

(資料 7)

ダイオキシン類/ポリ塩素化ビフェニル類 (PCB77, PCB126, PCB153) の
レチノイド代謝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

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 μ g/ml ノナン溶液) を Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA) から購入し、TCDD の含量が 4 μ g/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 μ g/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 μ g/kg 体重を 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 μ g TCDD/kgを、また50または75 μ g/kg体重のPCB77、1mg/kg体重のPCB126、200mg/kg体重の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 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、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。

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 μ m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340nm、蛍光波長460nmとした。分析カラムはMightysil RP-18 GP 250-4.6(5 μ m, 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1mL/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(Retiny

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 QuantproTM; 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 μ 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。肝臓30ng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 μ m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 μ g TCDD/kg 体重を投与し、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 μ g/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 μ g/kg 体重 と 20 μ g/kg による差はほとんど見られなかった。20 μ g TCDD/kg 体重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 体重投与群と 70 mg/kg 体重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 体重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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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的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-グルクロノ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、このことにより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した。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, TEQ) 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性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 µg/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. *Toxicol 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 chemical carcinogens 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, Ahlberg UG, Poiger H. (1990) Vitamin A storage in rats subchronically exposed to PCDDs/PCDFs. *Chemosphere* 20, 1147-1150
- Hakansson H, Johansson L, Manzoor E, Ahlberg 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, Trossvik 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 ウェスタンブロット免疫染色
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 メッセージ RNA 発現量の結果とよく一致した。

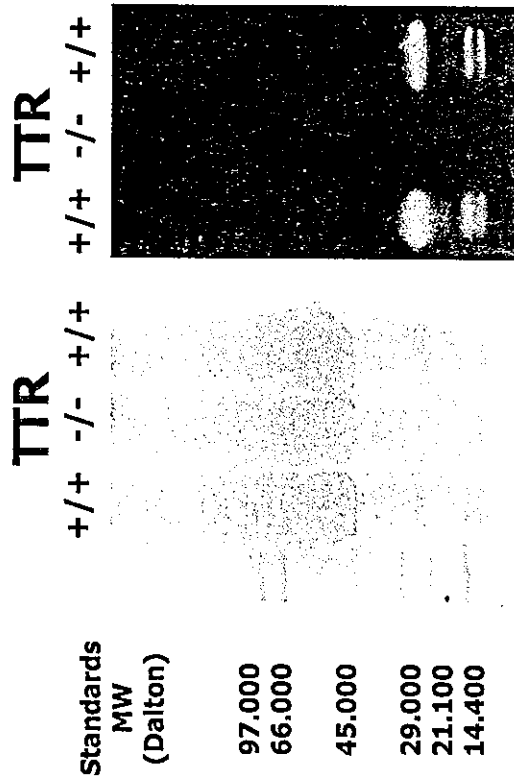
A: TCDD 曝露 TTR^{+/+}マウスの肝臓: 中心静脈周辺部の肝実質細胞に強い染色性が認められた。門脈結合組織周辺の肝細胞は陰性であった。

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。

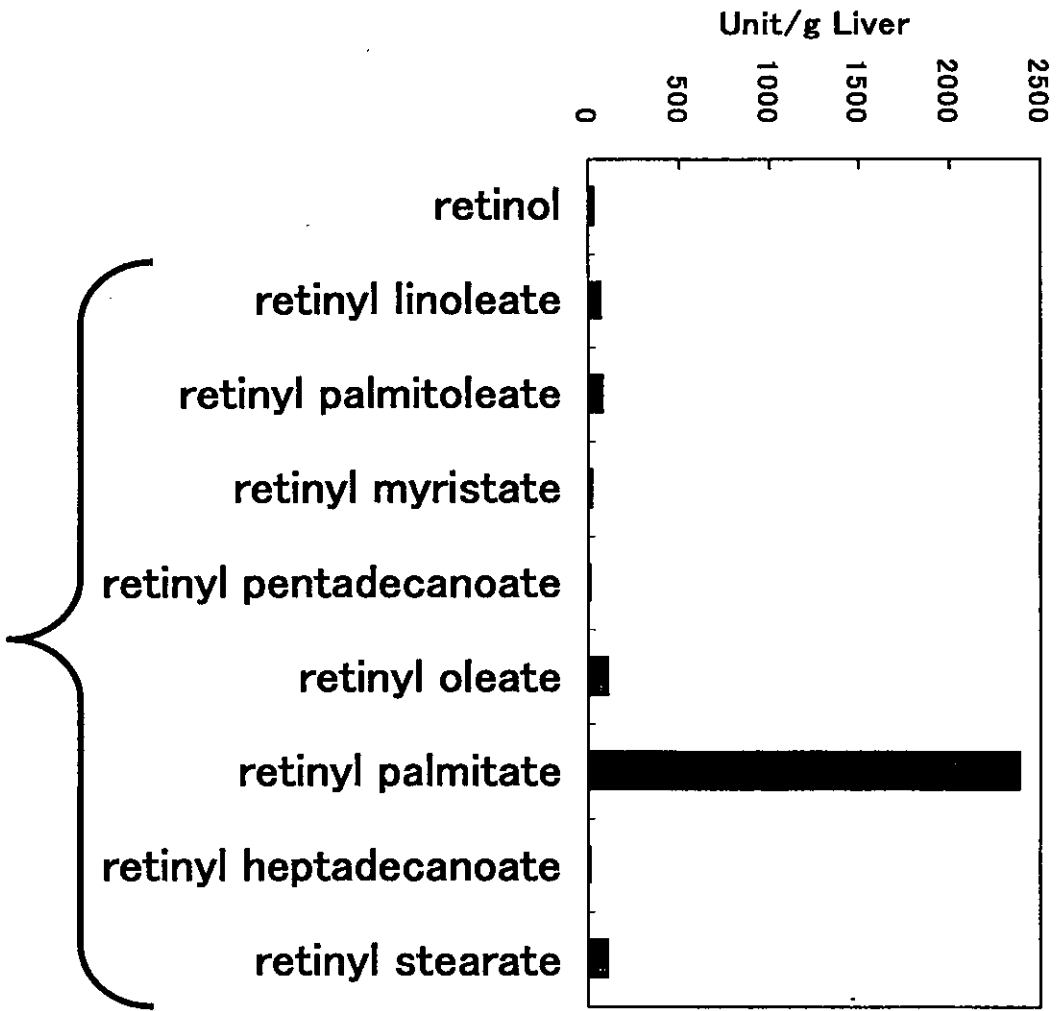
C: TCDD 曝露の TTR^{-/-}マウスの肝臓: TTR^{+/+}ラットに TCDD を曝露した場合と同程度に中心静脈周辺部の肝実質細胞に強い染色性が認めら、門脈結合組織周辺の肝細胞は陰性であった。

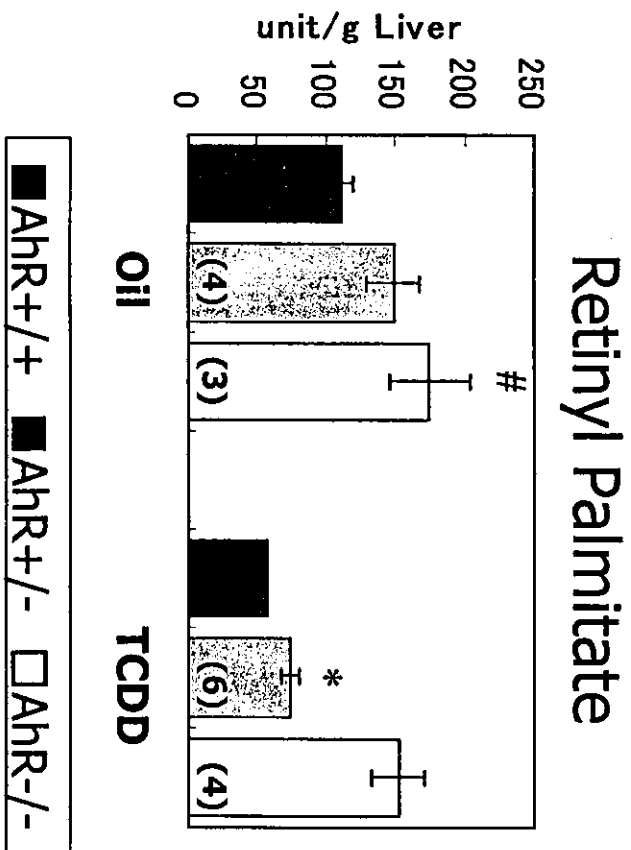
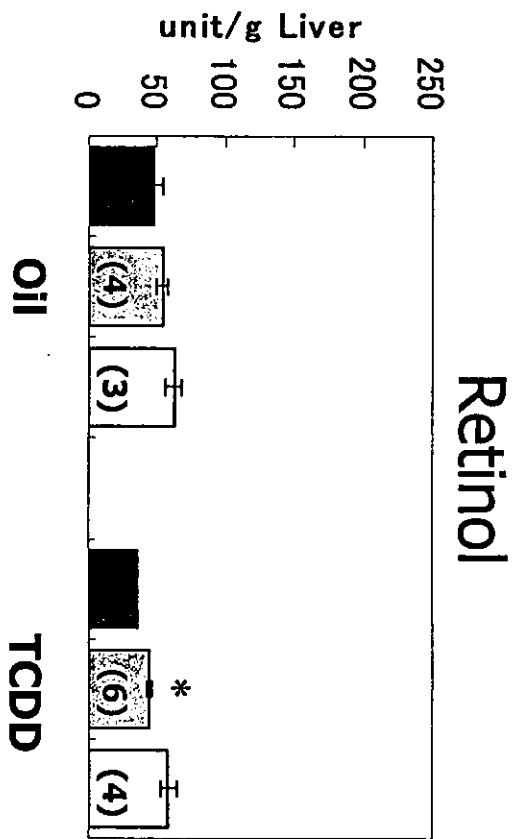
D: オイル投与対照群の TTR^{+/+}マウスの肝臓: CYP1A1 の染色性は全く認められなかった。

Bar = 50 μ m

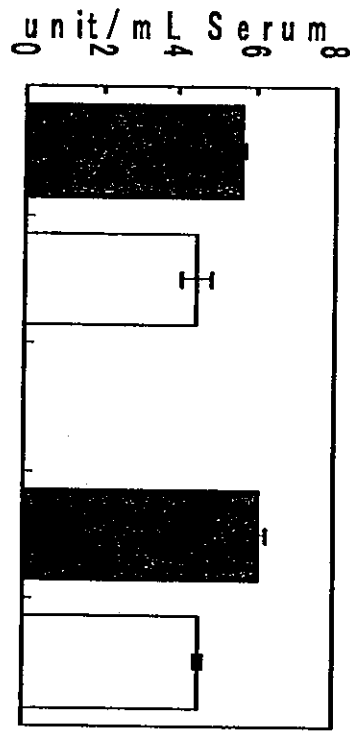


Retinyl esters

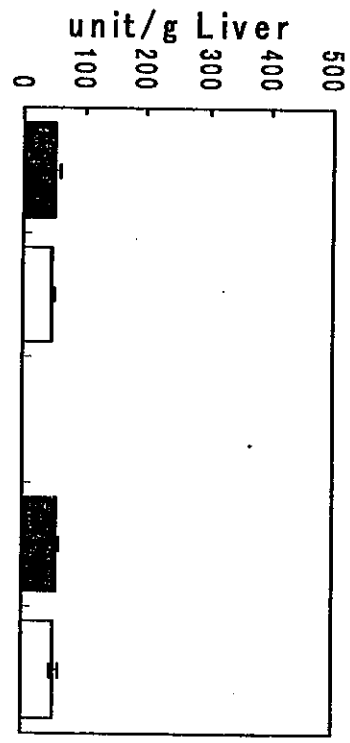




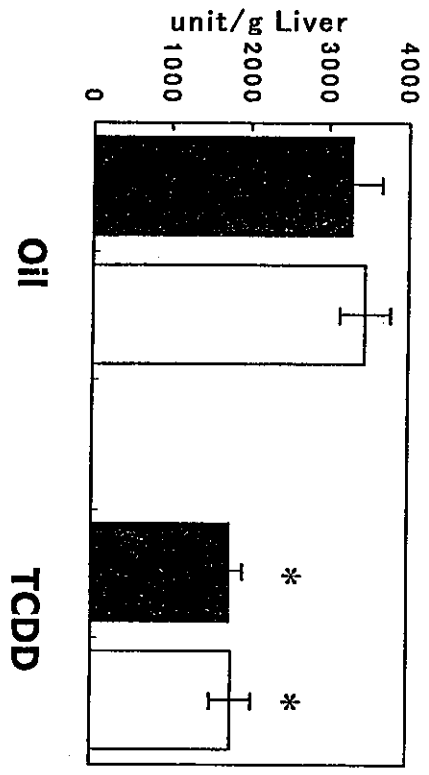
A Serum Retinol



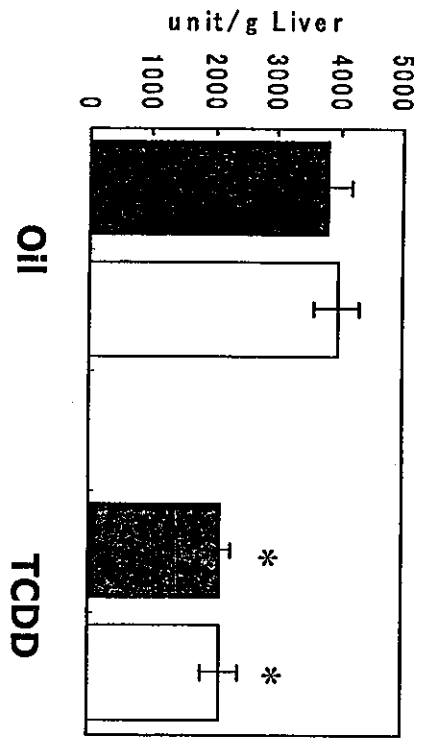
B Hepatic Retinol



C Hepatic Retinyl Palmitate

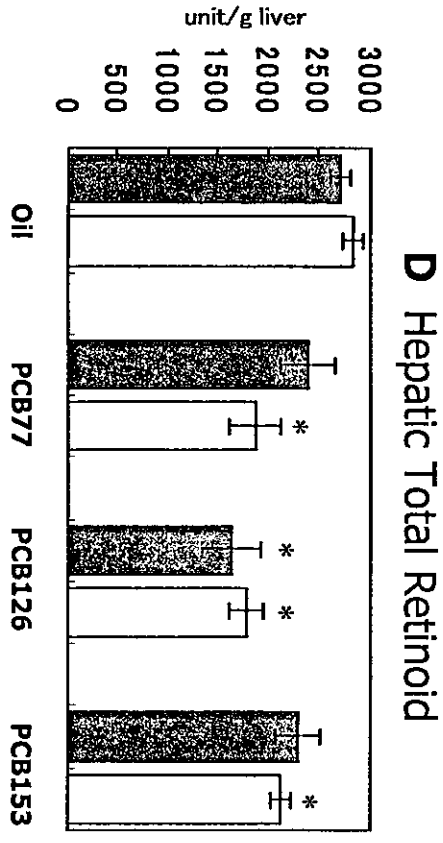
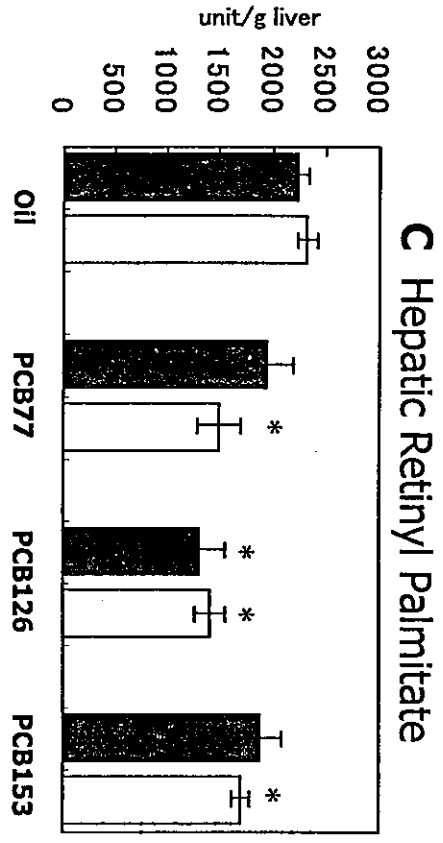
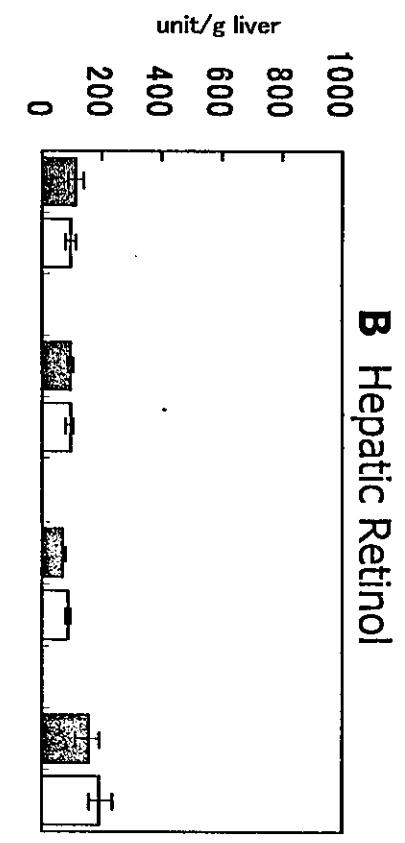
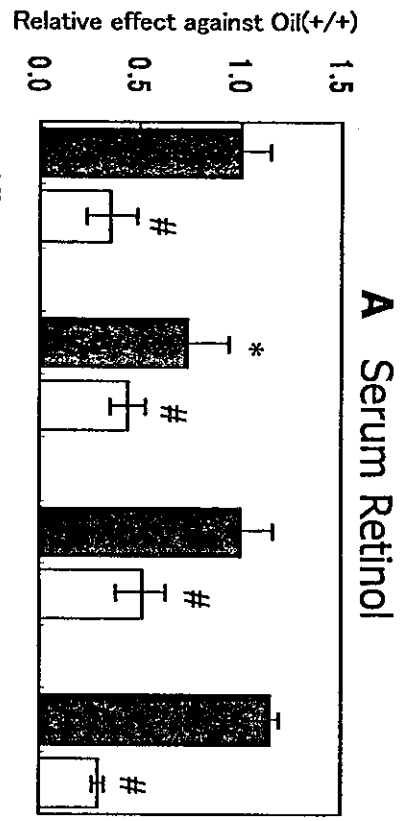


D Hepatic Total Retinoid

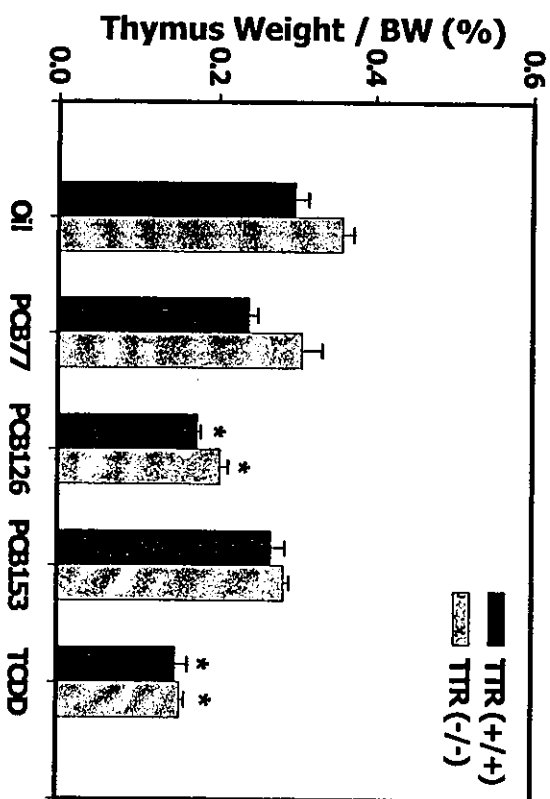
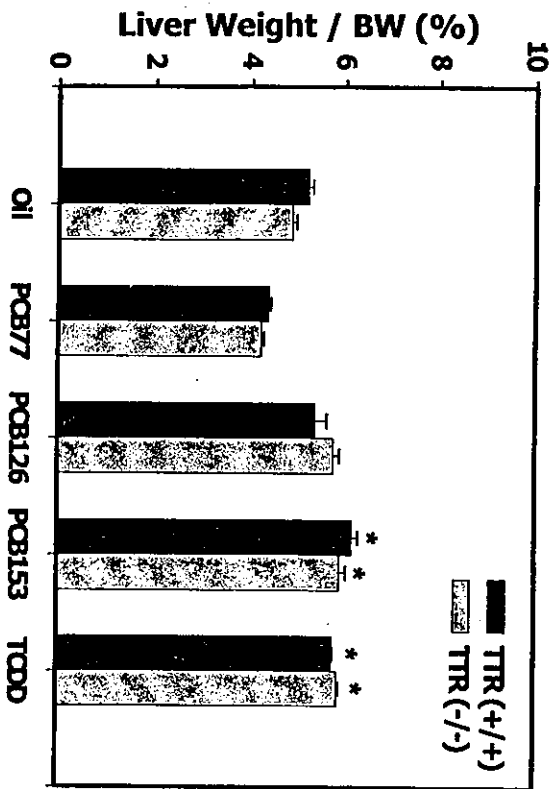


■ TTR+/+ □ TTR-/-

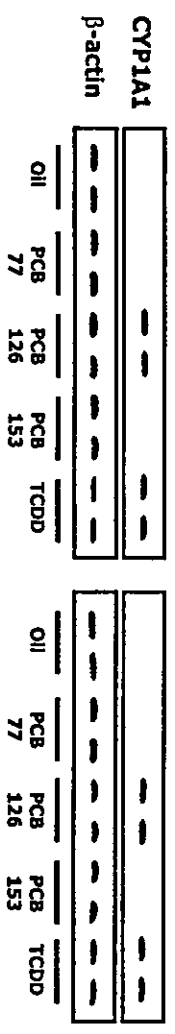
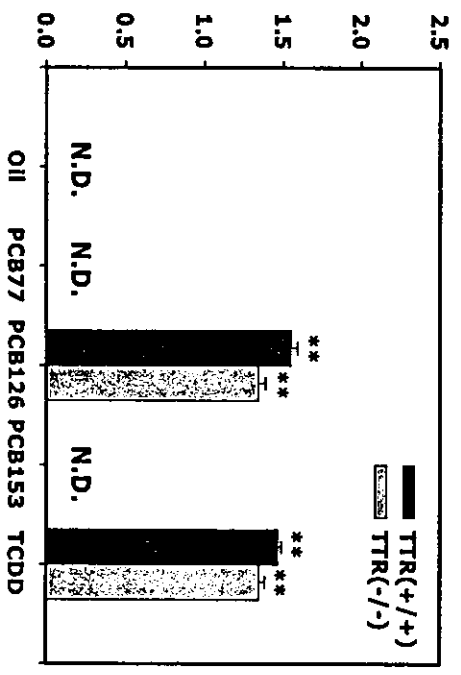
图 4

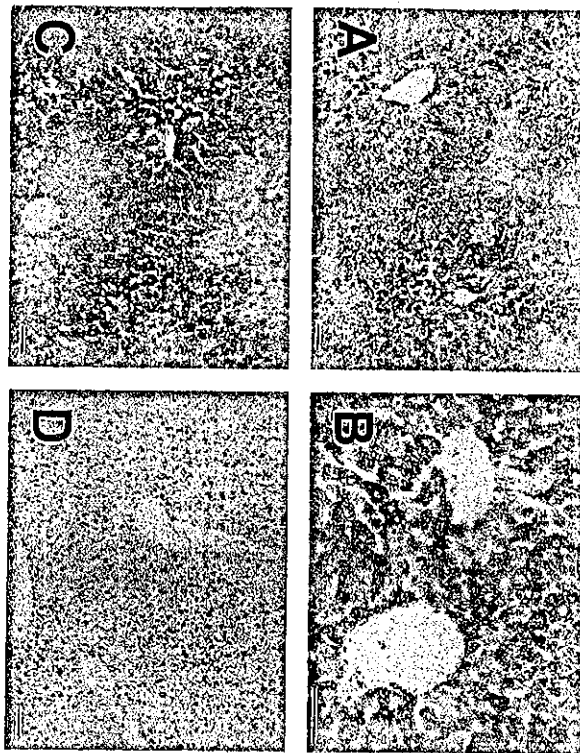


■ TTR+/+ □ TTR-/-



Expression of CYP1A1 / β -actin





8

(資料 8)

コプラナーPCB(PCB118、PCB114)の AhR 非依存性の
甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝に及ぼす影響とメカニズムの検討

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

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。

(1) コプラナーPCB の甲状腺ホルモンおよびレチノイド代謝への影響が AhR 依存性か否かを調べるために、PCB118 (TEF:0.0001) と PCB114 (TEF:0.0005) の投与実験を行った。PCB118 投与マウスでのみ AhR の活性化を伴わずに甲状腺ホルモンおよび血清レチノールレベルの低下が認められた。

(2) 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 PCB118 および PCB114 投与実験を行った結果、PCB118 だけは甲状腺ホルモンレベルおよび血清中 Retinol 量を低下させたことから、その作用に対して TTR の関与が認められた。

(3) PCB118 あるいは PCB114 を曝露したマウスの肝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。

本実験結果は、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攪乱に対する毒性機構が AhR 非依存性の場合があり、この場合の指標となる可能性のある遺伝子が同定された。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、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、
前田秀一郎 山梨大学大学院医学工学総合研究部

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