

平成 11 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括及び分担研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：

チトクローム P450 発現を指標として

（課題番号 H11-生活-024）

平成 12 年 4 月

主任研究者 出 川 雅 邦

（静岡県立大学薬学部）

平成 11 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括及び分担研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：

チトクローム P450 発現を指標として

（課題番号 H11-生活-024）

平成 12 年 4 月

主任研究者 出川 雅 邦

（静岡県立大学薬学部）

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：

チトクローム P450 発現を指標として

主任研究者 出川 雅邦 静岡県立大学 薬学部教授

研究要旨：内分泌かく乱作用をもつ PCB 類や重金属類（鉛）をラットやマウスに投与し、内分泌かく乱物質の代謝パターンや、ホルモン合成・分解に関わる数種のチトクローム P450 (P450) 分子種への影響を、それぞれ薬物代謝学的及び分子生物学的手法を用いて比較検討し、それぞれ測定した項目につき動物種差や臓器差があることを見出した。また同時に、これまでほとんどの臓器で発現し、かつ発現変動が少ないと考えられていたコレステロール合成に関わる P450 分子種 (CYP51) 酵素の遺伝子が、硝酸鉛投与時、変動することなどの新知見を得た。これらは、内分泌かく乱物質が代謝パターンや、ホルモン合成・分解酵素系を変動させること、さらに、その変動には動物種差があることを示している。また、グルココルチコイド (GC) に感受性をもつ遺伝子プロモーター (マウス乳ガンウイルス LTR 由来) をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) 上流に連結した発現プラスミドをラット線維芽細胞 3Y1 に導入した細胞株の樹立に成功し、これを利用して種々の植物より新規グルココルチコイド様作用化合物を見出した。その他の成果として、1) 数種の P450 分子種を発現・誘導するラット肝培養細胞株を見出したこと、2) ヒト組み換え P450 (CYP1A1/1A2 および CYP1B1) 発現系細胞を用いて、最近内分泌かく乱作用が懸念されているディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物の代謝活性化およびこれら化合物の P450 への影響を、主に *umu* 試験を用いて検索し、ディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物のいずれの代謝活性化にも、CYP1B1 が関与していることを明らかにしたこと、3) 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシシン (TCDD) の P450 酵素による代謝研究を行うに当たり、まずはじめに、TCDD およびその代謝物の分離・測定法および TCDD 代謝物の抽出法を確立し、次いで、本法がラット肝ミクロソームを酵素源とした場合の TCDD の代謝物の検出に有効であることを確認したことなどが挙げられる。

分担研究者 木村 良平  
静岡県立大学 教授  
根本 清光  
静岡県立大学 助手  
梅原 薫  
静岡県立大学 助手  
横井 毅  
金沢大学 教授

藤井 宏融  
呉大学 教授  
協力研究者 加藤 善久  
静岡県立大学 講師

A. 研究目的

これまでに、ステロイドホルモンの代謝（合成・分解）や内分泌かく乱物質などの外来化

化合物の代謝にはチトクローム P450 (以下 P450 と略す) を中心とした薬物代謝酵素が関わっていること、また、P450 をはじめとする薬物代謝酵素は、しばしば外来化合物の曝露で変動することやこの変動にはしばしば動物種差が見られること、さらにまた、TCDD や PCB などの代表的な内分泌かく乱物質には、P450 をはじめとする薬物代謝酵素を変動させる働きがあることなどが明らかにされている。したがって、内分泌かく乱物質による P450 分子種の変動と内分泌かく乱作用発現との関連性を把握できれば、P450 発現に関わる種々の細胞内因子を指標として、ヒトを含めた各動物種に対する危険性を的確に評価することが可能になると期待される。しかし、内分泌かく乱物質の P450 発現への影響や、その動物種差の解析はほとんど行われていない。そこで、本研究では、内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差を解明する一環として、「内分泌かく乱物質曝露時における種々動物での P450 発現の変動と内分泌かく乱作用との関連性」を追究する。また、これまで、内分泌かく乱物質の検索や同定は、主にエストロゲン様作用を指標に行われてきたが、生体の恒常性維持には、種々のホルモンが関与しており、1) 各ホルモンレセプターへの結合能、2) ホルモン感受性培養細胞に対する分化・増殖誘導能、および、3) ホルモン感受性遺伝子の発現などを指標にした検索、さらには、4) P450 発現への影響を検索することによって、より広範な内分泌かく乱物質の同定が可能になるとともに、動物種ごとのよりの確な危険度評価が可能になると期待される。

## B. 研究方法

### 1) 内分泌かく乱物質による P450 分子種発現への影響：動物種差

PCB のメチルスルホン代謝物には、肝臓のグルクロニルトランスフェラーゼ (UGT) 1A1 や 1A6 を誘導する作用があること、また、これによりチロキシン (T4) の代謝が亢進され、

血中 T4 濃度が低下することなどをすでに明らかにしてきている。このようにメチルスルホン代謝物に内分泌かく乱作用のある PCB 類では、その代謝パターンやこの代謝に関わる酵素の質的量的相違が、各動物のこれら内分泌かく乱物質に対する感受性の相違を支配する要因になると考えられる。そこで、2,2',4',5,5'-ペンタクロロピフェニール (CB101) および 2,2',3',4',5,6'-ヘキサクロロピフェニール (CB132) を試料として、ラットとマウスに投与した後の糞中および肝臓中の含硫代謝物量、P450 や UGT などの薬物代謝酵素活性をそれぞれ測定し、ラットとマウス間におけるそれらの種差を検討した。また、精巣におけるアンドロゲンの合成阻害や肝の増殖作用があることが知られている鉛イオン (硝酸鉛) を試料として、ラットの肝や精巣における薬物代謝酵素 (P450 分子種:CYP1A1/2, 3A1/3A2 など) やステロイドホルモン合成に関わる P450 分子種 (CYP51 や CYP11) の発現への影響を RT-PCR 法を用いて検討した。

### 2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

これまで、植物性内分泌かく乱物質としては、ゲニスチン、クメステロールなどの植物性エストロゲン様作用化合物が注目を浴び、多数の化合物が分離・同定されてきている。一方、植物成分にはその他のホルモン様作用化合物の存在も示唆されているが、それらについての詳細な研究は行われていない。そこで、本研究では、糖代謝のみならずストレスや中枢神経系機能の調節に深く関わる副腎皮質ホルモンのグルココルチコイド (GC) に着目し、様々な生薬・植物のエキスの粗画分を出発材料として、GC 様作用を有する化合物の検索および同定を以下の 2 方法を用いて行った。

i) 培養細胞 (M1 細胞) の分化誘導を指標とした検索法：GC によりマクロファージに分化誘導されるマウス骨髄性白血病由来 M1 細胞を用い、分化誘導作用 (食食能の誘導) を

指標にした測定。

ii) 遺伝子プロモーター活性を指標とする検索法：GC に感受性遺伝子プロモーター（マウス乳ガンウイルス LTR 由来）をレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）上流に連結した発現プラスミドをラット線維芽細胞 3Y1 に導入した細胞株を用いた測定。

### 3) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

P450 分子種の発現機構の解析には培養細胞を用いることが有利であるが、現在まで種々 P450 分子種を発現する培養細胞株は樹立されていない。そこで、まず、ラット肝初代培養細胞より樹立した培養肝細胞株を用いて各種 P450 分子種の発現・誘導能を検討した。また、硝酸鉛処理時の CYP51 分子種の発現変動を RT-PCR 法を用いて検討した。

### 4) P450 誘導を指標とする *in vitro* 毒性評価系の確立

ヒト組み換え P450 (CYP1A1/1A2 および CYP1B1) 発現系細胞を用いて、内分泌かく乱作用が懸念されているディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物の代謝活性化およびこれら化合物の P450 への影響を、主に *umu* 試験を用いて検索した。

### 5) ダイオキシン類の P450 酵素による代謝とその種差・性差の解析

2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD) の P450 酵素による代謝研究を行うに当たり、まずはじめに、TCDD およびその代謝物の分離・測定法および TCDD 代謝物の抽出法を検討した。

#### (倫理面への配慮)

P450 の発現制御機構に関する研究は、P450 を充分発現する培養細胞株が樹立されておらず、動物実験に依存しているのが現状である。本研究で、少なくともある種のラット P450 分子種については、既に樹立した肝培養細胞株で研究が可能となった。今後、ヒトを含め他

の動物の P450 発現研究についても、順次研究材料となりうる細胞株の樹立・検索を進め、実験動物に依存する研究を少なくしたいと考えている。

## C. 研究結果

### 1) 内分泌かく乱物質による P450 分子種発現への影響：動物種差

PCB 類や重金属類（鉛）などの内分泌かく乱物質をラットやマウスに投与し、内分泌かく乱物質の代謝パターンや、ホルモン合成・分解に関わる数種の P450 酵素への影響を、それぞれ薬物代謝学的及び分子生物学的手法を用いて比較検討し、それぞれ測定した項目につき動物種差や臓器差（肝及び精巣）があることを見出した。また同時に、これまでほとんどの臓器で発現し、かつ発現変動が少ないと考えられていたコレステロール合成に関わる CYP51 酵素の遺伝子が、硝酸鉛投与時、肝や精巣で変動することなどの新知見を得た。

### 2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

グルココルチコイド (GC) に感受性をもつ遺伝子プロモーター（マウス乳ガンウイルス LTR 由来等）をレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）上流に連結した発現プラスミドをラット線維芽細胞 3Y1 に導入した細胞株の樹立に成功し、これを利用して種々の植物より新規グルココルチコイド様作用化合物を見出した。

### 3) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

雄性 SD ラットの初代培養肝細胞より樹立した培養肝細胞株を用いて、数種の P450 分子種の発現状況を検索した結果、平常培養時には、CYP1A1、CYP2B1 および CYP51 の各分子種の発現が、また、タンパク質合成阻害剤のサイクロヘキシミド添加時には平常時に見られた P450 分子種に加え、*in vivo* 肝細胞で発現している CYP1A2、CYP3A1/3A2 および CYP2B2 の発現も起こった。また、硝酸鉛を添加し、培養すると *in vivo* 肝の場合と類似し

た CYP51 の発現増加が観察された。

#### 4) P450 誘導を指標とする *in vitro* 毒性評価系の確立

ヒト組み換え P450 (CYP1A1/1A2 および CYP1B1) 発現系細胞を用いて、内分泌かく乱作用が懸念されているディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物の代謝活性化およびこれら化合物の P450 への影響を、主に *umu* 試験を用いて検索し、ディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物のいずれの代謝活性化にも、CYP1B1 が関与することを明らかにした。

#### 5) ダイオキシン類の P450 酵素による代謝とその種差・性差の解析

ヒューレードパッカー社の HP5973 システムを用いた TCDD の至適分析条件を検討した。分析カラム；HP-5、分析温度；70-280 °C (15°C/min 昇温) が最適であり、検出限界は 1 pg (S/N:5) であった。また、TCDD およびその代謝物の反応系からの抽出溶媒にはジクロロメタンが最適であった。本抽出液の溶媒を除去後、ヘキサンで再溶解し、GC/MS に付することにより、TCDD 及びその代謝物の分離・測定が可能であると判断した。実際、本法をラット肝ミクロソームを酵素源とした場合の TCDD の代謝物の検出に応用し、本法が有効であることを確かめた。

### D. 考察

#### 1) 内分泌かく乱物質による P450 分子種発現への影響：動物種差

PCB 類 (CB101 や CB132) あるいは硝酸鉛をラットあるいはマウスに投与すると、PCB 類の代謝パターンや、ホルモン合成・分解に関わる酵素 (CYP51、CYP11、CYP1A、あるいは CYP3A) の発現量に変動し、そこには種差や臓器差が見られた。これらの結果は、内分泌かく乱物質曝露時の P450 酵素の発現変動の種差や臓器差が、内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差や臓器差を生む要因にな

っている可能性を示すものであり、現在さらに、種々の内分泌かく乱物質および動物を用いて、P450 の発現変動と内分泌かく乱との関連性を追究中である。

#### 2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

GC 様作用物質のルシフェラーゼ検索法を確立し、生薬・植物成分より種々の GC 様作用物質の存在を明らかにした。また、本法はこれまでの検索法より高感度で GC 様作用物質を測定できることが確かめられた。現在、本法を用いて、より広範な生薬・植物より GC 様作用物質の検索・同定を進めている。

#### 3) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

すでに樹立していたラット肝培養細胞の種々 P450 分子種の発現・誘導能を調べた結果、少なくとも数種の P450 分子種 (CYP1A、2B、3A および CYP51) については、*in vivo* 肝細胞と類似の発現・誘導が観察され、これら分子種についてはその発現制御機構の解明に有用なものになることが示された。

#### 4) P450 誘導を指標とする *in vitro* 毒性評価系の確立

ヒト CYP1B1 が、ディーゼル排気粉塵抽出物や芳香族ニトロ化合物の代謝活性化の代謝活性化に関わっていること、また、上記化合物のあるものには P450 の活性を阻害するものがあることが判明した。CYP1B1 は肝外臓器に多く発現していることが知られており、今後、本酵素の肝外臓器における発現と毒性発現との関連性を検討する。

#### 5) ダイオキシン類の P450 酵素による代謝とその種差・性差の解析

TCDD およびその代謝物の測定法を確立し、本法が TCDD の代謝研究に有用であることが確認された。今後、研究計画に沿ってヒトおよび種々の動物の各種 P450 酵素を用いて、TCDD 類の代謝における種差・性差を比較検討する。

## E. 結論

本年度の代表的な研究成果として、1) PCB 類や重金属類(鉛)の内分泌かく乱物質を種々の実験動物に投与し、内分泌かく乱物質の代謝パターンや、ホルモン合成・分解に関わる数種の P450 酵素への影響を調べ、それぞれ測定した項目につき動物種差や臓器を見出したこと、2) これまでほとんどの臓器で発現し、かつ発現変動が少ないと考えられていたコレステロール合成に関わる CYP51 酵素の遺伝子が、硝酸鉛投与時、変動することを見出したこと、及び 3) GC に応答性をもつ遺伝子プロモーター(マウス乳ガンウイルス LTR 由来)をレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)上流に連結した発現プラスミドを導入したラット線維芽細胞株の樹立に成功し、これを利用して種々の植物より新規グルココルチコイド様作用化合物を見出したことなどが挙げられる。本研究により、内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差が、期待通り内分泌かく乱物質曝露時の P450 酵素の発現変動の種差と関わっていること、また、植物成分には GC 様作用物質が多数含まれていることが示された。また、*in vitro* 試験系による P450 の発現制御機構の研究や、毒性評価系の確立のための研究も徐々に進展しており、今後、当初の計画に沿ってさらなる研究を推し進める。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. *Organohalogen Compounds*, **42**, 337-340 (1999).
2. Yoshihisa Kato, Kouichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Shinya Yumoto, Yoshito Masuda and Ryouhei Kimura. Reduction of serum thyroxine concentrations by methylsulfonyl metabolites of tetra, penta and hexachlorinated biphenyls in male Sprague

Dawley rats. *Chemosphere*, **40**, 1233-1240 (2000).

3. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda and Ryouhei Kimura. The induction of hepatic microsomal UDP-glucuronyl-transferase by the methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem. -Biol. Interact.*, **125**, 107-115 (2000).
2. 学会発表
  1. 吉本直樹, 並木雅幸, 宮田信吾, 根本清光, 橋本嘉幸, 出川雅邦: ラット培養肝細胞株における種々のチトクローム P450 分子種の発現. 第 6 回肝細胞研究会(東京), 抄録集, 3, p.104, 1999 年 6 月 5 日.
  2. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. 19th International Symposium on Halogenated Enviromental Organic Pollutants and POPs (Venice, Italy), 1999, Sep. 13.
  3. 渥美 宏, 梅原 薫, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた生薬中のグルココルチコイド様成分の検索. 日本生薬学会第 46 回大会(大阪), 要旨集, p.168, 1999 年 9 月 18 日.
  4. 加藤善久, 湯本信也, 新村康彦, 木村良平, 原口浩一, 増田義人: 2,2',4',5'-Tetrabromobiphenyl のメチルスルホン代謝物の薬物代謝誘導効果. 第 25 回環境トキシコロジーシンポジウム・第 3 回衛生薬学フォーラム合同大会(名古屋), 講演要旨集, p.118, 1999 年 10 月 21 日.
  5. 根本清光, 安本 勤, 宮田信吾, 村井詩, 出川雅邦: 硝酸鉛投与ラット肝での神経栄養因子およびその受容体の発現変動. 平成 11 年度日本薬学会東海支部会例会(名古屋), 要旨集, p. 25, 1999 年 12

月 4 日.

6. 梅原 薫, 渥美 宏, 宮瀬敏男, 野口博司, 根本清光, 出川雅邦: 植物起源のグルココルチコイド様物質の検索 (2). 日本薬学会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 2, p.57, 2000 年 3 月 29 日.
7. 吉本直樹, 今野芳浩, 根本清光, 出川雅邦: ラット肝細胞培養株を用いた CYP 分子種の発現機構の解明. 日本薬学会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 3, p.58, 2000 年 3 月 30 日.
8. 安本 勤, 宮田信吾, 根本清光, 根本文子, 村井 詩, 出川雅邦: 硝酸鉛による

ラット肝増殖誘発時の神経栄養因子及びその受容体遺伝子の発現変動. 日本薬学会第 120 年会 (岐阜), 要旨集 3, p.75, 2000 年 3 月 30 日.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：  
チトクローム P450 発現を指標として

分担研究課題：PCB 類の代謝：動物種差

分担研究者 木村 良平 静岡県立大学 薬学部教授

協力研究者 加藤 善久 静岡県立大学 薬学部講師

(以下の研究者との共同研究として行った)

出川 雅邦 静岡県立大学 薬学部教授 (主任研究者)

根本 清光 静岡県立大学 薬学部助手 (分担研究者)

研究要旨：既に、著者らは 9 種類の PCBs の 3-及び 4-メチルスルホン(3-及び 4-MeSO<sub>2</sub>)代謝物には、血清中甲状腺ホルモンの低下作用のあることを報告した。今回、これらの内 8 種類の MeSO<sub>2</sub>-PCBs は、肝臓の UGT1A1 及び UGT1A6 を誘導することにより、thyroxine (T<sub>4</sub>)の代謝を亢進し、血清中 T<sub>4</sub> 濃度の低下を引き起こすことを明らかにした。このように、MeSO<sub>2</sub> 代謝物に内分泌かく乱作用のある PCB では、PCB の代謝パターン及び肝薬物代謝酵素活性への影響の違いが、各動物種の内分泌かく乱作用発現において種差が表れる要因の一つと考えられる。そこで、2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (CB101)及び 2,2',3',4',5,6-hexachloro-biphenyl (CB132)をラット、マウスに腹腔内投与し、経時的に糞及び肝臓中含硫代謝物濃度、肝薬物代謝酵素活性を測定した。ラット、マウスに、CB101 及び CB132 投与後、兩種間の経時的な組織重量の変化に違いが認められた。また、各 PCB 投与後、未変化体及び MeSO<sub>2</sub> 代謝物の肝臓中濃度及び糞中排泄量に、ラット、マウス間に明らかな差異が認められた。各 PCB 投与後、第 1 相薬物代謝酵素誘導は、マウスよりラットにおいて顕著であり、UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A6、UGT2B1)、glutathione S-transferase (mu class、pi class)活性の増加割合は、ラット、マウスで異なっていた。

## A. 研究目的

PCB のメチルスルホン(MeSO<sub>2</sub>)代謝物は、多くの野生哺乳動物の組織や、我が国のカネミ油症患者及び健常人の血液、肝臓、肺及び脂肪組織、スウェーデン及びカナダの健常人の母乳から検出されている。これらの主な MeSO<sub>2</sub>-PCBs の化学構造は、2,5-位または 2,5,6-位に塩素置換基を有する PCB の 3 位または 4 位が MeSO<sub>2</sub> 化されたものであるが、これらの

生物活性や毒性についての研究はほとんど進められていない。著者らは、これまでに健常人の母乳及び肝臓に残留する PCB の 3-MeSO<sub>2</sub> 代謝物が、母化合物より数百倍強力なフェノバルビタール (PB)型のラット肝薬物代謝酵素誘導効果を有することを報告し、次いで 13 種類の MeSO<sub>2</sub>-PCBs を用いて、それらの PB 誘導性 P450 分子種 CYP2B1/2 の誘導作用の強さがそれらの化学構造と密接な相関があること

を明らかにした。さらに、*in vitro* の細胞間コミュニケーションに関する研究から、数種の 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 誘導体がラットにおいて肝発癌プロモーターとして作用することを示唆した。また、ヒトの母乳、肝臓及び脂肪組織中に比較的多く残留している 9 種類の PCBs の 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物 (Fig. 1) は、ラット血清中甲状腺ホルモン量を低下させる作用のあることを見出し、これらの MeSO<sub>2</sub> 代謝物が内分泌かく乱化学物質であることを明らかにした。

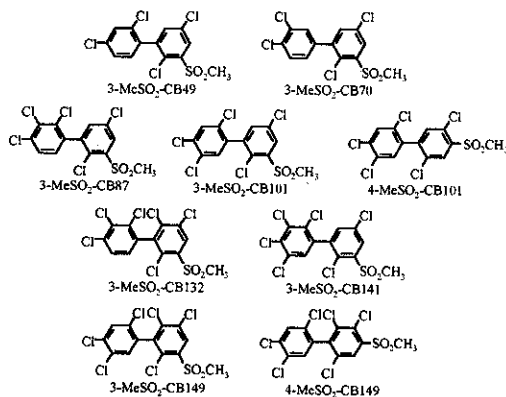


Fig. 1. Chemical structures of methyl sulfone derivatives of PCB congeners

そこで、Fig. 1 に示す MeSO<sub>2</sub>-PCBs の甲状腺ホルモン量の低下作用メカニズムを解明することから本研究を開始した。前述した PCB の MeSO<sub>2</sub> 代謝物のように、化学物質の野生生物及びヒトにおける内分泌かく乱作用は、生体内で活性代謝物が生成し、これらの代謝物が内分泌かく乱作用を引き起こしていることも十分に考えられる。MeSO<sub>2</sub> 代謝物を生成する PCB の場合、PCB の代謝パターンあるいは肝薬物代謝酵素に与える影響の違いが、各動物種の内分泌かく乱作用発現の種差の要因の一つと考えられる。そこで、本研究では、PCB の MeSO<sub>2</sub> 体への代謝能及び PCB 投与による肝薬物代謝酵素活性の変動の種差と各動物における内分泌かく乱との関連性を追求することを目的とする。本研究から得られる成果は、行政機関の内分泌かく乱化学物質対策に寄与する重要な資料となり、国民の健康の維持に、かつ野生生物の保護に貢献できるものと確信する。

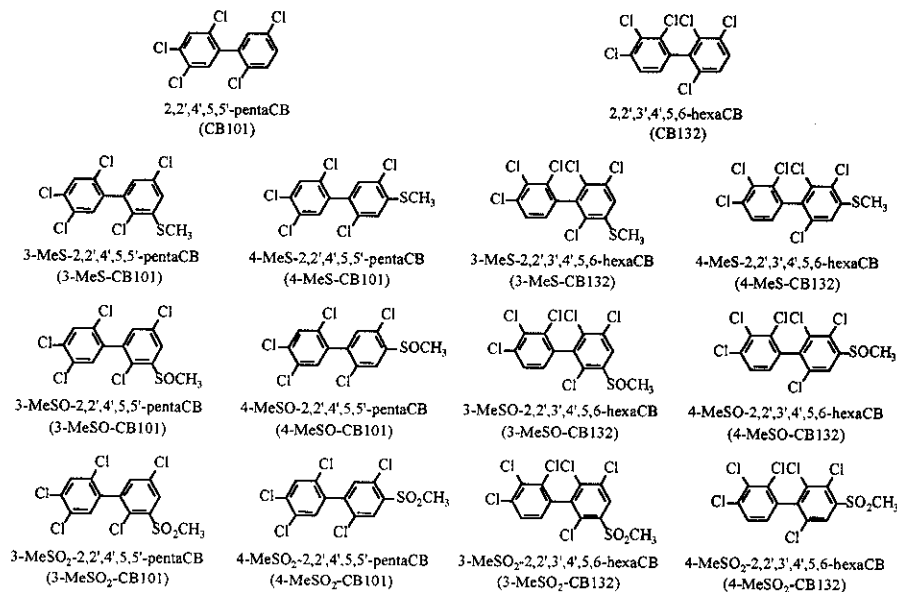


Fig. 2. Chemical structures of PCB congeners and their sulfur containing derivatives

## B. 研究方法

1) MeSO<sub>2</sub>-PCBs の甲状腺ホルモン量の低下作用メカニズムの解明に関する実験

動物は Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重

180~200 g) を用いた。MeSO<sub>2</sub>-PCBs 20 μmol/kg を 1 日 1 回 4 日間腹腔内に反復投与した。最終投与後 7 日に屠殺し、肝ミクロゾームの総 cytochrome P450 量、第 1 相薬物代謝酵素 (7-

benzyloxyresorufin *O*-dealkylase (BROD)、7-pentoxyresorufin *O*-dealkylase (PROD)、7-ethoxyresorufin *O*-dealkylase (EROD))活性及び4-nitrophenol (4-NP)、4-methylumbelliferone (4-MU)、chloramphenicol (CP)及び thyroxine ( $T_4$ )を基質とした時の UDP-glucuronosyl-transferase (UDP-GT)活性を測定した。

## 2) PCB の代謝パターンと PCB 投与による肝薬物代謝酵素活性の変動の種差に関する実験

2,2',4',5,5'-Pentachlorobiphenyl (CB101)及び2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl (CB132) (Fig. 2)各 342  $\mu\text{mol/kg}$  を、Wistar 系雄性ラット (体重 150~200 g)、ddy 系雄性マウス (体重 27~35 g)に一回腹腔内投与し、経時的に糞を採取した。また、投与後 1、2、4、8 日に屠殺し、脳、下垂体、胸腺、肺、肝臓、腎臓、副腎及び精巣を摘出し、各組織重量を測定した。糞及び肝臓中の未変化体、メチルスルフィド (MeS)、メチルスルフォキシド (MeSO)及び  $\text{MeSO}_2$  代謝物 (Fig. 2)濃度を測定し、肝ミクロゾームの第 1 相薬物代謝酵素活性及び UDP-GT 活性、肝可溶性画分の 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)、1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB)、ethacrynic acid (EA)及び 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane (EPNP)を基質とした時の glutathione *S*-transferase (GST)活性を測定した。

### (倫理面への配慮)

本研究では、*in vivo* での代謝及び薬物代謝酵素活性の変動の種差を再現しうる培養系細胞あるいはそれに代わる実験系がないため、やむを得ず実験動物を使用した。その使用数は最小限にとどめ、実験動物に対して苦痛を与えない十分な配慮をした。

## C. 研究結果

### 1) $\text{MeSO}_2$ -PCBs の甲状腺ホルモン量の低下作用メカニズムの解明

7 種類の 3- $\text{MeSO}_2$  誘導体、すなわち、3- $\text{MeSO}_2$ -CB49、3- $\text{MeSO}_2$ -CB70、3- $\text{MeSO}_2$ -CB87、3- $\text{MeSO}_2$ -CB101、3- $\text{MeSO}_2$ -CB132、3- $\text{MeSO}_2$ -

CB141 及び 3- $\text{MeSO}_2$ -CB149 ( $\text{MeSO}_2$  誘導体は、PCB の IUPAC number に  $\text{MeSO}_2$  基を付して示す)投与により、総 cytochrome P450 量は約 2 倍の、PROD (CYP2B1/2)活性は 28~55 倍の増加が観察された。また、3- $\text{MeSO}_2$ -CB49、3- $\text{MeSO}_2$ -CB87、3- $\text{MeSO}_2$ -CB101 及び 3- $\text{MeSO}_2$ -CB132 投与により、EROD (CYP1A1/2)活性は 1.4~7 倍の上昇が認められた。一方、2 つの 4- $\text{MeSO}_2$ -PCBs、すなわち、4- $\text{MeSO}_2$ -CB101、4- $\text{MeSO}_2$ -CB149 はいずれの第 1 相薬物代謝酵素活性にも変化を与えなかった。

今回検討した全ての 3-及び 4- $\text{MeSO}_2$  誘導体投与により、CP を基質とした場合の UDP-GT (UGT2B1)活性は、68~452%の有意な上昇が認められた (Fig. 3)。7 種類の 3- $\text{MeSO}_2$  誘導体及び 4- $\text{MeSO}_2$ -CB101 投与後に、4-NP を基質として用いた場合の UDP-GT (UGT1A6)活性は 44~317%の有意な増加が、また、4-MU を基質とした場合の UDP-GT (UGT1A6)活性は 50~244%の有意な増加が認められた。 $T_4$  を基質とした時の UDP-GT 活性は、7 種類の 3- $\text{MeSO}_2$  誘導体及び 4- $\text{MeSO}_2$ -CB101 投与により有意な増加が認められた (Fig. 4)。一方、4- $\text{MeSO}_2$ -CB149 投与では 4-NP、4-MU-及び  $T_4$ -UDP-GT 活性に変化は全く認められなかった (Figs. 3 and 4)。

既に報告 (Kato *et al.*, *Arch. Toxicol.*, **72**, 541-544 1998, Kato *et al.*, *Toxicol. Sci.*, **48**, 51-54 1999) した 9 種類の  $\text{MeSO}_2$ -PCBs 投与後の血清中 total  $T_4$ 、total triiodothyronine (total  $T_3$ )及び thyroid stimulating hormone (TSH) 濃度と今回得られた肝ミクロゾームの総 cytochrome P450 量、薬物代謝酵素活性及び UDP-GT 活性との関係について検討を行った。最終投与後 3 日の血清中 TSH 濃度と最終投与後 7 日の肝総 cytochrome P450 量、PROD (CYP2B1/2)活性及び CP を基質とした UDP-GT (UGT2B1)活性との間に有意な相関(相関係数  $r=0.788$ ,  $P<0.01$ 、 $r=0.796$ ,  $P<0.01$  及び  $r=0.833$ ,  $P<0.01$ ,  $n=10$ )が認められた。しかし、TSH 濃度と EROD (CYP1A1/2)活性あるいは 4-NP-及び 4-MU-

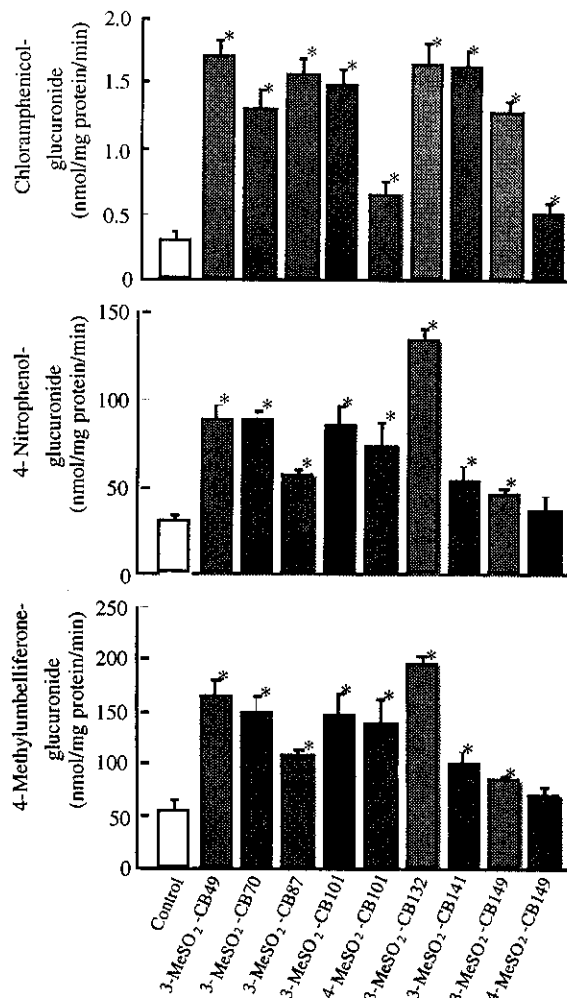


Fig. 3. Effects of MeSO<sub>2</sub> derivatives of PCBs on UDP-glucuronosyltransferase activities of liver microsomes in rats. MeSO<sub>2</sub>-PCBs (20 μmol/kg) were given i.p. to rats once daily for four days and the rats were killed seven days after final administration. Results are expressed as the mean ± S.E. for four to eight animals. \*P<0.05, significantly different from the control.

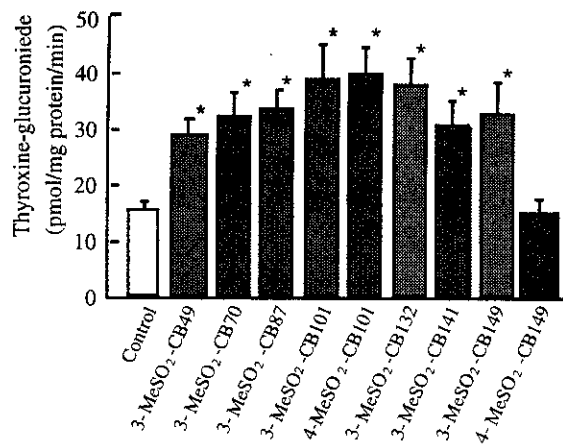


Fig. 4. Effects of MeSO<sub>2</sub> derivatives of PCBs on UDP-glucuronosyltransferase activity toward thyroxine of liver microsomes in rats. The experimental condition was the same as described in the legend to Fig. 3. Results are expressed as the mean ± S.E. for four to ten animals. \*P<0.05, significantly different from the control.

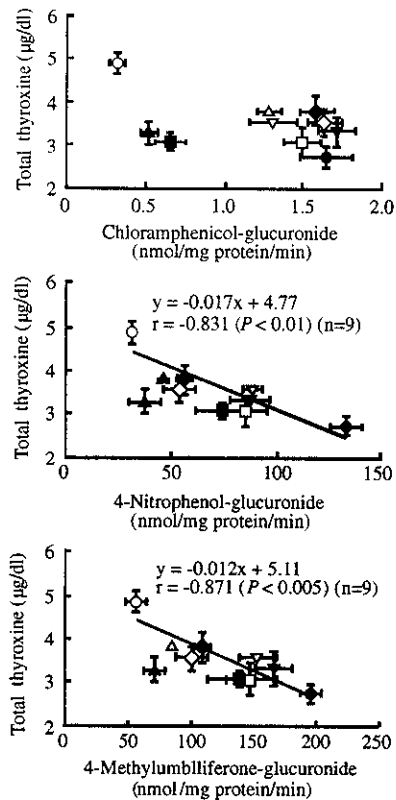


Fig. 5. Correlations between hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase activities and serum total thyroxine concentration in MeSO<sub>2</sub>-PCB derivative-administered rats. ○, Control; ▼, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB49; ▽, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB70; ◆, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB87; □, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB101; ■, 4-MeSO<sub>2</sub>-CB101; ●, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB132; ◇, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB141; △, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB149; ▲, 4-MeSO<sub>2</sub>-CB149. The data of T<sub>4</sub> concentrations in MeSO<sub>2</sub>-PCB derivative-administered rats cited from our previous papers (*Arch. Toxicol.*, 72 541-544 1998, *Toxicol. Sci.*, 48 51-54 1999). Each point represents the mean ± S.E. (vertical bars) for four to eight animals. Regression line was calculated from nine points except the point of 4-MeSO<sub>2</sub>-CB149 (▲).

UDP-GT (UGT1A6)活性との間には相関は認められなかった。4-MeSO<sub>2</sub>-CB149 (4-NP-及び 4-MU-UDP-GT 活性に変化を示さなかった)を除いた9化合物の最終投与後2日の血清中 total T<sub>4</sub> 濃度と最終投与後7日の4-NP及び4-MUを基質としたUDP-GT (UGT1A6)活性との間に、有意な相関( $r=0.831$ ,  $P<0.01$  及び  $r=0.871$ ,  $P<0.005$ ,  $n=9$ )が認められた (Fig. 5)。しかし、血清中 total T<sub>4</sub>濃度とCPを基質としたUDP-GT (UGT2B1)活性との間に相関は認められなかった (Fig. 5)。さらに、4-MeSO<sub>2</sub>-CB149を除いた9化合物の最終投与後7日の血清中 total T<sub>4</sub> 濃度と肝臓の T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性との間に有意な相関 ( $r=0.784$ ,  $P<0.02$ ,  $n=9$ )が認められた (Fig. 6)。

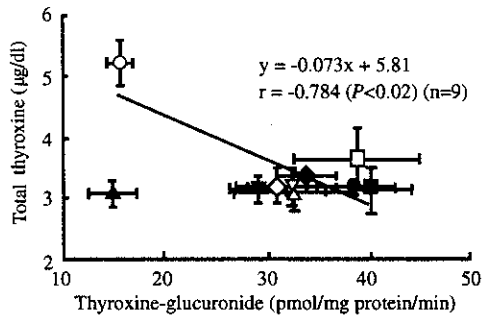


Fig. 6. Correlation between hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity toward thyroxine and serum total thyroxine concentration in MeSO<sub>2</sub>-PCB derivative-administered rats. ○, Control; ▼, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB49; ▽, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB70; ◆, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB87; □, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB101; ■, 4-MeSO<sub>2</sub>-CB101; ●, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB132; ◇, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB141; △, 3-MeSO<sub>2</sub>-CB149; ▲, 4-MeSO<sub>2</sub>-CB149. The data of T<sub>4</sub> concentrations in MeSO<sub>2</sub>-PCB derivative-administered rats cited from our previous papers (*Arch. Toxicol.*, 72 541-544 1998, *Toxicol. Sci.*, 48 51-54 1999). Each point represents the mean ± S.E. (vertical bars) for four to eight animals. Regression line was calculated from nine points except the point of 4-MeSO<sub>2</sub>-CB149 (▲).

## 2) PCB の代謝パターンと PCB 投与による肝薬物代謝酵素活性の変動の種差

ラットに CB101 を投与すると、投与後 2、8 日に肝臓及び腎臓重量の増加、2 日に精巣重量の低下が認められた (Fig. 7)。マウスに CB101 を投与すると、4 日目に脳重量の増加、

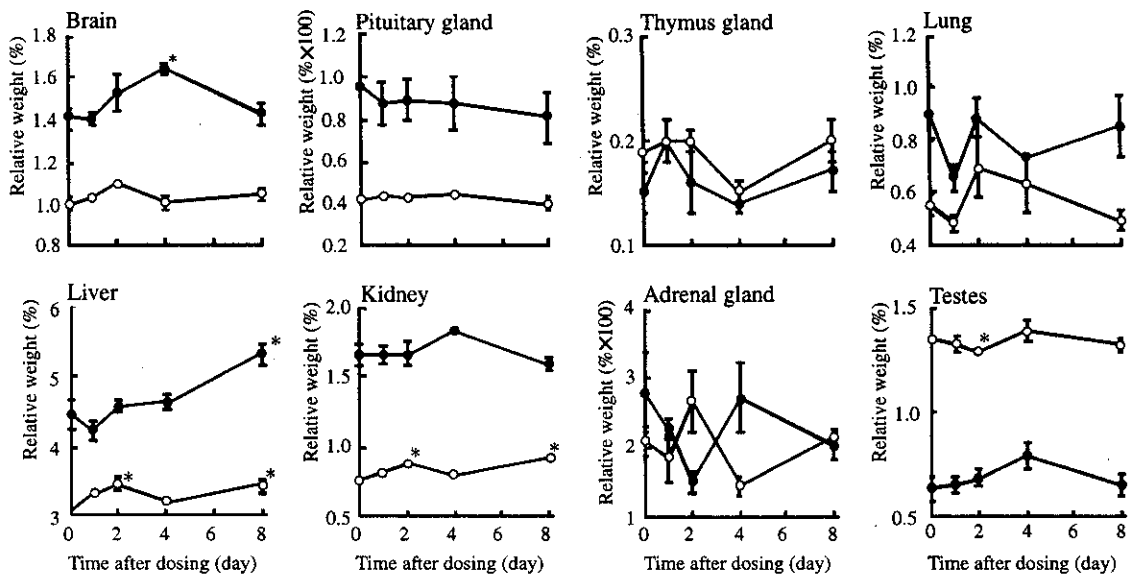


Fig. 7. Relative tissue weights after the administration of CB101 to rats and mice. Animals were given CB101 (342 µmol/kg) i.p. and killed at the appropriate times after the administration. Each point represents the mean ± S.E. (vertical bars) for two to four animals. \*  $P < 0.05$ , significantly different from the corresponding control. —○—: Rats, —●—: mice.

8 日目に肝臓重量の増加が認められた。また、CB132 をラットに投与すると、投与後 4、8 日に肺重量、2 日に肝臓重量、2~8 日に腎臓重量の増加が観察された (Fig. 8)。CB132 投与マウスでは、4 日から 5 日にかけて全例 (3 匹) が死亡した。この死亡前あるいは死亡時に、胸腺重量の低下、肺、肝臓、腎臓重量の顕著な増加が認められた。

マウスに CB101 投与後 1 日に、肝臓中未変化体濃度は最高となり、以後急激に減少した (Fig. 9)。この時、投与後 4 日にピークとなる 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物の生成及び残存が認められた。一方、ラットに CB101 投与後、肝臓中未変化体濃度は、マウスに CB101 投与後の肝臓中未変化体濃度より低く、ラットの肝臓中 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物の生成もマウスの肝臓中両 MeSO<sub>2</sub> 代謝物濃度に比べ低かった。また、ラット、マウスに CB132 を投与すると、CB101 投与時の肝臓中未変化体及び 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物濃度と類似した結果が観察された (Fig. 10)。CB132 投与後、マウスの肝臓中未変化体濃度は 2 日目から急激に減少した。一方、肝臓中 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物はマウスの死亡時まで生成量の増加が認められた。

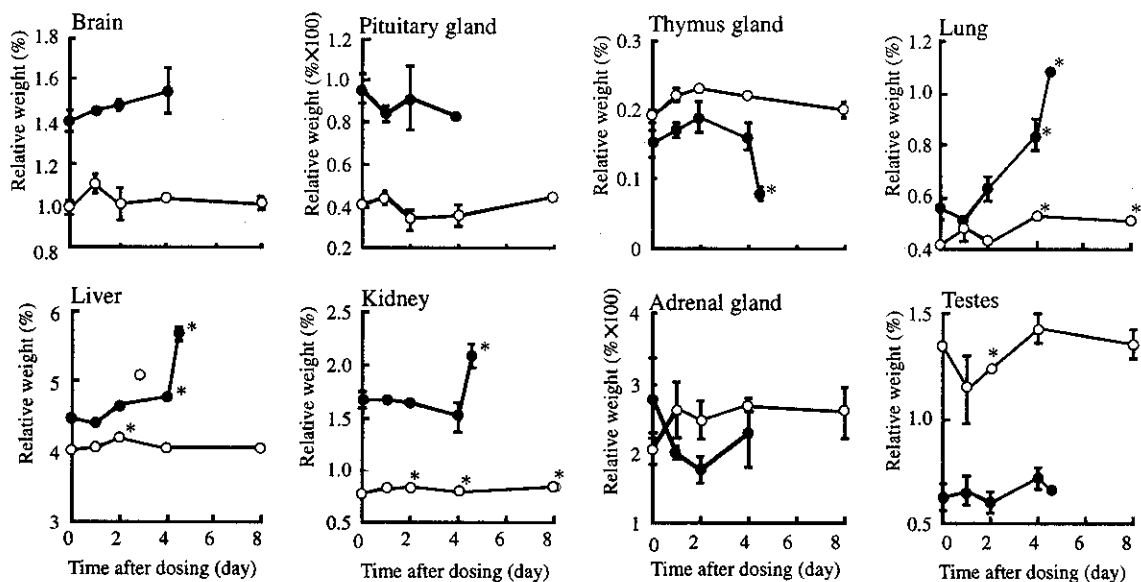


Fig. 8. Relative tissue weights after the administration of CB132 to rats and mice. Animals were given CB132 (342  $\mu\text{mol/kg}$ ) i.p. and killed at the appropriate times after the administration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for two to four animals. \* $P < 0.05$ , Significantly different from the corresponding control.  $\circ$ —:Rats,  $\bullet$ —:mice.

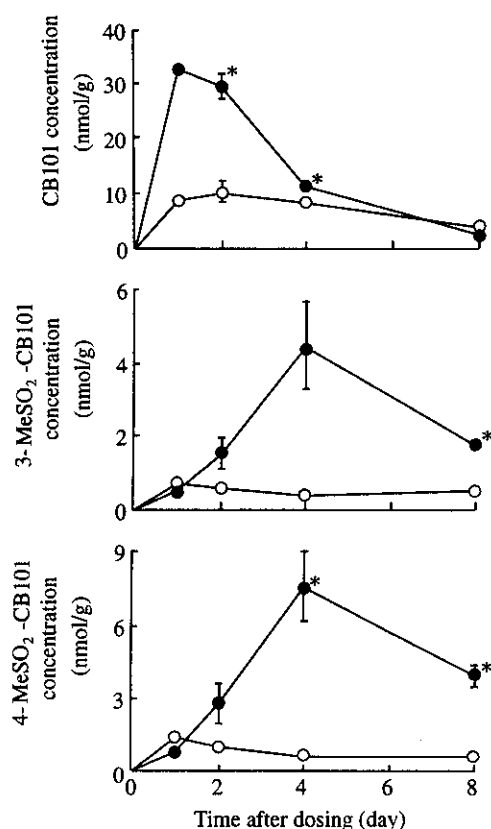


Fig. 9. Time courses of liver concentrations of CB101, and its 3- and 4-MeSO<sub>2</sub> metabolites after the administration of CB101 to rats and mice. The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 7. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for one to three animals. \* $P < 0.05$ , significantly different from the corresponding value of rats.  $\circ$ —:Rats,  $\bullet$ —:mice.

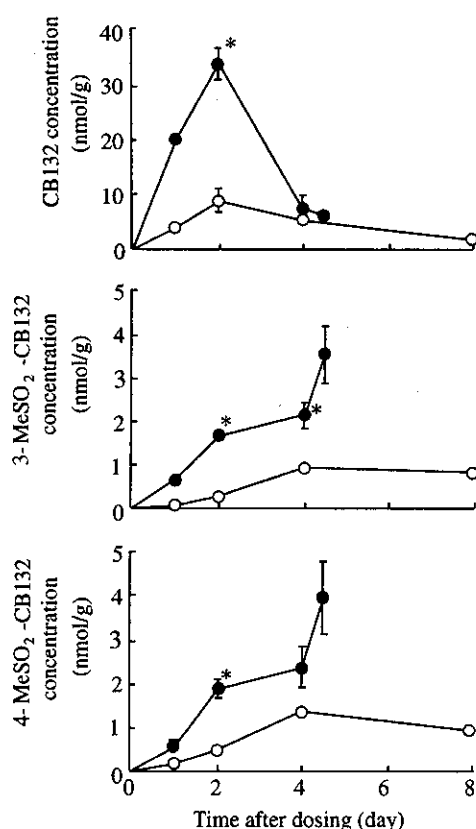


Fig. 10. Time courses of liver concentrations of CB132, and its 3- and 4-MeSO<sub>2</sub> metabolites after the administration of CB132 to rats and mice. The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 8. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for one to three animals. \* $P < 0.05$ , significantly different from the corresponding value of rats.  $\circ$ —:Rats,  $\bullet$ —:mice.

両動物に CB101 投与後 8 日迄の、投与量に対する未変化体の糞中排泄量の割合は、ラットでは 1.9%、マウスでは 0.74%であった (Fig. 11)。また、CB101 の 3-MeS 代謝物の糞中排泄割合は、ラットでは 0.3%、マウスでは 0.6%であった。一方、4-MeS 代謝物の排泄割合は、ラットでは 2%、マウスでは 1.3%であり、3-MeS 代謝物よりかなり多かった。また、マウスにおける CB101 の 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物の排泄割合は、ラットの場合より 5~15 倍多く、それぞれ 0.1、0.23%であった。一方、両動物に CB132 投与後、投与量に対する未変化体の糞中排泄量の割合は、ラットでは 0.26% (8 日迄)、マウスでは 0.48% (死亡時迄)であった (Fig. 12)。ラットにおける CB132 の両 MeS 代謝物の糞中排泄割合は、マウスのそれらより大きかったが、両 MeSO<sub>2</sub> 代謝物の排泄は、マウスにおいてラットより 48 時間先行していた。また、ラット、マウスに各 PCB 投与において、糞中に MeSO 代謝物の排泄は、観察されなかった (Figs. 11 and 12)。

ラット、マウスに CB101 を投与すると、BROD、PROD 及び EROD 活性は有意に増加し、投与後 8 日にこれら 3 種の酵素活性は、ラットではそれぞれ 34 倍、16 倍及び 1.7 倍に、マウスではそれぞれ 11 倍、6 倍及び 1.3 倍になった (Fig. 13)。ラットに CB132 を投与すると、BROD 及び PROD 活性は 1 日目及び 4 日目に 2 相性の有意な増加が認められ、マウスに CB132 を投与すると、両酵素活性は 4 日目に最大になった (Fig. 14)。両動物において、CB132 投与では EROD 活性の増加は認められなかった。

ラットにいずれの PCB 投与においても、CP を基質とした時の UDP-GT 活性は、投与後 2~8 日に有意な増加が認められた。また、4-NP を基質とした時のラットの UDP-GT 活性は CB101 投与後 8 日に、CB132 投与後 1 日にわずかに上昇した。一方、マウスに各 PCB を投与した時には、両基質の UDP-GT 活性に変化が認められなかった。

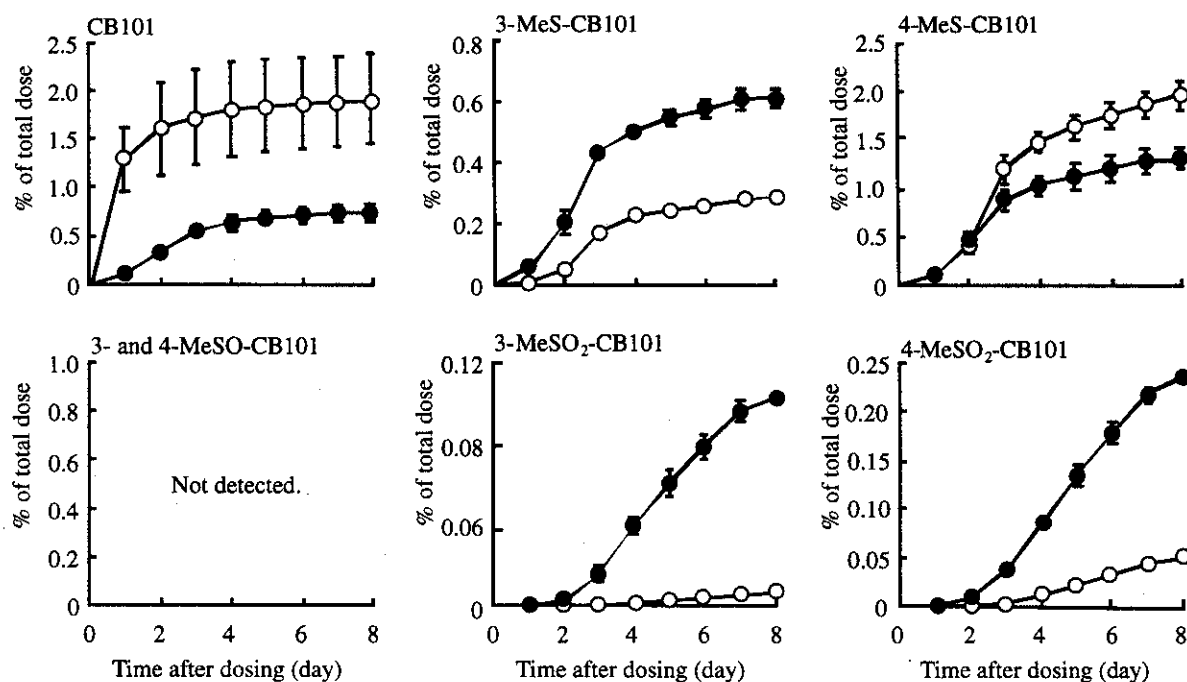


Fig. 11. Fecal excretions of CB101 and its sulfur containing metabolites after the administration of CB101. Animals were given CB101 (342  $\mu$ mol/kg) i.p. and killed 8 days after the administration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for two to three animals.  $\circ$ —Rats,  $\bullet$ —mice.

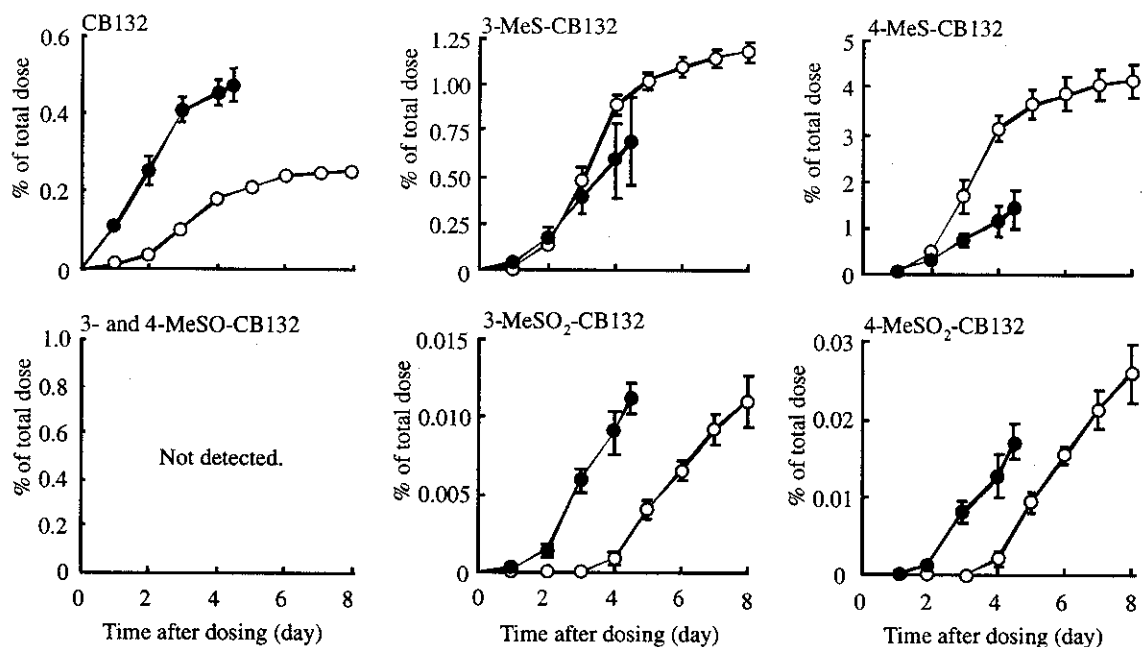


Fig. 12. Fecal excretions of CB132 and its sulfur containing metabolites after the administration of CB132. Animals were given CB132 (342  $\mu\text{mol/kg}$ ) i.p. and killed 8 days after the administration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for three animals.  $\circ$ —:Rats,  $\bullet$ —:mice.

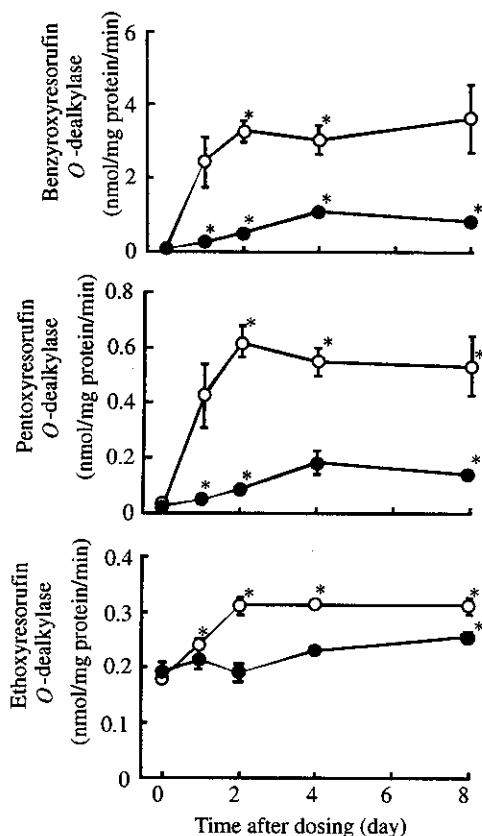


Fig. 13. Effects of CB101 on the activities of drug-metabolizing enzymes of hepatic microsomes in rats and mice. The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 7. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for one to four animals. \*  $P < 0.05$ , significantly different from each control.  $\circ$ —:Rats,  $\bullet$ —:mice.

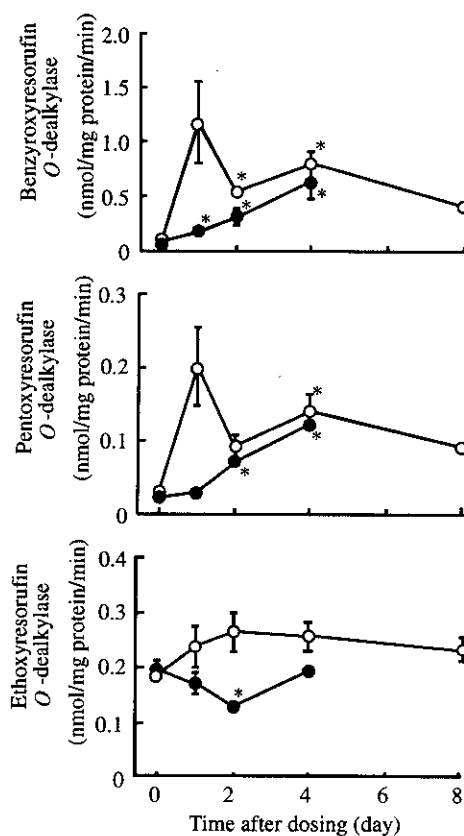


Fig. 14. Effects of CB132 on the activities of drug-metabolizing enzymes of hepatic microsomes in rats and mice. The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 8. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (vertical bars) for one to four animals. \*  $P < 0.05$ , significantly different from each control.  $\circ$ —:Rats,  $\bullet$ —:mice.



ラットに CB101 を投与した時、CDNB を基質に用いた total GST 活性は、わずかな上昇を示したが、CB132 を投与した時、この活性には変化が認められなかった。マウスに各 PCB を投与すると、この GST 活性は上昇傾向を示した。ラット、マウスに各 PCB を投与した時、DCNB を基質に用いた mu class の GST 活性は、ラットよりマウスに顕著な上昇が認められた。また、EPNP を基質に用いた pi class の GST 活性は、各 PCB 投与により、マウスにのみ有意な上昇あるいは上昇傾向が認められた。しかし、EA を基質に用いた GST 活性は、両動物に各 PCB 投与において変化は認められなかった。

#### D. 考察

1) MeSO<sub>2</sub>-PCBs の甲状腺ホルモン量の低下作用メカニズムの解明

7 種類の 3-MeSO<sub>2</sub> 誘導体 20 μmol/kg を 4 日間連続投与すると、総 cytochrome P450 量、PROD (CYP2B1/2) 活性は、既報 (Kato *et al.*, *Chem.-Biol. Interact.*, **95**, 257-268 1995, Kato *et al.*, *Chem.-Biol. Interact.*, **95**, 269-278 1995, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **3**, 137-144 1997) の単回投与の増加割合を上回る増加、及び PB に類似した誘導パターンを示した。また、これらの 3-MeSO<sub>2</sub> 誘導体は、CP(UGT2B1)-、4-NP(UGT1A6)-、4-MU(UGT1A6)-及び T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性を有意に増加した。これらの結果は、3-MeSO<sub>2</sub>-PCBs が第 1 相薬物代謝酵素の PB 型誘導剤であることを支持している。さらに、3-MeSO<sub>2</sub>-PCBs が第 2 相薬物代謝酵素、UDP-GT の内、UGT2B1 (phenobarbital-inducible UGT) に加え、UGT1A6 (phenol UGT) を誘導することを示すものである。

一方、4-MeSO<sub>2</sub>-CB101 及び 4-MeSO<sub>2</sub>-CB149 の 2 つの 4-MeSO<sub>2</sub> 誘導体は、20 μmol/kg を 4 日間連続投与した場合でも、単回投与の場合と同様に、総 cytochrome P450 量、PROD 及び EROD 活性に変化を示さなかった。4-MeSO<sub>2</sub>-CB149 は CP-UDP-GT 活性にわずかな増加を

示したが、4-NP-、4-MU-及び T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性には変化を示さなかった。しかし、4-MeSO<sub>2</sub>-CB101 は、CP、4-NP-及び 4-MU-UDP-GT 活性を増加し、UGT2B1 及び UGT1A6 を誘導することが明らかとなった。

MeSO<sub>2</sub>-PCBs 投与後の血清中 TSH 濃度 (最終投与後 3 日) と肝総 cytochrome P450 量、PROD (CYP2B1/2) 及び CP-UDP-GT (UGT2B1) 活性 (最終投与後 7 日) との間に、有意な相関が認められた。この結果は、MeSO<sub>2</sub>-PCBs による血清中 TSH 濃度の変動に、PB 誘導性 cytochrome P450 分子種 (CYP2B1/2) 及び UDP-GT 分子種 (UGT2B1) が関与していることを示唆している。

9 種類の MeSO<sub>2</sub>-PCB の血清中甲状腺ホルモン濃度に対する影響と肝薬物代謝酵素誘導との関係について検討したところ、4-MeSO<sub>2</sub>-CB149 を除いた MeSO<sub>2</sub>-PCBs 投与後の血清中 T<sub>4</sub> 濃度 (最終投与後 2 日) と 4-NP-及び 4-MU-UDP-GT (UGT1A6) 活性 (最終投与後 7 日) との間に、有意な相関が認められた。T<sub>4</sub> を代謝する UDP-GT の分子種は、UGT1A1 及び UGT1A6 であることから、血清中 T<sub>4</sub> 濃度と T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性との関係を検討した。4-MeSO<sub>2</sub>-CB149 を除いた MeSO<sub>2</sub>-PCBs を投与した後の血清中 total T<sub>4</sub> 濃度と T<sub>4</sub>-UDP-GT 活性との間に、有意な相関が認められた。この結果は、3-MeSO<sub>2</sub>-PCBs と 4-MeSO<sub>2</sub>-CB101 は、肝臓の UGT1A1 及び UGT1A6 を誘導して T<sub>4</sub> の代謝を亢進し、グルクロン酸抱合された T<sub>4</sub> が胆汁排泄されることにより、血清中 T<sub>4</sub> 濃度の低下を引き起こすことを示している。また、4-MeSO<sub>2</sub>-CB149 投与後の血清中 T<sub>4</sub> 濃度の低下は、他の MeSO<sub>2</sub> 誘導体とは異なり、甲状腺に直接作用することがその主因である可能性がある。

2) PCB の代謝パターンと PCB 投与による肝薬物代謝酵素活性の変動の差

ラットとマウスでは、CB101 投与後の脳、胸腺、腎臓及び副腎重量の増加程度が異なる傾向があった。一方、CB132 投与の場合には

マウスの胸腺、肺、肝臓、腎臓及び副腎重量はラットと異なる異常な増加あるいは減少が認められた。

CB101 及び CB132 投与後、肝臓中未変化体濃度の減少、3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物濃度の増加に、ラット、マウス間に明らかな差異が認められた。両動物に CB101 投与後、マウスにおける肝臓中 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物濃度は、ラットのそれより高いことは、マウスにおける糞中両 MeSO<sub>2</sub> 代謝物の排泄量が、ラットのそれらより多いことと一致し、CB101 の 3-及び 4-MeSO<sub>2</sub> 代謝物の生体内での生成は、ラットよりマウスの方がかなり多いと考えられる。また、CB132 投与マウスにおける肝臓中両 MeSO<sub>2</sub> 代謝物濃度の急激な増加は、経時的な両 MeSO<sub>2</sub> 代謝物の糞中排泄量の増加と一致している。また、CB132 投与マウスは全て死亡したことから、CB132 のマウスへの毒性は強いが、肝臓中 MeSO<sub>2</sub> 代謝物濃度の上昇が、死亡を引き起こした原因と深く関連しているものと推察される。

CB101 及び CB132 投与後、BROD 及び PROD 活性の上昇は、いずれもマウスよりラットにおいて顕著であった。また、各 PCB 投与後、UGT2B1 及び UGT1A6 活性の変動には、ラット、マウス間において明らかな違いが認められた。さらに、両動物に各 PCB を投与した時、DCNB(mu class)及び EPNP(pi class)を基質にした GST 活性は、それらの上昇割合に、ラット、マウス間に違いが認められた。

以上の結果から、ラット、マウスに CB101 及び CB132 を投与すると、組織重量の変化、未変化体及び MeSO<sub>2</sub> 代謝物の肝臓中濃度及び糞中排泄量に、ラット、マウス間に差異が認められることが明らかとなった。さらに、各 PCB 投与後の BROD 及び PROD 活性、UGT2B1 及び UGT1A6 活性、mu class 及び pi class の GST 活性の変動に、ラット、マウス間に違いがあることが明らかになった。

## E. 結論

7 種類の 3-MeSO<sub>2</sub>-PCBs 及び 4-MeSO<sub>2</sub>-CB101 は、UGT1A1 及び UGT1A6 を誘導することにより、血清中 T<sub>4</sub> の代謝を亢進し、血清中 T<sub>4</sub> 濃度の低下を引き起こすことが明らかとなった。一方、4-MeSO<sub>2</sub>-CB149 による血清中 T<sub>4</sub> 濃度の低下は、甲状腺に直接作用することがその主因である可能性がある。

CB101 及び CB132 を投与後、MeSO<sub>2</sub> 体への代謝パターンには、ラット、マウス間で違いがあることが明らかとなった。また、CB101 及び CB132 投与による肝薬物代謝酵素 (BROD 及び PROD 活性、UDP-GT (UGT2B1 及び UGT1A6) 活性、GST (mu class 及び pi class)) 誘導にも、ラット、マウス間に種差があることが明らかになった。

今後、PCB 及び MeSO<sub>2</sub>-PCB 投与後の肝臓中 MeSO<sub>2</sub> 体量及び肝薬物代謝酵素誘導に関するデータを、副腎及び精巣の生殖機能に関わる各種ステロイドホルモン合成酵素活性の変動及びその合成酵素遺伝子の発現量に関するデータと照合し、それらの変動の種差と各動物における内分泌かく乱との関連性を追求する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. *Organohalogen Compounds*, **42**, 337-340 (1999).
2. Yoshihisa Kato, Kouichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Shinya Yumoto, Yoshito Masuda and Ryouhei Kimura. Reduction of serum thyroxine concentrations by methylsulfonyl metabolites of tetra, penta and hexachlorinated biphenyls in male Sprague Dawley rats. *Chemosphere*, **40**, 1233-1240 (2000).
3. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda and Ryouhei Kimura. The induction of hepatic microsomal UDP-glucuronyl-

transferase by the methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem. -Biol. Interact.*, **125**, 107-115 (2000).

## 2. 学会発表

1. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Tomoo Shibahara, Yasuhiko Shinmura, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryouhei Kimura. Induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congenere in rats. 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (Venice, Italy), 1999, Sep. 13.
2. 加藤善久, 湯本信也, 新村康彦, 木村良平, 原口浩一, 増田義人 : 2,2',4',5-

Tetrabromobiphenyl のメチルスルホン代謝物の薬物代謝誘導効果. 第 25 回環境トキシコロジーシンポジウム・第 3 回衛生薬学フォーラム合同大会 (名古屋), 講演要旨集, p.118, 1999 年 10 月 21 日.

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明：  
チトクローム P450 発現を指標として

分担研究課題：内分泌かく乱物質によるチトクローム P450 の変動  
の分子生物学的解析

分担研究者 根本 清光 静岡県立大学 薬学部助手  
(主任研究者 出川 雅邦との共同研究として行った)

研究要旨：肝障害、生殖障害、造血障害をもたらすことが知られている鉛イオン（硝酸鉛）を雄性 SD ラットに投与し、肝及び精巣におけるステロイドホルモン代謝（合成や分解）に関わるチトクローム P450（P450）酵素（CYP51、CYP11、CYP1A1/1A2 および CYP3A1/3A2 など）の変動を RT-PCR を用いて検討した。その結果、硝酸鉛投与により、肝では、臓器重量の増加とともにこれまで発現変動がほとんど起こらないとされていた CYP51 やコレステロール合成の律速酵素のひとつ HMG-CoA レダクターゼ遺伝子の発現増加が起こること、また逆に CYP1A や CYP3A 分子種の発現は低下することが明らかとなった。また、精巣においては、CYP51 の発現増加は見られるものの、HMG-CoA レダクターゼの発現はほとんど変化しないこと、また、CYP11 の発現は低下することが明らかになった。また、この CYP11 の発現低下が、既に報告されている硝酸鉛投与時のアンドロゲンの産生の主因となることが示唆された。その他、P450 各分子種の発現制御機構の解明に、最近樹立したラット肝培養細胞株が有用であることが明らかとなった。

### A. 研究目的

これまでに 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)、DDT や polychlorinated biphenyls (PCB) など、数多くの 外因性内分泌かく乱物質が報告され、ヒトへの影響が懸念されている。これら化合物には、ホルモン様物質として直接的にホルモンレセプターに作用するものや、それ自身にはホルモン様作用はないが、生体内でホルモンの合成や代謝、排泄に影響を与え、二次的にホルモンバランスを変化させるものなどが考えられている。また、これらの内分泌かく乱機構は各々独立したものは限らない。たとえば、DDT や PCB あるいはその代謝物は、直接的ホルモン様作用

をもつものとされているが、これら化合物を含め、多くの内分泌かく乱物質には、それら自身のみならずホルモンの代謝に関わる酵素の発現を変動させる作用があり、直接的ホルモン様作用物質もまた、少なからず生体内でのホルモンの合成や代謝、排泄に影響を及ぼしているものと推察される。一方また、内分泌かく乱物質に対する感受性には動物種差、性差あることや、チトクローム P450 (P450) には数多くの分子種が存在し、各分子種の発現・誘導には、動物種差、性差および臓器差が見られることが知られている。これらの知見は、種々 P450 分子種の発現量の差が、内分泌かく乱作用発現の動物種差・性差・臓器差