

食品中化学物質の複合影響による反応生成物に関する研究

「クロロゲン酸と亜硝酸ナトリウム併用投与による活性酸素種生成に関する研究」

研究分担者	中澤 裕之	星薬科大学	薬品分析化学教室
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学	薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学	薬品分析化学教室

研究要旨

近年、食品中に含有されるフェノール性化合物の抗酸化能が注目されており、健康食品などにフェノール性化合物が幅広く使用されている。しかし、種々のフェノール性化合物は、金属との反応によって活性酸素種（ROS）を生成し、DNA の損傷や脂質の過酸化を引き起こすことが報告されている。本研究では、コーヒー中に含まれるクロロゲン酸およびカフェイン酸について、ニトロ化によるラジカル発生能の変化を検討した。その結果、フェノール性化合物はニトロ化を受けることによって ROS 発生量が上昇した。また、クロロゲン酸および亜硝酸ナトリウムを併用したマウスからフェノール性化合物がニトロ化を受けた化合物を検出した。

A. 研究目的

近年、茶葉に含まれるカテキン類に代表されるフェノール性化合物は抗酸化作用を有することから注目されている。一方で、活性酸素種（ROS）は動脈硬化、心疾患、老化や発がんといった種々の疾病に関与していることが明らかとなっており、ROS を消去する抗酸化物質の摂取はこれら疾病の予防につながると考えられている。しかし、フェノール性化合物と金属が反応することで ROS が発生することが報告<sup>1)</sup>されている。これらのことより、抗酸化物質の安全性についてさらに詳細な研究が要求されている。

他方、亜硝酸ナトリウム（ $\text{NaNO}_2$ ）は食品添加物として使用されているが、胃酸酸

性条件下でニトロ化反応を引き起こすことが考えられる。

そこで、平成 20 年度ではフェノール性化合物の一つであり、コーヒーなどに多く含まれているクロロゲン酸と  $\text{NaNO}_2$  を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化を引き起こし、ROS の生成に関与しているかについて *in vitro* の系で検証した。また、生体内で同様の反応が起こることを確認するためにマウスを用いた併用投与実験を行った。

B. 研究方法

B-1. ニトロ化を受けたフェノール性化合物が活性酸素種発生に与える影響

#### B-1-1. 人工胃液中におけるフェノール性化合物と NaNO<sub>2</sub> の反応

フェノール性化合物と NaNO<sub>2</sub> の反応性を確認するためにクロロゲン酸およびカフェイン酸と NaNO<sub>2</sub> をそれぞれ人工胃液中で反応を行った。得られた化合物は高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) によって解析を行なった。

#### B-1-2. ラジカル発生作用の評価

ニトロ化前後における ROS 発生量の比較を行うために、フェノール性化合物と高い反応性を示す銅と反応させた。ROS 発生量の評価には、蛍光プローブである 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて励起波長 485 nm、蛍光波長 523 nm で蛍光強度を測定した<sup>2)</sup>。

#### B-2. *in vivo* におけるフェノール性化合物の検出

##### B-2-1. 動物実験

6 週齢の雄 ddy 系マウスに 0.5% のクロロゲン酸を混餌で、0.2% の NaNO<sub>2</sub> を飲水で投与後、経時的に屠殺し、得られた肝臓組織中のニトロ化合物の検出を行った。ニトロ化合物の解析には液体クロマトグラフィー/フォトダイオードアレイ/質量分析法 (LC/PDA/MS) を用いた。  
(倫理面の配慮)

動物実験は星薬科大学規程に則り、実験を行った。

#### C 研究結果

##### C-1. ニトロ化を受けたフェノール性化合物が活性酸素種発生に与える影響

フェノール性化合物と NaNO<sub>2</sub> を人工胃液

中で反応させ、得られた化合物を LC/MS で測定したところ、ニトロ化合物の生成が確認された。また、DCFH-DA による ROS 発生量の評価を行ったところ、フェノール性化合物はニトロ化を受けることで活性酸素種の生成量を増大させる結果が得られた (Fig. 1)。また、この反応系は抗酸化物質であるアスコルビン酸を加えることで ROS の発生量を減少させた (Fig. 2)。

##### C-2. *in vivo* におけるフェノール性化合物の検出および酸化的ストレス評価

生体内でもフェノール性化合物と NaNO<sub>2</sub> を併用投与することにより胃酸条件下で上記 C-1 と同様の反応が起こる可能性があると考え、*in vivo* への適用を試みた。その結果、クロロゲン酸と NaNO<sub>2</sub> を併用投与したマウス肝臓組織からフェノール性化合物がニトロ化を受けた 1,2-(4H)-benzoxazin-4-one が検出された (Fig. 3)。

#### D. 考察

本研究において、コーヒーなどに多く含まれているクロロゲン酸と NaNO<sub>2</sub> を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化を引き起こし、ROS の生成に関与しているかについて *in vitro* の系で検証した。フェノール性化合物は抗酸化作用があることで、近年、注目されているが、ベンゼン環のオルト位に水酸基がある化合物については ROS を発生させることが知られている。本実験系においても銅を加えたことで、ROS の上昇が見られたが、ニトロ化を行うことで、ROS の発生量がさらに増大した。ニトロ基は強力な電子吸引性基であることから、銅との反応性が上がり、ROS の上昇につながる

ったものと考えられる。

他方、*in vivo*の結果より、フェノール性化合物がニトロ化を受けた化合物を検出できたことから、クロロゲン酸と  $\text{NaNO}_2$  を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化を引き起こし、ROS の生成に寄与していることが示唆された。

#### E. 結論

本研究では、食品に含まれるフェノール性抗酸化物質であるクロロゲン酸およびカフェイン酸と  $\text{NaNO}_2$  の併用投与によるニトロ化反応による ROS 発生量に及ぼす影響の解明を行った。生体内における過剰の ROS 生成は、種々の疾患に関与することが知られている。このことから、生体内で摂取されたフェノール性化合物と  $\text{NaNO}_2$  の併用投与によって ROS 生成の増加が起こり、さまざまな疾患へとつながることが考えられる。

本研究の結果より、フェノール性化合物と  $\text{NaNO}_2$  を併用することで、人工胃液中でニトロ化反応が起こり、ROS 発生量の増大が認められた。

また、*in vivo* において併用投与実験を行ったところ、マウス肝臓からフェノール性化合物がニトロ化を受けた物質を検出したことから、生体内でも ROS 生成量の増大と、それによって惹起される DNA や脂質への影響が危惧された。

#### F. 研究発表

##### F-1. 学会発表

- 1) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之、カフェイン酸の Prooxidant 作

用にニトロ化反応が及ぼす影響 第 69 回分析化学討論会 (2008 年 5 月・愛知県)

- 2) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之、カフェイン酸のニトロ化反応による活性酸素種生成への影響、第 96 回 日本食品衛生学会学術講演会 (2008 年 9 月・兵庫県)

#### G. 参考文献

- 1) Li Y., Trush M.A.: Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* 54(1994)1895-1898.
- 2) O'Malley Y.Q., Reszka K.J., Britigan B.E.: Direct oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by pyocyanin and other redox-active compounds independent of reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* 36(2004)90-100.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし



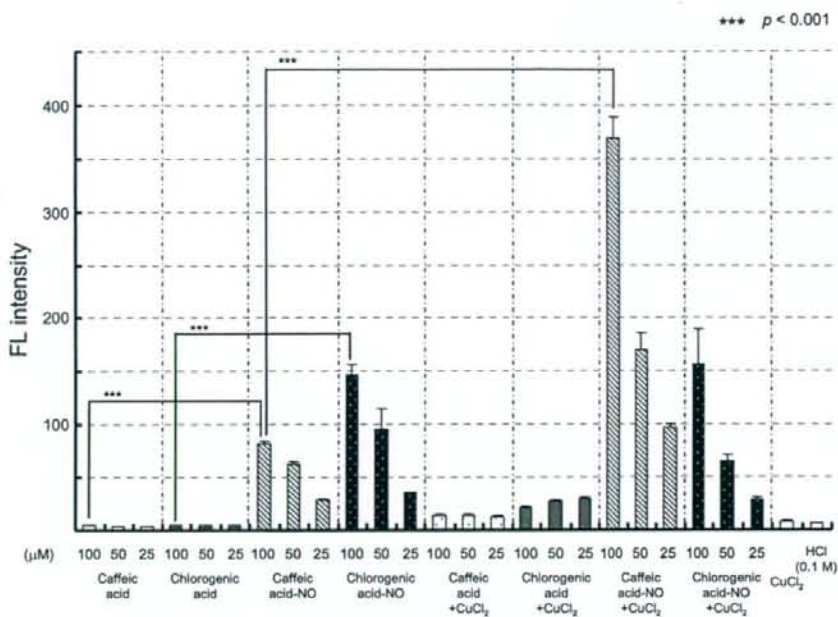


Fig. 1 Comparison of prooxidant ability interacted by copper sulfate between phenolic compounds and nitration compounds

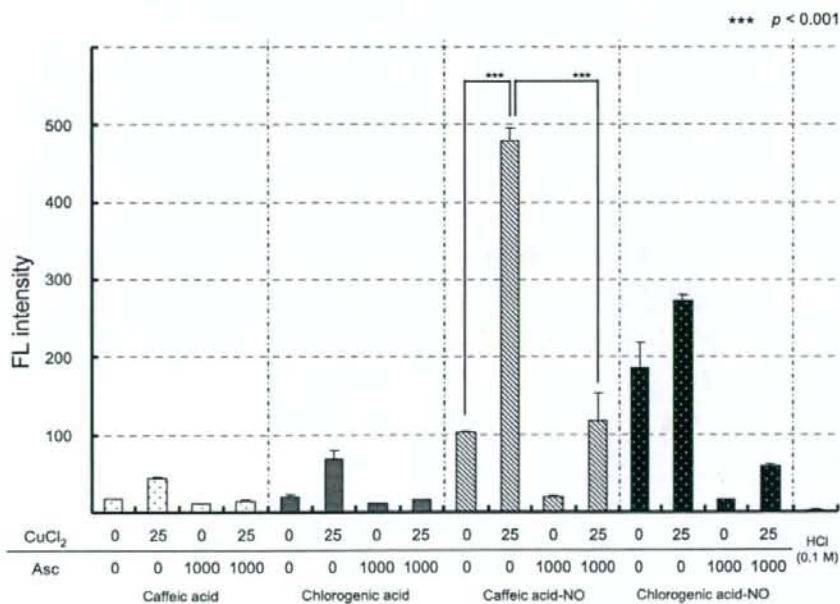


Fig. 2 Comparison of prooxidant ability under ascorbic acid for scavenging reactive oxygen species

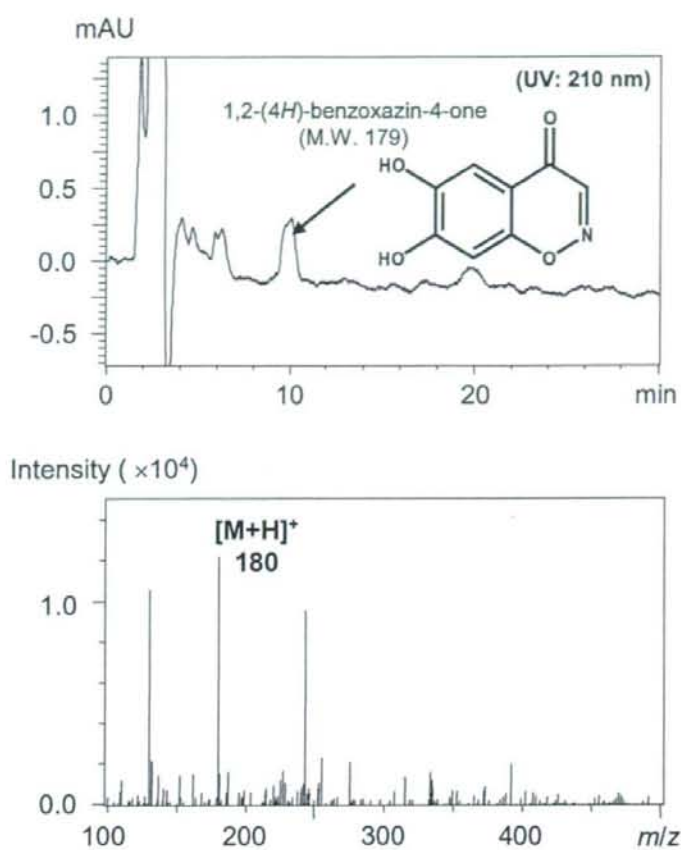


Fig. 3 Chromatogram and mass spectrum of nitrated phenolic compounds in mice liver samples

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Umemura T, Tasaki M, Kijima A, Okamura T, Inoue T, Ishii Y, Suzuki Y, Masui N, Nohmi T, <u>Nishikawa A.</u>	Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and in vivo mutagenicity in kidneys of gpt delta rats treated with potassium bromate	Toxicology	257	257: 46-52	2009
Kuroiwa, Y., Yamada, M., Matsui, K., Okamura, T., Ishii, Y., Masumura, K., Tasaki, M., Umemura, T., Mitsumori, K., Nohmi, T., Hirose, M., <u>Nishikawa, A.</u>	Combined ascorbic acid and sodium nitrite treatment induces oxidative DNA damage-associated mutagenicity in vitro, but lacks initiation activity in rat forestomach epithelium	Toxicol. Sci.	104	274-282	2008
Kanki, K., Umemura, T., Kitamura, Y., Ishii, Y., Kuroiwa, Y., Kodama, Y., Itoh, K., Yamamoto, M., <u>Nishikawa, A.</u> , Hirose, M.	A possible role of nrf2 in prevention of renal oxidative damage by ferric nitrilotriacetate	Toxicol. Pathol.	36	353-361	2008

Kuroiwa, Y., Okamura, T., Ishii, Y., Umemura, T., Tasaki, M., Kanki, K., Mitsumori, K., Hirose, M., <u>Nishikawa, A.</u>	Enhancement of esophageal carcinogenesis in acid reflux model rats treated with ascorbic acid and sodium nitrite in combination with or without initiation	Cancer Sci.	99	7-13	2008
Miyamoto, S., Yasui, Y., <u>Tanaka, T.</u> , Ohigashi, H., and Murakami, A.	Suppressive effects of nobiletin on hyperleptinemia and colitis-related colon carcinogenesis in male ICR mice	Carcinogenesis	29	1057-1063	2008
Kim, M., Miyamoto, S., Sugie, S., Yasui, Y., Ishigamori- Suzuki, R., Murakami, A., Nakagama, H., and <u>Tanaka, T.</u>	A tobacco-specific carcinogen, NNK, enhances AOM/DSS-induced colon carcinogenesis in male A/J mice	In Vivo	22	557-564	2008
Shimizu, M., Shirakami, Y., Sakai, H., Adachi, S., Hata, K., Hirose, Y., Tsurumi, H., <u>Tanaka, T.</u> , and Moriwaki, H.	(-)-Epigallocatechin gallate suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice	Cancer Prev. Res.	1	298-304	2008
Miyamoto, S., Epifano, F., Curini, M., Genovese, S., Kim, M., Ishigamori- Suzuki, R., Yasui, Y., Sugie, S., and <u>Tanaka, T.</u>	A novel prodrug of 4'-geranyloxy-ferulic acid suppresses colitis-related colon carcinogenesis in mice	Nutr. Cancer	60	675-684	2008
Kim, M., Miyamoto, S., Yasui, Y., Oyama, T., Murakami, A., and <u>Tanaka, T.</u>	Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice	Int. J. Cancer,	124	264-271	2008