

る自己免疫疾患の発症が報告されている。Sobel 等⁸⁾は自己免疫疾患モデル動物の(NZB×NZW) F1 マウスを用いた実験で、メトキシクロル、o,p'-DDT 及びクローロデコンの慢性投与が膜性糸球体腎炎誘発及び自己 DNA に反応する抗体の産生を引き起こすことを報告しており、農薬投与による免疫攪乱が、自己免疫疾患を引き起こす異常免疫担当細胞を出現させる可能性を示唆している。さらに本年度の結果から、免疫抑制作用をもつ農薬の複合暴露によってその影響が増強された場合、その後の免疫攪乱に及ぼす影響も強まることが示唆された。

E. 結論

本研究では、有機塩素剤（メトキシクロル）、有機リン剤（パラチオン）及び殺虫剤用共力剤（ピペロニルブトキシド）の複合暴露による免疫抑制能及びアレルギー性喘息及ぼす影響を検索した。獲得免疫抑制検出実験では、メトキシクロルとパラチオンを複合投与したマウスにおいて、単剤暴露と比較して IgM 抗体産生能、T 細胞及び B 細胞数の相乗的な増加が、メトキシクロルとピペロニルブトキシドを複合投与したマウスにおいて、単剤暴露と比較して IgM 抗体産生能及び B 細胞数の相乗的な増加が認められた。

アレルギー喘息検出実験では、メトキシクロルとパラチオン及びメトキシクロルとピペロニルブトキシドを複合暴露したマウスにおいて、アレルギー喘息で特徴的に認められる、肺門リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞数、肺胞洗浄液中の細胞数及びケモカイン量が単剤暴露群と比較して相乗的に増加した。

これらの結果から、本試験条件下では、メトキシクロルとパラチオン及びメトキシクロルとピペロニルブトキシドの複合暴露により、獲得免疫能が相乗的に抑制され、アレルギー喘息作用が相乗的に増悪することが示唆された。また、その組合せにより作用点に違いがある事も明らかとなった。

F. 引用文献

- 1) Temple L. et. al.: Volume 1 Chapter 9 ELISA to measure SRBC-specific serum IgM: Method and data evaluation In: Method in Immunotoxicology, edited by Burleson G.R., Dean J.H., and Munson A.E., pp. 137-157, Wiley-Liss Inc., New York, 1995.
- 2) Jerne, N. K., and Nordin, A. A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140:450, 1963.
- 3) Saha S and Banerjee BD. Effect of sub-chronic Lindane exposure on humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 795-802, 1993.
- 4) Banerjee BD, Remachandran and Hussain QZ. Sub-chronic effect of DDT on humoral immune response in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 37, 433-440, 1986.
- 5) Crittenden PL, Carr R and Prurt SB. Immunotoxicological assessment of Methyl parathion in female B6C3F1 mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 54, 1-20, 1998.
- 6) Carson, D. S., Tribble, P. W., and Weart, C. W. Pyrethrins combined with piperonyl butoxide (RID) vs. 1% permethrin (NIX) in the treatment of head lice. *Am. J. Dis. Child* 142:768-769, 1988..
- 7) Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T. Apoptosis in immunocytes induced by several types of pesticides. *J Immunotoxicol.* 7, 39-56, 2010.
- 8) Sobel ES, Gianini J, Butfiloski EJ, Croker BP, Schiffenbauer J, Roberts

SM. Acceleration of Autoimmunity by Organochlorine Pesticides in (NZB × NZW)F1 Mice Environ. Health Persp., 113, 323-328, 2005.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Miyashita, L., Tajima, Y., Wada, K., Nishino, R., Ueda, H., and Harada, T. Role of regulatory T cells in the induction of atopic dermatitis by immunosuppressive chemicals. Toxicol Lett, 213, 392-401, 2012.

- 2) Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Miyashita, L., Tajima, Y., Wada, K., Nishino, R., Ueda, H., and Harada, T. Immunotoxicity in mice induced by short-term exposure to methoxychlor, parathion, or piperonyl butoxide. J Immunotoxicol, 2012, in press

2. 学会発表

- 1) 短期間暴露による環境化学物質免疫評

価法の検討：福山朋季、小坂忠司、林宏一、宮下理沙、田島由香里、上田英夫、原田孝則第 39 回日本毒性学会（仙台，2012）

- 2) NC/Nga マウスアトピー性皮膚炎モデルを用いた環境中免疫抑制化学物質によるアトピー性皮膚炎増悪機序の解明：福山朋季、小坂忠司、宮下理沙、西野里沙子、林宏一、上田英夫、原田孝則、第 19 回日本免疫毒性学会（東京，2012）

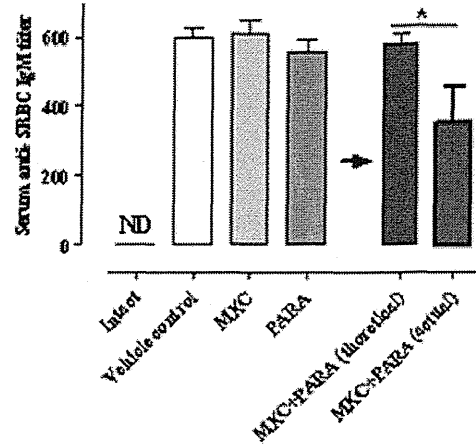
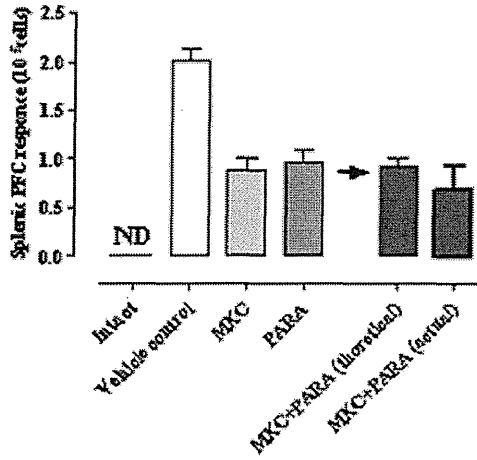
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

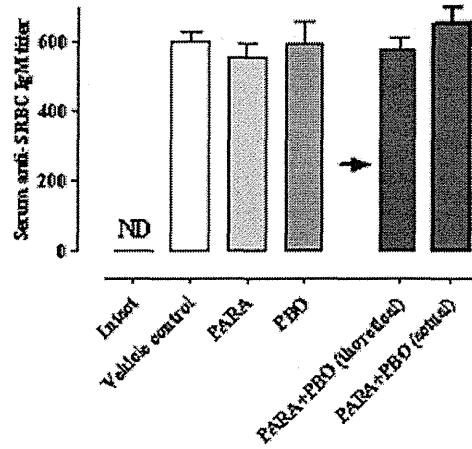
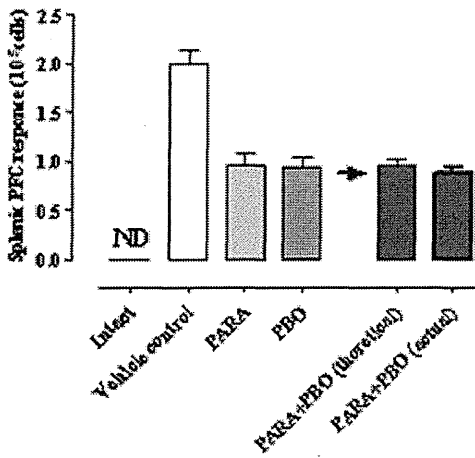
Figure 1

Anti-SRBC IgM response in female Balb/c mice treated with test chemicals.

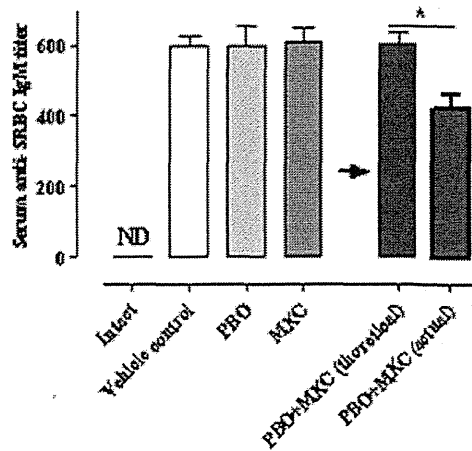
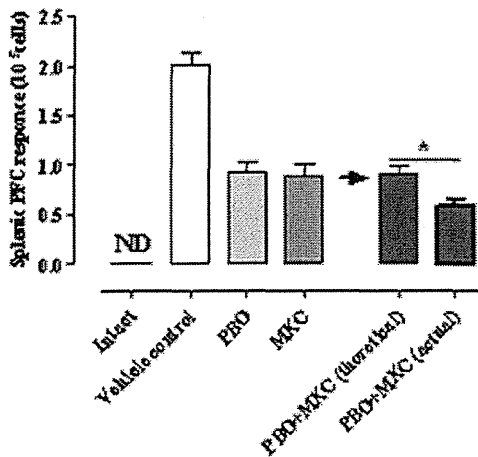
MXC+PARA



PARA+PBO



PBO+MXC



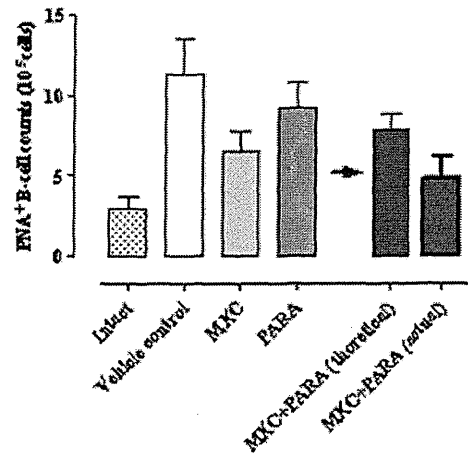
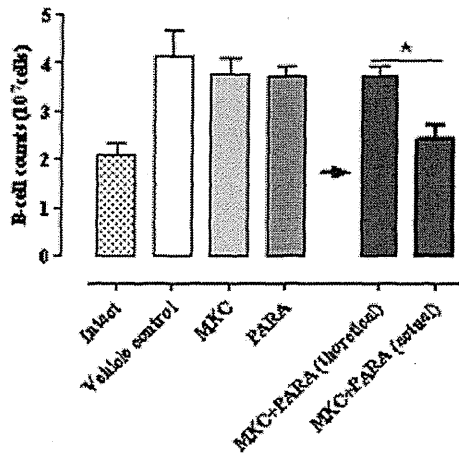
MXC = methoxychlor, PARA = parathion, PBO = piperonyl butoxide, DEX = dexamethasone, Cp = cyclophosphamide

*P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the theoretical group

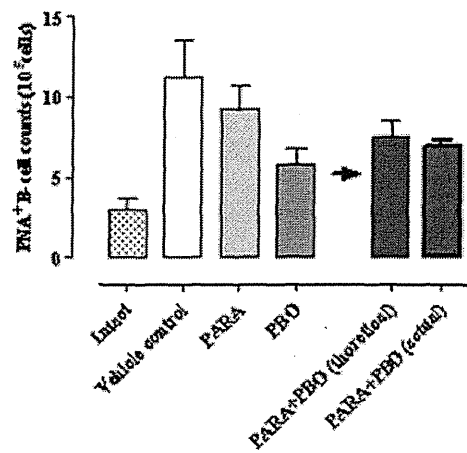
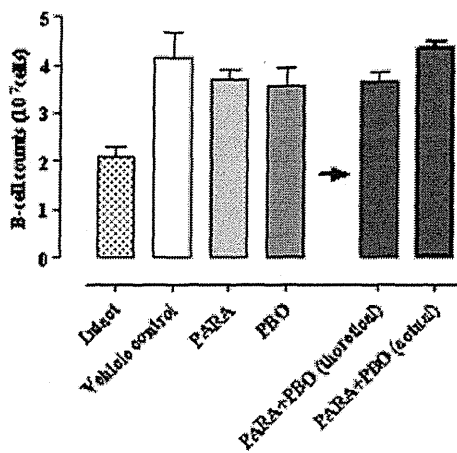
Figure 2

B cells among splenocytes in female Balb/c mice treated with test chemicals.

MXC+PARA



PARA+PBO



PBO+MXC

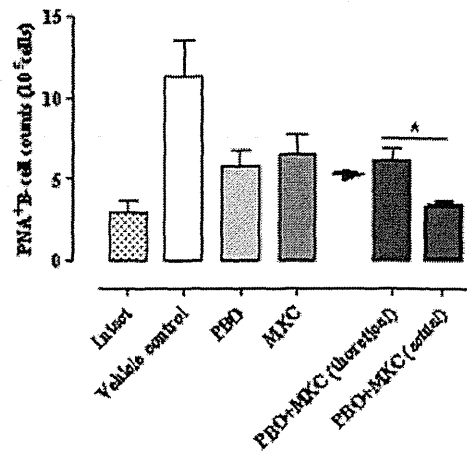
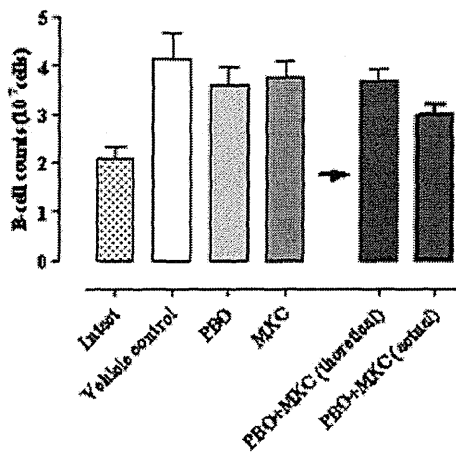
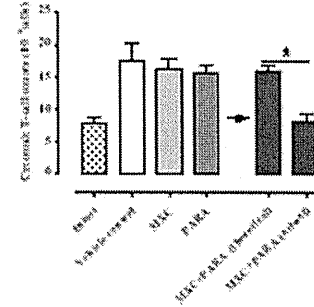
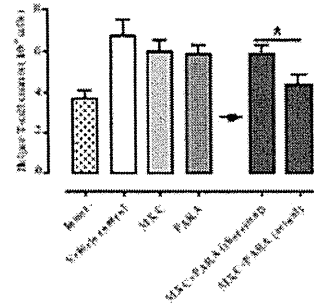
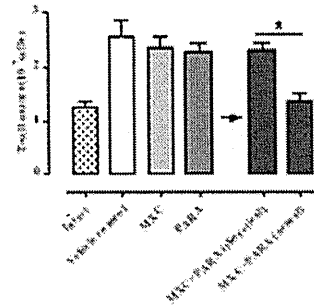


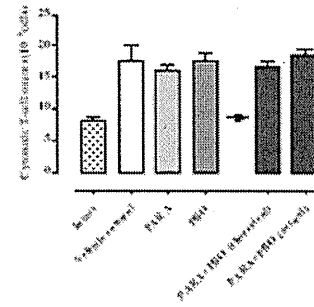
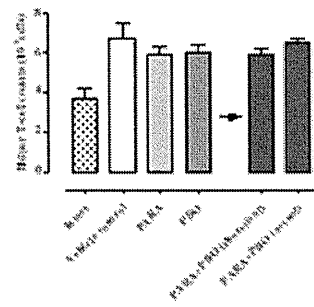
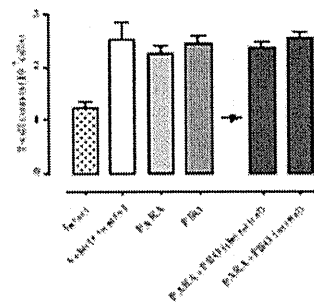
Figure 3

T cells among splenocytes in female Balb/c mice treated with test chemicals.

MXC+PARA



PARA+PBO



PBO+MXC

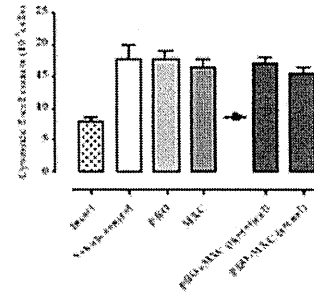
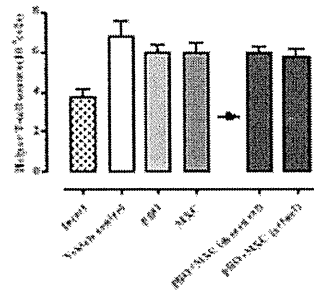
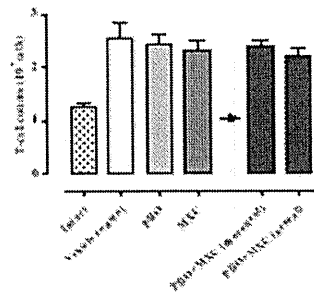
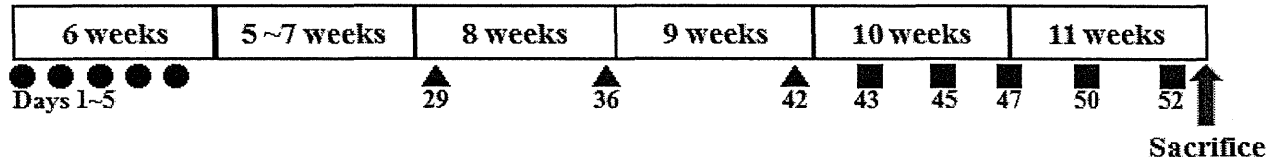


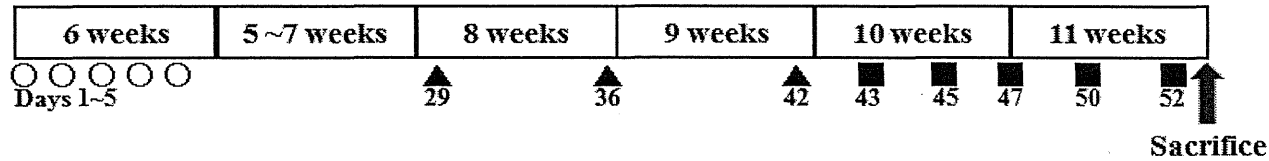
Figure 4

Experimental protocol of allergic asthma model.

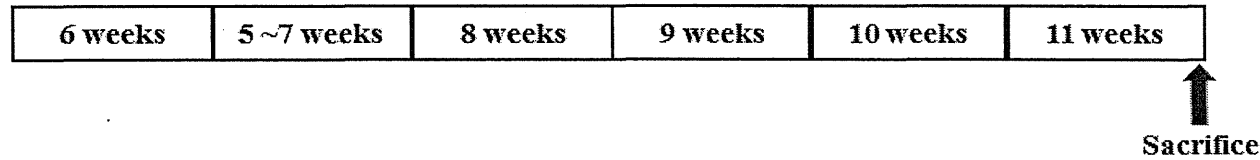
Treated group



Vehicle control group



Intact group



- : Oral exposure to immunosuppressive chemicals
- : Oral exposure to vehicle control (corn oil)
- ▲ : Sensitization by intraperitoneal injection of OVA (with ALUM)
- : Challenge by inhalation exposure of OVA

Figure 5

Inhalation exposure system

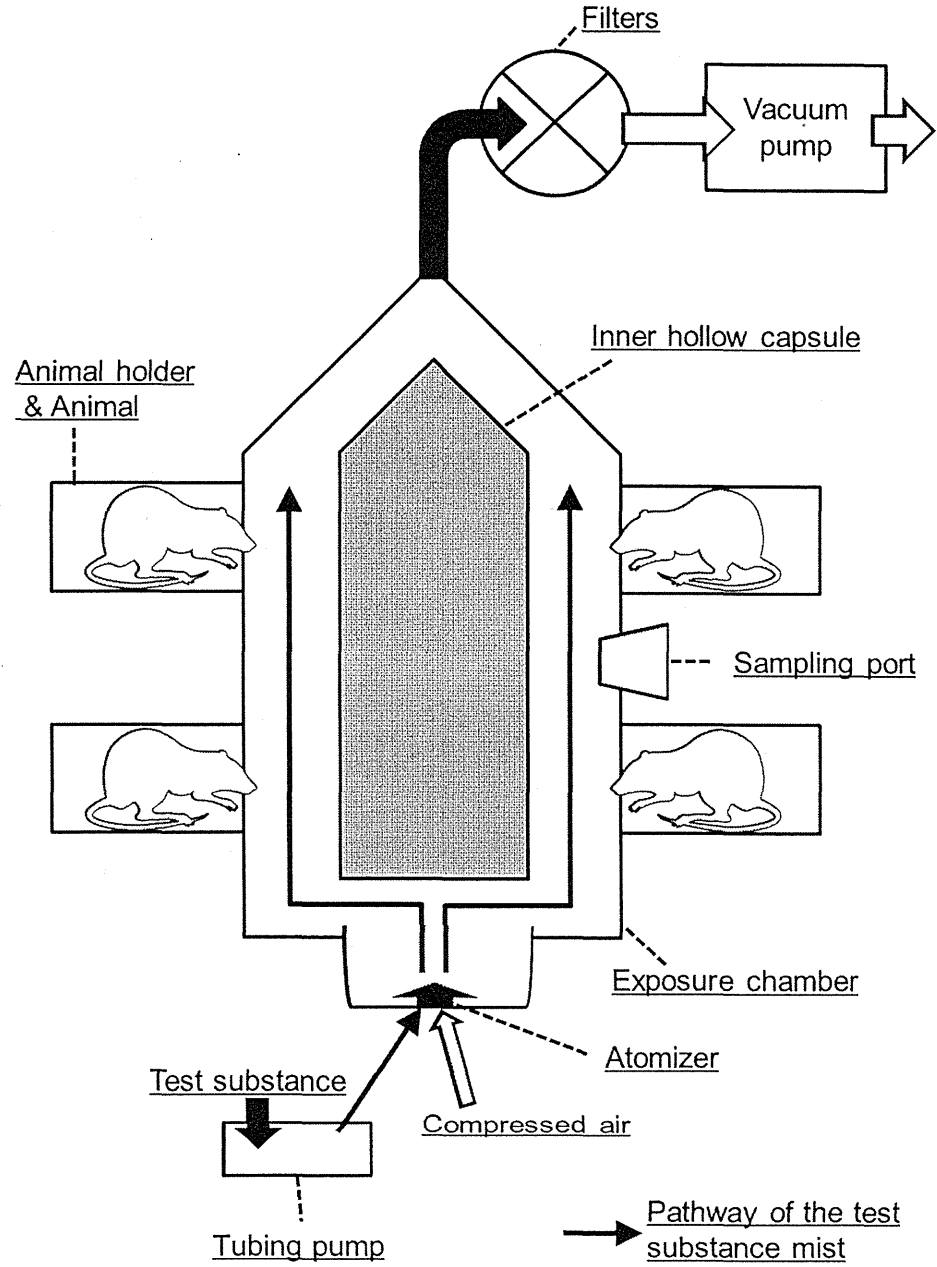
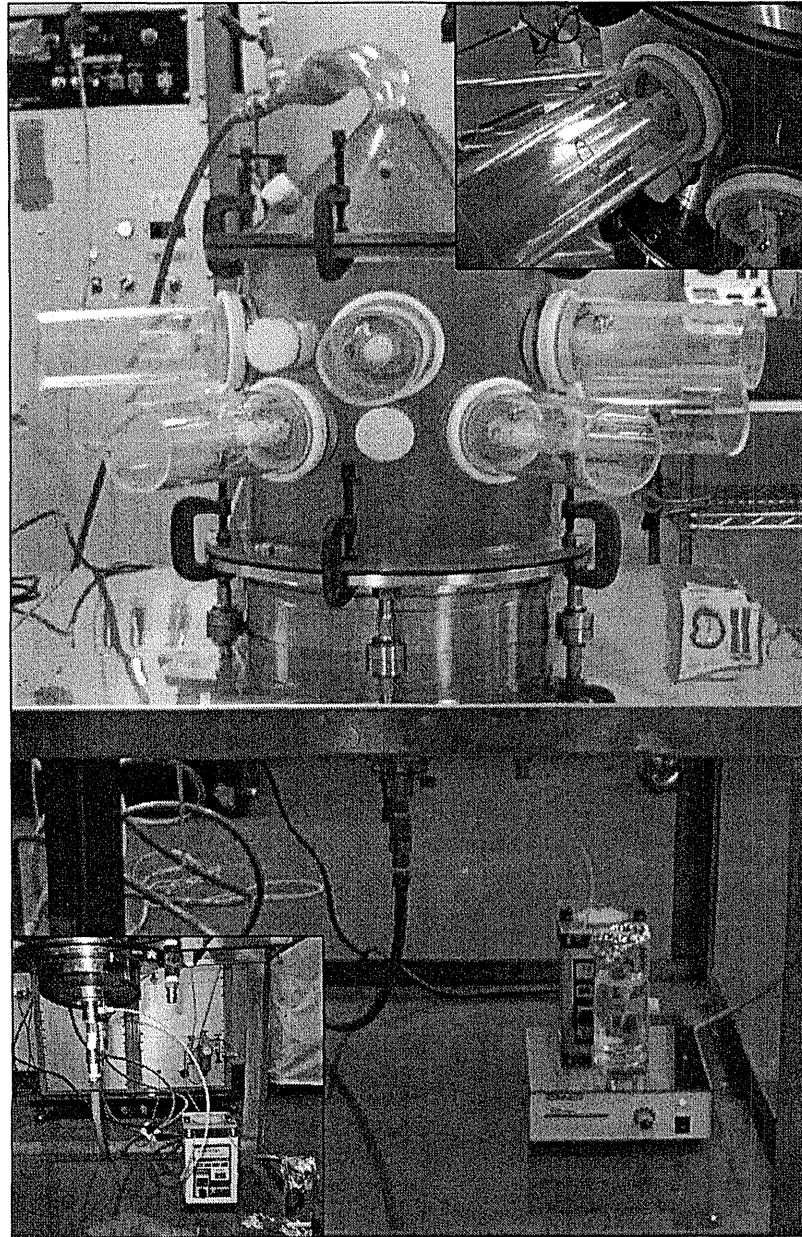
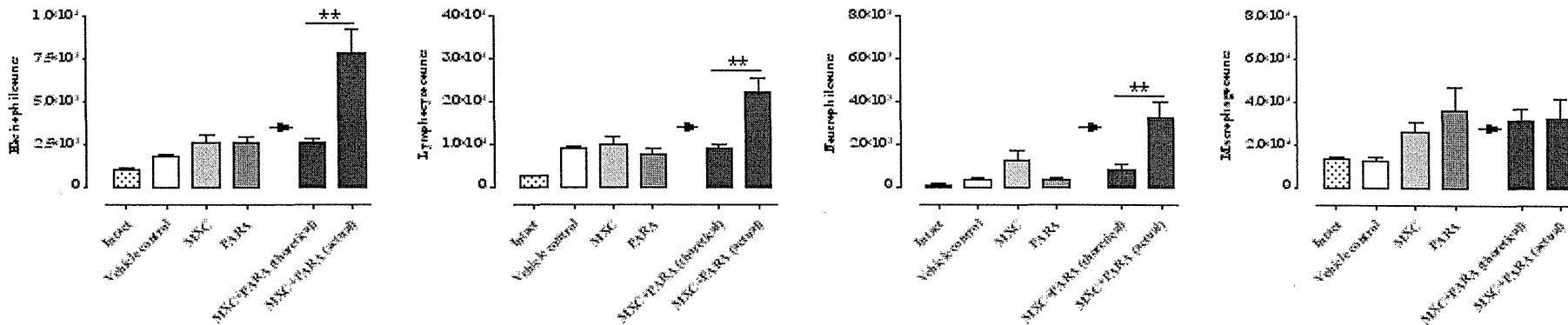


Figure 6 Differential cell counts among BALF in female Balb/c mice treated with test chemicals.

MXC+PARA



PBO+MXC

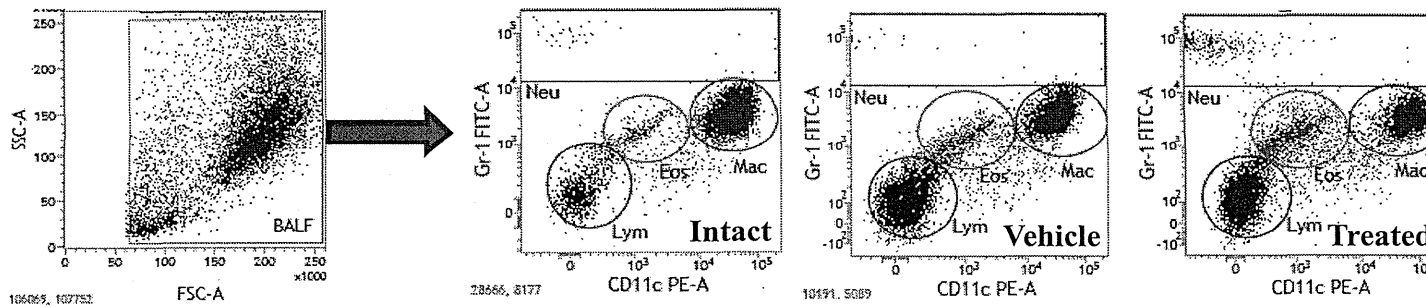
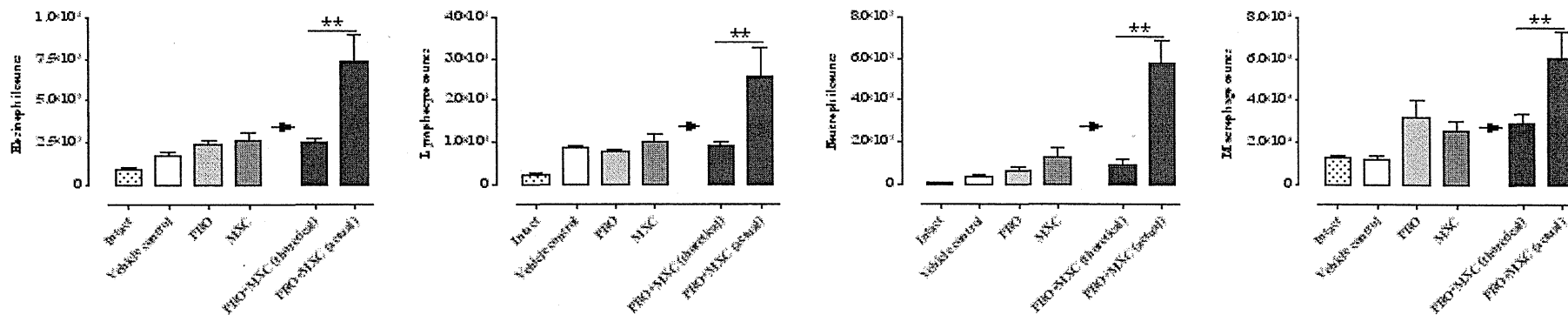
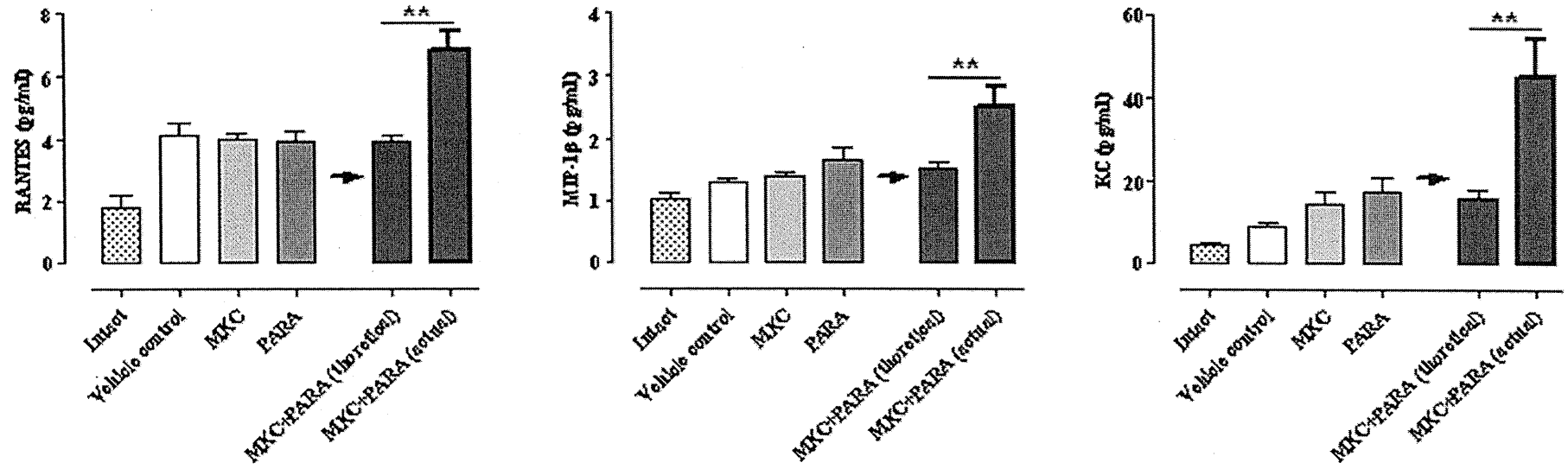


Figure 7

Chemokine levels among BALF in female Balb/c mice treated with test chemicals.

MXC+PARA



PBO+MXC

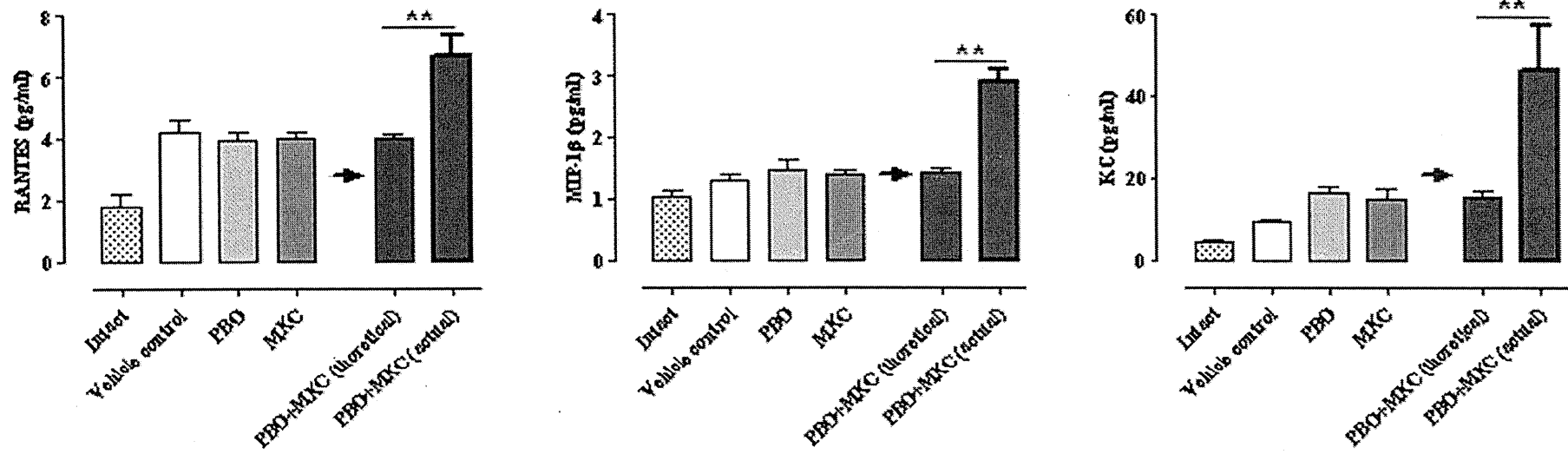
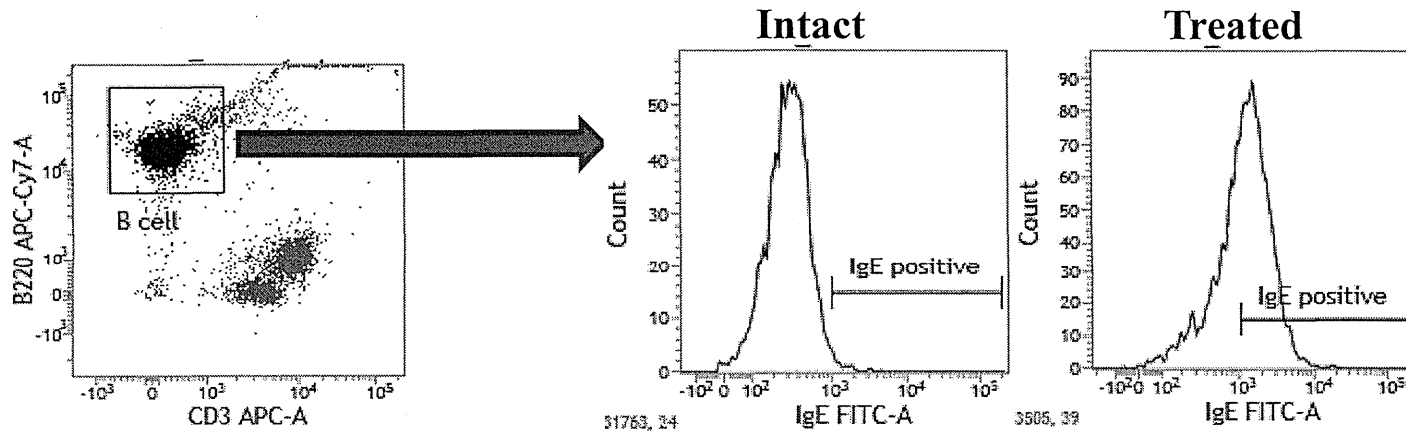
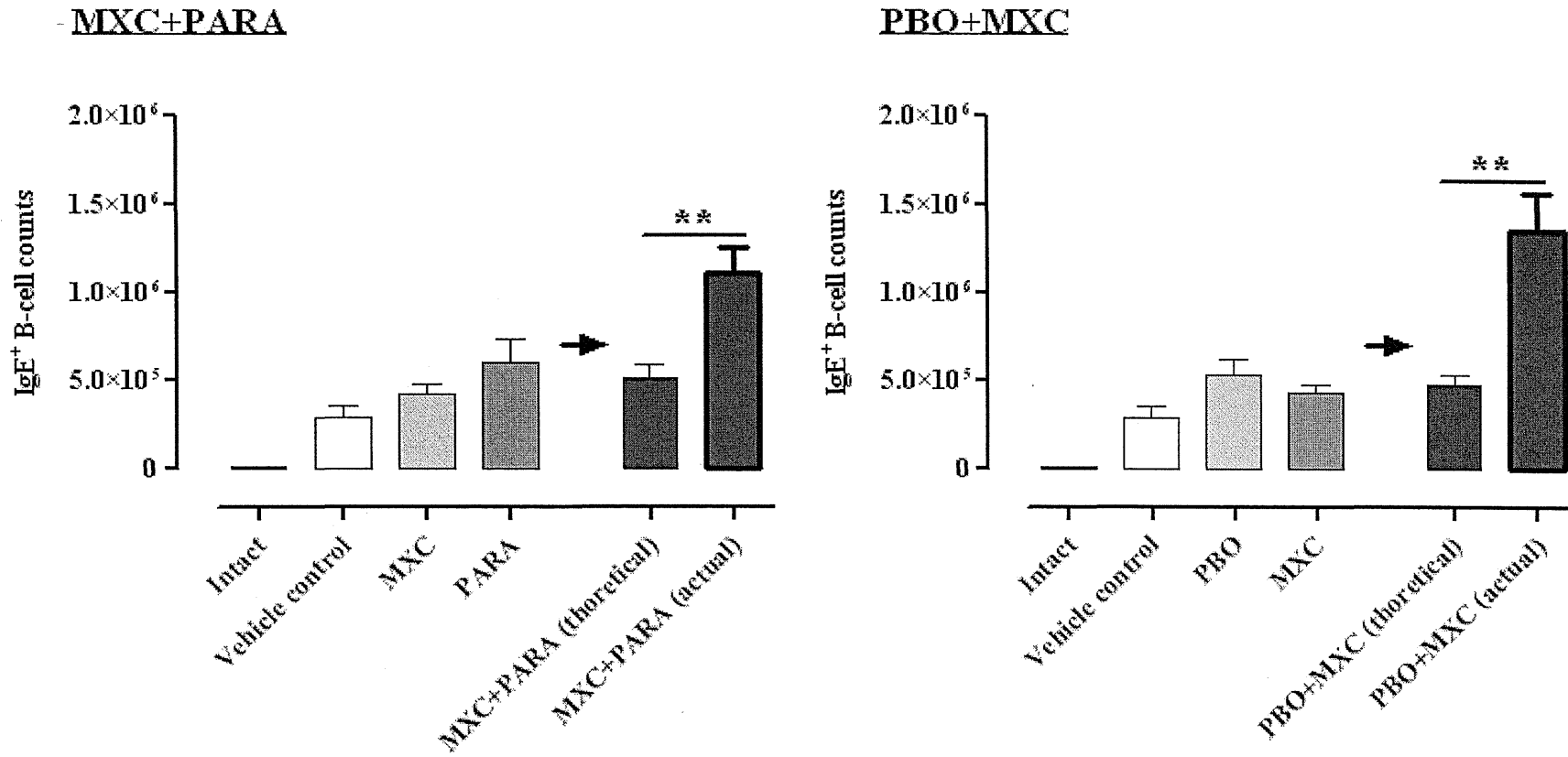


Figure 8 Chemokine levels among cervical lymph node in female Balb/c mice treated with test chemicals.



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：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
CYP1A/3A 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： 氏名 出川 雅邦

所属 静岡県立大学 薬学部教授

研究協力者： 氏名 関本 征史

所属 静岡県立大学 薬学部講師

研究要旨

昨年度までに、ヒトプレグナン X 受容体 (PXR) リガンド検索用細胞株 HPL-A3 に対するクルクミン (CUR) と CYP3A 酵素誘導剤の同時処理により、CYP3A 酵素誘導剤による CYP3A4 プロモーター活性化および CYP3A 酵素遺伝子発現誘導に対しても、早期では抑制作用を、後期では増強作用をそれぞれ示すことを明らかとしてきた。本年度は、シトクロム P450 (CYP) 酵素誘導に対するクルクミン (CUR) と CYP3A 酵素誘導剤の複合影響機構を追究した。

まず、処理時間で相反する作用が発揮される原因として、生成する CUR 代謝物の関与を推定し、主代謝物のテトラヒドロクルクミン (THC) の CYP3A 酵素誘導効果を検討した。しかし、THC と CYP3A 酵素誘導剤との間に複合影響は観察されなかった。そこで次に、CUR が VDR リガンドとなりうることに着目し、CYP3A 酵素誘導における VDR リガンドと CYP3A 酵素誘導剤との相互作用を解析した。その結果、VDR リガンドと CYP3A 酵素誘導剤との間に相加的な複合影響が見られた。

以上の結果から、CUR と CYP3A 酵素誘導剤は、VDR を介した機構をはじめ、複数の機構によって複合影響を発揮している可能性が示された。

A. 研究目的

ヒト肝 CYP3A4 酵素は異物（医薬品を含む）の代謝に関わる主要な酵素であり、その発現変動は異物の薬効・毒性発現に大きな影響をもたらす。したがって、CYP3A4 遺伝子発現変動に影響を及ぼす化合物の把握は、適切な薬物治療を考える上で重要である。実際に、米国食品医薬品局 (FDA) では、食品成分（サプリメント）の安全性評価の一環として、異物代謝酵素の発現変動を含めた薬物動態試験を行うことを推奨している。

我々はこれまでの先行研究において、ヒト CYP3A 酵素誘導を簡便に解析できるル

シフェラーゼレポーター細胞株を樹立し、これを用いて、食品中化学物質の肝 CYP 酵素誘導における複合影響を解析してきた。その結果、着色料として繁用されているクルクミン (CUR) が、CYP3A 酵素誘導剤による CYP3A4 プロモーター活性化および CYP3A 酵素遺伝子発現誘導に対して、早期では抑制作用を、後期では増強作用を示すことを見いだしている。本研究では、CYP3A 酵素の誘導に対する CUR と CYP3A 酵素誘導剤の複合影響の発現機構を追究した。

B. 研究方法

1) 被検化合物

クルクミン (CUR) およびジメチルスルホキシド (DMSO) は和光純薬より購入した。テトラヒドロクルクミン (THC)、リファンピシン (RIF)、および1,25-ジヒドロキシビタミン D (VD₃) はいずれも Sigma 社より購入した。いずれの化合物も DMSO に最終濃度の 1000 倍濃となるように溶解して使用した。

2) 試験細胞株

本研究では、ヒト PXR リガンド検索用細胞株 HPL-A3 を用いた。本細胞は、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) を含んだルシフェラーゼレポータープラスミドを、ヒト PXR 強制発現プラスミドとともに HepG2 に導入し、ヒト 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。両細胞とも、5%胎児ウシ血清と硫酸カナマイシンを含んだ DMEM 培地を用い、5%炭酸ガス下、37°C で培養した。

3) PXR 活性化の測定

HPL-A3 細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように播種し、48 時間前培養後、被検化合物を処理した。処理後、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) と混和して生じた発光をルミネッセンサー 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。

4) 遺伝子発現量の測定

HPL-A3 細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように播種し、被検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) を用いてリアルタイム 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。

(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いずれも、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

C. 研究結果

1) HPL-A3 細胞での CYP3A4 プロモーター活性化に及ぼす CUR 代謝物の影響

ラット肝細胞懸濁液を用いた検討より、CUR は速やかに代謝を受け、テトラヒドロクルクミン (THC) などに代謝されることが示されている。さらに、THC をはじめとする CUR の代謝物は、CUR よりも強い生理活性を有する場合がある。そこで、PXR 活性化剤と CUR との複合影響の経時的な変化 (早期抑制/後期増強) と CUR の代謝との関連性を検討した。

HPL-A3 細胞に CUR (10 μM) あるいは THC (10 μM) をそれぞれ単独、あるいは RIF (1 μM) と複合処理し、24 時間および 72 時間後の CYP3A4 プロモーター活性化に及ぼす影響を検討した。CUR は 24 時間後に活性化抑制作用、72 時間後に活性化増強作用を示したが、これら作用は THC ではないずれも認められなかった。

2) PXR 活性化剤と VDR 活性化剤の複合影響

HPL-A3 の性状を詳細に解析したところ、強制発現させた PXR だけでなく、ビタミン D 受容体 (VDR) の発現増加が観察された。この VDR は PXR と同様に CYP3A4 遺伝子を正に制御することが報告されている。また、大腸がん細胞において CUR は VDR の活性化を介して CYP3A4 酵素を誘導するこ

とが示されている。そこで、HPL-A3 細胞に PXR 活性化剤と VDR 活性化剤を同時処理場合の複合影響を検討した。

HPL-A3 細胞に PXR 活性化剤である RIF (1 μ M) を単独、あるいは VD₃ (0.1 μ M) と複合処理し、24 時間後および 72 時間後の CYP3A4 プロモーター活性化および CYP3A 遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。その結果、RIF と VD₃ を 24 時間複合処理することで、これら発現量の相加的な増加が観察された。

D. 考察

CUR は HPL-A3 細胞での PXR リガンドによる CYP3A4 プロモーターの活性化や CYP3A 酵素遺伝子発現誘導に対しても、24 時間で抑制作用を、72 時間で増強作用を示す。そこで、CUR 作用の時間による相違が CUR 代謝物の生成に起因する可能性を考え、CUR 代謝物である THC を用いた検討を行った。しかし、THC には活性化の抑制・増強作用はいずれも見られなかった。したがって、CUR そのものの作用が時間により変化していることが示唆される。

これまでに、CUR は Jun N-terminal Kinase (JNK) の活性化抑制を介して VDR 活性化に伴う CYP3A4 遺伝子発現を抑制することが示されている。従って、CUR 処理早期で見られた CYP3A4 プロモーター活性の抑制は、JNK の抑制に起因する可能性が考えられる。さらに最近、食品成分であるフコキサンチンが転写共役因子 SRC-1 と PXR の相互作用を阻害して CYP3A4 遺伝子発現抑制を引き起こすことなども報告されており、CUR による PXR 活性化抑制との関連性に興味を持たれる。

後期に見られた CUR による CYP3A4 遺伝子プロモーター活性化の増強機構の 1 つとして、細胞内リガンド量の増加の可能性が考えられる。PXR リガンドである RIF や NIC、および TAM はいずれも異物排泄トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp/MDR1) の基質となることが知られている。一方、

CUR は P-gp の発現あるいは機能を阻害することが知られることから、CUR 処理後期でみられる CYP3A4 遺伝子プロモーター活性化の増強作用は、異物トランスポーターの阻害に伴う細胞内リガンド量の増加による可能性が示唆された。

本研究で用いている HPL-A3 細胞は、VDR を高発現しており、VDR 依存的に CYP3A4 遺伝子発現を誘導する。また最近、ヒト大腸がん細胞 Caco-2 において、CUR が VDR を介して CYP3A4 遺伝子発現を誘導することが報告された。したがって、CUR とヒト PXR 活性化剤の複合影響発現における VDR の役割にも興味を持たれる。そこでまず、PXR 活性化剤と VDR 活性化剤の複合処理が CYP3A4 遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、相加的な誘導増強作用が観察された。

HPL-A3 細胞には CYP3A4 遺伝子プロモーター中の PXR が結合すると報告されている XREM 領域 (-7839/-7208) 及び PXRE 領域 (-362/+53) を含むレポータープラスミドを導入している。VDR は、ヒト CYP3A4 遺伝子プロモーターの PXR 結合配列だけでなく、VDR 特異的な配列に結合することも示されている。これらのことから、本細胞では少なくとも VDR リガンドと PXR リガンドとの間に複合影響が見られることから、CUR による PXR 活性化作用増強にも関わる可能性が考えられた。

E. 結論

本研究ではヒト PXR 活性化を測定出来るレポーター細胞株を用いて、CUR と PXR リガンドとの複合影響について解析した。その結果、これら化合物は複数の機構により CYP3A 酵素の発現に対して複合影響を引き起こす可能性を明らかとした。今後、より詳細な機構を明らかとすることができれば、食品中化学物質の安全な使用に大きく貢献することが期待される。

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., 35, 677, 2012

2. 学会発表

- 1) 長澤孝真、田中裕有、関本征史、根本清光、出川雅邦：プレグナン X 受容体およびビタミン D 受容体の活性化を介した CYP3A4 遺伝子の発現. 第 39 回日本毒性学会学術年会 (仙台)、プログラム・要旨集、p.S237、2012 年 7 月 17 日
- 2) Masashi Sekimoto, Shinsuke Sano, Takuomi Hosaka, Kiyomitsu Nemoto, Masakuni Degawa: Establishment of a stable human cell line, HPL-A3, adaptable for the PXR/VDR-based reporter gene assays for screening of human CYP3A inducers. 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-VI) (Sendai, Japan), Proceedings, July 17-20, 2012

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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
金属とフェノール性化合物が反応することで生成する
新たな化合物に関する研究

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

研究要旨

食品中に含まれるフェノール性化合物としてケイ皮酸類縁化合物に着目し、Antioxidant作用および金属との反応による Prooxidant 作用について評価した。Antioxidant 作用の強さはフェノール性水酸基が多い化合物ほど増加していく傾向が認められた。一方、オルト位にフェノール性水酸基を持つ化合物は中性条件下で銅と反応することで活性酸素種 (ROS) の産生が認められた。更に、一部の化合物は金属と反応することにより、新たな化合物が生成された。

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

ているため、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。

本研究では、食品中に含まれるフェノール性化合物としてケイ皮酸類縁化合物に着目し、Antioxidant作用および Prooxidant作用について評価した。また、金属と反応して生成する新たな化合物についても検討した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

測定対象物質であるケイ皮酸、クマル酸、クロロゲン酸、シナピン酸、3-ヒドロキシ-4-メトキシケイ皮酸、3,4,5-トリヒドロキシケイ皮酸および3,4,5-トリメトキシケイ皮酸は東京化成工業社製を使用した。カフェイン酸およびフェルラ酸は和光純薬社製を用いた (Fig. 1)。

金属として塩化銅 (I) および塩化鉄 (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製造装置を用いて調製した。

B-2. DPPH 法による Antioxidant 作用の評価

Antioxidant 作用の評価には、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)を用い、DPPH ラジカルの消去率を吸光度によって測定することで評価した。各種フェノール性化合物に DPPH 溶液を加え、プレートリーダーを用いて波長 540 nm で測定した。

B-3. 電子スピン共鳴装置 (ESR) および HPLC/UV/ECD 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*-butylnitrone (POBN)を用いたスピントラッピング法によって評価した。

試料の調製は PBS 210 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 30 分間インキュベート操作を行い、氷冷後、ESR で測定した。

また、DNA に対する酸化ストレス評価は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、8-OHdG を測定した。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 10 mM リン酸二水素一ナトリウム：メタノール=97：3 を用いた。

B-4. フェノール性化合物と金属の反応

フェノール性化合物と金属との反応性を評価するためにフェノール性化合物と金属を混和し、それぞれ PBS または人工胃液中で反応を行った。得られた反応溶液は高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出/質量分析計 (LC/PDA/MS) で測定を行い、未知成分については核磁気共鳴装置 (NMR) で構造解析を行った。PDA 検出器の測定波長は 200~400 nm に設定した。分離カラムには Inertsil ODS4 (150 \times 2.1 mm) を使用し、移動相には水：アセトニトリル：1% 酢酸=80：10：10 を用いた。MS は ESI のポジティブイオンモードで測定を行った。

C. 研究結果

DPPH 法は簡便な Antioxidant 作用の分析法であり、現在でも汎用性の高い方法として認知されている。そこで、検討対象物質について Antioxidant 作用を評価した。その結果、フェノール性水酸基を多く持つ物質については、強い Antioxidant 作用を示す傾向があることが明らかとなった (Fig. 2)。

Prooxidant 作用の評価のために ESR を用いて測定を行った。検討した化合物については、オルト位にフェノール性水酸基を持つ、カフェイン酸、クロロゲン酸、3,4,5-トリヒドロキシケイ皮酸は銅と反応することで ROS の産生が認められた。しかし、シナピン酸はオルト位にフェノール性水酸基を持たないにも関わらず ROS が産生された。生体成分の酸化指標である 8-OHdG を HPLC/UV/ECD によって評価したところ、ESR で得られた結果と同様にカフェイン酸、クロロゲン酸、シナピン酸および 3,4,5-トリヒドロキシケイ皮酸と銅の反応によって DNA の酸化が促進された (Fig. 3)。

生体内における各々の化合物の安定性試験を行うために、人工胃液および PBS 中で反応を行い、経時的に測定を行った。人工胃液中では金属が共存しても、検討した対象物質は安定に存在していた。しかし、カ

フェイン酸およびシナピン酸については、PBS 中で銅と反応することで新たなピークを確認することができた (Fig. 4)。カフェイン酸と銅が反応してできた新たな化合物を MS および NMR で解析したところ、3-Carboxy-6,7-dihydroxy-1-(3',4'-dihydroxyphenyl)-naphthalene が生成されていることが明らかとなった (Fig. 5)。

D. 考察

食品中に含まれるフェノール性化合物の Antioxidant 作用の強さについて、DPPH 法によって評価した。Antioxidant 作用の強さはフェノール性水酸基が多い化合物ほど増加していく傾向が認められた。

フェノール性化合物と金属の反応による Prooxidant 作用の強さについて ESR を用い評価した。得られた結果から、酸性条件下では ROS の生成は認められなかった。しかし、オルト位に水酸基を有する化合物と銅が中性条件下で反応することで ROS の生成が認められた。オルト位に水酸基を有するフェノール性化合物と銅は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同様に、二価の銅と反応し、ROS を生成することが示唆された。しかし、シナピン酸はオルト位にフェノール性水酸基を持たないにも関わらず ROS の生成が認められた。

フェノール性化合物と金属が反応することで新たな化合物が生成される可能性が考えられたため、LC/PDA/MS を用い反応溶液の測定を試みた。その結果、カフェイン酸およびシナピン酸は中性条件下で銅と反応することにより、新たな化合物が生成されることが明らかとなった。新たに生成された化合物は金属と反応することで ROS が生成される可能性があることから、今後、構造解析を含め、Antioxidant 作用および Prooxidant 作用の評価が必要であると考えられる。

E. 結論

本研究において、フェノール性化合物に代表される抗酸化物質と金属の反応が 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中性条件下で銅と反応し、ROS を生成することが明らかとなった。更に、一部の化合物は金属と反応することで新たな化合物が生成された。

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、一部の化合物については生体内で新たな化合物を生成し、ROS が産生される可能性を示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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

1) 岩崎 雄介、石井 雄二、伊藤 里恵、斉藤 貢一、梅村 隆志、中澤 裕之：食品中の化学物質の複合反応に関する研究 - 活性酸素種および活性窒素種の生成 -，第 25 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (2012 年 8 月 8 日 東京)

2) ケイ皮酸類縁化合物の抗酸化作用および活性酸素種産生に関する研究
佃 優里、岩崎 雄介、伊藤 里恵、斉藤 貢一、中澤 裕之 (星薬大) (第133回 日本薬学会 2013年3月27日-30日 神奈川)

- | | |
|------------------------------|--------|
| G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) | 該当なし |
| 1. 特許取得 | 3. その他 |
| 該当なし | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | |

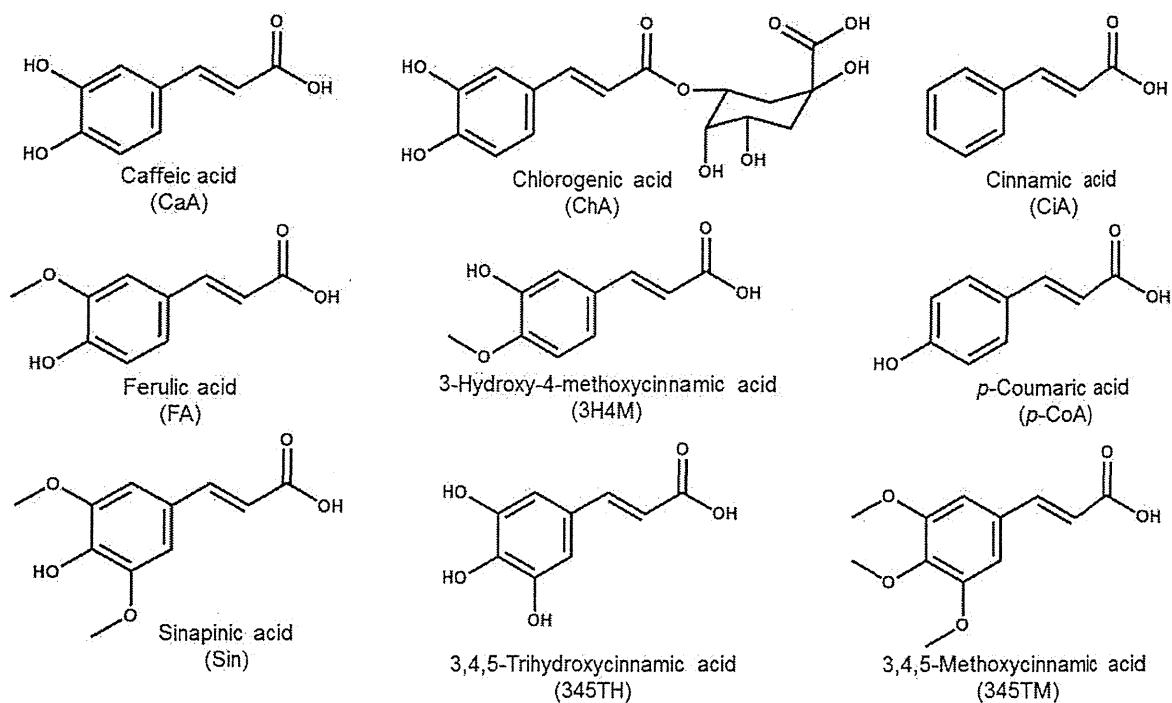


Figure 1 検討した測定対象物質

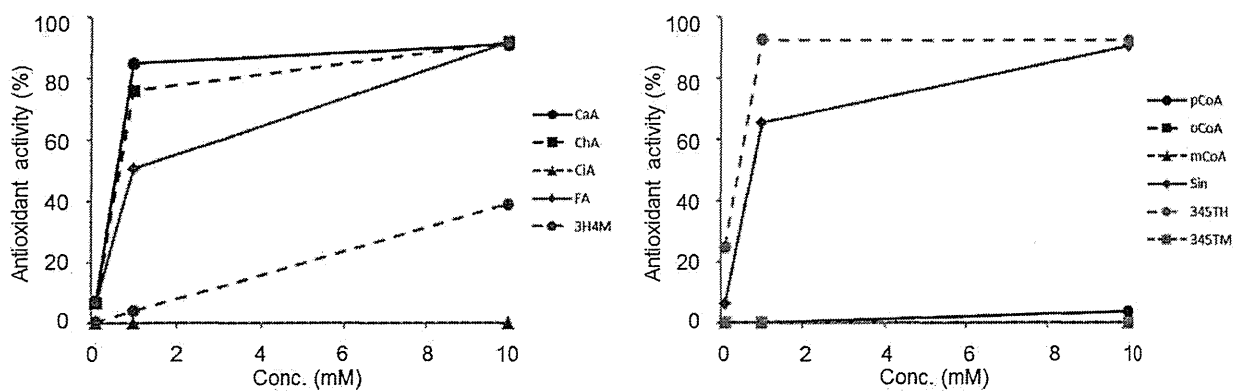


Figure 2 DPPH 法による Antioxidant 作用の評価

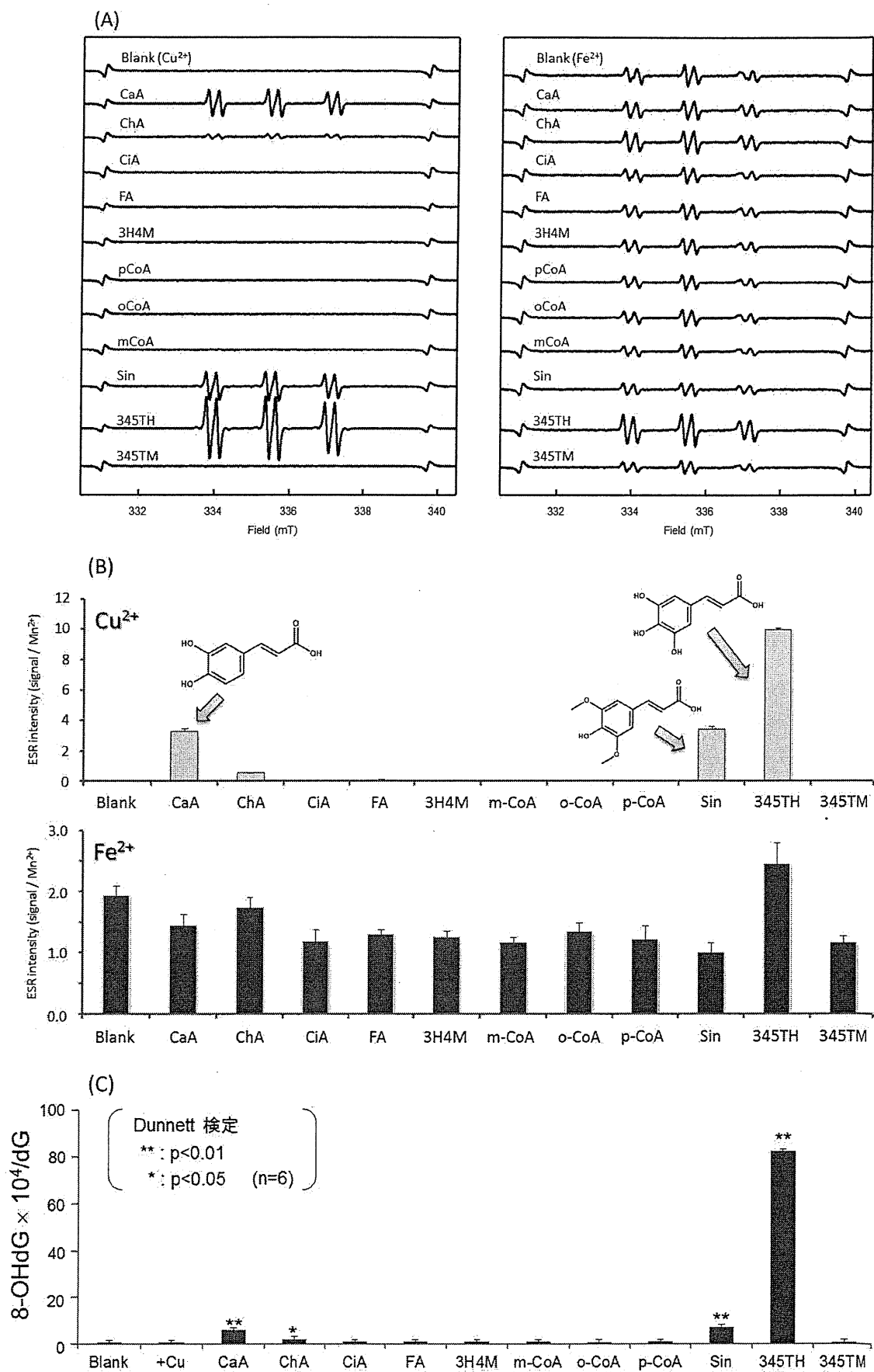


Figure 3

フェノール性化合物と金属との反応による Prooxidant 作用の評価
 (A) ESR スペクトル (B) Prooxidant 作用の結果 (C) DNA の酸化的損傷