【総 説】

スルフォラファン含有食品,
ブロッコリースプラウト摂取
による *H.pylori* 胃炎軽減作用
と胃癌予防の可能性

Daily Intake of Sulforaphane-
Rich Broccoli Sprouts
Suppresses *H. pylori*
Colonization and Attenuates
H. pylori-induced Gastritis via
Upregulation of
Nrf2-dependent Antioxidant
Enzymes

谷中昭典^{1,*}, 田内雅史¹, 山本雅之²,
兵頭一之介¹

Akinori YANAKA^{1,*}, Masafumi TAUCHI¹,
Masayuki YAMAMOTO²,
Ichinosuke HYODO¹

¹ 筑波大学大学院人間総合科学研究科
病態制御医学専攻, 消化器内科

² 東北大学大学院医学系研究科医化学分野

【要 旨】

ブロッコリーの芽に含まれるスルフォラファン (Sfn) は, 酸化ストレス応答転写因子 nrf2 を活性化することにより, 細胞内の抗酸化酵素群を誘導し, 酸化ストレスによる細胞障害を防止し, *in vitro* において抗 *H. pylori* (Hp) 作用を発揮する。我々は, Hp 感染マウス, およびヒト Hp 感染者において, Sfn 含有食品であるブロッコリースプラウト (BS) の摂取により Hp 胃炎を予防しうるか否かについて検討した。その結果, BS 投与によりマウス, ヒト両者において, Hp 菌数は減少し, 胃炎は軽減した。以上より, Sfn 含有食品である BS の摂取により, Hp 胃炎の軽減効果が確認され, Sfn による胃癌予防効果が示唆された。

【キーワード】

ブロッコリースプラウト, スルフォラファン, ヘリコバクターピロリ, 胃炎, 酸化ストレス

はじめに

近年の研究により胃癌の発症には *H. pylori* 感染が深く関与することが次第に明らかになりつつある^{1,2)}。健康な胃粘膜を有するヒトが *H. pylori* に感染すると, 胃粘膜には炎症が惹起され, 徐々に胃粘膜萎縮が進行し, 最終的に胃癌の発症につながる³⁾。このことから, *H. pylori* 感染により惹起される胃炎は胃癌発症の母地と位置づけられている。しかしながら, *H. pylori* 感染者の中で生涯を通じて胃癌になる人は約 5 ~ 10% 程度にすぎない。また, 近年行われている臨床介入研究の結果を見る限り, *H. pylori* 除菌による胃癌予防効果には限界がある^{4,5)}。これらの報告から, 胃癌の発症には, *H. pylori* 以外の環境因子も重要であることが想定され, その中でも, とりわけ食餌性因子が深く関与する可能性を指摘する疫学的報告が多い⁶⁻⁸⁾。胃癌発症を促進する食餌性因子として, これまでの報告によれば, 食塩の摂取量と胃癌の罹患率に強い相関が認められている⁹⁾。これに対して, 野菜, 果物類には胃がんの発症を抑制する食品が多いことが指摘されているが⁸⁾, その詳細な作用機序は明らかではない。今後, 食品による胃がん予防対策を考える上で, これらの食品の発がん抑制作用機序を解明し, その臨床的有用性を検証していくことは非常に重要である。

発がん予防食品の研究分野において, ブロッコリーの新芽 (ブロッコリースプラウト) に豊富に含まれるスルフォラファンという物質が最近注目されている^{10,11)} (図 1)。スルフォラファンは, 酸化ストレス応答遺伝子であ

受理日: 2006 年 12 月 30 日

* 〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1 筑波大学大学院人間総合科学研究科 (消化器内科) Tel: 029-853-3210

Fax: 029-853-3218 E-mail: ynk-aki@md.tsukuba.ac.jp

図1 スルフォラファンとブロッコリースプラウト

図2 Nrf2 を介するスルフォラファンの抗酸化酵素刺激作用

る Nrf2 (NF-E2 p45-related factor-2) と呼ばれる転写因子を介して、抗酸化酵素群を誘導することにより、酸化ストレスによる DNA 障害から細胞を防御する¹²⁾ (図2)。さらにスルフォラファンは *in vitro* において抗 *H. pylori* 作用を有する¹³⁾。

これらの背景に基づき、我々は *H. pylori* 感染マウスや *H. pylori* 感染者に対して、スルフォラファン含有食品であるブロッコリースプラウトを経口摂取させることにより *H. pylori* により惹起される胃炎を軽減しうるか否かを検討した。

高塩分食負荷 *H. pylori* 感染マウス胃粘膜におけるスルフォラファンの胃炎軽減作用

6 週令の野生型 C57/BL6 マウスに *H. pylori* (ヒト胃炎患者から分離した標準株 Sydney Strain-1: SS-1) を経口感染させると、ヒト (特に欧米人) の胃炎と類似した前庭部優位の慢性胃炎が惹起される¹⁴⁾。さらに、この *H. pylori*

感染マウスに高塩分食を長期間投与すると、胃粘膜の炎症は前庭部から胃体部へと拡大し、胃体部優位型の胃炎に変化し、胃体部粘膜の萎縮を進行させる^{15,16)}。高塩分食により惹起される胃体部粘膜の萎縮性変化は、特に日本人の *H. pylori* 感染者において頻繁にみられ、胃癌発症のリスクとなることが指摘されている^{1,17)}。すなわち、*H. pylori* 感染マウスに対する高塩分食の長期投与は、マウスの胃粘膜を胃癌になりにくい欧米人型から胃癌になりやすい日本人型に変化させる。我々は、この *H. pylori* 感染+高塩分食負荷マウスモデルを用いて、スルフォラファンの胃炎軽減効果を以下の方法で検証した。

1. 動物実験モデル

既報¹⁴⁾の如く、6 週令の野生型、および Nrf2 遺伝子欠損型 (Nrf2-/-) マウス¹⁸⁾ (いずれも雌、C57/BL6) に *H. pylori* (Sydney Strain-1; SS1) を経口感染させ、慢性胃炎を作成した。

2. 実験プロトコル

上記の *H. pylori* 感染マウスを、通常食 (0.25% NaCl) 投与群と高塩分食 (7.5% NaCl) 投与群に分け、さらに、各々の群を、スルフォラファンを含むブロッコリースプラウト (以下 BS) 投与群と非投与群に分け、3 ヶ月間飼育した。BS の投与法は、スルフォラファンを豊富に含む発芽 3 日目の BS (村上農園、ブロッコリースーパースプラウト®; スルフォラファン含有量 258 mg/100 g) をホモジェナイズし、スルフォラファンの一日摂取量が 4.5 mg/kg/day となるように調整した水溶液を自由飲水にて投与した。投与開始後、1 ヶ月毎にマウスを屠殺、胃粘膜を取り出し、以下の項目について検討した。

3. 検討項目

a) 胃炎・胃粘膜萎縮の評価

Updated Sydney System を用いて胃炎 (慢性炎症)、及び胃粘膜萎縮の程度を点数化して評価した。

b) 胃粘膜 8-OHdG の定量

胃粘膜細胞における DNA 傷害の程度を評価するために胃粘膜内 8-OHdG 量を ELISA 法にて測定・評価した。

c) 胃粘膜抗酸化酵素活性の定量

胃粘膜中における第 2 相解毒酵素である Glutathione-S-Transferase (GST) 活性を ELISA 法にて測定した。

d) 胃粘膜 *H. pylori* 菌量の評価

胃粘膜ホモジェネートを培養して *H. pylori* 菌量を定量した。

増大が認められた。野生型マウスでは、BS 投与により高塩分食投与による胃炎悪化に対する防御効果 (図 3, 4)、胃粘膜 GST 活性の増大 (図 5) が認められた。これに対して、Nrf2 遺伝子欠損マウスでは、ブロッコリースプラウト投与によるこれらの効果は認められなかった (図 4)。

2. 野生型マウスでは、高塩分食投与時において BS 投与により、*H. pylori* 菌数の有意な減少が認められたが、nrf2 遺伝子欠損マウスでは *H. pylori* 菌数に対する効果は認められなかった。

以上の結果より、スルフォラファンは、nrf2 を介して胃粘膜の酸化ストレス応答能を活性化させ、胃粘膜の免疫能を強化することにより、*H. pylori* の菌量を減少させ胃炎を軽減させるものと考えられた。

ヒトにおけるスルフォラファンの *H. pylori* 胃炎の軽減効果

以上の動物実験より、4.5 mg/kg/day のスルフォラファ

図 3 BS 投与は高塩分食投与による *H. pylori* 胃炎悪化を防止する (組織像)

成 績

1. 野生型マウスにおいて、高塩分食投与による *H. pylori* 感染群における胃体部粘膜の炎症の悪化、胃体部における粘膜萎縮の進展、胃粘膜内 8-OHdG 量の

図 4 BS 投与による *H. pylori* 胃炎悪化軽減効果 (シドニーシステムによる組織像解析結果)

図5 BS投与によるマウス胃粘膜GST活性増大作用

ン投与がマウスの *H. pylori* 胃炎を改善させることが明らかになった。このスルフォラファン量はヒトに換算すると、体重 57 kg の人間が 1 日あたり 100 g (=2 パック) の BS を摂食することによって摂取可能な量であることから、我々は、ヒトにおいてもマウスと同様にBSの経口摂取により、*H. pylori* 胃炎が改善される可能性を想定し、ヒト (*H. pylori* 感染者) を対象に BS 投与を行う臨床介入試験を計画した。

方法

1. 参加対象者の選定

文書にて本研究への参加について同意が得られたボランティア 140 名に対して尿中 *H. pylori* 抗体検査を実施し

た結果 65 名が *H. pylori* 陽性であった。以上 65 名のうち 60 名の患者に対して病歴を聴取し内視鏡検査を実施したところ、抗潰瘍薬、NSAIDs の常用歴がなく、かつ内視鏡的に *H. pylori* 感染によると思われる胃炎以外の病変を認めない 50 名を本研究への参加対象者とした。

2. スプラウトによる介入試験の方法

二重盲検法で介入試験を実施するに当たり、我々は本研究においてプラセボとして用いるべき適当な食品を模索した。その結果、スルフォラファンを全く含まない点以外には含有栄養成分、形状、風味等が BS と極めて類似しているアルファルファスプラウト（以下 AS）をプラセボとして用いることにした。前述した 50 名の対象者を BS 群 25 名、AS 群 25 名に無作為に分け、BS 群

図6 ヒト *H. pylori* 胃炎患者における BS 投与介入試験プロトコール

には発芽 3 日目の BS (村上農園, ブロッコリースーパースプラウト®; スルフォラファン含有量 250 mg/100 g) を, AS 群には AS (スルフォラファン含有量ゼロ) を 8 週間毎日 70 g/日ずつ摂食してもらい, 摂食開始前, 開始 4 週後, 8 週後, 及び摂食終了 8 週後に, 採血, 検尿, 検便, および呼気を採取し, 以下の項目について検討した (図 6).

3. 測定項目

- 1) 胃炎の評価: 胃粘膜に存在するペプシノーゲンには胃体部にのみ存在する PGI と, 胃全体にわたり存在する PGII の 2 つの分画がある. 胃粘膜に炎症が惹起されると胃粘膜内の PG は血中に放出され, 血中 PGI, PGII とともに上昇する. 通常, この時の上昇率は $PGII > PGI$ であるために, PGI/II 比は低下する. これらの変化は *H. pylori* 除菌治療により可逆的に変化することから, 血清ペプシノーゲン値 (PGI, PGII, PGI/II) は, 胃炎の程度を反映する指標と考えられている¹⁹⁾. 本研究では, 血清 PGI, PGII, PGI/II 測定を行い, 胃炎の程度を評価した.
- 2) *H. pylori* 菌量の評価:
 - a) HpSA (便中 *H. pylori* 抗原) 値: 胃内に生息する *H. pylori* の菌体は糞便中から排泄される. 本研究では, Hp 菌体成分を抗原とする HpSA 測定キットを用いて, 便中に排泄される Hp 菌量を評価した²⁰⁾.
 - b) 尿素呼気試験 (urea breath test: UBT) 胃内 *H. pylori* 由来のウレアーゼ活性を反映する尿素呼気試験を行い, 胃内に生存する viable *H. pylori* の量を評価した²¹⁾.
- 3) スルフォラファン吸収量の評価

消化管より体内に吸収されたスルフォラファンは肝内で代謝され, dithiocabamates (DTC) に変換されて尿中に排泄される²²⁾. 本研究では, 尿中 DTC 量を測定することにより, 体内に吸収されたスルフォラファン量を評価した.

以上の成績を BS 群と AS 群とで比較検討した.

成績

1. HpSA 値: BS 群でのみ摂食 8 週後に OD 値が有意に低下した. 摂食終了 2 ヶ月後には OD 値は前値に復した (図 7).
2. UBT 値: BS 群でのみ摂食 8 週後に UBT 値が有意に低下した. 摂食終了 2 ヶ月後には UBT 値は前値に復した.
3. ペプシノーゲン値: BS 群でのみ摂食開始後経時的に PGI, PGII 値の有意な低下, 及び PGI/II 比の上昇が認められた. 摂食終了 2 ヶ月後には前値に復した (図 7).
4. 尿中 DTC: スルフォラファンの体内吸収量を反映する指標である尿中 DTC は, BS 投与群でのみ, 摂食中に有意な増加が認められた.
5. 胃炎の改善度とスルフォラファン吸収量の相関: BS 群において, BS 摂取による胃炎の改善度を反映する PGI/II の上昇幅と, スルフォラファンの体内吸収量を反映する尿中 DTC の増大幅の間に, 有意に正の相関が認められた.

以上より, スルフォラファン含有食品である BS を 8 週間継続的に摂取することにより, ヒトにおいて *H.*

ブロッコリースプラウト摂食による *H.pylori* 菌量と胃炎の変化

図 7 BS 投与がヒト便中 *H. pylori* 菌量 (HpSA), 及び胃炎の程度 (PGII 値) に及ぼす影響

pylori の菌量が減少し、胃癌発症の母地である胃炎が改善することが確認された。

考 察

本研究において *H. pylori* 感染マウスを用いた実験成績は、以下の重要な点を明らかにした。第1に、*in vivo* の *H. pylori* 感染胃粘膜において、スルフォラファンを含むブロッコリースプラウトの経口投与が胃炎軽減作用と胃粘膜萎縮予防効果を有することが確認された。今回用いたスルフォラファンの投与量 (4.5 mg/kg/day) は、ヒトに換算すると、ブロッコリースプラウトとして約 100 g/day であり、通常の食事で摂取可能な量であることから、ヒトにおいてもブロッコリースプラウト摂取による胃がん予防の可能性が示唆された。第2に、スルフォラファンの胃炎軽減作用が宿主側の転写因子 Nrf2 を介した胃粘膜の酸化ストレス応答能強化に基づくものであることが明らかにされた。*H. pylori* 感染胃粘膜は、白血球の著明な浸潤により恒常性に酸化ストレスを受けているので、酸化ストレス応答能活性化作用を有するスルフォラファンが *H. pylori* 感染胃粘膜に対して防御的に作用する可能性が想定される。第3に、スルフォラファン投与による *H. pylori* 菌数の減少は *nrf2* 遺伝子欠損マウスでは認められなかったことから、スルフォラファンは *in vivo* のマウスでは直接 *H. pylori* に作用する可能性よりも *nrf2* を介して宿主胃粘膜の免疫機能を強化する結果、2 次的に *H. pylori* 菌量を減少させる可能性が高いと考えられる。

本研究におけるヒトでの臨床介入試験成績は、通常の食生活の範囲内で摂取可能な量の BS を継続的に摂取することにより、*H. pylori* 胃炎を改善しうることを明らかにした点で極めて重要である。今回の検討では、ヒトにおいても BS 摂取後に *H. pylori* 菌量の低下が認められたが、その機序として、スルフォラファンの胃粘膜の免疫能強化作用と、*H. pylori* に対する直接的な抗菌作用の 2 つの可能性が考えられる。

本研究は動物実験で得られた成績に基づいて、ヒトにおいて臨床介入試験を企画し、臨床への利益還元を目指したトランスレーショナルリサーチであり、スルフォラファンの胃がん発症の予防効果をヒトにおいて検証することが最終目標である。そのために今後は対象被験者を胃癌発症のハイリスクグループにしぼりこみ、より長期間の介入試験を実施したいと考えている。

参 考 文 献

- 1) Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784–789.
- 2) Watanabe T, Tada M, Nagai H, et al. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998; 115: 642–648.
- 3) Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735–6740.
- 4) Wong BC, Lam SK, Wong WM, et al. China Gastric Cancer Study Group. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 187–194.
- 5) Take S, Mizuno M, Ishiki K, et al. The effect of eradicating *Helicobacter pylori* on the development of gastric cancer in patients with peptic ulcer disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1037–1042.
- 6) Thomson CA, LeWinn K, Newton TR, et al. Nutrition and diet in the development of gastrointestinal cancer. *Curr Oncol Rep* 2003; 5: 192–202.
- 7) Cummings JH, Bingham SA. Diet and the prevention of cancer. *BMJ* 1998; 317(7173): 1636–1640.
- 8) Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 1–9.
- 9) Tsugane S. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Sci* 2005; 96: 1–6.
- 10) Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 10367–10372.
- 11) Fahey JW, Talalay P. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 973–979.
- 12) Morimitsu Y, Nakagawa Y, Hayashi K, et al. A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 3456–3463.
- 13) Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, et al. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 7610–7615.
- 14) Lee SA, Kang D, Shim KN, et al. Effect of diet and *Helicobacter pylori* infection to the risk of early gastric cancer. *J Epidemiol* 2003; 13: 162–168.
- 15) Fox JG, Dangler CA, Taylor NS, et al. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1999; 59: 4823–4828.
- 16) Yanaka A, Cho S, Tauchi M, et al. High salt diet accelerates progression of atrophy of *Helicobacter pylori*-infected gastric corpus mucosa in wild type C57/B6 mice, but not in IL-1 receptor knockout mice *in vivo*. *Gastroenterology* 2002; 122: A-1.

- 17) Nozaki K, Shimizu N, Inada K, et al. Synergistic promoting effects of *Helicobacter pylori* infection and high-salt diet on gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1083–1089.
- 18) Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 3410–3415.
- 19) Vaira D, Holton J, Menegatti M, et al. Blood tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. Italian *Helicobacter pylori* Study Group. *Gut* 1998; 43 Suppl 1: S39–S46.
- 20) Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter* 2004; 9: 347–368.
- 21) Gisbert JP, Pajares JM. ¹³C-urea breath test in the management of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis* 2005; 37(12): 899–906.
- 22) Ye L, Dinkova-Kostova AT, Wade KL, et al. Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin Chim Acta* 2002; 316: 43–53.

ABSTRACT

Daily Intake of Sulforaphane-Rich Broccoli Sprouts Suppresses *H. pylori* Colonization and Attenuates *H. pylori*-induced Gastritis via Upregulation of Nrf2-dependent Antioxidant Enzymes

Akinori YANAKA¹, Masafumi TAUCHI¹, Masayuki YAMAMOTO², Ichinosuke HYODO¹

¹ Department of Gastroenterology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba

² Tohoku University School of Medicine

Background: Sulforaphane (SFN), a compound abundant in broccoli sprouts (BS), protects cells from oxidative injury by activating nrf2-mediated antioxidant enzymes. Sulforaphane also shows bactericidal activity against *H. pylori* *in vitro*. The aim of this study was to determine if daily intake of SFN-rich BS inhibits *H. pylori* colonization and mitigated gastritis in *H. pylori*-infected gastric mucosa in mice and humans.

Methods: Study 1: Nrf2^{+/+} and nrf2^{-/-} C57BL/6 female mice were infected with *H.pylori* Sydney Strain; SS1. Mice were maintained for 2 mo. on a high salt diet (7.5% NaCl), supplemented with or without BS containing approximately 2.5 mM SFN. Degree of gastritis was evaluated by updated Sydney system. Study 2: Fifty subjects infected with *H. pylori* were randomly assigned to either the BS group (n=25) or the Alfalfa Sprouts (AS) group (n=25). All subjects were asked to eat BS 70 g/day (containing approximately 180 mg SFN) or AS 70 g/day (no SFN) for 2 months. *H.pylori* colonization was evaluated by measurement of HpSA. The degree of gastritis was evaluated by measuring serum levels of pepsinogen (PG) I and II.

Results: Study 1: BS treatment decreased Hp colonization and mitigated gastritis in nrf2^{+/+} but not in nrf2^{-/-} mice. Study 2: Two months intervention with BS decreased HpSA values and serum levels of PG I and II, while AS showed no effect.

Conclusion: Daily intake of SFN-rich BS suppresses *H.pylori* colonization and improves gastritis in *H. pylori*-infected gastric mucosa via nrf2-dependent mechanisms.

Key words: broccoli sprout, sulforaphane, *Helicobacter pylori*, gastritis, oxidative stress