

平成 12 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 13 年 4 月

主任研究者 出 川 雅 邦

（静岡県立大学薬学部）

目 次

I. 総括研究報告	
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	----- 1
出川 雅邦	
II. 分担研究報告	
1. PCB 類の代謝：動物種差	----- 9
加藤 善久	
2. 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	----- 19
根本 清光	
3. 植物成分由来の内分泌かく乱物質の検索	----- 28
梅原 薫	
4. チトクローム P450 誘導能を指標とする <i>in vitro</i> 毒性評価系の確立	----- 35
横井 毅	
5. ダイオキシン類のチトクローム P450 酵素による 代謝とその動物種差・性差	----- 42
藤井 宏融	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 49

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：PCB（PentaCB、HexaCB や KC500）および硝酸鉛をラットやマウスに投与し、肝臓および精巣の臓器重量への影響を調べるとともに各臓器におけるステロイドホルモンの生合成・分解に関わる酵素への影響を薬物代謝学および分子生物学的手法を用いて比較検討し、それぞれ臓器差や種差があることを示したが、それら差を生む原因は未だ明らかにはなっていない。PCB 類投与時における各活性代謝物量や血中甲状腺ホルモン（T4）量の変動のラット、マウス間での相違は、本研究で調べた酵素の遺伝子（mRNA）発現量の差とは必ずしも一致しないことが明らかとなった。一方、PentaC や HexaCB の代謝活性に関わると考えられる酵素量あるいは比活性と各メチルスルホン体生成量や毒性発現との間には密接な関連性が示唆され、mRNA から酵素蛋白質への翻訳効率や動物種間における同種酵素の比活性の相違が、活性代謝物生成や毒性発現に種差や臓器差を生む要因になっていると考えられる。これらの結果は、P450 を指標とした内分泌かく乱物質に対する感受性の種差や臓器差の解析には、mRNA レベルでの研究より酵素活性レベルでの研究の方がより有効であることを示唆している。しかし、肝臓以外の臓器の酵素活性測定は酵素量が少なく困難な場合が多いことや、酵素発現誘導機序に関する種差や臓器差の解析を考えると、mRNA レベルでの研究は不可欠である。また、KC500 投与時、他の PCB と同様に、マウス、ラットともに T4 量の低下が起こること確認するとともに、KC500 投与時には他の PCB の場合とは異なり、マウス選択的に血中テストステロン量の増加を引き起こすことを世界に先駆け明らかにした。また、TCDD の *in vitro* での代謝研究から、各 P450 酵素の発現・誘導量あるいは比活性にはラットでは系統差が、ラットとヒトの間では種差があることなども明らかとなった。

上記の研究結果は、内分泌かく乱作用発現には、チトクローム P450（P450）をはじめとする酵素が深く関わっていることを示唆しており、P450 をはじめとする種々酵素を指標とした内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解析が重要であることが再確認された。また、ダイズ、ニンジン、ピーマン、ダイコンなど50種の食用植物のメタノール抽出物について、グルココルチコイド（GC）様作用をルシフェラーゼレポーターアッセイで検索したが、いずれの抽出物にも GC 様作用は認められなかった。しかし、国民の健康維持・増進を図るため食品を中心に、生活関連物質の GC 様作用についてさらに検索を継続する必要がある

その他、本研究により、硝酸鉛投与によるラット肝臓の重量増加（肝細胞増殖）に、神経栄養因子が関わっている可能性を世界に先駆け見い出した。神経栄養因子が神経細胞のみならず血管平滑筋などの非神経細胞の増殖や機能維持に重要であることが最近続々と報告されてきていること考え合わせると、本知見は、極めて興味深く、今後神経栄養因子の発現を指標とした感受性の解析も重要になるものと考えられる。

分担研究者 加藤 善久
静岡県立大学 講師
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 原口 浩一
第一薬科大学 助教授

A. 研究目的

TCDD や PCB などの代表的な内分泌かく乱物質には、肝チトクローム P450（以下 P450 と略す）の発現を変動させる性質があることが知られている。P450 はホルモンの生合成や代謝および外来性化合物（内分泌かく乱物質、がん原性化合物、医薬品など）の代謝を担っており、生体におけるホルモンバランスの維持や外来性化合物の薬効・毒性発現と深く関わっている。一方また、P450 には種々の分子種が存在すること、また、それらはそれぞれ異なった外来性化合物で誘導されること、さらに、その誘導には動物種差、性差、臓器差などがあることが知られている。したがって、P450 各分子種の量的変動を指標とした内分泌かく乱物質の研究は、内分泌かく乱作用発揮に至る作用経路や内分泌かく乱物質に対するヒトを含めた動物種差、性差を理解するうえで不可欠である。そこで、本研究では昨年度に引き続き、内分泌かく乱物質のヒトや種々動物に対する的確な危険度評価法を確立する一環として、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とともに、種差を生む生体要因を解明することを目的とした。また、これまで植物性内分泌かく乱物質とし

ては、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が、その他のホルモン様作用化合物についての研究は数少ない。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グルココルチコイド（GC）に焦点を合わせ、我々が樹立したルシフェラーゼアッセイ法を用いて食用植物中の GC 様作用物質を検索した。

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

昨年度に引き続き non-planar PCB の 2,2',4',5,5'-ペンタクロロビフェニール（PentaCB: CB101）や 2,2',3',4',5,6-ヘキサクロロビフェニール（HexaCB: CB132）の他、これら化合物を含む KC500 を試料として、ラットとマウスに投与した後の種々臓器重量の変動や、肝チトクローム P450（P450 と略す）および UGT などの薬物代謝酵素の発現変動を酵素学および分子生物学的手法を用いて測定するとともに、精巣でのアンドロゲン生合成酵素遺伝子発現への影響を RT-PCR 法を用いて検討した。また、同時に、血中の甲状腺ホルモン（T4）量やテストステロン量を測定し、各動物における薬物代謝酵素の発現変動と血中上記ホル

モン量との関連性を追究した。同様に、精巣におけるアンドロゲン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）を投与したラットやマウスの肝や精巣における薬物代謝酵素遺伝子（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種々酵素遺伝子（HMG-CoA reductase, CYP51, CYP11, CYP17など）の発現変動を RT-PCR 法を用いて比較検討した。さらに、最近、神経細胞のみならず血管平滑筋細胞の増殖や機能維持に関わることが明らかになってきた神経栄養因子に着目し、硝酸鉛投与によるラット肝の重量増加（肝細胞増殖）と神経栄養因子やその受容体遺伝子発現との関連性についても検討を加えた。

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）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っている。そこで、生活環境中の GC 様活性物質の検索を行った。なお、本研究では種々の食用植物や生薬のメタノールエキスを試料とし、測定には昨年度開発したルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いた。

3) 種々P450分子種の発現機構の解明

昨年度に引き続き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、種々の培養条件下、各種 P450 分子種の発現・誘導能を RT-PCR 法を用いて検討し、その有用性を調べた。

4) P450 誘導を指標とする in vitro 毒性評価系の確立

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の P450 に及ぼす影響とそれらの代謝的活性化について、それぞれ酵素学的試験法および微生物を用いた変異原性試験法を用いて検討した。

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）を P450 誘導剤で処理したラット肝ミクロソームおよびヒト P450 を用いて in

vitro で代謝させ、代謝物の同定および定量をガスクロマトグラフィー・質量分析計（HP5973 MSD システム；ヒューレットパッカード社）を用いて行った。

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

昨年度に引き続き、PCB（PentaCB、HexaCB および KC500）や重金属イオン類（硝酸鉛）などをラットやマウスに投与し、肝臓や精巣における各種 P450 分子種（内分泌かく乱物質の代謝や、ホルモン合成・分解に関わる酵素）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た。その結果、用いたいずれの内分泌かく乱物質を投与した場合にも、薬物代謝酵素（各種 P450 分子種および UGT2B1 など）の発現（特に酵素量やその比活性）には動物種差・臓器差（肝と精巣）が見られることが確認された。

しかし、PCB 類投与時における各活性代謝物量や血中 T4 量の変動のラット、マウス間での相違は、本研究で調べた酵素の遺伝子発現（mRNA）量の差とは必ずしも一致しないことが明らかとなった。

一方また、今回用いた PCB 投与量ではラット、マウスともにほぼ同様の血中 T4 量の低下が見られ、メチルスルホン代謝物量と血中 T4 量低下との相関性は認められなかった。また、PentaCB や HexaCB の投与では、ラット、マウスともに血中テストステロン量には変化が見られなかったが、KC500 投与時には血中 T4 量の低下に加え、マウスではテストステロン量の有意な増加も観察された。また、PCB 類や硝酸鉛投与時、重量が増加する肝臓では、コレステロール合成系酵素遺伝子の発現が増加すること、また、肝重量増加時には、種々神経栄養因子やそれらの受容体遺伝子の発現が増加することなどの新知見も得られた。

2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

ダイズ、ニンジン、ピーマン、ダイコンなど 50 種の食用植物のメタノール抽出物について、グルココルチコイド (GC) 様作用をルシフェラーゼレポーターアッセイで検索したが、今回用いた抽出物にはいずれも GC 様作用は認められなかった。

3) 種々 P450 分子種の発現機構の解明

樹立した培養肝細胞株 (Kan-R1 および Kan-R2 細胞株) は、細胞の大きさ (Kan-R1>Kan-R2) や軟寒天培地での増殖性 (Kan-R2 は Kan-R1 と異なり、増殖可) に違いは見られるものの、いずれの細胞株も CYP1A1/2 や CYP2B1/2、CYP3A1/2 酵素遺伝子を発現しており、これら P450 遺伝子の制御機構の解明に有用な細胞株であることが確認された。また、これら P450 遺伝子の発現はいずれの細胞株においても蛋白質合成阻害剤のサイクロヘキシミド存在下で上昇した。

4) P450 誘導を指標とする in vitro 毒性評価系の確立

主目的の in vitro 毒性評価系の確立には未だ至っていないが、並行して行ってきたディーゼル排気粉塵中に含まれるニトロ化合物の P450 酵素誘導能につき、これら化合物は自身の代謝活性化に関わる P450 分子種 (特に CYP1B1) を肺、肝臓、腎臓などに誘導する性質があ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

各種 P450 誘導剤を処理した Wistar 系ラットや Fisher344 系ラットの肝ミクロソームおよびヒト P450 を用いて、TCDD の in vitro 代謝を比較検討し、ラットでは系統差が、ラットとヒト間での種差があることを明らかにした。また、本 in vitro 代謝には、いずれも補酵素として NADPH を要したが、本反応は二酸化炭素を添加しても完全には阻害されなかった。

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 (PentaCB、HexaCB や KC500) あるいは硝酸鉛をラットやマウスに投与し、肝臓および精巣の臓器重量への影響を調べるとともに各臓器におけるステロイドホルモンの合成・分解に関わる酵素の影響を主に薬物代謝学および分子生物学的手法を用いて比較検討し、それぞれ臓器差や種差があることを示したが、それら差を生む原因は未だ明らかになっていない。PCB 類投与時における各活性代謝物量や血中 T4 量の変動のラット、マウス間での相違は、本研究で調べた酵素の遺伝子 (mRNA) 発現量の差と必ずしも一致しないことが明らかとなった。一方、PentaCB、HexaCB の代謝的活性化に関わると考えられる酵素量あるいは比活性と各メチルスルホン体生成量や毒性発現との間には密接な関連性が示唆され、mRNA から酵素蛋白質への翻訳効率や動物種間における同種酵素の比活性の相違が、活性代謝物生成や毒性発現に種差や臓器差を生む要因になっていると考えられる。これらの結果は、P450 を指標とした内分泌かく乱物質に対する感受性の種差や臓器差の解析には、mRNA レベルでの研究より酵素活性レベルでの研究の方がより有効であることを示唆している。しかし、肝臓以外の臓器の酵素活性測定は酵素量が少なく困難な場合が多いことや、酵素誘導機序に関する種差や臓器差の解析を考えると、mRNA レベルでの研究は不可欠である。

なお、今回用いた投与量では、メチルスルホン生成量と血中 T4 量低下との間には必ずしも正の相関は見られず、この点に関しては、投与量を変えてさらに検討する必要がある。また、本研究を通じ、KC500 にマウス選択的ではあるが血中テストステロン量増加作用があることを世界に先駆け見出したこと、また、肝重量の増加に神経栄養因子やその受容体が発現している可能性を見出したことは

特筆に値する。

2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

昨年度、GC 様作用物質のルシフェラーゼ検索法を確立した。本年度は本法を用いて生薬カミツレ中の GC 様作用成分の単離・同定を行うとともに、ダイズ、ニンジン、ピーマン、ダイコンなど50種の食用植物のメタノール抽出物について、GC 様作用物質の検索を行った。カミツレ中から GC 様作用成分として4種の化合物が同定され、そのうち3種がフラボノイドであることが明らかになった。

一方、今回用いた食用植物抽出物のいずれからも GC 様作用物質は検出されなかったが、国民の健康の維持、増進に貢献すべく、今後さらに種々生活関連物質について GC 様作用の検索を進めてゆく必要があると考える。

3) 種々P450分子種の発現機構の解明

樹立したラット肝培養細胞株 (Kan-R1 および Kan-R2 細胞株) は、その細胞の大きさや軟寒天培地での増殖性等の点で性質が異なるが、いずれも種々P450 を定常的に発現しており、種々P450 発現制御機構の解明に貴重な細胞株になることが再確認された。また、これら細胞株で発現している P450 分子種はいずれも蛋白質合成阻害剤のサイクロヘキシミド存在下での培養により、その発現量が増加することが明らかとなり、これら P450 分子種の発現制御には抑制性因子が深く関わっているものと考えられた。

4) チトクローム P450 誘導を指標とする in vitro 毒性評価系の確立

昨年度より本 in vitro 毒性評価系の構築を試みているが、未だその実用化には至っていない。一方、昨年度より並行して進めてきた、ラットやヒトの 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的活性化の関わる酵素とその変動に関する研究から、本年度は、ディーゼル廃棄粉塵中に含まれるニトロ化合物が自身の代謝活性化に関わる P450 分子種 (特に CYP1B1) を肺、肝臓、腎臓などに誘導することを明らかにした。

今後、主研究目的の in vitro 評価系の確立を目指すとともに、ディーゼル排気粉塵中のニトロ化合物の肝外臓器における酵素誘導と毒性発現との関連性をさらに検討することが必要である。

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

ヒトおよび種々系統ラットの各種肝ミクロソーム (P450 酵素) を用いて、TCDD の in vitro 代謝における種差・性差を比較検討し、ラット系統差やヒト、ラット間での種差を見出した。また、本反応は補酵素として NADPH を必要とするが、一酸化炭素で完全には阻害されないため、P450 以外の酵素の関与も考えられる。この点に関してはさらに検討を行う必要がある。

E. 結論

本年度の代表的な研究成果として、1) PCB 類 (PentaCB、HexaCB や KC500) や重金属イオン類 (硝酸鉛) をマウスやラットに投与した場合、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 P450 酵素の発現パターンには、それぞれ動物種差や臓器 (肝臓と精巣) 差があることを再確認したこと、また、2) いずれの PCB を投与した場合にも、ラットとマウスいずれの動物でも血中 T4 量が低下し、さらに、KC500 投与時にはマウス選択的に血中テストステロン量が低下すること、3) TCDD の代謝に関わる肝酵素の比活性にはラット系統差や動物種差などがあること、さらに、4) 内分泌かく乱物質投与により重量が増加した肝では神経栄養因子やその受容体遺伝子の発現が上昇することなどの新知見を得たことが挙げられる。

上記結果は、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発現に関わっていることを強く示唆しており、初期実験計画に沿った研究の重要性が再確認された。また、内分泌かく乱物質による臓器重量

の変化には神経栄養因子が関与する可能性を新たに見出しており、神経栄養因子の発現に着目した感受性の解析も重要になると考えられる。また、今回用いた 50 種の食用植物からは GC 様作用を持つ成分は検出されなかったが、国民の健康維持・増進を図るため食品を中心に、生活関連物質の GC 様作用についてさらに検索を継続する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Shinya Yumoto, Yasuhiro Nagano, Tomoaki Yamazaki, Yoshito Masuda and Ryohei Kimura. 3-Methylsulfonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a metabolite of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl induces CYP2B1/2 in rats. *Organohalogen Compounds*, **49**, 209-212 (2000).
2. Yoshihisa Kato, Yasuhiko Shinmura, Koichi Haraguchi, Kimie Imai, Kiyomitsu Nemoto, Tachio Aimoto, Yoshito Matsuda, Masakuni Degawa, and Ryohei Kimura, In vivo metabolism of 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl and its inductive activity of drug-metabolizing enzymes: Species difference between rats and mice. *Organohalogen Compounds*, **49**, 213-216 (2000)
3. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Shinya Yumoto, Yasuhiro Nagano, Tomoaki Yamazaki, Yoshito Masuda and Ryohei Kimura. 2,2',4',5-Tetrabromobiphenyl metabolite, 3-MeSO₂-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl is a potent inducer of CYP2B1/2. *J. Toxicol. Sci.*, **25**, 312 (2000).
4. Yoshihisa Kato, Yasuhiko Shinmura, Koichi Haraguchi, Kiyomitsu Nemoto, Kimie Imai, Tachio Aimoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa, and Ryouhei Kimura. In vivo metabolism of 2,2,7,4,4'-pentachlorobiphenyl and its inductive activity of drug-metabolizing enzymes: Species difference between rats and mice. *J. Toxicol. Sci.*, **25**, 313 (2000)
5. Kiyomitsu Nemoto, Shingo Miyata, Fumiko Nemoto, Tsutomu Yasumoto, Uta Murai, Haruaki Kageyama, and Masakuni Degawa, Gene expression of neurotrophins and their receptors in lead nitrate-induced rat liver hyperplasia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 472-476 (2000)
6. Ikuro Abe, Kaoru Umehara, Ryoko Morita, Kiyomitsu Nemoto, Masakuni Degawa, and Hiroshi Noguchi. Green tea polyphenols as potent enhancers of glucocorticoid-induced mouse mammary tumor virus gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 122-125 (2001)
7. Hiroshi Yamazaki, Naoya Hatanaka, Ryoichi Kizu, Kazuichi Hayakawa, Noriaki Shimada, F. Peter. Guengerich, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi, Bioactivation of diesel exhaust particles extracts and their major nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon components, 1-nitropyrene and dinitropyrenes, by human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Mutat. Res.*, **472**, 129-138 (2000).

2. 学会発表

1. 加藤善久、原口浩一、湯本信也、永野泰弘、山崎友朗、増田義人、木村良平：2,2',4',5-Tetrabromobiphenyl のメチルスルホン代謝物の強力な CYP2B1/2 誘導作用。第 27 回日本トキシコロジー学術年会 (横浜)、要旨集、p.186、2000 年 6 月 28 日
2. 加藤善久、新村康彦、原口浩一、根本清光、今井公江、相本太刀男、増田義人、出川雅邦、木村良平：2,2',4,4'-Pentachlorobiphenyl の代謝と薬物代謝酵素誘導能：ラット、マウス間での種差。第 27 回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜)、要旨集、p.187、2000 年 6 月 28 日
3. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Shinya Yumoto, Yasuhiro Nagano, Tomoaki Yamazaki, Yoshito Masuda and Ryohei Kimura. 3-Methylsulfonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a metabolite of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl induces CYP2B1/2 in rats. 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) (Monterey, California, USA), 2000, Aug., 14.
4. Yoshihisa Kato, Yasuhiko Shinmura, Koichi Haraguchi, Kimie Imai, Kiyomitsu Nemoto,

- Tachio Aimoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryohei Kimura. In vivo metabolism of 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl and its inductive activity of drug-metabolizing enzymes : Species difference between rats and mice. 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) (Monterey, California, USA), 2000, Aug., 14.
5. 梅原 薫、渥美 宏、森田良子、宮瀬敏男、野口博司、根本清光、出川雅邦。カミツレ中のグルココルチコイド様物質の検索。日本生薬学会第 47 回年会(東京)、要旨集、p.128、2000 年 9 月 7 日
 6. 根本清光、宮田信吾、出川雅邦：硝酸鉛投与時のラット肝での細胞増殖と神経栄養因子及びその受容体遺伝子の発現変動。第 59 回日本癌学会総会(横浜)、総会記事、p.82、2000 年 10 月 4 日
 7. 加藤善久、新村康彦、原口浩一、山崎友朗、今井公江、根本清光、相本太刀男、増田義人、出川雅邦、木村良平：2,2',3',4,5,6'-Hexachlorobiphenyl の代謝と薬物代謝酵素誘導能：ラット、マウス間での種差。第 15 回日本薬物動態学会年会(福岡)、薬物動態、15 (Suppl.)、S241、2000 年 10 月 11 日
 8. 岩成正司、中島美紀、木津良一、早川和一、山崎浩史、横井 毅：ニトロ多環芳香族炭化水素類による CYP1 ファミリーの誘導作用。第 15 回日本薬物動態学会年会(福岡)、15 (Suppl.)、S262、2000 年 10 月 11 日
 9. 畑中直也、山崎浩史、木津良一、早川和一、島田典招、中島美紀、横井 毅：ディーゼル排気粉塵抽出物とニトロ多環芳香族炭化水素類のヒト CYP1 ファミリーによる代謝的活性化について。第 15 回日本薬物動態学会年会、15 (Suppl.)、S263、2000 年 10 月 11 日
 10. 宮田信吾、根本清光、大見和宏、出川雅邦：血管平滑筋細胞の収縮型形質発現における神経栄養因子の関わり。第 73 回日本生化学会大会(横浜)、発表抄録集、p.838、2000 年 10 月 12 日
 11. 小島美咲、根本清光、村井 詩、出川雅邦：精巣のストロイドホルモンおよびコレステロール合成酵素に及ぼす鉛イオンの影響について。第 73 回日本生化学会大会(横浜)、発表抄録集、p.959、2000 年 10 月 13 日
 12. 根本清光、宮田信吾、根本文子、小島美咲、出川雅邦：PC12 細胞の神経様分化誘導時におけるコレステロール生合成系酵素 (HMG-CoA reductase および CYP51) 遺伝子の発現変動。第 73 回日本生化学会大会(横浜)、発表抄録集、p.1021、2000 年 10 月 14 日
 13. 綾部悠子、吉村那美、根本清光、出川雅邦：硝酸鉛投与ラットの肝および腎の重量増加とコレステロール生合成系酵素遺伝子の発現変動について。平成 12 年度日本薬学会東海支部例会(静岡)、要旨集、p.27、2000 年 12 月 9 日
 14. 牧野正宣、吉本直樹、根本清光、出川雅邦：培養ラット肝細胞株 (Kan-R1) のシトクロム P450 発現能。平成 12 年度日本薬学会東海支部例会(静岡)、要旨集、p.30、2000 年 12 月 9 日
 15. 藤井宏融：ダイオキシンのラット肝ミクロソームによる分解。第 74 回日本薬理学会年会(横浜)、2001 年 3 月 21 日
 15. 梅原 薫、宮瀬敏男、野口博司、根本清光、出川雅邦：生薬アマチャ中のグルココルチコイド様物質に関する研究。日本薬学会第 121 年会(札幌)、要旨集 2、p.101、2001 年 3 月 28 日
 16. 小島美咲、村井 詩、根本清光、出川雅邦：硝酸鉛により誘発される肝増殖とコレステロール生合成・代謝系酵素遺伝子の発現変動。日本薬学会第 121 年会(札幌)、要旨集 3、p.39、2001 年 3 月 29 日

17. 牧野正宣、吉本直樹、根本清光、並木雅幸、橋本嘉幸、出川雅邦：培養ラット肝細胞株（Kan-R1、Kan-R2）のシトクロム P450 発現能. 日本薬学会第 121 年会（札幌）、要旨集 3、p.49、2001 年 3 月 29 日
18. 畑中直也、山崎浩史、木津良一、早川和一、青木康展、中島美紀、横井 毅：ディーゼル排気暴露ラットにおける肺、肝および腎 P450 1B1 の誘導について. 日本薬学会第 121 年会（札幌）、要旨集 3、p.50、2001 年 3 月 29 日
19. 綾部悠子、吉村那美、根本清光、小島美咲、出川雅邦：塩化カドミウム投与ラットの肝臓・精巣の重量変化とコレステロール・ステロイドホルモン生合成系酵素遺伝子の発現変動. 日本薬学会第 121 年会（札幌）、要旨集 3、p.51、2001 年 3 月 29 日
20. 横山敏紀、綾部悠子、濱地勇希、牧野正宣、吉村那美、根本清光、加藤善久、木村良平、出川雅邦：Non-planar PCB 類投与時のマウス精巣および肝臓におけるテストステロン生合成・代謝系酵素遺伝子の発現変動. 日本薬学会第 121 年会（札幌）、要旨集 3、p.51、2001 年 3 月 29 日
21. 山崎浩史、畑中直也、木津良一、早川和一、中島美紀、横井 毅：環境発癌性物質 1-ニトロピレンのヒト P450 1B1 による代謝的活性化経路について. 日本薬学会第 121 年会（札幌）、要旨集 3、p.51、2001 年 3 月 29 日
20. 宮田信吾、根本清光、小島美咲、出川雅邦：神経栄養因子によるコレステロール生合成酵素遺伝子の発現誘導. 日本薬学会第 121 年会（札幌）、要旨集 4、p.83、2001 年 3 月 29 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 加藤 善久 静岡県立大学 薬学部講師

協力研究者 木村 良平 静岡県立大学 薬学部教授

(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：ラット、マウスに 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB)、2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl (HexaCB)及び Kanechlor500 (KC500)を投与し血清中総テストステロン、総サイロキシン (total T_4)、総トリヨードサイロニン (total T_3)及び甲状腺刺激ホルモン (TSH)濃度に与える影響について検討した。また、肝ミクロソームの cytochrome P450 分子種量及びUDP-glucuronosyltransferase (UDP-GT) 活性を測定し、すでに報告した結果と合わせて考察した。ラット、マウスに PentaCB 及び HexaCB を投与した時の CYP2B、CYP3A 及び CYP1A 量の経時変化のパターンは、7-pentoxyresorufin *O*-dealkylase、7-benzyloxyresorufin *O*-dealkylase 及び 7-ethoxyresorufin *O*-dealkylase 活性の経時変化のパターンとそれぞれほぼ類似していた。PentaCB 投与により投与後 4～8 日の、また HexaCB 投与により投与後 2～4 日のマウスの CYP2b 量の増加割合は、ラットの CYP2B 量の増加割合より著しく大きかった。また、UGT2B1 活性は、いずれの PCBs を投与したラットでも顕著に増加したが、マウスではいずれの UDP-GT 活性も両 PCBs 投与による影響はほとんど見られなかった。血清中総テストステロン濃度は、PentaCB 及び HexaCB を投与したいずれの動物にも変化は認められなかったが、KC500 を投与したマウスでは顕著に増加した。また、血清中 total T_4 濃度は、両 PCBs 及び KC500 投与により、ラット、マウスともに同程度の低下が認められた。一方、PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与した両動物の血清中 total T_3 濃度の低下は軽微であり、血清中 TSH 濃度の変化はほとんど見られなかった。

以上の結果から、PentaCB、HexaCB 投与後、肝臓の CYP2B、CYP3A 及び CYP1A 量、及び UGT2B1 活性の変動には、ラット、マウス間に明確な違いがあることが明らかにされた。また、PentaCB 及び HexaCB 投与によるラット、マウス間のメチルスルホン体への代謝パターンの違いは、両 PCBs 投与による肝臓の CYP、UDP-GT、glutathione *S*-transferase の誘導能の違いに関係していることが示唆された。PentaCB、HexaCB 及び KC500 は、ラット、マウスの血清中 total T_4 濃度の低下作用を有すること、KC500 は血清中総テストステロン濃度の増加作用を有することが明らかにされた。また、PentaCB 及び HexaCB の T_4 濃度の低下機序は、UDP-GT 活性の増加による、 T_4 の代謝促進ではなく、別の作用機序により引き起こされていることが示唆された。

A. 研究目的

すでに、著者らは平成 11 年度の本研究報告書において、ラット、マウスに 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB) 及び 2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl (HexaCB)を投与した時、メチルスルホン(MeSO₂)代謝物への代謝パターンには、両動物間に違いがあること、PentaCB 及び HexaCB 投与による肝薬物代謝酵素(7-benzyloxyresorufin *O*-dealkylase (BROD) 及び 7-pentoxoresorufin *O*-dealkylase (PROD)活性及び glutathione *S*-transferase (GST)(mu class 及び pi class))誘導にも、ラット、マウス間に違いがあることを報告した。さらに、3-MeSO₂-及び 4-MeSO₂-PentaCB、及び 3-MeSO₂-HexaCB などの 7 種類の MeSO₂-PCBs は、UGT1A1 及び UGT1A6 を誘導することにより、血中サイロキシン (T₄)の代謝を亢進し、血中 T₄ 濃度の低下を引き起こすことを報告した。

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、PCB の MeSO₂ 代謝物のように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。MeSO₂ 代謝物を生成する PCB の場合、PCB の代謝パターンあるいは PCB の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。本研究では、PCB の MeSO₂ 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している。

今回、ラット、マウスに PentaCB、HexaCB (Fig. 1)及びカネミ油症の原因物質であり、PentaCB 及び HexaCB をその成分として含む Kanechlor500 (KC500)を投与し血清中ホルモン濃度に与える影響について検討した。また、この時の肝ミクロソームの cytochrome P450 分子種量及び UDP-glucuronosyltransferase (UDP-GT)活性を測定し、これまでの実験結果との関連性を考察した。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。

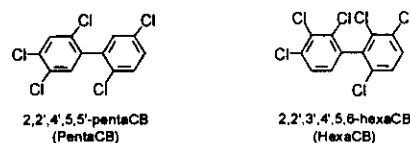


Fig. 1. Chemical structures of 2,2',4',5,5'-pentaCB and 2,2',3',4',5,6-hexaCB

B. 研究方法

PentaCB 及び HexaCB (各 342 µmol/kg)を、Wistar 系雄性ラット (体重 150~200 g)あるいは ddy 系雄性マウス (体重 27~39 g)にそれぞれ一回腹腔内投与し、投与後 1、2、4、8 日に屠殺した。経時的に血清中総テストステロン、総サイロキシン(total T₄)、総トリヨードサイロニン(total T₃)及び甲状腺刺激ホルモン(TSH)濃度を測定するとともに、肝ミクロソームの cytochrome P450 分子種 (CYP1A、CYP2B、CYP3A)量、4-nitrophenol (4-NP)及び chloramphenicol (CP)を基質とした時の UDP-GT 活性を測定した。

また、KC500 (100 mg/kg)を同様な動物に一回腹腔内投与した。投与後 4 日に屠殺し、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、副腎、腎臓及び精巣を摘出し、各組織重量を測定するとともに、血清中総テストステロン、total T₄、total T₃ 及び TSH 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、*in vivo* でのホルモン濃度、cytochrome P450 分子種量及び UDP-GT 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

両 PCBs を投与したラット、PentaCB を投与したマウスは 8 日間生存したが、HexaCB を投与したマウスは 4~5 日にかけて全て死亡した。

両動物に PentaCB 及び HexaCB を投与し、経時的に各 CYP 量を測定した。結果を Figs. 2、3、4 及び 5 に示す。ラットに PentaCB を投与した時、CYP2B1、CYP2B2 量は投与後 1 日より著的に増加し、2 日にピーク (それぞれ対照値の 33 倍、25 倍) に達し、8 日にも高い値 (それぞれ対照値の 18 倍、12 倍) を示した。CYP3A2 量は 1~8 日に有意な増加を示し、CYP1A2 量は 2 日に有意な低下を示した (Fig. 2)。マウスに PentaCB を投与した時、Cyp2b9/10 量は投与後 1 日から

増加を示し、4 日、8 日では著しい増加 (対照値の 25~28 倍) を示した。Cyp3a 量は 4~8 日に増加を示した。一方、Cyp1a 量はほとんど変化を示さなかった (Fig. 3)。また、ラットに HexaCB を投与した時、CYP2B1、CYP2B2 量は投与後 1 日に著しく増加 (それぞれ対照値の 11 倍、6 倍) し、8 日においてもなお高い値を示した。CYP3A2 量は 1~8 日に有意な増加を示し、CYP1A2 量は 1 日と 8 日にわずかな増加を示した (Fig. 4)。マウスに HexaCB を投与すると、

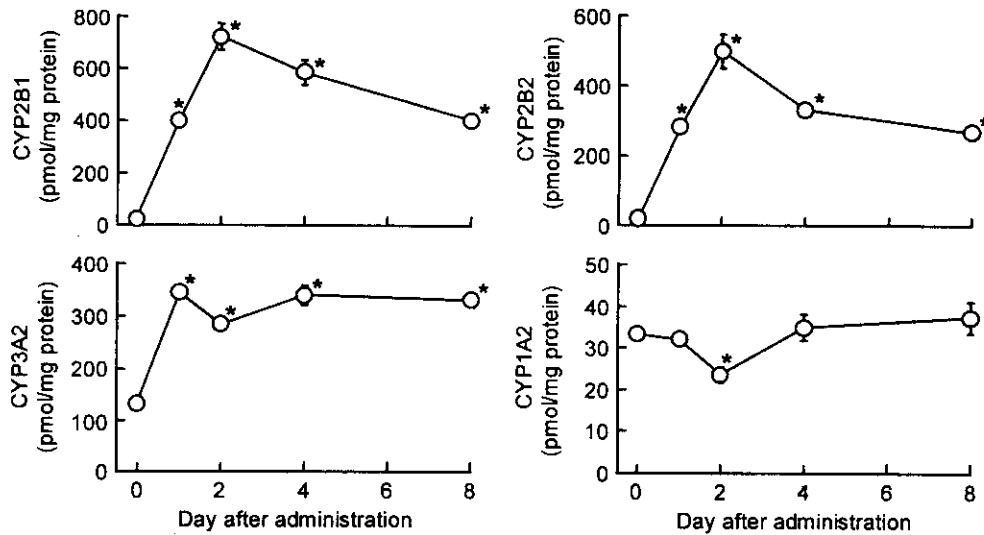


Fig. 2. Effects of 2,2',4',5,5'-pentaCB on cytochrome P450 isozyme contents of liver microsomes in rats

Rats were given i.p. 2,2',4',5,5'-pentaCB (342 μ mol/kg) and killed at the appropriate times after the administration. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for three to four rats.

* $P < 0.05$, significantly different from each control (0 hr).

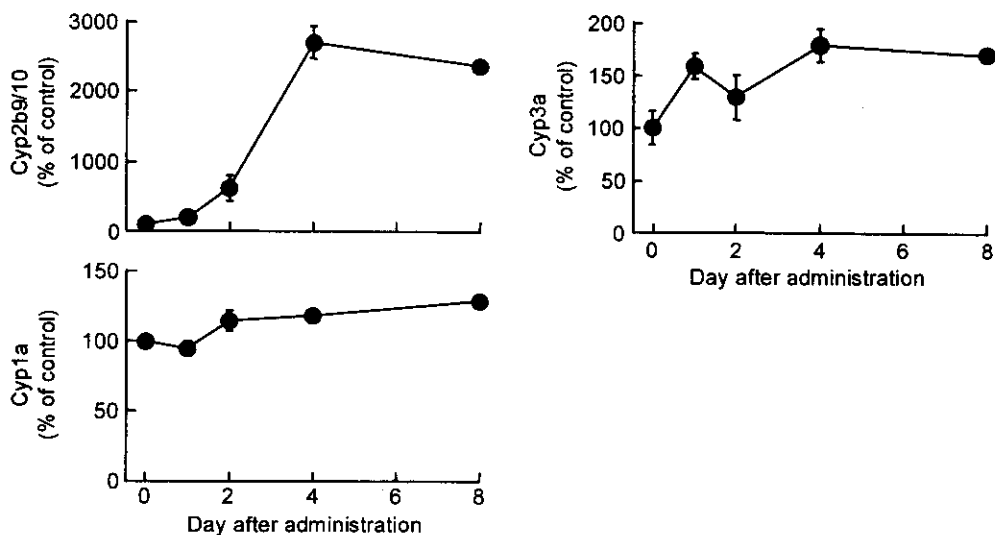


Fig. 3. Effects of 2,2',4',5,5'-pentaCB on cytochrome P450 isozyme contents of liver microsomes in mice

Mice were given i.p. 2,2',4',5,5'-pentaCB (342 μ mol/kg) and killed at the appropriate times after the administration. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for three to four mice.

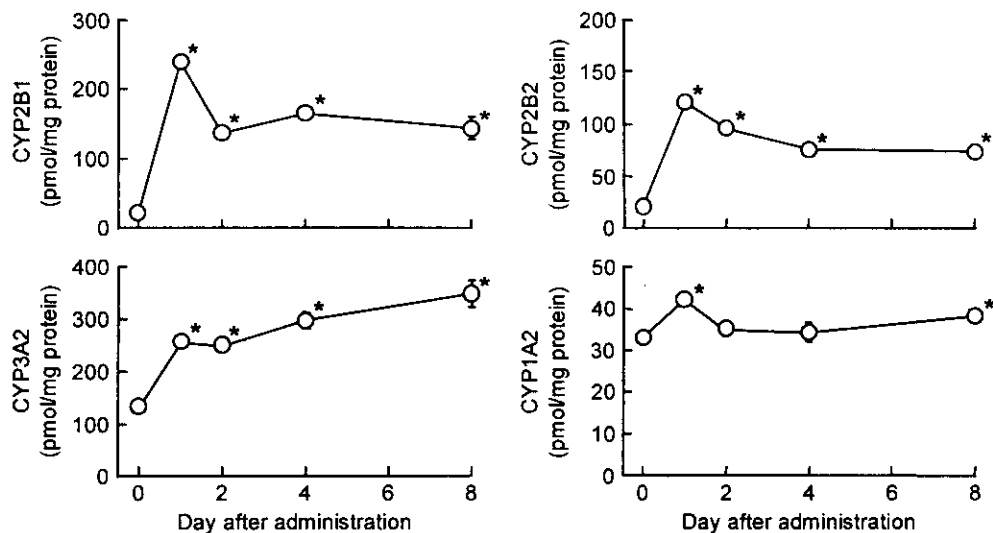


Fig. 4. Effects of 2,2',3',4',5,6-hexaCB on cytochrome P450 isozyme contents of liver microsomes in rats

Rats were given i.p. 2,2',3',4',5,6-hexaCB (342 $\mu\text{mol/kg}$) and killed at the appropriate times after the administration. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for three to four rats.

* $P < 0.05$, significantly different from each control (0 hr).

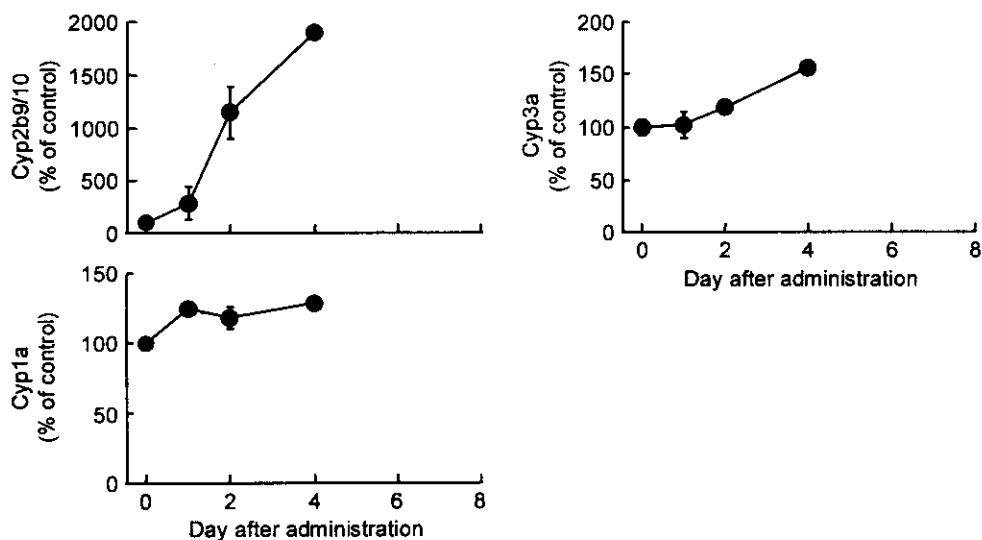


Fig. 5. Effects of 2,2',3',4',5,6-hexaCB on cytochrome P450 isozyme contents of liver microsomes in mice

Mice were given i.p. 2,2',3',4',5,6-hexaCB (342 $\mu\text{mol/kg}$) and killed at the appropriate times after the administration. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for three to four mice.

Cyp2b9/10 量は、2~4日に著しい増加(対照値の13~21倍)を、Cyp3a量は4日にわずかな増加を示した。一方、Cyp1a量はほとんど変化は認められなかった(Fig. 5)。

両動物に PentaCB 及び HexaCB を投与し、経時的に UDP-GT 活性を測定した。結果を Figs. 6 及び 7 に示す。4-NP を基質として用いた UDP-GT 活性は UGT1A6 活性の、CP を基質として用いた UDP-GT 活性は UGT2B1 活性の変動をそれぞれ反映することが報告されている。

CP-UDP-GT 活性は、両 PCBs を投与したラットでは 2~8 日に顕著に増加したが、4-NP-UDP-GT 活性はほとんど変化しなかった。一方、マウスでのこれらの UDP-GT 活性には、PCBs 投与による影響はほとんど見られなかった。

Figs. 8, 9, 10 及び 11 に両 PCBs を投与したラット、マウスの血清中総テストステロン、total T_4 、total T_3 及び TSH 濃度の経時変化を示す。血清中総テストステロン濃度は、PentaCB 及び

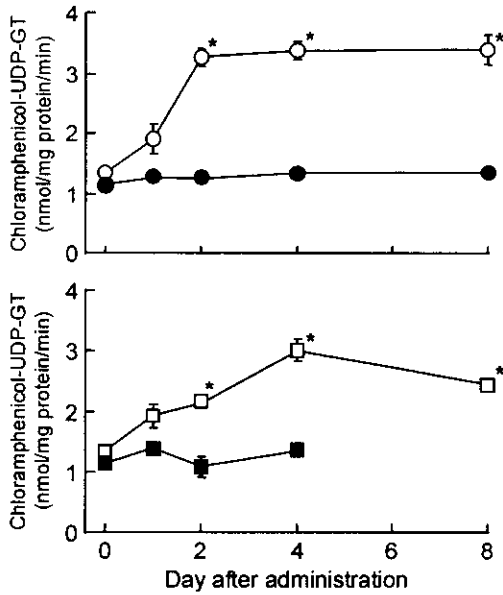


Fig. 6. Effects of 2,2',4',5,5'-pentaCB and 2,2',3',4',5,6-hexaCB on UDP-glucuronosyltransferase activities of liver microsomes in rats and mice

Animals were given i.p. 2,2',4',5,5'-pentaCB and 2,2',3',4',5,6-hexaCB (342 μ mol/kg each) and killed at the appropriate times after the administration. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for three to seven animals.

* $P < 0.05$, significantly different from each control (0 hr).

- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (rat);
- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (mouse);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (rat);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (mouse).

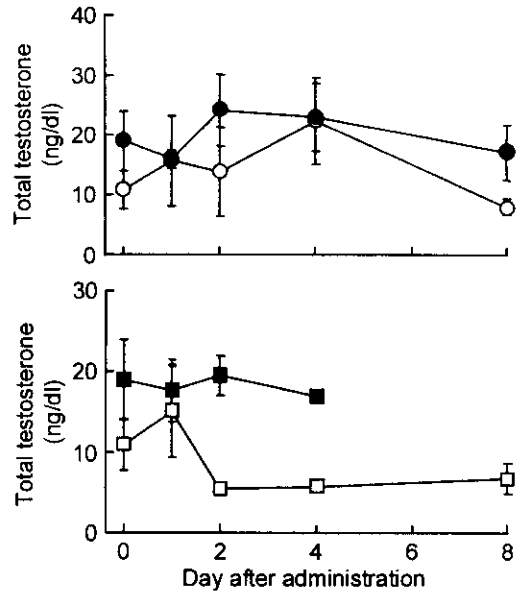


Fig. 8. Effects of 2,2',4',5,5'-pentaCB and 2,2',3',4',5,6-hexaCB on serum total testosterone concentration in rats and mice

The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 6. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for two to eight animals.

- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (rat);
- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (mouse);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (rat);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (mouse).

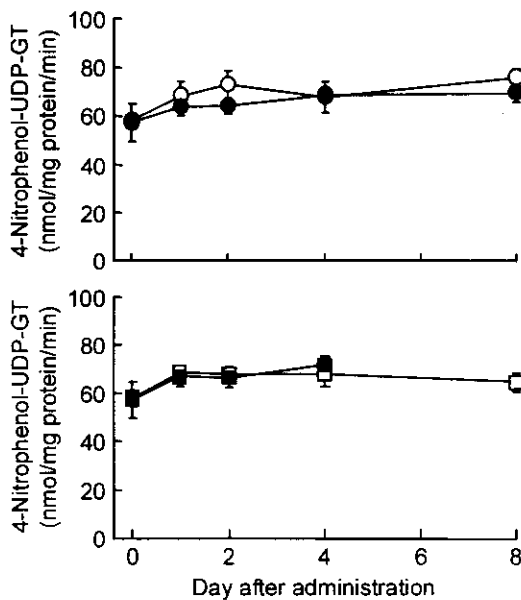


Fig. 7. Effects of 2,2',4',5,5'-pentaCB and 2,2',3',4',5,6-hexaCB on UDP-glucuronosyltransferase activities of liver microsomes in rats and mice

The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 6. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for three to seven animals.

* $P < 0.05$, significantly different from each control (0 hr).

- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (rat);
- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (mouse);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (rat);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (mouse).

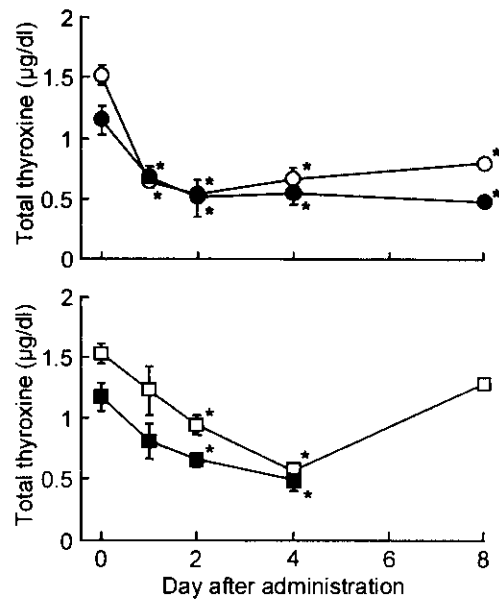


Fig. 9. Effects of 2,2',4',5,5'-pentaCB and 2,2',3',4',5,6-hexaCB on serum total thyroxine concentration in rats and mice

The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 6. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for three to eight animals.

* $P < 0.05$, significantly different from each control (0 hr).

- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (rat);
- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (mouse);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (rat);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (mouse).

HexaCB を投与したいずれの動物においても有意な変化は観察されなかった (Fig. 8)。一方、血清中 total T_4 濃度は、PentaCB を投与したラット、マウスでは投与後 1~8 日に有意な低下を示し、その低下割合は、ラットでは 46~64%、マウスでは 40~58%であった。また、HexaCB を投与したラット、マウスでは投与後 2~4 日にそれぞれ 39~63%、44~58%の低下が認められた。ラットではこの低下は、投与後 8 日に回復した (Fig. 9)。また、血清中 total T_3 濃度は、PentaCB を投与したラットでは投与後 1 日に 42%低下した。一方、PentaCB を投与したマウスでは変化は観察されなかった。また、HexaCB を投与したラット、マウスでは投与後 4 日に、それぞれ 53%、63%の有意な低下が認められた (Fig. 10)。血清中 TSH 濃度は、HexaCB を投与したマウスでは投与後 1 日に 56%の低下を示したが、2 日には回復した。一方、PentaCB を投与した両動物、HexaCB を投与したラットでは有意な変化は観察されなかった (Fig. 11)。

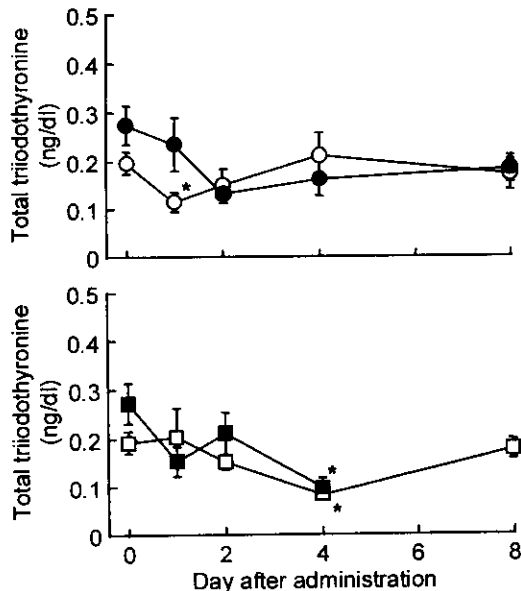


Fig. 10. Effects of 2,2',4',5,5'-pentaCB and 2,2',3',4',5,6-hexaCB on serum total triiodothyronine concentration in rats and mice

The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 6. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for two to seven animals.

* $P < 0.05$, significantly different from each control (0 hr).

- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (rat);
- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (mouse);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (rat);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (mouse).

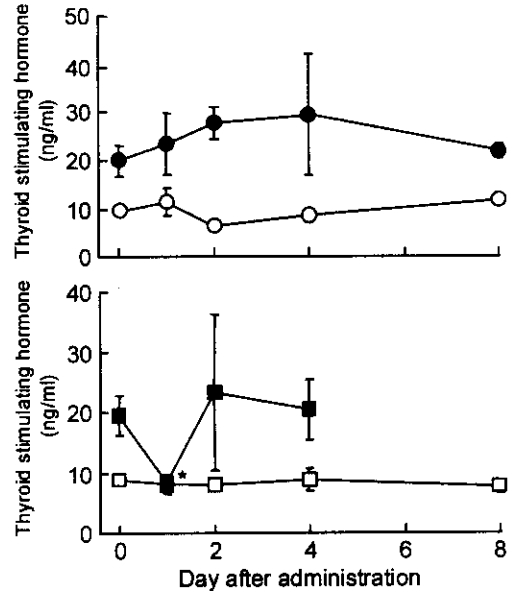


Fig. 11. Effects of 2,2',4',5,5'-pentaCB and 2,2',3',4',5,6-hexaCB on serum thyroid stimulating hormone concentration in rats and mice

The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 6. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for two to eight animals.

* $P < 0.05$, significantly different from each control (0 hr).

- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (rat);
- , 2,2',4',5,5'-pentaCB (mouse);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (rat);
- , 2,2',3',4',5,6-hexaCB (mouse).

両動物に KC500 を投与し、投与後 4 日における各組織の体重に対する相対重量を測定した。結果を Figs. 12 及び 13 に示す。KC500 を投与したいずれの動物でも肝臓重量の増加が認められた。一方、他の組織重量には有意な変化は観察されなかった。

ラット、マウスに KC500 を投与した時の血清中総テストステロン、total T_4 、total T_3 及び TSH 濃度を測定した。結果を Figs. 14, 15, 16 及び 17 に示す。血清中総テストステロン濃度は、KC500 を投与したマウスでは有意な増加が認められた。一方、ラットでは変化が認められなかった (Fig. 14)。一方、血清中 total T_4 濃度は、KC500 を投与したラット、マウスではいずれも著しい低下が認められた (Fig. 15)。また、血清中 total T_3 濃度は、KC500 を投与したマウスでは有意な低下が認められた。一方、ラットでは変化が観察されなかった (Fig. 16)。血清中 TSH 濃度は、いずれの動物においても KC500 投与による影響はほとんど見られなかった (Fig. 17)。

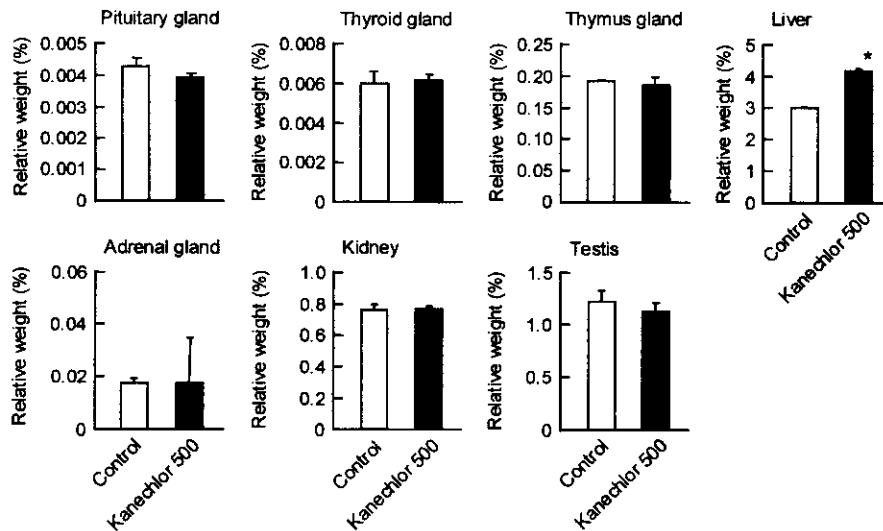


Fig. 12. Relative tissue weight after the administration of Kanechlor 500 to rats
 Rats were given i.p. Kanechlor 500 (100 mg/kg) and killed 96 hr after the administration.
 Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for four to five rats.
 * $P < 0.001$, significantly different from the corresponding control.

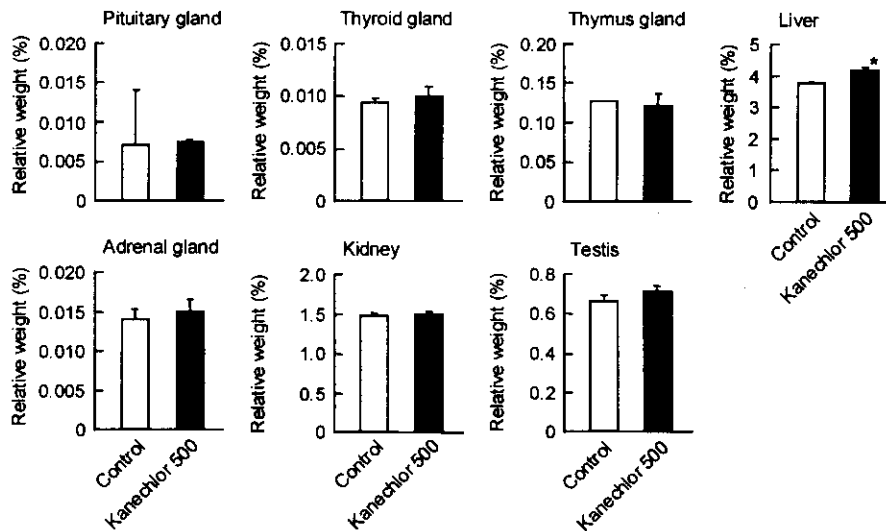


Fig. 13. Relative tissue weight after the administration of Kanechlor 500 to mice
 Mice were given i.p. Kanechlor 500 (100 mg/kg) and killed 96 hr after the administration.
 Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for ten to twelve mice.
 * $P < 0.001$, significantly different from the corresponding control.

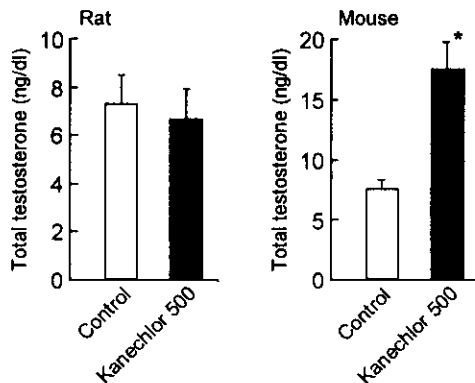


Fig. 14. Effects of Kanechlor 500 on serum total testosterone concentration in rats and mice

Animals were given i.p. Kanechlor 500 (100 mg/kg) and killed 96 hr after the administration. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for three to seven animals.
 * $P < 0.01$, significantly different from each control.

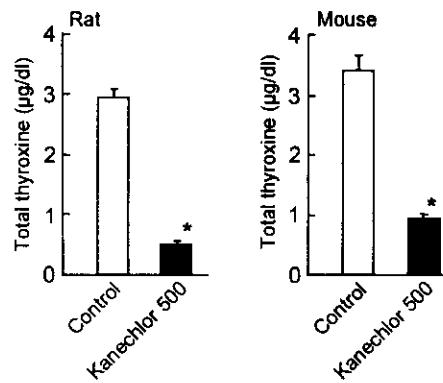


Fig. 15. Effects of Kanechlor 500 on serum total thyroxine concentration in rats and mice

The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 14. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for four to seven animals.
 * $P < 0.001$, significantly different from each control.

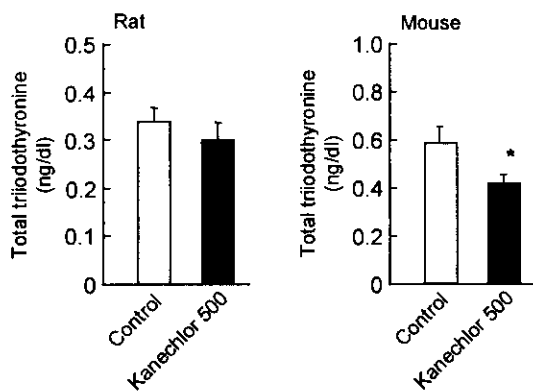


Fig. 16. Effects of Kanechlor 500 on serum total triiodothyronine concentration in rats and mice

The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 14. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for four to eight animals. * $P < 0.05$, significantly different from each control.

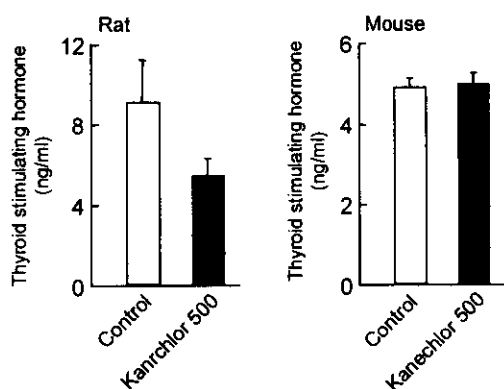


Fig. 17. Effects of Kanechlor 500 on serum thyroid stimulating hormone concentration in rats and mice

The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 14. Each point represents the mean \pm S.E. (vertical bars) for four to eight animals.

D. 考察

ラット、マウスに PentaCB 及び HexaCB を投与した時の CYP2B、CYP3A 及び CYP1A 量の経時変化のパターンは、すでに報告した PROD、BROD 及び EROD 活性の経時変化のパターンとそれぞれほぼ類似していた。この結果から、両 PCBs 投与によるラット、マウスの PROD、BROD 及び EROD 活性の変動はそれぞれ CYP2B、CYP3A 及び CYP1A 量の変動をほぼ反映していることが示された。

PentaCB 投与により投与後 4~8 日の、また HexaCB 投与により投与後 2~4 日のマウスの CYP2b 量の増加割合は、ラットの CYP2B 量の増加割合より著しく大きかった。また、UGT2B1 活性は、いずれの PCBs を投与したラットでも顕著に増加したが、マウスではいずれの UDP-GT

活性も両 PCBs 投与による影響はほとんど見られなかった。また、両 PCBs を投与した時、mu class の GST 活性はラットよりマウスに顕著な増加を示すこと、pi class の GST 活性はマウスにのみ有意な増加を示すことを報告した。Fig. 18 に、PCB の MeSO₂ 代謝物の推定生成経路を示す。すでに、両 PCBs 投与により肝臓中 MeSO₂ 代謝物濃度は、ラットよりマウスにおいて高いことを報告した。この一因は、これまでの結果を考え合せると、いずれの PCBs 投与の場合にもマウスの Cyp2b 量及び GST 活性の増加割合はラットより大きいこと (すなわち、両 PCBs ともラットよりマウスの方がグルタチオン抱合体を生成しやすく、MeSO₂ 体の前駆体が豊富になること)、またラットにおいて UGT2B1 活性が高いこと (すなわち、ラットの方が水酸化体の排泄がされやすく、エポキシサイドの消失が促進される可能性があること) によると考えられる。

血清中総テストステロン濃度は、PentaCB 及び HexaCB を投与したいずれの動物にも変化は認められなかったが、KC500 を投与したマウスでは顕著に増加した。一方、血清中 total T₄ 濃度は、両 PCBs 及び KC500 投与により、ラット、マウスともに同程度の低下が認められた。これらの結果から、両動物ともに、PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与により、血清中 total T₄ 濃度の低下を引き起こすことが明らかとなった。

T₄ の代謝を亢進させる場合には、T₄ のグルクロン酸抱合反応、硫酸抱合反応、脱ヨード化反応、酸化脱アミノ化反応、エーテル結合の開裂などの反応があることが知られている。そのなかでも、血中 T₄ の消失には、T₄ の代謝を促進する UDP-GT (UGT1A1、UGT1A6) 活性が大きな役割を果たすことが報告されている。PentaCB、HexaCB 投与によって、ラット、マウスとも UGT1A6 活性はほとんど変化を示さなかった。この結果から、PentaCB、HexaCB 投与による血清中 T₄ 濃度の低下は、UDP-GT 活性の増加による、T₄ の代謝促進ではなく、別の作用機序により血中 T₄ 濃度の低下が引き起こされていることが示唆された。

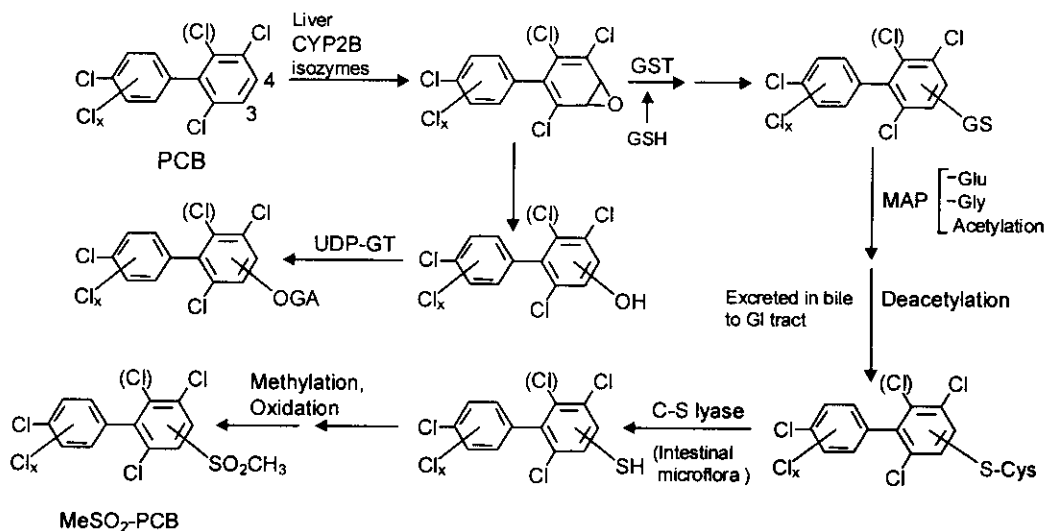


Fig. 18. Speculative representation of the formation of MeSO₂ metabolites of PCBs with 3,4-vicinal hydrogens and 2,5- or 2,5,6-chlorine substitutions

PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与した両動物の血清中 total T₄ 濃度の明らかな低下に対して、血清中 total T₃ 濃度の低下は軽微であり、血清中 TSH 濃度の変化はほとんど見られなかった。これらの結果は、Aroclor1254 を用いた実験結果(Liu *et al.*, 1995)と類似した結果であり、PentaCB、HexaCB 及び KC500 は T₃ よりも、T₄ に対して影響を及ぼし易いものと考えられる。また、甲状腺ホルモンをかく乱する化学物質は、TSH に影響を及ぼすものと及ぼさないものに分類され (Barter and Klaassen, 1994 ; Liu *et al.*, 1995)、PCB は TSH に影響を及ぼさないものに該当することが報告されている (Barter and Klaassen, 1994 ; Liu *et al.*, 1995)。今回の結果は、これらの報告と類似した結果であり血清中 T₄ 濃度の低下が血清中 TSH 濃度の上昇に、直接影響しない可能性も考えられる。

本研究において、PentaCB 及び HexaCB を投与後、肝ミクロソームの CYP2B、CYP3A、CYP1A 及び UGT2B1 の誘導能には、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、PentaCB 及び HexaCB は、ラット、マウスの血清中総テストステロン濃度に対してほとんど影響を及ぼさないが、KC500 はマウスの血清中総テストステロン濃度の増加を引き起こすことが示された。また、PentaCB、HexaCB 及び KC500 は、血清中 T₄ 濃度の顕著な低下作用を有すること、一

方、血清中 T₃ 及び TSH 濃度に対する作用は弱いことが明らかとなった。また、PentaCB 及び HexaCB の T₄ 濃度の低下機序は、UDP-GT 活性の増加による、T₄ の代謝促進ではなく、別の作用機序により引き起こされていることが示唆された。しかし、PentaCB、HexaCB 及び KC500 による血清中 T₄ 濃度の低下に関してラット、マウス間の種差については、今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

PentaCB、HexaCB 投与後、肝臓の CYP2B、CYP3A 及び CYP1A 量、及び UGT2B1 活性の変動には、ラット、マウス間に明確な違いがあることを明らかにした。PentaCB、HexaCB 及び KC500 は、ラット、マウスの血清中 total T₄ 濃度の低下作用を有すること、KC500 は血清中総テストステロン濃度の増加作用を有することを明らかにした。

今後、各動物における PCB の甲状腺ホルモンかく乱作用の発現を追求するに当り、PentaCB、HexaCB 及び KC500 が T₄ の代謝経路のどこに影響を及ぼすかを解明し、各動物間の血清中 T₄ 濃度の低下のメカニズムを明らかにしていくことが重要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Shinya Yumoto, Yasuhiro Nagano, Tomoaki Yamazaki, Yoshito Masuda and Ryohei Kimura. 3-Methylsulfonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a metabolite of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl induces CYP2B1/2 in rats. *Organohalogen Compounds*, **49**, 209-212 (2000).

2. Yoshihisa Kato, Yasuhiko Shinmura, Koichi Haraguchi, Kimie Imai, Kiyomitsu Nemoto, Tachio Aimoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryohei Kimura. *In vivo* metabolism of 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl and its inductive activity of drug-metabolizing enzymes : Species difference between rats and mice. *Organohalogen Compounds*, **49**, 213-216 (2000).

3. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Shinya Yumoto, Yasuhiro Nagano, Tomoaki Yamazaki, Yoshito Masuda and Ryohei Kimura. 2,2',4',5-Tetrabromobiphenyl metabolite, 3-MeSO₂-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl is a potent inducer of CYP2B1/2. *J. Toxicol. Sci.*, **25**, 312 (2000).

4. Yoshihisa Kato, Yasuhiko Shinmura, Koichi Haraguchi, Kiyomitsu Nemoto, Kimie Imai, Tachio Aimoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryohei Kimura: *In vivo* metabolism of 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl and its inductive activity of drug-metabolizing enzymes : Species difference between rats and mice. *J. Toxicol. Sci.*, **25**, 313 (2000).

2. 学会発表

1. 加藤善久、原口浩一、湯本信也、永野泰弘、山崎友朗、増田義人、木村良平 : 2,2',4',5-Tetrabromobiphenyl のメチルスルホン代謝物の強力な CYP2B1/2 誘導作用. 第 27 回日本トキシコロジー学術年会 (横浜)、要旨集、p.186、2000 年 6 月 28 日.

2. 加藤善久、新村康彦、原口浩一、根本清光、今井公江、相本太刀夫、増田義人、出川雅邦、木村良平 : 2,2',4',5,5'-Pentachlorobiphenyl の代謝と薬物代謝酵素誘導能:ラット、マウス間での種差. 第 27 回日本トキシコロジー学術年

会 (横浜)、要旨集、p.187、2000 年 6 月 28 日.

3. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Shinya Yumoto, Yasuhiro Nagano, Tomoaki Yamazaki, Yoshito Masuda and Ryohei Kimura. 3-Methylsulfonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a metabolite of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl induces CYP2B1/2 in rats. 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) (Monterey, California, USA), 2000, Aug., 14.

4. Yoshihisa Kato, Yasuhiko Shinmura, Koichi Haraguchi, Kimie Imai, Kiyomitsu Nemoto, Tachio Aimoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryohei Kimura. *In vivo* metabolism of 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl and its inductive activity of drug-metabolizing enzymes : Species difference between rats and mice. 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) (Monterey, California, USA), 2000, Aug., 14.

5. 加藤善久、新村康彦、原口浩一、山崎友朗、今井公江、根本清光、相本太刀夫、増田義人、出川雅邦、木村良平 : 2,2',3',4',5,6-Hexachlorobiphenyl の代謝と薬物代謝酵素誘導能:ラット、マウス間での種差. 第 15 回日本薬物動態学会年会 (福岡)、薬物動態、15 (Suppl.)、S241、2000 年 10 月 11 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