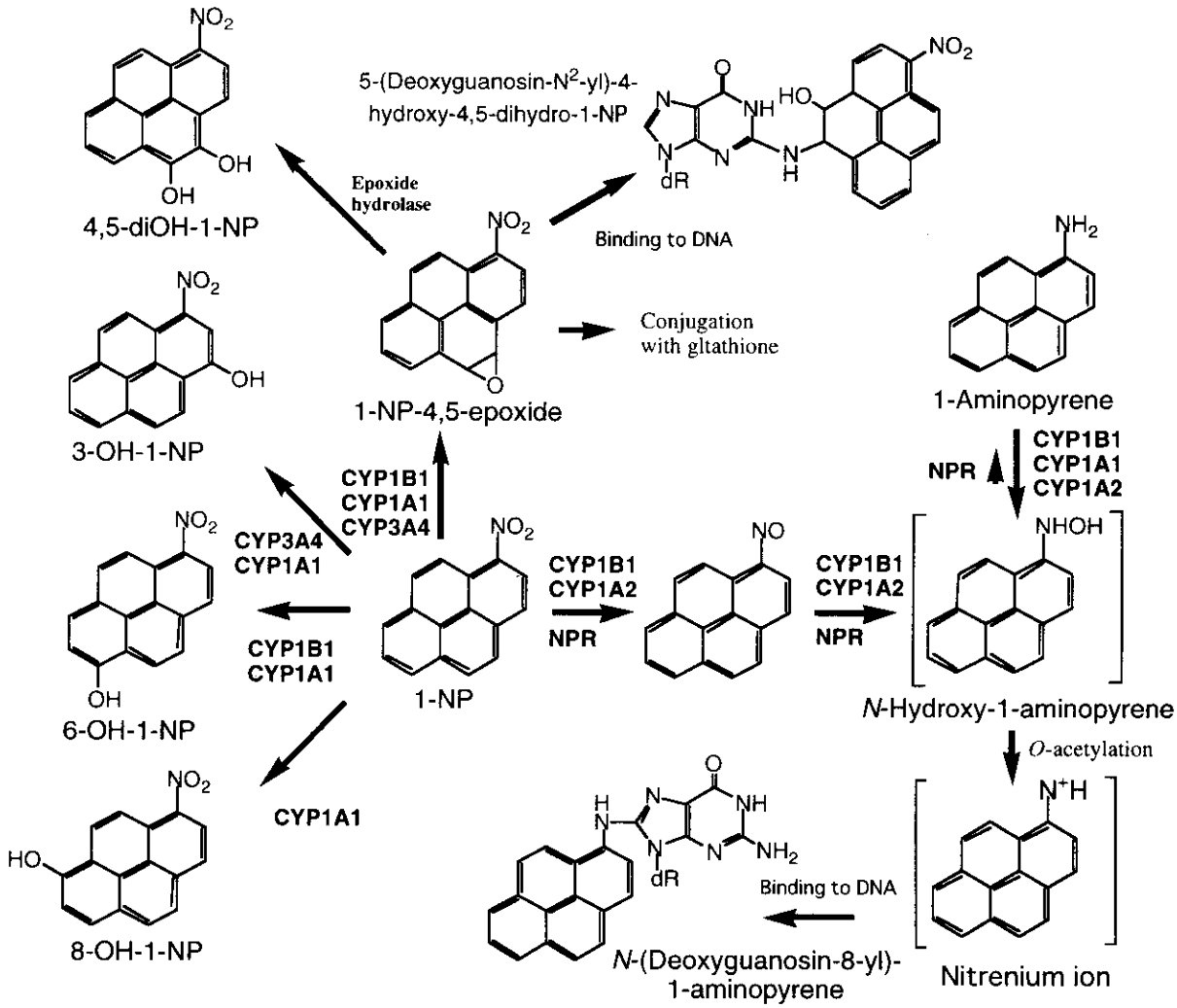

Fig. 3. Proposed metabolic pathways of 1-NP

Table 2. Effects of DEP exposure on microsomal P450 contents and drug oxidation activities in rats

	DEP	Total P450	P450 1A1	P450 1A2	P450 1B1	AHH	EROD
	mg/m^3	pmol/mg protein				pmol/min/mg protein	
Liver	0.0	369 ± 34	< 0.1	12 ± 1	< 0.1	82 ± 11	107 ± 20
	0.3	375 ± 46	< 0.1	12 ± 2	< 0.1	86 ± 9	140 ± 12*
	3.0	345 ± 50	< 0.1	17 ± 3*	< 0.1	74 ± 22	115 ± 12
Kidney	0.0	22± 6	< 0.1	< 0.1	< 0.1	ND	9 ± 1
	0.3	38±11**	< 0.1	< 0.1	< 0.1	ND	9 ± 1
	3.0	31± 4*	< 0.1	< 0.1	< 0.1	ND	9 ± 1
Lung [a]	0.0	12	< 0.1	< 0.1	0.11	ND	9 ± 1
	0.3	13	< 0.1	< 0.1	0.15	ND	9 ± 1
	3.0	14	0.1	< 0.1	0.16	ND	24 ± 5

Mean ± SD for 5 rats.
[a] Microsomes were prepared from pooled rat lungs.
Significantly different from untreated group (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).
AHH, benzo[a]pyrene hydroxylase; EROD, ethoxyresorufin O-deethylase; ND, not determined.

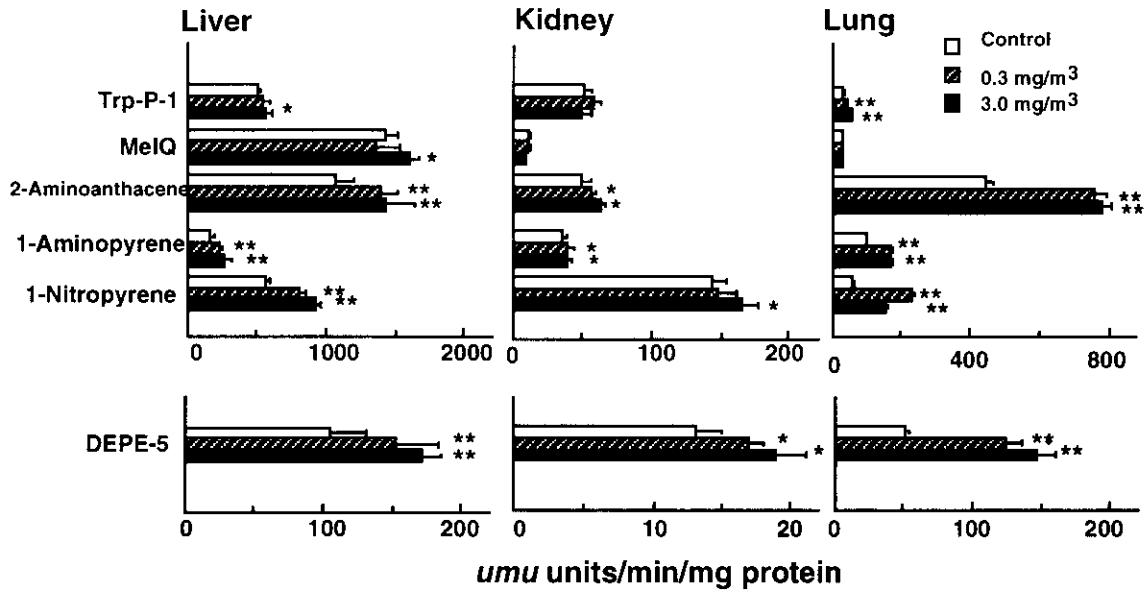

Fig. 4. Genotoxic activation of chemicals by liver, kidney, and lung microsomes from DEP-exposed rats. Significantly different from control group (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

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。

DEPE とそれらに含まれる NPAH の代謝的活性化・不活化はヒト組換え P450 酵素を用いる検討から明らかとなり、特に P450 1B1 の寄与が大きいことを見出した。そして、アセチル転移酵素過発現試験菌株を用いることで、1-NP のニトロ基は P450 1B1 により最も効率よく代謝され、活性中間体ヒドロキシルアミン体を経由した代謝的活性化経路により DNA 損傷性を発現することが推察された。一方、ディーゼル排気に暴露されたラット肺において P450 1B1 の誘導が顕著に認められ、肝や腎についても誘導が確認された。このことは、現行の環境基準値（日平均 0.1 mg/m^3）程度のディーゼル排気粉塵が P450 1B1 の酵素誘導を引き起こし、吸入された粉塵に含まれる化学物質は P450 1B1 により代謝的活性化を受けることが推察された。

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、酵素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 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。1-NP は P450 1B1 によってそのニトロ基が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。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

1) Yamazaki, H., Hatanaka, N., Kizu, R., Hayakawa, K., Shimada, N., Guengerich, F.P., Nakajima, M., and Yokoi, T. Bioactivation of diesel exhaust particles extracts and their major nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon components, 1-nitropyrene and dinitropyrenes, by human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. Mutat. Res., 472: 129-138, 2000.

2. 学会発表

1) 畑中直也，山崎浩史，木津良一，早川和一，島田典招，中島美紀，横井　毅．ディーゼル排気粉塵抽出物とニトロ多環芳香族炭化水素類のヒト CYP1 ファミリーによる代謝的活性化について．第 15 回日本薬物動態学会年会．福岡, 2000.

2) 岩成正司，中島美紀，木津良一，早川和一，山崎浩史，横井　毅．ニトロ多環芳香族炭化水素類によるCYP1ファミリーの誘導作用．第15回日本薬物動態学会年会．福岡, 2000.

3) 山崎浩史，畑中直也，木津良一，早川和一，中島美紀，横井　毅．環境発癌性物質 1-ニトロピレンのヒト P450 1B1 による代謝的活性化経路について．日本薬学会第 121 年会．札幌, 2001.

4) 畑中直也，山崎浩史，木津良一，早川和一，青木康展，中島美紀，横井　毅．ディーゼル排気暴露ラットにおける肺、肝および腎 P450 1B1 の誘導について．日本薬学会第 121 年会．札幌, 2001.

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

NADPH 存在下で、2,3,7,8-TCDD とラット肝ミクロソームとを、37℃で保温した時に生じる物質が、TCDD の分解物であることを確認する目的で、この生成反応への一酸化炭素の影響ならびに、この物質の生成に及ぼす各種誘導物質（3-methylcholanthren, clofiblic acid, dexamethasone, isoniazid, Naphthoflavone, perfluorodecanoate, Phenobarbital, pregnenolone-16α-carbonitril, streptozotocin, β-naphthoflavone）前投与の影響を検討した．この反応は NADPH を必要としたが、一酸化炭素で完全に阻害できなかった。マススペクトログラム上で、この反応生成物中に塩素分子の存在が認められなかった。シトクロム P450 の各種誘導物質で誘導された肝ミクロソームの、この物質の生成反応誘導現象は認められなかった。mg タンパクあたりで比較すると、この物質(A)の生成活性は SD 系ラットが最も高く、ついで Wister 系、Human、Fischer 344 系ラットで、Human のそれは、SD 系ラットに比して 10 分の 1 以下であった。雌雄の差は SD 系ラット、Wister 系、Human、Fischer 344 系ラット共にみられなかった。これらの結果から、次のことが明らかになった。1）物質(A)の生成は、この反応生成物が 2,3,7,8-TCDD の分解物である確証は得られないものの、NADPH を必要とし、2,3,7,8-TCDD と肝ミクロソームとの反応によって生じる物質である。2）物質(A)の生成反応は、シトクロム P450 の関与しない反応である。3）物質(A)の生成活性に、系統差があるが、性差はほとんどない。

A．研究目的

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，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は必要不可欠である．しかし現在ヒトでの代謝はほとんど検討されていない。

一般にダイオキシン類は代謝されにくいとされているが、代謝物として水酸化体が検出されており、2,3,7,8-TCDD （以下 TCDD）が肝ミクロソームの薬物代謝酵素により代謝されたものと推測できる。グルクロニダーゼやアリルスルファターゼ処理による検索の結果、代謝物のグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体は、胆汁中に排泄され

ないことが示唆されている。このことから、代謝物の多くは抱合反応などの第２相反応を受けず、未変化体のまま尿中や胆汁中に排出されると考えられる。

TCDD の排泄に代謝がどの程度関与しているかは、Olson 等が報告している。モルモットにトリチウムでラベルした TCDD を１回投与し、45 日間 TCDD の代謝と分解を検討した結果、投与した TCDD の 36%は脂肪中に分布しており、肝、皮膚、骨格筋、他の残骸にそれぞれ投与量の７%が分布している。肝、腎、腎付近の脂肪組織、および骨格筋にはほとんどが未変化体として分布し、4－28%が代謝物に関連したものである。尿中と糞中への排泄は１次の排泄過程で、その排泄半減期は 93.7+15.5 日である。尿と胆汁中への排泄はすべてが代謝物であり、糞中への排泄は 70－90%が未変化体である。この結果から、代謝物は未変化体のまま腸管から直接排泄されることを示している。45 日間の累積排泄量の 74.3%は糞中に TCDD として、25.7%は尿中と糞中に代謝物として排泄され、モルモットの TCDD 排泄の主な経路は TCDD として腸管であることがわかる。従って、モルモットでの TCDD の代謝は生体外への排泄にはあまり重要な役割をしていないようである。この結果と、代謝しにくく、半減期の長いことも相まって、ほ乳類のなかではモルモットは TCDD に最も感受性が高いといわれている原因かもしれない。

本研究は，昨年度報告したラット肝ミクロソームと 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine（以下 2,3,7,8-TCDD と略）との反応で生成される物質(A)の生成反応について、シトクロム P450 の関与と、系統差、性差について検討した。

B．研究方法

1) 薬品類

TCDD（シー・アイ・エル.ジャパン），NADPH(ベーリンガーマンハイム)，各種誘導物質（イソニアジド、ストレプトゾトシン、クロフィブリク酸、ナフトフラボン、メチルコラントレン、カルボニトリル、フェノバルビタール、パーフルオロデカノエイト、デキサメタゾン）前投与 SD 系ラットの肝ミクロソーム、無処置のウイスター系ラット、SD 系ラット、フィッシャー344 系ラットの肝ミクロソーム（ゼノテック社），リン酸緩衝液（0.1 N, pH 7.4），ジクロルメタン，ヘキサンなどは分析用試薬特級を用いた。

2) 使用機器

分析カラムとして HP-５（ヒューレットパッカード社））を取り付けた HP5973 MSD システム（ヒューレットパッカード社）を用いた．分析温度は 70-280℃（15℃/min 昇温）で分析した。

3) 反応系

終容量 1ml，酵素標品としてラット肝ミクロソーム（5 mg protein; 1 -10 nmol P450），電子供与体としての NADPH（終濃度 0.5 mM），基質として TCDD（250 ng)を加え，37 度で２時間保温し，ジクロルメタン 1 ml を加えて反応を停止させた。

4) 分析

ジクロルメタンを加えて反応を停止させた反応液を 2000 rpm x 10 分間、遠心分離した後、有機溶媒層を分取し，不活性ガスで乾燥した後，ヘキサン 50 μl で再溶解後その中に含まれる 2,3,7,8-TCDD とその代謝産物をガスクロマトグラフ-質量分析計で分析した。

C．研究結果

1) TCDD の水酸化体生成と分解物質(A)について

水酸化体のフラグメントイオンである m/z:335,350 を用いたイオンクロマトグラムには水酸化体の生成を示すピークはみられなかった（データ未掲載）。本実験条件で、TCDD とミクロソームとの保温によって水酸化体は生性しなかった。

TCDD とミクロソームとの保温によって生じた保持時間 14.9 分の物質(A)のマススペクトルは，親イオンが m/z：257(100.0)であり，主なフラグメントイオンは m/z:126(55.9%)，m/z:239(21.6%)

であった（図１）。塩素原子の存在を示す同位体の３対１のフラグメントイオンの対ピークは存在しなかった。

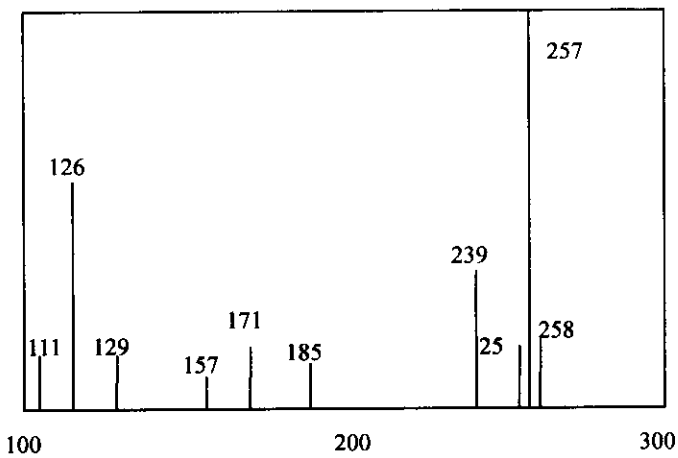

図１　2,3,7,8-TCDD とミクロソームとの保温によって生じた保持時間 14.9 分の物質(A)の電子衝撃イオン化方式によるマススペクトル：ガスクロマトグラムの分析条件は本文参照。塩素原子の存在を示す同位体の３対１のフラグメントイオンの対ピークは存在しなかった。

2)　一酸化炭素の影響

反応液中に一酸化炭素を１分間、緩やかに吹き込み、生成活性への影響を検討した。その結果、一酸化炭素の添加により、物質(A)の生成活性は対象に対して 57.21±16.26%(n=3)に減少した。物質(A)の生成活性を完全に消失させることは出来なかった。

3)　補助因子の必要性

フィッシャー344 系ラットの肝ミクロソームで物質(A)の生成反応に必要な補助因子を検討した。その結果、物質(A)の生成にはフィッシャー344 系ラットの肝ミクロソーム、TCDD および NADPH の３者を必要とし、いずれが欠けても物質(A)の生成は観察されなかった。

4) 物質(A)の生成に及ぼす各種誘導物質（ 3-methylcholanthren, clofiblic acid, dexamethasone, isoniazid, Naphthoflavone, perfluorodecanoate, Phenobarbital, pregnenolone-16α-carbonitril, streptozotocin, β-naphthoflavone）前投与の影響

SD ラットにシトクロム P450 の誘導物質を前投与した肝ミクロソームで、物質(A)の生成活性を調べた。その活性を表１に示した。シトクロム P450 1　nmol あたりの活性は、雄の生食群に比べると、酵素誘導物質を投与したラットですべて活性が低くなった。シトクロム P450 1　nmol あたりの Ratio は 0.028±0.021(mean±sd)、1 mg protein あたりの Ratio は 0.036±0.015 (mean ±sd)であった。

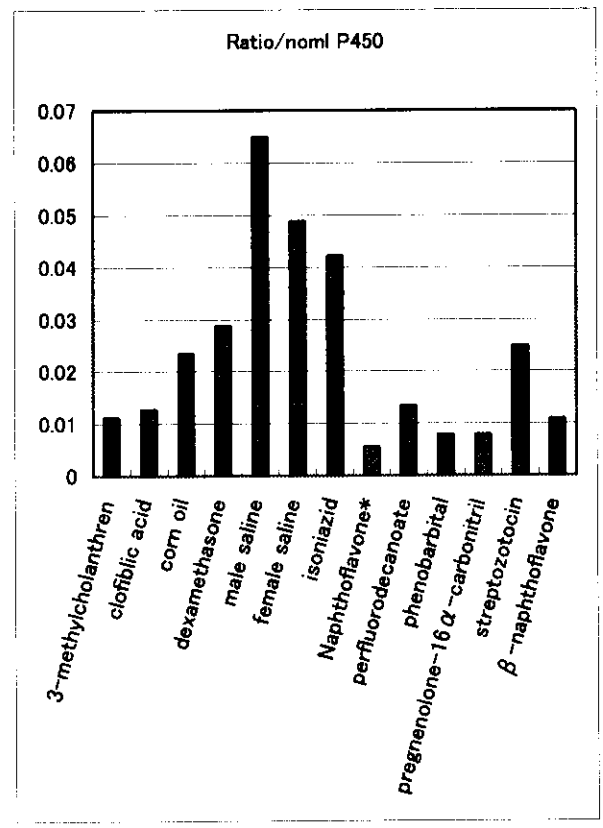

図２　物質(A)の生成に及ぼす各種誘導物質前投与の影響－1nmol P450 あたりの生成活性－：3-methylcholanthren, clofiblic acid, dexamethasone, isoniazid, Naphthoflavone, perfluorodecanoate, Phenobarbital, pregnenolone-16α-carbonitril, streptozotocin, β-naphthoflavone を前投与した雄性 SD 系ラットのミクロソームで物質(A)の生成活性（ratio/2 時間）を測定した。条件は本文参照。生理食塩水投与の肝

ミクロソームを基準にすると、コーンオイル投与も含め、すべて活性が小さくなった。

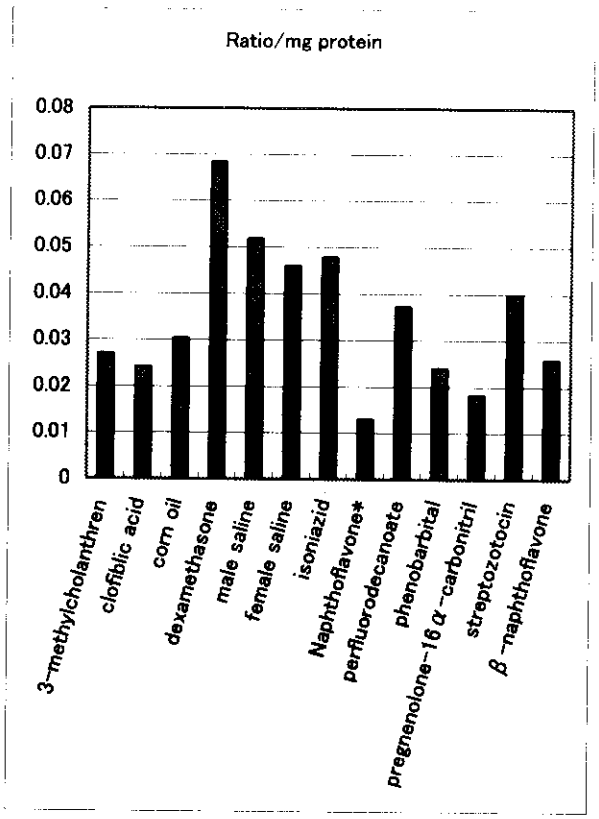

図３　物質(A)の生成に及ぼす各種誘導物質前投与の影響―mg タンパクあたりの生成活性―：3-methylcholanthren, clofiblic acid, dexamethasone, isoniazid, Naphthoflavone, perfluorodecanoate, Phenobarbital, pregnenolone-16α-carbonitril, streptozotocin, β-naphthoflavone を前投与した雄性SD系ラットのミクロソームで物質(A)の生成活性（ratio/2時間）を測定した（条件は本文参照)。条件は本文参照。生理食塩水投与の肝ミクロソームを基準にすると、コーンオイル投与も含め、すべて活性が小さくなった。減少の割合は 1nmol P450 あたりの生成活性の場合に比べて、小さかった。

5) Troleandomycin誘導ミクロソームによる活性

troleandomycin 誘導ミクロソームによる物質(A)の生成活性は反応時に troleandomycin が存在した時、シトクロム P450 あたりにすると 3.38 倍になり、タンパクあたりにすると 1.25 倍になった（それぞれ n=1)。

6) 系統差、性差

SD ラット（生食群)、Fischer 344 系ラット、Wister系ラットおよびHumanの雌雄の肝ミクロソームで生成活性を測定した（図２)。タンパク mg あたりで活性を比較すると、SD系ラットが最も高く、ついで Wister 系、Human、Fischer 344 系ラットであった。Human のそれは、SD系ラットに比して１０分の１以下であった。

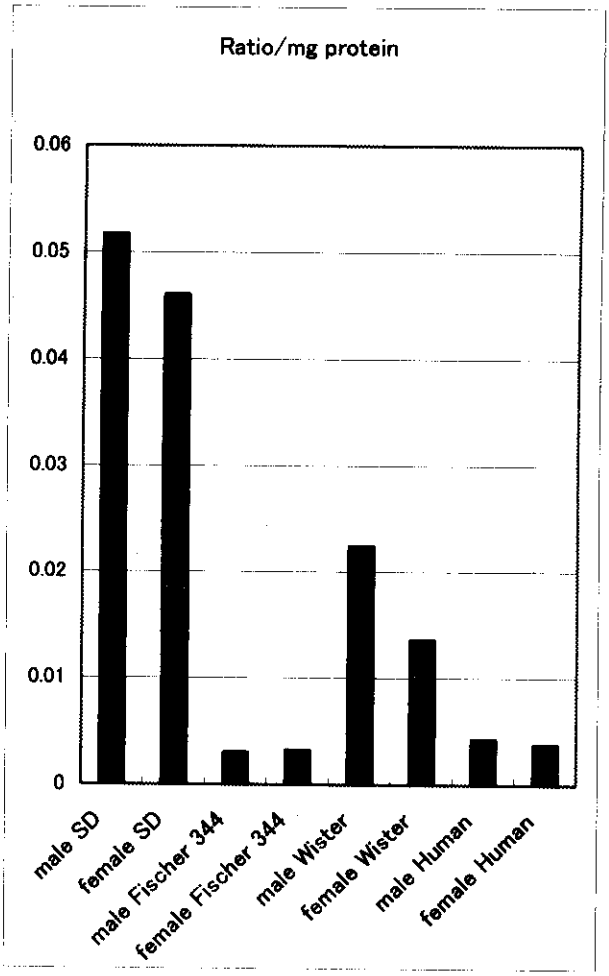

図４　物質(A)の生成のラットの系統差、性差：雄性または雌性の SD、Fisher 344、Wister 各系統ラットのミクロソームで物質(A)の mg タンパクあたりの生成活性(ratio/2 時間)を測定した(条件は本文参照)。S 系 D ラットがもっとの活性が高く、Fisher 344 系ラットが最も低かった。ヒトの活性は SD 系ラットの活性に比べて約 1/10 であった。

D. 考察

TCDD を投与したイヌの胆汁中にいくつかの極

性代謝物が、薄層クロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーで検出されている。また代謝物のグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体は胆汁中に排泄されていないことから、そのまま糞中に排泄されるものと思われる。主な代謝物は、TCDDの水酸化体である。この代謝物の未変化体が胆汁中に排泄されていることから、この水酸化体は、肝のシトクロム P450 酵素系で代謝されたものと考えられる。しかし、ラットの肝ミクロソームをもちいた本実験分析条件で、水酸化体のフラグメントイオンである m/z:350, m/z:335 のイオンクロマトグラフィーで検討した結果、水酸化体の生成は確認できなかった（データ未掲載)。この結果がモルモットとラットの系統差によるものかどうかは本実験では明らかに出来ない。

本実験で、ラット肝ミクロソームと TCDD との反応で一つの分解物が検出された。この分解物の生成にはNADPHを必要とした。Poiger等が、検出した分解物から示している可能な代謝機構ではすべてに塩素原子が存在している。しかし、物質(A)の電子衝撃方式のマススペクトログラムには塩素原子の存在が確認できなかった（図１)。さらに、すべての塩素イオンが水酸基に置き換わった場合の親イオンであるm/z=248の存在も、イオンクロマトグラムで、認められなかった。

シトクロム P450 の誘導薬である 3-methylcholanthren 、 clofiblic acid 、 dexamethasone、 isoniazid、Naphthoflavone、 perfluorodecanoate 、 phenobarbital 、 pregnenolone-16α-carbonitril 、 streptozotocin、β-naphthoflavone による誘導効果もみられなかった（図２，３)。Troleandomycin で誘導されたシトクロム P450 は troleandomycin が存在すると troleandomycin が誘導されたシトクロム P450 のヘム部分に結合して活性が消失するといわれている。Troleandomycin 誘導ミクロソームによる物質(A)の生成活性は反応時に troleandomycin が存在した時、シトクロムP450あたりにすると3.38倍になり、タンパクあたりにすると1.25倍になった。これらのことから、物質(A)の生成反応にはシトクロムP450酵素が関与しない反応と考えられる。

さらに、male Fischer 344、 female Fischer 344、male Wister、 female Wister、 male Human、female Human それぞれの肝ミクロソームによるこの反応物質の生成と、シトクロム p450(nmol/mg)、protein(mg)との相関はみられなかった（図４)。

タンパクあたりで比較すると、この物質(A)の生成活性はSD系ラットが最も高く、ついでWister系、Human、Fischer 344系ラットで、Humanのそれは、SD系ラットに比して１０分の１以下であった。雌雄の差は SD 系ラット、Wister 系、Human、Fischer 344 系ラット各系で、ほとんどみられなかった。

E．結論

本実験の結果から次のことが明らかになった。１）物質(A)の生成は、この反応生成物が TCDD の分解物である確証は得られないものの、NADPH を必要とし、2,3,7,8-TCDD と肝ミクロソームとの反応によって生じる物質である。２）物質(A)の生成反応はシトクロム P450 の関与しない反応である。３）物質(A)の生成活性に、系統差があるが、性差はほとんどない。

F．研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

１．藤井 宏融： ダイオキシンのラット肝ミクロソームによる分解. 第 74 回日本薬理学会年会（横浜）2001.3.21

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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Yoshihisa Kato Koichi Haraguchi Shinya Yumoto Yasuhiro Nagano Tomoaki Yamazaki Yoshito Masuda Ryohei Kimura	3-Methylsulfonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a metabolite of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl induces CYP2B1/2 in rats.	Organohalogen Compounds	49	209-212	2000
Yoshihisa Kato Yasuhiko Shinmura Koichi Haraguchi Kimie Imai Kiyomitsu Nemoto Tachio Aimoto Yoshito Matsuda Masakuni Degawa 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
Yoshihisa Kato Koichi Haraguchi Shinya Yumoto Yasuhiro Nagano Tomoaki Yamazaki Yoshito Masuda Ryohei Kimura	2,2',4',5-Tetrabromobiphenyl metabolite, 3-$MeSO_2$-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl is a potent inducer of CYP2B1/2	J. Toxicol. Sci.	25	312	2000
Yoshihisa Kato Yasuhiko Shinmura Koichi Haraguchi Kiyomitsu Nemoto Kimie Imai Tachio Aimoto Yoshito Masuda Masakuni Degawa 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
Kiyomitsu Nemoto Shingo Miyata Fumiko Nemoto Tsutomu Yasumoto Uta Murai Haruaki Kageyama Masakuni Degawa	Gene expression of neurotrophins and their receptors in lead nitrate-induced rat liver hyperplasia.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	275	472-476	2000
Hiroshi Yamazaki Naoya Hatanaka Ryoichi Kizu Kazuichi Hayakawa Noriaki Shimada F. Peter. Guengerich Miki Nakajima Tsuyoshi Yokoi	Bioactivation of diesel exhaust particles extracts and their major nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon components, 1-nitropyrene and dinitropyrenes, by human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1.	Mutat. Res.	472	129-138	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Ikuro Abe Kaoru Umehara Ryoko Morita Kiyomitsu Nemoto Masakuni Degawa 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

20000743

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。