

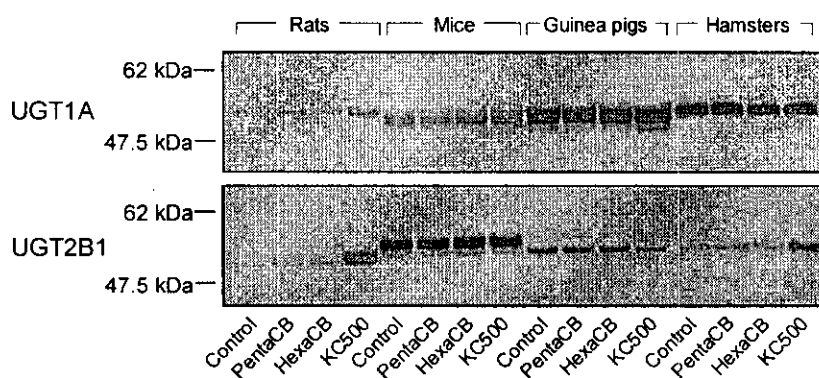


Fig. 8. Immunoblots of hepatic microsomes of rats, mice, guinea pigs and hamsters treated with PentaCB, HexaCB and KC500

The experimental conditions were the same as described in the note to Fig. 2. Microsomes proteins (10 µg) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters, and probed with antibodies against UGT1A and UGT2B1.

Table 1. Liver concentrations of PCB congeners after the administration of PentaCB, HexaCB and KC500 to rats, mice, guinea pigs and hamsters

Treatment	PCB congener	PCB concentration (ng/g liver)			
		Rats	Mice	Guinea pigs	Hamsters
PentaCB	PentaCB	1179.5 ± 102.5	1246.5 ± 629.5	212.0 ± 179.0	287.0 ± 247.5
HexaCB	HexaCB	436.5 ± 35.5	860.5 ± 354.5	375.0 ± 214.0	337.5 ± 30.5
KC500	PentaCB	33.5 ± 1.6	105.2 ± 14.3	187.4 ± 43.4	139.6 ± 8.5
	2,3,3',4,4'-pentaCB	253.5 ± 16.6	307.8 ± 21.2	213.8 ± 45.2	167.0 ± 5.0
	2,3',4,4',5-pentaCB	811.6 ± 25.2	545.4 ± 48.9	816.0 ± 158.1	494.6 ± 17.2
	2,2',3,4,4',5'-hexaCB	859.2 ± 49.6	721.4 ± 38.4	598.8 ± 139.8	370.6 ± 24.9
	2,2',4,4',5,5'-hexaCB	426.5 ± 18.5	302.6 ± 32.3	372.6 ± 95.2	246.6 ± 9.5
	2,3,3',4,4',5-hexaCB	205.3 ± 12.0	75.2 ± 10.8	167.3 ± 42.1	47.7 ± 5.7
	2,2',3,3',4,4',5-heptaCB	204.8 ± 10.3	121.8 ± 10.6	151.5 ± 45.6	33.4 ± 2.4
	2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB	160.2 ± 6.3	113.6 ± 11.0	139.8 ± 38.5	102.4 ± 5.1
	Sum of PCB	3000.3 ± 147.8	2292.6 ± 156.4	2664.3 ± 420.5	1604.4 ± 62.3

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. Results are expressed as the mean ± S.E. for two to six animals.

において UGT1A の発現量が増加した(Fig. 8)。また、PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与したハムスターにおいて、UGT2B1 の発現量が増加した。一方、マウスではいずれの PCB を投与しても UGT1A、UGT2B1 の発現量は変化しなかった。

各動物において 3 種の PCB を投与し、投与後 4 日の肝臓中未変化 PCB 濃度を測定した結果を Table 1 に、MeSO₂ 体及び OH 体濃度を測

定した結果を Table 2 に示す。4 種の動物に PentaCB 投与後、肝臓中未変化体濃度はラット及びマウスでは約 1,200 ng/g となり、モルモット及びハムスターの場合にはそれらの約 1/4～1/6 となった(Table 1)。また、HexaCB 投与後の肝臓中未変化体濃度はマウスにおいて 860 ng/g となり最も高く、ラット、モルモット及びハムスターの場合にはその約 1/2～1/3 となった。4 種の動物に KC500 投与後、肝臓中未変化 PCB の総濃

Table 2. Liver concentrations of MeSO₂- and OH-PCB metabolites after the administration of PentaCB, HexaCB and KC500 to rats, mice, guinea pigs and hamsters

Treatment	Metabolite	MeSO ₂ - or OH-PCB concentration (ng/g liver)			
		Rats	Mice	Guinea pigs	Hamsters
PentaCB	3-MeSO ₂ -PentaCB	13.6 ± 1.5	74.1 ± 3.0	28.1 ± 3.3	3.2 ± 0.1
	4-MeSO ₂ -PentaCB	23.4 ± 4.3	105.9 ± 6.3	20.2 ± 8.6	2.4 ± 0.1
	Sum of mono-OH-PCB	178.7 ± 124.9	130.8 ± 19.5	164.6 ± 81.8	21.7 ± 15.2
	Sum of di-OH-PCB	152.8 ± 110.3	4.4 ± 1.0	12.1 ± 11.5	18.6 ± 13.0
HexaCB	3-MeSO ₂ -HexaCB	100.8 ± 7.2	141.4 ± 30.1	480.4 ± 19.1	15.4 ± 0.4
	4-MeSO ₂ -HexaCB	126.3 ± 8.6	158.8 ± 29.0	107.4 ± 2.8	18.8 ± 0.5
	Sum of mono-OH-PCB	307.5 ± 46.8	326.0 ± 184.0	126.9 ± 103.3	247.1 ± 8.1
	Sum of di-OH-PCB	54.2 ± 24.5	1.8 ± 1.0	15.5 ± 8.1	45.9 ± 5.5
KC500	3-MeSO ₂ -2,3',4',5-tetraCB	32.3 ± 4.1	57.3 ± 2.8	9.1 ± 1.7	18.9 ± 1.0
	4-MeSO ₂ -2,3',4',5-tetraCB	23.9 ± 3.1	83.6 ± 4.1	19.9 ± 3.7	12.3 ± 0.7
	3-MeSO ₂ -2,2',3',4',5-pentaCB	9.3 ± 1.2	9.2 ± 0.4	8.0 ± 1.5	2.4 ± 0.1
	4-MeSO ₂ -2,2',3',4',5-pentaCB	12.8 ± 1.6	29.8 ± 1.5	17.9 ± 3.3	5.0 ± 0.3
	3-MeSO ₂ -PentaCB	5.3 ± 0.7	16.8 ± 0.8	26.7 ± 5.0	6.3 ± 0.3
	4-MeSO ₂ -PentaCB	3.8 ± 0.5	34.3 ± 1.7	27.7 ± 5.1	1.1 ± 0.1
	3-MeSO ₂ -HexaCB	3.5 ± 0.5	10.1 ± 0.5	19.6 ± 3.6	n.d. ^{a)}
	4-MeSO ₂ -HexaCB	5.1 ± 0.7	8.3 ± 0.4	8.3 ± 1.5	n.d. ^{a)}
	3-MeSO ₂ -2,2',4',5,5',6-hexaCB	3.8 ± 0.5	3.2 ± 0.2	0.2 ± 0.0	n.d. ^{a)}
	4-MeSO ₂ -2,2',4',5,5',6-hexaCB	2.3 ± 0.3	15.0 ± 0.7	0.2 ± 0.0	n.d. ^{a)}
	Sum of MeSO ₂ -PCB	102.2 ± 13.0	267.4 ± 13.2	137.5 ± 25.5	46.0 ± 2.5
	Sum of OH-PCB	258 ^{b)}	106 ^{b)}	2568 ^{b)}	709 ^{b)}

The experimental conditions were the same as described in the note to Table 1. Results are expressed as the mean ± S.E. for two to six animals. ^{a)}Not detected. ^{b)}Results are expressed as roughly estimated value.

度はラットで最も高く(3,000 ng/g)、続いてモルモット>マウス>ハムスターの順であった(Table 1)。各動物で KC500 投与後、肝臓中に残存する PCB 同族体の主なものは、Table 1 に示した 8 種の PCB であった。その内 PentaCB 及び 2,3,3',4,4'-pentaCB を除く 6 種類の肝臓中未変化 PCB 濃度は、ラットにおいて最も高く、続いてモルモット>マウス>ハムスターの順であった(Table 1)。一方、残りの 2 種類の肝臓中未変化 PCB 濃度は、それらのパターンとは異なっていた。4 種の動物において PentaCB 投与後、肝臓中 3-MeSO₂ 代謝物濃度は、マウスにおいて最も高く、続いてモルモット>ラット>ハムスターの順

であった(Table 2)。また、肝臓中 4-MeSO₂ 代謝物濃度も、マウスで最も高く、続いてラット>モルモット>ハムスターの順であり、ハムスターのその濃度はマウスの場合の 1/45 であった。各動物において HexaCB 投与後、肝臓中 3-MeSO₂ 代謝物濃度は、モルモットにおいて最大となり、続いてマウス>ラット>ハムスターの順であった(Table 2)。また、肝臓中 4-MeSO₂ 代謝物濃度は、マウス>ラット>モルモット>ハムスターの順であり、ハムスターにおける肝臓中 4-MeSO₂ 代謝物濃度は著しく低かった。4 種の動物において KC500 投与後、肝臓中総 MeSO₂ 代謝物濃度はマウスにおいて最大となり、モルモットではその 1/2、ラ

ットでは約 1/3、ハムスターでは約 1/6 であった (Table 2)。マウス、モルモット及びラットにおいて KC500 投与後、肝臓中の主な MeSO₂ 代謝物は、Table 2 に示した 10 種の PCB であった。その内 8 種類の肝臓中 MeSO₂ 代謝物濃度は、マウスにおいて最も高く、ハムスターでは最も低いか、検出されなかった。各動物において PentaCB 投与後、肝臓中 mono-OH 体及び di-OH 体濃度はいずれもラットにおいて最大となり、続いて mono-OH 体ではモルモット>マウス>ハムスターの順であり、di-OH 体ではハムスター>モルモット>マウスの順であった (Table 2)。また、HexaCB 投与後の肝臓中 mono-OH 体濃度は、マウス>ラット>ハムスター>モルモットの順であり、di-OH 体濃度は、ラット>ハムスター>モルモット>マウスの順であった。一方、KC500 投与後の肝臓中総 OH 体濃度はモルモットにおいて著しく高く、ハムスターではその約 1/4、ラットでは約 1/10、マウスでは約 1/25 であった。

2) PCB 投与ラットにおける血清中 T₄ 濃度の低下と肝 UDP-GT 活性との関連性

Wistar 系ラット及び Gunn ラットに KC500(100

mg/kg)を腹腔内投与し、投与後 4 日の血清中 total T₄、total T₃ 及び TSH 濃度を測定した結果を Table 3 に示す。KC500 を投与した時、血清中 total T₄ 濃度は両ラットとも同程度の著しい低下が認められたが、血清中 total T₃ 及び TSH 濃度は両ラットとも変化しなかった (Table 3)。また、PentaCB(112 mg/mg)投与時においても、両ラットとも血清中 total T₄ 濃度は著しく低下したが、血清中 TSH 濃度は変化しなかった。一方、Gunn ラットに PentaCB を投与した場合には、血清中 total T₃ 濃度はわずかに低下した。

両ラットに KC500 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結果を Table 4 に示す。両ラットに KC500 投与後、benzyloxyresorufin、pentoxyresorufin 及び ethoxyresorufin 代謝酵素活性はいずれも著しく増加した。この時、Gunn ラットにおけるそれら 3 種の酵素活性の増加割合は、Wistar 系ラットの場合より少なかった (Table 4)。また、両ラットに PentaCB 投与後、benzyloxyresorufin 及び pentoxyresorufin 代謝酵素活性はそれぞれ顕著に増加した。この時、Gunn ラットの増加割合は Wistar 系ラットの増加割合より少なかった。ま

Table 3. Effects of KC500 on serum total thyroxine, total triiodothyronine and thyroid stimulating hormone concentrations in Wistar and Gunn rats

Treatment	Total thyroxine (µg/dl)		Total triiodothyronine (ng/ml)		Thyroid stimulating hormone (ng/ml)	
	Wistar	Gunn	Wistar	Gunn	Wistar	Gunn
Control	2.95 ± 0.15	8.59 ± 0.21 [†]	0.34 ± 0.03	0.96 ± 0.05 [†]	7.43 ± 1.74	20.85 ± 1.79 [†]
KC500	0.51 ± 0.04*	1.66 ± 0.02*	0.30 ± 0.04	0.86 ± 0.03	5.48 ± 0.85	17.19 ± 2.61

Animals were given 100 mg/kg of KC500 i.p. and killed at 4 days after the administration. Results are expressed as the mean ± S.E. for three to six animals. *P<0.01, significantly different from control. [†]P<0.01, significantly different from control of Wistar rats.

Table 4. Effects of KC500 on drug-metabolizing enzyme activities of liver microsomes in Wistar and Gunn rats

Treatment	7-Benzoyloxyresorufin O-dealkylase (nmol/mg protein/min)		7-Pentoxyresorufin O-dealkylase (nmol/mg protein/min)		7-Ethoxyresorufin O-dealkylase (nmol/mg protein/min)	
	Wistar	Gunn	Wistar	Gunn	Wistar	Gunn
Control	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.004	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01
KC500	6.72 ± 0.64*	1.11 ± 0.11*	0.82 ± 0.03*	0.22 ± 0.02*	7.31 ± 0.92*	1.35 ± 0.05*

The experimental conditions were the same as described in the note to Table 3. Results are expressed as the mean ± S.E. for four to six animals. *P<0.01, significantly different from control.

た、ethoxyresorufin 代謝酵素活性は両ラットとも同程度に増加した。

両ラットに PentaCB 及び KC500 投与後、chloramphenicol-UDP-GT 活性はそれぞれ有意に増加した。この時、いずれの PCB 投与の場合にも、Gunn ラットにおける UDP-GT 活性の増加割合は、Wistar 系ラットの場合より少なかった。T₄-UDP-GT 活性は、Wistar 系ラットに PentaCB 及び KC500 を投与した時、顕著に増加した。一方、Gunn ラットでは PentaCB、KC500 投与時に T₄-UDP-GT 活性は変化しなかった。各ラットに PentaCB 及び KC500 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 抗体を用いて検討した (Fig. 9)。Wistar 系ラットに PentaCB 及び KC500 を投与した時、UGT1A 及び UGT2B1 の発現量は増加した (Fig. 9)。特に、UGT2B1 の発現量の増加は、いずれの PCB 投与の場合にも顕著であった。一方、Gunn ラットにおいて UGT1A は発現していなかったが、UGT2B1 はわずかに発現していた。Gunn ラットに PentaCB 及び KC500 を投与した場合、いずれの PCB 投与においても UGT1A の発現は観察されなかった (Fig. 9)。一方、両 PCB 投与により UGT2B1 の発現量はわずかに増加した。

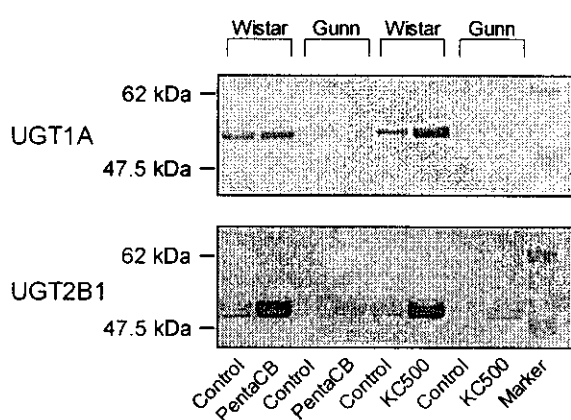


Fig. 9. Immunoblots of hepatic microsomes of Wistar and Gunn rats treated with PentaCB and KC500

Animals were given PentaCB (112 mg/kg) and KC500 (100 mg/kg) i.p. and killed at 4 days after the administration. Microsomes proteins (10 µg) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters, and probed with antibodies against UGT1A and UGT2B1.

D. 考察

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

今回、4 種の動物に PCB を投与した時、血清中 T₄ 濃度を肝薬物代謝酵素活性及び肝臓中 PCB 及びその代謝物濃度と併せて検討するために、マウスでの用量と血清中 T₄ 濃度との関係から各 PCB の投与量を ED₅₀ に定め、本実験を進めた。

血清中 total T₄ 濃度は PentaCB 投与によりラット、マウス及びハムスターにおいて、また HexaCB 投与によりマウスにおいて有意に低下した。さらに、KC500 投与により全ての動物において有意に低下し、その低下割合は各動物によって異なっていた。血清中 total T₃ 濃度は PentaCB 投与によりマウスにおいて、また KC500 投与によりモルモットにおいて有意に低下した。PCB 投与によるマウス、モルモット、ハムスターの血清中甲状腺ホルモン濃度の低下を報告した例はなく、今回が初めての報告である。これらの結果から、PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与による血清中 total T₄、total T₃ 濃度の低下において、ラット、マウス、モルモット、ハムスター間に種差があることが明らかになった。

一般に、血清中 T₄ 濃度の低下の要因として、甲状腺濾胞上皮細胞における T₄ の合成系の抑制、T₄ のグルクロン酸抱合をはじめとする T₄ の代謝系の促進などいくつかのメカニズムのかく乱が考えられる。また、T₄ の代謝を促進する主な UDP-GT 分子種は、UGT1A1 及び UGT1A6 であることが報告されている。今回、4 種の動物に PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与した時、T₄-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。これらの結果から、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 T₄ 濃度の低下には、肝臓の UDP-GT (UGT1A1 及び UGT1A6) の誘導による T₄ の代謝促進による T₄ の消失を含むことが示唆された。しかし、ラット、マウス及

びハムスターに PentaCB 及び KC500 を投与した時の血清中 T_4 濃度の低下は、肝臓の UDP-GT の誘導による T_4 の代謝促進では説明が困難であり、別の作用機序による可能性が示唆された。

PCB 及びその OH 体は血中 T_4 の輸送タンパクである transthyretin(TTR)と結合すること、さらに、そのことが T_4 の血中での標的器官への輸送を阻害し、血中 T_4 濃度を低下させる一因となる可能性があることが報告されている。これらのことから、ラット、マウス、モルモット及びハムスターにおいて PentaCB、HexaCB あるいは KC500 投与による血清中 T_4 濃度の低下の一因は、PCB 及び OH-PCB と TTR とが結合することである可能性が考えられる。特に、KC500 を投与したモルモットでは PCB の OH 体の生成量が著しく多いことから、KC500 投与モルモットにおける血清中 T_4 濃度の低下には、肝臓の UDP-GT の誘導による T_4 の代謝促進に加えて、PCB 及び OH-PCB と TTR との結合が T_4 低下の一因となっている可能性が考えられる。

ラットにおいて PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与により benzyloxyresorufin、pentoxyresorufin 及び ethoxyresorufin *O*-dealkylase 活性は著しく増加した。すでに、PentaCB 及び HexaCB は弱い phenobarbital 型誘導剤であることが報告されている。今回の結果はこの報告を支持する結果であった。一方、KC500 は phenobarbital 様誘導剤であることが報告されている。しかし、今回の 3 種の基質を用いた酵素誘導の結果から、KC500 は強力な混合型誘導剤であることが示された。4 種の動物に PentaCB 及び HexaCB を投与した場合、3 種の酵素活性はラット、マウスで増加し、マウスにおけるそれらの増加割合はラットの場合より小さいか、それらの変化は認められなかった。一方、モルモットでは、それらの酵素活性は低下するか、変化しなかった。また、ハムスターでは、いずれの酵素活性にも変化は認められなかった。4 種の動物に KC500 投与後、3 種の酵素活性はラットにおい

て著しく増加した。マウス及びハムスターではそれらの酵素活性は同程度に増加したが、それらの増加割合はラットの増加割合に及ばなかった。また、モルモットでは ethoxyresorufin 代謝酵素活性のみ顕著に増加した。これらの結果は、薬物代謝酵素誘導において 4 種の動物間に種差があることを支持しており、各動物の P450 分子種の違いを反映した結果であると考えられる。

ラットに PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与後、UGT2B1(chloramphenicol-UDP-GT)活性及び UGT2B1 の発現量は増加した。また、モルモットに KC500 投与後、UGT2B1 活性はわずかに増加したが、UGT2B1 の発現量は変化しなかった。一方、ハムスターに PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与後、UGT2B1 活性は変化しなかったが、UGT2B1 の発現量はわずかに増加した。また、マウスではいずれの PCB 投与によっても、この酵素活性及び UGT2B1 の発現量は変化しなかった。これらの結果は、PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与による UGT2B1 の誘導において 4 種の動物間に種差があることを示している。また、各 PCB を投与した 4 種の動物の chloramphenicol-UDP-GT 活性の増加と UGT2B1 の発現量の増加、あるいは T_4 -UDP-GT 活性の増加と UGT1A の発現量の増加は、必ずしも相関していなかった。しかし、ラットの UGT1A 及び UGT2B1 抗体を用いて、モルモット及びハムスターの UGT1A 及び UGT2B1 分子種を検討した報告はなく、それら 2 種の動物の UGT1A 及び UGT2B1 分子種のアミノ酸配列も報告されていない。今回、モルモット及びハムスターにも、ラットの UGT1A 及び UGT2B1 抗体に反応した複数のバンドが観察されたことから、ラットの UGT1A 及び UGT2B1 と相同性が高いそれら 2 種の分子種が存在することが示唆された。

4 種の動物に PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与した時、それぞれの肝臓中未変化 PCB の残存量、 $MeSO_2$ 体及び OH 体の生成量は著しく異なり、それらの PCB 代謝において 4 種の

動物間に明白な種差があることが示された。3種の PCB を投与した各動物における肝臓中 OH-PCB 濃度及び MeSO₂-PCB 濃度の違いは、エポキシイド生成に關与する CYP2B (pentoxyresorufin *O*-dealkylase) 活性の違いとは相関せず、この違いには PCB のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄率の違い、グルタチオン抱合体及びシステイン抱合体の生成量の違い、あるいは各動物の腸内細菌 C-S lyase の質的、量的な違いなどが關与している可能性が考えられる。

PentaCB 投与後の肝臓中総 MeSO₂ 代謝物濃度はマウスにおいて最も高く、続いてモルモット>ラット>ハムスターの順となった。この時、血清中 total T₄ 濃度はラット、マウス及びハムスターにおいて低下したが、モルモットでは変化しなかった。また、HexaCB 投与後の肝臓中 3-MeSO₂ 代謝物濃度はモルモット>マウス>ラットの順となり、4-MeSO₂ 代謝物濃度はマウス>ラット>モルモットの順となり、ハムスターにおける肝臓中両 MeSO₂ 体濃度は著しく低かった。この時、マウスにおいてのみ血清中 total T₄ 濃度の低下が観察された。KC500 投与後の肝臓中の総 MeSO₂ 代謝物濃度はマウスで最大となり、続いてモルモット>ラット>ハムスターの順となった。しかし、この時の血清中 total T₄ 濃度の低下割合はラット>モルモット>ハムスター>マウスの順であった。これらの結果から、3種の PCB 投与後の各動物の血清中 total T₄ 濃度の低下と肝臓中 MeSO₂ 代謝物濃度との間に相関が見られず、それぞれの場合の血清中 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に、他の因子が關与している可能性が示唆された。

2) PCB 投与ラットにおける血清中 T₄ 濃度の低下と肝 UDP-GT 活性との関連性

Gunn ラットにおいて UGT1A の発現は全く認められなかったが、UGT2B1 の低レベルの発現は認められた。また、Gunn ラットに PentaCB 及

び KC500 を投与した場合、UGT2B1 活性及び UGT2B1 の発現量は増加した。これらの結果から、本実験に用いた Gunn ラットは UGT1 ファミリーを欠損しているが、UGT2B1 を有しており、その誘導を受ける能力があることが確認された。

Gunn ラットに PentaCB 及び KC500 を投与した時、benzyloxyresorufin、pentoxyresorufin 及び ethoxyresorufin 代謝酵素活性の増加割合は、Wistar 系ラットに両 PCBs を投与した時のそれらの酵素活性の増加割合よりも少なかった。この結果から、Gunn ラットにおける pentoxyresorufin (CYP2B1/2)、benzyloxyresorufin (CYP2B1/2、CYP3A、CYP2C) 及び ethoxyresorufin *O*-dealkylase (CYP1A1/2) の酵素誘導能力は、Wistar 系ラットの場合より低いことが示された。このことは、Gunn ラットでは UGT1 ファミリーの欠損だけでなく、P450 分子種の種類と含量にも変化が生じていることを示している。

Wistar 系ラット及び Gunn ラットに PentaCB 及び KC500 を投与後、血清中 total T₄ 濃度は両ラットとも同程度に著しく低下した。この時、Wistar 系ラットにおいて両 PCBs 投与後の T₄-UDP-GT 活性及び UGT1A の発現量は顕著に増加した。一方、Gunn ラットでは PentaCB 及び KC500 投与により、T₄-UDP-GT 活性の変化及び UGT1A の発現は全く認められなかった。これらの結果を考え併せると、Gunn ラットに PentaCB 及び KC500 を投与した時の血清中 T₄ 濃度の低下には、肝臓の UDP-GT は關与せず、別のメカニズムが關与していることが示唆された。このことから、Wistar 系ラットに PentaCB 及び KC500 を投与した時の血清中 T₄ 濃度の低下においても、肝の UDP-GT 活性の増加以外に別の作用機序が關与している可能性が考えられる。

両ラットに KC500 を投与した場合、血清中 total T₃ 濃度は両ラットとも変化しなかった。一方、両ラットに PentaCB 投与後、Wistar 系ラットの血清中 total T₃ 濃度は変化しなかったが、Gunn ラットでは有意に低下した。血清中 TSH 濃度は、両ラットともいずれの PCB 投与によっても変化し

なかった。これらの結果から、PentaCB は Gunn ラットに対して軽度に血清中 T_3 濃度に影響を及ぼすこと、KC500 は Gunn ラットの血清中 T_3 濃度にほとんど影響を及ぼさないこと、また両 PCBs は Gunn ラットの血清中 TSH 濃度にほとんど影響を与えないことが示唆された。このことは、PCB 類は血清中 T_3 濃度よりも血清中 T_4 濃度に影響を及ぼしやすく、血清中 TSH 濃度にはほとんど影響を及ぼさないという報告を支持している。

E. 結論

ラット、マウス、モルモット及びハムスターに PentaCB、HexaCB 及び KC500 を投与する時、血清中 total T_4 、total T_3 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、PentaCB、HexaCB 及び KC500 投与後の 4 種の動物における血清中 total T_4 濃度の低下には、MeSO₂ 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。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 T_4 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 および KC500 を投与した時の血清中 T_4 濃度の低下には、肝臓の UGT1A1 及び UGT1A6 の関与はほとんどなく、別の作用機序が関わる可能性が示唆された。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理解するためには、各動物における血中 T_4 濃度の低下作用メカニズムを解明し、PCB の甲状腺ホルモンに対する作用における動物種差を明らかにする必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*, (2002) in press.

2. 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).

3. 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).

4. 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).

5. 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).

6. 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-Dawley rats. *Organohalogen Compounds*, **53**, 50-53 (2001).

7. Nobuyuki Koga, Koichi Haraguchi, Tomoyo Kanamaru, Nahoko Oishi, Yoshihisa Kato, Ryohei Kimura and Yoshito Masuda, Species differences in the *in vitro* metabolism of

2,2',3',4,4',5-hexachlorobiphenyl. *Organohalogen Compounds*, **53**, 428-431 (2001).

8. 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).

9. 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).

2. 学会発表

1. 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巢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)、講演要旨集4、P51、2001年3月29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の濃度の低下作用. 第28回日本トキシコロジー学会学術年会(東京)、要旨集、P121、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、P122、2001年6月12日

4. Yoshihisa Kato, Tomoaki Yamazaki, Koichi Haraguchi, Yuriko Ito, Kiyomitsu Nemoto, Yoshito Masuda, Masakuni Degawa and Ryohei Kimura, Effects of 2,2',4,5,5'-pentachloro-

biphenyl 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, Sep., 13

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-Dawley rats. *21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants(POPs)*, (Gyeongju, Korea), 2001, Sep., 13

6. 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, Sep., 13

7. Nobuyuki Koga, Koichi Haraguchi, Tomoyo Kanamaru, Nahoko Oishi, Yoshihisa Kato, Ryohei Kimura and Yoshito Masuda, Species differences in the in vitro metabolism of 2,2',3',4,4',5-hexachlorobiphenyl. *21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants(POPs)*, (Gyeongju, Korea), 2001, Sep., 10

8. 加藤善久、伊藤由里子、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の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

9. 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

10. 宮島省吾、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)、講演要旨集 3、P174、2002 年 3 月 27 日

11. 濱地勇希、宮島省吾、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)、講演要旨集 3、P174、2002 年 3 月 27 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：内分泌かく乱物質の作用の一つとして、コレステロール／ステロイドホルモン生合成のかく乱が推定される。これら生合成に関わる酵素には、CYP51、CYP11、CYP17 といったチトクローム P450 があり、内分泌かく乱物質によるそれら遺伝子発現への影響を評価することは、内分泌かく乱作用機構の解明、内分泌かく乱物質に対する感受性の動物種差の解明に極めて重要な課題であると思われる。われわれは昨年度までに、PCB 類や硝酸鉛投与ラットおよびマウスで、肝臓、精巣の臓器重量変化に応じて、コレステロールやステロイドホルモンの生合成に関わる種々酵素の遺伝子発現が変動することを見いだしている。本年度は、肝臓や精巣に組織傷害性を示し、発がん性や内分泌かく乱作用が疑われているカドミウムに注目し、塩化カドミウム（Cd）投与ラットでの肝臓・精巣の臓器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を検討した。その結果、Cd 投与により、肝重量の増加、精巣重量の一過性の増加（12 時間後）の後の減少を観察したが、HMG-CoA R、CYP51、CYP11、CYP17、3 β HSD 遺伝子の発現変動が認められた。したがって、カドミウムの内分泌かく乱作用発現にもコレステロール／ステロイドホルモン生合成系酵素の遺伝子発現変動が深く関わっている可能性が考えられた。

また、Cd 投与ラットの肝臓・精巣では、コレステロール／ステロイドホルモン生合成系酵素と同様にある種の神経栄養因子、神経栄養因子受容体の遺伝子発現も変動し、加えて、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いた検討から、神経栄養因子が HMG-CoA R や CYP51 遺伝子の発現制御を行う可能性を見いだした。このことから、内分泌かく乱物質の毒性発現に神経栄養因子が重要な役割な役割を果たすことが推定された。

A. 研究目的

細胞膜やオルガネラ膜の構成成分であるコレステロール（Chol）は、図 1 に示すように、HMG-CoA reductase（HMG-CoA R）や lanosterol 14 α -demethylase（CYP51）と

いった種々酵素の触媒により生合成される。

細胞内 Chol の量的制御は、これら酵素の量的変動により行われているが、最近では、細胞内 Chol の量的変動が、増殖・分化といった細胞機能発現に重要な役割を果たしている

ことが盛んに示されるようになってきた。また、Chol は、種々ステロイドホルモン、胆汁酸などの前駆体ともなり、例えば精巣内では、図 2 に示すように、CYP11、 3β HSD や CYP17 といった酵素により testosterone が生合成される。環境化学物質の内分泌かく乱作用機序を考える上で、それら物質の、性ホルモンおよびその前駆物質である Chol の生合成量へ及ぼす影響を評価することは極めて重要な課題であると思われる。

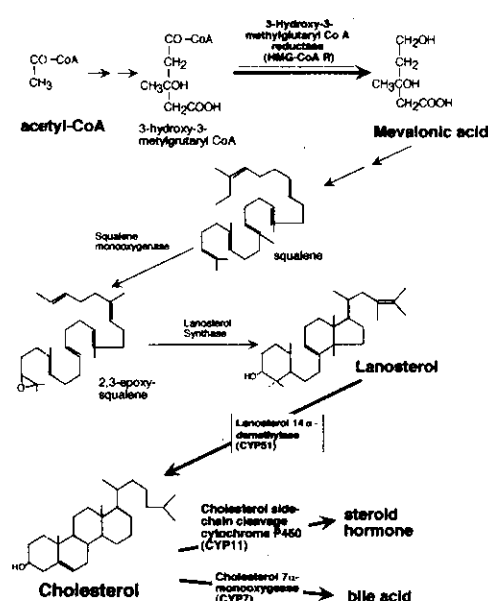


図 1 コレステロール生合成経路

われわれは昨年度までに、内分泌かく乱物質である PCB 類や硝酸鉛投与ラットおよびマウスで、肝臓、精巣の臓器重量変化に応じて、Chol やステロイドホルモンの生合成に関わる種々酵素の遺伝子発現が変動することを見いだしている。本年度は、肝臓や精巣に組織傷害性を示し、発がん性や内分泌かく乱作用が疑われているカドミウムに注目し、塩化カドミウム (Cd) 投与ラットでの肝臓・精巣のコレステロール／ステロイドホルモン生合成系

酵素遺伝子の発現変動を検討した。また、昨年度、硝酸鉛投与によるラット肝肥大に神経栄養因子が関与する可能性を示したが、それら遺伝子の発現についても、あわせて検討した。さらに本年度は、環境化学物質の内分泌かく乱作用発揮への神経栄養因子の関わりを評価するために、神経栄養因子による Chol 生合成関連遺伝子の発現制御の可能性も追究した。

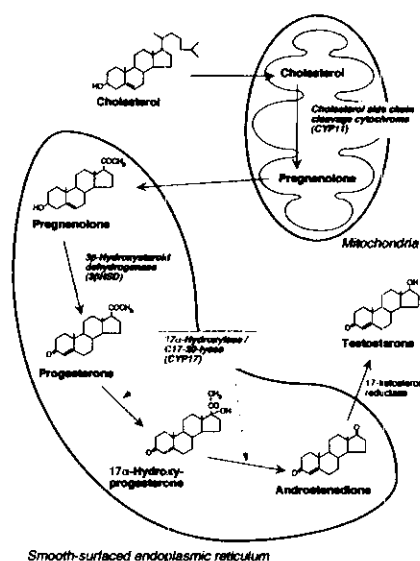


図 2 精巣でのコレステロールからテストステロンへの合成経路

B. 研究方法

1) 塩化カドミウム投与ラットの肝臓および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

7 週齢雄性 SD ラットに塩化カドミウム (Cd) を単回 (20 μ g/kg, s.c) 投与し、12、24、48 時間後の肝臓、精巣を摘出、臓器重量を測定した後 (臓器重量は 72 時間後も測定)、total RNA を抽出し、コレステロール生合成酵素 (HMG-CoA R、CYP51)、ステロイド

ホルモン生合成 (CYP11、CYP17、 3β HSD) 酵素遺伝子の発現変動を RT-PCR 法により検討した。

2) 塩化カドミウム投与ラットの肝臓および精巣での神経栄養因子、それら受容体遺伝子の発現変動

上記1) で得た total RNA を用いて、神経栄養因子 (NGF、BDNF、NT-3、NT-4) やそれら受容体遺伝子の発現を RT-PCR 法により検討した。

神経栄養因子およびそれに対応する受容体の関連性を図 3 に示した。それら遺伝子発現量は、図 4 の矢印で示すような位置に対応する primer を用いて、RT-PCR により検討した。神経栄養因子は、図 4A に示すように、BDNF や NT-3 は 5'側エクソンで alternative splicing が見られるため、これらについては、個々の alternative splicing 転写産物を検出できるように primer を設定した。神経栄養因子受容体の Trk ファミリーに関しては、ポリペプチドの挿入、あるいは C 末側の欠落が見られるものがあるため、図 4B に示すように、その欠落体を検出しないように primer を設定した。

3) 神経栄養因子によるコレステロール生合成系酵素の発現調節

ラット副腎髄質褐色腫由来 PC12 細胞を通常培養条件下 (10%牛胎児血清+5%馬血清)、50 ng/ml NGF を添加後、経時的に各細胞より total RNA を調製し、RT-PCR により、2 種 Chol 生合成酵素遺伝子 (HMG-CoA R、CYP51) の発現を検討した。

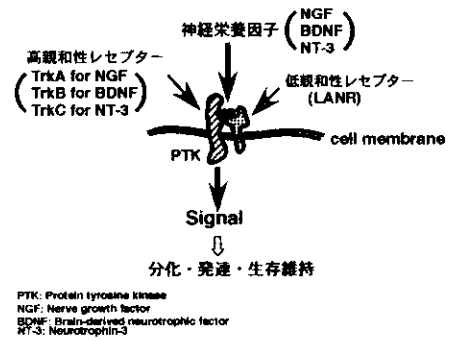


図 3 神経栄養因子とその受容体

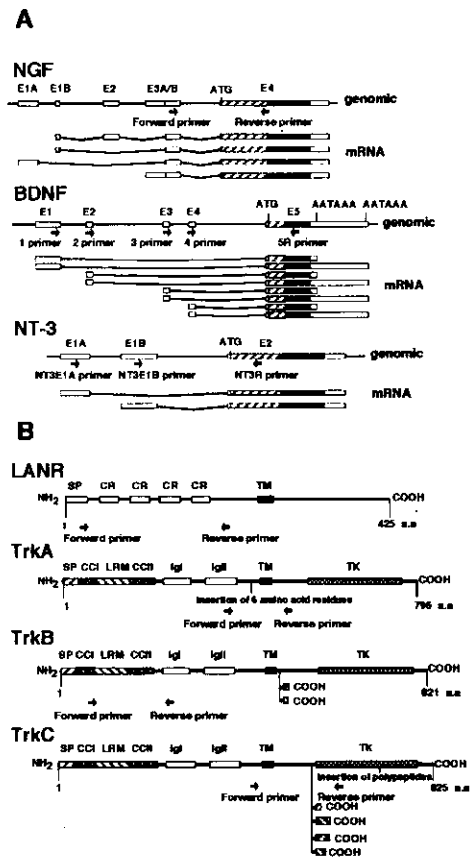


図 4 神経栄養因子遺伝子 (A) および神経栄養因子受容体 (B) の構造

太字矢印は、RT-PCR に用いたプライマーの設定箇所と方向を示す。

SP: signal peptide, CR: cystein-rich region, CC: cystein cluster, LRM: leucine-rich motif, Ig: immunoglobulin-like C2-type motif

(倫理面への配慮)

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は、培養細胞株を用いた実験系では再現できないため、やむを得ず実験動物を使用して研究を進めている。しかし、研究の進展に伴い、培養細胞系を用いて研究可能と判断された場合には、その研究項目については順次、動物実験から培養細胞を用いた実験に移行していく。

C. 研究結果

1) 塩化カドミウム投与ラットの肝臓および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

図 5 に示すように、肝臓重量は、Cd 投与後 24 時間から 72 時間まで有意に増加した。一方、精巣重量は 12 時間後に増加が見られたが、その後減少し、72 時間後には、無処置群に比し、有意な減少を示した。

肝臓における種々遺伝子の発現変動に関しては、HMG-CoA R 遺伝子は、Cd 投与後、12 時間で一過性の発現上昇が、CYP51 および 3 β HSD 遺伝子は、12 時間で上昇し、そのレベルは 48 時間まで持続した (図 6)。逆に、CYP17 遺伝子の発現は 12 時間から 48 時間まで減少し続けた (図 6)。CYP11 遺伝子はいずれの時間でも発現が検出されなかった。一方、精巣において、HMG-CoA R 遺伝子発現は、48 時間まで低下し続け、CYP51 および CYP11 遺伝子の発現は、24 時間まで上昇した後、48 時間でコントロールレベル以下まで減少した (図 7)。CYP17 および 3 β HSD 遺伝子は 48 時間で顕著な発現低下が観察された (図 7)。

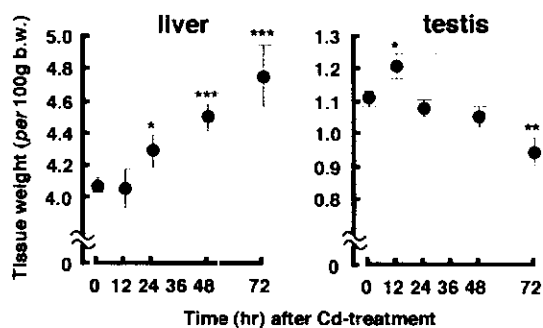


図 5 塩化カドミウム投与ラットの肝臓、精巣の重量変化

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

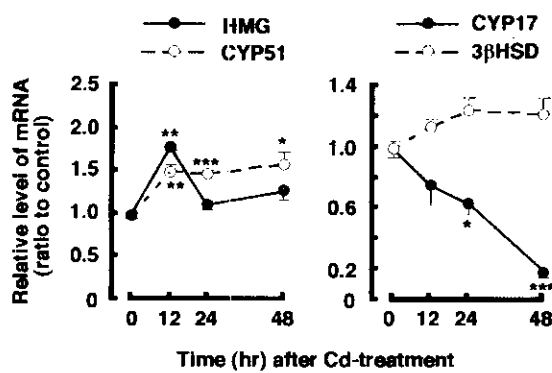


図 6 塩化カドミウム投与ラット肝臓でのコレステロール/ステロイドホルモン生合成系酵素遺伝子の発現変動

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

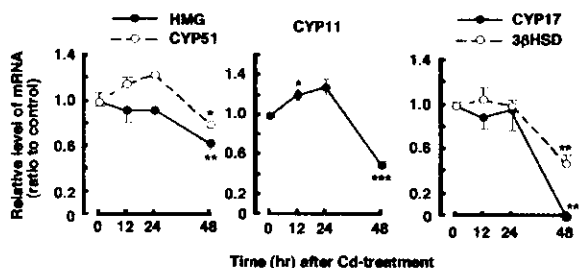


図 7 塩化カドミウム投与ラット精巣でのコレステロール/ステロイドホルモン生合成系酵素遺伝子の発現変動

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

2) 塩化カドミウム投与ラットの肝臓および精巣での神経栄養因子、それら受容体遺伝子の発現変動

Cd 投与ラットの肝臓、精巣における神経栄養因子、受容体遺伝子発現を検討し、以下の結果を得た。

① 肝臓重量の増加に先立ち、12 時間で BDNF Ex4、NT-3 E1A mRNA の発現増加が認められた。さらに、肝重量が増加し始める 24 時間後に TrkC mRNA の一過性な発現増加、48 時間後には LANR mRNA の発現増加と TrkA、TrkB mRNA の発現減少が認められた。BDNF Ex4、NT-3 E1A mRNA については 48 時間後に再度発現増加が認められた。(図 8)

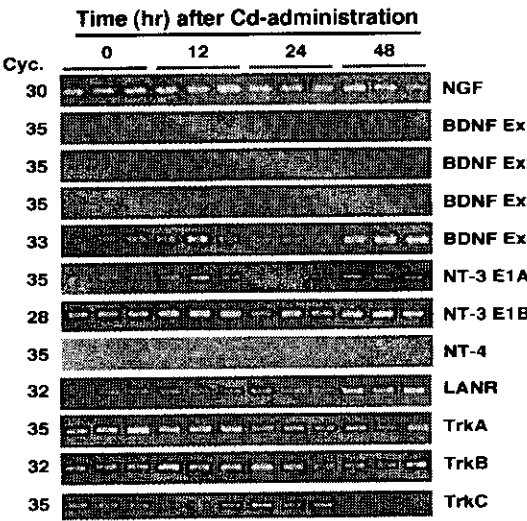


図 8 塩化カドミウム投与ラット肝臓での神経栄養因子およびその受容体遺伝子の発現変化

② 精巣重量の減少が見られ始める 48 時間後には、NGF、BDNF Ex3、Ex4、TrkA mRNA の発現増加、NT-4、TrkB、TrkC mRNA の発現量も減少が認められた。(図 9)

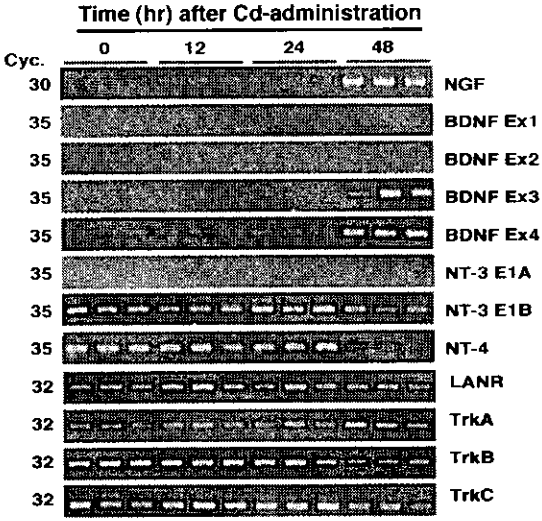


図 9 塩化カドミウム投与ラット肝臓での神経栄養因子およびその受容体遺伝子の発現変化

3) 神経栄養因子によるコレステロール生合成系酵素遺伝子の発現調節

通常培養条件下での、PC12 細胞への NGF 処理は、HMG-CoA R、CYP51 各遺伝子の顕著な発現を、それぞれ処理 1~4 時間後、2 ~ 12 時間後に惹起した (図 9)。同様の結果が、BDNF の高親和性受容体 TrkB の発現ベクターを導入した PC12-TrkB 細胞への BDNF 曝露によっても得られた。これらの結果から、NGF や BDNF といった神経栄養因子が HMG-CoA R、CYP51 の各遺伝子の発現調節を行う可能性が示唆された。また、これら発現亢進は、高親和性受容体 Trk の選択的阻害剤である K252a の前処理により阻害されたことより、2 種の神経栄養因子受容体 (高親和性受容体 TrkA、B、C および低親和性受容体 LANR) のうち、Trk 受容体を介した発現調節であることが示唆された。

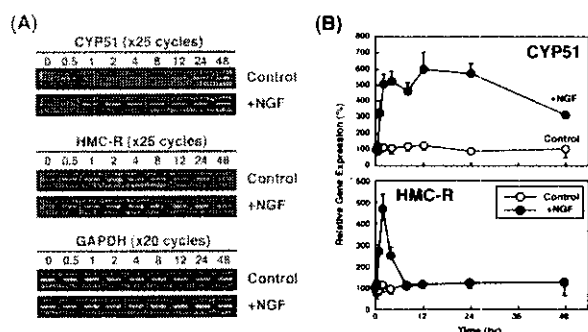


図 10 NGF 処理 PC12 細胞における遺伝子発現変化

PC12 細胞を NGF (50 ng/ml) 含有の通常培地で培養し、経時的に totalRNA を分離した。さらに RT-PCR を行ない CYP51 遺伝子および HMG-CoA R (HMG-R) 遺伝子の発現を検討した。(A) にアガロース電気泳動像を、(B) に Real Time PCR により定量化したものを示した。

D. 考察

1) 塩化カドミウム投与ラットの肝臓および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

われわれは昨年度までに、内分泌かく乱物質である PCB 類や硝酸鉛投与ラットおよびマウスで、肝臓、精巣の臓器重量変化に応じて、コレステロールやステロイドホルモンの生合成に関わる種々酵素の遺伝子発現が変動することを見いだしている。今回、肝臓や精巣に組織傷害性を示し、内分泌かく乱作用が疑われているカドミウムにおいても、同様の知見が得られたことから、内分泌かく乱物質の作用発現にコレステロール／ステロイドホルモン生合成系酵素の遺伝子発現変動が深く関わっている可能性が考えられる。

したがって、今後は、コレステロール／ステロイドホルモン生合成系酵素の遺伝子発現変動と内分泌かく乱作用の関連性、内分泌かく乱物質によるそれら遺伝子の発現調節機構を、内分泌かく乱物質に対する感受性の動物

種差を考慮に入れながら詳細に検討する予定である。

2) 塩化カドミウム投与ラットの肝臓および精巣での神経栄養因子、それら受容体遺伝子の発現変動

① 肝臓について

われわれは、既に、Pb で誘導される肝肥大過程で、種々神経栄養因子および神経栄養因子受容体の遺伝子発現が変動することを見出している。本研究で示したように、Cd 投与ラットの肝肥大時でも、種々遺伝子の発現が変動することから、肝肥大を引き起こす様々な環境化学物質の毒性発現に対して神経栄養因子が関わること、および、肝細胞増殖に神経栄養因子が重要な役割を果たす可能性があるものと推定される。しかし、Pb と Cd とでの肝肥大過程で、種々遺伝子の発現様式は異なっているように思われる。これは、両化合物間での肝肥大の割合、変動時間の相違を導く何らかの要因があるものと思われる。今後、さらに、肝障害を引き起こす環境化学物質での検討を行い、肝障害への神経栄養因子の役割を評価していく必要があると考える。

② 精巣について

これまで、精巣の発生、分化および精子形成への神経栄養因子の役割に関する報告はいくつかなされていたが、環境化学物質曝露により、種々神経栄養因子および神経栄養因子受容体の発現変動が引き起こされることを示した報告は今回が初めてである。NGF、TrkA mRNA は精巣の Leydig 細胞、Sertoli 細胞など非生殖細胞で、LANR、TrkB、TrkC mRNA は、精母細胞、精子細胞で発現していることが報告されている。Cd 投与により変

動した神経栄養因子遺伝子および神経栄養因子受容体遺伝子が、いかなる種類の細胞で変動しているのか、そして、それらと Cd による細胞傷害性との関連性に興味を持たれる。

3) 神経栄養因子によるコレステロール生合成系酵素遺伝子の発現調節

本研究により、神経栄養因子である NGF や BDNF は Trk 受容体のチロシンキナーゼを活性化することにより HMG-CoA R、CYP51 といったコレステロール生合成系酵素遺伝子の発現を惹起することが見いだされた。

神経栄養因子は、神経系のみならず、精巣の発生、分化、機能維持に重要な役割を果たしているものとされている。また、われわれは、硝酸鉛や塩化カドミウム投与により傷害を受けた肝臓や精巣で、それら遺伝子やその受容体遺伝子の発現が変化することを見いだしている。さらには、内分泌かく乱物質の作用の一つとして、コレステロール/ステロイドホルモン生合成のかく乱が推定されている。これらを考慮に入れると、神経栄養因子がコレステロール生合成系酵素遺伝子発現調節を介して、内分泌かく乱物質の作用発現に関与している可能性が強く考えられ、本研究成果は極めて興味深いものと思われる。今後、神経栄養因子によるそれら酵素遺伝子の発現調節機構を詳細に検討する予定である。

E. 結論

本研究により、1) 塩化カドミウムをラットに投与することにより、肝臓、精巣の臓器重量が変動すること、その変動に伴い、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や神経栄養因子および受容体遺伝子

の発現変動が見られること、2) 神経栄養因子がコレステロール生合成系酵素遺伝子の発現を調節する可能性のあることなどが明らかになった。

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. 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).
3. 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).
4. 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).

5. 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).
6. 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、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
3. 斉藤昌洋、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

4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. Kaoru Umehara, Kiyomitsu Nemoto, Masakuni Degawa, and Hiroshi Noguchi: Identification 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
20. 宮島省治、濱地勇希、根本清光、加藤善久、木村良平、出川雅邦：Kancchlor500 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
21. 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
22. 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
23. 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
24. 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 P 450 発現を指標として

分担研究課題：植物成分由来の内分泌かく乱物質の検索

分担研究者 梅原 薫 静岡県立大学 薬学部助手
(以下の研究者との分担研究として行った)

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：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 $\mu\text{g/ml}$ 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 estrogen (E)様作用を示す可能性が示唆された。強い E 様活性を示した生薬トシシメタノールエキス中の E 様物質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 E 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、化合物 4、7 は、アンタゴニストの同時処理でその活性が消失したが、化合物 10 の活性に変化は認められなかったことから、ER を介さない経路で細胞増殖を促進している可能性が推測された。

また、植物中の estrogen 様物質の検索に供する特異的かつ高感度な estrogen 検出系の作成を目的に、ルシフェラーゼアッセイ系の確立を試みた。本アッセイ系は、被験物質の作用をレポーター遺伝子の転写・翻訳として捉えることから、作用経路がシンプルであり短時間で評価が可能な特長を有する。MCF-7 細胞及び T-47D 細胞に一過性にレポータープラスミドを導入した、ルシフェラーゼトランジェントアッセイの結果、本アッセイ系が E2 に対し高い応答性を示す一方、その他のステロイドホルモンに対してはコントロールレベルの T/C を示すに止まり、E2 に対する高い特異性が示唆された。また、増殖活性試験に比べ高感度であることも同時に示された。

本アッセイ系を用いて、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 には両細胞で E 様活性が確認できたものの、化合物 10 は E 様活性を示さなかった。これは tamoxifen を併用した E-screen の結果と同様であり、化合物 10 が ERE を介さない経路でがん細胞の増殖を促進している可能性を支持するものと思われた。

A. 研究目的

内分泌系は神経系及び免疫系と共に生体の恒常性を保つために重要な制御機構であり、乳癌や前立腺癌等、様々な疾患がその異常

により引き起こされる。ホルモンの働きは、例えば排卵を促すといった、一時的なものと考えられがちだが、胎児にとってその影響は一過性ではなく、一生を通じてまた世