

Original article

## S-allyl cysteine increases blood flow in NO-dependent and -independent manners

Shigekazu Takemura<sup>1,4)</sup>, Hideshi Ihara<sup>2)</sup>, Kanako Nakagawa<sup>1)</sup>, Yukiko Minamiyama<sup>3)</sup>

1) Department of Frontier Life-science, Graduate School of Medicine,  
Osaka Metropolitan University, Osaka, Japan

2) Department of Biological Chemistry, Graduate School of Science,  
Osaka Metropolitan University, Sakai, Osaka, Japan.

3) Food Hygiene and Environmental Health Division of Applied Life Science,  
Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan

4) Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Graduate School of Medicine,  
Osaka Metropolitan University, Osaka, Japan

Glycative Stress Research 2022; 9 (3): 146-157

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

## S-アシルシステインはNO依存のおよび非依存に血流を増加させる

竹村茂一<sup>1,4)</sup>、居原 秀<sup>2)</sup>、中川加奈子<sup>1)</sup>、南山幸子<sup>3)</sup>

1) 大阪公立大学大学院 医学研究科 先端生命科学

2) 大阪公立大学大学院 理学研究科 分子生物学

3) 京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 食環境安全性学

4) 大阪公立大学大学院 医学研究科 肝胆膵外科学

### 抄録

S-アシルシステイン (SAC) は、熟成ニンニクに含まれる生理活性物質で、その効果として肝機能の改善、臓器の線維化抑制、抗癌作用が知られている。SACを単回経口投与 (10 mg/kg) すると、ラットの尾静脈血流量が1時間以上にわたり最大10%増加し、0.3%のSAC混合飼料を与えると通常飼料に比べて2ヶ月後の尾静脈血流量が増加した。これらの血流増加と一酸化窒素 (nitric oxide: NO) との関係を調べるため、NO合成酵素阻害剤であるL-ニトロアルギニン (2 mM) を3日間投与した後にSAC (100 mg/kg) を単回経口投与した結果、SACによる血流増加は消失した。しかし、L-ニトロアルギニンおよび過剰L-アルギニンを飲料水に混合して投与すると、SACによる血流増加は回復した。この現象は足底血流においても観察された。以上よりSACによる血流増加はNO依存であることが示された。次に血管を用いて、vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) のウェスタンブロットを実施した。リン酸化VASP (pVASP) はcGMP依存性キナーゼとcAMP依存

連絡先：講師 竹村茂一  
大阪公立大学大学院 医学研究科 先端生命科学  
〒545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町 1-4-3  
TEL: 06-6645-3692 FAX: 06-6645-8500 e-mail: take@omu.ac.jp  
共著者：居原 秀 iharah@omu.ac.jp;  
中川加奈子 k-nakagawa@nichinichi-phar.co.jp;  
南山幸子 yukiko-m@kpu.ac.jp

Glycative Stress Research 2022; 9 (3): 146-157  
本論文を引用する際はこちらを引用してください。  
(c) Society for Glycative Stress Research

性キナーゼの両方の基質であることが特徴である。L-ニトロアルギニンは大動脈 pVASP を消失させたが、L-ニトロアルギニン+ SAC はL-ニトロアルギニン投与ラットの動脈 pVASP を部分的に回復させた。NO 非依存性血管拡張物質である H<sub>2</sub>S に焦点をあて、血漿中の反応性過硫酸塩類を測定したところ、L-ニトロアルギニン処理によりシステイン、シスチン、GSH、H<sub>2</sub>S などのチオール類が有意に減少することが示された。L-ニトロアルギニン処理により減少したチオール類のうち、SAC の併用はシステインとシスチンの減少を有意に回復させたが、H<sub>2</sub>S には影響しなかった。これらの結果から、SAC は NO ドナーとして働くニトロチオール（酸化窒素とチオールの化合物）を維持し、フリーラジカル消去活性による抗酸化作用によって、間接的に NO の生体利用効率 (bioavailability) を高め、血流量を増加させる可能性が示唆された。

**KEY WORDS:** S-アリルシステイン (S-allyl cysteine)、血流、一酸化窒素 (nitric oxide: NO)、vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)、nitrosothiol、L-ニトロアルギニン (L-nitro-arginine)

## はじめに

S-アリルシステイン (SAC) は、熟成ニンニク抽出物に含まれる有機硫黄成分で、生物活性がある。SAC は、殺腫瘍効果、抗炎症効果などに関して広く研究されている。また、肺の障害<sup>1)</sup>と線維化<sup>2)</sup>、肝臓の障害<sup>3)</sup>と線維化<sup>4,5)</sup>、精子機能不全<sup>6)</sup>に対する SAC の改善効果についても報告されている。このように、SAC は多機能性、疾病予防薬としての可能性を有する。

SAC は、ヒト胎盤トロフォブラスト細胞において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による活性酸素の生成を減少させ、細胞内の一酸化窒素 (NO) および cGMP レベルを回復させた<sup>7)</sup>。この研究では、SAC は細胞内の非酸化ストレス状態でも NO と cGMP レベルを増加させる能力を有することが報告されている。しかし、SAC が *in vivo* で直接 NO による血流量を増加させることができるか否かは不明である。さらに、NO 以外のガスメディエーターである H<sub>2</sub>S は、シスタチオンβ シンターゼ (CBS)、シスタチオンγ リアーゼ (CSE)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) がシステインアミントランスフェラーゼ (CAT) と共同して L-システインから生成される。H<sub>2</sub>S は Akt を介して内皮 NO 合成酵素を活性化し NO 産生を増加させることが確認されており<sup>8)</sup>、この作用が相乗効果の一因と考えられている。

そこで、本研究では、ラットを用いて、SAC 処理による血流への影響とそのメカニズムについて検討した。

## 材料と方法

### 動物

ラットはすべて Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals に準拠して飼育し、大阪市立大学医学部動物実験施設管理委員会の承認を得た (No.18018)。

### SAC の単回投与

Wistar 系雄性ラット (8 週齢、220 ~ 240 g; SLC 社、静岡) を 1 g/kg のウレタンで麻酔した。その後、ヒーティングマット上で 37°C にて 30 分以上静置し、MoorLDI (Moor instruments LTD, Devon, UK) を用いて尾静脈血流または足底血流を測定した。測定条件は以下の通りである。Scan Speed: 4 ms/pixel, Scan Distance: 30 cm、画像解像度。126 x 54。血流量の変化は、信号強度の変化として表した。

SAC 単回投与の効果を評価するため、SAC を 10 ~ 200 mg/kg 体重で胃ゾンデを用いて経口投与し、15, 30, 45, 60, 75, 90 分後の血流量を測定した。

### SAC の連続投与

8 週齢の Wistar 系雄性ラットを 4 週ごとに以下の混合麻酔薬 (2.5 mL/kg) で腹腔内麻酔し、24 週間飼育した。3 種混合麻酔薬は、メドミジン (0.15 mg/0.15 mL)、ミダゾラム (2 mg/0.4 mL)、ブトルフェノール (2.5 mg/0.5 mL) および生理食塩水 (1.45 mL) で総容量 2.5 mL にした。ラットは 37°C の保温マット上で少なくとも 30 分間維持し、上記のように尾静脈血流を測定した。

SAC による NO 依存性血流を評価するため、8 週齢の Wistar 系雄ラットに L-nitro-arginine (LNA; Sigma, N5501) 40 μmol/kg/day を含む飲料水を 3 日間摂取させた。また、LNA の効果を打ち消すために、2.4 mmol/kg/day の過剰な L-アルギニン (Arg; 和光、019-04611) を LNA 溶液と混合した。SAC (200 mg/kg) を単回経口投与し、ウレタン麻酔下で経時的に尾静脈血流を測定した。LNA 10 μmol/kg/day と L-Arg 1 mmol/kg/day を飲水で 3 日間自由摂取させたラットにも同様の実験を行った。足底血流は、37°C のプレート上にラットをうつ伏せに静置し、足底が上を向くようにテープで踵を固定し、測定した。

## ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析のため、0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) またはSAC (200 mg/kg p.o.) を投与した60分後に動物を解剖した。腹部大動脈からヘパリン処理した注射器に採血し、氷冷した生理食塩水 (50 mL) に入れた。腹部大動脈からヘパリン処理した注射器に血液を採取し、氷冷生理食塩水 (50 mL) に灌流した。胸部大動脈は直ちに分離し、液体窒素で凍結した。測定準備が整うまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

胸部大動脈をRIPAバッファーでホモジナイズし、ウェスタンブロット解析を行った。使用した抗体は、vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP: Calbiochem, 676600, 1: 5,000) とeNOS (endothelial nitric oxide synthase) (BD Biosciences, 610296, 1: 5,000) であった。

## 血漿中の反応性過硫化物種の分析

過硫化物の捕捉剤として  $\beta$ -(4-hydroxyphenyl) ethyl iodoacetamide (HPE-IAM, Molecular Bioscience, Boulder, CO, USA) を用い、LC-ESIMS/MS (液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析器) により反応性過硫化物の分析を行った<sup>9,10</sup>。血漿を1.25 mM HPE-IAMを含む氷冷メタノールで5倍希釈し、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。この混合物を15,000  $\times$  g、 $4^{\circ}\text{C}$ で5分間遠心分離し、得られた上清を、既報に従って合成した既量の同位体ラベル内部標準を含む0.1%ギ酸で10倍希釈した<sup>9,10</sup>。PE-IAMと様々な反応性過硫化物種の付加体をWaters Alliance HPLCシステムとWaters Xevo TQD ESIトリプル四重極型質量分析計を組み合わせて分析した。分離はMightysil RP-18カラム (長さ50 mm  $\times$  内径2 mm、関東化学製) を用い、0.1%ギ酸中、 $40^{\circ}\text{C}$ で10分間、1~95%メタノール直線グラジエントで行った。総流量は0.3 mL/minであった。質量分析は、ESI-MS/MSのポジティブイオンモードとMRM (Multiple Reaction Monitoring) モードを併用して行った。MRMパラメータをTable 1にまとめた。

Table 1. Parameters of Multiple reaction monitoring (MRM) mode.

Analyte	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Cone potential (ev)	Collision energy (eV)
CysS-HPE-AM	299.1	121.0	30	29
[ $^{13}\text{C}$ ]CysS-HPE-AM	300.1	121.0	30	29
CysS-S-HPE-AM	330.8	121.0	35	29
CysS- $^{34}\text{S}$ -HPE-AM	332.8	121.0	35	29
Bis-S-HPE-AM	388.9	121.0	35	30
Bis- $^{34}\text{S}$ -HPE-AM	390.9	121.0	35	30
Bis-S $_2$ -HPE-AM	420.9	121.0	40	23
Bis- $^{34}\text{S}_2$ -HPE-AM	424.9	121.0	40	23
GS-HPE-AM	484.9	356.3	35	18
[ $^{13}\text{C}$ ]GS-HPE-AM	487.9	359.1	35	18
GSS-HPE-AM	516.9	388.3	40	18
GS $^{34}\text{S}$ -HPE-AM	518.9	390.3	40	18

## 統計解析

特に断りのない限り、データは平均値  $\pm$  標準誤差 (SE) で表示した。結果は、 $p < 0.05$  で有意とした。統計解析は、対応のないスチューデントのt検定、または反復測定のための分散分析 (ANOVA)、その後のフィッシャーポストホック検定を用いて行った。

## 結果

### SAC単回投与後の血流

Fig. 1-aは尾静脈の血流変化の代表的な図である。青色から赤色になるにつれて、血流が多くなることを示す。尾静脈血流測定結果 (Fig. 1-b) より、0.5% CMCを2 mL/kg体重で投与した対照群と比較して、SAC投与群では投与後15分から血流量が増加し、その効果は75分後でも持続していた。

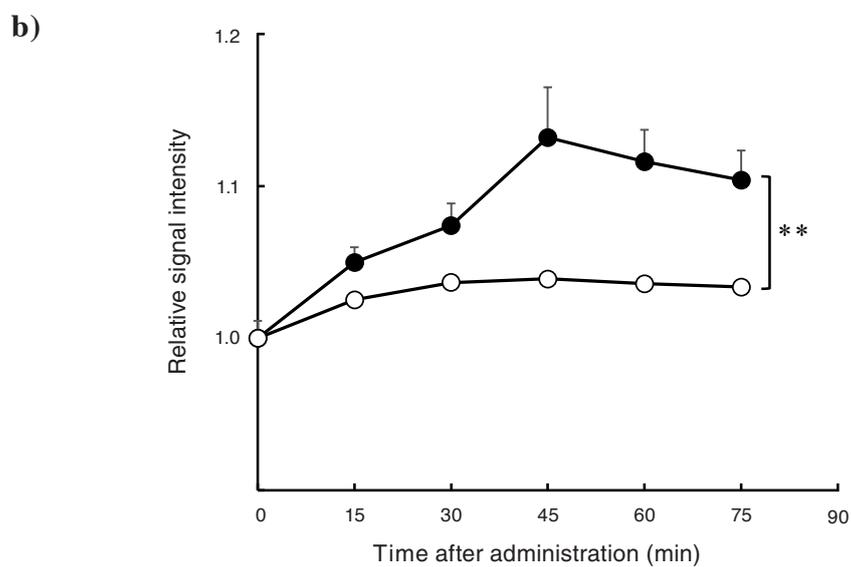
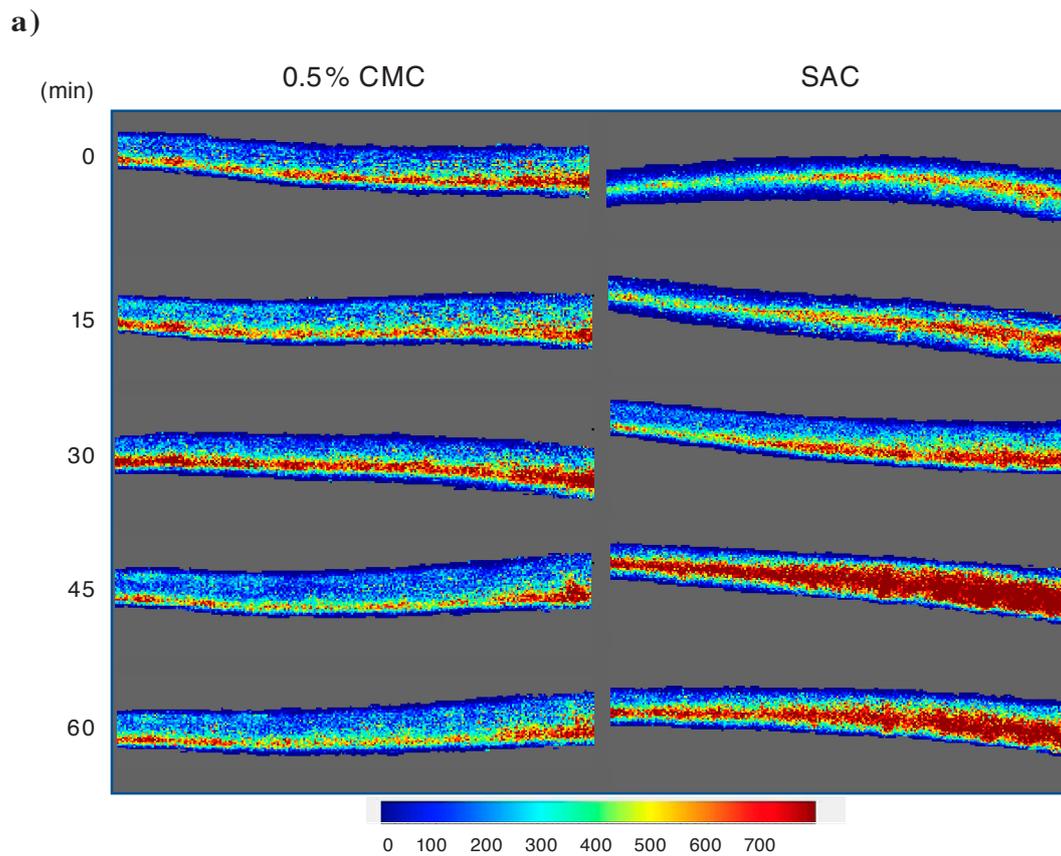
### SAC長期投与後の尾静脈の血流量

血流測定の結果をFig. 2に示す。SAC投与後の血流は、8週、20週、24週において、普通食を与えたラットの血流と比較して有意に増加した。

### NOとの関係

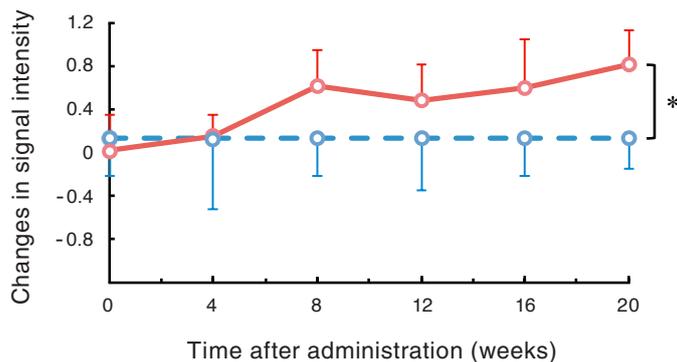
Fig. 3は、NO合成酵素の阻害剤であるLNAを前投与したラットを用いた試験結果であり、LNA投与群の血流はSACによって増加しなかった。さらに、LNA + Arg投与群では、SAC単独投与群レベルまで血流は回復しなかった (Fig. 4)。このことから、SACによる血流量の増加は、NO依存的な作用とNO非依存的な作用によることが示唆された。

同様に足底血流もLNA投与で減少し、SAC投与ではSAC単独投与よりも血流の増加が緩やかであった。Fig. 5より、LNA + Arg投与では、SAC単独投与ほどではないが、血流が増加したことが示された。



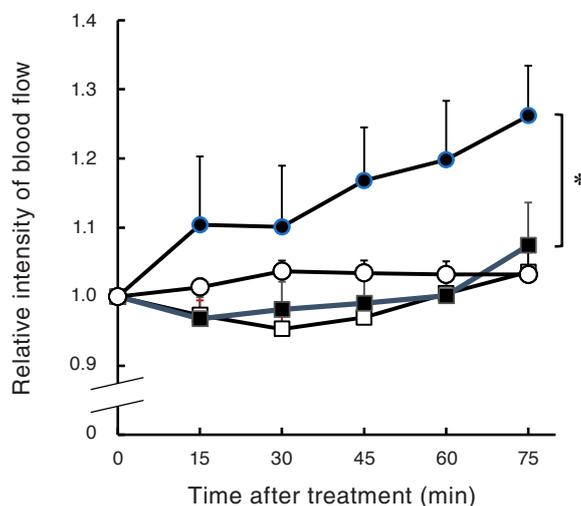
**Fig. 1. Blood flow in the rat tail vein.**

**a)** Representative figures of blood flow (left vein) after SAC administration. It shows increased blood flow as the color changes from blue to red. **b)** Changes in blood flow. SAC was suspended in 5 mg/mL 0.5% CMC and administered orally at 2 mL/kg. Blood flow in the tail vein of rats was measured under anesthesia. The blood flow signal before treatment was set as one and the change over time was shown. Open circle (○), 0.5% CMC in control rats; closed circle (●), SAC (100 mg/kg) in control rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SE, \*\*  $p < 0.01$  between SAC ( $n = 6$ ) and control (CMC,  $n = 17$ ). SAC, S-allylcysteine; CMC, carboxymethyl cellulose; SE, standard error.



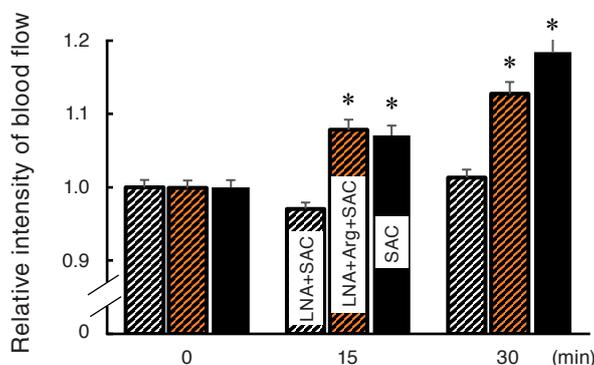
**Fig. 2. Blood flow changes in long-term administration of SAC.**

Blood flow was measured every 4 weeks under triple mixed anesthesia in rats fed a 0.3% SAC mixed diet. \*  $p < 0.05$ , SAC vs. Control,  $n = 6$  each. Red line, SAC; Blue dotted line, Control; SAC, S-allylcysteine; SD, standard deviation.



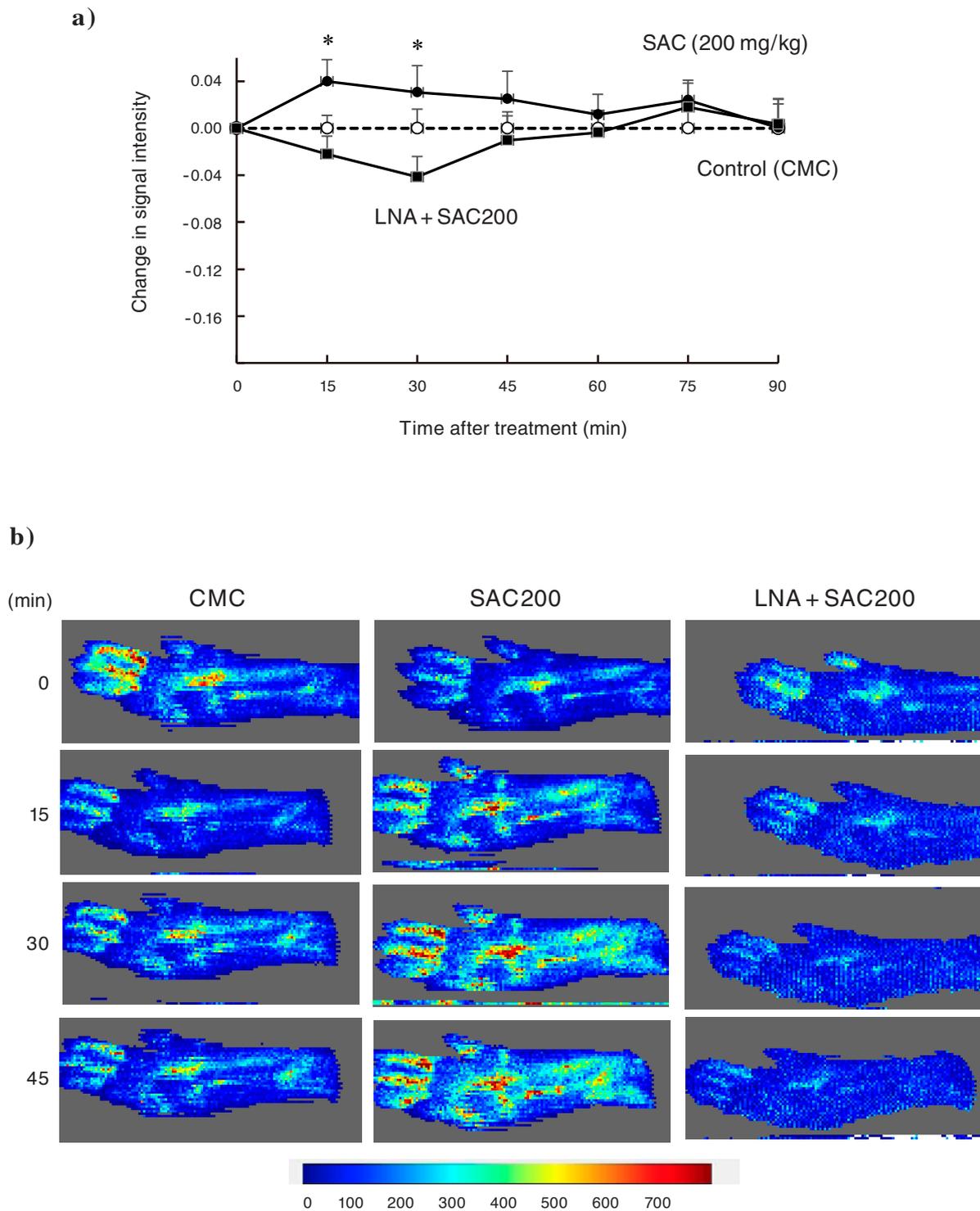
**Fig. 3. Effects of inhibition of NO synthesis on tail vein blood flow.**

LNA (2 mM) was administered to rats as a drinking water *ad libitum* for 3 days. Figure indicates % changes in tail blood flow after SAC (100 mg/kg, p.o.) administration. Open circle (○), 0.5% CMC in control rats; closed circle (●), SAC (100 mg/kg) in control rats; open square (□), 0.5% CMC in LNA treated rats; closed square (■), SAC in LNA treated rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SE,  $n = 6 \sim 18$ , \*  $p < 0.05$ . SAC vs. LNA+SAC. SAC, S-allylcysteine; CMC, carboxymethyl cellulose; LNA, L-nitro-arginine; SE, standard error.



**Fig. 4. Effects of inhibition of NO synthesis on tail vein blood flow.**

LNA (2 mM) and Arg (100 mM) were administered to rats as a drinking water *ad libitum* for 3 days. Figure indicates changes in relative intensity of tail blood flow after SAC (100 mg/kg, p.o.) administration. Results are expressed as mean  $\pm$  SE,  $n = 3 \sim 4$ , \*  $p < 0.05$  vs. LNA+SAC. SAC, S-allylcysteine; CMC, carboxymethyl cellulose; LNA, L-nitro-arginine; Arg, L-arginine; SE, standard error.



**Fig. 5. Effects of SAC on plantar blood flow.**

**a)** Changes in blood flow of foot pad after a single oral administration of 200 mg/kg of SAC to rats that received LNA (0.5 mM) for 3 days. Open circle (○), 0.5% CMC in control rats (n = 17); closed circle (●), SAC (200 mg/kg) (n = 7); closed square (■), SAC in LNA treated rats (n = 5). Results are expressed as mean ± SE, \* p < 0.05, vs LNA + SAC. **b)** Representative changes in plantar blood flow. SAC, S-allylcysteine; CMC, carboxymethyl cellulose; LNA, L-nitro-arginine; Arg, L-arginine; SE, standard error.

血管弛緩反応に関連するpVASP/VASPの発現はLNA処理により低下し、SAC処理によりその低下が改善された(Fig. 6)。一方、eNOSレベルは変化しなかった。

## H<sub>2</sub>S関連物質の関与

NO非依存性血管拡張因子としてのH<sub>2</sub>S関連物質の関与を検討した。SAC単回投与後1時間の血漿中のシステイン(Cys-SH)、シスチン、GSH(グルタチオン)、H<sub>2</sub>S、GSSH(酸化型GSH)、H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>濃度を種々の条件下で測定した(Fig. 7)。SACを投与した正常ラットでは、GSSH濃度のみが上昇した。LNA投与群では、Cys-SH、シスチン、GSH、H<sub>2</sub>Sがいずれも有意に減少し、SACによりCys-SHとシスチンが改善した。

## 考察

本研究により、SAC投与は正常ラットの末梢血流量をNO依存性およびNO非依存性に増加させることが示された。Fig. 8にSACによる血流改善の推定経路を示した。

この血流増加現象は、経口投与後の血漿中SAC量の動態と一致することがわかった(Suppl. 2)<sup>11)</sup>。SACは低酸素誘導因子(HIF)-1 $\alpha$ 、血管増殖因子(VEGF)、マトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)の過剰な上昇を抑制することにより、網膜の虚血障害を改善する<sup>12)</sup>。VEGFの阻害は、肝細胞癌の転移を抑制する<sup>13)</sup>。しかし、SACが通常条件下で末梢血流量を増加させることは報告されていない。ヒトでは、ニンニク600 mgを1週間投与し、血漿中のNO<sub>x</sub>およびIL-6を測定した結果、IL-6と血流の間に相関が見られたため、IL-6を介して血流が増加する可能性があるという報告がある<sup>14)</sup>。しかし、IL-6の関与については明確な証拠は得られていない。

Fig. 3, 4, 5の結果から、SACによる血管拡張は少なくともNOが関与していることが示唆された。しかし、SACは血漿NO<sub>x</sub>、尿中NO<sub>x</sub>、血漿レニン活性に影響を与えず(Suppl. 1)、血圧にも影響を与えなかった(データ未掲載)。これらのことから、この変化は全身的な変化ではなく、局所的な、あるいは血管周囲の生理的な変動による可能性を示唆している。

H<sub>2</sub>Sは、ガス状のシグナル分子であるNOと並ぶ強力な血管弛緩物質として、最近注目を集めている。NOとは対照的に、血中のH<sub>2</sub>Sの主な供給源は、赤血球による生成<sup>15)</sup>または血管平滑筋細胞による生成<sup>16)</sup>であると考えられる。H<sub>2</sub>Sはシステインから生成され、シスタチオニン $\beta$ シターゼとシスタチオニン $\gamma$ リアーゼ(CSE)という酵素が関与している。CSEの重要性は、近年、CSEを欠損したマウスで証明されている。このマウスでは、H<sub>2</sub>Sレベルが低下し、高血圧を発症し、内皮を介した血管弛緩作用が低下する。これらの所見は、H<sub>2</sub>Sが重要な新規生体内シグナル分子であり、血管の血流と血圧の新しい調節因子であることを示している<sup>17)</sup>。さらに、H<sub>2</sub>SはNO/cGMP/sGC/PKGシグ

ナル伝達経路の効果をアップレギュレートしている。H<sub>2</sub>Sの血管拡張作用の一部は、平滑筋細胞の形質膜におけるATP感受性K(+)チャネルの活性化を介して発揮される。脳では、虚血再灌流障害により、NOを介したシグナル伝達経路が阻害をされるため、細動脈の拡張能が低下する<sup>18)</sup>。

N-Nitro-L-arginine methylester (L-NAME)はCSE活性とH<sub>2</sub>S発生を抑制する。L-NAME誘発高血圧ラットでは、血管内H<sub>2</sub>S合成/H<sub>2</sub>S経路の機能不全が認められた。外因性H<sub>2</sub>Sは、L-NAMEによる高血圧の発症を効果的に抑制する。これらの知見は、H<sub>2</sub>S合成/H<sub>2</sub>S経路が高血圧に関与していることを示唆するものである<sup>19)</sup>。

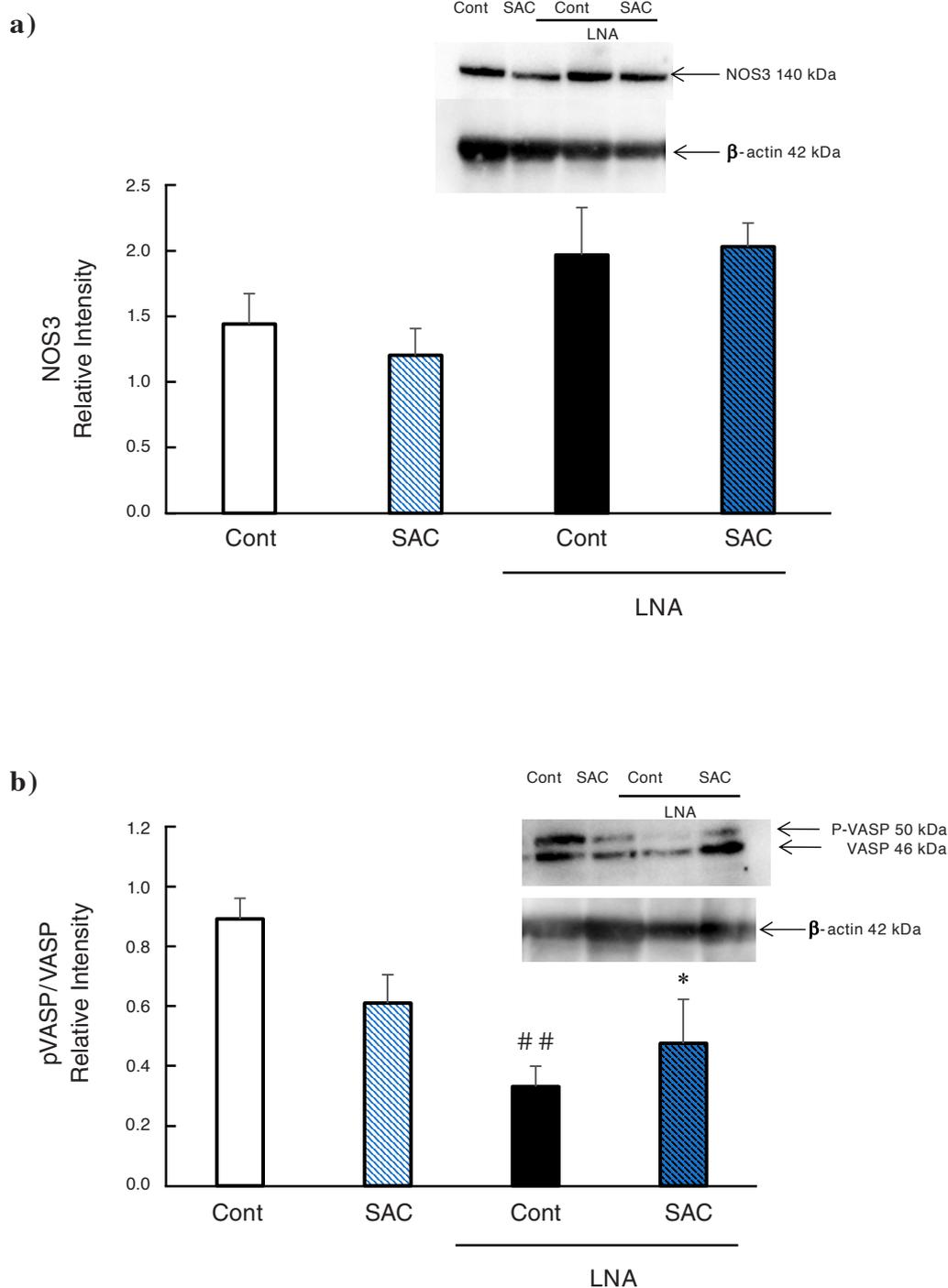
しかし、SACはH<sub>2</sub>S濃度にほとんど影響を与えなかったことから、LNAがシスタチオニンからのシステイン合成を阻害し、NOが合成されず、活性酸素種(ROS)の増加によりシステインが減少している可能性が示唆された。NOの生物学的利用能はO<sub>2</sub><sup>-</sup>によって低下するが、それを消去する酵素であるSOD1、SOD2には変化がなかった(データ未掲載)。一方、H<sub>2</sub>S供給体であるS-propargyl-cysteine (SPRC)はSACの構造類似体であることが報告されている。これは、胃がん細胞に対する抗癌作用の可能性を検討したものである<sup>20)</sup>。したがって、SAC投与により微小血管周辺に検出限界以下のH<sub>2</sub>Sが生成される可能性は否定できない。この点については明確でなく、今後の検討が必要である。

ニトロソチオールは、NO<sub>2</sub>やNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とチオール(R-SHで示される化合物)との反応によって産生される化合物で、生体内では血管弛緩活性を有する。システインやグルタチオンのS-ニトロソ体は、ニトロソチオールとして、生体内でNO供給体(ドナー)として作用し、血管平滑筋の緊張緩和や血管拡張作用を発揮する。今回の実験では、LNA投与によりCys-SH、シスチン、GSH、H<sub>2</sub>Sが減少したが、SACによりCys-SHとシスチンが改善することが示された。SACによりCys-SHやシスチンが維持され、それらがNOと反応することでニトロソチオールが生成される可能性も示唆される。

また、ヒトを対象としたSACの二重盲検無作為臨床試験において、2 mgカプセルを4週間投与したところ、疲労感が改善されたことが報告されている<sup>21)</sup>。今後の研究では、本試験品のヒトにおける血流改善効果を検討したいと考えている。

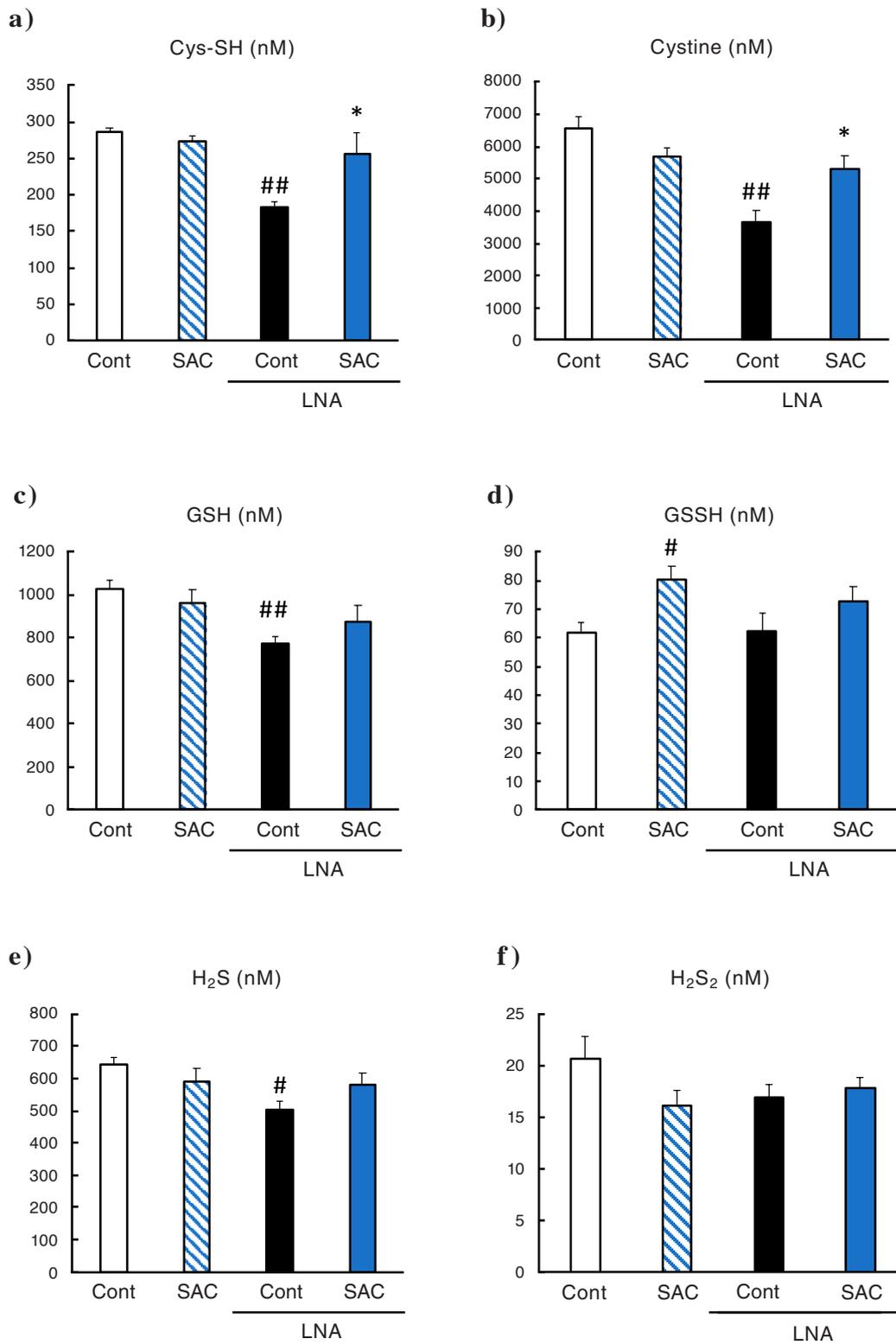
## 結論

本研究では、SACの血流増加作用のメカニズムを検討した結果、SACはNOドナーとして働くニトロソチオールの維持によるNOのバイオアベイラビリティの向上、フリーラジカル消去活性による抗酸化能の向上により間接的に血流を増加させている可能性が示唆された。



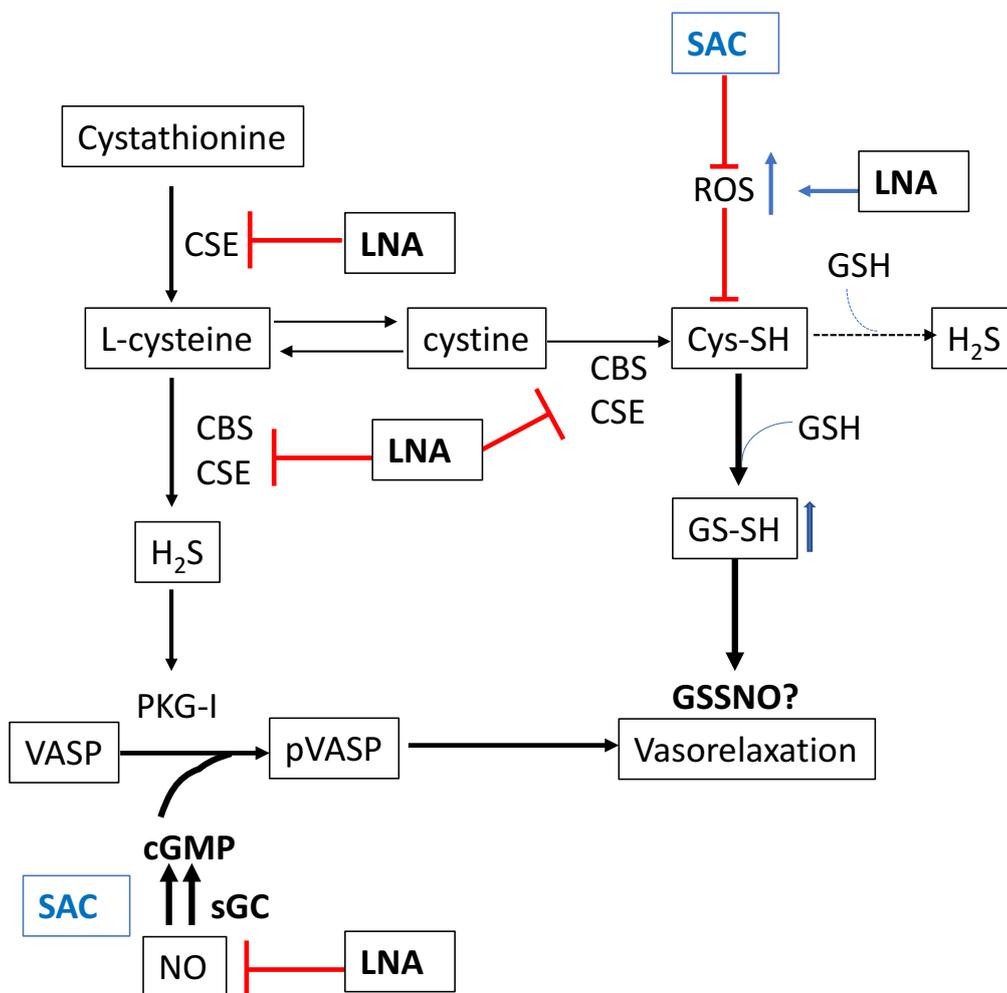
**Fig. 6. Western blot analysis of thoracic aorta.**

**a)** Expression of eNOS protein, **b)** Expression of pVASP. Rats were treated with 0.5 mM LNA for 3 days and 0.5% CMC (Control) or 200 mg/kg SAC orally. Results are expressed as mean  $\pm$  SE,  $n = 3 \sim 4$ , ##  $p < 0.01$  vs. vehicle control, \*  $p < 0.05$  vs. LNA. eNOS, endothelial nitric oxide synthase; VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein; pVASP, phosphorylated VASP; SAC, S-allylcysteine; CMC, carboxymethyl cellulose; LNA, L-nitro-arginine; SE, standard error.



**Fig. 7.** Analysis for reactive persulfide species by LC-ESI-MS/MS in plasma.

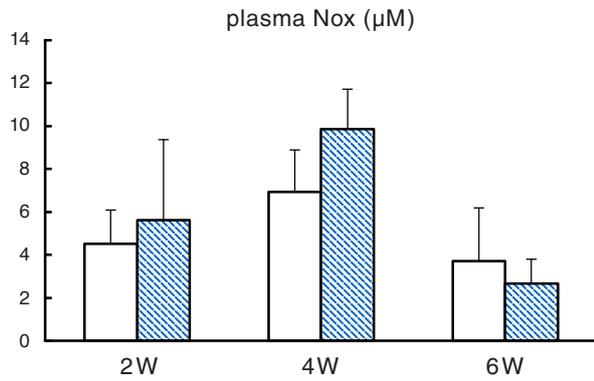
**a)** Cys-SH, **b)** Cystine, **c)** GSH, **d)** GSSH, **e)** H<sub>2</sub>S, **f)** H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. Rats were treated with 0.5 mM LNA for 3 days and 0.5% CMC (Control) or 200 mg/kg SAC orally. Results are expressed as mean ± SE, n = 3 ~ 4, # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. vehicle control, \* p < 0.05 vs. LNA. Cys-SH, cysteine; GSH, glutathione; GSSH, oxidized glutathione; SAC, S-allylcysteine; CMC, carboxymethyl cellulose; LNA, L-nitro-arginine; SE, standard error.



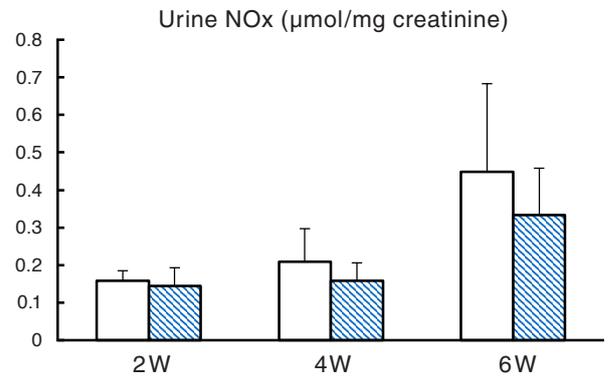
**Fig. 8. Estimated pathway of SAC in improving blood flow.**

In addition to improving blood flow by increasing the bioavailability of NO through free radical scavenging, SAC may also be a source of cysteine, which increases SH compounds and increases NO releaser by increasing nitroso compounds, resulting in increased blood flow. It is also thought that the increase in NO releaser due to the increase in nitroso compounds may cause increased blood flow. Cys-SH, cysteine; GSH, glutathione; SAC, S-allylcysteine; LNA, L-nitro-arginine; ROS, reactive oxygen species; GSH, glutathione; CSE, cystathionine  $\gamma$ -lyase; CBS, cystathionine  $\beta$ -synthase; VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein; pVASP, phosphorylated VASP; PKG-1, protein kinase G-1; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; sGC, soluble guanylate cyclase.

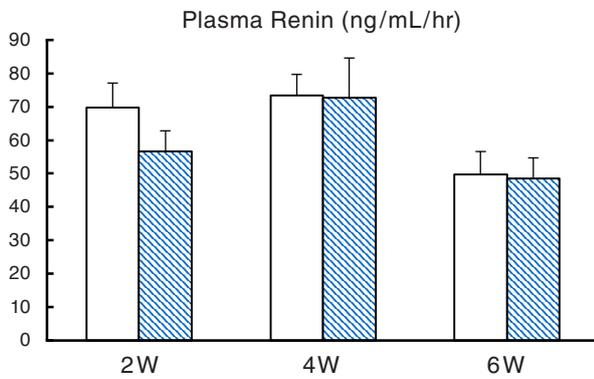
a)



b)



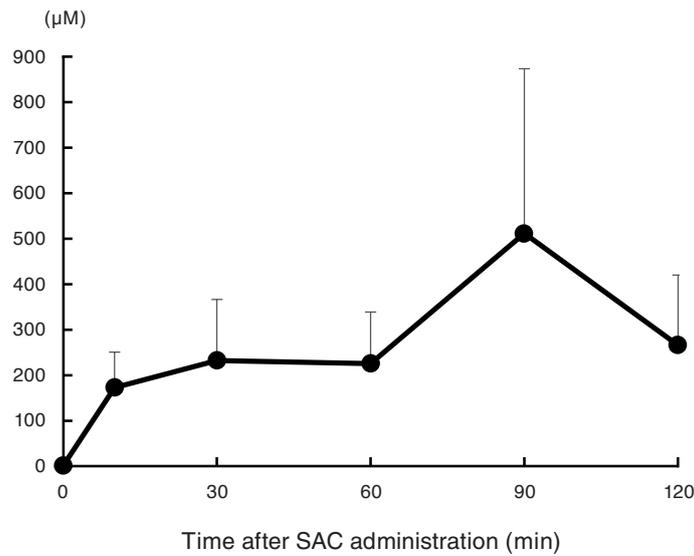
c)



**Suppl. 1.**

**Levels of plasma NOx, urine NOx, and plasma renin.**

a) Plasma NOx, b) Urine NOx, c) plasma renin. Plasma concentrations were measured after a control diet or a 0.3% SAC mixed diet at the indicated time. Open column, Control; Stripe column, SAC. Values are means ± SD, n = 6. SAC, S-allylcysteine; SD, standard deviation.



**Suppl. 2. Effects of SAC concentration after the oral administration.**

SAC (200 mg/kg) was orally treated to rats. At the indicated times, heparinized blood was collected via the femoral vein. Values are means ± SE, n = 3 ~ 6. SAC, S-allylcysteine; SE, standard error.

## 謝辞

貴重なご助言をいただきました株式会社ダイセルの向井克之氏に感謝します。ウェスタンブロットリングは、大阪市立大学（現大阪公立大学）大学院医学研究科の研究支援プラットフォームを利用して実施した。

## 研究費用

本研究の一部は、ダイセル化学工業株式会社（東京）の共同研究費により実施された。

## 参考文献

- 1) Mizuguchi S, Takemura S, Minamiyama Y, et al. S-allyl cysteine attenuated CCl<sub>4</sub>-induced oxidative stress and pulmonary fibrosis in rats. *Biofactors*. 2006; 26: 81-92.
- 2) Tsukioka T, Takemura S, Minamiyama Y, et al. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats with S-allyl cysteine. *Molecules*. 2017; 22: 543.
- 3) Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, et al. S-allyl cysteine prevents CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in rats. *Free Radic Res*. 2007; 41: 489-497.
- 4) Kodai S, Takemura S, Kubo S, et al. Therapeutic administration of an ingredient of aged-garlic extracts, S-allyl cysteine resolves liver fibrosis established by carbon tetrachloride in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2015; 56: 179-185.
- 5) Shinkawa H, Takemura S, Minamiyama Y, et al. S-allylcysteine is effective as a chemopreventive agent against porcine serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Osaka City Med J*. 2009; 55: 61-69.
- 6) Takemura S, Ichikawa H, Naito Y, et al. S-allyl cysteine ameliorates the quality of sperm and provides protection from age-related sperm dysfunction and oxidative stress in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2014; 55: 155-161.
- 7) Yu J, Feng L, Hu Y, et al. Effects of SAC on oxidative stress and NO availability in placenta: Potential benefits to preeclampsia. *Placenta*. 2012; 33: 487-494.
- 8) Predmore BL, Julian D, Cardounel AJ. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an akt-dependent mechanism. *Front Physiol*. 2011; 2: 104.
- 9) Akaike T, Ida T, Wei FY, et al. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun*. 2017; 8: 1177.
- 10) Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A, et al. Exposure to electrophiles impairs reactive persulfide-dependent redox signaling in neuronal cells. *Chem Res Toxicol*. 2017; 30: 1673-1684.
- 11) Amano H, Kazamori D, Itoh K, et al. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of S-allyl-L-cysteine in rats and dogs. *Drug Metab Dispos*. 2015; 43: 749-755.
- 12) Chen YQ, Pan WH, Liu JH, et al. The effects and underlying mechanisms of S-allyl l-cysteine treatment of the retina after ischemia/reperfusion. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2012; 28: 110-117.
- 13) Ng KT, Guo DY, Cheng Q, et al. A garlic derivative, S-allylcysteine (SAC), suppresses proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012; 7: e31655.
- 14) Anim-Nyame N, Sooranna SR, Johnson MR, et al. Garlic supplementation increases peripheral blood flow: a role for interleukin-6? *J Nutr Biochem*. 2004; 15: 30-36.
- 15) Vitvitsky V, Yadav PK, An S, et al. Structural and mechanistic insights into hemoglobin-catalyzed hydrogen sulfide oxidation and the fate of polysulfide products. *J Biol Chem*. 2017; 292: 5584-5592.
- 16) Kanagy NL, Szabo C, Papapetropoulos A. Vascular biology of hydrogen sulfide. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017; 312: C537-C349.
- 17) Wagner CA. Hydrogen sulfide: A new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. *J Nephrol*. 2009; 22: 173-176.
- 18) Lobov GI, Sokolova IB, Gorshkova OP, et al. Contribution of hydrogen sulfide to dilation of rat cerebral arteries after ioschemia/reperfusion injury. *Bull Exp Biol Med*. 2020; 168: 597-601.
- 19) Zhong G, Chen F, Cheng Y, et al. The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J Hypertens*. 2003; 21: 1879-1885.
- 20) Ma K, Liu Y, Zhu Q, et al. H<sub>2</sub>S donor, S-propargyl-cysteine, increases CSE in SGC-7901 and cancer-induced mice: Evidence for a novel anti-cancer effect of endogenous H<sub>2</sub>S? *PLoS One*. 2011; 6: e20525.
- 21) 高柳 勝, 江口 晃, 大江 健, 他. S-アリルシステインの身体的な疲労感軽減効果:ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験. *薬理と治療*. 2019; 47: 607-619.