

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による leukotriene B4 蓄積の毒性学的意義の検討

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分野 准教授
 研究協力者 武田 知起 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野 助教

研究要旨 昨年度までの研究により、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) がラット肝臓において leukotriene (LT) B4 合成系の亢進を介して LTB4 を蓄積させる可能性を見出した。引き続き本年度は、この毒性学的意義の検討を行った。メタボローム解析の結果、昨年度までの成果と一致して、TCDD 曝露により肝臓において LTB4 増加ならびに LTC4 減少が示唆され、LTB4 の増加の程度はおおよそ 20 倍程度と推測された。さらに、LTB4 作用のマーカーである myeloperoxidase (MPO) 活性が TCDD 曝露により有意に増加し、LTB4 の肝への蓄積を支持した。続いて、LTB4 増加の毒性学的意義を検討するため、LTB4 を充填した浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込むことで LTB4 を持続的に処理し、ダイオキシンと同様の毒性が生じるか否かを解析した。その結果、LTB4 持続注入により、肝 MPO 活性が TCDD 曝露時と同程度にまで増加し、肝において LTB4 作用が生じていることが確認された。しかし、TCDD において認められる肝肥大、胸腺萎縮ならびに体重増加抑制は LTB4 処理では出現しなかった。以上の結果から、少なくともこれらの毒性指標で見える限り、LTB4 はその発現決定因子ではないことが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシンは、消耗症、肝障害および免疫機能障害等の多様な毒性を引き起こす (1)。これらの多くは、細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化を起点とした遺伝子発現変動に基づくと考えられている (2, 3)。ダイオキシン依存的に変動する遺伝子は 200 種類以上も存在するが (3, 4)、どの変動が毒性に直結するかは殆ど理解されていない。当教室ではこの問題解決の糸口を得るための新たな試みとして、超分解能液体クロマトグラフィー／飛行時間型質量分析計 (UPLC-TOF-MS) を用いたメタボローム解析を実施し、最強毒性のダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) がラット肝臓の leukotriene (LT) B4 を蓄積させる可能性を見出した (平成

23 年度分担研究報告書)。さらに、肝 LTB4 蓄積は LT 合成の律速酵素である 5-lipoxygenase の誘導と、LTC4 synthase の減少に基づく可能性も示した (平成 24 年度分担研究報告書)。LTB4 は、強力な白血球遊走作用をもつ脂質炎症メディエーターである (5)。従って、これの肝への異常蓄積は毒性学的観点から重要と考えられる。そこで本研究では、LTB4 増加の毒性学的意義の検討を行うため、ラットへの LTB4 投与が TCDD と同様の毒性を惹起しうるか否かを解析した。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物処理

Wistar 系雄性ラット (4 週齢) を一週間馴化させたのち、以下に従って TCDD および LTB4 処理を行った。TCDD は 60

$\mu\text{g}/\text{kg}/2 \text{ mL}$ コーン油の用量で単回経口投与した。対照群にはコーン油を投与した。投与 7 日後に臓器 (肝臓、脾臓および胸腺) を採取し重量を測定した。肝臓は採取したのち実験に供した。LTB4 の処理では、本物質を充填した浸透圧ポンプを体内に埋設し、持続注入法によって処理を行った。すなわち、セボフルラン吸入麻酔下において腹部を 2 cm 程度切開し、あらかじめ LTB4 を充填し先端にゴム管を装着した浸透圧ポンプ (流出速度: $10 \mu\text{L}/\text{時間}$) を腹腔内に留置した。切開部を縫合および消毒したのち継続飼育した。LTB4 は 0.75 および $7.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ の濃度で PBS に溶解しポンプに充填した。なお、対照群も同様の手術を施し、溶媒のみを充填したポンプを埋め込んだ。手術翌日より一日一回体重を測定し、手術 7 日後に臓器 (肝臓および胸腺) を採取し重量を測定するとともに、摘出した肝臓は実験に供した。

2. メタボローム解析

肝臓は、4 倍量の 50 mM Tris-HCl [$\text{pH}7.4$; 1 mM EDTA、 1 mM EGTA、 $1 \times$ protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic 社)、 1 mM NaF] にてホモジナイズしたのち、 2000 x g で 10 分間遠心分離した。得られた上清を、水-メタノールを用いて極性成分を抽出したのち、C18 カラムを装着した UPLC-TOF/MS に付してメタボローム変動を解析した。データ解析は、主成分分析法および直交型部分的最小二乗法を用いて行った。後者により得られた S-plot をもとに有意な変動 (相関係数が 0.8 以上または -0.8 以下) を示す質量イオン (m/z) を抽出し、質量と保持時間をデータベースと照合することにより変動成分を推定した。参照したデータベースは以下の通り: Human Metabolome Database (URL: <http://www.hmdb.ca>) および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (URL: <http://www.genome.jp>)。

3. Myeloperoxidase (MPO) 活性 (6)

本解析には、上記のメタボローム解析と同様の手法にて調製した肝 2000 x g 上清を用いた。本サンプル $3 \mu\text{L}$ に 50 mM リン酸バッファー [$\text{pH} 6.0$; $0.157 \text{ mg}/\text{mL}$ O-dianisidine (Sigma-Aldrich 社)、 0.005% 過酸化水素] を $100 \mu\text{L}$ 加えて 5 分間室温放置したのち、 450 nm の吸光度を測定した。活性算出のための基準活性は、ヒト MPO (Carlbiochem 社) を使用し、サンプルと同様に反応させたのちに吸光度を測定して求めた。

(倫理面への配慮)

本研究における全ての動物実験は、「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た上で、動物の苦痛を排除して実施した (動物実験承認番号: A25-037-0)。

C. 研究結果

LTB4 処理による影響を検討するに先立ち、TCDD による急性毒性の発現と LTB4 増加等のメタボローム変動が惹起されることの再確認を試みた。検討の結果、 $60 \mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD の単回経口投与により、代表的な急性毒性である体重増加抑制、肝肥大ならびに胸腺萎縮が生じ (Fig. 1)、LTB4 増加ならびに LTC4 減少をはじめとする多数のメタボローム変動が推定された (Fig. 2 and Table 1)。また、今回の解析によって TCDD 依存的な LTB4 増加の程度はおおよそ 20 倍であることが示唆された。さらに、LTB4 の肝臓への集積を支持して、LTB4 作用 (好中球活性化作用) のマーカーである MPO 活性が TCDD 依存的に誘導されることが明らかになった (Fig. 3A)。

LTB4 増加の毒性学的意義を検討するため、ラットへの LTB4 投与により TCDD と同様な毒性が再現できるか否かを解析した。浸透圧ポンプを用いた LTB4 持続的投与により、肝 MPO 活性は用量依存的に増大し (Fig. 3B)、投与した LTB4

が肝臓にも作用することが示唆された。なお、高用量の LTB₄ 処理 (7.5 ng/μL) による MPO 活性の上昇は、TCDD 処理とほぼ同程度にまで認められた。しかし、TCDD 処理により認められる体重増加抑制、肝肥大、並びに胸腺萎縮は、LTB₄ 処理によっては観察されなかった (Fig. 4)。

D. 考察

本年度の研究では、TCDD 依存的な肝 LTB₄ 増加と毒性との関連性を検討するため、LTB₄ を充填した浸透圧ポンプをラット腹腔内に埋め込み、LTB₄ が体重増加および臓器重量に及ぼす影響を解析した。その結果、本検討で用いた条件の LTB₄ 処理においては、TCDD により認められる体重増加抑制や臓器重量変化は生起せず、肝 LTB₄ 蓄積はこれらの発現に寄与しないことが示唆された。

本検討では、LTB₄ の消失半減期が 1 分未満であるという事実 (7)、並びに予備的に行った静脈内投与方法による検討では MPO 活性に影響が生じなかった結果に基づき、持続的投与方法によって LTB₄ の影響を評価した。さらに、肝臓中 LTB₄ 含量が 1~2 ng/g tissue 程度であること (8)、並びにメタボローム解析によって TCDD による増加倍率が 20 倍程度と推定されたことから、7.5 および 75 ng/hr を曝露濃度として設定した。本検討では、肝臓中の LTB₄ レベルの定量は行っていないが、MPO 活性の誘導で見ると、本検討での処理条件は 60 μg/kg TCDD によって出現する LTB₄ 蓄積状況に近似すると考えられる。しかし、MPO は LTB₄ 以外の複数の炎症性サイトカインによっても誘導されるので (9)、TCDD による MPO 活性の上昇が LTB₄ の増加だけで誘起されるか否かは今後の解析が必要である。昨年度の研究結果から、TCDD は少なくとも肺においては LTB₄ 合成系酵素の発現を変動させないことから、LTB₄ 増加には臓

器選択性が存在する可能性が考えられる。一方、本実験では腹腔内への投与での検討であったため、全身において LTB₄ が上昇していると予想される。すなわち、LTB₄ が他の臓器において炎症を誘発し、生じた炎症性サイトカインによって二次的に肝臓での MPO 活性が上昇した可能性も否定できない。LTB₄ の肝への蓄積の毒性学的意義をより明確にするため、今後 LTB₄ レベルの定量結果に基づいて投与量を設定して解析を行うとともに、肝臓に選択的に集積する LTB₄ 処理法による解析や他の毒性を対象とした検討も必要と思慮される。

E. 結論

TCDD による肝 LTB₄ 増加は、肝肥大、胸腺萎縮ならびに体重増加抑制の発現に対して寄与は低いものと推定された。

F. 研究発表

- 1) フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー (福岡、2013 年 9 月)
- 2) 日本薬学会第 134 年会 (熊本、2014 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

H. 参考文献

- 1) Poland, A., Knutson, J.C., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**: 371-399 (1982).
- 2) Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M., Gonzalez, F.J. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **140**: 173-179 (1996).
- 3) Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
- 4) Frueh, F.W., Hayashibara, K.C., Brown, P.O., Whitlock, J.P. Jr., *Toxicol.*

- Lett., 122, 189-203 (2001).
- 5) Yokomizo, T., Fukuoka Acta Med., 97: 183-191 (2006).
 - 6) Iizuka, Y., Okuno, T., Saeki, K., Uozaki, H., Okada, S., Misaka, T., Sato, T., Toh, H., Fukayama, M., Takeda, N., Kita, Y., Shimizu, T., Nakamura, M., Yokomizo, T., FASEB J., 24: 4678-4690 (2010).
 - 7) Marleau, S., Dallaire, N., Poubelle, P.E., Borgeat, P., Br. J. Pharmacol., 112: 654-658 (1994)
 - 8) Takamatsu, Y., Shimada, K., Chijiwa, K., Kuroki, S., Yamaguchi, K., Tanaka, M., J. Surg. Res., 119: 14-20 (2004).
 - 9) Suzuki, K., J. Jpn. Coll. Angiol., 49: 21-29 (2009)

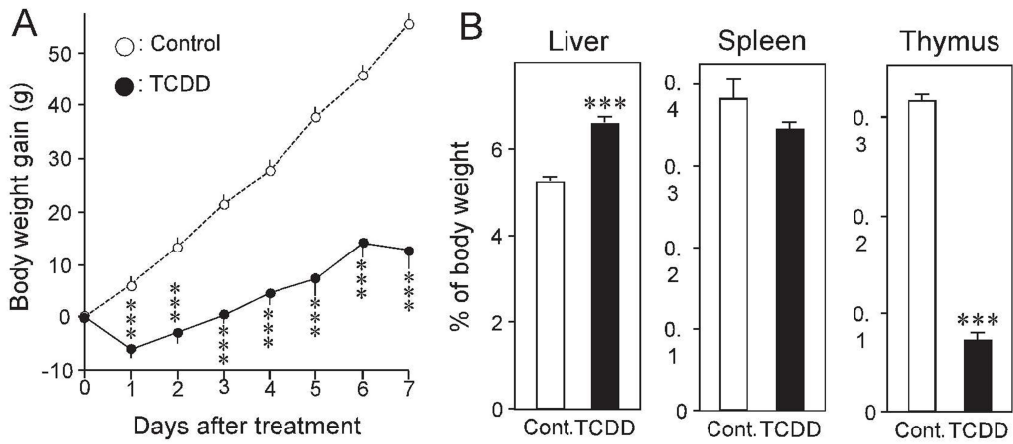


Fig. 1. The effects of TCDD on the body weight gain (A) and tissue weight (B) in male pubertal rats. (A) Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 6 rats. (B) Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 6 rats. Significantly different from control group; ***, $p < 0.001$.

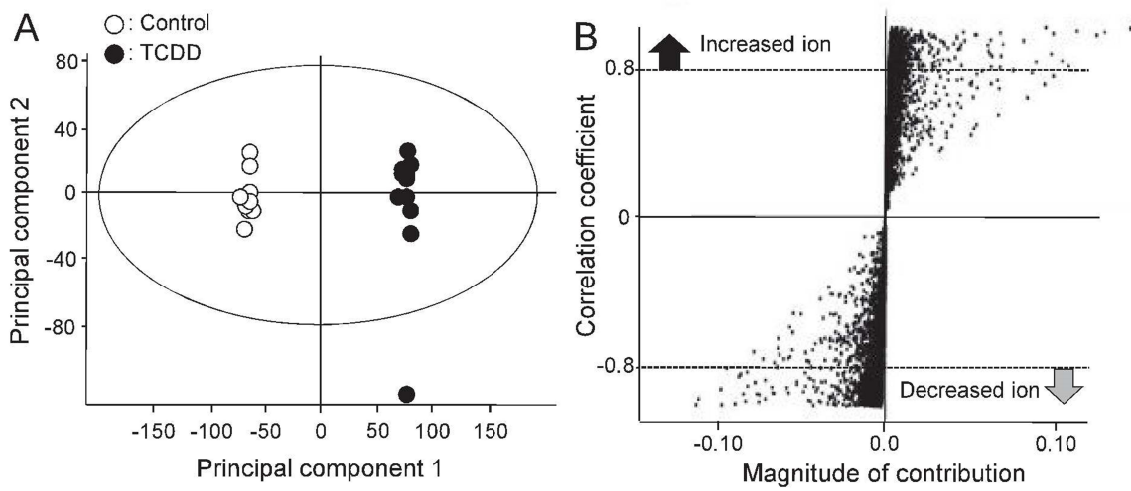


Fig. 2. Principal component analysis for a change in the profile of hepatic metabolome by TCDD. Male pubertal rats were either exposed to TCDD (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, p.o.) or vehicle alone (each $n=12$), and their metabolomic profile in the liver was analyzed. A and B represented score plot and S-plot between control and TCDD group, respectively.

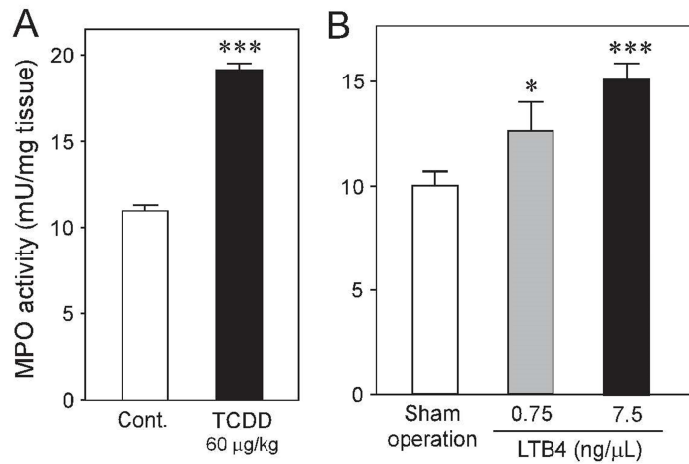


Fig. 3. Induction of MPO activity by treating TCDD (A) and LTB4 (B) in male pubertal rats. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 4-6 rats. Significantly different from control group; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

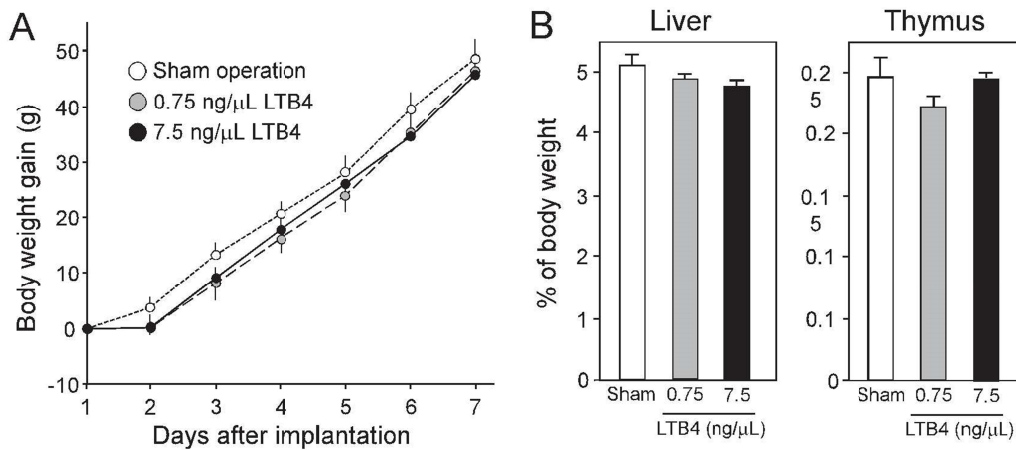


Fig. 4. Absence of the effects of LTB4 treatment on the body weight gain (A) and tissue weight (B) in male pubertal rats. (A) Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 4 rats. (B) Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 4 rats. Abbreviation: Sham, sham operation

Table 1. Representative cellular ingredients, the levels of which are altered by TCDD treatment, in the liver of male pubertal rats.

Samples	Cellular ingredients altered by TCDD (60 µg/kg)			
	↑↑ ^a	↑ ^a	↓ ^a	↓↓ ^a
Liver	LTB4 D-Galactosamine Saccharopine Oleic acid Coproporphyrinogen I	Taurine Histidine 5-Dodecanoic acid Arachidic acid Pyridoxal Flavin adenine dinucleotide Guanosine Gluconate dCMP Glucose-6-phosphate AMP	5-Hydroxyeicosatetraenoate L-Kynurenine 11-Dehydrocorticosterone Biotin Methyl tetrahydrofolate	LTC4 20-Hydroxy-LTB4 Glycochenodeoxycholate Taurochenodeoxycholate Glycocholate Taurocholate Arginine 2-Ketobutylic acid α-Linolenic acid Progesterone L-Stercobilin Acetyl muramic acid

^aThe magnitude in alteration is expressed as the following symbols: ↓↓ and ↑↑, increase and decrease by more than double from control, respectively; ↓ and ↑, increase and decrease within double compared with control, respectively.