

【WI-38 を用いた細胞増殖抑制試験】

WI-38 正常ヒト 2 倍体繊維芽細胞 (PDL=32.6) は、理研 BRC より購入し、3~ 4 日おきに継代培養したものをを用いた。培養培地は、DMEM 培地に FBS (10%, v/v)、Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension (×100, WAKO) を加えたものをを用いた。

対数増殖期にある細胞を Trypsin 処理した後、細胞懸濁液を 2.0×10^4 cells/mL に調製し、96 well マイクロプレートに 100 μ L ずつ播種した。37 °C、5% CO₂/ air 濃度の条件下 24 時間培養後、検体の 10% DMSO 水溶液 (最終濃度 0.004–4 mg/mL) 及びコントロール溶媒を 10 μ L/well 添加し、同条件下 44 時間培養を行った。WST-8 試薬 (Dojindo) 10 μ L/well を添加後、さらに 4 時間培養を行い、検出波長 450 nm、参照波長 610 nm にて吸光度を測定した。

各濃度における細胞増殖率 (%) は以下の式により算出した。

$$\text{増殖率 (\%)} = (\text{薬物添加の吸光度} / \text{コントロールの吸光度}) \times 100$$

なお、検体濃度 (4 mg/mL) における細胞増殖率が 50% を下回ったものについては順次濃度を下げ、各濃度における細胞増殖率を測定し、用量・増殖率曲線から 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) を算出した。

【HL-60 を用いた細胞増殖抑制試験】 [4]

HL-60 ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (JCRB0085) は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入し、3~ 4 日おきに継代培養したものをを用いた。培養培地は、RPMI 1640 培地に FBS (10%, v/v)、Penicillin G

(100,000 units/L)、Streptomycin sulfate (100 mg/L) を加えたものをを用いた。

継代培養中の HL-60 細胞を 4×10^4 cells/mL になるように 10% FBS 含有 RPMI 1640 培地に懸濁させ、懸濁液を 96 well マイクロプレートの各 well に 196 μ L ずつ分注した。これを 37 °C、5% CO₂/ air インキュベーター内で 24 時間前培養した。その後、サンプルの EtOH: H₂O (1: 1) 溶液 (最終濃度 0.2–200 μ g/mL) 及びコントロールとして EtOH: H₂O (1: 1) 溶液を各 well に 4 μ L ずつ添加し、同条件で 72 時間培養した。これらの操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。培養終了後、MTT 試薬 10 μ L を各 well に添加し、さらに 4 時間培養後、生成した MTT ホルマザンを DMSO に溶解させ、550 nm における吸光度を測定した。各濃度における細胞増殖率 (%) は以下の式により算出した。

$$\text{増殖率 (\%)} = (\text{薬物添加の吸光度} / \text{コントロールの吸光度}) \times 100$$

なお、検体濃度 (200 μ g/mL) における細胞増殖率が 50% を下回ったものについては順次濃度を下げ、各濃度における細胞増殖率を測定し、用量・増殖率曲線から 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) を算出した。

【A549 を用いた細胞増殖抑制試験】 [4]

A549 ヒト肺腺癌細胞 (JCRB0076) はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入し、3~ 4 日おきに継代培養したものをを用いた。培養培地は、MEM 培地に FBS (10%, v/v)、Penicillin G (100,000 units/L)、Streptomycin sulfate (100 mg/L) を加えたものをを用いた。

継代培養中の A549 細胞を 1×10^4 cells/

mLになるように10% FBS含有MEM培地に懸濁させ、懸濁液を96 well マイクロプレートの各wellに100 μ Lずつ分注した。これを37 $^{\circ}$ C、5% CO₂/ air インキュベーター内で24時間前培養した。前培養後、培地を抜き取り、新たに培地を96 well マイクロプレートの各wellに196 μ Lずつ分注した。その後、サンプルのEtOH:H₂O (1:1) 溶液(最終濃度0.2–200 μ g/ mL) 及びコントロールとしてEtOH:H₂O (1:1) 溶液を各wellに4 μ Lずつ添加し、同条件で72時間培養した。これらの操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。培養終了後、培地を抜き取り、MTT 試薬を溶解させた培地100 μ Lを各wellに添加し、さらに4時間培養した。その後、生成したMTT ホルマザンをDMSOに溶解させ、550 nmにおける吸光度を測定した。各濃度における細胞増殖率(%)は以下の式により算出した。

$$\text{増殖率 (\%)} = (\text{薬物添加の吸光度} / \text{コントロールの吸光度}) \times 100$$

なお、検体濃度(200 μ g/ mL)における細胞増殖率が50%を下回ったものについては順次濃度を下げ、各濃度における細胞増殖率を測定し、用量-増殖率曲線から50%細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)を算出した。

【変異原性試験】

変異原性試験は、市販キット(ウムラックAT、蛋白精製工業)を用い、添付マニュアルに記載の操作手順に従って行った。

試験溶液としてMeOH抽出物約20 mgを正確に10% DMSO水溶液500 μ Lに溶解し、4倍希釈系列を8点作成し、評価を行った。

C. 結果

各活性試験用にMeOH抽出エキスを作成し、Table 1に示す収量を得た。抽出効率は5%から96%まで存在し、関与成分の存在量に大きな違いがあることが明らかとなった。

3種の培養細胞による細胞増殖抑制試験では、Table 1に示すIC₅₀値をそれぞれ得た。N106、N201、N202、N204、N307及びN404の6検体は、3種に共通して検討範囲内で活性を認めることが出来なかった。また、N104、N203、N302、N308及びN401はHL-60及びA549に、N407はWI-38に、それぞれ特異的に活性を発現しないことが明らかとなった。

WI-38を対象にした試験では、IC₅₀が検体によって1,000倍以上の差を有し、少量の摂取でも高い危険性を有するものが流通していることが明らかとなった。また、陽性対象として用いたFluorouracilは、IC₅₀=0.012 mg/ mLを示し、一部の検体ではそれに匹敵するかそれ以上の活性を有することが明らかとなった。

HL-60及びA549では、陽性対照としてCisplatinを用い、それぞれIC₅₀=0.38及び0.59 μ g/ mLを示したが、それに匹敵するような活性を有するものは存在しなかった。

本検討により、抗酸化力の高いものは、総じて細胞増殖抑制も強い事が明らかとなった。Figs. 1~3は、それぞれWI-38、HL-60及びA549のIC₅₀値(product mg/ mL)を横軸に、H-ORAC値(μ mol TE/ g)を縦軸に、両対数として表記した際の相関図である。寄与率は、33~45%を示しており、弱い相関があると考えられた。なお、各図には活性を発現しなかった検体も記載したが、これらの記載の有無による結果への影響は軽微であった。

変異原性試験は、細胞増殖試験において

顕著な活性を発現した 15 検体に限定して評価を行った (Table 1)。その結果、これまでに変異原性が報告されている Quercetin を含むサプリメント N101 において、陽性反応が確認された。その他、N102、N302、N306 及び N503 の S9 mix 添加試験で陽性反応を認められた。

今回変異原性を示したものを対象に、商品情報が開示されているかインターネットのホームページ上で確認したところ、効果・効能に関する記載がされているものは散見されたが、安全性について記載されているものは皆無であった。

D. 考察

抗酸化能の測定は、MWA (MeOH: H₂O: AcOH= 90: 9.5: 0.5) 抽出液を作成し、適宜希釈したものを直接 H-ORAC 法で評価している。しかし、MWA 抽出溶媒に含まれる成分濃度は区々であり、これを直接を用いたの安全性評価では、正確に評価できない可能性も考えられたことから、抽出方法を変更して行った。また、H-ORAC 法の評価結果を尊重できるよう、抽出溶媒には組成の近いものを選択した。なお、本抽出法による成分の抽出効率と H-ORAC 活性においては、相関関係を認めなかった。

今回、細胞増殖抑制の評価に 3 種の培養細胞を用いた。一部特異的な反応を示したものが存在したが、多くに差を認めなかった。よって、評価としては、単一の細胞種でも差し支えないと考えられる。また、*in vitro* の評価では、生体に特異的な、吸収、分布及び長期投与といった因子は加味されないことから、毒性試験の結果を単純に安全性の評価として用いることは出来ない。しかし、本検討結果から、

抗酸化力が製品に表示されていれば、その値から身体への影響も推測できることが示唆された。ただし、本検討結果では寄与率が低いことから、今後より相関の高い評価法の探索も必要であると考えられる。

検体 N501 及び N503 は、WI-38 細胞増殖抑制試験において陽性対照よりも低い IC₅₀ 値を示した。根本らの報告によると、[5] 培養細胞に高濃度の Ascorbic Acid (AsA) が添加された際 H₂O₂ が過剰に誘発され、その影響により増殖が抑制されるとしており、本検討でも同様の結果が得られたものと思われる。

本検討に用いた抗酸化サプリメントでは、酸化防止剤として広く AsA が添加されており、今回用いた評価系に影響を及ぼしていたものと思われる。本検討では、抗酸化に着目したことから、原材料に AsA の使用が明記されていたが、他の効果・効能を標榜する際には省略されることも考えられ、関与成分の評価に直結できない可能性もある。

HL-60 を用いた検討では、N407 が他の検体とは異なる挙動を示していた。本検体に含まれる α -lipoic acid は、白血病細胞に対して毒性を持つことが知られており、その影響が出たものと考えられる。[6]

今回、変異原性試験は、細胞増殖抑制を有する検体に限って評価を行った。しかし、未評価のものでも、変異原性を有するものが存在する可能性は否定できないことから、今後検討を行い、詳細を明らかにする必要があるものと考えられる。

N101 及び N306 に含有される Quercetin は、変異原性を有することが広く知られており、本検討に用いた UMU 試験でも、S9 mix 添加時に陽性反応を示すことが記載されていた。N301 は、2 番目に主要な成分として、玉ねぎ

抽出物の記載があつたが、変異原性を示さなかつた。本検討に用いた評価キットは、変異原性物質が過剰でも微量でも陰性反応を示すとしており、N301 においては、Quercetin の存在量が微量のため、変異原性を示さなかつたものと思われる。よって、本製品が過剰に摂取された際には、健康に影響がないとは言い切れない。

また、変異原性を呈した N102、N302 及び N503 は、それぞれ 288、21 及び 833 mg/g (tablet) の AsA を含んでおり、変異原性の発現は、細胞増殖抑制試験同様 AsA の酸化による H₂O₂ の発生が影響しているものと思われる。[5] 特に、使用されている原材料を勘案しても、変異原性を発現するような成分が確認できないことから支持された。

本検討から、健康食品の安全性は、第三者が正確に評価することは困難であり、製造者が危険因子の存在の有無や存在量について明記することが重要であると考えられた。

E. 結論

抗酸化サプリメントに関する安全性評価の一環として、変異原性及び細胞増殖抑制について検討を行った。その結果、抗酸化力の高いものは、細胞増殖抑制が強く、その摂取において注意を要することが明らかとなった。また、変異原性試験では、これまでに報告例があるもの以外にも、陽性反応が検出されたが、擬陽性であると考えられた。

現在抗酸化を標榜するサプリメントが多数販売されているが、安全性に関する情報は開示されていない。しかし、抗酸化力を表示することによって、その効果を明らかにすると共に、危険性の評価にも繋がる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

<参考文献>

- [1] 食品衛生法（昭和 22 年 12 月 24 日法律第 233 号、最終改正：平成 21 年 6 月 5 日法律第 49 号）。
- [2] 食品安全基本法（平成 15 年 5 月 23 日法律第 48 号、最終改正：平成 21 年 6 月 5 日法律第 49 号）。
- [3] 「錠剤、カプセル状等食品の適正な製造に係る基本的考え方について」及び「錠剤、カプセル状等食品の原材料の安全性に関する自主点検ガイドライン」について、厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、食安発第 0201003 号、平成 17 年 2 月 1 日。
- [4] Yokosuka A, Sano T, Hashimoto K, Sakagami H, Mimaki Y, Steroidal Glycosides from *Furcraea foetida* and Their Cytotoxic Activity. *Chem. Pharm. Bull.* 57, 1161-66 (2009).
- [5] 根本信乃, 鈴木恵美子, 大塚恵, 荒川信彦, 培養細胞系におけるアスコルビン酸の毒性, *ビタミン* 67, 87-88, (1993).
- [6] Pack RA, Hardy K, Madigan MC,

Hunt NH, Differential effects of the antioxidant alpha-lipoic acid on the proliferation of mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes and leukaemic T cells. *Mol Immunol.* 38, 733-45 (2002).

Table 1. 検体情報一覧

分類	Tag	採取量*1	エキス量*1	activity*2	UMRAC*3	WI-38*4	HL-60*4	A549*4	
ポリフェノール類	N101	1	1.9367	0.8758	19420	+	0.053	0.015	0.108
	N102	2	1.9748	1.3812	4539	+	0.226	0.069	0.107
	N103	3	1.9344	0.1010	192	-	2.820	1.130	1.297
	N104	4	2.0029	0.9758	279	nt	2.202	0.411	0.411
	N105	5	1.9955	1.0153	4176	-	0.078	0.017	0.012
	N106	6	1.9703	1.6046	5335	-	4.733	0.246	0.246
野菜・果物末	N201	7	2.0010	0.5761	148	nt	6.423	0.695	0.695
	N202	8	2.0143	0.7637	82	nt	10.819	0.527	0.527
	N203	9	2.0923	0.4668	54	nt	6.593	0.896	0.896
	N204	10	1.9769	0.3810	4	nt	18.866	1.038	1.038
	N205	11	1.9930	0.9459	424	-	0.329	0.204	0.145
野菜・果物等の濃縮エキス	N301	12	2.0275	0.3109	293	nt	2.514	0.036	0.568
	N302	13	2.0571	0.9172	1136	+	3.299	0.449	0.449
	N303	14	2.0345	1.1072	1123	nt	0.294	0.014	0.099
	N304	15	1.9827	0.2198	233	-	1.362	0.052	0.513
	N305	16	1.9293	0.2619	410	-	9.937	0.016	0.460
	N306	17	2.0580	0.1519	1173	+	1.635	0.017	0.917
	N307	18	1.9956	0.3108	22	nt	24.247	1.284	1.284
	N308	19	2.0810	1.0172	170	nt	0.721	0.409	0.409
	N309	20	1.9976	0.3448	128	-	0.691	0.029	0.258
	その他	N401	21	2.0153	0.4076	23	nt	1.771	0.989
N402		22	1.9778	0.5922	810	-	0.135	0.024	0.022
N403		23	2.0169	0.5895	3181	-	0.485	0.346	0.321
N404		24	2.0771	2.0008	120	nt	3.926	0.208	0.208
N405		25	1.9686	0.2729	77	nt	6.689	0.239	0.694
N406		26	2.0001	1.0935	1296	nt	0.665	0.016	0.108
N407		27	2.0270	0.2135	4	nt	11.460	0.122	0.598
ビタミン	N501	28	2.0187	0.8275	964	-	0.010	0.042	0.154
	N502	29	1.9566	0.5719	522	nt	0.849	0.141	0.186
	N503	30	1.9677	1.6728	2477	+	0.005	0.023	0.007

*1: 単位は g

*2: 単位は $\mu\text{mol TE/g}$

*3: +, positive; -, negative; nt, not treated; +S9, S9 mix 添加

*4: 単位は product mg/ mL

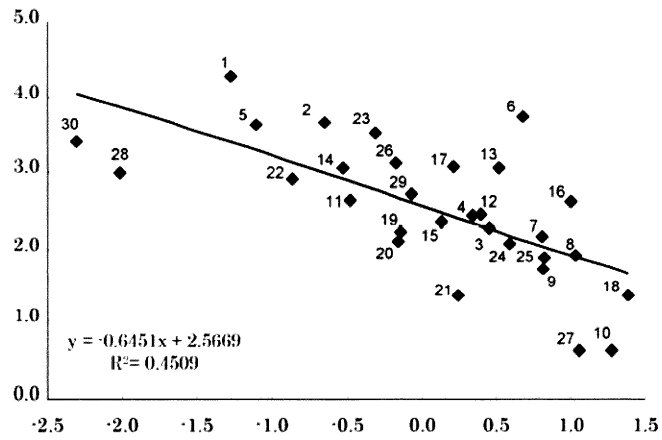


Fig 1. WI-38 に対する各検体の IC₅₀ と H-ORAC 活性

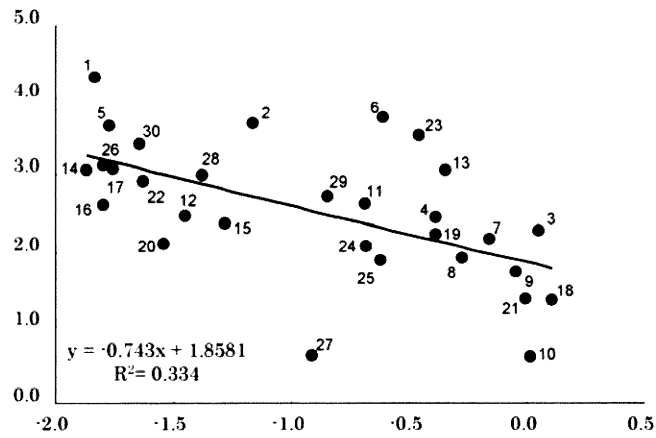


Fig 2. HL-60 に対する各検体の IC₅₀ と H-ORAC 活性

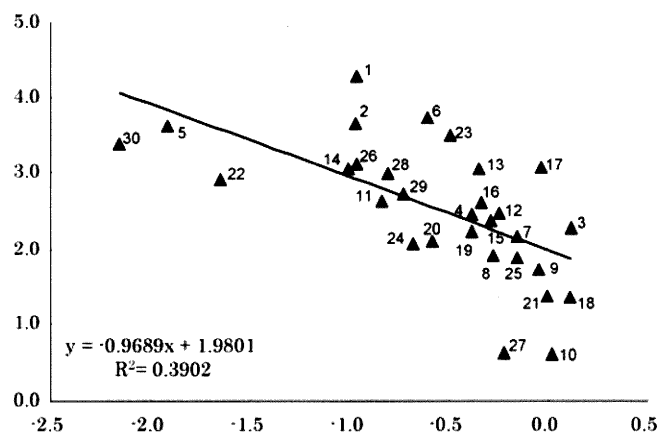


Fig 3. A549 に対する各検体の IC₅₀ と H-ORAC 活性

抗酸化サプリメントの有効性・安全性評価に関する文献研究

分担研究者 卓 興鋼 独立行政法人国立健康・栄養研究所
情報センター 健康・栄養情報プロジェクト プロジェクトリーダー

【目的】本研究では、文献調査により、代表的な抗酸化サプリメントの有効性・安全性についての科学的根拠を収集し、可能な場合は系統的レビューまたはメタ分析にて評価する。

【方法】抗酸化サプリメントの有効性・安全性に関する文献等は、PubMed にて調査する。エビデンスレベルが一番高いとされている「システマティックレビュー又はメタアナリシス」を優先的に調査した。1つの文献(論文)には複数のエビデンスがあり、それぞれの有効性・安全性について、独自に評価した。また、抗酸化サプリメントに関するエビデンスの有効性・安全性評価に基づき、摂取する上で推奨の強さにグレードを付けた。抗酸化サプリメントの有効性・安全性について、可能な場合は RevMan メタ分析専用ソフトと Stata 統計ソフトを用いてメタ分析を行い、総合評価する。

【結果及び考察】PubMed の文献調査により、303 件の論文を検索した。2006 年から発表された抗酸化サプリメントに関する 25 報のシステマティックレビュー又はメタアナリシスについて、各研究のデザイン、対象者、介入、比較、結果、及び評価をまとめた。抗酸化サプリメントとしてよく利用されているものは、ビタミン A, B, C, E, α -カロテン(α -carotene), β -カロテン(β -carotene), セレン(Selenium), 亜鉛(Zinc)の単独使用又はそれらの併用であった。結果は脳卒中、がん発症率又は死亡率、自覚症状、高血圧、子癇、血中ヘモグロビンレベル、認知機能、総死亡率、目の加齢黄斑変性(AMD)、風邪、動脈硬化の進展度、冠動脈心疾患、大腸腺腫等が多岐にあった。よく利用された抗酸化サプリメントの殆どは有効性・危険性がなかった。一部は有効と報告されたが、逆に危険性も多く報告された。それぞれの対象者、介入に使用した抗酸化サプリメント、対照群、結果の測定方法によって、抗酸化サプリメントの効果の評価が様々で、推奨の強さの分類にグレードを付けるのは難しい。今後、食品に含まれている代表的な抗酸化物質の安全性・有効性に関する無作為化比較試験の論文全文を入手し、関連データを抽出し、システマティックレビュー又はメタアナリシスにて評価する必要がある。

A. 研究目的

現在抗酸化ビタミンやミネラル等を含有する抗酸化サプリメントが多数流通しており、多くの人が健康に良いと思い摂取している。ところが、抗酸化サプリメントが本当に健康に良いのか、

またその摂取目安量を示す科学的根拠は乏しい。現時点で、抗酸化サプリメントの有効性・安全性評価が充分に行われていない一つの原因とされる。

本研究では、文献調査により、代表的な抗

酸化サプリメントの有効性・安全性についての科学的根拠を収集し、可能な場合は系統的レビューまたはメタ分析にて評価する。

B. 研究方法

酸化サプリメントの有効性・安全性に関する文献等の情報については、PubMed 文献データベースにて調査する。いろいろな文献がある中、エビデンスレベルが一番高いとされている「システマティックレビュー又はメタアナリシス(systematic review and meta-analysis)」を優先的に調査することにした(表1、表2)。2011年1月25日に、“Antioxidant”をキーワードにし、“meta-analysis”の論文を検索した。

1つの文献(論文)には複数のエビデンスがあり、それぞれの有効性・安全性について、独自に考案し、表3に示されているとおりに評価することにした。また、酸化サプリメントに関するエビデンスの有効性・安全性評価に基づき、摂取する上で推奨の強さを表4に示されているグレードを付けることにした。

酸化サプリメントの有効性・安全性について、可能な場合は RevMan メタ分析専用ソフトと Stata 統計ソフトを用いてメタ分析を行い、総合評価する。

C. 結果

PubMed の文献調査により、303 件の論文を検索した。2006 年から発表された酸化サプリメントに関する 25 報のシステマティックレビュー又はメタアナリシスについて、各研究のデザイン(Study design)、対象者(Population)、介入(Intervention)、比較(Comparison)、結果(Outcomes)、及び評価(Evaluation)を表5にまとめた。

酸化サプリメントとしてよく利用されている

ものは、ビタミン A, B, C, E, α -カロテン(α -carotene), β -カロテン(β -carotene), セレン(Selenium), 亜鉛(Zinc)の単独使用又はそれらの併用であった。殆どはプラセボ(placebo)又は空白対照(no intervention)との比較であった。また、酸化サプリメントは一次予防(primary prevention)又は二次予防(secondary prevention)に利用された。結果は脳卒中、がん発症率又は死亡率、自覚症状、高血圧、子癇、血中ヘモグロビンレベル、認知機能、総死亡率、目の加齢黄斑変性(AMD)、風邪、動脈硬化の進展度、冠動脈心疾患、大腸腺腫等が多岐にあった。無作為化比較試験(randomized controlled trial)のシステマティックレビュー又はメタアナリシスを優先的に調査したため、相対危険度(relative risk or relative ratio, RR)、加重平均差(weighted mean difference, WMD)、エフェクトサイズ(effect size)が計算され、酸化サプリメント摂取の効果量が示された。時間などの関係で、全ての文献全文を入手し、詳細は確認することはできなかったが、酸化サプリメントの有効性・安全性の概要がよく分かった。

1報のシステマティックレビュー又はメタアナリシスでは、複数のエビデンスがあり、表3の指標を用いて、それぞれを表5に示されているとおりに評価した。25報の文献から、96件のエビデンスを整理した。そのうち、有効が15件、有効傾向が1件、有効性・危険性なしが51件、危険傾向が4件、危険が17件、有効性・危険性不明が1件、詳細情報必要が7件で、殆どが酸化サプリメントの有効性・危険性が認められず、危険性を認めたエビデンスは有効性を認めたエビデンスより多かった。

酸化サプリメントの有効性・危険性に関する重要なエビデンス(全て最高レベル)とそれ

ぞれ推奨の強さを下記のとおりまとめてみた。

1. ビタミン E サプリメントが全体の脳卒中に影響しない(グレードC)が、虚血性脳卒中を防ぐ効果がある(グレードA)が、出血性脳卒中のリスクを上昇させた(グレードD)。[1]
2. β -カロテンは前立腺がんの発生率と死亡率に影響しない(グレードC)。[2]
3. ビタミン C は前立腺がんの発生率と死亡率に影響しない(グレードC)。[2]
4. ビタミン E は前立腺がんの発生率と死亡率に影響しない(グレードC)。[2]
5. Selenium は前立腺がんの発生率と死亡率に影響しない(グレードC)。[2]
6. 40 歳以上の対象者において、ビタミン E は大腸がんの発生率に影響しない(グレードC)。[3]
7. 子癩前症の危険性ある妊婦において、ビタミン C と E の併用は妊娠性高血圧と低体重児リスクを上昇し(グレードD)、子癩前症の危険性に効果なし(グレードC)。[4]
8. 成人血液透析患者において、ビタミン C は血中ヘモグロビンレベルを上昇させる(グレードA)。[5]
9. 抗酸化サプリメントは全がんの一次予防と二次予防に効果がない(グレードC)が、膀胱がんのリスクを上昇させる(グレードD)。[6]
10. 抗酸化サプリメントは胃腸癌の発生率に影響しない(グレードC)が、胃腸癌の死亡率を上昇させる傾向がある(グレードD)。[7, 8]
11. β -カロテンは胃腸癌の発症率を上昇させる傾向がある(グレードD)。[7, 8]
12. セレンは胃腸癌の発症率を低下させる(グレードA)。[7, 8]
13. β -カロテンとビタミン A の併用は、胃腸癌の死亡率を上昇させる(グレードD)。[7, 8]
14. ビタミン E は、胃腸癌の死亡率を上昇させる(グレードD)。[7, 8]
15. 子供において、セレンは Kashin-Beck disease (KBD)のリスクを低下する(グレードA)。[9]
16. ビタミン A は死亡率を上昇させる(グレードD)。[10]
17. β -カロテンは死亡率を上昇させる(グレードD)。[10]
18. ビタミン E は死亡率を上昇させる(グレードD)。[10]
19. 抗酸化サプリメント(β -カロテン、ビタミン C と E)は加齢黄斑変性(AMD)の進行度を抑える(グレードA)。[11]
20. 妊婦において、抗酸化サプリメント(主にビタミン C と E の併用)は妊娠後期の腹痛、抗血圧薬の使用、高血圧ための入院リスクを上昇させる(グレードD)。[12]
21. 喫煙者において、 β -カロテンはがんの発生率と死亡率を上昇させる(グレードD)。[13]
22. 男性において、セレンはがんの発生率と死亡率を低下させる(グレードA)。[13]
23. ビタミン E 単独又は他のサプリメントとの併用は、前立腺がんの発生率を低下させる(グレードA)。[14]
24. ビタミン C 予防的摂取は風邪を予防する傾向があり(グレードB)、風邪の期間を短くする(グレードA)が、風邪症状が出た後のビタミン C 治療は風邪の期間と重症度に影響しない(グレードC)。[15]
25. 成人において、抗酸化サプリメント(β -カロテン、ビタミン A、C と E、セレンの単独使用又は併用)は、全死亡率を上昇させる(グレードD)。 β -カロテン、ビタミン A、ビタミン E

の単独使用又は併用(セレン除き)はそれぞれ死亡率を上昇させる(グレードD)。

[16]

26. 非経皮的冠動脈形成術の患者において、抗酸化サプリメント(ビタミン E と C、 β -カロテン、或いはセレン)は動脈硬化の進行に影響しない(グレードC)、B ビタミン(葉酸、ビタミン B₆、或いはビタミン B₁₂も動脈硬化の進行に影響しない(グレードC)。[17]
27. 経皮的冠動脈形成術の患者において、抗酸化サプリメント(ビタミン E と C、 β -カロテン、或いはセレン)は再狭窄に影響しない(グレードC)、B ビタミン(葉酸、ビタミン B₆、或いはビタミン B₁₂も再狭窄に影響しない(グレードC)。[17]
28. セレンサプリメントは、冠動脈心疾患リスクに影響しない(グレードC)。[18]
29. 抗酸化サプリメント(β -カロテン、ビタミン A、C と E、セレンの単独使用又は併用)は、大腸線腫のリスクに影響しない(グレードC)。[19]

D. 考察

今回採用したシステマティックレビュー又はまたアナリシスによると、抗酸化サプリメントの殆どは有効性・危険性がないことが分かった。また、一部の論文は有効と報告したが、逆に危険性があるとも報告した。それぞれの対象者(年齢、性別、健康状況)、介入に使用した抗酸化サプリメント(種類、用量、摂取方法、介入期間)、対照群、結果の測定方法によって、抗酸化サプリメントの効果の評価が様々で、推奨の強さの分類にグレードを付けるのは難しい。

今後、食品に含まれている代表的な抗酸化物質の健康影響に関する論文全文を入手し、

健康影響の結果データを抽出し、可能な場合は系統的レビューまたはメタ分析にて評価する必要がある。

E. 結論

よく利用された抗酸化サプリメントの殆どは有効性・危険性がなかった。一部は有効と報告されたが、逆に危険性も多く報告された。それぞれの対象者、介入に使用した抗酸化サプリメント、対照群、結果の測定方法によって、抗酸化サプリメントの効果の評価が様々で、推奨の強さの分類にグレードを付けるのは難しい。今後、食品に含まれている代表的な抗酸化物質の安全性・有効性に関する無作為化比較試験の論文全文を入手し、健康影響の結果データを抽出し、科学的にシステマティックレビュー又はメタアナリシスにて評価する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

<参考文献>

- [1] Schurks M, Glynn RJ, Rist PM, Tzourio C, Kurth T. Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2010;341: c5702.
- [2] Jiang L, Yang KH, Tian JH, Guan QL, Yao

- N, Cao N, Mi DH, Wu J, Ma B, Yang SH. Efficacy of antioxidant vitamins and selenium supplement in prostate cancer prevention: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Cancer* 2010;62: 719-27.
- [3] Arain MA, Abdul Qadeer A. Systematic review on "vitamin E and prevention of colorectal cancer". *Pak J Pharm Sci* 2010;23: 125-30.
- [4] Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi M. A meta-analysis on the efficacy and safety of combined vitamin C and E supplementation in preeclamptic women. *Hypertens Pregnancy* 2009;28: 417-34.
- [5] Deved V, Poyah P, James MT, Tonelli M, Manns BJ, Walsh M, Hemmelgarn BR. Ascorbic acid for anemia management in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009;54: 1089-97.
- [6] Myung SK, Kim Y, Ju W, Choi HJ, Bae WK. Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 2010;21: 166-79.
- [7] Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28: 689-703.
- [8] Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD004183.
- [9] Zou K, Liu G, Wu T, Du L. Selenium for preventing Kashin-Beck osteoarthropathy in children: a meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17: 144-51.
- [10] Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD007176.
- [11] Evans J. Antioxidant supplements to prevent or slow down the progression of AMD: a systematic review and meta-analysis. *Eye (Lond)* 2008;22: 751-60.
- [12] Rumbold A, Duley L, Crowther CA, Haslam RR. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD004227.
- [13] Bardia A, Tleyjeh IM, Cerhan JR, Sood AK, Limburg PJ, Erwin PJ, Montori VM. Efficacy of antioxidant supplementation in reducing primary cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2008;83: 23-34.
- [14] Alkhenizan A, Hafez K. The role of vitamin E in the prevention of cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Saudi Med* 2007;27: 409-14.
- [15] Douglas RM, Hemila H, Chalker E, Treacy B. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev* 2007: CD000980.
- [16] Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL,

- Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007;297: 842-57.
- [17] Bleys J, Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Appel LJ, Guallar E. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006;84: 880-7; quiz 954-5.
- [18] Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2006;84: 762-73.
- [19] Bjelakovic G, Nagorni A, Nikolova D, Simonetti RG, Bjelakovic M, Gluud C. Meta-analysis: antioxidant supplements for primary and secondary prevention of colorectal adenoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24: 281-91.
- [20] 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会編集. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006 版. In. 東京: ライフサイエンス出版株式会社; 2006. p. 141.
- [21] 日本糖尿病学会編集. 科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン 2010. In. 東京: 株式会社 南江堂; 2010. p. 299.
- [22] Toulis KA, Anastasilakis AD, Tzellos TG, Goulis DG, Kouvelas D. Selenium supplementation in the treatment of Hashimoto's thyroiditis: a systematic review and a meta-analysis. *Thyroid* 2010;20: 1163-73.
- [23] Kaur B, Rowe BH, Arnold E. Vitamin C supplementation for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2009: CD000993.
- [24] Jia X, McNeill G, Avenell A. Does taking vitamin, mineral and fatty acid supplements prevent cognitive decline? A systematic review of randomized controlled trials. *J Hum Nutr Diet* 2008;21: 317-36.
- [25] Gallicchio L, Boyd K, Matanoski G, Tao XG, Chen L, Lam TK, Shiels M, Hammond E, Robinson KA, Caulfield LE, Herman JG, Guallar E, Alberg AJ. Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2008;88: 372-83.
- [26] Isaac MG, Quinn R, Tabet N. Vitamin E for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD002854.
- [27] Evans JR, Henshaw K. Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD000253.
- [28] Lirussi F, Azzalini L, Orlando S, Orlando R, Angelico F. Antioxidant supplements for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007: CD004996.

表 1. エビデンスの基準(レベル) [20]

I	システマティックレビュー / メタアナリシス
II	1 つ以上のランダム化比較試験による
III	非ランダム化比較試験による
IV	分析疫学的研究(コホート研究や症例対照研究による)
V	記述研究(症例報告やケース・シリーズ)による
VI	患者データに基づかない, 専門委員会や専門家個人の意見

(福井・丹後による「診療ガイドラインの作成の手順 ver4.3」より)

表 2. ガイドラインで用いた evidence 水準表 — 各研究へ付された水準 [21]

水準(レベル)	それに該当する臨床研究デザインの種類
1+	水準 1 の規模を含むランダム化比較試験のシステマティックレビューまたはメタアナリシス
1	十分な症例数(全体で 400 例以上)のランダム化比較試験
2+	水準 2 の規模を含むランダム化比較試験のシステマティックレビューまたはメタアナリシス
2	小規模(全体で 400 例未満)のランダム化比較試験
2-	さらに小規模(全体で 50 例未満)のランダム化比較試験, クロスオーバー試験(ランダム化を伴う), オープンラベル試験(ランダム化を伴う)
3	非ランダム化比較試験, コントロールを伴うコホート研究
4	前後比較試験, コントロールを伴わないコホート研究, 症例対照研究
5	コントロールを伴わない症例集積(10~50 例程度)
6	10 例未満の症例報告

なお, 括弧内の例数は目安である.

表 3. エビデンスの有効性・安全性評価






	有効 ($P \leq 0.05$)
	有効傾向 ($0.05 < P \leq 0.10$)
	有効性・危険性なし ($P > 0.1$)
	危険傾向 ($0.05 < P \leq 0.10$)
	危険 ($P \leq 0.05$)
	有効性・危険性不明
	詳細情報必要








表 4. 推奨の強さの分類(グレード) [20, 21]




-
- | | |
|---|--------------------|
| A | 行うよう強く勧められる |
| B | 行うよう勧められる |
| C | 行うよう勧めるだけの根拠が明確でない |
| D | 行わないよう勧められる |
-







(福井・丹後による「診療ガイドラインの作成の手順 ver4.3」より)









表 5. 採用された無作為化比較試験の系統的レビューまたはメタ分析 (Included systematic reviews and meta-analyses of randomized controlled trials)*

No.	Study ID	Study design	Population	Intervention	Comparison	Outcomes	Evaluation
1	Schurks 2010 (PMID: 21051774)[1]	Systematic review and meta-analysis of 9 randomized placebo-controlled trials	118,765 participants (59,357 vitamin E vs. 59,408 placebo)	Vitamin E supplementation	Vitamin E vs. placebo	<u>Total stroke</u> (7 trials): pooled RR, 0.98 (95% CI, 0.91 to 1.05, P = 0.53) <u>Haemorrhagic stroke</u> (5 trials): pooled RR, 1.22 (95% CI, 1.00 to 1.48, P = 0.045) <u>Ischaemic stroke</u> (5 trials): pooled RR, 0.90 (95% CI, 0.82 to 0.99, P = 0.02)	  
2	Toulis 2010 (PMID: 20883174)[22]	Systematic review of prospective studies, meta-analysis randomized placebo-controlled blinded trials	Patients with Hashimoto's thyroiditis (HT) under levothyroxine (LT ₄) treatment	Selenium supplementation as an adjunctive therapy to LT ₄ in the treatment of HT.	Selenium vs. placebo	<u>Thyroid peroxidase</u> <u>autoantibodies</u> (4 studies): WMD, -271.09 (95% CI, -421.98 to -120.19, P < 0.0001) Chance of reporting an improvement in <u>well-being</u> and/or <u>mood</u> (3 studies): RR, 2.79 (95% CI, 1.21 to 6.47, P = 0.016)	 

3	Jiang 2010 (PMID: 20661819)[2]	Meta-analysis of randomized controlled trials	165,056 participants	Antioxidant vitamins and selenium supplement	Beta-carotene vs. placebo Vitamin C vs. placebo Vitamin E vs. placebo	<u>Demands in LT₄</u> <u>replacement therapy</u> : either unaltered or underreported <u>Ultrasonographic thyroid</u> <u>morphology</u> : either unaltered or underreported <u>Prostate cancer incidence</u> (3 trials): RR, 0.97 (95% CI, 0.90 to 1.05, NS) <u>Mortality of prostate cancer</u> (1 trial): RR, 1.19 (95% CI, 0.87 to 1.65, NS) <u>Prostate cancer incidence</u> (2 trials): RR, 0.98 (95% CI, 0.91 to 1.06, NS) <u>Mortality of prostate cancer</u> (1 trial): RR, 1.45 (95% CI, 0.92 to 2.29, NS) <u>Prostate cancer incidence</u> (5 trials): RR, 0.96 (95% CI, 0.85 to 1.08, NS)	      
---	--------------------------------------	---	-------------------------	---	--	--	---

						<p><u>Mortality of prostate cancer</u> (2 trial): RR, 0.85 (95% CI, 0.58 to 1.24, NS)</p> <p><u>Prostate cancer incidence</u> (2 trials): RR, 0.78 (95% CI, 0.41 to 1.48, NS)</p> <p><u>Mortality of prostate cancer</u> (1 trial): RR, 2.98 (95% CI, 0.12 to 73.16, NS)</p>	
4	<p>Arain 2010 (PMID: 20363687)[3]</p>	<p>Systematic review and meta-analysis of 4 randomized placebo-controlled trials</p>	<p>94,069 participants (47,029 vitamin E vs. 47,040 placebo), aged 40 years or above</p>	<p>Vitamin E for primary prevention of colorectal cancer</p>	<p>Selenium vs. placebo</p>	<p><u>Incidence of colorectal cancer in follow up period 7 to 10 years</u>: RR, 0.89 (95% CI, 0.76 to 1.05, P = 0.18)</p>	
5	<p>Rahimi 2009 (PMID: 19843004)[4]</p>	<p>Meta-analysis of 7 randomized placebo-controlled trials</p>	<p>5,969 pregnant women at risk of preeclampsia (2982 vitamin C and E vs. 2,987 placebo)</p>	<p>Vitamin C and E co-supplement</p>	<p>Vitamin C and E vs. placebo</p>	<p><u>Gestational hypertension</u>: RR, 1.3 (95% CI, 1.08 to 1.57, P = 0.0066)</p> <p><u>Preeclampsia</u>: RR, 0.7 (95% CI, 0.58 to 1.08, P = 0.1653)</p>	

6	Deved 2009 (PMID: 19783342)[5]	Systematic review and meta-analysis of 6 randomized controlled trials	326 adult hemodialysis patients	Ascorbic acid	Ascorbic acid use in addition to standard anemia management vs. standard care	<p><u>Preterm delivery</u>: RR 1.12 (95% CI, 0.96 to 1.32, P = 0.141)</p> <p><u>Small for gestational age</u>: RR, 1.04 (95% CI, 94 to 1.15, P = 0.4789)</p> <p><u>Low birth weight</u>: RR, 1.13 (95% CI 1.004 to 1.27, P = 0.0429)</p> <p><u>Change in hemoglobin level</u> (3 trials involving patients with baseline hemoglobin level < 11g/dL): WMD, 0.9g/dL (95% CI, 0.5 to 1.2 g/dL)</p> <p><u>Recombinant human erythropoietin (rHuEPO)</u> dose: WMD, -17.1 U/kg/wk (95% CI, -26.0 to -8.2 U/kg/wk, S)</p> <p><u>Transferring saturation</u>: WMD, 7.9% (95% CI, 5.2 to 10.5%)</p>	     
---	--------------------------------	---	---------------------------------	---------------	---	--	---

7	Myung 2010 (PMID: 19622597)[6]	Meta-analysis of 22 randomized controlled trials	161045 subjects (88610 antioxidant supplements vs. 72435 placebo or no-intervention)	Antioxidant supplements on the primary and secondary prevention of cancer	Antioxidant supplements vs. placebo or no-intervention	<p><u>Ferritin concentration</u>: no change </p> <p><u>Adverse events</u>: questionable relevance to ascorbic acid use </p> <p><u>Preventive effect of cancer</u> (22 trials): RR, 0.99 (95% CI, 0.96 to 1.03, NS) </p> <p><u>Primary prevention of cancer</u> (12 trials): RR, 1.00 (95% CI, 0.97 to 1.04, NS) </p> <p><u>Secondary prevention of cancer</u>: RR, 0.97 (95% CI, 0.83 to 1.13, NS) </p> <p><u>Risk of bladder cancer</u> (subgroup of 4 trials): RR, 1.52 (95% CI, 1.06 to 2.17, S) </p>	
8	Kaur 2009 (PMID: 19160185; Cochrane Review:	Systematic review of 9 randomized controlled trials	330 participants	Vitamin C in the treatment of asthma	NA	<p><u>Lung function</u>: NA </p> <p><u>Symptom scores</u>: NA </p>	