

画期的な、液状の複合フォトニュートリエント栄養補助飲料が遺伝子の突然変異に及ぼす影響

ベンジャミン・ベックラー、フロリーナ・ニタ、ロン・ジョーンズ、ジョイ・L・フレステッド著

*当文献は、2009 年 3 月に Springerlink.com にて発行される。©著者

要約：この研究は、果実、野菜、アロエなどのエキスを、それに加えて製造社特許所有の緑茶からの複合カテチンのブレンドを基とした液状の複合フォトニュートリエント栄養補助飲料（米国ミネソタ州アノカ在籍、エニーバ・ニュートラシューティカル社製造、VIBE カーディック&ライフ、以下 VIBE で統一）が、細胞核の遺伝子に及ぼす影響（抗発癌性）を調べたものである。当実験では、VIBE が、紫外線に露出された皮膚細胞の遺伝子への悪影響を防ぐという仮定を調べた。まず人の A431NS 層から皮膚細胞を摘出、0%（比較対象）、0.125%、0.5%、1%、2%の VIBE 溶液に浸した後、240J/m²（240 ジュール/平方メートル毎）の紫外線に露出した後、遺伝子への悪影響をコメット（帚星型彗星）分析試験法で測定した。その結果、比較対象の VIBE なしの場合 VIBE ありの場合と比べて、紫外線への露出によって遺伝子への損傷が見られ、VIBE の濃度が高くなるのに比例して遺伝子への損傷が少なくなっていることがコメット分析試験法を用いて明らかになった。（VIBE の）濃度は、（遺伝子の損傷の）カーブと密接な関係にあることが確認され、0.5%の VIBE 溶液が最も顕著な反応を示しており、コメットの末端部の密度は VIBE なしの比較対象のサンプルと比べて 3 倍の違いが確認された（ $p<0.001$ ）。この VIBE が人の皮膚の細胞の遺伝子に紫外線が与える悪影響を制御することを実証した実験結果を基盤として、引き続きの臨床実験を行う価値があるだろう。

序章：

細胞レベルでのストレスが、遺伝子の損傷を引き起こし、遺伝的突然変異、つまり制御の効かない発癌的細胞の急増殖へと進展してしまう。人の皮膚細胞において、この発癌的突然変異を引き起こす原因のひとつとして知られているのが紫外放射線である。紫外線への露出が引き起こす皮膚癌のハッキリしたメカニズムはまだ解明されていないが、紫外線への露出は、フリーラジカルを発生させ、それが遺伝子の螺旋様を破壊し、それが発癌的連鎖反応を起こし癌細胞へと進展して行くと考えられている[1-3]。カテチンの一種であるエピガロカテチン-3-ガレート（epigallocatechin-3-gallate）、通称 EGCG は、紫外線の悪影響から皮膚を守って遺伝子の損傷を抑制し、皮膚癌、または他の癌細胞からの保護を供給することが知られている[4-11]。ひとつの研究実験によると、EGCG が人の皮膚の繊維細胞、皮膚角質のケラチノサイトに紫外線が与える悪影響を、その濃度に応じて保護するという結果が得られている。この実験結果によると、EGCG を豊富に含む緑茶の摂取によって、紫外線にさらされた人の血液細胞の遺伝子崩壊の度合いが軽減されたとされている[12]。

当実験は、必須栄養素、各種果実野菜類の複合エキスを、そして EGCG を含む緑茶カテチン・エキスを配合した液状栄養補助飲料（米国ミネソタ州アノカ在籍、エニーバ・ニュートラシューティカル社製造、VIBE 2.0 カーディック&ライフ）が、紫外線に露出された人の皮膚の細胞内の遺伝子の損傷を抑制する働きがある、という仮定の立証を目的としている。この実験には、コメット分析試験法が使われ[単細胞ゲル電極反応測定法(SCGE)][13]、VIBE を用いた処方の紫外線に露出された皮膚の角質部の突然変異に対する抑制の度合を、試験管内で測定した。このコメット分析試験法は、環境毒素学や癌のリサーチ、放射線生理学の分野で広く使われている

測定法で、感度が高く、単一細胞の遺伝子への損傷度合を測定する一般的な測定法として認められている。簡単に説明すれば、細胞を顕微鏡のスライド上のアガロース（寒天の一種）ゲルに採取し、細胞壁を破損し、電極反応を設定、遺伝子を蛍光塗料で染色すると、損傷している遺伝子は、電極反応で、陽極へと流れ、細胞の核を『頭』として破損した遺伝子を『尾』としたコメット、帚星型彗星の形を成すことになる。この場合、遺伝子の損傷が大きければ大きい程コメットの『尾』の部分が大きくなり、このコメットの『尾』の部分の密度を測ることで、遺伝子の破損度を知ることが出来る。

必要部品と測定法：

細胞組織：— 人の皮膚の角質細胞 A413NS（ヴァージニア州マナサス市のアメリカン・タイプ栽培法による）を、10%の子牛の血漿液と 2 mM（ミリモル）のグルタミン溶液 RPMI1640（=Rosewell Park Memorial Institute 製の細胞培養溶液）で保存する。

実験対象：— 必須ミネラル、果実と野菜のエキスのブレンド、アロエ・ヴェラ・ゲルのエキス、緑茶 EGCG カテキン配合の液状複合フォトニュートリエント栄養補助飲料（米国ミネソタ州アノカ在籍、エニーバ・ニュートラスーティカル社製造、VIBE 2.0 カーディアック&ライフ：表 1、『VIBE 成分表』を参照）を作られたばかりの RPMI 1640 と混合する（10%の v/v [=volume to volume、容量に対しての比率]）。

紫外線処理：— スペクトル頂点が 254nm の殺菌用紫外線ランプを放射線源として使用、240J/m² のエネルギーを媒介物に採取された細胞の表面にあてる。

細胞生体反応分析試験：—（細胞の）生体反応は、実験対象による処理の後、（紫外線）放射処理後 15 分の休息時間を持ってチェックされる（カリフォルニア州ヘイワード市、グァバ・テクノロジー社によるグァバ・ヴィア・カウント分析試験法に基づく）。

コメット分析試験法：— 採取された細胞は、24-well プレートに、60-80%の融合率になった時点で 0%（プラスとマイナスの比較対象）、0.125%、0.25%、0.5%、1.0%、そして 2.0%の VIBE 溶液に 30 分間浸しておく（それぞれに 2 つサンプルを用意する）。実験対象混合媒介液は、VIBE 無しの 100μl 新しい媒介液と取り替えられた後、比較対象実験として 240J/m² の紫外線に再度細胞を露出する（『マイナス』比較として被験体をアルミホイルで覆うことで紫外線への露出を遮り、『プラス』比較として被験体を紫外線に直接露出させる）。その後、細胞は、刺激からの回復期間

表 1：VIBE 2.0 成分表

用量：1 液量オンス（28ml）

	1回あたり有効成分含量	デ일리バリュースレート*
カロリー	30	
総炭水化物	6 g	2%*
糖分	5 g	†
ビタミン A	2,000 IU	40%
ビタミン C	120 mg	200%
ビタミン D	500 IU	125%
ビタミン E	30 IU	100%
チアミン(ビタミン B1)	1.5 mg	100%
リボフラビン(ビタミン B2)	1.7 mg	100%
ナイアシン	18 mg	90%
ビタミン B6	2 mg	100%
葉酸	400 mcg	100%
ビタミン B12	12 mcg	200%
ビオチン	300 mcg	100%
パントテン酸	10 mg	100%
カルシウム	100 mg	10%
リン	20 mg	2%
ヨウ素	150 mcg	100%
マグネシウム	155 mg	39%
亜鉛	5 mg	33%
セレン	25 mcg	36%
銅	0.5 mg	25%
マンガン	1.8 mg	90%
クロム	120 mcg	100%
カリウム	175 mg	5%
微量元素商標ブレンド	37 mg	†
硫黄、ホウ素、ゲルマニウム、バナジウム		
AntiOX2® 商標ブレンド	6,500 mg	†
天然エキス：ブドウ、サクロ、アロニア（チョコベリー）、クランベリー、ニンジン、ブルーベリー、ステビア（葉）、オレガノ、エルダーベリー、アセロラ、トマト、ライム、レモン、アップル、ブラックカラント、ハイビスカス（花）、かぼちゃ、チェリー、グレープ種子エキス、クコ（ゴジベリー）、オレンジ、シトラスバイオフラボノイド、ブラックベリー、ラズベリー、ストロベリー、アサイベリー		
HeartPRO® 商標ブレンド	280 mg	†
D-リボース、コエンザイム Q10、L-カルニチン、リンゴ酸、分離大豆レシチン、混合トコフェロール		
CollaMAX® 商標ブレンド	3500 mg	†
緑茶葉エキス、L-リジン、L-プロリン、グルコサミン塩酸（植物性）、アロエベラジェル、アラニン、バリン、イソロイシン、グリシン、ロイシン		

*パーセントデ일리バリュース（%DV）は2,000カロリーの食事に基づいています
★デ일리バリュースは確立されていません。

として15分間そのままの状態 で保管され、リン酸塩で中和されたダルベッコ食塩水で洗浄された後、タンパク質分解処理で単一細胞安定を確立させる。10,000 から 20,000 個の細胞を遠心分離機にかけ (400xg で 5 分間)、0.5%の低い融点のアガロース (摂氏 37 度の PBS [=リン酸緩衝液]) と混合、同じくアガロースでコーティングした顕微鏡用のスライド・ガラスに塗り、カバー・ガラスでカバーする。このスライド・ガラスを20分間冷却した後、カバー・ガラスを取り除く。この細胞を含んだ層の上に更に 70 μ l の低融点アガロース混合溶液を塗り、カバー・ガラスで薄く広げもう一度冷却する。アガロース溶液が固くなったらカバー・ガラスを取り除き、低温の溶解液に一晩浸しておく。このスライドを、電気泳動タンクの水平ゲルに固定し、25V で 20 分間電気泳動させる。その後このスライドを洗浄し、臭化エチジウム (= Ethidium Bromide : 60 μ l, 20 μ g/ml) で染色し、すぐに G-2A フィルター使用 40 パワー被写のニコン E400 カメラで、コメット III イメージ・システム法 (パーセプティブ・インストラメンツ社 (Perceptive Instruments, Ltd.) ハーバーヒル、サフォークス、イギリス) ,を用いて映像を撮影する。2対作られたプレートの両方から細胞を50個選んで撮影を行いそのコメットの『尾』の部分の密度を測定する (『尾』の部分の DNA のパーセンテージを測る)。この全てのプロセスは、もう一度行われ、一回目のデータと独立した実験として記録される。



図2：遺伝子細胞への発癌影響 (紫外線) なしのマイナス比較の例 (細胞2個)。

統計：— 非パラメトリックのマン・ホイットニー (Mann-Whitney) テストを採用し、紫外線に露出された VIBE 処理された細胞と、紫外線に露出された処理無しの細胞 (プラス比較) の比較を測定する。

結果：

細胞の生存能力は全てのサンプルにおいて 94.5%以上を示しており、徐々に濃度を高めて行った VIBE で処理された細胞の遺伝子への紫外線による損傷は、コメット分析試験法による『尾』の部分の密度の比較において、プラス比較の細胞サン



図3：VIBE なし (抗発癌作用無し) で発癌影響 (紫外線) 下に露出された遺伝子細胞、プラス比較のコメットの『尾』の映像—崩壊した遺伝子細胞が電極に向かって流れ出している。



図4：VIBE を加えることによって、コメットの『尾』の部分に見られる遺伝子の崩壊が、図3に比べて目に見えて減少しており、VIBE の発癌影響に対しての『保護作用』が確認出来る。

プルと比べて統計的に意味を持つと結論付けるに値する減少率を記録した ($p<0.001$ 、表1)。それぞれのサンプルの実験後の写真を見ると (図2、3、4) コメットの『尾』の部分の密度の違いがよくわかる。紫外線に露出されなかったマイナス比較のサンプル (図2) のコメットの『尾』の密度は、VIBE の影響を全く受けずに紫外線に直接露出させられたプラス比較のサンプル (図3) のコメットの『尾』と比べて遥かに小さいことがわかる。0.5%の VIBE 溶液に浸された被験サンプル (図4) を見ると、コメットの『尾』の密度が、プラス比較サンプルと比べて目に見えて少ないことがわかる (図3と図4を比較)。

論議:

この実験で、複合フォトニュートリエント栄養補助飲料、VIBE、が遺伝毒素などからの細胞

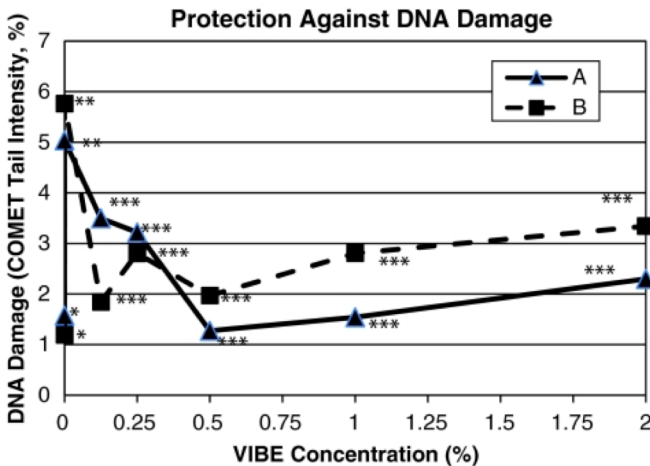


図1：VIBEが、紫外線に露出されることによって遺伝子細胞が受ける発癌作用から保護することの確認。二度に渡る同実験（実線のAと点線のB）共、VIBEが、紫外線から受ける発癌影響から人の皮膚細胞の遺伝子を守る防御作用があることを、コメット分析試験の結果が示している。紫外線的作用を受けなかったマイナス比較の例は左下の（*、三角形と正方形）、左上のグラフの始まりの（**）がVIBEなしで紫外線に露出されたプラス比較の例、全ての濃度（%）のVIBE溶液（グラフのx軸）に浸された細胞の例（***）は、全て同量の紫外線が浴びせられ、この全ての例において、VIBEなしのプラス比較の例と比べて明らかに損傷率が著しく制御されていることがわかる（ $p<0.001$ ）。

性を制御する働きがあると考えられる。このようなVIBEの人の皮下細胞への好影響を念頭に置いて、皮膚のみでなく、各種癌が人類全体に及ぼす悪影響というものを考えたとき、VIBEの効用というものは今後注目され、各種の研究を継続するに値するものであろう。

フォトニュートリエントは、紫外線など発癌性が確認されている各種悪性作用から人の皮膚細胞を守る働きがあると知られているが、EGCGも、直接皮膚に適用させることで、紫外線からの損傷を抑制する働きがあることが確認されている[9, 11, 15, 16]。また適度な専門家の管理下において口投与することで動物にも[17]人にも[12]同等の効果があることが確認されている。興味深いことに、人を対象とした症例対照実験で、地域によって、緑茶の摂取量が扁平上皮癌の発生の抑制と相互関係があることが確認されている[18, 19]。この事実は、VIBEの効用の有無が確認された今回の実験に基づいて、同様の効果がVIBEの経口投与でも見られるであろうことを促している（図3、4参照）。

EGCGの紫外線による皮膚への発癌作用に対しての抑制防御効果があるに加えて、EGCGには各種広範囲に渡る癌発生の可能性を抑制する働きがあるとされており[4, 20]、しかも安全で服用し易いことでも知られている[21]。各種リサーチによって解明されつつある緑茶のカテキンと各種果物、野菜のエキスを口投与することによる抗変異原性、また抗腫瘍性を考慮に入れると、（これら各種栄養素を含む栄養補助飲料製品である）VIBEには、各種発癌性のあるフリーラジカル等に対する抗体を強化する働きがあると言えるだろう[22-26]。

の遺伝子の損傷を抑制することが、人の皮下細胞を紫外線の放射線に露出させて測定されるコメット分析試験法の結果からわかった。VIBEは、各種フルーツ、野菜、アロエ・ヴェラや緑茶のエキスなどの、広範囲にわたる抗酸化要素をふんだんに使っており、この遺伝子保護能力は、この複数の抗酸化要素の相互効果が影響していると推測される[14]。この二度に渡る個別のコメット分析試験法の実験では、VIBE溶液に浸すことによって、コメットの『尾』の部分に流れ出る細胞遺伝子の損傷部の密度が、VIBEなしで紫外線に露出された比較対象の遺伝子のコメットの『尾』と比べてはるかに少なくなっていることが測定された（実験に使用された全てのVIBEの濃度で確認され、全ての統計率は $p<0.001$ であった：図1）。これらの実験結果のデータは、VIBEが細胞遺伝子の安定性を補強し、一般的に皮膚への発癌性があると知られている紫外線放射などによる細胞の突然変異分子の活発

果実、野菜の摂取量が各種癌と循環器系統の疾患の減少に関与してということから、果実、野菜から各種生体活性化合物を抽出し混合する各種技法が開発されて来ているが、実際の効果の基盤となるのはこれら各種成分の RDA（1 日の奨励分量）と有機食物に含まれている添加フォトニュートリメントとの複雑な連結作用によるものではないか、という考えが昨今主流となりつつあるが、残念ながら、これら各種フォトニュートリメントのほとんどが抽出行程で失われてしまうのが現状である。近年の報告によると、これら各種フォトニュートリメント（植物科学物質）のコンビネーションは、単一で働く抗癌性物質よりも遥かに効果がある、という考え方をサポートする実験結果が報告されている[23]。これら有機果実、有機野菜などから得られた各種補因子成分の相乗効果の方が、今までに調査されて来ている個別の活性因子栄養素よりも遥かに効果があると考えられている。この各種成分の相乗効果による効果が、各種果実、野菜の複合エキスから成る栄養補助飲料、VIBE が、細胞遺伝子に対する紫外線の損傷を制御することを確認したこのコメント分析試験の結果を説明するものである。各種フリーラジカルが細胞の発癌性における影響を考慮に入れた場合、引き続き（VIBE の抗癌作用の）リサーチを行うことを奨励するものである。

結論として、液状の複合フォトニュートリメント栄養補助飲料、VIBE が、採取された人の皮下細胞の遺伝子に対する紫外線による損傷から遺伝子を保護し、損傷を抑制するという結果が得られた。今後、当製品の口投与による長期的効果の可能性を調査する必要があるだろう。

参考文献

1. Rigel DS (2008) Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 58:S129–S132. doi:10.1016/j.jaad.2007.04.034. [PubMed]
2. Wischermann K, Popp S, Moshir S, Scharfetter-Kochanek K, Wlaschek M, de Grujil F, Hartschuh W, Greinert R, Volkmer B, Faust A, Rapp A, Schmezer P, Boukamp P (2008) UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene* 31:4269–4280. doi:10.1038/ncr.2008.70. [PubMed]
3. Marrot L, Meunier JR (2008) Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* 58:S139–S148. doi:10.1016/j.jaad.2007.12.007. [PubMed]
4. Cabrera C, Artacho R, Giménez R (2006) Beneficial effects of green tea—a review. *J Am Coll Nutr* 25:79–99. [PubMed]
5. Song XZ, Xia JP, Bi ZG (2004) Effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate on expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in fibroblasts irradiated with ultraviolet A. *Chin Med J (Engl)* 117:1838–1841. [PubMed]
6. Xia J, Song X, Bi Z, Chu W, Wan Y (2005) UV-induced NF-kappa B activation and expression of IL-6 is attenuated by (–)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes in vitro. *Int J Mol Med* 16:943–950. [PubMed]
7. Yang SW, Lee BR, Koh JW (2007) Protective effects of epigallocatechin gallate after UV irradiation in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Korean J Ophthalmol* 21:232–237. doi:10.3341/kjo.2007.21.1.48. [PMC free article] [PubMed]
8. Bae JY, Choi JS, Choi YJ, Shin SY, Kang SW, Han SJ, Kang YH (2008) (–)-Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase. *Food Chem Toxicol* 46:1298–1307. doi:10.1016/j.fct.2007.09.112. [PubMed]
9. Elmetts CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Mukhtar H (2001) Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol* 44:425–432. doi:10.1067/mjd.2001.112919. [PubMed]
10. Chung FL, Schwartz J, Herzog CR, Yang YM (2003) Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *J Nutr* 133:3268S–3274S. [PubMed]
11. Katiyar SK (2003) Skin photoprotection by green tea: antioxidant and immunomodulatory effects. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3:234–242. doi:10.2174/1568008033340171. [PubMed]
12. Morley N, Clifford T, Salter L, Campbell S, Gould D, Curnow A (2005) The green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21:15–22. doi:10.1111/j.1600-0781.2005.00119.x. [PubMed]
13. Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291–298. doi:10.1016/0006-291X(84)90411-X. [PubMed]
14. Szeto YT, Benzie IF (2002) Effects of dietary antioxidants on human DNA ex vivo. *Free Radic Res* 36:113–118. doi:10.1080/10715760210161. [PubMed]
15. Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Mukhtar H (2001) Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* 22:287–294. doi:10.1093/carcin/22.2.287. [PubMed]
16. Linden KG, Carpenter PM, McLaren CE, Barr RJ, Hite P, Sun JD, Li KT, Viner JL, Meyskens FL (2003) Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer: experience with a polyphenol from green tea. *Recent Results Cancer Res* 163:165–171. [PubMed]
17. Katiyar S, Elmetts CA, Katiyar SK (2007) Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *J Nutr Biochem* 18:287–296. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.08.004. [PubMed]
18. Hakim I, Harris R, Weisgerber U (2000) Tea intake and squamous cell carcinoma of the skin: Influence of type of tea beverages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:727–731. [PubMed]
19. Hakim IA, Harris RB (2001) Joint effects of citrus peel use and black tea intake on the risk of squamous cell carcinoma of the skin. *BMC Dermatol* 1:3. doi:10.1186/1471-5945-1-3. [PMC free article] [PubMed]
20. Shanafelt TD, Lee YK, Call TG, Nowakowski GS, Dingli D, Zent CS, Kay NE (2006) Clinical effects of oral green tea extracts in four patients with low grade B-cell malignancies. *Leuk Res* 30:707–712. doi:10.1016/j.leukres.2005.10.020. [PubMed]
21. Chow HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, Dorr RT, Hara Y, Alberts DS (2003) Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 9:3312–3319. [PubMed]
22. Khan N, Afaq F, Mukhtar H (2008) Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxid Redox Signal* 10:475–510. doi:10.1089/ars.2007.1740. [PubMed]
23. de Kok TM, van Breda SG, Manson MM (2008) Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *Eur J Nutr* 47(Suppl 2):51–59. doi:10.1007/s00394-008-2006-y. [PubMed]
24. Wasson GR, McKelvey-Martin VJ, Downes CS (2008) The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis* 23:153–162. doi:10.1093/mutage/gen003. [PubMed]
25. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA (2007) A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 18:567–579. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.10.007. [PubMed]
26. Zhang M, Holman CD, Huang JP, Xie X (2007) Green tea and the prevention of breast cancer: a case-control study in Southeast China. *Carcinogenesis* 28:1074–1078. doi:10.1093/carcin/bgl252. [PubMed]