

Table 1. Results of LLNA performed with Parathion and 2,4-D-butyl.

Treatment at 4wk (Parathion)	Dose of LLNA (2,4-D-butyl)	Final BW (g; mean $\pm$ SD)	Lymph node weight (mg; mean $\pm$ SD)	$[^3\text{H}]\text{-TdR}$ incorporation	
				dpm (mean $\pm$ SD)	SI <sup>a</sup>
0 mg/kg	0 %	20.8 $\pm$ 1.2	3.85 $\pm$ 0.90	134 $\pm$ 40	1.0
	2.5 %	21.1 $\pm$ 3.2	4.48 $\pm$ 1.27	222 $\pm$ 52*	1.7
	5 %	21.7 $\pm$ 2.6	4.70 $\pm$ 0.70	322 $\pm$ 49**	2.4
	10 %	21.4 $\pm$ 1.6	6.26 $\pm$ 1.02**	461 $\pm$ 42**	3.5
0.4 mg/kg	0 %	21.0 $\pm$ 1.1	3.20 $\pm$ 0.80	130 $\pm$ 38	1.0
	2.5 %	21.4 $\pm$ 1.6	5.58 $\pm$ 0.87*	601 $\pm$ 252	4.6
	5 %	20.9 $\pm$ 1.6	6.75 $\pm$ 1.55**	1054 $\pm$ 294	8.1
	10 %	21.8 $\pm$ 1.1	9.66 $\pm$ 0.81**	2107 $\pm$ 832**	16.1
1.2 mg/kg	0 %	20.9 $\pm$ 1.6	3.88 $\pm$ 0.22	129 $\pm$ 52	1.0
	2.5 %	21.2 $\pm$ 1.1	8.45 $\pm$ 1.19**	816 $\pm$ 367	6.3
	5 %	21.0 $\pm$ 1.1	11.56 $\pm$ 1.86**	2106 $\pm$ 683**	16.3
	10 %	21.5 $\pm$ 1.6	12.52 $\pm$ 2.22**	2957 $\pm$ 243**	22.9

<sup>a</sup>SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. \*p < 0.05; \*\* p < 0.01.

**Table 2. Results of LLNA performed with Parathion and Eugenol.**

Treatment at 4wk (Parathion)	Dose of LLNA (Parathion)	Final BW (g; mean $\pm$ SD)	Lymph node weight (mg; mean $\pm$ SD)	$^3\text{H}$ -TdR incorporation	
				dpm (mean $\pm$ SD)	SI <sup>a</sup>
0 mg/kg	0 %	20.3 $\pm$ 2.5	3.85 $\pm$ 1.14	304 $\pm$ 208	1.0
	5 %	20.7 $\pm$ 1.4	5.28 $\pm$ 0.77	593 $\pm$ 159	2.0
	10 %	20.8 $\pm$ 1.2	6.15 $\pm$ 0.62	2287 $\pm$ 705	7.5
	25 %	20.5 $\pm$ 1.6	10.54 $\pm$ 1.93**	8964 $\pm$ 2588**	29.5
0.4 mg/kg	0 %	20.6 $\pm$ 1.3	3.70 $\pm$ 0.48	205 $\pm$ 133	1.0
	5 %	20.2 $\pm$ 1.5	4.35 $\pm$ 1.41	972 $\pm$ 448	4.7
	10 %	20.7 $\pm$ 1.9	8.03 $\pm$ 0.99**	2931 $\pm$ 1843	14.3
	25 %	20.5 $\pm$ 1.5	12.44 $\pm$ 1.80**	11492 $\pm$ 2841**	56.1
1.2 mg/kg	0 %	20.8 $\pm$ 1.8	4.50 $\pm$ 1.14	302 $\pm$ 170	1.0
	5 %	20.7 $\pm$ 1.3	7.58 $\pm$ 1.72	2648 $\pm$ 1392	8.8
	10 %	21.2 $\pm$ 1.1	11.46 $\pm$ 3.20**	6947 $\pm$ 3184**	23.0
	25 %	20.0 $\pm$ 1.2	14.76 $\pm$ 2.64**	13775 $\pm$ 2869**	45.6

<sup>a</sup>SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. \*p < 0.05; \*\* p < 0.01.

Table 3. Results of LLNA performed with Methoxychlor and 2,4-D-butyl.

Treatment at 4wk (Methoxychlor)	Dose of LLNA (2,4-D-butyl)	Final BW (g; mean $\pm$ SD)	Lymph node weight (mg; mean $\pm$ SD)	$[^3\text{H}]\text{-TdR}$ incorporation	
				dpm (mean $\pm$ SD)	SI <sup>a</sup>
0 mg/kg	0 %	21.4 $\pm$ 1.5	4.63 $\pm$ 0.47	134 $\pm$ 76	1.0
	2.5 %	21.7 $\pm$ 1.9	4.98 $\pm$ 0.24	254 $\pm$ 34	1.9
	5 %	21.3 $\pm$ 1.8	4.55 $\pm$ 0.70	334 $\pm$ 26	2.5
	10 %	21.2 $\pm$ 2.0	6.84 $\pm$ 1.23**	592 $\pm$ 249**	4.4
100 mg/kg	0 %	21.8 $\pm$ 1.7	4.08 $\pm$ 0.19	122 $\pm$ 43	1.0
	2.5 %	21.5 $\pm$ 2.1	5.80 $\pm$ 1.02	230 $\pm$ 58	1.9
	5 %	21.2 $\pm$ 1.5	9.20 $\pm$ 3.04**	721 $\pm$ 248**	5.9
	10 %	21.6 $\pm$ 1.4	9.60 $\pm$ 1.34**	1705 $\pm$ 208**	14.0
300 mg/kg	0 %	21.3 $\pm$ 2.3	4.18 $\pm$ 0.76	129 $\pm$ 13	1.0
	2.5 %	21.7 $\pm$ 2.6	7.80 $\pm$ 2.52*	616 $\pm$ 360	4.8
	5 %	21.3 $\pm$ 2.2	9.00 $\pm$ 1.41**	843 $\pm$ 188*	6.5
	10 %	21.2 $\pm$ 2.1	12.50 $\pm$ 1.35**	1942 $\pm$ 555**	15.1

<sup>a</sup>SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01.

**Table 4. Results of LLNA performed with Methoxychlor and Eugenol.**

Treatment at 4wk (Methoxychlor)	Dose of LLNA (Eugenol)	Final BW (g; mean $\pm$ SD)	Lymph node weight (mg; mean $\pm$ SD)	$[^3\text{H}]\text{-TdR}$ incorporation	
				dpm (mean $\pm$ SD)	SI <sup>a</sup>
0 mg/kg	0 %	20.9 $\pm$ 1.7	3.65 $\pm$ 0.32	192 $\pm$ 113	1.0
	5 %	21.1 $\pm$ 1.3	5.48 $\pm$ 1.85	1208 $\pm$ 1336	6.3
	10 %	21.0 $\pm$ 1.1	9.60 $\pm$ 0.53**	3029 $\pm$ 1776*	15.8
	25 %	21.2 $\pm$ 1.9	11.42 $\pm$ 1.76**	9476 $\pm$ 1707**	49.4
100 mg/kg	0 %	21.9 $\pm$ 2.3	4.38 $\pm$ 1.13	389 $\pm$ 428	1.0
	5 %	21.7 $\pm$ 2.5	9.90 $\pm$ 0.44*	4209 $\pm$ 935	10.8
	10 %	21.5 $\pm$ 1.2	12.75 $\pm$ 3.71**	8087 $\pm$ 2839**	20.8
	25 %	21.8 $\pm$ 1.7	14.92 $\pm$ 2.32**	16157 $\pm$ 4083**	41.5
300 mg/kg	0 %	20.8 $\pm$ 1.6	3.85 $\pm$ 0.37	167 $\pm$ 113	1.0
	5 %	21.0 $\pm$ 1.8	8.63 $\pm$ 1.85*	2911 $\pm$ 1096	17.4
	10 %	20.8 $\pm$ 1.4	10.85 $\pm$ 3.93**	8434 $\pm$ 3324**	50.5
	25 %	21.2 $\pm$ 1.8	15.56 $\pm$ 1.95**	17085 $\pm$ 2995**	102.3

<sup>a</sup>SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. \*p < 0.05; \*\* p < 0.01.

Table 5. EC3 values.

	Parathion Treatment at 4wk			Methoxychlor Treatment at 4wk		
	0 mg/kg	0.4 mg/kg	1.2 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
EC3 values of 2,4-D-butyl	7.73	1.39	0.94	6.32	3.19	1.32
EC3 values of Eugenol	5.28	2.66	0.83	1.89	0.53	0.61

EC3 value was an estimation of the amount of the test solution required in LLNA to induce a SI of 3.

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題： 食品中化学物質の複合影響に及ぼす代謝活性化に関する研究  
「種々食品中化学物質の CYP1A および CYP3A サブファミリー酵素誘導能の評価」

研究分担者： 出川雅邦 静岡県立大学 薬学部教授

研究協力者： 関本征史 静岡県立大学 薬学部講師

研究要旨

本研究では、食品中に含まれる化学物質の複合暴露が CYP1A または CYP3A サブファミリー酵素発現に及ぼす影響やその機構について詳細に検討した。

① CYP1A サブファミリー酵素誘導への影響：代表的な AhR リガンドである 3-メチルコラントレン (MC) の存在下、4 種の食品添加物 (クルクミン (CUR)、チアベンダゾール (TBZ)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT)、没食子酸プロピル (PG)) をヒト AhR リガンド検索性細胞株 HepG2-A10 に処理し、AhR 活性化の経時変化を検討した。その結果、MC の濃度依存的に AhR の活性化が見られ、その時間—曲線下面積 (AUC) も濃度依存的に増加した。また、CUR、TBZ、PG の共存下、低濃度 (0.1  $\mu\text{M}$ ) の MC を処理したところ、MC 単独処理に比して AUC の増加が見られた。特に TBZ+MC 群は高濃度 (1  $\mu\text{M}$ ) MC 処理群と極めて類似した AhR 活性化の経時変化パターンを示した。

② CYP3A サブファミリー酵素誘導への影響：昨年度構築したヒト PXR リガンド検索性細胞株 HepG2-PXRLucA3 に対して、PXR 活性化剤であるリファンピシン (RIF) を処理し、その CYP3A 酵素発現に及ぼす影響について検討した。その結果、用いた 4 種の食品添加物はいずれも、単独では CYP3A4 遺伝子の発現を誘導しないこと、また、CUR、PG あるいは BHT は、RIF による CYP3A4 遺伝子発現誘導をわずかながら阻害することが確認された。また、これら化合物は CYP3A 酵素活性にほとんど影響を及ぼさなかった。

以上、本研究で用いた 4 種の食品添加物 (CUR、TBZ、BHT、PG) の作用を検討した結果、MC による AhR 活性化や CYP1A 酵素活性を TBZ が顕著に増強することが改めて示された。一方、RIF による CYP3A 酵素遺伝子の誘導に対しては、TBZ を除いた 3 化合物が抑制効果を示した。したがって、これら食品添加物は、環境中に含まれる種々化学物質による CYP1A あるいは CYP3A 酵素誘導に対して促進または阻害効果を持つことが示唆された。

## A. 研究目的

肝シトクロム P450 (CYP) 分子種のうち、CYP1、CYP2 および CYP3 ファミリー酵素は、外来異物に対する解毒代謝反応の中心を担っている。その一方で、これら酵素は時として、異物の代謝活性化による発がんや肝障害などの毒性発現にも関与することが明らかとなっている。したがって、食品中の化学物質による異物代謝酵素の発現様式を予測することは、これら化学物質の安全性を評価する上で重要である。

本年度は、平成 19 および 20 年度の同研究の結果をもとに、食品添加物が CYP1 および CYP3 ファミリー酵素誘導に及ぼす影響を、培養細胞株を用いて検討した。

## B. 研究方法

### 1) 試験細胞株

① ヒト AhR リガンド検索性細胞株：ラット CYP1A1 遺伝子のプロモーター領域にある AhR 結合配列 (XRE) の 3 回繰り返し配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを導入し、ヒト肝がん培養細胞株 HepG2 に導入した。その後、セレクションおよびスクリーニングを行い、AhR リガンドに対し高い反応性を有する細胞株として株化した HepG2-A10 を使用した。

② ヒト PXR リガンド検索性細胞株：ヒト CYP3A4 遺伝子プロモーターに存在する PXR 結合配列を含んだ 2 か所の転写調節領域 (-7836 ~ -7208 および -362 ~ +53) を、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミド

(phCYP3A4Luc) を作成し、ヒト PXR 強制発現プラスミドとともに HepG2 に導入した。その後、セレクションおよびスクリーニングを行い、PXR リガンドに対し高い反応性を有する細胞株として株化した HepG2-PXRLucA3 を使用した。

### 2) 被検化合物

本研究で使用した化合物の構造を図 1 に示す。CUR (生薬試験用標準品、純度 99%、和光純薬)、TBZ (純度 98%、Sigma)、BHT (純度 99%、Sigma)、および PG (純度 98%、Fluka) をそれぞれ購入し、使用した。また、MC については、98%純度品 (Aldrich) を使用した。各化合物はいずれもジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用した。

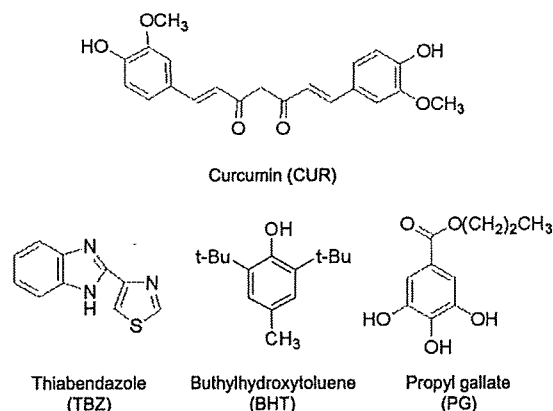


図 1 本研究で用いた被検化合物

### 3) AhR 活性化能の測定

HepG2-A10 細胞を  $2 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> となるように 24 穴プレートに播種し、48 時間前培養した。前培養後、被検化合物を添加し、一定時間培養した。その後、Reporter Lysis Buffer (Promega) を用いて細胞を溶解した。この細胞溶解液にルシフェラーゼ基質液 (東洋インキ) を添

加し、生じた発光をルミネッセンサー PSN (ATTO) により測定した。また、BCA-protein assay kit (PIERCE) を用いて細胞溶解液中の蛋白質濃度を測定し、蛋白質あたりの発光強度を算出した。

#### 4) CYP3A 遺伝子発現量の測定

HepG2-PXRLucA3 細胞を 60mm dish で培養し、被験化合物を添加して一定時間培養後、Total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン) により単離した。この Total RNA より、ランダムヘキサマーと MMLV-逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。この cDNA に、遺伝子特異的なプライマーセット (ヒト CYP3A4 または GAPDH) および SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、7300/7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) によりリアルタイム PCR を行った。さらに、CYP3A4 遺伝子の発現量を GAPDH 遺伝子の発現量で除することにより標準化した。

#### 5) CYP3A 酵素アッセイ

本研究では、CYP3A 酵素活性を p450-Glo CYP3A4 assay kit (Promega 社) により測定した。本キットは、CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 の基質となる Luciferin-6'-pentafluorobenzyl ether の脱アルキル化を酵素活性の指標とするものである。

HepG2-PXRLucA3 細胞を 96well plate で培養し、各化合物を添加して一定時間培養した。細胞を洗浄後、50 $\mu$ M の基質を含む無血清培地を 60  $\mu$ L/well の割合で加え、37°C で 4 時間培養した。その後、

上清 50  $\mu$ L をとり、50  $\mu$ L の Luciferin Detection Reagent と混合し、代謝物に由来する発光を測定した。また、各 well に残存した細胞の溶解液を調製し、蛋白質濃度を測定することにより、蛋白質あたりの酵素活性を算出した。

#### 6) 倫理面への配慮

申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。また、使用した薬品のうち有害物質を含むものについては、環境への拡散がないように注意した。

### C. 研究結果

#### 1) AhR 活性化に及ぼす食品添加物の影響

平成 19 年度の同研究の結果より、本研究で使用する 4 種の食品添加物 (CUR、TBZ、BHT、PG) はいずれも単独では AhR を活性化しないこと、また、AhR リガンドである 3-メチルコランスレン (MC) の共存下、CUR、TBZ、BHT は MC による AhR 活性化を増強することが明らかとなっている。そこで、被験化合物処理時の AhR 活性化の経時的変化を測定し、その時間—曲線下面積 (AUC) を算出し、活性化の度合いを評価した。

まず、各種濃度の MC を処理したところ、0.01  $\mu$ M および 0.1  $\mu$ M では 6 時間、1  $\mu$ M では 12 時間で AhR 活性化がピークとなり、その後減少に転じた。処理後 48 時間までの AhR 活性化における AUC 値 (RLU $\cdot$ h) は、0.01  $\mu$ M、0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M 処理群でそれぞれ対照群の 2.14 倍、5.04



倍、11.20 倍となった。一方、被験化合物の単独処理時の AUC は、対照群と比較して CUR で 1.62 倍、TBZ で 2.55 倍、BHT で 0.88 倍、PG で 1.43 倍となった。

次に、MC (0.1  $\mu\text{M}$ ) と被験化合物 (10  $\mu\text{M}$ ) を組み合わせて処理し、AhR 活性化の経時変化を測定した。

CUR+MC 処理群では、MC 単独処理群と比較して AhR 活性化のピークに遅延が見られ (6 時間  $\rightarrow$  24 時間)、AUC 値は 1.62 倍 (対照群の 8.19 倍) となったが、最大値に変化は見られなかった。

TBZ+MC 処理群では、MC 単独処理群と比較してピークの遅延 (6 時間  $\rightarrow$  12 時間)、および最大値の増加が認められた。また、12 時間以降の全ての時間において AhR 活性化の増強が見られ、AUC 値は 2.41 倍 (対照群の 12.16 倍) に増大した。

PG+MC 処理群では、6 時間までは MC 単独処理群と同程度の活性化を示した。単独処理群では 12 時間以降で AhR 活性化が経時的に減少したが、PG+MC 処理群ではその減少が軽微であり、AUC 値は MC 単独処理群の 1.57 倍 (対照群の 7.89 倍) となった。

BHT+MC 処理群では、AhR 活性化の経時変化パターンは MC 単独処理群とほぼ同一であり、AUC 値は MC 単独処理群の 0.91 倍 (対照群の 4.59 倍) となった。

## 2) CYP3A4 サブファミリー酵素遺伝子発現に及ぼす食品添加物の影響

平成 20 年度の同研究において、我々は 4 種の食品添加物 (CUR、TBZ、BHT、PG) はいずれも単独ではヒト PXR を活性化しないこと、また、10  $\mu\text{M}$  のリファ

ンピシン (RIF) 処理時に見られるヒト PXR 活性化に対して CUR、BHT、PG は抑制作用を、また TBZ は増強作用を持つ可能性を明らかとしている。そこで、HepG2-PXRLucA3 に対して、RIF (10  $\mu\text{M}$ ) と被験化合物 (10  $\mu\text{M}$ ) を組み合わせて処理し、CYP3A4 遺伝子発現量を RT-PCR 法により測定した。

食品添加物の単独処理では、いずれの被験化合物を処理した場合にも CYP3A4 遺伝子の発現誘導は見られなかった。また、RIF との複合暴露により、CUR+RIF 処理群で 0.82 倍 (対照群の 3.1 倍)、TBZ+RIF 処理群で 1.00 倍 (対照群の 3.7 倍)、PG+RIF 処理群で 0.82 倍 (対照群の 3.1 倍)、BHT+RIF 処理群で 0.73 倍 (対照群の 2.8 倍) となり、TBZ 以外では CYP3A4 発現の減少傾向が認められた。

## 3) CYP3A サブファミリー酵素活性に及ぼす食品添加物の影響

ここまでの検討より、RIF 処理による PXR 活性化および CYP3A4 遺伝子発現誘導に食品添加物が影響を与えることが確認された。そこで、HepG2-PXRLucA3 に対して、RIF (10  $\mu\text{M}$ ) と被験化合物 (1-100  $\mu\text{M}$ ) を組み合わせて処理し、CYP3A 酵素活性を p450-Glo assay により測定した。

各化合物の単独処理群の中では唯一、100  $\mu\text{M}$  PG 処理群において対照群の 1.67 倍と活性増加が見られた。一方、10  $\mu\text{M}$  RIF との複合暴露では、PG (100  $\mu\text{M}$ ) +RIF 処理群において 1.67 倍 (対照群の 2.90 倍) と活性増加が見られた。他の化合物については、活性はわずかながら増加させる傾向にあったものの、単独処理、

あるいは RIF との複合処理いずれの場合でも、CYP3A 酵素活性に影響を与えなかった。

#### D. 考察

平成 19 および 20 年度の結果を踏まえ、本研究では 4 種の食品添加物による CYP1 および CYP3A サブファミリー酵素誘導性を 2 種のレポーター細胞株を用いて詳細に検討した。

まず、HepG2-A10 細胞を用いて、CYP1A 酵素誘導の指標となる AhR 活性化の経時変化を解析し、その AUC を算出することにより、その機構解析を目指した。

MC の濃度依存的にピーク時間が後方へとシフトし、また AUC が増加することから、これら現象は細胞内の MC 濃度が増加することによる可能性が示唆された。TBZ 存在下では、0.1  $\mu\text{M}$  MC による AhR 活性化が著しく増強されたが、この TBZ+MC 群でみられた AhR 活性化の経時変化は 1  $\mu\text{M}$  MC 処理群のそれと酷似しており、TBZ の存在下では細胞内 MC 濃度が増加している可能性が示唆された。

一方、CUR 存在下では、AUC の増加は観察されたにも関わらず AhR 活性化の最大値に変化は見られなかった。これまでの報告では、CUR は TCDD による AhR 活性化に対して抑制作用を示すことが報告されている。本研究でも、反応早期（6 時間以前）において、MC による AhR 活性化は CUR 存在下で低値を示すことから、これまでの報告と同様、CUR は AhR 活性化に対して抑制的に働いていることが示唆された。一方、反応後期（12 時間

以降）において CUR は、AhR 活性化のネガティブフィードバックに対して拮抗的に働き、結果的に AhR 活性化を増強しているものと考えられた。

PG 存在下においても、AUC の増加が観察されるが、反応早期（6 時間以前）には、AhR 活性化パターンは MC 単独処理群と MC+PG 処理群間ではほとんど同一であることから、PG は AhR 活性化の初期過程には影響しないことが示唆される。一方、反応後期（12 時間以降）では、PG は AhR 活性化を長時間維持させる。これらの結果より、PG は AhR の活性化を総合的に増強することが示唆された。

次に HepG2-PXRLucA3 を用いて、CYP3A 酵素誘導に対する食品添加物の影響について検討した。昨年度の PXR 活性化の結果と同様に、CUR、PG および BHT は RIF による CYP3A4 遺伝子発現を抑制していることが示唆された。したがって、これら化合物はヒト PXR の活性化に対して拮抗的に働き、CYP3A 酵素誘導を抑制していることが示唆された。

一方、TBZ は RIF による PXR 活性化を増強するにも関わらず、CYP3A4 遺伝子の発現にはほとんど影響を与えなかった。昨年度の本細胞を用いた検討では、低レベルの PXR 活性化を惹起する化合物では、CYP3A4 遺伝子誘導がほとんど見られないケースも見られており、TBZ もこれら化合物と同様、PXR 活性化を優先的に引き起こしている可能性が考えられた。

また、p450-Glo を用いた CYP3A 酵素活性の測定結果からは、PG は高濃度域において酵素活性を増加させるものと思

われた。一方、他の化合物には CYP3A 酵素の活性に対する直接的な作用はないことが示された。

なし

#### E. 結論

本研究ではヒト AhR あるいは PXR 活性化を測定可能なレポーター細胞株を用いて、食品中の化学物質（4種の食品添加物）が CYP1A および CYP3A 酵素誘導に及ぼす影響を評価した。その結果、各食品添加物には CYP1A および 3A 酵素の発現誘導に影響を及ぼす性質があることが示唆された。また、その機構は一様でなく、化合物毎に異なる可能性が示唆され、化学物質の複合影響を考える場合には各化合物の特徴を踏まえた詳細な解析が必要と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

関本征史、佐野慎亮、根本清光、西川秋佳、出川雅邦：食品添加物のヒト PXR 活性化能：ヒト PXR 活性化物質検索用レポーター細胞株 HepG2-PXRLucA3 を用いた解析  
第 36 回日本トキシコロジー学会（盛岡）、2009 年 7 月 6-7 日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題： 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  
「クロロゲン酸およびカフェイ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： 齊藤貢一 星薬科大学 薬品分析化学教室  
研究協力者： 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電子スピン共鳴装置（ESR）によって検討した。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 Prooxidant 作用が減弱し Antioxidant 作用が上昇した。DNA 酸化指標として 8-OHdG を測定したところ、ESR で得られた結果と同様にフェノール性化合物では DNA の酸化が認められ、ニトロ化を受けることで、作用が減弱した。

A. 研究目的

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。そのため、茶葉に含まれるカテキン類やコーヒーなどに多く含まれるクロロゲン酸およびカフェイン酸（CFA）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、近年、注目されている。しかし、フェノー

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されてお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、胃酸酸性条件下でフェノール性化合物と反応してニトロ化を引き起こすことが考えられる。

そこで、平成 21 年度ではクロロゲン酸および CFA と  $\text{NaNO}_2$  を併用することにより生成されるニトロ化合物について、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。

## B. 研究方法

### B-1. 人工胃液中におけるフェノール性化合物と $\text{NaNO}_2$ の反応

フェノール性化合物と  $\text{NaNO}_2$  の反応生成物の標準品を得るためにクロロゲン酸および CFA と  $\text{NaNO}_2$  をそれぞれ人工胃液中で反応を行った。フェノール性化合物 1 mmol に対し、亜硝酸ナトリウムを 5 mmol 加え、0.1 M 塩酸条件下で反応を行い、その後、酢酸エチルを用いて液液分配抽出を行った。エバポレーターで酢酸エチル相を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製を行い、高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) および核磁気共鳴装置 (NMR) によって構造解析を行なった。

### B-2. 電子スピン共鳴装置 (ESR) による Antioxidant 作用および Prooxidant 作用の評価

電子スピン共鳴装置は JEOL 製 JES-RE1X ESR spectrometer を使用した。Antioxidant 作用を評価するためのスピントラッピング剤には 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) を使用し、Prooxidant 作用では、 $\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitron (4-POBN) を用いた。

### B-3. 酸化ストレス評価のための 8-OHdG の測定

高速液体クロマトグラフ-紫外吸光度検出-電気化学検出器 (HPLC-UV-ECD)

を使用した。UV 検出器は島津製作所社製 SPD-10AV<sub>VP</sub> を用い、電気化学検出器は ESA 社製 Coulochem III を使用した。UV 検出器の測定波長は 290 nm、ECD の印加電圧は 300 mV に設定した。分離カラムは Inertsil ODS3 (150 × 4.6 mm) を使用し、移動相は 20 mM リン酸 2 水素 1 ナトリウム : メタノール = 97 : 3 を用いた。

## C 研究結果

### C-1. 人工胃液中におけるフェノール性化合物と $\text{NaNO}_2$ の反応

フェノール性化合物のニトロ化体の標準品が市販されていないことから合成を試みた。得られた化合物を LC/MS および NMR で確認したところ、Fig. 1 に示すように CFA がニトロ化を受けた化合物 1,2-(4*H*)-benzoxazin-4-one、2-oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2,5-oxadiazole の生成を確認した。

### C-2. ESR による Antioxidant 作用および Prooxidant 作用の評価

活性酸素種生成を評価する方法として、現在までにさまざまな方法がある。その中でも ESR を用いた方法はラジカルを直接測定できることから、信頼性の高い方法と考えられる。ニトロ化を受けたフェノール性化合物が活性酸素種生成に及ぼす影響を調べるために、汎用性の高いスピントラッピング剤である 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) を用い、Prooxidant 作用を評価した。しかし、Fig. 2 に示すとおり、DMPO は銅を添加することで、ヒドロキシラジカルの生成が認められたが、DMSO を併用することで、メチルラジカルの生成を

確認することができなかった。このことから、DMPOは銅と反応することで、ヒドロキシラジカルに類似したスペクトルを描写するため、活性酸素種生成の評価が困難であることが分かった。そこで、新たな活性酸素種測定方法としてスピントラッピング剤に

$\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron を用いた方法を検討した。既存の方法であるDMPOとPOBNを比較したところ、ヒドロキシラジカル発生量に相関性が認められたことから、DMPOに代わるヒドロキシラジカルの測定法の構築ができた (Fig. 3)。

構築した方法を用い、フェノール性化合物 (CFA、ニトロカフェイン酸、クロロゲン酸およびニトロクロロゲン酸) と金属 (鉄および銅) と反応させたところ、フェノール性化合物と銅との反応において、ヒドロキシラジカルの生成を確認した。また、ニトロ化を受けることでヒドロキシラジカルの生成量が減少する結果が得られた (Fig. 4)。

他方、Antioxidant作用については、全てのフェノール性化合物について、スーパーオキシドラジカルの消去を確認し、特にニトロ化を受けた化合物においては、ヒドロキシラジカルの消去も確認された (Fig. 5)。

これらの結果より、フェノール性化合物はニトロ化を受けることでAntioxidant作用が増強し、活性酸素種生成量を減少させることが示唆された。

### C-3. 酸化ストレス評価のための 8-OHdG の測定

前項で示唆された活性酸素種生成につい

て生体内でも同様の結果が得られるか評価するために、DNA酸化の指標である8-OHdGの測定を試みた。その結果、ESRで得られた結果と同様に、フェノール性化合物と銅を併用することで、8-OHdG量の増加が認められ、ニトロ化を受けることで減少することが分かった (Fig. 6)。

### D. 考察

クロロゲン酸およびCFA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す結果が得られた。フェノール性化合物のニトロ化は構造によってベンゼン環が直接ニトロ化を受ける場合と、側鎖に受ける場合がある。ベンゼン環がニトロ化を受ける場合、電子密度が大きく変化すると考えられ、ヒドロキシラジカルに代表される反応性が高い分子種はベンゼン環に結合するものと考えられる。

他方、CFAのニトロ化のように側鎖に起こった場合、不安定な構造になることが考えられ、活性酸素種生成には寄与しないが、活性窒素種の生成を引き起こす可能性がある。活性窒素種は活性酸素種と反応することでペルオキシナイトライドなど反応性の高い分子種に変化することが知られていることから、活性窒素種生成についても調査する必要があると考えられる。

### E. 結論

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およびCFA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。

まず、ニトロ化合物が胃酸条件下で進行し、ニトロクロゲン酸およびニトロカフェイン酸の生成を確認した。

次に、フェノール性化合物と金属の反応を評価するために ESR を用いた新たな評価法の開発を行った。

最後に ESR で得られた結果との同一性を確認するために DNA 酸化指標である 8-OHdG の測定を試みた。

これらの結果から、フェノール性化合物と  $\text{NaNO}_2$  を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化が引き起こされ、ニトロ化を受けた化合物は Antioxidant 作用が増強することが示唆された。また、Prooxidant 作用についてもニトロ化を受けることで減少した。これらの結果を踏まえ、DNA への酸化を評価したところ、ESR と同様の結果が得られた。

本研究の結果から、生体内でニトロ化を受けた新たに生成される化合物について ROS 生成量は減少することが示唆されたが、生体への影響を考える上で、他の毒性評価も行うことが必要と考えられる。

## F. 研究発表

### 学会発表

岩崎 雄介、斉藤 勇介、石井 雄二、伊藤 里恵、斉藤 貢一、西川 秋佳、中澤 裕之. ク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. 第58回分析化学会年会 (2009年9月・北海道)

## G. 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

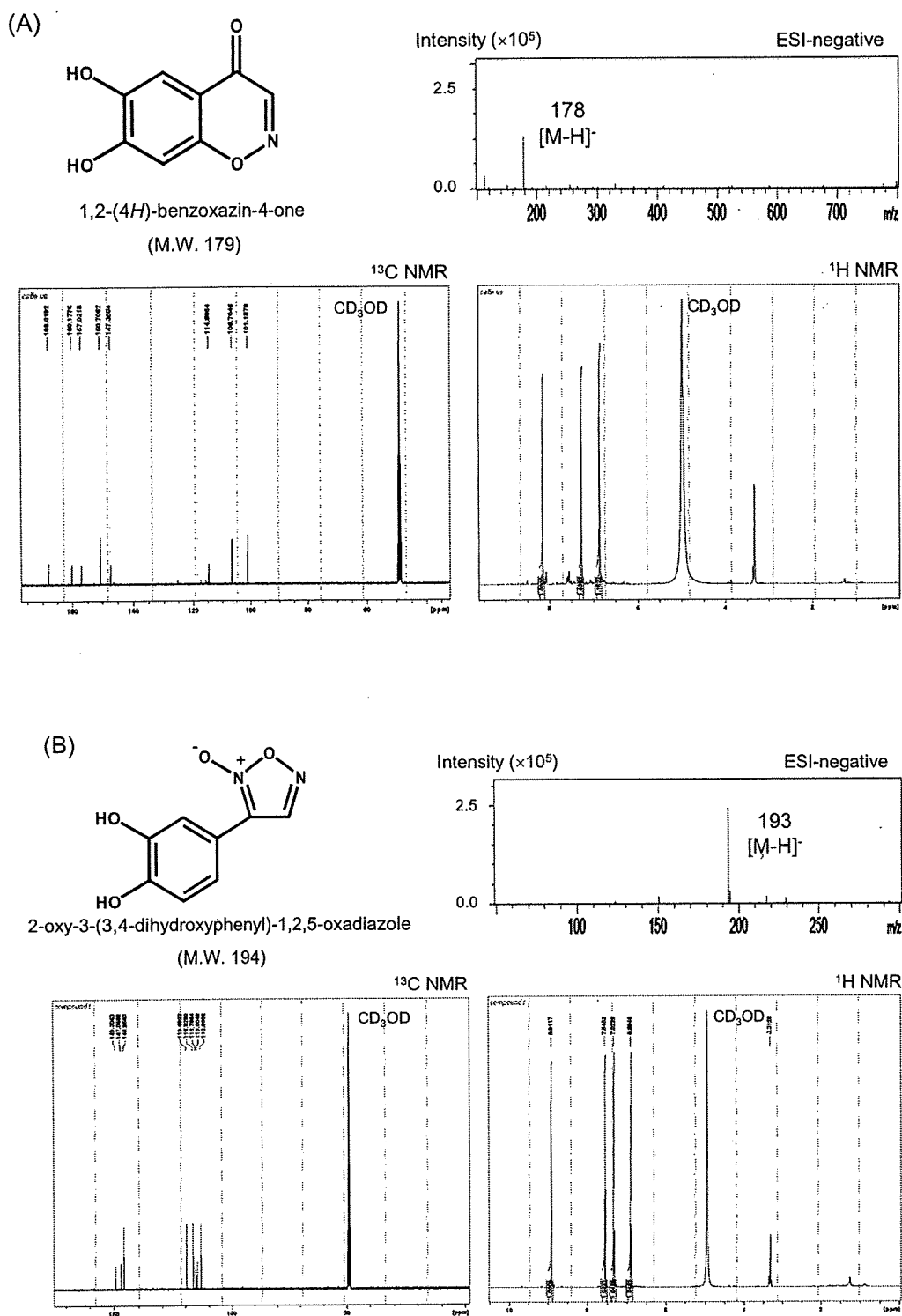


Fig. 1 Mass, <sup>13</sup>C-NMR and <sup>1</sup>H NMR spectra of nitrated caffeic acid



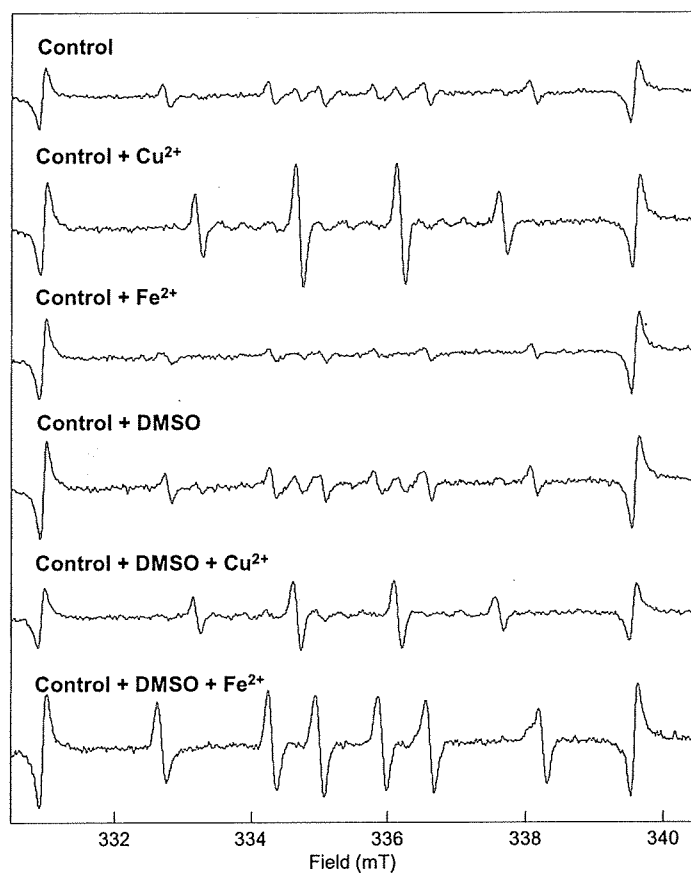


Fig. 2 Effect of metal ion for the determination of hydroxyl radical by DMPO reagent

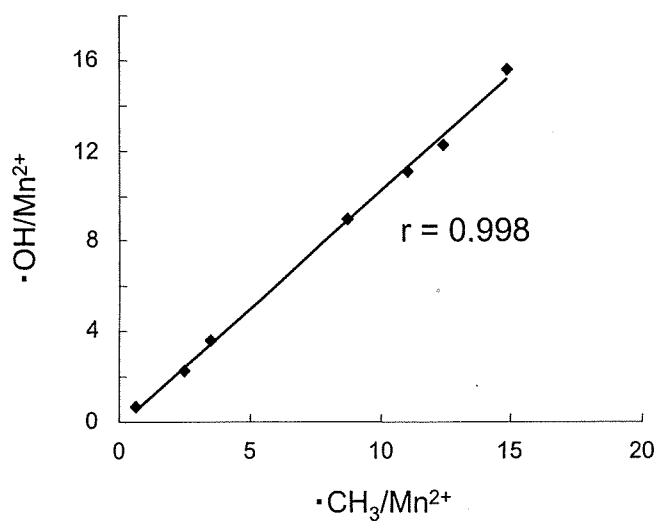


Fig.3 Comparison of DMPO-OH and POBN-CH<sub>3</sub> method for the determination of hydroxyl radical

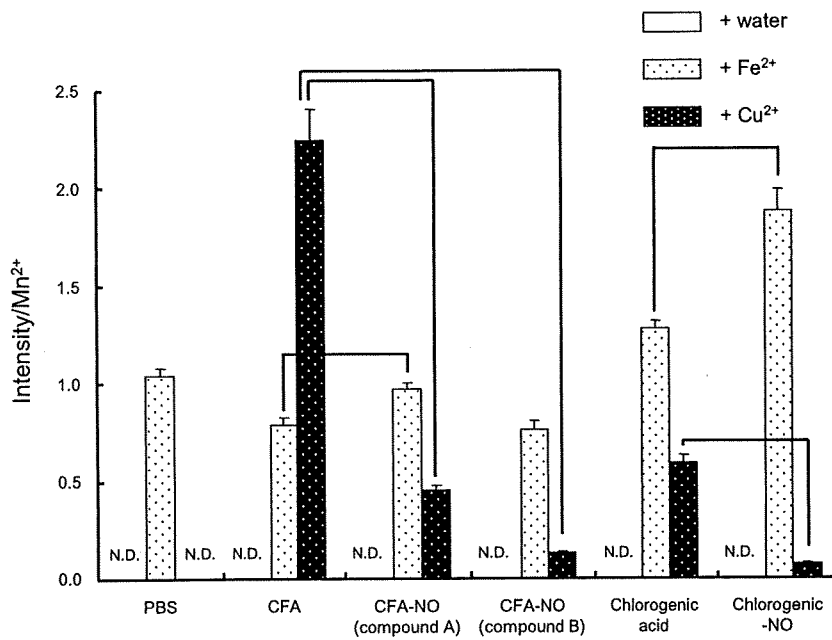


Fig. 4 Comparison of prooxidant ability for phenolic compounds

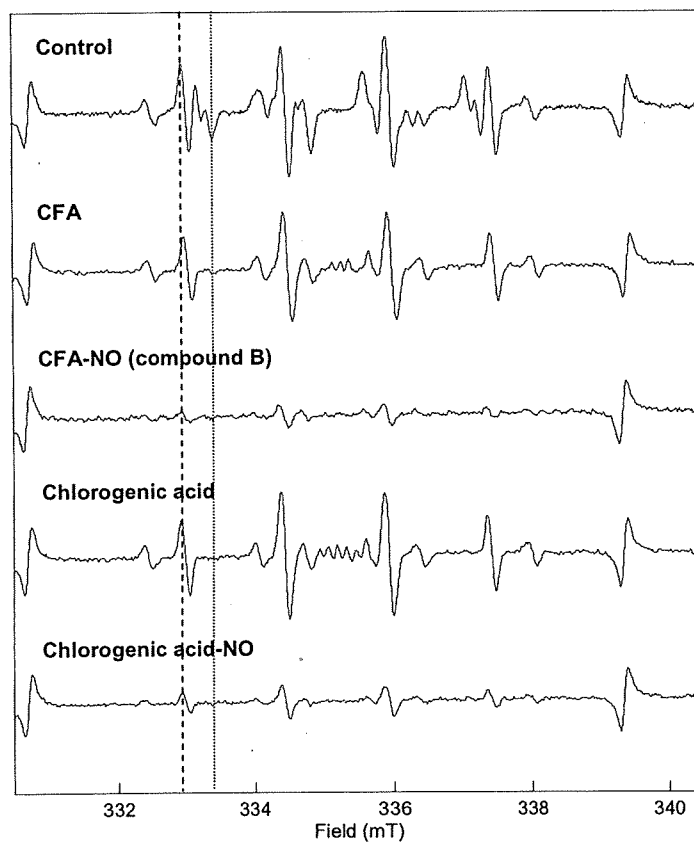
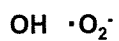


Fig. 5 Effect of antioxidant ability on nitration for phenolic compounds

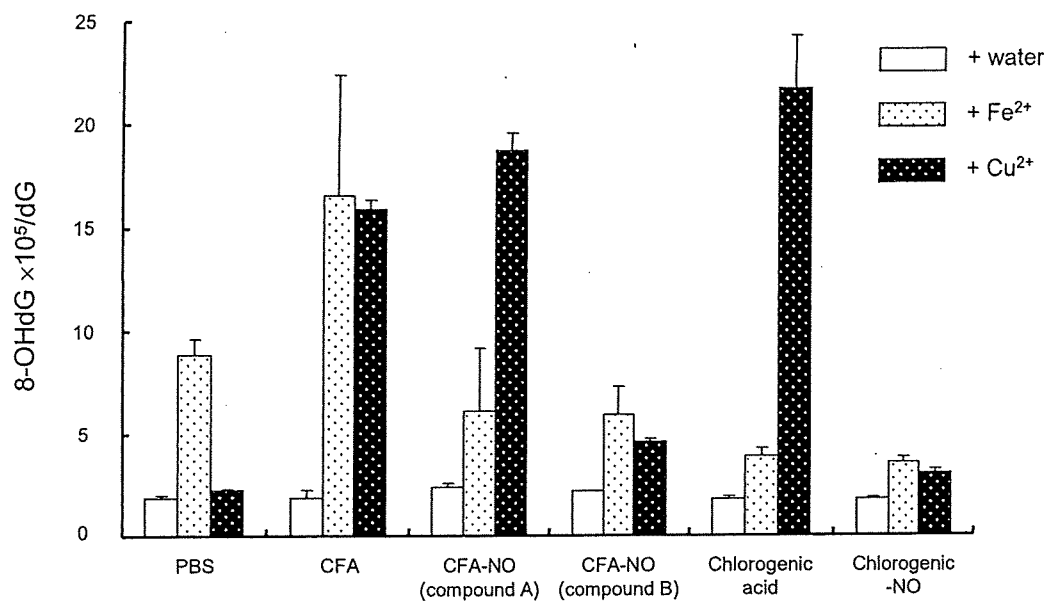


Fig. 6 Determination of deoxyguanosine (dG) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in calf thymus DNA for the assessment of oxidative stress

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 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
	該当なし						

## 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
Kim M, Miyamoto S, Yasui Y, Oyama T, Murakami A, Tanaka, T.	Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice.	Int. J. Cancer	124	264-271	2009
Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T.	Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides.	Toxicology	261	152-161	2009
Tasaki M, Umemura T, Kijima A, Inoue T, Okamura T, Kuroiwa Y, Ishii Y, Nishikawa A.	Simultaneous induction of non-neoplastic and neoplastic lesions with highly proliferative hepatocytes following dietary exposure of rats to tocotrienol for 2 years.	Arch. Toxicol.	83	1021-1030	2009
Ishii Y, Okamura T, Inoue T, Tasaki M, Umemura T, Nishikawa A.	Dietary catechol causes increased oxidative DNA damage in the livers of mice treated with acetaminophen.	Toxicology	263	93-99	2009
Takahashi M, Shibutani M, Nakahigashi J, Sakaguchi N, Inoue K, Morikawa T, Yoshida M, Nishikawa A.	Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods.	Arch. Toxicol.	83	785-793	2009