

cytochrome P450など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価

(分担) 研究者 藤田 正一 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

シトクロムP450 (P450, CYP) は広範な生物種に存在し、生理活性物質の生合成や、医薬品・環境汚染物質などの代謝排泄に関与する、生体のホメオスタシス維持の為に重要な酵素である。CYPの発現調節機構はさまざまであるが、年齢、臓器によってCYP分子種の発現パターンが異なっていることが報告されている。多くのCYP分子種は、ステロイドホルモンやエイコサノイド、サイトカインなどによる発現制御を受けている。従って、これらの生理活性物質が大きく変動する妊娠期や性成熟は、CYP活性を左右する大きな要因となっている。

そこで、CYPなどの薬物代謝酵素を中心に、母体、胎盤、胎児の薬物代謝の差に関する最近の知見について文献調査を行った。母親および胎児・新生児の外来異物の代謝能に関し、胎児・新生児肝臓および胎盤におけるCYPや、抱合酵素などのPhaseII酵素の発現は、一部のステロイドホルモン代謝酵素を除くと成人に比べて低い為、母体肝臓における代謝能が薬物・環境汚染物質のクリアランスを決定していることが示唆される。妊娠期には、一部CYP2DなどのP450分子種に関して、母体肝臓で活性が上昇している可能性も報告されている。しかし、多くの環境化学物質の代謝に関与するCYP、抱合酵素の発現、誘導は妊娠時の母体肝臓では抑制されることが分かった。

さらに、得られた知見を元に、実際に妊娠ラットを用いて母体肝臓における各CYP分子種の発現レベルや、aniline, propranolol, ethanolなど薬物あるいは外来異物の代謝活性について測定した。CYP2Dサブファミリーに関しては妊娠期に活性が増加するが、その他のCYP分子種、CYP2B, CYP2E, CYP2C, CYP1A2に関しては、蛋白発現量あるいは薬物代謝活性が、妊娠期に顕著に減少することが明らかとなった。

また、一方で、CYP遺伝多型による代謝能の違いは薬物や環境化学物質の薬効・毒性を決定する重要なファクターとなっている。P450には様々な分子種が存在するが、CYPの遺伝多形によって、薬物を中心とした外来異物のクリアランス、毒性発現が異なることが報告されている。また、そこで、P450及びその制御機構に存在する遺伝多形について、新規SNPs解析方法の開発を試みた。本研究では、異物代謝酵素群及びその調節因子の遺伝的多形を一度に解析するために、新規マイクロアレイを作成した。

研究協力者

数坂昭夫

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教授

石塚真由美

北海道大学大学院獣医学研究科・助手

活性物質の生合成・代謝を行うと同時に、医薬品や環境汚染物質など、多くの外来異物代謝も担っている一酸素添加酵素である。CYPには様々な分子種が存在し、哺乳類では数百に及ぶ分子種が報告されている。

CYPは外来異物の代謝に対して働く重要な薬物代謝酵素群であるが、同時に生理活性物質の生合成や異化も行うため、多くのCYP分子種は、ステロイドホルモンやエイコサノイド、サイトカインなどによる発現制御を受けている。従って、これらの生理活性物質が大きく変動する妊娠期や性

A. 研究目的

Cytochrome P450(P450, CYP)は細菌、植物から哺乳類まで多くの生物種に存在し、ステロイドホルモンやビタミン、エイコサノイドなどの生理

成熟は、CYP活性を左右する大きな要因となっている。実際、ラットを用いた実験から、妊娠中は、母体側のCYP1Aサブファミリーやグルクロン酸抱合酵素の誘導能や活性が減少するとの報告もあり、この時期に曝露され、生体に取り込まれた環境化学物質は通常とは異なる速度で代謝・排泄過程を経ることも考えられる。妊娠期の環境化学物質や薬物への曝露は、胎児に不可逆的な影響を与える可能性も考えられる。そこで、特にCYPを中心に、母体、胎盤、胎児の薬物代謝の差に関する最近の知見について文献調査を行った。

また、得られた知見を元に、母体肝臓におけるCYP発現量や、薬物代謝活性の変動について、妊娠ラットをモデルとして研究を行った。

一方で、CYP遺伝多型による代謝能の違いは薬物や環境化学物質の薬効・毒性を決定する重要なファクターとなっている。例えば、CYP2D6はヒトにおいて、肝臓における総CYP発現量の2-10%を占めているに過ぎないが、ヒト臨床に用いられる薬物の3割以上に関与する。同時に、debrisoquine や bunitrolol、bufuralol、propranololなどの薬物代謝活性は日本人や中国人において白人よりも低く、その低活性の原因が遺伝的多形（主にCYP2D6*10）に起因することも報告されている。また、450は薬物だけではなく、喫煙物質や食物由来の外來異物も代謝するため、CYP1A1遺伝多形と肺癌、CYP1B1遺伝多形と大腸癌発生率との関係も報告されている。そこで、P450及びその制御機構に存在する遺伝多形について、新規SNPs解析方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 母と子の薬物代謝の差

ヒトにおける母と子の薬物代謝、特に、母体肝臓、胎児肝臓、胎盤に発現するCYPを中心に、その発現レベルやパターンの違いについて文献を調べた。

2. 妊娠ラットの母体肝臓における薬物代謝能の変動

妊娠ラットをモデルとして、妊娠中にCYP各分子種の発現や薬物代謝活性がどのように変動するのかを調べた。妊娠0日目、10日目、11日目、15日目、18日目、20日目のWistarラットについて、肝臓を採取し、マイクロソームにおけるCYP発現や薬物代謝活性を測定した。

薬物代謝活性の基質には、実際にヒト臨床に用いられる薬剤も含め、propranolol R体およびS体、imipramine、amitriptyline、p-nitrophenol、aniline、ethanolを用いた。Propranolol、imipramine、amitriptylineについては、それぞれ低基質（各薬剤5 μ M）および高基質濃度（propranolol 1000 μ M、imipramine 700 μ M、amitriptyline 100 μ M）において反応を行い、HPLC-UVによって代謝物の分析を行った。p-nitrophenol、aniline、ethanolはそれぞれ100 μ M、2mM、50mMの基質濃度で反応を行い、吸光光度計にて代謝活性の測定を行った。

妊娠時のラット肝臓に発現するCYP各分子種発現量の変動はCYP2B1、CYP2B2、CYP2E1、CYP2C12に特異的な各抗体（ウサギ血清）を用い、Western blottingによって解析した。

3. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

薬物代謝酵素に存在する遺伝的多形を簡便に調べる為に、マイクロアレイを用いた方法の開発を試みた。マイクロアレイ法ではサーマルサイクラー以外の特異な機械を必要とせず、発色によって変異アレルを検出することができ、また、一度に多数の遺伝子について調べることができる。また、PCR簡略化によって、PCR-RFLP法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができる可能性がある。

そこで、P450などの薬物代謝酵素から、実際にfunctionにつながる変異であること、日本人に多型が多い変異であること、を考慮してアレルを選定し、マイクロアレイの作成を行った。

（倫理面への配慮）

動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。また、遺伝子解析に関する本研究は、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。

C. 研究成果

1. 母と子の薬物代謝の差

（1）ヒト CYP ファミリー

CYPは巨大なスーパーファミリーを形成しており、アミノ酸の相同性によって、分子種名が決められている(1, 2)。40%以上相同性を持つものをファミリー、55%以上相同性を持つものをさらにサブファミリーとしている。これまでの研究において、ヒトではCYP1、CYP2、CYP3、CYP4、CYP5、CYP7、CYP8、CYP11、CYP17、CYP19、CYP21、CYP24、CYP26、CYP27、CYP39、CYP46、CYP51ファミリーがクローニングされ、それらの酵素学的性質が明らかにされている(表1)。CYPの中でも、CYP1、CYP2、CYP3、CYP4ファミリーは生理活性物質以外にも、様々な外来異物の代謝に関与することが知られており、ダイオキシン類や多環芳香族、PCB、農薬などを代謝する。外来異物代謝CYP分子種の調節因子として、AhR (aryl hydrocarbon receptor) やPXR (pregnane X receptor ; NR1I2)、CAR (constitutive androstane receptor; NR1I3)、PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) が知られているが(3)、これらの受容体群は、ダイオキシン類やPCB、フタル酸エステルなどのリガ

ンド受容体にもなっている。多くの環境汚染物質はこれら受容体群を活性化し、CYP各分子種の発現量に影響を与える。最近では、CYP2C9がPXRで転写制御されていることも報告された(4, 5)。また、外来異物だけではなく、ステロイドホルモンであるprogesteroneやandrogensがCARを抑制し、また反対にestrogensはCARを活性化することが明らかとなった(6)。

（2）成人肝臓、胎盤、胎児肝臓に発現する CYP

これまでの報告で、ヒト肝臓および胎盤のCYP分子種の発現パターンは異なることがわかっている。最近、Nishimuraらによって、ヒト成人肝臓、胎児肝臓、胎盤に発現する30種のCYP分子種(CYP1A1、1A2、1B1、2A6、2A7、2B6、2C8、2C9、2C18、2C19、2D6、2E1、2J2、3A4、3A5、3A7、4A11、4F2、4F3、5A1、7B1、8A1、8B1、17、26A1、27、27B1、39A1、46、51)の発現パターンが報告された(7)。

図1にそれらの発現量を補正したグラフを示す。成人ヒト肝臓では、CYP2A6やCYP2E1mRNAの発現量が多い。一方、胎児では、CYP2E1のほか、CYP4A11、CYP3A7、CYP8B1やCYP51の発現が比較的多い。以下に胎児肝臓に発現する各CYP isoformの特性について述べる。

CYP2E1は、acetaminophen、halothane、chlorzoxazone、四塩化炭素などを基質とし、ethanolやtolueneなどアルコールや有機溶剤によって誘導を受ける。CYP2E1は妊娠90日前の胎児肝臓ではほとんど発現していない(8)。

CYP4ファミリーは、脂肪酸やarachidonic acid、prostaglandin Aなどエイコサノイドの水酸化を行っている(9)。ヒトCYP4A11はBellらによってクローニングされ(10)、その後、脂肪酸の ω 水酸化を行うことが明らかとなった(11) CYP4ファミリーの転写調節因子として、PPAR α が報告されており、そのリガンドとして、脂肪酸、leukotriene B4 や8(S)-hydroxyeicosatetraenoic acidが知られている(12, 13, 14)。

また、ヒトのCYP3AサブファミリーはCYP3A4、

CYP3A43、CYP3A5、CYP3A7が同定されている。特にadultではCYP3A4の肝臓における発現は多く、薬物代謝の50%に関与すると考えられている(15)。CYP3A4の基質となるのは(16)、ステロイドホルモンであるtestosterone、progesterone、androstenediol、DHEAや胆汁酸である。また、医薬品ではquinidine、nifedipine、diltiazem、lidocaine、lovastatin、erythromycin、cyclosporin、triazolam、midazolamなどを代謝することが報告されている。ヒトCYP3Aサブファミリーはrifampicin、dexamethasone、nifedipine、phenobarbitalなどで誘導を受けることがわかっている。また、CYP3Aの転写がPXRやCARで制御されていることが報告された(17, 18, 19, 20)。CYP3A4には性差が存在し、女性の方が発現量が高い。しかし、CYP3A4の転写を制御するPXRの発現に性差は存在せず、P糖タンパクの発現にも性差は認められなかった(21)。

胎児肝臓では、成人肝臓と異なり、CYP3A7が特異的に発現している。分娩直前までCYP3A7の発現は継続し、生後はCYP3A4の発現量が増加することがわかっている。図に胎児期から新生児期におけるCYP分子種の発現パターンを示す(図2)。また、CYP3A7の胎児期における生理的な機能はDHEAなどステロイドホルモンの調節であると考えられている(図3)(22)。最近では、Chenらによって、CYP3A7の基質の一つがレチノイン酸であることが報告され、CYP3A7がステロイドホルモンだけではなく、CYP26とともに、発達期のレチノイン酸のホメオスタシスにも関与していることを明らかにした(23)。

CYP8B1はGafvelsら(1999)によってヒトおよびマウスよりクローニングされた(24)。CYP8B1プロモーターはhepatocyte nuclear factor-4-alpha(HNF4A)によって活性化される(25)。CYP8B1はsterolの12 α 位水酸化を行っており、水溶性の変化によって胆汁酸の生体内動態と濃度を調節していることが報告されている(26)。

CYP51は微生物、植物や動物に広く分布するCYP分子種であり、コレステロールの生合成の

key stepであるsterolの14 α 位脱メチル化反応を行っている(27)。

従って、胎児期の肝臓に主に発現しているCYPは、ステロイドホルモン、コレステロール、脂肪酸、胆汁酸、レチノイン酸などの生理活性物質を水酸化する分子種である。成人肝臓のCYP発現レベルに対する胎児肝臓CYP発現量の比からも、胎児肝臓では、CYP3A7、CYP11A、CYP19などが、成人の肝臓に比べて特異的に発現していることが明らかである(図4)。すなわち、胎児肝臓では、CYPは主に生理活性物質の調節に寄与していることが考えられる。

一方、実験動物では、胎児肝臓を成体に移植し、胎盤通過効果を見逃して胎児の肝臓におけるCYP誘導能を調べた報告がある。胎仔肝臓をadultラットに移植し、 β -naphthoflavone、phenobarbital、dexamethasoneを投与した実験では、胎仔の肝臓でCYP1A、CYP2BそしてCYP3Aが誘導されることが明らかとなった(28)。1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxinを分娩後の母親に投与したラットの実験では、1,2,3,4-TCDDが乳汁によって新生仔に移行し、新生仔の肝臓でCYP1A1依存のethoxyresorufin-o-deethylase(EROD)活性が上昇し、CYP1A2依存のmethoxyresorufin-o-demethylase(MROD)もわずかではあるが上昇することが分かった(29)。また、dexamethasoneやpregnenolone-16 α -carbonitrile(PCN)を妊娠ラットに曝露した実験では、胎仔肝臓においてCYP3A1が誘導されることが報告されている(30)。また、妊娠16週から24週のヒト胎児肝臓ではCYP2E1が発現しており、妊娠19、23、25週齢の胎児の初代肝培養細胞を用いた実験でも、ethanolやclofibrateによって、非曝露時に比べてCYP2E1の発現量が増加することが報告されている(31)。CYP2Bサブファミリーはニコチンを代謝するため、CYP2Bの代表的な誘導剤であるPhenobarbital投与だけではなく、smokingによっても発現誘導を受ける。最近、母親のsmokingによって、ラット新生仔肝臓においてCYP2B発現の上昇が報告された(32)。以上の報告からも、胎児肝臓におい

でも、成人肝臓と同様に、薬物代謝酵素の発現の誘導が起こることがわかった。

一方、胎児期に発現する主要なP450 isoformのCYP3Aサブファミリーはコカインを代謝する。成人や胎児肝臓ミクロソームを用いた実験では、コカインN脱メチル化（CYP3A依存）は胎児肝ミクロソームのほうが低いKmを示し、P450あたりのコカインのクリアランスは胎児肝臓のほうが早いことが分かった（33）。しかし、実際には、肝臓に発現するP450量の差から、コカイン代謝活性は、胎児肝臓よりも成人肝臓のほうが高い。前述したCYP2Bサブファミリーのsmokingによる誘導に関しても、新生仔肝臓で誘導されたCYP2B発現レベルは、adultラット非誘導時の1/10程度に過ぎない。また、CYP1A2はadultの肝臓において恒常的に発現しているが、新生仔ラットでは肝臓のCYP1A2依存MROD活性はadultラットの1/10以下である。羊などのモデル動物を用いて胎仔の肝臓における薬物代謝能を測定した実験では、胎仔肝臓における薬物基質（propranololなど）の代謝体の濃度はadultに比べると低いことが報告されている（34, 35）。

CYPによるphase Iの反応の後、多くの基質はphase II酵素による修飾を受ける。Phase II反応を担う主要酵素のグルクロン酸抱合酵素（UGT）には、CYPと同じく、多くの分子種が存在する（36）。環境ホルモンであるxenoestrogenなどを抱合するUGT2Bはラットでは生後21日目にadultとほぼ同程度の活性まで上昇するが、生後3日目の新生児期のラットでは、肝臓におけるUGT2B1活性は、adultの肝臓に比べて40-80%に減少していることが報告されている（37）。

胎盤では、CYP11やCYP19の発現が認めらるが、CYP発現量は胎児の肝臓に比べてさらに低い。さらに、dexamethasone やPCNの妊娠ラットへの投与では、胎盤におけるCYP3A1発現は低く、このCYPに関しては胎盤では誘導能がほとんどないことが明らかとなった。またsmokingによるCYP2Bサブファミリーの誘導も、ラットおよびヒトの胎盤においては認められなかった。

以上の知見から、外来異物を代謝するCYP分子種の発現レベルは、成人肝臓>胎児肝臓>胎盤の順で、妊娠時に、外来異物のクリアランスを決定するのは、母体肝臓であることが考えられる。

（3）妊娠期における母体肝臓の薬物代謝酵素

これまでの知見から、妊娠時の外来異物のクリアランスに寄与するのは、主に母体肝臓であることが示唆された。しかし、妊娠時には、母体肝臓におけるCYP分子種は通常の成人のCYP発現とは異なるパターンを示すことも報告されている。CYP1ファミリーの一つCYP1B1はextra hepaticなCYP分子種で、通常、肝臓よりも血液中の発現量のほうが20%程度多い（38）。女性の血液中でのCYP1B1発現量は男性に比べて有意に高いことも報告されているが（39）、妊娠期間に血液中のCYP1B1mRNA発現量は変動しないことが報告されている（40）。しかし、同じCYP1ファミリーに関し、ラットを用いた実験から、妊娠中は、非妊娠時に比べて、母体側のCYP1Aサブファミリー誘導能や活性が減少するとの報告がある（41）。また、喫煙によるCYP2Bサブファミリーの肝臓での誘導は、非妊娠時と違って妊娠時にはほとんど起こらないことがラットの実験から報告されている。

CYPによる代謝の後、多くの薬物はphase II酵素による抱合を受け、水溶性を増して排泄されやすくなる。しかし、妊娠中に曝露され、生体に取り込まれた環境化学物質は、通常とは異なる速度で代謝・排泄過程を経ることが考えられる。グルクロン酸抱合酵素分子種のひとつで、bisphenol Aやnonylphenol、DESなどのxenoestrogenの代謝に関わるUGT2B1の活性は、妊娠期には非妊娠児期の10-20%減少することがラットを用いた実験から報告された。UGT2B以外にも、妊娠期には、UGT1ファミリーの代謝活性も減少することが報告されている（42）。UGT1A1、UGT1A5、UGT1A6、UGT1A7は、妊娠期において、mRNA発現レベルは抑制されていないが、蛋白発現量が非妊娠時の30%以下に減少していた。

また、妊娠期における高血糖因子は先天性異常

を引き起こす要因となることが報告されているが、その原因としてoxidative stressの増加が報告されている（43）。4-hydroxy-2(E)-nonenal（4 HNE）は、リノール酸やアラキドン酸などの ω 6系高度不飽和脂肪酸が酸化ストレスをうけることでnon-enzymaticに生成されるアルデヒドであり、activeで毒性が強い（44）。4 HNEはphase IIのグルタチオン抱合酵素のひとつGSTA4-4によって抱合を受け、解毒されることが報告されている（45）。従って、抱合酵素GSTは妊娠期における生体の酸化機構に重要な因子のひとつである。実際、MnSOD（manganese superoxide dismutase）の多型とともに、GST M1が欠損する遺伝多型null typeでは、子宮においてoxidative stressの指標となる8-OHdGの生成量が多いことが報告されている（46）。

妊娠時に1-3%の合併が報告されている高血糖について、ラットを用いた実験が行われているが、高血糖妊娠ラットの膵臓ではCYP2E1依存の代謝活性が上昇するとともに、母体肝臓のGSTの発現および代謝活性が低下し、脂質の過酸化が増加することが報告されている（47）。一方、糖尿病患者の胎盤に発現するCYP1A依存EROD活性は非糖尿病患者と差はなかったが、胎盤GST依存のCDNB抱合活性は、糖尿病患者では対照群に比べると有意に増加していることが報告された（48）。しかし、顕性糖尿病では、胎盤においてGST活性が顕著に減少することも報告された（49）。

従って、一部CYP2Dサブファミリーについて、母体肝臓での発現の上昇の可能性も報告されているが（50）、妊娠期において、多くのCYP分子種やUGT分子種の発現レベルが減少し、それらの酵素群の誘導能の低下することから、この時期の環境化学物質や薬物への曝露は、薬剤クリアランスの変化から、体外への排泄が遅れ、胎児に不可逆的な影響を与える可能性も考えられる。

そこで、次に、実験動物ラットを用いて、実際にヒトの臨床に用いられる薬物や、アルコールを基質として、妊娠期中の母体肝臓における薬物代謝能の変化を経時的に調べた。

2. 妊娠ラットの母体肝臓における薬物代謝能の変動

妊娠期におけるラットの母体肝臓のCYP発現量は非妊娠期に比べて有意に減少した（対照群の約70%）。しかし、CYP、特にCYP1ファミリーに電子伝達を行うcytochrome b5の発現量に変化は見られなかった（図5）。

表に各薬剤（propranolol R体およびS体、imipramine、amitriptyline、aniline、p-nitrophenol、ethanol）を基質としたときの、妊娠期のラット肝臓ミクロソームにおける薬物代謝活性の変動を示す（表2）。

propranolol は β 1受容体を遮断する作用があるため、臨床において抗高血圧薬、特に抗不整脈薬として用いられている。propranolol R体について、妊娠前期（妊娠15日齢まで）に、5位水酸化活性の上昇と、N脱イソプロピル化活性の減少が認められた（図7）。また、三環系抗鬱剤の一つであるimipramineをモデル薬物として妊娠ラット肝ミクロソームで代謝させたところ、低基質濃度（5 μ M）では代謝活性に大きな変動は見られなかったが、高基質濃度（700 μ M）ではN脱メチル化活性の顕著な低下が妊娠時期に認められた。amitriptylineは低基質、高基質濃度のいずれも、代謝活性に関して妊娠による影響は認められなかった。

aniline、p-nitrophenol、ethanolの水酸化活性は妊娠期には非妊娠期の50%まで減少した。各薬剤の代謝活性の減少は基質によって異なるが、特にCYP2E1依存の代謝活性であるaniline水酸化は全妊娠期を通して低活性であった（図8）。

CYP 2 C12、CYP2B1、CYP2B2、CYP2E1に特異的な各抗体を用いて行ったWestern blottingの結果から、いずれの分子種も妊娠期では非妊娠期に比べて蛋白発現量が減少することが分かった（図6）。

3. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

P450はCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調節因子として、GSTM1、GSTP1、NAT2、AhR、PPARの11遺伝子、の32アレルをリストアップした（表3）。

変異場所の増幅にPCRを用いるため、multiplex PCRによる条件設定を行ったところ、GST nullやCYP2D6 deletionに関しては遺伝多型の検出が困難だった為、これらのアレルを除いた遺伝子についてwild、変異アレルのDNAを合成してスライドグラスにスポットティングし、マイクロアレイを作成した。PrimerはPCR産物が数100bp以内になるように設計し、multiplex PCRを3回に分けて行った。得られたPCR産物は、混合してスライドグラス上のオリゴDNAにハイブリダイズし、ペルオキシダーゼによって発色させ、アレルの判定を行った。

D. 考 察

胎児期の肝臓に主に発現しているCYPは、CYP3A7、CYP11A、CYP19など、ステロイド、コレステロール、脂肪酸、胆汁酸、レチノイン酸などの生理活性物質を水酸化する分子種であることが明らかとなった。これらのCYP分子種では、CYP3Aを除くと基質特異性が狭く、外来異物の排泄には余り関与していない。従って、胎児肝臓では、発現するほとんどのCYPは生理活性物質の調節に寄与していることが考えられる。従って、母体肝臓における代謝能が、胎児期の薬物・環境汚染物質のクリアランスを決定していることが示唆される。しかし、妊娠時期には、母体側の肝臓に発現するCYPやグルクロン酸抱合酵素の誘導能や活性が減少するため、外来異物の代謝・排泄能が通常よりも低いことが考えられた。

我々の研究においても、モデルや薬物として用いたpropranololの代謝活性に関して、妊娠期に5位水酸化活性の上昇が認められたものの、N脱イソプロピル化活性は減少していた。ラットおよび

ヒトにおいて、propranolol5位水酸化はCYP2D6あるいはCYP2D2のCYP2Dサブファミリー、propranolol脱イソプロピル化活性はCYP1A2が行っていることがわかっている。これまでの報告でヒト妊娠期ではCYP2D6発現上昇を示唆する報告があるが、実際、ラットの妊娠期においてもCYP2Dサブファミリー依存の代謝活性は増加していた。しかし、総CYP量や、CYP2D以外のCYP2B、CYP2C、CYP2E、CYP1A分子種に関しては、蛋白発現量あるいは代謝活性は妊娠期に顕著に減少しており、この時期に薬剤のクリアランスが通常と異なること、代謝活性が抑制されていることが分かる。

一方、ヒトCYPのSNPsなど遺伝多型解析において、multiplex PCR法を用いたマイクロアレイ解析法は、従来のPCR-RFLP法よりも簡便に多くの変異アレルの遺伝多型検出を行うことができる可能性がある。しかし、マイクロアレイ法による判定では、PCRの正確性やハイブリダイゼーション上の都合から、極端に大きなPCR産物（数10kbpなど）を用いた実験は難しい。特に、CYP2D6 deletion、GST nullなどのdeletion アレルは、数イントロン、エクソンにまたがる繰り返し配列が原因で起こっていると考えられる為、各アレルに特異的なPCR産物の作成が難しかった。

E. 結 論

母親および胎児・新生児の外来異物の代謝能に関し、胎児・新生児肝臓および胎盤におけるCYP、抱合酵素などPhase II酵素の発現は、一部のステロイドホルモン代謝酵素を除くと成人に比べて低い為、母体肝臓における代謝能が薬物・環境汚染物質のクリアランスを決定していることが示唆される。しかし、一部CYP2DなどのP450分子種に関しては、母体肝臓で活性が上昇している可能性があるが、多くの環境化学物質の代謝に関与するCYP、抱合酵素の発現、誘導は妊娠時の母体肝臓では抑制される。

一方、ヒトCYPのSNPs解析において、multiplex PCR法を用いたマイクロアレイ解析法

は、従来のPCR-RFLP法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができた。

F. 参考文献

1. <http://drnelson.utm.edu/cytochrome450.html>
2. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 1996 Feb;6(1):1-42.
3. Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J*. 2000 Apr 15;347(Pt 2):321-37.
4. Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, Maurel P. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):209-17. Epub 2001 Oct 25.
5. Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med*. 2001 May;7(5):584-90.
6. Kawamoto T, Kakizaki S, Yoshinari K, Negishi M. Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse *Cyp2b10* gene. *Mol Endocrinol*. 2000 Nov;14(11):1897-905.
7. Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*. 2003 May;123(5):369-75.
8. Johnsrud EK, Koukouritaki SB, Divakaran K, Brunengraber LL, Hines RN, McCarver DG. Human hepatic CYP2E1 expression during development. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Oct;307(1):402-7.
9. Roman, L. J., Palmer, C. N. A., Clark, J. E., Muerhoff, A. S., Griffin, K. J., Johnson, E. F. and Masters, B. S. S. (1993) Expression of rabbit cytochromes P4504A which catalyze the ω -hydroxylation of arachidonic acid, fatty acids, and prostaglandins. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 57-65
10. Bell, D. R.; Plant, N. J.; Rider, C. G.; Na, L.; Brown, S.; Ateitalla, I.; Acharya, S. K.; Davies, M. H.; Elias, E.; Jenkins, N. A.; Gilbert, D. J.; Copeland, N. G.; Elcombe, C. R. : Species-specific induction of cytochrome P-450 4A RNAs: PCR cloning of partial guinea-pig, human and mouse CYP4A cDNAs. *Biochem. J.* 294: 173-180, 1993.
11. Kawashima, H.; Kusunose, E.; Kikuta, Y.; Kinoshita, H.; Tanaka, S.; Yamamoto, S.; Kishimoto, T.; Kusunose, M. : Purification and cDNA cloning of human liver CYP4A fatty acid ω -hydroxylase. *J. Biochem.* 116: 74-80, 1994.
12. Göttlicher, M, Widmark, E., Li, Q. and Gustafsson, J.-Å. (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4653-4657
13. Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J. and Wahli, W. (1996) The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature (London)* 384, 39-43
14. Yu, K., Bayona, W., Kallen, C. B., Hardi ng, H. P., Ravera, C. P., McMahon, G., Brown, M. and Lazar, M. A. (1995) Differe

- ntial activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J. Biol. Chem.* 270, 23975–23983
15. Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet.* 1997 Mar;32(3):210-58.
16. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999 39:1–17.
17. Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Backman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 13;95(21):12208-13.
18. Blumberg B, Sabbagh W Jr, Juguilon H, Bolado J Jr, van Meter CM, Ong ES, Evans RM. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* 1998 Oct 15;12(20):3195-205.
19. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T, Lehmann JM. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell.* 1998 Jan 9;92(1):73-82.
20. Pascucci JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Feb 17;1619(3):243-53.
21. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology.* 2003 Oct;38(4):978-88
22. Oesterheld JR. A review of developmental aspects of cytochrome P450. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 1998;8(3):161-74.
23. Chen H, Fantel AG, Juchau MR. Catalysis of the 4-hydroxylation of retinoic acids by cyp3a7 in human fetal hepatic tissues. *Drug Metab Dispos.* 2000 Sep;28(9):1051-7.
24. Gafvels, M.; Olin, M.; Chowdhary, B. P.; Raudsepp, T.; Andersson, U.; Persson, B.; Jansson, M.; Bjorkhem, I.; Eggertsen, G. : Structure and chromosomal assignment of the sterol 12-alpha-hydroxylase gene (CYP8B1) in human and mouse: eukaryotic cytochrome P-450 gene devoid of introns. *Genomics* 56: 184-196, 1999.
25. Zhang, M.; Chiang, J. Y. L. : Transcriptional regulation of the human sterol 12-alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4-alpha in mediating bile acid repression. *J. Biol. Chem.* 276: 41690-41699, 2001.
26. Pandak WM, Bohdan P, Franklund C, Mallonee DH, Eggertsen G, Bjorkhem I, Gil G, Vlahcevic ZR, Hylemon PB. Expression of sterol 12alpha-hydroxylase alters bile acid pool composition in primary rat hepatocytes and in vivo. *Gastroenterology.* 2001 Jun;120(7):1801-9.
27. Rozman, D.; Stromstedt, M.; Tsui, L.-C.; Scherer, S. W.; Waterman, M. R. : Structure and mapping of the human lanosterol 14-alpha-demethylase gene (CYP51) encoding the cytochrome P450 involved in cholesterol biosynthesis: comparison of exon/intron organization with other mammalian and fungal CYP genes. *Genomics* 38: 371-381, 1996.
28. Lupp A, Lau K, Trautmann AK, Krausse T,

- Klinger W. Transplantation of fetal liver tissue suspension into the spleens of adult syngenic rats: inducibility of cytochrome P450 dependent monooxygenase functions by beta-naphthoflavone, phenobarbital and dexamethasone. *Exp Toxicol Pathol.* 1999 Jan;51(1):65-74.
29. Kono Y, Okada S, Tazawa Y, Kanzaki S, Mura T, Ueta E, Nanba E, Otsuka Y. Effect of lactational exposure to 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on cytochrome P-450 1A1 mRNA in the neonatal rat liver: quantitative analysis by the competitive RT-PCR method. *Pediatr Int.* 2001 Oct;43(5):458-64.
30. Ejiri N, Katayama K, Doi K. Induction of CYP3A1 by dexamethasone and pregnenolone-16alpha-carbonitrile in pregnant rat and fetal livers and placenta. *Exp Toxicol Pathol.* 2003 Mar;54(4):273-9.
31. Carpenter SP, Lasker JM, Raucy JL. Expression, induction, and catalytic activity of the ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in human fetal liver and hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 1996 Feb;49(2):260-8.
32. Czekaj P, Wiaderkiewicz A, Florek E, Wiaderkiewicz R. Expression of cytochrome CYP2B1/2 in nonpregnant, pregnant and fetal rats exposed to tobacco smoke. *Acta Biochim Pol.* 2000;47(4):1115-27.
33. Ladona MG, Gonzalez ML, Rane A, Peter RM, de la Torre R. Cocaine metabolism in human fetal and adult liver microsomes is related to cytochrome P450 3A expression. *Life Sci.* 2000 Dec 15;68(4):431-43.
34. Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol Ther.* 1999 Dec;84(3):429-45.
35. Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Shulkes A, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic propranolol metabolism. Studies in the isolated perfused fetal sheep liver. *Drug Metab Dispos.* 1995 Feb;23(2):190-6.
36. Bock KW. Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochem Pharmacol.* 2003 Sep 1;66(5):691-6.
37. Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2002 Feb;110(2):193-6.
38. Finnstrom N, Thorn M, Loof L, Rane A. Independent patterns of cytochrome P450 gene expression in liver and blood in patients with suspected liver disease. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001 Aug;57(5):403-9.
39. Finnstrom N, Ask B, Dahl ML, Gadd M, Rane A. Intra-individual variation and sex differences in gene expression of cytochromes P450 in circulating leukocytes. *Pharmacogenomics J.* 2002;2(2):111-6
40. Lind AB, Wadelius M, Darj E, Finnstrom N, Lundgren S, Rane A. Gene expression of cytochrome P450 1B1 and 2D6 in leukocytes in human pregnancy. *Pharmacol Toxicol.* 2003 Jun;92(6):295-9.
41. Khlood EB, Miyoshi H, Iwata H, Kazusaka A, Kon Y, Hadid AH, Moustafe EK, Ghonim MH, Fujita S. Effects of concurrent exposure to 3-methylcholanthrene and vitamin A on fetal development in rats. *Jpn J Vet Res.* 1999 Aug;47(1-2):13-23.
42. Luquita MG, Catania VA, Pozzi EJ, Veggi LM, Hoffman T, Pellegrino JM, Ikushiro Si, Emi Y, Iyanagi T, Vore M, Mottino AD. Molecular basis of perinatal changes in

- UDP-glucuronosyltransferase activity in maternal rat liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Jul;298(1):49-56.
43. Zaken V, Kohen R, Ornoy A. Vitamin C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* 2001; 64: 33-44.
44. Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med.* 2003 Aug-Oct;24(4-5):281-91.
45. Bruns CM, Hubatsch I, Ridderstrom M, Mannervik B, Tainer JA. Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. *J Mol Biol.* 1999 May 7;288(3):427-39.
46. Glover DD, McRobie DJ, Tracy TS. Effects of gestational and overt diabetes on placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase. *Prim. Care Update Ob Gyns.* 1998 Jul 1;5(4):189.
47. Raza H, John A. Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004 Jan-Feb;20(1):72-8.
48. McRobie DJ, Glover DD, Tracy TS. Effects of gestational and overt diabetes on human placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase. *Drug Metab Dispos.* 1998 Apr;26(4):367-71.
49. Glover DD, McRobie DJ, Tracy TS. Effects of gestational and overt diabetes on placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase. *Prim. Care Update Ob Gyns.* 1998 Jul 1;5(4):189.
50. Wadelius M, Darj E, Frenne G, Rane A. Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther.* 1997 Oct;62(4):400-7.
- G. 健康危険情報**
なし
- H. 研究発表**
- 1. 論文発表**
- 1) Konomu Saito, Hyung-Sub Kim, Noriaki Sakai, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat (in press)
- 2) Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. *Arch Toxicol.* 2003 Aug;77(8):446-51.
- 3) Sakamoto KQ, Nakai K, Aoto T, Yokoyama A, Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Cytochrome p450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere.* 2003 May;51(6):491-500.
- 4) Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C, Sone H. Perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003;17(5):278-85.
- 5) Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Ishinazaka Tsuyoshi, Sakurai Yasunori. Organochlorine compound accumulation in Steller sea lion *Eumetopias jubatus* migrating along the coast of Hokkaido in northern Japan. *Jpn J Toxicol.* 2003;6(1):1-10

2. 学会発表

1) 第 135 回日本獣医学会（平成 15 年春）

① Nakano et al. マウス肝におけるCYP1A2誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Saji et al. ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価

③ Ibrahim et al. Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

2) 第 30 回 日本トキシコロジー学会

① Nakano et al. マウス肝におけるCYP1A2誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Sasaki et al. 抗菌剤フラゾリドンとその代謝物が肝薬物代謝酵素系に与える影響

3) 環境ホルモン学会 第 6 回研究発表会

① Joji Tsunada, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka and Shoichi Fujita. Transient neonatal exposure of brain to testosterone surge initiates amplification of testosterone production in astrocytes.

② Naosuke Saji, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Biomonitoring of the Harbor Seawater Environment in Hokkaido Coast with Induced Hepatic Cytochrome P450 of Minnow

4) Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry in New Zealand

① Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Tsuyoshi Ishinazaka, Vladimir N. Burkanov, Yasuhiro Sakurai. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters

② Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio

Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

5) バイオアッセイ研究会・環境毒性学会

① 佐治尚介、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一 ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価

② 星野広志、藤田正一、後藤陽子、磯野岳臣、石名坂豪、Vladimir N. Burkanov、桜井泰憲. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters（極東海域に棲息するトドにおける有機塩素系化合物汚染）

③ Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

表1 ヒトに発現するCYP分子種

ファミリー	サブファミリー	機能や発現
CYP1	A	1 発現は少なく、肺など肝臓以外の組織にも分布。TCDD や多環芳香族で発現が誘導。
		2 肝臓で発現する P450 の 10%以上を占める。医薬品代謝の他、食物由来の MeIQ など も代謝し活性化する。
	B	1 CYP1A と同じく AhR で発現を調節される。肝臓は発現が少ない。内因性基質としては エストロゲンを代謝。
		6 肝臓に発現し、クマリンなどを代謝する。テストステロン 7 位水酸化。
	A	7
		13
		18
	B	6 テストステロンの 16α 位、16β 位を水酸化する。発現は肝 P450 の 2%以下に過ぎない が、様々な外来異物で誘導を受ける。
		7
		8
C	9 遺伝的多形が存在する。	
	18	
	19	
CYP2	D	6 多くの薬物代謝に関わる。遺伝的多形が報告されている。肝臓における発現は P450 総 量の 2%だが、薬物代謝の 30%以上に関与する。
		7
		8
	E	1 アルコールや絶食で誘導を受ける。内因性基質としてアセトンを代謝。
	F	1 肺より単離された。エトキシクマリン代謝。
	G	1 Olfactory に分布
		2
	J	2 心臓に主に局在し、アラキドン酸を代謝(エポキシ化)する。
	R	1
	S	1
	T	2
		3
	U	1
	W	1
CYP3	A	3
		4 ヒトの肝臓(成人)の 30-40%を占める主要な P450 分子種。
		5 CYP3A4 よりは発現量が少ないが、様々な薬物代謝に関わる。肝臓以外にも分布する。
		7 ヒト胎児肝臓の 30%を占める、胎児特異的な P450 分子種。成人の肝臓で検出される mRNA はわずか。DNA 配列では CYP3A4 と 90%の相同性を持つ。
		43
CYP4	A	11 ヒトの肝臓には少なく、肺や胎盤でクローニングされた。ロイコトリエンや脂肪酸を代 謝する。
		20
	B	1
	F	2 ロイコトリエン B4 _ω 水酸化酵素。

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

		3	ロイコトリエン B4 ω 水酸化酵素。
		8	
		9	
		10	
		11	
		12	
		22	
		23	
		24	
		25	
		26	
		27	
	V	2	
	X	1	
	Z	1	
CYP5	A	1	トロンボキサン合成酵素。
CYP7	A	1	コレステロール 7 α 位水酸化酵素。胆汁酸合成の第一ステップを担う。CPF (cholesterol 7 α -hydroxylase promoter factor) で発現調節される。
	B	1	オキシステロール 7 α 位水酸化酵素。
CYP8	A	1	プロスタサイクリン合成酵素（プロスタグランジン H2 \rightarrow I2）。
	B	1	ステロール 12 α 位水酸化酵素。
CYP11	A	1	コレステロール側差切断を行う（コレステロールからステロイドホルモン合成経路に入る第 1 段階）。別名 P450 _{sc} 。
	B	1	ステロイド 11 β 位水酸化酵素。
	B	2	ステロイド 11 β 位水酸化酵素。アルドステロンの生成を行う。
CYP17			ステロイドの 17 位水酸化
CYP19			アンドロゲンからエストロゲン生成（テストステロン \rightarrow エストラジオール、アンドロステンジオン \rightarrow エストロン）
CYP21	A	1	
	A	2	
CYP24			ビタミン D24 位水酸化酵素。
CYP26	A	1	レチノイン酸を代謝して不活化する。最初 P450RAI と名付けられる。
	B	1	
CYP27	A	1	脳髄黄色腫症(Cerebrotendinous xanthomatosis: CTX) の原因遺伝子。
	B	1	
	C	1	
CYP39			
CYP46			コレステロール 24 位水酸化酵素。
CYP51			ラノステロール 14 α 位脱メチル化酵素。プロモーターから推測すると Housekeeping 遺伝子。

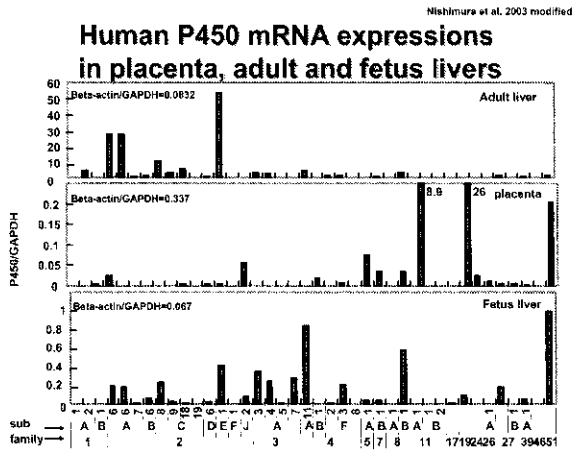


図 1：ヒト肝臓、胎児肝臓および胎盤に発現する CYPmRNA パターン (Nishimura ら 2003 の文献より)。Real-time RT-PCR によって得られた各 CYP 発現レベルを GAPDH で補正したもの。

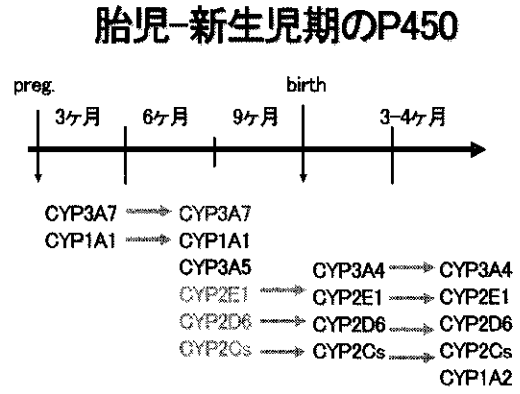


図 2：ヒト胎児および新生児肝臓の CYP 発現するパターン。

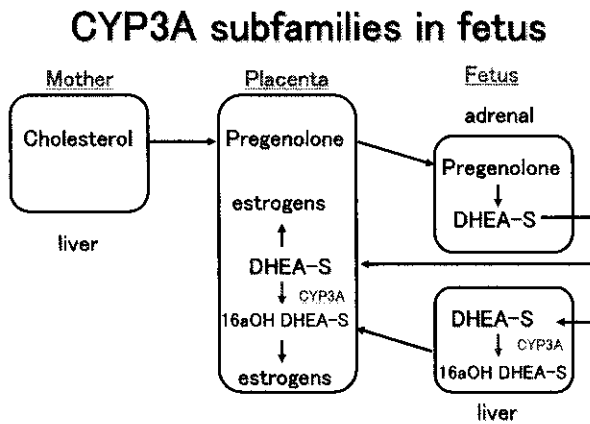


図 3：CYP3A サブファミリーの役割。母親肝臓、胎盤、胎児肝臓におけるステロイドホルモンの代謝経路を示した。

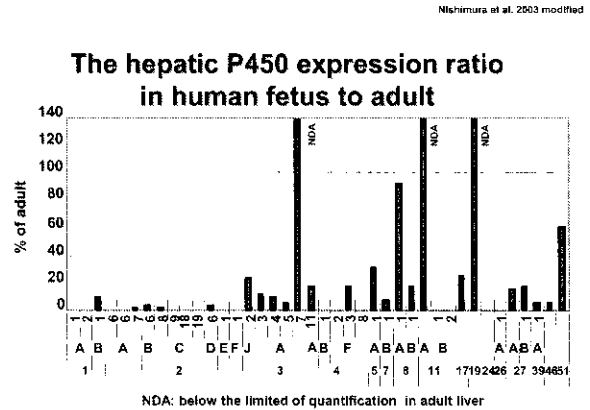


図 4：ヒト胎児肝臓に発現する CYPmRNA パターン (Nishimura ら 2003 の文献より)。Real-time RT-PCR によって得られた各 CYP 発現レベルを、成人肝臓に対する相対地で補正した。

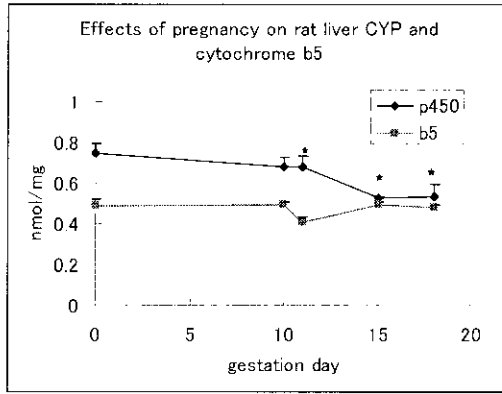


図 5：妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける P450 および cytochrome b5 の発現量の変化。（★：p<0.05）

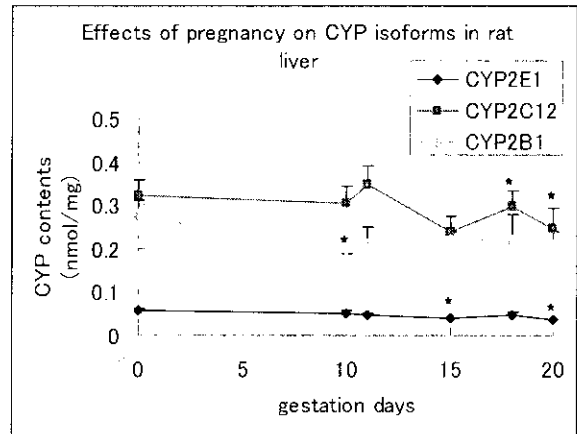


図 6：妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける P450 各分子種発現量の変化。（★：p<0.05）

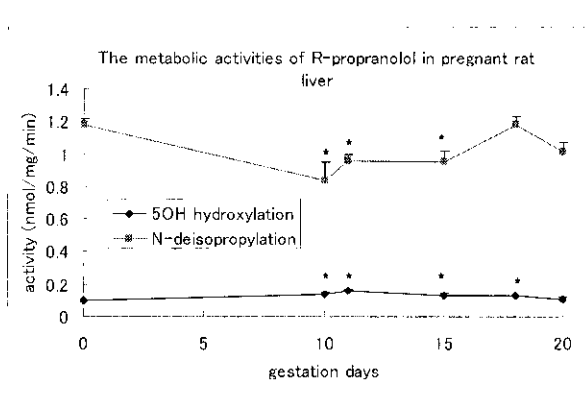


図 7：妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける propranolol 代謝活性。基質に R 体を用い、高基質濃度 1000uM で反応を行った結果を示す。（★：p<0.05）

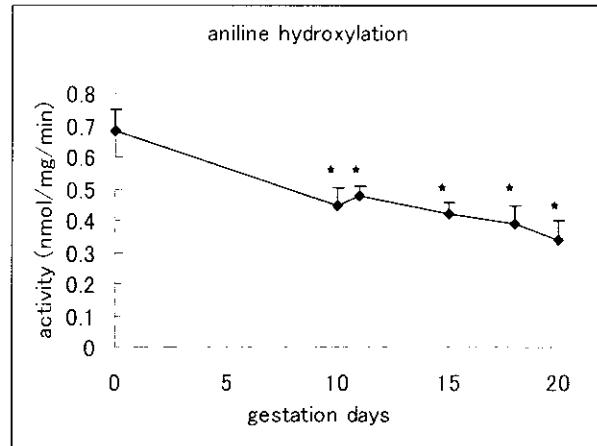


図 8：妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける aniline 水酸化活性の変動。（★：p<0.05）

表2 妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける薬物代謝活性の変動

基質	代謝反応	基質濃度	妊娠による変動（妊娠日齢）				
			10	11	15	18	20
CYP 量			±	±	—	—	—
propranolol (R体)	4位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		1000uM	±	±	±	±	—
	5位水酸化	5 uM	+	+	+	±	±
		1000uM	+	+	+	±	±
	7位水酸化	5 uM	±	+	±	±	±
		1000uM	±	+	±	±	±
	N脱イソプロピル化	5 uM	±	±	±	—	±
		1000uM	—	—	—	±	±
propranolol (S体)	4位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		1000uM	±	±	±	±	±
	5位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		1000uM	±	±	±	±	±
	7位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		1000uM	±	±	±	±	±
	N脱イソプロピル化	5 uM	±	±	—	±	±
		1000uM	±	±	±	±	±
imipramine	2位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		700uM	±	±	±	±	±
	N脱メチル化	5 uM	±	±	±	±	±
		700uM	±	±	—	—	—
amitriptyline	trans10位水酸化	5uM	±	±	±	±	±
	cis10位水酸化	100uM	±	±	±	±	±
p-nitrophenol	水酸化	100uM	—	±	—	—	—
aniline	水酸化	2mM	—	—	—	—	—
ethanol	酸化	50mM	±	±	±	—	—

±：コントロール（妊娠0日目のメスラット）に比べて変化無し、+：有意に上昇、—：有意に減少

表3 多形アレイ遺伝子リスト

gene	ACC No.	allele	position	DNA	Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee
CYP1A1	X02612	wild	6819	A	
		2C	6819	G	2455A>G(I462V)
CYP1A2	dbSNP ID rs2069514	wild	-3860	G	
		1C	-3860	A	-3858G>A
CYP1B1	U56438	wild	4160	G	
		2	4160	T	355G>T(A119S)
		wild	8131	C	
		3	8131	G	4326C>G(L432V)
CYP2A6	U22027	wild	6867	ttgt...	
		4	6867	-	allele deletion
		wild	6416	T	
		7	6416	C	1412T>C(I471T)
CYP2C19	gi22051774(NT_030059)	wild	180546	G	
		3	180546	A	636G>A(stop codon)
		wild	1806252	G	
		2A	1806252	A	681G>A(splicing defect)
CYP2D6	M33189	wild			
		5	deletion		allele deletion
		wild	913	C	
		10	913	T	100C>T
GSTM1	gi22042153(NT_029860)	wild			
		0	deletion		allele deletion
GSTP1	M24485	wild	2627	A	
		1b	2627	G	I105V
NAT2	X14672	wild	1311	G	
		6	1311	A	590G>A(R197Q)
		wild	1578	G	
		7	1578	A	857G>A(G286E)
AhR	dbSNP ID rs2066853	wild		A	
		R554K		G	R554K
PPAR gamma	AB005520	wild	892	C	
		Pro12Ala	892	G	Pro12Ala

オンライン前処理 液体クロマトグラフ質量分析計を利用した ヒト血液中有機フッ素系化合物の分析法開発

主任研究者 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 岸 玲子
分担研究者 星薬科大学 薬品分析化学教室 中澤 裕之
研究協力者 星薬科大学 薬品分析化学教室 吉村 吉博、井之上 浩一、伊藤 里恵、岡田 文雄

研究要旨

前年度まで実施してきた内分泌かく乱化学物質(ED)のヒト暴露モニタリング手法の基礎的検討を基盤として、EDと疑われている有機フッ素系化合物の暴露汚染源の解明を目的とした新たな分析法の構築を目指した。既報の環境汚染報告内容を踏まえ、有機フッ素系化合物の中でもPFOS, PFOA, 及びPFOSAを対象物質とする。一方、既にヒト尿中のアルキルフェノール類の分析法に、オンライン前処理-Liquid Chromatography/Mass spectrometry(LC/MS)法[現有設備]を開発・応用しているが、本法は、簡単な除タンパク操作のみで迅速に測定ができ、対象物質の質量数に合わせてモニタリングができるため、精度の高い分析法である。そこで、このLC/MS法を基本として有機フッ素系化合物へ応用することとする。その結果、PFOS(0.5~200ppb)、PFOA(0.5~200ppb)及びPFOSA(1.0~200ppb)において、相関係数0.999と良好な直線性を得た。また、回収率も80%以上と迅速・高感度な分析法が構築できた。本法を応用して、健常人21名を対象に分析した結果、すべての検体からPFOSが10ppb前後検出された。ヒト生体試料の高精度かつ高感度な分析法の構築が達成でき、大規模スクリーニングに伴う疫学的解析評価を行うことが可能と思われる。

A. 研究目的

「奪われし未来(シーアコルボーン他著)」が刊行されて後、様々な環境汚染化学物質(農薬、医薬品、合成化学物質等)は「内分泌かく乱化学物質(ED)」として、新たな毒性評価研究が実施され、ヒトに対するリスク評価が注目されている。その中でも生活関連製品に利用されるEDは、暴露量の多さから生体影響が危惧されているビスフェノールA、ノニルフェノール、フタル酸エステル類を代表して、ヒト生体暴露評価が多く報告されている。これら化学物質は、母体血、さい帯血、母乳等の生体試料を分析した結果、生体内代謝・排泄が速く、残留量がppb以下レベルであることが判明し、低用量での暴露影響を種々疾病との因果関係の究明は困難な状況にある。一方、繊維類の撥水剤、テフロン加工製品等に汎用されている有機フッ素系化学物質は身の回りでの使用頻度も高く、ヒトへの暴露も懸念されている。しかし、

これらフッ素系化合物は、食品用容器材料(紙皿、ポップコーン用袋等)、調理用具、半導体コーティングや飛行機の油圧オイルまで様々な製品に使用されており、使用実態は明らかとされていない。この一連の有機フッ素系化合物は、残留性有害化学物質(POPs)として、法的に指定されていないが、その性質(難分解性や生体残留性等)もPCBやDDTなどと類似している。これら有機フッ素系化合物の甲状腺ホルモンのかく乱、神経系への影響、妊娠動物に対する催奇形性が報告され始めたが、毒性評価や生体影響は不明の点も多い。また、国内では、環境モニタリングが僅かに実施しているが、ヒトでの汚染状況や生体影響を検討している研究は皆無である¹⁾。また、動物実験を用いた研究では、胎児期にPFOSを暴露した場合、生まれた仔に奇形や甲状腺異常等が観察された報告もある^{2,3)}。

そこで、前向きコホート研究による先天性異常

と有機フッ素系化合物などの環境汚染物質との関わりについては、多くの関心が寄せられている。そこで、本研究では、上記の目標を達成するため、多検体処理能を有するオンライン前処理/液体クロマトグラフ質量分析法(LC/MS)を開発することとした。

B. 研究方法

B.1. 試薬

PFOS：和光純薬工業社製

PFOA：Fluka社製

PFOSA：ABCR GmbH & Co.KG社製

Internal Standard for PFOS, PFOA and PFOSA (IS) Perfluorodecanoic acid：Lancaster社製

アセトニトリル：和光純薬工業社製 HPLC用及び残留農薬用300

メタノール：和光純薬工業社製 HPLC用及び残留農薬用300

酢酸アンモニウム：和光純薬工業社製 特級

精製水：Millipore社製EDS Polisher付Milli-Q gradient A10で精製

B.2. オンライン前処理-LC/MS法の測定概要

血液試料(血清・血漿)は内標準物質を添加したアセトニトリルで除タンパクし、遠心分離した上清をフィルターを通し測定用試料とする。抽出精製・濃縮は、オンライン前処理固相カラムを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質を分離部及び検出部(LC/MS)に導入する。検出には、ESI-MSによるSIM/ネガティブモードで測定を実施する。

測定試料の調製法

-80℃で凍結保存してある血液試料を常温で解凍し、転倒混和を行った後、ピペッターで正確に300μlを量り取りアシストチューブ(2ml)に移す。同様に内標準物質(Prefluorodecanoic acid：PFDA)を添加したアセトニトリル溶液を300μl量り取りゆっくりと添加する。溶液を

よく混ぜタンパク質を十分変性させた後、遠心分離(3000 rpm, 10分)で除タンパクを行う。遠心後の上清をパスツールピペットで取り、45μmのフィルターを通したものを測定試料とする。

標準試料の調製法

各標準品をメタノールに溶解させ、1.0 mg/mlの溶液を調製し、0.1~400 μg/mlの範囲で標準溶液を水で適宜希釈して測定用試料を調製した。

測定条件

LC/MS条件 (機種：Agilent 1100 LC/MSD SL)

LC条件

- ・ 分析用カラム：GLサイエンス社製 Inertsil C₈ (2.1×100 mm, 5μm)
- ・ 前処理用カラム：OASIS HLB (2.1×20 mm, 25μm)
- ・ 移動相：アセトニトリル+1.0 mM酢酸アンモニウム/1.0 mM酢酸アンモニウム溶液 (65：35→85：15 v/v, 5-15分)
- ・ 流速：0.2 ml/min
- ・ カラム温度：40℃
- ・ 注入量：30 μl

MS条件

- ・ イオン化法：Electrospray (ESI), Negative
- ・ Nebulizer gas：N₂ (35 psi)
- ・ Drying gas：N₂ (12 L/min, 350℃)
- ・ フラグメンター電圧：220 V (PFOS), 130 V (PFOA), 170 V (PFOSA), 130 V (PFDA)
- ・ モニタリングイオン (m/z)：499 (PFOS), 369 (PFOA), 498 (PFOSA), 469 (PFDA)