

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

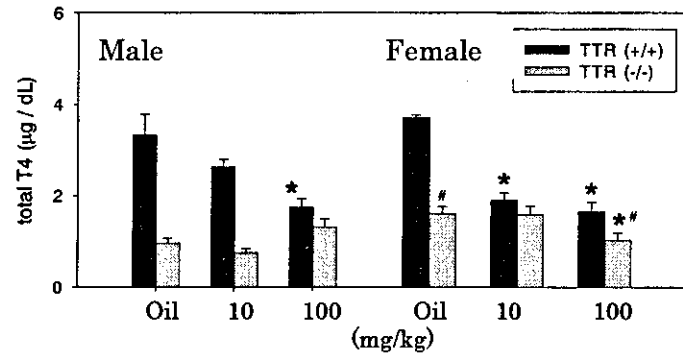
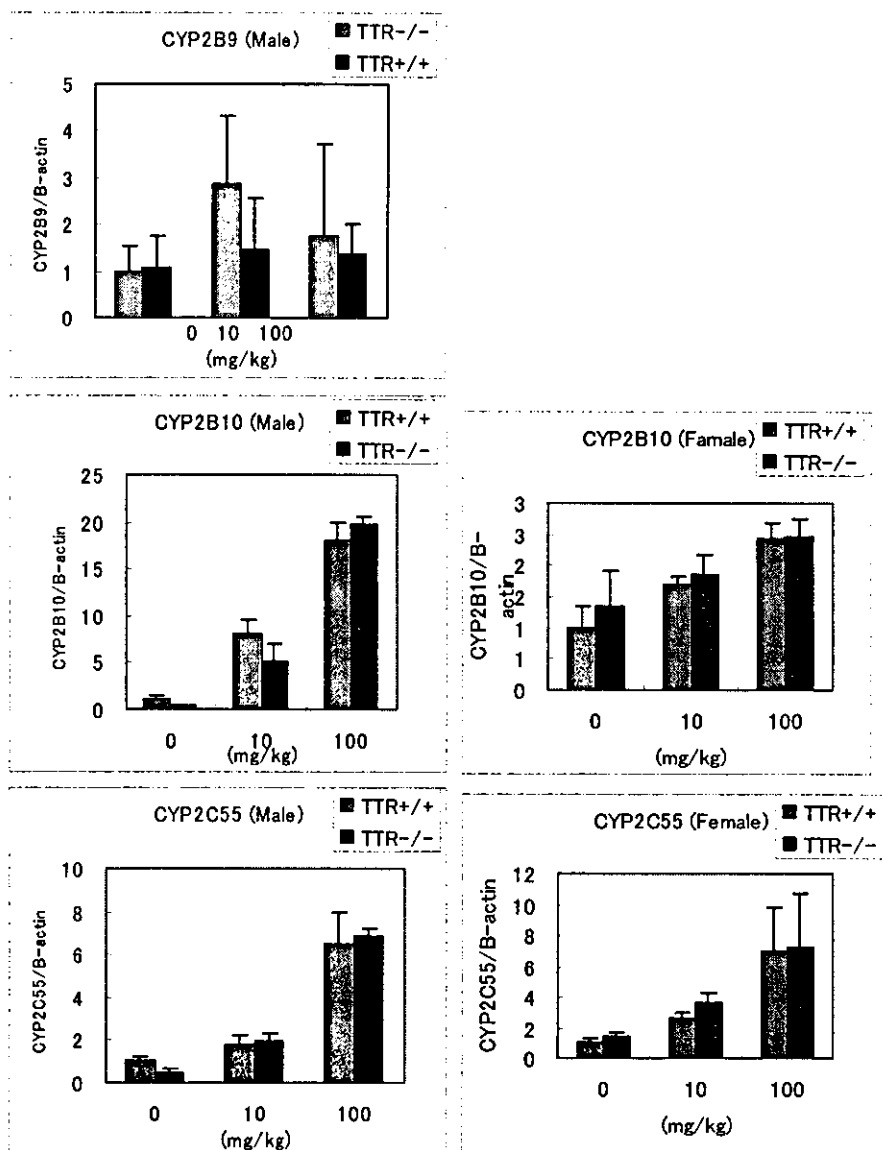


図 3. PCB153 投与マウス肝臓の CYP2B9, CYP2B10 および CYP2C55 遺伝子の発現レベル (野生型 (TTR +/+) および TTR 欠損マウス (-/-))



(資料 10)

PCB の血中甲状腺ホルモン濃度低下作用における TCDD 様作用と  
非 TCDD 様作用の識別

分担研究者 加藤善久  
静岡県立大学薬学部 講師

研究要旨

本研究の目的は、異なるタイプのポリ塩化ビフェニル (PCB) による血中サイロキシン (T4) 濃度低下作用メカニズムを、aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介した 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (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である。本研究の結果から、異なるタイプの PCB を投与したときの血中 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、3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (CB77) および 2,3',4,4',5-penta-chlorobiphenyl (CB118) 投与では、非 TCDD 様作用である血清中 T4 とトランスサイレチン (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、2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB153) 投与では、T4 トランスポーター、モノカルボン酸トランスポーター (MCT8) 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。このように、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。

A. 研究目的

ポリ塩化ビフェニル (PCB) には 209 種の同族体が存在し、その毒性評価には毒性等価量 (TEQ) が用いられている。これは、aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介して、作用をおよぼす化合物に付与されている毒性等価係数 (TEF) に、個々の化合物の存在量を乗じたものである。PCB には、ラットの血中甲状腺ホルモン濃度を低下させる作用がある。その低下作用メカニズムの 1 つとして、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) のように AhR を介して肝の UDP-glucuronyltransferase (UDP-GT) を誘

導し、サイロキシン (T4) のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄を促進させることが報告されている。一方、PCB には、その特有なメカニズムが存在すると考えられている。このように、PCB には TCDD 様作用と非 TCDD 様作用があることから、PCB の毒性を正しく評価するためには、各 PCB (coplanar PCB や、TEF では十分に評価されない non-planar PCB および mono-*ortho* PCB など) に対して新たな指標が必要である。本研究では、異なるタイプの PCB による血中 T4 濃度低下作用メカニズムを、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<sup>[125I]</sup>T4 を静脈内投与し、<sup>[125I]</sup>T4 の血清クリアランス、胆汁中<sup>[125I]</sup>T4 のグルクロン酸抱合体の排泄量、血清中<sup>[125I]</sup>T4 と血清タンパクとの結合率、<sup>[125I]</sup>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)。Pentoxeresorufin-*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<sup>[125I]</sup>T4 のグルクロン酸抱合体の排泄量は、<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>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、<sup>[125I]</sup>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(K<sub>p</sub>値)、およびC57BL/6系マウスにCB153を投与したときの甲状腺のK<sub>p</sub>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<sup>[125I]</sup>T4の分布量および肝臓単位重量当たりの<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>T4と血清タンパクとの結合率を測定した。血中<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>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 を介して、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<sup>[125I]</sup>T4 を投与し、<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>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体反応を亢進し、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、<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>T4 の薬物動態的パラメーターを算出した。<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>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<sup>[125I]</sup>T4 の組織分布量を測定し、K<sub>p</sub> 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<sup>[125I]</sup>T4 の分布量、肝臓の K<sub>p</sub> 値および単位肝臓重量当りの<sup>[125I]</sup>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 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 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 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 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 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 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、 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ を投与し、血中 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 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 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 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 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 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

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 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 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 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 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 $[^{125}\text{I}]\text{T4}$ 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(a<sub>n</sub>=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 pentoxyresorufin 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<sup>125</sup>I]T4を静脈内投与した後の胆汁中<sup>125</sup>I]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<sup>125</sup>I]T4を静脈内投与した後の<sup>125</sup>I]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、<sup>125</sup>I]T4を静脈内投与し、5分後の<sup>125</sup>I]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、<sup>125</sup>I]T4を静脈内投与し、5分後の<sup>125</sup>I]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、<sup>125</sup>I]T4を静脈内投与し、5分後の<sup>125</sup>I]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<sup>125</sup>I]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<sup>125</sup>I]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 ± 0.00	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>
	C B 1 1 8	0.84 ± 0.08	0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>
	C B 1 5 3	3.39 ± 0.31	0.32 ± 0.05 <sup>c</sup>
D B A / 2	C B 7 7	0.98 ± 0.22	0.33 ± 0.12 <sup>a</sup>
	C B 1 1 8	3.54 ± 0.50	0.26 ± 0.05 <sup>b</sup>
	C B 1 5 3	1.08 ± 0.12	0.02 ± 0.01 <sup>c</sup>

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.

Fig. 1.

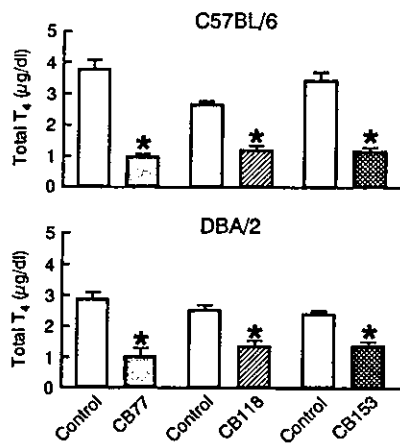


Fig. 2.

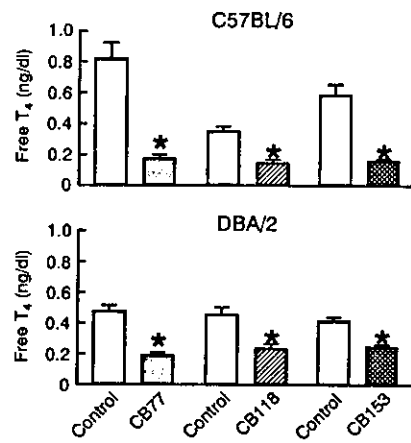


Fig. 3.

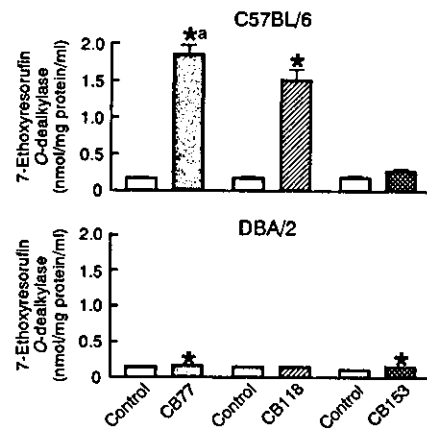


Fig. 4.

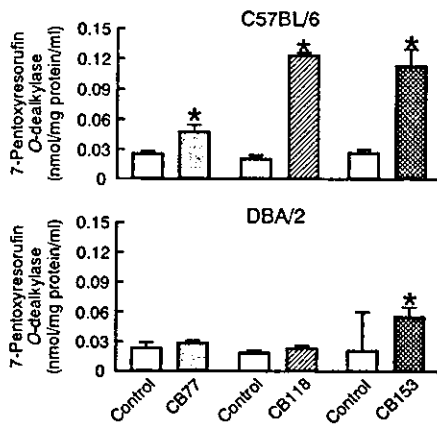
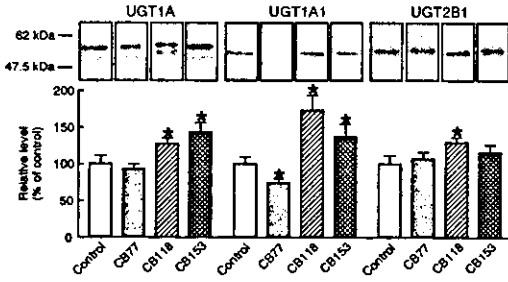


Fig. 5.



Microsomal proteins (UGT1A, UGT2B1: 10 µg, UGT1A1: 40 µg) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters, and probed with antibodies against UGT1A and UGT1A1 of rats. After the immunoblot, the isolated bands responsible for UGT isozymes were densitometrically quantified.

Fig. 6.

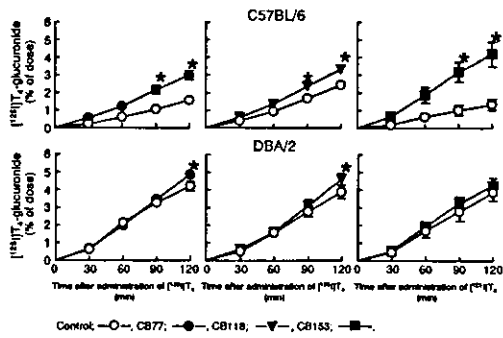


Fig. 7.

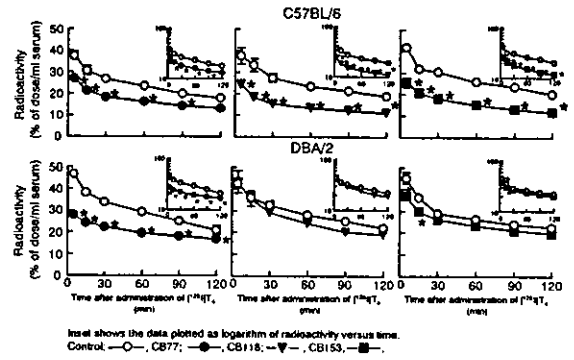


Fig. 8.

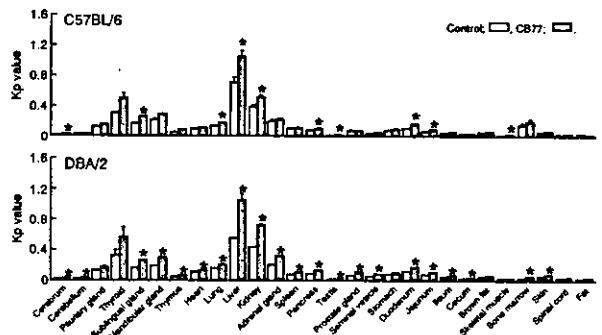


Fig. 9.

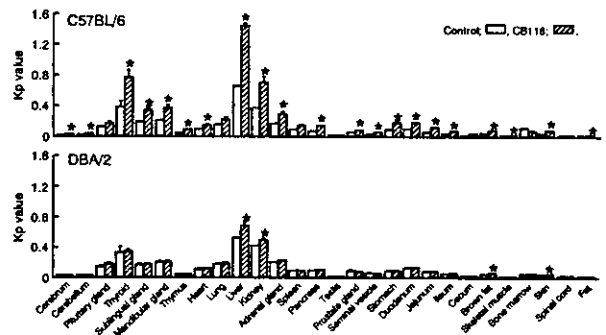


Fig. 10.

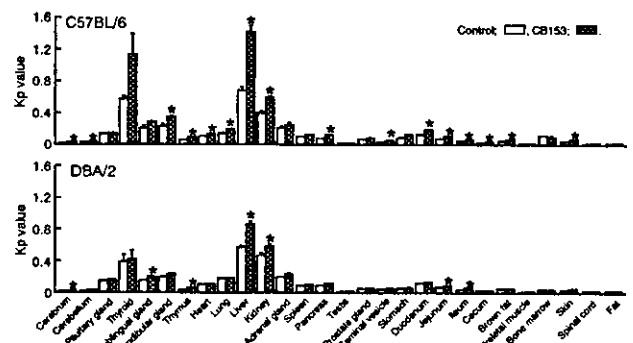
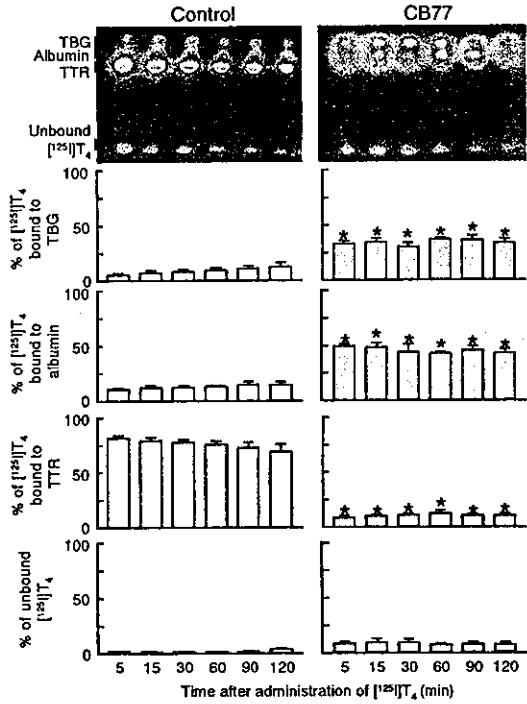
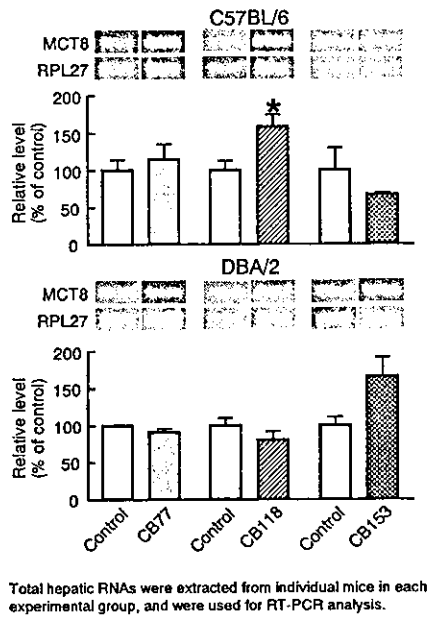


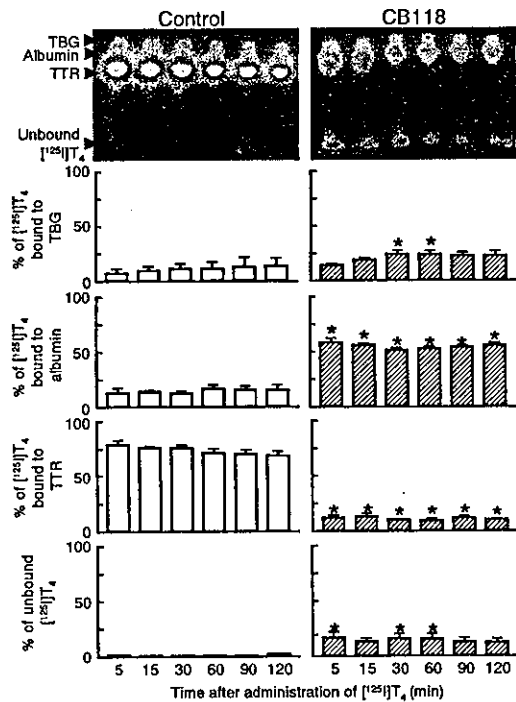
图 13.

图 11.



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.

## コプラナーPCBの免疫系への作用

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

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

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

研究協力者 野原恵子、潘小青 国立環境研究所・環境健康研究領域

### A 研究目的

PCB類は脂溶性化学物質であるため、過去に環境中に放出されたPCB類が魚や哺乳類の脂質に蓄積され、食物連鎖を通じて人類に健康影響を及ぼすことが懸念されている(Chang et al., 1982; Safe, 1990 and 1994)。PCB類は、コプラナーPCBをはじめとするダイオキシン様の作用を持つもの、すなわちAhRを活性化作用をもつものと、非ダイオキシン類に分けることができる。これまでの研究(Silkworth, et al., 1984; Davis and Safe, 1990; Kerkvliet N et al., 1990; Safe, 1990 and 1994; Wilson and Safe, 1998)では、PCB類の免疫系への作用はそのAhR活性化能と正の相関を示し、すなわちTCDDの毒性を1とした場合のTEFが高いほど免疫系に対する作用が強いことが報告されている。コプラナーPCBのPCB126 (TEF 0.1)とPCB169 (TEF 0.01)はPCB類の中で高いTEFをもち、免疫系への作用が強いことが報告されているが、このうち特に

PCB169については、T細胞非依存性抗原であるTNP抗原に対する抗体産生能を指標とした

場合には、そのTEFが数十倍大きくなることが報告されている(Harper, et al., 1995)。

最近我々は、T細胞依存性抗原であるタンパク(卵白アルブミン、OVA)に対する抗体反応において、TCDDが抗体産生において重要な働きをするT細胞由来のサイトカイン産生を顕著に抑制するなどを明らかにした(Nohara, et al., 2002, Ito, et al., 2002)。しかしながら、PCB169をはじめとするコプラナーPCBのT細胞依存性抗原に対するIgG抗体産生反応などについては、詳細な検討が行われていない。そこで本研究では、PCB169のT細胞依存性抗原に対する抗体産生反応への影響についてTCDDの影響と比較し、そのTEFの検討、およびPCB169がTCDDとは異なる作用を示すかどうか、すなわち非ダイオキシン様の作用について検討した。

## B 研究方法

### 1 試験材料

#### 1.1 化合物

PCB169 を AccuStandard Inc. (New Haven, CT) から購入し、PCB169 含量が 0.02、0.2、0.5 mg/ml となるようにコーン油に溶解させた。TCDD (50 µg/ml ノナン溶液) を Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA) から購入し、TCDD の含量が 2 µg/ml となるようにコーン油に溶解させた。対照群には 4% ノナン含有コーン油を同様に投与した。

#### 1.2 抗原物質

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

### 2 実験動物および飼育条件

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

### 3 実験計画

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

#### 群構成

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

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

### 4 分析方法

#### 4.1 細胞の調製

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

#### 4.2 リンパ球サブポピュレーション解析

調製した細胞浮遊液を用いてフローサイトメーター (FACSCalibur, Beckton-Dickinson, Mountain View, CA) により T 細胞 (CD3<sup>+</sup>)、CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、B 細胞 (B220<sup>+</sup>) 解析を行った (Nohara et al., 2000)。

#### 4.3 サイトカイン産生測定

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

#### 4.4 血漿中抗体価測定

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

#### 4.5 CYP1A1 遺伝子発現誘導の測定

##### 4.5.1 RNA 精製と測定

肝臓及び脾臓からキアゲン RNeasy mini kit (キアゲン株式会社、東京) を用いて、RNA 精製を行った。RNA 量は分光光度計 (Gene Quantpro<sup>TM</sup>; Pharmacia Biotech, Cambridge, England) で測定した。

##### 4.5.2 cDNA 合成

RNA PCR kit (AMV) (宝酒造株式会社、東京) を用いて 0.1 µg RNA から cDNA を合成した。cDNA の増幅は GeneAmp PCR system 9700 (PE Corporation, Norwalk,

Conn., USA)を用いて行った。

#### 4.5.3 リアルタイム定量 PCR (real-time PCR)

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

40 ng の cDNA 量を用い、SYBR Green PCR kit を用いて、増幅反応をさせた。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) を内部標準遺伝子として、結果を GAPDH に対する CYP1A1 の比で表示した(Hu et al., 2002; Mansson et al., 2001)。

#### 5 統計学的手法

本実験のデータは、平均値±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. 体重及び免疫臓器重量に対する TCDD または PCB169 の影響 (表 I、図 1a~d)

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

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

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

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

20  $\mu$ g/kg TCDD を投与して 10 日目のマウスは、対照群と比較して胸腺細胞数が約 8 割有意に減少していた (表 II)。その

うち、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の細胞数と割合が有意に減少し、CD4<sup>+</sup>T細胞と CD8<sup>+</sup>T細胞の細胞数と割合の増加が認められた。しかし、PCB169 0.2 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kg 各曝露群において、胸腺細胞数および胸腺細胞の各サブポピュレーションに有意な変化はみられなかった (表 II)。

脾臓細胞数は対照群と比較して、TCDD 曝露群で有意に減少していた (表 III)。更に、各サブポピュレーションの細胞数をみると、TCDD 投与群で T細胞数が 34% 減少したと、B細胞数が 37% 増加したことが認められた。PCB169 の 0.2 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kg 各曝露群では、脾臓細胞数と各サブポピュレーションの細胞数におけるいずれの変化もみられなかった (表 III)。

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

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

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

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

#### 5 肝臓重量の変化 (図 4)

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

#### 6 肝臓と脾臓における CYP1A1 発現誘導 (図 5)

TCDD と同様に PCB169 も Ah 受容体の



アゴニストであるため、両者ともフェース I 代謝酵素の CYP1A1 を誘導することが報告されている (Diliberto, et al., 1995; Whitlock, 1999; DeVito, et al., 2000)。そこで、TCDD および PCB169 曝露 4 日後の肝臓と脾臓中の CYP1A1 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で調べた。表 IV に示すように、PCB169 曝露による肝臓での CYP1A1 発現量は TCDD 曝露に比べて 2 mg/kg で約 45%、5 mg/kg で 73%であった。一方、PCB169 曝露による脾臓での CYP1A1 発現量は、TCDD 曝露に比べて 2 mg/kg で約 2%、5 mg/kg で 30%であり、PCB169 による脾臓での CYP1A1 発現誘導量は肝臓に比べると低かった。

#### D 考察

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

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

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

また TCDD 曝露群では IL-5 産生および

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

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

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

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

## E 結論

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

## F 健康危険情報 特になし

## G 参考文献

- Chang KJ, Hsieh KH, Tang SY, Tung TC, Lee TP. (1982) Immunologic evaluation of patients with polychlorinated biphenyl poisoning: evaluation of delayed-type skin hypersensitive response and its relation to clinical studies. *J Toxicol Environ Health* 9(2):217-23
- Davis D, Safe S. (1990) Immunosuppressive activities of polychlorinated biphenyls in C57BL/6N mice: structure-activity relationships as Ah receptor agonists and partial antagonists. *Toxicology* 63(1):97-111
- DeVito M, Menache MG, Diliberto J, Ross D, Birnbaum L. (2000) Dose-response relationships for induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzyme activity in liver, lung, and skin in female mice following subchronic exposure to polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol* 167(3):157-72
- Diliberto JJ, Akubue PI, Luebke RW, Birnbaum LS. (1995) Dose-response relationships of tissue distribution and induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzymatic activities following acute exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 30(2):197-208
- Kerkvliet N, Steppan L, Brauner J, Deyo J, Henderson M, Tomar R, Buhler D. (1990) Influence of the Ah locus on the humoral immunotoxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: evidence for Ah-receptor-dependent and Ah-receptor-independent mechanisms of immunosuppression. *Toxicol Appl Pharmacol* 105(1):26-36
- Harper N, Connor K, Steinberg M, Safe S. (1995) Immunosuppressive activity of polychlorinated biphenyl mixtures and congeners: nonadditive (antagonistic) interactions. *Fundam Appl Toxicol* 27(1):131-9
- Harper N, Connor K, Steinberg M, Safe S. (1994) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific for antibodies to TNP-LPS detects alterations in serum immunoglobulins and isotype switching in C57BL/6 and DBA/2 mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Toxicology* 92(1-3):155-67
- Hu Y, Ippolito JE, Garabedian EM, Humphrey PA, Gordon JI. (2002) Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *J Biol Chem* 277(46):44462-74
- Inouye, K., Ito, T., Fujimaki, H., Takahashi, Y., Takemori, T., Pan, X., Tohyama, C., and Nohara, K. Suppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response to protein antigen in C57BL/6 mice. (submitted)

- Ito, T., Inouye, K., Fujimaki, H., Tohyama, C. and Nohara, K. (2002). Mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced suppression of antibody production: Effect on T cell-derived cytokine production in the primary immune reaction of mice, *Toxicol. Sci.*, **70**, 46-54
- Mansson E, Liliemark E, Soderhall S, Gustafsson G, Eriksson S, Albertioni F. (2002) Real-time quantitative PCR assays for deoxycytidine kinase, deoxyguanosine kinase and 5'-nucleotidase mRNA measurement in cell lines and in patients with leukemia. *Leukemia* **16**(3):386-92
- Nohara K, Ushio H, Tsukumo S, Kobayashi T, Kijima M, Tohyama C, Fujimaki H. (2000) Alterations of thymocyte development, thymic emigrants and peripheral T cell population in rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicology* **145**(2-3): 227-35
- Nohara, K., Fujimaki, H., Tsukumo, S., Inouye, K., Sone, H. and Tohyama, C. (2002). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on T cell-derived cytokine production in ovalbumin (OVA)-immunized C57Bl/6 mice, *Toxicology* **172**, 49-58
- Safe S. (1990) Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* **21**(1):51-88. Review.
- Safe S. (1994) Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* **24**(2):87-149
- Silkworth J, Antrim L, Kaminsky L. (1984) Correlations between polychlorinated biphenyl immunotoxicity, the aromatic hydrocarbon locus, and liver microsomal enzyme induction in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **75**(1):156-65
- Whitlock, J, Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 103-125
- Wilson C, Safe S. 1998 Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. *Toxicol Pathol* **26**(5):657-71
- Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunstrom B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen FX, Liem AK, Nolt C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Waern F, Zacharewski T. (1998) Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* **106**(12):775-92

## H 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得  
特になし
- 2.実用新案登録  
特になし
- 3.その他  
特になし

## I 図の説明

図1 胸腺と脾臓重量に対する TCDD または PCB169 曝露の影響

マウスに TCDD あるいは PCB169 を投与し、OVA 免疫して 4 日目と 10 日目に解

剖した。胸腺重量 (1a, 4 日目; 1b, 10 日目) と脾臓重量 (1c, 4 日目; 1d, 10 日目) は体重に対しての比率で表し、平均値±標準誤差 (n = 5) で表示した。\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 。

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

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

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

図 3 抗体産生能に対する TCDD または PCB169 曝露の影響

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

図 4 曝露 4 日目の肝臓重量の変化

曝露 4 日目に対照群、TCDD または PCB169 群のマウスを解剖して、肝臓の重量を測定した。結果は、体重に対しての比率で表し、平均値±標準誤差 (n = 5) で表示した。\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 。

図 5 曝露 4 日目の肝臓と脾臓中の CYP1A1 メッセンジャーRNA 発現量

曝露 4 日目に対照群、TCDD または PCB169 群の肝臓と脾臓から RNA を精製し、cDNA を合成して、リアルタイム PCR で a)肝臓と b)脾臓 CYP1A1cDNA を測定した。結果は、GAPDH に対する CYP1A1 の比で表し、平均値±標準誤差 (n = 5) で表示した。\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 。