

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：内分泌かく乱物質によるチトクローム P450 の変動
の分子生物学的解析

分担研究者 根本 清光 静岡県立大学 薬学部助手
(主任研究者 出川 雅邦との共同研究として行った)

研究要旨： non-planar PCB (PentaCB: CB101 および HexaCB:CB132) の活性代謝物と推測されるメチルスルホン体の生成量にはラットとマウス間で著しい動物種差があることを昨年度報告した。そこで、この生成量の差がどのようなチトクローム P450 (P450 と略す) 分子種 (mRNA) の発現誘導量の差に起因するかを RT-PCR 法を用いて検索した。その結果、各 PCB の代謝に関わると考えられる肝臓での CYP2B、CYP1A、CYP3A subfamily 酵素遺伝子の誘導量には両動物で著しい差は認められず、これら P450 分子種の mRNA 誘導量の相違が必ずしもメチルスルホン体生成量の差を生む要因にはなっていないことが示された。また、昨年度、特に HexaCB 投与時、マウスでは精巣のテストステロン合成系酵素遺伝子の発現が低下することを見出したが、ラットではそのような低下は見られないことが明らかになった。同様に、昨年度硝酸鉛投与によりラットでは肝臓の重量増加やコレステロール生合成系酵素遺伝子の発現亢進を報告したが、この増加はマウスでは見られないことが明らかとなった。以上のように、各内分泌かく乱物質に対する感受性には、動物種差や臓器差があることが再確認された。また、神経細胞のみならず種々の細胞・組織の増殖・機能維持に重要とされてきている神経栄養因子に着目し、ラット肝重量増加の機序について検討を加えた結果、肝重量の増加に先立ち神経栄養因子やその受容体遺伝子の発現が亢進することが判明し、神経栄養因子と肝細胞増殖との関連性が示唆された。

A. 研究目的

種々P450 分子種の発現量や活性の差が、内分泌かく乱作用発現の動物種差・性差・臓器差などを生む要因になることを示唆されており、本研究では、内分泌かく乱作用があることが確認されている PCB 類や重金属イオン類を試料として、雄性ラットおよびマウスに投与した場合の、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 P450 を中心と

した酵素遺伝子の発現変動を比較検討し、毒性発現における動物種差・臓器差との関連性を明確にすることを目的とした。また、同時に、それら相違を生み出す生体内要因の解明を目指した。また、各 P450 分子種の発現・誘導における動物種差、性差などを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、本研究開始以前には

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おらず、昨年度樹立したラット培養肝細胞株の P450 発現誘導機序解析への有用性を検討した。

B. 研究方法

1) ラットとマウスの肝臓および精巣における P450 発現

PCB (PentaCB: CB101 あるいは HexaCB: CB132 を 342 $\mu\text{mol/kg}$, i.p) あるいは硝酸鉛 (100 $\mu\text{mol/kg}$, i.v) を、7~8 週令の雄性 SD ラットおよび ddY マウスに投与し、肝臓や精巣の湿重量およびこれら臓器におけるステロイドホルモン生合成系酵素 (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) 発現への影響を RT-PCR 法を用いて比較検討した。

2) 各種 P450 分子種の発現機構の解明

昨年度に引き続き、ラット肝初代培養細胞より樹立した培養肝細胞株 (Kan-R1 および Kan-R2 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。

3) ラット肝重量の増加における神経栄養因子の関与

神経栄養因子およびそれに対応する受容体の関連性を図 1 に示した。ラット肝臓でのそれら遺伝子発現量は、図 2 の矢印で示すような位置に対応する primer を用いて、RT-PCR により検討した。神経栄養因子は、図 2A に示すように、BDNF や NT-3 は 5'側エクソンで alternative splicing が見られるため、これらについては、個々の alternative splicing 転写産物を検出できるように primer を設定した。神経栄養因子受容体の Trk ファミリーに関しては、ポリペプチドの挿入、あるいは C 末側の欠落が見られるものがあるため、図 2B に示すように、その欠落体を検出しないように primer を設定した。

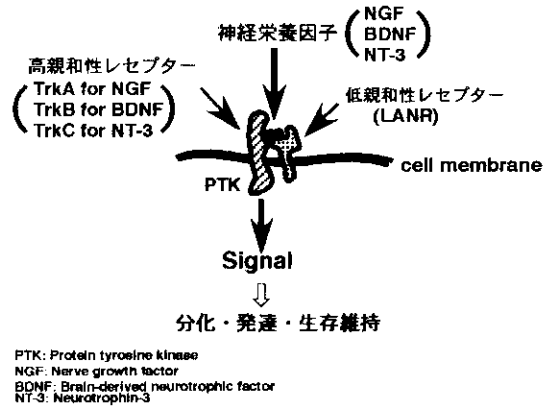


図1 神経栄養因子とその受容体

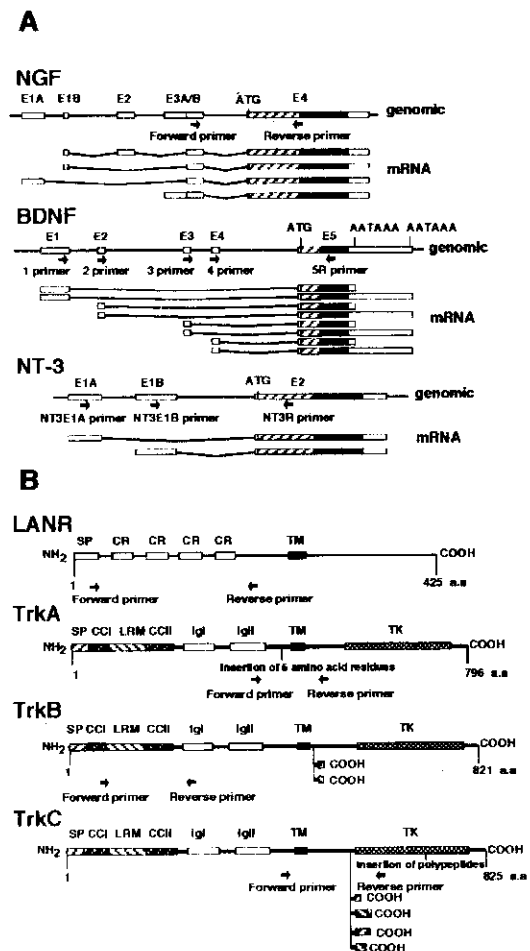


図2 神経栄養因子遺伝子および神経栄養因子受容体の構造

太字矢印は、RT-PCRに用いたプライマーの設定箇所と方向を示す。SP: signal peptide CR: cystein-rich region CC: cystein cluster LRM: leucine-rich motif Igl: immunoglobulin-like C2-type motif

(倫理面への配慮)

生体におけるホルモン量の変動や P450 各分子種の変動は、培養細胞株を用いた実験系では再現できないため、止む終えず実験動物を使用して研究を進めている。また、研究の進展に伴い、培養細胞系を用いて研究可能と判断された場合には、その研究項目については順次、動物実験から培養細胞を用いた実験に移行して行く。

C. 研究結果

1) ラットとマウスにおける肝および精巣重量の変化

PCB (PentaCB: CB101 あるいは HexaCB: CB132 を 342 $\mu\text{mol/kg}$, i.p) あるいは硝酸鉛 (100 $\mu\text{mol/kg}$, i.v) をラットあるいはマウスに投与し、経時的に屠殺し、それぞれ肝臓および精巣の湿重量を測定した。その結果、PentaCB や HexaCB を投与したラット、マウスの肝重量は昨年度報告したと同様に、それぞれ投与 2 日後から 8 日後までに増加傾向が観察された。また、精巣重量は、ラットではいずれの PCB を投与した場合にも投与 2 日後に減少が認められ、4 日後には回復した。なお、マウスではこのような変動は観察されなかった。硝酸鉛を投与した場合には、48 時間後にラットでは肝重量の増加が観察されたが、マウ

スでは少なくとも投与 72 時間後まで肝重量の増加は観察されなかった。また、精巣重量はラット、マウスともに有意な変化は見られなかった。

2) ラットおよびマウスの肝臓及び精巣におけるステロイドホルモン生合成・分解系酵素遺伝子の発現変動

PCB (PentaCB: CB101 あるいは HexaCB: CB132 を 342 $\mu\text{mol/kg}$, i.p) あるいは硝酸鉛 (100 $\mu\text{mol/kg}$, i.v) をラットあるいはマウスに投与し、経時的に屠殺し、それぞれ肝臓および精巣のコレステロール/ステロイドホルモン生合成酵素 (HMG-CoA reductase, CYP51, CYP11, CYP17 など) や分解系酵素 (CYP1A, CYP2B, CYP3A など) 遺伝子の発現変動を RT-PCR 法を用いて測定した。

ステロイドホルモン分解系酵素 (CYP1A, CYP2B, CYP3A など) の遺伝子発現についての結果を図 3A、3B に示した。PentaCB 投与によりラット、マウスともに肝では CYP2B の遺伝子発現が数十倍に増加し、その他測定した P450 分子種の遺伝子発現の上昇も見られた (図 3A)。また、同様に HexaCB 投与の場合にも、マウス、ラットともに CYP2B が数倍に、また他の P450 遺伝子も上昇傾向が見られた (図 3B)。

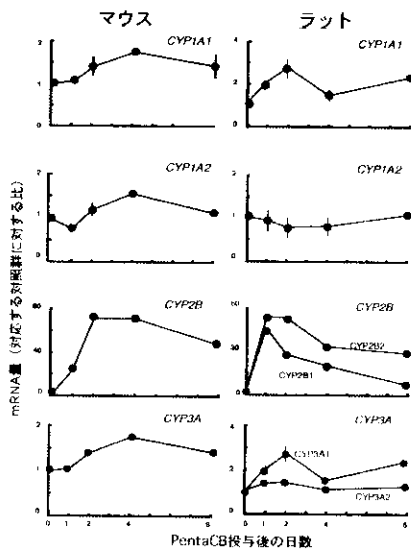


図3A PentaCB投与後のマウスとラットの肝における種々P450 mRNAの発現変動

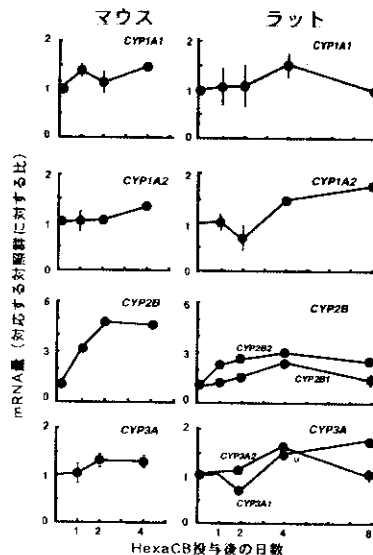


図3B HexaCB投与後のマウスとラットの肝における種々P450 mRNAの発現変動

また、各 PCB 投与時、マウス精巢におけるテストステロン合成系酵素（特に CYP17）遺伝子の発現は、低下傾向にあり、特に HexaCB 投与 4 日後のマウスでは CYP11 と CYP17 遺伝子の顕著な発現低下が見られた（図 4）。一方、ラットでは、いずれの PCB を投与した場合にも、投与 1-4 日後に CYP17 の発現上昇が見られ、他の酵素発現には有意な変化は見られなかった（図 4）。

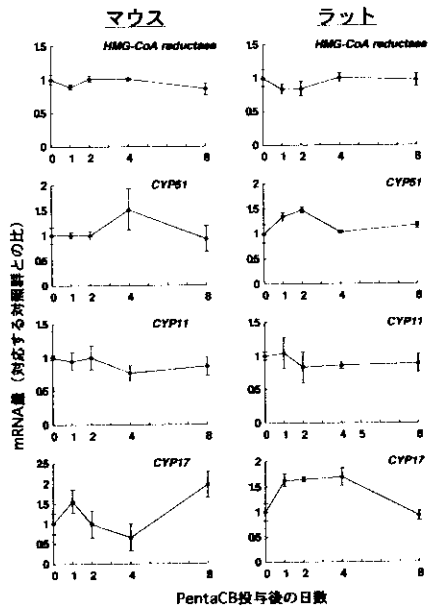


図4A PentaCB投与後のマウスとラットの精巣におけるテストステロン合成系酵素の発現変動

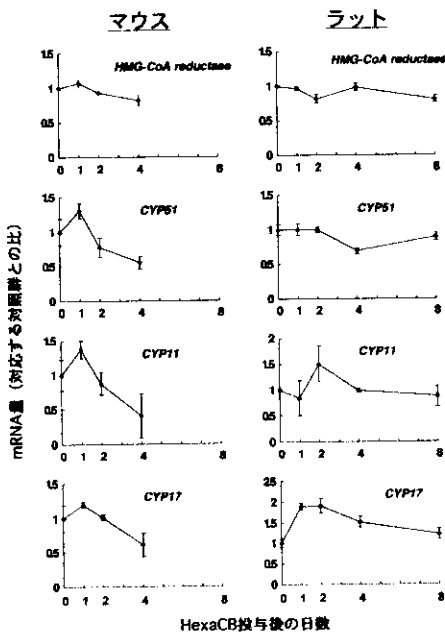


図4B HexaCB投与後のマウスとラットの精巣におけるテストステロン合成系酵素の発現変動

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（Kan-R1 及び Kan-R2 細胞株）を用いて、P450 分子種の発現能を調べた結果、CYP1A1/1A2、CYP2B1/2B2、CYP3A1/3A2 の各遺伝子を発現していることが確認された（図 5）。

また、サイクロヘキシミド存在下での培養では、いずれの P450 遺伝子も発現上昇した。

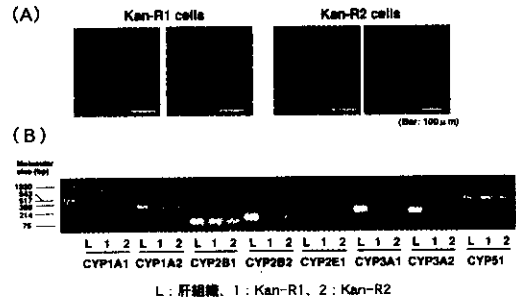


図5 ラット培養肝細胞（Kan-R1と Kan-R2）の形態（A）と P450発現能（B）

4) ラット肝重量の増加における神経栄養因子の関与

まず、無処置ラット肝臓での神経栄養因子およびその受容体遺伝子の発現を検討した。その結果を図 6 に示した。NGF やエクソン 4 を有する BDNF、LANR、TrkA、TrkB 転写産物は、35 サイクルの PCR 条件で検出された。TrkC 転写産物は、40 サイクルの PCR 条件で検出されるようになった。一方、エクソン 1~3 を有する BDNF 転写産物は、40 サイクルの PCR 条件でも検出されなかった。以上の結果から、平常時のラット肝臓において、すでに神経栄養因子やその受容体遺伝子が発現していることが明らかとなった。

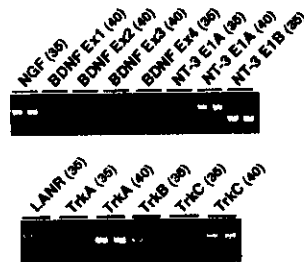


図6 無処置ラット肝臓での神経栄養因子とその受容体遺伝子の発現
かっこ内の数字はPCRのcycle数

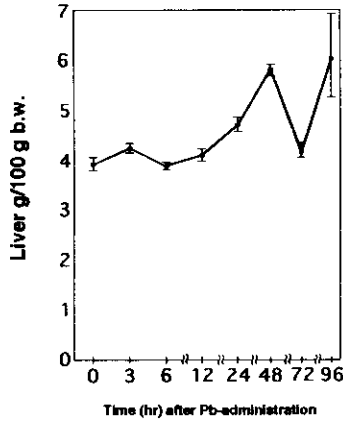


図7 硝酸鉛投与後のラット肝重量変化
0.1 mmol/kg b.w.硝酸鉛投与7週齢雄性
SDラットの2個体の肝臓の平均値を●で示
した。0 hrは無処置群。

次に、ラットに硝酸鉛を投与し、3、6、12、24、48、72、96 時間後の肝臓重量および神経栄養因子とその受容体遺伝子の発現を検討した。硝酸鉛投与後の各時間での肝重量を測定し、図 7 に示した。72 時間で減少が見られたものの、従来の報告と類似した経時的重量増加が確認された。神経栄養因子およびその受容体遺伝子の発現変化については、図 8 に示した。NGF 遺伝子発現は、硝酸鉛投与後、6 時間で上昇した後、12 時間で回復が見られ、24-48 時間後に再び上昇した。その後、その発現はコントロールレベルに戻った。エクソン 4 を有する BDNF 転写産物の発現は、6-24 時間で上昇が見られた。エクソン 3 を有する BDNF 転写産物に関しては、40 サイクルの PCR 条件で、6-12 時間後に発現上昇することが認められた。エクソン 1A を有する NT-3 転写産物については、投与後、6-12 時間で発現が上昇し、その後徐々に発現が低下していった。エクソン 1B を有する NT-3 転写産物の発現は、投与 3 時間後に上昇が見られ、その後 24-48 時間でコントロールレベル以下に低下した。LANR 遺伝子に関しては、6-12 時間で発現上昇が見られ、その後はコントロールレベルに低下した。TrkA 遺伝子産物に関しては、12 時間をピークとして、6-24 時間で発現上昇が認められた。48 時間でコントロールレベルに戻り、72-96 時間でコントロールレベル以下

にまで低下した。TrkB 転写産物は、各個体間でばらつきが認められたため、発現変化の有無を明確にするには至らなかった。なお、TrkC の遺伝子発現には大きな変化は観察されなかった。

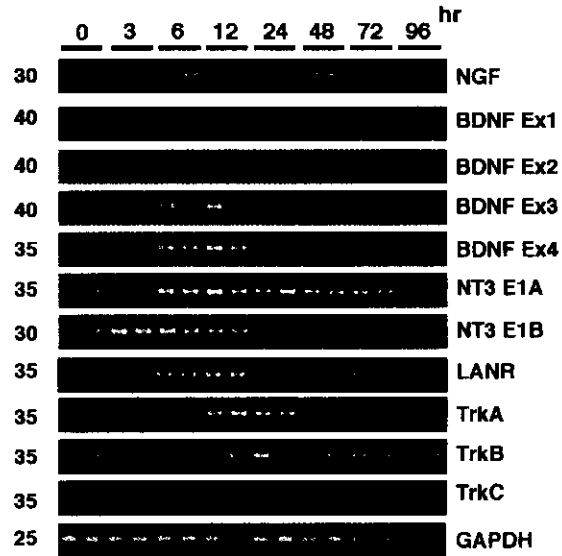


図8 硝酸鉛投与ラット肝臓での神経栄養因子およびその受容体遺伝子の発現変化
写真左側の数字は、PCRのcycle数

D. 考察

1) ラットとマウスにおける肝および精巣重量の変化

PentaCB や HexaCB のような PCB をラットおよびマウスに投与すると、いずれの動物でも肝重量の上昇が見られた。一方、精巣重量はマウスではほとんど変動しないが、ラットではいずれの PCB を投与した場合にも2日後に低下がみられ、種差が観察された。以上の結果より、ラット精巣はこれら PCB に対して肝臓やマウスの精巣および肝臓より感受性が高いことが推測される。

また同様に、硝酸鉛を投与した場合、肝重量の変化には種差が認められ、ラットでは投与 48 時間後に有意な増加が、一方、マウスでは少なくとも投与 72 時間後まで有意な変化は観察されなかった。なお、精巣重量はラット、マウスともに硝酸鉛投与の影響をほとんど受けなかった。

内分泌かく乱物質投与時の動物臓器の重量変化の動物種差、臓器差がどのような機序で発現するかは、未だ不明であり、今後の検討が必要である。

2) ラットおよびマウスの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

PentaCB や HexaCB をラットとマウスに投与すると、いずれの動物でも肝臓に PCB 活性化酵素と考えられている CYP2B subfamily 遺伝子の顕著な誘導が見られ、その誘導率には顕著な動物種差は認められなかった。また同様に、その他 CYP1A や CYP3A subfamily 酵素遺伝子も PCB 投与によって誘導が観察されたが、これら P450 分子種の誘導にも大きな動物種差は認められなかった。しかしながら、分担研究者の加藤の報告にあるように CYP2B subfamily 酵素の蛋白質レベルでの誘導は、ラットよりもマウスの方が顕著に高く、昨年度報告した PCB のメチルスルホン代謝物の生成量の差は、CYP2B subfamily 酵素量の差および比活性の差に依存し、mRNA 発現・誘導量の差には必ずしも依存していない可能性が示された。

PentaCB や HexaCB 投与時、ラットとマウスの精巣におけるコレステロール/テストステロン合成系酵素の遺伝子発現の変動を調べた結果、特に hexaCB 投与時、マウスではラットとは異なり、CYP11 や CYP17 の発現減少が観察された。しかしながら、血中テストステロン量はラットの場合と同様にマウスでも有意な低下は見られないことが分担研究者の加藤により示された。これらの結果は、CYP11 や CYP17 の mRNA は平常時過剰に発現しており、それら遺伝子が若干発現低下してもテストステロン生成量の低下には結びつかない可能性を示している。

硝酸鉛を投与すると、ラットでは肝重量の増加が認められること、さらに、ラット肝重量の変化とコレステロール合成系酵素 (HMGCoAR と CYP51) 遺伝子の発現との間

には正の相関があることを昨年度報告したが、現在、肝重量の変化とこれらコレステロール合成系酵素遺伝子発現との関連性をより明確にするため、肝重量の変化が見られなかったマウスにおけるこれら酵素遺伝子の発現について検討を進めている。

3) 種々P450 分子種の発現機構の解明

培養肝細胞株 (Kan-R1 及び Kan-R2 細胞株) は、いずれも CYP1A1/1A2、CYP2B1/2B2、CYP3A1/3A2 の各遺伝子を発現していることが確認されたが、CYP1A1 を除きそれらの発現量は肝臓組織に比べ極めて低かった。また、これら P450 分子種の遺伝子発現量は、いずれもサイクロヘキシミドの添加培養によって上昇することが示された。したがって、これら遺伝子の肝組織における定常的発現は、各遺伝子発現に対して正に働く細胞内因子よりもむしろ負に働く細胞内因子に依存している可能性が考えられる。現在、本培養肝細胞株を用いて各 P450 遺伝子発現に関わる正および負に働く細胞内因子の検索を進めている。

4) ラット肝重量の増加における神経栄養因子の関与

正常ラット肝臓および硝酸鉛投与後のラット肝臓での神経栄養因子とその受容体の遺伝子発現の検討を行った。その結果、平常時のラット肝臓でも、検討したすべての遺伝子が発現していることが確認された。また、硝酸鉛投与ラットの肝臓では、肝重量の増加に先立って、NGF、BDNF、NT-3、LANR、TrkA 遺伝子の発現上昇が認められた。したがって、神経栄養因子は、硝酸鉛により誘発される肝細胞増殖にオートクラインあるいはパラクライン的機構を介して関与している可能性が考えられる。

これまで、TNF- α が、硝酸鉛によって誘発される肝細胞の増殖の引き金として重要な役割をしているものと考えられていた。これは、TNF- α の遺伝子発現が、硝酸鉛の投与後、肝臓の DNA 合成が開始する以前に亢進することがその根拠となっている。本研究において

も、硝酸鉛投与後、肝重量増加に先立ち、TNF- α 遺伝子の発現亢進が見られたが、その時期に一致して（あるいは、それ以前に）、NGF、エクソン3あるいはエクソン4を有するBDNF、エクソン1Aを有するNT-3、エクソン1Bを有するNT-3、LANR および TrkA の各遺伝子の発現亢進も観察された。特に NGF とその特異的高親和性受容体の TrkA の発現亢進や、全ての神経栄養因子と結合性を示す低親和性受容体の LANR 発現亢進は、NGF をはじめとする神経栄養因子が肝増殖の引き金になっている可能性を示唆している（図8）。

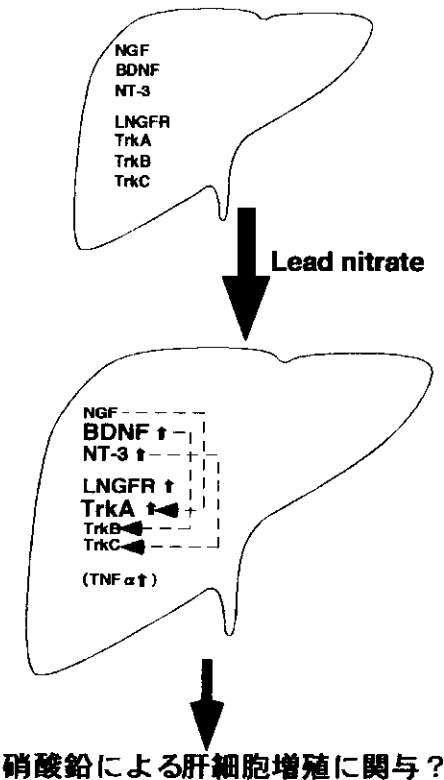


図9 硝酸鉛による肝増殖時における神経栄養因子関連遺伝子の発現変動

今後、硝酸鉛投与での神経栄養因子とその受容体の発現変化を引き起こす機構や、肝増殖への神経栄養因子の関わりを明確にすることが極めて重要と思われる。また、硝酸鉛は神経系や生殖器に対し毒性を示すことを考えると、硝酸鉛の種々臓器（組織）における毒性発現に、神経栄養因子およびその受容体の発現変化が関与している可能性も考えられる。

E. 結論

PentaCB、HexaCB および硝酸鉛をラットとマウスに投与し、肝臓および精巣の臓器重量への影響を調べるとともに各臓器におけるステロイドホルモンの合成・分解に関わる酵素遺伝子発現への影響を主に分子生物学的手法を用いて比較検討し、それぞれ臓器差や種差があることを示したが、それら差を生む原因は未だ明らかになっていない。PCB 類投与時における各活性代謝物量や血中 T_4 量の変動のラット、マウス間での相違は、本研究で調べた酵素遺伝子の発現量の差とは必ずしも一致しないことが明らかとなった。しかし、分担研究の加藤らの研究結果より、酵素蛋白量あるいは酵素比活性と PentaCB、HexaCB の活性代謝物メチルスルホン体生成量や毒性発現との間には密接な関連性がうかがわれ、mRNA から酵素蛋白質への翻訳効率や各動物間における同種酵素の比活性の相違が、活性代謝物生成や毒性発現に種差や臓器差を生む要因になっていることが示唆された。これらの結果は、P450 を指標とした内分泌かく乱物質に対する感受性の種差や臓器差の解析には、mRNA レベルでの研究より酵素活性レベルでの研究の方がより有効であることを示している。しかし、肝臓以外の臓器の酵素活性測定は酵素量が少なく困難な場合が多いことや、酵素誘導機序に関する種差や臓器差の解析を考えると、mRNA レベルでの研究も不可欠である。

また、本研究により、硝酸鉛投与によるラット肝臓の重量増加（肝細胞増殖）に、神経栄養因子が関わっている可能性を世界に先駆け見い出した。神経栄養因子が神経細胞のみならず血管平滑筋などの非神経細胞の増殖や機能維持に重要であることが最近続々と報告されてきていること考え合わせると、本知見は、極めて興味深く、今後神経栄養因子の発現を指標とした感受性の解析も重要になるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kiyomitsu Nemoto, Shingo Miyata, Fumiko Nemoto, Tsutomu Yasumoto, Uta Murai, Haruaki Kageyama, and Masakuni Degawa, Gene expression of neurotrophins and their receptors in lead nitrate-induced rat liver hyperplasia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 472-476 (2000)
2. Yoshihisa Kato, Yasuhiko Shinmura, Koichi Haraguchi, Kimie Imai, Kiyomitsu Nemoto, Tachio Aimoto, Yoshito Matsuda, Masakuni Degawa, and Ryohei Kimura, In vivo metabolism of 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl and its inductive activity of drug-metabolizing enzymes: Species difference between rats and mice. *Organohalogen Compounds*, **49**, 213-216 (2000)
3. Yoshihisa Kato, Yasuhiko Shinmura, Koichi Haraguchi, Kiyomitsu Nemoto, Kimie Imai, Tachio Aimoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa, and Ryouhei Kimura. In vivo metabolism of 2,2',7,4,4'-pentachlorobiphenyl and its inductive activity of drug-metabolizing enzymes: Species difference between rats and mice. *J. Toxicol. Sci.*, **25**, 313 (2000)

2. 学会発表

1. 加藤善久、新村康彦、原口浩一、根本清光、今井公江、相本太刀男、増田義人、出川雅邦、木村良平：2,2',4,4'-Pentachlorobiphenyl の代謝と薬物代謝酵素誘導能：ラット、マウス間での種差。第 27 回日本トキシコロジー学会学術年会（横浜）、要旨集、p.187、2000 年 6 月 28 日
2. 根本清光、宮田信吾、出川雅邦：硝酸鉛投与時のラット肝での細胞増殖と神経栄養因子及びその受容体遺伝子の発現変動。第 59 回日本癌学会総会（横浜）、総会記事、p.82、2000 年 10 月 4 日
3. 加藤善久、新村康彦、原口浩一、山崎友朗、今井公江、根本清光、相本太刀男、増田義人、出川雅邦、木村良平：2,2',3',4,5,6'-Hexachlorobiphenyl の代謝と薬物代謝酵素誘導能：ラット、マウス間

での種差。第 15 回日本薬物動態学会年会（福岡）、薬物動態、15 (Suppl.)、S241、2000 年 10 月 11 日

4. 宮田信吾、根本清光、大見和宏、出川雅邦：血管平滑筋細胞の収縮型形質発現における神経栄養因子の関わり。第 73 回日本生化学会大会（横浜）、発表抄録集、p.838、2000 年 10 月 12 日
5. 小島美咲、根本清光、村井 詩、出川雅邦：精巣のストロイドホルモンおよびコレステロール合成酵素に及ぼす鉛イオンの影響について。第 73 回日本生化学会大会（横浜）、発表抄録集、p.959、2000 年 10 月 13 日
6. 根本清光、宮田信吾、根本文子、小島美咲、出川雅邦：PC12 細胞の神経様分化誘導時におけるコレステロール生合成系酵素（HMG-CoA reductase および CYP51）遺伝子の発現変動。第 73 回日本生化学会大会（横浜）、発表抄録集、p.1021、2000 年 10 月 14 日
7. 綾部悠子、吉村那美、根本清光、出川雅邦：硝酸鉛投与ラットの肝および腎の重量増加とコレステロール生合成系酵素遺伝子の発現変動について。平成 12 年度日本薬学会東海支部例会（静岡）、要旨集、p.27、2000 年 12 月 9 日
8. 牧野正宣、吉本直樹、根本清光、出川雅邦：培養ラット肝細胞株（Kan-R1）のシトクロム P450 発現能。平成 12 年度日本薬学会東海支部例会（静岡）、要旨集、p.30、2000 年 12 月 9 日
9. 小島美咲、村井 詩、根本清光、出川雅邦：硝酸鉛により誘発される肝増殖とコレステロール生合成・代謝系酵素遺伝子の発現変動。日本薬学会第 121 年会（札幌）、要旨集 3、p.39、2001 年 3 月 29 日
10. 牧野正宣、吉本直樹、根本清光、並木雅幸、橋本嘉幸、出川雅邦：培養ラット肝細胞株（Kan-R1、Kan-R2）のシトクロ

ム P450 発現能. 日本薬学会第 121 年会 (札幌)、要旨集 3、p.49、2001 年 3 月 29 日

11. 綾部悠子、吉村那美、根本清光、小島美咲、出川雅邦：塩化カドミウム投与ラットの肝臓・精巣の重量変化とコレステロール・ステロイドホルモン生合成系酵素遺伝子の発現変動. 日本薬学会第 121 年会 (札幌)、要旨集 3、p.51、2001 年 3 月 29 日

12. 横山敏紀、綾部悠子、濱地勇希、牧野正宣、吉村那美、根本清光、加藤善久、木村良平、出川雅邦：Non-planar PCB 類投与時のマウス精巣および肝臓におけるテストステロン生合成・代謝系酵素遺伝子の発現変動. 日本薬学会第 121 年会 (札

幌)、要旨集 3、p.51、2001 年 3 月 29 日

13. 宮田信吾、根本清光、小島美咲、出川雅邦：神経栄養因子によるコレステロール生合成酵素遺伝子の発現誘導. 日本薬学会第 121 年会 (札幌)、要旨集 4、p.83、2001 年 3 月 29 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
(以下の研究者との分担研究として行った)
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：前年度構築した、glucocorticoid (GC)に対する高感度かつ特異的な作用点を有するルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ系を用いて、比較的強い GC 様活性を示した生薬カミツレメタノールエキス中の GC 様物質の単離及び構造決定を行った。その結果、3 種の flavonoid を含む、4 種の GC 様物質を単離した。類縁化合物を含めた、その GC 様活性の比較から、5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxy 構造を持つ flavone が低濃度においても強い活性を示す事が認められた。また、単独で GC 様作用を示さない濃度の GC 様物質が共存した場合、その効果が増強されることが認められた。一方、我々が日常摂取する可能性の高い食用植物 50 種のメタノールエキスを対象としたスクリーニングの結果、いずれも GC 様活性は検出されなかった。

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。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。

一方で、副腎皮質ホルモンの一種である glucocorticoid (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、糖質代謝のみならず多くの生理作用に広く関わる。抗ストレスホルモンとして中心的な役割を果たす事も知られ、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となる。また近年、母胎の GC 濃度が胎児の性成熟に影響を与える事が、妊

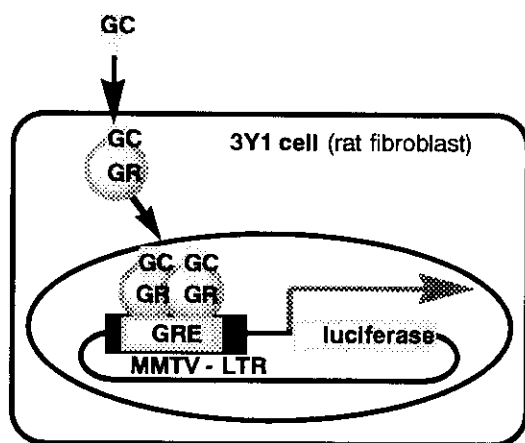
娠ラットを用いた実験結果を基に報告されている。

前年度構築した、GC に高感度かつ特異的な作用点を有するレポーター遺伝子アッセイ系を用いて、植物メタノールエキスを対象に行ったスクリーニングの結果、植物界に GC 様物質が広く分布する事実が認められた。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、phytoestrogen 以外の植物成分が有するホルモン様作用に関する報告は乏しいのが現状である。そこで申請者らは、高等植物中の GC 様物質を明らかにするとともに、我々が日常接する機会の多い植物の GC 様作用について検討を加えた。

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。

〔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 遺伝子の upstream 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 活性の評価とする (Chart 1)。



G : Glucocorticoid,
GR : Glucocorticoid Receptor,
GRE : Glucocorticoid Response Element.

Chart 1. Glucocorticoid 応答性 luciferase アッセイ概念図

(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

前年度構築した、GC の作用機構を模したレポーターアッセイ系を用いたスクリーニングの結果、強い活性が認められた生薬カミツレメタノールエキスについて、その GC 様成分の分離を行った。

生薬カミツレはキク科カミツレの頭花を乾燥させたもので、抗炎症、鎮痙、駆風の他、芳香性苦味健胃薬としても有効なことが知られる。また、ヨーロッパでは古くから、風邪、頭痛、下痢などに対して熱湯を

注いだカミツレ・ティーを飲む風習がある。

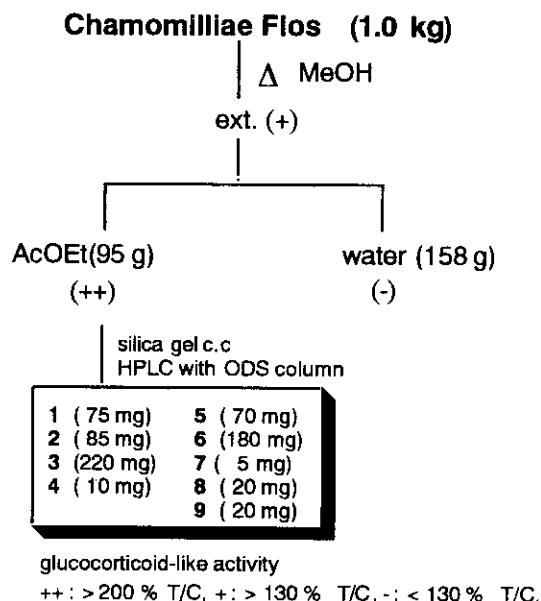


Chart 2 カミツレ中の GC 様物質の分離

市販の生薬カミツレ 1 kg を熱時メタノールで抽出しエキスとした後、水に懸濁し、酢酸エチルで分配を行った。強い活性が観察された酢酸エチル可溶部に対して、GC 様活性を指標としながらヘキサン-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、以下に示す 9 種の化合物を得た (Chart 2, 3)。

これらの化合物の構造決定は、NMR スペクトルを主とした、各種分光学的データを基に行った。糖やエステル結合位置は HMBC スペクトルの C-H long range 相関から決定した。単離化合物の内 6 種がフラボノイドであったことから、関連化合物も併せ、これらの GC 様作用を luciferase 発現量を指標に検討した。

一般に 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、ホモ二量体を形成し、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) に結合することで、標的遺伝子の転写を活性化する事が知られる。

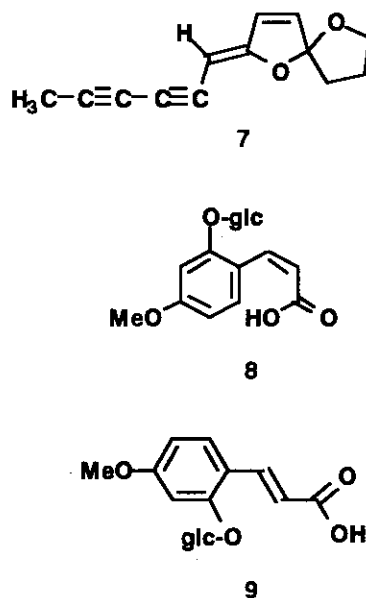
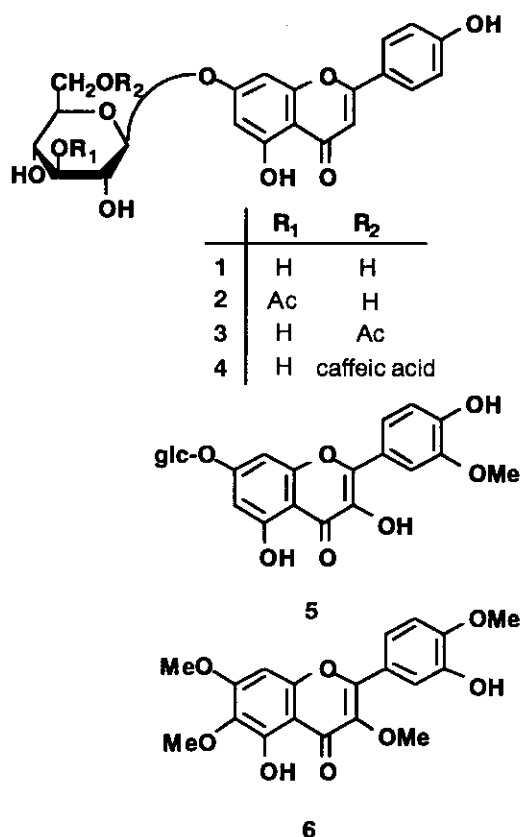


Chart 3
カミツレ AcOEt fr. より得られた化合物

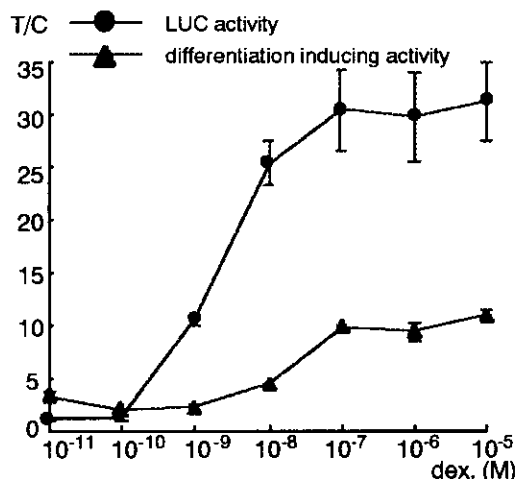


Fig.1 Dex. に対する M1 細胞分化誘導活性
及び MMTV-luciferase 導入 3Y1
細胞のルシフェラーゼ活性

今回 GC 様物質のスクリーニングに用いた細胞は、GC 感受性プロモーターを有するマウス乳頭腫ウイルスの long terminal repeat (MMTV-LTR) の下流にレポーター luciferase 遺伝子を連結し (MMTV-luciferase)、ラット線維芽細胞 3Y1 に安定的に導入したものである (3Y1/Luc)。GC 様物質存在下で培養した後、基質を加えるこ

とで観察される発光量から、その luciferase 発現量を測定し、GC 様活性の指標とした (Fig 1)。

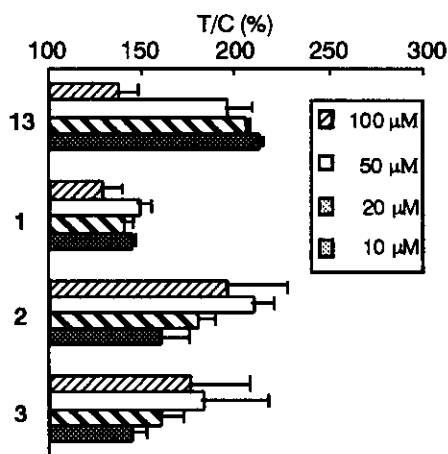


Fig.2 Apiin 誘導体の GC 様活性

化合物 1-4 は何れも ¹H-NMR において δ 6.48、6.74 ppm 付近にフラボンの A 環 6 位、8 位に特徴的なシグナル、δ 6.61 ppm 付近に C 環 3 位由来のシグナル、δ 6.91、7.82 ppm 付近にそれぞれ 2H ずつ B 環 3', 5' 位、2', 6' 位由来のシグナ

ルを認めた。さらに δ 5.04 ppm 付近に glucose 1 位由来のシグナルが観察されたことから apiin 誘導体と推定された。また、化合物 2-4 の HMBC スペクトルにおける C-H ロングレンジ相関より、エステル結合位置を決定した。化合物 5, 6 は、その $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルからフラボノールと推定された。各種スペクトルデータを丹念に文献値と比較することで、Chart 2 に示すような構造と同定した。化合物 1-4 のアグリコン apigenin(13) は、植物界に広く分布することが知られる。そこで、配糖体とそのアグリコンの GC 様活性を比較検討した (Fig.2)

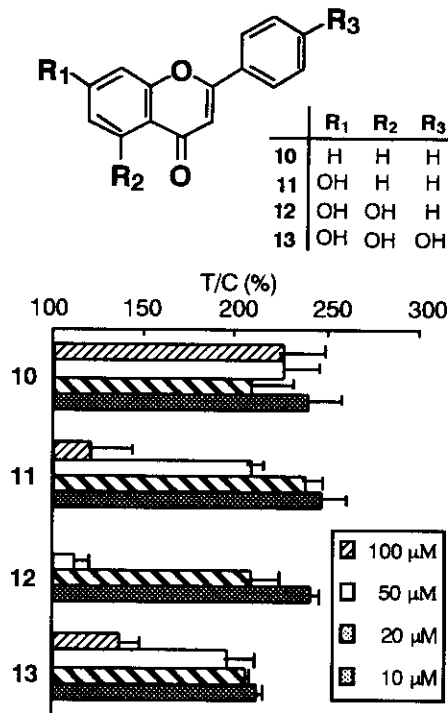


Fig.3 Apigenin 類縁体の GC 様活性

Fig.2 は 3Y1/Luc 細胞を各化合物で処理した際の luciferase 活性 (T) を、エタノール処理群 (C) と比較したものである。Apiin (1) は今回活性を検討した 10-100 μM の濃度で、150 % 程度の活性を示すに留まった。また、ケイヒ酸エステル (4) に活性は認められなかったが、アセテート (2, 3) には apiin (1) よりも強い luciferase 発現誘導が観察された。一方、apigenin (13) にも 10 - 50 μM で T/C 200 % の活性が認めら

れたことから、その類縁体の GC 様活性を検討した (Fig. 3)。

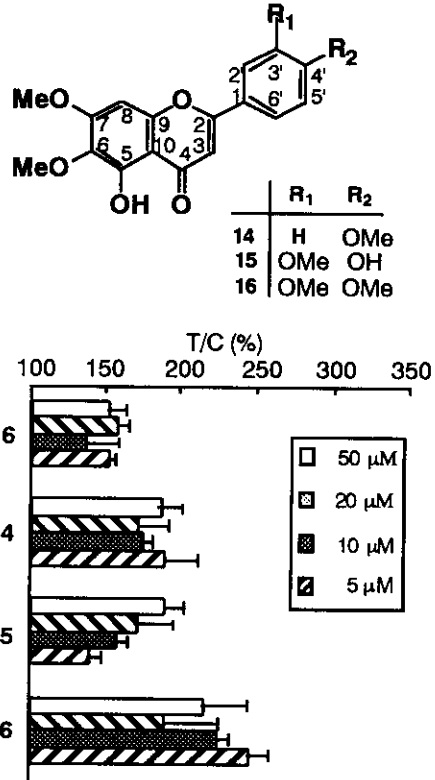


Fig.4 Polymethoxyflavones の GC 様活性 (1)

何れの化合物も GC 様作用を示し、10 μM の濃度においても 200 % を超える T/C が認められたが、一方で水酸基を有する化合物 (11-13) は高濃度で細胞毒性が認められた。部分構造に糖、水酸基などの極性基を持つ化合物の活性が比較的低かったことから、水酸基が methoxyl 化された、polymethoxyflavone を対象に、その GC 様活性を検討した。Polymethoxyflavone も植物界に広く分布することが知られ、今回アッセイに供した化合物は、先に我々が白血病細胞分化誘導活性を指標に、ミカン科植物より分離したものである。

A 環 5,6,7 位に *o*-function を有する化合物の比較では、16 が低濃度でも強い GC 様活性を有することが認められた。この化合物は、今回 GC 様活性を検討した中でも、最も強く luciferase の発現を誘導したものの一つで、5 μM の濃度で約 250 % の T/C を示した。一方で 4' が OH であるこ

と以外、16 と同じ置換パターンを有する 15 は活性が大きく低下していた。また、16 の 3' の OMe が H になった構造を有する 14 も、16 に比較して活性の低いことが認められた。

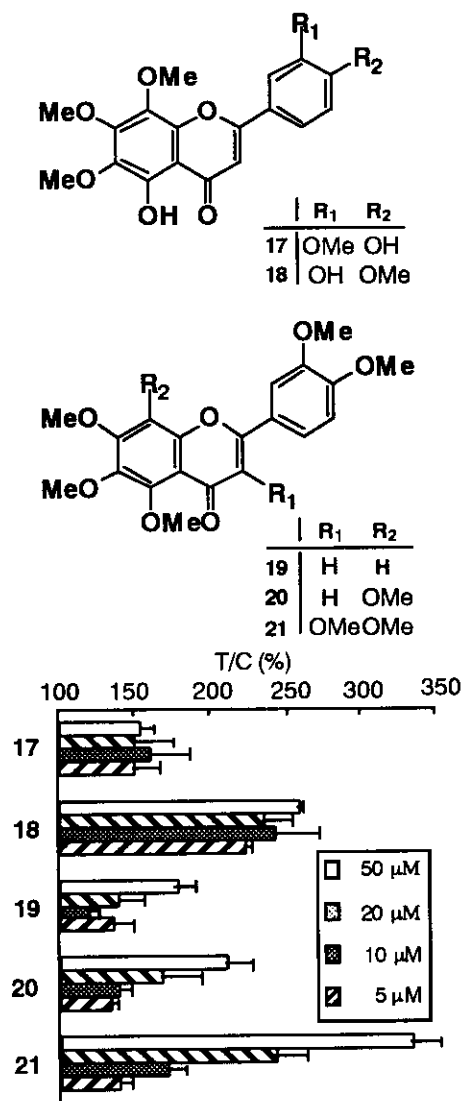


Fig.5
Polymethoxyflavones の GC 様活性 (2)

A 環 5,6,7,8 位に *o*-function を有する化合物の比較では、18 に 5 μM 以上で強い GC 様活性が認められた。化合物 16 の B 環 3',4' 位の *o*-function が入れ替わった構造を有する 17 は、活性が大きく低下していた。また、化合物 21 は 50 μM の濃度でおよそ 350 % (T/C) と、今回アッセイに供したフラボン中最も高い luciferase 発

現量を示した。しかしながら、5 μM の濃度では殆ど GC 様活性を示さず、5,6,7,3',4' 位に MeO 基を有する 19, 20 も同様の傾向を示した。

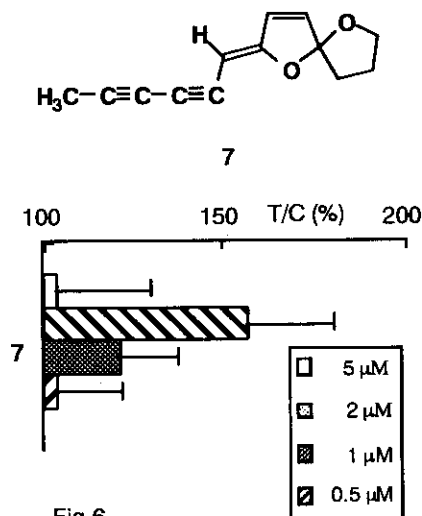


Fig.6
Mycosinol の GC 様活性

化合物 7 の構造は、各種スペクトルデータの文献値との比較から 11-deoxy-12,13-dihydro-(7Z) mycosinol、8,9 は何れもケイヒ酸誘導体と同定された。化合物 7 は 2 μM で GC 様活性を示したが、その活性が認められる濃度は非常に狭い範囲であった (Fig.6)。また、化合物 8,9 のケイヒ酸誘導体は何れも活性を示さなかった。

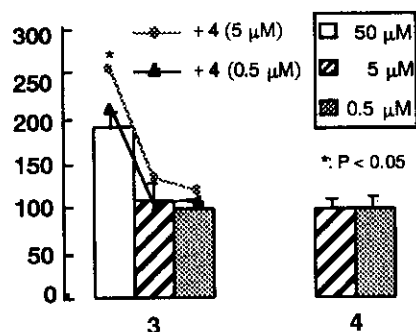


Fig.7
フラボノイド併用時の GC 様活性

植物・生薬は様々な種類の化合物から成る多成分系であることから、今回単離した化合物が共存した場合の GC 様作用に興味を持たれた。そこで、比較的収量の多かった 3 と 6 を用いて、共存時の GC 様作用を単独処理時と比較検討した。化合物 3, 4 は何

れも 5 μM 以下では全く GC 様作用を示さない。しかしながら、この二者が共存した場合、その作用が増強される傾向が認められ、50 μM の 3 と 5 μM の 4 が共存した場合、有意な活性の増強が観察された (Fig.7)。

高等植物中の様々な GC 様物質が明らかとなったが、次に我々が日常これらの物質を摂取する可能性に関心が持たれた。そこで、市販の食用植物 50 種を対象に、この GC アッセイ系を用いスクリーニングを行った (Table 1)。植物は何れもメタノールエキスとし、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でアッセイに供したが、何れも活性は認められなかった。

D. 考察・結論

前年度構築した GC 様物質スクリーニング系を用い、比較的強い活性の認められた生薬カミツレ中の GC 様物質の分離を行った結果、9 種の化合物を分離し、内フラボン 4 種を含む 5 種の化合物に活性を認めた。ヨーロッパでは古くからカミツレを、風邪、頭痛、下痢などに対してカミツレ・ティーとして飲む風習が知られる。また、生薬カミツレは、抗炎症、鎮痙、駆風の目的に用いられるが、GR を介した機構で抗炎症などの glucocorticoid 様作用を示している事実が実験的に確認された。

活性を示したフラボンである apiin 誘導体および、その類縁体の GC 様活性試験の結果から、活性発現に必要な部分構造を推察

したところ、5-OH, 6,7,3',4' 位に *o*-function を有する化合物が低濃度まで強い活性を示した (16,18)。3',4' 位は何れも MeO が活性発現には好ましいようであるが、3'-OH の場合もその活性は保持されていた (18)。しかしながら、4'-OH の化合物 (6, 15, 17) の活性は、MeO の化合物 (16,18) に比較して大きく低下していた。一方、5 位のキレート性水酸基が MeO となった化合物 (21) は高い luciferase 発現量を示したが、有効濃度範囲の狭いことが確認された。今回強い活性を示す化合物として単離されたこれらの flavonoid はいずれも芳香環に対して水平方向に *o*-function を有する。天然の glucocorticoid に比較して、およそ 1000 分の 1 程度の活性はこの立体構造の違いに寄ることが大きいものと思われる。今後、立体構造に関する知見を集めることで、従来の GC 剤に替わる優れた抗炎症・免疫抑制作用を持ち、副作用の弱い新たな GC 剤開発に繋がる可能性が期待される。

植物・生薬は様々な種類の化合物から成る多成分系であることから、単離した GC 様物質共存時の GC 様作用を単独処理時と比較検討した。比較的収量の多かった化合物 3, 6 を用いた実験では、単独では何れも GC 様作用を示さない濃度の二者が共存した場合、その作用が増強される傾向が認められ、50 μM の 3 と 5 μM の 6 が共存した場合、有意な活性の増強が観察された。

近年、妊娠ラットを用いた実験で、母胎

Table 1 GC 様活性を検討した植物メタノールエキス (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

<p>アシタバ (<i>Angelica keiskei</i>)、アズキ (<i>Phaseolus Semen</i>)、アボガド (<i>Persea americana</i>)、イチゴ (<i>Fragaria × ananassa</i>)、エシャレット (<i>Allium chinense</i>)、オオムギ (<i>Triticum sp.</i>)、オクラ (<i>Hibiscus esculentus</i>)、カイワレ (<i>Raphanus sativus</i>)、キウイ (<i>Actinidia chinensis</i>)、キャベツ (<i>Brassica oleracea</i>)、キュウリ (<i>Cucumis sativus</i>)、キントキマメ (<i>Phaseolus vulgaris</i>)、ギンナン (<i>Ginkgo biloba</i>)、クレソン (<i>Nasturtium officinale</i>)、クロマメ (<i>Phaseolus vulgaris</i>)、</p> <p>サクランボ (<i>Prunus avium</i>)、サツマイモ (<i>Ipomoea batatas</i>)、サヤインゲン (<i>Phaseolus vulgaris</i>)、シメジ (<i>Lyophyllum shimeji</i>)、ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>)、シロゴマ (<i>Sesamum indicum</i>)、セロリ (<i>Apium graveolens</i>)、ダイコン (<i>Raphanus sativus</i>)、ダイズ (<i>Glycine max</i>)、ダイフクマメ (<i>Dilichos lablab</i>)、タマネギ (<i>Allium cepa</i>)、チャ (<i>Camellia sinensis</i>)、トウモロコシ (<i>Zea mays</i>)、トマト (<i>Lycopersicon esculentum</i>)、</p> <p>ナガネギ (<i>Allium fistulosum</i>)、ナス (<i>Solanum melongena</i>)、ニラ (<i>Allium tuberosum</i>)、ニンジン (<i>Daucus carota</i>)、ニンニク (<i>Allium sativum</i>)、</p> <p>パセリ (<i>Petroselinum crispum</i>)、ピーマン (<i>Capsicum annum</i>)、ブドウ (<i>Vitis vinifera</i>)、ブロッコリー (<i>Brassica oleracea</i>)、ホウレンソウ (<i>Spinacia oleracea</i>)、ホップ (<i>Humulus lupulus</i>)、</p> <p>マイタケ (<i>Grifola frondosa</i>)、マッシュルーム (<i>Agaricus bisporus</i>)、ミツバ (<i>Cryptotaenia canadensis</i>)、メロン (<i>Cucumis melo</i>)、モヤシ (<i>Glycine max</i>)、モロヘイヤ (<i>Corchorus olerius</i>)、</p> <p>ヨモギ (<i>Artemisia princeps</i>)、</p> <p>ラズベリー (<i>Rubus idaeus</i>)、リンゴ (<i>Malus domestica</i>)、レタス (<i>Lactuca scariola</i>)</p>

の GC 濃度が胎児の思春期の早晩に影響を与える結果が報告されている。高濃度の GC 環境にあった妊娠ラットから生まれた雌の思春期は遅く、低濃度の GC 環境にあった妊娠ラットから生まれた雄の思春期は早まる傾向にあることが明らかとされている。ヒトに対する影響に関する報告は無いが、我々が日常摂取する可能性を想定し、食用に供される植物 50 種のメタノールエキスの GC 様作用を検討したが、何れも単独で活性は認められなかった。しかし、これらのエキスが GC 存在下でどのような影響を及ぼすか、今後検討の余地があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikuro Abe, Kaoru Umehara, Ryoko Morita, Kiyomitsu Nemoto, Masakuni Degawa, and Hiroshi Noguchi. Green tea polyphenols as potent enhancers of glucocorticoid-induced mouse mammary tumor virus gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 122-125 (2001).

2. 学会発表

1. 梅原 薫、渥美 宏、森田良子、宮瀬敏男、野口博司、根本清光、出川雅邦. カミツレ中のグルココルチコイド様物質の検索. 日本生薬学会第 47 回年会 (東京)、要旨集、p. 128、2000 年 9 月 7 日.
2. 梅原 薫、渥美 宏、森田良子、宮瀬敏男、野口博司、根本清光、出川雅邦. 生薬アマチャ中のグルココルチコイド様物質に関する研究. 日本薬学会第 121 年会 (札幌)、要旨集 2、p.101、2001 年 3 月 28 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：チトクローム P450 誘導能を指標とする *in vitro* 毒性評価系の確立

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。大気浮遊粉塵とディーゼル排気粉塵（DEP）に含まれるニトロ多環芳香族炭化水素（NPAH）類の類似性が示唆されている。そこで、DEP 抽出物（DEPE）とそれらに含まれる 1-ニトロピレン（1-NP）、ジニトロピレン（DNP）類等の NPAH 類に着目し、それらの代謝的活性化・不活性化におけるヒト CYP1 ファミリーの役割について、umu 法による DNA 損傷性を指標として検討した。さらにヒト P450 による 1-NP の代謝的活性化を *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 と高感度検出系を用いて調べ、DNA 損傷性を指標として代謝経路を予測した。さらにディーゼル排気をラットに暴露させ、生体内における P450 1B1 の誘導について検討した。本研究の結果、1-NP は P450 1B1 によって効率よく代謝的に活性化されることが示唆された。さらに 1-NP 等を含むディーゼル排気は主に肺、肝および腎の P450 1B1 を誘導し、誘導された P450 はディーゼル排気粉塵中の化学物質の代謝的活性化を効率よく触媒することが示唆された。

A. 研究目的

近年、ディーゼル排気粉塵抽出物はダイオキシン等と同様に、発癌性のみならず、様々な問題を引き起こす外因性内分泌攪乱化学物質として問題視されている。最近ではダイオキシン発生量の低減のため高温でのごみ焼却が推奨されているが、一方で高温燃焼ではニトロ化合物の生成は増大することが指摘されている。タイオキシンは芳香族炭化水素（Ah）レセプターに結合して P450 を誘導し、ステロイドホルモンの代謝を促進することによって内分泌かく乱作用を示すことが知られている。環境化学物質、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 P4501A1 と 1A2 の発現を指標とした研究がなされてきたが、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酵素誘導作用と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。その結果、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 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。ディーゼル排気は主に肺、肝および腎 P450 1B1 を誘導し、さらに誘導された P450 はディーゼル排気粉塵中の化学物質の代謝的活性化を効率よく触媒することが示唆された。

B. 研究方法

ディーゼルエンジン搭載車 4 台から DEP をガラスフィルターに捕捉し、ベンゼン：エタノール (3 : 1) 抽出物のエタノール溶液を DEPE-1~4 として用いた。ディーゼル排気暴露装置から得た粉塵からも同様に抽出物を調製し、DEPE-5 とした。ヒト P450 と P450 還元酵素(NPR)を共発現させた大腸菌メンブランまたは市販のヒト P450 発現系存在下で DNA 損傷性を *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002、O-アセチル転移酵素過発現株 (NM2009) とその欠損株 (NM2000)、ニトロ還元酵素過発現株 (NM1011) とその欠損株 (NM1000) 中に検出される DNA 損傷性を指標に調べた。熱処理により失活させた酵素による数値を差し引いた値を P450 による代謝的活性化・不活性化とした。ディーゼル排気による生体内における P450 1B1 の誘導を調べる実験では、雄性 Fischer 344 系ラット(4 週令)にディーゼル排気粉塵 (0, 0.3 および 3 mg/m³) を 4 週間 (1 日 12 時間) 暴露させた。各臓器を摘出後、ミクロソーム画分を調製し、P450 分子種含量、薬物酸化酵素活性および *umu* 試験法の DNA 損傷性を指標とした P450 酵素誘導を検討した。P450 1A1 の指標基質として Trp-P-1、P450 1A2 の指標基質として MeIQ、および P450 1B1 の指標基質として 2-アミノアントラセン、1-NP、1-アミノピレン(1-AP)および DEPE (DEPE-5) を用い、*S. typhimurium* NM2009 を試験菌株とした。

C. 研究結果

5 種の DEPE の DNA 損傷性を *umu* 法を用いて調べた(Fig. 1)。P450 非存在下、ディーゼル車から得た DEPE の中では、DEPE-1 が最も強い直接的な DNA 損傷性を示した (Fig. 1B)。ディーゼル暴露装置から調製した DEPE-5 は DEPE-1 より強い直接活性を示した。さらに DEPE-1 と DEPE-5 は、CYP1 ファミリーの中で CYP1B1 により最も効率よく代謝的に活性化された。以上の結果から、CYP1 ファミリー、特に肺や生殖器等に発現する CYP1B1 は、DEP の生体に及ぼす影響に関与することが示唆された。

1-ニトロピレン (1-NP) とその還元体である 1-AP の DNA 損傷性を 5 種類のサルモネラ試験菌株を用いて調べた (Fig. 2)。1-NP の直接的な DNA 損傷性は用いる試験菌株に依存して異なっていた (Fig. 2A)。低基質濃度 (0.3 μM) の 1-NP は P450 1B1 により代謝的に活性化され、アセチル転移酵素導入 NM2009 株存在下に高い活性値 (750 *umu* units/min/nmol P450 1B1) を示したが、通常株と NM2000 株ではこの活性化は検出されなかった (Fig. 2C)。高基質濃度 10 μM では、通常株と NM2000 株で検出される 1-NP の活性値 (約 400 *umu* units/min/nmol P450) に差は認められなかった。1-AP も P450 1B1 により代謝的に活性化され、低基質濃度において、NM2009 株存在下に強い DNA 損傷性を示した (2500 *umu* units/min/nmol P450 1B1) (Fig. 2D)。HPLC 分析の結果、基質濃度 10 μM においては P450 1B1 による 1-NP の 6-水酸化体と 4,5-ジオール体が検出された (Table 1)。基質濃度 1 μM においては、本条件下では代謝物は検出されなかった。以上の結果から、1-NP は低濃度において、P450 1B1 によりニトロ還元/アセチル抱合を介した経路 (Fig. 3) によって効率よく代謝的に活性化されることが推察された。

雄性 Fischer 344 系ラット(4 週令)にディ

ディーゼル排気粉塵(0, 0.3 および 3 mg/m³)を 4 週間(1 日 12 時間)暴露させた。0.3 mg/m³ は都市部で日常的に観察される濃度に相当する。P450 の誘導作用を調べたところ、肺、肝および腎 P450 1B1 が触媒する 4 種の代謝的活性化反応は、ディーゼル排気暴露(0.3 mg/m³)によってそれぞれ 1.4-4.2、1.3-1.5 および 1.1-1.3 倍上昇した (Fig. 4)。ディーゼル排気 3 mg/m³ 暴露群においては、P450 1B1

の触媒活性に加えて、肺ミクロソーム P450 1A1 の *umu* 指標活性と肝 P450 1A2 含量 (Table 2)がそれぞれ 2 倍および 1.4 倍上昇した。以上の結果から、ディーゼル排気は主に肺、肝および腎 P450 1B1 を誘導し、さらに誘導された P450 はディーゼル排気粉塵中の化学物質の代謝的活性化を効率よく触媒することが示唆された。

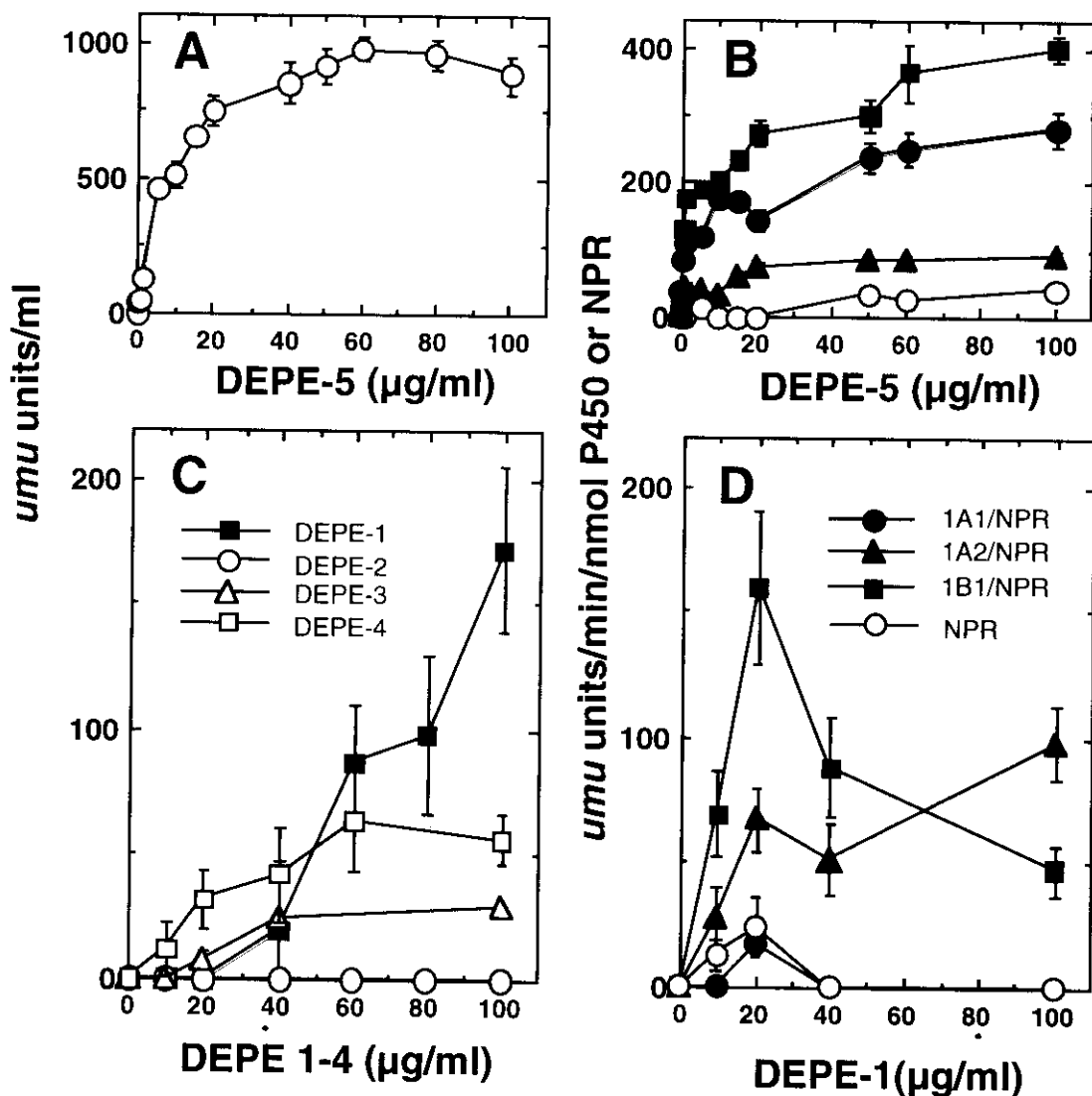


Fig. 1. Genotoxicity of DEPE in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

(A,C) *umu* gene expression of five samples of DEPE in the absence of activation systems; (B,D) bioactivation of a sample designated DEPE-5 (B) or DEPE-1 (D) by human P450s 1A1/NPR membranes (●), 1A2/NPR membranes (▲), and 1B1/NPR membranes (■) and by human NPR membranes (○). Spontaneous background levels of *umu* gene expression ($\sim 120 \pm 20$ units/ml) were subtracted. Results are presented as means of duplicate or triplicate determinations and SD (range).

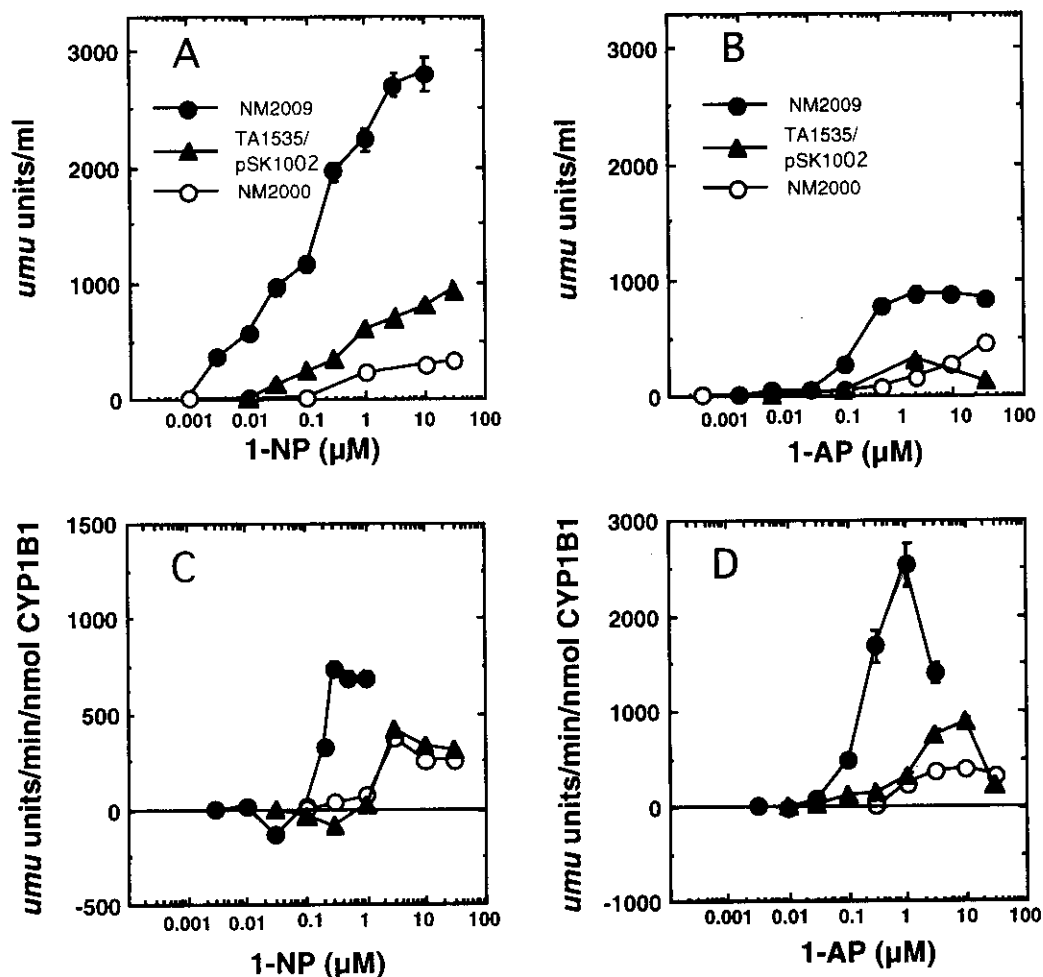


Fig. 2. Genotoxicity of 1-NP and 1-AP in *S. typhimurium* tester strains. (A, B) *umu* gene expression of 1-NP in *S. typhimurium* NM2009 (●), TA1535/pSK1002 (▲), and NM2000 (○) without metabolic activation systems. Background levels of *umu* gene expression were subtracted. (C, D) Bioactivation of 1-NP and 1-AP by human P450 1B1/NPR membranes. The *umu* gene expression was measured in the absence and presence of the enzyme system; negative values indicate inactivation. Results are presented as means of triplicate determinations and S.D.

Table 1. The organic solvent-extractable metabolites of 1-NP formed by human hepatic microsomes and recombinant P450 enzymes

Enzymes	pmol/min/nmol P450 or NPR				
	4,5-diOH-1-NP	1-AP	8-OH-1-NP	6-OH-1-NP	3-OH-1-NP
HL-110	0.67	0.06	0.05	0.25	2.4
HL-114	< 0.01	0.02	0.28	0.08	0.38
1A1/NPR	0.53 ± 0.03	0.02 ± 0.01	1.96 ± 0.03	1.56 ± 0.05	0.01 ± 0.01
1A2/NPR	< 0.01	0.04 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.11 ± 0.02	< 0.01
1B1/NPR	0.22 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.25 ± 0.03	1.61 ± 0.21	0.26 ± 0.12
3A4/NPR	0.35 ± 0.02	< 0.01	< 0.01	0.15 ± 0.04	1.08 ± 0.07
NPR	< 0.01	0.03 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

Data are means of duplicate (HL, human liver microsomes) or triplicate and S.D. (*E. coli* membranes).