

メカニズムを、AhR を介した TCDD 様作用と、それを介さない非 TCDD 様作用とに分けて解明することを目的として、以下の実験を行なった。

B. 研究方法

TCDD 高感受性 C57BL/6 系マウスおよび TCDD 低感受性 DBA/2 系マウスに、3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (CB77) (50 mg/kg)、2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) (50 mg/kg)、2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB153) (100 mg/kg) を投与し、それぞれ 7、5、3 日後に、血清中総 T4、遊離 T4、総トリヨードサイロニン(総 T3)および甲状腺刺激ホルモン(TSH)濃度、肝ミクロソームの薬物代謝酵素活性および UGT1A の発現量、血清中 PCB の水酸化代謝物濃度、肝臓中 T4 トランスポーター遺伝子の発現量を測定した。さらに、各 PCB 投与後 7、5、3 日に $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ を静脈内投与し、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の血清クリアランス、胆汁中 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ のグルクロン酸抱合体の排泄量、血清中 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ と血清タンパクとの結合率、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の組織分布量(28 組織)を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、*in vivo* での代謝、抱合酵素および T4 トランスポーター遺伝子の発現量、甲状腺ホルモン濃度の変動および T4 の体内動態を再現しうる培養系細胞あるいはそれに代わる実験系がないため、やむを得ず実験動物を使用した。その使用数は最小限にとどめ、実験動物に対して苦痛を与えない十分な配慮をした。

C. 研究結果

両マウスに各 PCB を投与すると、血清中総 T4 および遊離 T4 濃度はいずれも有意に低下した(図 1 および 2)。また、血清

中総 T3 濃度は、C57BL/6 系マウスに各 PCB 投与により、また DBA/2 系マウスに CB118 投与により有意に低下した。一方、血清中 TSH 濃度はいずれの PCB を投与した場合にもほとんど変化しなかった。

相対肝臓重量は C57BL/6 系マウスに CB77 を投与したとき、DBA/2 系マウスに CB118 を投与したときにわずかに増加した。一方、相対甲状腺重量は、両マウスにいずれの PCB を投与した場合にも変化しなかった。

肝臓ミクロソームの ethoxyresorufin *O*-dealkylase (EROD) 活性は C57BL/6 系マウスに CB77、CB118 投与により顕著に、また DBA/2 系マウスに CB77 および CB153 投与によりわずかに増加した(図 3)。Pentoxyresorufin-*O*-dealkylase (PROD) 活性は C57BL/6 系マウスに CB118、CB153 投与により顕著に、また C57BL/6 系マウスに CB77 投与、DBA/2 系マウスに CB153 投与によりわずかに増加した(図 4)。

この時、UGT1A および UGT1A1 の発現量は、C57BL/6 系マウスに CB118、CB153 投与により有意に増加した(図 5)。一方、DBA/2 系マウスでは、それらの発現量はいずれの PCB 投与においても増加しなかった。ところが、胆汁中 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ のグルクロン酸抱合体の排泄量は、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 投与後 120 分において、C57BL/6 系マウスに CB77 投与では 89%、CB118 投与では 37%、CB153 投与では 213%増加した。また、DBA/2 系マウスでは、CB77、CB118 を投与した場合にわずかに増加した(図 6)。

次に、T4 の体内動態に注目して検討を加えた。血中からの $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の消失は、C57BL/6 系マウスにいずれの PCB を投与したとき、また DBA/2 系マウスに CB77 を投与したときに、有意に亢進した(図 7)。また、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の分布容積は、C57BL/6 系マウスにいずれの PCB 投与においても有意に増加し、DBA/2 系マウスでは CB77

投与においてのみ有意に増加した。また、C57BL/6 系マウスに CB77、CB118 および CB153 を投与したとき、DBA/2 系マウスに CB77 を投与したときの肝臓の血清-組織間分配係数(Kp 値)、および C57BL/6 系マウスに CB153 を投与したときの甲状腺の Kp 値は 1 を上回った(図 8-10)。さらに、両マウスにいずれの PCB を投与した場合にも、全肝臓重量当たりの [¹²⁵I]T4 の分布量および肝臓単位重量当たりの [¹²⁵I]T4 の分布量は顕著に増加した。

肝臓の T4 トランスポーター、L 型アミノ酸トランスポーター(LAT1)、有機アニオン輸送ポリペプチド(Oatp1)の mRNA の発現量は、両マウスにいずれの PCB を投与した場合にも変化しなかった。一方、モノカルボン酸トランスポーター(MCT8)の mRNA の発現量は、C57BL/6 系マウスに CB118 投与により有意に増加し、DBA/2 系マウスに CB153 投与により増加傾向が見られた(図 11)。

さらに、血中 [¹²⁵I]T4 と血清タンパクとの結合率を測定した。血中 [¹²⁵I]T4 とトランスサイレチン(TTR)との結合率は、C57BL/6 系マウスに CB118 投与および DBA/2 系マウスに CB77 投与により著しく低下し、代わってアルブミンおよびサイロキシシン結合グロブリン(TBG)との結合率が顕著に増加した(図 12、13)。

また、C57BL/6 系マウスに CB77 投与において、血中 [¹²⁵I]T4 と TTR との結合率はわずかに減少した。一方、C57BL/6 系マウスに CB153 投与、また DBA/2 系マウスに CB118 および CB153 投与では、いずれのタンパクとの結合率にも変化は全く認められなかった。

また、C57BL/6 系マウスに各 PCB を投与したときの血清中水酸化代謝物濃度は、3-OH-2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB153 投与) > 4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (CB118 投与) > 4-OH-3,3',4',5-

tetrachlorobiphenyl (CB77 投与)の順であった(表 1)。一方、DBA/2 系マウスに各 PCB を投与したときの血清中水酸化代謝物濃度は、4-OH-3,3',4',5-tetrachlorobiphenyl (CB77 投与) > 4-OH-2,3,3',4',5-

pentachlorobiphenyl (CB118 投与) > 3-OH-2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB153 投与)の順であった(表 1)。

D. 考察

まず、用いた PCB が、AhR および constitutive androstane receptor (CAR)のどちらに高い親和性を有しているかを確認するため、また両マウスが有している AhR の機能の程度の違いを確認するために、TCDD 高感受性 C57BL/6 系マウスおよび TCDD 低感受性 DBA/2 系マウスに 3 種の PCB を投与し、肝ミクロソームの EROD および PROD 活性を測定した。EROD 活性の結果から、CB77 および CB118 が強力な AhR アゴニストであること、また DBA/2 系マウスは、AhR アゴニストに対して感受性が低いことが確認された。PROD 活性の結果から、CB118 および CB153 は、フェノバルビタール(PB)のように CAR に対する親和性が高いこと、また CB77 もわずかながら CAR と結合し、弱い PB 様作用を有することが示唆された。また、DBA/2 系マウスは、C57BL/6 系マウスに比べ CAR アゴニストに対しても、感受性が低いことが示唆された。

血清中総 T4 および遊離 T4 濃度は、両マウスにいずれの PCB 投与によっても有意に低下したが、その低下率は DBA/2 系マウスよりも C57BL/6 系マウスのほうが大きかった。この結果と前述のことを考え合わせると、総 T4 および遊離 T4 濃度の低下は、CB77 投与では主に AhR 介して、CB153 投与では主に CAR を介して、CB118 投与では AhR と CAR を介して生

じていることが示唆された。また、AhR アゴニストとともに CAR アゴニストに対しても感受性が低いことが示唆された DBA/2 系マウスにおいて、いずれの PCB 投与の場合にも総 T4 および遊離 T4 濃度は有意に低下した。この結果より、両マウスに CB77、CB118 および CB153 投与による血清中総 T4 および遊離 T4 濃度の低下には、AhR や CAR を介さないメカニズムも関わっている可能性が示唆された。

一般に、TCDD 様 PCB は、AhR を介して肝の UGT1A を誘導し、T4 のグルクロン酸抱合体の胆汁中排泄を促進することによって、血清中 T4 濃度を低下させると考えられている。そこで、両マウスに各 PCB を投与し、肝ミクロソームの UDP-GT 分子種の発現量を、また各 PCB 処置後 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ を投与し、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ のグルクロン酸抱合体の胆汁中排泄量を測定した。UGT1A および UGT1A1 の発現量および $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ のグルクロン酸抱合体の胆汁中排泄量の結果から、CB153 は CAR を介して、また CB118 は AhR と CAR の両者を介して、肝臓の UGT1A および UGT1A1 を誘導し、T4 のグルクロン酸抱合反応を亢進し、その胆汁排泄を促進することで、血清中 T4 濃度を低下させることが示唆された。また、CB77 投与による血清中 T4 濃度の低下には、AhR を介した未知の機序による、T4 のグルクロン酸抱合体の胆汁中排泄量の増加が関わっていることが示唆された。

次に、T4 の体内動態に注目して検討を加えた。両マウスに CB77 を投与したとき、DBA/2 系マウスのほうが、C57BL/6 系マウスより、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の血中からの消失が亢進していた。この結果から、CB77 投与による $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の血中からの消失の亢進は、AhR を介さない非 TCDD 様作用によることが示唆された。一方、CB118 およ

び CB153 投与により、C57BL/6 系マウスで観察された $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の血中からの消失の亢進は、DBA/2 系マウスでは見られなかった。この結果より、CB118 および CB153 投与による $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の血中からの消失の亢進は、CB118 では AhR と CAR を、CB153 では CAR を介して生じている可能性が示唆された。続いて、PCB 投与マウスの血中 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の薬物動態的パラメーターを算出した。 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の分布容積の結果から、C57BL/6 系マウスに 3 種の PCB、DBA/2 系マウスに CB77 投与により、血中の $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ が組織へ急速に移行している可能性が示唆された。

一般に、分布容積の増加の要因は、組織容積の増加、輸送担体による能動輸送の増加、血中タンパクとの結合率の変化、組織への結合量の増加などが考えられる。そこで、PCB 投与により血中の $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ が、どこの組織へ移行したのかを明らかにするために、両マウスに各 PCB 投与後の $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の組織分布量を測定し、 K_p 値を算出した。両マウスに 3 種の PCB 投与により、いずれの場合にも肝臓への $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の分布量、肝臓の K_p 値および単位肝臓重量当りの $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の移行量は有意に増加した。これらの結果から、両マウスに各 PCB 投与における血中 T4 濃度の低下は、肝臓への T4 の移行量の増加に起因していることが示唆された。この肝臓への T4 の移行量の増加は、CB77 投与では AhR を介して、CB118 投与では AhR と CAR を介して、CB153 投与では CAR を介して生じていること、さらに DBA/2 系マウスにおいても各 PCB 投与により肝臓への T4 の移行量は増加していたことから、AhR も CAR も介さない作用も関わっている可能性が示唆された。また、C57BL/6 系マウスに CB77、DBA/2 系マウスに CB118 を投与により肝臓重量はわずかながら増加していた。このことより、C57BL/6 系マ

ウスに CB77、DBA/2 系マウスに CB118 を投与したときには、肝肥大も肝臓への T4 の移行量の増加に関わっていることが示唆された。

また、血中 ^{125}I T4 の肝臓への移行量の増加には、甲状腺ホルモントランスポーターによる ^{125}I T4 の能動輸送の増加が考えられる。そこで、各 PCB を投与した両マウスの肝臓の甲状腺ホルモンを基質とするトランスポーターの mRNA の発現量の変動について検討した。その結果、CB118 を投与した C57BL/6 系マウスおよび CB153 を投与した DBA/2 系マウスにおける ^{125}I T4 の肝臓への移行量の増加は、肝臓の MCT8 の mRNA の発現量が増加することによる可能性が考えられた。

多くの論文において PCB 特有の血中 T4 濃度の低下メカニズムが報告されている。そのメカニズムは、PCB の水酸化体あるいは PCB 自身が、T4 より高い親和性を有し、血中 TTR と結合し、血中甲状腺ホルモンの輸送を変化させるというものである。そこで、各 PCB を処置した両マウスに、 ^{125}I T4 を投与し、血中 ^{125}I T4 と TTR、TBG、アルブミンとの結合率を測定した。その結果から、C57BL/6 系マウスに CB77、CB118 を投与したとき、DBA/2 系マウスに CB77 を投与したときの ^{125}I T4 の分布容積の増加は、血中 T4 と TTR との結合が阻害されることにより、T4 の肝臓への移行が亢進することが関与している可能性が示唆された。今回、C57BL/6 系マウスに CB118 を投与したとき、また DBA/2 系マウスに CB77 を投与したときには、血中 ^{125}I T4 と TTR との結合は著しく阻害された。しかし、C57BL/6 系マウスに CB77 を投与したときには、それらの阻害はわずかであり、DBA/2 系マウスに CB118 を投与したときには、それらの阻害は全く観察されなかった。この結果の違いは、系統差によるものと考え

られるが、現在のところ詳細は不明である。

さて、血中 ^{125}I T4 と TTR との結合阻害に系統差や化合物による違いが見られたのは、動物により各 PCB の代謝パターンが異なり、TTR と結合する水酸化体の血中濃度が異なっていたためである可能性が考えられる。そこで、両マウスに各 PCB 投与後の血中 ^{125}I T4 と TTR との結合率の変動と、血中 PCB および水酸化代謝物濃度との関連性について検討を加えた。しかし、両マウスに各 PCB を投与した後、血中 ^{125}I T4 と TTR との結合阻害の程度と、血中の各 PCB の未変化体およびその水酸化代謝物の濃度との間に相関関係を見出すことはできなかった。

以上の結果をまとめると、異なるタイプの PCB を投与したときの血清中 T4 濃度の低下には、いずれの PCB 投与の場合にも、血中 T4 の肝臓への移行量の増加が大きく寄与していることが示唆された。この移行量の増加には、CB77 および CB118 投与では、非 TCDD 様作用である血清中 T4 と TTR との結合阻害が関与している可能性が示唆された。また、CB118、CB153 投与では、MCT8 など特定の T4 トランスポーターの関与が考えられる。さらに、CB118 投与では TCDD 様と非 TCDD 様作用により、CB153 投与では非 TCDD 様作用により UGT1A を誘導し、また CB77 投与では未知因子により、T4 のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄量の増加が、血清中 T4 濃度の低下に関与していることが示唆された。

E. 結論

Coplanar PCB、mono-ortho PCB、non-planar PCB などの異なるタイプの PCB による血清中 T4 濃度の低下は、AhR を介した TCDD 様作用と、それを介さない非 TCDD 様作用が複雑に絡み合って起こる

ことを明らかにした。PCB 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いる。しかし、本研究結果により、PCB による血中甲状腺ホルモン濃度低下作用には AhR を介さない機構が大きく関与していることが示唆された。今後、PCB の毒性評価において、非 TCDD 様作用を軸にした毒性評価係数の設定が急務である。

F. 参考文献

Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa

Kato and Nobuyuki Koga: In vitro metabolism of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB 187) with liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs. *Xenobiotica*, (2005) in press.

Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Nobuyuki Koga and Masakuni Degawa: Species differences in tissue distribution of catechol and methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyls in rats, mice, hamsters, and guinea pigs. *Xenobiotica*, (2005) in press.

Koichi Haraguchi, Nobuyuki Koga and Yoshihisa Kato: Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls and tissue distribution of persistent metabolites in rats, hamsters and guinea pigs. *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 373-380 (2005)

Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Nobuyuki Koga and Masakuni Degawa: Metabolism of polychlorinated biphenyls by Gunn rats: Identification and serum retention of catechol metabolites. *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 1684-1691 (2004)

Yoshihisa Kato, Shinichi Ikushiro, Koichi

Haraguchi, Tomoaki Yamazaki, Yuriko Ito, Hiroshi Suzuki, Ryohei Kimura, Shizuo Yamada, Tohru Inoue and Masakuni Degawa: A possible mechanism for decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in Wistar and Gunn rats. *Toxicol. Sci.*, **81**, 309-315 (2004)

Kelly J. Gauger, Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Hans-Joachim Lehmler, Larry W. Robertson, Ruby Bansal and R. Thomas Zoeller: Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors. *Environ. Health Perspect.*, **112**, 516-523 (2004)

加藤善久、木村良平、山田静雄、出川雅邦：PCB 類による甲状腺ホルモンかく乱作用とその作用機構：動物種差。環境変異原研究、**26**、101-106 (2004)

加藤善久、山田静雄、出川雅邦：Polychlorinated biphenyls による血中サイロキシン濃度低下作用機構。 *Endocrine Disrupter News Letter*, **7**(3)、2 (2004)

G. 健康危険情報

特になし

H. 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（データベース等）
なし

I. 図の説明

図1. C57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスにCB77、CB118およびCB153を投与した後の血清中総サイロキシン濃度.

平均±標準誤差. n=3-6. * $P<0.01$.

図2. C57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスにCB77、CB118およびCB153を投与した後の血清中遊離サイロキシン濃度.

平均±標準誤差. n=3-6. * $P<0.05$.

図3. C57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスにCB77、CB118およびCB153を投与した後の肝ミクロソームのethoxyresorufin O-dealkylase 活性.

平均±標準誤差. n=3-5(^an=2). * $P<0.05$.

図4. C57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスにCB77、CB118およびCB153を投与した後の肝ミクロソームのpentoxoresorufin O-dealkylase 活性.

平均±標準誤差. n=3-5. * $P<0.05$.

図5. C57BL/6系マウスにCB77、CB118およびCB153を投与した後の肝ミクロソームのUGT分子種の発現量.

平均±標準誤差. n=3-5. * $P<0.1$.

図6. CB77、CB118およびCB153を処置したC57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスに $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ を静脈内投与した後の胆汁中 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ のグルクロン酸抱合体の排泄量.

平均±標準誤差. n=4-5. * $P<0.05$.

図7. CB77、CB118およびCB153を処置したC57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスに $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ を静脈内投与した後の

$[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の血清クリアランス.

平均±標準誤差. n=3-7. * $P<0.05$.

図8. CB77を処置したC57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスに、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ を静脈内投与し、5分後の $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の血清-組織間分配係数.

平均±標準誤差. n=3-4. * $P<0.05$.

図9. CB118を処置したC57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスに、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ を静脈内投与し、5分後の $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の血清-組織間分配係数.

平均±標準誤差. n=3-4. * $P<0.05$.

図10. CB153を処置したC57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスに、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ を静脈内投与し、5分後の $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ の血清-組織間分配係数.

平均±標準誤差. n=3-4. * $P<0.05$.

図11. C57BL/6系マウスおよびDBA/2系マウスにCB77、CB118およびCB153を投与した後の肝臓のMCT8遺伝子の発現量.

平均±標準誤差. n=3-4. * $P<0.05$.

図12. C57BL/6系マウスにCB118を投与した後の $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ と血中タンパクとの結合率.

平均±標準誤差. n=3-4. * $P<0.05$.

図13. DBA/2系マウスにCB77を投与した後の $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ と血中タンパクとの結合率.

平均±標準誤差. n=3-5. * $P<0.001$

表1. C57BL/6 系マウスおよび DBA/2 系マウスに CB77、CB118 および CB153 を投与した後の血清中 PCB および PCB の水酸化代謝物濃度 (平均±標準誤差. n=4-7.)

表 1 .

S t r a i n	T r e a t m e n t	C o n c e n t r a t i o n (μ g / m l s e r u m)	
		P C B	O H - P C B
C 5 7 B L / 6	C B 7 7	0.01 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01 ^a
	C B 1 1 8	0.84 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.02 ^b
	C B 1 5 3	3.39 $\pm$ 0.31	0.32 $\pm$ 0.05 ^c
D B A / 2	C B 7 7	0.98 $\pm$ 0.22	0.33 $\pm$ 0.12 ^a
	C B 1 1 8	3.54 $\pm$ 0.50	0.26 $\pm$ 0.05 ^b
	C B 1 5 3	1.08 $\pm$ 0.12	0.02 $\pm$ 0.01 ^c

a: 4-OH-3,3',4',5-tetrachlorobiphenyl, b: 4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl, c: 3-OH-2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl.

图1.

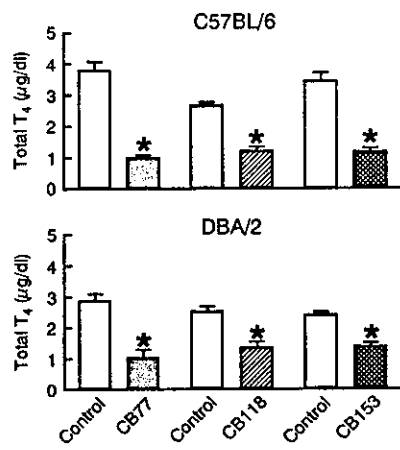


图2.

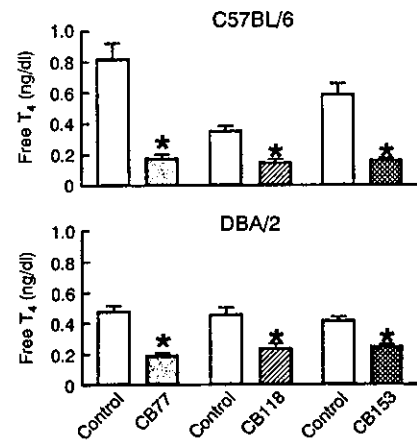


图3.

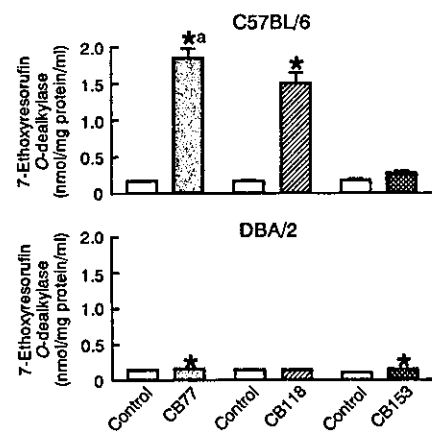


Fig. 4.

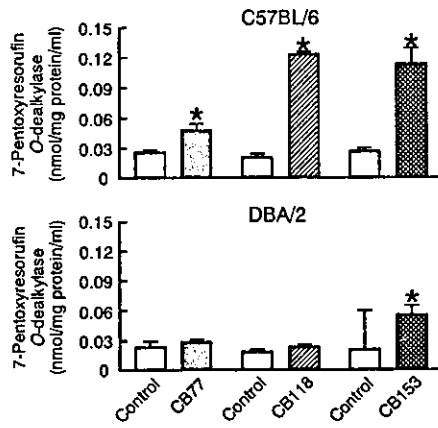


Fig. 7.

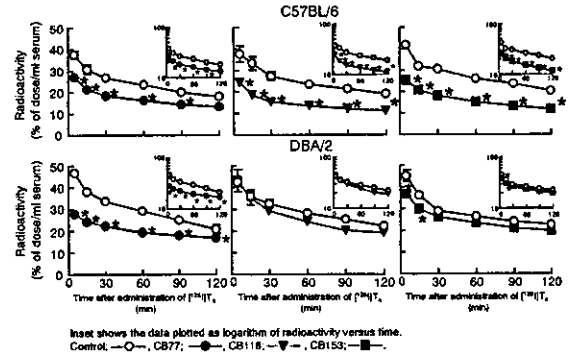


Fig. 8.

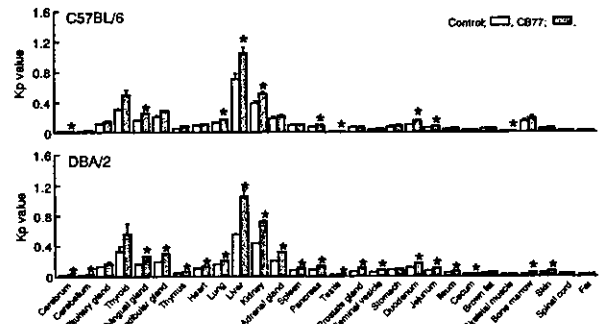


Fig. 5.

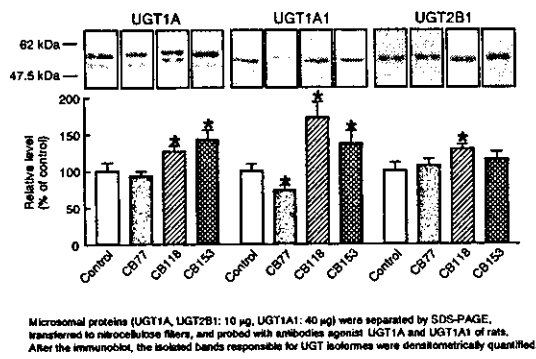


Fig. 9.

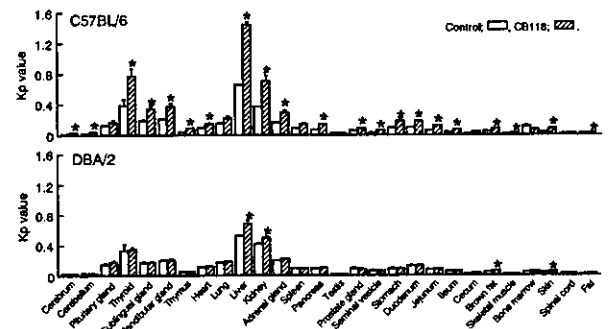


Fig. 6.

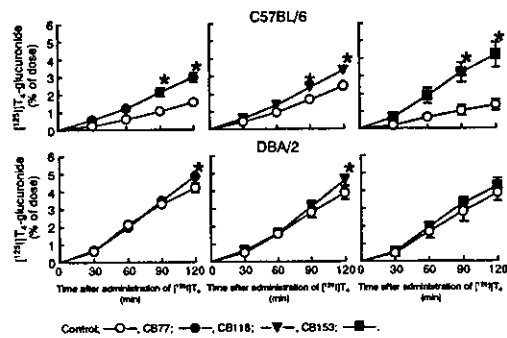


Fig. 10.

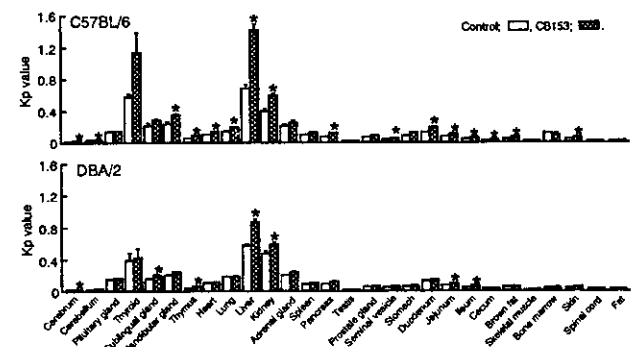
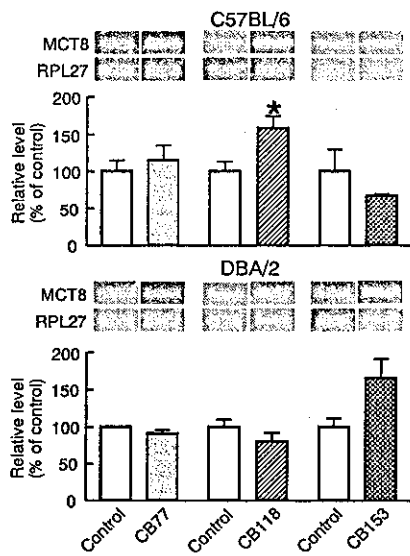
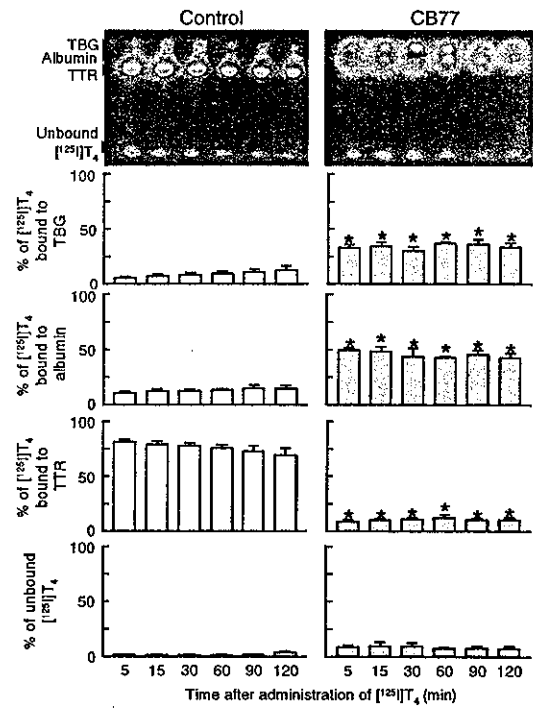


图 11.



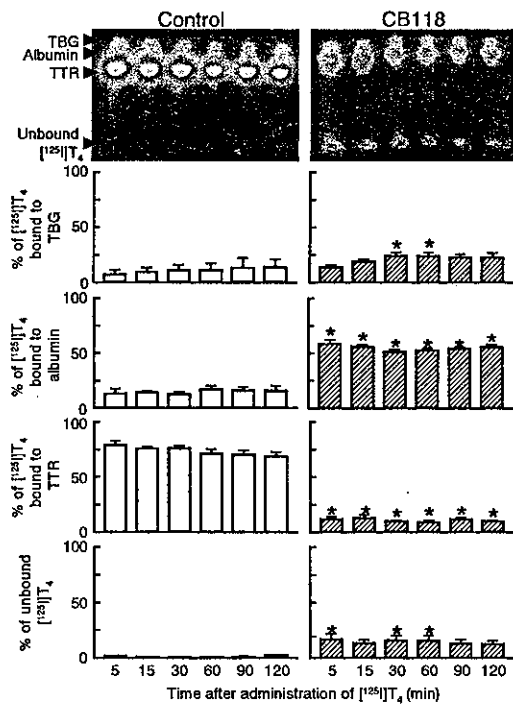
Total hepatic RNAs were extracted from individual mice in each experimental group, and were used for RT-PCR analysis.

图 13.



The femoral arteries were cannulated at 7 days after the administration. Serums were collected at the indicated times after the i.v. administration of $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$, and were subjected to nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, pH 8.4, 4°C. The distribution of $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ was analyzed by bioimaging analyzing system.

图 12.



The femoral arteries were cannulated at 5 days after the administration. Serums were collected at the indicated times after the i.v. administration of $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$, and were subjected to nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, pH 8.4, 4°C. The distribution of $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ was analyzed by bioimaging analyzing system.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

コプラナーPCB（PCB118、PCB114）並びに PCB153 の甲状腺ホルモン代謝と遺伝子
発現に及ぼす影響の比較検討

主任研究者 遠山 千春
東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 教授
（前職： 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長）

研究要旨

昨年度までに、毒性等価係数（toxic equivalency factor, TEF）の異なるコプラナーPCB（2,3',4,4'5-五塩素化ビフェニル；PCB118、2,3,4,4'5-五塩素化ビフェニル；PCB114）の甲状腺およびレチノイド代謝への攪乱作用を調べ、PCB 類の Arylhydrocarbon receptor（AhR）を介さない非 TCDD 毒性のメカニズムとこの場合の毒性指標となる遺伝子を発現遺伝子の網羅的な遺伝子解析により検討した。PCB118 あるいは PCB114 を曝露したマウスの肝臓における発現遺伝子を網羅的に解析したところ、PCB118 だけに顕著に誘導される遺伝子が明らかとなった。この遺伝子はコプラナーPCB の毒性指標としての可能性が示唆された。

そこで、本年度は、これら変動が観察された遺伝子のうち、CYP2B9、2B10、2C55、Saal、CYP1A1、UGT1 に着目をして、Real-Time PCR による解析を行った。その結果、AhR を介さない甲状腺ホルモン代謝へ及ぼす影響の指標として CYP2B10 および CYP2C55 が候補となることが分かった。さらに、ノンコプラナーPCB である PCB153（2,2',4,4'5,5'-六塩素化ビフェニル）の甲状腺ホルモンへの影響を調べたところ、投与量に依存して T4 の低下が認められ、この場合も投与量に依存して CYP2B10 および CYP2C55 遺伝子の顕著な発現上昇が認められた。このことから、コプラナーPCB を含むダイオキシン類の毒性評価には、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、さらに AhR を介さない甲状腺ホルモン系への影響の指標として CYP2B10 および CYP2C55 が有力候補となることが示唆された。

研究協力者

西村典子、米元純三、竹内陽子、横井千沙子

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

A. 研究目的

ダイオキシン、ジベンゾフランおよびダイオキシン様活性を持つとされる 12 種類のコプラナーPCB を合わせてダイオキシン類と称している。ダイオキシン類には多くの同族体、異性体が含まれていることから、その毒性評価、曝露量評価に毒性等価量（TEQ）概念が用いられている。すなわち、2,3,7,8-TCDD の毒性を 1 とし、相対的な毒性値が付与されている。

PCB には、甲状腺ホルモンを低下させたり、レチノイド代謝を攪乱する作用が知られており、そのメカニズムの一つと

して、PCB 水酸化代謝物の T4 輸送タンパク、トランスサイレチン（TTR）への競争的結合が考えられている。一方、TCDD は、Ah レセプター（AhR）を介し、肝臓の UGT1（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 を低下させると考えられている（Nishimura et al., 2002; Nishimura et al., 2003）。コプラナーPCB には、ダイオキシン様作用と非ダイオキシン様作用があることから、甲状腺ホルモン抑制作用やレチノイド代謝攪乱作用の

メカニズムを明らかにすることは、コプラナーPCBを含めたダイオキシン類の毒性等価量概念の精緻化のために必要である。

本実験では、PCB118、PCB114を投与したTTR欠損マウスにおける甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝に及ぼす影響を調べ、網羅的に発現遺伝子を解析することによりPCBの毒性指標をの可能性を探索した。さらにノンコプラナーPCBであるPCB153投与マウスにおける甲状腺ホルモンへの影響と肝臓における発現遺伝子の変化を調べて比較検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物、投与量及び投与方法

PCB118、PCB114およびPCB153をAccuStandard Inc. (NewHaven, CT)から購入し、コーン油に溶解して、50 mg/ml (PCB118およびPCB114)あるいは100 mg/kg (PCB153)の投与液を調製した。

2. TTR 遺伝子欠損マウスの PCB118、PCB114 および 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用いた。12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。一群7匹のマウスにPCB118およびPCB114の場合は50 mg/kg bwのPCBを、PCB153の場合は10あるいは100 mg/kg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。

3. 飼育条件

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。

4. 甲状腺ホルモンの測定

血清中Total T4(TT4)はRIA法(DPC Products Corporation, Buckinghamshire, UK)により定量した。

5. マウス肝臓の遺伝子解析

DNAチップ解析：各群雌マウス3匹分の肝臓モジネート液を1試料として、マウスDNAチップコンソーシアム事務局・実験センター・日本レーザ電子株式会社(名古屋)にDNAチップ解析を依頼した。

RT-PCRによる発現遺伝子の定量的解析：DNAチップ解析結果(表1)から、PCB114およびPCB118投与により2倍以上に上昇する遺伝子の中の特定遺伝子(CYP2B9、CYP2B10、CYP2C55、Saa1)およびCYP1A1、UGT1に関してmRNA量を求めるためのprimerを設定し、測定条件を検討して(表3)、RT-PCRにより遺伝子の発現量を解析した。

比較検討のために、ノンコプラナーPCBであるPCB153について甲状腺ホルモン系への影響を調べ、さらにPCB153 100mg/kg投与雄マウスの肝臓組織中の遺伝子をDNAチップ解析により行った(表2)。この結果から発現レベルが顕著に変化する遺伝子を特定してRT-PCRによる発現遺伝子の定量的解析を行った。

6. 統計学的手法

本実験のデータは、血清T4値は各群7試料の平均値 $\pm$ 標準誤差で表示し、肝臓における遺伝子発現量は各群4試料の平均値 $\pm$ 標準偏差で表示した。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. PCB118とPCB114の肝臓におけるDNAチップ解析による発現遺伝子の変動

Oil投与対照マウスと比較して、PCB118投与マウスで2倍以上に発現上昇した遺伝子は54遺伝子であった。特にCYP2B9(11.5)、CYP2B10(4.3)、CYP2A4(4.1)、CYP2A5(4.0)、CYP4A14(3.9)、CYP2C55(3.8)、CYP1A2(3.7)、retinol dehydrogenase 11(2.7)、CYP1A1(2.5)は高い比率で上昇していた。

PCB114 投与マウスと比較して、PCB118 投与マウスで 2 倍以上に発現上昇した遺伝子は 46 遺伝子であった。特に CYP2B9 (11.5)、CYP2B10 (4.3)、retinol dehydrogenase 11 (2.2)、CYP2C55 (2.1)、CYP2B13 (2.0)、に差が認められた(表 1)。

比較検討のために、PCB153 投与マウス肝臓における遺伝子の発現量を DNA チップで解析を行った結果、Oil 投与対照マウスと比較して、特に CYP2B9 (11.5)、CYP2B10 (4.3)、CYP2C55 (2.1) の発現量増加が認められた(表 2)。

2. RT-PCR による PCB118 と PCB114 の肝臓における発現遺伝子の定量的解析

Oil 投与対照マウスと比較して、PCB118 投与マウスで、特に CYP2B10 および CYP2C55 遺伝子が高い比率で上昇していた。また PCB114 投与マウスと比較して、PCB118 投与マウスで発現上昇した遺伝子は CYP2B10 および CYP2C55 に差が認められた(図 1)。しかしながら Saa1、CYP1A1、UGT1 は PCB118 と PCB114 との間に差は見られなかった。

3. PCB153 投与マウスにおける血清 T4 の変動と肝臓における発現遺伝子の変動比較検討のために行った PCB153 投与マウスでは、雌雄共に用量依存的な血清 T4 量の減少が認められ、100 mg/kg 投与群では Oil 投与群の約 50%に低下した。TTR 欠損雌マウスにおいては、PCB153 投与による T4 の有意な低下が認められた。

PCB153 投与マウスでは雌雄マウスともに投与量に依存する CYP2B10 および CYP2C55 の発現量増加が認められた(図 2)。

TTR 欠損マウスと野生型マウスの間には、CYP2B9、CYP2B10 および CYP2C55 遺伝子の発現量の差は見られなかった。CYP2B9 遺伝子に関しては PCB153 投与による発現上昇は認められたが、個体差が大きく、用量依存的変動は見られなかった。各群共に CYP1A1 遺伝子の発現はほとんど認められなかった。

D. 考察

環境中には、ダイオキシン、ジベンゾ

フラン、PCB が共存して存在する。このうち、毒性等価係数が付与されているダイオキシン様 PCB が有する TCDD 様作用と非 TCDD 作用を比較検討して、ダイオキシン類の毒性をリスク評価することは、WHO の検討課題となっている。

昨年度までの本研究結果から、雄の野生型マウスに PCB118 を投与すると血清甲状腺ホルモンおよびレチノール量が著しく減少し、肝臓中レチノイド量も有意に低下することが判明した。この場合、PCB114 は肝臓において CYP1A1 を顕著に誘導するが、PCB118 はほとんど誘導をしないことを組織化学的に明らかにした。本年度の PCB153 を投与した野生型マウスにおいて、用量依存的な T4 レベルの低下が認められた。

昨年度までに、PCB114 または PCB118 を投与したマウス肝臓中の遺伝子の網羅的解析を行い、そのうち、顕著に発現が観察された遺伝子を RT-PCR 法により定量した。

本実験結果から、薬物代謝系酵素の CytochromeP450 系遺伝子 47 種類のなかで、PCB118 および PCB153 投与により、CYP2B10 と CYP2C55 が顕著に発現していた。特に、CYP2B10 は、核内転写因子 constitutive androstane receptor に依存的な誘導を受けることが報告されていることから、PCB118 及び PCB153 は、フェノバルビタール型の誘導メカニズムにより毒性作用を発現すると考えられる。また DNA チップ解析データから、PCB118 曝露によって TTR 遺伝子が約 1.5 倍に発現増加していることから、PCB118 の水酸化代謝産物の TTR への結合による血中 T4 の減少の推察された。

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、甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝への影響に対する毒性機構が 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 異性体の PCB118 と PCB114 の甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝への攪乱作用を調べ PCB 類の Arylhydrocarbon receptor (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、AhR を介さない甲状腺ホルモン代謝へ及ぼす影響としての指標として CYP2B10 および CYP2C55 が候補となること、特に前者は、CAR を介した誘導メカニズムによると考えられた。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. 参考文献

- Niishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C, Altered Thyroxine and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Mice. Arch. Toxicol. 2004 (in press).
- Nishimura N., Yonemoto J, Takeuchi Y., Yokoi C., Nishimura H., Tohyama C. Effects on thyroid hormone and retinoid metabolism in transthyretin-null mice by polychlorinated biphenyl isomers 118 and 114. Organohalogen Compounds, 66: 2928-2931, 2004
- 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 144, 2075-2083
- 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

G. 健康危険情報

特になし

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. PCB18 または PCB114 を曝露した野生型および TTR 欠損マウス肝臓の CYP2B9, CYP2B10 および CYP2C55 遺伝子の発現レベル

12週齢の野生型およびTTR欠損マウスに PCB118 または PCB114 を投与し、7 日目に解剖して、肝臓の発現遺伝子を RT-PCR 法により分析した。結果は、平均値 ± 標準偏差 (n =3-4) で表示した。

図 2. PCB153 によるマウス血清 T4 の変化 (野生型 (TTR +/+) および TTR 欠損マウス (-/-))

12週齢野生型およびTTR欠損マウスにコーン Oil または PCB153 を投与し、7 日目に解剖中甲状腺ホルモンの測定をおこなった。結果は、平均値 ± 標準偏差 (n =6-7) で表示した。* 印はオイル投与対照群と比較して有意差が有る ($P < 0.05$) 場合である。また RT-PCR 法により、PCB153 により肝臓で発現する遺伝子 (CYP2B9, CYP2B10 および CYP2C55) の半定量的解析を行った。

図 3. PCB153 によるマウス肝臓の CYP2B9, CYP2B10 および CYP2C55 遺伝子の発現レベル (野生型 (TTR +/+) および TTR 欠損マウス (-/-))

12週齢野生型およびTTR欠損マウスにコーン Oil または PCB153 を投与し、7 日目に解剖して、肝臓で発現する遺伝子 (CYP2B9, CYP2B10 および CYP2C55) の半定量的解析を RT-PCR 法により行った。結果は、平均値 ± 標準偏差 (n =3-4) で表示した。

表1 PCB114 に対して PCB118 に曝露したマウス（野生型）肝臓において 2 倍以上に
発現上昇した遺伝子

	遺伝子略名	遺伝子名	倍率 Log ₂ -Normalized Value
1	Saa1	serum amyloid A 1	3.59
2	Cyp2b9	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9	2.87
3	Cyp2b10	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10	1.96
4	2510003E04Rik	RIKEN cDNA 2510003E04 gene	1.95
5	Folr2	folate receptor 2 (fetal)	1.79
6	Ebp	phenylalkylamine Ca ²⁺ antagonist (emopamil) binding protein	1.79
7	Frda	Friedreich ataxia	1.77
8	2410003M15Rik	RIKEN cDNA 2410003M15 gene	1.55
9	1700003N22Rik	RIKEN cDNA 1700003N22 gene	1.53
10	Slc4a2	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 2	1.51
11	Sqle	squalene epoxidase	1.5
12	Slc22a1	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	1.47
13	Hspa5	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)	1.46
14	Hp	haptoglobin	1.45
15	Btn1a1	butyrophilin, subfamily 1, member A1	1.39
16	Bhmt	betaine-homocysteine methyltransferase	1.37
17	Dhcr24	24-dehydrocholesterol reductase	1.37
18	Mup1	major urinary protein 1	1.37
19	Letm1	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	1.35
20	Itih3	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3	1.34
21	Prss8	protease, serine, 8 (prostasin)	1.33
22	Pccb	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	1.32
23	Acly	ATP citrate lyase	1.3
24	Itk	IL2-inducible T-cell kinase	1.27
25	Pgm3	phosphoglucomutase 3	1.25
26	Odc	ornithine decarboxylase, structural	1.25
27	Rdh11	retinol dehydrogenase 11	1.25
28	Tpbpa	trophoblast specific protein alpha	1.24

29	Hspca	heat shock protein 1, alpha	1.22
30	Itih1	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 1	1.21
31	Sfrs3	splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SRp20)	1.2
32	Xbp1	X-box binding protein 1	1.19
33	Gapds	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic	1.18
34	Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	1.18
35	Fgls-pending	fragilis	1.16
36	Krtap5-4	keratin associated protein 5-4	1.16
37	1810009M01Rik	RIKEN cDNA 1810009M01 gene	1.16
38	Cyp2c55	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55	1.16
39	Mcsp	mitochondrial capsule selenoprotein	1.14
40	Pnp	purine-nucleoside phosphorylase	1.14
41	Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)	1.13
42	2310037K05Rik	RIKEN cDNA 2310037K05 gene	1.13
43	Fgf22	fibroblast growth factor 22	1.12
44	1110011E12Rik	RIKEN cDNA 1110011E12 gene	1.12
45	Cort	cortistatin	1.11
46	Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	1.11

12週齢野生型およびTTR欠損マウスにPCB118またはPCB114を投与し、7日目に解剖して、肝臓を取り、DNAチップにより遺伝子の網羅的解析を業者に依頼した。試料は1群につき雄マウス3匹分を合わせたものである。

表 2. Oil コントロールに対して PCB153 に曝露したマウス(野生型)肝臓において 3.6 倍以上に発現上昇した遺伝子

	遺伝子略名	遺伝子名	倍率 Log ₂ Normalized Value
1	Cyp2b9	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9	5.3
2	Cyp2b10	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10	4.8
3	Adm	adrenomedullin	3.5
4	Cyp2c55	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55	3.3
5	Myc	myelocytomatosis oncogene	3.2
6	Csnk2a1	casein kinase II, alpha 1 polypeptide	2.8
7	Phlda1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	2.8
8	Elovl3	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3	2.7
9	Cyp26a1	cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1	2.3
10	Clpx	caseinolytic protease X (E.coli)	2.2
11	Bhmt	betaine-homocysteine methyltransferase	2.2
12	2410003M15Rik	RIKEN cDNA 2410003M15 gene	2.1
13	Krtap5-4	keratin associated protein 5-4	2.1
14	Btn1a1	butyrophilin, subfamily 1, member A1	2.1
15	4930579A11Rik	RIKEN cDNA 4930579A11 gene	2.1
16	Gabpb1	GA repeat binding protein, beta 1	2.1
17	Hspca	heat shock protein 1, alpha	2
18	Tuba6	tubulin, alpha 6	2
19	0610025L15Rik	RIKEN cDNA 0610025L15 gene	2
20	Tpbpa	trophoblast specific protein alpha	2
21	Hhex	hematopoietically expressed homeobox	2
22	H2-DMa	histocompatibility 2, class II, locus DMa	2
23	4933433D23Rik	RIKEN cDNA 4933433D23 gene	2
24	Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats	1.9
25	Trfr	transferrin receptor	1.9
26	0610010I13Rik	RIKEN cDNA 0610010I13 gene	1.9
27	Acly	ATP citrate lyase	1.9
28	Tuba4	tubulin, alpha 4	1.8
29	Tubb5	tubulin, beta 5	1.8
30	Hhex	hematopoietically expressed homeobox	1.8
31	Hspa5	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)	1.8
32	Mcsp	mitochondrial capsule selenoprotein	1.8
33	Thrsp	thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus)	1.8
34	2510003E04Rik	RIKEN cDNA 2510003E04 gene	1.8
35	Gsta1	glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya)	1.8

12 週齢マウス (野生型) に Oil または PCB153 を投与し、7 日目に解剖して、肝臓の DNA チップによる遺伝子解析を業者に依頼した。試料は 1 群につき雄マウス 3 匹分を合わせたものである。

表 3-1. RT-PCR の各遺伝子の Primer の配列

Gene	Products	Forward primer	Reverse primer
CYP2b9	341	GATGACCAGTTCCTTCA TCTG	GCGCTTGTGGTCTCAGTTC C
CYP2b10	699	GACCGTCAGTTCTTGCG CCTG	TTCACITTTTCTTCAGTGCCC CA
CYP2c55	369	CTGGATGAGAATGGGAA CT	GACTGGATTGTGGGAGAA
Saa1	230	GAAGGAAGCTAACTGGA AAAATC	GCAGTCCAGGAGGTCTGTA GTAATTG
CYP1A1	344	CCATGACCGGGAAGTGT GG	TCTGGTGAGCATCCTGGAC A
UGT1	490	TGGGATCCATGGTCTCA GAG	CCCTTGTGCCTCATCACGT A

表 3-2. RT-PCR の cDNA 合成条件および RT-PCR の温度条件

cDNA 合成

Advantage™ RT-for-PCR Kit (BD Biosciences Clontech)

A	RNA 125μg/mL	8	μL
B	DEPC-treated water	3.5	
C	Random hexamer primer (20μM)	1	
D	5X Reaction Buffer (250mM Tris-HCl pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl ₂)	4	
E	DTT (dithiothreitol)(100mM)	1	
F	dNTP Mix (10mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1	
G	Recombinant Rnase inhibitor (40units/μL)	0.5	
H	MMLV Reverse transcriptase (200units/μL)	1	
	Total	20	
A～C のみで 70℃2min, D～H を加えて 42℃ 1hr, 94℃, 5min			
RNase-free water で 5 倍希釈して RT-PCR に使用。			

RT-PCR

TITANIUM™ Taq PCR Kits (BD Biosciences Clontech)

PCR-Grade Water	13.6	μL
10X TITANIUM Taq PCR Buffer	2	
50X dNTP Mix (10mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.4	
50X TITANIUM Taq DNA Polymerase	0.4	
Primer forward (10μM)	0.8	
Primer reverse (10μM)	0.8	
cDNA	2	
Total	20	
95℃	1min	
95℃	30sec	
66～68℃	2min	22～33 cycles
68℃	5min	

]

表 4. TTR 欠損あるいは野生型マウスにおける、Oil、PCB118 および PCB114 による CytochromeP450 系遺伝子発現レベルの比

Control Test	Oil(+/-) Oil(-/-)	Oil(+/-) 118(+/-)	Oil(+/-) 118(+/-)	114(+/-) 118(+/-)	Oil(+/-) 118(+/-)	Oil(+/-) 118(+/-)
Cyp1a1	1.4	2.5	UP	1.3	1.7	
Cyp1a2	0.7	3.7	UP	1.4	2.5	UP
Cyp1b1	0.8	0.8		0.9	0.9	
Cyp2a4	2.3	4.1	UP	1.1	2.1	UP
Cyp2a5	2.0	4.0	UP	1.1	1.7	
Cyp2a12	1.4	1.3		1.7	1.8	
Cyp2b9	1.1	11.5	UP	6.8	3.4	UP
Cyp2b10	0.9	4.3	UP	3.6	1.6	
Cyp2b13	1.2	1.4		2.0	0.9	
Cyp2b19	0.8	0.7		0.8	0.7	
Cyp2c37	1.0	1.2		1.3	1.0	
Cyp2c40	0.5	0.4	DOWN	0.6	0.6	
Cyp2c55	0.9	3.8	UP	2.1	1.8	
Cyp2c70	0.5	0.6		0.8	0.6	
Cyp2d22	0.9	0.7		0.9	0.7	
Cyp2d26	1.9	1.2		1.0	1.4	
Cyp2e1	1.1	1.5		1.4	1.2	
Cyp2f2	1.1	1.3		1.3	1.1	
Cyp2g1	0.9	0.8		0.8	0.8	
Cyp2j5	1.3	1.1		1.1	1.1	
Cyp2j6	0.9	0.7		0.7	0.6	
Cyp2j9	1.1	1.0		1.0	1.1	
Cyp2s1	0.9	0.8		0.8	3.8	UP
Cyp2u1	1.1	1.1		1.0	1.2	
Cyp3a11	1.1	1.5		1.4	1.2	
Cyp3a13	1.0	1.0		1.0	0.7	
Cyp3a16	1.1	1.5		1.4	1.6	
Cyp4a10	1.6	0.7		0.6	1.0	
Cyp4a14	1.9	3.9	UP	1.1	1.5	
Cyp4b1	0.9	0.9		0.9	0.8	
Cyp4f13	0.6	0.7		0.8	0.8	
Cyp4f13	0.6	0.6		0.7	0.6	
Cyp4f14	1.5	1.2		1.5	1.8	
Cyp4f16	1.0	0.8		0.6	0.5	
Cyp7a1	0.9	1.1		1.4	1.7	
Cyp7b1	0.7	0.8		1.1	1.3	
Cyp8b1	0.4	0.6		1.6	1.6	
Cyp11a1	0.7	0.7		0.9	0.7	
Cyp17a1	0.9	0.9		0.9	0.7	
Cyp19a1	0.9	1.1		1.0	1.0	
Cyp20a1	1.0	0.9		0.9	0.8	
Cyp24a1	0.9	0.7		1.0	1.0	
Cyp26a1	1.0	0.9		1.1	0.9	
Cyp27a1	1.4	1.2		1.2	1.9	
Cyp27b1	0.9	0.9		1.0	0.9	
Cyp39a1	1.0	0.8		0.9	2.5	UP
Cyp46a1	0.8	0.8		0.7	0.7	
Cyp51	1.3	2.0		1.6	1.6	
Transthyretin	0.0	1.5	DOWN	1.5	-	