柑橘果皮およびオーラプテン濃縮物がラット血清成分 および組織脂肪酸組成に及ぼす影響

赤星亜朱香[§], 金田尚子, 下田亜沙子, 西村和子, 南 美幸, 工藤康文*, 菅野道廣

熊本県立大学環境共生学部

* 熊本県食品加工研究所

Physiological Functions of Citrus Auraptene as Estimated by the Effects on Blood Components and Other Parameters in Rats

Asuka Akahoshi[§], Naoko Kaneta, Asako Shimoda, Kazuko Nisihimura, Miyuki Minami,
Yasufumi Kudoh* and Michihiro Sugano

Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto,
3-1-100 Tsukide, Kumamoto 862-8502

* Kumamoto Food Processing Research Institute, 3-11-38 Higashi-machi, Kumamoto 862-0901

To gain further information on physiological functions of citrus auraptene (Aur), either dried powder of the peel from amanatsu (Kawano natsudaikai, *Citrus natudaidai*) abundant in Aur or the Aur concentrate prepared from the rind were fed to rats in separate feeding trials. The serum components and the hepatic fatty acid compositions were analyzed. The concentration of serum triglyceride tended to decrease in the groups of rats fed Aur in both experiments. This was not reproduced in rats fed the peel from Ponkan citrus (*Citrus reticulata*) poor in Aur. In addition, in fatty acid composition of liver phospholipids, the proportion of linoleic acid decreased, while that of arachidonic acid increased after feeding Aur, suggesting a raise in the desaturation rate for linoleic acid. These results indicate that Aur characteristically modifies fatty acid metabolism, and in particular the change in polyunsaturated fatty acid pattern may indicate changes in eicosanoid production. Thus, Aur may possibly have diverse physiological functions other than the anti-carcinogenic potential hitherto evidenced.

(Received Sep. 22, 2003 ; Accepted Dec. 22, 2003)

柑橘類の果皮に含まれるクマリン化合物の一種であるオーラプテン (Aur) は種々の癌, とくに化学発癌剤による消化器癌発症に対し抑制効果を示し, その作用機作として活性酸素生成抑制や肝臓での薬物代謝酵素系の活性化などが指摘されている^{1)~11)}. 化学構造および他のクマリン化合物の多様な生理機能などから判断して, Aur にはより広範な生理活性があるものと推測されるが¹²⁾¹³⁾, 発癌抑制以外の機能についての知見は限られている¹⁴⁾¹⁵⁾.

著者らは, 柑橘果皮の有効利用ならびに Aur の局在性¹⁶⁾を考慮し, Aur 含量が高い熊本県特産の甘夏柑橘果皮を対象として Aur の機能性を検索することにした. そのため, ラットを用い Aur 含量に差がある柑橘 (ポンカン, *Citrus reticulata* および甘夏, *Citrus natudaidai*) 果皮の摂取の影響について検討し, 続いて甘夏果皮から調製した

Aur 濃縮物の効果を調べた. その結果, Aur の効果とみられるいくつかの生理機能を観察することができたので, ここに報告する.

実 験 方 法

1. 動物の飼料および飼育

2回の実験において, Sprague-Dawley 系雄ラット (セアック吉富, 福岡) を用い, 1匹ずつステンレスケージに入れ, 室温 21-23°C, 12時間の明暗 (午前8時~午後8時点灯) 条件下で市販配合飼料 (オリエンタル NMF, 東京) による1週間の予備飼育の後, AIN-93G に従い調整した飼料¹⁷⁾を自由に摂食させた. 水も自由に与えた. 2日ごとに体重測定と飼料の入れ替えを行った. 動物実験は熊本県立大学実験動物ガイドラインに準じて行った.

実験1: 4週齢ラットを用い, 対照群, ポンカン果皮群および甘夏果皮群の3群を設けた (1群10匹). 甘夏果皮の組成はタンパク質 7.1%, 脂質 1.1%, 灰分 2.6%, 糖質

〒862-8502 熊本県熊本市月出 3-1-100

* 〒862-0901 熊本県熊本市東町 3-11-38

[§] 連絡先 (Corresponding author), a-asuka@pu-kumamoto.ac.jp

10.8%, 食物繊維 75.5% およびオーラプテン 0.21%, ぽんかん果皮の組成はタンパク質 7.5%, 脂質 1.0%, 灰分 2.5%, 糖質 9.3% および食物繊維 76.3% で, オーラプテンはほとんど含まれない. 対照食は AIN-93G 配合食でセルロースを 5% レベル含み, 両果皮食にはそれぞれの果皮凍結乾燥物粉末を 5% レベル (セルロースと置換) 添加した. Aur 含量は甘夏果皮で約 210 mg/100 g (約 10 mg/100 g 飼料に相当する), ポンカン果皮では検出されなかった. 4 週間の飼育後, エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し血清を得た. 臓器は摘出後秤量した. 盲腸内容物の pH は投げ込み型 pH メーター (東亜 DKK, 東京) を用い直接測定した.

実験 2: 甘夏果皮凍結乾燥物粉末をアセトンで抽出し, 抽出液を濃縮乾固後エタノールに溶解し, セパピーズ SP 70 カラムを用いる液体クロマトグラフィー (Waters LC module 1, Waters Co., MA) により Aur 画分を調製した. すなわち, 40% エタノールで洗浄後, エタノールで抽出される Aur-エタノール画分を得た¹⁸⁾. この画分を濃縮乾固してエタノールを除去した Aur 濃縮物の濃度は 19.7 mg/mL であった. 実験 1 での結果を勘案して, Aur として 0.04% レベルとなるよう調整するため, 飼料 100 g に対し 2.03 ml の Aur 濃縮物をさらに乾固し, 油脂に溶解して添加した. 5 週齢のラットを用い 1 群 8 匹とし, 対照群および Aur conc 群の 2 群を設け, 26 日間飼育した後, 実験 1 と同様に処理した.

2. 分析方法

実験 1 では血清中の総および高密度リポタンパク質 (HDL)-コレステロール, トリグリセリド (TG), リン脂

質, グルコース, グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) およびグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) 濃度は市販のキット (和光純薬工業, 大阪) を用いて測定した. 血清インスリン (SPI-Bio, Massey Cedex) および腫瘍壊死因子 (TNF)- α レベルはキットを用い酵素免疫抗体 (ELISA) 法で測定した. 血清ビタミン C 濃度は Ihara ら¹⁹⁾ の方法, グルタチオンレベルはキット (Oxis Research, OR) を用い測定した. 実験 2 では総および HDL-コレステロール, TG, グルコース, 総タンパク質, アルブミン, GOT, GPT および血中尿素窒素 (BUN) は Dry Chem 530 型自動分析装置 (富士フィルム, 東京) を用い酵素法により測定した²⁰⁾. 他の血清成分の分析は実験 1 に準じ行った. 肝臓脂質は Folch らの方法²¹⁾ で抽出し, ガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を分析した²²⁾. トリグリセリドとリン脂質の分画はシリカゲル薄層クロマトグラフィーにより行った²²⁾.

3. 統計処理法

得られた結果は Stat View ソフトシステム (第 5 版, SAS Institute Inc., NC) を用いて, 実験 1 では Turkey-Kramer 法, 実験 2 では Student-Newman-Keuls 法に準じて統計処理を行った.

結果および考察

1. 柑橘果皮摂取がラットの成長パラメーターに及ぼす影響

Table 1 に示すように, ラットの摂食量, 体重増加量に 3 群間で差はなく, したがって飼料効率も同じであった. 臓器重量では肝臓重量が対照群に比べ両果皮群で減少傾向

Table 1 Growth parameters and tissue weight of rats fed citrus rinds (Exp. 1)

Parameter	Dietary group		
	Control	Ponkan	Amanatsu
Body weight (g)			
Initial	90 $\pm$ 2	90 $\pm$ 2	89 $\pm$ 2
Final	325 $\pm$ 5	316 $\pm$ 6	313 $\pm$ 9
Food intake (g/day)	19.7 $\pm$ 0.8	18.8 $\pm$ 0.8	18.2 $\pm$ 0.8
Food efficiency	0.43 $\pm$ 0.00	0.43 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.01
Tissue weight (g/100 g body weight)			
Liver	4.22 $\pm$ 0.06 ^a	3.94 $\pm$ 0.07 ^b	4.00 $\pm$ 0.09 ^{ab}
Kidney	0.75 $\pm$ 0.02	0.77 $\pm$ 0.02	0.81 $\pm$ 0.02
Lung	0.45 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.02
Heart	0.31 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.00
Spleen	0.25 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.02
Adipose tissue (g/100 g body weight)			
Perirenal	0.39 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.04
Epididymal	1.40 $\pm$ 0.05	1.45 $\pm$ 0.04	1.39 $\pm$ 0.04
Brown adipose	0.19 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01
Cecum pH	6.6 $\pm$ 0.08 ^a	6.2 $\pm$ 0.10 ^b	6.7 $\pm$ 0.09 ^a

Mean $\pm$ SE (n=10). Values not sharing common superscript letters are significantly different at $p<0.05$.

にあり、とくにポンカン群では有意に低くなった。しかしこの変化は正常値範囲内での変化であり生理的な意義はないものと考えられた。その他の臓器の重量や脂肪組織重量に食餌の影響は認められなかった。盲腸内容物の pH はポンカン果皮群で有意に低くなり、腸内細菌による短鎖脂肪酸生成の増加が推測された。

2. 柑橘果皮摂取がラットの血清成分に及ぼす影響

血清成分の分析結果は Table 2 にまとめている。血清脂質成分（総および HDL-コレステロール、TG およびリン脂質）の濃度には有意な影響は認められなかったが、TG 濃度は甘夏群で低値を示した。GOT および GPT 値にも変化が認められないことから、両果皮とも肝臓機能には影響しないようであった。グルコース濃度は両果皮群で有意に、かつ同程度低下したので、糖質代謝促進あるいは吸収抑制作用が推定された。インスリン濃度には明確な差はなかったことから、食物繊維によるグルコースの吸収抑制の可能性が高いようである。一方、ビタミン C 濃度は両果皮食群で著増し、その程度は甘夏群でより顕著であった。両果皮群間で有意差が認められたのはグルタチオンと TNF- α 濃度で、前者はポンカン群で、後者は甘夏群でそれぞれ有意に高かった。グルタチオン濃度は抗酸化能の 1 指標となることから、ポンカン群ではビタミン C の上昇と相まって抗酸化能が強化されていることが推定された。TNF- α は単球やマクロファージからだけでなく、脂肪細胞からも産生されるサイトカインの一種である。ガン細胞の壊死を引き起こすだけでなく、炎症細胞のアポトーシスを誘発し炎症を抑える働きがある。これらのことから生体防御機構の活性化の可能性が考えられる。また TNF- α は、インスリン抵抗性を誘導する知見もあるが、本実験において、血中グルコース濃度は上昇せず、逆に低下を示した。

3. 柑橘果皮摂取がラットの組織脂肪酸組成に及ぼす影響

脂肪酸代謝への影響を知るために組織の脂肪酸組成を測定し Table 3～Table 5 に示した。肝臓総脂質では、主要な脂肪酸の組成にかなりの変化が観察された (Table 3)。パルミチン酸とオレイン酸の割合は甘夏群でもっとも低く、ポンカン群がこれに次いだ。逆にステアリン酸、リノール酸およびアラキドン酸の割合は甘夏群でもっとも高く、ポンカン群は中間値を示した。正常ラットの肝臓では、総脂質中でリン脂質は量的にもっとも多い脂質であり、ステアリン酸とアラキドン酸はリン脂質に局在しているの、観察された変化は主としてリン脂質での応答を反映していると考えられる。リノール酸代謝産物をリノール酸で割った「不飽和化指標」には 3 群間で差はないことから、脂肪酸組成の変化の原因は明らかでないが、少なくともこのような変化に伴って、膜機能が影響を受けている可能性は十分考えられ、それはとくに甘夏群で顕著であると推測された。副睾丸周辺脂肪組織 (Table 4) の組成には 3 群間で顕著な食餌の影響は認められなかった。しかし、肩胛骨間褐色脂肪組織 (Table 5) では、両果皮群でリノール酸は上昇し、パルミチン酸は低下したことから、この組織の特性、すなわち熱産生能に何らかの影響を及ぼすことが推察された²³⁾²⁴⁾。

4. オーラプテン濃縮物の摂食効果

実験 1 で甘夏果皮の特徴的な生理的効果の概要を把握できたので、Aur 濃縮物を用い、Aur 含量が実験 1 の約 4 倍になるように添加して実験を行った。ラットの成長パラメーターを Table 6 にまとめている。摂食量、体重増加量および飼料効率に Aur 濃縮物添加の影響はなかった。臓器重量については実験 1 とは逆に、肝臓重量は Aur 濃縮物群で上昇し、腎臓重量は有意に増加した。これ以外の各種臓器の重量には食餌の影響はなかった。しかし、白色脂

Table 2 Serum chemistries of rats fed citrus rinds (Exp. 1)

Parameter	Dietary group		
	Control	Ponkan	Amanatsu
Cholesterol (mg/dL)			
Total	121 $\pm$ 7	118 $\pm$ 13	129 $\pm$ 10
HDL	55.2 $\pm$ 4.0	56.4 $\pm$ 4.6	47.7 $\pm$ 4.6
Triglyceride (mg/dL)	189 $\pm$ 16	221 $\pm$ 29	153 $\pm$ 21
Phospholipid (mg/dL)	168 $\pm$ 6	172 $\pm$ 6	183 $\pm$ 8
Glucose (mg/dL)	154 $\pm$ 4 ^a	139 $\pm$ 4 ^b	138 $\pm$ 4 ^b
Insulin (ng/dL)	88.7 $\pm$ 0.8	91.1 $\pm$ 2.4	86.4 $\pm$ 1.3
Ascorbic acid (mg/dL)	118 $\pm$ 29 ^a	255 $\pm$ 31 ^{ab}	305 $\pm$ 74 ^b
GOT (IU)	51.6 $\pm$ 2.0	53.0 $\pm$ 1.8	48.2 $\pm$ 3.8
GPT (IU)	33.8 $\pm$ 2.9	37.3 $\pm$ 11.6	37.7 $\pm$ 7.2
Glutathione (μ M)	7.58 $\pm$ 0.53 ^a	24.2 $\pm$ 4.1 ^b	8.99 $\pm$ 0.62 ^a
TNF- α (pg/dL)	297 $\pm$ 20 ^a	274 $\pm$ 13 ^a	403 $\pm$ 26 ^b

Mean $\pm$ SE (n=10). Values not sharing common superscript letters are significantly different at $p < 0.05$.

Table 3 Fatty acid compositions of liver total lipids of rats fed citrus rinds (Exp. 1)

Fatty acid	Dietary group		
	Control	Ponkan	Amanatsu
16 : 0	28.2±0.9 ^a	25.2±0.8 ^b	22.8±0.4 ^b
16 : 1	5.4±0.3 ^a	4.1±0.4 ^b	3.0±0.2 ^b
18 : 0	11.9±0.5 ^a	13.5±0.6 ^a	16.0±0.4 ^b
18 : 1	21.5±0.8 ^a	18.0±0.9 ^b	16.0±0.4 ^b
18 : 2n-6	13.3±0.4 ^a	15.3±0.5 ^{ab}	17.1±1.0 ^b
18 : 3n-3	0.8±0.1 ^a	1.3±0.1 ^{ab}	2.3±0.6 ^b
20 : 4n-6	11.9±0.7 ^a	13.9±0.5 ^{ab}	14.9±0.5 ^b
22 : 6n-3	3.3±0.3	3.7±0.2	3.8±0.1

Mean±SE (n=8). Fatty acids less than 1% are omitted. Values not sharing common superscript letters are significantly different at $p<0.05$.

Table 4 Fatty acid compositions of epididymal adipose tissue total lipids of rats fed citrus rinds (Exp. 1)

Fatty acid	Dietary group		
	Control	Ponkan	Amanatsu
14 : 0	1.4±0.1	1.4±0.0	1.3±0.1
16 : 0	24.1±0.7	24.0±0.5	22.9±0.8
16 : 1	7.3±0.2	7.3±0.3	6.9±0.4
18 : 0	3.1±0.1	3.0±0.1	3.1±0.1
18 : 1	29.7±0.2	29.0±0.2	29.3±0.3
18 : 2n-6	27.8±0.5	27.9±0.6	29.2±1.2
18 : 3n-3	3.1±0.1 ^a	3.4±0.1 ^{ab}	3.6±0.2 ^b

Mean±SE (n=8). Fatty acids less than 1% are omitted. Values not sharing common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

Table 5 Fatty acid compositions of brown adipose tissue total lipids of rats fed citrus rinds (Exp. 1)

Fatty acid	Dietary group		
	Control	Ponkan	Amanatsu
14 : 0	2.6±0.1	2.4±0.0	2.3±0.1
16 : 0	31.0±0.8 ^a	26.7±0.7 ^b	27.2±0.6 ^b
16 : 1	7.1±0.3	6.6±0.3	6.9±0.4
18 : 0	7.1±0.4	6.7±0.4	6.1±0.3
18 : 1	34.1±0.5	33.3±0.5	34.0±0.8
18 : 2n-6	14.1±1.0 ^a	19.6±1.4 ^b	19.1±1.5 ^b
18 : 3n-3	1.2±0.2 ^a	1.9±0.2 ^b	1.9±0.2 ^b

Mean±SE (n=8). Fatty acids less than 1% are omitted. Values not sharing common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

Table 6 Growth parameters and tissue weight of rats fed auraptene (Exp. 2)

Parameter	Dietary group	
	Control	Aur concentrate
Body weight (g)		
Initial	145±2	142±3
Final	339±7	349±6
Food intake (g/day)	21.2±0.3	22.1±0.3
Food efficiency	0.35±0.01	0.36±0.01
Tissue weight (g/100 g body weight)		
Liver	4.25±0.18	4.75±0.16
Kidney	0.72±0.02	0.79±0.02*
Lung	0.85±0.02	0.81±0.03
Heart	0.69±0.02	0.76±0.03
Spleen	0.22±0.01	0.25±0.02
Adipose tissue (g/100 g body weight)		
Perirenal	2.19±0.17	1.86±0.20
Epididymal	1.82±0.06	1.74±0.08
Brown adipose	0.12±0.02	0.13±0.02
Cecum pH	6.6±0.08	6.2±0.10*

Mean±SE (n=8). *Significantly different from the control group at $p<0.05$.

肪組織重量はいずれも低下傾向を示した。褐色脂肪組織重量には変化はなかった。盲腸 pH は Aur 濃縮物群で有意に低下した。盲腸 pH が低下するとサルモネラや大腸菌といった有害菌の繁殖が抑制されると考えられる²⁵⁾。実験 1 では食物繊維摂取量の増加が pH の低下に寄与したものと考えられた。食物繊維が腸内細菌によって分解され酪酸や乳酸などの有機酸が排出されるためである。しかし、Aur 濃縮物の投与でも低下したことから、Aur に何らかの作用機構で盲腸 pH の低下させる可能性が考えられる。

Table 7 に示すように、この実験では血清脂質成分のうち TG 濃度が有意に低下した。TG の血中濃度が高くなると高脂血症を引き起こし、さらには動脈硬化の原因となる。血中 TG 低下効果を示す食品成分としては大豆タンパク質や n-3 系多価不飽和脂肪酸などが知られている²⁶⁾。しかしながら、今回の実験では Aur 含量 0.01~0.04% の低濃度で TG 濃度の低下効果が見られたことは、興味深い結果である。血糖値、インスリン濃度、肝臓機能指標などにも Aur 濃縮物の影響は認められなかった。また血清タンパク質の濃度にも差はなかった。TNF- α 濃度にも変化は認められなかった。実験 1 における血糖値の低下は食物繊維の影響によるものかもしれない。しかし TNF- α 濃度の上昇も確認されなかったことから Aur 活性が他の成分の共存下では弱められた可能性も考えられる。

Table 8 に肝臓リン脂質画分の脂肪酸組成を示した。実験 1 の結果から推測されたように、Aur 濃縮物摂取による肝臓リン脂質中のステアリン酸およびアラキドン酸の有意な増加とリノール酸の有意な低下が見られ、リノール酸の

Table 7 Serum chemistries of rats fed auraptene (Exp. 2)

Parameter	Dietary group	
	Control	Aur concentrate
Cholesterol (mg/dL)		
Total	115±5	112±4
HDL	58.4±3.7	47.0±5.5
Triglyceride (mg/dL)	212±18	144±18*
Phospholipid (mg/dL)	150±7	151±6
Glucose (mg/dL)	197±7	151±6
Insulin (ng/dL)	371±13	356±10
GOT (IU)	49.5±2.1	49.0±0.8
GPT (IU)	4.9±1.3	2.9±0.7
Total protein (g/dL)	5.18±0.05	5.15±0.05
Albumin (g/dL)	3.54±0.04	3.53±0.03
BUN (mg/dL)	14.4±1.9	14.1±0.5
TNF- α (pg/mL)	11.0±1.8	9.18±1.76

Mean±SE (n=8). *Significantly different from the control group at $p<0.05$.

Table 8 Fatty acid compositions of liver phospholipid of rats fed auraptene (Exp. 2)

Fatty acid	Dietary group	
	Control	Aur concentrate
16:02	21.9±1.0	19.3±0.8
18:02	20.6±1.0	24.1±0.7*
18:1	7.4±0.3	6.4±0.3*
18:2n-6	12.7±0.9	10.1±1.1*
20:3n-6	0.8±0.3	0.9±0.3
20:4n-6	27.1±0.4	30.6±0.9*
22:6n-3	8.1±0.7	8.2±0.4
20:4/(18:2+20:3)	2.03±0.14	2.89±0.33

Mean±SE (n=4). Fatty acids less than 1% were omitted.

*Significantly different from the control group at $p<0.05$.

不飽和化指標 $[20:4n-6/(18:2n-6+20:3n-6)]$ は高くなる傾向にあった。

以上のように、今回の実験では明確な Aur 効果は限られた指標についてのみ観察されたが、Aur 供給源 (Aur 濃縮物) の純度から判断して、得られた結果を Aur のみに限定することはできない。果皮には Aur 以外の多種多様の成分が含まれており、かつポンカンと甘夏で Aur のみが唯一の違いではないからである。また、濃縮物中の Aur 純度は低く、共存成分の影響は無視できない。血清 TG 濃度低下は実験 1 および 2 の両方で確認されたことから、Aur がその効果を示す可能性が高い。また実験 2 では白色脂肪組織の重量は低下傾向を示したことから、体脂肪蓄積抑制効果も期待できる。肝臓脂質での特徴的な脂肪酸組成の変化、とくにアラキドン酸の割合の増加は生体膜機能、ひい

てはエイコサノイド産生の変化を推測させる。これらの変化は、Aur 摂取量を増せばより明確な変化として把握できる可能性がある。TNF- α 濃度の変化と併せて、免疫系への影響も考えられる¹⁴⁾¹⁵⁾。現在、より高純度の Aur 標品を用いてこれらの点を解析する用量依存性実験を計画している。

要 約

Aur の生理機能についての知見を集積するため、Aur に富む甘夏果皮あるいは Aur 濃縮物をラットに投与し、血清成分や肝臓脂質の脂肪酸組成を中心に検討した。その結果、血清トリグリセリド濃度低下効果が観察され、脂肪酸代謝への関与が示唆された。肝臓脂質の脂肪酸組成にかなりの変化が見られ、とくに肝臓リン脂質におけるステアリン酸およびアラキドン酸の増加、リノール酸の減少、リノール酸不飽和化促進効果が指摘され、膜機能への影響と同時にエイコサノイド産生への効果も推察された。

本研究は科学研究費基盤研究 (C) (2) 14560108 の補助により行われた。血清成分の自動分析を行って頂いた不二製油(株) 研究所に深謝する。

文 献

- 1) 佐藤良夫, 田代眞一, 佐藤美鶴, 藤本康雄, 許 静亜, 池川哲朗, 枳実 (Aurantii Fructus Immaturus) の生理活性成分の研究. 薬誌, **116**, 244-250 (1996).
- 2) Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Nakamura, Y., Ohto, Y., Ohigashi, H. and Koshimizu, K., Auraptene, a citrus coumarin, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in ICR mouse skin, possibly through suppression of superoxide generation in leukocytes. *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 443-452 (1997).
- 3) Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Makita, H., Hara, A., Mori, H., Satoh, K., Hara, A., Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., Citrus auraptene inhibits chemically induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats. *Carcinogenesis*, **18**, 2155-2161 (1997).
- 4) Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Hara, A., Matsunaga, K., Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Maeda, M., Ota, T., Odashima, S., Yamane, T., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., Citrus auraptene exerts dose-dependent chemopreventive activity in rat large bowel tumorigenesis: the inhibition correlates with suppression of cell proliferation and lipid peroxidation and with induction of phase II drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.*, **58**, 2550-2556 (1998).
- 5) Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Matsunaga, K., Mori, H., Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Satoh, K., Hara, A., Maeda, M., Ota, T., Odashima, S., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by citrus auraptene in rats. *Carcinogenesis*, **19**, 425-431 (1998).
- 6) Kawabata, K., Tanaka, T., Yamamoto, T., Hara, A.,

- Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Stoner, D.E. and Mori, H., Suppression of N-nitroso-methylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis by dietary feeding of auroaptene. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **19**, 45-52 (2000).
- 7) Murakami, A., Wada, K., Ueda, N., Sasaki, K., Haga, M., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., *In vitro* absorption and metabolism of a citrus chemopreventive agent, auroaptene, and its modifying effects on xenobiotic enzyme activities in mouse livers. *Nutr. Cancer*, **36**, 191-199 (2000).
- 8) Tanaka, T., Kohono, H., Murakami, M., Kagami, S. and El-Bayoumy, K., Suppressing effects of dietary supplementation of the organoselenium 1,4-phenylenebis (methylene)selenocyanate and the Citrus antioxidant auroaptene on lung metastasis of melanoma cells in mice. *Cancer Res.*, **60**, 3713-3716 (2000).
- 9) Murakami, A., Nakamura, Y., Tanaka, T., Kawabata, K., Takahashi, D., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., Suppression by citrus auroaptene of phorbol ester- and endotoxin-induced inflammatory responses: role of attenuation of leukocyte activation. *Carcinogenesis*, **21**, 1843-1850 (2000).
- 10) Mori, H., Niwa, K., Zheng, Q., Yamada, Y., Sakata, K. and Yoshimi, N., Cell proliferation in cancer prevention: effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on an *in vitro* model in human colorectal cells. *Mutat. Res.*, **480-481**, 201-207 (2001).
- 11) Zheng, Q., Hirose, Y., Yoshimi, N., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Sakata, K., Matsumoto, Y., Sayama, Y. and Mori, H., Further investigation of the modifying effect of various chemopreventive agents on apoptosis and cell proliferation in human colon cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **128**, 539-546 (2002).
- 12) 川井 悟, カンキツ類のがん抑制成分, 化学と生物, **39**, 795-802 (2001).
- 13) 杉浦 実, 日本カンキツ類の健康機能性, *Food Style* **21**, **6**, 65-69 (2002).
- 14) Tanaka, T., Sugiura, H., Inaba, R., Nishikawa, A., Murakami, A., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., Immunomodulatory action of citrus auroaptene on macrophage functions and cytokine production of lymphocytes in female BALB/c mice. *Carcinogenesis*, **20**, 1471-1476 (1999).
- 15) Murakami, A., Matsumoto, K., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced IkappaB degradation in RAW264.7 macrophages. *Cancer Lett.*, **195**, 17-25 (2003).
- 16) Ogawa, K., Kawasaki, A., Yoshida, T., Nesumi, H., Nakano, M., Ikoma, Y. and Yano, M., Evaluation of auroaptene content in citrus fruits and their products. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1763-1769 (2000).
- 17) Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C., Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).
- 18) Takahashi, Y., Inaba, N., Kuwahara, S., Kuki, W., Yamane, K. and Murakami, A., Rapid and convenient method for preparing auroaptene-enriched product from hassaku peel oil: implications for cancer-preventive food additives. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3193-3196 (2002).
- 19) Ihara, H., Shino, Y., Hashizume, N. and Minegishi, N., A simple and rapid method for the routine assay of total ascorbic acid in serum and plasma using ascorbate oxidase and o-phenylenediamine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **46**, 321-324 (2000).
- 20) Fukui, K., Tachibana, N., Wanezaki, S., Tsuzaki, S., Takamatsu, K., Yamamoto, T., Hashimoto, Y. and Shimoda, T., Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5717-5721 (2002).
- 21) Folch, J., Lees, M. and Slone-Stanley, G.H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-506 (1957).
- 22) Lee, J.H., Ikeda, I. and Sugano, M., Effects of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid balance on tissue lipid levels, fatty acid patterns, and eicosanoid production in rats. *Nutrition*, **8**, 162-166 (1992).
- 23) Ohno T., Furuyama F. and Kuroshima A., Fatty acid composition of brown adipose tissue in genetically heat-tolerant FOK rats. *Int. J. Biometeorol.*, **45**, 41-44 (2001).
- 24) Saha S.K., Ohno T., Tsuchiya K. and Kuroshima A., Adaptive modification of membrane phospholipid fatty acid composition and metabolic thermosuppression of brown adipose tissue in heat-acclimated rats. *Int. J. Biometeorol.*, **43**, 163-168 (2000).
- 25) Mineo H., Hara H., Tomita F., Short-chain fatty acids enhance diffusional Ca transport in the epithelium of the rat cecum and colon. *Life Sci.*, **69**, 517-526 (2001).
- 26) Carson J.A., Nutrition therapy for dyslipidemia. *Curr. Diab. Rep.*, **3**, 397-403 (2003).

(平成 15 年 9 月 22 日受付, 平成 15 年 12 月 22 日受理)