

特別研究報告

## 生物システムに作用する化学物質の機能と

## 3次元構造相関の解明 (第一次)

(平成9年度～平成11年度)

世話人 佐竹元吉

生体内酵素、構成蛋白等の活性部位はその三次元構造が特異性を示す。例えば、生体蛋白質のアミノ酸はL体が主で、その組み合わせからペプチドや蛋白質が作られ複雑な三次元構造を形成している。このような構成蛋白によって組織される生物システムに作用する医薬品、機能性食品、その他の生活環境物質も独自の三次元構造を有している。

したがって、生体の機能のメカニズムを解明するには両者の立体構造を解析することが不可欠であるにも拘わらず、蛋白の構造に関する情報が極く一部のものに限られていたため、少数の医薬品を除いては殆どなされていない。しかし、近年のコンピューターの高速化による高磁場核磁気共鳴装置や分子力場計算等ハード、ソフト両面の進展により分子の複雑な三次元構造の予測や解析が可能になり、一方では遺伝子解析による生体タンパクの情報が集積されつつあることから、低分子化合物と生体蛋白の相互作用を三次元的に解明する環境が整い始めてきた。このような機会をとらえ、当所で研究対象としている種々の化学物質について生物システムにおける機能と三次元構造相関の研究を行うことは、生命活動の動的解析の基礎をなすもので、医薬品をはじめとした化学物質の真の有効性、安全性の解明に貢献する重要な研究課題と考えられる。

生体構成蛋白や受容体の精製技術、物理測定機器の精密化、高速化の発展に呼応して、種々の生体反応系が解明されはじめ、これらの結果はラショナル・ドラッグ・デザインという新しい医薬品の開発分野に取り入れられている。この手法を発展させれば、かつてはマクロな捉え方しかできなかった低分子化合物と生物システムとの反応を、分子個体の特異的、選択的な反応として見直すことが可能であることが示唆される。これまで構造活性相関については専ら置換基の比較による二次元的解析が行われているのみであったものも、メカニズムの本質に迫る三次元解析に期待が寄

せられている。また、最近、抗酸化剤が動脈硬化予防に関与することが明らかにされたが、その機能と構造相関、安全性、有効性についての研究が急務とされている。さらに、塩素化エチレン化合物は、各種産業で広く用いられており、その廃棄や漏出のため、微量ではあるが環境中にかなり広範囲に検出されている。しかし、社会的に軽視できない塩素化エチレン化合物の毒性機構はまだ解明されておらず、代謝活性化に関与するシトクロムP450種の変動をとらえて三次元的に本質を明らかにすることは重要な課題である。又、未解明とされている発癌プロモーションの過程を、複数の化合物を用いてこれらに共通に関わる遺伝子を探査し、その構造に関わる事象を明らかにすることは効果のある発癌制御をもたらしものと期待される。これらの研究を通して得られる結果は、化学物質の生物システム上の有効性、安全性を確立するものである。

以上を包括する研究として、第1期研究期間(平成9年度～11年度)においては以下に記す研究を実施した。

1. 強い生理活性を有する化合物の立体構造と受容体分子の三次元解析
  - (1) 高分解能NMR, CDを基盤とする天然化合物の三次元構造解析の解明
  - (2) 化学計算を用いた環境化学物質の構造と反応性に関する研究
2. 緩やかな生理活性を有する化合物の構造と作用発現機構に関する解析
  - (1) ポリフェノールの抗酸化機構
  - (2) 天然に存在するフェノール系抗酸化剤の機能及び生理の解明に関する研究
3. 生体側から見た生理活性物質の構造と関連遺伝子の構造解析
  - (1) 塩素化エチレン化合物によるラット肝シトクロム

P450の変動：その構造活性相関の解明

(2) 化学物質の機能と細胞生物学的活性の間に介在する事象に関する研究

本研究は第II期研究期間として平成12年度から14年度の前定で継続されている。生体システムに關与する化学物質の有効性、安全性の解明に寄与することを目的に、それぞれの課題をより本質に迫るものとして推進させる前定である。

1. 強い生理活性を有する化合物の立体構造と受容体分子の三次元解析

(1) 真菌代謝産物 trichotetronine 類の三次元構造解析に関する研究

生薬部 関田節子, 代田 修, 佐竹元吉

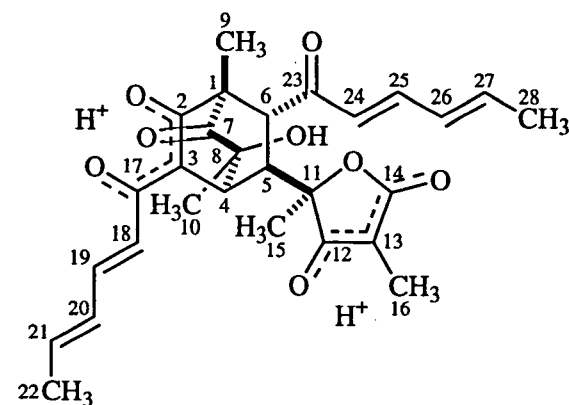
[目的]

真菌代謝産物は多様な立体構造を有していて特異的な生

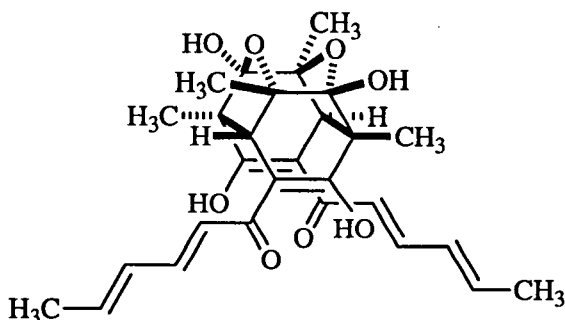
理活性を示すが、フェニルアラニン由来の芳香環と酢酸及びマロン酸由来の11~13員環又はこれから Baeyer-Villiger タイプの酸化を受けてきたと考えられる13~14員環の含酸素環を有するサイトカラシン類は HIV プロテアーゼ阻害活性を示すことが報告されている。マイコトキシン研究の一環として、我々は *Chaetomium globosum* よりトリプトファン由来の13員環骨格を有する新規サイトカラシンとして chaetoglobosin A-J を単離し構造解析を行ってきた。また、これらの化合物が細胞内アクチンに特異的な作用を示すこと、HIV プロテアーゼ阻害活性を示すことを報告してきた。そこで、今回は *Chaetomium* 属の菌類と同様に代謝産物の構造と活性に多様性があることで知られている *Trichoderma* 属について検討し、得られた新規化合物について NMR や CD スペクトルによる立体構造を含めた構造解析を行った。

[方法]

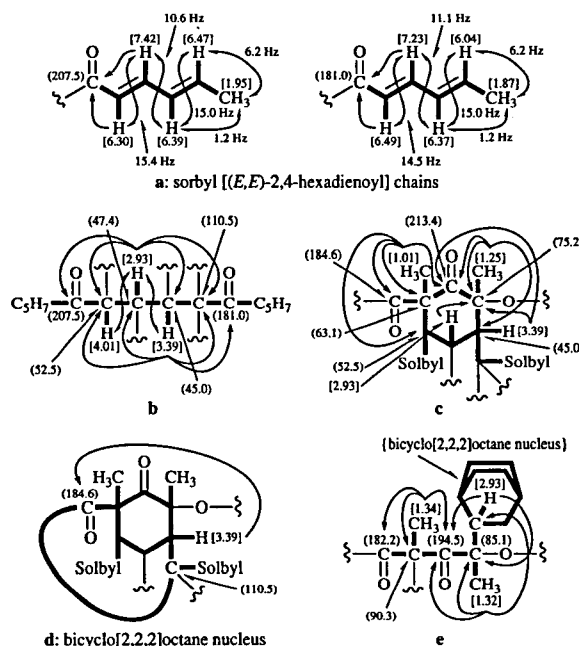
干し草から分離した *Trichoderma* sp. を米培地で 25℃, 3週間静置培養後、ジクロロメタンおよび酢酸エチルエステルで抽出し、得られたエキスについてシリカゲルカラムならびに ODS カラムを用いた MPLC と HPLC を繰り返し、既知化合物 trichodimerol (3) と共に trichotetronine (1), dihydrotrichotetronine (2) と命名した2種類の新規化合物を単離精製した。これらの化合物について FAB-MS により分子量と分子式を、UV ならびに IR スペクトルにより部分構造を推定し、<sup>1</sup>NMR, <sup>13</sup>NMR および CD 測定により平面構造式と三次元構造解析を行った。



1  
2: 24,25-dihydro



3

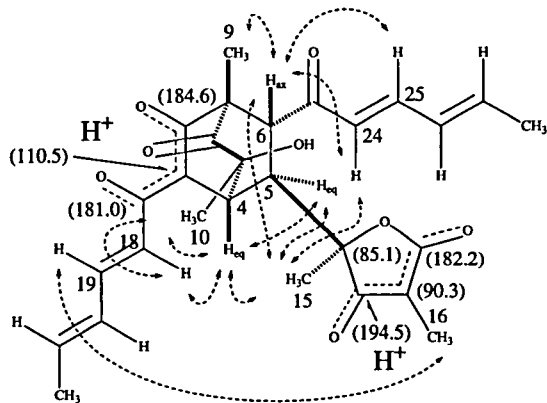


~: H-H coupling correlations [ ]: δ<sub>H</sub>, ppm  
 ~: HMBC correlations ( ): δ<sub>C</sub>, ppm

fig. 1 NMR structure connectivities of 1 by H-H cosy and HMBC experiments

[結果と考察]

IR スペクトルより水酸基, 複数のケトン基, 強くキレートしたカルボニル基, 共役二重結合の存在が, UV スペクトルより共役二重結合に隣接するカルボニルの存在が予測された. Fig. 1 に示した <sup>1</sup>NMR, <sup>13</sup>NMR のピークの数値から 6 つの部分構造が, さらに H-H COSY, HMBC, NOE, NOESY の測定により部分構造のそれぞれの結合位が明らかとなり, 同時に相対立体構造を推定した (Fig. 2). 又,



--- : NOE correlations from NOESY experiment.  
( ) : δ<sub>C</sub>, ppm

fig. 2 Gross structure and relative stereochemistry of 1

Fig.3 に示した CD スペクトルにより絶対立体構造が決定した. これらの化合物は, 2, 4-dimethyl-hexaketide を出発物質とした生合成経路で, sorbyl-cyclohexadienone タイプの中

間体が 2 分子結合したものが trichodimerol (3) となり, 一方この中間体と sorbyl-tetronic acid タイプの中間体が Diels-

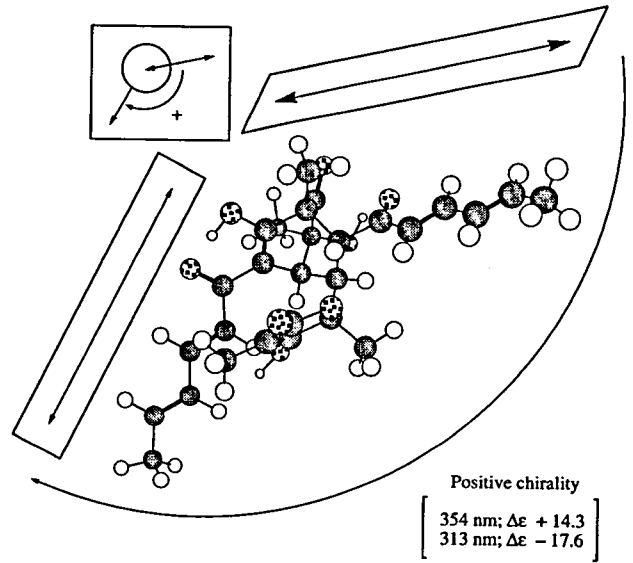
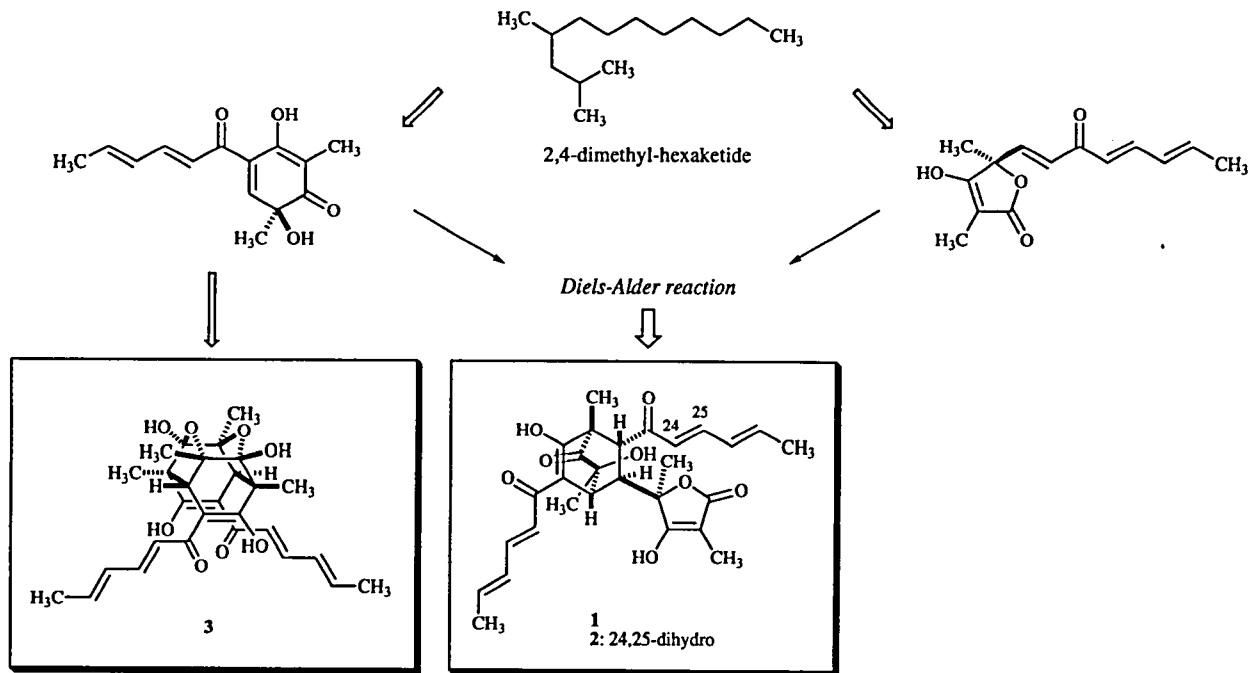


fig. 3 Absolute stereochemistry of 1 by CD spectral analysis

Alder 反応することにより trichotetronine(1), dihydrotrichotetronine (2) となるものと推察された (Scheme 1).

これらのスペクトル解析を, さらに, 立体異性体が複数ある Phytosphingosine 類の CD スペクトルによる構造決定の研究に展開したところ, 三次元構造を決定するには NMR と同様に CD スペクトルが極めて重要であった.

得られた結果は, 今後の生物システムでの活性メカニズム



Scheme 1 Positive biosynthetic route for trichotetronines and trichodimerol

の解明に発展させる予定である。

#### 発表論文

- (1) Osamu Shirota, Vibha Pathak, Chowdhury Faiz Hossain, Setsuko Sekita, Kosuke Takatori and Motoyoshi Satake: Structural elucidation of trichotetrones: polyketides possessing a bicyclo [2.2.2] octane skeleton with a tetronic acid moiety isolated from *Trichoderma* sp., *J. Chem. Soc., perkin Trans. 1*, 2961-2964 (1997)
- (2) Osamu Shirota, Koji Nakanishi and Nina Berova: Phytosphingosines-A facile Synthesis and Spectroscopic Protocol for Configurational Assignment, *Tetrahedron*, **55**, 13643-13658 (1999)

#### 関連する発表論文

- (3) Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Kuwano, H.: Structures of Chaetoglobosin A and B, Cytotoxic Metabolites of *Chaetomium globosum*, *Tetr. Letters*, **1973**, 2109-2112
- (4) Umeda, M., Ohtsubo, K., Saito, M., Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Udagawa, S., Sakabe, F., Kurata H.: Cytotoxicity of new cytochalasins from *Chaetomium globosum*, *Experientia*, **31**, 435-438 (1975)
- (5) J. V. Silverton, A. Akiyama, C. Kabuto, S. Sekita, K. Yoshihira and S. Natori: X-Ray Analysis of Chaetoglobosin A, an Indol-3-yl-[13] Cytochalasin from *Chaetomium globosum*, *Tetr. Letters*, **1976**, 1349-1350
- (6) I. Low, W. Jahn, Th. Wieland, S. Sekita, K. Yoshihira, S. Natori: Interaction between muscle Actin and Several Chaetoglobosins and cytochalasins, *Anal. Biochem.*, **956**, 14-18 (1979)
- (10) Yahara, I., Harada, F., Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S.: Correlation between Effects of 24 Different Cytochalasins on cellular Structures and Cellular Events and those on Actin Polymerization in vitro, *J. Cell Biol.*, **92**, 69-78 (1982)
- (11) 関田節子, 佐竹元吉: 科学技術振興調整費「エイズ等感染・発症制御のための基盤技術の開発に関する研究」平成7年度報告書

#### (2) サイトカラシン類 L-696,474 の HIV プロテアーゼ阻害活性作用機構の解析

有機化学部 栗原正明, 宮田直樹

#### [目的]

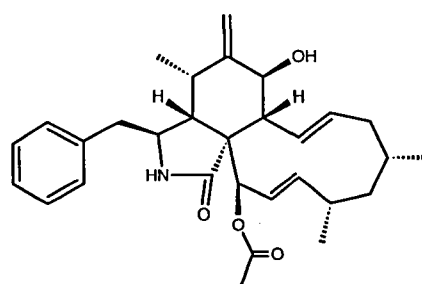
本特別研究では化学計算の手法を用いて以下の3つのテーマについて研究を行った。(1) カテキンの抗酸化作用機構の解析; (2) イソバリンより構成されるホモペプチドのコンフォメーション解析; (3) HIV プロテアーゼ阻害活性を有するサイトカラシン類 L-696,474 の活性作用機構の解析。(1), (2) については, 昨年の本国立医薬品食品

衛生研究所報告で発表したもので, ここでは (3) について報告する。

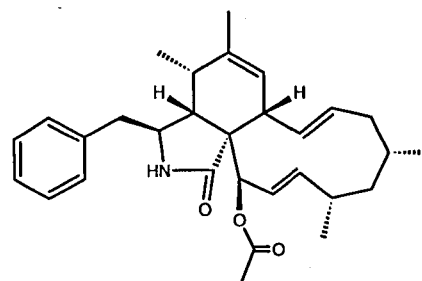
サイトカラシン類 1: L-696,474 は 1992 年メルク社のグループによって糸状菌 *Hypoxyton fragiforme* から単離され, 強い HIV プロテアーゼ阻害活性を有していた。しかし, この化合物の HIV プロテアーゼ阻害活性のメカニズムについては現在まで, 報告がない。そこで, 化学計算を用いた分子モデリングによりその作用機構の解明を行った。

#### [方法]

類似化合物である, L-696,475 は阻害活性が非常に低いことより, 6員環上の水酸基が活性発現に重要であることが考えられた。分子力学法によるコンフォメーションサーチ (MacroModel ver. 6.5; Monte Carlo Method; MM2\* Force



1: L-696,474



2: L-696,475

fig. 1 Structure of L-696, 474 and L-696, 475

Field) により 1 の最安定構造を求めた (Fig. 2)。多くの HIV プロテアーゼ阻害剤は, プロテアーゼ (ホモダイマー) の 2 つの 25 番目のアスパラギン酸と水素結合する水酸基と, 2 つの 50 番目のイソロイシンのアミド水素と水素結合をつくるカルボニル基を分子内に有している。また, これら水酸基とカルボニルの酸素原子間の距離は 4.7~4.9 Å 程度である。1 の 6 員環上の水酸基と  $\gamma$ -ラクタムの両酸素原子間の距離は先程の計算安定構造では 4.83 Å であった。

#### [結果及び考察]

1 において, 6 員環上の水酸基が活性発現に重要であり,

この水酸基の酸素原子と $\gamma$ -ラクタムのアミド酸素原子との距離が4.83 Åと、他の阻害剤と非常に近い値を示すこと

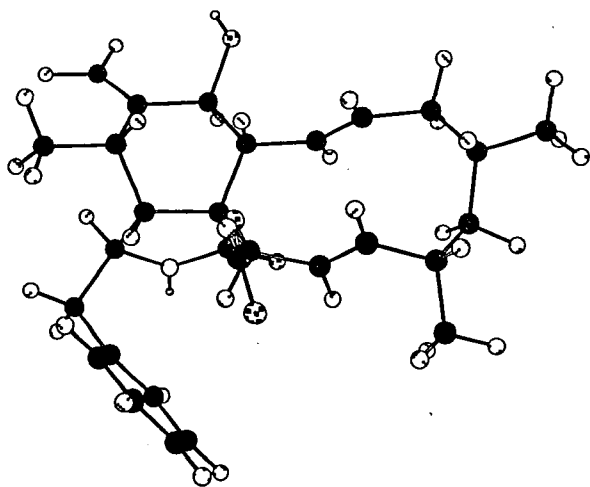


fig. 2 Structure of global minimum energy conformation calculated by Macro Model

より、この水酸基とアミドがプロテアーゼと水素結合を形成していると考えた (Fig. 3).

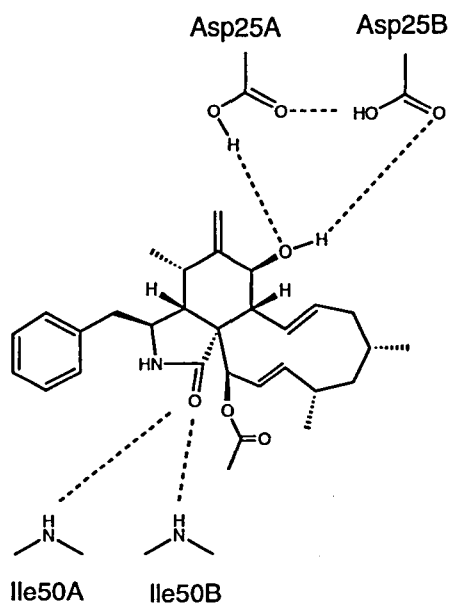


fig. 3 Potential hydrogen bonds between 1 and Asp25, Ile50

さらに、HIVプロテアーゼのX線構造解析より得られている3次元構造と1の安定構造より結合モデルを構築した。(Fig. 4) このモデルでは、25番目のアスパラギン酸と50番目のイソロイシンと1とが水素結合を形成できること、 $\gamma$ -ラクタム上のベンジル基のベンゼン環及び、11員環部は酵素と疎水相互作用をしていることが推定された。

今後は、更に精密なモデリングを行うとともに、この作

用機構のモデリングを基にして、新規骨格の非ペプチド性のHIVプロテアーゼの設計と合成を行う予定である。

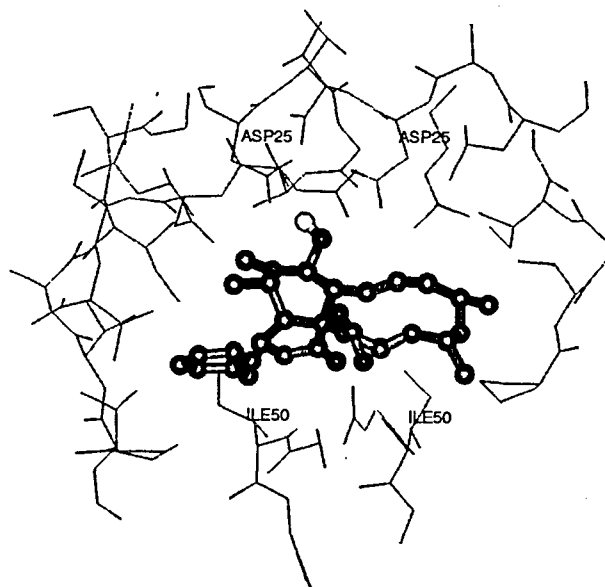


fig. 4 Model of 1 docked into HIV-PR active site calculated by Macro Model

#### 発表論文

- 1) K. Kondo, M. Kurihara, N. Miyata, T. Suzuki, M. Toyoda, *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**, 79-86 (1999)
- 2) K. Kondo, M. Kurihara, N. Miyata, T. Suzuki, M. Toyoda, *Free Radical Biol. Med.*, **27**, 855-863 (1999)
- 3) M. Kurihara, K. Kondo, K. Fukuhara, M. Toyoda, N. Miyata, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 163-165 (1999)
- 4) K. Kondo, M. Kurihara, K. Fukuhara, T. Tanaka, T. Suzuki, N. Miyata, M. Toyoda, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 485-488 (2000)
- 5) M. Tanaka, N. Imawaka, M. Kurihara, H. Suemune, *Helv. Chim. Acta.*, **82**, 485-493 (1999)
- 6) M. Kurihara, M. Tanaka, N. Imawaka, H. Suemune, N. Miyata, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 166-168 (1999)
- 7) M. Kurihara, M. Tanaka, N. Imawaka, H. Suemune, N. Miyata, *JCPE Journal*, **11**, 185-190 (1999)
- 8) M. Kurihara, M. Tanaka, N. Imawaka, H. Suemune and N. Miyata, *Peptide science 1999*, 329-330 (2000)
- 9) M. Tanaka, N. Imawaka, M. Kurihara, H. Suemune, *Peptide science 1999*, 327-328 (2000)

2. 緩和な生理活性を有する化合物の構造と作用発現機構に関する解析

(1) ポリフェノールの抗酸化作用機構

食品部 近藤一成, 豊田正武

[目的]

ポリフェノールは、カテキンなどフラボノイドとそれらの重合体プロアントシアニジンなどのフェノール性水酸基を分子内に数多く有する化合物の総称である。これらは緑茶やブドウ、リンゴの種子や果皮など食品中に多く含まれ、発ガン抑制作用や抗アレルギー作用など興味ある生物活性を有することから現在注目されている。ポリフェノールの発ガン抑制作用は、主として活性酸素消去作用（抗酸化作用）によるDNA等酸化的損傷抑制と考えられている。そして、この抗酸化作用はflavan-3-olのB環上のOH基からラジカルへの1電子供与によるラジカル消去活性に起因しているために、B環上に多くの隣接OH基を有する酸化電位の低い化合物が抗酸化活性には有利と考えられてきた（カテキンではB環 dihydroxyl 構造のECよりB環 trihydroxyl 構造のEGCの方が強い抗酸化作用を示す）。しかし、EGCの抗酸化作用はあまり強くないことやカテキンの一つECの抗酸化作用が類似の構造を持ち、より低い酸化電位

を持つフラボノイド quercetin よりも強いこと、逆に quercetin は酸化を促進し細胞毒性を示すと報告されていることから、ポリフェノールの抗酸化作用には不明な点も多くその実体および反応機構は現在まで全く明らかにされていなかった。その原因には、従来ラジカル研究に威力を発揮したESRがポリフェノールのラジカルに対する最初の反応部位を知ることができるものの、ラジカルをトラップした後のポリフェノール自身の作用や変化を全く捕らえることができないためである。さらに、多くの場合スピントラップ剤を用いるが、これ自体ラジカルでありラジカル反応の研究に別のラジカル種が関与するため本来の反応とは違う反応になる可能性も考えられる。また、ラジカル反応生成物の単離から反応機構を推測することも可能であるが、複雑なラジカル反応物からの単離は容易ではなく、単離した化合物がその単離過程で二次的に生成したものではないことを証明することも難しい。

そこで、今回はポリフェノールのラジカルに対する反応部位とラジカルをトラップした後のポリフェノール自身の変化の両方について多くの情報が得られるフォトダイオード検出器 (PDA) と組み合わせたLC/MSに着目し、分子軌道計算の結果と合わせてポリフェノールの抗酸化反応機構について検討した。今回用いたポリフェノールの構造式を Fig. 1 に示す。

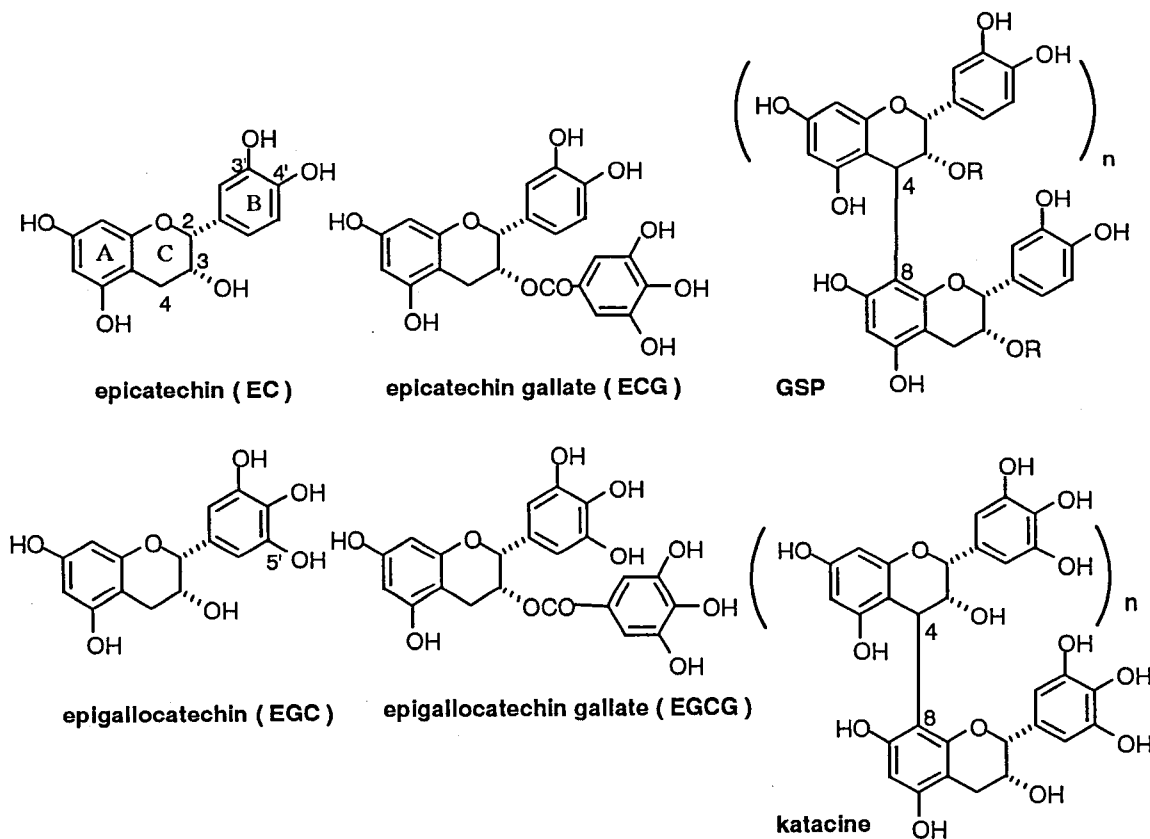


Fig. 1

[方法]

1. 抗酸化作用：リポソーム中およびバッファー中における抗酸化作用について、ラジカル開始剤AAPHを用いて検討した。また、スーパーオキシドおよびOHラジカル消去剤として superoxide dismutase (SOD) および mannitol, DMSOを用いても同様の実験を行い関与する活性酸素種を調べた。
2. 抗酸化反応機構：PDA付きLC/MS (イオントラップ型) によりラジカル開始剤添加によりカテキンから初期に生成するラジカル反応生成物の構造解析を、またサイクリックボルタモトリーでポリフェノールの酸化還元電位を、分子軌道計算 (半経験的分子軌道法 AM1) によりポリフェノールのラジカルに対する反応部位の解析を行い、ポリフェノールの抗酸化作用機構について検討した。

[結果および考察]

1. リポソーム中および水溶液中における抗酸化作用：リポソーム中の実験では、phosphatidyl choline (PC) から調整した一重層リポソームに対してAAPH添加で生成するPC過酸化物PCOOHのポリフェノールに対する抑制作用を指標に調べた。その結果、B環 trihydroxyl 構造を有するEGCは短時間 (57 min) しか抗酸化作用を示さなかった (Fig. 2)。解析を容易にするためより単純な系である水溶液中で同様にポリフェノールの抗酸化作用を調べたところ、B環 trihydroxyl 構造を有するEGCはEGCGの抗酸化作用は短時間しか続かず、逆に酸化を促進することが分かった。これは、B環 dihydroxyl 構造を有するECやECGには見られなかった。プロアントシアニジンについても同様の検討をしたところ、B環 dihydroxyl 構造の重合体GSPは測定時間中完全にラジカルを消去したのに対し、B環 trihydroxyl 構造の重合体katacineは短時間の抗酸化作用の後顕著な酸化促進作用が見られた (Fig. 3)。このB環 trihydroxyl 構造のカテキンおよびプロアントシ

アニジンの酸化促進作用は、SOD存在下においては見られないことから、抗酸化反応過程で生じるスーパーオキシドが原因であることが分かった。

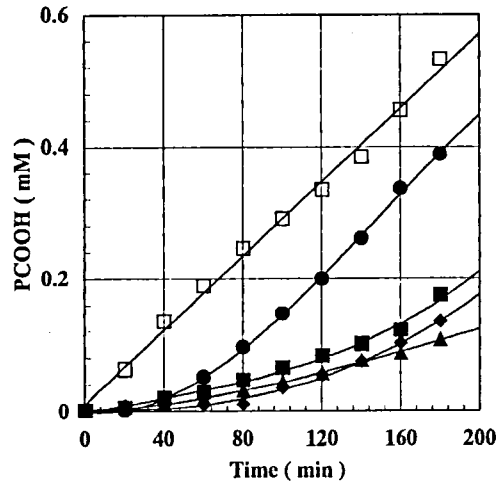


Fig. 2. Inhibitory effect of catechins on the peroxidation of soybean PC liposomes. The reaction system consisted of soybean PC (5 mM) and catechins (5 μM) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.5 mM DTPA. Control (□), EC (■), EGC (●), ECG (▲), EGCG (◆).

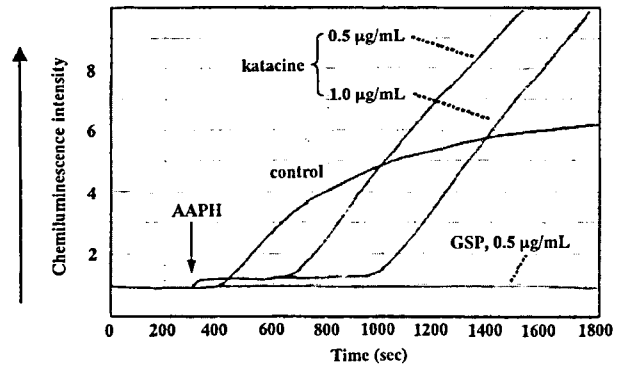


Fig. 3. Effect of GSP and katacine against radical oxidation in phosphate buffer (pH 7.4). GSP and katacine (0.5 and 1.0 μg/mL) were oxidized by the addition of AAPH (5 mM) in the presence of luminol.

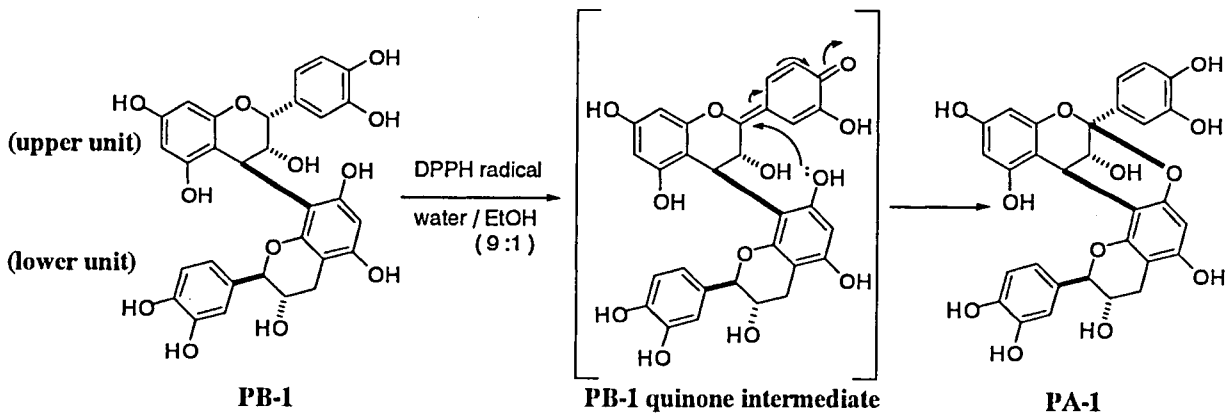


Fig.4. Conversion of PB-1 to PA-1

2. カテキン酸化体の解析による抗酸化反応機構: カテキン酸化体の構造解析からカテキンC-2位プロトンの脱離が示唆され, サイクリックボルタモトリーの結果から2つの酸化波が観察されカテキンは2電子以上の酸化が容易であること, また, カテキン2量体PB-1とラジカルとの反応によりPA-1が生成したことから, カテキンの抗酸化反応にはフェノール性OH基以外, すなわちC-2位のCH基も関与しこれが他のフラボノイドよりも強い抗酸化作用を発揮するのに重要であることが判明した (Fig. 4).
3. 1, 2の結果から, カテキンの抗酸化反応機構は次のように考えられた. すなわち, カテキンECはB環o-dihydroxyl基とC-2位プロトンの存在により2分子のラジカルと反応してアントシアニン様化合物が生成, これはさらに分子内にo-dihydroxyl構造を持つためさらにラジカルと反応してそれを消去できる. そのため, quercetinのようなC-2位プロトンを持たないフラボノイドより強い抗酸化作用を発揮する事ができると考えられた. 一方, EGCも同等以上の強い抗酸化作用を発揮できるものの, 反応過程で7のような還元性の強い化合物が生成し, これが酸素へ1電子供与し superoxideが生成してしまうためEGC自身の抗酸化作用が相殺され, 結果として, EGCの抗酸化作用が低下してしまうことが分かった.

#### 発表論文

- a) Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T., and Toyoda, M. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 79-86 (1999)
- b) Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T., and Toyoda, M. Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. *Free Radical Biol. Med.* **27**, 855-863 (1999)
- c) Kondo, K., Kurihara, M., Fukuhara, K., Tanaka, T., Miyata, N., Suzuki, T., and Toyoda, M. Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: Evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Tetrahedron Lett.* **41**, 485-488 (2000)
- d) Kondo, K., Kurihara, M., Fukuhara, K. Mechanism of antioxidant effect of catechins. *Method in Enzymology*, **335**, 203-217 (2001)

#### (2) 天然に存在するフェノール系抗酸化剤の機能及び生理の解明に関する研究

大阪支所食品試験部 中村優美子・津村ゆかり・  
吉井公彦・石光進・外海泰秀

#### [目的]

ポリフェノール(polyphenol)は植物の二次代謝産物として多種にわたり普遍的に存在する物質であり, ヒトや動物の食餌中に必ず存在する. 単純フェノール誘導体, フェニルプロパノイド誘導体やフラボノイドのように分子量の小さいものから分子量が30,000 Daを越えるタンニン(加水分解性タンニン, 縮合性タンニン)まで多種多様のものがあり, 食品では穀類, 豆類, 種実類, 野菜, 果物, ジュース類, 茶, コーヒー, ココア, ワイン, ビール等の嗜好飲料中に多く含まれている<sup>1)</sup>.

ポリフェノールは大別して以下のカテゴリーに分類される<sup>2)</sup>.

#### (1) 単純フェノール(Simple phenols)

(1-1) フェノール酸及びクマリン(Phenolic acids and coumarines), C6-C1 and C6-C3 structure.

(1-2) フラボノイド(Flavonoid compounds, including anthocyanidins), C6-C3-C6 structure

#### (2) 重合体フェノール(Polymeric phenols)

(2-1) Tannins タンニン (2-1-A) 加水分解性タンニン(Hydrolyzable tannins) (2-1-B) 縮合型タンニン(Condensed tannins) (2-1-C) Phlorotannins

#### (2-2) リグナン(Lignans)

このうち食品として摂取する量の多いポリフェノールはフラボノイド, 縮合型タンニン及びフェノール酸類である. フラボノイドはdiphenolを基本構造とする化合物の総称で, これまでに4000種類以上の化合物が報告されている. フラボノイドには, 抗酸化作用, 抗菌・抗ウイルス作用, 抗炎症作用, エストロゲン或いは抗エストロゲン作用, 抗変異原性・抗癌作用, 酵素の活性化或いは不活性化作用等様々な生理活性のあることが報告されている<sup>3,4)</sup>. また, フラボノイド化合物の摂取量と心臓疾患の発症率との間に負の相関のあることが, 疫学的調査で報告されている<sup>5)</sup>. 一方, タンニンについては, 経口投与時にタンパク質, ミネラル, ある種のビタミン吸収阻害作用, 生長抑制作用, 肝細胞壊死作用, 腹腔内投与時にメトヘモグロビン血症惹起作用等の毒性<sup>6)</sup>のため, 従来は有害物質として考えられてきた. しかし, 近年になって, 縮合型タンニンに抗酸化作用, 抗癌作用, 心臓血管系の病気の治療・予防に有用な作用のあること等が知られるようになり, 機能性食品素材として注目されるようになってきた<sup>7)</sup>.

ポリフェノールが脂質代謝に影響を及ぼすことは考えられるが, 報告は非常に少ない. 本研究では, 食物由来として重要と考えられるポリフェノールのうち, ヘスペリジン(hesperidin), ケルセチン(quercetin), ルチン(rutin)の3種のフラボノイドを選択し, ラットに0.01~1.0 g/kgの用量で3週間投与することにより, これらの物質のラットにおける脂質含量, ステロイド排泄及び血清中の過酸化物質等抗酸化作用に関係あると考えられる物質の変動を調べた<sup>8)</sup>. また,



化合物の形態による代謝の差を, quercetin及び rutin (quercetinのrutinose配糖体) について調べた<sup>8)</sup>。

## [方法]

### 1. 投与試料

投与用の hesperidin, quercetin 及び rutin は Extrasynthese (Geney, France) より購入し, 用時 1%CMC-Na に懸濁して 0.01-1.0 g/5 ml の投与試料を調製した。いずれも実験中は同一ロットのものを使用した。Figure 1 に hesperidin の化学構造式を, Figure 2 に quercetin, rutin 及びその代謝物である isorhamnetin と tamarixetin の化学構造式を示す。

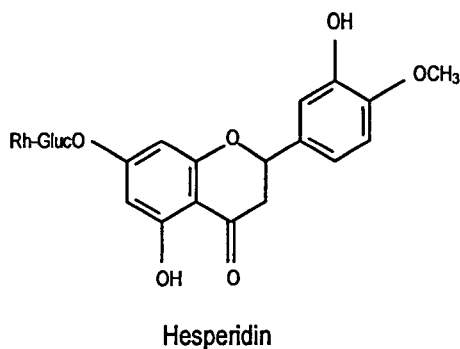


Figure 1 Chemical Structure of hesperidin

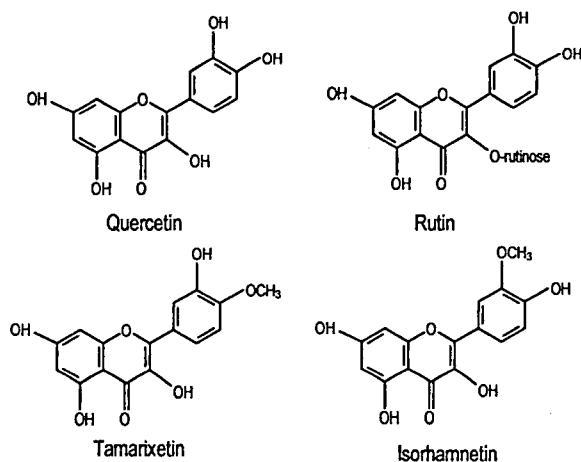


Figure 2 Chemical Structures of quercetin, rutin and their metabolites

### 2. 動物実験

4週令の Wistar 系雄性ラットを明暗サイクル 12 時間毎 (7:00 ~ 19:00 明), 温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 5\%$  の動物舎で, 5頭ずつ金網ケージにて集団飼育した。ラットは実験期間中市販 F-2 固形飼料 (船橋農場, 千葉) 及び水を自由摂取させた。実験では体重 118-149 g のラットを実験に用い, 各実験において 1 群 5 匹ずつとした。

実験 1 ~ 3 では hesperidin, quercetin 或いは rutin を 0.01,

0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1.0 g/kg の用量で, 対照群のラットには 1%CMC-Na を 5 mL/kg 体重, それぞれ 22 日間胃ゾンデにて 1 日 1 回強制経口投与した。各試料は全て毎日 10:00 から 12:00 の間に投与した。実験 18-19 日目にラットを代謝ケージに入れ糞及び尿を採取した。ラットは 21-22 日目一晩絶食させた。22 日目にジエチルエーテル麻酔下で心臓より採血し, 放血後心臓を速やかに摘出した。血清及び肝臓は, 分析時まで  $-20^\circ\text{C}$  以下で冷蔵保存した。

実験 4 では quercetin 或いは rutin を 1.0 g/kg の用量で上記と同様の条件でラットに 10 日間強制経口投与し, 心臓採血により血清を得た。実験 5 では quercetin 或いは rutin を 1.0 g/kg の用量で, 代謝ケージに 1 匹ずつ静置したラットに 1 回強制経口投与し, 3 日間にわたり尿を採取した。また, 3 日後に心臓採血により血清を得た。

### 3. 分析法

血清総コレステロール, HDL-コレステロール, リン脂質及びトリグリセライド, TBARS を市販のキットで測定した。肝臓はクロロホルム/メタノール混液 (2:1, v/v) で抽出し, 総コレステロール, トリグリセライド及びリン脂質を市販キットを用いて分析した。採取した糞は  $60^\circ\text{C}$  で一晩乾燥し, 粉碎した。糞中中性ステロイド及び胆汁酸を 5  $\alpha$ -cholestane, norDCA 或いは 5  $\beta$ -cholanic acid を内部標準とし, Grundy ら<sup>9)</sup>及び Setchell ら<sup>10)</sup>の方法の改良法<sup>11)</sup>で分析した。血清及び尿中フラボノイドは, そのまま或いは  $\beta$ -glucuronidase により加水分解を行い flavone を内部標準としてメタノール-塩酸性下で酢酸エチルで抽出し HPLC で測定した。

### 4. 統計処理

測定値はすべて平均値  $\pm$  SE で示した。実験 1 ~ 3 においては, 各データについて 1-way ANOVA 次いで Dunnett の多重比較検定を行った。実験 4 及び 5 においては, quercetin 投与ラットを対照として Aspin-Welch t test により有意差検定を行った。用量依存性の解析は回帰分析で行った。いずれも場合も, 対照群に対して  $p < 0.05$  の場合に有意差ありと判定した。

### [結果]

実験 1 ~ 3 において, 投与したフラボノイド類はいずれも, 体重増加量, 肝臓相対重量, 食餌摂取量及び糞乾燥重量に有意な影響を及ぼさなかった。Quercetin 1.0 g/kg 投与ラットの糞及び rutin 1.0 g/kg 投与ラットの尿は肉眼的に明らかに黄色に着色しているのが認められたが, 他の群のラットでは対照群に比べて糞や尿の有意な変色は肉眼では認められなかった。また, rutin 投与ラットの血清は, 投与量が 0.1 g/kg 以上でレモン色に着色しているのが認められ, 投与量が高くなるほど着色が顕著であった。しかし, hesperidin 或いは quercetin 投与時には血清の色調の変化は認められなかった。

1. 血清及び肝臓中脂質に及ぼす影響 (実験1~3, Table 1)

Hesperidin, quercetin 或いは rutin はいずれも肝臓総コレステロール, トリグリセライド及びリン脂質濃度には有意な影響を及ぼさなかった. 血清トリグリセライド濃度は hesperidin 或いは rutin 1.0 g/kg 投与ラットでそれぞれ対照群に

比べて有意に低下, 血清 HDL-コレステロール濃度は rutin 0.5 g/kg 投与ラットで対照群に比べ有意に低下した以外は, これらの化合物の血清脂質濃度に及ぼす有意な変動は認められなかった.

2. 糞中ステロイド排泄に及ぼす影響 (実験1~3, Tables

Table 1 Hepatic and Serum Lipids of Rats Administered Hesperidin, Quercetin or Rutin (Experiments 1-3, Day 22, Food-deprived Overnight)

Experiment 1	Control	Hesperidin 0.01 g/kg	Hesperidin 0.05 g/kg	Hesperidin 0.1 g/kg	Hesperidin 0.2 g/kg	Hesperidin 0.5 g/kg	Hesperidin 1.0 g/kg
Hepatic total cholesterol [mg/g]	2.327±0.075	2.059±0.097	2.286±0.045	2.540±0.069	2.437±0.098	2.430±0.121	2.243±0.113
Hepatic triglycerides [mg/g]	13.51±0.64	13.03±1.81	13.04±0.48	13.52±0.68	13.29±0.55	12.41±1.05	13.11±0.62
Hepatic phospholipids [mg/g]	19.73±0.61	20.41±1.50	20.31±0.92	19.96±0.43	21.02±0.66	20.24±1.54	19.41±1.24
Serum total cholesterol [mg/dL]	72.59±3.67	60.76±3.30	68.41±3.98	69.00±5.87	64.85±3.85	58.28±2.20	63.46±3.92
Serum HDL-cholesterol [mg/dL]	37.11±1.84	35.57±2.12	37.61±1.93	40.39±2.19	34.63±1.83	37.88±3.99	37.26±2.31
Serum triglycerides [mg/dL]	67.13±3.25	74.27±4.88	61.55±6.69	66.80±5.03	64.01±3.84	52.66±6.88	51.79±4.47*
Serum phospholipids [mg/dL]	95.90±4.71	93.83±3.73	92.81±5.15	99.40±8.06	93.15±3.88	86.07±4.36	82.57±3.98
Experiment 2	Control	Quercetin 0.01 g/kg	Quercetin 0.05 g/kg	Quercetin 0.1 g/kg	Quercetin 0.2 g/kg	Quercetin 0.5 g/kg	Quercetin 1.0 g/kg
Hepatic total cholesterol [mg/g]	2.803±0.153	2.915±0.143	2.734±0.096	2.565±0.286	2.448±0.110	2.517±0.157	2.710±0.146
Hepatic triglycerides [mg/g]	15.84±1.01	14.55±0.88	13.10±0.89	16.26±1.17	12.93±1.47	14.34±1.18	14.05±1.57
Hepatic phospholipids [mg/g]	25.27±1.65	21.86±1.13	22.24±1.30	27.83±0.69	23.07±1.00	24.23±1.05	24.21±1.07
Serum total cholesterol [mg/dL]	67.98±6.06	66.16±2.87	65.49±1.61	58.08±1.52	59.27±4.48	62.69±2.23	63.33±2.50
Serum HDL-cholesterol [mg/dL]	35.45±3.09	34.78±2.35	35.94±2.56	28.78±0.96	34.80±3.11	30.28±2.13	29.36±0.92
Serum triglycerides [mg/dL]	61.43±2.77	72.93±3.89	71.28±6.40	67.93±5.83	55.34±3.21	61.83±4.28	52.03±3.50
Serum phospholipids [mg/dL]	105.7±4.3	109.4±4.7	110.9±1.9	102.7±3.2	110.0±4.2	106.4±3.0	106.3±5.3
Experiment 3	Control	Rutin 0.01 g/kg	Rutin 0.05 g/kg	Rutin 0.1 g/kg	Rutin 0.2 g/kg	Rutin 0.5 g/kg	Rutin 1.0 g/kg
Hepatic total cholesterol [mg/g]	2.376±0.106	2.376±0.061	2.380±0.086	2.341±0.079	2.397±0.044	2.450±0.156	2.101±0.067
Hepatic triglycerides [mg/g]	13.48±1.19	13.67±0.84	14.74±1.04	12.42±0.94	14.11±1.62	11.68±0.21	11.14±0.51
Hepatic phospholipids [mg/g]	22.03±0.56	20.63±0.61	19.97±0.35	19.54±1.25	19.57±0.83	20.12±1.30	19.23±0.68
Serum total cholesterol [mg/dL]	69.6±2.47	63.83±4.08	68.16±3.51	67.14±4.80	59.54±4.29	62.22±0.93	60.84±1.67
Serum HDL-cholesterol [mg/dL]	42.34±2.52	39.20±1.73	43.16±2.42	39.87±3.08	37.06±1.46	32.59±1.72* <sup>1)</sup>	34.90±2.70
Serum triglycerides [mg/dL]	63.14±7.81	63.34±5.83	48.99±5.54	55.18±11.84	58.83±10.10	39.14±6.14	32.08±4.75*
Serum phospholipids [mg/dL]	108.6±1.8	108.2±7.4	110.6±7.0	111.8±5.8	105.2±3.6	98.05±2.16	101.0±3.4

Data are expressed as mean±SEM (n=5).

1) Different significantly from the control group.

(\* p<0.05 vs. Control, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. Control, 1-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test)

Table 2 Fecal Excretion of Bile Acids in Rats Administered Hesperidin (Experiment 1, Days 18-19)

	Control	Quercetin 0.01 g/kg	Quercetin 0.05 g/kg	Quercetin 0.1 g/kg	Quercetin 0.2 g/kg	Quercetin 0.5 g/kg	Quercetin 1.0 g/kg
<b>Fecal neutral steroid excretion</b>							
Coprostanol (Cp) [µmol/day]	9.01±1.03	13.65±1.43	12.19±0.53	10.91±0.64	14.33±1.62*	10.78±2.31	10.75±1.57
Cholesterol (Ch) [µmol/day]	4.12±0.09	4.26±0.58	4.72±0.36	4.13±0.40	4.46±0.49	4.04±0.37	5.50±0.69
Coprostanone [µmol/day]	0.96±0.13	1.15±0.08	1.10±0.13	1.00±0.19	1.11±0.11	1.01±0.11	0.97±0.04
Total [µmol/day]	14.09±1.12	19.06±1.98* <sup>1)</sup>	18.01±0.68	16.15±1.02	19.90±1.69*	15.83±2.38	17.21±1.78
<b>Cp/Ch ratio</b>	2.19±0.24	3.20±0.43	2.58±0.28	2.64±0.37	3.21±0.37	2.67±0.39	1.95±0.34
<b>Fecal bile acid excretion</b>							
Total bile acids [µmol/day]	11.14±1.18	16.23±1.84*	11.86±1.29	11.09±0.99	12.25±1.58	10.98±1.22	14.22±0.59
<b>Compositions of fecal bile acids [%]</b>							
<b>Cholic acid derived bile acids (CAs)</b>							
Cholic acid (CA)	1.58±0.43	0.89±0.09	0.58±0.06	0.79±0.13	0.81±0.32	1.20±0.41	0.60±0.20
Deoxycholic acid (DCA)	12.78±0.56	13.50±0.85	14.09±1.85	13.67±0.60	12.57±0.63	11.15±1.38	11.36±1.03
Isocholic acid (ICA)	3.58±0.44	3.61±0.58	4.48±0.86	4.39±0.25	3.68±0.31	3.31±0.36	3.73±0.43
12-Ketolithocholic acid (12KLCA)	4.80±0.63	4.37±0.63	6.19±1.17	4.33±0.41	6.15±0.41	7.40±0.91	5.93±1.01
7-Ketodeoxycholic acid (7KDCA)	0.49±0.20	0.15±0.15	0.18±0.17	ND <sup>2)</sup>	0.12±0.11	0.37±0.21	0.66±0.42
12-Ketochenodeoxycholic acid (12KCDA)	0.39±0.24	0.07±0.07	0.86±0.39	0.83±0.23	1.58±0.50	0.85±0.51	0.70±0.36
<b>Chenodeoxycholic acid derived bile acids (CDAs)</b>							
β-Muricholic acid (βMCA)	7.38±0.55	4.96±0.77	7.04±0.91	7.24±1.26	6.79±1.17	10.44±2.32	8.29±1.83
Lithocholic acid (LCA)	2.72±0.27	3.86±0.59	4.38±0.43	3.16±0.43	3.89±0.86	2.48±0.63	2.52±0.14
Isolithocholic acid (ILCA)	0.66±0.12	0.57±0.15	0.82±0.11	0.83±0.25	0.90±0.16	0.48±0.14	0.79±0.25
Hydroxycholic acid (HCA)	33.94±7.25	46.93±3.84	37.33±8.23	39.60±3.75	32.28±7.05	33.03±11.21	27.37±6.82
Murodeoxycholic acid (MCA)	ND <sup>2)</sup>	0.12±0.11	0.56±0.46	0.11±0.10	0.31±0.21	0.25±0.14	0.47±0.47
α-Muricholic acid (αMCA)	0.84±0.17	0.78±0.17	1.21±0.46	0.93±0.15	0.82±0.53	1.68±0.44	1.23±0.52
ω-Muricholic acid (ωMCA)	29.70±7.57	17.62±3.18	19.15±6.14	24.17±2.11	25.94±7.65	24.40±9.44	34.96±5.94
6-Ketolithocholic acid (6KLCA)	1.07±0.41	2.07±0.52	2.15±0.75	1.25±0.40	3.12±0.82	2.25±0.67	0.69±0.22
<b>Others</b>							
3β-Hydroxy 5-cholenic acid	0.57±0.26	0.50±0.26	0.25±0.15	0.18±0.11	0.55±0.19	0.72±0.36	0.70±0.20
<b>CAs/CDAs ratio</b>	0.299±0.025	0.295±0.017	0.364±0.039	0.318±0.014	0.333±0.025	0.327±0.031	0.303±0.025
<b>Ratio of primary bile acids<sup>3)</sup> [%]</b>	8.96±0.93	5.84±0.82	7.62±0.90	8.03±1.31	7.60±0.88	11.64±2.18	8.90±1.90

Data are expressed as mean±SEM (n=5).

1) Different significantly from the control group.

(\* p<0.05 vs. Control, 1-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test)

2) ND: not detected.

3) Primary bile acids: Total of CA, CDA and βMCA.

2~4)

Hesperidin投与時(実験1)には、糞中中性ステロイド排泄総量が0.01或いは0.2 g/kg投与時のみ対照群に比べて

有意に増加したが、糞中コプロスタノール/コレステロール比(Cp/Ch比)については有意な変動は認められなかった。胆汁酸総排泄量は0.01 g/kg投与ラットでのみ対照群に

Table 3 Fecal Excretion of Bile Acids in Rats Administered Quercetin (Experiment 2, Days 18-19)

	Control	Quercetin 0.01 g/kg	Quercetin 0.05 g/kg	Quercetin 0.1 g/kg	Quercetin 0.2 g/kg	Quercetin 0.5 g/kg	Quercetin 1.0 g/kg
<b>Fecal neutral steroid excretion</b>							
Coprostanol (Cp) [μmol/day]	8.55±0.72	7.25±0.76	7.05±0.86	7.95±0.80	8.20±0.58	8.75±0.73	9.46±0.82
Cholesterol (Ch) [μmol/day]	3.95±0.23	4.02±0.69	4.89±0.95	3.92±0.45	4.03±0.39	4.54±0.28	5.15±0.42
Coprostanone [μmol/day]	0.95±0.13	0.88±0.15	0.90±0.15	0.96±0.06	0.78±0.11	1.07±0.11	1.32±0.20
Total [μmol/day]	13.45±0.92	12.15±1.11	12.84±1.16	12.83±1.25	13.01±0.81	14.35±1.07	15.93±1.29
<b>Cp/Ch ratio</b>	2.14±0.09	1.96±0.25	1.63±0.26	2.05±0.09	2.12±0.29	1.92±0.09	1.86±0.13
<b>Fecal bile acid excretion</b>							
Total bile acids [μmol/day]	10.30±0.73	8.87±1.07	10.32±0.99	9.92±0.95	11.13±1.47	12.51±0.73	11.22±1.02
<b>Compositions of fecal bile acids (%)</b>							
<b>Cholic acid derived bile acids (CAs)</b>							
Cholic acid (CA)	0.55±0.16	1.01±0.29	0.63±0.36	0.46±0.13	0.90±0.33	0.88±0.24	0.67±0.24
Deoxycholic acid (DCA)	12.48±0.92	13.89±1.03	14.64±1.69	14.98±0.87	14.90±1.12	17.57±1.27* <sup>1)</sup>	13.35±1.81
Isodeoxycholic acid (IDCA)	3.00±0.29	3.25±0.25	3.21±0.49	3.22±0.22	3.06±0.17	5.29±0.53**	3.73±0.43
12-Ketolithocholic acid (12KLCA)	7.51±0.71	5.03±0.70	7.32±0.36	7.60±0.96	5.98±1.08	3.62±0.40**	5.79±0.65
7-Ketodeoxycholic acid (7KDCA)	0.39±0.27	0.19±0.19	0.55±0.34	0.20±0.12	0.56±0.24	0.12±0.12	0.25±0.17
12-Ketochenodeoxycholic acid (12KCDA)	1.44±0.55	1.13±0.24	0.82±0.19	0.65±0.18	0.36±0.19	0.37±0.07	1.32±0.56
<b>Chenodeoxycholic acid derived bile acids (CDAs)</b>							
β-Muricholic acid (βMCA)	9.61±2.75	5.80±1.06	9.66±2.49	7.56±2.13	9.48±1.39	4.58±1.16	5.56±1.97
Lithocholic acid (LCA)	5.50±0.53	5.45±0.57	5.22±0.58	4.90±0.34	4.91±0.38	5.34±0.66	5.52±0.37
Isolithocholic acid (ILCA)	1.16±0.10	0.67±0.24	1.02±0.25	1.02±0.09	0.95±0.08	1.12±0.21	1.13±0.10
Hyodeoxycholic acid (HDCA)	31.31±5.90	45.51±2.14	32.13±3.60	32.25±9.40	21.56±8.56	35.40±4.39	36.62±7.79
Murodeoxycholic acid (MCA)	2.25±0.59	2.47±0.22	3.27±0.83	2.07±0.45	5.01±0.22**	4.98±0.17**	3.72±0.82
α-Muricholic acid (αMCA)	2.01±0.50	1.28±0.24	2.53±0.71	1.69±0.38	4.33±0.54	3.25±0.35	3.15±0.65
ω-Muricholic acid (ωMCA)	17.18±3.09	8.73±0.89	15.53±3.54	19.16±6.60	24.90±6.26	14.28±3.45	14.43±2.48
6-Ketolithocholic acid (6KLCA)	5.26±1.35	5.01±0.48	4.22±0.79	3.91±1.07	2.82±0.32	2.71±0.21	5.25±1.64
<b>Others</b>							
3β-Hydroxy 5-cholenic acid	0.35±0.10	0.60±0.22	0.73±0.26	0.33±0.09	0.29±0.11	0.50±0.18	0.48±0.16
<b>CAs/CDAs ratio</b>	0.341±0.027	0.328±0.022	0.379±0.031	0.378±0.034	0.350±0.026	0.392±0.038	0.320±0.026
<b>Ratio of primary bile acids<sup>2)</sup> (%)</b>	10.16±2.75	6.06±1.54	10.29±2.58	8.02±2.16	10.09±0.88	5.45±1.34	6.23±1.94

Data are expressed as mean±SEM (n=5).

1) Different significantly from the control group.

(\* p&lt;0.05 vs. Control, 1-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test)

2) Primary bile acids: Total of CA, CDCA and βMCA.

Table 4 Fecal Steroid Excretion in Rats Administered Rutin (Experiment 3, Days 18-19)

	Control	Rutin 0.01 g/kg	Rutin 0.05 g/kg	Rutin 0.1 g/kg	Rutin 0.2 g/kg	Rutin 0.5 g/kg	Rutin 1.0 g/kg
<b>Fecal neutral steroid excretion [μmol/day]</b>							
Coprostanol (Cp) [μmol/day]	9.51±0.47	7.36±0.49	7.96±0.63	8.17±0.68	8.81±0.93	6.75±1.05	6.59±0.85
Cholesterol (Ch) [μmol/day]	3.94±0.27	3.37±0.29	5.41±0.63	4.17±0.56	3.94±0.39	4.86±0.41	3.85±0.32
Coprostanone [μmol/day]	0.50±0.07	0.54±0.03	0.48±0.08	0.56±0.10	0.54±0.08	0.51±0.18	0.42±0.05
Total [μmol/day]	13.96±0.36	13.31±0.69	12.60±1.17	12.07±1.11	14.20±1.37	11.11±1.54	12.47±1.75
<b>Cp/Ch ratio</b>	2.46±0.24	1.46±0.23*** <sup>1)</sup>	1.97±0.14	2.12±0.16	1.80±0.07	1.72±0.12*	1.29±0.21**
<b>Fecal bile acid excretion</b>							
Total bile acids [μmol/day]	12.14±0.41	17.14±0.60*	10.99±0.54	11.25±1.11	11.38±1.26	9.69±1.78	9.96±1.21
<b>Compositions of fecal bile acids (%)</b>							
<b>Cholic acid derived bile acids (CAs)</b>							
Cholic acid (CA)	0.74±0.13	0.86±0.13	0.67±0.24	1.18±0.11	1.02±0.17	1.17±0.27	1.49±0.26
Deoxycholic acid (DCA)	10.58±0.64	12.60±0.58	11.28±2.49	10.96±1.15	14.89±0.51	13.50±1.38	13.07±1.52
Isodeoxycholic acid (IDCA)	2.71±0.12	3.18±0.56	2.57±0.16	2.02±0.24	2.52±0.10	3.15±0.54	2.92±0.34
12-Ketolithocholic acid (12KLCA)	4.80±0.63	4.37±0.63	6.19±1.17	4.33±0.41	6.15±0.41	7.40±0.91	5.93±1.01
7-Ketodeoxycholic acid (7KDCA)	0.20±0.20	0.51±0.35	ND <sup>2)</sup>	ND	0.12±0.12	0.45±0.45	0.19±0.19
12-Ketochenodeoxycholic acid (12KCDA)	0.54±0.54	0.46±0.27	1.01±0.60	0.34±0.34	0.20±0.20	0.40±0.20	1.11±0.71
<b>Chenodeoxycholic acid derived bile acids (CDAs)</b>							
β-Muricholic acid (βMCA)	11.56±0.58	11.09±2.32	8.61±1.63	6.06±0.50	8.77±1.12	8.99±2.94	9.23±1.74
Lithocholic acid (LCA)	5.77±2.63	5.52±0.69	6.96±0.59	6.13±0.54	5.90±0.53	6.66±0.40	5.73±0.74
Isolithocholic acid (ILCA)	1.05±0.06	0.87±0.04	1.42±0.15	1.32±0.14	0.94±0.28	1.26±0.09	1.01±0.16
Hyodeoxycholic acid (HDCA)	25.00±6.83	34.32±10.37	33.90±4.89	49.56±1.92	41.16±2.88	32.36±14.53	32.01±5.39
Murodeoxycholic acid (MCA)	2.66±0.92	1.50±0.37	1.90±0.45	1.90±0.22	1.75±0.15	1.72±0.51	2.05±0.86
α-Muricholic acid (αMCA)	2.36±0.11	1.96±0.64	1.49±0.16	1.04±0.13*	1.13±0.11*	1.69±0.50	1.88±0.22
ω-Muricholic acid (ωMCA)	25.25±6.71	17.38±6.88	16.50±4.32	8.16±0.44	10.68±2.79	19.36±9.46	17.87±3.80
6-Ketolithocholic acid (6KLCA)	3.32±1.30	1.92±0.97	3.78±1.19	2.14±0.50	1.97±0.53	1.72±1.03	3.32±1.73
<b>Others</b>							
3β-Hydroxy 5-cholenic acid	0.38±0.05	0.20±0.07	0.50±0.06	0.73±0.18	0.81±0.21	0.73±0.24	1.42±0.76
<b>CAs/CDAs ratio</b>	0.289±0.007	0.343±0.040	0.342±0.055	0.304±0.033	0.372±0.014	0.391±0.046	0.349±0.017
<b>Ratio of primary bile acids<sup>3)</sup> (%)</b>	12.30±0.56	11.95±2.39	9.28±1.64	7.24±0.39	9.80±1.14	11.61±2.79	10.52±1.58

Data are expressed as mean±SEM (n=5).

1) Different significantly from the control group.

(\* p&lt;0.05 vs. Control, 1-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test)

2) ND: not detected.

3) Primary bile acids: Total of CA, CDCA and βMCA.

比べて有意に増加したが、胆汁酸組成については有意な変化は認められなかった (Table 2).

Quercetin投与時 (実験2) には、糞中中性ステロイド排泄量及びその組成に有意な変化は認められなかった。胆汁酸排泄は対照群のラットと比較して排泄総量には有意な変化はなく、組成については quercetin 0.2 g/kg 投与ラットで MDCA が増加し 0.5 g/kg 投与ラットで DCA, IDCA 及び MDCA が増加し 12KLCA が減少したがコール酸系胆汁酸/ケノデオキシコール酸系胆汁酸比 (CA/CDCA 比) には有意な変化は認められなかった (Table 3).

Rutin投与時 (実験3) には、糞中ステロイド排泄総量には有意な変化は認められなかったが、Cp/Ch 比は 0.01, 0.5 及び 1.0 g/kg 投与ラットで対照群のラットに比べて有意に低かった。胆汁酸総排泄量は 0.01 g/kg 投与ラットでのみ対照群比比べて有意に増加したが、胆汁酸組成については、0.1 及び 0.2g/kg 投与ラットで  $\alpha$ -muricholic acid ( $\alpha$  MCA) が減少した以外は、有意な変化は認められなかった (Table 4).

### 3. 血清 TBARS 値及びフラボノイド濃度 (実験2及び3, Table 5)

Quercetin投与ラットでは血清 TBARS 値は用量依存的に減少し ( $r^2$  0.4619,  $p < 0.001$ ), 投与量が 0.2 g/kg 以上で対照群に比べて有意に低い値を示した (実験2). 血清から検出された遊離型フラボノイドは quercetin 及び isorhamnetin の2種であったが、いずれも用量依存的に増加し ( $r^2$  0.5963,  $p < 0.001$  及び  $r^2$  0.6681,  $p < 0.001$ ), 血清 TBARS 値と負の相関があった ( $r^2$  0.4951,  $p < 0.001$  及び  $r^2$  0.5318,  $p < 0.001$ ).

Rutin投与ラットにおいても血清 TBARS 値は用量依存的に減少し ( $r^2$  0.7774,  $p < 0.001$ ), 投与量が 0.01 g/kg 以上で対照

群に比べて有意に低い値を示した (実験3). 血清から検出された遊離型フラボノイドは quercetin 及び isorhamnetin の2種であったが、いずれも用量依存的に増加し ( $r^2$  0.1978,  $p < 0.01$  及び  $r^2$  0.2255,  $p < 0.01$ ), 血清 TBARS 値と負の相関があった ( $r^2$  0.1185,  $p < 0.05$  及び  $r^2$  0.1382,  $p < 0.05$ ).

尚, hesperidin投与ラット (実験1) では、血清 TBARS 値及びフラボノイド濃度は調べていない。

### 4. Quercetin 或いは rutin 高用量投与ラットにおけるフラボノイド代謝の相違について (実験4及び5, Tables 6~8)

実験2~3において、quercetin投与ラットでは 0.1 g/kg 以上、quercetinの配糖体である rutin投与ラットでは 0.2 g/kg 以上の投与量で血清中に遊離型フラボノイドが検出されたため、これらの化合物を各 1.0 g/kg 投与し、両者について投与物の代謝を比較検討した。

10日間連続経口投与ラットでは、血清中に検出された遊離型フラボノイドは quercetin 及び isorhamnetin であり、rutinは検出されなかった (実験4, Table 6). Rutin投与ラットでは quercetin投与ラットに比べて総及び遊離型フラボノイド濃度、総フラボノイドに対する遊離型フラボノイド及び quercetinの割合が有意に高く ( $p < 0.05-0.001$ ), isorhamnetinの割合が低かった ( $p < 0.05$ ).

1回投与ラットでは、投与3日後においても血清より quercetin 及び isorhamnetin が検出された (実験5, Table 7). Rutin投与ラットの方が quercetin投与ラットに比べて総フラボノイド濃度、遊離型総フラボノイド及び isorhamnetin濃度が有意に高かった ( $p < 0.01-0.05$ ) が、組成については有意な差は認められなかった。尿中で検出されたフラボノイドは quercetin, isorhamnetin 及び tamarixetin であった (実

Table 5 Correlation of Serum TBARS and Flavonoids (Experiments 2-3, Day 22)

Experiment 2	Control	Quercetin 0.01 g/kg	Quercetin 0.05 g/kg	Quercetin 0.1 g/kg	Quercetin 0.2 g/kg	Quercetin 0.5 g/kg	Quercetin 1.0 g/kg	Dose-response Significance ( $r^2$ )
Serum TBARS <sup>2)</sup> [generated MDA nmol/mL]	4.474±0.148	4.742±0.254	5.328±0.179* <sup>1)</sup>	4.375±0.358	2.701±0.184***	2.020±0.109***	2.214±0.205***	$p < 0.001$ (0.4619)
Serum free flavonoids [nmol/mL]								
Quercetin	ND <sup>3)</sup>	ND	ND	0.419±0.171	0.407±0.166	0.903±0.052	1.110±0.093	$p < 0.001$ (0.5963)
Isorhamnetin	ND	0.166±0.055	0.119±0.073	0.594±0.157	0.527±0.135	1.062±0.055	1.326±0.077	$p < 0.001$ (0.6681)
Correlation of serum free flavonoids and TBARS								
Serum free quercetin vs. TBARS			$p < 0.001$ ( $r^2$ 0.4951)					
Serum free isorhamnetin vs. TBARS			$p < 0.001$ ( $r^2$ 0.5318)					
Experiment 3	Control	Rutin 0.01 g/kg	Rutin 0.05 g/kg	Rutin 0.1 g/kg	Rutin 0.2 g/kg	Rutin 0.5 g/kg	Rutin 1.0 g/kg	Dose-response Significance ( $r^2$ )
Serum TBARS [generated MDA nmol/mL]	3.749±0.255	3.082±0.083*	2.974±0.107**	2.753±0.181***	1.834±0.144***	1.535±0.099***	1.680±0.110***	$p < 0.001$ (0.7774)
Serum free flavonoids [nmol/mL]								
Quercetin	ND <sup>3)</sup>	ND	ND	ND	0.208±0.093	0.830±0.164	10.23±3.35	$p < 0.01$ (0.1978)
Isorhamnetin	ND	ND	ND	ND	ND	0.407±0.176	3.225±0.905	$p < 0.01$ (0.2255)
Correlation of serum free flavonoids and TBARS								
Serum free quercetin vs. TBARS			$p < 0.05$ ( $r^2$ 0.1185)					
Serum free isorhamnetin vs. TBARS			$p < 0.05$ ( $r^2$ 0.1382)					

Data are expressed as mean±SEM (n=5).

1) Different significantly from the control group.

(\*  $p < 0.05$  vs. Control, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control, 1-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test)

2) TBARS: thiobarbituric acid reactive compounds, indicated as malondialdehyde generated.

3) ND, not detected (less than 0.05 nmol/mL).

験5, Table 7). 3日間における尿中へのフラボノイド排泄量は rutin 投与ラットの方が多傾向があったが、データのばらつきが大きかったため有意差は検出されなかった。投与後3日間に尿中へ排泄されたフラボノイドのうち

Table 6 Concentration and Composition of Serum Flavonoids (Experiment 4, Day 10)

	Quercetin 1.0 g/kg	Rutin 1.0 g/kg	Significance <sup>1)</sup>
<b>Total flavonoids [nmol/mL]</b>			
Quercetin	9.73±0.87	34.32±5.42	p<0.05
Isorhamnetin	31.57±2.76	69.67±2.12	p<0.001
Total	41.30±3.22	103.99±6.71	p<0.001
<b>Free flavonoids [nmol/mL]</b>			
Quercetin	0.56±0.14	6.37±1.37	p<0.05
Isorhamnetin	1.20±0.16	4.38±0.38	p<0.001
Total	1.76±0.27	10.75±1.71	p<0.01
<b>Composition of flavonoids [%]</b>			
Total quercetin	23.70±1.89	32.36±2.90	p<0.05
Total isorhamnetin	76.30±1.89	67.64±2.90	p<0.05
Aglycone <sup>2)</sup>	4.25±0.56	10.16±1.09	p<0.01

Data are expressed as mean±SEM (n=5).

1) Significance was compared between quercetin-fed group and rutin-fed group by Aspin-Welch t test.

2) Sum of the percentage of free quercetin and isorhamnetin.

Table 7 Concentration and Composition of Serum and Urinary Flavonoids (Experiment 5, Days 0-3)

	Quercetin 1.0 g/kg	Rutin 1.0 g/kg	Significance <sup>1)</sup>
<b>Serum flavonoids (day 3)</b>			
<b>Total flavonoids [nmol/mL]</b>			
Quercetin	3.04±0.36	7.58±1.44	p<0.05
Isorhamnetin	8.77±1.11	20.30±4.02	N.S. <sup>2)</sup>
Total	11.81±1.40	27.88±5.41	N.S.
<b>Free flavonoids [nmol/mL]</b>			
Quercetin	Not detected <sup>3)</sup>	0.45±0.23	N.S.
Isorhamnetin	0.35±0.10	0.99±0.09	p<0.01
Total	0.35±0.10	1.44±0.28	p<0.05
<b>Composition of serum flavonoids [%]</b>			
Total quercetin	25.97±1.40	27.42±1.21	N.S.
Total isorhamnetin	74.02±1.40	72.58±1.21	N.S.
Aglycone	3.61±1.64	6.03±1.42	N.S.
<b>Urinary flavonoids (days 0-3)</b>			
<b>Total flavonoids excreted [nmol/3 days]</b>			
Quercetin	308.3±172.1	1012.7±587.6	N.S.
Isorhamnetin	189.1±106.5	666.5±349.7	N.S.
Tamarixetin	231.9±110.6	714.3±264.6	N.S.
Total	729.4±388.9	2393.5±1188.7	N.S.
<b>Free flavonoids excreted [nmol/3 days]</b>			
Quercetin	91.4±35.2	571.4±426.8	N.S.
Isorhamnetin	68.8±33.3	385.2±270.9	N.S.
Tamarixetin	82.3±29.8	426.6±201.5	N.S.
Total	242.5±96.3	1383.1±892.4	N.S.
<b>Composition of urinary flavonoids [%]</b>			
Total quercetin	40.84±6.63	37.46±3.00	N.S.
Total isorhamnetin	24.85±1.41	27.29±3.31	N.S.
Total tamarixetin	34.30±6.33	35.25±5.52	N.S.
Aglycone <sup>4)</sup>	36.71±9.65	58.12±11.47	N.S.

Data are expressed as mean±SEM (n=5).

1) Different significantly from quercetin-fed group by Aspin-Welch t test.

2) Not significant (p>0.05 by Aspin-Welch t test).

3) Not detected (less than 0.1 nmol/mL).

4) Sum of the percentage of free quercetin, isorhamnetin and tamarixetin.

quercetin投与ラットでは94.1%が、rutin投与ラットでは85.6が1日以内に排泄された (Table 8). 投与されたquercetin及びrutinの投与後3日間における尿中及び3日後の血清中でのフラボノイドとしての検出率は、quercetin投与ラットで各0.13%及び0.03%, rutin投与ラットで各0.89%及び0.13%であった.

[考察]

フラボノイドの血清・肝臓脂質及び糞中ステロイド排泄に及ぼす影響については、hesperidinが通常及び高コレステロール血症ラットで血漿総コレステロール, LDL-コレステロール, 総脂質及びトリグリセライドを減少させ, HDL-コレステロールを上昇させること<sup>12)</sup>, catechinがラットの血清及び肝臓中のコレステロール, トリグリセライドレベルを低下させ, 糞中ステロイド排泄を増加させること<sup>13)</sup>が報告されている. その他のフラボノイドの脂質代謝に対する影響については報告が少ない.

日本人一人あたりのquercetin及びrutinの1日摂取量はKimiraら<sup>14)</sup>によりそれぞれ8.3 mg/d, 1.5 mg/dと報告されている. Quercetin及びrutinのLD50はそれぞれ160 mg/kg (PO, マウス), 950 mg/kg (iv, マウス)である<sup>15)</sup>. Quercetin及びrutinの毒性について, quercetinに変異原性があるとする報告<sup>16)</sup>とないとする報告<sup>17)</sup>の両方があり, rutinには変異

原性はないとされている<sup>16)</sup>. 発癌性についても, quercetinに発癌性があるとする報告<sup>18)</sup>とないとする報告<sup>19)</sup>の両方がある. 一方で, rutin, quercetinに抗癌性があるという報告<sup>20)</sup>がある. 一方, hesperidinの1日摂取量及び毒性に関する報告は見あたらない.

実験1~3の結果からみてhesperidin, quercetin或いはrutinを日本人の1日摂取量の5000倍以上に相当する1.0 g/kgの用量で22日間連続経口投与しても体重増加抑制等の有害な作用は認められなかった. また, コレステロールを負荷しない通常食では, hesperidin, quercetin或いはrutinはラットのコレステロール・胆汁酸代謝には影響しないことが明らかになった. また, 血清フラボノイド濃度とTBARS値の間に負の相関が認められたことより, 血清中のフラボノイドが抗酸化作用を顕している可能性が考えられる.

Quercetin或いはrutin各1.0 g/kgを10日間連続 (実験4) 或いは1回投与 (実験5) した場合, rutin投与ラットの方が血清中の総及び遊離型フラボノイド濃度が高く, rutinの遊離型であるquercetinの割合がquercetinの代謝物であるisorhamnetinの割合より高い傾向が認められた. Rutinの分子量(610.53)はquercetinの分子量(302.24)の約2倍であり, 投与した量は遊離型のquercetinとして換算すると約半分となる. 予想に反して血清中のフラボノイド濃度が2倍以上でありまたフラボノイド組成が異なることより, rutinと

Table 8 Percentage of Urinary Excretion and Serum Distribution of Flavonoids (Experiment 5, day 0-3)

	Quercetin 1.0 g/kg	Rutin 1.0 g/kg	Significance
Percentage of urinary excretion [%] (molar ratio)			
Day 0-1			
Quercetin	0.0524±0.0333	0.3261±0.1777	N.S. <sup>1)</sup>
Isorhamnetin	0.0336±0.0201	0.2092±0.1016	N.S.
Tamarixetin	0.0408±0.0212	0.2320±0.0774	N.S.
Total	0.1269±0.0745	0.7637±0.3515	N.S.
Day 1-2			
Quercetin	0.0064±0.0016	0.0456±0.0345	N.S.
Isorhamnetin	0.0028±0.0009	0.0336±0.0240	N.S.
Tamarixetin	0.0036±0.0009	0.0307±0.0194	N.S.
Total	0.0128±0.0030	0.1106±0.0776	N.S.
Day 2-3			
Quercetin	0.0005±0.0002	0.0044±0.0020	N.S.
Isorhamnetin	0.0000±0.0000	0.0061±0.0044	N.S.
Tamarixetin	0.0000±0.0000	0.0043±0.0026	N.S.
Total	0.0006±0.0002	0.0148±0.0089	N.S.
Days 0-3			
Quercetin	0.0580±0.0339	0.3761±0.2134	N.S.
Isorhamnetin	0.0355±0.0209	0.2490±0.1281	N.S.
Tamarixetin	0.0436±0.0219	0.2670±0.0968	N.S.
Total	0.1349±0.0769	0.8921±0.4329	N.S.
Percentage of distribution in blood <sup>2)</sup> [%] (molar ratio)			
Quercetin	0.0072±0.0008	0.0361±0.0069	p<0.05
Isorhamnetin	0.0207±0.0026	0.0965±0.0189	p<0.05
Total	0.0279±0.0033	0.1326±0.0572	p<0.05

Data are expressed as mean±SEM (n=5).

1) Not significant (p>0.05 by Aspin-Welch t test).

2) Percentage of distribution was calculated by assuming that all flavonoids in blood distributed in serum and that blood weight accounted for 7% of total body weight.

quercetinとでは代謝経路に幾分差のあることが示唆された。また、1回投与実験(実験5)において、投与後3日間で血清及び尿中でフラボノイドとして回収されたのは投与量の1%以下であることについては、1) 腸管より吸収されずにそのまま糞中へ排泄された、2) 腸管より吸収されたフラボノイドが肝臓で分解を受けフラボノイド以外の物質となり速やかに代謝され呼吸或いは糞中へ排泄された、或いは血中でHPLCで検出されない物質として存在している、等の可能性が考えられる。

フラボノイドをはじめとするポリフェノール類が生体への機能性の側面から脚光を浴び研究が進んできたのは比較的近年のことであり、その種類のや代謝、生理作用等、未解明な部分が少なくなく、今後の研究が望まれる。

#### 文献 (発表論文を含む)

- 1) Bravo, L.: *Nutr. Rev.*, **56**, 317-333 (1998)
- 2) Deshpande, S.S., Cheryan, M., Salunke, D.K.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **24**, 401-449 (1986)
- 3) Shahidi, F. ed. (1997): "Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications", AOCS Press, Champaign, Illinois, U.S.A.
- 4) Rice-Evans, C.A., Packer, L. eds. (1998): "Flavonoids in Health and Diseases", Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A.
- 5) Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D.: *Lancet*, **342**, 1007-1011 (1993)
- 6) Waterman, P.G.: *Prog. Clin. Biol. Res.*, **280**, 77-91 (1988)
- 7) Diplock, A.T., Charleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J.: *Brit. J. Nutr.*, **80**, S77-S112 (1998)
- 8) Nakamura, Y., Ishimitsu, S., Tonogai, Y.: *J. Health Sci.*, **46**, 229-240 (2000)
- 9) Grundy, S.M., Ahrens, E.H.Jr., Mietinen, T.A.: *J. Lipid Res.*, **6**, 397-410 (1965)
- 10) Setchell, K.D.R., Lawson, A.M., Tanida, N., Sjoval, J.: *J. Lipid Res.*, **24**, 1085-1100 (1983)
- 11) Nakamura, Y., Tsumura, Y., Tonogai, Y., Shibata, T.: *J. Nutr.*, **129**, 1214-1222 (1999)
- 12) Monforte, M.T., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A.M., Galati, E.M.: *Il Farmaco*, **50**, 595-599 (1995)
- 13) Valsa, A.K., Ushakumari, B., Vijayalakshmi, N.P.: *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **19**, 175-182 (1995)
- 14) Kimura, M., Arai, Y., Shimoi, K., Watanabe, S.: *J. Epidemiol.*, **8**, 168-175 (1998)
- 15) Budavari, ed. (1996): "The Merck Index. Twelfth Edition", Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
- 16) Stoewsand, G.S., Anderson, J.L., Boyd, J.N., Hrazdina, G., Babish, J.G., Walsh, K.M., Losco, P.: *J. Toxicol. Environ. Health*, **14**, 105-114 (1984)
- 17) Aeschbacher, H.-U., Meier, H., Rush, E.: *Nutr. Cancer*, **4**, 90-98 (1982)
- 18) Pamukcu, A.M., Yalciner, S., Hatcher, J.F., Bryan, G.T.: *Cancer Res.*, **40**, 3468-3472 (1980)
- 19) Saito, D., Shirai, A., Matsushima, T., Sugimura, T., Hirono, I.: *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **1**, 213-221 (1980)
- 20) Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G., Newmark, H.L.: *Carcinogenesis*, **12**, 1193-1196 (1991)

### 3. 生体側から見た生理活性物質の構造と関連遺伝子の構造解析

#### (1) 塩素化エチレン化合物によるラット肝シトクロム P450の変動: その構造活性相関の解明

環境衛生化学部 埴岡伸光, 神野透人,  
西村哲治, 安藤正典

#### [目的]

塩素化エチレン化合物は、各種産業で有機溶剤や樹脂原料として広く使用されている。しかし、その廃棄や漏出のため微量であるが、かなり広範囲の地下水や大気から検出され、生体に対する影響が懸念されている<sup>1)</sup>。化学物質の中には生体内での酵素による代謝がなければ毒化作用を示すことはない例も多数みられ、この毒化現象(代謝的活性化)のなかでシトクロムP450(P450)は、最も重要な役割を担っていることはよく知られている。塩素化エチレン化合物による毒性も代謝的活性化による可能性も考えられ、その毒性発現にはP450が鍵を握っているものと思われる。しかし、塩素化エチレン化合物の代謝および毒性に対して、どのP450分子種がどの程度の寄与があるかという点はほとんど明らかにされていない。本研究は、塩素化エチレン化合物によるP450変動の構造活性相関を解明することを目的として、異物代謝に関与するP450分子種に対するトリクロロエチレン(TCE)、1,1-ジクロロエチレン(1,1-DCE)、cis-1,2-ジクロロエチレン(cis-1,2-DCE)およびtrans-1,2-ジクロロエチレン(trans-1,2-DCE)の影響について検討した。

#### [方法]

##### 1. 動物および投与

8週齢のWistar系雄性ラットを用いた。1群4匹ずつとし、対照群はコーン油のみを、また投与群はコーン油に溶解したTCE(400, 800および1200 mg/kg)、1,1-DCE(200, 400および800 mg/kg)、cis-1,2-DCE(800 mg/kg)あるいはtrans-1,2-DCE(800 mg/kg)を1日1回4日間腹腔内投与した。いずれの群も最終投与24時間後に屠殺し、常法に従い肝ミクロソームを調製した。

##### 2. P450依存性酵素活性の測定

7-エトキシレゾルフィンO-デエチラーゼ(EROD)、7-メトキシレゾルフィンO-デメチラーゼ(MROD)および7-ベ

ンジルオキシレゾルフィン *O*-デベンジラーゼ (BROD) 活性は、生成したレゾルフィン量を蛍光で測定することによって行った<sup>2)</sup>。7-エトキシクマリン *O*-デエチラーゼ (ECOD) 活性は、生成した7-ヒドロキシクマリンを定量することにより行った<sup>3)</sup>。また、ベンツフェタミン *N*-デメチラーゼ (BZND)、アミノピリン *N*-デメチラーゼ (APND) およびエリスロマイシン *N*-デメチラーゼ (EMND) 活性は、Nashの方法<sup>4)</sup>に従い、生成したホルムアルデヒドを測定して求めた。4-ニトロフェノール2-ヒドロキシラーゼ (4NP2H)、クロルゾキサゾン6-ヒドロキシラーゼ (CZ6H)、テストステロン2 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ (TS2AH)、テストステロン6 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ (TS6BH)、テストステロン7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ (TS7AH) およびラウリン酸 $\omega$ -ヒドロキシラーゼ (LAOH) 活性は、それぞれ生成した4-ニトロカテコール、6-ヒドロキシクロルゾキサゾン、2 $\alpha$ -ヒドロキシテストステロン、6 $\beta$ -ヒドロキシテストステロン、7 $\alpha$ -ヒドロキシテストステロンおよび $\omega$ -ヒドロキシラウリン酸を高速液体クロマトグラフィーで定量して行った<sup>5-8)</sup>。いずれのP450依存性酵素活性の測定もラット肝ミクロソームにおける最適反応条件下で行った<sup>9-11)</sup>。

3. イムノブロットイング

それぞれの肝ミクロソームを7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付した<sup>12)</sup>。さらに、泳動されたタンパクをニトロセルロース膜に転写し、抗ラットCYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11/6, CYP2E1, CYP3A2/1 およびCYP4A1/2/3抗体をプローブに用いてそれらと認識するタンパクを4-クロロ-1-ナフトールで染色した<sup>13)</sup>。バンド強度は、デンシトメーターで測定した。

[結果および考察]

1. TCEの影響

LAOH活性は、いずれの投与量でも有意に増加し、その誘導率は、対照群の2.9~3.0倍であった。また、4NP2HおよびTS6BH活性もTCE投与により用量依存的に増加した(1.2~1.8倍)。しかし、TS2AH活性は、1200 mg/kg TCEで有意に低下した。一方、他のP450依存性酵素活性は、

Table 1. P450-dependent monooxygenase activities in liver microsomes from control and TCE-treated rats

	TCE (mg/kg)			
	0	400	800	1200
EROD <sup>a)</sup>	43.0 ± 8.1	45.7 ± 2.7	57.3 ± 9.5	64.4 ± 3.4*
MROD <sup>a)</sup>	45.4 ± 7.2	44.8 ± 6.0	50.4 ± 11.9	49.6 ± 11.1
ECOD <sup>b)</sup>	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.45 ± 0.04†	0.48 ± 0.06*
BROD <sup>b)</sup>	18.8 ± 3.2	23.1 ± 4.6	29.8 ± 6.9*	27.9 ± 6.1*
BZND <sup>b)</sup>	3.82 ± 0.50	4.29 ± 0.25	4.71 ± 0.22*	4.50 ± 0.20*
APND <sup>b)</sup>	4.02 ± 0.51	4.27 ± 0.15	4.80 ± 0.43	4.91 ± 0.67
4NP2H <sup>b)</sup>	0.32 ± 0.03	0.39 ± 0.05*	0.47 ± 0.05†	0.55 ± 0.03†
EMND <sup>b)</sup>	7.26 ± 1.10	8.13 ± 0.70	9.41 ± 1.15*	8.40 ± 0.31
LAOH <sup>b)</sup>	0.44 ± 0.05	1.34 ± 0.43†	1.28 ± 0.32†	1.31 ± 0.06†
TS2AH <sup>b)</sup>	0.60 ± 0.17	0.68 ± 0.12	0.56 ± 0.08	0.35 ± 0.08*
TS6BH <sup>b)</sup>	0.88 ± 0.16	1.08 ± 0.26	1.27 ± 0.10†	1.56 ± 0.33†
TS7AH <sup>b)</sup>	0.33 ± 0.08	0.34 ± 0.04	0.31 ± 0.05	0.32 ± 0.01

Each value represents the mean ± SD of four animals.  
<sup>a)</sup>pmol/min/mg protein.  
<sup>b)</sup>nmol/min/mg protein.  
 \*Significantly different from the control ( $p < 0.05$ ).  
 †Significantly different from the control ( $p < 0.01$ ).

800あるいは1200 mg/kgのTCE投与により有意に増加したが、それらの誘導率は、LAOH活性のような顕著なものではなかった (Table 1)。また、イムノブロットイングからもTCE投与によるCYP4A1/2/3タンパクの誘導が確認され (Table 2)、この誘導は、TCE代謝物であるトリクロロ酢酸に起因しているものと考えられた<sup>14)</sup>。

Table 2. P450 protein levels in liver microsomes from control and TCE-treated rats

	TCE (mg/kg)			
	0	400	800	1200
CYP1A1/2	1.00 ± 0.14	0.97 ± 0.19	1.09 ± 0.18	1.07 ± 0.12
CYP2B1/2	1.00 ± 0.33	1.07 ± 0.28	1.91 ± 0.53*	2.49 ± 0.36†
CYP2C11/6	1.00 ± 0.10	1.09 ± 0.04	0.90 ± 0.07	0.65 ± 0.04†
CYP2E1	1.00 ± 0.14	1.03 ± 0.10	1.20 ± 0.05*	1.32 ± 0.13*
CYP3A2/1	1.00 ± 0.17	1.02 ± 0.16	1.28 ± 0.07*	1.31 ± 0.13*
CYP4A1/2/3	1.00 ± 0.10	2.14 ± 0.43†	2.07 ± 0.42†	2.01 ± 0.16†

The immunoblotting results were normalized to those of control rats. Each value represents the mean ± SD of four animals.  
 \*Significantly different from the control ( $p < 0.05$ ).  
 †Significantly different from the control ( $p < 0.01$ ).

2. 1,1-DCE, cis-1,2-DCEおよびtrans-1,2-DCEの影響

1,1-DCEは、CYP2C11依存性酵素のTS2AH活性を顕著に減少させ、800 mg/kg群におけるその活性は、対照群の10%以下であった (Table 3)。また、CYP2C11/6タンパクも400および800 mg/kg 1,1-DCEによりそれぞれ36および83%減少した (Table 4)。cis-1,2-DCEおよびtrans-1,2-DCEも

Table 3. P450-dependent monooxygenase activities in liver microsomes from control and 1,1-DCE-treated rats

	1,1-DCE (mg/kg)			
	0	200	400	800
EROD <sup>a)</sup>	36.6 ± 4.2	33.2 ± 2.4	36.8 ± 6.6	32.3 ± 6.7
MROD <sup>a)</sup>	23.8 ± 2.7	18.1 ± 1.6*	18.2 ± 3.3*	14.3 ± 4.0†
ECOD <sup>b)</sup>	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.13 ± 0.01†
BROD <sup>b)</sup>	15.6 ± 3.5	13.1 ± 1.8	18.6 ± 2.0	14.3 ± 1.4
BZND <sup>b)</sup>	4.27 ± 0.60	4.44 ± 0.16	3.66 ± 0.42	1.49 ± 0.27†
APND <sup>b)</sup>	9.18 ± 0.63	9.06 ± 0.32	9.67 ± 1.20	7.66 ± 1.11
CZ6H <sup>b)</sup>	1.05 ± 0.10	1.01 ± 0.05	0.92 ± 0.07	0.37 ± 0.05†
EMND <sup>b)</sup>	7.67 ± 0.54	7.85 ± 0.39	8.43 ± 1.06	6.42 ± 0.47*
LAOH <sup>b)</sup>	0.59 ± 0.08	0.51 ± 0.09	0.68 ± 0.18	0.48 ± 0.13
TS2AH <sup>b)</sup>	0.86 ± 0.15	0.91 ± 0.10	0.59 ± 0.08*	0.08 ± 0.02†
TS6BH <sup>b)</sup>	0.82 ± 0.06	0.67 ± 0.11	0.72 ± 0.15	0.25 ± 0.09†
TS7AH <sup>b)</sup>	0.31 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.04

Each value represents the mean ± SD of four animals.  
<sup>a)</sup>pmol/min/mg protein.  
<sup>b)</sup>nmol/min/mg protein.  
 \*Significantly different from the control ( $p < 0.05$ ).  
 †Significantly different from the control ( $p < 0.01$ ).

Table 4. P450 protein levels in liver microsomes from control and 1-DCE-treated rats

	1,1-DCE (mg/kg)			
	0	200	400	800
CYP1A1/2	1.00 ± 0.13	0.61 ± 0.05*	0.59 ± 0.08*	0.34 ± 0.09*
CYP2B1/2	1.00 ± 0.27	0.94 ± 0.23	0.89 ± 0.22	0.40 ± 0.17*
CYP2C11/6	1.00 ± 0.12	0.97 ± 0.08	0.64 ± 0.09*	0.17 ± 0.03*
CYP2E1	1.00 ± 0.19	0.92 ± 0.14	0.91 ± 0.12	0.40 ± 0.10*
CYP3A2/1	1.00 ± 0.15	0.81 ± 0.10	0.86 ± 0.16	0.26 ± 0.04*
CYP4A1/2/3	1.00 ± 0.18	0.83 ± 0.12	1.17 ± 0.35	0.96 ± 0.12

The immunoblotting results were normalized to those of control rats. Each value represents the mean ± SD of four animals.  
 \*Significantly different from the control ( $p < 0.01$ ).

TS2AH活性およびCYP2C11/6タンパク量を有意に減少させたが、その減少率は1,1-DCEのような顕著なものではなかった (Table 5およびTable 6)。TS6BHおよびCYP3A2/1タンパク量は、1,1-DCEおよびcis-1,2-DCE投与で有意に減少した。cis-1,2-DCEおよびtrans-1,2-DCEは、CYP1A2および



CYP2B2の酵素活性およびタンパク量を誘導し、ジクロロエチレンによる肝P450変動パターンは、異性体により異なることが示唆された。

Table 5. P450-dependent monooxygenase activities in liver microsomes from control, *cis*-1,2-DCE- and *trans*-1,2-DCE-treated rats

	Control	<i>cis</i> -1,2-DCE	<i>trans</i> -1,2-DCE
EROD <sup>a)</sup>	53.6 ± 4.9	51.7 ± 1.8	76.1 ± 3.5†
MROD <sup>b)</sup>	37.8 ± 3.7	36.3 ± 4.7	71.0 ± 7.3†
ECOD <sup>b)</sup>	0.42 ± 0.03	0.30 ± 0.08*	0.48 ± 0.06
BROD <sup>b)</sup>	21.6 ± 2.3	15.6 ± 0.8†	23.6 ± 3.8
BZND <sup>b)</sup>	4.77 ± 0.32	3.43 ± 1.10	4.64 ± 0.55
APND <sup>b)</sup>	11.1 ± 1.1	10.4 ± 1.7	12.6 ± 0.9
CZ6H <sup>b)</sup>	1.36 ± 0.06	0.90 ± 0.29*	1.09 ± 0.17
EMND <sup>b)</sup>	8.29 ± 0.90	6.81 ± 1.33	8.72 ± 0.64
LAOH <sup>b)</sup>	0.61 ± 0.13	0.53 ± 0.07	0.56 ± 0.04
TS2AH <sup>b)</sup>	0.75 ± 0.10	0.40 ± 0.12†	0.47 ± 0.08†
TS6BH <sup>b)</sup>	0.66 ± 0.06	0.27 ± 0.12†	0.74 ± 0.03
TS7AH <sup>b)</sup>	0.33 ± 0.02	0.24 ± 0.03†	0.33 ± 0.03

Each value represents the mean ± SD of four animals.

<sup>a)</sup>pmol/min/mg protein.

<sup>b)</sup>nmol/min/mg protein.

\*Significantly different from the control ( $p < 0.05$ ).

†Significantly different from the control ( $p < 0.01$ ).

Table 6. P450 protein levels in liver microsomes from control, *cis*-1,2-DCE- and *trans*-1,2-DCE-treated rats

	Control	<i>cis</i> -1,2-DCE	<i>trans</i> -1,2-DCE
CYP1A1/2	1.00 ± 0.08	0.78 ± 0.13*	1.38 ± 0.10†
CYP2B1/2	1.00 ± 0.08	0.58 ± 0.09†	1.29 ± 0.12†
CYP2C11/6	1.00 ± 0.16	0.60 ± 0.13†	0.66 ± 0.08†
CYP2E1	1.00 ± 0.06	0.82 ± 0.14	0.89 ± 0.08
CYP3A2/1	1.00 ± 0.14	0.58 ± 0.10†	1.09 ± 0.10
CYP4A1/2/3	1.00 ± 0.13	0.90 ± 0.09	0.97 ± 0.12

The immunoblotting results were normalized to those of control rats. Each value represents the mean ± SD of four animals.

\*Significantly different from the control ( $p < 0.05$ ).

†Significantly different from the control ( $p < 0.01$ ).

### 3. 塩素化エチレン化合物によるP450変動の構造活性相関

本研究で用いたいずれの塩素化エチレン化合物も概ね肝臓の常在性P450分子種に何らかの影響を与えた。すでに我々は、テトラクロロエチレン (塩素数4) は、*in vivo*および*in vitro*系でラット肝のCYP2BサブファミリーP450分子種に強い影響を与えることを明らかにしている<sup>15,16)</sup>。このように同じ塩素化エチレン化合物でも肝P450に対する影響 (誘導・抑制および強弱) は、極めて多様であり、それらの変動が各塩素化エチレン化合物の毒性発現に何らかの形で関わっていることが推察された。

#### [文献]

- 1) World Health Organization: Guidelines for Drinking-Water Quality (Geneva: WHO) (1996)
- 2) Pohl, R.J. and Fouts, J.R.: *Anal. Biochem.*, **107**, 150-155 (1980)
- 3) Aitio, A.: *Anal. Biochem.*, **85**, 488-491 (1978)
- 4) Nash, T.: *Biochem. J.*, **107**, 416-421 (1953)
- 5) Tassaneeyakul, W., Veronese, M.E., Birkett, D.J. and Miners, J.O.: *J. Chromatogr.*, **616**, 73-78 (1993)
- 6) Lucas, D., Menez, J.F. and Berthou, F.: *Methods Enzymol.*,

**272**, 115-123 (1996)

- 7) Yoshihara, S., Nagata, K., Wada, I., Yoshimura, H. and Masuda, Y.: *J. Pharmacobio-Dyn.*, **5**, 994-1004 (1982)
- 8) Aoyama, T. and Sato, R.: *Anal. Biochem.*, **170**, 73-82 (1988)
- 9) Hanioka, N., Nakano, K., Jinno, H., Hamamura, M., Takahashi, A., Yoda, R., Nishimura, T. and Ando, M.: *Chemosphere*, **30**, 1297-1309 (1995)
- 10) Hanioka, N., Omae, E., Nishimura, T., Jinno, H., Onodera, S., Yoda, R. and Ando, M.: *Chemosphere*, **33**, 265-276 (1996)
- 11) Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T. and Ando, M.: *Chemosphere*, **34**, 719-730 (1997)
- 12) Laemmli, U.K.: *Nature (London)*, **227**, 680-685 (1970)
- 13) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354 (1979)
- 14) Zanelli, U., Puccini, P., Acerbi, D., Ventura, P. and Gervasi, P.G.: *Arch. Toxicol.*, **70**, 145-149 (1996)
- 15) Hanioka, N., Jinno, H., Toyo'oka, T., Nishimura, T. and Ando, M.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 273-280 (1995)
- 16) Hanioka, N., Jinno, H., Takahashi, A., Nakano, K., Yoda, R., Nishimura, T. and Ando, M.: *Xenobiotica*, **25**, 151-165 (1995)

#### [発表論文]

- 1) Hanioka, N., Omae, E., Yoda, R., Jinno, H., Nishimura, T. and Ando, M.: Effect of trichloroethylene on cytochrome P450 enzymes in the rat liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**, 628-635 (1997)
- 2) Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T. and Ando, M.: Changes in cytochrome P450 enzymes by 1,1-dichloroethylene in rat liver and kidney. *Arch. Toxicol.*, **72**, 9-16 (1997)
- 3) Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T. and Ando, M.: Changes in hepatic cytochrome P450 enzymes by *cis*- and *trans*-1,2-dichloroethylene in rat. *Xenobiotica*, **28**, 41-51 (1997)

#### (2) 発癌プロモーターの生化学的作用と発癌プロモーション活性との関連

衛生微生物部 酒井綾子

#### [目的]

本研究は、化学物質の発癌プロモーション作用と3次元構造相関を解明するための基礎的な知見を得るため、発癌プロモーターが生体に作用して発癌の促進を起こす過程に介在する事象を遺伝子発現変化を解析することによって明らかにすることを目的としている。

発癌は、多段階的な現象であって、イニシエーション、プロモーション、プログレッション等の過程に分けられる。イニシエーションは、遺伝子の損傷に伴って遺伝子に不可逆的な変化が起きる過程であり、これについては多くの優れた研究がある。しかし、一旦体細胞にもたらされたイニ

シエーションを除くことはできない。一方、プロモーション過程は、イニシエーションを受けた細胞がある因子によって長期にわたって刺激された結果、自律的な腫瘍細胞(または細胞集団)に変わる過程であって、ある程度まで可逆的である。プロモーション過程を抑制・制御することができれば、イニシエーションがあっても、最終的な癌の発生を抑えることが出来ると考えられる。しかしながら、イニシエーション過程と異なり、プロモーション過程の分子レベルでの解明は遅れている。

発癌プロモーターは、多様な遺伝子の発現を誘導することが知られているが、それらの遺伝子群のどれが発癌の促進に関与しているかは、明らかにされていない。種々の発癌プロモーターに共通した発現変化を示す遺伝子を見出すことが出来れば、発癌の促進の要となる遺伝子である可能性が高く、プロモーターの作用機序の解明や簡便なスクリーニング法の開発に役に立つと考えられる。BALB/3T3細胞を用いる *in vitro* 2段階形質転換実験系は、実験動物における2(多)段階発癌のモデルとしてプロモーターの検索や発癌過程の解析に用いられている。著者らの実験でも動物を用いた結果とよい相関が認められる。そこで、2段階形質転換試験を2段階発癌モデルとして用い、遺伝子発現変化を解析することを計画した。遺伝子発現の可視化の方法としては、蛍光mRNA・ディファレンシャル・ディスプレイ(DD)法を用いた。

はじめに、種々の化学物質について2段階形質転換試験を実施して形質転換プロモーション作用を調べた。その結果、TPA、オカダ酸、バナジン酸塩が強いプロモーション活性を示したので、この3物質に共通した発現変化を示す遺伝子を検索した。第一次を終えた段階で2つの遺伝子を見出している。

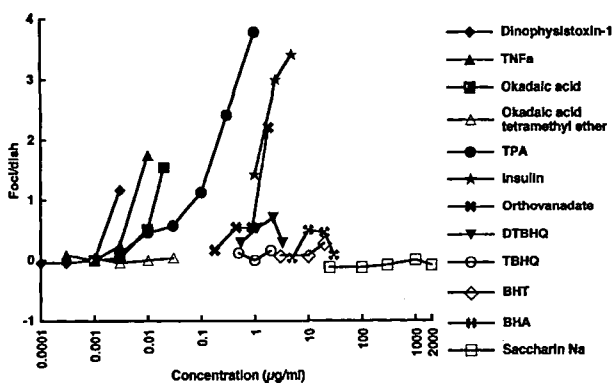


Fig.1 Promoting activity of tumor promoters and related substances in BALB/3T3 cell transformation. Open symbols designate that those substances were negative for promoting activity in the two-stage transformation assay. DTBHQ, 2, 5-di(*tert*-butyl)-1, 4-hydroquinone; TBHQ, 2-*tert*-butyl-1, 4-hydroquinone; BHT, 3, 5-di(*tert*-butyl)-4-hydroquinone; BHA, 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole.

[方法]

1. 2段階形質転換試験

BALB/3T3細胞を10<sup>4</sup>個/dishの密度で播種し、24時間後閾値をわずかに越える濃度の3-メチルコラントレン(MCA, 0.2 µg/ml)を加えて3日間イニシエーション処理を行った。通常培地にかえて3日間培養した後、被験物質を加えた培地で3または4日に1度の培地交換を行いながら2週間プロモーション処理を行った。通常培地でさらに3週間培養し、形質転換フォーカスを計数した。

2. 遺伝子解析

細胞の暴露とRNAの単離 細胞を10<sup>4</sup>個/dishの密度で播種し、途中1回の培地交換を行って1週間培養した。培地にTPA (0.2 µg/ml), オカダ酸 (0.015 µg/ml, 2回目以降は, 0.012 µg/ml) またはオルトバナジン酸ナトリウム (1.8 µg/ml) を加えて2週間プロモーション処理を行った。この間, 0, 4, 7, 11日目に培地交換を行った。この条件は, 形質転換試験におけるプロモーション処理の条件と同一である。プロモーション処理開始後, 0, 24時間後, 3, 7, 8, 14日目に総RNAをTRIzol (ライフテックオリエンタル) 試薬を用いて抽出し, さらにISOGEN試薬(和光)で精製した。

mRNA・ディファレンシャル・ディスプレイ 総RNA 2.5 µgとFITCラベルしたGT<sub>15</sub>VA, GT<sub>15</sub>VC, GT<sub>15</sub>VGまたはGT<sub>15</sub>VT 50 pmol (Vは, A, CまたはG) とから逆転写酵素反応によってfirst cDNA鎖を調製した。このfirst cDNAの1/50量 (20 µl) に任意の5'側プライマー (10mer) 10 pmolとfirst cDNA調製に用いたプライマー5 pmolを加えてlow stringencyでPCRを行った。PCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離させ, そのままあるいはSYBR Green Iで染色後, 蛍光イメージアナライザーでスキャンして可視化した。対照と比較して, 作用させた3つのプロモーターに共通した発現変化を示すmRNAのcDNA断片を含むバンドを切り出し, PCRによって再増幅した。

クローニングと塩基配列の決定 再増幅したcDNA断片をpSTBlue-1 Vector (Novagen) のEcoRVサイトにクローニングしてABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE)を用いて塩基配列を決定した。

[結果及び考察]

1. 化学物質のBALB/3T3細胞2段階形質転換試験におけるプロモーション作用

今まで試験した物質のうち主だったものの形質転換促進作用をまとめてFig.1に示した。イニシエーターとしてMCAを用いたときの結果である。グラフには, 参考のために内因性の物質も含めている。

強力な発癌プロモーターであるTPA, オカダ酸, デイノフィシトキシシン-1は, 強力な形質転換のプロモーション作用を示した。デイノフィシトキシシン-1は, オカダ

酸タイプの発癌プロモーターの1つである。オカダ酸テトラメチルエーテルは、マウス皮膚でプロモーション活性を示さないオカダ酸の誘導体であるが、形質転換のプロモーション作用も陰性であった。フェノール系抗酸化剤にプロモーション活性を示すものがあったが、TPAやオカダ酸などの典型的な発癌プロモーターに比べるとプロモーション活性を示す濃度域並びに誘発されるフォーカス数の両方の点で活性は弱かった。

TPAとオカダ酸とは、それぞれプロテインキナーゼC活性化作用とプロテインセリン/スレオニンホスファターゼ阻害作用を有し、いずれもタンパク質のセリン/スレオニン残基での燐酸化を亢進する。また、多くの癌遺伝子産物にチロシンキナーゼ活性があることが知られている。これらのことにヒントを得て、タンパク質のチロシン残基での燐酸化を亢進する物質として、プロテインチロシンホスファターゼ阻害剤であるオルトバナジン酸塩の形質転換プロモーション作用を試験することにした。その結果、オルトバナジン酸塩も強いプロモーション作用を示した。タンパク質の燐酸化と脱燐酸化は、細胞周期や増殖、分化の制御にかかわる細胞内情報伝達系で重要な役割を果たしている。従って、形質転換プロモーション作用の試験で得られた結果は、情報伝達ネットワークに引き起こされた変化の中に癌の進展に導くものがある可能性を示唆していると考えられた。

2段階形質転換試験において、TPAとオカダ酸、オルトバナジン酸塩が強力なプロモーション作用を示したので、この3つのプロモーターに共通した発現変化を示す遺伝子を検索することにした。3つのプロモーターのプロモーション作用がほぼ均しくなる濃度の発癌プロモーターに細胞を暴露し、培養の条件も形質転換試験と同一にして遺伝子発現の状態を比較した。TPAとオカダ酸、オルトバナジン酸塩の濃度は、それぞれ、200, 12-15, 1800 ng/mlとした。

2. mRNA・ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた発現遺伝子の解析

50組のプライマーを用いてDD法を実施した結果、約10のmRNAにプロモーター共通の発現変化が認められた。mRNAの発現変化の再現性、発現の差の顕著さなどを考慮して、2つのcDNA断片G09とC05を分離した。G09は、プロモーターを作用させた細胞に共通して発現の増加が認められるもので、DD法における断片の大きさは、約540 bpであった。C05は、プロモーターを作用させた細胞に共通して発現の低下が認められるもので、DD法における断片の大きさは、約300 bpであった。G09とC05の対照との発現差は、それぞれ、24時間目と7日目にもっとも顕著であった。このときのDD法におけるバンドの蛍光イメージ

をFig. 2に示した。

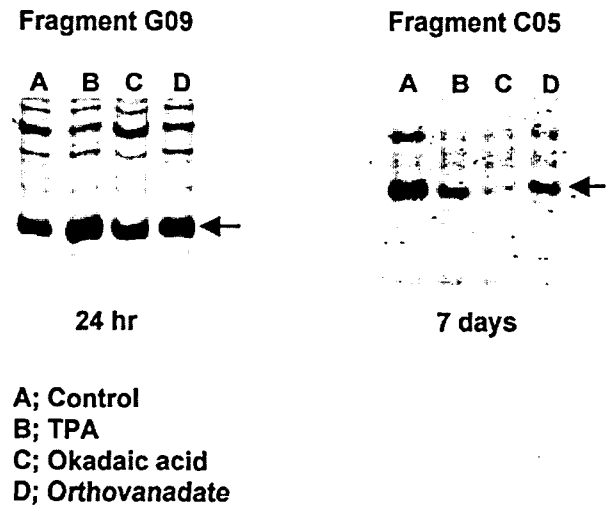


Fig.2 Fluorescent differential display of mRNA from BALB/3T3 cells treated by tumor promoters. Primers: G09, FGT<sub>15</sub>VG and GGGTAACGCC; C05, FGT<sub>15</sub>VG and AGGGGTCTTG.

G09とC05をpSTBlue-1 Vectorにクローニングして塩基配列を決定した。G09は、核タンパク質NP95のcDNA (全長3488 bp)の2198-2708と完全に一致した。NP95は、増殖に関連するネズミの核タンパク質として見いだされ、ネズミ lymphoma 細胞株では恒常的に高発現していることが報告されている。C05は、3種のプロモーター共通に発現の低下が認められるもので、297 bpであった。GenBank + EMBL + DDBJ + PDBの塩基配列データベースをEST Divisionsも含めてBLAST検索したが、ホモロジーのあるシーケンスは見つからない。3種のプロモーターに共通した発現変化を示す複数の遺伝子が見いだされたことは、3種の化学物質のプロモーター作用に共通の機序が存在する可能性を示唆している。

#### 発表論文

- 1) Sakai, A., Miyata, N. and Takahashi, A.: Promoting activity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Letters*, **115**, 213-220 (1997).
- 2) Sakai, A.: Orthovanadate, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases, acts more potently as a promoter than as an initiator in the BALB/3T3 cell transformation. *Carcinogenesis*, **18**, 1395-1399 (1997).
- 3) Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M.W., Sakai, A., Sueoka, E. and Fujiki, H.: Essential role of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in tumor promotion as revealed by TNF- $\alpha$ -deficient mice. *Cancer Res.*, **59**, 4516-4518 (1999).