

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin のダイオキシン次世代毒性に対する拮抗作用の検討

研究分担者 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 我々は昨年度、ダイオキシン毒性に対する新たな拮抗剤の創製を目指し、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の塩素原子を全てフッ素原子に置換した 2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD) を合成した。これを用いた検討により、TFDD 自身はラットへの単回経口投与ではダイオキシン様の急性毒性を示さないこと、ならびに細胞レベルでは TCDD に対して拮抗作用を持つことを確認した。そこで本年度の研究では、これらの知見に基づいて、TCDD 母体曝露による胎児の脳下垂体ホルモン合成低下に対する拮抗作用を検討した。妊娠 15 日目の母ラットに TCDD を単回経口投与したのち、妊娠 16 日から 19 日まで 1 日 1 回 TFDD を経口投与した。その結果、TCDD によって胎児脳下垂体における黄体形成ホルモンならびに成長ホルモンの発現が低下ないし低下傾向を示したが、TFDD の併用処理による改善効果は観察されなかった。また、TCDD によって胎児数の減少も確認されたが、これに対しても TFDD による改善は認められなかった。これらの結果から、少なくとも 1 日 1 回の併用処理では、TFDD は TCDD 依存的な胎児のホルモン合成障害に対して改善効果を示さないことが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシンは、妊娠期母体への比較的
低用量曝露によって、出生児に様々な発育
障害を惹起する (1)。カネミ油症の被害者
追跡調査や出生コホート研究から、ダイオ
キシンがヒトこどもの発達に及ぼす影響
も懸念されており (2, 3)、早期の治療・予
防法の確立が求められている。

一般に、ダイオキシン毒性には、受容体
型転写因子である芳香族炭化水素受容体
(aryl hydrocarbon receptor; AHR) が重要な
役割を演じることが明らかにされている
(4)。昨年度、我々はこの事実に着目し、
AHR を標的としたダイオキシン毒性拮
抗剤の創製を目指した研究に着手した。す
なわち、強毒性ダイオキシンである
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)
の塩素原子を全てフッ素原子に置換した
2,3,7,8-tetrafluorodibenzo-*p*-dioxin (TFDD)

を合成し、これの生体毒性と細胞株を用い
たダイオキシン拮抗作用を検討した。その
結果、TFDD 自身はダイオキシン様の急
性毒性を示さないことならびに細胞にお
いては TCDD 依存的な AHR 活性化を
抑制することを見出した (平成 28 年度
分担研究報告書)。

一方、我々はこれまでの一連の解析によ
って、妊娠ラットへの TCDD 曝露が胎児
脳下垂体において成長ホルモン (growth
hormone; GH) ならびに黄体形成ホルモン
(luteinizing hormone; LH) の合成を低下さ
せることで出生後に低体重や交尾行動障
害を引き起こすことを見出している (5,
6)。そこで本年度の研究では、上記の胎児
への障害性を指標として、生体内での
TFDD の拮抗作用を検討した。

B. 研究方法

1. 細胞培養

TFDD は、林純薬工業株式会社に委託して合成した。ヒト乳がん細胞株である T47D 細胞を 48 穴プレートに播種し、DMEM (10% 牛胎児血清含有) 中にて 37°C、5% CO₂ 下で培養した。接着を確認したのち、TCDD (500 pM) および TFDD (100 fM~10 μM) を添加した DMEM に置換して継続培養した。24 時間後に細胞を回収したのち、50 mM Tris-HCl にて懸濁して実験に供した。

2. 動物実験

雌雄の Wistar 系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。妊娠 15 日目に、TCDD (1 μg/kg/2 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 16 日目から 19 日目にかけて、1 日 1 回 TFDD (1 mg/kg/day/2 mL コーン油) あるいはコーン油を経口投与したのち、妊娠 20 日目の雄胎児より脳下垂体を採取した。

3. cytochrome P450 (CYP) 1A1 活性測定

T47D 細胞における CYP1A1 活性は、7-ethoxyresorufin の O-脱アルキル化反応により生じる resorufin の蛍光測定により算出した (励起光: 544 nm; 測定光: 590 nm) (7)。反応に用いたタンパク質量および反応時間はそれぞれ以下の通りである。肝 S9: 200 μg、3 分; T47D 細胞: 50 μg、2 時間。

4. CYP1A1 タンパク質発現

T47D 細胞溶解液を用い、イムノブロット法によって CYP1A1 タンパク質発現を解析した。さらに、標準タンパク質として β-actin も検出した。電気泳動に用いた細胞溶解液のタンパク質量: 5 μg。

5. リアルタイム RT-PCR 法

脳下垂体より 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 (8)。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。

(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: A28-209-0。

C. 研究結果

まず、TFDD が細胞レベルでダイオキシン依存的な AHR 活性化に対して拮抗作用を示すこと、ならびにその用量依存性を再確認した。指標には、代表的な AHR 標的遺伝子である CYP1A1 のタンパク質発現ならびに酵素活性を用いた。検討の結果、昨年度の報告と同様に、T47D 細胞への 500 pM の TCDD 処理による CYP1A1 タンパク質発現ならびに酵素活性の誘導は、TFDD 併用によって 100 nM 以上では用量依存的に抑制される傾向が観察された (Fig. 1)。

妊娠ラットへの TCDD 単回経口投与によって、胎児脳下垂体において GH ならびに LHβ mRNA 発現は低下ないし低下傾向を示したが、これらに対して TFDD 併用による改善効果は観察されなかった (Fig. 2)。さらに、TFDD 併用処理は CYP1A1 mRNA 発現誘導に対しても効果を示さなかった (Fig. 2)。また、本検討では TCDD 曝露が胎児数を有意に減少させることを確認したが、TFDD の併用はこれに対しても影響を認めなかった (Table 1)。なお、TCDD および TFDD による胎児体重、胎盤重量ならびに性比には影響は観察されなかった (Table 1)。

D. 考察

昨年度の細胞レベルでの検討により、

TCDD (0.5 nM) による TFDD の 50% 効果量が 45.9 nM であることが確認されており、本研究においても同様の傾向での再現性が得られた。さらに、TFDD はマウス腹腔内への投与によっては、24 時間後に肝臓中レベルが投与量の 1~2 % 程度にまで減少することが報告されている (9)。これらの事実に基づいて、本研究では TCDD 投与量の 1,000 倍高用量の TFDD を一日一回連続投与し、TCDD 毒性に対する拮抗作用を検討した。検討の結果、本研究で用いた TFDD 処理条件下では、胎児の GH/LH β mRNA 発現低下ならびに CYP1A1 mRNA 発現誘導のいずれに対しても TFDD は拮抗できないことが示唆された。しかし、細胞レベルの検討においては、100 倍量の TFDD によって拮抗作用が見られており、胎児組織中においては拮抗作用を示すレベルに達していない可能性が考えられる。これまで、TFDD の胎盤透過性に関する情報はないが、ダイオキシン類の胎盤移行性ならびに透過性には脂溶性や AHR への結合親和性が重要であるため、TFDD は TCDD よりもこれらが小さいために胎盤を透過性しにくい可能性が考えられる。上記の通り、TFDD は生体内において比較的代謝されやすいことから (9, 10)、母体での易代謝性も相まって胎児への移行量が制限されている可能性も考えられる。TFDD の生体内での効果を明らかにするため、胎児組織中の TFDD レベルの測定を行うと共に、より効果的な投与方法にて再検討することが必要であろう。

E. 結論

妊娠ラットに対する 1 日 1 回の経口投与では、TFDD はダイオキシンによる胎児 GH/LH mRNA 発現低下に対して拮抗作用を示さないことが確認された。

F. 研究発表

特になし。

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) Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Chiba T, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Fukushima K, Wake N, Furue M. *Environ Int*, **38**: 79-86 (2012).
- 3) Nishijo M, Tawara K, Nakagawa H, Honda R, Kido T, Nishijo H, Saito S. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, **18**: 246-251 (2008).
- 4) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
- 5) 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).
- 6) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y, Yamada H. *Endocrine*, (2014).
- 7) Burke MD, Mayer RT. *Drug Metab Dispos*, **3**: 245-253 (1975).
- 8) 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).
- 9) Weber R, Schrenk D, Schmitz HJ, Hagenmaier A, Hagenmaier H. *Chemosphere*, **30**: 629-639 (1995).
- 10) Schmitz HJ, Weber R, Hagenmaier A, Hagenmaier H, Poellinger L, Schrenk D. *Environ Toxicol Pharmacol*, **3**: 105-113 (1997).