

Figure 3 IL-8 secretion levels were increased in dose-dependent manner.

Normal human epidermal keratinocytes were exposed to BaP for 24h. A IL-8 secretion was analyzed by ELISA in culture supernatants. IL-8 secretion levels were increased in dose-dependent manner.

B. Western blotting. The cells treated with BaP for 24h were lysated and their proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to a PDNF membrane and then incubated with anti-AhR, anti-ARNT, and anti-CYP1A1 antibody. The blots were then incubated with conjugated antibody and images were captured using X-ray film. Protein levels of AhR and ARNT are also degraded in dose-dependent manner, in contrast, CYP1A1 is graded. C Resveratrol is one of selective antagonists of AhR. To examine the relationship between the production of IL-8 and AhR signaling pathway, we measured the production of IL-8 by ELISA using resveratrol. Normal human epidermal keratinocytes were exposed either BaP only or BaP and resveratrol together. BaP and resveratrol were administrated at the same time. Treatment with resveratrol only did not increase the secretion of IL-8. Because the treatment with BaP (100nM and 1µM) decreased the secretion of IL-8, it was likely linked to AhR signaling pathway.

2,2',3,4',5',6-六塩素化ビフェニル(CB149)の動物肝マイクロゾームによる代謝

研究分担者 古賀 信幸 中村学園大学栄養科学部 教授
 研究協力者 太田 千穂 中村学園大学栄養科学部 助教

研究要旨 ヒト血液中には、CB153やCB138などの未変化体に加え、PCB代謝物として4-hydroxy (OH)-CB187や4-OH-CB146などが高濃度で検出されている。最近、ヒト血液中から新たに4,5-diOH-CB149が検出されたことから、本研究では、この代謝物の母化合物を明らかにするため、CB149のin vitro代謝をラット、モルモットおよびハムスター肝マイクロゾーム(Ms)を用いて調べた。その結果、主代謝物として2種類のOH体(M-1、M-2)と、1種類のdiOH体(M-3)が生成された。さらに、GC-MSにより別途合成した標品と比較した結果、M-1、M-2およびM-3はそれぞれ5-OH体、4-OH体および4,5-diOH体であることが明らかとなった。主代謝物のM-1およびM-3の生成は、ラットで最も多く、ハムスター、モルモットの順であった。また、両代謝物の生成は、PB前処理により、促進され、特にラットでは未処理の数100倍以上であった。なお、M-2はM-1に比べ、非常に少ないもののPB前処理のラットとハムスターで生成された。以上の結果より、ヒト血中で検出された4,5-diOH-CB149はCB149から少なくとも5-OH体を経由して生成されることが確認された。また、CB149代謝にはPB誘導性のP450、すなわちCYP2B酵素が強く関与することが明らかになった。

A. 研究目的

ヒトをはじめとする哺乳動物の血中から、CB153 や CB138 とともに PCB 代謝物である 4-および 3-水酸化(OH)体が高濃度で検出されている。最も多いのは、4-OH-CB187 で、次いで 4-OH-CB146 である。当研究室では、まず 4-OH-CB187 の親 PCB を明らかにするため、CB187 と CB183 の代謝を検討したところ、4-OH-CB187 は CB187 からのみ生成されることが明らかとなった。また、4-OH-CB146 についても CB146 から微量ながら生成されることを確認した。

最近、これらの 4-あるいは 3-OH 体以外に、ヒト血中において比較的高濃度で 4,5-dihydroxy (diOH)-2,2',3,4',5',6-六塩素化ビフェニル (CB149)が新たに検出された。本代謝物は2段階の酸化反応、すなわち CB149 から 4-OH 体あるいは 5-OH 体を経由して、生成されると考えられる。そこで本研究では、4,5-diOH-CB149 が、CB149

から生成されるか否かについてラット、モルモットおよびハムスター肝マイクロゾーム(Ms)を用いて検討した。なお、本年度は、実験動物を用いた検討だけであるが、最終的にはヒト肝 Ms(購入可能)を用いた検討を行う予定である。

B. 研究方法

① CB149 の合成:2,4,5-トリクロロアニリンおよび 1,2,4-トリクロロベンゼンをテトラクロロエチレンで溶かし、亜硝酸イソアミルを加え、油浴中で、110℃、24 時間反応させた。反応残渣は、n-ヘキサンで溶解後、アルミナおよびシリカゲルカラムに付した。次に、CB149 を含む画分を濃縮後、HPLC に付して精製した(保持時間 39.6min;純度 99%)。HPLC 条件は次の通りである。カラム、YMC-Pack ODS (250×20mm I.D.);溶離液、100%アセトニトリル;流速、4.0ml/min;検出波長、254nm。

② 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 200g)、Hartley 系雄性モルモット(体重約 280g)および Golden syrian 雄性ハムスター(体重約 90g)を用いた。動物肝 Ms の調製は、未処理、フェノバルビタール(PB, 80 mg/kg/day×3, ip)および 3-メチルコラントレン(MC, 20 mg/kg/day×3, ip)前処理の各動物より肝を摘出し、常法により行った。③ **CB149 代謝活性:** 40 μ M CB149 を、動物肝 Ms、NADPH 生成系、6mM MgCl₂、100mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)とともに、好氣的に 37°C で 20 分間インキュベートした後、クロロホルム-メタノール(2:1)および n-ヘキサンで3回抽出し、さらにジアゾメタンでメチル化後、GC-ECD および GC-MS により測定した。代謝物の定量は CB149 未変化体の検量線を用いて行った。

(倫理面への配慮)

「中村学園大学における動物実験のための指針」に従い、動物肝 Ms の調製に際しては、動物の苦痛をできるだけ軽減するため、軽くエーテル麻酔後さらに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、CB149 をラット肝 Ms とともに 37°C で 20 分間インキュベートして得られた代謝物の GC クロマトグラムを示す。まず、ラットの場合には、未処理肝 Ms により、1種類の代謝物(これを M-1 とする)が、また、PB 前処理 Ms により3種類の代謝物(M-1、M-2 および M-3)が GC 保持時間のそれぞれ 17.18 min、18.18 min および 19.58 min に検出された。

次に、CB149(未変化体)の検量線を用いて、これらの代謝物を定量した(Fig. 2)。未処理動物肝 Ms ではいずれも M-1 のみが生成され、その生成量はラット、ハムスターおよびモルモットでそれぞれ 6、15 および 14 pmol/min/mg protein であった。次に、PB 前処理肝 Ms で行ったところ、ラットでは M-1 が未処理の約 250 倍に驚異的な増加

を示した。また、新たな代謝物 M-3 も顕著に増加した(452 pmol/min/mg protein)。もう1つの新代謝物 M-2 の生成量は他2者に比べ極めて少なく、30 pmol/min/mg protein 程度であった。次に、ハムスターでは、ラットと同様に、M-1 の顕著な増加(約 11 倍)および代謝物 M-2 と M-3 の新たな生成を示したが、生成量はラットの 10 分の 1以下であった。さらに、モルモットでは M-1 の増加は未処理の約 2 倍にすぎず、また M-3 の生成は痕跡程度であった。一方、MC 前処理 Ms の場合、ラットでは M-1 が未処理の 1.5 倍に増加したにすぎなかった。また、ハムスターとモルモットではいずれも M-1 の生成が未処理の 50%前後までに減少した。

次に、これらの代謝物の化学構造を明らかにするため、予想代謝物として 5-MeO-CB149、4-MeO-CB149 および 4,5-diMeO-CB149 を別途合成し、GC-MS におけるマスフラグメンテーションと保持時間を比較した。その結果、Table 1 に示すように、メチル化後、M-1 と M-2 は分子量 388 を、また、M-3 は分子量 420 を有していたことから、M-1 と M-2 は MeO 体、M-3 は diMeO 体であることが明らかとなった。さらに、合成標品 5-MeO-CB149、4-MeO-CB149 および 4,5-diMeO-CB149 のマスフラグメンテーションおよび GC 保持時間がほぼ一致したことから、M-1、M-2 および M-3 は 5-OH-CB149、4-OH-CB149 および 4,5-diOH-CB149 であることが示唆された。

D. 考察

今回、初めて CB149 の主代謝物として、5-OH 体および 4,5-diOH 体を明らかにすることができた。また微量代謝物として、4-OH 体を明らかにできた。主代謝物の 5-OH 体および 4,5-diOH 体の生成量はラット > ハムスター > モルモットの順であり、いずれの動物でも PB 誘導性 P450 (CYP2B 酵素) がそれらの生成に強く関与していることが示唆された。なお、今回は、インキュベーション時間を 20min で行っ

たが、予備的にPB前処理ラット肝Msを用いて、60 minまで長くしたところ、5-OH体の減少とともに4,5-diOH体の著しい増加がみられた。この結果から、少なくとも4,5-diOH体は、5-OH体を経由して生成され则认为られる。

E. 結論

ヒト血中で検出された4,5-diOH-CB149はCB149から少なくとも5-OH体を経由して生成されること、また、CB149代謝にはPB誘導性のP450、すなわちCYP2B酵素が強く関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo, M. Matsuoka, and N. Koga, Metabolism of 2,2',3,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB146) by liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs. *Organohalogen Compds.*, **70**, 1185-1188 (2008).

2) Y. Kato, K. Haraguchi, M. Kubota, S. Ikushiro, T. Sakaki, N. Koga, S. Yamada and M. Degawa, A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by 4-OH-2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl in mice. *Organohalogen Compds.*, **70**, 1601-1604 (2008).

2. 学会発表

1) C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo, M. Matsuoka, and N. Koga, 「Metabolism of 2,2',3,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB146) by liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs.」第28回国際学会 Dioxin 2008 (The ICC, Birmingham, England) 平成20年8月17～22日

2) Y. Kato, K. Haraguchi, M. Kubota, S. Ikushiro, T. Sakaki, N. Koga, S. Yamada

and M. Degawa, 「A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by 4-OH-2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl in mice」第28回国際学会 Dioxin 2008 (The ICC, Birmingham, England) 平成20年8月17～22日

3) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸, 「2,2',3,4',5,5',6-六塩素化ビフェニル(PCB149)の動物肝ミクロゾームによる代謝」フォーラム2008:衛生薬学・環境トキシコロジー(熊本市市民会館、熊本市)平成20年10月17～18日

4) 原口浩一, 久道洋輔, 遠藤哲也, 加藤善久, 太田千穂, 古賀信幸, 「海洋哺乳動物における PCB 代謝物-鯨類の肝臓中にみられる methylsulfone 体および dihydroxy 体の残留特性-」フォーラム2008:衛生薬学・環境トキシコロジー(熊本市市民会館、熊本市)平成20年10月17～18日

5) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸, 「2,2',3,4',5,5',6-六塩素化ビフェニル(PCB149)のヒト肝ミクロゾームによる代謝」日本薬学会第129年会(国立京都国際会館、京都市)平成21年3月26～28日

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

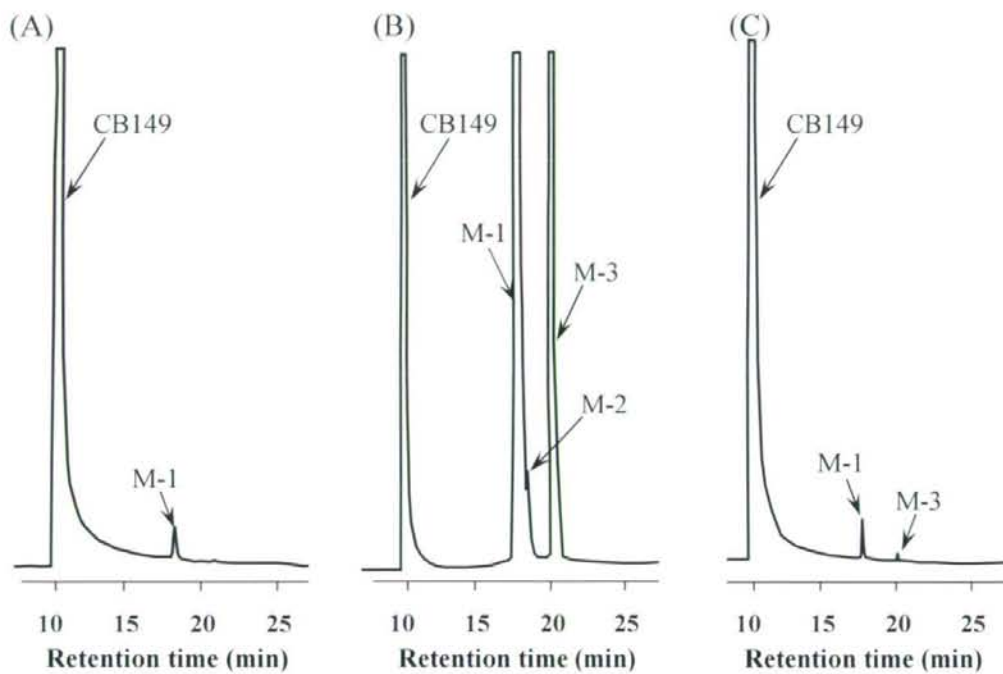


Fig. 1 Gas chromatography of the methylated derivatives of CB149 metabolites formed by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B) and MC-treated (C) rats.

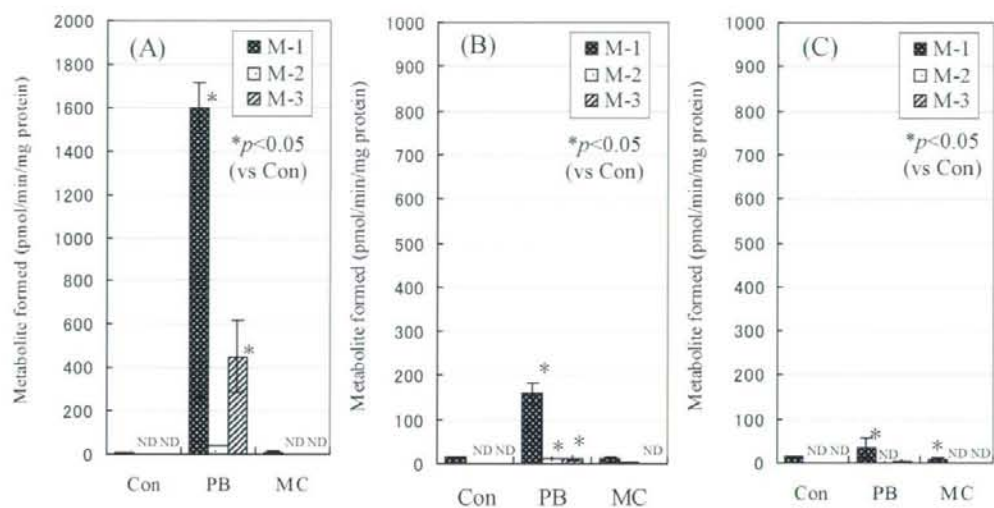


Fig. 2 Effect of cytochrome P450 inducers on CB149 metabolism by liver microsomes of rats (A), hamsters (B) and guinea pigs (C).

Table 1 Mass spectral data and retention times of the methylated derivatives of three CB149 metabolites and its synthetic compounds

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) in GC-MS
		[M ⁺]	[M ⁺ -15]	[M ⁺ -35]	[M ⁺ -43]	[M ⁺ -50]	[M ⁺ -70]	
CB149	392	100	-	32	-	-	74	11.95
M-1	388	100	6	-	30	17	-	14.89
M-2	388	100	-	-	33	-	-	15.13
M-3	418	100	29	-	22	-	-	15.61
6-MeO-CB146	388	100	-	-	-	123	29	13.50
5-MeO-CB149	388	100	6	-	30	16	-	14.89
4-MeO-CB149	388	100	4	-	37	-	-	15.13
4,5-diMeO-CB149	418	100	28	-	18	-	-	15.61
3-MeO-CB153	388	100	7	-	45	13	-	16.67

6-MeO-CB146, 6-MeO-2,3,5,2',4',5'-hexaCB;

3-MeO-CB153, 3-MeO-2,4,5,2',4',5'-hexaCB

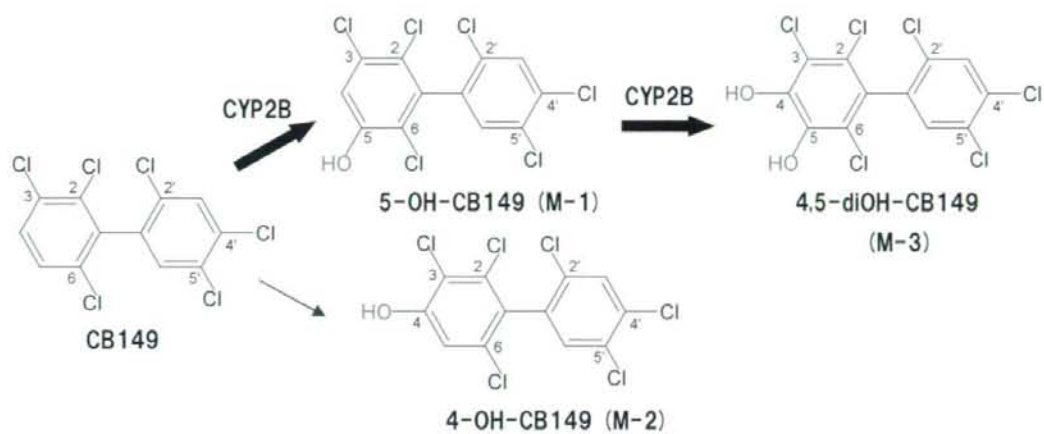


Fig. 3 Postulated pathways of CB149 in animal liver.

PCB/ダイオキシン類による呼吸器障害モデル作成に関する研究

研究分担者 中西洋一 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 教授

研究要旨 油症患者には咳や痰など特有の呼吸器症状がある。PCB/ダイオキシン類による呼吸器障害の機序解明には動物モデルの作成が必要と考えられるため検討を行った。

A. 研究目的

油症患者にみられる喀痰症状に対して漢方薬の麦門冬湯が有効であることが報告された。PCB/ダイオキシン類による呼吸器障害の機序解明には動物モデルの作成が必要と考えられるが、確立された動物モデルはない。そこでその作成を検討した。

B. 研究方法

2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)をコーンオイルで溶解し、C57Bl/6マウス雌、6週齢に以下の2通りの経路で投与した。肺組織傷害は、肺組織所見と気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中炎症細胞数で評価した。

実験 1

TCDD 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ あるいは 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を day1 から day5 までマウスに経口摂取させた。コーンオイルのみを経口摂取した群をコントロールとした。Day 7 に肺を取り出し、HE 染色組織標本作製、評価した。

実験 2

TCDD 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を day1 から day5 までマウスに腹腔内投与した。コントロール群はコーンオイルのみを腹腔内投与した。day6 に BAL 液を回収して炎症細胞数、細胞分画について測定した。また肺を取り出し、HE 染色組織標本作製して、評価した。

(倫理面への配慮)

九州大学動物実験実施規則に従って実験を行った。

C. 研究結果

経口投与モデルの結果

TCDD 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群 (n=4) あるいは 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群 (n=4) においてコントロール群 (n=4) と比較し、肺組織所見に有意差は認めなかった。

腹腔内投与モデルの結果

TCDD 投与群とコントロール群の間で BAL 液中の炎症細胞数と細胞分画 (図 1) に有意差はみられなかった。TCDD 群 7 匹中 1 匹の肺組織所見で、肺胞隔壁肥厚、肺胞出血が認められたが (図 2A)、のこり 6 匹では異常所見がなく (図 2B)、コントロール群との比較で有意差は認められなかった。

D. 考察

油症患者では、咳や痰など慢性気管支炎に類似した特有の呼吸器症状がみられることがある。こうした呼吸器症状の改善に、漢方薬の一つである麦門冬湯が有効である可能性が示唆されている (1)。PCB/ダイオキシン類肺傷害動物モデルは、ダイオキシン類による呼吸器障害の機序解明、新規治療戦略探索の上で重要と考えられるが、確立したモデルの報告は未だ無い。そこで

TCDD による肺傷害動物モデルの作成を試みた。経口投与と腹腔内投与の2つの系を検討した。TCDD 腹腔内投与により肺胞隔壁肥厚、肺胞出血を認めたものがあったが、再現性に乏しく、安定したモデルの作成には至らなかった。我々は昨年の報告書において TCDD が気道上皮細胞由来の BEAS2B 細胞に対して Aryl Hydrocarbon receptor, CYP1A1 の発現を増強させ、また肺胞上皮細胞由来の A549 細胞に対して酸化ストレスを誘導することを示した(2)。このことは TCDD が肺上皮細胞に傷害を起こしうることを示唆しており、ダイオキシン類による肺障害症状は肺上皮傷害によるものと推測される。今後、投与経路を経気道投与に変更して検討を継続していく予定である。

参考文献

- 1) 徳永章二、油症に対する漢方療法。熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究。平成 19 年度総括・分担研究報告書。2008 年 3 月。
- 2) 中西洋一、ダイオキシン暴露による気道上皮傷害の検討。熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究。平成 19 年度総括・分担研究報告書。2008 年 3 月。

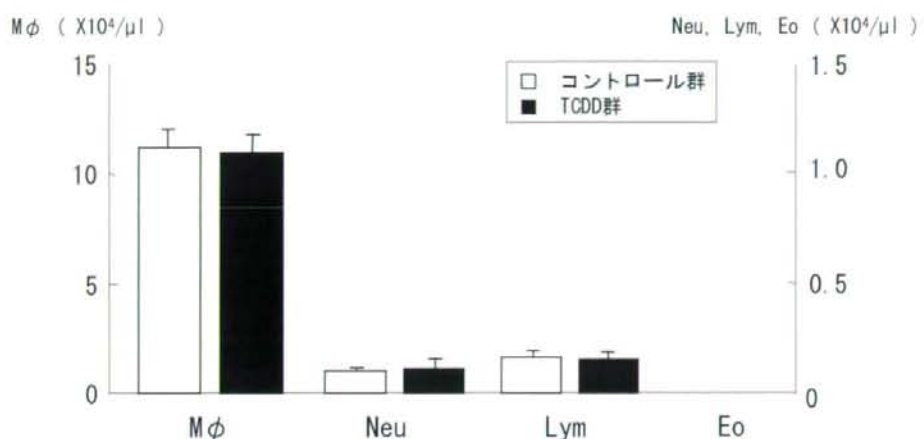


図 1. マウスBAL液中の炎症細胞数
 TCDD群とコントロール群で細胞数に有意差は認めなかった。
 Mφ=マクロファージ、Neu=好中球、Lym=リンパ球、Eo=好酸球。

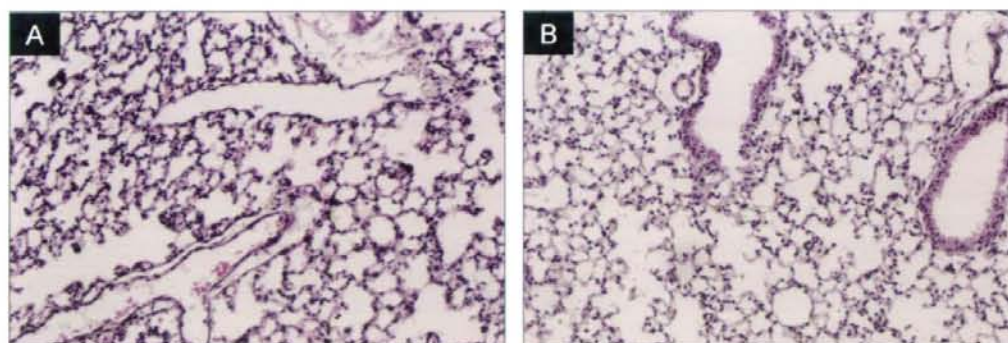


図 2. TCDD腹腔内投与後のマウス肺組織。
 肺胞隔壁の肥厚、細胞浸潤と肺胞腔内出血を来した例(A)もみられたが、多くはほぼ正常肺組織の所見(B)であった。

分担研究報告書

Cholebine によるダイオキシン排泄促進

研究分担者	山田 英之	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野	教授
	古江 増隆	九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野	教授
研究協力者	石井 祐次	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野	准教授
	石田 卓巳	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野	助教

研究要旨 Cholebine のダイオキシン排泄促進作用について検討を行った。5 週令の Wistar 系雄性ラットに ^{14}C -2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF, 2.9 MBq/mg) を 0.5 mg/kg body weight/3 mL corn oil 経口投与し、cholebine 含有飼料を与え 1 週間飼育した。その結果、cholebine 摂取 1 日日において、PenCDF の糞中排泄量が対照群に比べ約 15% 増加した。2 日目以降については、有意差は認められるもののその差はいずれも 1% 以下であった。一方、臓器中の PenCDF 残存量については、脳を除いて、cholebine により 20~30% の低下が観察された。次に、観察期間を 28 日間に延長し、同様の検討を行った。その結果、糞中排泄促進効果については短期処理実験の結果と同様であったが、臓器中の PenCDF 残存量は、脳を除き、cholebine による軽減効果は認められなかった。さらに、cholebine は、PenCDF と直接結合せず、胆汁酸などの因子を介して結合し、糞中排泄を促進している可能性が考えられた。以上の結果から、cholebine はダイオキシンの初回吸収は効果的に抑制するが、ラットを用いた本検討からみる限り、再吸収に関しては顕著な抑制効果を示さなかった。

A. 研究目的

油症は、複数のダイオキシン類が関与した複合汚染が原因であると考えられている (1,2)。中でも 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) は、原因油中含量や毒性の強さ等から、油症病態の最も重要な起因物質と考えられている。生体異物による健康障害に対する治療では、原因物質の体外排泄の促進が有効であるのは論を俟たない。これまでの研究から、ダイオキシン中毒症状のほとんどは、細胞の可溶性画分に存在する芳香族炭化水素受容体の活性化、並びにそれに伴う機能性タンパク質の発現変動を介して惹

起されると考えられている (3)。しかし、その症状の複雑さから、詳細な機構については不明な点が多い。従って、ダイオキシン中毒症状に対する現実的な対処法としては、ダイオキシン類の体外排泄の促進を目指す以外に有効な方策がないのが現状である。

Cholebine (一般名 colestimide) は、高コレステロール血症治療薬として使用されている医薬品である。Cholebine は、腸管内において胆汁酸を吸着し、その糞中排泄を促進する (2007 年 10 月 (第 14 版) 添付文書より)。一方、体内に吸収されたダイオキシン類は、微量ずつ小腸壁より管

腔内に排泄され、胆汁酸の介助によって再びリンパ系を介して再吸収される(4)。従って、cholebine がダイオキシン類の再吸収を阻害し、その糞中排泄を促進する可能性が期待される。事実、cholebine の6ヶ月間の服用で、ヒト血中ダイオキシンの濃度が平均20%低下するとの報告がなされている(5)。しかし、この検討は例数が少なく、さらに偏差も大きいため、その有効性には疑問もある。そこで、本研究では、ダイオキシン類の体外排泄におけるcholebine の有効性を実証するため、ラットを用いcholebine によるPenCDFの糞中排泄促進効果を検討した。

B. 研究方法・研究結果

Cholebine 短期間摂取による PenCDF 排泄促進

Cholebine 含有飼料は、三菱ウェルファーマ株式会社(現 田辺三菱製薬株式会社)より供与された。5週令のWistar系雄性ラットを1群3匹として2群に分け、1週間馴化した。そのうち、¹⁴C-PenCDF (2.9 MBq/mg) を0.5 mg/kg body weight/3 mL corn oil の用量で経口投与し、1群には3% cholebine 含有飼料を、他群には、対照となる飼料を与え1週間飼育した。期間中、毎朝定時に糞を回収し、それぞれのラットの体重を測定した。また、1日あたりの摂餌量と糞量を、それぞれラット3匹分の総量として計測した。最終日における糞を回収したのち、臓器を摘出してPenCDF 含量の測定に用いた。一方、回収した糞は、一定量をデシケーター内に約1ヶ月間放置して乾燥させ、粉碎してその一部をPenCDF 含量測定に用いた。Fig. 1-5にはcholebine 併用による種々の影響を解析した結果を示すが、各図には

cholebine 短期処理実験の結果と共に(Aパネル)、長期処理実験での結果(Bパネル、詳細は後述)をも合わせて掲載する。

短期処理での検討では、PenCDF 単独処理群(PenCDF 群)と併用群(PenCDF + cholebine)の体重変化には顕著な差は認められなかった(Fig. 1A)。一方、摂餌量と糞量については、両群間の有意差を検出することはできなかったが、両指標とも併用群において増加する傾向が認められた(Fig. 2A and 3A)。糞中へのPenCDFの排泄量を測定した結果、1日目において、併用群でPenCDF 群に比べ約15%の増加が観察された(Fig. 4A)。2日目以降についても両群間にPenCDF 排泄量の差が散見されたが、そのいずれも摂取1日目に比べわずかであった。本検討における糞中へのPenCDFの総排泄量は、併用群で投与量の約42.9%であったのに対し、PenCDF 群では約28.1%であった。さらに、臓器中におけるPenCDF 含量を測定した結果、脳を除く全ての臓器において、cholebine 摂取による有意な低下が認められた(Fig. 5A)。

Cholebine 長期間摂取による PenCDF 排泄促進

次に、cholebine の長期間摂取による効果を評価するため、観察期間を28日間に延長し検討を行った。検討方法については、先に示した方法と同様に行ったが、PenCDF 自身による体重変化、摂餌量、並びに糞量への影響を観察するため、PenCDF とcholebine を与えない群(コントロール群)も準備した。各群における体重変化を観察した結果、12日目までに併用群とPenCDF 群においてわずかではあるが有意な違いが観察された(前者>後

者) (Fig. 1B)。また、摂餌量と糞量においても、短期間実験の場合と同様、併用群で増加傾向が認められた (Fig. 2B and 3B)。コントロール群と PenCDF 処理群の間に顕著な差は認められなかった。糞中への PenCDF の排泄量を測定した結果、1 日目において、併用群では PenCDF 群よりも排泄量が約 15% 増加した (Fig. 4B)。2 日目以降も散発的に有意差が認められたが、むしろ両群間には殆ど差はなかった。28 日間における PenCDF の総排泄量は、cholebine 併用群で投与量の約 64.4% であったのに対し、PenCDF 処理群では、約 48.4% であった。また、臓器における PenCDF 含量を測定した結果、短期間実験の場合とは異なり、脳を除く臓器に有意な差は認められなかった (Fig. 5B)。

Cholebine による PenCDF 排泄促進機構の解析

最後に、cholebine による PenCDF 排泄促進機構を明らかにするため、cholebine による PenCDF の結合実験を行った。本検討では、 ^{14}C -PenCDF を含む corn oil (0.17 mg/mL) と粉砕した cholebine 含有飼料をサンプルチューブに加え、24 時間穏やかに攪拌したのち、遠心してその上清中の PenCDF 含量を測定した。その結果、粉砕飼料を加えた場合、対照群に比べ上清中の PenCDF 含量は有意に低下した (Fig. 6)。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認を受け実施した。

C. 考察

本検討の結果から、cholebine の摂取は、ダイオキシンの糞中排泄を促進させることが明らかとなった。また、臓器中のダイオキシン含量も、糞中への排泄量の増加に伴い低下することが明らかとなった。

PenCDF は、ダイオキシン毒性等価係数が 0.3 であり、多塩素化ジベンゾフラン類中最も強い毒性を有することが知られている。F344 ラットにおける LD_{50} が 916 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight (6) であることから、今回の検討において設定された PenCDF の投与量は、比較的高用量であったと考えられる。しかし、長期間実験で観察されたように、体重変化に対する PenCDF の影響は殆ど観察されず、ダイオキシンの急性中毒として観察される wasting syndrome は観察されなかった。また、摂餌量と糞量に対する影響も認められなかった。従って、本検討において、PenCDF による急性毒性は惹起されなかったと考えられる。一方、cholebine の場合、長期間実験において、コントロール群に比べ体重変化への影響が認められた。しかし、これに関しても、PenCDF 処理の場合と同様わずかな差であったため、急性毒性が発生した可能性は低いと思われる。ところで、本検討において、cholebine は、摂餌量と糞量を増加させる傾向を示した。この点に関して原因は不明であるが、摂餌量の増加は、栄養素摂取量が cholebine により低下することに起因し、これを相補するために摂餌量が増加したものと推定される。また、糞量の増加は、排泄された cholebine が含まれるためであると予想された。

Cholebine によるダイオキシンの糞中排泄促進効果は、短期間実験、並びに長期間実験共に、摂取 1 日目において顕著であ

り、いずれも約 15% の排泄量の増加が認められた。一方、2 日目以降については、有意差も散見されるが、顕著な排泄促進効果は認められなかった。従って、本検討における cholebine の効果は、腸管内におけるダイオキシンの再吸収の阻害より初回吸収の阻害の寄与が大きいものと考えられる。一方、臓器中の PenCDF 残存量は、短期間実験では、脳を除く全ての臓器において cholebine 摂取により非摂取群に比べ 20~30% の低下が観察された。これに対し、長期間実験では、脳を除いて cholebine による効果は認められなかった。長期間実験において差が消失した原因を明らかにすることはできなかったが、曝露 28 日目では、臓器中の PenCDF 量は 7 日目と比較してかなり低下しており (Fig. 5 脚注参照)、cholebine による効果が出現しにくい状況に至っている可能性が考えられた。これらの結果を総合すると、一旦体内に蓄積したダイオキシンが微量ずつ排泄される定常状態では、cholebine による再吸収阻害は、無効とまでは言えないが、少なくとも顕著な効果は期待できないものと考えられた。ただ、ラットとヒトでのダイオキシン体内半減期は大きく異なり (ラット << ヒト) (7)、ラットはその固有の性質としてダイオキシン排泄能力が高いものと思慮される。従って、ヒトはダイオキシン再吸収能力が高い種とも考えられ、cholebine の効果がラットよりも顕著に出現する可能性は否定できない。前述の通り、cholebine 投与されたヒトではダイオキシン水準が低下することが示唆されており (5)、このことは上記推論を支持するかもしれない。

Cholebine による PenCDF の排泄は、cholebine と PenCDF の直接的な結合に

よるものではない可能性が示された。Cholebine による本作用の詳細な機構については不明であるが、本検討より得られた結果は、これまでの報告から推測されるものと一致する。従って、cholebine によるダイオキシン排泄促進は、ダイオキシン吸収に寄与する胆汁酸の排泄を促進するためと考えられた。

D. 結論

Cholebine 摂取により、ダイオキシンの糞中排泄量が有意に増加することが明らかとなった。また、ダイオキシンの組織中の残存量も、若干の低下、ないしその傾向が認められた。Cholebine による排泄促進効果は、摂取 1 日目において最も顕著であり、それ以降、顕著な差は見られなかった。さらに、cholebine によるダイオキシンの糞中排泄は、胆汁酸などを介して惹起されると考えられた。以上の結果から、cholebine はダイオキシンの初回吸収は効果的に抑制するが、ラットでの検討からみる限り、再吸収に関しては顕著な抑制効果を示さなかった。

E. 参考文献

- 1) Furue, M., Uenotsuti, T., Urabe, K., Ishikawa, T. and Kuwabara, M., Overview of Yusho. *J. Dermatol. Sci.*, 1 (Suppl. 1), S3-S10 (2005).
- 2) Yoshimura, T., Yusho in Japan. *Ind. Health*, 41, 139-148 (2003).
- 3) Fernandez-Salguero, P. M., Hilbert, D. M., Rudikoff, S., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J., Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140,

173-179 (1996).

4) Yoshimura, H. and Kamimura, H., Chapter 9
The accelerated excretion of PCBs and PCDFs.
in Kuratsune, M., Yoshimura, H., Hori, Y.,
Okumura, M. and Masuda, Y. (Eds), Yusho
-A Human Disaster Caused by PCBs and
Related Compounds-. Kyushu University
Press, Fukuoka, pp. 269-282 (1996).

5) Mochida, Y., Fukata, H., Matsuno, Y. and
Mori, C., Reduction of dioxins and
polychlorinated biphenyls (PCBs) in human
body. Fukuoka Acta Med., 98, 106-119
(2007).

6) Brewster, D. W., Uraih, L. C. and
Birnbaum, L. S., The acute toxicity of
2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (4PeCDF)
in the male Fischer rat. Fundam. Appl.
Toxicol., 11, 236-249 (1988).

7) Larsen, J. C., Risk assessments of
polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins,
polychlorinated dibenzofurans, and
dioxin-like polychlorinated biphenyls in food.
Mol. Nut. Food Res., 50, 885-896 (2006).

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし。

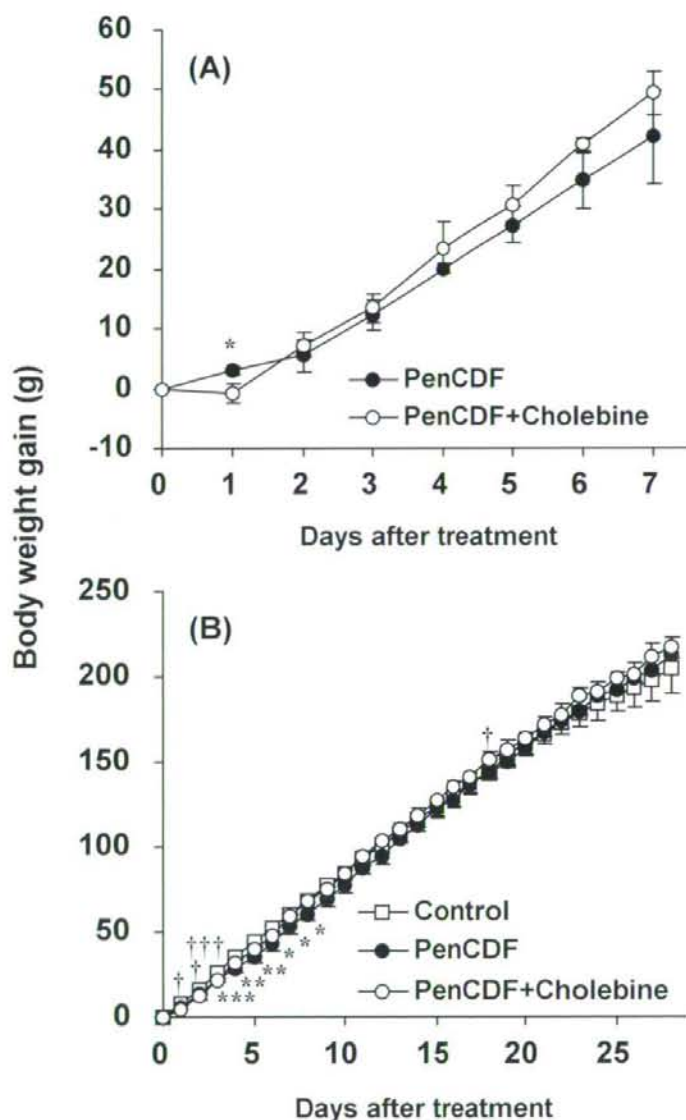


Fig. 1. Effects of cholebine on body weight gain in Wistar rats treated with PenCDF. Cholebine was given to rats for 7 days (A) and 28 days (B). The values represent the mean \pm S.D. of 3 rats. The initial body weight (mean \pm S.D.) of rats in PenCDF- and PenCDF+Cholebine-treated groups in (A) were 177.6 ± 5.6 and 188.7 ± 6.8 g, respectively. The initial body weight (mean \pm S.D.) of rats in Control-, PenCDF- and PenCDF+Cholebine-treated groups in (B) were 100.3 ± 4.3 , 101.1 ± 2.0 and 101.9 ± 2.2 g, respectively. Significant difference in PenCDF-group from control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Significant difference in PenCDF+Cholebine-group from control: †, $p < 0.05$; †††, $p < 0.001$.

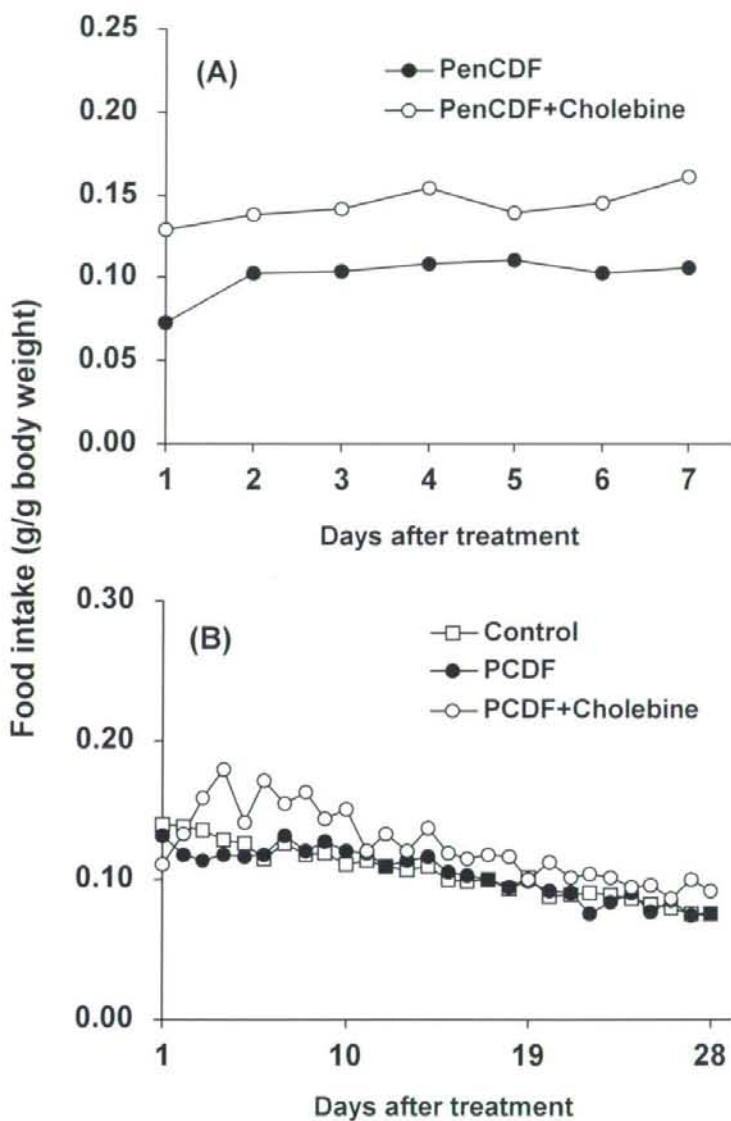


Fig. 2. The effects of cholebine on food intake of Wistar rats after exposure to PenCDF. Cholebine was given to rats for 7 days (A) and 28 days (B). The values represent the weight of food intake corrected by total body weight of 3 rats.

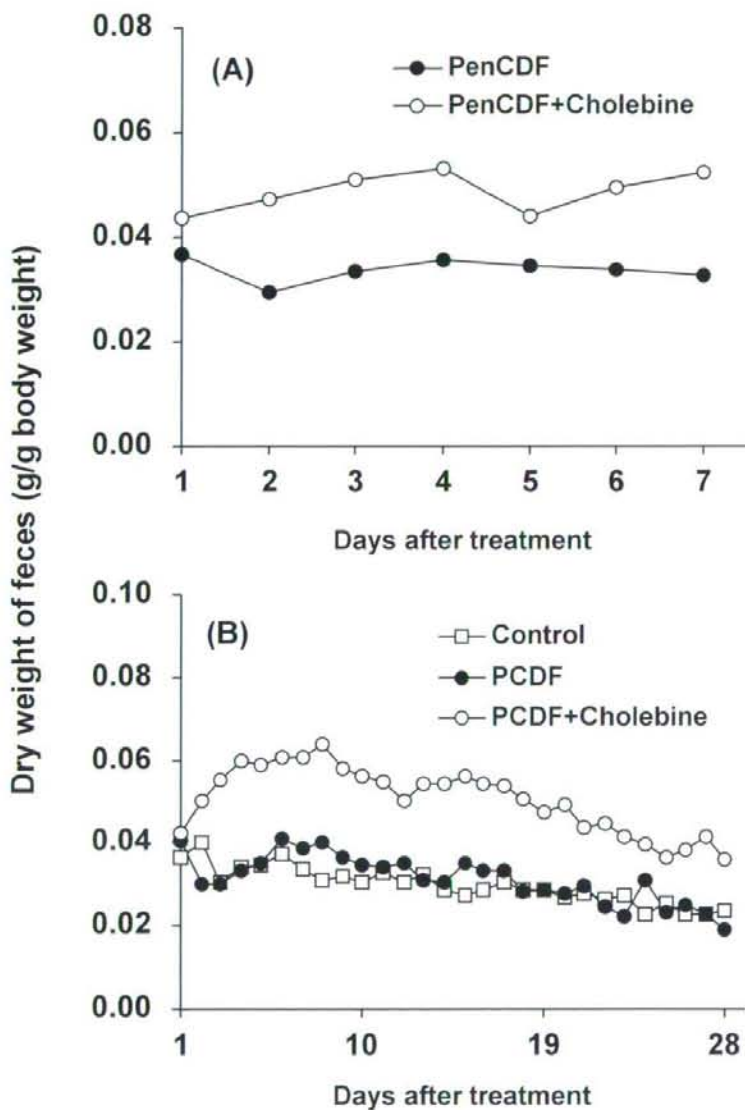


Fig. 3. The effects of cholebine on dry weight of feces in Wistar rats after exposure to PenCDF. Cholebine was given to rats for 7 days (A) and 28 days (B). The values represent the dry weight of feces corrected by total body weight of 3 rats.

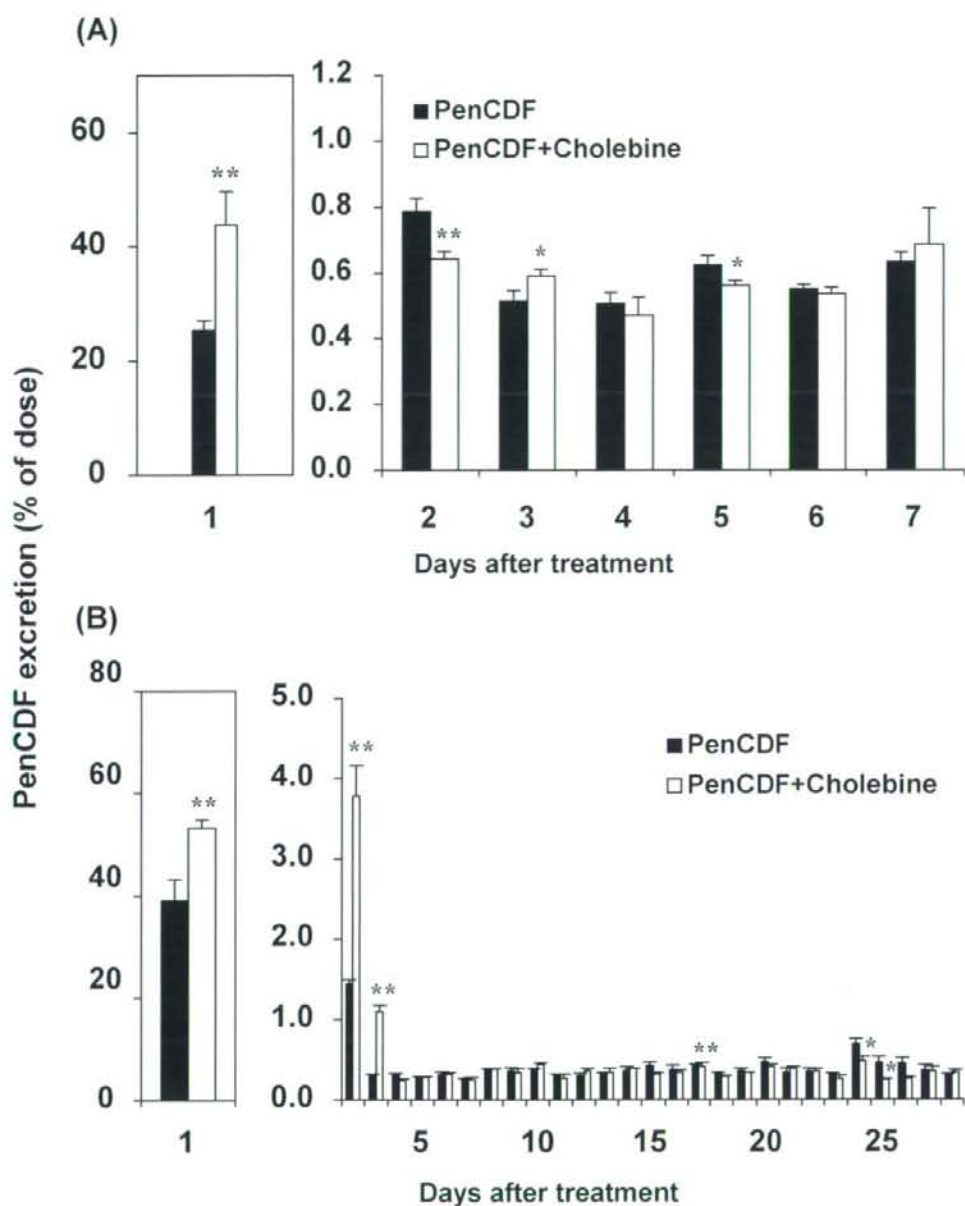


Fig. 4. Effect of cholebine on the excretion of PenCDF into feces. Cholebine was given to rats for 7 days (A) and 28 days (B). Values were represent the mean \pm S.D. of 3 assays. Significant difference from each PCDF-treatment group, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.