

内因性および外因性化学物質の
抱合代謝産物の生体内運命とその役割

家子 貴裕

内因性および外因性化学物質の
抱合代謝産物の生体内運命とその役割

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

家子 貴裕

獣医生化学

指導教員 教授 岩野 英知

2019 年度

目次

緒論	1
第 章 唾液腺におけるステロイド合成能の評価	
1. 序文	5
2. 材料と方法	7
3. 結果	10
4. 考察	18
5. 小括	23
第 章 カビ毒ゼアラレノンの腸管における代謝動態	
1. 序文	25
2. 材料と方法	28
3. 結果	31
4. 考察	39
5. 小括	44
第 章 カビ毒ゼアラレノンの肝臓における代謝動態	
1. 序文	46
2. 材料と方法	47
3. 結果	49
4. 考察	56
5. 小括	61
総括	62
謝辞	64

引用文献	65
------	----

英文要旨	74
------	----

緒論

薬物代謝とは、薬物代謝酵素によって生体内で不要になったステロイドなどの内因性化学物質や、薬物および毒物などの外因性化学物質を活性化または分解・解毒し、生体外へと排出するための代謝反応である。薬物代謝酵素による反応には、加水分解や酸化還元反応を行う第1相、および抱合反応を行う第2相から成る2つの相に分類される。第2相の抱合反応は、第1相で得られた代謝産物にグルタチオン、グリシン、硫酸、またはグルクロン酸などの荷電性内因性因子を抱合することで、物質の極性を高め、不要な化学物質を生体外へと排泄されるようにする役割がある。このように、内因性および外因性化学物質の代謝にとって抱合反応は体外排泄という意味で非常に大切な役割を担っていると考えられる。しかし、近年ステロイドなどの内因性化学物質が代謝を受け抱合体となった後に、体外へと排泄されずに局所臓器へと輸送され、抱合体が脱抱合され、その後のステロイド合成に利用されることが報告されてきた[25, 86]。このようなステロイド抱合体の役割を考慮すると、外因性化学物質も抱合代謝を受けた後に、ステロイド抱合体と同様に、標的器官へと輸送され、その後脱抱合され元の毒性のある化学物質へと再賦活化され、毒性を発揮している可能性が懸念される。そこで、本研究では、内因性化学物質であるステロイドの抱合体の局所臓器への輸送とその役割の確認・調査、および外因性化学物質であるカビ毒ゼアラレノン (ZON) の生体内における抱合代謝動態を調査することで、内因性および外因性化学物質の抱合代謝産物の生体内運命とその役割について比較検討した。

ステロイドホルモンは一般的に生殖腺や副腎皮質などの内分泌腺によって合成および分泌され、血液と共に全身循環し標的器官に運ばれ作用する。ステロイド合成には、cytochrome P450 (CYP) や hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) が関与しており[77]、これらの酵素によって、コレステロールを出発物質とし、プレグネノロンやプロゲステロンを経て、最終的にはグルココルチコイド、ミネラルコルチコイドおよび性ステロイドが生合成される。ステロイドは脂溶性が高いため、容易に血液中から標的細胞の細胞

膜を通過し、細胞内にある受容体と結合する単純拡散モデルが想定されている。ステロイドは血糖値の上昇、抗炎症、体液量の調整および身体の発達など様々な生理活性を示すことで、生体内の恒常性を維持している[72]。

従来、ステロイドホルモンは生殖腺や副腎皮質などの内分泌腺によってのみ合成されたと考えられていた。しかし、近年の研究により、内分泌器官以外の組織におけるステロイド合成が報告されてきた[103, 104]。ステロイドホルモン合成に関する酵素の発現や活性は、胸腺[14, 78, 84, 85]、腸管[15, 17, 66]、皮膚[98]、中枢神経系[16, 20, 32, 89, 108]、心血管系[30, 45]、および骨格筋筋芽細胞[25]などで確認されている。また、コレステロールを出発物質としない局所的なステロイドホルモンの生合成も報告されている。デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体は副腎皮質で産生され、血液を介して胎盤などの末梢組織に運ばれ、胎盤で脱抱合されてデヒドロエピアンドロステロンとなり、テストステロンおよびエストロゲン合成の基質として利用される[1, 86]。マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞株においては、ステロイド合成の主な基質がプレグネノロン硫酸抱合体であることが示唆されている[25]。このように、ステロイドは肝臓などの臓器で抱合され、抱合体として他の臓器へと運搬され、局所臓器において脱抱合された後に、ステロイドの生合成に利用されることが考えられる。つまり、ステロイド抱合体は生体内を循環し、標的臓器に運搬された後に、局所的なステロイド合成に利用されていると考えられる（図 1）。

カビ毒である ZON は、エストロゲンレセプターへの親和性があり、家畜飼料などから暴露された動物に繁殖障害を引き起こすことが知られており、内分泌かく乱化学物質として危惧されている[5, 83]。ZON は、経口暴露された後に、腸管や肝臓において薬物代謝酵素によって代謝を受け、抱合体となり排泄されることが知られているが[5]、未だに生体内における詳細な代謝動態は明らかになっていない。また、内分泌かく乱化学物質の Bisphenol A (BPA) は、肝臓で代謝を受け抱合体となった後に、血液を介して胎盤へと輸送され、胎児へと運ばれる事が示唆されている[40]。以上のことを考慮し、ZON もステロイド抱合体輸送システムに則って標的器官へと運搬されるという仮説が考えられた（図 1）。

そこで本研究では、未だステロイドホルモンの局所合成が報告されていない唾液腺において、抱合型ステロイドを利用したステロイドホルモンの局所合成能について検討した(第□章)。次に、構造や性質がステロイドに類似している外因性化学物質である ZON が、ステロイドと同様の抱合代謝産物の輸送経路を辿って標的器官へと到達するのか、あるいは不活性化され生体外へと排泄されるのかを見極める目的で、ラット反転腸管を用いた ZON の腸管における代謝動態を検討した(第 章)。最後に、腸管で吸収された化学物質は、血液と共に血流を介して主要な代謝臓器である肝臓へと運ばれると推測されるため、ラット肝臓灌流試験を用いた ZON の肝臓における代謝動態を検討した(第 章)。

以上、内因性化学物質であるステロイドの抱合体の局所臓器輸送とその役割、および外因性化学物質である ZON の生体内における抱合代謝動態について比較検討し、抱合体反応の意義を考察する目的で研究を発展させた。

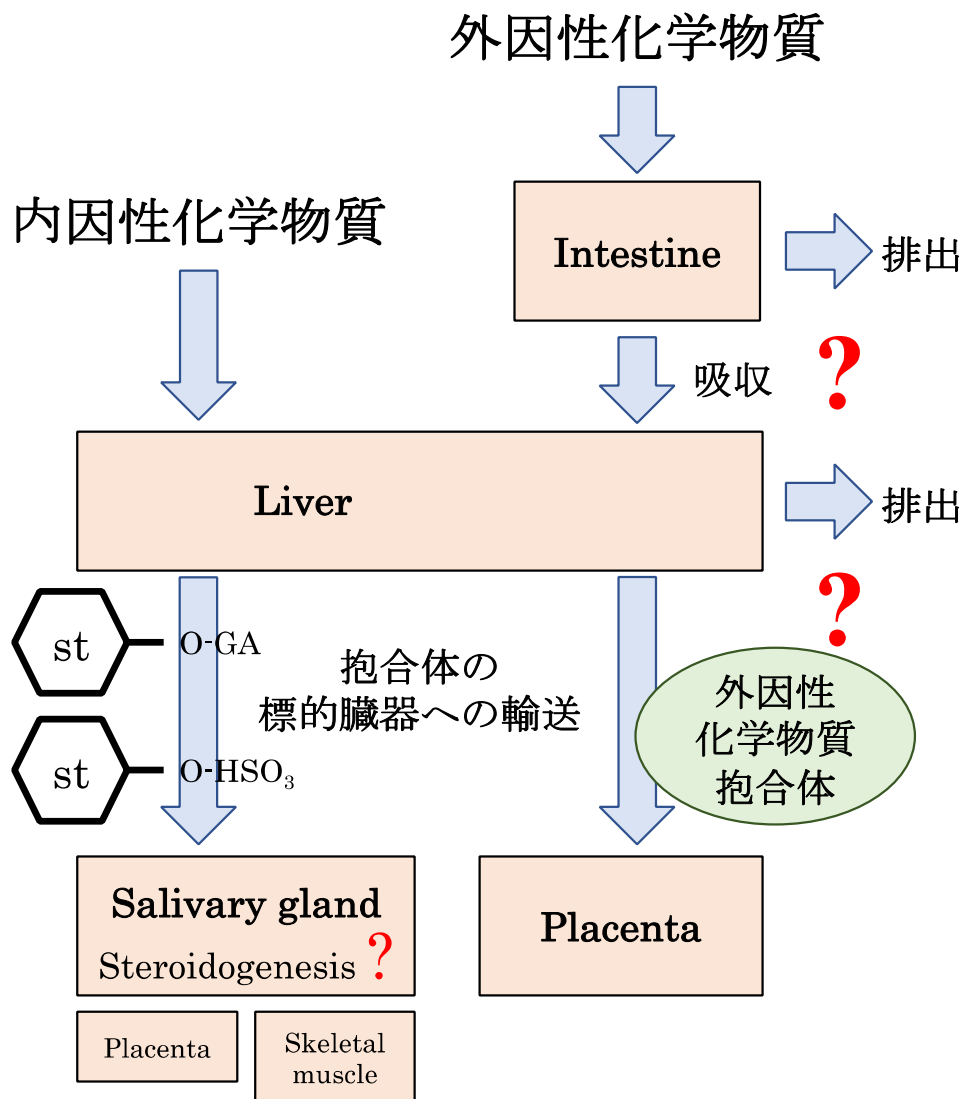


図1 化学物質抱合体の標的器官への輸送の概略図

肝臓や副腎皮質などの臓器で抱合されたステロイド（ステロイド, st; グルクロン酸抱合体, -GA; 硫酸抱合体, -HSO₃）は、血中へと放出された後に、血液と共に全身循環することにより様々な局所臓器へと運搬されると推測される。局所臓器に運ばれたステロイド抱合体は、局所的なステロイド合成などに利用されると予測される。経口暴露された外因性化学物質は腸管や肝臓で代謝された後に、ステロイドと同様の経路で標的器官へと到達する可能性が推測される。この仮説を検証する足がかりとして、本研究ではラット唾液腺を用いたステロイド抱合体の局所臓器における利用、および外因性化学物質であるゼアラレノンの腸管と肝臓における抱合代謝産物の動態を検討した。

第 章 唾液腺におけるステロイド合成能の評価

1. 序文

ステロイドホルモンは、生殖器や副腎皮質などの内分泌腺によって合成および分泌され、血液と共に全身循環し標的器官に運ばれ作用する。これらの内分泌腺では、ステロイドホルモン合成の最初の基質であるコレステロールが、ミトコンドリアおよび滑面小胞体に存在する5つのcytochrome P450 (CYP)と2つのhydroxysteroid dehydrogenase (HSD)の酵素によって多段階の酵素反応を受ける(図2)。ステロイドホルモン合成の最初の段階として、細胞内コレステロールはsteroidogenic acute regulatory protein (StAR)および末梢型ベンゾジアゼピン受容体を介してミトコンドリア内膜に輸送され、そこでCYP family 11 subfamily A member 1 (CYP11A1)によってプレグネノロンへと変換される[62]。progesteroneはCYP21A2によってdeoxycorticosteroneに変換された後に、ミトコンドリアに存在するCYP11Bによって、さらにcorticosteroneへと合成される。cortisolは、hydrocortisoneがCYP21A2によって合成されるdeoxycorticosteroneからCYP11Bによって合成される(図2)。ヒト副腎皮質で合成される主なglucocorticoidはcortisolであるが、ラットやマウスを含むげっ歯類では、CYP17 α の活性が副腎と比較してほぼ欠落しているため、corticosteroneが主なglucocorticoidである[71, 79, 111]。

唾液は、口腔内の恒常性の維持に重要な役割を果たす。唾液には、アミラーゼなどの消化酵素に加えて、glucocorticoidや性ステロイドホルモンが含まれている。ヒトおよびラットでは、唾液中のglucocorticoid濃度は血漿中のglucocorticoid濃度とある程度の正の相関($r = 0.893$)がある[110, 113]。診断目的でcorticosteroneとcortisolの濃度を測定する際に、唾液の採取は非侵襲的で簡便なため、血液の代わりに唾液を使用することは臨床的に有用であると考えられている[6]。唾液中のcorticosteroneおよびcortisol濃度の測定は、採血による潜在的なストレスを回避することができる点か

らも優れていると見なされている。しかし、血液中グルコルチコステロンの濃度変化は、唾液中グルコルチコステロンの濃度変化と完全に一致するわけではない[112]。

そこで、本章では唾液腺におけるステロイドの局所合成の可能性に注目し、抱合型ステロイドを利用したステロイドホルモンの局所合成能を明らかにすることを目的として検討した[34]。使用した唾液腺は、舌下腺、顎下腺および耳下腺（図3）の三大唾液腺である。舌下腺、顎下腺、および耳下腺は、それぞれ構造や分泌物が異なる。耳下腺の腺房細胞は漿液腺房のみから構成されており、主に漿液性分泌に機能している。顎下腺は漿液腺房と粘膜腺房が混在している。舌下腺も漿液腺房と粘膜腺房が混在しているが、そのほとんどは粘膜腺房である[2]。唾液の産生・分泌のほとんどはこの三大唾液腺が担っているが、構造や分泌物が異なることから、この3つの唾液腺を用いて、ステロイドホルモンの合成能を調査した。

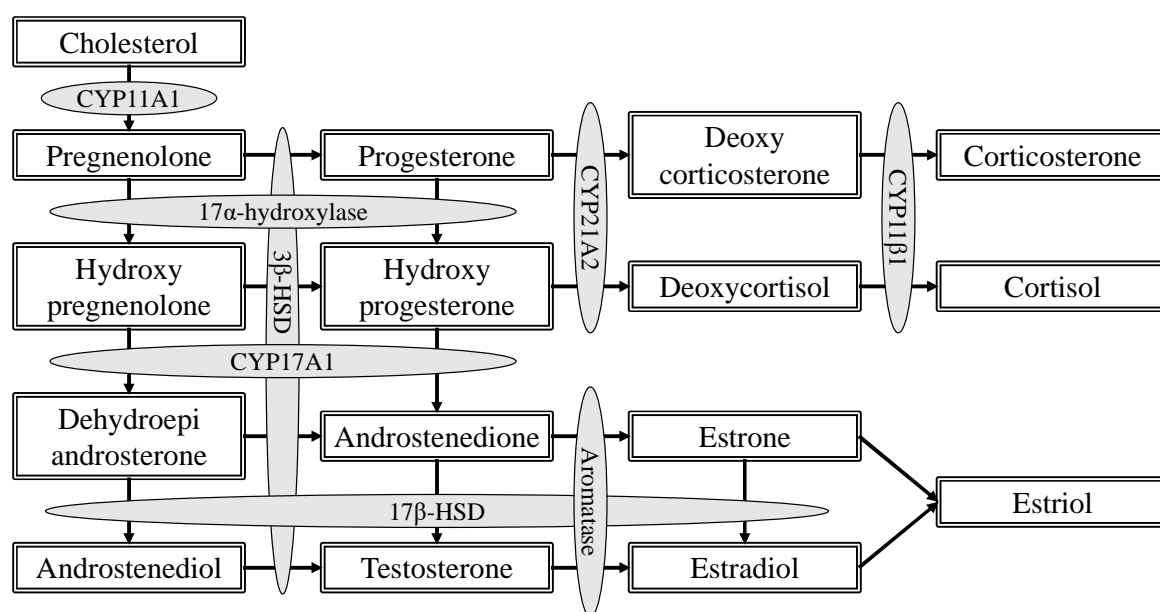


図2 従来のステロイドホルモン合成経路図

内分泌腺によるステロイドホルモン合成の概略を示した。細胞内のコレステロールを最初の基質とし、複数の cytochrome P450（CYP）および hydroxysteroid dehydrogenase（HSD）による多段階の酵素反応を経て、グルコルチコイドおよび性ステロイドホルモンは合成される。

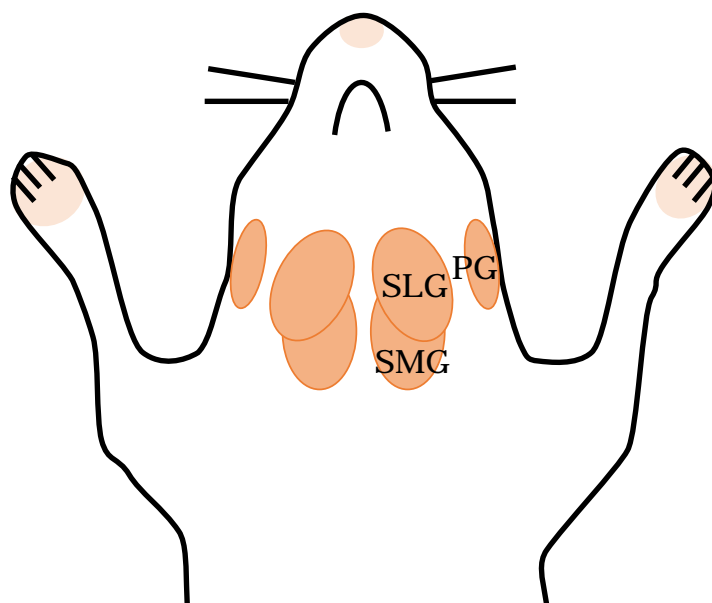


図3 ラット唾液腺の解剖学的模式図

本実験で使用した唾液腺の解剖学的な位置を示した。三大唾液腺である舌下腺（SLG）、顎下腺（SMG）および耳下腺（PG）をそれぞれ採取した。

2. 材料と方法

1) 試薬

プレグネノロン、プロゲステロン、デオキシコルチコステロン、コルチコステロン、テストステロン、アンドロステンジオンおよびプレグネノロン硫酸抱合体は Sigma-Aldrich（アメリカ合衆国）より購入した。コレステロールは和光純薬工業（大阪）より購入した。HPLC 用特級アセトニトリルおよびギ酸は Supelco（アメリカ合衆国）より購入した。Western blotting 分析には、以下の抗体を使用した：一次抗体として rabbit polyclonal anti-GAPDH (sc-25778, Santa Cruz, アメリカ合衆国)、anti-CYP11A1 (ab175408, Abcam, イギリス)、anti-StAR (sc-25806, Santa Cruz)、anti-steroid sulfatase (bs-3857R, Bioss, アメリカ合衆国)および anti-CYP11B1 (慶應義塾大学より分与)、二次抗体として goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate (#1706515, BIO-RAD, アメリカ合

衆国)。anti-CYP11B1 は、アミノ酸残基 272-283 (KNVYRELAEGRQC) に対応して、ウサギで産生した。抗体のアフィニティー調整のために、カルボキシ末端システイン残基のスルフヒドリル基をキャリアタンパク質と結合させた[69]。

2) 供試動物

8-15 週齢の雄 (300-400 g) および妊娠雌 (gestation day, GD 12-13, 240-300 g) Sprague-Dawley (SD) ラットを日本エスエルシー (浜松) から購入した。ラットは自由採食・自由飲水できる環境下で 1 週間馴化した後に実験に供した。イソフルラン麻酔下で放血殺し、唾液腺、副腎および精巢を雄ラットから、胎盤を妊娠雌ラットから採取した。酵素活性試験に用いた唾液腺には、舌下腺、顎下腺および耳下腺が含まれる。酵素発現を検討した Western blotting 分析では、耳下腺のみを単離し、耳下腺単独サンプルと、舌下腺および顎下腺の複合サンプルとして使用した。合計 11 匹の雄ラットを酵素活性試験 (6 匹) および Western blotting 分析 (5 匹) に使用し、また合計 4 匹の妊娠雌ラットを酵素活性試験または Western blotting 分析に使用した。本実験は、酪農学園大学の動物実験倫理委員会によって承認を受け (承認番号: VH17A4) すべての手術は麻酔下で行われ、動物の苦痛を最小限に抑えるように原則に従い実験を行った。

3) 組織サンプル調整

採取した唾液腺、副腎、精巢および胎盤をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、それぞれの組織に 4 倍量の 0.25 M スクロースを加え、ホモジナイズし、900 × g で遠心分離し、細胞質およびミトコンドリア分画を含む上清を回収した。その上清に終濃度が 0.5% になるように 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulphonate (CHAPS) を加えて膜成分を可溶化した。その後、Lowry 法によってタンパク濃度の定量を行い[54]、酵素活性試験および Western blotting 分析に用いるまで -25°C で凍結保存した。

3) 酵素活性試験

ステロイド合成に関する酵素の活性を評価するための酵素活性試験は、Wang らによって報告された方法に[113]、後述の質量分析 (MS) を用いた反応生成物の検出のためにいくつかの修正を加えて行った [56]。各組織サンプル溶液に、4 mM の MgCl_2 を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) および 30 μM の各酵素基質 (コレステロール、プレグネノロン、プロゲステロン、デオキシコルチコステロンおよびアンドロステンジオン) を加えた。さらに、100 μM NADPH および NADH を添加し、37°C で 2 時間インキュベートにより反応させた。その後、反応液を煮沸処理により酵素反応を停止した。内部標準として、各ステロイドホルモンを最終濃度が 5 ng/mL になるように、0.1% ギ酸を含む 100 μL のアセトニトリルに溶解し、煮沸した反応液に加え、10,000 \times g、4°C で 10 分間遠心分離を行った。上清に 100 μL のヘキサンを加えた後に、遠心分離し、上清を MS 分析に使用した[56]。

4) MS 分析によるステロイド濃度測定

デオキシコルチコステロンおよびコルチコステロンの LC-TOF MS ピークは SigmaFit™ アルゴリズム (Bruker Daltonics, ドイツ) を使用して同定し、他のステロイドは前田らの報告に基づいて同定した[56]。ステロイドホルモンの定量のために、Acquity UPLC (Waters, イギリス) および ESI ソースが接続された Xevo TQ-S micro タンデム四重極型質量分析計を使用した (LC-MS/MS)。プレグネノロン、プロゲステロン、テストステロン、デオキシコルチコステロンおよびコルチコステロンの検出限界は、それぞれ 14.2、3.2、0.6、9.2、0.4 fmol/g であった。安定同位体コルチコステロン-d8 は大塚製薬 (東京) テストステロン-d3 は Merck (アメリカ合衆国) から購入した。

5) Western blotting 分析

各サンプルのタンパク質濃度を 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように調整し、総タンパク質量を 20 μg とした。各サンプルを SDS-PAGE で分離し、Western blotting 分析のために PVDF 膜

(ATTO, 東京) に転写した。3%スキムミルクで室温にて 1 時間ブロッキングした後、PVDF 膜を室温で 2 時間一次抗体と反応させた (anti-GAPDH, 1:400; anti-CYP11A1, 1:400; anti-StAR, 1:200; anti-steroid sulfatase, 1:200 and anti-CYP11 β 1, 1:500)。その後、PBS で 15 分間の洗浄を 4 回繰り返し、続いて室温で 2 時間二次抗体と反応させた (goat anti-rabbit IgG, 1:2000)。再度、PBS で 15 分間の洗浄を 4 回繰り返した後、PVDF 膜を ECL™ Western blotting 検出試薬 (GE ヘルスケア、アメリカ合衆国) と室温で 1 分間反応させた。各タンパク質の発現レベルは、CS Analyzer (ATTO) を用いて測定した。

6) 統計処理

すべての結果は Mann-Whitney U 検定を用いて評価した。 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。結果は、4-6 回の独立した実験の平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm S.D.) で表した。

3. 結果

1) ラット唾液腺のステロイド合成に関する酵素活性

ラット唾液腺のステロイド合成を調べるために、ラット唾液腺の組織ホモジネート (舌下腺、顎下腺および耳下腺の混合物; salivary gland, SG) およびラット副腎のホモジネート (Adr) をポジティブコントロールとして、ステロイド合成に関連する酵素反応の活性を評価した。反応生成物を LC-MS/MS で分析した結果、プレグネノロンからprogesterone、progesteroneからdeoxycorticosterone、およびdeoxycorticosteroneからcorticosteroneの合成酵素の活性を示すピークが観察された (図 4)。これらの結果から、ラット唾液腺ホモジネートがプレグネノロンからcorticosteroneの合成に関連する酵素活性を有することが示唆された。

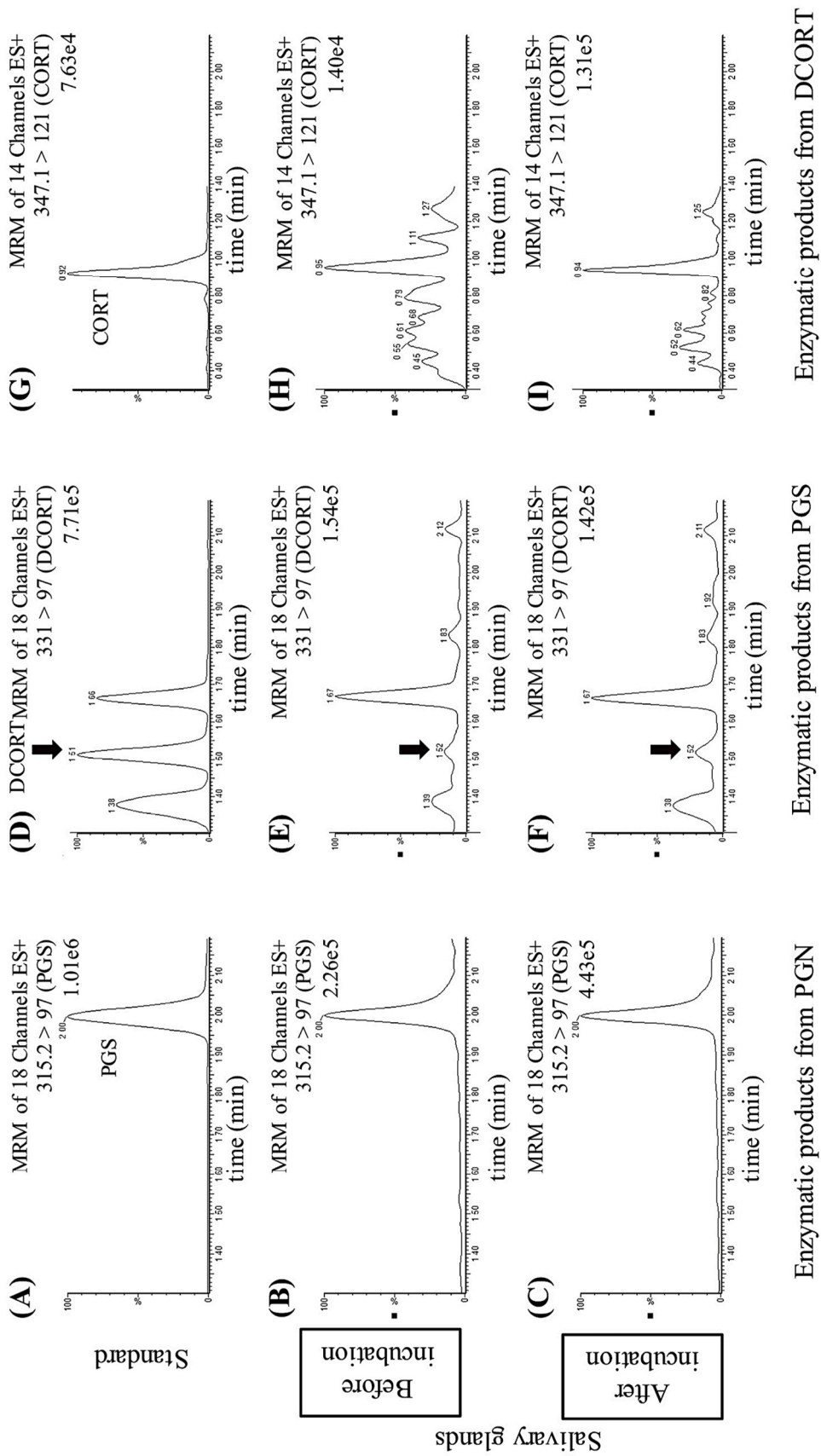


図4 酵素反応生成物の LC-MS 分析

(A)(D) および (G) は、それぞれプロゲステロン (PGS)、デオキシコルチコステロン (DCORT) およびコルチコステロン (CORT) の標準物質 (10 ng/mL) のクロマトグラム、(B)(E) および (H) は、それぞれプレグネノロン (PGN)、プロゲステロンおよびデオキシコルチコステロンをラット唾液腺ホモジネート由来の細胞質およびミトコンドリア分画を含む上清に添加した反応前のクロマトグラム、(C)(F) および (I) は、それぞれプレグネノロン、プロゲステロンおよびデオキシコルチコステロンを添加した反応後のクロマトグラムである。クロマトグラムの右上の数値は、それぞれプリカーサーイオン、プロダクトイオンおよび最も高いピーク (100%に設定) の大きさを表している。デオキシコルチコステロンクロマトグラムでは、黒い矢印がデオキシコルチコステロンを示す。

次に、酵素反応後の生成物の濃度を測定した(図5)。プレグネノロンおよびプロゲステロンを基質とした際に、ラット唾液腺ホモジネートで後続のステロイドホルモンの生成が観察されたが、その濃度は副腎と比較して低かった。興味深いことに、ラット唾液腺ホモジネートで生成されたコルチコステロン濃度は、唾液腺で合成された他のステロイド濃度と比較して高かった。これは、コルチコステロン合成経路がラット唾液腺で機能的であることを示す。副腎ホモジネートにおいて、コレステロールを基質にした反応でプレグネノロンが生成された。しかし、図5に示すように、プレグネノロンはラット唾液腺ホモジネートにおいて、コレステロールからは生成されなかった。

さらに、コルチコステロン合成経路だけでなく、ラット唾液腺におけるテストステロンの潜在的な合成能も明らかにするために、ラット唾液腺ホモジネートおよびポジティブコントロールとしてラット精巣ホモジネートでのアンドロステンジオンからテストステロンの合成も検討した。その結果、興味深いことに、ラット唾液腺で合成されたテストステロン濃度は、精巣と比べて有意に高かった(図6)。

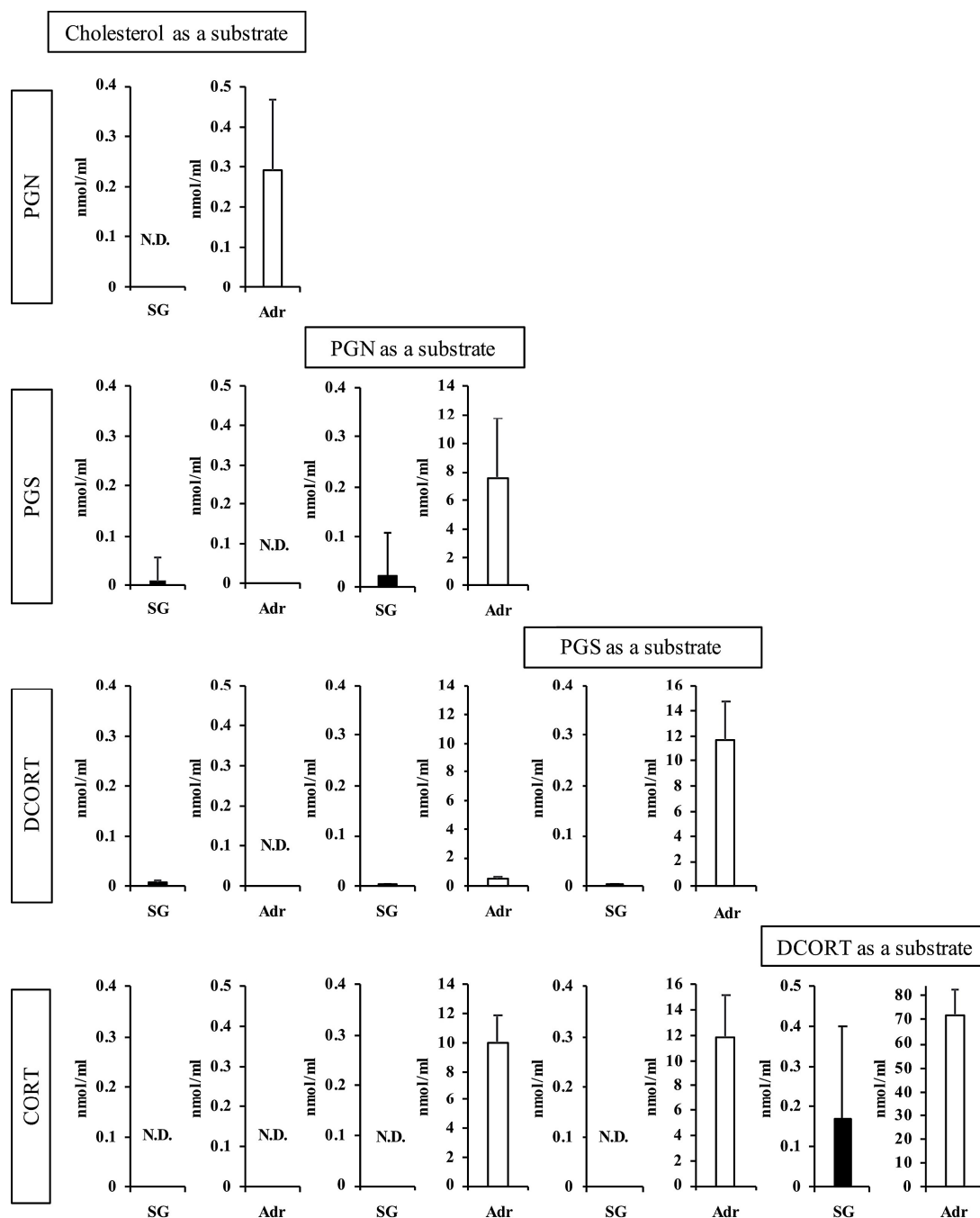


図5 ラット唾液腺 (SG) および副腎 (Adr) におけるステロイド合成酵素活性

ラット唾液腺 (closed bars) および副腎 (open bars) ホモジネート由来の細胞質およびミトコンドリア分画を含むそれぞれの上清において、2時間の酵素反応でコレステロール、プレグネノロン (PGN)、プロゲステロン (PGS)、デオキシコルチコステロン (DCORT) から生成されたプレグネノロン、プロゲステロン、デオキシコルチコステロンおよびコルチコステロン (CORT) の濃度を示した。 (mean \pm S.D. n = 6)

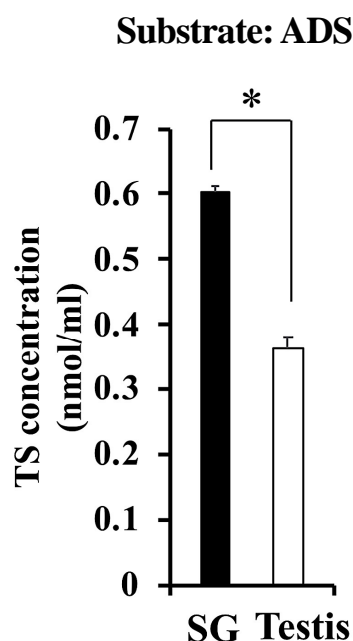


図6 ラット唾液腺（SG）および精巣におけるテストステロン（TS）合成酵素活性

ラット唾液腺（closed bars）および精巣（open bars）ホモジネート由来の細胞質およびミトコンドリア分画を含むそれぞれの上清において、2時間の酵素反応でアンドロステンジオン（ADS）から生成されたテストステロンの濃度を示した（mean \pm S.D. n = 6）。* $p < 0.05$ 。

2) ラット唾液腺におけるステロイド合成酵素の発現

酵素活性試験の結果、コレステロールからのプレグネノロン生成に関連する酵素活性を除いて、ステロイド産生に関連する酵素活性がラット唾液腺で観察された。プレグネノロン合成に関与する酵素がラット唾液腺で発現しているのかを、Western blotting 分析により調べた。ラット舌下腺と顎下腺の混合サンプル、ラット耳下腺、および陽性対照としてラット副腎のホモジネートを用いて、ミトコンドリア内へのコレステロール輸送を調節する輸送タンパク質である StAR、およびコレステロール側鎖を切断してプレグネノロンを生成する酵素である CYP11A1 の発現を調べた結果、ラット舌下腺と顎下腺の混合サンプルおよび耳下腺においてどちらのタンパクおよび酵素も検出されなかった（図 7A、B）。

これらの結果から、ラット唾液腺ではコルチコステロンとテストステロンがプレグネノロンから生成されるものの、コレステロールがステロイド合成の主要な基質として機能しないことが示唆された。

次に、デオキシコルチコステロンからコルチコステロンを合成する酵素である CYP11 β 1 の発現を調べた。ラット舌下腺と顎下腺の混合サンプルホモジネートおよび耳下腺ホモジネートでは、CYP11 β 1 発現が観察された(図 7C)。この結果は、ラット唾液腺ホモジネートにおけるコルチコステロン合成活性と一致した(図 5)。

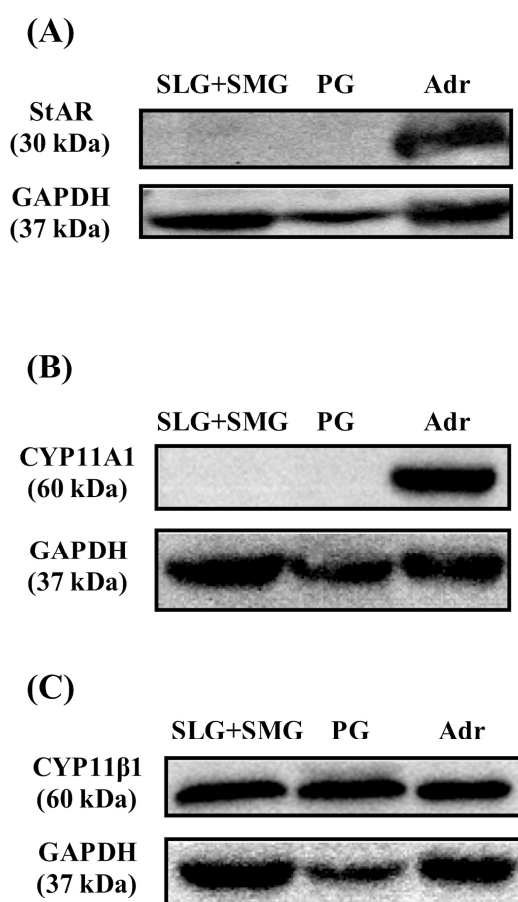


図 7 Western blotting によるステロイド合成酵素発現

ラット舌下腺および顎下腺 (SLG + SMG)、耳下腺 (PG)、および副腎 (Adr) ホモジネート由来の細胞質およびミトコンドリア分画を含むそれぞれの上清における (A) Steroidogenic acute regulatory (StAR) タンパク質、(B) CYP11A1 タンパク質、および (C) CYP11 β 1 タンパク質の発現。

3) ラット唾液腺における脱抱合に関する酵素の活性と発現

ラット唾液腺におけるプレグネノロン硫酸抱合体の脱抱合能を調べるために、ラット唾液腺ホモジネートを用いて脱抱合に関する酵素の活性と発現を検討した。ポジティブコントロールとして胎盤ホモジネートを用いた。酵素活性試験の結果、ラット唾液腺ホモジネートにおいて、プレグネノロン硫酸抱合体の脱抱合産物であるプレグネノロンが検出された(図 8A)。また、ラット舌下腺と顎下腺の混合サンプル、耳下腺、および胎盤のホモジネートを用いて、ステロイドホルモンの硫酸抱合体を脱抱合する酵素である steroid sulfatase (STS) の発現を Western blotting 分析を用いて検討した結果、STS は、ラット舌下腺と顎下腺の混合サンプルホモジネートおよび耳下腺ホモジネートにおいて、胎盤ホモジネートと同等レベルの発現が検出された(図 8B)。

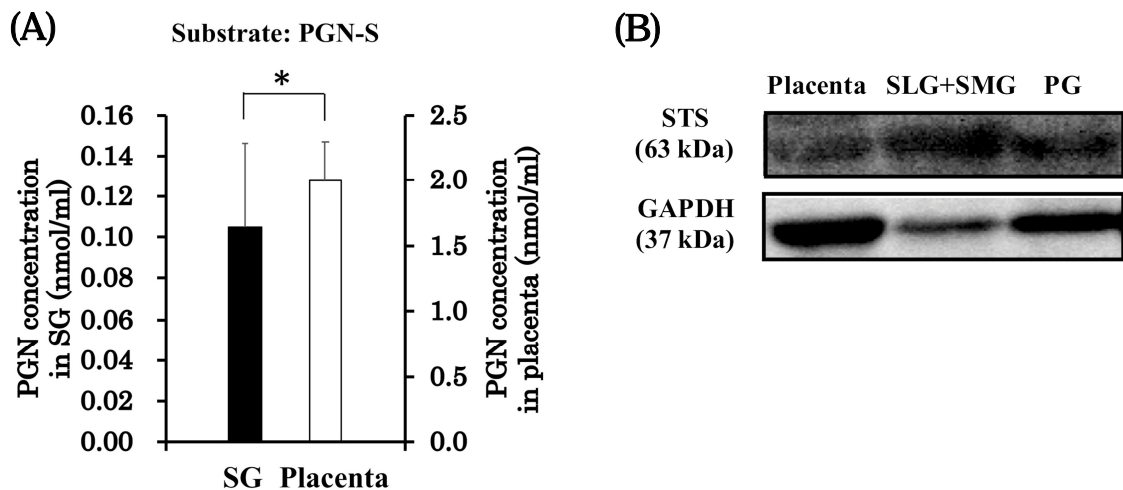


図 8 ラット唾液腺 (SG) および胎盤における脱抱合に関する酵素の活性と発現

(A) ラット唾液腺 (closed bars) および胎盤 (open bars) ホモジネート由来の細胞質およびミトコンドリア分画を含むそれぞれの上清における脱硫酸抱合に関連する酵素活性。プレグネノロン硫酸抱合体 (PGN-S) から生成されたプレグネノロン (PGN) の濃度を示した (mean \pm S.D. n = 4)。* $p < 0.05$ 。(B) ラット舌下腺および顎下腺 (SLG + SMG)、耳下腺 (PG) および胎盤における steroid sulfatase (STS) タンパク質の発現。

4. 考察

唾液は唾液腺によって産生され、口腔内に分泌される。唾液腺には舌下腺、顎下腺、および耳下腺の三大唾液腺があり、唾液の産生・分泌のほとんどはこの三大唾液腺で行われる。この章では、ラット唾液腺のホモジネートにおけるコルチコステロンおよびテストステロンの合成を媒介する酵素の活性と発現を検出した。これらの結果は、コルチコステロンとテストステロンがラット唾液腺で合成されることを示す。しかし、ラット唾液腺において StAR および CYP11A1 の発現を検出できなかったため、ラット唾液腺ではコレステロールをミトコンドリア内に輸送することが出来ず、またコレステロールからプレグネノロンを生成することが出来ないことが明らかになった。そこで、ラット唾液腺のステロイド合成の主要な基質を検討した。ラットの様々な臓器中の遊離型ステロイドおよび血漿タンパク結合型ステロイドをアセトニトリル抽出にて測定した報告では、非抱合型プレグネノロンは血中にはほぼ存在しないが(表1)、プレグネノロン硫酸抱合体が血中および肝臓に豊富に含まれていることが知られている(表2)[56]。このことから、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞株におけるステロイド局所合成と同様に(図9)[25]、肝臓由来のプレグネノロン硫酸抱合体が唾液腺においてステロイド合成の基質となる可能性が考えられた。脱抱合酵素の活性試験の結果、骨格筋と同様に、ラット唾液腺はプレグネノロン硫酸抱合体を脱抱合し、プレグネノロンへと変換することが可能であったことから、唾液腺においてプレグネノロン硫酸抱合体からコルチコステロンおよびテストステロンを合成する可能性が示唆された。

表 1 成体雄ラットの様々な臓器中のステロイドホルモンとその前駆体物質濃度

Steroids	Blood	Testis	Adrenal glands	Liver	Kidney	Brain			
						Cerebrum	Cerebellum	Hippocampus	Muscle
TS	5.4±1.3	175.8±41.8	0.105±0.004	—	8.5±1.5	9.1±2.6	9.4±2.5	1.17±0.21	3.14±0.90
ADS	0.57±0.16	45.6±8.8	0.15±0.02	—	6.1±2.7	—	—	0.052±0.015	0.88±0.09
HPGT	—	36.2±9.5	—	—	—	—	—	—	—
PGT	2.21±1.43	13.7±5.3	28.5±2.8 *a	—	10.1±0.4	15.67±5.40	4.4±0.36	0.083±0.043	0.45±0.15
PGN	—	25.4±2.5	4.99±0.86 *a	304.2±55.1	25.3±4.4	—	—	—	216.2±28.0
11-DCC	20.4±3.1	40.2±17.8	17.2±1.5 *a	—	30.4±1.6	11.2±5.9	18.8±1.0	0.368±0.07	14.4±3.4
CCS	140.3±38.1	137.7±24.1	38.2±1.1 *a	—	414.7±127.8	101.0±6.6	92.7±6.5	2.55±0.62	57.0±19.3

19

濃度は nmol/mL または nmol/g として示された (mean ± S.D. n = 3-5)

TS, テストステロン; ADS, アンドロステンジオン; HPGT, ヒドロキシプロゲステロン; PGT, プロゲステロン;

PGN, プレグネノロン; 11-DCC, デオキシコルチコステロン; CCS, コルチコステロン

*a は mmol/g、—は検出限界以下を表す。

表は Maeda et al. 2013. [56]から引用した。

表 2 成体雄ラットの様々な臓器中のステロイドホルモン硫酸抱合体の濃度

Sulfate conjugates	Blood	Testis	Adrenal glands	Liver	Kidney	Whole brain	Muscle
TS	0.068 ± 0.006	—	—	—	0.041 ± 0.018	0.015 ± 0.011	0.032 ± 0.002
ADS	—	—	—	—	—	—	—
17 α -HPGT	—	—	—	—	—	—	—
PGT	—	—	—	—	0.042 ± 0.006	0.013 ± 0.005	—
PGN	6.12 ± 0.42	—	—	17.95 ± 3.50	15.99 ± 5.98	10.91 ± 1.43	8.66 ± 0.73
11-DCC	—	—	—	—	—	0.012 ± 0.004	—
CCS	0.056 ± 0.002	—	—	—	0.067 ± 0.017	0.018 ± 0.008	0.036 ± 0.018

濃度は nmol/mL または nmol/g として示された (mean ± S.D. n = 3-5)

TS, テストステロン; ADS, アンドロステンジオン; 17 α -HPGT, ヒドロキシプロゲステロン; PGT, プロゲステロン; PGN,

プレグネノロン; 11-DCC, デオキシコルチコステロン; CCS, コルチコステロン

—は検出限界以下を表す。

表は Maeda et al. 2013. [56]から引用した。

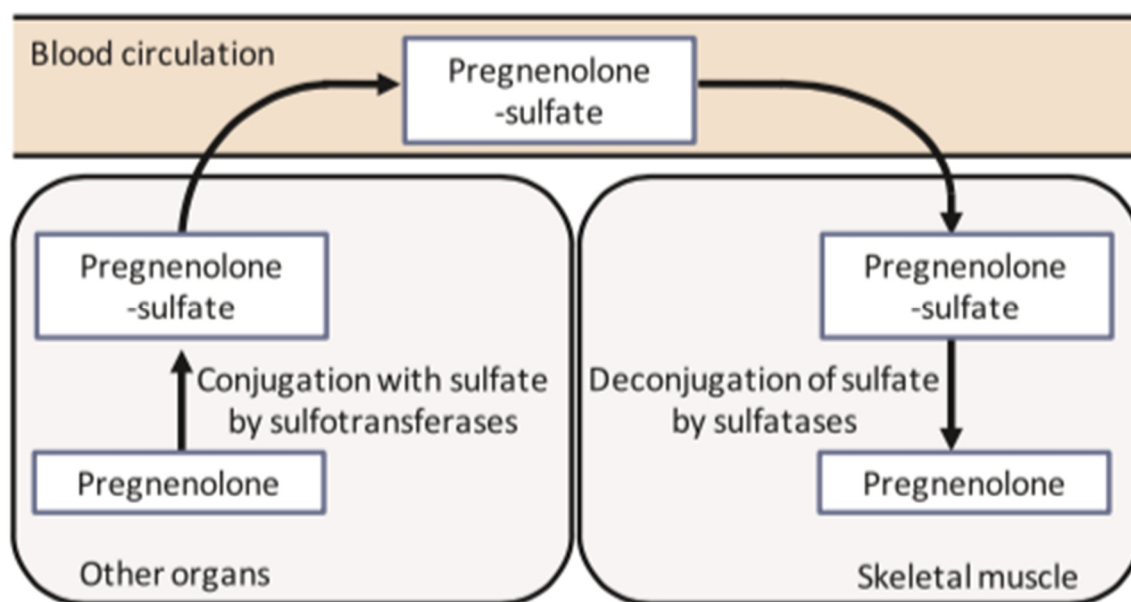


図9 骨格筋へのプレグネノロン供給の概略図

抱合反応を経たプレグネノロン硫酸抱合体が血液を介して全身循環し、その後、骨格筋に取り込まれる。取り込まれたプレグネノロン硫酸抱合体は、sulfatase による脱抱合によってプレグネノロンに変換され、骨格筋における局所ステロイド合成の基質として機能する。図は Fujiki et al. 2018. [25]から引用した。

唾液腺は、精巣とほぼ同等レベルのテストステロン産生酵素活性を有していた。このことから、かなりの量のテストステロンが唾液に分泌される可能性がある。唾液中に分泌された大量のテストステロンは、口腔組織の恒常性維持だけでなく、唾液とともに消化管に達し、腸管機能も調節する可能性が考えられる。また、唾液腺のコルチコステロン合成の酵素活性は副腎の活性と比較して約 0.23%であり、中間生成物のプロゲステロンおよびデオキシコルチコステロンの合成活性も低いことから、唾液腺で合成されるコルチコステロンは微量であると思われる。したがって、唾液中に分泌されるコルチコステロンも少ないと考えられる。唾液腺細胞および口腔組織は、ステロイドホルモン受容体を発現するため [12, 36, 118]、コルチコステロンおよびテストステロンはこれらの受容体を介してパラクリンあるいはオートクリン因子として作用する可能性がある。腸上皮細胞によって合

成されたグルコルチコイドは、マウスとヒトの両方で上皮細胞の増殖を促進し、炎症性腸疾患に関連する損傷を改善することが知られている[17, 70]。また、皮膚で合成されたグルコルチコイドは、急速な局所ストレス応答システムとして機能すると考えられている[98]。腸や皮膚のように、唾液腺由来ステロイドホルモンは唾液腺部位特異的細胞の活性に影響を及ぼし、唾液の成分変動を調節する可能性がある。免疫細胞、筋肉細胞、および脂肪細胞から分泌されるサイトカイン、マイオカイン、およびアディポカインは、パラクラインにより他臓器に影響を及ぼすことが、近年の研究で多くの注目を集めている[27, 28, 107]。また、これらの因子は、オートクラインによる分泌組織の代謝調節にも関与している[27, 107]。唾液腺も含めて、体全体の様々な組織で局所的に合成されたステロイドは、サイトカイン、マイオカイン、およびアディポカインと共に組織間の連絡物質として働くか[88]、または分泌組織内の代謝調節因子として機能すると考えられる[16]。

本章の結果より、コレステロールの代わりに肝臓由来のプレグネノロン硫酸抱合体を基質としてラット唾液腺でコルチコステロンおよびテストステロンが合成される可能性が示唆された（図 10）。これは、局所的なステロイド合成の基質としてプレグネノロン硫酸抱合体が他臓器から血流を介して唾液腺に運搬されることを示す。つまり、抱合体が化学物質の運搬に深く関与していることを示唆する。

唾液腺で局所的に合成されたステロイドが唾液腺における唾液や消化酵素の分泌にどのように作用するかは、大変興味深く今後の課題である。人間の唾液腺は、ラットの耳下腺、舌下腺、および顎下腺とほぼ同一構造で構成されている[2]。局所ステロイド合成は、ヒトの唾液腺でも行われていると推察される。また、本研究結果は、人だけではなく、動物のストレスや体の状態を調べる指標としても使用できる可能性がある。今後、唾液腺におけるステロイド合成とその役割に関する詳細な調査により、内分泌学においてさらなる新しい知見が得られると考える。

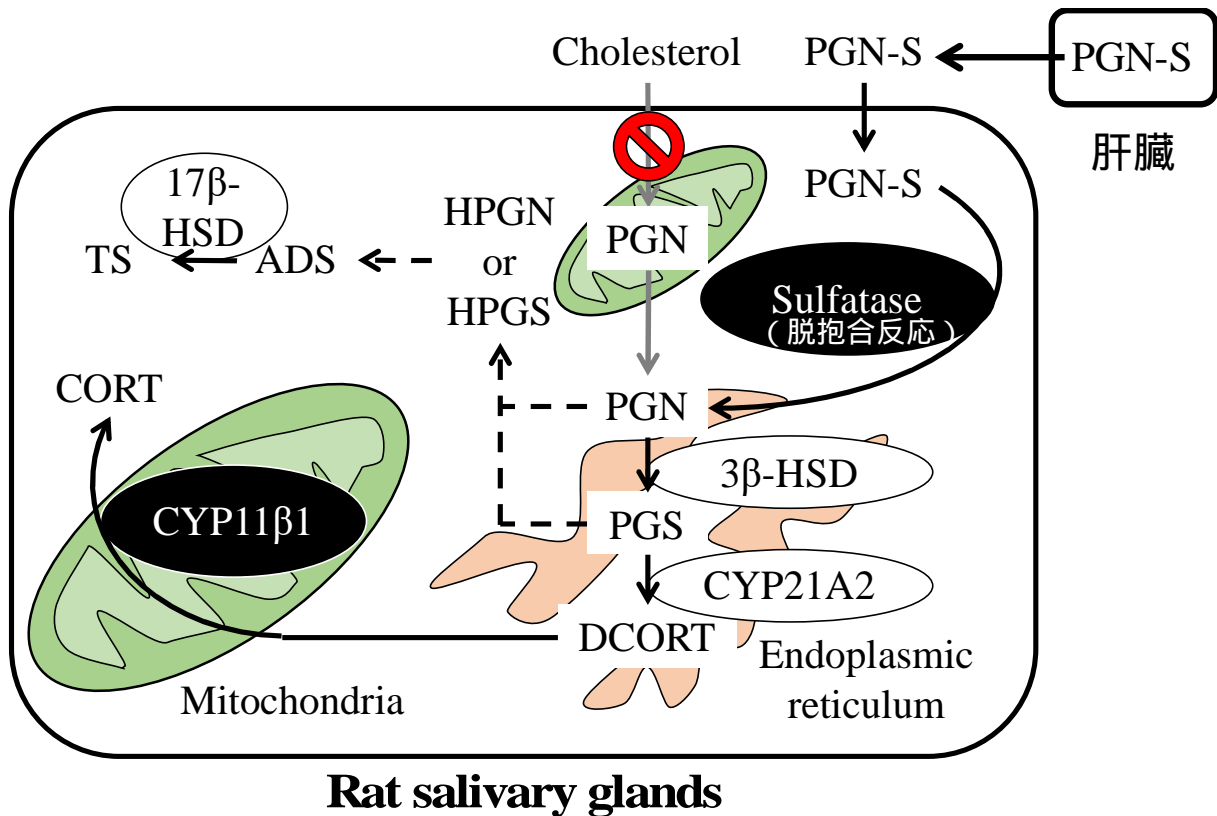


図 10 ラット唾液腺におけるステロイドホルモン合成経路の模式図

肝臓由来のプレグネノロン硫酸抱合体 (PGN-S) は、血液を介して唾液腺に輸送・取り込まれ、sulfatase によってプレグネノロン (PGN) に変換される。脱抱合されたプレグネノロンは、唾液腺局所におけるコルチコステロン (CORT) またはテストステロン (TS) 合成経路の前駆物質として機能すると考えられる。

5. 小括

第 4 章では、ラット唾液腺のホモジネートを用いたステロイド合成に関する酵素の活性と発現と調査することで、唾液腺における局所的なステロイド合成能を検討した。その結果、唾液腺はプレグネノロンからコルチコステロン、およびアンドロステンジオンからテストステロンを生合成する能力を有することが明らかとなった。また、唾液腺では脱硫酸抱合酵素の活性と発現が示された。以上のことから、唾液腺は一部のステロイドホルモン合成能を有し、その基質は血中を介して唾液腺へと輸送されるプレグネノロン硫酸抱合体

である可能性が示唆された。

第 章 カビ毒ゼアラレノンの腸管における代謝動態

1. 序文

ゼアラレノン (ZON) は、*Fusarium* 属真菌によって産生される非ステロイド性のエストロゲン様マイコトキシンである[11]。ZON は、17- β -エストラジオールと同様の作用を有することで、哺乳類において繁殖障害を引き起こすことが知られている[83]。ZON は世界中で、主にトウモロコシや小麦などの穀類で汚染が確認されている[3, 52]。ZON は熱安定性が高いため、加工過程の熱処理では分解されず、穀類を原材料とした食品での汚染が認められている[115]。ZON の汚染は、家畜の飼料でも確認されており、特に豚の ZON 感受性が高いことから、豚の飼料汚染が問題となっている[5]。

ZON は哺乳類において主に生殖器官に影響を及ぼし、子宮肥大、外陰腺炎、不妊症、流産などの生殖障害を引き起こす[121]。また、性成熟の遅延や着床の中断が、ZON 暴露されたげっ歯類において認められている[49, 119]。ZON は経口暴露された後に、胃や腸管で急速に吸収される。ZON の腸管からの取り込み率は約 80 ~ 85%と推測されており、ZON とその代謝物は血液中から検出されている[73]。ZON とその主な代謝物を図 11A に示す[67]。

ZON は、ステロイドと同様に HSD を介した酵素反応によって還元され、7 位の炭素が還元された α -および β -ゼアラレノール (ZOL) に代謝される (ZON の分子構造と炭素の位置番号を図 11B に示す)。 α -および β -ZOL は、さらに二重結合の還元により α -および β -ゼアララノール (ZAL) に代謝される。また、ZON は二重結合の還元により、可逆的にゼアララノン (ZAN) に変換される[67, 74]。これらの ZON 還元物質は反応性があり、そのほとんどは親化合物である ZON よりも強力なエストロゲン活性を有する (エストロゲン活性の相対的な強さ: α -ZAL > α -ZOL > β -ZAL > ZON > β -ZOL) [41, 67]。ZON およびその代謝物は、それぞれ UDP-glucuronosyltransferase (UGT) によってグルクロン酸抱合を受けることが知られており、UGT2B7 に対して高い活性があることが報告されている

[81]。一般に、UGT2B ファミリーはステロイドホルモンをグルクロン酸抱合する酵素として知られている[109]。各グルクロン酸抱合体は、エストロゲン活性が低く、尿または糞中に排泄される[24, 57, 67]。経口暴露された ZON は、生殖器官などの標的臓器に到達する前に腸管や肝臓を通過しなければならない。腸管は経口的に暴露した外因性化学物質に対する最初の障壁として機能する。したがって、ZON 標的組織への影響を解明するためには、消化管から吸収される際の ZON の代謝と分布を明らかにすることが不可欠である。

Binder らは、腸管での吸収中に、腸壁で ZON に生体内変化が起こることを示唆した[5]。しかし、腸壁内での吸収中における ZON 代謝動態に関する詳細は不明なままである。本章ではラット反転腸管モデルを用いて、経口的に暴露された物質に対する最初のバリアとなる腸管におけるステロイド様物質 ZON の代謝と分布を検討した[35]。

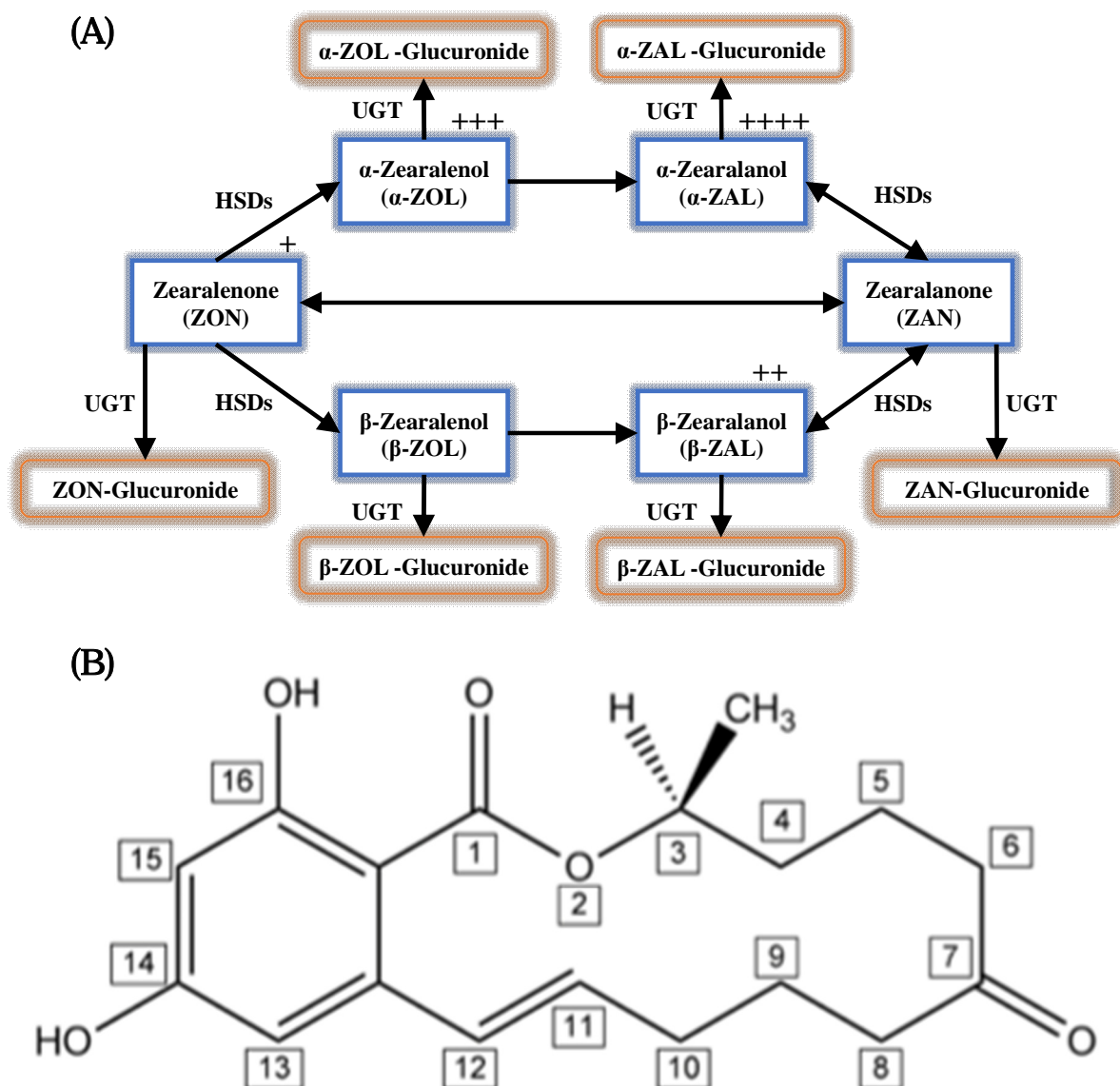


図 11 ゼアラレノン (ZON) の代謝経路の概略図と構造

(A) 哺乳類の生体内における ZON 代謝には、hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) による還元と、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) によるグルクロン酸抱合が関与する。+は各物質の相対的なエストロゲン活性の強さを示す； α -ゼアララノール (α -ZAL) > α -ゼアラレノール (α -ZOL) > β -ゼアララノール (β -ZAL) > ZON > β -ゼアラレノール (β -ZOL)。 (B) ZON の分子構造と炭素の位置番号を示した。図は Mukherjee et al. 2014. [67]を改変して引用した。

2. 材料と方法

1) 試薬

ZON はフナコシ（東京） HPLC 用特級メタノールは和光純薬工業、 β -glucuronidase は Sigma-Aldrich から購入した。ZON グルクロン酸抱合体 (ZON-GA) および ZOL グルクロン酸抱合体 (ZOL-GA) は、肝臓に ZON を灌流した胆汁から精製し、 β -glucuronidase 処理サンプルと未処理サンプルの HPLC 分析により定量し、標準物質として用いた。

2) 供試動物

雄 (330-400 g) 雌 (240-280 g) および妊娠雌 (270-340 g, GD 12-13) の SD ラット (8-10 週齢) を日本エスエルシーから購入した。ラットは自由採食・自由飲水できる環境下で 1 週間馴化した後実験に供した。合計 18 匹のラットを使用した (雄 6 匹、雌 6 匹、妊娠雄 6 匹)。本実験は酪農学園大学動物実験倫理委員会により承認されている (承認番号: VH18A15)。すべての手術は麻酔下で行われ、動物の苦痛を最小限に抑えるように原則に従い実験を行った。

3) 反転腸管試験

培養液は、Krebs Ringer's bicarbonate buffer (NaCl, 110 mM; KCl, 5 mM; MgCl₂, 1.2 mM; CaCl₂, 2.5 mM; NaHCO₃, 25 mM and glucose, 10 mM) を使用した。培養液を 95% O₂ / 5% CO₂ で通気して、pH を 7.4 に調整し、37°C に加温した。麻酔下での放血による安楽殺後、ラットから空腸、回腸、および結腸を採集した。採集された空回腸を洗浄し、等しい長さの 3 つの部位に切除し分けた。各部位の遠位部分を切り取り、腸管の長さがそれぞれ 10 cm になるようにトリミングし、近位から順にセグメント I、II、および III とした。同じ方法で、結腸 (セグメント IV) を切除し、洗浄し、遠位端から 10 cm のセグメント長にトリミングした (図 12A) [39]。

切り取った 4 つの腸管セグメントを反転させ、ポリエチレンチューブに取り付け、粘膜

側培養液 (25 ml) に浸した。チューブポンプ MP-32N (EYELA、東京) を用いて、ポリエチレンチューブを介して、漿膜側培養液 (25 ml) を反転腸管にポンプで送液した (図 12B)。ZON を $10\ \mu\text{M}$ の濃度で粘膜緩衝液に添加し (総量として 250 nmol の ZON を粘膜側に負荷) 培養後 0、20、40、および 60 分で漿膜側および粘膜側の培養液を回収し、含有する ZON とその代謝物を LC-MS/MS を用いて分析した。

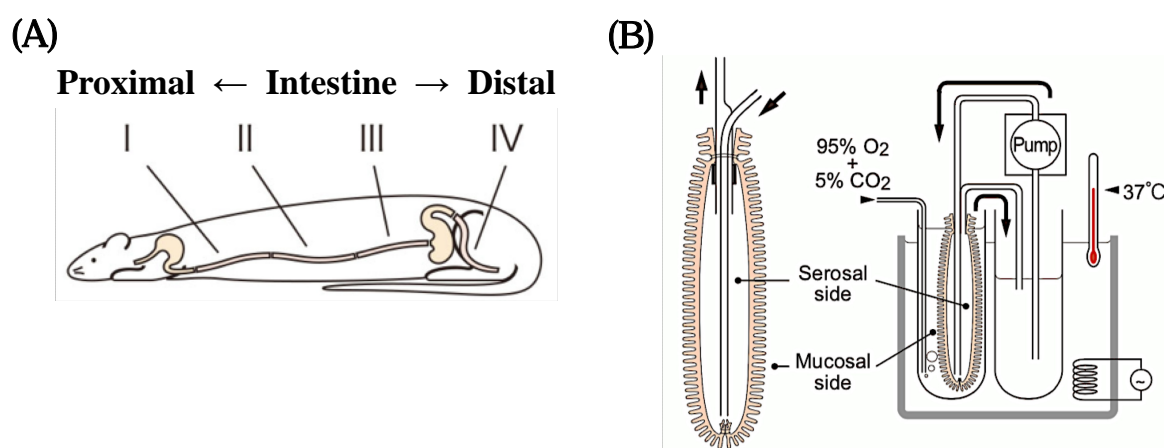


図 12 反転腸管モデル模式図

(A) 十二指腸を除く小腸を 3 つの等しい長さに分割し、遠位部分を切除し、長さを 10 cm に調整した。近位から順番にセグメント I、II、および III とした。同様に、結腸を切除し、10 cm に調整し、セグメント IV とした。(B) 反転した腸管をポリエチレンチューブに取り付けた。ポンプを使用して、漿膜側培養液を 5 ml / min で循環させた。ZON ($10\ \mu\text{M}$) を粘膜側培養液に添加した。水温は 37°C に維持され、腸管組織は常に $95\%\text{O}_2 / 5\%\text{CO}_2$ で通気した。

4) LC-MS/MS による ZON およびその代謝物の分析

粘膜側および漿膜側の培養液サンプルを HLC-DISK3 (関東化学、東京) を用いてろ過し、分析まで -80°C で凍結保存した。エレクトロスプレーイオン化源を備え、ネガティブモードで動作する LC-MS / MS システム (島津、京都) を用いて、サンプルを分析した。移動相 A および B は、それぞれ 10 mM 酢酸アンモニウムと 100% メタノールを含むメタ

ノール/水/酢酸(5 : 95 : 0.05) で構成された。グラジエント条件は以下のように実施した : 0 ~ 8 分 (0 ~ 100%B) , 8 ~ 10 分 (100%B) 。 サンプルを Triart C18 逆相カラム (2.1 × 150 mm、YMC Co.、東京) で分離し、多重反応モニタリングモードを使用して検出した。ブリカーサーイオンとプロダクトイオンは表 3 に示した。13C-ZON (関東化学、東京) は、ZON とその代謝物を定量するための内部標準として用いた。

表3 最適化された多重反応モニタリングのパラメーター

Analyte		m/z	RT (min)	CE (V)
Zearalenone	ZON	317 > 273	7.58	21
Zearalanone	ZAN	319 > 205	7.52	23
α -Zearalenol	α -ZOL	319 > 160	7.50	32
β -Zearalenol	β -ZOL	319 > 160	7.30	32
α -Zearalanol	α -ZAL	321 > 277	7.41	24
β -Zearalanol	β -ZAL	321 > 277	7.24	24
Zearalenone glucuronide	ZON-GA	493 > 175	6.57	19
α -Zearalenol glucuronide	α -ZOL-GA	495 > 319	6.62	29
β -Zearalenol glucuronide	β -ZOL-GA	495 > 319	6.32	29
Zearalenone diglucuronide	ZON-GA/GA	669 > 493	5.75	23

5) 統計処理

すべての結果は多群比較のために ANOVA 後の Tukey-Kramer 法を用いて評価した。 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。結果は、4-6 回の独立した実験の平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm S.D.) で表した。

3. 結果

1) ZON の吸収と輸送の検討

ZON (10 μ M) を反転腸管の粘膜側に添加すると、粘膜側培養液中の ZON 濃度は培養時間にわたって減少した。粘膜側培養液からの ZON 消失量は、すべてのセグメントにおいて約 100 ~ 200 nmol/h であった (図 13A)。雄ラットでは、小腸の遠位部分 (セグメント III) で ZON 消失量が小腸の近位および中間部分 (セグメント I および II) に比べて有意に減少した。また、妊娠雌ラットでは、小腸の遠位部分 (セグメント III) で ZON 消失量が結腸に比べて有意に減少した。一方、雌ラットにおいては腸管のどの部分でも ZON 消失量は同程度であった。

反転腸管の漿膜側培養液から ZON が検出された。粘膜側から漿膜側への ZON の輸送量は、雄、雌、および妊娠雌ラットの全てにおいて、結腸 (セグメント IV) で他の部位に比べて有意に増加した。また、雌ラットでは小腸の遠位部分で漿膜側への ZON 輸送量が小腸の近位および中間部に比べて有意に増加した (図 13B)。このことから、性別や妊娠の有無に関わらず、ZON の漿膜側輸送は遠位腸管で増加することが明らかになった。しかし、粘膜側から漿膜側への輸送が最も多く観察された結腸でさえ、その量は非常に少なく、培養 60 分間で約 2 nmol であった (図 13B, C)。

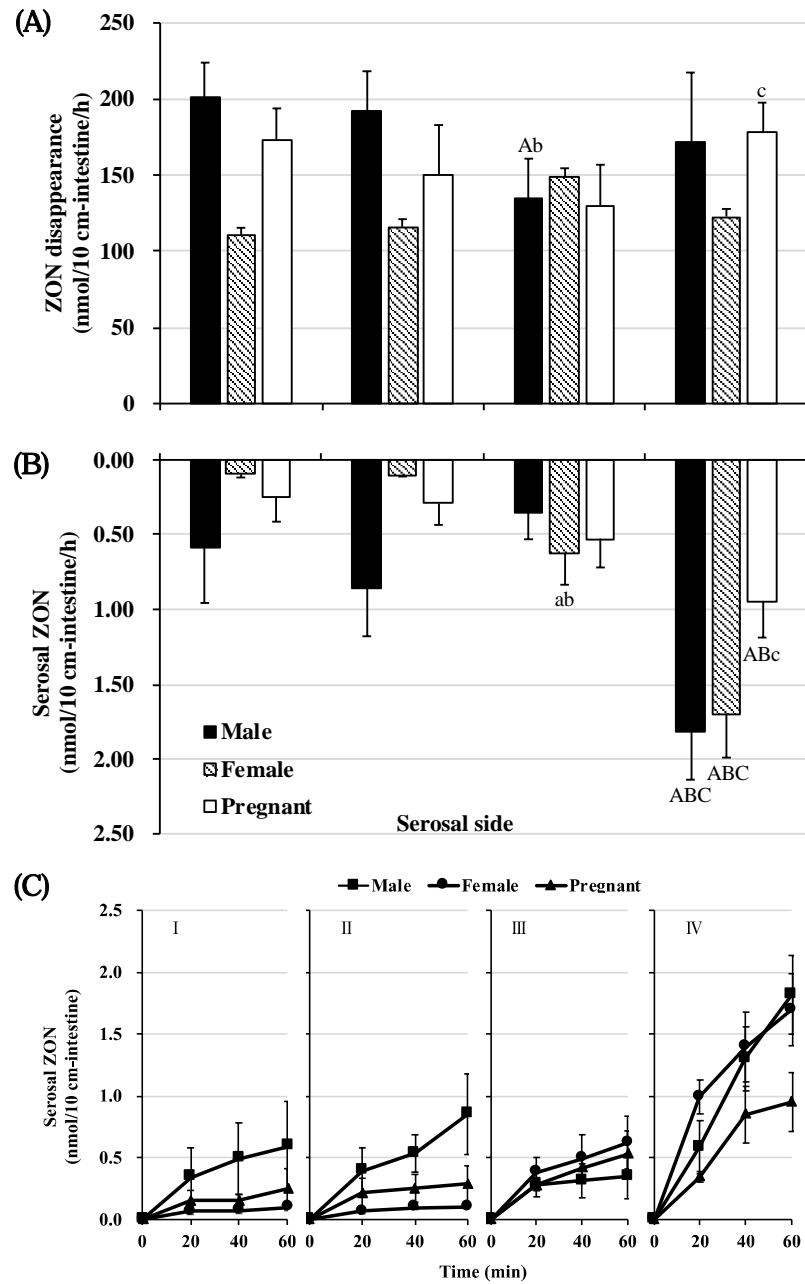


図 13 ラット反転腸管におけるゼアラレノン (ZON) の吸収と分布

(A) 培養 60 分間で粘膜側から消失した ZON の量を示した。ZON 消失量は、60 分間の培養後の粘膜培養液中の ZON 最終量を差し引くことで決定した。(B) 培養 60 分間で粘膜側から漿膜側へ輸送された ZON の量を示した。I、II、および III は、トライツ靱帯から遠位にある腸管の部位を示し、IV は結腸を示す。(C) 漿膜側への ZON 輸送の時間推移を示した。a, vs ; b, vs □; c, vs □; 小文字は $p < 0.05$ 、大文字は $p < 0.01$ を示す。(mean \pm S.D. n = 4-6)

2) ZON 代謝物の吸収と分布

粘膜側培養液から約 100 ~ 200 nmol / h の ZON が吸収されているにもかかわらず、各腸管セグメントいずれも粘膜側から漿膜側への ZON 輸送量が 2 nmol 未満であったことから、次に ZON 代謝物の排泄と輸送を調べた。

培養 60 分後、粘膜および漿膜側培養液から α -ZOL、ZON-GA、および α -ZOL-GA が検出、定量された。また ZAN、 β -ZOL、 β -ZOL-GA、および ZON ジグルクロン酸抱合体(ZON-GA/GA ; ZON にグルクロン酸が 2 つ抱合されたもの) も検出されたが、その量は非常に微量であった (data not shown)。

粘膜側への α -ZOL の排泄が各腸管セグメントで観察された。 α -ZOL の粘膜側排泄量は、雄ラットの近位小腸 (セグメント I) および雄ラットの近位小腸 (セグメント I) と結腸 (セグメント) で中間部小腸 (セグメント) に比べて有意に増加した。また、妊娠雌ラットの結腸 (セグメント IV) で近位小腸および中間部小腸に比べて増加した。しかし、その量は非常に少なく、最大でも約 0.3 nmol であった (図 14A, B)。漿膜側への α -ZOL 輸送量は、全てのラット群において近位腸管に比べて遠位腸管で有意に増加した。 α -ZOL 漿膜側輸送量は、粘膜側へ排泄される量よりもさらに少なく、最大であった妊娠雌ラットの結腸で約 0.05 nmol であった。粘膜側への α -ZOL 排泄量は、漿膜側への最大の輸送量を示した結腸で約 6 倍、小腸においては約 10 倍以上の違いが見られた (図 14A, C)。

吸収された ZON は、そのままの形ではほとんど漿膜側には輸送されず、また還元された α -ZOL としてもほとんど粘膜側排泄または漿膜側輸送されなかった。そこで次に、ZON が腸管細胞内で抱合されている可能性を検討した。その結果、すべての腸管セグメントにおいて、ZON および α -ZOL がグルクロン酸抱合された ZON-GA および α -ZOL-GA が検出された。ZON-GA の粘膜側への排泄量は、雌ラットにおいて結腸で小腸に比べて有意に減少し、遠位小腸で中間部小腸に比べて有意に減少した。また、妊娠雌ラットにおいて結腸および遠位小腸で近位および中間部小腸に比べて有意に減少した。ZON-GA の粘膜側排泄量は、妊娠雌ラットの近位小腸で最大の 85.39 nmol、雌ラットの結腸で最小の 22.55

nmol であった (図 15A, B)。また、ZON-GA の漿膜側への輸送量は、全てのラット群において結腸で小腸に比べて有意に増加し、さらに雌および妊娠雌ラットにおいて遠位小腸で近位および中間部小腸に比べて有意に増加した。ZON-GA の漿膜側輸送量は、雌ラットの結腸で最大の 49.94 nmol、雌ラットの近位小腸で最小の 1.64 nmol であった (図 15A, C)。粘膜側への α -ZOL-GA の排泄量は、雄ラットにおいて結腸で近位および遠位小腸に比べて有意に減少し、雌ラットにおいて結腸で全ての小腸部位に比べて有意に減少し、妊娠雌ラットにおいて結腸で近位および中間部小腸に比べて有意に減少した。 α -ZOL-GA 粘膜排泄量の最大は、妊娠雌ラットの近位小腸で 60.02 nmol であり、最小は雌ラットの結腸で 20.09 nmol であった (図 16A, B)。また、漿膜側への α -ZOL-GA の輸送量は、全てのラット群において結腸で全ての小腸部位に比べて有意に増加し、また遠位小腸で近位および中間部小腸に比べて有意に増加した。 α -ZOL-GA 漿膜側輸送量の最大は、妊娠雌ラットの結腸で 36.15 nmol であり、最小は雌ラットの近位小腸で 2.84 nmol であった (図 16A, C)。

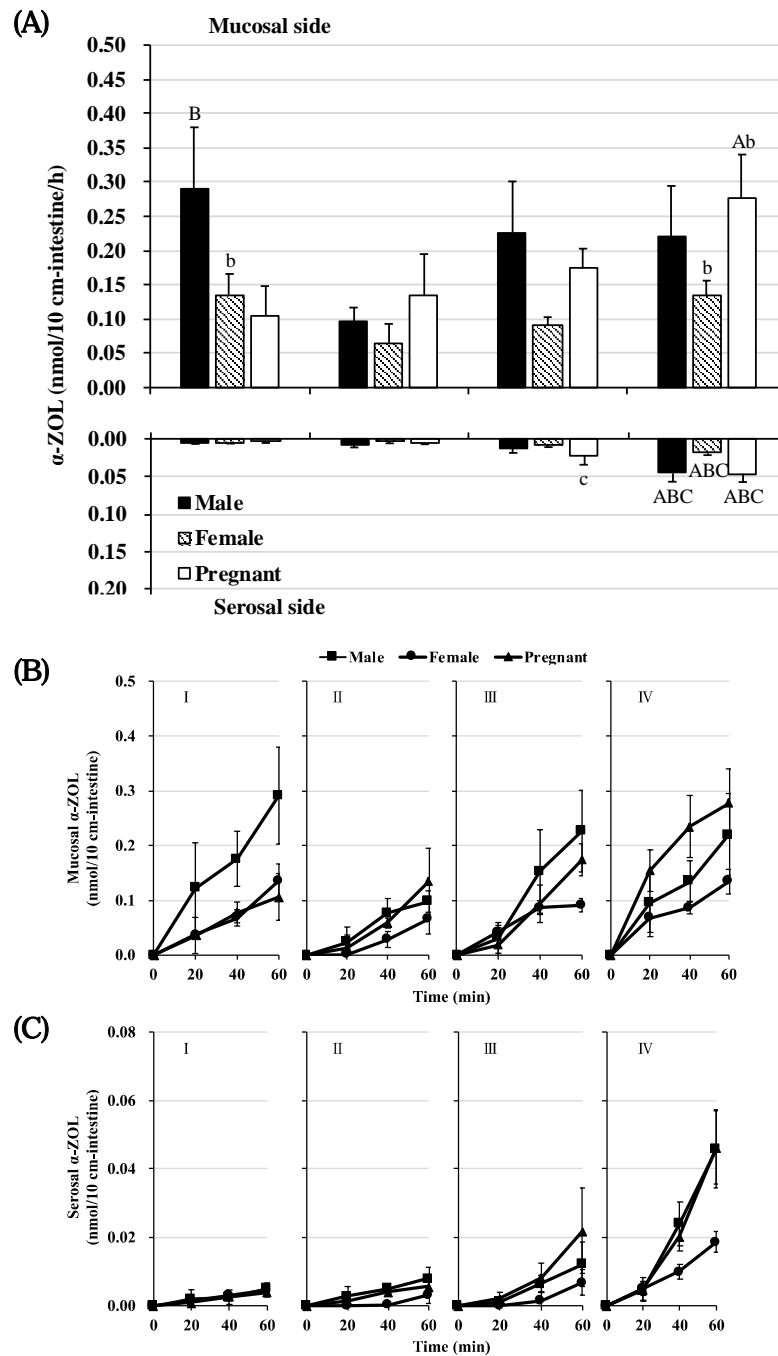


図 14 α -ゼアラレノール (α -ZOL) の粘膜側排泄と漿膜輸送側

(A) 培養 60 分間で粘膜側に排出される α -ZOL の量 (上のグラフ) および漿膜側に輸送される α -ZOL の量 (下のグラフ) を示した。(B) 粘膜側への α -ZOL 排泄量、(C) 漿膜側への α -ZOL 輸送量の時間推移を示した。I、II、および III は、トライツ靱帯から遠位にある腸管の部位を示し、IV は結腸を示す。a, vs ; b, vs ; c, vs ; 小文字は $p < 0.05$ 、大文字は $p < 0.01$ を示す。(mean \pm S.D. n = 4-6)

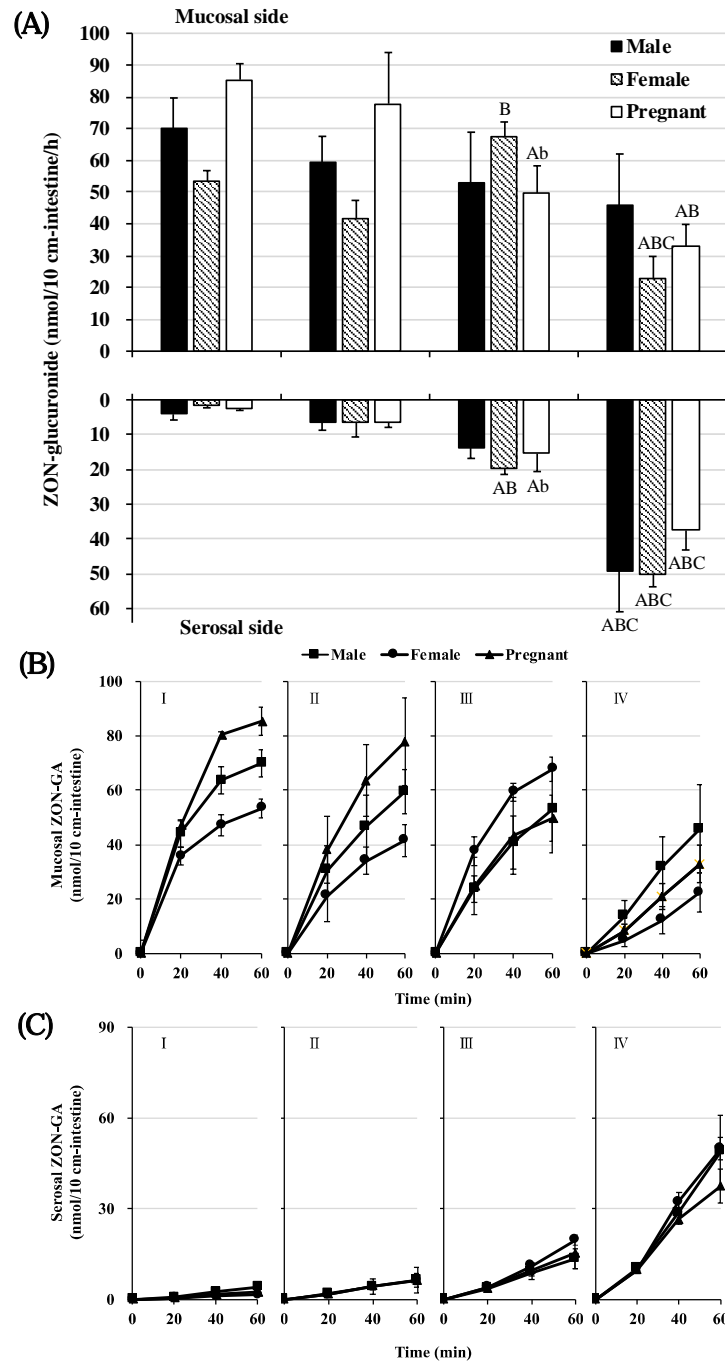


図 15 ゼアラレノングルクロン酸抱合体 (ZON-GA) の粘膜側排泄と漿膜輸送側

(A) 培養 60 分間で粘膜側に排出される ZON-GA の量 (上のグラフ) および漿膜側に輸送される ZON-GA の量 (下のグラフ) を示した。(B) 粘膜側への ZON-GA 排泄量、(C) 漿膜側への ZON-GA 輸送量の時間推移を示した。I、II、および III は、トライツ靱帯から遠位にある腸管の部位を示し、IV は結腸を示す。a, vs ; b, vs ; c, vs ; 小文字は $p < 0.05$ 、大文字は $p < 0.01$ を示す。(mean \pm S.D. n = 4-6)

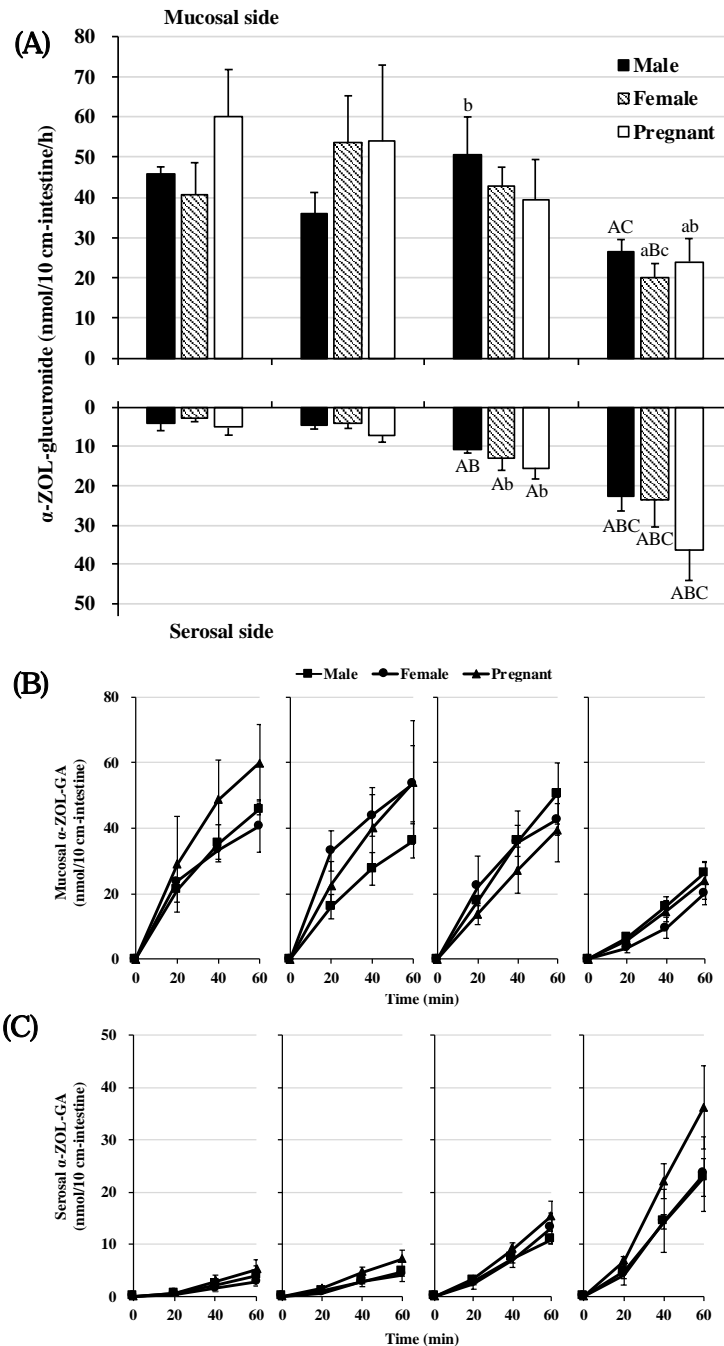


図 16 α-ゼアラレノールグルクロン酸抱合体(α-ZOL-GA)の粘膜側排泄と漿膜輸送側

(A) 培養 60 分間で粘膜側に排出される α-ZOL-GA の量 (上のグラフ) および漿膜側に輸送される α-ZOL-GA の量 (下のグラフ) を示した。(B) 粘膜側への α-ZOL-GA 排泄量、(C) 漿膜側への α-ZOL-GA 輸送量の時間推移を示した。I、II、および III は、トイツ靱帯から遠位にある腸管の部位を示し、IV は結腸を示す。a, vs ; b, vs ; c, vs ; 小文字は $p < 0.05$ 、大文字は $p < 0.01$ を示す。(mean ± S.D. n = 4-6)

3) 培養 60 分での腸管における ZON の代謝動態

反転腸管に ZON (10 μ M) を添加して 60 分間の培養後の代謝物の排泄と輸送の合計量を調べた (図 17)。雄ラットの小腸セグメント I、II および妊娠雌ラットの結腸セグメント IV を除いて、すべての腸管セグメントで吸収された ZON の 80%以上が回収された (図 17)。吸収された ZON は、いずれの腸管セグメントにおいても ZON のまま漿膜側ではほとんど検出されていないことから、吸収された ZON は ZON-GA、および α -ZOL を経由して α -ZOL-GA に急速に代謝されたと言える。さらに、各グルクロン酸抱合体は主に小腸の粘膜側に排出されたが、遠位腸管である結腸では、各グルクロン酸抱合体の約半分が漿膜側に輸送された (図 15, 16)。

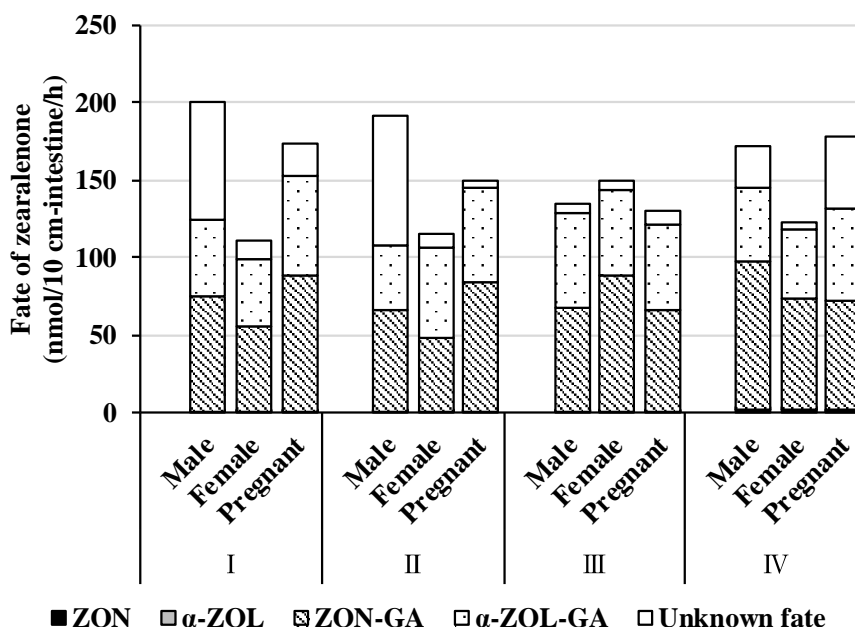


図 17 ラット反転腸管におけるゼアラレノンの代謝挙動

各腸管セグメントにおいてゼアラレノン (ZON) 漿膜側輸送量、 α -ゼアラレノール (α -ZOL)、ZON グルクロン酸抱合体 (ZON-GA)、 α -ZOL グルクロン酸抱合体 (α -ZOL-GA) の粘膜側排泄量と漿膜側輸送量の合計を示した。培養 60 分後の各腸管セグメントの粘膜側 ZON 消失量は、各代謝物質のフラクションの合計として表される。Unknown fate は未回収の ZON を表す。I、II、および III は、トライツ靱帯から遠位にある腸管の部位を示し、IV は結腸を示す。

4. 考察

経口暴露された ZON は、生殖器系などの標的器官に到達する前に腸を通過しなければならない。ZON が標的器官に与える悪影響の原因メカニズムを解明するには、腸管内での ZON の代謝動態を明らかにすることが不可欠である。しかし、標的臓器への輸送中の ZON の挙動に関する詳細は未だ不明なままである。そこで、本章ではラット反転腸管モデルを用いて、腸管内における ZON の代謝動態を解明した。

反転腸管試験の結果、粘膜側から吸収された ZON の大半は、腸上皮細胞で還元またはグルクロン酸抱合されることが示された。反転腸管の粘膜側および漿膜側から一部の α -ZOL が検出されたが、ZAN および α - β -ZAL は検出されなかった。このことから、ZON はラットの腸管で容易に α -ZOL に変換されると推測できる。消化管における ZON の ZOL への代謝は、動物種による違いが報告されている[18]。特に、ブタなどの単胃動物とウシなどの複胃動物とでは顕著に異なる。これは ZON 代謝にルーメン内の微生物が関与しているためである。単胃は遠位腸管（盲腸や結腸）と比較して比較的微生物密度が低い、対照的に複胃は微生物密度が高いため、牛などの複胃動物では、ルーメン微生物の影響が大きいと推察されている[18]。以上のことから、本研究の結果を様々な家畜に反映するためには、胃内細菌の影響を考慮する必要がある、今後の課題である。ZON は HSD によって還元され、ZOL に変換されることが知られている[59]。3 α -HSD は、小腸および結腸においても mRNA の高発現が確認されていることから[53]、腸管における ZON 還元反応に 3 α -HSD が関与していると思われる。また、 α -ZOL の粘膜側排泄量は各腸管セグメントで低かったが、漿膜側輸送量はさらに低かった。このことから、各腸管セグメントが α -ZOL を漿膜側にほとんど通過させないと思われる。さらに、ZON は主に CYP1A2 や CYP3A サブファミリー酵素によって水酸化を受け、OH-ZON に変換されることも報告されている[9, 82]。CYP3A サブファミリーは、腸管における主要な薬物代謝酵素であり、ラットの腸管にも発現していることが報告されている[29, 48, 64]。しかし、本結果では、OH-ZON は検出されなかった。このことから、ラット腸管においては、ZON は CYP による水酸化

反応よりも HSD による還元反応を受け α -ZOL に変換されやすいことが示唆された。OH-ZON は親化合物である ZON やその還元物質である ZOL や ZAL に比べて、エストロゲン活性が低いことが知られている[9]。そのため、OH-ZON より α -ZOL に代謝されやすいという点は、ZON 代謝物による標的器官への内分泌かく乱作用の影響が高い可能性が示唆された。

興味深いことに、粘膜側培養液および漿膜側培養液から検出された α -ZOL は 0.4 nmol 未満と微量であったが、一方で大部分の α -ZOL-GA が検出された。このことから、腸管において α -ZOL は直ちにグルクロン酸抱合されることが示唆された。すなわち、グルクロン酸抱合を介して不活性化することにより、腸は ZON の吸収に対する障壁として機能していると言える。ZON のグルクロン酸抱合はすべての腸管セグメントで顕著に見られたため（図 17）、腸管では UGT の発現と活性が高く、吸収の際に大部分の ZON と α -ZOL が迅速にグルクロン酸抱合を受ける可能性が高いと考えられる。これは、腸管が ZON の暴露に対する障壁として機能していることを示唆する。UGT1A1、1A7、1A8、および 2A3 は、げっ歯類の腸管、特に近位小腸で高発現している[8, 76]。ヒトの肝臓および腸管のミクロソームを用いた研究では、UGT1A1、1A3、1A8、および 2B7 が ZON に対して高い活性を示した[81]。Ugt2b mRNA はラット肝臓の総 Ugt mRNA の約 80%を占めすが、Ugt1a mRNA はラット小腸の総 Ugt mRNA のほぼ 90%を占める[51]。したがって、UGT1A1 および 1A8 は、腸管での ZON グルクロン酸抱合に関与する最も有望な候補であると推測できる。

本実験で小腸に吸収された ZON の 55.48%以上はグルクロン酸抱合を受け、その 70.40%以上は粘膜側に排泄された。これは ZON と同様に、エストロゲン作用を有することが知られている内分泌かく乱化学物質の一つであるビスフェノール A に対する小腸防御機構と一致する[37, 40]。これらを総合すると、腸管粘膜はエストロゲン活性異物の漿膜側への吸収を選択的に抑制するだけでなく、グルクロン酸抱合を介して異物を不活性化することを示唆する。他方、多剤耐性関連タンパク質（multidrug resistance associated

proteins, MRP) は、エストロゲンやグルクロン酸抱合体を含む広範な両親媒性化合物の膜貫通排泄を媒介することが知られている[75, 116]。腸上皮細胞の頂端膜側に局在する MRP2 はラットの近位小腸に分布し、基底膜側に局在する MRP3 は結腸などの遠位腸管に分布する[46, 65, 92]。興味深いことに、本実験の結果で見られた、ZON-GA と α -ZOL-GA の頂側膜方向である粘膜側排泄と基底膜方向である漿膜側輸送の傾向は、ラット腸管における MRP2 と MRP3 のそれぞれの局在および分布パターンと一致していた。以上のことから、ZON-GA と α -ZOL-GA はそれぞれ MRP2 と MRP3 によって粘膜側排泄あるいは漿膜側輸送されると推測される (図 18)。

腸管全体が生体異物に対する障壁として機能することが示されたが、一方で毒性作用を防御できない危険性もある。本実験の結果より、ZON とその代謝物は漿膜側にも輸送された。各腸管セグメントで観察された ZON 漿膜側輸送量は 2 nmol 未満と非常に少なかった。本実験では高濃度の ZON を用いて行われたため、この程度の ZON 漿膜側輸送は問題ないと考えられる。しかし、ZON と比較して、漿膜側に輸送されるグルクロン酸抱合体の量は非常に多く、小腸で約 10 倍、結腸で約 20 倍であった。血液中に輸送される抱合体の一部は、体外排泄されることなく局所器官に分布することが知られている[40, 68]。局所臓器に輸送された抱合体は、組織内で脱抱合反応による再活性化によって悪影響を引き起こす可能性がある。本実験の結果から、ZON-GA と α -ZOL-GA の漿膜側輸送量は遠位腸管である結腸で特に高い傾向にあった。解剖学的に門脈と繋がらないために、遠位結腸で吸収された化合物の一部は、肝初回通過効果を受けずに全身循環する (図 18)。すなわち、結腸で漿膜側へと吸収された ZON-GA と α -ZOL-GA の一部は体内を循環し、局所臓器に分布し、それらは脱抱合によって再び活性物質である ZON や α -ZOL へと変換される可能性がある。ZOL は ZON に比べて親油性が高いことが知られている[18]。親油性は、生体膜を介した受動拡散を促進するため、親油性の高い物質は腸上皮細胞の二重脂質膜を容易に通過し吸収されると推察される[26]。ZOL の親油性がエストラジオールの親油性とほぼ同等であることを考慮すると、ZOL はエストラジオールと同じくらい標的組織の細胞膜を

通過する可能性が示唆される[18]。したがって、標的組織へと循環してきた ZOL-GA が局所で脱抱合されると、拡散しやすいことが危惧される。また、 α -ZOL-GA の漿膜側輸送量は、ZON-GA の漿膜側輸送量と同程度であった。 α -ZOL のエストロゲン様活性の強さは、ZON と比べて約 3 倍である[63]。以上のことから、経口暴露された ZON が内分泌系に影響を与えるメカニズムにおいて、結腸での α -ZOL-GA の漿膜側輸送が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

ZON-GA および α -ZOL-GA の両グルクロニドの粘膜側への最大排泄量は小腸（セグメント I～ ）で見られた。小腸で粘膜側に排泄される ZON-GA および α -ZOL-GA は、消化内容物とともに遠位腸管に流入すると考えられる。結腸では、グルクロニドは腸内細菌の β -グルクロニダーゼによって脱抱合される[87]。よく知られている例として、抗腫瘍薬であるイリノテカン[®]は、体内のカルボキシルエステラーゼによって代謝され、活性物質である 7-エチル-10-ヒドロキシカンブトテシン(SN-38)になることで抗腫瘍活性を示す[33]。SN-38 は肝臓の UGT によりグルクロン酸抱合され、不活性物質 SN-38 グルクロニド(SN-38-GA)として胆汁中に排泄される[91]。胆汁中に排泄された SN-38-GA は、腸内細菌の β -グルクロニダーゼによって脱抱合され、再活性化されることが報告されている[44]。再活性化された SN-38 は、遠位腸で吸収され、粘膜組織を損傷すると言われている[102]。イリノテカンの生体内挙動パターンは ZON に当てはめて考えることができ、ZON-GA および α -ZOL-GA は腸管に流れ、脱抱合により再活性化され、結腸で再吸収される危険性が示唆された。

ラットに ZON を経口暴露させ、排泄される糞尿中の ZON 代謝物を測定した研究では、ラットにおける ZON 還元反応産物は α -ZOL が多いという報告がある[99]。この報告は、本研究の結果と一致する。また、ヤギの胃および腸管における ZON 還元反応産物は、主に α -ZOL であり、その量は肝臓に比べて 1/8 ～ 1/3 ほどであることが知られている[21]。しかし、胃腸の総重量を考慮すると、薬物代謝の主要臓器である肝臓に匹敵する貢献度であると推察できるため、腸管での代謝動態を調査することは重要である。しかし、腸管の部

位毎の ZON 代謝動態の報告は未だない。本研究では、ラット腸管を用いて各腸管部位での ZON 代謝動態の詳細を明らかにした。ZON の代謝産物である ZON-GA および α -ZOL-GA は、近位腸管では主に粘膜側に排出され、遠位腸管では主に漿膜側へと輸送された。これは、ZON と同様に内分泌かく乱物質である BPA の腸管における代謝動態と一致した [37]。

本実験では、近位腸において吸収された ZON に対する代謝物の回収率が低かった（図 17）。未成熟な雌豚を用いた低用量の ZON 暴露実験において、曝露直後に近位腸管組織で ZON の蓄積が認められた [120]。本研究においても豚と同様に、暴露された ZON はラットの空腸に蓄積する可能性があるが、この可能性を確認するにはさらなる調査が必要である。雄ラットは雌ラットと比較して、近位小腸において粘膜側からより多くの ZON を吸収したが、未回収のものが多くなる傾向にあった。これは、摂取された ZON が雌雄ラットで異なる代謝経路をたどることを示唆しており、ZON 毒性の性特異的な違いに関連している可能性がある。本結果では、ZON の吸収に若干の性差が見られたが、腸管における ZON の主要代謝物質である ZON-GA と α -ZOL-GA の代謝動態に雌雄差や妊娠の有無による有意な差は見られなかった。また、空腸および結腸における UGT1A 遺伝子の転写調節は、エストロゲン受容体 α (ER α) を介して抑制されることが報告されている [42] が、UGT 発現の性差は種や系統によって異なるため、詳細は不明である [51]。妊娠の有無によって影響を受ける UGT 遺伝子はほとんどないことが報告されている [96]。一方で、ZON の代謝に関与する酵素および ZON 代謝物質の輸送に関与するトランスポーターの肝臓における発現は、性別および妊娠の有無によって異なることが多数報告されている [13, 47, 51, 96]。以上のことから、性別や妊娠の有無による ZON 代謝動態の違いは、腸管よりも肝臓による影響を強く受けている可能性が示唆された。性差と妊娠状態に焦点を向けた、肝臓における ZON の詳細な代謝動態の解明は第 4 章で検討する。

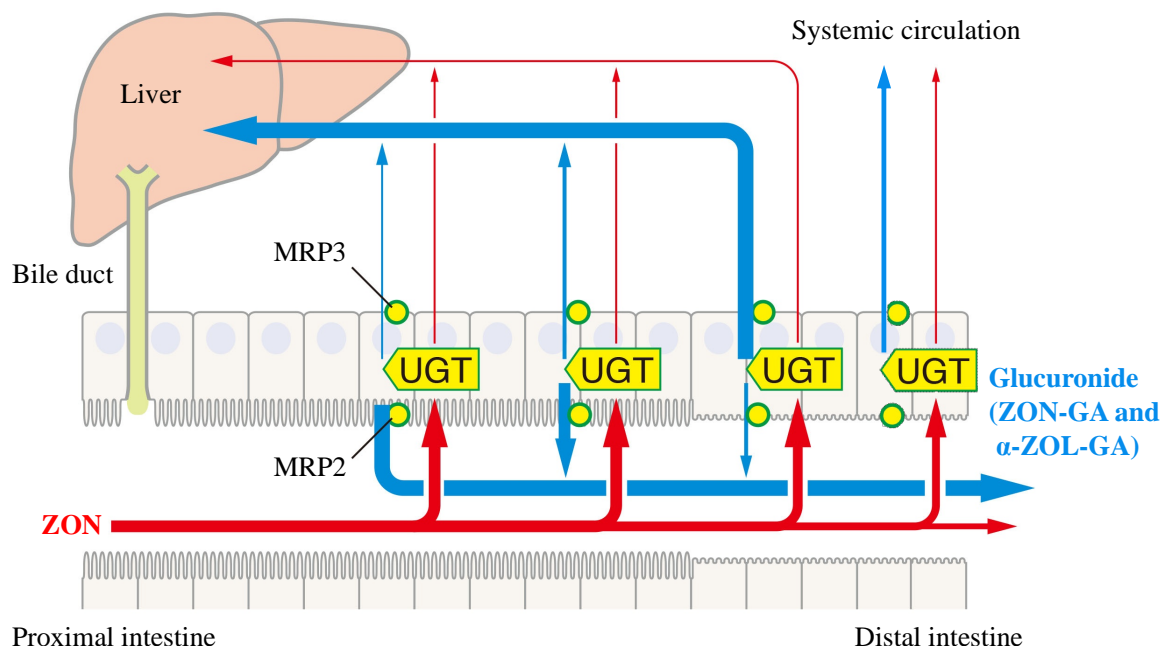


図 18 腸管部位に依存した代謝と代謝物質の挙動に関する仮説の概略図

腸管に吸収されたゼアラレノン (ZON) の大半は、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) によって ZON グルクロン酸抱合体 (ZON-GA) または α -ゼアラレノールグルクロン酸抱合体 (α -ZOL-GA) に代謝される。近位小腸では、multidrug resistance associated proteins 2 (MRP2) を介して主に粘膜側に排出され、遠位腸管では、主に MRP3 を介して漿膜側に輸送される可能性が示唆された。少量の ZON が、未代謝のまま漿膜側に輸送される可能性が示された。遠位結腸に吸収された一部の ZON およびグルクロニドは、肝臓を通過せずに全身に循環する可能性が示された。

5. 小括

第 4 章では、ラット反転腸管モデルを用いて、腸管内における ZON の代謝動態を解明した。ZON が近位腸管内で不活性代謝物である ZON-GA あるいは α -ZOL-GA に代謝され、その後腸管腔に排出されることを明らかにした。これは、腸管が ZON の吸収に対して重要な防御的役割を果たしていることを裏付ける。しかし、ZON-GA および α -ZOL-GA は主に遠位腸管である結腸で漿膜側へと輸送され血中に吸収されることで、局所標的臓器

へ運搬される可能性が示唆された。

第 章 カビ毒ゼアラレノンの肝臓における代謝動態

1. 序文

経口暴露された化学物質は、腸管で吸収された後に門脈血流を介して肝臓へと運ばれる。そして肝臓で代謝を受けることで親水性が高まり、体外へ排泄されやすくなる。肝臓で代謝を受けた物質の一部は胆汁中へと放出され、胆汁と共に胆管から十二指腸へと排泄される。一方、もう一部は、静脈血中へと排泄され、血流によって全身循環し、最終的には腎臓から尿へ排出される。そのため、吸収された化学物質が標的器官に到達する前の肝臓において、どのような代謝を受け、その後どの程度胆汁または静脈血側へと排出されるかという代謝動態を調査することは重要である。

多くの哺乳類において ZON は、肝臓では α -ZOL もしくは β -ZOL に還元されることが知られており、さらに、これらの還元物質はグルクロン酸抱合を受ける[57]。 α -ZOL は元の化合物である ZON より約 3 倍強いエストロゲン作用を持つことから[63]、一部の国では牛の成長促進剤として使用されているが、ヨーロッパ諸国ではその危険性を考慮して α -ZOL の使用を禁止している[57, 67]。ZON だけでなく、その還元物質は、子宮内膜腺癌および過形成[106]や未成熟児において思春期の早期発症[93, 95]を引き起こす可能性が示唆されている。また α -ZOL は卵胞刺激ホルモンの合成と分泌を特異的に阻害することが報告されている[31]。

このように、生体内で変換された α -ZOL は、生殖器官などの標的臓器に甚大な影響を与えられる。しかし、主な代謝器官である肝臓における ZON の代謝、およびその代謝物の挙動と分布の詳細は未だに不明な点が多い。第 章において、腸管での ZON 代謝動態の一部を明らかにしたが、腸管における性別や妊娠の有無による違いはそれほど顕著ではなく、腸管から吸収された後の肝臓における代謝動態を精査する必要があると考えられた。そこで、第 章では、雄、非妊娠雌および妊娠雌ラットを用いて肝臓灌流試験を行い、肝臓における ZON 代謝動態を解明し、標的器官での毒性発現に至るメカニズムの

一端を解明することを試みた。

2. 材料と方法

1) 試薬

ZON はフナコシ、HPLC 用特級メタノールは和光純薬工業、 β -glucuronidase は Sigma-Aldrich から購入した。ZON グルクロン酸抱合体 (ZON-GA) および ZOL グルクロン酸抱合体 (ZOL-GA) は、肝臓に ZON を灌流した胆汁から精製し、 β -glucuronidase 処理サンプルと未処理サンプルの HPLC 分析により定量し、標準物質として用いた。

2) 供試動物

雄 (330-400 g)、雌 (240-280 g) および妊娠雌 (270-340 g、GD 12-13) の SD ラット (8-10 週齢) を日本エスエルシーから購入した。ラットは自由採食・自由飲水できる環境下で 1 週間馴化した後に実験に供した。合計 12 匹のラットを使用した (雄 4 匹、雌 4 匹、妊娠雄 4 匹)。本実験は酪農学園大学動物実験倫理委員会により承認されている (承認番号: VH17A22)。すべての手術は麻酔下で行われ、動物の苦痛を最小限に抑えるように原則に従い実験を行った。

3) 肝臓灌流試験

灌流液は、Krebs-Ringer-Buffer (NaCl, 115 mM; KCl, 5.9 mM; $MgCl_2$, 1.2 mM; $CaCl_2$, 2.5 mM; NaH_2PO_4 , 1.2 mM; Na_2SO_4 , 1.2 mM; $NaHCO_3$, 25 mM and glucose, 10 mM) を使用した。灌流液は、95% O_2 /5% CO_2 で通気し、pH を 7.4 に調整し、37°C に加温した。

肝臓灌流外科手術の模式図を図 19 に記した[38]。ラットは 2.0~3.0% イソフルラン吸入麻酔下で手術した。血液凝固を阻止するために、大腿静脈を露出し、ヘパリン (持田製薬、東京) を静脈注射した。その後、腹部を切開し、胆管、肝門脈および後大静脈を露出し、それぞれにカニュレーションを施した。ポンプ (MP-32N、東京理化工械、東京) を介し

て、灌流液を送液(30 mL/min)した。試験開始直後から 5 分間、10 μ M ZON に調整した灌流液を肝門脈から流入させ、その後 ZON を含まない灌流液を 55 分間流した。5 分毎に胆汁および静脈側灌流液を回収し、含有する ZON とその代謝物を LC-MS/MS を用いて分析した。

4) LC-MS/MS による ZON およびその代謝物の分析

胆汁および静脈側灌流液サンプルは分析まで-80°C で凍結保存した。エレクトロスプレーイオン化源を備え、ネガティブモードで動作する LC-MS/MS システム(島津)を用いて、サンプルを分析した。移動相 A および B は、それぞれ 10 mM 酢酸アンモニウムと 100%メタノールを含むメタノール/水/酢酸(5:95:0.05)となるように調整した。B 液 0%の状態から 8 分で B 液 100%に置き換わるリニアグラジエントを行い、さらに 2 分間 B 液 100%を維持する分析条件を実施した。サンプルを Triart C18 逆相カラム(2.1 \times 150 mm、YMC Co.)で分離し、多重反応モニタリングモードを使用して ZON 代謝物を検出した。プリカーサーイオンとプロダクトイオンは表 3 に示した。13C-ZON(関東化学)は、ZON とその代謝物を定量するための内部標準として用いた。

5) 統計処理

すべての結果は多群比較のために ANOVA 後の Tukey-Kramer 法を用いて評価した。 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。結果は、4-6 回の独立した実験の平均値 \pm 標準偏差(mean \pm S.D.)で表した。

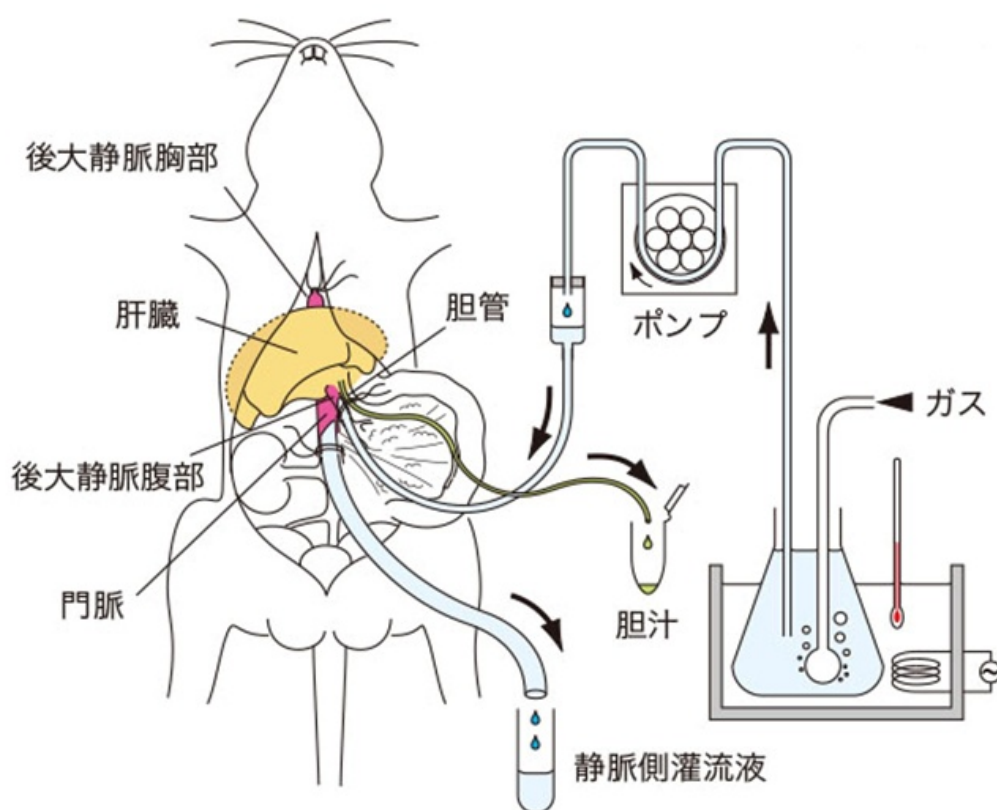


図 19 肝臓灌流試験模式図

灌流液を門脈から流入させ、肝臓を通過した後、静脈側へと流出したものを回収した。後大静脈以外の血管は結紮し、肝臓以外への灌流液の流出を防いだ。試験開始直後の 5 分間のみ ZON (10 μ M) 入りの灌流液を流し、残り 55 分間は基質の入っていない灌流液を灌流した。5 分毎に胆汁および静脈側から排出される灌流液を回収した。図は Inoue H et al. 2001. [38]から引用した。

3. 結果

1) 肝臓における ZON グルクロン酸抱合体の動態

ZON (10 μ M) を肝臓に灌流すると、ZON およびその代謝物質が胆汁および静脈側灌流液中から検出された。全てのラット群において、検出された物質の 89.84%以上は ZON-GA および α -ZOL-GA であった。また ZON、 α -ZOL、 β -ZOL、ZON 硫酸抱合体 (ZON-S)、 β -ZOL-GA、ZON グルクロン酸硫酸抱合体 (ZON-GA/S) および ZON-GA/GA も検

出されたが、その量は非常に微量であった (data not shown)。

胆汁中への ZON-GA の排泄は、雄ラットおよび雌ラットでは ZON 灌流開始から 5~10 分間で最大となり、その量はそれぞれ 82.05 nmol/5 min および 94.38 nmol/5 min であった。妊娠雌ラットでは、胆汁中への ZON-GA の最大排泄は ZON 灌流開始から 10~15 分間で見られ、その値は 99.96 nmol/5 min であった (図 20A)。いずれのラットにおいても、ZON-GA の胆汁中への最大排泄が見られた後は、ZON-GA の胆汁中への排泄量は徐々に減少していったが、その減少の程度は妊娠雌ラットで大きい傾向にあった。静脈側への ZON-GA の排泄は、雄ラットでは ZON 灌流開始から 5 分後に最大となり、その量は 120.32 nmol/5 min であった。雌ラットおよび妊娠雌ラットでは、静脈側への ZON-GA の最大排泄は ZON 灌流開始から 10 分後に見られ、その値はそれぞれ 127.11 nmol/5 min および 179.86 nmol/5 min であった (図 20B)。胆汁中への排泄と同様に、静脈側への ZON-GA の最大排泄が見られた後は、徐々に静脈側への ZON-GA の排泄量が減少していった。最大排泄が見られた 5、10 分を除いて、その他の時間帯での静脈側への ZON-GA の排泄量に、雄、雌、および妊娠雌ラットで大きな違いは見られなかった。

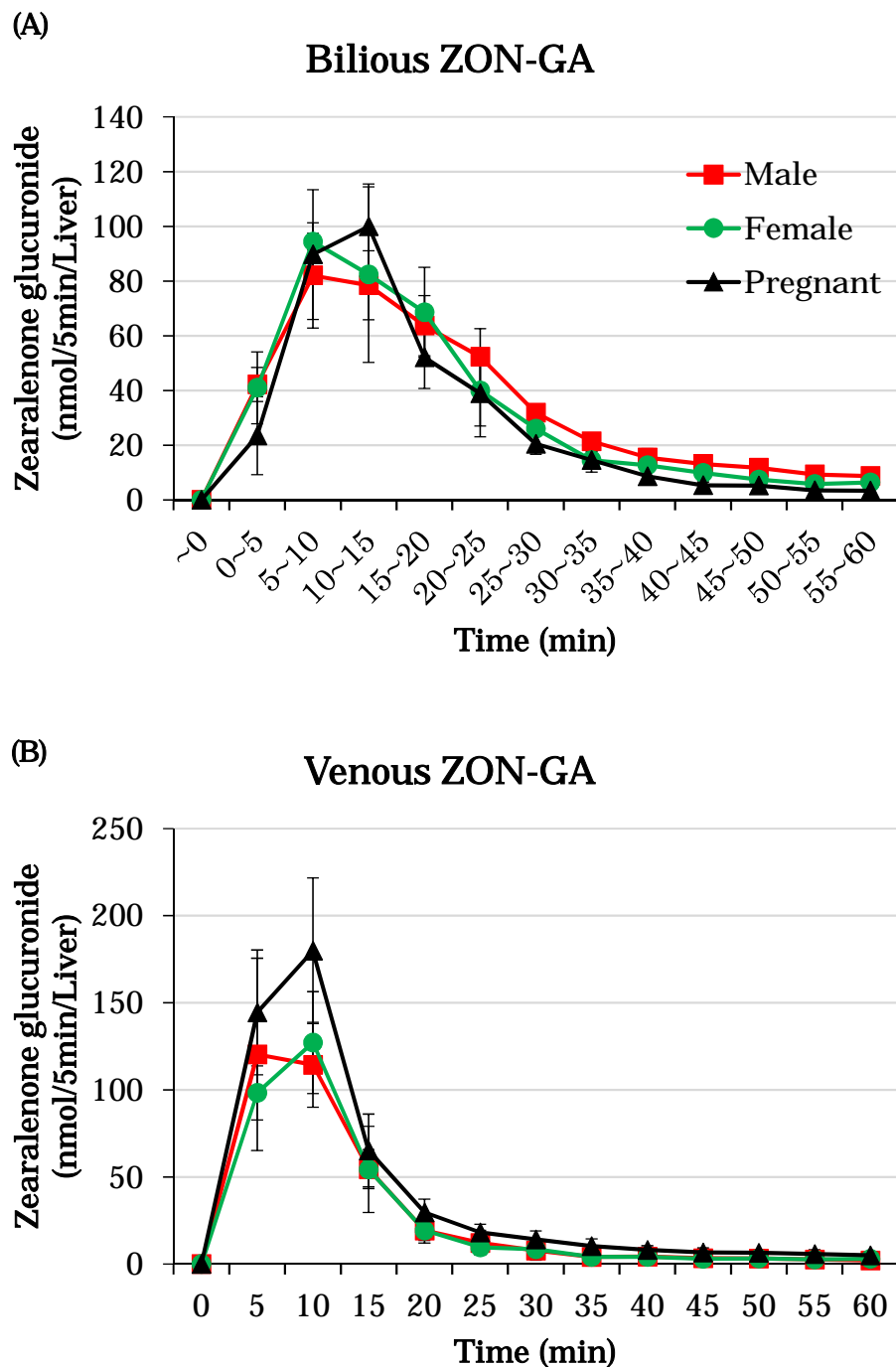


図 20 ZON グルクロン酸抱合体の胆汁および静脈側への排泄量の時間的推移

(A) 灌流 60 分間で胆汁中に排泄されるゼアラレノングルクロン酸抱合体 (ZON-GA) の時間的推移を示した。(B) 静脈側に排泄される ZON-GA の量の時間的推移を示した。肝臓にゼアラレノン (ZON) を含む灌流液を試験開始直後の 5 分間灌流し、その後、ZON を含まない灌流液で 55 分間灌流した。(mean \pm S.D. n = 3-4)

2) 肝臓における α -ZOL グルクロン酸抱合体の動態

続いて、ZON-GA と同程度、多量に検出された α -ZOL-GA の胆汁中および静脈側への排泄を定量した。胆汁中への α -ZOL-GA の排泄は、雄ラットおよび雌ラットでは ZON 灌流開始から 15~20 分の間で最大となり、その量はそれぞれ 71.18 nmol/5 min および 70.68 nmol/5 min であった。妊娠雌ラットでは、胆汁中への α -ZOL-GA の最大排泄は ZON 灌流開始から 10~15 分の間で見られ、その値は 77.47 nmol/5 min であった (図 21A)。いずれのラットにおいても、 α -ZOL-GA の胆汁中への最大排泄が見られた後は、 α -ZOL-GA の胆汁中への排泄量は徐々に減少していったが、その減少の程度は雌ラット、特に妊娠雌ラットで大きい傾向にあった。静脈側への α -ZOL-GA の排泄は、雄ラット、雌ラットおよび妊娠雌ラットでは ZON 灌流開始から 10 分後に最大となり、その量はそれぞれ 71.93 nmol/5 min、77.35 nmol/5 min および 108.84 nmol/5 min であった (図 21B)。胆汁中への排泄と同様に、静脈側への α -ZOL-GA の最大排泄が見られた後は、徐々に静脈側への α -ZOL-GA の排泄量が減少していった。最大排泄が見られた 10 分を除いて、その他の時間帯での静脈側への ZON-GA の排泄量に、雄、雌、および妊娠雌ラットで大きな違いは見られなかった。

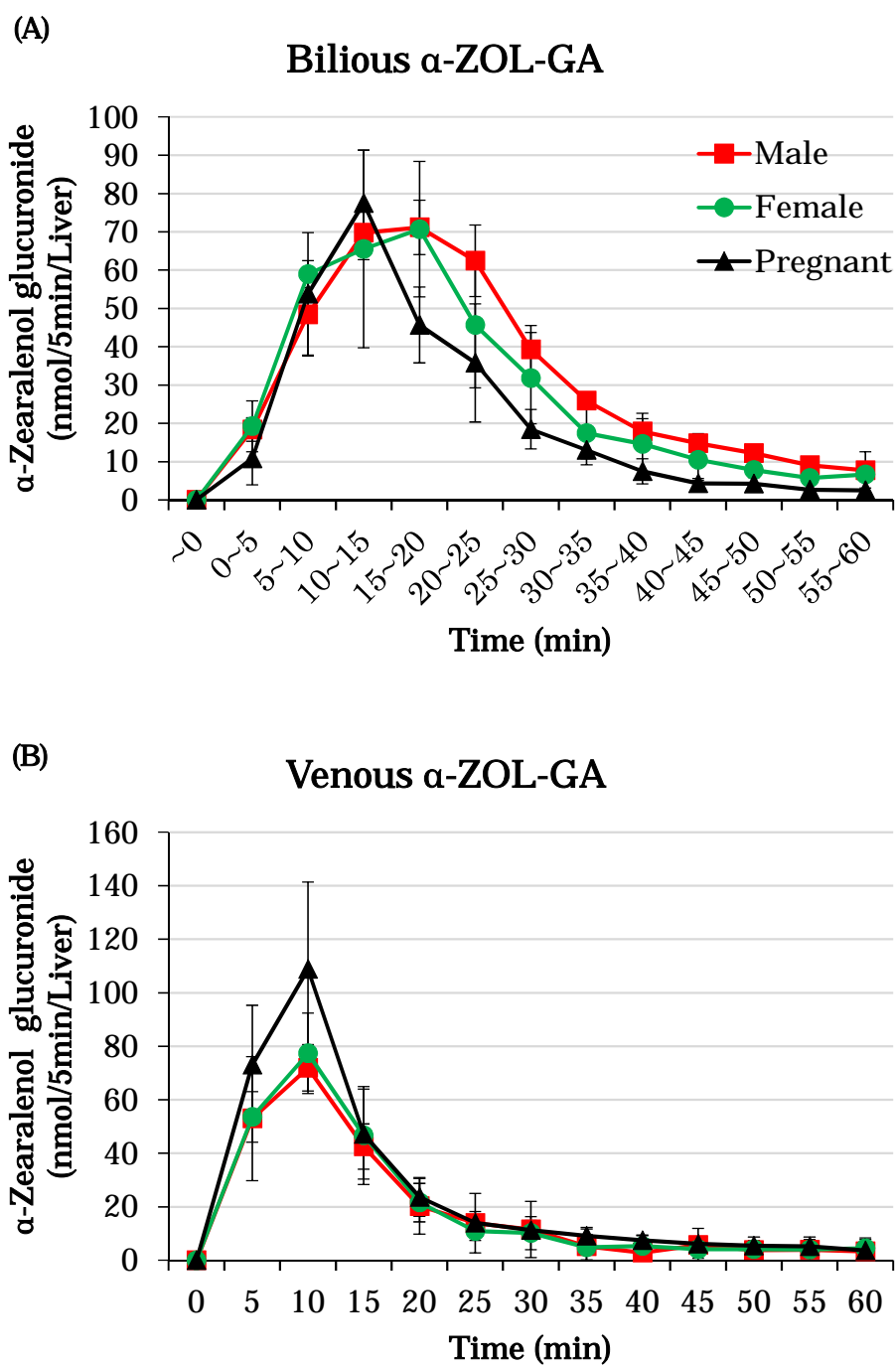


図 21 α -ZOL グルクロン酸抱合体の胆汁および静脈側への排泄量の時間的推移

(A) 灌流 60 分間で胆汁中に排泄される α -ゼアラレノールグルクロン酸抱合体 (α -ZOL-GA) の時間的推移を示した。(B) 静脈側に排泄される α -ZOL-GA の量の時間的推移を示した。肝臓にゼアラレノン (ZON) を含む灌流液を試験開始直後の 5 分間灌流し、その後、ZON を含まない灌流液で 55 分間灌流した。(mean \pm S.D. n = 3-4)

3) 灌流 60 分での肝臓における ZON の代謝挙動

雄、雌、および妊娠雌ラットの 60 分間の灌流において、ZON-GA および α -ZOL-GA の胆汁排泄の最大値に大きな違いは見られなかったが、時間経過に伴う排泄量の減少程度に違いが見られた。雌、特に妊娠雌ラットにおいて、胆汁排泄量の減少が早く見られる傾向にあった。また、ZON-GA および α -ZOL-GA の静脈側への排泄に関しては、妊娠雌ラットで排泄量が多い傾向があった。これらのことから、60 分間の灌流における胆汁中および静脈側への ZON-GA および α -ZOL-GA の総排泄量に、性別および妊娠の有無による違いが見られるのではないかと考え、それぞれのラットでの胆汁中および静脈側への総排泄量を調べた (表 4、図 22)。

雄、雌、および妊娠雌ラットの全てで、灌流した ZON のほとんどが回収された (回収率 > 89% (表 4))。雄ラットにおいては、胆汁中への ZON-GA の総排泄量は 430.38 nmol/5 min、 α -ZOL-GA の総排泄量は 397.01 nmol/5 min、静脈側への ZON-GA の総排泄量は 348.10 nmol/5 min、 α -ZOL-GA の総排泄量が 237.74 nmol/5 min であった。両グルクロン酸抱合体の胆汁中および静脈側への排泄割合はそれぞれ 55.16% および 39.06% であった。雌ラットにおける胆汁中への ZON-GA の総排泄量は 409.12 nmol/5 min、 α -ZOL-GA の総排泄量は 354.55 nmol/5 min、静脈側への ZON-GA の総排泄量は 336.93 nmol/5 min、 α -ZOL-GA の総排泄量が 247.31 nmol/5 min であった。両グルクロン酸抱合体の胆汁中および静脈側への排泄割合はそれぞれ 50.91% および 38.95% であった。妊娠雌ラットにおける胆汁中への ZON-GA の総排泄量は 365.13 nmol/5 min、 α -ZOL-GA の総排泄量は 276.22 nmol/5 min、静脈側への ZON-GA の総排泄量は 494.24 nmol/5 min、 α -ZOL-GA の総排泄量が 315.22 nmol/5 min であった。両グルクロン酸抱合体の胆汁中および静脈側への排泄割合はそれぞれ 42.76% および 53.97% であった (表 4)。雌雄ラットと比べて、妊娠雌ラットでは、胆汁中への α -ZOL-GA の放出量が有意に減少した。また、有意差は見られなかったが、妊娠雌ラットで雄および雌ラットに比べて静脈中への ZON-GA および α -ZOL-GA の排泄量が増加する傾向が認められた (図 22)。

表 4 灌流 60 分における各代謝物質の胆汁中および静脈側への排泄割合

	Bilious excretion		Venous excretion		Total		
	(nmol/5min/Liver)	(%)	(nmol/5min/Liver)	(%)	(nmol/5min/Liver)	(%)	
Male	ZON-GA	430.38 ± 55.17	28.69 ± 3.68	348.10 ± 105.58	23.21 ± 7.04	778.48 ± 159.40	51.90 ± 10.63
	α-ZOL-GA	397.01 ± 29.15	26.47 ± 1.94	237.74 ± 85.70	15.85 ± 5.71	634.74 ± 111.62	42.32 ± 7.44
	Total	827.38 ± 83.77	55.16 ± 5.58	585.84 ± 185.07	39.06 ± 12.34	1413.22 ± 263.76	94.21 ± 17.58
Female	ZON-GA	409.12 ± 36.34	27.27 ± 2.42	336.93 ± 53.01	22.46 ± 3.53	746.05 ± 75.36	49.74 ± 5.02
	α-ZOL-GA	354.55 ± 15.42	23.64 ± 1.03	247.31 ± 44.55	16.49 ± 2.97	601.85 ± 56.59	40.12 ± 3.77
	Total	763.67 ± 36.35	50.91 ± 2.42	584.24 ± 92.05	38.95 ± 6.14	1347.91 ± 120.24	89.84 ± 8.02
Pregnant	ZON-GA	365.13 ± 57.39	24.34 ± 3.83	494.24 ± 100.46	32.95 ± 6.70	859.53 ± 44.76	57.30 ± 2.98
	α-ZOL-GA	276.22 ± 39.09	18.41 ± 2.61	315.22 ± 73.89	21.01 ± 4.93	591.44 ± 47.04	39.43 ± 3.14
	Total	641.35 ± 94.38	42.76 ± 6.29	809.62 ± 174.23	53.97 ± 11.62	1450.97 ± 89.87	96.73 ± 5.99

mean ± S.D. n = 3-4。

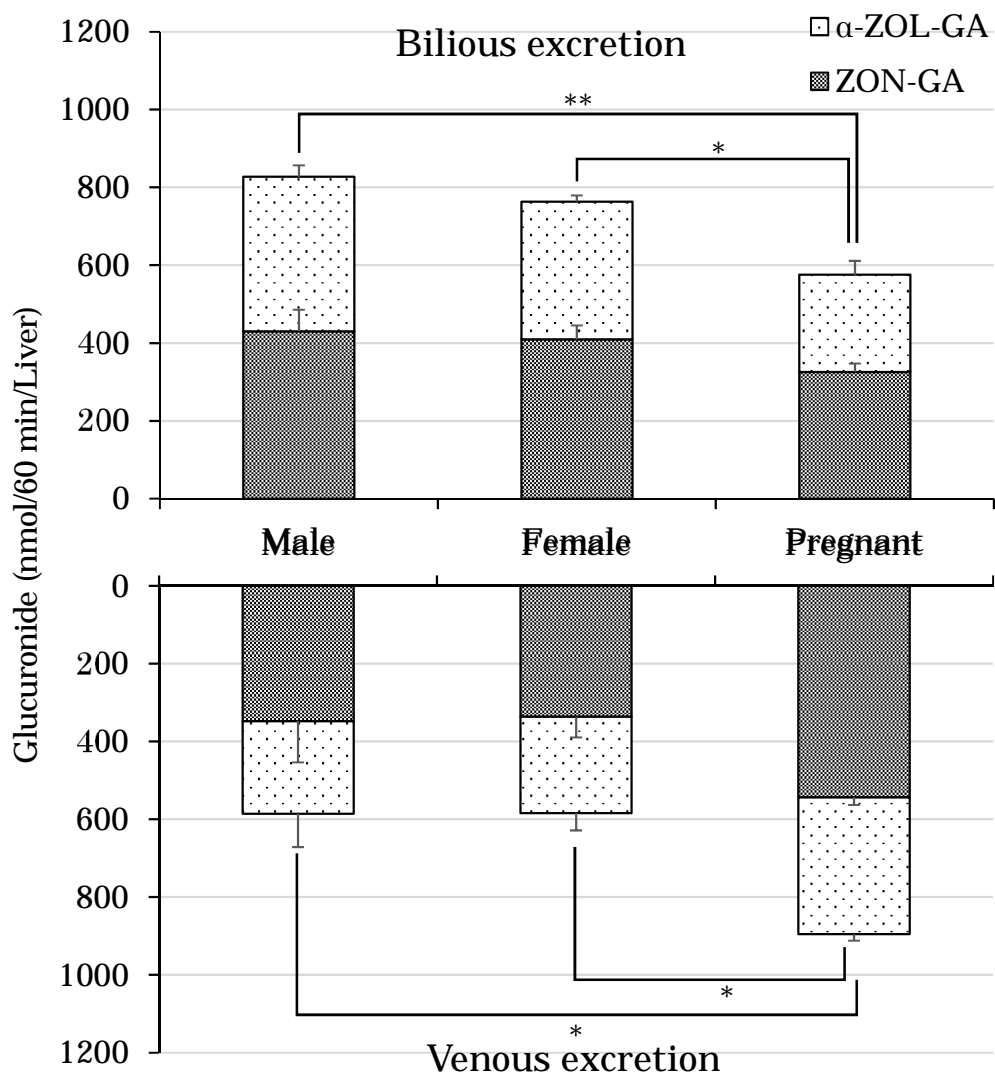


図 22 雄、雌、および妊娠雌ラットにおける ZON 肝臓代謝動態の違い

雄、雌、妊娠雌ラットの肝臓にゼアラレノン (ZON) を灌流した際の、ゼアラレノン グルクロン酸抱合体 (ZON-GA) および α-ゼアラレノールグルクロン酸抱合体 (α-ZOL-GA) の胆汁中および静脈側への排泄動態を示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。(mean \pm S.D. n = 3-5)

4. 考察

肝臓には、ZON の還元と抱合の 2 つの経路があることが知られている。肝臓で代謝された代謝物は、胆汁中または静脈側へと放出されるが、ZON 代謝物の経路別排泄比率につ

いては明らかになっていなかった。また、腸管から血中へと吸収された ZON が肝臓で ZOL へと変換され、どの程度標的器官へ運ばれる可能性があるのかを調べることは、ZON が標的器官に与える悪影響の原因メカニズムを解明する上で重要である。そこで、本章ではラット肝臓灌流試験を用いて、肝臓における ZON の代謝動態を解明した。

肝臓灌流試験の結果、肝門脈から肝臓に流入した ZON は、肝臓で直ちに還元またはグルクロン酸抱合されることが示された。胆汁中から少量の α - β -ZOL が検出されたが、ZAN および α - β -ZAL は検出されなかった。このことから、ZON はラットの肝臓で大部分が α - β -ZOL に変換されると推測できる。さらに、胆汁中および静脈側灌流液から多量の α -ZOL-GA が検出されたことから、ラット肝臓における ZON の主要な還元反応産物は α -ZOL であると思われる。肝臓における ZON 還元反応は、動物種差があることが知られている[18]。ウシ肝ホモジネートを用いた研究では、ZON 還元反応産物の 73-100%が α -ZOL であり、またウシ肝臓の ZON 還元能力はラット肝臓と同等であることが報告されている[58]。これは本研究の結果と一致する。一方で、ブタやヒツジの肝臓における ZON 還元能力はウシやラットより強いことが知られている[58]。このことから、家畜の中でも特に ZON 感受性が高いことが知られているブタでは、より多くの α -ZOL が ZON 還元反応産物として胆汁および血中へ放出されることが推察される。ZON の還元には、HSD が関与していることが知られている[59]。3 α - β -HSD は肝臓に発現していることが知られている[53, 97]。このことから、肝臓における ZON 還元反応を担う酵素の候補として、3 α - β -HSD が考えられるが、それぞれの酵素の ZON 代謝の寄与率はさらなる調査が必要である。ZON が CYP1A2 や CYP3A サブファミリーによって水酸化された OH-ZON は、本実験においては検出されなかった。ラット肝ミクロソームを用いた ZON の薬物代謝第 1 相反応産物の調査では、検出された反応産物はほぼ α -ZOL であり、OH-ZON は α -ZOL の 1/8 以下であった[9]。また、 β -ZOL は検出限界であった。さらに、ZON から α -ZOL への変換の V_{max}/K_m は、 β -ZOL への V_{max}/K_m より約 3 倍以上高いことが知られている[67]。これらの実験結果と一致して、ラット肝臓組織では、ZON は α -ZOL へ、そしてそれに続く α -ZOL-GA への

変換が効率的に行われていると推察された。

ZON-GA および α -ZOL-GA の胆汁中および静脈側への排泄量の時間的推移を比べてみると、 α -ZOL-GA の最大排泄量が得られる時間は、ZON-GA の最大排泄量が見られる時間より約 5 分遅れている。このことから、肝臓に流入した ZON のおよそ半分は直ちにグルクロン酸抱合され ZON-GA となり胆汁あるいは静脈側へと排泄されるが、もう半分は α -ZOL へ還元された後に、さらにグルクロン酸抱合される可能性が示唆された。肝臓灌流試験で得られた ZON 代謝物質の回収率より、肝臓に流入した ZON のおよそ 89%以上がグルクロン酸抱合 (ZON-GA および α -ZOL-GA) された後に、肝臓から排泄されることが明らかとなった。これは、ラット肝臓が ZON をグルクロン酸抱合することで不活性化し、排泄するという防御機構の役割を担っていることを裏付けている。他方、肝臓には、UGT2B サブファミリーが豊富に発現しており[51]、ZON は UGT2B7 でグルクロン酸抱合されることが知られている[81]。UGT2B サブファミリーがステロイドホルモンのグルクロン酸抱合を媒介することから[55, 109]、いくつかの UGT2B サブファミリー酵素が ZON のグルクロン酸抱合を担っている可能性が考えられる。ZON および ZOL のグルクロン酸抱合は、14 位あるいは 16 位の炭素にグルクロン酸を結合させた 2 種類のグルクロン酸抱合体が存在するが、ラット肝ミクロソームを用いた研究において 14 位のグルクロン酸抱合体が多いことが知られている[81]。よって、本研究で検出された ZON-GA および α -ZOL-GA も 14 位がグルクロン酸抱合されたものであると推察される。

ラット肝ミクロソームを用いた研究で、ZON は肝臓においてグルクロン酸抱合を受けことが知られており[117]、この報告は本実験結果と一致する。一般的に、グルクロン酸抱合体は腸肝循環しやすいと言われていることから[80]、本実験で見られた胆汁へ排泄された大量の ZON-GA および α -ZOL-GA は腸管循環によって遠位腸管に流入する可能性が示唆される。この結果に加えて、第 4 章で近位腸管に吸収された ZON が ZON-GA および α -ZOL-GA の両グルクロン酸抱合体へと代謝された後に、主に粘膜側へ排泄されたことを考慮すると、より多くのグルクロン酸抱合体が遠位腸管に流入する可能性が示唆される。

第 章で考察したように、遠位腸管に流入するグルクロン酸抱合体は、結腸で腸内細菌の β -グルクロニダーゼによって脱抱合され[87]、再活性化した後に、結腸で再吸収される危険性が示唆される。

生体内に取り込まれた化学物質は、薬物代謝酵素による還元反応や抱合反応により体外へと排出される。特に、抱合反応は化学物質の生体外排泄に非常に重要な役割を担っている。しかし、近年、化学物質抱合体が体外へ排泄されず生体内で利用されることが知られてきた。血流を介して輸送されたプレグネノロン硫酸抱合体が脱抱合され、骨格筋や唾液腺における局所的なステロイド生合成に利用されることが明らかになった[25, 34]。すなわち、ステロイドなど生体内で利用される内因性化学物質は主に硫酸抱合体となり、それが輸送の 1 つのフォームとなって機能している可能性が示唆される。一方で、カビ毒 ZON は、腸管[35]および肝臓において生体外排泄のために主にグルクロン酸抱合を受けることが明らかになった。つまり、生体異物など体内から排除すべき外因性化学物質は主にグルクロン酸抱合体となり、生体外へ排出されている可能性が示唆される。このように抱合体の種類によって、生体内の化学物質を仕分けしている可能性があると推察された。他方で、ZON と同じくエストロゲン活性を有する内分泌かく乱化学物質である BPA は肝臓でグルクロン酸抱合を受けた後に、胎盤を通過し、さらに脱抱合されることが知られている[40, 68]。このことが妊娠異常や胎児影響に寄与している可能性がある。この報告を考慮すると、ZON-GA および α -ZOL-GA も同じく胎盤を通過する可能性が示唆される。

生体異物の輸送に関与し、肝細胞の胆管側に局在する MRP2 は、妊娠時には発現が減少することが報告されている[13]。この報告は、雌雄ラットと比べて、妊娠雌ラットにおける ZON の肝臓灌流試験で、ZON-GA および α -ZOL-GA の胆汁排泄が減少した結果と一致する。つまり、ZON-GA および α -ZOL-GA の両グルクロン酸抱合体は、MRP2 を介して肝臓から胆汁中へと放出される可能性が示唆された。また、その代償として、妊娠雌ラットでは、雌雄ラットと比べて静脈側への両グルクロン酸抱合体の排泄が増加傾向にあったと考えられる。これは、妊娠雌においてより多くの ZON-GA および α -ZOL-GA が全

身循環する危険性を示唆する。ZON の標的器官の一つである胎盤は、高い β -glucuronidase 活性を持っている[100]。このことから、胎盤では ZON-GA および α -ZOL-GA は脱抱合され、ZON および α -ZOL となる可能性がある。ヒトにおいても、妊娠中に胎盤の β -glucuronidase 活性が高まることが報告されている[50]。妊娠後期のラットに ZON を暴露すると、母体組織のみならず、胎児からも ZON および α -ZOL が検出されることが報告されている[4]。ヒト胎盤灌流によって ZON の胎盤移行に関する研究においても、エストロゲン活性の強い α -ZOL が胎児側から検出されることが知られている[114]。これらの報告と本実験の結果から、血液と共に全身循環した ZON-GA および α -ZOL-GA は、何かしらのトランスポーターを介して胎盤に取り込まれ、胎盤の β -glucuronidase によって脱抱合された ZON および α -ZOL が臍帯血流を介して胎児に移行する危険性が示唆された。ラットにおける ZON-GA および α -ZOL-GA の胎盤への取り込みは、胎盤に存在する有機アニオントランスポーター (organic anion transporting polypeptide ; OATP) ファミリーのうち、特に非妊娠時に比べて妊娠中に mRNA 発現が約 10 倍高くなることが知られている OATP4A1 の関与が考えられる[101]。また、ラット胎児は UGT 発現が弱いことが知られていることから、一度胎盤で脱抱合され再活性化すると、胎児側では抱合反応によって ZON を不活性化ができないと推察される[40, 61, 68]。さらに、ヒトにおいても、外因性化学物質の代謝に重要な UGT2B の発現は、胎児および新生児では低いことが知られている[19, 22]。ヒト胎盤では ZON の還元反応に関与する 3 β -HSD の活性が高いことが知られている[60]。このため、ヒトにおいては、胎盤へ運搬された ZON-GA は胎盤で脱抱合を受けた後に、次いで胎盤に発現している 3 β -HSD によって、よりエストロゲン活性の強い α -ZOL に変換される可能性が示唆される。また、ブタにおいて α -/ β -ZOL は 3 β -HSD に対して競合的に拮抗することが知られている[105]。したがって、胎盤における 3 β -HSD 活性阻害による内分泌かく乱も危惧される。さらに、 α -ZOL の親油性がエストラジオールの親油性とほぼ同等であることから[18]、 α -ZOL はエストラジオールと同等に標的組織の細胞膜を通過する可能性が示唆される。つまり、血流を介して運搬された α -ZOL-GA が胎盤で脱

抱合を受け α -ZOL に変換されると、胎仔移行しやすい可能性が危惧される。

また、非妊娠時に比べて妊娠時では、より多くの ZON-GA および α -ZOL-GA が静脈中へと放出されるという本結果から、妊娠時に胎盤や胎児が ZON および α -ZOL の影響を受けやすいことを危惧される。さらに、 α -ZOL は ZON に比べてエストロゲン活性が高いことから、胎盤や胎児へと移行した α -ZOL は妊娠の維持や胎児の発育に甚大な影響を与えると推測される。

ZON-GA と α -ZOL-GA が全身循環された後、どのように胎盤を通過し、どの程度胎児組織に蓄積するかを調べることは、将来の毒性学研究にとって重要な問題である。さらに、ZON は植物や菌類によって代謝されることが知られており、グルコシドまたは硫酸抱合体となる[43, 90]。これらの生体外抱合体は masked mycotoxins として知られており、食品および飼料での汚染が報告されている[7, 10, 94]。masked mycotoxins は、摂取後に脱抱合により親マイコトキシンへ変換する可能性や、未知の代謝物への生体内変化する可能性があるため、注意が必要である[23]。今後の研究では、これらの masked mycotoxins の代謝動態も調査する必要があると思われる。

5. 小括

第 4 章では、ラット肝臓灌流試験を用いて、肝臓におけるステロイド様物質 ZON の代謝動態を解明した。肝臓に流入した ZON は、肝臓内で不活性代謝物である ZON-GA あるいは α -ZOL-GA に代謝され、その後胆汁あるいは静脈側へと排出されることが明らかになった。これは、肝臓が ZON に対して、そのほとんどをグルクロン酸抱合することで重要な防御的役割を果たしていることを裏付ける。しかし、妊娠雌ラットにおいては、静脈側へのグルクロン酸抱合体の放出が多かったことから、大量の ZON-GA および α -ZOL-GA が全身循環する可能性が示され、そのことは、それら抱合体が胎盤に吸収され、その後脱抱合され再活性化することが示唆されると同時に、エストロゲン作用を発揮する化学物質として胎児に移行する危険性が示唆された。

総括

本研究は、内因性化学物質であるステロイドの抱合体が局所臓器に運搬された後に、どのように利用されるのかを調べる目的として、口腔内にステロイドを分泌する組織である唾液腺における抱合型ステロイドからのステロイド局所合成の可能性を検討した。また、ステロイドに類似しているカビ毒 ZON を用いて、外因性化学物質がステロイド抱合体の標的器官輸送システムと同じ経路で標的組織に到達するのかを調査する目的で、腸管および肝臓における ZON の代謝動態の詳細を検討し、以下の結果を得た。

1. 唾液腺におけるステロイド合成能を明らかにした

ラット唾液腺ホモジネートを用いて、ステロイド合成酵素の活性と発現を明らかにした。酵素活性試験の結果より、ラット唾液腺では、プレグネノロンからコルチコステロンおよびアンドロステンジオンからテストステロンまでを合成する酵素の活性が示された。また、舌下腺、顎下腺および耳下腺の全てで、コルチコステロン合成酵素である CYP11B1 の発現が確認された。さらに、唾液腺において、プレグネノロン硫酸抱合体を脱抱合しプレグネノロンに変換する steroid sulfatase の酵素活性と発現が認められた。さらに、ステロイド抱合体が標的器官への輸送形態の 1 つとなっており、局所的なステロイド合成において前駆体供給としての役割を担っている可能性が示唆された。以上の結果から、唾液腺において、プレグネノロン硫酸抱合体からステロイドを局所的に合成できる能力を有することが明らかになった。

2. ZON の腸管における代謝動態を明らかにした

エストロゲン活性を有するカビ毒 ZON を用いたラット反転腸管試験の結果より、腸管で吸収された ZON は、そのほとんどがグルクロン酸抱合を受けることが示された。腸管で代謝された ZON-GA および α -ZOL-GA は、近位腸管では主に粘膜側へと排泄されるこ

とが明らかになった(>74.40%)。一方、遠位腸管では、代謝された両グルクロン酸抱合体の49.83%以上が漿膜側へと輸送され血中に吸収されることが明らかになった。

3. ZON の肝臓における代謝動態を明らかにした

ZON を用いた肝臓灌流試験の結果より、ZON は肝臓で代謝され、主に ZON-GA あるいは一度 α -ZOL へと水酸化された後に、さらに抱合された α -ZOL-GA になることが明らかになった。雌雄ラットでは、両グルクロン酸抱合体は静脈側より胆汁中へと放出されやすいことが示された。一方、妊娠雌ラットでは、雌雄ラットとは逆で両グルクロン酸抱合体は静脈側へと放出されやすいことが明らかになった。

以上の研究から、唾液腺におけるステロイド局所合成の可能性を世界で初めて明らかにした。肝臓などの臓器で硫酸抱合されたステロイドは、血液を介した全身循環により唾液腺などの局所臓器へと運ばれ、局所的なステロイド合成などに利用される可能性が示された。内因性化学物質の硫酸抱合体が局所組織への物質の運搬を担っているという輸送形態の1つを見出した点は、内分泌学において新たな知見を得られる足がかりになると考える。

カビ毒 ZON は腸管および肝臓において還元反応並びにグルクロン酸抱合を受けることで不活性物質となり、その大半が腸管腔へと排泄されることが明らかになった。硫酸抱合体とは異なり、グルクロン酸抱合体は主に体外排泄として機能する可能性が示唆された。しかし、一部のグルクロン酸抱合体が血液中へと吸収されることから、ZON 代謝物は血液と共に全身循環する可能性が示唆された。これは、外因性化学物質が体外へと排泄されずに、標的器官である局所組織に運搬され分布することで、局所的に毒性作用を示す可能性を危惧する。現在、世界的に実施されている毒性研究の多くは、化学物質の代謝動態、および運搬動態を考慮しているものが少ないため、本研究で得られた知見は今後の毒性学研究に大きく貢献できると考える。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始親身にご指導くださり、適切な助言を賜りました獣医生化学ユニット岩野英知教授に心から感謝の意を表します。また、本実験および論文作成を進めるにあたりご協力いただきました、獣医栄養生理学ユニット翁長武紀教授、獣医薬理学ユニット寺岡宏樹教授、酪農学園大学横田博名誉教授、日本動物特殊診断井上博紀先生、蛭沢雅司先生、農食環境学群食と健康学類前田尚之講師、獣医保健学類宮庄拓講師、獣医生化学ユニット藤木純平助教、慶應義塾大学医学部向井邦晃先生、農食環境学群中谷暢丈教授、並びに獣医生化学教室員各位に心よりお礼申し上げます。

引用文献

1. Aizawa, K., Iemitsu, M., Maeda, S., Jesmin, S., Otsuki, T., Mowa, C. N., Miyauchi, T. and Mesaki, N. 2007. Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from dhea in skeletal muscle of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**: E577-584.
2. Amano, O., Mizobe, K., Bando, Y. and Sakiyama, K. 2012. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: -overview of the japan salivary gland society-sponsored workshop-. *Acta Histochem Cytochem* **45**: 241-250.
3. Balendres, M. A. O., Karlovsky, P. and Cumagun, C. J. R. 2019. Mycotoxigenic fungi and mycotoxins in agricultural crop commodities in the philippines: A review. *Foods* **8**.
4. Bernhoft, A., Behrens, G. H., Ingebrigtsen, K., Langseth, W., Berndt, S., Haugen, T. B. and Grotmol, T. 2001. Placental transfer of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rats. *Reprod Toxicol* **15**: 545-550.
5. Binder, S. B., Schwartz-Zimmermann, H. E., Varga, E., Bichl, G., Michlmayr, H., Adam, G. and Berthiller, F. 2017. Metabolism of zearalenone and its major modified forms in pigs. *Toxins (Basel)* **9**.
6. Blair, J., Adaway, J., Keevil, B. and Ross, R. 2017. Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **24**: 161-168.
7. Boevre, M. D., Mavungu, J. D. D., Landschoot, S., Audenaert, K., Eeckhout, M., Maene, P., Haesaert, G. and Saeger, S. D. 2012. Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin Journal* **5**: 207-219.
8. Bolling, B. W., Court, M. H., Blumberg, J. B. and Chen, C. Y. 2011. Microsomal quercetin glucuronidation in rat small intestine depends on age and segment. *Drug Metab Dispos* **39**: 1406-1414.
9. Bravin, F., Duca, R. C., Balaguer, P. and Delaforge, M. 2009. In vitro cytochrome p450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: Possible occurrence of this metabolite in vivo. *Int J Mol Sci* **10**: 1824-1837.
10. Broekaert, N., Devreese, M., De Baere, S., De Backer, P. and Croubels, S. 2015. Modified fusarium mycotoxins unmasked: From occurrence in cereals to animal and human excretion. *Food Chem Toxicol* **80**: 17-31.
11. Caldwell, R. W., Tuite, J., Stob, M. and Baldwin, R. 1970. Zearalenone production by fusarium species. *Appl Microbiol* **20**: 31-34.
12. Can, N. T., Lingen, M. W., Mashek, H., McElherne, J., Briesse, R., Fitzpatrick, C., van Zante, A. and Cipriani, N. A. 2018. Expression of hormone receptors and her-2 in benign and malignant salivary gland tumors. *Head Neck Pathol* **12**: 95-104.
13. Cao, J., Stieger, B., Meier, P. J. and Vore, M. 2002. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver*

Physiol **283**: G757-766.

14. Chen, Y., Qiao, S., Tuckermann, J., Okret, S. and Jondal, M. 2010. Thymus-derived glucocorticoids mediate androgen effects on thymocyte homeostasis. *FASEB J* **24**: 5043-5051.
15. Cima, I., Corazza, N., Dick, B., Fuhrer, A., Herren, S., Jakob, S., Ayuni, E., Mueller, C. and Brunner, T. 2004. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate t cell activation. *J Exp Med* **200**: 1635-1646.
16. Compagnone, N. A. and Mellon, S. H. 2000. Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* **21**: 1-56.
17. Coste, A., Dubuquoy, L., Barnouin, R., Annicotte, J. S., Magnier, B., Notti, M., Corazza, N., Antal, M. C., Metzger, D., Desreumaux, P., Brunner, T., Auwerx, J. and Schoonjans, K. 2007. Lrh-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13098-13103.
18. Danicke, S. and Winkler, J. 2015. Invited review: Diagnosis of zearalenone (zen) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). *Food Chem Toxicol* **84**: 225-249.
19. Divakaran, K., Hines, R. N. and McCarver, D. G. 2014. Human hepatic ugt2b15 developmental expression. *Toxicol Sci* **141**: 292-299.
20. Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., Tonon, M. C., Pelletier, G. and Vaudry, H. 2009. Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol* **30**: 259-301.
21. Dong, M., Tulayakul, P., Li, J. Y., Dong, K. S., Manabe, N. and Kumagai, S. 2010. Metabolic conversion of zearalenone to alpha-zearalenol by goat tissues. *J Vet Med Sci* **72**: 307-312.
22. Ekstrom, L., Johansson, M. and Rane, A. 2013. Tissue distribution and relative gene expression of udp-glucuronosyltransferases (2b7, 2b15, 2b17) in the human fetus. *Drug Metab Dispos* **41**: 291-295.
23. Freire, L. and Sant'Ana, A. S. 2018. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food Chem Toxicol* **111**: 189-205.
24. Frizzell, C., Uhlig, S., Miles, C. O., Verhaegen, S., Elliott, C. T., Eriksen, G. S., Sorlie, M., Ropstad, E. and Connolly, L. 2015. Biotransformation of zearalenone and zearalenols to their major glucuronide metabolites reduces estrogenic activity. *Toxicol In Vitro* **29**: 575-581.
25. Fujiki, J., Maeda, N., Sato, M., Ieko, T., Inoue, H., Iwasaki, T., Iwano, H. and Yokota, H. 2018. Corticosterone biosynthesis in mouse clonal myoblastic c2c12 cells. *Steroids* **138**: 64-71.
26. Galtier, P. 1998. Biological fate of mycotoxins in animals. *Revue Medicine Veterinaire* **149**: 549-554.
27. Galvão, A., Skarzynski, D. J., Szóstek, A., Silva, E., Tramontano, A., Mollo, A., Mateus, L. and Ferreira-Dias, G. 2012. Cytokines tumor necrosis factor- α and interferon- γ participate in modulation of the equine corpus luteum as autocrine and paracrine factors. *J Reprod Immunol* **93**:

28-37.

28. Gerner, R. R., Wieser, V., Moschen, A. R. and Tilg, H. 2013. Metabolic inflammation: Role of cytokines in the crosstalk between adipose tissue and liver. *Can J Physiol Pharmacol***91**: 867-872.
29. Guengerich, F. P. 1999. Cytochrome p-450 3a4: Regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol***39**: 1-17.
30. Hatakeyama, H., Miyamori, I., Takeda, Y., Yamamoto, H. and Mabuchi, H. 1996. The expression of steroidogenic enzyme genes in human vascular cells. *Biochem Mol Biol Int***40**: 639-645.
31. He, J., Wei, C., Li, Y., Liu, Y., Wang, Y., Pan, J., Liu, J., Wu, Y. and Cui, S. 2018. Zearalenone and alpha-zearalenol inhibit the synthesis and secretion of pig follicle stimulating hormone via the non-classical estrogen membrane receptor gpr30. *Mol Cell Endocrinol***461**: 43-54.
32. Higo, S., Hojo, Y., Ishii, H., Komatsuzaki, Y., Oishi, Y., Murakami, G., Mukai, H., Yamazaki, T., Nakahara, D., Barron, A., Kimoto, T. and Kawato, S. 2011. Endogenous synthesis of corticosteroids in the hippocampus. *PLoS One***6**: e21631.
33. Humerickhouse, R., Lohrbach, K., Li, L., Bosron, W. F. and Dolan, M. E. 2000. Characterization of cpt-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hce-1 and hce-2. *Cancer Res***60**: 1189-1192.
34. Ieko, T., Sasaki, H., Maeda, N., Fujiki, J., Iwano, H. and Yokota, H. 2019. Analysis of corticosterone and testosterone synthesis in rat salivary gland homogenates. *Front Endocrinol (Lausanne)***10**: 479.
35. Ieko, T., Inoue, S., Inomata, Y., Inoue, H., Fujiki, J. and Iwano, H. 2020. Glucuronidation as a metabolic barrier against zearalenone in rat everted intestine. *J Vet Med Sci***82**: 153-161.
36. Iguchi, T., Takaori, K., Mii, A., Sato, Y., Suzuki, Y., Yoshifuji, H., Seno, H., Ogawa, O., Omori, K., Bessho, K., Kondo, S., Yoshizaki, T., Nakashima, H., Saito, T., Mimori, T., Haga, H., Kawano, M. and Yanagita, M. 2018. Glucocorticoid receptor expression in resident and hematopoietic cells in igg4-related disease. *Mod Pathol***31**: 890-899.
37. Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H. and Kato, S. 2003. Bisphenol a glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos***31**: 140-144.
38. Inoue, H., Yokota, H., Makino, T., Yuasa, A. and Kato, S. 2001. Bisphenol a glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metab Dispos***29**: 1084-1087.
39. Inoue, H., Yokota, H., Taniyama, H., Kuwahara, A., Ogawa, H., Kato, S. and Yuasa, A. 1999. 1-naphthol beta-d-glucuronide formed intraluminally in rat small intestine mucosa and absorbed into the colon. *Life Sci***65**: 1579-1588.
40. Iwano, H., Inoue, H., Nishikawa, M., Fujiki, J. and Yokota, H. 2018. Biotransformation of bisphenol a and its adverse effects on the next generation. *Endocrine Disruptors*. 63.
41. Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., Clark, G. and Newbold, R. R. 2002. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci***777**: 179-189.

42. Kalthoff, S., Winkler, A., Freiberg, N., Manns, M. P. and Strassburg, C. P. 2013. Gender matters: Estrogen receptor alpha (eralpha) and histone deacetylase (hdac) 1 and 2 control the gender-specific transcriptional regulation of human uridine diphosphate glucuronosyltransferases genes (ugt1a). *J Hepatol* **59**: 797-804.
43. Kamimura, H. 1986. Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by rhizopus sp. *Appl Environ Microbiol* **52**: 515-519.
44. Kaneda, N. and Yokokura, T. 1990. Nonlinear pharmacokinetics of cpt-11 in rats. *Cancer Res* **50**: 1721-1725.
45. Kayes-Wandover, K. M. and White, P. C. 2000. Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 2519-2525.
46. Klaassen, C. D. and Aleksunes, L. M. 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: Function and regulation. *Pharmacol Rev* **62**: 1-96.
47. Kobayashi, K., Abe, C., Endo, M., Kazuki, Y., Oshimura, M. and Chiba, K. 2017. Gender difference of hepatic and intestinal cyp3a4 in cyp3ahumanized mice generated by a human chromosome-engineering technique. *Drug Metab Lett* **11**: 60-67.
48. Komura, H. and Iwaki, M. 2011. In vitro and in vivo small intestinal metabolism of cyp3a and ugt substrates in preclinical animals species and humans: Species differences. *Drug Metab Rev* **43**: 476-498.
49. Kunishige, K., Kawate, N., Inaba, T. and Tamada, H. 2017. Exposure to zearalenone during early pregnancy causes estrogenic multitoxic effects in mice. *Reprod Sci* **24**: 421-427.
50. Kushari, J. and Mukherjea, M. 1980. Studies on beta-glucuronidase of the developing human placenta. *Gynecol Obstet Invest* **11**: 119-127.
51. Kutsukake, T., Furukawa, Y., Ondo, K., Gotoh, S., Fukami, T. and Nakajima, M. 2019. Quantitative analysis of udp-glucuronosyltransferase ugt1a and ugt2b mrna expression in the rat liver and small intestine: Sex and strain differences. *Drug Metab Dispos* **47**: 38-44.
52. Li, M., Yang, C., Mao, Y., Hong, X. and Du, D. 2019. Zearalenone contamination in corn, corn products, and swine feed in china in 2016-2018 as assessed by magnetic bead immunoassay. *Toxins (Basel)* **11**.
53. Lin, H. K., Jez, J. M., Schlegel, B. P., Peehl, D. M., Pachter, J. A. and Penning, T. M. 1997. Expression and characterization of recombinant type 2 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (hsd) from human prostate: Demonstration of bifunctional 3 alpha/17 beta-hsd activity and cellular distribution. *Mol Endocrinol* **11**: 1971-1984.
54. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
55. Mackenzie, P. I., Mojarrabi, B., Meech, R. and Hansen, A. 1996. Steroid udp glucuronosyltransferases: Characterization and regulation. *J Endocrinol* **150 Suppl**: S79-86.
56. Maeda, N., Tanaka, E., Suzuki, T., Okumura, K., Nomura, S., Miyasho, T., Haeno, S. and Yokota,

- H. 2013. Accurate determination of tissue steroid hormones, precursors and conjugates in adult male rat. *J Biochem* **153**: 63-71.
57. Malekinejad, H., Maas-Bakker, R. F. and Fink-Gremmels, J. 2005. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Vet Res* **36**: 799-810.
 58. Malekinejad, H., Maas-Bakker, R. and Fink-Gremmels, J. 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet J* **172**: 96-102.
 59. Malekinejad, H., Van Tol, H. T., Colenbrander, B. and Fink-Gremmels, J. 2006. Expression of 3alpha- and 3beta-hydroxy steroid dehydrogenase mrna in cocs and granulosa cells determines zearalenone biotransformation. *Toxicol In Vitro* **20**: 458-463.
 60. Mason, J. I., Ushijima, K., Doody, K. M., Nagai, K., Naville, D., Head, J. R., Milewich, L., Rainey, W. E. and Ralph, M. M. 1993. Regulation of expression of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenases of human placenta and fetal adrenal. *J Steroid Biochem Mol Biol* **47**: 151-159.
 61. Matsumoto, J., Yokota, H. and Yuasa, A. 2002. Developmental increases in rat hepatic microsomal udp-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect* **110**: 193-196.
 62. Miller, W. L. 1998. Early steps in androgen biosynthesis: From cholesterol to dhe. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **12**: 67-81.
 63. Mirocha, C. J., Pathre, S. V. and Robison, T. S. 1981. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet Toxicol* **19**: 25-30.
 64. Mitschke, D., Reichel, A., Fricker, G. and Moenning, U. 2008. Characterization of cytochrome p450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats. *Drug Metab Dispos* **36**: 1039-1045.
 65. Mottino, A. D., Hoffman, T., Jennes, L., Cao, J. and Vore, M. 2001. Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartum rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**: G1261-1273.
 66. Mueller, M., Atanasov, A., Cima, I., Corazza, N., Schoonjans, K. and Brunner, T. 2007. Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines. *Endocrinology* **148**: 1445-1453.
 67. Mukherjee, D., Royce, S. G., Alexander, J. A., Buckley, B., Isukapalli, S. S., Bandera, E. V., Zarbl, H. and Georgopoulos, P. G. 2014. Physiologically-based toxicokinetic modeling of zearalenone and its metabolites: Application to the jersey girl study. *PLoS One* **9**: e113632.
 68. Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H. and Yokota, H. 2010. Placental transfer of conjugated bisphenol a and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect* **118**: 1196-1203.
 69. Nishimoto, K., Nakagawa, K., Li, D., Kosaka, T., Oya, M., Mikami, S., Shibata, H., Itoh, H., Mitani, F., Yamazaki, T., Ogishima, T., Suematsu, M. and Mukai, K. 2010. Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *J Clin Endocrinol Metab* **95**: 2296-2305.

70. Noti, M., Corazza, N., Mueller, C., Berger, B. and Brunner, T. 2010. Tnf suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis. *J Exp Med* **207**: 1057-1066.
71. Nowak, K. W., Neri, G., Nussdorfer, G. G. and Malendowicz, L. K. 1995. Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex. *Life Sci* **57**: 833-837.
72. Nussey, S. and Whitehead, S. 2001. *In: Endocrinology: An integrated approach*, Oxford (in eng).
73. Olsen, M. 1989. Fusarium: Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity. *Elsevier Amsterdam*: 167-177.
74. Olsen, M., Pettersson, H. and Kiessling, K. H. 1981. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **48**: 157-161.
75. Oude Elferink, R. P., Meijer, D. K., Kuipers, F., Jansen, P. L., Groen, A. K. and Groothuis, G. M. 1995. Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. *Biochim Biophys Acta* **1241**: 215-268.
76. Pan, Y., Omori, K., Ali, I., Tachikawa, M., Terasaki, T., Brouwer, K. L. R. and Nicolazzo, J. A. 2018. Altered expression of small intestinal drug transporters and hepatic metabolic enzymes in a mouse model of familial alzheimer's disease. *Mol Pharm* **15**: 4073-4083.
77. Payne, A. H. and Hales, D. B. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* **25**: 947-970.
78. Pazirandeh, A., Xue, Y., Rafter, I., Sjoval, J., Jondal, M. and Okret, S. 1999. Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. *FASEB J* **13**: 893-901.
79. Pelletier, G., Li, S., Luu-The, V., Tremblay, Y., Bélanger, A. and Labrie, F. 2001. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome p450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome p450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads. *J Endocrinol* **171**: 373-383.
80. Pellock, S. J. and Redinbo, M. R. 2017. Glucuronides in the gut: Sugar-driven symbioses between microbe and host. *J Biol Chem* **292**: 8569-8576.
81. Pfeiffer, E., Hildebrand, A., Mikula, H. and Metzler, M. 2010. Glucuronidation of zearalenone, zeranol and four metabolites in vitro: Formation of glucuronides by various microsomes and human udp-glucuronosyltransferase isoforms. *Mol Nutr Food Res* **54**: 1468-1476.
82. Pfeiffer, E., Hildebrand, A., Damm, G., Rapp, A., Cramer, B., Humpf, H. U. and Metzler, M. 2009. Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro. *Mol Nutr Food Res* **53**: 1123-1133.
83. Prouillac, C., Koraichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Rodriguez, F., Baltas, M. and Lecoer, S. 2012. In vitro toxicological effects of estrogenic mycotoxins on human placental cells: Structure activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* **259**: 366-375.
84. Qiao, S., Okret, S. and Jondal, M. 2009. Thymocyte-synthesized glucocorticoids play a role in

- thymocyte homeostasis and are down-regulated by adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology* **150**: 4163-4169.
85. Qiao, S., Chen, L., Okret, S. and Jondal, M. 2008. Age-related synthesis of glucocorticoids in thymocytes. *Exp Cell Res* **314**: 3027-3035.
 86. Rainey, W. E., Rehman, K. S. and Carr, B. R. 2004. The human fetal adrenal: Making adrenal androgens for placental estrogens. *Semin Reprod Med* **22**: 327-336.
 87. Reddy, B. S., Engle, A., Simi, B. and Goldman, M. 1992. Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology* **102**: 1475-1482.
 88. Refojo, D., Liberman, A. C., Giacomini, D., Carbia Nagashima, A., Graciarena, M., Echenique, C., Paez Pereda, M., Stalla, G., Holsboer, F. and Arzt, E. 2003. Integrating systemic information at the molecular level: Cross-talk between steroid receptors and cytokine signaling on different target cells. *Ann NY Acad Sci* **992**: 196-204.
 89. Remage-Healey, L., London, S. E. and Schlinger, B. A. 2010. Birdsong and the neural production of steroids. *J Chem Neuroanat* **39**: 72-81.
 90. Righetti, L., Rolli, E., Galaverna, G., Suman, M., Bruni, R. and Dall'Asta, C. 2017. Plant organ cultures as masked mycotoxin biofactories: Deciphering the fate of zearalenone in micropropagated durum wheat roots and leaves. *PLoS One* **12**: e0187247.
 91. Rivory, L. P., Riou, J. F., Haaz, M. C., Sable, S., Vuilhorgne, M., Commercon, A., Pond, S. M. and Robert, J. 1996. Identification and properties of a major plasma metabolite of irinotecan (cpt-11) isolated from the plasma of patients. *Cancer Res* **56**: 3689-3694.
 92. Rost, D., Mahner, S., Sugiyama, Y. and Stremmel, W. 2002. Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**: G720-726.
 93. Saenz de Rodriguez, C. A., Bongiovanni, A. M. and Conde de Borrego, L. 1985. An epidemic of precocious development in puerto rican children. *J Pediatr* **107**: 393-396.
 94. Schneweis, I., Meyer, K., Engelhardt, G. and Bauer, J. 2002. Occurrence of zearalenone-4-beta-d-glucopyranoside in wheat. *J Agric Food Chem* **50**: 1736-1738.
 95. Schoental, R. 1983. Precocious sexual development in puerto rico and oestrogenic mycotoxins (zearalenone). *Lancet* **1**: 537.
 96. Shuster, D. L., Bammler, T. K., Beyer, R. P., Macdonald, J. W., Tsai, J. M., Farin, F. M., Hebert, M. F., Thummel, K. E. and Mao, Q. 2013. Gestational age-dependent changes in gene expression of metabolic enzymes and transporters in pregnant mice. *Drug Metab Dispos* **41**: 332-342.
 97. Simard, J., Ricketts, M. L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F. A. and Melner, M. H. 2005. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev* **26**: 525-582.
 98. Slominski, A. and Wortsman, J. 2000. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev* **21**: 457-487.
 99. Smith, T. K. 1982. Dietary influences on excretory pathways and tissue residues of zearalenone

- and zearalenols in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* **60**: 1444-1449.
100. Sperker, B., Backman, J. T. and Kroemer, H. K. 1997. The role of beta-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. *Clin Pharmacokinet* **33**: 18-31.
 101. St-Pierre, M. V., Stallmach, T., Freimoser Grundschober, A., Dufour, J. F., Serrano, M. A., Marin, J. J., Sugiyama, Y. and Meier, P. J. 2004. Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**: R1505-1516.
 102. Takasuna, K., Hagiwara, T., Hirohashi, M., Kato, M., Nomura, M., Nagai, E., Yokoi, T. and Kamataki, T. 1996. Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (cpt-11) in rats. *Cancer Res* **56**: 3752-3757.
 103. Talaber, G., Jondal, M. and Okret, S. 2013. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* **380**: 89-98.
 104. Taves, M. D., Gomez-Sanchez, C. E. and Soma, K. K. 2011. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: Evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**: E11-24.
 105. Tiemann, U., Tomek, W., Schneider, F. and Vanselow, J. 2003. Effects of the mycotoxins alpha- and beta-zearalenol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries. *Reprod Toxicol* **17**: 673-681.
 106. Tomaszewski, J., Miturski, R., Semczuk, A., Kotarski, J. and Jakowicki, J. 1998. [tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium]. *Ginek Pol* **69**: 363-366.
 107. Trayhurn, P., Drevon, C. A. and Eckel, J. 2011. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem* **117**: 47-56.
 108. Tsutsui, K., Ukena, K., Usui, M., Sakamoto, H. and Takase, M. 2000. Novel brain function: Biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci Res* **36**: 261-273.
 109. Turgeon, D., Carrier, J. S., Levesque, E., Hum, D. W. and Belanger, A. 2001. Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing ugt2b subfamily members. *Endocrinology* **142**: 778-787.
 110. Umeda, T., Hiramatsu, R., Iwaoka, T., Shimada, T., Miura, F. and Sato, T. 1981. Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin Chim Acta* **110**: 245-253.
 111. van Weerden, W. M., Bierings, H. G., van Steenbrugge, G. J., de Jong, F. H. and Schröder, F. H. 1992. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci* **50**: 857-861.
 112. Vining, R. F., McGinley, R. A., Maksvytis, J. J. and Ho, K. Y. 1983. Salivary cortisol: A better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* **20 (Pt 6)**: 329-335.
 113. Wang, G. M., Ge, R. S., Latif, S. A., Morris, D. J. and Hardy, M. P. 2002. Expression of 11beta-hydroxylase in rat leydig cells. *Endocrinology* **143**: 621-626.

114. Warth, B., Preindl, K., Manser, P., Wick, P., Marko, D. and Buerki-Thurnherr, T. 2019. Transfer and metabolism of the xenoestrogen zearalenone in human perfused placenta. *Environ Health Perspect* **127**: 107004.
115. Witaszak, N., Stepien, L., Bocianowski, J. and Waskiewicz, A. 2019. Fusarium species and mycotoxins contaminating veterinary diets for dogs and cats. *Microorganisms* **7**.
116. Yamazaki, M., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. 1996. Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharm Res* **13**: 497-513.
117. Yang, S., Zhang, H., Sun, F., De Ruyck, K., Zhang, J., Jin, Y., Li, Y., Wang, Z., Zhang, S., De Saeger, S., Zhou, J., Li, Y. and De Boevre, M. 2017. Metabolic profile of zearalenone in liver microsomes from different species and its in vivo metabolism in rats and chickens using ultra high-pressure liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **65**: 11292-11303.
118. Yeoh, C. C., Dabab, N., Rigby, E., Chhikara, R., Akaev, I., Gomez, R. S., Fonseca, F., Brennan, P. A. and Rahimi, S. 2018. Androgen receptor in salivary gland carcinoma: A review of an old marker as a possible new target. *J Oral Pathol Med* **47**: 691-695.
119. Zhao, F., Li, R., Xiao, S., Diao, H., Viveiros, M. M., Song, X. and Ye, X. 2013. Postweaning exposure to dietary zearalenone, a mycotoxin, promotes premature onset of puberty and disrupts early pregnancy events in female mice. *Toxicol Sci* **132**: 431-442.
120. Zielonka, L., Waskiewicz, A., Beszterda, M., Kostecki, M., Dabrowski, M., Obremski, K., Golinski, P. and Gajecki, M. 2015. Zearalenone in the intestinal tissues of immature gilts exposed per os to mycotoxins. *Toxins (Basel)* **7**: 3210-3223.
121. Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C. and Manes, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* **45**: 1-18.

英文要旨

The fate and role of conjugated metabolites of endogenous and exogenous substances.

Rakuno Gakuen University Graduate School of Veterinary Medicine
Department of Veterinary Medicine
Laboratory of Veterinary Biochemistry Takahiro Ieko

Drug metabolism is a metabolic reaction for decomposing and detoxifying endogenous substances, which are chemical substances that are no longer necessary in the body, and exogenous (xenobiotic) substances, such as drugs and toxic substances, by drug metabolizing enzymes and excreting them outside the body. The conjugation reaction, which is the phase II reaction of drug metabolism, plays an important role in excreting endogenous and exogenous substances. However, in recent years, it has become clear that conjugates of endogenous substances such as steroid-sulfates are not only excreted outside the body but also transported to various organs and used locally. This concern led us that the conjugate of the exogenous substances that should be excluded by the drug metabolism may be transported to the local organ without being excreted like endogenous substances. In this study, we focused on the steroids synthesis in the salivary glands as the endogenous substance and the mycotoxin zearalenone (ZON) as the exogenous substance, and examined the fate and role of the endogenous and exogenous substance conjugates.

In Chapter I, we clarified the possibility of steroidogenesis in the salivary gland using rat salivary gland homogenate. From the assay of enzymatic activities associated with steroidogenesis using rat salivary gland homogenate, we observed the enzymatic activities which produced corticosterone from pregnenolone and testosterone from androstenedione in the salivary gland was confirmed. The enzymatic expression to produce corticosterone was also observed in the tissue homogenates. Furthermore, it was shown that there is activity and expression of the enzyme that deconjugates pregnenolone sulfate in rat salivary gland. From the above results, it was clarified that local steroidogenesis can be performed in the salivary glands using pregnenolone sulfate as one of the steroid resources.

In Chapter II, we clarified the metabolic kinetics of ZON in the intestinal tract using rat everted intestines. Most of the ZON absorbed in the intestinal tract can be glucuronidated in the intestine and become zearalenone glucuronide (ZON-GA) and α -zearalenol glucuronide (α -ZOL-GA). ZON-GA and α -ZOL-GA were excreted mainly to the mucosal side in the proximal intestine, but more than half were transported to the serosal side in the distal intestine. From the above results, it was revealed that the ZON conjugate may be absorbed into the bloodstream in the intestinal tract.

In Chapter III, we clarified the metabolic kinetics of ZON in the liver using rat liver perfusion. It was shown that ZON flowing into the liver is metabolized mainly to ZON-GA or α -ZOL-GA in the liver. ZON-GA and α -ZOL-GA were excreted mainly in the bile in male and female rats, but were found to be easily excreted in the

venous side in pregnant rats. From the above results, it was suggested that ZON and ZOL conjugated in the liver may be transported to the target organ through the bloodstream.

This study revealed for the first time the possibility of local steroidogenesis in the salivary glands using pregnenolone sulfate as a substrate. It is also clarified that most of orally exposed ZON undergoes glucuronide metabolism in the intestine and liver, but there is a possibility that some ZON conjugates can be transported to the target organ by systemic circulation after released into the blood. The finding of the possibility for the conjugates of endogenous and exogenous substances to play a role in transporting chemicals to target local tissues is thought to contribute significantly to the fields of endocrinology and toxicology.