

令和 5 年 3 月 25 日
(年 4 回 3, 6, 9, 12 月の 25 日 発行)
第 1174 号

Vol. 114 No. 1
March 2023

CODEN : FKIZA4
ISSN 0016-254X

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

第 114 卷 第 1 号 (通巻 1174 号)

令和 5 年 3 月 25 日

特 集 号

油症とPCB及びダイオキシン関連化合物

研 究 報 告 第 29 集

責任編集者 辻 学

The Twenty-ninth Reports of the Study on Yusho
—PCBs and Dioxin-Related Compounds—

Editor Gaku Tsuji

福岡医誌

Fukuoka Acta Med.

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

令和五年三月二十五日発行

第百十四卷
第一号

Vol. 114 No. 1, March 2023

定価

二〇〇〇円

油症と PCB 及びダイオキシン関連化合物に関する研究

報告集 第 29 集

(福岡医学雑誌 第 114 巻 第 1 号 令和 5 年 3 月)

目 次

- 序 言 辻 学… (1)
- 総 説
炎症性皮膚疾患における IL-37 の役割と芳香族炭化水素受容体による制御機構 辻 学… (3)
- 原 著
同居家族条件によって認定された油症患者の血液中ダイオキシン類濃度と傾向
堀 就英, 飛石 和大, 安武 大輔, 新谷 依子, 古谷 貴志,
高尾 佳子, 戸高 尊, 広瀬 勇氣, 香月 進, 辻 学… (10)
- 油症における末梢血 CD4 陽性 CD25 陽性 T リンパ球に関する検討 辻 博, 松村 潔… (17)
- 坐骨神経および脊髄神経のタンパク質発現に基づくベンゾ[a]ピレン投与ラット
に対するシナモンの効果
申 敏哲, 行平 崇, 小牧 龍二, 福永 貴之, 田中 哲子, 吉村 恵… (22)
- チャイニーズハムスター肝ミクロゾームによる Tetrachlorobiphenyl の代謝
太田 千穂, 加藤 善久, 原口 浩一, 藤井由希子, 木村 治, 古賀 信幸… (31)
- 2,2',3,4',5',6'-六塩素化ビフェニル(CB149)のラット, ハムスター, モルモットおよび
ヒトにおける *in vitro* 代謝の比較研究
太田 千穂, 原口 浩一, 加藤 善久, 藤井由希子, 木村 治, 古賀 信幸… (40)
- 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 母体暴露による胎児期成長ホルモン発現低下:
胎児期の成長ホルモン補給による成長後の骨代謝改善
服部友紀子, 武田 知起, 山田 英之, 石井 祐次… (51)
- ダイオキシン低用量暴露母体の肝薬物代謝第二相酵素活性の変動と
ポリメトキシフラボノイドの *in vitro* 阻害効果
稲次 良哉, 池田佳乃子, 佐野 宏江, 堤 諒太,
太田 千穂, 古賀 信幸, 田中 嘉孝, 石井 祐次… (65)

The Twenty-ninth Reports of the Study on Yusho
—PCBs and Dioxin-Related Compounds—
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 114, No. 1, 2023)

CONTENTS

Foreword	G. Tsuji··· (1)
Review Article (in Japanese) Role of IL-37 in Inflammatory Skin Diseases and Its Regulatory Mechanism via Aryl Hydrocarbon Receptor	G. Tsuji··· (3)
Original Article (in Japanese) Blood Dioxin Concentrations and their Tendencies Examined in Family Members Living with Certificated Yusho Patients and Considered as Yusho Patients T. Hori, K. Tobiishi, D. Yasutake, Y. Shintani, T. Furutani, Y. Takao, T. Todaka, Y. Hirose, S. Katsuki and G. Tsuji···	(10)
CD4 Positive CD25 Positive T Lymphocyte in Patients with Yusho	H. Tsuji and K. Matsumura··· (17)
Effect of Cinnamon on Benzo[a]pyrene-Treated Rats Based on Sciatic and Spinal Nerve Protein Expression MC. Shin, T. Yukihiro, R. Komaki, T. Fukunaga, T. Tanaka and M. Yoshimura···	(22)
<i>In Vitro</i> Metabolism of Tetrachlorobiphenyls by Chinese Hamster Liver Microsomes C. Ohta, Y. Kato, K. Haraguchi, Y. Fujii, O. Kimura and N. Koga···	(31)
Comparative Study on the <i>in Vitro</i> Metabolism of 2,2',3,4',5',6-Hexachlorobiphenyl (CB149) in Rats, Hamsters, Guinea Pigs and Humans C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, Y. Fujii, O. Kimura and N. Koga···	(40)
Maternal Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin Results in Offspring Growth Retardation : Fetal Growth Hormone Supplementation Can Restore Bone Metabolism in Adulthood Y. Hattori, T. Takeda, H. Yamada and Y. Ishii···	(51)
<i>In Vitro</i> Inhibitory Effects of Polymethoxyflavonoids Nobiletin and Tangeretin on the Activity of Hepatic Phase-II Drug-Metabolizing Enzymes in Dams Exposed to Low-Dose 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin R. Inatsugi, K. Ikeda, H. Sano, R. Tsutsumi, C. Ohta, N. Koga, Y. Tanaka and Y. Ishii···	(65)

序 言

厚生労働省全国油症治療研究班・班長

九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 准教授

辻 学

Foreword

Gaku TSUJI

Chief of The Study Group for Yusho

(granted by The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan)

Associate Professor, Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital

A mass poisoning, involving at least 2300 individuals, occurred in Kyushu (Western Japan) in 1968. The incident is called Yusho, oil disease, as it was caused by ingestion of rice bran oil that was contaminated with Kanechlor-400, a commercial brand of Japanese polychlorinated biphenyls (PCBs). It was later found that the rice oil had been contaminated with not only PCBs but also polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated quaterphenyls (PCQs) and others.

Yusho is, thus, recognized as a poisoning by a mixture of PCBs, dioxins and related compounds. For 50 years the patients have been suffering from various symptoms such as general malaise, headache, acneform eruption, dark-brownish nail pigmentation, increased discharge from the eyes with swelling of eyelids, pigmentation of oral mucosa, peripheral neuropathy, irregular menstruation in women.

A method for quantification of PCBs in the blood was developed after 1973. The blood polychlorinated quaterphenyls (PCQs) levels were then added to the diagnostic criteria of Yusho as a relatively specific marker. Recent technological advancement allowed us to measure dioxins levels in 5 to 10ml of human blood samples. After the evaluation of validity, sensitivity and reproducibility of the blood levels of dioxins, we added the blood levels of 2,3,4,7,8-penta-CDF in the new diagnostic criteria in Sep. 29th, 2004.

The clinical and basic observation and follow-up study of Yusho patients are extremely important not only for supporting patients' health but also for understanding the potential prolonged effects of high-level exposure to dioxin-related chemicals in humans. In our follow-up study, Yusho consultants, established in 2002 and expanded in 2016, keep in touch with the patients by direct interview, by phone or by mail. Various types of questionnaire were carried out by Yusho consultants. Statistical correlations were analyzed between blood PeCDF levels and clinical/laboratory manifestations in addition to questionnaire comments. Also, we have conducted a survey of the next generation of Yusho patients from 2021.

Patients with Yusho still complain various subjective and objective symptoms. Although definitive therapy for Yusho has not been proposed yet, basic and clinical research by us and others have revealed that some Japanese Kampo drugs such as Keishibukuryogan and OrenGEDOKUTOU are potential candidates for treatments by modulating aryl hydrocarbon receptors. Furthermore, Yusho study led to the development of a topical agent, tapinarof, which acts on the dioxin receptor to ameliorate skin inflammation. Finally, we very much appreciate the contribution and participation of the patients in health examinations for follow-up of Yusho each year. I also deeply thank all the members of the study group and the Japanese

Ministry of Health, Labour and Welfare for their efforts to help and support patients' health and well-being.

Acknowledgement ; This work was supported by a grant from The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

この度、厚生労働省全国油症治療研究班の第29報告集を刊行することができました。令和3年度と令和4年度の研究成果ならびに関連分野の情報をまとめております。油症は1968年（昭和43年）に西日本一帯の広範囲な住民の方々からPCB（ポリ塩化ビフェニル）の混入した食用米ぬか油を摂取したことによって起こった食中毒事件です。その後、研究班によってPeCDF（ポリ塩化ジベンゾフラン）などのダイオキシン類も混入していたことがつきとめられ、油症はPCB類とダイオキシン類による複合中毒であったことが証明されました。ダイオキシン類は血中にごくわずかにしか含まれていないために、その定量は困難な状況でしたが、研究班内での技術改良により少ない血液量で再現性のあるダイオキシン類測定が可能となり、2001年（平成13年）は福岡県の検診でパイロット的に測定を行い、2002年（平成14年）以降は全国の検診で測定を開始しました。これらのデータを妥当性・精度・再現性などの面から解析しました。その結果、血液中2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran（PeCDF）値を診断基準に追補することが妥当と考えられ、油症診断基準（平成16年9月29日補遺）が作成されました。

患者さんの健康管理と健康相談の窓口として、2002年（平成14年）から油症相談員システムを立ち上げました。油症相談員は検診での直接面接、電話や手紙による問診や相談受付などを行います。油症相談員の活躍によって、従来よりも信頼性の高いアンケート調査を行うことが可能となりました。2016年（平成28年）から油症相談支援員制度として充実拡大されました。また2021年（令和3年）からは、油症認定者の次世代調査を進めております。油症に関する研究成果は油症ニュース（<http://www.kyudai-derm.org/part/yusho/index.html>）にとりあげて、認定者の方々に送付しております。現時点では油症に著効する治療薬はありませんが、我々を含めた最近の研究によって、桂枝茯苓丸や黄連解毒湯といった漢方薬にダイオキシンの作用を抑制する効果が期待されることが明らかになってきました。また、油症研究からタピナロフというダイオキシンの受容体に作用して、皮膚の炎症を抑える外用薬が開発されました。毎年検診に参加いただいている認定者の方々に御礼申し上げますとともに、油症検診（<http://www.kyudai-derm.org/yusho/index.html>）にお力添えをいただいている班員の方々、そして各県の行政の方々、厚生労働省担当課の皆様にも深く感謝申し上げます。

謝辞：本誌は、厚生労働行政推進調査事業費（食品の安全確保推進研究事業（カネミ油症に関する研究））研究課題名（課題番号）：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（21KA2003）によって刊行されています。深く感謝申し上げます。

総 説

炎症性皮膚疾患における IL-37 の役割と 芳香族炭化水素受容体による制御機構

九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター

辻 学

はじめに

インターロイキン (IL) -37 は、炎症を抑制する働きのある抗炎症サイトカインとして同定された¹⁾。しかし、その役割はまだほとんど明らかにはなっていない。最近の研究では、IL-37 は炎症性皮膚疾患において新たな治療標的となりうる可能性が示唆されている²⁾。これまでに、ダイオキシン類の受容体である芳香族炭化水素受容体 (Aryl Hydrocarbon Receptor: AHR) が炎症性皮膚疾患の病態形成に関与することが示されている³⁾。そこで、炎症性皮膚疾患における IL-37 と AHR の関係性について、我々の研究結果を含めて、最新の知見について紹介する。

1. IL-37 の構造とシグナル伝達機構

IL-37 (IL-1F7) は、IL-1 ファミリーに属するサイトカインの 1 つである。IL-37 をコードする遺伝子は、染色体 2q12-13 に位置し、IL-1 α および IL-1 β 遺伝子の制御領域に非常に近い。この特異的な位置は、炎症を阻害する IL-37 の役割に重要であると考えられる⁴⁾。IL-37 のサイズは 3,617bp であり、その mRNA は alternative splicing を受け、a-e の 5 種類のアイソフォームを生じる。これらのアイソフォームのうち、IL-37b はエクソンを 5 つ含み、アイソフォームの中で最も完全型に近い。多くの研究が IL-37b に焦点を当てて行われている。IL-37c と IL-37e は IL-37 の活性維持に必須なタンパク質をコードするエクソン 4 を欠損しているため、機能しないと予測されている。IL-37a と IL-37d の特異的な活性はまだ不明であり、IL-37 の特定のアイソフォームに関する研究は限定的である²⁾。また、IL-37 は、マウスに相同遺伝子が同定されておらず²⁾、遺伝子改変マウスを用いる実験では、ヒト IL-37 遺伝子を持つトランスジェニックマウスなどを作成する必要がある。

IL-37 は細胞外および細胞内のサイトカインとして機能する。IL-37 のエクソン 1 には、Caspase-1 による切断部位がある。前駆体タンパクである pro IL-37 は、Caspase-1 によって切断され、mature IL-37 となる。細胞質の pro IL-37 は細胞外に放出された場合には、様々なプロテアーゼによって mature IL-37 となる。細胞外に分泌された mature IL-37 は IL-18R に関連する受容体に作用して抗炎症効果を発揮する。具体的には、IL-18 は IL-18 α と IL-18 β からなる複合体を形成して、MyD88 の活性化を介して炎症を誘導する。このとき、mature IL-37 は、IL-18 α および IL-1 受容体 8 (IL-1R8) と結合して、IL-18-IL-18 α -IL-18 β 複合体を形成することで MyD88 の活性化を阻害し、IL-18 によるシグナル伝達を抑制する⁵⁾。

また、細胞質に生成された pro IL-37 の一部は、Caspase-1 によって切断され、細胞質で mature IL-37 となる。IL-37 は核局在化配列を持たないため、核内に移行し、標的遺伝子の発現を制御するためには他の因子を必要とする。Caspase-1 で切断された後、IL-37 は Smad3 と結合して IL-37-Smad3 複合体を形

成する。Smad3 のリン酸化により、IL-37 の核内移行が可能となり、炎症性遺伝子の発現を抑制する⁶⁾。核内の IL-37-Smad3 複合体は MAPK, PI3K, NF- κ B, STAT3 などのチロシンリン酸化依存性シグナル伝達経路の脱リン酸化を促進して、シグナル伝達を阻害する⁷⁾。

このように、IL-37 は細胞外および細胞内において抗炎症作用を発揮する。細胞外の IL-37 は、炎症性の IL-18 の働きを競合的に阻害し、抗炎症効果を発揮する。細胞内の IL-37 は、Smad3 を介して、炎症に関連する遺伝子の発現に対して負の制御を行う。

2. 皮膚における IL-37 の発現と芳香族炭化水素受容体による制御機構

免疫組織染色による検討では、IL-37 のタンパク発現は、表皮細胞⁸⁾、マクロファージ⁹⁾、血管内皮細胞¹⁰⁾、リンパ球¹⁰⁾ で報告されているが、それぞれの報告で染色される部位が異なる場合があり、より慎重な検討が必要である。表皮細胞では、IL-37 は分化によって誘導され、顆粒層に発現し、分化マーカーの一つである Loricrin, Filaggrin, Fillagrin2, Involucrin と共存することが示されている¹¹⁾。また、口腔扁平苔癬や口腔扁平上皮癌では IL-37 は表皮全層性に発現する¹²⁾。

これまでに、表皮細胞において IL-37 の遺伝子発現を誘導する因子としては、*M. leprae* による感染症¹⁰⁾、UVB の照射¹³⁾、*Actinidia arguta* の水溶性抽出物である PG102¹⁴⁾、TLR リガンド (Flagellin, LPS, PGN Poly (I:C))⁵⁾、抗菌ペプチド (hBD-3)⁵⁾、サイトカイン (TNF- α ¹⁵⁾、EGF⁵⁾) がある。このうち、メカニズムが明らかとされているものとしては、PG102 による p38, ERK, Smad3 シグナルの活性化を介した経路¹⁴⁾、hBD-3 による CCR6 を介した MAPK と NF- κ B の活性化による経路⁵⁾、TNF- α による MAPK の活性化による経路¹⁵⁾ がある。一方で、表皮細胞の IL-37 の発現を低下させる因子としては、IL-17A, IL-17C, IL-17F, IL-22 があり、これらは TNF- α による IL-37 の発現を阻害することが報告されている¹⁵⁾ が、その機序はまだ不明な点が多い。また、Th2 サイトカインである IL-4, IL-13, IL-31 を組み合わせて投与すると、Loricrin, Filaggrin, Fillagrin2, Involucrin の発現が低下するが、それに伴って IL-37 の発現も低下する¹¹⁾。

そこで、表皮細胞における IL-37 の発現は分化によって制御される可能性があることから、我々は表皮細胞の分化を制御する AHR が IL-37 の発現に関与するかを検討した。AHR はダイオキシン類に対する受容体として同定されたが、近年では、ダイオキシン類以外の外因性・内因性の作用物質が明らかにされており、皮膚の恒常性や様々な炎症性皮膚疾患の病態に関与することが示されている³⁾。AHR に作用する物質として、治療用 AHR 調節薬 (Therapeutic AHR-modulating Agent: TAMA) であるタピナロフ、*Galactomyces ferment filtrate* (GFF) を用いて表皮細胞を刺激し、IL-37 の発現を解析した。その結果、タピナロフ・GFF は IL-37 の mRNA とタンパクレベルを増加させた。さらに、siRNA を用いて AHR の発現を低下させたところ、タピナロフ・GFF による IL-37 の mRNA とタンパクレベルの誘導は抑制された (図 1)。これらのことから、表皮細胞において AHR が IL-37 の発現を直接的に調節する機序が示された¹⁶⁾¹⁷⁾。

3. 炎症性皮膚疾患における IL-37 の役割

上記から抗炎症性サイトカインである IL-37 の低下は、炎症を誘導する方向に働き、炎症性皮膚疾患の病態を悪化させることが予想される。以下に、IL-37 の関与が報告されている炎症性皮膚疾患について詳説する (図 2)。

a. アトピー性皮膚炎

アトピー性皮膚炎は、強い痒みを伴う湿疹病変を生じる慢性の炎症性皮膚疾患である。現在、アトピー性皮膚炎の病態は、Th2 サイトカインによる、2 型免疫応答、皮膚バリア機能障害、掻痒が複雑に相互作用することによって形成されると考えられている¹⁸⁾。

接触過敏症 (Contact hypersensitivity: CHS) は、湿疹・皮膚炎を形成する重要な要因の 1 つである。ヒ

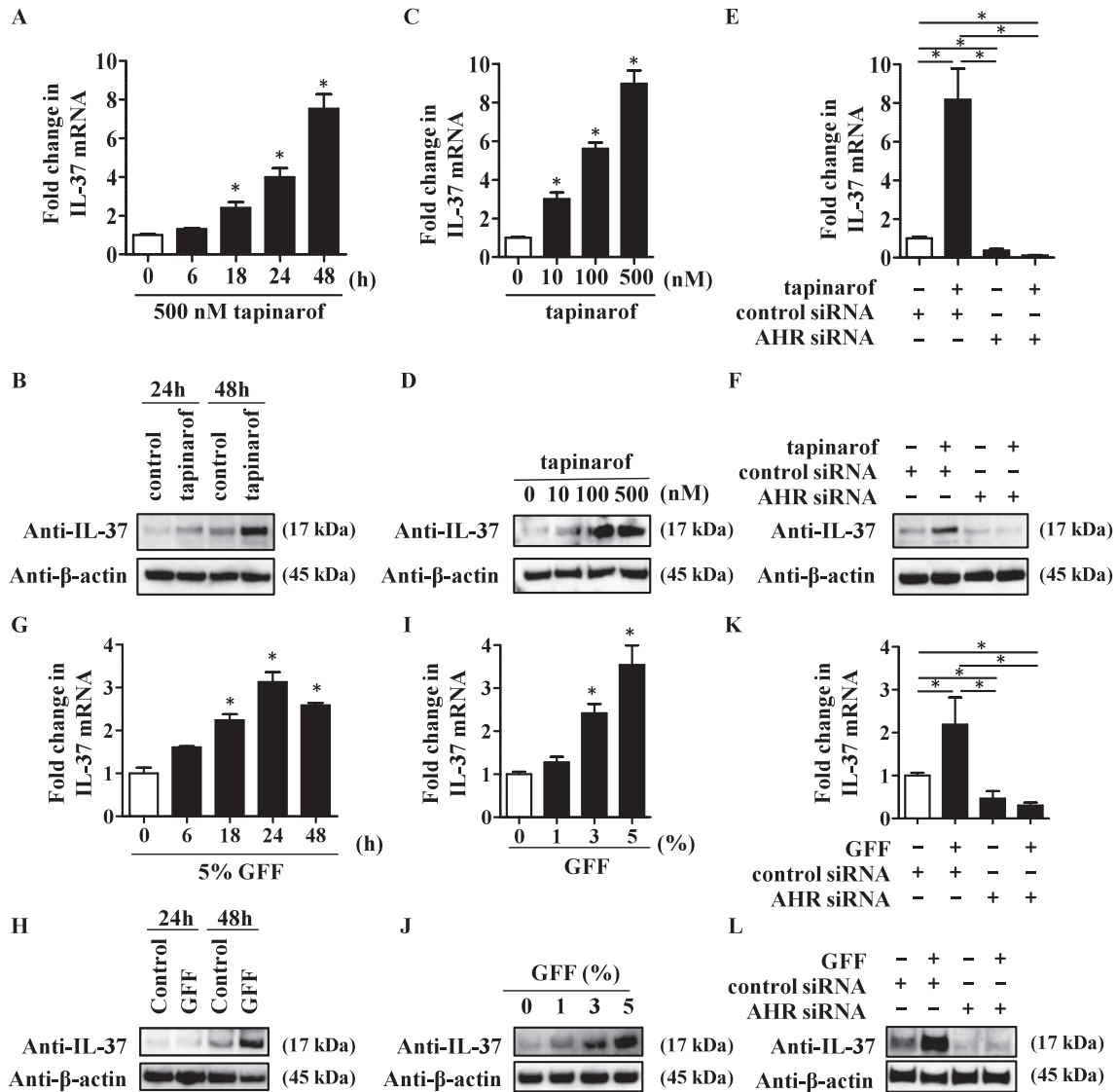


図 1: タピナロフと *Galactomyces ferment filtrate* (GFF) は IL-37 の発現を誘導し、その機序は AHR に依存する。**A, C, E, G, I, and K**: qRT-PCR による解析. IL-37 mRNA 発現量 (mean $\pm$ S.D. n=3). * $p < 0.05$. **B, D, F, H, J, and L**: ウェスタンブロットによる解析. IL-37 タンパク発現量. 3 回独立した実験を施行し、代表的なものを提示した. **A-D**: タピナロフは時間・用量依存性に IL-37 の発現を誘導した. **E-F**: AHR の発現を siRNA でノックダウンすると、タピナロフによる IL-37 の発現の増加は解除された. **G-J**: GFF は時間・用量依存性に IL-37 の発現を誘導した. **K-L**: AHR の発現を siRNA でノックダウンすると、GFF による IL-37 の発現の増加は解除された. 引用文献 16 より

ト IL-37 を過剰発現したマウスではハプテン塗布後の耳介の腫脹が減弱し、CHS が抑制される。この機序として、樹状細胞における IL-37 の発現が抗原提示能・成熟を阻害し、さらに制御性 T 細胞を誘導することで、CHS を抑制することが示されている¹⁹⁾。さらに、MC903 (ビタミン D 誘導体) 誘発のアトピー性皮膚炎モデルでは、ヒト IL-37b の過剰発現によってアトピー性皮膚炎による耳介の腫脹、痒みの増強、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生が抑制された²⁰⁾。この実験系においても、制御性 T 細胞の誘導が示されている²⁰⁾。また、MC903 誘発のアトピー性皮膚炎モデルにヒト IL-37b を皮下注射すると、同様に耳介の腫脹が減弱するが、このときに好塩基球の浸潤が減少していた²¹⁾。In vitro では、アトピー性皮膚炎の病態で重要な TSLP によって刺激された好塩基球由来の IL-4 の産生は、ヒト IL-37b によって抑制される²¹⁾。このことから、ヒト IL-37b は好塩基球を介してアトピー性皮膚炎の病態を改善する可能性が指摘されている。アトピー性皮膚炎の患者における血清中の IL-37 産生量は、皮疹の重症度と相関したという

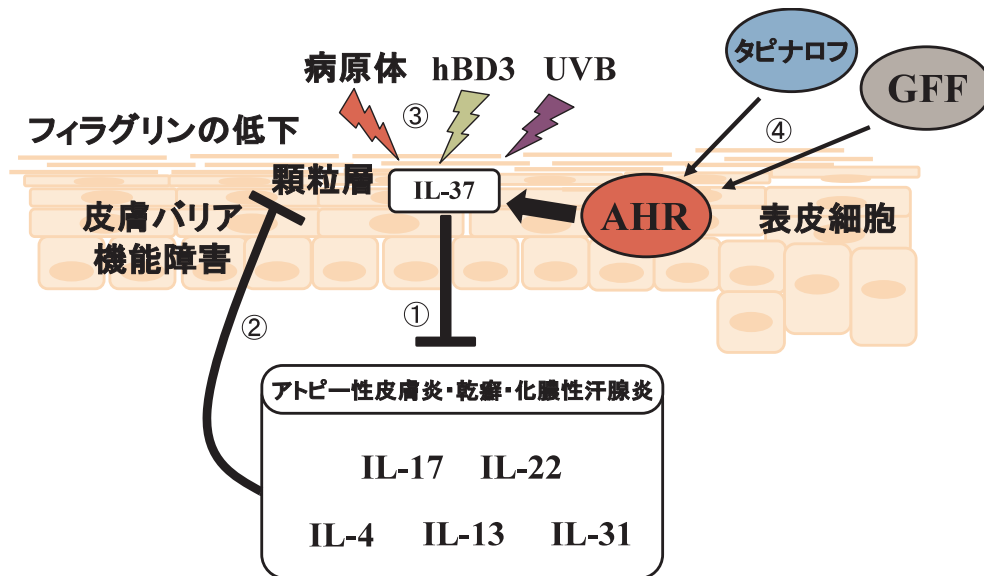


図2：アトピー性皮膚炎・乾癬・化膿性汗腺炎における IL-37 の役割

- ① IL-37 はアトピー性皮膚炎・乾癬・化膿性汗腺炎の病勢を抑制する。
- ② IL-17, IL-22, IL-4, IL-13, IL-31 は表皮におけるバリア機能障害を生じ, IL-37 の発現も減少する。
- ③ 病原体 (TLR), h BD-3, 紫外線は IL-37 の発現を誘導する。
- ④ タピナロフ・GFF は表皮における AHR に作用し, IL-37 の発現を誘導する。

報告²²⁾と、健常人に較べて低値を示したという報告があり²³⁾、一定の見解が得られていない。その一方で、皮疹部における IL-37 の発現は非皮疹部に較べて低下していることが示されている²⁴⁾。この機序としては、上述の Th2 サイトカインによる皮膚バリアタンパク (Loricrin, Filaggrin, Filaggrin2, Involucrin) の低下が関与していることが考えられる。

これらのことから、アトピー性皮膚炎において、IL-37 は TypeII 免疫応答を抑制する働きがあり、IL-37 の低下は、アトピー性皮膚炎の病態の悪化に関与していると考えられる。

b. 乾癬

乾癬は鱗屑を伴う比較的境界明瞭な紅斑を生じる慢性の炎症性角化症である。乾癬による病変は、皮膚や関節に生じるため、整容面や日常生活へ影響が大きい³⁾。

炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-17A, IL-22, IL-1 α , および Oncostatin-M) で刺激された表皮細胞において、ヒト IL-37b は、乾癬の病態に重要とされる CXCL8, IL-6, S100A7 の産生を抑制する⁹⁾。表皮特異的に VEGF-A を過剰発現させた乾癬モデルマウスでは、ヒト IL-37 を含むプラスミドの注射によって皮疹が改善し、病変部での IFN- γ の発現が低下した⁹⁾。これらの結果は、ヒト IL-37 が乾癬の炎症を抑える効果がある可能性を示唆する。しかし、イミキモド外用による乾癬モデルマウスでは、ヒト IL-37b の局所注射による皮膚炎の改善はみられていない¹⁵⁾。

乾癬患者の血清中の IL-37 の濃度は、健常人と較べると低値である²⁵⁾。血清の IL-37 の濃度と皮疹の重症度 (PASI) には正の相関関係があることが報告されている²⁶⁾。また、乾癬に JAK 阻害薬である Tofacitinib を用いると、皮疹は改善するが、それとともに表皮細胞における IL-37 の発現は増加する²⁷⁾。さらに、乾癬患者のトランスクリプトーム解析では、健常者と比較して、乾癬の病変部で IL-37 の発現が低下することが報告されている⁸⁾。これらのことから、IL-37 は乾癬の病態に対して防御的な働きをするものと考えられる。

免疫組織染色では、健常人では表皮の顆粒層に IL-37 が発現するのに対して、乾癬の病変部では消失する⁸⁾。このメカニズムには、上述した乾癬の主要なサイトカインである IL-17A, IL-17C, IL-17F, IL-22

が関与していると思われる。特に、IL-17A と IL-22 は表皮細胞における Filaggrin の発現を低下させることが分かっており²⁸⁾²⁹⁾、これによって IL-37 の発現も低下していると推測される。

これらの知見は、IL-37 が乾癬の治療標的としての役割を果たす可能性を示唆するものである。

c. 化膿性汗腺炎

化膿性汗腺炎は、思春期以降に多く発症し、疼痛を伴う慢性的な炎症性皮膚疾患である。症状として、腋窩・鼠径部・臀部などに強い痛みを伴う炎症性の結節、膿瘍、瘻孔を形成する。重症化すると著しく日常生活が障害される。化膿性汗腺炎の病態は不明な点が多いが、病変部における毛包の角化異常と炎症の調節機構の異常が要因として指摘されている。特に化膿性汗腺炎の炎症性サイトカインのプロファイルは、乾癬と重複するものが多く、病変部での IL-23, IL-17, TNF- α の発現の増加が示されている。さらに、化膿性汗腺炎の病変部は非病変部と較べると IL-37 の発現が著しく低下している³⁰⁾。

おわりに

近年、様々な炎症性皮膚疾患における IL-37 の役割が発見されている。これまで、IL-37 は新規の治療標的として注目されてきたが、IL-37 を誘導する経路は明らかではなかった。今回、AHR が IL-37 の発現を制御する受容体であることが明らかになった。AHR に作用する治療用 AHR 調節薬は、IL-37 を誘導することで幅広い抗炎症作用を発揮する可能性があり、新しい治療効果が期待される。

参 考 文 献

- 1) Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, Oostingh GJ, Pfaller T, Pixner C, Posselt G, Italiani P, Nold MF, Nold-Petry CA, Bufler P and Dinarello CA : IL-37 : a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw.* 22 : 127-147, 2011.
- 2) Pan Y, Wen X, Hao D, Wang Y, Wang L, He G and Jiang X : The role of IL-37 in skin and connective tissue diseases. *Biomed Pharmacother.* 122 : 109705, 2020.
- 3) Furue M, Hashimoto-Hachiya A and Tsuji G : Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 20 : 5424, 2019.
- 4) Martin P, Goldstein JD, Mermoud L, Diaz-Barreiro A and Palmer G : IL-1 Family Antagonists in Mouse and Human Skin Inflammation. *Front Immunol.* 12 : 652846, 2021.
- 5) Smithrithree R, Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Ushio H, Ikeda S, Okumura K and Ogawa H : Human β -defensin-3 increases the expression of interleukin-37 through CCR6 in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 77 : 46-53, 2015.
- 6) Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P and Dinarello CA : IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol.* 11 : 1014-1022, 2010.
- 7) Cavalli G and Dinarello CA : Suppression of inflammation and acquired immunity by IL-37. *Immunol Rev.* 281 : 179-190, 2018.
- 8) Li B, Tsoi LC, Swindell WR, Gudjonsson JE, Tejasvi T, Johnston A, Ding J, Stuart PE, Xing X, Kochkodan JJ, Voorhees JJ, Kang HM, Nair RP, Abecasis GR and Elder JT : Transcriptome analysis of psoriasis in a large case-control sample : RNA-seq provides insights into disease mechanisms. *J Invest Dermatol.* 134 : 1828-1838, 2014.
- 9) Teng X, Hu Z, Wei X, Wang Z, Guan T, Liu N, Liu X, Ye N, Deng G, Luo C, Huang N, Sun C, Xu M, Zhou X, Deng H, Edwards CK 3rd, Chen X, Wang X, Cui K, Wei Y and Li J : IL-37 ameliorates the inflammatory process in psoriasis by suppressing proinflammatory cytokine production. *J Immunol.* 192 : 1815-1823, 2014.
- 10) de Sousa JR, Prudente RL, Dias Junior LB, Oliveira Carneiro FR, Sotto MN and Simões Quaresma JA : IL-37 and leprosy : A novel cytokine involved in the host response to *Mycobacterium leprae* infection. *Cytokine.* 2018 106 : 89-94, 2018.
- 11) Zhou J, Gemperline DC, Turner MJ, Oldach J, Mollignano J, Sims JT and Staybrook KR : Transcriptomic Analysis of Healthy and Atopic Dermatitis Samples Reveals the Role of IL-37 in Human Skin. *Immunohorizons.* 5 : 830-843, 2021.
- 12) Lin L, Wang J, Liu D, Liu S, Xu H, Ji N, Zhou M, Zeng X, Zhang D, Li J, Chen Q. Interleukin-37 expression and

- its potential role in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 6 : 26757, 2016.
- 13) Lossius AH, Berents TL, Saetre F, Nilsen HR, Bradley M, Asad S, Haraldsen G, Sundnes O and Holm JØ : Early transcriptional changes after UVB treatment in atopic dermatitis include inverse regulation of IL-36 γ and IL-37. *Exp Dermatol*. 30 : 249-261, 2021.
 - 14) Kim HK, Lim S, Bae MJ, Lee W, Kim S. PG102 Upregulates IL-37 through p38, ERK, and Smad3 Pathways in HaCaT Keratinocytes. *Mediators Inflamm*. 24 : 2019 : 6085801, 2019.
 - 15) Rønholt K, Nielsen AL, Johansen C, Vestergaard C, Fauerbye A, López-Vales R, Dinarello CA, Iversen L. IL-37 Expression Is Downregulated in Lesional Psoriasis Skin. *Immunohorizons*. 4 : 754-761, 2020.
 - 16) Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Matsuda-Taniguchi T, Takai-Yumine A, Takemura M, Yan X, Furue M and Nakahara T : Natural Compounds Tapinarof and *Galactomyces* Ferment Filtrate Downregulate IL-33 Expression *via* the AHR/IL-37 Axis in Human Keratinocytes. *Front Immunol*. 13 : 745997, 2022.
 - 17) Yan X, Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A and Furue M : *Galactomyces* Ferment Filtrate Potentiates an Anti-Inflammatory System in Keratinocytes. *J Clin Med*. 2022 11 : 6338, 2022.
 - 18) Nakahara T, Kido-Nakahara M, Tsuji G and Furue M : Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Dermatol*. 48 : 130-139, 2021.
 - 19) Luo Y, Cai X, Liu S, Wang S, Nold-Petry CA, Nold MF, Bufler P, Norris D, Dinarello CA and Fujita M : Suppression of antigen-specific adaptive immunity by IL-37 via induction of tolerogenic dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111 : 15178-15183, 2014.
 - 20) Hou T, Sun X, Zhu J, Hon KL, Jiang P, Chu IM, Tsang MS, Lam CW, Zeng H and Wong CK : IL-37 Ameliorating Allergic Inflammation in Atopic Dermatitis Through Regulating Microbiota and AMPK-mTOR Signaling Pathway-Modulated Autophagy Mechanism. *Front Immunol*. 11 : 752, 2020.
 - 21) Hou T, Tsang MS, Kan LL, Li P, Chu IM, Lam CW and Wong CK : IL-37 Targets TSLP-Primed Basophils to Alleviate Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2021 22 : 7393, 2021.
 - 22) Fujita H, Inoue Y, Seto K, Komitsu N and Aihara M : Interleukin-37 is elevated in subjects with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 69 : 173-175, 2013.
 - 23) Hou T, Tsang MS, Chu IM, Kan LL, Hon KL, Leung TF, Lam CW and Wong CK : Skewed inflammation is associated with aberrant interleukin-37 signaling pathway in atopic dermatitis. *Allergy*. 76 : 2102-2114, 2021.
 - 24) Hu T, Todberg T, Ewald DA, Hoof I, Correa da Rosa J, Skov L and Litman T : Assessment of Spatial and Temporal Variation in the Skin Transcriptome of Atopic Dermatitis by Use of 1.5 mm Minipunch Biopsies. *J Invest Dermatol*. 8 : S0022-202X (22)02657-4, 2022.
 - 25) Ślucznowska-Głabowska S, Jaworska W, Staniszevska M, Tkacz M, Safranow K, Łuczowska K, Zagrodnik E, Stecewicz I, Machaliński B and Pawlik A : Plasma Levels of Interleukins 36 α , 36 β , and 37 in Patients with Psoriasis and Their Correlation with Disease Activity Parameters. *J Clin Med*. 11 : 5254, 2022.
 - 26) Sehat M, Talaei R, Dadgostar E, Nikouejinejad H and Akbari H : Evaluating Serum Levels of IL-33, IL-36, IL-37 and Gene Expression of IL-37 in Patients with Psoriasis Vulgaris. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 17 : 179-187, 2018.
 - 27) Krueger J, Clark JD, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Cueto I, Wang CQ, Tan H, Wolk R, Rottinghaus ST, Whitley MZ, Valdez H, von Schack D, O'Neil SP, Reddy PS and Tatulych S : A3921147 Study Investigators. Tofacitinib attenuates pathologic immune pathways in patients with psoriasis : A randomized phase 2 study. *J Allergy Clin Immunol*. 137 : 1079-1090, 2016.
 - 28) Ma WY, Jia K and Zhang Y : IL-17 promotes keratinocyte proliferation via the downregulation of C/EBP α . *Exp Ther Med*. 11 : 631-636, 2016.
 - 29) Zhuang L, Ma W, Yan J and Zhong H : Evaluation of the effects of IL 22 on the proliferation and differentiation of keratinocytes in vitro. *Mol Med Rep*. 2020 22 : 2715-2722, 2020.
 - 30) Hessam S, Sand M, Gambichler T, Skrygan M, Rüdell I and Bechara FG : Interleukin-36 in hidradenitis suppurativa : evidence for a distinctive proinflammatory role and a key factor in the development of an inflammatory loop. *Br J Dermatol*. 178 : 761-767, 2018.

(特に重要な文献については、番号をゴシック体で表記している.)

Role of IL-37 in Inflammatory Skin Diseases and Its Regulatory Mechanism via Aryl Hydrocarbon Receptor

Gaku TSUJI

*Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital,
Fukuoka 812-8582, Japan*

Abstract

Interleukin (IL)-37 has been identified as an anti-inflammatory cytokine with the ability to suppress inflammation. However, its role remains largely unknown. Recent studies suggest that IL-37 may be a potential new therapeutic target in the treatment of inflammatory skin diseases. It has been shown that the dioxin receptor, the aryl hydrocarbon receptor (AHR), is involved in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. In this article, we present the latest findings on the relationship between IL-37 and AHR in inflammatory skin diseases, including our studies. IL-37 is expressed in the granular layer of the skin, together with skin barrier function proteins such as Filaggrin, Loricrin and Involucrin. In lesions of atopic dermatitis and psoriasis, these skin barrier proteins are reduced, consistent with decreased expression of IL-37. We analyzed the expression of IL-37 in normal human epidermal keratinocytes treated with an AHR modulator that promotes keratinocyte differentiation. The therapeutic AHR- modulating agent, Tapinarof, induced IL-37 expression, which mechanism was AHR-dependent. We have revealed that the AHR is the receptor that regulates the expression of IL-37 in the skin. Thus, tapinarof potentially exerts a broad anti-inflammatory effect by inducing IL-37 and is expected to have novel therapeutic effects on inflammatory skin diseases.

Key Words : Aryl hydrocarbon receptor(AHR), IL-37, inflammatory skin diseases

原 著

同居家族条件によって認定された油症患者の 血液中ダイオキシン類濃度と傾向

¹⁾福岡県保健環境研究所

²⁾公益財団法人北九州生活科学センター

³⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

⁴⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

堀 就英¹⁾, 飛石 和大¹⁾, 安武 大輔¹⁾, 新谷 依子¹⁾, 古谷 貴志¹⁾, 高尾 佳子¹⁾,
戸高 尊²⁾, 広瀬 勇気²⁾, 香月 進¹⁾, 辻 学³⁾⁴⁾

Blood Dioxin Concentrations and their Tendencies Examined in Family Members Living with Certificated Yusho Patients and Considered as Yusho Patients

Tsuguhide HORI¹⁾, Kazuhiro TOBISHI¹⁾, Daisuke YASUTAKE¹⁾, Yoriko SHINTANI¹⁾,
Takashi FURUTANI¹⁾, Yoshiko TAKAO¹⁾, Takashi TODAKA²⁾, Yuki HIROSE²⁾,
Susumu KATSUKI¹⁾ and Gaku TSUJI³⁾⁴⁾

¹⁾*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, Fukuoka, Japan*

²⁾*Kitakyushu Life Science Center, Kitakyushu, Japan*

³⁾*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka, Japan*

⁴⁾*Research and Clinical Center for Yusho and Dioxin, Kyushu University Hospital,
Fukuoka, Japan*

Abstract

We performed congener specific analysis of dioxins using HRGC/HRMS and determined their lipid based concentrations in blood samples collected from 175 family members living with certificated Yusho patients and considered as Yusho patients (Family members living with Yusho patients) during annual Yusho examinations between 2013 and 2021. When concentration of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) was compared in eleven Family members living with Yusho patients, undergoing examinations among the nine years, the longitudinal concentrations in the respective individuals hardly changed over these years. Mean concentration of 2,3,4,7,8-PeCDF in blood from 175 Family members living with Yusho patients was calculated as 25 pg/g-fat, which was higher than the mean value of 12 pg/g-fat in blood from 409 Yusho-suspected (non-registered) persons. The rates of persons with blood 2,3,4,7,8-PeCDF concentrations below 50 pg/g-fat in the entire Family members living with Yusho patients occupied approx. 90 %, on the other hand, concentrations above 50 pg/g-fat, defined as high concentration in Yusho criteria, were also found in fourteen Family members living with Yusho patients.

Key words : Yusho, Dioxin, PCB, Blood

はじめに

1968年に発生した油症の原因物質はPCBとダイオキシン類であることが明らかにされている。これらの物質は脂溶性が高く体外への排泄が困難であるため、当初の予想を超えて体内に長期残留する傾向が認められている¹⁾²⁾。油症患者の血液中ダイオキシン類を定量する実用的方法は2000年頃に確立された。これは大量試料注入技術を組み合わせた二重収束型高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HRGC/HRMS)を用い、少量(約5グラム)の血液を用いて短期間で高感度にダイオキシン類を検出、定量できる方法である³⁾⁴⁾。本方法によって2001年度に福岡県の油症検診受診者を対象にパイロット的な測定が行われ、2002年度以降は全国の検診受診者を対象にダイオキシン類測定を開始するに至った。2004年には油症診断基準に血液中2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) 値が追補として加えられた。この追補では、血液中の2,3,4,7,8-PeCDF濃度(脂肪重量当たり)30 pg/g未満は通常、50 pg/g以上は高い濃度と区分された。油症診断基準の追補・改定は1981年以来23年ぶりのことで、油症診断で大きな転機となる出来事であった。その後、研究班は未認定者を含む油症検診受診者の血液中ダイオキシン類測定を継続して実施し、2022年度までにダイオキシン類を測定した血液試料数は6,000件に上っている。一方、油症認定制度においては2012年12月に同居家族条件による認定制度が設立された⁵⁾。同居家族認定制度が開始されて以降、同制度で認定された患者は2021年6月時点で308名となっている。油症検診で同居家族認定者は従来の油症診断基準で認定を受けた患者と同様の取扱いとなり、血液中PCB濃度と血液中2,3,4,7,8-PeCDFを含むダイオキシン類濃度の測定対象となっている。本報告では同居家族認定制度が始まって以降の2013~2021年度の油症検診を受診した同居家族認定者175名を含む1,224名の血液中ダイオキシン類の分析結果をもとに、従来の油症診断基準で認定を受けた患者(検診認定者)及び未認定者と血液中濃度を比較し、その傾向を調べた。

実験方法

1. 試料

2013年度から2021年度までの9年間に、全国油症一斉検診において採取した血液試料を対象にダイオキシン類の定量分析を行った。血液はヘパリン入り真空採血管に採血され、冷蔵状態で試験室に搬入後、直ちに10mL容量のガラス製ねじ口瓶に移し、分析まで4℃以下で冷蔵保存した。測定の内部精度管理のため、コントロール試料として日水製薬製の精度管理用凍結プール血清「L-コンセーラⅡ」を使用した。

2. 分析方法

既報³⁾⁴⁾に記載された方法に従い分析を行った。血液約5gを秤量した後、凍結乾燥処理を行い、クリーンアップスパイクを添加した。高速溶媒抽出装置ASE-200又は350型(Thermo社製)により脂肪抽出を行い、ロータリーエバポレーターで有機溶媒を完全に留去して脂肪重量を求めた。脂肪の全量をヘキサンで溶解し、硫酸処理を行った後、硝酸銀シリカゲルカラム及び活性炭カラム等で精製した。

測定装置条件の詳細は既報⁶⁾⁷⁾に記載されている。測定にはすべてHRGC/HRMS(Agilent 6890/Waters Autospec Premier等)を使用した。厚生労働省が定めた血液中ダイオキシン類の分析マニュアルには、1回の分析に使用する標準的な血液量は約50gとされている⁸⁾。被験者にとって採血の負担が少ない血液量(5g)から2,3,4,7,8-PeCDF等のダイオキシン類を安定的に検出・定量するために、SCLV(SGE社製)、LVI(アイスティサイエンス社製)等の大量注入技術を順次導入し、高感度測定を継続して行った。

ダイオキシン類(21種化合物)の定量値はすべて脂肪重量当たり濃度(pg/g-fat)で表記した。これは油症診断基準で用いられる濃度表記(pg/g-lipid)と同義である。2,3,7,8-TeCDD毒性等量(TEQ)の算出にはWHOによる毒性等価係数(WHO-2005)を用い⁹⁾、定量下限値未満となった化合物の濃度は定量下限値の1/2値として取り扱い、TEQを算出した。ダイオキシン類濃度の集計では、9年間に1度しか測定していない場合はその濃度を、複数回測定している場合は最後に測

定した濃度（最新の濃度）を当該受診者の血液中濃度とした。患者の年齢は採血時の年齢を用いた。

3. 統計処理

血液中ダイオキシン類濃度の群間比較には t 検定を行い、解析には IBM SPSS Statistics (Ver. 25) を用いた。

結果及び考察

1. 同居家族認定者の血液中ダイオキシン類濃度の推移

2013 年から 2021 年の 9 年間でダイオキシン類濃度測定を行った同居家族認定者の血液試料数は 264 例であったが、複数回受診した認定者が存在するため、実数は 175 名であった。これは 2020 年 6 月末現在の同居家族認定者数 308 名の 57% に相当する人数であった。175 名の内訳は男性が 72 名、女性 103 名であり、受診時の最高年齢は男性で 93 歳、女性で 92 歳、最低年齢は男性で 46 歳、女性で 45 歳であった。受診回数が 3 回以上の同居家族認定者 11 名（患者 A～K）について血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度及び TEQ 濃度の合計値 (Total TEQ) の年次推移を表 1 に示した。9 年間の受診回数で最多は患者 I（出生 1949 年、女性）の 6 回であった。油症認定患者の血液中ダイオキシン類濃度測定は原則として 4 年に 1 回の頻度で行われているため測定間隔があるが、油症診断基準の指標のひとつである血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度に顕著な変化は認められず、Total TEQ 濃度も同様であった。この傾向は 2001 年から 2017 年までの検診認定者における傾向とも一致していた¹⁰⁾。

2. 同居家族認定者と各受診者区分の血液中ダイオキシン類濃度の比較

表 2 に 2013 年から 2021 年度の 9 年間で実施した血液中ダイオキシン類調査結果をまとめた。表 2 (A) は同居家族認定者 175 名、(B) に検診認定者 640 名、(C) に未認定者 409 名についてダイオキシン類各異性体の実測濃度と TEQ 濃度を示した。さらに 2004 年度に福岡県内の一般住民（60 歳以上の 127 名）を対象に実施した調査結果¹¹⁾を示した。

2013～2021 年度に血液中ダイオキシン類を測

定した未認定者 409 名の内訳は男性が 165 名、女性 244 名であり、受診時の年齢は男性が 16～93 歳、女性が 8～45 歳であった。血液中のダイオキシン類の各異性体濃度を対照群の一般住民と比較すると同等か低くなる傾向が認められ、油症診断基準の指標である 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は未認定者で平均 12 pg/g-fat であったのに対し、一般住民で平均 17 pg/g-fat であった。これは未認定者の集団に若年者が多く含まれることが要因として考えられた。未認定者の約半数（238 名）は 9 年間で 1 回のみの受診であったが、9 名は 9 回の検診をすべて受診していた。複数回受診した未認定者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の変動は概して少なく、濃度変化は殆ど認められなかった。

一方、検診認定者（640 名）の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度は平均 25 pg/g-fat となり、対照群の一般住民に対して約 4.8 倍高い値であった。検診認定者の血液中濃度が一般住民と比べて 2 倍以上高かった化合物は 2,3,4,7,8-PeCDF の他に 1,2,3,4,7,8-HxCDF (3.5 倍)、2,3,7,8-TeCDF (2.7 倍) 及び 3,3',4,4',5,5'-HxCB (2.4 倍) の 4 化合物であった。検診認定者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF の濃度分布は 2.8～1,300 pg/g-fat と広い範囲に及び、17 名が 500 pg/g-fat を超える高濃度であったが、検診認定者数全体の約 60% は 50 pg/g-fat 未満の濃度であった（表 3）。

表 2 (A) に同居認定者（175 名）の血液中ダイオキシン類濃度を示した。同居認定者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の平均値は 25 pg/g-fat で認定者の 84 pg/g-fat より低く、一般住民の 17 pg/g-fat や未認定者の 12 pg/g-fat よりも高い値を示した。Total TEQ 濃度においても同居認定者の平均 31 pg-TEQ/g-fat に対して認定者の 55 pg-TEQ/g-fat より低く、未認定者の 22 pg-TEQ/g-fat よりも高い値となった。血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と Total TEQ 濃度について同居認定者—検診認定者間及び同居認定者—未認定者間で t 検定を行った結果、それぞれ有意差が認められた ($p < 0.01$)。

同居認定者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の分布は 2.8～440 pg/g-fat と広範囲に及び、未認定者における濃度分布と異なっていた（表 3）。同居認定者全体の約 90% に相当する 161 名は 50 pg/g-fat 未満であったが、油症診断基準で「高い

表 1 同居家族認定者 11 名の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度 (pg/g-fat) と Total TEQ 濃度 (pg-TEQ/g-fat) の推移

患 者 (生年, 性別)		検 診 年 度								
		2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
A (1946, 女)	PeCDF	20	19	16	-	-	-	21	-	-
	TEQ	42	35	37	-	-	-	33	-	-
B (1952, 女)	PeCDF	-	54	-	-	-	39	-	31	-
	TEQ	-	48	-	-	-	37	-	32	-
C (1955, 女)	PeCDF	85	84	-	-	-	62	-	-	-
	TEQ	110	117	-	-	-	91	-	-	-
D (1963, 女)	PeCDF	53	48	-	-	-	-	45	-	-
	TEQ	26	23	-	-	-	-	21	-	-
E (1957, 男)	PeCDF	22	22	-	-	-	15	-	-	-
	TEQ	44	40	-	-	-	39	-	-	-
F (1951, 男)	PeCDF	-	20	-	-	-	14	14	11	-
	TEQ	-	27	-	-	-	16	17	15	-
G (1953, 男)	PeCDF	98	-	-	-	90	-	-	-	66
	TEQ	79	-	-	-	71	-	-	-	57
H (1954, 男)	PeCDF	13	12	-	-	-	-	8.2	-	-
	TEQ	22	18	-	-	-	-	16	-	-
I (1949, 女)	PeCDF	15	15	13	-	12	12	-	12	-
	TEQ	38	34	32	-	27	27	-	30	-
J (1950, 女)	PeCDF	13	13	13	13	12	-	-	-	-
	TEQ	24	26	26	25	23	-	-	-	-
K (1935, 男)	PeCDF	-	-	-	25	25	32	33	-	-
	TEQ	-	-	-	33	35	45	43	-	-

PeCDF : 2,3,4,7,8-pentaCDF

TEQ : Total TEQ

- : 未受診のためデータなし

濃度」に区分される 50 pg/g-fat を超える患者が 14 名認められた。これらの認定者は同居家族条件による認定制度をきっかけに初めて油症検診を受診し、高濃度の曝露が明るみになった事例である。油症では事件発生から 40 年後の 2007 年時点での詳細な死因調査により、男性において全がん、肺がん等の死亡率が一般人よりも高いことが示されており¹²⁾、健康状態の継続的な観察が必要である。

油症患者の血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度を男女間で比較すると、年齢層を問わず女性が高くなる傾向が認められている¹³⁾。同居認定者 175 名

のうち男性 72 名と女性 103 名の 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度を比較すると、男性は平均 16 pg/g-fat (範囲 : 3.4~66 pg/g-fat) 及び女性は平均 30 pg/g-fat (範囲 : 2.8~440 pg/g-fat) となり、女性で高くなっていた。これは女性の同居認定者に含まれる高濃度の患者が平均値を押し上げたものと考えられ、中央値を比較すると男性 14 pg/g-fat、女性は 15 pg/g-fat となり、ほぼ同等となっていた。

総 括

少量 (約 5 グラム) の血液から 2,3,4,7,8-

表2 油症検診受診者 (2013 - 2021 年度) の血液中ダイオキシン類濃度 (pg/g-fat)

同 族 体 名	(A)				(B)				(C)				(D)			
	平均	最小	最大	中央値	平均	最小	最大	中央値	平均	最小	最大	中央値	平均	最小	最大	中央値
2,3,7,8-TeCDD	1.4	ND	7.7	1.3	1.4	ND	7.0	1.3	1.1	ND	6.3	0.5	1.9	ND	4.3	0.5
1,2,3,7,8-PeCDD	6.5	ND	28	6.0	7.9	ND	41	6.9	5.0	ND	23	4.0	9.0	3.2	20	4.0
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.2	ND	11	1.0	2.9	ND	480	2.1	2.0	ND	22	1.0	3.6	ND	13	2.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	20	2.4	91	16	32	ND	320	23	15	ND	96	12	28	7.3	70	23
1,2,3,7,8,9-HxCDD	3.5	ND	17	2.7	3.5	ND	26	2.9	2.9	ND	36	2.2	4.5	ND	16	2.9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	37	5.5	170	31	40	2.8	1,200	32	34	ND	640	25	78	18	470	32
OCDD	480	77	2,900	390	490	56	7,900	390	450	31	7,600	310	1,200	180	7,600	390
2,3,7,8-TeCDF	1.6	ND	9.3	1.1	2.6	ND	83	1.6	1.7	ND	78	0.5	1.0	ND	4.5	1.6
1,2,3,7,8-PeCDF	1.1	ND	8.3	0.5	1.3	ND	13	0.5	0.94	ND	8.7	0.5	0.67	ND	4.6	1.3
2,3,4,7,8-PeCDF	25	2.8	440	15	84	2.3	1300	33	12	1.1	54	8.9	17	6.0	63	84
1,2,3,4,7,8-HxCDF	5.2	ND	89	3.2	17	ND	530	5.6	2.9	ND	28	2.5	5.0	ND	20	17
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4.5	ND	37	3.4	8.9	ND	170	5.0	3.2	ND	28	2.7	5.7	ND	16	8.9
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.2	ND	6.6	1.0	1.2	ND	7.0	1.0	1.1	ND	5.7	1.0	1.2	ND	5.2	1.2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0	ND	13	1.0	1.0	ND	3.0	1.0	ND	-	-	1.0	ND	-	-	1.0
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.8	ND	12	1.0	2.1	ND	74	1.0	1.6	ND	53	1.0	2.2	ND	14	2.1
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1.1	ND	24	1.0	ND	-	-	-	1.0	ND	3.0	1.0	ND	-	-	1.0
OCDF	2.1	ND	38	2.0	2.0	ND	13	2.0	ND	-	-	2.0	2.1	ND	18	2.0
3,4,4',5'-TeCB (PCB81)	5.3	ND	18	5.0	5.5	ND	49	5.0	5.2	ND	28	5.0	5.6	ND	24	5.5
3,3',4,4'-TeCB (PCB77)	7.3	ND	39	5.0	8.5	ND	130	5.0	7.3	ND	40	5.0	8.4	ND	31	8.5
3,3',4,4',5'-PeCB (PCB126)	85	ND	510	66	86	ND	610	65	67	ND	570	37	110	17	520	86
3,3',4,4',5,5'-HxCB (PCB169)	92	11	390	69	150	10	1200	120	60	ND	380	41	64	16	190	150
Total PCDDs	550	100	3,200	460	570	74	9,200	470	510	42	7,900	350	1,300	210	8,200	510
Total PCDFs	45	12	570	31	120	11	1,900	55	27	10	160	23	37	15	86	120
Total PCDD/PCDFs	600	120	3,300	490	700	90	9,500	580	530	53	7,900	380	1,300	220	8,300	600
Total Non-ortho PCBs	190	32	840	160	250	25	1,500	200	140	20	940	94	190	59	740	250
Total Dioxins	780	180	3,500	670	950	120	9,700	800	670	73	8,200	480	1,500	280	9,000	780
Total PCDDs-TEQ	11	1.8	48	10	14	1.4	76	12	8.5	1.3	46	6.7	16	5.1	35	14
Total PCDFs-TEQ	9.0	1.3	140	5.7	28	1.2	440	11	4.6	0.80	19	3.6	6.6	2.3	14	28
Total PCDDs/PCDFs-TEQ	20	3.6	180	16	42	3.4	510	25	13	2.2	65	10	22	7.4	50	42
Total Non-ortho PCBs-TEQ	11	0.82	60	9.4	13	0.82	74	11	8.5	0.65	67	4.9	13	2.6	58	13
Total Dioxins-TEQ	31	5.5	210	26	55	5.2	560	38	22	2.8	120	16	37	12	110	55

(ND : 定量下限値未満)

表3 血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度(脂肪重量当たり)の度数分布

2,3,4,7,8-PeCDF 濃度範囲 (pg/g)		検診 認定者	同居家族 認定者	未認定者
以上	未満			
1,200	～ 1,300	1	-	-
1,100	～ 1,200	1	-	-
1,000	～ 1,100	-	-	-
900	～ 1,000	-	-	-
800	～ 900	-	-	-
700	～ 800	1	-	-
600	～ 700	2	-	-
500	～ 600	7	-	-
400	～ 500	13	1	-
300	～ 400	28	1	-
200	～ 300	27	-	-
100	～ 200	67	3	-
90	～ 100	11	1	-
80	～ 90	14	-	-
70	～ 80	20	1	-
60	～ 70	24	4	-
50	～ 60	23	3	1
40	～ 50	38	7	6
30	～ 40	63	8	18
20	～ 30	73	27	44
10	～ 20	125	67	122
0	～ 10	102	52	218
人数計		640	175	409

PeCDFを含むダイオキシン類を定量する技術を維持し、継続して測定を行った。同居認定者の血液中ダイオキシン類濃度の経年推移をみたところ、顕著な変化は認められなかった。また血液中ダイオキシン類濃度について同居認定者は検診認定者及び未認定者との間に有意差があったが、濃度に影響する性別や年齢について補正した解析が今後必要と考えられる。同居認定者の血液中ダイオキシン類の濃度分布では、同居認定者の多くは通常の30 pg/g-fat未満の濃度区分に属し、ダイオキシン類による健康リスクは一般人と同等と考えられた。一方、油症診断基準で「高い濃度」に該当する同居認定者が少数認められた。血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度が100 pg/g-fatを超えるなど、典型的な患者と同等の濃度事例が得られたことから、これらの対象者について今後の健康状態を注

意深く観察する対策が求められる。

謝 辞

本研究は厚生労働行政推進調査事業費(食品の安全確保推進研究事業)に負うものである。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 松本伸哉, 赤羽学, 神奈川芳行, 梶原淳睦, 三苦千景, 内博史, 古江増隆, 今村知明: カネミ油症におけるダイオキシン類の排泄速度研究の進展, 福岡医誌. 108: 118-123, 2017.
- 2) 松本伸哉, 赤羽学, 神奈川芳行, 古江増隆, 辻学, 今村知明: 油症患者における体脂肪率推定式の作成と半減期の再検証, 福岡医誌. 112: 110-119, 2021.
- 3) Todaka T, Hirakawa H, Tobiishi K and Iida T: New protocol for dioxin analysis of human blood. Fukuoka Acta Med. 94: 148-157, 2003.
- 4) 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 飛石和太, 飯田隆雄: ヒト血液中ダイオキシン類の抽出・精製法の改良および油症患者血液中ダイオキシン類濃度, 福岡医誌. 96: 185-191, 2005.
- 5) 厚生労働省ホームページ: <https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000924398.pdf>, 2023年3月1日閲覧.
- 6) Todaka T, Uchi H, Hirakawa H, Kajiwaru J and Furue M: Development of a large-volume injection system for dioxin determinations in blood of Yusho patients. Fukuoka Acta Med. 104: 110-117, 2013.
- 7) 安武大輔, 飛石和太, 平川博仙, 新谷依子, 小木曾俊孝, 堀就英, 梶原淳睦, 香月進, 三苦千景, 古江増隆: Deans Switch型SilFlowを用いた血中ダイオキシン類測定におけるソルベントカット大量注入法の開発, 福岡医誌. 108: 102-110, 2017.
- 8) 厚生省: 血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル, 2000.
- 9) Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland, W, Feeley, M, et al.: The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. Toxicol Sci. 93: 223-241, 2006.
- 10) 堀就英, 安武大輔, 平川博仙, 戸高尊, 広瀬勇気, 新谷依子, 梶原淳睦, 香月進, 三苦千景, 古江増隆: 油症認定患者及び未認定者の血液中ダイオキシン類濃度と傾向(2001～2007年度), 福岡医誌. 110: 61-66, 2019.
- 11) Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Iida

- T and Furue M : Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-*ortho* and mono-*ortho* polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. Chemosphere. 66 : 1983-1989, 2007.
- 12) Onozuka D, Yoshimura T, Kaneko S and Furue M : Mortality after exposure to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans : a 40-year follow-up study of Yusho patients. Am J Epidemiol. 169 : 86-95, 2009.
- 13) 梶原淳睦：油症患者の血液中 PCDF 濃度の測定. 古江増隆, 赤峰昭文, 山田英之, 吉村健清編：油症研究Ⅱ—治療と研究の最前線—。pp. 34-39, 九州大学出版会。2010.
- (Received for publication March 17, 2023)

原 著

油症における末梢血 CD4 陽性 CD25 陽性 T リンパ球に関する検討

¹⁾北九州若杉病院西日本総合医学研究所²⁾北九州若杉病院内科辻 博¹⁾, 松 村 潔²⁾

CD4 Positive CD25 Positive T Lymphocyte in Patients with Yusho

Hiroshi TSUJI¹⁾ and Kiyoshi MATSUMURA²⁾¹⁾Nishinohon Research Institute of Medical Science, Kitakyushu Wakasugi Hospital²⁾Department of Internal Medicine, Kitakyushu Wakasugi Hospital

Abstract

To investigate chronic immune effects of polychlorinated biphenyl (PCB), CD4⁺ T lymphocytes and CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes in peripheral blood were studied in 187 subjects in 2022. There was no correlation between the blood PCB levels and the absolute density or the percentage of the CD4⁺ or CD4⁺CD25⁺ lymphocytes. The percentage of CD4⁺CD25⁺ lymphocytes was significantly increased in patients with Yusho compared with those in control subjects. Furthermore, the percentage of CD4⁺CD25⁺ lymphocytes was significantly increased in subjects with high PCB level compared with those in subjects with low PCB level. We conclude that CD4⁺CD25⁺ lymphocytes increase in patients with Yusho, and it may be associated with PCB levels in blood.

Key words : Yusho, CD4⁺CD25⁺ T lymphocyte, PCB

はじめに

1968年4月頃よりポリ塩化ビフェニル(PCB)混入ラيسオイル摂取により北部九州を中心に発生した油症では、原因油の分析から油症の原因物質としてポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)の毒性影響が大きいと考えられる¹⁾²⁾。PCDFは、狭義のダイオキシンであるポリ塩化ジベンゾ-パラジオキシン(PCDD)およびコプラナーPCBとともにダイオキシン類と総称され、これらの物質の毒性は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体(Ah受容体)を介すると考えられているが、その機構の詳細は未だ不明である³⁾。油症発生以来50年以上が経過し種々の症状は軽快しているが、重

症例においては体内のPCB濃度が今なお高く血中PCBの組成には未だに特徴的なパターンが認められ、慢性中毒に移行していると推定される^{4)~6)}。2001年度より福岡県油症一斉検診においてダイオキシン類の測定が開始され、油症患者では未だに血中PCDF濃度が高値であり、PCDFの体内残留が推測される⁷⁾。

近年、PCB、ダイオキシン類が内分泌攪乱物質として正常なホルモン作用を攪乱し、生殖機能の阻害、悪性腫瘍の発生、免疫機能の低下等を引き起こす可能性が指摘されている⁸⁾⁹⁾。油症における免疫機能影響については、1996年度福岡県油症一斉検診において血中PCB濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認

Table 1 Correlation coefficients between T lymphocyte subpopulation and PCB concentration in blood

		r
CD4 ⁺ cell	(%)	0.011
	(/μl)	- 0.013
CD4 ⁺ CD25 ⁺ cell	(%)	0.038
	(/μl)	0.029

め油症患者における免疫機能の障害が推測された¹⁰⁾。そして、1997年度の福岡県油症一斉検診において免疫グロブリンIgA, IgG, IgMのいずれか1分画以上の上昇を40.0%に、自己抗体では抗核抗体を45.6%と高率に認め、油症において液性免疫の障害を高頻度に認めることが報告されている¹¹⁾。

今回我々は、2022年度福岡県油症一斉検診において細胞性免疫機能検査として末梢血リンパ球亜集団のCD4陽性細胞およびCD4陽性CD25陽性細胞を測定し、油症における細胞性免疫に対する慢性的影響について検討した。

対象および方法

2022年度福岡県油症一斉検診における15歳以上の受診者189例中、細胞性免疫検査にアンケートにて同意が得られた187例を対象者とした。

白血球数、末梢血液像は半導体レーザを使用したフローサイトメトリー法により多項目自動血球分析装置XE-2100（シスメックス株）にて測定した。末梢血リンパ球亜集団のCD4陽性細胞およびCD4陽性CD25陽性細胞の測定は抗ヒトマウスモノクローナル抗体を用い二重染色フローサイトメトリー法により、CD4陽性細胞はCD4 FITC（Beckman Coulter）を用いて、CD25陽性細胞はCD25 PE（BD Biosciences）を用いてBD FACS-Canto II フローサイトメーター（BD Biosciences）にて測定した。リンパ球亜集団は、総リンパ球に対する比率および絶対密度で表した。

PCBの測定は福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、北九州市環境科学研究所および北九州生活科学センターで行った。血中PCB濃度は2022年度福岡県油症一斉検診において測定した187例の測定値を用いてCD4陽性細胞およびCD4陽性CD25陽性細胞との関連について検討

した。

結果は平均±標準偏差（mean ± S.D.）で表し、平均値の比較についてはt検定を用いた。

結 果

2022年度福岡県油症一斉検診における15歳以上の受診者で細胞性免疫検査に同意が得られた187例の内訳は女性106例、男性81例で、平均年齢は57.8 ± 18.7（18～93）歳であり、油症患者91例、油症患者（同居家族）15例、未認定患者78例、観察者3例であった。血中PCB濃度と年齢の間に有意の正の相関（ $r=0.624$, $P < 0.001$ ）を認めた。

2022年度福岡県油症一斉検診の受診者187例について血中PCB濃度とCD4陽性細胞およびCD4陽性CD25陽性細胞との関連について検討した（Table 1）。血中PCB濃度とCD4陽性細胞の総リンパ球に対する比率あるいはCD4陽性細胞数の間に相関をみなかった。血中PCB濃度とCD4陽性CD25陽性細胞の比率あるいはCD4陽性CD25陽性細胞数の間に相関をみなかった。

次に、油症患者91例について未認定患者78例を対照者として、両群間のCD4陽性細胞およびCD4陽性CD25陽性細胞について検討した（Table 2）。対照者の平均血中PCB濃度は 0.25 ± 0.21 ppb、油症患者の平均血中PCB濃度は 0.98 ± 0.88 ppbであった。CD4陽性細胞の総リンパ球に対する比率は対照者 $46.2 \pm 8.6\%$ に比べ油症患者では $47.7 \pm 10.0\%$ と差をみなかった。CD4陽性細胞数は対照者 $915.2 \pm 352.1/\mu\text{l}$ に対し油症患者では $847.3 \pm 310.6/\mu\text{l}$ と差をみなかった。CD4陽性CD25陽性細胞の比率は対照者 $16.9 \pm 6.9\%$ に対し油症患者では $19.2 \pm 7.5\%$ と有意の上昇を認めた（ $P < 0.05$ ）。CD4陽性CD25陽性細胞数は対照者 $328.1 \pm 165.5/\mu\text{l}$

Table 2 T lymphocyte subpopulations in controls and in patients with Yusho

No.		Controls 78	Yusho 91
CD4 ⁺ cell	(%)	46.2 ± 8.6	47.7 ± 10.0
	(/μl)	915.2 ± 352.1	847.3 ± 310.6
CD4 ⁺ CD25 ⁺ cell	(%)	16.9 ± 6.9	19.2 ± 7.5*
	(/μl)	328.1 ± 165.5	339.7 ± 172.0

*P < 0.05 vs. controls.

Table 3 T lymphocyte subpopulations in subjects with low PCB concentration and with high PCB concentration

No.		PCB concentration	
		≤ 0.20 ppb 47	≥ 0.87 ppb 47
CD4 ⁺ cell	(%)	46.0 ± 8.5	46.6 ± 10.3
	(/μl)	954.8 ± 356.5	887.5 ± 327.2
CD4 ⁺ CD25 ⁺ cell	(%)	16.1 ± 7.5	19.3 ± 7.7*
	(/μl)	328.2 ± 167.2	370.6 ± 205.5

*P < 0.05 vs. blood PCB concentration ≤ 0.20 ppb.

に対し油症患者では $339.7 \pm 172.0/\mu\text{l}$ と差をみなかった。

福岡県油症一斉検診受診者 187 例について血中 PCB 濃度上位 25% を PCB 高濃度群, 下位 25% を PCB 低濃度群とし両群間の CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性細胞について検討した (Table 3)。PCB 低濃度群 47 例の血中 PCB 濃度は 0.20 ppb 以下, 平均血中 PCB 濃度は $0.13 \pm 0.05\text{ppb}$ であり, 未認定患者 42 例, 油症患者 3 例, 油症患者 (同居家族) 2 例であった。PCB 高濃度群 47 例の血中 PCB 濃度は 0.87 ppb 以上, 平均血中 PCB 濃度は $1.62 \pm 0.90\text{ppb}$ であり, 油症患者 39 例, 油症患者 (同居家族) 4 例, 未認定患者 2 例, 観察者 2 例であった。CD4 陽性細胞の比率は PCB 低濃度群 $46.0 \pm 8.5\%$, PCB 高濃度群 $46.6 \pm 10.3\%$, CD4 陽性細胞数は PCB 低濃度群 $954.8 \pm 356.5/\mu\text{l}$, PCB 高濃度群 $887.5 \pm 327.2/\mu\text{l}$ と両群間に差をみなかった。CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率は PCB 低濃度群 $16.1 \pm 7.5\%$ に比べ PCB 高濃度 $19.3 \pm 7.7\%$ と有意の上昇を認めた ($P < 0.05$)。CD4 陽性 CD25 陽性

細胞数は PCB 低濃度群 $328.2 \pm 167.2/\mu\text{l}$, PCB 高濃度群 $370.6 \pm 205.5/\mu\text{l}$ と差をみなかった。

考 察

油症における免疫機能への影響については血中 PCB 濃度が高値の油症患者に抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認めることが報告されている。油症発生 28 年後の 1996 年度福岡県油症一斉検診の甲状腺機能検査において, 甲状腺ホルモンは血中 PCB 濃度 3.0 ppb 以上の PCB 高濃度群と 3.0 ppb 未満の PCB 低濃度群の間に差がみられなかったが, 抗サイログロブリン抗体を高濃度群の 19.5% と低濃度群の 2.5% に比べ高頻度に認めた¹⁰⁾。そして, 1997 年度福岡県油症一斉検診において免疫機能検査として免疫グロブリンおよび自己抗体を測定し, 油症患者において免疫グロブリン IgA, IgG, IgM のいずれか 1 分画以上の上昇を 40.0% に, 自己抗体についてはリウマチ因子を 8.9% に, 抗核抗体を 45.6% と高率に認め, 液性免疫を中心とする免疫機能に対する慢性的影響が示唆された¹¹⁾。さらに, 2007 年度福岡県油

症一斉検診において、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子との間に正の相関を、抗核抗体を血中 2,3,4,7,8-PeCDF 低濃度群に比べ高濃度群に高頻度に認め、油症における免疫グロブリン IgA およびリウマチ因子の上昇、抗核抗体の出現に 2,3,4,7,8-PeCDF が関与している可能性が考えられ、液性免疫に対する 2,3,4,7,8-PeCDF の慢性的影響が示唆された¹²⁾。

油症における細胞性免疫への影響については 2008 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中 PCB 濃度および血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度との関連について報告されている¹³⁾。血中 PCB 濃度と末梢血リンパ球数、helper/inducer T 細胞を示す CD4 陽性細胞数、suppressor/cytotoxic T 細胞を示す CD8 陽性細胞数の間に相関はみられなかったが、血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と末梢血リンパ球数、CD4 陽性細胞数の間に相関が認められた。そして血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高値の油症患者では低値の患者に比べ末梢血リンパ球数、CD4 陽性細胞数の上昇が認められた。油症患者における末梢血リンパ球数、CD4 陽性細胞数の上昇に 2,3,4,7,8-PeCDF の関与が示唆された。

2022 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症患者について未認定患者を対照者として CD4 陽性細胞および CD4 陽性 CD25 陽性細胞を検討し、CD4 陽性細胞は油症患者と対照者に差をみなかったが、油症患者では対照者に比べ CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率の上昇を認めた。そして、2022 年度福岡県油症一斉検診の受診者について PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率の上昇を認めた。油症患者に CD4 陽性 CD25 陽性細胞の上昇を認め、油症における CD4 陽性 CD25 陽性細胞の上昇に血中 PCB 濃度の関与が示唆される。

Sakaguchi ら¹⁴⁾ は T 細胞が欠損するヌードマウスに CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞を除去した T 細胞を移入することにより自己免疫疾患が発症し、CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の移入により自己免疫疾患の発症が阻止されることより、自己免疫疾患の発症を阻止する CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞を CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞として報告した。CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞は免疫

自己寛容により自己免疫疾患の発症抑制に関与するほか、抗腫瘍免疫の抑制、移植免疫寛容の誘導に関与することが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。今回の検討では油症において CD4 陽性 CD25 陽性細胞の上昇が認められたが、CD4 陽性 CD25 陽性細胞に含まれる CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞に対する慢性的影響については不明である。油症において自己免疫疾患の発症抑制に関連する CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞について検討が必要と考えられる。

2022 年度福岡県油症一斉検診において対照者に比べ油症患者に CD4 陽性 CD25 陽性細胞の上昇を認め、PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率の上昇を認めることより油症における CD4 陽性 CD25 陽性細胞に対する慢性的影響に PCB の関与が示唆される。今後、油症における CD4 陽性 CD25 陽性細胞の上昇に対する血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の関連について検討が必要と考えられる。

総 括

油症発生 54 年後の 2022 年度福岡県油症一斉検診受診者 187 例について末梢血リンパ球亜集団を測定し、血中 PCB 濃度との関連について検討した。血中 PCB 濃度と CD4 陽性細胞の総リンパ球に対する比率あるいは CD4 陽性細胞数の間に相関をみなかった。血中 PCB 濃度と CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率あるいは CD4 陽性 CD25 陽性細胞数の間に相関をみなかった。油症患者 91 例では対照者 78 例に比較し CD4 陽性細胞の比率あるいは絶対密度に差をみなかったが、CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率は対照者に比べ油症患者では有意の上昇を認めた。CD4 陽性 CD25 陽性細胞の絶対密度には差をみなかった。そして、血中 PCB 高濃度群では PCB 低濃度群に比べ CD4 陽性 CD25 陽性細胞の比率の上昇を認めた。油症における CD4 陽性 CD25 陽性細胞に対する慢性的影響に PCB の関与が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Masuda Y and Yoshimura H : Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance : A Review. Amer J Ind Med. 5 : 31-44, 1984.

- 2) Oishi S, Morita M and Fukuda H : Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 43 : 13-22, 1978.
- 3) Gonzalez FJ, Liu SY and Yano M : Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanism. *Pharmacogenetics.* 3 : 51-57, 1993.
- 4) 飯田隆男, 芥野岑男, 高田智, 中村周三, 高橋克巳, 増田義人 : ヒトの血液中におけるポリ塩化ビフェニルおよびポリ塩化クアテルフェニルについて. *福岡医誌.* 72 : 185-191, 1981.
- 5) 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一 : 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニール異性体. *福岡医誌.* 76 : 150-152, 1985.
- 6) 増田義人, 原口浩一, 古野純典 : 油症患者における PCB 異性体の 30 年にわたる特異な残留. *福岡医誌.* 94 : 136-143, 2003.
- 7) 飯田隆男, 戸高尊, 平川博仙, 飛石和大, 松枝隆彦, 堀就英, 中川礼子, 古江増隆 : 油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (2001 年). *福岡医誌.* 94 : 126-135, 2003.
- 8) Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP and Becker JL : Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam. Appl Toxicol.* 21 : 433-441, 1993.
- 9) Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y and Kato S : Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature.* 423 : 545-550, 2003.
- 10) 辻博, 佐藤薫, 下野淳哉, 東晃一, 橋口衛, 藤島正敏 : 油症患者における甲状腺機能 : 油症発生 28 年後の検討. *福岡医誌.* 88 : 231-235, 1997.
- 11) 辻博, 平橋高明, 緒方久修, 藤島正敏 : 油症患者における免疫機能の検討. *福岡医誌.* 90 : 147-149, 1999.
- 12) 辻博 : 油症患者における免疫機能の検討. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業「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 (主任研究者 : 古江増隆). pp. 37-39, 2008.
- 13) 辻博 : 油症における末梢血リンパ球亜集団の検討. *福岡医誌.* 100 : 131-135, 2009.
- 14) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M : Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155 : 1151-1164, 1995.
- 15) Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F and Sakaguchi S : Thymus and autoimmunity : production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 162 : 5317-5326, 1999.
- 16) Togashi Y, Shitara K and Nishikawa H : Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 16 : 356-371, 2019.

(Received for publication March 17, 2023)

原 著

坐骨神経および脊髄神経のタンパク質発現に基づく ベンゾ[a]ピレン投与ラットに対するシナモンの効果

¹⁾熊本保健科学大学 保健科学部 リハビリテーション学科

²⁾帝京大学福岡医療技術学部 理学療法学科

³⁾リハビリテーションセンター 熊本回生会病院

⁴⁾くまもと南部広域病院

⁵⁾医療法人社団温故会 直方中村病院

申 敏 哲¹⁾, 行 平 崇¹⁾²⁾, 小 牧 龍 二¹⁾³⁾, 福 永 貴 之¹⁾⁴⁾,
田 中 哲 子¹⁾, 吉 村 恵⁵⁾

Effect of Cinnamon on Benzo[a]pyrene-Treated Rats Based on Sciatic and Spinal Nerve Protein Expression

Min-Chul SHIN¹⁾, Takashi YUKIHIRA¹⁾²⁾, Ryuji KOMAKI¹⁾³⁾, Takayuki FUKUNAGA¹⁾⁴⁾,
Tetsuko TANAKA¹⁾ and Megumu YOSHIMURA⁵⁾

¹⁾*Department of Rehabilitation, Faculty of Health Sciences, Kumamoto Health Science University,
Kumamoto, Japan*

²⁾*Department of Physical Therapy, Teikyo University Faculty of Fukuoka Medical Technology,
Fukuoka, Japan*

³⁾*Rehabilitation Center Kumamoto Kaiseikai Hospital, Kumamoto, Japan*

⁴⁾*Kumamoto Southern Regional Hospital, Kumamoto, Japan*

⁵⁾*Nogata Nakamura Hospital, Fukuoka, Japan*

Abstract

This study investigated the effects of cinnamon on benzo[a]pyrene-administered rats within the peripheral and central nerves using behavioral and molecular biological methods. As a result, the benzo[a]pyrene-administered group (Ben-DW) showed a significant decrease in locomotor activity at night compared to the corn oil-administered group (Corn-DW), but this decrease was significantly suppressed in the cinnamon-administered rat groups (Ben-3 mg CNM and Ben-10 mg CNM). In the study of sensory threshold changes using 2000 Hz electrical stimulation, the Ben+DW group showed increased sensory threshold compared with that in the Corn-DW group. However, the administration of cinnamon suppressed this increase in the threshold. In addition, the Ben-DW group experienced more oxidative stress than did the Corn-DW group, and cinnamon administration improved the oxidative stress. To investigate the relationship between behavioral and oxidative stress level changes in rats induced by administering benzo[a]pyrene and cinnamon and assess changes in the peripheral and central nerves, cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1), myelin-associated glycoprotein (MAG), and myelin basic protein (MBP) proteins were analyzed on the sciatic nerve fibers and spinal cord. Regarding the Aryl hydrocarbon receptor (AHR) target gene CYP1A1, the Ben-DW group had significantly increased CYP1A1 protein expression in both the sciatic and spinal nerves, when

Corresponding author : Min-Chul SHIN

Laboratory of Neuroscience, Kumamoto Health Science University, Izumimachi 325 kumamoto, Japan 861-5598

TEL : + 81-96-275-2111, FAX : + 81-96-245-2175

E-mail : karosu94@kumamoto-hsu.ac.jp

compared with that in the Corn-DW group. However, cinnamon administration on both nerves significantly suppressed that increase. For MAG protein, the Ben-DW group had significantly decreased protein expression, in comparison with that in the Corn-DW group, in the sciatic nerve fibers, and its suppression decreased in the cinnamon-treated group. However, there was no significant difference between the groups in the spinal cord. As for MBP protein, there was a slight change between the groups in both sciatic and spinal nerves, but there was no significant difference. According to these results, we can conclude that exposure to benzo[a]pyrene may cause paresthesia due to its toxicity to both the peripheral and central nerves. However, it is hypothesized that the peripheral nerves are more likely to be affected than the central nerves. In addition, herbs and herbal ingredients such as cinnamon, which have antioxidant and AHR activity inhibitory effects, may be effective in benzo[a]pyrene exposure. However, further studies are needed to clarify the action of dioxins, such as benzo[a]pyrene, on the central nervous system.

Key words : benzo[a]pyrene, cinnamon, sciatic nerve, spinal nerve

はじめに

ダイオキシン類化合物による複合中毒であるカネミ油症事件は、発生からおおよそ50年の年月が経過した現在においても様々な後遺症が多く報告されている¹⁾²⁾。特に、一部の患者では末梢の感覚鈍麻やしびれ感、自律神経失調症等の末梢神経障害および中枢神経障害等が報告されているが、その理由については不明な部分が多い^{2)~4)}。油症の急性期には、全身倦怠感、食欲不振、体重減少、頭重感といった全身症状が見られることが報告されている。特に全身倦怠感、頭痛、手足のしびれといった自覚症状は、未だに50%の患者さんに認められ、これらの症状はダイオキシン類が末梢神経系に限らず中枢神経系にも何らかの影響を与える可能性を示唆している⁵⁾⁶⁾。ダイオキシン類は、芳香族炭化水素受容体 (Arylhydrocarbon receptor, 以下 AHR) を介してその毒性を発揮させることと様々な植物成分や生薬が AHR の活性を抑制させることが Uchi ら⁷⁾ により報告されている。特に、生薬の一つであるケイヒは、抗酸化作用と AHR 活性化の阻害作用があり、ダイオキシン類の中毒症状を改善させる可能性が報告されている⁷⁾。近年、私たちが行ったダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを用いた動物実験で、ベンゾピレンに曝露されたラットの末梢のしびれ感等に関係が有るとされる $\alpha\beta$ 神経線維の伝導速度が低下していることが確認された⁵⁾⁶⁾。これらの行動学的・電気生理学的動物実験による結果は、ダイオキシン類が末梢神経系に明らかに影響を与えることを示したものの、中枢神経系に

与える影響については未だ明らかでないのが現状である。従って、本研究では、24 時間行動評価ができる自発運動量計と小動物用感覚閾値測定装置を用いた行動学的評価法と分子生物学的手法を用いた坐骨神経と脊髄神経内の変化を検討することでベンゾピレンとケイヒの投与がラットの末梢及び中枢神経に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. 実験動物

5 週齢の Wistar 系雄性ラット (SLC 株, 静岡) を用いて、コーンオイル 2 週間連続投与後蒸留水投与 (Corn-DW) 群、ベンゾピレン 2 週間連続投与後蒸留水投与 (Ben-DW) 群、ベンゾピレン 2 週間連続投与後ケイヒ投与 (Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM) 群に分けた。ラットは市販の飼料 (CE-2, 日本クレア) および水を自由に摂取させ、動物舎の照明は 12 時間ごとに明暗のコントロールをし、室温 25.0℃、湿度 55 ± 5% の条件下で飼育した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育および実験に関しては、熊本保健科学大学動物倫理委員会の許可 (登録番号、動 18-10) を得て行った。3 種混合麻酔薬の全身深麻酔下で心臓から採血後、左右の坐骨神経と脊髄神経を採集し、その後、心臓・大血管を切開して失血死させたため痛みなどの侵襲は殆ど無い。

2. 試薬の投与

ベンゾピレン (Benzo[a]pyrene) は富士フィル

ム和光純薬(株)から購入した。ケイヒはスリランカ産のオーガニックシナモンを使用した。コーンオイル投与群にはコーンオイルを、ベンゾピレン投与群には 30 mg/kg ベンゾピレンをコーンオイルに溶かして経口投与器にてそれぞれのラットに2週間、一回 500 μ l ずつ胃に直接投与した。2週間のベンゾピレン投与後からコーンオイル投与群とベンゾピレン投与群には蒸留水、ケイヒ投与群には蒸留水に溶かした 3 mg/kg と 10 mg/kg のケイヒをそれぞれ経口投与器で 500 μ l ずつ、4週間胃に直接投与した。

3. ナノタグの装着と自発運動量の計測

ラットの自発運動量の計測のために小型運動量計であるナノタグ（キッセイコムテック株式会社, nano tag）を使用した。背中側にナノタグを装着するため、ラット等小動物実験用簡易吸入麻醉装置を用いて、3%イソフルランを使用し深麻醉下で背部を剃毛した後に、ヨード液を用いて皮膚の消毒を行った。滅菌済みの手術道具を用いて除毛部位の皮膚を一部切開し、皮膚と筋肉の間にナノタグを挿入した後、手術用の糸を用いて筋肉に固定した。切開した皮膚は手術用の糸にて縫合し、ヨード液で傷部位の消毒を行った。自発運動量の計測については、手術1週間後から毎週1回、20時から24時間計測した。

4. 感覚閾値の測定

時間的経過による感覚の変化は小動物用電気刺激装置（STG2000 バイオリサーチセンター）を用いて電気刺激による感覚閾値を測定した。ラットを拘束装置に入れ、一定時間放置し、ラットが環境に慣れた頃合いをみて開始した。周波数は、末梢のしびれ感と関係する A β 線維の刺激が可能である 2,000 Hz の正弦波電機刺激のみを利用し覚醒下のラット右後肢足底部に与え、刺激を与えてからラットの逃避反応が観察された時点までの時間を計測し、p-clamp ソフトウェア（Axon Instrument 社製）で、刺激時間から刺激強度（ μ A）を換算した。

5. 酸化ストレス・抗酸化力測定と CYP1A1, MBP, MAG タンパク質の測定

最終日の行動実験実施後、直ちに3種混合麻醉

薬を用いてラットを麻醉し、心臓から採血後、坐骨神経と L1~L5 の脊髓標本を採集し、-80℃に凍結した。血液試料は遠心分離し、取り出した血清を用いて、採血後 72 時間以内に酸化ストレスと抗酸化力の測定を行った。測定機器はフリーラジカル解析装置 FREE CARRIO DUO（WIS-MERLL 社）を用いた。測定キットは、酸化ストレスの測定に d-ROMs テスト（正常範囲：200 から 300 U.CARR）（Diacron 社製）、抗酸化力の測定に BAP テスト（最適値：2200 μ M/L 以上）（Diacron 社製）を使用した。d-ROMs テストでは、pH4.8 の酢酸緩衝液キュベットを 37℃まで加温し、保温したキュベットに血清 20 μ l を入れた後、呈色液クロモゲン（N, N ジエチルパラフェニレンジアミン）を 20 μ l 入れ混合し、光度計に入れて活性酸素・フリーラジカルによる代謝物であるヒドロペルオキシドの量を測定した。単位は U.CARR が用いられ、1 U.CARR = 0.08 mg/100 mlH₂O₂ になる。BAP テストは、チオシアン酸塩誘導体を含む試薬入りのキュベットを 37℃まで加温する。次に三価鉄塩を含む試薬を 50 μ l 滴下、混合し赤く呈色させる。その後光度計で三価鉄イオン濃度を測定後、三価鉄イオンが呈色している試薬に血清を 10 μ l 入れて混合すると血清中の抗酸化物質の作用で二価鉄イオンに還元され、脱色される。その色の変化を光度計で計測し、血清の還元力を評価した。

凍結したラットの坐骨神経と脊髓神経は解凍後、T-PER Tissue Protein Extraction Reagent（Thermo Fisher Scientific）を用いてタンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液は cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1, Santa Cruz Biotechnology), myelin basic protein (MBP, Cosmo Bio), myelin-associated glycoprotein (MAG, Cosmo Bio), 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase, GENETEX), β -Actin (Cell Signaling Technology) の抗体を用いてタンパク質自動分析装置、WES (Protein simple) により分離し分析を実施した。

6. 統計処理

自発運動量と感覚閾値の結果は、標準偏差（S.D.）で、酸化ストレス・抗酸化力と CYP1A1, MBP, MAG タンパク質測定結果は平均 $\pm$ 標準誤

差 (S.E.) でそれぞれ算出した。各群間差は、一元配置分散分析事後検定として Scheffe 検定を用いた多重比較を行った。なお有意水準は 5% ($p < 0.05$) とした。

結 果

1. 時間的経過による自発運動量の変化

ベンゾピレンとケイヒ投与がラットの自発運動量変化に及ぼす影響を、ナノタグを用いてベンゾピレンの投与前、投与 2 週間後、その後の蒸留水又はケイヒの連続 4 週間投与まで 1 週間毎に測定を行った。その結果、コーンオイル 2 週間投与後蒸留水投与群 (Corn-DW, 23337.1 ± 1263.3) に対し、ベンゾピレン投与後蒸留水投与群 (Ben-DW, 19205.4 ± 1140.2 , $p < 0.001$) で有意な夜の自発運動量の低下がみられた。また、ベンゾピレンを 2 週間投与後からケイヒを投与した群 (Ben-3 mg CNM (21810.1 ± 1336.4 , $p < 0.05$) と Ben-10 mg CNM (22080.6 ± 1032.8 , $p < 0.01$)) については自発運動量の低下の抑制が認められた。しかし、昼の自発運動量については各群間で有意な変化は認められなかった (Fig. 1)。

2. ベンゾピレンとケイヒの投与による感覚閾値の経時的变化

ベンゾピレンとケイヒの投与がラットの感覚閾値変化に及ぼす影響を、小動物用電気刺激装置を用いて評価で測定した。植田ら⁸⁾は、5Hz の刺激により C 線維、250Hz の刺激により A δ 線維、2,000 Hz の刺激により A β 線維を選択的に刺激することが出来ると報告している。本研究では末梢のしびれ感と関係する A β 線維の刺激が可能である 2,000 Hz の正弦波電機刺激のみを利用し覚醒下で閾値を測定した。その結果、2,000 Hz の電気刺激周波数による感覚閾値変化において、Corn + DW 群 (475.2 ± 89.2) に対し、Ben + DW 群 (587.7 ± 98.3 , $p < 0.05$) で感覚閾値の有意な上昇がみられ、ケイヒ投与群 (Ben-3 mg CNM (500.2 ± 89.1 , $p < 0.05$) と Ben-10 mg CNM (481.2 ± 96 , $p < 0.05$)) で、その感覚閾値上昇の抑制がみられた (Fig. 2)。

3. 酸化ストレス・抗酸化力に対するベンゾピレンとケイヒの影響

自発運動量の変化と酸化ストレスの関係性を明らかにするために、酸化ストレス度に対する影響を検討した。その結果、Corn-DW 群 (320 ± 21.1) に対し、Ben-DW 群 (374.1 ± 23.4 , $p < 0.05$) で酸化ストレスの有意な上昇がみられ、その上昇は Ben-3 mg CNM (350.6 ± 20.6) と Ben-10 mg CNM 群 (340.6 ± 18.6) で抑制傾向がみられたものの、有意差は認められなかった (Fig. 3A)。抗酸化力に関しては、Corn-DW 群 (3678.3 ± 203.8) に対し、Ben-DW 群 (2905.2 ± 196.6 , $p < 0.001$) で抗酸化力の有意な低下がみられたが、Ben-3 mg CNM (3231.3 ± 210.1) と Ben-10 mg CNM 群 (3401.2 ± 138.5 , $p < 0.05$) では、Ben 群に対し、抗酸化力の上昇傾向又は有意な上昇が認められた (Fig. 3B)。これらの結果から酸化ストレス度を計算した結果が Fig. 3C である。BAP/d-ROMs ≤ 12.5 の場合を酸化ストレス状態とみなす。酸化ストレス度については、Ben-DW 群 (7.8 ± 0.8 , $p < 0.001$) で Corn-DW 群 (11.5 ± 0.7) に対し、酸化ストレス状態であり、Ben-3 mg CNM (9.2 ± 0.9) と Ben-10 mg CNM (10.0 ± 0.6 , $p < 0.01$) 群では Ben-DW 群に対し、有意な酸化ストレス状態の改善が見られた。

4. ベンゾピレンとケイヒの投与による

CYP1A1, MBP, MAG タンパク質の変化

ベンゾピレンとケイヒの投与によるラットの行動変化や酸化ストレス度の変化と末梢及び中枢神経内の変化の関連性を検討するために坐骨神経と脊髄の L1~L5 を取り出し、AHR の活性を測定するために CYP1A1 タンパク質 (Fig. 4A)、中枢神経内の脱髄と自発運動量変化の関係を検討するために MAG (Fig. 4B)、MBP (Fig. 4C) タンパク質を測定した。AHR の標的遺伝子である CYP1A1 に関しては、Ben-DW 群 (坐骨神経, 5.0 ± 0.2 , $p < 0.001$ と脊髄神経, 4.6 ± 0.1 , $p < 0.001$) で Corn-DW 群 (坐骨神経, 2.9 ± 0.2 と脊髄神経, 3.2 ± 0.2) に対し坐骨神経、脊髄神経共に CYP1A1 タンパク質の有意な発現増加がみられたが、ケイヒを投与した Ben-3 mg CNM (坐骨神経, 3.9 ± 0.3 , $p < 0.001$ と脊髄神経, 3.7 ± 0.4 , $p < 0.001$) と Ben-10 mg CNM 群

(坐骨神経, 3.6 ± 0.5 と脊髄神経, 3.3 ± 0.3) では, いずれの神経においても発現増加の有意な抑制がみられた. MAG タンパク質においては, 坐骨神経で Corn-DW 群 (0.79 ± 0.02) に対し Ben-DW 群 (0.67 ± 0.03 , $p < 0.001$) で有意な発現低下がみられ, Ben-10 mg CNM 群 (0.75 ± 0.02 , $p < 0.05$) ではその発現低下の抑制がみられた. しかし, 脊髄神経では各群有意な変化はみられなかった. MBP タンパク質については, いずれの神経においても若干の発現変化がみられたものの, 有意差はなかった.

考 察

本実験では, ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを投与したラットに対するケイヒの効果を, 自発運動量計と小動物用感覚閾値測定装置を用いた行動学的評価法と坐骨神経と脊髄神経を用いた分子生物学的手法で比較検討し, 動物の行動変化と末梢神経, 中枢神経内の変化の関連性について検討を行った. 自発運動量計を用いた行動学的評価法では, ベンゾピレン投与 (Ben-DW) 群でコーンオイル投与 (Corn-DW) 群に対し, 夜間の自発運動量の有意な低下がみられたが, ケイヒ投与群でその低下が抑制された. 古谷ら⁹⁾によるとカネミ油症患者で感覚鈍麻や神経のしびれ感などの末梢神経障害および中枢神経障害が多いことが明らかになっている. 末梢のしびれ感は, 末梢神経の中でも $A\beta$ 線維の伝導速度緩徐化が関係していると考えられており, 近年私たちのベンゾピレンを用いた研究の結果でもベンゾピレンの毒性による $A\beta$ 神経線維の伝導速度低下が確認されている⁵⁾⁶⁾. また, 本実験のベンゾピレンを投与したラットでの閾値の測定結果でも, 先行研究と同様に 2,000Hz の電気刺激で閾値の上昇がみられたことから, 夜の自発運動量低下は, ダイオキシン類の毒性が $A\beta$ 線維の神経に作用し, 神経異常を起こした結果, 感覚異常の発生に至った可能性が考えられる. しかし, 油症の急性期には, 全身倦怠感, 食欲不振, 体重減少, 頭重感といった全身症状がみられることが報告されており, 特に全身倦怠感, 頭痛, 手足のしびれといった自覚症状は, 50%の患者さんに認められている^{2)~4)}. これらの症状はダイオキシン類が末梢神経系に限らず中枢神経系にも何らかの影響を与える可能性

を示唆している. 従って, 坐骨神経と L1~L5 までの脊髄を取り出し分子生物学的手法を用いて自発運動量の変化や感覚閾値の上昇と AHR の活性化や脱ミエリンとの関係について末梢神経と中枢神経を用いて検討した. その結果, ベンゾピレン投与により末梢神経と中枢神経内の CYP1A1 タンパク質の発現増加がみられ, その増加はケイヒ投与群で抑制されたことが確認された. MAG タンパク質については, ベンゾピレン投与群の坐骨神経内のみ MAG タンパク質の発現低下がみられ, ケイヒ投与によりその発現低下が抑制されたが, 脊髄神経内の MAG タンパク質と坐骨神経や脊髄神経内の MBP タンパク質においては, タンパク質発現の若干の変化はみられたものの, 有意差がなかった. 中枢神経系の神経回路の多くは, 神経軸索の周囲が髄鞘に覆われ, 跳躍伝導を行う有髄神経回路である. また, 髄鞘は内部の軸索に対して栄養供給をする働きもあることから¹⁰⁾, 髄鞘は神経機能の恒常性維持に重要な役割を担う構造物と認識されている. 種々の中枢神経疾患で病巣周囲に髄鞘の脱落が検出され, 脱髄は症状の発症や悪化をもたらす現象と認識されている^{11)~13)}. 従って, 油症でみられる全身倦怠感, 頭痛, 手足のしびれといった自覚症状は, ベンゾピレンによって引き起こされる $A\beta$ 神経線維の脱髄と同様に, ダイオキシン類によって中枢神経の脱髄が引き起こされた影響である可能性も考えられる. 一方で末梢神経の脱髄疾患は, 神経を覆っているミエリンが脱ミエリン化し, 神経信号がうまく伝達できなくなるため, 四肢のしびれなど様々な神経症状が出る疾患とされており, いずれの脱髄疾患も原因不明の疾患である^{10)~14)}. 本研究では, ベンゾピレンの毒性作用を CYP1A1 タンパク質で測定した結果, 末梢と中枢神経の両側でその作用がみられ, 末梢神経ではその毒性によって脱髄が引き起こされたことで神経の伝導速度が低下し, 感覚閾値が上昇した可能性が考えられたが, 中枢神経の脱髄に関する検討では各群間に差がみられなかったことから中枢神経よりも末梢神経の方がベンゾピレンによる影響を受けやすいと考えられる. 今回のナノタグを用いた行動実験では, ベンゾピレンの毒性による神経作用が自発運動量低下に影響を与えた可能性が考えられるが, その作用は中枢神経よりも末梢神経の異常による感覚障害

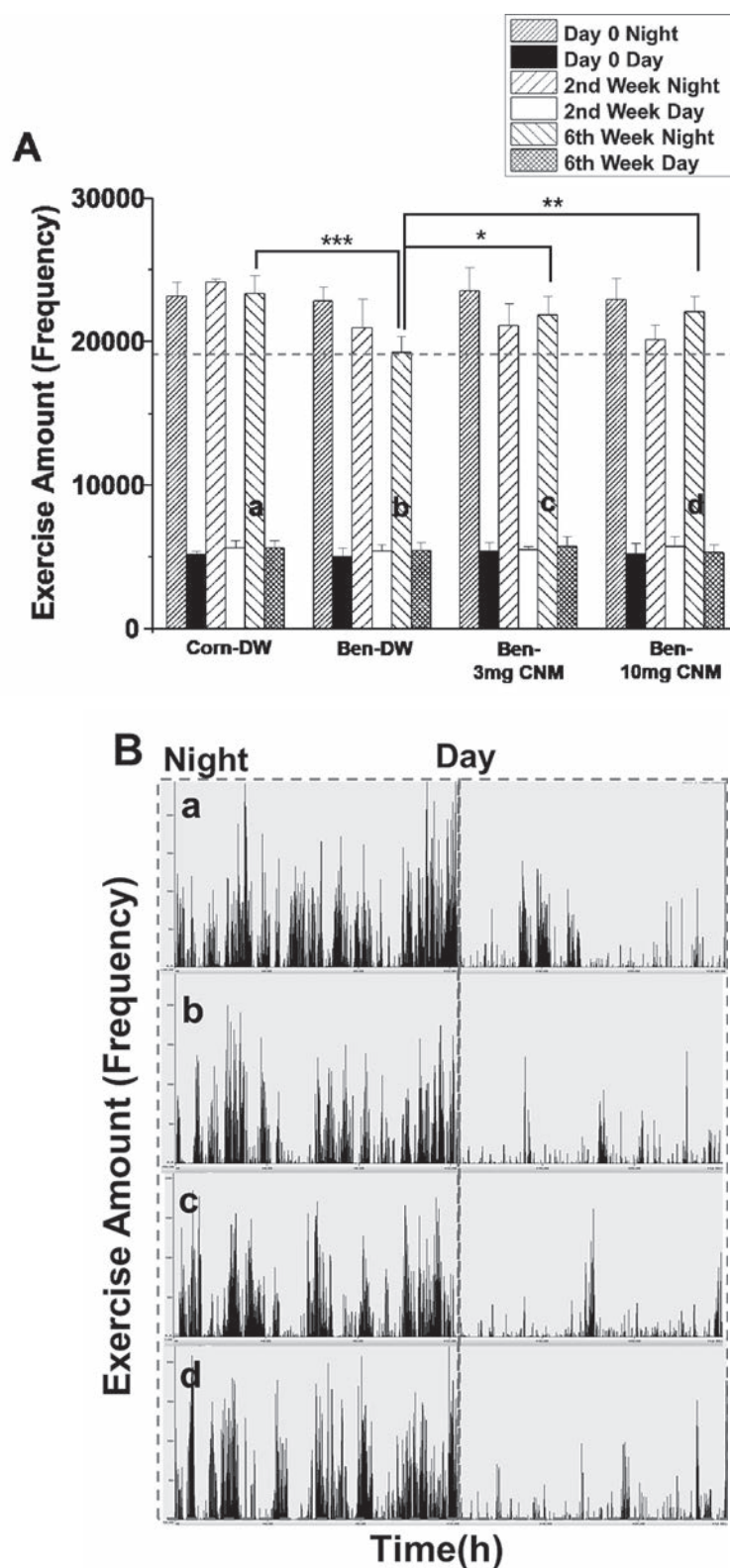


Fig. 1 Effects of benzo[a]pyrene and cinnamon administration in rat locomotor activities.

A, The changes in the locomotor activity. **B**, Typical actograms of Corn-DW, Ben-DW, and 3mg · 10mg Ben-CNM groups. a, b, c, d are the respective statistical data and typical actograms after 4 weeks of administration of distilled water or cinnamon. Corn, Corn-oil. DW, Distilled water. Ben, benzo[a]pyrene. CNM, cinnamon. *, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$. ***, $P < 0.001$. Mean $\pm$ S.D. n=6.

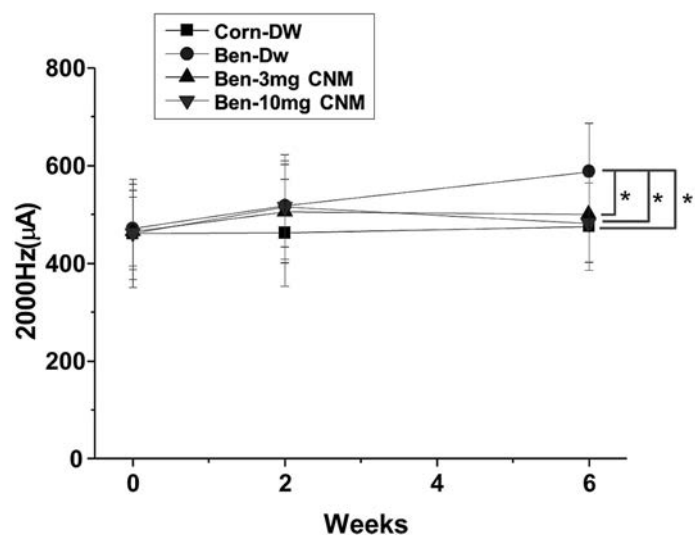


Fig. 2 Effects of benzo[a]pyrene and cinnamon administration on sensory thresholds in rats.

Corn, Corn-oil. DW, Distilled water. Ben, benzo[a]pyrene. CNM, cinnamon. *, $P < 0.05$. Mean $\pm$ S.D. $n=6$.

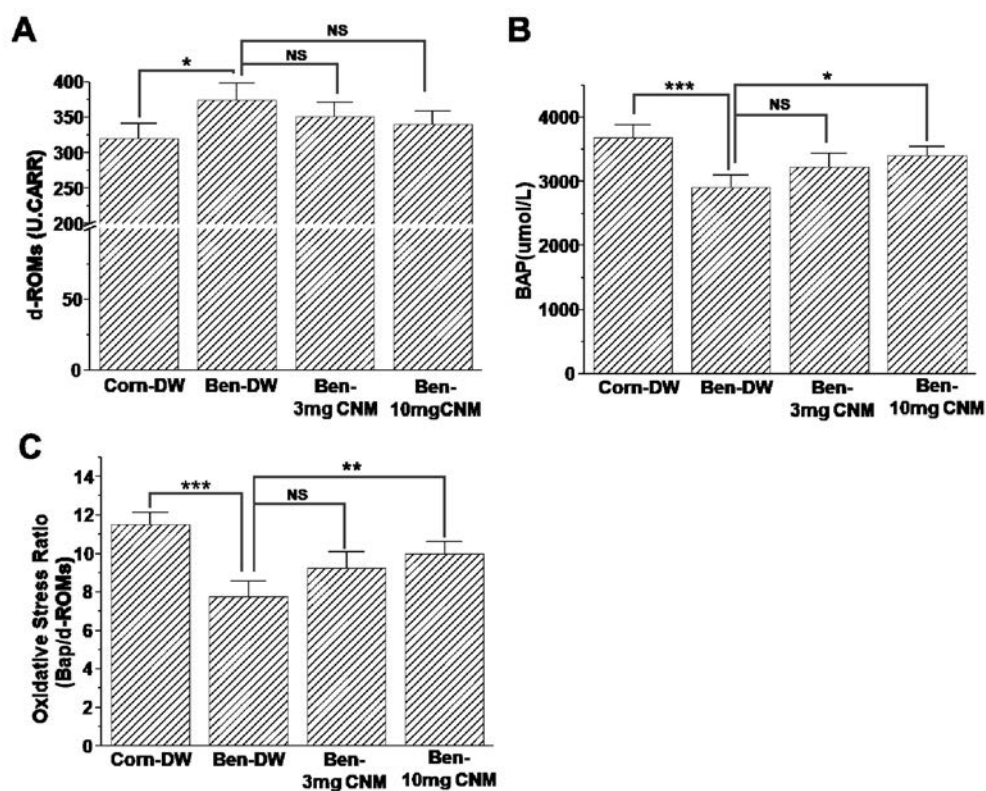


Fig. 3 Effects of benzo[a]pyrene and cinnamon administration on antioxidant and oxidative stress in rats.

The mean levels of serum d-ROMs (A), BAP (B), and Oxidant/antioxidant balance (C). Corn, Corn-oil. DW, Distilled water. Ben, benzo[a]pyrene. CNM, cinnamon. d-ROMs, Diacron reactive oxygen metabolites. BAP, Biological antioxidant potential. NS, no significant. *, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$. ***, $P < 0.001$. Mean $\pm$ S.E. $n=6$.

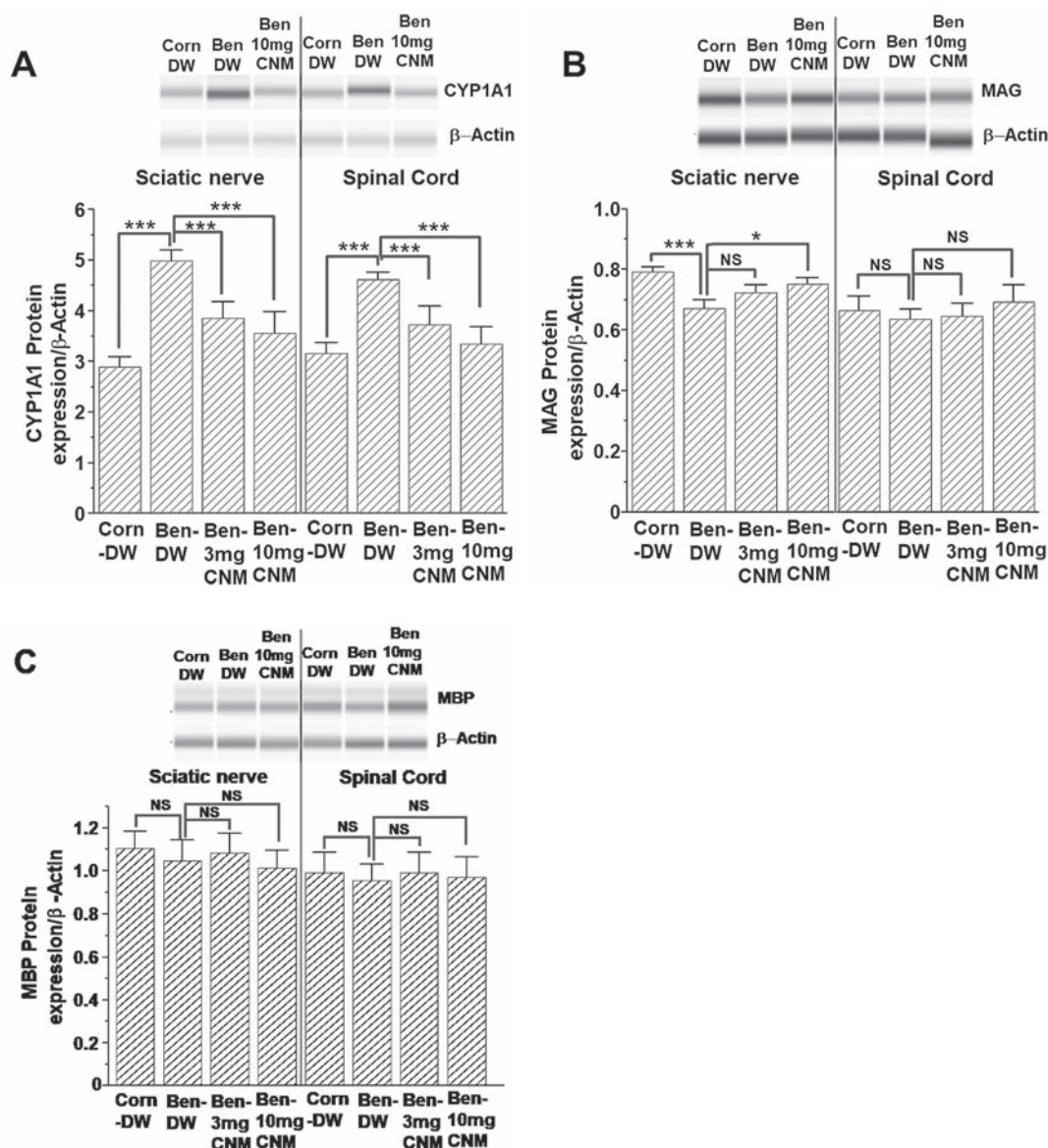


Fig. 4 Effects of benzo[a]pyrene and cinnamon administration on CYP1A1, MBP and MAG protein expression in rat sciatic and spinal nerves.

The mean levels of CYP1A1 (A), MAG (B), and MBP (C) protein expression. Corn, Corn-oil. DW, Distilled water. Ben, benzo[a]pyrene. CNM, cinnamon. CYP1A1, cytochrome P450 (P450) 1A1. MBP, myelin basic protein. MAG, myelin-associated glycoprotein. NS, no significant. *, $P < 0.05$. ***, $P < 0.001$. Mean $\pm$ S.E. $n=6$.

が影響を与えた可能性が考えられた。また、本研究では、ベンゾピレン投与ラットに対する 3 mg・10 mg/kg ケイヒの効果を検討した。その結果、自発運動量低下改善、感覚閾値の上昇抑制、酸化ストレス度の改善、CYP1A1 の発現増加抑制、末梢神経内の MAG タンパク質の発現低下抑制傾向がみられた。ケイヒの主な成分であるシンナムアルデヒドは AHR の標的遺伝子である CYP1A1

タンパク質の発現を阻害するとともに抗酸化ストレス作用が強いことが明らかになっている⁷⁾。前回の私たちの実験の結果でも、3 mg/kg のケイヒの摂取はベンゾピレンの毒性による症状に改善効果があることが確認されたことから、AHR の活性化抑制と抗酸化ストレス作用を持つケイヒは、ベンゾピレン投与により発生する AHR の活性化や酸化ストレスを抑制させることで、ベンゾピレ

ンの毒性による脱髄を抑制させ、神経異常を改善させる可能性があると考えられる。

結 論

本研究の結果から、ベンゾピレンの曝露による中毒は、末梢及び中枢神経の双方でその毒性により感覚異常を引き起こす可能性 (CYP1A1 の検討結果) が示唆された。しかし、その影響は中枢神経よりも末梢神経が受けやすいこと (MAG タンパク質の検討結果) が考えられた。また、抗酸化作用と AHR 活性阻害作用を持つケイヒ等の植物成分や生薬はダイオキシン類の曝露に効果的である可能性が示唆された。しかし、今回の研究でも中枢神経でのベンゾピレン等のダイオキシン類の作用を明確に調べる事ができなかったため、今後は脳神経内での感覚と関連する部位までの分析を通して中枢神経での影響まで検討する必要があると考えられる。

謝 辞

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金 (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、課題番号：21KA2003) の助成を受けたものである。ここに記して謝辞を表します。

参 考 文 献

- 1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxin, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disruptors what we have learned from Yusho disease. Environ Res. 86 : 2-11, 2001.
- 2) 岩下宏, 志田堅四郎, 増田義人 : 慢性油症患者における頭痛, 四肢異常感と血中 PCB. 福岡医誌. 68 : 139-144, 1977.
- 3) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司 : 油症患者における神経学的所見. 福岡医誌. 60 : 462-463, 1969.
- 4) 古谷博和, 大八木保政, 山田猛, 他 : 36 年以上経過した油症患者における神経症候. 福岡医誌. 96 : 152-156, 2005.
- 5) 申敏哲, 吉村恵 : ベンゾピレンの末梢神経および脊髄感覚系シナプス伝達に及ぼす作用に関する研究. 福岡医誌. 108 : 75-82, 2017.
- 6) 申敏哲, 行平崇, 小牧龍二, 他 : 感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討. 福岡医誌. 112 : 155-163, 2021.
- 7) Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, et al : Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. J Dermatol Sci, 85 : 36-43, 2017.
- 8) 植田弘師, 松本みさき : ニューロメーターを用いた新しい知覚線維選択的侵害受容評価法. 日本薬理学雑誌. 131 : 367-371, 2008.
- 9) 古谷博和, 大八木保政, 山田猛, 三好甫, 藤井直樹, 吉良潤一 : 36 年以上経過した油症患者における神経症候. 福岡医誌. 96 : 152-156, 2005.
- 10) Philips T and Rothstein JD: Oligodendroglia : metabolic supporters of neurons. J Clin Invest. 127 : 3271-3280, 2017.
- 11) 三井良之, 楠進 : 末梢神経の障害. 日本内科学会雑誌. 97 : 1771-1777, 2008.
- 12) Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, et al : Myelin in the Central Nervous System : Structure, Function, and Pathology. Physiol Rev. 99 : 1381-1431, 2019.
- 13) 三井良之, 楠進 : 末梢神経の障害. 日本内科学会雑誌. 97 : 1771-1777, 2008.
- 14) 荒記俊一, 村田勝敬 : 鉛による末梢神経障害の診断. 26 : 3-8, 1984.

(Received for publication March 15, 2023)

 原 著

チャイニーズハムスター肝ミクロゾームによる Tetrachlorobiphenyl の代謝

¹⁾中村学園大学栄養科学部
²⁾徳島文理大学香川薬学部薬物動態学講座
³⁾第一薬科大学薬学部
⁴⁾北海道医療大学薬学部病院薬学講座

太田千穂¹⁾, 加藤善久²⁾, 原口浩一³⁾, 藤井由希子³⁾, 木村 治⁴⁾, 古賀信幸¹⁾

In Vitro Metabolism of Tetrachlorobiphenyls by Chinese Hamster Liver Microsomes

Chiho OHTA¹⁾, Yoshihisa KATO²⁾, Koichi HARAGUCHI³⁾, Yukiko FUJII³⁾,
Osamu KIMURA⁴⁾ and Nobuyuki KOGA¹⁾

¹⁾*Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University, 5-7-1, Befu, Johnan-ku,
Fukuoka 814-0198*

²⁾*Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 1314-1 Shido,
Sanuki, Kagawa 769-2193*

³⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Daiichi University of Pharmacy, 22-1
Tamagawa, Minami-ku, Fukuoka, 815-8511*

⁴⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido,
1757 Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293*

Abstract

The *in vitro* metabolism of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (TCB) (CB52), 2,3',4',5'-TCB (CB70) and 3,3',4,4'-TCB (CB77) with liver microsomes of Chinese (CH) hamsters was studied and compared with those of Golden Syrian (GS) hamsters. It has been revealed that GS hamster liver microsomes produces two hydroxy (OH)-metabolites each from three TCB isomers and that phenobarbital (PB) pretreatment mainly increased 3-OH-metabolite of CB52 and CB70, whereas 3-methylcholanthrene pretreatment preferentially increased 4-OH-metabolite of CB52, CB70 and CB77. In this study, CH hamster liver microsomes produced only 4-OH-metabolite from both CB52 and CB70 and their metabolic activities were increased to about 4-fold of untreated microsomes by PB pretreatment. However, CH hamster liver microsomes had no activity for CB77. In addition, coumarin 7-hydroxylase activity, a characteristic activity of CYP2A enzymes, was also markedly induced by PB pretreatment. As with the report of Fukuhara and others, immunoblot analysis of CH hamster liver microsomes using anti-CYP2A14 antiserum confirmed that CYP2A14 was constitutive and PB-inducible. From these results, it was suggested that CH hamster is a unique animal different from GS hamster in terms of the mode of TCB metabolism and that CYP2A14 plays a major role as a 4-hydroxylase for CB52 and CB70 in CH hamster liver.

Key words : Chinese hamster ; liver microsomes ; tetrachlorobiphenyl ; metabolism; cytochrome P450 ; CYP2A14

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は、カネミ油症の原因物質であるとともに、世界的環境汚染物質としても知られているが、脂溶性が極めて高いことから、経口摂取されると、その大部分は小腸から吸収される。その後、肝臓に移行し、ここで主に薬物代謝酵素のチトクロム P450 (CYP) により一酸素原子が添加され、水酸化 (OH) 体に変換される。生成された OH 体の多くは胆汁を介して糞中へと排泄される¹⁾。一方、置換塩素数が 6~7 個以上の PCBs は CYP による代謝を受けにくくなり、血液、脂肪組織および肝臓などに高濃度で残留することになる。

ところで、PCBs の水酸化には、現在、3 つのサブファミリーに属する CYP 分子種が関与していることが明らかになっている²⁾。まず、CYP1A 酵素は、主に coplanar PCB, すなわち 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) (CB77)³⁾, 3,3',5,5'-TCB (CB80)⁴⁾, 2,3',4,5'-TCB (CB70)⁵⁾, などの *para* 位の水酸化を触媒する。次に、CYP2B 酵素は、*ortho* 位に塩素原子が 1~4 個置換した PCB, すなわち 2,2',5,5'-TCB (CB52)³⁾⁶⁾, CB70⁵⁾, 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (CB153)⁷⁾, 2,2',4,4',6,6'-hexaCB (CB155)⁸⁾, などの *meta* (3, 5, 3' あるいは 5') 位の水酸化を触媒する。さらに、CYP2A 酵素は、*meta-para* 位に隣接する 2 つの水素原子が置換している PCB, すなわち CB52⁹⁾¹⁰⁾, CB70⁵⁾, 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB101)¹¹⁾, 2,2',3,4,5',6-hexaCB (CB149)¹²⁾, などの *para* (4

あるいは 4') 位の水酸化を特異的に触媒する。

Chinese (CH) ハムスターの卵巣細胞は、バイオ医薬品 (ワクチン、抗体などのタンパク質の医薬品) の製造の際の宿主細胞として、非常に有名である¹³⁾¹⁴⁾。特に、抗体医薬品を製造する場合、約 80% の品目で本細胞が使用されている。これ以外にも、遺伝学、栄養学、毒性スクリーニングおよび遺伝子や組換えタンパク質の発現などの研究においても、広く用いられている。しかしながら、ラットやマウスに比べ、CH ハムスターの薬物代謝酵素に関する報告はほとんど見当たらない。Fukuhara らは、Golden Syrian (GS) ハムスターおよび CH ハムスターの肝薬物代謝酵素につき、系統差を調べている過程で、phenobarbital (PB) や 3-methylcholanthrene (MC) などの CYP 誘導剤に対する反応性が、両ハムスターで大きく異なることを見出した^{15)~20)}。すなわち、発がん物質 aflatoxin B₁ の代謝活性化や 7-ethoxycoumarin O-脱エチル化活性を調べると、GS ハムスターでは MC 前処理により顕著に促進されるのに対し、CH ハムスターでは PB 前処理により促進されることを報告した。その後、彼らは CH ハムスター肝から、主要な PB 誘導性の CYP 分子種を精製し、本酵素 (CYP2A14 と命名) が CYP2A 酵素の特徴である coumarin 7-水酸化活性²¹⁾ を有すること、また、前述の aflatoxin B₁ の代謝活性化や 7-ethoxycoumarin O-脱エチル化活性に強く関与することを明らかにした²²⁾。

我々はこれまでに、TCB 異性体、すなわち CB52, CB70, CB77, CB80 につき、GS ハムスター肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を調べ、

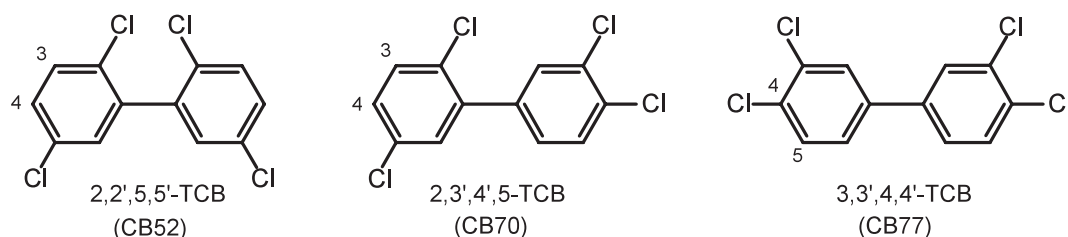


Fig. 1 Chemical structures of CB52, CB70 and CB77 used in this study.

CB52 および CB70 は、PB 誘導性の CYP2B 酵素により 3-OH 体へ、CB70、CB77 および CB80 は、MC 誘導性の CYP1A2 および CYP2A8 によって 4-OH 体へと代謝されることを報告した⁶⁾⁹⁾²³⁾。そこで本研究では、CB52、CB70 および CB77 につき、CH ハムスター肝 Ms による代謝を調べ、既報の GS ハムスターと比較した (Fig. 1)。CH ハムスター肝 Ms として、未処理 Ms とともに、PB および MC で前処理した肝 Ms を用いた。

実験方法

1. 実験材料

(1) TCB および代謝物

CB52 と CB70 は Hutzinger らの方法²⁴⁾ に従い、また、4-OH-CB52 は既報²³⁾ に従い合成した。3-OH-CB52 は吉村らの方法²⁵⁾、すなわち、CB52 (200 mg/kg) をラットに単回腹腔内投与した後、ラット糞から精製した。3-OH-CB70 と 4-OH-CB70 の合成は既報²⁶⁾ に従い行った。CB77 は Nakatsu らの方法²⁷⁾ により、5-OH-CB77 および 4-OH-3,5,3',4'-TCB (CB78) は、既報²⁸⁾ に従い、合成した。

(2) その他の試薬

PB (Na 塩) および MC は和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。Glucose-6-phosphate (G-6-P) および NADP⁺ はオリエンタル酵母株式会社 (東京) より、また、7-ethoxyresorufin (7-ER)、resorufin、coumarin、7-hydroxycoumarin および、G-6-P 脱水素酵素は Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) より購入した。トリメチルシリル (TMS) 化剤の *N,O*-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide はジエールサイエンス株式会社より購入した。その他の試薬は最も高い純度のものを用いた。

(3) 抗体

抗 CYP2A14 抗血清は、福原守男博士 (国立健康・栄養研究所) から供与された。抗ラット CYP2A2 抗血清は、第一化学薬品株式会社 (東京) から購入した。また、抗ラット CYP1A1 抗血清は既報⁴⁾ に従い、調製した。

(4) 実験動物の薬物処理

雄性の CH ハムスター (体重約 20 g) を、それぞれ未処理群、PB 前処理群および MC 前処理群の 3 群に分け、1 群 3 匹とした。PB-Na 塩は生理食塩水に溶解し 80 mg/kg/day の用量で、一方、

MC はコーン油に溶解し 20 mg/kg/day の用量で、いずれも 2 日間腹腔内に投与した。最終投与日の翌日に CH ハムスターを屠殺して、肝を摘出し、常法により肝 Ms を調製した。なお、これらの動物実験は中村学園大学の動物実験研究倫理審査委員会の承認を得た上で、「中村学園大学 (含む短期大学部) における実験動物のための指針」を遵守し実施した。

2. 肝 Ms による TCB 代謝

CH ハムスター肝 Ms による TCB の代謝は既報⁵⁾ に準じて行った。すなわち、40 μ M TCB を NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-P 脱水素酵素 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ および ハムスター肝 Ms (1 mg protein) を 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計 1 mL として、37°C で 20 min インキュベートした。その後、代謝物を chloroform-methanol (2:1) 1 mL および *n*-hexane 3 mL で 3 回ずつ抽出した。抽出液は TMS 化後、GC-ECD に付した。各 TCB 代謝物の TMS 誘導体の保持時間は次の通りである。3-OH-CB52 (8.27 min), 4-OH-CB52 (8.67 min), 3-OH-CB70 (8.78 min), 4-OH-CB70 (9.08 min), 5-OH-CB77 (11.37 min), 4-OH-CB78 (12.26 min)。なお、代謝物の定量は、各 TCB の検量線を用いて行った。

GC-ECD の条件は次の通りである。分析機器、電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ HP5890 Series II (Hewlett-Packard 製); カラム、DB-1 フューズドシリカキャピラリーカラム (15 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.33 μ m 膜厚, J&W Scientific 製); キャリアーガス, N₂ (1 mL/min); カラム温度, 200°C; 注入口温度, 250°C; 検出器温度, 250°C。

3. その他

肝 Ms のタンパク質の定量は、Lowry らの方法²⁹⁾ に従い行った。なお、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。また、総 CYP 含量、7-ER *O*-脱エチル化活性および coumarin 7-水酸化活性は、それぞれ Omura and Sato³⁰⁾, Prough ら³¹⁾ および Yamazaki ら³²⁾ の方法で測定した。肝 Ms の SDS-アクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロットティングは、

Table 1 Effect of CYP inducers on liver microsomal monooxygenases in CH and GS hamsters

CYP inducer	Total CYP content (nmol/mg protein)	7-ER <i>O</i> -deethylase (nmol/min/mg protein)	Coumarin 7-hydroxylase (nmol/min/mg protein)
<i>CH hamster</i> ^{a)}			
None	0.486 ± 0.027 (1.00)	0.063 ± 0.009 (1.00)	0.385 ± 0.047 (1.00)
PB	1.459 ± 0.339* (3.00)	0.124 ± 0.024* (1.99)	1.753 ± 0.480* (4.55)
MC	1.435 ± 0.153* (2.95)	0.572 ± 0.185* (9.13)	0.081 ± 0.012* (0.21)
<i>GS hamster</i> ^{b)}			
None	1.025 (1.00)	0.179 (1.00)	0.255 (1.00)
PB	1.502 (1.47)	0.114 (0.64)	0.341 (1.34)
MC	1.917 (1.87)	2.865 (16.00)	0.132 (0.52)

*Significantly different from the control, $p < 0.05$.

^{a)} Each value represents the mean ± S.D. of three CH hamsters and those in parentheses are the relative ratio to the control.

^{b)} The data were cited from our previous report²³⁾ and each value represents mean of duplicate determinations of pooled microsomes from ten GS hamsters. Coumarin 7-hydroxylase activity represents mean of duplicate determination of pooled microsomes from three GS hamsters.

Guengerich らの方法³³⁾で行った. CYP タンパクの免疫染色に用いたコニカイムノステインキットはコニカ(株)から購入した.

実験結果

1. 肝薬物代謝酵素に対する CYP 誘導剤の影響

Table 1 には, CH および GS ハムスター肝 Ms 中の総 CYP 含量, 7-ER *O*-脱エチル化活性および coumarin 7-水酸化活性に対する CYP 誘導剤の影響を示した. まず総 CYP 含量は, GS ハムスターでは, PB 前処理で未処理 Ms の 1.5 倍に, MC 前処理で 1.9 倍に増加したが, CH ハムスターでは, PB および MC のいずれによっても未処理の約 3 倍と有意に増加した. 次に, MC で誘導される CYP1A1 の特徴的な活性である 7-ER *O*-脱エチル化活性を比較すると, GS ハムスターでは MC 前処理により未処理 Ms の 16 倍に増加したが, CH ハムスターでも同様に, MC によって未処理 Ms の 9.1 倍に顕著に増加した. さらに, CYP2A 酵素の特徴的な活性である coumarin 7-水酸化活性は, GS ハムスターでは PB 前処理で

未処理の 1.3 倍であったが, CH ハムスターでは PB により未処理の 4.6 倍に増加した. しかし, 両ハムスターともに, MC 前処理により, それぞれ未処理の 21% および 52% と激減した.

2. CH ハムスター肝 Ms による CB52, CB70 および CB77 の代謝

CH ハムスター肝 Ms による TCB 代謝を調べ, GS ハムスターの結果と比較した. Fig. 2 には, CH ハムスター肝 Ms による CB52 代謝物の GC-ECD クロマトグラムを示した. その結果, 未処理, PB 前処理および MC 前処理の CH ハムスター肝 Ms において, 1 本の代謝物ピークがいずれも保持時間 8.67 min に検出された. このピークは PB 前処理により顕著に増加した. 標準品との比較から, 3-OH 体 (保持時間 8.27 min) ではなく, 4-OH 体の TMS 誘導体と保持時間が一致した. 同様に, TMS 誘導体として, CB70 の 3-OH 体と 4-OH 体は保持時間 8.78 min と 9.08 min に, CB77 の 5-OH 体と 4-OH 体は 11.37 min と 12.26 min に検出された. 以下, 各ピーク面積

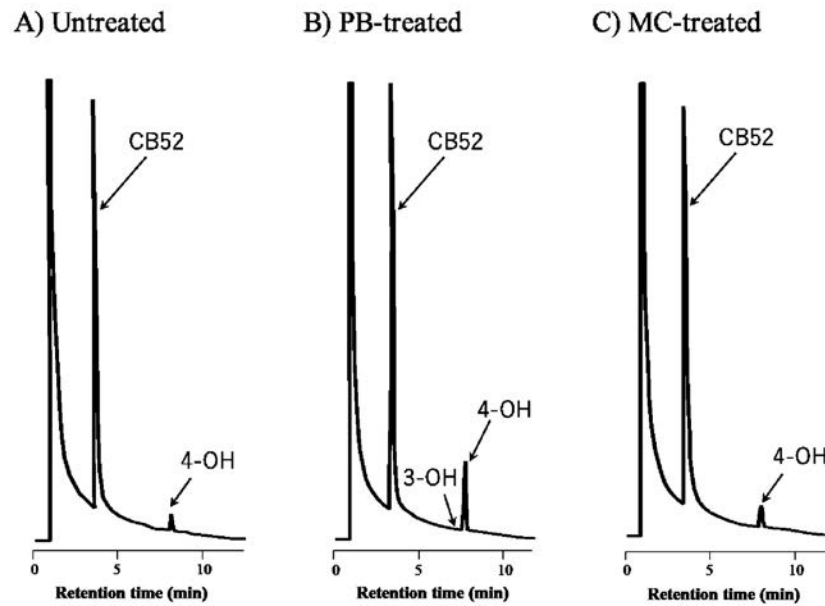


Fig. 2 GC-ECD chromatograms of the trimethylsilylated derivatives of CB52 metabolite by liver microsomes from untreated (A), PB-treated (B) and MC-treated (C) CH hamsters.

Table 2 Effects of CYP inducers on the metabolism of CB52, CB70 and CB77 by CH and GS hamster liver microsomes

CYP inducer	Metabolite formed (pmol/min/mg protein)					
	CB52		CB70		CB77	
	3-OH	4-OH	3-OH	4-OH	5-OH	4-OH
<i>CH hamster</i> ^{a)}						
None	N.D.	20.1 ± 3.3 (1.00)	N.D.	22.3 ± 4.2 (1.00)	N.D.	N.D.
PB	N.D.	68.0 ± 15.0* (3.38)	N.D.	83.0 ± 25.1* (3.73)	N.D.	N.D.
MC	N.D.	25.1 ± 2.8 (1.25)	N.D.	18.2 ± 0.4 (0.82)	N.D.	N.D.
<i>GS hamster</i> ^{b)}						
None	6.3 ± 0.5 (1.00)	5.6 ± 0.3 (1.00)	5.9 ± 1.4 (1.00)	46.8 ± 2.1 (1.00)	N.D.	N.D.
PB	20.1 ± 0.2* (3.19)	11.1 ± 0.3* (1.98)	40.7 ± 2.1* (6.90)	59.0 ± 2.3 (1.26)	0.9 ± 0.7	N.D.
MC	3.6 ± 0.4* (0.57)	15.2 ± 0.6* (2.71)	N.D.	96.4 ± 9.6* (2.06)	0.4 ± 0.1	3.6 ± 0.7

*Significantly different from the control, $p < 0.05$. N.D., not detected.

^{a)} Each value represents the mean ± S.D. of three CH hamsters and those in parentheses are the relative ratio to the control.

^{b)} The data were cited from our previous reports⁵⁾²³⁾ and each value represents the mean of triplicate determinations of pooled microsomes from ten GS hamsters.

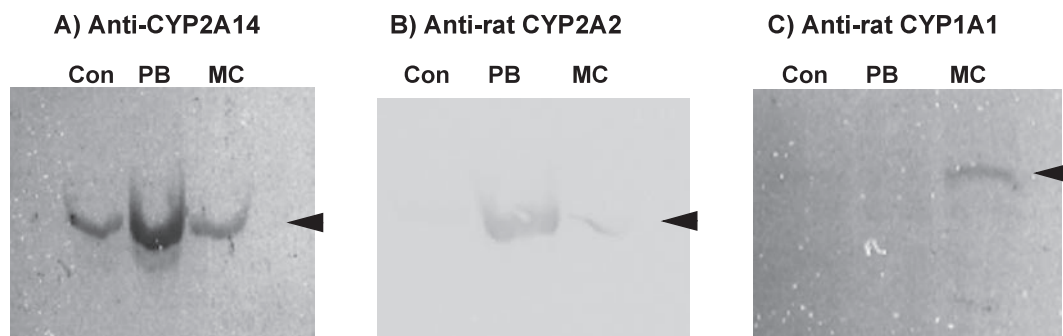


Fig. 3 Immunoblot analysis of liver microsomes from CYP inducers-treated CH hamsters with antiserum against CYP2A14 (**A**), rat CYP2A2 (**B**) and rat CYP1A1 (**C**). Lanes Con, PB and MC contain liver microsomes (10 μ g protein each) from untreated, PB-treated and MC-treated CH hamsters, respectively.

から生成量を算出した。

Table 2 に各 TCB 代謝物の定量結果を示した。その結果、CB52 および CB70 は非常によく似た代謝パターンを示した。すなわち、未処理、PB 前処理および MC 前処理のすべての CH ハムスター肝 Ms では 4-OH 体のみを生成した。また、この生成は PB 前処理により、CB52 で未処理の 3.4 倍、CB70 で未処理の 3.7 倍に顕著に増加した。一方、CB77 は、CH ハムスター肝 Ms では、全く代謝物は生成されなかった。これらの結果から、CH ハムスター肝 Ms による代謝は、GS ハムスターと大きく異なり、CB52 と CB70 に対して 3-水酸化ではなく、4-水酸化を触媒すること、これらの TCB 代謝活性は PB 誘導性酵素によって触媒されること、CB77 に対しては代謝活性を示さないことが明らかになった。

3. CH ハムスター肝 Ms の免疫染色

CH ハムスター CYP2A14, ラット CYP2A2 およびラット CYP1A1 に対する抗血清を用いて、CH ハムスター肝 Ms 中の CYP2A14 タンパクの検出を試みた。Fig. 3A に示すように、すべての CH ハムスター肝 Ms において、抗 CYP2A14 抗血清と交差反応するバンドが 1 本検出され、さらに、このバンドは PB 前処理 Ms で顕著に増加していた。また、抗ラット CYP2A2 抗血清を用いた場合にも同様に、PB 前処理 Ms で濃いバンドとして検出された (Fig. 3B)。なお、抗ラット CYP1A1 抗血清を用いた場合には、MC 前処理 Ms でのみ、1 本のバンドが検出された (Fig. 3C)。これらの結果から、CYP2A14 は CH ハムスター

肝 Ms において、構成的で PB 誘導性の CYP であることが確認された。

考 察

従来、PB は、ラット、マウス、GS ハムスター、モルモットおよびヒトなど、多くの動物肝において、CYP2B 酵素を顕著に誘導する代表的な CYP2B 誘導剤として知られている。これに対し、Fukuhara らは、GS ハムスターと全く異なり、CH ハムスター肝では、PB 前処理により、CYP2B 酵素が全く誘導されず、その代わり CYP2A 酵素が顕著に誘導されることを報告した¹⁸⁾²⁰⁾。本研究において、CH ハムスターを PB で前処理した際、最初の投与から 24 時間後も睡眠作用が継続していた。この事実は、Fukuhara らの報告と同様に、PB の代謝酵素 (CYP2B 酵素) が誘導されていない、あるいは極めて少ないことを示唆していると思われる。

今回、CH ハムスター肝 Ms による 3 種類の TCB の代謝を調べたところ、CB52 と CB70 に対し、4-OH 体のみを生成し、3-OH 体は全く生成されなかった。また、この活性は PB 前処理により、4 倍に増加した。さらに、この TCB 代謝の誘導パターンは、CYP2A 酵素の特徴的な活性である coumarin 7-水酸化活性の誘導パターンとよく一致していた。これらの結果から、CB52 と CB70 の 4-水酸化酵素として、CYP2A 酵素の関与が示唆された。さらに、抗 CYP2A14 抗血清を用いた免疫染色の結果、PB 前処理により、CYP2A14 タンパクが顕著に増加することが確認された。Fig. 4 に、CH ハムスターおよび GS ハム

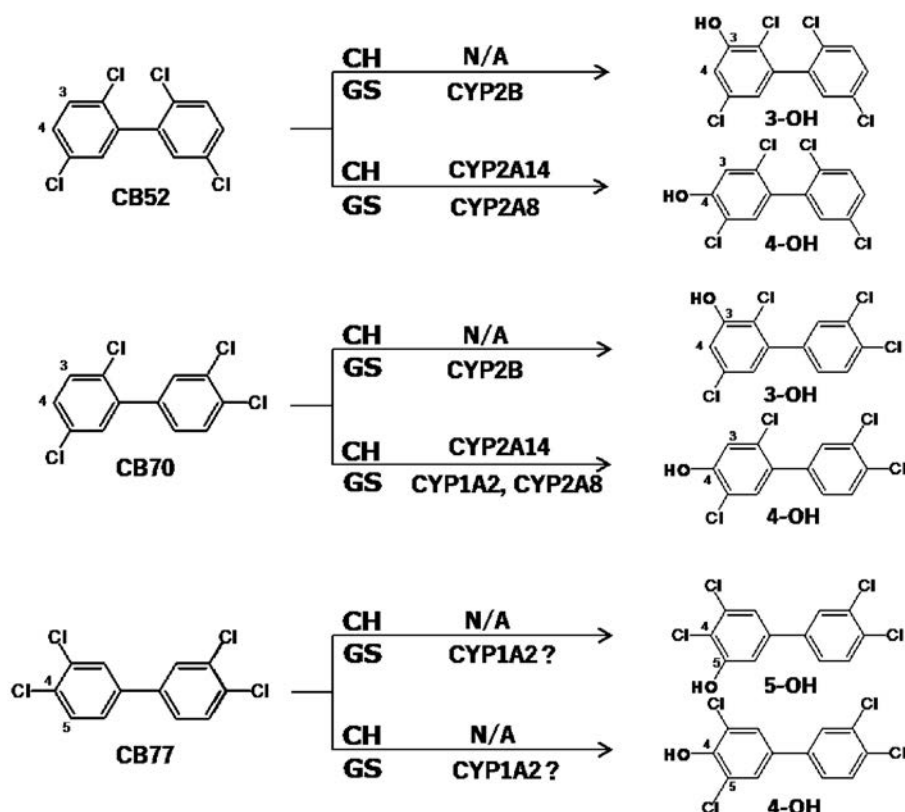


Fig. 4 Postulated metabolic pathways of CB52, CB70 and CB77 by CYP isoforms in CH and GS hamsters. N/A, not applicable.

スターの CYP 分子種による TCB 異性体の推定代謝経路を示したが、CH ハムスターにおける CB52 と CB70 の 4-水酸化は、CYP2A14 によって主に触媒されていることが示唆された。なお、CYP2A14 は coplanar PCB の CB77 に対しては代謝活性を有していなかった。

ヒト血中には、PCB 異性体だけではなく、それらの PCB 代謝物である 4-OH 体も、高濃度で検出されている³⁴⁾。4-OH 体のうち最も多いのは、4-OH-2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB187) で、次いで 4-OH-2,2',3,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB146) や 4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (CB107) が多い。これらの構造は、4 位水酸基の両隣 (3 および 5 位) に塩素が置換されているのが特徴であるが、現在のところ、これらの生成に関与するヒト CYP 分子種は特定されていない。前述のように、PCB の 4 位水酸化を触媒できる CYP としては、ラット CYP1A1、ラット CYP1A2 および GS ハムスター CYP2A8 が挙げられるが、CYP1A 酵素は主に

coplanar PCB を基質にしていることから、ヒト CYP2A 酵素が最有力であろう。最後に、現在、入手困難ではあるものの、このユニークな CH ハムスターを用いた検討により、今後、5 個以上の塩素が置換された高残留性 PCB 異性体の代謝研究がさらに進展することが期待される。

総括

- 3 種類の TCB (CB52, CB70 および CB77) につき、CH ハムスター肝 Ms による代謝を調べ、GS ハムスターと比較した。CB52 と CB70 の代謝について、GS ハムスター肝 Ms では、両 PCB から 3-および 4-OH 体が生成されたが、CH ハムスター肝 Ms では、両 PCB のいずれから 4-OH 体のみが生成された。また、この代謝活性は GS ハムスターでは MC 前処理で増加したが、CH ハムスターでは PB 前処理により著しく増加した。一方、coplanar PCB の CB77 は、CH ハムスター肝 Ms により全く代謝されなかった。

2. CH ハムスター肝 Ms が有する CB52 と CB70 に対する 4-水酸化活性の CYP 誘導剤による誘導パターンは, coumarin 7-水酸化活性のそれとよく一致していた.
3. 抗 CYP2A14 抗体および抗ラット CYP2A2 抗体を用いた免疫染色の結果, CH ハムスター肝 Ms 中の CYP2A14 タンパクは, CB52 および CB70 の 4-水酸化活性と一致して, PB 前処理により顕著に増加した.

以上の結果から, Fukuhara らにより報告された PB 誘導性の CH ハムスター CYP2A14 は, CB52 および CB70 の 4-水酸化反応を特異的に触媒することが示唆された.

謝 辞

本研究は厚生労働行政推進調査事業費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業, 21KA2003 太田千穂)および JSPS 科研費(JP20K12188 原口浩一, JP21K12262 藤井由希子)の助成を受けたものです. ここに記して謝意を表します.

参 考 文 献

- 1) 古賀信幸, 吉村英敏: PCB と関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編: 油症研究—30 年の歩み—. pp. 93-110, 九州大学出版会, 2000.
- 2) 古賀信幸, 太田千穂: 高残留性 PCB の代謝と代謝物の毒性. 古江増隆, 赤峰昭文, 山田英之, 吉村健清編: 油症研究 II—治療と研究の最前線—. pp. 200-218, 九州大学出版会, 2010.
- 3) Ishida C, Koga N, Hanioka H, Saeki HK and Yoshimura H: Metabolism in vitro of 3,4,3',4'- and 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyls by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P-450. J Pharmacobio-Dyn. 14 : 276-284, 1991.
- 4) Koga N, Nishimura N, Kuroki H, Masuda Y and Yoshimura H: Metabolism of 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P4501A1. Xenobiotica. 24 : 775-783, 1994.
- 5) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H: Metabolism of 2,3',4',5'-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. Chemosphere. 37 : 1985-1904, 1998.
- 6) Koga N, Kikuichi N, Nishimura N, Hara T, Harada N, Ishii Y, Yamada H, Oguri K and Yoshimura H: Purification and characterization of a newly identified isoform of cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl in hamster liver. Arch Biochem Biophys. 312 : 464-470, 1995.
- 7) Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, Yoshimura H and Funae Y: Metabolism of highly persistent PCB congener, 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. Biochem Biophys Res Commun. 212 : 455-460, 1995.
- 8) 太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村治, 古賀信幸: 2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル (PCB155) のラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム, およびヒトチトクロム P450 による代謝. 福岡医誌. 112 : 127-135, 2021.
- 9) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H: Hamster liver cytochrome P450 (CYP2A8) as a 4-hydroxylase for 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. Biochem Biophys Res Commun. 225 : 685-688, 1996.
- 10) Shimada T, Kakimoto K, Takenaka S, Koga N, Uehara S, Murayama N, Yamazaki H, Kim D, Guengerich FP and Komori M: Roles of human CYP2A6 and monkey CYP2A24 and 2A26 cytochrome P450 enzymes in the oxidation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. Drug Metab Dispos. 44 : 1899-1909, 2016.
- 11) McGraw SrJE and Waller DP: Specific human CYP450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC#101). Biochem Biophys Res Commun. 344 : 129-133, 2006.
- 12) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 藤井由希子, 木村治, 古賀信幸: 2,2',3,4',5',6'-六塩素化ビフェニル (CB149) のラット, ハムスター, モルモットおよびヒトにおける *in vitro* 代謝の比較研究. 福岡医誌. 114 : 31-39, 2023.
- 13) 山野-足立範子: 組換えタンパク質を生産するための優れた宿主細胞とは. 生産と技術. 73 : 68-71, 2021.
- 14) 大政健史: バイオ医薬品製造の研究開発はどう進めるべきか—技術研究組合の事例から考える. Yakugaku Zasshi. 142 : 723-729, 2022.
- 15) Mizokami K, Nohmi T, Fukuhara M, Takanaka A and Omori Y: Purification and characterization of a form of cytochrome P-450 with high specificity for aflatoxin B₁ from 3-methylcholanthrene-treated hamster liver. Biochem Biophys Res Commun. 139 : 466-472, 1986.
- 16) Fukuhara M, Mizokami K, Sakaguchi M, Niimura Y, Kato K, Inouye S and Takanaka A: Aflatoxin B₁-specific cytochrome P-450 isozyme (P-450-AFB) inducible by 3-methylcholanthrene in Golden hamsters. Biochem Pharmacol.

- 39 : 463-469, 1990.
- 17) Antignac E, Fukuhara M, Kimura M and Ushio F : Clotrimazole-induced modulation of hepatic cytochrome P450 enzymes in Syrian and Chinese hamsters. *Biochem Pharmacol.* 44 : 2266-2270, 1992.
 - 18) Fukuhara M, Antignac E, Fukusen N, Kato K and Kimura M : Characterization of cytochrome P450-monooxygenases of Chinese hamsters with respect to aflatoxin B₁ activation. *Toxicology.* 93 : 165-173, 1994.
 - 19) Ushio F, Antignac E, Fukuhara M and Kimura M : Differential induction of cytochrome P-450 isozymes by rifampicin in the Chinese hamster, *Cricetus griseus*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 12 : 163-168, 1995.
 - 20) Fukuhara M, Sun B, Kato K, Kimura M and Yamazaki S : Cytochrome P450 isoforms catalyzing benzo [a] pyrene metabolism in the Chinese hamster liver. *Toxicol Lett.* 110 : 85-93, 1999.
 - 21) Pearce R, Greenway D and Parkinson A : Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes : effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Arch Biochem Biophys.* 298 : 211-225, 1992.
 - 22) Fukuhara M, Kurose K, Aiba N, Matsunaga N, Omata W, Kato K and Kimura M : A major phenobarbital inducible P450 isozyme, CYP2A14, in the Chinese hamster liver : purification, characterization, and cDNA cloning. *Arch Biochem Biophys.* 359 : 241-248, 1998.
 - 23) Koga N, Kikuichi-Nishimura N and Yoshimura H : Effect of cytochrome P450 inducers on liver microsomal metabolism of tetrachlorobiphenyls in rats, guinea pigs and hamsters. *Biol Pharm Bull.* 18 : 705-710, 1995.
 - 24) Hutzinger O, Safe S and Zitko V : Polychlorinated biphenyls : Synthesis of some individual chlorobiphenyls. *Bull Environ Contamin Toxicol.* 6 : 209-219, 1971.
 - 25) 吉村英敏, 山本弘明, 米沢和明 : PCB の代謝に関する研究 (第 7 報) 2,5,2',5'-テトラクロロビフェニルのラットにおける代謝. 福岡医誌. 66 : 555-562, 1975.
 - 26) Koga N, Shin'yama A, Ishida C and Yoshimura H : A new metabolite of 2,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in rat feces. *Chem Pharm Bull.* 40 : 3338-3339, 1992.
 - 27) Nakatsu K, Brien JF, Taub H, Racz WJ and Marks GC : Gram quantity synthesis and chromatographic assessment of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *J Chromatogr.* 239 : 97-106, 1982.
 - 28) Yoshimura H, Yonemoto Y, Yamada H, Koga N, Oguri K and Saeki S : Metabolism *in vivo* of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats. *Xenobiotica.* 17 : 897-910, 1987.
 - 29) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 : 265-275, 1951.
 - 30) Omura T and Sato R : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J Biol Chem.* 239 : 2379-2385, 1964.
 - 31) Prough RA, Burke MD and Mayer RT : Direct fluorometric methods for measuring mixed function oxidase activity. *Methods Enzymol.* 102 : 372-377, 1978.
 - 32) Yamazaki H, Mimura M, Sugahara C and Shimada T : Catalytic roles of rat and human cytochrome P450 2A enzymes in testosterone 7 α - and coumarin 7-hydroxylations. *Biochem Pharmacol.* 48 : 1524-1527, 1994.
 - 33) Guengerich FP, Wang P and Davidson NK : Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P-450 in rats, rabbits, and human using immunochemical staining coupled with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry.* 21 : 1698-1706, 1982.
 - 34) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuroki H : Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ Health Perspect.* 102 : 464-469, 1994.

(Received for publication March 17, 2023)

原 著

**2,2',3,4',5',6-六塩素化ビフェニル (CB149) のラット, ハムスター,
モルモットおよびヒトにおける *in vitro* 代謝の比較研究**

¹⁾中村学園大学栄養科学部

²⁾第一薬科大学薬学部

³⁾徳島文理大学香川薬学部薬物動態学講座

⁴⁾北海道医療大学薬学部病院薬学講座

太田千穂¹⁾, 原口浩一²⁾, 加藤善久³⁾, 藤井由希子²⁾, 木村 治⁴⁾, 古賀信幸¹⁾

**Comparative Study on the *in Vitro* Metabolism of 2,2',3,4',5',6-
Hexachlorobiphenyl (CB149) in Rats, Hamsters,
Guinea Pigs and Humans**

Chiho OHTA¹⁾, Koichi HARAGUCHI²⁾, Yoshihisa KATO³⁾, Yukiko FUJII²⁾,
Osamu KIMURA⁴⁾ and Nobuyuki KOGA¹⁾

¹⁾*Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University, 5-7-1,
Befu, Johnan-ku, Fukuoka 814-0198*

²⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Daiichi University of Pharmacy, 22-1 Tamagawa,
Minami-ku, Fukuoka, 815-8511*

³⁾*Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 1314-1
Shido, Sanuki, Kagawa 769-2193*

⁴⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, 1757
Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293*

Abstract

The *in vitro* metabolism of 2,2',3,4',5',6-hexachlorobiphenyl (CB149) was examined using liver microsomes of rats, hamsters, guinea pigs and humans. Three metabolites (M1, M2 and M3) were produced common to animals and humans and M1 was a major metabolite in all microsomes used in this study. Pretreatment of phenobarbital (PB) resulted in the marked increase of M1, M2 and M3 in all animals. In PB-treated animals, M1 production increased 253-, 11- and 2.4-fold of untreated in rats, hamsters and guinea pigs, respectively. Moreover, the order of M1 production was rats >> hamsters > guinea pigs (46 : 5 : 1). In 3-methylcholanthrene-treated animals, M1 production was the same or less than that of untreated animals. GC-MS determined M1, M2 and M3 to be 5-hydroxy (OH)-, 4-OH- and 4,5-diOH-CB149, respectively. Human liver microsomes prepared individually from fifteen Caucasians exhibited quite similar metabolic patterns. However, there was about 6-fold inter-individual variation in the amounts of total metabolites. When the correlation coefficients between the amount of CB149 metabolites generated and the enzymatic activities of CYP isoforms were determined, the production of 5-OH- and 4,5-diOH-CB149 was significantly correlated with both activities of CYP2B6 and CYP3A4, and the production of 4-OH-CB149 was significantly correlated with CYP2A6 activity. So, when we actually investigated the metabolic activity using twelve CYP isoforms, CYP2B6 and CYP2A6 catalyzed the formation of 5-OH- and 4-OH-CB149, respectively.

However, CYP3A4 showed no activity. From these findings, it was suggested that CYP2B and CYP2A enzymes play an important role in CB149 metabolism in animals and humans.

Key words : CB149, metabolism, cytochrome P450, rat, hamster, human

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は、カネミ油症の原因物質であるとともに、世界的環境汚染物質としても知られているが、脂溶性が極めて高いことから、ヒトの血液、脂肪組織および肝臓などから、高濃度で検出される。PCB 異性体の中でも、置換塩素数が6個以上で、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するもの、すなわち2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (CB153), 2,2',3,4,4',5'-hexaCB (CB138), 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (heptaCB) (CB180), 2,2',3,3',4,4',5-heptaCB (CB170) および2,3,3',4,4',5-hexaCB (CB156) などは、ほとんど代謝されないため、ヒト血液中で特に高濃度で検出されている^{1)~3)}。Todaka らは、日本人の健常者と油症患者の血中 PCB 異性体濃度を調べ、日本人健常者でも上記と全く同様の PCB 異性体が検出されること、さらには油症患者では健常者の3~4倍多く残留していることを報告した⁴⁾。

一方、PCB 異性体のうち、置換塩素数が4個以下のもの、または置換塩素数が5個以上でもビフェニル骨格の *meta-para* 位に隣接する水素が置換されたものは、肝小胞体に局在するチトクロム P450 (CYP) により、比較的容易に水酸化され、胆汁を介して糞中へと排泄される⁵⁾。最近、我々は2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体が、前述の難代謝性 PCB 異性体と比べ、置換塩素数にかかわらず、*meta* (3, 3', 5あるいは5') 位の水酸化を非常に受けやすいことを新たに見出している^{6)~8)}。

本研究の2,2',3,4',5',6-hexaCB (CB149) は六塩素化 PCB であるが、*meta-para* (5,4) 位に隣接する水素を有することから、代謝されやすく、そのため残留性は低いと考えられる。事実、三村らは油症原因油中の CB149 濃度が総 PCB の0.5~0.7%であるのに対し、油症患者の血液中および

母乳中の CB149 濃度が0.01~0.05 ppb と非常に低いことを報告している⁹⁾¹⁰⁾。また、前出の Todaka らは油症患者および健常者の血液中に、CB149 は全く検出されないと報告している⁴⁾。これらの事実は、CB149 がヒトにおいて、容易に代謝され、排泄されることを示唆している。一方、我々は PCB 混合物のカネクロール 500 をラット、ハムスターおよびモルモットに腹腔内投与し、投与後5日目の肝臓および血液中の CB149 代謝物を調べたところ、ハムスター血液中に、カテコール体の4,5-dihydroxy (diOH)-CB149 が高濃度検出されること、また、モルモット肝臓では特に、CB149 のメチルスルホン体が高濃度検出されることを報告した¹¹⁾¹²⁾。これらの代謝物は、まず CYP により一酸素原子が添加された後、さらに連続して水酸化されたり、あるいはグルタチオン抱合を受けたりして、最終的に生成されと考えられる。

PCB 代謝に関与する CYP 分子種として3種類のサブファミリーに属するものが報告されている¹³⁾。CYP1A 酵素 (ラット CYP1A1¹⁴⁾) は、コプラナー PCB の *para* (4あるいは4') 位の水酸化を、CYP2B 酵素 (ラット CYP2B1¹⁵⁾, ハムスター CYP2B¹⁶⁾, モルモット CYP2B18¹⁷⁾, ヒト CYP2B6^{18)~20)}) は *meta* (3, 3', 5あるいは5') 位の水酸化を、さらに CYP2A 酵素 (ハムスター CYP2A8²¹⁾, ヒト CYP2A6²⁰⁾²²⁾²³⁾) は *para* (4あるいは4') 位の水酸化を触媒する。一方、CB149 の代謝酵素に関する報告はほとんどない。

そこで本研究では、ラット、ハムスター、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム (Ms) を用いて、CB149 代謝、特にカテコール体の生成機構について検討を加えた。動物肝 Ms として、未処理 Ms とともに、代表的な CYP 誘導剤として知られている phenobarbital (PB) および3-methylcholanthrene (MC) で前処理した動物肝 Ms を用いた。また、ヒト CYP 分子種についても検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) CB149 の合成

CB149 は Cadogan の方法²⁴⁾ で合成した。すなわち、2,4,5-trichloroaniline 1.0 g および 1,2,4-trichlorobenzene 3.0 g を tetrachloroethylene 10 mL で溶解し、さらに isopentyl nitrite 0.5 mL を加えて、110℃で24時間反応させた。反応物はアルミナカラム (100 g, Merck) およびシリカゲルカラム (80 g, Merck) で部分精製した後、HPLC にて精製した。HPLC 条件は次の通りである。分取用カラム, ODS カラム (250 × 20 mm i.d., 5 μm, YMC 製); プレカラム, ODS プレカラム (50 × 20 mm i.d., YMC 製); 移動相, acetonitrile; 流速, 4 mL/min; 検出波長, 254 nm. なお, CB149 の化学構造は GC-MS により決定した。得られた CB149 の純度は, 97.8% であった。

CB149 : MS (EI) m/z (relative intensity, %) : 358 (100) [M^+], 360 (181) [$M^+ + 2$], 362 (155) [$M^+ + 4$], 364 (73) [$M^+ + 6$], 366 (15) [$M^+ + 8$], 323 (33) [$M^+ - Cl$], 288 (85) [$M^+ - Cl_2$].

(2) 代謝物の合成

5-Methoxy (MeO)-CB149 は Cadogan の方法²⁴⁾ で合成した。すなわち、2,4,5-trichloroaniline 1.0 g を、2,4,5-trichloroanisole (東京化成) 2.0 g とともに、tetrachloroethylene 10 mL で溶解し、さらに isopentyl nitrite 0.5 mL を加えて、110℃で24時間反応させた。その後、chloroform にて抽出した。抽出物はアルミナカラム (100 g, Merck) およびシリカゲルカラム (80 g, Merck) で部分精製した後、分取用 HPLC を行い、5-MeO-CB149 を精製した。次に、5-OH-CB149 は、5-MeO-CB149 を脱メチル化して得た。5-MeO-CB149 を dichloromethane で溶解し、17%三臭化ホウ素 (和光純薬) を加えて密封し、室温で5時間攪拌した。その後、GC-MS により脱メチル化の確認を行った。

一方、4-OH-CB149 の合成は Hutzinger らの方法²⁵⁾ で行った。すなわち、2,4,5-trichloroaniline 1.0 g を濃塩酸で塩酸塩とした後、亜硝酸ナトリウム飽和水溶液を滴下し、これに acetonitrile に溶解した 2,3,5-trichlorophenol (東京化成) 2.0 g を加えて、110℃, 2時間反応させた。その

後、chloroform にて抽出し、次に 2M 水酸化ナトリウムで逆抽出を行い、濃塩酸で弱酸性とした後、再び chloroform で抽出した。抽出物はアルミナカラム (100 g, Merck) で部分精製した後、上記と同様な条件で HPLC を行って 4-OH-CB149 を分離精製した。また、GC-MS 用標準品 4-MeO-CB149 は、4-OH-CB149 を diazomethane でメチル化して得た。

5-MeO-CB149 : MS (EI) m/z (relative intensity) : 388 (100) [M^+], 390 (191) [$M^+ + 2$], 392 (158) [$M^+ + 4$], 394 (47) [$M^+ + 6$], 396 (16) [$M^+ + 8$], 373 (7) [$M^+ - CH_3$], 345 (26) [$M^+ - COCH_3$], 338 (15) [$M^+ - CH_3Cl$], 275 (43) [$M^+ - COCH_3Cl_2$].

4-MeO-CB149 : MS (EI) m/z (relative intensity) : 388 (100) [M^+], 390 (188) [$M^+ + 2$], 392 (149) [$M^+ + 4$], 394 (68) [$M^+ + 6$], 396 (16) [$M^+ + 8$], 373 (4) [$M^+ - CH_3$], 345 (28) [$M^+ - COCH_3$], 275 (36) [$M^+ - COCH_3Cl_2$].

4,5-diMeO-CB149 の合成は、Haraguchi らの方法¹¹⁾ に準じて行った。すなわち、4-aminoveratrole を、isopentyl nitrite を用いて 1,2,4-trichlorobenzene とジアゾカップリングした。次に、veratrole 側のベンゼン環の 2,3,6 位を塩素化するため、得られた三塩素化 PCB veratrole 体の混合物を、さらに塩酸下で塩素酸ナトリウムを用いて塩素化した。最終的に、上記の分取カラムにより分離精製した。

合成標品および代謝物の分子量は、GC-MS 2000 (島津製作所) を用いて、EI モードで測定した。分析条件は次の通りである。カラム, DB-1 フューズドシリカキャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 70℃ (1.5 min) - 20℃/min - 230℃ (0.5 min) - 4℃/min - 280℃ (5 min); 注入口温度, 250℃; キャリアーガス, He (1 mL/min).

(3) 実験動物の薬物処理

雄性的 Wistar 系ラット (体重約 260 g), Hartley 系モルモット (体重約 280 g), および Golden Syrian 系ハムスター (体重約 90 g) を、それぞれ未処理群, PB 前処理群および MC 前処理群の 3 群に分け、1 群 4 匹とした。PB-Na 塩は生理食塩水に溶解し 80 mg/kg/day の用量で、一方、MC はコーン油に溶解し 20 mg/kg/day の用量で、いず

れも3日間腹腔内に投与した。最終投与日の翌日に実験動物を屠殺して、肝を摘出し、常法により肝 Ms を調製した。なお、これらの動物実験は中村学園大学の動物実験研究倫理審査委員会の承認を得た上で、「中村学園大学(含む短期大学部)における実験動物のための指針」を遵守し実施した。

(4) ヒト肝 Ms およびヒト CYP 分子種

ヒト肝 Ms は、白人男性9名(HG32, HG74, HH74, HH81, HG64, HG18, HH37, HH715, HH741)および白人女性6名(HH77, HH91, HH101, HK37, HG3, HG43)から個人別に調製されたものを BD Gentest 社(Woburn, MA, USA)より購入した。相関係数を算出するのに必要なヒト肝 Ms 中の各 CYP 分子種の酵素活性は、添付書類のデータを使用した。また、ヒトリンパ芽球様細胞発現系の CYP 分子種10種類(CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4)および昆虫バキュロウイルス系の CYP1B1 と CYP3A5 は BD Gentest 社(Woburn, MA, USA)から購入した。

2. 肝 Ms による代謝

動物肝 Ms による CB149 の代謝は既報⁶⁾に準じて行った。すなわち、40 μ M CB149 を NADPH 生成系(0.33 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ および動物肝 Ms (1 mg protein) を 100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)とともに合計 1 mL として、37℃で20分間インキュベート後、代謝物を chloroform-methanol (2:1) 1 mL および *n*-hexane 3 mL で3回ずつ抽出した。ヒト肝 Ms の場合には、スケールをすべて半量として、またインキュベーション時間を30分間として、同様に行った。抽出液は diazomethane でメチル化後、GC-ECD または GC-MS に付した。代謝物の定量は、CB149 の検量線を用いて行った。

GC-ECD の条件は次の通りである。分析機器、ECD 付 HP5890 Series II ガスクロマトグラフ(Hewlett-Packard 製)；カラム、DB-1 フューズドシリカキャピラリーカラム(30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製)；オープン温度、230℃；注入口温度、250℃；検出器温度、250℃；キャリアーガス、N₂ (1 mL/min)。

3. ヒト CYP 分子種による代謝

40 μ M CB149, NADPH 生成系(0.33 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ およびヒト CYP 分子種(0.5 mg protein) を 100 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.4)とともに合計 0.5 mL として、37℃で60分間インキュベート後、代謝物を chloroform-methanol (2:1) 0.5 mL および *n*-hexane 1.5 mL で3回ずつ抽出した。抽出液は diazomethane でメチル化後、GC-ECD または GC-MS に付した。代謝物の定量は、CB149 の検量線を用いて行った。

4. その他

肝 Ms のタンパク質の定量は、Lowry らの方法²⁶⁾に従って行った。なお、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

実験結果

1. ラット肝 Ms による代謝と代謝物の化学構造

Fig. 1 には、3種類のラット肝 Ms により生成された CB149 代謝物(メチル誘導体)の GC-ECD クロマトグラムを示す。未処理ラット肝 Ms では、保持時間 17.18 min に代謝物 M1 が1種類のみ検出された。PB 前処理 Ms では、3種類の代謝物が生成された。特に M1 と M3 (保持時間 19.58 min) は顕著に増加し、さらに、M1 につづき、M2 が微量であるが、保持時間 18.18 min に検出された。MC 前処理 Ms では M1 と M3 が検出された。

次に、CB149 代謝物の化学構造を決定するため、PB 前処理ラット肝 Ms で生成された代謝物(メチル誘導体)を GC-MS に供した。その結果、M1 および M2 のメチル誘導体は、いずれも分子量 388 を有することから、両者とも OH 体であること、また、M3 のメチル誘導体は分子量 418 を有することから、diOH 体であることが示唆された(Table 1)。別途合成した予想代謝物と比較したところ、分子量、マスフラグメンテーションおよび保持時間から、M1, M2 および M3 のメチル誘導体はそれぞれ、5-MeO-CB149, 4-MeO-CB149 および 4,5-diMeO-CB149 とほぼ完全に一致した。以上の結果から、M1 は 5-OH 体、M2 は 4-OH 体、M3 は 4,5-diOH 体であることが明らかになった。

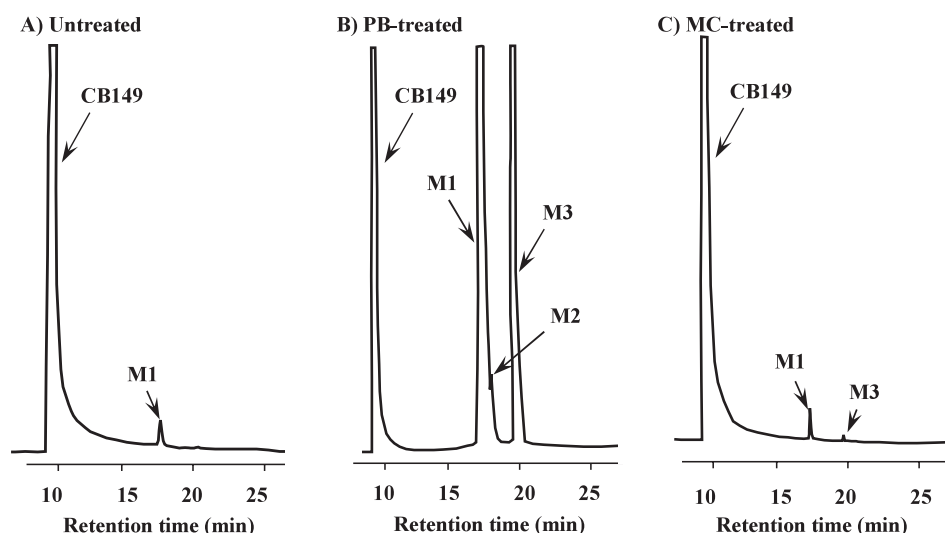


Fig. 1 GC-ECD chromatograms of the methylated derivatives of CB149 metabolites formed by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B) and MC-treated (C) rats.

Table 1 GC-MS data and retention times of the methylated derivatives of three CB149 metabolites and their 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	358	100	-	32	-	-	74	11.95
M1	388	100	6	-	30	17	-	14.89
M2	388	100	2	-	33	-	-	15.13
M3	418	100	29	-	22	-	-	15.61
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

-, not detected.

2. 肝 Ms による CB149 代謝の動物種差

ラット、ハムスターおよびモルモット肝 Ms による CB149 代謝を比較した (Table 2). 代謝物の定量は CB149 の検量線を用いて行った. その結果, 未処理肝 Ms では, すべての動物で 5-OH 体の低い生成活性しか示さなかった (6~15 pmol/min/mg protein). 次に, PB 前処理肝 Ms では, ラットの場合, 5-OH 体の生成活性は未処理 Ms の 253 倍に顕著に増加した. また, ハムスターでは 11 倍に, モルモットでは 2.4 倍に増加した. さらに, すべての動物で新たに 4-OH 体および 4,5-diOH 体の生成活性も見られ, 活性の強さはラット ≫ ハムスター > モルモットの順であった.

特に, ラットでの 4,5-diOH 体の生成活性は 452 pmol/min/mg protein と高かった. 一方, MC 前処理肝 Ms では, いずれの動物でも 5-OH 体が生成されたが, その活性は未処理 Ms と同程度か, あるいは減少した. また, ハムスターでは弱いながらも 4-OH 体が生成された.

このように, すべての動物において, PB 前処理により, CB149 代謝が強く促進されたが, 次に, 一次代謝物の 5-OH-CB149 および 4-OH-CB149 を基質として用い, これらから 4,5-diOH-CB149 への生成を比較した (Table 3). 酵素源としてラット肝 Ms を用いた. 未処理 Ms では 5-OH-CB149 からのみ, 低いながらも 4,5-diOH-CB149

Table 2 *In vitro* metabolism of CB149 by liver microsomes of rats, hamsters and guinea pigs and the effects of CYP inducers on CB149 metabolism

Treatment	Metabolite formed (pmol/min/mg protein)		
	5-OH (M1)	4-OH (M2)	4,5-diOH (M3)
Rat			
Untreated	6.3 ± 2.6 (1.0)	N.D.	N.D.
PB-treated	1596 ± 116* (253)	36.3 ± 2.9*	452 ± 166*
MC-treated	10.3 ± 4.2 (1.6)	N.D.	N.D.
Hamster			
Untreated	14.6 ± 1.4 (1.0)	N.D.	N.D.
PB-treated	158 ± 23.1* (10.9)	11.4 ± 2.9*	13.3 ± 4.0*
MC-treated	9.8 ± 4.8 (0.7)	3.3 ± 1.3*	N.D.
Guinea pig			
Untreated	14.5 ± 4.6 (1.0)	N.D.	N.D.
PB-treated	34.6 ± 4.5* (2.4)	1.3 ± 1.1	2.8 ± 1.4*
MC-treated	6.1 ± 1.6* (0.4)	N.D.	N.D.

N.D., not detected.

Each value represents the mean ± S.D. of four animals and those in parentheses are the relative ratio of untreated animals.

*Significantly different from untreated animals ($p < 0.05$).**Table 3** Production of 4,5-diOH-CB149 from 5-OH- and 4-OH-CB149 by rat liver microsomes

Treatment	4,5-diOH-CB149 formed (pmol/min/mg protein)	
	from 5-OH-CB149	from 4-OH-CB149
Untreated	45.5 ± 11.7 (1.0)	N.D.
PB-treated	2236 ± 216* (49.1)	1125 ± 242*
MC-treated	N.D.	N.D.

N.D., not detected.

Each value represents the mean ± S.D. of four rats and those in parentheses are the relative ratio of untreated rats.

*Significantly different from untreated rats ($p < 0.05$).

の生成活性が観察された。次に、PB 前処理 Ms では、5-OH-および 4-OH-CB149 を基質にした場合、それぞれ 2,236 および 1,125 pmol/min/mg protein の高い活性を示し、CB149 を基質にした場合に比べ、それぞれ 4.9 倍および 2.5 倍であった。以上の結果より、4,5-diOH-CB149 生成における基質特異性は、5-OH-CB149 > 4-OH-CB149 > CB149 の順となった。なお、MC 前処

理 Ms ではいずれの OH 体からも 4,5-diOH 体は生成されなかった。

3. ヒト肝 Ms による代謝

白人男性 9 名と白人女性 6 名の肝 Ms を用いて、CB149 の代謝を個人別に調べた。反応は 37℃、60 分間行った。CB149 の検量線から、各代謝物を定量した。その結果、Fig. 2 に示すように、す

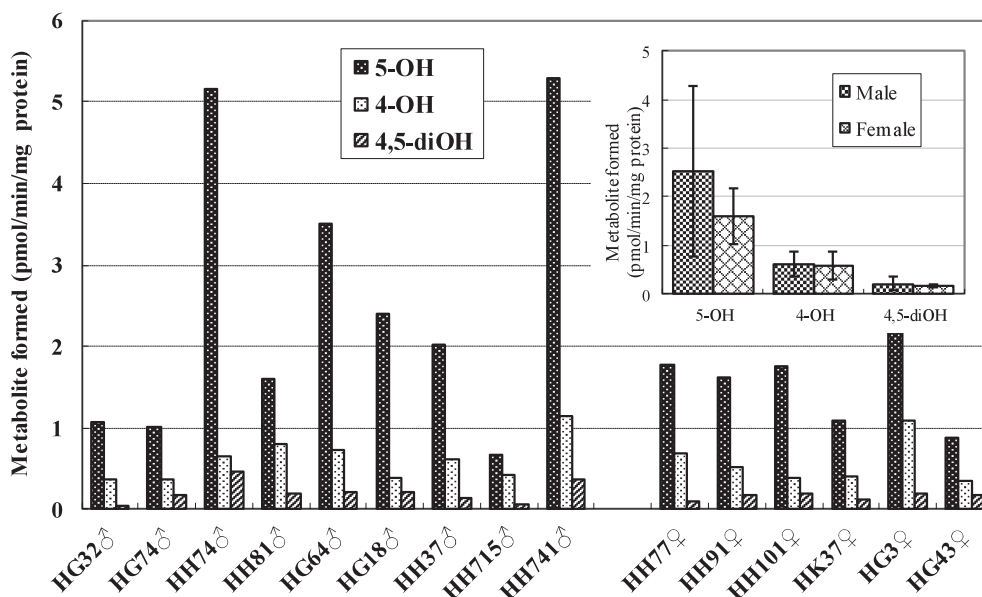


Fig. 2 Metabolism of CB149 by human liver microsomes prepared from fifteen individuals (nine males and six females)

すべてのヒトでよく似た代謝パターンを示した。すなわち、主代謝物は 5-OH 体であり、次いで 4-OH 体および 4,5-diOH 体と続いた。ただし、総代謝物量は個人差が大きく、一番低い HH715 (男性) と一番高い HH741 (男性) では 5.9 倍の差があった。さらに、男女別に平均したところ、5-OH 体の生成活性は、男女ともに 2 pmol/min/mg protein 前後であり、前述の未処理動物の 3 分の 1 以下と低かった。また、未処理動物では 4-OH 体および 4,5-diOH 体が生成されなかったのに対し、ヒトでは両代謝物も生成され、それぞれ 0.6 および 0.2 pmol/min/mg protein と算出された。なお、3 種類の代謝物の生成活性はいずれも男女とも同程度で有意差はなかった。

次に、3 種類の CB149 代謝物の生成活性と CYP 分子種の酵素活性との相関係数を算出した (Table 4)。その結果、5-OH 体と 4,5-diOH 体の生成活性が CYP2B6 および CYP3A4 の両活性と有意な正の相関を示すこと、また 4-OH 体の生成活性が、CYP2A6 活性と有意な正の相関を示すことが明らかになった。なお、その他の CYP 分子種では有意な相関は全く認められなかった。

4. ヒト CYP 分子種による代謝

ヒト肝 Ms を用いた検討から、CB149 代謝には、CYP2B6、CYP2A6 および CYP3A4 の関与が強

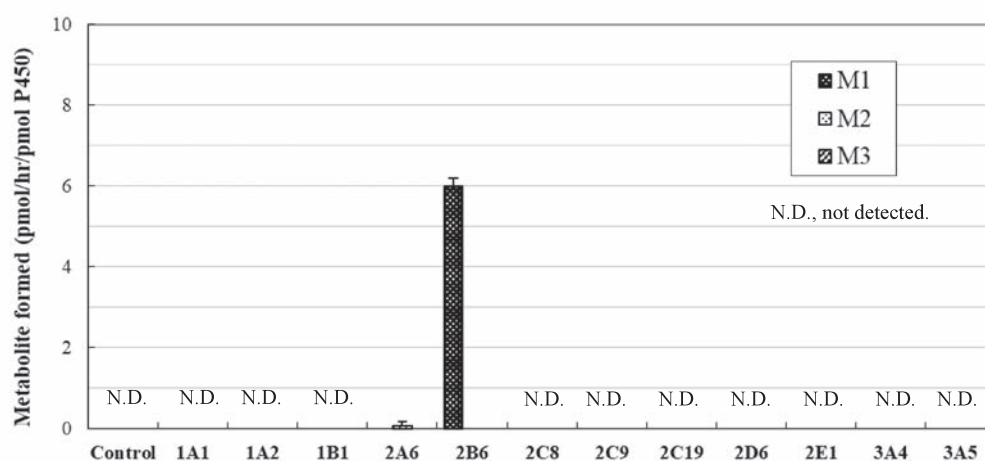
く示唆された。そこで、12 種類のヒト CYP 分子種を用いて、CB149 代謝を調べた。反応を 37℃ で 60 分間行った結果、Fig. 3 に示すように、CYP2B6 が 5-OH 体の高い生成活性を示した (5 pmol/hr/pmol CYP)。また、CYP2A6 は弱いながらも、4-OH 体の生成活性を示した。しかしながら、CYP2B6 による 4,5-diOH 体の生成は見られなかった。また、期待された CYP3A4 をはじめ、その他の CYP 分子種では代謝物の生成は全く見られなかった。

考 察

低残留性 PCB である CB149 の *in vitro* 代謝について、ラット、モルモット、ハムスターおよびヒト肝 Ms を用いて比較検討した。また、ヒト CYP 分子種を用いて検討した。その結果、すべての動物において、未処理肝 Ms では主代謝物として 5-OH-CB149 のみが同程度生成された。また、PB 前処理 Ms では、5-OH 体の顕著な増加に続き、新たに 4,5-diOH-CB149 と 4-OH-CB149 が生成された。特に、5-OH 体の生成はラットで未処理 Ms の 253 倍、ハムスターでは 11 倍、さらにモルモットでは 2 倍に促進された。このときの生成活性を比較すると、ラット (1,596 pmol/min/mg protein)、ハムスター (158 pmol)、モルモット (35 pmol) の順であった。これらの結果は、3 種類

Table 4 Correlation coefficient between human liver microsomal CYP activities and three CB149 metabolites produced by human liver microsomes of fifteen individuals

Isoform	M1 (5-OH)	M2 (4-OH)	M3 (4,5-diOH)
Total P450	0.672*	0.270	0.659
CYP1A2	-0.007	-0.093	0.119
CYP2A6	0.577	0.856**	0.531
CYP2B6	0.803**	0.475	0.776**
CYP2C8	0.570	0.483	0.568
CYP2C9	0.489	0.406	0.318
CYP2C19	-0.115	-0.175	0.059
CYP2D6	-0.066	-0.063	-0.108
CYP2E1	0.397	0.309	0.166
CYP3A4	0.714*	0.593	0.841**
CYP4A11	0.017	0.086	-0.088

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.**Fig. 3** Metabolism of CB149 by human CYP isoforms

の CB149 代謝物生成のすべてに、PB 誘導性の CYP2B 酵素が関与していることを示唆している。

MC 前処理 Ms では、ハムスターでのみ、新たな 4-OH-CB149 の生成が見られた。これまでに、我々は MC 前処理ハムスター肝から、MC 誘導性の CYP2A8 を精製し、これが 2,2',5,5'-および 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl (CB52 および CB70) の 4-水酸化反応を特異的に触媒することを報告している¹⁵⁾²¹⁾。本研究の結果は、CB149 代謝における 4-OH 体の生成にも、ハムスター

CYP2A8 が関与していることを示唆している。

本研究では、15 名のヒト肝から個人別に調製された Ms を用い、CB149 代謝物 3 種類の生成活性につき、肝 CYP 活性との相関を調べた。その結果、5-OH 体と 4,5-diOH 体の生成活性が CYP2B6 活性 ((S)-mephenytoin N-demethylase 活性) および CYP3A4 活性 (testosterone 6 β -hydroxylase 活性) と、一方、4-OH 体の生成活性が CYP2A6 活性 (coumarin 7-hydroxylase 活性) と有意な正の相関を示すことが明らかになった。こ

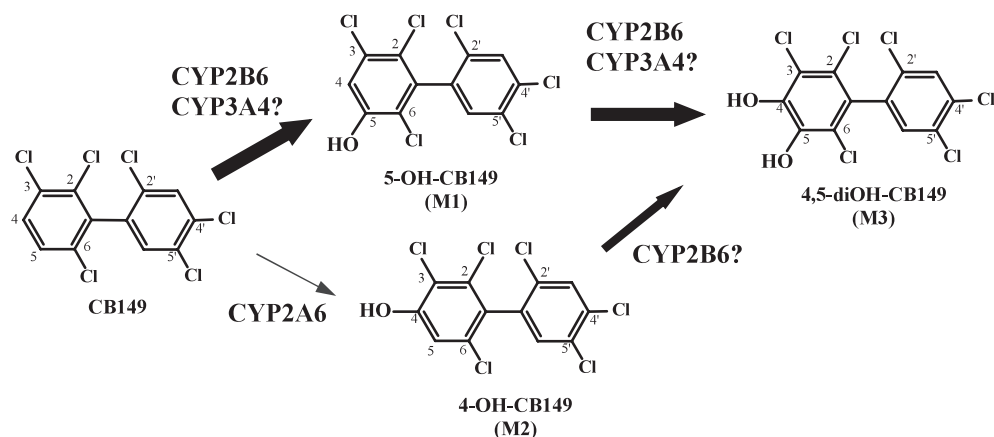


Fig. 4 Postulated metabolic pathways of CB149 in human liver

これらの結果は、ヒト肝でのCB149代謝に、CYP2B6、CYP2A6およびCYP3A4が関与していることを示唆している。また、ヒト肝CYP含量については、CYP3A (3A4および3A5を含む) が総CYP含量の約40%、CYP1A2が約18%、CYP2C (2C8, 2C9, その他を含む) が約25%を占めていること、さらにその他のCYP分子種は5%以下であることが報告されている²⁷⁾²⁸⁾。そこで、12種類のヒトCYP分子種を用いて検討を加えたところ、CYP2B6による5-OH体の生成活性と、弱いながらもCYP2A6による4-OH体の生成活性を確認することができた。しかしながら、ヒト肝においてCYP含量が最も多いCYP3A4ではCB149代謝物が全く生成されなかった。また、CYP2B6による4,5-diOH体の生成も見られなかった。これらの点について、その理由は現在不明である。Fig. 4に、ヒト肝におけるCB149の推定代謝経路を示した。

15名のヒト肝ドナーのうち、高いCB149代謝活性を示した男性3名 (HG64, HH74, HH741) について、提供者者の情報を調べたところ、HG64は、死因が頭蓋内出血で、生前にwarfarinを使用していたこと、HH74とHH741は高血圧症で、生前にアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬 cozaar および抗うつ薬 prozac を使用していたことがわかった。さらに、この3名の肝MsのCYP2B6活性が、他より2~13倍高いことも明らかになった。これらの事実から、服薬により誘導されたCYP2B6が、CB149代謝を促進したものと考えられる。

我々は、これまでに *meta-para* 位に隣接する

水素を持つ 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB101) について、ラット、ハムスターおよびモルモット肝Msによる代謝を報告している²⁹⁾。その結果、いずれの動物でもCB101の主代謝物は3'-OH体であり、PB前処理により顕著に増加すること、また3'-OH体の生成活性がラット>ハムスター>モルモットの順である点は、本研究のCB149代謝とよく共通していた。一方、CB101代謝において、4'-OH体の生成活性がすべての動物の未処理肝Msで見られること、また、MC前処理で数倍に増加する点は、CB149代謝と全く異なった。さらに、PB前処理Msで生成された代謝物の総量を比較すると、CB101より置換塩素数が1つ多いCB149の方が、ラットでは7倍、ハムスターでは6倍、モルモットでは2倍といずれの動物でも代謝されやすいことが判明した。この理由は現在のところ不明であるが、両PCBの化学構造をみると、CB101は2,5-二塩素置換のdi-*ortho*型PCBであるのに対し、CB149は2,3,6-三塩素置換のtri-*ortho*型PCBで、*ortho*位への塩素置換が1つ多い。結果として、CB149における2位の塩素置換がビフェニル環の安定化をもたらし、CYP2B酵素による *meta-para* 位の水酸化が促進されたのかもしれない。

総 括

1. ラット、ハムスターおよびモルモット肝MsによるCB149の代謝を調べたところ、すべての動物において、主代謝物は5-OH-CB149であること、次いで4,5-diOH-CB149および

4-OH-CB149 が生成されること、PB 前処理によりこれら 3 種類の代謝物の生成が顕著に促進されること、さらに、それらの生成活性の強さは、ラット ≧ ハムスター ≧ モルモットの順であることが明らかになった。MC 前処理では、いずれの動物肝 Ms でも 5-OH-CB149 の生成は減少したが、ハムスター肝 Ms では、4-OH-CB149 が新たに増加した。

2. 5-OH-CB149 および 4-OH-CB149 を基質として用い、ラット肝 Ms による 4,5-diOH-CB149 の生成を調べた。その結果、基質特異性は、5-OH 体 (2,236 pmol/min/mg protein) > 4-OH 体 (1,125 pmol) > CB149 (452 pmol) の順であった。
3. ヒト肝 Ms (男性 9 名、女性 6 名) につき、個人別に CB149 代謝を比較したところ、いずれもよく似た代謝パターンを示した。主代謝物として 5-OH-CB149 が生成され、次いで 4,5-diOH-CB149 と 4-OH-CB149 の生成が続いた。また、総代謝物量において、5.9 倍の個人差があったが、各代謝物の生成活性において性差は認められなかった。
4. 前述のヒト肝 Ms につき、CB149 代謝物の生成活性と CYP 分子種に特徴的な酵素活性との相関を調べたところ、5-OH 体および 4,5-diOH 体の生成活性は、CYP2B6 および CYP3A4 の両活性と有意に正の相関を示した。また、4-OH 体の生成活性は、CYP2A6 活性と有意に正の相関を示した。
5. 12 種類のヒト CYP 分子種による CB149 代謝を検討したところ、CYP2B6 は 5-OH-CB149 の高い生成活性を、また、CYP2A6 は 4-OH-CB149 の生成活性を有していた。なお、CYP3A4 を含め、その他の CYP は全く代謝活性を示さなかった。

以上の結果から、CB149 代謝において、ヒトを含むいずれの動物でも、PB 誘導性の CYP2B 酵素が最も重要な代謝酵素であることが示唆された。

謝 辞

本研究は厚生労働行政推進調査事業費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業, 21KA2003 太田千穂) および JSPS 科研費 (JP20K12188 原口

浩一, JP21K12262 藤井由希子) の助成を受けたものです。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Sjödin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Björk J and Bergman Å : Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish men. *Environ Health Perspect.* 108 : 1035-1041, 2000.
- 2) Sandau CD, Ayotte P, Dewailly E, Duffe J and Nostrum RJ : Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs (OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit. *Environ. Health Perspect.* 108 : 611-616, 2000.
- 3) Fängström B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P and Bergman Å : Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ. Health Perspect.* 110 : 895-899, 2002.
- 4) Todaka T, Hori T, Yasutake D, Yoshitomi H, Hirakawa H, Onozuka D, Kajiwara J, Iida T, Yoshimura T and Furue M : Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood collected from Yusho patients during medical check-ups performed from 2004 to 2007. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 100 : 156-165, 2009.
- 5) 古賀信幸, 吉村英敏 : PCB と関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編 : 油症研究—30 年の歩み—. pp. 93-110, 九州大学出版会, 2000.
- 6) 太田千穂, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 木村治, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',3,4,4',5,6'-七塩素化ビフェニル (CB182) のラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝. *福岡医誌.* 108 : 51-57, 2017.
- 7) 太田千穂, 山本健太, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村治, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',3,4',5,6,6'-七塩素化ビフェニル (CB188) のラットおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝. *福岡医誌.* 110 : 83-90, 2019.
- 8) 太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村治, 古賀信幸 : 2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル (PCB155) のラット, モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム, およびヒトチトクロム P450 による代謝. *福岡医誌.* 112 : 127-135, 2021.
- 9) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人 : 高分解能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析計による全 PCB 異性体の分析. *福岡医誌.* 90 : 192-201, 1999.
- 10) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人 : 油症

- 患者母乳及び血液中の全 PCB 異性体の分析. 福岡医誌. 90 : 202-209, 1999.
- 11) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R and Masuda Y : Tissue distribution of methylsulfonyl metabolites derived from 2,4,5,2',5'-pentachlorobiphenyl and 2,4,5,2',3',6'-hexachlorobiphenyl in rats. *Arch Environ Contam Toxicol*. 37 : 135-142, 1999.
 - 12) Haraguchi K, Koga N and Kato Y : Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls and tissue distribution of persistent metabolites in rats, hamsters and guinea pigs. *Drug Metab Dispos*. 33 : 373-380, 2005.
 - 13) 古賀信幸, 太田千穂 : 高残留性 PCB の代謝と代謝物の毒性. 古江増隆, 赤峰昭文, 山田英之, 吉村健清編 : 油症研究Ⅱ—治療と研究の最新線—, pp. 200-218, 九州大学出版会, 2010.
 - 14) Koga N, Nishimura N, Kuroki H, Masuda Y and Yoshimura H : Metabolism of 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P4501A1. *Xenobiotica*. 24 : 775-783, 1994.
 - 15) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H : Metabolism of 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. *Chemosphere*. 37 : 1895-1904, 1998.
 - 16) Koga N, Kikuichi N, Nishimura N, Hara T, Harada N, Ishii Y, Yamada H, Oguri K and Yoshimura H : Purification and characterization of a newly identified isoform of cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl in hamster liver. *Arch Biochem Biophys*. 312 : 464-470, 1995.
 - 17) Koga N, Kanamaru T, Kikuichi N, Oishi N, Kato S and Yoshimura H : Guinea pig liver cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Bull Environ Contam Toxicol*. 60 : 898-903, 1998.
 - 18) Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, Yoshimura H and Funae Y : Metabolism of highly persistent PCB congener, 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. *Biochem Biophys Res Commun*. 212 : 455-460, 1995.
 - 19) Nagayoshi H, Kakimoto K, Konishi Y, Kajimura K and Nakano T : Determination of the human cytochrome P450 monooxygenase catalyzing the enantioselective oxidation of 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB95) and 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (PCB183). *Environ Sci Pollut Res Int*. 25 : 16420-16426, 2018.
 - 20) Uwimana E, Ruiz P, Li X and Lehmler H-J : Human CYP2A6, CYP2B6 and CYP2E1 atrop-selectively metabolize polychlorinated biphenyls to hydroxylated metabolites. *Environ Sci Technol*. 53 : 2114-2123, 2019.
 - 21) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H : Hamster liver cytochrome P450 (CYP2A8) as a 4-hydroxylase for 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Biochem Biophys Res Commun*. 225 : 685-688, 1996.
 - 22) McGraw SrJE and Waller DP : Specific human CYP450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC#101). *Biochem Biophys Res Commun*. 344 : 129-133, 2006.
 - 23) Shimada T, Kakimoto K, Takenaka S, Koga N, Uehara S, Murayama N, Yamazaki H, Kim D, Guengerich FP and Komori M : Roles of human CYP2A6 and monkey CYP2A24 and 2A26 cytochrome P450 enzymes in the oxidation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Drug Metab Dispos*. 44 : 1899-1909, 2016.
 - 24) Cadogan JIG : A convenient new method of aromatic arylation. *J Chem Soc*. : 4257-4258, 1962.
 - 25) Hutzinger O, Safe S and Zitko V : Polychlorinated biphenyls : Synthesis of some individual chlorobiphenyls. *Bull Environ Contam Toxicol*. 6 : 209-219, 1971.
 - 26) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193 : 265-275, 1951.
 - 27) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP : Inter-individual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals : Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 270 : 414-423, 1994.
 - 28) Rendic S and Guengerich FP : Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chem Res Toxicol*. 28 : 38-42, 2015.
 - 29) 太田千穂, 太岡樹子, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',4,5,5'-五塩素化ビフェニル (CB101) のラット, ハムスターおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝. 福岡医誌. 98 : 236-244, 2007.

(Received for publication March 13, 2023)

原 著

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 母体暴露による 胎児期成長ホルモン発現低下：胎児期の成長ホルモン 補給による成長後の骨代謝改善

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

²⁾九州大学大学院薬学研究院 細胞生物薬学分野

服部 友紀子¹⁾, 武田 知起¹⁾, 山田 英之¹⁾, 石井 祐次¹⁾²⁾

Maternal Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Results in Offspring Growth Retardation : Fetal Growth Hormone Supplementation Can Restore Bone Metabolism in Adulthood

Yukiko HATTORI¹⁾, Tomoki TAKEDA¹⁾, Hideyuki YAMADA¹⁾ and Yuji ISHII¹⁾²⁾

¹⁾Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

²⁾Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

Abstract

The direct supplementation of growth hormone (GH) to the fetus was previously shown to restore GH attenuations that result from maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Furthermore, it also stimulates the expression of insulin-like growth factor-1, which is a major growth factor that promotes systemic development, including body weight, body length, and learning memory. In this study, a metabolomic analysis of serum in TCDD-exposed offspring reaching maturity was conducted. Elevated levels of activated vitamin D₃ were identified, and these were reduced to control levels with GH supplementation on gestational day 20. Inorganic phosphorus in the blood was similarly affected, but there was no change in calcium levels. The mRNA levels of cytochrome P450 (CYP) isoforms, CYP27B1 and CYP24A1 which are involved in activated vitamin D₃ production and inactivation, were not significantly changed. The results suggest that the TCDD-dependent elevation of 1 α , 25-(OH)₂ vitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃) in adulthood is due to factors other than the altered expression of synthetic and metabolic enzymes in the kidney. Bone-derived alkaline phosphatase (ALP) mRNA and serum ALP activity were significantly reduced by maternal TCDD exposure. Serum ALP was significantly improved by GH supplementation. The decrease in mononucleate cells around the osteoclasts in the tibia of male offspring after reaching maturity supported the results, and this tended to improve with fetal GH supplementation. TCDD was thus found to trigger a decrease in fetal GH levels and there were exceptionally high 1,25-(OH)₂D₃ levels when reaching maturity, which decreases the number of osteoblasts and suppresses bone formation.

Key words : growth hormone, TCDD, vitamin D, cytochrome P450, calcium

は じ め に

妊娠期母体が、比較的低用量のダイオキシンの暴露することによって、出生児に成長遅延や性特異的行動障害などの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も、ダイオキシンがヒトこどもの発達に及ぼす影響が懸念され²⁾³⁾、早期の治療・予防法の確立が待たれている。そのためにも、この毒性発現機構の解明が必要である。

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)~6)}。すなわち、AHR はダイオキシンとの結合により核内に移行し、cytochrome P450 (CYP) 1A1 等の標的遺伝子の転写調節領域に存在する xenobiotic responsive element への結合を介して、これらの発現を変動させる。変動遺伝子は数百種類も存在し^{7)~10)}、これらが複合的に毒性に寄与すると考えられている。

妊娠動物がダイオキシンの暴露を受けることにより、出生児に低身長・低体重¹⁾³⁾⁴⁾、学習記憶能力の低下³⁾¹¹⁾などの成長遅延や、生殖器官の萎縮¹²⁾および交尾行動障害¹²⁾¹³⁾などの性未成熟が生じることが報告されている。これらの毒性の多くは、成熟個体へのダイオキシン暴露によっては発現しない、あるいはかなりの高用量を要する¹⁴⁾。一方、母体が暴露したダイオキシンの約0.01~0.1%が胎盤を経由して胎児に移行するに過ぎないが¹⁵⁾¹⁶⁾、多種多様な毒性が生起する。さらに深刻なことに、胎児期の暴露であっても障害が成長後にまで継続し、不可逆的な場合もある。これらの事実から、高感受性である胎児期に特異的な影響が引き金となって成長過程で様々な発育障害が定着することが推定される。我が国におけるヒトへの暴露被害の事例として、九州北部一帯で発生したカネミ油症事件が知られている。油症患者およびその子供を対象とした追跡調査により、母体の血中ダイオキシン類濃度と出生児の体重が負の

相関を示すなど、児の成長への悪影響との関連性が報告されている²⁾¹⁷⁾。さらに、近年の出生コホート調査からも、子供の低体重や知的能力の低下は、母親の食事由来の微量なダイオキシン類により引き起こされる可能性が示唆されている^{18)~20)}。従って、ダイオキシン類による出生児発育障害の機構解明とそれに基づく解決策の構築は、未来のこどもの健康を確保する上で喫緊の課題である。しかし、これらの次世代障害に関しては、実態さえも正確に把握されていないのが現状である。

ダイオキシン類による次世代影響は低用量で発現し、一生涯にわたって影響が定着するため問題である。筆者らはこれまでの一連の研究によって、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1 μ g/kg, 経口)の妊娠ラットへの暴露が、出生前後の児の luteinizing hormone (LH) の合成を低下させ、これを起点として成長後に交尾行動が障害されることを実証している²¹⁾²²⁾。また、胎児期後期と新生児期に当たる臨界期の LH の低下と同時期に、成長ホルモンの合成も低下することが明らかになった²³⁾²⁴⁾。

すなわち、妊娠 15 日目のラットへの TCDD 暴露により、胎児脳下垂体において GH mRNA ならびに血中 GH レベルが用量依存的に低下する²³⁾。この GH 低下により insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 発現が低下することが明らかとなった²⁴⁾。低下する GH を胎児に直接補給した結果、胎児期 GD20 に低下した IGF-1 が正常レベルまで回復し、新生児の低体重が改善傾向、低身長が正常レベルにまで改善、成長後の学習記憶能力障害も改善傾向を示した²⁴⁾。TCDD 母体暴露は、雌雄胎児脳下垂体において GH 産生細胞数を選択的に減少させることが明らかとなった。また、この影響は、雄児により顕著に認められた²⁴⁾。TCDD は母体および雄児において一過的にコルチコステロンレベルを低下させ GH 低下に寄与する、これは、母体へのコルチコステロン補給により改善した²⁵⁾。また、DNA マイクロアレイ解析により、GH 低下を規定しうる雌雄に共通した遺

伝子として death associated protein-like 1 (DAPL1) が推定された²⁴⁾。DAPL1 発現抑制に合致して、GH 発現低下のみならず、細胞周期関連遺伝子である cyclin D2 および cyclin E2 の発現が胎児期特異的に低下した²⁴⁾。以上の成果から、TCDD は胎児脳下垂体において DAPL1 発現低下によって細胞周期タンパク質の発現を抑制し、GH 産生細胞数および GH 合成を低下させるという一連の新規毒性機構が見出された²⁴⁾。

脳下垂体より分泌された GH は、直接的に組織成熟を促すと共に、肝臓に作用して主要な成長因子である IGF-1 の発現を刺激し、骨や神経をはじめとする全身の発育を促進する²⁶⁾²⁷⁾。従って、TCDD 依存的な発達期の GH 発現低下は、IGF-1 レベルの低下を通して成長後にまで定着する様々な成長障害を惹起する可能性が示唆される。また、上述のように、雄胎児におけるコルチコステロン低下、雌雄胎児における DAPL1 低下の重要性が分かった²⁴⁾²⁵⁾。TCDD 母体暴露による GH 低下の機構と、胎児期の GH 補給による改善作用は分かかってきたものの、GH の作用は多岐に亘る。TCDD による胎児期の GH 発現の抑制が出生・成長過程で生じるどのような障害形質に寄与するかについては、未だ十分に明らかになったとは言えない。そこで、本研究では、上記の課題解決を目的として、TCDD 暴露胎児に直接 GH を補給し、成熟期にメタボロミクスによる解析を行った。さらに、その結果を受け、成熟期の骨代謝への影響と、低下する GH を胎児に直接補給した場合の成熟期の骨代謝の改善作用について検討した。

実験方法

1. 動物実験

本研究における動物実験は、九州大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した。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 μ g/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。また、GH の補給による影響も調べた。GH の胎児への補給は GD20 に既報の通り行い、自然に分娩させた²⁴⁾。出生 28 日 (PND28) および 13 週齢に成長した動物について、肝臓、血

液、脛骨を採取して検討を行った。血液からは血清を分離した。既報にて²⁴⁾、同条件で得られた凍結保存サンプルを本研究での解析対象とした。なお、用いた動物では GH 併用により、TCDD 母体暴露で低下した血中 IGF-1 レベルは正常レベルまで回復し、学習記憶能力も回復傾向があった²⁴⁾。

2. メタボロミクス解析

血清より水およびメタノールによって極性成分を抽出したのち、ultra-performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS) 装置 (Waters) に付してメタボローム解析を行った。試料の調製および解析は既報に従った²⁸⁾。データ解析には、主成分分析法 (principal component analysis; PCA) および直交型部分的最小二乗法 (orthogonal partial least squares; OPLS) を用いた。

3. 血中脂質濃度、血清アルカリホスファターゼ (ALP) 活性および無機リン、カルシウム濃度の測定

血清 ALP 活性: TRACP & ALP Assay Kit (タカラバイオ) を用いて測定した。血清は MilliQ 水により 50 倍希釈した。

血清カルシウム濃度: カルシウム E-テストワコー (和光純薬工業) を用いた。血清は原液のまま使用した。

血清無機リン濃度: 富士ドライケムスライド IP-P (富士フイルム) を用いて測定した。血清は MilliQ 水により 10 倍希釈した。これを IP-P スライドに添加したのち、富士ドライケム生化学分析装置 (富士フイルム) を使用し、650 nm の吸光度を測定した。

4. mRNA レベルの測定

リアルタイム RT-PCR は、既報に従って行った²²⁾。

用いた primer の配列は Table 1 に示す。

反応は、StepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo-Fisher Scientific, Inc.) を用いて、96 Wells, Quantitation-Comparative CT ($\Delta\Delta$ CT), Fast mode にて行った。

Table 1 Primers used for real-time RT-PCR.

Targets	Forward primer (5'→3') Reverse primer (5'→3')	Primer region	Size of product (bp)	Accession No. ^a
BALP	CTGCAAGGACATCGCCTATC GTACATGTACTTCCGGCCAC	752-771 814-833	82	NM_013059
β -actin	CACCATGTACCCAGGCATCGC AGCCACCAATCCACACAGAG	2791-2811 3017-3036	246	V01217
CYP27B1	GTCCAGAGCGCTGTAGTTTC GAGCCTCTGCCATTCTTCAC	313-332 394-413	101	NM_053763
CYP24A1	AAAGCCTATCGCGACCACAG TGATCTCCACGGGCTTCATG	748-767 843-862	115	NM_201635

^a The GenBank accession number is shown.

5. 脛骨の病理組織学的解析

13 週齢の雄ラットの脛骨を採取し, paraformaldehyde (4% in 0.1 M PBS) 溶液にて浸潤固定した. カルキトックス液にて, 4℃で5日間脱灰処理を行ったのち, 5%硫酸ナトリウム水溶液にて4℃で1晩中和した. 組織のパラフィン包埋, 薄切および hematoxylin-eosin 染色は, 九州大学生体防御医学研究所 技術室に委託した. 染色した組織を光学顕微鏡を用いて形態観察を行った (倍率: $\times 100$ および $\times 400$).

結 果

1. 胎児期の GH 発現低下によって生じる成長後の障害に繋がる因子の探索: メタボローム解析を通じた極性成分の解析

水およびメタノールにより抽出した血清の極性成分を UPLC-TOF-MS 装置に付してメタボローム解析を行った. データ解析には, 主成分分析法 (principal component analysis; PCA) および直交型部分的最小二乗法 (orthogonal partial least squares; OPLS) を用いた. Score plot に示す通り, 3 群間でプロットが乖離する傾向が観察され (Fig. 1A and B), 胎児期の TCDD および GH 処理により, 成長後にまで顕著なメタボローム変動が継続することが明らかになった. さらに, S-plot (Fig. 1C-F) において相関係数 0.8 以上を有意な増加, -0.8 以下を有意な減少イオンとして抽出し, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes および Human Metabolome Database を用いた

データベース解析に付して変動化合物の推定を行った. その結果, TCDD 母体暴露および胎児期の GH 補給により, アミノ酸, ビタミンならびにホルモン代謝物を中心にそれぞれ 66 成分 (増加: 25, 減少: 41) および 61 成分 (増加: 19, 減少: 42) もの変動が示唆された. これらのうち, TCDD 依存的な変動が GH 補給により改善することが推定された成分を Table 2 に示す. 記憶や運動機能に関わる acetylcarnitine²⁹⁾³⁰⁾ が TCDD により減少したが, GH 補給により改善した (Table 2). 従って, TCDD は胎児期の GH 合成低下を起点として成長後に acetylcarnitine レベルを低下させ, 学習記憶等の神経活動に影響を与える可能性が浮上した. また, $1\alpha, 25$ -dihydroxycholecalciferol ($1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$) が TCDD 依存的に増加し, 胎児期の GH 補給により改善した (Table 2). $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ は, リンおよびカルシウム濃度の調節や, 骨の形成・維持に重要であり, この過剰状態は高カルシウム, リン血症, および骨形成異常へと繋がる^{31)~33)}. これと関連して, TCDD 依存的に増加が認められた骨質低下のバイオマーカーである pentosidine³⁴⁾³⁵⁾ は, GH 補給により改善した (Table 2). これらの結果から, TCDD は胎児期の GH 発現低下を介して, 成長後に高 $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ 体質を惹起し, 骨形成を障害するとの新たな毒性機構が想定された.

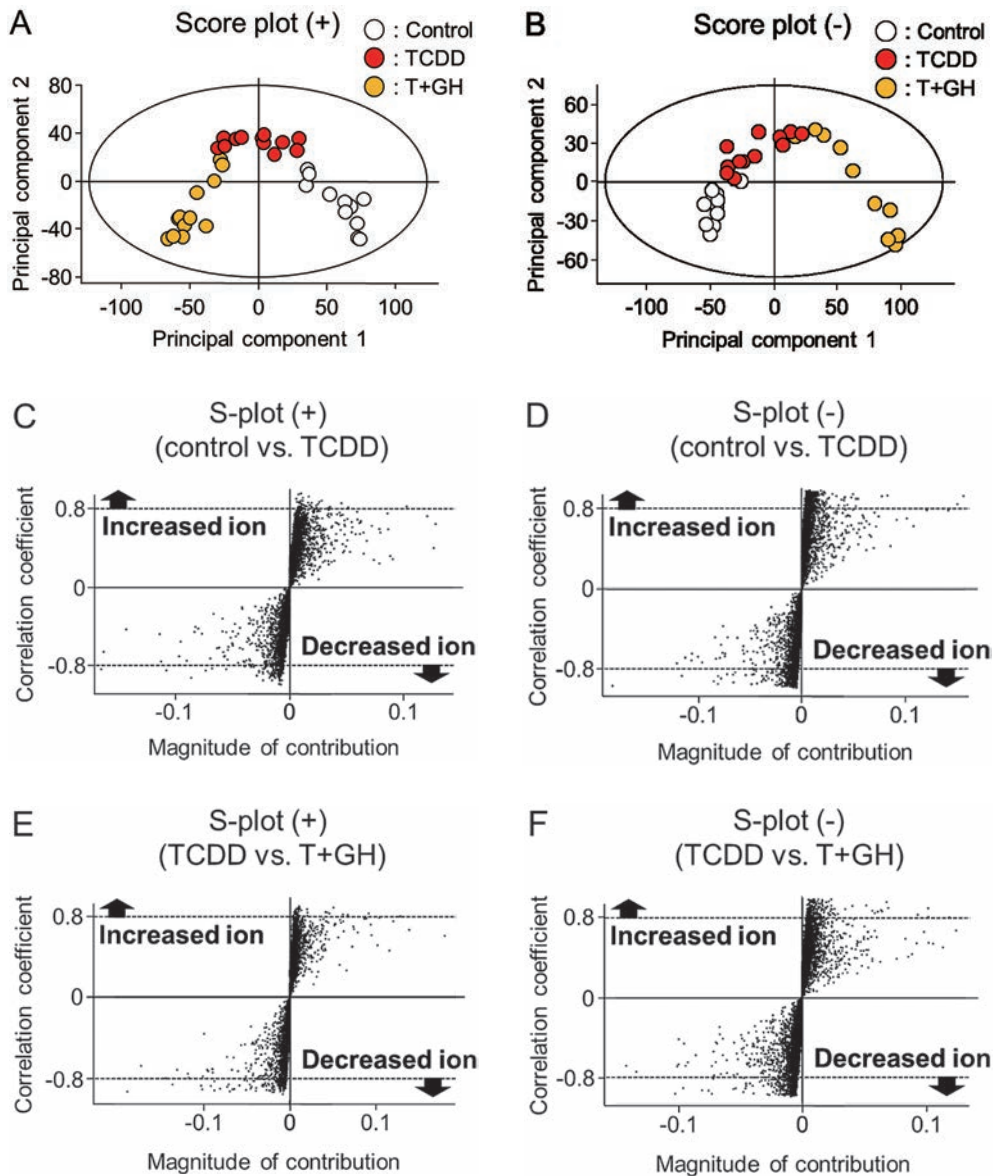


Fig. 1 Principal component analysis for a change in serum metabolome of male adult rats (13 week-old) caused by exposing TCDD and GH at the fetal stage. The sera of male offspring born from dams treated with TCDD at GD15 were collected at 13 week-old. The metabolomic profile of the serum was analyzed using an UPLC-TOF-MS system. (**A** and **B**) Score plot among control, TCDD and TCDD + GH (T + GH). (**C** and **D**) S-plot between control and TCDD. (**E** and **F**) S-plot between TCDD and T + GH. The plots show the results analyzed by a positive ion mode (**A**, **C** and **E**) and a negative ion mode (**B**, **D** and **F**).

2. 成長後の血中 1,25-(OH)₂D₃, 無機リンおよびカルシウム濃度への影響

前述のメタボローム解析 (Fig. 1) によって見出された 1,25-(OH)₂D₃ の増加に着目し、骨への影響との関連性について検討した。まず、メタボローム解析の妥当性を検証するため、成長後の児 (13 週齢) の血中 1,25-(OH)₂D₃ 濃度を定量した。その結果、胎児期の TCDD 暴露により、1,25-

(OH)₂D₃ 濃度は有意に増加したが、GH 補給により正常レベルにまで改善し (Fig. 2), メタボローム解析を支持する結果が得られた。そこで、1,25-(OH)₂D₃ により恒常性が維持される無機リンおよびカルシウムレベルへの影響を検証した。その結果、1,25-(OH)₂D₃ の変動と合致して、TCDD 依存的な無機リン濃度の増加は、GH 補給により正常水準に回復した (Fig. 3A)。一方、血

Table 2 Representative serum components in the male offspring reaching maturity the levels of which were altered by maternal exposure to TCDD and direct supplementation of GH to fetuses.

Groups	Increased		Decreased	
	by > 10 times	by ≤ 10 times	to < 1/10 level	to ≥ 1/10 level
Control vs. TCDD	Pentositidine	1 α , 25-Dihydroxy-cholecalciferol	Acetylcarnitine	17 α -Hydroxy-pregnenolone
	Riboflavin		3 α , 17 β -Dihydroxyandrostane	
	β -Carotene	Histidine	N-Formyl-kynurenine	
	Tyrosine	Ubiquinol		
	2-Oxoadipate			
	L-Kynurenine			
	10-Formyl-THF			
	Cytidine			
	4-Pyridoxate			
	6-Keto-prostaglandin F1 α			
	11-Dehydrothromboxane B ₂			
	Acetylcarnitine		Pentositidine	1 α , 25-Dihydroxy-cholecalciferol
	17 α -Hydroxy-pregnenolone		β -Carotene	
TCDD vs. TCDD + GH	3 α , 17 β -Dihydroxyandrostane		Tyrosine	Riboflavin
	N-Formyl-kynurenine		Histidine	Ubiquinol
			2-Oxoadipate	
			L-Kynurenine	
			10-Formyl-THF	
			Cytidine	
			4-Pyridoxate	
			6-Keto-prostaglandin F1 α	
			11-Dehydrothromboxane B ₂	

The components shown as red characters represent the potential markers for the dioxin-produced low-growth of offspring. THF ; tetrahydrofolate.

中カルシウム濃度への TCDD および GH 処理の影響は認められなかった (Fig. 3B).

また, TCDD による血中 1,25-(OH)₂D₃ 増加の機構解析のため, その合成および代謝に関わる酵素の mRNA 発現変動を解析した. 1,25-(OH)₂D₃ は, 腎臓に発現する CYP27B1 により前駆体である 25-hydroxycholecalciferol の 1 位の炭素が水酸化されて生成し, 24 位水酸化酵素である CYP24A1 により生理活性の低い 1 α -hydroxy-23-carboxy-24,25,26,27-tetranorvitamin D₃ に代謝される. 本検討では, メタボローム解析を行った 13 週齢と同様に TCDD 依存的な高リン血症が認められた PND28 (Fig. 4A) の児の腎臓を用いて, CYP27B1 および CYP24A1 の mRNA 発

現を解析した. その結果, いずれにおいても TCDD 暴露および GH 補給の影響は認められなかった (Fig. 4B). 従って, TCDD 依存的な成長後の高 1,25-(OH)₂D₃ 体質は, 腎臓における合成および代謝酵素の発現変動以外の要因で出現することが示唆された.

3. 成長後の骨形成マーカーへの影響

過剰な 1,25-(OH)₂D₃ は, 骨芽細胞への影響によって骨形成を低下させる³⁶⁾³⁷⁾. そこで, 骨芽細胞で合成される骨形成マーカーである bone alkaline phosphatase (BALP) を指標とし, 骨形成への影響を検討した. 成長後の児の脛骨における BALP mRNA 発現を解析した結果, 胎児期の

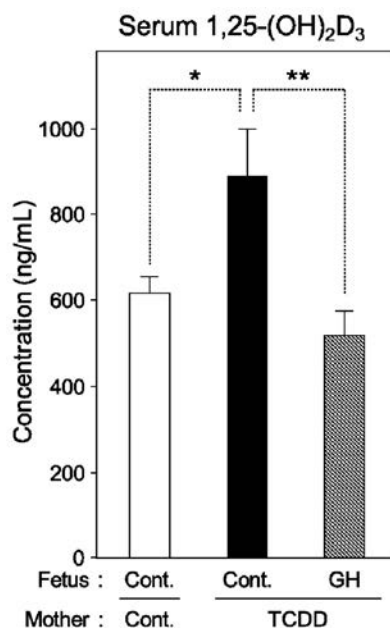


Fig. 2 Recovery by GH supplementation during the fetal period from TCDD-induced increase on serum levels of 1,25-(OH)₂D₃ in the male offspring after reaching maturity (13 week-old).

The serum concentration of 1,25-(OH)₂D₃ was measured by ELISA. The bars represent the means ± S.E.M. of 11-13 rats. Significantly different between the pair indicated : * p < 0.05, ** p < 0.01. 1,25-(OH)₂D₃; 1 α , 25-dihydroxycholecalciferol.

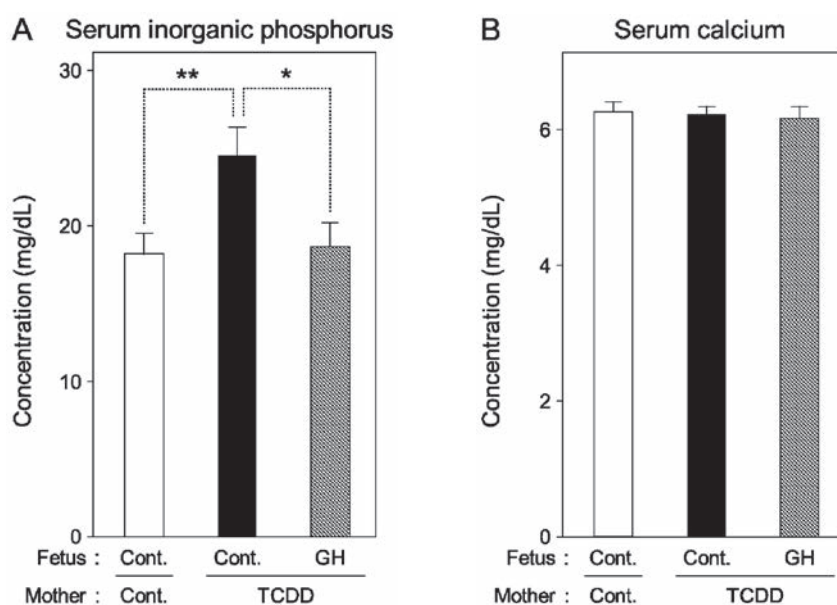


Fig. 3 Effect of maternal exposure to TCDD and direct supplementation of GH to fetuses on the serum levels of inorganic phosphorus (A) and calcium (B) in the male offspring after reaching maturity (13 week-old). The concentration of inorganic phosphorus and calcium in serum were measured by commercial kits. The bars represent the means ± S.E.M. of 6-10 rats. Significantly different between the pair indicated : * p < 0.05, ** p < 0.01.

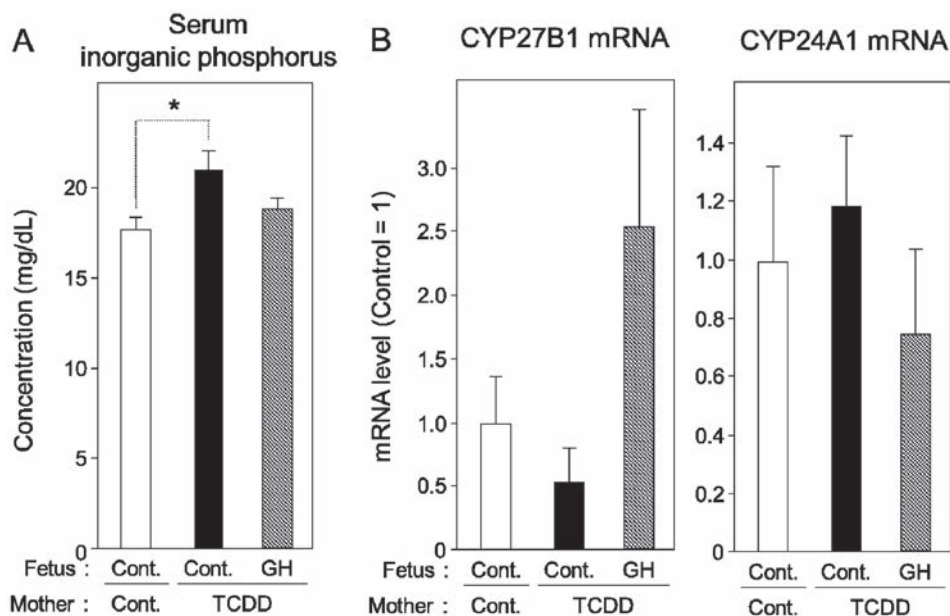


Fig. 4 Effect of maternal exposure to TCDD and direct supplementation of GH to fetuses on the serum levels of inorganic phosphorus (**A**) and the renal expression of mRNAs coding for CYP27B1 and CYP24A1 (**B**) in the male offspring at PND28. (**A**) The concentration of inorganic phosphorus in serum was measured by commercial kits. (**B**) The renal expression of mRNAs coding for CYP27B1 and CYP24A1 were determined by real-time RT-PCR, and normalized by β -actin mRNA. The bars represent the means $\pm$ S.E.M. of 4-11 rats. Significantly different between the pair indicated: * $p < 0.05$.

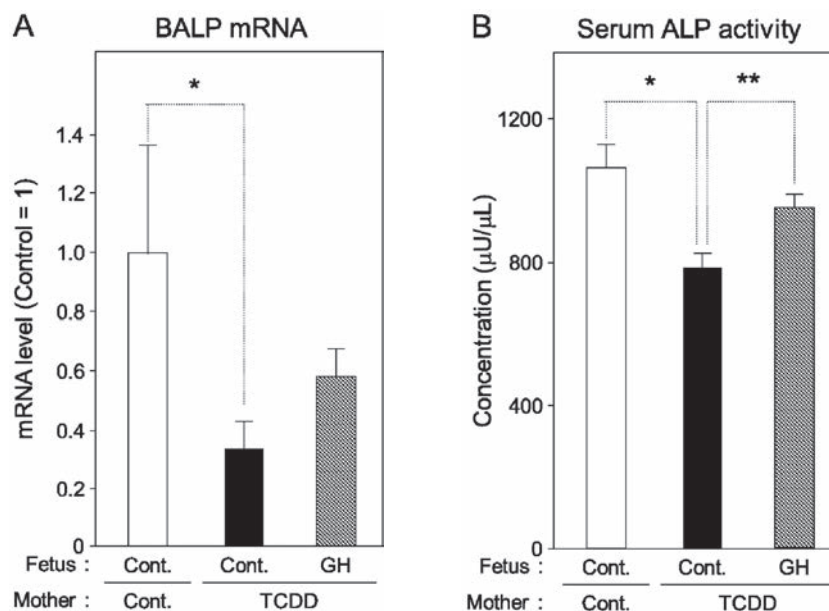


Fig. 5 Effect of maternal exposure to TCDD and direct supplementation of GH to fetuses on the tibial expression of BALP mRNA (**A**) and serum activity of ALP (**B**) in the male offspring after reaching maturity (13 week-old). (**A**) The relative level of BALP mRNA was determined by real-time RT-PCR, and normalized by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA. (**B**) The serum activity of ALP was measured using a commercial kit. The bars represent the means $\pm$ S.E.M. of 5-15 rats. Significantly different between the pair indicated: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. BALP ; bone alkaline phosphatase.

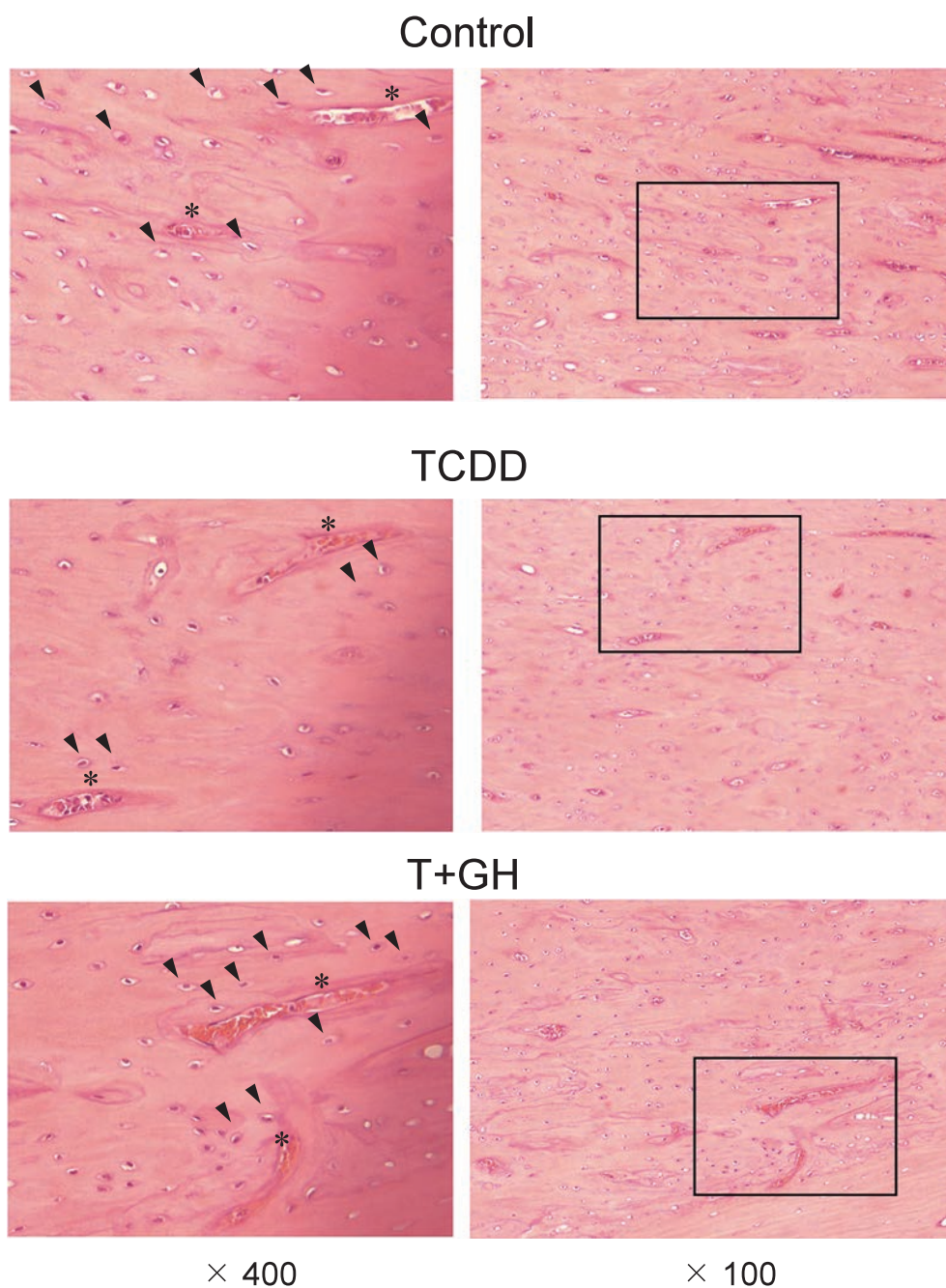


Fig. 6 Effect of maternal exposure to TCDD and direct supplementation of GH to fetuses on the tibia in the male offspring after reaching maturity (13 week-old). The section of the tibia fixed by 4% paraformaldehyde was stained by the solutions of hematoxylin and eosin, and was analyzed using an optical microscope (× 100 and 400). Asterisks and black arrows indicate the multinucleate cells (osteoclasts) and mononucleate cells (osteoblasts/osteocytes), respectively.

TCDD 暴露により有意に減少したが、GH 補給により改善する傾向を示した (Fig. 5A)。これと符合して、TCDD 依存的な血清 ALP 活性の低下は、胎児期の GH 補給により正常レベルにまで改善した (Fig. 5B)。さらに、骨組織への影響を検証するため、hematoxylin eosin 染色法による頸骨の病

理組織学的解析を行った。骨の成長部位では、単核細胞である骨芽細胞による骨形成と多核細胞である破骨細胞による骨吸収の両者が活発に行われる。そこで、破骨細胞の周辺部位について、TCDD 母体暴露および胎児期の GH 補給の影響を観察した。なお、骨組織における単核細胞には、

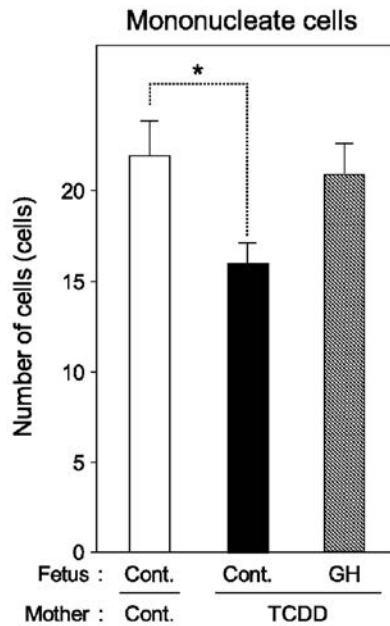


Fig. 7 Effect of maternal exposure to TCDD and direct supplementation of GH to fetuses on the number of mononucleate cells around osteoclast in the tibia of male offspring after reaching maturity (13 week-old). The number of mononucleate cells present at 400 μ m around the osteoclast was measured. The bars represent the means $\pm$ S.E.M. of 5 osteoclasts. Significantly different between the pair indicated: * $p < 0.05$.

未成熟の破骨細胞と骨芽細胞，成熟した骨芽細胞および骨細胞が含まれる．そこで，各群，任意に5つの破骨細胞を選択し，その周囲400 μ mに存在する単核細胞の数を計測した．その結果，胎児期のTCDD暴露により，単核細胞数が有意に減少したが，GH補給により改善する傾向が認められた (Figs. 6 and 7)．以上の結果から，TCDDは胎児期のGHレベルの低下を引き金として，成長過程で高1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 体質を固着し，骨芽細胞の減少ひいては骨形成を抑制するとの一連の可能性が見出された．

考 察

妊娠期のTCDD暴露 (1 μ g/kg, GD15) による出生児発育障害が，出生前後に一過的なGH/IGF-1レベルの低下を起点として生起するとの仮説を検証するため，TCDDによって低下するGHを胎児に直接補給し，障害に対する効果を検討した．その結果，胎児期のGH補給により，TCDDによるIGF-1発現低下のみならず，低体重・低身長が出生後早期においては完全に回復し，成長後に生じる学習記憶障害に対しても改善傾向が認められた．さらに，出生児の血清メタボローム解析によって，TCDDは胎児期のGH発現低下を介して成長後に高1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 体質を定着させることが明らかとなった．高濃度の1,25-(OH) $_2$ D $_3$

は，直接的に骨芽細胞に作用することで骨形成を抑制し³⁷⁾，過剰な1,25-(OH) $_2$ D $_3$ を処理したマウスにおいては，骨の発達が障害される³²⁾．本研究結果は，このことを支持しており，TCDD暴露出生児の成長後において，骨組織における単核細胞の減少および骨芽細胞マーカーであるALPレベルの低下が認められ，胎児期のGH補給によっていずれも改善ないし改善傾向を示した．以上の成果から，TCDD母体暴露による出生前後の一過的なGH発現低下とそれに基づくIGF-1レベルの低下が，出生・成長後の発育障害の一端を担うことが実証された．上記の通り，本研究では胎児期のGHレベルの低下が引き金となって成長後にまで1,25-(OH) $_2$ D $_3$ レベルの増加が継続し，骨形成抑制へと繋がるという一連の毒性機構を見出すことができた．しかし，GHは骨形成以外にも筋肉の発達や神経の成熟など多彩な成長促進作用を有するため，本ホルモンの低下は上記以外の様々な生体影響に繋がる可能性が高い．引き続き，得られたメタボロームの変化に注視した解析を推進していくことが，より広範囲の障害メカニズムや標的因子を明らかにするために必要であろう．

胎児期のGH発現低下が，成長後において血中1,25-(OH) $_2$ D $_3$ レベルの上昇を定着させる機構は不明である．授乳期における比較的高用量のTCDD暴露 (15 μ g/kg, PND1) により，離乳後

の児の腎臓において合成酵素である CYP27B1 の発現が増加し、血中 1,25-(OH)₂D₃ 濃度が上昇することが報告されている³⁸⁾。しかし、本研究の暴露条件においては、CYP27B1 および代謝酵素である CYP24A1 の mRNA に対する TCDD 暴露および GH 補給の影響は認められず、少なくとも上記とは異なる機構で惹起されると考えられる。血中の 1,25-(OH)₂D₃ レベルは、腎臓の vitamin D receptor (VDR) を介したフィードバック作用により恒常性が維持されており³⁹⁾、VDR 欠損マウスは高 1,25-(OH)₂D₃ 体質を呈する⁴⁰⁾。一方、胎児腎臓の発達には、GH および IGF-1 の受容体発現の一過的な増加による両ホルモンの刺激が重要であり⁴¹⁾⁴²⁾、IGF-1 受容体欠失マウスにおいては、出生後に腎組織の萎縮や機能異常が認められる⁴³⁾。また、GH は VDR の発現を上昇させることも報告されている⁴⁴⁾。従って、胎児期における GH/IGF-1 系の低下は腎臓における VDR の発現抑制へと繋がり、成長後の高 1,25-(OH)₂D₃ 体質の要因となる可能性が考えられる。胎児期特異的な GH 発現低下が、腎臓の発達とこれに基づく成長後の障害にどのように繋がるのかを検討することは、ダイオキシン毒性のみならず、胎児期の GH の意義を理解する上で重要と思われる。

本研究におけるメタボローム解析では、acetylcholine の前駆体である acetylcarnitine が TCDD 母体暴露によって減少し、GH の補給により改善することも示唆された。コリン作動性神経において acetylcarnitine から生成される acetylcholine は、記憶の形成や維持に重要な神経伝達物質である⁴⁵⁾。さらに、acetylcholine はニコチン性受容体を介して、同じく記憶形成に必須の γ -aminobutyric acid の放出を高める³⁰⁾⁴⁶⁾。従って、TCDD は胎児期の GH レベルの低下を介してコリン作動性神経に影響を及ぼし、成長後に学習記憶能力の低下を惹起する可能性が考えられる。GH 欠損動物はコリン作動性神経の減少によって低 acetylcholine 体質となる事実⁴⁷⁾も、上記の機構を支持する。従って、TCDD がコリン作動性神経に及ぼす影響に着目した解析は、ダイオキシンによる脳機能障害の新たな機構解明へと繋がるということが期待できる。

結 論

本研究では、TCDD による胎児期の GH 発現の抑制が出生・成長過程で生じるどのような障害形質に寄与するか検討する目的で、TCDD 暴露胎児に直接 GH を補給し、障害に対する効果を検証した。TCDD 妊娠期暴露し出生後、成熟期まで成長した児のメタボロミクス解析を行い、カルシウムの吸収および骨の形成に関係する活性型ビタミン D レベルが上昇していることが分かった。

また GD20 における GH の補給が、これを対照レベルまで低下させることも分かった。血液中の無機リンも同様の影響を受けたが、カルシウム濃度には変動はなかった。また、活性化ビタミン D 生成および代謝に関与する CYP 分子種の発現についても検討を行ったが、有意な変動は認められなかった。

これらのことから、TCDD 依存的な成長後の高 1,25-(OH)₂D₃ 体質は、腎臓における合成および代謝酵素の発現変動以外の要因で出現することが示唆された。骨由来の BALP および血清 ALP の発現レベルは、有意に低下し、血清 ALP は GD20 における GH 補給により有意に改善、BALP にも改善傾向があった。また、脛骨の破骨細胞の周辺部位の単核細胞数が有意に減少し、GH 補給により改善する傾向が認められた。

TCDD は胎児期の GH レベルの低下を引き金として、成長過程で高 1,25-(OH)₂D₃ 体質を固着し、骨芽細胞の減少ひいては骨形成を抑制するとの一連の可能性が見出された。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）（課題番号：H24-食品-指定-014, H27-食品-指定-017）、（食品の安全確保推進研究事業）（課題番号：H30-食品-指定-005, R3-食品-指定-JP21KA2003）、科学研究費補助金（基盤研究 A JSPS KAKENHI JP17H00788, 基盤研究 A JSPS KAKENHI JP21H04928）によった。

参 考 文 献

- 1) Peterson RE, Theobald HM and Kimmel GL : Developmental and reproductive toxicity of

- dioxins and related compounds : cross-species comparisons. 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 and Furue M : Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease. Environ Int. 38 : 79-86, 2012.
 - 3) Nishijo M, Tawara K, Nakagawa H, Honda R, Kido T, Nishijo H and Saito S : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. J Expo Sci Environ Epidemiol. 18 : 246-251, 2008.
 - 4) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ : 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) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M and Fujii-Kuriyama Y : Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. Genes Cells. 2 : 645-654, 1997.
 - 6) Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y and Ishikawa T : Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. Proc Natl Acad Sci. USA. 97 : 779-782, 2000.
 - 7) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 35 : 307-340, 1995.
 - 8) Mimura J and Fujii-Kuriyama Y : Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. Biochim Biophys Acta. 1619 : 263-268, 2003.
 - 9) Whitlock JP Jr : Induction of cytochrome P4501A1. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 39 : 103-125, 1999.
 - 10) Nebert D and Dillmann I : Embryotoxic effects in mice treated with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 272 : 243-264, 1972.
 - 11) Hojo R, Kakeyama M, Kurokawa Y, Aoki Y, Yonemoto J, and Tohyama C : Learning behavior in rat offspring after *in utero* and lactational exposure to either TCDD or PCB126. Environ Health Prev Med. 13 : 169-180, 2008.
 - 12) Gray LE Jr : Ostby JS. *In utero* 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. Toxicol Appl Pharmacol. 133 : 285-294, 1995.
 - 13) Bjerke DL and Peterson RE : Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male rats : different effects of *in utero* versus lactational exposure. Toxicol Appl Pharmacol. 127 : 241-249, 1994.
 - 14) Simanainen U, Adamsson A, Tuomisto JT, Miettinen HM, Toppari J, Tuomisto J and Viluksela M : Adult 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) exposure and effects on male reproductive organs in three differentially TCDD-susceptible rat lines. Toxicol Sci. 81 : 401-407, 2004.
 - 15) Van den Berg M, Heeremans C, Veenhoven E and Olie K : Transfer of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans to fetal and neonatal rats. Fundam Appl Toxicol. 9 : 635-644, 1987.
 - 16) Hurst CH, DeVito MJ, Setzer RW and Birnbaum LS : Acute administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in pregnant Long Evans rats : association of measured tissue concentrations with developmental effects. Toxicol Sci. 53 : 411-420, 2000.
 - 17) Tsukimori K, Uchi H, Tokunaga S, Yasukawa F, Chiba T, Kajiwara J, Hirata T and Furue M : Blood levels of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in Yusho mothers and their descendants : association with fetal Yusho disease. Chemosphere. 90 : 1581-1588 (2013).
 - 18) Stølevik SB, Nygaard UC, Namork E, Haugen M, Meltzer HM, Alexander J, Knutsen HK, Aaberge I, Vainio K, van Loveren H, Løvik M and Granum B : Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from the maternal diet may be associated with immunosuppressive effects that persist into early childhood. Food Chem Toxicol. 51 : 165-172, 2013.
 - 19) Papadopoulou E, Kogevinas M, Botsivali M, Pedersen M, Besselink H, Mendez MA, Fleming S, Hardie LJ, Knudsen LE, Wright J, Agramunt S, Sunyer J, Granum B, Gutzkow KB, Brunborg G, Alexander J, Meltzer HM, Brantsæter AL, Sarri K, Chatzi L, Merlo DF, Kleinjans JC and Haugen M : Maternal diet, prenatal exposure to dioxin-like compounds and birth outcomes in a European prospective mother-child study (NewGeneris). Sci Total Environ. 484 : 121-128, 2014.
 - 20) Caspersen IH, Haugen M, Schjølberg S, Vejrur

- K, Knutsen HK, Brantsæter AL, Meltzer HM, Alexander J, Magnus P and Kvale HE : Maternal dietary exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) is associated with language delay in 3 year old Norwegian children. *Environ Int.* 91 : 180-187, 2016.
- 21) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y, and Yamada H : Fetal pituitary gonadotropin as an initial target of dioxin in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. *Endocrinology.* 147 : 927-936, 2006.
- 22) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T, and Yamada H : Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. *J Pharmacol Exp Ther.* 329 : 1091-1099, 2009.
- 23) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, and Yamada H : 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran is far less potent than 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in disrupting the pituitary-gonad axis of the rat fetus. *Toxicol Appl Pharmacol.* 281 : 48-57, 2014.
- 24) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Yamada H and Ishii Y : Attenuation of growth hormone production at the fetal stage is critical for dioxin-induced developmental disorder in rat offspring. *Biochem Pharmacol.* 186 : 114495, 2021.
- 25) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y, and Yamada H : Dioxin-induced fetal growth retardation : the role of a preceding attenuation in the circulating level of glucocorticoid. *Endocrine.* 47 : 572-580, 2014.
- 26) Waters MJ and Kaye PL : The role of growth hormone in fetal development. *Growth Horm IGF Res.* 12 : 137-146, 2002.
- 27) Edmondson SR, Werther GA, Russell A, LeRoith D, Roberts CT Jr and Beck F : Localization of growth hormone receptor/binding protein messenger ribonucleic acid (mRNA) during rat fetal development : relationship to insulin-like growth factor-I mRNA. *Endocrinology.* 136 : 4602-4609, 1995.
- 28) Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y, Yamada H. Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases : a new insight into the mechanism for the imprinting of sexual immaturity by dioxin. *J Biol Chem.* 287 : 18440-18450, 2012.
- 29) Fariello RG, Ferraro TN, Golden GT and DeMattei M : Systemic acetyl-L-carnitine elevates nigral levels of glutathione and GABA. *Life Sci.* 43 : 289-292, 1988.
- 30) Jiang X, Tian Q, Wang Y, Zhou XW, Xie JZ, Wang JZ and Zhu LQ : Acetyl-L-carnitine ameliorates spatial memory deficits induced by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C. *J Neurochem.* 118 : 864-878, 2011.
- 31) Finch JL, Brown AJ, Kubodera N, Nishii Y, Slatopolsky E : Differential effects of 1,25-(OH)₂D₃ and 22-oxacalcitriol on phosphate and calcium metabolism. *Kidney Int.* 43 : 561-566, 1993.
- 32) Smith EA, Frankenburg EP, Goldstein SA, Koshizuka K, Elstner E, Said J, Kubota T, Uskokovic M and Koeffler HP : Effects of long-term administration of vitamin D₃ analogs to mice. *J Endocrinol.* 165 : 163-172, 2000.
- 33) Lambers TT, Bindels RJ and Hoenderop JG : Coordinated control of renal Ca²⁺ + handling. *Kidney Int.* 69 : 650-654, 2006.
- 34) Sanaka T, Funaki T, Tanaka T, Hoshi S, Niwayama J, Taitoh T, Nishimura H and Higuchi C : Plasma pentosidine levels measured by a newly developed method using ELISA in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 91 : 64-73, 2002.
- 35) Saito M and Marumo K : Roles of collagen enzymatic and advanced glycation end products associated crosslinking as a determinant of bone quality. *Nihon Rinsho.* 69 : 1189-1197, 2011.
- 36) St-Arnaud R, Arabian A, Travers R, Barletta F, Raval-Pandya M, Chapin K, Depovere J, Mathieu C, Christakos S, Demay MB and Glorieux FH : Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology.* 141 : 2658-2666, 2000.
- 37) Yamaguchi M and Weitzmann MN : High dose 1,25(OH)₂D₃ inhibits osteoblast mineralization in vitro. *Int J Mol Med.* 29 : 934-938, 2012.
- 38) Nishimura N, Nishimura H, Ito T, Miyata C, Izumi K, Fujimaki H, Matsumura F : Dioxin-induced up-regulation of the active form of vitamin D is the main cause for its inhibitory action on osteoblast activities, leading to developmental bone toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 236 : 301-309, 2009.
- 39) Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. The vitamin D receptor in the proximal renal tubule is a key regulator of serum 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃.

- Am J Physiol Endocrinol Metab. 308 : 201-205, 2015.
- 40) Shiizaki K, Hatamura I, Imazeki I, Moriguchi Y, Sakaguchi T, Saji F, Nakazawa E, Kato S, Akizawa T and Kusano E : Improvement of impaired calcium and skeletal homeostasis in vitamin D receptor knockout mice by a high dose of calcitriol and maxacalcitol. Bone. 45 : 964-971, 2009.
 - 41) Walker JL, Moats-Staats BM, Stiles AD and Underwood LE : Tissue-specific developmental regulation of the messenger ribonucleic acids encoding the growth hormone receptor and the growth hormone binding protein in rat fetal and postnatal tissues. Pediatr Res. 31 : 335-339, 1992.
 - 42) Hammerman MR and Miller SB : The growth hormone insulin-like growth factor axis in kidney revisited. Am J Physiol. 265 : F1-F14, 1993.
 - 43) Rogers SA, Powell-Braxton L and Hammerman MR : Insulin-like growth factor I regulates renal development in rodents. Dev Genet. 24 : 293-298, 1999.
 - 44) Chen C, Noland KA and Kalu DN : Modulation of intestinal vitamin D receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. Mech Ageing Dev. 99 : 109-122, 1997.
 - 45) Myhrer T : Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat : a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. Brain Res Rev. 41 : 268-287, 2003.
 - 46) McClure-Begley TD, Wageman CR, Grady SR, Marks MJ, McIntosh JM, Collins AC and Whiteaker P : A novel α -conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptor modulates [(3) H]-GABA release in the superficial layers of the mouse superior colliculus. J Neurochem. 122 : 48-57, 2012.
 - 47) Li E, Kim DH, Cai M, Lee S, Kim Y, Lim E, Hoon Ryu J, Unterman TG and Park S : Hippocampus-dependent spatial learning and memory are impaired in growth hormone-deficient spontaneous dwarf rats. Endocr J. 58 : 257-267, 2011.

(Received for publication March 17, 2023)

原 著

ダイオキシン低用量暴露母体の肝薬物代謝第二相酵素活性の変動と
ポリメトキシフラボノイドの *in vitro* 阻害効果¹⁾九州大学薬学部臨床薬学科細胞生物薬学分野²⁾九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野³⁾中村学園大学栄養科学部稲次良哉¹⁾, 池田佳乃子¹⁾, 佐野宏江²⁾, 堤諒太²⁾, 太田千穂³⁾,
古賀信幸³⁾, 田中嘉孝²⁾, 石井祐次²⁾***In Vitro* Inhibitory Effects of Polymethoxyflavonoids Nobiletin
and Tangeretin on the Activity of Hepatic Phase-II Drug-
Metabolizing Enzymes in Dams Exposed to Low-Dose
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin**Ryoya INATSUGI¹⁾, Kanoko IKEDA¹⁾, Hiroe SANO²⁾, Ryota TSUTSUMI²⁾, Chiho OHTA³⁾,
Nobuyuki KOGA³⁾, Yoshitaka TANAKA²⁾ and Yuji ISHII²⁾¹⁾*Division of Pharmaceutical Cell Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University*²⁾*Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University*³⁾*Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University***Abstract**

The present study investigated the effects of polymethoxyflavonoids nobiletin and tangeretin on uridine diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) activity in the livers of dams exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Pregnant Wistar rats received TCDD (1 μ g/kg, p.o.) on gestational day (GD) 15, and the hepatic UGT activity and its inducibility using TCDD were assessed at GD20. UGT activity against *p*-nitrophenol, 4-methylumbelliferone, and SN-38 was significantly induced in hepatic S9 of TCDD-treated rats. Therefore, UGT isoforms involved in the glucuronidation of these substrates are considered TCDD-inducible in pregnant rats. Kinetic analyses were performed for pooled S9 of rats maternally exposed to TCDD and for control rats for SN-38 glucuronidation. Their K_m values were comparable, but the V_{max} value in TCDD group was greater than that in the control group. Considering the K_m value, SN-38 concentration was fixed at 10 μ M, and the inhibitory effects of nobiletin and tangeretin were studied. Nobiletin and tangeretin significantly inhibited SN-38 glucuronidation in pooled hepatic S9 in the control rats at 10 μ M. Tangeretin also inhibited SN-38 glucuronidation in the TCDD-treated dams at 10 μ M, whereas Nobiletin was inclined to inhibit it. At 100 μ M, nobiletin and tangeretin inhibited SN-38 glucuronidation in TCDD and control groups. Although their inhibitory properties were similar, tangeretin was slightly stronger than nobiletin. Thus, UGTs are involved in hormone homeostasis. Further analysis is required to determine whether nobiletin and tangeretin reduce the adverse effects of maternal exposure to TCDD via their modulation of TCDD-induced UGT activity.

Corresponding author : Yuji ISHII

Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

Tel : +81-92-642-6586 E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

Key words : TCDD, UGT, dam, polymethoxyflavonoid

はじめに

ダイオキシン類は生体に対して多様な毒性を引き起こす環境汚染物質である。1968年に西日本で発生したカネミ油症は、ライスオイルの加熱脱臭時の熱媒体として用いられた polychlorinated biphenyl (PCB) およびその加熱により生じたダイオキシン類が原因物質であると考えられており、全身倦怠感や塩素ざ瘡、色素沈着などの中毒症状がみられた¹⁾。

ダイオキシン類の影響の中でも妊娠期や授乳期の実験動物母体への暴露によって、出生児に対して低身長・低体重²⁾、学習記憶障害³⁾、社会行動の低下⁴⁾といった成長遅延、ならびに生殖器官の萎縮⁵⁾、交尾行動障害⁶⁾などの性未成熟といった影響が生じる。さらに、ヒトにおいても母親の食事由来の微量なダイオキシン類の摂取が次世代の発育に対して影響を及ぼすことも示唆されている⁷⁾。ダイオキシン類の多様な毒性の多くは、転写因子である芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) に結合して核内因子 AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子の転写を活性化することによって生じる⁸⁾⁹⁾。ダイオキシン類は化学的安定性、脂溶性が高く、また難分解性でありヒトにおける半減期が10数年となっている¹⁰⁾¹¹⁾ことから、生体に対して長期的な影響を及ぼすと考えられる。これらのことから、ダイオキシン類の慢性的な低用量暴露による影響への対策を講じることは、油症患者の症状緩和の方法構築とともに重要であると考え

られる。

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Fig. 1) は最強毒性を有するダイオキシンで、極めて微量で皮膚障害、肝障害、生殖障害、がんや奇形などの原因となることが知られている¹⁾。ダイオキシン類の多様な毒性のなかには薬物代謝酵素の誘導に起因するものがあると考えられ、AhRを介した cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) の誘導性の強さは、ダイオキシン毒性の鋭敏な指標として広く用いられている⁸⁾¹²⁾。ダイオキシン類のような AhR リガンドが誘導する遺伝子は多岐に亘り、薬物代謝第一相酵素の P450 だけでなく、第二相酵素にも影響を及ぼし、グルクロン酸抱合を司る UDP-glucuronosyltransferase (UGT) も誘導することが分かっている¹³⁾。ヒトにおいては、human UGT1A6 および UGT1A9 が、ラットにおいては、rat UGT1A6 および UGT1A7 が TCDD により誘導されると報告されている^{12)~14)}。当研究室では、TCDD 次世代毒性の解析を目的とし、妊娠母ラットへの TCDD (1 μ g/kg, p.o., gestational day (GD) 15) 投与による検討を行っている^{15)~18)}。また、他研究室のこれまでの研究により、妊娠母ラットへの TCDD 単回経口投与によって出生直前および離乳時期において児の血中甲状腺ホルモン濃度低下¹⁹⁾²⁰⁾が見られ、また妊娠期、授乳期の継続的な TCDD 処理による母体甲状腺ホルモン低下とそれに伴う児の血中レベルの低下が報告されている。TCDD による児の甲状腺ホルモンレベル低下の機構には TCDD による UGT の誘導が寄与する可能性が示唆されてお

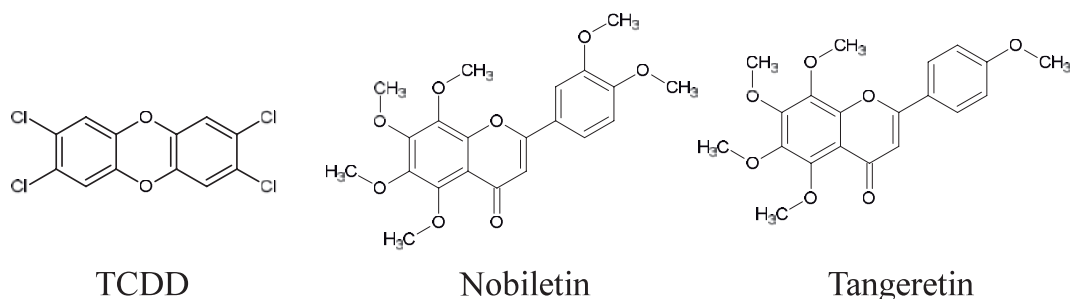


Fig. 1 Structure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), Nobiletin and Tangeretin.

り¹⁹⁾²⁰⁾, これは TCDD 妊娠期暴露による発育障害の一因と考えられる。しかし, TCDD 処理した妊娠母体を対象とする第Ⅱ相薬物代謝酵素の変動については, 当研究室の先行研究で GD18 および GD19 における妊娠母体肝臓 UGT mRNA レベルが調べられているものの, 実際の活性に対する影響など, 未だ詳しい研究が行われていない²¹⁾。そこで本研究では GD15 の母ラットへ TCDD (1 μ g/kg) 経口投与し, GD20 における母体肝臓での UGT 活性の変動を解析することで TCDD による次世代毒性へのグルクロン酸抱合の関与について考察し, 次いで UGT 発現誘導に対する改善策の構築を目的とする。ラット妊娠母体に TCDD 低用量暴露させた際の肝臓での UGT の活性の変動とそれらの変動に対する防御策の検討を行った。

先行研究により, ラットの UGT 分子種が多様な薬物を代謝することが分かっており, 4-methylumbelliferone (4-MU) を基質とする分子種として, 多環芳香族炭化水素により AhR を介して誘導される UGT1A6, UGT1A7 が知られている¹³⁾。また, フェノバルビタール誘導性の UGT2B1²²⁾, モノテルペノイドに特異性を示す UGT2B12²³⁾ も 4-MU を基質にする。4-MU は UGT に対する普遍的な基質であり, 上述の分子種だけでなく, ラットにおいて UGT1A1, 1A2, 1A3 など含む広範な UGT 分子種が基質とする²⁴⁾。また, HPLC による測定法も確立されている²⁵⁾。p-Nitrophenol (p-NP) はアルカリ性で黄色を呈し, また抱合により脱色することを利用した消失法が, 測定の容易さから汎用されてきた²⁶⁾。p-NP の抱合活性が多環芳香族炭化水素誘導性であることがよく知られており²⁷⁾, この活性を指標に酵素が精製され, cDNA クローン化されたのが rat UGT1A6 である²⁶⁾。UGT2B12 にも p-NP 抱合活性があることが分かっている²³⁾。p-NP は, 有機リン系農薬であるパラチオン, メチルパラチオンの微生物分解によって生じ, 水質汚濁の指標に用いられる物質であり²⁹⁾, ラットにおいては UGT1A6 に活性が高いことが知られている²⁶⁾。また, p-NP についても, HPLC による測定法が確立されている²⁵⁾。抗がん剤であるイリノテカンの活性代謝物である SN-38 はラットで主に rat UGT1A1, 1A7, 1A8 によりグルクロン酸抱合を受け, また, ヒトにおいては human UGT1A1,

1A7, 1A9, 1A8 で抱合される³⁰⁾ことが知られている。これらの基質に対する UGT 活性が, TCDD 低用量暴露母体の肝臓でどのように変動するのかは未だ検討された例はなく, 本研究ではこれを研究対象とした。

ダイオキシン毒性に対して, レスベラトロール, クルクミンなどのポリフェノール類³¹⁾³²⁾や多くのフラボノイド類がその毒性軽減に有効であると報告されている^{33)~37)}。柑橘類に含まれるヘスペリジン³³⁾³⁴⁾や, リンゴなどに含まれるケルセチン³⁵⁾³⁶⁾, ケンフェロール³⁷⁾などがその例である。本研究では, TCDD 毒性に対する防御策として期待されるノビレチン (NBL, 3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone) およびタンゲレチン (TNG, 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone) を *in vitro* における検討に用いた (Fig. 1)。ノビレチンは柑橘系植物, 特にシークワーサーに多く含まれるポリメトキシフラボノイドの一種であり, 抗炎症作用³⁸⁾³⁹⁾, 抗認知症作用⁴⁰⁾, 抗がん作用⁴¹⁾⁴²⁾及び抗肥満作用⁴³⁾などの多様な作用を示すことが知られている。TCDD 毒性に関する報告では, U937 ヒトマクロファージで TCDD によって誘導された human CYP1A1 を mRNA レベルで発現抑制すること⁴⁴⁾, また当研究室では Luciferin 誘導体をマーカー基質とした rat CYP1A1, 1A2, 2C6 および 3A に対する活性の阻害作用を報告している¹⁸⁾が, UGT の活性に及ぼす影響に関する情報は筆者の知る限り乏しい。タンゲレチンも同様に, 柑橘系植物, 特にタンジェリンに多く含まれるポリメトキシフラボノイドであり, 抗炎症作用⁴⁵⁾や抗糖尿病作用⁴⁶⁾, 抗がん作用⁴⁷⁾などが報告されている。タンゲレチンはヒト大腸腺がん株を対象とした *in vitro* 実験で, human CYP1A2 に対し阻害を示すこと⁴⁸⁾, また TCDD 毒性に関しては Caco-2 細胞で TCDD によって誘導された human CYP1A1, CYP1A2 を mRNA レベルで発現抑制することが報告されている⁴⁹⁾が, UGT 活性への影響に関する報告は筆者の知る限り未だなされていない。よって本研究では, 妊娠母体に対する TCDD 低用量暴露による母体肝臓の UGT 活性の誘導作用を調べ, UGT 活性変動に対するノビレチンおよびタンゲレチン添加効果を解析することで, TCDD 次世代毒性に対するこれらポリメトキシフラボノイドの有効性を検討した。

実験方法

1. 試薬

4-Methylumbelliferon (4-MU) : Sigma-Aldrich (東京)

p-Nitrophenol (*p*-NP), 4-MU-glucuronide, *p*-nitrophenyl- β -D-glucuronide, UDP-glucuronic acid (UDPGA, trisodium salt), Brij-58 : ナカライテスク (京都)

ノビレチン : INDOFINE Chemical Company のものをフナコシ(株)より購入した。

タンゲレチン : 富士フイルム Wako (東京)。

SN-38, SN-38-glucuronide : 株式会社ヤクルト本社より供与された。

2. 動物実験

本研究における動物実験は、九州大学動物実験委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した。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 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}/2 \text{ mL corn oil}$) を単回経口投与した。対照群には、Corn oil のみを投与した。胎生 20 日目 (GD20) の胎児は母体から摘出し、次世代毒性の解析に供した⁵⁰⁾。また、母体の肝臓を摘出し、液体窒素にて凍結したのち、使用まで -80°C にて凍結保存した。

3. S9 サンプル調製

GD20 母体 1 匹分当たり 1 g を 0.25 M スクロース 3 mL でホモジナイズした。そののち、 $9,000 \times g$, 4°C で 20 分間遠心分離した。得られた上清 (S9) を分注し、使用するまで -80°C にて保存した。タンパク質定量は、Lowry らの方法に基づいて行った。なお、標準タンパク質として bovine serum albumin (BSA) を用い、吸光度測定には HITACHI U-1800 Spectrophotometer を用いた。

4. UGT 活性測定

基質として 4-MU, SN-38, *p*-NP を用い、UGT の活性測定を行った。有機溶媒の終濃度は全て 1% 以下になるよう調節した。S9 サンプルと Brij-58 ($0.25 \text{ mg}/\text{mg}$ of protein) と混合後、30 分間氷

上で処理したのちに活性測定に供した。UDPGA を含む buffer を加えた後、 37°C , 10 分プレインキュベーションし、酵素反応は S9 の添加により開始し、 37°C , 60 分インキュベーションした。反応はいずれの基質に対しても 1 M TCA 溶液を $100 \mu\text{L}$ 添加することで停止させた。30 分間氷冷後、 $13,000 \text{ rpm}$, 4°C , 10 分遠心し、上清を HPLC 解析に供した。生成物であるグルクロニドの定量は、いずれの基質においても各々のグルクロニドを標品とした絶対検量線法にて行った。HPLC 条件は以下に示す通りで、移動相および測定条件は 4-MU²⁵⁾, SN-38⁵¹⁾, *p*-NP²⁵⁾, それぞれの基質に対し先行研究にて適用された条件を参考に設定した。

HPLC 条件

装置 : HITACHI Chromaster 5110 Pump, 5210 Auto sampler, 5440 FL Detector, 5420 UV-VIS Detector, 5310 Column Oven

Column : Nova-Pak® C18 cartridge ($4 \mu\text{m}$, $8 \times 100 \text{ nm}$: Waters) を RCM $8 \times 10 \text{ Module}$ (Waters) に充填したものを、Nova-Pak® C18 Guard Column ($60 \text{ \AA}$, $4 \mu\text{m}$, $3.9 \text{ nm} \times 20 \text{ mm}$) に連結して使用した。

5. データ解析

データ解析には Graphpad Prism® 8.02 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA) で行った。全ての 2 群間の比較については、Student's *t* test を用いて解析した。有意水準は $p < 0.05$ とした。また、kinetics の結果は Michaelis-Menten 式に非線形解析を行い、各パラメーターを算出した。

酵素阻害における IC_{50} (half maximum inhibitory concentration) の算出は以下の式に当てはめて行った。

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{((\log(\text{IC}_{50}) - \log(X)) * \text{Hillslope}))}}$$

この数式において、酵素活性 (Y) は阻害剤の濃度 (X) と 4 つのパラメータにより表現される。Top は阻害剤濃度 $Y=0$ のときの酵素活性を表し、Bottom は阻害剤濃度が無限大の時の活性を示している。また、Hillslope の値が大きいほど IC_{50} 付近のグラフの傾きは急になる。

実 験 結 果

1. TCDD 低用量暴露母体肝での UGT 酵素活性変動

4-MU, *p*-NP, SN-38 を基質とし, 活性測定を実施した. S9 のタンパク量を, 4-MU, SN-38 では $50 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, *p*-NP に対しては $200 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ として解析を行った. 基質濃度はいずれの基質に対しても低濃度側, 高濃度側の 2 点で測定を実施し, 先行研究の K_m 値を参考に, 4-MU は終濃度 $50 \mu\text{M} \cdot 200 \mu\text{M}^{(25)(52)}$, *p*-NP は終濃度 $100 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{M}^{(25)}$, SN-38 は終濃度 $30 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{M}^{(53)}$ に設定した. その結果, Control 群と比較して TCDD 群ではいずれの基質に対しても, 低濃度・高濃度双方でグルクロン酸抱合活性が有意に増加した (Fig. 2). SN-38 はどちらも Control 群より高い活性を示したが, 低濃度・高濃度での酵素活性に差がみられないことから, 本条件においてラット肝 S9 の SN-38 の K_m 値は $30 \mu\text{M}$ よりも低濃度側にあることが示唆された.

2. ノビレチン, タンゲレチンによる *in vitro* での UGT 活性に対する阻害効果

次に, SN-38 を基質としてノビレチン及びタンゲレチンの UGT に対する阻害効果を検討した. SN-38 の終濃度は, 算出されたキネティックスパラメーター (K_m , $V_{\max}$) (Table 1) を基に $10 \mu\text{M}$ に設定した. 阻害剤として添加したノビレチンおよびタンゲレチンは SN-38 と同じく DMSO に溶解し, 終濃度 $1 \sim 100 \mu\text{M}$ の範囲で反応させた. 酵素源として, 5 匹の母ラット肝臓のサンプルを等量混和したプールド S9 サンプルを用い, 酵素を添加することで反応を開始させた. 算出さ

れた IC_{50} 値はいずれも本条件の最高濃度である $100 \mu\text{M}$ より大きな値となった. 本結果を基に, ノビレチンおよびタンゲレチン濃度 $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ における阻害効果を検討した. ノビレチンおよびタンゲレチンの代わりに DMSO を同量添加し反応させた対照と比較した. ダイオキシンを投与していない母体の肝臓由来のプールドした Control の S9 に, ノビレチンおよびタンゲレチンは $10 \mu\text{M}$ で有意な阻害効果を示し, また高濃度側の $100 \mu\text{M}$ においても同様に阻害作用を示した (Fig. 3). また, Control の S9 に対してノビレチンには, 低濃度より高濃度で阻害作用が強くなる傾向があったが, タンゲレチンでは低濃度と高濃度間で同程度の阻害作用を示した. 一方, TCDD 妊娠期暴露した母体の肝臓由来のプールドした S9 において, タンゲレチンは $10 \mu\text{M}$ で有意な阻害作用を示したが, ノビレチン $10 \mu\text{M}$ では UGT 活性の減少傾向にとどまった. また, 高濃度側においては, ノビレチンおよびタンゲレチンは, ほぼ同様の阻害作用を示した. ノビレチンおよびタンゲレチンいずれにおいても, 低濃度に比べて高濃度では阻害効果が有意に強くなっていた. このように, ラット肝 S9 分画を用いた *in vitro* での検討ではノビレチンおよびタンゲレチンによる UGT 阻害効果が確認された. これらの阻害作用は類似していたものの, タンゲレチンの方がノビレチンよりも僅かに, 阻害効果が強い結果となった.

考 察

本研究では, TCDD 妊娠期低用量暴露した母ラットの肝臓の UGT 活性を測定し, さらに SN-38 を基質とした UGT 活性に対するノビレチン・タンゲレチンの影響について検討した. 高濃度お

Table 1 The kinetic parameters for UGT activity in rat liver S9 toward SN-38.

Enzyme source (S9)	K_m (μM)	$V_{\max}$ (pmol/min/mg protein)
Control	8.69 ± 2.62	6.52 ± 0.51
TCDD	9.42 ± 2.64	11.8 ± 0.9

S9 samples were prepared from the liver homogenate of pregnant rats (GD20) orally treated with TCDD ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) or vehicle (corn oil). S9 samples of 5 rats were pooled and subjected to the assay. Pooled S9 sample ($50 \mu\text{g}$ protein) was used for each assay. SN-38 concentrations were varied ranging from 1 to $100 \mu\text{M}$. UDPGA concentration was fixed at 2 mM . Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of triplicate assay.

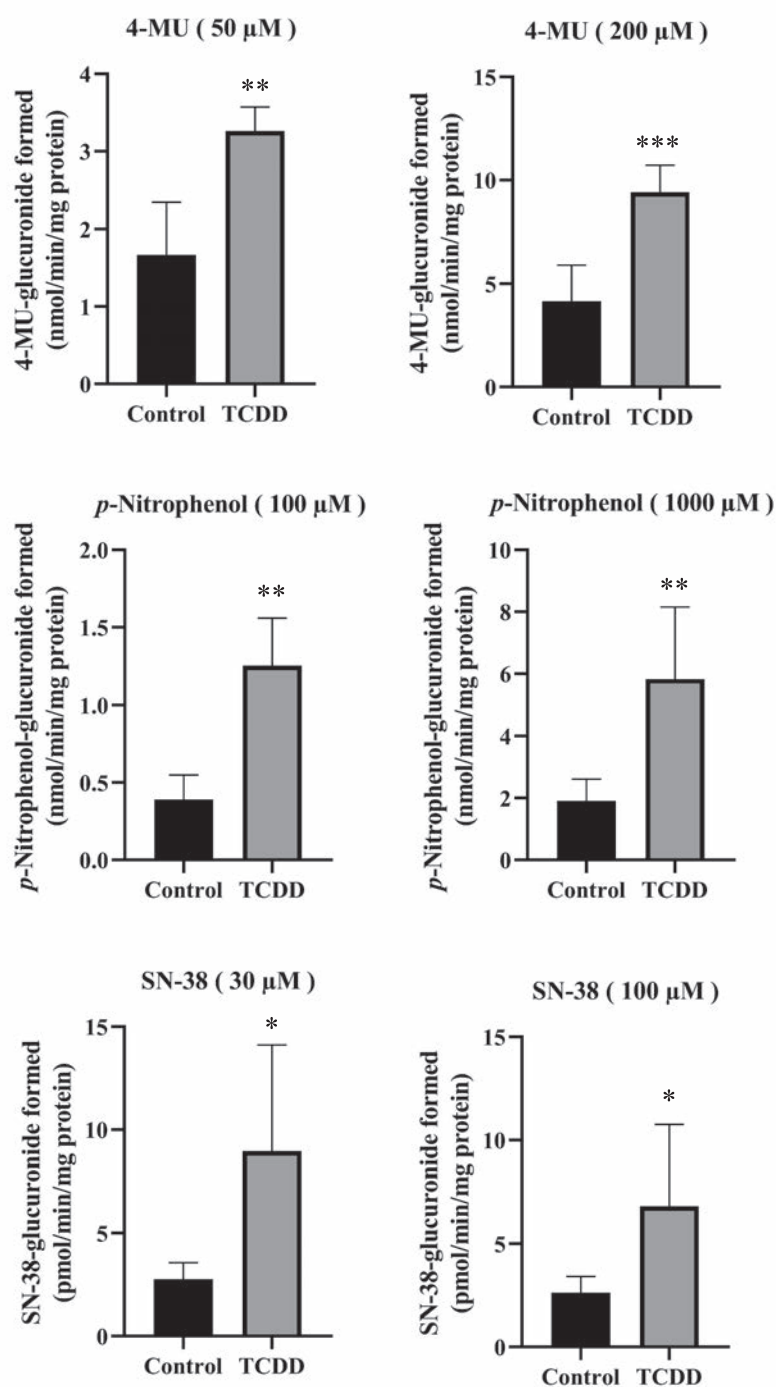


Fig. 2 Effect of maternal exposure to TCDD (1 $\mu\text{g/kg}$ at GD15) on the hepatic glucuronidation activity in dams at GD20 toward 4-MU, *p*-nitrophenol and SN-38. Control group was treated with corn oil at GD15. S9 was prepared from dam liver at GD20. Glucuronidation activities toward 4-MU, *p*-nitrophenol and SN-38 were assayed at indicated concentrations. UDPGA concentration was fixed at 2 mM. Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M. of 5 rats. Significantly different from Control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

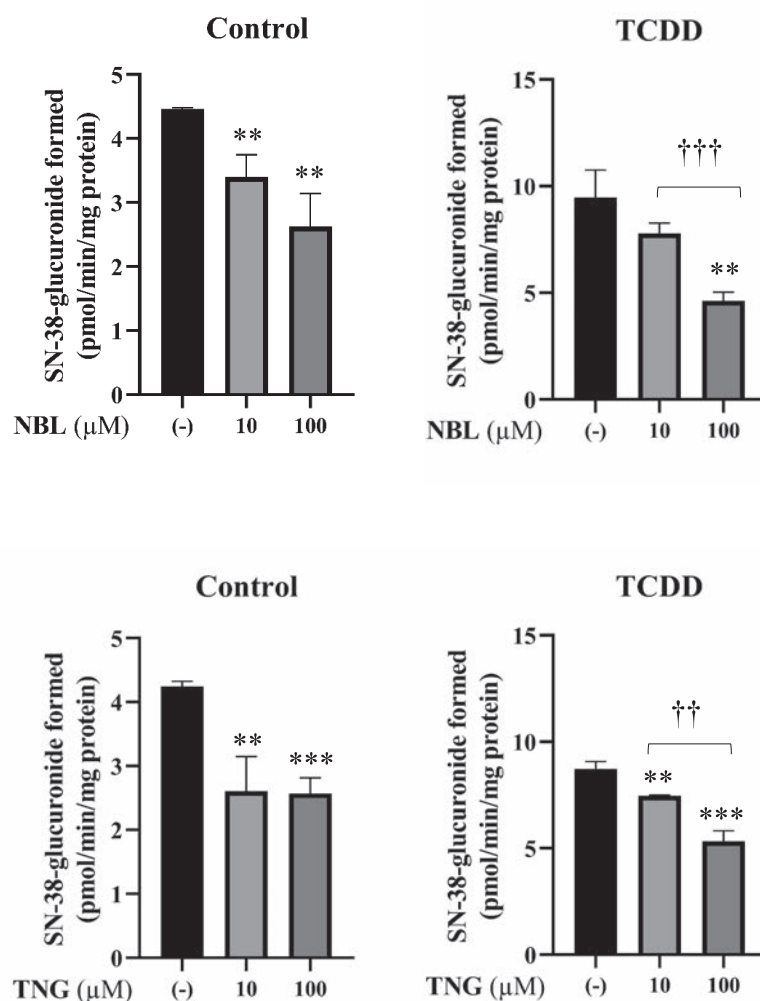


Fig. 3 Effect of nobiletin (NBL) and tangeretin (TNG) *in vitro* on the glucuronidation activity in hepatic S9 of pregnant rats (GD20) exposed to TCDD (1 μ g/kg at GD15). Control group was treated with corn oil at GD15. S9 samples of 5 rats of control group or TCDD-group were pooled and subjected to the assay. NBL and TNG were added at indicated concentration. For S9 without NBL and TNG, DMSO was added as a vehicle. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of triplicate assays. Significantly different from S9 without NBL or TNG : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significantly different between the pair indicated : †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$.

よび低濃度の基質濃度 2 点を対象とした 4-MU, *p*-NP および SN-38 に対する UGT 活性測定の結果, いずれの基質に対しても TCDD 処理群の方が活性が高かったことから (Fig. 2), TCDD 母体暴露によりこれらの基質の抱合に参与する UGT 分子種が誘導されたと考えられる. TCDD による rat UGT1A6, 1A7 の誘導については広く知られており^{12)~14)}, AhR 活性化を介したメカニズムについても考察がなされている^{12)~14)}. また, 先

行研究において TCDD 低用量暴露による肝臓での rat UGT1A6/7 の mRNA レベルの解析が行われており, 胎児においては増加傾向, 母体においては顕著な誘導がみられている²¹⁾. 筆者が知る限り現在までに検証した報告はないため, rUGT1A7 が *p*-NP 抱合活性を示す可能性は否定できないが, *p*-NP 抱合活性を有する rUGT1A6 は AhR を介して誘導される (なお, 当時は命名法が定まっていなかったため, 多環芳香族炭化水

素により誘導される UGT 分子種を CYP1A1 に倣って、UGT1A1 と記述されていることに留意する必要がある)⁵⁴⁾、よって、*p*-NP に対する抱合活性が TCDD 妊娠期暴露により有意に上昇したことは、少なくとも UGT1A6 が誘導されたことによると考えられる。また、SN-38 抱合活性を有するラットの UGT 分子種のうち TCDD 誘導性が分かっているのは rUGT1A7 である³⁰⁾。従って、SN-38 に対する抱合活性が TCDD 低用量暴露により有意に上昇したことは、rUGT1A7 が誘導されたことによると考えられ、同用量で GD18 および GD19 にて実施された先行研究²¹⁾を支持する結果となった。4-MU は多くの UGT 分子種に抱合を受けると考えられるが、冒頭でも記述したようにダイオキシン誘導性の rUGT1A6 および rUGT1A7 でも代謝を受けることが知られている¹³⁾。このことから、TCDD 母体暴露により誘導されたこれら分子種により 4-MU に対する抱合活性が有意に上昇したためと考えられる。TCDD により誘導された rUGT1A7 は甲状腺ホルモンであるチロキシン (T4) の抱合に関与することが報告されており¹⁴⁾、これが母体における甲状腺ホルモンレベルの減少に関与していると考えられている。本研究の結果から TCDD 妊娠期低用量暴露によって母体肝における rUGT1A7 の誘導が示唆されたことから、母体において甲状腺ホルモンレベルも同様の機構で低下し、これが間接的に児の甲状腺ホルモンレベルへ影響する可能性がある。

次いで、TCDD 低用量暴露した妊娠母体肝において誘導されたと考えられる rUGT1A7 の触媒する活性として SN-38 抱合活性を指標とし、プールした S9 に対する 2 種のポリメトキシフラボノイドの阻害活性を評価した (Fig. 3)。結果、ノビレチン及びタンゲレチンはダイオキシン処理していない対照群の母体肝臓のプールした S9 において基質濃度と同濃度である 10 μ M で UGT 活性を有意に阻害した。また、ノビレチンには 100 μ M において阻害作用が僅かに強くなる傾向があったが、タンゲレチン 100 μ M では、10 μ M の時と阻害効果はほぼ同じであり、高濃度にするることによる影響は小さかった。ノビレチンの高濃度における阻害作用は、タンゲレチンと遜色なかった。ラット肝に発現している UGT 分子種のうち、

SN-38 の抱合速度は UGT1A7, 1A8, 1A1 の順に高い³⁰⁾との報告があるものの、UGT1A7 および 1A8 は恒常的な発現量が低く、mRNA レベルでは UGT1A1 と比べ 1/10 に満たない⁵⁵⁾程度である。そのため、それぞれその恒常的な発現量を考慮すると構成的条件下では、SN-38 の主要抱合酵素は rUGT1A1 である。ダイオキシン暴露していない母体肝臓の S9 においては、ノビレチン及びタンゲレチンは主に恒常的に発現している rUGT1A1 に対して阻害効果を示し、ノビレチンよりタンゲレチンの方がやや rUGT1A1 に対する阻害効果が高いことが示唆された。また、高濃度ではいずれも同程度 rUGT1A1 活性を低下させると考えられた。ヒト肝癌細胞由来である HepG2 細胞でポリメトキシフラボノイドによる hUGT1A1 発現量の変動を ELISA 法を用いて検討した研究が行われており、その結果ノビレチンでは hUGT1A1 発現量に影響を及ぼさなかったものの、タンゲレチンでは hUGT1A1 発現量を上昇させたとの報告がある⁵⁶⁾。本研究では、cell-free の実験系を用い *in vitro* での添加効果を調べている。代謝物による影響が一部ある可能性は否定できないものの、基本的に UGT に対するポリメトキシフラボノイドの直接の影響を見たものと考えて良いだろう。そのため、酵素活性を測定する際にタンパク質レベルが変動することは考えづらい。一方、先行研究⁵⁶⁾では、ELISA 法を用いて調べており、活性を測定したのではなく hUGT1A1 のタンパク質としての発現量を定量していることになる。従って、細胞に添加したタンゲレチンが実際に UGT1A1 による抱合活性にどのように影響したのかが調べられているわけではない。また、細胞にポリメトキシフラボノイドを添加しているため、代謝の影響が無視できない上に、遺伝子発現を変動させる転写調節因子にも影響を与える可能性がある。本研究はラット肝臓 S9 を用いたものであり、この先行研究はヒト由来細胞を用いているという違いもあるが、タンゲレチンがラット UGT1A1 を阻害するだけでなくヒト UGT1A1 にも類似の影響を及ぼす可能性は否定できない。このように、本研究から、タンゲレチンがラット UGT1A1 による SN-38 抱合活性を低下させる作用があることが分かった。

また TCDD 母体暴露した母ラット肝臓 S9 に

よる SN-38 抱合活性に対しては、低濃度のタンゲレチンでは有意な活性低下作用が見られたが、低濃度ノビレチンでは減少傾向にとどまった。また高濃度ではどちらも有意な活性低下作用があり、遜色なかった。TCDD 暴露した母ラット肝臓には UGT1A7 が誘導されていると考えられ、ここで検討した 2 種のポリメトキシフラボノイドの SN-38 抱合活性の低下作用は類似しているものの、タンゲレチンの方がノビレチンよりも僅かに強いことが分かった。このことは、濃度増大による阻害効果の増強の度合いがノビレチンの方に顕著だったことから支持される。TCDD 母体暴露した母ラット肝臓 S9 には rUGT1A1 が含まれているだけでなく、TCDD により誘導された rUGT1A7 も含まれており、後者の SN-38 抱合への寄与が大きいと考えられる。従って、阻害効果も、構成的発現をしている rUGT1A1 と TCDD により誘導された rUGT1A7 の両方に対するものであると言えよう。ポリメトキシフラボノイドがダイオキシンによる rUGT1A7 の誘導作用を阻害するか否かは今後の課題であるが、ダイオキシンで誘導された rUGT1A7 が触媒する抱合活性を適度に阻害することは期待される。

次に、これら 2 種類のポリメトキシフラボノイドによる阻害効果の差に関して考察する。ノビレチン及びタンゲレチンはともに CYP による酸化を受けることが知られている。本研究において用いた TCDD 妊娠期暴露した母ラット肝臓 S9 サンプルでは、UGT のみならず CYP も TCDD による誘導を受けていると考えられる¹⁷⁾。本研究で S9 に添加した補酵素は UDPGA のみであるが、内在性の補酵素も一部残存していると考えられる。ラット肝においてノビレチンは CYP による脱メチル化反応を受け、4'-OH, 7-OH, 6-OH, 3', 4'-diOH, 6,7-diOH に代謝され⁵⁷⁾、中でも 4'-OH 体の生成は CYP2C11, 次いで rCYP1A1 の寄与が最も大きく、7-OH 体の生成には CYP2C11 の影響が突出して大きく、次いで CYP3A1 及び CYP3A2 が関与している。6-OH 体の生成には CYP2C11, CYP2D1, CYP3A1 および CYP3A2 がほぼ同程度で関与している。ラットでは 4'-OH 体が主要代謝物であるが、その生成に主に関与する CYP2C11 は雄に特異的な分子種であり⁵⁸⁾、この代わりに雌では CYP2C6 による代謝が起こる

ことが推測されている¹⁸⁾。マーカーとなる酵素活性を基にすると、TCDD 低用量暴露母体の肝臓において CYP2C6 および rCYP1A1 のマーカー活性が誘導される¹⁸⁾ことから、TCDD 暴露群母ラットからのプールした S9 では誘導された CYP による代謝を一部は受け、主に 4'-OH, 7-OH, 6-OH の形でノビレチン代謝産物が生成されたと推定される。ノビレチン及びタンゲレチンが直接 UGT を阻害する可能性もあるが、これら代謝物が UGT に対する阻害効果を示した可能性もある。一方タンゲレチンはラット肝において CYP による脱メチル化反応や水酸化反応を受け、4'-OH, 3',4'-diOH, 4',6-diOH に代謝される⁵⁹⁾⁶⁰⁾ことが報告されている。どの CYP 分子種が代謝に寄与するかの報告は乏しいが、CYP1A が 3' の水酸化反応に、その他の CYP が脱メチル化反応に関与することが報告されている⁵⁹⁾。ヒト肝を対象とした検討ではタンゲレチンの代謝物としては 4'-OH, 5,6-diOH, 3',4'-diOH, 4',7-diOH, 4',6-diOH があり⁶¹⁾、4'-OH 体への代謝は CYP1A2 の関与が最も大きく、ついで CYP3A4 となっている。3',4'-diOH は CYP1A2, CYP3A4 が同程度に関与することが確認されており⁶¹⁾、ラットにおいて CYP1A が脱メチル化に関与する点で類似性がみられる。ラットにおいて知られている上述の 3 つの代謝物のうち 4'-OH 体が主要代謝物であり、次いで 3',4'-diOH, 4',6-diOH とされている⁵⁹⁾⁶⁰⁾。これらのことから、ノビレチン同様にタンゲレチンも TCDD 低用量暴露母体肝臓において誘導された CYP 分子種で酵素的脱メチル化反応や水酸化反応を受け、4'-OH, 3',4'-diOH, 4',6-diOH となると推測される。先行研究において母体に対する TCDD 低用量暴露により rCYP1A2 活性に増加傾向がみられる¹⁸⁾ことも、本推測を支持する。今回用いた 2 種のポリメトキシフラボノイドの阻害効果の差において、CYP により代謝を受け、脱メチル化ないし水酸化され生成された代謝物の構造に着目すると、タンゲレチンにおいて主要代謝物の水酸基数がノビレチンのそれよりも多いことがわかる。阻害作用には構造的な特性が最も重要と考えるものの、二つの化合物の予想代謝物は極めて類似した構造であり、水酸基数に違いがある。グルクロン酸抱合反応は対象化合物の水酸基に対して UDPGA よりグルクロン酸を転移する反応

であることから、主要代謝物の水酸基数の差によって、ノビレチンよりもタンゲレチンの方が強い阻害効果を示した可能性はある。

本研究で実施した阻害実験の濃度範囲では2種の阻害剤のIC₅₀を算出するには至らなかったが、いずれのポリメトキシフラボノイドも母体におけるTCDD低用量暴露により誘導されたUGTに対し、基質濃度と同濃度で阻害効果を示した。TCDDにより誘導されたrUGT1A7は甲状腺ホルモンであるT₄の主要抱合酵素として働く¹⁴⁾ことが報告されている。TCDDによる児の発育障害には、児の成長ホルモンの低下⁶²⁾や母親のプロラクチンの低下による低育児⁶³⁾が重要であるが、冒頭にも述べたように、児の甲状腺ホルモンレベルの低下も一因とされており¹⁹⁾²⁰⁾、出生後は児における影響が主と思われるが、胎児期においては母体における甲状腺ホルモンレベル減少に伴う児での甲状腺ホルモン減少が関与していると考えられている⁶⁴⁾。本研究により*in vitro*でノビレチン及びタンゲレチンが母体肝臓S9におけるTCDD誘導性のrUGT1A7のSN-38抱合活性を低下させることが示された。これらの食事由来ポリメトキシフラボノイドの摂取が*in vivo*においてもダイオキシン誘導性UGT1A7阻害するか否かは今後の課題である。ノビレチンやタンゲレチンの摂取が、UGT1A7の適度な阻害を通じた甲状腺ホルモンの過剰な抱合の抑制、ならびに児における発育障害の抑制につながることが期待される。

結 論

比較的低用量のTCDD (1 µg/kg, p.o.) を妊娠ラットGD15に暴露することよりGD20の母体肝臓において、4-MU、*p*-NPおよびSN-38のグルクロン酸抱合活性が有意に上昇したことから、rUGT1A6およびrUGT1A7の誘導が起こったと推察された。

ノビレチン及びタンゲレチンは*in vitro*でダイオキシンで誘導されたSN-38抱合活性を有意に阻害した。

SN-38抱合活性をrUGT1A7が触媒するT₄抱合活性測定のための代替と考え、これらのポリメトキシフラボノイドが甲状腺ホルモンの過剰な抱合を抑制し得る食事由来成分として期待された。

これらの食餌由来ポリメトキシフラボノイドの

摂取が*in vivo*においてもダイオキシン誘導性rUGT1A7阻害するか否かは今後の課題である。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)(課題番号:H30-食品-指定-005, R3-食品-指定-JP21KA2003)、科学研究費補助金(基盤研究A JSPS KAKENHI JP17H00788, 基盤研究A JSPS KAKENHI JP21H04928)によった。

参 考 文 献

- 1) Furue M, Ishii Y, Tsukimori K and Tsuji G: Aryl Hydrocarbon Receptor and Dioxin-Related Health Hazards-Lessons from Yusho. *Int J Mol Sci.* 22 : 708, 2021.
- 2) Thiel R, Koch E, Ulbrich B and Chahoud I: Peri- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: effects on physiological development, reflexes, locomotor activity and learning behaviour in Wistar rats. *Arch Toxicol.* 69 : 79-86, 1994.
- 3) Zhang HJ, Liu YN, Xian P, Ma J, Sun YW, Chen JS, Chen X and Tang NJ: Maternal exposure to TCDD during gestation advanced sensory-motor development, but induced impairments of spatial learning and memory in adult male rat offspring. *Chemosphere.* 212 : 678-686, 2018.
- 4) Negishi T, Shimomura H, Koyama T, Kawasaki K, Ishii Y, Kyuwa S, Yasuda M, Kuroda Y and Yoshikawa Y: Gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin affects social behaviors between developing rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Toxicol Lett.* 160 : 233-244, 2006.
- 5) Gray LE, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS and Birnbaum LS: Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol.* 131 : 108-118, 1995.
- 6) Wilker C, Johnson L and Safe S: Effects of developmental exposure to indole-3-carbinol or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on reproductive potential of male rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol.* 141 : 68-75, 1996.
- 7) Stølevik SB, Nygaard UC, Namork E, Haugen M, Meltzer HM, Alexander J, Knutsen HK,

- Aaberge I, Vainio K, van Loveren H, Løvik M and Granum B : Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from the maternal diet may be associated with immunosuppressive effects that persist into early childhood. *Food Chem Toxicol.* 51 : 165-172, 2013.
- 8) Poland A and Knutson JC : 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.
 - 9) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35 : 307-340, 1995.
 - 10) Aylward LL, Collins JJ, Bodner KM, Wilken M and Bodnar CM : Elimination rates of dioxin congeners in former chlorophenol workers from Midland, Michigan. *Environ Health Perspect.* 121 : 39-45, 2013.
 - 11) Shirai JH and Kissel JC : Uncertainty in half-lives of PCBs in human : impact in exposure assessment. *Sci Total Environ.* 187 : 199-210, 1996.
 - 12) Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y and Dalton TP : Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 59 : 65-85, 2000.
 - 13) Bock KW, Gschaidmeier H, Heel H, Lehmköster T, Münzel PA, Raschko F and Bock-Hennig B : AH receptor-controlled transcriptional regulation and function of rat and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Adv Enzyme Regul.* 38 : 207-222, 1998.
 - 14) Emi Y, Ikushiro S and Kato Y : Thyroxine-metabolizing rat uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A7 is regulated by thyroid hormone receptor. *Endocrinology.* 148 : 6124-6133, 2007.
 - 15) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T and Yamada H : Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. *J Pharmacol Exp Ther.* 329 : 1091-1099, 2009.
 - 16) Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases : a new insight into the mechanism for the imprinting of sexual immaturity by dioxin. *J Biol Chem.* 287 : 18440-18450, 2012.
 - 17) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H and Ishii Y : The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. *Biochem Pharmacol.* 154 : 213-221, 2018.
 - 18) 池田佳乃子, 佐野宏江, 宮内優, 太田千穂, 古賀信幸, 田中嘉孝, 石井祐次 : ダイオキシン低用量曝露母体の肝薬物代謝酵素活性に対するシークワサー由来ポリメトキシフラボノイド : ノビレチンの *in vitro* 阻害効果. *福岡医誌.* 112 : 136-147, 2021.
 - 19) Nishimura N, Yonemoto J, Nishimura H, Ikushiro S and Tohyama C : Disruption of thyroid hormone homeostasis at weaning of Holtzman rats by lactational but not in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Sci.* 85 : 607-614, 2005.
 - 20) Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Sato M and Tohyama C : Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Endocrinology.* 144 : 2075-2083, 2003.
 - 21) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y and Yamada H : Dioxin-induced fetal growth retardation : the role of a preceding attenuation in the circulating level of glucocorticoid. *Endocrine.* 47 : 572-580, 2014.
 - 22) Mackenzie PI : Rat liver UDP-glucuronosyltransferase. Sequence and expression of a cDNA encoding a phenobarbital-inducible form. *J Biol Chem.* 261 : 6119-6125, 1986.
 - 23) Green MD, Clarke DJ, Oturu EM, Styczynski PB, Jackson MR, Burchell B and Tephly TR : Cloning and expression of a rat liver phenobarbital-inducible UDP-glucuronosyltransferase (2B12) with specificity for monoterpenoid alcohols. *Arch Biochem Biophys.* 322 : 460-468, 1995.
 - 24) Yu C, Ritter JK, Krieg RJ, Rege B, Karnes TH and Sarkar MA : Effect of chronic renal insufficiency on hepatic and renal udp-glucuronosyltransferases in rats. *Drug Metab Dispos.* 34 : 621-627, 2006.
 - 25) Hanioka N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T and Ando M : Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 activity in human and rat liver microsomes by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal.* 25 : 65-75, 2001.
 - 26) Iyanagi T, Haniu M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Watanabe S, Shively JE and Anan KF : Cloning and characterization of cDNA encoding 3-methylcholanthrene inducible rat mRNA for

- UDP-glucuronosyltransferase. J Biol Chem. 261 : 15607-15614, 1986.
- 27) Bock KW, Josting D, Lilienblum W and Pfeil H : Purification of rat-liver microsomal UDP-glucuronyltransferase. Separation of two enzyme forms inducible by 3-methylcholanthrene or phenobarbital. Eur J Biochem. 98 : 19-26, 1979.
 - 28) Chaudhry GR, Ali AN and Wheeler WB : Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. Appl Environ Microbiol. 54 : 288-293, 1988.
 - 29) Tchieno FMM and Tonle IK : *p*-Nitrophenol determination and remediation : an overview. Rev Anal Chem. 37 : 20170019, 2018.
 - 30) Tallman MN, Ritter JK and Smith PC : Differential rates of glucuronidation for 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) lactone and carboxylate in human and rat microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms. Drug Metab Dispos. 33 : 977-983, 2005.
 - 31) Ishida T, Takeda T, Koga T, Yahata M, Ike A, Kuramoto C, Taketoh J, Hashiguchi I, Akamine A, Ishii Y and Yamada H : Attenuation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity by resveratrol : a comparative study with different routes of administration. Biol Pharm Bull. 32 : 876-881, 2009.
 - 32) Ishida T, Taketoh J, Nakatsune E, Kan-o S, Naito E, Takeda S, Mutoh R, 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.
 - 33) Bentli R, Ciftci O, Cetin A, Unlu M, Basak N and Cay M : Oral administration of hesperidin, a citrus flavonone, in rats counteracts the oxidative stress, the inflammatory cytokine production, and the hepatotoxicity induced by the ingestion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Eur Cytokine Netw. 24 : 91-96, 2013.
 - 34) Tan YQ, Chiu-Leung LC, Lin SM and Leung LK : The citrus flavonone hesperetin attenuates the nuclear translocation of aryl hydrocarbon receptor. Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 210 : 57-64, 2018.
 - 35) Ishida T, Naito E, Mutoh J, Takeda S, Ishii Y and Yamada H : The plant flavonoid, quercetin, reduces 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.
 - 36) Ciftci O, Aydin M, Ozdemir I and Vardi N : Quercetin prevents 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced testicular damage in rats. Andrologia. 44 : 164-173, 2012.
 - 37) Kitakaze T, Makiyama A, Nakai R, Kimura Y and Ashida H : Kaempferol modulates TCDD- and t-BHQ-induced drug-metabolizing enzymes and luteolin enhances this effect. Food Funct. 11 : 3668-3680, 2020.
 - 38) Rong X, Xu J, Jiang Y, Li F, Chen Y, Dou QP and Li D : Citrus peel flavonoid nobiletin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation by activating IL-6/STAT3/FOXO3a-mediated autophagy. Food Funct. 12 : 1305-1317, 2021.
 - 39) Li S, Li X, Chen F, Liu M, Ning L, Yan Y, Zhang S, Huang S and Tu C : Nobiletin mitigates hepatocytes death, liver inflammation, and fibrosis in a murine model of NASH through modulating hepatic oxidative stress and mitochondrial dysfunction. J Nutr Biochem. 100 : 108888, 2022.
 - 40) Nakajima A and Ohizumi Y : Potential Benefits of Nobiletin, A Citrus Flavonoid, against Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 20 : 3380, 2019.
 - 41) Chen YY, Liang JJ, Wang DL, Chen JB, Cao JP, Wang Y and Sun CD : Nobiletin as a chemopreventive natural product against cancer, a comprehensive review. Crit Rev Food Sci. Nutr. 28 : 1-21, 2022.
 - 42) Huang J, Chang Z, Lu Q, Chen X and Najafi M : Nobiletin as an inducer of programmed cell death in cancer : a review. Apoptosis. 27 : 297-310, 2022.
 - 43) Morrow NM, Trzaskalski NA, Hanson AA, Fadzeyeva E, Telford DE, Chhoker SS, Sutherland BG, Edwards JY, Huff MW and Mulvihill EE : Nobiletin Prevents High-Fat Diet-Induced Dysregulation of Intestinal Lipid Metabolism and Attenuates Postprandial Lipemia. Arterioscler. Thromb Vasc Biol. 42 : 127-144, 2022.
 - 44) Sciullo EM, Vogel CF, Wu D, Murakami A, Ohigashi H and Matsumura F : Effects of selected food phytochemicals in reducing the toxic actions of TCDD and p,p'-DDT in U937 macrophages. Arch Toxicol. 84 : 957-966, 2010.
 - 45) Xing Z, Wang Y, Feng Z, Zhao Z and Liu X : Effect of ⁶⁰Co-irradiation on postharvest quality and selected enzyme activities of *Hypsizygus marmoreus* fruit bodies. J Agric Food Chem. 55 : 8126-8132, 2007.
 - 46) Sundaram R, Shanthi P and Sachdanandam P : Effect of tangeretin, a polymethoxylated flavone

- on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 21 : 793-799, 2014.
- 47) Kurowska EM and Manthey JA : Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. *J Agric Food Chem*. 52 : 2879-2886, 2004.
 - 48) Weiss J, Gattuso G, Barreca D and Haefeli WE : Nobiletin, sinensetin, and tangeretin are the main perpetrators in clementines provoking food-drug interactions *in vitro*. *Food Chem*. 319 : 126578, 2020.
 - 49) Hamada M, Satsu H, Natsume Y, Nishiumi S, Fukuda I, Ashida H and Shimizu M : TCDD-induced CYP1A1 expression, an index of dioxin toxicity, is suppressed by flavonoids permeating the human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem*. 54 : 8891-8898, 2006.
 - 50) Yuan M, Sano H, Nishino T, Chen H, Li RS, Matsuo Y, Nishida K, Koga T, Takeda T, Tanaka Y and Ishii Y : α -Lipoic acid eliminates dioxin-induced offspring sexual immaturity by improving abnormalities in folic acid metabolism. *Biochem Pharmacol*. 210 : 115490, 2023.
 - 51) Ishii Y, Koba H, Kinoshita K, Oizaki T, Iwamoto Y, Takeda S, Miyauchi Y, Nishimura Y, Egoshi N, Taura F, Morimoto S, Ikushiro S, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI and Yamada H : Alteration of the function of the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily by cytochrome P450 3A4 : different susceptibility for UGT isoforms and UGT1A1/7 variants. *Drug Metab Dispos*. 42 : 229-238, 2014.
 - 52) Miners JO, Lillywhite KJ, Matthews AP, Jones ME and Birkett DJ : Kinetic and inhibitor studies of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*. 37 : 665-671, 1988.
 - 53) Hanioka N, Ozawa S, Jinno H, Ando M, Saito Y and Sawada J : Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica*. 31 : 687-699, 2001
 - 54) Emi Y, Ikushiro S and Iyanagi T : Xenobiotic responsive element-mediated transcriptional activation in the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex. *J Biol Chem*. 271 : 3952-3958, 1996.
 - 55) Kutsukake T, Furukawa Y and Ondo K : Quantitative Analysis of UDP-Glucuronosyltransferase Ugt1a and Ugt2b mRNA Expression in the Rat Liver and Small Intestine : Sex and Strain Differences. *Drug Metab Dispos*. 47 : 38-44, 2019.
 - 56) Lü J, Zhang D, Zhang X, Sa R, Wang X, Wu H, Lin Z and Zhang B : Network Analysis of the Herb-Drug Interactions of Citrus Herbs Inspired by the "Grapefruit Juice Effect". *ACS Omega*. 7 : 35911-35923, 2022.
 - 57) Koga N, Matsuo M, Ohta C, Haraguchi K, Matsuoka M, Kato Y, Ishii T, Yano M and Ohta H : Comparative study on nobiletin metabolism with liver microsomes from rats, Guinea pigs and hamsters and rat cytochrome p450. *Biol. Pharm Bull*. 30 : 2317-2323, 2007.
 - 58) Kamataki T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T and Kato R : Sex difference of cytochrome P-450 in the rat : purification, characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. *Arch Biochem Biophys*. 225 : 758-770, 1983.
 - 59) Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C and Dragsted LO : *In vitro* biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica*. 28 : 389-401, 1998.
 - 60) Nielsen SE, Breinholt V, Cornett C and Dragsted LO : Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus. *Food Chem Toxicol*. 38 : 739-746, 2000.
 - 61) Breinholt VM, Rasmussen SE, Brøsen K and Friedberg TH : *In vitro* metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. *Pharmacol Toxicol*. 93 : 14-22, 2003.
 - 62) Hattori Y, Takeda T, Fujii M, Taura J, Yamada H and Ishii Y : Attenuation of growth hormone production at the fetal stage is critical for dioxin-induced developmental disorder in rat offspring. *Biochem Pharmacol*. 186 : 114495, 2021.
 - 63) Takeda T, Fujii M, Izumoto W, Hattori Y, Matsushita T, Yamada H and Ishii Y : Gestational dioxin exposure suppresses prolactin-stimulated nursing in lactating dam rats to impair development of postnatal offspring. *Biochem Pharmacol*. 178 : 114106, 2020.
 - 64) 服部友紀子, 武田知起, 田浦順樹, 黒木広明, 石井祐次, 山田英之 : ダイオキシン母体曝露による発達児の甲状腺ホルモンへの影響. *福岡医誌*. 106 : 127-134, 2015.

(Received for publication March 17, 2023)

福岡医学雑誌投稿規定

1. 本誌には原著論文、症例報告、総説、学会報告等を掲載する。
2. 原著論文は、和文の場合は英文抄録、はじめに、実験方法、実験結果、考察、総括または結論、謝辞、文献の順とし、英文の場合は、Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, の順で記すものとする。ただし、短報の場合は、この区別をつけなくともよい。図、表の標題、説明文は、英文とすることが望ましい。
3. 和文原著には英文の抄録を、欧文原著には和文抄録を付けることとし、それぞれ本誌印刷1ページ以内とする。
4. 和文は現代かなづかい、平がなまじりの横書きとする。外国語は typewriter を使用するか、あるいは block letter で鮮明に記すことが必要である。
5. 数字は算用数字を用い、度量衡の単位は、cm, mm, μm , nm, g, mg, μg , ng, ml, dl, μl , cm^2 など、一般的に用いられる略字を使用する。
6. 原稿の第1ページには、標題、著者の所属（必要あれば指導者名付記）、著者名のみを記し、印刷所要部数を赤で付記する。ランニングタイトルを20字以内（欧文の場合は40文字以内）で鉛筆で付記する。
7. 引用した文献は末尾に一括して番号を付けて記載し、その順序は引用した順とする。著者名は全員併記する。本文の引用箇所には上付きで¹⁾²⁾と記す。なお総説等の場合、重要なものについて5～10程度に○をつけて読者の便宜を図る。記載の形式は次の例による。
 - 1) 雑誌の場合：著者名、論文表題、雑誌名、巻：最初最終頁、発行年、とする。
原著の first and middle name の省略のピリオドは用いない。
(例) Hatch TP, Miceli M and Silverman JA : Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of Chlamydia psittaci and Chlamydia trachomatis. J Bacteriol. 162 : 938-942, 1985.
(例) 神村英利, 吉村英敏 : 油症原因物質の排泄促進, 福岡医誌. 78 : 266-280, 1987.
 - 2) 単行本の場合：著者名、書名、第何版、引用頁、発行社、発行地、発行年。
(例) Bloom W and Fawcett DW : A Textbook of Histology 10th ed. pp. 179-227, Saunders Co. Philadelphia, 1975.
 - 3) 分担執筆の場合：著者名、章の表題、編者、書名、第何版、最初最終頁、発行者、発行地、発行年。
(例) Yamada Y : Far-storing cells, In Yamakawa I (ed) : Structure and Function of the Liver. 1st ed. pp. 188-202, Nanzando Tokyo, 1980.
8. 写真原稿は鮮明なものでなければならない。表は1ページに組める大きさであることを要する。
9. 英文原稿については、文法上の誤りがない正確なものを提出できるよう、原則として native speaker 等による校閲を受けること。
10. 人を対象とした研究については、ヘルシンキ宣言を遵守したものであること、また症例を提示する際（症例報告）は、患者さんのプライバシーの保護やインフォームドコンセントなどに関する倫理的問題に十分配慮されていること。
11. 定期号のほかに補冊を刊行することがある。教室論文集等を補冊とすることの可否は幹事会で決定する。
12. 投稿時には原稿を4部揃えて福岡医学雑誌編集室へ提出する。
13. 本誌に掲載する論文は、2名のレフリーによる査読を原則とし、その採否は編集幹事が決定する。

本誌に掲載された原著論文、症例報告、総説、学会報告・図版等の著作権は福岡医学会に帰属する。

Copyright, right of publication, right of reproduction and public token of all articles printed and published in the Fukuoka Acta Medica (Fukuoka Igaku Zasshi) lies with the Fukuoka Medical Association.

令和5年3月25日発行

発行所 福岡医学会

〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1番1号（九州大学医学部内）

TEL ダイアルイン (092) 642-6896

E-mail : famed-2@med.kyushu-u.ac.jp

(日本出版協会準会員番号 B211042 振替 01750-2-2233)

編集兼発行者 鴨 打 正 浩

印刷所 ダイヤモンド秀巧社印刷株式会社
福岡市東区松田3丁目9-32

本会の会費には、本学会の「福岡医学雑誌」(FUKUOKA ACTA MEDICA)購読料を含む。