

スズキ及びマコガレイ肝臓の薬物代謝酵素 (EROD) 活性に及ぼす

β -ナフトフラボンの影響

渡辺剛幸*¹・宮庄 拓*²・箕輪 康*³・堀口一彦*⁴・柴崎道廣*¹
橋爪政男*⁵・原 猛也*¹

Effects of β -naphthoflavone on the hepatic EROD activities in Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) and Marbled sole (*Pseudopleuronectes yokohamae*)

Takayuki Watanabe*¹, Taku Miyasyo*², Yasushi Minowa*³, Kazuhiko Horiguti*⁴,
Michihiro Shibazaki*¹, Masao Hashidume*⁵ and Takeya Hara*¹

要約 : EROD活性のモデル誘導物質である β -ナフトフラボン (β -NF) をスズキとマコガレイの腹腔内に注入し, 24及び48時間後に肝臓内におけるEROD活性を測定した。両魚種ともに β -NF投与量とEROD活性との間には, 用量-反応関係が認められた。スズキに比べてマコガレイのEROD活性が高く, スズキよりもマコガレイの薬物代謝機能が高いことが示唆された。

キーワード : スズキ, *Lateolabrax japonicus*, マコガレイ, *Pseudopleuronectes yokohamae*, EROD活性, β -ナフトフラボン, 肝臓

Abstract : β -naphthoflavone (β -NF), which was a model material to induce EROD activity, was injected in an abdominal cavity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* and Marbled sole, *Pseudopleuronectes yokohamae*, and the activity of EROD in liver was measured 24 and 48hours after injection. There observed a positive dose-response relationship between the amount of β -NF injected and EROD activity induced in both species. EROD activity induced in Marbled sole was higher than that induced in Japanese sea bass by about 40pmol/min/mg protein, which suggested, therefore, that chemical substance metabolism would be more active in the former than in the latter.

Keywords : *Lateolabrax japonicus*, *Pseudopleuronectes yokohamae*, EROD activities, β -naphthoflavone, liver

まえがき

魚類における汚染物質の代謝には, 肝臓中の薬物代謝酵素チトクロームP-450が関与しており, そのうちのCYP1A1は代表的な基質であるエトキシシレゾルフィンの7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 活性で測定される (加藤・鎌滝, 2002)。魚類のEROD活性は, 汚染物質であるPCB,

TCDD/F, PAHの投与量との有意な相関が認められている (Bucheli and Fent, 1995)。また, コブラナーPCB (Co-PCB, IUPAC No.126) の全魚体中濃度とEROD活性に相関があることは, ニジマス *Oncorhynchus mykiss* 稚魚の経口投与実験で確かめられている (Brown *et al.*, 2002)。

著者らは, スズキ *Lateolabrax japonicus* とマコガレイ *Pseudopleuronectes yokohamae* に, Co-PCB

(2006年3月31日受付, 2006年4月19日受理)

*1 財団法人 海洋生物環境研究所 事務局 (〒101-0051 東京都千代田区神田神保町3-29 帝国書院ビル5F)
§ E-mail : t-watanabe@kaiseiken.or.jp

*2 酪農学園大学 獣医学部 獣医化学教室 (〒069-8501 北海道江別市文京台緑町582)

*3 財団法人 海洋生物環境研究所 実証試験場 (〒945-0017 新潟県柏崎市荒浜4-7-17)

*4 国際協力事業団 (海外渡航中)

*5 全国漁業共済組合連合会 (〒101-0047 東京都千代田区内神田1-1-12 コープビル)

類の経口投与を行い、筋肉中のCo-PCB濃度とEROD活性との関係を調べた。その結果、マコガレイではEROD活性は増加したが、スズキでは変化が認められなかった。水中曝露実験でも同様の結果となり、薬物代謝酵素の誘導特性に種差のあることが示唆された(渡辺ら、未発表)。

本研究では、マコガレイ及びスズキに見られたEROD活性の差が確かなものであることを追試するために、ERODのモデル誘導物質として知られている β -ナフトフラボン(β -NF)をスズキ及びマコガレイに投与し、両種の反応特性の違いを比較した。

材料及び方法

供試魚 供試材料としたスズキは千葉県栽培漁業センターから、マコガレイは(財)温水養魚開発協会から、それぞれ種苗を購入して(財)海洋生物環境研究所(以下、海生研と略記)中央研究所(千葉県御宿町)で中間育成を行った。スズキでは体重約40g、マコガレイでは約100gに達したものを選別し、海生研実証試験場(新潟県柏崎市)に移送して実験に用いた。

飼育条件 供試魚をそれぞれ150L流水式水槽に6個体收容し、水温20°Cで飼育した。中間育成時には飼料を1日2回、飽食するまで与え、実験は無給餌で行った。

投与及び採取方法 β -NF(東京化成工業(株)製、純度99+)をコーン油に溶かし、5、10、30、50、100mg/kg体重となるように腹腔内注射を行った。投与後24時間と48時間後に各3個体を取り上げ、直ちに頸部及び鰓周辺を切開して海水中で放血後、体重、体長を測定、肝臓を採取した。採取した肝臓は重量測定後、液体窒素で急速冷凍し、酵素活性測定に供するまで-80°Cで冷凍保存した。

マイクロゾーム溶液の調製 Hanaoka *et al.* (2000)及びPohl and Fouts (1980)に従い、マイクロゾーム溶液の調製及びEROD活性を測定した。スズキは魚体が小さかったため、1濃度区当たり3個体分の肝臓試料を混合したものを1試料とした。マコガレイは個体別に約1gを1試料(1濃度区当たり3試料)とした。肝臓試料を1.15% KCl-10mM EDTA (pH7.4) 5.0mLとともに、テフロン製ホモジナイザーで、5,000rpmで15秒間の処理を3回繰り返して破碎した後、9,000×gで45分間の遠

心分離処理し、さらに静置沈殿後の上澄みを102,000×gで60分間の超遠心分離処理した。破碎から超遠心分離に至る処理は、試料を約4°Cに保ち行った。生じた沈渣(マイクロゾーム画分)を1.15% KCl-10mM EDTA (pH7.4) 1.0mLを加え、超音波ホモジナイザーで5秒間、3回の処理で均一になるように攪拌し、これをマイクロゾーム溶液とした。この操作は可能な限り氷水中で冷却しながら行った。

EROD活性の測定 調製したマイクロゾーム溶液25 μ Lに、100mMエトキシレゾルフィン/エタノールを超純水で10倍希釈した10mMエトキシレゾルフィン溶液50 μ L、5.0mM NADPH/NaHCO₃50 μ L及び100mMリン酸カルシウムバッファー(pH7.4)125 μ Lを加え、よく混和した後、直ちに26°Cで15分間反応させた。反応を停止するためにエタノール250 μ Lを加えてよく混和し、氷中で30分間静置した。次いでそれを微量冷却高速遠心機(himac CF15R, HITACHI)で遠心分離(6,000×g, 20分間, 4°C)し、その上澄みをろ過(0.45 μ m)して逆相高速液体クロマトグラフィー(LC-Vp series, SHIMADZU)で反応産物であるレゾルフィンを定量分離した。検出は励起波長560nm、蛍光波長585nmで行った。なお、カラムにはLUNA C18(2)5 μ mを用い、20mMリン酸カルシウムバッファー(pH6.6)/メタノール/アセトニトリル(52:45:3, v/v/v)(流速0.8mL/min)で溶出した。

蛋白質の定量 Lowry *et al.* (1951)の方法に基づき、調製したマイクロゾーム溶液中のタンパク質の定量を行った。

結果と論議

β -NFを腹腔内注射したスズキ及びマコガレイにおけるEROD活性は、スズキで24及び48時間後ともに50mg/kg体重まで投与量の増加に伴って増加傾向を示したが、100mg/kg体重ではEROD活性がやや低下した。マコガレイでは、24時間後で100mg/kg体重まで投与量の増加に伴って増加傾向を示したが、48時間後ではスズキと同様に100mg/kg体重でEROD活性がやや低下した(Fig.1.)。

両種とも、5~50mg/kg体重の範囲では、 β -NF濃度の対数(x)と24時間後EROD活性(y)との間には、以下に示すとおり有意な関係が認められた($P<0.05$)。

$$\text{スズキ} \quad : \quad y=17.7x+29.1$$

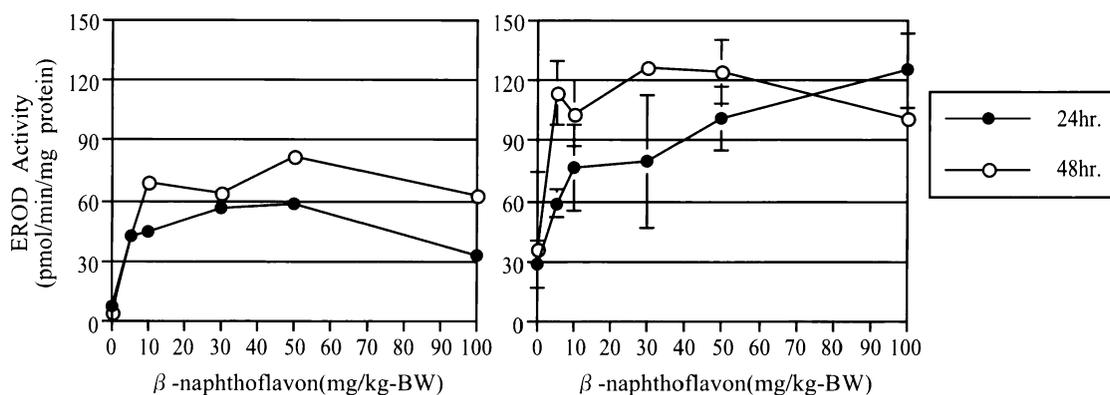


Fig. 1 EROD activities in hepatic microsomes from Japanese sea bass (left) and Marbled sole (right) pre-treated with a single intraperitoneal injection of various doses of β-naphthoflavin.

マコガレイ : $y=35.4x+35.8$

24時間後と48時間後のEROD活性を比較すると、マコガレイに100mg/kg体重を投与した場合を除いて、48時間後のEROD活性が24時間後に比べておおむね高い値を示した。

β-NFを50mg/kg体重腹腔内注射した場合、スズキとマコガレイのEROD活性は、24及び48時間後にそれぞれ59-81 pmol/min/mg protein, 101-124 pmol/min/mg proteinを示し、マコガレイで高く、その差は約40 pmol/min/mg proteinであった。著者らが別に実施したCo-PCBs曝露実験におけるスズキとマコガレイのEROD活性は、8週後にそれぞれ20, 50 pmol/min/mg protein増加し、マコガレイで高くその差は30 pmol/min/mg proteinであり(渡辺ら, 未発表)、曝露方法や測定時期は異なるが、本実験における両魚種の差とほぼ同程度であった。このことから、スズキよりもマコガレイの薬物代謝機能が高いことが示唆された。

本実験で得られた結果を、β-NFを腹腔内注射により投与した他魚種のEROD活性の値と比較した(Table 1)。スズキとマコガレイでは24時間後より48時間後のEROD活性が増加する傾向を示したが、riverine catfish (*Rita rita*)では3日後と10日後の活性は変化がないこと、marine mudfish (*Apocryptes bato*)では10日後には大幅に減少することが示されている。gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Pretti *et al.*, 2001)では、投与量10mg/kg体重までは濃度依存的に活性は増加するが、10 mg/kg体重と50mg/kg体重ではその値は変化していない。本実験においてもスズキ、マコガレイと

も50mg/kg体重までは濃度依存的に増加したが、それ以上の濃度については濃度依存性は認められなかった。Meyer *et al.* (2002)は、汚染の程度の異なる二つの河川から採取したマミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*)にβ-NFの腹腔内注射を行い、2日後のEROD活性を調べている。それによると、同一魚種においても供試魚の採取地等の履歴によってEROD活性が異なることを示している。いずれもスズキ、マコガレイの活性値に比べて、極めて高い値であった。

以上の結果から、種によって薬物代謝機能が異なるものと考えられる。また、同一種においてもその生息環境によってEROD活性が異なる可能性があることが示されていることから、今後、スズキ、マコガレイについてもさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

謝 辞

本研究の端緒となった有益な示唆を頂いた海生研中央研究所伊藤康男総括研究員に深謝します。また、ご指導を頂いた元海生研研究専門家里見至弘博士及び海生研の木下秀明博士、道津光生博士、御園生淳総括研究員、ご校閲頂いた東京大学名誉教授平野礼次郎博士、東京大学名誉教授清水誠博士、元海生研顧問会澤安志博士に感謝の意を捧げます。

なお、本研究は水産庁委託「ダイオキシン類等漁業影響調査—魚介類中のコプラナーPCB削減方策検討説明事業」の一部である。併せて謝意を表します。

Table 1 EROD activities in hepatic microsomes from fishes with a single injection of various doses of β-naphthoflavone

fish	β-naphthoflavone (mg/kg-BW)	days after single injection (day)	EROD activity (pmol/min/mg)	references
Japanese sea bass (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	0	1	7.9	this study
	5	1	42.8	
	10	1	44.7	
	30	1	56.5	
	50	1	59.0	
	100	1	32.7	
	0	2	4.7	
	5	2	42.6	
	10	2	68.8	
	30	2	64.0	
	50	2	81.4	
	100	2	63.3	
	Marbled sole (<i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>)	0	1	
5		1	59.0± 7.0	
10		1	76.1±21.2	
30		1	80.1±32.8	
50		1	100.7±15.8	
100		1	124.9±18.6	
0		2	36.1±38.2	
5		2	113.5±15.8	
10		2	103.4±16.2	
30		2	126.4± 5.9	
50		2	124.0±15.6	
100		2	101.4± 3.0	
gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)		0	7	9.2
	50	7	529	
	0	7	10	
	0.3	7	50	
	1.0	7	150	
	10	7	520	
	50	7	520	
killifish (<i>Fundulus heteroclitus</i>)	50	2	800	Meyer <i>et al</i> (2002). (Sediment PAH concentration;above 1000ppm)
	50	2	2200	
	50	2	2200	
marine mudfish (<i>Apocryptes bato</i>)	50	3	58.2±11.0	Al-Arabi <i>et al</i> (2002).
	50	10	3.7± 2.0	
riverine catfish (<i>Rita rita</i>)	50	3	57±28	Al-Arabi <i>et al</i> (2002).
	50	10	58±24	

引用文献

Al-Arabi, S. A. M. and Goksoeyr, A. (2002). Cytochrome P4501A responses in two tropical fish species, riverine catfish (*Rita rita*) and marine mudfish (*Apocryptes ato*). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 131, 61-71.

Brown, S. Fisk, A. T., Brown, M., Vilella, M., Muir, D. C. G., Evans, R. E., Lockhart, W. L., Metner, D. A. and Cooley, H. M. (2002). Dietary accumulation and biochemical responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB126). *Aquat. Toxicol.* **59**, 139-152.

Bucheli, T. D. and Fent, K. (1995). Induction on

cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **25**, 201-268.

Hanaoka, N., Tatarazako, N., Jinno, h., Arizono, K. and Ando, M. (2000). Determination of cytochrome P450 1A activities in mammalian liver microsomes by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 744, 399-406.

加藤隆一・鎌滝哲也 (2002). 薬物代謝学. 第2版, 東京化学同人, 東京, pp.9-52.

Lowry, O. H., Rosebrough, M. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Boil. Chem.*

- 193, 265-275.
- Meyer, J. N., Nacci, D. E. and Giulio, R. T. D. (2002). Cytochrome P4501A (CYP1A) in killifish (*Fundulus heteroclitus*): heritability of altered expression and relationship to survival in contaminated sediments. *Toxicol. Sci.* **68**, 69-81.
- Pohl, R. J. and Fouts, J. R. (1980). A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.*, **107**, 150-155.
- Pretti, C., Salvetti, A., Longo, V., Giorgi, M. and Gervasi, P. G. (2001). Effects of β -naphthoflavone on the cytochrome P450 system, and phase II enzymes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* **130**, 133-144.