

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題：チトクローム P450 誘導能を指標とする *in vitro* 毒性系の確立

分担研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部教授

研究要旨：環境中の内分泌かく乱物質の生体に及ぼす影響を調べることを目的に、ディーゼル排気粉塵抽出物のヒトチトクローム P450 に及ぼす影響とそれらの代謝的活性化について検討した。ディーゼル排気粉塵 (DEP)のベンゼン・エタノール抽出物 (DEPE)と大気浮遊粉塵に検出される 1-ニトロピレン (1-NP)、ジニトロピレン (DNP)、ニトロフルオランテン (NF)および 6-ニトロクリセンを対象としてこれらの遺伝毒性を、ヒトチトクローム P450 ファミリー 1 に属する P450 酵素と P450 還元酵素 (NPR)との大腸菌を用いた共発現系を利用して調べた。3 種の DEPE に、*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 に対する直接的な *umu* 遺伝子発現作用が認められた。調べた 4 種の DEPE はさらに P450 1B1/NPR によって代謝的活性化された。DEPE-1 と命名したサンプルは、P450 1B1/NPR の他に、P450 1A2/NPR による活性化も認められたが、P450 1A1/NPR または NPR では活性化されなかった。1-NP は P450 1B1/NPR によって強く活性化され、さらに 1,8-DNP が P450 1A1/NPR と 1B1/NPR に活性化されて最も高い値を示した。一方、1,3-DNP は P450 1A1/NPR、P450 1A2/NPR および P450 1B1/NPR によって不活性化されたが、NPR によってわずかに活性化反応を受けた。2-NF と 3-NF は P450 1B1/NPR によって 1-NP と同程度活性化されたが、6-ニトロクリセンの活性化は弱かった。見かけの DEPE の遺伝毒性はニトロアレン標準品と比較して弱かった。この理由のひとつとして、DEPE がヒト P450 1B1/NPR の阻害作用を示すことが示唆された。以上の結果から、近年発見されたヒト P450 1B1 が、浮遊粉塵中に存在する化学物質、ディーゼル排気粉塵抽出物や、1-NP、1,6-DNP、1,8-DNP、2-NF、3-NF などのニトロ芳香族炭化水素類の代謝的活性化に関与することが判明した。ニトロアレン類や大気汚染物質のヒトの肝外臓器、とくに P450 1B1 が発現している組織に対する生体影響に関心が持たれる。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質など、環境中の化学物質の生体に及ぼす影響を調べることを目的に、大気中の粉塵粒子成分と組成が類似しているディーゼル排気粉塵抽出物とそれらに含有されるニトロ芳香族炭化水素類のチトクロ-

ム P450、特にヒト family 1 の酵素に及ぼす影響を調べるため、それらの代謝的活性化ならびに不活性化について、*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 を用いた *umu* 法で検討した。近年、ディーゼル排気成分に内分泌かく乱物質作用があるとの指摘がある。これらの環境

化学物質は 1980 年代に主に変異原性・発癌性における代謝的活性化の観点から研究がなされてきた。この化学物質、特にニトロ芳香族炭化水素の代謝的活性化はヒト P450 1A1 や 1A2 を用いて詳細な検討がなされてきた。しかし、1994 年にヒトにおいても発見された P450 1B1 のニトロ芳香族炭化水素の代謝的活性化における役割は現在まで全く考慮されていない。化学物質の生体に対する影響を調べるため、薬物代謝酵素、特にチトクローム P4501A1 と 1A2 の発現を指標とした研究もなされてきたが、P450 誘導作用においても P450 1B1 には着目されてこなかった。以上の観点から、今回は、大気中のニトロ芳香族炭化水素類の代謝的活性化に焦点を絞り、ヒトを含めた実験動物で肝外臓器に広く発現している P4501B1 に着目し、環境汚染物質の代謝における役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ディーゼルエンジン搭載車の排気粉塵を捕集してベンゼン・エタノール抽出物を調製した。ガラスファイバーフィルターを排気管の 30 cm 後ろにセットし、エアースンプラーを用いて毎分 30 分の流量でディーゼル粉塵を捕

集した。粉塵はベンゼン・エタノール (3:1) で超音波処理により抽出した。有機層を留去し、エタノールに溶解した (20 mg/ml)。DEPE-1、-2、-3 および-4 と命名したサンプルはそれぞれディーゼルエンジン搭載車(1993 年型 2.8 L、1996 年型 2.5 L、1990 年型 4.1 L、1989 年型 7.4L) から調製した。これらの主要成分は約 100 - 500 μ M のベンズ[a]アントラセン、ベンズ[a]ピレン、ベンゾ[ghi]ピリレン、ベンゾ[b]フルオランテンおよびベンゾ[k]フルオランテンであり、ニトロ芳香族炭化水素類は、これらの約 100 分の 1 であった。

ディーゼル排気粉塵抽出物とニトロ化合物標準品の代謝的活性化におけるヒト P450 1A1、1A2 および 1B1 の役割を、*S. typhimurium* TA1535/pSK1002 を用いる *umu* 法による DNA 損傷性を指標にして調べた。組換えヒト P450 発現系には主に大腸菌 *E. coli* を宿主とする P450/NPR 共発現系を調製し、市販のパキユロウイルス発現系と B-リンパ芽球発現系も用いてヒト P450 酵素の触媒活性を比較した。

P450 1B1 の役割を確認するため、 β -ナフトフラボン誘導したラット肝ミクロソームを調製した。

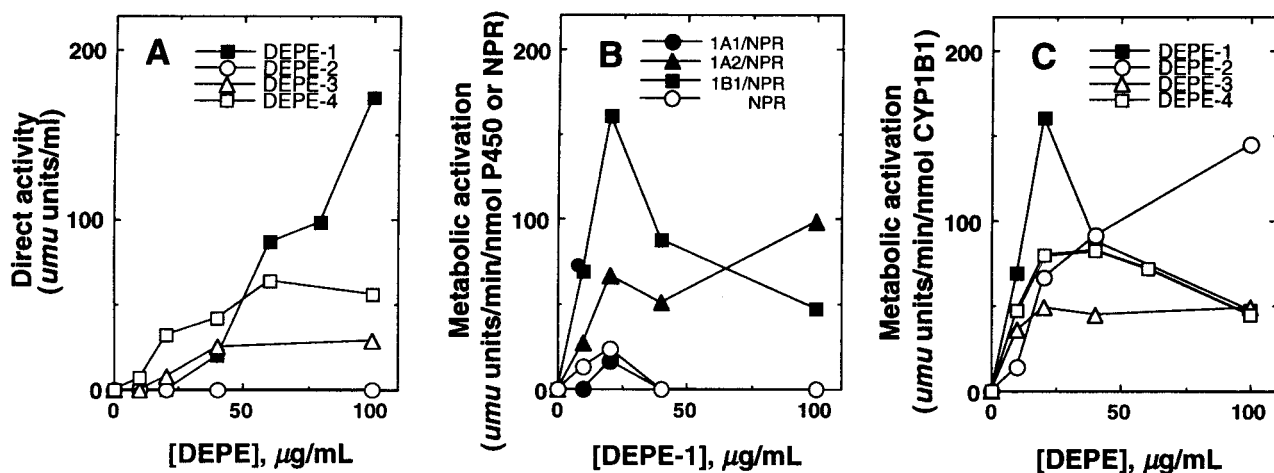


Fig. 1. Genotoxicity of DEPE in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

(A) *umu* gene expression of four samples of DEPE without activation systems; (B) bioactivation of a sample designated DEPE-1 by human P450s 1A1/NPR membranes, 1A2/NPR membranes, and 1B1/NPR membranes and by human NPR membranes, and in (C), bioactivation of four samples of DEPE by human P450 1B1/NPR membranes. Background levels of *umu* gene expression were subtracted. Results are presented as means of duplicate determinations.

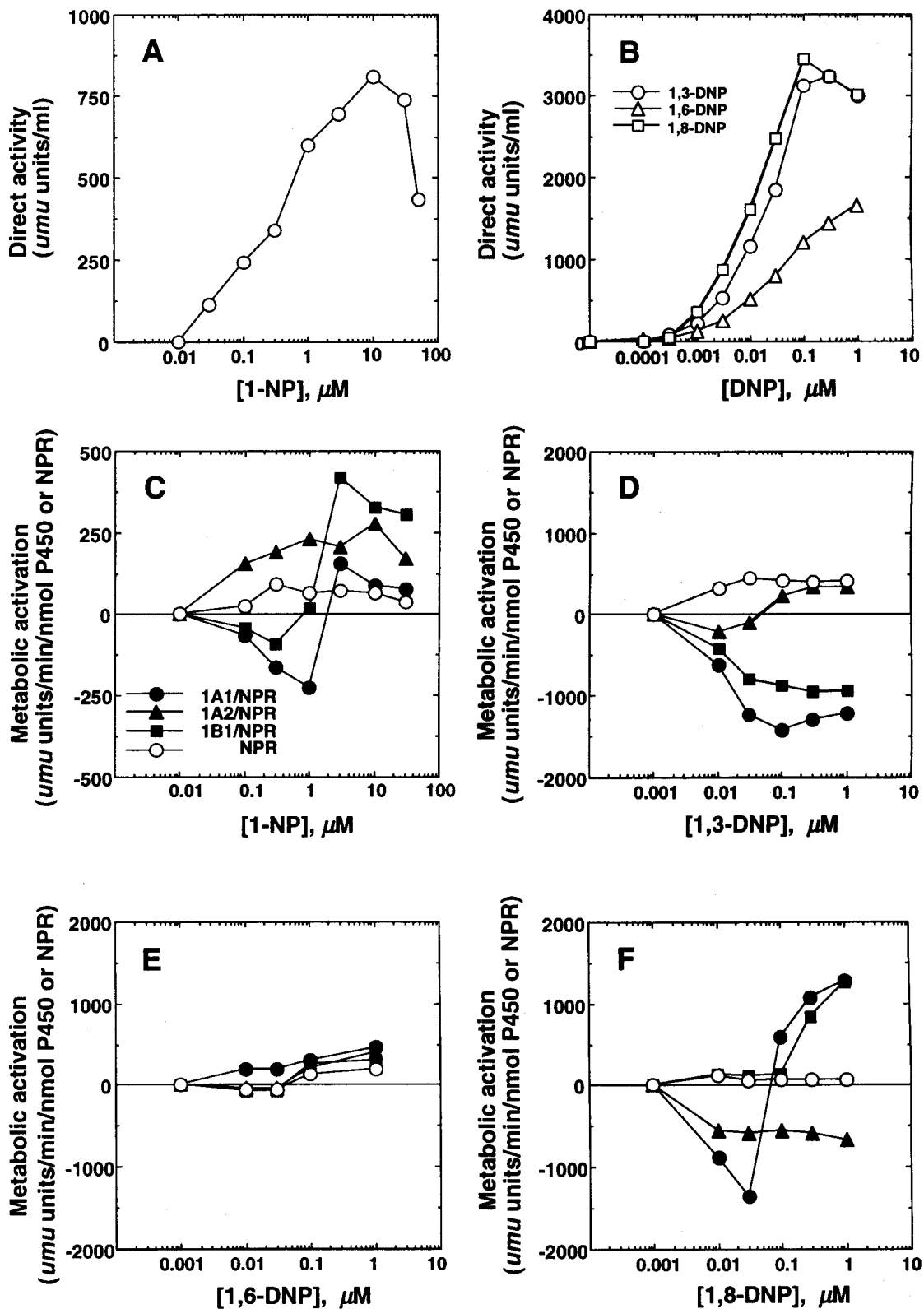


Fig. 2. Genotoxicity of 1-NP and dinitropyrenes in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

(A) umu gene expression of 1-NP without activation systems. (B) umu gene expression of 1,3-DNP, 1,6-DNP, and 1,8-DNP without activation systems. (C-F), Bioactivation of 1-NP (C), 1,3-DNP (D), 1,6-DNP (E), and 1,8-DNP (F) by human P450s 1A1/NPR membranes, 1A2/NPR membranes, and 1B1/NPR membranes and by human NPR membranes. In parts C-F, the umu response was measured in the absence and presence of the enzyme system; thus negative values indicate inactivation. Results are presented as means of triplicate determinations.

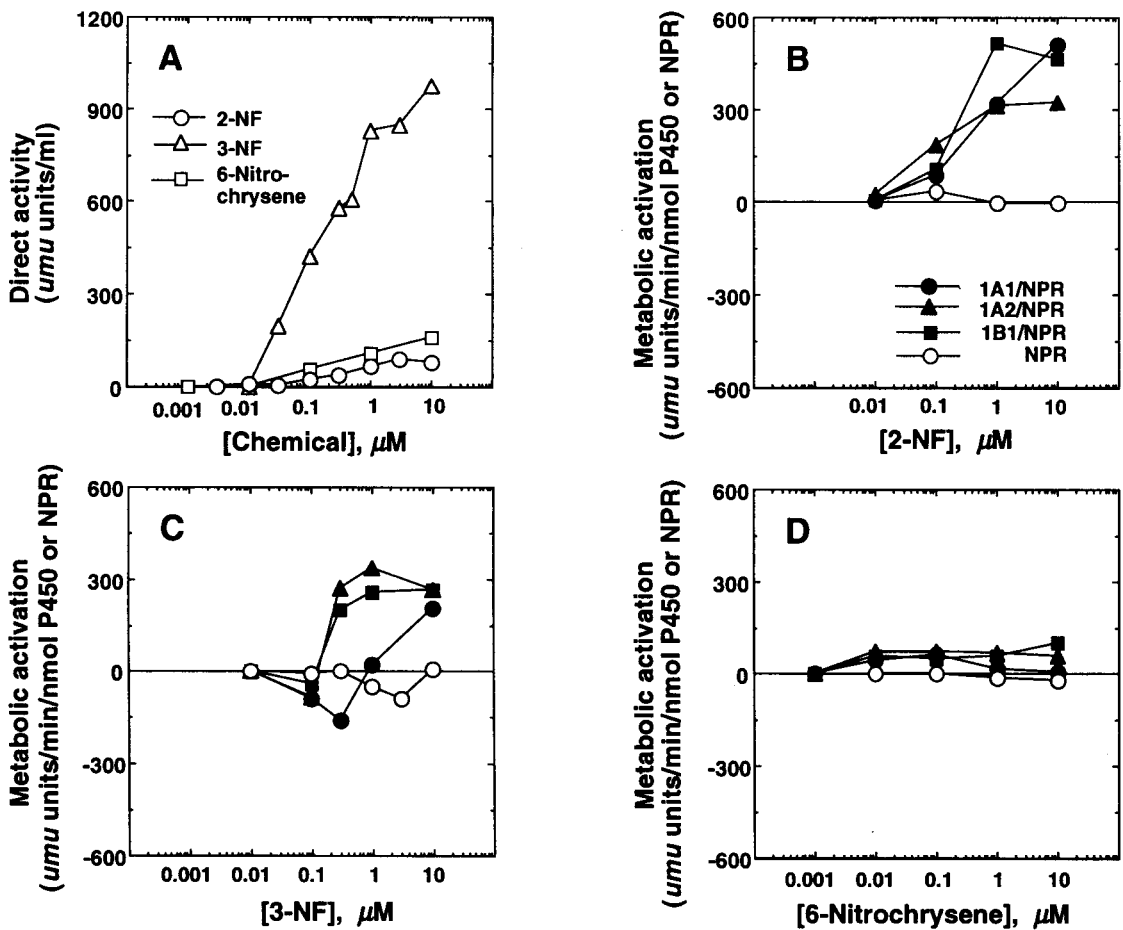


Fig. 3. Genotoxicity of 2-NF, 3-NF, and 6-nitrochrysene in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

(A) *umu* gene expression of 2-NF, 3-NF, and 6-nitrochrysene without activation systems. (B-D), Bioactivation of 2-NF (B), 3-NF (C), and 6-nitrochrysene (F) by human P450s 1A1/NPR membranes, 1A2/NPR membranes, and 1B1/NPR membranes and by human NPR membranes. Background levels of *umu* gene expression were subtracted. Results are presented as means of triplicate determinations.

C. 研究結果

S. typhimurium TA1535/pSK1002 を用いる *umu* 法による DEPE の DNA 損傷性を調べた (Fig. 1)。3 種の DEPE に、*S. typhimurium* TA1535/pSK1002 に対する直接的な *umu* 遺伝子発現作用が認められた (Fig. 1A)。DEPE-1 と命名したサンプルは、P450 1B1/NPR の他に、P450 1A2/NPR による活性化も認められたが、P450 1A1/NPR または NPR では活性化されなかった (Fig. 1B)。P450 1B1/NPR による活性化は調べた 4 種の DEPE すべてに認められた (Fig. 1C)。

次にニトロ化合物標品の遺伝毒性を調べた (Fig. 2)。1-NP と 1,3-, 1,6-および 1,8-DNP はいずれも直接的な DNA 損傷性を示したが (Figs. 2A, 2B)、1-NP は P450 1B1 によって強く活性化され (Fig. 2C)、さらに調べた中で 1,8-

DNP が P450 1A1 と 1B1 に活性化されて最も高い値を示した (Fig. 2F)。一方、1,3-DNP は P450 1A1/NPR、P450 1A2/NPR および P450 1B1/NPR によって不活性化されたが (Fig. 2D)、NPR によってわずかに活性化反応を受けた。

2-NF と 3-NF は P450 1B1/NPR によって 1-NP と同程度活性化されたが、6-ニトロクリセンの活性化は弱かった (Fig. 3)。

P450 1B1 による代謝的活性化反応を確認するため、他のヒト組換え P450 発現系を用いて調べた。Table 1 に用いた 3 種の発現系の P450 1A1, 1A2 および 1B1 のエトキシレゾルフィンと 7-エトキシマリニン脱エチル化酵素活性とピレン、1-NP, 1,3-DNP の代謝的活性化と不活性化と示した。薬物酸化酵素活性が低いリンパ芽球発現系を用いて調べた場合に高い代謝的活性化または不活性化が見られた。

見かけの DEPE の遺伝毒性はニトロアレン標準品と比較して弱かった。この理由のひとつとして、DEPE がヒト P4501B1/NPR の 1-NP と 1,8-DNP の代謝的活性化反応と CYP1B1 の 7-エトキシマリン脱エチル化酵素活性に対する阻害作用を示すことが判明した (Fig. 4)。

ヒト組み換え P450 酵素と対比させる目的で、

ラット肝ミクロソームによる DEPE-1 とニトロ芳香族炭化水素の代謝的活性化も検討した (Fig. 5)。DEPE-1 の代謝的活性化は本条件下では検出されなかった。しかし、1-NP などの活性化反応の濃度依存性は、ヒト P450 1B1/NPR を用いて見られた場合と類似していた。

Table 1 Bioactivation or inactivation of pyrene, 1-nitropyrene, and 1,3-dinitropyrene by recombinant human P450s 1A1, 1A2, and 1B1 co-expressed with NPR in different systems

P450	Expression system	NPR/P450 (molar ratio)	O-Deethylation ^a (nmol/min/nmol P450)		Metabolic activation (umu units/min/nmol P450)		
			Ethoxy-resorufin	7-Ethoxycoumarin	Pyrene (3.0 μM)	1-NP (3.0 μM)	1,3-DNP (0.03 μM)
1A1/NPR	<i>E. coli</i> membranes	0.82	95	32	132	154	-1230
	Insect cell microsomes	6.5	125	62	51	92	-1360
	Lymphoblastoid cell microsomes	2.2	42	10	30	735	-1850
1A2/NPR	<i>E. coli</i> membranes	0.28	6	0.5	50	205	-106
	Insect cell microsomes	1.2	10	2.6	29	484	-826
1A2 ^b	Lymphoblastoid cell microsomes	0.08	1	0.2	6	144	829
1B1/NPR	<i>E. coli</i> membranes	1.03	51	7.2	148	416	-792
	Insect cell microsomes ^c	0.45	18	1.1	16	185	-1300
	Lymphoblastoid cell microsomes	0.25	5	0.3	29	1310	-444

Chemicals (0.03 - 3.0 μM) were incubated with 0.010 μM recombinant P450 for 2 h at 37 °C in the presence of *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 and induction of *umu* gene expression in the tester strain was determined. Results are means of duplicate or triplicate determinations.

^a O-Deethylation activities of ethoxyresorufin and 7-ethoxycoumarin expressed as nmol products formed/min/nmol P450.

^b P450 1A2 expressed in lymphoblastoid cell microsomes was a monocistronic system.

^c Notes. Insect cell microsomes containing P450 1B1 and NPR had heat-sensitive background levels of β-galactosidase activities (~1600 units/mL per 10 pmol P450 1B1 equivalent proteins), however, bioactivation was calculated after subtracting the high background.

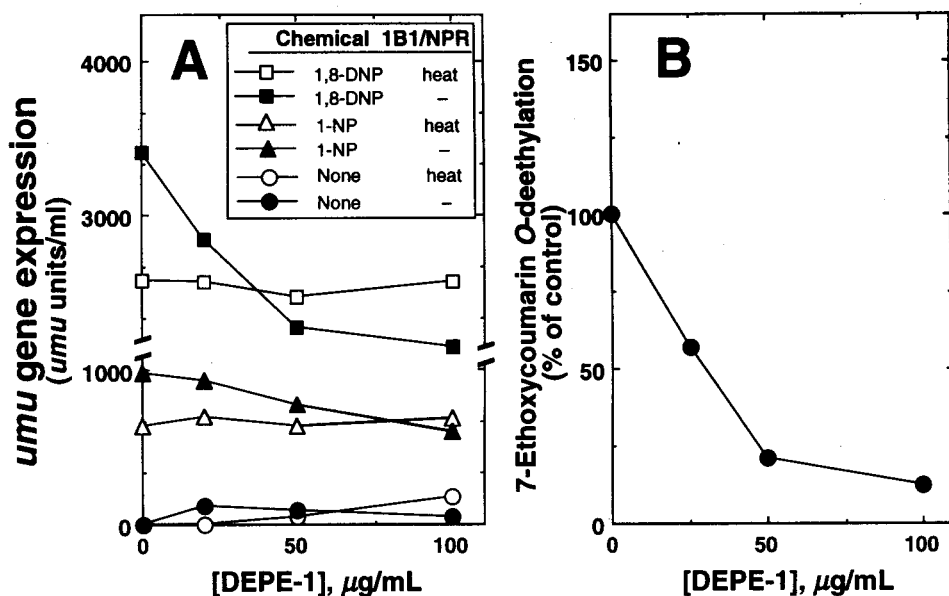


Fig. 4. Inhibitory effects of DEPE-1 on bioactivation of 1-NP and 1,8-DNP (A) and on 7-ethoxycoumarin O-deethylation activities (B) catalyzed by human P450 1B1/NPR membranes in the presence of *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

(A) 1-NP (3.0 μM) or 1,8-DNP (0.3 μM) was incubated with DEPE-1 (0 - 100 μg/mL) and heat-inactivated or intact P450 1B1/NPR membranes. (B) Control activity of 7-ethoxycoumarin O-deethylation (at 100 μM) without DEPE was 8.2 nmol/min/nmol P450 1B1. Results are presented as means of duplicate determinations.

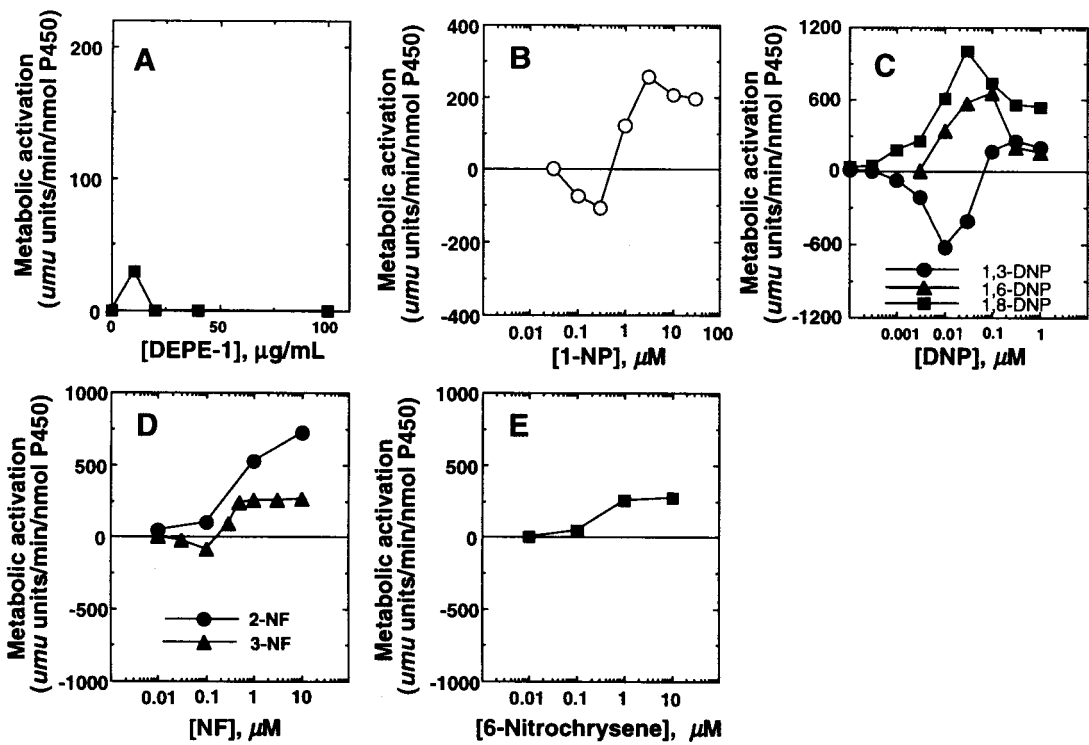


Fig. 5. Activation and inactivation of DEPE-1 (A), 1-NP (B), DNPs (C), NFs (D), and 6-nitrochrysenes (E) by liver microsomes from β -naphthoflavone-treated rats in *S. ryphimurium* TA1535/psk1002.

Results are presented as means of duplicate (in A) or triplicate (B-E) determinations.

D. 考察

近年発見されたヒト P450 1B1 が、内分泌かく乱作用を持つことが指摘されているディーゼル排気粉塵抽出物やニトロ芳香族炭化水素類の代謝的活性化に關与することが明らかとなった。

ディーゼル排気粉塵抽出物は主にヒト P450 1B1 によって代謝的活性化を受けた。しかし、その組成中にはヒト P450 1B1 によって DNA 障害を示す成分のほか、P450 1B1 の触媒作用を阻害する成分も含まれることが示唆された。このことが、DEPE とニトロ化合物標品が示す活性値の差異の一因であることが示唆された。

ニトロピレン類など環境中の化学物質には生体内の代謝酵素を誘導する作用があり、誘導能の動物種差が知られている。現在、ディーゼル排気粉塵抽出物あるいはニトロピレン類によるヒト P450 1A1、1A2 および 1B1 の誘導能とその機構を検討している。

E. 結論

近年発見されたヒト P450 1B1 が、浮遊粉

塵中に存在する化学物質、ディーゼル排気粉塵抽出物や、1-NP、1,6-DNP、1,8-DNP、2-NF、3-NF などのニトロ芳香族炭化水素類の代謝的活性化に關与することが判明した。ニトロアレン類や大気汚染物質のヒトの肝外臓器、とくに P450 1B1 が発現している組織に対する生体影響に關心が持たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有件の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし