

厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

AhR 内因性リガンド候補 indirubin の生体内代謝と活性変動

分担研究者 広島大学医歯薬学総合研究科 北村 繁 幸

研究要旨

Ah receptor(AhR)の内因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(TCDD)と同様の AhR を介した肝薬物代謝酵素誘導活性を認めたが、高い AhR 親和性に比して誘導活性は低かった。これは indirubin が生体内で代謝され易いためと予測され、ラット肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 実験で複数の代謝物の生成と二次三次代謝の進行が認められた。発現系 CYP 各分子種を用いた indirubin の代謝活性を調べたところ、1A1, 1A2 での活性が高く 3A1, 2E1 でわずかな活性が認められ、分子種特異性が高かった。ラットおよびマウス *in vivo* で indirubin の生体内動態を調べたところ、投与後急速な消失が認められた。

A. 研究目的

Indirubin による AhR を介した薬物代謝酵素誘導能が低い原因として、生体内での代謝を受けやすいことが示唆されている。そこで、代謝に関する酵素系の検索および代謝物について調査を行った。また、*in vivo* で生体内での indirubin の動態を調べた。

B. 研究方法

In vitro 代謝実験では、3-methylcholanthrene (MC)あるいは phenobarbital (PB) などの前処理ラット肝より常法に従いミクロゾーム(Ms)を調製し、indirubin と NADPH 存在下で反応後、反応液を抽出し HPLC にて残存 indirubin 量および代謝物を測定した。CYP 分子種同定にはラット CYP 発現系 Ms を用いた。AhR との結合活性は組み換え酵母レポーター試験で測定した。

生体内動態は、ラット(Slc:SD)あるいはマウス(C57BL/6J)に indirubin を経口、腹腔内、皮下、あるいは尾静脈から投与後血中濃度および臓器内濃度を測定した。

C. 研究結果

1) Indirubin あるいは indigo をラット肝 Ms と反応後、抽出液の AhR 結合活性を調べたところ、著しい減少が認められ、活性は反応抽出液中の残存 indirubin, indigo 量に相関していた。このことより、indirubin, indigo の肝 Ms 代謝物は AhR 結合能がほとんどないことが示唆された。

2) Indirubin をラット肝 Ms で代謝し抽出物を HPLC で測定したところ、複数の代謝物の生成が認められた。これら代謝物は、経時的に二次三次代謝され低分子の高極性代謝物に変換されていた。LC/MS 解析の結果より、代謝物として1水酸化体、isatin 類などが認められた。ラット肝 Ms での indirubin 代謝活性の km は $14.8 \mu M$, V_{max} は $13.1 \text{ nmol/min/mg protein}$ であった。

3) ラットを MC, PB, acetone および pyridine で前処理し CYP を分子種特異的に誘導した肝 Ms で比較したところ、MC 前処理ラット肝 Ms で最も高い indirubin 代謝活性が認められた。

4) 7種の CYP 分子種特異的発現系 Ms を用いて反応したところ 1A1, 1A2 での活性が高く、3A1, 2E1 でわずかな活性がみられ、indirubin 代謝は CYP 分子種の特異性が高かった。

5) マウスあるいはラットを用い indirubin の生体内動態を調べたところ、経口、腹腔内、皮下投与ではいずれも血中より indirubin を検出することができなかった。尾静脈投与により血中濃度推移を測定したところ、急速な消失が確認された。また、臓器残存量を調べたところ、肝で投与後約 2 時間でほとんど消失していることがわかった。

6) Indigocarmine をモデル化合物として代謝機構を調べたところ、嫌気下でラット肝 Ms の cytochrome P450 reductase により 1 電子還元を受け leuco 体に変換されるとともに O_2^- を産生していることを見出した。Leuco 体は酸素により容易に酸化され、もとの indigocarmine に変換された。

D. 考察

Indirubin, indigo は *in vitro* 実験系で、主に CYP1A1/2 により代謝され、代謝生成物は AhR 結合活性を示さなかった。LC/MS 解析や indigocarimine を用いたモデル反応の結果より、代謝物として 1 水酸化体の生成、二重結合の還元開裂、isatin 類の生成、それらの更なる代謝が認められ、予想代謝図を Fig. 1 に示した。 *In vivo* での indirubin の代謝は著しく早く、経口、腹腔内、皮下投与による血中からの検出はできなかったが、静脈内投与で急速な血中濃度減少が認められた。しかし、静脈内投与では実験動物が死亡するため半減期等は測定できなかった。本毒性は indirubin の生理作用というより、再結晶化などのような物理的な毒性発現によるものと考えられる。 Idigocarmine をモデル化合物として代謝機構を調べたところ cytochrome P450 reductase による還元反応による leuco 体の生成が認められたことより、indirubin, indigo 代謝にも一部同様な代謝経路が関与していると考えられる。

E. 結論

Indirubin, indigo は、主に CYP1A1/2 により急速な代謝を受け、代謝物は AhR 結合活性を示さなかった。代謝物は複数生成し、急速な二次三次代謝の進行が認められた。 *In vivo* 動態実験では indirubin の生体からの急速な消失が認められた。

以上、indirubin, indigo 投与時の生体影響、代謝について研究を行ったが、今後生体内生成機構について、酵素系や生成部位などを調べる予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) N.Fujimoto, H.Honda, S.Kitamura
Effects of environmental estrogenic chemicals on AP1 mediated transcription with estrogen receptors alpha and beta, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., In press (2003).
- 2) N.Fujimoto, R.Kohta, S.Kitamura and H.Honda
Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA). Life Sciences, in press (2003).
- 3) S.Kitamura, O.Ueda, K.Sugihara and S.Ohta,
Deacylation of *N*-Formylanilines and

N-Acetylanilines by Rat Liver Formamidase. Journal of Health Science, 49(6), 501-508(2003).

- 4) S.Sanoh, S.Kitamura, K.Sugihara, N.Fujimoto and S.Ohta, Estrogenic Activity of Stilbene Derivatives. Journal of Health Science, 49(5), 359-367 (2003).
 - 5) S.Kitamura, S.Sanoh, R.Kohta, T.Suzuki, K.Sugihara, N.Fujimoto and S.Ohta, Metabolic activation of proestrogenic diphenyl and related compounds by rat liver microsomes. Journal of Health Science, 49(4), 298-310 (2003).
 - 6) 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, 303, 419-426 (2003).
 - 7) 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) 367-372 (2003).
 - 8) 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), 503-508 (2003).
 - 9) 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).
 - 10) 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), 329-334 (2003).
- ##### 2. 学会発表
- 1) DIOXIN2003 August 24-29. 2003 Boston, USA
K. Sugihara, S. Kitamura, S. Ohta., S. Okamura, K. Yamashita, M. Yasuda, S. Matsui and T. Matsuda,

Metabolism of indirubin and indigo, endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand candidates, and competitive effect with respect to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Organohalogen Compounds*, 65, 134-137 (2003)

2) 第76回 日本生化学会大会 2003年10月15-18日

Kazumi Sugiharal, Shigeyuki Kitamura, Takashige Okayama, Shigeru Ohta, Keisuke Yamashita, Mineo Yasuda, Ken'ich Saeki, Saburo Matsui and Tomonari Matsuda

Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of Microsomal Drug-Metabolizing Enzyme Activity by Indirubin and Indigo

3) 第18回日本薬物動態学会 2003年10月8-10

日

AhR 内在性リガンド候補インディルビンの *in vivo* での誘導と代謝

北村 繁幸, 岡山 幸誠, 原田 亜紀子, 杉原 数美, 太田 茂

4) 第6回環境ホルモン学会 2003年12月2-3日
Indirubinの生体内代謝とAhR結合活性の変動
杉原数美¹⁾、北村繁幸¹⁾、岡山幸剛¹⁾、太田茂¹⁾、山下敬介¹⁾、岡村さおり¹⁾、安田峯生²⁾、佐伯憲一³⁾、松井三郎⁴⁾、松田知成⁴⁾、関澤純⁶⁾

1) 広島大・医歯薬、2) 広島国際大・保健医療、
3) 筑波大・先端、4) 名古屋市大・5) 京都大院・工 6) 徳島大・総合科学
講演要旨集 p228

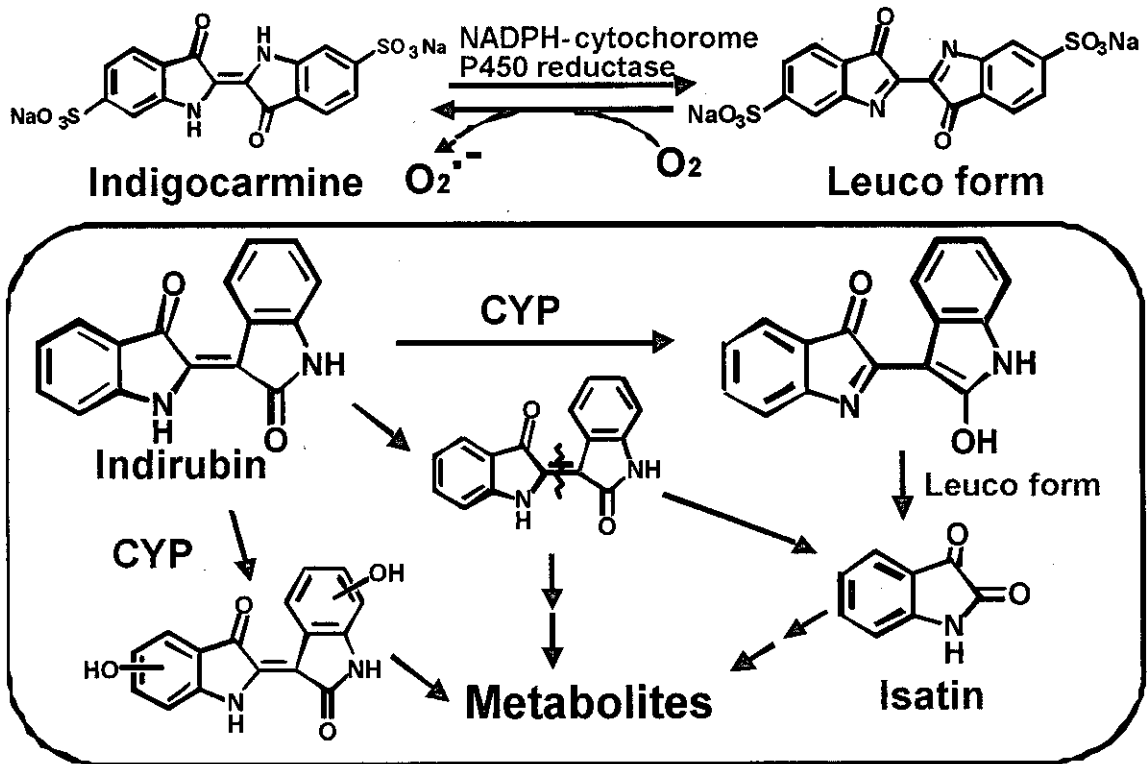


Fig. 1. Indirubinの予想代謝経路図

ヒト肝マイクロゾームを用いたインディルビンの代謝反応における個体差解析

分担研究者 佐伯 憲一 名古屋市立大学大学院薬学研究科

研究要旨：インディルビン (Idb) の生体内代謝排泄経路として、グルクロン酸抱合反応を経由した機構を想定し、ヒト肝マイクロゾームを用いて検討した結果、直接的なグルクロン酸抱合及び CYP による酸化代謝に続くグルクロン酸抱合共に速度が非常に遅いことが明らかとなった。この結果は、ヒト肝における主たる代謝経路はグルクロン酸抱合とは別経路であることを示唆している。また、これらの代謝反応に関わるアイソザイム特異性は低く、複数の CYP 分子種並びにグルクロン酸転移酵素 (UGT) 分子種の関与が示唆された。

A. 研究目的

Idb はヒト尿中に約 0.2 nM 存在し、非常に低濃度においても Ah 受容体活性化能を有しているが、その体内動態については不明である。そこで、ヒト肝マイクロゾームを用いて Idb のシトクロム P450 及びグルクロン酸転移酵素による代謝反応について検討し、これら Idb 代謝におけるヒト個体差の解析を行った。

B. 研究方法

ヒト肝マイクロゾーム (HLM) はプールド (10 数人の HLM から調製された平均的なヒト肝 CYP 組成に近いもの) とシングルドナー由来のものを用いた。Idb のグルクロン酸転移酵素 (UGT) による代謝反応は ^{14}C -UDPGA 存在下 37°C, 30 min で行い、生成物を TLC にて分離後オートラジオグラフィにより定量した。また、Idb の CYP による代謝反応は NADPH 産生系存在下 37°C, 30 min で行い、代謝産物を酢酸エチルにて抽出後、混合物のまま UGT 代謝させることにより、グルクロン酸抱合体として定量した。

C. 研究結果

要約：プールド HLM を用いた Idb の直接的な UGT 活性は殆ど見られなかったが、Idb を一旦 CYP により代謝させた後に UGT 代謝を行った場合は、プールド HLM において UGT 活性 (44 ± 10 pmol/min/mg) が見られ、これらには個体差も確認された。

1. プールド HLM を用いた Idb 代謝経路の解析

Idb の肝マイクロゾームによる代謝経路としては、1) 1 位あるいは 1' 位の N 原子への直接的な N-グルクロン酸抱合、2) 還元的代謝 (ロイコ Idb ; 3,3'-ハイドロキノ型 Idb) を経由した 3 位あるいは 3' 位への O-グルクロン酸抱合、3) CYP によるベンゼン環部位 (4-7 位及び 4'-7' 位) への水酸基導入に続く O-グルクロン酸抱合の 3 種の経路が考えられる。しかし、プールド HLM を用いた Idb の直接的な UGT 活性 (経路 1) は 20-200 μM において殆ど見られなかった。一方、Idb を一旦 CYP により代謝させた後に UGT 代謝を行った場合 (経路 3) は、プール

ド HLM において最終的なグルクロン酸抱合活性値が 44 ± 10 pmol/min/mg protein であった。経路 2 については検討した反応系ではロイコ Idb の安定性が非常に低いためにグルクロン酸抱合体としては検出されなかった。

2. Idb 代謝におけるヒト個体差

シングルドナー由来の HLM を用いて上記の経路 3 における個体差を検討した。その結果、CYP 代謝を各シングルドナー HLM を用い UGT 代謝を全てプールド HLM を用いた場合 (Idb の CYP 代謝における個体差)、最終的な UGT 活性が $20\text{--}125$ pmol/min/mg protein であり 6.2 倍の個体差が見られた。一方、CYP 代謝を全てプールド HLM を用い UGT 代謝を各シングルドナー HLM を用いた場合 (Idb の UGT 代謝における個体差)、最終的な UGT 活性が $31\text{--}117$ pmol/min/mg protein であり 3.8 倍の個体差が見られた。

D. 考察

HLM を用いた今回の検討では、Idb のグルクロン酸抱合反応は直接的及び CYP 代謝を経由した間接的の何れも非常に速度が遅いことが示された。この結果は、ヒト肝における主たる代謝経路はグルクロン酸抱合とは別経路であることを示唆している。しかし、還元的代謝を経由した経路 2 についてはさらに検討する必要があるほか、生体内での Idb の存在濃度域 (nM オーダー) における再検討も必要であるが検出感度などの問題があると思われる。

一方、Idb の CYP 代謝及び UGT 代謝におけるヒト個体差はそれぞれ 6.1 倍と

3.8 倍みられたが、肝臓で主に発現している個々の CYP 分子種や UGT 分子種活性の個体差のみでは説明できなかった。このことは、Idb が複数の CYP 分子種及び UGT 分子種によって認識されることを示唆している。

E. 結論

Idb のヒト肝マイクロゾームによる第 I 相及び第 II 相代謝をグルクロン酸抱合化活性を指標にして検討した結果、グルクロン酸抱合化を介した Idb の代謝速度は非常に遅いことが明らかとなった。また、それぞれの代謝反応に関わる CYP 分子種並びに UGT 分子種特異性は見られず、複数のアイソザイムが関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Katsuya Yamada, Takayoshi Suzuki, Arihiro Kohara, Makoto Hayashi, Takaharu Mizutani, and Ken-ichi Saeki
In vivo mutagenicity of benzo[f]quinoline, benzo[h]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the *lacZ* transgenic mice
Mutat. Res., in press.

Katsuya Yamada, Takayoshi Suzuki, Atsushi Hakura, Takaharu Mizutani, and Ken-ichi Saeki
Metabolic activation of 10-aza-substituted benzo[a]pyrene by cytochrome P450 1A2 in human liver microsomes
Mutat. Res., in press.

Kenichi Saeki, Tomonari Matsuda,
Taka-aki Kato, Katsuya Yamada,
Takaharu Mizutani, Saburo Matsui,
Kiyoshi Fukuhara, and Naoki Miyata

Activation of the human Ah receptor by
aza-polycyclic aromatic hydrocarbons and
their halogenated derivatives

Biol. Pharm. Bull. (2003) **26**, 448-452.

2. 学会発表

1) 山田勉也、鈴木孝昌、羽倉昌志、
佐伯憲一

10 位窒素置換ベンズピレンのヒト肝
microsome を用いた Ames 試験での変異
原性評価, 日本癌学会第 62 回総会. 2003
年 9 月 25-27 日 (名古屋).

2) 山田勉也、羽倉昌志、加藤隆明、水
谷隆治、佐伯憲一

窒素置換クライセン誘導体の変異原性
発現に関わるヒト CYP 分子種の同定, 平
成 15 年度日本薬学会東海支部例会. 2003
年 12 月 6 日 (岐阜).

3) 山田勉也、羽倉昌志、鈴木孝昌、加
藤隆明、竹本育世、水谷隆治、佐伯憲一

一連の含窒素芳香族化合物の代謝活性
化に関わるヒト CYP 分子種の同定, 日本
薬学会 124 年会. 2004 年 3 月 29-31 日 (大
阪).

4) 神谷信輝、松田知成、水谷隆治、
佐伯憲一

ヒト肝マイクロソームを用いたインデ
イルビンの CYP 及び UGT 代謝反応におけ
る個体差, 日本薬学会 124 年会. 2004 年
3 月 29-31 日 (大阪).

マウス胎児繊維芽細胞における遺伝子発現プロファイルのインディルビンと TCDD の比較

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

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ルビンと、TCDDの生体影響を遺伝子発現プロファイルにより解析する。今年度は昨年度より低用量域で検討した。マウス胎児繊維芽細胞(MEF)において *in vitro* 曝露実験を行ったところ、低用量での遺伝子発現誘導が弱いながらも検出された。すなわち、TCDD, TCDF と共通し、AhR を介することが既知である遺伝子発現誘導に加え、インディルビン特異的な発現誘導遺伝子も見いだされた。このことから、インディルビンは1) AhR を介した遺伝子発現誘導を行う可能性があること、2) TCDD, TCDF とは異なる生理活性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ルビン類の生体影響を、TCDD と比較し遺伝子発現プロファイル解析する。

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。

B. 研究方法

C57BL/6 マウス胎児に由来する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リングによりインディルビン及び 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。特に、今年度は昨年度より低用量の影響を検討する。

C. 研究結果

要約

胎生 14 日のマウス胎児繊維芽細胞において、10nM のインディルビンが曝露後短時間で遺伝子発現誘導を引き起こすこと、そのプロファイルは TCDD, TCDF と同様でありつつ、異なる面もあることがわかった。

(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

胎生 14 日のマウス胎児より MEF 細胞を調製し、インディルビン及び TCDD, TCDF の曝露実験を行った。特に初期応答遺伝子プロファイルを検索するために、10nM の化合物を曝露し、開始後 3hr, 8hr について RNA を抽出、Affymetrix GeneChip MOE430A を用いて遺伝子発現を網羅的にモニターした。その結果、Cyp1A1, Cyp1B1 の誘導が 10nM のインディルビンでも起こ

ること、インディルビンによる誘導は持続せず、3hr で誘導された発現が 8hr では低下していた。また、インディルビンのみで誘導される遺伝子として、Eif2s2 (eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2)などを始めいくつかの遺伝子が見いだされた。

D. 考察

昨年度に実施した 5 μ M の濃度での検討で、インディルビンは CYP1B1 など、TCDD, TCDF と共通の発現誘導をマウス胎児繊維芽細胞に対し惹起することが示されている。よって、インディルビンは外来物質である TCDD と同様に AhR を介する遺伝子発現を誘導するということができ、このことはインディルビンが確かに生体内で AhR を活性化しうる物質であることを確認するものである。一方で、インディルビンは TCDD とは明らかに異なる遺伝子群も誘導した。今年度は、昨年度よりも 500 倍低い濃度でインディルビンによる遺伝子発現誘導が起きるかについて検討した。誘導の程度は弱いものの、高濃度の場合と同様の傾向を示すことが明らかとなった。また、インディルビンの生理作用は、この濃度においても TCDD と似ているものの異なる面もあることが示唆され、生理リガンドを想定したダイオキシン毒性メカニズムを検討する上で、インディルビン特有の作用を含め、リガンド特異的な側面の検討が今後ますます重要となる。

E. 結論

今年度までの検討で、インディルビンは 50nM の濃度において MEF に対し確かに

遺伝子発現誘導を引き起こすことがわかった。また、誘導のかかった遺伝子レポーターは TCDD, TCDF と共有なものに加え、インディルビン独特のものもあった。これらの情報は生体内リガンド候補物質としてのインディルビンの生理作用を解明する糸口となり得るものであると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies. Environ Health Perspect. 2003 Sep;111(12):1550-8.

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. Environ Health Perspect. 2003 Sep;111(12):1530-49.

Yoon BL, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. Environ Health Perspect. 2003 Aug;111(11):1411-20.

©Matsunaga N, Kanno J, Yoshimura I A
statistical method for judging synergism:
Application to an endocrine disruptor
animal experiment- Synergism in
endocrine disruptor studies,
Environmetrics 2003, Volume 14, Issue
2,: 213-222

© Kanno J, Reverse toxicology as a
future predictive toxicology, T. Inoue,
W.D. Pennie Eds, Toxicogenomics,
pp.213-218, Springer-Verlag Tokyo,
2002

©Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y,
Kodama Y, Kaneko T, Kanno J, Kim DY,
Fujii-Kuriyama Y, Inoue T. Aryl
hydrocarbon receptor mediates benzene-
induced hematotoxicity. *Toxicol*
Sci. 2002 Nov;70(1):150-6.

Utsuyama M, Kanno J, Inoue T,
Hirokawa K. Age/sex dependent and
non-monotonous dose-response effect of
diethylstilbestrol on the immune
functions in mice. *Toxicol Lett.* 2002 Sep
5;135(1-2):145-53.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生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

エストロゲン受容体の転写調節機構への影響の解析に関する研究

分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所

研究要旨

内分泌攪乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つに、性ステロイドホルモン作用の攪乱が考えられている。性ステロイドホルモンは核内受容体型転写因子を介した標的遺伝子群の転写制御によりその作用を現す。本研究では、核内受容体の転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、性ステロイドホルモンと結合する核内受容体の転写促進領域の同、及びこれら受容体の転写共役因子群を同定する。

A. 研究目的

内分泌攪乱化合物の作用点の一つとして、性ステロイドホルモン受容体が標的と考えられ、直接的な結合により受容体の転写制御能の修飾が想定される。そこで、性受容体の転写機能を担い、内分泌攪乱化合物結合により、相互作用が修飾される転写共役因子を同定する。

B. 研究方法

内分泌攪乱化合物の多くが女性ホルモン様作用を示すことから、これら化合物は女性ホルモン受容体 (ER α 及びER β) に直接結合する可能性が考えられる。結合により、転写共役因子との相互作用が改変する可能性が考えられるので、ER に結合する転写共役因子及びその複合体の精製同定を試みる。

C. 研究結果

ER α に結合する転写共役因子群を生化学的に精製同定を試みた。その結果、候補因子の一つとしてER α N末端に結合する特異的な転写共役抑制因子を同定した。

1) ER α 特異的転写共役因子同定の試み

ER α の N 末端に局在する転写促進領域 (AF-1)は、受容体の組織特異的なホルモン活性発現に極めて重要な働きをしている。そのため、性ホルモン作用を攪乱する人工化合物は、AF-1 活性を正負に制御する可能性が考えられる。そこで、ER α AF-1 に結合する転写共役因子を生化学的手法により、単離同定を試みた。具体的には、HeLa 細胞核抽出液を用い、組み換え ER α AF-1 変異体タンパクをプローブにして、結合する因子を集めた。その結果、複数の因子が AF-1 領域に特異的に結合することが分かった。そこで、MALDI-TOFMASS 法により、タンパク質の同定を行い、p54、PSF を同定することに成功した。これらの因子は、二量体を形成することで、他の DNA 結合性転写制御因子の機能を抑制することが知られており、実際 ER α AF-1 に直接相互作用し、その機能を抑制することが分かった。すなわち、ER α AF-1 は細胞種によっては、その機能は著しく低値であることが知られているが、これら因子が機能を担う可能性が考えられた。このことから、内分泌攪乱物質結合により、ER はこれら因子とより

強固な結合の可能性が考えられた。

2) ダイオキシン受容体を介したエストロゲン攪乱の分子メカニズム

ダイオキシン受容体とエストロゲン受容体とがダイオキシン依存的に相互作用し、エストロゲン非存在下にエストロゲン受容体を活性化することを見出した。その一方、ダイオキシン受容体がエストロゲン受容体のプロテアソーム依存的分解を促進することを新たに見出した。この分解促進作用によって、リガンド活性化エストロゲン受容体に対する機能抑制が起こり、従ってダイオキシン受容体によるエストロゲン受容体制御は転写活性化作用・分解促進作用のバランスによって決定されると考えられる。現在、これらのクロストークを担う相互作用複合体を精製により同定を試みているところである。

D. 考察及び結論

ER α に結合する転写共役因子群は数多く存在するようであり、また複合体として存在する可能性が高いと考えられた。一方、受容体による転写制御には、染色体構造の修飾を介するため、今後は染色体構造調節を踏まえた受容体転写制御機能の解明が必須となる。そして、それらを担う転写共役因子の同定は内分泌攪乱物質の作用機構解明につながるものと期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

©Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Modulation of estrogen receptor signalin by an association with the activated dioxin receptor. *Nature*, **423**, 545-550, 2003.

©Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., Nakagawa, T., Ito, T., Ishimi, Y., Nagasawa, H., Matsumoto, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: Promoter targeting of a nuclear receptor with an ATP-dependent chromatin remodeling complex related to Williams syndrome. *Cell*, **113**, 905-917, 2003.

©Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S.: Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression PPAR γ function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, **5**, 224-230, 2003.

©Ishitani, K., Yoshida, T., Kitagawa, H., Ohta H., Nozawa, S., Kato, S.: p54^{nrb} acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 660-665, 2003.

Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Metzger, D., Chambon, P., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Kato, S.: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9416-9421, 2003.

Nakamichi, Y., Shukunami, C., Yamada, T., Aihara, K., Kawano, H., Sato, T., Nishizaki, Y., Yamamoto, Y., Shindo, M., Yoshimura, K., Kawaguchi, H., Hiraki, Y., Kato, S.: Chondromodulin-I (ChM-I) is a bone remodeling factor. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 636-644, 2003.

Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H., Kato, S.: Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (ARKO) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 167-171, 2003.

Taketani, Y., Nomoto, M., Yamamoto, H., Isshiki M., Morita, K., Arai, H., Miyamoto, K., Kato, S., Takeda E.: Increase in IP3 and intracellular Ca²⁺ induced by phosphate depletion in LLC-PK1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **305**, 287-291, 2003.

Fujishima, T., Kittaka, A., Yamaoka, K., Takeyama, K., Kato, S., Takayama, H.: Synthesis of 2, 2-dimethyl-1, 25-dihydroxyvitamin D₃: A-ring structural motif that modulates interactions of vitamin D receptor with transcriptional coactivators. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 1863-1869, 2003.

Masuyama, R., Nakaya, Y., Katsumata, S., Kajita, Y., Uehara, M., Tanaka, S., Sakai, A., Kato, S., Nakamura, T., Suzuki, K.: Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J. Bone Miner. Res.*, **18**, 1217-1226, 2003.

© Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003 (in press).

Endo, I., Inoue, D., Mitsui, T., Umaki, Y., Akaike, M., Yoshizawa, T., Kato, S., Matsumoto, T.: Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology*, 2003 (in press).

WuQiang, F., Yanase, T., Yin, W., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors,

GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol. Endocrinol.*, 2003 (in press).

子宮筋腫における特異的遺伝子の検索とダイオキシン関連遺伝子の変動

分担研究者 有菌幸司 熊本県立大学

研究要旨

ダイオキシンリスクおよび内在性リガンドを解析する際の有用な試料を選択し、特異的に発現する遺伝子を標的遺伝子として、リスク評価を行うことは有用であると考えられる。今回、GnRH セラピー処置を施した2名の患者より摘出した子宮筋腫と正常部位、および市販正常子宮由来RNAを用いてcDNAマイクロアレイ法にて、子宮筋腫と正常子宮の間で差として認められる遺伝子を比較検討した。その結果、市販正常子宮と比較してGnRHセラピー処置正常部位で発現する遺伝子、GnRHセラピー処置正常部位間で発現異常は認められず子宮筋腫のみで発現する遺伝子を明らかにした。

A. 研究目的

子宮筋腫は、女性ホルモン依存性の良性腫瘍と考えられ、ダイオキシンリスク評価に有用な生体試料の一つと考えられる。そこで、本研究は、生体試料として子宮筋腫に着目し、組織特異性の高い遺伝子を検索すること、併せて、ダイオキシン関連遺伝子の変動を解析することを目的とした。

B. 研究方法

鹿児島大学医学部より享受されたGnRHセラピー処置を施した患者2名より摘出した子宮筋腫と正常部位および市販正常子宮由来total RNAを用いた。

子宮筋腫特異的遺伝子の検索には、サブトラクション法(Clontech PCR-select Subtraction)を用い、PCR クローンをTAベクターにライゲーション(Promega)した後、大腸菌に形質転換し、クローンを選択した。これらcDNAのスクリーニングにはマイクロアレイ法を用い、子宮筋腫・正常部位間において、2倍以上の差として認められた遺伝子の候補から配列を決定した。各遺伝子の定量解析には、リアルタイムPCR法を用いた。

ダイオキシンリスク評価の基礎的データの集積を目的として、AhRを含むダイオキシン類関連遺伝子の発現解析をリアルタイムPCR法にて行

った。

C. 研究結果

マイクロアレイ法を用い子宮筋腫および正常子宮で発現が差として認められるかどうか比較検討した。その結果、同一人物の正常部位間では差異は見られなかったものの同じ正常部位でも個体が異なるとそれぞれ特異的な遺伝子の発現が見られた。また同一人物で採取部位が異なる場合共通して発現する遺伝子が認められた。これらの発現差異が組織中のインディルビンと何らかの関与が見られるかどうか興味あるところである。尚、自作線虫マイクロアレイチップを用いてCYP関連遺伝子の発現についても検討中である。

抗インディルビンモノクローナル抗体取得を目指したところ定量範囲1-50ppb程度のクローンを取得した。本抗インディルビンモノクローナル抗体はインディルビン類縁体と47-200%の範囲で反応することが明らかとなった。

D. 考察

子宮筋腫と正常部位間では、明らかに遺伝子の挙動が異なることが確かめられた。今回解析に用いた検体数は少ないため、今後子宮筋腫特異的な遺伝子を検索するため多くの検体を用いた解析

を進める必要がある。

ダイオキシン類関連ヒト遺伝子の挙動が、子宮筋腫・正常部位間で異なる可能性が示唆された。自作線虫マイクロアレイチップを用いて CYP 関連遺伝子やの発現、ダイオキシン類関連ヒト遺伝子由来遺伝子群の解析をすすめることで子宮をはじめとしたヒト臓器においてダイオキシン類および内在性リガンドによる制御機構解明が可能となろう。

E. 結論

ヒト子宮組織および線虫におけるダイオキシン受容体関連遺伝子の解析・定量分析の比較検討することによりヒト臓器におけるダイオキシン類および内在性リガンドに対する制御機構解明の一助とする。

F. 研究発表

1. 論文発表

N. Tominaga, S. Kohra, T. Iguchi, K. Arizono, (2003) A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans*, Journal of Health Science, Vol.49, No.6, 459-463

Y. Takao, K. Yamashita, S. Kohra, M. Inudo, M. Nagae, N. Tominaga, Y. Ishibashi, J. Sekizawa, S. Miyairi, and K. Arizono, (2003) High sensitivity analysis of indirubin by silylation using GC/MS, Journal of Health Science, Vol.49, No.1, 88-90

H. Shimada, N. Tominaga, S. Kohra, H. Ishibashi, Y. Mitsui and K. Arizono, (2003) Metallothionein Gene Expression in the Larvae of *Caenorhabditis elegans* is an Potential Biomarker for Cadmium and Mercury, Trace Elements and Electrolytes, Vol.20, No.4, 240-243

N. Tominaga, M. kunimoto, T. Kai, K. Arizono, and S. Kohra, (2003) A convenient assay for evaluating

chemical toxicity using *Caenorhabditis elegans* as a model organism – Application to alkylphenol toxicity test, Environmental Sciences, Vol.10, No.4, 215-221

N. Tominaga, K. Ura, M. Kawakami, T. Kawaguchi, S. Kohra, Y. Mitsui, T. Iguchi, and K. Arizono, (2003) *Caenorhabditis elegans* Responses to Specific Steroid Hormones, Journal of Health Science, Vol.49, No.1, 28-33

2. 学会発表

K. Arizono, Y. Koga, T. Nakamoto, S. Sakata, H. Ishibashi, H. Kimura, K. Ura and T. Iguchi, Effect of environmental chemicals on post-embryonic development in *C.elegans*, SETAC Europe 13th Annual Meeting (2003, 4, Hamburg, Germany)

N. Tominaga, T. Matsuno, Y. Kohara, T. Iguchi, and K. Arizono, Sensing of Steroid hormones by cDNA microarray using *Caenorhabditis elegans* as a model organism, Toxicogenomics International Forum 2003 (2003, 10, Tokyo)

Y. Koga, K. Ura, T. Iguchi, and K. Arizono, Application of DNA microarray analysis using CYP Chip in *C. elegans*, Toxicogenomics International Forum 2003 (2003, 10, Tokyo)

富永伸明, 松野哲也, 小原雄治, 井口泰泉, 有菌幸司, ステロイドホルモンによる代謝系遺伝子の発現変動, 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (2003, 12, 仙台)

古賀由香里, 浦和寛, 木村宏和, 富永伸明, 上杉裕子, 小原雄治, 井口泰泉, 有菌幸司, DNA マイクロアレイを用いた線虫 (*C. elegans*) の環境化学物質曝露による遺伝子発現変動の解析, 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (2003, 12, 仙台)

厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

インディルビンによるダイオキシン発生毒性の修飾

分担研究者 広島国際大学保健医療学部 安田 峯生

研究要旨

ダイオキシンの毒性発現機構に関わるアリールハイドロカーボン受容体の内在性リガンド候補であるインディルビン (Idb) で前処置した妊娠マウスに、ダイオキシンの中で最も毒性の強い 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) を経口投与して、両者の相互作用を調べた。胎児の口蓋裂および水腎(腎盂拡大)を発生毒性検出指標として観察した。いずれについても明瞭な TCDD の用量反応関係は認められたものの、Idb 前処置群と溶媒前処置群の間に有意な差は認められず、期待された Idb と TCDD の相互作用は認められなかった。Idb 前処置と TCDD 投与に 6 時間の間隔をとったこの実験結果だけで結論を出すのは早計であるが、少なくとも Idb に口蓋裂や水腎誘発作用のないことは明らかになった。

A. 研究目的

インディルビン (Idb) はアリールハイドロカーボン受容体 (AhR) に結合する内在性リガンドの一つで、ダイオキシン類と相互作用があるのではないかと考えられる。マウスでのダイオキシンの発生毒性発現に及ぼす Idb の影響を調べることが本研究の目的である。

B. 研究方法

C57BL マウスを交配し、陰栓発見日の午前 0 時を妊娠 0 日として、妊娠 11 1/4 日および 12 1/4 日に Idb100 mg/kg を経口投与した。12 1/2 日にダイオキシンの中で最も毒性の強い 2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) 0、5、10、または 20 μ g/kg を経口投与した。いずれも溶媒にはコーンオイルを用い、液量は 5 ml/kg とした。妊娠 18 1/2 日に母体を屠殺し、胎児の口蓋裂および水腎(腎盂拡大)の発生を調べた。腎盂拡大は正常 (0) から腎乳頭欠如 (4) まで、重症度を半定量的に評価した。溶媒前処置群 4 群、Idb 前処置群 4 群、計 8 群で、1 群 5~6 母体を観察した。

C. 研究結果

口蓋裂および水腎のいずれの発現についても明瞭な TCDD の用量反応関係は認められたものの、Idb 前処置群と溶媒前処置群の間に有意な差は認められず、期待された Idb と TCDD の相互作用は認められなかった。

Idb 前処置は妊娠母体に特記すべき毒性作用を

示さず、妊娠は順調に進行した。コーンオイル前処置群 (C) と Idb 前処置群 (I) で TCDD の 0、5、10、20 μ g/kg による胎児死亡・吸収率 (%) を C : I の形式で表示して比較すると、それぞれ 4.8:6.4、4.5:4.2、2.2:5.6、7.3:11.8 で、TCDD の最高用量でも、胎児致死作用はさほど示されなかった。口蓋裂の頻度 (%) を同様の形式で表示すると、0 : 0、0 : 2.4、43.2 : 40.8、88.9 : 86.8 で、TCDD の用量が増加するに伴い口蓋裂の頻度は 100% 近くまで高まった。水腎の重症度の平均値と標準偏差は、0.27 \pm 0.28 : 0.17 \pm 0.13、2.77 \pm 0.73 : 2.49 \pm 1.06、3.30 \pm 0.75 : 2.83 \pm 0.62、3.71 \pm 0.51 : 3.49 \pm 0.60 で、TCDD の用量に伴って水腎は重症となった。しかし、各用量でコーンオイル前処置群と Idb 前処置群間には有意な差は認められなかった。

D. 考察

本実験で用いた Idb の量は 100 mg/kg と超大量であるが、経口投与では妊娠マウスに毒性を示す量ではなかった。溶媒にはコーンオイルを用いたが、5ml/kg の投与液量では懸濁状態で、どの程度の量がどれくらいの時間で吸収されたか、その薬物動態は不明である。北村らによれば、マウス経口、腹腔内、皮下投与ではいずれも血中より Idb を検出することができなかったとのことで、薬物相互作用を検討するのに投与経路が適当であったかとの疑問が残る。また、本実験では Idb の最終投与から TCDD 投与までに 6 時間の間隔をとっ

たが、静脈内投与された Idb の血中濃度は急速に減少することが認められており、この時間設定にも問題がある。しかし、少なくとも経口投与された Idb に催奇形作用のないこと、すなわち AhR に結合しても、発生毒性発現に至らないことは確認された。TCDD 量は口蓋裂、水腎の誘発閾値に近いところから、ほぼ 100% に異常を起こす範囲にわたっており、相互作用を検討する目的には適当な用量設定といえる。本実験条件では Idb は TCDD の発生毒性を修飾しなかったが、今後は Idb の体内動態を踏まえて、投与経路、Idb 投与と TCDD の投与間隔を変えた実験が必要である。

E. 結論

マウスに経口投与された Idb は 100 mg/kg でも発生毒性を示さなかった。Idb の 100 mg/kg を 2 日間前投与し、最終投与から 6 時間後に TCDD を投与したところ、TCDD の発生毒性は修飾を受けなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Yamashita H, Nagano Y, Nakamura T, Ohmori H, Avraham H, Avraham S, Yasuda M, Matsumoto M: Identification and characterization of a novel Pyk2/related adhesion focal tyrosine kinase-associated protein that inhibits alpha-synuclein phosphorylation. *J Biol Chem*, 278 (43), 42225-33, 2003.
- 2) 安田峯生: マウス胎児における外脳誘発による口蓋裂の予防. 河合幹, 夏目長門編, 口唇口蓋裂における基礎研究と予防の現状, 丸善, 東京, pp 229-234, 2003.

2. 学会発表

- 1) 安田峯生, 隅田寛, 松葉美鈴, 杉原数美, 岡村さおり, 山下敬介, 関澤潤: インディルビンによるダイオキシン毒性の修飾. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会要旨集, 323 (抄録), 2003. (環境ホルモン学会第 6 回研究発表会, 2003 年 12 月 2-3 日, 仙台)
- 2) 杉原数美, 北村繁幸, 岡山幸誠, 原田亜紀子, 太田茂, 山下敬介, 岡村さおり, 安田峯生, 佐伯憲一, 松井三郎, 松田知成, 関澤潤: Indirubin の生体内代謝と AhR 結合活性の変動. 環境ホルモ

ン学会第 6 回研究発表会要旨集, 228 (抄録), 2003. (環境ホルモン学会第 6 回研究発表会, 2003 年 12 月 2-3 日, 仙台)

- 3) 隅田寛, 上塚翼, 安田峯生, 山下敬介, 角崎英志, 井上稔: 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) の胎児・授乳期暴露を受けたアカゲザル肝細胞の形態解析. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会要旨集, 325 (抄録), 2003. (環境ホルモン学会第 6 回研究発表会, 2003 年 12 月 2-3 日, 仙台)
- 4) 安田峯生, 松葉美鈴, 隅田寛: C57BL マウスの口蓋ヒダ. 日本解剖学会第 58 回中国・四国地方会要旨集, 17 (抄録), 2003. (日本解剖学会第 58 回中国・四国地方会, 2003 年 11 月 8-9 日, 松山)
- 5) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Tsuga K, Akagawa Y: Effect of in utero and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 431-434 (Short paper), 2003. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 6) Sumida H, Tsusaki H, Inouye M, Yasuda M: Renal fibrosis induced by in utero and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 64, 453-456 (Short paper), 2003. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)
- 7) Sugihara K, Kitamura S, Okayama T, Kohno Y, Ohta S, Yamashita K, Okamura S, Yasuda M, Saeki K, Matsui S, Matsuda T: Metabolism of indirubin and endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand candidates, and competitive effect with respect to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Organohalogen Compounds*, 65, 134-137 (Short paper), 2003. (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 24-29, 2003, Boston, USA)

- 8) 安田以久, 安田峯生, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル歯形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会要旨集, 118 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)
- 9) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 津賀一弘, 赤川安正: ダイオキシン胎生期暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成への影響. 第43回日本先天異常学会学術集会要旨集, 119 (抄録), 2003. (第43回日本先天異常学会学術集会, 2003年7月2-4日, 大阪)
- 10) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, 角崎英志, 井上稔, 山下敬介: アカゲザルの口蓋ヒダ. *Acta Anat Nippon*, 78, Suppl, 220 (抄録), 2003. (第108回日本先解剖学会総会・学術集会, 2003年4月1-3日, 福岡)

ヒト試料のダイオキシンおよびインディルビンの分析および関連遺伝子発現解析

分担研究者 秋葉澄伯 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

研究要旨

子宮筋腫による子宮全摘出手術を受けた症例より同意を得て尿中インディルビンの測定を行い、同時に生活習慣や病歴等に関する質問票調査も行った。（同症例からは子宮筋腫組織と子宮正常組織を採取し、特異的遺伝子の検索も実施している。）本研究はインディルビンの動態と女性ホルモン関連疾患の病態や女性ホルモン濃度等との関連性を中心に解析を行うことで、ヒト体内におけるインディルビンの役割についての検討を行った。

A. 研究目的

尿中の Ah リガンドであるインディルビンの生理作用についての解明をすすめるにあたり、特に女性ホルモン関連疾患であることが知られている子宮筋腫の患者における尿中インディルビンと各性腺ホルモンの動態を比較し関連性の有無について検討を行い、生活習慣などの調査結果とあわせて分析を行う。

B. 研究方法

鹿児島大学病院産婦人科にて子宮筋腫による子宮全摘出手術をうける患者より①子宮筋腫組織組織、②子宮正常組織、③尿検体、④生活習慣等の質問票を回収し①・②についての分析は熊本県立大学・有菌研究室に、③の尿中インディルビンの分析については徳島大学・関澤研究室にて行った。

C. 研究結果

子宮筋腫症例は現在までに4例の登録であったが、後日2例目の症例が術後の病理学検査で筋腫だけでなく肉腫も合併していることが判明した。各症例のデータについては下記のとおりである。

症例1. 46才女性、身長154cm、体重40.5kg、合併症：うつ病、子宮筋腫家族歴：なし、既婚、初潮14才、月経周期ほぼ規則的、出産2回、初産28才、授乳期間合計9ヶ月、喫煙：18才～30才、45才～現在まで喫煙。1日5～6本。飲酒：ほぼ無。食習慣：肉一週に2、3回以上。魚一週に2、3回以上。大豆食品一週に2、3回以上。味噌汁一毎日。緑黄色野菜一毎日。レバー食品一時々。無農薬食品等一減農薬米を自家栽培。常用健康食品一鉄剤。43才頃から毎日摂取。運動一3年間、職業一看護師16年、就寝時電灯一消す。出生時母年齢：27才、出生体重：普通

症例番号	MYO1	MYO2 ^{注1}	MYO3 ^{注2}	MYO4	GYU1 ^{注3}
手術内容	子宮・左卵巣摘出	子宮単純摘出	子宮単純摘出	子宮単純摘出	子宮・卵巣摘出
年齢	46才	46才	43才	44才	45才
身長	154	161.5	156	153	150.6
体重	40.5	79	43	52	60
20歳体重	45	63	45	50	47
喫煙	有	無	無	無	無
喫煙本数	5-6本	-	-	-	-
喫煙開始	18	-	-	-	-
禁煙年齢	30-45	-	-	-	-
飲酒	無	無	無	無	無
肉料理	週2-3回	時々	週2-3回	週2-3回	週2-3回
魚料理	週2-3回	時々	週2-3回	週2-3回	毎日
豆腐類	週2-3回	週2-3回	時々	週2-3回	毎日
味噌汁	毎日	時々	週2-3回	週2-3回	週2-3回
緑黄色野菜	毎日	毎日	毎日	毎日	毎日
レバー類	時々	時々	全然食べない	時々	時々
無農薬野菜	自家作物	時々買う	気にしない	いつも買う	いつも買う
薬・栄養食品	抗うつ剤・鉄剤	無	無	無	ステロイド剤
頻度・開始年齢	毎日43歳~	-	-	-	毎日23才~
婚姻	既婚	既婚	既婚	既婚	未婚
初潮	14才	13才	11才	15才	12才
30代月経	ほぼ規則的	規則的	ほぼ規則的	規則的	規則的
出産回数	2回	4回	2回	3回	0回
初産年齢	28才	26才	24才	25才	-
授乳期間	9ヶ月	41ヶ月	6ヶ月	24ヶ月	-
兄弟人数	5人	3人	3人	2人	-
順番	3番目	1番目	1番目	2番目	-
筋腫家族歴	無	無	有	有	無
合併症	うつ病	下肢静脈瘤	ジストニア	無	膠原病
運動歴	有	有	無	無	有
職業歴	看護師	専業主婦	事務	パート事務	事務
就寝時灯	暗	薄明かり	暗	暗	暗
出生時母年齢	27才	24才	26才	26才	30才
出生時体重	普通	低出生体重	普通	普通	普通

筋腫試料なし

注1: 術前診断はLeiomyoma(筋腫)だったが、術後の病理学的検査でsarcomaと診断された。

(正式診断名: Mixed endometrial stromal and smooth muscle tumor, low grade)

注2: 特発性捻転ジストニー発症(20才)抗けいれん剤等を服用し、20,25,28才時に視床凝固手術

注3: 筋腫組織は同意が得られませんでした。膠原病以外に乳がんの既往歴があり抗エストロゲン剤を内服中のため女性ホルモンが低値になっている。