

ら濾過消失するのを防ぐ機能も果たしている。この巨大分子の形成が阻害されると低分子化する結果、レチノールが糸球体から濾過され血中レチノールの減少が起こるとされている。TTR を遺伝的に欠損したマウス (TTR^{-/-}) の血清レチノール量はオイル投与の対照群で TTR^{+/+}マウスの約 30-40% に減少していた。このことは血中レチノール量の保持に TTR が不可欠であることが明らかとなった。

13 週齢の雄 TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウスの血中レチノール量に対して TCDD 投与の影響はなかった。このことから、血中 TTR が関与する糸球体濾過の亢進の可能性はないものと考えられた。しかし、TCDD 投与は TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウスの肝臓中レチノイド量を有意に低下させた。我々は TCDD が成獣および乳児期のラットでグルクロン酸抱合を司る UGT1 酵素を誘導する事を既に報告している。本実験と同時に行った AhR 欠損マウスを用いた実験において示唆されたと同様に、成熟マウスにおいても、肝臓におけるグルクロン酸抱合の亢進が TCDD によるレチノイド代謝攪乱に関与している可能性が考えられた。

生体で代謝されやすい PCB のレチノール代謝攪乱機構は PCB の水酸化体が TTR と結合するために尿中排泄増加につながりレチノール量の減少が起こることが知られている。13 週齢の雄 TTR^{+/+}、TTR^{-/-}マウスに PCB77、PCB126、PCB153 を単回経口投与し、血中および肝臓中レチノイド代謝に及ぼす影響を調べたところ、PCB77 投与群にのみ TTR^{+/+}マウス血清中のレチノール量の有意な減少を認めたことから、PCB77 による血清中レチノール量の減少には、TTR が関与することが明らかとなった。PCB77 は生体内で容易に水酸化されることが報告され

ていることから、おそらくその水酸化代謝物が血中 TTR と結合してレチノールの尿中排泄増加につながり、血中レチノール量の減少が起こることが考えられた。PCB77 は TTR^{+/+}マウスの肝臓中レチノイド量に対しては全く影響が見られなかった。

PCB126 は TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウスにおいて血清中レチノール量に対する影響はなかった。興味深いことに、PCB126 は TTR の有無に関わらず、肝臓中のレチノイド量を有意に低下させた。このことから PCB126 のレチノイド代謝攪乱作用機構は、TTR は関与しないことが明らかとなった。さらに免疫組織染色法および RT-PCR 法による遺伝子の解析から、PCB126 は肝臓で AhR 依存性が知られている CYP1A1 mRNA 及びタンパク質の顕著な合成誘導を起こすことが分かった。このことは、PCB126 のレチノイド代謝攪乱作用機構は、TCDD と同様に、AhR が介在することを強く示唆した。

一方、PCB77 および PCB153 投与群では肝臓中 CYP1A1 遺伝子の発現およびタンパク質の合成誘導が全く認められないにもかかわらず TTR^{-/-}マウスの肝臓レチノイド量がオイル投与対照群に比べて有意に減少した。この場合は、肝臓レチノイド代謝攪乱作用に TTR と AhR 以外の因子が関与している可能性が示唆された。TTR も AhR も関与しないと考えられる PCB の肝臓レチノイド代謝攪乱作用の不明な機序について研究することは大変興味深く今後の課題と考えている。

これまでダイオキシン類および PCB 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基づく TEF を指標として評価されてきたが、本実験結果によりコプラナー PCB の中でも、レチノイド代謝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 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となった。このことから、今後ダイオキシン類の毒性評価には非 TCDD 毒性であるコプラナーPCB 毒性を考慮する必要があることが示唆された。

E 結論

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。その結果、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があることが判明した。

F 健康危険情報

特になし

G 参考文献

- Andreola F, Fernandez-Salguero PM, Chiantore MV, Petkovich MP, Gonzalez FJ, De Luca LM. (1997) Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR^{-/-}) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Research*, 57, 2835-2838
- Bank PA, Salyers KL, Zile MH. (1989) Effects of tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) on the glucuronidation of retinoic acid in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 993, 1-6
- Bastomsky CH. (1977) Enhanced thyroxine metabolism and high uptake goiters in rats after a single dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Endocrinol.* 101, 292-296
- Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. (1991) Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiological Reviews* 71, 951-990
- Bock KW. (1991). Roles of UDP-glucuronosyltransferase in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 129-150
- Brouwer A, Hakansson H, Kukler A, Den Berg KJ, Ahlberg UG. (1989) Marked alterations in retinoid homeostasis of Sprague-Dawley rats induced by a single i.p. dose of 10 μ g/kg of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology* 58, 267-283
- Chen LC, Berberian I, Koch B, Mercier M, Azais-Braesco V, Glauert HP, Chow CK, Robertson, LW. (1992) Polychlorinated and polybrominated biphenyl congeners and retinoid levels in rat tissues: Structure-activity relationship. *Toxico Appl Pharmacol* 114, 47-55
- Chu I, Villeneuve DC, Yagminas A, Lecavalier P, Hakansson H, Ahlberg UG, Valli VE, Kennedy SW, Bergman A, Seegal RF, Feeley M. (1995) Toxicity of PCB 77 (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl) and PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in the rat following subchronic dietary exposure. *Fundam Appl Toxicol* 26, 282-292
- DeVito M, Menache MG, Diliberto J, Ross D, Birnbaum L. (2000) Dose-response relationships for induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzyme activity in liver, lung, and skin in female mice following subchronic exposure to polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol* 167,157-72

- Diliberto JJ, Akubue PI, Luebke RW, Birnbaum LS. (1995) Dose-response relationships of tissue distribution and induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzymatic activities following acute exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 30, 197-208
- 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
- Fattore E, Trossvik C, Hakansson H. (2000) Relative potency values derived from hepatic vitamin A reduction in male and female Sprague-Dawley rats following subchronic dietary exposure to individual polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran congeners, and a mixture thereof. *Toxicol Appl Pharmacol* 165,184-194
- 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
- Fletcher N, Hanberg A, Hakansson H. (2001). Hepatic vitamin A depletion is a sensitive marker of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure in four rodent species. *Toxicol Sci* 62, 166-175
- Gonzalez FJ, Gelboin HV. (1994) Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemicalcarcinogens and toxins. *Drug Met Rev* 26, 165-183
- Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. (1998). The aryl hydrocarbon receptor studies using the AHR-null mice tertachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 140, 173-179
- Got L, Gousson T, Delacoux E (1995) Simultaneous determination of retinyl esters and retinol in human livers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 668, 233-239
- Hakansson H, Johanson L, Ahlborg UG, Poiger H. (1990) Vitamin A storage in rats subchronically exposed to PCDDs/PCDFs. *Chemosphere* 20, 1147-1150
- Hakansson H, Johansson L, Manzoor E, Ahlborg UG. (1991). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the vitamin A status of Hartley guinea pig, Sprague-Dawley rats, C57B1/6 mice, DBA/2 mice and Golden Syrian hamsters. *J Nutr Sci Vitaminol* 37, 117-138
- Miura 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
- Nebert DW, Puga A, Vasiliou V. (1993) Role of the Ah Receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 685, 624-640
- Nilsson CB, Hanberg A, Trossvik C, Hakansson H. (1996) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects retinol esterification in rat hepatic satellite cells and kidney. *Environ Toxicol Pharmacol* 2, 17-23
- Nilsson CB, Hanberg A, Trossvik C, Hakansson H. (1996) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects retinol esterification in rat hepatic

stellate cells and kidney. *Environ. Toxicol Pharmacol* 2, 17-23

Nilsson CB, Hoegberg P, Trossvic C, Azais-Brasco V, Blaner WS, Fex G, Harrison EH, Nau H, Schmidt CK, van Bennekum AM, Hakansson H. (2000) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases serum and kidney retinoic acid levels and kidney retinol esterification in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 169,121-131

Nishimura N, Miyabara Y, Suzuki JS, Sato M, Aoki Y, Satoh M, Yonemoto J, Tohyama C. (2001) Induction of metallothionein in the livers of female Sprague-Dawley rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Life Sci* 69,1291-1303

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)

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

Okey AG, Vella LM, Harper PA. (1989) Detection and characterization of a low affinity form of cytosolic Ah receptor in livers of mice nonresponsive to induction of cytochrome P 450 by 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol* 35, 823-830

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

Ritter JK. (2000) Role of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129, 171-193

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 血清 Transthyretin の SDS-PAGE ウェスタンブロッティング免疫染色

TTR+/+ マウス血清中に認められる TTR のバンドが TTR-/-マウス血清においては認められなかった。

図2 TTR+/+マウス (13 週齢) 肝臓の レチノイドの分析

レチノールと8種類のレチニルエステルを測定するとパルミチン酸エステル (レチニルパルミチン酸) が最も多い。レチノールと8種類のエステルを合計して総レチノイド量とした。

図3 TCDD 曝露の AhR+/+および AhR-/-マウス (21 日齢) 肝臓レチノイド量に及ぼす影響

妊娠 12 日目に TCDD を曝露して、生後 21 日齢の AhR+/+、AhR-/-および

AhR^{-/-}マウスの肝臓中レチノール (A) およびレチニルパルミチン酸 (B) 量を測定した。

結果は、平均値±標準誤差 (n=2-6、図に表示) で表示した。*オイル投与対照群と比較して有意差有り (P<0.05)、#AhR^{+/+}マウス群と比較して有意差あり (P<0.05)。

図 4 TCDD 曝露の TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウス肝臓レチノイド量に及ぼす影響

12週齢 TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウスに TCDD を投与し、7日目に解剖して、肝臓中レチノイド量を測定した。結果は、平均値±標準誤差 (n=4-5) で表示した。

*オイル投与対照群と比較して有意差有り (P<0.05)。

図 5 PCB77、PCB126、PCB153 曝露の TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウス肝臓レチノイド量に及ぼす影響

12週齢 TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウスに PCB77、PCB126、PCB153 を投与し、7日目に解剖して、肝臓中レチノイド量を測定した。結果は、平均値±標準誤差 (n=3-6) で表示した。

*オイル投与対照群と比較して有意差有り (P<0.05)。

図 6 PCB77、PCB126、PCB153、TCDD 曝露の TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウス肝臓および胸腺重量に対する影響

12週齢 TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウスに PCB77、PCB126、PCB153 を投与した後、7日目に解剖して、肝臓および胸腺重量は体重に対しての比率で表し、平均値±標準誤差 (n=5) で表示した。

*オイル投与対照群と比較して有意差有り (P<0.05)。

図 7 PCB77、PCB126、PCB153、TCDD 曝露の TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウス肝臓中の CYP1A1 メッセンジャーRNA

発現量に及ぼす影響

12週齢 TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウスに PCB77、PCB126、PCB153 を投与した後、7日目に解剖して、肝臓から RNA を精製し、cDNA を合成して、RT-PCR で CYP1A1 メッセンジャーRNA 発現量を測定した。結果は、β-actin に対する CYP1A1 の比で表し、平均値±標準誤差 (n=3-4) で表示した。*オイル投与対照群と比較して有意差有り (P<0.01)。

図 8 PCB77、PCB126、PCB153、TCDD 曝露の TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウス肝臓中の CYP1A1 蛋白の免疫組織染色

12週齢 TTR^{+/+}および TTR^{-/-}マウスに PCB77、PCB126、PCB153 を投与した後、7日目に解剖して、肝臓のパラフィン組織標本を作製し、CYP1A1 抗体を用いて免疫酵素抗体法により CYP1A1 の蛋白を染色した。PCB126 と TCDD 曝露場合は肝臓細胞に強い CYP1A1 蛋白の誘導が認められたが、PCB77 と PCB153 曝露による肝臓中 CYP1A1 蛋白の誘導は見られなかった。肝臓中 CYP1A1 の免疫組織染色の結果は RT-PCR 解析による CYP1A1 メッセンジャーRNA 発現量の結果とよく一致した。

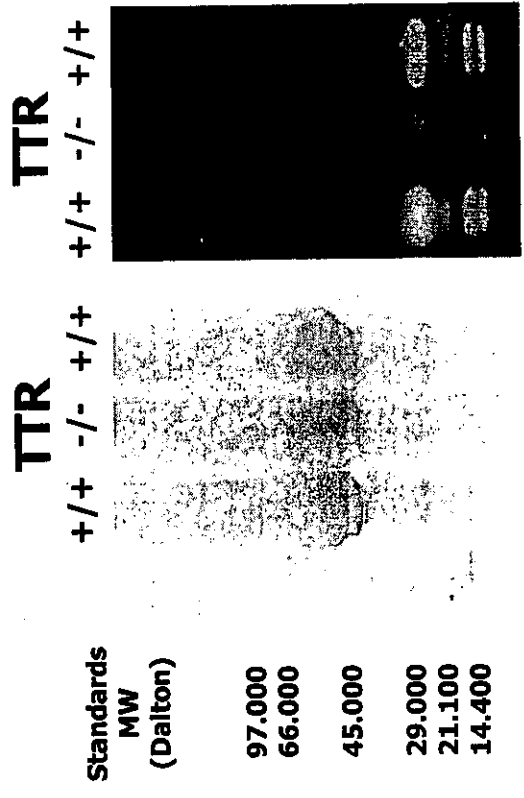
A: TCDD 曝露 TTR^{+/+}マウスの肝臓：中心静脈周辺部の肝実質細胞に強い染色性が認められた。門脈結合組織周辺の肝細胞は陰性であった。

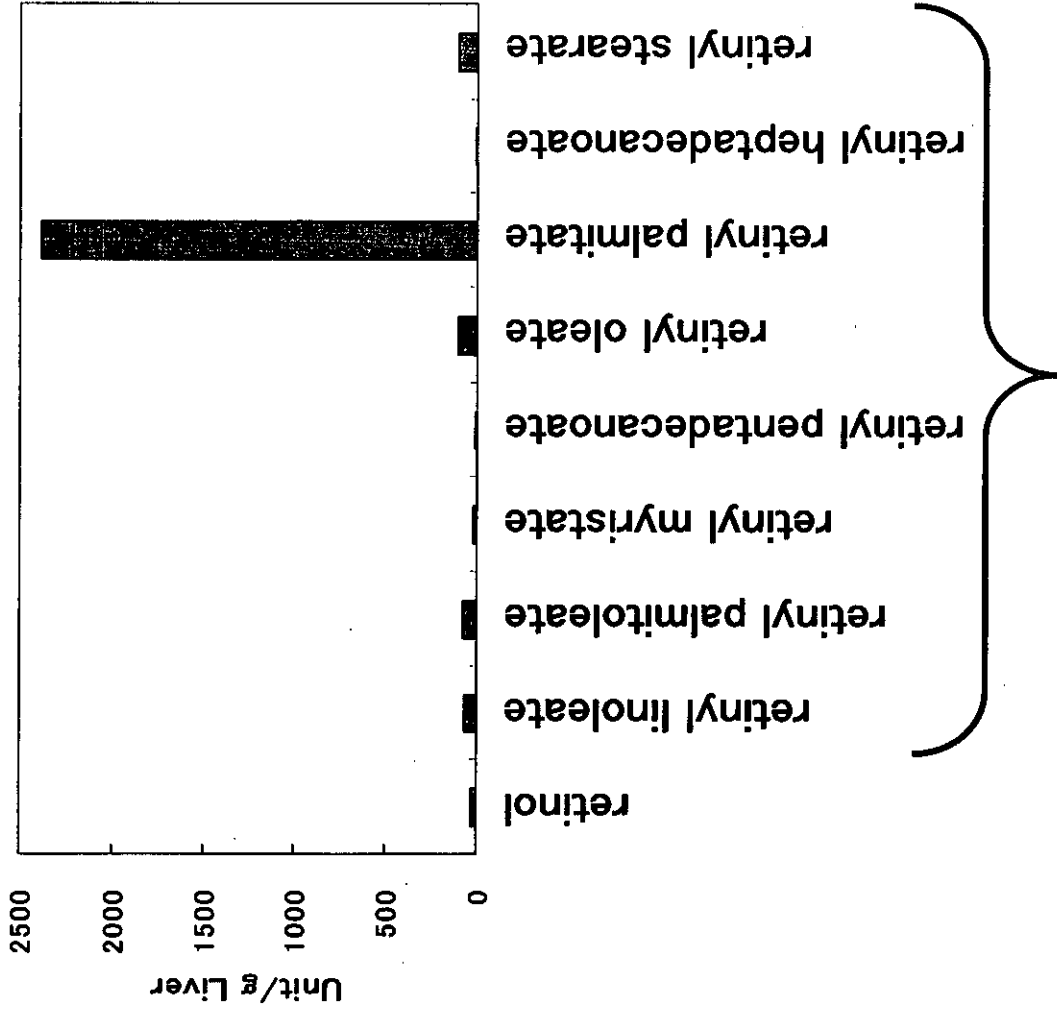
B: 写真 A の拡大図：個々の感実質細胞間で染色性の違いが認められる。

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。

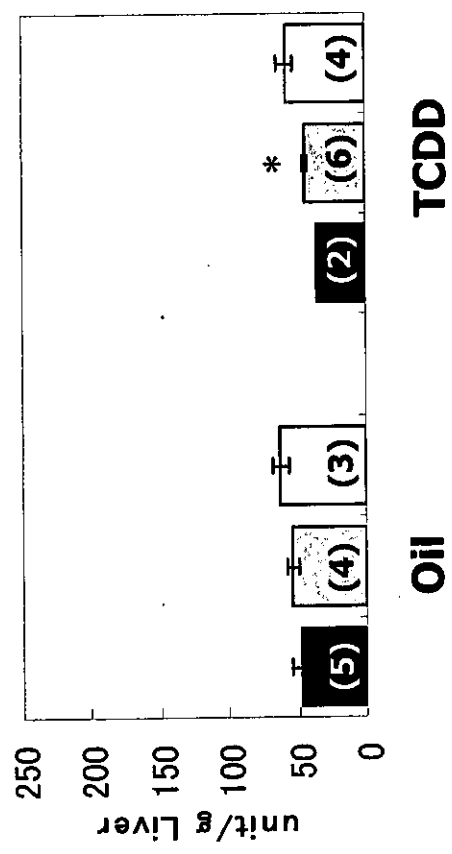
Bar = 50 μm



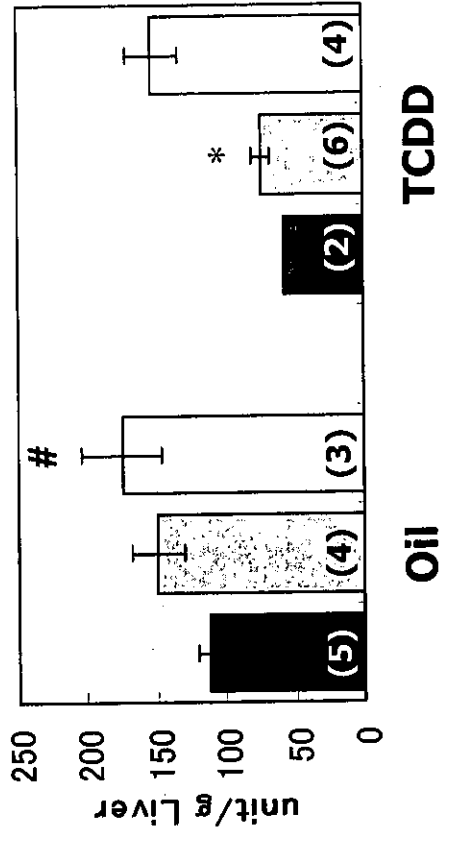


Retinyl esters

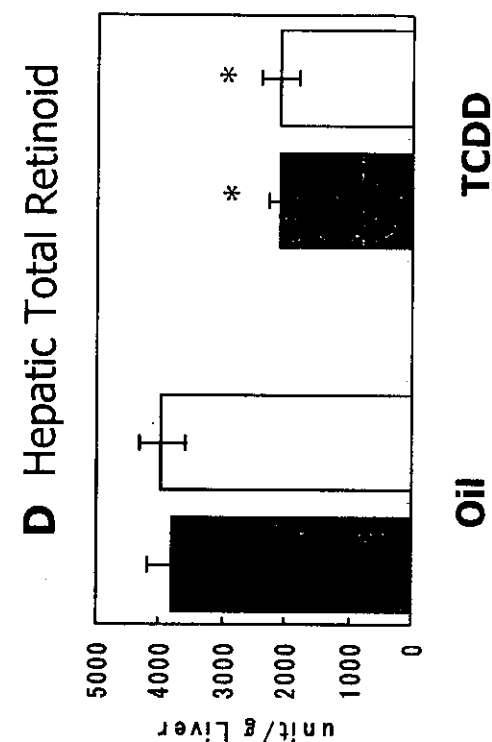
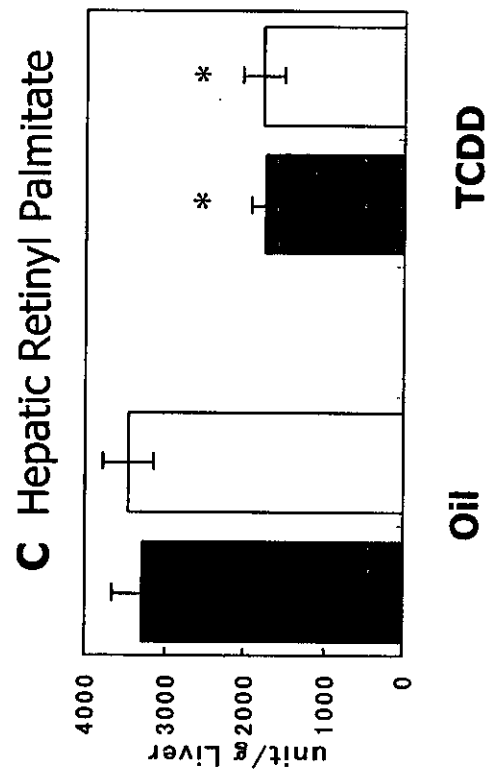
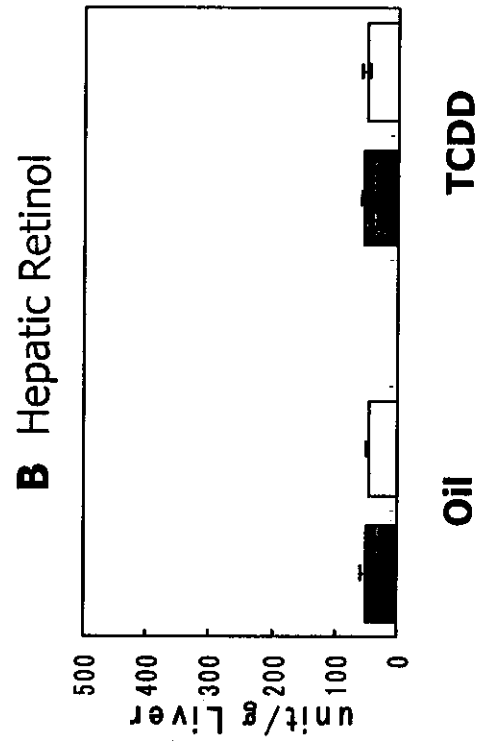
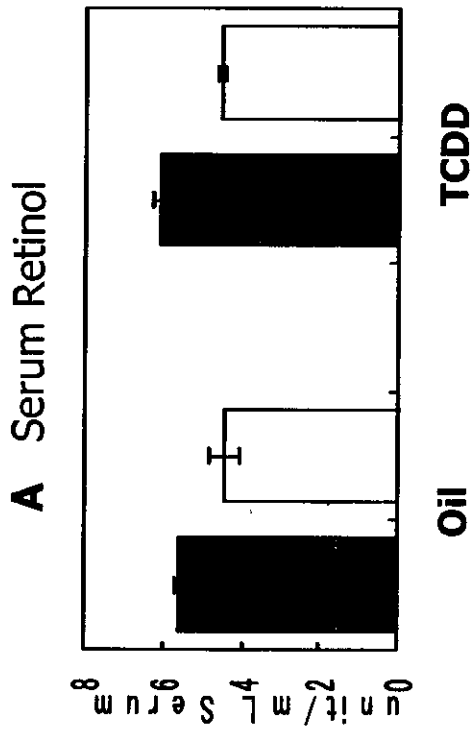
A Retinol



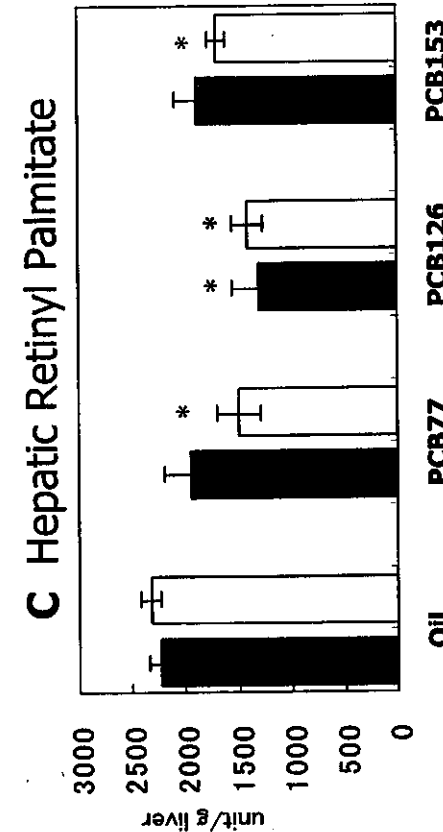
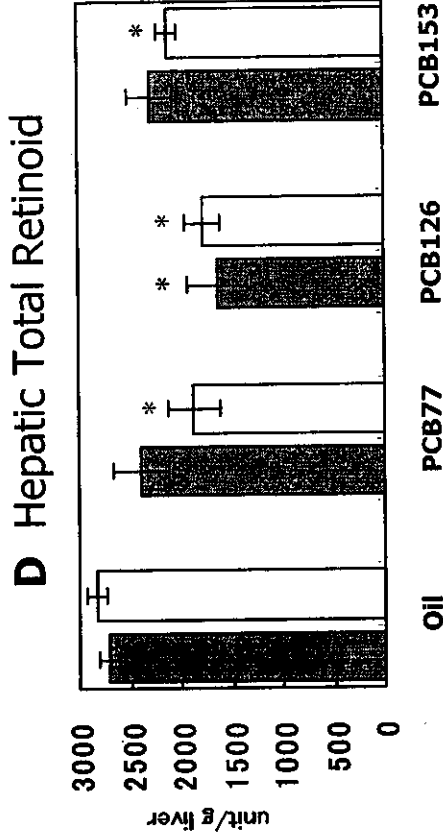
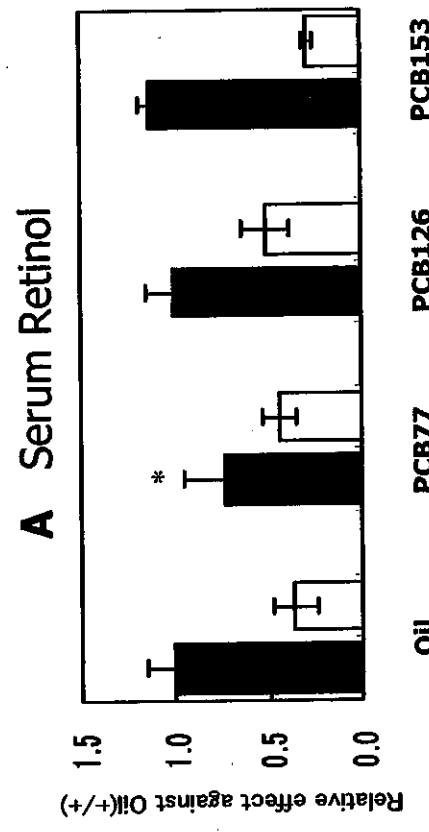
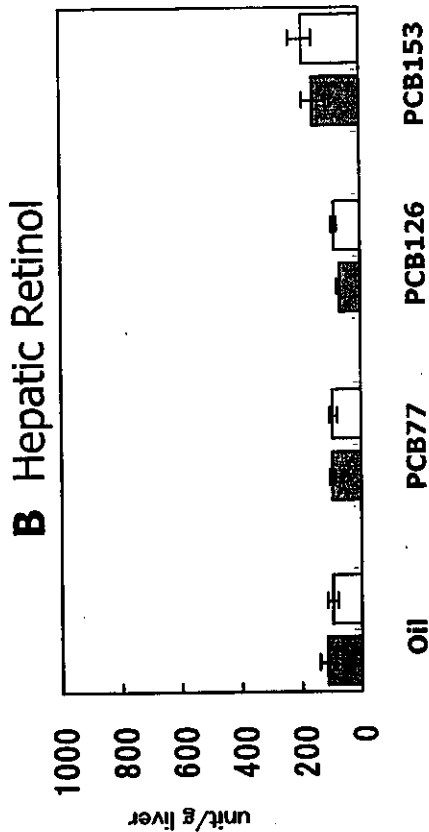
B Retinyl Palmitate



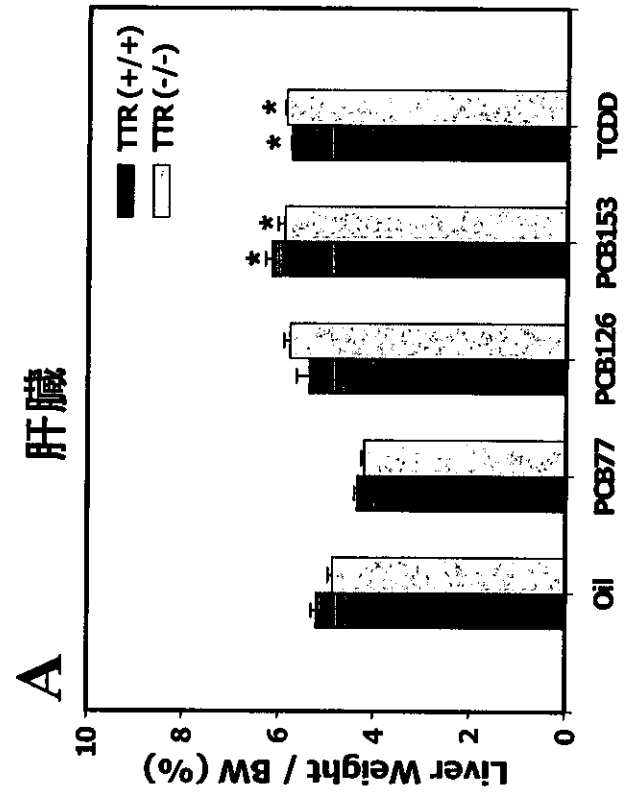
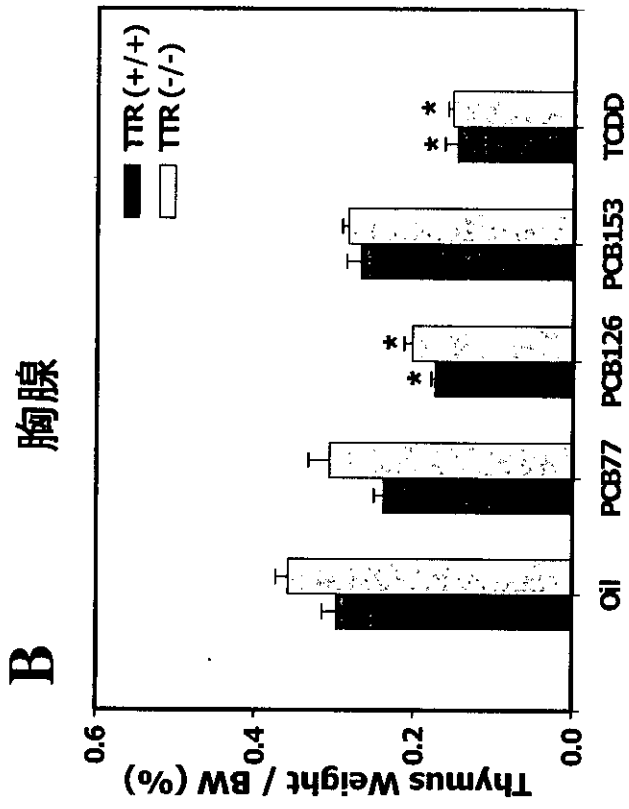
■ AhR+/+ ▨ AhR+/+/- □ AhR-/-

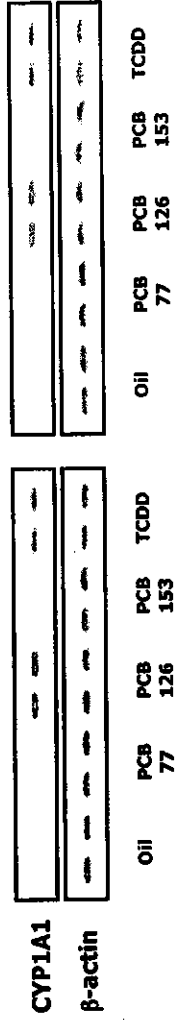
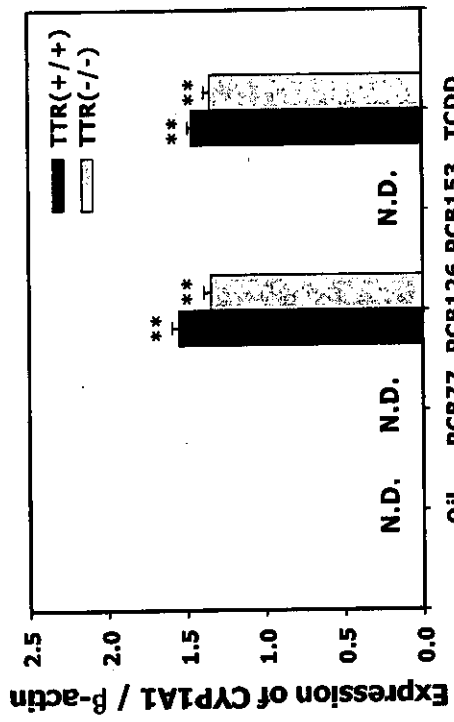


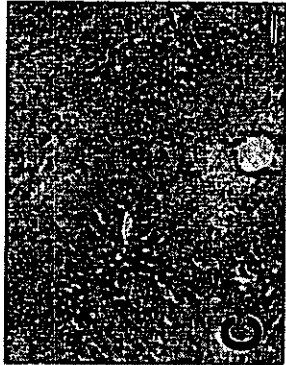
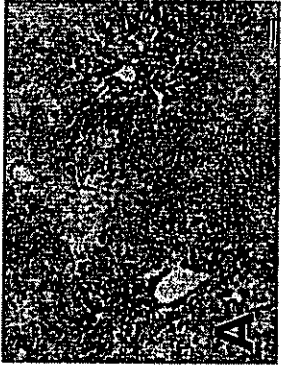
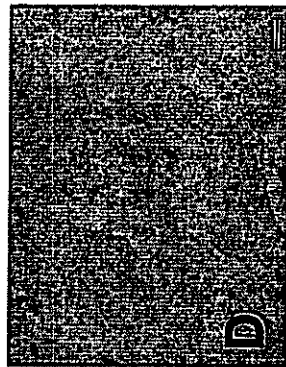
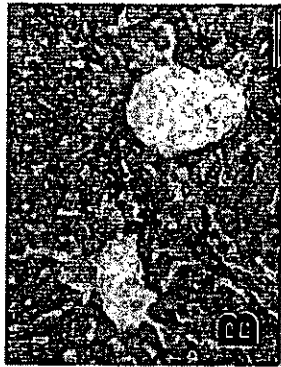
■ TTR+/+ □ TTR-/-



■ TTR+/+ □ TTR-/-







PCB169 の免疫毒性の評価

主任研究者 遠山千春 国立環境研究所・環境健康研究領域

研究要旨

3,3',4,4',5,5'-六塩化ビフェニル(PCB169、毒性等価係数(toxic equivalent factor, TEF) 0.01)または2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を6週齢のC57BL/6J雌性マウスに単回経口投与し、一次免疫反応に対する影響を比較した。

TCDD 20 µg/kg の単回投与で胸腺萎縮、IgG1 抗体産生の抑制および脾臓T細胞からのIL-5産生の抑制が見られるのに対して、2 mg/kg または5 mg/kg のPCB169 を単回経口投与したマウスでは抑制効果が認められなかった。更に、Arylhydrocarbon receptor (AhR) 依存的に発現誘導されるCYP1A1メッセンジャーRNA量を調べると、TCDD 20 µg/kg とPCB169 5 mg/kg の投与群で肝臓では同程度のCYP1A1の誘導が見られるが、脾臓ではPCB169による誘導はTCDDとくらべて弱いことがわかった。以上の結果から、IgG1産生やT細胞由来のサイトカイン産生に対してPCB169のTEF 0.01という係数は適用されないことが明らかとなった。

研究協力者 潘小青、野原恵子 国立環境研究所・環境健康研究領域

A 研究目的

PCB類は脂溶性化学物質であるため、過去に環境中に放出されたPCB類が魚や哺乳類の脂質に蓄積され、食物連鎖を通じて人類に健康影響を及ぼすことが懸念されている(Chang et al., 1982; Safe, 1990 and 1994)。PCB類は、コプラナーPCBをはじめとするダイオキシン様の作用を持つもの、すなわちAhRを活性化する作用をもつものと、非ダイオキシン類に分けることができる。これまでの研究(Silkworth, et al., 1984; Davis and Safe, 1990; Kerkvliet N et al., 1990; Safe, 1990 and 1994; Wilson and Safe, 1998)では、PCB類の免疫系への作用はそのAhR活性化能と正の相関を示し、すなわちTCDDの毒性を1とした場合のTEFが高いほど免疫系に対する作用が強

いことが報告されている。コプラナーPCBのPCB126 (TEF 0.1)とPCB169 (TEF 0.01)はPCB類の中で高いTEFをもち、免疫系への作用が強いことが報告されているが、このうち特にPCB169については、T細胞非依存性抗原であるTNP抗原に対する抗体産生能を指標とした場合には、そのTEFが数十倍大きくなることが報告されている(Harper, et al., 1995)。

最近我々は、T細胞依存性抗原であるタンパク(卵白アルブミン、OVA)に対する抗体反応において、TCDDが抗体産生において重要な働きをするT細胞由来のサイトカイン産生を顕著に抑制するなど明らかにした(Nohara, et al., 2002, Ito, et al., 2002)。しかしながら、PCB169をはじめとす

るコプラナーPCBのT細胞依存性抗原に対するIgG抗体産生反応などについては、詳細な検討が行われていない。そこで本研究では、PCB169のT細胞依存性抗原に対する抗体産生反応への影響についてTCDDの影響と比較し、そのTEFの検討、およびPCB169がTCDDとは異なる作用を示すかどうか、すなわち非ダイオキシン様の作用について検討した。

B 研究方法

1 試験材料

1.1 化合物

PCB169をAccuStandard Inc. (New Haven, CT)から購入し、PCB169含量が0.02、0.2、0.5 mg/mlとなるようにコーン油に溶解させた。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2 µg/mlとなるようにコーン油に溶解させた。対照群には4%ノナン含有コーン油を同様に投与した。

1.2 抗原物質

Phosphate buffered saline (PBS)に1 mg/ml Ovalbumin (Grade VII, Sigma Chemical Corp.)を溶解し、同容量の9% ミヨウバン $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ と混合して、KOHでpH 6.5となるように調製した(OVA/alum)。

2 実験動物および飼育条件

6週令のC57BL/6J雌性マウスは日本クレア株式会社から購入し、実験する一週間前から新しい環境に順化させた。飼育条件は温度 $24\pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、人工照明1日12時間に設定し、マウスはホワイトフレック(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收容した。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。

3 実験計画

マウスを下記の5群に分け、ディスプレイ注射筒およびマウス用胃ゾンデを用いて、それぞれの化合物を10 ml/kgの容量で強制経口投与した。

群構成

群	匹数	化合物	投与量
1	10	コーン油	-
2	10	TCDD	0.02 mg/kg
3	10	PCB169	0.2 mg/kg
4	10	PCB169	2.0 mg/kg
5	10	PCB169	5.0 mg/kg

その後すぐにOVA/alum(100 µg/マウス)を腹腔内注射し免疫刺激をした。投与してから4日および10日後にエーテル麻酔下でマウスを解剖し、以下の方法で免疫機能の解析を行った。

4 分析方法

4.1 細胞の調製

採取した胸腺、脾臓の重量を測り、ステンレスメッシュを用いて胸腺細胞、脾臓細胞を調製した。血球計算盤を用いて総細胞数を計数した。

4.2 リンパ球サブポピュレーション解析 調製した細胞浮遊液を用いてフローサイトメーター(FACSCalibur, Beckton-Dickinson, Mountain View, CA)によりT細胞($\text{CD}3^+$)、 $\text{CD}4^+$ T細胞、 $\text{CD}8^+$ T細胞、B細胞($\text{B}220^+$)解析を行った(Nohara et al., 2000)。

4.3 サイトカイン産生測定

調製した脾臓細胞をOVA(100 µg/ml)刺激下、 1×10^6 細胞/200 µlで72時間培養し、培養上清中のサイトカイン(IL-5)濃度をELISAにより測定した(Ito et al., 2002)。

4.4 血漿中抗体価測定

免疫刺激を 0 日目とし、免疫後 10 日目にエーテル麻酔下で、心臓からヘパリン処理した加注射筒で採血し、遠心分離 (3000 r.p.m.; 15 分間) して、血漿を得た。血漿は測定まで -80°C で保存した。血漿中の抗 OVA 特異的抗体価を ELISA 法により測定した (Nohara et al., 2002)。

4.5 CYP1A1 遺伝子発現誘導の測定

4.5.1 RNA 精製と測定

肝臓及び脾臓からキアゲン 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。

4.5.2 cDNA 合成

RNA PCR kit (AMV) (宝酒造株式会社、東京)を用いて $0.1\ \mu\text{g}$ 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。

4.5.3 リアルタイム定量 PCR (real-time PCR)

PCR 反応とデータの収集は ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems)を用いて実行した。

$40\ \text{ng}$ の cDNA 量を用い、SYBR Green PCR kit を用いて、増幅反応をさせた。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) を内部標準遺伝子として、結果を GAPDH に対する CYP1A1 の比で表示した (Hu et al., 2002; Mansson et al., 2001)。

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

1. 体重及び免疫臓器重量に対する TCDD または PCB169 の影響 (表 I、図 1a~d)

対照群に比べ、TCDD 曝露群および各 PCB 曝露群で体重差は認められなかった (表 I)。

TCDD $20\ \mu\text{g}/\text{kg}$ を投与したマウスは、対照群と比較して胸腺の重量が 4 日目から約 50% 減少することがみられたが、PCB169 の $0.2\ \text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\ \text{mg}/\text{kg}$ 、 $5.0\ \text{mg}/\text{kg}$ 各曝露群の胸腺重量に有意な変化はみられなかった (図 1a, b)。

OVA/alum 免疫から 10 日目に TCDD 曝露されたマウスは、対照群と比べて脾臓重量が約 30% 減少することが示された。PCB169 $2.0\ \text{mg}/\text{kg}$ 、 $5.0\ \text{mg}/\text{kg}$ 曝露群でも脾臓の重量が 20% 減少することが認められた (図 1c, d)。

2 免疫細胞に対する TCDD または PCB169 曝露の影響 (表 II、表 III)

$20\ \mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD を投与して 10 日目のマウスは、対照群と比較して胸腺細胞数が約 8 割有意に減少していた (表 II)。そのうち、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 細胞の細胞数と割合が有意に減少し、 CD4^+ T 細胞と CD8^+ T 細胞の細胞数と割合の増加が認められた。しかし、PCB169 $0.2\ \text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\ \text{mg}/\text{kg}$ 、 $5.0\ \text{mg}/\text{kg}$ 各曝露群において、胸腺細胞数および胸腺細胞の各サブポピュレーションに有意な変化はみられなかった (表 II)。

脾臓細胞数は対照群と比較して、TCDD 曝露群で有意に減少していた (表 III)。更に、各サブポピュレーションの細胞数をみると、TCDD 投与群で T 細胞数が 34% 減少したと、B 細胞数が 37% 増加したことが認められた。PCB169 の $0.2\ \text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\ \text{mg}/\text{kg}$ 、

5.0 mg/kg 各曝露群では、脾臓細胞数と各サブポピュレーションの細胞数におけるいずれの変化もみられなかった (表Ⅲ)。

3 サイトカイン産生に対する TCDD または PCB169 曝露の影響 (図 2)

以前の研究から、TCDD は脾臓中 T 細胞のサイトカイン産生能を抑制することが知られている。今回の実験でも、TCDD 曝露群においてタイプ 2 サイトカインの IL-5 産生の抑制効果がみられた。一方、PCB169 の 0.2 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kg 各曝露群においては、IL-5 産生量に変化が認められなかった (図 2)。

4 抗体産生に対する TCDD または PCB169 曝露の影響 (図 3)

図 3a、b に示したように、TCDD 群のマウスで血漿中の IgM と IgG1 抗体量の減少がみられた。一方、PCB169 曝露群の場合、IgM 産生能の低下が 2.0 mg/kg、5.0 mg/kg 曝露群でみられたが、IgG1 産生の変化は PCB169 0.2 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kg いずれの曝露群においても認められなかった。

5 肝臓重量の変化 (図 4)

TCDD 曝露後 4 日目に、マウス肝臓の重量が有意に増加した。同様な増加が PCB169 の 2.0 mg/kg および 5.0 mg/kg 曝露群でも示された。

6 肝臓と脾臓における CYP1A1 発現誘導 (図 5)

TCDD と同様に PCB169 も Ah 受容体のアゴニストであるため、両者ともフェース I 代謝酵素の CYP1A1 を誘導することが報告されている (Diliberto, et al., 1995; Whitlock, 1999; DeVito, et al., 2000)。そこで、TCDD および PCB169 曝露 4 日後の肝臓と脾臓中の CYP1A1 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で調べた。表

IV に示すように、PCB169 曝露による肝臓での CYP1A1 発現量は TCDD 曝露に比べて 2 mg/kg で約 45%、5 mg/kg で 73%であった。一方、PCB169 曝露による脾臓での CYP1A1 発現量は、TCDD 曝露に比べて 2 mg/kg で約 2%、5 mg/kg で 30%であり、PCB169 による脾臓での CYP1A1 発現誘導量は肝臓に比べると低かった。

D 考察

これまでに PCB169 を含むコプラナー PCB の免疫毒性評価が多く報告されているが、T 細胞依存性抗原に対する IgG 抗体産生や T 細胞由来サイトカインに関しては報告がされていなかった。本研究では、TCDD および PCB169 単回投与の、OVA 免疫刺激に対する T 細胞由来サイトカイン産生および抗体産生能の対する影響を中心に検討を行った。TEF0.01 (Van den Berg et al., 1998) を参考にし、20 µg/kg TCDD 曝露マウスと PCB169 投与量を 0.2 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kg を比較した。

胸腺は T 細胞が分化、成熟する重要な器官であり、20 µg/kg TCDD の投与で C57BL/6J 雌性マウスに胸腺重量と細胞数の減少が認められた。胸腺内の未熟な CD4+CD8+細胞の減少と成熟した CD8+ T 細胞の増加が認められた。それに対して PCB169 曝露群は、対照群と有意な変化を認めず、PCB169 の胸腺に対する毒性は TEF0.01 より低いと考えられた。

脾臓では曝露 10 日目に対照群と比べて、TCDD 曝露マウスで脾臓重量と細胞数の減少、脾臓中の T 細胞と B 細胞の減少を認めた。一方、PCB169 2.0 mg/kg、5.0 mg/kg いずれの曝露群においても、脾臓重量の減少を認めたが、細胞数の減少や T 細胞、B 細胞の有意な変化は認められなかったため、PCB169 は TCDD より脾臓細胞に対す

る影響が弱いと考えられた。

また TCDD 曝露群では IL-5 産生および IgM や IgG 抗体産生の抑制が認められ、先の報告との再現性が得られた (Ito et al., 2002; Inouye et al., submitted)。しかしながら PCB169 曝露群では、IL-5 産生や IgG 産生量も対照群と有意に変化してなかった。

さらに、TCDD による AhR 活性化の指標として用いられる CYP1A1 の誘導に関して、メッセンジャーRNA をリアルタイム PCR で定量した。肝臓では、PCB169 曝露群でも TCDD と同様のメッセンジャーRNA の発現が認められたのに対して、脾臓での CYP1A1 発現の誘導は TCDD よりかなり弱いことが明らかとなった。このことは、上記の PCB169 群の脾臓細胞や抗体産生能への影響が TEF0.01 より弱いことの原因が、脾臓での AhR 依存的な遺伝子発現能が弱いことによるものであることを示唆した。これらの差は、TCDD と PCB169 の代謝や組織分布の違いに起因する可能性が考えられ、今後検討が必要である。

なお、Harper ら (1995) は、T 細胞非依存性抗原である TNP 抗原に対する抗体産生能を指標とした場合には、PCB169 の TEF が 0.4-0.7 程度と大きくなることを報告している。それに対して、今回の我々の結果では、脾臓 T 細胞からの IL-5 産生や、さらに IgG 産生に関しては、PCB169 は TEF0.01 より効果が小さいことが示された。この差については、Harper らが、T 細胞非依存性抗原に対する反応を指標としたのに対して、我々は T 細胞依存性のタンパク抗原に対する反応を調べたためと考えられる。最近我々は、TCDD が従来調べられてきた IgM 抗体を中心とする低親和性の抗体産生反応だけでなく、主として IgG 抗体を産生する高親和性の抗体産生反応をも抑制することを報告しているが

(Inouye, et al., submitted)、今回得られた結果から、PCB169 は高親和性の抗体産生反応に対しては作用が弱いことが示唆された。

また今回の研究では、PCB169 曝露によって、胸腺細胞や脾臓細胞のポピュレーションの変化等にも PCB169 曝露により特有の変化は認められず、非ダイオキシン様の作用については明らかにならなかった。

E 結論

3,3',4,4',5,5'-六塩化ビフェニル (PCB169 ; 2 mg/kg または 5 mg/kg) または 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD ; 20 µg/kg) を C57BL/6J 雌性マウスに単回経口投与し、一次免疫反応に対する影響を比較した。その結果、TCDD 投与群で観察される胸腺萎縮、IgG1 抗体産生の抑制、ならびに脾臓 T 細胞からの IL-5 産生の抑制は、PCB169 投与群では観察されないことがわかった。CYP1A1 mRNA 量は、TCDD 20 µg/kg と PCB169 5 mg/kg の投与群で肝臓では同程度であるが、脾臓では PCB169 による誘導は TCDD とくらべて弱いことがわかった。以上の結果から、免疫系のこれらの影響指標については、PCB169 の TEF 0.01 は適用できないことが明らかとなった。

F 健康危険情報

特になし

G 参考文献

Chang KJ, Hsieh KH, Tang SY, Tung TC, Lee TP. (1982) Immunologic evaluation of patients with polychlorinated biphenyl poisoning: evaluation of delayed-type skin hypersensitive response and its relation to clinical studies. *J Toxicol Environ Health* 9(2):217-23

Davis D, Safe S. (1990)

- Immunosuppressive activities of polychlorinated biphenyls in C57BL/6N mice: structure-activity relationships as Ah receptor agonists and partial antagonists. *Toxicology* **63**(1):97-111
- DeVito M, Menache MG, Diliberto J, Ross D, Birnbaum L. (2000) Dose-response relationships for induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzyme activity in liver, lung, and skin in female mice following subchronic exposure to polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol* **167**(3):157-72
- Diliberto JJ, Akubue PI, Luebke RW, Birnbaum LS. (1995) Dose-response relationships of tissue distribution and induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzymatic activities following acute exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **30**(2):197-208
- Kerkvliet N, Steppan L, Brauner J, Deyo J, Henderson M, Tomar R, Buhler D. (1990) Influence of the Ah locus on the humoral immunotoxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: evidence for Ah-receptor-dependent and Ah-receptor-independent mechanisms of immunosuppression. *Toxicol Appl Pharmacol* **105**(1):26-36
- Harper N, Connor K, Steinberg M, Safe S. (1995) Immunosuppressive activity of polychlorinated biphenyl mixtures and congeners: nonadditive (antagonistic) interactions. *Fundam Appl Toxicol* **27**(1):131-9
- Harper N, Connor K, Steinberg M, Safe S. (1994) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific for antibodies to TNP-LPS detects alterations in serum immunoglobulins and isotype switching in C57BL/6 and DBA/2 mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Toxicology* **92**(1-3):155-67
- Hu Y, Ippolito JE, Garabedian EM, Humphrey PA, Gordon JI. (2002) Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *J Biol Chem* **277**(46):44462-74
- Inouye, K., Ito, T., Fujimaki, H., Takahashi, Y., Takemori, T., Pan, X., Tohyama, C., and Nohara, K. Suppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response to protein antigen in C57BL/6 mice. (submitted)
- Ito, T., Inouye, K., Fujimaki, H., Tohyama, C. and Nohara, K. (2002). Mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced suppression of antibody production: Effect on T cell-derived cytokine production in the primary immune reaction of mice, *Toxicol. Sci.*, **70**, 46-54
- Mansson E, Liliemark E, Soderhall S, Gustafsson G, Eriksson S, Albertioni F. (2002) Real-time quantitative PCR assays for deoxycytidine kinase, deoxyguanosine kinase and 5'-nucleotidase mRNA measurement in cell lines and in patients with leukemia. *Leukemia* **16**(3):386-92
- Nohara K, Ushio H, Tsukumo S, Kobayashi T, Kijima M, Tohyama C, Fujimaki H. (2000) Alterations of thymocyte development, thymic emigrants and peripheral T cell population in rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology* **145**(2-3): 227-35
- Nohara, K., Fujimaki, H., Tsukumo, S., Inouye, K., Sone, H. and Tohyama, C. (2002). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

(TCDD) on T cell-derived cytokine production in ovalbumin (OVA)-immunized C57Bl/6 mice, *Toxicology* 172, 49-58

Safe S. (1990) Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* 21(1):51-88. Review.

Safe S. (1994) Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 24(2):87-149

Silkworth J, Antrim L, Kaminsky L. (1984) Correlations between polychlorinated biphenyl immunotoxicity, the aromatic hydrocarbon locus, and liver microsomal enzyme induction in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 75(1):156-65

Whitlock, J, Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 103-125

Wilson C, Safe S. 1998 Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. *Toxicol Pathol* 26(5):657-71

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(12):775-92

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 胸腺と脾臓重量に対する TCDD または PCB169 曝露の影響

マウスに TCDD あるいは PCB169 を投与し、OVA 免疫して 4 日目と 10 日目に解剖した。胸腺重量 (1a、4 日目; 1b、10 日目) と脾臓重量 (1c、4 日目; 1d、10 日目) は体重に対しての比率で表し、平均値±標準誤差 (n = 5) で表示した。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

Veh、コーン油; TC、TCDD(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$); P-0.2、PCB169 (0.2 mg/kg); P-2.0、PCB169 (2.0 mg/kg); P-5.0、PCB169 (5.0 mg/kg)

図 2 サイトカイン産生に対する TCDD または PCB169 曝露の影響

曝露 4 日目に対照群、TCDD または PCB169 群から脾臓を摘出し、脾臓細胞にして、OVA 存在下で 72 時間培養した。その上清液中のサイトカイン量を ELISA 法で測定した。結果は、平均値±標準誤差 (n = 5) で表示した。** $P < 0.01$ 。

図 3 抗体産生能に対する TCDD または PCB169 曝露の影響

曝露 10 日目に対照群、TCDD または PCB169 群から血漿をえて、a) IgM および b) IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。結果は、平均値±標準誤差 (n = 5) で表示した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

図 4 曝露 4 日目の肝臓重量の変化

曝露 4 日目に対照群、TCDD または PCB169 群のマウスを解剖して、肝臓