様 式 C－19、F－19－1、Z－19 （共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 ２６ 日現在

機関番号：２４３０２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１２７０８

研究課題名（和文）和食から発がん抑制効果を最大に得るためのヒト生体内利用能を考慮した摂取様式の特定

研究課題名（英文）The best dietary schedule for cancer prevention in Japanese food with reflecting the bioavailability

研究代表者
中村　考志（Nakamura, Yasushi）

京都府立大学・和食文化研究センター・教授

研究者番号：９０２８５２４７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトが大根を摂取したときのMTBITC生体内利用能に個人差があったため，MTBITCを摂取したときの発がん抑制作用には個人差が存在すると考えられる．この個人差に性差はないが，年代間差と季節間差は認められ，年齢と季節がMTBITC生体内利用能の変動要因のひとつである可能性が示唆された．そのため，個人により異なる大根の発がん抑制作用を最大に得るための最適な摂取季節を，生体内利用能試験をおこなって決定した．

研究成果の学術的意義や社会的意義
　和食の中に世界で日本人のみがもつ食材や食習慣があれば，そこに日本人の長寿要因があるはずであるという概念のもと，世界で日本人のみがもつ「大根おろしを食べる」という食習慣に注目して，大根がもつ長寿要因の科学的解明を試みた．大根特有の辛み成分は発がん抑制成分でもあるが，いつ，どのように，どれだけの大根を摂取したら期待する発がん抑制効果が得られるのかを，生体内利用能測定試験を開発して明らかにした．大根の発がん抑制作用は，個人により最大に得られる季節が異なることがわかり，これを念頭において大根を用いた料理を楽しむことが発がん抑制による健康長寿に有効であると考えられた．

研究成果の概要（英文）： MTBITC (cancer preventive isothiocyanate in daikon: 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate) bioavailability varied among human volunteers, and the MTBITC cancer preventive effect therefore depends on the individual even in the same MTBITC administration level. The difference depends on generations and season in individual intake, and the variation factor of the MTBITC bioavailability should be generation and season. The best dietary schedule for cancer prevention in Japanese food with reflecting the bioavailability might be determined the MTBITC-bioavailability test.

研究分野：和食文化学

キーワード：大根　がん予防　生体内利用能　非侵襲的試験　尿中マーカー　MTBITC　摂取時期　季節変動

１．研究開始当初の背景

アブラナ科野菜のもつ食品機能性成分のひとつであるイソチオシアネート類は世界的に研究されており，和食材ではワサビのアリルイソチオシアネートがもつ抗菌性，洋食材ではブロッコリーのスルフォラファンがもつ発がん抑制作用がよく知られている．和食材にはアブラナ科野菜も多く，蕪と大根はその品種も多岐にわたっている．大根は日本が世界消費量の 90%を占める，和食の主要な野菜のひとつであり，おろすという調理法も日本独特のものである．大根をおろすと，大根のもつミロシナーゼン酵素作用により，4-methyltio-3-butenyl glucosinolate（MTBGLS）から大根特有の辛味成分である 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate（MTBITC）が生成する．MTBITC を経口摂取した動物は膵臓がんと食道がんの抑制効果を示し，ヒトの疫学調査では大根摂取が食道がんのリスク低下因子であることが明らかとなっている．日本では古来より MTBITC の独特の香気や辛味を利用して摂食しており，MTBITC は日本人の食文化に深く根付いた成分であると考えられる．

ヒトが大根を摂取すると，小腸から生体内に吸収された MTBITC は肝臓の GST で代謝され，最終的に 4-methyltio-3-butenyl dithiocarbamate（MTBDTC）として尿中に排泄される．MTBITC が代謝されるときに，同時に発がん物質を無毒化する酵素である UGT1A6 も誘導されるため，MTBITC は発がん抑制的にはたらくと考えられている．しかしヒトが大根を摂取したとき，MTBITC の発がん抑制作用がどの程度得られるか，MTBITC の生体内利用能に個人差や時間変動があれば，同量の大根を摂取した場合でも得られる発がん抑制作用に差が生じ，期待した作用を得られない場合もあると考えられた．以上のことから，和食材の大根に注目し，ヒト生体内利用能を考慮して発がん抑制効果を最大に得るための摂取様式を特定することを試みた．

２．研究の目的

【目的 1】大根おろしをヒトが摂取すると，吸収された MTBITC は肝臓で 4 段階の反応を経て最終代謝物である *N*-acetyl-*S*-(*N*-4-methyltio-3-butenyl thiocarbamoyl)cysteine（MTBITC-NAC）として尿中に排泄される．そのため，MTBITC の吸収率は，最終代謝物の MTBITC-NAC の尿中での定量値を指標として評価するが，その前駆体が尿中に排泄されている場合は，MTBITC-NAC とその前駆体の総量を指標として評価すべきである．しかし，MTBITC-NAC の前駆体はこれまでに化学合成されておらず，尿中への排泄の有無は不明である．本研究では，MTBITC-NAC の前駆体のひとつである *S*-(*N*-4-methyltio-3-butenyl thiocarbamoyl)cysteine（MTBITC-Cys）を得るための化学合成法を確立し，得られた MTBITC-Cys を標準品として，ヒトが MTBITC を摂取したときの MTBITC-Cys の尿中への排泄の有無を検討した．

【目的 2】ヒト尿中の MTBITC-NAC 排泄量を MTBITC の吸収率の指標とし，大根を摂取したときの MTBITC の吸収率の個人差と変動を解析した．

３．研究の方法

【方法 1】320 mg の *t*-butyloxycarbonyl-*S*-*t*-butyl-L-cysteine [Boc-Cys (tBu)]を試験管にとり，2.8 mL のテトラヒドロフラン（THF）に完全に溶解させた後，1.4 mL のトリエチルアミンを混合して塩基性溶液とすることで Boc-Cys (*t*Bu)から *t*-butyl 基を解離させながら 72 mg の MTBITC を滴下後 5 分間撹拌した．同操作を 4 回繰り返して 288 mg の MTBITC を Boc-Cys (*t*Bu)の SH 基と反応させた．これに 160 μL の水を添加した後に，2.4 mL のヘキサンを用いた液－液分配法による未反応の MTBITC を除去した溶液から溶媒を留去後，2.8 mL の THF に置換した．これに 800 μL のトリフルオロ酢酸（TFA）を加えて撹拌することで *t*-butyloxycarbonyl 基を解離させることで粗 MTBITC-Cys を得た．得られた粗 MTBITC-Cys は 50%アセトニトリル（AN）溶液に溶解し，HPLC（Scherzo SW-C_{18}, 25.2% AN/0.1% TFA，流速 1.0 mL/min, UV 254 nm）により 8.0-9.0 min の間に溶出する物質を分取することで MTBITC-Cys の標準品とした．この標準品を用い，MTBITC-Cys と MTBITC-NAC の同検出を可能とする HPLC の分析条件を決定した上で，ヒトが MTBITC を摂取したときの MTBITC-Cys の尿中への排泄の有無を検討した．

【方法 2】20 名の被験者（21-60 歳の男性 4 名，女性 16 名）が 3 日間大根摂取を禁止した後に 9.21-27.55 μmol の MTBITC を含有する大根ジュースを摂取後 24 時間蓄尿した．このとき蓄尿の開始直前と終了直後の尿に MTBITC-NAC が未検出であることを確認できた場合に 24 時間尿を分析試料とした．大根ジュース中の MTBITC と尿中の MTBITC-NAC は HPLC により定量した．MTBITC 摂取量に対する MTBITC-NAC の排泄量の百分率を MTBITC の吸収率とした．

４．研究成果

【結果 1】化学合成した MTBITC-Cys は 2 mg 得られ，HPLC のクロマトグラム上で単一ピークを示したことから純粋な標準品として使用できると考えられた．大根非摂取時において MTBITC-Cys が尿より検出されなかった人を被験者として，大根ジュース（MTBITC 23.63-25.55

μmol）を摂取後の 24 時間尿に MTBITC-Cys の排泄はみられず，MTBITC-NAC は検出された．このことからヒトが大根おろし摂取したときに吸収される MTBITC は，肝臓で 4 段階の反応が速やかに進み，最終代謝物である MTBITC-NAC として尿中に排泄されると考えられ，MTBITC の吸収率を評価する場合は中間代謝物である MTBITC-Cys は考慮せずに，最終代謝物の MTBITC-NAC を定量の指標としてよいと考えられた．

【結果 2】のべ 179 名を対象とした尿試料のうち，試験過程に不備がないと判断できた 153 名の試料について MTBITC-NAC の排泄量を測定し，MTBITC 吸収率を算出した．各被験者の吸収率の平均値は，最小値が 18.1%，最高値が 65.0%（過去データでは最小値 13.0%，最大値 65.0%）であったことから，吸収率には個人差があると考えられる結果が得られた．また，MTBITC の吸収率の個人差は，性別，年齢，身長，体重との間に相関は認められなかったが， 3 年間の結果全体では 20 代と 30 代以上の間に有意な差が認められたため，年齢が吸収率の変動要因のひとつであると示唆された．各被験者における吸収率の測定日間の変動幅は，最小値が 8.6%，最高値が 88.0 %（過去データでは最小値 8.6%，最大値 90.0%）であったことから，MTBITC の吸収率は同一個人であっても摂取時期により変動すると考えられた．摂取時期を春分・夏至・秋分・冬至を境界とした四季に区分したところ四季間で有意な差は認められなかったが，夏秋間に差のある傾向は認められた．3 年間の結果全体では MTBITC 摂取量 15-30 μmol の場合は夏秋間に有意な差が認められ，MTBITC 摂取量 30-45 μmol の場合は夏秋間と秋冬間において有意な差が認められた．以上のことから，大根を摂取したときの MTBITC の吸収率には個人差があり，摂取する時期と年齢が変動要因である可能性が示唆された．これらの結果から，大根を摂取したときに期待される発がん抑制成分の MTBITC の吸収率は個人差や季節変動があるため，発がん抑制効果を最大に得るためには，万人に一致した時期があるのではないため，個人対応の摂取時期（季節）や加齢による変化を考慮した摂取様式の設定が必要であることが示唆された．
また，試験日とその前 2 日間の天候，気温，湿度，体調をあわせて記録し，季節変動の要因とそれに影響を及ぼす因子を推測することにより，より確証の高いデータを作成できることも示唆された．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

① Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Park EY, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, and Ogawa K, 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (*Raphasatin*) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats, *J. Toxicol. Pathol.*, 29, 237-246 (2016) 査読あり

② Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, and Ogawa K, Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (*Raphasatin*) in the rat urinary bladder without genotoxicity, *J. Appl. Toxicol.*, 37, 485-494 (2017) 査読あり

③ Nakamura T, Nakamura Y, Sasaki A, Fujii M, Shirota K, Mimura Y, and Okamoto S, Protection of Kyo-yasai (heirloom vegetables in Kyoto) from extinction: a case of *Sabaka-daikon* (Japan’s heirloom white radish, *Raphanus sativus*) in Maizuru, Japan, *J. Ethn. Foods*, 4, 103-109 (2017) 査読あり

④ Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numazawa S, and Ogawa K, 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate mediates nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation by regulating reactive oxygen species production in human esophageal epithelial cells, *Food Chem. Toxicol.*, 111, 295-301 (2018) 査読あり

⑤ 中村考志，食品機能性研究の観点から見た和食材への期待，和食文化研究, 0, 110-122 (2018) 査読なし

⑥ Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numazawa S, and Ogawa K, 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC) induced apoptotic cell death and G2/M cell cycle arrest via ROS productionin human esophageal epithelial cancer cells, *J. Toxicol. Sci.*, 44, 73-81 (2019) 査読あり

〔学会発表〕（計 1 件）

① Nakamura Y, Protection of *Kyo-yasai* (heirloom vegetables in Kyoto) in *Washoku* (Japanese cuisine) materials from extinction: a case of *Sabaka-daikon*, The 3rd Joint Symposium on Basic and Applied Studies of Ethnic Food Materials for Human Health, 2017.6.29 (Bangkok, Thailand)

〔その他〕

ホームページ等

食べて健康！京野菜（京野菜機能性連絡協議会ホームページ）：日本の伝統的な大根品種の MTBITC 生成能の差と MTBITC の発がん抑制効果についての研究成果の閲覧を可能としている（http://kenko-kyoyasai.jp/）．

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。