

## 脳内老化制御とバイオマーカー：基盤研究と食品素材

---

2009年5月30日 第1刷発行

---

監修 大澤俊彦, 丸山和佳子 (T0663)  
発行者 辻 賢司  
発行所 株式会社シーエムシー出版  
東京都千代田区内神田 1-13-1 (豊島屋ビル)  
電話 03 (3293) 2061  
大阪市中央区南新町 1-2-4 (椿本ビル)  
電話 06 (4794) 8234  
<http://www.cmcbooks.co.jp/>

---

[印刷 株式会社遊文舎]

©T. Osawa, W. Maruyama, 2009

定価はカバーに表示してあります。  
落丁・乱丁本はお取替えいたします。

本書の内容の一部あるいは全部を無断で複写(コピー)することは、  
法律で認められた場合を除き、著作者および出版社の権利の侵害に  
なります。

ISBN978-4-7813-0094-8 C3047 ¥65000E

# 第1章 DHA, イソフラボン摂取と脳の高次機能

安藤富士子\*<sup>1</sup>, 下方浩史\*<sup>2</sup>

## 1 高齢社会と脳の高齢変化

我が国の平均寿命は男性79.19歳, 女性85.99歳(平成19年)で, 世界最高水準である。日常生活に障害なく過ごせる健康寿命(無障害期間)も伸びてきており, 男性77.64歳, 女性80.63歳(平成16年)となっている。国民皆保険制度や高い医療水準, 経済成長に伴う生活環境や栄養状態の向上, さらには近年の予防医療・健康に対する意識の向上により, 高血圧症, 脳血管障害, 虚血性心疾患などの身体的な慢性疾患は徐々に減少してきている。

その一方で高齢者の増加や核家族化, さらには昨今の社会的入院の抑制は, 地域での独居高齢者や虚弱高齢者を増加させている。氾濫する情報と社会のめまぐるしい変化, 社会保障や終身雇用制度の崩壊のきざしは現代の中高年齢者に, 近い将来への不安を抱かせている。我が国の自殺率が平成4年から上昇傾向にあり, 平成18年には32,155人が自殺している<sup>1)</sup>が, 中高年齢者の自殺者は全体の7割を占めている。高齢者の約半数は悩みやストレスを抱えており, 地域在住の高齢者の8~16%に抑うつが認められる。この割合は施設入所者や長期入院患者ではさらに高くなる。高齢者の抑うつは, 日常生活における興味や関心の低下, 活力や集中力の低下, 病気や将来への不安の増加を引き起こし, QOLや社会参加を妨げる大きな問題となっている。

一方, 高齢者の増大は認知症患者の増大をももたらしている。図1は性別・年代別の認知症有病率である<sup>2)</sup>。有病率は指数関数的に増加し, 5歳ごとに約2倍となっている。

認知症の発症率も加齢に伴って上昇し, その割合は後期高齢者で高い。我々が1997年から約2300人の地域住民を対象として行っている「国立長寿医療センター研究所・老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)<sup>3)</sup>」では認知症スクリーニング検査であるMMSE(Mini Mental State Examination)を用いて認知症発症を追跡調査しているが, 60歳以上の高齢者では年間約1.5%が新規に認知症を発症している。80歳以上ではその割合は飛躍的に増加し, 毎年4.0%が認知症となる。認知症患者の将来推計は, 用いるデータにより結果が異なるが, 2035年には約380万

---

\* 1 Fujiko Ando 愛知淑徳大学 医療福祉学部 医療貢献学科 教授;

国立長寿医療センター研究所 疫学研究部

\* 2 Hiroshi Shimokata 国立長寿医療センター研究所 疫学研究部 部長

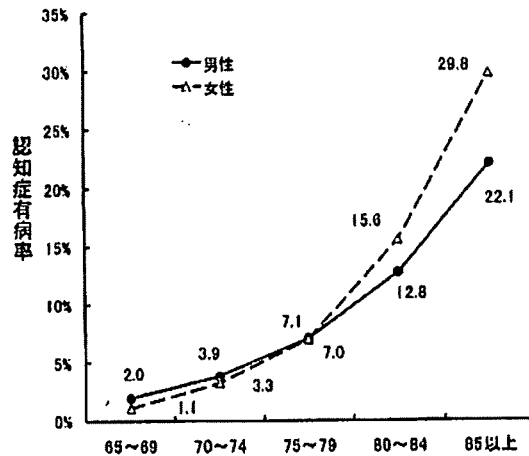


図1 認知症の性別、年齢別有病率  
文献2)より改題

人<sup>4)</sup>から440万人<sup>3)</sup>になると予測されている。

高齢者の抑うつも認知症も、多因子疾患であり、原因は複雑である。しかし食生活は生涯にわたって心身に影響を与え得る環境要因であり、食事・栄養がこれらの疾患に何らかの関連を持つ可能性については長い間国内外で検討されてきた。最近特に抗酸化ビタミンや機能性栄養素との関係についての関心が高まっているが、一定の見解が得られていない。ここではn-3系脂肪酸、特にDHA (Docosahexaenoic acid) と、ポリフェノールの中でも日本人の食生活になじみの深い大豆イソフラボンについて、中高年者の抑うつや認知機能との関係について我々の研究成果も含めて解説する。

## 2 DHAと脳高次機能

DHAは22個の炭素鎖を有する多価不飽和脂肪酸で6個の二重結合を含む、n-3系脂肪酸である。魚油に多く含まれ、日本人中高年者での1日平均摂取量は約550 mgと推定されている<sup>5)</sup>。脳や網膜に多く含まれ<sup>6)</sup>、脳の発達や機能には必須である。DHAは脳細胞の細胞膜のリン脂質に含まれる脂肪酸の主要成分であり、膜の流動性や神経伝達物質の放出に関与すると考えられている。

DHAと認知機能との関係についてはラットによる実験ではかなり詳細に検討されている。たとえば、Chungらの報告<sup>7)</sup>によると胎児期からn-3系脂肪酸欠乏状態で育てたラットと比較して、魚油に由来するn-3系脂肪酸を与えたラットでは空間的学習能力や水迷路試験での得点が高かった。n-3系脂肪酸欠乏ラットでは記憶関連得点が低かったが、魚油を与えると部分的に回復し、

DHAが脳の海馬領域や眼球により強く集積していた。

Oksmanらは、若年ラットに様々なn-6系脂肪酸/n-3系脂肪酸比の食餌を3-4ヶ月与えたところ、DHAを多く含む食餌を与えた群では、脳内のβアミロイド蛋白の沈着が少なく、海馬での活性化マイクログリアが減少し、探索的能力が上昇した、と報告している<sup>8)</sup>。

高齢動物でもDHAの知能に関する効果は報告されており、Jiangらは、高齢マウスにDHAを7週間、50もしくは100 mg/kg/day投与したところ、認知機能の上昇を認めたと報告している<sup>9)</sup>。DHAを与えられたマウスでは、海馬のBDNF (brain-derived neurotrophic factor) 蛋白と、海馬・線条体の一酸化窒素、ドーパミン濃度が上昇しており、DHAの投与はこれらの反応を介して知能に影響を与えた可能性があるとして述べている。

DHAと抑うつとの関係を調べるモデルとして、Levantはα-リノレン酸欠乏食を用いて、大脳皮質のDHAが23-26%少ない未産、産褥期ラットを作製した<sup>10)</sup>。未産、経産の有無にかかわらず、脳内DHA欠乏ラットでは、海馬でのBDNF遺伝子の出現が減少し、ストレスに対するコルチコステロンの分泌が上昇していた。未産ラットの前頭葉でのDHA、セロトニン濃度と代謝速度は対象群と比較して低下していた。さらに産褥期のDHA欠乏ラットでは対象群と比較して、脳内のDHA濃度が減少、海馬での5-HA受容体数が増加し、ストレスに対するコルチコステロンの反応増大や、強制水泳試験での動けなくなるまでの時間の短縮が認められた。これらの結果から脳内DHAの減少、特に産褥期のDHAの減少とラットの神経生物学的な反応との関係はヒトにおける抑うつ、特に産褥期うつ病のモデルになるのでは、と彼らは述べている。

このように動物実験においては、n-3系脂肪酸、特にDHAと脳機能との関係について肯定的な研究結果が多いが、ヒトにおける報告はより複雑であり、いまだ一定の見解が得られていない。

Kalmijnらは1997年に5,386人の非認知症中高年者(55歳以上)を対象とした平均2.1年間の追跡調査の結果として総脂質の摂取は認知症発症リスクを高め(相対危険率2.4, 95%信頼区間1.1-5.2)、一方魚油の摂取は認知症の発症を抑制し(RR=0.4 (0.2-0.91))、その効果は特にアルツハイマー病で強かった(RR=0.3 [0.1-0.9])と報告している<sup>11)</sup>。

Samieriらは血中不飽和脂肪酸が、抑うつとは独立したアルツハイマー病の危険因子であるかどうかを検討している<sup>12)</sup>。認知機能障害のない高齢者(年齢確認のこと)1,214人を平均4年間追跡したところ、65人が認知症になった。EPA (Eicosapentaenoic acid) は抑うつやその他の関連要因を調整しても、予防因子として働いていた(EPA 1標準偏差あたりのハザード比0.69, 95%信頼区間0.48-0.98)。DHAやn-3系脂肪酸総量とは有意な関係は認められなかった。AA (Arachidonic acid) /DHA比、n-6/n-3比が高いことは、抑うつのある対象者の中では認知症の危険因子となっていた。

一方Laurinらは65歳以上の高齢者を平均5年間追跡し、血清不飽和脂肪酸濃度と認知障害や認知症の発症との関係を検討している<sup>13)</sup>。横断的な検討では血清不飽和脂肪酸濃度は認知障害や認知症とは関連していなかったが、縦断的な検討では、認知機能障害発生群ではむしろベースラインでの血中EPA濃度が高く、また認知症発症群ではn-3系脂肪酸濃度が有意に高く、DHAも高い傾向を認めたという。

その他、うつ病患者では血漿リン脂質中におけるn-3系多価脂肪酸の欠乏が見られるという報告<sup>14)</sup>や魚摂取量の多い国ではうつの頻度が低いという報告<sup>15)</sup>があり、中枢神経系の細胞膜のn-3/n-6比の低下が神経内分泌や受容体の性状に影響を与える可能性が指摘されている。

前述したNILS-LSAではほぼ全数の対象者に3日間秤量食事調査を中心とした栄養調査を行っている。筆者らは平成11年度から13年度まで、厚生労働省科学研究費の研究班「高齢者の抑うつと栄養に関する疫学的研究」<sup>16)</sup>を組織し、3日間の食事秤量記録調査の結果をもとに4訂日本食品標準成分表掲載のすべての食品群と栄養素、さらには脂肪酸とアミノ酸についてはそれぞれのデータベースを用いて栄養と抑うつとの関係について網羅的に検討した。横断的な解析では多くの食品群、栄養素について抑うつとの関係が認められた<sup>17)</sup>が、初回調査時に抑うつの認められなかった65歳以上の高齢者を対象とした2年間の縦断研究においては男性では魚介類脂肪、ビタミンD摂取が抑うつ発症を有意に抑制していた(表1)<sup>18)</sup>。この結果からは魚介類脂肪摂取量が1標準偏差(2.5g/日)上昇するごとに抑うつ発症のリスクは約1/3になると考えられた。一方、抑うつ発症リスクが有意に高かったのは、獣鳥肉類とアラキジン酸であった。魚介類脂肪

表1 2年後の抑うつ(有/無)を目的変数としたロジスティック分析(ステップワイズ法) 18種の食品群、98栄養素について網羅的に解析した結果、男性において魚介類脂肪、ビタミンD、アラキジン酸、獣鳥肉類のみが有意な結果を示した。

	Odds 比 (1 s.d.あたり)	95%信頼区間	p
男性			
魚介類脂肪	0.308	0.105-0.908	<0.05
ビタミンD	0.361	0.137-0.950	<0.05
アラキジン酸	1.660	1.016-2.712	<0.05
獣鳥肉類	2.261	1.154-4.431	<0.05
女性			
(有意な項目無し)			

(初回調査時に抑うつがなかった者を対象とし、年齢、初回時CES-D得点、老研式生活活動度指標、喫煙、自覚的健康度、就業、家庭内収入、学歴、HDLコレステロール、アルカリフォスファターゼ、遊離T3、甲状腺刺激ホルモン、血小板数、BMIを調整した。)

## 第1章 DHA, イソフラボン摂取と脳の高次機能

摂取量3分位でCES-Dによる抑うつ得点（食欲を除いた19項目の得点）を、背景要因を調整して比較した結果、摂取量上位の1群が、その他の2群より有意に抑うつ得点が低く、そのカットオフポイントは4.8 g/日であった（図2）。この値は鯖に換算すれば約30 g/日、鰹では70 g/日であり、魚介類を摂取する時のサイズとしては一回量、もしくはそれ以下である。従って毎日、あるいは2日に1回、魚を食べることによって、ある程度の抑うつ予防効果を期待することができると思われる。

このように観察研究や患者対象研究ではn-3系脂肪酸の脳機能への効果を認める報告が多いが、一方、介入試験では否定的な報告が多い。

Freund-Leviらは204人のアルツハイマー病患者（平均年齢74歳で、MMSE15点以上）をDHA（1.7 g/日）とEPA（0.6 g/日）を投与する群と対象群に無作為割付けした。6ヶ月間服用後、MMSEやCDRで認知機能を判定したが両群に有意な差は認められなかった。ただしMMSEが27点より高い、軽度認知機能障害の群ではDHAとEPAの投与群ではMMSEの低下率が有意に小さかった、と報告している<sup>19)</sup>。

65歳以上の地域住民302人をEPA + DHA1800 mg/day, 400 mg/day, プラセボの3群に無作為二重盲検法で割付け、それぞれを26週間服用させた研究<sup>20)</sup>では、EPA + DHAの血中濃度は、EPA + DHA服用群で服用前よりそれぞれ238%, 52%上昇した。しかし抑うつなどの心理的健康関連検査結果は服用前、服用開始後13週、26週において有意差を示さなかった。

このように動物実験では不飽和脂肪酸、特に魚油やDHAの脳機能に対する効果は明らかであり、また疫学研究においても横断的研究や観察研究では効果があるとするものが多い。その一方で、介入研究では否定的な見解が多いのはなぜだろうか。

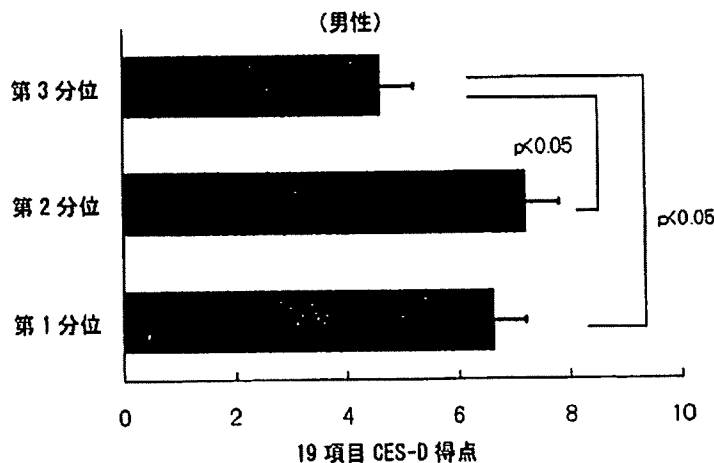


図2 魚介類脂肪摂取量3分位での19項目CES-D得点  
初回調査時の19項目CES-D得点を、年齢、背景要因を調整して多重比較した。

ひとつの理由は研究による介入期間が相対的に短いことである。食事は、ヒトにとって最も長期間曝露している環境要因である。中高年者はすでに数十年の食習慣要因に曝露しており、その影響を半年程度の介入で打ち消すことは難しい。第二に、介入要因以外の要因の統制を取ることがヒトでは困難である。脳の高次機能に対して、心理社会的要因の影響は食事の影響よりも大きいと考えられるが、介入期間中の対象者の心理社会的要因を統制することは不可能に近い。一方で、ヒトを対象とした観察研究では、DHAを摂取している状況の背景に「好ましい食習慣」があることを忘れてはならない。DHAを多く摂取しているヒトではEPAや魚由来の脂肪酸、タンパク質が多く摂取されており、また、我が国でいえば豆腐などの大豆製品、野菜、果物、米を摂取する頻度が高い、いわゆる日本食好みである。また、このような「健康的な食習慣」を指向する、健康意識や経済水準の高い群である可能性もある。このような食習慣（食べ合わせ）、ライフスタイルの影響を完全に統制することは困難である。従って、観察研究ではDHA摂取効果の有意な結果が出やすく、介入研究では有意な結果が出にくくなっていると考えられる。

植木らは高齢一般地域住民を対象とした調査で1年後のMMSEが改善する群では低下群と比較して、総蛋白、魚介類、n-3系不飽和脂肪酸の摂取量が多かったと報告している<sup>21)</sup>。しかしさらに重要なことは、改善群は悪化群に比して、総摂取エネルギー、カルシウム、亜鉛、総脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、コレステロールなど多くの栄養素にわたって摂取量が多く、逆に総摂取エネルギーに占める砂糖類や菓子類の比率が低かったことであると述べ、品数が多く何でも食べることが高齢者の認知機能により影響を与えるのではないかとまとめている。

### 3 イソフラボンと脳高次機能

酸素呼吸は生体にエネルギーをもたらすが、同時に酸化反応の過程で産生される活性酸素は、DNAや細胞膜に障害を与える酸化ストレスとなる。近年、食品中の抗酸化物質が老化や動脈硬化、発癌などの予防に効果があるのではないかと期待されている。

イソフラボンはポリフェノール的一种であるフラボノイド類に属する。大豆イソフラボンのダイゼニン、ゲニステインには抗酸化作用があるほか、その骨格がエストロゲン類似であることから、エストロゲン様作用をも有する。女性では閉経後の血清女性ホルモン低下とともに骨粗鬆症、認知機能低下などの老化過程が加速することが知られており<sup>22)</sup>、ホルモン補充療法や大豆イソフラボンの摂取に認知症予防効果や認知機能低下を防ぐ作用があることが期待され、近年多くの研究がなされている。

動物実験ではLeeらが雄ラットにイソフラボンを16週間投与した群では対照群と比較して、コリン作動性神経系に有意な変化が認められ、空間認識が良好で、加齢変化による神経細胞の減少

が少なかったと報告している<sup>23)</sup>。

心血管疾患の日系人コホートとして有名なホノルルハーとスタディのデータを用いて、Whiteらは中年期に豆腐を多く摂取していた男性では高齢期の認知機能が低く、脳室の開大が認められたと報告している<sup>24)</sup>。しかしこの研究ではベースラインでの認知機能の調査がなされておらず、今日ではこの結果に対しては懐疑的な意見が多い。

介入研究では閉経後の女性に大豆サプリメントを6週間与えたところ、非言語性短期記憶や前頭葉機能検査で有意な効果が得られたという報告<sup>25)</sup>や若い女性に1週間で900グラムの大豆を摂取させたところ、いくつかの認知機能テストの改善が認められた<sup>26)</sup>という報告がある一方で、最近の無作為割付二重盲検法による介入試験では効果があるとする報告<sup>27)</sup>、効果がなかったとする報告<sup>22, 28)</sup>、認知機能に対して一部悪影響を認めたとする報告<sup>29)</sup>が混在している。

脳機能に対するイソフラボンの効果の文献レビューにおいてもその効果に期待はよせるものの、十分なエビデンスが得られていないとするものが多い<sup>30~32)</sup>。Leeらは大豆イソフラボンの認知機能に対する効果についていくつかの論文をまとめて、女性では有効な効果があるが男性ではその効果は一定せず、女性での認知機能に対する効果はエストロゲン受容体を介しての効果と特にゲニステインによるチロシンキナーゼ抑制効果が関係するのではないかと述べている<sup>32)</sup>。

### 4 DHAとイソフラボンの脳機能に対する相加作用, 相乗作用

ここまで概観してきたように機能性食品の中でも魚油などに含まれるドコサヘキサエン酸(DHA)は脳機能を改善することが少なくとも動物実験では明らかであるが、ヒトでの効果についての報告は一定しない。イソフラボンについては研究が始まってからの歳月が短いこともあり、まだ一定の見解が得られていないのが実情である。

このように単一の栄養素の効果が一定しないことの理由の一つに、脳機能に関係する栄養素間の交互作用が考えられる。たとえばDHAは不飽和脂肪酸であり、酸化を受け易く不安定である。実際にEPAやDHAを多く摂取している者では血清中の過酸化脂質が高い。過酸化した不飽和脂肪酸は神経細胞やDNAに対して有害作用を示すと考えられる。すなわちn-3系脂肪酸摂取は高次脳機能保持に予防的に働く可能性があると同時に、生体の抗酸化機能が低下している状況では神経細胞毒として働く可能性があるのである。食品の抗酸化物質には生体の抗酸化防御系を補う作用があり、DHAとの同時摂取によりその安定化に寄与する可能性がある。

筆者らは農林水産省の班研究において、中高年者の推定IQに対するDHAと大豆イソフラボン摂取の効果について検討している(平成16年-18年度農林水産省 食品の安全性及び機能性に関する総合研究「多価不飽和脂肪酸とポリフェノール類の相乗作用によるヒト痴呆症の防御に関する



る研究」研究代表者 丸山和佳子)。NILS-LSAの第1次～第4次調査の縦断データを用い、性、年齢、総摂取エネルギーを調整して検討した結果、DHA摂取、大豆イソフラボン摂取は単独でも地域在住中高年者の推定IQに影響を及ぼしていた。DHAに関しては摂取量の第5分位群は、その他の群と比較して有意に推定IQが高かったが、その差はわずか0.6点であった(図3)。大

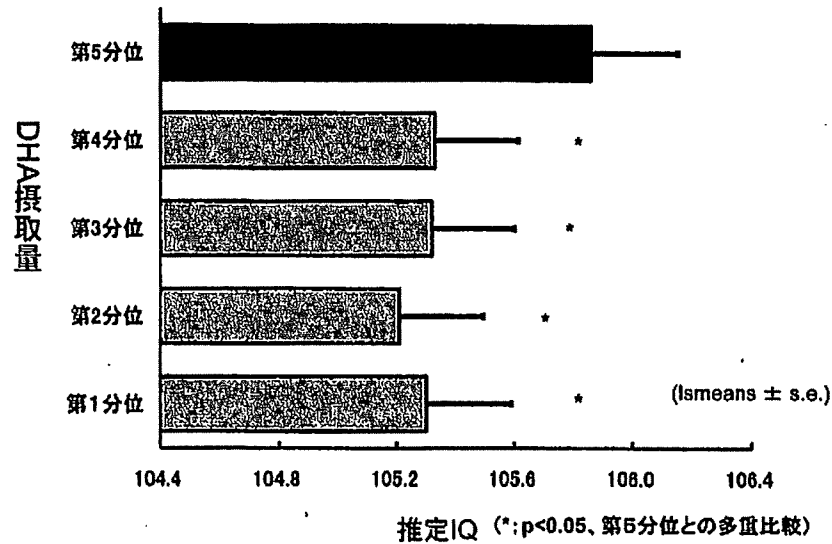


図3 DHA摂取の推定IQに対する単独効果  
(性、年齢、総摂取エネルギーを調整したMixed Effect Modelによる)  
DHA摂取量が最も多い群ではそれ以外の群に比較して推定IQが0.6点高かった。

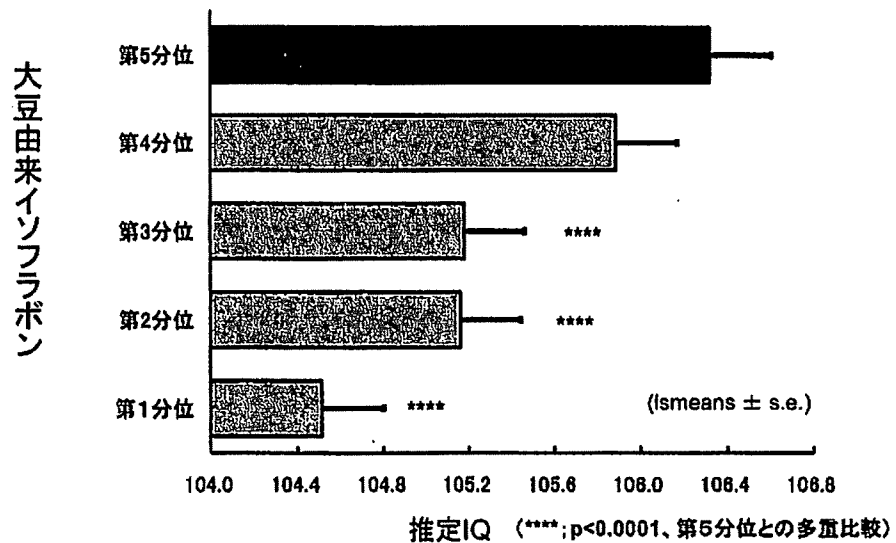


図4 大豆由来イソフラボン摂取の推定IQに対する単独効果  
(性、年齢、総摂取エネルギーを調整したMixed Effect Modelによる)  
大豆由来イソフラボノイドはdose dependentに推定IQに対する効果を示した。

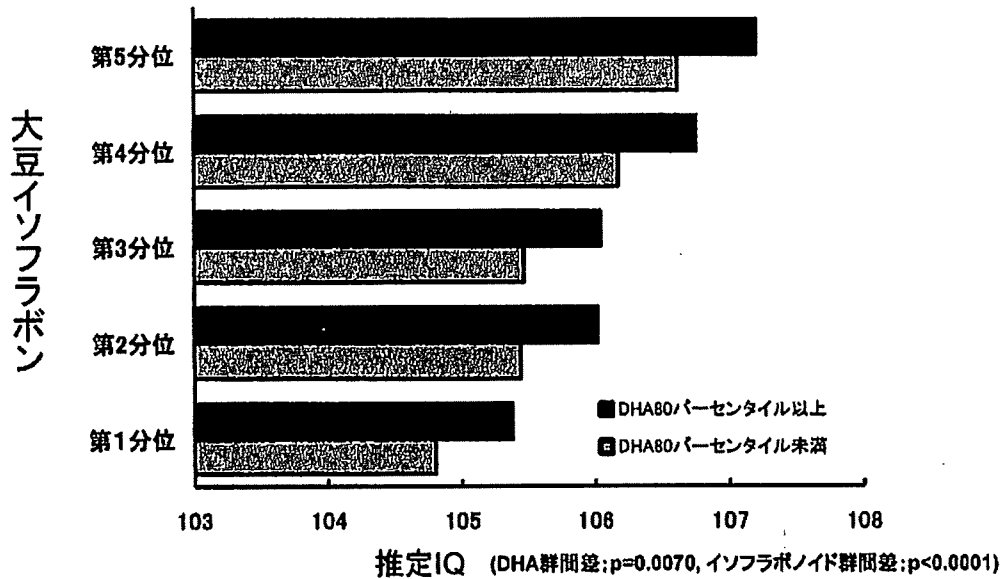


図5 大豆由来イソフラボン・DHA摂取の推定IQに対する相加効果  
 (性, 年齢, 総摂取エネルギーを調整したMixed Effect Modelによる)  
 大豆由来イソフラボン第5分位/DHA80パーセンタイル以上の群は最も  
 低い群と比較すると推定IQは2.4点高い。

豆由来イソフラボン摂取の単独効果は濃度依存性であり、図4に示すように、第5分位群は第1～第3分位群と比較して有意に推定IQが高かった。第1分位と第5分位の推定IQの差は1.8点であった。さらにイソフラボンの5分位をそれぞれ、DHA80パーセンタイル以上群と未満群に分けて推定IQを比較したのが図5である。どの分位においてもDHA摂取量が多い群で推定IQはより高く、第1分位のDHA摂取量が少ない群と第5分位のDHA摂取量が多い群を比較すると推定IQの差は2.4点であった。DHAと大豆イソフラボンとの間に、推定IQに対する交互作用(相乗効果)は認められなかったものの、相加作用が示された。

## 5 まとめ

脳の高次機能は神経のネットワーク、神経伝達物質の分泌、細胞膜の性状や細胞内代謝など多くの要因により階層的に複雑に構成されており、また、特にヒトにおいては心理社会的要因に大きく影響を受ける。DHAは神経細胞の主要構成脂肪酸として細胞膜の流動性や神経内分泌を介して、また大豆イソフラボンはその女性ホルモン類似作用や抗酸化作用を介して、認知障害や抑うつ発生の抑制的に働くことが期待されるが、確かな結論を得るためにはより大規模な観察研究や長期間にわたる介入研究が必要と考えられる。

文 献

- 1) 厚生統計協会編, 国民衛生の動向・厚生 の指標 臨時増刊, 55(9), 53-54 (2008)
- 2) 柄澤昭秀, 老人性痴呆の疫学—痴呆の出現率を中心に, 老人性痴呆 (琵琶湖長寿科学実行委員会編) 別冊総合ケア, 医歯薬出版, p21-29 (1993)
- 3) Shimokata H, Ando F, Niino N, A new comprehensive study on aging — the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA), *J Epidemiol* 10 (Suppl 1), S1-S9 (2000)
- 4) 厚生労働省, 平成19年度版厚生労働白書, p19 (2007)
- 5) 厚生労働科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業「老化とその要因に関する長期縦断的疫学研究」総合報告書 (平成17年度-平成19年度) 第2巻, p855 (2008)
- 6) Hisamoto M, Hossain S, Shimada T, Sugioka K, Yamasaki H, Fujii Y *et al.*, Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats, *J. Neurochem.*, 81, 1084-91 (2002)
- 7) Chung WL, Chen JJ, Su HM, Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels, *J. Nutr.*, Jun, 138(6), 1165-71 (2008)
- 8) Oksman M, Iivonen H, Hogyes E, Amtul Z, Penke B, Leenders I, Broersen L, Lütjohann D, Hartmann T, Tanila H, Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice, *Neurobiol Dis.*, Sep, 23(3), 563-72 (2006)
- 9) Jiang LH, Shi Y, Wang LS, Yang ZR, The influence of orally administered docosahexaenoic acid on cognitive ability in aged mice, *J. Nutr. Biochem.*, (2008)
- 10) Levant B, Ozias MK, Davis PF, Winter M, Russell KL, Carlson SE, Reed GA, McCarson KE, Decreased brain docosahexaenoic acid content produces neurobiological effects associated with depression: Interactions with reproductive status in female rats, *Psychoneuroendocrinology*, Oct, 33(9), 1279-92 (2008)
- 11) Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM, Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study, *Ann. Neurol.*, Nov, 42(5), 776-82 (1997)
- 12) Samieri C, Féart C, Letenneur L, Dartigues JF, Pérès K, Auriacombe S, Peuchant E, Delcourt C, Barberger-Gateau P, Low plasma eicosapentaenoic acid and depressive symptomatology are independent predictors of dementia risk, *Am. J. Clin. Nutr.*, Sep, 88(3), 714-21 (2008)
- 13) Laurin D, Verreault R, Lindsay J, Dewailly E, Holub BJ, Omega-3 fatty acids and risk of cognitive impairment and dementia, *J. Alzheimers. Dis.*, Aug, 5(4), 315-22 (2003)
- 14) Maes M, Christophe A, Delanghe J, Altamura C, Neels H, Meltzer HY, Low omega3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients, *Psychiatry Res.*, 85(3), 275-91 (1999)
- 15) Hibbeln JR, Salem N Jr, Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when

- cholesterol does not satisfy, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1-9 (1995)
- 16) 安藤富士子, 高齢者の抑うつと栄養に関する疫学的研究—横断的ならびに縦断的解析結果—, 平成11~13年度厚生科学研究補助金 長寿科学総合研究事業「高齢者の抑うつと栄養に関する疫学的研究」総合報告書 (2002.3)
  - 17) 安藤富士子, 中高年者の栄養素摂取量と抑うつに関する研究, 平成11年度厚生科学研究補助金 長寿科学総合研究事業「高齢者の抑うつと栄養に関する疫学的研究」分担報告書 (2000.3)
  - 18) 安藤富士子, 地域在住高齢者の抑うつに栄養摂取が及ぼす影響についての縦断的検討, 平成13年度厚生科学研究補助金 長寿科学総合研究事業「高齢者の抑うつと栄養に関する疫学的研究」分担報告書 (2002.3)
  - 19) Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jönhagen M, Cederholm T, Basun H, Faxén-Irving G, Garlind A, Vedin I, Vessby B, Wahlund LO, Palmblad J, Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial, *Arch. Neurol.*, Oct, 63(10), 1402-8 (2006)
  - 20) van de Rest O, Geleijnse JM, Kok FJ, van Staveren WA, Hoefnagels WH, Beekman AT, de Groot LC, Effect of fish-oil supplementation on mental well-being in older subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Am. J. Clin. Nutr.*, Sep 88(3), 706-13 (2008)
  - 21) 植木彰, 認知症の予防と治療—生活習慣の意義—食習慣, *Advances in Aging and Health Research 2006*, 長寿科学財団, 愛知, 27-33 (2007)
  - 22) Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Grobbee DE, de Haan EH, Aleman A, Lampe JW, van der Schouw YT, Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial, *JAMA*, Jul 7, 292(1), 65-74 (2004)
  - 23) Lee YB, Lee HJ, Won MH, Hwang IK, Kang TC, Lee JY, Nam SY, Kim KS, Kim E, Cheon SH, Sohn HS, Soy isoflavones improve spatial delayed matching-to-place performance and reduce cholinergic neuron loss in elderly male rats, *J. Nutr.*, Jul, 134(7), 1827-31 (2004)
  - 24) White LR, Petrovitch H, Ross GW, Masaki K, Hardman J, Nelson J, Davis D, Markesbery W, Brain aging and midlife tofu consumption, *J. Am. Coll. Nutr.*, Apr, 19(2), 242-55 (2000)
  - 25) File SE, Hartley DE, Elsabagh S, Duffy R, Wiseman H, Cognitive improvement after 6 weeks of soy supplements in postmenopausal women is limited to frontal lobe function, *Menopause*, Mar, 12(2), 193-201 (2005)
  - 26) Celec P, Ostatníková D, Cagánová M, Zuchová S, Hodosy J, Putz Z, Bernadic M, Kúdela M, Endocrine and cognitive effects of short-time soybean consumption in women, *Gynecol. Obstet. Invest.*, 59(2), 62-6 (2005)
  - 27) Kritz-Silverstein D, Von Mühlen D, Barrett-Connor E, Bressel MA, Isoflavones and cognitive function in older women: the Soy and Postmenopausal Health In Aging (SOPHIA) Study, *Menopause*, May-Jun, 10(3), 196-202 (2003)

- 28) Jorissen BL, Brouns F, Van Boxtel MP, Ponds RW, Verhey FR, Jolles J, Riedel WJ. The influence of soy-derived phosphatidylserine on cognition in age-associated memory impairment. *Nutr. Neurosci.*, 4(2), 121-34 (2001)
- 29) Fournier LR, Ryan Borchers TA, Robison LM, Wiediger M, Park JS, Chew BP, McGuire MK, Sclar DA, Skaer TL, Beerman KA. The effects of soy milk and isoflavone supplements on cognitive performance in healthy, postmenopausal women. *J. Nutr. Health Aging.* Mar-Apr, 11(2), 155-64 (2007)
- 30) Zhao L, Brinton RD. WHI and WHIMS follow-up and human studies of soy isoflavones on cognition. *Expert Rev. Neurother.*, Nov, 7(11), 1549-64 (2007)
- 31) Cooke GM. A review of the animal models used to investigate the health benefits of soy isoflavones. *J. AOAC Int.*, Jul-Aug, 89(4), 1215-27 (2006)
- 32) Lee YB, Lee HJ, Sohn HS. Soy isoflavones and cognitive function. *J. Nutr. Biochem.*, Nov, 16(11), 641-9 (2005)

## Synergistic interaction of cigarette smoking and alcohol drinking with serum carotenoid concentrations: findings from a middle-aged Japanese population

Minoru Sugiura<sup>1\*</sup>, Mieko Nakamura<sup>2</sup>, Kazunori Ogawa<sup>1</sup>, Yoshinori Ikoma<sup>1</sup>, Hikaru Matsumoto<sup>1</sup>, Fujiko Ando<sup>3</sup>, Hiroshi Shimokata<sup>4</sup> and Masamichi Yano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Team for Health Benefit of Fruit, National Institute of Fruit Tree Science, 485-6 Okitsunaka-cho, Shimizu-ku, Shizuoka 424-0292, Japan

<sup>2</sup>Department of Community Health and Preventive Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan

<sup>3</sup>Department of Community Care Philanthropy, Aichi Shukutoku University, 23 Sakuragaoka, Chigusa-ku, Nagoya 464-8671, Japan

<sup>4</sup>Department of Epidemiology, National Institute for Longevity Sciences, 36-3 Gengo, Morioka-cho, Obu, Aichi 474-8522, Japan

(Received 16 October 2008 – Revised 31 March 2009 – Accepted 1 April 2009 – First published online 19 May 2009)

Previous studies have indicated low serum carotenoid concentrations among cigarette smokers and/or alcohol drinkers, but little is known about the interaction of smoking and drinking with serum carotenoids. We tested the hypothesis that smoking and drinking reduce serum carotenoid concentrations synergistically. A total of 1073 subjects (357 male and 716 female) who had received health examinations in the town of Mikkabi, Shizuoka Prefecture, Japan, participated in the study. The subjects were divided into six groups according to alcohol intake (non-drinkers, <1 g/d; light drinkers,  $\geq 1$ , <25 g/d; moderate-to-heavy drinkers,  $\geq 25$  g/d) and smoking status (non-smokers and current smokers). The dietary intakes and serum concentrations of six carotenoids (lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lutein,  $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin) within each group were evaluated cross-sectionally. The dietary intakes of all carotenoids did not differ in the six groups after adjusting for age and sex. The multivariate-adjusted means of the serum carotenoid concentrations in non-drinkers did not differ between non-smokers and current smokers. In contrast, the adjusted means of serum  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin were significantly lower than those with increased alcohol intake, and these lower serum carotenoids among alcohol drinkers were more evident in current smokers than in non-smokers. Serum lycopene of moderate-to-heavy drinkers was significantly lower than that of non-drinkers, but it was not influenced by smoking. Neither smoking nor drinking was associated with the serum concentrations of lutein and zeaxanthin. These results suggest that smoking and drinking may reduce the serum  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin concentrations in a synergistic manner.

### Carotenoids: Smoking: Alcohol drinking: Cross-sectional studies

Antioxidant micronutrients, such as vitamins and carotenoids, exist in abundance in fruit and vegetables and have been known to contribute to the body's defence against reactive oxygen species<sup>(1,2)</sup>. Numerous epidemiological studies have demonstrated that a high dietary consumption of fruit and vegetables rich in carotenoids or with high serum carotenoid concentrations results in lower risks of certain cancers, diabetes and CVD<sup>(3–8)</sup>. These epidemiological studies have suggested that antioxidant carotenoids may have a protective effect against these diseases.

On the other hand, active smokers are exposed to reactive free radicals that are present in cigarette smoke<sup>(9,10)</sup>. Therefore, smoking is a potent oxidative stress in humans<sup>(11–13)</sup>. Furthermore, alcohol drinking also induces reactive oxygen species during its metabolism in the liver<sup>(14–16)</sup>. Oxidants and free radicals induced by cigarette smoking and/or alcohol drinking can cause damage to lipids, proteins, DNA,

carbohydrates and other biomolecules<sup>(17,18)</sup>. In such circumstances, antioxidant micronutrients, such as carotenoids, may play important roles in defending against oxidative stress by efficiently quenching the production of singlet oxygen and free radicals. Numerous epidemiological studies have shown that serum carotenoid concentrations were low among cigarette smokers and alcohol drinkers<sup>(19–31)</sup>. However, there is limited information about the synergistic interaction of cigarette smoking and alcohol drinking with serum carotenoid concentrations. The major serum carotenoids are lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lutein,  $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin, and they account for more than 90 % of the circulating carotenoids in humans<sup>(32)</sup>. However, the differences in the change among these six major serum carotenoid concentrations against oxidative stress induced by cigarette smoking and alcohol drinking have not been thoroughly studied while controlling for dietary carotenoid concentrations.

\* Corresponding author: Dr Minoru Sugiura, fax +81 543 69 2115, email msugiura@affrc.go.jp

The present study aimed to investigate the interaction of cigarette smoking and alcohol drinking with the serum concentrations of the following main six carotenoid concentrations, i.e. lutein, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin. The synergistic interaction of cigarette smoking and alcohol drinking with serum carotenoid concentrations was evaluated cross-sectionally.

## Subjects and methods

### Subjects

Data used in the present study were derived from health examinations of residents of the town of Mikkabi, Shizuoka Prefecture, Japan, aged from 30 to 70 years, in 2003 and 2005. Mikkabi is located in western Shizuoka, and about 40% of its residents work in agriculture. In 2003, a total of 1979 males and females were subjects for the health examination. As a result, 1448 participants (73.2% of the total) received a health examination. Informed consent was obtained from the 886 subjects (302 male and 584 female) recruited for the present study. The response rate was 61.2%. In 2005, a total of 1891 males and females were subjects for the health examinations. As a result, 1369 participants (72.4% of total subjects) underwent such an examination. Participants who had received the health examination in 2005 were further recruited for the present study, and informed consent was newly obtained from 187 subjects (fifty-five male and 132 female). As a result, a total of 1073 subjects were included in this survey.

In the present study, the following subjects were excluded from the data analysis: (1) those for whom the self-administered questionnaire data were incomplete; and (2) those for whom blood samples for serum carotenoid analysis were not collected. As a result, a total of 354 male and 715 female subjects were included for further data analysis.

### Measurements

Blood samples were obtained in the morning after overnight fasting. Serum was separated from blood cells by centrifugation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis of the serum carotenoid concentrations. The concentrations of six serum carotenoids (lutein, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin) were analysed by reverse-phase HPLC using  $\beta$ -apo-8'-carotenal as an internal standard at the laboratory of Public Health and Environmental Chemistry, Kyoto Biseibutsu Kenkyusho (Kyoto, Japan), as described previously<sup>(33)</sup>. The serum total cholesterol was measured using an autoanalyser using a commercial kit (Determiner TC-II C for serum total cholesterol; Kyowa-Medics, Inc., Tokyo, Japan) at the laboratory of the Seirei Preventive Health Care Centre (Shizuoka, Japan). Height and body weight were measured by trained public health nurses. BMI was calculated as the body weight (kg) divided by the height ( $\text{m}^2$ ).

### Lifestyle assessment and dietary data analysis

A self-administered questionnaire was used to collect lifestyle information, including tobacco use (current smoker, ex-smoker, or non-smoker), exercise (weekly participation),

regular alcohol intake (one or more times per week) and dietary habits. The assessment of diet was a modification of the validated self-administered 121-item simple FFQ developed especially for the Japanese by Wakai and colleagues<sup>(34,35)</sup>. Information about alcohol consumption from Japanese *sake*, beer, *shochu*, wine and whisky, and the daily intake of eighteen nutrients from foods were estimated from monthly food intake frequencies with either standard portion size (for most types of food) or subject-specified usual portion size (for rice, bread, and alcoholic and non-alcoholic beverages) using the FFQ analysis software package for windows (Food Frequency Questionnaire System; System Supply Co., Ltd, Kanagawa, Japan). This FFQ analysis software computes an individual's food and nutrient intake from FFQ data on the basis of the Standard Tables of Food Composition in Japan<sup>(36)</sup>. The dietary carotenoid intakes of each individual were computed to obtain the amount of six carotenoids (lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lutein,  $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin) using a published database of the carotenoid composition of fruit and vegetables<sup>(37,38)</sup>. In our survey, we calculated an individual's carotenoid intake from important sources of carotenoids. In this data analysis, the dietary carotenoid intakes were calculated from the FFQ data of each individual's food items, not dishes. The dietary intakes of six carotenoids and total energy intake of all subjects were used in the present report.

### Statistical analysis

The dietary intakes and serum concentrations of carotenoids were skewed toward higher concentrations. These values were log (natural)-transformed to improve the normality of their distribution. The *t* test was used to compare the means of continuous variables in two groups. The  $\chi^2$  test was used to compare the rates of categorical variables in two groups. All variables were presented as an original scale. The data are expressed as the mean values and standard deviations, geometric mean values with 95% CI, range, or percentages. In order to examine the relationship of independent variables with each serum carotenoid concentration, multiple regression analysis was performed with sex, age, BMI, smoking status, ethanol intake, serum total cholesterol, total energy intake excluding ethanol, and dietary intakes of respective carotenoids included always in the models as independent variables. The subjects were divided into three groups stratified by alcohol intake levels defined as non-drinker ( $<1$  g ethanol per d), light drinker ( $\geq 1$  to  $<25$  g ethanol per d) and moderate and heavy drinkers ( $\geq 25$  g ethanol per d) because one glass of Japanese *sake* (180 ml) or one bottle of beer (633 ml), which are major alcohol beverages and widely consumed in Japan, commonly contains about 25 g alcohol. In our study population, the number of ex-smokers was ninety-seven (9.1% among the study population) from the self-administered questionnaire. However, in our survey, we did not collect data on time since last smoking. Therefore, ex-smokers were included in the non-smokers group. All subjects were categorised into six groups according to daily alcohol intake (non-drinkers,  $<1$  g/d; light drinkers,  $\geq 1$  to  $<25$  g/d; moderate-to-heavy drinkers,  $\geq 25$  g/d) and smoking status (current smokers and non-smokers, including ex-smokers). The multivariate adjusted mean of the dietary intakes and serum concentrations

of six carotenoids were calculated after adjusting for confounding factors. Differences in the multivariate adjusted mean of the dietary intakes and serum concentrations of six carotenoids among each group were tested by Bonferroni multiple comparison.

In our study population, the subjects who take carotenoid supplements were only 0.2% among the study population. Therefore, we did not take account of carotenoid intake from supplements in the data analysis. The detection limit for the serum lycopene concentration for the method used in the study was 0.04 µg/ml (0.075 µmol/l), and values below the limit of detection of the assay were marked as 0.03 µg/ml (0.056 µmol/l) in the analysis. Each of the detection limits of other carotenoids was 0.02 µg/ml. In our survey, except for lycopene, there was no subject whose serum concentration of carotenoid was under the limit of detection. All statistical analyses were performed using the statistical software package SPSS for Windows (version 12.0J; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) on a personal computer.

#### Ethical approval

The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects were approved by the ethics committee of the National Institute of Fruit Tree Science and the Hamamatsu University School of Medicine. Written informed consent was obtained from all subjects.

#### Results

Table 1 shows the characteristics of the study subjects stratified by sex. The dietary carotenoid intakes, excluding β-cryptoxanthin, were significantly higher in female than in male subjects. The serum carotenoid concentrations, excluding zeaxanthin, were significantly higher in female than in male subjects. The rates of current smokers and regular alcohol drinkers were higher in male than in female subjects.

**Table 1.** Characteristics of the study subjects  
(Geometric means and 95% confidence intervals, mean values and standard deviations or percentages)

	Male (n 354)		Female (n 715)	
	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI
Age (years)				
Mean	56.3		54.6**	
SD	9.7		10.1	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )				
Mean	23.5		22.6***	
SD	2.9		3.1	
Total cholesterol (mmol/l)				
Mean	5.31		5.61***	
SD	0.86		0.90	
Total energy intake (kJ/d)				
Including ethanol				
Mean	9128.9		8370.0***	
SD	2277.4		2362.8	
Excluding ethanol				
Mean	8380.4		8319.1	
SD	2152.0		2364.8	
Ethanol intake (g/d)				
Mean	26.9		1.6***	
SD	31.2		4.9	
Dietary carotenoid intakes (mg/d)				
Lycopene	0.05	0.04, 0.06	0.07**	0.06, 0.08
α-Carotene	0.11	0.10, 0.12	0.24***	0.23, 0.26
β-Carotene	1.06	0.99, 1.13	1.70***	1.62, 1.77
Lutein	1.38	1.30, 1.47	1.92***	1.84, 2.00
β-Cryptoxanthin	0.30	0.25, 0.37	0.31	0.27, 0.37
Zeaxanthin	0.59	0.55, 0.65	0.70***	0.67, 0.75
Serum carotenoid concentrations (µmol/l)				
Lycopene	0.21	0.19, 0.23	0.31***	0.29, 0.33
α-Carotene	0.10	0.10, 0.11	0.15***	0.14, 0.16
β-Carotene	0.40	0.38, 0.43	0.74***	0.71, 0.77
Lutein	0.52	0.50, 0.55	0.57**	0.55, 0.58
β-Cryptoxanthin	1.03	0.93, 1.14	1.46***	1.37, 1.55
Zeaxanthin	0.22	0.22, 0.23	0.23	0.22, 0.23
Habitual exercise (%)‡	22.1		23.2	
Current smoker (%)	33.1		1.4†††	
Regular alcohol intake (%)‡	60.5		9.4†††	

Mean value was significantly different from that for the male subjects: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's *t* test).

††† Percentage was significantly different from that for the male subjects ( $P < 0.001$ ;  $\chi^2$  test).

‡ One or more times/week.



Next, in order to examine the relationship of independent variables with each serum carotenoid concentration, multiple regression analysis was performed; sex, age, BMI, smoking status, ethanol intake, serum total cholesterol, total energy intake excluding ethanol, and dietary intakes of carotenoids were always included in the models as independent variables (Table 2). All six serum carotenoid concentrations were significantly associated with the dietary intakes of carotenoids. The strongest correlation between dietary intake and serum concentration was observed in  $\beta$ -cryptoxanthin. The serum total cholesterol was a significant positive predictor of the serum carotenoid concentration. The BMI was a significant negative predictor of serum carotenoid concentrations excluding  $\beta$ -cryptoxanthin. Smoking status was a significant negative predictor of the serum carotenoid concentration except for zeaxanthin. Ethanol intake was a significant negative predictor of the concentrations of serum lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin. Neither smoking status nor ethanol intake was associated with the serum zeaxanthin concentration.

Table 3 shows the results of the dietary carotenoid intakes in six groups stratified by daily alcohol intake and smoking status. The dietary intakes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in current smokers and/or in regular alcohol drinkers (>1 g/d) were significantly lower than those in non-smokers among non-drinkers. In addition, the dietary intake of lutein was significantly lower in moderate-to-heavy drinkers (more than 25 g/d) and in light drinkers (1–25 g/d) among current smokers than it was in non-smokers among non-drinkers. The dietary intake of  $\beta$ -cryptoxanthin was significantly lower in light drinkers (1–25 g/d) among current smokers than it was in non-smokers among non-drinkers. However, after adjusting for age and sex, these significantly lower dietary intakes of carotenoids were non-significant.

The unadjusted and adjusted means of the serum carotenoid concentration among the six groups are shown in Table 4. After adjusting for age and sex, the serum lutein and zeaxanthin concentrations were not different among the six groups stratified by daily alcohol intake and smoking status. In contrast, the serum lycopene concentration in moderate-to-heavy drinkers was significantly lower than that in non-drinkers. Although this lower serum lycopene concentration in moderate-to-heavy drinkers was observed in both non-smokers and current smokers, no significant difference was observed between non-smokers and current smokers. On the other hand, the concentrations of serum  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin were significantly lower than those with increased alcohol intake. Furthermore, the serum  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin of current smokers among regular alcohol drinkers (more than 1 g/d) were significantly lower than those of non-smokers who have the same alcohol intake. The lower serum carotenoid concentrations among regular alcohol drinkers were more evident in current smokers than in non-smokers. After further adjusting for BMI, total cholesterol, total energy intake excluding alcohol, and dietary intake of respective carotenoids, no obvious change in these associations of cigarette smoking and alcohol drinking with the serum carotenoid concentration was observed.

Furthermore, after multivariate adjusting, no obvious change of the present results about the differences in the

Table 2. Standard regression coefficients of each serum carotenoid concentrations with contributory factors\*

	Lycopene		$\alpha$ -Carotene		$\beta$ -Carotene		Lutein		$\beta$ -Cryptoxanthin		Zeaxanthin	
	$\beta$	P	$\beta$	P	$\beta$	P	$\beta$	P	$\beta$	P	$\beta$	P
Age	-0.329	<0.001	0.013	0.641	0.134	<0.001	0.128	<0.001	0.142	<0.001	0.015	0.619
Sex	0.024	0.523	0.017	0.655	0.121	<0.001	-0.032	0.435	-0.020	0.536	-0.081	0.044
BMI	-0.098	<0.001	-0.126	<0.001	-0.165	<0.001	-0.133	<0.001	-0.031	0.179	-0.093	0.001
Smoking status	-0.074	0.033	-0.182	<0.001	-0.177	<0.001	-0.118	0.002	-0.146	<0.001	-0.067	0.071
Ethanol intake	-0.167	<0.001	-0.167	<0.001	-0.240	<0.001	0.047	0.175	-0.174	<0.001	0.014	0.675
Total cholesterol	0.262	<0.001	0.205	<0.001	0.212	<0.001	0.277	<0.001	0.146	<0.001	0.315	<0.001
Total energy intake excluding ethanol	-0.034	0.216	-0.074	0.007	-0.103	<0.001	-0.033	0.312	-0.069	0.003	-0.039	0.220
Dietary intake of corresponding carotenoid	0.170	<0.001	0.224	<0.001	0.171	<0.001	0.119	<0.001	0.492	<0.001	0.239	<0.001
R <sup>2</sup> adjusted	0.249		0.264		0.409		0.140		0.455		0.145	

\*Standard regression coefficients of each serum carotenoid concentrations with independent variables were calculated by multiple linear regression analysis included always in the models as independent variables.

**Table 3.** Unadjusted and adjusted dietary carotenoid intakes stratified by smoking status and daily alcohol intake (Geometric means and 95% confidence intervals, mean values and standard deviations or percentages)

	Daily alcohol intake											
	< 1 g/d				≥ 1 to < 25 g/d				≥ 25 g/d			
	Non-smokers (n 579)		Current-smokers (n 29)		Non-smokers (n 263)		Current-smokers (n 35)		Non-smokers (n 100)		Current-smokers (n 63)	
	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI
Age (years)												
Mean	55.8		53.4		53.8		49.3**		57.1		55.6	
sd	9.9		10.0		10.2		9.3		9.6		9.9	
Male (%)	7.8		82.8		37.6		88.6		93.0		98.4	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )												
Mean	22.8		22.9		22.8		23.1		23.7		22.7	
sd	3.2		3.5		2.8		2.7		2.9		2.6	
Serum total cholesterol (mmol/l)												
Mean	5.60		5.49		5.49		5.35		5.35		5.20*	
sd	0.88		0.91		0.90		0.82		0.89		1.06	
Total energy intake (kJ/d)												
Including ethanol												
Mean	8379.8		8366.0		8512.5		8856.7		9433.8***		9992.0***	
sd	2462.5		1622.6		2102.2		2197.4		2174.1		2408.1	
Excluding ethanol												
Mean	8377.5		8361.7		8301.3		8527.3		8091.5		8426.5	
sd	2462.5		1621.3		2092.7		2186.4		2059.8		2239.7	
Ethanol intake (g/d)												
Mean	0.1		0.1		6.4***		10.6***		49.6***		57.3***	
sd	0.2		0.2		5.9		7.2		24.6		35.9	
Dietary carotenoid intakes (mg/d)												
Lycopene												
Crude	0.07	0.06, 0.08	0.05	0.02, 0.12	0.07	0.05, 0.08	0.04	0.02, 0.08	0.06	0.04, 0.08	0.04	0.03, 0.07
Adjusted†	0.06	0.05, 0.07	0.06	0.03, 0.13	0.07	0.05, 0.09	0.05	0.02, 0.09	0.07	0.04, 0.10	0.05	0.03, 0.09
α-Carotene												
Crude	0.23	0.21, 0.24	0.14*	0.10, 0.19	0.18**	0.16, 0.20	0.14*	0.10, 0.20	0.12***	0.10, 0.14	0.09***	0.07, 0.12
Adjusted†	0.19	0.18, 0.21	0.20	0.15, 0.27	0.19	0.17, 0.21	0.21	0.16, 0.28	0.18	0.15, 0.22	0.15	0.12, 0.18
β-Carotene												
Crude	1.68	1.60, 1.76	1.17**	0.89, 1.53	1.37***	1.26, 1.48	1.04***	0.80, 1.36	1.10***	0.98, 1.23	0.99***	0.83, 1.17
Adjusted†	1.49	1.40, 1.58	1.49	1.18, 1.87	1.42	1.31, 1.52	1.42	1.14, 1.75	1.41	1.23, 1.61	1.32	1.11, 1.56
Lutein												
Crude	1.89	1.80, 1.99	1.51	1.19, 1.92	1.68	1.56, 1.80	1.34*	1.06, 1.70	1.37***	1.23, 1.54	1.40**	1.20, 1.65
Adjusted†	1.74	1.64, 1.83	1.79	1.43, 2.23	1.72	1.60, 1.85	1.66	1.35, 2.04	1.65	1.44, 1.88	1.73	1.47, 2.03
β-Cryptoxanthin												
Crude	0.39	0.33, 0.46	0.16	0.07, 0.41	0.25	0.19, 0.33	0.10**	0.04, 0.25	0.30	0.20, 0.45	0.25	0.16, 0.41
Adjusted†	0.38	0.32, 0.45	0.18	0.09, 0.36	0.28	0.22, 0.36	0.16	0.08, 0.30	0.23	0.15, 0.35	0.22	0.13, 0.37
Zeaxanthin												
Crude	0.69	0.64, 0.74	0.55	0.40, 0.75	0.68	0.62, 0.75	0.62	0.48, 0.80	0.57	0.49, 0.66	0.65	0.52, 0.80
Adjusted†	0.66	0.61, 0.71	0.59	0.44, 0.80	0.68	0.62, 0.75	0.67	0.50, 0.88	0.63	0.53, 0.75	0.72	0.58, 0.89

Mean value was significantly different from that of non-smoking non-drinkers: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (Bonferroni multiple comparison test).  
† Age and sex were adjusted.

**Table 4.** Unadjusted and adjusted serum carotenoid concentrations stratified by smoking status and daily alcohol intake (Geometric means and 95% confidence intervals)

Serum carotenoids (µmol/l)	Daily alcohol intake											
	<1 g/d				≥1 to <25 g/d				≥25 g/d			
	Non-smokers		Current-smokers		Non-smokers		Current-smokers		Non-smokers		Current-smokers	
	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI	Geometric mean	95% CI
Lycopene												
Crude	0.30	0.29, 0.32	0.24	0.19, 0.31	0.29	0.27, 0.32	0.21	0.17, 0.28	0.19***	0.16, 0.22	0.17***	0.14, 0.20
Adjusted§	0.29	0.28, 0.31	0.26	0.20, 0.33	0.28	0.26, 0.31	0.21	0.17, 0.26	0.21**	0.18, 0.25	0.19***	0.15, 0.22
Adjusted	0.30	0.28, 0.32	0.24	0.19, 0.31	0.28	0.26, 0.30	0.20*	0.16, 0.25	0.21***	0.18, 0.24	0.19***	0.16, 0.22
α-Carotene												
Crude	0.14	0.14, 0.15	0.10**	0.09, 0.12	0.13	0.13, 0.14	0.09***†††	0.08, 0.11	0.09***	0.09, 0.10	0.07***††††	0.06, 0.08
Adjusted§	0.14	0.13, 0.14	0.11	0.10, 0.14	0.14	0.13, 0.14	0.10*†	0.09, 0.12	0.11**	0.10, 0.12	0.08***†††	0.07, 0.09
Adjusted	0.14	0.13, 0.14	0.11	0.09, 0.13	0.13	0.13, 0.14	0.10**††	0.09, 0.12	0.11***	0.10, 0.12	0.08***††	0.07, 0.09
β-Carotene												
Crude	0.74	0.71, 0.77	0.50**	0.41, 0.60	0.63**	0.59, 0.67	0.35***††††	0.28, 0.45	0.38***	0.34, 0.42	0.25***††††††	0.22, 0.29
Adjusted§	0.66	0.63, 0.70	0.61	0.51, 0.74	0.65	0.61, 0.70	0.47**†	0.40, 0.57	0.46***	0.41, 0.52	0.32***††††††	0.28, 0.37
Adjusted	0.67	0.64, 0.70	0.58	0.49, 0.70	0.65	0.61, 0.69	0.46***††	0.39, 0.54	0.46***	0.41, 0.51	0.32***††††††	0.28, 0.36
Lutein												
Crude	0.80	0.58, 0.62	0.52	0.45, 0.61	0.59	0.57, 0.62	0.47***††	0.40, 0.54	0.59	0.55, 0.64	0.55	0.50, 0.61
Adjusted§	0.58	0.56, 0.60	0.56	0.49, 0.64	0.60	0.58, 0.63	0.52	0.45, 0.59	0.62	0.57, 0.67	0.59	0.53, 0.66
Adjusted	0.58	0.56, 0.60	0.54	0.47, 0.62	0.60	0.57, 0.63	0.51	0.45, 0.57	0.62	0.57, 0.67	0.59	0.53, 0.65
β-Cryptoxanthin												
Crude	1.55	1.45, 1.65	1.01	0.71, 1.44	1.34	1.21, 1.48	0.62***††††	0.44, 0.86	0.98***	0.82, 1.17	0.61***††	0.49, 0.76
Adjusted§	1.49	1.38, 1.60	1.11	0.83, 1.48	1.41	1.28, 1.55	0.78***††††	0.60, 1.02	0.95***	0.80, 1.13	0.62***†††	0.50, 0.77
Adjusted	1.44	1.35, 1.53	1.20	0.94, 1.54	1.43	1.32, 1.55	0.87***†††	0.70, 1.10	1.00***	0.87, 1.16	0.67***††††	0.56, 0.80
Zeaxanthin												
Crude	0.24	0.24, 0.25	0.23	0.21, 0.27	0.25	0.24, 0.26	0.22	0.20, 0.24	0.24	0.23, 0.26	0.24	0.22, 0.26
Adjusted§	0.24	0.23, 0.25	0.24	0.21, 0.27	0.25	0.24, 0.26	0.23	0.20, 0.25	0.24	0.23, 0.26	0.24	0.22, 0.26
Adjusted	0.24	0.23, 0.25	0.24	0.21, 0.26	0.25	0.24, 0.25	0.22	0.20, 0.25	0.24	0.23, 0.26	0.24	0.22, 0.26

Mean value was significantly different from that of non-smoking non-drinkers: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (Bonferroni multiple comparison test).  
 Mean value was significantly different from that of non-smokers who have the same alcohol intake: †  $P < 0.05$ , ††  $P < 0.01$ , †††  $P < 0.001$  (Bonferroni multiple comparison test).  
 Mean value was significantly different from that of non-drinking current smokers: ‡  $P < 0.05$ , ‡‡  $P < 0.01$ , ‡‡‡  $P < 0.001$  (Bonferroni multiple comparison test).  
 § Age and sex were adjusted.  
 || Age, sex, BMI, total cholesterol, total energy intake excluding alcohol, and dietary intake of corresponding carotenoid were adjusted.

changes among the serum concentrations of six carotenoids stratified by cigarette smoking and alcohol drinking habits were observed, even though female subjects were excluded (data not shown).

## Discussion

The original FFQ we used in the present survey is not able to estimate the amount of carotenoid intake from foods because all six carotenoid contents in each food are not assessed in standard tables of food composition in Japan. However, recently, a database of the carotenoid composition of fruit and vegetables was published<sup>(37,38)</sup>. In the present study, we adapted FFQ analysis software package to calculate an individual's carotenoid intake from important sources of carotenoids, and significant relationships between dietary intake of each carotenoid and its serum levels were observed. This is the first experiment to estimate six dietary carotenoids in Japan.

The present investigation is the first-reported cross-sectional study to examine the synergistic interaction of cigarette smoking and alcohol drinking with the six major serum carotenoids while controlling for dietary carotenoid intakes. The results indicated that daily alcohol intake may reduce the serum concentrations of lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin in a dose-dependent manner. Furthermore, these alcohol-related lower serum carotenoid concentrations, except for lycopene, were more evident in current smokers than in non-smokers. The serum lycopene concentration seems to be influenced by alcohol drinking and not by smoking. In addition, neither smoking nor alcohol drinking affected the serum lutein and zeaxanthin concentrations.

Although many epidemiological studies have indicated that the serum carotenoid concentrations were low among current smokers and/or regular alcohol drinkers<sup>(19-31)</sup>, most of these previous studies evaluated the effect of these lifestyle factors on the serum carotenoid concentrations separately. It is widely known that the dietary intake of carotenoids is lower in smokers than in non-smokers, in alcohol drinkers than in non-drinkers, and in males than in females<sup>(21)</sup>. In addition, the consumption of alcohol among smokers is higher than that among non-smokers. Therefore, the possibility that the correlation between cigarette smoking and alcohol drinking with the serum carotenoid concentrations observed in these previous reports would be an artifact of the strong correlation of cigarette smoking and alcohol drinking could not be ruled out. In our data analysis, the subjects were stratified into six groups according to their smoking status and the amount of daily alcohol intake. Thus, we believe that the influence of the association among cigarette smoking and alcohol drinking can be completely eliminated in the analysis of these six subgroups.

Previously, seven cross-sectional studies have reported the possibility that cigarette smoking and alcohol drinking might synergistically enhance the depletion of serum carotenoid concentrations<sup>(19-23,25,26)</sup>. However, these studies did not take into account the dietary intakes of carotenoids; therefore, it is not clear whether the low serum carotenoid concentration was due to the low dietary intake of carotenoids or whether cigarette smoking and alcohol drinking would cause deterioration in the serum carotenoid concentrations.

To our knowledge, there have been no reports about the synergistic interaction of cigarette smoking and alcohol drinking with the serum carotenoid concentrations after taking into account the dietary carotenoid intakes. Furthermore, there is limited information about the differences in the changes among the serum concentrations of the six major carotenoids against oxidative stress induced by cigarette smoking and alcohol drinking. In our data analysis, the dietary intakes of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and lutein in current smokers and/or regular alcohol drinkers were significantly lower than those in non-smokers among non-drinkers. However, these significantly lower dietary intakes became insignificant after adjusting for age and sex. Furthermore, a significant synergistic interaction of cigarette smoking and alcohol drinking with the serum carotenoid concentrations was observed after further adjusting for the dietary intakes of respective carotenoids. Therefore, it seems that the significant differences of the multivariate adjusted means of the serum carotenoid concentrations among the six groups stratified by lifestyle factors might be caused by the depletion of serum carotenoids and not by differences in dietary carotenoid intakes.

Recently, some animal experiments have been reported concerning the synergistic effect of cigarette and alcohol on the antioxidant defence system in several tissues<sup>(39-41)</sup>. These animal experiments show the possibility that combination of alcohol plus cigarette smoke induces the excessive generation of reactive oxygen species and free radicals to a greater extent than that from alcohol or cigarette smoke alone. Thus, the combination of cigarette smoking and alcohol drinking might induce the excessive generation of free radicals and cause the marked depletion of serum carotenoid concentrations of regular alcohol drinkers among current smokers than those of non-smokers who have the same alcohol intake.

It is also known that a transforming reaction from pro-vitamin A to retinol is induced by smoking<sup>(42)</sup>. On the other hand, alcohol is known to promote increased oxidation of vitamin A compounds and reduced liver stores<sup>(43)</sup>. It can be postulated that alcohol intake may also accelerate the conversion of pro-vitamin A to retinol<sup>(44)</sup>. From among the six major serum carotenoids we measured,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin are pro-vitamin A. These three carotenoids are converted to retinol in the body. Therefore, the serum concentrations of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin might be more easily influenced by cigarette smoking and alcohol drinking than lycopene.

In the present study, serum lutein and zeaxanthin concentrations were not influenced not only by alcohol drinking but also by cigarette smoking. We have no clear explanation for these inconsistencies with previous results<sup>(25,27-29,31)</sup>. We concluded that lutein and zeaxanthin might be difficult to be exposed to oxidative stress or that the differences among the six serum carotenoids observed occurred by chance. One possible explanation is that the differences in the associations of the six serum carotenoids with cigarette smoking and alcohol drinking might be attributed to the polar characteristics of each carotenoid. It is conceivable that the tissue distribution and localisation in the cell membranes of carotenoids differ in each carotenoid. Especially, the chemical structure of a carotenoid may determine its localisation in a cell membrane. Hydrocarbon carotenoids, such as lycopene,  $\alpha$ -carotene and