

レスベラトロールメチル誘導体のラット肝ミクロゾームによる代謝および代謝物の抗酸化活性

太田千穂 山本健太 徳富美沙紀 古賀信幸

Metabolism of Methylated Resveratrols by Rat Liver Microsomes and Anti-Oxidative Activity of their Metabolites.

Chiho Ohta Kenta Yamamoto Misaki Tokutomi Nobuyuki Koga

(2019年11月27日受理)

はじめに

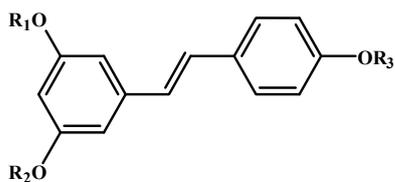
Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxy-*trans*-stilbene) (Fig. 1) は、スチルベン骨格に3つの水酸基が置換されたポリフェノール化合物の一種であり、ぶどう果実、赤ワイン、ピーナッツの薄皮、りんごやベリー類などに広く分布している¹⁾。1990年代、ワインの飲酒量と心疾患の罹患率との疫学研究から、「フレンチ・パラドックス」という用語が生まれたが²⁾、その関連因子として赤ワインから resveratrol が報告され³⁾、一躍世界中から注目されることになった。その後、多くの研究者により resveratrol が、抗酸化作用、抗炎症作用、心臓保護作用、抗がん作用など様々な生理活性を有することが明らかにされている¹⁾。さらに、2006年には、マウスを用いた実験より、寿命延長作用があることが報告され⁴⁾、老化防止の可能性からより一層注目を集めるに至っている。

一方、resveratrol のメチル誘導体あるいはメトキシスチルベン類として、resveratrol の3つの水酸基のうち、1～3個をメトキシ基で置換した3-methoxy-5,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene (pinostilbene)、3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-*trans*-stilbene (pterostilbene) および3,5,4'-trimethoxy-*trans*-stilbene (TMS) の生理作用について検討され、多くの研究成果が報告されている。例えば、resveratrol と同様に、抗がん作用^{5,6)}、抗炎症作用⁶⁾、抗酸化作用⁶⁾、心臓保護作用¹⁾、細胞増殖阻害作用⁷⁻⁹⁾、腫瘍形成阻害作用⁹⁾、細胞周期停止の誘導作用¹⁰⁾、血管新生抑制作用¹⁰⁾、アポトーシスの誘導作用^{10,11)}、LDL-コレステロール低下作用^{12,13)}、血糖降下作用¹²⁾ および抗真菌増殖作用¹⁴⁾ などが報告されている。また、抗がん作用^{5,6)}、抗炎症作用⁶⁾、抗酸化作用⁶⁾ をは

じめ、いくつかの作用については、メチル誘導体である pterostilbene や TMS の方が resveratrol よりも強いことが明らかとなっている。

一般に、ポリフェノール化合物の場合、水酸基がメトキシ基になると、脂溶性が高くなることから、小腸からの吸収も、増加すると考えられる。実際、ラット経口による resveratrol のバイオアベイラビリティが約30%であるのに対して、pterostilbene は80%と高いことが報告されている¹⁾。また、血中の滞留時間をみると、pterostilbene や TMS の場合、resveratrol より、排出半減期が長く、クリアランスが低いことが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。

前述の生理活性が、親化合物自身によるのか、あるいは代謝物によるのかは興味ある問題であるが、resveratrol とそのメチル誘導体の代謝については報告があまり多くない。これらの代謝様式は、その化学構造から、1) ベンゼン環の水酸化反応、2) メチル誘導体の場合、酸化的脱メチル化反応、3) 水酸基がある場合、抱合反応、が起こると考えられる。Resveratrol の代謝では、ヒト、ラットおよびマウス肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を調べ、チトクロム P450 (CYP) による代謝物、すなわち水酸化体は検出されないこと^{18,19)}、あるいは、ヒト肝 Ms により、3'位水酸化体とスチルベン骨格の中央にある二重結合への水酸化体の生成²⁰⁾、が報告された。また、ラットとマウスを用いた *in vivo* 代謝では、ラット尿中およびマウス血清から主にグルクロン酸や硫酸の抱合体が検出されることが報告された¹⁸⁾。一方、メチル誘導体 pterostilbene のラットを用いた *in vivo* 代謝でも、血清および尿中からグルクロン酸抱合体が生成されることが明らかにされている⁶⁾。しかし、TMS の代謝研究はほとんどない。そこで、本研究では、



Compound	R ₁	R ₂	R ₃
Resveratrol	H	H	H
Pinostilbene	CH ₃	H	H
Pterostilbene	CH ₃	CH ₃	H
Trimethoxystilbene (TMS)	CH ₃	CH ₃	CH ₃

Fig. 1 Chemical structures of stilbene analogues

resveratrolのメチル誘導体であり、またメトキシスチルベン類であるTMSとpterostilbeneにつき、ラット肝Msによる*in vitro*代謝を調べた。また、代謝に関与するCYP分子種を推定するために、CYP誘導剤であるphenobarbital (PB)、3-methylcholanthrene (MC) およびdexamethasone (DEX) を前処理したラット肝Msでも同様に調べた。さらに、それらの代謝物の抗酸化活性、すなわちDPPHラジカル消去活性を調べ、比較した。

実験方法

1. 試薬

Resveratrol および pterostilbene はフナコシ (株) より、また pinostilbene は東京化成工業 (株) より購入した。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)、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) および CYP 誘導剤である PB (Na 塩)、MC および DEX は、和光純薬 (株) より購入した。さらに、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox®) は EMD Biosciences (ドイツ) より、2-morpholinethanesulphonic acid (MES) は、同人化学研究所より購入した。有機溶媒などのその他の試薬は入手可能な限り高純度の市販製品を用いた。

2. TMS の合成

TMS は、resveratrol をメチル化して合成した。すなわち、resveratrol 1.0 g を、ジメチル硫酸 12.8 mL、炭酸カリウム 36.8 g およびアセトン 200 mL とともに 500 mL ナス型フラスコに入れ、さらに、還流冷却器を付した後、40℃で24時間反応させた。得られた反応液は、中和後、酢酸エチルで抽出して、無水硫酸ナトリウムで脱水した。酢酸エチル層は濃縮乾固後、*n*-ヘキサンに溶解し Bond Elute (Si, 10 g, 60 mL, Agilent

Technologies 製) に付した。まず、*n*-ヘキサンで、次に *n*-ヘキサン：酢酸エチル (1:1, v/v) で溶出した。TMS 溶出画分を高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) にて確認後、TMS 画分はさらに分取用高速液体クロマトグラフ (HPLC) で精製した。その分析条件は、以下の通りである。分析機器、LC-10AT (島津製)；カラム、Inertsil ODS-HL (250 × 10 mm i.d., 5 μm 粒径、GL Sciences 製)；移動相、60% アセトニトリル-0.1% ギ酸；流速、5.0 mL/min；検出波長、305 nm。

3. ラット肝 Ms の調製

Wistar 系雄性ラット (体重約 200 g) は、九動 (株) より、16匹購入した。1群4匹として、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。また、CYP 誘導剤前処理は、既報²¹⁾ に準じて、すなわち PB (80 mg/kg/day)、MC (20 mg/kg/day)、DEX (100 mg/kg/day) をそれぞれ3日間連日腹腔内に投与した。最終投与日の翌日に屠殺し、直ちに肝臓を摘出後、常法により肝 Ms を調製した。なお、本研究は中村学園大学の実験動物委員会の承認を得た後、「中村学園大学における動物実験のための指針」に従い、実施した。

4. ラット肝 Ms による *in vitro* 代謝

TMS あるいは pterostilbene のラット肝 Ms による代謝は、既報²¹⁾ に準じて行った。すなわち、0.2 mM TMS あるいは pterostilbene を 6 mM MgCl₂、100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4)、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP、5 mM G-6-P、G-6-PD 1.0 unit) およびラット肝 Ms (1 mg protein) とともに合計 1 mL として、37℃で20分間インキュベートした。その後、冷メタノール 3 mL 添加にて反応を停止した。氷中に30分間放置した後、遠心分離 (700 × *g*, 10 min) を行い、得られた上清の一部を、HPLC および LC-MS に付した。代謝物の定量は、TMS あるいは pterostilbene の検量線を用いて行った。なお、HPLC の分析条件は次の通りである。分析機器、LC-10AT (島津製)；カラム、Mightysil RP-18 (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm 粒径、関東化学製)；移動相、A液0.1% ギ酸、B液100% アセトニトリル、B液 30-60% (7 min) - 60% (8 min) - 100% (10 min)；流速、1.0 mL/min；検出波長、305 nm。また、LC-MS の分析条件は次の通りである。分析機器、LCMS-8030 (島津製)；カラム、Shim-pack XR-ODS II (150 × 2 mm i.d., 2.2 μm 粒径、Shimadzu GLC 製)；カラム温度、40℃；移動相、A液0.1% ギ酸、B液100% アセトニトリル、B液 20-60% (5 min) - 60% (4 min) - 100% (5 min)；流速、0.2 mL/min。MS 条件、イオン化モード、ESI 化 (ポジティブ) モード；インターフェイス電

圧、4.5 kV；DL 温度、300℃；ブロックヒーター温度、500℃；ネブライザーガス流量、3.0 L/min；ドライインゲガス流量、15.0 L/min；スキャン範囲、 m/z 100～500。

5. TMS 代謝物および resveratrol 関連化合物の DPPH ラジカル消去活性

DPPH ラジカル消去活性は、Oki らの方法²²⁾ に準じて測定した。すなわち、適宜希釈した代謝反応液（75% メタノール溶液）および 0.2 mM resveratrol 関連化合物（TMS、pterostilbene、pinostilbene、resveratrol）100 μ L を、200 mM MES 緩衝液（pH 6.0）および 0.8 mM DPPH ラジカル溶液とともに 96 穴マイクロプレートに分注し、合計 200 μ L として、室温で 20 分間反応後、マイクロプレートリーダー（Model 3550、Bio Rad 製）で 520 nm の吸光度を測定した。

6. その他

ラット肝 Ms のタンパク定量は、Lowry 法²³⁾ の方法に従って行った。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。また、統計処理は、Student's t-test にて $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

実験結果

1. TMS の合成

TMS は resveratrol をジメチル硫酸と反応し、メチル化することにより合成した。Fig. 2 には resveratrol から TMS が合成されるまでの 6 時間の経時的変化を示した。各反応時間に反応液を 10 μ L 採取し、その一部を LC-MS に付した。Resveratrol (m/z 229) から pinostilbene (m/z 243)、pterostilbene (m/z 257) を経て、約 5 時間後には、resveratrol のほとんどが TMS (m/z 271) に変換された。最終的に、TMS の白色結

晶 890 mg（純度 99.5% by HPLC）が得られた。

2. ラット肝 Ms による代謝

TMS あるいは pterostilbene をラット肝 Ms とともに NADPH 生成系の存在下、好氣的に 37℃ で 20 分間反応させた。また、代謝に関与する CYP 分子種を明らかにするため、3 種類の代表的な CYP 誘導剤で前処理したラット肝 Ms を用いた。

まず、TMS 代謝物の HPLC クロマトグラムを Fig. 3 に示す。未処理 Ms では、TMS は保持時間 21.65 min に検出されたが、これ以外に代謝物と思われるピークが 3 種類検出された。次に、PB 前処理 Ms および DEX 前処理 Ms では未処理 Ms と同様な代謝物が 2～3 種類検出された。一方、MC 前処理 Ms では、新たに 4 種類が検出され合計 7 種類もの代謝物ピークが検出された。これらの代謝物はいずれも TMS より早く溶出されたが、TMS に近いピークから保持時間が早い方へと、M1（保持時間 16.48 min）、M2（15.75 min）、M3（15.44 min）、M4（13.43 min）、M5（13.15 min）、M6（11.52 min）および M7（10.97 min）と命名した。

次に、TMS の検量線を用いて各代謝物を定量した（Fig. 4）。まず、未処理 Ms では 3 種類の代謝物（M2、M4、M6）が検出されたが、このうち、M2 が主代謝物であり、その生成活性は 0.86 nmol/min/mg protein であった。また、微量代謝物として M6 と M4 が検出され、それぞれ 0.06 と 0.02 nmol/min/mg protein であった。次に、PB および DEX 前処理 Ms では、代謝パターンは未処理とよく似ていたが、いずれも未処理 Ms より低い値であった。MC 前処理 Ms では、M1 が最も多く生成された（2.23 nmol/min/mg protein）。次いで、M4（1.26 nmol/min/mg protein）と M3（0.95 nmol/min/mg protein）、未処理 Ms で主代謝物であった M2（0.95 nmol/min/mg protein）も比較的多く検出された。さらに、M6、M5、M7 が検出された。

一方、TMS と全く同様に、pterostilbene のラット肝

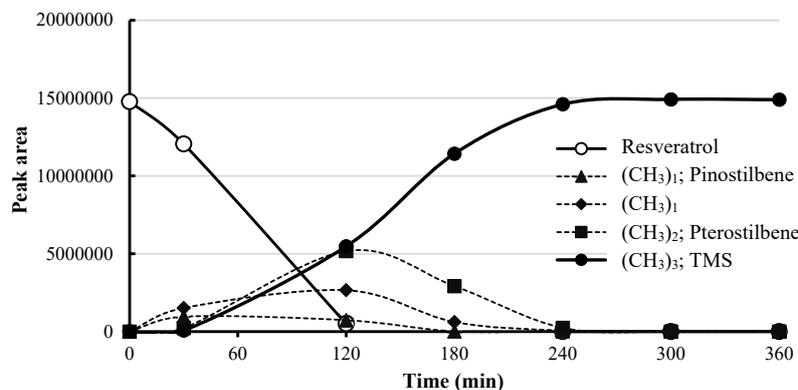


Fig. 2 Synthesis of TMS from resveratrol by methylation using dimethyl sulfate

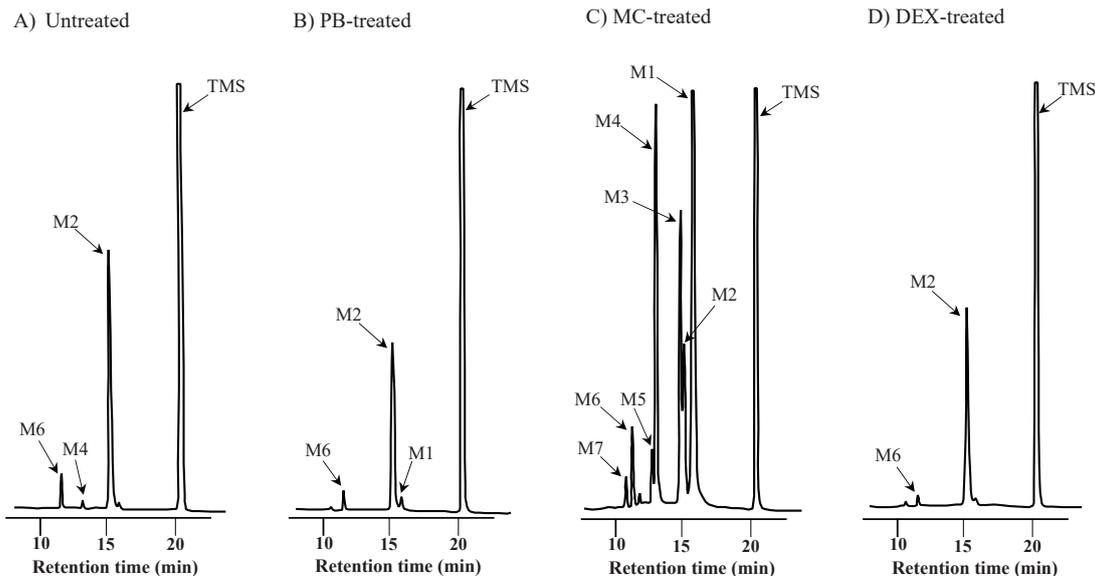


Fig. 3 HPLC chromatograms of TMS and its metabolites formed by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B), MC-treated (C) and DEX-treated (D) rats

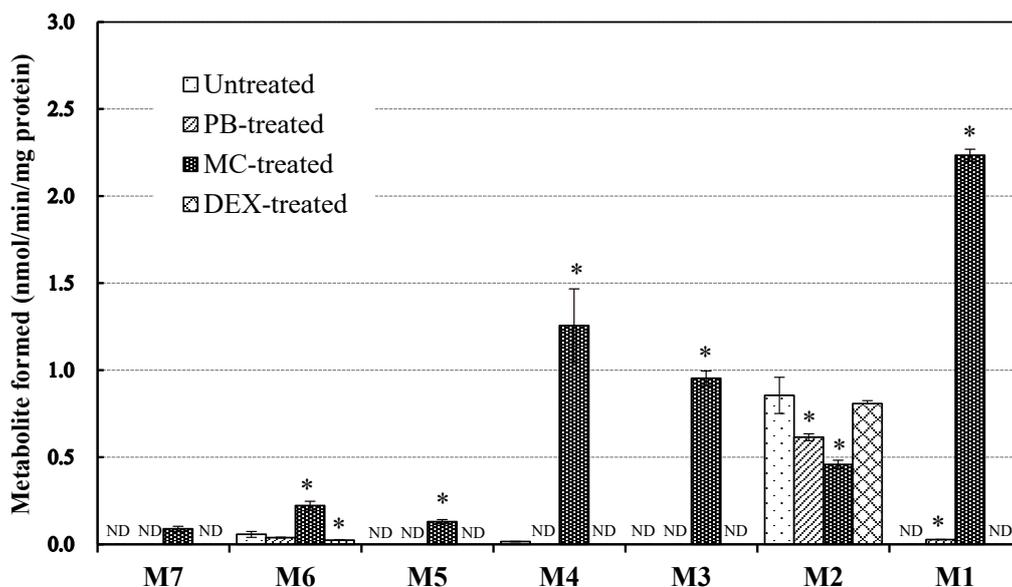


Fig. 4 Effect of CYP inducers on TMS metabolism by rat liver microsomes.

Each bar represents mean \pm S.D. of four rats.

*Significantly different from untreated rats, $p < 0.05$. ND, not detected.

Msによる代謝を調べた。Fig. 5に、代謝物の定量結果を示した。なお、定量は pterostilbene の検量線を用いて行った。Pterostilbene は保持時間15.75 minに検出され、TMS代謝物のうちM2と完全に一致した。未処理Msでは、2種類代謝物ピークが保持時間13.43 minと11.52 minに検出されたが、これらの保持時間はそれぞれTMS代謝物のM4およびM6と一致していた。それらの生成活性は、それぞれ0.11および0.07 nmol/min/mg proteinであった。次に、PBおよびDEX前処理Ms

では、代謝パターンは未処理と全く同じであったが、いずれも未処理Msより低い値であった。MC前処理Msでは、保持時間11.02 minと13.43 minの2種類の代謝物が多く生成されたが、それらはそれぞれTMS代謝物のM7およびM4と保持時間がほぼ一致した。M7とM4の生成活性は2.79と1.49 nmol/min/mg proteinであった。

3. 代謝物の化学構造

TMS代謝物の分子量を調べるために、代謝反応液

をLC-MSにて分析した。代謝反応液は、TMSおよびpterostilbeneのMC前処理のものを用いた。Table 1にTMSとその代謝物の結果を示した。なお、TMS代謝物のLC-MS溶出パターンはFig. 3のHPLC溶出パターンと同様であった。TMSは、保持時間12.86 minに、 m/z 271 [M+H]⁺が検出された。次に、未処理Msで主代謝物のM2は m/z 257 [M+H-14]⁺であることから一脱メチル化体と推定した。そこで、標準品のpterostilbeneと比較したところ、保持時間(10.51 min)および分子イオン(m/z 257)が完全に一致した。以上の結果から、M2はpterostilbeneであることが明らかとなった。また、未処理Msで検出されたM4およびM6は m/z 273 [M+H+2]⁺および m/z 259 [M+H-12]⁺であったことから、それぞれ一脱メチル化・一水酸化体および二脱メチル化・一水酸化体であると推定された。

一方、MC前処理Msで新たに生成された3種類のうち、M1とM3は、いずれも m/z 287 [M+H+16]⁺であることから、TMSの一水酸化体であると推定された。

なお、M7については、pterostilbeneのMC前処理代謝反応液を調べたところ、 m/z 273 [M+H+16]⁺であったことから、pterostilbeneの一水酸化体であると推定された。この結果から、M7はTMS代謝物の一脱メチル化・一水酸化体であると推定された。なお、M5は今回、分子イオンを検出できなかった。また、標準品pinostilbene(保持時間7.94 min)の分子イオン(m/z 243)および標準品resveratrol(保持時間6.08 min)の分子イオン(m/z 229)と一致するピークもTMS代謝において全く検出されなかった。

4. TMS代謝物およびresveratrol関連化合物のDPPHラジカル消去活性

TMS代謝反応液および0.2 mM resveratrol関連化合物のDPPHラジカル消去活性を比較した。なお、DPPHラジカル消去活性は、標準物質としてTroloxを用いて、その検量線から $\mu\text{mol-TE}$ (Trolox equivalent)/Lを算出した。その結果をFig. 6に示す。まず、未処理Msの代謝反応液の活性は、20 $\mu\text{mol-TE/L}$ であった。ま

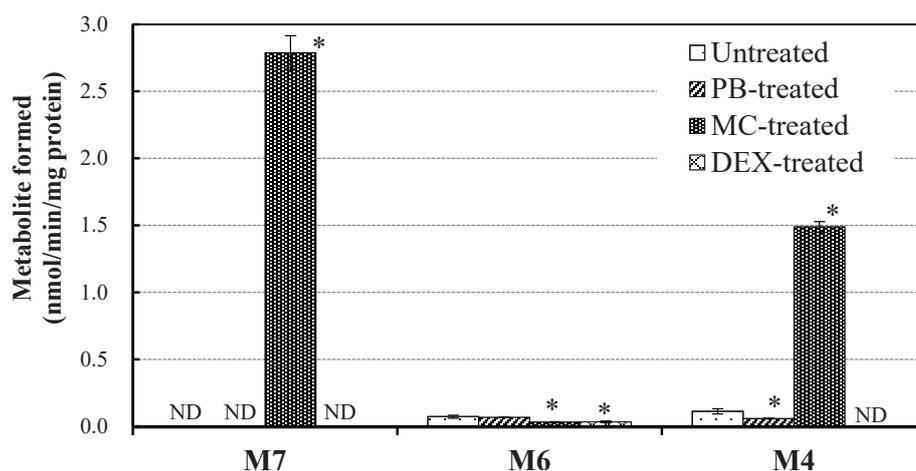


Fig. 5 Effect of CYP inducers on pterostilbene metabolism by rat liver microsomes.

Each bar represents mean \pm S.D. of four rats.

*Significantly different from untreated rats, $p < 0.05$.

ND, not detected.

Table 1 LC-MS data of TMS and its metabolites formed by rat liver microsomes

Metabolite	Retention time (min)	Molecular weight (m/z)	Metabolic pattern
M7	7.43	273 [M+H+2] ⁺	Mono-hydroxylation and mono-demethylation
M6	7.82	259 [M+H-12] ⁺	Mono-hydroxylation and di-demethylation
M5	N.D.	N.D.	Unknown
M4	8.83	273 [M+H+2] ⁺	Mono-hydroxylation and mono-demethylation
M3	10.47	287 [M+H+16] ⁺	Mono-hydroxylation
M2	10.51	257 [M+H-14] ⁺	Mono-demethylation (= pterostilbene)
M1	11.23	287 [M+H+16] ⁺	Mono-hydroxylation
TMS	12.86	271 [M+H] ⁺	

N.D., not detected.

た、PB および DEX 前処理 Ms の代謝反応液の活性は、それぞれ20および19 $\mu\text{mol-TE/L}$ であり、未処理 Ms と差はなかった。MC 前処理 Ms の代謝反応液の場合、58 $\mu\text{mol-TE/L}$ であり、代謝反応液の中で最も高く、未処理 Ms の約3倍を示した。一方、標準物質として4種類の resveratrol 関連化合物について、代謝に用いた基質濃度0.2 mMの活性を調べたところ、TMSで0.5 $\mu\text{mol-TE/L}$ であり、ほとんど DPPH ラジカル消去活性を示さなかった。他の化合物では、resveratrol が106 $\mu\text{mol-TE/L}$ で最も高く、次に pterostilbene (80 $\mu\text{mol-TE/L}$)、pinostilbene (74 $\mu\text{mol-TE/L}$) の順であった。

考 察

ラット肝 Ms による TMS および pterostilbene 代謝を調べた。また、その代謝に及ぼす CYP 分子種を明らかにするために代表的な CYP 誘導剤前処理の効果も調べた。さらに、代謝によって生成された代謝反応液の DPPH ラジカル消去活性についても検討した。

今回、TMS 代謝において、7種類 (M1~M7) の代謝物ピークが検出された。未処理 Ms において、M2が主代謝物であり、LC-MSの結果、4'位の脱メチル化体である pterostilbene であることが明らかになった。PB前処理 Ms および DEX 前処理 Ms では、未処理 Ms と類似した代謝パターンを示したが、両 Ms での M2の生成量は未処理 Ms より減少していた。CYP 誘導剤の PB および DEX は、ラット肝において、それぞれ CYP2B 酵素

および CYP3A 酵素の強い誘導剤であることから²⁴⁾、この結果は少なくとも4'位の脱メチル化は CYP2B あるいは CYP3A 酵素が関与していないことを示唆している。恐らく、構成的 CYP である CYP2C 酵素²⁴⁾ がこの反応を触媒しているものと考えられる。また、微量代謝物として、M6および M4が生成されたが、それぞれ二脱メチル化・一水酸化体および一脱メチル化・一水酸化体であった。これらの事実は、M2から M4を経由して M6が生成されていることを示唆している。すなわち、3回連続的に酸化反応が起こっていることを意味している。

MC 前処理ラットにおいて、TMS の代謝パターンは激変した。未処理 Ms で主代謝物の M2は半減し、しかも、新たに M1、M3および M4が激増した。他の代謝物 M6、M7および M5も少ないながら、MC 前処理で増加した。LC-MSの結果、M1と M3はいずれも TMS の一水酸化体であった。この事実は、水酸化された位置が、両者で異なることを示している。これまでに、植物から resveratrol の2'位および3'位の水酸化体は見つかっているが²⁵⁾、代謝物としては3'位およびスチルベン骨格中央の二重結合の水酸化体が報告されている²⁰⁾。さらに、M7は、pterostilbene (M2) の一水酸化体であることが判明した。ラット肝における TMS の推定代謝経路を Fig. 7 に示した。なお、MC 前処理により、ラット肝では CYP1A 酵素 (CYP1A1、CYP1A2) および CYP1B1が強く誘導される²⁴⁾。今回、M1、M3および M7は MC 前処理で顕著に増加したことを考えると TMS と pterostilbene の両端あるいはそれに近い部分、すな

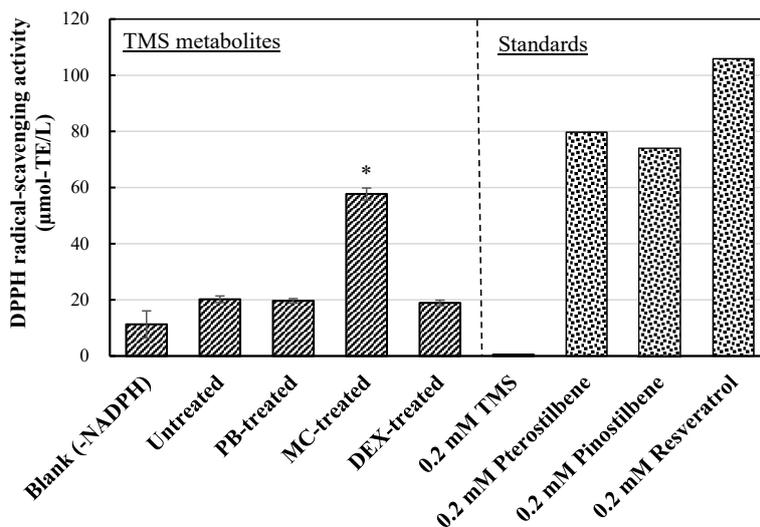


Fig. 6 DPPH radical-scavenging activity of TMS metabolites obtained from untreated and CYP inducer-treated Ms and of standards of stilbene analogs

Each bar represents mean \pm S.D. of four rats.

Standards of stilbene analogs represent mean of triplicate determination.

*Significantly different from untreated rats, $p < 0.05$.

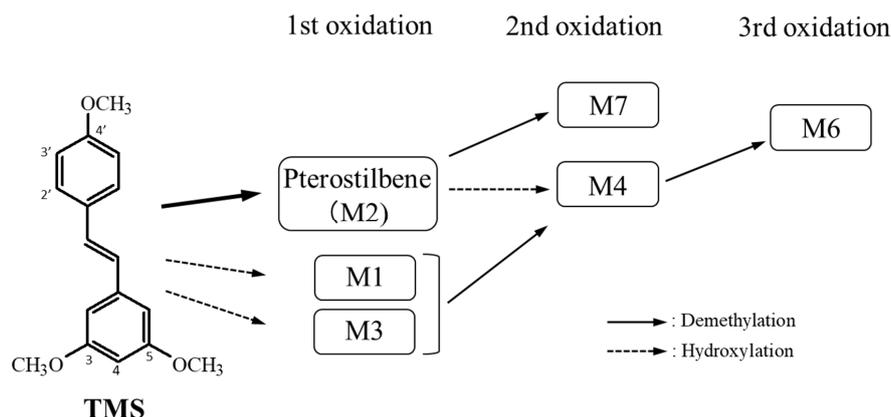


Fig. 7 Postulated metabolic pathways of TMS in rat liver.

わち3'位および4位が水酸化されているのではと思われる。どのCYP分子種がどの反応を触媒しているか現在不明であるが、この点は、今後の課題である。また、TMSを含むメトキシスチルベン化合物がCYP1A2に対し阻害作用を有していることが報告されている²⁶⁾。しかしながら、本研究ではMC前処理により、多くの代謝物が増加しており、明確な阻害作用は観察されなかった。

一方、TMS代謝物の抗酸化活性について調べたところ、MC前処理Msの代謝反応液で高いDPPHラジカル消去活性を観察した。これまでにresveratrolとともにpinostilbeneやpterostilbeneが強い抗酸化活性を有するとの報告がされており²⁷⁾、今回の結果はこれを支持していた。また、親化合物のTMSが、ほとんどDPPHラジカル消去活性を示さなかったことから、本活性を示すには少なくとも1つの水酸基が必要であることが示唆された。これらのことから、今回MC前処理代謝反応液で見られた高いDPPHラジカル消去活性にはpterostilbeneだけではなく、MC前処理で増加する一水酸化体のM1とM3、さらには一水酸化・一脱メチル化体のM4が大きく関与している可能性が示唆された。また、前述のようにresveratrolとそのメチル誘導体は多くの生理活性を有することが報告されているが、今後は代謝物の生理活性を明らかにすることが重要であろう。

総括

1. ラット肝Msによる3,5,4'-trimethoxy-*trans*-stilbene (TMS) および3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-*trans*-stilbene (pterostilbene) の代謝を調べた。また、その代謝によって生成された代謝反応液の抗酸化活性(DPPHラジカル消去活性)を調べた。
2. 未処理MsおよびPB前処理Msでは3種類、DEX前処理Msでは2種類、MC前処理Msでは7種類の

代謝物が検出された。未処理Ms、PB前処理MsおよびDEX前処理Msでは、いずれも主代謝物は一脱メチル化体のM2(pterostilbeneと一致)であり、この生成活性は未処理Msで最も高かった。また、微量代謝物のM4は一脱メチル化・一水酸化体、M6は二脱メチル化・一水酸化体であった。MC前処理Msで新たに生成された主代謝物のM1およびM3はいずれも一水酸化体であった。さらに、M7はM4と同様に、一脱メチル化・一水酸化体であった。MC前処理により、M2の生成は未処理より半減したが、それ以外のすべての代謝物が顕著に増加した。

3. MC前処理Msより生成された代謝反応液が、最も高いDPPHラジカル消去活性を示した。このことから、M2(pterostilbene)に加え、MC前処理で新たに生成された代謝物(M1、M3、M4)がより強いDPPHラジカル消去活性を有することが示唆された。

以上の結果から、ラット肝において、TMSの代謝は主にpterostilbeneへの脱メチル化反応が主要な経路であること、また、MC前処理により、多くの水酸化反応が進行し代謝物が多岐にわたること、抗酸化活性はTMS自身より、水酸基を持つ代謝物においてより強いことが示唆された。

謝辞

本研究は厚生労働行政推進調査事業費補助金(食の安全確保推進研究事業、H30-食品-指定-005古賀信幸)の助成を受けたものである。ここに記して謝意を表します。また、TMS代謝物の分析および活性測定にご協力いただいた研究室の4年生(江上夏子、有安瑠美、緒方麻里、福井明日香)に感謝します。

文 献

- 1) Akinwumi BC, Bordun K-AM, Anderson HD. 2018. Biological activities of stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences* **19**(3). pii: E792. doi: 10.3390/ijms19030792.
- 2) Renaud S, de Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**(8808): 1523-1526.
- 3) Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition* **61**(3): 549-554.
- 4) Kaeberlein M, Rabinovitch PS. 2006. Medicine: grapes versus gluttony. *Nature* **444**(16): 280-281.
- 5) Nutakul W, Sobers HS, Qiu P, Dong P, Decker EA, McClements DJ, Xiao H. 2011. Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells: a side-by-side comparison. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(20): 10964-10970.
- 6) Remsberg CM, Yáñez JA, Ohgami Y, Vega-Villa KR, Rimando AM, Davies NM. 2008. Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytotherapy Research* **22**(2): 169-179.
- 7) Traversi G, Fiore M, Percario Z, Degrassi F, Cozzi R. 2017. The resveratrol analogue trimethoxystilbene inhibits cancer cell growth by inducing multipolar cell mitosis. *Molecular Carcinogenesis* **56**(3): 1117-1126.
- 8) Storniolo CE, Moreno JJ. 2019. Resveratrol analogs with antioxidant activity inhibit intestinal epithelial cancer Caco-2 cell growth by modulating arachidonic acid cascade. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**(3): 819-828.
- 9) Dias SJ, Li K, Rimando AM, Dhar S, Mizuno CS, Penman AD, Levenson AS. 2013. Trimethoxy-resveratrol and piceatannol administered orally suppress and inhibit tumor formation and growth in prostate cancer xenografts. *The Prostate* **73**(11): 1135-1146.
- 10) Aldawsari FS, Velázquez-Martínez CA. 2015. 3,4',5-trans-Trimethoxystilbene; a natural analogue of resveratrol with enhanced anticancer potency. *Investigational New Drugs* **33**(3): 775-786.
- 11) Weng CJ, Yang YT, Ho CT, Yen GC. 2009. Mechanisms of apoptotic effects induced by resveratrol, dibenzoylmethane, and their analogues on human lung carcinoma cell. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(12): 5235-5243.
- 12) Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, Yokoyama W. 2005. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(9): 3403-3407.
- 13) Aguirre L, Palacios-Ortega S, Fernández-Quintela A, Hijona E, Bujanda L, Portillo MP. 2019. Pterostilbene reduces liver steatosis and modifies hepatic fatty acid profile in obese rats. *Nutrients* **11**(5): pii: E961, doi: 10.3390/nu11050961.
- 14) Yang YT, Weng CJ, Ho CT, Yen GC. 2009. Resveratrol analog-3,5,4'-trimethoxy-trans-stilbene inhibits invasion of human lung adenocarcinoma cell by suppressing the MAPK pathway and decreasing matrix metalloproteinase-2 expression. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**(3): 407-416.
- 15) Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK. 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition* **32**(12): 1377-1382.
- 16) Lin HS, Yue BD, Ho PC. 2009. Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* **23**(12): 1308-1315.
- 17) Lin HS, Ho PC. 2009. A rapid HPLC method for the quantification of 3,5,4'-trimethoxy-trans-stilbene (TMS) in rat plasma and its application in pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* **49**(2): 387-392.
- 18) Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS, Hirschelman WH, Pezzuto JM, Mehta RG, van Breemen RB. 2002. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharmaceutical Research* **19**(12): 1907-1914.
- 19) Maier-Salamon A, Böhmendorfer M, Thalhammer T, Szekeres T, Jaeger W. 2011. Hepatic glucuronidation of resveratrol: interspecies comparison of enzyme kinetic profiles in human, mouse, rat, and dog. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **26**(4): 364-373.
- 20) Steenwyk RC, Tan B. 2010. In vitro evidence for the formation of reactive intermediates of resveratrol in human liver microsomes. *Xenobiotica* **40**(1): 62-71.
- 21) 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.
- 22) Oki T, Masuda M, Kobayashi M, Nishiba Y, Furuta S, Suda I, Sato T. 2002. Polymeric procyanidines as radical-scavenging components in red-hulled rice. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry* **50**(26): 7524-7529.
- 23) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**(1): 265-275.
- 24) Guengerich FP. 1997. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chemical-Biological Interactions* **106**: 161-182.
- 25) Passos CL, Ferreira C, Soares DC, Saraiva EM. Leishmanicidal effect of synthetic *trans*-resveratrol analogs. *PLoS One* **10**(10): e0141778. Doi: 10.1371.
- 26) Mikstacka R, Rimando AM, Szalaty K, Stasik K, Baer-Dubowska W. 2006. Effect of natural analogues of *trans*-resveratrol on cytochromes P450 1A2 and 2E1 catalytic activities. *Xenobiotica* **36**(4): 269-285.
- 27) Acharya JD, Ghaskadbi SS. 2013. Protective effects of pterostilbene against free radical mediated oxidative damage. *BMC Complementary and Alternative medicine* doi: 10.1186/1472-6882-13-238.