁵⁵⁻⁵⁷⁾、アセトアルデヒドが発がんの原因となっている可能性が強く示唆されている。

日本国立がんセンターが実施した、38,700 人の中年男性を対象とした前向きコホート研究の結果⁵⁸⁾、野菜や果物の摂取量が 1 日当たり 100 g 増えると食道がんの発症リスクが 11%低下することが報告されている。さらに興味深いことに、アブラナ科野菜の摂取量が 1 日当たり 100 g 増えると食道がん発症リスクが 56%低下することが層別解析の結果から示されており、食道がんの発症原因となるアセトアルデヒドの毒性緩和に有効な成分がアブラナ科野菜に存在する可能性が示唆されている。

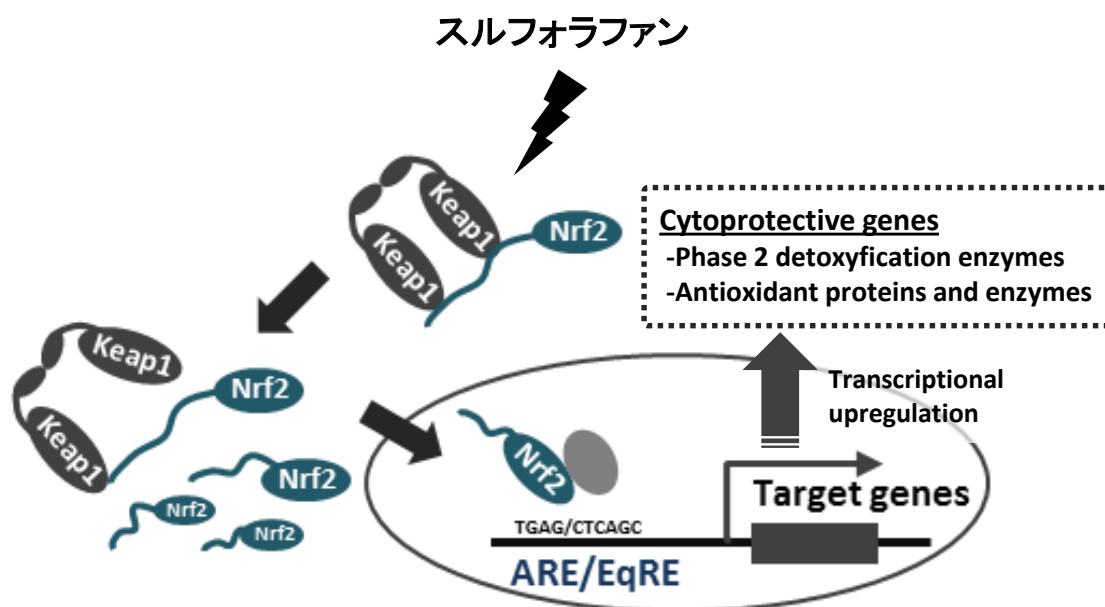


Fig. 3-1. Keap1-Nrf2-ARE 経路を介した、スルフォラファンの生体防御遺伝子誘導機構

多数の疫学研究⁵⁹⁻⁶²⁾から、アブラナ科野菜の種々の健康効果や生理作用にはアブラナ科野菜に特異的に豊富に含まれるグルコシノレート (GLS) 類が関与している可能性が高いと指摘されている。植物体において安定的に存在する GLSs は、植物に内在する、またはヒトや動物の腸内細菌叢が産生するミロシナーゼの作用により、生理活性成分として知られるイソチオシアネート (ITC) 類に変換される (Fig. 1-2B)⁶³⁾。ITCs は、その特有の官能基 (-NCS) や強い求電子性のために生体内に存在する様々なタンパク質と結合し、多彩な生理作用を発現することが知られる。ITCs の代表例のひとつであるスルフォラファン (SFN) は、強力な第二相酵素誘導能を持つ成分としてブロッコリーから見出された¹²⁾。それ以降、世界中の研究者の関心を集め、SFN は種々の抗酸化酵素や第二相酵素を誘導する作用や抗炎症作用により、発がん性物質や変異原性物質、活性酸素種等から細胞・組織を保護することが明らかとなっている^{16, 64, 65)}。生物の生体防御機構の中心的役割を担う転写因子 Nrf2 (Fig. 3-1) が、上述の SFN の生理作用発現に関与することが明らかとなっている⁶⁶⁾。Nrf2 は、通常、細胞質内において Keap1 と呼ばれる二量体タンパク質により捕捉されているが、種々のストレスや SFN のような誘導剤

の作用により Keap1 から遊離し、核内に移行後、Antioxidant Response Element (ARE) に結合し、上記の第二相酵素群を含む種々の標的遺伝子の転写を誘導する⁶⁷⁾。この Nrf2 を中心とした一連の転写制御機構 (Keap1-Nrf2-ARE 経路) を誘導する多様な低分子化合物がこれまでに見出されている^{68, 69)}。その中には SFN のような植物性食品から見出されたファイトケミカルが多数含まれている。したがって、Nrf2 を介した生体防御機構は、植物性食品によるがん予防効果や細胞・組織保護効果、さらには種々の疾病予防効果、“Phyto-Chemoprotection” を実現するための鍵と考えられる。そこで本章では、アセトアルデヒドの代謝を司る ALDH の発現誘導に対する Keap1-Nrf2-ARE 経路の関与を検証するとともに、その経路の誘導剤である SFN がアセトアルデヒドの代謝に及ぼす影響について検討を行った。

第2節 材料および方法

第1項 材料および試薬

試薬類は下記のように入手した。

SFN は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から、他の ITCs (erucin, iberin, benzyl-ITC, phenetyl-ITC, propyl-ITC, hexyl-ITC) は LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA) から購入した。4-(Rhamnopyranosyloxy)benzyl ITC は、*Moringa oleifera* から精製したものの⁷⁰⁾を J.W. Fahey (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA) から恵与された。Triterpenoid TP-225⁷¹⁾ は M.B. Sporn (Dept. of Pharmacology and Toxicology, Dartmouth Medical School, Hanover, NH, USA) から恵与された。Celastrol は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。Bis(benzylidene)acetones, HBB-2 and HBB-4 は、既報⁷²⁾により合成したものを使用した。Tricyclic bis(cyano-enone) (TBE-31) は既報⁷³⁾により合成したものを M.B. Sporn からご供与頂いた。フラボノイド類 (β -naphthoflavone, pinostrobin, tectochrysin, kaempferide) は Indofine Chemical Company

(Hillsborough, NJ, USA) から購入した。

第2項 細胞培養

使用した全ての細胞株は 5% CO₂ 環境下 37°C で培養した。マウス肝がん由来細胞株 Hepa 1c1c7 (American Type Culture Collection) は熱非動化処理を施したウシ胎児血清 (FBS) 10% (v/v) を含む α -MEM で培養した。マウス胎仔線維芽細胞 (MEFs) は 13.5 日胚を野生型または Nrf2 遺伝子欠損型の C57BL/6 マウスから取得し、熱非動化 FBS 10% (v/v) および 2 mM L-glutamine を含む Iscoves Modified Dulbecco's Medium 中で培養した。

第3項 動物試験

全ての動物試験は、National Institutes of Health (NIH) Guidelines および Animal Care and Use Committee of the Johns Hopkins University (MO11M123) に従って実施した。

動物試験 1 では、15 匹の 8-9 週齢雌性 CD-1 マウス (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) を使用し、種々の臓器における ALDH の活性および遺伝子発現の上昇に有効な SFN 摂取量の評価を行った。15 匹全ての CD-1 マウスを、AIN-76A 飼料で 7 日間馴化した後、無作為に 3 群に割付け (各群 n = 5)、SFN を含まない AIN-76A 飼料、AIN-76A 3 g 当たりに 5 (= 0.89 μ g) または 20 μ mol (= 3.54 μ g) の SFN を混合した飼料を 7 日間自由摂取させた。その後、安楽死させた後、肝臓、前胃および腺胃を摘出し、液体窒素中で急速凍結した後、使用まで -80°C で保存した。なお、CD-1 マウスでは前胃と腺胃とで第二相酵素の誘導挙動が異なるという報告¹²⁾があり、分けて摘出した。各臓器の一部については、RNA 安定化試薬 (RNAlater, Sigma, St. Louis, MO, USA) に浸し、RNA 抽出まで 4°C で保管した。

動物試験 2 では、18 匹の 8-9 週齢雌性 CD-1 マウスを使用した。動物試験 1 と同様に馴化させた後、2 群に割付け、Control 群には AIN-76A 飼料を、SFN 群には AIN-76A 3 g 当たりに 20 μ mol (= 3.54 μ g) の SFN を含む飼料を 7 日間自由摂取させた。その後、一

晩絶食させたマウスに 35% (v/v) エタノールを経口投与した (2.0 g/kg 体重)。エタノール投与前と投与 0.5、1、2、3、4 および 6 時間後に 20 μ L の血液を尾静脈より採取し、血中エタノールおよびアセトアルデヒド濃度を測定した (第 3 章第 7 項参照)。

第 4 項 ALDH 活性測定

Hepa 1c1c7 (6.0×10^5 cells) または MEFs (1.2×10^6) を 6 cm プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 環境下で 24 時間培養した後、連続希釈により調製した異なる濃度の誘導剤を含む培地 (10% FBS/ α -MEM) に交換し、さらに 48 時間培養した。調製した誘導剤を添加する際、アセトニトリルまたは DMSO の終濃度がそれぞれ 0.5 または 0.1% (v/v) を上回らないようにした。48 時間の培養後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、スクレーパーを用いてプレートから剥離・回収し、低温 (4°C) 下でホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離 (3000 $\times$ g, 15 min, 4°C) に供し、得られた上清の ALDH 活性を Koivula らの方法⁷⁴⁾を一部改良し、蛍光法により 96 well-plate を用いて測定した。具体的には、70 mM sodium pyrophosphate buffer (pH 8.0)、1.67 mM pyrazole、1.33 mM NAD および上清を含む反応溶液 (190 μ L) に 10 μ L の 90 mM propionaldehyde を添加することで反応を開始させ、NADH 生成 ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm/ $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm) の初速度を 25°C で 10 分間測定した。Propionaldehyde 非添加ウェルを設けることでブランクの反応速度も測定した。ALDH 反応速度 (propionaldehyde 添加時の NADH 生成速度から propionaldehyde 非添加時の NADH 生成速度を差し引いた値) を上清のタンパク質濃度で標準化し、ALDH 活性 (nmol-NADH/min/mg protein = mU/mg-protein) を算出した。

細胞分画の ALDH 活性を測定するために、細胞 (Hepa 1c1c7) および摘出した各臓器を、0.25 M sucrose および 1 mM 2-mercaptoethanol を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中でホモジナイズした後、遠心分離 (750 $\times$ g, 15 min, 4°C) に供し、細胞核等を除去した。得られた上清をさらに 2 回遠心分離 (12,000 $\times$ g, 20 min, 4°C) に供し、細胞質およびミクロソームを含む画分 (上清)、ならびにミトコンドリア画分を含む沈殿を得た。細胞

質およびミクロソーム画分は、希釈した後、前述の ALDH 活性測定に供した。ミトコンドリア画分については、沈殿を 0.25 M sucrose 水溶液に懸濁した後、同量の 1% (w/v) sodium deoxycholate/1% sodium bicarbonate 水溶液を加え、Branson Sonicator (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA) を用いて 2 分間超音波処理を行い、ALDH 活性測定に供した。

第 5 項 NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 活性測定

Hepa 1c1c7 を 10^4 cells/well となるように 96 ウェルプレートに播種し、24 時間培養した後、連続希釈により調製した誘導剤溶液を添加し、48 時間処理を行った。Prochaska assay method^{75, 76)}に準じ、menadione を基質に用いて、NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の活性を測定した (Fig. 3-2)。具体的には、処理後の細胞を PBS で 2 回洗浄した後、0.8 mg/mL digitonin/2 mM EDTA 溶液 75 μ L を各ウェルに添加し、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、室温に移し、プレートシェーカーで振とう (250 rpm) することで細胞を溶解させた。細胞溶解液のうち 20 μ L については、新たな 96 ウェルプレートに移し、BCA 法によるタンパク質定量に供した。各ウェルに残る 55 μ L の細胞溶解液に対し、200 μ L の反応溶液 [7.5 mL の 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4)、100 mg のウシ血清アルブミン、1 mL の 1.5% (v/v) Tween-20、0.1 mL の 7.5 mM FAD、1 mL の 150 mM glucose-6-phosphate、90 μ L の 50 mM NADP、300 U の glucose-6-phosphatase dehydrogenase (from yeast)、150 μ L の 50 mM menadione/acetonitrile および 45 mg の MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) を混合し、蒸留水で 150 mL の定容を添加し、室温で 5 分間反応させた。各ウェルに 50 μ L の反応停止液 (30 mM dicumarol/5% DMSO/5 mM phosphate buffer) を添加した後、610 nm の吸光度を測定することで、MTT formazan (モル吸光係数: $11.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 生成量を見積もり、NQO1 活性 (nmol/min/mg-protein = mU/mg-protein) を求めた。

CD-1 マウスから採取した臓器については、前項で述べたように細胞質およびミクロ

ソームを含む画分を調製し、NQO1 活性測定に供した。

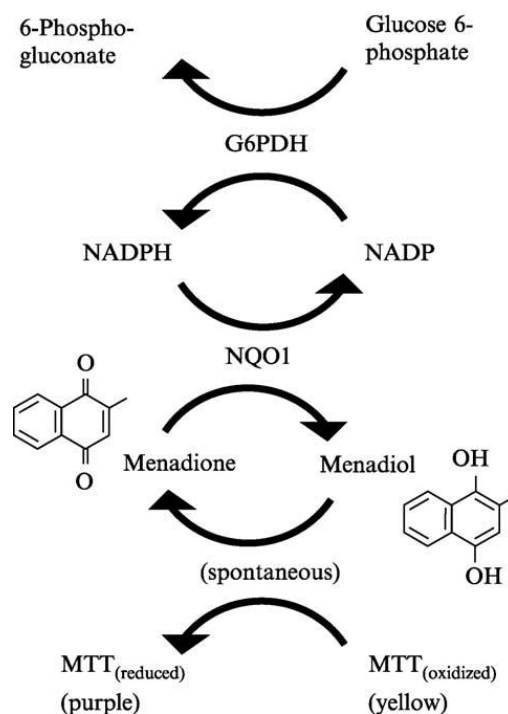


Fig. 3-2. NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 活性測定法の原理 ⁷⁶⁾

第6項 ALDHs 遺伝子発現量の測定

各種各濃度の誘導剤による処理を24時間行ったHepa 1c1c7、またはRNA安定化処理を行ったマウス由来の各臓器切片からTRIzol reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)を用いて抽出したtotal RNAを逆転写反応 (iScript, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) に供し、cDNAを作製した。cDNAはSYBR Green fluorescence (POWER SYBR Mastermix, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いた定量PCR (7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems) に供した。使用したプライマーは全て既報 ⁷⁷⁾に基づき設計した。各ALDHのmRNA発現量は、 β -actinのmRNAを用いて標準化し、 $\Delta\Delta C_t$ 法によりALDH遺伝子の発現比を算出した。

第7項 血中エタノールおよびアセトアルデヒド濃度の測定

血中エタノールおよびアセトアルデヒド濃度は、Tottmar らの方法⁷⁸⁾を改良し、酵素法により測定した。すなわち、マウスの尾静脈から採取した全血試料 (20 μL) を速やかに 200 μL の 4% (v/v) 過塩素酸 (PCA) と混合した後、密閉したチューブ中でインキュベートした (4°C, 10 min)。その後、遠心分離 (3000 $\times g$, 10 min, 4°C) によって得た上清を新たなチューブに移し、20 μL の 3 M K_2CO_3 を加えることで上清の pH を 7.5 ~ 8.0 とした。遠心分離 (3000 $\times g$, 10 min, 4°C) により沈殿を除去し、上清をエタノールおよびアセトアルデヒド分析に供した。

エタノール濃度の測定は 96 ウェルプレートを使用して行った。反応溶液：0.5 M glycine-NaOH buffer (pH 9.0), 0.6 mM NAD, 53 units/mL ADH (purified ADH from yeast, Sigma) を含むウェルに、適当に希釈した上清またはエタノールの希釈系列を添加して反応を開始させ、NADH ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$, 25°C) の生成速度を測定した。上清またはエタノールを含む最終の反応溶液量は 200 μL とした。血中エタノール濃度は、5 分間までの測定により得た NADH の生成速度をもとにエタノール検量線を用いて算出した。

アセトアルデヒド濃度の測定は石英キュベット (光路長：10 mm) を用いて行った。2.33 mL の反応溶液 [50 mM sodium pyrophosphate (pH 8.8)、0.1 mM pyrazole、0.1 mM NAD^+ および 0.2 unit/mL of ALDH (potassium-activated from baker's yeast, Sigma)] に、前述の上清 0.17 mL を添加することで反応を開始させた。反応開始前と 5 分後に蛍光強度 ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$, Model LS 50, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) を測定し、NADH (モル吸光係数： $6.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) の生成速度を見積もった。アセトアルデヒド標品の希釈系列の測定により作成した検量線を用いて蛍光強度の変化量 (NADH 生成量) から血中のアセトアルデヒド濃度を算出した。

第8項 統計解析

全ての値は平均値±標準誤差として示した。2群間の比較は Student's *t*-test により、3群間以上の比較は、一元配置分散分析 (ANOVA) の後、Dunnett's test による多重比較検定を行った。有意水準は 5%未満とした。

第3節 結果

第1項 Hepa 1c1c7 における SFN の ALDH 活性上昇作用

マウス肝がん由来細胞 Hepa 1c1c7 を用いて、SFN が ALDH に及ぼす影響を検討した。異なる濃度 (0.3、1.0 および 3.0 μM) の SFN で 48 時間処理した Hepa 1c1c7 のホモジネート上清の ALDH 活性を測定した結果、SFN は濃度依存的に ALDH 活性を上昇させることが初めて示された (Fig. 3-3A)。少なくとも 0.3 μM の SFN で処理を行うことで有意 ($p < 0.05$) に ALDH 活性を上昇させることが判明した。また、SFN の ALDH 活性上昇作用は、SFN による処理時間に依存していた (Fig. 3-3B)。

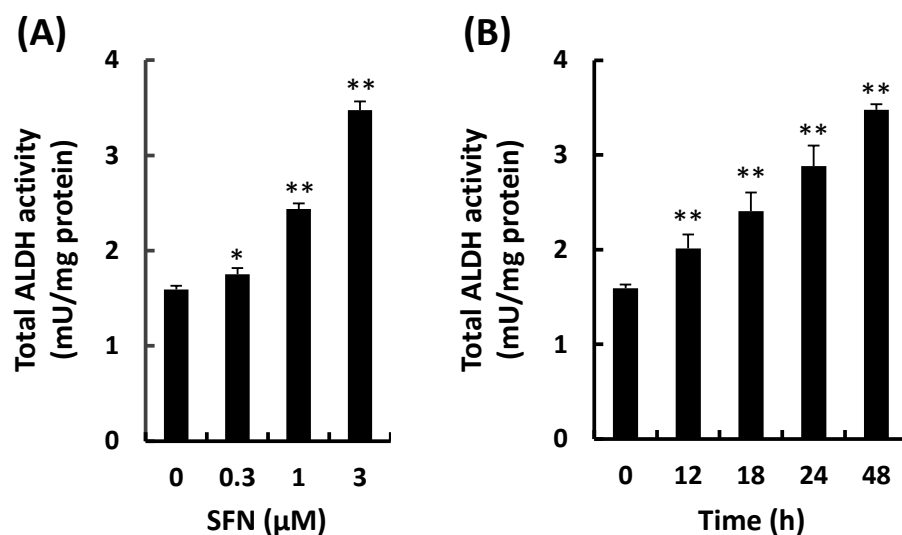


Fig. 3-3. スルフォラファン (SFN) が Hepa 1c1c7 細胞の ALDH 活性に及ぼす影響。培養時間：48 時間 (A)、SFN 濃度：3 μM [平均値±標準誤差 (n = 8)、*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. untreated (Dunnett's test)]

第2項 第二相酵素誘導剤の ALDH 誘導能

SFN の構造が特異的に ALDH 誘導に寄与したかを明らかにするために、8 つの構造分類に属する 20 種の化合物の ALDH 誘導能を評価した (Table 3-1)。Nrf2 を介して第二相酵素を誘導することが既知、あるいは、その化学構造から誘導が期待される化合物を選定した。Hepa 1c1c7 を用いて評価を行った結果、SFN が属する ITCs だけではなく、フラボノイド類やトリテルペノイド類を含む 15 種の化合物が ALDH 誘導作用を示した。そのうち、11 種類が天然由来の化合物、すなわちファイトケミカルであった。各化合物の ALDH 誘導能は、Hepa 1c1c7 において ALDH 活性を 2 倍まで高めるために必要な化合物濃度 (CD_{ALDH} ; Concentration required to Double the enzyme activity of ALDH) として求めた。いくつかの化合物の測定結果と CD_{ALDH} 値の求め方を Fig. 3-4 に示した。

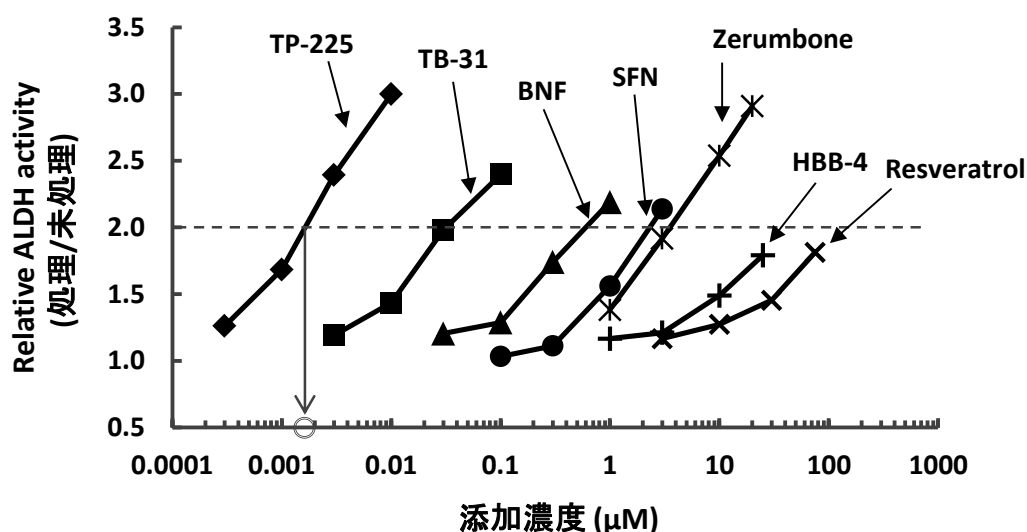


Fig. 3-4. 構造が異なる誘導剤が Hepa 1c1c7 の ALDH 活性に及ぼす影響[未処理細胞の ALDH 活性に対する比活性 ($n = 8$)、TP-225 を例に CD_{ALDH} 値の求め方を示す。]

Table 3-1. 評価に供した 20 種類の化合物 (天然由来:16、合成:4) の ALDH 誘導能 (CD_{ALDH}) および NQO1 誘導能 (CD_{NQO1}) [CD: ALDH または NQO1 活性を 2 倍まで高めるのに必要な化合物濃度]

構造分類, 化合物/主な含有素材	構造	CD_{ALDH} (μM)	CD_{NQO1} (μM)
イソチオシアネート			
Sulforaphane [1] [†] /broccoli, Cruciferous vegetables		2.31	0.22
Erucin [2]/Cruciferous vegetables		1.61	0.65
Iberin [3]/Cruciferous vegetables		13.0	2.01
Benzyl isothiocyanate/Cruciferous vegetables		>30	>30
Phenethyl isothiocyanate/Cruciferous vegetables		>10	>10
Propyl isothiocyanate/Cruciferous vegetables		>100	>100
Hexyl isothiocyanate/Cruciferous vegetables		>100	>100
4-(Rhamnopyranosyloxy)benzyl isothiocyanate; 4RBITC [4] /Moringa		3.04	0.14
ステロイド			
Withaferin A [5]/Indian winter cherry		1.98*	0.19
トリテルペノイド			
2-Cyano-3,12-dioxooleane-1,9(11)-dien-28-onitrile; TP-225 [6] /Synthetic		0.0016	0.00038
Celastrol [7]/Thunder god vine		0.94	0.24
トリサイクリックシアノエノン			
Tricyclic bis(cyano enone); TBE-31 [8]/Synthetic		0.032	0.0019
ビスベンジリデン			
Bis(2-hydroxybenzylidene)acetone; HBB-2/Synthetic		>10	0.27
Bis(4-hydroxybenzylidene)acetone; HBB-4 [9] /Synthetic		47.0	16.9
フラボノイド			
β -Naphthoflavone [10] /Synthetic		0.60	0.023
Pinostrobin [11]/Thai ginger		4.6	0.67
Tectochrysin [12]/Sour cherry		7.0	0.4
Kaempferide [13]/Aromatic ginder		27.8	6.4
スティルベン			
Resveratrol [14]/Grape		121*	>150
セスキテルペン			
Zerumbone [15]/Wild ginger		3.53	0.6

[†]括弧内の数字はFigure 3-5中の数字と対応

*外挿値

第3項 低分子化合物の ALDH 誘導能と NQO1 誘導能の相関

次に、前項での 20 種類の化合物について、代表的な第二相酵素である NQO1 に対する誘導能 (CD_{NQO1}) を求め、 CD_{ALDH} とともに Table 3-1 に示した。 CD 値は、最も強力な誘導能を示した TP-225 の水準 ($CD_{ALDH} = 0.0016 \mu M$, $CD_{NQO1} = 0.00038 \mu M$) から、今回評価可能であった中で最も低い誘導能を示した resveratrol の水準 ($CD_{ALDH} = 121 \mu M$, $CD_{NQO1} > 150 \mu M$) まで広い分布を示した。 $ALDH$ に対する誘導能 (CD_{ALDH}) と NQO1 に対する誘導能 (CD_{NQO1}) の関連を明らかにするために、Hepa 1c1c7 において CD 値を求めることができた 15 化合物の CD_{ALDH} 値と CD_{NQO1} 値を両対数プロットした (Fig. 3-5)。その結果、両酵素に対する CD 値のダイナミックレンジが 5 桁以上にわたって極めて高い相関関係を示すことが明らかとなった。

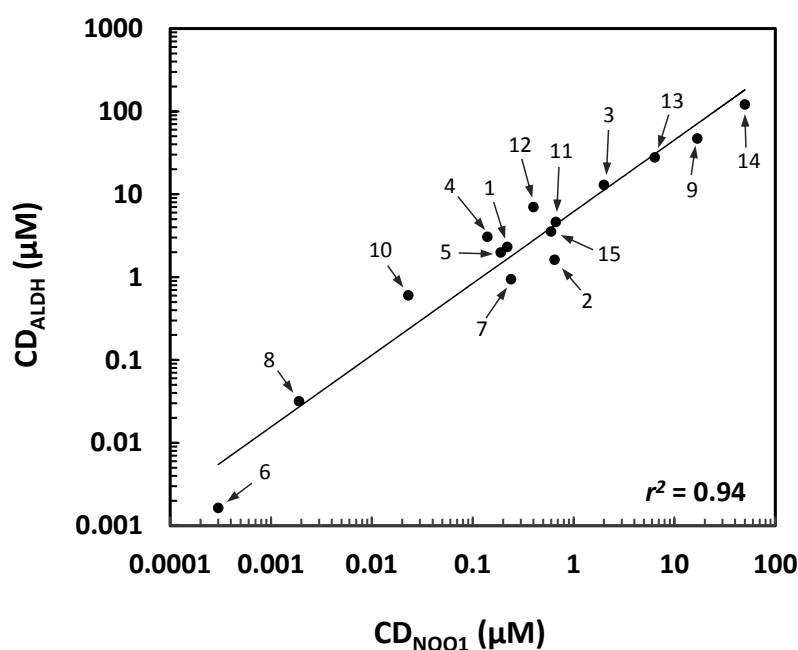


Fig. 3-5. 15 種類の化合物の ALDH 誘導能 (CD_{ALDH}) と NQO1 誘導能 (CD_{NQO1}) の関係 [グラフ中の番号は Table 3-1 と対応]

第4項 SFN による ALDH 誘導作用に対する Nrf2 の関与

SFN の ALDH 誘導作用 (Fig. 3-3) に転写因子 Nrf2 が関与するかどうかを明らかにす

るために、野生型 (WT) C57B/6 および Nrf2 遺伝子を欠損させた (Nrf2^{-/-}) C57B/6 から得た MEFs を用いて SFN が ALDH 活性に及ぼす効果を評価した。その結果、SFN は WT MEFs の ALDH 活性を濃度依存的 (1 ~ 5 μ M) に上昇させたが、Nrf2^{-/-} MEFs では ALDH 活性の上昇は全く認められなかった (Fig. 3-6)。

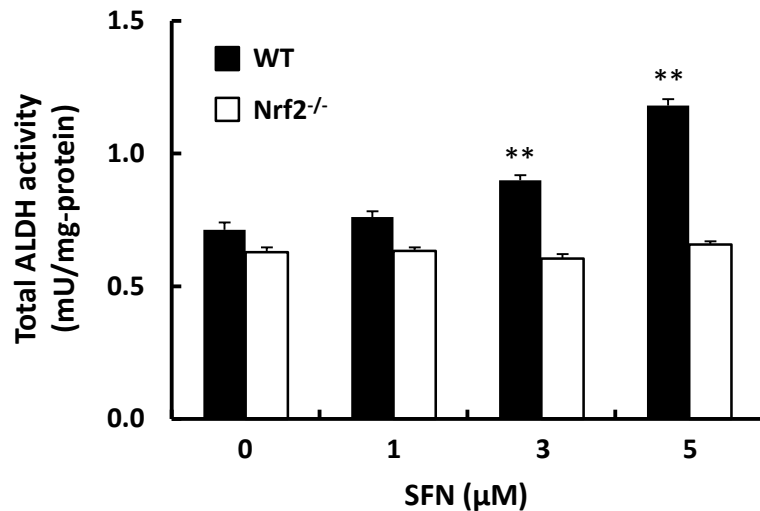


Fig. 3-6. スルフォラファン (SFN) が野生型 (WT) C57B/6 由来 MEFs および Nrf2 欠損 (Nrf2^{-/-}) C57B/6 由来 MEFs の ALDH 活性に及ぼす影響 [平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 8), **: $p < 0.01$ vs. 0 μ M (Dunnett's test)]

第5項 ALDH アイソザイムに及ぼす影響

強力な第二相酵素誘導能が知られ、化学構造が大きく異なる 3 種の化合物 (SFN, TP-225, β -naphthoflavone) について、アセトアルデヒドの代謝を担うことが知られる ALDH1A1 (細胞質に局在) と ALDH2 (ミトコンドリアに局在) に注目して誘導作用を検討した。細胞質画分とミトコンドリア画分の ALDH 活性を測定した結果、いずれの化合物も両画分において ALDH 活性を上昇させた (Fig. 3-7)。また、その作用は化合物の濃度依存的であり、最大で 3 倍程度まで ALDH 活性が上昇した。さらに、データは示していないが、*Aldh1a1* および *Aldh2* の mRNA 発現量も増加した。

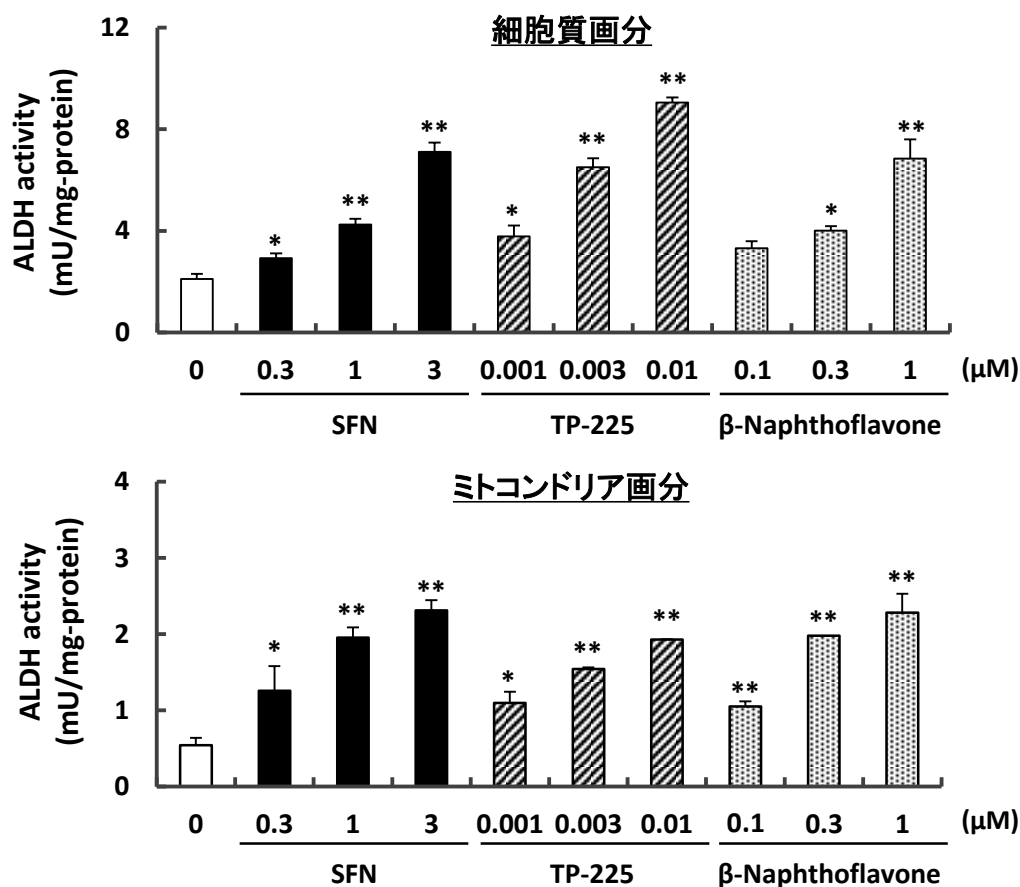


Fig. 3-7. 構造が異なる 3 種の誘導剤が Hepa 1c1c7 細胞の細胞質画分およびミトコンドリア画分の ALDH 活性に及ぼす影響 [平均値±標準誤差 (n = 4), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. 0 μM (Dunnett's test)]

第 6 項 ALDHs 遺伝子における Antioxidant Response Element 配列の存在

ALDHs 遺伝子が Keap1/Nrf2/ARE 経路を介して誘導されるのであれば、第二相酵素をコードする遺伝子と同様に遺伝子配列中に Antioxidant Response Element (ARE) コアコンセンサス配列 [RTGA(S/Y)nnnGCR (R = A or G, S = C or G, Y = C or T and n = any nucleotide)] を有していると考えられる。これまでの研究^{79,80)}から、ALDHs 遺伝子のうち、*Aldh1a1* と *Aldh3a1* が自身の 5'フランキング領域に ARE コアコンセンサス配列を有することが示唆されている。同様の手法を用いて、*Aldh2* の 5'フランキング領域 (the ENSEMBL mouse project website) に ARE コアコンセンサス配列が存在するか否かを調

べたところ、2,000 塩基範囲内だけでも少なくとも 2 箇所に完全に一致 (Score: 8/8) する配列を見出した。それらの配列は、“GTGACcagGCG”と“ATGAGacaGCA”であり、それぞれ推定転写開始点の上流 82–92 塩基と 1364–1374 塩基上流に位置した。両配列とも embedded activator protein 1-binding sites (TGASTCA) を含まないことから、class 4 に分類される⁸¹⁾。

第7項 SFN 摂取によるマウス臓器における ALDH 誘導作用

SFN の *in vivo* における ALDH 誘導能を評価するために、異なる含量の SFN を含む飼料を 7 日間摂取したマウスから摘出した臓器（肝臓・前胃・腺胃）の NQO1 活性ならびに ALDH 活性と ALDHs mRNA の発現量を測定した。本試験では、異なる濃度の SFN を含む飼料を摂取した 3 群間において、体重や摂餌量に有意な差は認められなかった。第二相酵素である NQO1 についてはこれまでと同様に、SFN 用量依存的な活性上昇が肝臓を含む全ての臓器において認められた (Fig. 3-8)。control 群のマウスにおいて臓器間の ALDH 活性を測定・比較した結果、肝臓の ALDH 活性が最も高かった。データは示していないが、この傾向はミトコンドリア画分において特に顕著であり、肝臓のミトコンドリア画分の ALDH 活性は、前胃および腺胃の同画分の ALDH 活性と比べてそれぞれ 20 倍および 5 倍高かった。SFN を摂取したマウスでは、肝臓を含む全ての臓器の両画分において ALDH 活性の有意な上昇が認められた。高用量 (20 $\mu\text{mol}/3 \text{ g diet}$) の SFN を摂取させたマウスの肝臓では、細胞質画分およびミトコンドリア画分の ALDH 活性はそれぞれ 1.4 倍および 1.5 倍まで上昇した (Fig. 3-9)。

アセトアルデヒドの代謝に関わる ALDH1A1 および ALDH2 の発現が誘導されたことを確認するために、マウス臓器の ALDHs (*Aldh1a1* および *Aldh2*) 遺伝子発現量を測定した。また、アセトアルデヒドの代謝への寄与は低いですが、ARE コアコンセンサス配列を持ち、Nrf2 依存的に発現制御されると示唆されていた *Aldh3a1* の発現量も同時に測定した。Table 3-2 に示すように、3 種の ALDH 遺伝子の基本発現量は臓器間で大きく異な

った。*Aldh1a1* と *Aldh2* は他の臓器と比べて肝臓中で多く発現した一方、*Aldh3a1* は肝臓と比べて前胃および腺胃における発現が顕著であった。SFN を摂取させたマウスの肝臓において *Aldh1a1* および *Aldh2* の遺伝子発現は最大で 2-2.5 倍まで上昇した。

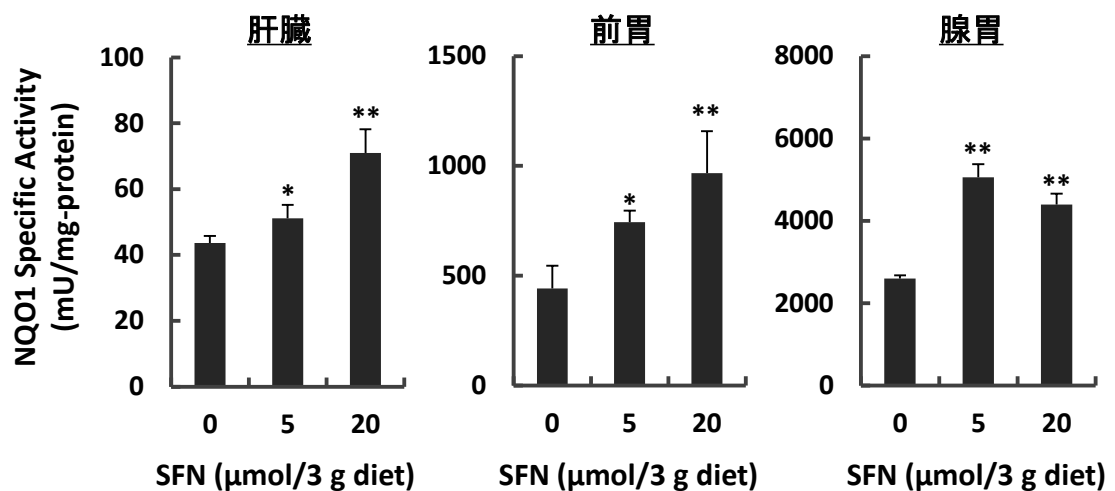


Fig. 3-8. スルフォラファン (SFN) の摂取が CD-1 マウス肝臓、前胃および腺胃の ALDH 活性に及ぼす影響 [平均値±標準誤差 (n = 5)、*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control (0 μM) (Dunnett's test)]

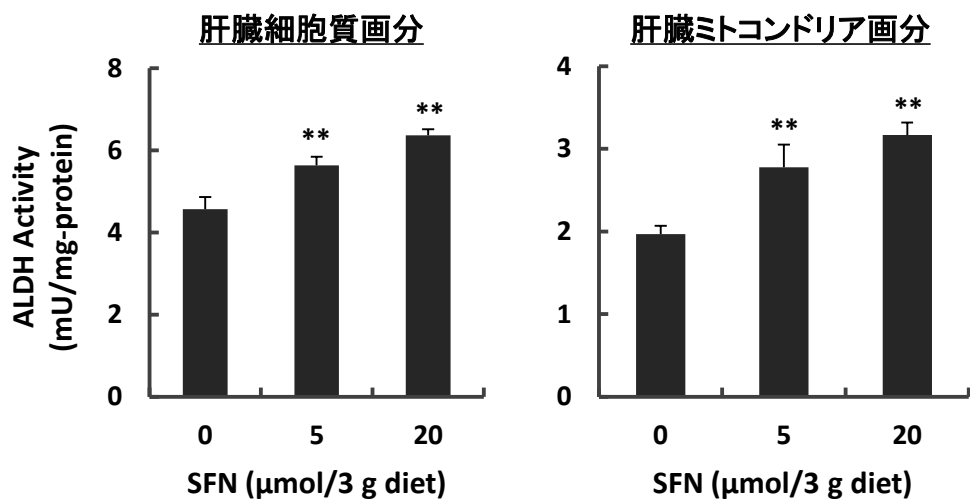


Fig. 3-9. スルフォラファン (SFN) の摂取が CD-1 マウス肝臓の細胞質画分およびミトコンドリア画分の ALDH 活性に及ぼす影響 [平均値±標準誤差 (n = 5)、**: $p < 0.01$ vs. control (0 μM) (Dunnett's test)]

Table 3-2. スルフォラファン (SFN) の摂取が CD-1 マウス肝臓、前胃および腺胃の ALDH 遺伝子発現に及ぼす影響 [平均値±標準誤差 (n = 5)、control 群の肝臓における発現量を 1.0 としたときの相対値]

遺伝子	SFN ($\mu\text{mol}/3 \text{ g diet}$)	相対発現量		
		肝臓	前胃	腺胃
<i>Aldh1a1</i>	0 (control)	1.00 ± 0.05^a	0.14 ± 0.02	0.066 ± 0.005
	5	1.72 ± 0.19^a	0.27 ± 0.04	0.099 ± 0.005
	20	2.54 ± 0.18^a	0.32 ± 0.02	0.102 ± 0.009
<i>Aldh2</i>	0 (control)	1.00 ± 0.13^a	0.050 ± 0.001	0.028 ± 0.001
	5	1.82 ± 0.14^a	0.070 ± 0.002	0.038 ± 0.002
	20	2.15 ± 0.11^a	0.076 ± 0.003	0.046 ± 0.002
<i>Aldh3a1</i>	0 (control)	1.00 ± 0.06^b	14700 ± 325	4920 ± 529
	5	1.75 ± 0.25^b	26000 ± 3880	14900 ± 1870
	20	3.53 ± 0.33^b	34000 ± 4250	34600 ± 4300

^a 肝臓における *Aldh1a1* および *Aldh2* 遺伝子発現量は胃（前胃および腺胃）と比べて高い

^b 肝臓における *Aldh3a1* 遺伝子発現量は胃（前胃および腺胃）と比べて顕著に低い。

第 8 項 SFN の摂取が血中エタノールおよびアセトアルデヒド濃度に及ぼす影響

SFN の摂取がアルコール投与後の血中エタノール濃度とアセトアルデヒド濃度に及ぼす影響を検討した。まず、control マウスではエタノール投与 (2.0 g/kg 体重) の 1 - 2 時間後までに血中エタノール濃度とアセトアルデヒド濃度はそれぞれ約 30 mM と約 22 μM にまで達した。その後、血中エタノール濃度は速やかに低下したが、血中アセトアルデヒド濃度はエタノール投与 6 時間後まで持続して検出された (Fig. 3-10A&B)。SFN (20 $\mu\text{mol}/3 \text{ g diet}$) を 7 日間摂取したマウスでは、エタノール投与後の血中エタノール濃度の低下が僅かに認められる傾向にあったが、時間曲線下面積 (AUC) において有意な差は認められなかった (Fig. 3-10C)。一方、血中アセトアルデヒド濃度は、SFN を摂取したマウスにおいて、投与後の急激な上昇が約 30%抑制され、その後も低値で推移した

(Fig. 3-10B)。血中アセトアルデヒド濃度の AUC は SFN を摂取したマウスで control マウスと比べて有意に ($p < 0.01$) 低かった (Fig. 3-10C)。一次線形モデルを用いた薬物動態解析の結果、SFN を摂取させたマウスにおける血中アセトアルデヒドの半減期 (1.77 ± 0.12 h) は、control マウスにおける血中半減期 (3.43 ± 0.23 h) と比べて半分程度であり、SFN の摂取によりアセトアルデヒドの血中からの消失が強く促進されたことが判明した (Fig. 3-10D)。

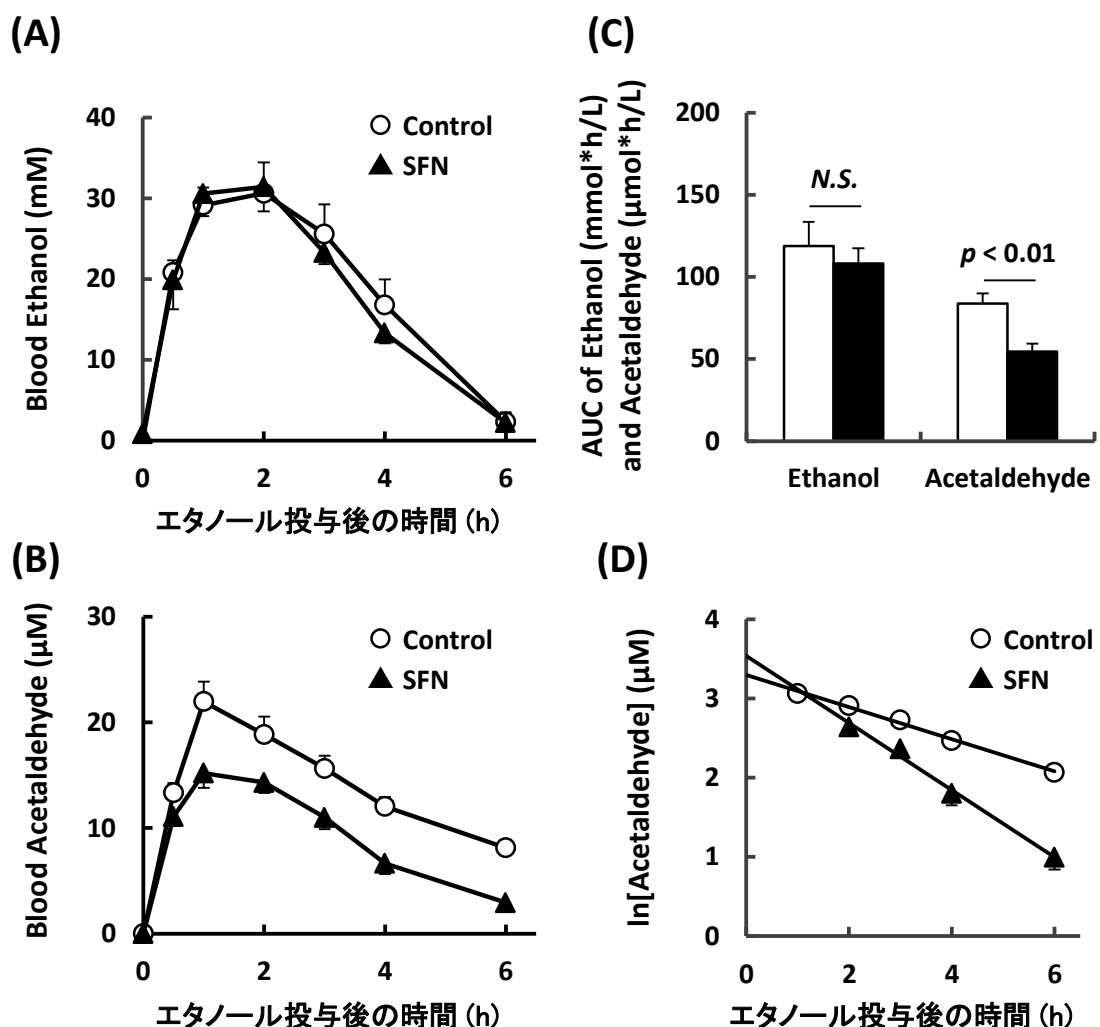


Fig. 3-10. スルフォラファン (SFN) の摂取がエタノール投与後の血中エタノール濃度およびアセトアルデヒド濃度の動態に及ぼす影響。A: 血中エタノール濃度、B: 血中アセトアルデヒド濃度、C: 血中エタノール濃度とアセトアルデヒド濃度の時間曲線下面積 (AUC)、D: 血中アセトアルデヒド濃度の片対数プロット (D) [平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 9)]

第4節 考察

ヒトゲノム中に少なくとも 17 種の ALDH 遺伝子が見出されている⁵¹⁾が、本章では、アセトアルデヒドの代謝に関わる ALDH1A1 および ALDH2 に着目し、SFN および他の第二相酵素誘導剤の ALDH 誘導能を検討した。8 つの化学構造分類に属する計 20 種類の化合物の ALDH 誘導能を評価した結果、それらの ALDH 誘導能は、代表的な第二相酵素である NQO1 に対する誘導能と強く相関することが判明した (Fig. 3-5)。さらに、SFN による ALDH 活性上昇作用は Nrf2 を遺伝的に欠損させた MEFs において完全に消失したことから (Fig. 3-6)、ALDHs の発現誘導に Nrf2 が関与していることが明示された。このことは、ALDH1A1 (*Aldh1a1*) および ALDH2 (*Aldh2*) のタンパク質または遺伝子発現量が、WT マウスと比べて Nrf2^{-/-}マウスで有意に低くなることを示した複数の omics 解析の結果^{80, 82-86)}とも一致する。また、Lamlé らの報告⁸⁷⁾によると、エタノールを長期投与した Nrf2^{-/-}マウスでは、WT マウスと比べて肝臓中に蓄積されるアセトアルデヒド濃度が高く、その結果、重篤な肝障害を原因に死亡する確率が劇的に高まることが示されており、このこともまた、Nrf2 が ALDH の発現誘導を制御していることを示している。さらに本研究では、*Aldh1a1* や *Aldh3a1*^{79, 80)}と同様に、*Aldh2* のプロモーター領域においても ARE コアコンセンサス配列が複数個存在することを確認しており、アセトアルデヒドの代謝を担う ALDH1A1 および ALDH2 の発現誘導が Keap1-Nrf2-ARE 経路により制御されていることが明示された。このことは、Keap1-Nrf2-ARE 経路を誘導することが知られる SFN を含む種々の化合物が ALDH 誘導を介してアセトアルデヒドの代謝を促進し得ることを示す知見であった。これらの知見から、SFN の供給源であるブロッコリーや BS のみならず、ALDH 誘導能を見出した 11 種のファイトケミカルを含む野菜や果物の摂取もまた、アセトアルデヒドの毒性緩和に有効であると期待できる。

第5節 小括

Most East Asians are afflicted with ethanol intolerance attributable to polymorphism of aldehyde dehydrogenases (ALDH), resulting in accumulation of acetaldehyde from ethanol metabolism. Elevated levels of acetaldehyde are responsible not only for the early symptoms of alcohol intolerance (flushing, headache, and tachycardia), but also for long-term liver damage and esophageal cancer. This chapter shows that low concentrations of sulforaphane (SFN), an isothiocyanate from broccoli and other crucifers, which is a known potent inducer of multiple cytoprotective genes, upregulated ALDH in Hepa 1c1c7 murine hepatoma cells. Various natural and synthetic agents displayed a wide range of inducer potencies for ALDH that paralleled those for NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1) over nearly 6 orders of magnitude. The induction was Keap1/Nrf2/ARE pathway dependent: (i) the induction did not occur in embryo fibroblasts from *nrf2*^{-/-} mice, and (ii) *Aldh1a1*, 2, and *3a1* genes contained ARE consensus sequences. The induction of ALDH by SFN occurred in cytosol and mitochondria involving several ALDH genes, as similar to the elevation of mRNA levels for *Aldh1a1*, *Aldh2*, and *Aldh3a1*. Feeding of SFN to female CD-1 mice (5 or 20 μ mol/day for 7 days) elevated cytosolic and mitochondrial ALDH specific activities in liver, glandular and forestomach. A single administration of ethanol (2.0 g/kg body weight) to these animals showed less effect of SFN on ethanol pharmacokinetics, but induced doubled rates of acetaldehyde disposal. These results suggest that SFN may protect humans against acetaldehyde toxicity.

第4章 腸管上皮におけるスルフォラファンの吸収機構

第1節 緒言

第3章において述べたように、ブロッコリーやキャベツ、ケールなどのアブラナ科野菜の摂取によって、種々のがんや生活習慣病の発症リスクが低下することが多数の疫学研究から示唆されている⁵⁸⁻⁶¹⁾。これは、アブラナ科野菜に含まれるグルコシノレート (GLSs) から派生するイソチオシアネート (ITCs) が関与していると考えられている⁶²⁾。ITCs の代表例であるスルフォラファン (SFN)¹²⁾は、転写因子 Nrf2 が制御する生体防御機構、すなわち、第二相解毒酵素や抗酸化タンパク質などを強力に誘導し(Fig. 3-1)⁶⁴⁻⁶⁷⁾、その結果、アフラトキシン¹³⁾やメチル水銀⁸⁸⁾、アクロレイン¹⁴⁾、さらには第3章で見出したアセトアルデヒドといった種々の発がん性・変異原性物質の解毒・排泄や、活性酸素種の消去を促進する。また、種々のがん¹⁵⁾や、肝障害⁸⁹⁾、II型糖尿病性心筋症⁹⁰⁾、中枢神経疾患⁹¹⁾などを顕著に予防することが動物試験によって示されている。さらに、複数の臨床研究から、SFN の摂取が自閉症¹⁸⁾やインスリン抵抗性¹⁹⁾、ピロリ菌感染²⁰⁾、統合失調症²¹⁾の改善に有効であることが示唆されている。このような知見の蓄積により、SFN の恩恵を受けられる機能性食品の開発が強く求められている。

ファイトケミカルなど、特定の成分の生体利用効率や生体内での有効性を推定するために、成分の ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) 特性を把握することが重要である。これまでの SFN の吸収性評価は、SFN として摂取した場合と SFN の前駆体であるグルコラファニン (GR) として摂取した場合での SFN の生体利用効率の比較に終始している^{92, 93)}。GR として摂取した場合、GR から SFN への変換は腸内菌叢に頼らざるを得ないため、SFN は緩やかに吸収され生体利用効率は 10 - 20%前後に留まる。一方、SFN として摂取した場合、SFN は速やかに、かつ高効率 (約 70%) で吸収された後、主に肝臓でメルカプツール酸代謝を受け、遅くとも摂取後 10 時間後までにほとんどの SFN は尿中へと排泄される⁹⁴⁾。しかしながら、SFN の腸管における吸収

メカニズムはこれまで明らかにされておらず、SFN が高効率に吸収される理由は不明であった。そこで本章では SFN の吸収メカニズムおよび経路の解明を目的として、Caco-2 細胞単層膜を用いた透過試験を実施した。

第2節 材料および方法

第1項 試薬

SFN は Toronto Research Chemical Inc. (Toronto, ON, Canada) から、phloretin は Wako Pure Chemicals Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から、fluorescein sodium salt、sodium butyrate、(-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) は Sigma-Aldrich (St. Louise, MO, USA) から、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、fetal bovine serum (FBS) は GIBCO Life Technologies (Grand Island, NY, USA) から、wortmannin は ENZO Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) から、Iberin (IBN; 1-isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)-propane) は LKT laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA) から、Glutathione conjugate of SFN (GSH-SFN) は、Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) から購入した。他の試薬類は全て分析試薬グレードものを、そのまま使用した。

第2項 Caco-2 細胞培養

Caco-2 細胞の培養は既報⁹⁵⁾に準じて行った。培地には、10% (v/v) FBS、1% (w/v) 非必須アミノ酸 (MP Biomedicals, Irvien, CA, USA)、2 mM L-glutamine (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、100 U/mL ペニシリン (Meiji Seika Co., Tokyo, Japan)、100 µg/mL streptomycin (Nacalai Tesque) および 1.7 µM insulin (Sigma-Aldrich) を含む DMEM を用い、CO₂ インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で培養した。Caco-2 細胞 (1.0×10^6 cells) を直径 100 mm のディッシュに播種し、4 - 5 日間の培養によりコンフルエントとした後、継代を行った。継代には、0.25% (w/v) trypsin と 0.02% (w/v) EDTA を含む PBS (Cosmo Bio

Co., Tokyo, Japan) を用いた。後述する透過試験には、継代数 50 - 60 の Caco-2 細胞を用いた。I 型コラーゲン (collagen gel culturing kit, Cellmatrix type I-A, Nitta Gelatin, Osaka, Japan) で表面をコーティングしたトランスウェル・インサート (BD Falcon cell culture inserts, polyethylene terephthalate membrane, 0.9 cm², 1.0 μm pore size; BD Biosciences, Bedford, MA, USA) に、培地に懸濁した Caco-2 細胞 (4.0×10^5 cells) を播種した。BD BioCoat™ intestinal epithelium differentiation kit (BD Biosciences) を用いて Caco-2 細胞の分化を促進させ、培養 6 日後に単層膜を切りだして試験に供した。Millicell®ESR-2 (EMD Millipore, Darmstadt, Germany) を用いた経上皮電気抵抗 (transepithelial electrical resistance: TEER) 値の測定結果から、TEER 値 $> 100 \Omega \text{ cm}^2$ を示した膜を透過試験に使用した。

第 3 項 透過試験

既報⁹⁶⁾に準じ、Ussing Chamber システム (Model U-2500, Warner Instrument Corporation, Hamden, CT, USA) を用いて、Caco-2 細胞単層膜に対する透過試験を実施した。Caco-2 細胞単層膜を Hank's balanced salt solution (HBSS, pH 6.0) で洗浄した後、インサートから丁寧に剥がし、Ussing Chamber にセットした。Caco-2 細胞単層膜の管腔側には、10 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) により pH 6.0 に調整した HBSS を、基底膜側には 10 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) により pH 7.4 に調整した HBSS をそれぞれ 6.0 mL ずつ添加した。平衡化 (37°C, 15 min) の後、管腔側の HBSS を 100 μM SFN を含む HBSS (pH 6.0) に置換することで、透過試験を開始した。その後、経時的 (15, 30, 45, 60 min) に基底膜側から 0.21 mL の HBSS を回収し、その都度 0.21 mL の新たな HBSS (pH 7.4) を加えた。回収した HBSS は LC-ESI-TOF-MS (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry) 分析に供し、SFN 濃度を測定した。透過試験終了後、Caco-2 細胞単層膜の TEER 値を測定した。

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 阻害剤、または monocarboxylic acid transporter (MCT) 阻害剤が SFN の透過に及ぼす影響を評価する際には、wortmannin (1 or 100 μ M)⁹⁷⁾ または phloretin (100 or 300 μ M)⁹⁸⁾ を含む HBSS (pH 6.0) を Caco-2 細胞単層膜の管腔側に加え、30 分間処理を行った後、上記と同様に透過試験を開始した。タイトジャンクション閉口剤が SFN 透過性に及ぼす影響を調べる際には、タイトジャンクション閉口剤の一種である sodium butyrate (2 mM)⁹⁹⁾ で 24 時間処置した Caco-2 細胞単層膜を用い、上記と同様に透過試験を実施した。なお、平衡化から透過試験の終了に至るまで、管腔側および基底膜側の HBSS は 37°C に保つとともに、混合ガス (O₂:CO₂ = 95:5) によるバブリングを行った。

逆向きの透過性、つまり、基底膜側から管腔側への透過性評価においては、基底膜側の HBSS (pH 7.4) を、100 μ M SF を含む HBSS (pH 7.4) に置換することで透過試験を開始し、管腔側の HBSS (pH 7.4) を経時的に回収した。

SF の透過係数 (P_{app} : apparent permeability) は、以下の計算式から求めた。

$$P_{app} \text{ (cm/sec)} = (dC/dt) \times V / (A \times C_0)$$

dC/dt : 基底膜側 HBSS 中の SF 濃度変化(μ M/s)

V : 基底膜側の HBSS の体積 (6.0 mL)

A : Caco-2 細胞単層膜の面積 (0.2826 cm²)

C_0 : 管腔側における初発の SFN 濃度 (100 μ M)

第 4 項 LC-ESI-TOF-MS 分析

透過試験において回収した試料のうち、20 μ L を LC-ESI-TOF-MS 分析に供し、SFN の透過量を測定した。分析条件を下記に示した。

LC (Agilent 1200 series, Agilent, Waldbronn, Germany)

・ カラム : Cosmosil 5C18-ARII ($\varnothing$ 2.0 mm $\times$ 150 mm, Nacalai Tesque)

・ カラム温度 : 40°C

- ・ 移動相 : 0.1% (v/v) formic acid/water (A), 0.1% (v/v) formic acid/acetonitrile (B)
- ・ グラジエント : 0% → 100% of solvent B/20 min
- ・ 流速 : 0.2 mL/min

MS (microTOF II, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

- ・ モード : Positive ion mode
- ・ 乾燥ガス : N₂
- ・ ガス流速 / 温度 / 圧力 : 8.0 L/min / 200°C / 1.6 bar
- ・ キャピラリー電位 : 4500 V
- ・ 校正溶液 : 10 mM sodium formate/50% (v/v) acetonitrile
- ・ データ解析 : Bruker Data Analysis 3.2 software

第5項 フルオレセイン透過試験

細胞間隙を介して透過される¹⁰⁰⁾フルオレセイン (FL) を用いて SFN の Caco-2 細胞単層膜透過性を検討した。すなわち、管腔側に SFN が存在する場合 (50 or 100 μ M) と存在しない場合 (0 μ M) で FL (10, 30, 50, 100 μ M) の透過性を評価した。30 分間の透過試験の間 5 分毎に基底膜側より 0.21 mL の HBSS を回収し、蛍光分光光度計 (Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer Life Sciences, Tokyo, Japan) を用いて、透過した FL 量を測定した (λ_{ex} = 490 nm, λ_{em} = 514 nm)。FL の流束 (Flux: nmol per min per cm²) を求め、Lineweaver-Burk plot 分析に供した。

第6項 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。2 群間の差の検定には Student's *t*-test を、3 群間の差の検定には一元配置分散分析 (ANOVA) を用いた。有意水準は 5%未満とした。統計解析は、Graph Pad Prism version 5.0 for windows (Graph Pad Software, La Jolla, CA) を用いて実施した。

第3節 結果

第1項 SFN の Caco-2 細胞単層膜透過性

管腔側から側基底側に透過した SFN 量の時間変化を測定することで、SFN の Caco-2 細胞単層膜に対する透過性を評価した。Fig. 4-1 に示したように、LC-ESI-TOF-MS 分析によって、基底膜側に透過した SFN を高感度に測定することができた。なお、本試験での SFN の検出限界は 1.0 pmol/injection であった。Caco-2 細胞単層膜を透過した SFN 量は経時的に増加した。SFN の P_{app} 値を算出したところ、 $31.2 \pm 2.5 \times 10^{-6}$ cm/sec であった (Table 4-1)。なお、60 分間の透過試験前後の Caco-2 細胞単層膜の TEER 値に有意な差が認められなかった (試験前: $344.9 \pm 26.1 \Omega \text{ cm}^2$ 、試験後: $354.9 \pm 21.6 \Omega \text{ cm}^2$) ことから、本試験系において 100 μM SFN が Caco-2 細胞に対して毒性を示さないことが明らかとなった。

SFN と類似の構造を有する iberin (IBN) の Caco-2 細胞単層膜に対する透過性を評価したところ、IBN の P_{app} 値 ($28.2 \pm 1.0 \times 10^{-6}$ cm/sec) は SFN と同程度であった。なお、これら ITC 類の P_{app} 値は、EGCg ($0.54 \pm 0.12 \times 10^{-6}$ cm/sec) と比較して 50 倍以上高いものであった。

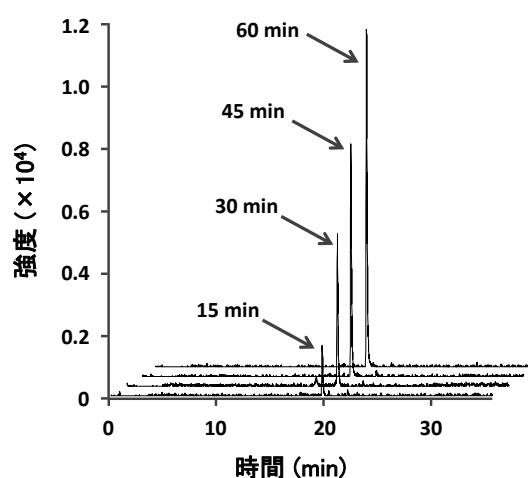


Fig. 4-1. Caco-2 透過試験において基底膜側から経時的に回収した HBSS を LC-ESI-TOF-MS 分析に供して得られた SFN の抽出イオンクロマトグラム ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 178 m/z)

Table 4-1. 本試験で評価した化合物の P_{app} 値

化合物名	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/sec)
SFN	31.2 ± 2.5
IBN	28.2 ± 1.0
EGCg	0.54 ± 0.12

第2項 SFN の Caco-2 細胞単層膜における透過機構

SFN の Caco-2 細胞単層膜に対する透過機構を明らかにするために、SFN の Efflux ratio の算出を行った。Efflux ratio とは、物質が Caco-2 細胞単層膜を能動的または受動的に透過しているか、あるいは透過ではなく排出を受けているかの判断に使用される指標であり、基底膜側 (B) から管腔側 (A) 方向の透過試験を行った際に得られる SFN の透過係数 ($P_{app\ B\ to\ A}$) を、第1項で述べた管腔側 (A) から基底膜側 (B) 方向の SFN の透過係数 ($P_{app\ A\ to\ B} = 31.2 \pm 2.5 \times 10^{-6}$ cm/sec) を除した値として求まる。試験の結果、 $B \rightarrow A$ での $P_{app\ B\ to\ A}$ は $51.1 \pm 13.1 \times 10^{-6}$ cm/sec と算出された (Fig. 4-2)。Efflux ratio¹⁰¹⁾を求めたところ 1.63 であった。Farrell らが提示した指標 (Efflux ratio: 1~2 は受動拡散)¹⁰¹⁾によると、受動拡散と判断できる数値であった。

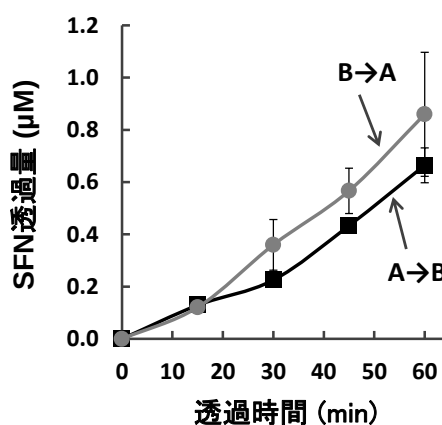


Fig. 4-2. Caco-2 細胞単層膜の管腔側から基底膜側への透過試験 (A→B) および逆方向の透過試験 (B→A) における SFN 透過量の経時変化 [平均値±標準誤差 (n = 3)]

第3項 SFN の Caco-2 細胞単層膜透過経路の解明

イソチオシアネート基 (-NCS) と相互作用することが報告されている MCT^{102, 103)}が SFN の透過に及ぼす影響について検討を行った。MCT 阻害剤として知られる phloretin⁹⁸⁾で処理した Caco-2 細胞を用いて SFN の透過試験を行ったところ、SFN の P_{app} 値に対する影響は認められなかった (Fig. 4-3)。PI3K 阻害を介してエンドサイトーシスを抑制することが知られる wortamannin⁹⁹⁾についても同様に検討を行ったところ、SFN の P_{app} 値に有意な差は認められなかった。

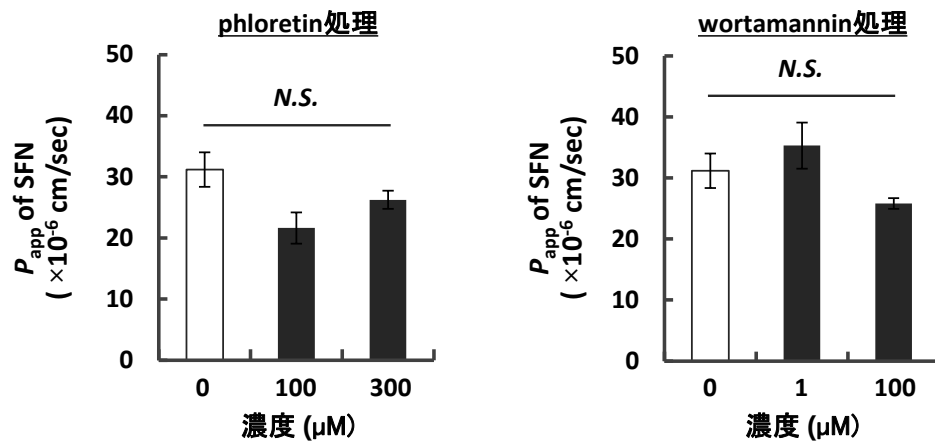


Fig. 4-3. phloretin または wortamannin 処理が Caco-2 細胞単層膜に対する SFN 透過性に及ぼす影響 [平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 3)、N.S.: 有意差なし (One-way ANOVA)]

第4項 SFN の Caco-2 細胞単層膜透過に対する細胞間隙透過経路の関与

受動輸送経路のひとつである細胞間隙を介して SFN が Caco-2 細胞単層膜を透過する可能性について検討した。細胞間隙輸送を制御するタイトジャンクションに作用し、細胞間隙を狭めることが知られる sodium butyrate⁹⁹⁾で処理した Caco-2 細胞単層膜を用いて SFN の透過試験を行った。その結果、SFN の P_{app} 値は、sodium butyrate 未処理の Caco-2 細胞単層膜に対する P_{app} 値と比べて有意に低下した (Fig. 4-4A)。その一方、sodium butyrate 処理を行った Caco-2 細胞単層膜の TEER 値は未処理のものと比べて有意に高値を示した (Fig. 4-4B)。

次に、細胞間隙を介して Caco-2 細胞単層膜を透過することが知られる FL¹⁰⁰)を用いて、SFN との透過競合性試験を行った。SFN 存在下 (50 or 100 μ M) および非存在下において各濃度の FL の流束 (Flux) を測定し、Lineweaver-Burk plot 分析を行った (Fig. 4-5)。得られた一次回帰式の Y 軸切片 ($1/V_{\max}$) から $V_{\max}$ を求めたところ、0.0111 (0 μ M SFN)、0.0113 (50 μ M SFN) および 0.0118 (100 μ M SFN) であり、SF 濃度にかかわらずほぼ同じ値を示した。

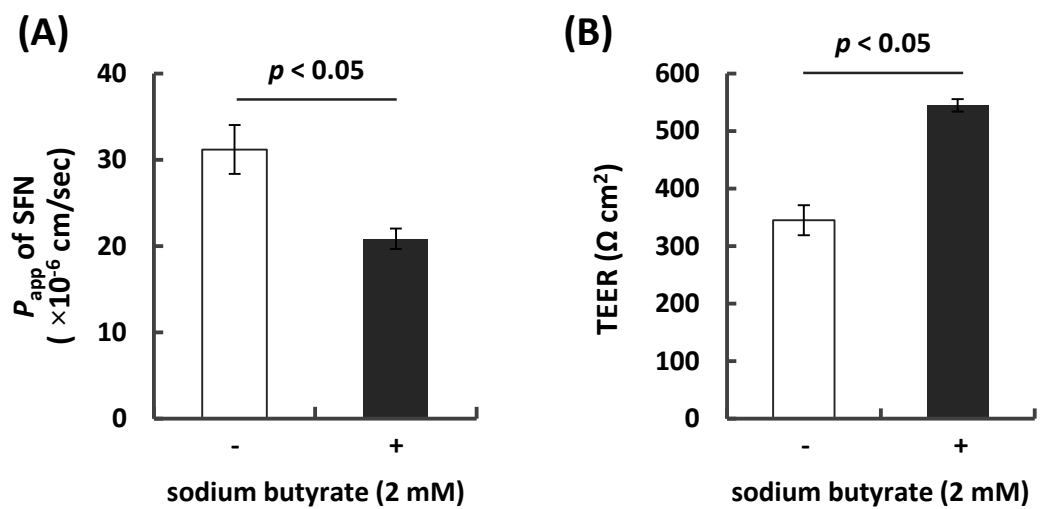


Fig. 4-4. Sodium butyrate 処理が Caco-2 細胞単層膜に対する SFN の透過性 (A) および Caco-2 細胞単層膜の TEER 値 (B) に及ぼす影響 [平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 3)]

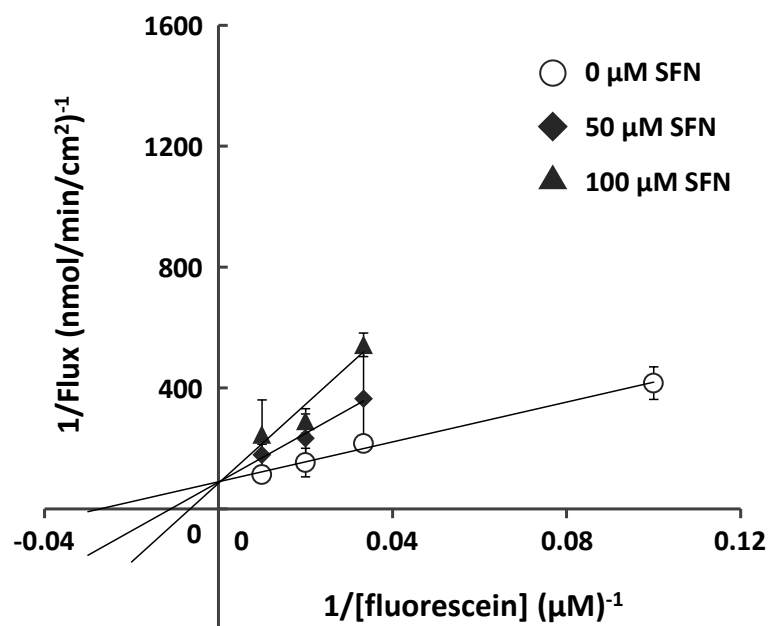


Fig. 4-5. SFN 不在下および存在下における Caco-2 細胞単層膜に対するフルオレセイン流束の Lineweaver–Burk plot [平均値±標準誤差 (n = 3 ~ 4)]

第 5 項 Caco-2 細胞単層膜透過過程での SFN 代謝の解明

Caco-2 細胞単層膜透過過程での SFN の代謝の有無を明らかにするため、60 分間の透過試験後の基底膜側 HBSS を LC-ESI-TOF-MS 分析に供し、メルカプツール酸代謝経路における SFN の代謝物； glutathione (GSH)-, cysteinylglycine (Cys-Gly)-, cysteine (Cys)-conjugates, *N*-acetylcysteine (NAC)-SFN の産生挙動を明らかにした。Fig. 4-6 に各代謝物の抽出イオンクロマトグラムを示した。メルカプツール酸代謝経路の一次代謝物である GSH-SFN ($m/z = 485.1193$) は検出されたが、その後の Cys-Gly-SFN ($m/z = 356.0767$)、Cys-SFN ($m/z = 299.0552$)、および NAC-SFN ($m/z = 341.0658$) は検出されなかった。基底膜側で検出された GSH-SFN 量を求めたところ、SFN の 60 分の 1 程度であった。なお、透過試験後に管腔側の HBSS についても MS 分析に供したが、いずれの代謝物も検出されなかった。

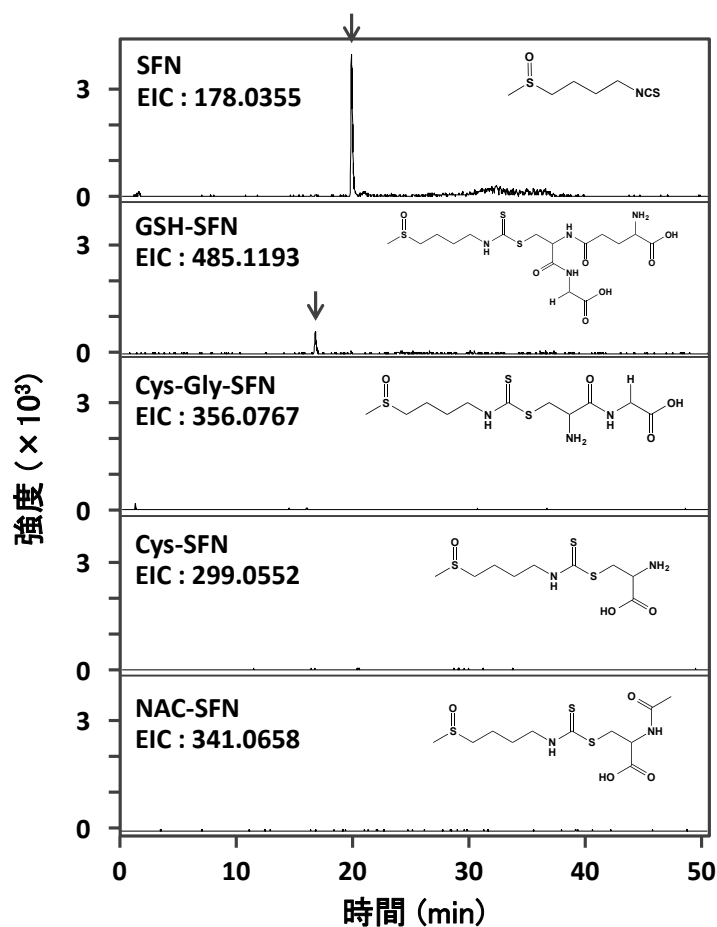


Fig. 4-6. 透過試験 60 分後に Caco-2 細胞単層膜の基底膜側 HBSS を LC-ESI-TOF-MS 分析に供して得られた SFN および代謝物の抽出イオンクロマトグラム [glutathione (GSH)-, cysteinylglycine (Cys-Gly)-, cysteine (Cys)-, *N*-acetylcysteine (NAC)-SFN]

第 4 節 考察

ブロッコリースプラウト (BS) 由来のファイトケミカルである SFN は速やかにかつ効率的に腸管から体内に吸収されることが知られる⁹²⁻⁹⁴⁾。しかしながら、SFN の腸管上皮における吸収機構は未解明であった。Ussing chamber を用いた透過試験の結果、SFN は高い P_{app} 値 ($31.2 \pm 2.5 \times 10^{-6}$ cm/sec) を示し、Caco-2 細胞単層膜の管腔側から基底膜側へと透過されることが判明した。SFN の P_{app} 値は緑茶由来のファイトケミカルである EGCg の P_{app} 値 ($0.54 \pm 0.12 \times 10^{-6}$ cm/sec) と比べて極めて高く、この違いは、SFN と

EGCg の生体利用効率 (SFN: ca. 70%, EGCg: ca. 5%¹⁰⁴⁾) と同等であった。Efflux ratio 解析および種々の阻害剤 (MCT 阻害剤やエンドサイトーシス阻害剤) を用いた試験結果から、SFN の Caco-2 細胞単層膜透過は受動拡散によるものであり、管腔側の細胞膜表面に存在する輸送担体を介するものではないと考察された。

物質が受動拡散により腸管上皮を透過するには、細胞内 (経細胞経路) または細胞間隙 (傍細胞経路) を通ることとなる。本試験において、sodium butyrate で処理し細胞間隙を狭めた Caco-2 細胞単層膜において SFN の P_{app} 値が有意に低下したこと、および細胞間隙透過マーカーとして知られる FL の透過を SFN が競合的に阻害したことから、SFN が細胞間隙を介して Caco-2 細胞単層膜を透過することが初めて明らかとなった。細胞間隙は以前より、様々な薬剤成分や栄養成分の重要な透過経路と見なされている¹⁰⁵⁾。また近年では、タイトジャンクション調節作用を有する多様な食品成分が見出されており¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾、細胞間隙は医薬品や機能性食品の有効成分の生体利用効率を高めるための分子標的として高い関心を集めている。したがって、今回得られた知見は、SFN や他の ITCs 化合物を訴求する栄養機能性食品の設計や開発に有益な情報を与えるものと考えられる。

もう一方の受動拡散経路である細胞内を通して SFN が腸管上皮を透過する可能性は、SFN の物性パラメーター [$\log P$ (octanol/water) = 0.72]¹⁰⁹⁾等から示唆されてきた¹¹⁰⁾。また、Petri らはヒト回腸を用いた *in vivo* モデル試験を行い、SFN の一次代謝物である GSH-SFN が基底膜側に検出されたことを報告している¹¹¹⁾。この報告は Caco-2 細胞単層膜を用いた本研究の結果とも一致しており、SFN の少なくとも一部は細胞内を通して腸管上皮を透過すると考えられた。Petri らのヒトを対象とした試験¹¹¹⁾および本研究の Caco-2 細胞単層膜を用いた試験ともに、GSH-SFN のみが基底膜側で検出された。一方、Clarke らの報告⁹⁵⁾によると、SFN 単回投与後のマウス小腸組織中において GSH-SFN 以降の SFN 代謝物 (Cys-Gly-SFN, Cys-SFN, NAC-SFN) が検出されている。この矛盾が生じた理由として、基底膜側に発現している multidrug resistance associated protein 1

(MRP-1) の基質特異性が関与した可能性がある。MRP-1 は GSH 抱合体に対して高い基質特異性を有する¹¹²⁾ことから、基底膜側では GSH-SFN が優位に存在すると考えられた。

結論として、SFN は Caco-2 細胞単層膜を受動的に透過し、経細胞経路だけでなく¹¹⁰⁾、傍細胞経路(細胞間隙)が関与することが本研究によって明らかとなった。この知見は、SFN や関連化合物を基本設計とする機能性食品の開発に有益な情報となり得るものと考えられる。

第5節 小括

The Chapter aimed to clarify the transport mechanism of sulforaphane (SFN) in Caco-2 cells. Transport study using an Ussing chamber system revealed high apparent permeability ($P_{app} = 31.2 \pm 2.5 \times 10^{-6}$ cm/sec) of SFN in the apical-to-basolateral direction. The results that the SFN transport was attenuated by sodium butyrate, a tight junction closer, and was competitive with fluorescein, a selective marker of paracellular transport, clearly indicated that SFN was mainly transported through paracellular tight junction pathway. The metabolite, GSH-SFN, was detected in the basolateral side, indicating that the transport of SFN was, in part, mediated by the transcellular pathway.

第5章 ブロッコリースプラウトサプリメント摂取による第二相酵素誘導作用

第1節 緒言

ブロッコリースプラウト (BS) から見出されたスルフォラファン (SFN)^{12, 22)}は、生体防御機構を司る転写因子 Nrf2 を介して第二相解毒酵素や抗酸化タンパク質など、細胞保護に関わる種々の遺伝子群を誘導することで⁶⁴⁻⁶⁶⁾、がん予防や様々な慢性疾患の予防・改善作用を示すことが報告されている^{15, 16)}。また、有用性に関するエビデンスの蓄積に伴い、SFN の恩恵を受けられる機能性食品への展開について関心が大いに高まりつつある。

SFN は BS 中では前駆体であるグルコラファニン (GR) として存在する⁶³⁾。腸管から速やかに吸収され、摂取後 10 時間程度でメルカプツール酸代謝物として尿中から排泄される SFN と異なり^{94, 96)}、安定前駆体である GR はそのままの形では吸収されないため、植物体が内在する、あるいは腸内菌叢が有するミロシナーゼ (β -thioglucosidase) による加水分解を受け SFN へ変換される必要がある⁶³⁾。先行研究^{95, 113, 114)}から、腸内菌叢のミロシナーゼと比べ、植物体に内在するミロシナーゼの方が GR から SFN への変換効率が高いことが示されている。さらに、ミロシナーゼ活性を失した BS 加工品を摂取した際の SFN の生体利用効率は、ミロシナーゼ活性が残存した生鮮の BS や非加熱の BS 調製物 (スムージーなど) と比べて低くなることが複数のヒト試験結果から示されている^{115, 116)}。このように生鮮の BS や非加熱の BS 調製物は SFN の生体利用効率の面では優れているものの、生成した SFN やミロシナーゼ活性が食品マトリックス中で不安定であるために品質保持期間が極めて短いという欠点がある。一方、BS 加工品、例えば BS 熱水抽出物やその粉末は、品質保持期間が長く、GR を濃縮可能という長所を有しているため、市販される多くの BS サプリメントには BS 加工品が使用されている。

米国を中心に BS サプリメントが市場に出回るようになって約 10 年が経過しているが、その有効性についての情報は少ない。第一に、BS 加工品をカプセルの形状や錠剤の

形状で摂取した際の SFN の吸収挙動および生体利用効率についてほとんど調べられていないことが挙げられる。第二に、BS サプリメントの製造者および販売者が推奨する GR 摂取量（約 30 mg）と、これまでの臨床試験^{13, 14)}において有効性が示唆された GR の用量（400 - 800 mol = 約 170 - 350 mg）は大きく異なっており、GR の推奨摂取量（約 30 mg）についての臨床的有効性は不明なことである。これらの点を明らかにするために、BS サプリメント、すなわち GR を含む BS 抽出粉末を詰めたカプセルの摂取が体内への SFN の吸収や血中の第二相解毒酵素活性に及ぼす影響を、健常被験者を対象に評価した。

第 2 節 材料および方法

第 1 項 BS 抽出物および BS サプリメントの調製

BS 抽出物は、カゴメ株式会社により生産した。発芽 1 日後の BS を熱水抽出（95°C, 30 min）に供した後、BS 残渣はケイソウ土ろ過により除去した。BS 抽出液は真空濃縮し、デキストリンと混合した後スプレードライにより粉末化した。粉末化した BS 抽出物 1 g 中の GR 含量は、既報²²⁾に準じて HPLC により測定し、カゴメ株式会社の規格値（135 ± 20 mg）内であることを確認した。BS 抽出物をコーンスターチ、結晶セルロース、ステアリン酸カルシウムと混合した後、hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) カプセルに封入した。BS サプリメント 1 粒（内容量：200 mg、HPMC 皮膜：60 mg）当たりの GR 含量が 10 mg となるように設計した。BS サプリメントの調製は Good Manufacturing Practices (GMP) に準拠した施設（Sunsho Pharmaceutical Co., Ltd., Shizuoka, Japan）で行った。BS サプリメントの栄養成分組成を Table 5-1 に示した。

Table 5-1. BS サプリメントの栄養成分組成

	3 粒当たり
Energy (kcal)	3.0
Protein (g)	0.07
Carbohydrate (g)	0.6
Lipids (g)	0.002
Glucoraphanin, GR (μmol: mg)	68.7 ± 2.3: 30 ± 1
Sulforaphane, SFN (μmol)	<0.5

第 2 項 試験方法

本試験は、その計画についてカゴメ株式会社研究倫理審査委員会による承認 (#2009-R04) を受け、人を対象とする生物医学研究の国際的倫理指針およびヘルシンキ宣言に則って実施した。24 歳以上 60 歳以下の健常な日本人男女で、喫煙習慣がなく、服薬や治療を受けておらず、妊娠していない方を募集し、21 名が試験に参加した。全ての被験者から書面による同意を得た。

試験期間は 1 日目から 3 日目までの 3 日間とし、その期間中、飲酒ならびに ITCs およびグルコシノレート (GLSs) を含む食品（特にアブラナ科野菜）の摂取を禁止した。また、試験期間中の 8 回の食事（朝食 3 回、昼食 3 回、夕食 2 回）は、試験実施者が用意し、全ての被験者は同じメニューを摂取した。試験 2 日目の朝、バイタルサイン（体重・心拍数・血圧）と体重を測定した後、ベースラインの尿および血液の採取、ならびに医師による問診を行った。その後、性別、年齢および体重が群間で均等となるよう被験者を 2 群に割付けた。午前 11 時に被験者は 3 粒または 6 粒の BS サプリメントを、100 mL 程度の水または白湯とともに摂取した。被験者には、翌日（試験 3 日目）の午後 5 時までの 30 時間の間、全ての尿を採取するよう以下のように指示した；1 回に排泄された尿は都度 1 本のプラスチック製の採尿容器に採取した後、4°C に保ったクーラーボックスに保管し、その時間を配布した採尿記録表に記入すること。採尿容器は定期的に回収し、排尿量を量った後、10 mL 程度を分注し、-80°C で測定に使用するまで保

管した。試験 3 日目の午前 11 時に被験者から再度採血を行った。得られた血液から調製した血清は第二相酵素活性の測定に使用するまで-80℃で保管した。

第 3 項 尿中 ITCs および dithiocarbamate (DTC) の測定

SFN の吸収量評価に広く使用される Cyclocondensation assay 法 (Fig. 5-1)¹¹³⁾に準じ、ITCs および dithiocarbamates (DTCs) の尿中排泄量を測定した。尿サンプル (5 mL) を遠心分離 (300 × g, 5 min, 4℃) に供して得られた上清 0.5 mL を、1.5 mL の反応溶液 (500 mM sodium borate buffer (pH 9.25): 0.5 mL + 1,2-benzenedithiol/methanol: 1.0 mL) を含むガラス瓶に移し、瓶中に窒素ガスを充満させた後、スクリュキャップを締めた。そのガラス瓶をインキュベート (65℃, 2 h) した後、遠心 (500 × g, 5 min, 4℃) 上清を HPLC 分析に供した。環化縮合反応生成物である 1,3-benzodithiole-2-thione を、ODS カラム (Partisil 10 μm ODS-2, 4.5 × 250 mm, Whatman, Clifton, NJ, USA) に保持した後、80% (v/v) Methanol/H₂O を用いたアイソクラティック法により溶出し (1.0 mL/min)、photodiode array detector (L-2455, Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan) により検出した (λ = 365 nm)。50% (v/v) 2-propanol/water を用いて調製した 1,3-benzodithiole-2-thione の希釈系列 (0.01 – 50 μM) により検量線を作成し、ITCs および DTCs の尿中濃度を定量し、それに採取した尿量を乗じることで ITCs および DTCs の尿中排泄量を見積もった。

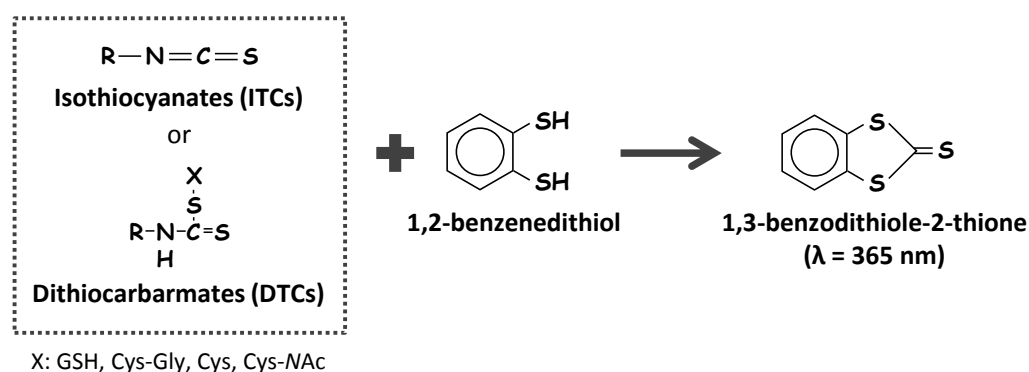


Fig. 5-1. Isothiocyanates (ITCs) または dithiocarbamates (DTCs) と 1,2-benzenedithiol との環化縮合反応スキーム¹¹³⁾

第4項 血清中第二相酵素活性の測定

BS サプリメントの摂取前および摂取 24 時間後に被験者から採取した血液から血清を調製し、代表的な第二相酵素である glutathione S-transferase (GST) および NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の活性を測定した。GST 活性は Habig らの方法¹¹⁷⁾に準じ、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) を基質に用いて測定した。NQO1 活性は menadione を基質に用い、Prochaska assay 法^{75, 76)}に準じて測定した (Fig. 3-2)。

第5項 統計解析

結果は平均値±標準偏差で示した。ITCs および DTCs の尿中排泄量、ならびに SFN の生体利用効率の 2 群間比較は Student's *t*-test により行った。BS サプリメントの摂取前および摂取 24 時間後における血清第二相酵素活性の比較は対応のある *t* 検定により行った。血清 GST 活性の変化率と血清 NQO1 活性の変化率との関連性については、ノンパラメトリック法である Spearman 検定により行った。有意水準は 5%未満とした。統計解析には、SPSS for Windows ver. 15.0 (SPSS Japan, Tokyo, Japan) を用いた。

第3節 結果

第1項 被験者のプロフィール

Table 5-2 に被験者のプロフィールを示した。男女比、平均年齢および平均体重について 2 群間に有意差は認められなかった。21 名全ての被験者が本試験を完遂した。本試験計画および BS サプリメント摂取に起因する有害事象は認められなかった。

Table 5-2. 被験者のプロフィール^a

	被験者数	性別 ^b	年齢	体重 (kg)
3 粒	11	7 (M) 4 (F)	29.1 ± 1.7	60.3 ± 2.8
6 粒	10	6 (M) 4 (F)	29.6 ± 2.1	60.9 ± 3.2

^a 全ての項目において群間で有意差なし^bM: 男性, F: 女性

第2項 尿中 ITCs および DTCs 排泄量の時間変化

BS サプリメント摂取後の SFN の吸収動態を明らかにするために、採取した尿毎の ITCs および DTCs 量を測定した。Fig. 5-2 に、個々の被験者において尿中に排泄された ITCs および DTCs 量の積算曲線を示した。BS サプリメントを 3 粒摂取した群および 6 粒摂取した群の両方において、摂取前の尿中 ITCs および DTCs 量は極めて微量（3 粒: $0.04 \pm 0.03 \mu\text{mol}$, 6 粒: $0.06 \pm 0.06 \mu\text{mol}$ ）であったことから、被験者が実施者の指示に従い、試験 1 日目に ITCs やグルコシノレート (GLSs) を含む食品の摂取を控えたことが確認された。尿中 ITCs および DTCs 量の積算曲線を観察すると、それらの高さ（最終到達点）は個人間で大きく異なったが、曲線の形状には類似点が見られた。すなわち、尿中 ITCs および DTCs 量の上昇は摂取後の数時間は緩慢であるが、BS サプリメント摂取 8 - 12 時間後において顕著に増大し、その後頭打ちとなった。動態解析により、Tmax 値、すなわち、尿中に排泄された ITCs および DTCs 量が最大となった時間を個々の被験者に対して求めた結果、BS サプリメント 3 粒摂取群と 6 粒摂取群間で有意差は認められなかった (Table 5-3)。30 時間の観察期間を 4 つの時間帯に分割したところ、BS サプリメント摂取 8-16 時間後の時間帯に尿中に排泄された ITCs および DTCs 量が、最終的に 30 時間で排泄された量の約 50%を占めることが判明した。その時間帯における尿中 ITCs および DTCs 量は 6 粒摂取群で 3 粒摂取群と比べて 2 倍高かった。

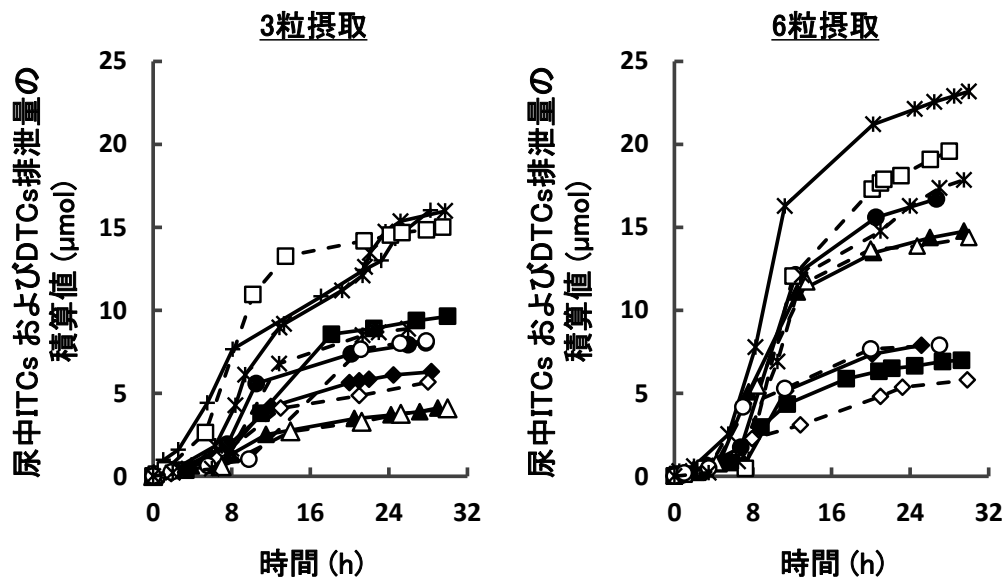


Fig. 5-2. ブロッコリースプラウト (BS) サプリメント3粒または6粒摂取後に尿中に排泄された、ITCs および DTCs 量の積算値

Table 5-3. ブロッコリースプラウト (BS) サプリメント3粒または6粒摂取後の尿中 ITCs および DTCs 排泄量の Tmax と経時変化 [平均値±標準偏差 (n = 10 – 11)]

試験群	Tmax (h) ^a	尿中に排泄された ITCs および DTCs の量 (μmol)			
		0 - 8 h	8 - 16 h	16 - 24 h	24 - 30 h
3 粒	12.4 ± 1.3	1.69 ± 0.33	3.84 ± 0.88	2.84 ± 0.70	0.91 ± 0.22
6 粒	10.7 ± 0.7	1.52 ± 0.37	7.80 ± 1.52	3.20 ± 0.45	0.98 ± 0.19

^a 尿中 ITCs および DTCs 排泄量が最大となった時間 (群間で有意差なし)

第3項 SFN 吸収量および生体利用効率の比較

BS サプリメント摂取後の SFN 吸収量と生体利用効率について、3 粒摂取群と 6 粒摂取群との比較を行った。前提として、BS サプリメント摂取後 30 時間までに排泄された尿量に関して 2 群間で有意な差は認められなかった (3 粒: 1691 ± 818 mL, 6 粒: 1245 ± 480 mL, N.S.)。Fig. 5-3 に示したように、BS サプリメント摂取後 30 時間までに尿中に排泄された ITCs および DTCs の総量、すなわち体内に吸収された SFN 量は用量依存的

に増加した。尿中に排泄された ITCs および DTCs の総量を、摂取した GR 量 (68.7 or 137.4 μmol 、それぞれ 30 or 60 mg に対応) で除し、個々の被験者毎に SFN の生体利用率を求めた。その結果、Fig. 5-2 に示したように、BS サプリメント摂取後の SFN の生体利用率は個人間で大きくばらついた (5.1 - 23.3%)。BS サプリメント 6 粒摂取群 (9.8%) と比べ、3 粒摂取群の SFN 生体利用率 (13.5%) が多少高い値となったが、統計学的な有意差は認められなかった (Fig. 5-3)。

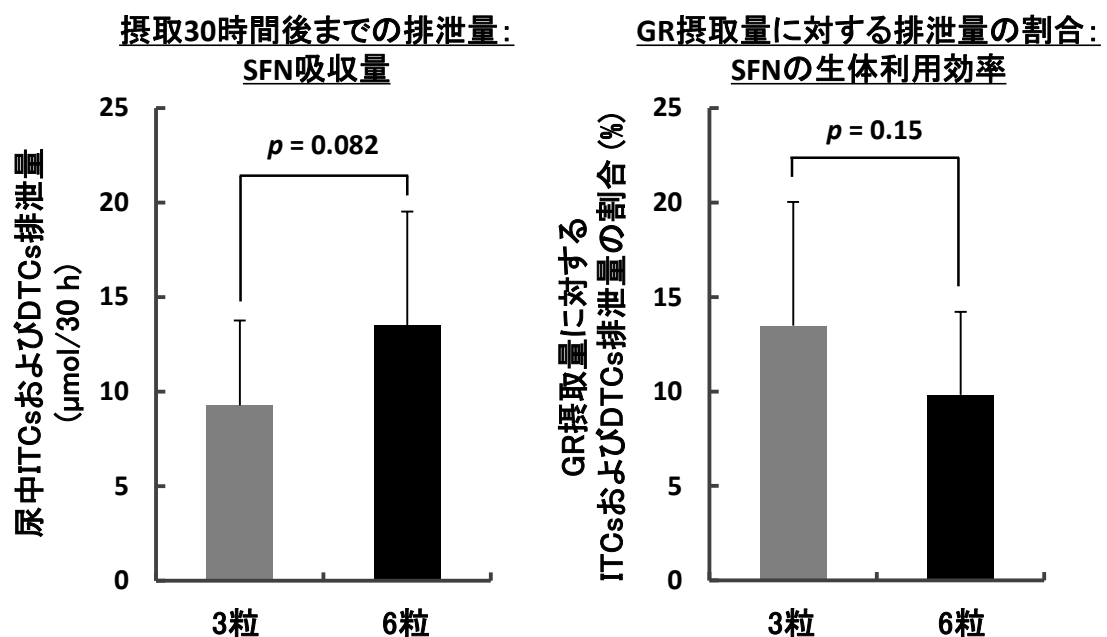


Fig. 5-3. BS サプリメント 3 粒または 6 粒摂取 30 時間後までに尿中に排泄された ITCs および DTCs 量、ならびに GR 摂取量に対する尿中 ITCs および DTCs 排泄量の割合 [平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n = 10 - 11$), Student's t -test]

第 4 項 血清第二相酵素活性に及ぼす影響

本試験において、BS サプリメントとして被験者が摂取した GR 量 (30 - 60 mg) は、過去の介入試験^{13, 14)}において有効性が示唆された GR 量 (170 - 350 mg) と比べて低い量である。そこで、BS サプリメントによる低用量の GR の摂取が、SFN の生理作用発現の鍵となる Nrf2 シグナリングおよび下流の第二相酵素群の誘導に有効であるかどうか

を評価するために、BS サプリメントの摂取前および摂取 24 時間後に被験者から採取した血清中の GST および NQO1 活性を測定した。その結果、3 粒または 6 粒の BS サプリメント摂取、すなわち 30 mg または 60 mg の GR 摂取により、用量依存的に血清 GST 活性および NQO1 活性ともに有意に上昇することが判明した (Fig. 5-4)。BS サプリメント摂取前後における血清 GST 活性および NQO1 活性の変化率を被験者毎に求め、Fig. 5-5 にプロットした。Spearman 検定の結果、GST 活性の変化率と NQO1 活性の変化率との間に弱いながらも有意な ($p < 0.05$) 正の相関関係があることが明らかになった。

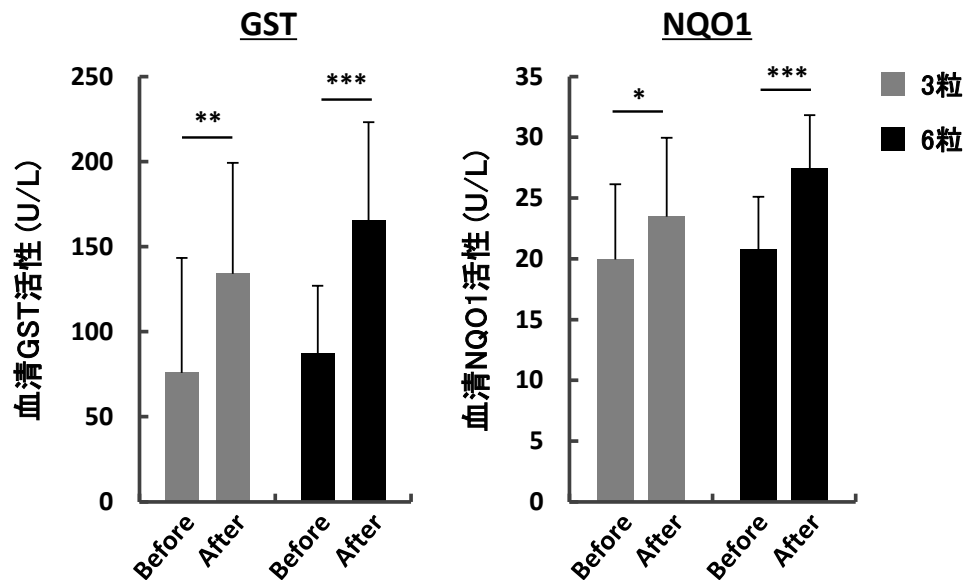


Fig. 5-4. BS サプリメント摂取前および 24 時間後の血清 GST および NQO1 活性 [平均値 ± 標準偏差 (n = 10 – 11), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (Paired t -test)]

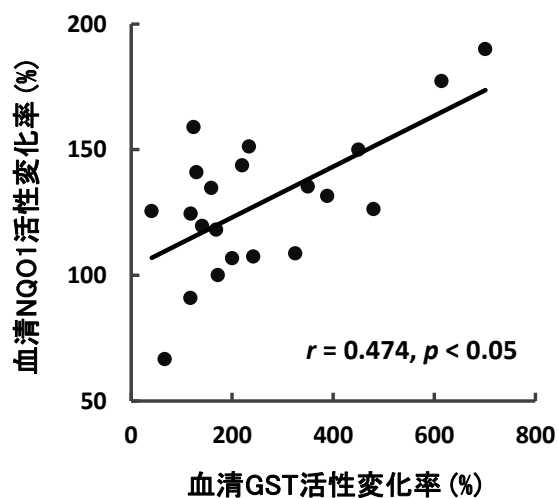


Fig. 5-5. 血清 GST 活性変化率と NQO1 活性変化率との相関関係 [n = 21, Spearman 検定]

第4節 考察

GR から SFN への変換に関わる細菌が腸内菌叢に存在するため、たとえミロシナーゼが失活した BS 加工品や調理品を摂取した場合でも SFN が体内に吸収されることが多数報告されている^{63, 113-116)}。しかし、市販の多くの BS サプリメントのように、BS 加工品（抽出液・粉末など）をカプセルに詰めて摂取した場合の SFN 吸収性を調べた報告はほとんどない。そこで本章では、SFN の吸収評価に広く用いられる手法¹¹³⁾、すなわち尿中に排泄される ITCs および DTCs 量を測定することで、BS サプリメントの摂取により、SFN がヒト体内に吸収されるかどうかを検討した。BS サプリメント摂取による SFN の生体利用効率 (5 ~ 25%) は、これまでに報告されたカプセルに充填されていない BS 加工品や BS 調理品を摂取した場合での SFN の生体利用効率 (2 ~ 40%)^{63, 113-116)}と同程度であった。有意差は認められなかったものの、BS サプリメント 6 粒摂取群の SFN 生体利用効率が 3 粒摂取群と比べて僅かに低くなったことから、腸内菌叢による GR から SFN への変換能に上限があることが懸念された。しかしながら、ITCs および DTCs の尿中排泄量が最も多かった BS サプリメント摂取 8 - 16 時間の時間帯において、6 粒摂取群の尿中 ITCs および DTCs 量は 3 粒摂取群のそれと比べて 2 倍であったことから

(Table 5-2)、腸内菌叢による GR から SFN への変換が律速となった可能性は低いと考えられた。Fahey らの報告⁶³⁾によると、本試験の用量 (68.7 ~ 137.4 μmol) よりも多い 200 μmol の GR を 45 人の被験者に摂取させたときの SFN の生体利用効率(平均値: 11.8%、中央値: 9.6%) と、400 μmol の GR を 99 人の被験者に摂取させたときの SFN の生体利用効率 (平均値: 10.4%、中央値: 9.4%) は同程度であった。

これまでに SFN の様々な疾病予防・改善効果が臨床試験^{13, 14, 17-21)}により明らかにされてきたが、それらの試験の多くは BS を SFN の供給源として使用している。その際、GR (または SFN) の用量は BS をどのように被験者に摂取させるかによって大きく異なる。GR とミロシナーゼを含む生鮮の BS や生成した SFN を含む BS 調製物を用いた試験では、SFN または GR の用量は 100 μmol 程度に設定されることが多い^{14, 18, 19)}。一方、ミロシナーゼが失活された BS 加工品を用いた試験では、SFN の生体利用効率が低いことを考慮し、GR の用量は比較的高く設定されてきた。例えば、中国の Qidong で実施され、SFN が種々の発がん性物質や環境汚染物質の解毒および排泄促進に有効であることを示した複数の試験^{13, 14)}の GR 用量は 400 - 800 μmol であった。これらの試験において、GR 摂取による有害事象は全く報告されておらず、また、他の安全性評価結果¹¹⁸⁾も勘案すると、GR は人の健康に害を及ぼす可能性が極めて低い食品成分であると考えられる。しかしながら、ダイエタリーサプリメントは使用制限がほとんどない状態で多種多様な人々に利用されるため、ダイエタリーサプリメントとして GR を提供する場合は、過剰摂取など不適切使用のリスクも考慮し、GR の用量を注意深く検討する必要がある。過去の調査^{119, 120)}から、GLSs の 1 日当たりの推定摂取量は約 100 μmol と報告されており、この食経験に基づく摂取量が GR を安全に様々な人々に提供する際の基準となる。

本研究では、低用量の GR (30 ~ 60 mg = 69 ~ 138 μmol) を含む BS サプリメントの摂取が、血清第二相酵素 (GST, NQO1) の活性を協奏的に高めることを示した (Fig. 5-4, 5-5)。この結果から、BS サプリメントの摂取により体内に吸収された SFN が、転写因

子 Nrf2 を介して第二相酵素を誘導したことが示唆された。Prochaska らの報告¹²¹⁾によると、古典的な第二相酵素誘導剤 (butylated hydroxyanisole: BHA) を投与したマウスにおいて、肝臓の第二相酵素活性と血清の第二相酵素活性が連動して上昇することが確認されており、血清中の第二相酵素活性が種々の臓器の”Chemoprotected State”を表すマーカーとなる可能性が提示されている。実際に、その後の複数の臨床試験¹²²⁻¹²⁴⁾においても、野菜やファイトケミカルの有用性を予備的に評価する指標として血清第二相酵素活性が測定されている。本研究の結果から、BS サプリメントにより 30 ~ 60 mg の GR を摂取することで、体内の種々の臓器においても第二相酵素（および Nrf2 の下流に存在する一連の生体防御遺伝子群）が誘導され、結果として種々の健康効果をもたらす可能性が示唆された。

第5節 小括

Broccoli sprout (BS) supplements have been marketed over a decade in anticipation of health beneficial effects of sulforaphane (SFN) that induces an Nrf2 signaling and the downstream chemoprotective genes including phase 2 enzymes. However, absorption behavior of SFN after intake of BS supplements has been largely unknown. Additionally, the GR dose (around 30 mg) recommended by many manufacturers of BS supplements is relatively lower than the effective dose determined in previous intervention studies. This human study aimed to assess the effect of a single administration of a typical BS supplement at lower dose of GR (30 or 60 mg from 3 or 6 capsules, respectively) on the SFN absorption and the serum activities of phase 2 enzymes as possible surrogate markers of health beneficial effects of SFN. Urinary excreted isothiocyanates and dithiocarbamates showed the SFN absorption after intake of BS supplement was prolonged and varied among individuals, which conforms to the well-known characteristics of intestinal microbiota-mediated SFN absorption. The absorbed amount of SFN increased with dose (3 capsules; 9.27 μ mol, 6 capsules; 13.5 μ mol). Serum activities of phase 2 enzymes glutathione

S-transferase (GST) and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), which had been reported to display “chemoprotected states” in organs such as liver, were dose-dependently and synchronously elevated ($p < 0.05$) by taking the BS supplement. This revealed that the low dose (30 mg) of GR could show chemoprotective effects in humans.

第6章 ブロッコリースプラウトサプリメント摂取による肝機能改善作用

第1節 緒言

治療薬の開発に伴いウイルス性肝炎の罹患者数は劇的に減少した。一方、生活習慣に関連する肥満や肝機能異常の発症数は増加の一途を辿っている¹²⁵⁾。非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease) は、飲酒歴や飲酒習慣が全くない、あるいはほとんどない場合でも発症する生活習慣に起因する肝疾患のひとつであり、高確率で肝炎や肝繊維化、通称 NASH (Non-alcoholic steatohepatitis) を併発する高いリスクを有している。今日では、この NASH がウイルス性肝炎に代わり肝硬変や肝がんの主たる原因となっており¹²⁶⁾、その予防・改善が強く求められている。2010年に日本肝臓学会が「NASH・NAFLDの診療ガイド2010」を発表したが、NASHやNAFLDの治療・改善に関する確立された方法はほとんどない。そのため、体重管理を主軸とした食事・運動療法が優先的に選択される現状にあるが、人々の生活様式・習慣を変えさせることは容易ではなく、治療・改善が成功する事例は限られている。生活習慣に起因する肝疾患のもうひとつの代表格としてアルコール性肝疾患 (ALD; Alcoholic liver disease) がある。ALDは飲酒によって発症する脂肪肝、肝炎、肝硬変および肝がんの総称であり、依然として世界中で深刻な健康課題となっている¹²⁷⁾。ALDの最も有効な予防・改善方法は禁酒であるが、飲酒を嗜好し、日々の生活の楽しみにする人々にとって、それは必ずしも簡単ではない。以上のことから、劇的な生活習慣の改善、例えば過度の食事制限や禁酒、運動療法を強いることなく、肝臓の健康や機能を良好に維持・改善し得る方法（さらにファイトケミカルの摂り方）の開発が望まれてきた。

ブロッコリースプラウト (BS) に豊富に含まれるスルフォラファン (SFN)^{12, 22)} は、転写因子 Nrf2 の活性化を介して、第二相解毒酵素や抗酸化タンパク質を含む一連の生体防御遺伝子を誘導する⁶⁴⁻⁶⁷⁾ことで、種々のストレスから細胞や組織を保護する^{15, 16, 68)}。Nrf2は全身の生体防御機構を司るが、そのうち、肝臓においてもその保護や機能維持の

ための決定的な役割を果たすことが近年明らかとなっている。すなわち、SFN は種々の肝毒性物質に対する保護作用¹²⁸⁾や第 3 章で明らかにしたアセトアルデヒド代謝促進作用に加え、Nrf2 が肝臓におけるエネルギー代謝をも制御し、高脂肪・高糖食の摂取が引き起こす肝障害を抑制することが示唆されている¹²⁹⁾。この Nrf2 を介したメカニズムに基づき、SFN の摂取が多様な肝毒性物質^{90, 130-132)}やアルコール¹³³⁾による肝障害に加え、高エネルギー食投与による脂肪肝を併発した肝障害を抑制する^{134, 135)}ことが報告されている。しかしながら、SFN の肝保護作用・肝機能改善作用をヒトで立証した報告は未だない。

これまでの SFN の臨床研究^{13, 14, 20)}では、SFN の前駆体であるグルコラファニン (GR) の用量が比較的高く設定されてきた。ダイエタリーサプリメントとして広く一般の人々に安全に提供するためには、その成分の食経験や摂取実態 (グルコシノレートの 1 日推定摂取量：約 100 μmol)^{119, 120)}に基づいて注意深く用量を決定する必要がある。第 5 章において、BS サプリメントの摂取により、食経験の範囲内の GR (30 mg = ca. 69 μmol) を摂ることで、転写因子 Nrf2 の下流に存在する第二相酵素活性の競争的な上昇が認められた。そこで本章では、肝機能異常と診断された男性に対して生活習慣指導を行うことなく BS サプリメントを 2 ヶ月間摂取させ、肝機能マーカーの数値に及ぼす影響を評価した。

第 2 節 材料および方法

第 1 項 BS 抽出物および BS サプリメントの調製

BS 抽出物は、第 5 章で述べたように、カゴメ株式会社において生産した。BS サプリメントは、Good manufacturing practices (GMP) 施設 (Sunsho Pharmaceutical Co., Ltd., Shizuoka, Japan) で調製した (Table 5-1)。なお、プラセボサプリメントは、BS 抽出物の代わりにコーンスターチを配合し、BS サプリメントと同様に調製した。

第2項 臨床試験

2014年1月から5月にかけて、東海大学医学部附属東京病院において、無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間試験を行った。試験はヘルシンキ宣言に則り実施した。試験計画について、東海大学医学部臨床研究審査委員会 (#13R-169) およびカゴメ株式会社研究倫理審査委員会 (#2013-R05) による承認を取得し、試験開始前までに UMIN 臨床試験登録システム (UMIN-CTR) に登録した (#UMIN000012855)。

東海大学医学部附属東京病院に通院する30歳以上69歳未満の男性のうち、過去2ヶ月間にアラニンアミノ基転移酵素 (ALT)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) のいずれかの値が基準値 (ALT $\geq$ 40 IU/L, AST $\geq$ 35 IU/L, γ -GTP $\geq$ 80 IU/L) を超え、超音波測定により脂肪肝の所見が認められた方を被験者とした。重篤な肝疾患の既往歴がある方、急性肝炎障害やウイルス性肝炎、または他の重篤疾患がある方、過度の飲酒習慣 (1日平均60g以上のアルコール摂取) を持つ方、および試験責任医師が不適格と判断した方は、被験者として選定しなかった。全ての被験者から書面でインフォームドコンセントを得た。

被験者の2群への無作為割付は乱数発生表を用いて行った。その結果に基づき、2種の試験食品 (BS サプリメントまたはプラセボ) が入った無地の容器に被験者番号を付した。被験者は、プラセボかBS サプリメントのいずれかを1日3粒 (GR = 0 mg or 30 mg)、2ヶ月間摂取した。被験者はもとより、医師ならびに測定・解析に関与する全ての研究者は、被験者がどちらの試験食品を摂取したか判らない状態 (二重盲検下) で試験を実施した。

主評価項目は、主要な肝機能マーカーである ALT、AST、または γ -GTP 値の変化量とした。副次評価項目を Table 6-1 に示した。

Table 6-1. 副次評価項目

分類	項目
身体測定	body weight, body mass index (BMI), and waist circumference
肝機能関連マーカー	albumin, total bilirubin (TB), alkali phosphatase (ALP), choline esterase (ChE), ferritin
腎機能関連マーカー	urinary acid (UA)
脂質代謝関連マーカー	triglyceride (TG), total-cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol
糖代謝関連マーカー	fasting blood sugar (FBS), hemoglobin A1c (HbA1c)
炎症マーカー	high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP)
アディポカイン	leptin, adiponectin
酸化ストレスマーカー	8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ¹

¹ 尿を分析に使用

第3項 動物試験

動物試験はカゴメ株式会社動物・生体試料管理運営委員会による承認 (#2008.004) を得た上で、実施した。7週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラットは個別のステンレスケージで飼育し、AIN-76 飼料 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を与えた。飼育環境は温度：20 ± 2°C、湿度：65 ± 6%、明暗サイクル：12 時間とした。十分に馴化させた後、ラットを 5 群：sham 群 (n = 6)、control 群 (n = 8)、BS-low 群 (n = 8)、BS-middle 群 (n = 8) および BS-high 群 (n = 8) に分けた。sham 群と control 群のラットには、AIN-76 飼料を 4 週間自由摂取させ、BS-low 群、BS-middle 群および BS-high 群のラットには異なる量の BS 抽出物を混ぜた AIN-76 飼料を 4 週間摂取させた。各飼料の組成と SFN の前駆体である GR 含量を Table 6-2 に示す。sham 群を除く 4 群のラットには、*N*-nitrosodimethylamine (NDMA) を体重 1 kg 当たり 5 mg となるように週に連続 3 日（火曜、水曜、木曜）、4 週間腹腔投与した。sham 群には生理食塩水を同様に投与した。4 週間の試験期間中はラットの体重と摂餌量を経時的に測定した。試験期間終了後、血液と肝臓を採取した。得られた血清および液体窒素で凍結させた肝臓は使用するまで -80°C で保管した。

Table 6-2. 動物飼料の組成

Contents, g/100 g	Normal Diet	BS-low	BS-middle	BS-high
Casein	25.00	25.00	25.00	25.00
Corn starch	40.25	39.83	39.41	38.56
Sucrose	20.00	20.00	20.00	20.00
Corn oil	5.00	5.00	5.00	5.00
Mineral mix ¹	3.50	3.50	3.50	3.50
Vitamin mix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00
Broccoli Sprout (BS) extract	0.00	0.42	0.84	1.69
Glucoraphanin (GR)	0.00	0.063	0.13	0.25

¹ AIN-76飼料組成に準拠

第4項 生化学指標の測定

被験者から採取した血液の生化学検査は、自動測定装置を用いて行った。血清 adiponectin および leptin 濃度は市販のキット (Human adiponectin ELISA kit, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, Japan; Human leptin highly sensitive assay kit, Immuno-Biological Laboratories Co, Ltd., Gunma, Japan) を用いて測定した。尿中 8-OHdG 濃度は市販の ELISA キット (New 8-OHdG check, JaICA, Shizuoka, Japan) を用いて測定し、クレアチニン濃度 (creatinine urinary assay kit, Cayman Chemical Company, MI, USA) で標準化した。

ラット血清中の AST および ALT 活性の測定にはトランスアミナーゼ CII-テストワコー (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を使用した。ラット血清中のアルブミンおよび総ビリルビン濃度の測定はそれぞれ、改良ブロモクレゾールパープル (BCP) 法および化学酸化法により行った (SRL, Inc., Tokyo, Japan)。ラット肝臓におけるチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) の測定は Kikugawa らの方法¹³⁶⁾に準じて行った。0.5 g の肝

臓切片を 4.5 mL の 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中でホモジナイズし、遠心分離 ($12,000 \times g$, 20 min, 4°C) により得た上清 0.2 mL を、0.65 mL の反応溶液 (5.0% sodium dodecyl sulfate (SDS): 0.4 mL, 0.8% butylhydroxytoluene (BHT): 0.01 mL, dH₂O: 0.32 mL) を含む試験管に加えた。0.15 mL の 20% 酢酸緩衝液 (pH 3.5) を添加した後、試験管をパラフィルムでシールし、100°C で 1 時間インキュベートした。その後 1 mL の butanol:pyridine (15:1) で抽出した TBARS を吸光度 ($\lambda = 532 \text{ nm}$) 測定した。肝臓中の TBARS 量は、1,1,3,3-tetramethoxypropane を用いて作成した検量線から計算した。ラット肝臓の glutathion S-transferase (GST) の活性は、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) を基質に用いて既報¹¹⁷⁾に準じて行った。

第 5 項 統計処理

パラメトリックデータは平均値±標準偏差で示し、ノンパラメトリックデータは中央値とパーセンタイル値で示した。臨床試験において、2 群間の差は Mann-Whitney *U*-test、同群の介入前後の比較は Wilcoxon の符号順位検定で解析した。変数間の相関は Spearman 検定により解析した。動物試験における 5 群間の比較は、ノンパラメトリックデータについては Kruskal-Wallis 検定を行った後、Steel-Dwass 法による多重検定を行い、パラメトリックデータについては ANOVA の後、Tukey-Kramer 法または Dunnett 法による多重検定を行った。有意水準は 5%未満とした。

臨床試験におけるサンプルサイズの計算は、試験期間中に 10%の脱落者が発生することを考慮し、信頼水準 95%、検出力 80%と仮定して行った。

全ての統計処理は、JMP (SAS institute, Cary, NC) を用いて行った。

第3節 結果

第1項 被験者のプロフィール

被験者として選定された合計 55 名の男性通院患者をプラセボ群 (n = 28) と BS 群 (n = 27) の 2 群に無作為に割付け、試験を開始した。制限事項等の逸脱がなく、試験を最後まで終了したプラセボ群の 28 名と BS 群の 24 名を解析対象者に選定し、BS サプリメントの有効性を評価することとした。BS 群の 3 名のうち 2 名は検査日に来院しないなど、試験計画からの逸脱が甚だしかったため解析対象者から除外し、残る 1 名は試験期間中に胆石性膵炎を患ったため試験参加を中止させた。試験計画および試験食品に起因する有害事象は一切認められなかった。Table 6-3 に被験者の特徴と試験開始前の主評価項目の数値を示す。肝機能マーカーである ALT、AST および γ -GTP の試験開始時の値について 2 群間で有意な差は認められなかった。

Table 6-3. プラセボ群および BS 群の被験者の介入前検査値¹

	Median (IQR)	
	プラセボ群	BS群
n	28	24
Age, year	56.0 (49.8–63.3)	51.5 (42.0–57.5)
BMI, kg/cm ²	25.9 (24.5–27.2)	25.7 (24.2–27.6)
Waist circumference, cm	92.3 (88.3–95.3)	86.5 (81.0–95.0)
AST, IU/L	30.0 (27.5–39.5)	37.5 (24.8–48.3)
ALT, IU/L	41.5 (34.0–64.3)	54.0 (34.5–79.0)
γ -GTP, IU/L	52.0 (39.5–91.5)	51.5 (40.8–91.3)

¹全ての項目において群間に有意差なし (Mann-Whitney U test)

IQR = interquartile range; AST = aspartate-aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; γ -GTP = γ -glutamyl transpeptidase.

第2項 BS サプリメントの摂取が肝機能マーカーの数値に及ぼす影響

SFN の前駆体である GR を 30 mg 含む BS サプリメントまたはプラセボ摂取前後の主要肝機能マーカー (ALT、AST、および γ -GTP) の値を Fig. 6-1 と Table 6-4 に示した。Wilcoxon の符号順位検定を行った結果、BS サプリメントを 2 ヶ月間摂取した BS 群において ALT と γ -GTP の値が摂取前と比べて有意に低下したことが判明した。AST の値については摂取前後で有意な差は認められなかった。プラセボ群では、3 種の肝機能マーカー全てにおいて摂取期間の前後で有意な差は認められなかった。

Table 6-4 に示したように、肝機能マーカーとして用いられる血清 ALP 値とアルブミン値もまた BS サプリメントの摂取で有意に低下した。ALP の中央値は BS 群において 6 IU/L (IQR = 17.8) 低下したが、プラセボ群においては 3.5 IU/L (IQR = 25.5) 上昇した ($p < 0.05$)。血清アルブミン値は BS 群において有意に低下したが、その変化量は僅かであり、基準値範囲内での変化であった。

第3項 BS サプリメントの摂取が他の生化学指標に及ぼす影響

BS サプリメントの摂取は、BMI や腹囲といった身体計測値や糖代謝マーカー（空腹時血糖値、HbA1c）にはほとんど影響しなかった。プラセボ群において BMI の有意な改善が認められたが、その原因は不明であった。BS 群において、脂質代謝関連マーカーの一部に改善が認められた。試験開始時の BS 群の血清総コレステロール濃度は、アメリカ心臓学会が境界域に定める 200 mg/dL を上回っていたが、BS サプリメントの摂取により有意に ($p < 0.05$) 改善した。一方、プラセボ群では試験期間の前後で血清総コレステロール濃度は上昇した。本試験では HDL-および LDL-コレステロール濃度に顕著な変化は認められなかった。総コレステロール濃度の改善と関連して、肥満や脂肪肝の進行に伴って上昇することが知られる血清コリンエステラーゼ (ChE) 活性は BS サプリメントの摂取により有意に低下した。さらに、代表的な酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG 濃度もまた BS サプリメントの摂取により有意 ($p < 0.05$) に低下した。

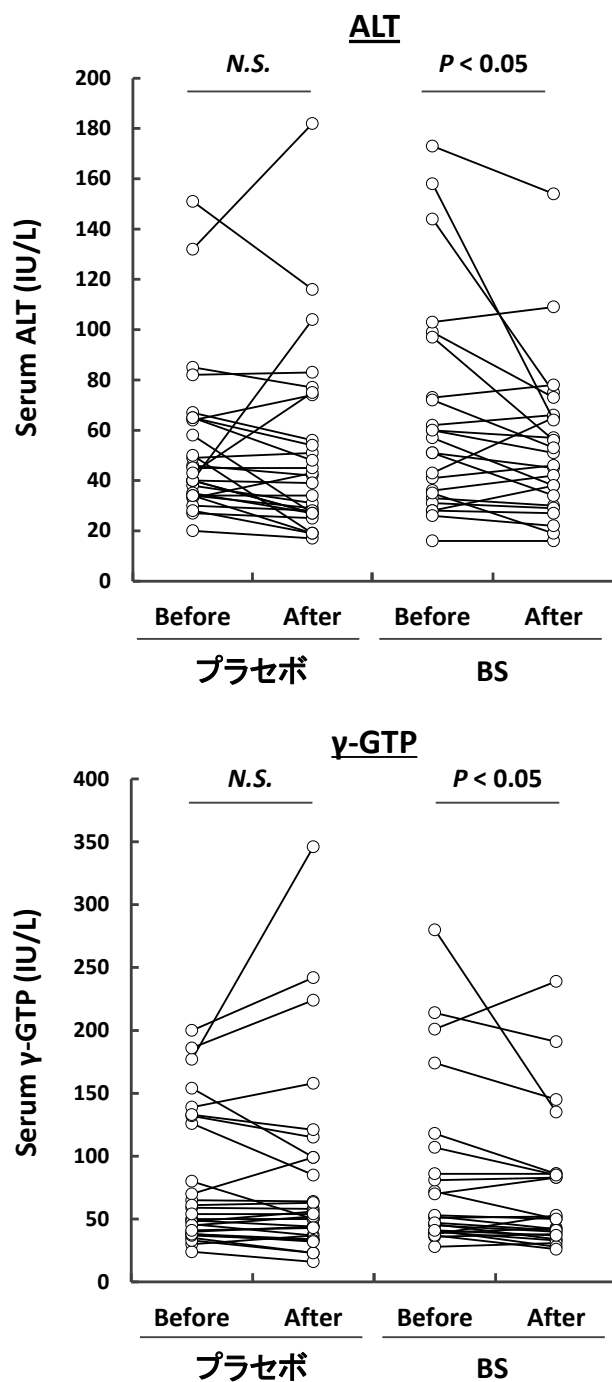


Fig. 6-1. プラセボまたはBSサプリメント摂取前および摂取2か月後の血清ALT値とγ-GTP値 [個々の被験者のデータを丸印で示し、前後の変化を線で結ぶ (n = 24 – 28), Wilcoxon の符号順位検定]

Table 6-4. プラセボ群および BS 群の被験者の介入前後における検査値 [Median (IQR)]

	プラセボ群 (n = 28)		BS 群 (n = 24)	
	Before	After	Before	After
BMI, kg/m ²	25.9 (24.6–26.8)	25.6 (24.5–26.8) ^a	25.7 (24.2–27.6)	25.8 (24.2–27.3)
Waist Circum., cm	92.3 (88.4–95.3)	91.4 (88.5–97.1)	86.5 (81.0–95.0)	88.8 (82.5–95.0)
AST, IU/L	30.0 (27.5–39.5)	26.0 (22.5–42.8)	37.5 (24.8–48.3)	37.5 (27.0–39.8)
ALT, IU/L	41.5 (34.0–64.3)	40.5 (27.0–60.5)	54.0 (34.5–79.0)	48.5 (33.0–65.3) ^a
γ-GTP, IU/L	52.0 (39.5–127.5)	53.0 (37–99)	51.5 (40.8–91.3)	50.0 (37.8–85.3) ^a
Alb, g/dL	4.6 (4.5–4.7)	4.6 (4.5–4.8)	4.6 (4.4–4.9)	4.5 (4.3–4.7) ^a
TB, mg/dL	0.9 (0.6–1.1)	0.8 (0.7–1.0)	0.9 (0.6–1.1)	0.9 (0.7–1.2)
ALP, IU/L	230 (206–274)	231 (214–281)	210 (168–248)	182 (166–140) ^a
ChE, IU/L	398 (369–458)	406 (370–424)	390 (359–436)	388 (358–421) ^a
Ferritin, ng/mL	231 (162–322)	215 (168–321)	281 (131–381)	216 (136–365)
UA, mg/dL	6.4 (5.4–6.8)	6.1 (5.6–6.7)	6.1 (5.5–7.0)	6.0 (5.4–6.8)
TG, mg/dL	133 (99.3–166)	113 (83.0–160)	146 (118–193)	135 (95.5–208)
TC, mg/dL	196 (183–224)	207 (184–225)	201 (182–219)	194 (184–211) ^a
HDL-C, mg/dL	47.5 (44.8–58.0)	49.5 (45.0–57.0)	50.0 (44.0–59.0)	48.5 (44.8–54.0)
LDL-C, mg/dL	125 (116–142)	137 (118–146)	123 (107–138)	123 (111–141)
HbA1c, %	5.8 (5.5–6.1)	5.8 (5.5–6.1)	5.7 (5.4–6.1)	5.7 (5.5–6.0)
FBS, mg/dL	105 (99–115)	106 (97.5–115)	105 (99.8–113)	106 (101–115)
hs-CRP, mg/dL	0.056 (0.037–0.14)	0.068 (0.028–0.15)	0.067 (0.036–0.13)	0.059 (0.031–0.13)
8-OHdG, ng/mg-CRE	6.6 (5.3–8.4)	6.1 (4.7–7.6)	6.8 (5.5–9.0)	5.5 (4.9–6.7) ^a
Adiponectin, μg/mL	6.3 (4.6–9.5)	6.1 (4.6–7.9) ^a	6.1 (4.8–7.4)	4.8 (4.1–7.7) ^a
Leptin, ng/mL	7.3 (5.2–11.4)	6.6 (4.1–10.1)	5.9 (4.2–7.5)	5.8 (3.0–8.7)

^a $p < 0.05$ vs before; AST = aspartate-aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; γ-GTP =

γ-glutamyl transpeptidase; Alb = albumin; TB = total bilirubin; ALP = alkali phosphatase; ChE = choline

esterase; UA= urinary acid; TG = triglyceride; TC = total cholesterol; HDL-C = high-density lipoprotein

cholesterol; LDL-C = low density lipoprotein cholesterol; HbA1c = hemoglobin A1c; FBS = fasting

blood sugar; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive protein; 8-OHdG = 8-hydroxydeoxyguanosine; CRE =

creatinine

第4項 酸化ストレス軽減と肝機能改善の相関

Spearman の相関解析の結果、BS 群の被験者において尿中 8-OHdG 濃度の変化量 ($\Delta 8\text{-OHdG}$) と肝機能マーカーの変化量 (ΔALT および $\Delta\gamma\text{-GTP}$) の間に有意な正の相関関係があることが明らかとなった (Fig. 6-2)。プラセボ群においては、これら変数間に有意な相関関係は認められなかった。酸化ストレス軽減と肝機能マーカー改善作用との相関を明らかにするために、尿中 8-OHdG 濃度が低下した ($\Delta 8\text{-OHdG} < 0$) 被験者とそうでない ($\Delta 8\text{-OHdG} \geq 0$) 被験者の間で肝機能マーカーの変化量 (ΔALT , $\Delta\gamma\text{-GTP}$) を比較した。その結果、両肝機能マーカーともに 8-OHdG 濃度が低下した被験者において低下する傾向が確認された (Fig. 6-3)。8-OHdG 濃度が低下した被験者の ΔALT および $\Delta\gamma\text{-GTP}$ の中央値は、そうでない被験者の ΔALT および $\Delta\gamma\text{-GTP}$ の中央値と比べてそれぞれ 17 IU/L および 11.5 IU/L 低いことが示された。

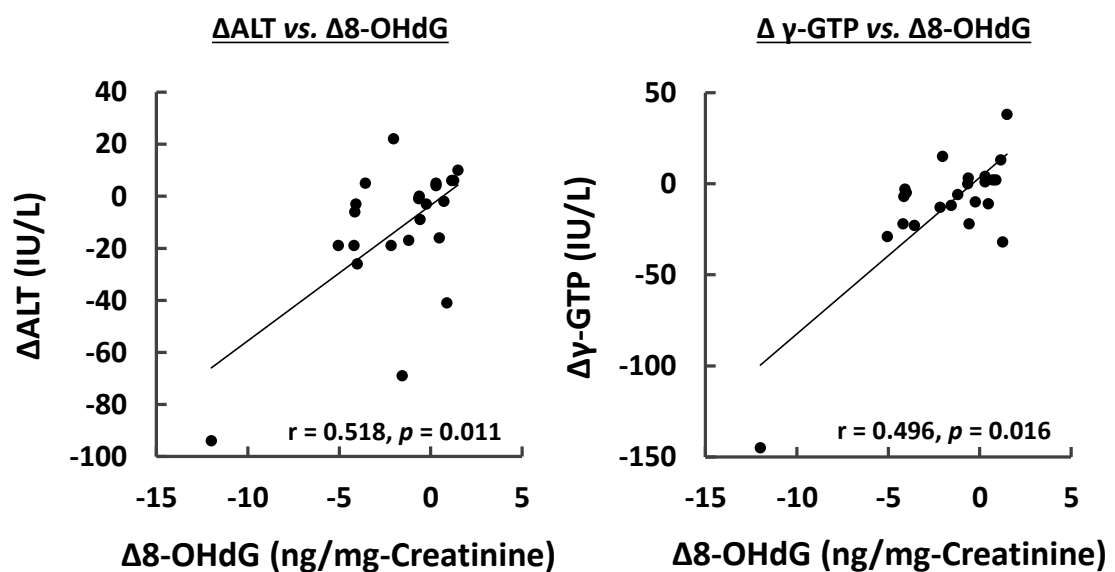


Fig. 6-2. BS 群の被験者における、尿中 8-OHdG 値の変化量 ($\Delta 8\text{-OHdG}$) と血清肝機能マーカー一値の変化量 (ΔALT または $\Delta\gamma\text{-GTP}$) との間の相関関係 [n = 24, Spearman 検定]

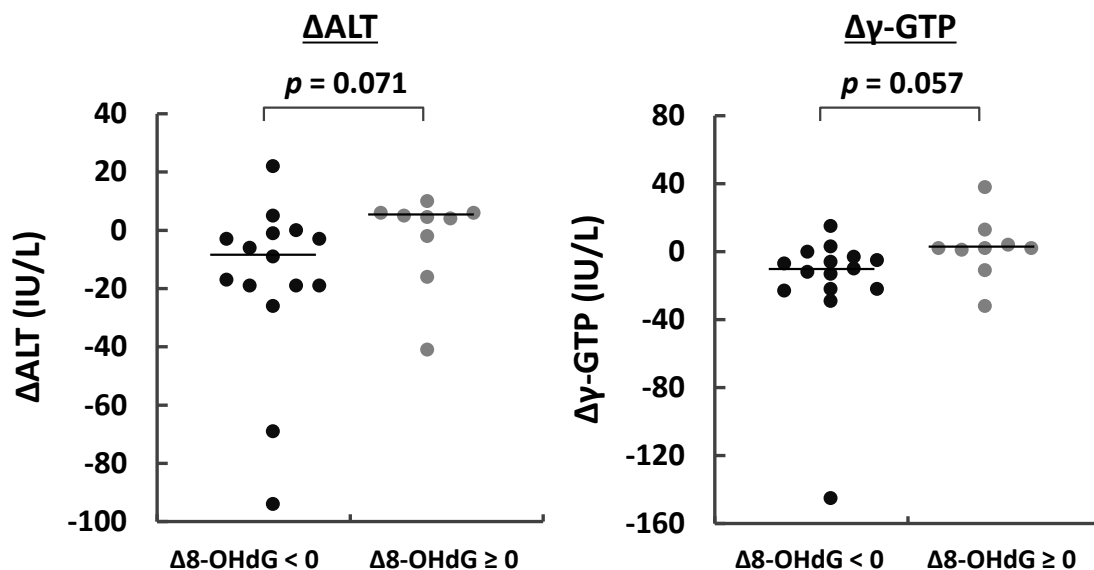


Fig. 6-3. BS 群の被験者のうち介入前後で尿中 8-OHdG 値が低下した人 ($\Delta 8\text{-OHdG} < 0$, $n = 15$) とそうでない人 ($\Delta 8\text{-OHdG} \geq 0$, $n = 9$) における、血清肝機能マーカー値の変化量 (ΔALT および $\Delta\gamma\text{-GTP}$) の比較 [グラフ中の横棒は中央値を示す。Mann-Whitney U 検定]

第 5 項 BS 抽出物の NDMA 誘導性慢性肝障害抑制作用

BS 抽出物の肝保護作用について慢性肝障害動物モデルを用いて検証した。4 週間 NDMA (5 mg/kg 体重) を反復腹腔投与したラット (control) の体重は、生理食塩水を投与されたラット (sham) と比べ約 17%低かった。肝重量については、sham 群と比べて control 群で有意に ($p < 0.05$) 低下した (29%) (Table 6-5)。これら NDMA による体重や肝重量の減少挙動は、BS 抽出物摂取群で用量依存的に抑制された。BS-high 群において、肝重量減少の有意な抑制が認められた。なお、試験期間中の摂餌量は群間で有意な差が認められなかった。control 群において主要な肝機能マーカーである血清 AST および ALT 値が sham 群と比べて 2 倍以上まで上昇したことから、NDMA の反復投与により慢性肝障害が誘導されたことが確認された (Fig. 6-4)。その一方で、BS 抽出物を摂取したラットでは血清 AST 値および ALT 値の上昇は用量依存的に抑制され、BS-middle 群および BS-high 群において有意な効果が確認された。また、BS 抽出物の摂取により、肝・胆管

機能の評価に使用される血清アルブミン値やビリルビン値の改善が認められた (Fig. 6-4)。

Table 6-5. *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) の毒性に対する BS 抽出物の効果 [平均値±標準偏差]

試験群	n	体重の増加量 (g)	肝重量 (g)	摂餌量 (g/day)
sham	6	210.0 ± 23.7	17.1 ± 1.4	20.3 ± 1.3
control	8	174.4 ± 20.5	12.1 ± 1.5**	19.2 ± 1.7
BS-low	8	181.4 ± 20.3	12.9 ± 1.6	19.3 ± 1.6
BS-middle	8	186.8 ± 21.1	13.9 ± 2.2	19.2 ± 2.1
BS-high	8	188.3 ± 8.7	15.1 ± 1.4††	18.9 ± 1.0

** $p < 0.01$ vs. sham, †† $p < 0.01$ vs. control by the Dunnett's test.

第6項 BS抽出物の摂取がラット肝臓の酸化ストレスや第二相酵素活性に及ぼす影響

血清 AST および ALT 値の上昇と連動して、肝臓 TBARS 値もまた control 群において有意に上昇した (Fig. 6-5)。しかしながら、BS 抽出物を摂取したラットの肝臓では TBARS 値は低値を示し、特に BS high 群では TBARS 値の上昇はほとんど完全に抑制された。代表的な第二相酵素であり、NDMA の解毒を担うとともに抗酸化的役割を果たすことが知られる GST のラット肝臓における酵素活性は、BS 抽出物の摂取により用量依存的に有意に上昇した (Fig. 6-5)。

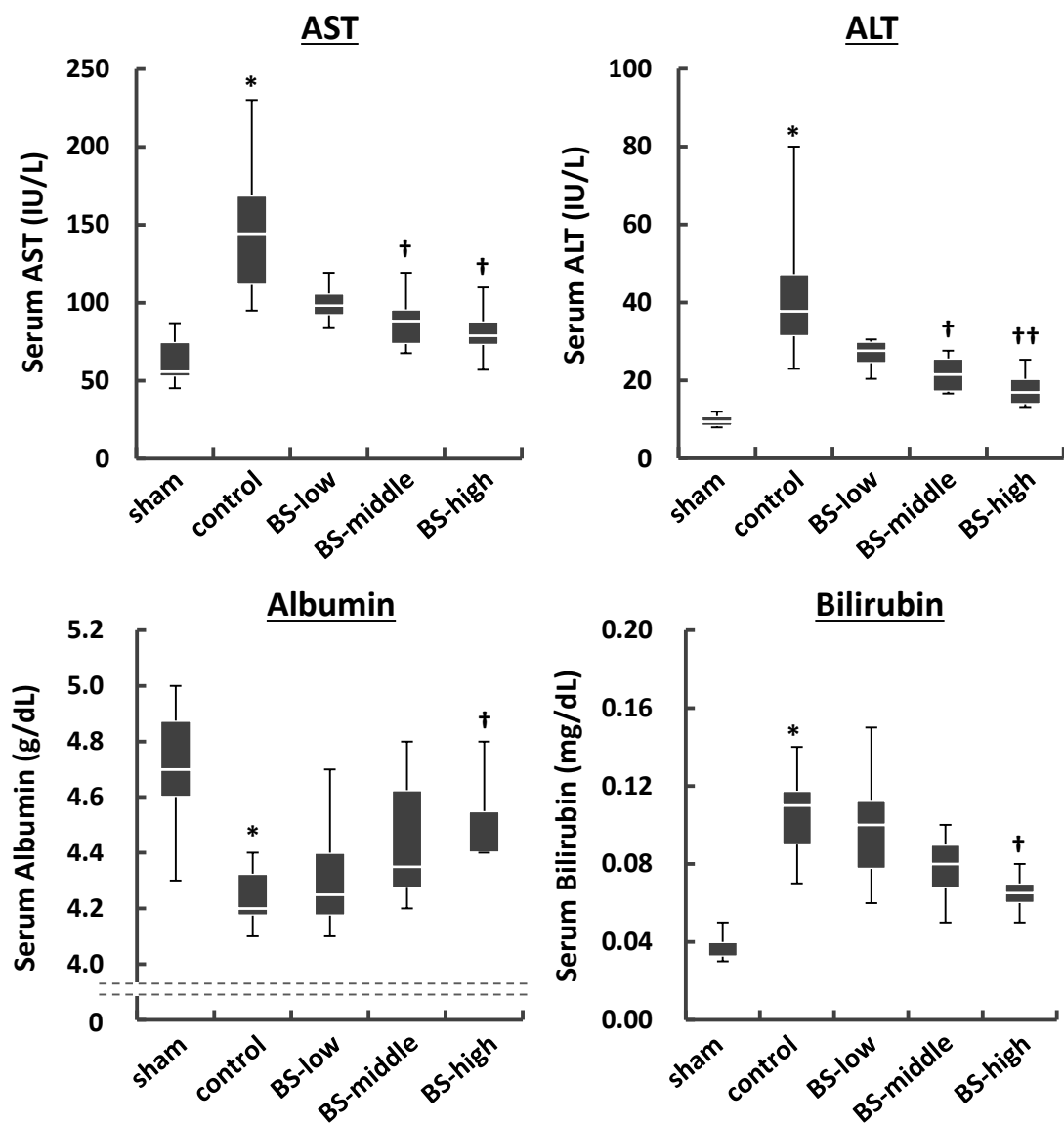


Fig. 6-4. BS 抽出物の摂取が、*N*-nitrosodimethylamine (NDMA) 反復投与により慢性肝障害を誘導したラットの血清肝機能マーカー (AST&ALT)、アルブミン、およびビリルビン値に及ぼす影響 [箱ひげ図のエラーバーの下端と上端、箱の下端と上端および箱内の横線は、最小値、最大値、第1四分位点、第3四分位点および中央値を示す (n = 6 - 8)。*: $p < 0.05$ vs. sham, †: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$ vs. control (Steel-Dwass 検定)]

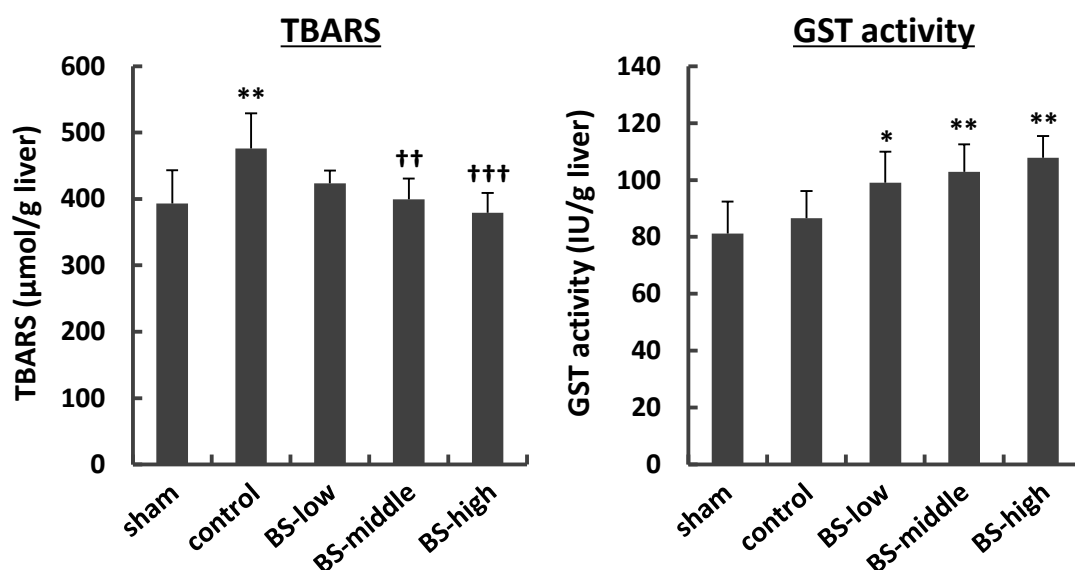


Fig. 6-5. BS 抽出物の摂取が、*N*-nitrosodimethylamine (NDMA) 反復投与により慢性肝障害を誘導したラットの肝臓 TBARS 量および GST 活性に及ぼす影響 [平均値±標準偏差 (n = 6 - 8), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. sham, ††: $p < 0.01$, †††: $p < 0.001$ vs. control (Dunnett's 検定)]

第4節 考察

深刻な状態に至るまで自覚症状が現れにくいことから、肝臓は沈黙の臓器と呼ばれる。それゆえ、日頃の健康診断で容易に測定可能な肝機能マーカーの数値に基づき肝臓の健康状態を管理することが、慢性肝疾患の予防・改善において極めて重要である。そこで本章では、肝機能マーカーが異常高値を示す男性被験者を対象に無作為化試験を実施し、SFN の前駆体 (GR = 30 mg) を含む BS サプリメントの継続摂取による肝機能改善効果を検討した。

本試験の主評価項目に設定した主要な肝機能マーカーである ALT および γ -GTP 値はもとより、副次的な肝機能マーカーとして知られる ALP 値について、BS 群の被験者において有意な改善が認められ、プラセボ群の被験者において有意な変化が認められなかったことから、BS サプリメントの継続摂取が男性被験者における肝機能改善に有効で

あることが判明した (Fig. 6-1)。しかしながら、肝機能マーカーの低下 (変化) 量を BS 群とプラセボ群とで比較したところ、有意差は認められなかった。被験者の選定基準を、「3 種の肝機能マーカー (AST, ALT, γ -GTP) のうち、いずれかの値が基準値を超えている方」としたことでデータのばらつきが生じ、有意差の検出が困難となったと考えられた。本試験において、プラセボ群の数名の被験者において肝機能マーカーの数値改善が見られた。いわゆるプラセボ効果や生活習慣の僅かな変化、その他のバイアスが微妙に影響したと考えられた。しかしながら、BS 群で認められた肝機能改善効果と決定的に異なることとして、プラセボ群における肝機能マーカーの数値改善は、酸化ストレスマーカー (尿中 8-OHdG 濃度) の低下と全く関連していなかった。このことから、2 ヶ月間のスルフォラファン前駆体 (GR) を含む BS サプリメントの摂取は、プラセボ効果の枠を超えて被験者の生理機能に確実な影響を及ぼしたと考察された。また、酸化ストレスの低減が肝機能改善に寄与した可能性が見出された。尿中 8-OHdG は、種々の細胞や組織で起こる DNA の酸化傷害を反映する指標として確立されており¹³⁷⁾、体内の酸化ストレスを評価するために広く様々な研究において使用されてきた^{138, 139)}。また、肝臓中の 8-OHdG 量と尿中 8-OHdG 濃度との間に有意な相関関係があることも C 型ウイルス肝炎患者を対象とした研究において確認されている¹⁴⁰⁾。本研究では肝生検を実施しなかったため直接的なデータを提示していないが、BS サプリメントを摂取した被験者においては、様々な生活習慣 (飲酒、暴飲暴食、喫煙) による肝臓中の酸化ストレス上昇が軽減されたと推察された。

SFN または BS による肝保護効果や肝機能改善効果に関して、ヒト試験における有効性を示した報告は未だないが、動物試験の結果については数多く報告されている。古くは肝毒性を持つ物質に対する SFN の効果が幅広く検討されており、SFN またはその前駆体である GR の摂取が、cisplatin¹³⁰⁾、mycocystin¹³¹⁾、carbon tetrachloride¹³²⁾、および D-galactosamine⁸⁹⁾によって誘導される肝障害を顕著に抑制することが報告されている。加えて近年では、SFN が生活習慣関連因子、つまり飲酒や過剰なエネルギー摂取による

肝疾患に対しても予防・改善効果を示すことが示唆されている¹³³⁻¹³⁵)。Nrf2 ノックアウトマウスを用いた多数の報告^{141, 142)}によって、転写因子 Nrf2 を介した第二相酵素・抗酸化タンパク質誘導作用や抗炎症作用などが SFN の多彩な肝保護効果に大きく寄与すること示されている。

本章では、ヒト試験で使用した BS 抽出物が Nrf2 の下流に存在する第二相酵素を誘導するかどうかについて、慢性肝障害動物モデルを用いた試験を実施した。その結果、BS 抽出物を 4 週間摂取させたラットの肝臓において代表的な第二相酵素として知られる GST が誘導されることを確認した (Fig. 6-5)。また、SFN が肝臓の GST を誘導した結果、NDMA の反復投与による肝臓中酸化ストレスの増大や慢性肝障害が有意に抑制された (Fig. 6-4)。以上の結果は、BS 抽出物の生体内での有用性、すなわち、BS 抽出物の摂取により SFN が体内に吸収され、肝臓等において Nrf2 を介して種々の作用を発現する可能性を示している。

本章の臨床試験では、第 5 章の結果に基づき、SFN の前駆体である GR の用量を 30 mg と設定した。この用量は、先行研究^{12, 13)}で使用された GR の用量 (400 - 800 μ mol) と比べて低く、また食経験の範囲内であり、ダイエタリーサプリメントとして広く安全に提供可能な用量であると考えられる。

なお、本研究にはいくつかの考慮すべき課題がある。第一に、本ヒト試験は男性被験者を対象に実施しており、試験結果が女性にも当てはまるか否かは不明である。第二に、試験期間が 2 ヶ月と短かったことがある。著明な肝保護成分である silymarin は、3 ヶ月間の摂取試験でその有効性が確認されている¹⁴³⁾。第三に、本研究では肝生検は実施していない。倫理的な観点から容易ではないが、ヒト体内または肝臓中における SFN の詳細な作用メカニズムを解明するためには、今後さらなる検討が必要である。

第 5 節 小括

To evaluate the effects of dietary supplementation of sulforaphane (SFN)-rich broccoli sprout

(BS) extract on hepatic abnormalities in Japanese male participants, a randomized, placebo-controlled, double blind trial was performed. Dietary supplementation with BS extract containing SF precursor GR (n = 24) for 2 months significantly improved serum levels of liver function markers, ALT and γ -GTP, as well as alkali phosphatase activity. Placebo (n = 28) showed no significant effects on the markers. The urinary level of 8-OHdG, an established oxidative stress marker, was significantly reduced in participants who had received BS supplement. The reduction of urinary 8-OHdG was significantly associated with decreased levels of both ALT and γ -GTP. Intake of BS extract significantly prevented chronic liver failure in Sprague-Dawley rats induced by successive intraperitoneal injection with *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) for 4 weeks. BS suppressed the increase in the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in rat livers through induction of hepatic phase 2 enzymes including hepatic GST. In conclusion, dietary supplementation with BS extract containing the SFN precursor GR (even at 30 mg) seems to be highly effective in improving liver function through reduction of oxidative stress.

第7章 総括

健康寿命の延伸を目的としたアクションプランには、基本的な生活習慣の見直し（適度な運動、適切な食習慣、禁煙）に加え、けんしん（健診・検診）が組み込まれている。

「けんしん」により自分自身の健康状態を定期的に把握することは、自律した健康管理や疾病予防の第一歩となる。現在、人間ドック受診者の約3人に1人が肝機能異常を抱えている。肝臓は沈黙の臓器と呼ばれ自覚症状を得にくいいため、「けんしん」により肝臓の健康状態を知り、必要に応じて肝機能改善に向けた対策を講じなければならない。しかしながら、人間ドックで知り得る他の健康異常（肥満、高血圧、耐糖能異常、高コレステロール、高中性脂肪）には、その予防や改善に有効である可能性が高いと裏付けられた特定保健用食品が多数存在するのに対して、肝機能異常に対応する特定保健用食品はない。それゆえ、肝機能異常と診断された人々が改善に向けた対策を講じることが困難な状況にある。そこで本研究では、野菜の摂取を通じて、肝機能改善に有効な情報を提供することを目的として、トマトおよびブロッコリースプラウトに着目し、その肝機能改善作用について詳細な検討を行った。

第2章では、世界各地の飲酒シーンで摂取される伝統・慣習があるトマトについて、飲酒後のアルコール代謝に及ぼす影響を調べた。健康な男性被験者に5%のアルコール(Alc)、または5%のアルコールを含むトマトジュース(TJAlc)を摂取させた結果、Alc摂取後と比べ、TJAlc摂取後の血中エタノール濃度が有意に低く推移し、血中酢酸濃度が有意に高く推移したことから、飲酒時のトマト（ジュース）の摂取がアルコール代謝を促進することが明らかとなった。動物試験により有効成分を探索した結果、トマトに含まれる複数の水溶性成分がアルコール代謝促進作用に寄与することが示唆された。作用機序については、トマト中の有効成分がピルビン酸合成系の亢進を介して肝臓の乳酸脱水素酵素の活性を高めたことで、NAD/NADH バランスが是正され、最終的にNAD依存酵素であるアルコール代謝関連酵素の活性が高まったものと推察された。

第3章では、強い毒性を示し、我々日本人を含む東アジアの人々の健康を脅かすアセトアルデヒドに着目した。アセトアルデヒドの代謝を担うアルデヒド脱水酵素 (ALDH) を誘導することが期待された、ブロッコリースプラウト (BS) 由来のファイトケミカル・スルフォラファン (SFN) について検討を行った。マウス肝がん由来細胞株 Hepa 1c1c7 を用いて検討を行った結果、SFN が顕著な ALDH 誘導能を示すことを見出した。また、天然由来および化学合成の計 15 種類の化合物が ALDH 誘導能を示すことを明らかにした。これら化合物の ALDH 誘導能と第二相酵素である NQO1 に対する誘導能の間に正の相関関係が認められたことから、ALDH が NQO1 と同じメカニズムで誘導されることが示唆された。そこで、NQO1 の誘導を制御する転写因子 Nrf2 を欠損させたマウス胎児線維芽細胞を用いて試験したところ、SFN による ALDH 誘導作用は完全に消失した。また、プロモーター領域に ARE (Antioxidant Response Element) コアコンセンサス配列の存在を確認したことから、アセトアルデヒドの代謝を担う *Aldh1a1* と *Aldh2* の発現誘導に Nrf2-ARE 経路が関与することが強く示唆された。本章では、SFN および他の第二相酵素誘導剤による ALDH 誘導メカニズムの解明に加え、SFN の摂取によりマウス肝臓の ALDH が誘導されること、その結果、エタノール投与後のアセトアルデヒドの代謝が約 2 倍まで速まることを実証した。

第4章では、Caco-2 細胞単層膜を用いて SFN の腸管上皮における吸収機構および吸収経路の解明を行った。その結果、SFN は受動拡散により Caco-2 細胞単層膜を透過することが判明した。タイトジャンクション (TJ) 閉口剤である sodium butyrate 処理を施した Caco-2 細胞単層膜において SFN の透過が有意に抑制されたこと、細胞間隙透過のマーカーとして用いられる fluorescein の Caco-2 細胞単層膜透過を SFN が競合的に阻害したことから、細胞間隙 TJ が SFN の透過経路であることが明らかとなった。一方、基底膜側から微量の GSH-SFN が検出されたことから、少なくとも SFN の一部は細胞内を透過しているものと示唆された。

第5章では、SFN の安定前駆体・グルコラファニン (GR) を含有する BS 抽出物を用

いてサプリメントを作製し、その有用性をヒト試験において評価した。健康被験者に 3 粒または 6 粒の BS サプリメント (GR = 30 or 60 mg) を摂取させ、その後 30 時間に尿から排泄される isothiocyanates (ITCs) および dithiocarbamates (DTCs) 量を SFN 吸収量の指標として測定した。その結果、BS サプリメント摂取により GR 用量依存的に SFN の吸収量が増加することが判明した。SFN の生体利用効率 (摂取した GR 量に対する SFN 吸収量の百分率比) は、BS サプリメントを 3 粒摂取したときと 6 粒摂取したときとで変化はなかった。BS サプリメント摂取により、GR 用量依存的な血中第二相酵素 (glutathione S-transferase: GST および NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1: NQO1) 活性の上昇が認められた。両第二相酵素活性の上昇が協奏的なものであったことから、体内に吸収された SFN が第二相酵素など一連の生体防御遺伝子群の転写を司る Nrf2 を活性化したと推察された。これまでに実施された臨床研究での GR の用量 (400 - 800 μmol) は、日常に摂取されるグルコシノレート (GLS) 量 (1 日推定摂取量: 約 100 μmol) と比べて極めて高い。本章において、Nrf2 を介して種々の生理作用を発現する可能性が示唆された GR 用量 (30 - 60 mg = 68.7 - 137.5 μmol) は食として安全にて提供可能な用量であるため、本研究成果は、SFN を訴求する機能性食品の開発に大いに役立つと期待される。

第 6 章では、第 5 章で試作した BS サプリメントを用いて、肝機能異常の男性を対象とした無作為化プラセボ対照二重盲検試験を行い、SFN の肝機能改善作用を検討した。男性被験者に、SFN の前駆体である GR (30 mg) を含む BS サプリメント、または GR を含まないプラセボを 2 ヶ月間摂取させ、血中の主要な肝機能マーカー (Alanine aminotransferase: ALT および γ -glutamyl transpeptidase: γ -GTP) の数値や他の生化学的指標に及ぼす影響を調べた。その結果、BS サプリメントを摂取した被験者において ALT、 γ -GTP および肝・胆機能マーカーである ALP (alkali phosphatase) の有意な改善が認められた。一方、プラセボを摂取した被験者では有意な改善は認められなかった。さらに、BS サプリメントを摂取した被験者では、肝機能マーカーの変化量と酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG の変化量の間に有意な相関関係が認められた。このことから、

BS サプリメント摂取による肝機能改善作用には酸化ストレスの軽減が寄与したものと推察された。*N*-nitrosodimethylamine (NDMA) 誘導性慢性肝障害ラットモデルを用いて、BS サプリメントの原材料である BS 抽出物の摂取が肝臓の酸化ストレスに及ぼす影響を調べた。その結果、GR 用量依存的にラット肝臓において第二相酵素 (GST) 活性が上昇し、NDMA 反復投与による肝臓の酸化ストレス (TBARS) の増大および慢性肝障害が有意に抑制された。以上の結果から、生体防御機構を司る Nrf2 の強力な誘導剤として知られる SFN は第二相酵素など種々の生体防御遺伝子を誘導することで、人々が日々の生活で被る酸化ストレスを軽減し、肝機能を改善する可能性が示唆された。ヒトを対象とした試験において SFN の肝機能改善作用を報告した例はなく、本研究成果は SFN の新たな臨床的有用性を示すものである。

栄養学・食品科学・医学・薬学など様々な分野における研究の進展に伴い、また、多数の疫学研究の結果から、野菜を摂取することの意義、野菜の摂取が人々の健康に役立つ理由が明らかになりつつある。しかしながら、未だ全容解明に至っていないのも事実であり、野菜には解明すべき価値や可能性、魅力が潜在している。その一例が、食品の三次機能を担うファイトケミカルの存在である。未知なるファイトケミカルの発見はもとより、SFN をはじめとする既知のファイトケミカルに新たな分子メカニズムや生理作用を見出すこともまた、野菜を摂取する意義の解明に繋がるものと考ええる。本研究がその一助となり、国民の野菜摂取量の増加やさらなる健康長寿社会の実現に貢献することを期待する。

謝辞

本学位論文を作成するにあたり、終始変わらぬ御懇意な御指導、御鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院教授 松井利郎先生に衷心より感謝の意を表します。

また、本論文の審査にあたり、御校閲の労をお取りくださいました九州大学大学院農学研究院教授 古瀬充宏先生ならびに教授 佐藤匡央先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の共同研究者として、貴重な御意見と御助言を賜りました Johns Hopkins University (JHU) School of Medicine 教授 Paul Talalay 先生、筑波大学医学医療系教授 谷中昭典先生、東海大学医学部教授 西崎泰弘先生、東海大学医学部客員准教授 菊池真大先生、九州大学大学院農学研究院助教 田中充先生、ならびにアサヒグループホールディングス株式会社イノベーション研究所主管研究員 大嶋俊二博士に心から感謝申し上げます。

本研究の機会を与えてくださいましたカゴメ株式会社会長 西秀訓氏、社長 寺田直行氏、前総合研究所長 児玉弘仁氏、前研究開発本部長 佐藤邦彦氏、イノベーション本部長 山口聡氏をはじめとする役員の皆様、ならびに前総合研究所自然健康研究部主席研究員 稲熊隆博博士に深く感謝いたします。

本研究の推進にあたり、貴重な御指導と御助言ならびに過大なご支援を賜りましたカゴメ株式会社イノベーション本部自然健康研究部長 菅沼大行博士、課長 砂堀諭氏、課長 相澤宏一博士に心から感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、多大なご協力を賜りましたアサヒグループホールディング株式会社、東海大学医学部附属東京病院、JHU Paul Talalay lab.ならびに九州大学大学院農学研究院食品分析学研究室の皆様、に厚く御礼申し上げます。さらに、日々の研究生活において大変お世話になりました自然健康研究部の皆様に深く感謝いたします。

最後に、現在に至るまで多大なる支援をしてくれました両親、常に私を理解し支えてくれた妻 菜穂子に感謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省. (2000). 健康日本 21.
- 2) 農林水産省. (2015). 野菜をめぐる情勢.
- 3) Liu R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 78, 517S-20S.
- 4) Stoewsand G.S. (1995). Bioactive organosulfur phytochemicals in Brassica oleracea vegetables--a review. *Food Chem Toxicol.* 33, 537-43.
- 5) Aizawa K., Iwasaki Y., Ouchi A., Inakuma T., Nagaoka S., Terao J., and Mukai K. (2011). Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 2. Measurements of the SOAC values for carotenoids and food extracts. *J Agric Food Chem.* 59, 3717-29.
- 6) Giovannucci E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst.* 91, 317-31.
- 7) Rao A.V., and Agarwal S. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *J Am Coll Nutr.* 19, 563-9.
- 8) Yamamoto T., Yoshimura M., Yamaguchi F., Kouchi T., Tsuji R., Saito M., Obata A., and Kikuchi M. (2004). Anti-allergic activity of naringenin chalcone from a tomato skin extract. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68, 1706-11.
- 9) Kim Y.I., Hirai S., Goto T., Ohyan C., Takahashi H., Tsugane T., Konishi C., Fujii T., Inai S., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Takahashi N., and Kawada T. (2012). Potent PPAR α activator derived from tomato juice, 13-oxo-9,11-octadecadienoic acid, decreases plasma and hepatic triglyceride in obese diabetic mice. *PLoS One* 7, e31317.
- 10) Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635-41.
- 11) 大澤俊彦. (2003). 食べてガンを防ぐスプラウト健康法. KAWADE 夢新書.
- 12) Zhang Y., Talalay P., and Cho C.G., and Posner G.H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2399-403.
- 13) Kensler T.W., Chen J.G., Egner P.A., Fahey J.W., Jacobson L.P., Stephenson K.K., Ye L., Coady J.L., Wang J.B., Wu Y., Sun Y., Zhang Q.N., Zhang B.C., Zhu Y.R., Qian G.S., Carmella S.G., Hecht S.S., Benning L., Gange S.J., Groopman J.D., and Talalay P. (2005). Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin-DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo township, Qidong, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14, 2605-13.
- 14) Egner P.A., Chen J.G., Zarth A.T., Ng D.K., Wang J.B., Kensler K.H., Jacobson L.P., Muñoz A., Johnson J.L., Groopman J.D., Fahey J.W., Talalay P., Zhu J., Chen T.Y., Qian G.S., Carmella S.G., Hecht S.S., and Kensler T.W. (2014). Rapid and sustainable detoxication of airborne pollutants by broccoli sprout beverage: results of a randomized clinical trial in China. *Cancer Prev Res (Phila).* 7, 813-23.
- 15) Lenzi M., Fimognari C., and Hrelia P. (2014). Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Cancer Treat Res.* 159, 207-23.
- 16) Elbarbry F., and Elrod N. (2011). Potential health benefits of sulforaphane: a review of the experimental, clinical and epidemiological evidences and underlying mechanisms. *J Med Plants Res.* 5, 473-84.

- 17) Talalay P., Fahey J.W., Healy Z.R., Wehage S.L., Benedict A.L., Min C., and Dinkova-Kostova A.T. (2007). Sulforaphane mobilizes cellular defenses that protect skin against damage by UV radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 17500-5.
- 18) Singh K., Connors S.L., Macklin E.A., Smith K.D., Fahey J.W., Talalay P., and Zimmerman A.W. (2014). Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 15550-5.
- 19) Bahadoran Z., Mirmiran P., Hosseiniapanah F., Rajab A., Asghari G., and Azizi F. (2012). Broccoli sprouts powder could improve serum triglyceride and oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 96, 348-54.
- 20) Yanaka A., Fahey J.W., Fukumoto A., Nakayama M., Inoue S., Zhang S., Tauchi M., Suzuki H., Hyodo I., and Yamamoto, M. (2009). Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice and humans. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2, 353-60.
- 21) Shiina A., Kanahara N., Sasaki T., Oda Y., Hashimoto T., Hasegawa T., Yoshida T., Iyo M., and Hashimoto K.. (2015). An open study of sulforaphane-rich broccoli sprout extract in patients with schizophrenia. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 13, 62-7.
- 22) Fahey J.W., Zhang Y., and Talalay P. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 10367-72.
- 23) 公益社団法人日本人間ドック学会. (2014). 2014 年人間ドックの現況. (インターネットに公開 <http://www.ningen-dock.jp/wp/wp-content/uploads/2013/09/e1ab5e9d9ec665e4918e3619911dea65.pdf>)
- 24) Vuppalanchi R., and Chalasani N. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 249, 306-17.
- 25) Itoh K., Ishii T., Wakabayashi N., and Yamamoto M. (1999). Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic Res*. 31, 319-24.
- 26) Guo, R. and Ren, J. (2010). Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *Int J Environ Res Public Health* 7, 1285-301.
- 27) Bennion L.J., and Li T.K. (1976). Alcohol metabolism in American Indians and Whites: lack of racial differences in metabolic rate and liver alcohol dehydrogenase. *N Engl J Med*. 294, 9-13.
- 28) Kopun M., and Propping P. (1977). The kinetics of ethanol absorption and elimination in twins and supplementary repetitive experiments in singleton subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 11, 337-44.
- 29) Abe Y., Haseba T., Oshima S., Kanda T., and Ohno Y. (2012). Influence of drinking conditions on alcohol metabolism in healthy men with ALDH2*1/*1 Genotype: comparison between different lcoholic drinks with or without meal. *Food and Nutr Sci*. 3, 997-1003.
- 30) Southgate H.W. (1925). The Effect of alcohol, under varying conditions of diet, on man and animals, with some observations on the fate of alcohol in the body. *Biochem J*. 19, 737-45.
- 31) Oshima S., Haseba T., Masuda C., Kakimi E., Sami M. Kanda T., and Ohno Y. (2012). Individual differences in blood alcohol concentrations after moderate drinking are mainly regulated by gastric emptying rate together with ethanol distribution volume. *Food and Nutr Sci*. 3, 732-7.
- 32) Haseba T., Sugimoto J., Sato S. Abe Y., and Ohno Y. (2008). Polyphenols in whisky lower blood acetaldehyde level by depressing alcohol metabolism through inhibition of alcohol dehydrogenase 1 (class 1) in mice. *Metabolism* 57, 1753-9.

- 33) Giovannucci, E. (2002). A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Exp Biol Med.* 227, 852-9.
- 34) Kasagi S., Seyama K., Mori H., Souma S., Sato T., Akiyoshi T., Suganuma H., and Fukuchi Y. (2006). Prevents senescence-accelerated mouse P1 strain from developing emphysema induced by chronic exposure to tobacco smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290, L396-L404.
- 35) Suganuma H., and Inakuma T. (1999). Protective effect of dietary tomato against endothelial dysfunction in hypercholesterolemic mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63, 78-82.
- 36) Aizawa K., Matsumoto T., Inakuma T., Ishijima T., Nakai Y., Abe K., and Amano F. (2009). Administration of tomato and paprika beverages modifies hepatic glucose and lipid metabolism in mice: A DNA microarray analysis. *J Agric Food Chem.* 57, 10964-71.
- 37) Martin C.S., Earleywine M., Musty R.E., Perrine M.W., and Swift R.M. (1993). Development and validation of the biphasic alcohol effect scale. *Alcohol Clin Exp Res.* 17, 140-6.
- 38) Earleywine M., and Erblich J. (1996). A confirmed factor structure for the biphasic alcohol effects scale. *Exp Clin Psychopharmacol.* 4, 107-13.
- 39) Ray L.A., Bujarski S., Chin P.F., and Miotto K. (2012). Pharmacogenetics of naltrexone in Asian Americans: A randomized placebo-controlled laboratory Study. *Neuropsychopharmacology* 37, 445-55.
- 40) Lisandar B., Lundvall O., Tomner J., and Jones A.W. (2006). Enhanced rate of ethanol elimination from blood after intravenous administration of amino acids compared with equicaloric glucose. *Alcohol Alcohol.* 41, 39-43.
- 41) Cunningham C.C., Preedy V.R., Paice A.G., Hesketh J.E., Peters T.J., Patel V.B., Volpi E., Mawatari K., Masaki H., Mori M., and Torii K. (2001). Ethanol and protein metabolism. *Alcohol Clin Exp Res.* 25, 262S-8S.
- 42) Okada, T., and Mizoi, Y. (1982). Studies on the problem of blood acetaldehyde determination in man and level after alcohol intake. *Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence* 17, 141-59.
- 43) Hayashi M. (1992). Determination of organic acids in foods by HPLC with post-column pH buffered electroconductivity detection. *Shimadzu Reviews* 49, 59-64.
- 44) Kishimoto R., Ueda M., Kawakami M., Goda K., Park S.S., and Nakata, Y. (1997). Effect of chronic administration of alcoholic beverages and seasoning containing alcohol on hepatic ethanol metabolism in mice. *J Nutr Sci Vitaminol.* 43, 613-26.
- 45) Iijima Y., Nakamura Y., Ogata Y., Tanaka K., Sakurai N., Suda K., Suzuki T., Suzuki H., Okazaki K., Kitayama M., Kanaya S., Aoki K., and Shibata D. (2008). Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *Plant J.* 54, 949-62.
- 46) Westerfeld W.W., Stotz E., and Berg R.L. (1942). The role of pyruvate in the metabolism of ethyl alcohol. *J Biol Chem.* 144, 652-65.
- 47) Mangeney M., Beaugé F., Nordmann J., and Nordmann, R. (1979). Effect of natural amino acids on ethanol oxidation in isolated rat hepatocytes. *Arch Int Physiol Biochim.* 87, 603-12.
- 48) Beaugé F., Mangeney M., Nordmann J., and Nordmann R. (1980). Comparative study of the effect of amino acids on ethanol oxidation in isolated hepatocytes from starved and fed rats. *Adv Exp Med Biol.* 132, 393-402.
- 49) Tanaka M., Nishigaki Y., Fuku N., Ibi T., Sahashi K., and Koga Y. (2007). Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 7, 399-401.
- 50) Yin Y.G., Tominaga, T., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Ashihara, H., Nishimura, S., Ezura, H., and Matsukura C. (2010). Metabolic alterations in organic acids and gamma-aminobutyric acid in

- developing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. *Plant and Cell Physiol.* 51, 1300-14.
- 51) Vasiliou V., Pappa A., and Estey T. (2004). Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev.* 36, 279–99.
 - 52) Yoshida A., Huang I.Y., and Ikawa M. (1984). Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 258–61.
 - 53) Eng M.Y., Luczak S.E., and Wall T.L. (2007). ALDH2, ADH1B, and ADH1C genotypes in Asians: a literature review. *Alcohol Res Health* 30, 22–7.
 - 54) Harada S., Agarwal D.P., and Goedde H.W. (1981). Aldehyde dehydrogenase deficiency as cause of facial flushing reaction to alcohol in Japanese. *Lancet* 31, 982.
 - 55) Brooks P.J., Enoch M.A., Goldman D, Li T.K., and Yokoyama A. (2009). The alcohol flushing response: an unrecognized risk factor for esophageal cancer from alcohol consumption. *PLoS Med.* 6, e50.
 - 56) Oze I., Matsuo K., Wakai K., Nagata C., Mizoue T., Tanaka K., Tsuji I., Sasazuki S., Inoue M., and Tsugane S.; Research Group for the Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan. (2011). Alcohol drinking and esophageal cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol.* 41, 677–92.
 - 57) Yokoyama T., Yokoyama A., Kato H., Igaki H., Tsujinaka T., Muto M., Omori T., Yokoyama M., and Watanabe H. (2003). Alcohol flushing, alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes, and risk for esophageal squamous cell carcinoma in Japanese men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12, 1227–33.
 - 58) Yamaji T., Inoue M., Sasazuki S., Iwasaki M., Kurahashi N., Shimazu T., Tsugane S.; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. (2008). Fruit and vegetable consumption and squamous cell carcinoma of the esophagus in Japan: the JPHC study. *Int J Cancer* 15, 1935–40.
 - 59) Talalay P, and Fahey J.W. (2001). Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J Nutr.* 131, 3027S–33S.
 - 60) Higdon J.V., Delage B., Williams D.E., and Dashwood R.H. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res.* 55, 224–36.
 - 61) Fahey J.W., Talalay P., and Kensler T.W. (2012). Notes from the field: ‘green’ chemoprevention as frugal medicine. *Cancer Prev Res.* 5, 179–88.
 - 62) Dinkova-Kostova A.T. (2013). Chemoprotection against cancer by isothiocyanates: a focus on the animal models and the protective mechanisms. *Top Curr Chem.* 329, 179-201.
 - 63) Fahey J.W., Wehage S.L., Holtzclaw W.D., Kensler T.W., Egner P.A., Shapiro T.A., and Talalay P. (2012). Protection of humans by plant glucosinolates: efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora. *Cancer Prev Res (Phila).* 5, 603-11.
 - 64) Juge N., Mithen R.F., and Traka M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 64, 1105–27.
 - 65) Guerrero-Beltrán C.E., Calderón-Oliver M., Pedraza-Chaverri J., and Chirino Y.I. (2010). Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol.* 64, 503–8.
 - 66) McMahon M., Itoh K., Yamamoto M., Chanas S.A., Henderson C.J., McLellan L.I., Wolf C.R., Cavin C., and Hayes J.D. (2001). The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res.* 61, 3299-307.
 - 67) Kensler T.W., Egner P.A., Agyeman A.S., Visvanathan K., Groopman J.D., Chen J.G., Chen T.Y., Fahey J.W., and Talalay P. (2013). Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by

- sulforaphane. *Top Curr Chem.* 329, 163-77.
- 68) Talalay P, Fahey J.W., Holtzclaw W.D., Prestera T., and Zhang Y. (1995). Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Lett.* 82–83, 173–9.
 - 69) Dinkova-Kostova A.T., Talalay P., Sharkey J. Zhang Y., Holtzclaw W.D., Wang X.J., David E., Schiavoni K.H., Finlayson S., Mierke D.F., and Honda T. (2010). An exceptionally potent inducer of cytoprotective enzymes: elucidation of the structural features that determine inducer potency and reactivity with Keap1. *J Biol Chem.* 285:33747–55.
 - 70) Fahey J.W., Wade K.L., Stephenson K.K., and Chou F.E. (2003). Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 996, 85-93.
 - 71) Dinkova-Kostova A.T., Liby K.T., Stephenson K.K., Holtzclaw W.D., Gao X., Suh N., Williams C., Risingsong R., Honda T., Gribble G.W., Sporn M.B., and Talalay P. (2005). Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4584-9.
 - 72) Dinkova-Kostova A.T., Abeygunawardana C., and Talalay P. (1998). Chemoprotective properties of phenylpropenoids, bis(benzylidene)cycloalkanones, and related Michael reaction acceptors: correlation of potencies as phase 2 enzyme inducers and radical scavengers. *J Med Chem.* 41, 5287-96.
 - 73) Honda T., Sundararajan C., Yoshizawa H., Su X., Honda Y., Liby K.T., Sporn M.B., and Gribble G.W. (2007). Novel tricyclic compounds having acetylene groups at C-8a and cyano enones in rings A and C: highly potent anti-inflammatory and cytoprotective agents. *J Med Chem.* 50, 1731-4.
 - 74) Koivula T., Koivusalo M., and Lindros K.O. (1975). Liver aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochem Pharmacol.* 24, 1807–11.
 - 75) Prochaska H.J., and Santamaria A.B. (1988). Direct measurement of NADPH: quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem.* 169, 328–36.
 - 76) Fahey J.W., Dinkova-Kostova A.T., Stephenson K.K., and Talalay P. (2004). The 'Prochaska' microtiter plate bioassay for inducers of NQO1. *Methods Enzymol.* 382, 243–58.
 - 77) Levi B.P., Yilmaz O.H., Duester G., and Morrison S.J. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems. *Blood* 113, 1670–80.
 - 78) Tottmar O., Marchner H., and Pettersson H. (1978). Determination of acetaldehyde in rat blood by the use of rat liver aldehyde dehydrogenase. *Anal Biochem.* 91, 241–9.
 - 79) Sreerama L., and Sládek N.E. (2001). Three different stable human breast adenocarcinoma sublines that overexpress ALDH3A1 and certain other enzymes, apparently as a consequence of constitutively upregulated gene transcription mediated by transactivated EpREs (electrophile responsive elements) present in the 5-upstream regions of these genes. *Chem Biol Interact.* 130–132, 247–60.
 - 80) Abdullah A., Kitteringham N.R., Jenkins R.E. Goldring C., Higgins L., Yamamoto M., Hayes J., and Park B.K. (2012). Analysis of the role of Nrf2 in the expression of liver proteins in mice using two-dimensional gel-based proteomics. *Pharmacol Rep.* 64, 680–97.
 - 81) Hayes J.D., McMahon M., Chowdhry S., and Dinkova-Kostova A.T. (2010). Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal.*

13, 1713–48.

- 82) Lee J.M., Calkins M.J., Chan K. Kan Y.W., and Johnson J.A. (2003). Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem.* 278, 12029–38.
- 83) Cho H.Y., Reddy S.P., Debiase A., Yamamoto M., and Kleeberger SR. (2005). Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury. *Free Radic Biol Med.* 38, 325–43.
- 84) Shen G., Xu C., Hu R., Jain M.R., Nair S., Lin W., Yang C.S., Chan J.Y., and Kong A.N. (2005). Comparison of (–)-epigallocatechin-3-gallate elicited liver and small intestine gene expression profiles between C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (–/–) mice. *Pharm Res.* 22, 1805–20.
- 85) Nair S., Xu C., Shen G., Gopalakrishnan A., Hu R., Jain M.R., Lin W., Keum Y.S., Liew C., Chan J.Y., and Kong A.N. (2006). Pharmacogenomics of phenolic antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA) in the small intestine and liver of Nrf2 knockout and C57BL/6J mice. *Pharm Res.* 23, 2621–37.
- 86) Kitteringham N.R., Abdullah A., Walsh J., Randle L., Jenkins R.E., Sison R., Goldring C.E., Powell H., Sanderson C., Williams S., Higgins L., Yamamoto M., Hayes J., and Park B.K. (2010). Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver. *J Proteomics* 73, 1612–31.
- 87) Lamé J., Marhenke S., Borlak J., von Wasielewski R., Eriksson C.J., Geffers R., Manns M.P., Yamamoto M., and Vogel A. (2008). Nuclear factor-eythroid 2-related factor 2 prevents alcohol-induced fulminant liver injury. *Gastroenterology* 134, 1159–68.
- 88) Toyama T., Shinkai Y., Yasutake A., Uchida K., Yamamoto M., and Kumagai Y. (2011). Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environ Health Perspect.* 119, 1117–22.
- 89) Sayed R.H., Khalil, W.K., Salem, H.A., Kenawy, S.A., and El-Sayeh B.M. (2014). Sulforaphane increases the survival rate in rats with fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. *Nutrition Res.* 34, 982–9.
- 90) Zhang Z., Wang S., Zhou S., Yan X., Wang Y., Chen J., Mellen N., Kong M., Gu J., Tan Y., Zheng Y., and Cai L. (2014). Sulforaphane prevents the development of cardiomyopathy in type 2 diabetic mice probably by reversing oxidative stress-induced inhibition of LKB1/AMPK pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 77, 42–52.
- 91) Shirai Y., Fujita Y., and Hashimoto K. (2012). Effects of the antioxidant sulforaphane on hyperlocomotion and prepulse inhibition deficits in mice after phencyclidine administration. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 10, 94–8.
- 92) Cramer J.M., Teran-Garcia M., and Jeffery E.H. (2012). Enhancing sulforaphane absorption and excretion in healthy men through the combined consumption of fresh broccoli sprouts and a glucoraphanin-rich powder. *Br J Nutr.* 107, 1333–8.
- 93) Egner P.A., Chen J.G., Wang J.B., Wu Y., Sun Y., Lu J.H., Zhu J., Zhang Y.H., Chen Y.S., Friesen M.D., Jacobson L.P., Muñoz A., Ng D., Qian G.S., Zhu Y.R., Chen T.Y., Botting N.P., Zhang Q., Fahey J.W., Talalay P., Groopman J.D., and Kensler T.W. (2011). Bioavailability of sulforaphane from two broccoli sprout beverages: results of a short-term, cross-over clinical trial in Qidong, China. *Cancer Prev Res (Phila).* 4, 384–95.
- 94) Clarke J.D., Hsu A., Williams D.E., Dashwood R.H., Stevens J.F., Yamamoto M., and Ho E. (2011). Metabolism and tissue distribution of sulforaphane in Nrf2 knockout and wild-type mice. *Pharm Res.* 28, 3171–9.

- 95) Takeda J., Park H.Y., Kunitake Y., Yoshiura K., and Matsui T. (2013). Theaflavins, dimeric catechins, inhibit peptide transport across Caco-2 cell monolayers via down-regulation of AMP-activated protein kinase-mediated peptide transporter PEPT1. *Food Chem.* 138, 2140-5.
- 96) Zhu X.L., Watanabe K., Shiraishi K., Ueki T., Noda Y., Matsui T., and Matsumoto K. (2008). Identification of ACE-inhibitory peptides in salt-free soy sauce that are transportable across Caco-2 cell monolayers. *Peptides* 29, 338-44.
- 97) Basquin C., Malardé V., Mellor P., Anderson D.H., Meas-Yedid V., Olivo-Marin J.C., Dautry-Varsat A., and Sauvonnnet N. (2013). The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *J Cell Sci.* 126, 1099-108.
- 98) Halestrap A.P., and Meredith D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 447, 619-28.
- 99) Peng L., Li Z.R., Green R.S., Holzman I.R., and Lin J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr.* 139, 1619-25.
- 100) Rosenthal R., Milatz S., Krug S.M., Oelrich B., Schulzke J.D., Amasheh S., Günzel D., and Fromm M. (2010). Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci.* 123, 1913-21.
- 101) Farrell T.L., Poquet L., Dew T.P., Barber S., and Williamson G. (2012). Predicting phenolic acid absorption in Caco-2 cells: a theoretical permeability model and mechanistic study. *Drug Metab. Dispos.* 40, 397-406.
- 102) Poole R.C., and Halestrap A.P. (1994). N-Terminal protein sequence analysis of the rabbit erythrocyte lactate transporter suggests identity with the cloned monocarboxylate transport protein MCT1. *Biochem J.* 303, 755-9.
- 103) Wilson M.C., Meredith D., Bunnun C., Sessions R.B., and Halestrap A.P. (2009). Studies on the DIDS-binding site of monocarboxylate transporter 1 suggest a homology model of the open conformation and a plausible translocation cycle. *J Biol Chem.* 284, 20011-21.
- 104) Miyazawa T. (2000). Absorption, metabolism and 38 antioxidative effects of tea catechin in humans. *Biofactors* 13, 55-9.
- 105) Tsukita S., Yamazaki Y., Katsuno T., Tamura A., and Tsukita S. (2008). Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27, 6930-8.
- 106) Suzuki T., and Hara H. (2011). Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J Nutr Biochem.* 22, 401-8.
- 107) Yeh T.H., Hsu L.W., Tseng M.T., Lee P.L., Sonjae K., Ho Y.C., and Sung H.W. (2011). Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials* 32, 6164-73.
- 108) Park J.H., Kim J.W., Lee C.M., Kim Y.D., Chung S.W., Jung I.D., Noh K.T., Park J.W., Heo D.R., Shin Y.K., Seo J.K., and Park Y.M. (2012). Sulforaphane inhibits the Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. *BMB Rep.* 45, 311-6.
- 109) Cooper D.A., Webb D.R., and Peters J.C. (1997). Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *J Nutr.* 127, 1699S-709S.
- 110) Winiwarter S., Bonham N.M., Ax F., Hallberg A., Lennernäs H., and Karlén A. (1998). Correlation of human jejunal permeability (*in vivo*) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J Med Chem.* 41, 4939-49.
- 111) Petri N., Tannergren C., Holst B., Mellon F.A., Bao Y., Plumb G.W., Bacon J., O'Leary K.A., Kroon

- P.A., Knutson L., Forsell P., Eriksson T., Lennernas H., and Williamson G. (2003). Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum *in vivo*. *Drug Metab Dispos.* 31, 805-13.
- 112) Cole S.P., and Deeley R.G. (2006). Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 438-46.
 - 113) Shapiro T.A., Fahey J.W., Wade K.L., Stephenson K.K., and Talalay P. (1998). Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7, 1091-100.
 - 114) Cramer J.M., and Jeffery E.H. (2011). Sulforaphane absorption and excretion following ingestion of a semi-purified broccoli powder rich in glucoraphanin and broccoli sprouts in healthy men. *Nutr Cancer* 63, 196-201.
 - 115) Conaway C.C., Getahun S.M., Liebes L.L., Pusateri D.J., Topham D.K., Botero-Omary M., and Chung F.L. (2000). Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutr Cancer* 38, 168-78.
 - 116) Vermeulen M., Klöpping-Ketelaars I.W., van den Berg R., and Vaes W.H. (2008). Bioavailability and kinetics of sulforaphane in humans after consumption of cooked versus raw broccoli. *J Agric Food Chem.* 56, 10505-9.
 - 117) Habig W.H., Pabst M.J., and Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249, 7130-9.
 - 118) Shapiro T.A., Fahey J.W., Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Stephenson K.K., Wade K.L., Ye L., and Talalay P. (2006). Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutr Cancer* 55, 53-62.
 - 119) Agudo A., Ibáñez R., Amiano P., Ardanaz E., Barricarte A., Berenguer A., Dolores Chirlaque M., Dorronsoro M., Jakszyn P., Larrañaga N., Martinez C., Navarro C., Pera G., Quirós J.R., Sánchez, M.J., Tormo M.J., and González C.A. (2008). Consumption of cruciferous vegetables and glucosinolates in a Spanish adult population. *Eur J Clin Nutr.* 62, 324-31.
 - 120) Sones K., Heaney R.K., and Fenwick G.R. (1984). An estimate of the mean daily intake of glucosinolates from cruciferous vegetables in the UK. *J Sci Food Agric.* 35, 712-20.
 - 121) Prochaska H.J., and Fernandes C.L. (1993). Elevation of serum phase II enzymes by anticarcinogenic enzyme inducers: markers for a chemoprotected state? *Carcinogenesis* 14, 2441-5.
 - 122) Nijhoff W.A., Mulder T.P., Verhagen H., van Poppel G., and Peters, W.H. (1995). Effects of consumption of brussels sprouts on plasma and urinary glutathione S-transferase class-alpha and -pi in humans. *Carcinogenesis* 16, 955-7.
 - 123) Bogaards J.J., Verhagen H., Willems M.I., van Poppel G., and van Bladeren P.J. (1994). Consumption of Brussels sprouts results in elevated alpha-class glutathione S-transferase levels in human blood plasma. *Carcinogenesis* 15, 1073-5.
 - 124) Chow H.H., Hakim I.A., Vining D.R., Crowell J.A., Tome M.E., Ranger-Moore J., Cordova C.A., Mikhael D.M., Briehl M.M., and Alberts D.S. (2007). Modulation of human glutathione S-transferases by polyphenon E intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16, 1662-6.
 - 125) Kikuchi M., Shiozawa H., Yamada C., Ogawa T., Matsushima M., Mine T., Watanabe N., and Nishizaki Y. (2013). Nonalcoholic Steatohepatitis as Fatal Fatty Liver - The next main target in the field of liver disease. *HEP.* 40, 476-81.
 - 126) Wong V.W., Wong G.L., Choi P.C., Chan A.W., Li M.K., Chan H.Y., Chim A.M., Yu J., Sung J.J., and Chan H.L. (2010). Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study

- with paired liver biopsies at 3 years. *Gut* 59, 969-74
- 127) Saucedo R.S. (2013). Background Paper 6.14 Harmful use of alcohol alcohol use disorders and alcoholic liver diseases. [Internet] 2013. Available from: http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/BP6_14Alcohol.pdf
 - 128) Enomoto A., Itoh K., Nagayoshi E., Haruta J., Kimura T., O'Connor T., Harada T., and Yamamoto M. (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci.* 59, 169-77.
 - 129) Shimozono R., Asaoka Y., Yoshizawa Y., Aoki T., Noda H., Yamada M., Kaino M., and Mochizuki H. (2013). Nrf2 activators attenuate the progression of nonalcoholic steatohepatitis-related fibrosis in a dietary rat model. *Mol Pharmacol.* 84, 62-70.
 - 130) Gaona-Gaona L., Molina-Jijón E., Tapia E., Zazueta C., Hernández-Pando R., Calderón-Oliver M., Zarco-Márquez G., Pinzón E., and Pedraza-Chaverri J. (2011). Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* 286, 20-7.
 - 131) Sun X., Mi L., Liu J., Song L., Chung F.L., and Gan N. (2011). Sulforaphane prevents microcystin-LR-induced oxidative damage and apoptosis in BALB/c mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 255, 9-17.
 - 132) Baek S.H., Park M., Suh J.H., and Choi H.S. (2008). Protective effects of an extract of young radish (*Raphanus sativus* L) cultivated with sulfur (sulfur-radish extract) and of sulforaphane on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72, 1176-82.
 - 133) Zhou R., Lin J., and Wu D. (2014). Sulforaphane induces Nrf2 and protects against CYP2E1-dependent binge alcohol-induced liver steatosis. *Biochim Biophys Acta* 1840, 209-18.
 - 134) Choi K.M., Lee Y.S., Kim W., Kim S.J., Shin K.O., Yu J.Y., Lee M.K., Lee Y.M., Hong J.T., Yun Y.P., and Yoo H.S. (2014). Sulforaphane attenuates obesity by inhibiting adipogenesis and activating the AMPK pathway in obese mice. *J Nutr Biochem.* 25, 201-7.
 - 135) Kay H.Y., Kim W.D., Hwang S.J., Choi H.S., Gilroy R.K., Wan Y.J., and Kim S.G. (2011). Nrf2 inhibits LXR α -dependent hepatic lipogenesis by competing with FXR for acetylase binding. *Antioxid Redox Signal.* 15, 2135-46.
 - 136) Kikugawa K., Hiramoto K., and Hiramata A. (1999). Beta-carotene generates thiobarbituric acid-reactive substances by interaction with nitrogen dioxide in air. *Free Radic Res.* 31, 517-23.
 - 137) Kasai H., Crain P.F., Kuchino Y., Nishimura S., Ootsuyama A., and Tanooka H. (1986). Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7, 1849-51.
 - 138) Evans M.D., Cooke M.S., Podmore I.D., Zheng Q., Herbert K.E., and Lunec J. (1999). Discrepancies in the measurement of UVC-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine: implications for the analysis of oxidative DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 259, 374-8.
 - 139) Shi M., Takeshita H., Komatsu M., Xu B., Aoyama K., and Takeuchi T. (2005). Generation of 8-hydroxydeoxyguanosine from DNA using rat liver homogenates. *Cancer Sci.* 96, 13-8.
 - 140) Tachi Y., Katano Y., Honda T., Hayashi K., Ishigami M., Itoh A., Hirooka Y., Nakano I., Samejima Y., and Goto H. (2010). Impact of amino acid substitutions in the hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and hepatic oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int.* 30, 554-9.
 - 141) Bataille A.M., and Manautou J.E. (2012). Nrf2: a potential target for new therapeutics in liver

- disease. *Clin Pharmacol Ther.* 92, 340-8.
- 142) Shin S.M., Yang J.H., and Ki S.H. (2013). Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2013, 763257.
- 143) Fried M.W., Navarro V.J., Afdhal N., Belle S.H., Wahed A.S., Hawke R.L., Doo E., Meyers C.M., and Reddy K.R.; Silymarin in NASH and C Hepatitis (SyNCH) Study Group. (2012). Effect of silymarin (milk thistle) on liver disease in patients with chronic hepatitis C unsuccessfully treated with interferon therapy: a randomized controlled trial. *JAMA.* 308, 274-82.