

などを生む要因になることを示唆している。

そこで、本研究では、造血障害、中枢神経障害、肝障害、生殖障害などを引き起こすことが報告されている鉛を試料として、雄性ラットに投与した場合の、精巣や肝臓におけるステロイドホルモン合成・分解に関わる数種の酵素遺伝子の発現変動を検討した。また、各 P450 分子種の発現・誘導における動物種差、性差など明らかにするにはそれらの発現制御機構の解析の必須であり、その解析には培養細胞を用いることが有利である。しかし、現在まで CYP1A1 を除く他の P450 分子種を発現する培養細胞株は樹立されていない。そこで、まず、ラット肝初代培養細胞より樹立した培養肝細胞株を用いて各種 P450 分子種の発現・誘導能を RT-PCR 法を用いて検討した。

B. 研究方法

1) 硝酸鉛投与時のラット肝および精巣における P450 分子種の発現変動

アンドロゲン合成阻害や肝増殖作用を有する鉛イオン（硝酸鉛: 100 $\mu\text{mol/kg}$, iv) を、4 週令雄性 SD ラットに投与し、肝や精巣の臓器重量およびこれら臓器におけるステロイドホルモン合成酵素（CYP51 や CYP11: それぞれ P450 分子種のひとつ）及び薬物やステロイドホルモンの代謝酵素（CYP1A1/2, 3A1/3A2 など）の発現への影響を RT-PCR 法を用いて検討した。

2) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

P450 分子種の発現機構の解析には培養細胞を用いることが有利であるが、現在まで CYP1A1 以外の P450 分子種を発現する培養細胞株は樹立されていない。そこで、まず、ラット肝初代培養細胞より樹立した培養肝細胞株を用いて各種 P450 分子種の発現・誘導能を RT-PCR 法を用いて検討した。また、硝酸鉛処理時の CYP51 分子種の発現変動も併せて検討した。

（倫理面への配慮）

P450 の発現制御機構に関する研究は、P450 を充分発現する培養細胞株が樹立されておらず、動物実験に依存しているのが現状である。本研究で、少なくともある種のラット P450 分子種については、既に樹立した肝培養細胞株で研究が可能となった。今後、ヒトを含め他の動物の P450 発現研究についても、順次研究材料となりうる細胞株の樹立・検索を進め、実験動物に依存する研究を少なくしたいと考えている。

C. 研究結果

1) 肝および精巣重量の変化

硝酸鉛を投与した後、経時的（3、6、12、24、48 時間後）に屠殺し、肝臓、精巣の各湿重量を測定した結果（図 1）、肝臓では投与 24 時間後から重量の増加が見られ、少なくとも、48 時間後まで継続した。一方、精巣重量は、投与 48 時間後まで有意な変化は見られなかった。

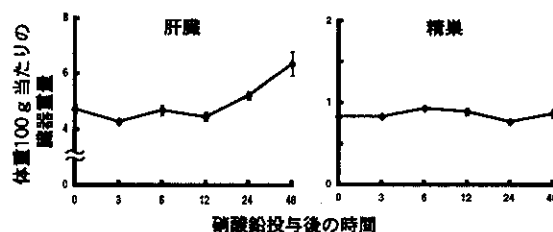


図1. 硝酸鉛投与後の肝臓と精巣の重量変化
各実験群 3 匹の平均値および標準誤差を示している。

2) 肝臓及び精巣におけるステロイドホルモン合成・分解系酵素遺伝子の発現変動

肝臓のコレステロール合成の律速酵素のひとつである HMG-CoA レダクターゼ遺伝子の発現は、硝酸鉛投与 3 時間後から上昇が見られ、投与 48 時間後まで継続した（図 2）。CYP51 遺伝子の発現は投与 12 時間後に増加が認められ、以後減少し、48 時間後にコントロールレベルに回復した。なお、肝ではコレステロー

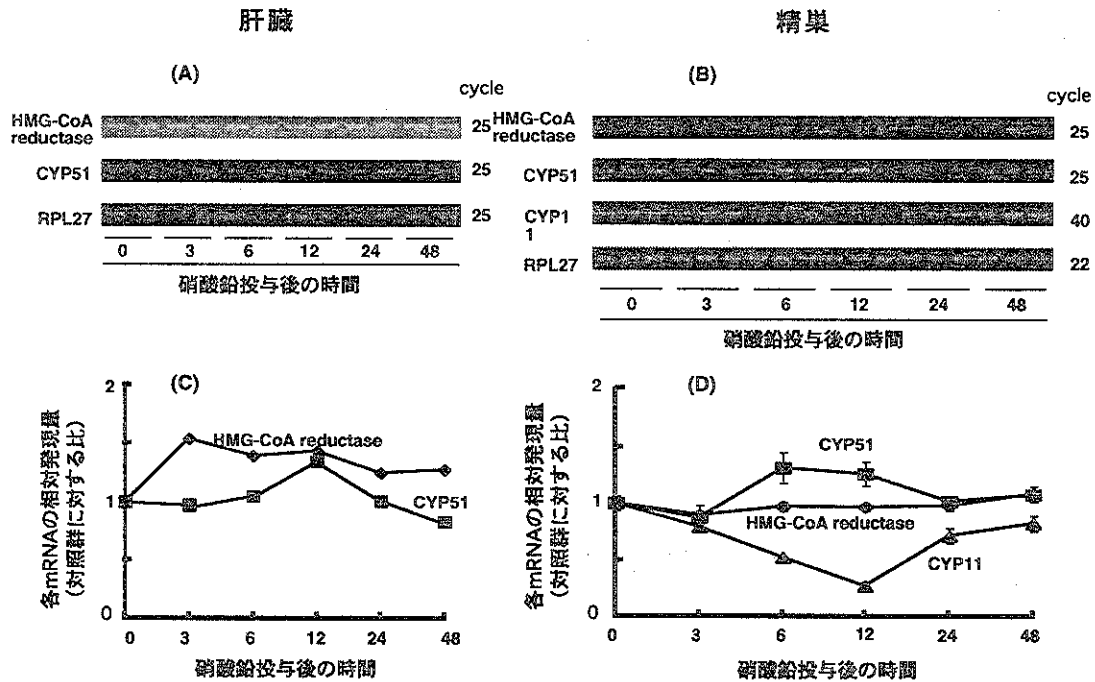


図2. 硝酸鉛投与後のラット肝臓および精巣におけるステロイドホルモン合成系酵素の発現変動

(A) & (B) : RT-PCR後の各生成物の電気泳動パターンを示している。

(C) & (D) : RPL27 mRNAの発現量を基準として各mRNA量を算出し、対応する対照群と比較した。

ルからのステロイドホルモン合成の最初の過程に働く P450_{scc} (CYP11) は発現しないことが確認された。また、精巣でも硝酸鉛投与 6-12 時間後に CYP51 遺伝子の発現上昇が見られたが、肝臓の場合とは異なり HMG-CoA レダクターゼの発現には大きな変化は見られなかった。また、精巣では常在的に発現している CYP11 の発現は、硝酸鉛投与 6 時間後から低下することが明らかになった (図 2)。

ステロイドホルモンの代謝に関わる酵素のうち CYP3A1 遺伝子の発現は、肝臓では、硝酸鉛投与により低下が認められたが、精巣では、逆に遺伝子の一過性 (投与 6 時間後) の上昇が見られた (図 3)。なお、CYP3A2 分子種の発現は、肝臓、精巣ともに、減少傾向が見られるに過ぎなかった。

3) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

雄性 SD ラットの初代培養肝細胞より樹立

した培養肝細胞株を用いて、数種の P450 分子種の発現状況を検索した結果、平常培養時には、CYP1A1、CYP2B1 および CYP51 の各分子種の発現が、また、タンパク質合成阻害剤のサイクロヘキシミド添加時には平常時に見られた CYP 分子種に加え、*in vivo* 肝細胞で発現している CYP1A2、CYP3A1/3A2 および CYP2B2 の発現も起こった。また、硝酸鉛を添加し、培養すると *in vivo* 肝の場合と同様に CYP51 遺伝子の発現増加が観察された。

D. 考察

本研究により得られた結果を、表 1 にまとめた。

精巣においては、硝酸鉛投与によりコレステロール合成系酵素のうち CYP51 の発現が上昇すること、また逆に、テストステロン合成の最初のステップを触媒するコレステロールの側鎖切断酵素 (P450_{scc} : CYP11) の発

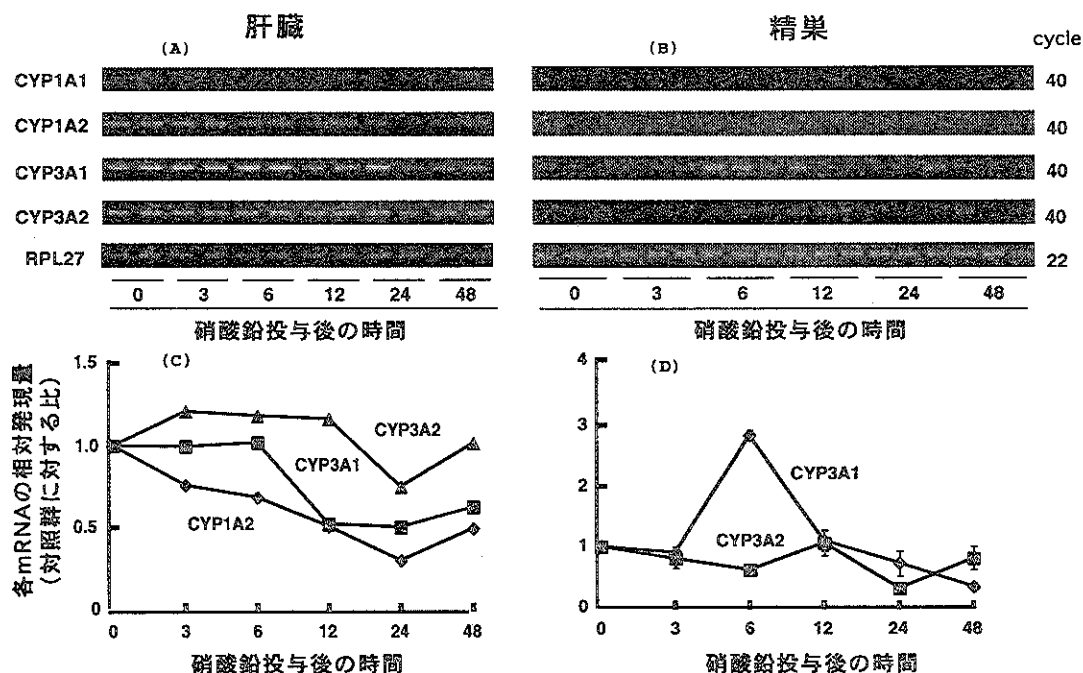


図3. 硝酸鉛投与後の異物・ステロイドホルモン代謝酵素の発現変動

(A) & (B) : RT-PCR後の各生成物の電気泳動パターンを示している。
 (C) & (D) : RPL27 mRNAの発現量を基準として各mRNA量を算出し、対応する対照群と比較した。

現が低下することが明らかとなった。また、テストステロンの分解代謝に関わる、CYP3A1 酵素遺伝子の発現が一過性ではあるが上昇することが明らかになった。本研究結果と、鉛投与によりラット精巣中のテストステロン量が低下するというこれまでの報告を考え合わせると、ステロイドホルモンの合成・分解経路全体として、CYP11 の減少がアンドロゲン合成の減少をきたす要因になっていると考えられる。

肝臓においては、硝酸鉛投与により、肝重量の増加とともにコレステロール合成系酵素 (HMG-CoA reductase や CYP51) の発現の上昇が見られた。また、これまで CYP51 遺伝子は、多種の生物において、また、あらゆる臓器に恒常的に発現するものとされ、その発現量はほとんど変動しないとされてきた。しかし、本研究により硝酸鉛投与により肝や精巣でその発現量が変動 (増加) することが示

され、細胞増殖や分化 (障害) と関連で新たな興味もたれる。

表1. 硝酸鉛投与によるラット肝臓および精巣でのステロイドホルモン合成・分解系酵素遺伝子の発現変動

| 測定した酵素遺伝子 | 精巣 | 肝臓 |
|-----------------------------|------|-------|
| コレステロール合成系酵素 | | |
| HMG-CoA reductase | → | ↗ |
| CYP51 | ↗ | ↗ |
| ステロイドホルモン合成系酵素 | | |
| P450 _{scc} (CYP11) | ↓ | N.D.* |
| ステロイドホルモン分解系酵素 | | |
| CYP1A1 | N.D. | N.D. |
| CYP1A2 | N.D. | ↓ |
| CYP3A1 | ↑ | ↘ |
| CYP3A2 | ↘ | ↘ |

*Not detected

一方また、高濃度ではあるが、硝酸鉛投与時、肝臓、精巣における種々の P450 分子種 (CYP1A や CYP3A など) が低下するため、

ステロイドホルモン及び異物に対する代謝機能の低下、さらには生体内における内分泌ホルモンのバランスのかく乱が推測される。したがって、今後、より低濃度での慢性曝露時の影響を精査することが必要と考えている。

以上得られた知見は、ステロイドホルモンの合成や分解に関与する P450 酵素の発現変動が、内分泌かく乱を惹起する要因になる可能性を強く示唆しており、現在、種々の動物を用いて、P450 酵素の発現変動と内分泌かく乱との関連性をさらに追跡中である。また、本研究では、肝臓、精巣における鉛の影響を検討したが、鉛の蓄積しやすい腎臓や糖質コルチコイド、鉱質コルチコイドなどのステロイドホルモン合成に関わる副腎などの臓器における影響も検討する必要がある。現在これらのことを考慮し、検討を進めている。

また、各種 P450 分子種を発現する培養細胞株を検索する一環として、すでに樹立していたラット肝培養細胞株を用いて種々 P450 分子種の発現・誘導能を調べた結果、少なくとも数種の P450 分子種 (CYP1A, 2B, 3A および CYP51) については、*in vivo* 肝細胞と類似の発現・誘導が観察された。したがって、現在本培養細胞株を用いて、上記 P450 分子種の発現制御機構の解明を進めている。

E. 結論

硝酸鉛をラットに投与し、肝および精巣におけるステロイドホルモンの合成・分解に関わる数種の P450 酵素への影響を分子生物学的手法を用いて比較検討し、臓器差 (肝及び精巣) を示す酵素があること、また、硝酸鉛曝露により精巣でのアンドロゲン量の減少が CYP11 の減少に起因している可能性を見出した。また同時に、これまでほとんどの臓器で発現し、かつ発現変動が少ないと考えられていたコレステロール合成に関わる CYP51 酵素の遺伝子が、硝酸鉛投与時、変動 (上昇) することなどの新知見を得た。以上の結果を踏まえ、今後さらに、発現変動が見られた P450

分子種を指標として、内分泌かく乱物質に対する感受性の種差・性差・臓器差の解析を継続する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. *Organohalogen Compounds*, 42, 337-340 (1999).

2. 学会発表

1. 吉本直樹, 並木雅幸, 宮田信吾, 根本清光, 橋本嘉幸, 出川雅邦: ラット培養肝細胞株における種々のチトクローム P450 分子種の発現. 第 6 回肝細胞研究会 (東京), 抄録集, 3, p.104, 1999 年 6 月 5 日.
2. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (Venice, Italy), 1999, Sep. 13.
3. 渥美 宏, 梅原 薫, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた生薬中のグルココルチコイド様成分の検索. 日本生薬学会第 46 回大会 (大阪), 要旨集, p.168, 1999 年 9 月 18 日.
4. 根本清光, 安本 勤, 宮田信吾, 村井詩, 出川雅邦: 硝酸鉛投与ラット肝での神経栄養因子およびその受容体の発現変動. 平成 11 年度日本薬学会東海支部会例会 (名古屋), 要旨集, p. 25, 1999 年 12 月 4 日.
5. 梅原 薫, 渥美 宏, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: 植物起源のグ

ルココルチコイド様物質の検索 (2). 日本薬学会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 2, p.57, 2000 年 3 月 29 日.

6. 吉本直樹, 今野芳浩, 根本清光, 出川雅邦: ラット肝細胞培養株を用いた CYP 分子種の発現機構の解明. 日本薬学会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 3, p.58, 2000 年 3 月 30 日.
7. 安本 勤, 宮田信吾, 根本清光, 根本文子, 村井 詩, 出川雅邦: 硝酸鉛によるラット肝増殖誘発時の神経栄養因子及びその受容体遺伝子の発現変動. 日本薬学

会第 120 年会(岐阜), 要旨集 3, p.75, 2000 年 3 月 30 日.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：
チトクローム P450 発現を指標として

分担研究課題：植物成分由来の内分泌かく乱物質の検索

分担研究者 梅原 薫 静岡県立大学 薬学部助手
(以下の研究者との共同研究として行った)

出川 雅邦 静岡県立大学 薬学部教授 (主任研究者)

根本 清光 静岡県立大学 薬学部助手 (分担研究者)

研究要旨：植物界における glucocorticoid (GC) 様物質の存在状況を明らかにするとともに、それらの単離及び構造決定を目的として、GC に対し高感度かつ特異的な作用点を有し、GC の作用発現機構を模したルシフェラーゼレポータージーンアッセイ系を構築した。この新たに構築した GC アッセイ系を用い、93 種の生薬・植物メタノールエキスのスクリーニングを行った結果、39 種のエキスが活性を示し、GC 様物質が広く植物界に分布することが認められた。活性を示したエキスの内、イヌマキについて活性成分の分離、構造決定を行った結果、GC 様物質として 8 種のフラボノイドを含む、計 11 種の化合物を得た。イヌマキより得られたフラボノイド、ならびに関連化合物計 28 種の GC 様活性を検討したところ、水酸基の数・結合位置の違い、及び糖の有無が活性に差を与えることが認められた。このアッセイ系は GC 以外にも、プロモーター部位を変える事で異なるホルモンに対する応答性を測定できる特長を持つ事から、広く環境ホルモン探索ツールとしての利用が期待される。

A. 研究目的

内分泌系は神経系及び免疫系と共に生体の恒常性を保つために重要な制御機構であり、乳癌や前立腺癌等、様々な疾患がその異常により引き起こされる。一方、医薬品はもとより、農薬、工業用化学物質等の中には、内分泌ホルモン様の生体内作用を持つものが少なくなく、蓄積性を示すこれらの物質が、環境中にて検出される例が相次いでいる。野生生物の繁殖や形態の異常現象が 1980 年代より論議的となっているが、これら環境中の内分泌障害性物質（環境ホルモン）による暴露が原因とする指摘もある。

ある種のクローバーを大量に摂取した羊に

生殖異常が起きたように、内分泌ホルモン様作用を有する物質は植物中にも存在することが知られる。その一例として、豆類、クローバー、アルファルファ等に含まれる coumestrol、genistein、daidzein 等の phytoestrogen と称される化合物群の存在はよく知られる。

ステロイドホルモンレセプターが核内レセプタースーパーファミリーを形成すること、植物二次代謝産物が多彩な有機化合物を擁することから、phytoestrogen 同様、高等植物中に他のステロイドホルモン様作用を持つ化合物が存在する可能性も推察された。食品・生薬等として摂取される植物は、その摂取量の多さから人間の暴露源として重要な意味を持

ち、その影響に関心が寄せられているが、その他の植物成分のホルモン様作用に関する報告は乏しいのが現状である。

一方で、副腎皮質ホルモンの一種である GC は糖質代謝に効果を示すことからそのように呼ばれるが、全身ほとんど全ての組織に作用し、糖質代謝だけでなく多くの生理作用に広く関わっている。特にストレス時には GC の分泌は増加し、糖、タンパク質、脂肪、電解質等の代謝系への作用の他に、中枢神経系の機能の調節、抗炎症、抗免疫作用の調節等に働き、生体の生存のために抗ストレスホルモンとして中心的な役割を果たす事が知られる。そのため、GC が欠乏した状態や、副腎が機能しない状態では生命維持が危ぶまれることになる。そこで申請者らは、高等植物中の GC 様物質検索を目的に、高感度な GC 検出系を構築し、ランダムスクリーニング、分離を行うこととした。

B. 研究方法

植物由来 GC 様物質の検索系として、以下のアッセイ法を用いた。

1) M1 分化誘導活性

マウス骨髄性白血病由来 M1 細胞は、GC による分化誘導を受けマクロファージに分化する。各サンプルの分化誘導活性を、GC antagonist 共存下の活性と比較し、GC 活性を検討した。

2) ルシフェラーゼアッセイ

GC は、細胞質内グルココルチコイドレセプター (GR) と複合体を形成した後、標的遺伝子の転写調節を行うが、中でもマウス乳頭腫ウイルスの long terminal repeat (MMTV-LTR) は、この複合体により転写活性化を受けるプロモーター領域を有する。そこで MMTV-LTR を luciferase 遺伝子上流に挿入したプラスミドベクター (MMTV-luciferase) を安定導入したラット線維芽細胞 3Y1 を用い、サンプル添加後の luciferase による発光量

を測定し、GC 活性を評価した。

(倫理面への配慮)

実験に際して研究者が、ホルモン様作用を有すると考えられる高濃度の被験物質に曝されることのないように、マスク、手袋等の着用を心掛けた。

C. 研究結果

GC に対し高感度かつ特異的な作用点を有するアッセイ系の構築を目的に、まず著者は GC の作用発現機構を模したレポーターアッセイ系の作製に着手した。

GC は細胞質内のグルココルチコイド受容体 (GR) と複合体 (GC-GR) を形成した後、ホモ二量体を形成する。この時、GR はそれまで複合体を形成していた hsp 90 と解離して活性型となり、この GC-GR 二量体が標的遺伝子のプロモーター領域に存在するグルココルチコイドレスポンスエレメント (GRE) に結合し、標的遺伝子の転写が活性化される。

GC 感受性プロモーターを有する遺伝子として知られるマウス乳頭腫ウイルスの long terminal repeat (MMTV-LTR) は、転写開始点より上流 200 塩基対の間に 4 個の GRE を持ち、遺伝子発現調節の実験モデルに繁用されている。そこで、MMTV-LTR をレポーター遺伝子である luciferase 遺伝子上流に挿入したプラスミドベクター (MMTV-luciferase) を作製し、このプラスミドベクターが安定に導入されたラット線維芽細胞 3Y1 の選抜を行い、GC に対する感度、及び特異性を検討した。

GC 処理で M1 細胞が分化誘導された時に獲得する食食能、及び MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞のルシフェラーゼ活性 (RLU 値) を指標に、両アッセイの感受性を比較した。その結果、ルシフェラーゼアッセイが 10^{10} M 以上の dex. で活性を検出したのに対し、M1 細胞分化誘導アッセイは 10^9 M 以下では活性を検出しなかったことから、ルシフェラーゼアッセイが M1 細胞分化誘導アッセイよりも 10 倍低濃度の GC に応答する事が確認された。

また、それぞれのアッセイの最大効果を比較した結果、ルシフェラーゼアッセイが約 30 倍の T/C を示したのに対し、M1 細胞分化誘導アッセイでは約 10 倍と、ほぼ 3 倍の開きが認められた (Fig. 1)。

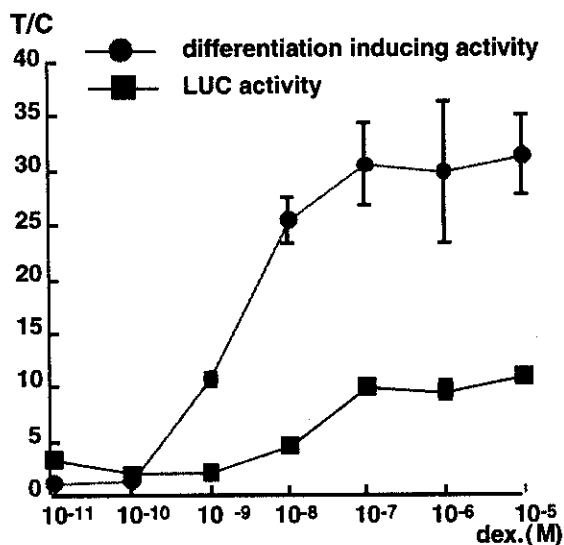


Fig. 1 Dex. に対する M1 細胞分化誘導活性及び MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞のルシフェラーゼ活性

以上の結果から、ルシフェラーゼアッセイが M1 細胞分化誘導アッセイよりもより低濃度の GC に応答し、かつ GC の存在がより明確な差となって現れる、高感度な GC 検出系である事が確認された。

MMTV-LTR は GC の他、プロゲステロン、アンドロゲンによっても転写制御を受けるこ

とが知られている。この事は、今回作製したルシフェラーゼアッセイ系が、プロゲステロン、アンドロゲンにも応答する可能性を示唆する。そこで MMTV-luciferase の GC 特異性を調べるため、構造類似の他のステロイドホルモンを含めた、各種ステロイド化合物をサンプルとし、ルシフェラーゼアッセイを行った。

アッセイに供したステロイド化合物は 1 μM の dex., dex. acetate (dex. Ac), hydrocortisone (corti.), progesterone (proge.), GC antagonist の RU486, 17 b-estradiol (E2), E2 antagonist の tamoxifen, testosterone propionate (TP), testosterone antagonist の flutamide, pregnenolone, b-sitosterol の 11 種である。

MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞は、GC である dex. (RLU : 2724), dex. Ac (2725), corti. (2326) に対し高い応答性を示す一方、その他のほとんどのホルモンに対してはコントロールレベルの RLU を示したに過ぎず、GC に対する特異性が示唆された (Fig. 2)。

この新たに構築した GC アッセイ系を用い、M1 細胞分化誘導作用を示し GC 様作用を持つ可能性の高い 50 種の試料を中心に 93 種の生薬・植物メタノールエキスのスクリーニングを行った結果、39 種のエキスが活性を示した。

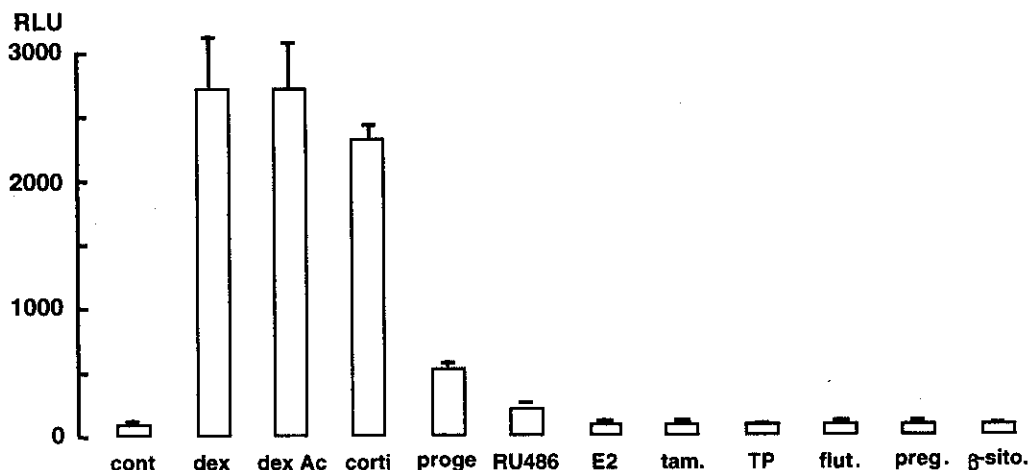


Fig. 2 様々なステロイド化合物のGC様活性

また、M1 細胞分化誘導作用との比較では、50 %以上の M1 細胞の分化を誘導したエキスは全てが GC 様活性を示したのに対し、25 %以上の M1 細胞の分化を誘導したエキスでは 25 種中 15 種 (60 %) が、10 %以上の M1 細胞の分化を誘導したエキスでは 19 種中 8 種 (42 %) が GC 様活性を示すに止まった (Table 1)。更に、分化誘導作用を示さないエキスでは、わずかに 43 種中 10 種 (23 %) が GC 様活性を示したに過ぎなかった。この事は、M1 細胞の分化誘導に GC receptor が強く関与する事を示唆する。

Table 1
生薬・植物メタノールエキスの M1 細胞分化誘導作用
及び GC 様活性

| 食食率 | ルシフェラーゼ活性 1) | |
|--------|---|---|
| | + | - |
| > 50 % | ゴボウシ、チョウジ、カミツレ、コンズランゴ、マキバブラシノキ、イチイ | |
| > 25 % | インチンコウ、ビャクジュツ、チンピ、ボンカン、エノキ、アマチャ、ヒマラヤキンシバイ、ヒキオコシ、ハギヤマモモ、オウバク、イヌマキ、ダイオウ、ヤーコン、タンポポ | アオキ、トウガン、キャベツ、イブキ、ビャクゼン、ジョウザンアジサイ、マサキ、サニーレタス、スイセン、ゴカヒ |

1) +, > 130 % T/C; -, < 130 % T/C.

ゴボウシ、チョウジ、カミツレ、コンズランゴ、マキバブラシノキ、イチイの各エキスは、GC 様作用ならびに分化誘導作用 (50 %以上の食食能) を併せ持つ事が認められた。これらの薬用植物について、著者らは既に M1 細胞分化誘導アッセイを用いて、活性本体の単離及び構造決定を行ってきた。それらの化合物の GC 様作用を、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。

アッセイには、oleanolic acid (12)、maslinic acid (13)、ponkanetin (14)、nobiletin (15)、matairesinol (16)、(-)-arctigenin (17)、condurangoglycoside A (18)、condu-rangoside B

(19)、trihydroxychalcone (20)、resveratrol (21) の 11 種の分化誘導物質を供し、それぞれ 100 ~ 0.1 μ M を MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞に作用させ活性を測定した。

その結果、フラボノイド (14, 15)、プレグナン配糖体 (19)、カルコン (20)、スチルベン (21) は 200 %を越える T/C を示した。中でも 15 の nobiletin は 100 μ M で 410 %の T/C を示し、今回ルシフェラーゼアッセイに供した化合物中で最強の GC 様活性を示した。一方、トリテルペン (12, 13)、リグナン (16, 17) は 130 %前後の T/C を示すに過ぎなかった。

高等植物中の GC 様物質単離を目的に、今回 25 %以上の M1 細胞分化誘導作用を持ち、且つ GC 様作用も併せ持つエキスからイヌマキを選び、分離・構造決定を行った。イヌマキ *Podocarpus macrophyllus* (Thumb.) D. Don (マキ科 Podocarpaceae) は、本州中南部、四国、九州、沖縄の暖地の山林に生え、日本各地及び中国で植栽される常緑高木である。種子と花托を採集して日干しにしたものを羅漢松実と称し民間的に心胃痛に用いられる他、葉と根皮も薬用とされる。

まず、イヌマキの枝葉乾燥重量 1.7 kg を熱時メタノールで還流抽出後、減圧濃縮しエキスとした。得られたエキスを水に懸濁しヘキササンで分配した後、水層はさらに酢酸エチルで分配を行った。MMTV-luciferase 導入 3Y1 細胞を用いた GC 様活性試験の結果、酢酸エチル層に強い活性が認められた。そこで酢酸エチル層について、GC 様活性を指標としながらヘキササン-酢酸エチル系、クロロホルム-メタノール系による順相シリカゲルクロマトグラフィー、水-アセトニトリル系、水-メタノール系による逆相 ODS カラムを用いた HPLC 等による分離を繰り返し、amentoflavone (1)、podocarpusflavone A (2)、isoginkgetin (3)、sciadopitysin (4)、hinokiflavone (5)、2,3-dihydrohinoki-flavone (6) 等のフラボンダイマーをはじめとする 8 種の化合物を GC 様物質

として得た (Chart 1)。

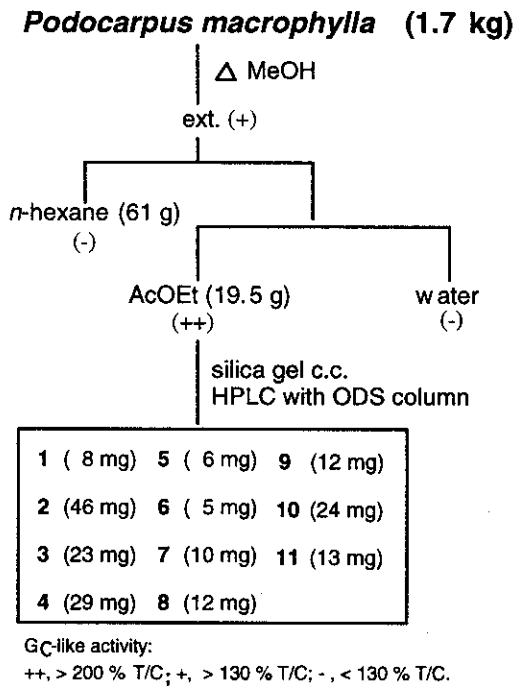


Chart 1

今回イヌマキからはフラボン同士が C-3' と C-8" 間で結合したものと、C-4' と C-6" 間で結合した、2 つのタイプのフラボンダイマーが得られている。

C 3'- C 8" 結合タイプのフラボンダイマー (1~4) では、メトキシル基を有するものに活性が認められ、更にその数によって活性に差が認められた。2 つのメトキシル基を 4', 4" 位に有する 3 は 10 μM の濃度で T/C 243 % を示し、最も強い活性を示したが、メトキシル基を 3 つ有する 4 は、メトキシル基を有する C 3' - C 8" 結合タイプのフラボンダイマーの中で最も弱い活性であった。

一方、C 4'- C 6" 結合タイプのフラボンダイマー (5, 6) では、同じ水酸基の置換パターンを有しながら、フラボン同士が結合した 5 がフラボンとフラバノンの結合した 6 よりも強い活性を示した (Fig. 3)。

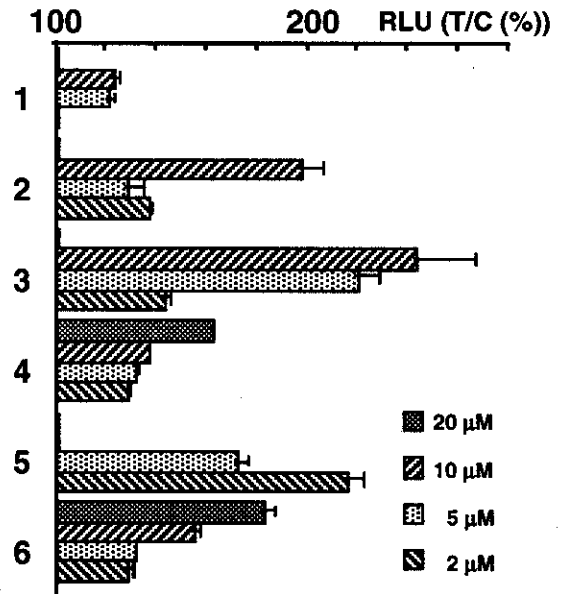


Fig. 3 フラボンダイマーのGC様活性

フラボノイドの GC 様作用が明らかとなったことから、1~6 のフラボンダイマーを構成する apigenin 並びにその類縁化合物についてルシフェラーゼアッセイを行った。則ち、flavone (22)、7-hydroxyflavone (23)、chrysin (24)、apigenin (25)、apigenin-7-glucoside (26)、rhoifolin (27)、naringenin (28)、daidzein (29)、genistein (30)、及びイヌマキより単離した 7、8 の 11 種についてその GC 様活性を検討した。

A 環の置換パターンに違いを有する化合物 22 - 24 の比較からは、5 位、5, 7 位における水酸基の存在により活性が低下する傾向が認められた。しかし、B 環 (4'位) にも水酸基が置換され、5, 7, 4'位に水酸基をもつ 25 は 22 よりも強い活性を示しており、同様の傾向はイソフラボン 29、30 の場合にも認められた。

一方、5, 7, 4'位に水酸基を持つフラバノン 28 は強い GC 様活性を示したが、3 位に水酸基を有するフラバノール 7、8 には僅かな活性を認めるに過ぎなかった。また、25 の配糖体 26、27 の例から、糖の存在によって活性が低下する事が認められた (Fig.4)。

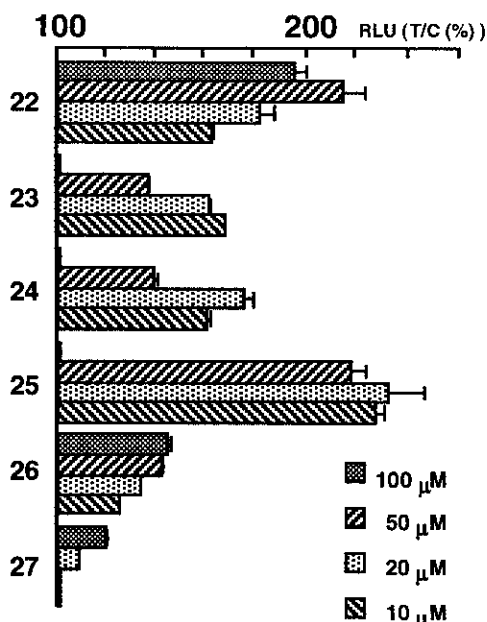


Fig. 4 フラボンダイマーのGC様活性

D. 考察・結論

GCを始め、ステロイドホルモン、ビタミンA、Dのレセプター等が近年クローニングされ、これらのリガンド・レセプター複合体が極めて類似した遺伝子制御機構を持つことが、分子レベルで明らかにされつつある。今回構築したアッセイ系は、*in vitro*でホルモンの遺伝子転写制御機構を分子生物学的手法を用いて再現したもので、 10^{-10} MのGCに应答する高感度性且つ特定された作用点を有する。このアッセイ系はプロモーター部位を変える事により、異なるホルモンに対する応答性を測定できる特徴を持つ事から、広く環境ホルモン探索ツールとしての利用が期待できる。

ステロイドホルモンレセプターは核内レセプタースーパーファミリーを形成することから、phytoestrogen同様、多彩な有機化合物を擁する天然物中に他のステロイドホルモン様作用を持つ化合物が存在する可能性が推察された。事実、オタネニンジン (*Panax ginseng*) に含まれる ginsenoside-Rg1 (G-Rg1) がGRに結合して作用を発現する事が、1998年 Chungらにより報告されている。しかし、G-Rg1以外に植物成分にGC様作用を見出だし

た例はなく、植物界におけるGC様物質の存在状況についての報告もなされていない。今回新たに構築したGCアッセイ系を用いた生薬・植物メタノールエキススクリーニングの結果、93種の生薬、植物メタノールエキスの内、39種が活性を示し、植物界にGC様物質が広く存在する事が示された。

イヌマキから得られた8種のフラボノイドとその関連化合物、計19種のルシフェラーゼアッセイにおけるGC様作用を測定し、その構造活性相関を検討した。flavone (22)、7-hydroxyflavone (23)、chrysin (24)はそれぞれ水酸基を0個、1個(7位)、2個(5, 7位)有するが、保有する水酸基の数が増加するにつれ活性が低下する傾向が認められた。これは、水酸基数の増加によって分子の極性が増大し、細胞膜に対する親和性、細胞質に存在するGC receptorとの結合能の低下によってもたらされたと考えられる。この事は、naringenin (28)とaromadendrin (7)、taxifolin (8)の場合にも当てはまる。更に、C3'-C8"結合タイプのフラボンダイマー(1~4)において、メトキシ基を有する podocarpusflavone A (2)、isoginkgetin (3)、sciadopitysin (4)には活性が認められるのに対し、置換基が全て水酸基の amentoflavone (1)には活性が認められなかった事も、水酸基による極性増大の結果と考えられる。しかし、3個の水酸基を5, 7, 4位に有する apigenin (25)は、水酸基を持たない flavone (22)よりも強い活性を示した。同様の傾向が、水酸基を2個(7, 4'位)有する daidzein (29)と3個(5, 7, 4'位)有する genistein (30)のイソフラボン同士を比較した場合にも認められた。以上の事から、GC様活性の発現には保有する水酸基数のみならず、その結合位置も重要な要因であることが示唆された。

また、apigenin (25)とその配糖体 apigenin-7-glucoside (26)、rhoifolin (27)の比較から、糖の存在によって活性が大幅に低下する事が認められた。これは、水酸基数の増加の場合と同様に、糖の存在により分子の極性が増大し

た結果と考えられる。置換基が全てメトキシ基である nobiletin (15) が今回ルシフェラーゼアッセイに供した化合物中最強の活性を示したのも、その低極性故と考えられる。

Phytoestrogen の daidzein (29) 及び genistein (30) が、今回の GC 様物質検出アッセイにおいて共に強い GC 活性を示した事は、非常に興味深い。Estrogen receptor と GC receptor のリガンド結合部は、アミノ酸配列において 30 %の相同性を有する事が既に明かされているが、この結果は phytoestrogen が estrogen receptor のみならず、GC receptor にも結合し、GC 様の作用を発現している可能性を示唆するものと考えられる。

今回構築したアッセイ系で用いたラット細胞の GR は、ヒト GR とアミノ酸配列において 90 %の相同性を有しており、このアッセイ系で検出された GC 様物質がヒトの生体内において作用を発現する可能性も高いものと考えられる。従って、この GC アッセイ系を用いて多彩な有機化合物を擁する植物二次代謝産物中より新たに GC 様物質を検索することにより、従来の GC 剤よりも優れた抗炎症・

免疫抑制作用を持ち、副作用の弱い薬物、あるいは新規制癌剤の開発に役立つことが期待される。また近年、様々な疾患の異常が、遺伝子転写レベルで起こる事が解明されつつあり、特定の遺伝子転写制御能を持つ物質の有用性は増すものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. 渥美 宏, 梅原 薫, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた生薬中グルココルチコイド様成分の検索, 日本生薬学会第 46 回年会(大阪), 要旨集, p.168, 1999 年 9 月 18 日.
 2. 梅原 薫, 渥美 宏, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: 植物起源のグルココルチコイド様物質の検索 (2). 日本生薬学会第 120 年会(岐阜), 要旨集 2, p.57, 2000 年 3 月 29 日.

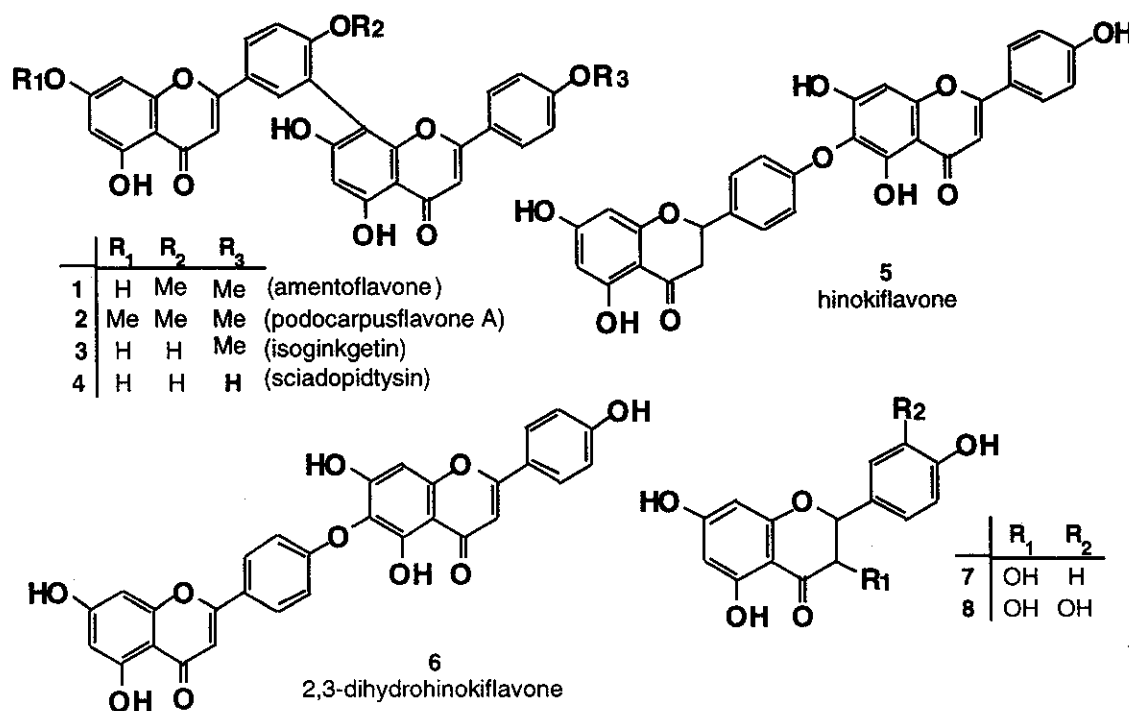


Chart 2

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：

チトクローム P450 発現を指標として

分担研究課題：チトクローム P450 誘導能を指標とする *in vitro* 毒性系の確立

分担研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部教授

研究要旨：環境中の内分泌かく乱物質の生体に及ぼす影響を調べることを目的に、ディーゼル排気粉塵抽出物のヒトチトクローム P450 に及ぼす影響とそれらの代謝的活性化について検討した。ディーゼル排気粉塵 (DEP)のベンゼン・エタノール抽出物 (DEPE)と大気浮遊粉塵に検出される 1-ニトロピレン (1-NP)、ジニトロピレン (DNP)、ニトロフルオランテン (NF)および 6-ニトロクリセンを対象としてこれらの遺伝毒性を、ヒトチトクローム P450 ファミリー 1 に属する P450 酵素と P450 還元酵素 (NPR)との大腸菌を用いた共発現系を利用して調べた。3 種の DEPE に、*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 に対する直接的な *umu* 遺伝子発現作用が認められた。調べた 4 種の DEPE はさらに P450 1B1/NPR によって代謝的活性化された。DEPE-1 と命名したサンプルは、P450 1B1/NPR の他に、P450 1A2/NPR による活性化も認められたが、P450 1A1/NPR または NPR では活性化されなかった。1-NP は P450 1B1/NPR によって強く活性化され、さらに 1,8-DNP が P450 1A1/NPR と 1B1/NPR に活性化されて最も高い値を示した。一方、1,3-DNP は P450 1A1/NPR、P450 1A2/NPR および P450 1B1/NPR によって不活性化されたが、NPR によってわずかに活性化反応を受けた。2-NF と 3-NF は P450 1B1/NPR によって 1-NP と同程度活性化されたが、6-ニトロクリセンの活性化は弱かった。見かけの DEPE の遺伝毒性はニトロアレン標準品と比較して弱かった。この理由のひとつとして、DEPE がヒト P450 1B1/NPR の阻害作用を示すことが示唆された。以上の結果から、近年発見されたヒト P450 1B1 が、浮遊粉塵中に存在する化学物質、ディーゼル排気粉塵抽出物や、1-NP、1,6-DNP、1,8-DNP、2-NF、3-NF などのニトロ芳香族炭化水素類の代謝的活性化に関与することが判明した。ニトロアレン類や大気汚染物質のヒトの肝外臓器、とくに P450 1B1 が発現している組織に対する生体影響に関心が持たれる。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質など、環境中の化学物質の生体に及ぼす影響を調べることを目的に、大気中の粉塵粒子成分と組成が類似しているディーゼル排気粉塵抽出物とそれらに含有されるニトロ芳香族炭化水素類のチトクロ-

ム P450、特にヒト family 1 の酵素に及ぼす影響を調べるため、それらの代謝的活性化ならびに不活性化について、*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 を用いた *umu* 法で検討した。近年、ディーゼル排気成分に内分泌かく乱物質作用があるとの指摘がある。これらの環境

化学物質は 1980 年代に主に変異原性・発癌性における代謝的活性化の観点から研究がなされてきた。この化学物質、特にニトロ芳香族炭化水素の代謝的活性化はヒト P450 1A1 や 1A2 を用いて詳細な検討がなされてきた。しかし、1994 年にヒトにおいても発見された P450 1B1 のニトロ芳香族炭化水素の代謝的活性化における役割は現在まで全く考慮されていない。化学物質の生体に対する影響を調べるため、薬物代謝酵素、特にチトクローム P4501A1 と 1A2 の発現を指標とした研究もなされてきたが、P450 誘導作用においても P450 1B1 には着目されてこなかった。以上の観点から、今回は、大気中のニトロ芳香族炭化水素類の代謝的活性化に焦点を絞り、ヒトを含めた実験動物で肝外臓器に広く発現している P4501B1 に着目し、環境汚染物質の代謝における役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ディーゼルエンジン搭載車の排気粉塵を捕集してベンゼン・エタノール抽出物を調製した。ガラスファイバーフィルターを排気管の 30 cm 後ろにセットし、エアサンプラーを用いて毎分 30 分の流量でディーゼル粉塵を捕

集した。粉塵はベンゼン・エタノール (3:1) で超音波処理により抽出した。有機層を留去し、エタノールに溶解した (20 mg/ml)。DEPE-1、-2、-3 および-4 と命名したサンプルはそれぞれディーゼルエンジン搭載車(1993 年型 2.8 L、1996 年型 2.5 L、1990 年型 4.1 L、1989 年型 7.4L) から調製した。これらの主要成分は約 100 - 500 μ M のベンズ[a]アントラセン、ベンズ[a]ピレン、ベンゾ[ghi]ピリレン、ベンゾ[b]フルオランテンおよびベンゾ[k]フルオランテンであり、ニトロ芳香族炭化水素類は、これらの約 100 分の 1 であった。

ディーゼル排気粉塵抽出物とニトロ化合物標準品の代謝的活性化におけるヒト P450 1A1、1A2 および 1B1 の役割を、*S. typhimurium* TA1535/pSK1002 を用いる *umu* 法による DNA 損傷性を指標にして調べた。組換えヒト P450 発現系には主に大腸菌 *E. coli* を宿主とする P450/NPR 共発現系を調製し、市販のパキユロウイルス発現系と B-リンパ芽球発現系も用いてヒト P450 酵素の触媒活性を比較した。

P450 1B1 の役割を確認するため、 β -ナフトフラボン誘導したラット肝ミクロソームを調製した。

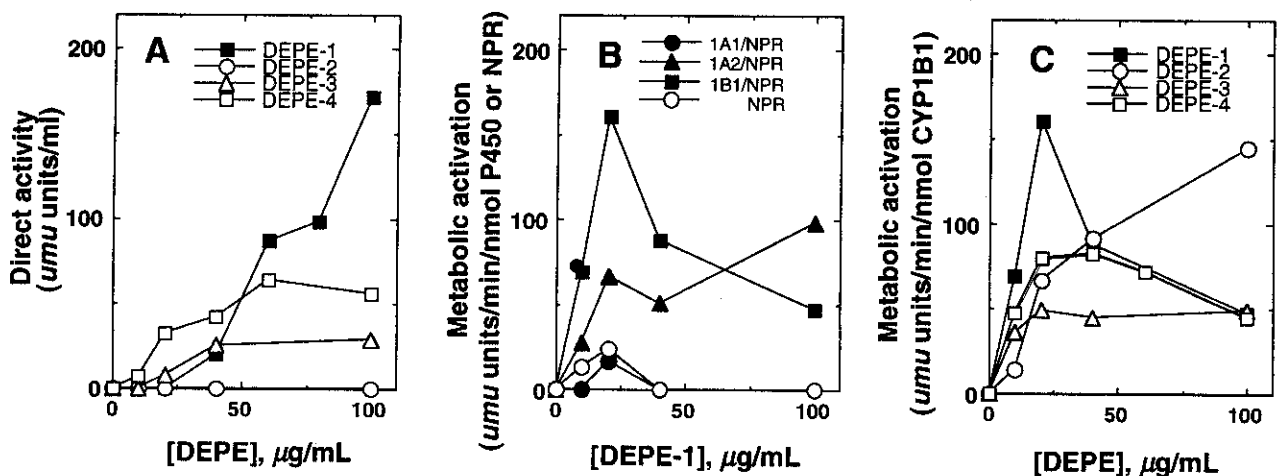


Fig. 1. Genotoxicity of DEPE in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

(A) *umu* gene expression of four samples of DEPE without activation systems; (B) bioactivation of a sample designated DEPE-1 by human P450s 1A1/NPR membranes, 1A2/NPR membranes, and 1B1/NPR membranes and by human NPR membranes, and in (C), bioactivation of four samples of DEPE by human P450 1B1/NPR membranes. Background levels of *umu* gene expression were subtracted. Results are presented as means of duplicate determinations.

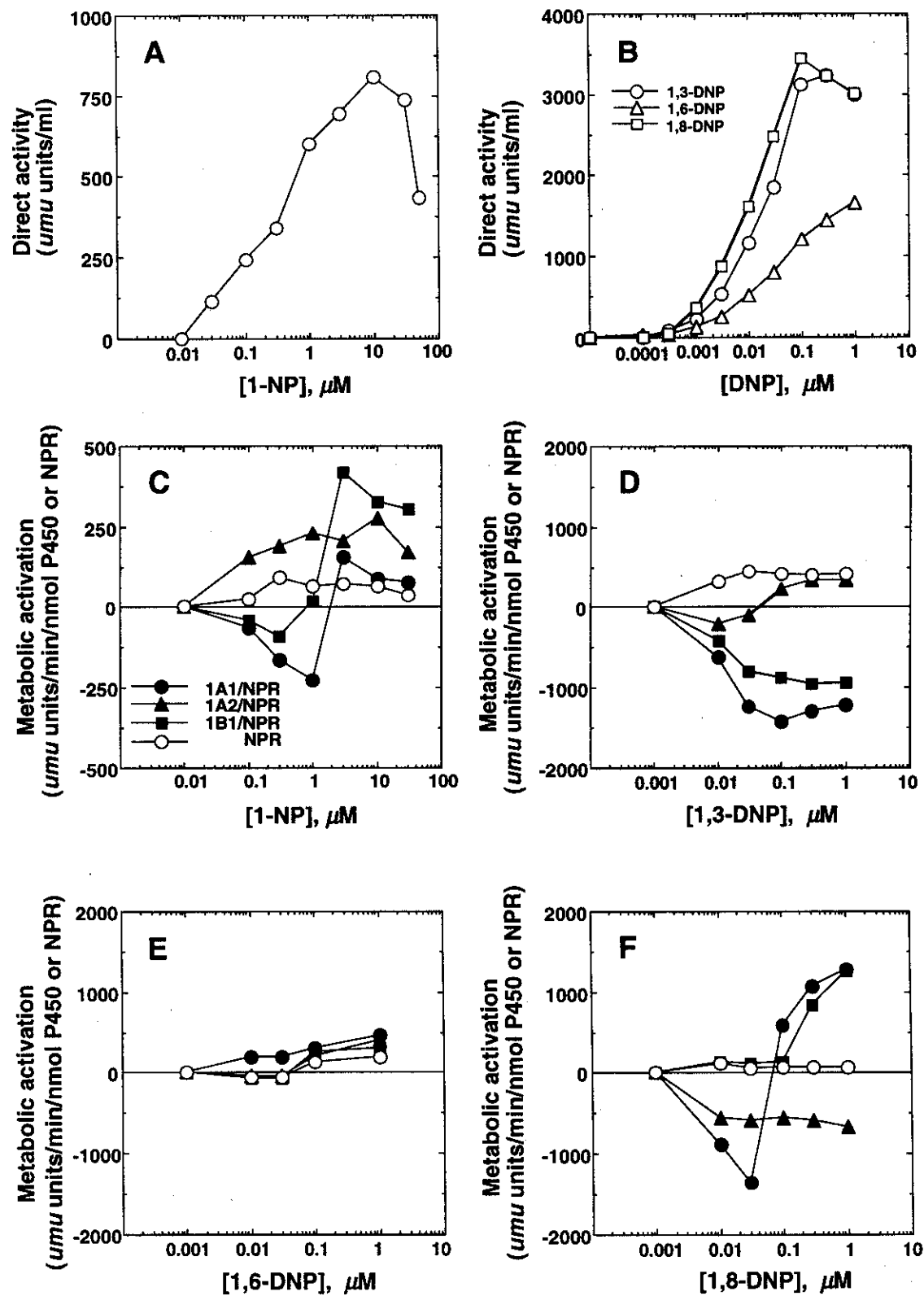


Fig. 2. Genotoxicity of 1-NP and dinitropyrenes in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

(A) *umu* gene expression of 1-NP without activation systems. (B) *umu* gene expression of 1,3-DNP, 1,6-DNP, and 1,8-DNP without activation systems. (C-F), Bioactivation of 1-NP (C), 1,3-DNP (D), 1,6-DNP (E), and 1,8-DNP (F) by human P450s 1A1/NPR membranes, 1A2/NPR membranes, and 1B1/NPR membranes and by human NPR membranes. In parts C-F, the *umu* response was measured in the absence and presence of the enzyme system; thus negative values indicate inactivation. Results are presented as means of triplicate determinations.

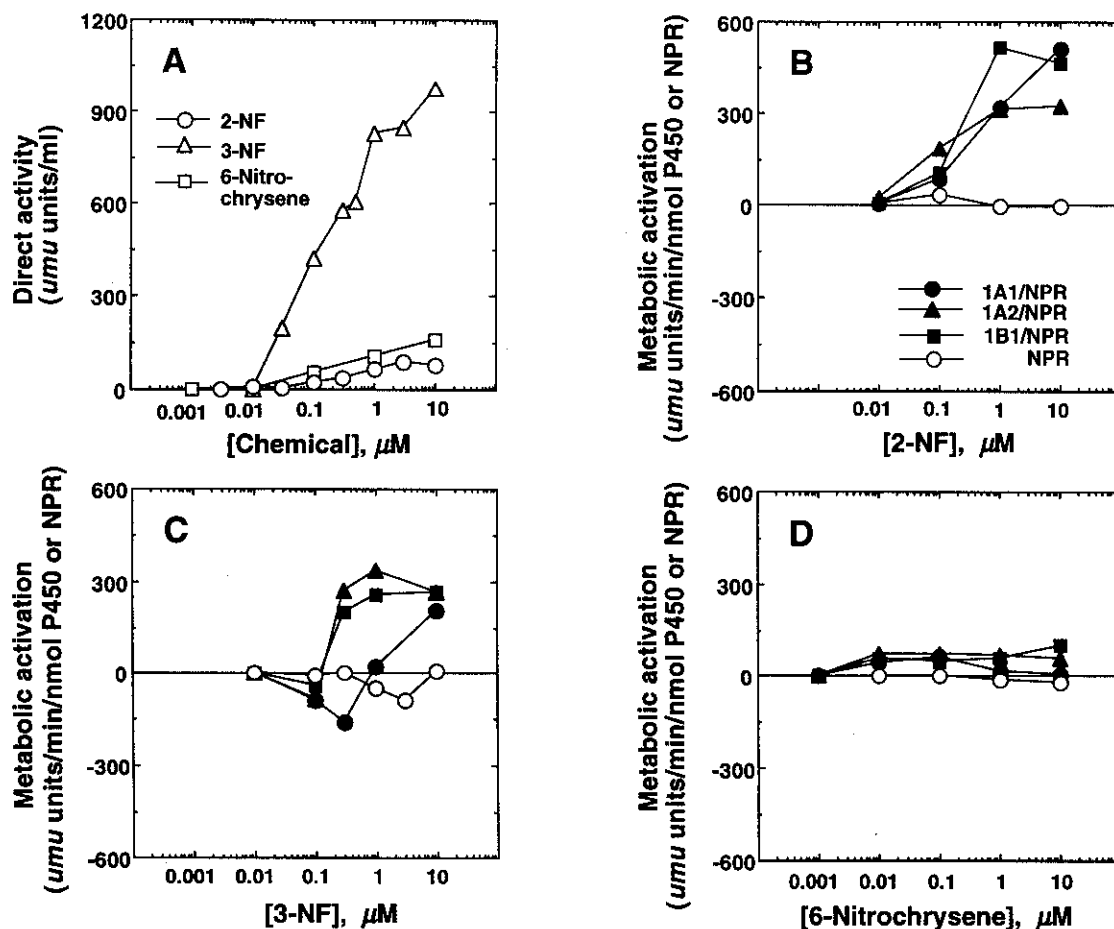


Fig. 3. Genotoxicity of 2-NF, 3-NF, and 6-nitrochrysene in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

(A) *umu* gene expression of 2-NF, 3-NF, and 6-nitrochrysene without activation systems. (B-D), Bioactivation of 2-NF (B), 3-NF (C), and 6-nitrochrysene (F) by human P450s 1A1/NPR membranes, 1A2/NPR membranes, and 1B1/NPR membranes and by human NPR membranes. Background levels of *umu* gene expression were subtracted. Results are presented as means of triplicate determinations.

C. 研究結果

S. typhimurium TA1535/pSK1002 を用いる *umu* 法による DEPE の DNA 損傷性を調べた (Fig. 1)。3 種の DEPE に、*S. typhimurium* TA1535/pSK1002 に対する直接的な *umu* 遺伝子発現作用が認められた (Fig. 1A)。DEPE-1 と命名したサンプルは、P450 1B1/NPR の他に、P450 1A2/NPR による活性化も認められたが、P450 1A1/NPR または NPR では活性化されなかった (Fig. 1B)。P450 1B1/NPR による活性化は調べた 4 種の DEPE すべてに認められた (Fig. 1C)。

次にニトロ化合物標品の遺伝毒性を調べた (Fig. 2)。1-NP と 1,3-, 1,6-および 1,8-DNP はいずれも直接的な DNA 損傷性を示したが (Figs. 2A, 2B)、1-NP は P450 1B1 によって強く活性化され (Fig. 2C)、さらに調べた中で 1,8-

DNP が P450 1A1 と 1B1 に活性化されて最も高い値を示した (Fig. 2F)。一方、1,3-DNP は P450 1A1/NPR、P450 1A2/NPR および P450 1B1/NPR によって不活性化されたが (Fig. 2D)、NPR によってわずかに活性化反応を受けた。

2-NF と 3-NF は P450 1B1/NPR によって 1-NP と同程度活性化されたが、6-ニトロクリセンの活性化は弱かった (Fig. 3)。

P450 1B1 による代謝的活性化反応を確認するため、他のヒト組換え P450 発現系を用いて調べた。Table 1 に用いた 3 種の発現系の P450 1A1、1A2 および 1B1 のエトキシレゾルフィンと 7-エトキシマリノ脱エチル化酵素活性とピレン、1-NP、1,3-DNP の代謝的活性化と不活化活性を示した。薬物酸化酵素活性が低いリンバ芽球発現系を用いて調べた場合に高い代謝的活性化または不活化が見られた。

見かけの DEPE の遺伝毒性はニトロアレン標準品と比較して弱かった。この理由のひとつとして、DEPE がヒト P4501B1/NPR の 1-NP と 1,8-DNP の代謝的活性化反応と CYP1B1 の 7-エトキシマリン脱エチル化酵素活性に対する阻害作用を示すことが判明した (Fig. 4)。

ヒト組み換え P450 酵素と対比させる目的で、

ラット肝ミクロソームによる DEPE-1 とニトロ芳香族炭化水素の代謝的活性化も検討した (Fig. 5)。DEPE-1 の代謝的活性化は本条件下では検出されなかった。しかし、1-NP などの活性化反応の濃度依存性は、ヒト P450 1B1/NPR を用いて見られた場合と類似していた。

Table 1 Bioactivation or inactivation of pyrene, 1-nitropyrene, and 1,3-dinitropyrene by recombinant human P450s 1A1, 1A2, and 1B1 co-expressed with NPR in different systems

| P450 | Expression system | NPR/P450 (molar ratio) | O-Deethylation ^a (nmol/min/nmol P450) | | Metabolic activation (umu units/min/nmol P450) | | |
|------------------|-------------------------------------|---------------------------|---|------------------|---|------------------|----------------------|
| | | | Ethoxyresorufin | 7-Ethoxycoumarin | Pyrene (3.0 μM) | 1-NP (3.0 μM) | 1,3-DNP (0.03 μM) |
| 1A1/NPR | <i>E. coli</i> membranes | 0.82 | 95 | 32 | 132 | 154 | -1230 |
| | Insect cell microsomes | 6.5 | 125 | 62 | 51 | 92 | -1360 |
| | Lymphoblastoid cell microsomes | 2.2 | 42 | 10 | 30 | 735 | -1850 |
| 1A2/NPR | <i>E. coli</i> membranes | 0.28 | 6 | 0.5 | 50 | 205 | -106 |
| | Insect cell microsomes | 1.2 | 10 | 2.6 | 29 | 484 | -826 |
| 1A2 ^b | Lymphoblastoid cell microsomes | 0.08 | 1 | 0.2 | 6 | 144 | 829 |
| 1B1/NPR | <i>E. coli</i> membranes | 1.03 | 51 | 7.2 | 148 | 416 | -792 |
| | Insect cell microsomes ^c | 0.45 | 18 | 1.1 | 16 | 185 | -1300 |
| | Lymphoblastoid cell microsomes | 0.25 | 5 | 0.3 | 29 | 1310 | -444 |

Chemicals (0.03 - 3.0 μM) were incubated with 0.010 μM recombinant P450 for 2 h at 37 °C in the presence of *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 and induction of *umu* gene expression in the tester strain was determined. Results are means of duplicate or triplicate determinations.

^a O-Deethylation activities of ethoxyresorufin and 7-ethoxycoumarin expressed as nmol products formed/min/nmol P450.

^b P450 1A2 expressed in lymphoblastoid cell microsomes was a monocistronic system.

^c Notes. Insect cell microsomes containing P450 1B1 and NPR had heat-sensitive background levels of β-galactosidase activities (~1600 units/mL per 10 pmol P450 1B1 equivalent proteins), however, bioactivation was calculated after subtracting the high background.

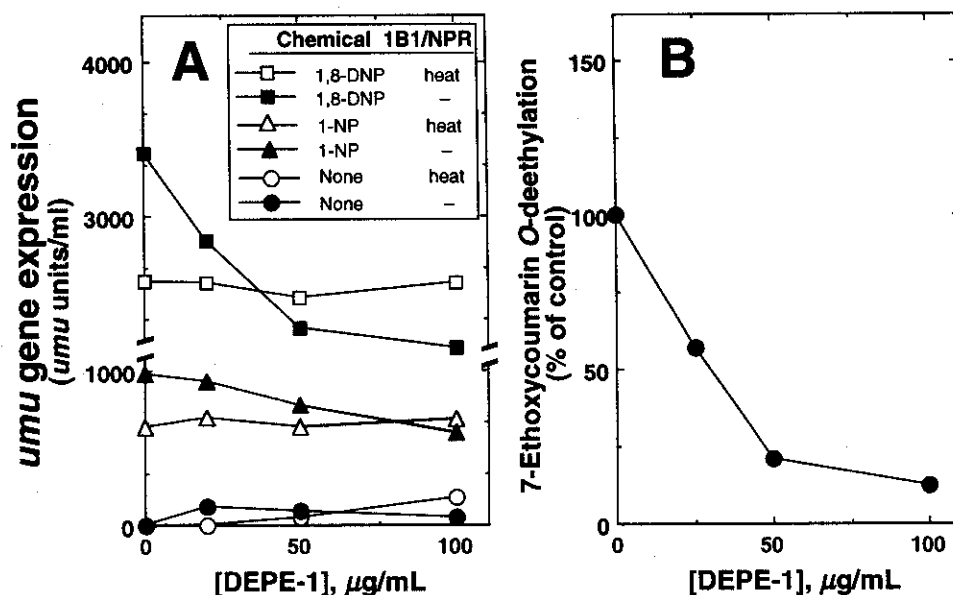


Fig. 4. Inhibitory effects of DEPE-1 on bioactivation of 1-NP and 1,8-DNP (A) and on 7-ethoxycoumarin O-deethylation activities (B) catalyzed by human P450 1B1/NPR membranes in the presence of *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

(A) 1-NP (3.0 μM) or 1,8-DNP (0.3 μM) was incubated with DEPE-1 (0 - 100 μg/mL) and heat-inactivated or intact P450 1B1/NPR membranes. (B) Control activity of 7-ethoxycoumarin O-deethylation (at 100 μM) without DEPE was 8.2 nmol/min/nmol P450 1B1. Results are presented as means of duplicate determinations.

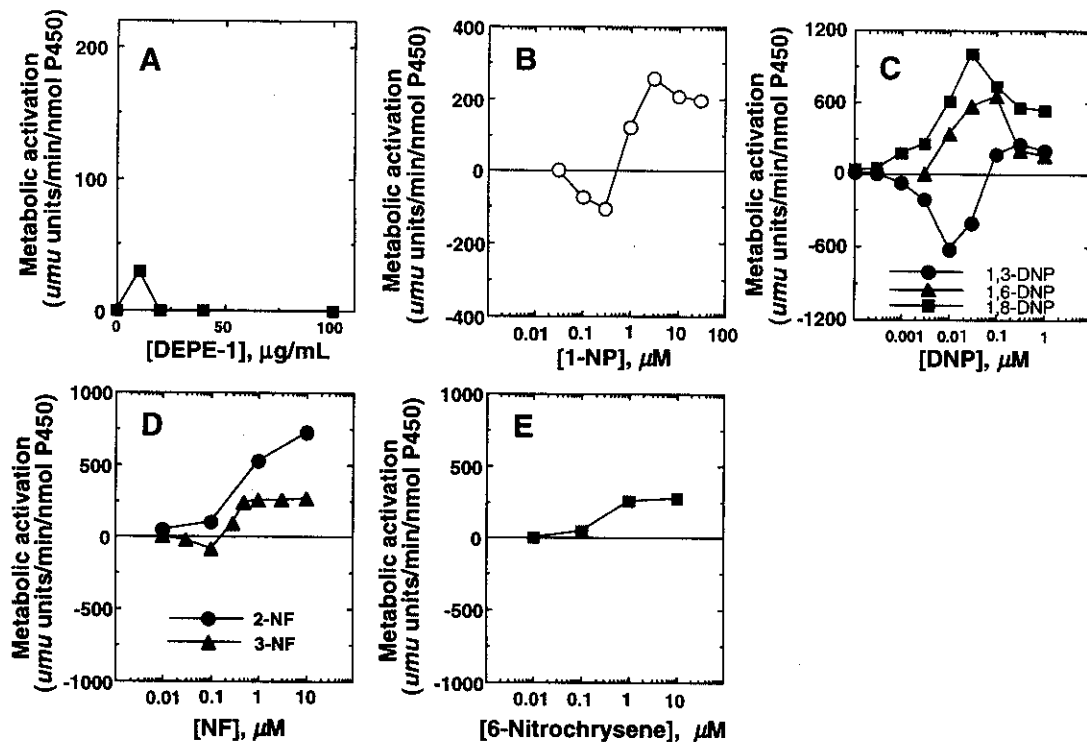


Fig. 5. Activation and inactivation of DEPE-1 (A), 1-NP (B), DNPs (C), NFs (D), and 6-nitrochrysene (E) by liver microsomes from β -naphthoflavone-treated rats in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

Results are presented as means of duplicate (in A) or triplicate (B-E) determinations.

D. 考察

近年発見されたヒト P450 1B1 が、内分泌かく乱作用を持つことが指摘されているディーゼル排気粉塵抽出物やニトロ芳香族炭化水素類の代謝的活性化に関与することが明らかとなった。

ディーゼル排気粉塵抽出物は主にヒト P450 1B1 によって代謝的活性化を受けた。しかし、その組成中にはヒト P450 1B1 によって DNA 障害を示す成分のほか、P450 1B1 の触媒作用を阻害する成分も含まれることが示唆された。このことが、DEPE とニトロ化合物標品が示す活性値の差異の一因であることが示唆された。

ニトロピレン類など環境中の化学物質には生体内の代謝酵素を誘導する作用があり、誘導能の動物種差が知られている。現在、ディーゼル排気粉塵抽出物あるいはニトロピレン類によるヒト P450 1A1、1A2 および 1B1 の誘導能とその機構を検討している。

E. 結論

近年発見されたヒト P450 1B1 が、浮遊粉

塵中に存在する化学物質、ディーゼル排気粉塵抽出物や、1-NP、1,6-DNP、1,8-DNP、2-NF、3-NF などのニトロ芳香族炭化水素類の代謝的活性化に関与することが判明した。ニトロアレン類や大気汚染物質のヒトの肝外臓器、とくに P450 1B1 が発現している組織に対する生体影響に関心が持たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有件の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：
チトクローム P450 発現を指標として

分担研究課題：ダイオキシン類のチトクローム P450 酵素による
代謝とその動物種差・性差

分担研究者 藤井 宏融 呉大学 看護学部教授

研究要旨：2,3,7,8-TCDD のチトクローム P450 酵素による代謝に関する次の 3 点について検討した。

- 1) 2,3,7,8-TCDD 分析条件設定：ヒューレットパッカード社の HP5973 システムで最適な分析を次のように設定した。分析カラム：HP-5、分析温度：70-280℃（15℃/min 昇温）、検出限界：1 pg (S/N: 5)。代謝産物の測定は SIM (m/z : 322, m/z : 257) で検出し、2,3,7,8-TCDD の m/z : 257 と代謝産物のそれとの比で定量した。
- 2) 2,3,7,8-TCDD 抽出方法の決定：ジクロロメタンで抽出、ジクロロメタン層を分取、乾燥後、ヘキサン（またはノルマルノナン）で再溶解、GC/MS に注入
- 3) 2,3,7,8-TCDD のミクロソーム系での代謝産物検出：酵素標品としてラット肝ミクロソーム、電子供与体としての NADPH、基質として 2,3,7,8-TCDD を 37℃ で 1-2 時間保温し、ジクロロメタン 1 ml を加えて反応を停止させた。前記条件で抽出、分析した結果、1 種類の分解産物を検出した。この物質のフラグメントイオンは m/z : 257(100.0), m/z : 126(55.9), M/z : 239(21.6)であった。

A. 研究目的

ダイオキシン類とはジベンゾパラジオキシン構造を持つ化合物の同族体である。ダイオキシン類は製品の不純物として含有され、廃棄方法や、廃棄物の不備な燃焼処理によって生じるものである。したがって、広範囲の環境、我々にとって必要不可欠な水、空気、食物に分布している可能性がある。したがって、ダイオキシンの摂取は好むと好まざるとに関わらず避けることができない問題である。不可避に生体に摂取されたダイオキシンの消長を検討することは急務の問題である。ダイオキシン類の体内からの排出には、その脂溶性から代謝によ

るところが大であり、しかも体内動態（吸収・代謝・排泄）のなかで代謝は生体からの排泄に大きく関与しており、ダイオキシン類の代謝は早急に検討する必要がある。特に代謝経路、代謝物の種類、代謝の関与する酵素のアイソザイム、代謝の程度を知ることが必要不可欠である。しかし現在ヒトでの代謝はほとんど検討されていない。

ダイオキシン類の代謝の概要が明らかになれば、この代謝酵素の修飾（酵素誘導、酵素阻害、活性亢進）によって代謝の一部を制御することが可能になる。しかし、ヒトのダイオキシン類の半減期は長く、代謝活性は低いと考えられ、その検討は困難と