

原 著

エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸による
消化管粘膜に対する直接作用の検討

熊谷 茉歩,* 石井 敬, 森本かおり, 富田 幹雄

Effect of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid
on the Gastrointestinal Mucosa

Maho KUMAGAI,* Makoto ISHII, Kaori MORIMOTO, and Mikio TOMITA

(Received November 20, 2016)

We investigated the effect of Eicosapentaenoic acid (EPA) and Docosahexaenoic acid (DHA) on major ATP-Binding Cassette transporter function such as P-glycoprotein (P-gp) in Caco-2 cell monolayers and also examined the involvement of tight junctional structure in the effects induced by both fatty acids on P-gp function. We investigated the effect of EPA (0.001%~0.1%) and DHA (0.001%~0.1%) on the barrier function of tight junction (TJ) by measuring transepithelial electrical resistance (TEER) and rhodamin123, a P-gp substrate flux. A decrease in the TEER value and an increase in Rhodamine123 in the apical to basal and basal to apical flux were observed after incubating Caco-2 cell monolayers with EPA and DHA in the high concentration range (0.03%~0.1%) for 24 hr, suggesting the loss of the barrier function of TJ. In addition, the inhibitory effect of Verapamil, a specific inhibitor of P-gp on Rhodamine123 in the basal to apical flux were observed in the low concentration range (0.001%~0.01%), but not in the high concentration range (0.03%~0.1%). And the relative of P-gp activity tended to increase in a concentration dependent fashion as the EPA and DHA increased up to 0.01% and decreased at concentrations higher than 0.03%. These results suggest that the levels of TEER are decreased by treatment with EPA and DHA, and that this change is involved in the relative P-gp activity dysfunction mechanism.

Key words — Eicosapentaenoic acid, Docosahexaenoic acid, P-glycoprotein, Tight Junction

緒 論

EPA (Eicosapentaenoic acid) および DHA (Docosahexaenoic acid) は青魚などに多く含まれている n-3 系多価不飽和脂肪酸で, 必須脂肪酸である α -LnA (α -linolenic acid) を摂取しても EPA への変換はわずか 10%, さらに DHA への変換も 10% であり¹⁾ ごくわずかしか合成されないことから広義の意味では必須脂肪酸と位置づけられる. n-3 系脂肪酸の摂取不良あるいは欠乏により皮膚炎, 感覚障害, 視力障害などが生じるとの報告がなされている.^{2,3)} 一方, EPA および DHA は, 冠動脈疾患, 心不全, 脳卒中, がん, 加齢黄斑変性といった幅広い疾患, 疾病において予防効果が認められ,^{4,5)} 近年では, 健康食品, サプリメントとしても一般に広く周知されている.

厚生労働省は, 本邦における大規模臨床研究結果の解析に基づき 2010 年版の食事摂取基準におい

ては n-3 系必須不飽和脂肪酸の 1 日 1 g 以上の摂取を推奨している.⁶⁾ 現在, n-3 系必須不飽和脂肪酸摂取の上限量は定められておらず, 高用量の摂取によって吐き気や下痢といった消化器症状が生じるといった報告もいくつかなされている.^{7,8)} しかし, 上限量を定めるべく十分なデータがないことから, 欧州食品安全機関においては, 1 日 5 g の摂取も特に問題がないとしている.⁹⁾

薬物動態学的側面から注目した場合, EPA および DHA の薬物代謝酵素 CYP 活性に対する報告はいくつかなされているが,^{10,11)} 消化管粘膜上皮細胞を介した膜輸送に対する報告はない. すなわち, EPA あるいは DHA を健康食品, サプリメントとしての摂取と考えた場合, 経口摂取を念頭に置く必要があるが, EPA および DHA の消化管粘膜上皮細胞に対する直接作用は不明である. 消化管粘膜上皮は外界との境界線であり, 異物, 薬物の体内への侵入に対しては厳密なバリアとしての機能

を有している。粘膜を介する輸送の観点から、そのバリアとしては細胞と細胞の接着帯 (Tight Junction; TJ) および排泄型トランスポーター (ABC transporter) の P-glycoprotein (P-gp) に大別される。

本研究では、ヒト小腸粘膜上皮細胞膜のモデルとして汎用されているヒト結腸癌由来 Caco-2 単層膜を用いて、種々濃度における EPA および DHA の Caco-2 単層膜への 24 時間曝露による TJ ならびに P-gp の機能に対する直接作用を明らかにすることを目的とした。なお、脂肪酸濃度は厚生労働省推奨用量である 1 日 1 g 以上を参考に、1 日 1 g を想定した濃度において試みたが、脂肪酸の界面活性作用により Caco-2 単層膜が溶解した。よって、安全域を検討するために 1 日 1 g 以下の濃度で検討を行った。

材料および方法

材料

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞は RIKEN Cell Bank より購入した。Rhodamine123 は SIGMA-ALDRICH, Verapamil は nacalai tesque より購入した。EPA および DHA は東京化成工業より購入した。他の試薬は全て特級を用いた。

方法

細胞培養

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を常法に従い単層培養した。¹²⁾ Transwell のカップ内側 (Apical 側; A 側) に DMEM FBS (+) にて懸濁した Caco-2 細胞を (12.6×10^4 cells/mL) 播種し、カップ外側 (Basal 側; B 側) には DMEM FBS (+) を加えた。その後、95% CO₂, 5% O₂, 37°C 条件下、21 日間培養を行った。なお、継代数は 48 から 55 のものを実験に供した。なお、FBS は培地中 10% 濃度で使用した。

脂肪酸曝露

培養 21 日目に DMEM FBS(-) 培地へと交換し、翌日脂肪酸 (EPA あるいは DHA) 含有培地にて 24 時間インキュベートした。脂肪酸は、Taurocholate と Lecithin を用いてミセルを形成した状態で培地中に乳化させた。Lecithin 11.4mg (0.75 mM), Taurocholate 32.2 mg (3 mM), DMEM FBS(-) 20 mL を Sonication により、EPA あるいは DHA を混合ミセルとして溶解し、

DMEM FBS(-) で 10 倍希釈することで培地を作成した。24 時間曝露する脂肪酸の培地中濃度設定を 0% (Control: Lecithin および Taurocholate 混合液), 0.001%, 0.003%, 0.01%, 0.03%, 0.1% とした。なお、脂肪酸濃度は厚生労働省推奨用量である 1 日 1 g 以上を参考に、1 日 1 g を想定した濃度において試みたが、脂肪酸の界面活性作用により Caco-2 単層膜が溶解した。よって、安全域を検討するために 1 日 1 g 以下の濃度で検討を行い、最大濃度を 0.1% と設定した。これは、消化管内で最も拡張している胃の容積 1 L 中に食事や水分とともに 1 g の EPA および DHA が溶解し、その溶解液が小腸へ運搬される状態から、1 日 1 g 経口摂取により管腔内濃度は 0.1% となると仮定した。

経上皮膜間抵抗 (Trans-Epithelial Electrical Resistance: TEER) 測定¹³⁾

TJ は細胞間接合部の総称であり、水溶性物質透過のバリアとして機能している。TJ 構造変化を伴い水溶性物質の透過性が増大するとバリア能の指標である TEER が低下する。本実験では、各種濃度の脂肪酸曝露 24 時間後の Tight Junction (TJ) 構造変化の指標として TEER を測定した。TEER の測定は Millicell ERS-2 (MILLIPORE) を用いた。

膜透過実験¹⁴⁾

P-gp 機能を評価するために、脂肪酸曝露 24 時間後の Caco-2 単層膜を用いた 2 時間の膜透過実験を施した。P-gp の特異的基質 Rhodamine123¹⁵⁾ の頂端膜側から基底膜側方向 (Apical to Basal: A to B, 吸収方向) あるいは基底膜側から頂端側膜方向 (Basal to Apical: B to A, 排出方向) の Rhodamine123 の膜透過係数を算出した。Rhodamine123 の濃度は 10 μ M に設定した。別途、P-gp の特異的阻害剤 Verapamil¹⁶⁾ を用いて、100 μ M の Verapamil 存在下、非存在下における Rhodamine123 の膜透過係数を求めることにより、P-gp の相対活性を算出した。なお、膜透過実験開始前と終了後に TEER を測定し、膜透過実験中の TEER に変動がないことを確認した。

1) A to B 方向の膜透過実験

あらかじめ、12 穴プレートに HBSS-HEPES buffer (HBSS, 4 mM NaHCO₃, HEPES, 1N NaOH, pH 7.4) を 1.5 mL ずつ加え、液温が 37°C になるようにインキュベートした。Transwell の A 側の培地を吸引除去し、生理食塩水で洗浄後、HBSS-HEPES buffer で満たされたプレートへとカップを

移し, Rhodamine123 を含有した HBSS-MES (HBSS, 4 mM NaHCO₃, MES, 1N NaOH, pH 6.5) 0.5 mL をカップ内 (A 側) に加えた. 20, 40, 60, 90, 120 分後にカップの外側 (B 側) から 100 μL 採取した. 試料採取後は直ちに同容量の buffer を B 側に補充した. Rhodamine123 濃度は, 蛍光強度 (Excitation: 485 nm, Emission: 538 nm) の測定を介して算出した (Infinite M1000, TECAN).

2) B to A 方向の膜透過実験

A to B 方向の膜透過実験と同様の手法で行った. B 側に Rhodamine123 を含有した HBSS-HEPES buffer (pH 7.4), A 側には HBSS-MES buffer (pH 6.5) を用いた. 20, 40, 60, 90, 120 分後にカップの内側 (A 側) から 100 μL 採取した. 試料採取後は直ちに同容量の buffer を A 側に補充した.

3) Rhodamine123 の膜透過係数ならびに P-gp 相対活性の算出

膜透過係数は以下の式により算出した.

膜透過係数 (Permeability coefficient; Pc, cm/s)

$$P_c = \frac{dA}{dt \cdot S \cdot C_0}$$

ただし, $\frac{dA}{dt}$: 単層膜を介した Rhodamine123 の

透過速度 (nmol/s) S: 単層膜の表面積 (cm²)

C₀: 初濃度 (μM)

P-gp の相対活性は以下の式より算出した。

B to A 方向の膜透過実験における P-gp 相対活性 (Relative activity)¹⁷⁾

$$\text{Relative activity} = \frac{P_{app} - P_{pass}}{P_{app}}$$

ただし,

P_{app}: Permeability coefficient without Verapamil

P_{pass}: Permeability coefficient with Verapamil

検定

統計処理は, Control 群との比較は Dunnett 検定, その他の検定は t 検定を用いて統計処理を行った.

結 果

EPA および DHA の TEER に及ぼす影響

経上皮膜間抵抗値 (Trans-Epithelial Electrical Resistance: TEER) に与える EPA および DHA の影響を検討した. Fig. 1 は脂肪酸曝露 24 時間後における Caco-2 単層膜の TEER 値を示したものである. EPA 曝露群において, 検討濃度 0.001%~0.01%の範囲内では TEER 値に Control 群との差は見られなかったが, 0.03%では Control 群に対して約 50%, 0.1%においては約 85%まで低下が見られた (Fig. 1a). 一方, DHA 曝露群においても, 0.03%以上の曝露濃度において control 群と比較して約 87%まで TEER の顕著な低下が見られた (Fig. 1b). 0.01%曝露においては 0.03%以上の曝露濃度に比べて低下の程度は小さいものの統計的に Control 群との間において有意な差となった. なお, EPA 曝露群および DHA 曝露群のそれぞれ

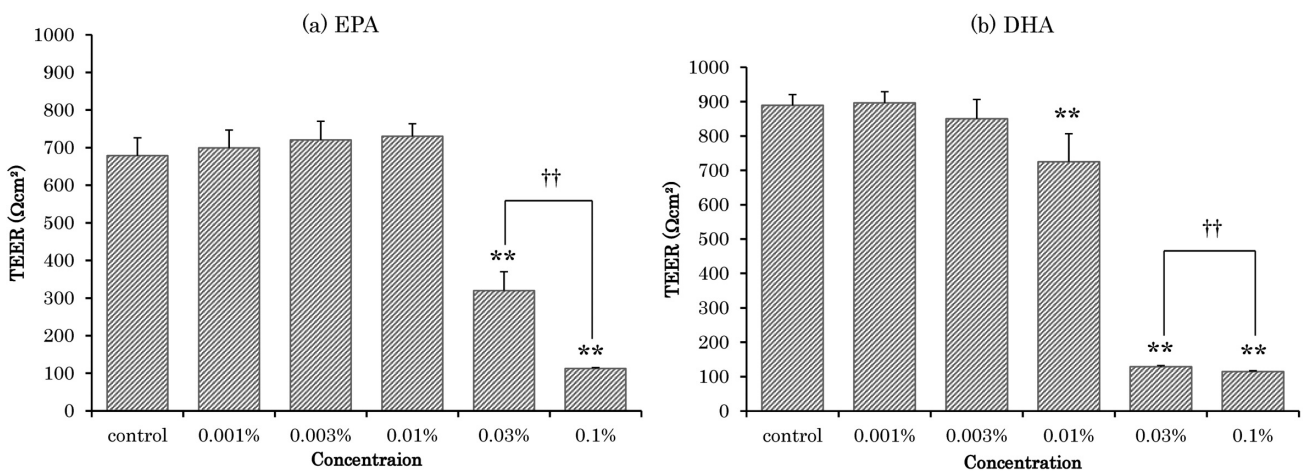


Fig. 1. Effects of EPA (a) and DHA (b) on TEER in Caco-2 cell monolayers. Caco-2 cell monolayers were incubated with fatty acids. After a 24 hr incubation period, TEER were measured according to Ohm's law. The concentrations used in this study were 0.001%, 0.003%, 0.01%, 0.03% and 0.1%. Results represent the mean and S.E. (n=12 for each condition). The significance of differences between control and fatty acids-exposed conditions was assessed using the Dunnett's test or Student's t-test for unpaired samples. N.S., not significant, *P<0.05, **P<0.01 compared with the control.

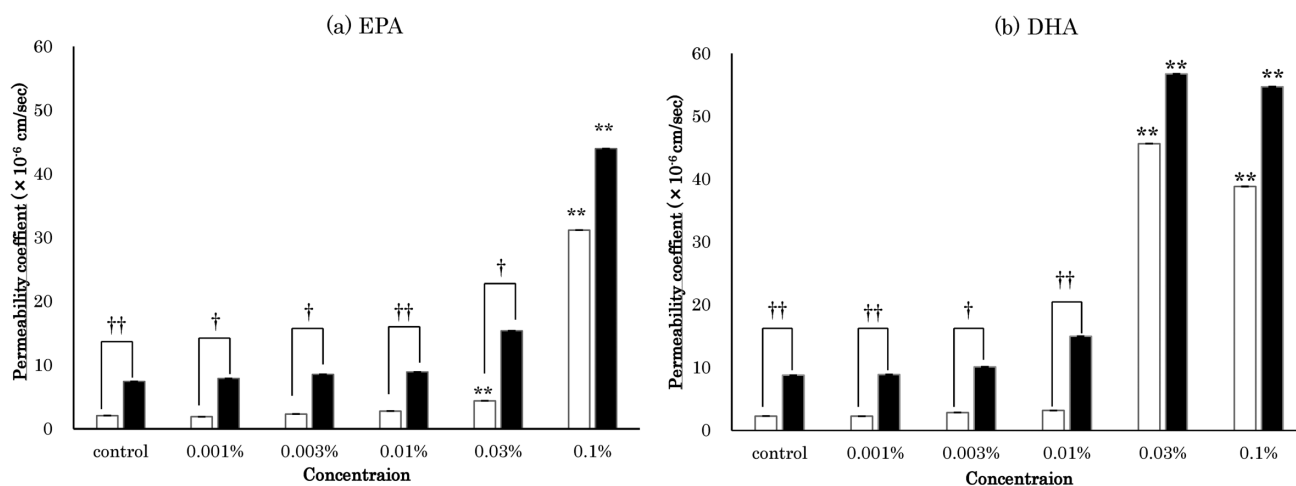


Fig. 2. Effects of EPA (a) and DHA (b) on the Rhodamine123 flux in the apical to basal and the basal to apical direction in Caco-2 cell monolayers. These permeation experiments were performed for a 2 hr period using Caco-2 cell monolayers treated by fatty acid. The concentrations used in this study were 0.001%, 0.003%, 0.01%, 0.03% and 0.1%. Results represent the mean and S.E. of at least three experiments. Open column and closed column represent the apical to basal and basal to apical direction of rhodamine123 permeability, respectively. The significance of differences between control and fatty acids-exposed conditions was assessed using the Dunnett's test or Student's t-test for unpaired samples. N.S., not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control. † $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$

0.03%と0.1%の間におけるTEERの低下に統計的に濃度依存性が見られた (Fig. 1).

EPA および DHA の Rhodamine123 膜透過性に対する影響

脂肪酸曝露24時間後のCaco-2単層膜を用いて、P-糖タンパク質 (P-gp) 基質のRhodamine123 (Rho123) の膜透過実験を試みた。頂側膜 (apical) 側から基底膜 (basal) 側、すなわちA to B方向およびB to A方向の膜透過係数を算出した。その結果、EPA曝露群においては0.03%および0.1%の濃度において両方向の膜透過係数がControl群と比較して3~10倍に上昇した (Fig. 2a)。なお、0.03%濃度におけるB to A方向の膜透過係数は、controlと比較して増大したが、統計的に有意差は認められなかった (Fig. 2a)。DHA曝露群においても0.03%以上の濃度において5~20倍と両方向の膜透過係数の有意な上昇が見られた (Fig. 2b)。

一方、ベクトル輸送について検討したところ、EPA曝露群においては0.001%~0.03%の濃度範囲においてB to A方向の膜透過係数がA to B方向の膜透過係数に比べて有意に高く、見かけ上Control群と同様にベクトル輸送が示された。0.1%の濃度では、A to B方向とB to A方向の膜透過係数に有意な差はみられなかった (Fig. 2a)。DHA曝露群においても、0.001%~0.01%の濃度範囲において、B to A方向の膜透過係数がA to B方向の膜

透過係数に比べて統計的に有意に高い結果となり、Control群と同様のベクトル輸送が確認された (Fig. 2b)。しかしながら、0.03%および0.1%の濃度においては、ベクトル輸送は消失した (Fig. 2b)。なお、検討した濃度範囲内において、膜透過実験開始前と終了後のTEERに変化が見られなかったことを確認している (Data not shown)。

Rhodamine123 膜透過性に対する Verapamil の影響

Rhodamine123の膜透過性に対するVerapamilの影響を検討した。Fig. 3は、Verapamil存在下および非存在下におけるRhodamine123のB to A方向の膜透過係数を●および◇で表し、それぞれのTEERに対してプロットしたものである。その結果、Verapamil非存在下 (◇) における膜透過係数に比べてVerapamil存在下 (●) での膜透過係数が低下し、Rhodamine123の膜透過に対するVerapamilの阻害効果が認められた。その効果はTEERが $500 \Omega \text{cm}^2$ 以上で顕著であった (Fig. 3)。なお、これらの結果はEPA曝露群、DHA曝露群いずれの脂肪酸においても観察された (Fig. 3)。

一方、TEERが $400 \Omega \text{cm}^2$ 以下に低下すると急激にRhodamine123の膜透過係数が上昇することが示された。このような条件下においては、Verapamilによる阻害効果が見られるものの、その影響はTEERが $500 \Omega \text{cm}^2$ 以上で見られた現象に比べて減弱した (Fig. 3)。

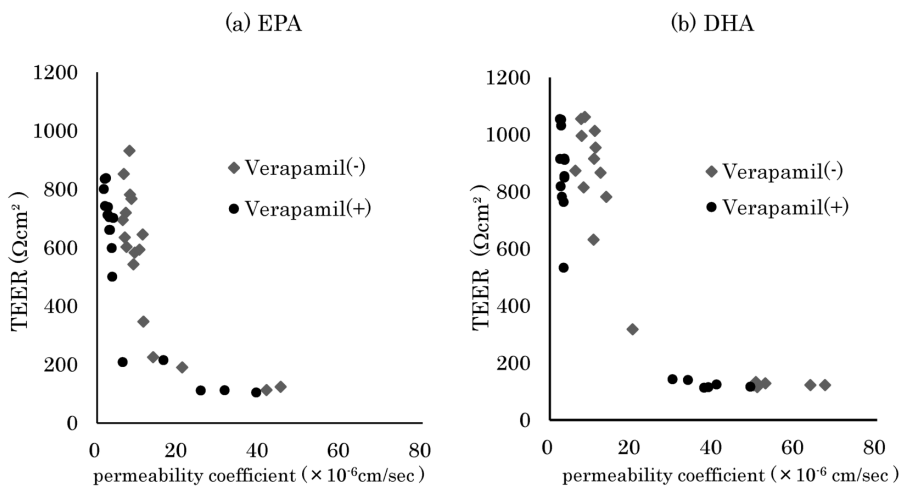


Fig. 3. Effects of Verapamil on the Rhodamine123 flux in the basal to apical direction in Caco-2 cell monolayers. Results are expressed as the relationship between permeability coefficient of Rhodamine123 and TEER after 24 hr exposure of EPA (a) and DHA (b) in Caco-2 cell monolayers. The circles and diamond represent the datum in the presence or absence of Verapamil, respectively.

Table 1. Effects of EPA and DHA on the relative activity of P-glycoprotein assessed with Rhodamine123 permeability in the presence or absence of Verapamil across Caco-2 cell monolayers. Each value represents the mean of three independent experiments.

		P. coefficient (× 10 ⁻⁶ cm/sec)		Relative activity
		[mean ± SE]		
		Ver (-)	Ver (+)	
EPA	control	7.4 ± 0.6	3.2 ± 0.5	0.57
	0.001%	7.9 ± 0.7	2.5 ± 0.3	0.68
	0.003%	8.5 ± 0.8	2.5 ± 0.4	0.70
	0.01%	8.9 ± 1.0	2.7 ± 0.2	0.69
	0.03%	15.4 ± 2.3	8.8 ± 3.1	0.48
	0.1%	44.0 ± 1.0	32.0 ± 3.2	0.27
DHA	control	8.8 ± 1.5	3.0 ± 0.2	0.64
	0.001%	8.9 ± 0.8	3.1 ± 0.2	0.65
	0.003%	10.1 ± 0.7	2.9 ± 0.3	0.71
	0.01%	15.0 ± 2.2	3.4 ± 0.05	0.76
	0.03%	56.8 ± 4.3	37.6 ± 4.8	0.34
	0.1%	54.7 ± 3.7	39.1 ± 0.7	0.28

P-gp 相対活性に対する EPA および DHA の影響

Table 1 には、EPA および DHA 曝露による P-gp の相対活性算出の結果を示している (Table 1)。両脂肪酸ともに曝露濃度 0.001%~0.01%の範囲において P-gp 相対活性は上昇傾向を示した (Table 1)。これに対して、EPA 曝露群の 0.03%および 0.1%において P-gp 相対活性の低下が見られ、その低下に濃度依存性が示された (Table 1)。DHA 曝露群においても 0.03%および 0.1%において P-gp 相対活性の低下が見られ、活性低下に対する濃度依存性は EPA ほど顕著なものではなかった (Table 1)。

考 察

EPA および DHA は n-3 系必須不飽和脂肪酸であり、循環器疾患などにおいて予防効果が認められており、健康食品、サプリメントとしても注目が集まっている。EPA および DHA の高用量摂取により消化器症状が生じるという報告もいくつかあるが、^{7,8)} 厚生労働省は n-3 系脂肪酸の 1 日 1 g 以上摂取することを推奨している。⁶⁾ しかしながら、n-3 系脂肪酸の摂取量に上限が定められていないのが現状である。消化管は水分吸収あるいは栄

養摂取に加えて薬物吸収さらにはサプリメントなどの吸収も担う。そのため、有効な血中濃度を保つことが大切であり、経口投与された薬物あるいはサプリメントは消化管内で高濃度を保つことにより、受動輸送にてその吸収が行われる。よって、消化管内での濃度が吸収過程においては重要な因子となる。経口投与された薬物、サプリメントは最初に胃に滞留する。胃は消化管内で最も拡張した部分で、その容積は成人では1 L~1.2 Lほどであり、早朝空腹時には40 mLの胃液が存在している。その後、主たる吸収部位である小腸に送り込まれる。胃内容物は胃と十二指腸の内圧の差によって移送されるが、胃内に留まる時間を胃内容排泄時間といい、食事の種類、胃内用量、温度、浸透圧、粘度、姿勢、病態、併用薬などの影響を受けることが知られている。我々は、サプリメントを1日1回経口摂取した場合を想定し、種々濃度のEPAおよびDHAのCaco-2単層膜への24時間曝露によるTJ構造ならびにP-gp機能に対する作用を検討した。なお、脂肪酸濃度は厚生労働省推奨用量である1日1 g以上を参考に、1日1 gを想定した濃度において試みたが、脂肪酸の界面活性作用によりCaco-2単層膜が溶解した。よって、安全域を検討するために1日1 g以下の濃度で検討を行い、最大濃度を0.1%と設定した。これは、消化管内で最も拡張している胃の容積1 L中に食事や水分とともに1 gのEPAおよびDHAが溶解し、その溶解液が小腸へ運搬される状態から、1日1 g経口摂取によって管腔内濃度は0.1%となると仮定した。一方、ヒトでの吸収性評価、バリア機能評価はヒト由来の細胞が好ましく、その中でヒト結腸癌由来Caco-2細胞は最も汎用されているツールである。我々は、Caco-2細胞を常法に従い培養することで単層膜として実験に供した。Caco-2細胞は結腸由来故にTJ構造が強固で大腸の性質を既存しているものの、ABCトランスポーター転写レベルがヒト小腸との間で非常に良い相関が見られている。¹⁸⁾

EPAおよびDHA曝露0.03%以上の濃度においてTEERの低下が見られ(Fig. 1)、0.03%と0.1%との間においても濃度依存性が認められ、TJ構造の面からのバリア機能破綻の曝露濃度依存性が示された。P-gp基質のRhodamine123の膜透過実験を試みたところ、両脂肪酸曝露群において0.03%および0.1%の濃度において両方向の膜透過係数が

Control群と比較して有意に上昇し(Fig. 2)、物質の膜透過性上昇の面からもバリア機能破綻が示された。今回のin vitroでの結果は、0.03%以上すなわち0.3 g以上のEPAおよびDHAの曝露はTJ構造変化を介した物質透過性上昇を引き起こすことを意味し、厚生労働省が推奨するEPAおよびDHA1日1 g以上の推奨では小腸粘膜上皮のバリア機能低下の可能性を示すものである。一般に、サプリメントの安全性においては担保されているが、下痢および吐き気^{9,10)}などに加えて消化管粘膜上皮バリア機能低下などの有害事象が起こる可能性が示唆された。

機構論の側面から捉える目的で、P-gp基質Rhodamine123のB to A方向の膜透過に対するP-gp阻害剤Verapamilの効果を検討した。EPA曝露群(Fig. 3a)、DHA曝露群(Fig. 3b)いずれの曝露群においても、Verapamil非存在下における膜透過係数に比べてVerapamil存在下での膜透過係数が低下し、TEERが $500 \Omega \text{cm}^2$ 以上で顕著であった(Fig. 3)。TEERが $400 \Omega \text{cm}^2$ 以下においてはVerapamilによる阻害効果は見られるものの顕著ではなかった(Fig. 3)。小腸上皮細胞は極性細胞であることが特徴の1つであり、TEERの低下によって極性維持が困難となりP-gpの膜上での安定性へ影響している可能性があるが、現在のところ明らかではない。そこで、これらを基に相対的P-gp活性を定量的に解析したところ、両脂肪酸ともに0.01%までの曝露においてはP-gp相対活性は上昇傾向を示した。この理由としては現在のところ明確な言及はできないが、脂肪酸と生体膜との相互作用により膜の流動性が上昇し、P-gpに対する親和性が変化した可能性が考えられる。一方、0.03%以上の曝露においてはP-gp相対活性は濃度依存的に低下することが示された(Table 1)。これまでに、有機酸である酒石酸、¹⁹⁾界面活性剤のPolyethyleneglycol、²⁰⁾脂肪酸とカルニチンとのコンジュゲートであるアシルカルニチン²¹⁾は消化管粘膜上皮細胞TEERの低下を伴わずにP-gp活性を低下させる濃度域が存在するという報告がなされている。Fig. 1との結果と考え合わせると、EPAおよびDHA曝露によるTEER低下の程度と相対的P-gp活性低下に関連性が見いだされたといえる。一方、これまでにカプリン酸ナトリウムによるTEER低下機能として、カプリン酸ナトリウムが、膜上のホスホイノシトール2リン酸からイノ

シトール3リン酸代謝過程に影響を与え、細胞内カルシウムレベルの上昇を介して、細胞骨格系の収縮によりTEERが低下するという生理学的機構が提唱されている。¹³⁾今回検討したEPAおよびDHAにおいても何らかのシグナルトランスダクションが推察されるが、詳細は今後の検討課題である。以上、EPAおよびDHA曝露により低下したTEERのレベルがP-gp相対活性低下のメカニズムに関与している可能性があるかと推察された。

本研究では、腸管吸収の制御因子であるTight junction (TJ)構造とP-糖タンパク質 (P-gp)機能に対するEicosapentaenoic acid (EPA)ならびにDocosahexaenoic acid (DHA)の作用について、ヒト結腸癌由来Caco-2単層膜を用いて検討した。その結果、EPAおよびDHAにはP-gp機能を低下させる濃度域が存在すること、その機構としてTJ構造の変化が関与していることが示唆された。

REFERENCES

- 1) Lagarde M., Bernoud-Hubac N., Calzada C., Véricel E., Guichardant M., *Mol. Nutr. Food. Res.*, **57**, 1347–1358 (2013).
- 2) Bjerve KS., *J. Intern. Med. Suppl.*, **731**, 171–175 (1989).
- 3) Holman RT., Johnson SB., Hatch TF., *Am. J. Clin. Nutr.*, **35**, 617–623 (1982).
- 4) Mozaffarian D., Rimm EB., *JAMA*, **296**, 1885–1899 (2006).
- 5) Chua B., Flood V., Rohtchina E., Wang J., Smith W., Mitchell P., *Arch. Ophthalmol.*, **124**, 981–986 (2006).
- 6) Ministry of Health, Labour and Welfare, “kouseiroudoushyou kenkou kyoku soumu ka seikatsusyuukannbyou taisaku situ eiyou tyousa gakari. Nihon jin no syokuzi sessyu kizyun (2010 nen ban)”
- 7) Yokoyama M., Origasa H., Matsuzaki M., Matsuzawa Y., Saito Y., Ishikawa Y., Oikawa S., Sasaki J., Hishida H., Itakura H., Kita T., Kitabatake A., Nakaya N., Sakata T., Shimada K., Shirato K., *Lancet*, **369**, 1090–1098 (2007).
- 8) Kotwal S., Jun M., Sullivan D., Perkovic V., Neal B., *Circulation: Cardiovascular quality and outcomes*, **5**, 808–818 (2012).
- 9) European Food Safety Authority (EFSA), Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, *EFSA J.*, **10**, 2815 [48 pp.] (2012).
- 10) Hirunpanich V., Sethabouppha B., Sato H., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1586–1588 (2007).
- 11) Wang D., Hirase T., Nitto T., Soma M., Node K., *J. Cardiol.*, **54**, 368–374 (2009).
- 12) Tomita M., Nagira M., Haga M., Hayashi M., *Drug Metab. Pharmacokin.*, **17**, 83–91 (2002).
- 13) Tomita M., Hayashi M., Awazu S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 739–743 (1995).
- 14) Tomita M., Watanabe A., Fujinaga I., Yamakawa T., Hayashi M., *Int. J. Pharm.*, **387**, 1–6 (2010).
- 15) Zhou S., Schuetz J.D., Bunting K.D., Colapietro A.M., Sampath J., Morris J.J., Lagutina I., Grosveld G.C., Osawa M., Nakauchi H., Sorrentino B.P., *Nat. Med.*, **7**, 1028–1034 (2001).
- 16) Borgnia M.J., Eytan G.D., Assaraf Y.G., *J. Biol. Chem.*, **271**, 3163–3171 (1996).
- 17) Tomita M., Takizawa Y., Kishimoto H., Hayashi M., *Drug Metab. Pharmacokin.*, **23**, 356–363 (2008).
- 18) Taipalensuu J., Tornblom H., Lindberg G., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **299**, 164–170 (2001).
- 19) Iida A., Tomita M., Matsuura Y., Takizawa Y., Hayashi M., *Drug Metab. Pharmacokin.*, **21**, 424–428 (2006).
- 20) Shen Q., Li W., Lin Y., Katsumi H., Okada N., Sakane T., Fujita T., Yamamoto A., *Pharm. Pharmacol.*, **60**, 1633–1641 (2008).
- 21) Tomita M., Doi N., Hayashi M., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, **35**, 1–7 (2010).