

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。

B 材料および方法

1. 実験動物、投与量及び投与方法

PCB118とPCB114をAccuStandard Inc. (NewHaven, CT)から購入し、コーン油に溶解して、各50 mg/ml、の調整液を作成した。

2. TTR 遺伝子欠損マウスの PCB118、PCB114 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。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50 mg/kg 体重のPCB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ック(日本チャールス・リパー株式会社)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)、RIA法(DPCnational, Buckinghamshire, UK)により定量した。

5. レチノイドの測定

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

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

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

6. CYP1A1の免疫組織染色

肝臓の一部をザンボニー液で24時間固定した後、パラフィン包埋した。4 μm のパラフィン切片を脱パラフィンした後、内因性パーオキシダーゼ活性の阻止

(0.3% H_2O_2 加メタノール30分)を行い生理食塩水(PBS)で洗浄する。CYP1A1の一次抗体と37度で1時間反応させる。生理食塩水(PBS)で洗浄後、ビオチン化二次抗体と37度で1時間反応させる。PBSにて洗浄後、アビジン・ビオチン複合体(PK-400, Vector Lab. Burlingame, California)で30分室温にて反応後、PBSで洗浄、0.003% hydrogen peroxide を基質

として
3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, Missouri)を加えて発色する。ヘマトキシリン染色で対比染色を行った。

7. マウス肝の発現遺伝子の解析

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（名古屋市熱田区三本松町 20-9）に DNA チップ解析を依頼した。

8. 統計学的手法

本実験のデータは、平均値±標準誤差 (mean ± 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. PCB118 と PCB114 の甲状腺ホルモンレベルへの影響

対照群では、TTR(-/-)マウスの TT4 レベルは、野生型マウスの約 50-60%であった。血清 TT4 濃度は野生型マウスでは PCB118 投与群において、対照群に比べて有意に低下した。TTR(-/-)マウスの血清 TT4 濃度は PCB 投与による低下は見られなかった (図 1)。

2. PCB118 と PCB114 のレチノイド代謝に及ぼす影響と TTR との関係

PCB118 と PCB114 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 12 週齢の TTR+/+ と TTR 欠損マウス(雄)に 50 mg/kg の PCB118 と PCB114 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 2)。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 10%にまで著しく低下した。

PCB118 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、PCB114 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、PCB118 は PCB114 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。PCB118 投与により TTR+/+マウスおよび TTR 欠損マウスの肝臓中でレチノール量の減少が認められたが、パルミチン酸および総レチノイド量の減少は見られなかった。TCDD と異なる作用が見られた。PCB114 曝露は TTR+/+マウスでは減少作用はなく、TTR 欠損マウスにおいてオイル投与対照群に比べて肝臓レチノールおよび総レチノイド量の有意な低下が認められた。

3. PCB118、PCB114 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、PCB114 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。PCB118 投与群のマウス肝臓においては CYP1A1 による染色性はほとんど見られなかった(図 3)。

4. PCB118 または PCB114 曝露の TTR+/+ および TTR 欠損マウス肝臓における PCB118 または PCB114 濃度 PCB118 と PCB114 曝露のマウスにおいて TTR+/+ および TTR 欠損マウス肝臓における PCB118 と PCB114 濃度に有意差は認められなかった(図 4)。

5. PCB118 と PCB114 の肝におけ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 遺伝子であったが、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)は高い割合で上昇していた。

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 遺伝子であったが、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。

D 考察

コプラナーPCB (PCB118、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。

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野生型マウスの約 10% 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。

12 週齢の雄野生型マウスに PCB118 を投与すると血中レチノール量が著しく減少した。さらに、PCB118 投与は野生型マウスの肝臓中レチノイド量をも有意に低下させた。

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。12 週齢の雄野生型、TTR 欠損マウスに PCB118 および PCB114 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、PCB118 投与群にのみ野生型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、PCB118 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。PCB118 は生体内で比較的水酸化されやすい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。PCB118 は野生型および TTR 欠損マウスの肝臓中レチノール量を低下した。

PCB114 は野生型および TTR 欠損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、PCB114 は TTR 欠損で、肝臓中のレチノイド量を有意に低下した。このことから PCB114 のレチノイド代謝攪乱作用機構は、TEF に基づく、AhR が介在することを示唆した。

一方、PCB118 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ほとんど認められないにもかかわらず野生型マウスの血清および肝臓レチノール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 が関与している可能性が示唆された。

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、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 (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、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 参考文献

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 PCB118またはPCB114曝露の野生型およびTTR欠損マウス血清甲状腺ホルモンレベルに及ぼす影響

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、血清甲状腺ホルモンレベルを測定した。結果は、平均値±標準偏差 (n=6-7) 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2 PCB118またはPCB114曝露の野生型およびTTR欠損マウス肝臓レチノイド

量に及ぼす影響

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、肝臓中レチノイド量を測定した。結果は、平均値±標準偏差 (n=6-7) 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)。

#野生型マウスと比較して有意差有り (P<0.05)。

図3 PCB118、PCB114曝露の野生型およびTTR欠損マウス肝臓中のCYP1A1蛋白の免疫組織染色

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、免疫酵素抗体法によりCYP1A1の蛋白を染色した。PCB118曝露の場合は肝臓細胞に強いCYP1A1蛋白の誘導が認められたが、PCB114曝露による肝臓中CYP1A1蛋白の誘導は見られなかった。

A, B: オイル投与対照群の野生型マウス (A) 及びTTR欠損マウス (B) の肝臓: CYP1A1の染色性は全く認められなかった。

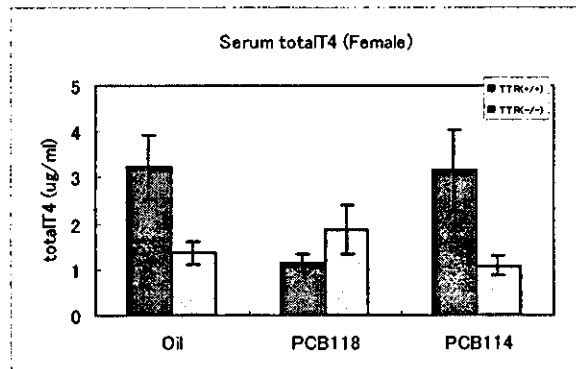
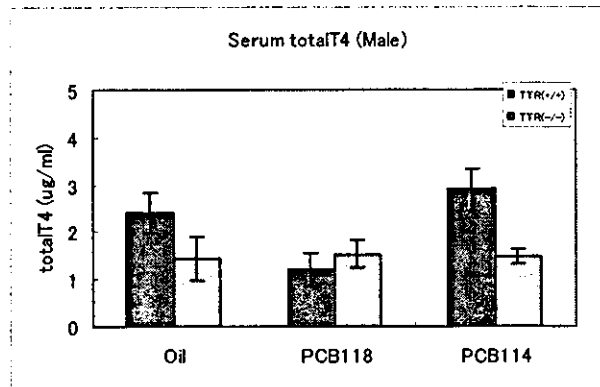
C, D: PCB118曝露野生型マウスおよびTTR欠損マウスの肝臓: 中心静脈周辺部の肝実質細胞に極めて僅かな弱い染色が認められたが、ほとんどの肝実質細胞は陰性であった。

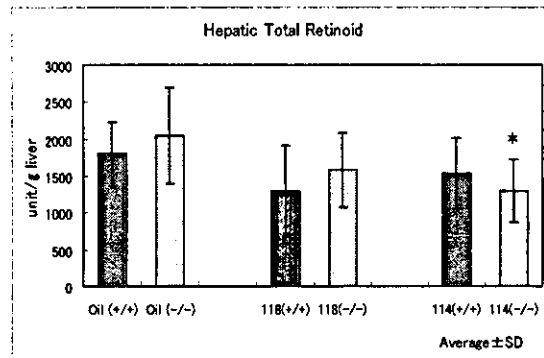
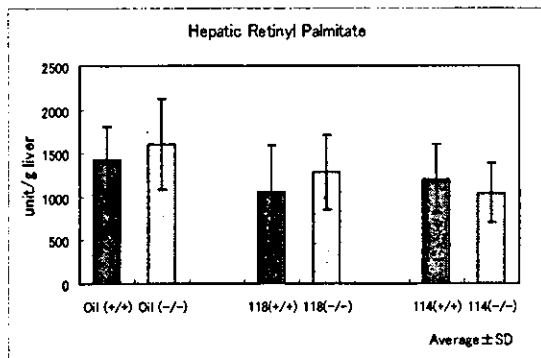
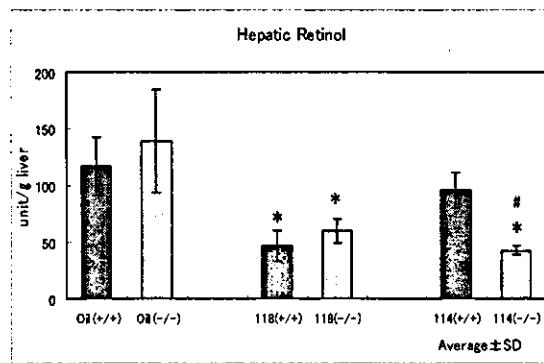
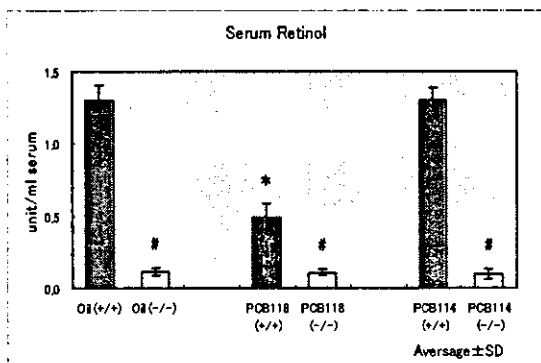
E, F: PCB114曝露野生型マウスおよびTTR欠損マウスの肝臓: 中心静脈周辺部の肝実質細胞に強い染色性が認められた。門脈結合組織周辺の肝細胞は陰性であった。

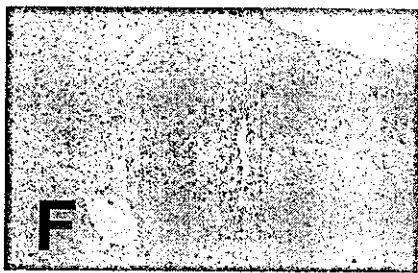
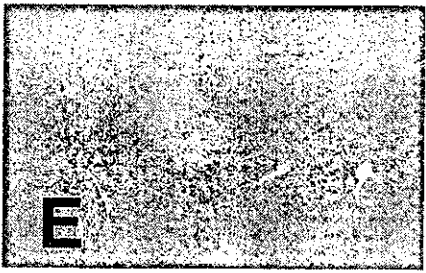
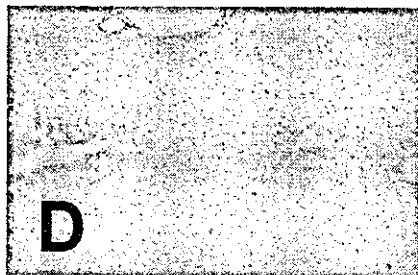
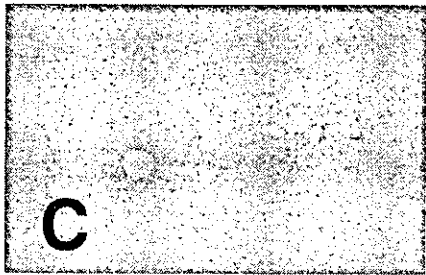
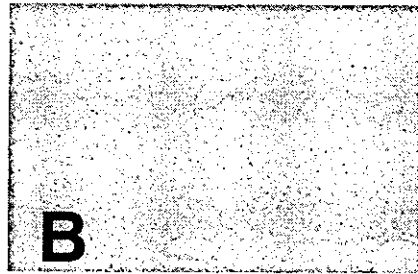
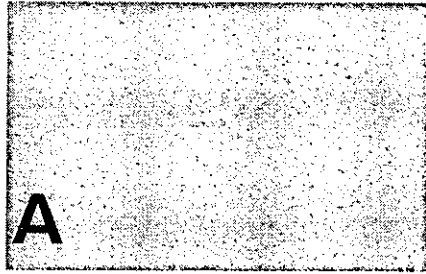
Bar = 50 μm

図4 PCB118またはPCB114曝露の野生型およびTTR欠損マウス肝臓におけるPCB118またはPCB114濃度

結果は、平均値±標準偏差 (n=3) で表示した。







☒ 3

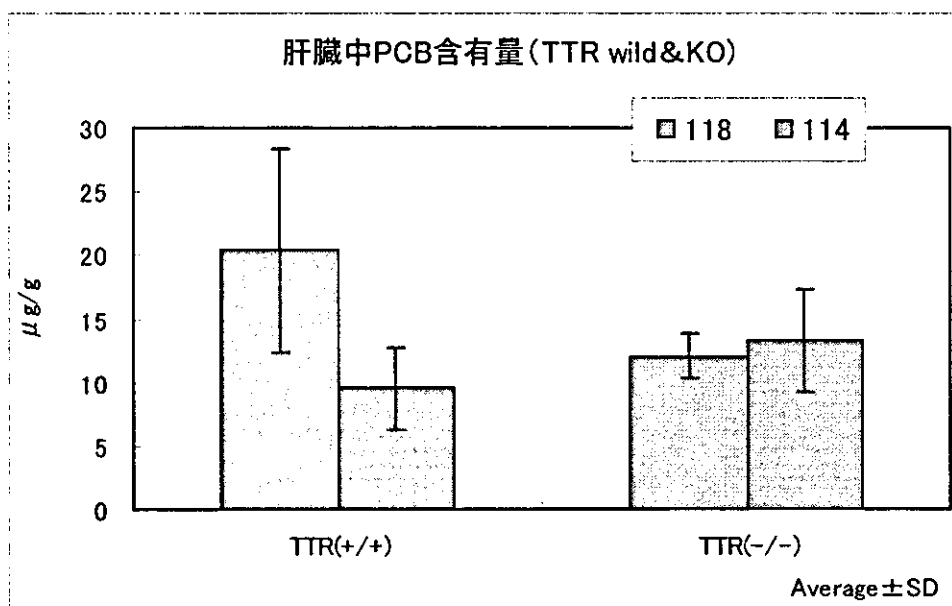


图 4

**表1. PCB118, PCB114に曝露したマウス肝において発現上昇した
遺伝子**

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(54遺伝子の中から抜粋)

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)

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(46遺伝子の中から抜粋)

CYP2B9(11.5)、CYP2B10(4.3)、retinol dehydrogenase 11(2.2)、CYP2C55(2.1)、
CYP2B13(2.0)、

(資料 9)

コプラナーPCB (PCB118 および 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イク (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。

特になし

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性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 Thyroxin 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

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	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	GATGACCAGTTCCTTCAT CTG	GCGCTTGTGGTCTCAGTTC C
CYP2b10	699	GACCGTCAGTTCTTGCGC CTG	TTCACITTTTCTTCAGTGCCC CA
CYP2c55	369	CTGGATGAGAATGGGAA CT	GACTGGATTGTGGGAGAA
Saa1	230	GAAGGAAGCTAACTGGA AAAATC	GCAGTCCAGGAGGTCTGTA GTAATTG
CYP1A1	344	CCATGACCGGGAACITGT 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°C 2min, D~H を加えて 42°C 1hr, 94°C 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°C	<u>1min</u>	
95°C	30sec	
66~68°C	<u>2min</u>	22~
68°C	<u>5min</u>	33cycles

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(+/+)	114(+/+) 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	UP	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	UP	3.4	UP
Cyp2b10	0.9	4.3	UP	3.6	UP	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	UP	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	DOWN	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	DOWN	1.5	1.5	-		

図 1. PCB118 および PCB114 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 (-/-)

