

肝ミクロゾームによる癌原物質の代謝的活性化反応についても調べた。用いた発癌性物質は、ベンツピレン7,8-ジオール、7,12-ジメチルベンズアントラセン-3,4-ジオール、MeIQ、Trp-P-1である。活性代謝物のDNA障害性の検出には、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002ならびにNM2009)を用い、障害に伴ってあらわれるSOS反応を指標に調べた。

雌雄ラット肝ミクロゾームによる(+)-および(-)-リモネンの代謝は以下の方法でおこなった。試験管中にラット肝ミクロゾーム、(+)-および(-)-リモネン、リン酸緩衝液(pH 7.4)、NADP⁺、Glucose 6-phosphate、Glucose 6-phosphate dehydrogenase、水を加え、37℃で30分間のインキュベーション後、ジクロロメタンを加え、攪拌後、遠心分離を行い、有機層をGC-MSにて分析することで代謝生成物の確認を行った。

また、リモネンの代謝に対するラット性差については、年齢の異なる雌雄ラット肝ミクロゾーム中のP450の発現量(0-119日)とりモネン酸化活性を比較し検討した。

さらにヒトP450よる(+)-および(-)-リモネンの代謝については、発現系P450(CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19、CYP2E1、CYP3A4)を用いて検討した。

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。組織を1N KOH/ethanolで加水分解後、n-ヘキサンでPCBを抽出し、シリカゲルカラム(Silica Gel Cartridge)にかけ、n-ヘキサンで溶出をおこない、nonaneに溶解後、PCBをGC-MS (HT8, 50 m x 0.25 mm; Instrument, JMS-700D)により定量した。

C. 研究結果

野生型と Ah受容体ノックアウトマウスにB[a]P、7,12-DMBA、DB[a,l]P、3-MC、3,4,3',4'-TCB、KC300ならびにKC500を100 mg/kg体重の割合で腹腔内投与し、3日目に動物をエーテル麻酔下、開腹し肝臓ならびに肺を摘出した。肝のRNAを調整し、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1の発現量をアクチンレベルと比較した (Fig. 1)。ノックアウトマウスではこれらP450の誘導はいずれの処置においてもみられず、対照群の値とほぼ同様であった。野生型マウスではB[a]P、7,12-DMBA、DB[a,l]P、3-MC、3,4,3',4'-TCB、KC300ならびにKC500によりそれぞれのP450が、物質の種類によって異なるものの、対照群にくらべて発現誘導がみられた。なかでも、B[a]P、7,12-DMBA、DB[a,l]P、3-MC、3,4,3',4'-TCB ではP450の誘導が著しく、とくにCYP1A1、CYP1B1の増加が顕著であった。他方、PCB混合物であるKC300ならびにKC500の場合はCYP1A2の誘導がみられた。肺のP450mRNAの発現量についても検討した。従来から知られているように、肺におけるCYP1A2の発現は観察されなかった。他方、CYP1A1、CYP1B1の発現は用いたB[a]P、7,12-DMBA、DB[a,l]P、3-MC、3,4,3',4'-TCBにより野生型のマウスで著しく誘導されたが、ノックアウトマウスでは観察されなかった。KC300ならびにKC500によっても肺でのP450の誘導は非常に低いものであった。

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。その結果は肝臓でのそれぞれのP450のmRNAの発現のパターンと類似したものであった。また、肝ミクロゾームのエトキシレゾルフィン脱エチル化活性、7-エトキシマリン脱エチル化活性、あるいは肝ミクロゾームによるベンツピレン

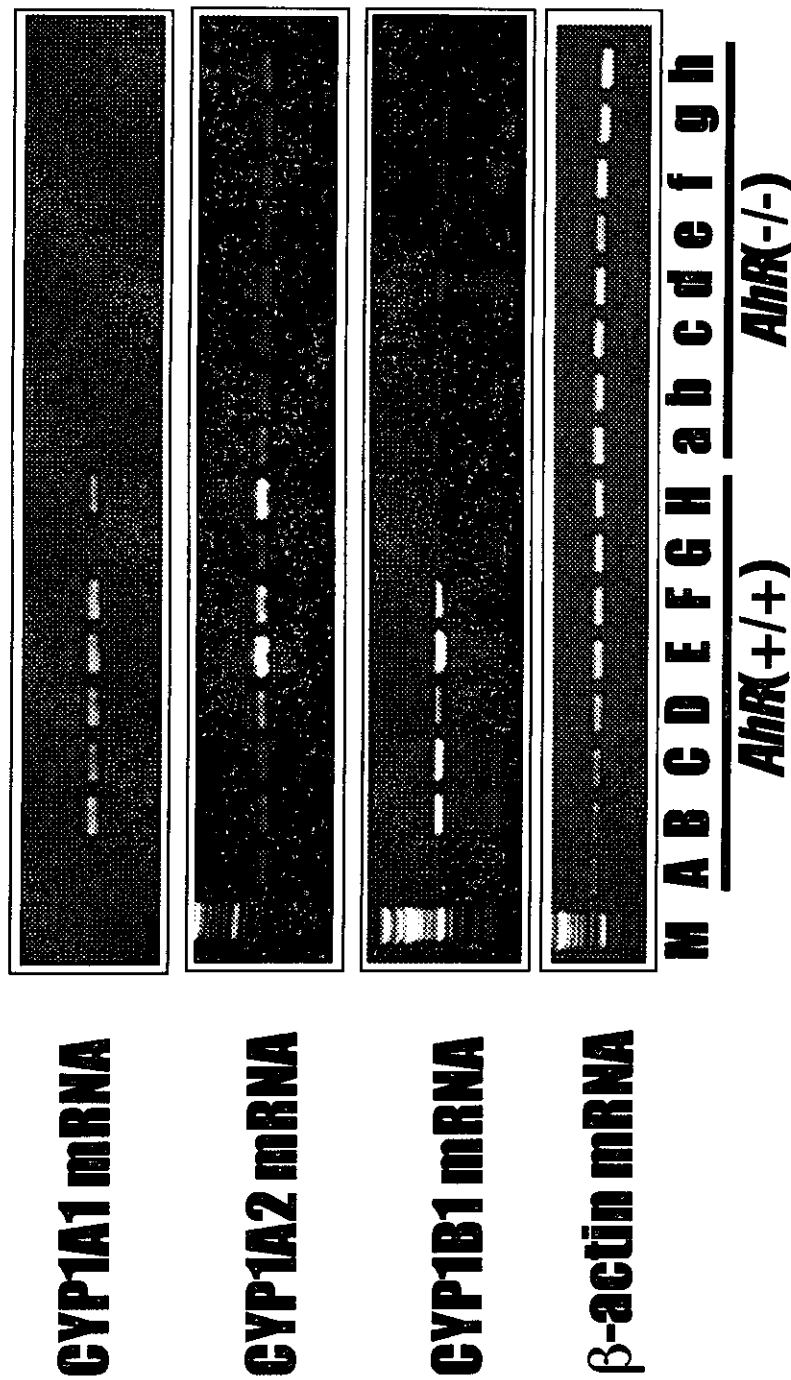


Fig. 1. mRNA expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, and β -actin in livers of AhR(+/-) (left part) and AhR(-/-) (right part) mice. Liver samples from control mice (A and a) and mice treated with B[a]P (B and b), 7,12-DMBA (C and c), DB[a,l]P (D and d), 3-MC (E and e), 3,4,3',4'-TCB (F and f), KC300 (G and g), and KC500 (H and h) were analyzed.

7,8-ジオール、7,12-ジメチルベンズアントラセン-3,4-ジオール、MeIQ、Trp-P-1も活性代謝物への変換活性についても *Salmonella typhimurium* NM2009を用い調べた。データを示さないが、基本的には肝ミクロゾームのP450発現量と類似するものであった。

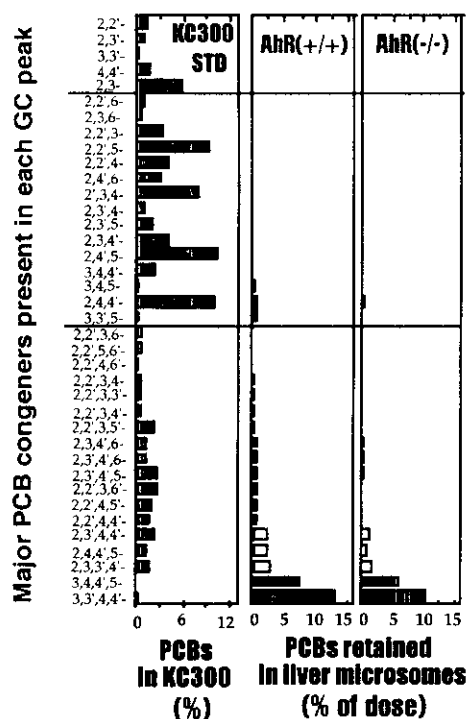


Fig. 2. In vitro metabolism of KC300 by recombinant (rat) CYP2B1 and (human) CYP2B6 expressed in *Trichoplusia ni* cells. KC300 (10 μ M) was incubated with P450 enzymes in the presence of an NADPH-generating system and after 30-60 min the incubates were extracted with n-hexane to analyze GC-MS. Open column and closed column indicate the incubations without or with NADPH, respectively.

酵素誘導によりPCB代謝が変化するかどうかを調べるため、KC300を投与した野生型と Ah受容体ノックアウトマウスの肝ミクロゾーム中のPCB異性体のGC-MSパ

ターンを解析した (Fig. 2)。その結果、両マウスにおいて、低塩素化ビフェニルは組織中から消失する速度が速いのに対し、塩素数の増えるに従って体内へ残存することが確かめられた。とくに、コプラナーPCBである3,4,3',4'-TCBの体内での残留は著しいものであった。野生型とAh受容体ノックアウトマウスの肝ミクロゾーム中のPCB異性体の残存パターンは類似していた。

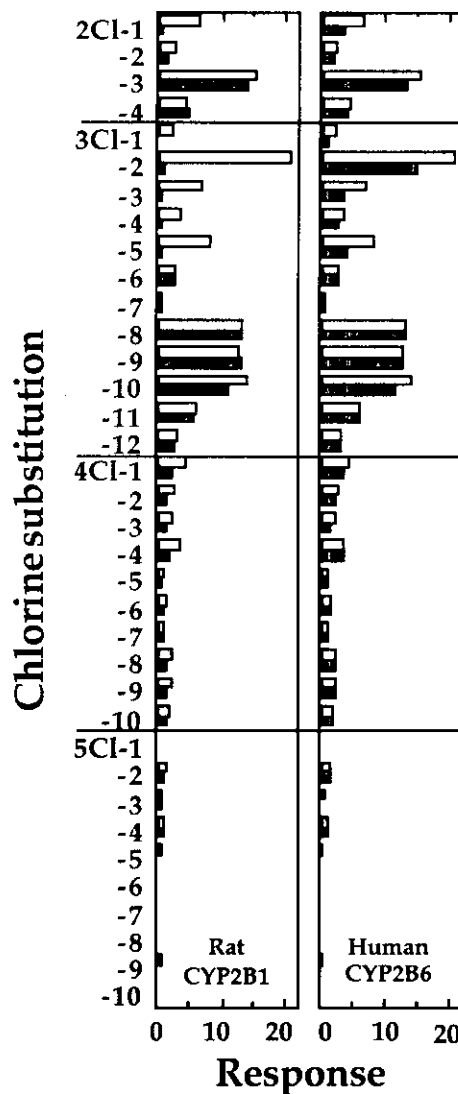


Fig. 3. GC-MS profile of extracts of PCBs in liver microsomes of AhR(+/-) and AhR(-/-) mice.

P450によるPCBの代謝の種差を調べるため、in vitroにおいてKC300をラットのCYP2B1とヒトのCYP2B6を用いてNADPH存在下、好氣的に代謝させ、n-ヘキサン抽出物をGC-MSで定量した (Fig. 3)。その結果、ラットのCYP2B1酵素がKC300中の低塩素化PCBの代謝に関して、ヒトのCYP2B6酵素よりはるかに強い活性をもつことが明らかになった。高塩素化PCBに関しては代謝の速度は両酵素を用いても遅く、これはマウスでのin vivoの結果と類似するものであった。

(+)-および(-)-リモネンの雌雄ラット肝ミクロソームによる代謝において、雄ラット肝ミクロソームは、リモネンをtrans-カルベオール、ペリリルアルコールへとそれぞれ代謝した (Table 1)。しかし、雌ラット肝ミクロソームによる代謝生成物活性は雄に比べ非常に低いものであった。

Table 1. Oxidation of (+)-limonene by liver microsomes of male and female rats

Sex	(+)-Limonene metabolism (nmol/min/mg protein)	
	(+)-Carveol	(+)-Perillyl alcohol
Female	<0.1	0.04
Male	0.87	1.23

Data are means from three animals.

また、リモネンの代謝における性差を明らかにするため、胎児から生後119日までの年齢の異なる雌雄ラット肝ミクロソームを用いた (Fig. 4)。雌雄の胎児肝ミクロソームでは非常に低い活性しか示さなかったが、生後まもなく雄においてのみリモネンの酸化活性が増加し、カルベオールの生成よりもペリリルアルコールの生成の方がより大きく増加し、約7-8週目に最大にな

ることが確認された。

一方、雄ラット肝ミクロソーム中の雄特異的CYP2C11の発現量とtrans-カルベオール、ペリリルアルコールの代謝活性の間には有意な関係が確認されたが、雌ラット肝ミクロソーム中の雌特異的CYP2C12の発現量との間には有意な関係は得られなかった。

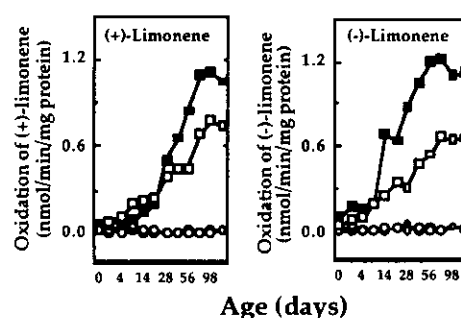


Fig. 4. Developmental changes in the formation of carveol (□ and ○) and perillyl alcohol (■ and ●) by liver microsomes of male rats (□ and ■) and female rats (○ and ●) when (+)-limonene and (-)-limonene were used as substrates. Data are means of duplicate determinations of combined microsomes obtained from 3-6 animals.

以上のことから、雌雄ラット肝ミクロソームによる(+)-および(-)-リモネンの代謝には性差があることが明らかとなった。

発現系ヒトP450を用いた(+)-および(-)-リモネンの代謝においては、ラットと同様にtrans-カルベオール、ペリリルアルコールが主生成物として確認された。データを示さないが、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19、CYP3A4は高いリモネンの酸化活性を示した。なかでも、CYP2C19がリモネンの酸化活性に対し最も高い活性を示し、次いでCYP2C9、CYP3A4、CYP2C8、CYP2C18であった。

いずれの場合においても、カルベオールへの酸化活性がペリリルアルコールへの酸化活性よりも大きかった。しかし、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2E1はリモネンの代謝に対し不活性であった。

D. 考 察

本研究において、野生型とAhR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腹腔内投与し、72時間目における肝臓と肺のCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1mRNAの量を測定することにより、それらによる誘導能を調べた。あわせて、誘導されたCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1によるPCB代謝ならびに薬物、癌原物質の代謝への影響を調べた。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。

得られた結果をまとめると以下になる。（1）PCB混合物はその中に含まれるコプラナーPCBの量に依存してAhR依存的にP450の増大を起こす可能性がある。

（2）KC500の方がKC300よりP450をより強く誘導するが、これは前者の方が残留性の高い、高塩素化ビフェニルを多く含むことによるものと考えられる。ただ、芳香族炭化水素類に比べてカネクロールの場合は、よりCYP1A2の誘導に高い活性をもっているようで、CYP1A1やCYP1B1の誘導性は低いものであった。（3）コプラナーPCBである3,4,3',4'-TCBは、その誘導性において用いた多環芳香族炭化水素（[a]P、7,12-DMBA、DB[a]P、3-MC）と類似した作用をもっていることが明らかになった。（4）KC300投与マウスの肝ミクロ

ゾーム中のPCB異性体の残留量をGC-MSで調べたところ、低塩素化PCBの代謝は高塩素化PCBに比べて速いことが示された。ただPCBの残存パターンは野生型とAhRノックアウトマウスにおいて大きな違いはなく、PCB代謝とP450誘導との間に関係を認めなかった。また、コプラナー3,4,3',4'-TCBの残留性は高いことが明らかになった。

本研究班で目的とするPCB代謝の種差について以下のような所見を得た。すなわち、*in vitro*の反応においてラットのCYP2B1とひとのCYP2B6によるKC300代謝を検討したところ、ラットの酵素がヒトの酵素より高い活性を示すことが明らかになった。P450は祖先型遺伝子から進化したファミリーを形成しているが、その中で同じファミリーに属するP450分子種のPCB代謝に種差の存在することは興味深い。

また、本研究において、植物中の成分であるリモネンのP450による代謝のラットにおける性差ならびに他の動物による種差も検討した。ラットにおいては明らかな性差の存在することを初めて明らかにしたが、これは、リモネンの腎毒性の頻度の性差を考える上で貴重な結果と考えられる。また、本報告では詳しくふれなかったが、リモネンのP450による代謝経路に大きな種差の存在することを見つけており（未発表データ）、植物中の化学物質による内分泌かくん乱との関係で興味深く、我々はさらに検討を続けている。

E. 結 論

環境中に放出されたPCB混合物はその中に含まれるコプラナーPCBの量に依存してAhR依存的にP450の増大を起こすことが考えられた。また、KC500の方がKC300よりP450をより強く誘導するが、これは前者の方が残留性の高い、高塩素化ビフェ

ニルを多く含むことによるものと考えられた。ただ、芳香族炭化水素類に比べてカネクロールの場合は、よりCYP1A2の誘導に高い活性をもっているようで、CYP1A1やCYP1B1の誘導性は低いものであった。他方、コプラナーPCBである3,4,3',4'-TCBは、その誘導性において用いた多環芳香族炭化水素 ([a]P、7,12-DMBA、DB[a,l]P、3-MC) と類似した作用をもっていることが明らかになった。KC300投与マウスの肝ミクロゾーム中のPCB異性体の残留量をGC-MSで調べたところ、低塩素化PCBの代謝は高塩素化PCBに比べて速いことが示された。ラットのCYP2B1とひとのCYP2B6によるKC300代謝を検討したところ、ラットの酵素がヒトの酵素より高い活性を示すことが明らかになった。植物中の成分であるリモネンのP450による代謝にラットにおいては明らかな性差の存在することを初めて明らかにした。また、本報告では詳しくふれなかったが、リモネンのP450による代謝経路に大きな種差の存在することを紹介した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimada, T., Watanabe, T., Guengerich, F.P., Inoue, K. and Gillam, E.M.J. Specificity of 17 β -estradiol and benzo[a]pyrene oxidations by polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants substituted at residues 48, 119 and 432. *Xenobiotica.*, 31: 163-176, 2001.
- 2) Shimada, T., Oda, Y., Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P., and Inoue, K. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450

1B1 allelic variants and othwe human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009 *Drug Metab. Dispos.*, 29; 1176-1182, 2001.

- 3) Miyazawa, M., Shindo, M., and Shimada, T. (2002) Sex differences in the metabolism of (+)- and (-)-limonene enantiomers to carveol and perillyl alcohol derivatives by cytochrome P450 enzymes in rat liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.*, 15: 15-20, 2001

2. 学会発表

- 1) Shimada, T., Satarug, S., Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P. and Inoue, K. (2001) Cytochrome P450 1B1 genetic polymorphisms in relation to cancer susceptibilities in humans 第28回日本トキシコロジー学会, 東京, 2001
- 2) 小田美光, Aryal, P., Gillam, E. M. J., Guengerich, F. P., 島田 力 (2001) 癌原性芳香族アミンの代謝的活性化におけるヒトチトクローム P450の役割 第28回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京, 2001
- 3) Oda, Y., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., S and Shimada, T. (2001) Analysis of metabolic activation of aminophenylnorharman, aminomethylnorharman and aminophenylharman using SOS/*umu* tester strains 8ty International Conference on Environmental Mutagenes, 静岡, 2001
- 4) 島田 力, 進藤正樹, 宮沢三雄. ヒト肝ミクロゾームによるリモネン異性体の酸化的代謝におけるCYP2C9、CYP2C19酵素の役割. 第16回 日本薬

物動態学会, 神戸、2001

- 5) 進藤正樹、宮沢三雄、島田 力雄ラット特異的に腎障害を引き起こすリモネン異性体のラット肝ミクロゾームによる酸化反応雌雄差および動物種差。第16回日本薬物動態学会、神戸、2001

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
古賀信幸 金丸知代 大石奈穂子 加藤善久 木村良平 原口浩一 増田義人	2,4,5,2',3',4'-六塩素化ビフェニルの in vitro 代謝における動物種差	福岡医学雑誌	92	167-176	2001
Yoshihisa Kato Tomoaki Yamazaki Koichi Haraguchi Yuriko Ito Kiyomitsu Nemoto Yoshito Masuda Masakuni Degawa Ryohei Kimura	Effects of 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl and 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl on serum hormone levels in rats and mice.	Organohalogen Compounds	53	44-46	2001
Yoshihisa Kato Tomoaki Yamazaki Koichi Haraguchi Kiyomitsu Nemoto Yoshito Masuda Masakuni Degawa Ryohei Kimura	Effects of polychlorinated biphenyls (Kanechlor-500) on serum hormone levels in rats and mice.	Organohalogen Compounds	53	47-49	2001
Yoshihisa Kato Yuriko Ito Tomoaki Yamazaki Yasuhiko Shinmura Ryohei Kimura	Reduction of serum thyroxine level by methylsulfonyl metabolites of chlorinated benzenes in male Sprague-Dowley rats.	Organohalogen Compounds	53	50-53	2001
Nobuyuki Koga Koichi Haraguchi Tomoyo Kanamaru Nahoko Oishi Yoshihisa Kato Ryohei Kimura	Species differences in the in vitro metabolism of 2,2',3',4,4',5-hexachlorobiphenyls.	Organohalogen Compounds	53	428-431	2001
Yoshihisa Kato Yuriko Ito Yuka Terada Tomoaki Yamazaki Yasuhiko Shinmura Ryohei Kimura	Reduction of serum thyroxine concentration by methylsulfonyl metabolites of chlorobenzenes in male rats.	J. Toxicol. Sci.	26	241	2001

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 Tomoeaki Yamazaki Koichi Haraguchi Kiyomitsu Nemoto Yoshito Masuda Masakuni Degawa Ryohei Kimura	Effects of 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl and 2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl on serum hormone levels in rats and mice.	J. Toxicol. Sci.	26	242	2001
Naoya Hatanaka Hiroshi Yamazaki Yoshimitsu Oda F. Peter Guengerich Miki Nakajima Tsuyoshi Yokoi	Metabolic activation of carcinogenic 1-nitropyrene by human cytochrome P450 1B1 in <i>Salmonella typhimurium</i> strain expressing an <i>O</i> -acetyltransferase in SOS/ <i>umu</i> assay.	Matat. Res.	497	223-233	2001
Naoya Hatanaka Hiroshi Yamazaki Ryoichi Kizu Kazuichi Hayakawa Yasunobu Aoki Masashi Iwamori Miki Nakajima Tsuyoshi Yokoi	Induction of cytochrome P450 1B1 in lung, liver and kidney of rats exposed to diesel exhaust.	Carcinogenesis	22	2033-2038	2001
Tsutomu Shimada Yoshimitsu Oda Elizabeth M.J. Gillam F. Peter Guengerich Kiyoshi Inoue	Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in <i>Salmonella typhimurium</i> NM2009.	Drug Metab. Dispos.	29	1176-1182	2001
T. Shimada J. Watanabe F.P. Guengerich K. Inoue E.M.J. Gillam	Specificity of 17 β -estradiol and benzo[a]pyrene oxidations by polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants substituted residues 48, 119 and 432.	Xenobiotica	31	163-176	2001
Mitsuo Miyazawa Masaki Shindo Tsutomu Shimada	Sex differences in the metabolism of (+)- and (-)-limonene enantiomers to carveol and perillyl alcohol derivatives by cytochrome P450 enzymes in rat liver microsomes.	Chem. Res. Toxicol.	15	15-20	2002
Yoshihisa Kato Ryohei Kimura	The contribution of 2,3,5-trichlorophenyl methyl sulfone, a metabolite of 1,2,4-trichlorobenzene, to the δ -aminolevulinic acid synthetase induction by 1,2,4-trichlorobenzene in rat liver.	Chemosphere	47	1-7	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Toshihiko Kasahara Masamichi Hashiba Tsuyoshi Harada Masakuni Degawa	Change in the gene expression of hepatic tamoxifen-metabolizing enzymes during the process of tamoxifen-induced hepatocarcinogenesis in female rats.	Carcinogenesis	23	491-498	2002
Yoshihisa Kato Koichi Haraguchi Sinya Yumoto Tomoaki Yamazaki Yasuhiro Nagano Nobuyuki Koga Yoshito Masuda Ryohei Kimura	Metabolite of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, 3-methylsulphonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a potent inducer of CYP2B1/2 in rat.	Xenobiotica (in press)			2002
Misaki Kojima Kiyomitsu Nemoto Uta Murai Nami Yoshimura Yuko Ayabe Masakuni Degawa	Altered gene expression of hepatic lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) in lead nitrate-treated rats.	Arch. Toxicol. (in press)			2002

研究成果の刊行物・別刷り

20010942

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。