

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞を用いた実験系で構成されており、倫理面の特別な配慮は必要ないと判断した。

C. 研究結果

1、気道上皮細胞株 (NCI-H292) および正常ヒト気道上皮細胞におけるダイオキシン類化合物受容体 (AhR) をメッセージ・タンパクレベルで確認した (図 1)

2、気道上皮細胞株 (NCI-H292) を AhR agonist であるベンゾピレン (BaP) で 24 時間刺激し、その後上清中の IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 、TIMP-1、TIMP-2、VEGF、GM-CSF、MCP-1、MIP-1 α 、IP-10、GRO α 、FGF を測定したが、いずれも産生増強は認められなかった。

3、気道上皮細胞株 (NCI-H292) を AhR agonist であるベンゾピレン (BaP) で 6、12、24 時間刺激したが、E-cadherin の発現は、メッセージ・タンパクレベルでも変化が認められなかった。

4、AhR agonist であるベンゾピレン (BaP) 刺激 (6 時間) により濃度依存性に MUC5AC mRNA の発現増強が認められた (図 2)。24 時間後には、ムチン (PAS 染色) の産生が増強された (図 3)。また、これらの効果は、AhR antagonist である resveratrol によって、抑制された (図 4)。

D. 考察

喫煙などによるダイオキシン類化合物の体内摂取が呼吸器系へ様々な悪影響を及ぼすことが報告されている。これまで、喫煙者と慢性気管支炎・閉塞性肺疾患との関連を示唆する報告が数多く報告され、煙草抽出液などを用いた *in vivo* の実験によりダイオキシン類化合物による気道上皮細胞からのムチン産生増強、炎症性サイトカイン産生、EGFR

(表成長因子受容体) 活性化などが明らかとなっている²⁾³⁾。しかし、これまで煙草に含まれるダイオキシン類化合物が、どのようなシグナル経路を介し、呼吸器障害を引き起こすのか不明な点が多かった。今回、我々は、ダイオキシン類化合物受容体 (AhR) を刺激することにより、気道上皮細胞からのムチン産生が増強することを確認した。ムチン産生の増強は、気管支喘息・慢性気管支炎・閉塞性肺疾患の発症・増悪因子に関与することが明らかとなっている⁴⁾⁵⁾。喫煙などにより持続的な気道上皮のダイオキシン類化合物受容体 (AhR) の活性化が起こり、これら呼吸器疾患の発生・増悪に関与している可能性が示唆された。ただ、ダイオキシン類化合物受容体 (AhR) の活性化が、直接的にムチン産生を誘導するのか、何らかのサイトカインや受容体のシグナル活性を介して誘導されるのか、いまだ不明であり現在、そのシグナル経路について検討中である。

E. 結論

AhR 刺激により、気道上皮細胞株からムチン産生の増強が確認されたが、サイトカイン産生・接着分子 E-cadherin 発現には影響を与えなかった。

F. 研究発表

1、学会発表

千葉貴人、辻 学、内 博史、師井洋一、古江増隆 ベンゾピレンによるヒト気道上皮からのムチン産生機構 第 59 回 日本アレルギー学会総会 2009. 10. 29-31 (秋田)

参考文献

- 1、小栗一太他：油症研究 30 年の歩み 2004
- 2、Baginski TK, Dabbagh K, Satjawatcharaphong C, Swinney DC.

Cigarette smoke synergistically enhances respiratory mucin induction by proinflammatory stimuli. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 165-174

- 3、 Baginski TK, Dabbagh K, Satjawatcharaphong C, Swinney DC. Cigarette smoke synergistically enhances respiratory mucin induction by proinflammatory stimuli. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 165-174
- 4、 Nadel JA. Role of epidermal growth factor receptor activation in regulating mucin synthesis. *Respir Res* 2001;2:85-89. Review
- 5、 Shao MX, Nakanaga T, Nadel JA. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L420-427

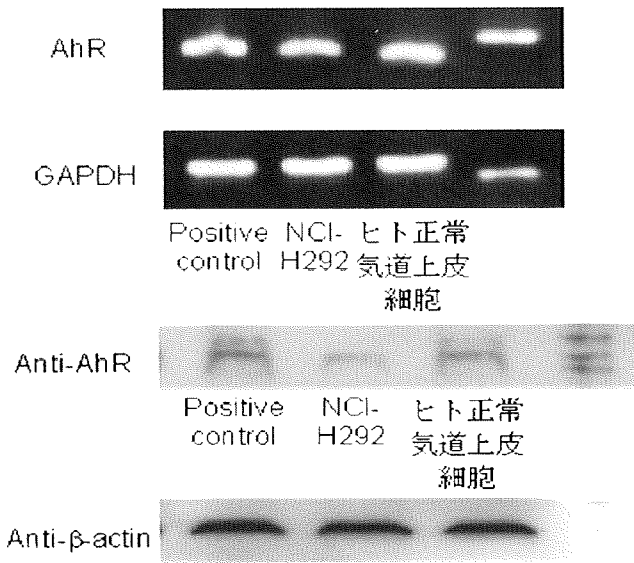


図 1

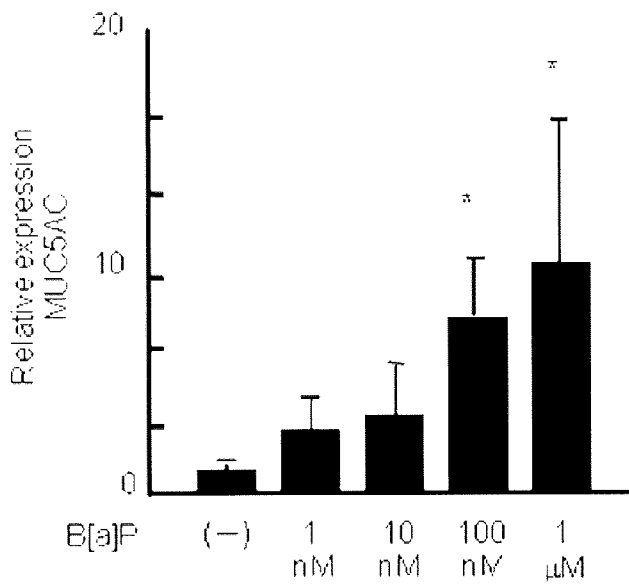


図 2

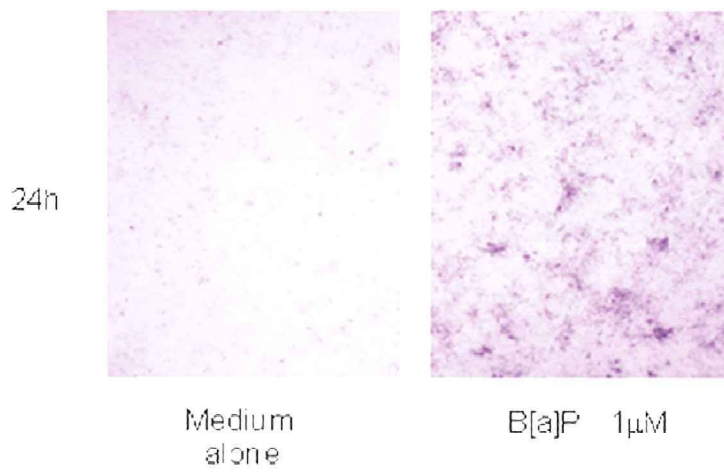


图 3

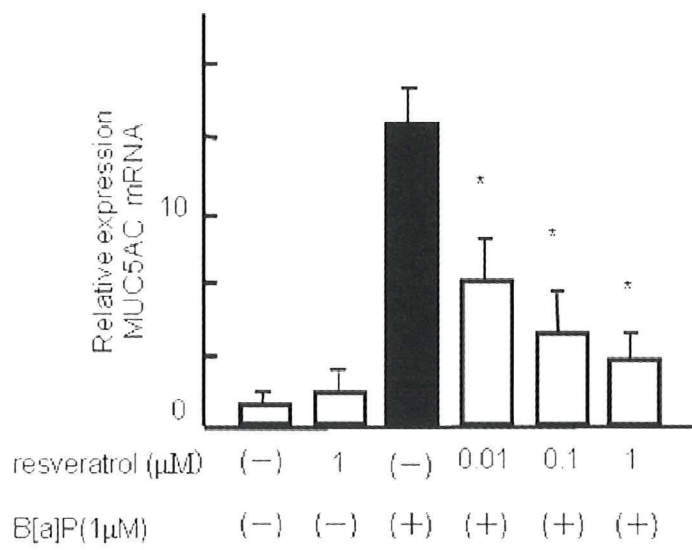


图 4

分担研究報告書

2,2',3,4,4',5'-六塩素化ビフェニル(CB138)のモルモットにおけるin vivo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、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。一方、ヒト肝では代謝物のうち、3'-OH-CB138が特異的に高濃度分布することが報告されている。そこで本研究では、CB138のモルモットにおけるin vivo代謝、すなわちCB138代謝物の血中、肝中および糞中への分布を調べた。その結果、CB138投与後4日目の血清中では3'-OH体と5'-OH-CB85が、また肝中では3'-OH体のみが、さらに4日間の糞中からは3'-OH体と6'-OH-CB105が検出された。しかしながら、2'-OH-CB157はすべての試料で全く検出されなかった。このように各代謝物はそれぞれ分布が異なっていたが、3'-OH体は、特に肝への分布が多かった。この結果から、3'-OH-CB138はモルモットにおいてもヒトと同様に、肝に高い親和性を有することが示唆された。

A. 研究目的

2,4,5-三塩素置換 PCB の CB153、CB138 および CB180 は、ヒトをはじめとする哺乳動物の肝、血液、脂肪組織および母乳などに高濃度蓄積している。特に、ヒト血中では前述の PCB に加え、4-OH-CB187、4-OH-CB146 および 4-OH-CB107 などの 4-OH 体や 3-OH-CB153 や 3'-OH-CB138 などの 3-OH 体も検出されている¹⁻⁵⁾。さらに、Guvenius らによって、3'-OH-CB138 が肝に特異的に高濃度分布することが報告された⁶⁾。

当研究室では、これまでに CB138 のモルモット、ラットおよびハムスター肝マイクロゾーム (Ms)による in vitro 代謝を調べ、次のことを明らかにした⁷⁾。まず、①モルモットが最も高い CB138 代謝活性を有すること、また、Fig. 1 に示すように、②4種類の代謝物が生成されること(3'-OH-CB138、2'-OH-CB157、6'-OH-CB105、5'-OH-CB85)、さらに、③これらの生成にはフェノバルビタール(PB)誘導性のチトクロム P450(P450)が関与することを明らかにした。そこで本研究では、これら CB138 代謝

物のモルモットにおける体内分布を調べた。

B. 研究方法

① CB138 の合成: 2,4,5-トリクロロアニリン および 1,2,3-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、CB138 を含む画分を濃縮後、HPLC に付して精製した(保持時間 42.4 min; 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 PCB 投与: 実験動物は、Hartley 系雄性モルモット(体重約 290g)5 匹を用いた。CB138 をモルモット1匹当たり、10 mg 腹腔内に投与した。本 PCB を 1 匹当たり 10mg 腹腔内に投与した。投与後 4 日間の糞を採取するとともに、4 日目には屠殺して血液および肝を採取した。血液は、血清分離剤にて処理後、分析するまで血清として一

80°Cで保管した。肝は摘出後、生理食塩水で灌流後、-80°Cで保管した。

③代謝物の分析:肝中代謝物は、肝 1g をアセトン-*n*-ヘキサン(2:1, v/v)でホモジネートして抽出した。また、血中代謝物は血清 0.5 ml に硫酸を加えて酸性にした後、クロロホルム-メタノール(2:1, v/v)および *n*-ヘキサンで抽出した。これらの抽出液はジアゾメタンでメチル化後、GC-ECD および GC-MS に供した。一方、糞中代謝物は糞を乾燥後、粉碎し、糞 5g につきアセトン-*n*-ヘキサン(2:1, v/v)で 16 時間ソックスレー抽出した。抽出液はジメチル硫酸でメチル化後、以下同様に GC-ECD および GC-MS により分析した。代謝物の定量は CB138 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、モルモットの屠殺に際しては、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. 2には、CB138投与後4日目の血清と肝、および投与後4日間の糞に分布する未変化体および代謝物(メチル化)のガスクロマトグラムを示した。以前報告した*in vitro*代謝物のGC保持時間と比べたところ、未変化体およびM-3 (3'-OH-CB138)は血清、肝および糞のいずれにおいても検出された。また、これら以外に血清ではM-2 (5'-OH-CB85)が、また糞中ではM-1 (6'-OH-CB105)が同時に検出された。一方、M-4 (2'-OH-CB157)はいずれの試料中からも、全く検出されなかった。

次に、各代謝物ピークのマススペクトルを測定し、化学構造の確認を行った。M-1とM-2のメチル化体は、いずれも分子量354であることから、両代謝物は塩素が1個脱離したOH体であることが確認された。さらに、M-1およ

びM-2はそれぞれ特徴的なフラグメントイオン[M⁺-50]および[M⁺-43]を示したことから、M-1のOH基はオルト位に、またM-2はメタ位に置換されていることが確認された。さらに、M-3(メチル化)は分子量388を有しており、フラグメントイオン[M⁺-43]を示したことから、3'-OH-CB138であると推定された。

Table 1には、CB138および各代謝物の定量結果を示す。血清中の未変化体、M-3およびM-2の濃度はそれぞれ0.22、0.17および0.04 nmol/ml serumであった。肝中の未変化体とM-3の濃度はそれぞれ1.87と2.00 nmol/g wet liver であった。なお、投与後4日目の肝に残留していた未変化体の総量は投与量の約0.1%に相当した。一方、糞中の未変化体、M-3およびM-1の濃度は、それぞれ4.30、3.45および1.33 nmol/g dry fecesであった。なお、4日間のCB138未変化体の総排泄量は投与量の約0.3%に相当した。

D. 考察

CB138投与モルモットにおいて、3種類の代謝物が検出されたが、各代謝物はそれぞれ分布パターンが異なっていた。すなわち、3'-OH-CB138は今回測定したすべての試料で検出されたが、投与後4日目では特に肝への分布が多かった。この結果から、3'-OH-CB138はモルモットにおいてもヒトと同様に、肝に高い親和性を有することが示唆された。また、2種類の脱塩素化OH体のうち、5'-OH-CB85は血中に分布していたが、6'-OH-CB105は糞中に排泄されていた。一方、*in vitro*代謝研究で主代謝物であった2'-OH-CB157 (M-4)は今回全く検出されなかった。この理由として、M-4が生成されていない、あるいは今回調べた組織以外に分布している、などが考えられるが現在のところ不明である。

E. 結論

モルモットにおけるCB138の主代謝物は3'-OH-CB138であり、血中、肝中および糞中に広く分布していたが、ヒトと同様に肝への分布が顕著であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Kato, K. Haraguchi, M. Kubota, Y. Seto, T. Okura, S. Ikushiro, N. Koga, S. Yamada, and M. Degawa, A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by a TCDD-like PCB congener, 3,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl in mice. *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 150-156 (2010).
- 2) Y. Kato, K. Haraguchi, M. Kubota, Y. Seto, S. Ikushiro, T. Sakaki, N. Koga, S. Maeda, S. Yamada, and M. Degawa, 4-Hydroxy-2,2',3,4',5,5',6'-heptachlorobiphenyl (4-OH-CB187)-mediated decrease in serum thyroxine level in mice occurs through Increase in accumulation of thyroxine in the liver. *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 2095-2102 (2009).
- 3) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',5,5'-四塩素化ビフェニル(CB52)のウサギ肝ミクロゾームによる代謝. *福岡医誌*, **100**, 200-209 (2009).
- 4) C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo and N. Koga, Metabolism of 2,2',3,4',5',6'-hexachlorobiphenyl (CB149) by liver microsomes from rats, hamsters, guinea pigs and humans. *Organohalogen Compounds*, **71**, 308-311 (2009).

2. 学会発表

- 1) 「A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by TCDD-like PCB, 3,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl in

mice.」第29回国際学会Dioxin 2009 (BICC, 北京市, 中国) 平成21年8月23~28日

- 2) 「Metabolism of 2,2',3,4',5',6'-hexachloro-biphenyl (CB149) by liver microsomes from rats, hamsters, guinea pigs and humans.」第29回国際学会Dioxin 2009 (BICC, 北京市, 中国) 平成21年8月23~28日
- 3) 「2,2',3,4,4',5,5'-七塩素化ビフェニル(PCB180)の動物肝ミクロゾームによる in vitro 代謝」フォーラム2009:衛生薬学・環境トキシコロジー(沖縄コンベンションセンター, 沖縄) 2009年11月6,7日
- 4) 「2,2',3,4,4',5'-六塩素化ビフェニル(PCB138)のモルモットにおける in vivo 代謝」日本薬学会第130年会(岡山市) 平成22年3月28~30日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

1. Å. Bergman, E. Klasson-Wehler and H. Kuroki, *Environ. Health Perspect.*, **102**, 464-469 (1994).
2. C. D. Sandau, P. Ayotte, E. Dewailly, J. Duffe and R. J. Norstrom, *Environ. Health Perspect.*, **108**, 611-616 (2000).
3. B. Fängström, M. Athanasiadou, P. Grandjean, P. Weihe, Å. Bergman, *Environ. Health Perspect.*, **110**, 895-899 (2002).
4. 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).
5. J.-S. Park, L. Linderholm, M. J. Charles, M. Athanasiadou, J. Petrik, A. Kocan, B. Drobna, T. Trnovec, Å. Bergman, I. Hertz-Picciotto, *Environ. Health Perspect.*, **115**, 20-27 (2007).

6. D. M. Guvenius, P. Hassanzadeh, Å. Bergman, K. Noren, *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 2264-2269 (2002).
7. 古賀信幸, 金丸知代, 大石奈穂子, 加藤善久, 木村良平, 原口浩一, 増田義人, 福岡医誌, **92**, 167-176 (2001).

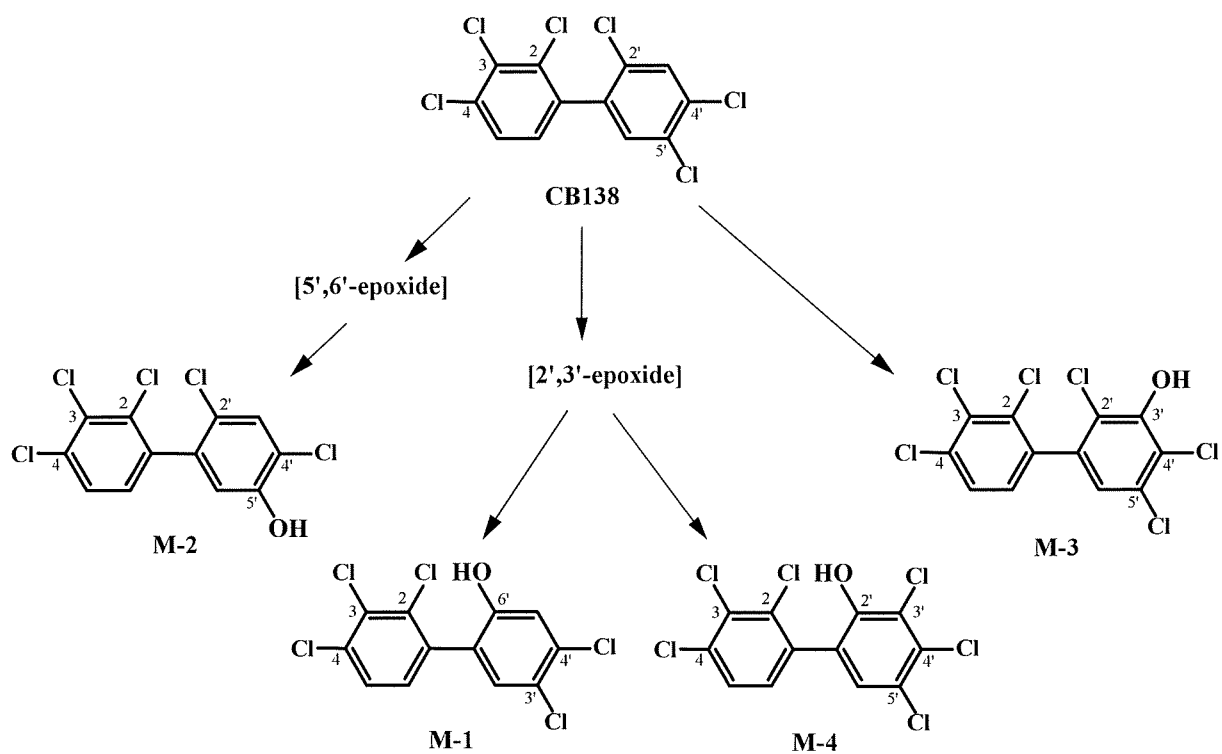


Fig. 1 Postulated metabolic pathways of CB138 in guinea pig liver.

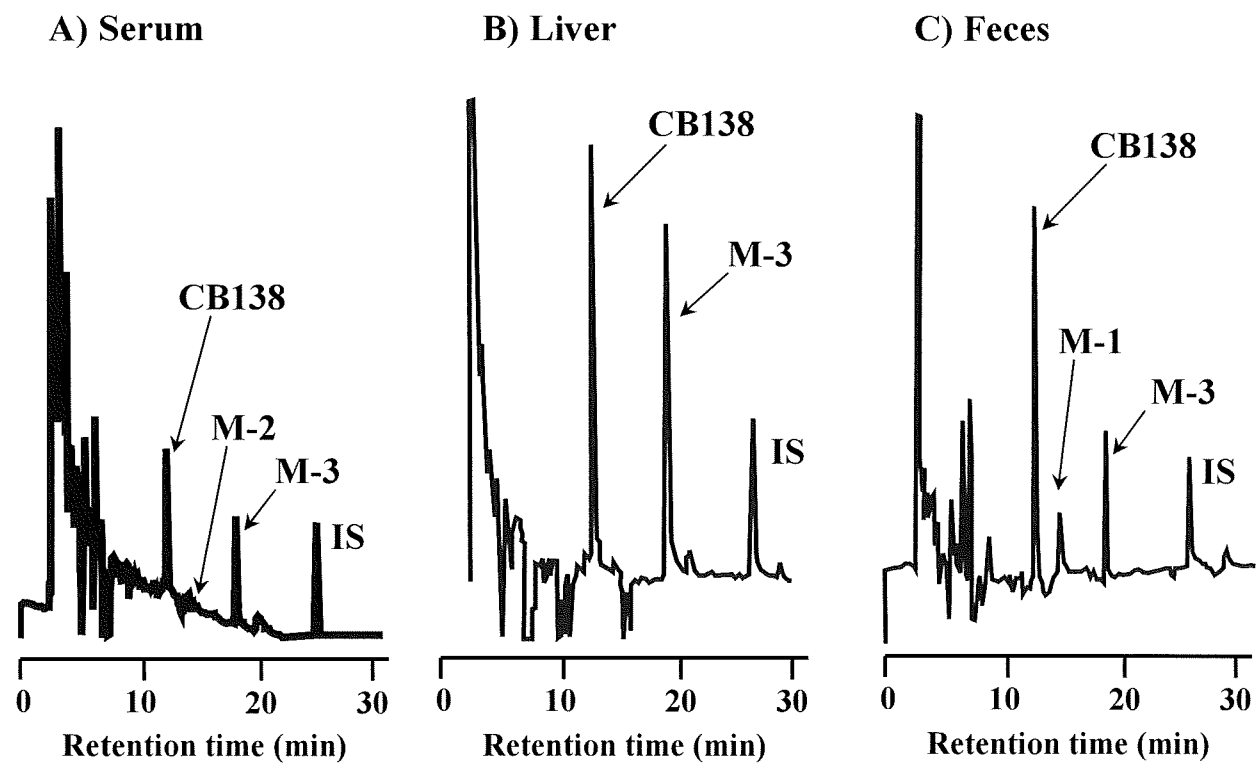


Fig. 2 GC-ECD chromatograms of CB138 and its metabolites extracted from serum (A), liver (B) and feces (C) of guinea pigs given CB138. 2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonachlorobiphenyl (CB208) was used as an internal standard (IS).

Table 1 Mass spectral data and retention times of the methylated derivatives of CB138 metabolites detected in serum, liver and feces of guinea pigs

Metabolite	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)				Retention time (min) in GC-MS
		[M ⁺]	[M ⁺ -15]	[M ⁺ -43]	[M ⁺ -50]	
Serum						
M-2	354	100	2	38	-	13.81
M-3	388	100	1	38	-	15.08
Liver						
M-3	388	100	6	33	-	15.08
Feces						
M-1	354	100	-	-	80	13.75
M-3	388	100	3	30	-	15.08

Table 2 Distribution of CB138 and its metabolites in serum, liver and feces of guinea pigs 4 days after exposure of CB138

Compound	Serum (nmol/ml serum)	Liver (nmol/g liver)	Feces (nmol/g feces)
CB138	0.22 ± 0.05	1.87 ± 0.35	4.30 ± 0.89
M-1	N.D.	N.D.	1.33 ± 0.46
M-2	0.04 ± 0.01	N.D.	N.D.
M-3	0.17 ± 0.07	2.00 ± 0.22	3.45 ± 0.38

N.D., not detected.

Each value represents the mean ± S.D. of five guinea pigs.

分担研究報告書

α -リポ酸の TCDD 急性毒性に対する効果

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
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 本研究では、ダイオキシンの急性毒性に対する α -リポ酸の効果について検証した。6 週令の Wistar 系雄性ラットに α -リポ酸 (10 mg、20 mg および 40 mg/kg) を 1 日 1 回、5 日間尾静脈内投与した結果、体重増加や臓器重量に影響は認められなかった。次に、TCDD (30 μ g/kg) を経口投与したのち、 α -リポ酸 (20 mg および 40 mg/kg) を 1 日 1 回、5 日間尾静脈内投与した。その結果、TCDD による体重増加抑制、肝肥大、および胸腺の萎縮に対して α -リポ酸による軽減効果は認められなかった。また、 α -リポ酸は、TCDD による芳香族炭化水素受容体の活性化に対して影響を示さなかったが、酸化ストレスの惹起に対して用量依存的な軽減効果を示した。以上の結果から、 α -リポ酸は、ダイオキシンによる酸化ストレスの抑制に有効であるが、急性毒性を軽減する効果は持たないか、または乏しいことが明らかとなった。

A. 研究目的

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) に代表されるダイオキシン類の毒性は、曝露量、曝露時期、性別、あるいは動物種などの違いによって、その内容や程度が変化する。一般に、成熟動物が比較的高用量のダイオキシン曝露を受けた場合、体重増加抑制に代表される wasting syndrome や胸腺・脾臓の萎縮、免疫機能の抑制、発ガンプロモーション作用や脂肪肝の惹起など多岐に亘る影響が引き起こされる (1-3)。これらの発症には、ダイオキシンの結合によって惹起される芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor: AhR) の活性化と、それを契機とする機能性タンパク質の発現変動が深く関与すると考えられている (4,5)。また、最近では酸化ストレスとの関連に注目した研究

も展開されている (6,7)。しかし、これらの報告にも関わらず、その詳細については不明な点が多く、有効な対処法は未だ開発されていない。

当研究室におけるこれまでの検討から、TCDD の母体曝露に伴う胎児の後世代影響が、補酵素の一つである α -リポ酸により改善されることが明らかとなった (平成 20 年度総括・分担研究報告書)。この機構については不明な点が多いが、 α -リポ酸は抗酸化物質であり、かつエネルギー代謝における補酵素として働くビタミンであることから、いずれかの作用によってダイオキシンの後世代影響に拮抗すると推測される。TCDD の胎児毒性に対し効果を示した α -リポ酸が、成熟動物における急性毒性に対しても効果を有するか否かについては、興味を持たれるところである。

そこで本研究では、ラット成獣における TCDD の急性毒性に対する α -リポ酸の効果について検討した。

B. 方法・結果

α -リポ酸による生体への影響と TCDD 投与量の決定

6 週令の Wistar 系雄性ラットを 1 週間ほど馴化したのち、dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した α -リポ酸を、10、20 および 40 mg/kg/200 μ L の用量で尾静脈内投与した。その翌日より 1 日 1 回、5 日間、同量の α -リポ酸を投与し、体重変化を観察した。その結果、いずれの投与群においても投与期間中の体重変化に有意な変化は認められなかった (Fig. 1)。さらに、最終投与 30 分後における肝臓、脾臓、並びに胸腺の重量を測定したが、いずれの群においても対照群に比べ変化は認められなかった (Table 1)。次に、TCDD の投与量を決定するため、corn oil に溶解した TCDD (30 および 60 μ g/kg/2 mL) を経口投与し、その翌日より 1 日 1 回、5 日間、 α -リポ酸の溶媒である DMSO を 200 μ L/kg の用量で尾静脈内投与した。その結果、両投与群において、対照群に比べ投与 1 日目より有意な体重増加の抑制、さらに、投与 5 日後における肝肥大と胸腺萎縮が観察された (Fig. 1, Table 1)。しかし、両投与群間におけるこれらの指標に差は認められなかった。TCDD の毒性に対する α -リポ酸の効果の検証において、毒性の過剰発現は、 α -リポ酸の効果をマスクしてしまう可能性が考えられる。そこで、TCDD の投与量として、毒性指標に影響が認められた 2 つの投与量のうち、低用量の 30 μ g/kg を、また、 α -リポ酸の投与量として、生体への影響が認められな

った 20 と 40 mg/kg を採用した。

TCDD の急性毒性に対する α -リポ酸の影響

6 週令の Wistar 系雄性ラットに α -リポ酸 (20 および 40 mg/kg) を尾静脈内投与し、その 30 分後に TCDD 30 μ g/kg を経口投与した。その翌日より、同量の α -リポ酸を、1 日 1 回、5 日間尾静脈内投与し、TCDD の毒性指標に対する影響を観察した。その結果、 α -リポ酸の併用は、いずれの投与群においても TCDD による体重増加抑制、肝肥大、および胸腺の萎縮に対して軽減効果を示さなかった (Fig. 2, Table 2)。 α -リポ酸が、TCDD の急性毒性に対して軽減効果を示さなかった原因として、TCDD による毒性の強度が強かったため、 α -リポ酸の効果を上回ってしまった可能性は否定できない。前述のように、ダイオキシン毒性の発現には、AhR の活性化に伴う機能性タンパク質の発現変動や酸化的ストレスの関与が示唆されている (4-7)。そこで、TCDD の毒性発現機構に対する α -リポ酸の影響を明らかにするため、AhR 応答性のタンパク質である cytochrome P450 1A1 の活性の指標である ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) 活性(8)、および酸化的ストレスの指標である thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 値(9)を測定した (測定方法は既報条件を参照)。その結果、TCDD を処理したラットでは、対照群に比べ肝臓における EROD 活性と TBARS 値の有意な上昇が認められた (Fig. 3)。一方、 α -リポ酸のみを処理した場合、両指標に変化は認められなかった。TCDD と α -リポ酸を併用した場合、 α -リポ酸は、TCDD による EROD 活性の上昇に対して軽減効果を示さな

った。しかし、TBARS 値は、 α -リポ酸 20 mg/kg の併用により軽減傾向を、さらに 40 mg/kg の併用で有意な低下を示した。従って、 α -リポ酸は、TCDD による酸化ストレスの惹起に対して有効であるものの、AhR の活性化に対して影響を及ぼさないことが明らかとなった。

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

本研究では、ダイオキシンによる後世代影響に対して有効性が認められた α -リポ酸を用い、TCDD の急性毒性に対する効果を検討した。その結果、TCDD による体重増加抑制、肝肥大、および胸腺の萎縮に対して α -リポ酸による軽減効果は認められなかった (Fig. 2, Table 2)。また、 α -リポ酸は、TCDD による AhR の活性化に対して影響を及ぼさなかったが、酸化ストレスの惹起に対して用量依存的な軽減効果を示した (Fig. 3)。これは、 α -リポ酸の抗酸化作用に起因していると考えられる。以上の結果から、 α -リポ酸は、ダイオキシンによる酸化ストレスの惹起に対して有効であるが、その急性毒性に対して効果を示さないことが明らかとなった。TCDD による後世代影響や急性毒性に対して α -リポ酸の効果に違いが生じた理由は不明である。しかし、一つの可能性として両毒性に対する α -リポ酸の作用点の違いが挙げられる。本検討において、ダイオキシン毒性の発現に最も寄与していると考えられている AhR の活性化に対して、 α -リポ酸は影響を与えなかった (Fig. 3)。従って、 α -リポ酸の作用点は、

AhR 自身ではなく、その活性化の下流のシグナルや機能性タンパク質であると予想される。 α -リポ酸は脳下垂体ゴナドトロピンの発現環境や発現因子の亢進を通してホルモン合成を促すのに対し、急性毒性に対しては AhR 活性化のみならずその下流シグナリングに拮抗できないものと考えられる。さらに、 α -リポ酸が TCDD の急性毒性に対して効果を示さなかった原因として、投与期間の短さが挙げられる。TCDD の急性毒性に対して軽減効果を有する成分の探索については、これまでも多くの研究報告がなされている。当研究室においても curcumin (10)、quercetin (11)、および piperine (12) などを用いて検討を行い、TCDD 曝露マウスにおける体重増加抑制に対する抑制作用を明らかにしている。これら食物成分による軽減効果は、投与 10 日目前後より観察される。また、その改善効果にも関わらず、TCDD による肝臓肥大や胸腺・脾臓の萎縮、並びに肝臓の EROD 活性の増加は、いずれも改善されない。同様の傾向は、抗酸化物質である butylated hydroxyanisole (13) やビタミン C (14) を用いた研究においても観察されている。従って、TCDD の急性毒性に対して、5 日間の α -リポ酸の投与では効果が発揮されなかった可能性が考えられる。

今回の研究から、少なくとも TCDD による体重増加抑制、肝肥大、および胸腺の萎縮に対して、肝臓における酸化ストレスの惹起は寄与が低いと考えられた。しかし、これは、肝臓における TBARS 値の測定結果からのみ推測される仮説であり、他の臓器における影響については不明である。従って、TCDD の急性毒性に対する α -リポ酸の軽減効果を検証するため

には、毒性発現の作用点の解明が不可欠であると共に、投与期間などについても詳細な検討を加える必要がある。

D. 結論

α -リポ酸は、TCDD による体重増加抑制、肝肥大、並びに胸腺の萎縮に対して軽減効果を示さなかった。また、TCDD による AhR の活性化に対しても影響を及ぼさなかった。一方、 α -リポ酸は、TCDD による酸化ストレスの惹起に対して用量依存的な軽減効果を示した。以上の結果から、 α -リポ酸は、ダイオキシンによる後世代影響に対しては有効であるものの、急性毒性に対する効果は低いと考えられた。

E. 参考文献

1. Poland, A. and Knutson, J. C., 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22, 517-554 (1982).
2. Albro, P. W., Corbett, J. T., Harris, M. and Lawson, L. D., Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on lipid profiles in tissue of the Fischer rat. *Chem. Biol. Interact.*, 23, 315-330 (1987).
3. Remillard, R. B. J. and Bunce, N. J., Linking dioxins to diabetes: epidemiology and biologic plausibility. *Environ. Health Perspect.*, 110, 853-858 (2002).
4. 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).
5. Yoon, C. Y., Park, M., Kim, B. H., Park, J. Y., Park, M. S., Jeong, Y. K., Kwon, H., Jung, H. K., Kang, H., Lee, Y. S. and Lee, B. J., Gene expression profile by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the liver of wild type (AhR+/+) and aryl hydrocarbon receptor-deficient (AhR-/-) mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 68, 663-668 (2006).
6. Yoshida, R. and Ogawa, Y., Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: application of oxidative stress markers to cancer risk assessment of dioxins. *Ind. Health*, 38, 5-14 (2000).
7. Hassoun, E. A., Al-Ghafri, M. and Abushabam, A., The role of antioxidant enzymes in TCDD-induced oxidative stress in various brain regions of rats after subchronic exposure. *Free Radic. Biol. Med.*, 35, 1028-1036 (2003).
8. Burke, M. D. and Mayer, R. T., Inherent specificities of purified cytochrome P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylase. *Drug Metab. Dispos.*, 3, 245-253 (1975).
9. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351-358 (1979).
10. Ishida, T., Taketoh, J., Nakatsune, E., Kan-o, S., Naito, E., Takeda, S., Mutoh, J., Ishii, Y. and Yamada, H., Curcumin

anticipates the suppressed body weight gain with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mice. *J. Health Sci.*, 50, 474-482 (2004).

11. Ishida, T., Naito, E., Mutoh, J., Takeda, S., Ishii, Y. and Yamada, H., The plant flavonoid, quercetin, reduced some forms of dioxin toxicity by mechanism distinct from aryl hydrocarbon receptor activation, heat-shock protein induction and quenching oxidative stress. *J. Health Sci.*, 51, 410-417 (2005).
12. Ishida, T., Ishizaki, M., Tsutsumi, S., Ishii, Y. and Yamada, H., Piperine, a pepper ingredient, improves the hepatic increase in free fatty acids caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Health Sci.*, 54, 551-558 (2008).
13. Hassan, M. Q., Stohs, M. Q. and Murray, W. J., Inhibition of TCDD-induced lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and toxicity by BHA and glutathione. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 34, 787-796 (1985).
14. Hassan, M. Q., Mohammadpour, H., Hermansky, S. J., Murray, W. J. and Stohs, S. J., Comparative effects of BHA and ascorbic acid on the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in rats. *Gen. Pharmacol.*, 18, 547-550 (1987).

F. 研究発表

1. フォーラム 2009 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (沖縄、2009 年 11 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

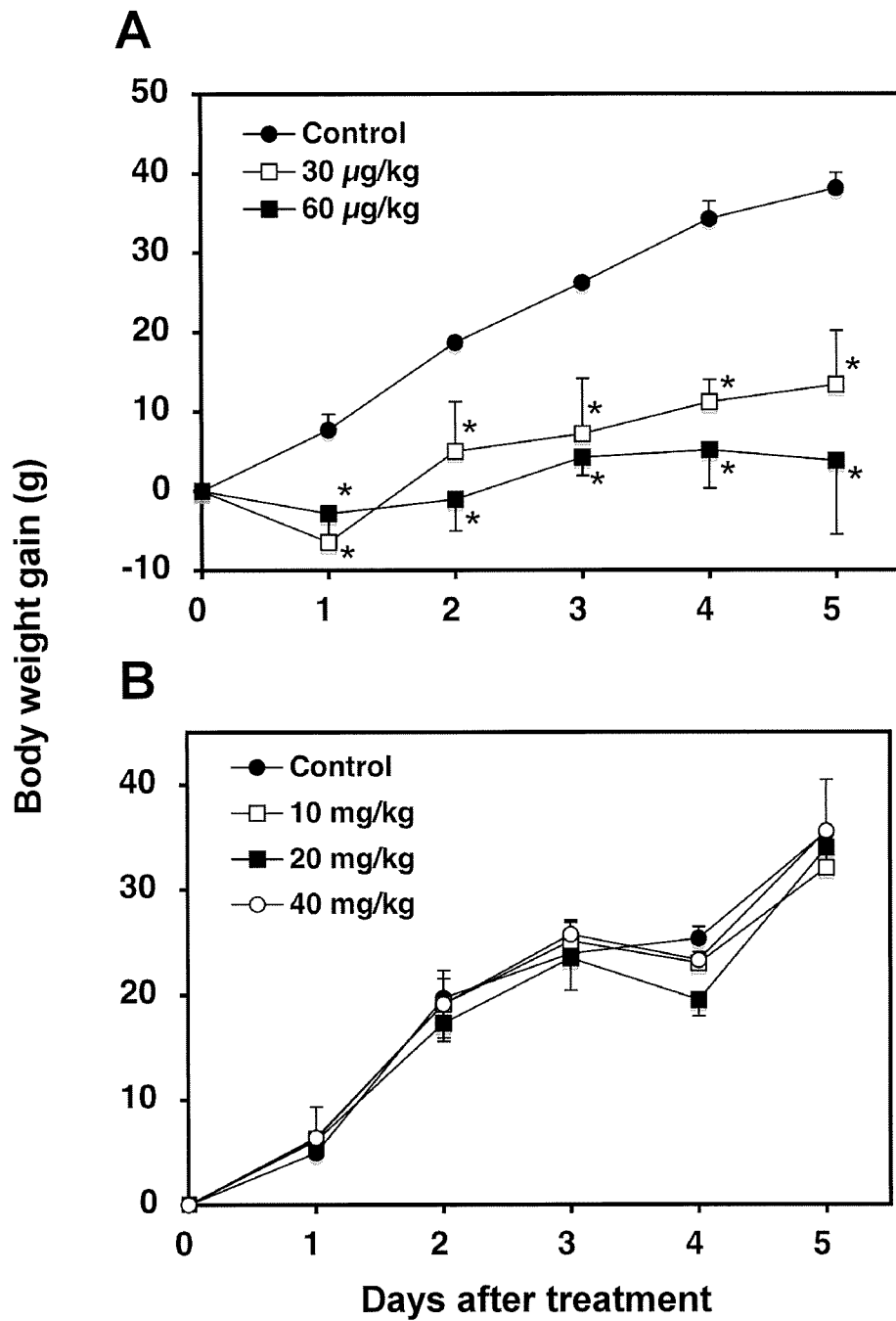


Fig. 1. The effect of TCDD (A) and α -lipoic acid (B) on the body weight gain of rats. The values represent the mean \pm S.D. of 3 rats. Significantly different from each control group: *, $p < 0.05$.

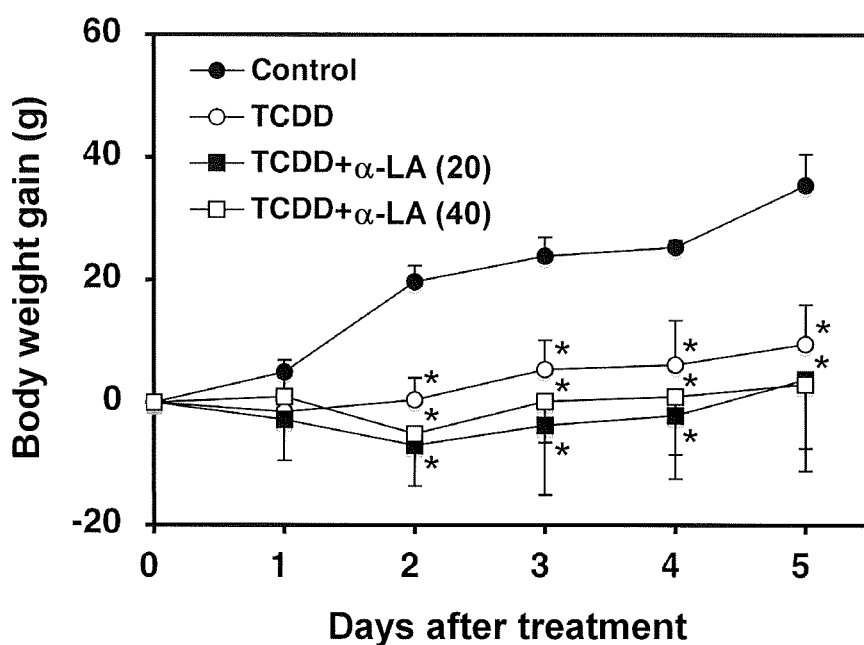


Fig. 2. The effect of α -lipoic acid (α -LA) on the body weight gain of TCDD-treated rats. The values represent the mean \pm S.D. of 3 rats. Significantly different from each control group: *, $p < 0.05$. α -LA (20): α -LA 20 mg/kg treatment. α -LA (40): α -LA 40 mg/kg treatment.

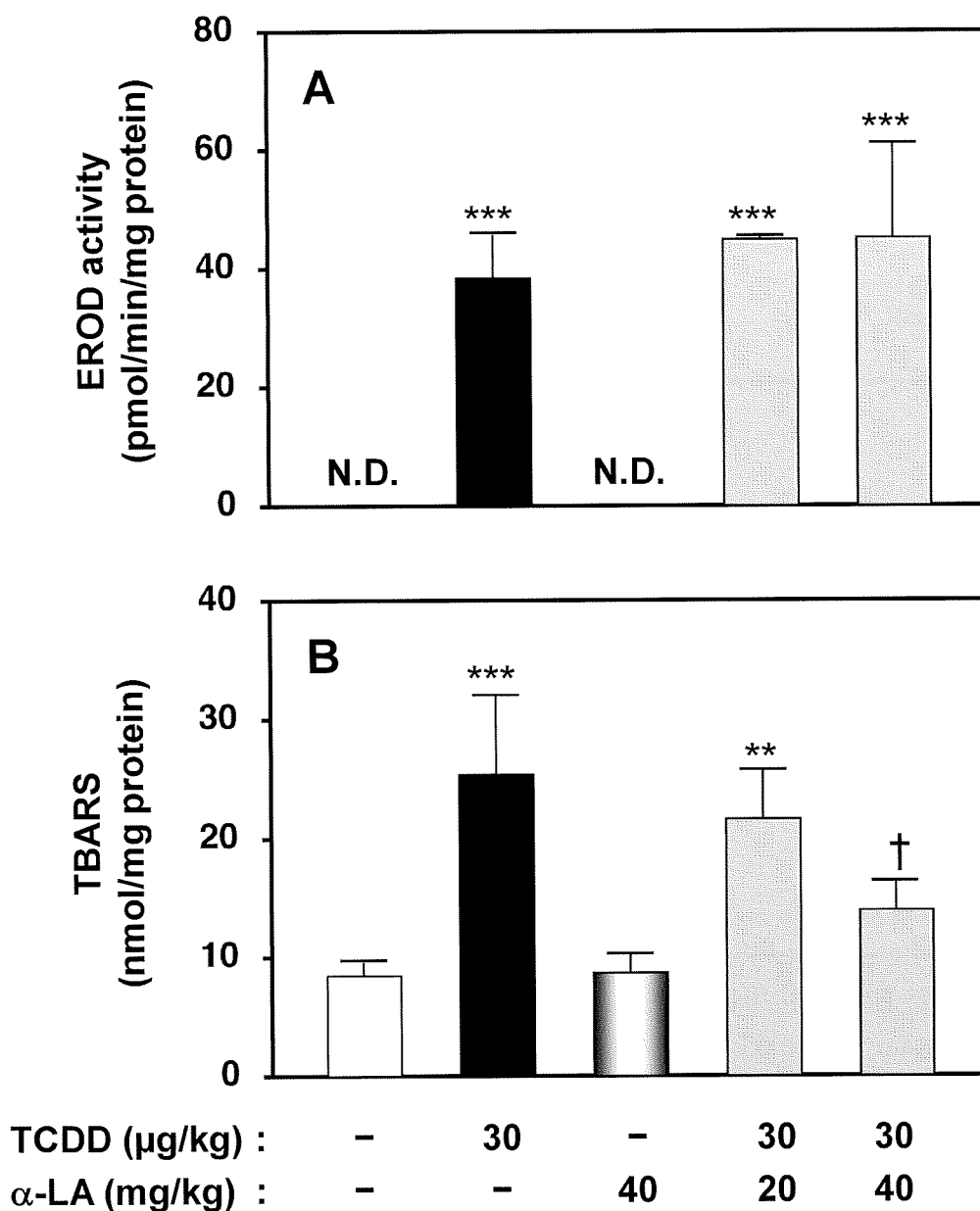


Fig. 3. The effect of a-lipoic acid (a-LA) on hepatic EROD activity (A) and TBARS concentration (B) in TCDD-treated rats. The values represent the mean \pm S.D. of 3 rats. Significantly different from each control group: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Significantly different from each TCDD-treated group: †, $p < 0.05$.

Table 1. The effect of TCDD and α -lipoic acid (α -LA) on the organ weights of rats.

Treatment	Organ weight (% of body weight)		
	Liver	Spleen	Thymus
Control	4.85 \pm 0.15	0.31 \pm 0.03	0.26 \pm 0.01
TCDD			
30 μ g/kg	6.17 \pm 0.51*	0.30 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02**
60 μ g/kg	6.48 \pm 0.55**	0.29 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01**
Control	4.56 \pm 0.23	0.27 \pm 0.04	0.25 \pm 0.05
α -LA			
10 mg/kg	4.36 \pm 0.23	0.30 \pm 0.04	0.28 \pm 0.04
20 mg/kg	4.25 \pm 0.22	0.29 \pm 0.03	0.24 \pm 0.06
40 mg/kg	4.38 \pm 0.13	0.32 \pm 0.03	0.23 \pm 0.01

The values represent the mean \pm S.D. of 3 rats. Significantly different from each control group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.