

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590710

研究課題名（和文） サプリメントの胎児に与える影響とそれを予測する方法の確立

研究課題名（英文） Effect of a supplement on fetuses and establishment of a Predictive method

研究代表者

永井 総子（NAGAI FUSAKO）

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：80118877

研究成果の概要（和文）：サプリメントにクエルセチンを選び、妊娠ラットに投与して胎児に与える影響について検討した。妊娠ラットにクエルセチンを投与すると、胎児の体重は有意に減少し、親ラット肝や胎児肝、さらに胎盤に多く発現しているグルタチオンS転移酵素のGSTPは、酵素蛋白および遺伝子レベルで増加した。他の代謝酵素についても検討した結果、GSTPはマーカーとなることができると考えられた。GSTPは胎盤由来のBeWo細胞にも発現しており、クエルセチンを添加培養するとGSTPの発現量に同様の結果が得られた。培養細胞を用いて、胎児に与える影響を簡便に予測できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We administered quercetin to pregnant rats as a supplement to investigate its effect on the fetuses. As a result, the body weight of the fetuses decreased significantly. Glutathione S-transferaseP(GSTP) was abundantly expressed in the placenta as well as in the livers of rats and fetuses, while its expression was increased at both the protein and gene levels by quercetin. Further investigation of other metabolic enzymes revealed that GSTP was a useful marker. GSTP was also expressed in placenta-derived BeWo cells and its expression was similarly induced by incubation with quercetin. Our findings suggest that fetal effects may be readily predicted by using culture cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：サプリメント、胎児肝、胎盤、薬物代謝酵素、GSTP

1. 研究開始当初の背景

（1）健康志向ブームにより健康食品の需要が増え、元来は生体に微量に存在するもの、食品成分であるもの等、体によい成分を手軽に摂取できるサプリメントが氾濫している。しかし食物として摂取した有効成分に対し

てサプリメントとしての摂取は一般に有効成分の含有量が非常に多く、過剰症が危惧されるが、現在これらを規制する法律はない。サプリメントとして扱われている成分には多くの薬物代謝酵素の発現量を変動するものが明らかにされており、過剰摂取の危険性

が危惧されている。

(2) 近年薬物代謝酵素に関する研究は Cytochrome P450 を中心に医薬品や嗜好品他との影響について、動物実験やヒト培養細胞で、発現調節機構を含めて明らかにされているが、必ずしも一致した結果が報告されていない。また胎児に与える影響については、フェノバルビタールなど代表的な薬物による薬物代謝酵素の発現変動について、動物実験で明らかにされているにすぎない。

(3) さまざまな成分の胎児に与える影響を調べるには、動物実験で確認することが重要であると思われるが、昨今動物実験は実施しにくくなっている。動物実験の代替として、培養細胞による方法を検討する。

2. 研究の目的

(1) 胎児に与える影響を検討するサプリメント成分として、タマネギや緑茶、赤ワインに含有しているフラボノイドで、抗炎症作用や抗酸化作用があり、欧米で花粉症緩和に常用されているクエルセチンを選んだ。もし胎児に影響がなければ、花粉症に悩む妊婦に朗報をもたらすかと考えた。

(2) 妊娠ラットにクエルセチンを投与した母親ラット肝、胎児肝および胎盤に発現している Cytochrome P450 (CYP) をはじめ薬物代謝酵素の酵素蛋白、酵素活性および酵素遺伝子発現変動について検討する。

(3) 摂取規制がないサプリメントの胎児に与える影響を動物実験で明らかにし、動物実験の代替法として培養細胞を用いる方法を検討した。これはサプリメントだけでなく身の回りに存在する多くの物質について、胎児に影響を及ぼす可能性のある物質を簡便に判定する方法に利用できる。

3. 研究の方法

(1) 妊娠ラットの投与実験

ウイスター系の妊娠 17 日齢のラットにクエルセチンをコーン油に懸濁して、40mg/Kg を 1 日 1 回、3 日間腹腔内投与した。72 時間後にラットをエーテル麻酔下で開腹し、胎児肝、胎盤および親ラットの肝臓を摘出した。摘出した臓器は酵素蛋白分析用と遺伝子解析用に分けて、各々の条件下で保存した。同時に同量の基剤を投与してコントロールとした。摘出した臓器は酵素蛋白分析用と遺伝子解析用に分けて、使用直前まで -80 または -20 で保存した。

酵素蛋白発現に関する実験
各摘出臓器を 0.25sucrose 含有 0.1Mtris

-HCl で常法に従い cytosol および microsomal fraction を調製した。ウエスタンブロット分析により各薬物代謝酵素 (CYP、Glutathion S-transferase 他) の発現および HPLC による酵素活性について検討した。

発現遺伝子発現に関する実験

各摘出臓器から RNeasy Plus Mini Kit を用いて mRNA を抽出した。各遺伝子のプライマーを合成し、RT-PCR を行い発現の変動を確認した。

(2) ヒト絨毛上皮がん由来培養細胞 BeWo 細胞によるスクリーニング法の検討

入手が比較的容易なヒト絨毛上皮がん由来の BeWo 細胞を用いた。細胞は 10%FBS 含有の F-12 HAM を用いて培養し、クエルセチンは最終濃度 10~50 μ M となるように dimethylsulfoxide (DMSO) で溶解した。DMSO 濃度はいずれも 0.1% となるように調整して培地に添加した。添加培養後 24~72 時間後に細胞から total RNA を抽出して、薬物代謝酵素やトランスポーターの発現について検討した。

(3) 動物実験およびヒト培養細胞による添加実験から、胎児に影響を与える物質の簡便なスクリーニング法について検討した。

4. 研究成果

(1) 妊娠ラットの投与実験

ウイスター系妊娠 17 日齢ラットにクエルセチンを腹腔内投与して 72 時間後に親ラット肝臓、胎盤、胎児肝臓を摘出した。親ラットの体重はいずれも増加していた。しかし 20 日齢の胎児の体重はコントロールが 3.71 ± 0.27 g (n=43) に対して投与群の胎児では 3.21 ± 0.56 g (n=41) であり、体重の減少が認められた。胎児の体重は 1 腹の胎児の数にも関連するが、いずれのラットも胎児数は 10.5 ± 1.9 (n=8) で、相違は見られなかった。また親ラットの肝臓および胎盤の重量には有意な差は認められなかった。

(2) 親ラット肝臓の影響

GST について

GSTP についてはウエスタンブロット分析ではコントロール群と比較して投与群では顕著に濃いバンドが確認された。mRNA レベルにおいても増加が確認された。ラット肝臓に多く発現している他の GST 分子種について検討したところ、GST では GSTP ほどではないが酵素蛋白および mRNA の発現が増加していることが確認された。一方 GST μ ではクエルセチン投与により酵素蛋白および mRNA 両者の発現が抑制されていた。このように GST では、分子種により発現変動に相違が確認された。

CYP について
CYP3A1 については、ウエスタンブロット分析ではコントロールに比べていずれのラットも濃いバンドが検出された。また RT-PCR の結果もコントロールに比べて発現の増加が観察された。その他の CYP 分子種 CYP1A1 および CYP1A2 では顕著な違いは確認されなかった。

(3) 胎児の肝臓の影響

GST について

クエルセチン投与群で酵素蛋白および mRNA はいずれも発現量の増加が観察された。しかし GST や GST μ は酵素蛋白としてはまだ発現されておらず、いずれの群からも確認されなかった。

CYP について

CYP3A1 は胎児肝臓には酵素蛋白としてはほとんど発現していなかったが、mRNA は発現しており、クエルセチン投与により発現の増加が確認された。胎児ではまだ酵素蛋白としては生成されていないが、遺伝子レベルではすでに影響を受けていることが明らかとなった。

(4) 胎盤の影響

GST について

胎盤においても GSTP は酵素蛋白および遺伝子レベルいずれもクエルセチンの影響を受けて発現の増加が確認された。しかし GST や GST μ は胎盤には発現していなかった。

トランスポーターについて

胎盤に発現しているトランスポーター-ENT1、ENT2、OCT2、OCTN3 の mRNA 発現について検討したが、いずれについても変動は確認されなかった。

(5) HPLC による酵素活性測定条件の検討

CYP 活性の測定は、HPLC による定量法は一般的である。HPLC によるラット肝臓の CYP3A の活性を検討した。基質には Testosterone を選んだ。

分析条件

Column : Capcell Pak UG 120 C18
(4.6mm * 250mm, Shiseido)

Eluent : gradient system

A : H₂O/MeCN (95/ 5)

B : H₂O/MeCN (20/80)

0 ~ 5 min A 100%

5 ~ 35min A100% B100%

A で 5 分送液後 30 分かけてリニアグラジェンドで B とした。Flow rate は 0.8ml/min で行った。

Testosterone 及び 6-hydroxytestosterone、内部標準として用いた 16-methyltestosterone の保持時間はそれぞれ 30、3.2、32min であった。

この条件下でラット microsome を用いて活性測定を検討したが、ラットはヒトと比べて CYP 活性に性差があり雌性ラットの CYP3A は雄性ラットに比べて活性が低く、測定方法を改良する必要があった。また測定に人手が必要となりこのまま続行することが難しくなり、HPLC による活性測定は一時中断せざるをえなくなった。

以上妊娠動物投与と実験の結果より、クエルセチンは CYP3A1 や GSTP の発現から、胎児に影響を与えていることが確認された。花粉症軽減の目的でクエルセチンを使用する際には、妊娠の有無を確認すべきであることが分かった。

(6) ヒト絨毛上皮がん由来 BeWo 細胞の添加培養による影響

GST について

BeWo 細胞にクエルセチンを 0, 10, 20 μ M 添加して 24 及び 48 時間培養すると、GSTP1 では発現の増加が観察されたが、50 μ M 添加して 72 時間培養すると、発現の減少が確認された。またさらに添加濃度を上げると細胞の壊死も確認された。クエルセチンは CaCo-2 などの培養細胞よりも濃度に対して細胞感受性が高いことが確認された。また GSTT2 の mRNA はクエルセチンの濃度を 50 μ M に上げて発現の変動は確認されなかった。

胎盤に発現している他の薬物代謝酵素について

胎盤には硫酸転移酵素 (SULT) の分子種のうち SULT1A3 と SULT2B1 が比較的多く発現していることが明らかにされている。BeWo 細胞においてもこれらの mRNA は発現しており、クエルセチンを 0 ~ 50 μ M を添加培養しても、いずれも顕著な発現の変動は観察されなかった。

トランスポーターについて

BeWo 細胞に発現しているトランスポーターのうち、MRP1 (multidrug resistance associated protein) および BCRP (breast cancer resistance protein) の mRNA 発現について検討した。MRP1 はクエルセチン添加により発現の減少が確認された。また BCRP は 10 μ M 添加培養後 24 時間ごとに検討した結果、発現は時間ごとに減少していた。5 μ M 添加においても同様であった。

これより少なくともクエルセチンにより BCRP が関与する成分の胎児への取り込みには影響を与えることが示唆された。

(7) 胎児に影響を与える物質のスクリーニング法について

動物実験は直接胎児肝を確認することができるが、種差の違いから実験動物の結果をヒトに外挿できるかという課題があり、さらに動物実験は実施しにくくなっている。今回はサプリメント成分のクエルセチンに着目してスクリーニング法を検討した。

培養細胞を用いる場合、胎児への影響を検討する方法は、化合物の種類や濃度をその都度自由に变化させて行うことができ有効な方法といえる。しかし通常培養細胞は、「がん細胞」という特殊な条件下の細胞を用いる。培養細胞で得られた結果は、すべて正常な細胞や固体でも同様に作用しているかなど課題は残り、また薬物の添加濃度の違いにより代謝酵素の変動メカニズムが変わる可能性も考えられる。しかし現時点では簡便に予測する方法として、第1段階のスクリーニング法として有効であると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 総子 (NAGAI FUSAKO)

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号: 80118877

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: