

## 環境化学物質の体内代謝，栄養要求に及ぼす影響とその制御

### Nutritional regulations for the metabolic impacts of environmental chemicals

代表研究者	名古屋大学農学部教授	吉田 昭
	Pro., Nutrition, Dept. of Agricultural Chem., Nagoya Univ.	
		Akira YOSHIDA
協同研究者	名古屋大学農学部教授	並木 満夫
	Pro., Food Science, Dept. of Food Sci., Tech., Nagoya Univ.	
		Mitsuo NAMIKI
	名古屋大学農学部助教授	青山 頼孝
	Assoc. Prof., Nutrition, Dept. of Agricultural Chem. Nagoya Univ.	
		Yoritaka AOYAMA
	名古屋大学農学部助手	大沢 俊彦
	Res, Assoc., Food Sci., Dept. of Food Sci., Tech., Nagoya Univ.	
		Toshihiko OSAWA

In industrial society, we have many chances to take various kinds of environmental chemicals, food additives and drugs. Among these, many fat soluble, low molecular synthesized organic chemicals (xenobiotics) are commonly metabolized by liver mixed function oxidases (or drug metabolizing enzymes) and induce these oxidases. These xenobiotics may affect the requirement of several vitamins, cholesterol metabolism, and lipid peroxidation. We studied on the nutritional regulations for the metabolic impacts of those environmental chemicals. Antimutagenic substances in foods were also studied.

1) Environmental chemicals and ascorbic acid metabolism: The administration of PCB, DDT or aminopyrine to rats caused a marked increase in urinary excretion of ascorbic acid (vitamin C) and in various tissue levels of ascorbic acid. When rats were fed diet containing PCB or DDT, the incorporation from U-<sup>14</sup>C-glucose into ascorbic acid in liver were significantly increased together with the increase in the activities of hepatic UDP-glucose dehydrogenase, UDP-glucuronyl transferase. Good correlation between the liver level of ascorbic acid and the activity of UDP-glucose dehydrogenase was observed. The turnover rates of ascorbic acid in various rat tissues were accelerated by feeding PCB containing diet suggesting the increased requirement of vitamin C in the animals including man in which ascorbic acid can not be synthesized. When guinea pigs were fed the PCB containing diet, the concentration of ascorbic acid in spleen, kidney and muscle was significantly decreased suggesting the moderate deficiency of ascorbic acid. In contrast to above organs, the concentration of ascorbic acid in liver where the main place of xenobiotic catabolism was increased indicating the increased demand of ascorbic acid in this organ. *In vivo* catabolism of a xenobiotic (zoxazolamine) was greatly accelerated by PCB feeding and this acceleration was greater in guinea pigs fed diets containing higher amount of ascorbic acid than that required for the prevention of scurvy. In a mutant strain of rats in which ascorbic acid can not be synthesized, some drug metabolizing enzymes were more induced by PCB with higher level of dietary ascorbic acid than usual requirement. These results indicate the increased requirement of ascorbic acid when xenobiotics are injected.

2) Xenobiotics and cholesterol metabolism: We found the various kinds of xenobiotics including PCB and DDT elevated the serum level of cholesterol. High level of cholesterol is considered to be an important risk factor of atherosclerosis. It was found that the serum lipoprotein pattern of hypercholesterolemic animals due to PCB diet is quite different from that due to high cholesterol feeding. In the former, both HDL-cholesterol and LDL-, plus VLDL-cholesterol were significantly elevated whereas in the latter case, only LDL-, plus VLDL-cholesterol was increased

and HDL-cholesterol was inversely decreased. The induction of hypercholesterolemia in rats by dietary xenobiotics was due to the increased biosynthesis of cholesterol in the liver. This increased cholesterologenesis was regulated by elevating the HMG CoA-reductase. This enzyme is activated by dephosphorylation and inactivated by phosphorylation. Hypercholesterolemia due to dietary PCB was not mediated by phosphorylation-dephosphorylation mechanism but mediated by increased enzyme amount. Cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase activity was also significantly elevated by dietary PCB and fecal excretion of bile acids was also increased. One of the physiological significance of increased cholesterologenesis would be for the higher production of bile acids to accelerate the xenobiotics excretion in bile. Induction of hypercholesterolemia due to dietary PCB was inhibited by  $\alpha$ -adrenergic blocker (phenoxybenzamine) suggesting the effect of PCB was through catecholamine system.

3) Much attention are focused on protective role of natural antioxidants against the oxidative damages caused by environmental chemicals. In the course of isolation and identification of natural antioxidants from plant materials, we have identified  $\beta$ -diketone derivatives as the main antioxidants in the leaf of *Eucalyptus globulus*. Screening for natural antioxidants in Japanese domestic plants indicated a strong evidence for the presence of different antioxidants in the leaf wax of cherry trees. Lignan type antioxidants were also isolated and identified from sesame seeds, and potential use of natural antioxidants in food systems as well as in the biological systems have been attempted. Desmutagenic effects of antioxidants have been evaluated and ascorbic acid and cysteine were found to play an important role in inactivation of C-nitro mutagens formed by the reaction of food components with sodium nitrite.

## 研究目的

現代の工業化社会における食生活では、工業廃棄物、農薬その他種々の環境化学物質が微量ではあるが食品や飲料水に混入する機会が多くなってきている。これらの環境化学物質の生体影響に関してはこれまで比較的少量摂取した場合の毒物学的立場からの研究が多い。しかし、外見上の毒性を示さない微量摂取によっても体内でビタミン類やコレステロールの代謝、脂質過酸化反応とそれに伴う変異原性物質の生成などを通して生体に重大な影響を及ぼすことがあり、ビタミンその他の栄養摂取によって、かなりその影響を軽減しうる可能性がある。本研究では微量の環境化学物質が栄養素の代謝や必要量に与える影響とその機構を明らかにして、栄養学的に毒性を制御することが目的である。本研究で我々は環境化学物質がアスコルビン酸（ビタミンC）代謝にどのような影響を与えるかについて詳細に調べ、環境化学物質を含めた生体異物摂取条件でのビタミンC摂取適量の基礎を示した。また、多くの環境化学物質が共通して血清コレステロール濃度を上昇させる作用のあることを見だし、その機構がコレステロール合成の促進によることを明らかにするとともに

に、このコレステロール合成促進がエピネフリン、ノルエピネフリンなどの作用を介して起こることを明らかにした。さらに、食品生体系における変異原物質の生成とその制御についても重要な知見を得ることができた。

## 研究経過および成果

1. 環境化学物質の摂取によるアスコルビン酸（ビタミンC）代謝の変動とビタミンC摂取適量について

さきに我々は、PCB、DDTなどの環境化学物質の投与でラットの尿中ビタミンC排泄が著しく増加することを観察し、PCB、DDTなど生体異物の代謝のために通常より多量のビタミンCが必要になるため、ラット体内でのビタミンC合成が増加するものと推定した。体内でビタミンC合成ができないモルモットを用いて実験したところ、PCBによるモルモットの成長低下が通常の5～10倍のビタミンCの投与で明らかに改善され、毒性が軽減されることを示した。そこで、まず、ラットを用い、環境化学物質によりビタミンCの合成分解がどのような変化を受けるかを明らかにし、ヒトのモデルとしてのモルモットについても環境化学物質摂取時のビタミンCの代謝変動につ

Table 1. Effect of dietary addition of PCB, DDT and aminopyrine on body weight gain, liver weight, tissue level of ascorbic acid, urinary ascorbic acid and plasma glucose<sup>1)</sup>.

Groups	Control (5) <sup>2)</sup>	200 ppm PCB (5)	500 ppm DDT (5)	1,000 ppm aminopyrine (5)
Body wt. gain for 14 days, g	23.9±3.8	72.3±2.7	74.3±4.7	67.7±7.2
Liver wt. %	4.52±0.05 <sup>a</sup>	6.28±0.12 <sup>b</sup>	5.86±0.10 <sup>c</sup>	4.82±0.12 <sup>d</sup>
Tissue level of ascorbic acid, µg/g tissue				
Liver	265±10 <sup>a</sup>	844±29 <sup>b</sup>	761±25 <sup>c</sup>	637±34 <sup>d</sup>
Kidney	97±5 <sup>a</sup>	365±14 <sup>b</sup>	296±7 <sup>c</sup>	228±3 <sup>d</sup>
Muscle	37±1 <sup>a</sup>	64±4 <sup>b</sup>	60±3 <sup>b</sup>	59±2 <sup>b</sup>
Urinary ascorbic acid mg/100 g body wt/day	0.24±0.02 <sup>a</sup>	9.07±0.38 <sup>b</sup>	9.30±0.44 <sup>b</sup>	5.88±0.76 <sup>c</sup>
Plasma glucose, mg/100 ml	159±10	153±3	160±7	160±4

<sup>1)</sup> Data presented as means ± SE. <sup>2)</sup> Number of animals each group is shown in the parenthesis. <sup>a,b,c,d</sup> Means within a column not followed by the same superscript letter are significantly different ( $P > 0.05$ ).

いて調べた。

### 1.1 環境化学物質によるラット体内のアスコルビン酸代謝回転の変動

ラットを 200 ppm PCB, 500 ppm DDT あるいは 1,000 ppm アミノピリンを含む飼料で飼育すると対照群に比し、尿中アスコルビン酸 (ビタミンC) の排泄はいずれの場合にも著しく増加するとともに、肝、腎、筋肉中のアスコルビン酸濃度も 2~3 倍に増加した (Table 1)。したがって、体内の

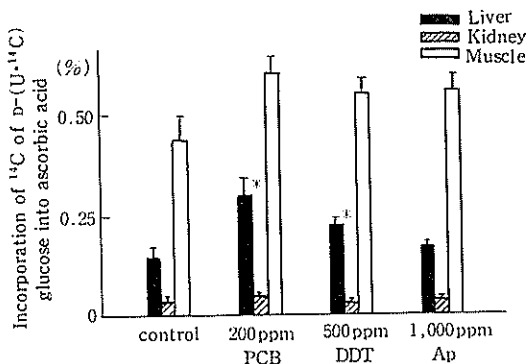


Fig. 1. Incorporation of <sup>14</sup>C into ascorbic acid from D-(U-<sup>14</sup>C) glucose. The radioactivity in total ascorbic acid in various tissues is presented as percent of the radioactivity in administered D-(U-<sup>14</sup>C) glucose (8.5 µCi/rat). The weight of muscle was calculated as 45 percent of body weight. Control: control group, 200 ppm PCB: 200 ppm PCB group, 500 ppm DDT: 500 ppm DDT group, 1,000 ppm Ap: 1,000 ppm aminopyrine group.

ビタミンCが単に尿に流出しているのではなく、これら生体異物の存在条件では生体の防御反応として組織中のビタミンCの濃度を高くすることが必要であり、体内で積極的にビタミンCを多量に合成するようになったと考えられる。そこで、実際にビタミンCの合成がこれら生体異物の投与によって促進されているかどうかを調べるべく、<sup>14</sup>C-グルコースから組織中のビタミンCへの取り込みを測定すると (Fig. 1), 肝や筋肉のビタミンCへの<sup>14</sup>Cの取り込みはPCB, DDTなどの投与群で明らかに増加していることが認められた。ラットではビタミンCはグルコースからグルクロン酸経路 (Fig. 2) をへて合成される。この経路に関与する酵素として肝の UDPG-デヒドロゲナーゼ, L-グルノラクトンオキシダーゼなどの活性を測定すると PCB, DDT, アミノピリン投与のいずれについても UDPG-デヒドロゲナーゼ活性が増加した。L-グルノラクトンオキシダーゼ活性は変化しなかった (Table 2)。また、肝のビタミンCの濃度と UDPG-デヒドロゲナーゼ活性の間には高い相関性が認められ、UDPG-デヒドロゲナーゼの活性がビタミンC合成の調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Fig. 3)。ビタミンCの合成に関与するその他の酵素として UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ, UDPG-グルクロン酸ピロフォスファターゼ, β-グルクロナダーゼ、活性についても検討したところ、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ活性も増加する

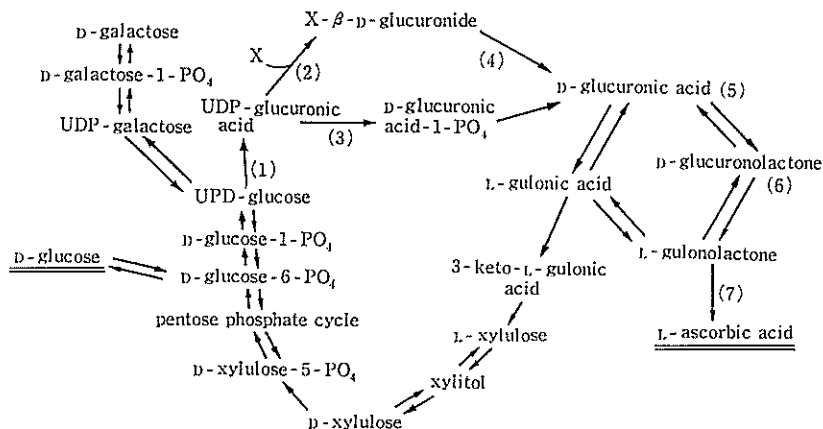


Fig. 2. Pathway of ascorbic acid synthesis.

Table 2. Effect of dietary addition of PCB, DDT and aminopyrine on the activities of hepatic UDPG dehydrogenase and L-gulonolactone oxidase<sup>1)</sup>.

Groups	Control (6) <sup>2)</sup>	200 ppm PCB (6)	500 ppm DDT (6)	1.000 ppm aminopyrine (6)
UDPG dehydrogenase, activity <sup>3)</sup> /g liver	0.229±0.006 <sup>a</sup>	0.368±0.017 <sup>b</sup>	0.354±0.022 <sup>b</sup>	0.264±0.025 <sup>a, b</sup>
activity/100 g body wt	1.044±0.056 <sup>a</sup>	2.468±0.162 <sup>b</sup>	2.115±0.186 <sup>b</sup>	1.334±0.094 <sup>a</sup>
L-gulonolactone oxidase, activity <sup>4)</sup> /g liver	0.128±0.022	0.137±0.031	0.107±0.011	0.123±0.013
activity/100 g body wt	0.577±0.109	0.922±0.213	0.641±0.081	0.558±0.089

<sup>1)</sup> Data presented as means±SE. <sup>2)</sup> Number of animals is shown in parentheses. <sup>3)</sup>  $\mu$ moles of NADH produced/minute. <sup>4)</sup>  $\mu$ moles of ascorbic acid produced/minute. <sup>a, b</sup> Means within a column not followed by the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

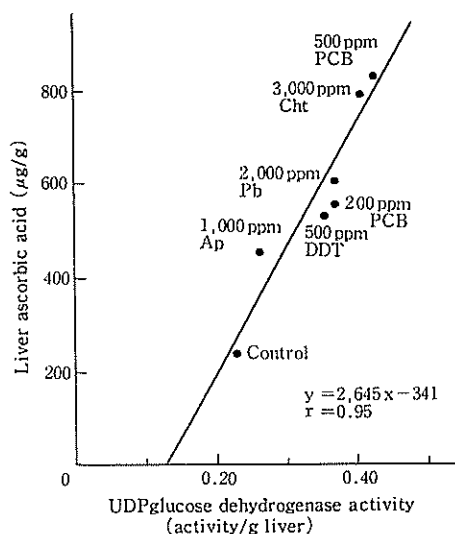


Fig. 3. Correlation between liver level of ascorbic acid ( $\mu$ g/g) and the activity of hepatic UDP glucose dehydrogenase (activity/g). Experimental period was 14 days. Control: control group, 200 ppm PCB: 200 ppm PCB group, 500 ppm DDT: 500 ppm DDT group, 1,000 ppm Ap: 1,000 ppm aminopyrine group, 500 ppm PCB: 500 ppm PCB group, 2,000 ppm Pb: 2,000 ppm pentobarbital group, 3,000 ppm Chl: 3,000 ppm chlore-tone group.

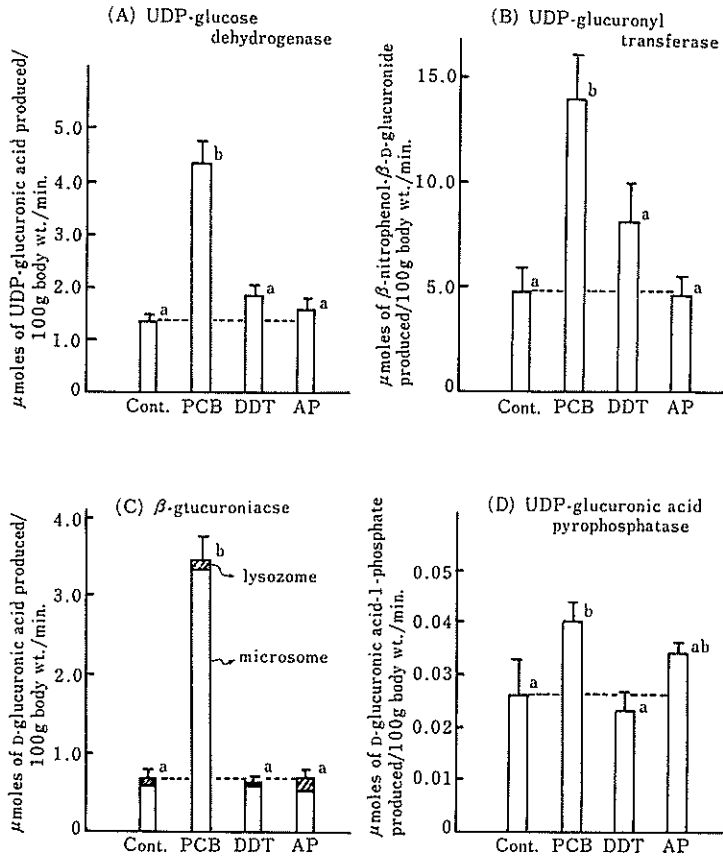


Fig. 4. Effects of the Dietary Addition of Xenobiotics on the Autivitic of Hepatic UDP-Glucose Dehydrogenase (A), UDP-Glucuronyl Transferase (B),  $\beta$ -Glucuronidase (C) and UDP-Glucuronic Acid Pyrophatase (D).

The bars indicate means and the vertical lines above the bars indicate the SE. Bars not followed by the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ). Cont., control group; PCB, PCB group; DDT, DDT group; AP, aminopyrine group.

ことが明らかとなった。D-グルクロン酸，D-グルクロノラクトンからビタミンCへの転換能は生体異物投与群でも変化はなかった (Fig. 4)。

体内におけるビタミンCの分解割合を調べるために，対照群および 200 ppm PCB ラットについて L-(1- $^{14}\text{C}$ )-アスコルビン酸を投与し，肝，腎，脾，筋肉，血漿，尿中のアルコールビン酸中の  $^{14}\text{C}$  の比放射能の時間的変化を測定した。Fig. 5 にみられるように PCB 投与群では  $^{14}\text{C}$ -アスコルビン酸の比放射能の減少割合は増加し，ビタミンCの合成が著しく増加するのに伴って，分解割合も増加していることが分かった。すなわち，PCB 摂

取時にはラットのビタミンCは体内で多量に消費されていることが分かった。

## 1.2 環境化学物質とビタミンC必要量

### 1.2.1 環境化学物質によるモルモットのアスコルビン酸代謝の変動

前述のように体内でビタミンCを合成できるラットにおいては PCB, DDT などの環境化学物質によってその合成が著しく促進される。このことから体内でビタミンCを合成できない人間，モルモットでは，これら環境化学物質の摂取によって一般にビタミンC要求量が増加することが予測される。

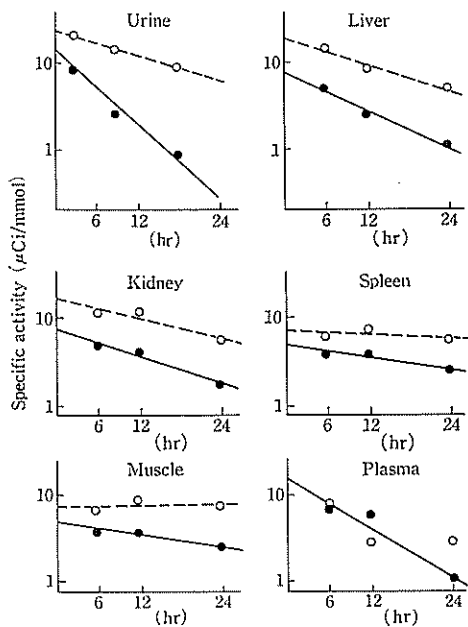


Fig. 5. Specific radioactivities of ascorbic acid in urine and various tissues of rats fed basal diet or 200 ppm PCB diet. After the feeding of the test diets for 14 days, body ascorbic acid was labeled with  $^{14}\text{C}$  by the administration of L-( $^{14}\text{C}$ ) ascorbic acid. Points represent means  $\pm$  SE except for points of plasma, because plasma was pooled in each group.  $\circ$ --- $\circ$ , control group;  $\bullet$ — $\bullet$ , 200 ppm PCB group.

PCB 群には 40 ppm PCB 含有食を摂取させ、対照群、PCB 群とも 2 週間試験食で飼育し、ビタミンは摂取量を一定にするため、体重 100 g 当

たり 0.1 mg を腹腔内に注射した。14 日間飼育後に L-[ $^{14}\text{C}$ ]-アスコルビン酸 (ビタミン C) を 2.62  $\mu\text{Ci}$  腹腔内に注射して、呼気中への  $^{14}\text{CO}_2$  の放出を測定 24 時間後に屠殺して、体内でのアスコルビン酸の分布を観察した。

屠殺時点での組織中のビタミン C 量を Table 3 に示す。肝ビタミン C 濃度は、対照群の 62.7  $\mu\text{g/g}$  に対し、PCB 群では 51.4  $\mu\text{g/g}$  と低下しその他、脾、腎、筋肉のいずれの臓器においてもビタミン C 濃度は低下し、PCB の投与によって組織中のビタミン C が不足している状態にあることが示された。また、臓器中の全体のビタミン C 量を体重 100 g 当たりについて示すと (Table 3), PCB 投与で肝の肥大が起こるため、肝ではむしろ増大し、他の臓器では低下し、生体異物の代謝の主要な場である肝に他の臓器からビタミン C が動員されているものと考えられた。

### 1.2.2 モルモットの生体異物代謝能に及ぼす飼料ビタミン C の影響

モルモットの飼料に 50 ppm の PCB を添加し、ビタミン C 含量を 50, 200, 2,000 ppm と変化させた場合の異物代謝能をゾキサゾラミンの分解割合、肝薬物代謝活性の面から検討した。実験飼料で 2 週間飼育した後、ゾキサゾラミンを体重 1 kg 当たり 100 mg 腹腔内に注射し、肝、血漿からの消失速度を測定した。また、肝の薬物代謝酵素活性も測定した。

血漿からのゾキサゾラミンの消失は PCB 投与

Table 3. Effects of dietary addition of PCB on tissue ascorbic acid and urinary ascorbic acid.

	Control group		40 ppm PCB group	
	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g}/100\text{ g body wt.}$ )	( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	( $\mu\text{g}/100\text{ g body wt.}$ )
Liver	62.7 $\pm$ 6.9	251 $\pm$ 23	51.4 $\pm$ 5.8	306 $\pm$ 34
Spleen	163 $\pm$ 13	25.0 $\pm$ 2.3	145 $\pm$ 8	10.8 $\pm$ 0.9
Kidney	33.7 $\pm$ 3.0	24.7 $\pm$ 2.5	19.3 $\pm$ 2.2 <sup>1)</sup>	14.9 $\pm$ 1.7*
Muscle	12.7 $\pm$ 1.0	572 $\pm$ 43	8.2 $\pm$ 0.3*	369 $\pm$ 15*
Total		872 $\pm$ 63		702 $\pm$ 41
Urine On day 10 to 11		202 $\pm$ 32		89 $\pm$ 11*
On day 14 to 15		82 $\pm$ 9		87 $\pm$ 9
	$\mu\text{g}/100\text{ g body wt./day}$			

<sup>1)</sup> Means  $\pm$  SE. Asterisks denote significant differences from the value of control group ( $p < 0.05$ ).

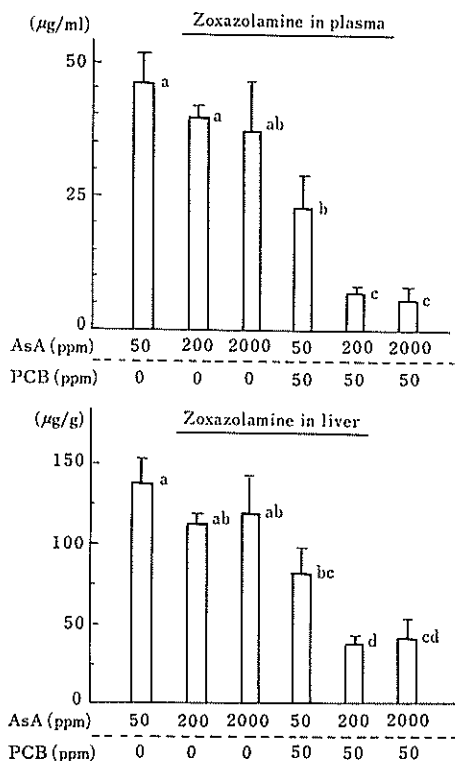


Fig. 6. Effects of dietary addition of PCB and ascorbic acid on plasma and liver levels of zoxazolamine: 25 minutes after the intraperitoneal injection of zoxazolamine. The bars indicate means and the vertical lines above the bars indicate SE. The bars not followed by the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

モルモットでは著しく促進された (Fig. 6)。PCB 無添加食群では飼料ビタミン含量 50~2,000 ppm の範囲でゾキサゾラミンの減少に大きな差はなかったが、PCB 添加食群においてはビタミンCが 200 ppm 以上の場合は 50 ppm の場合より注射後 25 分後の血漿ゾキサゾラミン濃度は明らかに低く、ゾキサゾラミンの分解が促進されていることが示された。肝におけるゾキサゾラミン濃度の減少も、PCB 投与群では全体に促進され、特に飼料中のビタミンCが 200 ppm 以上の時に減少割合が大きかった。モルモットの壊血病予防には 50 ppm 程度のビタミンCが必要であるがゾキサゾラミンのようなある種の生体異物代謝の最大活性を誘導するためにはそれよりも多い量のビタミン

ンCを必要とするものと推定される。

アミノピリン N-デメチラーゼ活性は飼料ビタミンC含量が 200 ppm の場合には 50 ppm の場合より活性は高かったが、アニリンヒドロキシラーゼ活性は 50 ppm 以上のビタミンC含量では活性はほぼ一定であった (Fig. 7)。また血漿中のアニリン濃度の低下もゾキサゾラミンと異なり、ビタミンC含量の高い群で促進されることは認められなかった。肝ミクロゾームの薬物代謝に関係する NADPH-シトクロムCレダクターゼ活性、シトクロム P450 も PCB 投与群では対照群に比して増加した。しかし、飼料のビタミンC含量が 50 ppm 以上では特にビタミンC量の違いによって影響されることはなかった。

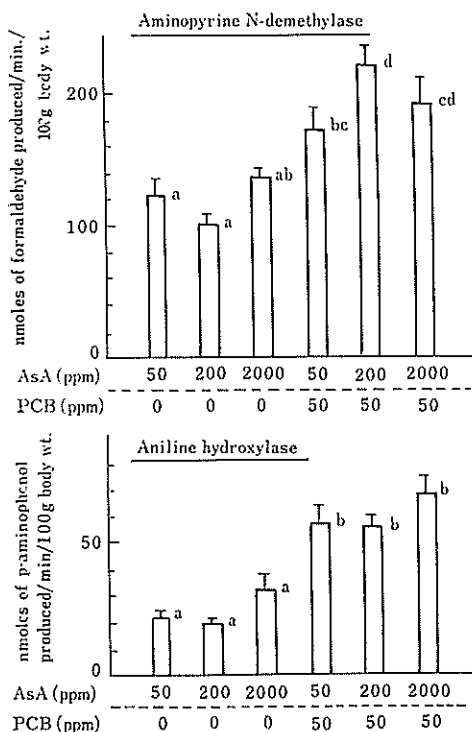


Fig. 7. Effects of dietary addition of PCB and ascorbic acid on the activities of hepatic aminopyrine N-demethylase and aniline hydroxylase in guinea pigs.

The bars indicate means and the vertical lines above the bars indicate SE. The bars not followed by the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

このようなことから、PCBのような生体異物存在条件下での薬物代謝能は一部の薬物に対してはビタミンC含量が壊血病予防に必要な量より、多い時の方が高くなるように思われる。

実際にモルモットにおいて PCB 摂取条件では通常必要量の約 200 ppm のアスコルビン酸より数倍高い量で最大の成長が得られることも明らかにした (Fig. 8)。

### 1.2.3 アスコルビン酸合成不能ラットのビタミンC必要量と環境化学物質

霊長類とモルモットを除いた大部分の動物は体内でアスコルビン酸を合成するため、ビタミンC必要量に関するヒトのモデルとしてはこれまでもっぱらモルモットが用いられてきた。しかし、現在用いられているモルモットはラットに比し、遺伝的素因が均一でなく、食性の面からも実験に不便であり、実験結果の再現性に問題のあることもある。筆者らは、最近、牧野らが遺伝的にアスコルビン酸を合成できないラット (OD ラット) を見だし、その育成に成功したことを知ったので、OD ラットを用いて、環境物質の摂取とビタミンC栄養の関連について研究した。このラットが何

故アスコルビン酸を合成できないかを酵素的に追求したところ、ヒト、モルモットと同様アスコルビン酸合成の最後の段階に関与する L-グルロノラクトンオキシダーゼのみが欠損し、その他の合成系の酵素活性には異常のないことを明らかにした。したがってヒトのビタミンC代謝研究のモデル動物として極めて有用であると考えられる。

OD ラットに 200 ppm の PCB を含み、アスコルビン酸含量を変化させた飼料で飼育し、2週間後の組織アスコルビン酸濃度、肝薬物代謝酵素活性などを測定した。Fig. 9, 10, に示されるよ

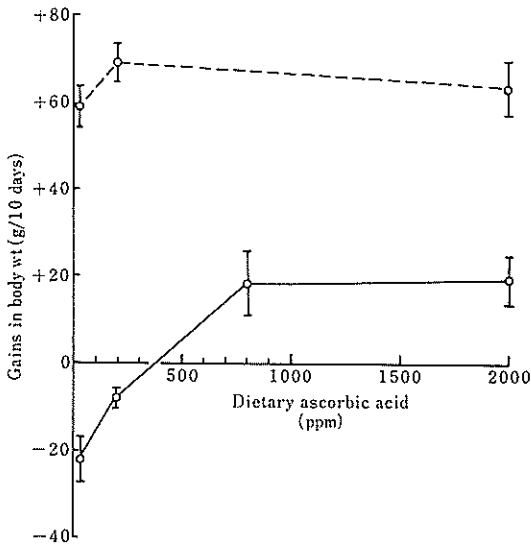


Fig. 8. Effect of dietary PCB and dietary level of ascorbic acid on gains in body weight in guinea pigs. PCB groups: ○—○; normal groups: ○---○.

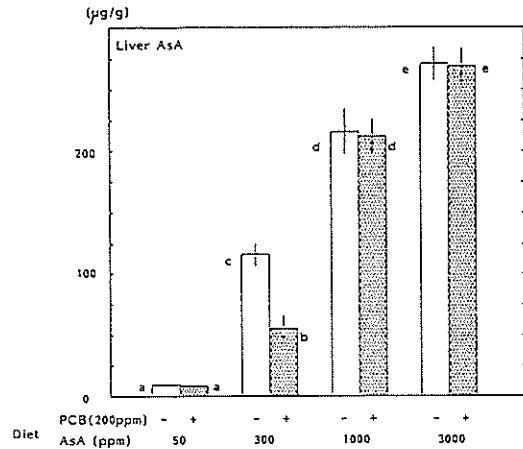


Fig. 9. Effect of dietary level of ascorbic acid on liver concentration of ascorbic acid in OD rats.

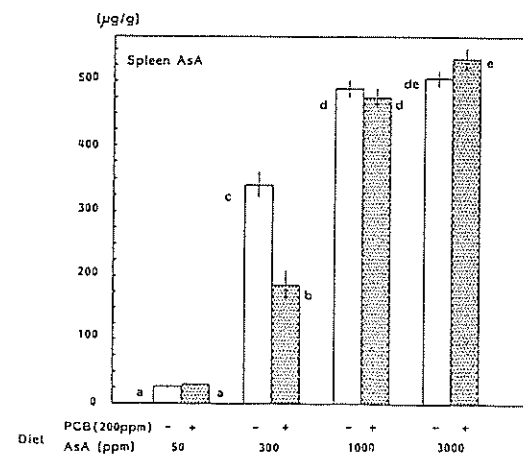


Fig. 10 Effect of dietary level of ascorbic acid on spleen level of ascorbic acid in OD rats.



うに飼料中のアスコルビン酸含量に対応して、肝、脾のアスコルビン酸濃度は上昇したが、通常の必要量である 300 ppm のアスコルビン酸を含む飼料の場合、PCB 摂取群において、肝や脾のアスコルビン酸濃度は明らかに低く、PCB 摂取によってアスコルビン酸の消費が増加していることが示唆された。飼料中のアスコルビン酸含量を 1,000 ppm 以上にすると両者に差はなくなり、1,000 ppm のアスコルビン酸食の方が望ましいと考えられた。薬物代謝酵素として、アニリンヒドロキシラーゼ、アミノピリン-N-デメチラーゼ

活性を測定すると、PCB 摂取によってこれらの酵素の活性は著しく上昇し、PCB 無添加食群では 300 ppm のアスコルビン酸食でほぼ最大の酵素活性がみられたが、PCB 含有食群では、300 ppm のアスコルビン酸食群で活性は明らかに低く、1,000 ppm で最大活性を示した。(Fig. 11, 12) ミクロゾームのシトクロム-P450 含量も飼料アスコルビン酸含量をともに増し、PCB 含有食の場合には 300 ppm では不十分で 1,000 ppm のアスコルビン酸を飼料に添加することによって最大値が得られた (Fig. 13)。シトクロム-P450 還元能は PCB

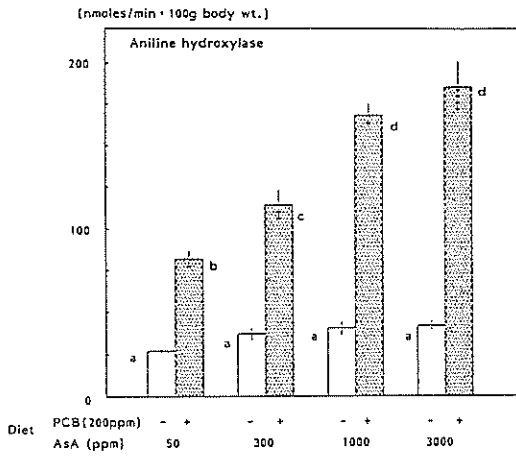


Fig. 11. Effect of dietary level of ascorbic acid on liver aniline hydroxylase activity in OD rats.

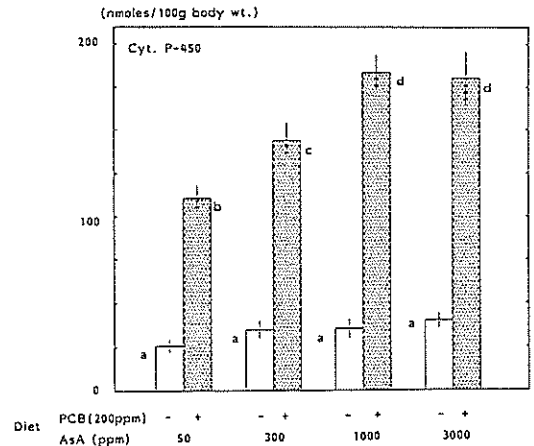


Fig. 13. Effect of dietary level of ascorbic acid on liver cytochrome P-450 in OD rats.

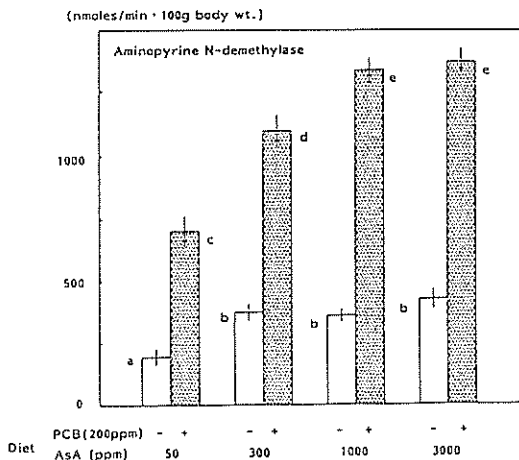


Fig. 12. Effect of dietary level of ascorbic acid on liver aminopyrine N-demethylase activity in OD rats.

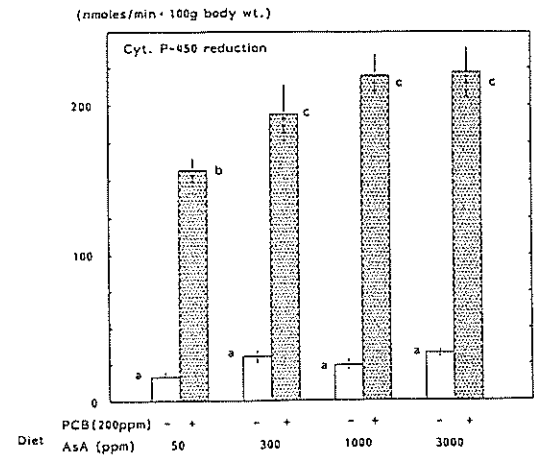


Fig. 14. Effect of dietary level of ascorbic acid on liver cytochrome P-450 reduction in OD rats.

摂取によって著しく誘導されたが、飼料中のアスコルビン酸量が 300 ppm 以上では有意な差は認められなかった (Fig. 14)。

これらの実験から、モルモットの場合と同様に、PCB などの環境化学物質の摂取の場合には通常の場合より、アスコルビン酸必要量が増加しており、アスコルビン酸投与量を増加させることによって異物代謝能を増大しうることが示された。

実際にモルモットにおいて、PCB 摂取条件では飼料中のアスコルビン酸が通常より数倍高い場合に、成長 (体重増加量) も改善されることを明らかにした (Fig. 8)。

## 2. 環境化学物質による血清コレステロール濃度の上昇とその機構

血清コレステロール濃度は動脈硬化の発症と高い相関性があり、最大の危険因子の一つであるといわれている。これまでも食餌コレステロールの摂取や食餌脂肪の飽和度などが血清コレステロール濃度に影響する重要な要因であることが報告されていたが、筆者らは、PCB, DDT 摂取ラットの血清コレステロールが著しく高くなることに気付いた。PCB, DDT など脂溶性、低分子、有機、合成化合物 (いわゆるゼノバイオティクス、生体異物) は、構造や生理作用の多様性にかかわらず、肝薬物代謝酵素の誘導や、ラット尿中アスコルビン酸排泄増加などに共通した影響を与えることから、薬物代謝酵素を誘導する数種の化合物について血清コレステロール濃度に及ぼす影響について調べたところ、PCB, DDT 以外にもクロレトン、BHA, BHT、ペントバルビタールなど多

くのが共通して血清コレステロールを上昇させる性質のあることが分かった (Table 4)。環境には種類としては濃度が低くとも、多種の化学物質が分布することがあり、その多くのものが血清コレステロールを上昇する作用があるとすると極めて重要な問題であり、その上昇機構について研究した。また、これら生体異物 (ここでは PCB, DDT のような低分子の脂溶性合成有機化合物で肝薬物代謝酵素を誘導するものを指して用いる) による高コレステロール血症は、多量のコレステロールを摂取した場合と著しく異なったりポタンパク中でのコレステロール分布を示す。すなわち、コレステロールを多量摂取させた場合には総コレステロールは上昇するが、HDL-コレステロールは顕著に減少する。これに対し、生体異物を与えた場合は HDL-コレステロールも、(LDL+VLDL)-コレステロールも同様に上昇する点で内容的に異なっており、高コレステロール血症の新しい実験モデルとしても重要なものと考えられる (Fig. 15)。PCB 食を摂取した場合についてみると、血清コレステロール濃度はかなり長期にわたって上昇しつづけ、PCB 無添加食に代えても、さらにかんりの期間、高い血清コレステロール値を示す (Fig. 16)。

実験飼料にはコレステロールは加えられていないので、血清コレステロールの上昇は合成の促進によるか、分解代謝の低下によることが考えられる。そこで  $^3\text{H}_2\text{O}$  を用い肝コレステロールへの取り込みを調べたところ、PCB に  $^3\text{H}_2\text{O}$  の取り込みは著しく増加し、肝でのコレステロール合成の

Table 4. Effect of dietary xenobiotics on serum total cholesterol and HDL-cholesterol

Chemicals	Gains in body wt. (g)	Cholesterol			% ratio
		Serum	HDL (mg/100 ml)	VLDL+LDL	
Control	45.5	98±4	61±4	37±3	1.65
PCB	40.6	185±3	125±1	60±2	2.08
Chloretone	43.9	170±4	116±2	54±3	2.14
DDT	48.9	152±11	97±8	54±3	1.80
BHA	53.3	131±3	76±3	56±2	1.36
Caffein	29.0	130±11	83±9	47±6	1.77
BHT	44.9	128±5	78±2	50±3	1.56
Pentobarbital	45.0	123±4	79±4	44±3	1.80

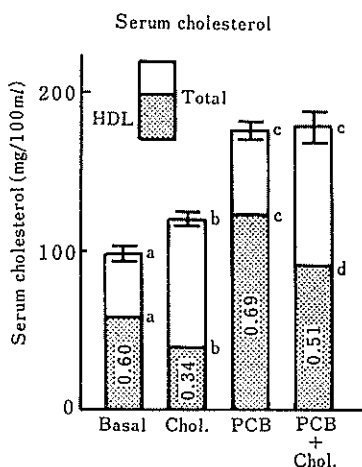


Fig. 15. Differences in serum lipoprotein cholesterol pattern between PCB or cholesterol fed rats.

上昇が示された (Table 5)。小腸ではこのような変化はみられなかった。

コレステロールはアセチル-CoA から体内で合成されるが、その律速酵素は  $\beta$ -ヒドロキシ- $\beta$ -メチル-グルタリル CoA レダクターゼ (HMG-CoA レダクターゼ) であることが知られている。また、この HMG-CoA レダクターゼはリン酸化-脱リン酸化によって不活性化されたり、活性化されたりすることも知られているので、肝での活性型と全酵素についての活性を測定した (Table 6)。

Table 5. Effect of dietary addition of 0.1% PCB on  $^3\text{H}_2\text{O}$  incorporation into hepatic cholesterol *in vivo*.

Group	Normal	PCB	Stimulation (-fold)	P
No. of rats	5	7		
Final body weight (g)	93.4 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	94.7 $\pm$ 3.0		
Liver weigh (g)	3.68 $\pm$ 0.13	6.86 $\pm$ 0.13		<0.001
Hepatic cholesterol				
mg/g liver	1.94 $\pm$ 0.13	6.53 $\pm$ 0.29	3.4	<0.001
mg/liver	7.11 $\pm$ 0.53	45.0 $\pm$ 2.8	6.3	<0.001
$^3\text{H}_2\text{O}$ incorporation into hepatic cholesterol				
dpm/g liver	394 $\pm$ 56	1570 $\pm$ 160	4.0	<0.001
dpm/liver	1430 $\pm$ 180	10770 $\pm$ 1090	7.5	<0.001
Serum cholesterol				
mg/100 ml	91 <sup>b</sup>	143		

<sup>a</sup> Mean $\pm$ SEM, <sup>b</sup> Pooled sample

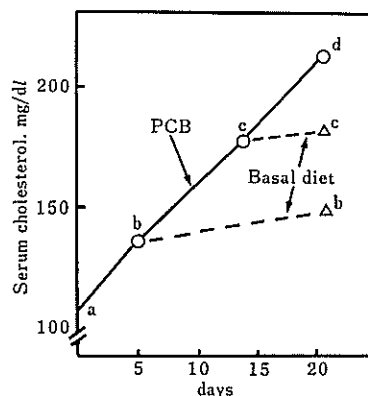


Fig. 16. Time course change in serum level of cholesterol in rats fed a PCB containing diet.

Table 6 にみられるように PCB を摂取させた場合には活性型も酵素の全活性もともに著しく増加し、肝でのコレステロール合成の増加がその律速酵素である HMG-CoA レダクターゼの活性増加によることが裏付けられた。しかも、この活性増加は、リン酸化、脱リン酸化反応による調節ではなく、酵素量そのものの増加によることが示された。

生体異物によってコレステロール合成が増加する生理的意義については次のことが考えられる。

1) 薬物代謝酵素は細胞の小胞体膜にあり、小胞体の増量のためにコレステロールの必要量も増大

Table 6. Effect of dietary PCB on total and expressed activities of HMG-CoA reductase of Wistar female rats (expt. 1)<sup>1,2</sup>

	HMG-CoA reductase activity					
	Total (active+inactive)			Expressed (active)		
	Basal	PCB	Stimulation (-fold)	Basal	PCB	Stimulation (-fold)
	(nmoles of mevalonate formed/min)					
per g tissue	2.78±0.15 <sup>a</sup>	7.26±0.75 <sup>b</sup>	2.6	0.55±0.02 <sup>a</sup>	0.98±0.06 <sup>b</sup>	1.8
per 100 g body wt.	14.24±0.80 <sup>a</sup>	52.85±5.70 <sup>b</sup>	3.7	2.83±0.14 <sup>a</sup>	7.10±0.44 <sup>b</sup>	2.5

<sup>1</sup> Different superscripts indicate significantly different means ( $P < 0.001$ ). <sup>2</sup> Microsomes were prepared in the presence (for expressed reductase activity which was present initially in the tissue) or absence (for the total reductase activity) of 50 mM sodium fluoride. Expressed reductase activity was compared to the total reductase activity obtained after full activation of the enzyme by preincubation with added *E. Coli* alkaline phosphatase. The preincubation period was 60 min and final incubation 30 min at 37°. Conditions for incubations and analyses are described in detail under "Materials and Methods".

する、2) 生体異物は薬物代謝酵素の作用を受けた後、物質によっては胆汁中に排泄されるが、その際胆汁酸も必要でその母体であるコレステロールの要求も増加する、3) 生体異物による代謝的ストレスに対応して、種々のステロイドホルモンが生産され、その母体としてのコレステロールの要求性が高まる、などである。1) については肝薬物代謝酵素が誘導されていることから十分理解できる。3) のストレスホルモンとしてのコルチコステロイドの分泌上昇は量的には比較的少ないと思われる。2) の胆汁酸の生成についてはラットが PCB 摂取することによって Fig. 17 にみられるように、一次胆汁酸や中性ステロール類が明らかに増加することから生体異物摂取ではその

排泄のために、コレステロールから多くの胆汁酸が生成され、糞中に排出していることが分かる。また、コレステロールから胆汁酸合成の律速酵素であるコレステロール-7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ活性は PCB 投与群で有意に高く、コレステロールから胆汁酸生成の増加が酵素的にも裏付けられた (Fig. 18)。生体異物により血清コレステロール濃度が上昇する重要な理由の一つであると考えられる。既に述べたように、生体異物の投与ではコレステロール投与と異なり、HDL-コレステロール、LDL-, VLDL-コレステロールともに上昇し、内容的にも異なることから、高コレステロール血症の新しいモデルとしても重要であると考えられる。

さらに、生体異物による血清コレステロール上

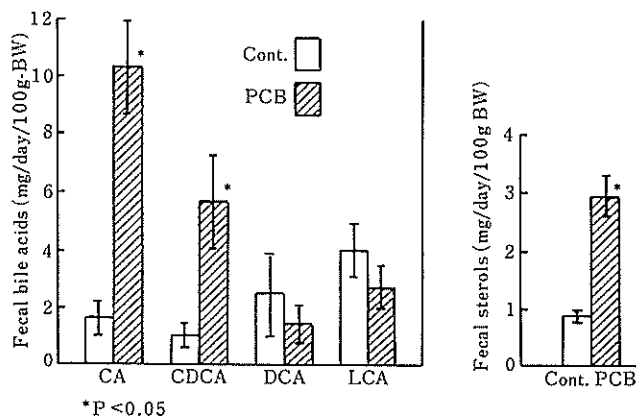


Fig. 17. Fecal bile acids and sterols.

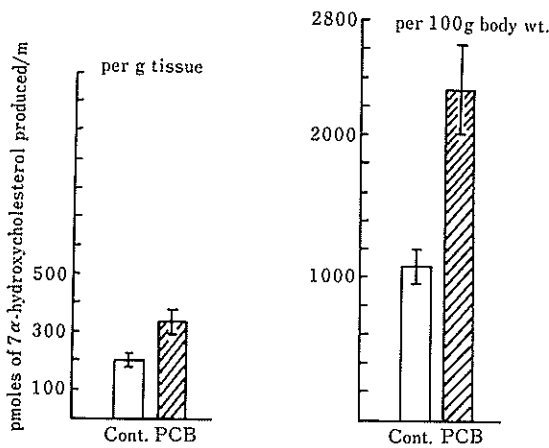


Fig. 18. Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity.

群に比し、過酸化脂質の指標である TBA-RS (チオバルビツール酸陽性物質) が著しく増加した。過酸化脂質は動脈硬化や脳その他の組織の老化色素の生成と密接な関係にあり、現代の高齢化社会において特に注目されているが、環境化学物質が老化促進の一つの要因になる可能性のあることは重要な問題である。また、PCB による過酸化脂質の生成はビタミン E、ビタミン C の飼料への添加によって効果的に抑制された。これらのことから環境化学物質はビタミン E の必要量にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

#### 4. 天然抗酸化物質の検索とその生理活性

今日、我々の身のまわりには莫大な種類と数の

Table 7. Effect of chronic  $\alpha$ -blocker treatment on serum cholesterol levels in rats fed either PCB- or tyrosinecontaining diets (experiment 3)<sup>1,2,3</sup>

Group	Cholesterol mg/dl	HDL-Chol. mg/dl	LDL+VLDL-Chol. mg/dl
Pair-fed control (20% Casein)	94.3 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>	58.8 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	35.5 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>
Pair-fed PCB (300 ppm)	221.6 $\pm$ 8.3 <sup>e</sup>	126.7 $\pm$ 8.9 <sup>e</sup>	94.9 $\pm$ 6 <sup>e</sup>
Ad libitum PCB (300 ppm)+ $\alpha$ -blocker	156.3 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	105.2 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>	55.0 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>
Pair-fed control (20% Casein)	111.2 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>	66.6 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	44.6 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>
Pair-fed tyrosine (10%)	148.3 $\pm$ 13.1 <sup>b</sup>	91.1 $\pm$ 12.6 <sup>b</sup>	57.2 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>
Ad libitum tyrosine (10%)+ $\alpha$ -blocker	110.6 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	62.4 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	48.2 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Feeding period was 14 days. <sup>2</sup> Means  $\pm$ SE. of 6 rats per group. <sup>3</sup> Means within a column not followed by the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

昇は  $\alpha$ -遮断剤 (フェノキシベンズアミン) で抑制されること、生体異物投与時に尿中カテコールアミン類の排出が増加することを明らかにした (Table 7)。このようなことから、生体異物による代謝的ストレスが交感神経あるいは副腎髄質を刺激してカテコールアミン類の分泌を促し、肝細胞の  $\alpha$ -受容体を介して HMG-CoA レダクターゼ活性を誘導し、コレステロール合成が増加するものと考えられる。以上のように広汎な生体異物が共通して血清コレステロール濃度を上昇させる作用のあることを発見し、その機構をほぼ全面的に解明し得たものとする。

#### 3. 環境化学物質と過酸化脂質

肝薬物代謝酵素を誘導する脂溶性環境化学物質は体脂質の過酸化反応を促進する。Fig. 19 に示すように、PCB 含有食投与モルモットでは対照

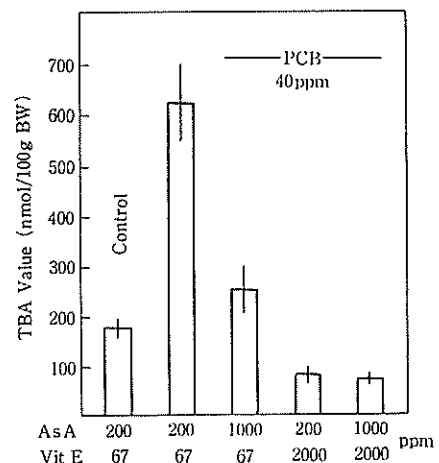


Fig. 19. Effect of dietary ascorbic acid and Vit. E on TBA value of guinea pig liver fed PCB containing diet.

化学物質が生産され、また、存在している。特に我が国においては、戦後の高度成長のあおりで各種の公害が発生し、環境中に希薄に拡散された各種環境化学物質は食物連鎖を通して生体濃縮されたり、大気汚染物質として直接我々人間に対して影響を及ぼしている。このような環境化学物質が生体に及ぼす毒性の一つに脂質の過酸化がある。一方、種々の食品、植物には抗酸化物質が含まれる。ここでは各種の天然抗酸化物質を検索した結果を報告する。

オーストラリア原産のユーカリ樹のリーフワックスという新しい素材に着目して強い抗酸化性を示す物質の検索を行ない、ビタミンEよりも強い抗酸化活性を示した $\beta$ -ジケトンという全く新しいタイプの抗酸化物質を見いだした。このような $\beta$ -ジケトンタイプの抗酸化物質は、E. globulus以外にも広くユーカリ樹のリーフワックスに存在することも明らかとなったので、広く国内産の植物のリーフワックスをモデル系抗酸化試験法によりスクリーニングを行なったところ、76種類の植物のうち、ヌルデやサクラに強い抗酸化性が見いだされた。ヌルデについては、 $\alpha$ -トコフェロールが抗酸化成分として同定されたが、植物の生体防御という面から見てもトコフェロールがリーフワックス中に存在することを見いだしたことは意義があろう。サクラについては、イヌザクラやウワミズザクラにトコフェロールや $\beta$ -ジケトン類とは異なる抗酸化物質の存在が予想され、現在構造解析中である。さらに、ゴマ種子中の抗酸化成分として既に知られているセサモール以外に、新しくセサモリノールと命名したリグナン類縁体を強い抗酸化成分として見だし、X線解析法などにより、その構造を明らかにすることに成功した。さらにゴマ種子中にはこれらの物質をアグリコンとするフェノール性配糖体が存在することも明らかにした。生薬については、主として台湾産の230種類に及ぶ植物性生薬について同様に、抗酸化性を指標にスクリーニングを行なったところ、最も強い抗酸化活性を示したのは6種類であった。その中でも特に強い抗酸化活性を示したのは、紫地丁(ヒメノボタン: *Osbeckia*)とヒバーチ(ヒバ

ツモドキ: *Piper Maxim*)であったが、まだ単離同定には至っていない。その他、米の籾殻という未利用資源中にも新しいタイプの天然抗酸化性物質が存在していることも確認しており、今後の研究の発展が期待される。

一方、このような天然抗酸化物質は食品添加物としてのみならず、生体系においても脂質の過酸化の抑制作用を有することが期待されるので、まず、*in vitro*系として、赤血球の膜(ゴースト)やラット・マイクロゾームでの過酸化の抑制の可能性について検討を行なってみた。その結果、ゴマ種子中のリグナン類縁体である抗酸化性物質は、赤血球ゴーストやラットのマイクロゾームを用いた系でも強い脂質の過酸化抑制作用を有することが明らかとなり、なかでも新しく見いだされたセサモリノールはラットの肝のマイクロゾームを用いてADP-Fe<sup>+++</sup>により誘導されたNADPH-dependentの系ではビタミンE以上の強い脂質過酸化抑制作用を示したことは、「ごま」のもつ健全性とのかわり合いからもきわめて意義のあることといえよう。

#### 5. 食品・生体系における変異原性物質の生成とその制御

環境中、特に食品中や生体内には変異原性物質を酵素的、化学的に不活性化する変異原不活性化因子(Desmutagen)や抗突然変異因子(Antimutagen)が存在することが最近注目されてきている。分担者らも、既にカボチャなどの野菜ジュースに強いC-ニトロ系変異原に対する不活性化作用を見だし、このものがアスコルビン酸やシステインなどの還元力を有する物質であることを不活性化機構も含めて明らかにした。最近、腸内細菌もC-ニトロ系変異原の無毒化に大きな役割を果たしていることを明らかにしたので、ヨーグルトなどの醗酵食品に関係の深い乳酸菌についてもその不活性化作用の検討を行なった。対象として11種類の乳酸菌を用いて検討を行なった結果、ソルビン酸-亜硝酸で生成する1,4-ジニトロ-2-メチルピロールやピペリン亜硝酸系の6-ニトロピペロナルなどのC-ニトロ系変異原はいずれの乳酸菌によっても分解されるが、同じニトロ系変異原

でもニトロフラン系のニトロフラゾンの分解率は低く、また、ニトロソアミン類はほとんど分解されず非常に安定であった。このような C-ニトロ系変異原の分解機構は乳酸菌中のビタミンCやニトロリダクターゼなどの還元力を有する物質による C-ニトロ基のアミノ基への還元とともに、システインやグルタチオンなどによる SH 基の付加反応に伴う脱ニトロ反応のために変異原性を失活する機構を明らかにすることに成功した。このような機構は広く生体内や食品中にも存在する可能性があり、このような変異原不活性化に関する研究は、今後の発展が期待されている。

以上のごとく本研究は工業化社会において重要な環境化学物質とビタミン、コレステロール代謝との関連について栄養学的に重要な知見を得、これら化学物質の生体影響とその栄養制御に関し寄与するところ大きいものと信じている。

#### 謝 辞

財団法人日産科学振興財団の三か年にわたる絶大なご援助により、本研究を順調に遂行しうることができた。ここに深甚なる感謝の意を表する。

#### 研究発表

- 1) F. Horio and A. Yoshida: Effect of some xenobiotics on ascorbic acid metabolism in rats. *J. Nutrition*, 112 (3), 416 (1982).
- 2) N. Kato, S. Mochizuki, K. Kawai and A. Yoshida: Effect of dietary level of sulfur containing amino acids on liver drug metabolizing enzymes, serum cholesterol and urinary ascorbic acid in rats fed PCB. *J. Nutrition*, 112 (5), 848 (1982).
- 3) N. Kato, K. Kawai and A. Yoshida: Effects of dietary polychlorinated biphenyls and protein level on liver serum lipid metabolism of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 46 (3), 703 (1982).
- 4) F. Horio, M. Kimura and A. Yoshida: Effects of several xenobiotics on the activities of enzymes affecting ascorbic acid synthesis in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 29, 233 (1983).
- 5) 吉田 昭, 加藤範久, 堀尾文彦: 生体異物と栄養, 化学と生物, 20 (9), 598 (1982).
- 6) S. Quazi, H. Yokogoshi and A. Yoshida: Effect of dietary fiber on hypercholesterolemia induced by dietary PCB or cholesterol in rats. *J. Nutrition*, 113 (6), 1109 (1983).
- 7) H. Yokogoshi, S. Mochizuki, M. Takahata, S. Quazi and A. Yoshida: The hypercholes-

terolemic effect of caffeine-containing beverages and xanthine derivatives in rats. *Nutr. Rep. Inter.*, 28 (4), 805 (1983).

- 8) S. Quazi, H. Yokogoshi and A. Yoshida: Time course effect of PCB feeding and role of fiber on lipid metabolism in rats. *Nutr. Rep. Inter.*, 28 (6), 1425 (1983).
- 9) T. Kimura, K. Hasegawa, H. Imamura and A. Yoshida: Mechanism of adverse effect of amaranth feeding in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 29 (2), 153 (1983).
- 10) F. Horio, M. Kimura and A. Yoshida: Effect of several xenobiotics on the activities enzymes affecting ascorbic acid synthesis in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 29 (3), 233 (1983).
- 11) 吉田 昭: 工業化社会の食生活と栄養—生体異物と栄養との関連—. 生態学的栄養学, No. 7, 83 (1983).
- 12) T. Osawa and N. Namiki: Mutagen formation in the reaction of nitrite with the food components analogous to sorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, 46 (9), 2299 (1982).
- 13) T. Osawa, M. Namiki and K. Namiki: Mutagen formation in the nitritepiperic acid reaction. *Agric. Biol. Chem.*, 46 (12), 3105 (1982).
- 14) T. Osawa, M. Namiki, K. Suzuki and T. Mitsuoka: Mutagen formation by intestinal bacteria. *Mutation Res.*, 122, 299 (1983).
- 15) T. Osawa and M. Namiki: Structure elucidation of streptiondole, a novel genotoxic metabolite isolated from intestinal bacteria. *Tetrahedron Lett.*, 24 (43), 4719 (1983).
- 16) S. Quazi, M. Takahata, H. Yokogoshi and A. Yoshida: Effect of dietary PCB and caffeine on serum and liver lipids and urinary ascorbic acid in rats at different time periods. *Agric. Biol. Chem.*, 48 (6), 1581 (1984).
- 17) S. Quazi, M. Takahata, F. Horio and A. Yoshida: Hepatic 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase and cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase activities in rats fed PCB. *Nutr. Rep. Inter.*, 30 (3), 617 (1984).
- 18) S. Quazi and A. Yoshida: Influence of unsaturated and saturated fats on lipid metabolism in rats fed either PCB or cholesterol. *Nutr. Rep. Inter.*,
- 19) K. Kawai-Kobayashi and A. Yoshida: Effect of dietary ascorbic acid and vitamin E on the metabolic changes in rats and guinea pigs exposed to PCB. *J. Nutrition*, in press.
- 20) 吉田 昭, 小田裕昭: 生体異物に対する代謝応答と含硫アミノ酸栄養, 必須アミノ酸研究, No. 104, 16 (1984).
- 21) 堀尾文彦, 永村慎子, 吉田 昭: モルモットにお

- ける生体異物摂取時の生存日数ならびに尿中カテコールアミン等に及ぼす食餌アスコルビン酸の影響, 第 38 回日本栄養・食糧学会総会 (1984 年 4 月, 京都).
- 22) 吉田 昭: 栄養素—生体異物の代謝的相互作用, 日本農芸化学会中部支部第 89 回例会 (1984 年 7 月, 伊那).
- 23) 正木久典, 長岡 利, 堀尾文彦, 青山頼孝, 吉田昭: 高血圧自然発症ラット (SHR) におけるコレステロールとアスコルビン酸代謝におよぼす生体異物の栄養, 第 39 回日本栄養・食糧学会総会 (1985 年 4 月, 東京).
- 24) 長岡 利, 青山頼孝, 吉田 昭: 生体異物およびアミノ酸による高コレステロール血症の比較研究, 第 39 回日本栄養・食糧学会総会 (1985 年 4 月, 東京).
- 25) 堀尾文彦, 尾崎和人, 吉田 昭, 牧野 進, 林幸之: 遺伝的アスコルビン酸合成不能ラットのアスコルビン酸必要量, 第 39 回栄養・食糧学会総会 (1985 年 4 月, 東京).
- 26) K. Namiki, Y. Yamada, T. Osawa and M. Namiki: Mutagen formation by nitrite-spice reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 32 948 (1984).
- 27) Y. Fukuda, T. Osawa, M. Namiki and T. Ozaki: Studies on antioxidative substances in sesame seed. *Agric. Biol. Chem.*, 49 (2), 301 (1985).
- 28) T. Osawa and M. Namiki: Natural antioxidants isolated from *Eucalyptus* leaf waxes. *J. Agric. Food Chem.*, in press (1985).
- 29) T. Osawa, N. Ramarathnam, S. Kawakishi, M. Namiki and T. Tashiro: Antioxidative defence systems in rice hull. *Agric. Biol. Chem.*, in press (1985).