

間固定した後、パラフィン包埋した。4 μm のパラフィン切片を脱パラフィンした後、内因性パーオキシダーゼ活性の阻止 (0.3% H_2O_2 加メタノール 30 分) を行い生理食塩水 (PBS) で洗浄した。CYP1A1 の一次抗体と 37 度で 1 時間反応させ、生理食塩水 (PBS) で洗浄後、ビオチン化二次抗体と 37 度で 1 時間反応させた。PBS にて洗浄後、アビジン・ビオチン複合体 (PK-400, Vector Lab. Burlingame, California) で 30 分室温にて反応後、PBS で洗浄、0.003% hydrogen peroxide を基質として 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, Missouri) を加えて発色させた。ヘマトキシリン染色で対比染色を行った。

7. 統計解析

値は平均値 \pm 標準誤差であらわした。対照群と実験群の平均値の差は t-test により検定した。

C. 研究結果

AhR ノックアウトマウスにおける TCDD の影響

TCDD 曝露の生後 21 日目の AhR(+/-)雌雄マウスでは、対照マウスと比べて血清 TT4 の有意な低下が認められたが、AhR(-/-)マウスでは血清 TT4 は対照と変わらなかった (図 1)。肝臓 UGT1A6、CYP1A1 および CYP1A2 mRNA の発現を図 2 に示す。AhR(+/-)マウスにおいては、TCDD 曝露により雌雄とも対照に比べ有意な誘導が認められた。しかしながら AhR(-/-) マウスではこれらの遺伝子の誘導は認められなかった。肝の CYP1A1 の免疫染色の結果、AhR(+/-)マウスでは肝の中心静脈周辺の実質細胞が強く染まっていた。AhR(-/-)マウスでは、このような免疫染色は認められなかった (図 3)。

TTR ノックアウトマウスにおける PCB、TCDD の影響

対照群では、TTR(-/-)マウスの TT4 レベルは、野生型マウスの約 50%であった。血清 TT4 濃度は野生型マウスでは TCDD および いずれの PCB 投与群においても、対照群に比べて有意に低下し、特に PCB77 投与群の低下は他の投与群に比べて大きかった。TTR(-/-)マウスの血清 TT4 濃度が TCDD 投与群で対照群の約 10%まで低下していたのに対し、PCB77 と PCB153 投与群では約 70%までしか低下しなかった (図 4)。対照群では、TTR(-/-)マウスの TT3 レベルも野生型マウスの約半分であった。血清中 TT3 濃度は、野生型、TTR(-/-)のいずれのマウスにおいても PCB および TCDD により有意に低下した。血清 TSH レベルは、TTR(-/-)マウスの TCDD 投与群でのみ有意な低下が認められた (図 5)。TCDD や PCB126 投与群では野生型マウス、TTR (-/-)マウスともに肝臓の CYP1A1、CYP1A2、UGT1A6 mRNA の誘導が見られたが、PCB77 と PCB153 投与群ではこれら AhR 応答遺伝子の誘導が見られなかった (図 6)。肝の CYP1A1 の免疫染色の結果、野生型、TTR (-/-)マウスにかかわらず、TCDD により肝の中心静脈周辺の実質細胞の濃染が認められた (図 7)。

D. 考察

AhR ノックアウトマウスにおける TCDD の影響

ダイオキシンの多くの作用は、AhR を介して起こると考えられている (Whitlock JP Jr, 1993)。実際、AhR ノックアウトマウスを用いて、催奇形性をはじめ、多くの毒性が抑制されることが報告されている (Fernandez-Salguero PM et al., 1996; Mimura J et al., 1997; Peters JM et al., 1999)。

AhR(+/-)マウスでは、TCDD 曝露により TT4 の減少、肝 UGT1A6、CYP1A1、CYP1A2 の誘導が見られたのに対し、AhR(-/-)マウスでは、これらの変化は認められなかった。また、肝の CYP1A1 の免疫染色の結果は、RT-PCR の結果と一致した。従って、TCDD による TT4 の減少は、AhR を介したものと考えられた。そのメカニズムとしては、AhR を介した肝の UGT1A6 の誘導による T4-グルクロン酸抱合の促進、それらの胆汁への排泄促進が主要なものと考えられる (図 8)。

TTR ノックアウトマウスにおける PCB、TCDD の影響

TTR ノックアウトマウスでは、TT4 レベルは野生型の約半分であった。この結果は、これまでの報告と一致している (Episkopou et al., 1993)。このことは、マウスにおいて TTR が T4 輸送に大きな役割を果たしていることを示している。PCB77、PCB153 においては、UGT1A6、CYP1A1、CYP1A2 の誘導が見られなかったことから、これら化合物による TT4 の低下は、AhR を介した T4 排泄の促進によるものではないと考えられる。TTR の野生型、ノックアウトにかかわらず PCB77、PCB126、PCB153、TCDD 投与によって TT4 が低下した。野生型に比べ TTR(-/-)では、PCB77 投与による TT4 の低下割合が少なかった。PCB77 においては、TT4 低下にある程度、TTR が関与していると考えられた。PCB153 の投与では、TT4 の低下割合は、野生型と TTR(-/-)マウスとの間で大きな差はなかった。AhR を介した T4-グルクロン酸抱合の促進、TTR との競争的結合以外の因子の関与が示唆された。

PCB153 は、非ダイオキシン様

PCB であり、Phenobarbital (PB) response unit (PBRU) を介して phase I、phase II の薬物代謝酵素を誘導すると報告されている (Ganem LG et al., 1999)。PCB153 は PB 型のプロトタイプで、UGT を誘導し、ラット、マウスにおいて血清中 TT4 を減少させることが報告されている (Desaulniers D et al., 1999; van Birgelen APJM et al., 1994; Craft ES et al., 2002)。今回の実験では、PCB153 による UGT1A6 の誘導は認められなかった。これまでの報告では UGT1A 全体を測定しており、PCB153 が UGT1A6 以外のアイソザイムの誘導を介して T4 を減少させている可能性も考えられる。甲状腺ホルモン抑制作用のメカニズムとして、甲状腺に直接作用して、甲状腺の TSH に対する反応性を阻害するという報告もある (Byrne et al., 1987)。この作用についても検討する必要がある。

TCDD の TT4 抑制作用は、野生型と TTR(-/-)マウスとの間で大きく異なった。すなわち、野生型では対照の 70% 程度の減少であったのに対し、TTR(-/-)マウスでは対照の 10% 程度に減少した。TTR(-/-)マウスと野生型との間で、甲状腺ホルモンの代謝が異なる可能性がある。TTR(-/-)マウスでは、TCDD 投与群のみ、血清中 TSH の有意な減少が認められた。また、TTR(-/-)マウスでは、T4 の thyroxine-binding globulin への結合が増加していることが報告されている (Palha et al., 1994)。これらのことが TCDD による TT4 の大幅な低下に何らかの関与をしているかもしれない。

TTR 野生型マウスにおいては、TCDD(20 µg/kg)、PCB126(1 mg/kg)、PCB153(200mg/kg)による TT4 抑制作用は同程度であり、PCB77(50 mg/kg)がこれらよりやや大きかつ

た。TT4 抑制作用の相対的な強さは、TCDD を 1 とすると、おおまかに PCB126=0.02、PCB153=0.0001、PCB77=0.0004 となる。現行の TEF は、それぞれ 0.1、なし、0.0001 であり、PCB126、PCB153 で大きく異なる。ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺機能に関する毒性評価に今後は TEF 以外の新たな指標が必要と考えられる。

E. 結論

TCDD、PCB126 投与による血清 TT4 の低下は AhR を介した影響であると考えられた。PCB77 投与による T4 の低下は、TTR 野生型マウスで血清 TT4 が他の投与群に比べてより低下したのに対し、TTR (-/-)マウスでは低下する割合が小さく、AhR 応答遺伝子の誘導も見られなかったことから、TTR の一部関与が考えられた。PCB153 投与による T4 の低下は PCB77 に比べて小さく、PCB77 とは異なるメカニズムが示唆された。

ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニル類の毒性は、AhR との親和性や AhR を介した酵素の誘導能などに主に基づく TEF を指標として評価がなされてきた。本実験結果によりコプラナーPCB の中でも、甲状腺への影響に対する毒性機構が AhR を介する場合と、AhR には関係なく TTR が関与する可能性があることが明らかになった。ダイオキシン類およびポリ塩素化ビフェニル類の甲状腺機能に関する毒性評価に今後は TEF 以外の新たな指標が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 参考文献

Bastomsky CH, Murthy PVN, Banovak K. (1976). Alterations in thyroxine metabolism produced by cutaneous

application of microscope immersion oil: effects due to polychlorinated biphenyls. *Endocrinol.* 98, 1309-1314.

Bock KW. (1991). Roles of UDP-glucuronosyltransferase in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 129-150

Brouwer A, Morse DC, Lans MC, Shuur AG, Murk AJ, Klasson-Wehler E, Bergman A, Visser TJ. (1998). Interactions of persistent environmental organohalides with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol. Ind. Health*, 14, 59-84.

Chauhan KR, Kodavanti PRS, McKinney JD. (1999). Assessing the role of ortho-substitution on polychlorinated biphenyl binding to transthyretin, a thyroxine transport protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 162, 10-21.

Craft ES, DeVito MJ, Crofton KM. (2002). Comparative responsiveness of hypothyroxinemia and hepatic enzyme induction in Long-Evans rats versus C57BL/6J mice exposed to TCDD-like and Phenobarbital-like polychlorinated biphenyl congeners. *Toxicol. Sci.* 68, 372-380.

Desaulniers D, Leingartner K, Wade M, Fintelman E, Yagminas A, Foster WG. (1999). Effects of acute exposure to PCBs 126 and 153 on anterior pituitary and thyroid hormones and FSH isoforms in adult Sprague Dawley male rats. *Toxicol. Sci.* 47, 158-169.

Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, Shimada K, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Robertson EJ. (1993) Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of palasma retinol and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 2375-2379.

- Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Radikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. (1996) Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 140, 173-179.
- Ganem LG, Trottier E, Anderson A, Jefcote CR. (1999). Phenobarbital induction of CYP2B1/2 in primary hepatocytes: Endocrine regulation and evidence for a single pathway for multiple inducers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155, 32-42.
- Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y. (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes to Cells* 2, 645-654.
- Nishimura N, Miyabara Y, Sato M, Yonemoto J, Tohyama C. (2002) Immunohistochemical localization of thyroid stimulating hormone induced by a low oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in female Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 171, 73-82
- Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Sato M, Tohyama C. (2003) Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Endocrinology.* (in press)
- Palha JA, Episkopou V, Maeda S, Shimada K, Gottesman ME, Saraiva MJ. (1994) Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain. *J Biol Chem* 269,33135-33139
- Peters JM, Narotsky MG, Elizondo G, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ, Abbott BD. (1999). Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol Sci* 47, 86-92.
- Schuur AG, Boekhorst FM, Brouwer A, Visser TJ. (1997). Extrathyroidal effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on thyroid hormone turnover in male Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*, 138, 3727-3734.
- Van Birgelen APJM, van der Kolk J, Fase KM, Bol I, Poiger H, van den Berg M, Brouwer A. (1994). Toxic potency of 2,3,3',4,4',5'-hexachlorobiphenyl relative to and in combination with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a subchronic feeding study in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126, 202-213.
- Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT; Brunstrom B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van-Leeuwen FX, Liem AK, Nolt C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Waern F, Zacharewski T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ-Health-Perspect.* 106, 775-792.
- Whitlock JP Jr. (1993). Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 754-763.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

I. 図の説明

図 1. TCDD 曝露の AhR(+/-)および AhR(-/-)マウス (21 日齢) 甲状腺ホルモン(TT4)濃度に及ぼす影響

妊娠 12.5 日目に TCDD10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を曝露した、生後 21 日齢の AhR(+/-)および AhR(-/-)雌マウスの血清中甲状腺ホルモン(TT4)濃度

値は、4-6 匹のマウスの平均 \pm 標準誤差
** 対照群と比較して有意差あり($p < 0.01$)

AhR(+/-)群と比較して有意差あり($p < 0.01$)

図 2. TCDD 曝露の AhR(+/-)および AhR(-/-)マウス (21 日齢) 肝 UGT1A6、CYP1A1、CYP1A2 mRNA 発現に及ぼす影響

妊娠 12.5 日目に TCDD10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を曝露した、生後 21 日齢の AhR(+/-)および AhR(-/-)雌マウスの肝における UGT1A6、CYP1A1、CYP1A2 mRNA 発現

値は、4-6 匹のマウスの平均 \pm 標準誤差
** 対照群と比較して有意差あり($p < 0.01$)

AhR(+/-)群と比較して有意差あり($p < 0.01$)

図 3. TCDD 曝露の AhR(+/-)および AhR(-/-)マウス (21 日齢) 肝臓中の CYP1A1 タンパクの免疫組織染色

A: TCDD 曝露 AhR(+/-)マウスの肝臓：中心静脈周辺部の肝実質細胞に強い染色性が認められた。門脈結合組織周辺の肝細胞は陰性であった。

B: 写真 A の拡大図：個々の肝実質細胞間で染色性の違いが認められる。

C: オイル投与対照群の AhR(+/-)マウスの肝臓：CYP1A1 の染色性は全く認められなかった。

D: TCDD 曝露の AhR(-/-)マウスの肝臓：CYP1A1 の染色性は全く認められなかった。

Bar = 50 μm

図 4. PCB77、PCB126、PCB153、TCDD 曝露の TTR(+/-)および TTR(-/-)マウス血清 TT4 量に及ぼす影響

13 週齢 TTR+/+および TTR-/-マウスに PCB77、PCB126、PCB153、TCDD を投与後 7 日目の血清中甲状腺ホルモン(TT4)濃度

値は、3-4 匹のマウスの平均 \pm 標準誤差
* 対照群と比較して有意差あり($p < 0.05$)

TTR(+/-)群と比較して有意差あり($p < 0.05$)

図 5. PCB77、PCB126、PCB153、TCDD 曝露の TTR(+/-)および TTR(-/-)マウス血清 TSH 量に及ぼす影響

13 週齢 TTR+/+および TTR-/-マウスに PCB77、PCB126、PCB153、TCDD を投与後 7 日目の血清中 TSH 濃度

値は、3-4 匹のマウスの平均 \pm 標準誤差
** 対照群と比較して有意差あり($p < 0.05$)

図 6. PCB77、PCB126、PCB153、TCDD 曝露の TTR(+/-)および TTR(-/-)マウス肝 UGT1A6、CYP1A1、CYP1A2 mRNA 発現に及ぼす影響

13 週齢 TTR+/+および TTR-/-マウスに PCB77、PCB126、PCB153、TCDD を投与後 7 日目の肝における UGT1A6、CYP1A1、CYP1A2、AhR mRNA 発現

値は、3-4 匹のマウスの平均 \pm 標準誤差
** 対照群と比較して有意差あり($p < 0.01$)

図 7. TCDD 曝露の TTR(+/-)および TTR(-/-)マウス肝臓中の CYP1A1 タンパクの免疫組織染色

A: TCDD 曝露 TTR+/+マウスの肝臓：中心静脈周辺部の肝実質細胞に強い染色性が認められた。門脈結合組織周辺の肝細胞は陰性であった。

B: 写真 A の拡大図：個々の肝実質細胞間で染色性の違いが認められる。

胞間で染色性の違いが認められる。

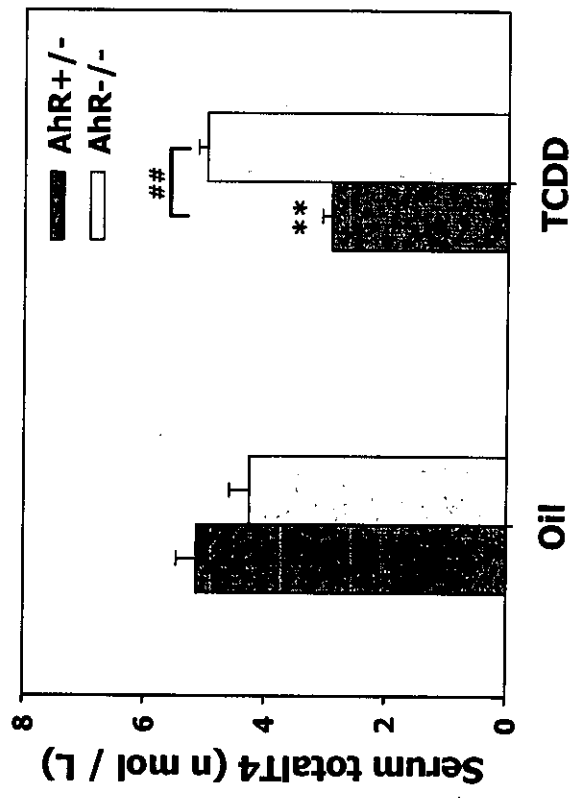
C: TCDD 曝露の TTR^{-/-}マウスの肝臓：TTR^{+/+}ラットに TCDD を曝露した場合と同程度に中心静脈周辺部の肝実質細胞に強い染色性が認めら、門脈結合組織周辺の肝細胞は陰性であった。

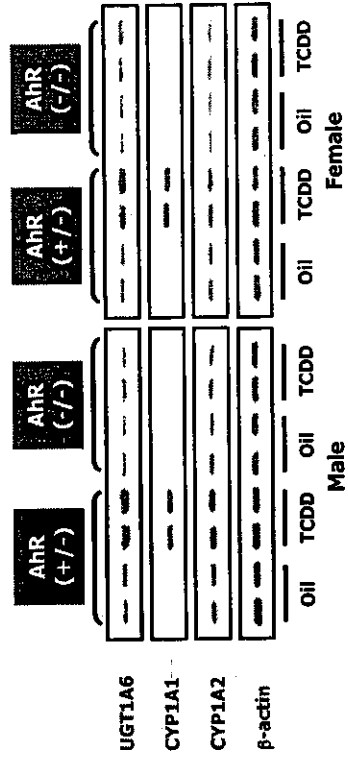
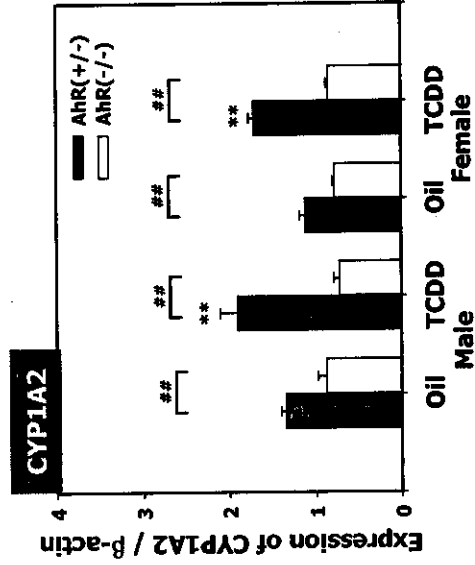
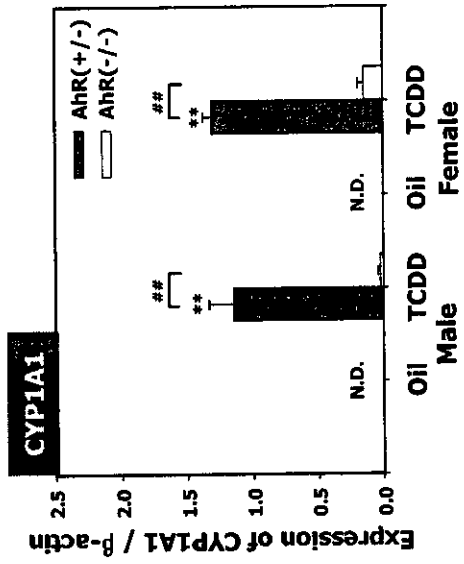
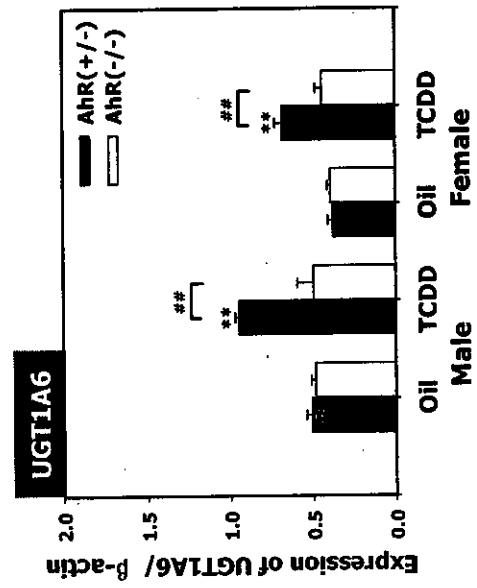
D: オイル投与対照群の TTR^{+/+}マウスの肝臓：CYP1A1 の染色性は全く認められなかった。

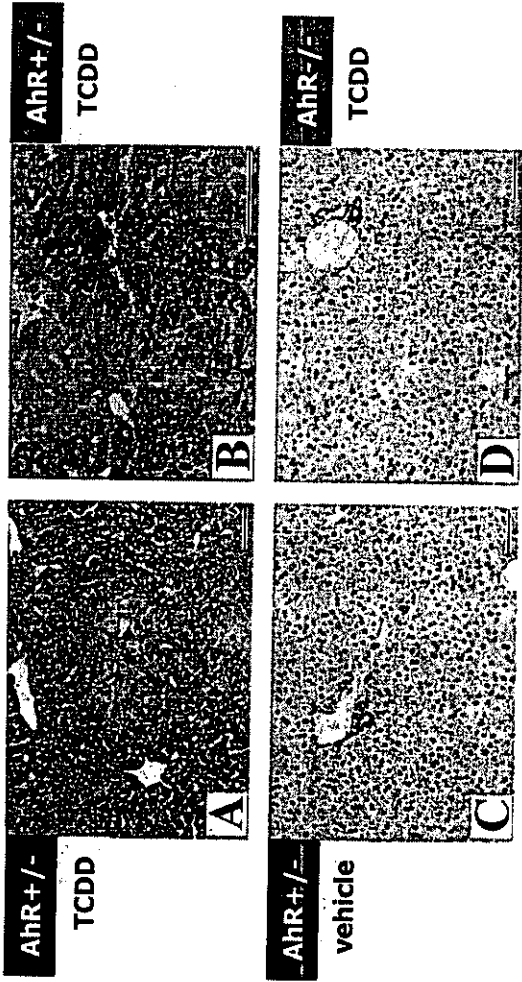
図 8. TCDD の甲状腺ホルモン代謝に及ぼす影響の模式図

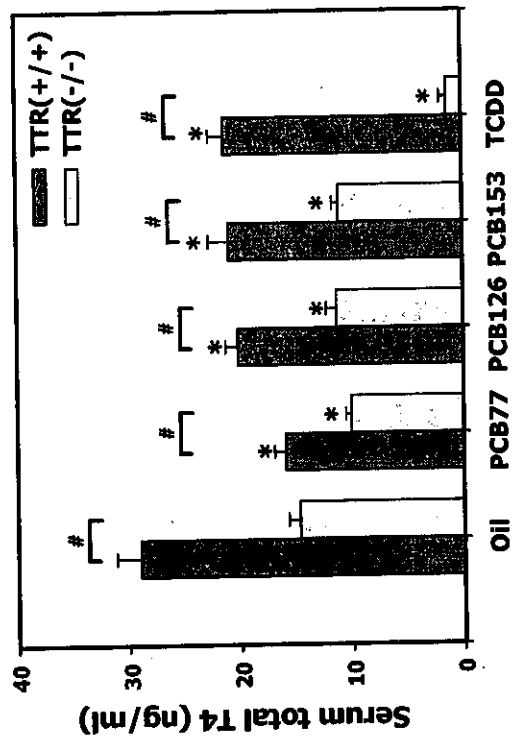
TCDD は、Ah レセプター(AhR)を介し、肝の

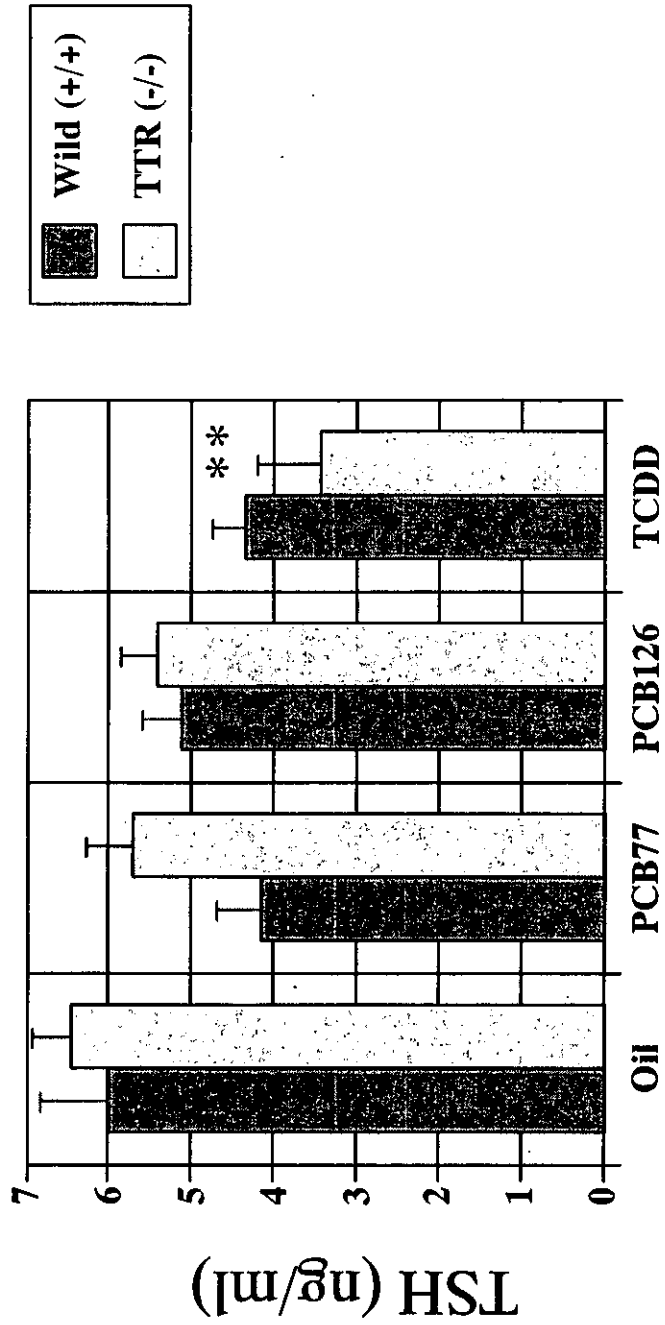
UGT1A(UDP-glucuronosyltransferase)を誘導し、サイロキシン(T4)のグルクロン酸抱合を促進し、それによる胆汁への排泄を促進することによって、T4 を低下させる。

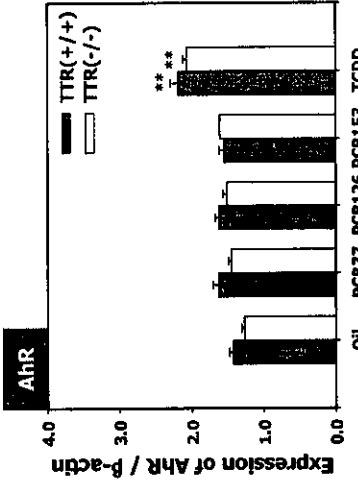
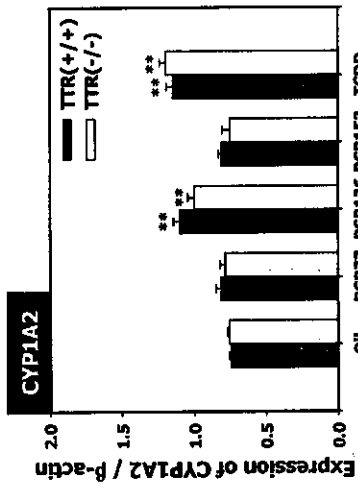
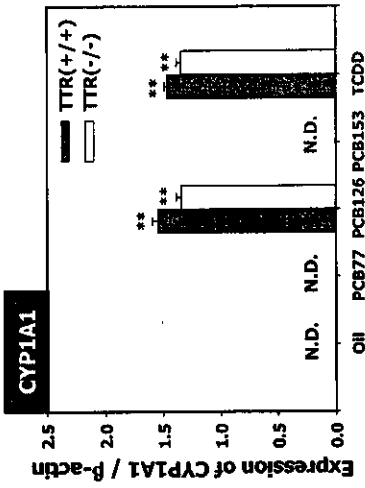
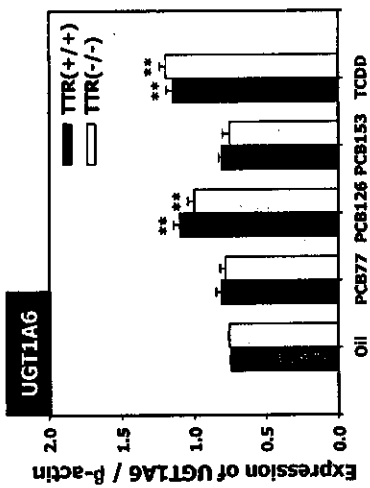




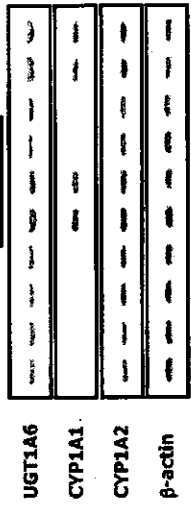






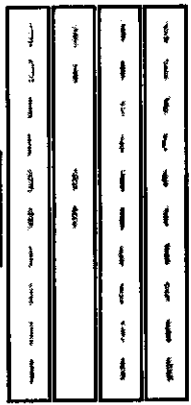


TTR +/+

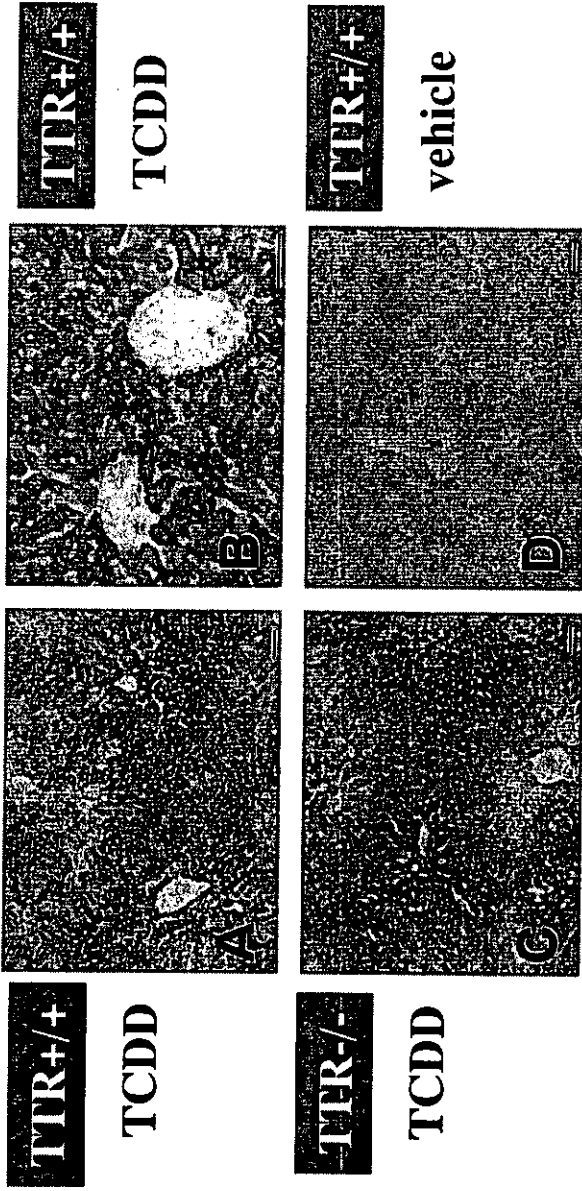


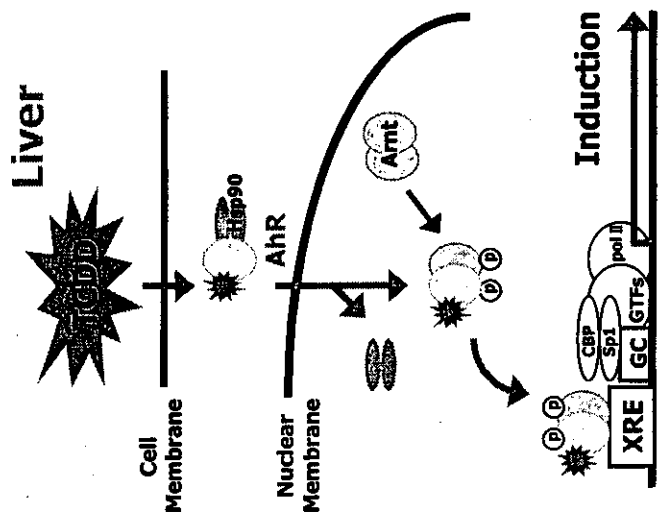
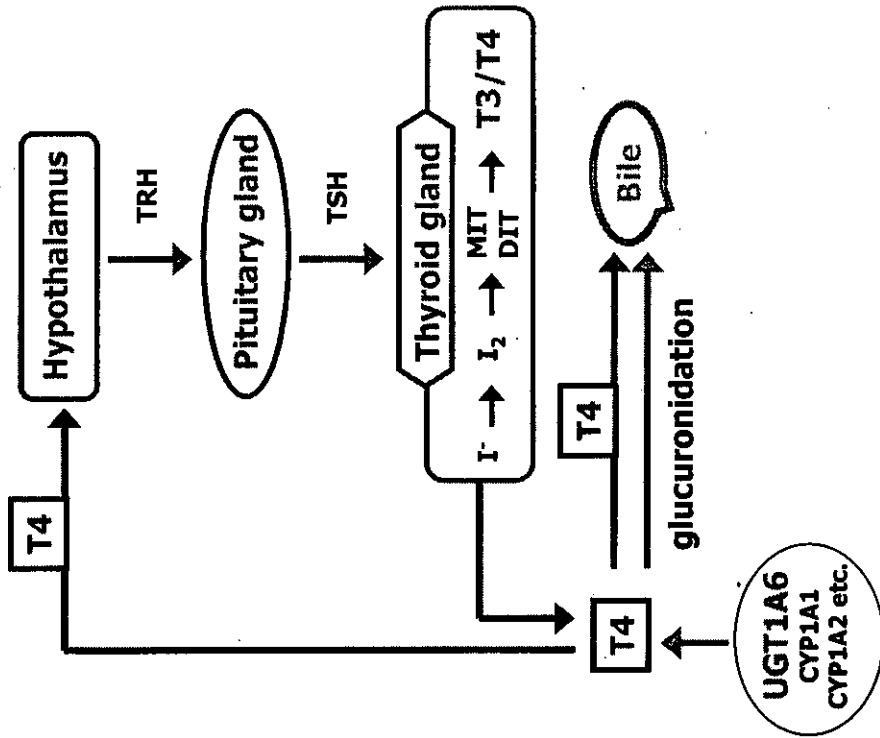
Oil PCB PCB 126 PCB 153 TCDD

TTR -/-



Oil PCB PCB 126 PCB 153 TCDD





Drug Metabolism

↑ The normal physiological pathway of thyroid hormone

↑ The abnormal situation or interference of TCDD

コプラナーPCB（PCB126、PCB77）および非コプラナーPCB（PCB153）の
レチノイド代謝に及ぼす影響

主任研究者 遠山千春 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長

研究要旨

コプラナーPCB（3,3',4,4'-五塩素化ビフェニル；PCB126、3,3',4,4'-四塩素化ビフェニル；PCB77）および非コプラナーPCB（2,2',4,4',5,5'-六塩素化ビフェニル；PCB153）のレチノイド代謝への攪乱作用を調べ、2,3,7,8-四塩素化ジベンゾパラダイオキシン（以下、TCDD と略す）のレチノイド代謝への影響と比較することにより、PCB 類の Arylhydrocarbon receptor (AhR) を介する毒性等価係数 (toxic equivalent factor, TEF) で評価される TCDD 毒性作用と、AhR を介さない非 TCDD 毒性のメカニズムを検討した。

(1) TCDD のレチノイド代謝攪乱作用が、AhR を介するか否かを調べるために、周産期に TCDD に曝露した AhR 遺伝子欠損マウス (AhR^{-/-})、AhR ヘテロ型マウス (+/-) およびその野生型マウス (AhR^{+/+}) を用いて検討した結果、TCDD は AhR を介して肝臓レチノイド量を低下させることが明らかになった。

(2) TCDD のレチノイド代謝攪乱作用に対して、血中におけるレチノールキャリアー蛋白質である transthyretin (TTR) の関与があるか否かを調べるために、TTR 欠損マウス (TTR^{-/-}) とその野生型 (TTR^{+/+}) マウスに対して TCDD 投与実験を行った結果、TCDD のレチノイド代謝攪乱作用に対する TTR の関与は認められなかった。

(3) PCB77、PCB126 および PCB153 は肝臓レチノイド代謝に対して影響を及ぼすか、また、影響がある場合はその攪乱作用に TTR の関与があるか否かを調べるために、TTR 欠損マウス (TTR^{-/-}) とその野生型 (TTR^{+/+}) マウスに対して、PCB77、PCB126 および PCB153 の投与実験を行った。その結果、PCB77 は血清中 Retinol 量を低下させ、その作用について TTR の関与が認められた。PCB126 は肝臓中レチノイド量を著しく低下したが、その作用に TTR の関与は見られなかった。しかしながら、AhR 依存性酵素 (CYP1A1) の顕著な誘導が認められ、このことから PCB126 のレチノイド代謝への影響は AhR に依存することが示唆された。PCB77 および PCB153 は、TTR^{-/-} マウスでのみ肝レチノイド量の有意な低下が認められたが、CYP1A1 を全く誘導しなかったことから、ビタミン A 代謝攪乱の作用機序に TTR と AhR 以外の因子の関与が示唆された。

本実験結果は、コプラナーPCB の中でも、レチノイド代謝攪乱に対する毒性機構が AhR を介する場合と、AhR には関係なく TTR を介する場合、さらに AhR と TTR 以外の要因の可能性が明らかになったことから、コプラナーPCB を含むダイオキシン類の毒性評価には、今後は非 TCDD 毒性であるコプラナーPCB 毒性を考慮する必要性があることを示唆した。

研究協力者： 西村典子、米元純三

国立環境研究所環境ホルモン/ダイオキシン研究プロジェクト
宮原裕一 信州大学山地水環境教育研究センター

A 研究目的

燃焼に伴う環境へのダイオキシン類の放出量は減少しているが、食品を介して取り込まれるダイオキシン類への曝露が小児の出生体重、学習機能、甲状腺機能に影響が生じている可能性が指摘されている。このダイオキシン類による影響は 2,3,7,8-TCDD (以下、TCDD と略す) に特異的な毒性ではなく、コプラナー PCB の非 TCDD 毒性による可能性も考えられる。PCB 類がレチノイド代謝に影響を及ぼすことが古くから知られているが、個々の PCB におけるその毒性と作用メカニズムについては充分に分かっていない。

レチノイドは脂溶性で、視覚機能、細胞の分化、免疫機能、粘膜等の正常化、成長や生殖機能等生体内の様々な生理過程に関与している。1970 年 Van Putten らは PCB 曝露の皮膚症状がレチノイドの欠乏症のそれと類似していることを報告した。PCB が肝臓中のレチノイド濃度を低下させることが、その後、多くの研究で明らかになっており、その作用機序は PCB 類の代謝産物が血清中レチノールの輸送蛋白質である Transthyretin (TTR) に対し競合結合する結果、糸球体を通過して尿中に排泄されるためと考えられている。しかしながら PCB 同族体の中でもそのレチノイドに対する作用機序は異なる可能性が示唆されており、依然不明な点が多い。近年、遺伝的に TTR を欠損する遺伝子改変マウスが作成された。このマウスを用いることにより PCB のレチノイド代謝に対する攪乱作用が TTR を介するかどうかを証明することが可能となると思われる。

本実験では、TTR 欠損マウスを用い

て次の異なる 3 種の PCB 同族体のレチノイド代謝への攪乱作用を検討する。(1) PCB77 (TEF: 0.0001): 生体内で水酸化物に代謝されやすく、TTR に対しレチノールとの競合能が高いことからレチノイド代謝攪乱の影響が高いとされる。(2) PCB153 (TEF 値は設定されていない) 非コプラナー PCB で比較的毒性が低いと報告されているが母乳を含め人の組織中に多く含まれる。(3) PCB 126 (TEF: 0.1): PCB 同族体の内で最も TEF が高く TCDD と同様な毒性作用があるとされている。

一方、TCDD はレチノイド代謝を攪乱する作用があり、また AhR 欠損マウスでは肝臓内にレチノイドが貯留する事が報告されている。ところが TCDD のレチノイド代謝攪乱作用に AhR が関与しているかどうかを実証した研究報告は殆んどない。さらに生体内でその代謝物が見つかっていないことから TCDD は水酸化されにくいと考えられている。TCDD が水酸化体に代謝される場合は血清の TTR と結合する可能性が考えられるため、TTR 欠損マウスを用いることで TCDD のレチノイド代謝攪乱作用に対して TTR の関与がないかどうかを証明することが可能である。

本実験では TCDD のレチノイドに対する作用機構を解明するために AhR および TTR 欠損マウスを用いて TCDD 投与実験を行った。さらに、PCB77、PCB126、PCB153 を投与した TTR 欠損マウスにおけるレチノイド代謝に及ぼす影響と、TCDD 投与による毒性作用とそのメカニズムについて比較検討した。

B 材料および方法

B.1 実験動物、投与量及び投与方法

TCDD(50 µg/ml ノナン溶液)を Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA) から購入し、TCDD の含量が 4 µg/ml となるようにコーン油に溶解させた。

PCB77、PCB126、PCB153 を AccuStandard Inc. (NewHaven, CT) から購入し、コーン油に溶解して、それぞれ 5 mg/ml、100 µg/ml、10 mg/ml の調整液を作成した。

B.1.1 AhR 遺伝子欠損マウスの TCDD 投与実験

AhR(+/-)マウスは、藤井義明博士(東北大学、現筑波大学)から供与を受け、国立環境研究所で自家繁殖したものをを用いた。妊娠 12 日目の AhR ヘテロ型 (AhR+/-) 妊娠マウス(10 週齢)に TCDD 10 µg/kg BW を 1 回経口投与した。対照群には 4%ノナン含有コーン油を同様に投与した。生後 21 日目に AhR-/-、AhR+/-、AhR+/+ 群マウスから肝臓と血液をそれぞれ採取して分析材料とした。

B.1.2 TTR 遺伝子欠損マウスの TCDD および PCB77、PCB126、PCB153 投与実験

TTR(+/-)マウスは前田秀一郎博士(山梨大学)から供与を受け、国立環境研究所で自家繁殖したものをを用いた。13 週齢雄の TTR-遺伝子欠損マウス (TTR-/-) と野生型マウス (TTR+/+) マウスを用いた。TTR-/-マウスにおいて血清中 TTR 蛋白の存在しないことを SDS-PAGE ウェスタンブロッティング免疫反応で確認した(図 1)。一群 6 匹のマウスに 10 または 20 µg/kg TCDD を、また 50 または 75 µg/kg bw の PCB77、1mg µg/kg bw の PCB126、200 mg µg/kg bw の PCB153 を単回経口投与し、その 7 日後に血液を採取し、肝臓、胸腺は採取して重量を測定後に分析材料とした。

B.1.3 飼育条件

飼育条件は温度 24±1°C、湿度 50±10%、人工照明 1 日 12 時間に設定し、マウスはホワイトフレーク(日本チャールス・リバー株式会社)を床敷としたポリカーボネート製ケージに収容した。飼料はコバルト 60 照射滅菌済みの固型飼料(CE-2、日本クレア株式会社)を自由に与え、飲水は滅菌水を給水瓶で自由に摂取させた。マウスの導入、飼育および処理はすべて国立環境研究所の動物実験手順に従って行った。

B.2 レチノイドの測定

血清はジエチルエーテル抽出、肝臓は 1.5%ピロガロール/エタノール溶液中でホモジナイズ後、n-ヘキサン抽出を行なった。抽出液を窒素気流下で蒸発乾固後、MeOH に再溶解して 0.5 µm のメンブランフィルターを通し液体高速クロマトグラフィー(HPLC)分析用試料とした。

レチノールとレチニールパルミチン酸を標準品として、定量は蛍光検出器(474, Waters)付き HPLC(2690, Waters)を用い、蛍光検出は励起波長 340 nm、蛍光波長 460 nm とした。分析カラムは Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 µm, 関東化学)を用いた。溶離溶媒はジクロロメタン/アセトニトリル(25:75)を用い、流量 1 mL/min とした。

本実験ではレチノール(Retinol) およびパルミチン酸エステル(Retinyl palmitate)に加え、Retinyl esters のうちの 7 種類について測定し、これらの総和を Total retinoid とした。

B.3 CYP1A1 遺伝子発現誘導の測定

肝臓はキアゲン RNeasy mini kit(キアゲン株式会社、東京)を用いて、RNA 精製を行った。RNA 量は分光光度計(Gene Quantpro™; Pharmacia Biotech, Cambridge, England)で測定した。RNA

PCR kit (AMV) (宝酒造株式会社、東京) を用いて 0.1 μg RNA から cDNA を合成した。cDNA の増幅は GeneAmp PCR system 9700 (PE Corporation, Norwalk, Conn., USA) を用いて行った。肝臓 30 ng の cDNA を用いて Reverse transcription and polymerase chain reaction 定量 PCR (RT-PCR) を行った。 β -actin を内部標準遺伝子として、結果を β -actin に対する CYP1A1 の比で表示した。

B.4 CYP1A1 の免疫組織染色

肝臓の一部をザンボニー液で 24 時間固定した後、パラフィン包埋した。4 μm のパラフィン切片を脱パラフィンした後、内因性パーオキシダーゼ活性の阻止 (0.3% H_2O_2 加メタノール 30 分) を行い生理食塩水 (PBS) で洗浄する。CYP1A1 の一次抗体と 37 度で 1 時間反応させる。生理食塩水 (PBS) で洗浄後、ビオチン化二次抗体と 37 度で 1 時間反応させる。PBS にて洗浄後、アビジン・ビオチン複合体 (PK-400, Vector Lab. Burlingame, California) で 30 分室温にて反応後、PBS で洗浄、0.003% hydrogen peroxide を基質として 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, Missouri) を加えて発色する。ヘマトキシリン染色で対比染色を行った。

B.5 統計学的手法

本実験のデータは、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm standard error) で表示し、コーン油対照群と曝露群間の有意差の検定は Student's *t*-test で行った (有意水準両側 5%)。

C. 研究結果

C.1 正常マウス肝臓中レチノイドの組成分布

13 週齢正常マウス肝臓内のレチノイドの分析を行った。測定を行った 9

種類のレチニルエステルの中で、マウス肝臓中のレチノイドはほとんどがレチニルパルミチン酸として存在した (図 2)。

C.2 TCDD のレチノイド代謝に及ぼす影響と AhR との関係

TCDD 曝露による肝臓内レチノイド量に及ぼす影響とその際の AhR の関与を調べるために妊娠 12 日目に AhR $+/+$ マウスに 10 μg TCDD/kg bw を投与し、生後 21 日目の AhR $+/+$ 、AhR $+/-$ および AhR $-/-$ マウス肝臓中レチノイド量を測定した (図 3)。オイル投与においても、AhR $+/+$ マウスや AhR $+/-$ マウスより AhR $-/-$ マウスで肝臓中レチニルパルミチン酸量の有意な増加が見とめられた。TCDD を投与すると、オイル投与対照群に比べて AhR $+/+$ マウスおよび AhR $+/-$ マウスで肝中濃度の有意な低下が認められた (図 3)。しかしながら AhR $-/-$ マウスではオイル投与対照群と比べて TCDD 投与による影響が全く見られなかった。

C.3 TCDD のレチノイド代謝に及ぼす影響と TTR との関係

TCDD 曝露による肝臓内レチノイド濃度に及ぼす影響とその際の TTR との相互関係を調べるために 13 週齢の TTR $+/+$ と TTR $-/-$ マウス (雄) に 10 または 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を投与し、その 7 日後に血清および肝臓中レチノイド量を測定した。TCDD の投与量が 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw と 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ による差はほとんど見られなかった。20 μg TCDD/kg bw 投与の結果を基に図を作成した (図 4)。TTR の欠損により血清中レチノール量は減少傾向を示したが、TTR $+/+$ マウスと比べて有意な差は認められなかった。TTR $+/+$ および TTR $-/-$ マウスどちらにも血清中レチノール量の TCDD 投与による影響は認められなかった。肝臓中レチノール、

レチニルパルミチン酸、および総レチノイド量は TTR 欠損による影響は認められなかった。TCDD 投与により TTR+/+ および TTR-/- マウスのどちらも肝臓中のレチニルパルミチン酸および総レチノイド量は顕著に減少し、オイル投与対照群の約 50%であった(図 4)。

C.4 PCB77、PCB126、PCB153 のレチノイド代謝に及ぼす影響と TTR との関係

PCB77、PCB126、PCB153 のレチノイド代謝に及ぼす影響とその際の TTR の関与を調べるために、13 週齢の TTR+/+ と TTR-/- マウスに PCBs を投与し、その 7 日後に血清および肝臓中レチノイド量を測定した(図 5)。PCB77 の 50 mg/kg bw 投与群と 70 mg/kg bw 投与群はほぼ同様な結果を得たので、図の作成には 50 mg/kg bw 投与群の結果を示した。オイル投与マウスにおいて、TTR の欠損は血清中レチノール量を約 40%にまで著しく低下した。PCB77 投与により TTR+/+ マウスで血清レチノール量がオイル投与対照群に比べて有意に低下したが、PCB126、PCB153 投与による血清レチノール量に対する影響は認められなかった。このことから、PCB77 は PCB126 および PCB153 の血清中レチノール代謝に及ぼす影響と異なることがわかった。PCB126 投与により TTR+/+ マウスおよび TTR-/- マウスの肝臓中でレチニルパルミチン酸および総レチノイド量の減少が認められ、TCDD と同様な作用が見られた。PCB77 と PCB153 曝露は TTR+/+ マウスでは減少作用はなく、TTR-/- マウスにおいてオイル投与対照群に比べて有意な低下が認められた。

C.5 PCB77、PCB126、PCB153 および TCDD 投与による肝臓、胸腺重量への影響と TTR との関係

肝臓重量の増加および胸腺の萎縮は TCDD 曝露の良い指標とされているので本実験においても両臓器重量の測定を行った。PCB153 および TCDD 投与群において、肝臓重量のオイル投与対照群との有意な増加が認められた(図 6A)。また、PCB126 および TCDD 投与群で胸腺重量の有意な低下が TTR+/+ および TTR-/- マウスに認められた(図 6B)。

C.6 PCB77、PCB126、PCB153 および TCDD の肝臓中 CYP1A1 遺伝子の発現誘導

PCB126 と TCDD 投与群の TTR+/+ および TTR-/- マウスの肝臓で CYP1A1 の顕著な遺伝子発現誘導が認められた。しかしながら PCB77 および PCB153 投与群においては CYP1A1 の発現は全く見られなかった(図 7)。

C.7 PCB77、PCB126、PCB153 および TCDD の肝臓中 CYP1A1 の免疫組織染色

肝臓中 CYP1A1 の免疫組織染色を行った結果、PCB126 および TCDD 投与群で CYP1A1 の顕著な合成誘導が認められた。すなわちこれらのマウス肝臓では中心静脈周辺の肝実質細胞に CYP1A1 の著しい染色性が認められた。尚、小葉間結合組織周辺の肝実質細胞は陰性であり、CYP1A1 酵素の局在が他の薬物代謝系酵素の局在とよく一致していた。PCB77 および PCB153 投与群のマウス肝臓においては CYP1A1 による染色性は全く見られなかった(図 8)。この免疫染色の結果は、RT-PCR 法により分析した肝臓内 CYP1A1 遺伝子の発現誘導能とよく一致する結果であった。

D 考察

コプラナー PCB (PCB126、PCB77) および非コプラナー PCB (PCB153) のレチノイド代謝への攪乱作用を調べ

TCDD のレチノイド代謝への影響と比較することにより、PCB 類の Arylhydrocarbon receptor (AhR) を介し毒性等価係数 (toxic equivalent factor, TEF) で評価される TCDD 毒性作用と、AhR を介さない非 TCDD 毒性のメカニズムを検討した。このことは TCDD や PCB の毒性を正しくリスク評価する際の情報提供に寄与するものと考えられる。

TCDD は AhR を介して毒性を現すことが知られているが、TCDD のレチノイド代謝に及ぼす影響が AhR を介するかどうかは証明されていない。このために、AhR を遺伝的に欠損したマウス (AhR^{-/-}) に TCDD を曝露して、レチノイドの動態を野性型マウス (AhR^{+/+}) と比較検討することで AhR の関与を証明できると考える。妊娠 12 日目の AhR^{+/-} マウスに 10 µg/kg TCDD を一回経口的に投与し、生後 21 日目に AhR^{-/-}、AhR^{+/-}、AhR^{+/+} マウスの肝臓及び血液中のレチノイド量を測定した。肝臓中に存在するレチノイドの殆どはレチニルパルミチン酸として存在することが分かった。ラットにおいては肝臓中レチノイドの 80-90% は非実質細胞に局在し、そしてレチノイドの 98% はレチノールのエステル型として存在していることが報告されているが、マウスにおいてもほぼ同様な結果を得た(図 2)。

オイル投与対照マウスでは肝臓レチニルパルミチン酸濃度は AhR^{+/+} マウスに比べて AhR^{-/-} マウスで有意に高い事がわかった。このことは AhR の欠損はレチノイドの代謝に阻害的に作用することを示唆したものであり、AhR による P450 関連酵素が発現しないためにレチノイン酸の酸化分解が抑制されたのかもしれない。AhR^{+/+} マウスおよび AhR^{+/-} マウスでは TCDD 投与により肝臓中レチノイド量の著しい減少が見られたのに対

し、AhR^{-/-} マウスでは TCDD 投与による影響が全く見られなかった。このことから、TCDD の肝臓レチノイド量の低下作用は AhR を介して起こることが明らかとなった。

これまでに、モルモット、マウス、ハムスター、ラットなど異種のげっ歯類において TCDD は同様に肝臓レチノイド量を低下することが報告されている。その作用機序に関しては、これまでにいくつかの仮説が提唱されている。すなわち、第 1 に、AhR を介してレチニルパルミチン酸合成酵素を阻害する作用、第 2 に、レチノイドのグルクロン酸抱合の亢進による尿中排泄を増加する作用、第 3 に、レチノイドの肝臓からの移動と糸球体濾過の亢進が同時的に起こる事によりレチノイド量の低下を生じることである。われわれは、別に行った TCDD 曝露実験で、肝臓でレチノイドのグルクロン酸抱合に関与するといわれている UDP-グルクロナシルトランスフェラーゼ (UGT) 1A7 の遺伝子発現が TCDD により顕著に誘導される結果を得ている。AhR 遺伝子欠損マウスでは TCDD を投与しても肝臓レチノイド量の低下が見られなかったことから、TCDD のレチノイド代謝攪乱作用は AhR に依存することが明らかとなった。TCDD は肝臓でレチノイドのグルクロン酸抱合に関わる UGT1A の合成誘導を亢進することにより、おそらくレチノイドの尿中排泄の促進がなされ、このことによって肝臓中レチノイド量の低下が起こることが示唆された。

TTR はげっ歯類における血清レチノールおよび甲状腺ホルモンの主要な輸送蛋白である。血中のレチノールはレチノール結合蛋白質 (RBP)、甲状腺ホルモンのサイロキシン (T4)、および TTR が結合した巨大分子として標的器官に輸送され、同時に腎臓か