

油症原因物質2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuranによる酸化ストレス惹起の推定機構：肝臓での過酸化水素産生亢進と肝障害

山田, 健一
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

武田, 知起
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

黒木, 廣明
第一薬科大学

三苫, 千景
九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター

他

<https://doi.org/10.15017/1809684>

出版情報：福岡醫學雑誌. 108 (3), pp.58-67, 2017-03-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：



油症原因物質 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran による酸化ストレス惹起の推定機構：肝臓での過酸化水素産生亢進と肝障害

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

²⁾第一薬科大学

³⁾九州大学病院 油症ダイオキシン研究診療センター

⁴⁾九州大学大学院医学研究院 皮膚科学分野

山田 健一¹⁾, 武田 知起¹⁾, 黒木 廣明²⁾, 三 苜 千 景³⁾,
内 博 史⁴⁾, 古 江 増 隆³⁾⁴⁾, 山 田 英 之¹⁾, 石 井 祐 次¹⁾

Possible Mechanism of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran-induced Oxidative Stress : Enhanced Production of Hydrogen Peroxide and the Liver Injury

Ken-ichi YAMADA¹⁾, Tomoki TAKEDA¹⁾, Hiroaki KUROKI²⁾, Chikage MITOMA³⁾,
Hiroshi UCHI⁴⁾, Masutaka FURUE³⁾⁴⁾, Hideyuki YAMADA¹⁾
and Yuji ISHII¹⁾

¹⁾Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

²⁾Daiichi University of Pharmacy, Fukuoka, Japan

³⁾Research and Clinical Center for Yusho Dioxin, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan

⁴⁾Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University,
Fukuoka, Japan.

Abstract

The mechanism of oxidative stress which is one of the major toxicities observed in 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF)-treated mice was studied. Previously, we evaluated the dose-response relationship on the wasting syndrome and oxidative stress elicited with PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 and 10 mg/kg, once, p.o.). Of PenCDF doses examined, the wasting syndrome and oxidative stress were most marked in 5 mg/kg. In disagreement with this, the hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity which is a marker of aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cytochrome P450 1a1 (Cyp1a1) was most significantly elevated at 0.3 mg/kg. To clarify this discrepancy, in this study, we determined the contents of Cyp1a1 and 1a2 protein. The content of Cyp1a1 was well correlated with the EROD activity up to the PenCDF dose 1.0 mg/kg while the induction profile of Cyp1a2 was not correlated with it. Although, at the PenCDF 5.0 mg/kg, the contents of Cyp1a1 and 1a2 protein were induced consistently, the EROD activity declined to the level far smaller than the PenCDF dose 1.0 mg/kg. Further, the NADPH consumption was comparable among the PenCDF dose examined. Instead, the hydrogen peroxide production was elevated in S9 fraction most markedly by PenCDF dose 5.0 mg/kg. In agreement with this, the marker of hepatic injury, the serum AST and ALT activities were also most elevated at the same dose. Therefore, it is possible that PenCDF elicits oxidative stress and hepatic injury through the production of hydrogen peroxide via the mechanism involving uncoupling of the P450s.

Corresponding author : Yuji ISHII

Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

Key words : Oxidative stress, Dioxins, PCDF, Cytochrome P450, Hydrogen peroxide, uncoupling, Liver injury

はじめに

1968年、西日本一帯に発生した奇病、油症では、皮膚症状や脂質代謝異常を始めとする多岐にわたる障害が発生し、発生後49年以上経過した現在もなお、多くの患者が苦しんでいる。油症原因物質は、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非意図的生成物であるダイオキシン類であると考えられている¹⁾。中でも、2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) は、油症患者の体内でのダイオキシン類としての毒性指標である TEQ [Toxicity Equivalency Quantity : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 換算量, TEF (Toxicity Equivalency Factor) と存在量との積] が全体の約70%と最も高く、発症への寄与が最も高い原因物質と考えられている²⁾³⁾。動物実験では、高用量のダイオキシン類によって、体重増加抑制作用を特徴とする消耗症 (wasting syndrome)、肝肥大および胸腺や脾臓の萎縮などの発症が知られている⁴⁾。

ダイオキシン類の毒性には、aryl hydrocarbon receptor (AhR) が関与することが、AhR ノックアウトマウスを用いた研究から示唆されている⁵⁾⁶⁾。ダイオキシンが細胞質の AhR に結合すると、AhR は核内に移行したのち、AhR nuclear translocator と結合し、ヘテロダイマーを形成後、標的遺伝子に存在する xenobiotic responsive element に結合する。これにより、転写が活性化され、cytochrome P450 (CYP) 1A1 を始めとするさまざまな酵素が誘導される⁷⁾。ダイオキシン類は多面的毒性を示すが、中でも酸化ストレスは代表的な毒性の一つである⁸⁾⁹⁾。ダイオキシン類により酸化ストレスが惹起される機構としては、複数の要因が考えられる。当研究室の先行研究では、ダイオキシン類の一種である coplanar PCB は、活性酸素消去系である Se-dependent glutathione peroxidase (GPx) や catalase を抑制することにより酸化ストレスを亢進させることが示唆されている¹⁰⁾¹¹⁾。一方、活性酸素生成系の亢進を示唆する報告もある。例えば、薬物の酸化に関

わる P450 は、スーパーオキシドアニオンや過酸化水素の生成も触媒する¹²⁾。これは、NADPH-P450 還元酵素から P450 へ供給された電子が、薬物の酸化に使われずに活性酸素種の生成/遊離に転用される場合である (uncoupling 反応)。TCDD 処理により誘導された Cyp1a1 は、この反応への寄与が大きいと考えられている¹³⁾。これ以外にも、xanthine oxidase や NADPH-oxidase などの誘導も酸化ストレス亢進に関与する¹⁴⁾¹⁵⁾。これらのことから、ダイオキシン類による酸化ストレス惹起には、活性酸素消去系の破綻と生成系の亢進があり、PenCDF ではどちらが重要かは明らかではない。

著者らの先行研究において、PenCDF の毒性の用量依存性を、C57BL/6J マウスにて PenCDF 用量 0.3, 1.0, 5.0 および 10.0 mg/kg (p.o.) にて検討した結果、Cyp1a1 の誘導の指標となる、ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 活性は、PenCDF 0.3 mg/kg で最も顕著に誘導された¹⁶⁾。一方、マウスに著しい体重減少や脾臓、胸腺の萎縮を伴った wasting syndrome を惹起する用量は、これとは明らかに異なっており、PenCDF 5 mg/kg の高用量で最も顕著であった¹⁶⁾。また、これと同じ用量において、脂質過酸化の指標である thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) も著しく上昇させた¹⁶⁾。ダイオキシン類中で最強毒性の TCDD は、雌ラットにおいて wasting syndrome を引き起こすが、これは抗酸化剤の butylated hydroxyanisol で抑制できる¹⁷⁾。同様に PenCDF による wasting syndrome においても、酸化ストレスの亢進が毒性発現に寄与する可能性は当然に考えられる。しかし、PenCDF による EROD 活性の誘導の用量依存性が、wasting syndrome や酸化ストレスの惹起作用のそれとは明らかに異なる理由は明らかではない。

TCDD で誘導された Cyp1a1 が酸化ストレスの惹起に関与することが、Cyp1a2 ノックアウトマウスを使った検討で明らかにされている。すなわち、TCDD による TBARS の上昇に、野生型と Cyp1a2 ノックアウトマウスで違いがない¹³⁾。一方、著者らの先行研究では、PenCDF0.3

mg/kg で著しく Cyplal が誘導されているものの酸化ストレスの惹起は限定的であった¹⁶⁾。従って、PenCDF の場合には、AhR を介した Cyplal の誘導だけでは、酸化ストレスを十分には説明できないと思われる。

これを支持する報告もある。すなわち、低用量の TCDD (15 μ g/kg, i.p.) を投与した雄性ラットの肝臓ミクロゾームでは、過酸化水素の生成はむしろ未処理群より抑えられているが、TCDD 等の多ハロゲン化炭化水素を 2.5 μ M 添加することにより過酸化水素の生成が増加すると言う¹⁸⁾。このことから、TCDD 処理ラット肝臓から単離したミクロゾームには、投与に由来する TCDD と誘導された CYP1A1 が含まれているものの、外から 2.5 μ M の TCDD を添加しなければ CYP1A1 は過酸化水素の生成にほとんど関与しないことが分かる。

本研究では、Cyp1a2 の PenCDF に対する親和性に着目した。当教室における先行研究で、PenCDF がラットの CYP1A2 に高い親和性を示すことが明らかにされている¹⁹⁾。つまり、PenCDF は自ら誘導した Cyp1a2 に結合して自身の毒性が低減された可能性が高い²⁰⁾。著者らの先行研究¹⁶⁾ の成果と併せて考えると、PenCDF はそれ自身が誘導した Cyp1a2 が保持し得る PenCDF 濃度までは著しい毒性は回避され、そのキャパシティーを超えたときに、wasting syndrome のような著しい毒性が引き起こされると推定される。

そこで、本研究では、この仮説を検証すべく、著者らの先行研究で得た試料¹⁶⁾ を用いて、PenCDF 投与量と EROD 活性、Cyplal および Cyp1a2 タンパク質レベルの関係について調べた。その結果、PenCDF 5 mg/kg では、Cyplal および 1a2 タンパク質の誘導性はほとんど変化していないにも関わらず、EROD 活性が低下することが分かったため、さらに、NADPH 消費量についても検討し、P450 の uncoupling 反応の亢進について調べた。また、肝障害のマーカーである血清 aspartate transaminase (AST) および alanine transaminase (ALT) の活性についても調べた。さらに、PenCDF 処理マウスの肝臓組織中の過酸化水素量も併せて定量し、PenCDF 毒性発現への酸化ストレスの寄与について考察した。

実験方法

1. PenCDF 処理動物の試料

著者らは、既報にて C57BL/6J マウスを用い PenCDF 用量依存性の検討を 0.3, 1.0, 5.0 および 10.0 mg/kg (p.o.) の用量にて行った¹⁶⁾。本研究における PenCDF 処理動物の試料は、既報¹⁶⁾にて著者らが調製したのを用いた。なお、PenCDF は既報に従い合成²¹⁾、PenCDF の構造と純度を確認の上使用した。動物実験は、すべて九州大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。PenCDF 用量依存性に関する実験は、九州大学薬学研究院動物舎において行った。マウスは日本クレア(株)より購入し、一週間の馴化ののち使用した。ダイオキシン類に対して高親和性の AhR を発現するマウス (C57BL/6J 系統) を使用した。7 週令の C57BL/6J 系雄性マウスに PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 および 10 mg/kg/5 mL コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油を経口投与した。投与 7 日後に体重を測定したのち臓器を採取した。

2. EROD 活性の測定

摘出した肝臓を 3 倍量の 1.15% KCl にてホモジナイズした。これを 9,000 \times g で 20 分間遠心分離した。得られた上清 (S9) 分画を用い、Burke らの方法に従って²²⁾、7-ethoxyresorufin の O-脱エチル化反応により生じる resorufin の蛍光を測定した (励起光, 544 nm; 測定光, 590 nm)。

3. 肝臓組織中の過酸化水素の測定

Pierce[®] Quantitative Peroxide Assay Kits (Thermo-Fisher Scientific) を用いて測定した。S9 サンプルをタンパク質濃度 (2 mg/mL) となるように 1.15% KCl で希釈し、その 100 μ L を過酸化水素定量に使用した。15 分間室温でインキュベートしたのち、560 nm の吸光度を測定した。測定時の室温は概ね 20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C の範囲にあり、毎回の測定には過酸化水素 (三徳化学工業(株)) (30%, 8.8 M) を milli Q 水で希釈して作成した検量線を同時に測定した。過酸化水素濃度 0.031 M ~ 0.244 M の範囲では良好な直線性があり、すべてのサンプルは、この範囲内で定量した。

4. NADPH 消費活性測定

De Matteis らの方法²³⁾ に準じて行った。β-NADPH 添加後の 340 nm の吸光度の変化を 37 °C にて U-3210 形自記分光光度計 (HITACHI) を用いて 5 分間スキャンした。NADPH のミリモル吸光係数である 6.2²⁴⁾ を用いて NADPH 消費量を算出した。

5. ALT および AST 活性の測定

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼキット・アラニンアミノトランスフェラーゼキット・トランスアミナーゼ C II-テストワコー (和光純薬工業株) を用いて、血清を測定した。ALT は、基本的に 10 倍希釈にて測定したが、control 群は吸光度が低かったため、5 倍希釈や原液を用いて測定した。また、AST は、control 群のみ原液で測定した。555 nm における吸光度を反応後 1 時間以内に測定した。

6. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および Western blotting

SDS-PAGE は Laemmli の方法²⁵⁾ に従って行った。SDS-PAGE 終了後のゲルを用い、Towbin らの方法²⁶⁾ に準じて PVDF 膜にタンパク質を転写した。一次抗体に、rabbit anti-rat P450 1A1 antibody²⁷⁾、二次抗体に、horseradish peroxidase-donkey anti-rabbit IgG (GE Healthcare 社) を用い、ClarityTM Western ECL Substrate (BioRad 社) により ChemiDoc MP (BioRad 社) を用いて Cyplal および 1a2 のバンドを化学発光法にて検出した。

結 果

PenCDF 処理マウス肝臓の S9 分画の相対的 Cyplal および 1a2 タンパク質含量を Fig. 1 に示す。Cyplal は、0.3 mg/kg にて強く誘導され、PenCDF 用量を上げて誘導の強さは同程度であった。一方、Cypla2 は、PenCDF 0.3 mg/kg では誘導傾向が認められ、1 mg/kg 以上で有意な誘導が観察された。PenCDF 用量を上げて誘導の強さは同程度であった。著者らの先行研究の図表¹⁶⁾ よりデータを抽出し、PenCDF 投与量と EROD 活性、並びに Cyplal および Cypla2 含量の変化の関係性を Fig. 2 に示す。PenCDF 1

mg/kg までの用量では、EROD 活性と Cyplal 含量の推移は概ね一致した。PenCDF 1 mg/kg では、Cypla2 が強く誘導されているものの、EROD 活性の変動は Cyplal 含量の変動で説明できることから、EROD 活性への Cypla2 の寄与が小さいことも分かる。一方、PenCDF 5 mg/kg では、Cyplal および 1a2 の含量はほとんど変化していないにも関わらず、EROD 活性が低下している。既報で述べたように¹⁶⁾、PenCDF 5 mg/kg では TBARS の著しい上昇が起こっているという事実から、P450 の uncoupling 反応が亢進したことは十分考えられる。もし、そうであるならば、EROD 活性と不相应な NADPH 消費量の増大が予想される。

Fig. 3 に PenCDF 処理マウス肝 S9 分画の EROD 活性を示す。ここに記載する実験では、各々の群内のサンプル (S9 分画) を等量ずつプールし、基質濃度を 4 μM として NADPH 消費量測定と同条件で EROD 活性を比較した。基質濃度 20 nM での EROD 活性 (先行研究の図表参照)¹⁶⁾ の場合と同様に、4 μM においても PenCDF 0.3 mg/kg 処理群で最も活性が高かった (Fig. 3)。PenCDF 0.3 mg/kg 群の活性は、Cyplal 阻害剤である α-naphthoflavone により、終濃度 1.2 mM および 2 mM でそれぞれ 90% および 97% 阻害された (データ未掲載)。このことから、この活性には Cyplal が主に寄与していることが示唆された。Fig. 4 には 4 μM ethoxyresorufin 存在下での S9 の NADPH 消費量を示す。NADPH 消費量は本研究で調べたどの PenCDF 投与量でも有意な上昇が認められた。しかし、EROD 活性の高さとは一致しておらず、EROD 活性の上昇が大きくなかった PenCDF 5 mg/kg でも、EROD 活性が最も高かった PenCDF 0.3 mg/kg と同程度の NADPH が消費された。また、最高投与量の PenCDF 10 mg/kg 投与群において、NADPH 消費量が高い傾向にあったものの、PenCDF 処理群間で有意な差はなかった。

Fig. 5 に、PenCDF 処理マウス肝臓 S9 分画に含まれる過酸化水素の量を示す。PenCDF 5 mg/kg 投与群において過酸化水素レベルが著しく上昇していることが明らかになった。10 mg/kg 群は上昇傾向を示したが、対照群との有意な差は PenCDF 5 mg/kg 投与群のみにとど

まった. PenCDF 5 mg/kg 群の過酸化水素レベルは, 他のどの用量を投与した群よりも有意に高かった. AST および ALT は, 肝細胞が破壊されたときに血液中に漏出するので, これらの血清中の活性は, 肝障害マーカーとして用いることができる. Fig. 5 および 6 に, 血清中の AST, ALT 活性に PenCDF が及ぼす影響を示す. 血清 AST および ALT 活性は PenCDF 1 mg/kg 以上で有意に増加し, 著者らの先行研究¹⁶⁾に記載の体重減少作用, TBARS 値の上昇同様に 5 mg/kg にて最も影響が大きかった.

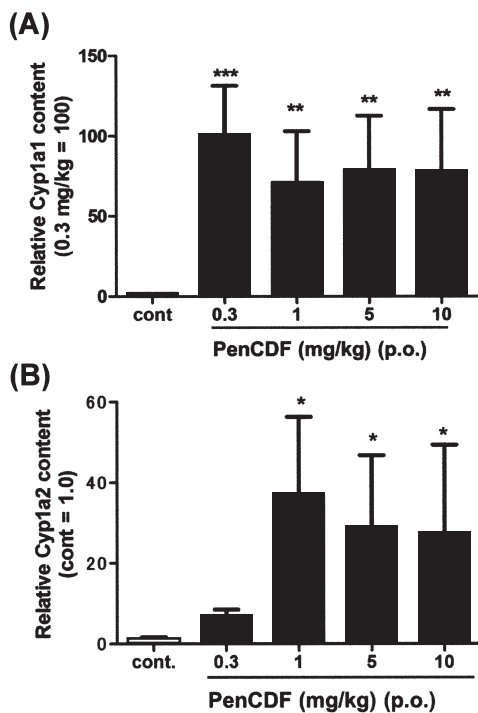


Fig. 1 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on the Cyp1a1 and 1a2 level in the liver of C57BL/6J mice

Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). Each value represents the mean \pm S.D. of 5 mice. Protein expression levels of Cyp1a1 and 1a2 in S9 of liver were determined by western blotting. Cyp1a1 (**A**) content represents the relative Cyp1a1 content in S9 of PenCDF 0.3 mg/kg group mice (=100). Cyp1a2 (**B**) content represents the relative Cyp1a2 content in S9 of control mice (= 1.0). Significantly different from control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

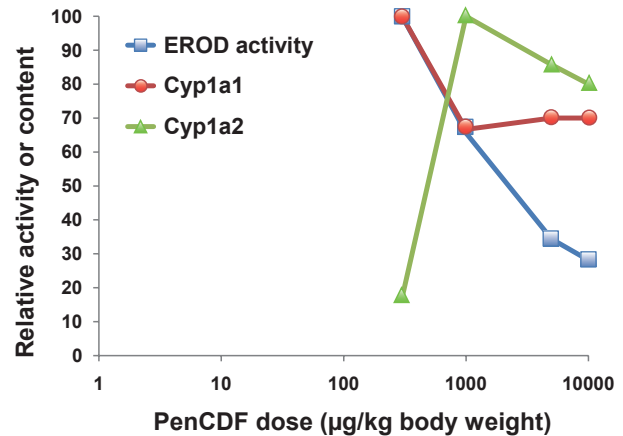


Fig. 2 Induction of EROD activity, Cyp1a1 and Cyp1a2 by PenCDF

EROD activity is shown as a percentage to that of 0.3 mg/kg PenCDF-treated group which exhibited the maximal value. Hepatic EROD activity (pmol/min/mg protein; mean \pm S.E.) in 0.3 mg/kg PenCDF group was 32.6 ± 5.6 . Similarly, the contents of Cyp1a1 and Cyp1a2 are expressed as the percentage to the maximal values in PenCDF (0.3 mg/kg) and PenCDF (1.0 mg/kg) groups, respectively. Data were taken from Fig. 3 of Yamada et al.¹⁶⁾ and Fig. 1.

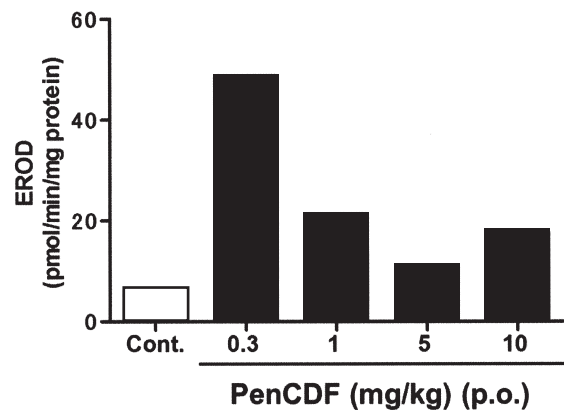


Fig. 3 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on hepatic EROD activity of C57BL/6J mice

Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). EROD activity in the pooled S9 fraction was used as the index of the induction of Cyp1a1. Each value represents the mean of triplicated assays. EROD activity in the S9 was measured under the conditions in which the final concentrations of NADPH and ethoxyresorufin were set at $130 \mu\text{M}$ and $4 \mu\text{M}$, respectively.

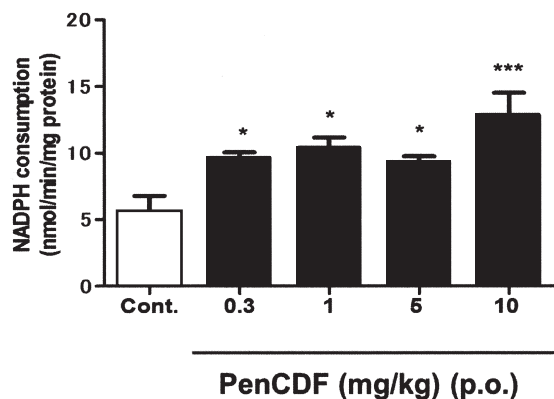


Fig. 4 Comparison of NADPH consumption in the hepatic S9 fraction of C57BL/6J mice treated with PenCDF. Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). Total NADPH consumption is shown. NADPH consumption was determined by comparing the change of absorbance at 340 nm in the presence and absence of 175 μ M NADPH. Ethoxyresorfin (4 μ M) was used as a substrate. Each value represents the mean \pm S. E. of 5 mice. Significantly different from control (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

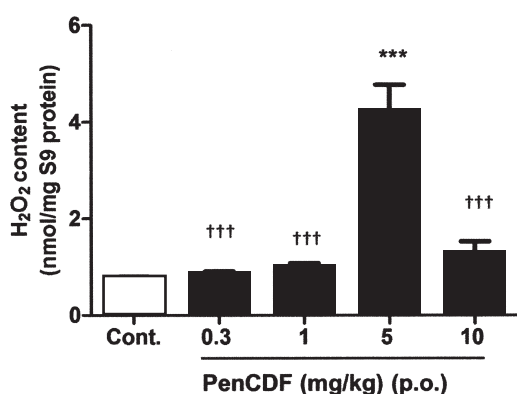


Fig. 5 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on H₂O₂ production in C57BL/6J mice. Mice were orally administered with PenCDF once at a dose indicated. After 7 days, liver was removed and homogenized in 1.15% KCl. The S9 fraction was stored at -80 °C until use. The sample was thawed and an aliquot containing (200 μ g protein) was subjected to the assay at room temperature. The content of hydrogen peroxide was determined by a commercial kit (Pierce Quantitative Peroxide Assay : Aqueous compatible formation). Each value represents the mean \pm S.E. of 5 mice. Significantly different from control (***, $p < 0.001$). Significantly different from PenCDF 5.0 mg/kg group (†††, $p < 0.001$).

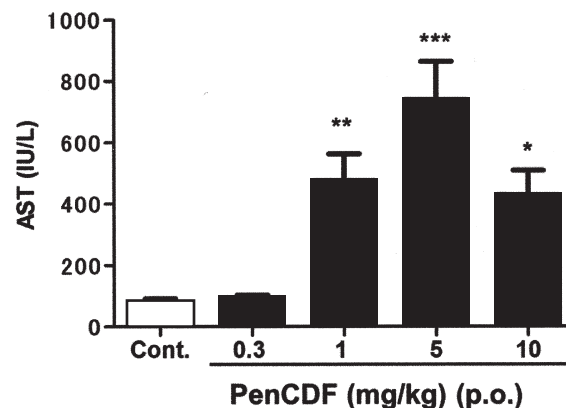


Fig. 6 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on AST activity in serum of C57BL/6J mice. Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). AST activity in serum was used as the index of liver injury. Each value represents the mean \pm S.E. of 5 mice. Significantly different from control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

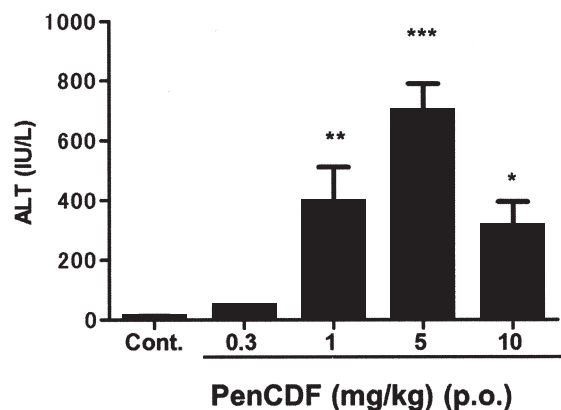


Fig. 7 Effect of 2,3,4,7,8-PenCDF on ALT activity in serum of C57BL/6J mice. Mice were given an oral dose of PenCDF (0.3, 1.0, 5.0 or 10 mg/kg). ALT activity in serum was used as the index of liver injury. Each value represents the mean \pm S.E. of 5 mice. Significantly different from control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

考 察

本研究では、C57BL/6Jc1系雄性マウスにおいて、経口投与した PenCDF が酸化ストレスを惹起する機構を明らかにするために、EROD 活性と NADPH 消費量の関係を調べるとともに、PenCDF 処理マウスの肝組織に残存する過酸化水素を定量した。肝ホモジネートより得た S9 分画は、約 2 年間に亘り超低温フリーザーに保存していたが、PenCDF 5 mg/kg 群においては、組織中に著しく高いレベルの過酸化水素を検出することができた (Fig. 5)。この群においては、Cyp1a1 含量および NADPH 消費量は、PenCDF 1 mg/kg 群と同程度であるにもかかわらず、EROD 活性は不相応に低かった (Fig. 3)。このことから、ethoxyresorufin の酸化以外に NADPH が消費されたことが示唆され、P450 反応の uncoupling が起こり、過酸化水素が大量に生成したことが示唆された。この群においては、脂質過酸化の二次生成物質の malondialdehyde を指標とする TBARS も著しく上昇することを著者らの先行研究で示しており¹⁶⁾、この仮説の妥当性を支持している。一方、PenCDF 5 mg/kg 群に比べれば低いものの、PenCDF 10 mg/kg 群にも、TBARS 値は有意に高かった¹⁶⁾。PenCDF 10 mg/kg と 5 mg/kg の二群間では、Cyp1a1, 1a2 のレベルはほとんど同じであるが (Fig. 1)、PenCDF 5 mg/kg の方にむしろ強い wasting syndrome が惹起されている¹⁶⁾。これは、TBARS の値とも相関している¹⁶⁾。従って、これら二群間の wasting syndrome の強さの違いには、酸化ストレスの違いの寄与が大きいと考えるのは妥当である。

まず、PenCDF が 0.3 mg/kg では酸化ストレスはわずかであるのに、なぜ 5 mg/kg になってから著しく亢進するのかについて考察する。これは、Cyp1a2 が PenCDF に対して高い親和性を示すことを基に説明できる。Fig. 2 に示す通り、PenCDF 1 mg/kg と 5 mg/kg では、Cyp1a1 および 1a2 の含量がほぼ同じである。しかし、EROD 活性は PenCDF 5 mg/kg で半分以下になっている。これは、PenCDF 1 mg/kg では、まだ Cyp1a2 と PenCDF の結合が飽和していないためと考えることができる。既報によれば、Cyp1a2 は、electron sink と考えられており、Cyp1a1 から

の電子を受取り消去することができる²⁸⁾。これを基に考えると、PenCDF 1 mg/kg では、Cyp1a2 が Cyp1a1 からの電子を受け取って、それが過酸化水素生成に使われるのを防いでいる可能性がある。一方、PenCDF の用量が高くなった 5 mg/kg では、Cyp1a2 が PenCDF で飽和したため、Cyp1a1 からの電子を受取り消去する能力を失ってしまったと考えることができる。低用量 TCDD で処理したラットの肝臓ミクロゾーム中の CYP1A1 は、in vitro で過剰量の TCDD を添加したとき過酸化水素を生成することが分かっている¹⁸⁾。従って、Cyp1a2 が PenCDF で飽和した PenCDF 5 mg/kg 群の S9 においても、これと類似した状況が生じたものと考えられる。PenCDF 5 mg/kg と 10 mg/kg の違いについては、もう一つ別の機構を考える必要がある。それは、Cyp1a2 との結合が飽和した後の余分な PenCDF の運命である。上述の機構のように、過剰な PenCDF が Cyp1a1 とともに過酸化水素生成に関与することが示唆されるものの、生成した過酸化水素によって、Cyp1a1 が一部不活性化されてしまった可能性である。3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB77) を NADPH 存在下に CYP1A1 と長時間反応させると、CYP1A1 を不活性化することが知られている²⁹⁾。PCB77 は CYP1A1 の uncoupling を引き起こすと同時に、生成した過酸化水素が CYP1A1 を不可逆的に不活性化して P420 にすることが示唆されている。本研究の PenCDF 10 mg/kg 処理群でも同様のことが起こっているのかも知れない。本研究では western blotting により Cyp1a1 と 1a2 を別々に定量しており、PenCDF 5 mg/kg 群と 10 mg/kg 群ではいずれも同程度であった。今後、S9 中の P450 含量を測定して比較することや、Cyp1a1 や 1a2 の精製酵素を用いた再構成系、あるいは発現系に PenCDF を添加するなどして検証する必要がある。これらは、現時点では、多くの推論を含むが、PenCDF により引き起こされる酸化ストレスと wasting syndrome の関係を説明出来る可能性がある。

ダイオキシン類による酸化ストレスの惹起には、これ以外のメカニズムも想定される。その一つには、ミトコンドリアの Cyp1b1 がある³⁰⁾。本研究では、EROD 活性、NADPH 消費量、また過

酸化水素の測定には S9 分画を用いた。S9 はミトコンドリアの混入を避けて調製しているものの、TBARS の測定を行ったのはホモジネートに対してでありミトコンドリア分画も含まれている。また、ミトコンドリアで産生された過酸化水素が細胞質に放出されれば、S9 分画に含まれていると思われる。本研究で S9 分画に見出された過酸化水素レベルの上昇の一部が、ミトコンドリアの Cypl1b1 に由来する可能性は否定できない。

また、PenCDF 処理マウスの肝臓 S9 では NADPH 消費量が増加したが、その増加倍率は、EROD 活性の 1,000 倍以上であった。仮に、それがそのまま P450 反応の uncoupling 反応に使われたのであれば、PenCDF 0.3 mg/kg 群においても著しい TBARS の上昇が認められたり、組織中に過酸化水素の顕著な残存があつてしかるべきである。従つて、S9 を使つた場合に、P450 反応以外にも NADPH が消費されていることも考慮する必要がある。PenCDF は、サイトゾル酵素である NADPH:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) を誘導することが知られている³¹⁾。また、TCDD が、過酸化水素の生成にも関与する NADPH-oxidase のサブユニットの一つを誘導することが報告されている¹⁵⁾。Xanthine dehydrogenase は、SH 基の酸化修飾³²⁾あるいは、ミトコンドリアプロテアーゼによる部分加水分解³³⁾により xanthine oxidase となることが知られている。Xanthine oxidase も過酸化水素の生成に寄与するが、TCDD が xanthine oxidase を誘導することも知られている¹⁴⁾。但し、この反応には NADPH は必要ないが、反応後に NADH が生成する。さらに、ダイオキシン類は活性酸素消去系にも影響を及ぼすことが分かつており、Se-dependent GPx の反応にも NADPH が必要である。これは、ダイオキシン類で抑制されるので、NADPH 消費量は少なくなる方向に働く¹⁰⁾³⁴⁾。また、過酸化水素の分解に関与する catalase がダイオキシン類の一つである PCB126 で著しく抑制されることも、当教室の先行研究から示唆されている¹¹⁾。PenCDF 高用量曝露による過酸化水素の肝組織内蓄積に、これらの機構が複合的に関与している可能性は否めない。

結 論

油症原因物質 PenCDF による過酸化水素生成亢進、酸化ストレス惹起とそれによる肝障害の機構について検討した。

1. 経口投与した PenCDF が酸化ストレスを惹起する機構を明らかにするために、EROD 活性と NADPH 消費量の関係を調べるとともに、PenCDF 処理マウスの肝組織に残存する過酸化水素を定量した。PenCDF 5 mg/kg 経口単回投与マウスの肝臓組織由来 S9 分画において、高レベルの過酸化水素が検出された。
2. Cypl1a1 の誘導は、PenCDF 1.0 mg/kg までは EROD 活性と相関したが、それより高濃度では相関しなかった。また、Cypl1a2 の誘導は EROD 活性とは相関しなかった。
3. EROD 活性は、PenCDF 0.3 mg/kg にて最も活性が高かった。NADPH 消費量は、いずれの PenCDF 処理群でも有意に高く、EROD 活性の低い 5 mg/kg 群でも、活性の高い 0.3 mg/kg 群と大差なかった。
4. PenCDF 5 mg/kg 処理群では、EROD 活性は NADPH 消費量と見合っておらず、uncoupling による過酸化水素の生成が起こつたことが示唆された。

本研究では、PenCDF の Cypl1a2 への特異的な結合による毒性軽減、また、そのキャパシティーを超えた PenCDF 用量での Cypl1a1 の uncoupling が過酸化水素生成、酸化ストレス惹起の主たる原因であると推定している。この点の詳細を明らかにするためには、S9 からの直接の過酸化水素の生成に対する、Cypl1a1 阻害剤や、xanthine oxidase 阻害剤の影響等も更に検討していく必要がある。本研究の成績が、今後の油症患者の毒性軽減につながることを期待する。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)(課題番号:H24-食品-指定-014 および H27-食品-指定-017)によつた。

参 考 文 献

- 1) Masuda Y : Behavior and toxic effects of PCBs and PCDFs in Yusho patients for 35 years. *J. Dermatological Sci.* 1 : S11-S20, 2005.
- 2) Masuda Y, Schechter A and Papke O : Concentrations of PCBs, PCDFs and PCDDs in the blood of Yusho patients and their toxic equivalent contribution. *Chemosphere* 37 : 1773-1780, 1998.
- 3) Tanabe S, Kannan N, Wakimoto T, Tatsukawa R, Okamoto T and Masuda Y : Isomer-specific determination and toxic evaluation of potentially hazardous coplanar PCBs, dibenzofurans and dioxins in the tissues of "Yusho" PCB poisoning victim and in the casual oil. *Toxicol. Environ. Chem.* 24 : 215-231, 1989.
- 4) 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.
- 5) 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, 1995.
- 6) 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.
- 7) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 : 307-340, 1995.
- 8) Stohs SJ, Hassan MQ and Murray WJ : Lipid peroxidation as a possible cause of TCDD toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111 : 854-859, 1983.
- 9) Stohs SJ : Oxidative Stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Free Radic. Biol. Med.* 9 : 79-90, 1990.
- 10) Hori M, Kondo H, Ariyoshi N, Yamada H, Hiratsuka A, Watabe T and Oguri, K : Changes in the hepatic glutathione peroxidase redox system produced by coplanar polychlorinated biphenyls in Ah-responsive and -less-responsive strains of mice : mechanism and implications for toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3 : 267-275, 1997.
- 11) 岩崎優, 加藤晴敏, 有吉範高, 小栗一太 : コプラナー PCB によるモルモット肝ペルオキシソーム酵素活性の変化. *福岡医誌* 86 : 144-152, 1995.
- 12) Poulos TL and Raag R : Cytchrome P450_{cam} : crystallography, oxygen activation, and electron transfer. *FASEB J.* 6 : 674-679, 1992.
- 13) Slezak BP, Diliberto JJ and Birnbaum LS : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated oxidative stress in CYP1A2 knockout (CYP1A2^{-/-}) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264 : 376-379, 1999.
- 14) Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M and Fujii-Kuriyama Y : Aryl hydrocarbon receptor (AhR) -mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281 : 1093-1099, 2001.
- 15) Wada T, Sunaga H, Ohkawara R and Shimba S : Aryl hydrocarbon receptor modulates NADPH oxidase activity via direct transcriptional regulation of p40^{phox} expression. *Mol. Pharmacol.* 83 : 1133-1140, 2013.
- 16) 山田健一, 石井祐次, 武田知起, 黒木廣明, 三苦千景, 内博史, 古江増隆, 山田英之 : Cynaropicrin が油症原因物質 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran による wasting syndrome および酸化ストレスに及ぼす影響. *福岡医誌* 106 : 169-175, 2015.
- 17) Stohs SJ, Hassan MQ and Murray WJ : Effects of BHA, d-alpha-tocopherol and retinol acetate on TCDD-mediated changes in lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and survival. *Xenobiotica* 14 : 533-537, 1984.
- 18) Shertzer HG, Clay CD, Genter MB, Chames MC, Schneider SN, Oakley GG, Nebert DW and Dalton TP : Uncoupling-mediated generation of reactive oxygen by halogenated aromatic hydrocarbons in mouse liver microsomes. *Free Radic. Biol. Med.* 36 : 618-631, 2004.
- 19) Kuroki J, Koga N and Yoshimura H : High affinity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsome of rats. *Chemosphere* 15 : 731-738, 1986.
- 20) 吉村英敏 : 生を衛る化学. *薬学雑誌* 111 : 737-755, 1991.
- 21) Kuroki H, Haraguchi K and Masuda Y : Synthesis of polychlorinated dibenzofuran isomers and their gas chromatographic profiles. *Chemosphere* 13 : 561-573, 1984.
- 22) Burke MD and Mayer RT : Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448

- toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. *Drug Metab. Dispos.* 3 : 245-253, 1975.
- 23) De Matteis F, Ballou DP, Coon MJ, Estabrook RW and Haines DC : Peroxidase-like activity of uncoupled cytochrome P450 studies with bilirubin and toxicological implications of uncoupling. *Biochem. Pharmacol.* 84 : 374-382, 2012.
- 24) Horecker BL and Kornberg A : The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175 : 385-390, 1948.
- 25) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 26) Towbin H, Staehelin T and Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350-4354, 1979.
- 27) Ishida C, Koga N, Hanioka N, Saeki HK and Yoshimura H : Metabolism in vitro of 3,4,3',4'- and 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P-450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14 : 276-284, 1991.
- 28) Shertzer HG, Clay CD, Genter MB and Schneider SN : CYP1A2 protects against reactive oxygen production in mouse liver microsomes. *Free Radic. Biol. Med.* 36 : 605-617, 2004.
- 29) Schlezinger JJ, White RD and Stegeman JJ : Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl : production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Mol. Pharmacol.* 56 : 588-597, 1999.
- 30) Bansal S, Leu AN, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Chowdhury AR, Anandatheerthavarada HK and Narayan G : Mitochondrial targeting of cytochrome P450 (CYP) 1B1 and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.* 289 : 9936-9951, 2014.
- 31) Yoshimura H, Yoshihara S, Koga N, Nagata K, Wada I, Kuroki J and Hokama Y : Inductive effect on hepatic enzymes and toxicity of congeners of PCBs and PCDFs. *Environ. Health Perspect.* 59 : 113-119, 1985.
- 32) Corte ED and Stirpe F : The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.* 126 : 739-745, 1972.
- 33) Saksela M, Lapatto R and Raivio KO : Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease. *FEBS Lett.* 443 : 117-120, 1999.
- 34) 堀美穂, 有吉範高, 山田英之, 小栗一太 : Coplanar PCB の肝 glutathione peroxidase redox system に対する影響. *福岡医誌* 88 : 144-148, 1997.

(Received for publication March 15, 2017)