

期曝露が記憶・学習機能の発達障害を引き起こすことが強く示唆された。

本実験結果には、以下の3つの主要な発見がある。第一に、我々の知る限り、これまで報告された非コプラナーPCB曝露実験よりも遙かに低い曝露量で影響が観察されたことがあげられる。これまでの報告におけるPCB153のLOAELは50 mg/kg (1.25 mg/kg/日、GD3~PND21、海馬におけるLTP (長期増強) の低下) (Hussain et al. 2000)であり、PCB混合物であるAroclor1254のLOAELで210 mg/kg (6 mg/kg/日、GD6~PND21、学習行動の低下)である。これに対し本研究では、2 mg/kgのPCB153母体単回投与 (妊娠5日目あるいは15日目)により学習行動に影響が認められた。

第二に、PCB153の曝露は、出生後の曝露開始では影響が極めて弱く、胎仔期曝露で顕著な影響が観察されたことである。本研究では、PND3曝露群の学習基準達成度、報酬獲得率はコントロール群と変わらず、GD5、GD15及びGD5+15+PND3曝露群で有意な影響が見られた。疫学調査では、臍帯血中のPCB濃度と児童のIQに相関が認められるが、臍帯血中に比べて濃度が高い母乳中PCB量とIQとの間に相関が認められなかったことが報告されている (Stewart et al. 2000)。これまでこの疫学調査のデータを裏付ける報告はなかったが、我々の今回の動物実験によって初めて裏付けられた。

第三に、GD15群における報酬獲得率がGD5群よりも有意に低かったことから、PCB153は特に妊娠後期の曝露に強い影響が現れることが示唆されたことで

ある。すなわち、脳の発達時系列において、胎生後期がPCB153に対する高感受性時期であると考えられる。

今回、学習機能影響におけるPCB153曝露の高感受性時期が特定できたことから、PCB153のLOAELについても新たな考察が可能となる。すなわち、先に述べたHussainら(2000)が報告したPCB153曝露による海馬LTPの低下影響は、妊娠3日目から離乳(PND21)までの期間、1.25 mg/kg/日の用量のPCB153の反復投与で観察された。我々の研究から、PCB153が作用した時期は、高感受性時期の数日の可能性が考えられる。実際に海馬LTPは記憶形成に重要であると考えられているので、我々の成果である学習行動影響とHussainらの観察した電気生理学的変化は、同一の影響である可能性が高い。今後この点についてもさらなる検証が必要であろう。

非コプラナーPCBも甲状腺ホルモン系に影響を及ぼすことが報告されており、PCB153では妊娠直後から離乳まで4 mg/kg/日の曝露により仔動物の血清中T4が顕著に低下する(Collins et al., 1980; Ness et al., 1993)。しかしAroclor 1254の曝露実験では(妊娠6日目から離乳まで、4および8 mg/kg/日)、PCBによる甲状腺ホルモン系への影響は授乳曝露によるものであることが示されており(Crofton et al. 2000)、本研究でみられた学習行動影響は、甲状腺ホルモン系を介したものは異なる可能性が示唆される。

甲状腺ホルモン抑制のほか、PCBは神経の情報伝達を直接的に障害することが示唆されており(Kodavanti and Tilson

2000)、PCB153では海馬スライスにおいても *in vivo* 実験と同様に LTP の抑制がみられたことから、甲状腺ホルモン系影響とは異なる神経情報伝達障害作用をもつと考えられる(Hussain et al. 2000)。これらのことから、本研究で見られた PCB153 の学習障害は PCB 特有の毒性機構に基づいた毒性によるものであることが示唆される。

昨年度報告した TCDD、PCB126 曝露実験では、800 ng/kg の TCDD 曝露 (妊娠 15 日目の母動物に単回経口投与) では影響が認められなかったが、8000 ng/kg の PCB126 (=800 ng TEQ/kg) では有意な影響が見られたことから、TCDD と PCB126 の毒性メカニズムの違いがあることが示唆された。本実験では、PCB153 でもラットの学習行動に影響を及ぼすことが明らかとなった。以上の結果を考えると、コプラナー PCB も非コプラナー PCB も TCDD とは異なる毒性すなわち非 TCDD 様毒性を持つ可能性が極めて高いと考えられる。

#### E 結論

PCB153 の発達期曝露が、成熟後の記憶・学習機能に影響を及ぼした。出生後の経母乳曝露は影響がないか極めて弱く、特に妊娠後期における経胎盤曝露が発達神経毒性を示すことが明らかとなった。記憶・学習機能の発達に対して、PCB は非 TCDD 様毒性を持つ可能性が強く示唆された。

#### F 参考文献

Stewart P, Reihman J, Lonky E, Darvill

T, Pagano J. (2000) Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance. *Neurotoxicol Teratol.* 22(1):21-29.

Rice DC. (2000) Parallels between attention deficit hyperactivity disorder and behavioral deficits produced by neurotoxic exposure in monkeys. *Environ Health Perspect.* 2000 Jun;108 Suppl 3:405-8.

Hussain RJ, Gyori J, DeCaprio AP, Carpenter DO (2000). *In vivo* and *in vitro* exposure to PCB 153 reduces long-term potentiation. *Environ Health Perspect.* Sep;108(9):827-31.

Ness DK, Schantz SL, Moshtaghian J, Hansen LG (1993) Effects of perinatal exposure to specific PCB congeners on thyroid hormone concentrations and thyroid histology in the rat. *Toxicol Lett* 68, 311-23.

Crofton KM, Ding D, Padich R, Taylor M, Henderson D (2000) Hearing loss following exposure during development to polychlorinated biphenyls: a cochlear site of action. *Hear Res* 144, 196-204.

Kodavanti PR, Tilson HA (2000)

Neurochemical effects of environmental chemicals: in vitro and in vivo correlations on second messenger pathways. Ann N Y Acad Sci 919, 97-105.

#### G. 健康危険情報

特に無し

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特に無し

##### 2. 実用新案取得

特に無し

##### 3. その他

特に無し

#### I. 図の説明

図 1. 学習基準に達した動物数 (%). 各曝露群において、各日 30 分間の中で 43 個以上の報酬を獲得した動物数を百分率で示した。(B)-(E)の点線は、コーンオイルを投与された母親から生まれた仔ラット (コントロール) 群の行動パターンを示す。(A)コントロール群、(B)GD5 単回経口投与群、(C)GD15 単回経口投与群、(D) PND3 単回経口投与群、(E) GD5+GD15+PND3 反復経口投与群

図 2. 全 15 日間の各群における報酬獲得率 (%).

\* $<0.01$ , vs. コントロール群、# $<0.05$ , vs. GD5 曝露群。

表 1. 妊娠期・授乳期に PCB153 曝露を受けた母動物の体重、産仔数、仔動物の体重変化

曝露群	母獣体重(g)		産仔数		仔獣体重(g)			
	妊娠 5 日目	妊娠 15 日目	雄	雌	PND4	PND21	PND42	
コントロール群	362.1 ± 19.3	390.1 ± 17.2	4.8 ± 0.7	4.6 ± 0.3	10.3 ± 0.6	41.0 ± 1.6	206.5 ± 3.6	
GD5 群	368.5 ± 15.3	390.8 ± 9.9	6.2 ± 0.8	5.3 ± 0.7	10.2 ± 0.6	43.9 ± 0.6	201.4 ± 4.8	
GD15 群	340.1 ± 11.6	359.9 ± 8.6	5.0 ± 0.6	4.3 ± 0.9	10.3 ± 0.6	38.5 ± 1.3	205.6 ± 6.6	
PND3 群	314.0 ± 22.9	337.8 ± 23.4	5.3 ± 1.1	5.0 ± 0.9	9.9 ± 0.4	43.6 ± 3.1	210.8 ± 4.4	
GD5+GD15+PND3 群	340.9 ± 13.7	368.0 ± 16.4	6.1 ± 0.9	4.1 ± 0.5	9.3 ± 0.4	40.2 ± 2.1	201.5 ± 8.2	

平均値 ± 標準誤差.

図1.

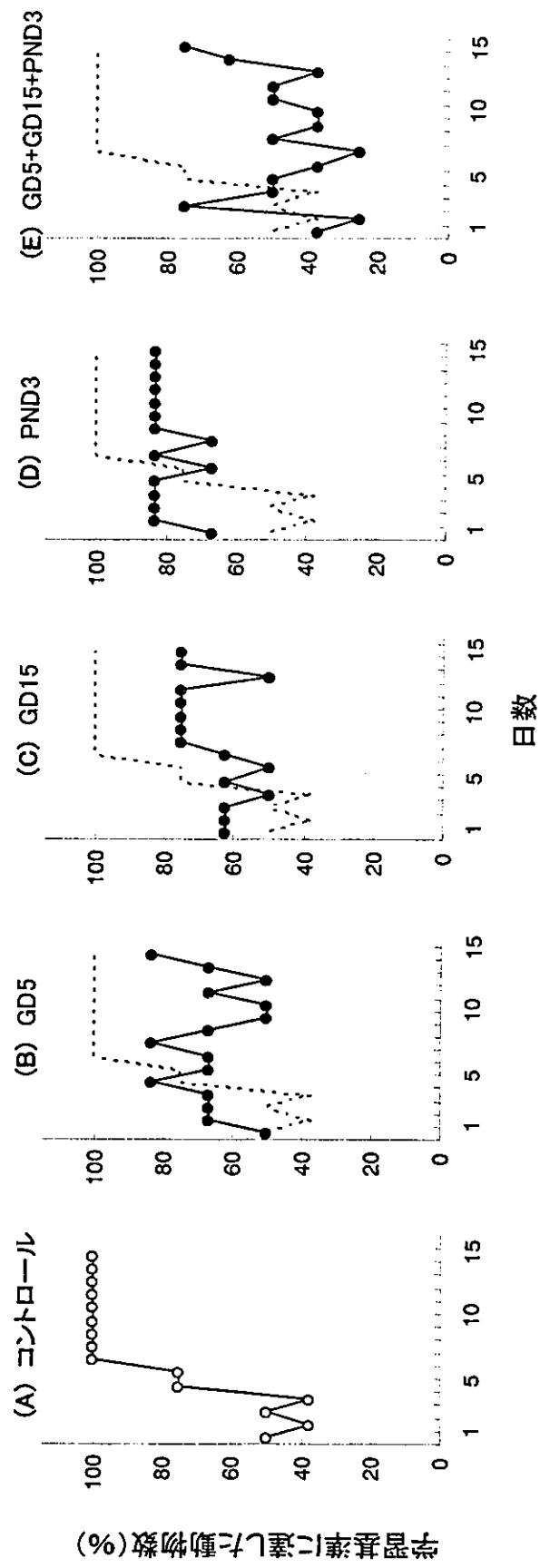
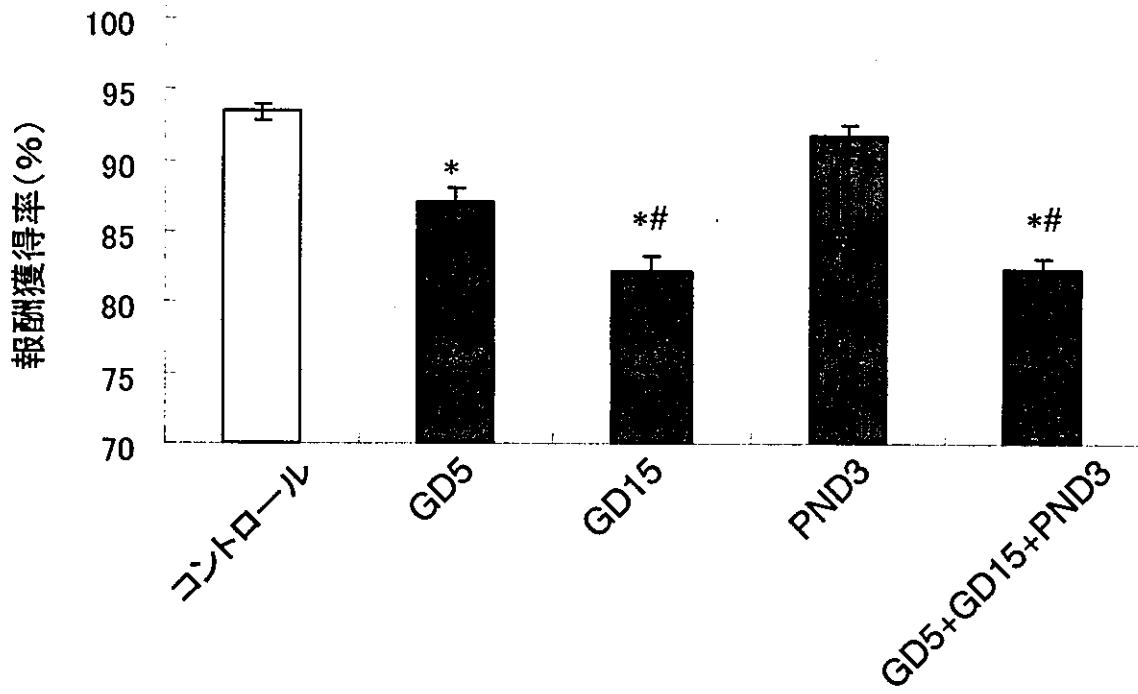


図 2.



(資料 6)

ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類(PCB77, PCB126, PCB153)の  
甲状腺ホルモンへの作用メカニズム

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

ダイオキシン類、コプラナーPCB、ノンコプラナーPCBの甲状腺ホルモン抑制作用とそのメカニズムを探る目的で、Ahレセプター(AhR)ノックアウトマウス、トランスサイレチン(TTR)ノックアウトマウスを用いて検討を行った。その結果、TCDD、PCB126の甲状腺ホルモン(TT4)抑制には、AhRを介した肝のT4-グルクロン酸抱合の促進による排泄促進がその主要なメカニズムと考えられた。PCB77についてはT4抑制にある程度、TTRが関与していることが示唆された。PCB153については、AhR、TTR以外の因子の関与が示唆された。また、甲状腺ホルモン抑制作用の相対的効力は、TCDDを1として、PCB126:0.02、PCB77:0.0004、PCB153:0.0001となった。PCB126ではTEF(0.1)と大きく異なり、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TEF以外の新たな指標が必要と考えられた。

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

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(van den Berg et al., 1998)。すなわち、2,3,7,8-TCDDの毒性を1として、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る作用が知られており(Bastomsky et al., 1976; Brouwer et al., 1998)、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(Brouwer et al., 1998; Chauhan et al., 1999)。一方、TCDDは、Ahレセプター(AhR)を介し、肝の

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(Bock, 1991; Schuur et al., 1997; 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。

ここでは、TCDDの甲状腺ホルモン抑制作用のメカニズムを確認するためにAhレセプターノックアウトマウスを、ダイオキシン類の甲状腺ホルモン抑制作用におけるトランスサイレチン(TTR)の関与をTTRノックアウトマウスを用いて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD: 50 µg/ml nonane 溶液)は、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 (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl)、PCB126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl)、PCB153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl)は、AccuStandard Inc. (New Haven, 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。

### 2. 実験動物および飼育条件

Ah-R(+/-)マウスは、藤井義明博士（東北大学、現筑波大学）から、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。飼育条件は温度 24±1℃、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。

### 3. 動物実験

AhR(+/-)マウス同士を交配し、妊娠 12.5 日の雌マウスに TCDD 10 µg/kg 体重 を一回経口投与した。対照には 4% nonane 含有コーン油を投与した。生後 21 日目に雌雄仔マウス (AhR+/- と AhR-/-) を解剖し、血清および肝臓を採取した。

13 週齢の野生型 (TTR(+/+)) および TTR 欠損 (TTR(-/-)) 雌マウスに、PCB77 (50 mg/kg 体重)、PCB126 (1 mg/kg 体重)、PCB153 (200 mg/kg 体重) および TCDD (20 µg/kg 体重) を一回経口投与した。対照にはコーン油を投与した。7 日後に血清および肝臓を採取した。TTR(-/-) マウスにおいて血清中 TTR 蛋白が存在しないことを SDS-PAGE ウェスタンブロッティング免疫反応で確認した。

全ての動物実験は、独立行政法人国立

環境研究所動物実験指針に従って行った。

### 4. 甲状腺ホルモンの測定

血清中 Total T4 (TT4)、Total T3 (TT3) を RIA 法 (Amerlex RIA Kit, Amersham International, Buckinghamshire, UK) により定量した。血清 TSH は EIA 法 (rat TSH enzyme immunoassay kit, Amersham International) により定量した。

### 5. RNA の抽出および RT-PCR

肝のトータル RNA は Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Tokyo) により抽出した。cytochrome P4501A1、1A2 (CYP1A1、CYP1A2)、UDP-glucuronosyltransferase 1A6 (UGT1A6) 及び AhR の mRNA 発現を RT-PCR により解析した。PCR 産物をアガロースゲル上で単一バンドとして検出し、バンドの強度を EDAS120 システム (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) により定量化した。結果は、β-actin を内部標準遺伝子として、β-actin に対する比であらわした。

### 6. CYP1A 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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±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

#### (1) 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)。

#### (2) 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

#### (1) 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)。

#### (2) 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  $\mu$ g/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った。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 が関与する場合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 plasma 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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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  $\mu$ m

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。

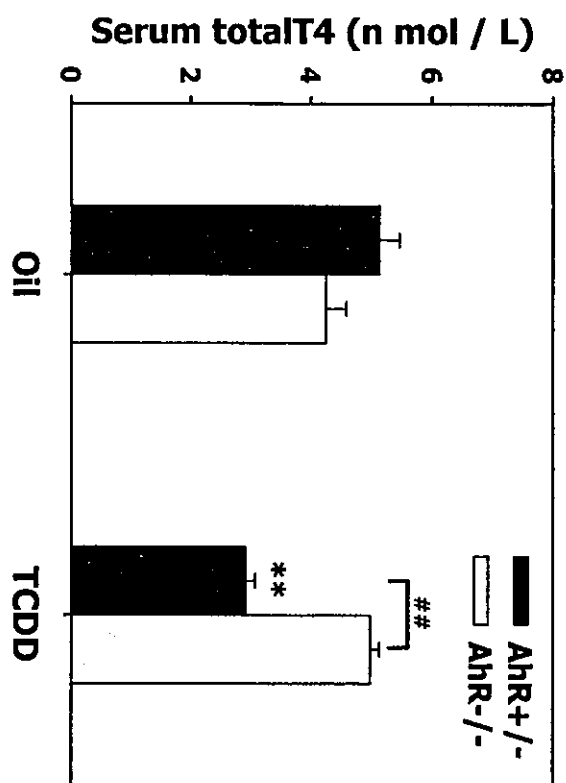
C: TCDD 曝露の TTR-/-マウスの肝臓: TTR+/+ラットに TCDD を曝露した場合と同程度に中心静脈周辺部の肝実質細胞に強い染色性が認めら、門脈結合組織周辺

の肝細胞は陰性であった。

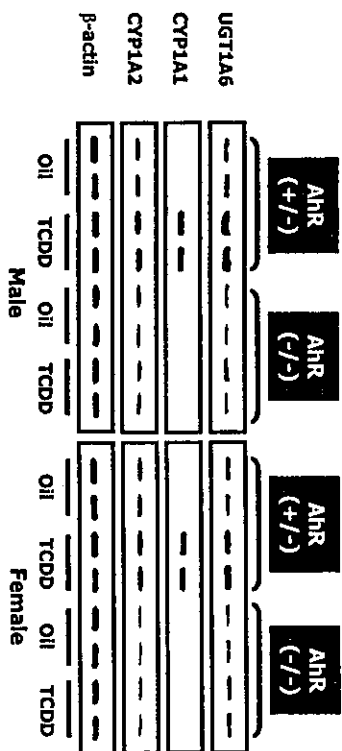
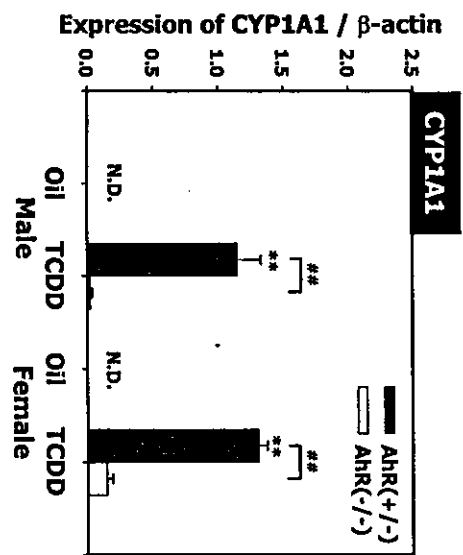
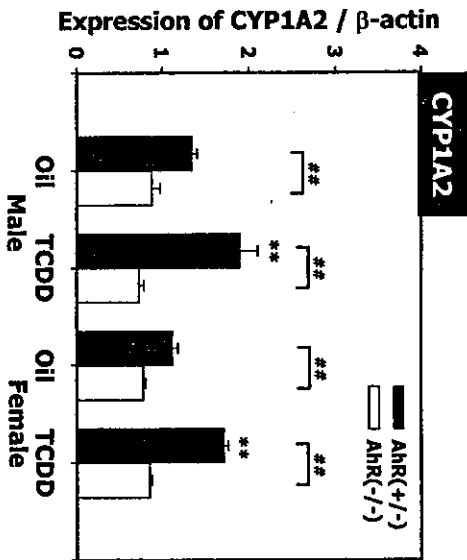
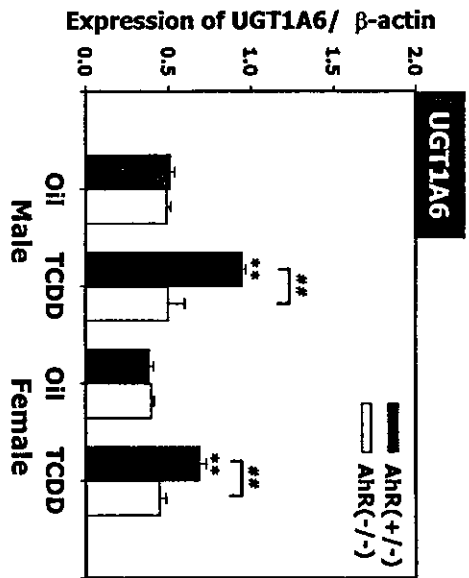
D: オイル投与対照群の TTR+/+マウスの肝臓：CYP1A1 の染色性は全く認められなかった。

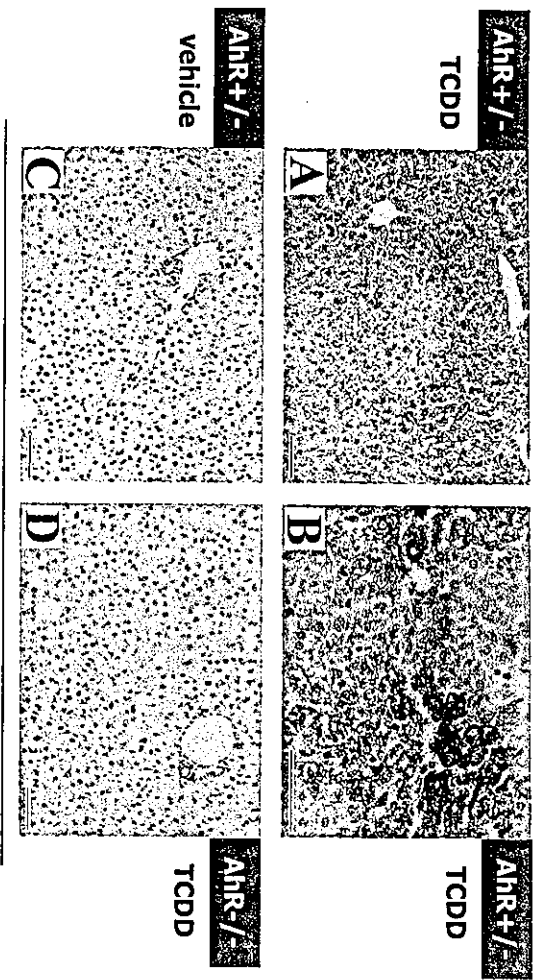
図 8. TCDD の甲状腺ホルモン代謝に及ぼす影響の模式図

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。

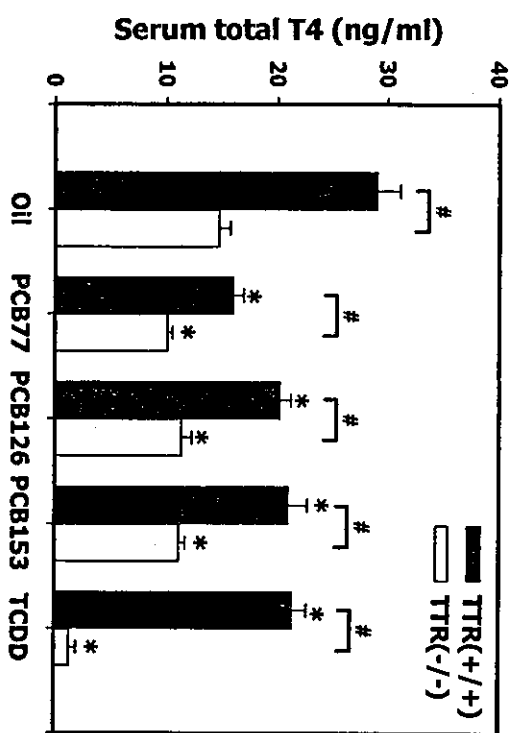


☒ 1

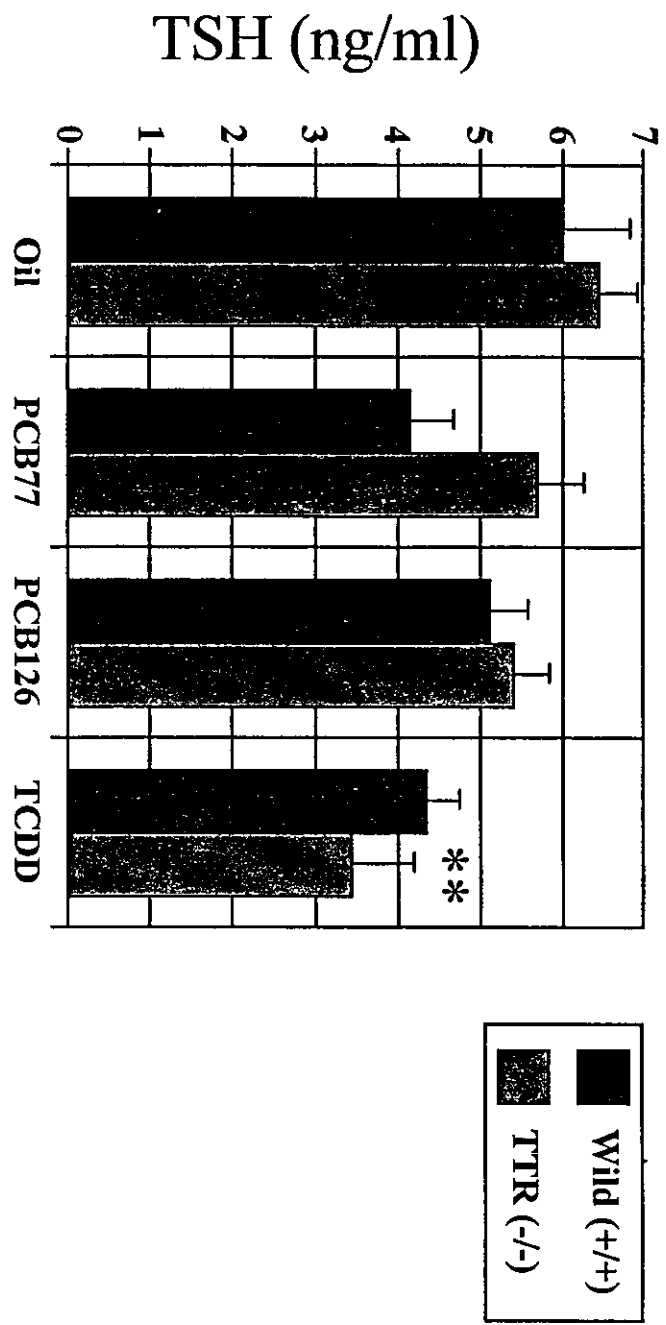






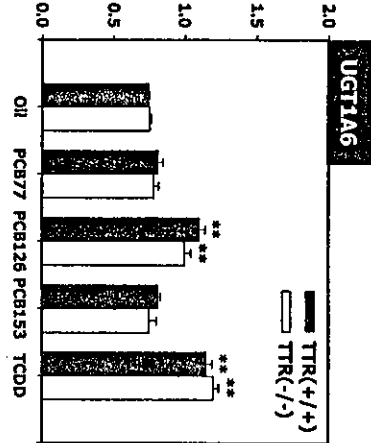


☒ 4

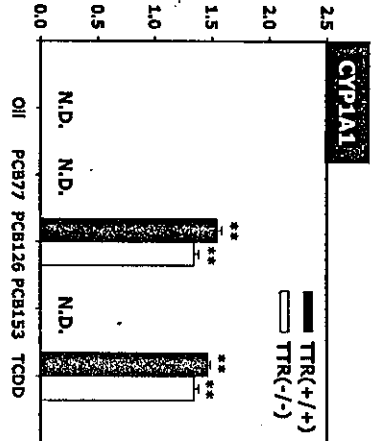


5

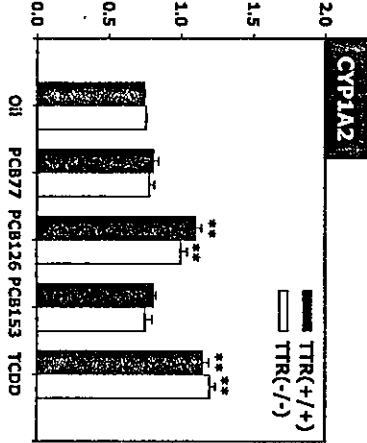
Expression of UGT1A6 /  $\beta$ -actin



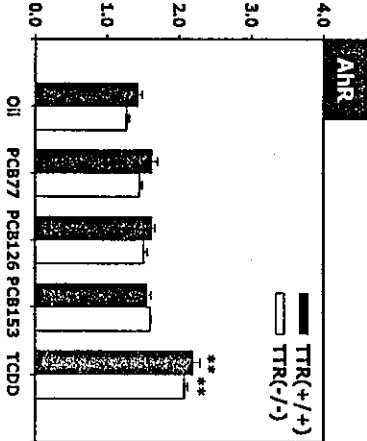
Expression of CYP1A1 /  $\beta$ -actin



Expression of CYP1A2 /  $\beta$ -actin



Expression of AhR /  $\beta$ -actin



UGT1A6  
CYP1A1  
CYP1A2  
 $\beta$ -actin

TTR +/+	
UGT1A6	Oil PCB 77 PCB 126 PCB 153 TCDD
CYP1A1	Oil PCB 77 PCB 126 PCB 153 TCDD
CYP1A2	Oil PCB 77 PCB 126 PCB 153 TCDD
$\beta$ -actin	Oil PCB 77 PCB 126 PCB 153 TCDD

TTR +/+

TTR -/-	
UGT1A6	Oil PCB 77 PCB 126 PCB 153 TCDD
CYP1A1	Oil PCB 77 PCB 126 PCB 153 TCDD
CYP1A2	Oil PCB 77 PCB 126 PCB 153 TCDD
$\beta$ -actin	Oil PCB 77 PCB 126 PCB 153 TCDD

TTR -/-

Oil PCB 77 PCB 126 PCB 153 TCDD

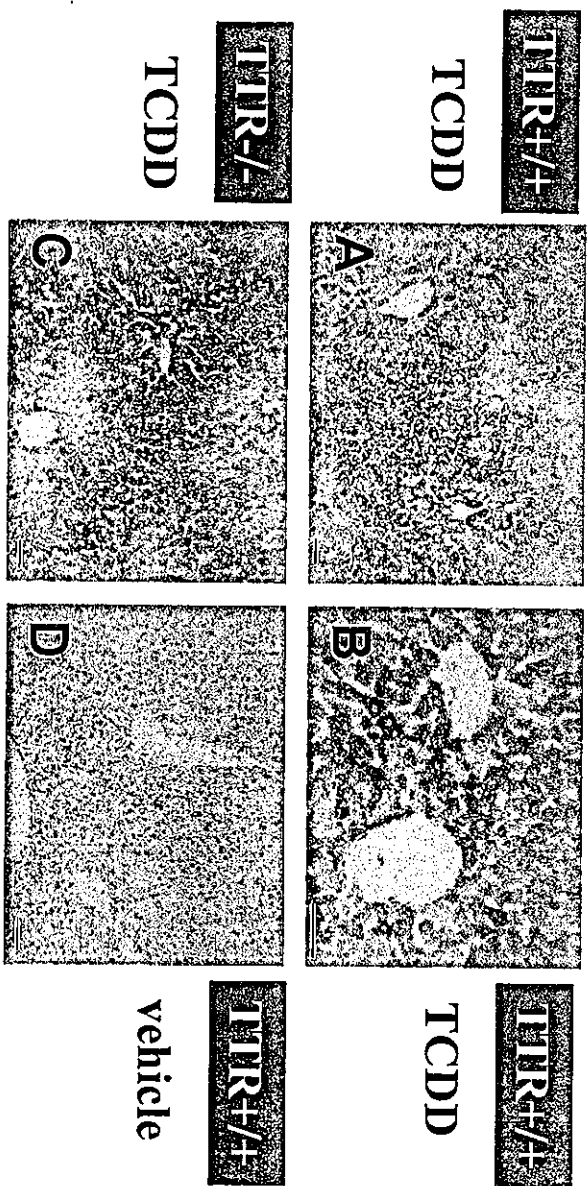


图7