

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 対象患者の性・濃度別の分布

2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 (pg/g lipid)	男性	女性	計
10 以下	32	25	57
10~20	31	42	73
20~50	33	24	57
50~100	19	8	27
100~200	14	21	35
200 以上	9	36	45
計	138	156	294

表 2 検出限界の延べ件数

	NULL 計測数値が確定できな かった個数	最小値 計測上の最小値とな った個数
c2378TCDD	33	499
c12378PeCDD	1	9
c23478PeCDF	0	1
c123678HxCDD	0	2
c123678HxCDF	12	111
c1234678HpCDF	43	890
cOCDD	0	*
c33445PeCB	1	21
c3344TCB	68	1337
c3445TCB	68	1709
c334455HxCB	2	29

図 1 2階微分が正の状況

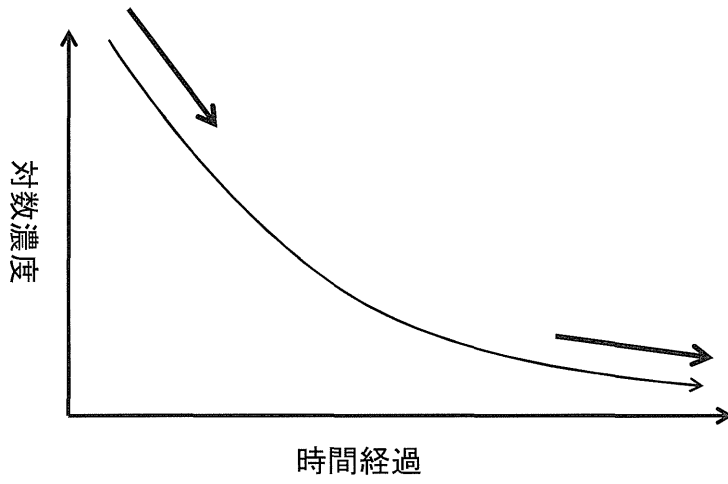


図 2 2階微分が正の状況

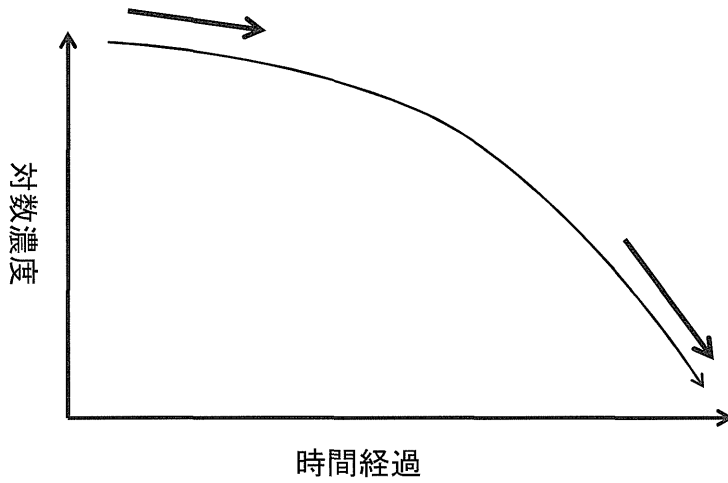


図3 2次の係数のT値の分布

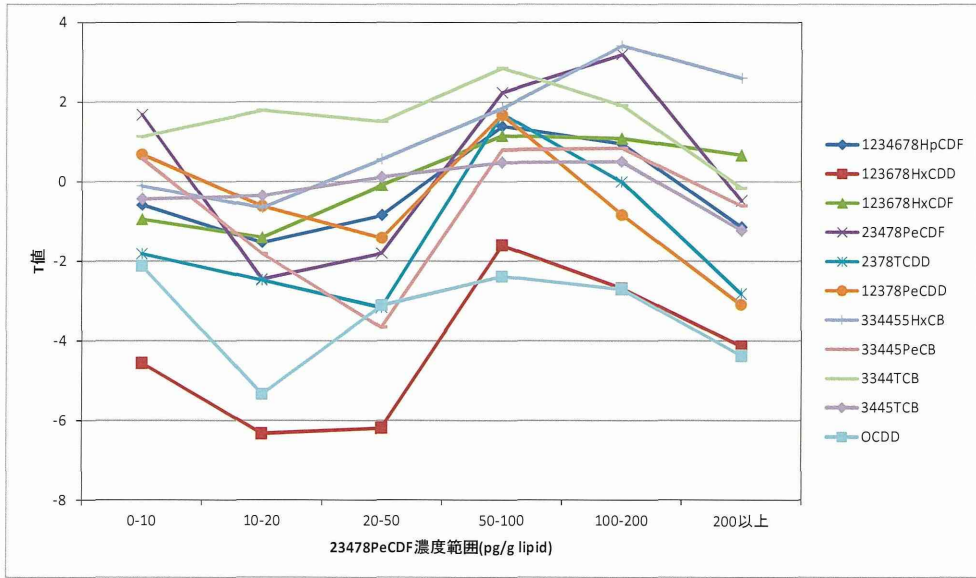


図4 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の濃度変化

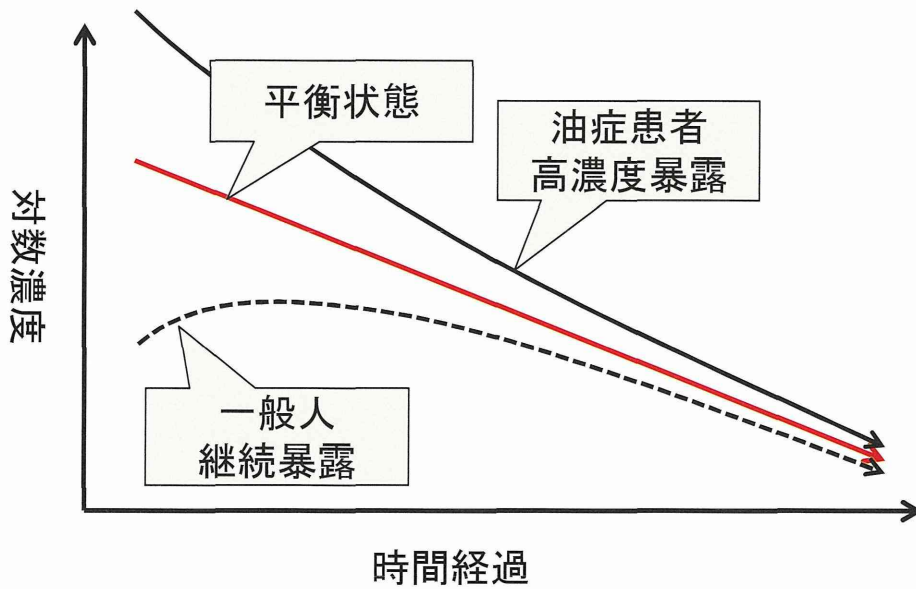


図 5 OCDD の濃度変化

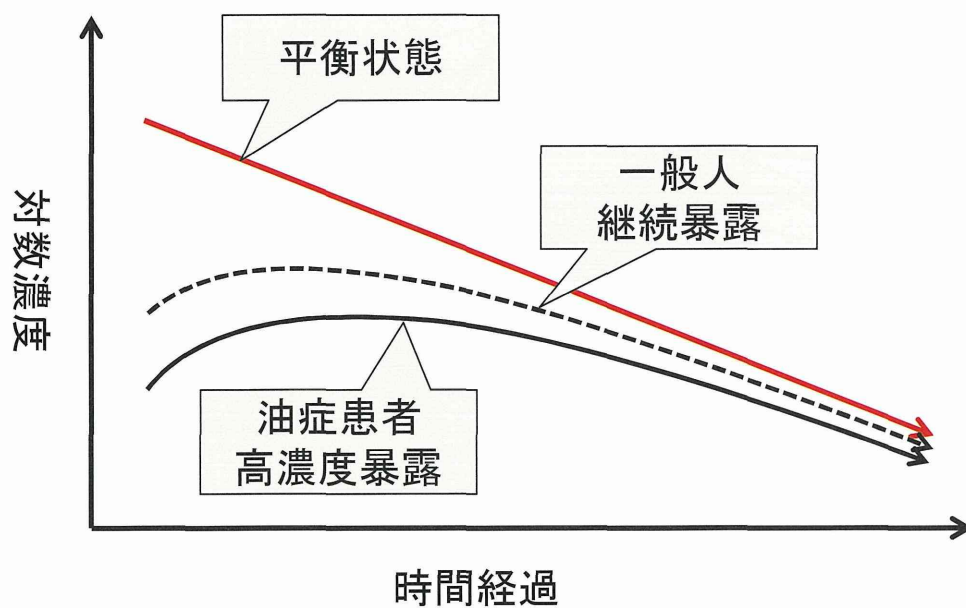
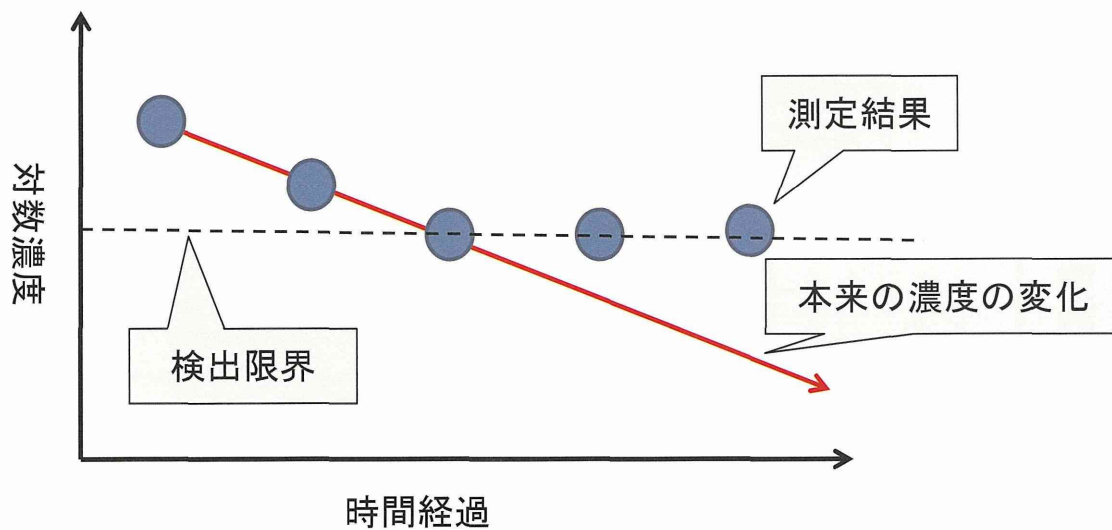


図 6 検出限界近くのダイオキシン類濃度変化



分担研究報告書

Helicobacter pylori 除菌後の胃癌発生に対する activation-induced cytidine deaminase およびダイオキシンの関与

研究分担者 江崎 幹宏 九州大学大学院病態機能内科学 講師
 研究協力者 前畠 裕司 九州大学大学院病態機能内科学 助教

研究要旨 胃癌の発生機序において遺伝子編集酵素群の一つである activation-induced cytidine deaminase (AID) 発現が関与することが示されている。胃癌発生の主要な病因としては *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) が挙げられるが、食生活も胃癌発生に関与することは疫学的調査により示されており、ダイオキシンなどの環境ホルモンの関与も示唆される。我々の検討では、*H. pylori* 除菌後も胃癌発生が必ずしも低下しなかったことから、酸化ストレスによる DNA 損傷との関連が示唆される AID の発現を内視鏡治療により切除した胃癌の切除材料を用いて評価を開始した。現在、101 病変 (*H. pylori* 陽性胃癌 84 病変、*H. pylori* 除菌後胃癌 17 病変) の AID 免疫組織化学染色を実施した。今後、症例をさらに追加した上で、AID 発現と組織学的変化との関連について検討していく予定である。

A. 研究目的

胃癌の発生機序において遺伝子編集酵素群の一つである activation-induced cytidine deaminase (AID) 発現が関与することが示されている。胃癌発生の主要な病因としては *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) が挙げられるが、食生活も胃癌発生に関与することは疫学的調査により示されており、ダイオキシンなどの環境ホルモンの関与も示唆される。我々は、早期胃癌に対して内視鏡治療を実施した症例において、*H. pylori* 除菌群と非除菌群の異時性胃癌出現の頻度を遡及的に検討した結果、*H. pylori* 除菌を行っても胃癌発生は必ずしも低下しないことを報告した。このことは、*H. pylori* 除菌後の胃癌発生リスクが除菌時点の慢性胃炎による組織学的変化の程度に規定される可能性だけでなく、酸化ストレスなど他の要因が異時性胃癌発生に影響する可能性も考えられる。そこで、酸化ストレスによる DNA 損傷との関連が示唆される AID の発現を内視鏡治

療により切除した胃癌の切除材料を用いて評価することとした。

B. 研究方法

早期胃癌に対して内視鏡治療が実施され、得られた切除材料を検討に用いた。切除材料の Hematoxylin & eosin 染色を行い、腫瘍部分に対しては組織学的悪性度を評価した。また、同時に切除された背景の胃粘膜については組織学的炎症性変化を評価した。

次に連続切片を用いて AID と p53 の免疫組織化学染色を行った。AID は細胞質の染色強度をもとに陰性、弱陽性、強陽性の 3 群に分類した。腫瘍組織における p53 染色性については、10%以上の陽性細胞を認めた場合に陽性として判定した。

これらの組織学的所見と免疫組織化学染色所見の関連を検討した。

C. 研究結果

平成 27 年 12 月末の時点で、早期胃癌に

対して当科で内視鏡的治療を行った 101 病変 (*H. pylori* 陽性胃癌 84 病変、*H. pylori* 除菌後胃癌 17 病変) に対して、Hematoxylin & eosin 染色、AID 染色、p53 染色を終了した。

組織学的炎症性変化は、*H. pylori* 感染を背景とした高分化型腺癌が大半を占めていることから、比較的高度の粘膜萎縮ならびに腸上皮化生を認める症例が多かった。AID 陽性細胞は腫瘍細胞のみならず背景の非腫瘍粘膜にも認められた。一方、p53 陽性細胞は腫瘍部分にのみ認められ、背景の非腫瘍粘膜では陽性細胞は認められなかった。

今後、症例数をさらに増やした上で、組織学的炎症性変化、AID、p53 の関連について評価を行う予定である。

D. 考察

H. pylori は胃癌の主要な病因であり、その発生機序において遺伝子編集酵素群の一つである AID が関与することが報告されている。また、3 年間の前向き群間比較試験において、*H. pylori* 除菌群では非除菌群に比べて有意に異時性胃癌発生が抑制された¹⁾ ことから、内視鏡治療後胃では *H. pylori* 除菌が積極的に勧められることとなった。一方、遡及的検討ではあるもののより長期間経過観察しえた我々の検討では、早期胃癌に対する内視鏡治療後に *H. pylori* 除菌を行ったとしてもその後の胃癌発生率は必ずしも低下しなかった²⁾。したがって、*H. pylori* 除菌後の胃癌発生リスクが除菌時点の慢性胃炎による組織学的変化の程度に規定されるのか、あるいは、酸化ストレスなど他の要因が除菌後の異時性胃癌発生に影響するののかについて検討を加える必要があると考え、本研究を開始した。

H. pylori 陽性患者の胃粘膜における AID 発現と組織学的炎症性変化の関連を検討した報告では、AID 発現は単核球浸潤

と腸上皮化生に有意な相関を認めたことが示されている³⁾。さらに、*H. pylori* 除菌により AID 発現は低下するものの、*H. pylori* 未感染胃よりも高かったことが報告されている³⁾。

現時点では症例集積ならびに組織学的炎症性変化の評価中であるため、AID、p53 との関連について検討はできていない。しかし、*H. pylori* 除菌後に異時性胃癌を発生した症例において、*H. pylori* 感染に伴う高度の組織学的炎症性変化を認めないにも関わらず高い AID 発現を認めた場合、*H. pylori* 除菌後の内視鏡生検で AID 染色を行うことにより、高リスク群を見出す指標となる可能性がある。また、これらの症例では異時性胃癌発生にダイオキシンをはじめとする酸化ストレスによる DNA 損傷が関与している可能性が示唆される。

(参考文献)

1. Fukase K, et al.: Lancet 372(9626):392-7, 2008
2. Maehata Y, et al.: Gastrointest Endosc 75(1):39-46, 2012
3. Nagata N, et al.: J Gastroenterol 49(3):427-35, 2014

E. 結論

H. pylori 除菌後の異時性胃癌発生における酸化ストレスの関与を検討するために AID 発現の有無を評価中であり、今後の検討結果が待たれる。

F. 健康危険情報

現時点ではない。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。

分担研究報告書

ダイオキシン類によるマウス肺障害における surfactant protein の発現に関する検討

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
 研究協力者 濱田 直樹 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教

研究要旨 ダイオキシン類によって肺障害が引き起こされるメカニズムの解明を目的に、動物実験モデルの作成を目指している。ダイオキシン類をマウスに経気管的に投与すると気道分泌物増加を認めるモデルができつつあり、その肺組織では surfactant protein の発現亢進を認めている。

A. 研究目的

油症発症から既に 47 年が経過したが、患者には慢性的な咳、痰等の呼吸器症状が未だ認められる。当科ではそのメカニズムを解明するために、動物実験モデルの作成を目指して研究を進めてきた。まずダイオキシン類をマウスに全身投与して肺組織の検討を行ったが、明らかな肺損傷を引き起こすことはできなかった。そこでマウスの肺に直接ダイオキシン類を投与して検討し、気道分泌物の増加を示すモデルができつつあるが、肺損傷の程度、再現性に課題があり、信頼度の高い動物実験モデルの確立を目的とした。

肺サーファクタントは、肺胞表面を覆って肺胞の虚脱を防ぎ、呼吸を円滑に進行させている物質で、リン脂質と 4 種類の特異蛋白 surfactant protein (SP)-A、SP-B、SP-C、SP-D からなる。なかでも SP-A と SP-D は気道-肺胞系における生体防御作用などの機能も持ち¹⁾²⁾、注目されている。実際の臨床においても、血中の SP-A、SP-D 値は間質性肺炎・肺線維症の活動性のマーカーとして用いられている^{3) 4)}。以前我々は、油症患者血中の SP-A、SP-D の濃度を測定し、油症患者の呼吸器症状や、血中ダイオキシン類の濃度との関連を統計学的に解析し、SP-D 濃度と咳嗽、喀痰といった症状との間、また SP-A 濃度と一部のダイオキシン類濃度との間に、有意な関連が

認められたことを報告した⁵⁾。surfactant protein がダイオキシン類による肺傷害において果たす役割に注目し解析した。

B. 研究方法

マウスに塩酸ケタミン、塩酸キシラジンにて全身麻酔をかけ、経気管的に benzo[a]pyrene (BaP) を投与し、投与 4 日後に肺組織を回収し解析した。

具体的には、C57BL/6 マウス、雌 8-10 週齢に、塩酸ケタミン 80 mg/kg+塩酸キシラジン 10 mg/kg を腹腔内投与して、自発呼吸が持続する程度に全身麻酔をかけた。その後、マウスを仰臥位に固定して、頸部を小切開し、気管を露出させた。トリカプリリンで溶解した BaP、1 匹あたり 500 μ g (50 μ l) を、24G 針にて経気管的に投与した。コントロール (対照) 群にはトリカプリリンを 50 μ l 投与した。投与 4 日後に肺組織を取り出して、HE 染色、Alcian Blue-PAS (AB-PAS) 染色にて組織学的に評価した。また SP-A、SP-C、SP-D について免疫組織学的に検討した。また取り出した肺をホモジネートしてウェスタンブロット法により SP-A、SP-C、SP-D について解析した。

(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

BaP 投与群ではコントロール群と比較して、細気管支への炎症細胞の浸潤と細気管支壁の肥厚が認められ、やや太い気管支から細気管支の気道上皮には AB-PAS 陽性細胞の増加を認めた。また、免疫組織学的には、BaP 投与群ではコントロール群と比較して、SP-D は細気管支上皮細胞や II 型肺胞上皮細胞に高発現を認め、SP-A は細気管支上皮細胞で発現の亢進が認められた。SP-C は BaP 投与群では、II 型肺胞上皮細胞における発現の亢進が認められた。肺組織のウェスタンブロット解析では SP-A、SP-D、SP-C の発現に一定の所見を得ることができなかった。

D. 考察

油症患者の主な呼吸器症状は慢性気管支炎様の咳嗽や喀痰であり、気道分泌物の増加に由来すると考えられている。マウスに BaP を経気管的に投与することで、AB-PAS 染色陽性の気道上皮細胞の増加を認め、ムチン類の増加、すなわち気道分泌物の増加を表すモデルを作成したが、個体間でのばらつきが大きいのが課題であった。この理由として、トリカプリリンで溶解した BaP は粘度が高く、マウスの気道に投与する際、または投与した後に容易に窒息するため、手技的に難度が高いことが原因と考えられる。そのため、まず複数の溶媒に変更して検討したが上手くいかなかった。また投与時期、投与量、投与期間などの条件を変更して様々な検討を行い、現時点では、麻酔薬を呼吸抑制が少ない薬剤に変更し、投与経路を目視で確認しやすい経気管投与法にすることが有効であったと考えている。今後も更に再現性を高めるための検討を行っていく必要がある。

また、油症患者の血中 SP-A、SP-D 濃度と、油症患者の呼吸器症状や、ダイオキシン類の濃度との統計学的な有意な関連があることから⁵⁾、ダイオキシン類による肺

損傷において surfactant protein が果たす役割に着目して、マウスモデルにおいて解析を行い、上記の如く BaP 投与群において肺組織中の surfactant protein 発現の亢進が認められた。しかしウェスタンブロット法による解析では現時点では有意な結果が出ておらず、今後も解析を進めていく予定である。また気管支肺胞洗浄液中の surfactant protein 値についても解析、検討したいと考えている。

近年、surfactant protein と呼吸器疾患との関連が注目されており、喫煙者や慢性閉塞性肺疾患患者では、血中や喀痰中の SP-A が有意に上昇していたという報告や⁶⁾、近年の慢性閉塞性肺疾患大規模コホート研究にて血中 SP-D 値の高い群は肺機能の低下が大きかったという報告がある⁸⁾。喫煙による肺障害の一部はタバコ燃焼によるダイオキシン類が関与している可能性があり、油症患者における肺障害との同一性が認められる可能性も考慮しつつ、今後も検討を進めていきたいと考えている。

E. 結論

マウスに BaP を経気管的に投与することによって気道分泌物が増加するマウスモデルを作成し、そのマウス肺組織においては surfactant protein の発現が亢進しており、病態への関与が考えられた。

F. 研究発表

1) 濱田直樹, 徳永章二, 横山哲也, 鈴木邦裕, 緒方彩子, 坪内和哉, 有村雅子, 中西洋一. 油症患者における肺サーファクタントプロテインに関する検討. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 平成 27 年 4 月 17-19 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

H. 参考文献

- 1) Mason RJ, *et al.* Surfactant protein A and Sufactant protein D in health and disease. *Am J Physiol* 1998; 275: L1-L13.
- 2) Kishore U, *et al.* Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 2006; 43: 1293-1315.
- 3) Vestbo J, *et al.* Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points (ECLIPSE). *Eur Respir J* 2008; 31: 869-873.
- 4) Lomas DA, *et al.* Serum surfactant protein is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2009; 34: 95-102.
- 5) 中西洋一 他. 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究
平成 25 年度総括・分担報告書:
81-86.
- 6) Nomori A, *et al.* Serum surfactant protein A levels in healthy individuals are increased in smokers. *Lung* 1998; 176: 355-361.
- 7) Mazur W, *et al.* Elevation of surfactant protein A in plasma and sputum in cigarette smokers. *Eur Respir J* 2011; 38: 277-284.
- 8) Coxson HO, *et al.* The presence and progression of emphysema in COPD as determined by CT scanning and biomarker expression: a prospective analysis from the ECLIPSE study. *Lancet Respir Med.* 2013; 1(2):129-36.
- 9) Wong PS, *et al.* Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42(2): 210-7.

分担研究報告書

2,3,3',4,4',5-六塩素化ビフェニル(PCB156)の動物肝マイクロゾームによるin vitro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 講師

PCB156 は、PCB153、PCB180 および PCB138 とともに高蓄積性であり、特に、油症患者の血中では、健常者の 3.9 倍の高濃度で存在することが報告されている。本研究では、PCB156 が代謝されるか否かについて、ラットおよびモルモット肝マイクロゾーム(Ms)を用いて調べた。その結果、両動物の未処理 Ms、PB 前処理 Ms および MC 前処理 Ms のいずれでも、37°C、60 min のインキュベーションでは、代謝物は全く生成されなかった。この結果は、PCB156 がヒト組織中において高濃度で検出されるという事実をよく支持している。

A. 研究目的

2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153)、2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB180) および 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB138)は、ヒト血液中や肝臓中に高濃度検出されるPCB異性体としてよく知られている¹⁻³⁾。このような高蓄積性PCB異性体は、いずれも共通して、2,4,5-三塩素置換ベンゼンあるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有している。戸高ら⁴⁾は油症発生から37年後の油症患者血液中のPCB異性体を調べ、その結果、油症患者および健常者のいずれも、上記のPCB異性体が最も多いこと、しかも油症患者で健常者の1.6~2.2倍多いことを報告した。

一方、PCB156は、PCBの中で最強の毒性を有するcoplanar PCBである3,4,5,3',4'-五塩素化ビフェニル(PCB126)の2位にさらに塩素置換された構造を有しているが、PCB126と同様に、強い肝薬物代謝酵素の誘導能を有することが報告されている⁵⁾。ただし、WHOによる毒性評価係数(TEF)をみると、PCB126が0.1であるのに対し、PCB156は1998年に0.0005、2005年の再評価では0.00003となった⁶⁾。ところで、前述の戸高らの報告⁴⁾によると、PCB156は油症患者でPCBのうち7番目に多く、しかも健常者の

3.9倍以上の高濃度であった。これらの結果は、PCB156が油症患者でより多く摂取され、代謝されずに蓄積していること、さらにPCB156が油症患者における毒性発現に少なからず寄与していることを示唆している。そこで、本研究ではラットおよびモルモット肝マイクロゾーム(Ms)を用いて、PCB156が代謝されるか否かを調べた。また、代謝に関与するチトクロムP450 (CYP) 分子種を明らかにするため、代表的なCYP誘導剤のphenobarbital (PB)あるいは3-methylcholanthrene (MC)で前処理した動物の肝Msでも同様に検討した。

B. 研究方法

① PCB156 の合成 : 3,4-Dichloroaniline および 1,2,3,4-tetrachlorobenzene を tetrachloroethylene に溶解し、isopentyl nitrite を添加後、100°C で 24 時間反応させた。反応液をchloroform で抽出後、アルミナカラムおよびシリカゲルカラムに通し、次に分取用HPLC にかけて、PCB156 のピーク (保持時間 39.4 min) を分取した。この画分を濃縮したところ、白色結晶が得られた。GC-MS の結果、分子量 358 であり、6 つの塩素原子を有することを確認した。収量は 40mg (収率 0.4%) で、純度は 99.3%であった。以下、

これを用いて、代謝研究を行った。② 動物肝 Ms の調製：Wistar 系雄性ラット(体重約 200g)および Hartley 系モルモット(体重約 300g)を用いた。動物肝 Ms は、未処理、phenobarbital (PB) および 3-methylcholanthrene (MC) 前処理のラットとモルモットから調製した。PB および MC はそれぞれ 80 および 20 mg/kg/day の用量で 3 日間腹腔内投与した。最終投与後翌日に屠殺し、直ちに肝を摘出した。さらに、常法により、肝 Ms を調製した。③ 代謝物の定量：各動物肝 Ms を 40 μ M PCB156、NADPH 生成系、100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)および MgCl₂とともに、好氣的に 37°C で 1 時間インキュベートした後、chloroform-methanol (2:1, v/v) および *n*-hexane で抽出し、さらに diazomethane でメチル化後、GC-ECD および GC-MS に供した。PCB156 代謝物の定量は PCB156 の検量線を用いて行うつもりであった。

(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、ラットの屠殺に際しては、苦痛をできるだけ軽減するため、エーテル麻酔後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

まず、ラット肝MsによるPCB156の代謝を調べた。Fig. 1に、GC-ECDによる結果を示した。未変化体のPCB156は、保持時間 15.1minに検出されたが、未処理Ms、PB前処理MsおよびMC前処理Msのいずれでも、PCB156以外に、代謝物ピークは全く検出されなかった(Fig. 1)。一方、モルモットの場合にも、未処理Ms、PB前処理MsおよびMC前処理Msのいずれでも全く代謝物ピークは見られなかった(未掲載)。

D. 考察

当研究室では PCB126 のラットにおける

in vivo 代謝を調べ、糞中から 4'位の塩素が 5'位に NIH 転位した 4'-OH 体を極微量ではあるが検出に成功した⁷⁾。もし、PCB156 の代謝物が生成されるのであれば、PCB126 と同様に、4'位の塩素が 5'位に NIH 転位した 4'-OH 体が考えられる(Fig. 2)。今回、PCB156 はラットおよびモルモット肝 Ms を用いた *in vitro* 系 (Incubation time, 60 min) による検討では代謝物が全く生成されなかった。この結果から、動物組織に高濃度で残留する PCB は、難代謝性であるという事実をよく支持した。

E. 結論

PCB156は、ラットとモルモット肝Msを用いた *in vitro*系では全く代謝されないことが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 木村 治, 古賀信幸, 2,2',3,4,4',5,5'-七塩素化ビフェニル(CB180)の動物肝ミクロゾームによる代謝. 福岡医誌, **106**(5), 176-183 (2015).
2. 太田千穂, 緒方 瞳, 山本健太, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸, ラット肝ミクロゾームによる Luteolin tetramethyl-ether の代謝. 中村学園研究紀要, in press (2016).

2. 学会発表

1. C. Ohta, Y. Kato, K. Haraguchi, T. Endo, N. Koga, *In vitro* metabolism of nobiletin in the small intestine and kidney of rats and guinea pigs. p262 (2015). 12th Asian Congress of Nutrition (パシフィック横浜、横浜市) 平成 27 年 5 月 14~17 日
2. K. Yamamoto, C. Ohta, H. Ogata, T. Endo, O. Kimura, Y. Kato, K. Haraguchi, N. Koga, *In vitro* metabolism of kaempferol tetramethyl

ether by rat liver microsomes. p261 (2015).

12th Asian Congress of Nutrition (パシフィコ横浜、横浜市)平成 27 年 5 月 14~17 日

3. 太田千穂、西村恵理、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、山本健太、古賀信幸、海洋生物由来臭素化合物のヒト肝酵素による代謝. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー (神戸学院大学、神戸市)平成 27 年 9 月 17, 18 日
4. 山本健太、太田千穂、加藤善久、原口浩一、遠藤哲也、古賀信幸、黒ショウガ成分 3,5,7,4'-Tetramethoxyflavone の動物肝ミクロゾームおよびヒトチトクロム P450 による代謝. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会 (沖縄県市町村自治会館、那覇市)平成 27 年 10 月 30, 31 日
5. 高木雅恵、森山綾香、藤井由希子、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、加藤善久、木村治、遠藤哲也、海藻食品に由来するヒト血液および尿中 6-OH-BDE47 の抱合体. 日本薬学会第 136 年会 (パシフィコ横浜、横浜市)平成 28 年 3 月 26~29 日
6. 木村 治、藤井由希子、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、加藤善久、遠藤哲也、Caco-2 細胞におけるアリストロキア酸 I の膜透過に及ぼすケルセチンの影響. 日本薬学会第 136 年会 (パシフィコ横浜、横浜市)平成 28 年 3 月 26~29 日
7. 木下真璃伽、久我歩佳、藤井由希子、加藤善久、木村 治、遠藤哲也、太田千穂、古賀信幸、原口浩一、大型海洋ほ乳類を用いた有機フッ素化合物の肝臓蓄積実態の解明. 日本薬学会第 136 年会 (パシフィコ横浜、横浜市)平成 28 年 3 月 26~29 日

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. 参考文献

- 1) A. Sjödin, L. Hagmar, E. Klasson-Wehler, J. Björk and Å. Bergman, *Environ. Health Perspect.*, **108**(11), 1035-1041 (2000).
- 2) D. M. Guvenius, P. Hassanzadeh, Å. Bergman and K. Norèn, *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 2264-2269 (2002).
- 3) 古賀信幸、太田千穂、油症研究 II (古江増隆、赤峰昭文、佐藤伸一、山田英之、吉村健清 編)九州大学出版会, pp. 200-218 (2010).
- 4) T. Todaka, T. Hori, D. Yasutake, H. Yoshitomi, H. Hirakawa, D. Onozuka, J. Kajiwara, T. Iida, T. Yoshimura, M. Furue, *Fukuoka Igaku Zasshi.*, **100**(5), 156-165 (2009).
- 5) A. Parkinson, S. H. Safe, L. W. Robertson, P. E. Thomas, D. E. Ryan, L. M. Reik and W. Levin, *J. Biol. Chem.*, **258**(9), 5967-5976 (1983).
- 6) M. Van den Berg, *et al.*, *Toxicol Sci.*, **93**(2), 223-241 (2006).
- 7) N. Koga, M. Beppu and H. Yoshimura, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 497-506 (1990).

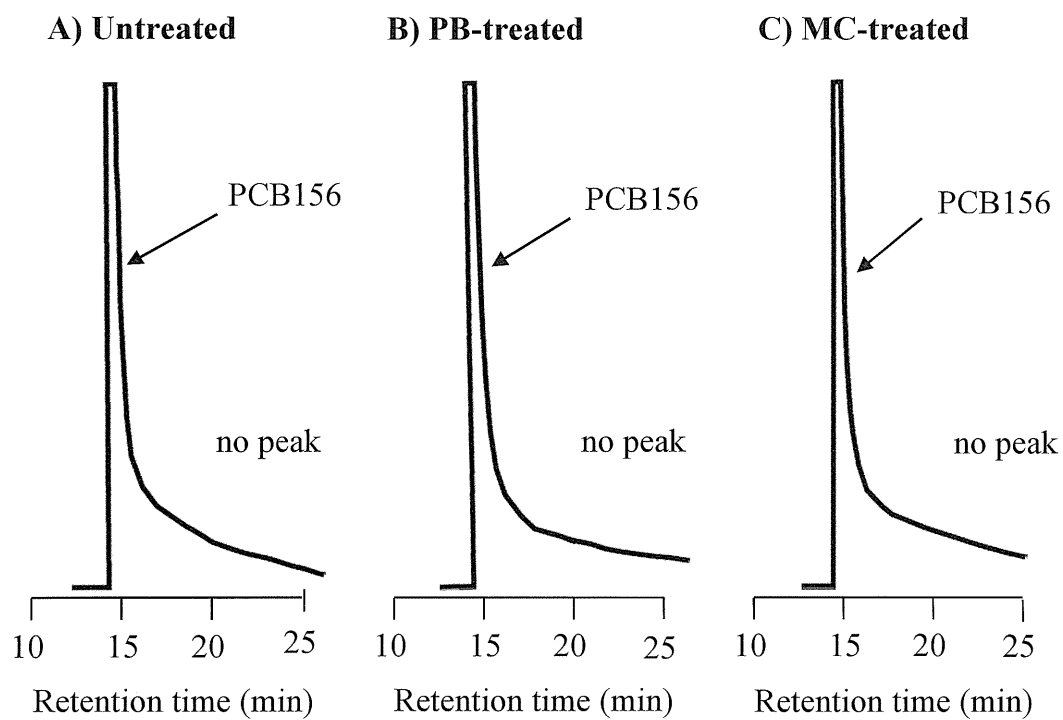


Fig. 1 ラット肝マイクロゾームによる PCB156 の代謝

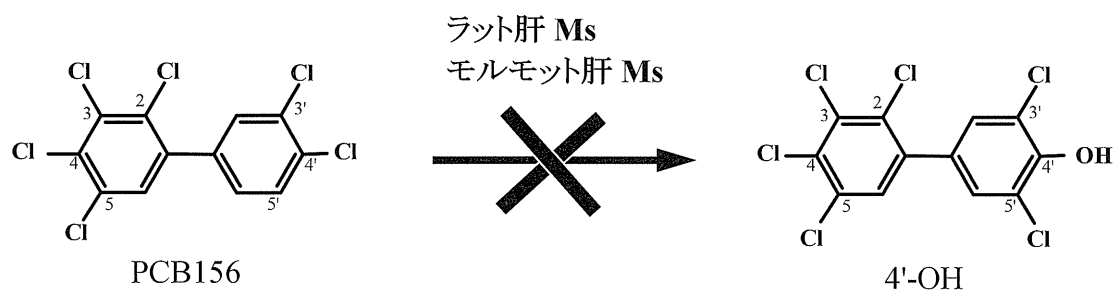


Fig. 2 PCB156 の予想代謝経路

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による胎児脳下垂体ホルモンへの影響とその機構解析：**aryl hydrocarbon receptor** 欠損ラットを用いた検討

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 当教室ではこれまでに、妊娠ラットへのダイオキシン曝露による性未成熟等の出生児発育障害の一端が、胎児脳下垂体の luteinizing hormone (LH) および growth hormone (GH) の発現低下に起因することを明らかにしている。本年度の研究では、ダイオキシンの毒性発現に重要である aryl hydrocarbon receptor (AhR) の遺伝子欠損ラットを用いて、上記の胎児脳下垂体ホルモンの低下とそれに付随する発育障害に対する AhR の寄与を母体と胎児の遺伝子型の両面から検討した。ヘテロ欠損型の妊娠ラットに 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を処理し、同腹に混在する異なる遺伝子型の胎児それぞれについて TCDD の影響を比較した。その結果、野生型胎児においては TCDD により脳下垂体 LH および GH レベルは低下したが、欠損型胎児では影響は認められなかった。さらに、胎児精巣の性ホルモン合成系タンパク質の発現に対する TCDD の影響も AhR 欠損によって消失した。これらの胎児期への影響と合致して、成長後の雄児の交尾行動および雌児のサッカリン嗜好性は TCDD 曝露母体より出生した野生型の児において障害されたが、AhR 欠損児では TCDD による影響は認められなかった。さらに、低体重や低体長も AhR 欠損によって消失した。続いて、母体側の AhR の寄与を検討するため、野生型あるいは欠損型母体に TCDD を処理し影響を比較した。その結果、野生型母体への TCDD 曝露によって生じる雄胎児の GH mRNA 減少は、欠損型母体への同処理では低下傾向に止まった。以上の結果から、1) TCDD は胎児自身の AhR を介して胎児 LH/GH 合成を低下させ、成長後に性未成熟等の発育障害を惹起すること、ならびに 2) 雄胎児の GH 発現抑制には母体の AhR も寄与することが明らかになった。

A. 研究目的

妊娠期のダイオキシン曝露による性未成熟等の出生児発育障害は、低用量で発現し、影響が長期間持続するため問題である (1)。当教室では、最強毒性ダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1 µg/kg、経口) の妊娠ラットへの曝露により、出生前後の限定された時期に脳下垂体 luteinizing hormone (LH) が低下し、これを起点として成長後の性未成熟が固着することを明らかにしている (2, 3)。更に、TCDD は別の脳下垂体ホルモンで

ある growth hormone (GH) の発現も胎児期に減少させ、これと付随して低体重や低体長が生じることも見出している (4, 5)。多くのダイオキシン毒性発現には、aryl hydrocarbon receptor (AhR) 活性化が重要であるが (6)、出生児発育障害に対して AhR が寄与するか否かは不明である。そこで本年度の研究では、上記の胎児 LH/GH 低下に基づく障害性に対して AhR が寄与するか否かを、AhR 遺伝子欠損ラットを用いて検討した。本研究ではまず、児自身の AhR の重要性を明らかにす

るため、ヘテロ欠損型 (Het) の妊娠ラットに TCDD を処理したのち、同腹内に混在する野生型 (WT) 胎児、Het 胎児、ならびにホモ欠損型 (KO) 胎児の 3 者間で、TCDD による影響の違いを比較した。さらに、母体自身の AhR が寄与する可能性を検討するため、WT 母体および KO 母体への TCDD 曝露が胎児 LH/GH 発現に及ぼす影響も比較した。

B. 研究方法

1. 動物実験

AhR-KO ラットは、XTN™ TAL nuclease ベクターを用いて作出した (平成 26 年度分担研究報告書)。遺伝子型の判別は、出生児の尾あるいは耳小片よりゲノム DNA を抽出し、AhR 遺伝子をコードするプライマーを用いた PCR によって行った。

1-1. 児の AhR 遺伝子型間での比較

雌雄の AhR-Het ラットを一晩交配し、翌朝膈内に精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。得られた AhR-Het 妊娠ラットの妊娠 15 日目に、TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/2 \text{ mL}$ コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油のみを投与した。妊娠 20 日目の胎児より組織および血液を採取した。一部の実験では、出生後の成熟に対する影響を調べるため、TCDD 処理後の母ラットを自然に出産させたのち、生後 21 日目において離乳させた。遺伝子型を判別したのち、継続飼育を行った。7 週齢時に、体重、体長、肛門生殖突起間距離 (AGD) ならびに尿道膈間距離 (UVD) を測定したのち、以降の行動試験に供した。

1-2. 母体の AhR 遺伝子型間での比較

本解析では、児の AhR 遺伝子型の影響を排除するため、全ての児が AhR-Het となるように妊娠ラットを作成した。すなわち、WT 雌 x AhR-KO 雄あるいは AhR-KO 雌 x WT 雄の組み合わせでの交配によって WT および KO の妊娠ラッ

トを得た。それぞれ妊娠 15 日目に TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/2 \text{ mL}$ コーン油) あるいはコーン油を単回経口投与したのち、妊娠 20 日目の胎児より脳下垂体を採取した。

2. リアルタイム RT-PCR 法

組織より total RNA を抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (7)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β -actin mRNA の Ct 値で補正した。

3. Enzyme immunoassay (EIA)

胎児血清 LH および GH 濃度は、市販のキットを用いて、添付説明書に従って測定した。血清は、LH については添付の希釈用溶液にて 2 倍希釈、GH は 5 倍希釈したのちに測定に用いた。

4. 交尾行動試験

既報 (3) に従って、出生雄児の 10 および 11 週齢時に雄特異的交尾行動試験を行った。指標には生殖器挿入を用い、30 分間における実施回数を計測した。

5. サッカリン嗜好性試験

既報 (3) に従って、出生雌児の 8 週齢時に実施した。0.01% のサッカリンナトリウム溶液および水を満たした 2 本の給水瓶を用意し、自由に摂取させた。一日あたりの飲水量を給水瓶の重量変化として測定し、全飲水量に対するサッカリン溶液の飲水量を嗜好性として算出した。

(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のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号:A26-151-0~3。遺伝子組換え実験は、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」第 10 条第 2 項の規定に基づき、委員会の承認を得て行っ

た (承認番号: 26-4)。

C. 研究結果

AhR-Het 妊娠ラットへの TCDD 曝露によって、これまでの成果と同様に WT 雄胎児では脳下垂体の LH β mRNA ならびに血中 LH レベルが減少した (Fig. 1A and B)。しかし、Het 胎児では減少傾向に止まり、KO 胎児においては影響が完全に消失した (Fig. 1A and B)。これと符合して、LH の下流で働く精巣の性ホルモン合成の律速タンパク質である *steroidogenic acute-regulatory protein (StAR)* の mRNA 発現も、WT 胎児のみで TCDD によって低下した (Fig. 1C)。さらに、TCDD は WT 胎児において脳下垂体 GH mRNA および血中 GH 濃度を減少させたが、同様の現象は KO 胎児では認められなかった (Fig. 2)。ただ、LH β /StAR と異なり、TCDD による血中 GH 濃度の低下は、Het 胎児でも有意差が検出された (Fig. 2B)。続いて、成長後の雄児の成熟に対する AhR の寄与を検討した。性成熟に対する影響を検討した結果、雄特異的交尾行動である生殖器挿入の回数は WT の出生雄児では減少したが、KO の出生雄児においては全く減少せず (Fig. 3A)、胎児期の LH 低下と合致した結果が得られた。形態的な性成熟の指標である AGD は、本条件においては TCDD による影響は観察されなかった (Fig. 3B)。一方、WT の出生雄児では、胎児期の TCDD 曝露によって体重および体長の減少ないし減少傾向も認められた (Fig. 3C and D)。

同腹胎児間での LH/GH 発現への影響について、雌胎児も同様に解析した。その結果、WT では TCDD 依存的な脳下垂体 LH β ならびに GH の mRNA 発現低下が認められたが、KO においてはこれらの影響は消失した (Fig. 4)。GH mRNA については、雌胎児では Het においても WT と同様に低下した (Fig. 4B)。さらに、胎

児期の LH 低下と符合して、成長後の雌特異的行動形質であるサッカリン嗜好性は WT 出生児のみで低下した (Fig. 5A)。また、形態的な性成熟の指標である UVD ならびに AGD は、WT および Het 出生雌児において短縮ないしその傾向を示した (Fig. 5B and C)。体重・体長も、TCDD 曝露母より出生した WT 児のみで減少した (Fig. 5D and E)。

次に、母体の AhR 遺伝子型の寄与を検討するため、WT および KO 母ラットに TCDD を処理したのち、胎児脳下垂体 LH β ならびに GH の発現水準に対する影響を比較した。その結果、胎児脳下垂体の LH β mRNA に関しては、母体の AhR 遺伝子型の違いに関わらず TCDD による有意な影響は生じなかった (Fig. 6)。一方、GH mRNA に関しては、雄胎児では WT 母への曝露によってのみ有意な低下が観察され、KO 母への曝露では低下傾向に止まった (Fig. 6)。一方、雌胎児においては母体の AhR の有無に関わらず、TCDD による GH mRNA の減少はほぼ同様に生じた (Fig. 6)。

D. 考察

本研究では、AhR-Het 母ラットの同腹内に混在する WT、Het および KO 児の 3 者間でダイオキシンによる LH/GH 低下を起点とする次世代障害に対する AhR 活性化の寄与を検討した。次世代への影響を論じる上では様々な要因を考慮する必要があるが、今回の検討においては、母親の遺伝子型ならびに胎児移行性は少なくとも配慮すべきであると思われる。例えば、トリプトファン水解酵素-2 の KO 母の出生児 (KO 型) と Het 母の出生児 (KO 型) では、同じ KO 児であっても生存率等の発育に明確な違いが生じる (8)。Cytochrome P450 1a2-KO 妊娠マウスへのダイオキシン曝露は、WT 妊娠マウスへの同処理よりも胎児移行性が高いと言う

(9)。今回の検討ではこれらの問題点を念頭に置き、同腹胎児間での比較を行うことによって、母の遺伝子型の違いに起因する効果を排除し、児の AhR 遺伝子型に由来する現象の把握に努めた。検討の結果、雌雄共に WT 胎児で生じる TCDD 依存的な LH および GH 低下は、KO 胎児では全く認められなかった。さらに、胎児精巣の StAR の発現低下のみならず、成長後の交尾行動障害/サッカリン嗜好性低下ならびに低体重等の種々の出生後の成熟抑制も AhR 欠損によって消失した。以上の結果から、TCDD は胎児の AhR 活性化を通して LH/GH の発現を減少させ、出生後の発育を障害することが明らかになった。

本研究では、WT および KO それぞれの妊娠ラットの胎児を用いて TCDD 依存的な LH/GH 低下に対する母体 AhR の寄与も検討した。この検討では、いずれの母体においても TCDD による胎児 LH β の低下は認められなかったが、これは解析した胎児が必然的に Het 遺伝子型であったことが原因と思われる。逆に言えば、母親の AhR に関わらず、胎児の遺伝子型が WT から Het に変わるだけで影響が消失する事実より、TCDD が胎児 LH β の発現に及ぼす影響は胎児 AhR の発現・機能への依存度が極めて大きいと考えられる。一方、GH mRNA への影響はこれとは異なっており、WT 母への TCDD 曝露により、雌雄胎児の GH mRNA の発現は減少したが、Het および KO 母の雄胎児では減少傾向に止まった。このことから、TCDD による雄胎児の GH 低下には母体の AhR 活性化も一定の寄与を果たすことが示唆された。我々は最近、TCDD が母体と共に雄胎児のコルチコステロンレベルを減少させ、これが GH 低下に寄与することを見出している(4)。本検討結果はこれをよく支持しており、TCDD は母体の AhR 活性化を通し

てコルチコステロンを低下させ、雄胎児のみで GH 低下に寄与するとの機構が推定される。母体のコルチコステロン低下が AhR 依存的に生起するか否かは、今後の課題である。

E. 結論

TCDD 依存的な胎児脳下垂体 LH 減少を起点とする性未成熟は、胎児の AhR 活性化に基づいて生起することが明らかになった。胎児 GH 抑制にも胎児 AhR が重要であるが、雄児では母体の AhR も寄与することが示された。

F. 研究発表

1. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー (神戸、2015 年 9 月 17-18 日) (2 演題)
2. 日本薬学会第 136 年会 (横浜、2016 年 3 月 29 日) (2 演題)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

- 1) Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. *Crit Rev Toxicol*, **23**: 283-335 (1993).
- 2) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y, Yamada H. *Endocrinology*, **147**: 927-936 (2006).
- 3) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T, Yamada H. *J Pharmacol Exp Ther*, **329**: 1091-1099 (2009).
- 4) Hattori Y, Takeda T, Taura J, Ishii Y, Yamada H. *Endocrine*, **47**: 572-580 (2014).
- 5) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Yamada H. *Toxicol Appl Pharmacol*, **281**: 48-57 (2014).
- 6) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM,

- Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ.
Toxicol Appl Pharmacol, **140**: 173-179
(1996).
- 7) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T,
Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D,
Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**:
365-373 (2010).
- 8) Angoa-Pérez M, Kane MJ, Sykes CE,
Perrine SA, Church MW, Kuhn DM.
Genes Brain Behav, **13**: 579-591 (2014).
- 9) Dragin N, Dalton TP, Miller ML, Shertzer
HG, Nebert DW. *J Biol Chem*, **281**:
18591-18600 (2006).