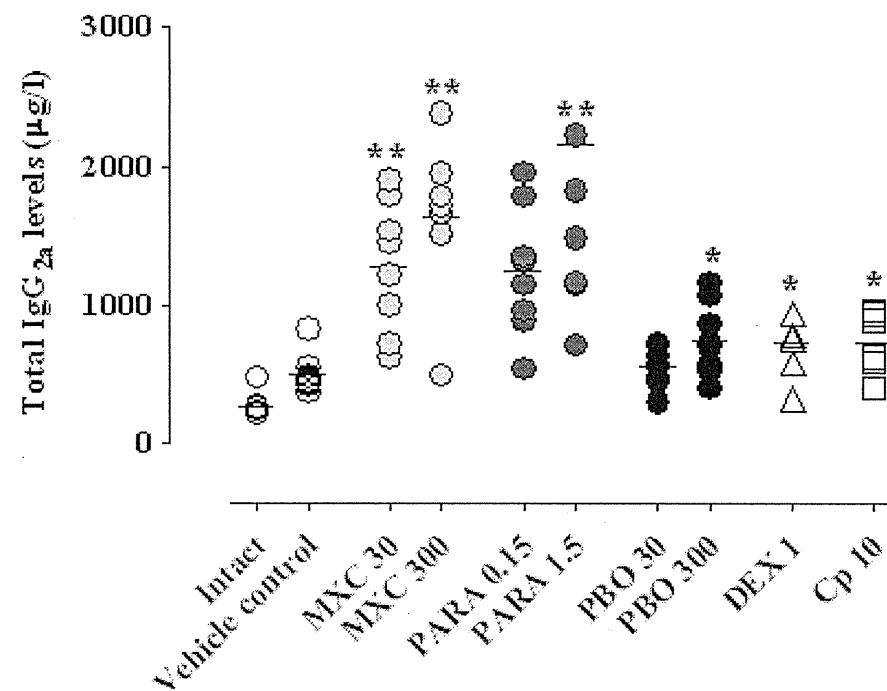
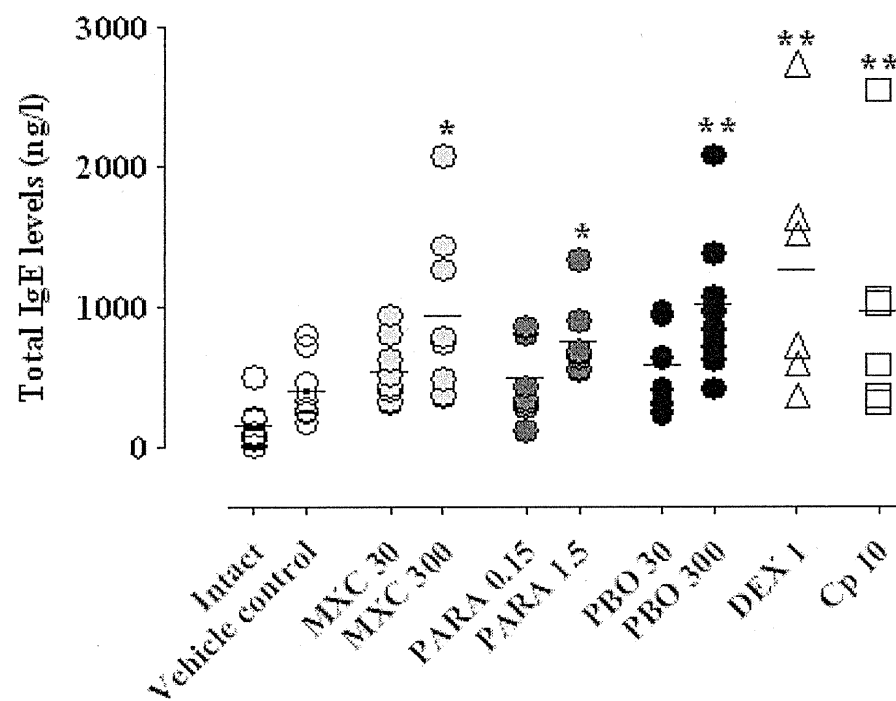
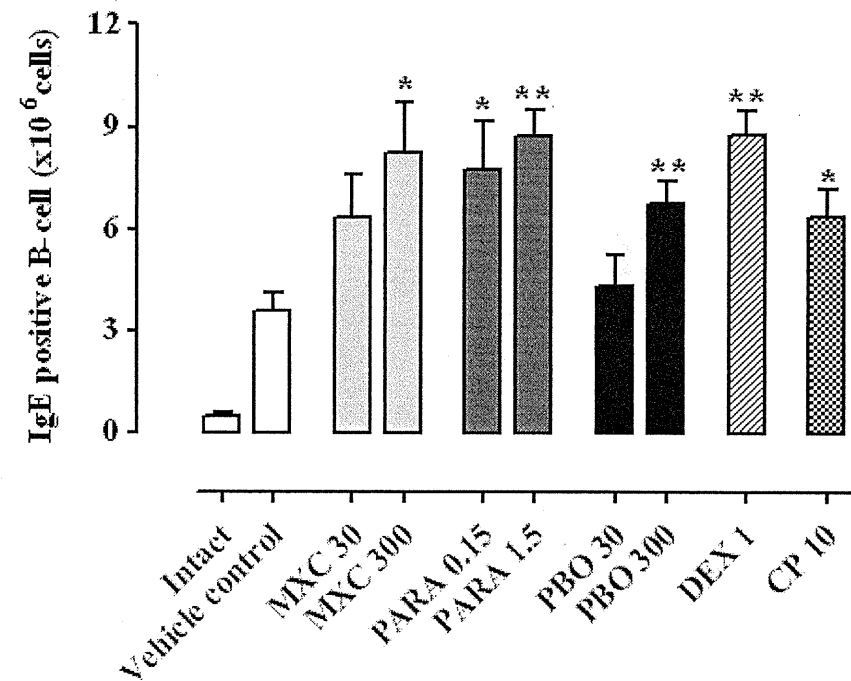
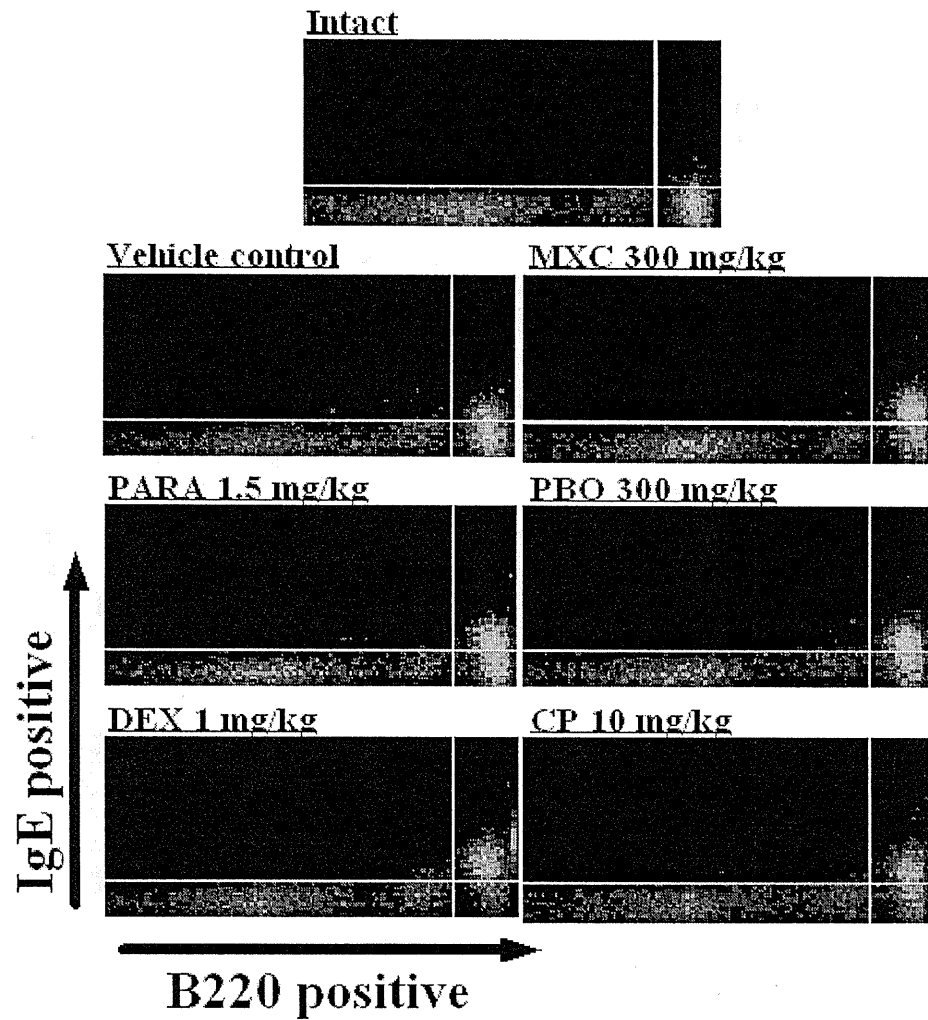


図2 血清中 IgE および IgG_{2a} 量



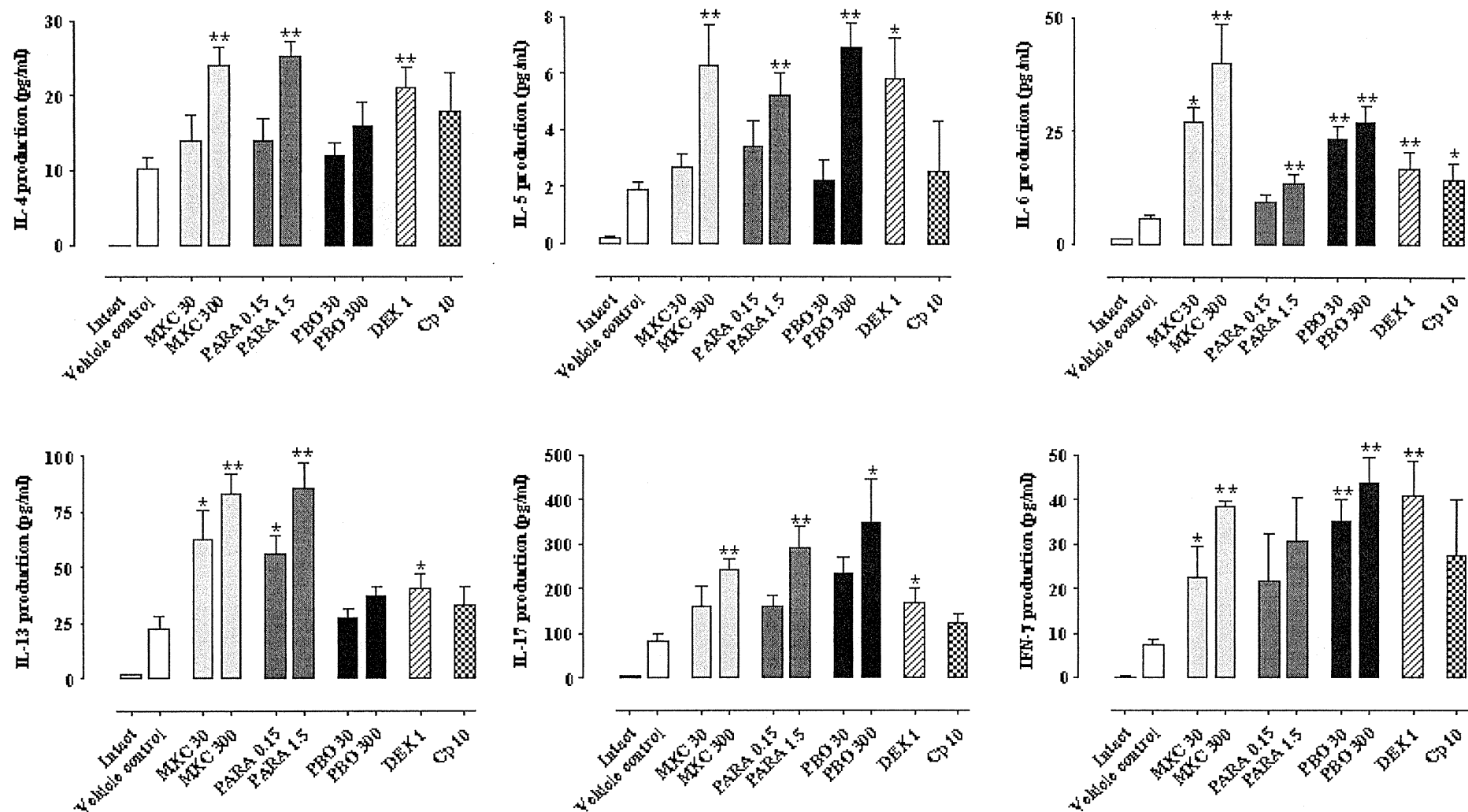
MXC = methoxychlor, PARA = parathion, PBO = piperonyl butoxide, DEX = dexamethasone, Cp = cyclophosphamide
 *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the vehicle control group

図3 血清中 IgE 陽性 B 細胞数



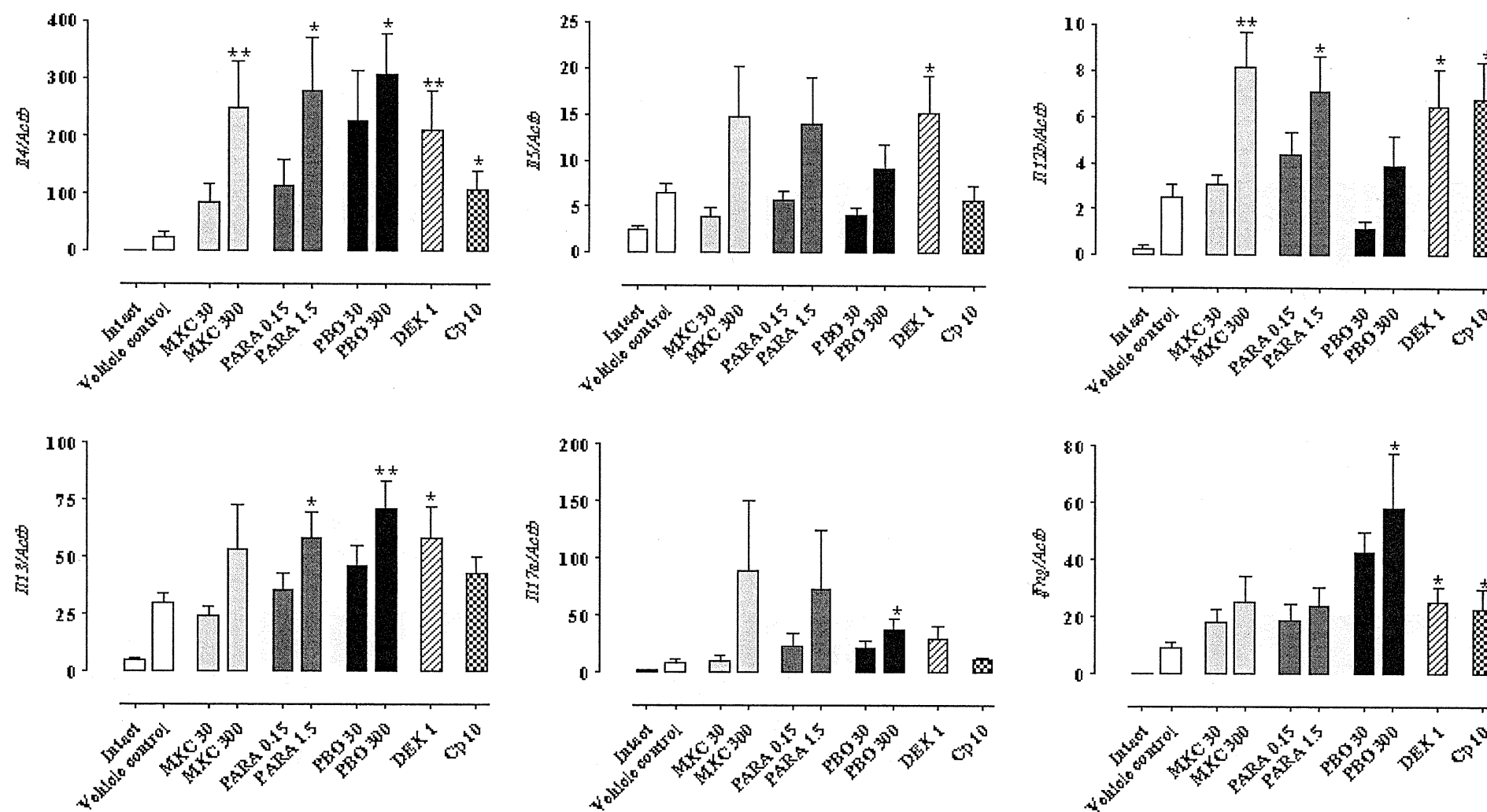
MXC = methoxychlor, PARA = parathion, PBO = piperonyl butoxide, DEX = dexamethasone, Cp = cyclophosphamide
 *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the vehicle control group

図 4 リンパ節中サイトカイン産生量



MXC = methoxychlor, PARA = parathion, PBO = piperonyl butoxide, DEX = dexamethasone, Cp = cyclophosphamide
 *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the vehicle control group

図5 耳介皮膚中サイトカイン遺伝子発現量



MXC = methoxychlor, PARA = parathion, PBO = piperonyl butoxide, DEX = dexamethasone, Cp = cyclophosphamide
 *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the vehicle control group

Table 1. Ear thickness (mm).

Age in weeks	Intact	Control	Methoxychlor (mg/kg)		Parathion (mg/kg)		Piperonyl butoxide (mg/kg)		Dexamethasone 1 mg/kg	Cyclophosphamide 10 mg/kg
			30	300	0.15	1.5	30	300		
8	0.27 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.25 ± 0.08	0.23 ± 0.08	0.26 ± 0.04	0.22 ± 0.08	0.23 ± 0.04	0.20 ± 0.08	0.25 ± 0.10
9	0.22 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.64 ± 0.08 **	0.71 ± 0.06 **	0.73 ± 0.10 **	0.67 ± 0.13 **	0.68 ± 0.06 **	0.75 ± 0.13 **	0.60 ± 0.10 **	0.60 ± 0.05 **
10	0.24 ± 0.03	0.57 ± 0.10	1.16 ± 0.50 **	1.20 ± 0.28 **	1.10 ± 0.24 **	1.17 ± 0.36 **	1.03 ± 0.16 **	1.23 ± 0.34 **	1.10 ± 0.20 **	1.06 ± 0.13 **
11	0.23 ± 0.02	0.78 ± 0.19	1.09 ± 0.20	1.23 ± 0.44 *	0.98 ± 0.20	1.20 ± 0.33 **	1.24 ± 0.26 **	1.38 ± 0.32 **	1.28 ± 0.15 **	1.23 ± 0.05 **
12	0.23 ± 0.01	0.82 ± 0.10	1.23 ± 0.35 **	1.35 ± 0.22 **	1.15 ± 0.28 **	1.28 ± 0.10 **	1.11 ± 0.23 *	1.29 ± 0.26 **	1.28 ± 0.18 **	1.39 ± 0.34 **

*P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the vehicle control group

Table 2. Clinical score.

Age in weeks	Intact	Control	Methoxychlor (mg/kg)		Parathion (mg/kg)		Piperonyl butoxide (mg/kg)		Dexamethasone 1 mg/kg	Cyclophosphamide 10 mg/kg
			30	300	0.15	1.5	30	300		
8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
10	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.6 ± 0.5	2.8 ± 0.5	2.5 ± 0.5	2.8 ± 0.5	2.4 ± 0.7	2.9 ± 0.4	2.7 ± 0.5	2.2 ± 0.4
11	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.5	2.6 ± 0.5	2.9 ± 0.4	2.0 ± 0.9	2.8 ± 0.5	2.8 ± 0.5	2.9 ± 0.4	3.0 ± 0.0	2.8 ± 0.4
12	0.0 ± 0.0	1.9 ± 0.4	2.8 ± 0.5	3.0 ± 0.0	2.5 ± 0.5	3.0 ± 0.0	2.4 ± 0.9	2.9 ± 0.4	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0

分担研究課題：異物代謝酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響
「CYP3A4 酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響とその機構解析」

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

ヒト CYP3A4 酵素は、肝薬物代謝において中心的な役割を担う酵素であり、本酵素の発現量や活性の変動は、薬物や異物の代謝分解の変動、ひいてはその薬理作用発現や毒性発現の変動を引き起こす。したがって、CYP3A4 酵素の発現に影響を及ぼす食品中化学物質の把握は、その安全性を考える上で重要である。そこで本研究では、ヒト肝 CYP3A4 酵素遺伝子の誘導をルシフェラーゼアッセイにより簡便に予測できる細胞株（HPL-A3）を用いて、食品添加物が CYP3A4 酵素誘導に及ぼす影響を評価した。

まず、食品添加物のクルクミン（CUR）、チアベンダゾール（TBZ）、没食子酸プロピル（PG）あるいはブチルヒドロキシトルエン（BHT）をそれぞれ最終濃度 10 μM で HPL-A3 細胞に 24 時間あるいは 72 時間処理し、各化合物の CYP3A4 酵素誘導能をルシフェラーゼアッセイおよびリアルタイム RT-PCR 法により測定した。ルシフェラーゼアッセイの結果、CUR および TBZ は両時間でルシフェラーゼ誘導能が観察され、また、PG および BHT は 24 時間処理でわずかな誘導能を示した。また、CYP3A4 遺伝子発現については、化合物 72 時間処理後、CUR で誘導作用が、BHT で抑制作用が認められた。

次いで、CYP3A4 mRNA を誘導した CUR と既知の CYP3A 酵素誘導剤（リファンピシン（RIF: 1 μM ）、タモキシフェン（TAM: 10 μM ）あるいはニカルジピン（NIC: 10 μM ））との複合影響について検討した。CUR は、用いた全ての誘導剤によるルシフェラーゼ活性および CYP3A4 遺伝子の誘導を、24 時間処理では抑制し、72 時間処理では増強した。なお、他の食品添加物と CYP3A 酵素誘導剤との複合曝露では、一部の化合物の組み合わせによっては CYP3A4 遺伝子発現誘導における相互作用が認められたが、その作用は化合物の組み合わせにより異なる場合がみられた。

以上、試験したいずれの食品添加物（特に CUR と TBZ）にも CYP3A4 遺伝子の発現を変動させる作用があることが示された。また、CUR による CYP3A4 遺伝子の活性化は VDR を介した機構で起こる可能性を示唆した。

A. 研究目的

肝シトクロム P450 (CYP) 分子種のうち、CYP3A 酵素は、医薬品をはじめとした多くの外来異物の代謝分解において中心的な役割を果たす。また、CYP3A 酵素は発がん性多環式芳香族炭化水素類や発がん性カビ毒（アフラトキシン）の代謝活性化にも関わっている。したがって、食品中の化学物質による CYP3A 酵素の発現誘導への影響を把握することは、健康影響や安全性を考える上で重要である。

我々はこれまでの本研究において、化学物質によるヒト CYP3A 酵素の誘導を簡便に解析することを目的として、ヒト肝 CYP3A4 酵素遺伝子プロモーターのレポータープラスミドと、CYP3A 酵素誘導に関わる受容体型転写因子であるヒトプレグナン X 受容体 (hPXR) を共発現させることにより、ヒト肝 CYP3A4 酵素遺伝子の誘導をレポーターアッセイにより簡便に予測できる細胞株 (HPL-A3) を樹立した (*Biol. Pharm. Bull.*, in press)。そこで本研究では、ヒト肝 CYP3A4 酵素の発現に及ぼす代表的な食品添加物の影響について、本細胞を用いて検討し、さらに、その機構について解析した。

B. 研究方法

1) 試験細胞株

ヒト CYP3A4 遺伝子プロモーターに存在する PXR 結合配列 (ER-6 および DR-1) を含んだ 2 か所の転写調節領域 (5' 上流域 -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 (phCYP3A4-Luc) 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、PXR リガンドに対し高い反応性を有する細胞をクローニングし、HPL-A3 細胞株を樹立し、試験細胞株として用いた。

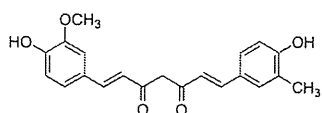
2) 被検化合物

食品添加物として、クルクミン (CUR、Wako)、チアベンダゾール (TBZ、Sigma)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT、Sigma)、および没食子酸プロピル (PG、Fluka) を用いた (図 1A)。CYP3A 酵素誘導剤としては、リファンピシン (RIF、Sigma)、ニカルジピン塩酸塩 (NIC、Wako) およびタモキシフェン (TAM、Sigma) を用いた (図 1B)。また、ビタミン D 受容体リガンドとして、1,25-ジヒドロキシビタミン D (AVD₃、Sigma) およびリトコール酸 (LCA、Sigma) を用いた (図 1C)。化合物はいずれもジメチルスルホキシド (DMSO) に最終濃度の 1000 倍濃となるように溶解して使用した。

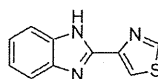
3) CYP3A4 酵素遺伝子プロモーター活性化能の測定

HPL-A3 細胞を 24 ウェル培養プレートに 5×10^4 cell/well の割合で播種し、48 時間前培養した後、被検化合物を添加し、一定時間処理した。処理後、細胞を 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 (Toyo Ink) を添加し、生じた発光をルミネッセンスセンサー PSN (ATTO) により測定した。さらに、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。

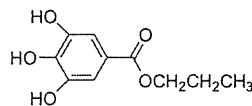
(A) Food additives



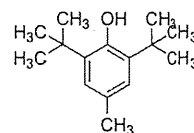
Curcumin
(CUR)



Thiabendazole
(TBZ)

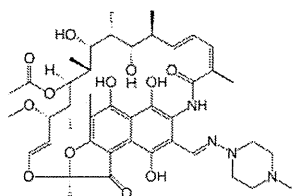


Propyl gallate
(PG)

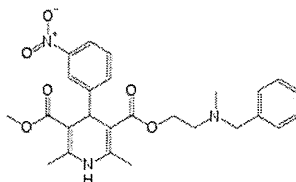


Butylated
hydroxytoluene
(BHT)

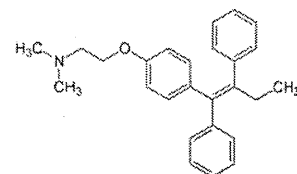
(B) CYP3A inducers



Rifampicin (RIF)

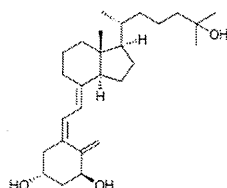


Nifedipine (NIC)

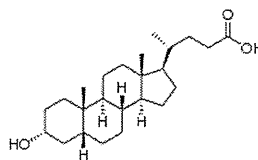


Tamoxifen (TAM)

(C) VDR activators



1,25-dihydroxyvitamin D₃ (AVD₃)



Lithocholic acid (LCA)

図. 本研究で用いた化合物

4) CYP3A 遺伝子発現量の測定

HPL-A3 細胞を 60 mm 培養皿に 5×10^5 cell/dish の割合で播種し播種し、48 時間前培養した後、被検化合物を一定時間処理した。全 RNA を ISOGEN (NipponGene) により単離し、pd(N)₆ プライマー (GE Healthcare) と MMLV-逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。この cDNA に、ヒト *CYP3A4*、*CYP3A5*、*CYP3A7* あるいは *GAPDH* 遺伝子に特異的なプライマー、および SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行い、各遺伝子の発現量を測定した。なお、各遺伝子の発現量は、それぞれ *GAPDH* 遺伝子の発現量で補正し、算出した。

5) 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) CYP3A4 遺伝子プロモーターの活性化に及ぼす CYP3A 酵素誘導剤の影響

まず、HPL-A3 に対する CYP3A 酵素誘導剤の単独処理が CYP3A4 遺伝子プロモーターの活性化に及ぼす影響を検討した。

HPL-A3 に RIF (1 μ M)、TAM (10 μ M) あるいは NIC (10 μ M) をそれぞれ処理し、

0、6、12、24、48、72 および 96 時間後におけるルシフェラーゼ活性を測定した。RIF では 12 時間後より、TAM および NIC では 6 時間後よりから有意な活性の増加が認められた。この誘導は、RIF では 96 時間後に、TAM では 24 時間後に、また NIC では 48~72 時間後に最大となった。

次に各種濃度の CYP3A 酵素誘導剤を 24 時間処理し、その濃度依存性について検討した。RIF では 0.25 -10 μM 、TAM および NIC では 2.5-20 μM の濃度域において、濃度依存性的かつ有意なルシフェラーゼ活性の誘導が認められた。また、この結果より、中程度（最大の 30-70%）のプロモーター活性が同程度となる CYP3A 酵素誘導剤の濃度（RIF は 1 μM 、TAM および NIC は 10 μM ）を設定し、以降の実験に用いた。

2) 食品添加物と CYP3A 酵素誘導剤の複合処理が CYP3A4 遺伝子プロモーターの活性化に及ぼす影響

① 処理条件

実験に先立ち、HPL-A3 に食品添加物（10 μM ）を単独、あるいは各 CYP3A 酵素誘導剤（1 μM RIF、10 μM TAM および 10 μM NIC）の共存下で処理し、0、6、12、24、48、72 および 96 時間後におけるルシフェラーゼ活性の経時変化を測定したところ、各誘導剤による活性の増加を、CUR は 24 時間後まで抑制し、逆に 72 時間後以降は増強すること、また、TBZ は 12 時間以降で増強することがそれぞれ示された。

そこで、処理時間を 24 時間と 72 時間に設定し、種々濃度の食品添加物が各 CYP3A 酵素誘導剤によるルシフェラーゼ活性の誘

導に及ぼす種々濃度の食品添加物の影響を検討した。

② CUR 処理の影響

24 時間では、10 μM の単独処理によりルシフェラーゼ活性の増加が見られた。複合処理では、各誘導剤による誘導に対して、10 μM で抑制効果を示した。

72 時間では、10 μM の単独処理で活性の増加が認められた。複合処理では、いずれの誘導剤による誘導に対しても、10 μM で増強効果を示した。

③ TBZ 処理の影響

24 時間では、いずれの濃度の単独処理によってもルシフェラーゼ活性の増加が見られた。複合処理では、各誘導剤による誘導に対して、10 μM および 100 μM で増強効果を示した。

72 時間では、10 μM および 100 μM の単独処理で活性の増加が認められた。複合処理では、いずれの誘導剤による誘導に対しても、100 μM で増強効果を示した。

④ BHT 処理の影響

24 時間では、1 μM および 10 μM の単独処理によってルシフェラーゼ活性の増加が見られた。複合処理では、各誘導剤による誘導に対して、10-100 μM で抑制効果を示した。

72 時間では、いずれの濃度の単独処理によっても活性の変動は認められなかった。複合処理では、いずれの誘導剤による誘導に対しても、10 μM で抑制効果を示した。

⑤ PG 処理の影響

24 時間では、1 μM および 10 μM の単独処理によってルシフェラーゼ活性の増加が見られた。複合処理では、各誘導剤による

誘導に対して、10-100 μM で抑制効果を示した。

72 時間では、100 μM の単独処理で活性の増加が認められた。複合処理では、RIF および NIC による誘導に対しては 100 μM で抑制効果を、また、TAM による誘導に対しては 100 μM で増強効果を示した。

3) CYP3A 酵素遺伝子の発現誘導

① 処理条件

食品添加物 (10 μM) と CYP3A 酵素遺伝子誘導剤 (1 μM RIF、1 μM TAM および 10 μM NIC) を単独あるいは複合処理し、24 時間後と 72 時間後における CYP3A サブファミリー酵素遺伝子 (CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7) の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。

② CUR 処理の影響

24 時間では、単独処理による CYP3A4 および CYP3A5 の発現変動は見られないが、CYP3A7 発現の減少が見られた。複合処理では、TAM および NIC による CYP3A4 発現誘導、および全ての誘導剤による CYP3A7 発現誘導に対してはそれぞれ抑制作用を示し、また、RIF による CYP3A4 発現誘導に対しても抑制傾向を示した。一方で、NIC による CYP3A5 誘導に対しては増強作用を示した。

72 時間では、単独処理で CYP3A4 および CYP3A7 発現の誘導がみられ、さらに、複合処理では、全ての誘導剤による CYP3A4 発現誘導や、RIF および NIC による CYP3A5 および CYP3A7 発現誘導に対して、それぞれ増強効果を示した。

③ TBZ 処理の影響

24 時間では、単独処理ではいずれの遺伝

子発現に対しても影響を与えなかった。複合処理では、NIC による CYP3A4 発現誘導に対してのみ増強作用を示した。

72 時間では、単独処理による発現変動はいずれの遺伝子についても認められなかった。複合処理では、TAM による CYP3A4 発現誘導、および RIF による CYP3A5 発現誘導に対して、それぞれ増強効果を示した。

④ BHT 処理の影響

24 時間では、単独処理による CYP3A4 および CYP3A5 の発現変動は見られないが、CYP3A7 発現の増加が見られた。複合処理では、NIC による CYP3A4 発現誘導および TAM による CYP3A5 発現誘導に対してそれぞれ抑制作用を示した。

72 時間では、単独処理で CYP3A4 および CYP3A5 の発現をそれぞれ減少させた。複合処理では、TAM による CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 発現誘導に対して、それぞれ増強効果を示したが、他の誘導剤による CYP3A 酵素遺伝子発現誘導には影響を及ぼさなかった。

⑤ PG 処理の影響

24 時間では、単独処理による CYP3A4 および CYP3A5 の発現変動は見られないが、CYP3A7 発現の減少が見られた。複合処理では、RIF および NIC による CYP3A7 発現誘導、および TAM による CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 発現誘導に対してそれぞれ抑制作用を示した。

72 時間では、単独処理による CYP3A 酵素遺伝子の発現変動は認められなかった。複合処理では、TAM による CYP3A4 および CYP3A7 発現誘導に対して増強効果を示したが、他の誘導剤による CYP3A 酵素遺伝子

発現誘導には影響を及ぼさなかった。

4) CYP3A4 遺伝子プロモーター活性化に及ぼす VDR 活性化剤の影響

HPL-A3 では、親株である HepG2 細胞に比べて PXR の発現の亢進が認められるが、その他にも VDR の発現亢進が認められる (*Biol. Pharm. Bull.*, in press)。近年、小腸における CYP3A4 発現誘導に VDR が重要な役割を果たしていること、さらに興味深いことに、CUR は VDR を介して小腸がん細胞の CYP3A4 発現誘導を引き起こすことが示されている (*Planta Med.*, 76, 1866, 2010)。CUR は調べた全ての CYP3A 酵素誘導剤による CYP3A4 発現誘導を 24 時間において抑制し、72 時間において増強することから、その相互作用発現に VDR の活性化が関わっている可能性が考えられる。そこで、HPL-A3 細胞に対する VDR 活性化剤 (AVD₃ および LCA) と CYP3A 酵素誘導剤 (RIF) の複合処理が CYP3A4 遺伝子プロモーター活性化に及ぼす影響を、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。

HPL-A3 細胞に対する VDR 活性化剤の単独処理により、AVD₃ では 24 時間において、また LCA では 24 および 72 時間において、それぞれ濃度依存的なルシフェラーゼ活性の誘導が見られた。さらに、1 μ M RIF と VDR 活性化剤の複合処理により、相加/相乗的なルシフェラーゼ活性の増強作用が認められた。

D. 考察

本研究では最近樹立したヒト CYP3A 酵素誘導剤検索用細胞株である HPL-A3 を

用いて、CYP3A 酵素誘導に対する食品添加物の影響を検討した結果、それぞれの化合物毎に異なった相互作用が起こることが示された。以下、化合物毎に考察する。

① CUR について

CUR は 24 時間処理および 72 時間処理において単独で、CYP3A4 遺伝子プロモーター活性化や CYP3A4 酵素発現誘導作用を示した。これまでも、CUR はヒト HepG2 細胞において CYP3A4 遺伝子プロモーターを活性化することが報告されており (*Free Radic. Biol. Med.*, 42, 315, 2007)、本研究結果もこれを支持するものと思われる。また、大腸がん細胞を用いた検討から、PXR 発現量の低い LS180 細胞では、CUR による CYP3A4 発現誘導は見られない (*Planta Med.*, 76, 1866, 2010) 一方で、Caco-2 細胞においては誘導がみられること、さらに、VDR を導入した Caco-2 細胞では、より顕著な誘導が見られることが示されている (*J. Nutr. Biochem.* 21, 1153, 2010)。本研究に用いた HPL-A3 細胞は親株である HepG2 に比べて VDR を高発現し、また、VDR リガンドに処理により CYP3A4 発現が誘導されることも確認している (*Biol. Pharm. Bull.*, in press)。これらの知見からから、CUR の単独処理による CYP3A4 誘導には VDR の活性化が関わっている可能性が強く示唆された。さらに、本研究の結果から、VDR 活性化剤と CYP3A 誘導剤の複合処理によって、CYP3A4 遺伝子のプロモーター活性の増強が起こることが示された。前述のように CUR は VDR の活性化を引き起こすことから、VDR を介した経路によって複合影響 (増強作用) が生

じている可能性が考えられた。

その一方、CYP3A 酵素誘導剤による CYP3A4 遺伝子プロモーターの活性化や CYP3A 酵素遺伝子発現誘導に対する CUR の作用には、24 時間では抑制、また 72 時間では増強という、二相性が示された。これらの作用については複数の機構が関与している可能性が考えられる。

例えば、CUR は AMPK や CDK などの細胞内シグナル伝達分子や細胞周期関連分子の活性を変動させる (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**, 377, 2009、*J. Neuro-oncol.*, **85**, 263, 2007)。これら分子の活性変動は PXR (CYP3A 酵素誘導に関わる核内受容体) の活性変動につながる (*J. Biol. Chem.*, **283**, 30650, 2008、*Biochem. Pharmacol.*, **82**, 1771, 2011) ことから、これら分子が CUR の作用発現に重要である可能性も考えられる。

② TBZ について

TBZ は単独処理により、CYP3A4 遺伝子プロモーターの活性化に対して増強作用を示し、さらに、CYP3A 酵素誘導剤との複合処理によっても、相加/相乗的な増強作用を示したが、CYP3A 遺伝子発現にはいずれの場合にも影響を与えなかった。これまでにヒト初代培養肝細胞において、高濃度 (50 μ M) の処理により CYP3A4 遺伝子誘導作用が報告されている (*Xenobiotica*, **38**, 574, 2008) ことから、TBZ は低用量ではプロモーター活性化を優先的に引き起こし、高用量では CYP3A4 遺伝子発現誘導も引き起こす可能性が考えられ、より高濃度での検討が必要と思われた。

③ BHT について

BHT は単独処理することで、いずれの間においても CYP3A4 遺伝子プロモーターを活性化する一方、CYP3A4 酵素遺伝子発現誘導に関しては、72 時間処理で低下作用を示した。これまでに、BHT はヒトの肝臓で CYP3A4 酵素遺伝子を誘導することが報告されており (*Xenobiotica*, **38**, 574, 2008)、本結果もこれを支持するものであった。

複合処理では、NIC や TAM による CYP3A4 酵素遺伝子発現誘導に対して抑制作用を示すのに対し、RIF による誘導に対しては抑制作用を示さず、誘導剤ごとに相互作用の機構が異なることが示された。また、BHT と類似の作用・構造を持つ酸化防止剤である Butylated hydroxyanisole (BHA) は転写因子である Nrf2 を活性化するが (*Mol. Carcinog.*, **45**, 841, 2006)、Nrf2 活性化は PXR 活性化を抑制することも報告されている (*Toxicol. In Vitro*, **24**, 452, 2010)。これらのことから、BHT も Nrf2 の抑制を介して PXR 活性化を抑制し、結果として CYP3A 酵素遺伝子発現誘導を抑制している可能性も考えられた。

④ PG について

PG は、単独で CYP3A4 遺伝子プロモーターの活性化に対してわずかに増強作用を示したが、CYP3A 遺伝子発現誘導に対しては影響を与えなかった。これまでに、PG はヒト初代肝細胞やラット肝での CYP3A 遺伝子誘導を引き起こさないことが示されており、本研究の結果もこれらを支持するものであった。

また、CYP3A 酵素誘導剤との複合処理で

は、誘導剤の種類により異なる作用を示し、CYP3A4 遺伝子プロモーター活性化と CYP3A 遺伝子発現との間の相関性は見られなかった。ゆえに、この転写後の調節機構が、この相互作用発現に関わっている可能性が考えられた。

E. 結論

本研究の結果から、試験した食品添加物は何れも単独では CYP3A 酵素誘導に対しわずかな作用しか示さなかったが、CYP3A 酵素誘導剤との複合処理時には、様々な機構によって CYP3A 酵素遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性が示された。特に CUR は、複合処理時間によって異なる影響を及ぼすため、それら標的分子の解明、あるいは *in vivo* での生体影響の把握が今後の課題となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masashi Sekimoto, Shinsuke Sano, Takuomi Hosaka, Kiyomitsu Nemoto and Masakuni Degawa: Establishment of a stable human cell line, HPL-A3, for use in reporter gene assays of CYP3A inducers. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

2. 学会発表

- 1) 田中裕有、関本征史、西川秋佳、梅村隆志、出川雅邦：プレグナン X 受容体依存的な CYP3A 酵素誘導に対する食品添加物の影響。第 57 回日本薬学会東海支部大会（名古屋）、要旨集、p.87、2011 年 7 月 9 日

- 2) 田中裕有、関本征史、西川秋佳、梅村隆志、出川雅邦：ヒト肝癌細胞株 HepG2-PXRLucA3 での CYP3A 酵素発現へのクルクミンの影響。日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2011（名古屋）、講演要旨集、p.75、2011 年 11 月 23 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

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の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：食品の複合反応が酸化および窒素化ストレスに与える影響
「抗酸化物質と金属の反応が活性酸素種生成に及ぼす影響」

研究分担者	：	中澤 裕之	所属	星薬科大学	薬品分析化学教室
研究協力者	：	斉藤 貢一	所属	星薬科大学	薬品分析化学教室
	：	伊藤 里恵	所属	星薬科大学	薬品分析化学教室
	：	岩崎 雄介	所属	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。また、健康補助食品としてビタミンなどが含有されている食品が数多く流通している。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、食品中に含まれる抗酸化物質（フェノール性化合物、チオール化合物、ビタミン類）に着目し、金属との反応が ROS 生成に及ぼす影響について評価した。金属との複合反応がラジカル発生能（Prooxidant）及ぼす影響を検討したところ、オルト位にフェノール性水酸基を有する化合物とビタミンは二価の銅と反応し、ROS が生成されることが明らかとなった。

A. 研究目的

2008 年 4 月から特定健診・特定保健指導が始まり、国民の健康意識は増加傾向にある。特に、メタボリックシンドロームは高血圧や糖尿病と密接な関係があり、これらの疾患の発現には活性酸素種（ROS）が関与していると考えられている。

ROS が過剰に生成されることでさまざまな疾患を惹起することから、これらを消去する抗酸化物質の摂取は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、赤ワインやコーヒーなどに多く含ま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。そのため、手軽に摂取できる

健康食品が人気を博している。

一方、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。ビタミン A を摂取することで、動脈硬化症をわずかに悪化させるといった報告もされている。これらのことから、食品中に含まれる抗酸化物質の安全性を評価することは重要であると考えられる。

本研究では、食品中に含まれる抗酸化物質（フェノール性化合物、チオール化合物、ビタミン類）に着目し、金属との反応が ROS 生成に及ぼす影響について評価した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

測定対象物質であるカフェイン酸、フェルラ酸、ケルセチン、ルチン、エピガロカテキン、エピカテキン、ガロカテキン、チアミン、リボフラビン、ニコチンアミド、パントテン酸、ピリドキシン、ピオチン、葉酸、シアノコバラミン、アスコルビン酸、エルゴカルシフェロール、コレカルシフェロール、トコフェロール、メナジオンは和光純薬社製を用いた。クロロゲン酸、キナ酸、レスベラトロール、カテキンは東京化成工業社製を使用した。エピガロカテキン、エピカテキンガラート、ガロカテキンガラート、カテキンガラートは Sigma 社製を使用した。

金属として塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化銅 (I)、塩化亜鉛、塩化鉄 (III) は和光純薬社製を用いた。硫酸銅 (II)、硫酸アンモニウム鉄 (II) は関東化学社製を用いた。

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. 電子スピン共鳴装置 (ESR) による 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。ESR による Prooxidant 作用の評価には、 α -(4-Pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitron (POBN) を用いたスピントラッピング法によって評価した。

試料調製は PBS 180 μ L に 20 mM に調製した測定対象物質 30 μ L、DMSO に溶解した POBN (100 mM) を 30 μ L、金属 (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。

C. 研究結果

Prooxidant 作用の評価のために ESR を用い測定を行った。フェノール性化合物と各種金属を反応させたところ、フェノール性化合物と銅または鉄が反応することでヒドロキシラジカルが生成されることを確認した (Fig. 1)。特に生成量が多かった銅に着目し検討したところ、フェノール性化合物と銅濃度の比率が 2:1 のときに最も ROS が生成されることが分かった (Fig. 2)。

この結果を踏まえ、食品中に含まれる各種フェノール性化合物と銅の反応を比較検討したところ、オルト位にフェノール性水酸基を有する化合物について、ROS の生成が認められた (Fig. 3)。

また、同一の反応系にキレート剤である EDTA や Bathocuproinedisulfonic acid、抗酸化系酵素である Catalaseなどを添加した際、ヒドロキシラジカルの生成は認められなかった (Fig. 4)。これらの結果から、反応には銅が関与し、過酸化水素が生成していることが明らかとなった。

同一の系を用い、チオール化合物およびビタミンと金属の反応を検証した。その結果、チオール化合物と銅の反応については、ROS の生成は認められなかった (Fig. 5)。しかし、抗酸化系ビタミンであるビタミン A 群、ビタミン C、ビタミン D 群、ビタミン E は銅と反応することでフリーラジカルの産生が認められた (Fig. 6)。

D. 考察

食品中に含まれるフェノール性化合物と金属の反応がROSの生成に与える影響についてESRを用いて評価した。得られた結果から、オルト位に水酸基を有する化合物と銅が反応することで最もROSの生成が認められた。一方、フェルラ酸のようにオルト位の片方がメチル基で置換されている化合物はROSの生成が認められなかった。

オルト位に水酸基を有するフェノール性化合物が銅とキレート錯体を形成し、銅が一電子還元を受ける際にROSが生成されることが報告されている。このことから、食品中に含有されているフェノール性化合物についても、オルト位に水酸基を有する化合物は二価の銅と反応し、ROSを生成することが示唆された。

他方、チオール化合物やビタミン類については、抗酸化力が強いビタミンA群、ビタミンC、ビタミンD群、ビタミンEが金属と反応することでROSの生成が認められた。還元鉄や還元銅は溶存酸素と反応し、金属が酸化される際にROSが生成されることが知られている。抗酸化系ビタミンは酸化された金属を還元させる作用があると考えられ、金属のレドックスサイクルを促進することで、ROSが生成された可能性が考えられた。

E. 結論

本研究において、フェノール性化合物やビタミンなど抗酸化物質として謳われている化合物と金属の反応がROSの生成に関与しているかを*in vitro*の系で検証した。

フェノール性化合物については、オルト位に水酸基を有する化合物は銅と反応し、

ROSを生成することが明らかとなった。更に、この反応によって過酸化水素が生成されていることを示した。

チオール化合物とビタミン類については、一部の化合物と銅の反応でROSが生成していることが明らかとなった。

本研究の結果から、抗酸化物質と金属を同時に摂取した場合、ROSが生成される可能性を示唆し、今後、生体への影響を考える必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Y. Iwasaki, T. Hirasawa, Y. Maruyama, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, T. Umemura, A. Nishikawa, H. Nakazawa, Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. *Toxicol. in Vitro*, 25(7), 1320-1327, (2011).

2) Y. Iwasaki, M. Nomoto, M. Oda, K. Mochizuki, Y. Nakano, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, T. Umemura, A. Nishikawa, H. Nakazawa, Characterization of nitrated phenolic compounds for their anti-oxidant, pro-oxidant, and nitration activities. *Arch. Biochem. Biophys.*, 513(1), 10-18, (2011).

3) Y. Iwasaki, K. Mochizuki, Y. Nakano, N. Maruya, M. Goto, Y. Maruyama, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Comparison of fluorescence reagents for simultaneous determination of hydroxylated phenylalanine and nitrated tyrosine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.*, 26(1), 41-50,

(2012).

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

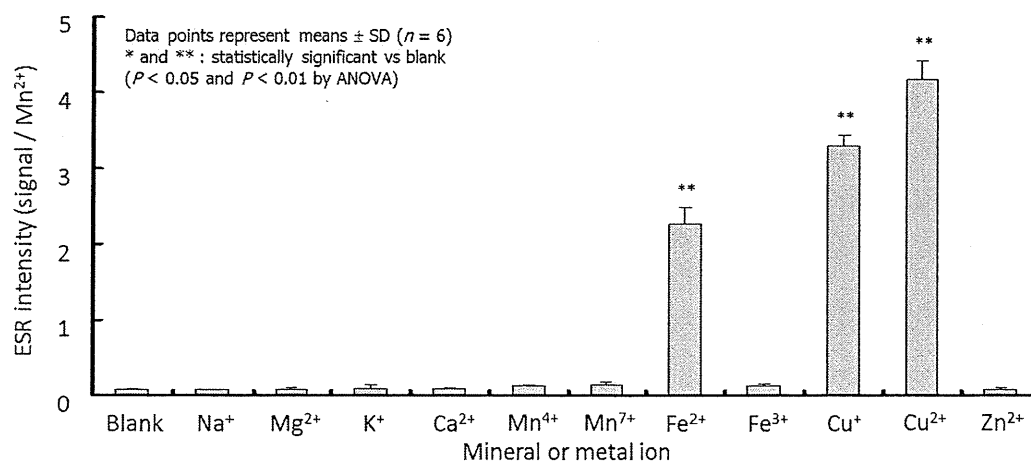


Figure 1 Effect of mineral and metal on prooxidant activity

The reaction mixture consisted of mineral or metal

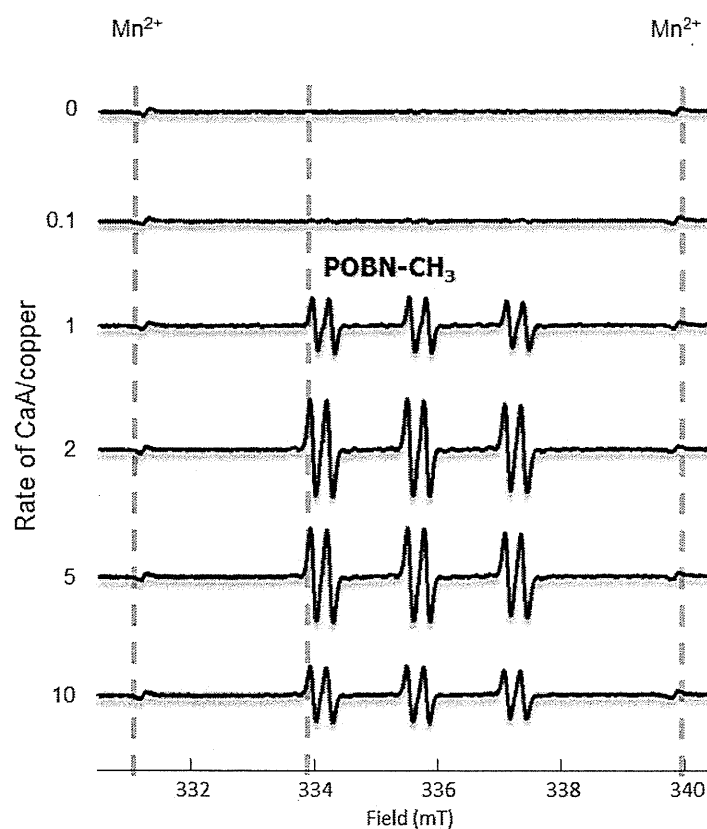


Figure 2 Representative ESR spectra of the interaction between CaA and copper

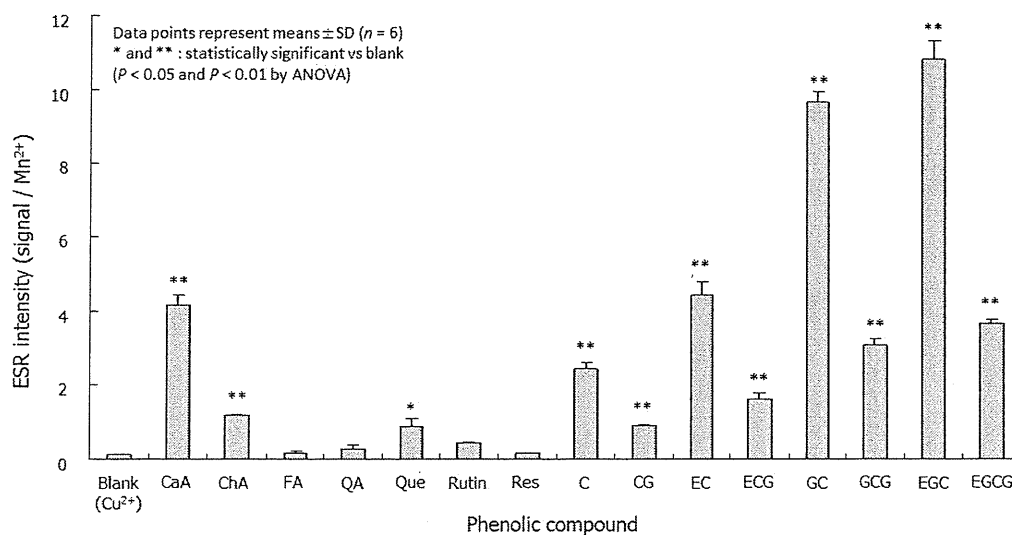


Figure 3 Prooxidant activities in the interaction between phenolic compounds and copper
 CaA, caffeic acid; ChA, chlorogenic acid; FA, ferulic acid; QA, quinic acid; Que, quercetin;
 Res, resveratrol; C, catechin; CG, catechin gallate; EC, epicatechin; ECG, epicatechin gallate;
 GC, gallic catechin; GCG, gallic catechin gallate; EGC, epigallocatechin; EGCG, epigallocatechin gallate

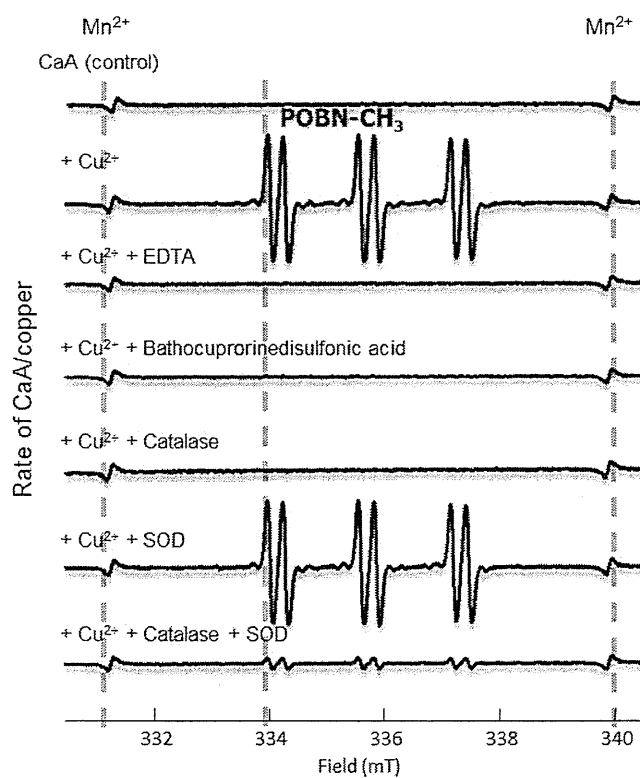


Figure 4 Effect of chelator and antioxidant enzyme on ROS generation

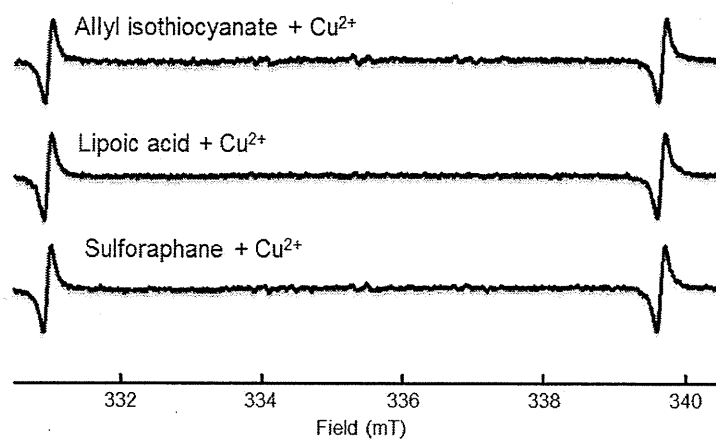


Figure 5 Prooxidant activities in the interaction between thiol compounds and copper

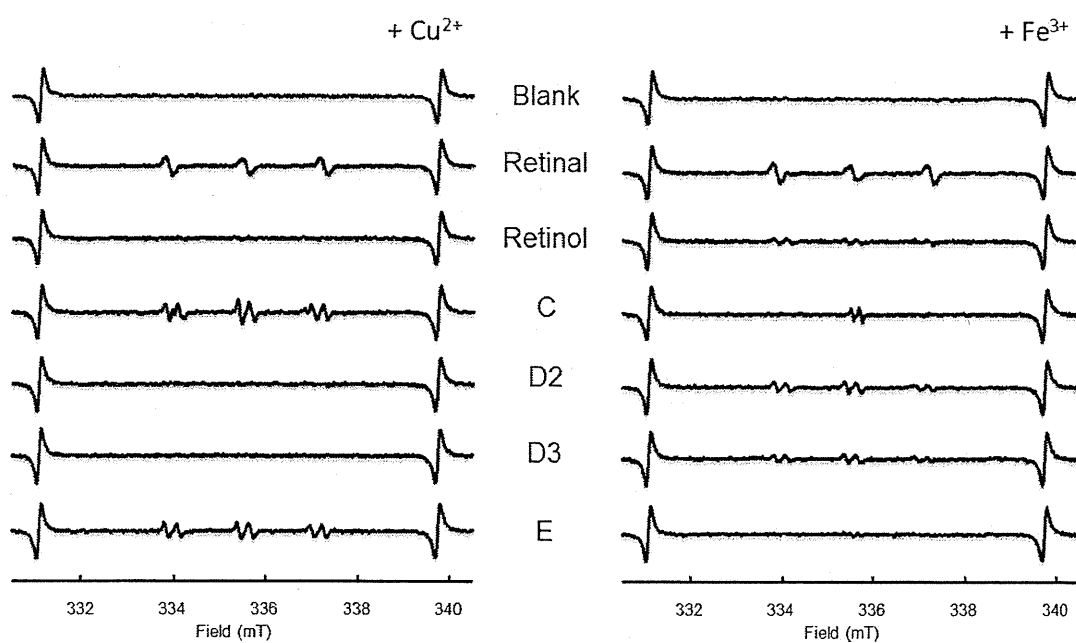


Figure 6 Prooxidant activities in the interaction between vitamin compounds and copper or iron