

# 植物成分 diosmetin および hesperetin の ラット肝ミクロゾームによる *in vitro* 代謝

太田 千穂<sup>1)</sup> 森岡 樹子<sup>2)</sup> 太田 英明<sup>1)</sup>  
加藤 善久<sup>3)</sup> 古賀 信幸<sup>1)</sup>

## *In vitro* Metabolism of Diosmetin and Hesperetin by Rat Liver Microsomes

Chiho Ohta<sup>1)</sup> Mikiko Matsuoka<sup>2)</sup> Hideaki Ohta<sup>1)</sup>  
Yoshihisa Kato<sup>3)</sup> Nobuyuki Koga<sup>1)</sup>

(2008年11月28日受理)

### はじめに

Diosmetin (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone) および hesperetin (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanone) は、植物成分の中の大きなグループの1つであるフラボノイド類に属しており、炭素骨格 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 構造からなる A 環, C 環および B 環のうち, C 環構造の違いより, それぞれフラボン類およびフラバノン類に分類されている (Fig. 1)。また, フラボノイド類には, 置換基の種類や数の違うものが数多く存在しており, 例えば, apigenin や genistein などのように水酸 (OH) 基のみが置換されたポリフェノール型, tangeretin や nobiletin などのように多くのメトキシ (MeO) 基が置換されたポリメトキシ型, さらに diosmetin や hesperetin などのように OH 基と MeO 基が両方とも置換された混合型に分類することができる。

Diosmetin は多様な植物に含まれているが, 一方, hesperetin は柑橘類のオレンジ (*Citrus sinensis* cv. Valencia), ダイダイ (*Citrus aurantium* L. var. *daidai*) およびナツミカン (*Citrus natsudaidai*) などの果皮や果実に含まれている<sup>1)</sup>。これらの大部分は diosmin や hesperidin などの配糖体として存在しているが, 経口的に摂取されると, 小腸の腸内細菌によって糖が加水分解され, それぞれアグリコンの diosmetin と hesperetin になると考えられる<sup>2,3)</sup>。

フラボノイド類は機能性成分として, 抗酸化作用, 抗炎症作用, 抗ガン作用<sup>4-7)</sup>などを有することが知られているが, このうち diosmetin については, 酸化ストレスによる細胞膜の障害から細胞を保

護したり<sup>8)</sup>, チトクロム P450 (P450) の1つである CYP1A1 活性に影響を及ぼす aryl hydrocarbon receptor のアゴニストとして働いたり<sup>9)</sup>, また発ガン物質の活性化に関与する CYP1A1 および CYP1B1 の活性を強く阻害したり<sup>10)</sup>, ヒト肝細胞において UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) を強く誘導したり<sup>11)</sup>, さらに, マクロファージにおける一酸化窒素 (NO) の生成を強く阻害したり<sup>12)</sup>, することが報告されている。一方, hesperetin についても, 血漿コレステロールを低下させたり<sup>13,14)</sup>, 抗アレルギー作用を示したり<sup>15,16)</sup>, 心疾患やアルツハイマー病などの病因の1つと考えられる過酸化亜硝酸 (ONOO-) のスカベンジャーとして働いたり<sup>17,18)</sup>, また, 最近では, 細胞増殖を阻害したり<sup>19)</sup>, 発ガン物質による酸化ストレスを軽減したり<sup>20)</sup>, ヒト臍静脈上皮細胞からの NO の遊離を促進したり<sup>21)</sup>, と多くの生理機能が報告されている。

ところで, フラボノイド類の代謝についても多くの研究が報告されている。ポリフェノール型の apigenin, naringenin および genistein の主な代謝経路は, B 環 3' 位の水酸化反応<sup>22-25)</sup> およびグルクロン酸あるいは硫酸の抱合反応<sup>26,27)</sup>である。一方,

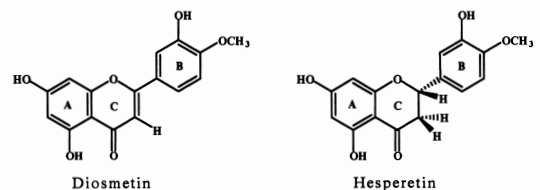


Fig.1 Chemical structures of diosmetin and hesperetin.

ポリメトキシ型の tangeretin や nobiletin では主として MeO 基の酸化的脱メチル化反応である<sup>22,25,28</sup>。混合型の diosmetin や hesperetin でもいくつか報告があり、動物肝マイクロゾームを用いた *in vitro* 代謝によると、4'-脱メチル化反応が主であり、それぞれ luteolin と eriodictyol へと代謝される<sup>22,29,30</sup>。また、Breinholtらはヒト肝 P450 の CYP1A2 が hesperetin に対し、高い 4'-脱メチル化活性を有することを報告している<sup>30</sup>。

そこで本研究では、基本骨格の違いによる代謝の違いを明らかにするため、置換基が全く同じフラボン類の diosmetin およびフラバノン類の hesperetin の代謝について、ラット肝マイクロゾームを用いて調べた。また、両化合物の代謝に関与する P450 分子種を特定するために、P450 誘導剤である phenobarbital (PB) および 3-methylcholanthrene (MC) 前処理によるそれぞれの代謝への影響、さらには P450 阻害剤による代謝阻害効果についても調べた。

## 実験方法

### 1. 試薬および動物肝マイクロゾームの調製

Diosmetin, hesperetin, luteolin および eriodictyol は Extrasynthèse (Genay, France) より購入した。PB (Na 塩), MC, glucose-6-phosphate (G-6-P) dehydrogenase および  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ NF) は和光純薬工業 (大阪) より、また、NADP<sup>+</sup> および G-6-P はオリエンタル酵母 (東京) より購入した。さらに、furaflavone (FFL) および ketoconazole (KCZ) は Ultrafine (Manchester, UK) より購入した。

実験動物の Wistar 系雄性ラット (5 週齢, 体重約 170 g) は九動 (株) (佐賀) より購入した。ラットは、1 群 4 匹として、未処理群, PB 前処理群および MC 前処理群の 3 群に分けた。PB は生理食塩水に溶解して 80 mg/kg/day の用量で、また、MC はコーン油に溶解して 20 mg/kg/day の用量で、3 日間連続して腹腔内に投与した。ラット肝マイクロゾームは、ラットを PB あるいは MC の最終投与日の翌日に屠殺した後、肝を摘出し、生理食塩水で灌流後、0.25 M sucrose - 0.1 mM EDTA - 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) でホモジナイズし、常法により調製した。

### 2. 代謝物の分析

ラット肝マイクロゾームによる diosmetin および hesperetin の代謝は既報<sup>28</sup> に準じて行った。す

なわち、0.28 mM diosmetin あるいは hesperetin (いずれも dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解) を、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-P dehydrogenase 1.0 unit), 6 mM MgCl<sub>2</sub> およびラット肝マイクロゾーム (2 mg protein) とともに 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で、合計 1 ml として、37°C で 20 min インキュベートした。その後、冷 methanol 3 ml 添加により反応を停止し、さらに氷中に 30 min 放置した。放置後、3,000 rpm で 15 min 遠心分離して、上清を HPLC に付した。Diosmetin 代謝物の定量は luteolin の検量線を、一方、hesperetin 代謝物の定量は eriodictyol の検量線を用いて行った。

HPLC の条件は次の通りである。高速液体クロマトグラフ, LC-6A (島津製作所); カラム, Mightysil RP-18 (4.6 × 250 mm i.d., 5  $\mu$ m 粒径, 関東化学); 移動相, acetonitrile (A 液), 0.1% formic acid (B 液), 30-60% acetonitrile; 流速, 1.0 ml/min; 検出波長, 340 nm (diosmetin の場合), 280 nm (hesperetin の場合)。

### 3. P450 阻害剤添加による代謝阻害

まず、ラット肝マイクロゾームと P450 阻害剤 (0.5 mM  $\alpha$ NF, 0.5 mM FFL あるいは 0.25 mM KCZ をいずれも DMSO 5  $\mu$ l に溶解) を 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で、MgCl<sub>2</sub> および NADPH 生成系とともに 37°C で 5 min プレインキュベート後、diosmetin または hesperetin を加え、合計 0.5 ml として 37°C で 20 min インキュベートを行った。反応後、冷 methanol 1.5 ml を添加し反応を停止した。以下、代謝物の分析は上記の通り行った。

### 4. その他

ラット肝マイクロゾームのタンパク量は、Lowry<sup>31</sup> の方法に従い定量した。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。

統計処理は、Students' t-test により危険率 5% 以下 ( $p < 0.05$ ) をもって有意差ありと判定した。

## 結 果

### 1. Diosmetin および hesperetin の代謝

Diosmetin あるいは hesperetin をラット肝マイクロゾームとともに、NADPH 存在下で好氣的に 37°C, 20 min インキュベートした。Fig. 2A には、未処理ラット肝マイクロゾームにより生成された diosmetin 代謝物の代表的な HPLC クロマトグラムを示す。未

変化体の diosmetin (保持時間 16.05 min) 以外に、代謝物と思われる 1 本のピークが保持時間 13.67 min に検出された。以下、これを DM1 とした。次に、予想代謝物として、diosmetin の B 環の 4' 位が脱メチル化した luteolin の標準品を HPLC に供したところ、13.67 min に溶出され、DM1 の保持時間と完全に一致した (データ未掲載)。この結果から、DM1 は luteolin であることが示唆された。

Fig. 2B には、未処理ラット肝ミクロゾームにより生成された hesperetin 代謝物の HPLC クロマトグラムを示す。未変化体の hesperetin (保持時間 16.38 min) 以外に、代謝物と思われる 4 本のピークが保持時間 13.92 min, 13.29 min, 12.77 min および 9.15 min に検出された。以下、これらをそれぞれ HM1, HM2, HM3 および HM4 とした。次に、hesperetin の B 環の 4' 位が脱メチル化した eriodictyol の標準品を HPLC に供したところ、HM1 の保持時間 13.92 min と完全に一致した (データ未掲載)。この結果から、主代謝物の HM1 は eriodictyol であることが示唆された。

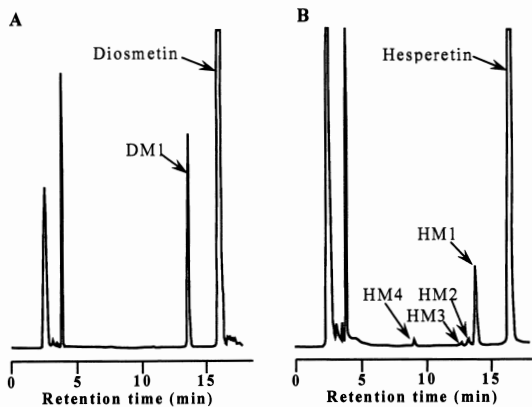


Fig.2 HPLC chromatograms of the metabolites of diosmetin (A) and hesperetin (B) formed by liver microsomes of untreated rats.

## 2. Diosmetin および hesperetin の代謝に及ぼす P450 誘導剤の影響

未処理ラットおよび PB あるいは MC を前処理したラットから調製した肝ミクロゾームを用いて diosmetin および hesperetin の代謝を調べ、代謝物の生成量を比較した。Diosmetin 代謝物の定量は、luteolin の検量線を用いて行った。Fig. 3A にその結果を示す。まず、未処理ミクロゾームの場合、前述のように DM1 (luteolin) が主代謝物であり、その活性は 0.47 nmol/min/mg protein であった。次に、PB 処理ミクロゾームの場合、未処理と同様に luteolin (DM1) のみが生成され、その生成量

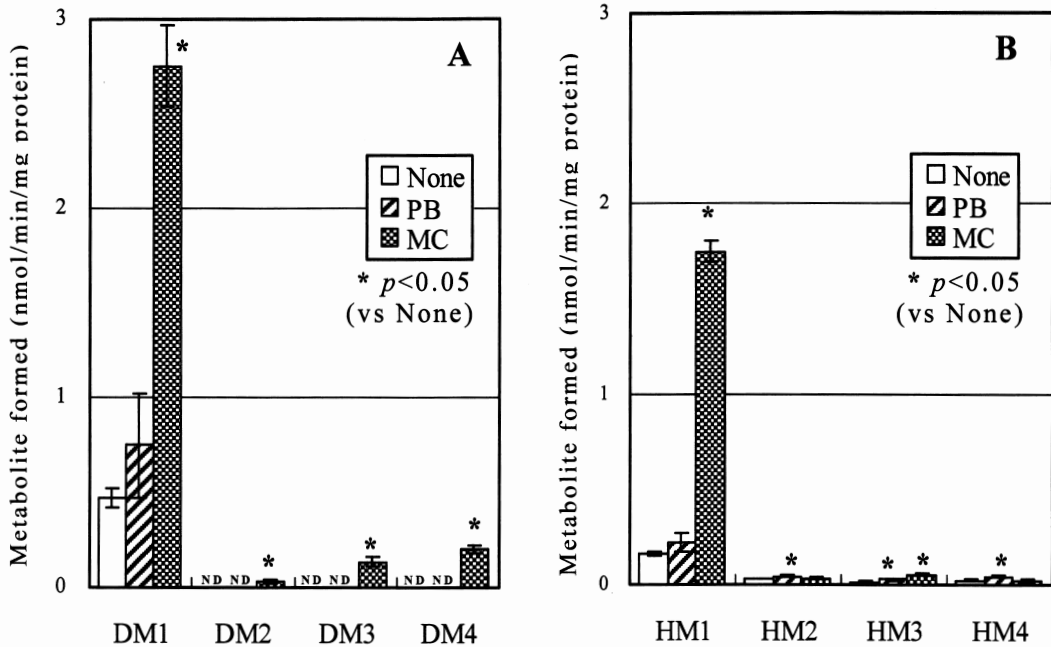
は未処理の 1.6 倍であった。一方、MC 処理ミクロゾームの場合には、luteolin (DM1) の生成は未処理の 5.9 倍に顕著に増加した。さらに、生成量は少ないものの新たに 3 種類の代謝物、すなわち DM2, DM3 および DM4 が、それぞれ保持時間 13.22 min, 12.66 min および 10.27 min に検出された。なお、新代謝物の生成量は DM1 の 1/14 以下であった (DM4>DM3>DM2)。以上の結果から、diosmetin 代謝には MC 誘導性の P450 分子種 (CYP1A1, CYP1A2) が強く関与していることが示唆された。

次に、hesperetin につき、同様に、代謝物の生成を調べた (Fig. 3B)。代謝物の定量は、eriodictyol の検量線を用いて行った。その結果、未処理ミクロゾームの場合、主代謝物 HM1 (eriodictyol) の生成は 0.16 nmol/min/mg protein であった。また、微量代謝物、すなわち HM2, HM3 および HM4 も検出され、それぞれ 0.03, 0.01 および 0.03 nmol/min/mg protein であった。PB 処理ミクロゾームの場合、eriodictyol (HM1) は未処理の 1.4 倍に増加したが有意ではなかった。ところが、微量代謝物 (HM2, HM3, HM4) は、それぞれ未処理の 1.3 倍, 2.8 倍および 1.8 倍といずれも有意に増加した。一方、MC 処理ミクロゾームでは、eriodictyol (HM1) は未処理の 10.9 倍に顕著に増加した。また、HM3 も 5.7 倍と有意に増加した。しかしながら、HM2 と HM4 については未処理と比べ、有意な変化はみられなかった。以上の結果から、hesperetin の場合、HM1 および HM3 の生成には MC 誘導性の CYP1A1 あるいは CYP1A2 の強い関与が示唆された。

## 5. P450 阻害剤による代謝阻害実験

Diosmetin と hesperetin の主代謝物である DM1 と HM1 の生成に関与する P450 分子種を明らかにするため、P450 阻害剤による代謝阻害を試みた。両フラボノイドともに MC 処理により、4'-脱メチル化反応が著しく促進されたことから、MC 誘導性の CYP1A1 および CYP1A2 に注目し、それぞれの特異的阻害剤として知られている  $\alpha$ NF<sup>32)</sup> および FFL<sup>32)</sup> の添加効果を調べた。また、4'-脱メチル化反応は PB 処理により、未処理の 1.5 倍前後に促進されたことから、CYP3A1/2<sup>33)</sup> に注目し、CYP3A の特異的阻害剤 KCZ<sup>32)</sup> の添加効果も調べた。なお、P450 の活性は DMSO の添加により、一部阻害されることが知られている<sup>34)</sup> ことから、コントロールとして、阻害剤の溶媒である DMSO 5  $\mu$ l を添加した時の活性を 100 とした。

Table 1 にその結果を示す。MC 処理ミクロゾー



**Fig. 3** Effects of P450 inducers on the metabolism of diosmetin (A) and hesperetin (B) by rat liver microsomes. ND, not detected. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of four rats. \* Significantly different from untreated rats,  $p < 0.05$ .

ムによる luteolin (DM1) および eriodictyol (HM1) の生成は、0.5 mM  $\alpha$ NF 添加でそれぞれコントロールの 45% および 18% まで阻害された。この結果から、両フラボノイド類の 4'-脱メチル化反応には主として CYP1A1 が関与していることが示唆された。また、0.5 mM FFL の添加により、eriodictyol (HM1) の生成が 84% まで有意に阻害されたことから、hesperetin 代謝への CYP1A2 の関与も示唆された。

一方、PB 処理マイクロゾームによる luteolin (DM1) および eriodictyol (HM1) の生成は、0.25 mM KCZ 添加でそれぞれコントロールの 32% および 31% まで阻害された。この結果から、両フラボノイド類の PB 処理マイクロゾームによる 4'-脱メチル化反応には CYP3A1/2 が強く関与していることが示唆された。

## 考 察

今回、基本骨格の違いがフラボノイド代謝にどのように影響を及ぼすかを明らかにするため、置換基が全く同じフラボン類の diosmetin およびフラバノン類の hesperetin につき、ラット肝マイクロゾームによる代謝を比較した。その結果、両フラボノ

イドともに、4' 位の酸化的脱メチル化反応が主であり、代謝物としてそれぞれ luteolin (DM1) および eriodictyol (HM1) が生成されることが明らかとなった。これらの結果は、Breinholt らの報告<sup>22,30)</sup> とよく一致していた。また、本研究では、luteolin と eriodictyol の生成が、MC 前処理で 6~11 倍に顕著に増加すること、また PB 前処理でも 1.5 倍前後に増加することが明らかとなった。これまでも、MC 誘導性の CYP1A1 あるいは CYP1A2 が B 環の 3'-水酸化反応や 4'-脱メチル化反応を触媒することは、apigenin<sup>30)</sup>、naringenin<sup>30)</sup>、genistein<sup>25)</sup>、tangeretin<sup>25)</sup> および nobiletin<sup>28)</sup> の代謝で報告されている。また、PB 誘導性の CYP3A 酵素に関しても、apigenin や naringenin の 3'-水酸化反応<sup>30)</sup> および tangeretin<sup>25)</sup> や nobiletin<sup>28)</sup> の 6-あるいは 7-脱メチル化反応をよく触媒することが知られている。本研究において、CYP1A1 の阻害剤  $\alpha$ NF および CYP3A 酵素の阻害剤 KCZ を添加し代謝活性を調べてみたところ、両フラボノイドの代謝はいずれも強く阻害された。以上の結果から、CYP1A1 および CYP3A1/2 は diosmetin および hesperetin 代謝に強く関与していることが示唆された。一方、Breinholt ら<sup>30)</sup> は、4 種類のヒト P450 による hesperetin の 4'-脱メチル化活性を調べ、その結果、CYP1A2

**Table 1** Effect of P450 inhibitors on the formation of luteolin and eriodictyol by rat liver microsomes

P450 inhibitor	Metabolite formation (nmol/min/mg protein)	
	Luteolin (DM1)	Eriodictyol (HM1)
<i>MC-treated microsomes</i>		
Control	3.11 ± 0.08 (100)	1.37 ± 0.05 (100)
$\alpha$ NF	1.40 ± 0.03* (45)	0.25 ± 0.02* (18)
FFL	3.01 ± 0.12 (97)	1.16 ± 0.04* (84)
<i>PB-treated microsomes</i>		
Control	0.87 ± 0.02 (100)	0.29 ± 0.01 (100)
KCZ	0.28 ± 0.03* (32)	0.09 ± 0.01* (31)

0.5 mM  $\alpha$ NF or 0.5 mM FFL was added to the incubation system containing liver microsomes of MC-treated rats. 0.25 mM KCZ was added to the incubation system containing liver microsomes of PB-treated rats. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate determinations and those in parentheses are the percentage of control (with DMSO only).

\* Significantly different from control,  $p < 0.05$ .

は高い触媒活性を有しているが、CYP3A4 は全く活性を示さなかった、と報告している。本研究では CYP1A2 の阻害剤 FFL の阻害効果を調べたが、hesperetin 代謝物の eriodictyol 生成のみ 16% が阻害された。この結果は、ラットでは CYP1A2 も hesperetin 代謝に一部関与することを示しており、彼らの結果を支持している。また、阻害剤を用いた検討結果から、ラットでは CYP1A2 より CYP1A1 の方がより重要であることが明らかになったが、残念ながら、Breinholt らはヒト CYP1A1 による検討を行っていない。さらに、阻害剤 KCZ を用いた結果から、ラット CYP3A1/2 の関与が明らかになったが、Breinholt らのヒト CYP3A4 の結果と異なった。これら結果は CYP3A 酵素の基質特異性がヒトとラットで大きく異なることを示しているのかもしれない。

本研究では、hesperetin の主代謝物 eriodictyol の生成量はすべての処理ミクロゾームで、diosmetin の主代謝物 luteolin の生成量の 30 ~ 64% と少なかった。このような生成量の違いは、diosmetin と hesperetin との C 環構造の違いに起因していると考えられる。すなわち、フラバノン類の hesperetin

は C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> 結合に二重結合がないため平面構造とならず、その結果、CYP1A や CYP3A 酵素の基質になりにくかったものと考えられる。また、diosmetin および hesperetin のいずれから、4'-脱メチル化体以外に微量代謝物が 3 種類検出された。現在のところ、これらの化学構造は不明であるが、HPLC の保持時間が 4'-脱メチル化体より速いことから、A 環あるいは B 環がさらに水酸化された代謝物と考えられる。今後、これら微量代謝物の化学構造についても検討する予定である。

Diosmetin および hesperetin の *in vivo* 代謝に関する研究もいくつか報告されている。Matsumoto らは hesperetin の 7 位配糖体である hesperidin をラットに経口投与し、投与後 18 時間の血漿中に hesperetin の 7-あるいは 3'-glucuronide を検出した<sup>3)</sup>。しかしながら、彼女らはアグリコンの hesperetin だけではなく、eriodictyol を全く検出なかった。また、ごく最近、Bretto ら<sup>27)</sup> はオレンジジュースあるいは果肉 (hesperidin 含有) を摂取したヒト血漿中および尿中の hesperidin 代謝物を分析したところ、アグリコンの hesperetin は検出されず、hesperetin の 7-および 3'-monoglucuronide, 2

種類の diglucuronide, さらには sulfo-glucuronide といった抱合体のみが存在することを報告した。さらに, Brandらは Caco-2 細胞を用いた系で hesperetin の代謝を調べ, hesperetin 7-glucuronide および 7-sulfate の生成を確認している<sup>35)</sup>。これらの結果は, 配糖体の diosmin や hesperidin の場合, 糖鎖が腸内細菌により切断されて, それぞれ diosmetin と hesperetin となった後, これらが小腸から吸収されると直ちに, グルクロン酸あるいは硫酸が抱合されてしまうことを示唆している。今回の *in vitro* 代謝の結果はこのような *in vivo* 代謝の結果と大きく異なっていることから, 実際には, 肝での代謝よりも小腸での代謝がより重要であるのかもしれない。今後, さらなる検討が必要である。

## 総 括

1. 置換基が全く同じであるフラボン類 diosmetin とフラバノン類 hesperetin につき, ラット肝ミクロゾームによる代謝を調べ比較した。両フラボノイドは未処理ミクロゾームにより, いずれも 1 種類の主代謝物へと代謝され, これは標品との比較により, 4' 位脱メチル化体の luteolin および eriodictyol であることが明らかとなった。なお, hesperetin 代謝では, 微量代謝物 3 種類も検出された。
2. P450 誘導剤の前処理の影響を調べたところ, MC 処理により, 主代謝物の luteolin および eriodictyol の生成がそれぞれ未処理の 5.9 倍および 10.9 倍まで顕著に促進された。一方, PB 処理の場合には, luteolin および eriodictyol の生成はともに未処理の 1.5 倍程度しか増加しなかった。なお, MC 処理により, diosmetin 代謝では, luteolin 以外に新たな 3 種類の微量代謝物が生成されたが, hesperetin 代謝では, 微量代謝物のうち HM3 が未処理の 5.7 倍に増加した。
3. Hesperetin の主代謝物 eriodictyol の生成量はすべてのミクロゾームで, diosmetin の主代謝物 luteolin の生成量の 30 ~ 64% と少なかった。この結果はフラバノン類が, フラボン類のように平面構造ではないため, CYP1A や CYP3A 酵素の基質になりにくいことを示している。
4. 特異的 P450 阻害剤による代謝阻害の結果, diosmetin 代謝における luteolin の生成には, CYP1A1 および CYP3A1/2 が, また, hesperetin

代謝における eriodictyol の生成には CYP1A1, CYP1A2 および CYP3A1/2 が関与していることが示唆された。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり, 両化合物の代謝物の分析にご協力いただきました井上秀一氏に感謝します。

## Abstract

*In vitro* metabolism of diosmetin (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone) and hesperetin (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanone) by rat liver microsomes was compared and effects of cytochrome P450 (P450) inducers, phenobarbital (PB) and 3-methylcholanthrene (MC), and P450 inhibitors,  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ NF), furafylline (FFL) and ketoconazole (KCZ), on their metabolism were also examined. In untreated microsomes, diosmetin and hesperetin were mainly oxidized to give 4'-demethylated metabolites, luteolin and eriodictyol, with the rates of 0.47 and 0.16 nmol/min/mg protein, respectively. PB-treatment showed a slight increase (about 1.5-fold of untreated rats) of both luteolin and eriodictyol, whereas MC-treatment increased luteolin and eriodictyol remarkably to 5.9-fold and 10.9-fold of untreated rats, respectively. 0.5 mM  $\alpha$  NF inhibited the formation of luteolin and eriodictyol to 45% and 18% of control, respectively. 0.25 mM KCZ showed about 70% inhibition of both metabolites. 0.5 mM FFL showed 16% inhibition only for the eriodictyol formation. From these results, it is suggested that CYP1A1 and CYP3A1/2 are the most important P450 isoforms in the metabolism of diosmetin and hesperetin in rat liver and that diosmetin having the planar structure is a better substrate than hesperetin for rat CYP1A and CYP3A enzymes.

## 文 献

- 1) Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H. 2006. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70(1): 178-192.
- 2) Cova D, De Angelis L, Giavarini F, Palladini G, Peregrino R. 1992. Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology* 30(1): 29-33.

- 3) Matsumono H, Ikoma Y, Sugiura M, Yano M, Hasegawa Y. 2004. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(21): 6653-6659.
- 4) Formica JV, Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* 33(12): 1061-1080.
- 5) Middleton EJR, 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.
- 6) Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96(2-3): 67-202.
- 7) 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.
- 8) Villa P, Cova D, De Francesco L, Guitani A, Palladini G, Perego R. 1992. Protective effect of diosmetin on *in vitro* cell membrane damage and oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicology* 73(2): 179-189.
- 9) Ciolino HP, Wang TT, Yeh GC. 1998. Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Research* 58(13): 2754-2760.
- 10) Doostdar H, Burke MD, Mayer RT. 2000. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* 144(1-3): 31-38.
- 11) Walle UK, Walle T. 2002. Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metabolism and Disposition* 30(5): 564-569.
- 12) Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I, Yoshikawa M. 2003. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11(9): 1995-2000.
- 13) Wilcox LJ, Borradaile NM, Dreu LE, Huff MW. 2001. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *Journal of Lipid Research* 42: 725-734.
- 14) Morin B, Nichols LA, Zalasky KM, Davis JW, Manthey JA, Holland LJ. 2008. The citrus flavonoids hesperetin and nobiletin differentially regulate low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 liver cells. *Journal of Nutrition* 138(7): 1274-1281.
- 15) Lee NK, Choi SH, Park SH, Park EK, Kim DH. 2004. Antiallergic activity of hesperidin is activated by intestinal microflora. *Pharmacology* 71(4): 174-80.
- 16) Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S. 2005. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Research* 25(5): 3367-3374.
- 17) Kim JY, Jung KJ, Choi JS and Chung HY. 2004. Hesperetin: a potent antioxidant against peroxynitrite. *Free Radical Research* 38(7): 761-769.
- 18) Pollard SE, Whiteman M, Spencer JP. 2006. Modulation of peroxynitrite-induced fibroblast injury by hesperetin: a role for intracellular scavenging and modulation of ERK signaling. *Biochemical Biophysical Research Communications* 347(4): 916-923.
- 19) Jin YR, Han XH, Zhang YH, Lee JJ, Lim Y, Kim TJ, Yoo HS, Yun YP. 2008. Hesperetin, a bioflavonoid, inhibits rat aortic vascular smooth muscle cells proliferation by arresting cell cycle. *Journal of Cell Biochemistry* 104(1): 1-14.
- 20) Choi EJ. 2008. Antioxidative effects of hesperetin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced oxidative stress in mice. *Life Science* 82(21-22): 1059-1064.
- 21) Liu L, Xu DM, Cheng YY. 2008. Distinct effects of naringenin and hesperetin on nitric oxide production from endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3): 824-829.
- 22) 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.
- 23) 太田千穂, 松尾美樹, 黍岡樹子, 太田英明, 古賀信幸. 2008. 植物成分 apigenin の動物肝ミクロゾームによる代謝. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要 40: 173-179.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) Gradolatto A, Canivenc-Lavier MC, Basly JP, Siess MH, Teyssier C. 2004. Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. *Drug Metabolism and Disposition* 32(1): 58-65.

- 27) Brett GM, Hollands W, Needs PW, Teucher B, R Dainty J, Davis BD, Brodbelt JS, Kroon PA. 2008. Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. *British Journal of Nutrition* 19: 1-12.
- 28) 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.
- 29) Boutin JA, Meunier F, Lambert PH, Hennig P, Bertin D, Serkiz B, Volland JP. 1993. In vivo and in vitro glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats. *Drug Metabolism and Disposition* 21(6): 1157-1166.
- 30) 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.
- 31) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.
- 32) U.S. Food and Drug Administration. 2006. Drug interaction studies-study design, data analysis, and implications for dosing and labeling (Draft Guidance).
- 33) Kim H, Putt DA, Zangar RC, Wolf CR, Guengerich FP, Edwards RJ, Hollenberg PF, Novak RF. 2001. Differential induction of rat hepatic cytochromes P450 3A1, 3A2, 2B1, 2B2, and 2E1 in response to pyridine treatment. *Drug Metabolism and Disposition* 29(3): 353-360.
- 34) Busby WF, Ackermann JM, Crespi CL. 1999. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition* 27(2): 246-249.
- 35) Brand W, van der Wel PA, Rein MJ, Barron D, Williamson G, van Bladeren PJ, Rietjens IM. 2008. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metabolism and Disposition* 36(9): 1794-1802.