

diseases, the most common cause of death is cancer. However, the rate of death from stomach cancer has dramatically decreased and the rates of death from lung and colon cancers steadily increase every year in both men and women [1–3]. The increase in colon cancer appears to be related to changes in dietary habits in Japan. Traditional Japanese dietary habits have changed to the Western style, which increases intakes of animal protein and fat; this results in the increased ratio of fat-derived energy compared to carbohydrate-derived energy. This change of dietary habits in Japan involves decreased intakes of both vegetable and rice, which is closely associated with a decreased intake of dietary fiber. To reduce the incidence of colon cancer, we Japanese have to change our dietary habits and eat more vegetables and rice to increase the intake of dietary fiber and vitamins. Aojiru is a juice prepared from kale, a plant akin to cabbage, and is named for its green color. At present, 400,000 households periodically purchase and drink Aojiru daily. The effects of Aojiru on health promotion were investigated by replies to a questionnaire sent to 1582 subjects drinking Aojiru daily. It was shown that Aojiru has a beneficial effect on constipation (20.7%), the common cold (13.3%), and hypertension (12.6%) [4]. Although the mechanism of health promotion by Aojiru is not fully understood, we have previously found that NK activity was significantly increased by feeding a diet with freeze-dried Aojiru to male rats [4]. In this study, we tried to investigate whether Aojiru has an ability to enhance NK activity of PBL in young women.

2. Methods and materials

2.1. Subjects

The study subjects consisted of 19 healthy young women aged 18–22 years. Women with disease or engaged in heavy exercise training were excluded from the experiment. The selected subjects agreed to drink 180 mL/day of Aojiru for 4 weeks. There was no limitation placed on their food intake during the experiment. No subjects took any medication during this study. Subjects received oral and written information about the study and gave their written consent. The study was approved by the Clinic Research Ethics Committee of Yamaguchi Prefectural University, Yamaguchi, Japan.

2.2. Contents of Aojiru

Aojiru, named for its color, is a juice prepared from kale, which is a plant akin to cabbage. Aojiru was obtained from Q'sai Co. (Fukuoka Japan). As shown in Table 1, the main component of Aojiru is water (~95%). The content of Ca in Aojiru is high and almost equal to that of a bottle (100mL) of milk. The contents of vitamins A and C are also high and are equivalent to levels of these vitamins in five and three tomatoes, respectively.

2.3. Isolation of PBL and preparation of serum

After overnight fasting, blood samples were obtained between 8:00 and 8:30 AM and collected in heparinized Vacutainer tubes (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Table 1
Ingredients of Aojiru (100 g)

Protein (mg)	1313
P (mg)	30
K (mg)	289
Ca (mg)	146
Mg (mg)	23
Caroteinoids (mg)	1.05
Vitamin A (IU)	580
Vitamin C (mg)	196
Vitamin E (mg)	0.4
Fiber (mg)	200
Water (g)	94.8

Each value is the mean average in Aojiru produced from kale.

Peripheral blood mononuclear cells (MNC) were immediately isolated from whole blood by lymphocyte separation medium (LSM at 2000 rpm for 20 minutes). Cells were suspended in RPMI 1640 medium containing 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Cansera International Inc., Ontario, Canada), 100,000 U/L bicarbonate benzylpenicillin potassium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), and 1000 $\mu\text{g/L}$ streptomycin sulfate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). They were then counted, adjusted to $1 \times 10^6/\text{mL}$, and immediately used for measuring NK cell activity.

After blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes, serum from each subject was collected and stored at -70°C until use for measuring cytokine concentration [5].

2.4. Lymphocyte subpopulations

Whole-blood samples were stained with both fluorescein isothiocyanate (FITC)–conjugated anti-human CD3 monoclonal antibody (mAb), and phycoerythrin (PE) conjugated anti-human CD16 and CD56 mAb (Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan). After washing with phosphate buffered saline (PBS) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), stained cells were fixed with 0.5% paraformaldehyde in saline and were analyzed with a FACS Calibur flow cytometer and Cell Quest software program (Becton Dickinson, San Jose, CA) [6].

2.5. NK cell activity

NK cell activity was measured by using a fluorescence release assay which was a modification of the carboxy–fluorescein-diacetate (C-FDA) method [7].

In brief, K562, target cells, were labeled with C-FDA (100 $\mu\text{g/mL}$). They were prepared in triplicate at 20:1 (effector [peripheral blood mononuclear cells] to target cell ratio) in multiwell tissue culture plates (Asahi Techno Glass Co., Chiba, Japan). The plates were incubated at 37°C in 5% CO_2 incubator for 3 hrs. Then, 100 μl of the supernatant was harvested from each well and their fluorescence intensity were measured by FL600 Micro-

plate Fluorescence Reader (BIO-TEK Instrument, Inc., Winooski, VT, USA). Spontaneous fluorescence release was determined from target cells incubated with medium alone. Maximum release was determined from target cells incubated with 100 μ L of 0.1 N NaOH. The percent lysis was calculated as follows:

$$\frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Maximum release} - \text{Spontaneous release}} \times 100.$$

2.6. Serum INF- γ and IL-2 concentrations

The serum samples before and 4 weeks after the onset of the experiment were placed in duplicate in multiwell tissue plates. IL-2 and IFN- γ concentrations were measured by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA kit, Cayman Chemical Co., Michigan, USA for IL-2; Immunotech, Marseille, France for IFN- γ) [8].

2.7. Statistical analysis

Data are statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) with separation of treatment means (Duncan's multiple range test) using a statistical analysis program (Systat, Inc., Evanston, IL). A *P* value of < 0.05 was regarded as significant.

3. Results

3.1. Number of MNC and percentage of NK cells or mature T cells

The number of MNC significantly decreased with prolonging the period of Aojiru consumption (Fig. 1A). The percentages of NK cells and mature T cell in PBL of young women taking Aojiru for 2 or 4 weeks were not significantly different from those before the experiment (Figs. 1B and 1C).

3.2. Correlation between the percentage and activity of NK cells in PBL

There was a significant positive correlation between the percentage and activity of NK cells in PBL of young women ($y = 0.984x - 8.533$, $r = 0.797$) at the onset of the experiment (Fig. 2). Furthermore, a significant positive correlation at 4 weeks was also observed between the percentage and activity of NK cells ($y = 0.687x + 2.137$, $r = 0.591$). NK activity at 4 weeks after Aojiru intake was relatively higher than that at the onset of the experiment (Fig. 2).

3.3. Concentration of serum IL-2

Although we measured both IFN- γ and IL-2 concentrations in serum of each subject, IFN- γ levels were not within a detection range of the ELISA kit used in this experiment.

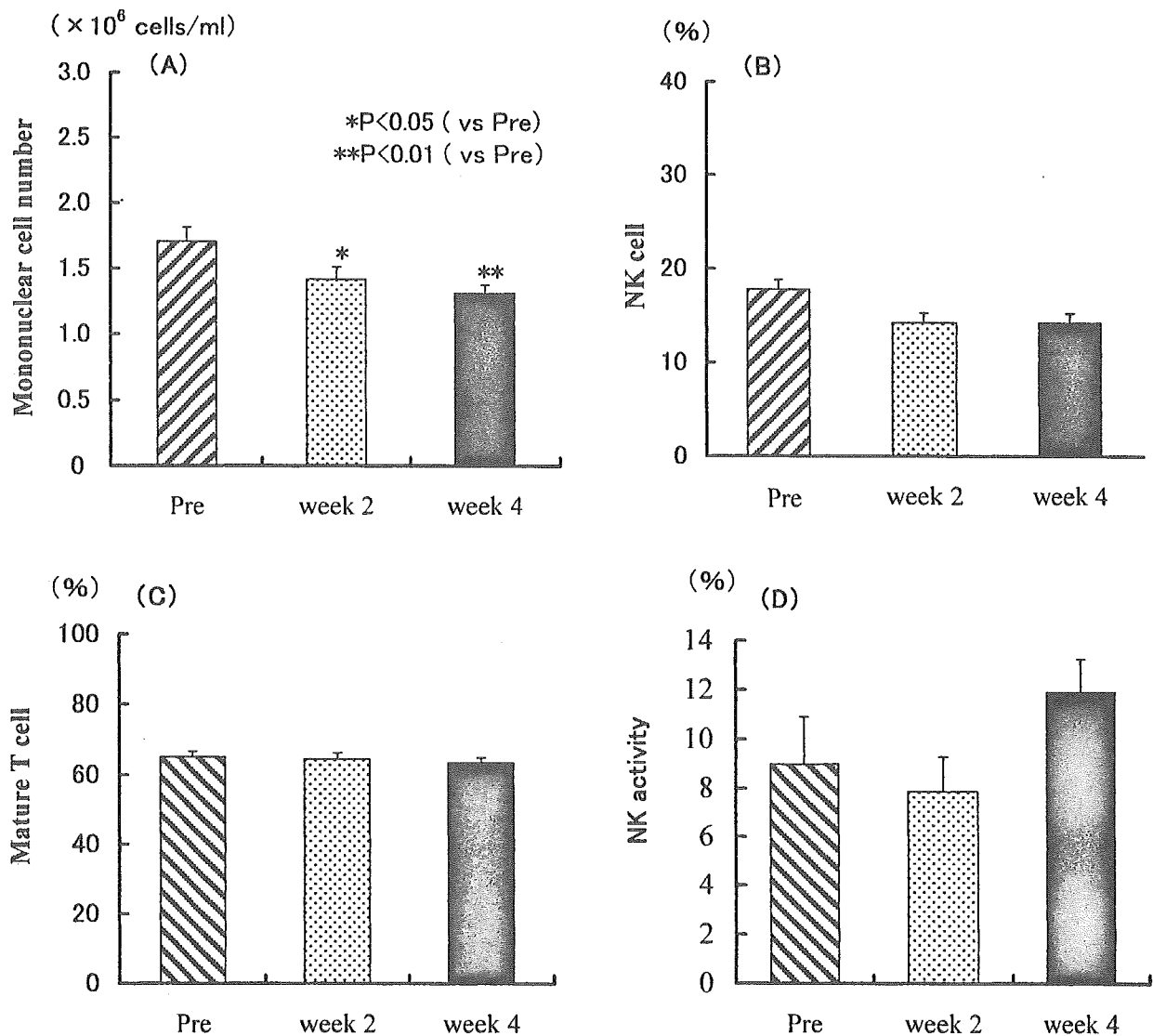


Fig. 1. Changes in number of mononuclear cells (MNC) (A), proportion of natural killer (NK) cells (B) and mature T cells (C), and change in NK activity (D) of peripheral blood lymphocytes (PBL) in young women ($n = 19$) after intake of the vegetable juice Aojiru pre-intake (open bars), at week 2 (striped bars), and at week 4 (filled bars). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: significantly different from pre-experiment).

Concentration of serum IL-2, however, was significantly higher in the subjects taking Aojiru for 4 weeks compared to that at the onset of this experiment ($P < 0.01$) (Fig. 3).

4. Discussion

The purpose of this study was to clarify the influence of Aojiru intake on NK activity of PBL in healthy young women. It is known that NK activity is greatly depressed by various stresses such as cigarette smoking, exercise-induced increases in plasma epinephrine, and emotional stress [9–11]. As the taste of Aojiru juice is not pleasant, Aojiru intake itself may

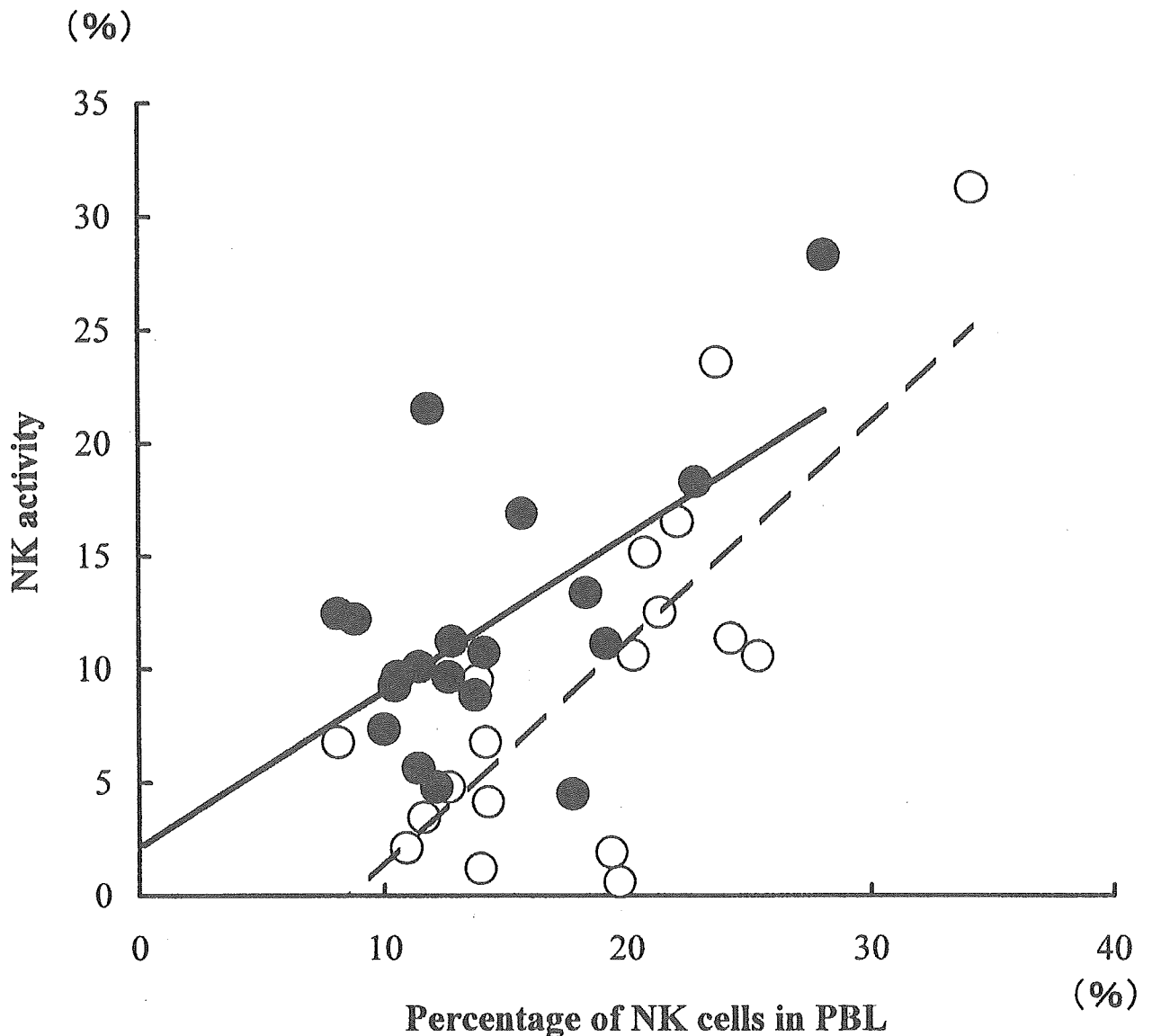


Fig. 2. Changes in the correlation between the proportion of natural killer (NK) cells and NK activity of peripheral blood lymphocytes (PBL) from young women ($n = 19$) after intake of the vegetable juice Aojiru for 4 weeks (onset of experiment [open circles]: $y = 0.984x - 8.533$, $r = 0.797$; 4 weeks after intake of Aojiru [filled circles]: $y = 0.687x + 2.137$, $r = 0.591$).

be a source of stress for some individuals and may induce a decrease in NK activity. To avoid this possibility, we selected subjects who already drank Aojiru juice and did not find this stressful. As a result, the number of subjects decreased from 70 to 19 at the onset of this study. Following this procedure it is considered that NK activity obtained in this study was little affected by the taste of Aojiru juice.

In the present study, Aojiru intake induced significant decreases in numbers of MNC (Fig. 1A). However, this does not appear to be due to the adverse effect of Aojiru juice, because the proportions of NK cells and mature T cells, and NK activity were not significantly decreased compared to values at the onset of this study, as shown in Fig. 1B, 1C and 1D. It

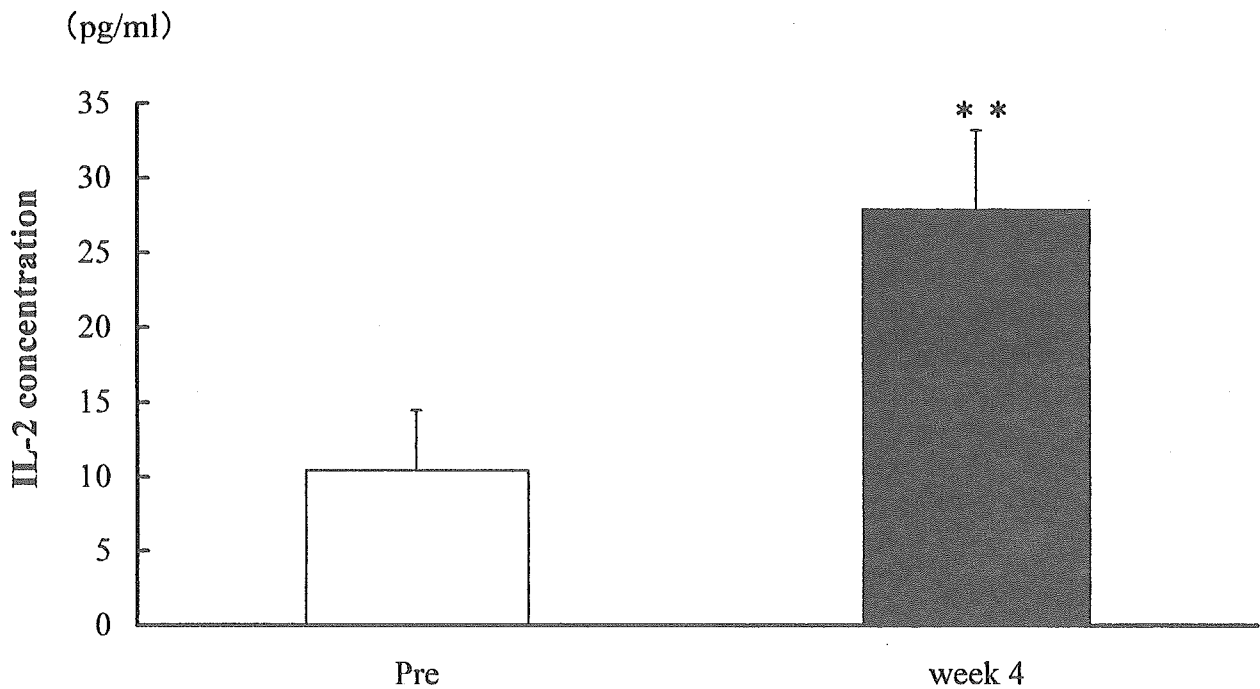


Fig. 3. Change in serum interleukin-2 (IL-2) concentration in young women ($n = 19$) after intake of the vegetable juice Aojiru for 4 weeks (pre-experiment [open bar]: 10.5 ± 4.0 pg/mL; at week 4 [filled bar]: 28.0 ± 5.3 pg/mL). ** $P < 0.01$, significantly different from pre-experiment.

is unknown why Aojiru intake induces a decrease of MNC number. As shown in Fig. 1D, NK activity showed an upward trend (not significant) after Aojiru intake for 4 weeks. This result is in agreement with results of our previous study using splenocytes of rats fed a diet containing the freeze-dried Aojiru [4]. The mechanisms by which Aojiru intake enhances NK activity may be as follows: 1) Aojiru intake may increase the proportion of NK cells in MNC, or 2) Aojiru intake may induce the activation of NK cells. Given that Aojiru intake did not change the proportion of NK cells, this evidence supports the second hypothesis, i.e., that Aojiru intake may induce the activation of NK cells.

NK activity is closely connected with the proportion of NK cells in PBL and had a significant positive correlation at the onset of this experiment. This result also suggests that the assay of NK activity by using the C-FDA method was appropriate.

In addition, the intake of Aojiru for 4 weeks induced little change in the proportion of NK cells in PBL but did increase NK activity. This suggests that the increase of NK activity after Aojiru intake is not due to an increased proportion of NK cells in PBL but rather to an increase in individual activity of NK cells. The enhancement of NK activity after Aojiru intake was largely seen in the subjects with smaller proportions of NK cells in PBL. As a result, the regression line between the proportion of NK cells and NK activity in PBL at 4 weeks showed a gentle slope compared to that at the onset of this study.

We also investigated the mechanism by which Aojiru intake activates NK cell activity. It is known that the cytokines produced from activated T cells have an ability to activate NK cells. In particular, IFN- γ and IL-2 are known as the cytokines activating NK cells [12,13]. Therefore, we measured serum concentrations of both cytokines in subjects at the study onset

and after 4 weeks of Aojiru intake. Although no IFN- γ was detected in the serum of subjects at either stage, the concentration of serum IL-2 was 2.5-fold higher in the subjects after 4 weeks of Aojiru intake compared to that at the onset of this study ($P < 0.01$). Since activated T cells produce IL-2 [14], the hypothesis is advanced that Aojiru intake has an ability to induce the activation of T cells. The first step is that Aojiru intake induces an increase in IL-2 secretion from T cells. The second step is that IL-2 activates NK cells. However, this hypothesis has many unexplained aspects. For example, it is not known how Aojiru intake activates T cells and enhances IL-2 production. To clarify these points will require further study.

In conclusion, the vegetable juice Aojiru enhances NK cell activity, which may be related to increased IL-2 production. The results from this study suggest that Aojiru intake could indeed be useful for maintaining and promoting health.

References

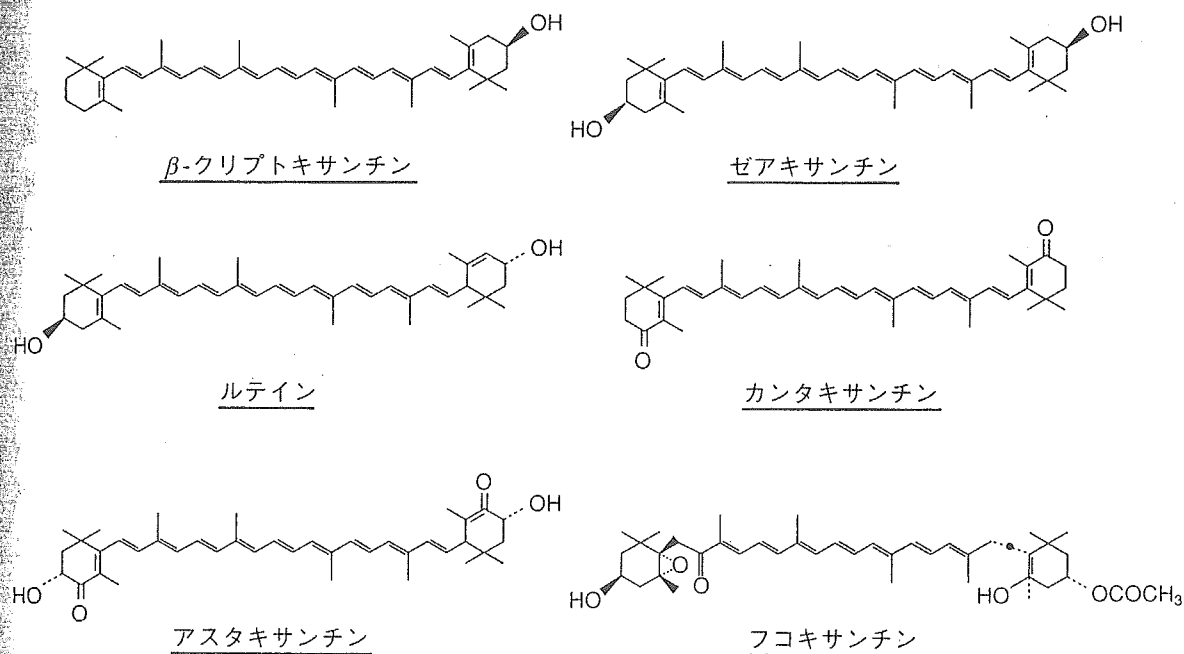
- [1] Ajiki W, Yamamoto S. Cancer statistics digest. Rectal cancer incidence in Japan. *Jpn J Clin Oncol* 1999;29:408.
- [2] Hirohata T, Kuno S. Diet/nutrition and stomach cancer in Japan. *Int J Cancer* 1997;10:34–6.
- [3] Tominaga S, Kuroishi T. An ecological study on diet/nutrition and cancer in Japan. *Int J Cancer* 1997;10:2–6.
- [4] Moriguchi S, Taka T, Yamamoto Y, Hasegawa T. Japanese vegetable juice Aojiru, and cellular immune response for health promotion. In: Watson RR, editor. *Vegetables, Fruit, and Herbs in Health Promotion*. CRC Press, 2000:p. 35–43.
- [5] Moriguchi S, Oonishi K, Kato M, Kishino Y. Obesity is a risk factor for deteriorating cellular immune functions decreased with aging. *Nutr Res* 1995;15:151–60.
- [6] Horvatinovich JM, Sparks SD, Borowitz MJ. Detection of terminal deoxynucleotidyl transferase by flow cytometry: a three color method. *Cytometry* 1994;18:228–30.
- [7] Suzuki Y, Yoshikawa K, Notake K. A fluorescence natural killer (NK) activity assay. *J. Aich Med Univ Assoc* 1988;16:507–13.
- [8] Gehman LO, Robb RJ. An ELISA-based assay for quantitation of human interleukin 2. *J Immunol Methods* 1984;74:39–47.
- [9] Ginns LC, Ryu JH, Rogol PR, Sprince NL, Oliver LC, Larsson CJ. Natural killer cell activity in cigarette smokers and asbestos workers. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:831–4.
- [10] Sukhikh GT, Meerson FZ. Inhibition of natural killer activity in emotional stress and elimination on this phenomenon by interferon inducer. *Biull Eksp Biol Med* 1983;96:84–6.
- [11] Kappel M, Tvede N, Galbo H, Haahr PM, Kjaer M, Linstow M, Klarlund K, Pedersen BK. Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine. *J Appl Physiol* 1991;70:2530–4.
- [12] Domzig W, Stadler BM, Herberman RB. Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) cell activity. *J Immunol* 1983;130:1970–3.
- [13] Weigent DA, Langford MP, Fleischmann WR Jr, Stanton GJ. Potentiation of lymphocyte natural killing by mixtures of alpha or beta interferon with recombinant gamma interferon. *Infect Immun* 1983;40:35–8.
- [14] Garman RD, Raulet DH. Characterization of a novel murine T cell-activating factor. *J Immunol* 1987;138:1121–9.

III - 11

キサントフィル

1 キサントフィルとは

カロテノイドとは、長鎖の共役系二重結合を有する色素群の総称である。自然界には600を超えるカロテノイドが存在するが、ヒトが食物から摂取するカロテノイドは40程度である。カロテノイドはその構造から炭化水素カロテノイドと含酸素カロテノイドに分類され(図1)、含酸素カロテノイドをキサントフィルといい、血漿中に見出されたキサントフィルはクリプトキサニン、ゼアキサニン、ルテインとその代謝物である。クリプトキサニンは柑橘類に多く含まれプロビタミンA活性を持つ。ルテインとその異性体であるゼアキサニンは主に緑黄色野菜に存在し、分子の両端のイオン環にヒドロキシ基が置換され、この官能基が生物活性に大きな影響を与えていると考えられている。



【図1】 主要なキサントフィル類

カロテノイドの主要な生理活性はプロビタミン A 活性と抗酸化活性であるが、ルテインやゼアキサントフィルにはプロビタミン A 活性はない。プロビタミン A 活性を持つキサントフィルには β -クリプトキサントフィルがあり、理論上 1 分子の β -クリプトキサントフィルは代謝されて 1 分子のビタミン A を生じる。キサントフィルは強い一重項酸素分子消去作用を有することから抗発がん、抗腫瘍食品因子として有用であると考えられる (表 1)。カロテノイドは生体の多種多様な組織で検出されているが、ヒトの網膜黄斑にはキサントフィルであるルテインとゼアキサントフィルのみが集積する。

【表 1 キサントフィルの一重項酸素分子消去作用】

化合物	$^1\text{O}_2$ 消去速度定数 [$10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$]		生体内濃度 [$\mu\text{mol/l}$]
	k_q	k_r	
α -トコフェロール	280	3.6	15~40
β -カロテン	14 000	n.d.	0.3~0.6
アスタキサントフィル	24 000	n.d.	
カンタキサントフィル	21 000	n.d.	
ゼアキサントフィル	10 000	n.d.	0.1~0.2
ルテイン	8 000	n.d.	0.1~0.3
クリプトキサントフィル	6 000	n.d.	0.3

k_q : 物理的消去速度定数, k_r : 化学的消去速度定数
n.d.: 未測定 (ほとんどの場合 k_q に比べて大変低い値を示す)

2. 生理活性

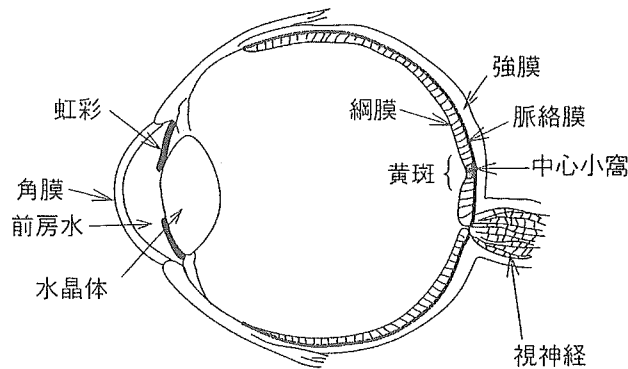
キサントフィルの主要な生理活性であるプロビタミン A と抗酸化作用の作用機構の詳細については、カロテノイドの項で述べる。ここでは、主として局在性に特徴のある視覚疾患を記載する。

■ 加齢性網膜黄斑変性疾患と白内障の予防

ルテインとゼアキサントフィルは、目の健康に関わるという点において非常にユニークなキサントフィルである。ヒトの組織や器官には種々のカロテノイドが検出されているが、物を見るのに不可欠な役割を演じる目の二つの組織、網膜とレンズにはルテインとゼアキサントフィルのみしか蓄積しない。網膜の中心に位置する直径 5~6 mm の黄斑は光受容体が集積しており、ここが太陽光線を直接受ける。太陽光線の中で、特に青色光線 (440 nm) は赤色光線 (590 nm) のおよそ 100 倍のエネルギーを放ち、強い障害をもたらすが、ルテインは 445 nm の吸収極大を持つことから、太陽光線の青色光線を効率よく吸収するため障害を予防できる¹⁾。

また、網膜は、高濃度の多価不飽和脂肪酸を構成成分とする血管が集約した組織であることから、非常に酸化障害を受けやすい。網膜黄斑中にルテインの代謝産物がみられることはルテインが抗酸化作用を発揮して網膜黄斑細胞を酸化障害から防御することを示唆する。多くの研究者（ビテイら²⁾、カイら³⁾、ウインクラールら⁴⁾は、ルテインとゼアキサチンはラジカルスカベンジャーとして作用し、網膜の炎症性肥厚形成を阻害して目の健康を保つと述べている。

目は光に激しくさらされ、強い酸化ストレスを受けるが、それに対応した光酸化障害防御機構の入口にレンズは位置する。白内障はレンズ内でタンパク質が酸化され、酸化したタンパク質が蓄積し、視覚に異常をきたす疾病である。レンズに蓄積するカロテノイドは網膜黄斑に比べ濃度は低いものの網膜黄斑と同じくルテインとゼアキサチンのみである。レンズにおいても両者は青色光線の遮蔽剤として、あるいは抗酸化因子として作用すると考えられている（図2）。



【図2 ヒトの眼球の断面図】

■ 心臓・血管系に対する作用

一般に、野菜や果物を多量に摂取する地域では、心疾患の罹患率が低いといわれている。これは、ビタミンA、C、Eやカロテノイドの高い摂取によるとされているが、疫学調査により、キサントフィル摂取と心疾患の相関性が示唆されている。フランスのトゥルーズ市と北アイルランド、ベルファストの疫学調査を比較すると⁵⁾、血清成分の大きな違いは含酸素カロテノイド、 β -クリプトキサニンとルテイン濃度であり、ベルファストでは心疾患の罹患率が高く、両キサントフィル濃度がトゥルーズ市民の1/2と低い値を示した。また、ロサンゼルス Atherosclerosis Study⁶⁾は、血清ルテインレベルと動脈内膜肥大 (IMT) の関連を始めて研究したものであるが、それによると、血清ルテイン濃度が800 nmol/l以上の中年男女ではIMTは皆無に近く、一方180 nmol/l以下のグループでは有

意に増加していた。米国の大規模コホート研究⁷⁾は、ルテイン摂取と虚血性疾患のリスク低下に正の相関があることを示した。喫煙者のクモ膜下出血のリスクは β -カロテンやリコペンとルテインの同時摂取で低下した。

■ 皮膚障害と発がん

ヒトが紫外線にさらされると皮膚に紅斑が誘導されるが、血清や皮膚中のカロテノイドはこの炎症を抑制してカロテノイド自体の濃度は低下する。このようにして、皮膚の健康が維持される。紫外線に曝露された皮膚は各種の活性酸素種が生成しそれにより赤い浮腫や紅斑を引き起こす。食事由来のカロテノイドをはじめとする抗酸化物質はこれらの炎症を抑制する。

■ がん予防

フィジー諸島の住民の疫学調査によると、彼らは毎日緑色野菜を 200 g (ルテイン 25 mg) 以上摂取しており、緑色野菜や果物をそれほど食しないほかの南太平洋諸島の住民に比べて、同じ喫煙率にもかかわらず肺がんの罹患は低いと報告されている⁸⁾。

キサントフィルによるがんの化学予防について動物実験が行われている⁹⁾。マウスにルテインを 1 回当たり 0.2 mg、週 3 回 25 週間経口摂取させることにより、プロモーション期の肺がんが抑制できた。また、結腸がんに対しては毎日 0.24 mg を 5 週間胃内に投与することにより腫瘍の形成数が低下した。0.005 % のゼアキサントチン摂取ではマウスの肝発がんが抑制され、 β -クリプトキサントチン摂取ラットでは結腸がんが抑制する傾向があった。

皮膚の発がんに対する作用も、動物実験により証明されている。0.04 あるいは、0.4 % のルテインを添加した食餌を与えたヌードマウスでは UVB 誘導皮膚の炎症が有意に抑制され、さらには UVB 誘導 DNA 障害が低下した。UVB 照射はがんを発症させるが、ルテインの摂取はラジカルスキャベンジャーとして皮膚発がんに対して抑制的に働くと考えられる。

3 介入試験

視覚に対するルテインの介入試験は数多く行われ、その代表的なものを表 2 に要約した。

リッチャーら¹⁰⁾は、14 人の平均年齢 70 歳の男性の加齢性網膜黄斑変性疾患患者に 140 g のホウレンソウ (ルテイン 14mg を含む) あるいは精製ルテインを 1 週間に 5~7 回 1 年間投与し病変の改善を観察したところ、種々の視覚機能は 60 %

【表2 ルテインの介入試験】

介入試験	対象	投入方法	結果	文献
Richer (1999a)	加齢性網膜黄斑疾患(AMD)患者男性14人	ハウレンソウ140g(ルテイン14mg含)または精製ルテイン14mgを毎日1年間	個人間に差はあるが視力機能の改善	<i>J. Am. Optom. Assoc.</i> , 70, pp. 24-36, 1999a
Dagnelie (2000)	色素性網膜炎患者16人	ルテイン40mg/日を9週間, 続いて20mg/日を17週間	視力の改善	<i>Optometry</i> , 71, pp. 147-164, 2000
Massacesi (2001)	AMD患者50人	ルテイン15mg/日を18か月	プラセボ群に比べ視力が2倍回復	<i>Assoc. Res. Vision. Ophthalmol.</i> , 42, S234, 2001
Richer (2002)	AMD患者90人	ルテイン10mg/日または(ルテイン10mg+混合抗酸化剤)/日を12か月	MPD, 眩輝, コントラスト感受性, および視力の改善	Proceedings of the Association For Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale FL. P. B539, 2002
Olmedilla (2003)	白内障患者5人	ルテイン15mg/日を2年間	視力, 眩輝の改善	<i>Clin. Sci.</i> , 102, pp. 447-456, 2003

以上の回復が認められた。その後、リッチャーらは1999年から2001年にかけて、シカゴ市内の病院で萎縮性加齢性網膜黄斑変性疾患と診断された90人の患者にルテイン-抗酸化剤供給試験を行った。患者を①ルテイン10mg投与群、②ルテイン10mg/抗酸化剤/ビタミン/ミネラル投与群、③マルトデキストリン(プラセボ群)の3グループに分け、それぞれのサプリメントを12か月摂取させた。その結果、プラセボ群に対し、ルテイン単独投与、あるいはルテインとほかの抗酸化剤を同時投与した群においては網膜の色素沈着が増加し、視覚の機能上昇がみられた。

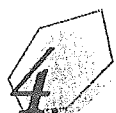
マサセッシらはリッチャーらと同様の結果を得た。ミラノ市において、50人の加齢性網膜黄斑変性疾患患者に15mgのルテインを含む抗酸化剤カクテルの投与試験を行ったところ、18か月の長期摂取によりカクテル投与群はプラセボ群に比べ視覚障害が2倍改善した。

色素性網膜炎患者の視覚機能に及ぼす作用については、ダグネリらがルテインの介入試験を行っている。精製ルテイン1日当たり40mgを9週間、引き続き17週間は20mg摂取させ、コンピュータによる自己診断を行った。それによると、有意な改善が認められたが、16人の患者のうち10人はDHAやビタミンB複合物、消化酵素を同時に摂取し、10人は介入試験の以前から介入試験期間を通して、ビタミンA単独またはβ-カロテンを同時に摂取している事実を考慮しな

ければならない。

さらに、白内障に対する作用についても介入試験が行われている。オルメンテラらは老人性白内障と診断された患者 17 名にルテイン 15 mg, あるいは α -トコフェロール 100 mg 投与群とプラセボ群に分け、それぞれの食品成分を週 3 回、2 年間摂取させ、視力と眩輝の改善を追及した。両マーカーはルテイン投与群のみで改善が認められた。

皮膚の炎症に対するキサントフィル単独の介入試験は未だ行われていない。2003 年、ハインリッヒら¹⁰⁾は混合カロテノイド 24 mg (β -カロテン、リコペン、ルテインの等量混合物)を 12 週間にもわたり摂取させたところ、紫外線照射により誘導される紅斑が有意に抑制されることを報告した。この研究はルテインの供給と皮膚の健康維持に直接つながるものではないが、ルテインとその代謝産物が皮膚に存在することから食事由来のカロテノイドが皮膚で代謝されることを示唆している。



4 吸収・代謝・排泄

364

キサントフィルの吸収代謝排泄については、カロテノイドの項で詳細に述べる。要約すると、食品成分として摂取したキサントフィルは消化され、脂質とともに胆汁酸でミセル化された後に、小腸上皮から吸収され、門脈循環を経て肝臓に到達する。その大半は肝臓に貯蔵されるが、各組織の必要性に対応し、肝臓から血流に乗って体の抹消組織に入り、最終的には腎臓、あるいは腸管で再吸収されて排泄される。

ルテインは一般に食品中では遊離型で存在するが、ごく一部、黄桃やオレンジのような黄橙色の果実では脂肪酸が結合したエステル型として存在する。一方、食品添加物として使用されるルテインはエステル型も多い。ルテインエステルは、吸収に先立ち消化管に存在するリパーゼやエステラーゼが作用して遊離型となる。



5 食品中の含有量

キサントフィルは、野菜や果物に広く存在する。ルテイン/ゼアキサントフィルはパセリ、セロリなどの緑色野菜に多量に含まれ、 β -クリプトキサントフィルはブロッコリーやグレープフルーツに含まれる(表 3)。アスタキサントフィルはエビやカニ

【表3 食品中のβ-クリプトキサンチン/ルテイン/ゼアキサンチン含有量】

(a) 野菜に含まれるルテイン/ ゼアキサンチン		(b) 果実に含まれるβ-クリプトキサンチン/ ルテイン/ゼアキサンチン		
野菜	ルテイン/ ゼアキサンチン (mg/100g)	β-クリプトキサンチン (>0.5 mg/100 g)	ルテイン (>0.5 mg/100 g)	ゼアキサンチン (>0.1 mg/100 g)
ケール (生)	39.6	温州ミカン	アンズ	パパイヤ
ホウレンソウ	11.9	パパイヤ	アボガド	黄桃
リーフレタス	2.64	ビワ	ブドウ	
ブロッコリー	2.45	グアバ	オリーブ	
夏カボチャ	2.13	ポンカン	クラムベリー	
芽キャベツ	1.59		スモモ	
グリーンピース	1.35		サクランボ	
コーン	0.884		キウイフルーツ	

の甲殻類に存在する動物性カロテノイドである。欧米では、結晶化したルテインが食品添加物色素として菓子類、乳製品、ドリンク類、穀物加工食品に汎用され、これらの加工食品を1人分食することで数mgのキサントフィルが体内に入る。



6. 過剰症

キサントフィルの過剰摂取による障害作用は報告されていない。ルテインを1日当たり30mgを5か月間、または40mgを2か月間摂取する介入試験においても副作用はみられなかった。血清脂質の変化から、想定される血液性状や目に対して何の作用ももたらされないことが報告されている。唯一、柑皮症があるが、この色素沈着は有害ではなく、キサントフィルの摂取を中止すれば退色する。

参考文献

- 1) W. T. Ham Jr., H. A. Mueller and D. H. Sliney: Retinal sensitivity to damage from short wavelength light, *Nature*, **260**, pp. 153-155, 1976
- 2) S. Beatty, H. Koh, M. Phil, D. Henson and M. Boulton: The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Surv. Ophthalmol.*, **45**, pp. 115-134, 2000
- 3) J. Cai, K. C. Nelson, M. Wu, P. Stenberg and D. P. Jones: Oxidative damage and protection of the RPE, *Prog. Retin. Eye Res.*, **19**, pp. 205-221, 2000
- 4) B. S. Winkler, M. E. Boulton, J. D. Gottsch and P. Stenberg, Oxidative damage and

I

III

III

IV

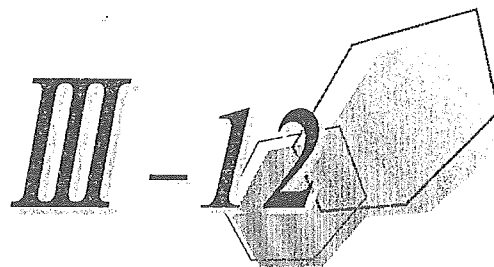
機能性食品

365

キサントフィル

age-related macular degeneration, *Mol. Vis.*, **5**, pp. 32, 1999

- 5) A. N. Howard, N. R. Williams, C. R. Palmer, J. P. Cambou, A. E. Evans, J. W. Foote, P. Marques-Vidal, E. E. McCrum, J. B. Ruidaverts, S. V. Nigdikar, J. Rajput-Williams and D. I. Thurnham: Do hydroxyl-carotenoids prevent coronary heart disease? A comparison between Belfast and Toulouse, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **66**, pp. 113-118, 1996
- 6) J. H. Dwyer, M. Navab, K. M. Dwyer, K. Hassan, P. Sun, A. Shircore, S. H. Levy, G. Hough, X. Wang, T. Drake, C. N. Merx and A. M. Fogelman: Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: The Los Angeles Atherosclerosis Study, *Circulation*, **103**, pp. 2922-2927, 2001
- 7) A. Ascherio, E. B. Rimm, M. A. Hernan, E. Giovannucci, I. Kawachi, M. J. Stampfer and W. C. Willet: Relation of consumption of Vitamin E, Vitamin C and carotenoids to risk for stroke among men in the United States, *Ann. Intern. Med.*, **130**, pp. 963-970, 1999
- 8) L. Le Marchand, J. H. Hankin, L. N. Kolonel, G. R. Beecher, L. R. Wilkens and L. P. Zhao: Intake of specific carotenoids and lung cancer risk, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2**, 39, pp. 183-187, 1993
- 9) H. Nishino, M. Murakoshi, T. Ii, M. Takemura, M. Kuchide, M. Kanazawa, X. Y. Mou, S. Wada, M. Masuda, Y. Ohsaka, S. Yogosawa, Y. Satomi and K. Jinno: Carotenoids in cancer chemoprevention, *Cancer and Metastasis Rev.*, **21**, pp. 257-264, 2002
- 10) U. Heinrich, C. Gartner, M. Wiebusch, O. Eichler, H. Sies, H. Tronnier and W. Stahl: Supplementation with beta-carotene or a similar of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema, *J. Nutr.*, **133**, 1, pp. 98-101, 2003



カロテノイド



カロテノイドとは

カロテノイドとは、長鎖の共役二重結合を特徴とする色素類の総称である。自然界には600種を超えるカロテノイドが存在する。カロテノイドの多くは炭素数40で構成され、十数個の二重結合を有することから、理論上、多数のシス-、トランス-異性体が存在するはずであるが、自然界ではトランス型として存在する。生体内では、シス異性体も見出されるが、これは摂取したカロテノイドが一部シス異性体に代謝変換されたものである。カロテノイドは細菌、藻類、植物、甲殻類、魚類、哺乳動物に広く見出されているが、動物は *de novo* 合成能を持たないため、体内で見出されるカロテノイドは飼料として摂取した植物性の食品成分そのものか、あるいは摂取後生体内で酸化を受けた代謝産物が蓄積したものである。

カロテノイドを構造から分類すると、酸素を含まない炭化水素カロテノイド（カロテン類やリコペン類）と含酸素カロテノイド（キサントフィル類）に分けられる。また、イオノン環の有無からは環状カロテノイド（カロテンやキサントフィル）と非環状カロテノイド（リコペンやフィトエンなど）に分類される（図1）。最も代表的なカロテノイドであるβ-カロテンは、ニンジンを始め緑黄色野菜に広く分布し、β-カロテンの異性体であるα-カロテンは緑葉に、リコペンはトマト果実に高濃度存在することが知られている。食品素材中の主要なキサントフィルは緑色野菜にみられるルテインや果実に多いβ-クリプトキサントフェンである。アスタキサントフェンはエビ、カニなどの甲殻類やサケやマスなどの魚類に豊富に含まれる色素であり、動物性カロテノイドとも呼ばれている。

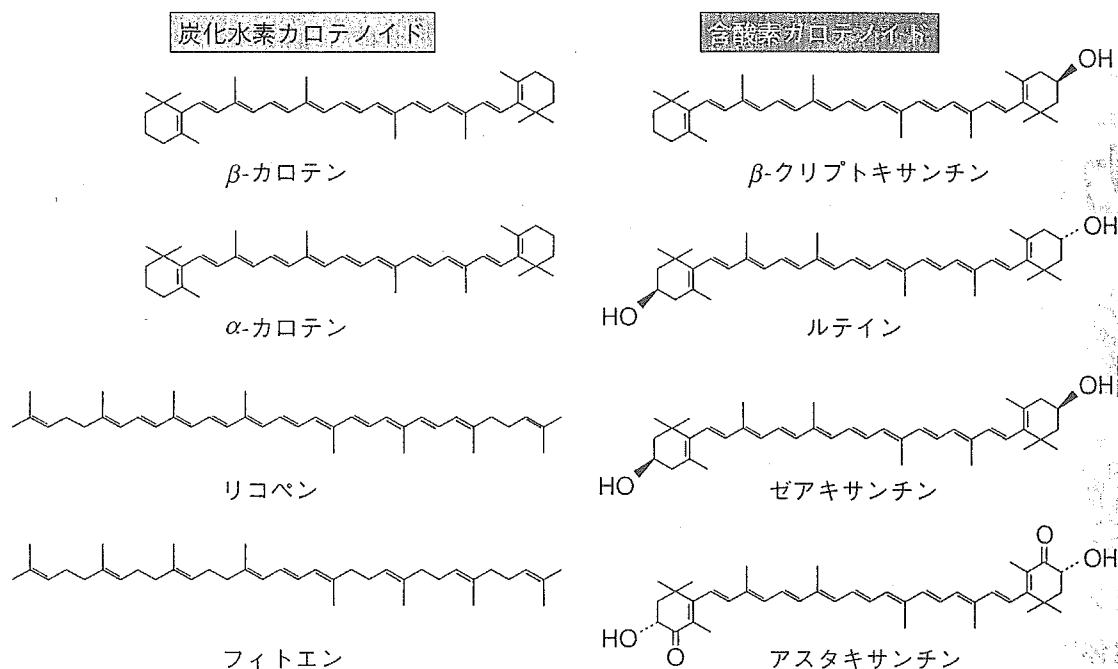


2 生理機能

● プロビタミン A 活性

ヒトは植物由来のカロテノイドを食事より摂取し、その一部をビタミン A に変換する。カロテノイドのうち、レチニデン残基を分子内に含む α -、 β -、 γ -カロテンなどは生体内でビタミン A に変換される。特に、分子内に 2 個のレチニデン残基を持つ β -カロテンは 2 分子のビタミン A になることから、強いプロビタミン A 活性を持つことが明らかである。食品成分として摂取された β -カロテンは小腸において、 β -カロテン 15, 15'-ジオキシナーゼの作用を受けて 2 分子のレチナールへ分解され、さらにレチナールはレチノールあるいはレチノイン酸に代謝される。レチノイン酸は、脂肪酸とのエステル化反応によりレチニルエステルとなり、キロミクロンに取り込まれる。

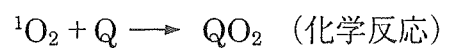
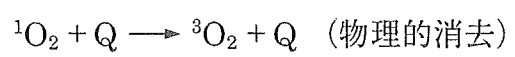
ビタミン A の生理機能としては、視覚、成長・生殖、味覚、細胞の終末分化、形態形成に関与するほか、上皮組織の機能維持や免疫作用にも深く関わっていることが知られている。



【図 1 主要なカロテノイドの構造】

抗酸化作用¹⁾

カロテノイドの抗酸化作用は、一重項酸素分子消去作用とラジカル捕捉作用に分けられる。酸素分子が光増感反応で励起されると活性酸素の一種である一重項酸素が発生する。一重項酸素はその親電子性により、二重結合を持つ化合物と容易に反応し、ヒドロペルオキシドやエンドペルオキシドなどを生成する。カロテノイドの一重項酸素消去は一重項酸素の励起エネルギーを熱エネルギーに変換するもので、カロテノイド自身は変化を受けず繰り返し消去できる（物理的消去）。

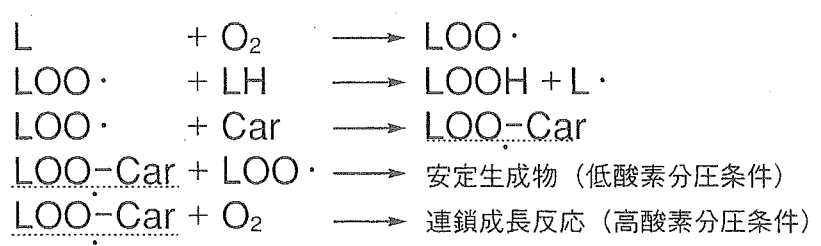


³O₂：三重項酸素（通常の酸素），¹O₂：一重項酸素

Q：消去剤，QO₂：酸化生成物

カロテノイドは、代表的なラジカル捕捉剤であるα-トコフェロールに比べその活性はかなり低いものの、低酸素分圧においては強いラジカル捕捉作用を発揮する。カロテノイドの共役二重結合にラジカル付加反応が起こるが、低酸素状態では生成した捕捉炭素ラジカルが共鳴安定化するために、連鎖ラジカル停止反応が優勢になると考えられる（図2）。その他の活性酸素種との反応については、β-カロテンは一酸化窒素（NO）関連種であるNO₂やONOO⁻との反応性が高く、このことはカロテノイドがNOにより誘導される生体障害を抑制する可能性を示唆する。

カロテノイドは血液中ではリポタンパク質に局在するが、それぞれのカロテノイドの各リポタンパク質への分布は一様ではない。β-カロテンやリコペンのような非極性のカロテノイドはVLDLやLDLに分布しやすいため、またLDLの酸化変性は動脈硬化の引き金になることから、これらのカロテノイドは動脈硬化予防因子として働く可能性がある。



LOO·：ペルオキシラジカル，LH：脂質，Car：カロテノイド
LOO·-Car：カロテノイドのラジカル付加物
L·：脂質ラジカル，LOOH：脂質ヒドロペルオキシド

【図2 脂質のラジカル反応に対するカロテノイドの抑制作用】

● その他の生理機能

カロテノイドの生理機能としては、プロビタミンAと抗酸化作用のほかに、その作用機作は十分には解明されていないが、免疫賦活作用や細胞間ギャップジャンクションを増強することが報告されている(表1)。隣接する細胞の間にはギャップ結合が形成され、ギャップ結合の細孔を通して低分子物質が通過する。ギャップ間の相互作用によって組織の恒常性が維持され、この相互作用が低下するとがん細胞の増殖が促進される。抗腫瘍作用のほかにカロテノイドがイソプレノイドとしてコレステロール生合成を抑制することも知られている。

【表1 カロテンの生物活性】

化合物	プロビタミンA 活性	薬剤誘導による 形質転換阻害	ギャップ結合誘導	脂質過酸化阻害
β -カロテン	++++	++++	++++	++
カンタキサンチン	-	++++	++++	+++
ルテイン	-	-	+++	+++
α -カロテン	++	++	+	+
リコペン	-	-	++	++
μ -ビキシン	-	-	-	+++
α -トコフェロール		+	±	++++

(L. -K. Zhang: Carcinogenesis, 12, p.2109, 1991)

3 臨床試験

● 発がんに対する介入試験

カロテノイドを含む野菜や果物摂取量とがんの罹患率は、負の相関関係があることが疫学調査で報告されている。また、臨床試験において、 β -カロテン摂取と発がんにも負の相関が明らかとなった。 β -カロテン投与による一次的ながん予防の大規模介入試験が数多く行われている(表2)。

一般人口を対象としたものとして、中国河南省林県の研究(Linxian Study)と米国医師を対象としたPhysician's Studyがある。食道がんや胃がんの多発地域である河南省林県では、 β -カロテン、ビタミンE、セレンの複合投与により、発がんリスクが低下し特に胃がんでは21%の低下が認められた。Physician's Studyはその多くが非喫煙者である医師が β -カロテンを服用したものであるが、がんに対し予防もリスクの上昇もみられなかった。

【表2 β-カロテンの大規模介入試験】

介入試験	対象	栄養素の量	期間	主な結果	文献
Linxian Study	中国・河南省林県住民 (約3万人)	2～3種類の栄養素を組み合わせ、4群に分け、毎日投与	1986) 1991	β-カロテン (15 mg)、ビタミンE (30mg)、セレン (50 mg) の投与群の死亡率が全がんで13%、胃がんで21%低下	L.-X. Zhang et al., <i>Carcinogenesis</i> , 12, 2109, 1991
ATBC trial	フィンランドの男性喫煙者 (約3万人)	β-カロテン 20 mg とビタミン E50 mg を毎日投与	1985) 1993	β-カロテン投与群の肺がんになる率が18%上昇	M. Rappala et al., <i>Lancet</i> , 349, 1715, 1997
Physicians' Study	米国の男性医師 (約2万2千人)	β-カロテン 50 mg とアスピリンを1日おきに投与	1982) 1995	β-カロテンにがんの予防効果も害もなし	C.H. Hennekens et al., <i>New Engl. J. Med.</i> , 91, 183, 1999
CARET Study	米国の喫煙者・アスベストを吸った人達 (約1万8千人)	β-カロテン 30 mg とビタミン A25 000 IU を毎日投与	1988) 1998	投与群の肺がんになる率が28%上昇、投与中止	G.S. Omen et al., <i>New Engl. J. Med.</i> , 334, 1150, 1996

発がんリスクの高い集団を対象とした研究では、フィンランドにおける喫煙者への ATBC trial や喫煙者、アスベスト吸引者を対象とした米国の CARET Study では、β-カロテンの投与によって肺がん罹患率が上昇するという予想に反する逆の結果が報告された。これらの研究結果から、がんは多段階発症するものであり、上記の喫煙者はイニシエーションを終了しており、β-カロテンはイニシエーション期に有効であることからリスクの軽減には働かないと推定された。この仮説を基にすると、発がんを予防するには初期からの摂取が必要であるということになる。また、投与量が食事からの摂取が推奨されている 6 mg をはるかに超える高容量であることから、摂取したβ-カロテンがむしろ酸化促進的に働き、発がんを誘導したとの意見もある。

一方、少人数、短期間の試験ではあるが、やはり発がんリスクの高い前がん病変である口腔内白斑症患者 24 人に 1日 30 mg のβ-カロテンを 3～6 か月摂取させ、口腔がんの予防におけるβ-カロテンの可能性を検討したガレウエルらの試験²⁾がある。この研究結果は、β-カロテン摂取群では 71 % の高率で症状が改善することを示した。

これらの介入試験は、β-カロテンをはじめとするカロテノイドの抗発がん機能を期待させるものである。野菜や果物の中にはリコペン、α-カロテンなどが存在するが、β-カロテン以外のカロテノイドにもβ-カロテンより強い抗腫瘍活性を持つものが少なくない。西野らの研究グループは混合カロテノイドとα-ト