

PCB126 による SeBP の誘導機構を明らかにするため、我々は、PCB126 処理によるラット SeBP mRNA の変化を、定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。Control、pair-fed および PCB126 処理ラット肝臓より total RNA を調製し、RT-PCR を行った。コントロールとして、 β -actin の mRNA レベルについても同様に定量した。その結果を Fig. 7 に示している。

PCR の増幅は、予備的検討の結果から、両タンパク質とも 27 cycle とした。また、SeBP に関しては、primer p54F1 と p54R2 を用い、532 bp のバンドを、 β -actin に関しては、primer ACTF1 と ACTR1 を用い、194 bp のバンドを定量した。PCR の結果、これらのバンド以外のバンドは検出されなかった (データ未掲載)。定量的 RT-PCR の結果、PCB126 処理ラット肝臓において SeBP の mRNA は、顕著に増加していた。これに対して、pair-fed 処理群においては、control に対して顕著な変化を観察することはできなかった。定量の結果、PCB126 処理により、SeBP の mRNA は、control に比べ約 400% 増加していることが明らかとなった (Table 3)。

3. 考察

Reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) によるラット肝SeBPのcDNAクローニングおよび open reading frame (ORF) 全長を含む塩基配列の決定

本研究において、新たにラット SeBP cDNA の塩基配列を明らかにし、Ah-receptor の ligand の 1 つである PCB126 による mRNA での誘導を明らかにした。

決定された cDNA は全長 1685 bp であり、ORF および 3', 5'-noncoding region を含んでいた。明らかにされた塩基配列およびそれより予想されるアミノ酸配列は、マウス SeBP、APBP およびヒト SeBP のそれと高いホモロジーを示した (Fig. 4 and 5, Table 2)。最近のゲノムプロジェクトの進行に伴い、SeBP と予想されるタンパク質は、*C. elegance* や *A. thaliana* 等にも見い出され、DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide database に登録されている。SeBP のタンパク質の発現に関する報告は非常に少ないが、その gene が、*C. elegance* 等にも見い出されていることから、進化の過程において種を越えて高度に保存されているタンパク質である可能性が考えられる。もしそうであるならば、SeBP の生理的機能は生物にとって非常に重要なものであると考えられる。

最近、intra-Golgi 輸送における SeBP の関与が報告された (39)。一般的に、小胞体からゴルジ装置への vesicle の移行には、いくつかのサイトソルに存在する factor が必要であると考えられている。著者らは、その報告の中で、ゴルジ装置におけるタンパク輸送に関与する factor について調べるため、ウシ脳のサイトソルをクロマトグラフにより分画し、各フラクションにおける影響を、intra-Golgi cell-free transport

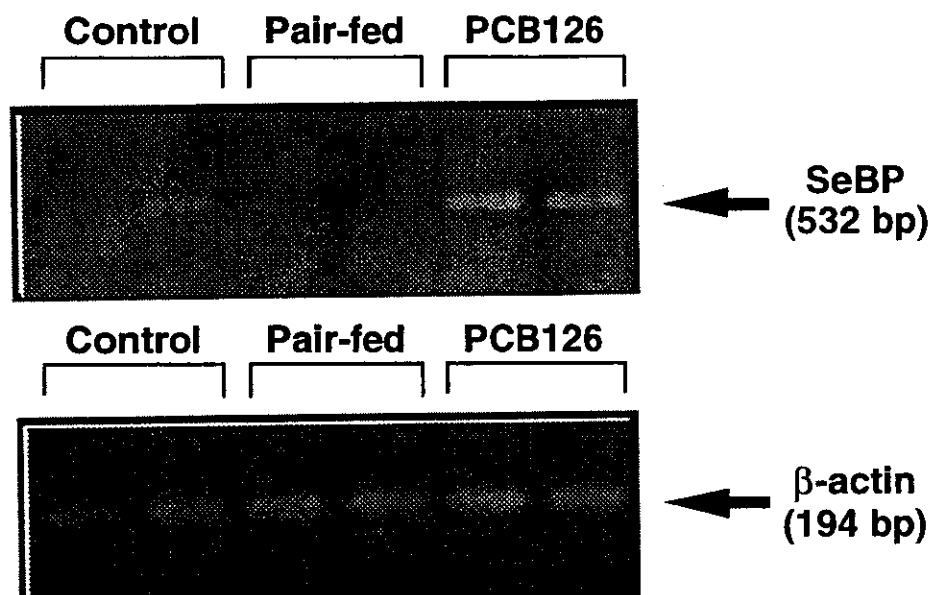


Fig. 7. Total mRNA expression of rat selenium-binding protein (SeBP) analyzed by quantitative RT-PCR. A 532 bp fragment encodes the open reading frame of SeBP was amplified by RT-PCR. As control, a 194 bp fragment of β -actin was also amplified. Both PCR products were separated in a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Stained bands were scanned and quantified using quantification software. Representative results of PCR analyses are given from distinct two rats.

Table 3. Relative abundance of selenium-binding protein (SeBP) mRNAs estimated by RT-PCR of the liver total RNAs of the treated rats.

treatment	SeBP/ β -actin	X-fold induction
Control (2)	0.285	1.00
Pair-fed control (1)	0.176	0.62
PCB126 treatment (2)	1.132	3.97

The band of the 532 bp (SeBP) and 194 bp (β -actin) PCR products on the gel shown in Fig. 21 were analyzed and quantified. The relative intensities of the bands were shown in the table. The data of control and PCB126 treatment are the means of two independent experiments, but the data of pair fed control was the value from one experiment. The numbers in the parenthesis represent the number of experiment.

assay を用いて測定した。その結果、活性を顕著に増加させるフラクションの1つに、分子量 56 kDa のSeBP が含まれていることを明らかにしている。この活性の増加は、assay 系に添加する SeBP 含有フラクションの量に依存しており、また、免疫沈降により SeBP を除去したサイトソルを assay 系に添加した場合、タンパク質輸送を示す活性が低下すること、さらに、精製 SeBP を加えることで、その活性が回復することも明らかにしている。さらに興味深いことに、SeBP に対する抗体で前処理した後、通常のサイトソルに切り替え活性を測定した場合、その活性がほとんど低下しない。このことから、SeBPはゴルジ装置内のタンパク質輸送のlate stage で働いている可能性が示唆されている。

その他にも、SeBPの生理的機能については様々な可能性が報告されている。これまでに、我々は、陽イオン交換カラムおよび Rotofor Cell™ を用いてSeBPを精製している (51)が、精製 SeBP におけるセレンとの結合比は一般的な selenoprotein に比べ非常に低いものであった。マウスやヒトのSeBPのcDNA中に、セレノシステインをコードするような TGA コドンは存在していない (31, 52)。今回明らかにしたラットSeBPのcDNA中にもそれと考えられる TGA コドンは存

在しなかった。それゆえ、ラット SeBP も、GPx や selenoprotein P のような selenoprotein と異なる方法でセレンと結合していると考えられる。一方、ラット SeBP 中には、マウスおよびヒトの SeBP と同様 bis (cysteiny) sequence motif の存在する可能性が示唆された (50)。この motif は、thioredoxin (53), thiol:protein disulfide oxidoreductase (54), lipoamide dehydrogenase (55), endoplasmic reticulum protein (56), protein disulfide isomerase (57), formate dehydrogenase (58) にも存在することが知られており、酸化還元反応の center として機能していることが示唆されている (50, 59)。さらに、Jamba らは、SeBP が酸化還元反応に関与する可能性について報告しており (38, 50)、我々も、NAD(P)H: quinone oxidoreductase 様の活性を有している可能性を報告している (60)。これらの結果から SeBP におけるセレンの存在の重要性について明らかにすることはできないものの、細胞内において、セレノシステインを含む selenoprotein とは異なる機構で酸化還元に関与するような機能を有している可能性が考えられる。

定量的 RT-PCR 法を用いた PCB126 による SeBP の mRNA 量の変化

ダイオキシン類や多環芳香族炭化水素は、生体に対して様々な毒性を示すことが知られているが、その毒性発現には、Ah-receptor が関与すると考えられている (9, 10)。これらの化学物質は、Ah-receptor の ligand としてよく知られており、また、cytochrome P450の isoform である CYP1A1 (61, 62)、CYP1A2 (61,

62) および CYP1B1 (61, 63)、glutathion S-transferase Ya subunit (64, 65)、NAD(P)H: quinone oxidoreductase (66) 等の薬物代謝酵素を誘導することが知られている。我々の研究室においても、ダイオキシン類の1つである PCB126 において、ALDH-3 (33)、HSP70 (67)、HSP90 (67) が誘導され、それとは逆に carbonic anhydrase III (68)、aldorase B (69)、alcohol dehydrogenase (70)、GRP78 (71)、GRP94 (71) の発現が抑制されることが明らかとなっている。これらタンパク質の誘導機構については、これまでに CYP1A1 をモデルタンパク質として詳細な検討がなされている (9, 10)。今回の結果から、PCB126 による SeBP の誘導は転写レベルにおいてなされていることが示唆された。このことは、SeBP をコードする遺伝子上流における、XRE の存在を示唆するものであり、SeBP が、Ah-receptor - XRE pathway を介して発現調節を受けている可能性が示唆された。

4.

ダイオキシン類は、環境中に広く分布した環境汚染物質の一つであり、近年、内分泌攪乱物質の一つとして挙げられているように、人体に対する影響が危惧されている化学物質である。当研究室では、これまで、ダイオキシン類の一つである高毒性コプラナー PCB の毒性発現機構の解明を目的として、PCB126 処理動物を用いた研究を行ってきた。本研究では、ダ

イオキシン類誘導性ラット肝サイトソル SeBP について、その誘導的発現調節に注目し研究を行った。本研究で得られた知見を要約して以下に示す。

1. ラット SeBP cDNA の ORF-full length を含む約 1.7 kbp の塩基配列を明らかにした。さらに、この配列は、ORF 領域において、マウスおよびヒトの SeBP および APBP のそれと高い相同性を示すことを見出した。また、この塩基配列より推測されるアミノ酸配列を解析した結果、thioredoxin や thiol:protein disulfide isomerase など、酸化還元反応を有する酵素に特徴的な motif である、bis (cysteiny) sequence motif の存在が確認された。
2. PCB126 処理により、ラット肝 SeBP mRNA の発現量が著しく増加することを明らかにした。この結果も、SeBP の転写調節領域に、XRE の存在を示唆するものであると考えられた。

高毒性のコプラナー PCB である PCB126 により、ラット肝サイトソル SeBP の発現量が顕著に増加することが本研究の端著であった (53, 54)。本タンパク質の生理的機能および発現調節機構については、これまでいくつかの報告がなされているが、未だ完全に解明されておらず、このことが、本タンパク質の誘導とダイ

オキシシン類の毒性との関連性の解明を困難なものにしていると考えられる。本研究では、ラット肝サイトソルにおける、ダイオキシシン類誘導性 SeBP に関して、タンパク質および mRNA レベルでの誘導を明らかにし、さらに、ORF を含む塩基配列を明らかにすることで、その全アミノ酸配列を解析した。現時点では、十分な結果が得られたとは言い難いが、本研究の成績は、SeBP とダイオキシシン類の毒性との関連性を解明するにあたり、重要な情報を与えるものであると考えられる。今後、さらに解析が進むことで、この関連性が明らかになるのではないかと確信される。

これまで、その作用の多面性のために、ダイオキシシンによる毒性発現機構の解明というテーマはアプローチが難しかったが、本タンパク質の誘導という現象は、このジレンマ解決に新たな可能性を示していると考えられる。また、ダイオキシシン類以外の様々な生体異物から細胞を防御する防御機構について、新たな知見を与えるものであると考えられる。

5. 研究発表

1. フォーラム 2000 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (東京, 2000年 10月)

【引用文献】

- 1) Masuda, Y., and Yoshimura, H. (1984) *Am. J. Ind. Med.*, **5**, 31-44.
- 2) Lucier, G. W., Tritscher, A., Goldsworthy, T., Foley, J., Clark, G., Goldstein, J., and Maronpot, R. (1991) *Cancer Res.*, **51**, 1391-1397.
- 3) Watson, M. A., Devereux, T. R., Malarkey, D. E., Anderson, M. W., and Maronpot, R. R. (1995) *Carcinogenesis*, **16**, 1705-1710.
- 4) Hsia M. T., and Kreamer, B. L. (1985) *Toxicol. Lett.*, **25**, 247-258.
- 5) Holspfle, M. P., Morris, D. L., Wood, S. C., and Synder, N. K. (1991) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **31**, 73-100.
- 6) Poland A., and Knutson, J. C. (1982) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517-554.
- 7) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N., and Miki, M. (1979) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **320**, 179-192.
- 8) 宮田秀明 (1993) *食衛誌*, **34**, 1-11,
- 9) Safe, S. H. (1986) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 371-399.
- 10) Poland, A., and Glover, E. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 4936-4946.
- 11) Bigelow, S. W., and Nebert, D. W. (1982) *Toxicol. Lett.*, **10**, 109-118.
- 12) Fujii-Kuriyama, Y., Ema, M., Mimura, J., and Sogawa, K. (1994) *Exp. Clin. Immunogenet.*, **11**, 65-74.
- 13) Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y.,

- Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 246-253.
- 14) Burbach, K. M., Poland, A., and Bradfield, C. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 8185-8189.
- 15) Okey, A. B., Vella, L. M., and Harper, P. A. (1989) *Mol. Pharmacol.*, **35**, 823-830.
- 16) Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Iwata, S., and Fujii-Kuriyama, Y. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 27337-27343.
- 17) Huff, J., Lucier, G., and Tritscher, A. (1994) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **34**, 343-372.
- 18) Denis, M., Cuthill, S., Wikström, A.-C., Poellinger, L., and Gustafsson, J.-A. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 801-807.
- 19) Chen H.-S., and Perdew, G. H. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 27554-27558.
- 20) Pongratz, I., Mason, G. G. F., and Poellinger, L. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 13728-13734.
- 21) LaPres, J. J., Glover, E., Dunham, E. E., Bunger, M. K., and Bradfield, C. A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 6153-6159.
- 22) Schwetz, B. A., Norris, J. M., Sparshu, G. L., Rowe, V. K., Gehring, P. J., Emerson, J. L., and Gerbig, C. G. (1973) *Environ. Health Perspect.*, **5**, 87-99.
- 23) McConnell, E. E., Moore, J. A., Haseman, J. K., and Harris, M. W. (1978) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **44**, 335-356.
- 24) Kleeman, J. M., Olson, J. R., and Peterson, R. E. (1988) *Fundam. Appl. Toxicol.*, **10**, 206-213.
- 25) Hochstein, J. R., Aulerich, R. J., and Bursian, S. J. (1988) *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **17**, 33-37.
- 26) Chapman, D. E., and Schiller, C. M. (1985) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **78**, 147-157.
- 27) Vos, J. G., Moore, J. A., and Zinkl, J. G. (1974) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **29**, 229-241.
- 28) Beatty, P. W., Holscher, M. A., and Neal, R. A. (1976) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **16**, 578-581.
- 29) Olson, J. R., Holscher, M. A., and Neal, R. A. (1980) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 67-78.
- 30) Henck, J. M., New, M. A., Kociba, R. J., and Rao, K. S. (1981) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 405-407.
- 31) Bansal, M. P., Oborn, C. J., Danielson, K. G., and Medina, D. (1989) *Carcinogenesis*, **10**, 541-546.
- 32) Bartolone, J. B., Sparks, K., Cohen, S. D., and Khairallah, E. A. (1987) *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 1193-1196.
- 33) Ishii, Y., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1996) *Chemosphere*, **32**, 509-515.

- 34) Ishii, Y., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1996) *Toxicol. Lett.*, **87**, 1-9.
- 35) Morrison, D. G., Dishart, M. K., and Medina, D. (1988) *Carcinogenesis*, **9**, 1801-1810.
- 36) Morrison, D. G., Bansal, M. P., Kittrell, F., and Medina, D. (1989) *in vivo*, **3**, 167-172.
- 37) Garberg, P., and Högberg, J. (1992) *Chem. Biol. Interact*, **81**, 291-306.
- 38) Jamba, L., Nehru, B., and Bansal, M. P. (1997) *Mol. Cell. Biochem.*, **177**, 169-75.
- 39) Porat, A., Sagiv, Y., and Elazar, Z. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 14457-14465.
- 40) Yang, M., and Sytkowski, A. J. (1998) *Cancer Res.*, **58**, 3150-3153.
- 41) Harvison, P. J., Guengerich, F. P., Rashed, M. S., and Nelson, S. D. (1988) *Chem. Res. Toxicol.*, **1**, 47-52.
- 42) Birge, R. B., Bartolone, J. B., Mccann, D. J., Mangold, J. B., Cohen, S. D., and Khairallah, E. A. (1989) *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 4429-4438.
- 43) Pezzano, M., Richard, C., Lampl, E., Pelletier, G., Fabre, M., Rimalho, A., and Auzépy, P. (1988) *Presse Medicale*, **17**, 9-16.
- 44) Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Davis, D. C., Gillette, J. R., and Brodie, B. B. (1973) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 185-194.
- 45) Jollow, D. J., Mitchell, J. R., Potter, W. Z., Davis, D. C., Gillette, J. R., and Brodie, B. B. (1973) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 195-202.
- 46) Potter, W. Z., Davis, D. C., Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Gillette, J. R., and Brodie, B. B. (1973) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 203-210.
- 47) Birge, R. B., Bartolone, J. B., Emeighart, S. G., Nishanian, E. V., Tyson, C. A., Khairallah, E. A., and Cohen, S. D. (1990) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **105**, 472-482.
- 48) Bartolone, J. B., Beierschmitt, W. P., Birge, R. B., Hart, S. G. E., Wyand, S., Cohen, S. D., and Khairallah, E. A. (1989) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 240-249.
- 49) Arnaiz, S. L., Llesuy, S., Cutrin, J. C. C., and Boveris, A. (1995) *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 303-310.
- 50) Jamba, L., Nehru, B., Medina, D., Bansal, M. P., and Sinha, R. (1996) *Anticancer Res.*, **16**, 1651-1657.
- 51) Ishida, T., Ishii, Y., Tasaki, K., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1997) *Fukuoka Acta Medica.*, **88**, 135-143.
- 52) Chang, P. W., Tsui, S. K., Liew, C., Lee, C. C., Wayne, M. M., and Fung, K. P. (1997) *J. Cell. Biochem.*, **64**, 217-224.
- 53) Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kondo, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N.,

- Arai, K., Yokota, T., Wakasugi, H., and Yodoi, J. (1989) *EMBO J.*, **8**, 757-764.
- 54) Sinha, R., Bansal, M. P., Ganther, H., and Medina, D. (1993) *Carcinogenesis*, **14**, 1895-1900.
- 55) Otulakowski, G., and Robinson, B. H. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 17313-17318.
- 56) Mazzarella, R. A., Srinivasan, M., Haugejorden, S. M., and Green, M. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 1094-1101.
- 57) Gong, Q. H., Fukuda, T., Parkison, C., and Cheng, S. Y. (1988) *Nucleic Acids Res.*, **16**, 1203-1203.
- 58) Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C., and Bock, A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 4650-4654.
- 59) Zhong, L., Arnér, E. S. J., and Holmgren, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 5854-5859.
- 60) Ishida, T., Maji, D., Yoshioka, Y., Ishii, Y., and Oguri, K. (1999) *J. Health Sci.*, **45**, P-19
- 61) Walker, N. J., Portier, C. J., Lax, S. F., Crofts, F. G., Li, Y., Lucier, G. W., and Sutter, T. R. (1999) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 279-286.
- 62) Whitlock, J. J. (1987) *Pharmacol. Rev.*, **39**, 147-161.
- 63) Savas, U., Bhattacharyya, K. K., Christou, M., Alexander, D. L., and Jefcoate, C. R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 14905-14911.
- 64) Rushmore, T. H., King, R. G., Paulson, K. E., and Pickett, C. B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 3826-3830.
- 65) Rushmore, T. H., Morton, M. R., and Pickett, C. B. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 11632-11639.
- 66) Favreau, L. V., and Pickett, C. B. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 4556-4561.
- 67) Fukuda, A., Ishii, Y., Tasaki, K., Matsusue, K., Ishida, T., and Oguri, K. (1999) *Fukuoka Acta Medica*, **90**, 259-271.
- 68) Ikeda, M., Ishii, Y., Kato, H., Akazawa, D., Hatsumura, M., Ishida, T., Matsusue, K., Yamada, H., and Oguri, K. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**, 159-164.
- 69) Ishii, Y., Kato, H., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1997) *Toxicology*, **116**, 193-199.
- 70) Kato, H., Ishii, Y., Hatsumura, M., Ishida, T., Nakayama, I., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1997) *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **43**, P-20.
- 71) Tasaki, K., Ishii, Y., Ishida, T., and Oguri, K. (1999) *Fukuoka Acta Medica*, **90**, 251-258. **26**, 371-399.

研究報告書

ダイオキシン類による健康影響の機構に関する研究

主任研究者 小栗 一太 九州大学薬学研究院 分子衛生薬学 教授
分担研究者 内海 英雄 九州大学薬学研究院 機能分子解析学 教授

研究要旨 本研究ではダイオキシン類縁物質である塩化フェノール類を用い、その生体酸化ストレス惹起性を調べると共に肝障害性との関連を調べ、塩化フェノール類の毒性発現への酸化ストレスの関与解析を目的とした。2,4,5-Trichlorophenol, 2,4,6-Trichlorophenol, Pentachlorophenol の投与後、マウス上腹部特異的にラジカル反応の亢進が観測され、血清 GOT 量の増加との間に高い相関が見られた。この亢進はヒドロキシルラジカル消去剤である mannitol の同時投与により用量依存的に抑制された。また、cytochrome p450 阻害剤である SKF-525A の前投与により、上腹部での酸化ストレスの亢進・血清 GOT 量の増加が顕著に抑制された。以上の結果から、これら塩化フェノール類がチトクローム P-450 代謝活性化等により・OHを活性種とする酸化ストレスを惹起し、酸化的肝障害を形成することが示唆された。

1. 目的

化学物質の中には酸化ストレスを経由して毒性発現するものが知られている。その機序として、1) 化学物質あるいはその代謝物から直接活性酸素が産生される場合、2) ミトコンドリア電子伝達系やミクロソーム薬物代謝等からの O_2 産生を間接的に亢進する場合、3) 抗酸化酵素生成あるいは活性を阻害することにより抗酸化防御系が低下し相対的に活性酸素が増加する場合等、種々の可能性が示唆されている。これら種々の機序が障害の形成・進行に及ぼす影響は異なると考えられることから、化学物質による生体内酸化ストレス変化を障害の惹起・進行と関連して経時的に調べることがその毒性機序の解明に不可欠である。

塩化フェノール類の製造過程で生成する微量のダイオキシン類による汚染事故がこれまで多く報告されている。また、小型焼却炉における塵芥処理、あるいはパルプ廃水・塩素漂白などの処理工程で塩化フェノールが発生し、これがダイオキシン類生成の一因ともなっている。一方、2,4,5-Trichlorophenol, 2,4,6-Trichlorophenol で、S9mixにより代謝を受けて O_2 を産生することがin vitro試験系で報告されている。また、Pentachlorophenolの長期暴露による肝癌誘発が抗酸化剤で軽減されることから、塩化フェノール類の毒性発現機序に酸化ストレスの関与が示唆される。しかし、それ以外は

ほとんど報告がなくこれら塩化フェノール類に毒性発現機序については不明である。

そこで本研究ではダイオキシン類縁物質である塩化フェノール類を用い、その生体酸化ストレス惹起性を調べると共に肝障害性との関連を調べ、塩化フェノール類の毒性発現への酸化ストレスの関与解析を目的とした。

2. 方法

ICR系雄マウス(6w、25-30g)は、セアック吉富株式会社より購入した。九州大学大学院薬学研究院付属の動物飼育舎において、自由飲水・摂餌下一週間馴化した後、以下の試験に用いた。

4-chlorophenol, 2,4-及び2,5-dichlorophenol, 2,4,5-及び2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenolの生理食塩水(0.01~1mM)を500 μ Lずつ経口投与した。投与3時間後に、ニトロキシルスピンプローブ(300mM 3-carbamoyl PROXYL 4 μ L/g b.w.)を尾静脈内投与し、マウス胸部、上腹部あるいは下腹部におけるESRスペクトルを計測した。なお、ビタミンE誘導体であるTrolox C(0.1~2.0 μ mol/g b.w.生理食塩水溶液)、Cytochrome p450阻害剤であるSKF-525A(2 μ mol/mouse)は塩化フェノール類投与6時間前にそれぞれ経口あるいは腹腔内投与した。ヒドロキシルラジカル消去剤のMannitol(0.1~1.0 μ mol/g bw.)はスピンプローブと同時に尾静脈内投与した。スピンプローブはフリーラジカルとの反応等により常時性を

失い、ESRシグナルを失うことが知られている。そのシグナル高さの対数を経過時間に対してプロットし、その初期の傾きから消失速度定数を得た。In vivo ESR測定条件は、マイクロ波出力1.0mW、周波数1.08GHz、磁場40.0 ± 5mT、磁場変調100KHz、変調幅0.063mT、時定数0.1s、掃引速度2.5mT/min、室温下で行った。ESR測定後あるいは塩化フェノール投与12時間後、生理食塩水で臓器灌流し脱血後、MDA法に基づき脂質過酸化量を測定した。血清GOT量は、採血後定法に基づき血清を調製し、GOT測定キット（和光純薬）により測定した。統計処理はStatView for Macintoshを用いてANOVAにより行った。

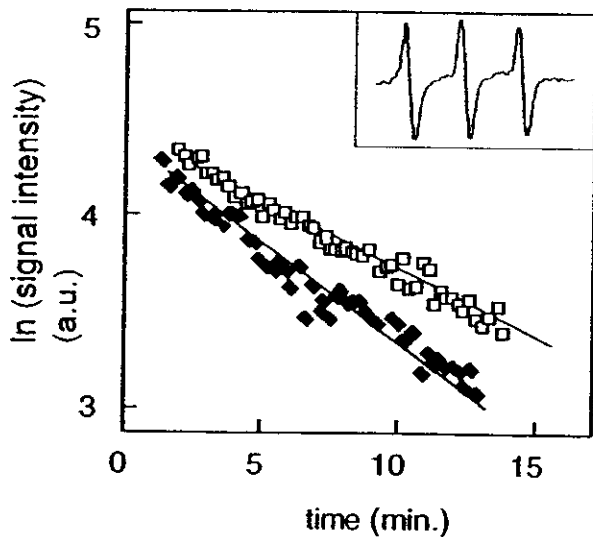


Fig. 1 Enhanced signal decay of nitroxyl spin probe by 2,4,6-trichlorophenol. Five hundred μ L of 0.05 mM 2,4,6-trichlorophenol or vehicle solution was administered orally. In vivo ESR spectra were measured one hour after the administration at upper abdomen. Triplet ESR spectrum of carbamoyl PROXYL was shown in inset.

3. 結果・考察

塩化フェノール投与後、スピンプローブを投与し直ちに in vivo ESR スペクトルを計測したところ、ニトロキシラジカル特有の3本線のESRスペクトルが観測された(図1)。このシグナルは投与後時間とともに減衰し、その片対数プロットは直線を示した。そこでこの直線の傾きから減衰速度を求めた。

4-Chlorophenol以外の塩化フェノール投与により、上腹部でスピンプローブ減衰速度の亢進が観測された(図2b)。次に特異的ラ

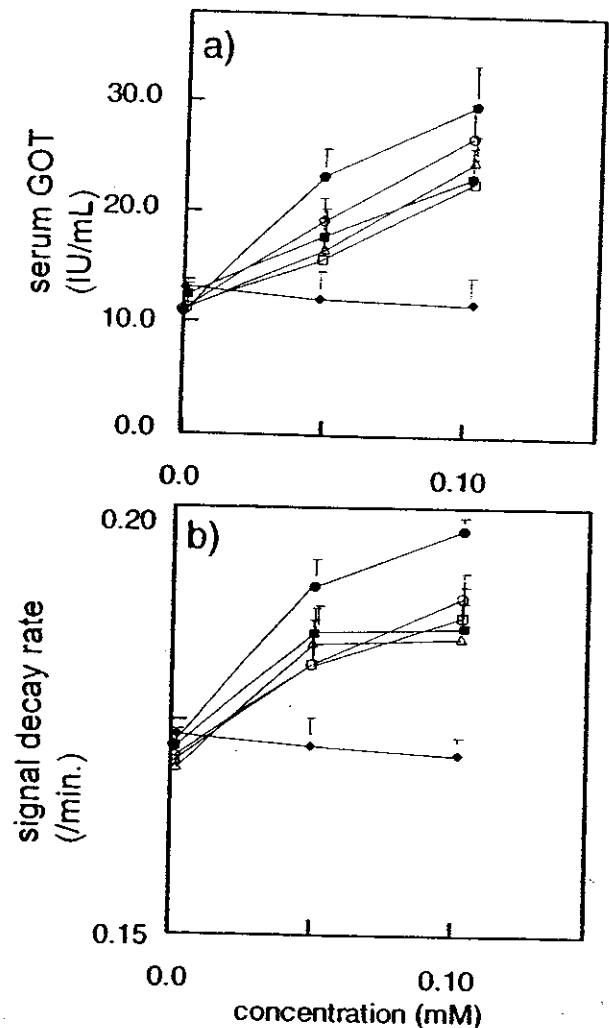


Fig. 2 Dose dependent induction of liver injuries (a) and oxidative stress (b) by 4-CP(◆), 2,4-DCP(□), 2,5-DCP(■), 2,4,5-TCP(●), 2,4,6-TCP(○), PCP(△). Chlorophenols was administered orally as described in Materials. Symbols are expressed as mean \pm S.D. of five animals.

ジカル消去剤をスピンプローブと同時投与し、スピンプローブ及び特異的ラジカル消去剤を活性種と競合反応させることで、ここで観察された肝特異的な酸化ストレス惹起の活性種の検討を行った。2,4,5-Trichlorophenol, 2,4,6-Trichlorophenol, Pentachlorophenolについて、ヒドロキシルラジカル消去剤である mannitol をスピンプローブと同時投与したところ、上腹部におけるシグナル減衰速度の亢進はmannitol 量依存的に抑制され(図3)、上腹部で観測された酸化ストレスの活性種はヒドロキシルラジ

カルであることが示された。一方、上腹部において観測された酸化ストレス亢進の程度は有意な容量依存性を示し、血清 GOT 量の増加(図2a)との間に高い相関が見られた(図4)。また、ビタミンE誘導体である Trolox C の前処置は、塩化フェノール投与による血清 GOT 量の増加及び上腹部におけるスピンプローブ減衰速度の亢進を、Trolox C 量依存的に抑制した(表1)。以上の結果は、これら試験物質が肝部位で $\cdot\text{OH}$ を活性種とする酸化ストレスを惹起し、肝障害を形成することを示唆している。

表2に各塩化フェノール類による酸化的肝障

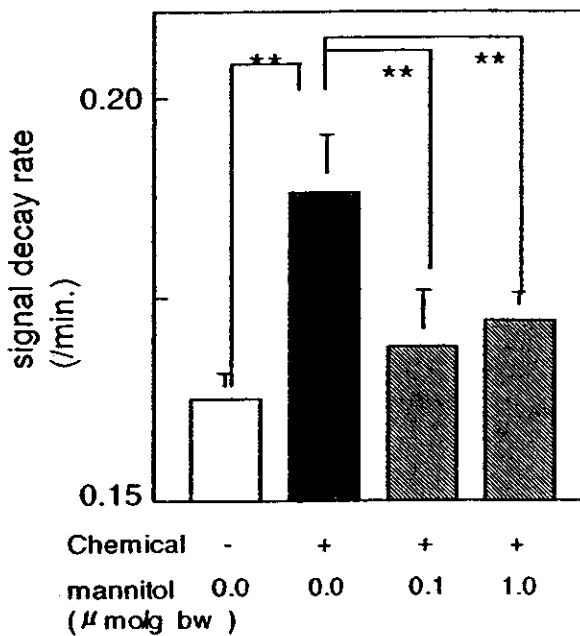


Fig.3 Suppressive effect of a hydroxyl radical scavenger on enhanced signal decay by 2,4,6-TCP. 2,4,6-TCP was administered orally as described in Materials. Mannitol was simultaneously administered with spin probe one hour after TCP treatment. Symbols are expressed as mean \pm S.D. of five animals. **: $p < 0.01$

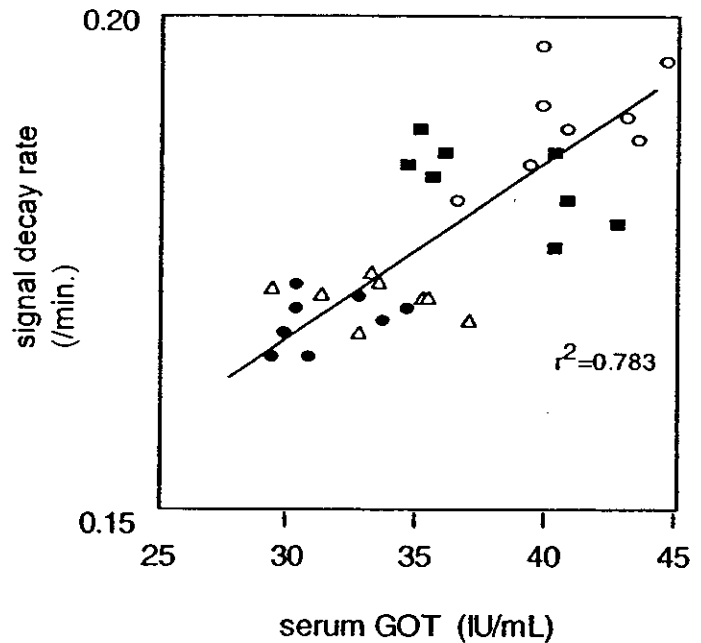


Fig. 4 Relation between signal decay rate and serum GOT by 2,4,6-TCP. 2,4,6-TCP was administered orally as described in Materials. In vivo ESR spectra were observed 3 hours after the administration. Blood samples were collected 12 hours after the treatment spin probe one hour after TCP treatment. ●: vehicle, △: 0.01mM, ■: 0.05 mM, ○: 0.1mM

Table 1 Effect of pretreatment of Trolox C on liver injuries by 2,4,6-TCP

treatment of Trolox C (μ mol/g bw)	treatment of 2,4,6-TCP (0.125 nmol/g bw)	Serum GOT (IU/mL)		ESR signal decay (/min.)
2.0	-	31.5 \pm 1.8		0.161 \pm 0.05
-	-	32.1 \pm 1.5		0.165 \pm 0.07
-	+	45.8 \pm 4.5	*	0.195 \pm 0.10 *
0.1	+	39.8 \pm 3.1	#	0.181 \pm 0.09 #
1.0	+	35.1 \pm 2.3	#	0.169 \pm 0.04 #
2.0	+	33.3 \pm 1.3	#	0.167 \pm 0.06 #

Trolox C was orally administered 6 hr TCP treatment. Serum GOT and in vivo ESR signal decay were measured 3 hr after the treatment. Each value was shown as mean \pm S.D. of five animals. Significant differences were estimated by ANOVA, *: $p < 0.01$ (Trolox C(-)TCP(-) v.s Trolox C(-)TCP(+)), #: $p < 0.05$ (Trolox C(-)TCP(+)) v.s. Trolox C(+TCP(+))

Table 2 Inductions of oxidative liver damages by chlorophenols

	log Pow	ESR (/min)	Liver TBARs (nmol MDA/g tissue)	serum GOT (IU/mL)
control		0.135 \pm 0.015	34.5 \pm 9.11	38.5 \pm 8.54
4- CP	2.39	0.141 \pm 0.009	35.5 \pm 8.3	49.4 \pm 6.68
2,4- DCP	3.06	0.171 \pm 0.033*		54.4 \pm 1.5 *
2,5- DCP	3.06	0.177 \pm 0.045*		61.2 \pm 8.0 *
2,4,5 - TCP	3.72	0.195 \pm 0.008*	83.5 \pm 10.54 *	71.3 \pm 16.3 *
2,4,6 - TCP	3.69	0.173 \pm 0.024*	73.5 \pm 11.15 *	45.5 \pm 4.41
PCP	5.12	0.175 \pm 0.057*	79.2 \pm 5.66 *	66.4 \pm 11.5 *

Chlorophenols were administered orally as described in Materials. In vivo ESR spectra were measured 3 hours after the administration at upper abdomen. Blood samples and liver tissues were obtained 12 hours after chlorophenols administrations. Symbols are expressed as mean \pm S.D. of five animals. *: $p < 0.05$.

害の結果をオクタノール/水分配係数と共にまとめて示す。これら物質のオクタノール/水分配係数は同程度であり、酸化ストレス惹起性との間に特に相関性は見られなかった。

そこで、 $\cdot\text{OH}$ の生成源を明らかにするために cytochrome p450 阻害剤である SKF-525A を 2,4,5- 及び 2,4,6-TCP、PCP 投与6時間前に腹腔内投与したところ、シグナル減衰の亢進は対照群レベルまで抑制された。同時に、肝障害指標である血清 GOT 量の増加も抑制した(図5)。以上の結果は、これら塩化フェノール類の酸

化的肝障害性にチトクロームP-450による代謝活性化等が関与していることを強く示唆している。また、今回用いた 4-chlorophenol 以外の塩化フェノールでは、シグナル減衰速度はマウス上腹部においてのみ亢進し、胸部・下腹部において有意な変化は認められず(図6)、塩化フェノールによる酸化ストレス惹起は肝を含む上腹部に局限していた。

以上の結果から、2,4- 及び 2,5-dichlorophenol, 2,4,5- 及び 2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenol は、酸化的肝障害を惹起することが示された。この中で 2,4,5-Trichlorophenol, Pentachlorophenol についてさらに検討を加えたところ、肝代謝により生成する $\cdot\text{OH}$ が活性種であることが示唆された。2,4,6-Trichlorophenol は 2,4,5-Trichlorophenol に較べて酸化障害は軽微であった。

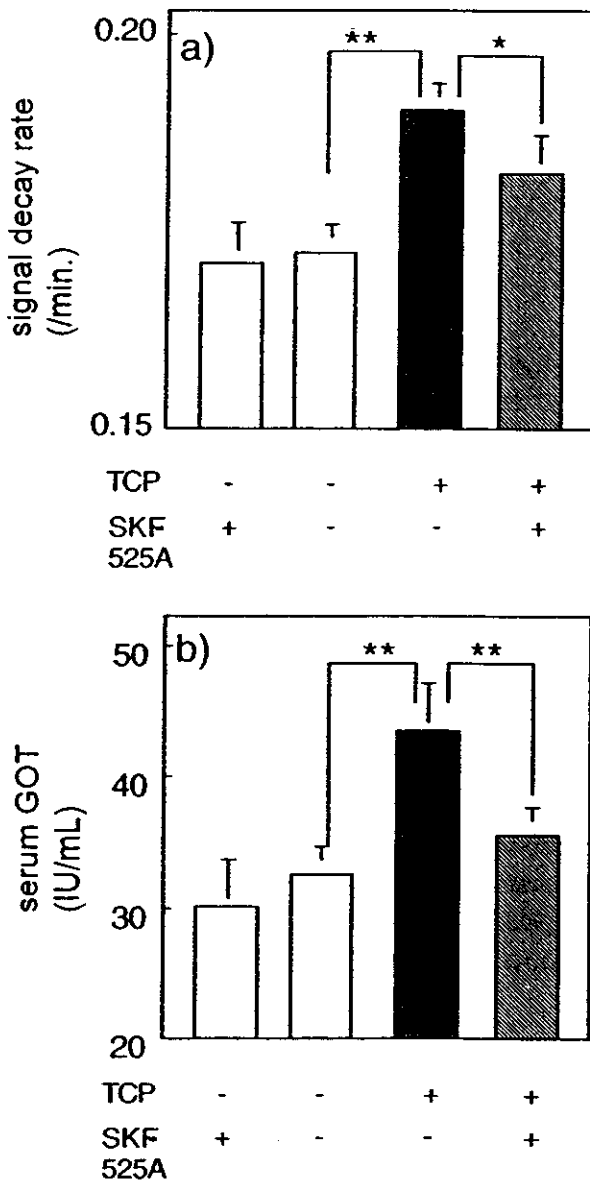


Fig.5 Effect of a cytochrome p450 inhibitor on enhanced signal decay and liver injuries by 2,4,6-TCP. 2,4,6-TCP was administered orally as described in Materials. SKF-525A (2 μ mol/mouse) was administered i.p. 6 hours before TCP treatment. Symbols are expressed as mean \pm S.D. of five animals. *: $p<0.05$ **: $p<0.01$

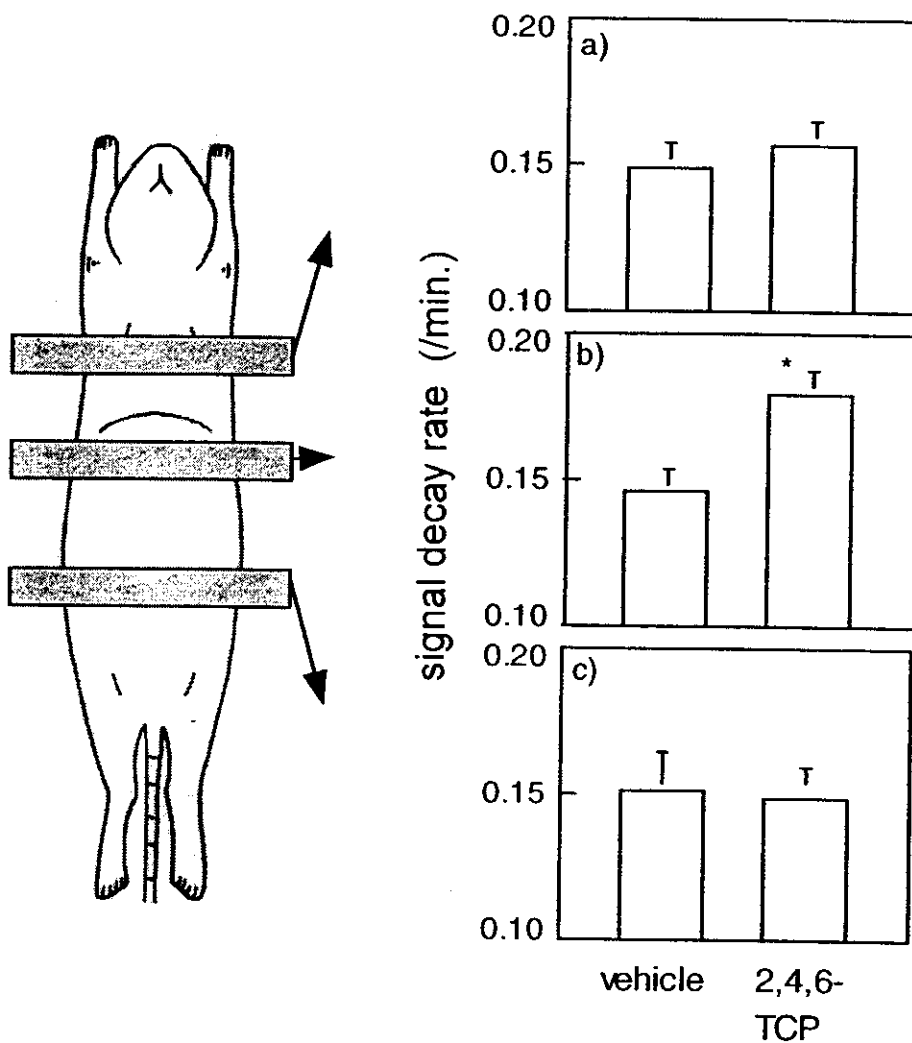


Fig.6 Induction of oxidative stress by administration of 2,4,6-trichlorophenol in breast (a), upper abdomen (b) and lower abdomen (c). 2,4,6-TCP was administered orally as described in Materials. SKF-525A ($2 \mu\text{mol}/\text{mouse}$) was administered i.p. 6 hours before TCP treatment. Symbols are expressed as mean \pm S.D. of five animals. *: $p < 0.05$

4. 参考文献

1. Armstrong, M. J., Galloway, S. M., and J. Ashby, J. (1993) *Mutation Res.*, **303**, 101-108 .
2. Gallagher, R. P., and Threlfall, W. J. (1984) *Lancet*, **48**.
3. IARC, Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Suppl. 4, IARC, Lyon, pp. 249-250 (1982)
4. Jansson, K., and Jansson, V. (1992) *Mutation Res.*, **280**, 175-179.
5. Juhl, U., Blum, K., and Witte, I. (1989) *Chem. Biol. Interactions*, **69**, 333-344.
6. Yamamoto, Y., and Takahashi, K. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 541-545.
7. Alsharif, N. Z., Lawson, T., and Stohs, S. J. (1994) *Toxicology*, **92**, 39-51.
8. Al-Bayati, Z. A., and Stohs, S. J. (1987) *Toxicol. Let.*, **38**, 115-21.