

ラットおよびモルモットの小腸と腎におけるノビレチンの代謝

太田千穂 加藤善久 原口浩一
遠藤哲也 古賀信幸

In Vitro Metabolism of Nobiletin in the Small Intestine and Kidney of Rats and Guinea Pigs

Chiho Ohta Yoshihisa Kato Koichi Haraguchi
Tetsuya Endo Nobuyuki Koga
(2012年11月30日受理)

はじめに

柑橘類の果皮には多くの種類のフラボン類が分布している。フラボン類は、フラボン骨格に、複数の水酸基が置換されたポリフェノール型や、この水酸基の代わりにメトキシ基が複数置換されたポリメトキシ型、さらに水酸基とメトキシ基が混在する中間型に分けられる。本研究のノビレチン(5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone; NBL)は、タンゲレチン(5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone; TNG)やシネンセチン(5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone; SNT)とともに、ポリメトキシ型フラボンの1つである¹⁾。

従来から、ポリフェノール型フラボン類では、抗酸化作用、抗炎症作用、抗がん作用、などの多くの生理活性が報告されている²⁻⁴⁾。一方、ポリメトキシ型フラボン類も、同様に、抗酸化作用、抗炎症作用、抗がん作用、脳機能改善作用が報告されている⁵⁻¹²⁾。特に、NBLに関する研究⁵⁻¹²⁾は多く、がんなどの老化と関連した疾病の治療に寄与する機能性成分の1つとして期待されている。ポリメトキシ型フラボン類は、ポリフェノール型フラボン類に比べ、脂溶性が高いことから、細胞内へ容易に移行し、ここで脱メチル化されて、上記のような生理作用を発揮するものと考えられる。

フラボン類の動物体内での代謝に関する研究は、1990年代後半に始まった。1998年Nielsenらは、16種類のフラボン類につきラット肝ミクロゾームによる代謝を調べ、主代謝経路が、ポリフェノール型ではA環あるいはB環の水酸化反応であること、またポリメトキシ型ではA環あるいはB環の

水酸化反応とメトキシ基の酸化的脱メチル化反応であることを報告した¹³⁾。また、このような代謝反応は薬物代謝酵素のチトクロムP450(P450)によって主に触媒されていることが明らかとなった¹³⁻¹⁶⁾。われわれは、NBLの動物肝およびヒト肝ミクロゾームによる代謝について調べ、代謝物として、3種類の一脱メチル化体(4'-OH体、7-OH体および6-OH体)と2種類の二脱メチル化体(3',4'-diOH体および6,7-diOH体)が生成されること、また、A環の脱メチル化には、代謝酵素としてP450分子種のうち、CYP3A酵素(ラットCYP3A1、ヒトCYP3A4)が、一方、B環の脱メチル化にはCYP1A1、CYP1A2およびCYP1B1が主に関与することを見いだした^{17,18)}(Fig. 1)。

これらのP450分子種の多くは、肝以外にも、肺、腎、小腸、皮膚、胎盤などでも発現していることが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。そこで、本研究では、肝以外の臓器でのNBL代謝の可能性を調べるため、ラットおよびモルモット小腸および腎9,000×g上清におけるNBL代謝活性を測定した。また、両動物を代表的なP450誘導剤で前処理した場合と比較した。なお、CYP2B酵素、CYP1A酵素およびCYP3A酵素の誘導剤として、それぞれphenobarbital(PB)、3-methylcholanthrene(MC)およびdexamethazone(DEX)を用いた。

実験方法

1. 試薬

NBLはフナコシ(株)より購入した。PB(Na塩)、MCおよびDEXは和光純薬(株)より購入し

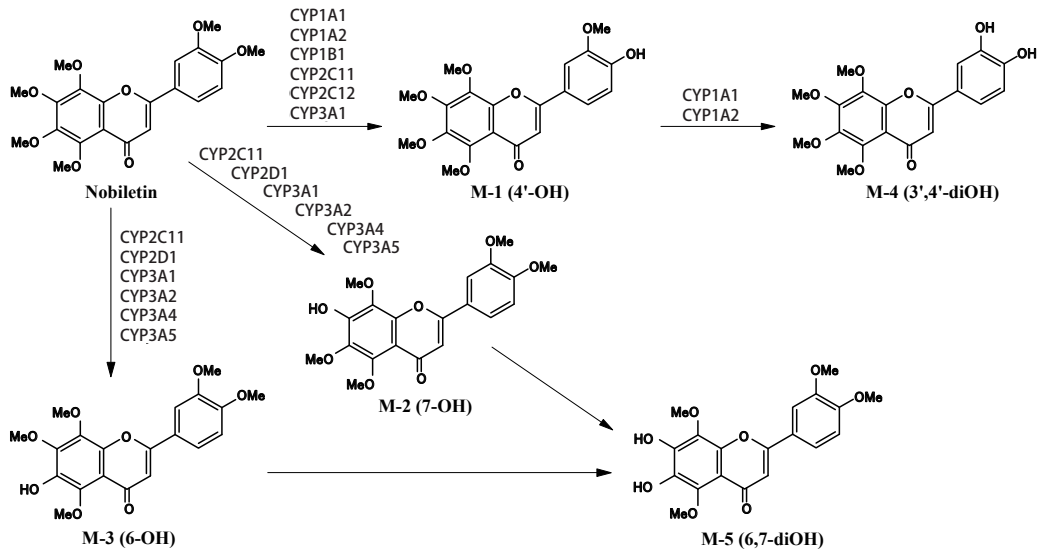


Fig. 1 Postulated metabolic pathways of NBL in animal and human liver.

た。NADP および glucose-6-phosphate (G-6-P) はオリエンタル酵母 (株) より, また, G-6-P 脱水素酵素 (G-6-PD) は和光純薬 (株) より購入した。

2. 実験動物と薬物投与

実験動物は, Wistar 系雄性ラット (体重約200 g) および Hartley 系雄性モルモット (体重約280 g) 各12匹を, 九動 (株) より購入して用いた。これらの実験動物を1群3匹とし, 未処理群, PB 前処理群, MC 前処理群および DEX 前処理群の4群に分けた。PB 前処理群は, PB を生理食塩水に溶解し80mg/kg/day の用量で, MC 前処理群は, MC をコーン油に溶解し20mg/kg/day の用量で, いずれも3日間腹腔内投与した。DEX 前処理群は, DEX を dimethylsulfoxide に溶解し300mg/kg/day の用量で, 2日間腹腔内投与した。いずれの前処理群も最終投与日の翌日に屠殺した後, 小腸, 腎および肝を摘出した。

3. 小腸, 腎および肝9,000×g 上清の調製

小腸および腎9,000×g 上清は, 各組織の脂肪組織および小腸内容物を取り除いた後, 0.25mM ショ糖-0.1mM EDTA-50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) でホモジナイズし, 9,000×g で20分間遠心分離して調製した。なお, 小腸をホモジナイズする際にはトリプシンインヒビター (0.3mg/mL) を添加した。また, 両臓器のホモジネートの作製にはポリトロンホモジナイザー PT-K (Kinematica AG 製) を用いた。一方, 肝9,000×g 上清は, 肝を摘出後, 生理食塩水で灌流し, 0.25mM ショ糖-0.1mM

EDTA-50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加えて, ポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズし, 9,000×g で20分間遠心分離して調製した。

4. 代謝物の分析

0.28mM NBL は, NADPH 生成系 (0.33mM NADP, 5mM G-6-P, G-6-PD 1.0unit), 6mM MgCl₂ および各動物の小腸, 腎および肝9,000×g 上清 (2mg protein) とともに100mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で, 合計1mL として, 37°C で20~90分間インキュベートした。次に, 冷メタノール 3mL 添加により反応を停止し, 水中に30分間放置した。その反応液を3,000rpm で10分間遠心分離して, 変性タンパク質を除いた後, 上清を HPLC に付した。HPLC の分析条件は次の通りである。分析機器, 高速液体クロマトグラフ LC-10AT (島津製); カラム, LiChrospher 100: RP-18 (250×4 mm i.d., 5 μm 粒径, Merck 製); 移動相, 50% acetonitrile - 0.01M ギ酸; 流速, 1mL/min; 検出波長, 340nm。

5. 小腸および腎9,000×g 上清中 CYP1A1 の検出

各動物の小腸あるいは腎9,000×g 上清 (30 μg protein) を, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後, ニトロセルロース膜にブロッティングを行った。CYP1A1 の免疫染色は, 一次抗体 (ヤギ抗ラット P450 抗体, 第一化学製), 二次抗体 (ウサギ抗ヤギ IgG-horse radish peroxidase 複合体, Organon Teknika Corporation)

およびコニカイムノステインキット（コニカ製）を用いて行った。

6. その他

各動物の小腸、腎および肝9,000×g上清のタンパク定量は、Lowryらの方法²²⁾に従って行った。なお、標準タンパク質としてウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich製）を用いた。

実験結果

1. 肝9,000×g上清によるNBL代謝

まず、未処理ラット肝9,000×g上清によるNBL代謝を調べた。インキュベーション時間は、既報¹⁷⁾の肝ミクロゾームを用いた場合と同様に20分間とした。なお、代謝物の定量は、NBLの検量線を用いて求めた。

その結果、3種類の代謝物M-1（4'-OH体）、M-2（7-OH体）およびM-3（6-OH）が検出された。次に、これらの代謝物を定量したところ、それぞれ9.4、18.7および5.1nmol/60min/mg proteinであった（Fig. 2）。これらの活性を、既報¹⁷⁾の未処理ラット肝ミクロゾームの活性と比較したところ、肝9,000×g上清は肝ミクロゾームに比べタンパク質が多いためか、50%程度であった。

2. 小腸9,000×g上清によるNBL代謝

ラットおよびモルモット小腸9,000×g上清によるNBL代謝に及ぼすP450誘導剤の影響を調べた。小腸の代謝活性は肝のそれよりもかなり低いものと仮定し、インキュベーション時間を90分間とした。

ラット小腸では、未処理群、PB、MCおよびDEX前処理群のいずれの場合にも、ラット肝で見られた代謝物は全く検出されなかった（Fig. 3A）。

一方、モルモット小腸においては、未処理群、PB、MCおよびDEX前処理群のいずれの場合にも3種類の代謝物（4'-OH体、7-OH体および6-OH体）が検出された。次に、これらの代謝物を定量した。その結果、Fig. 3Aに示すように、未処理群では4'-OH体が1.8 nmol/60min/mg proteinと最も多く生成されたが、MC前処理群では1.7倍に増加した。2番目に多い7-OH体は、MCおよびDEX前処理群で約1.5倍に増加した。また、6-OH体は、MCおよびDEX前処理群で約2倍に増加した。さらに、PB前処理群では全く変化は見られなかった。なお、未処理モルモット小腸9,000×g上清の総NBL代謝活性は、未処理ラット肝のそれと比較すると、15%程度と低いものであった。

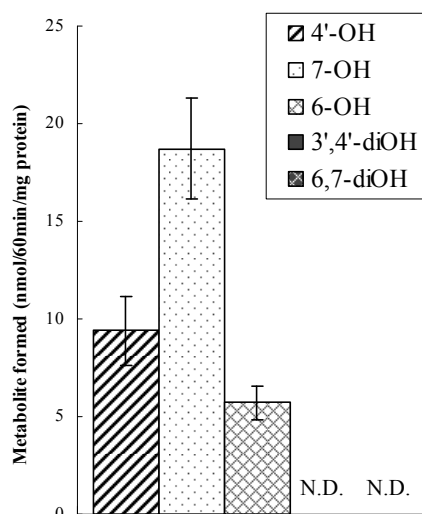


Fig. 2 Metabolism of NBL by liver 9,000×g supernatants from untreated rats. N.D., not detected. Each bar represents mean ± S.D. of three rats.

3. 腎9,000×g上清によるNBL代謝

次に、ラット腎およびモルモット腎9,000×g上清によるNBL代謝に及ぼすP450誘導剤の影響を調べた。その結果、ラット腎ではすべての処理群において、4'-OH体のみが生成された（Fig. 4A）。また、その生成はMC前処理により未処理群の約4倍に顕著に増加した。なお、未処理ラット腎9,000×g上清の4'-OH体生成活性を、未処理ラット肝9,000×g上清の活性と比較すると、腎では肝の約40分の1と低かった。

一方、モルモット腎では、未処理群、PB前処理群およびDEX前処理群において、いずれも4'-OH体、7-OH体および6-OH体が生成された。未処理群による代謝物の生成量は、7-OH体>6-OH体>4'-OH体の順であった。DEX前処理群ではいずれの生成も未処理群の1.5~2.0倍に増加したが、PB前処理群ではいずれの生成も未処理群と同程度であった。一方、MC前処理群では、既報¹⁷⁾の動物肝と同様に、5種類（4'-OH体、7-OH体、6-OH体、3',4'-diOH体および6,7-diOH体）がすべて生成された。特に、4'-OH体はMC前処理により、未処理の30倍と驚異的に増加した。また、4'-OH体に次いで、6,7-diOH体が多く生成され、4'-OH体の5分の1であった。MC前処理モルモット腎の総NBL代謝活性をMC前処理ラット腎のそれと比較すると、9倍であった。また、未処理ラット肝の活性の約44%に匹敵していた。

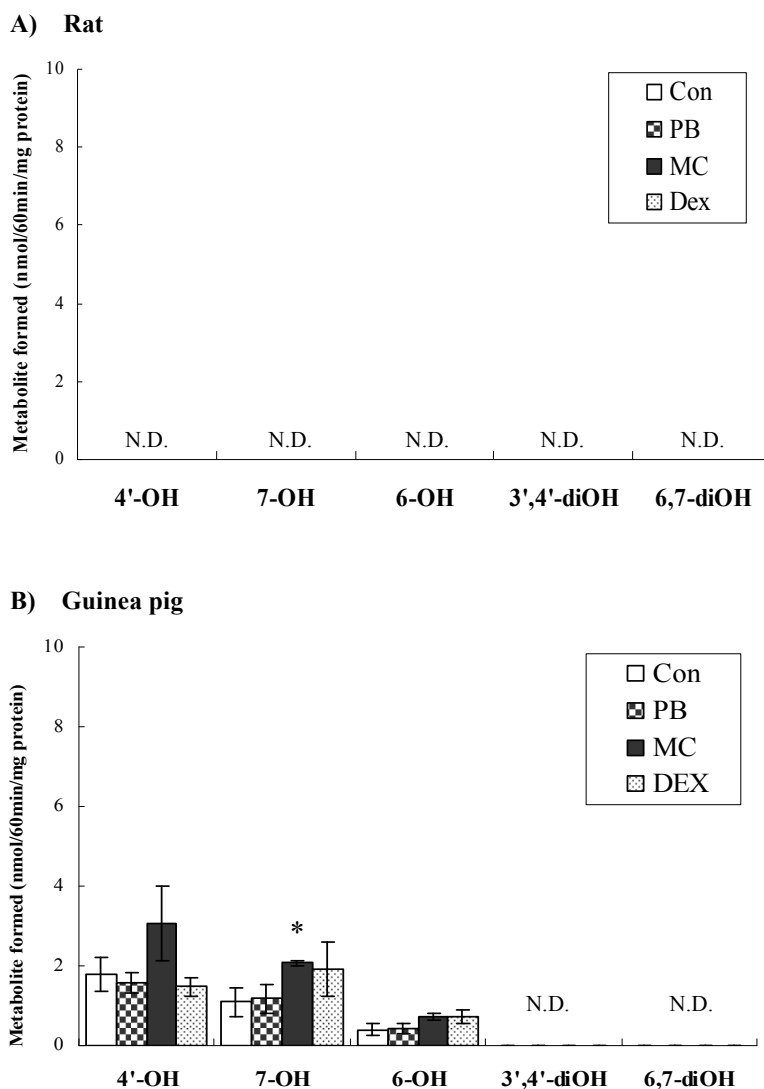


Fig. 3 Metabolism of NBL by small intestine $9,000\times g$ supernatants from untreated, PB-treated, MC-treated and DEX-treated rats (A) and guinea pigs (B). N.D., not detected. Each bar represents mean \pm S.D. of three animals. *Significantly different from untreated animals, $p < 0.05$.

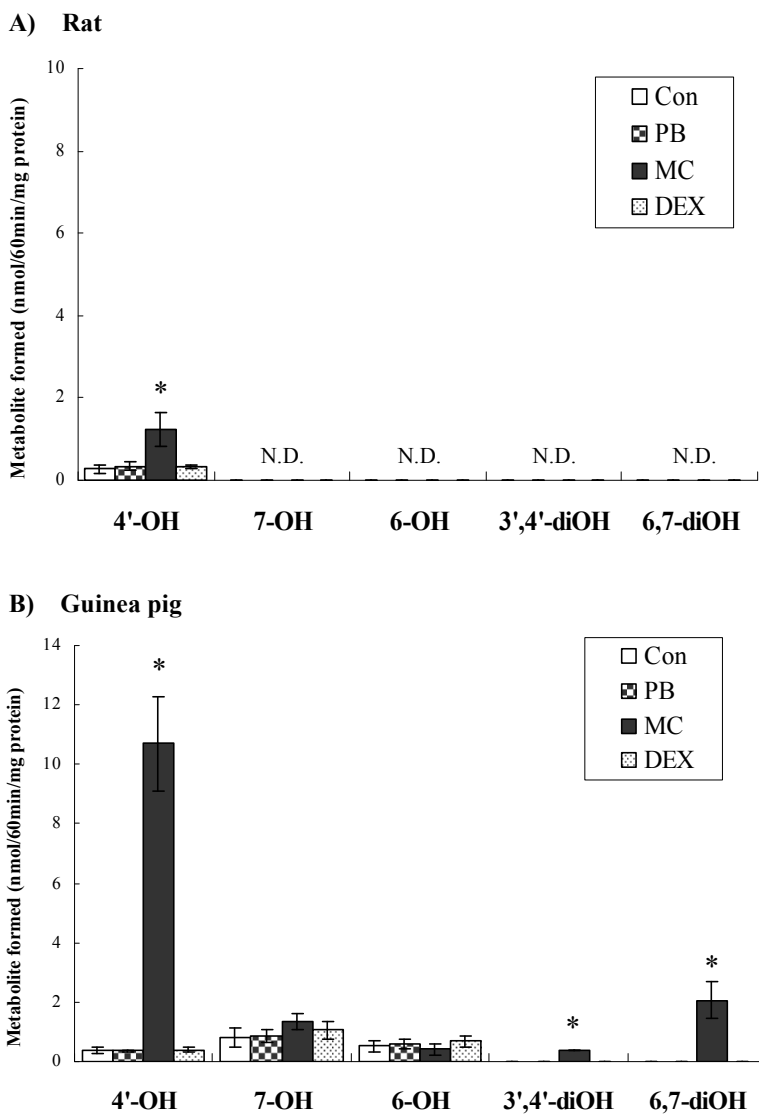


Fig. 4 Metabolism of NBL by kidney 9,000×g supernatants from untreated, PB-treated, MC-treated and DEX-treated rats (A) and guinea pigs (B). N.D., not detected. Each bar represents mean ± S.D. of three animals. *Significantly different from untreated animals, p<0.05.

4. 小腸および腎9,000×g上清中 CYP1A1分子種の検出

動物をMC前処理すると、P450分子種のうち、CYP1A1およびCYP1A2が、肝をはじめとした多くの組織で顕著に誘導されることが知られている^{19,21)}。そこで、MC前処理群のラットとモルモットの各組織において、CYP1A1の誘導を確認するため、ラットおよびモルモットの小腸と腎9,000×g上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ウエスタンブロッティングし、ラット肝CYP1A1に対する抗体を用いて免疫染色を行った (Fig. 5)。

ラット小腸では、MC前処理群でのみCYP1A1抗体と交叉するタンパク質が1本顕著に増加していることが観察された。なお、モルモット小腸では、MC前処理によるCYP1A1タンパク質の増加は確認されなかった。

一方、腎では、ラットとモルモットのいずれにおいてもMC前処理群で、CYP1A1抗体と交叉するタンパク質が1本、未処理に比べ顕著に増加していることが観察された。このタンパク質はCYP1A1と思われるが、このタンパク質の増加はラットにおける4'-OH体の増加や、モルモットにおける4'-OH体、6,7-diOH体および3',4'-diOH体の顕著な増加とよく一致していた。

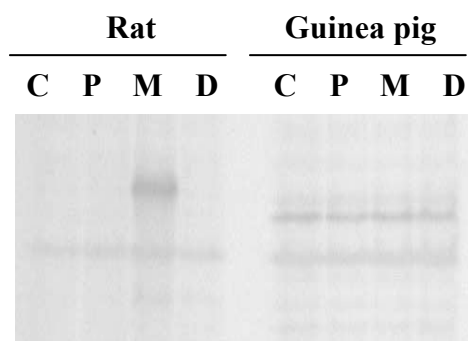
考 察

小腸および腎9,000×g上清におけるNBL代謝活性をラットおよびモルモットで比較したところ、大きな種差が観察された。すなわち、ラット小腸で

は、未処理群およびP450誘導剤前処理群のすべての群でNBLの代謝物が生成されなかったのに対し、モルモット小腸では3種類の一脱メチル化体(4'-OH体、7-OH体および6-OH体)が生成された。また、ラット腎では、4'-OH体の生成が観察されたのに対し、モルモット腎では、3種類の代謝物(4'-OH体、7-OH体および6-OH体)が生成された。さらに、MC前処理により、モルモット腎では4'-OH体の顕著な増加(未処理の38倍)と、6,7-diOH体および3',4'-diOH体の新たな生成が観察されたのに対し、ラット腎では4'-OH体が未処理の4倍に増加したにすぎなかった。われわれはこれまでに、肝におけるNBL代謝活性を調べ、モルモット>ラットであることを報告している^{17,18)}。今回の検討結果から、小腸および腎におけるNBL代謝活性も、モルモット>ラットであることが明らかになった。また、MC前処理モルモット腎での結果から、P450誘導剤の暴露により肝以外の組織においてNBL代謝が大きく影響を受けることが示唆された。

最近、Mantheyらは、TNGあるいはNBLをラットに経口投与し、投与後30分後のラット血中から、両化合物のグルクロン酸抱合体を検出したと報告した²³⁾。この事実は、NBLが小腸で吸収される過程で、小腸上皮細胞内のP450により脱メチル化され、さらにグルクロン酸抱合を受け、血中に入ったことを示唆している。本研究では、ラット小腸においてNBL代謝活性(脱メチル化体の生成)は全く検出されなかった。一般に、グルクロン酸抱合反応は、脱メチル化後のOH基に起こることから、NBL代謝に関してはラット小腸の関与は低いと考えられる。ただし、モルモット小腸においては、総NBL代謝活性が腎の代謝活性の約3倍であり、また3種

(A) Small intestine



(B) Kidney

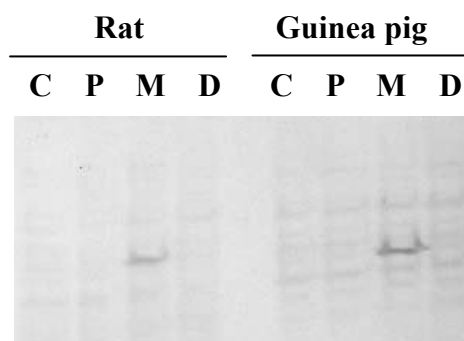


Fig. 5 Immunostaining of small intestine and kidney 9,000×g supernatants from rats and guinea pigs against rat hepatic CYP1A1.

C, untreated; P, PB-treated; M, MC-treated; D, DEX-treated.

類のOH体が生成された。この結果は、動物種によりNBL代謝における小腸の寄与率が大きく異なることを示唆している。

一方、Sashidaらは、NBL投与マウスの尿中代謝物を調べ、主代謝物として4'-OH体を報告したが、グルクロン酸抱合体は検出していない²⁴⁾。また、われわれの予備的検討でも、動物尿中においてNBLグルクロン酸抱合体の生成を示唆する結果は得られていない。この点は、今後の課題である。

ラットCYP1A1抗体を用いた免疫染色の結果、MC前処理により両動物の腎にCYP1A1タンパク質の顕著な増加を観察した。CYP1A1は動物において肝、肺、腎、小腸、胎盤、リンパ球などの多くの組織で発現するが、ヒト肝ではほとんど発現しないことが知られている¹⁹⁻²¹⁾。また、本研究のMCを含む芳香族炭化水素類の暴露により、強く誘導されることも知られている。前述のように、NBL代謝においてCYP1A1は、CYP1A2やCYP1B1とともに高い4'-OH体の生成活性を有しており、さらに2次代謝物である3',4'-diOH体の生成をも触媒する¹⁷⁾。今回のラット腎CYP1A1とモルモット腎CYP1A1を比べると、①MC前処理による誘導性がモルモットの方が大きい、また、②モルモットの方がdiOH体の生成活性が高い、などの違いが考えられる。

モルモット腎CYP1A1は、高い6,7-diOH体の生成活性を有していた。これまでに、われわれは、発現系ラット肝およびヒト肝P450を用いて検討した結果、CYP3A酵素(CYP3A1, CYP3A2, CYP3A4, CYP3A5)が、7-OH体あるいは6-OH体の高い生成活性を有することを見いだした。ただし、6,7-diOH体の生成を触媒するものは見つからなかった^{17,18)}。この事実は、モルモット腎CYP1A1が、肝CYP1A1とは異なる基質特異性を有することを示唆している。一方、CYP3A酵素は、肝をはじめ、肺、小腸、腎で強く発現することが報告されていることから¹⁹⁻²¹⁾、動物腎およびヒト腎に局在するCYP3A酵素がNBL代謝にどの程度関与しているか興味を持たれる。

総括

1. 小腸と腎9,000×g上清のNBL代謝活性をラットとモルモットで比較した。また、チトクロムP450誘導剤の効果も調べた。
2. 小腸9,000×g上清によるNBL代謝をみたところ、ラットで全く代謝されなかったが、モルモットでは4'-OH体、7-OH体および6-OH体が生成された。
3. 腎9,000×g上清のNBL代謝をみたところ、ラットでは4'-OH体が生成されただけだったが、モルモットでは4'-OH体、7-OH体および6-OH体が生成された。MC前処理により、4'-OH体の生成が顕著に増加し、ラットで未処理の4倍、モルモットで38倍になった。モルモットでは、さらに6,7-diOH体と3',4'-diOH体も新たに増加した。
4. ラット肝CYP1A1抗体による免疫染色の結果、ラットおよびモルモット腎においてCYP1A1タンパク質の顕著な増加を観察した。

以上の結果から、モルモットはラットに比べ、肝だけではなく小腸や腎でもより高いNBL代謝活性を有していること、また、MC前処理により、肝以外の組織のNBL代謝への関与が増大することが示唆された。

謝辞

本研究を実施するにあたり、代謝物の分析にご協力いただきました中島(松尾)美樹修士、久保奈実子修士および井上望氏に感謝いたします。

Abstract

Nobiletin (NBL), a polymethoxyflavone present abundantly in the peels of citrus fruits, has been shown to be anti-inflammatory and anti-carcinogenic. Our recent studies have elucidated using liver microsomes and cytochrome P450 (P450) isoforms from animals and human that NBL is metabolized to three mono-demethylated metabolites (4'-OH-, 7-OH- and 6-OH-NBL) and two di-demethylated metabolites (3',4'-diOH- and 6,7-diOH-NBL) and that CYP1A and CYP3A enzymes are responsible for NBL metabolism. In this study, we examined the *in vitro* metabolism of NBL using 9,000×g supernatants of extrahepatic tissues such as small intestine and kidney from rats and guinea pigs, and also the effect of P450 inducers, phenobarbital (PB), 3-methylcholantrene (MC) and dexamethasone (DEX) on NBL metabolism. Rat small intestine 9,000×g supernatants had no activity to metabolize NBL. In contrast, guinea pig small intestine 9,000×g supernatants produced 4'-OH-, 7-OH- and 6-OH-NBL and their formation were slightly increased by MC-pretreatment. On the other hand, guinea

pig kidney 9000×*g* supernatants produced five metabolites in the same manner as liver microsomes, and both 4'-OH- and 6,7-diOH-NBL were markedly increased by MC-pretreatment. Pretreatment of PB and DEX did not almost affect NBL metabolism. Western blotting and immunostaining showed the marked increase of CYP1A1 protein in both animal kidneys. These results suggest that extrahepatic tissues such as small intestine and kidney could metabolize NBL with lower activities than liver, and that kidney CYP1A1 plays an important role in NBL metabolism in both animals, especially in guinea pigs.

文 献

- 1) 十一元晴. 2005. カンキツ類の化学成分とがん予防物質に関する研究. 薬学雑誌, **125**(3): 231-254.
- 2) Formica JV, Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food and Chemical Toxicology, **33**(12): 1061-1080.
- 3) Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews, **52**(4): 673-751.
- 4) Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and Therapeutics, **96**(2-3): 67-202.
- 5) Ishiwa J, Sato T, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. 2000. A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts. Journal of Rheumatology, **27**: 20-25.
- 6) Kawabata K, Murakami A, Ohigashi H. 2005. Nobiletin, a citrus flavonoid, down-regulates matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) expression in HT-29 human colorectal cancer cells. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, **69**: 307-314.
- 7) Kohno H, Yoshitani S, Tsukio Y, Murakami A, Koshimizu K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Ohigashi H, Tanaka T. 2001. Dietary administration of citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. Life Sciences, **69**: 901-913.
- 8) Murakami A, Nakamura Y, Ohta Y, Yano M, Koshiba T, Koshimizu K, Tokuda H, Nishino H, Ohigashi H. 2000. Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobiletin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid. Biofactors, **12**: 187-192.
- 9) Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshiba T, Koshimizu K, Kuwahara S, Takahashi Y, Ogawa K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Mimaki Y, Sashida Y, Kitanaka S, Ohigashi H. 2000. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. Cancer Research, **60**: 5059-5066.
- 10) Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. 2003. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. Biochemical Pharmacology, **65**: 2065-2071.
- 11) Tanaka S, Sato T, Akimoto N, Yano M, Ito A. 2004. Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes *in vivo* and *in vitro*. Biochemical Pharmacology, **68**: 433-439.
- 12) Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. 2008. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A β pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **326**: 739-744.
- 13) Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO. 1998. *In vitro* biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. Xenobiotica, **28**(4): 389-401.
- 14) Roberts-Kirchhoff ES, Crowley JR, Hollenberg PF, Kim H. 1999. Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s. Chemical Research in Toxicology, **12**(7): 610-616.
- 15) Breinholt VM, Offord EA, Brouwe C, Nielsen SE, Brøsen K, Friedberg T. 2002. *In vitro* investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. Food and Chemical Toxicology, **40**(5): 609-616.
- 16) Breinholt VM, Rasmussen SE, Brøsen K, Friedberg TH. 2003. *In vitro* metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. Pharmacology and Toxicology, **93**(1): 14-22.
- 17) Koga N, Matsuo M, Ohta C, Haraguchi K, Matsuoka M, Kato Y, Ishii T, Yano M, Ohta H. 2007. Comparative study on nobiletin metabolism with liver microsomes from rats, guinea pigs and hamsters and rat cytochrome P450. Biological and Pharmaceutical Bulletin, **30**(12): 2317-2323.
- 18) Koga N, Ohta C, Kato Y, Haraguchi K, Endo T, Ogawa K,

- Ohta H, Yano M. 2011. *In vitro* metabolism of nobiletin, a polymethoxy-flavonoid, by human liver microsomes and cytochrome P450. *Xenobiotica*, **41**(11): 927-933.
- 19) Guengerich FP. 1997. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chemico-Biological Interactions*, **106**: 161-182.
- 20) Pelkonen O, Raunio H. 1997. Metabolic activation of toxins: tissue- specific expression and metabolism in target organs. *Environmental Health Perspectives*, **105** (suppl 4): 767-774.
- 21) Ding X, Kaminsky LS. 2003. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annual Review of Pharmacological Toxicology*, **43**: 149-173.
- 22) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**(1): 265-275
- 23) Manthey JA, Cesar TB, Jackson E, Mertens-Talcott S. 2011. Pharmacokinetic study of nobiletin and tangeretin in rat serum by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization- mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(1): 145-151.
- 24) Yasuda T, Yoshimura Y, Yabuki H, Nakazawa T, Ohsawa K, Mimaki Y, Sashida Y. 2003. Urinary metabolites of nobiletin orally administered to rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **51**: 1426-1428.