

代を越えて影響を及ぼすことから、内分泌バランスの乱れは非可逆的な障害を来す事となる。

ところで、1940 年代の西オーストラリアで、地中海原産のクローバーを摂取した羊に不妊と死産が大量に認められた例は、後にクローバーに含まれる formononetin の estrogen 類似作用が原因であること、内分泌攪乱作用を有する化合物が植物中にも存在することを示したが、このような植物性 estrogen は phytoestrogen とも称される。Phytoestrogen の代表例には、flavonoid の coumestrol、genistein、daidzein、formononetin や lignan の enterolactone などがある。特に coumestrol は、試験管内で強力な estrogen 作用を示し、生体内でも卵巣摘出動物で顕著な子宮重量の増加が認められている。また、daidzein は腸内細菌によって estrogen 作用を持つ equol になり、E 様活性を示すことが報告されている。

また、パセリ、セージ、ニンニク、コムギ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、米、ジャガイモ、ニンジン、リンゴ、サクランボ、プラム、ザクロ、豆類など我々が日常摂取しうる植物中にも phytoestrogen の存在は知られる。Phytoestrogen を含む植物は時に、避妊や流産を目的に使用されたと云われるが、オオウイキョウ (*Foeniculum vulgare*) は現在でも使われているそうした植物の一種である。

したがって、大量の phytoestrogen を含んだ食物の摂取は内分泌攪乱作用が心配されるが、近年、適量摂取では逆に乳癌、前立腺癌の発症を抑制するとの報告がある。なぜなら、phytoestrogen などの天然内分泌作用物質は、一日もあれば体外に排出されてしまうのに対し、合成化学物質は体内に何年も残留してしまうゆえである。しかし、これら phytoestrogen は合成化学物質に比べ、その E 様作用が強く、代謝が速やかで有用性が高いにも関わらず、植物成分全般を対象に estrogen 様物質を検討した報告は乏しいのが現状である。

そこで、内分泌作用を持ち、またホルモン依存性がんの存在も知られる estrogen 様物質を植物成分中より検索する目的で、estrogen 依存的な増殖を示すヒト乳癌由来 MCF-7 細胞を用いたアッセイを基に、その探索を行

うこととした。また、estrogen の作用機構を分子生物学的手法を用いて再現し、高感度な遺伝子レベルでの検出系の構築を同時に試みた。

B. 研究方法

[細胞] エストロジェンに応答して増殖する事が知られるヒト乳がん由来 MCF-7 細胞ならびに T47D 細胞は大日本製薬(株)より購入した。

[植物エキス] 市販の生薬、本学において栽培されている薬用植物、または近郊で入手した野草及び野菜類を十分乾燥後、熱時メタノールで還流抽出した。得られた抽出液を減圧下濃縮し、溶媒を留去して乾エキスとした。

[細胞の培養] 細胞の継代培養は、牛胎児血清(FBS)を10%添加したEagle's MEM 培地(MCF-7細胞)、RPMI-1640 培地(T47D細胞)にて行った。また、細胞増殖試験にあたっては、dextran coated charcoal (DCC, Sigma) でステロイドホルモンを除去したFBS (DCC-FBS) を5%添加したRPMI-1640 培地を使用し、増殖試験に供する細胞は、供試に先立つこと3日前より、この培地で培養を行った。

[E-screen] 10^4 cells/90 μ l に調整したMCF-7細胞を96穴プレートの各ウェルに分注し、70% EtOH で溶解したサンプル溶液(10 μ l)を加え、4日間5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下で培養する。MTT法を用いたキット(Alamar blue (Biosource INTERNATIONAL社)により生細胞数を計数し、各サンプルが有する細胞増殖促進能を estradiol (E2) と比較検討する。(Chart 1)。

[レポータープラスミド ERE-Luc の構築]

PCR で増幅した ERE 断片を pGEM - T Easy Vector System I (プロメガ株式会社)を用いたTA クローニング法にてプラスミド化した。このプラスミドを制限酵素処理し、ライゲーションバック(ニッポンジーン株式会社)を用いて、luciferase 遺伝子を含むピッカジーンプロモーターベクターにサブ

クローニングした。

[ERE-Luc の細胞へのトランスフェクション]
リポフェクトアミン (LIFE TECHNOLOGIES) で処理した ERE-Luc を OPTI-MEM 培地中で培養している MCF-7 細胞もしくは T-47D 細胞に加え、CO₂ インキュベーター中にて 12 時間培養することで、トランスフェクションを行った。

[ルシフェラーゼトランジェントアッセイ]

ERE-Luc をトランスフェクションした MCF-7 細胞 2×10^4 cells / 90 μ l を 96 穴プレートの各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培地で調整したサンプル溶液 10 μ l を各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 条件下で 12 時間培養した。PBS (-) で 2 回洗浄後、細胞溶解剤を 20 μ l ずつ加えた。室温にて 15 分間放置した後、ルミノスキャンにて、各ウェル 100 μ l の発光基質を加え、2 秒経過した後、10 秒間の発光量 (RLU) を測定した。

(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

E-screen を用いて生薬・薬用植物類、約 300 種のメタノールエキスを対象にランダムスクリーニングを行った (Table 1)。

各メタノールエキス 100 μ g / ml で処理した結果、E2 100 pM の有する効果以上に細胞の増殖を促進したエキスを +++、以下同様に E2 10 pM 相当以上の作用を示したエキスを ++、E2 1 pM 相当以上の作用を示したエキスを + で表した。

E 様活性が +++ に属する 31 種中、クロマメ、サヤインゲン、トシシ、モヤシの 4 種のエキスには特に強い E 様活性が確認できた。

また、これらのエキスは tamoxifen 添加によってその活性が有意に消失したことから、estrogen receptor (ER) を介して細胞増殖に関わる成分が含まれるものと考えられた。

このうち、マメ科植物に分類されるクロマメ、サヤインゲン、モヤシの強い E 様活性は、エキス中に含まれる genistein, daidzein 等の phytoestrogen と称される flavonoid に由来するものと思われた。そこで、特に強い E 様活性が確認できたエキスのうち、flavonoid 以外の主成分が知られる生薬トシシ中の活性成分の単離、構造決定を行うこととした。

生薬トシシ (*Cuscutae Semen*) は、ハマナシカズラ *Cuscuta chinensis* Lam. (ヒルガオ科) を起源植物とし、その成熟種子を乾燥したものである。本植物は本州中部以西、四国、九州、沖縄および朝鮮半島、中国、東南アジア、オーストラリア、アフリカの熱帯から暖帯に分布する一年生の寄生性草本である。全草 (莧糸、トシ) または種子 (莧糸子、トシシ) を薬用部位とし、種子成分として樹脂配糖体、コレステロール、カンベステロール、 β -シトステロールの存在が知られる。

市販のトシシ (2 kg) を熱時メタノールで還流抽出後、減圧下濃縮しエキスとした。得られたエキスを水に懸濁し酢酸エチルで分配した。MCF-7 細胞を用いた増殖活性試験の結果、水層および酢酸エチル層の何れにも強い活性が認められた。そこで E 様活性を指標としながら、まず水層について HP-20 を充填したカラムを用いてメタノール 50 %、100 % で順次溶出し、得られた画分を引き続き水-アセトニトリル系、水-メタノール系溶媒と逆相系 ODS カラムを用いた HPLC 等により分離を繰り返し、化合物 1 - 3 を得た。また酢酸エチル層についても同様に、ヘキサン- (クロロホルム-メタノール) 系、クロロホルム-メタノールの混合溶媒系による順相シリカゲルクロマトグラフィー、水-アセトニトリル系による逆相 ODS カラムを用いた HPLC 等により分離を繰り返し、化合物 4 - 10 を得た (Chart. 1)。

NMR を主とする各種スペクトルデータの解析から、これらの化合物の構造をそれぞれ、benzaldehyde 配糖体 (1, 2)、caffeic acid 配糖体 (3)、alkaloid (4)、lignan (5, 6)、flavonoid (7, 8, 9)、及び樹脂配糖体 (10) と同定、もしくは決定した (Chart 2)。糖やエステルの結合位置は HMBC スペクトルの C-H long range 相関から決定した。このうち、

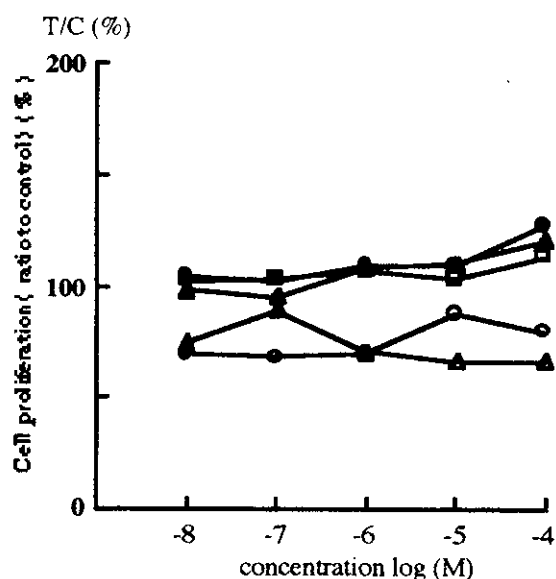


Fig. 1. MCF-7 cell proliferation assay. Cells were exposed to increased concentrations of each compounds for 4 days. Proliferation was tested using Aramar-blue cell proliferation reagent. Results are presented as the percentage of control (1 % control).

—○—: 1, —▲—: 2, —□—: 3, —●—: 5, —▲—: 6.

MCF-7 細胞及び T-47D 細胞の両細胞に対して活性を示した化合物 4、7、10 の 3 種について、抗 estrogen 薬 tamoxifen を併用した増殖活性試験を行った。その結果、両細胞に対して化合物 4、7 が示した E 様活性は、tamoxifen の添加で抑制されることが確認された。しかし、化合物 10 の増殖活性は tamoxifen を添加しても抑制されなかったことから、その増殖促進作用は、ER を介した

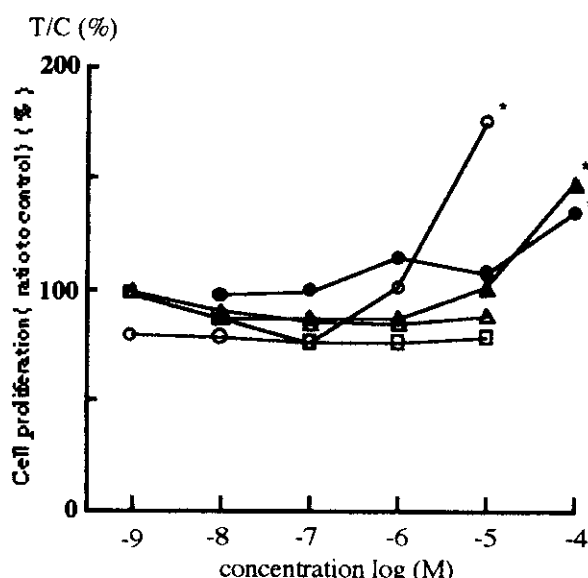


Fig. 2. MCF-7 cell proliferation assay. The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 1. * $P < 0.001$, significantly different from control.

—●—: 4, —○—: 7, —▲—: 8, —□—: 9, —▲—: 10.

経路以外の可能性が推測できた。

Phytoestrogen として知られる、genistein、daidzein 等が isoflavone 骨格を有するのに対して、今回最も強い活性を示した単離化合物 7 は flavonol に分類される。そこで単離化合物 7、8、9 の flavonol 3 種に加え、A 環 B 環の水酸基の置換パターンが似ている 6 種の flavonoids、すなわち、flavone の apigenin (11)、flavanone の naringenin (12)、eriodictyol (13)、flavanonol の aromadendrin (14)、isoflavone の genistein (15)、daidzein (16) の活性の比較を行うこととした (Chart 4, Fig. 4, 5)。

その結果、MCF-7 細胞に対しては 10 μ M の濃度で化合物 7、11、12、13、14 にそれぞれ T/C 約 180 %、170 %、150 %、140 %、190 % の有意な E 様活性が認められた。また、isoflavone は、他の化合物が活性を示した濃度の 1/100 である 100 nM においても化合物 15 に T/C 約 180 %、化合物 16 に T/C 約 150 % の有意な E 様活性が確認でき、特に化合物 15 では 100 pM においても T/C 約 130 % の有意な E 様活性が確認できた。

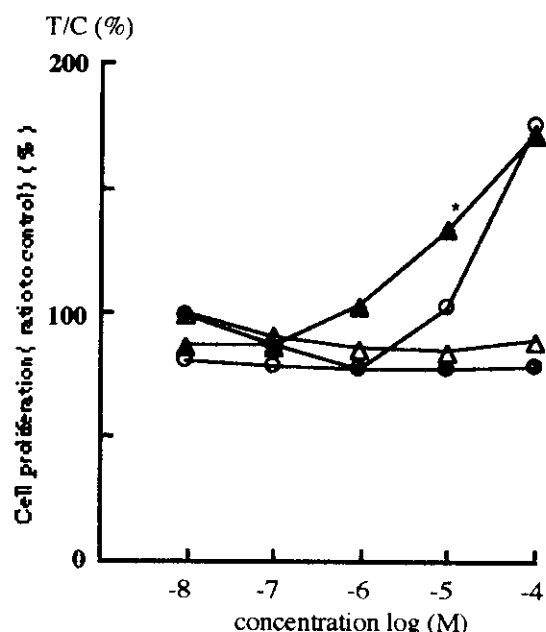


Fig. 4. MCF-7 cell proliferation assay. The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 1. * $P < 0.001$, significantly different from control.

—○—: 7, —▲—: 8, —●—: 9, —▲—: 11.

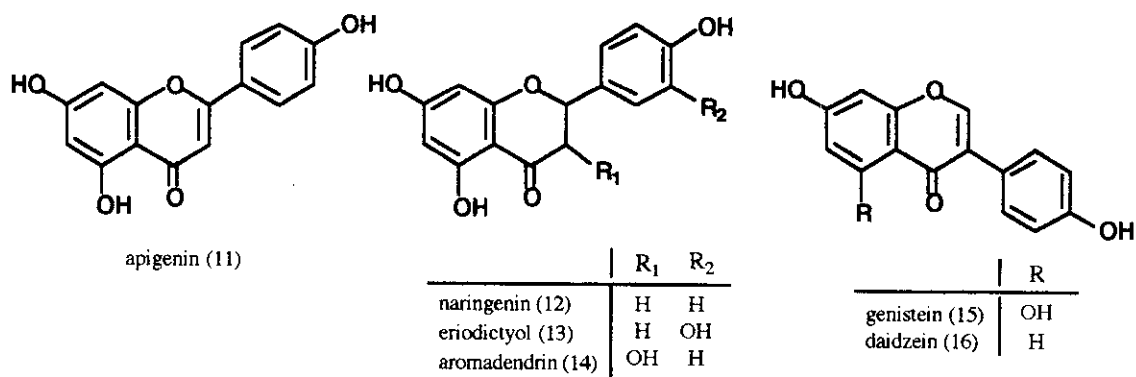


Chart 3

一方、T-47D 細胞を用いた試験では、濃度 10 μ M で化合物 7、11、12、14 にそれぞれ T/C 約 180 %、150 %、150 %、180 % の有意な E 様活性が認められた。また、MCF-7 細胞同様、100 nM で化合物 15、16 にそれぞれ T/C 約 150 %、160 % の有意な E 様活性が確認でき、化合物 15 では濃度 100 pM においても T/C 約 160 % の有意な E 様活性が確認できた。

両細胞に E 様活性を示した flavonoids は、化合物 7、11、12、14、15、16 の 6 種であった。化合物 11、7 は flavone タイプの C 環を、化合物 12、14 は flavanone タイプの C 環を有するが、その立体構造が活性に与える影響は少ないことが示唆された。一方同じ flavone タイプの化合物でも、化合物 9、8 の場合に見られたように、水酸基の数が増

え分子の水溶性が高まるに伴い、活性が低下する傾向も観察された。

従来、E 様活性の測定にはヒト乳癌由来 MCF-7 細胞を用いた E-screen が広く用いられてきた。このアッセイ系は比較的操作が簡便な一方、結果の判定に時間のかかること、特異性もしくはその作用点に問題を有する。一方で近年、遺伝子の転写制御のモニタリングに繁用されているレポーター遺伝子アッセイ系は、被験物質の作用をレポーター遺伝子の転写・翻訳として捉えることから、作用経路がシンプルであり短時間で評価が可能な利点を有する。また、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子に用

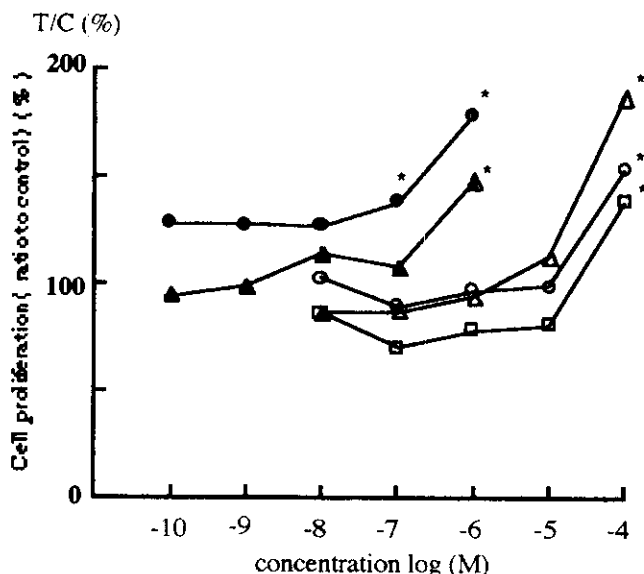


Fig. 5. MCF-7 cell proliferation assay. The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 1. * $P < 0.001$, significantly different from control.

○ : 12, △ : 13, □ : 14, ● : 15, ▲ : 16.

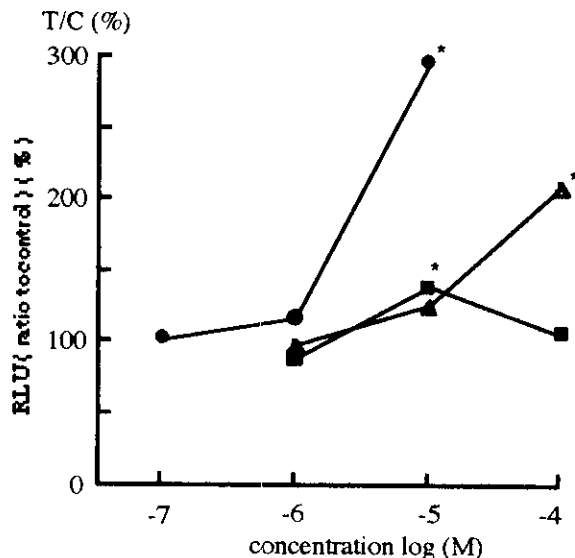


Fig. 6. Luciferase reporter assay for estrogenic compounds from *Cuscutae Semen* with MCF-7 cells. MCF-7 cells, transiently transfected with ERE-Luc reporter plasmid, were preincubated in DMEM with 0.5 % fetal bovine serum for 24 h and then treated with an indicated concentrations of each compounds. After 12 h incubation, cells were lysed, and their luciferase activities were measured with a microplate luminometer and were expressed as percent of control (vehicle alone). *, significantly different from vehicle control ($P < 0.001$). ● : 4, ▲ : 7, ■ : 10.

いることで、検出感度の向上も期待できる。そこで、植物中の estrogen 様物質の検索に供する特異的かつ高感度な estrogen 検出系の作成を目的に、ルシフェラーゼアッセイ系の確立を試みることにした。

PCR で増幅した ERE 断片を luciferase 遺伝子上流に導入したプラスミドを、MCF-7 細胞もしくは T-47D 細胞に加え、トランスフェクションを行った。その結果、被験物質中にエストロゲン様物質が含まれた場合、細胞内のエストロゲンレセプター(ER)と結合した後ホモ二量体を形成し、ERE を認識・結合することで、下流の luciferase の発現を促進することとなる。

まず、ERE-Luc プラスミドの E2 特異性を調べるため、E2 および hydrocortisone (corti.)、progesterone (proge.)、pregnenolone (prege.)、E2 antagonist の tamoxifen (tam.)、5 α -dihydro-testosterone (DHT) を用いて、ルシフェラーゼトランジェントアッセイを行った。

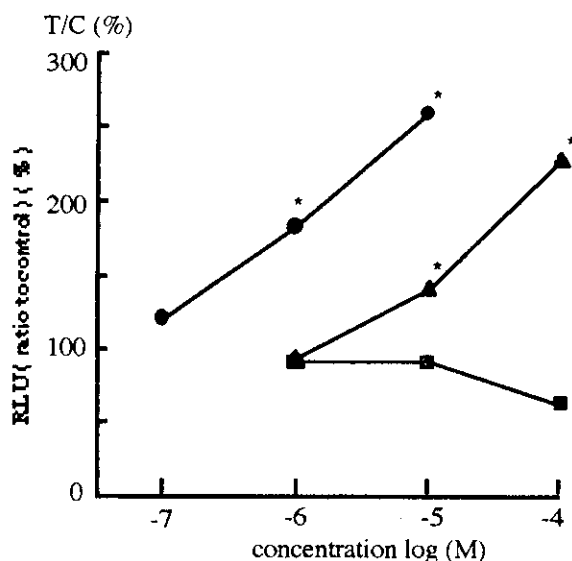


Fig. 7. Luciferase transient assay with estrogenic compounds from *Cuscutae Semen* with T-47D cells. The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 6. *P<0.001, significantly different from control.

●: 4, ▲: 7, ■: 10.

MCF-7 細胞及び T-47D 細胞を用いたルシフェラーゼトランジェントアッセイの結果、ERE-Luc プラスミドは E2 に対し高い応答性を示す一方、その他のホルモンに対してはコントロールレベルの T/C を示したに過ぎなかった。両細胞が PgR や GR を持つこ

とから、これらに対する応答が懸念されたが、prog.、cort. の何れに対してもその応答は低く、E2 に対する高い特異性が示唆された。

生薬トシシから単離した化合物中、E-screen において活性を示した化合物 4、7、10 について、MCF-7 細胞及び T-47D 細胞を用いたルシフェラーゼトランジェントアッセイを行った。その結果、両細胞で化合物 4、7 には E 様活性が確認できたが、化合物 10 は E 様活性を示さなかった(Fig. 6,7)。これは tamoxifen を併用した E-screen の結果と同様であり、化合物 10 が ERE を介さない経路で癌細胞の増殖を促進している可能性が示唆された。

D. 考察・結論

E-screen を用いて生薬・薬用植物類、約 300 種のメタノールエキスを対象にランダムスクリーニングを行った結果、73 種に estrogen (E) 様活性が認められた。さらに、強い活性を示した 31 種のエキスは、アンタゴニストである tamoxifen 添加によって、その活性が消失したことから、estrogen receptor (ER) を介して細胞増殖に関わる成分が含まれるものと考えられた。Flavonoids、lignans などの phytoestrogen として知られる化合物を主成分として含む植物が少なからず認められたが、それ以外の化合物を主成分として含む植物エキスも活性を示しており、E 様作用を示す化合物の構造が多様であることを期待させるとともに、E 様作用を示す化合物が植物界に広く分布することを示唆するものと思われた。

強い活性を示したエキスの一つである生薬トシシ中の活性成分の単離、構造決定を行った結果、alkaloid (4)、flavonoid (7)、樹脂配糖体 (10) の 3 種の化合物が MCF-7 細胞及び T-47D 細胞の両細胞に対して E 様活性を示す事が認められた。また、化合物 4、7 は、アンタゴニストの同時処理でその活性が消失したが、化合物 10 の活性に変化は認められなかった。従って化合物 10 は、ER を介さない経路で細胞増殖を促進している可能性が推測された。

また、flavonoid の E 様活性について構造活性相関を検討した結果、isoflavone の

genistein (15)、daidzein (16) が低濃度で MCF-7 細胞及び T-47D 細胞の両細胞に対して、有意な E 様活性を示し、その濃度は 100 nM と他の化合物が活性を示した 10 μ M の 1/100 であった。一方、他の flavonoid については、7 位、4' 位に水酸基を有する化合物 7、11、12、14 に両細胞で有意な E 様活性が認められた。これに対し、7 位、4' 位に加え、B 環 3' 位にも水酸基を有する化合物 9 では有意な E 様活性を示さず、化合物 13 では MCF-7 細胞に対してのみ活性が認められた。

代表的な phytoestrogen である、genistein についてはこれまでレセプター結合実験の結果から、ER に対して高い親和性を有することが確認されていたが、X 線結晶構造解析の結果を基に、近年その結合様式が明らかとされた。すなわち、genistein B 環 4' 位と A 環 7 位の水酸基との距離 (12.1 Å) は、E2 3 位と 17 位の水酸基間距離 (10.8 Å) に近く、genistein B 環 4' 位の水酸基は E2 3 位の水酸基と、genistein A 環 7 位の水酸基は、E2 17 位の水酸基とそれぞれ対応し、前者は Glu 305、Arg 346 と水素結合し、後者は His 475 と水素結合することで安定に保持される。

E-screen が適用される MCF-7 細胞は ER α を有し、リガンドが結合するポケット (cavity) の体積が 490 Å³ である事が明らかとされているが、これに対して genistein の分子サイズは 236 Å³ と小さい事が知られる。リガンドとなる化合物の大きさに対して、ER の cavity に余裕のあることが、今回の実験で MCF-7 細胞に対してさまざまな flavonoids が応答を促す結果につながったものと推測される。しかし、一方で isoflavones とその他の flavonoids で活性発現濃度に 100 倍の差が認められたことは、リガンド中の水酸基とレセプター蛋白との水素結合のみならず、脂溶性アミノ酸による分子の保持も厳密に行われていることを示すものと思われる。

ER α を発現している MCF-7 細胞及び ER α 、 β を発現している T-47D 細胞の両細胞に対する増殖活性試験を併用することで、それぞれのレセプターに特異的なリガンドの検索につながることが期待された。その結果、化合物 13 を用いた場合、両細胞間の活性に差が観察された。この事実は、両レセ

プターに対して親和性の異なる植物成分の存在を示唆するものと思われる。近年、ER β の働きが ER α とは異なる可能性が報告され、その分布と共に注目されている。代表的な phytoestrogen の coumestrol、genistein は ER α よりも ER β に対してそれぞれ 2 倍、7 倍の親和性を有することが報告されている。一方、化合物 10 のように、核内 ER を介することなく増殖を促進する化合物の存在も示唆された。

Phytoestrogens が動物やヒトの生殖に影響を与えたり、がん発症に抑制的に働く可能性などが指摘されている。多彩な作用機構を有する E 様物質が植物成分中に存在する可能性が示されたことは、今後 ER α 、ER β に選択的なリガンドの検出系を構築する事で、そのリスク評価のみならず、有効利用の可能性に道が開かれることが期待される。今回我々が構築した、E2 の作用機構を模したトランジェントレポータージーンアッセイ系は、被験物質の作用点をより限局できることから、E 様物質を検索する上で、簡便性及び特異性に優れた、有効な手段であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

1. 阿部郁朗、梅原 薫、根本清光、出川雅邦、野口博司：没食子酸エステル of 生理活性 (第 2 報)：核内レセプターを介するステロイドホルモン応答性遺伝子の転写制御活性

日本生薬学会 第 48 回年会 (金沢)、講演要旨集、p. 80、2001 年 9 月 7 日。

2. 梅原 薫、根本清光、森田良子、宮瀬敏男、野口博司、出川雅邦、生薬カミツレ中の glucocorticoid 様物質の検索 (2)、日本生薬学会第 48 回 (2001 年) 年会、講演要旨集 p. 101、2001 年 9 月 7 日、
3. 梅原 薫・根本清光・宮瀬敏男・野口博司・出川雅邦、植物を起源とするステロイドホルモン様作用物質の検索、

G. 知的所有権の取得状況

2. 特許取得
なし
3. 実用新案登録
なし
4. その他
なし

Table 1. The list of plant extracts that promoted cell proliferation of the MCF-7 cells

Estrogenic activity	Extracts
+++	<i>Pieris japonica</i> (アセビ)、 <i>Salvia officinalis</i> (アメジストセージ)、 <i>Podocarpus macrophylla</i> (イヌマキ)、 <i>Celtis sinensis</i> (エノキ)、 <i>Quercus</i> (オーク)、 <i>Diospyros kaki</i> (カキ)、 <i>Polygoni Multiflora Radix</i> (カシュウ)、 <i>Catalpa ovata</i> (キササゲ)、 <i>Phaseolus vulgaris</i> (クロマメ)、 <i>Scrophularia ningpoensis</i> (ゲンジン)、 <i>Cunninghamia lanceolata</i> (コウヨウザン)、 <i>Asiasari Radix</i> (サイシン)、 <i>Phaseolus vulgaris</i> (サヤインゲン)、 <i>Smilax medica</i> (サルサ)、 <i>Crataegi Fructus</i> (サンザシ)、 <i>Paris polyphyll</i> (ジュウロウ)、 <i>Cimicifugae Rhizoma</i> (ショウマ)、 <i>Cryptomeria japonica</i> (スギ)、 <i>Peucedani Radix</i> (ゼンコ)、 <i>Raphanus sativa</i> (ダイコン)、 <i>Rhododendron mucronatum</i> (ツツジ)、 <i>Benincasa cerifera</i> (トウガン)、 <i>Cuscutae Semen</i> (トシシ)、 <i>Picrasmae Lignum</i> (ニガキ)、 <i>Ligularia japonica</i> (ハンカイソウ)、 <i>Osmanthus ilicifolius</i> (ヒイラギ)、 <i>Euphorbia lathyris</i> (ホルトソウ)、 <i>Triticum aestivum</i> (ムギ)、 <i>Glycine max</i> (モヤシ)、 <i>Longanae Arillus</i> (リュウガンニク)、 <i>Pteridium aquilinum</i> (ワラビ)
++	<i>Angelica keisk</i> (アシタバ)、 <i>Securinega suffruticosa</i> (アマミヒトツバハギ)、 <i>Iris tectorum</i> (イチハツ)、 <i>Clematidis Radix</i> (イレイセン)、 <i>Prunus mume</i> (ウメ)、 <i>Allium chinense</i> (エシャレット)、 <i>Aethusa cynapium</i> (エトウサ)、 <i>Raphanus sativus</i> (カイワレ)、 <i>Pogostemi Herba</i> (カッコウ)、 <i>Torreya nucifera</i> (カヤ)、 <i>Tricosanthis Semen</i> (カロニン)、 <i>Actinidia chinensis</i> (キウイ)、 <i>Sophora flavescens</i> (クララ)、 <i>Gentianae Radix</i> (ゲンチアナ)、 <i>Hovenia dulcis</i> (ケンボナシ)、 <i>Magnolia fargesii</i> (コブシ)、 <i>Dioscoreae Rhizoma</i> (サンヤク)、 <i>Apium graveolens</i> (セロリ)、 <i>Vicia faba</i> (ソラマメ)、 <i>Angelicae Radix</i> (トウキ)、 <i>Aurantii Pericarpium</i> (トウヒ)、 <i>Zea mays</i> (トウモロコシ)、 <i>Brassica oleracea</i> (ブロッコリー)、 <i>Spinacia oleracea</i> (ホウレンソウ)、 <i>Arisaema ringens</i> (ムサシアブミ)、 <i>Smallanthus sonchifolius</i> (ヤーコン)、 <i>Vitis coignetiae</i> (ヤマブドウ)、 <i>Myrica rubra</i> (ヤマモモ)、 <i>Lactuca scariola</i> (レタス)
+	<i>Phaseoli Semen</i> (アズキ)、 <i>Gambir</i> (アセンヤク)、 <i>Artemisiae Capillaris Flos</i> (インチンコウ)、 <i>Linderae Radix</i> (ウヤク)、 <i>Sophora japonica</i> (エンジュ)、 <i>Picrorhiza kurroa</i> (コオウレン)、 <i>Acori Calami Rhizoma</i> (ショウブコン)、 <i>Anemarrhenae Rhizoma</i> (チモ)、 <i>Euphorbia pekiensis</i> (トウダイグサ)、 <i>Cynanchi Stauntoni Rhizoma et Radix</i> (ビャクゼン)、 <i>Metasequoia glyptostroboides</i> (メタセコイア)、 <i>Daphniphyllum macropodum</i> (ユズリハ)、 <i>Alpiniae Officinarum Rhizoma</i> (リョウキョウ)

+++、> 100 pM of E2; ++、> 10 pM of E2; +、> 1 pM of E2.

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：近年、多環芳香族炭化水素類（PAHs）に内分泌かく乱作用があることが報告され、注目されている。大気中の粉塵にはディーゼル排気粉塵中に含まれている種々の PAHs およびその窒素酸化物であるニトロ多環芳香族炭化水素類（NPAHs）も多数含まれている。PAHs と NPAHs は構造的に類似しているため、ともに CYP1 ファミリー mRNAs を誘導すると考えられており、NPAHs の中には PAHs よりも強い内分泌攪乱作用を有する化合物が存在すると言われている。しかしながら、これまで NPAHs による CYP1 ファミリー mRNAs の誘導および活性に及ぼす影響に関してはあまり明らかにされていない。そこで本研究では NPAHs に焦点を絞り、CYP1 ファミリーの誘導および内分泌かく乱作用との関係について検討した。その結果と、ディーゼル排気粉塵中に含まれる NPAHs により CYP1 ファミリー mRNAs の誘導効果が認められたことをはじめとして、PAHs や NPAHs による CYP1 ファミリー mRNAs の誘導効果は化合物、CYP 分子種そして細胞により特異性が異なることを明らかにした。さらに CYP1 ファミリーの誘導メカニズムについての検討より、CYP1 ファミリー mRNAs 低誘導性の細胞では、転写調節に関わる部位およびその周辺領域において、ヒストンは脱アセチル化状態であり、DNA はメチル化状態である結果、遺伝子の転写が抑制されている可能性が示唆された。さらに CYP1A1 遺伝子 5'-上流領域に存在する転写開始点および XRE 付近のメチル化の程度を定量したが、メチル化が CYP1A1 遺伝子の細胞間における誘導能の違いには影響していないことが示唆された。本研究で得られた結果は、今後、CYP1 ファミリー mRNAs の誘導メカニズムおよび内分泌かく乱作用との関係を明らかにする上で、有益な基礎資料となることが期待される。

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。ディーゼル排気粉塵は Ames 試験において、非常に強い変異原性を示し、ラットでは発癌性を示すことが明らかになっている。また、PAHs は内分泌攪乱作用を有することが示されている。ディーゼル排気粉塵中には PAHs の他にその窒素酸化物であるニトロ多環芳香族炭化水素類 (NPAHs) が多数含まれている。NPAHs は PAHs よりも強い変異原性や発癌性を有すると言われている。PAHs は細胞質に存在する Aryl hydrocarbon receptor (AhR) と結合し AhR nuclear translocator (ARNT) とヘテロダイマーを形成し、エンハンサー領域に存在する xenobiotic responsive element (XRE) と結合し、薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) の CYP1 ファミリーを誘導することが知られている。NPAHs も PAHs と構造的に類似しているため、PAHs と同様に CYP1 ファミリー mRNA を誘導すると考えられるが、ヒトの CYP1 ファミリー mRNA および活性についてはこれまで明らかにされていない。そこで本研究では NPAHs やその母核化合物である PAHs、また、その還元代謝物である amino PAHs による CYP1 ファミリー mRNA の誘導能を明らかにすることを目的とした。また、臓器特異的な誘導メカニズムを明らかにすることを目的として、1) CYP1 ファミリー mRNA の誘導効果を増大させるといわれている estrogen receptor (ER) の発現量、2) AhR の機能をネガティブフィードバック機構により調節すると言われている AhR repressor

(AhRR) の発現量、3) 遺伝子の転写を抑制するメカニズムであるヒストンの脱アセチル化および DNA のメチル化、について検討した。

B. 研究方法

種々のヒト臓器由来細胞 (肝癌由来 HepG2 細胞、乳癌由来 MCF-7 細胞、結腸腺癌由来 LS-180 細胞、肺癌由来 A549 細胞、腎癌由来 ACHN 細胞、膀胱癌由来 HT-1197 細胞、子宮頸部癌由来 HeLa 細胞、睾丸由来奇形腫 NEC14 細胞および卵巣癌由来 OMC-3 細胞) に PAHs および NPAHs を曝露した。使用した化合物の種類と構造を Fig. 1 に示す。その後、total RNA を抽出し RT-PCR 法により CYP1A1、CYP1A2 および CYP1B1 mRNA 発現レベルと AhR および ARNT mRNA 発現レベルを測定した。さらに、ER α および β と AhRR mRNA の発現量を RT-PCR 法により調べた。

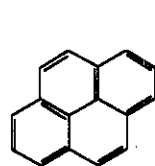
次に、HeLa 細胞、A549 細胞および MCF-7 細胞にヒストン脱アセチル化の阻害剤である trichostatin A (TSA) を 75~100 ng/mL または DNA メチル化の阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (AzaC) を 1~5 μ M 前処置し、PAHs を 24 時間曝露させた後、CYP1 ファミリー mRNA の発現量を RT-PCR 法により調べた。DNA のメチル化の定量には HeLa 細胞と MCF-7 細胞のゲノム DNA を Bisulfite Modification し、転写開始点付近から上流約 1.5 kbp ままで PCR 法により増幅し、TA サブクローニング後、シークエンス解析した。

C. 研究結果と考察

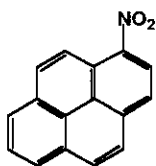
【 NPAHs によるヒト CYP1 ファミリー mRNA の誘導作用 】

各ヒト臓器由来細胞を用い、PAHs や

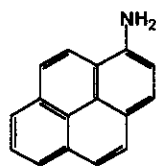
Pyrenes



Pyrene
(Py)

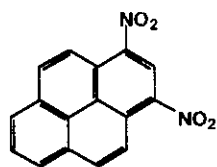


1-Nitropyrene
(1-NP)

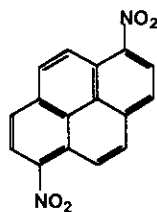


1-Aminopyrene
(1-AP)

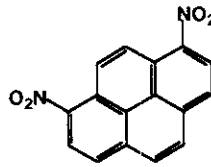
Dinitropyrenes



1,3-Dinitropyrene
(1,3-DNP)

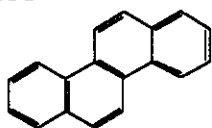


1,6-Dinitropyrene
(1,6-DNP)

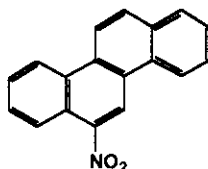


1,8-Dinitropyrene
(1,8-DNP)

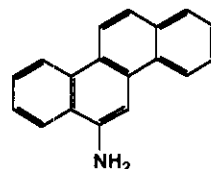
Chrysenes



Chrysene
(Chry)

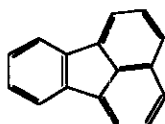


6-Nitrochrysene
(6-NC)

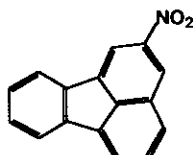


6-Aminochrysene
(6-AC)

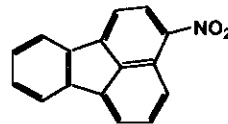
Fluoranthenes



Fluoranthene
(Flu)

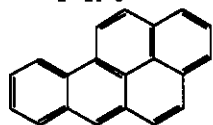


2-Nitrofluoranthene
(2-NF)

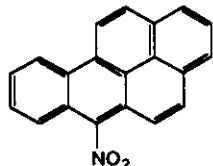


3-Nitrofluoranthene
(3-NF)

Benzo[a]pyrenes

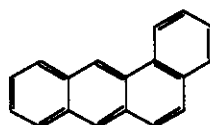


Benzo[a]pyrene
(B[a]P)

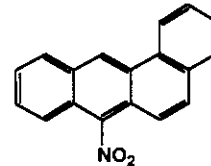


6-Nitrobenzo[a]pyrene
(6-NB[a]P)

Benz[a]anthracenes

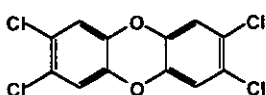


Benz[a]anthracene
(B[a]A)

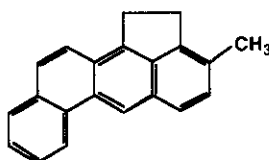


7-Nitrobenzo[a]anthracene
(7-NB[a]A)

PAHs



2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
(TCDD)



3-Methylcholanthrene
(3-MC)

Fig. 1. Structures of PAHs and NPAHs used in this study.

NPAHs による CYP1 ファミリー mRNA の誘導能を RT-PCR 法により明らかにした。HepG2、MCF-7、LS-180 および OMC-3 細胞では CYP1 ファミリー mRNA は強く誘導され、その誘導効果は CYP1A1 > CYP1A2 ≒ CYP1B1 であった。A549 細胞、ACHN 細胞、HT-1197 細胞、HeLa 細胞および NEC14 細胞では誘導効果はあまり認められなかった。HepG2 細胞における結果を Fig. 2 に示す。ディーゼル排気粉塵中に含まれる 2-NF、6-NC、6-NB[a]P および 7-NB[a]A のような NPAHs によりヒト CYP1 ファミリー mRNA が誘導され、ニトロ置換基の存在により母核化合物よりも誘導効果が増大する化合物が存在した (Figs, 3, 4)。以上のことから CYP1 ファミリー mRNA の誘導は化合物、CYP 分子種そして臓器特異的であることが認められた。しかしながら、その誘導効果と AhR、ARNT、ER α および β mRNA の発現との相関は認められなかった (Figs. 5 and 6)。

【ヒト CYP1 ファミリー mRNA 誘導の抑制メカニズムの検討】

CYP1 ファミリー mRNA 高誘導性の HepG2 細胞、MCF-7 細胞、LS-180 細胞および OMC-3 細胞では TCDD と 3-MC を曝露させると AhRR mRNA の誘導効果が認められたが、CYP1 ファミリー mRNA 低誘導性の A549 細胞、ACHN 細胞、HT-1197 細胞、HeLa 細胞および NEC14 細胞では TCDD と 3-MC を曝露しても AhRR mRNA の誘導効果は認められなかった。この結果から、AhRR mRNA の誘導性は CYP1 ファミリー mRNA の誘導性と相関しており、AhRR mRNA の発現も CYP1 ファミリー mRNA の発現と同様に XRE を介して調節されているという報告と一

致した。しかしながら、AhRR mRNA の常在的な発現と CYP1 ファミリー mRNA の誘導能には相関は認められなかった。次に、HeLa 細胞、A549 細胞および MCF-7 細胞に TSA および AzaC を前処置し、PAHs を曝露させたところ、CYP1 ファミリー mRNA 低誘導性の HeLa 細胞と A549 細胞では CYP1A1 mRNA の誘導効果が特に増大した。しかしながら、CYP1 ファミリー mRNA 高誘導性の MCF-7 細胞では阻害剤による影響は認められなかった (Table 1)。以上の結果から、CYP1A1 mRNA の誘導にはヒストンの脱アセチル化および DNA のメチル化、すなわちクロマチンの構造の変化が関連している可能性が示唆された。

【ヒト CYP1A1 遺伝子 5'-上流領域のメチル化の定量】

上流 5 ヶ所の各 XRE でメチル化の程度に差は認められたものの HeLa 細胞と MCF-7 細胞でメチル化の程度に有意な差は認められなかった。従って、検討した領域内の XRE のメチル化が臓器特異的な CYP1A1 mRNA の誘導に重要な役割を果たしていない可能性が示唆された。

本研究により、各ヒト臓器由来細胞における PAHs と NPAHs による CYP1 ファミリー mRNA の誘導能が RT-PCR 法により明らかになり、特に CYP1A1 mRNA の誘導効果が高かった。また、その細胞特異的な誘導に対する DNA のメチル化の関与は低いことを明らかにした。CYP1 ファミリーの臓器特異的な誘導メカニズムを明らかにするには更なる検討が必要であると思われる。

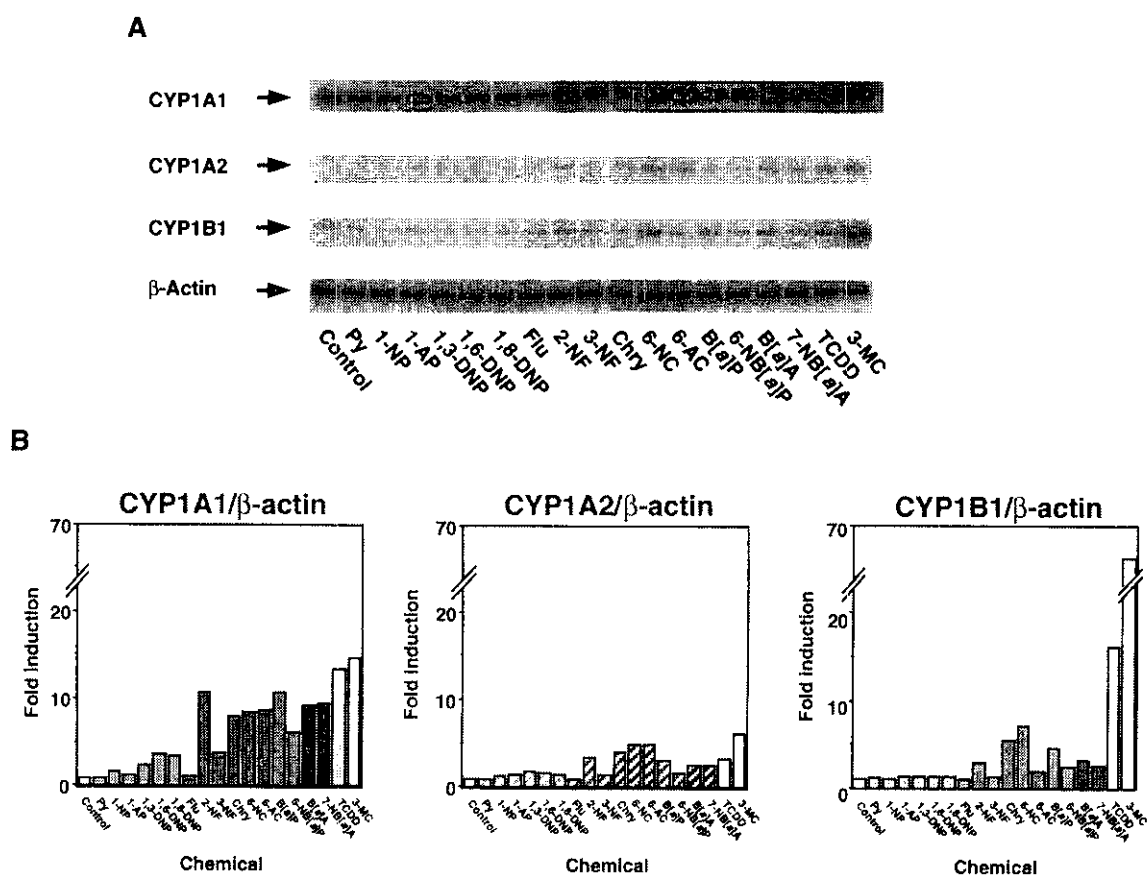


Fig. 2. Effects of various PAHs and NPAHs on CYP1 mRNA expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with PAHs and NPAHs for 24 hr. (A) PCR products incorporated with [α - 32 P]dCTP were separated in 10% acrylamide gel and visualized by exposing to Fuji-imaging plate for 2 hr. β -Actin was used as a loading control. (B) The mRNA induction patterns of CYP1 family. Each column represents the mean of two independent experiments.

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hatanaka, N., Yamazaki, H., Kizu, R., Hayakawa, K., Aoki, Y., Iwanari, M., Nakajima, M., Yokoi, T., Induction of cytochrome P450 1B1 in lungs, livers, and kidneys of rats exposed to diesel exhaust. *Carcinogenesis*, **22**, 2033-2038 (2001).
- 2) Hatanaka, N., Yamazaki, H., Oda, Y., Guengerich, F. P., Nakajima, M., Yokoi, T., Metabolic activation of carcinogenic 1-nitropyrene by human cytochrome P450 1B1 in *Salmonella typhimurium* strain expressing an *O*-acetyltransferase in

SOS/*umu* assay. *Mutat. Res.*, **497** (1-2), 223-233 (2001).

- 3) Masashi I., Nakajima M., Kizu R., Hayakawa K., Yokoi T., Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissues-derived cells: chemical-, CYP isoform-, and cell-specific differences. *Arch. Toxicol.*, in press

2. 学会発表

- 1) 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 P4501B1 による代謝的活性化経路について, 日本薬学会第 121

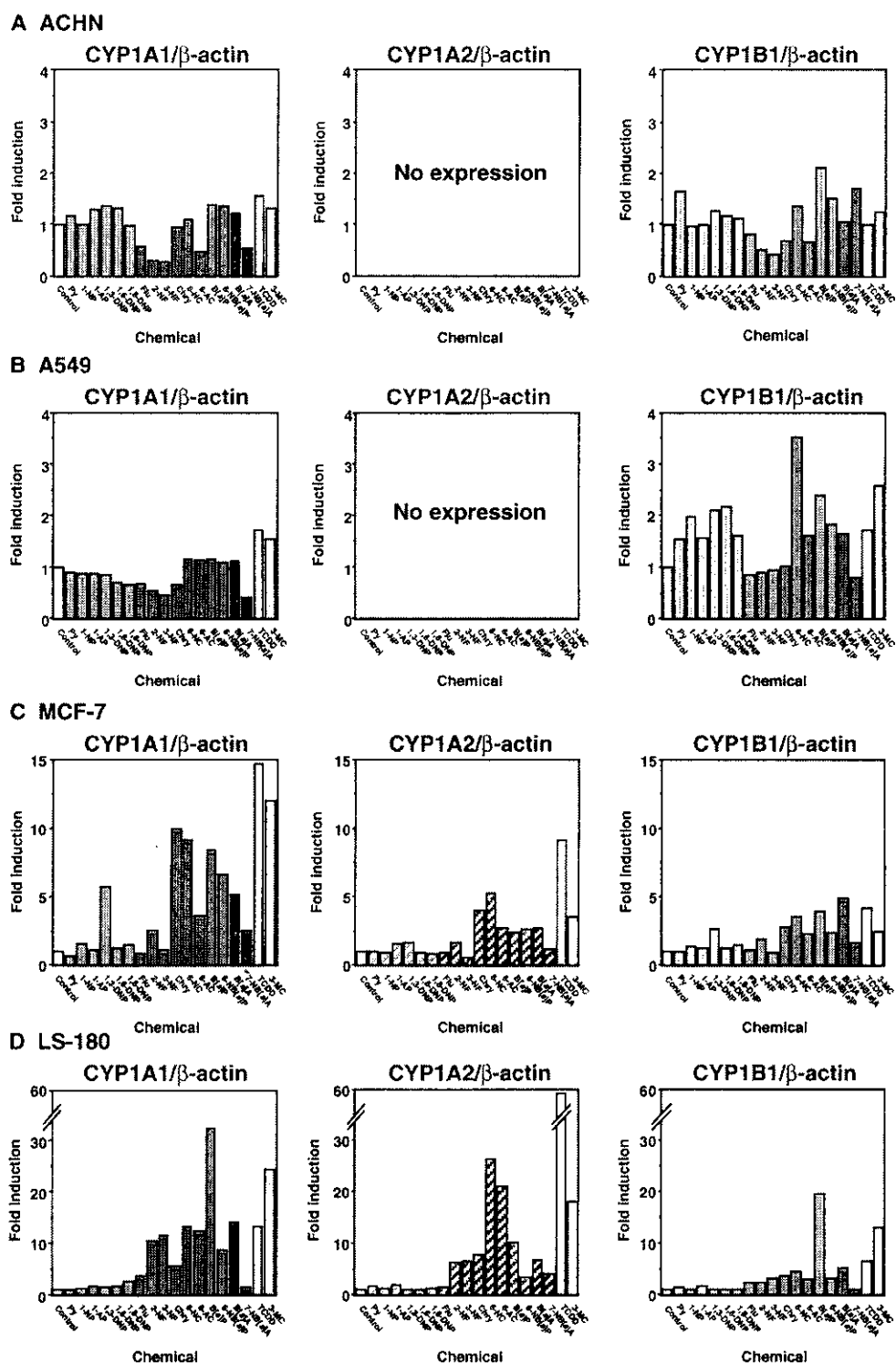
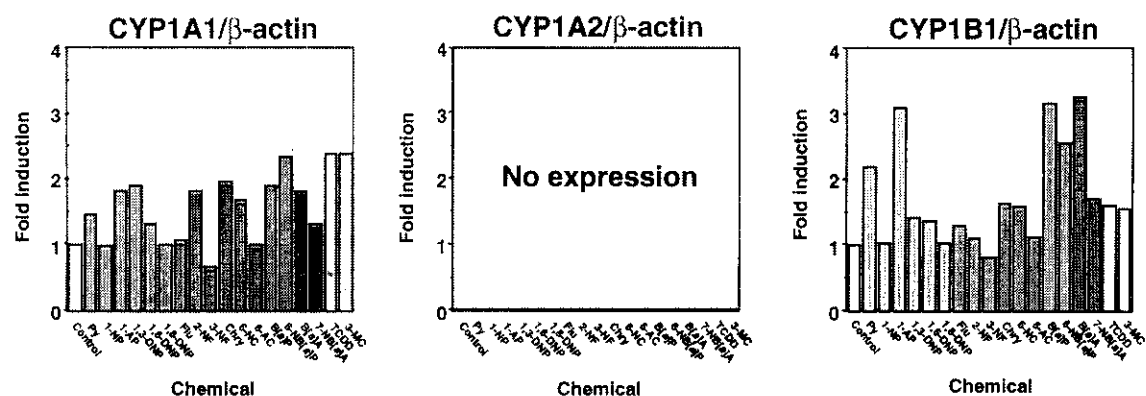
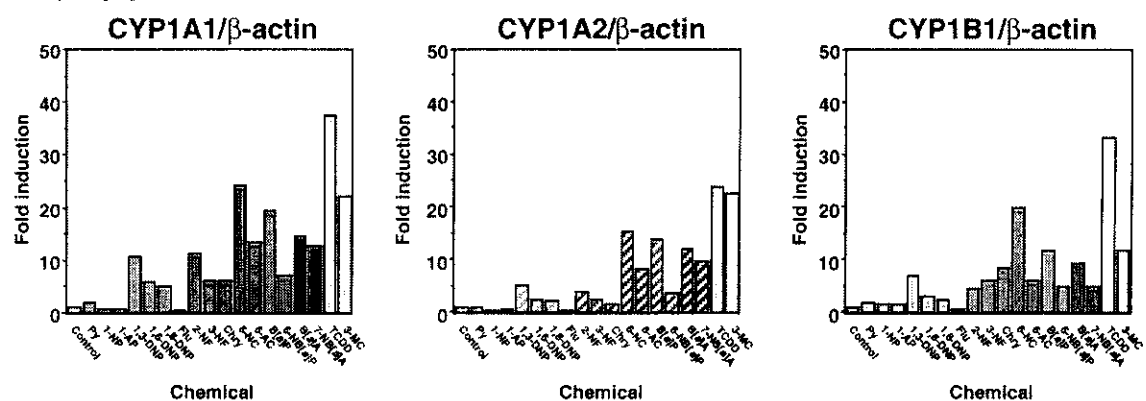


Fig. 3. Effects of various PAHs and NPAHs on CYP1 mRNA expression. (A) ACHN cells, (B) A549 cells, (C) MCF-7 cells, and (D) LS-180 cells were treated with PAHs and NPAHs for 24 hr. Each column represents the mean of two independent experiments.

A HeLa



B OMC-3



C NEC14

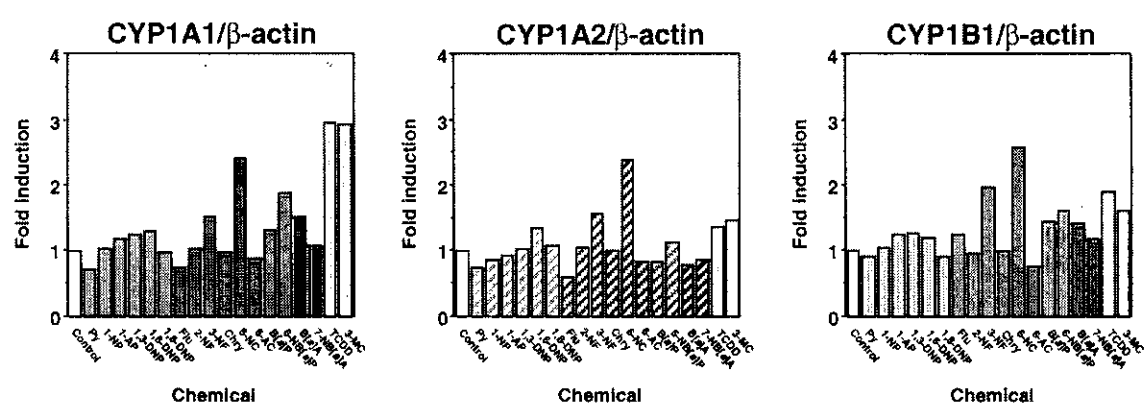


Fig. 4. Effects of various PAHs and NPAHs on CYP1 mRNA expression. (A) HeLa cells, (B) OMC-3 cells, and (C) NEC14 cells were treated with PAHs and NPAHs for 24 hr. Each column represents the mean of two independent experiments.

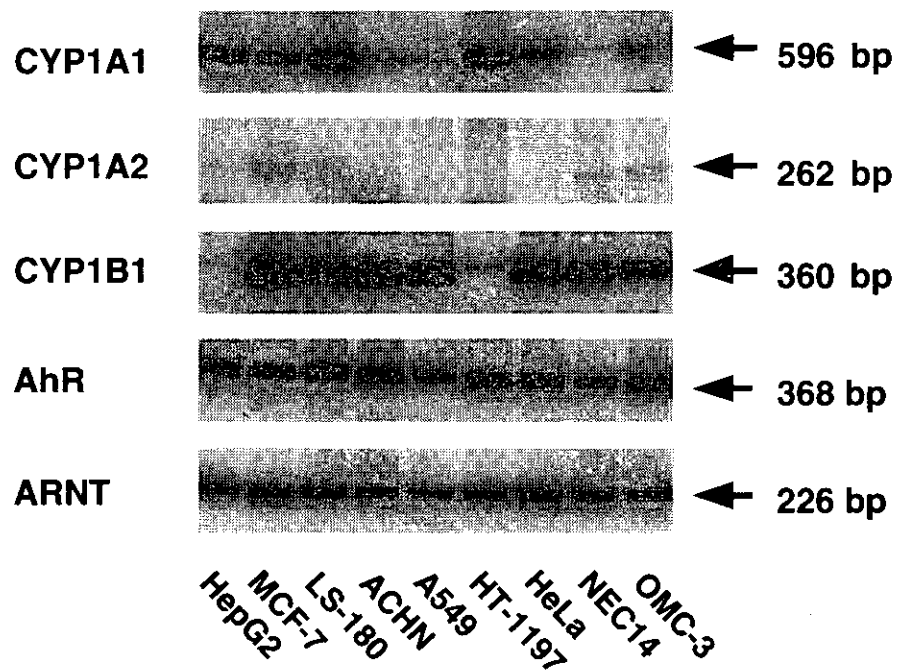


Fig. 5. RT-PCR analyses of mRNA for CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, AhR, and ARNT in nine human cell lines. HepG2, MCF-7, LS-180, ACHN, A549, HT-1197, HeLa, NEC14, and OMC-3 cells were treated 0.1% DMSO for 24 hr.

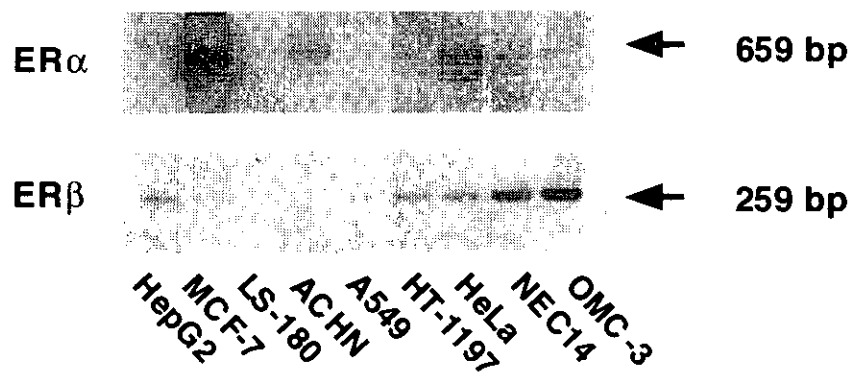


Fig. 6. RT-PCR analysis of mRNA for ER α and ER β in nine human cell lines. HepG2, MCF-7, LS-180, ACHN, A549, HT-1197, HeLa, NEC14, and OMC-3 cells were treated with 0.1% DMSO for 24 hr.

Table 1. Effects of TSA and 5-AzaC on Induction of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, AhR, and Arnt mRNAs by PAHs and NPAHs in HeLa and MCF-7 Cells

TSA					
Cell line	Inducibility				
	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	AhR	Arnt
HeLa	+++	+	+	+	-
MCF-7	-	-	-	-	-

5-AzaC					
Cell line	Inducibility				
	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	AhR	Arnt
HeLa	++	+	-	+	-
MCF-7	-	-	-	-	-

- 年会，2001. 3. 28-30，札幌
- 2) 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，ディーゼル排気曝露ラットにおける肺，肝および腎 P4501B1 の誘導について，日本薬学会第 121 年会，2001. 3. 28-30，札幌
- 3) 岩成正司，中島美紀，山崎浩史，横井 毅，ヒト CYP1 ファミリーの細胞特異的な誘導機構について，第 16 回日本薬物動態学会年会，2001. 10. 17-19，神戸
- 4) 岩成正司，中島美紀，横井 毅，ヒト

CYP1 ファミリーの細胞特異的な誘導機構について，平成 13 年度日本薬学会北陸支部第 2 回総会，2001. 11. 11，

G. 知的所有件の取得状況

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし
- 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：PCB類のチトクロームP450酵素による代謝とその動物種差

分担研究者 島 田 力 大阪府立公衆衛生研究所 主任研究員

研究要旨： 野生型とアリルハイドロカーボン受容体（Ah受容体）ノックアウトマウスにPCBならびに多環芳香族炭化水素を投与し、肝ならびに肺のCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1の誘導性をmRNAレベルと薬物酸化活性を測定することにより調べた。あわせてPCB投与マウスの組織中のPCB量をGC-MSで定量し、誘導と代謝の関連を追及した。PCB化合物のカネクロール300(KC300)、カネクロール500(KC500)、3,4,3',4'-四塩化ビフェニール（TCB）は、Ah受容体依存的にこれらP450を誘導した。なかでもTCBは最も強い誘導性を示し、従来から指摘されているようにコプラナーPCBの生物学的作用の強さを確認した。カネクロールの誘導性はそれらの中に含まれるコプラナーPCBの量に依存する可能性があるが、KC500の方がKC300より強い誘導作用を示した。MCなどの誘導剤と比較するとKC500はどちらかというCYP1A2の誘導性が強く、CYP1A1やCYP1B1の誘導性は比較的弱かった。組織中のPCBのGC-MSパターンを調べると、野生型とAhRノックアウトマウスの組織中のPCB異性体の代謝には大きな違いがない、という結果であった。In vitroでのKC300のラットCYP2B1とヒトCYP2B6による代謝についてGC-MSを用いて検討した。その結果、KC300中の異性体の減少割合が、ラットCYP2B1でヒトCYP2B6より著しく速いことが明らかになった。最後に、植物中のリモネンの代謝と種差についても検討した。リモネンは雄のラットでのみ腎障害を起こすが、雌ラットあるいは他の動物では起こらないことが知られていた。 α 2u-globulinが腎毒性に関係するが、代謝も関係するのではないか、という点を明らかにするために調べた。その結果、リモネンのラットP450の酸化的代謝には大きな性差のあることが明らかになった。また、このリモネンの代謝には種差も存在し、毒性との関係で興味深い結果であった。

A. 研究目的

PCB、ダイオキシンなどの内分泌かく乱物質はアリルハイドロカーボン受容体 (Ah受容体) に親和性をもって結合し、細胞内の遺伝子の発現調節をおこなうことを通じて様々な生物学的作用を示す。Ah受容体への親和性の強さが、ダイオキシン、ジベンゾフラン、コプラナーPCBの生体影響作用の強さを決めているのである。また、ベンツピレン、メチルコラントレンなどの芳香族多環炭化水素 (アリルハイドロカーボン化合物) も、TCDDに比べて弱いながらも、Ah受容体へ親和性をもっている。Ah受容体を介して誘導される酵素には、チトクロームP450 (以下P450あるいはCYP)、グルクロニル転移酵素、グルタチオン転移酵素、アルデヒド脱水素酵素など、異物 (薬物) 代謝に関わる多くの酵素が含まれている。しかしながら、どのようにしてAh受容体を介して様々な生物学的作用があらわれるかの分子機構については、十分に明らかにされていない。

薬物代謝に関与する P450 は、薬物・毒物・癌原物質などの外来性化学物質だけでなく、ステロイド、脂質、プロスタグランジン、脂溶性ビタミンなどの生体内物質の代謝にも重要な働きをもっている。そのため、体内でのP450の量的・質的変動は、化学物質の薬効・毒性に影響を及ぼすだけでなく、内分泌物質の代謝異常などを通して様々な作用を引き起こす。CYP1ファミリーの酵素は、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1の3種類からなるが、いずれも多種類の癌原物質 (多環芳香族炭化水素、アリルアミンなど) の代謝的活性化に関わっている。CYP1B1やCYP1A1はさらに7,12-ジメチルベンゾ[a]アントラセンのように乳癌・肺癌を誘発する芳香族多環炭化水素のDNA障害性代謝物への変換にも活性をもっている。PCBなどの内分泌かく乱

物質はアリルハイドロカーボンレセプター (AhR) を介して酵素誘導や毒性発現を引き起こすが、いまだ詳細なメカニズムは明らかにされていない。

本研究では、野生型とAhRノックアウトマウスを用いたPCBならびに多環芳香族炭化水素の生体影響作用を、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1の誘導性として比較検討し、あわせて、誘導されたCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1によるPCB代謝ならびに癌原物質の代謝への役割を明らかにすることを目的とした。また、組織中のPCB濃度をGC-MSを用いて調べ、残留パターンの変化から、AhR依存性P450の誘導によるPCB異性体の代謝を特定する。これらの結果をもとに、標準PCB異性体 (特にコプラナー異性体) による誘導を野生型とノックアウトマウスで比較した。

植物エストロゲン (phytoestrogen) 作用物質、リモネンのP450による代謝の性差、種差に関する研究についても研究をおこなった。動物の異物代謝酵素の進化は、植物中の成分の分解 (解毒) を通じて成し遂げられてきたとも考えられている。最近、植物成分の中にも内分泌かく乱作用をもつもの (植物エストロゲンなど) の存在することが分かってきた。これらはいずれもイソフラボンやリグナン類で特定の植物に少量存在するものである。本研究では、植物中のリモネンのP450による代謝の性差・種差についても検討を行ったので報告する。すなわち、リモネンは雄のラットでのみ腎障害を起こすことが知られている。リモネンあるいはその代謝物がa2u-globulinと相互作用をおこし腎毒性に関係することが明らかにされている。代謝の毒性への寄与を調べた結果、ラットのP450によるリモネンの代謝に大きな性差のあることを見いだした。これらの結果についても報告する。

B. 研究方法

野生型とAh受容体ノックアウトマウスにPCBならびに多環芳香族炭化水素を一回、腹腔内投与し、投与後3ケ目に動物をエーテル麻酔下解剖し、肝ならびに肺の組織をmRNA測定用に採取した。また、肝臓についてはミクロゾーム画分を調整した。この調整方法は、最初に肝臓を4倍量の0.15Mの塩化カリウムを含む緩衝液中でホモゲナイズし、9,000 x g上清を得た。この液をさらに105,000 x gで遠心し、肝ミクロゾーム画分が調整された。肝ミクロゾーム中のP450含量はOmura, Satoの方法に準じて、一酸化炭素在下、スペクトルを分光学的に定量した。

RNAの調製は以下のようにおこなった。臓器 (50 - 100 mg) にPhenol と guanidine thiocyanateからなるIsogen試薬を加えホモゲナイズし、クロロホルムで抽出後、15,000xg遠心分離により上清を得た。この上清にIsopropanolを加え、15,000xg遠心分離をおこなうことで白色沈澱を得た。その後、この白色沈澱をさらにethanol沈澱、15,000xg遠心分離をおこない、乾燥後、水に溶解し加温することでRNA溶液を得た。

mRNAのRT-PCRは以下の条件でおこなった。RT反応は、MgCl₂、dNTP/analog、H₂O、Oligo dt Primer、RNase Inhibitor、AMV Rtase、mRNAを含む緩衝液中で30° C (10min)、42° C (30 min)、5° C (5min)の条件で反応を完了させた。

PCR反応は、MgCl₂、dNTP、H₂O、AMV Optimized Taq DNA Polymelaze、Primer (CYP1A1: 5'-TTGGGGATATAGAAGCCATTC-3'、5'-CAGATGATAAGGTCATCACGA-3'、CYP1A2: 5'-TGTGTATCGGTAGATCTCCAG-3'、5'-

CAGTATCCAAGACATCACAAG-3'、CYP1B1: 5'-AGGTTGGGCTGGTCACTCAT-3'、5'-GATCCAACGCAGCCGGTCATTG-3')、cDNA (RT反応液) を含む緩衝液中でCYP1A1は85° C (30 sec, 32 サイクル)、55° C (30 sec, 32 サイクル)、72° C (1 min, 32 サイクル)、72° C (5 min)で、CYP1A2は85° C (30 sec, 25 サイクル)、55° C (30 sec, 25 サイクル)、72° C (1 min, 25 サイクル)、72° C (5 min)で、CYP1B1は85° C (30 sec, 34 サイクル)、60° C (30 sec, 34 サイクル)、72° C (1 min, 34 サイクル)、72° C (5 min)で反応を完了させた。

その後、エチジウムブロマイドを発色剤として含むアガロースゲルで電気泳動をおこなうことによりCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1の発現量の確認をした。

肝ミクロゾーム中の各CYP1酵素量は免疫化学的にラットのCYP1A1抗体を用いて調べた。抗体作成のためのP450酵素の精製法ならびに家兎を用いた抗血清の作製は従来の我々の方法に準じておこなった。免疫化学的なP450酵素の定量 (ウエスタンブロッティング) は、7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動において肝ミクロゾームのタンパク質を分離後、タンパク質を電気的にニトロセルロース膜に移し、その膜上で抗原抗体反応を行わせることで調べた。

薬物や他の化学物質のP450酵素による酸化活性の測定は、既報の通りの方法に従っておこなった。今回測定した薬物酸化活性は以下の通りである。エトキシレゾルフィン脱エチル化活性、7-エトキシクマリン脱エチル化活性である。これらの薬物酸化活性は、肝ミクロゾームをNADPH産生系の存在下、37°Cで基質である薬物を代謝させ、反応生成物を高速液体クロマトグラフィー、蛍光光度計で定量した。