

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：23701  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22310042  
 研究課題名（和文） 哺乳動物におけるダイオキシン類の代謝排泄メカニズムに関する研究  
 研究課題名（英文） Metabolism and excretion of dioxins in mammals  
 研究代表者  
 中西 剛 (NAKANISHI TSUYOSHI)  
 岐阜薬科大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：50303988

## 研究成果の概要（和文）：

本研究ではダイオキシン類の代謝・排泄メカニズムについて、甲状腺ホルモンをキー化合物として解明することを目的としている。甲状腺ホルモンを野生型マウスに投与すると、肝臓中のダイオキシン類の蓄積が減少し、尿中への排泄が促進された。一方で甲状腺ホルモンによる糞中へのダイオキシン排泄促進作用は認められなかった。また甲状腺ホルモン受容体（TR）欠損マウスを用いた検討により、甲状腺ホルモンは TR $\beta$  を介してダイオキシン類の排泄を促進していることも明らかとなった。さらに甲状腺ホルモンにより尿中への排泄が促進されたダイオキシン類は大部分が未変化体であった。これらの結果は、ダイオキシン類は代謝を受けずにそのまま尿中に排泄されることを示唆している。

## 研究成果の概要（英文）：

Polyhalogenated aromatic hydrocarbons (PHAHs) which include polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) are environmental contaminants found in emissions resulting from combustion of fossil fuels; incineration of municipal, hazardous, and hospital wastes; and production of bleached paper. Human exposure to these compounds usually involves complex mixtures in the diet, particularly milk and other dairy products, fish and meat. These compounds elicit a variety of biological and toxic responses; induction of xenobiotics metabolizing enzymes, behavioral abnormalities, teratogenicity, immunotoxicity, thymus atrophy, reproductive disorders, epithelial disorders, wasting syndrome, hepato-toxicity and cancer. PHAHs tend to accumulate in liver and adipose tissue because of its high lipophilicity. In experimental animals, fecal excretion is the major route of excretion of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), which is the prototype and the most potent isomer of the PHAHs, following intratracheal instillation, oral gavage, intraperitoneal or intravenous administration. Although TCDD is so hardly metabolized that tend to remain in the body for a long time, previous studies have provided evidences that TCDD is metabolized both in vivo and in vitro to more polar metabolites. However, in mammals, it remains unclear how to metabolite TCDD and excrete its polar metabolites in urine. Here we used <sup>3</sup>H-TCDD to search for metabolites in urine of mice.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：ダイオキシン、尿中排泄、代謝

### 1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類の中でも特に難分解性の 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

(TCDD) や coplanar polychlorinated biphenyl (coPCB) などについては、その毒性に関する報告は多数存在するものの、その生体内運命に関する情報は非常に乏しい。これまでに TCDD の代謝排泄については、ラットの肝ミクロソーム [Nature, 281:706-7(1979)] や肝初代培養細胞 [BBRC, 105:341-46(1982)] とのインキュベーションで代謝物の存在を示唆するデータが報告されてきた。しかしながら、その後様々な代謝酵素のリコンビナント蛋白質を用いて精力的な検討がなされてきたが、TCDD の代謝酵素は同定されておらず、未だに詳細な代謝排泄経路の解明には至っていない。一方で、CYP1A2 欠損マウスではダイオキシン類にばく露した際の尿中へのダイオキシン類の排泄が、野生型マウスに比べて増加するという報告がある [Toxicol Appl Pharmacol, 159:52-64(1999)]。この論文では、肝臓中の CYP1A2 にトラップされるはずの TCDD が、当該分子が存在しないためにトラップされず、その分排泄量が増えると論じられているが、これらの実験は単に RI ラベルの TCDD を投与してその後の RI 活性をトレースしたに過ぎず、排泄された TCDD が未変化体なのか代謝物であるのかなどに関する検討までは行われていない。このようにダイオキシン類の生体内運命については、代謝物の存在が示唆されて以降、30 年経った今もなお不明なままである。

### 2. 研究の目的

先述の背景のもと、申請者は  $^3\text{H}$ -TCDD を用いて TCDD の排泄を促進する化合物の探索を行ってきた。その結果、トリヨードチロニン (T3) やチロキシン (T4) などの甲状腺ホルモンが、 $^3\text{H}$ -TCDD の肝臓中の蓄積量を減少させ、尿中への排泄を促進することを見出した。これらの結果は、マウスの肝臓に TCDD の尿中排泄を促進するような分子 (代謝酵素等) が存在し、甲状腺ホルモンやアナトー色素によってその分子が誘導される可能性を示唆している。特に甲状腺ホルモンは、核内受容体である甲状腺ホルモン受容体 (TR) のアゴニストとして作用することで TR 応答遺伝子を誘導することから、TCDD の排泄促進機構は TR を介してその引き金が

引かれていると考えられる。申請者は、この TR を介した TCDD の排泄促進機構を解明することで、ダイオキシン類の代謝排泄メカニズムを解明できるのではないかと考えた。本研究では、甲状腺ホルモンをキー化合物とし、哺乳動物において未だ明らかになっていない TCDD の代謝・排泄に関わる分子をマウスにおいて同定し、その具体的な代謝排泄経路の全容を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物、飼料

雄性 ddY マウス、C57BL/6 マウス、TR $\alpha$  欠損マウスまたは TR $\beta$  欠損マウス (8-11 週令) を用いた。また餌料による影響を排除するために、試験期間中は精製飼料である AIN-93M を与えた。

#### (2) ダイオキシン類の体内動態実験

Day0 に  $^3\text{H}$ -TCDD 6 ng (0.6 $\mu\text{Ci}$ ) /mouse または PCB126 40 n (0.6 $\mu\text{Ci}$ ) /mouse を各マウスに腹腔内投与し、2 日おきに糞と尿を回収した。Day16 に糞と尿を回収した後に、マウスを解剖し、採血および各臓器を回収した。回収した尿、血液および臓器は、組織溶解液で溶解し、脱色後、液体シンチレーションカクテルを加え、RI 活性を測定した。また糞はホモジナイズした後に、前述と同様の処置をして放射活性を測定した。T3 または T4 は、Day8 から実験終了時まで毎日皮下投与を行った。活性炭は、精製試料に対して 2% の割合で混餌し、Day8 より実験終了時まで自由摂取させた。

#### (3) TCDD 代謝物の同定

Bligh&Dyer 法により  $^3\text{H}$ -TCDD を投与した尿及びホモジナイズした肝臓検体から脂溶性画分の抽出を行った。この抽出物について、逆相カラムを用いて HPLC による分画を行った後に、各画分について放射活性を測定した。

#### (4) ダイオキシン類の排泄に関わる分子に関する定量 RT-PCR

Day0 に TCDD 6 ng をマウスの腹腔内に投与し、さらに Day8 から Day16 まで T3 を毎日皮下投与した。Day16 にマウスから肝臓を回収し、Total RNA を抽出した。得られた Total RNA について定量 RT-PCR を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 甲状腺ホルモンによるダイオキシン類の排泄促進作用

<sup>3</sup>H-TCDD は、投与後 1 日目から主に脂肪と肝臓に蓄積し始め、投与 4～8 日目でその蓄積がほぼ一定となる。また血中 <sup>3</sup>H-TCDD 濃度は、投与後すぐに減少し始め、Day8 以降で血中濃度がほぼ一定となることから、<sup>3</sup>H-TCDD は投与後 1 週間程度で各臓器への分布が安定すると考えられる。そこでまず <sup>3</sup>H-TCDD ばく露したマウスに対する T3 および T4 の排泄促進効果を検討した。その結果、T3 および T4 投与により尿中の放射活性の有意な増加と、肝臓中の放射活性の有意な減少が認められた。またこの作用は、ddY マウスでも C57BL/6 マウスでも認められたことから、マウスの系統差はないものと考えられた。

次に肝臓からの <sup>3</sup>H-TCDD の消失と尿中への <sup>3</sup>H-TCDD の排泄の因果関係を追求するために、活性炭の併用投与による排泄促進効果について検討を行った。活性炭は胆汁排泄された TCDD が腸管から再吸収されるのを阻止し、そのまま糞中へ排泄させる作用を有する。したがって甲状腺ホルモンにより胆汁中への TCDD 排泄が促進したのであれば、活性炭との併用により、糞中への排泄量が増加すると考えられる。しかし T3 と活性炭との併用投与時と活性炭単独投与時の糞中 TCDD 排泄量に違いは認められなかったことから、甲状腺ホルモンは肝臓に蓄積した TCDD を積極的に尿中に排泄している可能性が考えられた。

また <sup>3</sup>H-TCDD の代わりに <sup>3</sup>H-PCB126 をマウスにばく露して同様の検討を行ったところ、甲状腺ホルモン投与により肝臓中の放射活性を有意な減少、尿中の放射活性の有意な増加が認められた。このことから甲状腺ホルモンは、TCDD のみならず PCB126 など他のダイオキシン類についても、尿中への排泄を促進する作用を有する可能性が示唆された。

(2) ダイオキシン類の尿中排泄に関与する甲状腺ホルモン受容体の同定

甲状腺ホルモンは核内受容体である TR のアゴニストとして作用することで一連のホルモン作用を誘導するが、TR には TR $\alpha$  と TR $\beta$  の 2 つのサブタイプが存在する。そこで TCDD の尿中排泄促進作用にどちらのサブタイプが関わるのかを検討するために、TR $\alpha$  および TR $\beta$  欠損マウスを用いて <sup>3</sup>H-TCDD の体内動態実験を行った。各マウスに <sup>3</sup>H-TCDD をばく露した後に T3 を投与したところ、TR $\alpha$  欠損マウスでは野生型マウスと同様に肝臓での蓄積量の低下と尿中への排泄促進作用が認められたが、TR $\beta$  欠損マウスでは T3 の影響が全く認められなくなった。また TR $\beta$  欠損マウスでは、甲状腺ホルモンを投与しな

い場合においても、<sup>3</sup>H-TCDD ばく露時の尿中排泄量が野生型マウスに比べて有意に減少していた。これらの結果から、甲状腺ホルモンによる TCDD 排泄促進は TR $\beta$  を介して引き金が引かれていることが明らかとなった。

(3) 排泄された TCDD の化学型

<sup>3</sup>H-TCDD にばく露した野生型マウスから排泄された尿中の TCDD の化学型について HPLC による解析を行ったところ、ほとんどがリテンションタイム 31～34 分である未変化体として検出されたが、21 分のあたりに Cl 基が水酸基に置換したものと考えられる代謝物の存在も確認された。次に <sup>3</sup>H-TCDD にばく露した野生型マウスに T3 を投与した際の尿中 TCDD について検討を行ったところ、予想に反して代謝物ではなく未変化体のピークが著しく上昇していた。またこの結果を反映して、<sup>3</sup>H-TCDD にばく露した TR $\beta$  欠損マウスに T3 を投与した場合には、野生型マウスと比較して代謝物ではなく未変化体の排泄量が減少していた。

これらの結果を *in vitro* 系においても再現するために、雄性マウスの肝臓ミクロソーム画分と TCDD をインキュベートして得られたものについて同様の分析を行ったところ、未変化体のみが検出され、代謝物は検出限界以下であった。これは TCDD の尿中排泄には肝臓中の肝臓ミクロソーム画分は関与していないと考えられ、動物実験の結果を反映したのものとなった。

(4) ダイオキシン類の排泄に関わる分子の同定

T3 によってダイオキシン類の尿中への排泄が促進するが、その排泄促進に関わる分子の探索を試みた。その結果、野生型マウスに T3 を投与すると肝臓中の CYP1A2 の発現が低下することが明らかとなった。また TR $\alpha$  欠損マウスでは野生型マウスと同様に T3 投与により CYP1A2 の発現低下が見られたが、TR $\beta$  欠損マウスでは見られなかった。さらに野生型、TR $\alpha$  欠損および TR $\beta$  欠損マウスから得られた初代培養肝細胞に、TCDD および T3 を添加して CYP1A2 の mRNA 発現を検討したところ、マウスに T3 を投与した際と同様に野生型細胞と TR $\alpha$  欠損細胞では CYP1A2 の発現が低下していたが、TR $\beta$  欠損細胞では発現が変動しなかった。CYP1A2 は TCDD の結合蛋白質であり、TCDD の肝臓蓄積に関わる分子として知られていることから、T3 投与時に起こる TCDD の肝臓からの消失には TR $\beta$  を介した CYP1A2 の発現低下が関わると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Ido A, Ishihara S, Kume A, Nakanishi T, Monguchi Y, Sajiki H, Nagase H, Practical method for PCB degradation using Pd/C-H<sub>2</sub>-Mg system, *Chemosphere*, 査読有, 90 巻, 2013, 57-64.
- ② Ishihara S, Ido A, Monguchi Y, Nagase H, Sajiki H, Pd/C-catalyzed dechlorination of polychlorinated biphenyls under hydrogen gas-free conditions, *Journal of Hazardous Materials*, 査読有, 229-230 巻, 2013, 15-19.
- ③ Onodera A, Tani M, Michigami T, Yamagata M, Min KS, Tanaka K, Nakanishi T, Kimura T, Itoh N, Role of megalin and the soluble form of its ligand RAP in Cd-metallothionein endocytosis and Cd-metallothionein-induced nephrotoxicity *in vivo*, *Toxicology Letters*, 査読有, 212 巻, 2012, 91-96.
- ④ Sawada K, Inoue D, Wada Y, Sei K, Nakanishi T, Ike M, Detection of retinoic acid receptor agonistic activity and identification of causative compounds in municipal wastewater treatment plants in Japan, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 査読有, 31 巻, 2012, 307-315.
- ⑤ Ikeda K, Yamasaki K, Homemoto M, Yamaue S, Ogawa M, Nakao E, Fukunaga Y, Nakanishi T, Utoguchi N, Myotoku M, Hirotsu Y, Efflux transporter mRNA expression profiles in differentiating JEG-3 human choriocarcinoma cells as a placental transport model, *Pharmazie*, 査読有, 67 巻, 2012, 86-90.
- ⑥ Kobayashi R, Nakanishi T, Nagase H, Trichloroethylene enhances TCR-CD3-induced proliferation of CD8<sup>+</sup> rather than CD4<sup>+</sup> T cells, *The Journal of Toxicological Sciences*, 査読有, 37 巻, 2012, 381-387.
- ⑦ Ayaori M, Yakushiji E, Ogura M, Nakaya K, Hisada T, Uto-Kondo H, Takiguchi S, Terao Y, Sasaki M, Komatsu T, Iizuka M, Yogo M, Uehara Y, Kagechika H, Nakanishi T, Ikewaki K, Retinoic acid receptor agonists regulate expression of ATP-binding cassette transporter G1 in macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 査読有, 1821 巻, 2012, 561-572.
- ⑧ Yoshioka H, Hiromori Y, Aoki A, Kimura T, Fujii-Kuriyama Y, Nagase H, Nakanishi T, Possible aryl hydrocarbon receptor-independent pathway of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced antiproliferative response in human breast

cancer cells, *Toxicology Letters*, 査読有, 211 巻, 2012, 257-265.

- ⑨ Kimura T, Okumura F, Onodera A, Nakanishi T, Itoh N, Isobe M, Chromium (VI) inhibits mouse metallothionein-I gene transcription by modifying the transcription potential of the co-activator p300, *The Journal of Toxicological Sciences*, 査読有, 36 巻, 2011, 173-180.
- ⑩ Katayama K, Furuki R, Yokoyama H, Kaneko M, Tachibana M, Yoshida I, Nagase H, Tanaka K, Sakurai F, Mizuguchi H, Nakagawa S, Nakanishi T, Enhanced *in vivo* gene transfer into the placenta using RGD fiber-mutant adenovirus vector, *Biomaterials*, 査読有, 32 巻, 2011, 4185-4193.

[学会発表] (計 17 件)

- ① 中西 剛 (招待講演)、化学物質による免疫機能の老化 ～トリフェニルスズの胸腺萎縮機構解明を例に～、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (横浜)
- ② 西岡 康、吉川 紘、伊師賢樹、吉田一郎、中西 剛、永瀬久光、アンドロゲン高産生モデルマウスの作製とその雌性生殖器形成の解析、フォーラム 2012 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、2012 年 10 月 26 日、名古屋観光ホテル (名古屋)
- ③ 廣森洋平、由井洋樹、中西 剛、永瀬久光、ヒト胎盤における有機スズ化合物のプロゲステロン産生への影響、フォーラム 2012 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、2012 年 10 月 26 日、名古屋観光ホテル (名古屋)
- ④ 中西 剛、永瀬久光 (招待講演)、胎児期エストロゲンシグナルと脳の性分化、フォーラム 2012 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、2012 年 10 月 26 日、名古屋観光ホテル (名古屋)
- ⑤ 松田達弥、吉川 紘、西岡 康、中西 剛、永瀬久光、Diethylstilbestrol の胎児蓄積性と胎児エストロゲンシグナルかく乱作用、フォーラム 2012 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、2012 年 10 月 25 日、名古屋観光ホテル (名古屋)
- ⑥ 廣森洋平、酒井紀行、小林 亮、上代大地、中西 剛、永瀬久光、トリフェニルスズの全身免疫系に対する加齢化促進作用の検討、第 3 回メタロミクス研究フォーラム、2012 年 8 月 30 日、昭和薬科大学 (東京)
- ⑦ Hiromori Y, Sakai N, Kobayashi R, Jodai D, Nagase H, Nakanishi T, Triphenyltin promotes thymic aging via PPARgamma signaling pathway, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012 年 7 月 20 日、仙台国際センター (仙台)

- ⑧ Kobayashi R, **Nakanishi T**, **Nagase H**, Enhancement of CD8 positive T cell proliferation caused by trichloroethylene, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012年7月20日, 仙台国際センター (仙台)
- ⑨ Aoki A, Yoshioka H, Hiromori Y, Kimura T, Fujii-Kuriyama Y, **Nagase H**, **Nakanishi T**, Possible aryl hydrocarbon receptor-independent pathway of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced antiproliferative response in human breast cancer cells, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012年7月20日, 仙台国際センター (仙台)
- ⑩ **中西 剛 (招待講演)**, 核内受容体としての有機スズ化合物とその毒性、第39回日本毒性学会学術年会、2012年7月18日、仙台国際センター (仙台)
- ⑪ **中西 剛 (招待講演)**, 核内受容体を介した有機スズ化合物の生体影響に関する研究、第23回日本微量元素学会学術集会、2012年7月6日、シェーンバッハ・サボア (東京)
- ⑫ **Nakanishi T**, Sakai N, Kobayashi R, Jodai D, Hiromori Y, **Nagase H**, Triphenyltin promotes thymic aging via PPAR  $\gamma$  signaling pathway, Eurotox 2012, 2012年6月19日, Stockholm Waterfront Congress Centre (Stockholm)
- ⑬ **中西 剛**, PPAR $\beta/\delta$  リガンドのスクリーニング法、BIOtech 2012 アカデミックフォーラム、2012年4月26日、東京ビッグサイト (東京)
- ⑭ 吉岡弘毅、廣森洋平、青木 明、木村朋紀、藤井義明、**中西 剛**、**永瀬久光**、AhR 依存的/非依存的経路を介した 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin の作用、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、北海道大学 (札幌)
- ⑮ **Nakanishi T**, Yoshioka H, Hiromori Y, Aoki A, Kimura T, **Nagase H**, Possible mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced antiproliferative response in human breast cancer MCF-7 cells through an independent pathway of aryl hydrocarbon receptor, Eurotox 2011, 2011年8月29日, Palais des Congrès de Paris (Paris)
- ⑯ 廣森洋平、小林 亮、青木 明、藤井義明、**中西 剛**、**永瀬久光**、AhR 非依存的経路を介した 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin の作用、第30回生体と金属・化学物質に関する研究会、2011年8月19日、森秋旅館 (渋川)
- ⑰ 吉岡弘毅、廣森洋平、小林 亮、青木 明、藤井義明、**中西 剛**、**永瀬久光**、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin による

aryl hydrocarbon receptor 非依存的な経路を介した MCF-7 細胞増殖抑制作用、フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010年9月9日、星薬科大学 (東京)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
特になし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中西 剛 (NAKANISHI TSUYOSHI)  
岐阜薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：50303988

### (2)研究分担者

永瀬 久光 (NAGASE HISAMITSU)  
岐阜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：40141395