

ダイオキシン低用量暴露母体の肝薬物代謝第二相酵素活性の変動とポリメトキシフラボノイドのin vitro阻害効果

稲次, 良哉
九州大学薬学部臨床薬学科細胞生物薬学分野

池田, 佳乃子
九州大学薬学部臨床薬学科細胞生物薬学分野

佐野, 宏江
九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野

堤, 諒太
九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野

他

<https://doi.org/10.15017/6790834>

出版情報：福岡醫學雑誌. 114 (1), pp.65-77, 2023-03-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：

原 著

ダイオキシン低用量暴露母体の肝薬物代謝第二相酵素活性の変動と
ポリメトキシフラボノイドの *in vitro* 阻害効果¹⁾九州大学薬学部臨床薬学科細胞生物薬学分野²⁾九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野³⁾中村学園大学栄養科学部稲次良哉¹⁾, 池田佳乃子¹⁾, 佐野宏江²⁾, 堤諒太²⁾, 太田千穂³⁾,
古賀信幸³⁾, 田中嘉孝²⁾, 石井祐次²⁾***In Vitro* Inhibitory Effects of Polymethoxyflavonoids Nobiletin
and Tangeretin on the Activity of Hepatic Phase-II Drug-
Metabolizing Enzymes in Dams Exposed to Low-Dose
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin**Ryoya INATSUGI¹⁾, Kanoko IKEDA¹⁾, Hiroe SANO²⁾, Ryota TSUTSUMI²⁾, Chiho OHTA³⁾,
Nobuyuki KOGA³⁾, Yoshitaka TANAKA²⁾ and Yuji ISHII²⁾¹⁾*Division of Pharmaceutical Cell Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University*²⁾*Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University*³⁾*Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University***Abstract**

The present study investigated the effects of polymethoxyflavonoids nobiletin and tangeretin on uridine diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) activity in the livers of dams exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Pregnant Wistar rats received TCDD (1 μ g/kg, p.o.) on gestational day (GD) 15, and the hepatic UGT activity and its inducibility using TCDD were assessed at GD20. UGT activity against *p*-nitrophenol, 4-methylumbelliferone, and SN-38 was significantly induced in hepatic S9 of TCDD-treated rats. Therefore, UGT isoforms involved in the glucuronidation of these substrates are considered TCDD-inducible in pregnant rats. Kinetic analyses were performed for pooled S9 of rats maternally exposed to TCDD and for control rats for SN-38 glucuronidation. Their K_m values were comparable, but the V_{max} value in TCDD group was greater than that in the control group. Considering the K_m value, SN-38 concentration was fixed at 10 μ M, and the inhibitory effects of nobiletin and tangeretin were studied. Nobiletin and tangeretin significantly inhibited SN-38 glucuronidation in pooled hepatic S9 in the control rats at 10 μ M. Tangeretin also inhibited SN-38 glucuronidation in the TCDD-treated dams at 10 μ M, whereas Nobiletin was inclined to inhibit it. At 100 μ M, nobiletin and tangeretin inhibited SN-38 glucuronidation in TCDD and control groups. Although their inhibitory properties were similar, tangeretin was slightly stronger than nobiletin. Thus, UGTs are involved in hormone homeostasis. Further analysis is required to determine whether nobiletin and tangeretin reduce the adverse effects of maternal exposure to TCDD via their modulation of TCDD-induced UGT activity.

Corresponding author : Yuji ISHII

Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

Tel : + 81-92-642-6586 E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

Key words : TCDD, UGT, dam, polymethoxyflavonoid

はじめに

ダイオキシン類は生体に対して多様な毒性を引き起こす環境汚染物質である。1968年に西日本で発生したカネミ油症は、ライスオイルの加熱脱臭時の熱媒体として用いられた polychlorinated biphenyl (PCB) およびその加熱により生じたダイオキシン類が原因物質であると考えられており、全身倦怠感や塩素ざ瘡、色素沈着などの中毒症状がみられた¹⁾。

ダイオキシン類の影響の中でも妊娠期や授乳期の実験動物母体への暴露によって、出生児に対して低身長・低体重²⁾、学習記憶障害³⁾、社会行動の低下⁴⁾といった成長遅延、ならびに生殖器官の萎縮⁵⁾、交尾行動障害⁶⁾などの性未成熟といった影響が生じる。さらに、ヒトにおいても母親の食事由来の微量なダイオキシン類の摂取が次世代の発育に対して影響を及ぼすことも示唆されている⁷⁾。ダイオキシン類の多様な毒性の多くは、転写因子である芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) に結合して核内因子 AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子の転写を活性化することによって生じる⁸⁾⁹⁾。ダイオキシン類は化学的安定性、脂溶性が高く、また難分解性でありヒトにおける半減期が10数年となっている¹⁰⁾¹¹⁾ことから、生体に対して長期的な影響を及ぼすと考えられる。これらのことから、ダイオキシン類の慢性的な低用量暴露による影響への対策を講じることは、油症患者の症状緩和の方法構築とともに重要であると考え

られる。

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Fig. 1) は最強毒性を有するダイオキシンで、極めて微量で皮膚障害、肝障害、生殖障害、がんや奇形などの原因となることが知られている¹⁾。ダイオキシン類の多様な毒性のなかには薬物代謝酵素の誘導に起因するものがあると考えられ、AhRを介した cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) の誘導性の強さは、ダイオキシン毒性の鋭敏な指標として広く用いられている⁸⁾¹²⁾。ダイオキシン類のような AhR リガンドが誘導する遺伝子は多岐に亘り、薬物代謝第一相酵素の P450 だけでなく、第二相酵素にも影響を及ぼし、グルクロン酸抱合を司る UDP-glucuronosyltransferase (UGT) も誘導することが分かっている¹³⁾。ヒトにおいては、human UGT1A6 および UGT1A9 が、ラットにおいては、rat UGT1A6 および UGT1A7 が TCDD により誘導されると報告されている^{12)~14)}。当研究室では、TCDD 次世代毒性の解析を目的とし、妊娠母ラットへの TCDD (1 μ g/kg, p.o., gestational day (GD) 15) 投与による検討を行っている^{15)~18)}。また、他研究室のこれまでの研究により、妊娠母ラットへの TCDD 単回経口投与によって出生直前および離乳時期において児の血中甲状腺ホルモン濃度低下¹⁹⁾²⁰⁾が見られ、また妊娠期、授乳期の継続的な TCDD 処理による母体甲状腺ホルモン低下とそれに伴う児の血中レベルの低下が報告されている。TCDD による児の甲状腺ホルモンレベル低下の機構には TCDD による UGT の誘導が寄与する可能性が示唆されてお

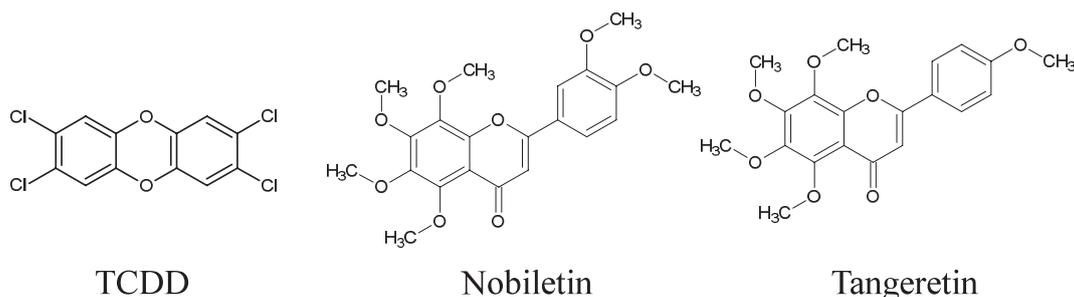


Fig. 1 Structure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), Nobiletin and Tangeretin.

り¹⁹⁾²⁰⁾, これは TCDD 妊娠期暴露による発育障害の一因と考えられる。しかし, TCDD 処理した妊娠母体を対象とする第Ⅱ相薬物代謝酵素の変動については, 当研究室の先行研究で GD18 および GD19 における妊娠母体肝臓 UGT mRNA レベルが調べられているものの, 実際の活性に対する影響など, 未だ詳しい研究が行われていない²¹⁾。そこで本研究では GD15 の母ラットへ TCDD (1 μ g/kg) 経口投与し, GD20 における母体肝臓での UGT 活性の変動を解析することで TCDD による次世代毒性へのグルクロン酸抱合の関与について考察し, 次いで UGT 発現誘導に対する改善策の構築を目的とする。ラット妊娠母体に TCDD 低用量暴露させた際の肝臓での UGT の活性の変動とそれらの変動に対する防御策の検討を行った。

先行研究により, ラットの UGT 分子種が多様な薬物を代謝することが分かっており, 4-methylumbelliferone (4-MU) を基質とする分子種として, 多環芳香族炭化水素により AhR を介して誘導される UGT1A6, UGT1A7 が知られている¹³⁾。また, フェノバルビタール誘導性の UGT2B1²²⁾, モノテルペノイドに特異性を示す UGT2B12²³⁾ も 4-MU を基質にする。4-MU は UGT に対する普遍的な基質であり, 上述の分子種だけでなく, ラットにおいて UGT1A1, 1A2, 1A3 など含む広範な UGT 分子種が基質とする²⁴⁾。また, HPLC による測定法も確立されている²⁵⁾。*p*-Nitrophenol (*p*-NP) はアルカリ性で黄色を呈し, また抱合により脱色することを利用した消失法が, 測定の容易さから汎用されてきた²⁶⁾。*p*-NP の抱合活性が多環芳香族炭化水素誘導性であることがよく知られており²⁷⁾, この活性を指標に酵素が精製され, cDNA クローン化されたのが rat UGT1A6 である²⁶⁾。UGT2B12 にも *p*-NP 抱合活性があることが分かっている²³⁾。*p*-NP は, 有機リン系農薬であるパラチオン, メチルパラチオンの微生物分解によって生じ, 水質汚濁の指標に用いられる物質であり²⁹⁾, ラットにおいては UGT1A6 に活性が高いことが知られている²⁶⁾, また, *p*-NP についても, HPLC による測定法が確立されている²⁵⁾。抗がん剤であるイリノテカンの活性代謝物である SN-38 はラットで主に rat UGT1A1, 1A7, 1A8 によりグルクロン酸抱合を受け, また, ヒトにおいては human UGT1A1,

1A7, 1A9, 1A8 で抱合される³⁰⁾ことが知られている。これらの基質に対する UGT 活性が, TCDD 低用量暴露母体の肝臓でどのように変動するのは未だ検討された例はなく, 本研究ではこれを研究対象とした。

ダイオキシン毒性に対して, レスベラトロール, クルクミンなどのポリフェノール類³¹⁾³²⁾ や多くのフラボノイド類がその毒性軽減に有効であると報告されている^{33)~37)}。柑橘類に含まれるヘスペリジン³³⁾³⁴⁾ や, リンゴなどに含まれるケルセチン³⁵⁾³⁶⁾, ケンフェロール³⁷⁾ などがその例である。本研究では, TCDD 毒性に対する防御策として期待されるノビレチン (NBL, 3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone) およびタンゲレチン (TNG, 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone) を *in vitro* における検討に用いた (Fig. 1)。ノビレチンは柑橘系植物, 特にシークワーサーに多く含まれるポリメトキシフラボノイドの一種であり, 抗炎症作用³⁸⁾³⁹⁾, 抗認知症作用⁴⁰⁾, 抗がん作用⁴¹⁾⁴²⁾ 及び抗肥満作用⁴³⁾ などの多様な作用を示すことが知られている。TCDD 毒性に関する報告では, U937 ヒトマクロファージで TCDD によって誘導された human CYP1A1 を mRNA レベルで発現抑制すること⁴⁴⁾, また当研究室では Luciferin 誘導体をマーカー基質とした rat CYP1A1, 1A2, 2C6 および 3A に対する活性の阻害作用を報告している¹⁸⁾ が, UGT の活性に及ぼす影響に関する情報は筆者の知る限り乏しい。タンゲレチンも同様に, 柑橘系植物, 特にタンジェリンに多く含まれるポリメトキシフラボノイドであり, 抗炎症作用⁴⁵⁾ や抗糖尿病作用⁴⁶⁾, 抗がん作用⁴⁷⁾ などが報告されている。タンゲレチンはヒト大腸腺がん株を対象とした *in vitro* 実験で, human CYP1A2 に対し阻害を示すこと⁴⁸⁾, また TCDD 毒性に関しては Caco-2 細胞で TCDD によって誘導された human CYP1A1, CYP1A2 を mRNA レベルで発現抑制することが報告されている⁴⁹⁾ が, UGT 活性への影響に関する報告は筆者の知る限り未だなされていない。よって本研究では, 妊娠母体に対する TCDD 低用量暴露による母体肝臓の UGT 活性の誘導作用を調べ, UGT 活性変動に対するノビレチンおよびタンゲレチン添加効果を解析することで, TCDD 次世代毒性に対するこれらポリメトキシフラボノイドの有効性を検討した。

実験方法

1. 試薬

4-Methylumbelliferon (4-MU) : Sigma-Aldrich (東京)

p-Nitrophenol (*p*-NP), 4-MU-glucuronide, *p*-nitrophenyl- β -D-glucuronide, UDP-glucuronic acid (UDPGA, trisodium salt), Brij-58 : ナカライテスク (京都)

ノビレチン : INDOFINE Chemical Company のものをフナコシ(株)より購入した。

タンゲレチン : 富士フィルム Wako (東京)。

SN-38, SN-38-glucuronide : 株式会社ヤクルト本社より供与された。

2. 動物実験

本研究における動物実験は、九州大学動物実験委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した。雌雄の Wistar 系ラットを一晩交配し、翌朝膈内に精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。妊娠 15 日目に、TCDD (1 μ g/kg/2 mL corn oil) を単回経口投与した。対照群には、Corn oil のみを投与した。胎生 20 日目 (GD20) の胎児は母体から摘出し、次世代毒性の解析に供した⁵⁰⁾。また、母体の肝臓を摘出し、液体窒素にて凍結したのち、使用まで -80°C にて凍結保存した。

3. S9 サンプル調製

GD20 母体 1 匹分当たり 1 g を 0.25 M スクロース 3 mL でホモジナイズした。そののち、9,000 \times g, 4°C で 20 分間遠心分離した。得られた上清 (S9) を分注し、使用するまで -80°C にて保存した。タンパク質定量は、Lowry らの方法に基づいて行った。なお、標準タンパク質として bovine serum albumin (BSA) を用い、吸光度測定には HITACHI U-1800 Spectrophotometer を用いた。

4. UGT 活性測定

基質として 4-MU, SN-38, *p*-NP を用い、UGT の活性測定を行った。有機溶媒の終濃度は全て 1% 以下になるよう調節した。S9 サンプルと Brij-58 (0.25 mg/mg of protein) と混合後、30 分間氷

上で処理したのちに活性測定に供した。UDPGA を含む buffer を加えた後、37°C, 10 分プレインキュベーションし、酵素反応は S9 の添加により開始し、37°C, 60 分インキュベーションした。反応はいずれの基質に対しても 1 M TCA 溶液を 100 μ L 添加することで停止させた。30 分間氷冷後、13,000 rpm, 4°C, 10 分遠心し、上清を HPLC 解析に供した。生成物であるグルクロニドの定量は、いずれの基質においても各々のグルクロニドを標品とした絶対検量線法にて行った。HPLC 条件は以下に示す通りで、移動相および測定条件は 4-MU²⁵⁾, SN-38⁵¹⁾, *p*-NP²⁵⁾, それぞれの基質に対し先行研究にて適用された条件を参考に設定した。

HPLC 条件

装置 : HITACHI Chromaster 5110 Pump, 5210 Auto sampler, 5440 FL Detector, 5420 UV-VIS Detector, 5310 Column Oven

Column : Nova-Pak[®] C18 cartridge (4 μ m, 8 \times 100 nm : Waters) を RCM 8 \times 10 Module (Waters) に充填したものを、Nova-Pak[®] C18 Guard Column (60 Å, 4 μ m, 3.9 nm \times 20 mm) に連結して使用した。

5. データ解析

データ解析には Graphpad Prism[®] 8.02 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA) で行った。全ての 2 群間の比較については、Student's *t* test を用いて解析した。有意水準は $p < 0.05$ とした。また、kinetics の結果は Michaelis-Menten 式に非線形解析を行い、各パラメーターを算出した。

酵素阻害における IC₅₀ (half maximum inhibitory concentration) の算出は以下の式に当てはめて行った。

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{((\log(\text{IC}_{50}) - \log(X)) * \text{Hillslope}))}}$$

この数式において、酵素活性 (Y) は阻害剤の濃度 (X) と 4 つのパラメーターにより表現される。Top は阻害剤濃度 Y=0 のときの酵素活性を表し、Bottom は阻害剤濃度が無限大の時の活性を示している。また、Hillslope の値が大きいほど IC₅₀ 付近のグラフの傾きは急になる。

実験結果

1. TCDD 低用量暴露母体肝での UGT 酵素活性変動

4-MU, *p*-NP, SN-38 を基質とし、活性測定を実施した。S9 のタンパク量を、4-MU, SN-38 では $50 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, *p*-NP に対しては $200 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ として解析を行った。基質濃度はいずれの基質に対しても低濃度側、高濃度側の 2 点で測定を実施し、先行研究の K_m 値を参考に、4-MU は終濃度 $50 \mu\text{M} \cdot 200 \mu\text{M}^{25)52)}$, *p*-NP は終濃度 $100 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{M}^{25)}$, SN-38 は終濃度 $30 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{M}^{53)}$ に設定した。その結果、Control 群と比較して TCDD 群ではいずれの基質に対しても、低濃度・高濃度双方でグルクロン酸抱合活性が有意に増加した (Fig. 2)。SN-38 はどちらも Control 群より高い活性を示したが、低濃度・高濃度での酵素活性に差がみられないことから、本条件においてラット肝 S9 の SN-38 の K_m 値は $30 \mu\text{M}$ よりも低濃度側にあることが示唆された。

2. ノビレチン, タンゲレチンによる *in vitro* での UGT 活性に対する阻害効果

次に、SN-38 を基質としてノビレチン及びタンゲレチンの UGT に対する阻害効果を検討した。SN-38 の終濃度は、算出されたキネティックスパラメーター (K_m , V_{max}) (Table 1) を基に $10 \mu\text{M}$ に設定した。阻害剤として添加したノビレチンおよびタンゲレチンは SN-38 と同じく DMSO に溶解し、終濃度 $1 \sim 100 \mu\text{M}$ の範囲で反応させた。酵素源として、5 匹の母ラット肝臓のサンプルを等量混和したプールド S9 サンプルを用い、酵素を添加することで反応を開始させた。算出さ

れた IC_{50} 値はいずれも本条件の最高濃度である $100 \mu\text{M}$ より大きな値となった。本結果を基に、ノビレチンおよびタンゲレチン濃度 $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ における阻害効果を検討した。ノビレチンおよびタンゲレチンの代わりに DMSO を同量添加し反応させた対照と比較した。ダイオキシンを投与していない母体の肝臓由来のプールした Control の S9 に、ノビレチンおよびタンゲレチンは $10 \mu\text{M}$ で有意な阻害効果を示し、また高濃度側の $100 \mu\text{M}$ においても同様に阻害作用を示した (Fig. 3)。また、Control の S9 に対してノビレチンには、低濃度より高濃度で阻害作用が強くなる傾向があったが、タンゲレチンでは低濃度と高濃度間で同程度の阻害作用を示した。一方、TCDD 妊娠期暴露した母体の肝臓由来のプールした S9 において、タンゲレチンは $10 \mu\text{M}$ で有意な阻害作用を示したが、ノビレチン $10 \mu\text{M}$ では UGT 活性の減少傾向にとどまった。また、高濃度側においては、ノビレチンおよびタンゲレチンは、ほぼ同様の阻害作用を示した。ノビレチンおよびタンゲレチンいずれにおいても、低濃度に比べて高濃度では阻害効果が有意に強くなっていた。このように、ラット肝 S9 分画を用いた *in vitro* での検討ではノビレチンおよびタンゲレチンによる UGT 阻害効果が確認された。これらの阻害作用は類似していたものの、タンゲレチンの方がノビレチンよりも僅かに、阻害効果が強い結果となった。

考 察

本研究では、TCDD 妊娠期低用量暴露した母ラットの肝臓の UGT 活性を測定し、さらに SN-38 を基質とした UGT 活性に対するノビレチン・タンゲレチンの影響について検討した。高濃度お

Table 1 The kinetic parameters for UGT activity in rat liver S9 toward SN-38.

Enzyme source (S9)	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/mg protein)
Control	8.69 ± 2.62	6.52 ± 0.51
TCDD	9.42 ± 2.64	11.8 ± 0.9

S9 samples were prepared from the liver homogenate of pregnant rats (GD20) orally treated with TCDD ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) or vehicle (corn oil). S9 samples of 5 rats were pooled and subjected to the assay. Pooled S9 sample ($50 \mu\text{g}$ protein) was used for each assay. SN-38 concentrations were varied ranging from 1 to $100 \mu\text{M}$. UDPGA concentration was fixed at 2mM . Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assay.

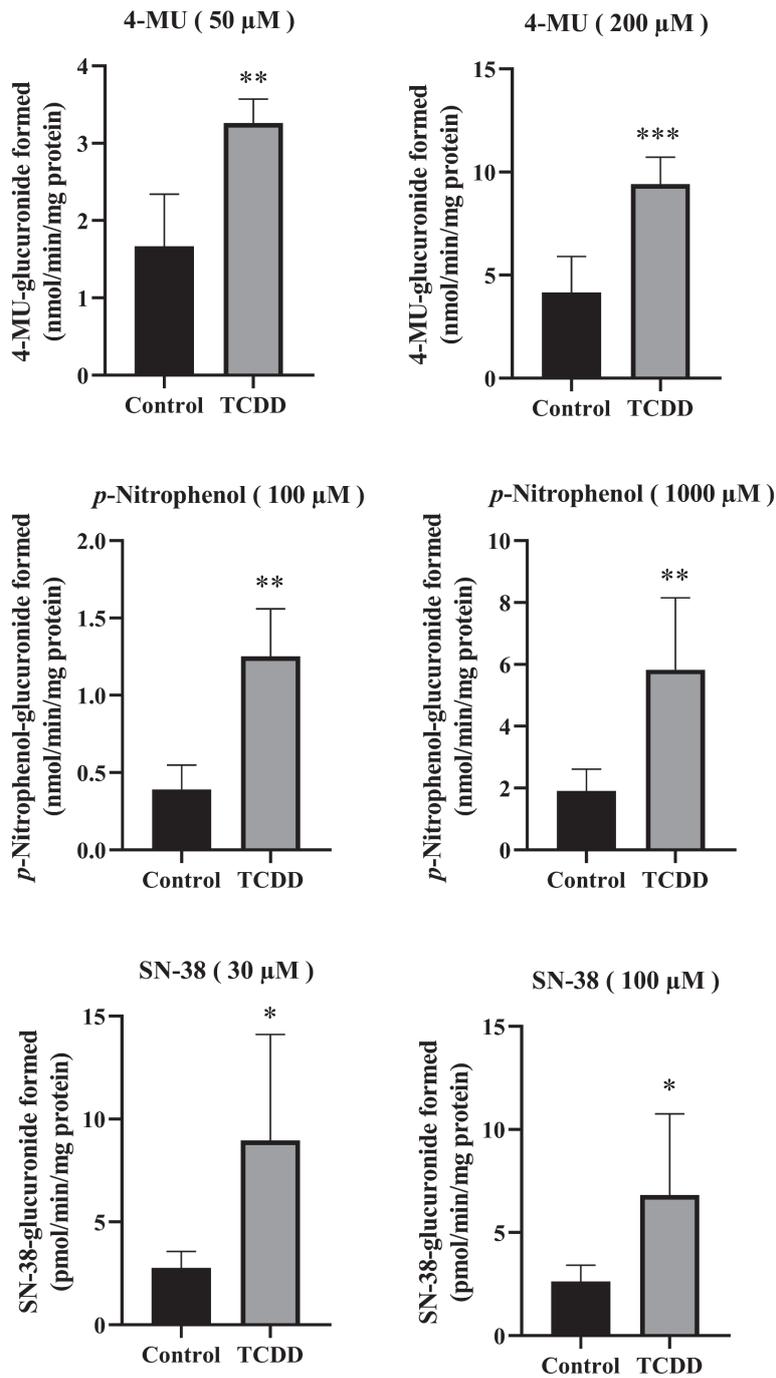


Fig. 2 Effect of maternal exposure to TCDD (1 μ g/kg at GD15) on the hepatic glucuronidation activity in dams at GD20 toward 4-MU, *p*-nitrophenol and SN-38. Control group was treated with corn oil at GD15. S9 was prepared from dam liver at GD20. Glucuronidation activities toward 4-MU, *p*-nitrophenol and SN-38 were assayed at indicated concentrations. UDPGA concentration was fixed at 2 mM. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 5 rats. Significantly different from Control: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

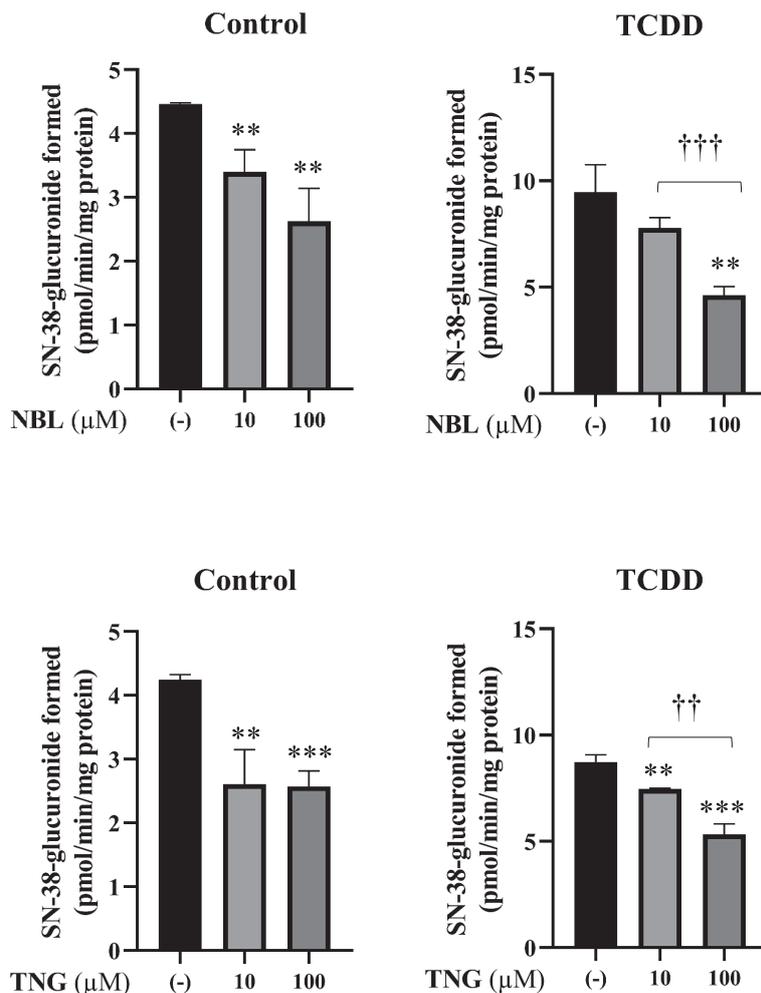


Fig. 3 Effect of nobiletin (NBL) and tangeretin (TNG) *in vitro* on the glucuronidation activity in hepatic S9 of pregnant rats (GD20) exposed to TCDD (1 μ g/kg at GD15). Control group was treated with corn oil at GD15. S9 samples of 5 rats of control group or TCDD-group were pooled and subjected to the assay. NBL and TNG were added at indicated concentration. For S9 without NBL and TNG, DMSO was added as a vehicle. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate assays. Significantly different from S9 without NBL or TNG : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significantly different between the pair indicated : †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$.

よび低濃度の基質濃度 2 点を対象とした 4-MU, *p*-NP および SN-38 に対する UGT 活性測定の結果, いずれの基質に対しても TCDD 処理群の方が活性が高かったことから (Fig. 2), TCDD 母体暴露によりこれらの基質の抱合に参与する UGT 分子種が誘導されたと考えられる. TCDD による rat UGT1A6, 1A7 の誘導については広く知られており^{12)~14)}, AhR 活性化を介したメカニズムについても考察がなされている^{12)~14)}. また, 先

行研究において TCDD 低用量暴露による肝臓での rat UGT1A6/7 の mRNA レベルの解析が行われており, 胎児においては増加傾向, 母体においては顕著な誘導がみられている²¹⁾. 筆者が知る限り現在までに検証した報告はないため, rUGT1A7 が *p*-NP 抱合活性を示す可能性は否定できないが, *p*-NP 抱合活性を有する rUGT1A6 は AhR を介して誘導される (なお, 当時は命名法が定まっていなかったため, 多環芳香族炭化水

素により誘導される UGT 分子種を CYP1A1 に倣って、UGT1A1 と記述されていることに留意する必要がある)⁵⁴⁾、よって、*p*-NP に対する抱合活性が TCDD 妊娠期暴露により有意に上昇したことは、少なくとも UGT1A6 が誘導されたことによると考えられる。また、SN-38 抱合活性を有するラットの UGT 分子種のうち TCDD 誘導性が分かっているのは rUGT1A7 である³⁰⁾。従って、SN-38 に対する抱合活性が TCDD 低用量暴露により有意に上昇したことは、rUGT1A7 が誘導されたことによると考えられ、同用量で GD18 および GD19 にて実施された先行研究²¹⁾ を支持する結果となった。4-MU は多くの UGT 分子種に抱合を受けると考えられるが、冒頭でも記述したようにダイオキシン誘導性の rUGT1A6 および rUGT1A7 でも代謝を受けることが知られている¹³⁾。このことから、TCDD 母体暴露により誘導されたこれら分子種により 4-MU に対する抱合活性が有意に上昇したためと考えられる。TCDD により誘導された rUGT1A7 は甲状腺ホルモンであるチロキシン (T4) の抱合に関与することが報告されており¹⁴⁾、これが母体における甲状腺ホルモンレベルの減少に関与していると考えられている。本研究の結果から TCDD 妊娠期低用量暴露によって母体肝における rUGT1A7 の誘導が示唆されたことから、母体において甲状腺ホルモンレベルも同様の機構で低下し、これが間接的に児の甲状腺ホルモンレベルへ影響する可能性がある。

次いで、TCDD 低用量暴露した妊娠母体肝において誘導されたと考えられる rUGT1A7 の触媒する活性として SN-38 抱合活性を指標とし、プールした S9 に対する 2 種のポリメトキシフラボノイドの阻害活性を評価した (Fig. 3)。結果、ノビレチン及びタンゲレチンはダイオキシン処理していない対照群の母体肝臓のプールした S9 において基質濃度と同濃度である 10 μ M で UGT 活性を有意に阻害した。また、ノビレチンには 100 μ M において阻害作用が僅かに強くなる傾向があったが、タンゲレチン 100 μ M では、10 μ M の時と阻害効果はほぼ同じであり、高濃度にするこによる影響は小さかった。ノビレチンの高濃度における阻害作用は、タンゲレチンと遜色なかった。ラット肝に発現している UGT 分子種のうち、

SN-38 の抱合速度は UGT1A7, 1A8, 1A1 の順に高い³⁰⁾との報告があるものの、UGT1A7 および 1A8 は恒常的な発現量が低く、mRNA レベルでは UGT1A1 と比べ 1/10 に満たない⁵⁵⁾ 程度である。そのため、それぞれその恒常的な発現量を考慮すると構成的条件下では、SN-38 の主要抱合酵素は rUGT1A1 である。ダイオキシン暴露していない母体肝臓の S9 においては、ノビレチン及びタンゲレチンは主に恒常的に発現している rUGT1A1 に対して阻害効果を示し、ノビレチンよりタンゲレチンの方がやや rUGT1A1 に対する阻害効果が高いことが示唆された。また、高濃度ではいずれも同程度 rUGT1A1 活性を低下させると考えられた。ヒト肝癌細胞由来である HepG2 細胞でポリメトキシフラボノイドによる hUGT1A1 発現量の変動を ELISA 法を用いて検討した研究が行われており、その結果ノビレチンでは hUGT1A1 発現量に影響を及ぼさなかったものの、タンゲレチンでは hUGT1A1 発現量を上昇させたとの報告がある⁵⁶⁾。本研究では、cell-free の実験系を用い *in vitro* での添加効果を調べている。代謝物による影響が一部ある可能性は否定できないものの、基本的に UGT に対するポリメトキシフラボノイドの直接の影響を見たものと考えて良いだろう。そのため、酵素活性を測定する際にタンパク質レベルが変動することは考えづらい。一方、先行研究⁵⁶⁾ では、ELISA 法を用いて調べており、活性を測定したのではなく hUGT1A1 のタンパク質としての発現量を定量していることになる。従って、細胞に添加したタンゲレチンが実際に UGT1A1 による抱合活性にどのように影響したのかが調べられているわけではない。また、細胞にポリメトキシフラボノイドを添加しているため、代謝の影響が無視できない上に、遺伝子発現を変動させる転写調節因子にも影響を与える可能性がある。本研究はラット肝臓 S9 を用いたものであり、この先行研究はヒト由来細胞を用いているという違いもあるが、タンゲレチンがラット UGT1A1 を阻害するだけでなくヒト UGT1A1 にも類似の影響を及ぼす可能性は否定できない。このように、本研究から、タンゲレチンがラット UGT1A1 による SN-38 抱合活性を低下させる作用があることが分かった。

また TCDD 母体暴露した母ラット肝臓 S9 に

よる SN-38 抱合活性に対しては、低濃度のタンゲレチンでは有意な活性低下作用が見られたが、低濃度ノビレチンでは減少傾向にとどまった。また高濃度ではどちらも有意な活性低下作用があり、遜色なかった。TCDD 暴露した母ラット肝臓には UGT1A7 が誘導されていると考えられ、ここで検討した 2 種のポリメトキシフラボノイドの SN-38 抱合活性の低下作用は類似しているものの、タンゲレチンの方がノビレチンよりも僅かに強いことが分かった。このことは、濃度増大による阻害効果の増強の度合いがノビレチンの方に顕著だったことから支持される。TCDD 母体暴露した母ラット肝臓 S9 には rUGT1A1 が含まれているだけでなく、TCDD により誘導された rUGT1A7 も含まれており、後者の SN-38 抱合への寄与が大きいと考えられる。従って、阻害効果も、構成的発現をしている rUGT1A1 と TCDD により誘導された rUGT1A7 の両方に対するものであると言えよう。ポリメトキシフラボノイドがダイオキシンによる rUGT1A7 の誘導作用を阻害するか否かは今後の課題であるが、ダイオキシンで誘導された rUGT1A7 が触媒する抱合活性を適度に阻害することは期待される。

次に、これら 2 種類のポリメトキシフラボノイドによる阻害効果の差に関して考察する。ノビレチン及びタンゲレチンはともに CYP による酸化を受けることが知られている。本研究において用いた TCDD 妊娠期暴露した母ラット肝臓 S9 サンプルでは、UGT のみならず CYP も TCDD による誘導を受けていると考えられる¹⁷⁾。本研究で S9 に添加した補酵素は UDPGA のみであるが、内在性の補酵素も一部残存していると考えられる。ラット肝臓においてノビレチンは CYP による脱メチル化反応を受け、4'-OH, 7-OH, 6-OH, 3', 4'-diOH, 6,7-diOH に代謝され⁵⁷⁾、中でも 4'-OH 体の生成は CYP2C11, 次いで rCYP1A1 の寄与が最も大きく、7-OH 体の生成には CYP2C11 の影響が突出して大きく、次いで CYP3A1 及び CYP3A2 が関与している。6-OH 体の生成には CYP2C11, CYP2D1, CYP3A1 および CYP3A2 がほぼ同程度で関与している。ラットでは 4'-OH 体が主要代謝物であるが、その生成に主に関与する CYP2C11 は雄に特異的な分子種であり⁵⁸⁾、この代わりに雌では CYP2C6 による代謝が起こる

ことが推測されている¹⁸⁾。マーカーとなる酵素活性を基にすると、TCDD 低用量暴露母体の肝臓において CYP2C6 および rCYP1A1 のマーカー活性が誘導される¹⁸⁾ ことから、TCDD 暴露群母ラットからのプールした S9 では誘導された CYP による代謝を一部は受け、主に 4'-OH, 7-OH, 6-OH の形でノビレチン代謝産物が生成されたと推定される。ノビレチン及びタンゲレチンが直接 UGT を阻害する可能性もあるが、これら代謝物が UGT に対する阻害効果を示した可能性もある。一方タンゲレチンはラット肝臓において CYP による脱メチル化反応や水酸化反応を受け、4'-OH, 3',4'-diOH, 4',6-diOH に代謝される⁵⁹⁾⁶⁰⁾ ことが報告されている。どの CYP 分子種が代謝に寄与するかの報告は乏しいが、CYP1A が 3' の水酸化反応に、その他の CYP が脱メチル化反応に関与することが報告されている⁵⁹⁾。ヒト肝臓を対象とした検討ではタンゲレチンの代謝物としては 4'-OH, 5,6-diOH, 3',4'-diOH, 4',7-diOH, 4', 6-diOH があり⁶¹⁾、4'-OH 体への代謝は CYP1A2 の関与が最も大きく、ついで CYP3A4 となっている。3',4'-diOH は CYP1A2, CYP3A4 が同程度に関与することが確認されており⁶¹⁾、ラットにおいて CYP1A が脱メチル化に関与する点で類似性がみられる。ラットにおいて知られている上述の 3 つの代謝物のうち 4'-OH 体が主要代謝物であり、次いで 3',4'-diOH, 4',6-diOH とされている⁵⁹⁾⁶⁰⁾。これらのことから、ノビレチン同様にタンゲレチンも TCDD 低用量暴露母体肝臓において誘導された CYP 分子種で酵素的脱メチル化反応や水酸化反応を受け、4'-OH, 3',4'-diOH, 4',6-diOH となると推測される。先行研究において母体に対する TCDD 低用量暴露により rCYP1A2 活性に増加傾向がみられる¹⁸⁾ ことも、本推測を支持する。今回用いた 2 種のポリメトキシフラボノイドの阻害効果の差において、CYP により代謝を受け、脱メチル化ないし水酸化され生成された代謝物の構造に着目すると、タンゲレチンにおいて主要代謝物の水酸基数がノビレチンのそれよりも多いことがわかる。阻害作用には構造的な特性が最も重要と考えるものの、二つの化合物の予想代謝物は極めて類似した構造であり、水酸基数に違いがある。グルクロン酸抱合反応は対象化合物の水酸基に対して UDPGA よりグルクロン酸を転移する反応

であることから、主要代謝物の水酸基数の差によって、ノビレチンよりもタンゲレチンの方が強い阻害効果を示した可能性はある。

本研究で実施した阻害実験の濃度範囲では2種の阻害剤のIC₅₀を算出するには至らなかったが、いずれのポリメトキシフラボノイドも母体におけるTCDD低用量暴露により誘導されたUGTに対し、基質濃度と同濃度で阻害効果を示した。TCDDにより誘導されたrUGT1A7は甲状腺ホルモンであるT₄の主要抱合酵素として働く¹⁴⁾ことが報告されている。TCDDによる児の発育障害には、児の成長ホルモンの低下⁶²⁾や母親のプロラクチンの低下による低育児⁶³⁾が重要であるが、冒頭にも述べたように、児の甲状腺ホルモンレベルの低下も一因とされており¹⁹⁾²⁰⁾、出生後は児における影響が主と思われるが、胎児期においては母体における甲状腺ホルモンレベル減少に伴う児での甲状腺ホルモン減少が関与していると考えられている⁶⁴⁾。本研究により*in vitro*でノビレチン及びタンゲレチンが母体肝臓S9におけるTCDD誘導性のrUGT1A7のSN-38抱合活性を低下させることが示された。これらの食事由来ポリメトキシフラボノイドの摂取が*in vivo*においてもダイオキシン誘導性UGT1A7阻害するか否かは今後の課題である。ノビレチンやタンゲレチンの摂取が、UGT1A7の適度な阻害を通じた甲状腺ホルモンの過剰な抱合の抑制、ならびに児における発育障害の抑制につながることが期待される。

結 論

比較的低用量のTCDD (1 μg/kg, p.o.) を妊娠ラットGD15に暴露することよりGD20の母体肝臓において、4-MU, *p*-NP およびSN-38のグルクロン酸抱合活性が有意に上昇したことから、rUGT1A6およびrUGT1A7の誘導が起こったと推察された。

ノビレチン及びタンゲレチンは*in vitro*でダイオキシンで誘導されたSN-38抱合活性を有意に阻害した。

SN-38抱合活性をrUGT1A7が触媒するT₄抱合活性測定の代替と考え、これらのポリメトキシフラボノイドが甲状腺ホルモンの過剰な抱合を抑制し得る食事由来成分として期待された。

これらの食餌由来ポリメトキシフラボノイドの

摂取が*in vivo*においてもダイオキシン誘導性rUGT1A7阻害するか否かは今後の課題である。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)(課題番号:H30-食品-指定-005, R3-食品-指定-JP21KA2003), 科学研究費補助金(基盤研究A JSPS KAKENHI JP17H00788, 基盤研究A JSPS KAKENHI JP21H04928)によった。

参 考 文 献

- 1) Furue M, Ishii Y, Tsukimori K and Tsuji G: Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin-Related Health Hazards-Lessons from Yusho. *Int J Mol Sci.* 22 : 708, 2021.
- 2) Thiel R, Koch E, Ulbrich B and Chahoud I: Peri- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: effects on physiological development, reflexes, locomotor activity and learning behaviour in Wistar rats. *Arch Toxicol.* 69 : 79-86, 1994.
- 3) Zhang HJ, Liu YN, Xian P, Ma J, Sun YW, Chen JS, Chen X and Tang NJ: Maternal exposure to TCDD during gestation advanced sensory-motor development, but induced impairments of spatial learning and memory in adult male rat offspring. *Chemosphere.* 212 : 678-686, 2018.
- 4) Negishi T, Shimomura H, Koyama T, Kawasaki K, Ishii Y, Kyuwa S, Yasuda M, Kuroda Y and Yoshikawa Y: Gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin affects social behaviors between developing rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Toxicol Lett.* 160 : 233-244, 2006.
- 5) Gray LE, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS and Birnbaum LS: Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol.* 131 : 108-118, 1995.
- 6) Wilker C, Johnson L and Safe S: Effects of developmental exposure to indole-3-carbinol or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on reproductive potential of male rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol.* 141 : 68-75, 1996.
- 7) Stølevik SB, Nygaard UC, Namork E, Haugen M, Meltzer HM, Alexander J, Knutsen HK,

- Aaberge I, Vainio K, van Loveren H, Løvik M and Granum B : Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from the maternal diet may be associated with immunosuppressive effects that persist into early childhood. *Food Chem Toxicol.* 51 : 165-172, 2013.
- 8) Poland A and Knutson JC : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 22 : 517-554, 1982.
- 9) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35 : 307-340, 1995.
- 10) Aylward LL, Collins JJ, Bodner KM, Wilken M and Bodnar CM : Elimination rates of dioxin congeners in former chlorophenol workers from Midland, Michigan. *Environ Health Perspect.* 121 : 39-45, 2013.
- 11) Shirai JH and Kissel JC : Uncertainty in half-lives of PCBs in human : impact in exposure assessment. *Sci Total Environ.* 187 : 199-210, 1996.
- 12) Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y and Dalton TP : Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 59 : 65-85, 2000.
- 13) Bock KW, Gschaidmeier H, Heel H, Lehmköster T, Münzel PA, Raschko F and Bock-Hennig B : AH receptor-controlled transcriptional regulation and function of rat and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Adv Enzyme Regul.* 38 : 207-222, 1998.
- 14) Emi Y, Ikushiro S and Kato Y : Thyroxine-metabolizing rat uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A7 is regulated by thyroid hormone receptor. *Endocrinology.* 148 : 6124-6133, 2007.
- 15) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T and Yamada H : Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. *J Pharmacol Exp Ther.* 329 : 1091-1099, 2009.
- 16) Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases : a new insight into the mechanism for the imprinting of sexual immaturity by dioxin. *J Biol Chem.* 287 : 18440-18450, 2012.
- 17) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H and Ishii Y : The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Biochem Pharmacol.* 154 : 213-221, 2018.
- 18) 池田佳乃子, 佐野宏江, 宮内優, 太田千穂, 古賀信幸, 田中嘉孝, 石井祐次 : ダイオキシン低用量曝露母体の肝薬物代謝酵素活性に対するシークワサー由来ポリメトキシフラボノイド : ノビレチンの *in vitro* 阻害効果. *福岡医誌.* 112 : 136-147, 2021.
- 19) Nishimura N, Yonemoto J, Nishimura H, Ikushiro S and Tohyama C : Disruption of thyroid hormone homeostasis at weaning of Holtzman rats by lactational but not in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Sci.* 85 : 607-614, 2005.
- 20) Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Sato M and Tohyama C : Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Endocrinology.* 144 : 2075-2083, 2003.
- 21) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin-induced fetal growth retardation : the role of a preceding attenuation in the circulating level of glucocorticoid. *Endocrine.* 47 : 572-580, 2014.
- 22) Mackenzie PI : Rat liver UDP-glucuronosyltransferase. Sequence and expression of a cDNA encoding a phenobarbital-inducible form. *J Biol Chem.* 261 : 6119-6125, 1986.
- 23) Green MD, Clarke DJ, Oturu EM, Styczynski PB, Jackson MR, Burchell B and Tephly TR : Cloning and expression of a rat liver phenobarbital-inducible UDP-glucuronosyltransferase (2B12) with specificity for monoterpenoid alcohols. *Arch Biochem Biophys.* 322 : 460-468, 1995.
- 24) Yu C, Ritter JK, Krieg RJ, Rege B, Karnes TH and Sarkar MA : Effect of chronic renal insufficiency on hepatic and renal udp-glucuronosyltransferases in rats. *Drug Metab Dispos.* 34 : 621-627, 2006.
- 25) Hanioka N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T and Ando M : Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 activity in human and rat liver microsomes by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal.* 25 : 65-75, 2001.
- 26) Iyanagi T, Haniu M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Watanabe S, Shively JE and Anan KF : Cloning and characterization of cDNA encoding 3-methylcholanthrene inducible rat mRNA for

- UDP-glucuronosyltransferase. *J Biol Chem.* 261 : 15607-15614, 1986.
- 27) Bock KW, Josting D, Lilienblum W and Pfeil H : Purification of rat-liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase. Separation of two enzyme forms inducible by 3-methylcholanthrene or phenobarbital. *Eur J Biochem.* 98 : 19-26, 1979.
- 28) Chaudhry GR, Ali AN and Wheeler WB : Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol.* 54 : 288-293, 1988.
- 29) Tchieno FMM and Tonle IK : *p*-Nitrophenol determination and remediation : an overview. *Rev Anal Chem.* 37 : 20170019, 2018.
- 30) Tallman MN, Ritter JK and Smith PC : Differential rates of glucuronidation for 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) lactone and carboxylate in human and rat microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Drug Metab Dispos.* 33 : 977-983, 2005.
- 31) Ishida T, Takeda T, Koga T, Yahata M, Ike A, Kuramoto C, Taketoh J, Hashiguchi I, Akamine A, Ishii Y and Yamada H : Attenuation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity by resveratrol : a comparative study with different routes of administration. *Biol Pharm Bull.* 32 : 876-881, 2009.
- 32) Ishida, T, Taketoh J, Nakatsune E, Kan-o S, Naito E, Takeda S, Mutoh R, Ishii Y and Yamada H : Curcumin anticipates the suppressed body weight gain with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mice. *J Health Sci.* 50 : 474-482, 2004.
- 33) Bentli R, Ciftci O, Cetin A, Unlu M, Basak N and Cay M : Oral administration of hesperidin, a citrus flavonone, in rats counteracts the oxidative stress, the inflammatory cytokine production, and the hepatotoxicity induced by the ingestion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Eur Cytokine Netw.* 24 : 91-96, 2013.
- 34) Tan YQ, Chiu-Leung LC, Lin SM and Leung LK : The citrus flavonone hesperetin attenuates the nuclear translocation of aryl hydrocarbon receptor. *Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 210 : 57-64, 2018.
- 35) Ishida T, Naito E, Mutoh J, Takeda S, Ishii Y and Yamada H : The plant flavonoid, quercetin, reduces some forms of dioxin toxicity by mechanism distinct from aryl hydrocarbon receptor activation, heat-shock protein induction and quenching oxidative stress. *J Health Sci.* 51 : 410-417, 2005.
- 36) Ciftci O, Aydin M, Ozdemir I and Vardi N : Quercetin prevents 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced testicular damage in rats. *Andrologia.* 44 : 164-173, 2012.
- 37) Kitakaze T, Makiyama A, Nakai R, Kimura Y and Ashida H : Kaempferol modulates TCDD- and t-BHQ-induced drug-metabolizing enzymes and luteolin enhances this effect. *Food Funct.* 11 : 3668-3680, 2020.
- 38) Rong X, Xu J, Jiang Y, Li F, Chen Y, Dou QP and Li D : Citrus peel flavonoid nobiletin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation by activating IL-6/STAT3/FOXO3a-mediated autophagy. *Food Funct.* 12 : 1305-1317, 2021.
- 39) Li S, Li X, Chen F, Liu M, Ning L, Yan Y, Zhang S, Huang S and Tu C : Nobiletin mitigates hepatocytes death, liver inflammation, and fibrosis in a murine model of NASH through modulating hepatic oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J Nutr Biochem.* 100 : 108888, 2022.
- 40) Nakajima A and Ohizumi Y : Potential Benefits of Nobiletin, A Citrus Flavonoid, against Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 20 : 3380, 2019.
- 41) Chen YY, Liang JJ, Wang DL, Chen JB, Cao JP, Wang Y and Sun CD : Nobiletin as a chemopreventive natural product against cancer, a comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 28 : 1-21, 2022.
- 42) Huang J, Chang Z, Lu Q, Chen X and Najafi M : Nobiletin as an inducer of programmed cell death in cancer : a review. *Apoptosis.* 27 : 297-310, 2022.
- 43) Morrow NM, Trzaskalski NA, Hanson AA, Fadzeyeva E, Telford DE, Chhoker SS, Sutherland BG, Edwards JY, Huff MW and Mulvihill EE : Nobiletin Prevents High-Fat Diet-Induced Dysregulation of Intestinal Lipid Metabolism and Attenuates Postprandial Lipemia. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 42 : 127-144, 2022.
- 44) Sciuillo EM, Vogel CF, Wu D, Murakami A, Ohigashi H and Matsumura F : Effects of selected food phytochemicals in reducing the toxic actions of TCDD and p,p'-DDT in U937 macrophages. *Arch Toxicol.* 84 : 957-966, 2010.
- 45) Xing Z, Wang Y, Feng Z, Zhao Z and Liu X : Effect of ⁶⁰Co-irradiation on postharvest quality and selected enzyme activities of *Hypsizygus marmoreus* fruit bodies. *J Agric Food Chem.* 55 : 8126-8132, 2007.
- 46) Sundaram R, Shanthi P and Sachdanandam P : Effect of tangeretin, a polymethoxylated flavone

- on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 21 : 793-799, 2014.
- 47) Kurowska EM and Manthey JA : Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. *J Agric Food Chem*. 52 : 2879-2886, 2004.
- 48) Weiss J, Gattuso G, Barreca D and Haefeli WE : Nobiletin, sinensetin, and tangeretin are the main perpetrators in clementines provoking food-drug interactions *in vitro*. *Food Chem*. 319 : 126578, 2020.
- 49) Hamada M, Satsu H, Natsume Y, Nishiumi S, Fukuda I, Ashida H and Shimizu M : TCDD-induced CYP1A1 expression, an index of dioxin toxicity, is suppressed by flavonoids permeating the human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem*. 54 : 8891-8898, 2006.
- 50) Yuan M, Sano H, Nishino T, Chen H, Li RS, Matsuo Y, Nishida K, Koga T, Takeda T, Tanaka Y and Ishii Y : α -Lipoic acid eliminates dioxin-induced offspring sexual immaturity by improving abnormalities in folic acid metabolism. *Biochem Pharmacol*. 210 : 115490, 2023.
- 51) Ishii Y, Koba H, Kinoshita K, Oizaki T, Iwamoto Y, Takeda S, Miyouchi Y, Nishimura Y, Egoshi N, Taura F, Morimoto S, Ikushiro S, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI and Yamada H : Alteration of the function of the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily by cytochrome P450 3A4 : different susceptibility for UGT isoforms and UGT1A1/7 variants. *Drug Metab Dispos*. 42 : 229-238, 2014.
- 52) Miners JO, Lillywhite KJ, Matthews AP, Jones ME and Birkett DJ : Kinetic and inhibitor studies of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*. 37 : 665-671, 1988.
- 53) Hanioka N, Ozawa S, Jinno H, Ando M, Saito Y and Sawada J : Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica*. 31 : 687-699, 2001
- 54) Emi Y, Ikushiro S and Iyanagi T : Xenobiotic responsive element-mediated transcriptional activation in the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex. *J Biol Chem*. 271 : 3952-3958, 1996.
- 55) Kutsukake T, Furukawa Y and Ondo K : Quantitative Analysis of UDP-Glucuronosyltransferase Ugt1a and Ugt2b mRNA Expression in the Rat Liver and Small Intestine : Sex and Strain Differences. *Drug Metab Dispos*. 47 : 38-44, 2019.
- 56) Lü J, Zhang D, Zhang X, Sa R, Wang X, Wu H, Lin Z and Zhang B : Network Analysis of the Herb-Drug Interactions of Citrus Herbs Inspired by the "Grapefruit Juice Effect". *ACS Omega*. 7 : 35911-35923, 2022.
- 57) Koga N, Matsuo M, Ohta C, Haraguchi K, Matsuoka M, Kato Y, Ishii T, Yano M and Ohta H : Comparative study on nobiletin metabolism with liver microsomes from rats, Guinea pigs and hamsters and rat cytochrome p450. *Biol. Pharm Bull*. 30 : 2317-2323, 2007.
- 58) Kamataki T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T and Kato R : Sex difference of cytochrome P-450 in the rat : purification, characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. *Arch Biochem Biophys*. 225 : 758-770, 1983.
- 59) Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C and Dragsted LO : *In vitro* biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica*. 28 : 389-401, 1998.
- 60) Nielsen SE, Breinholt V, Cornett C and Dragsted LO : Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus. *Food Chem Toxicol*. 38 : 739-746, 2000.
- 61) Breinholt VM, Rasmussen SE, Brøsen K and Friedberg TH : *In vitro* metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. *Pharmacol Toxicol*. 93 : 14-22, 2003.
- 62) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Yamada H and Ishii Y : Attenuation of growth hormone production at the fetal stage is critical for dioxin-induced developmental disorder in rat offspring. *Biochem Pharmacol*. 186 : 114495, 2021.
- 63) Takeda T, Fujii M, Izumoto W, Hattori Y, Matsushita T, Yamada H and Ishii Y : Gestational dioxin exposure suppresses prolactin-stimulated nursing in lactating dam rats to impair development of postnatal offspring. *Biochem Pharmacol*. 178 : 114106, 2020.
- 64) 服部友紀子, 武田知起, 田浦順樹, 黒木広明, 石井祐次, 山田英之 : ダイオキシン母体曝露による発達児の甲状腺ホルモンへの影響. *福岡医誌*. 106 : 127-134, 2015.

(Received for publication March 17, 2023)