

2) 尿中総イソチオシアネート代謝物の分析

(独) 農研機構 野菜茶業研究所 一法師 克成

はじめに

イソチオシアネート (Isothiocyanate) は、一般式 $R-N=C=S$ (図 1) で表される化合物の総称で、共通の化学構造としてイソチオシアネート基 ($-N=C=S$) を有し、キャベツ、ブロッコリー、ダイコンなどのアブラナ科野菜に特徴的な辛味および刺激臭を与える¹⁾。アブラナ科野菜が食物由来のイソチオシアネートの主な供給源となっている²⁾。内生酵素であるミロシナーゼ (Myrosinase) が植物体に含まれているグルコシノレート (Glucosinolate) に作用しイソチオシアネートを生成させる (図 1)。グルコシノレートは、オキシム基とエステル結合した硫酸残基を有する一種の塩で S-配糖体であり、側鎖 R の異なるものが 120 種類以上報告されている。植物体ではミロシナーゼと隔離され、植物体が傷害を受けるまではミロシナーゼと接触しないと考えられている。ミロシナーゼの酵素反応により加水分解されたグルコシノレートから D-グルコース (D-Glucose) とアグリコン (Aglycone) が生成し、さらにアグリコンからイソチオシアネートが生成する。

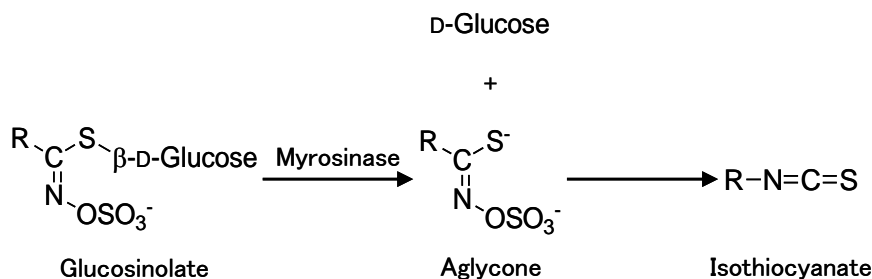
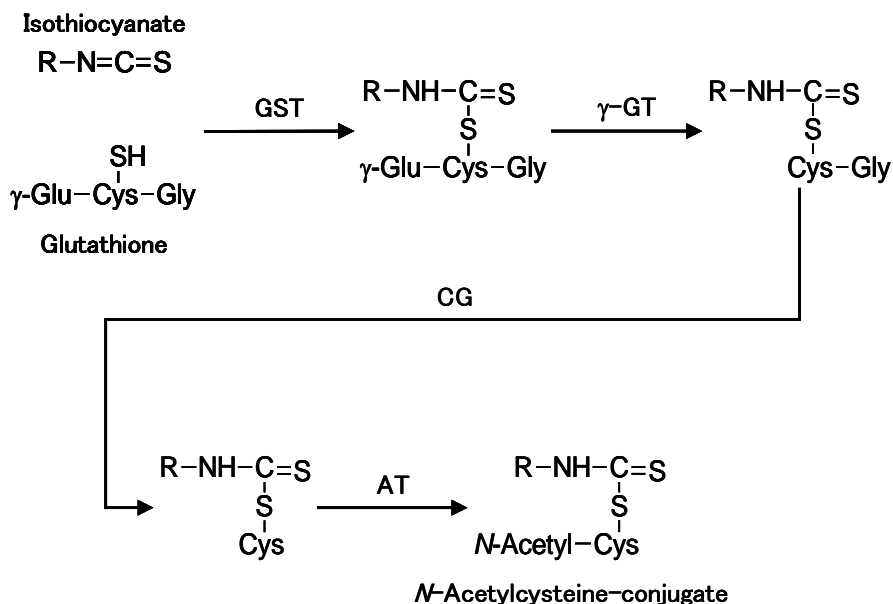


図 1 グルコシノレートからイソチオシアネートの生成

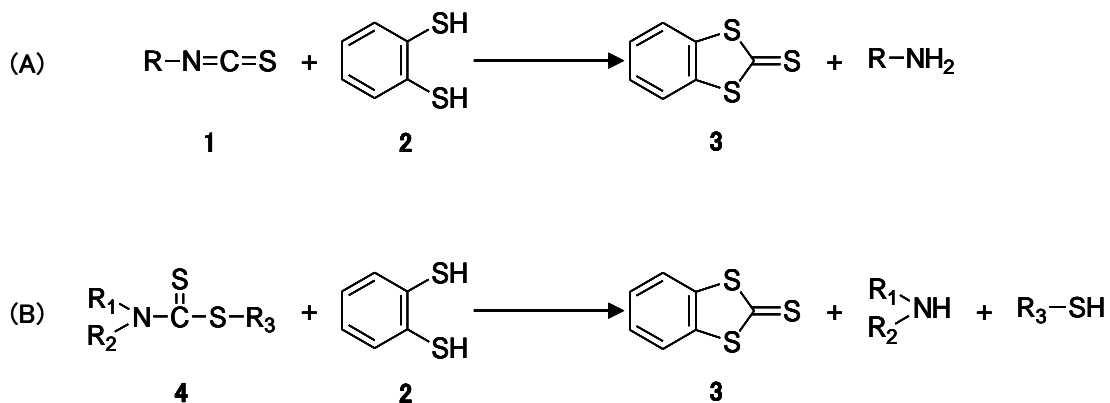
体内に吸収されたイソチオシアネートは、主にメルカプツール酸経路 (Mercapturic acid pathway) で代謝される³⁾ (図 2)。イソチオシアネートは、吸収後、自然にまたはグルタチオン S-トランスフェラーゼ (Glutathione S-transferase) の作用によりグルタチオン抱合化され、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -Glutamyltranspeptidase)、システイニルグリシナーゼ (Cysteinylglycinase) および N-アセチルトランスフェラーゼ (N-Acetyltransferase) の作用により、N-アセチルシステイン抱合体 (N-Acetylcysteine-conjugate) へと代謝

され尿へ排泄される。N-アセチルシステイン抱合体は、イソチオシアネートの主要な尿中代謝物であり、イソチオシアネートの体内吸収量を評価する上で重要な分析項目である。



GST: Glutathione *S*-transferase, γ -GT: γ -Glutamyltranspeptidase,
 CG: Cysteinylglycinase, AT: *N*-Acetyltransferase

図 2 イソチオシアネートの主要な代謝経路（メルカプツール酸経路）



1: Isothiocyanate, 2: 1,2-Benzenedithiol, 3: 1,3-Benzodithiole-2-thione, 4: Dithiocarbamate

図 3 1,2-ベンゼンジチオールを用いた縮合環化法

尿中の *N*-アセチルシステイン抱合体と 1,2-ベンゼンジチオール (1,2-Benzenedithiol) との反応から生成する 1,3-ベンゾジチオール-2-チオン (1,3-Benzodithiole-2-thione) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量することにより、イソチオシアネートの種類に関係なく、尿中のトータルの *N*-アセチルシステイン抱合体量を測定できる縮合環化法 (Cyclocondensation assay) が開発されている⁴⁾。元々、この 1,2-ベンゼンジチオールを用いる縮合環化法は、総イソチオシアネートの定量方法として開発された⁵⁾。イソチオシアネートを 1,2-ベンゼンジチオールと反応させ、生成する 1,3-ベンゾジチオール-2-チオンを分光光度計 (365 nm) または HPLC で定量する (図 3 の A)。イソチオシアネートの R の構造に関係なく、1 mol のイソチオシアネートから 1 mol の 1,3-ベンゾジチオール-2-チオンが生成する。その後、イソチオシアネート以外にも、ジチオカーバメイト (Dithiocarbamate) とも反応することが明らかとなり⁶⁾、*N*-アセチルシステイン抱合体 ($R_2 = H$, $R_3 = N$ -アセチルシステイン) の定量に利用されている (図 3 の B)。イソチオシアネートと同様に、*N*-アセチルシステイン抱合体の R (図 2) の構造に関係なく、1 mol の *N*-アセチルシステイン抱合体から 1 mol の 1,3-ベンゾジチオール-2-チオンが生成する。

準備するもの

1. 実験器具

- ・純水製造装置
- ・微量分注器およびチップ
- ・ボルテックスミキサー
- ・遠心機
- ・ヒートブロック
- ・オートサンプラーバイアル (2 mL 程度)
- ・その他ガラス器具
- ・その他プラスチック器具

2. 分析機器

HPLC システム; ポンプ, 紫外可視吸光検出器, カラムオーブン, デガッサー, データ処理装置, マニュアルインジェクターもしくはオートサンプラー

3. 試薬

- ・1,2-ベンゼンジチオール
- ・2-プロパノール (特級)

- ・りん酸二水素カリウム (特級)
 - ・水酸化カリウム (特級)
 - ・プロピルイソチオシアネート
 - ・メタノール (特級および HPLC 用)
 - ・水 (HPLC 用)
 - ・10 mM 1,2-ベンゼンジチオール溶液 ; 1,2-ベンゼンジチオールを 28.4 mg 量り取り, 20 mL の 2-プロパノールに溶解する.
 - ・0.1 M リン酸緩衝液 ; りん酸二水素カリウムを 1.36g 量り取り, 約 90 mL の純水に溶解し, 水酸化カリウムで pH を 8.5 に調整後, 純水で最終液量を 100 mL に調製する.
4. 1,3-ベンゾジチオール-2-チオンの HPLC 分析条件
- ・カラム : オクタデシル基化学結合型シリカゲル充填カラム. 各社から販売されている標準的なカラムであれば問題ないとする. 筆者は, 資生堂社製 CAPCELL PAK C18 (UG80, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm) を使用している.
 - ・移動相 : 70% メタノール/30% 水 (アイソクラティック)
 - ・移動相流速 : 1.0 mL/min
 - ・カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C
 - ・検出波長 : 365 nm
5. 検体
- 動物あるいはヒトの尿試料

プロトコール

図 4 にプロトコールの概略を示す.

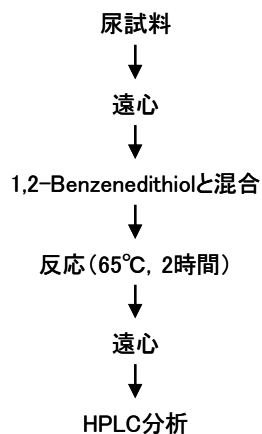


図 4 縮合環化法のプロトコールの概略図

1. 検量線用プロピルイソチオシアネート溶液の調製

プロピルイソチオシアネートをメタノールに溶解し、0~4mM の範囲で数点の検量線用プロピルイソチオシアネート溶液を調製する。原報では、1,3-ベンゾジチオール-2-チオンを合成し検量線を作成しているが、各濃度のプロピルイソチオシアネートに対して 2. で説明する縮合環化を行い検量線を作成した方が簡便である。

2. 1,2-ベンゼンジチオールを用いた縮合環化

- 1) 凍結保存していた尿試料を融解し攪拌する。
- 2) 遠心し不溶物を取り除く。
- 3) オートサンプラーバイアルに、10mM 1,2-ベンゼンジチオール溶液 (600 μ L) を添加し、次に 0.1M リン酸緩衝液 (500 μ L) を添加する。
- 4) 2) の遠心上清または検量線用プロピルイソチオシアネート溶液を 100 μ L 添加する。
- 5) 反応液を攪拌後、65 $^{\circ}$ C、2 時間、ヒートブロックでインキュベートする。
- 6) 反応液を室温に戻した後、遠心し不溶物を取り除く。
- 7) 6) の遠心上清を HPLC で分析する。

3. 1,3-ベンゾジチオール-2-チオンの HPLC 分析

尿試料中の *N*-アセチルシステイン抱合体または検量線用プロピルイソチオシアネートと 1,2-ベンゼンジチオールとの反応から生成した 1,3-ベンゾジチオール-2-チオンを HPLC で分析し、1,3-ベンゾジチオール-2-チオンの面積値を求める。参考にカイワレダイコンを摂取したラット尿を分析した例を図 5 に示す。

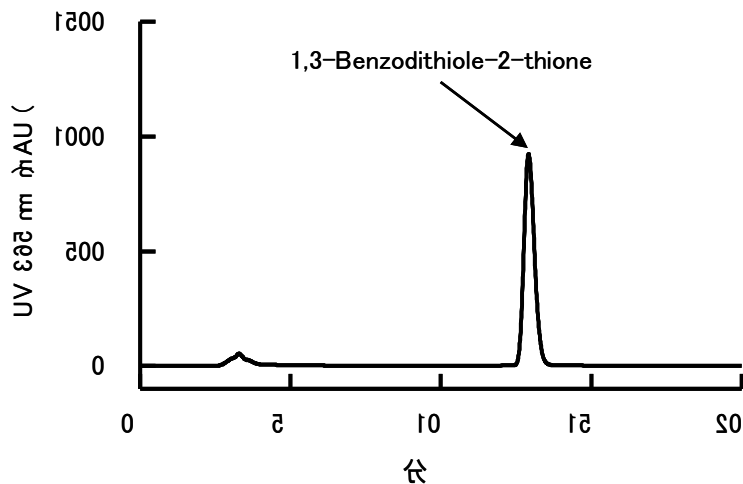


図 5 1,3-ベンゾジチオール-2-チオンの分析例

プロトコールのポイント

1. イソチオシアネートの主要代謝経路であるメルカプトール酸経路上の代謝物は、すべてジチオカーバメイト ($R_1-NH-C(-S-R_2)=S$) であることから、 R_1 の構造に関係なくイソチオシアネートおよびその代謝物は、1,2-ベンゼンジチオールと反応し、1,3-ベンゾジチオール-2-チオンを生成する。この理由により、1,2-ベンゼンジチオールを用いた縮合環化法は、体液（血液や尿など）中のトータルのイソチオシアネート+イソチオシアネート代謝物の定量に利用できる³⁾。
2. イソチオシアネート基に結合している炭素原子が第三級の場合（例えば、*tert*-Butyl isothiocyanate ($(H_3C)_3C-N=C=S$)）は、1,2-ベンゼンジチオールとの反応性が低い。しかし、このような第三級のイソチオシアネートおよびグルコシノレートが自然界に存在するという報告はない⁶⁾。

計算方法

検量線用プロピルイソチオシアネートの各濃度と生成した 1,3-ベンゾジチオール-2-チオンの面積値との間の検量線を作成し、尿試料の面積値から総イソチオシアネート代謝物の濃度を求める。

後片付け

1. HPLC 分析などに伴う有機廃液やチップなどの実験廃棄物等は、所属機関の規定に従い処理する。
2. HPLC 分析終了後、カラムは付属の取扱説明書に従い洗浄・保管する。

おわりに

動物実験レベルで明らかにされたイソチオシアネートの機能性を、今後、疫学調査などによりヒトレベルで実証することが期待される。その際、イソチオシアネート摂取バイオマーカーとして簡便に利用できる 1,2-ベンゼンジチオールを用いた縮合環化法 (Cyclocondensation assay) が極めて有用な道具になると思われる。

参考文献

- 1) Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P., The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*,

56, 5-51 (2001).

- 2) Johnson, I.T., Glucosinolates: Bioavailability and importance to health. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **72**, 26-31 (2002).
- 3) Zhang, Y., Cancer-preventive isothiocyanates: Measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat. Res.*, **555**, 173-190 (2004).
- 4) Chung, F.L., Jiao, D., Getahun, S.M. and Yu, M.C., A urinary biomarker for uptake of dietary isothiocyanates in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **7**, 103-108 (1998).
- 5) Zhang, Y., Cho, C.G., Posner, G.H. and Talalay, P., Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. *Anal. Biochem.*, **205**, 100-107 (1992).
- 6) Zhang, Y., Wade, K.L., Prester, T. and Talalay, P., Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzenedithiol. *Anal. Biochem.*, **239**, 160-167 (1996).