

博士（栄養学）学位論文

健康人における酸化ストレス関連因子，遺伝子多型
および野菜類摂取による抗酸化効果の検討

Study of Factors Affecting Oxidative Stress,
Genetic Polymorphisms and Antioxidant Effects
by Vegetable Intake on Healthy Subjects

2013年

指導教員 香川 靖雄 教授

1002001

市川 優
ICHIKAWA, Yuh

女子栄養大学

目次

抄録.....	1
略語一覧	5
序章.....	6
研究の背景	
第 1 章	12
酸化ストレス関連マーカーに影響を及ぼす環境・遺伝的因子の探索	
1.1 緒言.....	12
1.2 実験材料と方法	15
1.3 結果.....	21
1.4 考察.....	25
第 2 章	35
トマトジュースの飲用による抗酸化効果と酸化ストレスに関連する 遺伝子多型	
2.1 緒言.....	35
2.2 実験材料と方法	37
2.3 結果.....	42
2.4 考察.....	45
第 3 章	51
シュンギクの摂取による抗酸化効果と酸化ストレスに関連する遺伝 子多型	
3.1 緒言.....	51
3.2 実験材料と方法	53

3.3 結果.....	58
3.4 考察.....	60
終章.....	67
総括と今後の課題	
引用文献	71
List of figures and tables	89

抄録

【背景】 酸化ストレスは様々な循環器疾患や炎症性疾患の重大なリスク要因であり，多くの環境因子（食習慣，運動など）または遺伝因子（SNPs）が酸化傷害および抗酸化防御系に影響を及ぼすことが示唆されている．一方で，酸化ストレスに関連する疾患の予防には抗酸化ビタミン，ミネラル，生理活性物質に富む野菜摂取が有効であるとされ，日々の積極的な摂取が望まれている．そこで，本研究は野菜摂取の有用性と野菜類やその加工品による抗酸化効果を明らかにするために，従来報告されていない環境と遺伝的側面から横断的・縦断的検討を行った．

本研究の第 1 章では，定常時における酸化傷害／抗酸化レベルをいくつかのバイオマーカーにより評価し，血中微量成分と酸化ストレス関連分子の遺伝子多型（5 種）から影響因子の探索を行った．第 2 章では，野菜類の加工品として世界的に広く消費され，リコペンなどの機能性成分に富むトマトジュースを取り上げ，その飲用による抗酸化効果および遺伝子多型の影響を検討した．第 3 章では，著者等が先に行った食事介入試験において適度な抗酸化効果が期待され，より詳細な検討が課題となったシュンギク（*Chrysanthemum coronarium* L.）を取り上げ，その摂取による抗酸化効果について遺伝子多型の影響と共に調査した．

【方法】 第 1 章から第 3 章まですべて同一の集団を対象とした．慢性疾患，薬剤・サプリメントの使用，飲酒習慣，過度な運動の継続などの有無を事前に調査し，これら項目に該当しない参加に適格な 20 名を選出した．採血・採尿は 10 時間以上絶食後の早朝空腹時に行い，血中微量成分（カロテノイド，トコフェロール，ビタミン C，葉酸，総グル

タチオン，尿酸，ホモシステイン），酸化傷害マーカー（ROM，MDA，8-OHdG，8-Isoprostane）および抗酸化マーカー（BAP，TEAC）の測定に用いた．そして，酸化ストレス関連分子の SNPs（*BCMO1**A379V/*R267S，*MTHFR**C677T，*GSTP1**I105V，*SOD2**V16A）を解析し，それぞれを遺伝子型から[+]群と[-]群に分けて比較した．さらに，食物摂取頻度調査，身体活動調査および身体計測を実施した．

第 1 章では，上記パラメーターから対象者らの定常時における酸化ストレス関連マーカーとその影響因子について検討した．第 2 章では対象者 20 名を 10 名ずつ 2 群に分けてクロスオーバーデザインとし，基準食+トマトジュース（テスト期間）または基準食のみ（コントロール期間）の食事介入を各 14 日間行った．その後 4 週間のウォッシュアウトを経て 2 群の食事を切り替えた．採血と採尿は介入 0，7，14，42，49，56 日目に行い，トマトジュース飲用による影響を上記パラメーターの変動から評価した．第 3 章では第 2 章のトマトジュースをシュンギクに置き換え，対象者の割付を変更して同様のスタイルでシュンギク摂取による影響を検討した．

【結果】 第 1 章では，血清 ROM および MDA は BMI，身体活動，食物摂取，血中微量栄養素等の項目で有意な関連は認められなかった．尿中 8-OHdG はナトリウム摂取と正の関連があり（ $P < 0.001$ ），8-Isoprostane は血清葉酸値とビタミン C 値（both, $P < 0.05$ ）が影響因子として示された．血清 BAP 値は β -カロテン摂取に有意な正の関連を認め（ $P < 0.01$ ），TEAC 値は血清リコペンと有意な正の関連があり（ $P < 0.05$ ），それぞれ重要な影響因子として示された．また，*BCMO1* 多型の[+]と[-]群間の比較において，血清カロテノイド等および酸化ストレス関連マーカーからいずれにも差は認められず，*GSTP1*

多型においてはどのパラメーターからも有意な結果は得られなかった。*MTHFR* 多型は TT 型を有する[-]群が CC/CT 型の[+]群に比べて有意に血清ビタミン C 濃度が低く，尿中 8-Isoprostane レベルは高いことが認められた。

第 2 章では，テスト期間後に血清リコペン， α -カロテン， β -カロテンおよびビタミン C 濃度が有意に上昇し，酸化傷害レベル（ROM，8-Isoprostane）の低下と抗酸化レベル（TEAC）の有意な上昇が認められた（all, $P < 0.01$ ）。*MTHFR* 多型の TT 型の者は介入前では有意に 8-Isoprostane レベルが高かったが，トマトジュース飲用の 1 週間後には CC/CT 型との差がなくなった。

第 3 章ではテスト期間後に血清 β -カロテン，ルテインおよび葉酸濃度の有意な上昇と血清ホモシステイン値の低下，酸化傷害レベル（ROM，8-Isoprostane）の低下（both, $P < 0.01$ ）と抗酸化レベル（BAP）の有意な上昇（ $P < 0.05$ ）がみられた。また，テスト介入前後の脂質過酸化レベル，血清葉酸およびホモシステイン値の変動には個人差がみられ，その要因の 1 つとして *MTHFR* 多型の関与が認められた。

【考察】 第 1 章では，食事性抗酸化物質の血中濃度が，血清抗酸化レベルの高値と脂質過酸化レベルの低値に寄与する可能性が示唆され，ビタミン C，葉酸， β -カロテンおよびリコペンは野菜類が供給源となっていることから野菜摂取の重要性が推察された。また，DNA 酸化傷害レベルに関してはナトリウムの摂取が酸化ストレスの増悪因子となる可能性が推察された。第 2 章のトマトジュース飲用による抗酸化効果はリコペンなどのカロテノイド類とビタミン C 等の相補・複合的作用により得られたと推察された。第 3 章のシュンギク摂取試験から血清 β -カロテン，ルテイン，葉酸の上昇が血清ホモシステインと酸化ストレス

の改善に繋がったと示唆された．そして，第 2 章と第 3 章で認められた抗酸化効果は，尿中 8-Isoprostane レベルの高い *MTHFR* 多型の TT 型の者に対してより顕著となる可能性が推察された．

略語一覧

- ・ ROS, Reactive oxygen species: 活性酸素種
- ・ ROM, Derivatives of reactive oxygen metabolite: 活性酸素代謝産物
- ・ MDA, Malondialdehyde: マロンジアルデヒド
- ・ BAP, Biological antioxidant potential: 抗酸化力（鉄イオン還元能）
- ・ TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity: Trolox 等量抗酸化能
- ・ 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン
- ・ 8-Isoprostane, 8-isoprostaglandin F₂ α : 8-イソプラスタグランジン F₂ α
- ・ SNPs, Single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型
- ・ BCMO1, β -carotene 15, 15'-monooxygenase: β -カロテン中央開裂酵素
- ・ MTHFR, Methylenetetrahydrofolate reductase: メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素
- ・ GSTP1, Glutathione S-transferase P1: グルタチオン S-転移酵素 P1
- ・ SOD2, Superoxide dismutase 2: スーパーオキシドジスムターゼ 2

序章

研究の背景

酸化ストレス関連疾患

様々な疾病に関与することが示唆される活性酸素は，ヒトのエネルギー産生の代謝物として，またその強い反応性から免疫系の中心的な役割を担うことなどで生体には不可欠な存在である．しかし，活性酸素やそれと同様に生体分子に対して反応性の高いフリーラジカルの過剰な生成は脂質過酸化，遺伝子損傷，タンパク質変性，酵素阻害などの影響を及ぼすことが懸念されている．通常はこのフリーラジカルや活性酸素種（Reactive oxygen species, 以下 ROS）に対して，内因性のスーパーオキシドジスムターゼ（以下，SOD）やグルタチオンペルオキシダーゼ（以下，GPx）などの酵素類および外因性（食事性）のカロテノイド，トコフェロールや生理活性物質のフラボノイド類などが抗酸化防御系として機能し ROS は不活化され，両者の平衡が保たれている．しかし何らかの要因でこの両者にインバランスが起き ROS の過剰な発現を招く酸化ストレス（状態）という概念が近年定着しつつある⁽¹⁾．酸化ストレスとは ROS の生成増大とそれに伴う抗酸化防御系の破壊から生体分子に対して酸化的傷害が及ぶことと定義され⁽¹⁾，特に血管内皮細胞の炎症に深く関与していることが疑われている．アテローム性動脈硬化症については酸化 LDL（Low-density lipoprotein）やマクロファージが内皮細胞に作用して ROS の産生を増大させることから⁽²⁾，その生成さ

れたヒドロキシラジカル，過酸化水素（ H_2O_2 ）などの ROS を炎症性メディエーターとして重視する傾向が出ている．酸化ストレスはその他に 2 型糖尿病やがんなどの循環器疾患⁽²⁻⁴⁾または季節性アレルギー⁽⁵⁾や加齢黄斑変性症⁽⁶⁾など幅広くその関与が指摘されており，これらをまとめて酸化ストレス関連疾患という分類もなされている⁽³⁾．さらに，酸化ストレスは喫煙，運動習慣，食習慣などの一般的なライフスタイルとも密接に関係しており，酸化ストレスの是正はハイリスクだけではなくポピュレーションへのアプローチも必要となる．ヒトの健康を維持する上で動脈硬化，がん，糖尿病などの酸化ストレス関連疾患を予防することはきわめて重要であり，一次予防のためにはそのリスクを早期に予測・発見でき，信頼性の高い酸化ストレスの評価指標が必要となる．

酸化ストレス関連マーカーの利用

一般的に，スーパーオキシドアニオン，ヒドロキシラジカルや一重項酸素などの ROS は反応性が非常に高く半減期が短いことから，直接これらを測定することは困難かつ生体内の実情を反映できない可能性が高い．現在普及している酸化ストレスの評価指標は，ROS によって修飾された核酸，脂質，タンパク質などの二次生成物が大半を占める．また，ROS による酸化的損傷を修復する抗酸化防御系の酵素活性またはラジカルや金属イオンを用いて酸化に対する還元力を評価することも酸化ストレスを総合的に捉えるために重要である．実際に多種多様なバイオマーカーが開発され，疫学および臨床分野で疾病リスクのスクリーニングなどに応用されており，その有用性が支持されている^(7,8)．さらに，それ以外の用途として，抗酸化活性の高い食品や抗酸化ビタミン類の補給による酸化ストレスの改善効果または一時的な運動の負荷による

酸化ストレスの変動などのモニタリングマーカーとしての利用も広がっている⁽⁹⁻¹¹⁾。

疾病予防と野菜摂取

今日まで予防医学的見地から、酸化ストレスに関与する生活習慣、生活環境または身体特性などの影響因子の解明・特定が試みられている。その結果から推察される傾向はまだ一定ではないものの、複数の先行研究から支持されているものを以下に挙げる。酸化ストレス増悪因子として、喫煙歴、飲酒量・飲酒頻度および肥満またはやせ^(8,12-14)などがあり、改善因子には適度な運動、望ましい食習慣、野菜および果物の摂取増大、減量^(12,13,15-17)などが示唆されている。この中で多くの疫学研究より、エビデンスの高い予防因子に野菜摂取が挙げられている。野菜摂取と疾病の関連をまとめた WHO/FAO および WCRF/AICR の報告^(18,19)から、肥満、循環器疾患、2 型糖尿病、数種のがん（口腔、咽頭、喉頭、食道、胃）に対する野菜や果物摂取の影響評価は「Probable decreasing risk」以上とされ、健康維持・増進のための野菜および果物の積極的な摂取が提唱されている。野菜・果物の摂取増大による効果の期待は大きく、WCRF/AICR の報告書では非でんぷん質性の野菜と果物摂取量の Public health goal を 600 g/day と設定している。日本国内においては、国立がんセンターが掲げる日本人のためのがん予防⁽²⁰⁾で野菜・果物の摂取量の目標は 400 g とされている。また、2012 年から厚生労働省がスタートさせた Smart Life Project⁽²¹⁾における重点課題の中に野菜摂取の増大が挙げられており、現在の国民全体の 1 日平均摂取量 280 g（平成 22 年国民健康栄養調査結果⁽²²⁾20 歳以上の平均値）に対してプラス 70 g の野菜を摂ること（目標 350 g/day）を推奨して

いる．健康寿命の延伸を目的に実践される本施策では，運動と禁煙に並ぶ 3 本柱の 1 つとして食生活が位置しており，野菜摂取が食生活の中でとりわけ重要であることを示している．野菜摂取による疾病リスク低減効果は，*in vitro* または食事介入試験をはじめとした *in vivo* の試みにおいてその影響が検証されている．酸化ストレス関連マーカーを用いた抗酸化効果の評価も進められており，野菜・果物の総摂取量の増大，アブラナ科野菜などの個別の野菜摂取，野菜類の加工品（e.g., 野菜ジュース，ペースト，スープ）の利用といった見地から研究が行われている^(9,10,16,17,23-26)．しかしながら，大規模なコホート研究で野菜摂取の有効性が支持されているにもかかわらず，短期・中期的なヒト介入試験の領域では結果に矛盾があるものは多い^(27,28)．

酸化ストレスに関連する遺伝子多型

アテローム性動脈硬化症や糖尿病などの慢性疾患を有する患者と健康人間の酸化ストレス状態の違いは明らかにされつつある⁽¹⁻⁴⁾．その一方で健康な集団内において酸化ストレスの個人間変動が相当に大きいことが報告されている^(16,29)．その背景には食事，喫煙，飲酒および運動などの生活習慣全般の差異による影響は前述のとおりであるが，これら環境因子以外に遺伝的背景の関与が指摘され始めている．医学・薬学の分野では遺伝的素因への対応について多くの研究が進められており，個別の適正な医療の実現化に向けて動き出している．しかし，健康人の個人間変動を酸化ストレスや抗酸化効果の側面から考察している研究はわずかである．酸化ストレス反応を調節する酵素やその他抗酸化物質の活性や代謝に関連する **Single Nucleotide Polymorphisms**（以下，SNPs）の影響は酸化ストレスレベルを評価する上で勘案する必要のある因子だ

と捉えられる．実際に，抗酸化酵素や酸化／抗酸化分子の調節を担うグルタチオン S 転移酵素（Glutathione S-transferase; *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*），内皮型一酸化窒素合成酵素（Endothelial nitric oxide synthase; *eNOS*），リポ蛋白結合性ホスホリパーゼ（Lipoprotein-associated phospholipase; *LpPLA2*），UDP グルクロン酸転移酵素（UDP-glucuronosyltransferase; *UGT1A1*），パラオキシナーゼ（Paraoxonase; *PON1*）などの SNPs による酸化ストレスレベルへの影響が調査されている^(5,30-32)．しかし，これらの健康人における横断的な検討は十分にはなされておらず，縦断的な研究にいたってはさらに途上の段階にある．酸化ストレスを扱う研究において酸化ストレス関連分子の SNPs を解析し遺伝的側面から解釈することは意義があると考えられる．そして，前述したヒト介入試験における結果の矛盾には遺伝的因子の関与が個人間の酸化ストレス改善効果に違いをもたらした可能性は否定できない．

これらの背景より，本研究は酸化ストレス関連マーカーを評価指標として用い，[1] 野菜摂取の重要性・有用性を確認すること，[2] 特定の野菜類摂取による抗酸化効果を明らかにすることの 2 点を全体の目的として横断的・縦断的な検討を行った．そこからいくつか得た新たな知見についてここに報告する．

本論文の構成および概略は以下のとおりである．第 1 章では，定常時における酸化ストレス関連マーカーとそれに関与する環境および遺伝因子の探索を行い，ヒト生体内の酸化傷害または抗酸化レベルに対する影響を調べた．その中でも野菜摂取状況と遺伝子多型から酸化ストレス関連マーカーへの影響があるかを重点に検討を行った．第 2 章では，

野菜類の加工品として世界的に広く消費され，ヒト介入研究の分野で主要な位置にあるリコペンの豊富なトマトジュースを取り上げ，その飲用による抗酸化効果を検討した．第 3 章では，著者等が先に行った健康人を対象とした食事介入試験⁽³³⁾において適度な抗酸化効果が期待され，より詳細な検討が課題となったシュンギク (*Chrysanthemum coronarium* L.) を取り上げ，その摂取による抗酸化効果について調査した．それぞれの研究の目的は各章の緒言にて述べる．

第 1 章

酸化ストレス関連マーカーに影響を及ぼす 環境・遺伝的因子の探索

1.1 緒言

慢性的な疾患を持たない健康人において酸化ストレスに影響を及ぼすとされる要因は多岐に渡っており，性，年齢，喫煙歴，運動習慣，飲酒習慣，食物摂取状況などにより一般集団内で酸化ストレスレベルの相当な分布の幅が認められている^(16,29)．これには，生活習慣などの環境の差異とともに酸化ストレスの調節を担う酵素や抗酸化作用を有する栄養素等の代謝に関与すると示唆される SNPs の影響，つまりは SNP の遺伝子型（Genotype）による差異を考慮することも求められている．これら環境的・遺伝的因子が健康な集団において酸化ストレスに影響を及ぼすという仮説を検討するために，酸化傷害および抗酸化マーカーにおける両因子の関連について横断的な検討を行った．血清および尿中の酸化ストレス関連マーカーと酸化傷害／抗酸化に関わる生体内の微量栄養成分等（カロテノイド，トコフェロール，ビタミン C，葉酸，ホモシステインなど）の分析を行い，食物・栄養素摂取の状況について調査した．その中でも特に野菜摂取に焦点を当て影響因子の検索を試みた．同時に，酸化ストレス関連分子の調節や代謝に寄与する 5 つの遺伝子多型を調べ，遺伝的因子の影響に関しても併せて考察した．

本研究で用いた酸化ストレス関連マーカーは、疾病リスクのスクリーニングや食事介入研究のモニタリングなどに活用されている^(7,8,10,12,13,16,28,29)以下の 6 つである。酸化傷害マーカーは、血清ヒドロペルオキシド濃度を反映する derivatives of Reactive Oxygen Metabolite（以下、ROM）、過酸化脂質の分解物である Malondialdehyde（以下、MDA）濃度、DNA の構成物質のデオキシグアノシンがヒドロキシラジカルにより損傷を受けることで生成し尿中に排泄される 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（以下、8-OHdG）濃度および生体膜リン脂質のアラキドン酸が過酸化を受けることで生成する尿中 8-isoprostaglandin F2alpha（以下、8-Isprostane）濃度の 4 つである。抗酸化マーカーは、血中の三価鉄イオンの還元力を反映する Biological Antioxidant Potential（以下、BAP）およびラジカルに対する抗酸化能を反映する Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity（以下、TEAC）の 2 つを用いた。

また、本研究で解析を行った遺伝子多型は β -carotene 15, 15'-monooxygenase 遺伝子（以下、*BCMO1*）の A379V および R267S 多型、Methylenetetrahydrofolate reductase 遺伝子（以下、*MTHFR*）の C677T 多型、Glutathione S-transferase P1 遺伝子（以下、*GSTP1*）の I105V 多型および Superoxide dismutase 2 遺伝子（以下、*SOD2*）の V16A 多型の 5 つである。

β -カロテンからレチノールへの転換効率に影響することが報告されている *BCMO1**A379V/*R267S 多型は、そのマイナーアレルをもつ者の転換効率が正常型に比べ 32-69% 低く^(34,35)、他方では血中において β -カロテンの上昇と付随して発生するカロテノイド類のインバランスが示唆されている⁽³⁶⁾。また、生体内における β -カロテンの過剰な蓄積はそ

れ自体がプロオキシダント化し酸化傷害を誘引すること⁽³⁷⁾、さらには、脂質代謝の恒常性に破たんを生じる可能性が懸念されている⁽³⁸⁾。ホモシステイン代謝に関与する *MTHFR***C677T* 多型は CC/CT 型の者に比べ TT 型は血中葉酸濃度が低く、ホモシステイン濃度が高いことが報告されている^(39,40)。そして、血中の高濃度のホモシステイン（高ホモシステイン血症）から、ROS による内皮細胞傷害が引き起こされ、延いては動脈硬化症に発展する可能性が指摘されている⁽⁴¹⁾。還元型グルタチオン（GSH）の異物抱合を触媒する酵素の調節に関与する *GSTP1***I105V* 多型においてはそのマイナーアレルを有する者は解毒能力が正常型と比較して低いことが示唆されており、アレルギー反応の増強や肺がんリスクの増大などの影響が示されている⁽⁴²⁾。SOD のミトコンドリアへの取り込みに関与する *SOD2***V16A* 多型は、変異型アレルを有する者はその取り込み効率が低くミトコンドリア由来の ROS による DNA などへの酸化傷害が指摘されており、動脈硬化症への影響も報告されている⁽⁴³⁾。現在までに報告されている上記 5 種の遺伝子多型の日本人におけるマイナーアレル頻度は、以下のとおりである。

*BCMO1***A379V*; 0.12, *BCMO1***R267S*; 0.14, *MTHFR***C677T*; 0.33, *GSTP1***I105V*; 0.16, *SOD2***V16A*; 0.16 ^(35,44,45)

さらに、本研究は本章から第 3 章まですべて同じ集団を対象とするため、介入前の両因子の影響により被験者の特徴を把握することも目的の一部とした。

1.2 実験材料と方法

1.2. (a) 対象者

対象者は私立大学に在籍する女子大学生 24 名より選出した。試験参加については、質問票を用いて慢性的な疾患、喫煙歴、飲酒習慣（厚生労働省の国民健康栄養調査の定義に従い、週 3 日以上、清酒に換算し 1 日 1 合以上飲酒する者を習慣有りとした）、過度な運動の継続、薬剤およびサプリメントの使用、一般的な食品アレルギーの有無を事前に調査し、これらを有する者は調査対象から除外した。対象として適格な 20 名にはインフォームドコンセントを行い、本研究への同意を書面で得た。本研究は、香川栄養学園倫理委員会の審査・承認を受けて実施した（承認番号第 117-G）。

1.2. (b) 血中微量栄養素等の測定

採血は少なくとも 10 時間以上絶食後の早朝空腹時に肘正中皮静脈より血液を採取し、分離した血清はレチノール、カロテノイド、トコフェロールおよび酸化ストレス関連マーカーの測定まで -80°C で保存した。また、血中総グルタチオンの測定のために抗凝固剤として EDTA を用いた採血管に血液を採取し、全血を 0.6N 過塩素酸 (HClO_4) で除タンパク処理した後に凍結し（株）SRL へ依頼して高速液体クロマトグラフィー法（以下、HPLC 法）により酸化型（GSSG）および還元型（GSH）の合計値である総グルタチオンを分析した。血清ビタミン C（血清を 0.8N 過塩素酸で除タンパク処理後 HPLC 法）、葉酸（化学発光酵素免疫法、CLEIA）および尿酸（ウリカーゼペルオキシダーゼ法）についても同社へ委託し、各測定方法による分析を行った。血清ホモン

ステインは、アルフレッサファーマ（株）に分析を依頼し、Alfred Auto Hcy Kit を用いた酵素法にて酸化型および還元型の合計値である総ホモシステインを測定した。

血清レチノール，カロテノイド（ α -カロテン， β -カロテン，ルテイン，ゼアキサンチン， β -クリプトキサンチン，リコペン）および α -トコフェロールは Oshima ら⁽⁴⁶⁾および Aizawa ら⁽⁴⁷⁾の方法に準じて，高速液体クロマトグラフィー・フォトダイオードアレイ（以下，HPLC-PDA）を用いた定量を行った．はじめに血清 200 μ L に対し，アポカロテナール（カロテノイド用），レチニルアセテート（レチノール用）， δ -トコフェロール（ α -トコフェロール用）を内部標準物質として各 10 μ L 加え，0.01%（w/v）ブチルヒドロキシトルエン（BHT）-エタノール溶液 5 mL を添加した．そこにヘキサン-ジクロロメタン（4:1, v/v）溶液 4 mL を加え，ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌した後，遠心分離（1000 x g, 10 min.）し，上清を分取した．この操作をさらに 2 回繰り返して集めた上清を減圧下で乾固した後，ヘキサン-アセトン-エタノール-トルエン（10:7:6:7, v/v/v/v）混液（以下，HAET 混液）200 μ L に溶解し，フィルターでろ過して試験溶液とした．HPLC による分析の設定条件等は以下に示すとおりである．

カラム, YMC carotenoid (5 μ m, 4.6 x 250 mm, YMC, Wilmington, NC, USA); 温度, 30°C; 流速, 1.0 mL/min; 注入量, 10 μ L; 検出波長, at 295 nm for α -Tocopherol; at 325 nm for retinol; at 460 nm for carotenoids.

移動相の組成, 溶媒 A: メタノール : tert-ブチルメチルエーテル : 蒸留水 (75:15:10, v/v/v); 溶媒 B: メタノール : tert-ブチルメチルエーテル : 蒸留水 (8:90:2, v/v/v); グラジエント条件, 分析開始;

溶媒 A 100% (0 min.) , 溶媒 B 100% (25 min.) , 溶媒 B 100% (28 min.) , 溶媒 A 100% (30 min.) , 分析終了; 溶媒 A 100% (40 min.) .

測定値は内部標準物質の回収率によって補正した. レチノール, カロテノイドおよびトコフェロールのクロマトグラムを図 1 に示す.

1.2. (c) 酸化ストレス関連マーカーの測定

血清酸化傷害マーカーの ROM は ROM test キット (Diacron, Grosseto, Italy) を用いて Free radical analytical system 4 (FRAS4, Diacron, Grosseto, Italy) による測定を行った. 既定の手順に従い, 血清サンプル 10 μ L を酢酸緩衝液に添加および混合し, それを呈色クロモゲンの入ったプラスチックセルに移して攪拌した. その反応溶液を遠心分離 (6000 rpm x 1 min, 37°C) した後, 37°C で 5 分間反応させ, 光度計で 505 nm における吸光度を測定し, 過酸化水素 (H_2O_2) 中のヒドロペルオキシド濃度の 0.08 mg/dL H_2O_2 を任意の単位である 1 CARR.U として表した.

脂質過酸化マーカーである血清 MDA は TBARS Assay Kit (Cayman Chemical, Co., Ann Arbor, MI, USA) を用いて測定した. 規定の手順に従い, チオバツール酸 (以下, TBA) 530 mg に対し, TBA Acetic Acid 50 mL と TBA Sodium Hydroxide 50 mL を加え混合し調製した (発色剤). MDA 標準液または希釈した血清サンプル 100 μ L を 15 mL 容ポリプロピレン遠沈管に入れ, さらにドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 溶液 100 μ L を添加し攪拌した. そこへ発色剤 4 mL を加えキャップをして 100°C で 1 時間加熱した. その後, 遠沈管を 10 分間氷冷し反応を止め, 遠心分離 (1600 x g, 4°C, 10

min.) を行った。30 分間室温で静置した後、遠沈管から 150 μ L の反応溶液を採取してマイクロプレートに添加し、マイクロプレートリーダーで 530-540 nm における吸光度を測定した。測定値は MDA 濃度で換算し、 μ mol/L で表した。

血清抗酸化マーカーである BAP は、BAP test キット (Diacron, Grosseto, Italy) を用いて上記 ROM と同様に FRAS4 による測定を行った。既定の手順に従い、チオシアン酸塩誘導体を含む試薬が入ったプラスチックセルに三価鉄塩含有試薬 50 μ L を添加して混合後、光度計で三価鉄イオンのベース濃度を測定した。測定後の同セルに血清サンプル 10 μ L を加え、37°C で 5 分間反応させ、光度計で 550 nm における吸光度を測定した。測定値は血清添加前のベース濃度と添加 5 分後の値を比較した鉄イオンの還元量 (三価から二価) を μ mol/L で表す。なお、BAP は FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) と同様の原理を用いた測定法である⁽⁴⁸⁾。

TEAC は、Miller ら⁽⁴⁹⁾および Kambayashi ら⁽⁵⁰⁾の方法に準じて、ミオグロビンの偽ペルオキシダーゼ反応による ABTS の酸化を利用した方法により測定した。1 mM 2,2'-アジノビス (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium) 溶液 (以下、ABTS 溶液) に 0.35 mM ペルオキシ二硫酸カリウムを適宜加え、室温暗所で 12-16 時間反応させた。その反応溶液 (ABTS ラジカル溶液) を蒸留水で希釈し、734 nm における吸光度が 0.80 ± 0.02 A.U.となるように調製した。エタノールで希釈した Trolox 溶液または希釈した血清サンプル 5 μ L と ABTS ラジカル溶液 300 μ L を混合し、4 分後の 734 nm における吸収度を測定した。測定値は、Trolox 濃度で換算し μ mol/L で表した。

採尿は採血と同じタイミングで早朝スポット尿をプラスチックチュ

ープに採取し，測定まで-80°Cで保存した．尿中酸化傷害マーカーの 8-OHdG 濃度は，New 8-OHdG Check（Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan）を用いた酵素免疫測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）の競合型 ELISA 法により測定した．規定の手順に従い，8-OHdG が固相化されたマイクロプレートに，8-OHdG 標準溶液または希釈した尿サンプル 50 μ L と第一抗体（抗 8-OHdG モノクローナル抗体）50 μ L を加え，37°C で 1 時間反応させた後に洗浄し，第二抗体（酵素標識抗体）100 μ L を添加して 37°C で 1 時間反応させた．反応溶液を除去・洗浄後，希釈した発色剤 100 μ L を加えて室温で 15 分間反応させた．その後，反応停止液 100 μ L を添加して反応を止め，マイクロプレートリーダーで 450 nm における吸光度を測定した．

尿中 8-Isoprostane 濃度は，Urinary Isoprostane EIA kit（Oxford Biomedical Research Inc., Oxford, MI, USA）を用いた競合型 ELISA 法により測定した．規定の手順に従い，15-isoprostaneF2t ポリクローナル抗体が固相化されたマイクロプレートに 15-isoprostaneF2t 標準溶液または希釈した尿サンプル 100 μ L と 15-isoprostaneF2t HRP Conjugate（ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ標識-15-isoprostaneF2t）100 μ L を添加し室温で 2 時間 反応させた後，反応溶液を除去・洗浄した．そこへ TMB（3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine）発色基質 200 μ L を加えて 35 分間反応させた後，3N 硫酸 50 μ L を添加して反応を停止させ，マイクロプレートリーダーで 450nm における吸光度を測定した．また，サンプルはスポット尿であることから，8-OHdG および 8-Isoprostane 濃度の補正をするために尿中クレアチニン濃度も同時に測定した．Jaffe 法に基づいたクレアチニン-テストワコー（Wako Pure

Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて分析し, そのクレアチニン濃度により 8-OHdG と 8-Isoprostane 濃度を補正し, それぞれを ng/mg creatinine で表した.

1.2. (d) 遺伝子多型の解析

上記血中成分の測定の際に採取した EDTA を添加した全血サンプルは, Magtration Reagent Mag DEA DNA 200 (GC) (Precision System Science Co., Ltd., Chiba, Japan) を用いて DNA/RNA 自動検出装置 Magtration System 6GC (Precision System Science Co., Ltd., Chiba, Japan) により核酸を抽出および精製し, ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR 法) による DNA の増幅を行った. *MTHFR***C677T* 多型は, プレシジョン・システム・サイエンス (株) に委託し BISTTM (Beads array in Straw Tip) を用いたゲノム解析を行った⁽⁵¹⁾. *BCMO1***A379V* /**R267S*, *GSTP1***I105V* および *SOD2***V16A* 多型は, 自治医科大学人類遺伝学研究部に依頼し, Taqman プローブを用いて ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) による解析を行った⁽⁵²⁾.

1.2. (e) 質問紙による調査および身体計測

採血・採尿と同日に, 身長および体重の測定を行った. また, 対象者の習慣的な食物摂取状況を把握するために, 食物摂取頻度調査票 (食物摂取頻度調査 FFQg Ver.3.0⁽⁵³⁾) を用いてエネルギー, 栄養素および食品群別の摂取量について調査し, 身体活動レベルを評価するために生活活動・運動時間の調査も併せて行った.

1.2. (f) 統計解析

測定および調査項目から得たデータは、正規性について Shapiro-Wilk の検定およびヒストグラムから確認し、分布に歪みのあるものは変数変換またはノンパラメトリック検定を採用した。遺伝子解析の結果からそれぞれの多型の正常型／ヘテロ型／変異型の 3 つを代謝機構や活性などの違いが報告されているいくつかの先行研究^(30,34,35,39-41,44,45)を参考にし、Genotype[+]および[-]の 2 群に分けて解析を行った。BCMO1*A379V/*R267S 多型の両方が正常型の者を[+]群とし、どちらか一方または両方の多型にマイナーアレルをもつ者を[-]群とした。MTHFR*C677T 多型では CC/CT 型の者を[+]群とし、TT 型を有する者を[-]群とした。GSTP1*I105V 多型では II 型の者を[+]群とし、IV/VV 型の者は[-]群とした。なお、SOD2*V16A 多型については、マイナーアレルをもつ対象者が 3 名のみであったため解析項目から除外した。

酸化ストレス関連マーカーと血中・尿中成分および生活習慣の変数の相関性の検定は Pearson の相関係数を用い、遺伝子多型による 2 群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を行った。さらに、これらの解析結果および酸化ストレス関連マーカーに対して影響を及ぼす可能性のある変数を用いたステップワイズ法にて重回帰分析を行った。

有意水準は 5%未満とし、解析には SPSS Ver.19.0J for Windows (IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

1.3 結果

調査は 2010 年 10 月から 11 月に実施した。対象者の特性を表 1-1 お

よび 1-2 に示す．年齢は 20-21 歳であり，Body mass index（以下，BMI）の判定基準からやせ（ $<18.5 \text{ kg/m}^2$ ）は 3 名（15%），肥満（ $>25 \text{ kg/m}^2$ ）の該当はなく，中央値は 20.9 kg/m^2 であった．遺伝子型（Genotype）の分類では，*BCMO1**A379V/ *R267S [+]: [-] は 15 名：5 名，*MTHFR**C677T [+]: [-] は 12 名：8 名，*GSTP1**I105V [+]: [-] は 10 名：10 名であった．食事調査から野菜の平均摂取量は 250 g/day であり，うち平均 27% が緑黄色野菜，平均 73% がその他の野菜であった（緑黄色野菜は五訂増補日本食品標準成分表⁽⁵⁴⁾の分類に準ずる）．

1.3.(a) 血中成分・食物摂取と酸化ストレス関連マーカーの相関性

血中微量栄養素等および食物摂取と血中酸化傷害マーカー（ROM，MDA）の相関分析の結果を表 2 に示す．血清 ROM 値および MDA 値から，血清・尿中パラメーター，栄養素摂取量および食品群別摂取量との間に有意な相関は認められなかった．血中微量栄養素等および食物摂取と血中抗酸化マーカー（BAP，TEAC）の分析結果を表 3 に示す．血清 BAP 値と血中成分の関連は認められなかったが， β -カロテン摂取のみに有意な正の相関がみられた（ $r = 0.48$, $P = 0.034$ ）．血清 TEAC は血清リコペン濃度との間に正相関が認められた（ $r = 0.50$, $P = 0.026$ ）．食物摂取との間にはいずれにおいても関連はみられなかった．血中微量栄養素等および食物摂取と尿中酸化傷害マーカー（8-OHdG，8-Isoprostane）の分析結果を表 4 に示す．尿中 8-OHdG 濃度と血中パラメーターの相関性は認められなかったが，炭水化物エネルギー比およびナトリウム摂取と 8-OHdG 間には有意な相関がみられた（ $r = -0.50$, $P = 0.047$; $r = 0.75$, $P < 0.001$, respectively）．尿中 8-Isoprostane 濃度は血清ビタミン C および血清葉酸と負の相関があり（ $r = -0.55$, $P =$

0.012; $r = -0.59$, $P = 0.006$, respectively) , 食物摂取では α -カロテン, β -カロテン, 葉酸摂取との間にそれぞれ負の相関が認められた ($P = 0.020$, $= 0.037$, $= 0.038$, respectively) .

野菜摂取量を総量／緑黄色／その他に分け, それら 3 群と血中パラメーターおよび酸化ストレス関連マーカー間の相関を分析した結果は表 5 に示す. 総量と緑黄色は共通して血清 β -クリプトキサンチン, α -カロテン, β -カロテン, 葉酸濃度との間に正の相関があり, 血清ホモシステインと負の相関が認められた. その他の野菜は血清 α -カロテンのみに正の相関がみられた. また, 酸化ストレス関連マーカーにおいては唯一, 緑黄色野菜摂取と血清 BAP 値の間に有意な正の相関が認められた ($r = 0.51$, $P = 0.023$) . また, 酸化ストレス関連マーカー間 (e.g., ROM vs MDA) の統計学的に有意な相関性はいずれにおいても認められなかった (data not shown) .

1.3.(b) 遺伝子多型に関連するバイオマーカー

遺伝子多型をそれぞれ[+]群および[-]群に分けて血中微量成分と酸化ストレス関連マーカーにおける 2 群間の差について比較した結果を表 6-1 および 6-2 に示す. *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T および *GSTP1**I105V 遺伝子の多型は, 関与する可能性のある血中微量栄養素等およびすべての酸化ストレス関連マーカーより群間差を検討した. *BCMO1**A379V/*R267S 多型においては血清 β -カロテンをはじめとするカロテノイド類およびレチノール濃度から 2 群間を比較したが, いずれにも差は認められず, 酸化ストレス関連マーカーにおける同様の検討でも有意差は認められなかった. *MTHFR**C677T 多型で 2 群間に差がみられたのは血清ビタミン C 濃度および尿中 8-Isoprostane 濃度であ

った． TT 型を有する[-]群が CC/CT 型の[+]群に比べて有意に血清ビタミン C 濃度が低く，尿中 8-Isoprostane 濃度は高いことが認められた． *GSTP1*I105V* 多型においてはどのパラメーターからも有意な結果は得られなかった．

1.3.(c) 酸化ストレス関連マーカーと血中成分・食物摂取変数の関連

酸化ストレス関連マーカーとの間に有意な相関性がみられた因子を中心に検討した重回帰分析の結果を表 7 および表 8 に示す．血清酸化傷害マーカーの ROM および MDA では関連付けられる因子がなかった．尿中酸化傷害マーカーの 8-OHdG の重回帰分析では BMI，身体活動，血清尿酸値および炭水化物エネルギー比に依存しない正の影響因子としてナトリウム摂取が示され，変化量は 55.5%であった．8-Isoprostane を目的変数としたモデルにおいては，BMI，身体活動，血清 β -カロテン，血清ホモシステイン，*MTHFR*C677T* 遺伝子多型で調整した結果，血清葉酸および血清ビタミン C の 2 因子に負の関連が認められた．血清ビタミン C に比べ血清葉酸値が 8-Isoprostane との関連の度合いが高く，このモデルの変化量は 44.7%であった．抗酸化マーカーの BAP 値は緑黄色野菜摂取で調整したモデルにおいて β -カロテン摂取が影響因子として示され，BAP との間に正の関連が認められた．その変化量は 31.3%であった．血清リコペン値は血清ルテイン値の調整後における血清 TEAC 値の独立した影響因子であり，その正の関連の変化量は 20.5%であった．

1.4 考察

本研究では、4種の酸化傷害マーカーと2種の抗酸化マーカーを調べ、それら血中・尿中酸化ストレス関連マーカーに対する影響因子を、血中微量成分と野菜摂取を中心とした食物摂取などの環境および遺伝的な側面から検討した。

1.4.(a) 酸化傷害マーカーとその影響因子

尿中酸化傷害マーカーの 8-OHdG は、炭水化物エネルギー比とナトリウム摂取との間にそれぞれ有意な相関性が認められ、さらにナトリウム摂取においては 8-OHdG の重要な影響因子であることが重回帰分析より示された。ナトリウムまたは塩化ナトリウム（食塩）の摂取と酸化ストレスの関連は、おもに動物実験により報告されている。食塩摂取は高血圧や胃がんへの関与が指摘され、これらは食塩による血管内皮細胞傷害および酸化ストレスの誘導によって疾病の発展に関与すると考えられている。実際に食塩摂取量と収縮期血圧および尿中 8-OHdG に正の相関が示されており、マウスを対象とした検討からも食塩負荷により ROS の増大と酸化ストレス誘導性シグナル分子（NF- κ B）の活性化が示されている⁽⁵⁵⁾。また、血管内皮機能の改善には食塩摂取制限が効果的であるとする報告や、食塩摂取から血圧への影響が及ぶ以前に ROS 増大が認められており⁽⁵⁶⁾、DNA 酸化傷害の変動要因としてナトリウム（食塩）摂取量は重要である可能性が示唆された。

尿中 8-Isoprostane については食事調査の結果から、ビタミン C および葉酸摂取、そして血清ビタミン C および血清葉酸濃度からすべて負の相関性がみられ、さらに重回帰分析から血清ビタミン C および血清葉酸値は 8-Isoprostane の負の関連因子として見出された。健康人かつ

非喫煙者を対象とした検討が少ない中で、Holt らによる 13-17 歳の青年期の男女 285 名を対象とし、野菜・果物の摂取と酸化ストレスの関連を示した横断研究から、ビタミン C および葉酸摂取量と尿中 8-Isoprostane 濃度はどちらも有意な負の相関がみられており⁽⁵⁷⁾、本研究の結果と一致していた。食事介入研究においても野菜・果物摂取の増大によって起こる血中ビタミン C および葉酸値の上昇は尿中の脂質過酸化レベルを低下させることが報告されている⁽¹⁷⁾。また、喫煙者においては血清ビタミン C を含む生体内の抗酸化物質の全般的な低値から脂質過酸化物の蓄積が懸念されている⁽⁵⁸⁾。喫煙者に限らずビタミン C や葉酸の十分な摂取と補完が脂質過酸化に対して重要であることが本研究から推察された。食品中に含まれるビタミン C および葉酸は、水溶性ビタミンであり熱、酸素、光に対して不安定な点が共通しており、その性質から生の野菜摂取または野菜・果物の総摂取量とビタミン C および葉酸の血中濃度が関連付けられている⁽⁵⁹⁾。本研究において、野菜と果物の総摂取量と 8-Isoprostane に関連性はみられず、食事調査に用いた質問票では摂取形態（e.g., 生、煮る、炒める）についてカテゴリー化されていないため、その点は不明瞭となった。

その他の環境因子として、本研究では見出されなかったが、尿中 8-OHdG と 8-Isoprostane はどちらも BMI との負の相関が示唆されており、低体重の者の酸化傷害レベルが相対的に高い可能性が先行研究から報告されているが⁽⁸⁾、本研究では両者から関連性は認められなかった。これにはおそらく低体重の者が 20 名中 3 名であったことが影響しているかもしれない。また、身体活動についても本研究の結果から関連性を認めなかったが、運動は適度な範囲であれば抗酸化酵素の活性増大が起こり、生成された ROS は不活化され酸化傷害／抗酸化の平衡が維持さ

れる可能性が示されている⁽¹⁵⁾。本研究の調査から、身体活動レベルⅢ（PAL > 1.85）の該当者はなく、対象者らがすべてレベルⅠ-Ⅱの範囲であったことも関連性が見出されなかった一因であると推察された。

血清酸化傷害マーカーである ROM および MDA からは有意な関連性をもつ因子が認められなかった。ROM は、同様の原理を用いた測定系が他になく、定常時における食物摂取との関連についての知見はわずかである。先行研究では Matsushita ら⁽²⁹⁾による非喫煙者の大学生を対象とした調査から性差について、Fukui ら⁽⁷⁾による平均年齢 47±11 歳の健康な日本人被験者の調査から ROM 値の関連因子に性別、高感度 C-反応性たんぱく質および腹部内臓脂肪面積（Visceral fat area, 以下 VFA）が示されている。性差については同一見解として男性よりも女性において有意に ROM 値が高いと示されている。また、メタボリックシンドロームのリスク因子である VFA と ROM の正の関連にはアルコールなどを含む食事因子が少なからず影響していると推察される。今後健康人における食物摂取と ROM の関連性の検討が幅広く実施されることが必要である。

一方、MDA は 8-Isoprostane と同様に脂質過酸化の結果として生じる代謝物であるが、本研究において両者に同様の傾向は認められなかった。その要因として、生成の過程が異なることや測定サンプルの対象が血清または尿であったことが挙げられる。一般的に、血中と尿中のバイオマーカーは半減期や影響が反映される期間が異なる。また、MDA の測定に用いた TBARS 法は、脂質ヒドロペルオキシド（L-OOH）の分解産物である MDA に TBA を加えて加熱および酸性下での反応によって生じた赤色色素を測定する方法であり、生体脂質の過酸化の評価に汎用されている方法であるが、特に高度不飽和脂肪酸が測定過程における

加熱処理により MDA に 類似した構造をとるため、L-OOH 量を必ずしも正しく反映しない可能性が示唆され、MDA と 4-hydroxyalkenals の総量を反映する Lipid Peroxidation (LPO) や 8-Isoprostane とはそれぞれ挙動が異なると報告されている⁽⁶⁰⁾。このことが同様の傾向がみられなかった要因ではないかと考えられた。8-Isoprostane は、アラキドン酸を有する生体膜リン脂質または LDL 粒子が非酵素的に過酸化され、ホスホリパーゼ A2 (phospholipase A2) により sn-2 位が切り出されて生成する二次生成物である。従来は質量分析法 (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS) による測定が行われてきたが、Proudfoot ら⁽⁶¹⁾の報告にあるように現在は免疫測定法が普及しており、従来法との相関性は高いとされるが、サンプルの精製などの点で信頼性の検討が課題となっている⁽⁸⁾。生体における脂質過酸化の経路は多岐にわたっていることから、その段階や反映される状態および期間について適用を考慮する必要があると示唆された。

1.4.(b) 抗酸化マーカーとその影響因子

血清 BAP 値と β -カロテン摂取および緑黄色野菜摂取の間に有意な正相関がみられ、 β -カロテン摂取とは正の関連が重回帰分析により認められた。前述の ROM と同様に、BAP は生活習慣との関連を示した断面調査の報告は乏しい。しかし、BAP は鉄イオンの還元力を反映するという測定原理から FRAP とほぼ同様とみなされる⁽⁴⁸⁾。先行研究では、健康人において、FRAP と β -カロテン摂取に正相関が認められた一方で、血中 β -カロテン濃度とは関連がみられない⁽⁶²⁾とする報告があり、本研究の結果と同様であった。これには、摂取した β -カロテンが生体内で消費された結果として鉄イオン還元力 (FRAP/BAP) が高レベル

に維持されている可能性が推察された。

血清 TEAC 値は血清リコペン濃度との間に有意な正の相関がみられ、重回帰分析からも関連因子として示された。先行研究において、TEAC の高値はリコペンのもつラジカル消去活性の機能と関連付けられていることから⁽⁶³⁾、本研究の結果は妥当であったと考えられる。TEAC と同じ ABTS ラジカルの反応性を応用した測定法による Total Antioxidant Capacity (以下、TAOC) を評価指標とした Tyssandier らの介入研究⁽²⁶⁾では、リコペンの主な供給源として挙げられるトマトおよびトマト加工品類の摂取を制限したときに血中リコペン濃度の低下がみられ、さらにそれにより TEAC 値の有意な低下が誘導されたことが示唆されている。そのメカニズムについては詳しく考察されていないが、この両者の関係性からリコペンの血中濃度の変動と TEAC 値は何らかの相互関係（連動）があると推察された。また、TAOC を反映するマーカーは本研究で用いた以外にも TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Potential) , ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) などが全身の Antioxidative status を表す指標として利用されている。それぞれは用いるラジカル、標準物質の種類、測定手法または脂溶性／水溶性の抗酸化物質の関与などの点で異なるものの、互いにより相関性を示すことが報告されている⁽⁶⁴⁾。一方で、各 TAOC マーカーと血中微量成分の関連性についての見解は必ずしも一致せず、それぞれの特徴を検証することや、単一ではなく TAOC マーカーをいくつか組み合わせることで測定することの意義が示されている。

1.4.(c) 酸化ストレスレベルと遺伝子多型

*BCMO1**A379V/*R267S および *GSTP1**I1105V の遺伝子多型から血

中・尿中パラメーターに対する影響は示されなかった。BCMO1 遺伝子の SNPs に関する Leung ら⁽³⁵⁾の報告では、A379V と R267S 多型のうち A379V または両方にマイナーアレルをもつ者がどちらも正常型の者と比較して定常時における血漿 β -カロテン濃度の平均値が 1.6-2.4 倍高く、 β -カロテンからビタミン A への転換効率に違いが認められている。本研究において正常型[+]群とマイナーアレルをもつ[-]群を分けて検討した結果、中央値で[+]群が 241.8 ng/mL, [-]群は 329.7 ng/mL であり、その比は 1.36 倍であった。このように先行研究と同様の傾向は観察されたものの、統計的有意差はなく、BCMO1*A379V/*R267S 遺伝子多型の血中 β -カロテンへの影響は明らかにならなかった。また、先行研究と同様に BMI, ビタミン A 摂取および β -カロテン摂取で調整して解析を実施したが 2 群に差は認められなかった (data not shown)。その要因として、[-]群に該当する者が 5 名と少なかったことおよび 2 群ともに分布の幅があったことが挙げられる。そして、本研究で解析した遺伝子多型以外にも血中 β -カロテンを含むカロテノイドの代謝に影響を及ぼす可能性のある多型について報告されている。BCMO1*A379V/*R267S 遺伝子付近に位置する SNP (rs6564851) のマイナーアレルは、血中の高い β -カロテンと α -カロテンレベル、低いリコペン、ゼアキサントシンおよびルテインレベルに関与することが複数の研究から示唆されている⁽³⁶⁾。このような多型の影響についても今後検討していくべきだろう。

GSTP1*I105V 多型は、アレルギー、大気汚染または Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) についての影響が報告されており⁽⁶⁵⁾、8-OHdG や MDA などの酸化傷害マーカーとの関連も指摘されている。また、Higasa らの若年女性を対象としたアスコルビン酸負荷

試験では、負荷前において II 型と IV 型に血中アスコルビン酸濃度の差は認められていないが、アスコルビン酸負荷後に IV 型と比較して II 型の血中濃度が有意に高値となったことが示されている⁽⁵²⁾。本研究において、*MTHFR* [+]群と[-]群に定常時のビタミン C レベルの差が認められなかった点は先行研究と一致していた。そして、血中の総グルタチオン値にも多型の影響が認められなかったが、これは本研究では抗酸化活性に寄与する還元型 (GSH) だけでなく酸化型 (GSSG) を含めた総グルタチオンから評価したことに起因する可能性が推察された。

*MTHFR***C677T* 多型で複数の先行研究で示されている血清葉酸とホモシステイン値への影響は、本研究では認められなかったが、これには葉酸摂取量が関与している可能性が考えられた。葉酸を十分に摂取している集団は多型による影響を認めないとする Gori らの報告がある⁽⁶⁶⁾。同報告で葉酸摂取のカットオフポイントを 222.1 μ g/day とし、それ以下の集団では CC/CT/TT 型の 3 群間に差がみられるが、それ以上の集団では有意差は認められていない。本研究における食事調査の結果から、TT 型 8 名のうち 222.1 μ g/day 以下だったのは 3 名であったことが[+]群と[-]群間の差がみられなかった要因ではないかと推察された。さらに、ホモシステイン代謝にもこのことが影響した可能性が考えられる。また、上記著者らは、ビタミン C 摂取が血中葉酸濃度に関与すると示唆しており、Cafolla ら⁽⁶⁷⁾の研究では血清葉酸値の増大にはビタミン C を付加することが効果的であると述べられている。本研究において血清ビタミン C 濃度は、*MTHFR***C677T* 多型の群間に差がみられ、[-]群が[+]群よりも低値であった。*MTHFR* 遺伝子はメチオニンから脱メチル化してホモシステインを生成する過程に影響を及ぼす遺伝子の 1 つであり、これの C677T 変異は、アミノ酸置換から (Ala→Val) *MTHFR* 酵素が

熱不安定となり、その活性が低下することが明らかにされている。*MTHFR***C677T* 多型の TT 型では血清葉酸低下による血清ホモシステインの増加は先行研究で確立されており、本研究では有意水準には達しなかったが表 6-1 にその傾向がある。そして、本研究の結果から TT 型でビタミン C が有意に低値を示したのは、増加したホモシステインから生じる ROS がビタミン C の消費（代謝回転）を促進したためだと考えられた。上記 Gori らおよび Cafolla らの報告では血中ビタミン C 濃度は測定されておらず、遺伝子多型の影響について触れられていないが、本研究において *MTHFR***C677T* 多型と血清ビタミン C 濃度の関連がみられた一因としてこれらのことが推察された。

尿中 8-Isoprostane レベルは *MTHFR***C677T* [+]群と比較して[-]群で高値を示した。このことは、日本の一般集団を対象とした Suyama ら⁽³⁰⁾の報告で、尿中 8-Isoprostane に影響を及ぼす SNPs を Generalized multifactor dimensionality reduction method (GMDR 法) によって解析し探索を行った結果、*MTHFR***C677T* と *eNOS***T-786C* 多型の組み合わせとその 2 つに *pPLA2***G944T* 多型を加えた 3 つの組み合わせに有意な結果が得られ、酸化ストレスを増悪させる組み合わせに該当する集団でより高レベルの尿中 8-Isoprostane が見出されていることに関連付けられる。同報告では *MTHFR***C677T* 多型単独では 8-Isoprostane との関連性がみられていないが、TT 型が CC/CT 型に比べてハイリスクとなる組み合わせが多く、脂質過酸化の変動に影響する重要な因子である可能性が本研究の結果からも示唆された。

1.4.(d) 研究の限界と課題

本研究の限界には以下の四点が挙げられ、結果を解釈する上で制約と

なる．第一にサンプルサイズが小さいこと，第二に酸化ストレス関連マーカーに対して食物摂取などの環境因子または遺伝因子が影響を与えているかという因果関係は横断研究のため特定できないこと，第三に自己申告（自記式）による身体活動および食事調査の結果は実際の生活習慣の状況とは異なる可能性があること，第四に酸化ストレス関連マーカーと環境・遺伝因子間の交絡因子が存在することである．本研究では野菜摂取により代謝される外因性の抗酸化物質を中心に上げたため，生体内の酸化／還元に寄与する酵素の活性およびそれらの遺伝子多型についての検討が十分ではない．そして，SOD，GPx やカタラーゼなどの酵素活性と野菜摂取の関連性は未知の部分が多いが，これらの酵素類の影響は酸化ストレス関連マーカーの変動因子として多大であることから，食事性抗酸化物質と併せて検討していく必要がある．

このような限界点はあるが，抗酸化物質の血中濃度の高値は，血中抗酸化レベルの高値と脂質過酸化レベルの低値に寄与する可能性が示唆され，ビタミン C，葉酸， β -カロテンおよびリコペンは野菜類が主な供給源となっていることから野菜摂取の重要性が推察された．また，DNA 酸化傷害レベルを表す 8-OHdG に関してはナトリウム（食塩）の摂取が酸化ストレスの増悪因子となる可能性が推察された．本研究では明らかな関与は示されなかったが，ナトリウムに対して緑黄色野菜を中心とした野菜類または果物に多く含まれるカリウムおよびマグネシウムの摂取が重要となることから，今後野菜摂取の重要性を検討する上でその血中濃度や尿中排泄等に関して考慮すべきである．特に，循環器疾患やがんの予防においてカリウムの摂取増加は食塩の摂取低減と共にクリアしていく必要があるものの，健康日本 21 の最終評価⁽⁶⁸⁾では平成 9 年以降，カリウム摂取量の暫時減少が示され，年齢階級別の摂取量では

20 歳代女性が最低の平均 1.8 g/day（目標量の約 1/2）であると報告された。ここ数年の野菜摂取量が横ばいで推移していることおよび果物などの主要なカリウム供給源の全般的な摂取低下傾向がその原因とされる。カリウム摂取の減少は、血圧上昇への影響、そして酸化ストレス関連疾患の増悪などが懸念され、その対策強化が求められていることから、野菜類を中心としたカリウム（ミネラル）補給について考えていく必要がある。

遺伝子多型の関与は *MTHFR***C677T* 遺伝子多型の TT 型を有することが、脂質過酸化状態に影響を与える可能性が示唆されたが、これは他の遺伝子多型や環境因子が相互に影響した結果である可能性も推察されることから、このリスク因子に関してはサンプルサイズを大きくし、慎重に考えていくべきである。

第 2 章

トマトジュースの飲用による抗酸化効果と 酸化ストレスに関連する遺伝子多型

2.1 緒言

多数のデータが、いくつかのがん（肺，前立腺，大腸）に対する予防効果の高い食事因子として，リコペンの摂取が有効であることを示唆している⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾．また，Sluijs らによる中年および高齢男性を対象とした調査から，内臓脂肪症候群（メタボリックシンドローム）およびそのリスク因子とカロテノイド摂取の関連性について報告されており，総カロテノイドあるいはリコペンの摂取量と脂質代謝や糖代謝などのリスク因子間の逆相関が示されている⁽⁷²⁾．また，同報告ではリコペン摂取量のみに関連性がみられた項目として，リコペン摂取が多いほど血清中の中性脂肪が低いことが認められている．日本では，平成 20 年 4 月より実施されている特定健康診査・特定保健指導の平成 22 年の報告において，内臓脂肪症候群の該当者およびその予備軍は前年からほぼ横ばいの 26.4%であった⁽⁷³⁾．内臓脂肪症候群で 1 番に懸念される動脈硬化に起因する心疾患や 2 型糖尿病などの進展におけるリコペン摂取の有効性は脂質代謝の正常化や抗酸化活性が主に寄与することに関連付けられている．

リコペンは，トマト，すいか，ピンクグレープフルーツ，グァバおよびあんずなどに含まれる赤色色素であり，その供給源はトマトおよび

その加工品が大半を占める⁽⁷⁰⁾。トマトはリコペンやその他のカロテノイド、ビタミン C やフラボノイド類など複数の抗酸化物質を含み、その生物学的利用能（Bioavailability）の面から、リコペンの効率的な吸収のためには生のトマトよりも切断や圧搾工程を経たトマト加工製品または加熱を含む調理加工を施したトマト料理（e.g., ジュース、ペースト、ソース、スープ）の利用が勧められている^(70,71,74)。そして、吸収性や利便性の点においてトマトジュースは優れた食品であるといえる。

リコペンはカロテノイドの中で一重項酸素の消去に最も有効であるとされ、その物理的な抑制率は β -カロテンの 2 倍、 α -トコフェロールの 10 倍といわれる。また、生体膜の脂質ラジカルの抑制を担う最初の防御システムとしてのはたらきを持ち、ビタミン C、トコフェロールまたは β -カロテンとの組み合わせによって相乗的な抗酸化活性を発揮することも示唆されている^(71,75)。

実際に、*in vivo* の研究から同量のリコペンが含まれる生のトマトとトマトジュースをそれぞれ 6 週間摂取させた食事介入試験において、生のトマト摂取群とトマトジュース摂取群に共通して血中中性脂肪の低下および HDL コレステロールの上昇がみられているが、トマトジュース摂取群にのみ血中 LDL コレステロールの低下および脂質過酸化抑制率の増大が観察されている⁽⁷⁴⁾。このようにトマトジュースの定期的な飲用により、血中の脂質バランスが調節され、抗酸化活性が高まるという効果が期待される。さらに、トマトジュースの飲用と遺伝子多型の影響について報告されはじめ、循環器疾患のリスクファクターとして注目される⁽⁷⁶⁾Paraoxonase1（以下、*PON1*）遺伝子の Q192R 多型による影響や効果の差異が推定されている⁽³²⁾。

本研究の目的は、健康な若年女性を対象とした 2 週間のトマトジュ

ースの飲用による酸化損傷および抗酸化バイオマーカーへの変動影響について調べることである．さらに，食事因子の影響を血中微量栄養素や抗酸化物質から検討し，SNPs の遺伝子型による効果の違いを考慮に入れ，クロスオーバーによる食事介入試験から酸化ストレスに対するトマトジュース飲用の抗酸化効果を評価した．

2.2 実験材料と方法

2.2.(a) 対象者と研究デザイン

対象者は第 1 章と同一の女子大学生 24 名から，試験参加の条件に適合な 20 名を選出した（除外基準等は 1.2.(a)参照）．倫理的配慮については第 1 章と同様である．

研究デザインの要約を図 2 に示す．クロスオーバーデザインを設定し，対象者を 10 名ずつ 2 群に分けた．A 群のはじめの 2 週間は基準食とトマトジュースを飲用するテスト期間であり，その後 4 週間のウォッシュアウト期間をおいて，つづく 2 週間は基準食のみのコントロール期間とした．B 群のはじめの 2 週間はコントロール期間とし，ウォッシュアウトをおいて 2 週間のテスト期間とした．採血および採尿のタイミングはそれぞれの介入開始日からテスト期間とコントロール期間とも 1 週間おきに計 6 回行い，前日から一晩絶食後の早朝空腹時の血液サンプルおよび早朝スポット尿サンプルを採取した．対象者には試験開始 1 週間前から全介入期間を通じて，過度な運動とアルコール摂取の制限を指示し，テストおよびコントロール期間中は規定の食事（基準食）の摂取とコーヒー，茶類およびミネラルウォーターなどの飲料の摂取範囲

について指示した．また，ベースライン調査として身体計測（身長・体重），食物摂取頻度調査および生活時間・運動時間の調査（第 1 章と同様，1.2.(e)参照）を行った．さらに，食物摂取状況については介入前とウォッシュアウト期間中の対象者らの普段の食事に変化がないことを確認するため，ウォッシュアウト期間終了の翌日（介入 42 日目）にも同調査票を用いた調査を実施した．

2.2.(b) 食事介入

テスト期間に飲用したトマトジュースは A 社提供の高リコペントマトを使用した缶詰のストレート果汁飲料であり，砂糖や食塩の添加されていない 100%ジュースを用いた．1 缶当たりの栄養表示内容および栄養素等の分析値を表 9 に示す．トマトジュースは 2 週間のテスト期間中の毎夕食時に基準食とともに 1 缶 190 g を飲用することとした．飲用の際の注意として，保存は常温または冷蔵で行い，加熱や食事への混入は行わず，缶から直接飲用するように指示した．

基準食のエネルギーおよび栄養素供給量を設定するに当たり，対象者の食事摂取および身体活動状況を調査した．食事調査は試験開始前に記録票を配布し，自己秤量式で連続しない 3 日間の記録を行った．身体活動は質問紙を用いて調査した．その結果から，基準食の供給エネルギー量を対象者ごとに 1500，1700 および 1900 kcal/day の 3 段階にわけ，1 週間のサイクルメニューを構成した．エネルギーは主食量のみを調整し，主菜・副菜などは 3 群とも同量とした．また，食事調査より対象者の野菜摂取量の平均は 250 g 程度であったことから，それに即した野菜量でメニューを構成した．基準食のうち朝食と間食は事前に食材を指定したレシピの配布を行い，対象者自身が準備した．昼食と夕食は

事前に調理し，1食ずつに分けて冷凍保存したものを配布した．実際に提供した食事のエネルギーおよび栄養素量を表 10 に示す．

2.2.(c) トマトジュース中の微量成分の分析

アスコルビン酸は食品衛生検査指針⁽⁷⁷⁾に準じて，HPLC を用いた 2,4-Dinitrophenylhydrazine（以下，DNPH）誘導体化法による定量を行った．本研究で用いた測定法は，還元型であるアスコルビン酸（AsA）と酸化型であるデヒドロアスコルビン酸（DAsA）を合わせた総アスコルビン酸量を示す．トマトジュース試料 約 5 g を 5%（w/v）メタリン酸溶液で 50 mL に定容し，その試料溶液を No.5A フィルターでろ過した．そのろ液 2 mL を 30 mL 容遠沈管に採取し，0.2%（w/v）ジクロロフェノール-インドフェノール溶液を 30 秒程度ピンク色が保持されるまで数滴滴下した．そして，2%（w/v）チオ尿素-5%メタリン酸溶液 2 mL を加え混合し，2%（w/v）DNPH-9N 硫酸溶液 0.5 mL を添加し，50°C の恒温槽中で 1.5 時間加温した．その後，流水中で冷却し，酢酸エチル 2 mL を加え，60 分間振とう器にて強振した後に溶媒層（上層）を分取し，それを試験溶液とした．溶媒層と水層の分離の際は，適宜，遠心分離（3000 rpm x 3 min.）を行った．また，L-アスコルビン酸標準品を適宜 5%メタリン酸溶液で希釈して試料溶液と同様に前処理を行い，HPLC にて分析を行った．HPLC による分析の設定条件等は以下に示すとおりである．

カラム，Silica-2150-N（5 μ m, 6 mm x 150 mm，SSC, Tokyo, Japan); カラムオープン温度，35°C; 流速，1.5 mL/min; 注入量，10 μ L; 検出波長，at 495 nm.

移動相の組成，酢酸エチル：n-ヘキサン：酢酸（5:4:1, v/v/v）

ビタミン C のクロマトグラムを図 3 に示す.

α -カロテン, β -カロテンおよびリコペン, HPLC-PDA を用い, Association of Official Analytical Chemists (以下, AOAC) の分析法⁽⁷⁸⁾に準じて定量を行った. トマトジュース試料 1 g を 100 mL 容褐色メスフラスコに採取し, ピロガロール 1 g および HAET 混液 40 mL を加え, エタノールで 100 mL に定容した. その後, 超音波処理を 20 分間行い, 試料溶液をシリンジフィルターでろ過し試験溶液とした. HPLC による分析の設定条件等は第 1 章の血清カロテノイド分析と同様である (1.2.(b)参照). カロテノイドのクロマトグラムを図 3 に示す.

ポリフェノールの測定は Singleton ら⁽⁷⁹⁾の方法に準じて, Folin-ciocalteu 法による定量を行った. トマトジュース試料は 25 倍希釈した. 没食子酸標準液または試料溶液 400 μ L に 2 倍希釈した Folin-ciocalteu 試薬 400 μ L を加え, さらに 0.4N 炭酸ナトリウム溶液 2.0 mL を添加し, 室温で 30 分間静置した. その後, 光度計で 760 nm における吸光度を測定し, 没食子酸換算値としてポリフェノール濃度 mg gallic acid equivalent/190 g で表した.

DPPH ラジカル消去能は, 須田ら⁽⁸⁰⁾の方法に準じて, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 退色法により測定した. トマトジュース試料 1 g をビーカーに採取し, 80% (v/v) エタノール溶液 40 mL を加え, 全体を遮光しマグネチックスターラーで 2 時間攪拌した. その後, 80% エタノール溶液で 50 mL に定容し, ガラス繊維フィルター (GC-50) でろ過し試料溶液とした. 標準物質の Butylated hydroxyanisole (以下, BHA) 5 g は 50% (v/v) エタノール溶液に溶解し 50 mL に定容した. この標準溶液または試料溶液 10 mL に 200mM 2-Morpholinoethanesulphonic acid (以下, MES) 緩衝液 (水酸化ナト

リウムで pH 6.0 に調製) 5 mL, 蒸留水 1 mL および 50%エタノール溶液 4 mL を加え混合し試験溶液とした。また, 200mM MES 緩衝液-蒸留水-メタノール混液 (1:1:2, v/v/v) を調製し溶液[A]とした。試験管に 200mM DPPH 溶液 1 mL, 100mM MES 緩衝液 (pH 6.0) 1 mL, および溶液[A]を $[2 - a^*]$ mL 加え混合し, そこへ試験溶液 (標準または試料) a^* mL を添加および攪拌し, 2 分後に光度計でその反応溶液の 520 nm における吸光度を測定した。また, 着色している試験溶液と DPPH 溶液の色を区別するために, DPPH 溶液の代わりにエタノールを加えた溶液 (BG, バックグラウンド) を作成し同様の手順で調製後, 吸光度を測定した。 a^* : 試験溶液の添加量は 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mL の 6 段階とした。測定値は DPPH 溶液を添加した試験溶液の吸光度から BG 溶液の値を除し, 各試験溶液の添加量 0 mL をブランクとしてその吸光度を 100%とした場合の吸光度 50%に相当する試験溶液の添加量を求めた。標準溶液も同様に換算し, BHA 換算値として $\mu\text{mol BHA equivalent}/190 \text{ g}$ で表した。

2.2.(d) 血中微量栄養素等の測定

項目および測定方法は第 1 章と同様である (1.2.(b)参照)。

2.2.(e) 酸化ストレス関連マーカーの測定

項目および測定方法は第 1 章と同様である (1.2.(c)参照)。

2.2.(f) 遺伝子多型の解析

第 1 章のデータを用いた (1.2.(d)および 1.3 参照)。

2.2.(g) 統計解析

測定および調査項目から得たデータは、正規性について Shapiro-Wilk の検定およびヒストグラムから確認し、分布に歪みのあるものは変数変換またはノンパラメトリック検定を採用した。遺伝子多型の *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T および *GSTP1**I105V は第 1 章と同様の分類でそれぞれを[+]群と[-]群に分けて解析した。2 群間の差の検定には Mann-Whitney の U 検定を行い、独立性の検定にはカイ二乗検定を用いた。また、A・B 群の血中・尿中パラメーターにおけるキャリーオーバー効果は、Repeated measures ANOVA により交互作用の検討を行った。トマトジュースを飲用するテスト期間と基準食のみのコントロール期間における血中・尿中パラメーターの変化は Repeated measures ANOVA および多重比較 (Bonferroni) から検討した。テスト期間の介入前後の各パラメーターにおける変化率の相関性の検定は Pearson の相関係数を用いた。

有意水準は 5%未満とし、解析には SPSS Ver.19.0J for Windows (IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

2.3 結果

2.3.(a) 対象者特性

食事介入試験は、2010 年 11 月から 2011 年 1 月に実施した。A 群および B 群の対象者特性を表 11 に示す。血清 TEAC 値にのみ群間の差が認められた。その他の血中・尿中成分および食事調査などから 2 群の差は認められなかった。そして、各パラメーターから交互作用は認めら

れなかった ($P > 0.05$) . このことから, A 群と B 群のテスト期間およびコントロール期間を合わせて解析した.

また, ベースラインおよび介入 42 日目に行った食事調査において, 対象者の普段の食物摂取状況に有意な変化は認められなかった (data not shown) .

2.3.(b) テスト期間とコントロール期間のパラメーターの変動

各介入期間の時系列変化を表 12 に示す. テスト期間とコントロール期間の変化パターンに差が認められたパラメーターについては多重比較を行った.

トマトジュースを飲用したテスト期間において, 血清 α -カロテン, β -カロテン, リコペンおよび α -トコフェロール濃度が介入前に比べて介入 1 週間後に有意に上昇し (all, $P < 0.001$) , 2 週間後もその状態が保たれていた. 血清ルテイン濃度は 1 週間後のみ上昇がみられ ($P < 0.05$) , 血清ビタミン C 濃度は 1 週間後に有意な上昇が認められ, 2 週間後もその状態が保たれていた (both, $P < 0.05$) . 酸化ストレス関連マーカーの変動からは, 血清 ROM 値の 1 週から 2 週間後にかけての有意な低下が認められた ($P < 0.01, < 0.001$, respectively) . 尿中 8-Isoprostane 濃度は 1 週および 2 週間後において有意な低下がみられた (both, $P < 0.001$) . 血清抗酸化マーカーの TEAC 値は介入前と比較して 1 週および 2 週間後に有意な上昇が認められた ($P < 0.001, < 0.01$, respectively) . テスト介入期間にはその他の血中および尿中パラメーターに有意な変動は認められなかった. コントロール期間においては血清 α -カロテン, リコペンおよび α -トコフェロール濃度が介入 1 週間後に有意な上昇を示し (all, $P < 0.05$) , 血清ビタミン C 濃度は介入 2 週

間後に低下がみられた ($P < 0.05$) . 酸化ストレス関連マーカーにはコントロール期間中の有意な変動は何も認められなかった.

2.3.(c) 血中・尿中マーカーの変化率の相関性

テスト期間の介入前後における酸化ストレス関連マーカーの変化率の相関性について解析した結果を表 13 に示す. 血清 ROM, MDA および尿中 8-OHdG の変化率から他のマーカーとの相関性は認められなかった. 血清 TEAC は BAP との間に有意な正の相関がみられ ($r = 0.48$, $P < 0.05$) , 尿中 8-Isoprostane との間には有意な負の相関が認められた ($r = -0.51$, $P < 0.05$) . さらに, 酸化ストレス関連マーカーと血中微量成分の変化率から相関性について検討した結果を表 14 に示す. 血清 ROM, MDA, TEAC および尿中 8-OHdG と血清成分の変化率間には相関性は何も認められなかった. 血清 BAP 値は α -カロテンの変化率と有意な正の相関が認められ ($r = 0.65$, $P < 0.01$) , 尿中 8-Isoprostane は血清ルテインおよび血清ビタミン C の変化率との間にどちらも有意な負の相関が認められた ($r = -0.51$, $r = -0.52$, respectively; both, $P < 0.05$) .

2.3.(d) テスト期間における遺伝子多型の影響

テスト期間の介入前／1 週間後／2 週間後の血中および尿中パラメーターを遺伝子型で[+]群および[-]群に分け, 各時点における 2 群の差を解析した結果を表 15-1 および 15-2 に示す.

BCMO1*A379V/*R267S 多型は血清レチノール, カロテノイドおよび血清酸化傷害・抗酸化マーカーにおいて 2 群の有意な差はいずれも認められなかった. 尿中 8-Isoprostane 濃度においてのみテスト介入の 1

週間後の時点で *BCMO1***A379V*/**R267S* [+]群と[-]群の中央値に差が示され ($P < 0.05$) , [+]群に比べ[-]群は有意に 8-Isoprostane 濃度が高いことが認められた. 介入前と 2 週間後には差はみられなかった.

*MTHFR***C677T* 多型は, 介入前の血清ビタミン C 濃度に有意な差が示され, [+]群と比較して[-]群は有意に低いことが認められた ($P < 0.05$) . その後 (1 週および 2 週間後) の血清ビタミン C 濃度に両群の差はみられなかった. 血清葉酸濃度は介入 1 週間後の時点のみ 2 群の差を認め, [+]群に比べ[-]群で低値であった ($P < 0.05$) . 尿中 8-Isoprostane 濃度は介入前の値において 2 群の差を認め, [+]群と比較して[-]群は有意に高いことが示された ($P < 0.05$) . その後の時点では群間の差はみられなかった. 血清ホモシステイン濃度と尿中 8-Isoprostane 以外の酸化ストレス関連マーカーには各時点における 2 群間の差は示されなかった.

*GSTP1***I105V* 多型は, 血清総グルタチオン濃度に差は認められなかった. 尿中 8-Isoprostane は介入前の 2 群の有意な差を認め, [+]群に比べ[-]群は高いことが示された. その後, 1 週目および 2 週目の 8-Isoprostane 濃度に 2 群間の有意差はみられなかった. その他の酸化ストレス関連マーカーに群間差はいずれも認められなかった.

2.4 考察

本研究ではリコペンをはじめとする抗酸化ビタミン類に富むトマトジュースの飲用による中期的な効果を酸化傷害／抗酸化マーカーから評価し, 影響の差異について遺伝的側面からアプローチした.

2.4.(a) トマトジュース飲用による影響

テスト期間において血清 α -カロテン、 β -カロテン、リコペン、 α -トコフェロールおよびビタミン C 濃度の上昇がみられた。酸化ストレス関連マーカーは ROM および 8-Isoprostane の低下から脂質過酸化の改善と TEAC の上昇から抗酸化力の増大が示唆された。また、コントロール期間において酸化ストレス関連マーカーに変動がみられなかった点から、これら酸化傷害／抗酸化レベルに対する影響はトマトジュースの飲用により抗酸化ビタミン類が補充され、生体内において適度な抗酸化効果が発揮された結果だと考えられる。Shen らは、リコペン含有量が同等の生のトマト、トマトジュースおよびリコペン飲料をそれぞれ 6 週間摂取させた食事介入研究において、生あるいはリコペン飲料と比較してトマトジュースの飲用が血中抗酸化力の指標とした脂質過酸化抑制率を上昇させ、血中の脂質バランスの改善が観察されたことを報告している⁽⁷⁴⁾。このことは、リコペンの吸収率とトマトに含まれるリコペンおよびその他微量栄養素等の供給が重要であることに関連付けられる。リコペン飲料やリコペンサプリメントの摂取については効果的とされる一方で、単一のカロテノイドの血中濃度の上昇が他のカロテノイド代謝に影響を及ぼすことが懸念され^(75,81)、その使用には議論の余地がある。本研究の結果は 1 日 190 g のトマトジュースの定期的な飲用が酸化ストレスの改善に繋がる可能性を示し、それにはリコペンを含む数種のビタミン類の補充が寄与している可能性が推察された。また、トマトジュースに含まれるリコペンや β -カロテンなどのカロテノイドとビタミン C などの抗酸化ビタミン類の全般的な増加は、それぞれが相補的または総合的（シナジー効果）な抗酸化効果を生み出すとされ、リコペン単独または個々の抗酸化ビタミンの影響以上となる可能性が示唆される。この

ことはまだ十分に解明されていないが、カロテノイド、ビタミン C および α -トコフェロールはその相互作用や複合作用について *in vitro* および *in vivo* においていくつか示されている⁽⁸¹⁻⁸³⁾。トマトジュースなどの食品を他の食事とともに同時に摂取する場合には、食事性たんぱく質や脂質にもカロテノイドの代謝は影響を受ける⁽⁸⁴⁾。本研究では基準食の PFC 比は日本人の食事摂取基準⁽⁸⁵⁾の範囲で設定したが、食品マトリクスまたは摂取する際の共存たんぱく質や脂質について今後検討が必要であり、抗酸化物質の効率的かつ過不足のない供給が実現できると考えられた。

一方で、MDA および 8-OHdG にはトマトジュースの飲用による有意な変動は認められなかった。尿中 8-OHdG は DNA の酸化傷害レベルを反映するマーカーであることから以下の要因が考えられた。生体内において、早期にカロテノイドなどの影響を受けるのは過酸化脂質であることが先行研究において示唆されており^(71,75)、2 週間という飲用期間や 1 日 190 g というトマトジュース負荷量では DNA の酸化損傷の修復まで達していない可能性が推察された。また、第 1 章と同様に MDA に関しては血中レベルの変化は抗酸化物質などの影響が反映される情報が一時的である可能性が考えられ、中期的な影響を捉えられなかったと推察される。そして、Tyssandier らのトマトジュース負荷試験において MDA への影響が認められなかったとする報告には、被験者が比較的健康であり、MDA が基底レベルにあった可能性を推察している⁽²⁶⁾。Thompson らは定常時の脂質過酸化状態が低い集団は野菜・果物の摂取量を増大させてもベースラインより有意に低下することはなかったことを示している。このことは尿中 8-OHdG にも共通するとしており⁽¹⁶⁾、健康人を対象とする介入研究においては今後さらなる検討が必要だと考えられた。

また、同じ脂質過酸化状態を反映する MDA と 8-Isoprostane の変動に矛盾があった点については、第 1 章および本章の結果にあるように定常時における両者の相関性は認められなかったことから、両者は必ずしも同時に同様の傾向を示さず、トマトジュース飲用による感度が異なる可能性が考えられた。

2.4.(b) 遺伝子型 (Genotype) による影響の差異

遺伝的因子の関与は、尿中 8-Isoprostane の変動から認められた。*MTHFR***C677T* [+]群に比べ[-]群は飲用前の 8-Isoprostane 濃度が高値であったが、1 週間後には差は認められず、2 週間後も同様であった。*MTHFR***C677T* 多型と 8-Isoprostane の関連については第 1 章に述べたとおりであるが、このことはトマトジュースの飲用は尿中 8-Isoprostane レベルの高い（脂質過酸化が増大した）被験者に対してより有用である可能性を示す。現在まで、*MTHFR***C677T* 多型とトマトジュースの飲用に関して検討はなされていないが、Bub らの報告では *PON1***Q192R* 多型がトマトジュース飲用前後の変化率に影響したことを示唆している⁽³²⁾。*PON1***Q192R* 多型のマイナーアレルをもつ群（QR/RR 型）は正常型の群（QQ 型）よりもベースラインにおいて血中脂質過酸化レベルが高値であったが、2 週間のトマトジュース飲用後の低下率はマイナーアレルをもつ群の方が有意に大きいことが示され、個人間変動の要因ではないかと推察されている。本研究の結果では、*MTHFR***C677T* 多型がトマトジュース飲用による抗酸化効果の個人差の一部を説明しうることが示唆された。さらに、*MTHFR***C677T* および *GSTP1***I105V* 多型のどちらも[-]群に該当する者はそうでない被験者と比較してトマトジュース飲用による 8-Isoprostane 変化率が[-]群

で有意に高いことが観察された（% change; [+]: -15.5 % vs [-]: -35.4 %, $P < 0.05$ ）。しかし、この[-]群に該当する被験者は 4 名のみであったため、今後サンプルサイズを大きくした検討が必要となる。

2.4.(c) 研究の限界と課題

本研究の限界は、まず、第 1 章と同様にサンプルサイズが小さいこと、抗酸化酵素についての影響を加味していないことおよび自己申告の情報は実際の生活状況を反映していない可能性があることであり、それに付随して、設定した基準食と被験者らの普段の食事には少なからずギャップがあることが挙げられる。実際に、尿中 8-Isoprostane 排泄量は、食事摂取パターンなどの変更によっても影響を受けることが報告され⁽¹⁰⁾、その他にも望ましい食事習慣をもつ者は DNA 酸化傷害レベルが低いことが示されている⁽¹²⁾。これらの影響を最小限に抑えるためには、介入前に規定食の run-in 期を設けることで集団の酸化傷害レベルのベースラインが比較的揃えられるという報告があり^(10,16)、今後、より信頼性の高い研究を行うために必要であると考えられた。さらに、リコペンの生物学的利用能に関する考慮が不十分であることも本研究の限界の 1 つである。食品に含まれるリコペンには大きく分けてシス型とトランス型の貯蔵形態があり、トランス型に比べシス型リコペンの多いトマトは生物学的利用能が高いと報告されている⁽⁸⁶⁾。本研究ではトマトジュースおよび血中のリコペンは総リコペンとして扱っており、詳細な検討は行えなかったが、このことは健康にとってより有益な発見となり得ると考えられ、トマトの新規機能性について示すことができるだろう。

このような限界点はあるが、2 週間のトマトジュースの飲用は血中のカロテノイド類、 α -トコフェロールを増大させ、それらによって適度な

抗酸化効果が誘導されたことが示唆された．さらに，血中ビタミン C 濃度が低く尿中 8-Isoprostane レベルの高い *MTHFR***C677T* 多型の TT 型を有する者に対してトマトジュースの飲用がより有用である可能性を新たに見出した．

第 3 章

シュンギクの摂取による抗酸化効果と 酸化ストレスに関連する遺伝子多型

3.1 緒言

緑色の葉物野菜（Green Leafy Vegetables, 以下 GLV）の摂取は、2 型糖尿病をはじめとするいくつかの慢性疾患のリスク低減に寄与していることが報告されている⁽⁸⁷⁻⁹⁰⁾。最新の日本人における調査では、野菜・果物摂取と 2 型糖尿病の関連について Kurotani らの研究により、特定の野菜群の摂取量と糖尿病リスクの低減に関連性を見出している⁽⁸⁷⁾。その中で興味深いのは、野菜・果物の総合または果物単体では糖尿病リスクの低減との関連が認められず、男性のみにアブラナ科野菜の摂取量とリスク低減の関与がみられ（Odds ratio; 0.89, Q4: high vs Q1: low），男女ともに関連性が示唆されたのは GLV（i.e., ほうれんそう, こまつな, にら, しゅんぎく, ちんげんさい, からしな, よもぎ, ふだんそう）の摂取にあると推察されていることである（Odds ratio; 0.81, Q4 vs Q1）。この研究では統計的な有意性は得られていないが、同様の傾向を示した報告は複数あり、GLV 摂取と 2 型糖尿病⁽⁸⁸⁾またはそれらと循環器疾患⁽⁸⁹⁾のリスク低減は GLV に含まれる多様な抗酸化物質や食物繊維と関連付けられている。

野菜摂取量や果物摂取量を増大させることは疾病予防の上で非常に重要であるが、摂取する野菜の種類（e.g., 葉物, 果実, 根菜）や植物

科 (e.g., Cruciferous, Chenopodiaceae, Asteraceae) といった特定の野菜またはグループが関与することを上記研究は示唆している。実生活において、さまざまな種類の野菜や果物を摂取することは、個別の不足分を補い合い、より多様な栄養素や Phytochemical を摂取できる面で効果的とされる。しかしながら、日本人においては健康日本 21⁽⁹¹⁾から Smart Life Project⁽²¹⁾まで引き続き目標に掲げている野菜摂取量の 1 日 350 g 以上の達成は、平成 22 年度の国民健康栄養調査の結果から、20 歳以上の各世代で 1 つも該当がなく、本研究で対象とした 20-29 歳の若年層の野菜摂取量は、年齢階級別で最低の約 232 g/day であった⁽²²⁾。そのような現状を踏まえて、総体的な摂取量の増大とともに、摂取する野菜類の種類および質に関しても注意を向けるべきである。同量の野菜摂取であっても、その多様性が重要となる側面や、より抗酸化活性の高い野菜の摂取が有望であるとの見解が示されている^(9,10,16,92)。

本研究で取り上げたシュンギクの特徴は、消費される地域が日本、中国、台湾、韓国などの一部のアジア地域に限定されており、その機能性や抗酸化効果に関する報告は非常にわずかである。そして、シュンギクは β -カロテン、ルテインや葉酸を豊富に含み、Phytochemical の一種であるクロロゲン酸などの数種のカフェ酸誘導体が含まれていることから抗酸化活性の高い野菜類であるといえる^(93,94)。また、ミネラル類も含有しており、抗酸化酵素の SOD や GPx のはたらきに不可欠な亜鉛や銅、または高血圧やインスリン抵抗性に対する有効性が示唆されるカリウムやマグネシウム⁽⁹⁵⁾などの GLV に概して多い栄養素を備えている。その機能性については、先に著者らが報告した若年女性を対象とし、本研究で用いた酸化ストレス関連マーカーを評価指標とした 7 日間のシュンギク摂取試験の結果より、血清 ROM 値の低下、尿中 8-

Isoprostane 濃度の減少および血清 BAP 値の上昇が認められ、摂取増大による適度な抗酸化効果に期待がもたれた⁽³³⁾。その研究より負荷前後における影響の個人間差、血中微量栄養素等の変動および抗酸化に関する成分の推定が課題となったことから、これらをより詳細に検討することを目的に、シュンギク摂取による抗酸化効果について第 2 章と同様のスタイルで食事介入試験を実施した。

3.2 実験材料と方法

3.2.(a) 対象者と研究デザイン

対象者は第 1 章・第 2 章と同一の女子大学生 24 名から試験参加に適格な 20 名を選んだ（除外基準等は 1.2.(a)参照）。なお、シュンギク摂取試験は、第 2 章のトマトジュース飲用試験からは 4 ヶ月以上の間隔をおいて実施した。倫理的配慮については第 1 章と同様である。

研究デザインの要約を図 4 に示す。第 2 章と同様にクロスオーバーデザインを設定し、対象者を 10 名ずつ 2 群に分けた（第 2 章の割付とは異なる）。A 群のはじめの 2 週間は基準食のみのコントロール期間であり、その後 4 週間のウオッシュアウト期間をおいて、つづく 2 週間は基準食とボイルしたシュンギクを摂取するテスト期間とした。B 群のはじめの 2 週間はテスト期間とし、ウオッシュアウトをおいて 2 週間のコントロール期間とした。採血・採尿のタイミング、サンプル採取の方法、対象者への介入期間中の指示およびベースライン調査等については第 2 章と同様である（2.2.(a)参照）。

3.2.(b) 食事介入

テスト期間に摂取したシュンギクは一般小売店より購入したサトユタカおよび中葉春菊の 2 品種であり，それぞれ購入当日に全体を流水で洗浄しペーパータオルで水分を除去した．その後，株元を除く可食部のみを 3-4 cm に切り分け，シュンギク 1 portion/raw 200 g を 2 L の沸騰水中に入れ，90 秒ボイルしストレーナーにあけ，室温まで放冷した．その後，チャック付きポリエチレン袋に入れ-30°C で冷凍保存した．生 200 g 相当のシュンギクに含まれる栄養素等の分析値を表 16 に示す．シュンギクは 2 週間のテスト期間中の毎夕食時に基準食とともに 1 portion 生 200 g 相当量を規定のノンオイルドレッシング 10 g で調味して摂取することとした．摂取の際の注意として，保存は冷凍で行い，解凍は電子レンジにて摂取の直前に行うことを指示した．解凍後のドリップは自然に出たもののみ除去し，食事への混入は行わないことを伝えた．

基準食の設定については第 2 章と同様である (2.2.(b)参照)．食事調査より，各被験者へのエネルギー供給量に変更はなく，対象者の野菜摂取量の平均は 235 g 程度であったことから，第 2 章と同一のメニューで基準食を調製した (表 10 参照)．

3.2.(c) シュンギク中の一般および微量成分の分析

シュンギクは被験者が摂取したものと同時かつ同様に調製し，測定サンプルとして用いた．冷凍保存していたものを解凍し，ドリップを除いてから測定に用いた．

シュンギク中の水分は，常圧加熱乾燥法 (直接法) によって測定した⁽⁷⁷⁾．空のアルミニウム製の秤量器を乾燥機に入れ 105 °C で 3 時間加熱後，デシケーターに移し 1 時間放冷した．その後，恒量を求めシ

シュンギク試料約 5 g を秤量器に採取し、全体の重量を計量した。それを 105 °C で 4 時間加熱した。加熱後、デシケーターに移して 1 時間放冷した後、全体重量を計量し、再度乾燥機に入れ 105 °C で 2 時間加熱した。加熱後、上記と同様に放冷・計量し恒量になるまで繰り返した。乾燥前の試料と秤量器の重量から乾燥後の試料と秤量器の重量を減じた値を、同様に恒量とした秤量器のみの重量を減じた値で除し、100 を乗じた値を%で表した。

アスコルビン酸の測定は HPLC を用いた DNPH 誘導体化法⁽⁷⁷⁾により行い、シュンギク試料に 9 倍量の 5% (w/v) メタリン酸溶液を加えホモジネートし、フィルターにてろ過を行った。その後の操作および HPLC による分析等は第 2 章と同様である (2.2.(c)参照)。

葉酸は (財) 日本食品分析センターに依頼し、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* (*L. casei*) を用いた微生物学的定量法による分析を行った。

α -カロテン、 β -カロテンおよびルテインは、AOAC 分析法⁽⁷⁸⁾に準じて HPLC-PAD を用いて測定した。シュンギク試料 60 g にピロガロール 1.8 g を加えて細かく均一化し、それを 5 g 乳鉢に採取し、HAET 混液を加えて磨砕した。抽出液を褐色メスフラスコに採り、総量が 40 mL になるよう調製した。それをエタノールで 100 mL に定容し、うち 10 mL を遮光した 50 mL 容チューブに採取した。それにピロガロール 0.2 g, 60% (w/v) 水酸化カリウム溶液 1 mL, (粒状) 水酸化カリウム約 0.5 g を加えて攪拌した後、ふたをして 70°C の水浴中で 30 分間加熱した。その後、水冷し 1% (w/v) 塩化ナトリウム溶液 15 mL, 2-プロパノール 3 mL を加え、ヘキサン-酢酸エチル (9:1, v/v) 混液を 10 mL 加え、5-10 分間振とう器によって強振した後、溶媒層を分取した。この操作を溶媒層が完全に無色透明になるまで繰り返し、集めた溶液を

減圧下で乾固した後、40% (v/v) HAET-エタノール溶液で 10 mL に定容した。それをシリンジフィルターでろ過し、試験溶液とした。HPLC による分析の設定条件等は第 1 章と同様である (1.2.(b)参照)。カロテノイドのクロマトグラムを図 5 に示す。

α -トコフェロールは HPLC 分析法⁽⁷⁷⁾による定量を行った。細かく均一化したシュンギク試料 2 g を 50 mL 容チューブに採り、1% (w/v) 塩化ナトリウム溶液 0.5 mL、3% (w/v) ピロガロール-エタノール溶液 10 mL および 60% (w/v) 水酸化カリウム溶液 2 mL を加え攪拌した。その後、遠沈管にふたをして 70°C の水浴中で 30 分間加温した後に水冷し、1% 塩化ナトリウム溶液 20 mL およびヘキサン-酢酸エチル (9:1, v/v) 混液を 15 mL 加え、5-10 分間振とう器によって強振した後、溶媒層を分取した。この操作を溶媒層が完全に無色透明になるまで繰り返し、集めた溶液を減圧下で乾固した後、ヘキサンで 10 mL に定容した。それをシリンジフィルターでろ過し、試験溶液とした。HPLC による分析の設定条件等は第 1 章と同様である (1.2.(b)参照)。 α -トコフェロールのクロマトグラムを図 5 に示す。

ポリフェノールは AOAC 分析法⁽⁷⁸⁾に準じて、Folin-Denis 法による定量を行った。シュンギク試料を凍結乾燥させ、ミルサーで粉碎した粉末試料 0.1 g を 10 mL 容遠沈管に採り、80% (v/v) メタノール溶液 7 mL を加え、30°C のインキュベーターで 10 分間振とうした。その後、遠心分離 (3000 rpm x 5 min.) し、上清を分取した。残渣には 80% メタノール溶液を加え、同様の抽出操作を 2 回繰り返し、集めた上清を 25 mL に定容した。その試料溶液 200 μ L を 1.5 mL 容チューブに入れ、1M フェノール試薬 200 μ L を添加し攪拌した後、3 分間静置した。そこへ 1M 炭酸ナトリウム溶液 200 μ L を加えて攪拌し、室温暗所にて 1

時間静置した．その後，遠心分離（3000 rpm x 5 min.）し，光度計で 760 nm における吸光度を測定し，没食子酸相当量としてポリフェノール濃度 mg gallic acid equivalent/raw 200 g で表した．

DPPH ラジカル消去能の測定は DPPH 退色法⁽⁸⁰⁾によって行い，シェンギク試料を凍結乾燥させ，ミルサーで粉碎した粉末試料 0.2g に 80% (v/v) エタノール溶液 40 mL を加え，全体を遮光しマグネチックスターラーで 2 時間攪拌した．その後，80% エタノール溶液で 50 mL に定容し，ガラス繊維フィルター（GC-50）でろ過し試料溶液とした．その後の操作および吸光度測定は第 2 章と同様である（2.2.(c)参照）．

3.2.(d) 血清・尿中酸化ストレスマーカーの測定

項目および測定方法は第 1 章と同様である（1.2.(c)参照）．

3.2.(e) 酸化ストレス関連マーカーの測定

項目および測定方法は第 1 章と同様である（1.2.(d)参照）．

3.2.(f) 遺伝子多型の解析

第 1 章のデータを用いた（1.2.(f)参照）．

3.2.(g) 統計解析

項目および解析方法は第 2 章と同様である（2.2.(g)参照）．

3.3 結果

3.3.(a) 対象者特性

食事介入試験は、2011 年 5 月から 7 月に実施した。A 群および B 群の対象者特性を表 17 に示す。血清ホモシステイン値および MDA 値に群間の差が認められた。その他の血中・尿中成分および食事調査などから 2 群の差は認められなかった。そして、各パラメーターから交互作用は認められなかった ($P > 0.05$)。このことから、A 群と B 群のテスト期間およびコントロール期間を合わせて解析した。

また、ベースラインおよび介入 42 日目に行った食事調査において、対象者の普段の食物摂取状況に有意な変化は認められなかった (data not shown)。

3.3.(b) テスト期間とコントロール期間のパラメーターの変動

各介入期間の時系列変化を表 18 に示す。テスト期間とコントロール期間の変化パターンに差が認められたパラメーターについては多重比較を行った。

シュンギクを摂取したテスト期間において、血清 β -カロテン、ルテイン濃度が介入前に比べて介入 1 週間後に有意に上昇し (both, $P < 0.001$)、2 週間後もその状態が保たれていた。血清葉酸濃度は 2 週間後に上昇がみられ ($P < 0.01$)、総グルタチオン濃度は 1 週間後のみに有意な上昇が認められた ($P < 0.05$)。ホモシステイン値は 2 週間後に有意な低下がみられた ($P < 0.05$)。

酸化ストレス関連マーカーの変動からは、血清 ROM 値のテスト期間の 1 週から 2 週間後にかけての有意な低下が認められた ($P < 0.05$, <

0.01, respectively) . 尿中 8-Isoprostane 濃度は 1 週および 2 週間後において有意な低下がみられた (both, $P < 0.001$) .

血清抗酸化マーカーの BAP 値は介入前と比べて, テスト期間の 1 週間後に有意な上昇が認められ, その状態は 2 週間後まで維持されていた (both, $P < 0.05$) . テスト介入期間にはその他の血中および尿中パラメーターに有意な変動は認められなかった. コントロール期間においては血清リコペン濃度にのみ介入 1 週間後の有意な上昇がみられた ($P < 0.05$) . コントロール期間中の有意な変動は酸化ストレス関連マーカーから何ら認められなかった.

3.3.(c) 血中・尿中マーカーの変化率の相関性

テスト期間の介入前後における酸化ストレス関連マーカーの変化率の相関性について解析した結果を表 19 に示す. すべてのマーカー間に有意な相関性は認められなかった. 酸化ストレス関連マーカーと血中微量栄養素等の変化率から相関性について検討した結果を表 20 に示す. 血清 ROM, MDA, BAP および尿中 8-OHdG と血清微量栄養素等の変化率間には相関性は何も認められなかった. 血清 TEAC 濃度は, α -トコフェロールとの間に有意な正相関がみられた ($r = 0.47, P < 0.05$) . 尿中 8-Isoprostane 濃度は血清 β -カロテンの変化率間に有意な負の相関が認められた ($r = -0.65, P < 0.01$) .

3.3.(d) テスト期間における遺伝子多型の影響

テスト期間の介入前／1 週間後／2 週間後の血中および尿中パラメーターを遺伝子型で[+]群および[-]群に分け, 各時点における 2 群の差を解析した結果を表 21-1 および 21-2 に示す.

*BCMO1*A379V/*R267S* 多型は血清レチノール，カロテノイドおよび血清・尿中酸化ストレス関連マーカーのいずれにおいても 2 群の有意な差は認められなかった。

*MTHFR*C677T* 多型は，介入前から 2 週間後の血清ビタミン C 濃度の 3 時点すべてにおいて有意な差が示され，[+]群と比較して[-]群は有意に低いことが認められた (all, $P < 0.05$)。血清葉酸は介入前および 1 週目に 2 群の差が示され (both, $P < 0.05$)，[+]群より[-]群は低値であったが，2 週間後にその差はみられなかった。また，血清ホモシステイン濃度は介入前の時点のみ 2 群の差を認め，[+]群に比べ[-]群で高値であった ($P < 0.05$)。尿中 8-OHdG は介入 1 週間後においてのみ群間差がみられ，[+]群より[-]群で高値であった ($P < 0.05$)。尿中 8-Isoprostane 濃度は介入前の値において 2 群の差を認め，[+]群と比較して[-]群は有意に高いことが示された ($P < 0.05$)。その後の時点では群間の差はみられなかった。これら以外の酸化ストレス関連マーカーには各時点における 2 群間の差は示されなかった。

*GSTP1*I105V* 多型は，血清総グルタチオン濃度およびすべての酸化ストレス関連マーカーでいずれも差は認められなかった。

3.4 考察

本研究では種々の抗酸化物質に富む GLV のシェンギクの摂取による中期的な効果を酸化傷害／抗酸化マーカーから評価し，影響の差異について遺伝的側面からアプローチした。

3.4.(a) シュンギク摂取による影響

基準食とシュンギクを摂取したテスト期間後において血清 β -カロテン、ルテインおよび葉酸濃度の上昇がみられた。酸化ストレス関連マーカーは ROM および 8-Isoprostane の低下から脂質過酸化の改善と BAP の上昇から抗酸化力の増大が観察された。また、基準食のみのコントロール期間において酸化ストレス関連マーカーに変動がみられなかった点から、これら酸化傷害／抗酸化レベルに対する影響はシュンギクの摂取によって適度な抗酸化効果が得られた結果だと示唆された。

カロテノイドとフリーラジカルとの相互作用、つまりカロテノイドによる抗酸化のメカニズムには、[1] Radical addition/adduct formation, [2] Electron transfer reaction および [3] Hydrogen abstraction の 3 つが存在するといわれる⁽⁹⁶⁾。さらに、カロテノイドは、炎症や動脈硬化の原因である酸化 LDL により誘導される好中球やマクロファージが発生源となる一重項酸素の消去活性が高いことで知られる。そして、生体膜の構成成分の不飽和脂肪酸が ROS により脂質ラジカルとなり、酸素を取り込み脂質ヒドロペルオキシドが生じる連鎖反応に対してカロテノイドは直接はたらきかけ、顕著な抑制効果を示すとされている^(75,96)。特に β -カロテンは自然界に広く分布しており、食事性の抗酸化因子の中でも重要である。本研究で得られた結果は、変化率の相関性から β -カロテンの血中濃度の増大によって脂質過酸化マーカーである 8-Isoprostane 濃度の減少に繋がった可能性が示唆され、上記の抗酸化メカニズムからも妥当だと考えられた。そして、野菜摂取の増大による血中の β -カロテン濃度増大と脂質過酸化レベルの低下の関連性を示した Thompson らの報告⁽¹⁶⁾と一致する。また、ルテインについては Zou らにより初期段階の動脈硬化症患者と健康な対照群との間に血中ルテイン

濃度の有意な差が認められており，ルテインの補充が抗酸化および動脈硬化の予防に繋がるとされている⁽⁹⁷⁾．動物実験では高 β -カロテン食の負荷は血液や網膜などの組織中のルテインの低下を引き起こすことが Wang ら⁽⁸¹⁾により示されているが，野菜や食事から摂取されるカロテノイドは単独ではなく，本研究で実施したシュンギク摂取の影響は β -カロテンとルテインの経時的増加と維持を示し，両者の適度な範囲内の量を供給できたと推定された．

一般的に GLV に多く含まれる葉酸は，ホモシステイン代謝の上で必須の栄養素である．ホモシステインは血管内皮細胞の直接的な傷害と LDL の過酸化から動脈硬化を惹起すると考えられている．また，ホモシステインの上昇は GPx 活性を阻害することが Outinen らにより報告され⁽⁹⁸⁾，GPx の不活性化は過酸化脂質および H_2O_2 濃度を増大させ，さらには GPx の阻害から遊離ホモシステインを生じることが Chen らにより示されている⁽⁹⁹⁾．Sahin らの動物実験によって，負荷する葉酸量に依存して血中ホモシステイン値と脂質過酸化レベルが低下することが示され⁽¹⁰⁰⁾，このことは本研究でシュンギク摂取により補充された葉酸の血中濃度の上昇と尿中 8-Isoprostane 排泄量および血清ホモシステイン値の低下が認められことの妥当性を意味する．

DNA 酸化傷害レベルを反映する尿中 8-OHdG はテスト期間前後で若干の低下はみられたものの，有意な差は認められなかった．8-OHdG と喫煙や飲酒などの疾病リスクとの関連は数多く報告されているが^(8,12,13)，Schmidt らは介入前の時点で 8-OHdG 濃度が高レベルの被験者でない限りは β -カロテン投与などによる酸化ストレスの改善効果は認められないとしている⁽¹⁰¹⁾．Martínez-Tomás らの報告において野菜スープの摂取による血中 β -カロテン濃度の上昇と尿中 8-Isoprostane 排

泄量の低下は認められているが、血中 8-OHdG 値の有意な変動はみられていない⁽²⁴⁾。さらに、 β -カロテンとルテインが豊富であるということにおいて本研究に近い研究として Moser らの行った 16 日間のホウレンソウ摂取試験 (225 g/day) では、血中葉酸値の上昇と血中ホモシステイン値の低下はみられているが、評価に用いた 4 種の酸化的 DNA 傷害マーカー (e.g., purines-Formamidopyrimidine glycosylase sensitive site) のうち 16 日後に有意な変動が認められたのは 1 つであった。その一方でアブラナ科野菜の摂取は DNA 酸化傷害に対して有効であることが Riso らによって報告されている⁽⁹⁾。アブラナ科植物 (e.g., ブロッコリー, クレソン) には普遍的に含硫化合物のイソチオシアネート類が含まれており、疫学研究からがん予防効果に期待がもたれている野菜類である^(9,92)。ブロッコリーなどに含まれるイソチオシアネート類のスルフォラファンは特に DNA 酸化傷害の修復に有用であるとされ、解毒酵素の活性を調整することなどで抗酸化性を発揮するとされる。本研究で 8-OHdG に有意な変動が認められなかった結果は、シュンギクに含まれる栄養素等の供給は DNA 酸化損傷の改善にはつながらないことを示唆し、野菜類に含まれる特異的・特徴的な栄養素または機能性成分により抗酸化効果が異なる可能性が推察された。このようなことから、被験者のベースラインレベル (ハイリスクグループの選択) や評価する酸化ストレス関連マーカーの種類などを再考する必要があると考えられた。

また、血中抗酸化レベルを示す BAP と尿中 8-Isoprostane 濃度の変化率において負の相関がみられたことは第 1 章および本章で前述した考察に共通し、血中 β -カロテン濃度の上昇が両マーカーに反映されたように抗酸化力と脂質過酸化の改善に繋がった可能性が示唆された。

3.4.(b) 遺伝子型 (Genotype) による影響の差異

遺伝的因子の関与は、すべて *MTHFR***C677T* 多型から認められた。第 1 章から本章まで血中ビタミン C への何らかの関連が認められており、介入前において[+]群と比較して[-]群の血中ビタミン C レベルの低値が示された。これは、被験者らが通常的生活習慣（食習慣）に戻るとビタミン C 値も各個人のベースラインレベルまで戻ることを意味し、本研究ではテスト介入期間のすべての時点で両群とも変動は少なく、[-]群の中央値は[+]群よりも常に低値であった。本研究で用いたシュンギクに含まれるアスコルビン酸は 14-20 mg/potion/day であり、2 週間この範囲の量を付加しても血中濃度の増大にはつながらないことが示唆された。つまり、本研究で示された抗酸化効果においてアスコルビン酸自体の影響は少なかったと推察されるが、前述した葉酸との相乗効果^(66,67)またはカロテノイドやトコフェロールなどとの相互作用⁽⁸¹⁻⁸³⁾に貢献している可能性はあるため、今後、アスコルビン酸の間接的な抗酸化への関与について検討する必要があると考えられた。

つぎに、血中葉酸値と血中ホモシステイン値は、本研究においてテスト期間前の時点で *MTHFR***C677T* 遺伝子多型による影響がみられ、これは先行研究で報告されている CC/CT 型に比べ TT 型（本研究では[-]群）の血中葉酸の低値／ホモシステインの高値という結果⁽³⁹⁻⁴¹⁾から妥当性が示唆された。また、シュンギク摂取の 1 週間後には[+]群と[-]群間のホモシステイン値の差はなくなり、摂取 2 週間後には葉酸値の 2 群間の差が認められなかったことから、シュンギクの摂取により遺伝的背景としてハイリスクでありホモシステインレベルの高い被験者に対して、そうでない被験者と同程度（有意差がなくなる）の状態にできることが本研究の結果から示唆された。本研究で用いた基準食の葉酸供給量

は 1 週間の平均で 247 $\mu\text{g/day}$ であり，基準食のみのコントロール期間において有意な変動は観察されなかったことから，シュンギクに含まれる 127-137 $\mu\text{g/potion/day}$ の付加量が重要であった可能性が推察された．女子大学生を対象に行った Hiraoka らの葉酸負荷試験では，サプリメントにより 400 $\mu\text{g/day}$ の葉酸を補充することで TT 型の集団の血清葉酸とホモシステイン濃度が CC/CT 型と同レベルまで改善できることが示されている⁽¹⁰³⁾．本研究では葉酸は食事からのみの供給であるため，サプリメントとは吸収率などが異なると考えられるが，適量範囲を考慮するにあたって，一定の目安が示せたと推察された．

*MTHFR***C677T* 多型の尿中 8-Isoprostane への影響は，第 2 章と同様の傾向を示した．*MTHFR***C677T* [+]群に比べ[-]群はシュンギク摂取前の 8-Isoprostane 濃度が高値であったが，1 週間後には差は認められず，2 週間後もその状態のままであった．*MTHFR***C677T* 多型と 8-Isoprostane の関連については第 1 章および第 2 章に述べたとおりであるが，本章の結果は脂質過酸化が増大した被験者に対してシュンギク摂取がより有用である可能性を示す．また，本章で前述したように，葉酸の補充と血中ホモシステインと過酸化脂質レベルの低下が認められたという結果からもこれらの関連性を説明できるだろう．

現在まで，シュンギク摂取と遺伝子多型に関連する報告はなく，ヒト介入試験の分野で個別の GLV を用いた遺伝的側面からの検証はほぼ行われていないため直接比較できる研究が少ないが，Silaste らのヒト介入試験で緑黄色野菜や果物（かんきつ類など）を多く取り入れた高葉酸食メニューの提供により比較的血中ホモシステイン濃度の高い *MTHFR***C677T* 多型の TT 型の者の葉酸およびホモシステインレベルを改善させることが示されている⁽¹⁰⁴⁾．本研究の結果は個別の野菜による

栄養素・抗酸化物質の補充という点で新たな知見が得られたと考えられる。

3.4.(c) 研究の限界と課題

本研究の限界は、まず、第 1 章・第 2 章と同様にサンプルサイズが小さいこと、ホモシステインとの関連が指摘される GPx などの抗酸化酵素についての影響を検証していないこと、食物摂取などの自己申告の情報は実際の生活状況を反映していない可能性があること、設定した基準食と被験者らの普段の食事には少なからずギャップが存在することが挙げられる。さらに、シュンギクに含まれる葉酸の生物学的利用能に関する考慮が不十分であった。モノグルタミル葉酸とポリグルタミル葉酸で吸収率が異なることや、咀嚼による物理的な分解の程度などは今後検討していくべきだと考えられた⁽¹⁰⁵⁾。

このような限界点はあるが、2 週間のシュンギクの摂取は血中の β -カロテン、ルテイン、葉酸濃度を増大し、ホモシステインレベルを低下させ、それらによって適度な抗酸化効果が誘導されたことが示唆された。さらに血中葉酸濃度が低く、ホモシステイン濃度が高く、尿中 8-Isoprostane レベルの高い *MTHFR***C677T* 多型の TT 型を有する者に対してシュンギクの摂取がより有用である可能性を新たに見出した。

終章

総括と今後の課題

本研究は野菜類のもつ多様な機能性の 1 つである抗酸化活性をテーマとして取り上げ、その摂取の有用性と抗酸化効果を明らかにすることを目的に、酸化ストレス関連マーカーから横断的・縦断的な検証を行った。また、その評価には食習慣などの環境因子だけではなく、酸化ストレス反応や抗酸化酵素などの調節に影響を及ぼす SNPs を用い、遺伝的側面からのアプローチを試みた。現在まで、一般的な集団における酸化ストレス関連分子の SNPs の影響に関する知見は相対的に欠如しており、野菜摂取の抗酸化効果について効果なしとされている先行研究や個人間変動の解釈において環境および遺伝的因子の両面から評価することが望ましいと考えられる。

生体の酸化ストレスレベルには多くの要因が複合的または依存的に作用することが報告されている。本研究の第 1 章の結果から、酸化ストレス関連マーカー毎に異なる影響因子が示された。先行研究において野菜摂取量や血中の抗酸化ビタミン類濃度が高いほど酸化傷害レベルが低いことと、本研究の第 1 章の結果は一致しており、それぞれの影響因子は異なっていたものの、酸化傷害の低値と抗酸化レベルの高値に寄与する抗酸化成分は野菜類が主要な食事因子となっている可能性が示唆された。また、DNA 酸化傷害の指標である 8-OHdG の高値はナトリウム摂取量が関連していると認められ、減塩とともに野菜・果物に由来するカリウムやマグネシウムの摂取が重要となることが推察された。

トマトジュース飲用の効果はリコペンなどのカロテノイドやビタミン C などの相補・複合的作用により得られたと推察された。シュンギクの摂取による血清 β -カロテン、ルテイン、葉酸の上昇が血清ホモシステインと酸化ストレスの改善に繋がったと示唆された。そして、2 つの介入試験で認められた抗酸化効果は、尿中 8-Isoprostane レベルの高値と関連付けられた *MTHFR* 多型の影響が推察された。著者が知る限り、本研究は食事をコントロールした介入研究において、トマトジュースおよびシュンギクの摂取による酸化ストレス関連マーカーと *MTHFR**C677T 多型の関連を示した最初の評価である。トマトジュースやシュンギクの摂取により、生体成分に対する酸化傷害を軽減し、抗酸化防御系を正常に維持されることの証明は、今後サンプルサイズを大きくし性別および年齢層など本研究とは異なる対象の選定、SNPs のバリエーションおよび介入期間について検討することでさらに信頼性の高い研究となるだろう。

抗酸化性の強い成分については高濃度の蓄積が多少なりともその抗酸化物質自体のプロオキシダント化を誘導することが懸念され、 β -カロテンやクロロゲン酸については *in vitro* または *in vivo* において供給の過多が酸化傷害の増悪因子になり得ることを示唆している⁽³⁷⁾。しかし、これら研究の多くは植物性食品等から抽出・精製されたものをサプリメントなどの形態にして用いており、単一の抗酸化物質の供給が生体内の他の抗酸化物質濃度や活性に波及している可能性が指摘されている⁽¹⁰⁶⁾。食品そのもの（ホールフード）からの抗酸化物質の補給で他の成分とのインバランスまたはプロオキシダント化に繋がるような過剰供給は報告されておらず、実生活に基づく野菜摂取量の範囲ではそのような弊害は少ないと考えられる。このような利点からも、野菜摂取の増大および有

用性の高い野菜類について幅広く検討していくべきである．野菜類に含まれる個々の機能性成分は本研究で分析した以外にフラボノイド類，ミネラル類，食物繊維などがあり，これらの既知または未知の成分の機能性やそのメカニズムの同定が今後の課題となり，生物学的利用能などを考慮することによって一層効果的・効率的な野菜の摂取が実現できると考えられる．また今後は，酸化ストレスを総合的に理解するために，食事性（外因性）だけではなく内因性の抗酸化防御系として重要な抗酸化酵素の機能や活性について検証していく必要がある．そして，将来これらの課題をクリアすることで野菜摂取の増大が酸化ストレスに関連する疾病の予防または顕在化していない疾病の改善に貢献できると考えられた．

謝辞

本論文の作成にあたり，終始温かいご指導を賜りました女子栄養大学香川靖雄教授に深謝し，厚く御礼申し上げます．また，修士課程から 5 年にわたりご指導ならびにご助言くださいました女子栄養大学食品栄養学研究室の三浦理代教授に御礼申し上げます．

生体・野菜試料の成分分析ならびに第 2 章のトマトジュース試料を提供いただきましたカゴメ株式会社総合研究所の稲熊隆博様ならびに吉田和敬様に深く御礼申し上げます．第 1 章の遺伝子多型の解析をしていただきました自治医科大学人類遺伝学研究部の岩本禎彦教授ならびに中山一大助教に心より御礼申し上げます．また，核酸抽出をしていただいた女子栄養大学臨床生化学研究室内の福島真実助教に深く感謝いたします．さらに，常に貴重なご意見を賜りました女子栄養大学食品栄養学研究室の五明紀春教授，昨年まで温かいご支援をいただきました後藤直子様ならびに平成 20 年度から 23 年度まで研究にご協力いただいた食品栄養学研究室の卒業研究生の皆様に心から感謝いたします．

引用文献

- (1) Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A: Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib Nephrol* **149**; 240-260: 2005
- (2) Halliwell B, Whiteman M: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**(2); 231-255: 2004
- (3) Holvoet P: Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. *Verh K Acad Geneeskd Belg* **70**(3); 193-219: 2008
- (4) Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C: 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* **27**(2); 120-139: 2009
- (5) Gilliland FD, Li YF, Saxon A, Diaz-Sanchez D: Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet* **363**(9403); 119-125: 2004
- (6) Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M: The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* **45**(2); 115-134: 2000
- (7) Fukui T, Yamauchi K, Maruyama M, Yasuda T, Kohno M, Abe

- Y: Significance of measuring oxidative stress in lifestyle-related diseases from the viewpoint of correlation between d-ROMs and BAP in Japanese subjects. *Hypertens Res* **34**; 1041-1045: 2011
- (8) Sakano N, Takahashi N, Wang DH, Sauriasari R, Takemoto K, Kanbara S, Sato Y, Takigawa T, Takaki J, Ogino K: Plasma 3-nitrotyrosine, urinary 8-isoprostane and 8-OHdG among healthy Japanese people. *Free Radic Res* **43**; 183-192: 2009
- (9) Riso P, Martini D, Møller P, Loft S, Bonacina G, Moro M, Porrini M: DNA damage and repair activity after broccoli intake in young healthy smokers. *Mutagenesis* **25**(6); 595-602: 2010
- (10) Thompson HJ, Heimendinger J, Sedlacek S, Haegeler A, Diker A, O'Neill C, Meinecke B, Wolfe P, Zhu Z, Jiang W: 8-Isoprostane F2alpha excretion is reduced in women by increased vegetable and fruit intake. *Am J Clin Nutr* **82**; 768-776: 2005
- (11) Martarelli D, Verdenelli MC, Scuri S, Cocchioni M, Silvi S, Cecchini C, Pompei P: Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Curr Microbiol* **62**(6); 1689-1696: 2011
- (12) Tamae K, Kawai K, Yamasaki S, Kawanami K, Ikeda M, Takahashi K, Miyamoto T, Kato N, Kasai: Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *H Cancer Sci* **100**(4); 715-721: 2009

- (13) Irie M, Tamae K, Iwamoto-Tanaka N, Kasai H: Occupational and lifestyle factors and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci* **96**(9); 600-606: 2005
- (14) Ogino K, Takahashi N, Takigawa T, Obase Y, Wang DH: Association of serum arginase I with oxidative stress in a healthy population. *Free Radic Res* **45**(2); 147-155: 2011
- (15) Jackson MJ: Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? *Free Radic Biol Med* **44**(2); 132-141: 2008
- (16) Thompson HJ, Heimendinger J, Gillette C, Sedlacek SM, Haeghele A, O'Neill C, Wolfe P: In vivo investigation of changes in biomarkers of oxidative stress induced by plant food rich diets. *J Agric Food Chem* **53**(15); 6126-6132: 2005
- (17) Fowke JH, Morrow JD, Motley S, Bostick RM, Ness RM: Brassica vegetable consumption reduces urinary F2-isoprostane levels independent of micronutrient intake. *Carcinogenesis* **27**; 2096-2102: 2006
- (18) Swinburn B, Baba NH, Belhadj M, Deurenberg-Yap M, Djazayeri A, Forrester T, Galuska DA, Herman S, James WPT, M'Buyamba Kabangu JR, Katan MB, Key TJ, Kumanyika S, Mann J, Moynihan P, Musaiger AO, Olwit GW, Petkeviciene J, Prentice A, Reddy KS, Schatzkin A, Seidell JC, Simopoulos AP, Sriajujata S, Steyn N, Uauy R, Wahlqvist M, Wu Zhao-Su, Yoshiike N, Rabenek S: Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consulta-

- tion (WHO Technical Report Series 916): 2003
- (19) Marmot M, Atinmo T, Byers T, Chen J, Hirohata T, Jackson A, James WPT, Kolonel LN, Kumanyika S, Leitzmann C, Mann J, Powers HJ, Reddy KS, Riboli E, Rivera JA, Schatzkin A, Seidell JC, Shuker DE, Uauy R, Willett W, Zeisel SH: Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective (WCRF/AICR Expert Report): 2007
- (20) 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター「がん情報サービス」, Available at: <http://ganjoho.jp/>, Accessed October 1: 2012
- (21) Smart Life Project 事務局（厚生労働省 健康局 がん対策・健康増進課）, Available at: <http://www.smartlife.go.jp>, Accessed November 1: 2012
- (22) 厚生労働省（健康局総務課生活習慣病対策室）平成 22 年国民健康・栄養調査結果の概要, Available at: <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000020qbb.html>, Accessed October 1: 2012
- (23) Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F: Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* **133**(9); 2812-2819: 2003
- (24) Martínez-Tomás R, Larqué E, González-Silvera D, Sánchez-Campillo M, Burgos MI, Wellner A, Parra S, Bialek L, Alminger M, Pérez-Llamas F: Effect of the consumption of a fruit and vegetable soup with high in vitro carotenoid bioaccessibility on serum carotenoid concentrations and markers of oxi-

- dative stress in young men. *Eur J Nutr* **51**(2); 231-239: 2012
- (25) Rizwan M, Rodriguez-Blanco I, Harbottle A, Birch-Machin MA, Watson RE, Rhodes LE: Tomato paste rich in lycopene protects against cutaneous photodamage in humans in vivo: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol* **164**(1); 154-162: 2011
- (26) Tyssandier V, Feillet-Coudray C, Caris-Veyrat C, Guillard JC, Coudray C, Bureau S, Reich M, Amiot-Carlin MJ, Bouteloup-Demange C, Boirie Y, Borel P: Effect of tomato product consumption on the plasma status of antioxidant microconstituents and on the plasma total antioxidant capacity in healthy subjects. *J Am Coll Nutr* **23**(2); 148-156: 2004
- (27) van den Berg R, van Vliet T, Broekmans WM, Cnubben NH, Vaes WH, Roza L, Haenen GR, Bast A, van den Berg H: A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. *J Nutr* **131**(6); 1714-1722: 2001
- (28) Jacob RA, Aiello GM, Stephensen CB, Blumberg JB, Milbury PE, Wallock LM, Ames BN: Moderate antioxidant supplementation has no effect on biomarkers of oxidant damage in healthy men with low fruit and vegetable intakes. *J Nutr* **133**(3); 740-743: 2003
- (29) Matsushita M, Kumano-Go T, Suganuma N, Adachi H, Yamamura S, Morishima H, Shigedo Y, Mikami A, Takeda M, Sugita Y: Anxiety, neuroticism and oxidative stress: cross-sectional study in non-smoking college students. *Psychiatry Clin Neurosci*

64(4); 435-441: 2010

- (30) Suyama Y, Matsuda C, Isomura M, Hamano T, Karino K, Yamasaki M, Yamaguchi S, Shiwaku K, Masuda J, Nabika T: Effects of six functional SNPs on the urinary 8-isoprostane level in a general Japanese population; Shimane COHRE Study. *Dis Markers* **30**(6); 291-298: 2011
- (31) Chang JL, Chen G, Ulrich CM, Bigler J, King IB, Schwarz Y, Li S, Li L, Potter JD, Lampe JW: DNA damage and repair: fruit and vegetable effects in a feeding trial. *Nutr Cancer* **62**(3); 329-335: 2010
- (32) Bub A, Barth SW, Watzl B, Briviba K, Rechkemmer G: Paraoxonase 1 Q192R (PON1-192) polymorphism is associated with reduced lipid peroxidation in healthy young men on a low-carotenoid diet supplemented with tomato juice. *Br J Nutr* **93**(3); 291-297: 2005
- (33) Ichikawa Y, Goto N, Gomyo T, Miura M: Effects of vegetable intake on biomarkers related to oxidative stress in healthy young females. *Anti-Aging Med* **9**(6); 155-160: 2012
- (34) Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, Thurnham D, Yin SA, Biesalski HK. Beta-carotene is an important vitamin A source for humans. *J Nutr* **140**(12); 2268S-2285S: 2010
- (35) Leung WC, Hessel S, Méplan C, Flint J, Oberhauser V, Tourniaire F, Hesketh JE, von Lintig J, Lietz G: Two common single nucleotide polymorphisms in the gene encoding beta-carotene

- 15,15'-monooxygenase alter beta-carotene metabolism in female volunteers. *FASEB J* **23**(4); 1041-1053: 2009
- (36) Ferrucci L, Perry JR, Matteini A, Perola M, Tanaka T, Silander K, Rice N, Melzer D, Murray A, Cluett C, Fried LP, Albanes D, Corsi AM, Cherubini A, Guralnik J, Bandinelli S, Singleton A, Virtamo J, Walston J, Semba RD, Frayling TM: Common variation in the beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1 gene affects circulating levels of carotenoids: a genome-wide association study. *Am J Hum Genet* **84**(2); 123-133: 2009
- (37) Young AJ, Lowe GM: Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* **385**(1); 20-27: 2001
- (38) Hessel S, Eichinger A, Isken A, Amengual J, Hunzelmann S, Hoeller U, Elste V, Hunziker W, Goralczyk R, Oberhauser V, von Lintig J, Wyss A: CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem* **282**(46); 33553-33561: 2007
- (39) Maruyama C, Araki R, Takeuchi M, Kuniyoshi E, Iwasawa A, Maruyama T, Nakano S, Motohashi Y, Nakanishi M, Kyotani S, Tsushima M: Relationships of nutrient intake and lifestyle-related factors to serum folate and plasma homocysteine concentrations in 30-69 year-old Japanese. *J Nutr Sci Vitaminol* **50**(1); 1-8: 2004
- (40) Lewis SJ, Ebrahim S, Smith GD: Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preven-

- tive potential of folate? *BMJ* **331**(7524); 1053-1056: 2005
- (41) Miyaki K, Murata M, Kikuchi H, Takei I, Nakayama T, Watanabe K, Omae K: Assessment of tailor-made prevention of atherosclerosis with folic acid supplementation: randomized, double-blind, placebo-controlled trials in each MTHFR C677T genotype. *J Hum Genet* **50**(5); 241-248: 2005
- (42) Lee SA, Fowke JH, Lu W, Ye C, Zheng Y, Cai Q, Gu K, Gao YT, Shu XO, Zheng W: Cruciferous vegetables, the GSTP1 Ile105Val genetic polymorphism, and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr* **87**(3); 753-760: 2008
- (43) Kakko S, Päivänsalo M, Koistinen P, Kesäniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ: The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* **168**(1); 147-152: 2003
- (44) Hamajima N, Takezaki T, Tajima K: Allele Frequencies of 25 Polymorphisms Pertaining to Cancer Risk for Japanese, Koreans and Chinese. *Asian Pac J Cancer Prev* **3**(3); 197-206: 2002
- (45) Kondo N, Bessho H, Honda S, Negi A: SOD2 gene polymorphisms in neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Mol Vis* **15**; 1819-1826: 2009
- (46) Oshima S, Sakamoto H, Ishiguro Y, Terao J: Accumulation and clearance of capsanthin in blood plasma after the ingestion of paprika juice in men. *J Nutr* **127**(8); 1475-1479: 1997
- (47) Aizawa K, Inakuma T: Quantitation of Carotenoids in Common-

- ly Consumed Vegetables in Japan. *Food Sci. Technol Res* **13**(3); 247-252: 2007
- (48) Ezaki S, Ito T, Suzuki K, Tamura M: Association between Total Antioxidant Capacity in Breast Milk and Postnatal Age in Days in Premature Infants. *J Clin Biochem Nutr* **42**(2); 133-137: 2008
- (49) Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* **84**(4); 407-412: 1993
- (50) Kambayashi Y, Binh NT, W Asakura H, Hibino Y, Hitomi Y, Nakamura H, Ogino K: Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate. *J Clin Biochem Nutr* **44**(1); 46-51: 2009
- (51) Kagawa Y, Hiraoka M, Miyashita-Hatano Y, Shishido-Oki M, Yoshida M, Kondou S, Sugiura M, Sawakami-Kobayashi K, Takahashi M, Tajima H, Yohda M: Automated single nucleotide polymorphism typing using bead array in capillary tube. *J Biosci Bioeng* **110**(4); 505-508: 2010
- (52) Higasa S, Tsujimura M, Hiraoka M, Nakayama K, Yanagisawa Y, Iwamoto S, Kagawa Y: Polymorphism of glutathione S-transferase P1 gene affects human vitamin C metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* **364**(3); 708-713: 2007
- (53) 吉村幸雄, 高橋啓子: エクセル栄養君 食物摂取頻度調査 FFQg Ver.3.0, 建帛社, 東京, 2010
- (54) 五訂増補日本食品成分表 2010, 女子栄養大学出版部, 東京, 2011

- (55) Weiss N: Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab* **6**(1); 27-36: 2005
- (56) Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K: Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension : modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* **101**(8); 856-861: 2000
- (57) Holt EM, Steffen LM, Moran A, Basu S, Steinberger J, Ross JA, Hong CP, Sinaiko AR: Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc* **109**(3); 414-421: 2009
- (58) Dietrich M, Block G, Hudes M, Morrow JD, Norkus EP, Traber MG, Cross CE, Packer L: Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F(2)-isoprostanes in plasma of smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(1); 7-13: 2002
- (59) Jung SK, Kim K, Tae K, Kong G, Kim MK: The effect of raw vegetable and fruit intake on thyroid cancer risk among women: a case-control study in South Korea. *Br J Nutr* **28**; 1-11: 2012
- (60) Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott FS: Valproic acid I: time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol Sci* **86**(2); 427-435: 2005
- (61) Proudfoot J, Barden A, Mori TA, Burke V, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB: Measurement of urinary F(2)-isoprostanes as mark-

- ers of in vivo lipid peroxidation-A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* **272**(2); 209-215: 1999
- (62) Wang Y, Yang M, Lee SG, Davis CG, Koo SI, Chun OK: Dietary total antioxidant capacity is associated with diet and plasma antioxidant status in healthy young adults. *J Acad Nutr Diet* **112**(10); 1626-1635: 2012
- (63) Böhm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzzi MG, Schwartz SJ: Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of alpha-carotene, beta-carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J Agric Food Chem* **50**(1); 221-226: 2002
- (64) Wang CC, Chu CY, Chu KO, Choy KW, Khaw KS, Rogers MS, Pang CP: Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clin Chem* **50**(5); 952-954: 2004
- (65) Vibhuti A, Arif E, Deepak D, Singh B, Qadar Pasha MA: Genetic polymorphisms of GSTP1 and mEPHX correlate with oxidative stress markers and lung function in COPD. *Biochem Biophys Res Commun* **359**(1); 136-142: 2007
- (66) Gori AM, Sofi F, Corsi AM, Gazzini A, Sestini I, Lauretani F, Bandinelli S, Gensini GF, Ferrucci L, Abbate R: Predictors of vitamin B6 and folate concentrations in older persons: the InCHIANTI study. *Clin Chem* **52**(7); 1318-1324: 2006
- (67) Cafolla A, Dragoni F, Girelli G, Tosti ME, Costante A, De Luca AM, Funaro D, Scott CS: Effect of folic acid and vitamin C

- supplementation on folate status and homocysteine level: a randomised controlled trial in Italian smoker-blood donors. *Atherosclerosis* **163**(1); 105-111: 2002
- (68) 厚生労働省（健康局総務課生活習慣病対策室）「健康日本 21」最終評価 , Available at: <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000001r5gc.html>, Accessed October 1, 2012
- (69) Salman H, Bergman M, Djaldetti M, Bessler H: Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomed Pharmacother* **61**(6); 366-369: 2007
- (70) Engelmann NJ, Clinton SK, Erdman JW Jr: Nutritional aspects of phytoene and phytofluene, carotenoid precursors to lycopene. *Adv Nutr* **2**(1); 51-61: 2011
- (71) Mordente A, Guantario B, Meucci E, Silvestrini A, Lombardi E, Martorana GE, Giardina B, Böhm V: Lycopene and cardiovascular diseases: an update. *Curr Med Chem* **18**(8); 1146-1163: 2011
- (72) Sluijs I, Beulens JW, Grobbee DE, van der Schouw YT: Dietary carotenoid intake is associated with lower prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and elderly men. *J Nutr* **139**(5); 987-992: 2009
- (73) 厚生労働省（保険局総務課医療費適正化対策推進室）平成 22 年度 特定健康診査・特定保健指導の実施状況（速報値） , Available at: <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000024j2g.html>, Accessed October 1, 2012
- (74) Shen YC, Chen SL, Wang CK: Contribution of tomato phenolics to antioxidation and down-regulation of blood lipids. *J Agric*

Food Chem **55**(16); 6475-6481: 2007

- (75) Kong KW, Khoo HE, Prasad KN, Ismail A, Tan CP, Rajab NF: Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules* **15**(2); 959-987: 2010
- (76) Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D, Fu X, Shao M, Brennan DM, Ellis SG, Brennan ML, Allayee H, Lusis AJ, Hazen SL: Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA* **299**(11); 1265-1276: 2008
- (77) 厚生労働省監修 食品衛生検査指針 理化学編, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京, 2005
- (78) Official Method of Analysis of AOAC Internatinal, 16th ed., AOAC International, 1995
- (79) Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**; 152-178: 1999
- (80) 農林水産省農林水産技術会議事務局, 食品の機能性評価マニュアル, p16-18: 1999
- (81) Wang Y, Roger Illingworth D, Connor SL, Barton Duell P, Connor WE: Competitive inhibition of carotenoid transport and tissue concentrations by high dose supplements of lutein, zeaxanthin and beta-carotene. *Eur J Nutr* **49**(6); 327-336: 2010
- (82) Jacob K, Periago MJ, Böhm V, Berruezo GR: Influence of lyco-

- pene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Br J Nutr* **99**(1); 137-146: 2008
- (83) Reboul E, Thap S, Perrot E, Amiot MJ, Lairon D, Borel P: Effect of the main dietary antioxidants (carotenoids, gamma-tocopherol, polyphenols, and vitamin C) on alpha-tocopherol absorption. *Eur J Clin Nutr* **61**(10); 1167-1173: 2007
- (84) Hosotani K, Kitagawa M: Effects of dietary protein, fat and beta-carotene levels on beta-carotene absorption in rats. *Int J Vitam Nutr Res* **75**(4); 274-280: 2005
- (85) 安斎正郷: 日本人の食事摂取基準 (2010 年版), 第一出版, 東京, 2010
- (86) Unlu NZ, Bohn T, Francis DM, Nagaraja HN, Clinton SK, Schwartz SJ: Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. *Br J Nutr* **98**(1); 140-146: 2007
- (87) Kurotani K, Nanri A, Goto A, Mizoue T, Noda M, Kato M, Inoue M, Tsugane S: Vegetable and fruit intake and risk of type 2 diabetes: Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Br J Nutr* **9**; 1-9: 2012
- (88) Cooper AJ, Forouhi NG, Ye Z, Buijsse B, Arriola L, Balkau B, Barricarte A, Beulens JW, Boeing H, Büchner FL, Dahm CC, de Lauzon-Guillain B, Fagherazzi G, Franks PW, Gonzalez C, Griponi S, Kaaks R, Key TJ, Masala G, Navarro C, Nilsson P, Overvad K, Panico S, Ramón Quirós J, Rolandsson O, Roswall N, Sacerdote C, Sánchez MJ, Slimani N, Sluijs I, Spijkerman AM,

- Teucher B, Tjonneland A, Tumino R, Sharp SJ, Langenberg C, Feskens EJ, Riboli E, Wareham NJ; The InterAct Consortium: Fruit and vegetable intake and type 2 diabetes: EPIC-InterAct prospective study and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* **66**(10); 1082-1092: 2012
- (89) Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC: Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J Natl Cancer Inst* **96**(21); 1577-1584: 2004
- (90) Bendinelli B, Masala G, Saieva C, Salvini S, Calonico C, Sacerdote C, Agnoli C, Grioni S, Frasca G, Mattiello A, Chiodini P, Tumino R, Vineis P, Palli D, Panico S: Fruit, vegetables, and olive oil and risk of coronary heart disease in Italian women: the EPICOR Study. *Am J Clin Nutr* **93**(2); 275-283: 2011
- (91) 健康・体力づくり事業財団: 健康日本 21 (21 世紀における国民健康づくり運動について) .
- (92) Brauer HA, Libby TE, Mitchell BL, Li L, Chen C, Randolph TW, Yasui YY, Lampe JW, Lampe PD: Cruciferous vegetable supplementation in a controlled diet study alters the serum peptidome in a GSTM1-genotype dependent manner. *Nutr J* **10**; 11: 2011
- (93) Takenaka M, Nagata T, Yoshida M: Stability and bioavailability of antioxidants in garland (*Chrysanthemum coronarium* L.) *Biosci Biotechnol Biochem* **64**(12); 2689-2691: 2000
- (94) Kim SJ, Cho AR, Han J: Antioxidant and antimicrobial activi-

- ties of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control* **29**(1); 112-120: 2012
- (95) Larsson SC, Wolk A: Magnesium intake and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Intern Med* **262**(2); 208-214: 2007
- (96) Krinsky NI, Johnson EJ: Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* **26**(6); 459-516: 2005
- (97) Zou Z, Xu X, Huang Y, Xiao X, Ma L, Sun T, Dong P, Wang X, Lin X: High serum level of lutein may be protective against early atherosclerosis: the Beijing atherosclerosis study. *Atherosclerosis* **219**(2); 789-793: 2011
- (98) Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts SL, Cooper J, Breteler MM, Bautista LE, Sharma P, Whittaker JC, Smeeth L, Fowkes FG, Algra A, Shmeleva V, Szolnoki Z, Roest M, Linnebank M, Zacho J, Nalls MA, Singleton AB, Ferrucci L, Hardy J, Worrall BB, Rich SS, Matarin M, Norman PE, Flicker L, Almeida OP, van Bockxmeer FM, Shimokata H, Khaw KT, Wareham NJ, Bobak M, Sterne JA, Smith GD, Talmud PJ, van Duijn C, Humphries SE, Price JF, Ebrahim S, Lawlor DA, Hankey GJ, Meschia JF, Sandhu MS, Hingorani AD, Casas JP: Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet* **378**(9791); 584-594: 2011
- (99) Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC: Homocysteine-induced endoplasmic reticu-

- lum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* **94**(3); 959-967: 1999
- (100) Sahin K.; Onderci M.; Sahin N.; Gursu M.F.; Aydin S: Cold-induced elevation of homocysteine and lipid peroxidation can be alleviated by dietary folic acid supplementation. *Nutrition Research* **23**(3); 357-365: 2003
- (101) Schmidt MC, Askew EW, Roberts DE, Prior RL, Ensign WY Jr, Hesslink RE Jr: Oxidative stress in humans training in a cold, moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplement. *Wilderness Environ Med* **13**(2); 94-105: 2002
- (102) Moser B, Szekeres T, Bieglmayer C, Wagner KH, Mišík M, Kundi M, Zakerska O, Nersesyan A, Kager N, Zahrl J, Hoelzl C, Ehrlich V, Knasmueller S: Impact of spinach consumption on DNA stability in peripheral lymphocytes and on biochemical blood parameters: results of a human intervention trial. *Eur J Nutr* **50**(7); 587-594: 2011
- (103) Hiraoka M, Kato K, Saito Y, Yasuda K, Kagawa Y: Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women: *Biochem Biophys Res Commun* **316**(4); 1210-1216: 2004
- (104) Silaste ML, Rantala M, Säämpi M, Alfthan G, Aro A, Kesäniemi YA: Polymorphisms of key enzymes in homocysteine metabolism affect diet responsiveness of plasma homocysteine in

- healthy women. *J Nutr* **131**(10); 2643-2647: 2001
- (105) McNulty H, Pentieva K: Folate bioavailability. *Proc Nutr Soc* **63**(4); 529-536: 2004
- (106) Männistö S, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Albanes D, Anderson K, van den Brandt PA, Cerhan JR, Colditz G, Feskanich D, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Miller AB, Rohan TE, Virtamo J, Willett WC, Hunter DJ: Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**(1); 40-48: 2004

List of figures and tables

- Fig. 1. Chromatogram of the carotenoids, retinols and tocopherols in human serum, obtained by HPLC-PDA
- Table 1-1, 1-2 Subject characteristics at baseline
- Table 2. Pearson's correlation of serum oxidative damage makers with each parameter
- Table 3. Pearson's correlation of serum antioxidant makers with each parameter
- Table 4. Pearson's correlation of urinary oxidative damage makers with each parameter
- Table 5. Pearson's correlation of vegetable intakes (total, green and yellow and other) with each parameter
- Table 6-1, 6-2. Baseline blood and urine concentration of micronutrients and biochemical markers in subjects depending on *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T and *GSTP1**I105V genotypes
- Table 7. Multiple regression analysis for urinary oxidative damage markers
- Table 8. Multiple regression analysis for serum antioxidant markers
- Fig. 2 Study design
- Table 9. Nutrients and bioactive compounds contained amount of high lycopene tomato juice (1can / 190g)

- Table 10. Energy and macro- and micro-nutrients contained in one week cycle basal diet menus by diet group
- Fig. 3. Chromatogram of ascorbic acid and carotenoids in tomato juice, obtained by HPLC and HPLC-PAD
- Table 11. Baseline characteristics by test group
- Table 12. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the interventions
- Table 13. Correlation coefficients among percentage changes of serum and urine oxidative stress markers during test intervention
- Table 14. Correlation coefficients among percentage changes of serum and urine oxidative stress markers and blood parameters in subjects during the test intervention
- Table 15-1, 15-2. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the test intervention depending on *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T and *GSTP1**I105V genotypes
- Fig. 4 Study design
- Table 16. Nutrients and bioactive compounds contained amount of crown daisy (1portion / raw 200g eq.)
- Fig. 5. Chromatogram of carotenoids and α -Tocopherol in crown daisy (Satoyutaka), obtained by HPLC and HPLC-PAD
- Table 17. Baseline characteristics by test group

Table 18. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the interventions

Table 19. Correlation coefficients among percentage changes of serum and urine oxidative stress markers during test intervention

Table 20. Correlation coefficients among percentage changes of serum and urine oxidative stress markers and blood parameters in subjects during the test intervention

Table 21-1, 21-2. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the test intervention depending on *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T and *GSTP1**I105V genotypes

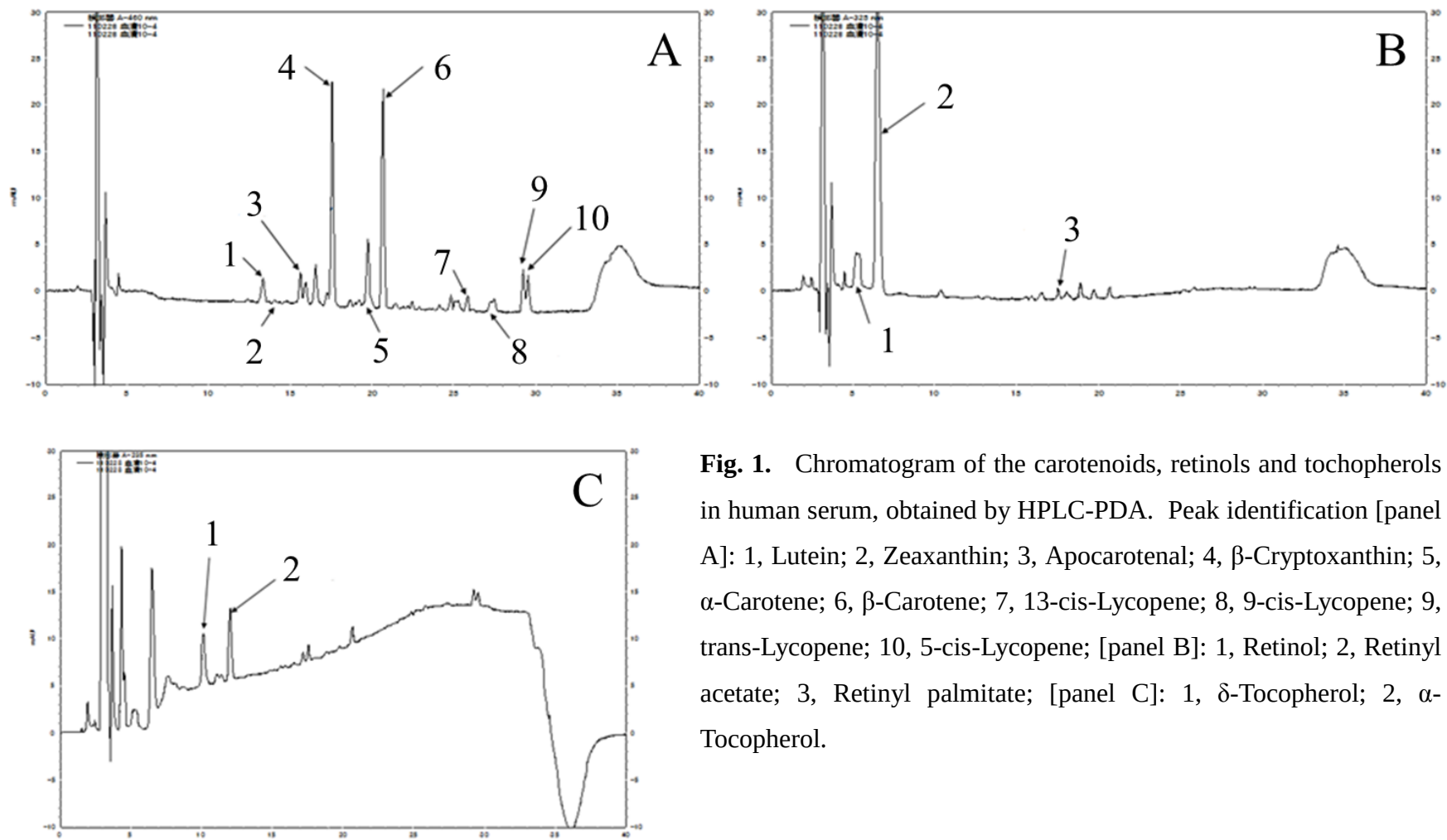


Fig. 1. Chromatogram of the carotenoids, retinols and tocopherols in human serum, obtained by HPLC-PDA. Peak identification [panel A]: 1, Lutein; 2, Zeaxanthin; 3, Apocarotenal; 4, β -Cryptoxanthin; 5, α -Carotene; 6, β -Carotene; 7, 13-cis-Lycopene; 8, 9-cis-Lycopene; 9, trans-Lycopene; 10, 5-cis-Lycopene; [panel B]: 1, Retinol; 2, Retinyl acetate; 3, Retinyl palmitate; [panel C]: 1, δ -Tocopherol; 2, α -Tocopherol.

Table 1-1. Subject characteristics at baseline

Variable	Mean	(SD)
No. of subjects	20	
Age, <i>yr</i>	21	(0.5)
Height, <i>cm</i>	158.9	(6.7)
Weight, <i>kg</i>	52.5	(7.1)
BMI, <i>kg/m²</i>	20.8	(2.2)
PAL, <i>Af</i>	1.49	(0.15)
Genotype, <i>n (%)</i>		
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S, [+] : [-]	15 (75)	: 5 (25)
<i>MTHFR</i> *C677T, [+] : [-]	12 (60)	: 8 (40)
<i>GSTP1</i> *I105V, [+] : [-]	10 (50)	: 10 (50)
Biochemical parameter		
Retinol, <i>ng/mL</i>	605.7	(131.0)
α -Carotene, <i>ng/mL</i>	155.2	(134.0)
β -Carotene, <i>ng/mL</i>	407.6	(391.4)
β -Cryptoxanthin, <i>ng/mL</i>	279.5	(155.6)
Lutein, <i>ng/mL</i>	203.3	(74.8)
Zeaxanthin, <i>ng/mL</i>	33.3	(12.4)
Total Lycopene, <i>ng/mL</i>	216.0	(73.8)
α -Tocopherol, <i>mg/mL</i>	9.0	(1.7)
Vitamin C, <i>μg/mL</i>	9.9	(1.4)
Folate, <i>ng/mL</i>	6.7	(2.6)
Total Glutathione, <i>μg/mL</i>	47.3	(5.5)
Uric acid, <i>mg/dL</i>	4.5	(0.7)
Homocysteine, <i>μmol/L</i>	6.5	(2.0)

Values are mean (SD: Standard Deviation). Abbreviations: BMI, body mass index; PAL, physical activity level; Af, activity factor. Genotype [+], AA for A379V and RR for R267S; CC and CT for C677T; II for I105V. Genotype [-], AV for A379V and/or RS and SS for R267S; TT for C677T; IV and VV for I105V.

Table 1-2. Subject characteristics at baseline

Variable	Mean	(SD)
Dietary intake		
Energy, <i>kcal/d</i>	1612	(302)
Protein, %E	13.4	(1.5)
Fat, %E	27.2	(3.1)
Carbohydrate, %E	59.4	(3.5)
α -Tocopherol, <i>mg/1000 kcal</i>	3.2	(0.6)
α -Carotene, <i>μg/1000 kcal</i>	275	(139)
β -Carotene, <i>μg/1000 kcal</i>	1745	(743)
Vitamin C, <i>mg/1000 kcal</i>	45.0	(20.4)
Folate, <i>μg/1000 kcal</i>	129.4	(32.2)
Total Vegetables, <i>g/d</i>	250.7	(94.7)
Oxidative stress biomarker		
Serum marker		
ROM, <i>CARR.U</i>	276.0	(45.9)
MDA, <i>μmol/L</i>	2.02	(0.53)
BAP, <i>μmol/L</i>	2752	(159)
TEAC, <i>μmol/L</i>	3363	(313)
Urine concentration, <i>ng/mg creatinine</i>		
8-OHdG	7.90	(2.29)
8-Isoprostane	1.57	(0.26)

All values are mean (SD). Abbreviations: %E, % of energy; ROM, derivatives of reactive oxygen metabolite; MDA, malondialdehyde; BAP, biological antioxidant potential; TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-Isoprostane, 8-isoprostaglandin F2alpha.

Table 2. Pearson's correlation of serum oxidative damage makers with each parameter

Variable	ROM		MDA	
	r^1	P^2	r	P
BMI, kg/m^2	-0.223	0.344	-0.251	0.287
PAL, Af	0.072	0.762	-0.021	0.931
Biochemical parameter				
Retinol, ng/mL	0.103	0.667	0.205	0.386
α -Carotene, ng/mL	0.201	0.396	0.311	0.182
β -Carotene, ng/mL	0.347	0.134	0.335	0.148
β -Cryptoxanthin, ng/mL	-0.147	0.536	0.379	0.099
Lutein, ng/mL	0.426	0.061	0.062	0.794
Zeaxanthin, ng/mL	0.249	0.291	0.087	0.715
Total Lycopene, ng/mL	-0.096	0.688	0.312	0.180
α -Tocopherol, mg/mL	0.425	0.055	-0.026	0.913
Vitamin C, $\mu g/mL$	0.147	0.535	-0.424	0.052
Folate, ng/mL	0.306	0.190	0.085	0.722
Total Glutathione, $\mu g/mL$	-0.270	0.249	0.065	0.786
Uric acid, mg/dL	0.183	0.439	-0.364	0.115
Homocysteine, $\mu mol/L$	-0.260	0.269	-0.383	0.096
Dietary intake				
Energy, $kcal/d$	0.033	0.891	0.284	0.225
Protein, %E	0.073	0.759	0.301	0.197
Fat, %E	-0.281	0.231	0.274	0.242
Carbohydrate, %E	0.215	0.362	-0.366	0.112
α -Carotene, $\mu g/1000 kcal$	-0.252	0.284	0.431	0.058
β -Carotene, $\mu g/1000 kcal$	-0.338	0.145	0.408	0.074
α -Tocopherol, $mg/1000 kcal$	-0.321	0.167	0.146	0.538
Ascorbic acid, $mg/1000 kcal$	-0.001	0.997	0.249	0.290
Folate, $\mu g/1000 kcal$	0.002	0.999	0.398	0.082
Vegetables, g/d	0.027	0.909	0.308	0.187

$n=20$. Log transformed data in biochemical parameters: MDA, α -Tocopherol, Lutein, α -Carotene, β -Carotene; dietary intake: β -Carotene.^{1,2} Correlation coefficients and significance levels among parameters by Pearson's correlation coefficient.

Table 3. Pearson's correlation of serum antioxidant makers with each parameter

Variable	BAP		TEAC	
	r^1	P^2	r	P
BMI, kg/m^2	0.116	0.626	-0.099	0.677
PAL, Af	-0.239	0.311	-0.418	0.067
Biochemical parameter				
Retinol, ng/mL	0.164	0.490	0.205	0.386
α -Carotene, ng/mL	0.182	0.442	0.093	0.696
β -Carotene, ng/mL	0.070	0.769	0.047	0.843
β -Cryptoxanthin, ng/mL	0.323	0.164	0.021	0.931
Lutein, ng/mL	-0.011	0.962	0.239	0.310
Zeaxanthin, ng/mL	-0.110	0.645	0.253	0.281
Total Lycopene, ng/mL	0.011	0.962	0.497	0.026 *
α -Tocopherol, mg/mL	-0.089	0.709	0.279	0.233
Vitamin C, $\mu g/mL$	0.359	0.120	-0.154	0.518
Folate, ng/mL	0.084	0.724	-0.045	0.850
Total Glutathione, $\mu g/mL$	0.130	0.586	0.302	0.196
Uric acid, mg/dL	-0.023	0.924	0.033	0.890
Homocysteine, $\mu mol/L$	0.139	0.558	0.237	0.314
Dietary intake				
Energy, $kcal/d$	-0.078	0.743	-0.281	0.230
Protein, %E	-0.207	0.382	-0.049	0.838
Fat, %E	-0.003	0.988	-0.004	0.987
Carbohydrate, %E	0.094	0.692	0.024	0.919
α -Carotene, $\mu g/1000 kcal$	0.424	0.062	0.107	0.654
β -Carotene, $\mu g/1000 kcal$	0.560	0.010 *	0.255	0.278
α -Tocopherol, $mg/1000 kcal$	0.291	0.212	0.006	0.981
Ascorbic acid, $mg/1000 kcal$	0.318	0.172	0.093	0.696
Folate, $\mu g/1000 kcal$	0.440	0.053	0.206	0.384
Vegetables, g/d	0.348	0.133	0.042	0.860

$n=20$. Log transformed data in biochemical parameters: α -Tocopherol, Lutein, α -Carotene, β -Carotene; dietary intake: β -Carotene.^{1,2} Correlation coefficients and significance levels among parameters by Pearson's correlation coefficient, * $P < 0.05$.

Table 4. Pearson's correlation of urinary oxidative damage makers with each parameter

Variable	8-OHdG		8-Isoprostane	
	r^1	P^2	r	P
BMI, kg/m^2	0.138	0.561	-0.078	0.744
PAL, Af	0.181	0.446	0.220	0.351
Biochemical parameter				
Retinol, ng/mL	0.281	0.231	-0.190	0.421
α -Carotene, ng/mL	0.141	0.555	-0.347	0.134
β -Carotene, ng/mL	0.181	0.444	-0.305	0.190
β -Cryptoxanthin, ng/mL	0.253	0.283	-0.085	0.722
Lutein, ng/mL	0.403	0.078	-0.043	0.857
Zeaxanthin, ng/mL	0.270	0.249	0.237	0.314
Total Lycopene, ng/mL	0.307	0.189	-0.246	0.296
α -Tocopherol, mg/mL	0.217	0.357	-0.050	0.835
Vitamin C, $\mu g/mL$	-0.402	0.079	-0.550	0.012 *
Folate, ng/mL	0.192	0.417	-0.588	0.006 **
Total Glutathione, $\mu g/mL$	-0.385	0.093	0.015	0.951
Uric acid, mg/dL	0.134	0.574	-0.361	0.118
Homocysteine, $\mu mol/L$	-0.200	0.398	0.308	0.187
Dietary intake				
Energy, $kcal/d$	0.028	0.905	-0.259	0.270
Protein, %E	0.272	0.246	0.023	0.923
Fat, %E	0.378	0.100	-0.107	0.652
Carbohydrate, %E	-0.449	0.047 *	0.084	0.724
Sodium, $mg/1000 kcal$	0.745	< 0.001 **	-0.010	0.965
α -Carotene, $\mu g/1000 kcal$	0.338	0.145	-0.517	0.020 *
β -Carotene, $\mu g/1000 kcal$	0.367	0.111	-0.469	0.037 *
α -Tocopherol, $mg/1000 kcal$	0.441	0.052	-0.205	0.386
Ascorbic acid, $mg/1000 kcal$	0.401	0.080	-0.415	0.069
Folate, $\mu g/1000 kcal$	0.294	0.208	-0.478	0.033 *
Vegetables, g/d	0.313	0.179	-0.412	0.071

$n=20$. Log transformed data in biochemical parameters: α -Tocopherol, Lutein, α -Carotene, β -Carotene; dietary intake: β -Carotene.^{1,2} Correlation coefficients and significance levels among parameters by Pearson's correlation coefficient, * $P < 0.05$, ** < 0.01 .

Table 5. Pearson's correlation of vegetable intakes (total, green and yellow and other) with each parameter

Variable	Total vegetables (g/day)			green and yellow (g/day)			other (g/day)	
	r ¹	P ²		r	P		r	P
Biochemical parameter								
α -Carotene, <i>ng/mL</i>	0.585	0.007	**	0.567	0.009	**	0.448	0.048 *
β -Carotene, <i>ng/mL</i>	0.554	0.011	*	0.467	0.038	*	0.434	0.056
Lutein, <i>ng/mL</i>	0.261	0.266		0.005	0.984		0.304	0.193
Zeaxanthin, <i>ng/mL</i>	0.162	0.496		-0.045	0.852		0.208	0.379
β -Cryptoxanthin, <i>ng/mL</i>	0.641	0.002	**	0.579	0.007	**	0.410	0.073
Total Lycopene, <i>ng/mL</i>	0.127	0.594		0.075	0.752		0.175	0.460
α -Tocopherol, <i>mg/mL</i>	0.049	0.838		0.005	0.982		0.055	0.817
Vitamin C, $\mu\text{g/mL}$	0.075	0.753		0.056	0.816		0.065	0.786
Folate, <i>ng/mL</i>	0.552	0.012	*	0.534	0.015	*	0.270	0.249
Total Glutathione, $\mu\text{g/mL}$	-0.403	0.078		-0.195	0.410		-0.391	0.089
Uric acid, <i>mg/dL</i>	-0.105	0.658		0.099	0.677		-0.165	0.487
Homocysteine, $\mu\text{mol/L}$	-0.547	0.013	*	-0.517	0.020	*	-0.295	0.207
Oxidative stress biomarker								
ROM, <i>CARR.U</i>	0.027	0.909		-0.287	0.220		0.152	0.523
MDA, $\mu\text{mol/L}$	0.308	0.187		0.425	0.062		0.183	0.440
BAP, $\mu\text{mol/L}$	0.348	0.133		0.507	0.023	*	0.196	0.407
TEAC, $\mu\text{mol/L}$	0.042	0.860		0.088	0.712		0.013	0.958
8-OHdG, <i>ng/mg creatinine</i>	0.313	0.179		0.269	0.251		0.255	0.279
8-Isoprostane, <i>ng/mg creatinine</i>	-0.412	0.071		-0.422	0.064		-0.306	0.189

$n=20$. Log transformed data in biochemical parameters: α -Tocopherol, Lutein, α -Carotene, β -Carotene, MDA. ^{1,2} Correlation coefficients and significance levels among percentage changes of biomarkers by Pearson's correlation coefficient, * $P < 0.05$, ** < 0.01 .

Table 6-1. Baseline blood and urine concentration of micronutrients and biochemical markers in subjects depending on *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T and *GSTP1**I105V genotypes.

Variable	Genotype		<i>P</i> value ³
	[+] ¹	[-] ²	
No. of subjects			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	15	5	—
<i>MTHFR</i> *C677T	12	8	—
<i>GSTP1</i> *I105V	10	10	—
Retinol, ng/mL			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	634.7 (58.0)	535.5 (2.9)	0.230 ns
α -Carotene, ng/mL			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	100.0 (34.6)	127.4 (54.8)	0.395 ns
β -Carotene, ng/mL			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	241.8 (101.3)	329.7 (41.2)	0.612 ns
β -Cryptoxanthin, ng/mL			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	263.4 (129.1)	279.0 (11.9)	0.735 ns
Lutein, ng/mL			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	186.1 (20.5)	182.7 (16.4)	1.000 ns
Zeaxanthin, ng/mL			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	32.6 (11.2)	28.6 (5.2)	0.445 ns
Total Lycopene, ng/mL			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	227.0 (47.7)	250.4 (10.1)	0.553 ns
Vitamin C, μ g/mL			
<i>MTHFR</i> *C677T	10.0 (0.9)	9.5 (1.2)	0.012 †
<i>GSTP1</i> *I105V	9.7 (0.6)	9.9 (0.4)	0.912 ns
Folate, ng/mL			
<i>MTHFR</i> *C677T	6.8 (1.1)	4.3 (2.0)	0.082 ns
Total Glutathione, μ g/mL			
<i>GSTP1</i> *I105V	48.3 (3.2)	47.5 (2.4)	0.853 ns
Homocysteine, μ mol/L			
<i>MTHFR</i> *C677T	5.6 (1.2)	6.9 (1.9)	0.115 ns

Values are median (QD: Quartile Deviation), *n*=20. ¹ Genotype [+], AA for A379V and RR for R267S; CC and CT for C677T; II for I105V. ² Genotype [-], AV for A379V and/or RS and SS for R267S; TT for C677T; IV and VV for I105V. ³ Significant difference was evaluated by using Mann-Whitney's U test between genotype [+] and [-] each genotype, † *P* < 0.05. ns, not significant, *P* > 0.05.

Table 6-2. Baseline blood and urine concentration of micronutrients and biochemical markers in subjects depending on *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T and *GSTP1**I105V genotypes.

Variable	Genotype		<i>P</i> value ³
	[+] ¹	[-] ²	
Serum marker			
ROM, <i>CARR.U</i>			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	261 (32)	288 (22)	0.866 ns
<i>MTHFR</i> *C677T	274 (33)	265 (32)	0.624 ns
<i>GSTP1</i> *I105V	273 (33)	266 (27)	0.796 ns
MDA, $\mu\text{mol/L}$			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	2.08 (0.27)	1.71 (0.09)	0.230 ns
<i>MTHFR</i> *C677T	2.15 (0.47)	1.90 (0.18)	0.792 ns
<i>GSTP1</i> *I105V	1.89 (0.32)	2.11 (0.31)	0.353 ns
BAP, $\mu\text{mol/L}$			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	2738 (89)	2673 (66)	0.445 ns
<i>MTHFR</i> *C677T	2741 (122)	2697 (99)	0.384 ns
<i>GSTP1</i> *I105V	2730 (56)	2756 (94)	0.739 ns
TEAC, $\mu\text{mol/L}$			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	3253 (169)	3569 (170)	0.933 ns
<i>MTHFR</i> *C677T	3179 (108)	3536 (136)	0.970 ns
<i>GSTP1</i> *I105V	3173 (109)	3497 (140)	0.739 ns
Urine concentration, <i>ng/mg cre.</i>			
8-OHdG			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	7.43 (0.87)	7.28 (2.16)	0.800 ns
<i>MTHFR</i> *C677T	7.23 (1.16)	8.74 (2.02)	0.181 ns
<i>GSTP1</i> *I105V	7.22 (1.63)	7.50 (0.69)	0.684 ns
8-Isoprostane			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	1.51 (0.19)	1.56 (0.19)	0.800 ns
<i>MTHFR</i> *C677T	1.42 (0.11)	1.78 (0.20)	0.042 †
<i>GSTP1</i> *I105V	1.47 (0.18)	1.65 (0.19)	1.000 ns

All values are median (QD: Quartile Deviation), *n*=20. ¹ Genotype [+], AA for A379V and RR for R267S; CC and CT for C677T; II for I105V. ² Genotype [-], AV for A379V and/or RS and SS for R267S; TT for C677T; IV and VV for I105V. ³ Significant difference was evaluated by using Mann-Whitney's U test between genotype [+] and [-] each genotype, † *P* < 0.05. ns, not significant, *P* > 0.05.

Table 7. Multiple regression analysis for urinary oxidative damage markers

Dependent variable	Explanatory variable	β	<i>P</i> value	Adjusted R ²
8-OHdG ^{a)}	Sodium intake	0.745	< 0.001	0.555
8-Isoprostane ^{b)}				0.447
	serum Folate	-0.470	0.017	
	serum Vitamin C	-0.416	0.032	

n=20. Statical analysis was conducted by stepwise multiple regression analysis. β indicates standardized partial regression coefficient. Log transformed data in dietary intake, β -Carotene. Genotype was scored "0" for [+], "1" for [-]. Variable included in the model, for a): BMI, PAL, serum Uric acid, Carbohydrate (%E); for b): BMI, PAL, serum Homocysteine, β -Carotene intake, Folate intake, *MTHFR**C677T genotype.

Table 8. Multiple regression analysis for serum antioxidant markers

Dependent variable	Explanatory variable	β	<i>P</i> value	Adjusted R ²
BAP ^{c)}	β -Carotene intake	0.591	0.006	0.313
TEAC ^{d)}	serum Total Lycopene	0.497	0.026	0.205

n=20. Statical analysis was conducted by stepwise multiple regression analysis. β indicates standardized partial regression coefficient. Log transformed data in biochemical parameter, Lutein; dietary intake, β -Carotene. Variable included in the model, for c): green and yellow vegetable intake; for d): serum Lutein.

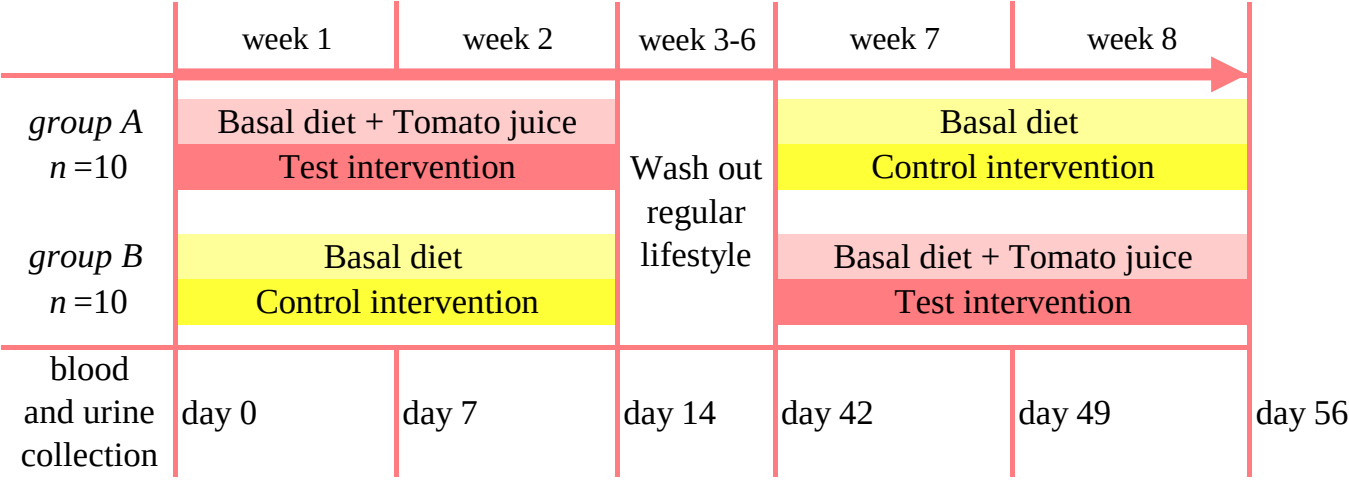


Fig. 2 Study design

Table 9. Nutrients and bioactive compounds contained amount of high lycopene tomato juice (1can / 190g)

Listed on the Nutrition Facts label		
Energy	43	kcal
Protein	2.1	g
Fat	0	g
Carbohydrate	8.0	g
Quantitative analytical results		
α -Carotene	368 (29)	μg
β -Carotene	559 (11)	μg
Lycopene	28.0 (1.4)	mg
Ascorbic acid	39 (2)	mg
Total polyphenol	107.0 (1.9)	mg GA eq.
DPPH radical scavenging activity	405.8 (7.9)	$\mu\text{mol BHA eq.}$

Quantitative values are mean (SD: Standard Deviation), $n=3$. Abbreviations: GA, gallic acid; BHA, butylated hydroxyanisole.

Table 10. Energy and macro- and micro-nutrients contained in one week cycle basal diet menus by diet group

	Diet group, <i>n</i> =20		
	1500kcal, <i>n</i> =12	1700kcal, <i>n</i> =4	1900kcal, <i>n</i> =4
Energy, <i>kcal</i>	1548 (60)	1722 (60)	1916 (62)
Protein, <i>g</i>	67.4 (4.8)	70.8 (5.2)	75.2 (5.4)
Fat, % <i>E</i>	26.6 (2.6)	24.2 (2.6)	22.2 (2.4)
Carbohydrate, % <i>E</i>	54.4 (3.7)	57.5 (3.5)	60.1 (3.2)
Sodium, <i>mg</i>	2983 (341)	2983 (341)	3056 (349)
Potassium, <i>mg</i>	2333 (306)	2382 (309)	2442 (312)
Calcium, <i>mg</i>	555 (83)	558 (83)	567 (83)
Magnesium, <i>mg</i>	231 (30)	244 (32)	258 (33)
Iron, <i>mg</i>	7.5 (1.0)	7.9 (1.0)	8.3 (1.1)
Zinc, <i>mg</i>	8.1 (1.1)	8.8 (1.1)	9.5 (1.1)
Copper, <i>mg</i>	0.99 (0.05)	1.10 (0.06)	1.21 (0.06)
Manganese, <i>mg</i>	2.82 (0.33)	3.16 (0.41)	3.47 (0.47)
Retinol, μ <i>g</i>	192 (30)	←	←
α -Carotene, μ <i>g</i>	402 (212)	←	←
β -Carotene, μ <i>g</i>	2541 (805)	←	←
Cryptoxanthin, μ <i>g</i>	49 (28)	←	←
β -Carotene equivalents, μ <i>g</i>	2791 (848)	←	←
Retinol equivalents, μ <i>g</i>	429 (63)	←	←
Vitamin D, μ <i>g</i>	6.5 (6.6)	←	←
α -Tocopherol, <i>mg</i>	5.3 (1.3)	5.4 (1.3)	5.5 (1.3)
Vitamin K, μ <i>g</i>	137 (56)	←	←
Thiamin, <i>mg</i>	1.24 (0.36)	1.29 (0.37)	1.33 (0.38)
Riboflavin, <i>mg</i>	1.19 (0.11)	1.20 (0.11)	1.21 (0.10)
Vitamin B ₆ , <i>mg</i>	1.25 (0.26)	1.31 (0.26)	1.36 (0.26)
Vitamin B ₁₂ , μ <i>g</i>	2.6 (1.1)	←	←
Folate, μ <i>g</i>	240 (10)	246 (10)	256 (10)
Ascorbic acid, <i>mg</i>	71 (12)	←	←
Total dietary fiber, <i>g</i>	12.0 (2.9)	12.4 (3.0)	13.2 (3.2)
Salt equivalents, <i>g</i>	7.6 (0.9)	7.6 (0.9)	7.7 (0.9)
Total vegetables, <i>g</i>	239.7 (18.7)	←	←
green and yellow, <i>g</i>	62.1 (18.5)	←	←
other, <i>g</i>	177.6 (21.6)	←	←

All values are mean (SD) per day. ← Same as left (1500kcal diet group). Nutrition analyses were performed by using the calculation software (Excel Eiyo-kun, Kenpakusha, Tokyo, Japan).

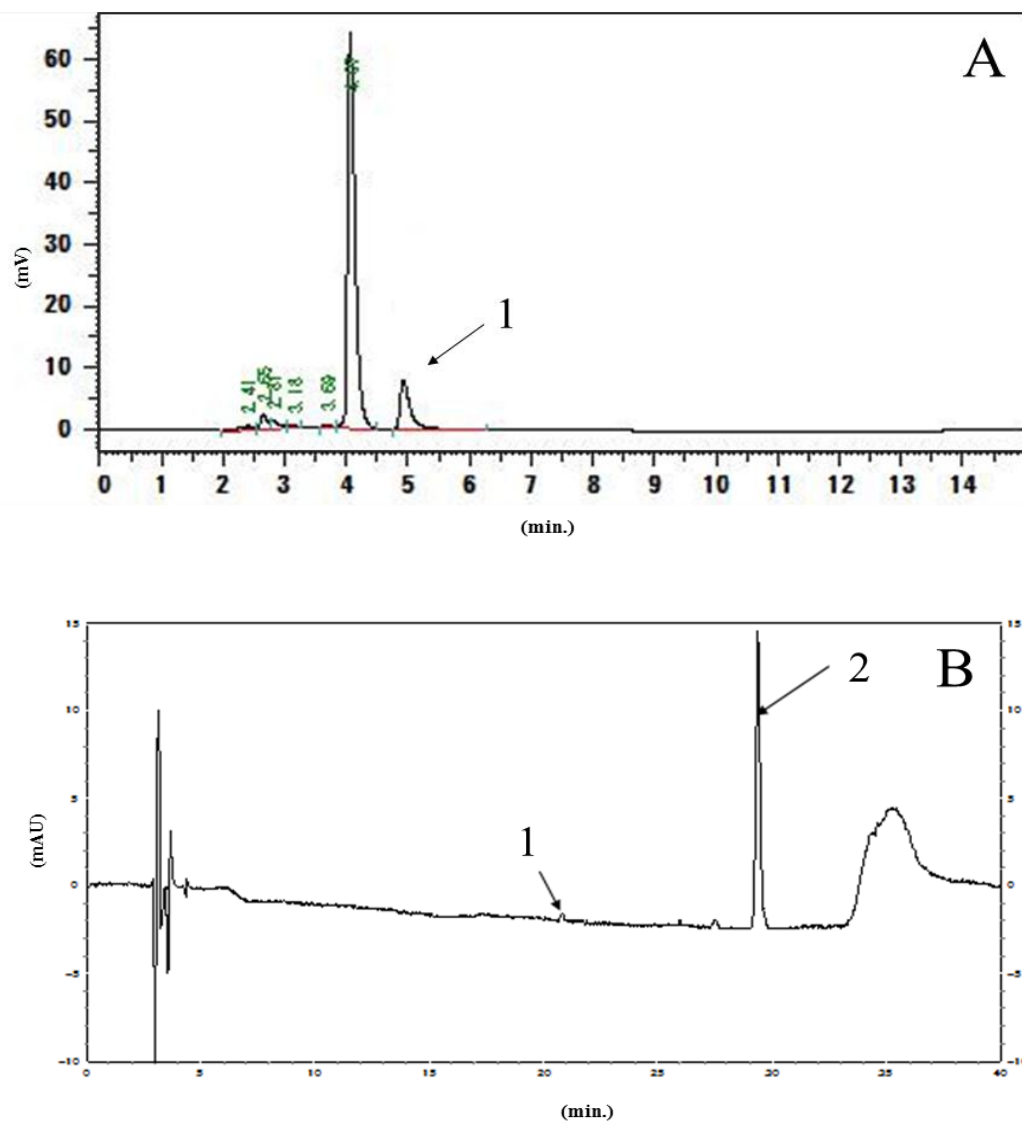


Fig. 3. Chromatogram of ascorbic acid and carotenoids in tomato juice, obtained by HPLC and HPLC-PAD. Peak identification [panel A]: 1, Ascorbic acid; [panel B]: 1, β -Carotene; 2, Lycopene.

Table 11. Baseline characteristics by test group

Variable	All subjects, <i>n</i> =20		<i>P</i> value ¹
	group A, <i>n</i> =10	group B, <i>n</i> =10	
Age, <i>yr</i>	21 (0.4)	21 (0.4)	1.000
Height, <i>cm</i>	161.4 (4.4)	155.5 (4.3)	0.853
Weight, <i>kg</i>	49.7 (5.1)	53.4 (4.9)	0.912
BMI, <i>kg/m</i> ²	20.9 (1.7)	20.9 (1.0)	0.853
PAL, <i>Af</i>	1.49 (0.11)	1.48 (0.09)	0.353
Genotype, <i>n</i> (%)			
<i>BCMO1</i> * <i>A379V</i> /* <i>R267S</i> , [+]: [−]	8 (40) : 2 (10)	7 (35) : 3 (15)	1.000
<i>MTHFR</i> * <i>C677T</i> , [+]: [−]	5 (25) : 5 (25)	7 (35) : 3 (15)	0.650
<i>GSTP1</i> * <i>I105V</i> , [+]: [−]	6 (30) : 4 (20)	4 (20) : 6 (30)	0.656
Dietary intake			
Energy, <i>kcal/d</i>	1702 (189)	1566 (200)	0.143
Protein, % <i>E</i>	13.8 (0.6)	13.5 (0.8)	0.481
Fat, % <i>E</i>	26.3 (1.2)	26.8 (2.5)	0.631
Carbohydrate, % <i>E</i>	59.6 (1.8)	60.3 (2.9)	0.436
Vegetables, <i>g</i>	243.8 (72.8)	282.1 (92.9)	0.684
Biochemical parameter			
Retinol, <i>ng/mL</i>	588.2 (56.1)	671.1 (90.6)	0.190
α-Carotene, <i>ng/mL</i>	119.7 (49.8)	105.3 (33.6)	0.971
β-Carotene, <i>ng/mL</i>	315.6 (87.6)	274.6 (118.5)	0.579
β-Cryptoxanthin, <i>ng/mL</i>	271.2 (106.8)	293.8 (94.0)	0.684
Total Lycopene, <i>ng/mL</i>	218.6 (46.5)	242.7 (40.0)	0.353
Lutein, <i>ng/mL</i>	177.1 (33.8)	191.9 (35.7)	0.247
Zeaxanthin, <i>ng/mL</i>	31.0 (12.8)	31.2 (4.4)	0.529
α-Tocopherol, <i>mg/mL</i>	8.8 (1.0)	9.0 (0.9)	0.280
Vitamin C, <i>μg/mL</i>	9.7 (0.3)	9.9 (0.8)	0.481
Folate, <i>ng/mL</i>	5.8 (1.2)	7.4 (2.1)	0.052
Homocysteine, <i>μmol/L</i>	6.6 (1.1)	5.6 (1.4)	0.631
Total Glutathione, <i>μg/mL</i>	49.3 (2.9)	46.2 (4.4)	0.796
Uric acid, <i>mg/dL</i>	4.2 (0.5)	4.6 (0.3)	0.529
Oxidative stress biomarker			
ROM, <i>CARR.U</i>	272.0 (31.3)	266.0 (28.8)	0.853
MDA, <i>μmol/L</i>	1.98 (0.23)	2.02 (0.34)	0.631
BAP, <i>μmol/L</i>	2739 (99)	2747 (91)	1.000
TEAC, <i>μmol/L</i>	3173 (109)	3497 (140)	0.019 †
8-OHdG, <i>ng/mg cre.</i>	7.14 (0.57)	8.10 (1.90)	0.052
8-Isoprostane, <i>ng/mg cre.</i>	1.61 (0.19)	1.46 (0.19)	0.165

Values are median (QD: quartile deviation). Abbreviations: %E, % of energy; ROM, derivatives of reactive oxygen metabolite; MDA, malondialdehyde; BAP, biological antioxidant potential; TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity; cre, creatinine; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-Isoprostane, 8-isoprostaglandin F2α. Genotype [+], AA for *A379V* and RR for *R267S*; CC and CT for *C677T*; II for *I105V*. Genotype [−], AV for *A379V* and/or RS and SS for *R267S*; TT for *C677T*; IV and VV for *I105V*.

¹ Variable data were tested for statistical significance using Mann-Whitney's U test and chi-square test between two groups, † *P* < 0.05.

Table 12. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the interventions

	Test intervention (<i>n</i> =20)			Control intervention (<i>n</i> =20)			<i>P</i> values ³		
	week 0 Pre	week 1	week 2 Post	week 0 Pre	week 1	week 2 Post	Treatment	Time	Treatment x Time
Retinol, <i>ng/mL</i>	646.0 (153.5)	723.1 (138.5)	721.4 (120.8)	624.3 (127.3)	718.5 (122.1)	713.4 (147.8)	ns	< 0.0001	ns
α -Carotene, <i>ng/mL</i> ¹	127.1 (1.8)	165.7 (1.7)***	168.4 (1.5)***	130.7 (1.8)	151.0 (1.7)*	127.7 (1.7)	< 0.01	< 0.0001	< 0.0001
β -Carotene, <i>ng/mL</i> ²	324.8 (1.9)	455.9 (1.7)***	489.3 (1.5)***	346.5 (1.9)	375.7 (1.8)	319.7 (1.7)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
β -Cryptoxanthin, <i>ng/mL</i>	272.1 (146.3)	250.8 (130.5)	226.2 (99.0)	358.5 (217.7)	332.4 (176.0)	281.3 (154.4)	< 0.05	< 0.05	ns
Total Lycopene, <i>ng/mL</i>	215.2 (81.5)	465.7 (119.4)***	529.1 (112.8)***	241.9 (61.8)	279.1 (70.3)*	254.5 (55.6)	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Lutein, <i>ng/mL</i>	189.4 (76.0)	208.7 (63.7)*	195.6 (45.9)	194.6 (83.5)	205.3 (53.1)	178.2 (42.2)	ns	< 0.05	< 0.05
Zeaxanthin, <i>ng/mL</i>	31.3 (11.6)	31.2 (9.2)	28.5 (7.8)	30.3 (10.6)	32.4 (10.0)	27.5 (8.4)	ns	< 0.05	ns
α -Tocopherol, <i>mg/mL</i>	8.7 (1.8)	10.5 (1.7)***	10.3 (1.9)***	8.4 (1.9)	9.5 (1.9)*	9.1 (1.9)	< 0.001	< 0.0001	< 0.01
Vitamin C, $\mu\text{g/mL}$	9.9 (1.8)	11.2 (1.0)*	11.0 (1.4)*	10.2 (1.7)	9.7 (1.8)	9.0 (2.1)*	< 0.001	ns	< 0.01
Folate, <i>ng/mL</i>	6.3 (2.3)	6.4 (1.7)	6.1 (2.0)	6.8 (2.7)	6.0 (2.1)	5.6 (1.8)	ns	< 0.05	ns
Homocysteine, $\mu\text{mol/L}$	6.4 (1.8)	6.7 (1.6)	6.8 (1.7)	6.9 (2.5)	6.8 (2.3)	6.7 (1.7)	ns	ns	ns
Total Glutathione, $\mu\text{g/mL}$	48.2 (5.3)	46.1 (5.7)	46.3 (4.3)	49.4 (6.2)	46.3 (6.8)	47.8 (6.7)	ns	< 0.001	ns
Uric acid, <i>mg/dL</i>	4.5 (0.7)	4.3 (0.6)	4.3 (0.6)	4.5 (0.6)	4.3 (0.6)	4.2 (0.6)	ns	< 0.01	ns
ROM, <i>CARR.U</i>	289 (46)	273 (38)**	256 (30)***	270 (40)	278 (35)	267 (34)	ns	< 0.001	< 0.001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	1.92 (0.42)	2.36 (0.58)	2.27 (0.53)	2.21 (1.03)	2.26 (0.52)	2.13 (0.56)	ns	ns	ns
BAP, $\mu\text{mol/L}$	2761 (136)	2725 (116)	2715 (114)	2774 (153)	2741 (115)	2693 (114)	ns	< 0.05	ns
TEAC, $\mu\text{mol/L}$	3212 (271)	3575 (282)***	3530 (339)**	3438 (283)	3559 (320)	3456 (242)	ns	< 0.001	< 0.05
8-OHdG, <i>ng/mg cre.</i>	7.90 (2.57)	8.01 (2.86)	9.28 (3.15)	8.57 (2.68)	8.18 (3.89)	8.66 (2.61)	ns	ns	ns
8-Isoprostane, <i>ng/mg cre.</i>	1.53 (0.27)	1.26 (0.27)***	1.17 (0.14)***	1.52 (0.24)	1.45 (0.37)	1.38 (0.30)	< 0.05	< 0.0001	< 0.05

Values are mean (SD). ^{1,2} Values are expressed as geometric mean (GSD: geometric standard deviation). ³ Significant difference from week 0 each intervention was analyzed by repeated measures ANOVA with post hoc Bonferroni correction, * *P* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001. ns, not significant, *P* > 0.05.

Table 13. Correlation coefficients among percentage changes¹ of serum and urine oxidative stress markers during test intervention

	MDA	BAP	TEAC	8-OHdG	8-Isoprostane
ROM	0.13	-0.01	0.12	0.19	-0.24
MDA	—	0.03	0.09	0.00	0.19
BAP	—	—	0.48 *	0.25	-0.35
TEAC	—	—	—	0.10	-0.51 *
8-OHdG	—	—	—	—	-0.20

¹ It was calculated according to the following equation: percentage change = (Post / Pre) x 100 - 100. Correlation coefficients and significance levels among percentage changes of biomarkers by Pearson's correlation coefficient, * $P < 0.05$.

Table 14. Correlation coefficients among percentage changes of serum and urine oxidative stress markers and blood parameters in subjects during the test intervention

	ROM	MDA	BAP	TEAC	8-OHdG	8-Isoprostane
Retinol, <i>ng/mL</i>	0.34	0.20	0.35	0.32	0.47	-0.38
α -Carotene, <i>ng/mL</i>	0.12	-0.36	0.65 **	0.33	0.43	-0.41
β -Carotene, <i>ng/mL</i>	0.29	-0.22	0.44	0.24	0.41	-0.41
β -Cryptoxanthin, <i>ng/mL</i>	0.03	-0.37	-0.06	-0.19	0.27	-0.23
Total Lycopene, <i>ng/mL</i>	-0.23	-0.21	0.29	0.29	0.48	0.05
Lutein, <i>ng/mL</i>	0.30	0.08	0.22	0.40	0.30	-0.51 *
Zeaxanthin, <i>ng/mL</i>	-0.36	-0.04	0.06	0.10	0.22	0.08
α -Tocopherol, <i>mg/mL</i>	0.06	0.17	-0.01	-0.23	0.35	0.03
Vitamin C, <i>μg/mL</i>	0.32	-0.39	0.02	0.18	0.36	-0.52 *
Folate, <i>ng/mL</i>	0.40	0.26	0.28	-0.09	0.42	-0.08
Homocysteine, <i>μmol/L</i>	-0.23	-0.31	0.25	-0.07	0.19	-0.06
Total Glutathione, <i>μg/mL</i>	-0.06	-0.02	0.17	0.30	0.04	-0.36
Uric acid, <i>mg/dL</i>	0.14	0.30	0.33	0.05	0.02	-0.01

n=20. Log transformed data in biochemical parameters: α -Tocopherol, Lutein, α -Carotene, β -Carotene. Correlation coefficients and significance levels among percentage changes of oxidative stress and blood parameters by Pearson's correlation coefficient, * *P* < 0.05, ** < 0.01.

Table 15-1. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the test intervention depending on *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T and *GSTP1**I105V genotypes

	Genotype [+] ¹			Genotype [-] ²		
	week 0	week 1	week 2	week 0	week 1	week 2
No. of subjects						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S		15			5	
<i>MTHFR</i> *C677T		12			8	
<i>GSTP1</i> *I105V		10			10	
Retinol, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	634.7 (54.7)	721.8 (77.6)	752.2 (55.2)	689.4 (146.5)	707.3 (108.3)	664.0 (42.5)
α -Carotene, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	110.7 (45.6)	133.0 (53.5)	140.1 (36.2)	116.6 (62.5)	178.9 (62.3)	178.3 (41.9)
β -Carotene, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	258.5 (104.9)	345.6 (133.4)	420.6 (78.9)	335.5 (30.1)	542.6 (37.8)	557.7 (64.9)
Total Lycopene, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	210.3 (48.4)	475.3 (55.1)	531.2 (47.9)	250.4 (63.9)	451.8 (105.5)	588.9 (12.4)
Lutein, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	165.5 (26.7)	185.1 (32.7)	181.1 (31.0)	204.7 (30.6)	200.0 (50.0)	191.1 (4.0)
Vitamin C, μ g/mL						
<i>MTHFR</i> *C677T	10.1 (1.1)†	11.4 (0.7)	11.7 (0.8)	9.6 (1.2)	11.3 (1.0)	10.3 (1.0)
<i>GSTP1</i> *I105V	9.9 (0.4)	11.3 (0.7)	10.5 (1.3)	9.9 (1.2)	11.9 (1.0)	11.4 (0.6)
Total Glutathione, μ g/mL						
<i>GSTP1</i> *I105V	45.9 (4.2)	44.9 (2.2)	46.4 (2.8)	49.8 (2.1)	48.6 (2.8)	47.1 (1.7)
Folate, ng/mL						
<i>MTHFR</i> *C677T	6.9 (1.1)	6.9 (0.7)†	6.1 (1.1)	4.3 (1.5)	5.2 (0.9)	4.5 (1.0)
Homocysteine, μ mol/L						
<i>MTHFR</i> *C677T	5.9 (1.2)	6.3 (0.6)	6.8 (1.0)	7.0 (1.2)	7.1 (1.3)	7.1 (1.9)

All values are median (QD), $n=20$. ¹ Genotype [+], AA for A379V and RR for R267S; CC and CT for C677T; II for I105V. ² Genotype [-], AV for A379V and/or RS and SS for R267S; TT for C677T; IV and VV for I105V. Significant difference was analyzed by Mann-Whitney's U test between Genotype [+] and [-] each time point, † $P < 0.05$.

Table 15-2. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the test intervention depending on *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T and *GSTP1**I105V genotypes

	Genotype [+] ¹			Genotype [-] ²		
	week 0	week 1	week 2	week 0	week 1	week 2
ROM, CARR.U						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	285.5 (33.4)	265.0 (18.6)	254.5 (16.0)	288.5 (10.5)	275.0 (12.8)	255.0 (14.0)
<i>MTHFR</i> *C677T	294.8 (24.9)	270.0 (17.5)	254.8 (17.3)	272.0 (39.9)	270.5 (28.0)	255.5 (14.5)
<i>GSTP1</i> *I105V	288.3 (27.3)	264.3 (21.3)	253.3 (17.8)	293.3 (34.5)	271.0 (15.3)	257.0 (10.8)
MDA, $\mu\text{mol/L}$						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	2.07 (0.24)	2.25 (0.39)	2.38 (0.44)	1.86 (0.35)	2.35 (0.46)	2.27 (0.34)
<i>MTHFR</i> *C677T	1.93 (0.41)	2.73 (0.47)	2.10 (0.34)	1.98 (0.15)	2.23 (0.24)	2.53 (0.34)
<i>GSTP1</i> *I105V	1.98 (0.36)	2.23 (0.47)	2.25 (0.50)	1.97 (0.25)	2.52 (0.40)	2.33 (0.34)
BAP, $\mu\text{mol/L}$						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	2746 (69)	2749 (75)	2729 (84)	2744 (121)	2646 (41)	2648 (54)
<i>MTHFR</i> *C677T	2751 (86)	2727 (80)	2699 (118)	2737 (84)	2705 (95)	2732 (50)
<i>GSTP1</i> *I105V	2742 (61)	2758 (107)	2698 (71)	2792 (96)	2691 (72)	2722 (59)
TEAC, $\mu\text{mol/L}$						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	3170 (97)	3613 (213)	3540 (160)	3198 (35)	3444 (159)	3701 (419)
<i>MTHFR</i> *C677T	3166 (156)	3539 (254)	3451 (219)	3187 (84)	3640 (206)	3676 (242)
<i>GSTP1</i> *I105V	3211 (310)	3597 (307)	3610 (414)	3171 (53)	3583 (185)	3525 (186)
8-OHdG, ng/mg cre.						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	7.43 (1.51)	7.92 (2.49)	8.52 (1.85)	7.10 (1.99)	5.94 (2.86)	7.81 (1.78)
<i>MTHFR</i> *C677T	6.67 (1.46)	6.77 (1.24)	7.96 (1.18)	7.83 (1.50)	8.92 (1.00)	8.64 (2.48)
<i>GSTP1</i> *I105V	7.14 (1.10)	6.39 (2.72)	7.14 (1.50)	8.16 (2.71)	9.77 (2.76)	8.04 (2.09)
8-Isoprostane, ng/mg cre.						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	1.43 (0.23)	1.15 (0.18)†	1.16 (0.12)	1.71 (0.15)	1.48 (0.06)	1.25 (0.07)
<i>MTHFR</i> *C677T	1.40 (0.17)†	1.25 (0.15)	1.16 (0.12)	1.71 (0.18)	1.26 (0.24)	1.21 (0.07)
<i>GSTP1</i> *I105V	1.47 (0.16)†	1.31 (0.27)	1.26 (0.06)	1.50 (0.23)	1.19 (0.12)	1.12 (0.11)

All values are median (QD), $n=20$. ¹ Genotype [+], AA for A379V and RR for R267S; CC and CT for C677T; II for I105V. ² Genotype [-], AV for A379V and/or RS and SS for R267S; TT for C677T; IV and VV for I105V. Significant difference was analyzed by Mann-Whitney's U test between Genotype [+] and [-] each time point, † $P < 0.05$.

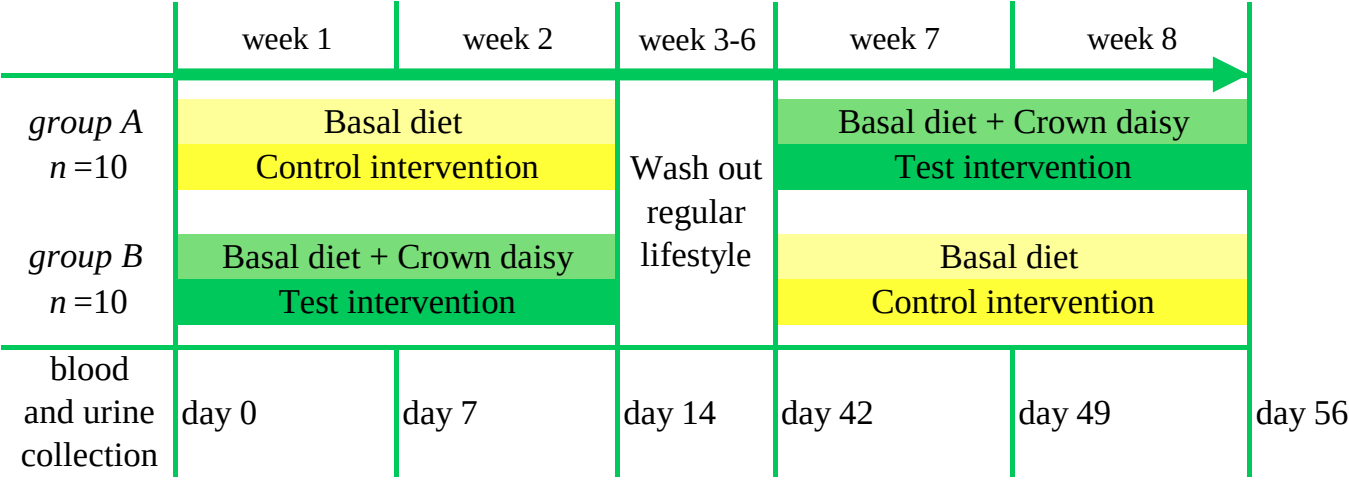


Fig. 4 Study design

Table 16. Nutrients and bioactive compounds contained amount of crown daisy (1portion / raw 200g eq.)

Component	Satoyutaka	Chuba shungiku
Moisture, %	93.8 (0.1)	93.1 (0.2)
Ascorbic acid, <i>mg</i>	20 (2.6)	14 (2.6)
α -Carotene, μg	582 (14)	526 (12)
β -Carotene, μg	5450 (146)	4911 (108)
Lutein, <i>mg</i>	8.1 (0.2)	8.1 (0.2)
α -Tocopherol, <i>mg</i>	1.71 (0.2)	1.88 (0.1)
Folate, μg	137 (n/a)	127 (n/a)
Total polyphenol, <i>mg GA eq.</i>	212.1 (6.7)	161.5 (27.8)
DPPH radical scavenging activity, $\mu mol BHA eq.$	1714 (18.9)	1717 (30.9)

Values are mean (SD: Standard Deviation), *n*=3. Abbreviations: GA, gallic acid; BHA, butylated hydroxyanisole; n/a, not available.

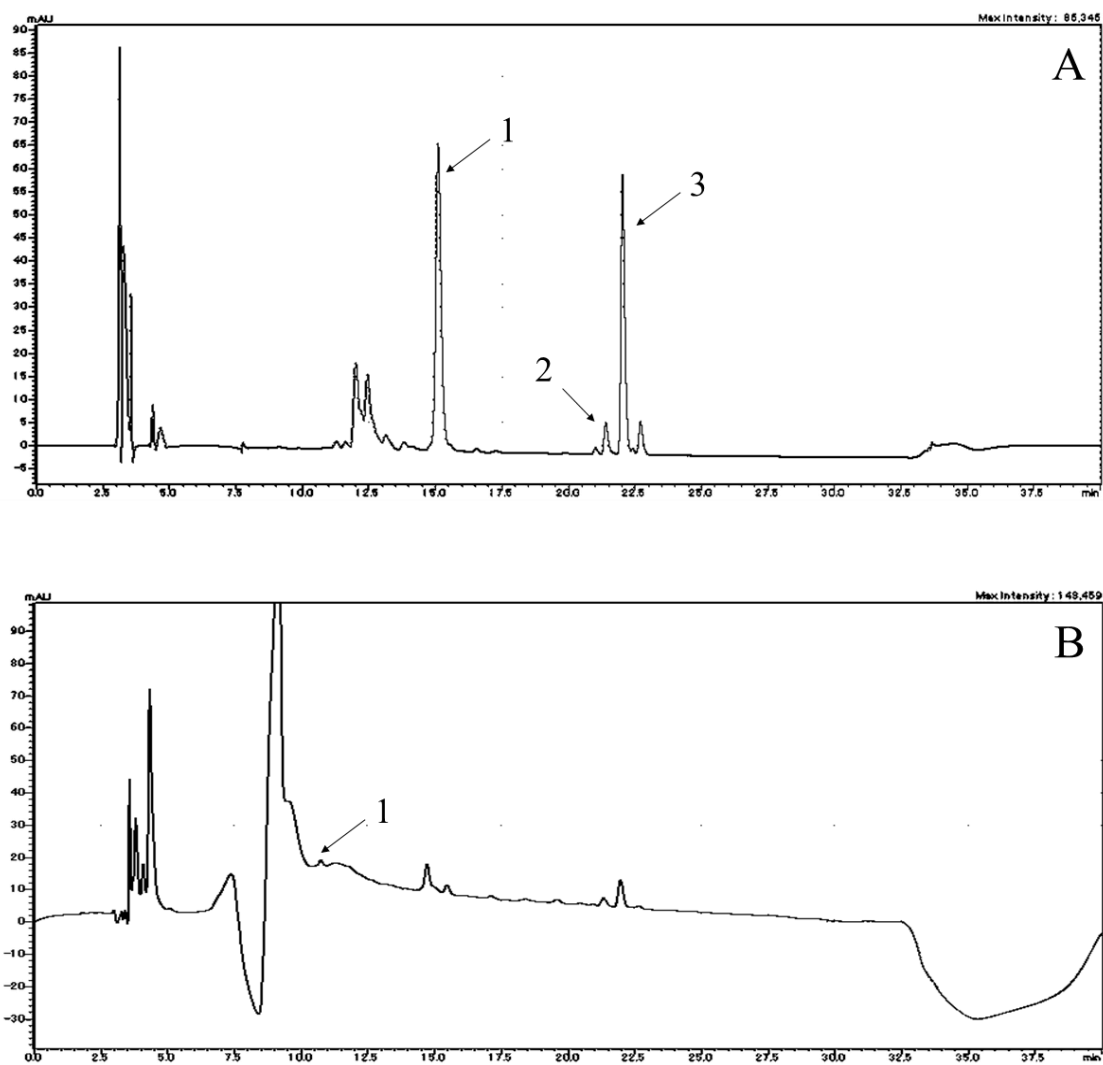


Fig. 5. Chromatogram of carotenoids and α -Tocopherol in crown daisy (Satoyutaka), obtained by HPLC and HPLC-PAD. Peak identification [panel A]: 1, Lutein; 2, α -Carotene; 3, β -Carotene [panel B]: 1, α -Tocopherol.

Table 17. Baseline characteristics by test group

Variable	All subjects, <i>n</i> =20		<i>P</i> value ¹
	group A, <i>n</i> =10	group B, <i>n</i> =10	
Age, <i>yr</i>	21 (0.0)	21 (0.4)	0.276
Height, <i>cm</i>	160.1 (5.7)	154.4 (4.7)	0.384
Weight, <i>kg</i>	53.8 (3.5)	48.1 (4.4)	0.226
BMI, <i>kg/m</i> ²	22.0 (1.5)	20.5 (0.9)	0.545
PAL, <i>Af</i>	1.48 (0.07)	1.45 (0.11)	0.970
Genotype, <i>n</i> (%)			
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S, [+] : [–]	6 (30) : 4 (20)	9 (45) : 1 (5)	0.303
<i>MTHFR</i> *C677T, [+] : [–]	6 (30) : 4 (20)	6 (30) : 4 (20)	1.000
<i>GSTP1</i> *I105V, [+] : [–]	5 (25) : 5 (25)	5 (25) : 5 (25)	1.000
Dietary intake			
Energy, <i>kcal/d</i>	1711 (144)	1565 (254)	0.650
Protein, % <i>E</i>	13.9 (1.3)	12.9 (0.8)	0.496
Fat, % <i>E</i>	29.2 (1.1)	30.4 (0.7)	0.199
Carbohydrate, % <i>E</i>	56.9 (1.2)	56.3 (1.3)	0.650
Vegetables, <i>g</i>	216.6 (69.8)	236.3 (22.6)	0.940
Biochemical parameter			
Retinol, <i>ng/mL</i>	332.5 (52.9)	327.4 (41.7)	0.705
α-Carotene, <i>ng/mL</i>	128.4 (78.9)	128.8 (37.3)	0.705
β-Carotene, <i>ng/mL</i>	542.8 (322.5)	386.8 (137.0)	0.257
β-Cryptoxanthin, <i>ng/mL</i>	187.6 (29.6)	122.9 (14.8)	0.059
Total Lycopene, <i>ng/mL</i>	293.5 (100.5)	313.8 (88.0)	0.880
Lutein, <i>ng/mL</i>	220.2 (72.1)	174.3 (42.1)	0.151
Zeaxanthin, <i>ng/mL</i>	29.6 (7.7)	23.1 (9.9)	0.650
α-Tocopherol, <i>mg/mL</i>	10.9 (1.4)	10.1 (0.7)	0.650
Vitamin C, <i>μg/mL</i>	9.3 (1.2)	9.8 (0.7)	0.650
Folate, <i>ng/mL</i>	7.5 (1.5)	4.5 (1.4)	0.131
Homocysteine, <i>μmol/L</i>	5.3 (0.6)	7.6 (1.3)	0.006 †
Total Glutathione, <i>μg/mL</i>	45.7 (3.2)	47.0 (1.1)	0.406
Uric acid, <i>mg/dL</i>	4.6 (0.3)	4.3 (0.6)	0.545
Oxidative stress biomarker			
ROM, <i>CARR.U</i>	268.3 (22.9)	247.0 (15.6)	0.173
MDA, <i>μmol/L</i>	3.58 (0.44)	2.31 (0.28)	0.004 †
BAP, <i>μmol/L</i>	2718 (51)	2676 (56)	0.427
TEAC, <i>μmol/L</i>	3723 (116)	3733 (89)	0.508
8-OHdG, <i>ng/mg cre.</i>	8.22 (1.50)	10.11 (1.97)	0.290
8-Isoprostane, <i>ng/mg cre.</i>	1.31 (0.14)	1.18 (0.15)	0.705

Values are median (QD: quartile deviation). Abbreviations: %E, % of energy; ROM, derivatives of reactive oxygen metabolite; MDA, malondialdehyde; BAP, biological antioxidant potential; TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity; cre, creatinine; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-Isoprostane, 8-isoprostaglandin F2alpha. Genotype [+], AA for A379V and RR for R267S; CC and CT for C677T; II for I105V. Genotype [–], AV for A379V and/or RS and SS for R267S; TT for C677T; IV and VV for I105V.

¹ Variable data were tested for statistical significance using Mann-Whitney's U test and chi-square test between two groups, † *P* < 0.01.

Table 18. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the interventions

	Test intervention (n =20)			Control intervention (n =20)			P values ³		
	week 0 Pre	week 1	week 2 Post	week 0 Pre	week 1	week 2 Post	Treatment	Time	Treatment x Time
Retinol, <i>ng/mL</i>	382.7 (88.3)	410.5 (80.2)	372.2 (80.2)	346.9 (77.3)	399.2 (127.8)	355.8 (73.2)	ns	< 0.01	ns
α -Carotene, <i>ng/mL</i> ¹	169.8 (2.0)	178.1 (1.9)	172.2 (1.8)	145.2 (2.0)	164.9 (1.8)	155.6 (1.8)	ns	< 0.05	ns
β -Carotene, <i>ng/mL</i> ²	552.7 (1.8)	650.3 (1.6)***	666.1 (1.5)***	536.9 (1.8)	541.6 (1.7)	485.2 (1.8)	< 0.01	< 0.05	< 0.0001
β -Cryptoxanthin, <i>ng/mL</i>	169.5 (109.0)	201.0 (110.9)	182.4 (77.5)	169.8 (77.4)	213.6 (87.7)	207.6 (124.7)	ns	< 0.05	ns
Total Lycopene, <i>ng/mL</i>	333.0 (127.9)	314.1 (91.2)	302.8 (70.6)	317.3 (114.9)	357.7 (108.6)*	363.3 (102.8)	ns	ns	< 0.01
Lutein, <i>ng/mL</i>	190.7 (68.7)	319.0 (94.7)***	342.9 (92.6)***	206.3 (66.9)	206.1 (59.7)	177.2 (47.8)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Zeaxanthin, <i>ng/mL</i>	29.4 (14.4)	26.6 (16.4)	25.3 (12.6)	27.0 (9.0)	24.2 (9.0)	24.2 (6.4)	ns	< 0.05	ns
α -Tocopherol, <i>mg/mL</i>	9.6 (1.6)	12.4 (2.6)	10.3 (2.5)	9.4 (2.6)	12.7 (3.1)	10.4 (2.2)	ns	< 0.0001	ns
Vitamin C, <i>μg/mL</i>	10.1 (1.4)	10.0 (2.0)	9.9 (2.4)	9.7 (2.2)	10.6 (1.8)	9.2 (2.1)	ns	< 0.05	ns
Folate, <i>ng/mL</i>	6.0 (2.4)	6.2 (2.5)	6.5 (2.5)**	6.5 (3.0)	6.8 (2.9)	6.1 (2.3)	ns	ns	< 0.01
Homocysteine, <i>μmol/L</i>	7.0 (1.8)	6.6 (1.5)	6.2 (1.6)*	6.8 (2.2)	6.5 (1.4)	6.9 (1.5)	ns	< 0.05	< 0.05
Total Glutathione, <i>μg/mL</i>	47.6 (4.8)	51.9 (7.3)*	48.9 (4.8)	47.9 (6.0)	45.9 (6.0)	46.5 (5.1)	< 0.0001	ns	< 0.0001
Uric acid, <i>mg/dL</i>	4.3 (0.7)	4.4 (0.8)	4.3 (0.6)	4.4 (0.7)	4.4 (0.7)	4.3 (0.7)	ns	ns	ns
ROM, <i>CARR.U</i>	270 (44)	257 (34)*	251 (38)**	265 (43)	272 (41)	270 (38)	ns	< 0.05	< 0.01
MDA, <i>μmol/L</i>	2.77 (0.79)	3.23 (0.76)	3.06 (0.79)	2.94 (0.76)	2.92 (0.79)	3.05 (0.89)	ns	ns	ns
BAP, <i>μmol/L</i>	2693 (106)	2775 (133)*	2780 (152)*	2727 (107)	2759 (91)	2700 (91)	ns	< 0.05	< 0.05
TEAC, <i>μmol/L</i>	3736 (196)	3638 (216)	3783 (320)	3668 (447)	3673 (343)	3668 (329)	ns	ns	ns
8-OHdG, <i>ng/mg cre.</i>	10.06 (4.36)	10.15 (4.23)	9.41 (4.89)	8.81 (4.83)	9.83 (3.49)	8.26 (3.89)	ns	ns	ns
8-Isoprostane, <i>ng/mg cre.</i>	1.34 (0.44)	1.05 (0.23)**	0.86 (0.18)**	1.20 (0.29)	1.08 (0.27)	1.01 (0.25)	ns	< 0.0001	< 0.05

Values are mean (SD). ^{1,2} Values are expressed as geometric mean (GSD: geometric standard deviation). ³ Significant difference from week 0 each intervention was analyzed by repeated measures ANOVA with post hoc Bonferroni correction, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. ns, not significant, $P > 0.05$.

Table 19. Correlation coefficients among percentage changes¹ of serum and urine oxidative stress markers during test intervention

	MDA	BAP	TEAC	8-OHdG	8-Isoprostane
ROM	-0.24	0.04	0.19	0.30	-0.23
MDA	—	0.01	0.26	-0.44	-0.05
BAP	—	—	-0.11	-0.08	-0.22
TEAC	—	—	—	-0.25	-0.13
8-OHdG	—	—	—	—	-0.20

¹ It was calculated according to the following equation: percentage change = (Post / Pre) x 100 - 100. Correlation coefficients and significance levels among percentage changes of biomarkers by Pearson's correlation coefficient.

Table 20. Correlation coefficients among percentage changes of serum and urine oxidative stress markers and blood parameters in subjects during the test intervention

	ROM	MDA	BAP	TEAC	8-OHdG	8-Isoprostane
Retinol, <i>ng/mL</i>	0.14	-0.03	0.26	0.29	0.16	-0.06
α -Carotene, <i>ng/mL</i>	0.24	-0.40	-0.21	0.03	0.30	-0.26
β -Carotene, <i>ng/mL</i>	0.41	-0.26	0.16	0.02	0.23	-0.65 **
β -Cryptoxanthin, <i>ng/mL</i>	0.04	0.07	-0.18	-0.15	0.10	-0.13
Total Lycopene, <i>ng/mL</i>	0.09	-0.09	0.27	-0.17	0.12	0.02
Lutein, <i>ng/mL</i>	0.36	-0.27	0.27	0.18	0.30	-0.27
Zeaxanthin, <i>ng/mL</i>	0.31	-0.43	0.01	0.08	0.43	-0.17
α -Tocopherol, <i>mg/mL</i>	-0.03	-0.01	-0.44	0.47 *	0.01	0.24
Vitamin C, <i>μg/mL</i>	-0.09	-0.36	0.03	-0.27	0.36	-0.01
Folate, <i>ng/mL</i>	-0.14	0.14	-0.28	-0.08	-0.15	-0.03
Homocysteine, <i>μmol/L</i>	-0.25	-0.10	-0.07	0.11	0.12	0.17
Total Glutathione, <i>μg/mL</i>	0.21	0.32	0.07	0.42	-0.11	-0.36
Uric acid, <i>mg/dL</i>	-0.22	0.08	0.20	0.37	0.10	0.01

n = 20. Log transformed data in biochemical parameters: α -Tocopherol, Lutein, α -Carotene, β -Carotene. Correlation coefficients and significance levels among percentage changes of oxidative stress and blood parameters by Pearson's correlation coefficient, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table 21-1. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the test intervention depending on *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T and *GSTP1**I105V genotypes

	Genotype [+] ¹			Genotype [-] ²		
	week 0	week 1	week 2	week 0	week 1	week 2
No. of subjects						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S		15			5	
<i>MTHFR</i> *C677T		12			8	
<i>GSTP1</i> *I105V		10			10	
Retinol, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	361.3 (43.7)	419.3 (39.6)	381.9 (35.5)	358.9 (77.8)	410.3 (51.0)	404.8 (61.4)
α -Carotene, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	135.0 (66.6)	133.4 (58.7)	121.5 (53.7)	145.5 (99.5)	164.1 (92.2)	169.4 (64.6)
β -Carotene, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	453.3 (237.9)	521.2 (202.7)	577.6 (135.1)	655.4 (85.2)	740.0 (158.0)	758.4 (86.4)
Total Lycopene, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	323.8 (77.4)	314.4 (76.8)	286.0 (37.4)	306.6 (98.9)	310.3 (42.7)	340.7 (49.2)
Lutein, ng/mL						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	192.9 (43.6)	301.3 (48.5)	347.1 (43.3)	184.3 (8.9)	356.4 (38.1)	378.3 (38.8)
Vitamin C, μ g/mL						
<i>MTHFR</i> *C677T	10.6 (1.0)†	11.0 (1.9)†	12.0 (2.1)†	9.0 (0.8)	8.7 (0.4)	8.8 (1.2)
<i>GSTP1</i> *I105V	10.6 (0.6)	9.2 (1.5)	9.3 (1.8)	9.9 (1.2)	11.9 (1.0)	11.4 (0.6)
Total Glutathione, μ g/mL						
<i>GSTP1</i> *I105V	46.4 (1.3)	51.5 (5.3)	48.4 (1.8)	47.8 (3.6)	50.0 (5.0)	49.2 (3.2)
Folate, ng/mL						
<i>MTHFR</i> *C677T	5.4 (1.5)†	5.5 (1.8)†	5.6 (1.8)	4.4 (0.9)	4.4 (0.4)	4.7 (0.6)
Homocysteine, μ mol/L						
<i>MTHFR</i> *C677T	6.6 (0.9)†	6.1 (0.4)	6.3 (0.7)	7.8 (1.9)	7.1 (1.4)	7.5 (1.3)

All values are median (QD), $n=20$. ¹ Genotype [+], AA for A379V and RR for R267S; CC and CT for C677T; II for I105V. ² Genotype [-], AV for A379V and/or RS and SS for R267S; TT for C677T; IV and VV for I105V. Significant difference was analyzed by Mann-Whitney's U test between Genotype [+] and [-] each time point, † $P < 0.05$.

Table 21-2. Blood and urine concentrations of micronutrients and biochemical markers of pro-oxidant and antioxidant status in subjects during the test intervention depending on *BCMO1**A379V/*R267S, *MTHFR**C677T and *GSTP1**I105V genotypes

	Genotype [+] ¹			Genotype [-] ²		
	week 0	week 1	week 2	week 0	week 1	week 2
ROM, CARR.U						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	263.0 (17.5)	252.5 (17.0)	256.0 (19.1)	276.0 (16.5)	272.0 (18.8)	259.0 (12.5)
<i>MTHFR</i> *C677T	273.8 (23.6)	260.8 (26.4)	257.5 (22.8)	272.0 (39.9)	270.5 (28.0)	255.5 (14.5)
<i>GSTP1</i> *I105V	263.8 (16.8)	253.3 (16.5)	260.5 (15.5)	267.3 (41.0)	260.8 (21.0)	251.3 (22.8)
MDA, $\mu\text{mol/L}$						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	2.36 (0.42)	3.02 (0.45)	2.96 (0.41)	2.94 (0.47)	3.27 (0.16)	2.78 (0.22)
<i>MTHFR</i> *C677T	2.54 (0.29)	3.29 (0.40)	2.80 (0.79)	2.70 (0.80)	3.07 (0.30)	2.94 (0.20)
<i>GSTP1</i> *I105V	2.51 (0.75)	3.19 (0.39)	2.90 (0.54)	2.54 (0.50)	3.10 (0.61)	2.98 (0.51)
BAP, $\mu\text{mol/L}$						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	2673 (62)	2820 (110)	2817 (102)	2662 (81)	2672 (11)	2725 (32)
<i>MTHFR</i> *C677T	2668 (54)	2782 (76)	2807 (80)	2666 (98)	2691 (137)	2776 (128)
<i>GSTP1</i> *I105V	2667 (48)	2729 (114)	2807 (119)	2697 (86)	2762 (118)	2782 (104)
TEAC, $\mu\text{mol/L}$						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	3666 (101)	3627 (167)	3716 (132)	3784 (66)	3479 (88)	3651 (120)
<i>MTHFR</i> *C677T	3725 (143)	3612 (188)	3785 (162)	3676 (100)	3609 (198)	3687 (51)
<i>GSTP1</i> *I105V	3676 (66)	3612 (214)	3656 (120)	3715 (224)	3547 (193)	3785 (112)
8-OHdG, ng/mg cre.						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	10.29 (1.33)	10.83 (3.06)	8.15 (1.92)	7.35 (2.11)	9.35 (2.50)	10.21 (3.89)
<i>MTHFR</i> *C677T	9.47 (2.62)	7.19 (2.44)†	8.13 (2.24)	10.89 (2.76)	13.31 (2.43)	10.04 (3.99)
<i>GSTP1</i> *I105V	8.13 (1.99)	8.35 (2.95)	7.46 (2.32)	11.22 (3.07)	12.22 (4.79)	9.98 (2.84)
8-Isoprostane, ng/mg cre.						
<i>BCMO1</i> *A379V/*R267S	1.38 (0.18)	1.02 (0.18)	0.86 (0.12)	1.18 (0.09)	1.11 (0.17)	0.88 (0.10)
<i>MTHFR</i> *C677T	1.17 (0.13)†	0.98 (0.17)	0.85 (0.15)	1.45 (0.35)	1.18 (0.22)	0.88 (0.11)
<i>GSTP1</i> *I105V	1.18 (0.16)	0.88 (0.14)	0.84 (0.08)	1.43 (0.40)	1.19 (0.18)	0.87 (0.19)

All values are median (QD), $n=20$. ¹ Genotype [+], AA for A379V and RR for R267S; CC and CT for C677T; II for I105V. ² Genotype [-], AV for A379V and/or RS and SS for R267S; TT for C677T; IV and VV for I105V. Significant difference was analyzed by Mann-Whitney's U test between Genotype [+] and [-] each time point, † $P < 0.05$.