

20010942

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

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 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 出 川 雅 邦

(静岡県立大学薬学部)

平成 14 (2002) 年 4 月

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 ----- 13

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 ----- 28

根本 清光

3. 植物成分由来の内分泌かく乱物質の検索 ----- 38

梅原 薫

4. チトクローム P450 誘導能を指標とする
in vitro 毒性評価系の確立 ----- 47

横井 毅

5. PCB 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 ----- 56

島田 力

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 66

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 69

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：ラット、マウス、モルモットあるいはハムスターに PCB 類（PentaCB、HexaCB、KC500）を投与し、各 PCB のメチルスルホン（MeSO₂）体及び水酸化(OH)体への代謝能の種差と各動物における甲状腺ホルモン濃度低下作用との関連性、ならびに肝薬物代謝酵素活性の変動の種差と各動物における甲状腺ホルモン濃度低下作用との関連性、さらに PCB 投与時の血清中総サイロキシン（total T₄）濃度の低下における肝臓の UDP-glucuronyltransferase（UDP-GT）活性の関与や肝臓重量の増加とコレステロール生合成系酵素遺伝子や神経栄養因子遺伝子発現との関連性について解析を行った。

その結果、用いたいずれの動物でも PentaCB、HexaCB あるいは KC500 を投与すると、血清中 total T₄ 及び total T₃ 濃度の低下、CYP2B、CYP3A、CYP1A、UGT1A1、UGT1A6、UGT2B1 の誘導、ならびに各 PCB の MeSO₂ 体及び OH 体への代謝能の変動が見られ、これら変動には動物種差があることが明らかになった。また、各 PCB を投与した時の 4 種の動物における血清中 total T₄ 濃度の低下には、MeSO₂ 代謝物による血清中 total T₄ 濃度の低下作用とは別の因子が関与している可能性が示唆された。さらに、PCB 類投与による肝臓肥大にはコレステロール生合成系酵素遺伝子やある種の神経栄養因子遺伝子の発現上昇が深く関わっていることが示唆された。

その他本研究の成果として、1) ディーゼル排気粉塵中のニトロ多環式炭化水素類には CYP1 ファミリー酵素を誘導する性質があること、また、この誘導は細胞株によって差が見られ、この相違は各細胞 CYP1 遺伝子近傍のヒストンのアセチル化状態やこの遺伝子の転写調節部位付近 DNA のメチル化状態の違いに起因する可能性が高いこと、2) アリルハイドロカーボン（AhR）受容体ノックアウトマウスを用いた研究により、PCB（KC300 や KC500 など）による CYP1 の誘導は、AhR 依存的に起こること、および、3) エストロゲン様作用化合物検索のための新規ルシフェラーゼレポーターアッセイが確立されたことなどが挙げられる。

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

島田 力

大阪府立公衆衛生院

主任研究員

研究協力者 木村 良平

静岡県立大学 教授

A. 研究目的

TCDD や PCB など代表的な内分泌かく乱物質には、いずれも肝チトクローム P450（以下 P450 と略す）の発現を変動させる性質があることが報告されている。P450 は、ホルモンの生合成や代謝、外来化合物（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化合物の薬効・毒性発現に深く関わっている。一方また、P450 には種々の分子種が存在すること、それらはそれぞれ異なった外来化合物で誘導されること、また、その誘導には、動物種差・性差・臓器差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を理解するうえで不可欠である。

昨年度までの2年間の研究では、PCB 類や重金属類（鉛など）を投与したラットとマウスを用い、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 酵素への影響を薬物代謝学的及び分子生物学的に検討し、それぞれ動物種差や臓器差（肝、腎及び睪丸）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ともなるコレステロール（ステロイドホルモンの前駆体となる）の生合成に関わる CYP51 酵素の遺伝子が、PCB 類や重金属類（鉛など）投与時、各臓器の重量変化とともに変動することや、少なくとも肝重量の増加（肝細胞の増殖）には神経栄養因子が関わっている可能性

があることなどの新知見を得た。

そこで、本年度はこれまでに得られた知見を踏まえ、変動する酵素（チトクローム P450 やその他コレステロール/ステロイドホルモン生合成系酵素など）の発現変動と内分泌かく乱との関連やこれら酵素の発現機構の解明を行うとともに、種々組織における神経栄養因子の発現と増殖・分化との関連性を明確にすることなどを主目的とした。また、すでにグルココルチコイド（GC）様作用化合物の新規ルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立しており、植物性食品を中心にさらに GC 様作用化合物の検索を進めるとともに、エストロゲン様作用化合物検索のための新規ルシフェラーゼレポーターアッセイ系の確立を目指した。

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

PCB 類や重金属類（鉛やカドミウム）など、既に見出されている内分泌かく乱物質を試料とし、各種実験動物（ラット、マウス、ハムスターなど）に投与した場合の肝および精巣などの各種臓器における異物代謝およびステロイドホルモンの生合成・代謝に関わる各種 P450（CYP1A1、CYP1A2、CYP3A、CYP2B、CYP51、CYP11、CYP17、CYP19 など）や 3-hydroxymethyl-3-glutaryl-CoA reductase（HMG-CoAR）の発現変動を主に RT-PCR 法を用いて検討するとともに、血中ホルモン量（ T_4 やテストステロン）をラジオイムノアッセイにて測定し、これら酵素発現の変動と血中ホルモン量との関連性を追究し

た。

さらに、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、PCB 類や重金属類投与によるラットの肝重量増加（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した。

2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

すでにグルココルチコイド（GC）様作用化合物の新規ルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立しており、植物性食品を中心に GC 様作用化合物の検索を進めるとともに、エストロゲン様作用化合物の新規ルシフェラーゼレポーターアッセイ系の確立を目指した。

2-1. 新規エストロゲン様作用化合物ルシフェラーゼアッセイ系の確立

まず、PCR で増幅したエストロゲンレスポンスエレメント（ERE）断片を pGEM-T Easy Vector System I を用いた TA クローニング法にてプラスミド化した。このプラスミドを制限酵素処理し、ライゲーションパックを用いて、luciferase 遺伝子を含むピッカジーンプロモーターベクターにサブクローニングし、レポータープラスミド ERE-Luc を得た。

得られた ERE-Luc をリポフェクトアミンで処理し、エストロゲンに応答して増殖する事が知られるヒト乳がん由来 MCF-7 細胞あるいは T47D 細胞に加え、12 時間培養することで、トランスフェクションを行った。

2-2. ERE-Luc 導入 MCF-7 を用いたエストロゲン様作用化合物の検索

種々の薬用植物および近郊で入手した野草及び野菜類よりの熱メタノール抽出物を試料

としてエストロゲン様作用化合物の検索を行った。

ERE-Luc を導入した MCF-7 細胞 2×10^4 cells /90 μ l を 96 穴プレートの各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 条件下で 24 時間培養後、試料溶液 10 μ l を各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 条件下で 12 時間培養した。その後、PBS で洗浄後、細胞溶解剤を 20 μ l ずつ加え、室温にて 15 分間放置した後、ルミノスキャンにて、各ウェルに発光基質を加え、発光量（RLU）を測定した。

一方、 10^4 cells/90 μ l に調整した MCF-7 細胞を 96 穴プレートの各ウェルに分注し、そこに試料溶液を加え、4 日間 5 % CO_2 , 37 $^{\circ}$ C で培養し、その後 MTT 法を用いて生細胞数を計数し、各試料が有する細胞増殖促進能を estradiol (E2)のそれと比較検討した。

3) P450 誘導を指標とする in vitro 毒性評価系の確立

種々のヒト臓器由来培養細胞株にニトロ多環式炭化水素類（NPAHs）を曝露させたのち、それぞれの細胞株より total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて、種々の P450 分子種の遺伝子の発現量を比較検討した。また、一部細胞株では、ヒストン脱アセチル化剤や DNA メチル化阻害剤を添加し、各 P450 遺伝子発現における影響を検討した。

4) PCB 類のチトクローム P450 酵素による代謝とその動物種差

野生型とアリルヒドロカーボン受容体（Ah 受容体）ノックアウトマウスに PCB（KC300、KC500 など）や多環式芳香族炭化水素類を投与し、肝および肺の CYP1A1、

CYP1A2、CYP1B1 の誘導性を mRNA レベルおよび酵素活性レベルで調べるとともに、PCB 投与マウスの組織中の PCB 量を GC-MS で定量し、酵素誘導と代謝との関連性を追究した。また、in vitro で KC300 のラット CYP2B1 とヒト CYP2B6 による代謝について GC-MS を用いて比較検討した

(倫理面への配慮)

ホルモン動態、化学物質に感応して引き起こる生体の様々な組織における種々遺伝子の発現変動、およびそれら変動の種差を再現する培養細胞株あるいはそれに代わる実験系が確立されていないため、やむを得ず実験動物を使用した。その使用数は最小限度にとどめ、実験動物に対して苦痛を与えないように十分な配慮をした。PCB などの内分泌かく乱物質やホルモン様作用を有すると考えられる高濃度の被検物質の使用の際には手袋、マスクを着用するなど実験者への曝露がないように十分注意するよう心掛けた。また、それら物質およびそれらを投与した実験動物は厳重に保管し、外部への廃棄は適切な廃棄処理法が確立できるまで行わないようにした。

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

マウス、ラット、ハムスター、モルモット、用いたいずれの動物でも PentaCB、HexaCB あるいは KC500 を投与すると、血清中 total T_4 及び total T_3 濃度の低下、CYP2B、CYP3A、CYP1A、UGT1A1、UGT1A6、UGT2B1 の誘導、ならびに各 PCB の MeSO_2 体及び OH 体への代謝能の変動が見られたが、これら変

化には動物種差があることが明らかになった。また、各 PCB を投与した時の 4 種の動物における血清中 total T_4 濃度の低下には、 MeSO_2 代謝物による血清中 total T_4 濃度の低下作用とは別の因子が関与している可能性が示唆された。

また、PCB 類投与による肝臓肥大にはコレステロール生合成系酵素遺伝子や NGF などある種の神経栄養因子遺伝子の発現上昇が関わっていることが示唆された。

2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

エストロゲンに応答して増殖する事が知られるヒト乳がん由来 MCF-7 細胞を用いて、生薬・薬用植物等、約 300 種の植物メタノールエキスを対象にランダムスクリーニングを行った。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で強い活性を示した 31 種のエキスには phytoestrogen として知られる化合物以外の化合物を主成分とする植物も含まれ、いずれもアンタゴニストである tamoxifen 添加によって、その活性が消失したことから、多彩な化合物がエストロゲン様作用を示す可能性が示唆された。次いで、強いエストロゲン様活性を示した生薬トシシメタノールエキスより活性成分の単離及び構造決定を行った。その結果、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞及び T-47D 細胞の両細胞に対して、濃度 10 μM においてエストロゲン様活性を示す化合物として alkaloid (4)、flavonoid (7)、樹脂配糖体 (10) の 3 種が確認された。

また、植物中のエストロゲン様物質の検索に供する特異的かつ高感度な estrogen 検出系を確立した。本ルシフェラーゼトランジェントアッセイにてヒト乳がん細胞の増殖を促進した化合物 4、7、10 の活性を検討したと

ころ、化合物 4、7 は陽性を示したが、化合物 10 は陰性であった。したがって、化合物 4、7 は ERE を介して、一方、化合物 10 は ERE を介さない経路で細胞増殖を促進するものと考えられた。

3) P450 誘導を指標とする *in vitro* 毒性評価系の確立

種々の培養細胞株を用いて NPAHs による CYP1 誘導機構を検討した結果、CYP1 ファミリーの遺伝子発現が弱い細胞株では、この遺伝子の転写調節近傍部位およびその周辺領域におけるヒストンは脱アセチル化の状態にあり、DNA はメチル化された状態となっている可能性が示唆された。

4) PCB 類のチトクローム P450 酵素による代謝とその動物種差

PCB 類として用いた KC300、KC500 および 3,4,3',4'-四塩化ビフェニル (TCB) は何れも、野生型マウスでは CYP1 を誘導したが、Ah 受容体ノックアウトマウスではその誘導は見られなかった。なお、これら PCB 類のうち、TCB が最も強い誘導性を示した。なお、組織中の PCB の GC-MS パターンを調べた結果、野生型と Ah 受容体ノックアウトマウスの組織中の PCB 異性体の代謝には大きな差は見られなかった。また、*in vitro* で KC300 のラット CYP2B1 とヒト CYP2B6 による代謝について GC-MS を用いて検討した結果、KC300 中の異性体の減少割合は、ラット CYP2B1 の方がヒト CYP2B6 より著しく大きいことが明らかになった。

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

昨年度に引き続き、PCB 類が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追加確認した。また、PCB 類の毒性発現にはそれらのメチルスルホン代謝物が関与していることが示唆されたが、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関与している可能性を見出したことは特筆に値すると考える。

2) 植物成分からの内分泌かく乱物質の検索

植物中のエストロゲン様物質の検索に供する特異的かつ高感度なエストロゲン様作用物質の検出系の作成を目的に、ルシフェラーゼレポーターアッセイ系の確立を試み、それに成功した。また、本アッセイ系がエストロゲンに対し高い応答性を示し、その他のステロイドホルモンに対してはほとんど応答性を示さないことより、エストロゲン様作用化合物選択的検索法として優れていることが確認された。また、MCF7 細胞を用いた増殖活性試験に比べ高感度であることも同時に示され、本アッセイ系の有用性が確認された。

3) 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

これまでに、ラットやヒトの CYP1B1 がディーゼル排気粉塵抽出物やニトロ多環式芳香族炭化水素類 (NPAHs) 化合物の代謝活性化の代謝活性化に関わっていることや、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 CYP1 ファミリー) を肺、肝臓、腎臓などで誘導することを明らかにしてきた。本年度の研究は、種々の培養細胞株を用いて NPAHs による CYP1 誘導機構を検討した。その結果、CYP1 ファミリーの遺伝子発現が弱い細胞株では、この遺伝子の転写調節近傍部位およびその周辺領域におけるヒストンは脱アセチル化の状態にあり、DNA はメチル化された状態となっているため遺伝子の発現が抑制されている可能性が示唆された。本研究結果は、CYP1 ファミリー酵素の誘導機構や、その誘導と内分泌かく乱作用との関連性を明らかにする上で、有益な基礎情報となると考えられる。

4) PCB 類のチトクローム P450 酵素による代謝とその動物種差

用いた PCB 類 (KC300、KC500 および TCB) の何れでも、野生型マウスには CYP1 の誘導を、また、Ah 受容体ノックアウトマウスに対しては誘導性を示さず、これら PCB 類は Ah 受容体依存的に CYP1 を誘導することが明らかになった。なかでも TCB は最も強い誘導性を示し、従来から指摘されてきたようにコプラナーPCB の生物学的作用の強さが確認された。また、このことは、KC300 と KC500 の誘導性はそれらの中に含まれるコプ

ラナーPCB の量に依存している可能性を示唆している。なお、組織中の PCB の GC-MS パターンを調べた結果、野生型と Ah 受容体ノックアウトマウスの組織中の PCB 異性体の代謝には大きな差は見られなかった。また、KC300 のラット CYP2B1 とヒト CYP2B6 による *in vitro* 代謝を比較した結果、その活性には種差があることが明らかになった。

E. 結論

本研究により、1) PCB 類や重金属類 (カドミウム) を種々の実験動物に投与した場合、内分泌かく乱物質の代謝パターンや、ホルモン合成・分解に関わる数種の P450 酵素の発現パターンにそれぞれ動物種差や臓器・組織差があること、2) PCB (PentaCB、HexaCB や KC500) 投与時、血中 T_4 量がラット、マウスともに低下するが、その低下はこれまで考えられてきた UGT 酵素の増加だけでは説明できないこと、3) KC500 投与時、マウス選択的に血中テストステロン量が増加すること、4) 内分泌かく乱物質投与により重量が増加する臓器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、5) PCB 類による CYP1 ファミリー酵素の誘導は Ah 受容体依存的に起こることなどが明らかになった。

以上の結果とこれまでに得られた知見より、1) 内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差が、少なくとも一部、内分泌かく乱物質曝露時の異物代謝やコレステロール・ステロイドホルモン生合成/代謝に関わる P450 を含む種々酵素の発現変動の差に起因していること、また、2) 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していることな

どが示唆される。したがって、内分泌かく乱化合物に対するヒトや各動物の感受性を予知・予測するためには、今後さらに、上記種々酵素の発現におけるヒトを含めた動物種差の解析の進展が望まれる。また、生活環境中（食品を含む）のエストロゲン様作用化合物の新規高感度簡易検索法が確立され、今後、これら化合物の摂取状況と健康影響などの調査・研究が容易になると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiho Ohnishi, Mariko Murata, Masakuni Degawa, and Shosuke Kawanishi, Oxidative DNA damage induced by an N-hydroxy metabolite of carcinogenic 4-dimethylaminoazobenzene. *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, 23-29 (2001).
2. 古賀信幸、金丸知代、大石奈穂子、加藤善久、木村良平、原口浩一、増田義人、2,4,5,2',3',4'-六塩素化ビフェニルの in vitro 代謝における動物種差。福岡医学雑誌、**92**, 167-176 (2001).
3. Yoshihisa Kato, Tomoaki Yamazaki, Koichi Haraguchi, Yuriko Ito, Kiyomitsu Nemoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa, and Ryohei Kimura, Effects of 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl and 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl on serum hormone levels in rats and mice. *Organohalogen Compounds*, **53**, 44-46 (2001).
4. Yoshihisa Kato, Tomoaki Yamazaki, Koichi Haraguchi, Kiyomitsu Nemoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa, and Ryohei Kimura, Effects of polychlorinated

biphenyls (Kanechlor-500) on serum hormone levels in rats and mice. *Organohalogen Compounds*, **53**, 47-49 (2001).

5. Yoshihisa Kato, Yuriko Ito, Tomoaki Yamazaki, Yasuhiko Shinmura, and Ryohei Kimura, Reduction of serum thyroxine level by methylsulfonyl metabolites of chlorinated benzenes in male Sprague-Dowley rats. *Organohalogen Compounds*, **53**, 50-53 (2001).
6. Nobuyuki Koga, Koichi Haraguchi, Tomoyo Kanamaru, Nahoko Oishi, Yoshihisa Kato, and Ryohei Kimura, Species differences in the in vitro metabolism of 2,2',3',4,4',5-hexachlorobiphenyls. *Organohalogen Compounds*, **53**, 428-431 (2001).
7. Yoshihisa Kato, Yuriko Ito, Yuka Terada, Tomoaki Yamazaki, Yasuhiko Shinmura, and Ryohei Kimura, Reduction of serum thyroxine concentration by methylsulfonyl metabolites of chlorobenzenes in male rats. *J. Toxicol. Sci.*, **26**, 241 (2001).
8. Yoshihisa Kato, Tomoaki Yamazaki, Koichi Haraguchi, Kiyomitsu Nemoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa, and Ryohei Kimura, Effects of 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl and 2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl on serum hormone levels in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.*, **26**, 242 (2001).
9. Naoya Hatanaka, Hiroshi Yamazaki, Yoshimitsu Oda, F. Peter Guengerich, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi, Metabolic activation of carcinogenic 1-nitropyrene by

- human cytochrome P450 1B1 in *Salmonella typhimurium* strain expressing an *O*-acetyltransferase in SOS/*umu* assay. *Matat. Res.*, **497**, 223-233 (2001).
10. Naoya Hatanaka, Hiroshi Yamazaki, Ryoichi Kizu, Kazuichi Hayakawa, Yasunobu Aoki, Masashi Iwamori, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi, Induction of cytochrome P450 1B1 in lung, liver and kidney of rats exposed to diesel exhaust. *Carcinogenesis*, **22**, 2033-2038 (2001).
 11. Tsutomu Shimada, Yoshimitsu Oda, Elizabeth M.J. Gillam, F. Peter Guengerich, and Kiyoshi Inoue, Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1176-1182 (2001).
 12. T. Shimada, J. Watanabe, F.P. Guengerich, K. Inoue, and E.M.J. Gillam, Specificity of 17 β -estradiol and benzo[a]pyrene oxidations by polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants substituted residues 48, 119 and 432. *Xenobiotica*, **31**, 163-176 (2001).
 13. Mitsuo Miyazawa, Masaki Shindo, and Tsutomu Shimada, Sex differences in the metabolism of (+)- and (-)-limonene enantiomers to carveol and perillyl alcohol derivatives by cytochrome P450 enzymes in rat liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 15-20 (2002).
 14. Yoshihisa Kato and Ryohei Kimura, The contribution of 2,3,5-trichlorophenyl methyl sulfone, a metabolite of 1,2,4-trichlorobenzene, to the δ -aminolevulinic acid synthetase induction by 1,2,4-trichlorobenzene in rat liver. *Chemosphere*, **47**, 1-7 (2002).
 15. Toshihiko Kasahara, Masamichi Hashiba, Tsuyoshi Harada, and Masakuni Degawa, Change in the gene expression of hepatic tamoxifen-metabolizing enzymes during the process of tamoxifen-induced hepatocarcinogenesis in female rats. *Carcinogenesis*, **23**, 491-498 (2002).
 16. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Sinya Yumoto, Tomoaki Yamazaki, Yasuhiro Nagano, Nobuyuki Koga, Yoshito Masuda, and Ryohei Kimura, Metabolite of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, 3-methylsulphonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a potent inducer of CYP2B1/2 in rat. *Xenobiotica* (in press).
 17. I Masashi, M Nakajima, R Kizu, K Hayakawa, and Tsuyoshi Yokoi, Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissues-derived cells: chemical-, CYP isoform-, and cell specific differences. *Arch. Toxicol.* (in press).
 18. Misaki Kojima, Kiyomitsu Nemoto, Uta Murai, Nami Yoshimura, Yuko Ayabe, and Masakuni Degawa, Altered gene expression of hepatic lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) in lead nitrate-treated rats. *Arch. Toxicol.* (in press).

2. 学会発表

1. 笠原利彦、出川雅邦：タモキシフェンで誘発されるラット肝過形成結節形成過程における発がん関連遺伝子の発現変動。第 28 回日本トキシコロジー学会学術大会（東京）、要旨集、p.108、2001 年 6 月 12 日
2. 加藤善久、伊藤由里子、寺田由香、山崎友朗、新村康彦、木村良平：クロルベンゼン類のメチルスルホン代謝物のラット血清中サイロキシン濃度の低下作用。第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会（東京）、要旨集、p. 121、2001 年 6 月 12 日
3. 加藤善久、山崎友朗、原口浩一、根本清光、増田義人、出川雅邦、木村良平：2,2',4',5,5'-Pentachlorobiphenyl 及び 2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl のラット、マウスの血清中ホルモン濃度に及ぼす影響。第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会（東京）、要旨集、p.122、2001 年 6 月 12 日
4. T Shimada, S Satarug, E.M.J. Gillam, F.P. Guengerich, and K Inoue, Cytochrome P450 1B1 genetic polymorphisms in relation to cancer susceptibilities in humans. 第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会（東京）
5. 小田美光、P. Aryal, E.M.J. Gillam, F.P. Guengerich、島田 力：癌原性芳香族アミンの代謝的活性化におけるヒトチトクローム P450 の役割。第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会（東京）
6. 斎藤昌洋、大西 誠、出川雅邦：ベンゼン曝露によるラット肝シトクローム P450 分子種の発現変動。第 47 回日本薬学会東海支部総会・大会（岐阜）、要旨集、p.16、2001 年 7 月 7 日
7. 治田有美子、牧野正宣、根本清光、出川雅邦：ラット肝由来培養細胞株（Kan-R2）のシトクローム P450 発現能。第 47 回日本薬学会東海支部総会・大会（岐阜）、要旨集、p.15、2001 年 7 月 7 日
8. 阿部郁朗、梅原 薫、根本清光、出川雅邦、野口博司：没食子酸エステルの生理活性（第 2 報）：核内レセプターを介するステロイドホルモン応答性遺伝子の転写制御活性。日本生薬学会第 48 回（2001 年）年会（金沢）、講演要旨集、p.80、2001 年 9 月 7 日
9. 梅原 薫、根本清光、森田良子、宮瀬敏男、野口博司、出川雅邦：生薬カミツレ中の glucocorticoid 様物質の検索 (2)。日本生薬学会第 48 回（2001 年）年会（金沢）、講演要旨集、p.101、2001 年 9 月 7 日
10. 成瀬理紗、関本征史、小島美咲、根本清光、出川雅邦：塩化カドミウム投与時のラット肝臓および精巣における栄養因子の遺伝子発現変動。第 60 回日本癌学会総会（横浜）、総会記事、p.497、2001 年 9 月 7 日
11. 小島美咲、根本清光、出川雅邦：コレステロール生合成酵素遺伝子の発現誘導と細胞増殖との関連性。第 60 回日本癌学会総会（横浜）、総会記事、p.500、2001 年 9 月 7 日
12. Yoshihisa Kato, Tomoaki Yamazaki, Koichi Haraguchi, Yuriko Ito, Kiyomitsu Nemoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa, and Ryohei Kimura, Effects of 2,2',4,5,5'-

- pentachlorobiphenyl and 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl on serum hormone levels in rats and mice. 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) (Gyeongju, Korea), 2001, September 13
13. Yoshihisa Kato, Tomoaki Yamazaki, Koichi Haraguchi, Kiyomitsu Nemoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa, and Ryohei Kimura, Effects of polychlorinated biphenyls (Kanechlor-500) on serum hormone levels in rats and mice. 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) (Gyeongju, Korea), 2001, September 13
 14. Yoshihisa Kato, Yuriko Ito, Tomoaki Yamazaki, Yasuhiko Shinmura, and Ryohei Kimura, Reduction of serum thyroxine level by methylsulfonyl metabolites of chlorinated benzenes in male Sprague-Dowley rats. 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) (Gyeongju, Korea), 2001, September 13
 15. Nobuyuki Koga, Koichi Haraguchi, Tomoyo Kanamaru, Nahoko Oishi, Yoshihisa Kato, and Ryohei Kimura, Species differences in the in vitro metabolism of 2,2',3',4,4',5-hexachlorobiphenyls. 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) (Gyeongju, Korea), 2001, September 13
 16. 梅原 薫、根本清光、宮瀬敏男、野口博司、出川雅邦：植物を起源とするステロイドホルモン様作用物質の検索。日本化学会第 80 秋季年会（千葉）、講演要旨集、p.12、2001 年 9 月 21 日
 17. 加藤善久、伊藤由里子、寺田由香、山崎友朗、新村康彦、木村良平：m-ジクロルベンゼンのラット血清中サイロキシン濃度の低下作用におけるメチルスルホン代謝物の関与。第 16 回日本薬物動態学会年会（神戸）、薬物動態、16 (Suppl.)、S267、2001 年 10 月 17 日
 18. 山崎友朗、加藤善久、原口浩一、根本清光、増田義人、出川雅邦、木村良平：Kanechlor-500 のラット、マウスの血清中ホルモン濃度に及ぼす影響。第 16 回日本薬物動態学会年会（神戸）、薬物動態、16 (Suppl.)、S279、2001 年 10 月 17 日
 19. 岩成正司、中島美紀、山崎浩史、横井毅：ヒト CYP1 ファミリーの細胞特異的な誘導機構について。第 16 回日本薬物動態学会年会（神戸）、2001 年 10 月 17 - 19 日
 20. 島田 力、進藤正樹、宮沢三雄：ヒト肝ミクロゾームによるリモネン異性体の酸化代謝における CYP2C9、CYP2C19 酵素の役割。第 16 回日本薬物動態学会（神戸）
 21. 進藤正樹、宮沢三雄、島田 力：雄ラット特異的に腎障害を引き起こすリモネン異性体のラット肝ミクロゾームによる酸化反応雌雄差および動物種差。第 16 回日本薬物動態学会（神戸）
 22. Misaki Kojima, Kiyomitsu Nemoto, and

- Masakuni Degawa: Altered gene expression of enzymes responsible for the cholesterol and testosterone biosyntheses in testes and livers in lead nitrate-treated rats. 8th International Conference on Environmental Mutagens (Shizuoka, Japan), Mutation Res., 483 (Suppl. 1), S82, 2001, October 21-26
23. Yuko Ayabe, Kiyomitsu Nemoto, Misaki Kojima, and Masakuni Degawa: Effect of cadmium chloride on the gene expression of several enzymes in the testes and livers of rats. 8th International Conference on Environmental Mutagens (Shizuoka, Japan), Mutation Res., 483 (Suppl. 1), S82, 2001, October 21-26
 24. Y Oda, Y Totsuka, K Wakabayashi, and T Shimada, Analysis of metabolic activation of aminophenylnorharman, aminomethylnorharman and aminophenylharman using SOS/umu tester strains. 8th International Conference on Environmental Mutagenesis (Shizuoka)
 25. 出川雅邦：（招待講演）シトクロム P450 と毒性発現：動物種差・性差、フォーラム 2001：衛生薬学・環境トキシコロジー（金沢）、講演要旨集、F4-4、2001 年 10 月 31 日
 26. Kaoru Umehara, Kiyomitsu Nemoto, Masakuni Degawa, and Hiroshi Noguchi: Identificaion of steroid hormone-like compounds in plants using hormone-responsive cells. 日中健康科学シンポジウム（静岡）、2001 年 11 月 6 日
 27. 岩成正司、中島美紀、横井 毅：ヒト CYP1 ファミリーの細胞特異的な誘導機構につ
いて、平成 13 年度日本薬学会北陸支部 第 2 回総会、2001 年 11 月 11 日
 28. 加藤善久、伊藤由里子、安岡佳名子、山崎友朗、出川雅邦、木村良平、原口浩一：市販鯨肉から抽出した有機ハロゲン化合物のマウスにおける体内動態とその生体におよぼす影響、日本内分泌攪乱化学物質学会第 4 回研究発表会（つくば）、要旨集、p.305、2001 年 12 月 14 日
 29. 叶 英樹、八百屋さやか、黒柳正典、梅原 薫、川原信夫：アサガオ毛状根によるフェノール性化合物のグルコシル化、日本薬学会第 122 年会（千葉）、要旨集 2、p. 110、2002 年 3 月 26 日。
 30. 綾部悠子、根本清光、小島美咲、出川雅邦：塩化カドミウム投与によるラットおよびマウスの肝臓・精巣でのコレステロール／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 122 年会（千葉）、要旨集 3、p. 169、2002 年 3 月 26 日
 31. 成瀬理紗、関本征史、小島美咲、根本清光、出川雅邦：カドミウム投与ラットの肝臓および精巣における神経栄養因子遺伝子の発現変動、日本薬学会第 122 年会（千葉）、要旨集 3、p. 169、2002 年 3 月 26 日
 32. 佐藤千尋、梅原 薫、宮瀬敏男、野口博司：キンシバイ（*Hypericum patulum*）中の男性ホルモン（アンドロゲン）様物質に関する研究、日本薬学会第 122 年会（千葉）、要旨集 2、p. 158、2002 年 3 月 27 日
 33. 村松友和、梅原 薫、野口博司：生薬インチコウ（*Artemisiae Capillaris Flos*）中

のグルココルチコイド様物質の検索. 日本薬学会第 122 年会 (千葉)、要旨集 2、p. 162、2002 年 3 月 27 日

34. 宮島省治、濱地勇希、根本清光、加藤善久、木村良平、出川雅邦：Kanechlor500 投与時のマウスおよびラットの肝臓および精巣におけるコレステロール／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 122 年会 (千葉)、要旨集 3、p. 174、2002 年 3 月 27 日
35. 濱地勇希、宮島省治、根本清光、加藤善久、木村良平、出川雅邦：Non-planar PCB 類投与時のラットの肝臓および精巣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 122 年会 (千葉)、要旨集 3、p. 174、2002 年 3 月 27 日
36. 齋藤晶洋、大西 誠、出川雅邦：ベンゼン曝露によるラット肝および精巣でのシトクロム P450 分子種の発現変動. 日本薬学会第 122 年会 (千葉)、要旨集 3、p. 179、2002 年 3 月 27 日
37. 関本征史、根本清光、原 信織、大久保

努、梅原 薫、野口博司、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関連酵素遺伝子の転写活性化. 日本薬学会第 122 年会 (千葉)、要旨集 3、p. 152、2002 年 3 月 28 日

38. 牧野正宣、治田有美子、橋本嘉幸、根本清光、出川雅邦：ラット肝培養細胞株 (Kan-R2) の肝選択的転写活性化因子の発現について. 日本薬学会第 122 年会 (千葉)、要旨集 4、p. 42、2002 年 3 月 28 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、モルモット及びハムスターに 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB)、2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl(HexaCB)及び Kanechlor-500(KC500)を投与し、各 PCB のメチルスルホン(MeSO_2)体及び水酸化(OH)体への代謝能の種差と各動物における甲状腺ホルモン濃度低下作用との関連性、ならびに肝薬物代謝酵素活性の変動の種差と各動物における甲状腺ホルモン濃度低下作用との関連性、さらに PCB 投与時の血清中総サイロキシシン(total T_4)濃度の低下における肝臓の UDP-glucuronyltransferase(UDP-GT)活性の関与について解析を行った。

マウスに種々の用量の3種のPCBsを投与すると、用量の増加に伴って血清中 total T_4 濃度は低下した。各 PCB 投与後のマウスにおける血清中 total T_4 濃度を 50%低下させる用量を算出し、この用量の各 PCB を4種の動物に投与した。血清中 total T_4 濃度は、ラット、マウス及びハムスターに PentaCB(11 mg/kg)投与後、マウスに HexaCB(19 mg/kg)投与後、また4種の動物に KC500(37.5 mg/kg)投与後、有意に低下した。この時、 T_4 -UDP-GT 活性は、マウスに HexaCB 投与後、あるいはモルモットに KC500 投与後にのみ有意に増加した。血清中総トリヨードサイロニン(total T_3)濃度は、マウスに PentaCB 投与後、モルモットに KC500 投与後、有意に低下した。血清中甲状腺刺激ホルモン濃度は4種の動物にいずれの PCB を投与した場合にも全く変化しなかった。4種の動物に PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与した時、benzyloxyresorufin、pentoxyresorufin 及び ethoxyresorufin 代謝酵素活性は、各動物の P450 分子種の違いを反映する変動を示した。Chloramphenicol-UDP-GT (UGT2B1)活性は、ラットに PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与後、またモルモットに KC500 投与後、有意に増加した。4種の動物に PentaCB 及び KC500 を投与した時、肝臓中総 MeSO_2 体濃度はマウス>モルモット>ラット>ハムスターの順になり、HexaCB を投与時には、モルモット>マウス>ラット>ハムスターの順になった。各 PCB 投与後の肝臓中 OH 体濃度は4種の動物で著しく異なっていた。Wistar 系ラット及び UGT1 ファミリーを欠損した Gunn ラットに PentaCB(112 mg/mg)及び KC500(100 mg/kg)を投与した時、血清中 total T_4 濃度は両ラットともに同程度の著しい低下が認められた。この

時、Wistar 系ラットでは UGT1A1 及び UGT1A6(T₄-UDP-GT)の発現量やその活性が顕著に上昇したのに対して、Gunn ラットでは全く変化しなかった。

以上の結果から、4 種の動物に PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与する時、血清中 total T₄ 及び total T₃ 濃度の低下、CYP2B、CYP3A、CYP1A、UGT1A1、UGT1A6、UGT2B1 の誘導、ならびに各 PCB の MeSO₂ 体及び OH 体への代謝能に動物種差があることが明らかになった。また、各 PCB を投与した時の 4 種の動物における血清中 total T₄ 濃度の低下には、MeSO₂ 代謝物による血清中 total T₄ 濃度の低下作用とは別の因子が関与している可能性が示唆された。さらに、マウスに HexaCB を投与した時、あるいはモルモットに KC500 を投与した時の血清中 total T₄ 濃度の低下には、肝臓の UGT1A1 及び UGT1A6 の誘導が関与しているが、ラット、マウス及びハムスターに PentaCB 及び KC500 投与した時の血清中 total T₄ 濃度の低下には、肝臓の UGT1A1 及び UGT1A6 の関与はほとんどなく、別の作用機序が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

多くの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には、PCB のメチルスルホン (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可能性も十分に考えられる。そのため、MeSO₂ 代謝物を生成する PCB では、そ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、とりわけ甲状腺ホルモンかく乱作用の発現の種差の一因になっているものと考えられる。そこで、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甲状腺ホルモンかく乱作用との関連性を追求することを目的とし、ヒトの母乳及び油症患者の組織で検出された MeSO₂-PCBs の母化合物である 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl(PentaCB) 及び 2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl(HexaCB) (Fig. 1)と、これらの PCB をその成分として含み、カネ

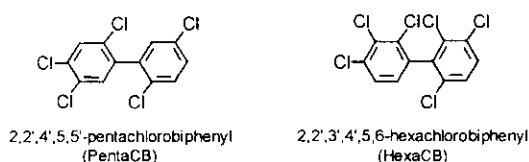


Fig. 1. Chemical structures of 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl and 2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl

ミ油症の原因にもなった Kanechlor-500(KC500) をモデル化合物として選択した。すでに、著者らは平成 11 及び 12 年度の本研究報告書において、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。また、ラット、マウスに PentaCB 及び HexaCB を投与した時、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(CYP2B、CYP3A、CYP1A、UGT2B1 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、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 はマウスの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報告した。そこで、本年度は、PentaCB、HexaCB 及び KC500 をラット、マウス、モルモット及びハムスターに投与し、各 PCB の MeSO₂ 体及び水酸化 (OH)体への代謝の種差と各動物における甲状腺ホルモン濃度低下作用との関連性、ならびに肝薬物代謝酵素活性の変動の種差と各動物における甲状腺ホルモン濃度低下作用との関連

性について検討し、さらに PCB 投与時の血中 T_4 濃度の低下における UDP-glucuronosyl-transferase(UDP-GT)活性の関与について検討を加えた。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。

B. 研究方法

1) PCB の血清中甲状腺ホルモン濃度低下作用における動物種差

種々の用量の PentaCB、HexaCB 及び KC500 を、ddy 系雄性マウス(体重 28~36 g)に 1 回腹腔内投与し、投与後 4 日に血清中 total T_4 濃度を測定した。また、PentaCB(11 mg/kg)、HexaCB(19 mg/kg)及び KC500(37.5 mg/kg)を Wistar 系雄性ラット(体重 170~200 g)、ddy 系雄性マウス(体重 30~39 g)、Hartley 系モルモット(体重 400~540 g)あるいは Syrian 系ハムスター(体重 90~120 g)にそれぞれ 1 回腹腔内投与し、投与後 4 日に屠殺した。血清中 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)濃度を測定するとともに、肝ミクロソームの第 1 相薬物代謝酵素(benzoyloxyresorufin、pentoxyresorufin 及び ethoxyresorufin *O*-dealkylase)活性、chloramphenicol 及び T_4 を基質とした時の UDP-GT 活性、特異的ペプチド抗体を用いて UGT 分子種の発現量、肝臓中の未変化 PCB、 $MeSO_2$ 代謝物及び OH 体濃度を測定した。

2) PCB 投与ラットにおける血清中 T_4 濃度の低下と肝 UDP-GT 活性との関連性

Wistar 系雄性ラット(体重 160~200 g)あるいは遺伝的に UGT1 ファミリーを欠損した Gunn ラット(体重 190~260 g)に PentaCB(112 mg/kg)及び KC500(100 mg/kg)をそれぞれ 1 回腹腔内投与し、投与後 4 日に血清中 total T_4 、total T_3 及び TSH 濃度を測定するとともに、肝ミクロソームにおける第 1 相薬物代謝酵素、UDP-GT 活性、

UGT 分子種の発現量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、*in vivo* での代謝、甲状腺ホルモン濃度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、また UGT1 ファミリーを欠損した動物を用いて *in vivo* での検証を行うため、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) PCB の血清中甲状腺ホルモン濃度低下作用における動物種差

マウスに種々の用量の PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与し、血清中 total T_4 濃度の変動を調べた。PentaCB では 8.4 mg/kg 投与から、HexaCB では 19 mg/kg 投与から、また KC500 では 25 mg/kg 投与から血清中 total T_4 濃度は有意に低下し、投与量の増加に伴って血清中 total T_4 濃度は低下した。3 種の PCB の各投与量と血清中 total T_4 濃度の関係からマウスにおける血清中 total T_4 濃度を 50%低下させる投与量(ED_{50})を算出した。各 ED_{50} は、PentaCB では 11 mg/kg、HexaCB では 19 mg/kg 及び KC500 では 37.5 mg/kg と見積もられた。

ラット、マウス、モルモット及びハムスターに PentaCB(11 mg/kg)、HexaCB(19 mg/kg)及び KC500(37.5 mg/kg)を腹腔内投与し、投与後 4 日の血清中 total T_4 、total T_3 、TSH 濃度を測定した(Figs. 2、3 及び 4)。血清中 total T_4 濃度はラット、マウス及びハムスターに PentaCB 投与後、マウスに HexaCB を投与後、また 4 種の動物に KC500 投与後、有意に低下した(Fig. 2)。血清中 total T_3 濃度はマウスに PentaCB を投与した時、あるいはモルモットに KC500 を投与した時に有意に低下した(Fig. 3)。血清中 TSH 濃度は、4 種の動物にいずれの PCB を投与した場合にも変化は全く認められなかった(Fig. 4)。

4種の動物に各PCBを投与し、4日後の肝ミクロソーム薬物代謝酵素活性を測定した(Figs. 5, 6及び7)。Benzoyloxyresorufin *O*-dealkylase 活性はラットにおいて PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与後、対照値のそれぞれ7倍、4倍及び34倍に増加した(Fig. 5)。マウスでは HexaCB 及び KC500 投与後、この酵素活性は対照値の2倍及び3倍に、またハムスターでは KC500 投

与においてのみ、対照値の4倍に増加した。一方、モルモットでは PentaCB 及び HexaCB 投与後に、それぞれ対照値の約50%に低下した。Pentoxoresorufin *O*-dealkylase 活性はラットにおいて PentaCB 及び KC500 投与後、対照値のそれぞれ4倍及び19倍に増加した(Fig. 6)。マウスでは HexaCB 及び KC500 投与後、ハムスターでは KC500 投与後にのみ、この酵素活性は

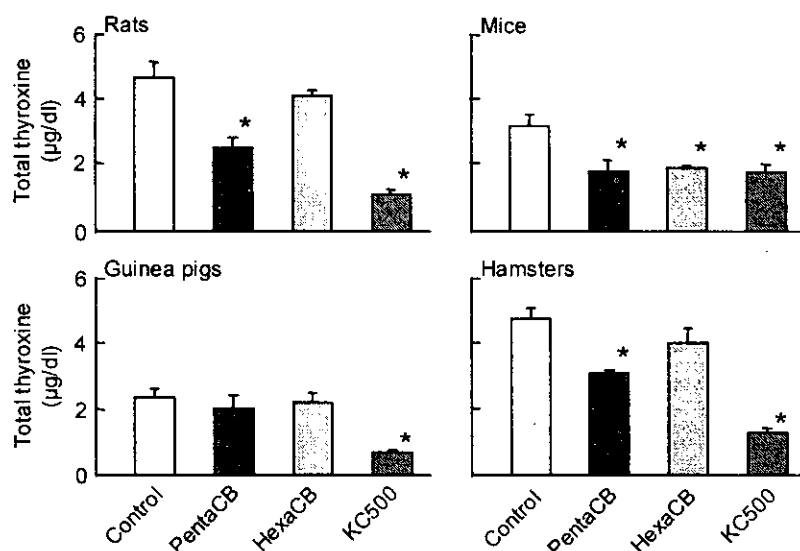


Fig. 2. Effects of PentaCB, HexaCB and KC500 on serum total thyroxine concentration in rats, mice, guinea pigs and hamsters

Animals were given PentaCB (11 mg/kg), HexaCB (19 mg/kg) and KC500 (37.5 mg/kg) i.p. and killed at 4 days after the administration. Each column represents the mean $\pm$ S.E. (vertical bars) for five to six animals. * P <0.05, significantly different from each control.

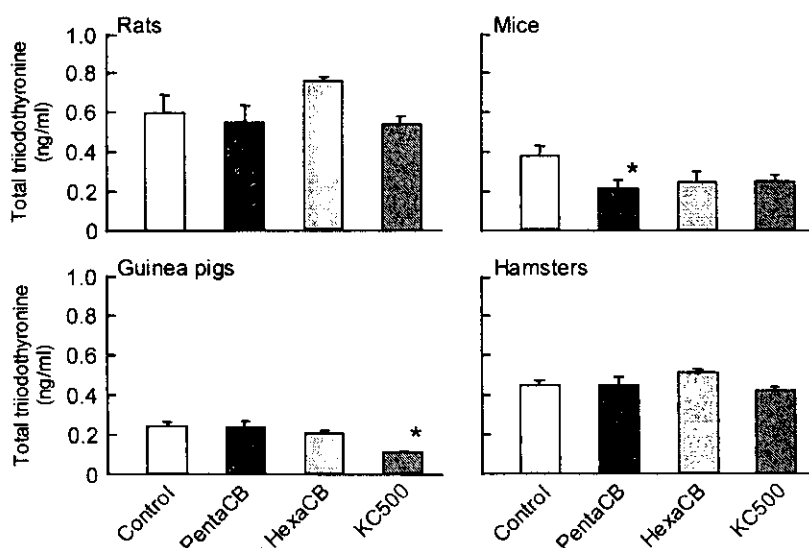


Fig. 3. Effects of PentaCB, HexaCB and KC500 on serum total triiodothyronine concentration in rats, mice, guinea pigs and hamsters

The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 2. Each column represents the mean $\pm$ S.E. (vertical bars) for six animals. * P <0.05, significantly different from each control.

わずかに増加した。一方、モルモットに PentaCB 投与後、この酵素活性は有意に低下した。Ethoxyresorufin O-dealkylase 活性はラットにおいて PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与後、対照値に対してそれぞれ 1.9 倍、1.4 倍及び 28 倍に増加した(Fig. 7)。ハムスターでは KC500 投与時にのみ、この酵素活性は有意に増加した。また、モルモットでは KC500 投与後、著しく増加

したが、PentaCB 投与によっては有意に低下した。

Chloramphenicol-UDP-GT 活性はラットに 3 種の PCB を投与後、有意に増加し、その増加割合は PentaCB では 66 %、HexaCB では 36 %、KC500 では 192 %であった。モルモットでは KC500 投与においてのみ、この UDP-GT 活性はわずかに増加した。一方、マウス及びハムス

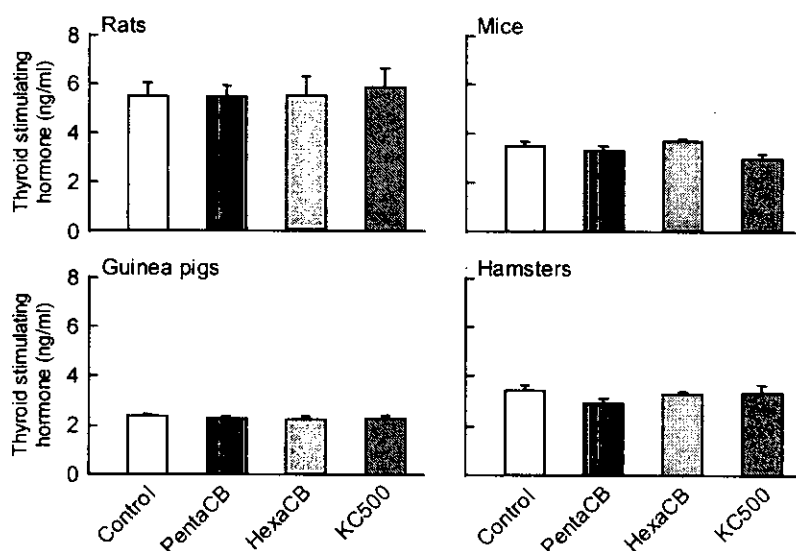


Fig. 4. Effects of PentaCB, HexaCB and KC500 on serum thyroid stimulating hormone concentration in rats, mice, guinea pigs and hamsters

The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 2. Each column represents the mean $\pm$ S.E. (vertical bars) for five to six animals.

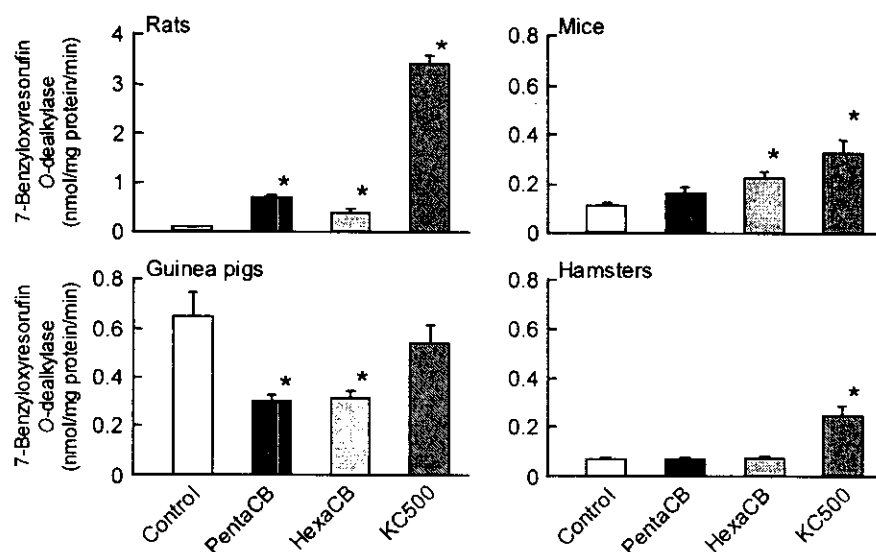


Fig. 5. Effects of PentaCB, HexaCB and KC500 on drug-metabolizing enzyme activities of liver microsomes in rats, mice, guinea pigs and hamsters

The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 2. Each column represents the mean $\pm$ S.E. (vertical bars) for four to six animals.

* $P < 0.05$, significantly different from each control.

ターではいずれの PCB 投与においても変化は全く観察されなかった。T₄-UDP-GT 活性は、マウスにおいて HexaCB 投与後、あるいはモルモットにおいて KC500 投与後、有意に増加した。一方、ラット及びハムスターにおいていずれの PCB を投与した時にも、この UDP-GT 活性の変化は全く観察されなかった。各動物に 3 種の PCB を投与し、肝ミクロソームの UGT 分子種の

発現量について、ラットの UGT1A 及び UGT2B1 の抗体を用いて検討した(Fig. 8)。PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与したラットにおいて、UGT1A 及び UGT2B1 の発現量の増加が観察された(Fig. 8)。マウス、モルモット、ハムスターの各対照群において、ラット UGT1A 抗体、UGT2B1 抗体に反応して複数のバンドが認められた(Fig. 8)。KC500 を投与したモルモット

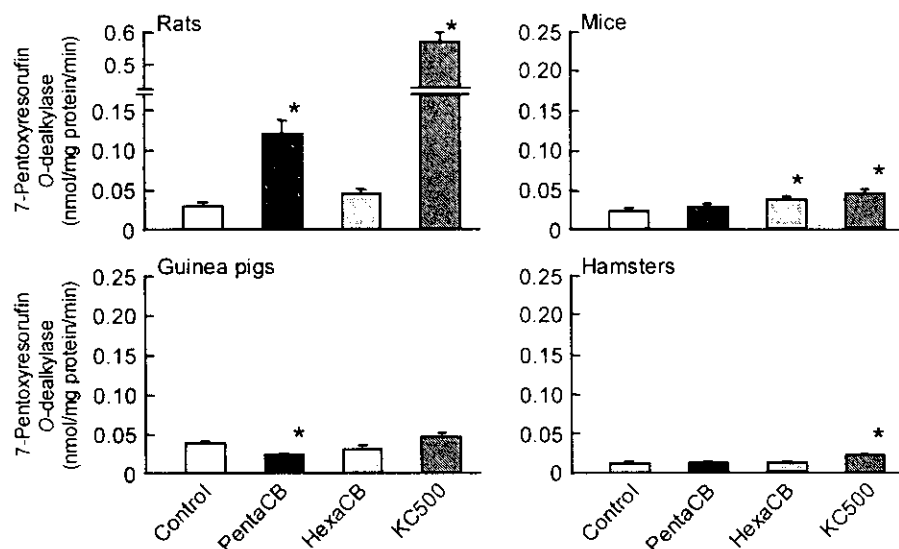


Fig. 6. Effects of PentaCB, HexaCB and KC500 on drug-metabolizing enzyme activities of liver microsomes in rats, mice, guinea pigs and hamsters

The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 2. Each column represents the mean $\pm$ S.E. (vertical bars) for four to six animals. * $P < 0.05$, significantly different from each control.

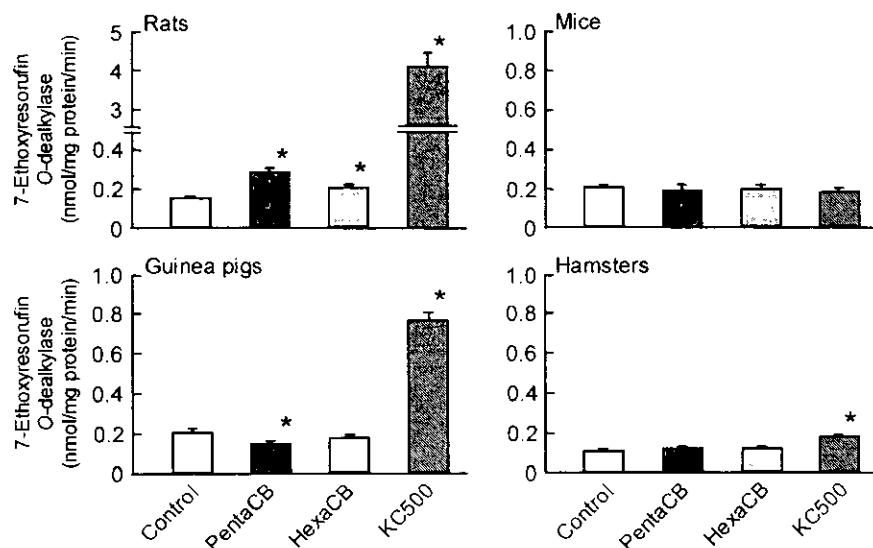


Fig. 7. Effects of PentaCB, HexaCB and KC500 on drug-metabolizing enzyme activities of liver microsomes in rats, mice, guinea pigs and hamsters

The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 2. Each column represents the mean $\pm$ S.E. (vertical bars) for four to six animals. * $P < 0.05$, significantly different from each control.