

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書

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

主任研究者 出川 雅邦 静岡県立大学 薬学部教授

研究要旨：内分泌かく乱作用をもつ PCB 類や重金属類（鉛）をラットやマウスに投与し、内分泌かく乱物質の代謝パターンや、ホルモン合成・分解に関わる数種のチトクローム P450 (P450) 分子種への影響を、それぞれ薬物代謝学的及び分子生物学的手法を用いて比較検討し、それぞれ測定した項目につき動物種差や臓器差があることを見出した。また同時に、これまでほとんどの臓器で発現し、かつ発現変動が少ないと考えられていたコレステロール合成に関わる P450 分子種 (CYP51) 酵素の遺伝子が、硝酸鉛投与時、変動することなどの新知見を得た。これらは、内分泌かく乱物質が代謝パターンや、ホルモン合成・分解酵素系を変動させること、さらに、その変動には動物種差があることを示している。また、グルココルチコイド (GC) に感受性をもつ遺伝子プロモーター (マウス乳ガンウイルス LTR 由来) をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) 上流に連結した発現プラスミドをラット線維芽細胞 3Y1 に導入した細胞株の樹立に成功し、これを利用して種々の植物より新規グルココルチコイド様作用化合物を見出した。その他の成果として、1) 数種の P450 分子種を発現・誘導するラット肝培養細胞株を見出したこと、2) ヒト組み換え P450 (CYP1A1/1A2 および CYP1B1) 発現系細胞を用いて、最近内分泌かく乱作用が懸念されているディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物の代謝活性化およびこれら化合物の P450 への影響を、主に *umu* 試験を用いて検索し、ディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物のいずれの代謝活性化にも、CYP1B1 が関与していることを明らかにしたこと、3) 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD) の P450 酵素による代謝研究を行うに当たり、まずはじめに、TCDD およびその代謝物の分離・測定法および TCDD 代謝物の抽出法を確立し、次いで、本法がラット肝ミクロソームを酵素源とした場合の TCDD の代謝物の検出に有効であることを確認したことなどが挙げられる。

分担研究者 木村 良平
静岡県立大学 教授
根本 清光
静岡県立大学 助手
梅原 薫
静岡県立大学 助手
横井 毅
金沢大学 教授

藤井 宏融
呉大学 教授
協力研究者 加藤 善久
静岡県立大学 講師

A. 研究目的

これまでに、ステロイドホルモンの代謝（合成・分解）や内分泌かく乱物質などの外来化

合物の代謝にはチトクローム P450 (以下 P450 と略す) を中心とした薬物代謝酵素が関わっていること、また、P450 をはじめとする薬物代謝酵素は、しばしば外来化合物の曝露で変動することやこの変動にはしばしば動物種差が見られること、さらにまた、TCDD や PCB などの代表的な内分泌かく乱物質には、P450 をはじめとする薬物代謝酵素を変動させる働きがあることなどが明らかにされている。したがって、内分泌かく乱物質による P450 分子種の変動と内分泌かく乱作用発現との関連性を把握できれば、P450 発現に関わる種々の細胞内因子を指標として、ヒトを含めた各動物種に対する危険性を的確に評価することが可能になると期待される。しかし、内分泌かく乱物質の P450 発現への影響や、その動物種差の解析はほとんど行われていない。そこで、本研究では、内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差を解明する一環として、「内分泌かく乱物質曝露時における種々動物での P450 発現の変動と内分泌かく乱作用との関連性」を追究する。また、これまで、内分泌かく乱物質の検索や同定は、主にエストロゲン様作用を指標に行われてきたが、生体の恒常性維持には、種々のホルモンが関与しており、

B. 研究方法

1) 内分泌かく乱物質による P450 分子種発現への影響：動物種差

PCB のメチルスルホン代謝物には、肝臓のグルクロニルトランスフェラーゼ (UGT) 1A1 や 1A6 を誘導する作用があること、また、これによりチロキシン (T4) の代謝が亢進され、

血中 T4 濃度が低下することなどをすでに明らかにしてきている。このようにメチルスルホン代謝物に内分泌かく乱作用のある PCB 類では、その代謝パターンやこの代謝に関わる酵素の質的量的相違が、各動物のこれら内分泌かく乱物質に対する感受性の相違を支配する要因になると考えられる。そこで、2,2',4',5,5'-ペンタクロロビフェニール (CB101) および 2,2',3',4',5,6-ヘキサクロロビフェニール (CB132) を試料として、ラットとマウスに投与した後の糞中および肝臓中の含硫代謝物量、P450 や UGT などの薬物代謝酵素活性をそれぞれ測定し、ラットとマウス間におけるそれらの種差を検討した。また、精巣におけるアンドロゲンの合成阻害や肝の増殖作用があることが知られている鉛イオン (硝酸鉛) を試料として、ラットの肝や精巣における薬物代謝酵素 (P450 分子種:CYP1A1/2, 3A1/3A2 など) やステロイドホルモン合成に関わる P450 分子種 (CYP51 や CYP11) の発現への影響を RT-PCR 法を用いて検討した。

2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

これまで、植物性内分泌かく乱物質としては、ゲニスチン、クメステロールなどの植物性エストロゲン様作用化合物が注目を浴び、多数の化合物が分離・同定されてきている。一方、植物成分にはその他のホルモン様作用化合物の存在も示唆されているが、それらについての詳細な研究は行われていない。そこで、本研究では、糖代謝のみならずストレスや中枢神経系機能の調節に深く関わる副腎皮質ホルモンのグルココルチコイド (GC) に着目し、様々な生薬・植物のエキスの粗画分を出発材料として、GC 様作用を有する化合物の検索および同定を以下の 2 方法を用いて行った。

i) 培養細胞 (M1 細胞) の分化誘導を指標とした検索法：GC によりマクロファージに分化誘導されるマウス骨髄性白血病由来 M1 細胞を用い、分化誘導作用 (食食能の誘導) を

指標にした測定。

ii) 遺伝子プロモーター活性を指標とする検索法：GC に感受性遺伝子プロモーター（マウス乳ガンウイルス LTR 由来）をレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）上流に連結した発現プラスミドをラット線維芽細胞 3Y1 に導入した細胞株を用いた測定。

3) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

P450 分子種の発現機構の解析には培養細胞を用いることが有利であるが、現在まで種々 P450 分子種を発現する培養細胞株は樹立されていない。そこで、まず、ラット肝初代培養細胞より樹立した培養肝細胞株を用いて各種 P450 分子種の発現・誘導能を検討した。また、硝酸鉛処理時の CYP51 分子種の発現変動を RT-PCR 法を用いて検討した。

4) P450 誘導を指標とする *in vitro* 毒性評価系の確立

ヒト組み換え P450 (CYP1A1/1A2 および CYP1B1) 発現系細胞を用いて、内分泌かく乱作用が懸念されているディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物の代謝活性化およびこれら化合物の P450 への影響を、主に *umu* 試験を用いて検索した。

5) ダイオキシン類の P450 酵素による代謝とその種差・性差の解析

2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD) の P450 酵素による代謝研究を行うに当たり、まずはじめに、TCDD およびその代謝物の分離・測定法および TCDD 代謝物の抽出法を検討した。

(倫理面への配慮)

P450 の発現制御機構に関する研究は、P450 を充分発現する培養細胞株が樹立されておらず、動物実験に依存しているのが現状である。本研究で、少なくともある種のラット P450 分子種については、既に樹立した肝培養細胞株で研究が可能となった。今後、ヒトを含め他

の動物の P450 発現研究についても、順次研究材料となりうる細胞株の樹立・検索を進め、実験動物に依存する研究を少なくしたいと考えている。

C. 研究結果

1) 内分泌かく乱物質による P450 分子種発現への影響：動物種差

PCB 類や重金属類（鉛）などの内分泌かく乱物質をラットやマウスに投与し、内分泌かく乱物質の代謝パターンや、ホルモン合成・分解に関わる数種の P450 酵素への影響を、それぞれ薬物代謝学的及び分子生物学的手法を用いて比較検討し、それぞれ測定した項目につき動物種差や臓器差（肝及び精巣）があることを見出した。また同時に、これまでほとんどの臓器で発現し、かつ発現変動が少ないと考えられていたコレステロール合成に関わる CYP51 酵素の遺伝子が、硝酸鉛投与時、肝や精巣で変動することなどの新知見を得た。

2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

グルココルチコイド (GC) に感受性をもつ遺伝子プロモーター（マウス乳ガンウイルス LTR 由来等）をレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）上流に連結した発現プラスミドをラット線維芽細胞 3Y1 に導入した細胞株の樹立に成功し、これを利用して種々の植物より新規グルココルチコイド様作用化合物を見出した。

3) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

雄性 SD ラットの初代培養肝細胞より樹立した培養肝細胞株を用いて、数種の P450 分子種の発現状況を検索した結果、平常培養時には、CYP1A1、CYP2B1 および CYP51 の各分子種の発現が、また、タンパク質合成阻害剤のサイクロヘキシミド添加時には平常時に見られた P450 分子種に加え、*in vivo* 肝細胞で発現している CYP1A2、CYP3A1/3A2 および CYP2B2 の発現も起こった。また、硝酸鉛を添加し、培養すると *in vivo* 肝の場合と類似し

た CYP51 の発現増加が観察された。

4) P450 誘導を指標とする *in vitro* 毒性評価系の確立

ヒト組み換え P450 (CYP1A1/1A2 および CYP1B1) 発現系細胞を用いて、内分泌かく乱作用が懸念されているディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物の代謝活性化およびこれら化合物の P450 への影響を、主に *umu* 試験を用いて検索し、ディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物のいずれの代謝活性化にも、CYP1B1 が関与することを明らかにした。

5) ダイオキシン類の P450 酵素による代謝とその種差・性差の解析

ヒューレードパッカー社の HP5973 システムを用いた TCDD の至適分析条件を検討した。分析カラム；HP-5、分析温度；70-280 °C (15°C/min 昇温) が最適であり、検出限界は 1 pg (S/N : 5) であった。また、TCDD およびその代謝物の反応系からの抽出溶媒にはジクロロメタンが最適であった。本抽出液の溶媒を除去後、ヘキサンで再溶解し、GC/MS に付することにより、TCDD 及びその代謝物の分離・測定が可能であると判断した。実際、本法をラット肝ミクロソームを酵素源とした場合の TCDD の代謝物の検出に応用し、本法が有効であることを確かめた。

D. 考察

1) 内分泌かく乱物質による P450 分子種発現への影響：動物種差

PCB 類 (CB101 や CB132) あるいは硝酸鉛をラットあるいはマウスに投与すると、PCB 類の代謝パターンや、ホルモン合成・分解に関わる酵素 (CYP51, CYP11, CYP1A, あるいは CYP3A) の発現量が変動し、そこには種差や臓器差が見られた。これらの結果は、内分泌かく乱物質曝露時の P450 酵素の発現変動の種差や臓器差が、内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差や臓器差を生む要因にな

っている可能性を示すものであり、現在さらに、種々の内分泌かく乱物質および動物を用いて、P450 の発現変動と内分泌かく乱との関連性を追究中である。

2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

GC 様作用物質のルシフェラーゼ検索法を確立し、生薬・植物成分より種々の GC 様作用物質の存在を明らかにした。また、本法はこれまでの検索法より高感度で GC 様作用物質を測定できることが確かめられた。現在、本法を用いて、より広範な生薬・植物より GC 様作用物質の検索・同定を進めている。

3) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

すでに樹立していたラット肝培養細胞の種々 P450 分子種の発現・誘導能を調べた結果、少なくとも数種の P450 分子種 (CYP1A, 2B, 3A および CYP51) については、*in vivo* 肝細胞と類似の発現・誘導が観察され、これら分子種についてはその発現制御機構の解明に有用なものになることが示された。

4) P450 誘導を指標とする *in vitro* 毒性評価系の確立

ヒト CYP1B1 が、ディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物の代謝活性化の代謝活性化に関わっていること、また、上記化合物のあるものには P450 の活性を阻害するものがあることが判明した。CYP1B1 は肝外臓器に多く発現していることが知られており、今後、本酵素の肝外臓器における発現と毒性発現との関連性を検討する。

5) ダイオキシン類の P450 酵素による代謝とその種差・性差の解析

TCDD およびその代謝物の測定法を確立し、本法が TCDD の代謝研究に有用であることが確認された。今後、研究計画に沿ってヒトおよび種々の動物の各種 P450 酵素を用いて、TCDD 類の代謝における種差・性差を比較検討する。

E. 結論

本年度の代表的な研究成果として、1) PCB 類や重金属類 (鉛) の内分泌かく乱物質を種々の実験動物に投与し、内分泌かく乱物質の代謝パターンや、ホルモン合成・分解に関わる数種の P450 酵素への影響を調べ、それぞれ測定した項目につき動物種差や臓器を見出したこと、2) これまでほとんどの臓器で発現し、かつ発現変動が少ないと考えられていたコレステロール合成に関わる CYP51 酵素の遺伝子が、硝酸鉛投与時、変動することを見出したこと、及び 3) GC に応答性をもつ遺伝子プロモーター (マウス乳ガンウイルス LTR 由来) をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) 上流に連結した発現プラスミドを導入したラット線維芽細胞株の樹立に成功し、これを利用して種々の植物より新規グルココルチコイド様作用化合物を見出したことなどが挙げられる。本研究により、内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差が、期待通り内分泌かく乱物質曝露時の P450 酵素の発現変動の種差と関わっていること、また、植物成分には GC 様作用物質が多数含まれていることが示された。また、*in vitro* 試験系による P450 の発現制御機構の研究や、毒性評価系の確立のための研究も徐々に進展しており、今後、当初の計画に沿ってさらなる研究を推し進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase by methylsulfonol metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. *Organohalogen Compounds*, **42**, 337-340 (1999).
2. Yoshihisa Kato, Kouichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Shinya Yumoto, Yoshito Masuda and Ryouhei Kimura. Reduction of serum thyroxine concentrations by methylsulfonol metabolites of tetra, penta and hexachlorinated biphenyls in male Sprague

Dawley rats. *Chemosphere*, **40**, 1233-1240 (2000).

3. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda and Ryouhei Kimura. The induction of hepatic microsomal UDP-glucuronol-transferase by the methylsulfonol metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem. -Biol. Interact.*, **125**, 107-115 (2000).
2. 学会発表
 1. 吉本直樹, 並木雅幸, 宮田信吾, 根本清光, 橋本嘉幸, 出川雅邦: ラット培養肝細胞株における種々のチトクローム P450 分子種の発現. 第 6 回肝細胞研究会 (東京), 抄録集, 3, p.104, 1999 年 6 月 5 日.
 2. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase by methylsulfonol metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. 19th International Symposium on Halogenated Enviromental Organic Pollutants and POPs (Venice, Italy), 1999, Sep. 13.
 3. 渥美 宏, 梅原 薫, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた生薬中のグルココルチコイド様成分の検索. 日本生薬学会第 46 回大会 (大阪), 要旨集, p.168, 1999 年 9 月 18 日.
 4. 加藤善久, 湯本信也, 新村康彦, 木村良平, 原口浩一, 増田義人: 2,2',4',5'-Tetrabromobiphenyl のメチルスルホン代謝物の薬物代謝誘導効果. 第 25 回環境トキシコロジーシンポジウム・第 3 回衛生薬学フォーラム合同大会 (名古屋), 講演要旨集, p.118, 1999 年 10 月 21 日.
 5. 根本清光, 安本 勤, 宮田信吾, 村井詩, 出川雅邦: 硝酸鉛投与ラット肝での神経栄養因子およびその受容体の発現変動. 平成 11 年度日本薬学会東海支部会例会 (名古屋), 要旨集, p. 25, 1999 年 12

月4日.

6. 梅原 薫, 渥美 宏, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: 植物起源のグルココルチコイド様物質の検索 (2). 日本薬学会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 2, p.57, 2000 年 3 月 29 日.
7. 吉本直樹, 今野芳浩, 根本清光, 出川雅邦: ラット肝細胞培養株を用いた CYP 分子種の発現機構の解明. 日本薬学会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 3, p.58, 2000 年 3 月 30 日.
8. 安本 勤, 宮田信吾, 根本清光, 根本文子, 村井 詩, 出川雅邦: 硝酸鉛による

ラット肝増殖誘発時の神経栄養因子及びその受容体遺伝子の発現変動. 日本薬学会第 120 年会(岐阜), 要旨集 3, p.75, 2000 年 3 月 30 日.

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