

価する上で重要である。

本研究では、食品中に含まれる化学物質として肝異物代謝に影響を及ぼす可能性が示されている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))に着目し、これら化合物の単独あるいはCYP誘導剤との複合暴露がヒトCYP1AおよびCYP3Aサブファミリー酵素発現に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

1) 試験細胞株

①ヒトAhRリガンド検索用細胞株: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リガンド検索用細胞株: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) 被験化合物

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。

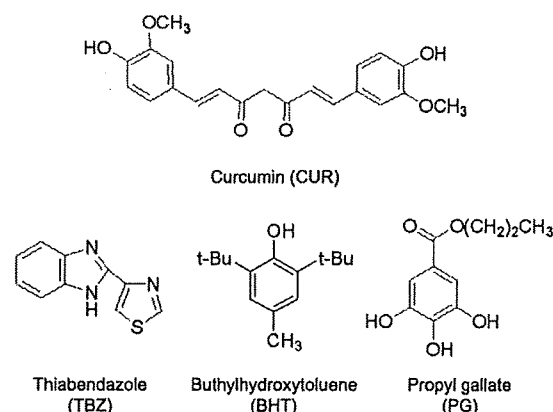


図1 本研究で用いた被験化合物

3) AhRおよびPXR活性化の測定

ヒトAhR活性化の測定にはHepG2-A10細胞を、ヒトPXR活性化の測定にはHepG2-PXRLucA3細胞をそれぞれ使用した。各細胞を 2×10^4 cell/cm²となるように播種し、48時間前培養後、被験化合物を添加した。一定時間経過後、Reporter Lysis Buffer (Promega)を用いて細胞溶解液を調製し、これをルシフェラーゼ基質液(東洋インキ)と混和することで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) 遺伝子発現量の測定

各細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように播種し、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 に各種遺伝子 (CYP1A1、CYP1A2、CYP3A4 または GAPDH) に特異的なプライマーと Power SYBR PCR 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、各遺伝子の発現量を GAPDH 遺伝子の発現量で除することにより標準化した。

5) 酵素活性の測定

CYP1A 酵素の代表的な基質として知られるエトキシレゾルフィン (ER) を用い、その脱エチル化活性 (EROD 活性) を指標として、CYP1A 酵素活性を測定した。また、CYP3A 酵素活性を p450-Glo CYP3A4 assay kit (Promega) により測定した。

各細胞を 24well または 96well plate に播種し、各化合物を添加して一定時間培養した。細胞を洗浄後、基質を含む無血清培地を加え、37°C で培養した。反応終了後、上清を回収し、必要に応じて発光試薬を添加し、代謝物に由来する蛍光または発光を測定した。さらに、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

HepG2-A10 細胞株を用いた研究

1) AhR 活性化に及ぼす食品添加物の影響

まず、HepG2-A10 細胞に対して被験化合物 (1-100 μM) を単独で 24 時間処理し、AhR 活性化に及ぼす影響を検討した。

その結果、TBZ (10 μM、100 μM) 処理群では、有意な AhR の活性化が認められたが、CUR、BHT あるいは PG 処理群では、いずれの濃度においても AhR の活性化は認められなかった。

2) 食品添加物の複合暴露が AhR 活性化に及ぼす影響

4 種の食品添加物のうち 2 種 (各 10 μM) を組み合わせて 24 時間処理した場合の AhR 活性化に及ぼす影響について検討した。

その結果、TBZ と他の被験化合物のそれぞれ複合暴露群において、TBZ 単独処理群と同程度の AhR 活性化が認められたが、他の組み合わせ処理による有意な AhR の活性化は認められなかった。

3) AhR リガンド (MC) と食品添加物との複合暴露が AhR 活性化に及ぼす影響

環境中には様々な AhR リガンドが存在

しており、食品添加物との相互作用の有無に興味を持たれる。そこで、AhR リガンドである MC (0.01-1 μM) と食品添加物 (10 μM) を組み合わせて 24 時間処理し、AhR 活性化に及ぼす影響を検討した。

0.01 μM MC 存在下では TBZ と PG が、0.1 μM MC 存在下では CUR と TBZ が、また 1 μM MC 存在下では CUR と TBZ が、それぞれ MC による AhR 活性化を有意に増強した。一方、BHT はいずれの濃度の MC に対しても増強効果を示さなかった。

4) MC と食品添加物との複合暴露が CYP1A 酵素遺伝子発現に及ぼす影響

次に、MC (0.1 μM) と食品添加物 (10 μM) を組み合わせて 24 時間処理し、CYP1A 酵素遺伝子 (CYP1A1 および CYP1A2) の発現に及ぼす影響について検討した。

食品添加物はいずれも単独では CYP1A 酵素遺伝子の発現を誘導しなかったが、MC 存在下では TBZ 処理 (すなわち MC+TBZ 処理) において、MC 単独処理群と比べて有意な誘導が観察された。

5) AhR 活性化および CYP1A 酵素誘導における TBZ の濃度依存性についての検討

次に、MC (0.1 μM) と TBZ (1-100 μM) を組み合わせて 24 時間処理し、AhR 活性化ならびに CYP1A 酵素活性誘導に及ぼす濃度依存性について検討した。

AhR 活性化、CYP1A 酵素活性いずれにおいても TBZ 単独による誘導作用は見られなかったが、0.1 μM MC 存在下では 3 μM TBZ より濃度依存的な AhR 活性化ならびに CYP1A 酵素活性の上昇が観察された。

6) 食品添加物処理時における AhR 活性化の経時変化

各食品添加物処理時の AhR 活性化の経時変化を測定し、その時間—曲線下面積 (AUC) を算出することで、活性化の度合いを評価し、機構解析の一助とした。

まず、各種濃度の MC を処理したところ、0.01 μM および 0.1 μM では 6 時間、1 μM では 12 時間で AhR 活性化がピークとなり、その後減少した。処理後 48 時間までの AhR 活性化における AUC 値 (RLU \cdot h) は、濃度依存的に増加した。一方、被験化合物の単独処理群では、CUR、TBZ および PG で AUC 値のわずかな増加が見られた。

次に、MC (0.1 μM) と食品添加物 (10 μM) を組み合わせて処理し、AhR 活性化の経時変化を比較した。CUR+MC、TBZ+MC および PG+MC 処理群において、MC 単独処理群と比べて AUC 値の増加が見られ、その中でも TBZ+MC 処理群が最も高値を示した。CUR+MC 処理群では、AhR 活性化のピークに遅延が見られた。TBZ+MC 処理群では、MC 単独処理群と比較してピークの遅延、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た。また、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、また 12 時間以降で起こる AhR 活性化の減少が緩やかであった。

HepG2-PXRLucA3 を用いた研究

7) PXR 活性化に及ぼす食品添加物の影響

HepG2-PXRLucA3 細胞に対して各被験

化合物 (1-100 μM) を単独で 24 時間処理し、PXR 活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、TBZ は僅かではあるが有意な PXR の活性化を惹起した。また、4 種の食品添加物のうち 2 種 (各 10 μM) を組み合わせて 24 時間処理した場合には、いずれの組み合わせの場合にも、単独処理の場合と同程度の PXR 活性化しか認められなかった。

8) PXR リガンド (RIF) と食品添加物との複合暴露が PXR 活性化に及ぼす影響

医薬品の多くは PXR リガンドになりうるものと考えられていることから、食品添加物との相互作用の有無に興味を持たれる。そこで、PXR リガンドである RIF (10 μM) と食品添加物 (1-100 μM) を組み合わせて 24 時間処理し、PXR 活性化に及ぼす影響を検討した。

その結果、RIF による PXR 活性化は高濃度 (10 μM 以上) の CUR、BHT および PG の存在下有意に抑制された。その一方、TBZ は、RIF による PXR 活性化をいずれの濃度においても増強した。

9) RIF と食品添加物との複合暴露が CYP3A 酵素遺伝子発現に及ぼす影響

次に、RIF (10 μM) と各被験化合物 (10 μM) を組み合わせて 24 時間処理し、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、いずれの被験物質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 による PXR 活性化は CUR、BHT および PG の存在下、その発現が抑制される傾向が見

られた。

10) RIF と食品添加物との複合暴露が CYP3A 酵素活性に及ぼす影響

最後に、HepG2-PXR_{LucA3} に対して、RIF (10 μM) と各被験化合物 (1-100 μM) を組み合わせて処理し、24 時間後の CYP3A 酵素を p450-Glo assay により測定した。

各化合物の単独処理時には、100 μM PG 処理群においてのみ活性増加が見られた。また、10 μM RIF との複合暴露では、PG (100 μM) +RIF 処理群において有意な活性増加が見られた。一方、他の化合物については、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

本研究では、2 種のレポーター細胞株を用いて、食品添加物であり、かつ肝 CYP 分子種の発現変動を引き起こす事が知られている CUR、TBZ、BHT および PG の CYP1A および CYP3A 酵素誘導に及ぼす影響を評価した。その結果、用いた被験化合物いずれも、単独では強い作用を示さないものの、それぞれの誘導剤と組み合わせて処理することにより、CYP1A および CYP3A 酵素誘導に対して増強あるいは阻害効果を示すことが明らかとなった。

CYP1A 酵素誘導に及ぼす影響

CUR は MC による AhR 活性化 (CYP1A 酵素誘導) に対して、早期 (6 時間以前) では抑制作用を、また後期 (12 時間以降) では増強作用を示した。CUR は AhR 依存

的に CYP1A1 遺伝子の発現を増加させる一方で、TCDD による CYP1A 酵素誘導や AhR 活性化を阻害することが示されている。本研究の結果から、これらは CUR の持つ作用が早期と後期で異なっていることに起因するものと考えられた。

TBZ は単独でも AhR 活性化能を有し、また MC による AhR 活性化を著しく増強した。さらに、AhR 活性化の経時変化から、TBZ は MC の細胞内濃度を増加させる可能性が考えられた。これまでの知見より TBZ は AhR に直接結合することなく間接的に AhR を活性化し、CYP1A 遺伝子の発現を誘導する事が知られている。しかし、AhR リガンドによる相乗的な CYP1A 酵素誘導や、相乗的な AhR 活性化についての報告は見当たらないため、*in vivo* での相乗作用の有無、あるいは相乗作用に伴った毒性発現などについて更なる検討が必要である。

BHT は単独、あるいは MC 存在下いずれの場合にも AhR 活性を変化させなかった。BHT にはマウス肝で CYP1A 酵素を誘導することが報告されているが、*in vitro* 培養細胞における誘導性は報告されていない。比較的分子量の小さな CYP1A 酵素誘導剤は *in vivo* 特異的な誘導作用を示すことが知られており、BHT も *in vivo* 特異的な CYP1A 酵素誘導剤である可能性が考えられた。

PG は MC 存在下、AhR 活性化を増強した。また、AhR 活性化の経時変化から、この増強作用は AhR 活性化の維持作用によるものと考えられた。活性化した AhR は通常、AhR タンパク分解（ユビキチン化）や抑制因子 AhRR の発現促進により抑制をうけ、その活性が低下することが知られている。

このことから、PG はこれら機構に対して拮抗的に働いている可能性が考えられた。

CYP3A 酵素誘導に及ぼす影響

CUR、PG、BHT はいずれも、RIF による PXR 活性化に対して抑制効果を示した。これまでに CUR がヒト初代肝細胞において PXR 活性化を介して CYP3A4 遺伝子の誘導作用を示すことが報告されている他に、CYP3A 酵素誘導との関わりは明らかとされておらず、その機構に興味を持たれた。

TBZ は単独で PXR 活性化能を示し、また RIF による PXR 活性化に対して増強作用を示した。これまでに、TBZ の単独処理によるヒト CYP3A 酵素誘導や PXR 活性化については既に報告されており、本研究の結果はこれを一部支持するものであった。また、RIF による PXR 活性化に対する TBZ の増強作用にも興味を持たれる。その一方で、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場合も確認されており、TBZ もこれら化合物と同様、PXR 活性化を引き起こすものの CYP3A 酵素誘導にはあまり影響しない化合物であ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ようものと思われた。一方、CYP3A 酵素活性に及ぼす他の化合物の影響はほとんど見られなかった。したがって、食品添加物は、PXR 活性化および CYP3A4 遺伝子発現レベルとは異なった、転写以外のレベル、すなわち翻訳過程や酵素反応の過程で CYP3A 酵素に何らかの影響を及ぼしているものと思われた。

E. 結論

本研究では、化合物のヒト AhR あるいは PXR 活性化能を評価できるレポーター細胞株 (HepG2-A10 及び HepG2-PXRLucA3) を樹立し、これら細胞株を用いて、4 種の食品添加物の 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

1) 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

2) 佐野慎亮、関本征史、矢部香織、根本清光、出川雅邦：ヒト PXR 活性化物質検索用レポーター細胞株 HepG2-PXRLucA3 の樹立 日本薬学会 129 年会（京都）、2009 年 3 月 28 日

3) 佐野慎亮、関本征史、矢部香織、根本清光、出川雅邦：ヒトプレグナン X 受容体活性化物質検索用レポーター細胞株の樹立

平成 20 年度日本薬学会東海支部例会（静岡）、2008 年 12 月 5 日

4) 関本征史、根本清光、西川秋佳、出川雅邦：3-メチルコラントレンによる HepG2 細胞での CYP1A 酵素誘導に及ぼす食品添加物の影響 第 35 回日本トキシコロジー学会（東京）、2008 年 6 月 26 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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）

分担総合研究報告書

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
「フェノール性化合物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
研究分担・協力者	斉藤貢一	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。他方、亜硝酸ナトリウム（ NaNO_2 ）は食品添加物として使用されていることから、それぞれの化合物を併用することで、生体内でニトロ化反応を引き起こすことが考えられる。

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、ニトロ化反応によるラジカル発生能（Prooxidant）および抗酸化（Antioxidant）作用に及ぼす影響を検討した。その結果、Prooxidant 作用は上昇するが、Antioxidant 作用も上昇することから、フェノール性化合物はニトロ化反応を受けることによって Prooxidant 作用が減弱する結果が得られた。

A. 研究目的

活性酸素種（ROS）は動脈硬化、心疾患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いる。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更なる詳細な研究が要求されている。

他方、亜硝酸ナトリウム（ NaNO_2 ）は発色剤として食品添加物で使用されているが、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反応を引き起こすことが考えられる。

本研究では、クロロゲン酸および CFA と 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 vivo* および *in vitro* の系で検証した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

ピロカテコール (CAT)、1,2-ジヒドロキシ-4-ニトロベンゼン (4-ニトロカテコール: NO_2 -CAT)、3,4-ジヒドロキシけい皮酸 (カフェイン酸: CFA)、亜硝酸ナトリウム (NaNO_2)、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG)、プロテアーゼ K、ヌクレアーゼ P1、ワコーシル[®]C-200 および HPLC 用アセトニトリルは和光純薬工業社製を用いた。クロロゲン酸水和物は東京化成工業社製を使用した。硫酸銅 (II) 五水和物、酢酸エチルおよびトルエンは関東化学社製を用いた。2'-デオキシグアノシン (dG)、牛胸腺 DNA およびアルカリホスファターゼは Sigma-Aldrich 社製を使用した。精製水は Millipore 社製の Milli-Q gradient-A10 EDS ポリッシャー付き精製水装置を用いて調製した。

B-2. DCFH-DA による活性酸素種生成量の評価

フェノール性化合物の Antioxidant 作用を評価するために、過酸化水素を添加し、塩基性条件下において発生するヒドロキシラジカルとフェノール性化合物を反応させた。

他方、フェノール性化合物の ROS 発生能の評価を行うために、高い反応性を示す銅を添加してその反応を検討した。ROS 発生量の評価には、蛍光プローブである

2,7-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA) を用い、ROS を蛍光物質に変換して蛍光測定した。蛍光検出器には島津製作所社製 RF-5300 PC を使用した。

試料調製方法は PBS 1110 μL に 10 mM に調製したフェノール性化合物 30 μL 、DMF に溶解した DCFH-DA (0.1 mM) を 30 μL 、硫酸銅溶液 (2.5 mM) を 30 μL 加えて、攪拌した。37°C、1 時間インキュベート操作を行い、氷冷後、励起波長 485 nm、蛍光波長 523 nm で蛍光強度を測定した。

B-3. *In vivo* におけるフェノール性化合物の検出

In vivo の実験にはマウスを用いた。マウスの飼育はバリヤーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。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_2 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を測定した。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動物実験規程に則り、実施した。

B-4. 人工胃液中におけるフェノール性化合物と NaNO_2 の反応

フェノール性化合物と 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 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 塩酸酸性条件下で反応させ、酢酸エチルを用いて液液分配抽出した。酢酸エチル相を減圧濃縮後、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) による構造解析に供した。

B-5. 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作用の評価には、 α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitron (4-POBN) を用いた。

試料調製はPBS 180 μ L に20 mMに調製したフェノール性化合物30 μ L、DMSOに溶解した4-POBN (100 mM) を30 μ L、硫酸銅 (10 mM) を30 μ L加えて、攪拌した。37°C で1時間インキュベート操作を行い、氷冷後、ESRで測定した。

B-6. 酸化ストレス評価のための 8-OHdG の測定

酸化ストレス評価には 8-OHdG を用い、その測定には、高速液体クロマトグラフー紫外吸光光度検出 - 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_{VP} 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 \times 4.6 mm) を使用し、移動相は 20 mM リン酸二水素一ナトリウム:メタノール=97:3 を用いた。

C 研究結果

C-1. ニトロカテコール (NO₂-CAT) が ROS 発生に与える影響

標準品が市販されている NO₂-CAT および CAT を使用し、ROS 生成に与える影響について DCFH-DA を用いて評価した。Fig. 1 に示すように NO₂-CAT には CAT と同様に抗酸化作用が見られた。しかし、ラジカル発生作用については、NO₂-CAT の方が ROS の発生量が有意に増大する結果が得られた (Fig. 2)。

C-2. ニトロ化を受けたフェノール性化合物が ROS 発生に与える影響

クロロゲン酸、CFA と NaNO₂ をそれぞれ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. 3)。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ることが確認された (Fig. 4)。

C-3. *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 NaNO₂ を併用投与することにより胃酸条件下で上記 C-2 と同様の反応が起こる可能性がある。そこで、*in vivo* への適用を試みた。

その結果、クロロゲン酸と NaNO₂ 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反応を受けた 1,2-(4*H*)-benzoxazin-4-one が検出された (Fig. 5)。

C-4. 人工胃液中におけるフェノール性化合物と NaNO₂ 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標準品を確保するために合成を試みた。得られた化合物を LC/MS および NMR で確認したところ、Fig. 6 に示すように CFA がニトロ化反応を受けた化合物 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-5. ESR による Antioxidant 作用および Prooxidant 作用の評価

ROS 生成を評価する方法としては、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、信頼性の高い方法である。ニトロ化反応を受けたフェノール性化合物が ROS 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. 7 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、ROS 生成の評価が困難であることが分かった。そ

こで、新たな ROS 測定方法としてスピントラッピング剤に α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitrone 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. 8)。

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、ニトロ化反応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. 9)。

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、特にニトロ化反応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. 10)。

これらの結果から、フェノール性化合物はニトロ化反応を受けることで Antioxidant 作用が増強し、ROS 生成量を減少させることが示唆された。

C-6. 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 ROS 生成について生体内でも同様の結果が得られるかを評価するために、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、ニトロ化反応を受けることで 8-OHdG 量が減少した (Fig. 11)。

D. 考察

フェノール性物質である CAT と 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を検討した。ROS 生成は、種々の発がん機構に関与することが知られている。生体内で摂取されたフェノール性化合物と NaNO_2 の併用投与によって ROS 生成の増加が起こり、さまざまな疾患の発症につながる事が考えられる。

DCFH-DA を用いた抗酸化作用の評価ではニトロ化された物質においても同様の抗酸化作用が認められた。しかし、ラジカル発生作用はニトロ化反応を受けたことにより、ROS の発生量に大きな変化が認められた。

また、食品に含まれているクロロゲン酸および CFA と NaNO_2 を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化反応を引き起こす結果が得られた。ニトロ化反応はフェノール性化合物の化学構造によってベンゼン環が直接ニトロ化反応を受ける場合と、側鎖がニトロ化される場合がある。ベンゼン環がニトロ化反応を受ける場合、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ような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 のように側鎖にニトロ化が起こった場合、不安定な化学構造になることが考えられ、ROS 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 ROS と反応することでペルオキシナイトライト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。今後、活性窒素種生成についても解明する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究において、フェノール性化合物と NaNO_2 を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化反応を引き起こし、ROS の生成に関与しているかを *in vivo* および *in vitro* の系で検証した。

1 年目では、ニトロ基が導入された標準品が市販されている NO_2 -CAT を用い、ROS 発生について検討した。DCFH-DA を用いた結果からニトロ化反応を受けることで Prooxidant 作用が増強することが示唆された。

2 年目は、コーヒーに含まれているクロロゲン酸、CFA と NaNO_2 を人工胃液中で反応させることによって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、マウスを用いた *in vivo* の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反応を受けた物質を検出した。

最終年度では、ニトロ化反応が胃酸条件下で進行し、ニトロクロロゲン酸およびニトロカフェイン酸の生成を確認し、標準品の合成を試みた。

得られたニトロクロロゲン酸およびニトロカフェイン酸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相同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 NaNO₂ を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化反応が引き起こされ、ニトロ化反応を受けた化合物は 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反応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。

本研究の結果より、生体内でニトロ化反応を受け、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

- 1) 大柄敦資、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之. カテコールのニトロ化と活性酸素種生成. 第 20 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2007) (2007 年 7 月・東京)
- 2) Atsushi Ogara, Yusuke Iwasaki, Yuji Ishii, Rie Ito, Koichi Saito, Akiyoshi Nishikawa and Hiroyuki Nakazawa. Effect of the nitration on generation of the reactive oxygen species for caffeic acid. 59th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (2008 年 2 月・アメリカ)
- 3) 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. フェノール性化合物の Prooxidant 作用に対するニトロ化反応の影響. フィジカル・ファーマフォーラ

ム 2008 (2008 年 3 月・東京)

- 4) 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. カフェイン酸による活性酸素種生成に及ぼすニトロ化の影響. 日本薬学会 第 128 年会 (2008 年 3 月・東京)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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 分析化学学会年会 (2009 年 9 月・北海道)

G. 知的所有権の取得状況

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

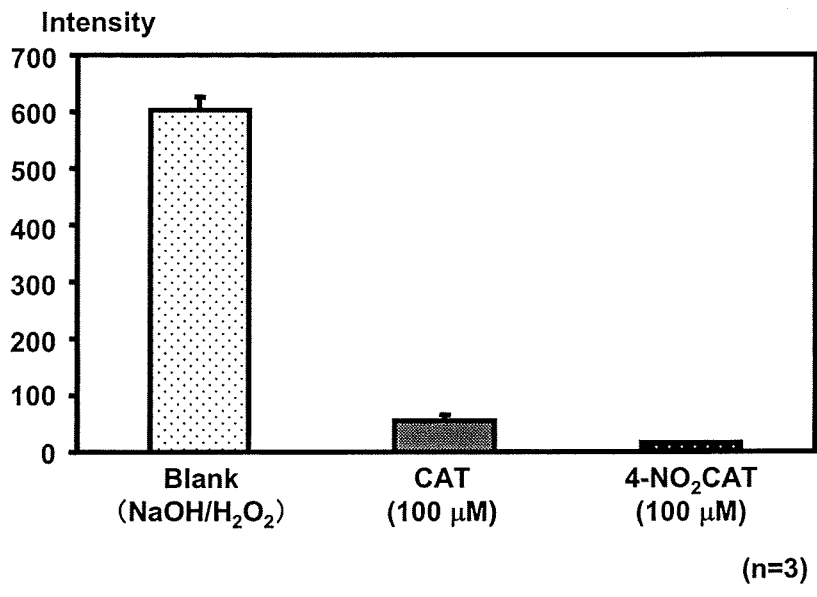


Fig. 1 Comparison of antioxidant ability between catechol and 4-nitrocatechol

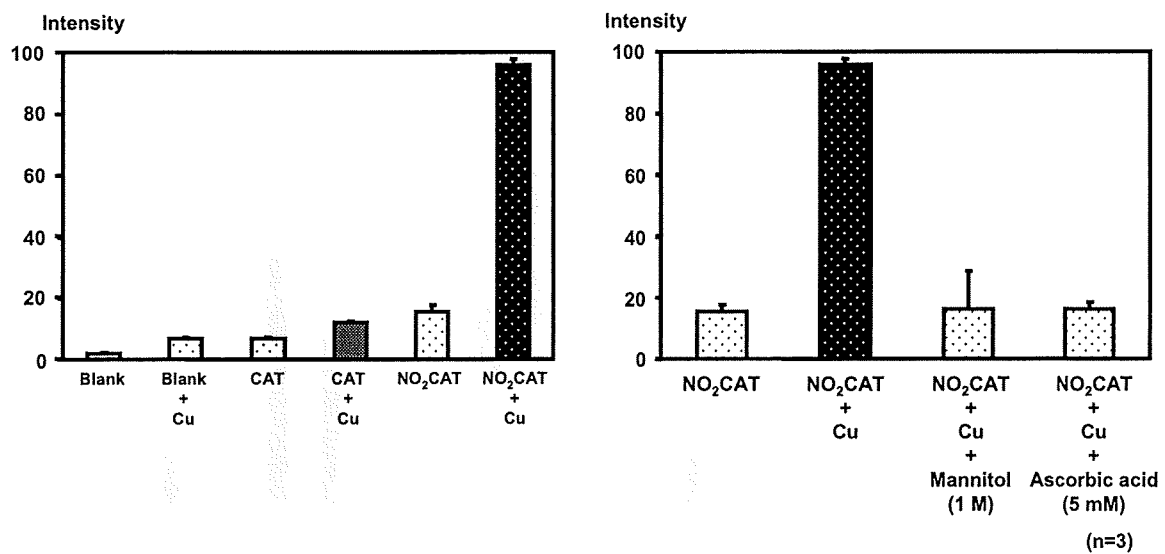


Fig. 2 Comparison of prooxidant ability between catechol and 4-nitrocatechol

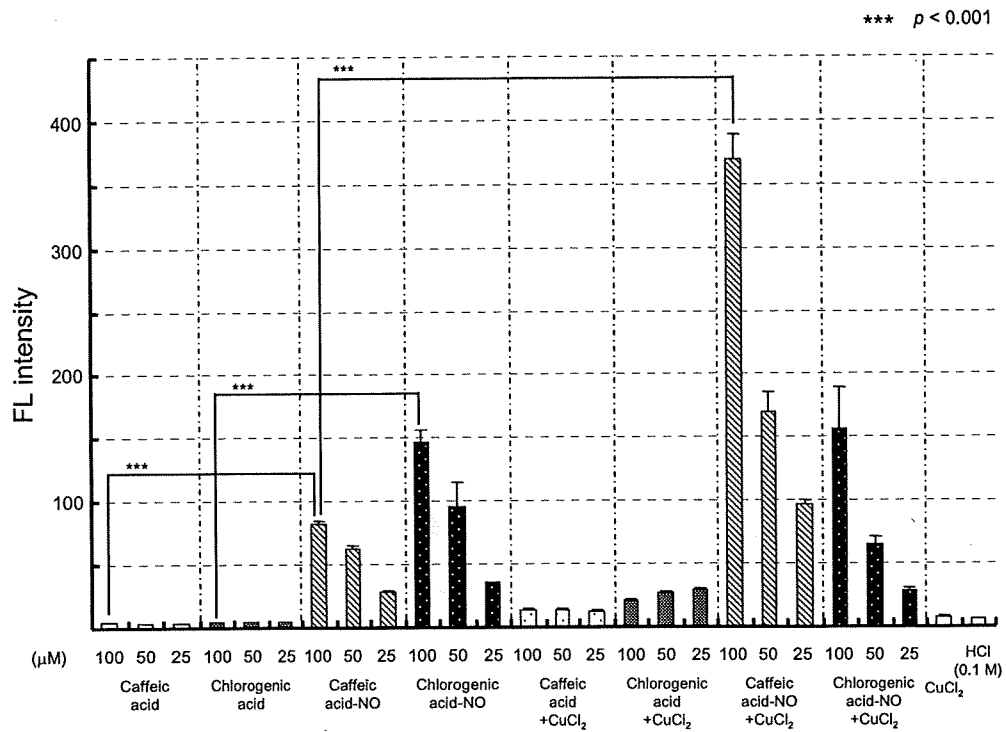


Fig. 3 Comparison of prooxidant ability interacted by copper sulfate between phenolic compounds and nitration compounds

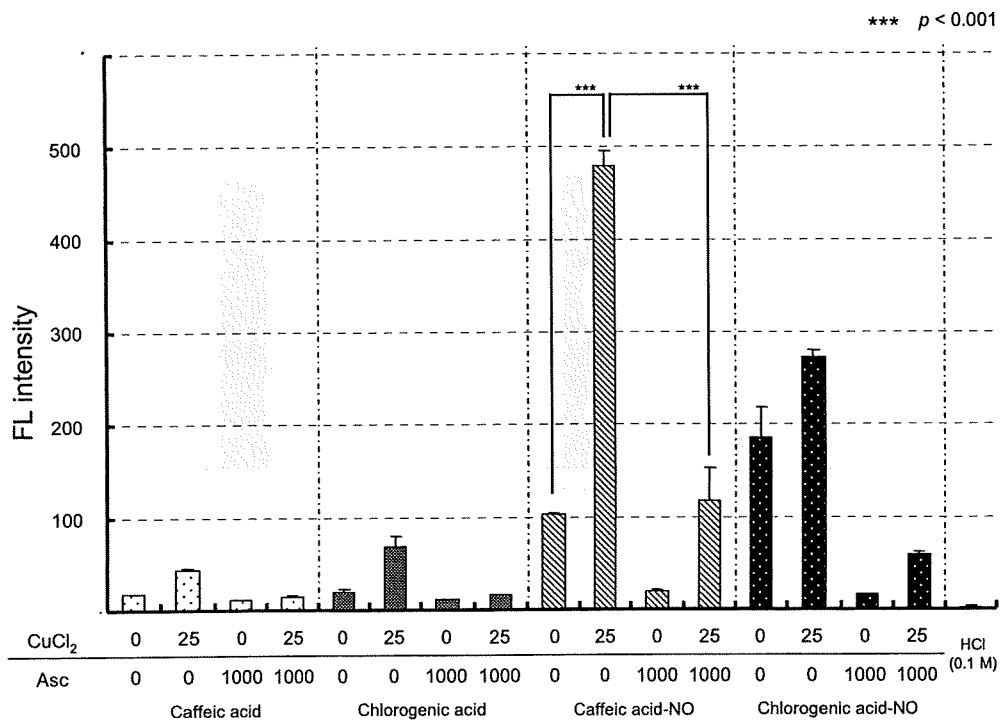


Fig. 4 Comparison of prooxidant ability under ascorbic acid for scavenging reactive oxygen species

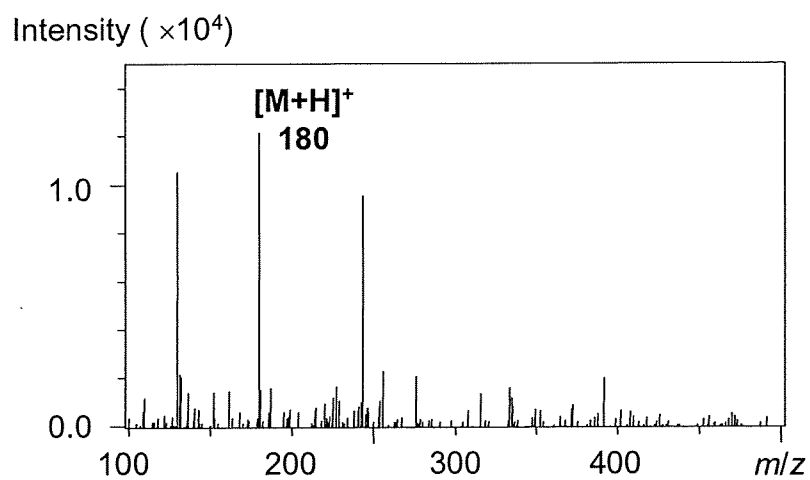
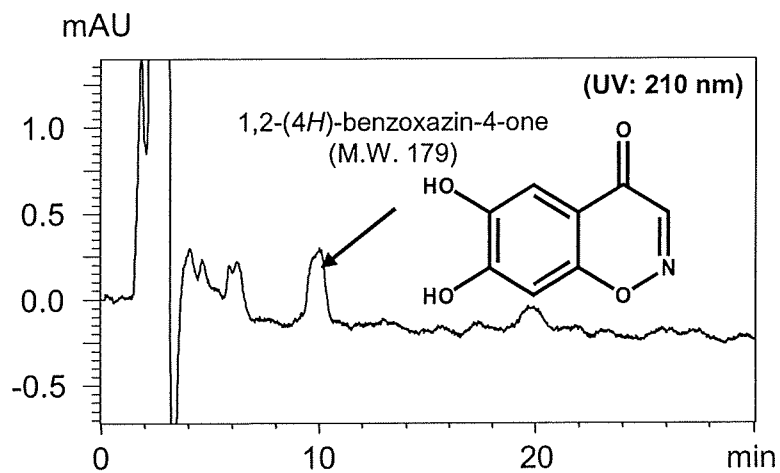


Fig. 5 Chromatogram and mass spectrum of nitrated phenolic compounds in mice liver samples

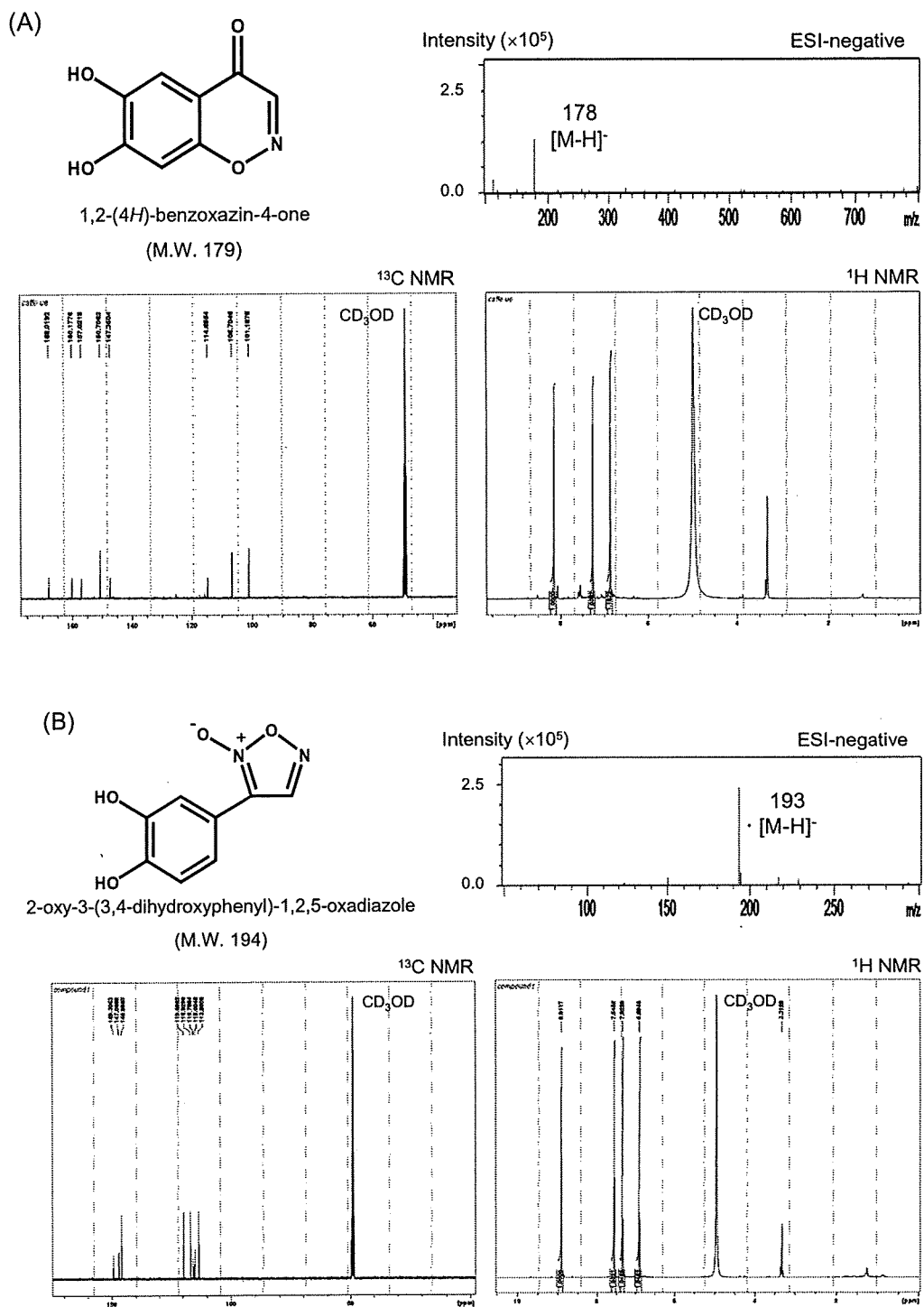


Fig. 6 Mass, ¹³C-NMR and ¹H NMR spectra of nitrated caffeic acid

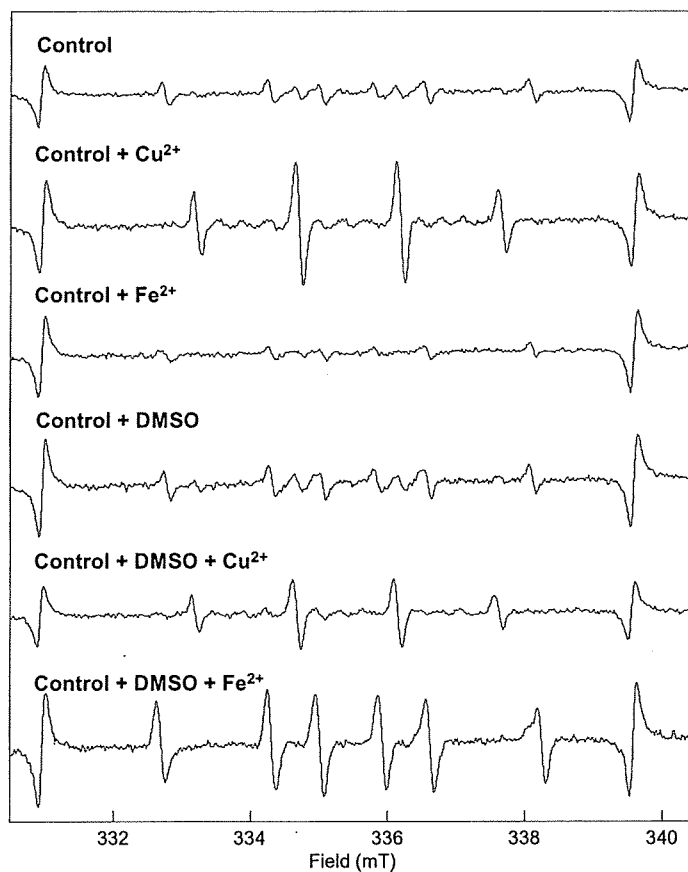


Fig. 7 Effect of metal ion for the determination of hydroxyl radical by DMPO reagent

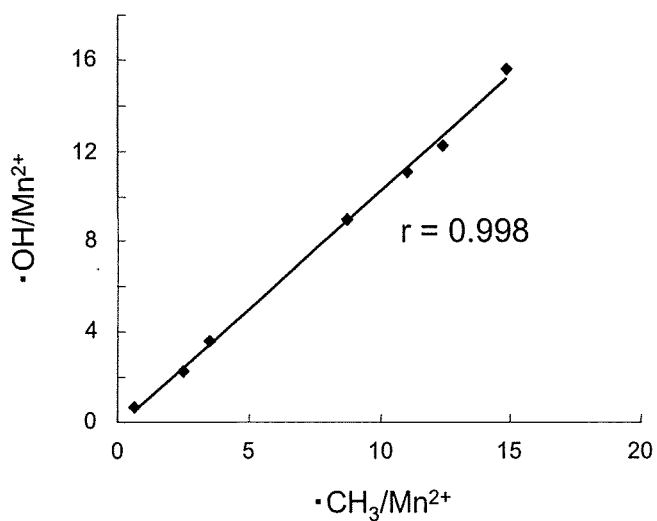


Fig.8 Comparison of DMPO-OH and POBN-CH₃ method for the determination of hydroxyl radical

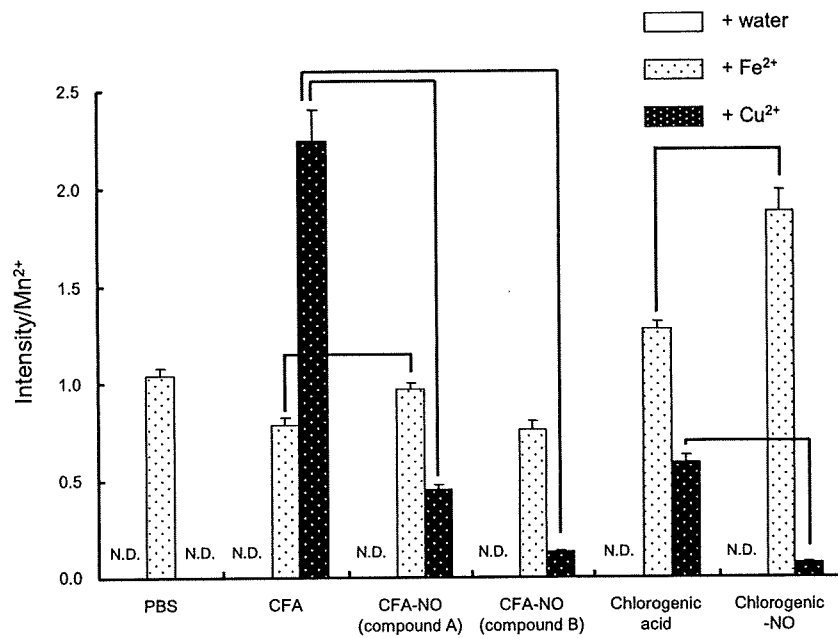


Fig. 9 Comparison of prooxidant ability for phenolic compounds

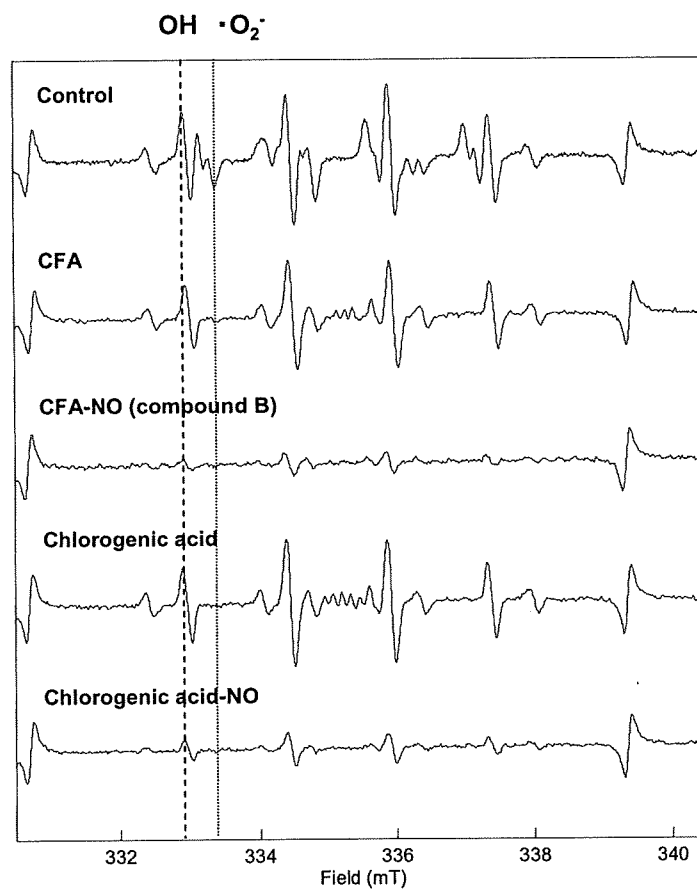


Fig.10 Effect of antioxidant ability on nitration for phenolic compounds

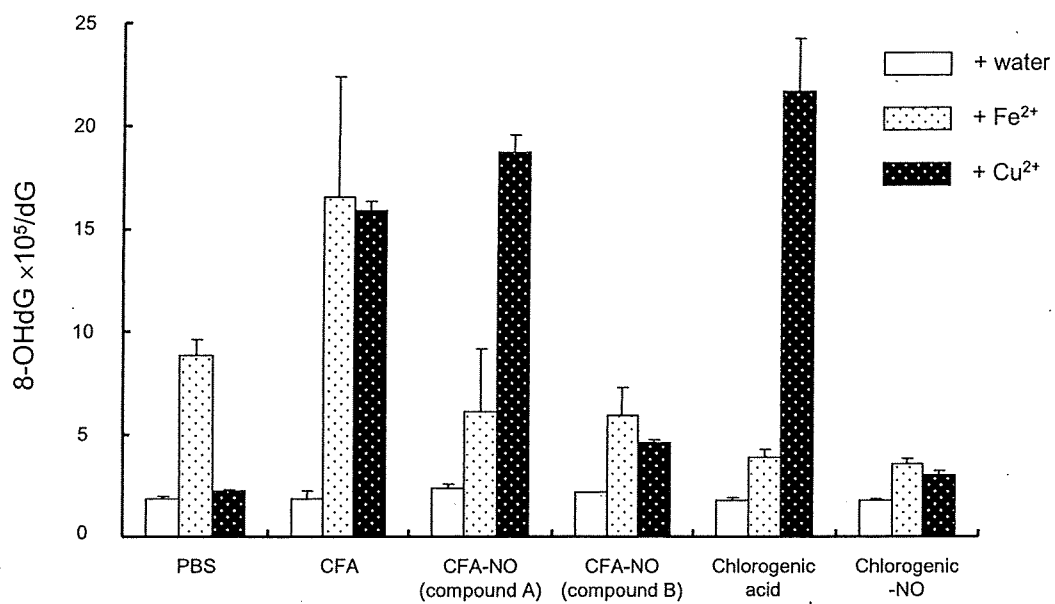


Fig.11 Determination of deoxyguanosine (dG) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in calf thymus DNA for assessment of oxidative stress

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
Kuroiwa Y, Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Mitsumori K, Nishikawa A, Nakazawa H, Hirose. M.	Combined treatment with green tea catechins and sodium nitrite selectively promotes rat forestomach carcinogenesis after initiation with <i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine.	Cancer Sci.	98	949-957	2007
Kuroiwa Y, Okamura T, Ishii Y, Umemura T, Tasaki M, Kanki K, Mitsumori K, Hirose M, Nishikawa A.	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
Kanki K, Umemura T, Kitamura Y, Ishii Y, Kuroiwa Y, Kodama Y, Itoh K, Yamamoto M, Nishikawa A, Hirose M.	A possible role of nrf2 in prevention of renal oxidative damage by ferric nitrilotriacetate.	Toxicol. Pathol.	36	353-361	2008
Kuroiwa Y, Yamada M, Matsui K, Okamura T, Ishii Y, Masumura K, Tasaki M, Umemura T, Mitsumori K, Nohmi T, Hirose M, Nishikawa A.	Combined ascorbic acid and sodium nitrite treatment induces oxidative DNA damage-associated mutagenicity <i>in vitro</i> , but lacks initiation activity in rat forestomach epithelium.	Toxicol. Sci.	104	274-282	2008