

開発した。また、GC-MS によるインディルビンの測定法開発に不可欠な安定同位体標識インディルビン 2 種を合成した。

酵素免疫アッセイ：抗血清 C2-Ab を用いた EIA では、インディルビン濃度 10-1000 fmol/100 μ L、C4-Ab では 3-300 fmol/100 μ L の範囲で良好な用量-作用曲線が得られた。また、交差反応性試験ではハプテン化におけるブリッジ導入部位である 5 位の誘導体である 5-メチルインディルビンや 5-メトキシインディルビンは数十%の交差反応性を示したが、前駆体と考えられているイサチンやその誘導体である 5-メチルイサチンや 5-メトキシイサチン、さらに近縁化合物のオキシインドールやトリプトファンはほとんど交差反応性を示さず、本 EIA 系は、予想代謝部位である 5 位への誘導体を含めたインディルビン関連化合物に高い特異性を示すことが判明した。

安定同位体標識インディルビン：今回合成した [4,5,6,7- 2 H₄] インディルビンおよび [3a,4,5,6,7,7a- 13 C₆]インディルビンは、いずれも化学純度のみならず同位体純度 (99.2%、99.1%) も高く、測定対象である天然型のインディルビンの含量がほとんど無視できることから、感度および精度において有利とされる GC-MS の内標準物質として使用可能なことが判明した。

D. 考察

ダイオキシンの生体影響を検討する上で、AhR の内因性リガンドと考えられるインディルビンの体内動態を検討することは重要である。しかし、現在までのところ、インディルビンの体内動態は不明であり、またインディルビンの高感度測定法に関する報告はない。それゆえ、今回開発を企てた 2 つの高感度測定法は極めてダイオキシンの生体影響を検討する上でも有用と考えられる。

E. 結論

酵素免疫アッセイ：今回開発した EIA 系は、極めて高感度であり、文献記載の体液中インディルビンの直接測定が可能と考えられ、本アッセイ系によるヒト尿中インディルビン測定が期待される。

安定同位体標識インディルビン：今回合成した [4,5,6,7- 2 H₄] インディルビンおよび [3a,4,5,6,7,7a- 13 C₆]インディルビンは純度に優れることから、GC-MS による精度の高いインディルビン測定法の開発が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

High sensitivity analysis of indirubin by silylation using GC/MS.

Yuji Takao, Kohei Yamashita, Shinya Kohra, Makiko Inudo, Masaki Nagase, Nobuaki Tominaga, Yasuhiro Ishibashi, Jun Sekizawa, Shinichi Miyairi and Koji Arizono.

J. Health Sci., 49(1), 88-90 (2003).

2. 学会発表

環境汚染化学物質のエストロゲン生合成酵素におよぼす直接作用の検討

武井亜樹、野原 孝、高畠 亨、宮入伸一
(日大・薬)

(第 46 回日本薬学会関東支部大会 平成 14 年 10 月 26 日 東京)

GC/MS 分析のためのインディルビンのトリメチルシリル化

高尾雄二、山下浩平、高良真也 (長崎大・環境)、犬童真紀子 (熊本県大・環境共生)、長江真樹 (長崎大・環境)、富永伸明 (有明工専)、石橋康弘 (長崎大・環境保全セ)、

関澤 純（国立医薬品食品衛生研究所）、
宮入伸一（日大・薬）、有菌幸司（熊本県
大・環境共生）

（日本内分泌攪乱化学物質学会第 5 回研
究発表会 平成 14 年 11 月 26 日 広島）

ダイオキシン受容体結合性を有する
indirubin の酵素イムノアッセイ法の開発
三井沙恵、武井亜樹、児島伸枝、高島 亨
（日大・薬）、松田知成（京大院・地球環
境）、関澤 純（国立医薬品食品衛生研）、宮

入伸一（日大・薬）

（第 123 回日本薬学会年会 平成 15 年 3
月 28 日 長崎）

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（データベース等）

なし

実験動物におけるインディルビンの臓器分布の解析

分担研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所総合評価室

協力研究者 官入伸一 日本大学薬学部

協力研究者 関澤 純 国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部

研究要旨

BrlHan:WIST (GALAS)ラットの血清、尿及び主要器官を採取し、インディルビンの臓器分布の解析を行った。初年度末時点では分析は進行中である。

A. 研究目的

ラットにおける血液、尿中および主要器官のインディルビン分布の解析を行う。

B. 研究方法

BrlHan:WIST (GALAS) 雄ラットを用いる。日本クレアからラットを購入し、7日間の検疫後、血清、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、及び精巣上体を採取する。採取した血清及び各器官は各ラット毎に個別に保存する。試料の調製は株式会社 イナ リサーチに委託する。分析定量は、新たに調製した抗体を用いた高感度酵素免疫アッセイ法を適用する。

C. 研究結果と考察

(i) ダイオキシンによる急性毒性の感度が相対的に低いことが知られている BrlHan:WIST (GALAS)ラットの雄(10 週令)37 匹を日本クレアから購入した。検疫期間中特記すべき異常は認められなかったため、健常な 30 匹を選抜し、試験に供した。

(ii) 11 週令の動物(体重325-351g)を用い24 時間蓄積尿を7日間継続採尿した。採尿時にトラブルはなく、全 210 サンプルを採取した。

(iii) 採尿終了後(体重 342-377g)、血液および臓器の採取を行った。肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体をトラブルなく採取した。採尿開始以後、終了に至るまでいずれの動物の一般状態にも異常は認められなかった。

(iv) 採取した血液、尿、臓器からのインディルビンの分離精製と分析が進行中である。

D. 結論

(i) ラット臓器におけるインディルビンの分布について調査を企図した。11 週令の雄ラット 30 匹を用い24 時間蓄積尿を7日間継続採尿、その後、血液および臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体)の採取を行った。

(ii) 採取した血液、尿、臓器からのインディルビンの分離精製と分析が進行中である。

(iii) ダイオキシンによる急性毒性の感度が相対的に低いことが、インディルビンの臓器分布と関連するか否かについて今後他の系統のラットを用いるなどして検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

Ema, M. (2002) Antiandrogenic effects of

- dibutyl phthalate and its metabolite, monobutyl phthalate, in rats. *Cong. Anom.*, 42, 297-308.
- Enma, M. and Miyawaki, E. (2002) Suppression of uterine decidualization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats, *Reprod. Toxicol.*, 16, 309-317.
- Enma, M. and Miyawaki, E. (2002) Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late pregnancy. *Reprod. Toxicol.*, 16, 71-76.
- 江馬 眞 (2002) 有機スズの生殖発生毒性、環境ホルモン学会ニューズレター, 4, 6.
- 広瀬明彦、西川秋佳、江馬 眞、紅林秀雄、山田雅巳、長谷川隆一 (2002). メチル-tert-ブチルエーテル (MTBE) の毒性情報、水環境学会誌、25, 491-496.
- 小泉睦子、大野泰雄、広瀬雅雄、江馬 眞、広瀬明彦、井上 達、長谷川隆一 (2002) DINP の毒性評価と耐容1日摂取量の算定、日本食品化学会雑誌 9, 39-45.
2. 学会発表
- Enma, M. and Miyawaki, E. (2003) Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBEP) uring pregnancy,. *Society of Toxicology, 42th Annual Meeting (The Toxicologist, 72 (S-12), 274, 2003)*
- Koizumi M, Nishida N, Enami T, Sunaga M, Horikawa H, Kamata E, Enma M, Hasegawa R.(2003) Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats. *Society of Toxicology, 42th Annual Meeting (The Toxicologist, 72 (S-12), 385, 2003)*
- Hasegawa R, Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S, Kamata E, Enma M, (2003) Higher susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol than young. *Society of Toxicology, 42th Annual Meeting (The Toxicologist, 72 (S-12), 390, 2003)*
- 江馬 眞 (2003) 可塑剤フタル酸エステルのラット次世代の発生に及ぼす影響、第5回生殖・発生毒性東京セミナー
- 江馬 眞 (2002) 内分泌かく乱化学物質問題の現状と将来、第 23 回 In vitro 発生毒性研究会
- 江馬 眞、宮脇英美子 (2002) 偽妊娠ラットの子宮脱落膜反応に及ぼすジフェニルスズの影響、第 42 回日本先天異常学会 (*Cong. Anom.*, 42, 272-273, 2002)
- 江馬 眞 (2002) ジブチルフタレート及び代謝物モノブチルフタレートの抗アンドロゲン作用、第 42 回日本先天異常学会シンポジウム (*Cong. Anom.*, 42, 234, 2002)
- 江馬 眞、宮脇英美子、原園 景 (2002) 可塑剤 butyl benzyl phthalate のラット雄胎児における生殖系発生に及ぼす機能影響、第 29 回日本トキシコロジー学会
- 前川京子、小出達夫、斎藤博幸、原園 景、江馬 眞、谷本 剛、岡田敏史 (2002) エルカトニン製剤の含有評価における問題、第 38 回全国衛生化学技術協議会
- F. 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(データベース等) なし

インディルビンと TCDD による遺伝子発現誘導の解析および細胞増殖、分化に与える影響

分担研究者 松田 知成 京都大学地球環境学堂

研究要旨

2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2, 3, 7, 8-TCDD) とインディルビンが、ヒト肝癌細胞株 HepG2 の遺伝子発現変化、及びヒト白血病細胞株 K562、ML-1 の細胞増殖・分化に与える影響について研究を行った。cDNA マイクロアレイ及び RT-PCR を用いた遺伝子発現解析で、HepG2 への 2, 3, 7, 8-TCDD またはインディルビンの暴露により、CYP1A1、CYP19A1、IGFBP1、IGFBP10 の発現誘導が、両物質に共通して確認された。CYP1A1、IGFBP1 については、インディルビン濃度依存的な発現誘導も確認できた。IGFBP1 のプロモーター領域を検索した結果、XRE の配列が確認された。K562、ML-1 の細胞増殖に関しては、2, 3, 7, 8-TCDD (10nM 3日間) またはインディルビン (10 μ M 3日間) の単独暴露ではほとんど影響が見られなかった。しかし、ML-1 細胞に TCDD、またはインディルビンとあるサイトカインを同時投与すると細胞増殖が劇的に抑制され、分化も誘導されていた。これらの知見は、TCDD の免疫毒性のメカニズムやインディルビンが白血病に有効なメカニズムの解明に役立つと考えられる。

A. 研究目的

我々は、人間の尿中から強力な AhR リガンド、インディルビンを発見し、その生理作用の解析を進めてきた。その結果、インディルビンは 1 pM という極低濃度でヒト細胞において CYP1A1 の mRNA を誘導し、さらに自らが誘導した CYP1A1 タンパクによって分解されることを明らかにしてきた。これらの結果は、インディルビンが内因性の AhR リガンドであることを示唆するが、その他のインディルビンの生理活性は不明である。そこで、本研究では、TCDD とインディルビンが細胞の遺伝子発現及び細胞増殖・分化に与える影響を比較し、TCDD とインディルビンの生理活性の違いを明らかにする。

B. 研究方法

ヒト肝がん細胞株 HepG2 に TCDD 及びインディルビンをそれぞれ 10nM ずつ 8 時間暴露し、cDNA マイクロアレイと RT-PCR により遺伝子発

現変化を解析した。また、ヒト白血病細胞株、K562 および ML-1 に TCDD を 1, 10nM およびインディルビン 3, 10 μ M を暴露し、細胞増殖試験及び細胞分化試験をおこなった。

C. 研究結果

HepG2 細胞への TCDD 及びインディルビンの暴露により、CYP1A1、CYP19A1、IGFBP1、IGFBP10 の mRNA の発現誘導が確認された。また、CYP1A1 及び IGFBP1 mRNA については、インディルビン濃度依存的な発現も確認された。K562、ML-1 の細胞増殖に関しては、2, 3, 7, 8-TCDD (10nM 3日間) またはインディルビン (10 μ M 3日間) の単独暴露ではほとんど影響が見られなかった。しかし、ML-1 細胞に TCDD、またはインディルビンとあるサイトカインを同時投与すると細胞増殖が劇的に抑制され、分化も誘導された。

D. 考察

・ 遺伝子発現変化

TCDD およびインディールビン暴露による遺伝子発現に大きな差異は見られず、発現が抑制された遺伝子も含めてほぼ同様の遺伝子発現変化のパターンが観察された。AhR の強力なリガンドでありながら、TCDD は極めて毒性が強く、インディールビンは毒性が弱いことが報告されているので、遺伝子発現のパターンも異なることが予測されたが、予想に反して遺伝子発現のパターンは似ていることがわかった。TCDD およびインディールビンで共通して誘導が見られた IGFBP1 は様々な転写因子によって制御されていることが知られている。このプロモーター領域には、cAMP、グルココルチコイド、インシュリン、hepatic nuclear factor、等に反応する部位が存在する。今回このプロモーター領域を新たに検索した結果、XRE の配列が確認された。この遺伝子は AhR を含む様々な転写因子によりかなり複雑な制御を受けていることが示唆された。

・ 細胞増殖・細胞分化

TCDD およびインディールビンは白血病細胞の増殖や分化にも類似の影響を示した。両物質とも単独では増殖や分化に影響を及ぼさなかったが、あるサイトカインと併用すると ML-1 細胞の増殖を強く抑制し、分化も誘導した。また、細胞死も誘導し、顕微鏡観察によりアポトーシスを誘導していることが示唆された。TCDD やインディールビンとあるサイトカインが互いのアポトーシス経路や細胞増殖抑制経路を活性化した可能性が高いがそのメカニズムの解明までには至らず、更なる研究が必要である。これらのメカニズムが明らかになれば、ダイオキシンの免疫毒性のメカニズムや、インディールビンの白血病への薬理効果がより明確になると考えられる。

E. 結論

HepG2 細胞を用いた実験では、インディールビン

と TCDD の遺伝子発現パターンは酷似しており、CYP1A1、CYP19A1、IGFBP1、IGFBP10 などの遺伝子の発現誘導が認められた。インディールビンと TCDD はヒト白血病細胞株の ML-1 細胞に対して、単独では高濃度でも影響を与えないが、あるサイトカインと併用することにより、低濃度 (1 nM) で細胞増殖を劇的に押さえ、アポトーシスや分化を誘導した。今後このメカニズムについて集中的に解析を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

M Yasui, S Matsui, Y.R. Santosh Laxmi, N Suzuki, SY Kim, S Shibutani, T Matsuda, Mutagenic events induced by 4-hydroxyequilin in *supF* shuttle vector plasmid propagated in human cells, *Carcinogenesis*, (accepted, 2003)

T. Kato, T. Matsuda, S. Matsui, T. Mizutani, and K. Saeki. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by methyl yellow and related congeners: structure-activity relationships in halogenated derivatives

松井三郎ら、水, 44, 38-40, 2002

松田知成、松井三郎：ヒト尿中に存在する強力な AhR リガンド、インディールビン(解説/特集)医学の歩み、201, 157-158, 2002

2. 学会発表

T. Matsuda et al. *The 2nd Pacific Conference on Reproductive Biology and Environmental Sciences*, p35-37, Nov. 2002

J. Adachi et al. *22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, Toxicology II*, p13-15, Aug. 2002

J. Adachi et al. *International Symposium on Endocrine Active Substances and Supplementary Workshop*, p55-56, Nov. 2002

インディルビンの免疫細胞機能獲得への影響解析

分担研究者 鈴木 和博 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部

研究要旨

免疫機能に対するインディルビンの影響を定量的に再現性良く検討する系として、ヒト未成熟白血球株 HL-60 をジメチルスルホキシド（DMSO）および顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を用いて好中球様に分化（機能的成熟過程）させる *in vitro* の培養試験系を確立した。その実験系において、分化後の細胞の活性酸素（スーパーオキシド）産生能を指標に検討した結果、1 μ M のインディルビンと共存させた細胞は、未処理のコントロール細胞と比べて有意に活性酸素産生能が上昇していることが明らかになった。

A. 研究目的

ダイオキシン等の受容体 Ah-receptor の内因性リガンドは長いこと不明であったが、最近インディルビンが同定された。Ah-receptor へのリガンド結合（活性化）は免疫系に影響をもつ可能性が指摘されてきたが、インディルビンの影響は不明である。本研究は、白血球の機能的成熟過程を *in vitro* で観察する細胞培養実験系を用いて、インディルビンの影響を感度良く定量的・生化学的に解析することを目的とする。

B. 研究方法

対数増殖期にあるヒト未成熟白血球細胞株 HL-60 を 1.25% DMSO および 25 ng/ml の G-CSF 存在下に 6 日間培養して好中球機能をもつ白血球に分化させる培養実験系に、種々の濃度のインディルビン（日本大学薬学部の宮入伸一教授より供与）を共存させた。6 日間培養後、細胞をハンクス液で洗浄して細胞外のインディルビンを除き、オプソニン化ザイモザン（OZ）で刺激して、生ずる活性酸素（スーパーオキシド）をシトクロム C の還元（550 nm の吸収の上昇）で定量した。

C. 研究結果

1) 白血球の培養分化系の構築

HL-60 細胞は、DMSO 存在下に培養すると分化することが知られていたが、分化活性をもつサイトカイン G-CSF も併用することにより、より高度に分化し成熟好中球とほぼ同等の活性酸素産生能をもつ細胞になった。分化誘導には 5-6 日間を要し、その間に細胞数は約 2 倍となって、増殖は停止した。なお、用いる HL-60 細胞の 2 倍増殖速度（doubling time）は約 40 時間で、他の多くの培養細胞より約 2 倍も遅かった。増殖の早い細胞（doubling time 20 時間）は、分化能が低く、本実験には不向きであることが判明した。

2) 白血球の分化に対するインディルビンの影響

上記の分化実験系において、様々な濃度のインディルビンと共存させて培養し、分化した白血球の機能を、もっとも定量性のある活性酸素産生能を指標に検討した。その結果、図に示すように、比較的低濃度のインディルビンにより、活性酸素産生は有意に上昇し、1 μ M の場合、上昇率は約 25% であった。また、10 μ M 以上では

細胞増殖阻害が観察された。

D. 考察

インディルビンは、ここで構築した白血球の培養分化系において、広い範囲の低濃度領域 (10^{-10} – 10^{-6} M) で、白血球の活性酸素産生能を有意に上昇させた。これはやや意外な結果であった。というのは、一般的にはダイオキシンなどの Ah-receptor リガンドは免疫能を低下させると想像されており、それとはむしろ逆の結果になったからである。しかし、これまではほとんどの研究がリンパ球中心の獲得免疫系で検討しており、このような in vitro での自然免疫担当細胞 (innate immunity competent cells) の分化に対する影響を検討した例はほとんどなく、驚くには当たらないであろう。今後、白血球の転写因子 (PU.1 など) に対する影響や、OZ 受容体 (CD18) の変化など作用メカニズムを検討するとともに、生体影響の推定に資する知見を得たい。

E. 結論

免疫機能に対する化学物質の影響を検討する系として、ヒト未成熟白血球株を好中球様に分化 (機能的成熟過程) させる in vitro の培養試験系を確立した。その実験系において、インディルビンを共存させた結果、分化後の細胞の活性酸素 (スーパーオキシド) 産生能は、未処理のコントロール細胞と比べて有意に上昇した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Adachi, R., Takeuchi, K., and Suzuki, K. (2002) Antisense Oligonucleotide to Cofilin Enhances Respiratory Burst and Phagocytosis in Opsonized Zymosan-stimulated Mouse Macrophage J774.1 Cells. *J Biol Chem* 277, 45566-45571
- 2) Matsui, S., Matsumoto, S., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Watanabe, H., Ohashi, K., Mizuno,

K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., and Suzuki, K. (2002) LIM kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. Possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton.

J Biol Chem 277, 544-549

2. 学会発表

- 1) 平山明子、安達玲子、笠原忠、鈴木和博: LIM キナーゼ 1 によるマクロファージ様 U937 細胞の機能修飾について 日本免疫学会 2002 年 12 月
- 2) 渡辺秀実、安達玲子、平山明子、笠原忠、鈴木和博: 白血球の遺伝子発現に対する内分泌攪乱化学物質の影響 日本生化学会 2002 年 10 月
- 3) 平山明子、松井幸子、松本幸子、笠原忠、安達玲子、鈴木和博、大橋一正、水野健作: LIM キナーゼ 1 によるマクロファージ様 U937 細胞の機能修飾について 第三回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2002 年 6 月
- 4) 安達玲子、武内恒成、鈴木和博: 食細胞の反応性に対するコフィリンアンチセンスの効果 日本細胞生物学会 2002 年 5 月

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

H. 謝辞

本研究は、共立薬科大学生化学教室の笠原忠教授、渡辺秀実さん、平山明子さんの協力を得て行ったものである。

厚生労働科学研究補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)

分担研究報告書

アリルヒドロカーボン受容体内因性リガンド候補 indirubin による酵素誘導とその代謝に関する研究

分担研究者 北村 繁幸 広島大学医歯薬学総合研究科

研究要旨

ダイオキシンの毒性発現機構に関わる Ah receptor (AhR) の内在性リガンド候補である indirubin, indigo の生理作用としてダイオキシンと同様の肝薬物代謝酵素誘導活性を認めたが、誘導能は低かった。この原因として、indirubin は代謝排泄を受けやすいことが *in vitro* 実験で認められた。Indirubin の AhR へのアンタゴニスト作用をダイオキシンとの競合で調べたが、抑制作用は認められなかった。

A. 研究目的

Indirubin および indigo の内在性リガンド候補としての可能性を精査するため、*in vivo* 動物実験で AhR を介して TCDD と同様な肝薬物代謝酵素誘導活性を示すかを調べた。また、*in vivo* および *in vitro* において、indirubin による AhR を介した薬物代謝酵素誘導の TCDD との競合作用についても検討した。

B. 研究方法

In vivo 酵素誘導実験では C57BL/6J Jcl マウスに indirubin あるいは TCDD を経口投与後、肝より常法に従いマイクロゾーム(Ms)を調製し、CYP 活性を測定した。また、ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を用いた誘導実験では、micro-EROD 法により活性測定した。

C. 研究結果

1) マウスに indirubin を 50 mg/kg で3日間投与し、肝酵素誘導率の経時変化を調べたところ、投与終了1日後に約 2.8 倍になった活性が3日後には約 30%、1週間後にはほとんど活性誘導は消失していた。これは、TCDD による酵素誘導が投与後4週間を経過してもほぼ 80%以上維持されていたことと比較し、indirubin が代謝排泄されやすく、

蓄積性が低いことによると考えられる。

2) Indirubin は組換え酵母を用いた AhR レポ

ーター試験で TCDD の約 50 倍の活性を示すにもかかわらず、肝酵素誘導能は TCDD よりかなり低く肝毒性もほとんど認められないことより、AhR のアンタゴニスト作用が期待される。そこで、indirubin と TCDD あるいは 3-methylcholanthrene (MC) との競合作用を *in vivo* で調べた。マウスに、1日目 indirubin のみ経口投与、2日目 indirubin 投与2時間後に TCDD あるいは MC を経口単回投与、さらに3、4日目に indirubin を投与し、5日目に肝酵素活性を調べた。結果、TCDD 30 ng/kg 投与マウスにおいてわずかながら酵素誘導抑制傾向がみられたが 2.5 µg/kg 投与ではほとんど影響は認められず、indirubin 投与量を 100 mg/kg にしても影響はみられなかった。

3) ラット肝初代培養細胞およびヒト肝癌細胞株 HepG2 に indirubin および TCDD を同時添加したところ、酵素活性誘導は抑制されなかった。

D. 考察

Indirubin は酵母レポーター試験で AhR との結合能が TCDD の約 50 倍と強いが、*in vivo* 投与での酵素誘導はかなり弱く、吸収、

代謝、排泄の影響が大きいことが考えられた。肝ミクロゾームとの反応において、早い indirubin の消失が認められることより、生体内で代謝が起きていることが予想される。TCDD 毒性抑制のためのアンタゴニスト作用は、高用量の TCDD では全く影響がなく、慢性毒性などを示す低量での効果をさらに検討する必要があると考えられる。

E. 結論

Indirubin は TCDD より *in vivo* での酵素誘導効果が低くまた誘導消失が早い。 *In vivo* および培養細胞での同時投与で TCDD の作用に対する影響はほとんど認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Fujimoto, S. Kitamura, S. Sanoh, K. Sugihara, S. Yoshihara, N. Fujimoto and S. Ohta

Estrogenic Activity of an Environmental Pollutant, 2-Nitrofluorene, after Metabolic Activation by Rat Liver Microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press (2003).

- 2) O. Ueda, S. Kitamura, K. Ohashi, K. Sugihara and S. Ohta

Xanthine Oxidase-Catalyzed Metabolism of 2-Nitrofluorene, a Carcinogenic Air Pollutant, in Rat Skin. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(4) in press (2003).

- 3) S. Kitamura, T. Suzuki, S. Ohta and N. Fujimoto

Antiandrogenic Activity of the Organophosphorus Pesticide Fenthion and Related Compounds, and the Effect of Metabolism. *Environmental Health Perspectives*, 111(4), in press (2003).

- 4) S. Kitamura, T. Suzuki, T. Kadota, M. Yoshida, K. Ohashi and S. Ohta

In Vitro Metabolism of Fenthion and Fenthion Sulfoxide by Liver Preparations of Sea Bream, Goldfish and Rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(2), 179-186 (2003).

- 5) S. Kitamura, M. Ohmegi, S. Sanoh, K. Sugihara, S. Yoshihara, N. Fujimoto and S. Ohta

Estrogenic Activity of Styrene Oligomers

after Metabolic Activation by Rat Liver Microsomes. *Environmental Health Perspectives*, 111(3), in press (2003).

- 6) O. Ueda, S. Kitamura, and S. Ohta
Deacylation of *N*-Arylformides and *N*-Arylacetamides by Formamidase in Rat Liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(12), 1297-1299 (2002).

- 7) S. Kitamura, N. Jinno, S. Ohta, H. Kuroki and N. Fujimoto

Thyroid Hormonal Activity of the Flame Retardants Tetrabromobisphenol A and Tetrachlorobisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(1), 554-559 (2002).

- 8) O. Ueda, S. Kitamura, and S. Ohta
Metabolism of 2-Nitrofluorene, an Environmental Pollutant, by Liver Preparations of Sea Bream, *Pagrus major*. *Xenobiotica*, 32(8), 667-682 (2002).

- 9) S. Kitamura, Y. Kohno, Y. Okamoto, M. Takeshita and S. Ohta

Reductive Metabolism of $\square\square$ -Ketoalkyne, 4-Phenyl-3-butyn-2-one, by Rat Liver Preparations. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(4), 414-420 (2002).

- 10) S. Sanoh, S. Kitamura, K. Sugihara and S. Ohta
Cytochrome P450 1A1/2 Mediated Metabolism of *trans*-Stilbene in Rats and Humans. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(3), 397-400 (2002).

- 11) S. Kitamura, Y. Shimizu, Y. Shiraga, M. Yoshida, K. Sugihara and S. Ohta

Reductive Metabolism of *p,p'*-DDT and *o,p'*-DDT by Rat Liver Cytochrome P450. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(2), 113-118 (2002).

- 12) K. Sugihara, T. Yamada, S. Kitamura, S. Ohta, K. Yamashita, S. Okamura, M. Yasuda, Y. Fujii-Kuriyama, K. Saeki, S. Matsui and T. Matuda

Ah-receptor-mediated induction of drug-metabolizing enzymes by indirubin and indigo. *Organohalogen Compounds*, 59, 453-456 (2002).

- 13) S. Kitamura, Y. Shiraga, Y. Shimizu, K. Sugihara and S. Ohta

Reductive Metabolism of *p,p'*-DDT and *o,p'*-DDT by Rat Liver Cytochrome P450. *Organohalogen Compounds*, 56, 37-40 (2002).

- 14) S. Kitamura, S. Sanoh, M. Ohmegi, T. Fujimoto, Y. Kohno, K. Sugihara, N. Fujimoto and S. Ohta

- Metabolic Activation of Proestrogens by Rat Liver Microsomes. *Environmental Sciences*, 9(2&3), 98 (2002).
- 15) Y. Shiraga, S. Kitamura, Y. Shimizu, K. Sugihara and S. Ohta
Metabolism of DDT by Rat Liver and the Inductive Effect on Drug Metabolizing Enzymes. *Environmental Sciences*, 9(2&3), 131 (2002).
- 16) T. Suzuki, S. Kitamura, S. Ohta and N. Fujimoto
Screening Test for Antiandrogenic Compounds in the Environment. *Environmental Sciences*, 9(2&3), 132 (2002).
- 17) K. Sugihara, T. Yamada, S. Kitamura, S. Ohta, K. Yamashita, S. Okamura, M. Yasuda, Y. Fujii-Kuriyama, K. Saeki, S. Matsui and T. Matuda
AhR-mediated Induction of Drug-Metabolizing enzymes by Indirubin and Indigo. *Environmental Sciences*, 9(2&3), 133 (2002).
- 18) S. Sanoh, K. Sugihara, S. Kitamura, S. Yoshihara, N. Fujimoto, H. Watanabe and S. Ohta
Structure-Activity Relationship and Effects of Estrogenic Stilbenes on Reproductive Organs. *Environmental Sciences*, 9(2&3), 134 (2002).
- 19) T. Fujimoto, S. Kitamura, K. Sugihara, S. Sanoh, S. Yoshihara and S. Ohta
Metabolic Activation of Proestrogen, 2-Nitrofluorene. *Environmental Sciences*, 9(2&3), 135 (2002).
- 59: 453-456, 2002. DIOXIN2002 August 11-16. 2002 Barcelona, Spain
- 2) 山田剛士、杉原数美、北村繁幸、太田茂、山下敬介、岡村さおり、安田峯生、藤井義明、佐伯憲一、松井三郎、松田知成
Ah receptor の内在性リガンド候補 indirubin による CytochromeP450 誘導、第 17 回 日本薬物動態学会 2002 年 11 月 20-22 日 講演要旨集 p182
- 3) 杉原数美、山田剛士、北村繁幸、太田茂、山下敬介、岡村さおり、安田峯生、藤井義明、佐伯憲一、松井三郎、松田知成
内在性 Ah レセプターリガンド候補 indirubin による酵素誘導と TCDD との競合作用、第 5 回環境ホルモン学会 2002 年 10 月 工講演要旨集 p321

2. 学会発表

- 1) Sugihara, K., Yamada, T., Kitamura, S., Ohta, S., Yamashita, K., Okamura, S., Yasuda, M., Fujii-Kuriyama, Y., Saeki, K., Matsui, S. and Matuda, T.
Ah-receptor-mediated induction of drug-metabolizing enzymes by indirubin and indigo. *Organohalogen Compounds*,

研究要旨：インディルビン (I_{db}) は Ah 受容体を介して非常に低濃度で CYP1A1 を誘導するが、その誘導程度は極めて低く、部分アゴニストである可能性が示唆されている。本研究では I_{db} のハロゲン置換体を合成し、その Ah 受容体阻害効果について検討した。その結果、5 位フッ素置換 I_{db} が、マウスにおいて Ah 受容体阻害活性を示し、ベンズピレンによる小核誘発性に対する抗変異原作用を有することが明らかとなった。

A. 研究目的

I_{db} はダイオキシンを凌駕する Ah 受容体結合活性を有していながら、ダイオキシンのような毒性は示さない。この両者の Ah 受容体介在性生理作用の質的・量的な違いを解明する目的で、I_{db} の Ah 受容体結合様式及び代謝経路を解明し、I_{db} が生体内における Ah 受容体保護物質である可能性について検討した。

B. 研究方法

合成したハロゲン置換 I_{db} 類について、ヒト Ah 受容体発現酵母株を用いたレポーター試験における Ah 受容体活性化能とマウスを用いた肝 CYP1A1 誘導試験を行い、これら化合物の Ah 受容体アンタゴニスト活性を調べた。さらに、マウス末梢血小核試験におけるベンズピレン (BaP) 誘発性染色体異常及び Ames 試験における BaP 誘発性復帰突然変異の両試験における I_{db} 類の抗変異原作用を検討した。

C. 研究結果

要約：5 位フッ素置換 I_{db} は、マウスにおいて BaP による CYP1A1 誘導を有意に抑制し、その結果、BaP 誘発性染色体異常に対し有意な抗変異原作用を示すことを明らかにした。

1. ハロゲン置換 I_{db} 類の合成

Fig. 1 に示したとおり、イサチン及びインドキシルアセテートのハロゲン誘導体から、5-F-I_{db}、5-Cl-I_{db}、5'-Br-5-F-I_{db}、及び 5'-Br-5-Cl-I_{db} の 4 種のハロゲン化 I_{db} を合成した。

2. Ah 受容体発現酵母株による Ah 受容体活性化試験 (Fig. 2)

上記の 4 種のハロゲン化 I_{db} の Ah 受容体活性化能についてヒト Ah 受容体発現酵母株を用いて I_{db} との比較検討を行った。その結果、5-F-I_{db} は I_{db} と同程度の Ah 受容体活性化能を有していたのに対し、5-Cl-I_{db} では I_{db} に比べやや弱い活性であった。さらに、5'位が臭素化された 5'-Br-5-F-I_{db} 及び 5'-Br-5-Cl-I_{db} では、何れも I_{db} の 1/100 程度の活性しか示さなかった。

3. マウスを用いた肝 CYP1A1 誘導試験における I_{db} 類のアゴニスト及びアンタゴニスト活性

データは示していないが I_{db}、5-F-I_{db} 及び 5'-Br-5-F-I_{db} を 7 週齢の雄 ICR マウス (一群 3-4 匹) に 5 mg/kg で腹腔内投与したところ、これらの 3 種の I_{db} 類は何れも 24 時間後において殆ど CYP1A1 誘導活性を示さなかった。

なお、CYP1A1 活性はエトキシレゾルフィン脱エチル化反応 (EROD) 活性及びウエスタンブロットリングによる CYP1A1 蛋白質の検出にて行った。

次に、BaP (100 mg/kg、腹くう内投与) によるマウス肝 CYP1A1 誘導に対する Idb 類併用投与による影響を検討した結果、Fig. 3 に示したように、Idb 併用により若干の CYP1A1 誘導阻害が見られた。阻害効果は 5 位フッ素置換体で増強が見られ、一方で 5'-Br-5-F-Idb では全く阻害効果が見られなかった。

4. BaP の染色体異常誘発性に与える Idb 類の抗変異原作用

BaP はそれ自身が誘導した CYP1A1 により代謝活性化を受け遺伝子傷害性を発揮することが知られており、マウス末梢血小核試験において有意な染色体異常誘発性 (小核形成率の増加) を示す。

上述の通り、Idb 類は BaP との併用投与時に Ah 受容体阻害効果を発揮することが明らかとなったので、マウス末梢血小核試験における BaP に対する抗変異原作用を検討した。その結果、Fig. 4 に示したように、BaP 100 mg/kg に対し 5-F-Idb 5 mg/kg の併用 (何れも腹くう内投与) により有意に小核誘発性が抑制された。Idb 併用においては若干の抑制が見られたが有意ではなかった。一方、5'-Br-5-F-Idb では全く抑制効果が見られなかった。

5. Ames 試験における Idb 類の抗変異原作用

Idb は BaP と同様に CYP1A1 によって代謝されることが示唆されている。そのため、競合的に BaP の代謝活性化を阻害する可能性も考えられる。そこで、Ames 試験において BaP の代謝活性化に及ぼす Idb 類の影響を検討した。Ames 試験はサルモネラ菌 TA100 を用いて、BaP 投与により CYP1A1 誘導を施した ICR マウスから調製した肝マイクロソーム存在下で

ブレインキューベーション法にて行った。

その結果 Fig. 5 に示したように、BaP 10 nmol/plate による復帰変異株数は、Idb 及び 5-F-Idb を 1/10 量併用しても殆ど減少しなかった。さらに、両化合物では BaP の 10 倍量を併用した場合においても有意な変異原性の減少は認められなかった。これに対し、5'-Br-5-F-Idb では BaP の 5 倍量以上の併用により有意な変異原性減弱効果が見られた。

D. 考察

今回用いたミラーらが開発したヒト Ah 受容体発現酵母レポーター試験系では、Ah 受容体のアンタゴニストとして知られる α -ナフトフラボンも陽性反応を示すことが確認されている。即ち、酵母レポーター試験系ではアゴニスト・アンタゴニスト共に Ah 受容体に対する親和性に応じて陽性反応 (リガンド活性) を呈することが示唆されている。

Idb は、本酵母レポーター試験系においてダイオキシンの 50 倍ものリガンド活性を有し、また、ヒト肝癌由来細胞 (HepG2) においてダイオキシンよりも低濃度で CYP1A1 mRNA を誘導することが松田らにより明らかにされているが、その CYP1A1 mRNA の誘導規模はダイオキシンの比べて極めて低い。従って、Idb は Ah 受容体の部分アゴニストであると考えられる。

今回の検討においても、マウスに Idb を 5 mg/kg で腹くう内投与した 24 時間後の肝臓では CYP1A1 の誘導は見られず、むしろ、BaP (100 mg/kg) との併用により若干の誘導阻害効果 (アンタゴニスト活性) が見られた。しかしながら、その阻害率は極めて低かった。これは、Idb の分子構造から推測すると、マウス体内で速やかに代謝消失していることが予想された。そこで、Idb の酸化的代謝部位と予想される 5 位並びに 5'位へのハロゲン置換体

の Ah 受容体への作用を Idb と比較検討した。その結果、5 位フッ素置換 Idb では CYP1A1 誘導阻害の増強が見られたのに対し、5'-Br-5-F-Idb では誘導阻害が全く見られなかった。酵母レポーター試験系におけるリガンド活性は、5-F-Idb は Idb と同程度の活性を有してしたが、5'-Br-5-F-Idb は Idb の 1/100 程度の活性しか認められなかったことから、5'位への臭素置換による Ah 受容体への親和性の低下が CYP1A1 誘導阻害能の消失に深く関与していると思われる。

さらに、BaP によるマウス末梢血小核誘発に対する Idb、5-F-Idb 及び 5'-Br-5-F-Idb の抗変異原作用は、マウス肝 CYP1A1 誘導阻害能と良く相関していた。この結果は、5-F-Idb による抗変異原作用が、Ah 受容体阻害に起因していることを強く示唆している。

一方で、Idb 類の Ames 試験における CYP1A1 酵素活性阻害による BaP への抗変異原作用は、非常に弱い事が明らかとなった。Ames 試験 (in vitro) では僅かに抗変異原作用を示した 5'-Br-5-F-Idb が、in vivo (マウス小核試験) では抗変異原作用が見られなかったことから、5-F-Idb の BaP に対する抗変異原作用が Ah 受容体阻害に基づくものであることを強く示唆している。

E. 結論

Idb は、マウスにおいて BaP による遺伝子傷害性に対し弱いながらも抗変異原性を有しており、その作用起序には Ah 受容体への部分アゴニスト作用による CYP1A1 誘導阻害が関与していることが示唆された。さらに、その抗変異原性は 5 位へのフッ素置換により増強されることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

K Saeki, T Matsuda, T Kato, K Yamada, T

Mizutani, S Matsui, K Fukuhara, & N Miyata, Activation of the human Ah receptor by aza-polycyclic aromatic hydrocarbons and their halogenated derivatives, *Biol. Pharm. Bull.* (2003) 26, in press.

K Yamada, T Suzuki, A Kohara, M Hayashi, A Hakura, T Mizutani, & K Saeki, Effect of 10-aza-substitution on benzo[a]pyrene mutagenicity in vivo and in vitro, *Mutat. Res.* (2002) 521, 187-200.

T Kato, T Matsuda, S Matsui, T Mizutani, & K Saeki, Activation of the aryl hydrocarbon receptor by methyl yellow and related congeners: structure-activity relationships in halogenated derivatives, *Biol. Pharm. Bull.* (2002) 25, 446-471.

Y Hirano, M Uehara, K Saeki, T Kato, K Takahashi, & T Mizutani, The influence of quinolines on coumarin 7-hydroxylation in bovine liver microsomes and human CYP2A6, *J. Health. Sci.* (2002) 48, 118-125.

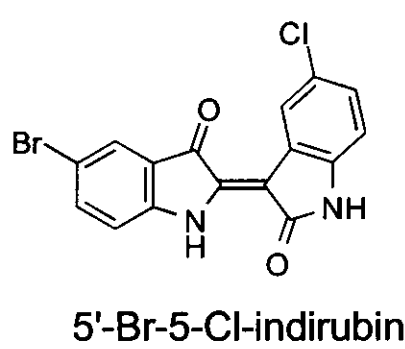
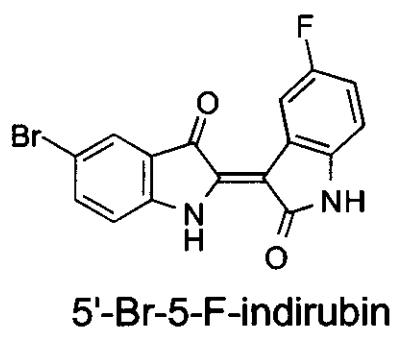
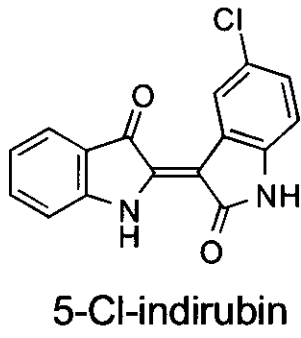
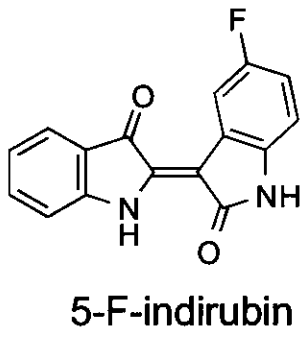
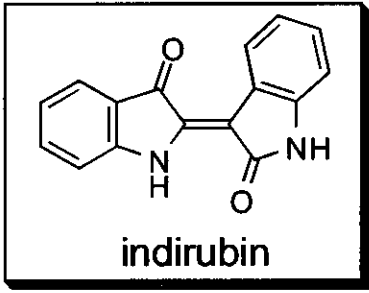
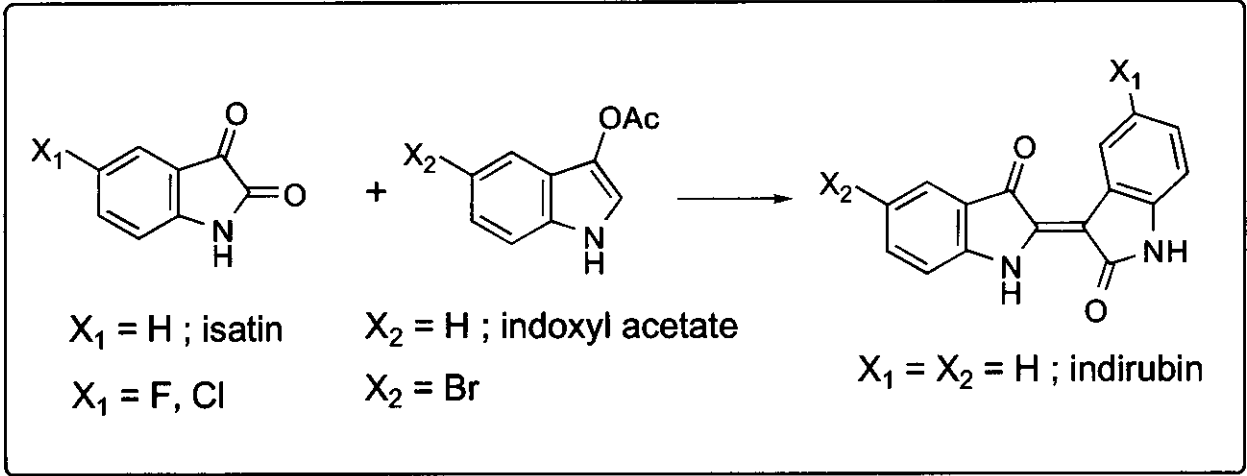


Fig. 1 インディルビン及びそのハロゲン誘導体の合成経路

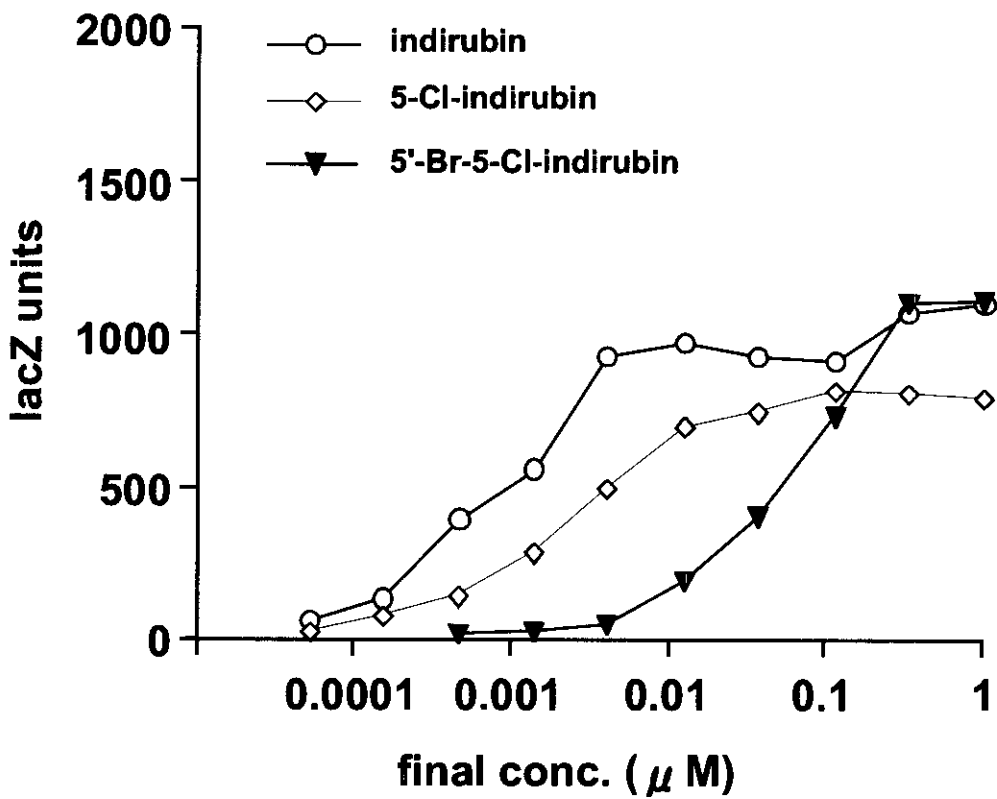
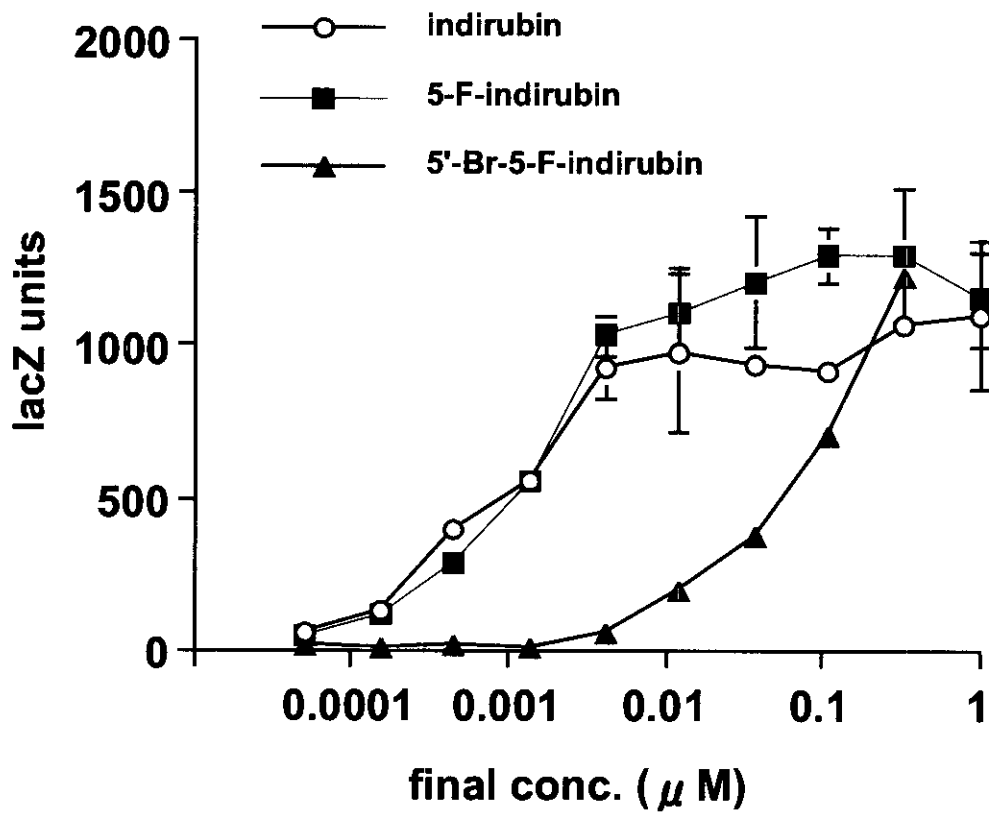


Fig. 2 インディルビン誘導体の酵母レポーターアッセイにおけるAh受容体活性化能

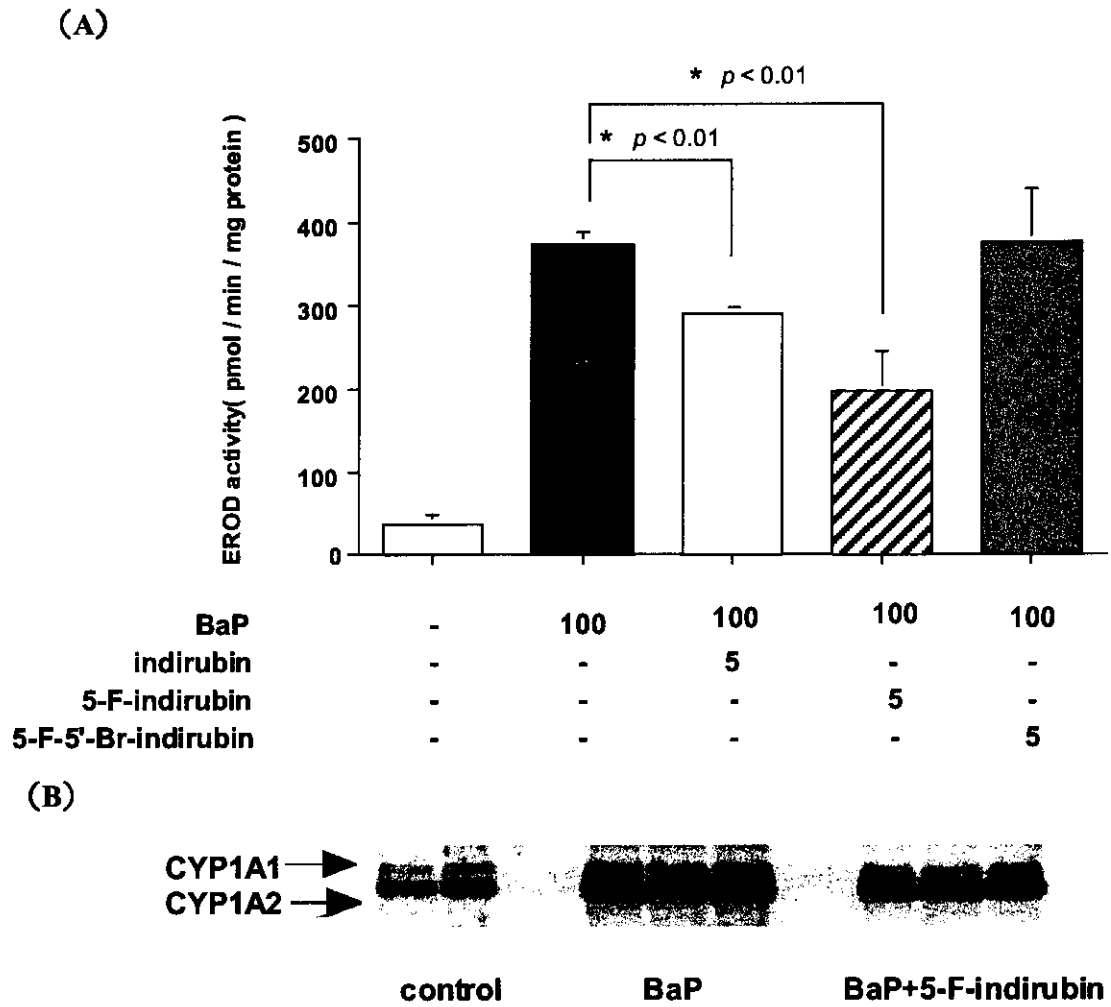


Fig. 3 (A) indirubin とそのハロゲン誘導体の *in vivo* CYP1A 誘導阻害能
 (B) Western blotting による解析

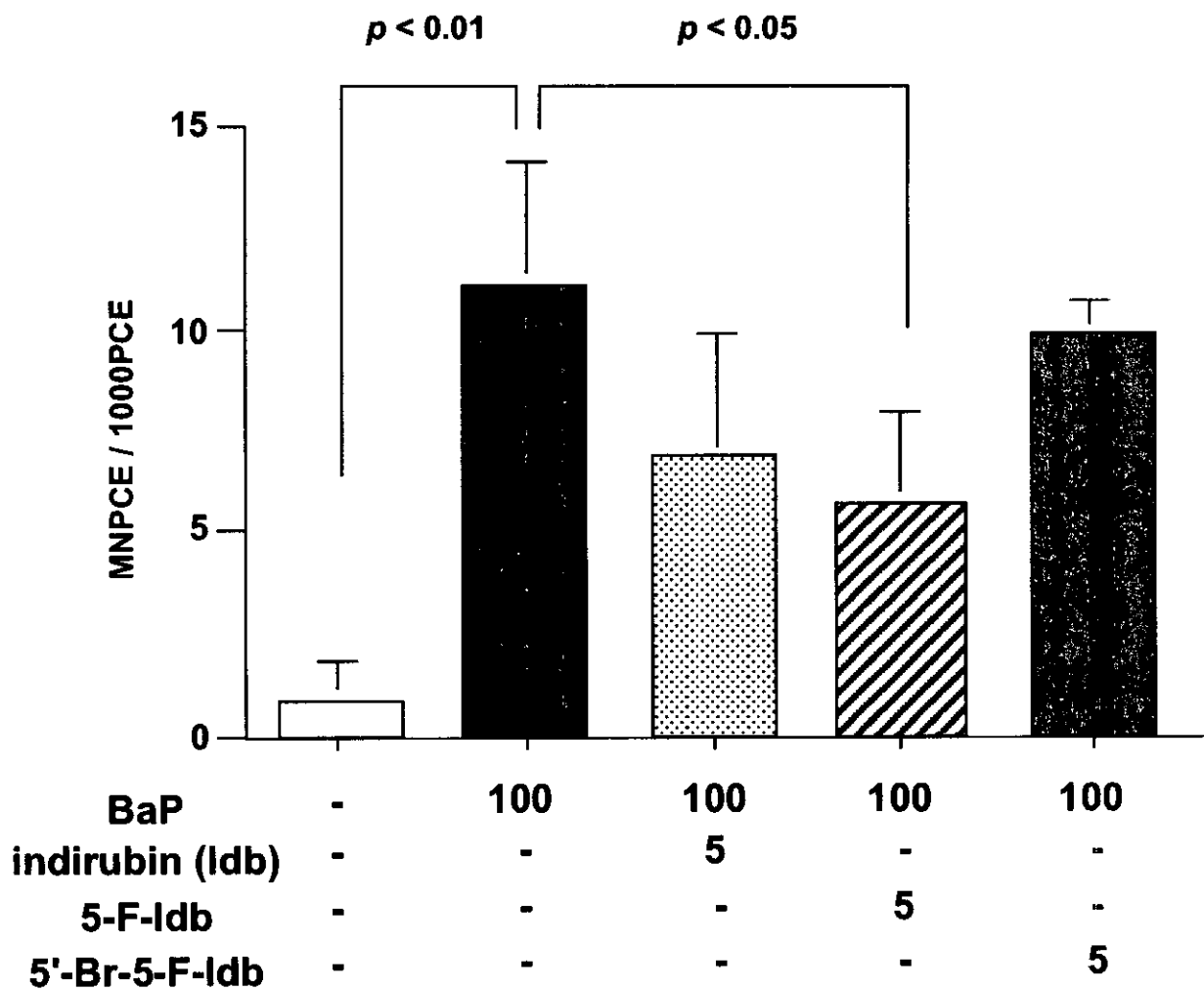


Fig. 4 BaPの染色体異常誘発性に与えるindirubin誘導体の効果

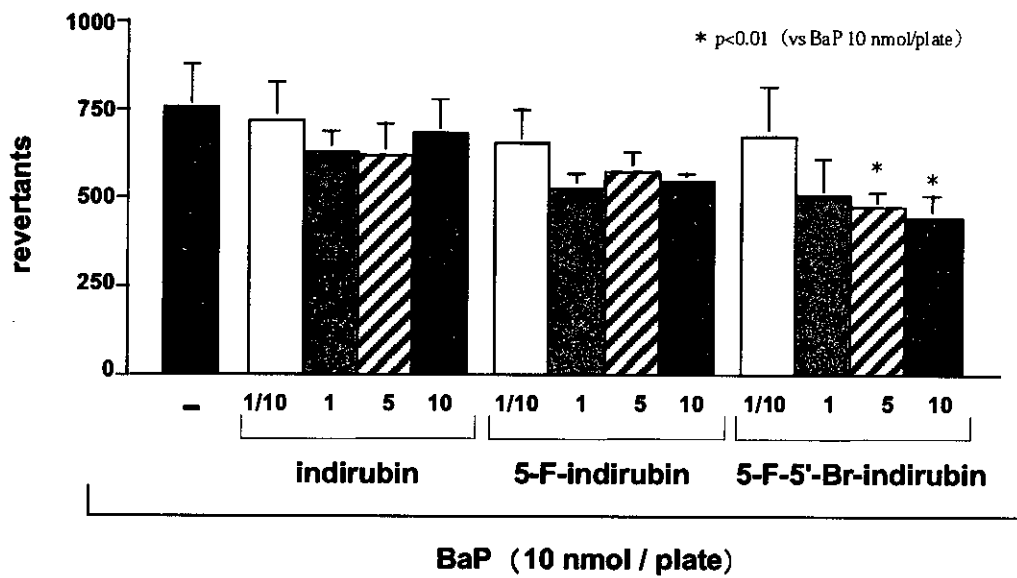


Fig. 5 BaP の変異原性に対する indirubin 類の抗変異原性

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

インディールビン等の Ah 受容体を介する生体反応機構の解析

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨

ダイオキシン受容体(AhR)の生理的リガンドとされるインディールビンの AhR を介した生体影響を遺伝子発現プロファイルにより解析する。野生型マウス由来の MEF 細胞において、*in vitro* 曝露実験を行ったところ、TCDD, TCDF と共通する発現誘導遺伝子に加え、多数のインディールビン特異的な発現誘導遺伝子を得た。このことから、インディールビンは 1) AhR を介した生理活性を有すること、2) 生理的リガンドとしての、TCDD, TCDF とは異なる活性機序を有していることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシン受容体のリガンドとして体内より見いだされたインディールビン類の AhR を介した生体影響を遺伝子発現プロファイルにより解析する。

B. 研究方法

野生型および AhR ノックアウトマウスに由来する MEF(mouse embryonic fibroblast) 細胞に対する影響を、Taqman PCR や GeneChip を用いた遺伝子発現プロファイルリングによりインディールビン及び TCDD, TCDF が惹起する生体反応の分子機序について、網羅的に検討する。

(倫理面への配慮)

実験動物個体の犠牲を最小にするため、*in vitro* 系として、wild type マウス及び AhR 欠損マウスより MEF 細胞を作成しこ

れを用いて実験を行う。使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、当研究施設はそのモデル施設となっている。

C. 研究結果

MEF 細胞を作成し、インディールビン及び TCDD, TCDF の曝露実験を行った。特に初期応答遺伝子群を検索するために曝露開始後 3hr, 8hr について RNA を抽出、Affymetrix GeneChip MU74Av2 を用いて遺伝子発現を網羅的にモニターした。今回は生理的リガンドとしてのインディールビンの特徴づける分子生物学的指標を検討する目的でインディールビン曝露により特異的に誘導される遺伝子を絞り込んだところ、3hr