

大豆イソフラボンによるアセトアミノフェン 肝障害抑制効果の解析

平野 雄 (管理栄養学科・教授)

【緒言】

大豆は日本では古くから食されており、栽培自体は既に5000年前にその記録がある¹⁾。味噌、豆腐などの大豆加工食品も平安時代には食されていたようである¹⁾。大豆・大豆加工食品にはよく知られているように様々な生理活性作用がある。例えば、脂質代謝の是正²⁻⁴⁾、発がん抑制⁵⁻⁸⁾、循環機能改善⁹⁾、抗炎症作用¹⁰⁾ など、その報告は多数である。これら大豆・大豆加工食品の作用は健康にとってプラス面が多く、多くの研究で、健康維持、疾病予防に大豆・大豆加工食品を摂取することの有用性が示唆されている。すなわち、日本人の健康を長きにわたって支え続けてきたのである。このように大豆イソフラボンの様々な生理活性作用は現在、精力的に研究されている。本研究では、代表的な大豆イソフラボンである、ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインの3種(図1)について、近年問題視されているアセトアミノフェン肝細胞障害に対する抑制効果を解析し、臨床応用の可能性を検討した。

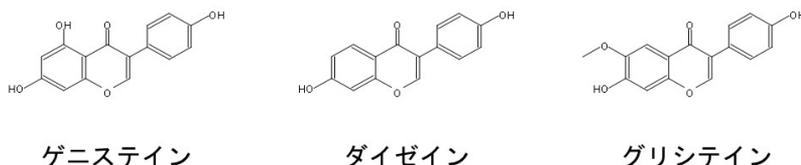


図1. 3種の大豆イソフラボン(ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン)の構造式

解熱鎮痛剤のひとつであるアセトアミノフェン(図2A)は副作用も少なく、比較的安
全な薬剤として認識され、小児、妊婦、高齢者に汎用されている。しかしながら、一方で
大量服用などの不適切使用により肝障害が誘導されることも知られていて、最近その予防
が重要視されている。急性肝障害の約42%がアセトアミノフェンによる薬剤性肝障害であ
るとする米国の報告¹¹⁾を始め、アセトアミノフェン肝障害事例の報告はこれまでも散見
されており、決して少なくはない¹²⁻¹⁵⁾。

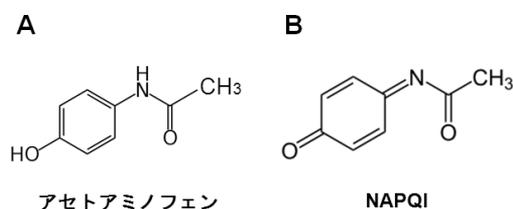


図2. アセトアミノフェン(A)とNAPQI(B)の構造式

アセトアミノフェン肝障害の発症メカニズムについても詳しく解析されている。体内に取り込まれたアセトアミノフェンの大部分は肝臓でグルクロン酸抱合あるいは硫酸抱合を受けて代謝され、尿中に排泄される。しかし、一部のアセトアミノフェンはチトクロームP-450代謝経路に入り CYP2E1 により酸化され、毒性のある *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) (図 2 B) に変換される^{2, 16, 17)}。この NAPQI の多くは肝臓内のグルタチオンにより抱合され無毒化されるため、一定量のグルタチオンが存在していれば NAPQI の毒性が発揮されることはない。しかしながら、大量のアセトアミノフェンが体内に吸収されることでグルタチオンが枯渇したり、何らかの理由 (大量飲酒など) でグルタチオン濃度が低下したりすると NAPQI 生成量が増大する (図 3)。

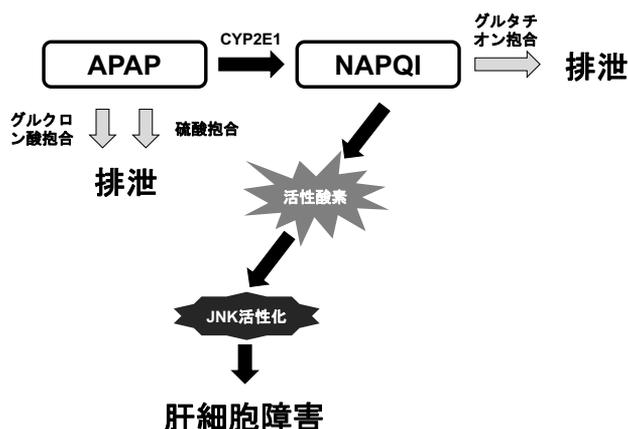


図 3. アセトアミノフェン (APAP) による肝細胞障害の発生メカニズム。体内に吸収されたアセトアミノフェンの多くはグルクロン酸抱合もしくは硫酸抱合を受け、尿中に排泄される。残ったアセトアミノフェンが毒性の強い NAPQI に変換される。NAPQI はグルタチオン抱合を受け代謝されるが、グルタチオンが低下すると NAPQI の毒性が発揮される。

生成した NAPQI は活性酸素生成を高め、細胞内高分子と結合して細胞壊死を起こすことで肝細胞障害型の薬剤性肝障害を発現する^{5, 9, 17)}。このような NAPQI の毒性発現機構において特に注目すべきことのひとつは c-jun N-terminal Kinase (JNK) の役割である^{12, 18)}。JNK は mitogen activated protein kinase (MAPK) の一種であり、紫外線・熱・高浸透圧などの様々なストレスやサイトカインによって活性化され、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどの様々な生命現象を制御するシグナル伝達因子として知られている。NAPQI によって生成された活性酸素は JNK を活性化し、さらにその持続的な活性化は細胞障害を惹起することが知られている¹³⁻¹⁵⁾。

以上のような NAPQI による肝細胞毒性が発現しやすい状況は、自殺企図を除けば、頭痛、関節痛などの慢性疼痛を抱え、常習的にアセトアミノフェンを服用し、かつ低栄養状態に陥りやすい高齢者に生じやすいと考えられ、アセトアミノフェン肝障害は、超高齢社会にあるわが国にとって今後看過できない重要な問題となる可能性がある。アセトアミノフェン肝障害に対する現行の治療方法は *N*-acetyl-L-cystein (NAC) (グルタチオンの前駆体) の経口投与である¹⁹⁾。NAC は、細胞内に取り込まれにくいグルタチオンの代わりに細胞内に取り込まれ、NAPQI の代謝を促進させ、その毒性を軽減する。しかし、この治

療法は1980年代に有効性が示されたものであり、それ以降の進歩がみられていない²⁰⁾。アセトアミノフェン服用後早期（24時間以内）に投与しないと有効性が示せないという欠点もある。そこで、新たな予防法・治療法を確立するために、著者はこれまで、アセトアミノフェン肝障害に抑制効果のある食材を検索してきた。その過程で、大豆イソフラボン、特にゲニステインにその効果があることを見出した²¹⁾。

【方法】

1. 試薬類の調整

アセトアミノフェンおよび大豆イソフラボン（ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン）はナカライテスク（京都）より購入した。アセトアミノフェンは超純水に溶解し、最終濃度 5mM となるように培地に添加した。大豆イソフラボンは Dimethyl Sulfoxide (DMSO、ナカライテスク) に溶解し、最終濃度 10 μ M となるように培地に添加した。コントロール群には vehicle として DMSO を添加し、すべての実験群において添加 DMSO は等量になるように調整した。

2. 細胞生存率の測定

被験細胞にはヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 (HSRRB、大阪) を用いた。10% FBS (GIB CO-BRL、Grand Island、NY) 添加 DMEM 培地 (Sigma、St. Louis、MO) で調整した HepG2 を 6-well 培養プレートに 3×10^5 cells / well の細胞数で播種した。24時間培養後、最終濃度としてアセトアミノフェンが 5 mM、ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインの各大豆イソフラボンがそれぞれ 10 μ M になるように調整した培地に交換し、さらに 48時間培養した。ゲニステインの最終濃度 10 μ M は著者の前報告²¹⁾に従い設定した。ダイゼインとグリシテインの最終濃度 10 μ M はゲニステインに準じて設定した。細胞生存率の測定はトリパンプルー色素排除試験法 (0.5%トリパンプルー溶液) (ナカライテスク) により行なった。

3. コロニー形成率の測定 (Clonogenic Assay)

6-well 培養プレートに HepG2 を 500 cells / well の細胞数で播種した。24時間培養後、最終濃度としてアセトアミノフェンが 5 mM、大豆イソフラボン（ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン）がそれぞれ 10 μ M になるように調整した培地に交換した。7日間培養後、培地を除去し、1%グルタルアルデヒド（ナカライテスク）で 1時間固定後、0.5%クリスタルバイオレット溶液（ナカライテスク）により細胞コロニーを 30分間染色した。染色されたコロニーを光学顕微鏡 (ECLIPSE TS100、ニコン、東京) 下で観察し、その数をカウントした。

4. 統計解析

群間比較は SPSS statistical software ver. 14.0 (SPSS, Chicago, IL) を用いて行ない、 $p < 0.05$ をもって有意とした。結果は平均値 \pm SD で記した。

【結果】

1. 細胞生存率

5mM アセトアミノフェン負荷により HepG2 の生存率は大幅に低下した ($23.3 \pm 2.6\%$) が、3 種の大豆イソフラボン (各 $10 \mu\text{M}$) 添加により、すべての実験群で生存率の低下が有意に抑えられた。その効果はゲニステインで最大 ($70.7 \pm 4.9\%$) で、コントロール群の 79.7% であった (図 4)。次にグリシテイン ($58.4 \pm 4.2\%$ 、コントロール群の 65.7%)、ダイゼイン ($47.0 \pm 9.2\%$ 、コントロール群の 52.9%) の順であった。

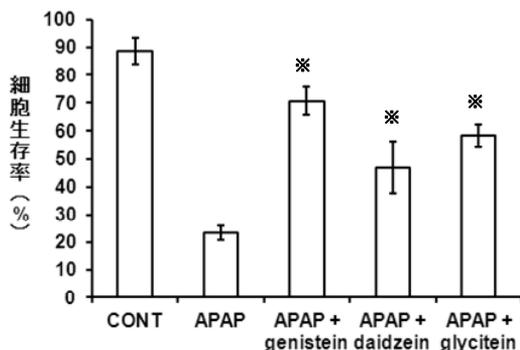


図 4. 細胞生存率の測定：ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 を 3×10^5 cells / well の細胞数で 6-well 培養プレートに播種し、24時間培養後、5mM アセトアミノフェン (APAP) 含有培地でさらに 48時間培養した。同時に各種大豆イソフラボン $10 \mu\text{M}$ (genistein、daidzein、glycitein) を添加した。細胞生存率の測定はトリパンプール色素排除試験法により行なった。※： $p < 0.05$ vs. アセトアミノフェン投与群、 $n=5$ 、CONT：コントロール群

2. コロニー生成率

5 mM アセトアミノフェン負荷によりコロニー生成率は有意に低下した (コントロール群の $15.9 \pm 8.3\%$)。3 種の大豆イソフラボン (各 $10 \mu\text{M}$) の中でゲニステインのみが添加によりその低下を有意に抑制した (コントロール群の $50.4 \pm 25.8\%$) (図 5)。ダイゼインとグリシテイン添加では低下の抑制傾向は見られたものの有意差は認めなかった。

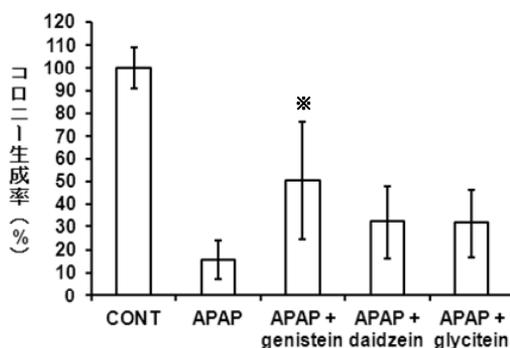


図 5. コロニー生成率：ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 を 500 cells / well の細胞数で 6-well 培養プレートに播種し、24時間培養後、5mM アセトアミノフェン (APAP) 含有培地でさらに 7日間培養した。同時に各種大豆イソフラボン $10 \mu\text{M}$ (genistein、daidzein、glycitein) を添加した。培養後に染色されたコロニー数を計測した。縦軸の値はコントロール群 (CONT) に対する比率 (%) を表している。※： $p < 0.05$ vs. アセトアミノフェン投与群、 $n=4$

【考察】

アセトアミノフェンは解熱鎮痛薬として幅広く使用されており、適正な使用量であれば比較的安全な薬剤であるが、過剰に摂取すると重篤な肝障害を起こすことが報告されている¹¹⁻¹⁵⁾。生じたアセトアミノフェン急性肝障害に対する現行の治療法としてはNACの経口投与¹⁹⁾が主流である。本研究では新たな治療法としての大豆イソフラボンの応用を検討した。

大豆・大豆製品に含まれる大豆イソフラボンは、抗酸化作用^{2, 22)}、発がん抑制作用⁵⁻⁸⁾、肝機能・循環機能改善作用⁹⁾など、生体にとってプラスの作用を多く有していることが知られ、諸疾患の予防に適している食品のひとつに挙げられている。表1に2014年に発表されたゲニステインの生体に対する作用・効果をまとめた。

表1 ゲニステインの生体に対する作用・効果

作用・効果	概要	論文
抗炎症作用	ゲニステインは ROS / Akt / NF- κ B経路を阻害し、AMPK 活性化を促進することにより TNF- α による炎症を抑えている。関節リウマチ治療にゲニステインが有効である。	Li et al. 2014 ²³⁾
感染予防効果	緑膿菌の肺胞上皮細胞への細胞接着と細胞侵入はゲニステインによって阻害された。	Buommino et al. 2014 ²⁴⁾
肝障害予防効果	LPS / D-GalN 誘導肝障害に対するゲニステインの防御効果は主に抗炎症反応に対する NF- κ B のシグナル伝達経路をブロックし、肝細胞死を低下させることによる。	Lin et al. 2014 ²⁵⁾
癌治療効果	ゲニステインは胃癌幹細胞の幹細胞性を減じることで、胃癌細胞の腫瘍形成能低下、胃癌細胞の抗癌剤への感受性上昇を導いた。	Huang et al. 2014 ²⁶⁾
	ゲニステイン誘導体は放射線療法によって生じる EGFR 活性化を阻害する。放射線感受性のある大腸癌に有効な治療併用薬となる。	Gruca et al. 2014 ²⁷⁾
心筋再生能促進作用	内皮コロニー形成細胞をゲニステインで前処理すると心筋梗塞治療効果が高まる。	Lee et al. 2014 ²⁸⁾
骨吸収抑制作用	ゲニステインは RANKL 処理による破骨細胞の分化を、酸化ストレスを低減することで抑制した。	Lee et al. 2014 ²⁹⁾
多発性硬化症治療効果	ゲニステインの発症後の早期投与は、サイトカイン産生、リンパ球増殖、CD8+ 細胞毒性を制御することで、多発性硬化症の症状を軽減した。	Jahromi et al. 2014 ³⁰⁾

本研究結果より3種の大豆イソフラボン(各10 μ M)のすべてにアセトアミノフェン肝細胞障害の抑制効果が認められた(図4、図5)。その効果は特にゲニステインで顕著であった。即ち、大豆イソフラボンや大豆・大豆加工食品はアセトアミノフェン肝障害の予防・治療に有効である可能性が示された。

今回の研究で明らかとなった大豆イソフラボンのアセトアミノフェン肝細胞障害抑制効果のメカニズムについては、第1に活性酸素の消去が挙げられる。過剰なアセトアミノフェンにより生成したNAPQIは肝臓に活性酸素を生成すること¹⁸⁾が知られており(図3)、かつ大豆イソフラボンには抗酸化作用があること^{2, 22)}が知られているからである。ゲニステ

インに関して言えば、著者の以前の研究²¹⁾ではアセトアミノフェンによる活性酸素生成増加をほぼコントロールレベルにまで抑えていた。しかしながら、本研究では、ゲニステインが細胞生存率低下やコロニー形成率低下を必ずしもコントロールレベルにまで回復させてはいないという結果が得られた(図4、5)。この事実はアセトアミノフェン肝細胞障害には活性酸素以外の要因が存在することを示唆している。そして、大豆イソフラボンには抗酸化作用以外にも注目すべき重要な作用がある。そのひとつがエストロゲン様作用である³¹⁾。例えば、ゲニステインのエストロゲン活性は 17β -エストラジオールのそれを1とした場合、0.00015である³²⁾。筆者の以前の研究ではゲニステインのアセトアミノフェン肝細胞障害抑制効果にエストロゲン受容体の関与が認められている²¹⁾が、その詳細は不明のままである。大豆イソフラボンの細胞防御作用を効果的に引き出すためには今後さらに解明しなければならない課題のひとつである。

では、今回の実験で用いた $10\mu\text{M}$ の大豆イソフラボンを摂取するためにはどの程度の量の大豆・大豆加工食品を摂取すればよいのか。ゲニステイン $10\mu\text{M}$ は日本人の日常的大豆摂取時のゲニステイン血中濃度と比較すると高値である。食品安全委員会の調査報告³³⁾によれば、男性6名に大豆粉を溶かした飲料($6.3\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重)を摂取させた場合の最高濃度は $4.09\pm 0.94\mu\text{M}$ であった。本研究で用いた $10\mu\text{M}$ はこの最高濃度よりもさらに高値である。食品に換算すると、例えば摂取した大豆中のゲニステインの20%が体内に吸収され、そのすべてがゲニステインに変換されたとし、循環血液量を5Lとして計算すると、概算で豆腐およそ3丁(1丁300g)、納豆およそ7パック(1パック45g)の摂取が必要となる。即ち、アセトアミノフェン肝障害の予防のために食品中から $10\mu\text{M}$ の大豆イソフラボンを摂取しようとするとかかなりの量の食品を摂取しなければならず、場合によってはサプリメントとして摂取する必要がある。

一方、アセトアミノフェンの濃度も本実験で使用した 5mM は、アセトアミノフェン薬物中毒患者28症例の服用4時間後の血中濃度²⁴⁾と比較して4~20倍程度高い。人体の血中濃度と培養細胞の培地中濃度とでは単純に比較はできないが、本実験の条件は大豆イソフラボン、アセトアミノフェン共に高い設定にあると思われる。今後はさらに詳細な検討を加え、より現実的な評価を目指したい。

【結論】

アセトアミノフェンを長期あるいは大量に服用する可能性があるのは高齢者である。超高齢社会を迎えているわが国にとって、アセトアミノフェン肝障害を抑制することは重要であり、その予防・治療に大豆・大豆加工食品の摂取、あるいは医薬品としての大豆イソフラボンの臨床応用が有用である可能性が示唆された。

【文献】

- 1) 渡邊昌 大豆と日本人の健康 幸書房 2014
- 2) Hodgson JM, Croft KD, Puddy IB, Mori TA, Beilin LJ. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum. *J. Nutr. Biochem.* 7: 664-669 (1996)
- 3) Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barragan VE, Cerbon-Cervantes MA, Torres N. Soy

- protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J. Nutr.* 138: 462-468 (2008)
- 4) Frigolet ME, Tprres N, Uribe-Figueroa L, Rangel C, Jimenez-Sanchez G, Tovar AR. White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte metabolic functions after soy protein consumption in rats. *J. Nutr. Biochem.* 22: 118-129 (2011)
 - 5) Lee HP, Lee J, Gourley L, Duffy SW, Day NF, Estève J. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* 337: 1197-1200 (1991)
 - 6) Mahmoud AM, Zhu T, Parray A, Siddique HR, Yang W, Saleem M, Bosland MC. Differential effects of genistein on prostate cancer cells depend on mutational status of the androgen receptor. *PLoS One* 8: e78479 (2013)
 - 7) Fritz H, Seely D, Flower G, Skidmore B, Fernandes R, Vadeboncoeur S, Kennedy D, Cooley K, Wong R, Sagar S, Sabri E, Fergusson D. Soy, red clover, and isoflavones and breast cancer: A systematic review. *PLoS One* 8: e81968 (2013)
 - 8) Chen M, Rao Y, Zheng Y, Wei S, Li Y, Guo T, Yin P. Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: A meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One* 9: e89288 (2014)
 - 9) Ruetten H, Thiemermann C. Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br. J. Pharmacol.* 122: 59-70 (1997)
 - 10) Jeong JW, Lee HH, Han MH, Kim GY, Kim WJ, Choi YH. Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Chem Biol Interact.* 212C: 30-39 (2014)
 - 11) Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schi?dt FV, Ostapowicz G, Shakil AO, Lee WM, the Acute Liver Failure Study Group. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology.* 42: 1364-1372 (2005)
 - 12) Li C, Martin BC. Trends in emergency department visits attributable to acetaminophen overdoses in the United States, 1993-2007. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 20: 810-818 (2007)
 - 13) Craig DG, Bates CM, Davidson JS, Martin KG, Hayes PC, Simpson KJ. Overdose pattern and outcome in paracetamol-induced acute severe hepatotoxicity. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 71: 273-282 (2011)
 - 14) Gow PJ, Jones RM, Dobson JL, Angus PW. Etiology and outcome of fulminant hepatitis failure managed at an Australian liver transplant unit. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19: 154-159 (2004)
 - 15) Wei G, Bergquist A, Broom? U, Lindgren S, Wallerstedt S, Almer S, Sangfelt P, Danielsson A, Sandberg-Gertzén H, Lööf L, Prytz H, Björnsson E. Acute liver failure in Sweden: etiology and outcome. *J. Intern. Med.* 262: 393-401 (2007)
 - 16) Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Bio.* 594: 57-72 (2010)

- 17) Gum SII, Cho MK. Recent updates on acetaminophen hepatotoxicity: The role of Nrf2 in hepatoprotection. *Toxicol. Res.* 29: 165-172 (2013)
- 18) Seki E, Brenner DA, Karin M. A liver full of JNK: Signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterol.* 143: 307-320 (2012)
- 19) アセチルシステイン内用液17.6%「ショーワ」添付文書(第8版)、2012
- 20) Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BH. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). *N. Engl. J. Med.* 319: 1557-1562 (1988)
- 21) 平野雄 ゲニステインによるアセトアミノフェン肝障害の抑制、日本臨床栄養学会誌 36: 52-56、2014
- 22) Mann GE, Rowlands DJ, Li FY, de Winter P, Siow RC. Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: Role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression. *Cardiovasc. Res.* 75: 261-274 (2007)
- 23) Li J, Li J, Yue Y, Hu Y, Cheng W, Liu R, Pan X, Zhang P1. Genistein suppresses tumor necrosis factor α -induced inflammation via modulating reactive oxygen species/Akt/nuclear factor κ B and adenosine monophosphate-activated protein kinase signal pathways in human synoviocyte MH7A cells. *Drug. Des. Devel. Ther.* 8: 315-323 (2014)
- 24) Buommino E, Di Domenico M, Paoletti I, Fusco A, De Gregorio V, Cozza V, Rizzo A, Tufano MA, Donnarumma G. Alpha(v)beta5 integrins mediates *Pseudomonas fluorescens* interaction with A549 cells. 19: 408-415 (2014)
- 25) Lin X, Zhang S, Huang R, Wei L, Liang C, Chen Y, Lv S, Liang S, Wu X, Huang Q. Protective effect of genistein on lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced hepatic failure in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 37: 625-632 (2014)
- 26) Huang W, Wan C, Luo Q, Huang Z, Luo Q. Genistein-inhibited cancer stem cell-like properties and reduced chemoresistance of gastric cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 3432-3443 (2014)
- 27) Gruca A, Krawczyk Z, Szeja W, Gryniewicz G, Rusin A. Synthetic genistein glycosides inhibiting EGFR phosphorylation enhance the effect of radiation in HCT 116 colon cancer cells. *Molecules* 19: 18558-18573 (2014)
- 28) Lee SH, Lee JH, Asahara T, Kim YS, Jeong HC, Ahn Y, Jung JS, Kwon SM. Genistein promotes endothelial colony-forming cell (ECFC) bioactivities and cardiac regeneration in myocardial infarction. *PLoS One* 9: e96155 (2014)
- 29) Lee SH, Kim JK, Jang HD. Genistein inhibits osteoclastic differentiation of RAW 264.7 cells via regulation of ROS production and scavenging. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 10605-10621 (2014)
- 30) Jahromi SR, Arrefhosseini SR, Ghaemi A, Alizadeh A, Sabetghadam F, Togha M. Effect of oral genistein administration in early and late phases of allergic encephalomyelitis. *Iran J. Basic Med. Sci.* 17: 509-515 (2014)
- 31) Messina M. Insights gained from 20 years of soy research. *J. Nutr.* Doi: 10.3945/jn.110.124107. (2010)
- 32) Yost EE, Meyer MT, Dietze JE, Meissner BM, Worley-Davis, Williams CM, Lee B,

- Kullman SW. Comprehensive assessment of hormones, phytoestrogens, and estrogenic activity in an anaerobic swine waste lagoon. *Environ. Sci. Technol.* 47: 13781-13790 (2013)
- 33) 大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の基本的な考え方、食品安全委員会、2006
- 34) 高山真理子、藤澤真奈美、堀寧、小田明、勝山新一郎、広瀬保夫、山崎佳苗、若林広行
急性中毒医療におけるアセトアミノフェン検出キットの臨床的有用性－新潟市民病院28症例の調査より－*YAKUGAKU ZASSHI* 128: 159-163 (2008)