

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：
チトクローム P450 発現を指標として

分担研究課題：ダイオキシン類のチトクローム P450 酵素による
代謝とその動物種差・性差

分担研究者 藤井 宏融 呉大学 看護学部教授

研究要旨：2,3,7,8-TCDD のチトクローム P450 酵素による代謝に関する次の3点について検討した。

- 1) 2,3,7,8-TCDD 分析条件設定：ヒューレットパッカード社の HP5973 システムで最適な分析を次のように設定した。分析カラム：HP-5、分析温度：70-280℃（15℃/min 昇温）、検出限界：1 pg (S/N: 5)。代謝産物の測定は SIM (m/z : 322, m/z : 257) で検出し、2,3,7,8-TCDD の m/z : 257 と代謝産物のそれとの比で定量した。
- 2) 2,3,7,8-TCDD 抽出方法の決定：ジクロロメタンで抽出、ジクロロメタン層を分取、乾燥後、ヘキサン（またはノルマルノナン）で再溶解、GC/MS に注入
- 3) 2,3,7,8-TCDD のマイクロソーム系での代謝産物検出：酵素標品としてラット肝マイクロソーム、電子供与体としての NADPH、基質として 2,3,7,8-TCDD を 37℃ で 1-2 時間保温し、ジクロロメタン 1 ml を加えて反応を停止させた。前記条件で抽出、分析した結果、1 種類の分解産物を検出した。この物質のフラグメントイオンは m/z : 257(100.0), m/z : 126(55.9), M/z : 239(21.6)であった。

A. 研究目的

ダイオキシン類とはジベンゾパラジオキシン構造を持つ化合物の同族体である。ダイオキシン類は製品の不純物として含有され、廃棄方法や、廃棄物の不備な燃焼処理によって生じるものである。したがって、広範囲の環境、我々にとって必要不可欠な水、空気、食物に分布している可能性がある。したがって、ダイオキシンの摂取は好むと好まざるとに関わらず避けることができない問題である。不可避に生体に摂取されたダイオキシンの消長を検討することは急務の問題である。ダイオキシン類の体内からの排出には、その脂溶性から代謝によ

るところが大であり、しかも体内動態（吸収・代謝・排泄）のなかで代謝は生体からの排泄に大きく関与しており、ダイオキシン類の代謝は早急に検討する必要がある。特に代謝経路、代謝物の種類、代謝の関与する酵素のアイソザイム、代謝の程度を知ることが必要不可欠である。しかし現在ヒトでの代謝はほとんど検討されていない。

ダイオキシン類の代謝の概要が明らかになれば、この代謝酵素の修飾（酵素誘導、酵素阻害、活性亢進）によって代謝の一部を制御することが可能になる。しかし、ヒトのダイオキシン類の半減期は長く、代謝活性は低いと考えられ、その検討は困難と

考えられる。これは毒物であるダイオキシンを使って生体実験を行うことは不可能であること、その代謝の低さによる研究の困難さにあるものと考えられる。しかし、代謝経路、代謝物の種類、代謝の関与する酵素のアイソザイム、代謝の程度をすることは必要不可欠である。ダイオキシン類の代謝の概要が明らかになれば、この代謝酵素の修飾（酵素誘導、酵素阻害、活性亢進）によって代謝の一部を制御することが可能になる。

本研究は、比較的半減期が短い（代謝活性が高い）と考えられているラット肝ミクロソームで2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine（以下2,3,7,8-TCDDと略）の代謝産物検索とその代謝の程度の検討を目的として2,3,7,8-TCDDの分析条件の決定、すなわち、ガスクロマトグラフ-質量分析計の条件設定、感度検討、溶媒の選定を行なった。その条件を使ってラットの肝ミクロソームにおける2,3,7,8-TCDDの分解の検討と代謝物の同定を試みた。

B. 研究方法

1) 薬品類

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine（シー・アイ・エル・ジャパン）、NADPH（ペーリンガーマンハイム）、ウイスター系ラットミクロソーム（自製）、リン酸緩衝液（0.1 N、pH 7.4）、ジクロロメタン、ヘキサンなどは分析用試薬特級を用いた。

2) 使用機器

分析カラムとして HP-1（ヒューレットパッカード社）、または HP-5（ヒューレットパッカード社）を取り付けた HP5973 MSD システム（ヒューレットパッカード社）を用いた。

3) 反応系

終容量 1ml、酵素標品としてラット肝ミクロソーム（0.1-1.0 g 肝湿重量相当；1-10 nmol P450）、電子供与体としての NADPH（終濃度 0.1 mM）、基質として2,3,7,8-TCDD（250 ng）を加え、37度で1-2時間保温し、ジクロロメタン 1 ml を加えて反応を停止させた。

4) 分析

ジクロロメタンを加えて反応を停止させた反応液を 2000 rpm x 10 分間、遠心分離した後、有機溶媒層を分取し、不活性ガスで乾燥した後、ヘキサンまたはノルマルノナン 100 μl で再溶解後その中に含まれる2,3,7,8-TCDDとその代謝産物をガスクロマトグラフ-質量分析計で分析した。

5) ガスクロマトグラフィーの測定条件の確立

反応後 1 ml ジクロロメタンを加え攪拌後、ジクロロメタン層を分離、乾燥後、ヘキサン（またはノルマルノナン）で再溶解し、GC/MS に付した。本分析に当たり、ガスクロマトグラフのカラムの選択、温度条件の検討を行った。

C. 研究結果

1) 2,3,7,8-TCDD 分析条件設定

ヒューレットパッカード社の HP5973 システムで、2,3,7,8-TCDD の分析条件を各種検討した結果、最適な分析条件を次のように設定した。分析カラムは HP-5 を使用し、分析温度は 70-280°C、15°C/min の昇温をおこなうことにより 2,3,7,8-TCDD の分析が可能であった。

2) 本実験に使用した 2,3,7,8-TCDD

本実験に使用した 2,3,7,8-TCDD を上記の分析条件で分析した。トータルイオンによ

るクロマトグラム(TIC)では保持時間 13.42 分に溶出される物質のみで、20 分までの間にはこれ以外の物質の溶出は見られなかった。この保持時間 13.42 分に溶出された物質のマスペクトログラムは製品に添付されていたクロマトグラムと同一であることが確認できた。親イオンが M/z : 322 であったので、ダイオキシンの定量にはこのイオンによるシングルイオンメソッド (SIM) によって分析した。確認のためには M/z : 257 のフラグメントイオンをもちいた。50 pg の 2,3,7,8-TCDD を M/z : 257 の SIM 法によって分析した結果、2,3,7,8-TCDD の本分析装置及び分析法での検出限界は約 1 pg (S/N: 5) であった。

3) 2,3,7,8-TCDD 及びその代謝産物の抽出方法

肝ミクロソームと 2,3,7,8-TCDD の反応液にジクロルメタンを容積比 1 対 1 に加え、攪拌後ジクロルメタン層を遠心分取し、乾燥後、ヘキサン (またはノルマルノナン) で再溶解、GC/MS の分析試料とすることで 2,3,7,8-TCDD が抽出可能であった。

4) 2,3,7,8-TCDD のミクロソーム系での代謝産物の検出

カラム HP-5 による代謝産物の検索: 終容量 1 ml、酵素標品としてラット肝ミクロソーム (2.0 g 肝湿重量; 20 nmol P450 相当)、電子供与体としての NADPH (終濃度 0.1 mM) を 37 度で 2 時間保温し、ジクロルメタン 1 ml を加えて反応を停止させた。2000 rpm x 10 分間、遠心分離した後、有機溶媒層を分取し、不活性ガスで乾燥した後、ヘキサン 100 μ l で再溶解後、1 μ l をガスクロマトグラフ-質量分析計で分析した。10.7 分と 20.0 分に溶出される物質が存在した。終容量 1 ml、酵素標品としてラット肝ミク

ロソ-ム (2.0 g 肝湿重量; 20 nmol P450 相当)、電子供与体としての NADPH (終濃度 0.1 mM)、基質として 2,3,7,8-TCDD (250 ng) を加え、37 度で 2 時間保温し、ジクロルメタン 1 ml を加えて反応を停止させた。2000 rpm x 10 分間、遠心分離した後、有機溶媒層を分取し、不活性ガスで乾燥した後、ヘキサン 100 μ l で再溶解後、1 μ l をガスクロマトグラフ-質量分析計で分析した。2,3,7,8-TCDD を加えないときと比較して、新たに 13.4 分と 14.9 分に新たな物質が溶出された。保持時間 13.4 分の物質は前述のように 2,3,7,8-TCDD である。保持時間 14.9 分の物質は 2,3,7,8-TCDD とミクロソームとの保温によって新たに生じた物質 (A) である。この物質 (A) の TIC による分析結果、親イオンは m/z : 257(100.0)、主なフラグメントイオンは m/z : 126(55.9)、 m/z : 239(21.6) であった。 m/z : 207、 m/z : 281 にもフラグメントイオンが見られたが、これらはバックグラウンドの信号であった。前述の 2,3,7,8-TCDD のマスペクトルと、この物質のマスペクトルとに共通のフラグメントイオンは M/z : 257 であり、 M/z : 257 の SIM によって 2,3,7,8-TCDD とこの分解物とが同時に分析可能であることが判った。

物質 (A) の反応時間-生成曲線: 2,3,7,8-TCDD のマスペクトルと、この物質のスペクトルとに共通のフラグメントイオンである M/z : 257 による SIM イオンクロマトグラム上で 2,3,7,8-TCDD と物質 (A) の高さの比を用いて、この物質 (A) の生成量とし、この値を用いて、この物質の反応時間-生成曲線を図 1 に示した。物質 (A) の生成量は時間と共に増加した。

ミクロソーム濃度 (酵素濃度) と物質 (A) の生成量の関係: 図 2 に示すように、ミクロソームに NADPH 及び 2,3,7,8-TCDD を加

え、2 時間保温した結果、物質 (A) の生成量は、湿肝重量 2 g のときを除いてマイクロソームの濃度に比例した。湿肝重量 2 g のとき、ジクロロメタンによる抽出は分離が不完全であった。

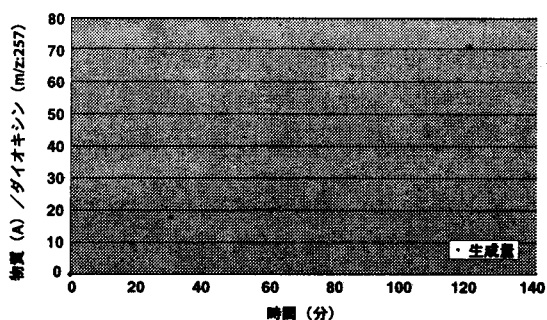


図 1 時間-生成量曲線

D. 考察

2,3,7,8-TCDD 分析条件を設定し、2,3,7,8-TCDD 抽出方法を決定し、その方法を用いて、ラット肝マイクロソームと、NADPH 及び 2,3,7,8-TCDD の反応によって、新たに 1 種類の物質の生成を認めた。

新たに生じた物質は、2,3,7,8-TCDD を加えないときに検出されず、反応時間に比例して増加した (図 1) こと、さらに酵素量に比例して増加した (図 2) ことか 2,3,7,8-TCDD のマイクロソームによる代謝産物の可能性がある。湿肝重量 2 g のときに生成量が比例しなかったのはジクロロメタンの分離が不十分であったことなどによるものと考えられる。

この物質のマススペクトログラムは $M/z : 257(100.0)$, $M/z : 126(55.9)$, $M/z : 239(21.6)$ にフラグメントイオンを持っていた。情報量不足のため、現在のところこの

物質の同定は出来ていない。したがって、この物質がダイオキシンの代謝産物であると断定するにはさらに検討する必要がある。

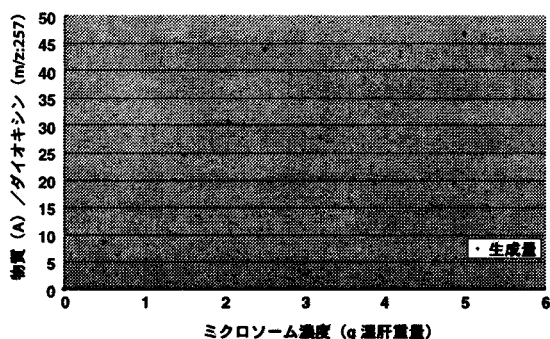


図 2 ミクロソーム濃度と物質 (A) の生成量

E. 結論

2,3,7,8-TCDD はラット肝マイクロソームで少なくとも 1 種類の分解産物 ($M/z : 257(100.0)$, $M/z : 126(55.9)$, $M/z : 239(21.6)$) が産生されることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし