ラット肝及び腎の分離細胞による没食子酸 プロピルの代謝: 肝細胞による代謝と アルコール添加の影響

(昭和 57 年 9 月 24 日受理)

新村 寿夫^{*1} 兼 俊明 夫^{*2}
土屋 利江^{*3} 山 羽 力^{*3}

Metabolism of Propyl Gallate by Isolated Hepatocytes and Renal Cells of the Rat: Metabolism by Hepatocytes and Effect of Addition of Alcohol

Toshio NIIMURA^{*1}, Akio KANETOSHI^{*2}, Toshie TSUCHIYA^{*3}
and Tsutomu YAMAHA^{*3}

(*¹Toyokogakuen Women's Junior College: 15-1, Todoroki 8-chome, Setagaya-ku,
Tokyo, Japan; *²Hokkaido Institute of Public Health: Nishi 12-chome, Kita 19-jo,
Kita-ku, Sapporo, Japan; *³National Institute of Hygienic Sciences:
18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

The metabolism of propyl gallate by isolated hepatocytes of the rat and the effect of alcohol on the metabolism were investigated. When the hepatocytes (5×10^6 cells) were incubated with $10^{-3} M$ propyl gallate for 1 hr, the cells hydrolyzed about 65% of the substrate, and produced large amount of free gallic acid and its conjugate and a small amount of 4-O-methyl gallate. However, the addition of methionine caused an increase in 4-O-methyl gallate formation from propyl gallate.

The hepatocytes also produced an unidentified substance in addition to the normal products in the presence of ethanol ($5 \times 10^{-3} M$). The maximum amount of the unidentified substance in an incubation mixture containing 0.1 M ethanol was observed after the incubation for 1 hr, and the amount then gradually decreased. The unidentified substance was identified as ethyl gallate by TLC, GC and GC-MS. Ethyl gallate might be produced by the transfer reaction of gallic acid produced by the action of esterase. The ester transfer reaction also occurred with other alcohols such as methanol, *iso*-butyl alcohol and *iso*-amyl alcohol, but ethanol was the most effective.

(Received September 24, 1982)

Key words: 没食子酸プロピル propyl gallate; 没食子酸 gallic acid; 4-O-メチル没食子酸 4-O-methyl gallate; ラット肝分離細胞 viable hepatocytes of rat; 代謝 metabolism; エステル交換 exchange of ester; エタノール ethanol

*¹ 東横学園女子短期大学: 東京都世田谷区等々力 8-15-1

*² 北海道立衛生研究所: 北海道札幌市北区北 19 条西 12 丁目

*³ 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

没食子酸プロピル (PG) は酸化防止剤として食用油脂に使用されている。

経口的に摂取された没食子酸 (G) は遊離の G, 4-O-メチル没食子酸 (MG), ピロガロール (P) 及びそれら

の抱合体として、尿に排せつされることが知られている¹¹⁻¹³。さらに微量代謝物としてレゾルシノール (R)²¹ 及び 2-O-メチルピロガロール^{11,22} の排せつが報告されている。なお Scheline^{23,25,26} は P 及び R の生成に腸内細菌が作用していることを予想している。

PG の代謝に関しては G と同様に代謝されたとした Booth¹¹ の報告があるのみなので、前報⁷ では PG をラットに経口投与し、尿中代謝物を定量した。その際 PG のグルクロニド (投与量の 5%) の排せつを認めたので、PG は腸粘膜その他で没食子酸に加水分解されず、PG のままでも肝臓に運ばれてくることが予想された。それゆえ本報ではラット肝及び腎の分離生細胞を用いて PG の代謝を検討した。

添加物の安全性研究の一環として代謝研究を行うとき、同時に摂取した他の化学物質の影響も重要である。種々の薬物の代謝がアルコールにより促進されるという報告^{81,91} もあり、PG とアルコールが同時に摂取される可能性もあるので、PG の代謝に及ぼすアルコールの影響も合わせて検討した。

実験方法

1. 試薬及び機器

(1) 試薬

1-メチオニン (味の素(株)製、特級)、没食子酸メチル (MeG, 東京化成工業(株)製)、没食子酸エチル (EG, 東京化成工業(株)製)、没食子酸イソブチル (BG, 東京化成工業(株)製)、没食子酸イソアミル (AG, 東京化成工業(株)製)、トリメチルケイ素化剤 (東京化成工業(株)製、TMS-HT)、アルミニウムシートシリカゲル 60, Silanised (メルク社製) 及びガスクロ Q 用シリコン 10% OV-1 (日本クロマト工業(株)製、80~100 メッシュ)、その他のものは前報^{7,10}に記載したものを用いた。

(2) 機器

イアトロスキャン (ヤトロン(株)製、TH-10)、FID ガスクロマトグラフィー ((株)島津製作所製、GC-4CM)、GC-MS (Dupont dimaspec model 321)

2. 方法

(1) 分離生細胞の調製

ウイスター雄ラット (150~300 g, 日本生物材料センター) よりコラゲナーゼとヒアルロニダーゼを用いて、前報¹⁰により肝及び腎の分離生細胞を調製した。この方法により調製した腎細胞は全腎由来の混合細胞である。

(2) 細胞のインキュベーション

カルシウムイオン、マグネシウムイオンを含まない Hank の平衡塩液 30 ml 中に、分離細胞を $3.0 \sim 7.0 \times 10^6$ 個/ml、透析した仔ウシ血清アルブミンを 2% 及び PG (又は G) を $10^{-3} M$ 、それぞれ含有させ、この溶液を 300 ml の三角フラスコに入れて 37°, 1 時間振とうした。

(3) 分析試料の調製

1 時間インキュベーションした細胞浮遊液を 10 ml ずつ 3 等分し、その各々に 1/10 容の塩酸を加えて細胞を破壊し、 $18,000 \times g$ で 15 分間遠心分離した。各上清を直接、酸加水分解後及び β -グルクロニダーゼ処理後、エーテルで代謝物を抽出した。直接抽出は塩酸性 (1 N) にし、塩化ナトリウムを飽和させ、同容量のエーテルで 3 回抽出した。エーテル抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、少量になるまで減圧濃縮し、さらに窒素気流でエーテルを蒸発させた。残留物をエタノール又は 0.8 mg/ml の *p*-アミノ安息香酸 (PABA, 内部標準) を含有するエタノール 0.2~1.0 ml (通常 0.5 ml) に溶かした。

加水分解処理は 2 N 濃度になるように塩酸を加え、1 時間還流した後同様に代謝物を抽出した。また β -グルクロニダーゼ処理は 1 M トリスヒドロキシメチルアミノメタン溶液を加えて pH 4.5~5.0 に調整し、 β -グルクロニダーゼ 10 mg (6500 Fishman units) を加え、37° で 1 夜インキュベーションした後、塩酸性 (1 N) で代謝物を同様に抽出した。

(4) TLC による代謝物の定性

アルミシートシリカゲル G-60 あるいはシリカゲル 60 シラナイズドに分析試料 3~5 μ l をスポットし、以下の展開溶媒で 10~18 cm 展開した。

- 展開溶媒 (a) ベンゼン-酢酸-アセトン (21:4:2) 10 cm
展開溶媒 (b) ベンゼン-酢酸-アセトン-水 (10:5:1:0.6) 15 cm
展開溶媒 (c) ベンゼン-酢酸 (2:1) 17~18 cm
展開溶媒 (d) ベンゼン-酢酸-アセトン-水 (20:7.5:2.5:0.8)
展開溶媒 (e) ベンゼン-酢酸-アセトン-水 (20:7:4.5:1.2)

検出は前報⁷と同様 Gibb's 試液を用いた。常法には展開溶媒 (a) を、培養液にエタノールを加えることにより生成した未知物質 (x 化合物) の分離には展開溶媒 (b) 及び (c) を、没食子酸プロピルエステル以外のエステルの検出には展開溶媒 (d) 及び (e) をそれぞれ使い、展開溶媒 (d) あるいは (e) にはシラナイズされたシリカゲルプレートを用いた。Table 1 に没食子酸プロピルの代謝物及び種々の没食子酸エステルの R_f 値を示す。

(5) イアトロスキャンによる代謝物の定量

常法の展開溶媒としてベンゼン-酢酸-アセトン (42:7.5:1.5) を使い、前報⁷と同様に行った。x 化合物の定量にはクロロホルム-酢酸-アセトン-水 (20:7.5:2.5:3.3) あるいはベンゼン-酢酸-アセトン-水 (24:7.5:2.5:3.3) を用いた。

Table 1. R_f values on TLC of Various Esters of Gallic Acid and Its Metabolites

Compounds	R _f values				
	Solv. a	Solv. b	Solv. c	Solv. d	Solv. e
Gallic acid	0.20	0.20	0.24		
x compound	0.34	0.39	0.35		
4-O-Methyl gallate	0.43	0.39	0.49		
p-Aminobenzoic acid	0.66				
Propyl gallate	0.36	0.45	0.40	0.50	0.49
Methyl gallate				0.37	0.37
Ethyl gallate				0.43	0.44
Isobutyl gallate				0.54	0.53
Isoamyl gallate				0.58	0.57

Solv. a, benzene-acetic acid-acetone (21: 4: 2) (10 cm)

Solv. b, benzene-acetic acid-acetone-water (10: 5: 1: 0.6) (15 cm)

Solv. c, benzene-acetic acid (2: 1) (17-18 cm)

Solv. d, benzene-acetic acid-acetone-water (20: 7.5: 2.5: 0.8) (15 cm)

Solv. e, benzene-acetic acid-acetone-water (20: 7: 4.5: 1.2) (15 cm)

(6) ガスクロマトグラフィー (GC) による MeG, EG, PG, BG, AG 及び G の定量

細胞のインキュベーションと同組成になるように、肝分離細胞（塩酸を加えてあらかじめ失活）、血清アルブミン及び Hank の平衡塩液を混合した 4 ml に EG, BG などの標品をそれぞれ加え、試料調製法と同様に抽出した。これを標準試料として検量線作製に使用した。

試料のアルコールを減圧で蒸発させた後、0.1 ml の TMS-HT 試薬を加え、5 分間放置してトリメチルシリル化した¹¹⁾。次に内部標準エイコサン (C₂₀) を 0.3 mg/ml 含有する *n*-ヘキサンで 1 ml にした。この 3~6 μ l を GC に注入した。

内径 3 mm, 長さ 2 m のガラスカラムにシリコン 10 % OV-1, 80~100 メッシュを充てんし, G, MeG, EG, PG 及び BG はカラム温度 180°, 窒素流速 20 ml/分, 感度 16~64 $\times$ 10³ で GC を行った。AG は気化部温度 220°, カラム温度 200° に設定し, 38 分後に 20°/分の割合で 210° まで昇温した。その際, 感度を 64 から 256 まで下げた。

結果及び考察

1. 生細胞による PG 及び G の代謝

あらかじめ行った肝細胞の 1 時間インキュベーションの実験で, PG 及び G の 10⁻⁸ M は細胞の生存率に影響を与えなかったため, この濃度を用いた。実験に供した分離肝細胞の生存率は約 73% で, 1 時間のインキュベーション後に約 11% 生存率が低下した。

10⁻⁸ M の PG あるいは G と生細胞を 1 時間インキュベーションしたときの結果を Table 2 に示す。PG あるいは G はインキュベーションの間に一部酸化され, その程度が一定しなかったため, 代謝物は反応液中の濃度で示した。

PG はすみやかに加水分解され, 主要代謝物は G であった。5 $\times$ 10⁶/ml の細胞濃度に換算するとき, 肝及び腎細胞の加水分解率 (3 例の平均) はそれぞれ 65% 及び 37% であった。

前報⁷⁾の尿中排せつの実験で, PG のグルクロニドの排せつを認めていたので, 肝, 腎それぞれ 3 例について PG のグルクロニドを分析してみたが, その生成は不検出又はごくわずかであった。

G の抱合体の生成は, PG を基質とした肝, 腎それぞれ 3 例について定量された。G の抱合体は, 肝細胞では総 G の平均 16% であったが, 腎細胞では認められなかった。また肝細胞における G の抱合体の生成は G を基質としてもそれほど変わらず, 2 例の平均は総 G の 20% であった。

PG を経口投与したとき, 尿中に MG が多量に排せつされたが⁷⁾, 肝細胞と 1 時間のインキュベーションでは MG の生成はわずかであった。また G から出発してもその生成は増さなかった。しかし反応液にメチル基の供与体としてメチオニンを加えることにより MG の生成は促進された。

MG を生成する G の O-メチル化はラット肝スライスですで行われている^{11), 12)}, Masri ら¹³⁾はラット肝ホモジネートの上清から硫酸分画した酵素を用いてさらに研究し, これに S-アデノシルメチオニンと G を加えてインキュベーションするとき, 28.9% の MG 及び 0.24% の 3-O-メチル没食子酸を生成したと報告している。

2. アルコールの影響

肝細胞と PG を 5 $\times$ 10⁻⁸ M エタノールの存在下でインキュベーションし, 常法通り TLC を行ったところ, PG に隣接した下方に G, MG 以外の未知のスポット (x 化合物) が現れた。この x 化合物は PG とエタノー

Table 2. Metabolism of Propyl Gallate by Isolated Viable Hepatocytes and Renal Cells

Subst. ($10^{-3} M$)	Tissue	Cells/ml of react. mix. ($\times 10^6$)	Met. (0.2 mg/ml)	Concent. of subst. & metabolites in react. mixture ($10^{-5} M$)						% of hydrolysis (calculated to 5×10^6 cells/ml)	
				P G		G		M G			
				F	C	F	C	F	(T)		C
P G	H	6.4	—	7	Nd	56	8	(0.7)		90 (70)	
P G	H	6.7	—	22	—	54	—	(Tr)			
P G	H	7.0	—	7	—	44	—	(1)			
P G	H	7.0	—	7	1	42	7	(1)		86 (61)	
P G	H	6.5	—	22	—	39	—	(Nd)			
P G	H	6.7	+	26	—	63	—	11	—		
P G	H	7.6	+	3	Nd	58	11	7	3	96 (63)	
G	H	3.9	—			92	16	(0.5)			
G	H	5.1	—			57	18	(0.4)			
P G	R	3.7	—	52	Nd	23	Nd	0.3	Nd	31 (42)	
P G	R	4.6	—	43	Nd	21	Nd	0.2	Nd	33 (36)	
P G	R	7.0	—	36	Nd	29	Nd	0.4	Nd	45 (32)	

PG, propyl gallate; G, gallic acid; MG, 4-O-methyl gallate; F, free; C, conjugate; (T), total amount; —, not tested; Nd, not detectable; H, hepatocyte; R, renal cells; subst., substrate; react. reaction; mix., mixture; Met., methionine

Fig. 1. Iatroscan-chromatogram of reaction mixture of hepatocytes with propyl gallate and ethanol

Peak-A, unidentified substance (x compound); Peak-B, propyl gallate; Peak-C, *p*-aminobenzoic acid; Peak-D, unknown substance

Solv., chloroform-acetic acid-acetone-water (20: 7.5: 2.5: 3.3)

ルをインキュベーションしただけでは生成せず、肝細胞あるいは肝ホモジネートを加えなければ生じなかった。さらにホモジネートの $100,000 \times g$ 上清では生成せず、 $10,000 \times g$ 上清で生成したことから、x 化合物の生成にはミクロソーム系が関与していると思われる。またこのものは酸加水分解により TLC における G と同一 Rf 値を示す物質に転換した。腎細胞でも生成したが、その生成量はごくわずかであった。Fig. 1 に x 化合物のイアトロスキヤンによるクロマトグラムを示す。この試料は肝細胞、PG 及び $5 \times 10^{-3} M$ エタノールを 3 時間インキュベーションしたものである。

(1) x 化合物の生成条件

この未知物質を同定するにあたり、まずエタノール濃度と x 化合物の生成について検討した。その結果を Fig. 2 に示す。

エタノールの存在下で肝細胞を PG と 1 時間インキュベーションするとき、添加するエタノールを 10^{-2} , $10^{-1} M$ と濃くするにしたがい、その生成量は増加したが、その反面 G の生成が抑制され PG の残存量が増加した。

次に $10^{-1} M$ エタノールの存在下でインキュベーションし、x 化合物の生成につき 2 時間まで時間を追って検討した (Fig. 3)。

時間の経過につれて PG が減少し、G が生成した。なお x 化合物の蓄積量は 1 時間インキュベーションで最高に達し、その後は減少した (Fig. 3)。この減少は一度蓄積した x 化合物が G に加水分解されるためと思われる。

Fig. 2. Effect of ethanol on accumulation of x compound

The reaction mixture contained 7.5×10^6 cells/ml, 10^{-3} M propyl gallate and ethanol were incubated for 1 hr. Each plot is a mean of two experiments.

○—○, gallate; △---△, propyl gallate; ×-----×, x compound.

Fig. 3. Effect of incubation time on accumulation of x compound

Each plot is a mean of two experiments.

○---○, propyl gallate; △---△, gallic acid; □—□, unidentified substance (x compound)

Final concentration of reaction mixture: PG, 10^{-3} M; ethyl alcohol, 10^{-1} M; cells, 6.9×10^6 /ml

(2) x 化合物の同定

x 化合物の蓄積条件がわかったので、次にこの化合物の分離精製を行った。

10^{-3} M PG と 10^{-1} M エタノールを肝細胞と 1 時間インキュベーションし、常法通り試料を調製した。この試料をシリカゲル G-60 のシートに線状にスポットし、クロロホルム-ギ酸-アセトン (15:5:4) で展開した後、x 化合物部分のシリカゲルをかきとった。アセトンで 3 回抽出し、TLC にかけたところ、ごく微量の PG が混在していたので、再度 TLC で分離を行い単一スポットにした。この x 化合物のエーテル溶液にシクロヘキサンを加えて冷蔵庫内に放置し、わた状の結晶 3.5 mg を得た。

x 化合物について予想される化合物はエステラーゼにより、プロピル基がエチル基で交換された没食子酸エチルである。そこで EG と x 化合物の TLC を行い Rf 値を比較したところ、両者の Rf 値が一致した。また Table 3 に示す種々の条件で両者の GC を行い、保持時間を比較したが、これも両者が一致した。

TLC 及び GC により x 化合物は没食子酸エチルと推定されたが、両化合物のアセチル化体をガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS) にかけて、両者のマススペクトルを比較した (Fig. 4)。

測定された両者のイオン化した分子量、イオンの開裂の形式及び大きさはよく一致した。従って x 化合物は没食子酸エチルと同定された。

(3) 種々の没食子酸エステルの生成と加水分解

エタノールの存在下で PG を肝細胞とインキュベーションすると、正常の代謝物以外に EG を生成することがわかった。これは PG の没食子酸部分がエステラーゼによりエタノールに転移する、すなわちエステル交換が起きたためと思われる。

このエステル交換は他のアルコールでも起こると思われるので、メタノール、イソブチルアルコール及びイソアミルアルコールについて、エステル交換が行われるかどうかを検討した。

10^{-3} M のアルコール及び PG と肝細胞を 1 時間インキュベーションしたとき、イソブチルアルコール及びイソアミルアルコールからもそれぞれ BG 及び AG を微量生成したが、メタノールから MeG の生成は TLC により検出されなかった。いずれの場合も PG の加水分解が行われ、多量の G が生成した。

アルコール濃度を 10^{-1} M にあげると MG も生成されたが、G の生成は抑制された。生成した MG, EG, BG 及び AG の残存 PG に対する量比はそれぞれ 0.08, 0.77, 0.24 及び 0.07 であった。PG の没食子酸部分は $C_1 \sim C_8$ のアルコールのうちではエタノールにもっとも転移しやすく、炭素数が多くなっても、また少なくなっても転移しにくくなると思われる。

PG とエタノールが同時に摂取された場合、PG が肝臓で EG に変換される可能性がある。しかしいずれは加水分解されてしまうので、尿中に EG が排泄されると

Table 3. Retention Times of Ethyl Gallate and Unidentified Substance on GC

Derivative	Column packing	Column temp.	Flow rate (ml/min)	Retention time (min) EG, x compound
TMS deriv.	Silicagel			
	DC-550	180°C	60	27.0
	3% OV-1	190°C	60	37.2
	2% SE-30	60°C	23	16.0
Acetyl deriv.	1% OV-1	200°C	20 (below)	4.0
	1% OV-1	160°C	20	6.0

Fig. 4. Mass spectra of ethyl gallate and x compound

GC-MS condition: source of temp., 200°C; ionization energy, 70 eV; column temp., 160°C; detector temp., 170°C; column, silicon 10% OV-1; derivative, acetylation.

は思われない。

PG は前報⁷⁾ の尿中排せつの実験から、一部は PG のまま抱合体になって尿中に排せつされるが、主として G に加水分解されて G 及びその抱合体と 4-O-メチル没食

子酸及びその抱合体として排せつされる。従って、排せつの第一段階は PG の加水分解であり、アルコール濃度が高くなると、PG の加水分解が抑制された事実は、アルコールの存在が PG の排せつを多少遅延するかもし

れない。

また食品添加物、医薬品のような化学合成品ばかりでなく、天然にもエステル類が存在するので、アルコールを同時に摂取した場合には、本報告に示したようなエステル交換が肝臓で起こる可能性がある。

総 括

ラット肝の分離生細胞を用いて PG の代謝及びその代謝に及ぼすアルコールの影響について研究した。

1. Hank の平衡塩液中で $10^{-3} M$ の没食子酸プロピルを分離肝細胞と 1 時間インキュベーションしたときの主要代謝物は没食子酸（うち 13% が抱合体）で、微量の 4-O-メチル没食子酸を生成した。なおこの 4-O-メチル没食子酸はメチオニンの添加により増量した。

腎細胞も PG を加水分解したが、1 時間のインキュベーションでは G の抱合体は認められなかった。

2. エタノールの存在下で PG を肝細胞とインキュベーションするとき、没食子酸部分がエタノールに転移して没食子酸エチルが生成された。エタノール濃度を 10^{-2} , $10^{-1} M$ と高めていくと EG の生成量が増加した反面、G の生成が抑制され、PG の残存量が増加した。

PG の没食子酸部分は $C_1 \sim C_5$ のアルコールのうちでエタノールに最も転移しやすく、炭素数が多くなっても、また少なくなっても転移しにくくなった。

終わりに実験に協力された小野寺 章、石毛美津江両氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Booth, A. N., Masri, M. S., Robbins, D. J., Emerson, O. H., Jones, F. T., DeEds, F.: J. Biol. Chem. **234**, 3014~3016 (1959).
- 2) Scheline, R. R.: Acta Pharmacol. Toxicol. **24**, 275~285 (1966).
- 3) Watanabe, A., Oshima, Y.: Agric. Biol. Chem. **29**, 90~93 (1965).
- 4) Potter, D. K., Fuller, H. L.: J. Nutr. **96**, 187~191 (1968).
- 5) Scheline, R. R.: J. Pharm. Pharmac. **18**, 664~669 (1966).
- 6) Scheline, R. R.: Acta Pharmacol. Toxicol. **26**, 332~342 (1968).
- 7) 新村寿夫, 兼俊明夫, 中島久男, 山羽 力: 食衛誌. **24**, 166~173 (1983).
- 8) Conney, A. H., Burns, J. J.: Science **178**, 576~586 (1972).
- 9) 渡辺日章: 化学と生物 **16**, 523~530 (1978).
- 10) 新村寿夫, 澤田敦行, 望月左弓, 時枝利江, 山羽力: 食衛誌. **20**, 338~344 (1979).
- 11) 竹村 功: 分析化学 **20**, 61~64 (1971).
- 12) Masri, M. S., Booth, A. N., DeEds, F.: Biochem. Biophys. Acta **65**, 495~500 (1962).
- 13) Masri, M. S., Robbins, D. J., Emerson, O. H., DeEds, F.: Nature **202**, 878~879 (1964).