

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650174

研究課題名（和文）アブラナ科野菜の発がん抑制作用を得るための摂取目標量と個人差のヒト尿を用いた測定

研究課題名（英文）Establish a novel assay system to demonstrate the bioavailability of cancer preventive isothiocyanates in cruciferous vegetables by measuring its urinary metabolite

研究代表者 中村 考志 (NAKAMURA YASUSHI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：90285247

研究成果の概要（和文）：ヒトが発がん予防効果を得るために必要なアブラナ科野菜摂取目標量を推定するための既存の方法は被験者に試験期間中アブラナ科野菜の摂取の禁止を強いるものであった。アブラナ科野菜由来のがん予防成分の代謝物を HPLC で分別定量する方法を確立し、被験者は試験期間中であってもアブラナ科野菜の摂取が可能となった。アブラナ科野菜の摂取目標量の設定には 50-100 名の被験者に連続した数日間の試験への参加を依頼するため、本研究で開発した試験方法をこれに適用すると、被験者の負担を大きく軽減することができる。

研究成果の概要（英文）：Our goal is to establish a novel assay system to demonstrate the bioavailability of isothiocyanate by measuring its urinary metabolite, dithiocarbamate. However conventional methods cannot discriminate between dithiocarbamates derived from other cruciferous vegetables vs. test vegetable, thus requiring subjects to fast from cruciferous vegetables during the test. To avoid the inconvenience of fasting from cruciferous vegetables, we developed a novel HPLC method that can fractionate dithiocarbamates in test vegetable from other dithiocarbamates. To validate the assay, we determined levels of urinary dithiocarbamate from human subjects fed with test vegetable-derived isothiocyanate. The time needed for assessment is several days, and does not require the inconvenience of the fasting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	300,000	3,000,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：①生理活性 ②癌 ③生体機能利用 ④細菌 ⑤食品

1. 研究開始当初の背景

発がんの抑制に寄与する食品として野菜の摂取は有効であることは実験動物・疫学調査で明らかになりつつあるが、がん罹患や抗がん剤奏効率には個人差があることから、野菜摂取による発がん抑制効果にも個人差が

あることは推測される。

これまで欧米人の食習慣を基礎としたアブラナ科野菜の発がん抑制効果が多く報告されてきたが、世界一の長寿国である日本の食習慣を基礎としたアブラナ科野菜の発がん抑制効果の報告はない。もし日本の食習慣

を基礎としたアブラナ科野菜の発がん抑制効果を明らかにして、ヒトがどれだけのアブラナ科野菜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明らかにすることができれば、これまでなかった食事摂取基準値の提示をとおして人々の健康増進に役立つと考えられる。

アブラナ科野菜の発がん抑制物質のイソチオシアン酸ベンジルやスルホラファンの作用は *in vitro* の培養細胞試験系や *in vivo* の哺乳動物試験系で報告されてきたが、ヒト生体レベルで発がん抑制効果に必要な摂取量を明らかにした結果は報告されておらず、ヒトがどれだけのアブラナ科野菜を摂取したら期待する発がん抑制効果が得られるのか現在でも全く不明である。このようにヒト生体レベルでの試験結果はほとんど報告されていない現状を打破して、「ヒトがどれだけのアブラナ科野菜を摂取したら期待する発がん抑制効果が得られるのか」を明らかにすることを最終目標としている。

本研究ではアブラナ科野菜のうち日本人の年間摂取量が最も多いダイコンを材料として、これに含まれるイソチオシアン酸のひとつ MTBITC の哺乳動物試験系での発がん抑制作用をヒト生体レベルにシフトさせ、MTBITC のヒトレベルでの生体内利用能を日常生活に支障をきたさずに非侵襲的・連続的にモニターできる尿中代謝物を指標とする手法を開発して、将来、アブラナ科野菜の摂取目標量と個人差を得られた数値から決定できることにつなげることが目的である。

本研究グループはアブラナ科野菜のダイコンに特異的に含まれる辛み成分イソチオシアン酸4-メチルチオ-3-ブテニル(MTBITC)を生物的抗変異原として2001年に同定し、ハムスターすい臓がんをMTBITC摂取により発がんイニシエーション段階で予防する効果を2004年に見出し、京都の伝統的なダイコンには普及種ダイコンの2-12倍のMTBITCが含まれることを2008年に見出した。発がん抑制成分のMTBITCは腸内細菌がもつミロシナーゼ(MTBITC生成酵素)によってもダイコンに含まれる前駆体4-メチルチオ-3-ブテニルグルコシノレート(MTBGLS)からヒト大腸内で生成する。そのためダイコンの摂取量は一定であっても腸内細菌叢のミロシナーゼ活性の個人差が生体内でのMTBITC生成量を左右して発がん抑制作用の強弱の決定要因となるという考えに至った。

2. 研究の目的

発がん抑制作用の個人差とその程度を明らかにすれば、個人に適合した野菜摂取目標量を設定することができるため、日本人が最

も多く摂取するアブラナ科野菜のダイコンを材料として、これを摂取したときの発がん抑制効果を数値化する手法を確立する。

(1) ヒトが日常生活に支障をきたすことなく実験に参加できるようなMTBITCの生体内利用能の測定方法の確立を目標として、ダイコンを摂取したヒトの尿を用いてMTBITCの生体内利用能を尿中代謝物のジチオカーバメート(MTBDTC)の排泄量を指標として測定する方法を確立する。

(2) 確立した測定方法を用いて、膀胱がん抑制作用を与える80 ppmのMTBITC混餌食を5週齢の雄性シリアンハムスター4匹に14日間与えたときと、単回強制経口投与したときの尿中排泄MTBDTCを定量することで、ハムスターにおけるMTBITC生体内利用能を算出する。

(1)と(2)により、ヒトがどれだけのダイコンをどのような形態で摂取した場合に動物実験で効果が見られるMTBDTC排泄量に近づけることができるか、また個人差はあるのかについて試験できるようにし、将来、発がん抑制に必要なヒトのダイコン摂取目標量を明らかにする研究につなげる。

3. 研究の方法

(1) 4-Methylthio-3-butenyl dithiocarbamates (MTBDTC)の化学合成

ガラス製試験管(1.5×10.5 cm)にN-acetyl-L-cystein 150 mgをとり、テトラヒドロフラン1.3 mlに溶解し、トリメチルアミン0.3 mlを加えた溶液をスターラーで攪拌しながら、MTBITC 160 mgをゆっくり滴下した。室温で2時間攪拌後、ヘキサン3 mlをここに分注して攪拌した後、ヘキサン層は除去した(未反応のMTBITCの除去のためMTBITC臭が消えるまで数回)。その後、ここに超純水を適量加えて減圧濃縮した(トリメチルアミンの除去のためトリメチルアミン臭が消えるまで数回)。イソチオシアン酸アリル(AITC)、イソチオシアン酸ベンジル(BITC)、イソチオシアン酸フェネチル(PEITC)、イソチオシアン酸3-ブテニル(BuITC)由来のdithiocarbamates (ADTC, BDTC, PEDTC, BuDTC)もMTBDTCと同様の方法で化学合成した。

(2) DTCs の HPLC 分析条件

カラム: YMC-Pack Pro C18 RS, 150×4.6 mm
溶出液: 0% CH₃CN/0.1% TFA (A液), 90% CH₃CN/0.1% TFA (B液)
検出波長: 254 nm

HPLC グラジエントプログラム

Time	Variable	Value
0.00	BCNC	26.5
10.00	BCNC	40.0
15.00	BCNC	40.0
15.01	BCNC	26.5
20.00	STOP	

4. 研究成果

(1) ADTC, BuDTC, BDTC, MTBDTC, PEDTC の化学合成

各種 ITC より得られた DTC の化学合成物質の確認をおこなうため、ESI-MS 分析をおこなった。合成した ADTC, BuDTC, BDTC, MTBDTC, PEDTC は、それぞれ理論値と同値の m/z 284 $[M+Na]^+$, 298 $[M+Na]^+$, 334 $[M+Na]^+$, 344 $[M+Na]^+$, 348 $[M+Na]^+$ を示し、HPLC 分析でも単一ピークを示した。このことから定量標準品として使用できる ADTC, BuDTC, BDTC, MTBDTC, PEDTC を得ることができたと考えられる。

(2) ADTC, BuDTC, BDTC, MTBDTC, PEDTC の HPLC による個別定量

化学合成した ADTC, BuDTC, BDTC, MTBDTC, PEDTC は逆相 HPLC によるイソクラティック条件下で分析した場合には、ADTC, BuDTC, PEDTC の 3 種類のピークは完全に分離せず、BDTC と MTBDTC のピークは分離困難であった（データ未掲載）。試行錯誤の結果、方法に記載のグラジエント条件を用いて分析した場合には、ADTC, BuDTC, BDTC, MTBDTC, PEDTC のピークは分離した。ここで BDTC と MTBDTC のピークは完全に分離させることはできなかったが、個別定量を可能とする分離は実現できたため、これを分析条件とした（図 1）。

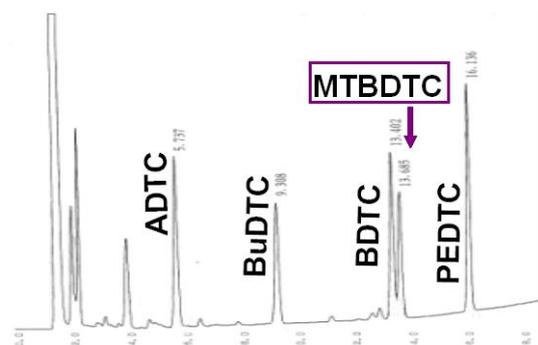


図 1. ADTC, BuDTC, MTBDTC, BDTC, PEDTC の HPLC クロマトグラム

(3) MTBITC 摂取時のヒト生体内利用の算出に必要なダイコン摂取後の尿採取時間と尿中での MTBDTC の安定化方法の決定

ダイコン摂取時の MTBITC のヒト生体内利用能を算出する上で、摂取したダイコン中の MTBITC がすべて MTBDTC として尿に排泄されるまで尿を採取する必要がある。ブロッコリーなどのアブラナ科野菜を摂取後にその尿代謝物を検出した報告では 48 時間尿を採取している。ダイコン中の MTBITC の生体内利用能を測定した報告はこれまでにないことから、MTBITC のヒト生体内利用能を算出する場合に必要な時間を決定することが必要である。大根おろしを 2 名の被験者に摂取したときの尿中の MTBDTC のピークが HPLC で検出限界以下となった時間を決定したところ、大根おろし摂取後それぞれ 45.3 h, 46.5 h であったため、大根おろし摂取時の尿中への MTBDTC の必要尿採取時間は 48 時間と設定すれば、全 MTBDTC の採取が可能であると考えられる。

(4) MTBITC を混餌投与させたハムスターにおける尿中 MTBDTC の定量

BOP 誘発のすい臓がんを 80 ppm の MTBITC の混餌投与により、発がんイニシエーション段階での予防効果が見られる・同条件で MTBITC 混餌食を 5 週齢の雄性シリアンハムスター 4 匹に 14 日間与えたとき、単回強制経口投与したときの尿中排泄 MTBDTC を定量することで、ハムスターにおける MTBITC 生体内利用能の算出を試みた。

その結果、MTBDTC はハムスター尿から検出されなかった。このことは、MTBITC を摂取したハムスターから代謝される生体内最終産物は MTBDTC ではないことが示唆される。また、MTBITC の排泄も認められなかった。以上のことから、ハムスター尿中への MTBDTC 排泄量をヒトで換算した MTBITC の発がん抑制作用が得られる摂取量の目標値として設定するための基礎データとして用いるためには、本研究の方法で明らかにすることは困難であると考えられる。そこで、アブラナ科野菜の尿中 DTC と ITC 関連物質の総量を求める従来法である cyclocondensation 法により、MTBITC 代謝関連物質の検出を試みた。その結果、MTBITC 代謝関連物質と 1, 2-ベンゼンジチオールが反応して生成したと考えられる 1, 3-ベンゼンジチオン-2-チオンが検出され、この値は定量限界以上であったため、この値を指標として MTBITC 代謝物の尿中への排泄量の算出を試みた。このとき、MTBITC 摂取群のハムスターの 1 日平均 MTBITC 摂取量に対する、MTBITC 代謝関連物質の尿中排泄量は $3.00 \pm 0.65\%$ と算出された。Cyclocondensation 法により、MTBITC 代謝関連物質の一部の尿中排泄量を定量できたが、 3.00% が MTBITC 代謝物の総量を代表していないことは十分考えられる。ハムスターで信頼性の高い

MTBITC の生体内利用能を求めるときには、ヒトとハムスターでは MTBITC の代謝機構が大きく異なり、ハムスターでは MTBITC は 1, 2 - ベンゼンジチオールとは反応しない物質に代謝されている可能性が高く、これらの代謝物の同定と定量方法の確立が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 中村考志, 糸井昭太郎, 藤井雅弓, 中村貴子, 城田浩治, 末留昇, 曹永晩, 小川久美子, 西川秋佳, 松尾友明, 岡本繁久, 朴恩榮, 佐藤健司, 京野菜の食品機能性における普及種に対する優位性とその利用, 査読なし, 食品加工技術, 印刷中

[学会発表] (計 3 件)

- ① 藤井雅弓, 中村考志, 城田浩治, 末留昇, 西川秋佳, 小川久美子, 曹永晩, 朴恩榮, 佐藤健司, ダイコンに含まれる抗変異原 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate のハムスターでの生体内利用能, 日本環境変異原学会, 2011 年 11 月 21 日, 学術総合センター (東京都)
- ② Nakamura Y, Shirota K, Suetome N, Matsuo T, Okamoto S, Nishikawa A, Imai T, Park EY, Sato K, Antimutagenic and anticarcinogenic properties of *Kyo-yasai*, heirloom vegetables in Kyoto, 2nd Asian conference on environmental mutagens (Pataya, Thailand), Abstracts, p.176, December 17, 2010
- ③ ダイコンに含まれる抗変異原 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate のヒト生体内利用能の評価方法の確立, 糸井昭太郎, 中村考志, 城田浩治, 末留昇, 西川秋佳, 小川久美子, 曹永晩, 朴恩榮, 佐藤健司, 日本環境変異原学会, 2010 年 11 月 16 日, つくば国際会議場 (茨城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 考志 (NAKAMURA YASUSHI)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：9 0 2 8 5 2 4 7

(2) 研究分担者

西川 秋佳 (NISHIKAWA AKIYOSHI)
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・センター長