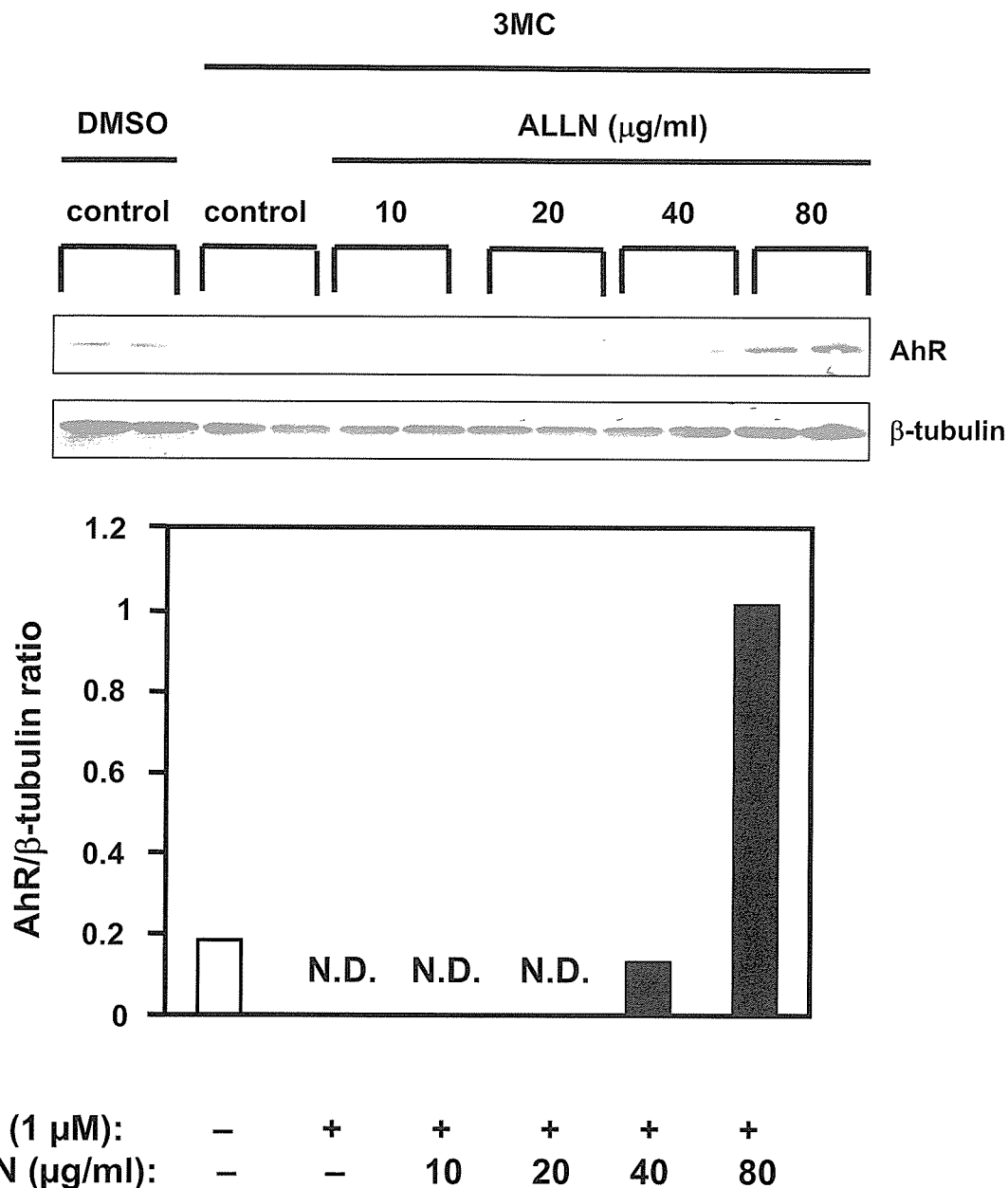
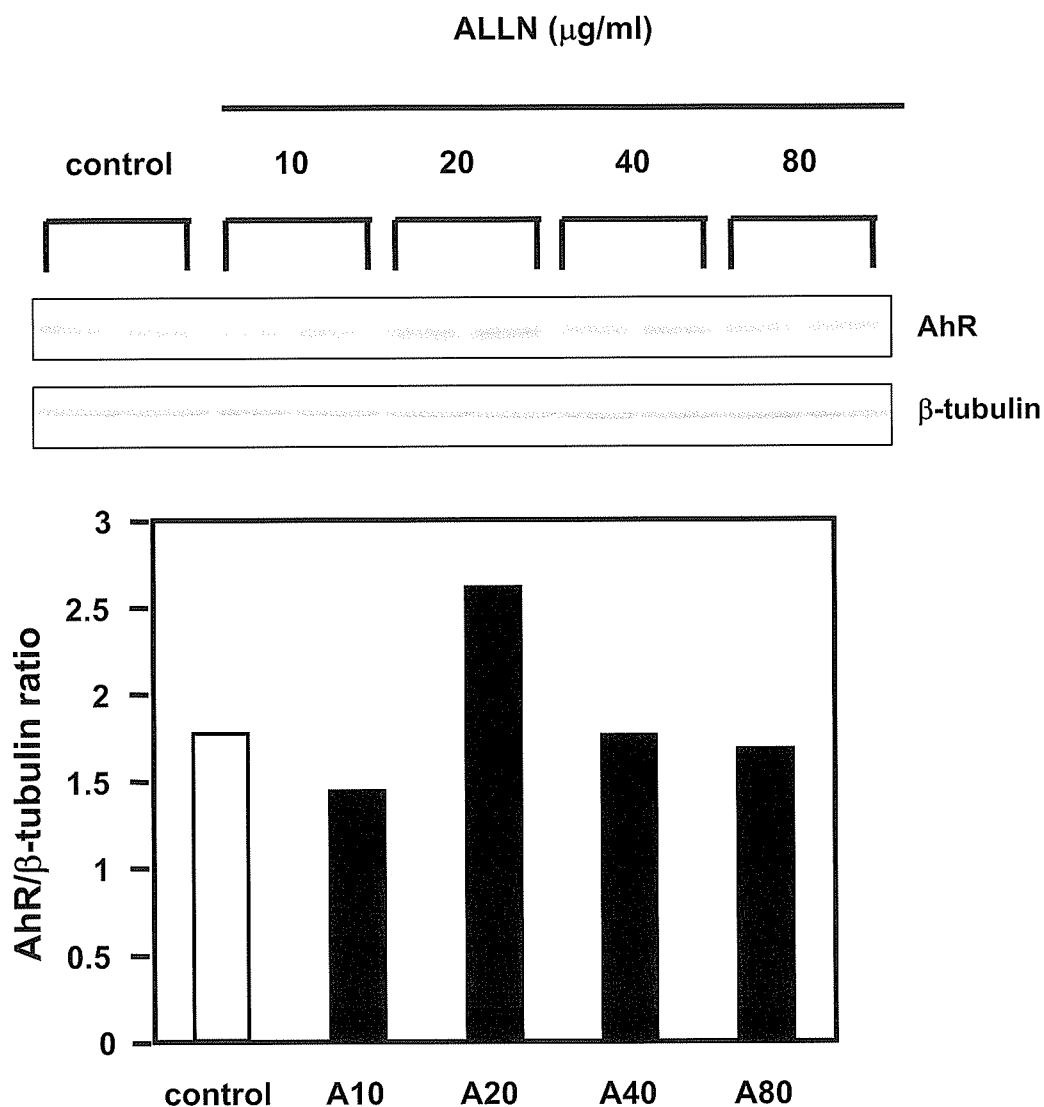


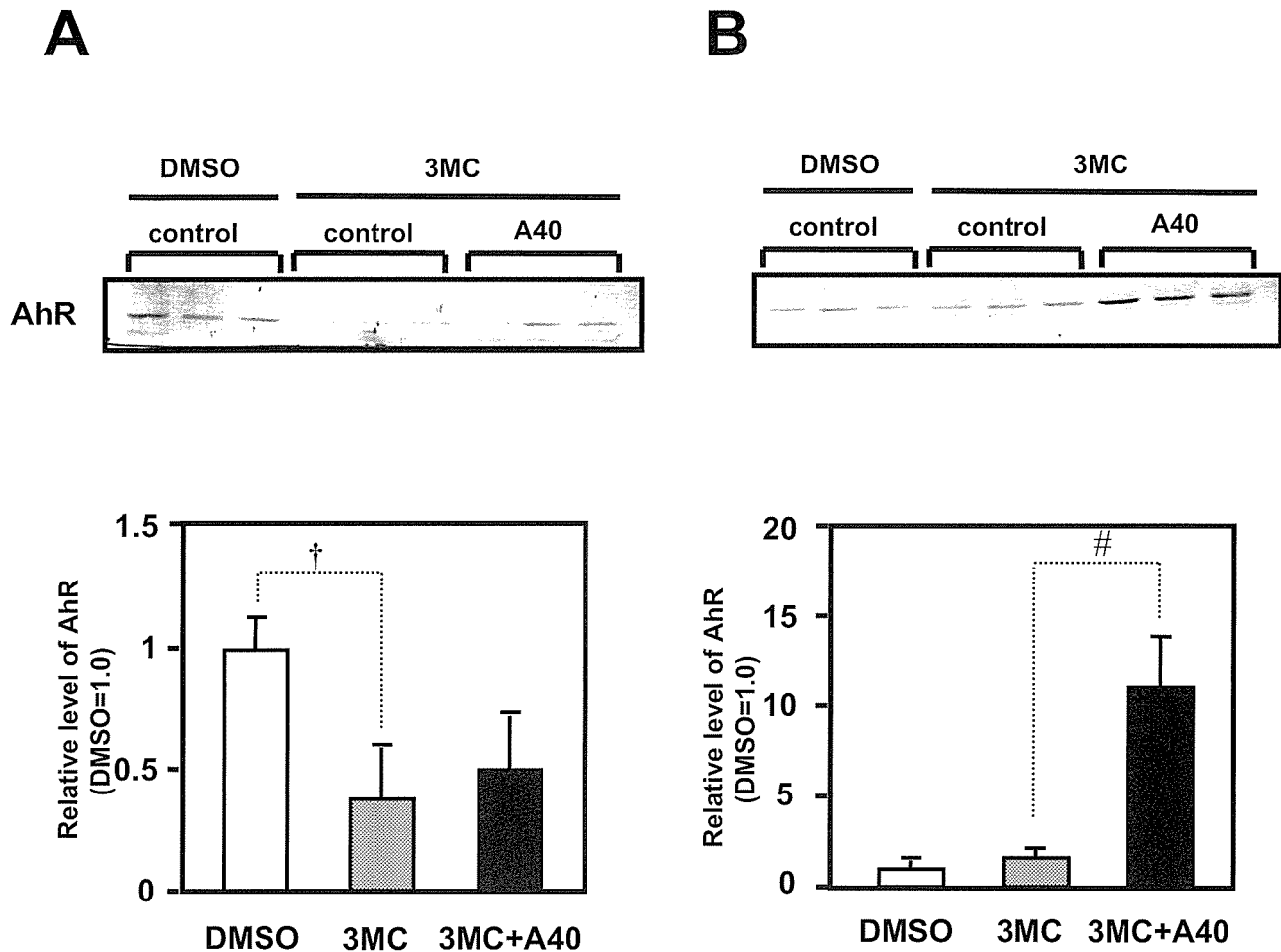
**Fig. 3. Continued.**



**Fig. 4. Immunoblotting of total AhR in T47D cells treated with ALLN and 3MC.** The T47D cells were pre-treated with ALLN the concentration of which is indicated in the figure for 4 h, and then cultured in the presence of the same concentration of ALLN and 1  $\mu\text{M}$  3MC for 12 h. After treatment, whole cell lysate (20 mg protein) was subjected to SDS-PAGE (7% gel) and immunoblotted using anti-AhR monoclonal antibody.  $\beta$ -tubulin was used as a loading control. The band intensity was quantified and normalized by  $\beta$ -tubulin level. Each bar of the lower figure represents the mean of two determinations. N.D.: not detected.



**Fig. 5. Immunoblotting of total AhR in T47D cells treated with ALLN.** T47D cells were treated for 12 h with ALLN the concentration of which is indicated in the figure (eg., A10 means ALLN 10  $\mu\text{g/ml}$ ). After treatment, whole cell lysate (20 mg protein) was subjected to SDS-PAGE (7% gel) and immunoblotted with anti-AhR monoclonal antibody.  $\beta$ -tubulin was used as a loading control. The band intensity was quantified and normalized by  $\beta$ -tubulin level. Each bar of the lower figure represents the mean of two determinations.



**Fig. 6. Increase in the nuclear accumulation of AhR following the double treatment of T47D cells with 3MC and ALLN.** The cells were pre-treated with 40  $\mu\text{g/ml}$  ALLN for 4 h, and then cultured in the presence of the same concentration of ALLN and 1  $\mu\text{M}$  3MC for 12 h. Cytosolic (A) and nuclear (B) fractions were subjected to SDS-PAGE (7% gel), and immunoblotted using anti-AhR monoclonal antibody. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of three determinations. †, # Significantly different between the pair indicated (†;  $p < 0.01$ , #;  $p < 0.001$ ).

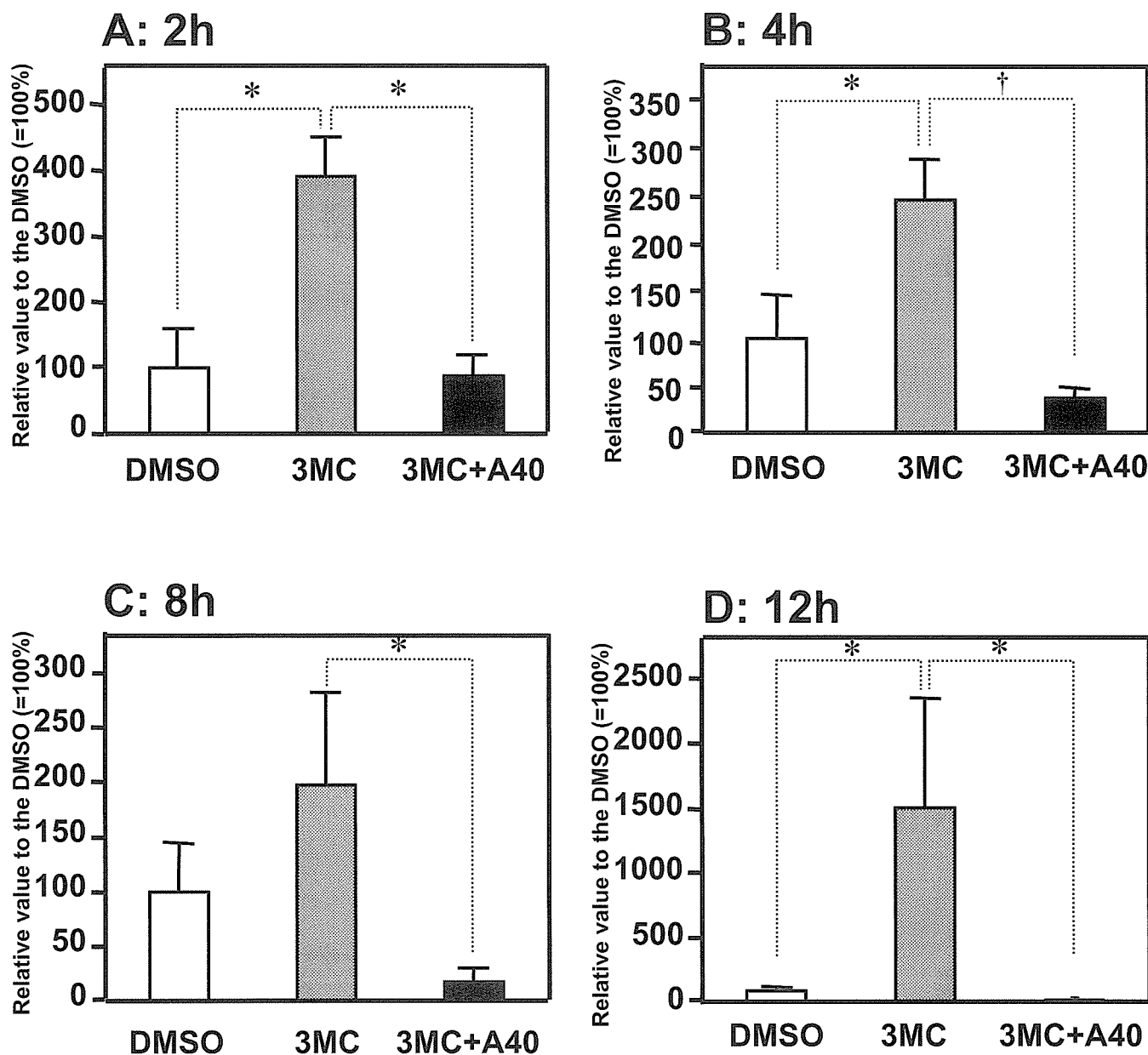
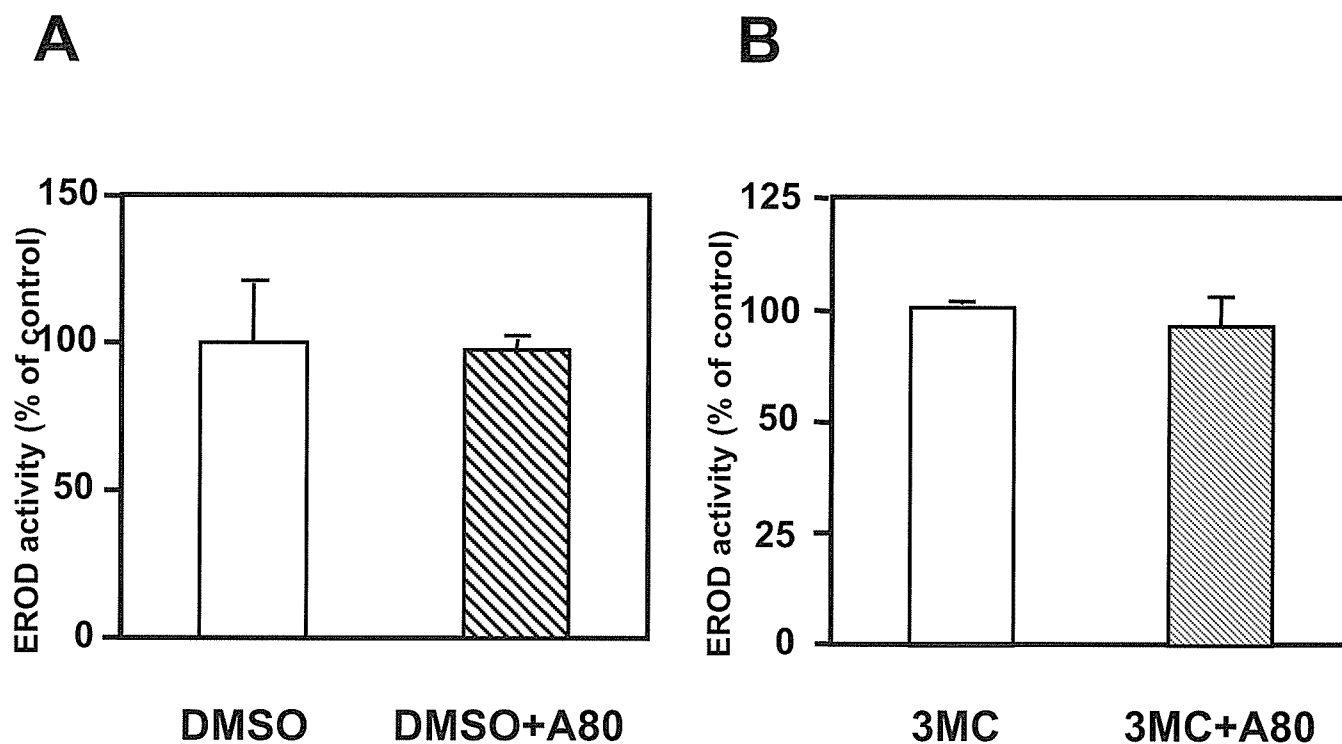
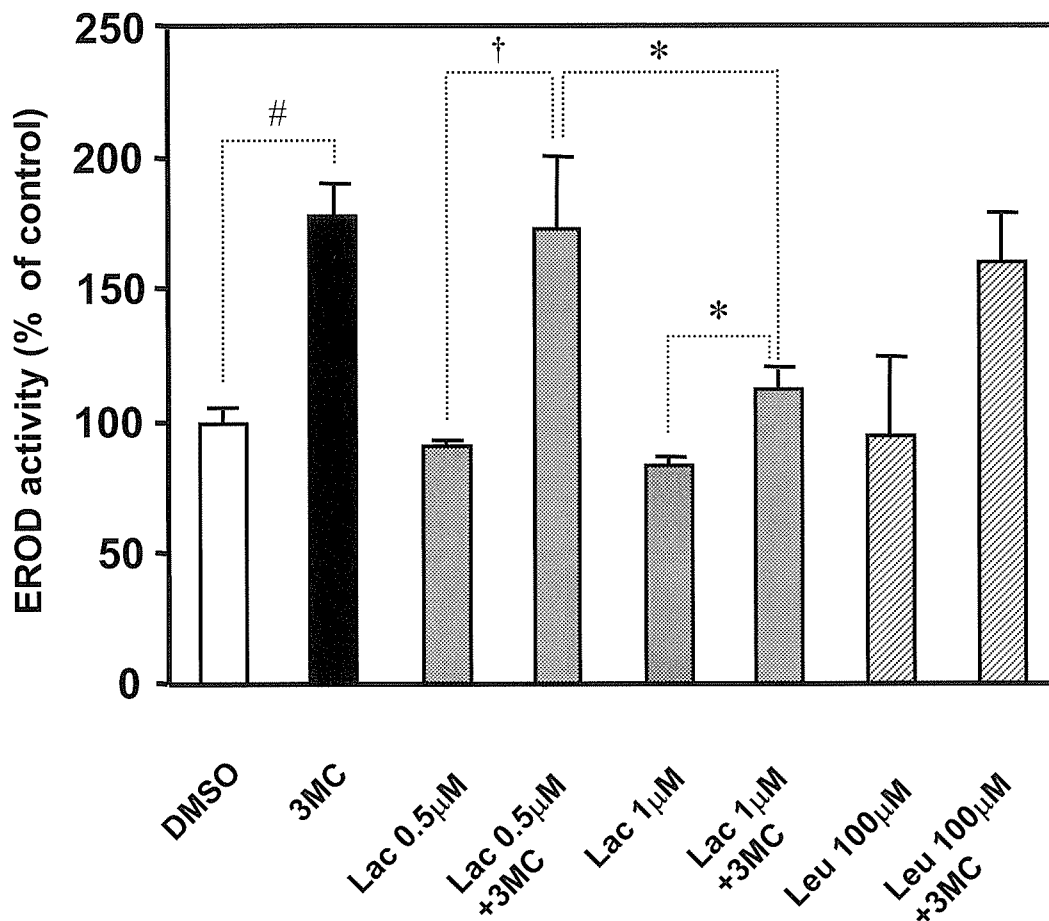


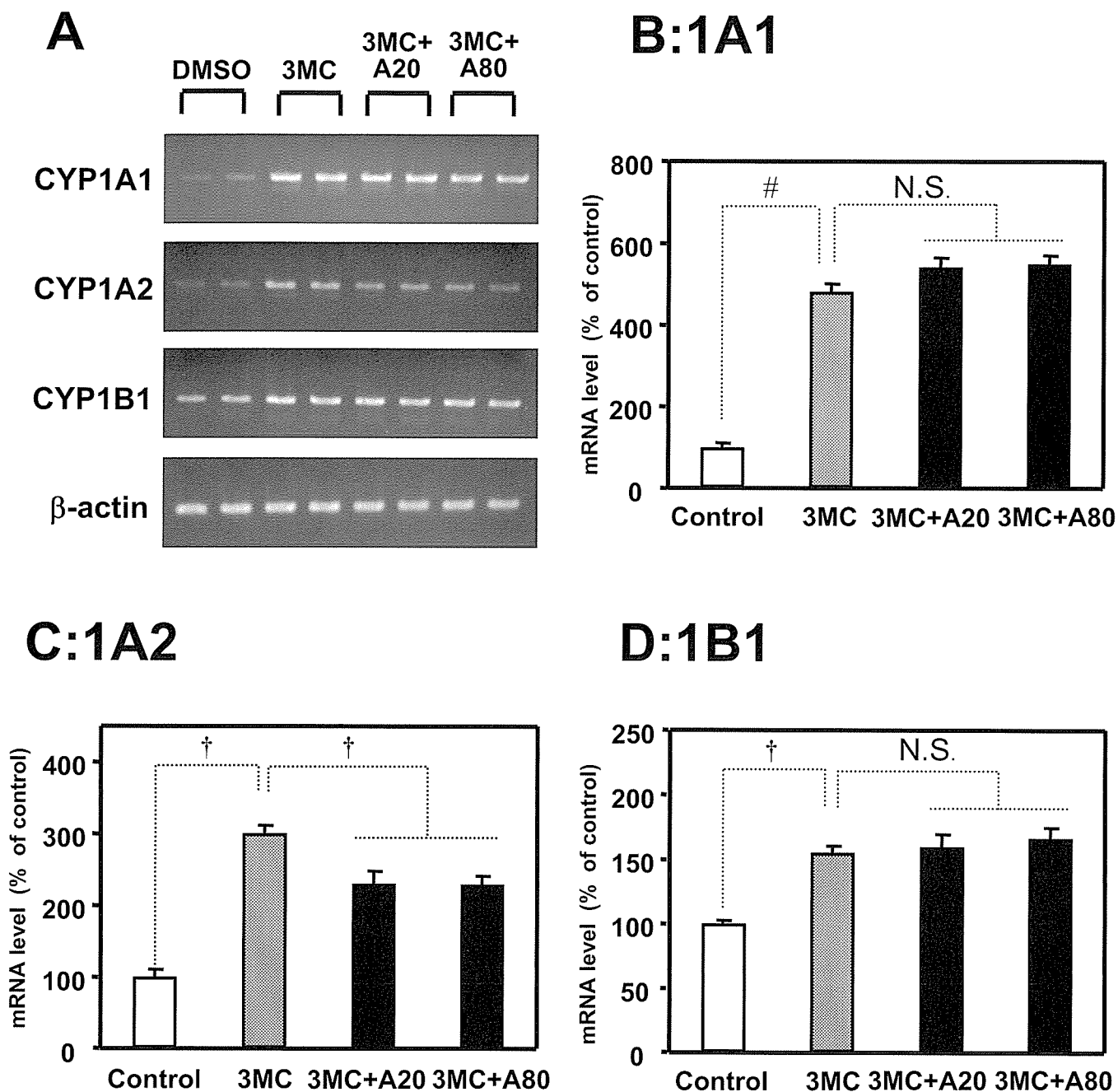
Fig. 7. The effect of ALLN on the 3MC-mediated increase of ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity, a maker of CYP1A, in T47D cells. T47D cells were pre-treated with 40  $\mu$ g/ml ALLN for 4h, and then cultured in the presence of the same concentration of ALLN and 1  $\mu$ M 3MC a period indicated and the activity of EROD was measured. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of three determinations. \*, †: Significantly different between the pair indicated (\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$ ). The EROD activity of control (DMSO, panel A) was 5.8 fmol resorufin formed/min/well.



**Fig. 8. The inhibitory effect of ALLN on CYP1A activity.** T47D cells were treated with DMSO (A) or 1  $\mu$ M 3MC (B) for 2 h, and then washed with PBS. Subsequently, the cells were incubated for 0.5 h with 7-ethoxyresorufin in the presence of ALLN (80  $\mu$ g/ml). CYP1A activity was determined by measuring ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD). Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of four determinations. The activities of DMSO- and 3MC-treated cells were  $0.25 \pm 0.01$  and  $1.83 \pm 0.15$  fmol resorufin formed/min/well, respectively.

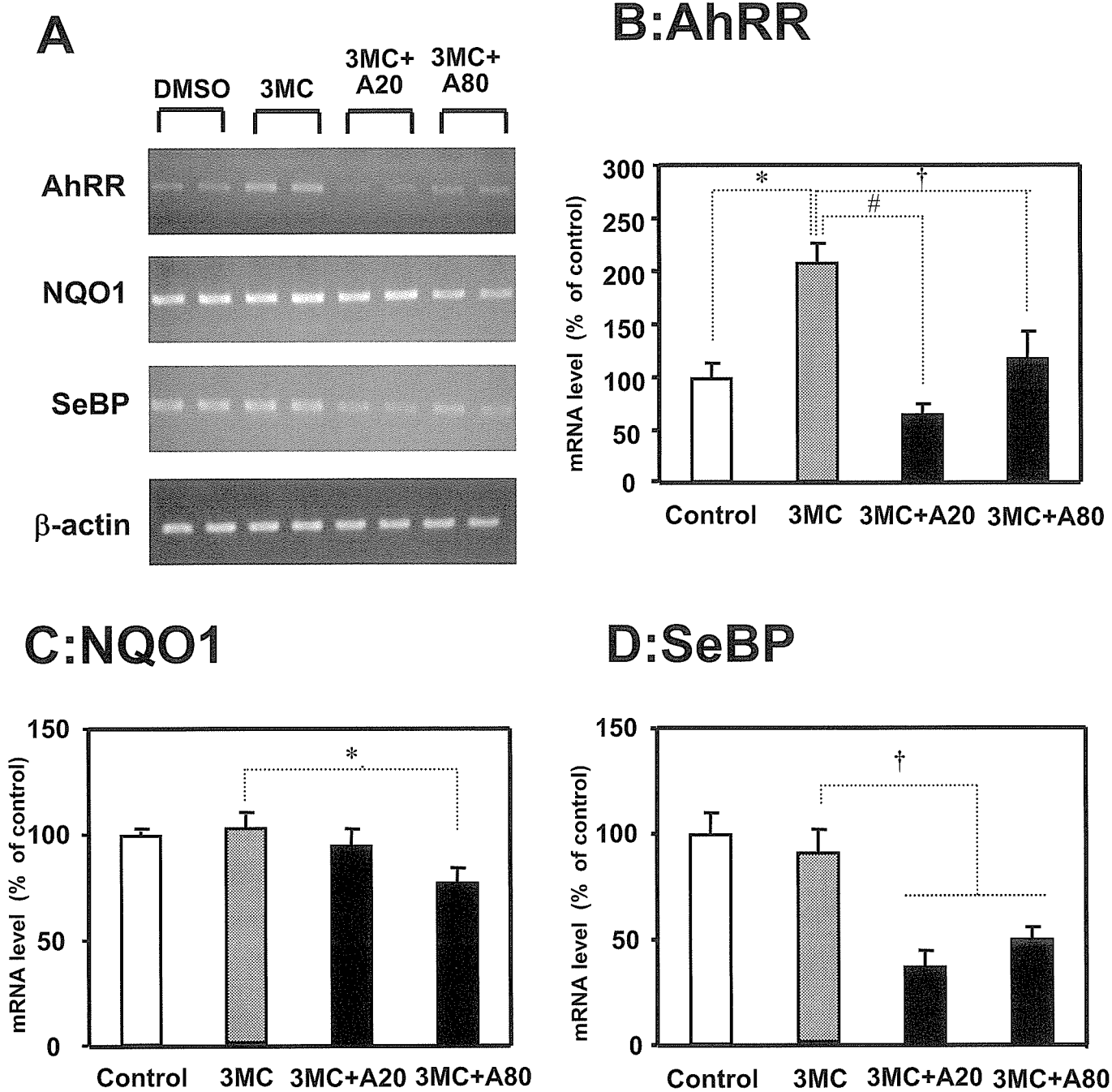


**Fig. 9. The effect of lactacystin and leupeptin on the 3MC-mediated increase of EROD activity in T47D cells.** T47D cells were pre-treated with lactacystin (Lac) or leupeptin (Leu) for 4h, and then cultured in the presence of the same concentration of these inhibitors and 1  $\mu$ M 3MC for 2h, followed by the determination of EROD activity. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of triplicate assay. \*, †, #: Significantly different between the pair indicated (\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$ ; #,  $p < 0.001$ ). The EROD activity in control (DMSO) was 0.03 fmol resorufin formed/min/well.

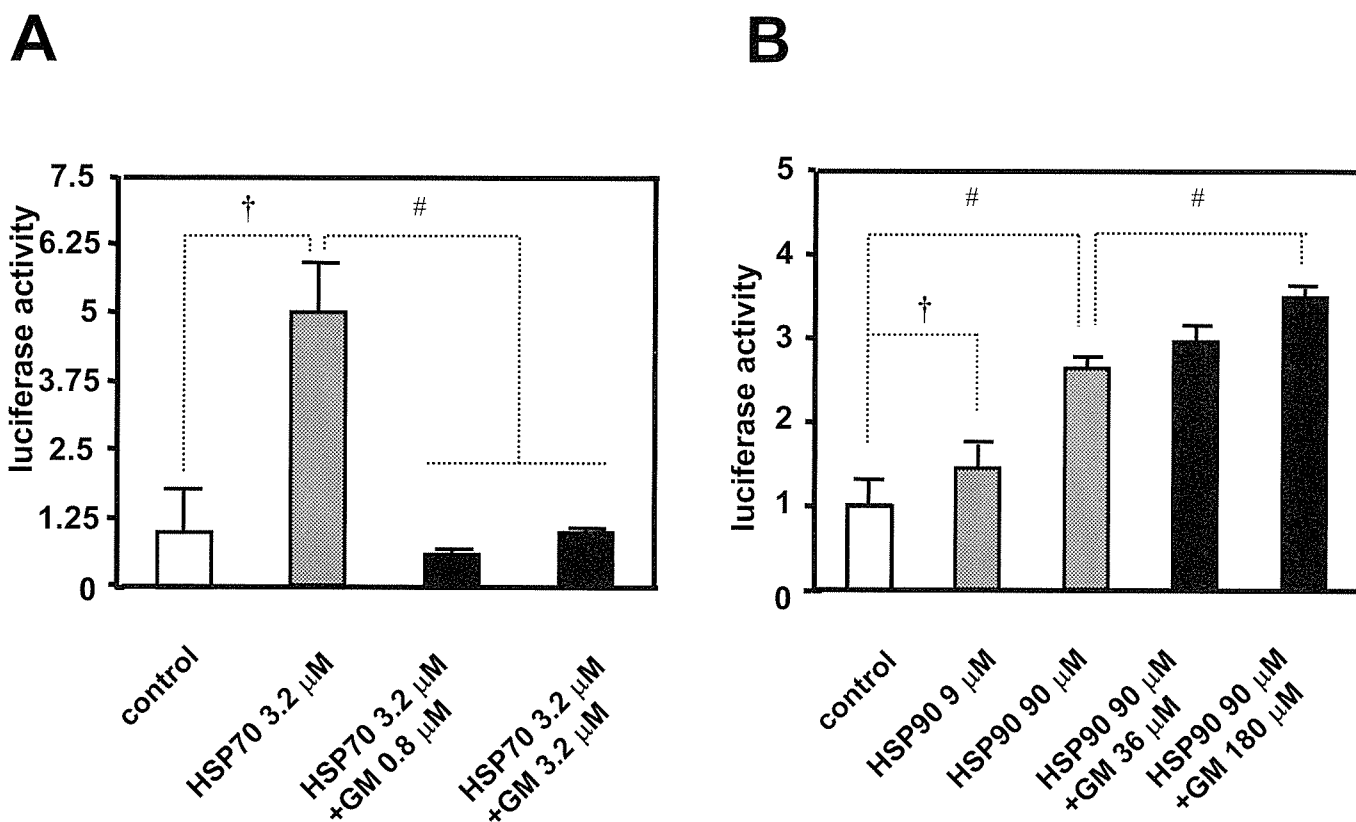


**Fig. 10. Effects of ALLN on the expression of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 mRNAs in T47D cells.** Gel image of cDNA amplified (A) and quantitative representation of mRNA (B-D) are shown. In panels B-D, each figure shows the relative expression to the control (= 100%). The band intensity of each CYP mRNA was normalized by  $\beta$ -actin. In B, C and D, each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of four determinations. †, #: Significantly different between the pair indicated (†,  $p < 0.01$ ; #,  $p < 0.001$ ). N.S.: Not significant.

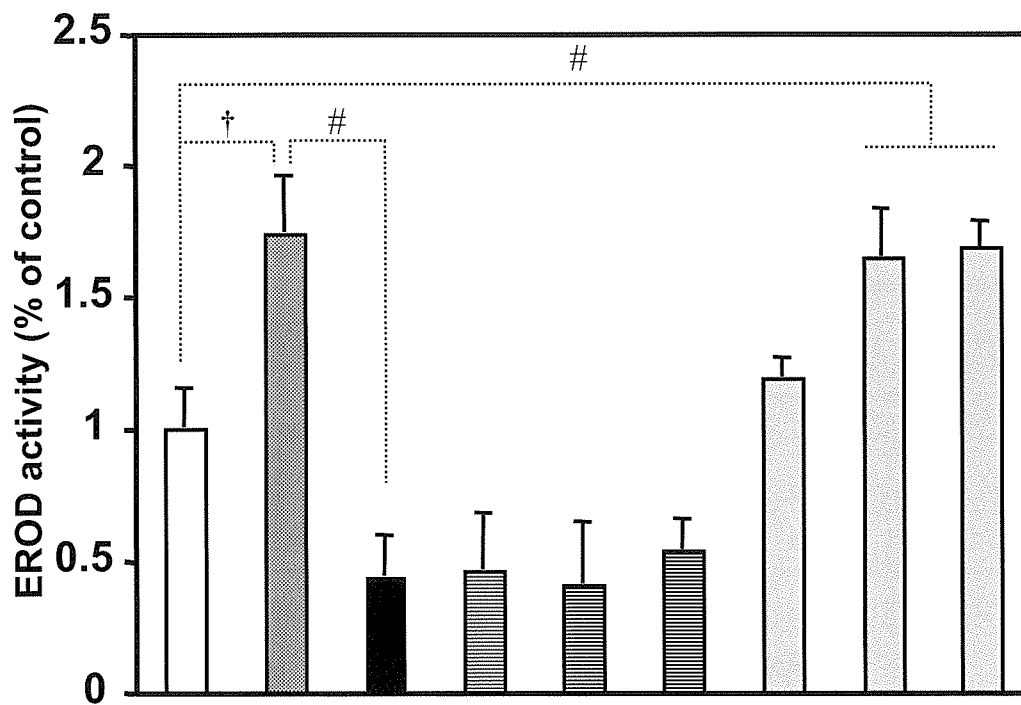




**Fig. 11. Effects of ALLN on the expression of AhRR, NQO1 and SeBP mRNAs in T47D cells.** Gel image of cDNA amplified (A) and quantitative representation of mRNA (B-D) are shown. In panels B-D, each figure shows the relative expression to the control (= 100%). The band intensity of each mRNA was normalized by  $\beta$ -actin. In B, C and D, each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of four determinations. \*, †, #: Significantly different between the pair indicated (\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$ ; #,  $p < 0.001$ ).

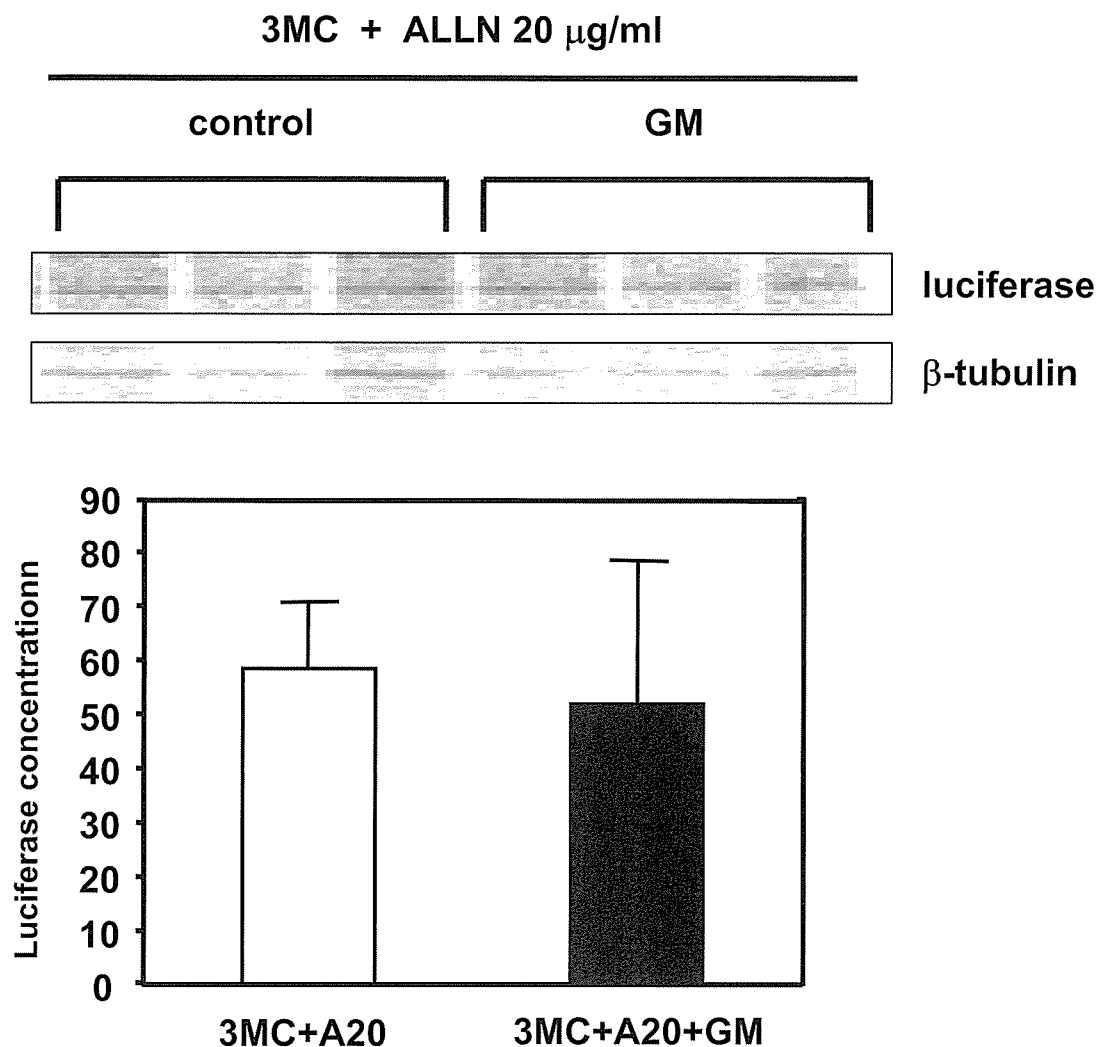


**Fig. 12. The inhibitory effect of GM on HSP70- and HSP90-mediated refolding of denatured firefly luciferase.** Firefly luciferase denatured with 6M guanidine was incubated with HSP70 (A) and HSP90 (B) in the absence and presence of GM. Following incubation, refolding of luciferase was measured by estimating the restoration of the activity. Each bar represents the mean of triplicate assay. †, #: Significantly different between the pair indicated (†,  $p < 0.01$ ; #,  $p < 0.001$ ).



3MC (1 μM) :	-	+	+	+	+	+	-	-	-
ALLN (40 μg/ml) :	-	-	+	+	+	+	-	-	-
GM (mM) :	-	-	-	0.2	1	2	0.2	1	2

**Fig. 13. Absence of the inhibitory effect of GM on the ALLN-produced reduction of CYP1A induction.** T47D cells were pre-treated with 40 μg/ml ALLN and GM for 4h, and then cultured in the presence of the same concentration of ALLN, GM and 1 μM 3MC for 2 h, followed by the determination of ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity. Each bar represents the mean ± S.E. of triplicate assay. †, #: Significantly different between the pair indicated (†,  $p < 0.01$ ; #,  $p < 0.001$ ).



**Fig. 14. The effect of GM on AhR-mediated expression of luciferase reporter gene.** T47D cells were pre-treated with 20  $\mu$ g/ml ALLN and 0.2 m $\square$  GM for 4h, and then cultured in the presence of the same concentration of ALLN, GM and 1  $\mu$ M 3MC for 12 h. The cells were then labeled for 30 min with [ $^{35}$ S]methionine and the luciferase protein was immunoprecipitated with a polyclonal anti-luciferase antibody. The labeled luciferase protein in the precipitates was subjected to SDS-PAGE (10% gel), and the radioactivity incorporated was visualized by BAS-2500 IP Reader. For reference,  $\beta$ -tubulin labeled with [ $^{35}$ S]methionine was precipitated and analyzed in the same manner as luciferase. The band was quantified and normalized by  $\beta$ -tubulin level.

## 分担研究報告書

### 2,2',3,4',4,5',6-七塩素化ジフェニル(CB183)のin vitro代謝の動物種差

分担研究者 古賀 信幸 中村学園大学栄養科学部 教授

**研究要旨** 哺乳動物血液中で最も高濃度に存在する PCB 代謝物として 4-hydroxy (OH)-CB187 が、注目されている<sup>1-3)</sup>。本代謝物の親 PCB としては CB187 と CB183 が考えられるが、昨年までに CB187 代謝を数種類の実験動物で検討したところ、主代謝物ではないがラットおよびモルモットで生成されることを確認した。そこで本研究では、CB183 から生成されるか否か明らかにするため、ラット、モルモットおよびハムスター肝ミクロゾーム(Ms)による in vitro 代謝を調べた。その結果、いずれの動物肝でも2種類の代謝物(M-1, M-2)が生成された。これらの代謝物の化学構造は、GC-MS および別途合成した標準品との比較から、それぞれ 3'-CH<sub>3</sub>O-CB183 および 5-CH<sub>3</sub>O-CB183 であると同定され、上記 4-OH-CB187 はいずれの動物肝 Ms によって、全く検出されなかった。また、M-1 と M-2 の生成活性はラットで最も高いこと、すべての動物で PB 前処理により生成が促進されることも明らかとなった。

以上の結果から、4-OH-CB187 の親 PCB は、CB187 であり、CB183 からは生成されないことが示唆された。

#### A. 研究目的

最近、4-hydroxy (OH)-CB187 が、哺乳動物血中で最も高濃度に存在する PCB 代謝物として注目されている<sup>1-3)</sup>。本代謝物の親 PCB としては CB187 と CB183 が考えられるが、両 PCB の代謝経路はよくわかっていなかった。当研究室では、昨年までに動物肝ミクロゾーム(Ms)による CB187 の in vitro 代謝<sup>4)</sup>を検討したところ、①3種類の代謝物、すなわち 4'-OH-CB151 (M-1), 4'-OH-CB178 (M-2), 4-OH-CB187 (M-3)が生成されること、②ラットやハムスターに比べ、モルモットで最も高い代謝活性を示すこと、③フェノバルビタール(PB)誘導性チトクロム P450 (P450)の CYP2B が最も重要であることを、また④CB187 投与ラットおよびモルモットを用いた in vivo 代謝において、生成された 4-OH-CB187 は選択的に血中へと分布することを明らかにした<sup>5)</sup>。

一方、この4-OH-CB187はCB183からも、4,5-エポキシドの生成およびNIH転位を經由

して生成される可能性が考えられる。そこで本研究では、本代謝物がCB183から生成されるか否かを明らかにするため、動物肝MsによるCB183のin vitro代謝を調べた。

#### B. 研究方法

① 実験動物および薬物処理: 実験動物は Wistar 系雄性ラット(体重約 200 g)、Hartley 系雄性モルモット(体重約 280 g)および Golden syrian 雄性ハムスター(体重約 90 g)を用いた。肝 Ms の調製は、未処理、PB (80 mg/kg/day × 3)または 3-メチルコラントレン (MC) (20 mg/kg/day × 3)前処理の実験動物より肝を摘出し、常法により行った。

② CB183 代謝: CB183 を NADPH 存在下、好氣的に動物肝 Ms とともに HEPES 緩衝液 (pH 7.4)中で、37°C、60 分間インキュベート後、クロロホルム-メタノール(2:1)および *n*-ヘキサンで抽出後、メチル化し、GC-ECD および GC-MS で分析した。

(倫理面への配慮)

動物肝 Ms の調製に際し、動物の苦痛をできるだけ軽減するため、後頭部を強打して気絶させ、頸動脈からの脱血により死亡させた。

### C. 研究結果

Fig. 1 には、GC-ECD の結果を示す。いずれの PB 前処理動物肝 Ms によっても CB183 から2種類の代謝物ピーク(M-1, M-2)が検出された。GC-MS の結果、これらの分子量はいずれも 422 であったことから、monoOH 体(メチル化体)であることが判明した(Table 1)。また、マスフラグメンテーションから、M-1(メチル化体)は meta 位にさらに M-2(メチル化体)は para 位に CH<sub>3</sub>O 基を持つことが示唆された。別途、予想代謝物を合成して、GC-MS で保持時間およびマススペクトルを比較したところ、M-1(メチル化体)は 3'-CH<sub>3</sub>O-CB183 と完全に一致した。一方、M-2(メチル化体)は 4-CH<sub>3</sub>O-CB187 だけでなく、5-CH<sub>3</sub>O-CB183 とも一致した。そこで、次にこれらを GC 上で完全に分離するため、GC カラムの再検討を行った。その結果、当初 DB-1(30m 長)カラムで分離できなかった上記2種の合成標品は、SP2330(30m 長)カラムで完全に分離された(Table 2)。このカラムで M-2(メチル化体)を測定したところ、保持時間が 5-CH<sub>3</sub>O-CB183 と完全に一致した。

ところで、肝 Ms による M-1 と M-2 の生成量には動物種差がみられた(Fig. 2)。すでに報告した CB187 代謝では、モルモットで活性が高かったが、今回の CB183 代謝ではラット >モルモット=ハムスターの順となった。また、両代謝物の生成は CB187 の場合と同様に、PB 前処理により促進されたが、誘導の程度

は CB183 代謝物の方が大きかった。さらに、M-1 と M-2 の生成比も動物間でかなり異なっており、モルモットで 1.77、ラットで 0.39、ハムスターで 0.22 であった。

### D. 考察

これまで、CB183代謝物のM-1とM-2はそれぞれ3'-OH-CB183および4-OH-CB187と考えてきたが<sup>6)</sup>、今回、M-2につきGCカラムの再検討をしたところ、5-OH-CB183であることが判明した。このことから、ラット、モルモットおよびハムスターのいずれの動物肝においても、CB183からは3'-OH-および5-OH-CB183が生成されるのみで、4-OH-CB187は生成されないことが明らかとなった(Fig. 3)。

### E. 参考文献

1. Å. Bergman, E. Klasson-Wehler and H. Kuroki, *Environ. Health Perspect.*, **102**, 464-469 (1994).
2. G. M. Sandala, C. Sonne-Hansen, R. Dietz, D. C. Muir, K. Valters, E. R. Bennett, E. W. Born and R. J. Letcher, *Sci. Total Environ.*, **331**, 125-141 (2004).
3. C. D. Sandau, P. Ayotte, E. Dewailly, J. Duffe and R. J. Norstrom, *Environ. Health Perspect.*, **108**, 611-616 (2000)
4. C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, and N. Koga, *Xenobiotica*, **35**, 319-330 (2005).
5. C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, and N. Koga, *Organohalogen Compounds*, **67**, 2343-2345 (2005).
6. C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, M. Ozaki, N. Koga, *Organohalogen Compounds*, **68**, 1733-1736 (2006).

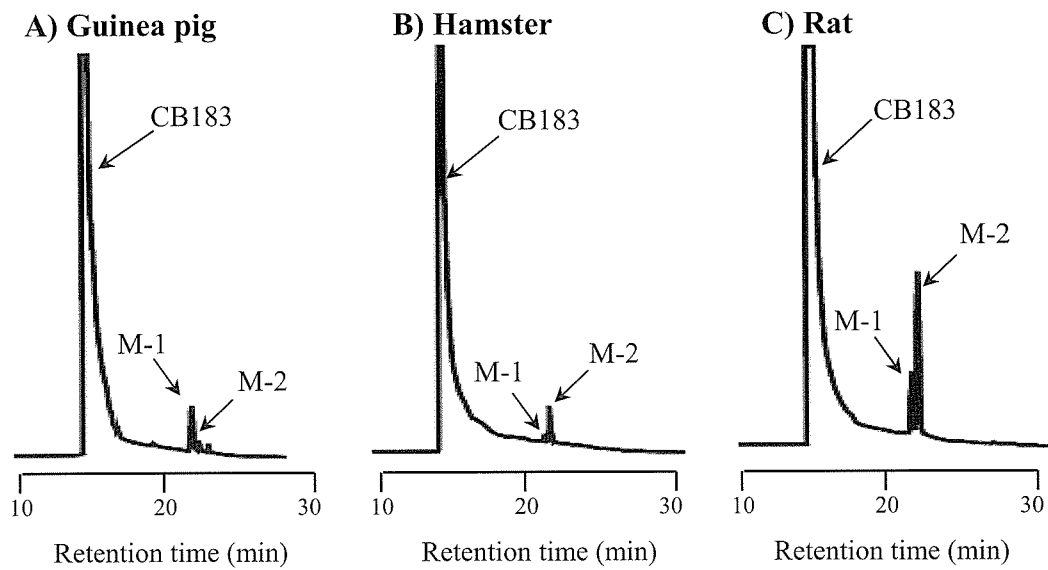


Fig. 1 GC-ECD chromatograms of the methylated derivatives of CB183 metabolites formed by liver microsomes of PB-treated rats (A), guinea pigs (B) and hamsters (C). DB-1 capillary column (30 m long) was used for GC-ECD.

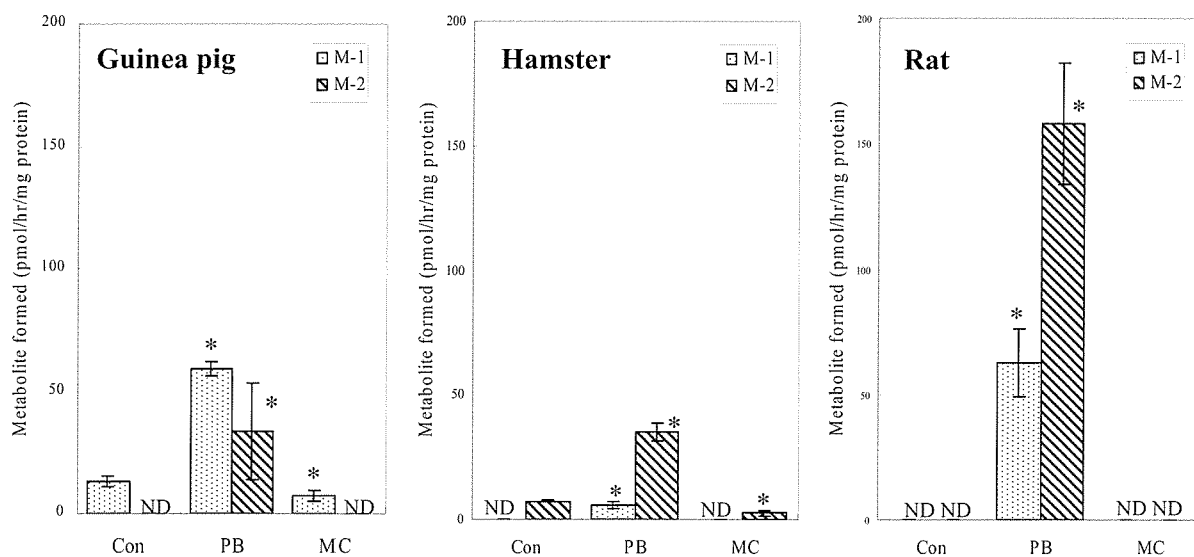


Fig. 2 Effects of P450 inducers on CB183 metabolism with liver microsomes of guinea pigs, hamsters and rats

Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (vertical bars) of four animals.

\* Significantly different from untreated animals ( $p < 0.05$ ).



Table 1 Mass spectral data and retention times of the methylated derivatives of two CB183 metabolites and its synthetic compounds in GC-MS

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (relative abundance, %)						Retention time (min)
		[M <sup>+</sup> ]	[M <sup>+</sup> -15]	[M <sup>+</sup> -35]	[M <sup>+</sup> -43]	[M <sup>+</sup> -50]	[M <sup>+</sup> -113]	
M-1	422	100	2	-	38	9	58	17.07
M-2	422	100	26	-	47	24	61	17.15
3'-MeO-CB187	422	100	13	-	40	12	56	16.75
4'-MeO-CB178	422	100	28	-	41	-	74	16.93
3'-MeO-CB183	422	100	4	-	40	-	46	17.07
4'-MeO-CB175	422	100	26	-	39	-	40	17.13
5-MeO-CB183	422	100	28	-	42	23	42	17.15
4-MeO-CB187	422	100	22	-	47	-	54	17.15

DB-1 capillary column (30 m long) was used for GC-MS.

The oven temperature was programmed from 70°C (2 min) to 230°C at a rate of 20°C/min and then to 280°C at a rate of 4°C /min. The temperatures in the injection port and the detector were 250°C.

Table 2 Comparison of retention times of the methylated CB183 metabolite (M-2) and its corresponding compounds using various GC columns.

Compound	Retention time (min)			
	DB-1 (30 m)	DB-1 (60 m)	DB-5 (60 m)	SP-2330 (30 m)
<b><u>Standard</u></b>				
5-MeO-CB183	22.51	106.24	119.52	23.69
4-MeO-CB187	22.51	106.39	119.91	24.13
<b><u>CB183</u></b>				
M-2	22.51	106.22	119.50	23.69

The temperatures in the column oven, the injection port and the detector were 230°C, 250°C and 250°C, respectively.

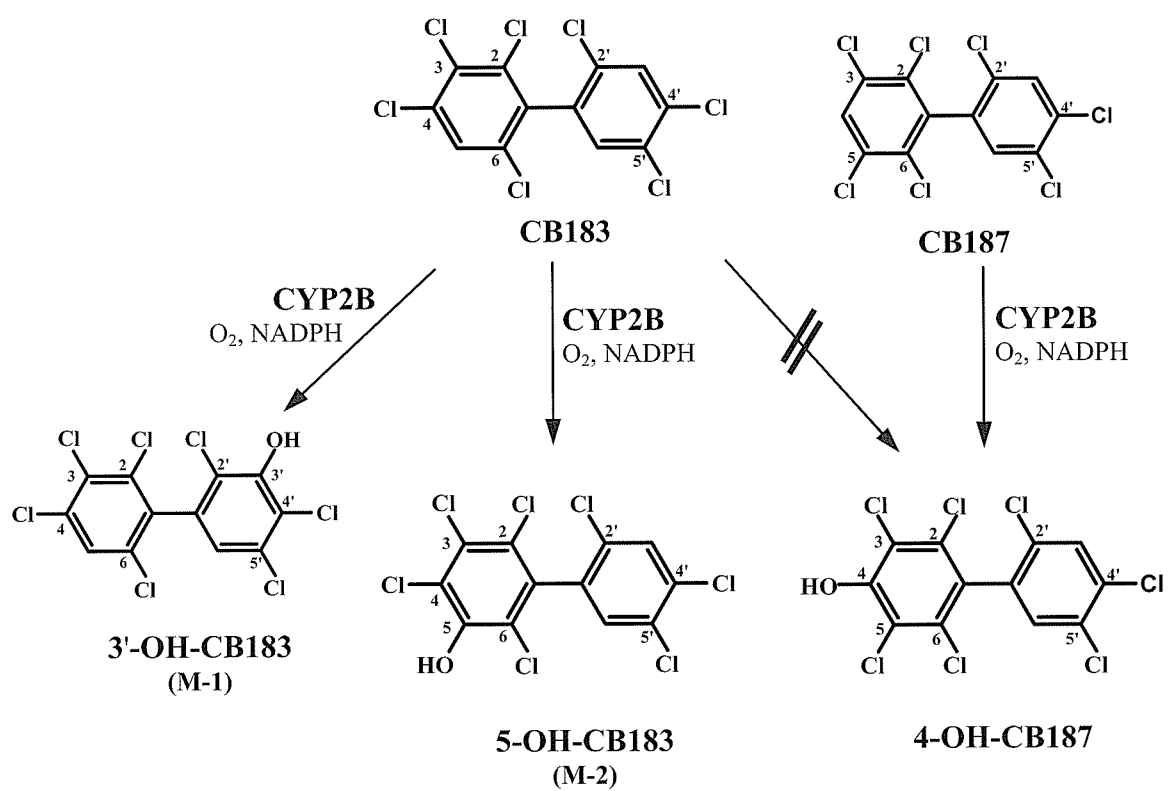


Fig. 3 Postulated metabolic pathways of CB183 in animal liver.

## ダイオキシン曝露による気道上皮傷害の検討

分担研究者 中西洋一 九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設 教授

**研究要旨** PCB/ダイオキシン類曝露による気道上皮細胞の傷害に関して検討を行った。*in vitro*の検討では TCDD 曝露により気道上皮細胞株に酸化ストレスが発生することが明らかになった。また抗酸化作用をもつといわれる (-)-epigallocatechin gallate や Vitamine E にても酸化ストレスは減弱した。*in vivo*での検討としてマウスへの腹腔へ TCDD の投与を行ったが今回の検討では酸化ストレスの発生は確認できなかった。

### A. 研究目的

油症の呼吸器症状として慢性の咳、痰などいわゆる慢性気管支炎の症状が認められる。PCB/ダイオキシン類の曝露により気道上皮の傷害が起こるものと考えられる。気道上皮由来の細胞株を用いてダイオキシン類の曝露による細胞傷害の機構を明らかにするために今回の研究を行った。

### B. 研究方法

酸化ストレスの計測(*in vitro*)：気道上皮由来の細胞株 A549 に TCDD を曝露し、細胞の酸化ストレスを測定した。酸化傷害の測定は DCF assay にて測定した。細胞に PCB/ダイオキシン類を 3 時間曝露した後に 10  $\mu$ M の H2DCFDA にて 30 分培養し、FACS にて蛍光 (excitation 490nm emission 526nm) を測定した。

酸化ストレスの計測(*in vivo*)

0, 0.001, 0.01, 0.1  $\mu$ g TCDD/kg/日 の TCDD をマウス (C57B6 8 週齢) の腹腔内へ 7 日間投与した後に cytochrome c reduction assay (1) にて組織内の superoxide anion production を計測した。

### C. 研究結果

A549 細胞に PCB/ダイオキシン類を曝露した後に酸化ストレスを検討した結果、コントロールと比較して酸化ストレスが増強した (図 1)。

抗酸化作用を有するとされる (-)-epigallocatechin gallate や Vitmine E を用いてダイオキシン類曝露による酸化ストレスを低減できるか否かの検討を行った。両者をダイオキシン類と共に曝露することにより酸化ストレスは低下した (図 2)。

マウスの実験系にて 7 日間の TCDD 投与後の検討では肺での酸化ストレスの発生は認めなかった (表 1)。

### D. 考察

ダイオキシンの曝露により気道の上皮細胞において酸化ストレスが発生し、この酸化ストレスは抗酸化作用をもつ (-)-epigallocatechin gallate や Vitmine E を用いることによって減弱できることが細胞株を用いた実験で明らかになった。しかしながら今回の動物実験系では組織での酸化ストレスの発生は確認できなかった。