

## 第6章 油症の生化学的研究

## 6.1. PCB と関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性

古賀信幸, 吉村英敏

### 6.1.1. PCB の生体内動態

一般に, PCB を含む環境汚染物質や医薬品のような脂溶性の高い化学物質(生体異物という)は, 生体内に入ると種々の代謝反応を受けて, より水溶性の高い代謝物に変換され, 尿中あるいは胆汁を介して糞中へと排泄される。代謝反応としては酸化, 還元, 加水分解, 抱合などがあり, 多くの薬物代謝酵素がこれらの反応にたずさわっている。

PCB は, 前述のように, 著しく高い脂溶性を有しており, さらに生物学的にもかなり安定であることから, 一旦生体内に取り込まれるとこれらを体外へ排泄するのは容易ではない。しかしながら, PCB の化学構造, すなわち置換された塩素数の違い, または塩素数が同じでも置換位置の違いにより, 生体外への排泄の程度には顕著な差がみられる。さらに動物の種類によってもその排泄能は大きく異なることが報告されている。

1971 年吉村と大島は Kanechlor 400 をマウスに経口投与した後, PCB 成分の各臓器への分布と消失速度を調べた (1)。その結果, 四塩素化ビフェニル (TCB) は投与後 3 週あるいは 4 週以内にマウス体内からほとんど消失していたが, 五塩素化ビフェニル (PenCB) 及び六塩素化ビフェニル (HCB) は, 投与後 10 週目でも少量がなお残留していることを見出した。同様に, Aroclor 1254 をラットに投与した場合にも, 高塩素化ビフェニルの方が組織への残留性が高いことが観察された (2)。翌年, Hutzinger らは単一の PCB 同族体である 4-一塩素化ビフェニル (MCB), 4, 4'-二塩素化ビフェニル (DCB), 2, 5, 2', 5'-TCB 及び 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB をラット, 鳥類のハト及び魚類のカワマスに投与し, 代謝物の生成を調べた。その結果, 4-MCB, 4, 4'-DCB 及び 2, 5, 2', 5'-TCB については, ラットとハトで一水酸化体の生成が認められるが 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB はいずれの動物でも代謝されないこと, さらにカワマスではいずれの PCB 異性体も代謝されないことが明らかになった (3)。さらに Matthews と Anderson は PCB の塩素数が代謝物の生成量にどのように影響するかを調べるため, 置換塩素数 1, 2, 5 及び 6 個の PCB をラットに投与したところ, 塩素数が増えるにつれて代謝物の生成量が減少することを報告した (4)。このように塩素数が多い PCB ほど, 代謝されにくくなり, 結果的に体内に蓄積されることになる。

PCB の生体内動態に影響する構造上の第 2 の重要な点は, 塩素原子がビフェニル環のどの位置に置換されているかという点である。吉村らは塩素原子の置換位置が異なる 3 種類の TCB, すなわち 2, 4, 3', 4'-, 2, 5, 2', 5'- 及び 3, 4, 3', 4'-TCB をラット 1 匹当たり 25 mg を経口投与した後, 糞中の代謝物量を比較した。8 日間の糞を採取し代謝物量を定量したところ, 2, 5, 2', 5'-TCB  $\gg$  2, 4, 3', 4'-TCB  $>$  3, 4, 3', 4'-TCB の順であった (5-7)。同様に, Sipes らは対称的構造をもつ 4 種類の HCB, すなわち 2, 3, 5, 2', 3', 5'-, 2, 3, 6, 2', 3', 6'-, 2, 4, 5, 2', 4', 5'- 及び 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB をイヌへ静脈注

射することによって、これらの糞中への排泄速度に及ぼす塩素置換位置の影響を調べた。その結果、排泄速度は  $2, 3, 6, 2', 3', 6'\text{-HCB} > 2, 4, 6, 2', 4', 6'\text{-HCB} > 2, 4, 5, 2', 4', 5'\text{-HCB} \gg 2, 3, 5, 2', 3', 5'\text{-HCB}$  の順であった (8)。これらの結果は、メタ位 (3, 3', あるいは 5, 5' 位) に塩素置換されると代謝されにくいことを示唆している。ただし、 $2, 3, 6, 2', 3', 6'\text{-HCB}$  はメタ位 (3 及び 3' 位) に塩素置換されているが、メタ-パラ位 (4 及び 5 位または 4' 及び 5' 位) に隣接する 2 つの水素があるため容易に代謝されたようである。

PCB の消失速度は動物種によってもかなり異なる。例えば、Sipes らは  $2, 4, 5, 2', 4', 5'\text{-HCB}$  に対し、ラット、サル及びヒトがほとんど代謝活性を示さないのに比較し、イヌが高い代謝能を有することを見出した (9)。最近、有吉らはモルモットも本 HCB に対し比較的高い代謝能をもつことを報告した (10)。

### 6.1.2. PCB の *in vivo* 代謝

1959 年 Bloch と Cornish は PCB としては初めて 4-MCB をウサギに投与し、尿中から代謝物として 4'-hydroxy-4-MCB とそのグルクロン酸抱合体を見出した (11)。その後、1968 年にカネミ油症事件が起こるまでの約 10 年間、PCB 代謝に関する報告は全く出されていない。カネミ油症事件を契機として 1970 年以降、PCB の代謝研究がラット、ウサギ、マウス、サル、ヤギ、ウシ、魚類及びヒトなどで数多く蓄積されてきた。図 6.1.1 には PCB の代謝経路の概略を示す。代謝物の主要なものは一水酸化 (monohydroxy) 体であるが、この生成には肝小胞体に局在するチトクロム P450 (P450)

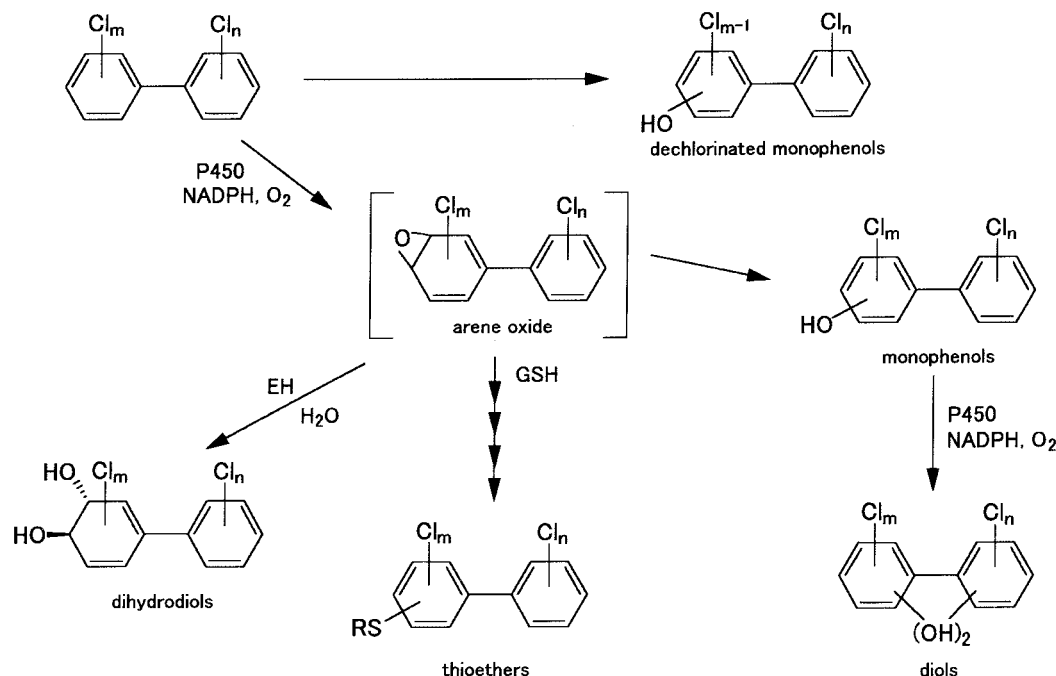


図 6.1.1. PCB の代謝経路

P450, cytochrome P450; GSH, glutathione; EH, epoxide hydrolase.

が、重要な役割を果たしている。これ以外にも二水酸化(ジオール)体, *trans*-ジヒドロジオール体及びメチルチオ ( $\text{CH}_3\text{S}$ ) 体, メチルスルフォキシド ( $\text{CH}_3\text{SO}$ ) 体, メチルスルホン ( $\text{CH}_3\text{SO}_2$ ) 体などの S 含有代謝物が見つかった。また、微量ではあるが母化合物から塩素原子が一個脱離し、さらに一水酸化された代謝物も報告されている。

わが国では、1968 年の油症事件発生から数年後に、九州大学薬学部の吉村らの研究グループによって Kanechlor 400 の主成分である 2, 4, 3', 4'-, 2, 5, 2', 5'- 及び 3, 4, 3', 4'-TCB などの単一 PCB 異性体の代謝研究が開始された。その後、彼らの代謝研究は 2, 3, 4, 3', 4'-PenCB, 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 及び 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB などの高塩素化の PCB へと広げられていった。図 6.1.2 には現在までに吉村らによって同定された PCB 代謝物の構造を示す。

1973 年、山本と吉村は 2, 4, 3', 4'-TCB の代謝をラットで調べ、糞中から 5- 及び 3-hydroxy 体の分離・同定に成功した (6)。この報告は塩素が 3 個以上置換された PCB 代謝物の化学構造を完全に証明した最初のものではあった。最近、筆者らは本 TCB の代謝をラットで再度検討し、上記 2 種の代謝物以外に、4 位の塩素が 5 位へと NIH 転位したと思われる 4-hydroxy-2, 5, 3', 4'-TCB を糞中に新たに見出した (12)。

3, 4, 3', 4'-TCB の代謝研究では、ラットに 25 mg/body を経口投与したところ、投与後 14 日間に未吸収分と思われる未変化体約 64% とともに糞中から 3 種類のフェノール性の代謝物が検出された。このうち主なものは 2-あるいは 5-hydroxy 体であろうと推定された。なお、抱合体はラット糞中及び尿中いずれからも検出されなかった (5, 13)。この報告から 10 年以上経過した 1987 年、吉村らは再度詳細に検討を加え、前述の主代謝物が 5-hydroxy 体及び 4 位の塩素が 5 位に NIH 転位したと思われる 4-hydroxy-3, 5, 3', 4'-TCB であることを明らかにした (14)。数年後、さらにラット糞中から、微量代謝物として 4-hydroxy-3, 3', 4'-三塩素化ビフェニル (TriCB) 及び 3 種類のジオール体、すなわち 2, 5-dihydroxy-3, 4, 3', 4'-TCB, 4, 4'-dihydroxy-3, 5, 3', 5'-TCB 及び 5, 6-dihydroxy-3, 4, 3', 4'-TCB が同定された (15)。これと時を同じくして、Klasson-Wehler らはマウスの尿、脂肪組織及び胎児体内から新たに上記主代謝物の 5- 及び 4-hydroxy 体以外に 6-hydroxy 体を検出したと報告した (16)。この 6-hydroxy 体は、筆者らがラットを用いた代謝研究では全く検出されなかったものでマウス特有の代謝物かもしれないが、現在のところは不明である。また、筆者らは本 TCB の新規代謝物として M-5 を見出し、そのメチル誘導体の分子量 336 から、一水酸化エポキシ体であると推定した (15)。しかしながら、最近、原口らはこれが間違いであり、実際は後述する S 含有代謝物の 6- $\text{CH}_3\text{S}$ -3, 4, 3', 4'-TCB であることを示した (17)。

次に、1975 年、吉村らは 2, 5, 2', 5'-TCB をラットに経口投与あるいは腹腔内投与したところ、胆汁中に主代謝物として 3-hydroxy 体が、また少量であるが 4-hydroxy 体が排泄されることを明らかにした (7)。さらに尿中からも非常に微量であるが両代謝物を検出した。本 TCB の代謝に関しては、1972 年にすでに Hutzinger らの報告 (3) がある。それによると、ラット尿中から 1 種類の一水酸化体が検出されたが、糞中には多量の未変化体のみが排泄されていたという。しかしながら、現在の研究成果は、2, 5, 2', 5'-TCB を含む多くの PCB の水酸化体が主として胆汁を介して糞中に排泄されることを証明しており、Hutzinger らの研究結果の明らかな誤りが指摘される。一方、Gardner らは 2, 5, 2', 5'-TCB をウサギに投与し、その糞中ではなく尿中から微量代謝物として新規な *trans*-

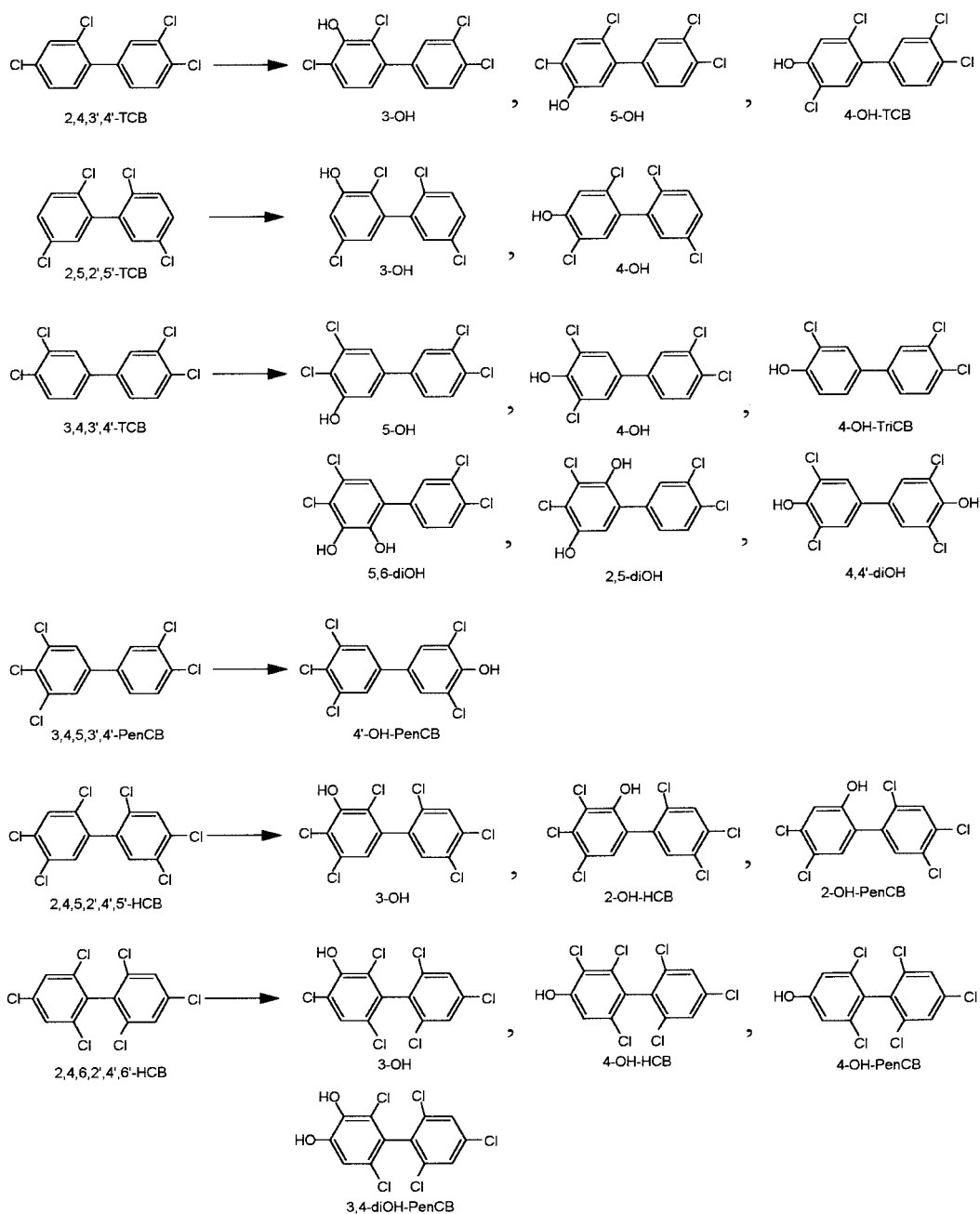


図 6.1.2. 吉村らによって同定された PCB 代謝物

TriCB, trichlorobiphenyl; TCB, tetrachlorobiphenyl; PenCB, pentachlorobiphenyl; HCB, hexachlorobiphenyl.

3, 4-dihydro-3, 4-dihydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB を検出した (18)。この代謝物は、吉村らの報告ではラット尿中には検出されていない。

1976 年、山本らはラットにおける 2, 3, 4, 3', 4'-PenCB の代謝について検討を加えた。投与後 8 日間の糞、尿及び組織を調べた結果、代謝物は全く検出されなかった (19)。この PenCB は前述の TCB

と同様に Kanechlor 400 の成分の 1 つであるとともに、油症患者の血清中 PCB 成分のうちで、健康者よりも濃度が低い成分として知られている (20)。山本らの報告から 17 年後、Klasson-Wehler らによりマウスとミンクでも検討され、その結果、2, 3, 4, 3', 4'-PenCB は代謝速度が非常に遅いものの 5 種類の代謝物へと変換されることが明らかにされた。それらの構造は 5-, 5'- 及び 2'-hydroxy 体とさらに NIH 転位した代謝物の 4-hydroxy-2, 3, 5, 3', 4'-PenCB 及び 4'-hydroxy-2, 3, 4, 3', 5'-PenCB であった (21)。興味あることに、4'-hydroxy 体とともに 4-hydroxy 体が比較的多く生成されており、塩素が 3 個置換している芳香環 (2, 3, 4-三塩素置換ベンゼン環) の方が 3', 4'-二塩素置換ベンゼン環より代謝されやすいという結果であった。ごく最近、原口らはラット糞中から上記 5 種類のうち 2'-hydroxy 体を除く 4 種類の水酸化体以外に、塩素が脱離した代謝物 4-hydroxy-2, 3, 3', 4'-TCB を新たに見出している (22)。

1976 年、Chen らは 2, 4, 5, 2', 5'-PenCB の代謝を報告した (23)。彼らは  $^{14}\text{C}$  標識した本 PenCB 0.6 mg/kg を雄性ラットに静脈注射したところ、投与した放射活性の 84% が 7 日間以内に排泄されること、また糞及び尿中の放射活性はいずれも代謝物であること、さらに主代謝物として 3'-hydroxy 体が、また微量代謝物として 3', 4'-dihydrodiol 体が生成されることを明らかにした。この結果は、メタ-パラ位 (3 及び 4 位または 3' 及び 4' 位) に隣接する 2 つの水素を有する PCB は、PenCB であっても非常に容易に代謝排泄されることを示している。

一方、小沢、吉村らにより初めて合成され、すべての PCB 中で最強の毒性を有することが明らかにされた 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB は、哺乳動物では代謝されないものと考えられていたが (24)、1990

表 6.1.1. HCB 異性体の代謝物

| HCB isomer              | Animal | Metabolite                                                                                            | Reference             |
|-------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 2, 3, 4, 2', 3', 4'-HCB | Rat    | 5-OH                                                                                                  | Haraguchi et al. (26) |
| 2, 3, 5, 2', 3', 5'-HCB | Rat    | 4-OH, 3-OH-2, 4, 5, 2', 3', 5'-HCB<br>6-OH, 4-OH-2, 5, 2', 3', 5'-PenCB                               | Kato et al. (27)      |
| 2, 3, 6, 2', 3', 6'-HCB | Rat    | 4-OH                                                                                                  | Kato et al. (27)      |
| 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB | Rabbit | 3-OH, 4-OH-2, 3, 5, 2', 4', 5'-HCB<br>3-OH-2, 5, 2', 4', 5'-PenCB<br>4-OH-2, 5, 2', 4', 5'-PenCB      | Sundstrom et al. (28) |
|                         | Rat    | 3-OH                                                                                                  | Sundstrom et al. (28) |
|                         | Mouse  | 3-OH                                                                                                  | Sundstrom et al. (28) |
|                         | Dog    | metabolite (3-OH?)                                                                                    | Sipes et al. (9)      |
|                         | Monkey | 3-OH                                                                                                  | Norback et al. (29)   |
|                         | Dog    | 3-OH, 2-OH-4, 5, 2', 4', 5'-PenCB<br>2-OH-3, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB                                     | Ariyoshi et al. (30)  |
| 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB | Rat    | 3-OH                                                                                                  | Goto et al. (31)      |
|                         | Rat    | 3-OH                                                                                                  | Kato et al. (27)      |
|                         | Dog    | 3-OH, 4-OH-2, 6, 2', 4', 6'-PenCB<br>3, 4-diOH-2, 6, 2', 4', 6'-PenCB<br>4-OH-2, 3, 6, 2', 4', 6'-HCB | Ariyoshi et al. (32)  |

HCB, hexachlorobiphenyl; PenCB, pentachlorobiphenyl.

年、筆者らは本 PenCB 投与ラットの 5 日間の糞中より 4'-hydroxy-3, 4, 5, 3', 5'-PenCB の分離・同定に成功した (25)。なお、その量は 5 日間で投与量のほんの 1.3% にすぎなかった。最近、原口らは、ラット糞中から新たに 5'-hydroxy 体と 4'-hydroxy-3, 4, 5, 3'-TCB を見出した (26)。

HCB 異性体の代謝に関しては比較的報告が多く、1970 年代の半ばから、ラット、ウサギ、マウス、サル及びイヌを用いて検討されている。表 6.1.1 には同定された HCB 代謝物のうち水酸化体のみを示している (26-32)。他の PCB 異性体と同様に一水酸化体が主代謝物であるが、monohydroxy-PenCB もよく見受けられる。この代謝物は塩素が 1 個脱離した一水酸化体で、同様な代謝物は 2, 3, 5, 2', 3', 5'-HCB (27)、2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB (28, 30) 及び 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB (32) に加え、前述のように 3, 4, 3', 4'-TCB (14-16)、2, 3, 4, 3', 4'-PenCB (22) 及び 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB (26) でも観察されている。この代謝物の生成メカニズムの詳細は現在のところ不明のままである。

このように PCB 代謝物は水酸化体を中心であるが、1976 年三尾らによって全く新しい構造の PCB 代謝物が発見された (33)。彼らは 2, 5, 2', 5'-TCB (2 mg/body) をマウスに腹腔内投与し、投与後 6 日間の糞中に 4 種類の代謝物を検出し、それらが 3- と 4-CH<sub>3</sub>S 体及び 3- と 4-CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub> 体であることを明らかにした。その後、このような S 含有代謝物はバルト海のアザラシの脂肪層 (34, 35)、さらには死亡した油症患者 (36) や油症以外で死亡したヒト (37) の肺、肝及び脂肪組織からも検出されている。これらの化学的特徴をみると、① 低塩素化体(4 個以下)に限らず、高塩素化体(5 個以上)も多く見られること、② 隣接したメタ-パラ位 (3 及び 4 位または 3' 及び 4' 位) に 2 個の水素を有する PCB すなわち 2, 5-二塩素置換のものが多いことがあげられる (22, 38, 39)。この生成メカニズムについては後述する。さらに、2, 5, 2', 5'-TCB 投与マウスの肺と腎からは CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub> 基が 2 個置換された 4, 4'-diCH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-2, 5, 2', 5'-TCB (40) が、ごく最近では 3, 4, 3', 4'-TCB 投与ラット糞中から 6-CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-3-CH<sub>3</sub>S-4, 3', 4'-TriCB が新たに見つかっている (17)。このように今や S 含有代謝物は水酸化体と並び、PCB 代謝における重要な代謝物となっている。

### 6.1.3. PCB の *in vitro* 代謝

肝ミクロゾームや精製した P450 分子種を用いた *in vitro* 系での代謝研究は、生体異物がどのような P450 分子種を中心とした薬物代謝酵素系で代謝されているかを知る上で必須である。これまでに哺乳動物から鳥類、魚類、植物及び微生物まで数百種類もの P450 分子種が報告されており、哺乳動物だけでも生体異物の代謝に関与するものが約 100 種類はあるといわれている (41)。

しかしながら、PCB 代謝に関与する P450 についての報告は非常に少ない。現在までのところ、3 つの P450 サブファミリー (CYP1A, 2B 及び 2A) のものが重要であることが明らかにされている。表 6.1.2 には再構成系(すなわち精製 P450, 精製 NADPH-P450 還元酵素, NADPH 生成系及びリン脂質を含有する系)を用いて、PCB 代謝(水酸化反応)を触媒することが証明された P450 分子種を示している (42-45, 51-56)。

歴史的にみると、1981 年の Kaminsky らの報告 (42) が最も重要であろう。彼らは 10 種類の DCB 異性体を用いて、これらの化学構造とその代謝に関与する P450 分子種を調べた。その結果、ラット P450 1A1 (CYP1A1) は 3, 3'-, 3, 4-, 3, 5- 及び 4, 4'-DCB のようにオルト位に塩素が置換されていない DCB を主に水酸化した。一方、CYP2B1 は 2, 2'- や 2, 6-DCB などのようにオルト位に 2 個塩



素置換がある DCB のみを選択的に代謝した。なお、2,3-, 2,4'-及び2,5-DCB のようにオルト位に1個塩素置換された DCB は両 P450 分子種によって水酸化された。この報告は、P450 分子種と PCB 異性体の化学構造が密接に関係していることを明確に示した最初のものであった。

その後、筆者らは TCB 異性体について検討し、3,4,3',4'-及び3,5,3',5'-TCB のような coplanar PCB はラット CYP1A1 によって代謝されること、また、2,5,2',5'-TCB がラット CYP2B1 及び CYP2B2 によって比較的容易に代謝されることを明らかにした (43, 44)。前述のように、1982 年 Sipes らは難代謝性の 2,4,5,2',4',5'-HCB に対し、イヌが高い代謝能を有することを報告したが、彼らはその5年後、フェノバルビタール (PB) 前処理したイヌ肝から1種類の P450 分子種 (CYP2B11) の精製に成功した。この分子種はラットの P450 分子種に比べ、はるかに高い HCB の水酸化活性を有していることが明らかとなった (45)。この分子種についてはさらにそれをコードする DNA 及び対応タンパク質の一次構造が明らかにされ、このような高い触媒活性がどのアミノ酸に由来するかといった点が詳細に検討されている (46-49)。

最近、筆者らはハムスターが肝ミクロゾームによる 2,5,2',5'-TCB 代謝において、ラットやモルモットと異なるパターンを示すことを報告した (50)。すなわち、ラットやモルモットでは3-水酸化活性しか観察されなかったが、ハムスターでは3-水酸化活性だけではなく新たに4-水酸化活性も認められた。引き続き、PB 前処理ハムスター肝より新規な P450 分子種 (HPB-1) の単離に成功した (51)。この分子種は PB 誘導性であり、その N-末端アミノ酸配列より CYP2B サブファミリーに属すると思われるが、ハムスター肝における 2,5,2',5'-及び2,5,3',4'-TCB の3-水酸化反応の主役であることが判明した (51, 52)。ただし、この活性はラット CYP2B1 に比べると10分の1以下と低いものであった。一方、4-水酸化活性に関しては、3-メチルコラントレン (MC) 誘導性の2種の P450 (CYP1A2, CYP2A8) のうち、CYP2A8 により触媒されることが明らかとなった (53)。なお、この報告は CYP1A と CYP2B 以外に、CYP2A サブファミリーに属する P450 分子種が PCB 代謝に関与することを初めて明らかにしたものとなった。さらにモルモット肝から精製された P450GP-1 (CYP2B18) は、2,5,2',5'-と2,5,3',4'-TCB の3-水酸化反応をよく触媒した (52, 54)。

塩素数が5個以上になると、PCB 自体の溶解度が低くなることから *in vitro* 系での代謝研究はかなり困難になるのであるが、有吉らは2,4,5,2',4',5'-HCB の再構成系での代謝物の検出に成功した (55)。P450 としてイヌ CYP2B11、モルモット CYP2B18 及びヒト CYP2B6 (cDNA-expressed) を用いて検討した結果、いずれの P450 分子種も 3-hydroxy 体を生成することが明らかとなった。なお、この活性の強さは CYP2B11  $\gg$  CYP2B6 = CYP2B18 の順であった。また、CYP2B11 及び CYP2B18 は 3-hydroxy 体以外に 2-hydroxy-3,4,5,2',4',5'-HCB 及び 2-hydroxy-4,5,2',4',5'-PenCB をそれぞれ 3-hydroxy 体と同程度生成したが、CYP2B6 はこれらの生成活性を有していなかった。この報告はヒト P450 分子種による PCB 代謝を示した最初のものである。

以上の結果をまとめると、3 (3'), 4 (4') あるいは 5 (5') 位に塩素置換された PCB (coplanar PCB) は、CYP1A 及び 2A に属する P450 によって主に 4-hydroxy 体へ、一方、2 (2'), 5 (5') あるいは 6 (6') 位に塩素置換された PCB は CYP2B に属する P450 によって主に 3-hydroxy 体へ水酸化されるということができる。



表 6.1.2. PCB の水酸化反応を触媒するチトクロム P450 分子種

| CYP         | Animal     | PCB congener            | Metabolite     | Reference            |
|-------------|------------|-------------------------|----------------|----------------------|
| 1A1         | Rat        | 3, 3'-DCB               | 4-OH           | Kaminsky et al. (41) |
|             |            | 3, 4-DCB                | 4'-OH          |                      |
|             |            | 3, 5-DCB                | 4-OH           |                      |
|             |            | 4, 4'-DCB               | 3-OH           |                      |
|             |            | 3, 4, 3', 4'-TCB        | 4-OH, 5-OH     | Ishida et al. (42)   |
|             |            | 3, 5, 3', 5'-TCB        | 4-OH           | Koga et al. (43)     |
|             |            | 2, 5, 3', 4'-TCB        | 4-OH           | Matsusue et al. (55) |
| 1A2         | Hamster    | 2, 5, 3', 4'-TCB        | 4-OH           | Koga et al. (51)     |
| 2A8         | Hamster    | 2, 5, 2', 5'-TCB        | 4-OH           | Koga et al. (52)     |
|             |            | 2, 5, 3', 4'-TCB        | 4-OH           | Koga et al. (51)     |
| 2B1         | Rat        | 2, 2'-DCB               | 3-OH (or 5-OH) | Kaminsky et al. (33) |
|             |            | 2, 6-DCB                | 3'-OH, 4'-OH   |                      |
|             |            | 2, 5, 2', 5'-TCB        | 3-OH           | Ishida et al. (42)   |
|             |            | 2, 5, 3', 4'-TCB        | 3-OH           | Matsusue et al. (55) |
| 2B2         | Rat        | 2, 5, 2', 5'-TCB        | 3-OH           | Ishida et al. (42)   |
| 2B11        | Dog        | 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB |                | Duignan et al. (44)  |
| 2B18 (GP-1) | Guinea pig | 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB | 3-OH           | Ariyoshi et al. (54) |
|             |            | 2, 5, 2', 5'-TCB        | 3-OH           | Koga et al. (53)     |
|             |            | 2, 5, 3', 4'-TCB        | 3-OH           | Koga et al. (51)     |
| 2B6         | Human      | 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB |                | Ariyoshi et al. (54) |
| HPB-1       | Hamster    | 2, 5, 2', 5'-TCB        | 3-OH           | Koga et al. (50)     |
|             |            | 2, 5, 3', 4'-TCB        | 3-OH           | Koga et al. (51)     |

DCB, dichlorobiphenyl; TCB, tetrachlorobiphenyl; PenCB, pentachlorobiphenyl; HCB, hexachlorobiphenyl.

#### 6.1.4. PCB 代謝物の生成機構

PCB をはじめとする芳香族化合物の主な代謝経路は芳香環の水酸化であるが、その水酸化機構として次の 2 つの経路が考えられている。まず、① アレンオキシド体を生成した後、転位を起こして生成する経路、次に② 芳香環の C-H 結合に酸素原子が挿入されて生成する経路(直接水酸化)、である。前者のアレンオキシド体の生成はしばしば、水素あるいは塩素原子の NIH 転位をもたらす。これまでも NIH 転位を起こしたと思われる多くの代謝物が、種々の PCB 異性体で見つかっている。例えば、4, 4'-DCB からは 4-hydroxy-3, 4'-DCB (57) が、3, 4, 3', 4'-TCB からは 4-hydroxy-3, 5, 3', 4'-TCB (14) が、2, 4, 3', 4'-TCB からは 4-hydroxy-2, 5, 3', 4'-TCB (12) が、2, 3, 4, 3', 4'-PenCB からは 4-hydroxy-2, 3, 5, 3', 4'-PenCB と 4'-hydroxy-2, 3, 4, 3', 5'-PenCB (21, 22) が、3, 4, 5, 3', 4'-PenCB からは 4'-hydroxy-3, 4, 5, 3', 5'-PenCB (25) が、2, 3, 5, 2', 3', 5'-HCB からは 3-hydroxy-2, 4, 5, 2', 3', 5'-HCB (27) が、さらに 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB からは 4-hydroxy-2, 3, 5, 2', 4', 5'-HCB (28) などが生成されている。このような代謝物はいずれもメタ-パラ位の 3, 4-オキシド体が中間体であることを示唆している。一般的にこの部位は酸化を受けやすいといえるが、オルト-メタ位の 2, 3-オキシド体の生成

を示唆する結果が1992年有吉らによって初めて報告された(30)。それによると、PB前処理イヌ肝ミクロゾームによる2,4,5,2',4',5'-HCBの代謝物として、3-hydroxy体とともに2-hydroxy-3,4,5,2',4',5'-HCBが同定されている。後者は2,3-オキシド体を経由して2位の塩素が3位にNIH転位して生成されたものと考えられる。

一般に、アレンオキシド体は非常に反応性が高いことから、酵素的あるいは化学的に反応して、*trans*-ジヒドロジオール体へと変換したり、グルタチオン(GSH)抱合体となったり、あるいは細胞内の核酸やタンパク質などの生体高分子に共有結合したりする。前出のGardnerらはウサギ尿中より、3-及び4-hydroxy体以外に*trans*-3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,5,2',5'-TCBを見出したが、この報告はPCB代謝において3,4-オキシド体が中間体として生成されていることを示唆した最初のものであった。その後、ForgeとAllenはGC/MSを用いてこのTCB代謝物としての3,4-オキシド体の検出に成功し、そのことを裏付けた(58)。一方、PCBの代謝的共有結合に関してもいくつか報告がある(59-63)。例えば、島田らは3,4,3',4'-TCBがラットCYP1A1により代謝され、生体高分子としてウマ肝アルコール脱水素酵素、ヒトヘモグロビン、ウシ血清アルブミン及びCYP1A1自身のチオール基に共有結合すること、一方、2,4,2',4'-と2,4,2',5'-TCBはラットCYP2B1により代謝され、上記生体高分子への共有結合を起こすことを明らかにした(61-63)。

1983年Prestonらは2,5,2',5'-TCB代謝における3-hydroxy体の生成が3,4-オキシド体を経由しない直接水酸化の機構で進行していることを提唱した(64)。彼らは2,5,2',5'-TCBの3,4-オキシ

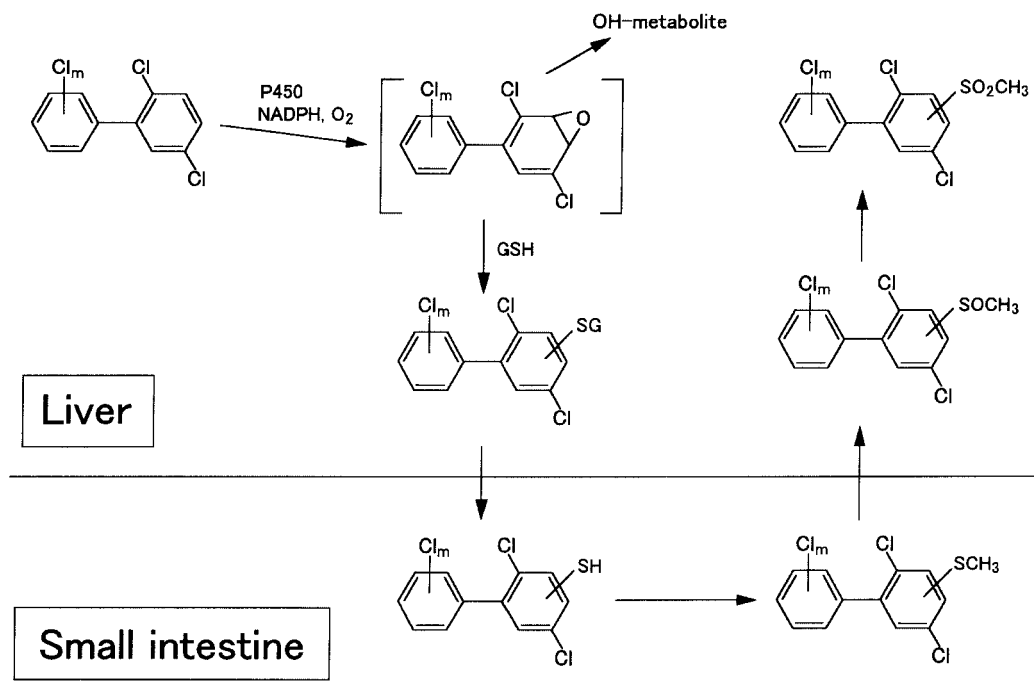


図 6.1.3. PCB の S 含有代謝物の生成経路

P450, cytochrome P450; GSH, glutathione

ド体 (3,4-epoxy-2,5,2',5'-TCB) を合成し、これを NADPH 存在下、PB 前処理ラット肝ミクロゾームと反応させたり、あるいはラットに投与して代謝物を調べたところ、主代謝物である 3-hydroxy 体はいずれの場合にもあまり生成されず、ほとんどが 4-hydroxy 体であったという。

次に PCB 代謝物として重要な S 含有代謝物の生成経路を図 6.1.3 に図示する。S 含有代謝物の生成には、水酸化体生成の場合とは異なり、P450 をはじめ多くの代謝酵素が関与していると考えられている。Bakke らは 2,4',5-TriCB を用いた精力的な研究結果より、次のような経路を提唱した (65-67)。まず最初に PCB は肝小胞体に局在する P450 によって中間体のアレンオキシド体へと酸化され、さらに転位により水酸化体へと代謝されるが、一方、アレンオキシド体の一部は細胞内 GSH と反応し、GSH 抱合体となる。続いて、この抱合体は胆汁を介して腸管内に排泄されるが、ここで腸内細菌が有する 2 つの酵素すなわち  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase と dipeptidase によってグルタミン酸とグリシンが遊離して、システイン抱合体へと変換される。システイン抱合体はさらに細菌の C-S lyase により C-S 結合が切断され、チオール体となる。次にチオール体は腸内細菌の酵素 S-methyl-transferase により  $\text{CH}_3\text{S}$  体へとメチル化され、一部は糞中へ排泄される。残りは再吸収されて肝臓において酸化され、 $\text{CH}_3\text{SO}$  体さらには  $\text{CH}_3\text{SO}_2$  体になると考えられている。

2,5-二塩素置換 PCB の S 含有代謝物の場合、動物組織中には必ずと言っていいほど 3- $\text{CH}_3\text{SO}_2$  体とともに 4- $\text{CH}_3\text{SO}_2$  体が検出される (37, 68)。この事実は中間体として 3,4-オキシド体が生成されていることを強く示唆している。また最近では、2,5-二塩素置換 PCB ではない 3,4,3',4'-TCB や 3,4,5,3',4'-PenCB 投与ラットの肝、脂肪組織及び糞より 2,3-あるいは 5,6-オキシド体の生成を示す S 含有代謝物が報告されている (17, 26)。

#### 6.1.5. PCB 代謝物の毒性

PCB のうち coplanar PCB は実験動物において、体重減少(体消耗)、脾臓や胸腺の萎縮、免疫低下、皮膚角質化、脂質代謝異常、水腫、催奇形性、発がん性及び致死などの種々の毒性を示す。このような毒性はまず PCB が細胞可溶性画分に存在する Ah-receptor に結合することによって発現すると考えられているが、ある種の PCB の場合、母化合物より強い急性毒性を有する代謝物が生成されることが知られている。このことを代謝活性化というが、PCB 代謝における最初の例は 1973 年山本と吉村によって報告された (6)。

彼らは、2,4,3',4'-TCB 及びその主代謝物である 5-hydroxy-2,4,3',4'-TCB について、CF-1 マウスにおける  $\text{LD}_{50}$  (50% 致死量) を調べ、5-hydroxy 体が母化合物の 5 倍もの強い急性毒性を有していることを明らかにした。この報告の 6 年後、Stadnicki と Allen は 2,5,2',5'-TCB とその代謝物の培養細胞 L-929 の増殖に及ぼす影響を調べ、母化合物よりも、代謝物である 4-hydroxy 体及び 3,4-オキシド体の添加の方が細胞の成長をより強く阻害することを明らかにした (69)。これらの報告は PCB の毒性評価をする場合、それらの代謝物の毒性評価がより重要であることを示している。

その後、吉村らは体重変化、肝臓、脾臓及び胸腺の重量変化、及び肝薬物代謝酵素の誘導などを急性毒性の指標とする毒性評価法を確立し、PCB 異性体の一水酸化体の毒性評価を試みた。まず最初に、3,4,3',4'-TCB の主代謝物である 5-hydroxy 体及び 4-hydroxy-3,5,3',4'-TCB を雄性 Wistar ラットに投与し、急性毒性を母化合物と比較したところ、両水酸化体では全く毒性がみられない、あ

るいははるかに弱いことが明らかになった(14)。また、PCB 中で最強の毒性を示す 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB の主代謝物である 4'-hydroxy-3, 4, 5, 3', 5'-PenCB についても、同様に毒性評価したところ、母化合物と異なり、ほとんど毒性を示さなかった(25)。このように coplanar PCB の主代謝物は上記急性毒性の指標に関しては解毒代謝物と評価された。

一方、2, 5, 2', 5'-TCB の主代謝物 3-hydroxy 体についても同様な方法で毒性評価がなされた(70)。本 TCB は PB 型の酵素誘導能を有しているが毒性は低い。その結果、母化合物では 0.82 mmol (240 mg/kg) をラットに 1 回腹腔内投与後、肝重量の増加、総肝脂質の減少、benzo[a]pyrene 3-水酸化活性及び benzphetamine N-脱メチル化活性の増加などの有意な変化が観察されたが、等モルの 3-hydroxy 体 (253 mg/kg) 投与の場合、有意な変化は全く観察されなかった。これらの結果から、3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB も解毒産物と評価された。

さらに、S 含有代謝物についても上記と同様な検討が加えられた。原口らは 1985 年 2, 5, 2', 5'-TCB の S 含有代謝物が肝酵素誘導作用を有することを初めて示した(71)。また最近、加藤らは 2, 5, 3', 4'-TCB や 2, 5, 2', 4', 5'-PenCB などの 2, 5-二塩素置換 PCB の 3-CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub> 体が母化合物よりはるかに強い PB 型の肝酵素誘導能を有していることを明らかにした(72-74)。CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub> 体の毒性についてはさらに後述する。

1986 年頃から PCB 代謝物が甲状腺ホルモンや他のステロイドホルモンと類似した作用を有することが報告されてきた。Brouwer と共同研究者らは一水酸化体のうち、特に 4-hydroxy 体が血中の主要な甲状腺ホルモン結合タンパクである transthyretin に高い親和性を有していることを明らかにした(75-77)。この transthyretin は retinol 結合タンパクとともにビタミン A の血中での輸送系を形成していることから、4-hydroxy 体が transthyretin に結合すると、血中の甲状腺ホルモンとビタミン A の血中レベルの減少をもたらすことになる。その後、多くの PCB 異性体の 4-hydroxy 体が血中に高濃度で残留するという結果が数多く報告されてきている(17, 21, 22, 78)。また最近では、ヒト組織に残留しやすい 2, 5-二塩素置換 PCB の 3-及び 4-CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub> 体が血中総甲状腺ホルモン量を有意に減少させることが報告された(79, 80)。

さらに、ある種の PCB 代謝物はエストロゲン様作用を有することが明らかになった(81-83)。例えば、4-hydroxy-2', 4', 6'-TriCB は 4-hydroxy-2', 6'-DCB, 4-hydroxy-3, 5, 4'-TriCB, 及び 4, 4'-dihydroxy-3, 5, 3', 5'-TCB などの水酸化体に比べ、エストロゲン受容体への親和性がずっと高いことが報告された。これらの報告は PCB の水酸化体及び S 含有代謝物がいずれも内分泌攪乱作用を有することを示すものである。

また、Lund らは 2, 5, 2', 5'-TCB の S 含有代謝物である 4, 4'-diCH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-2, 5, 2', 5'-TCB がラットやマウスの肺可溶性画分に存在する特定のタンパク質に親和性を有すること(84)を、さらに Larsen らは同じ代謝物がラット腎可溶性画分に存在する主要な尿タンパク質である  $\alpha_2$ -globulin へ結合すること(85)を報告した。しかしながら、この高い親和性がどのような毒性と関連しているかは現在のところ不明である。

加藤らは PCB 異性体の CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub> 体が細胞間コミュニケーションを阻害することを明らかにした(86)。哺乳動物の細胞はギャップ結合というチャンネルを通していろんな情報をやりとりしているが、このことを細胞間コミュニケーションという。これまでも、細胞間コミュニケーションを阻害す

るものとして、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), coplanar PCB 及び DDT などの発ガンプロモーターが知られており、PCB の  $\text{CH}_3\text{SO}_2$  体も同様に発ガンプロモーターとして作用しうる可能性が示唆された。

このように、PCB 代謝物の毒性評価は PCB の毒性発現機構を解明するためにますます重要となつてきている。

#### 6.1.6. PCDF の代謝

1978 年、黒木と増田は油症患者の肝臓及び脂肪組織に特定の異性体、すなわち 2,3,6,8- と 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF), 1,2,4,7,8- と 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF), 及び 1,2,3,4,7,8- と 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzofuran が他の PCDF 成分に比べ高濃度で残留していることを見出した (87)。中でも、2,3,4,7,8-PenCDF は PCDF 中で最も毒性が強いといわれている異性体であり、両組織中で最高の濃度で検出された。これらの事実は、PCDF においても置換塩素数の違い及び置換された部位の違いにより体外への排泄速度が大きく左右されること、また隣接した 2 個の水素原子をもつ PCDF 異性体は容易に代謝されることを示している。

多くの研究者によって、PCDF の代謝物がいくつか報告されている。PCB の場合と同様に、主代謝物として一水酸化体及びジオール体が、さらに、量的には少ないものの一水酸化体でかつ塩素が一個脱離したものと及び S 含有代謝物も検出されている (88-93)。一方、PCDF に特有な代謝物として、フラン環のエーテル結合が開裂した代謝物が 2,3,7,8-TCDF 投与ラットの胆汁中より見出された (94)。

Brewster と Birnbaum は 1 カ所だけ塩素置換位置が異なる 2 つの PenCDF すなわち 1,2,3,7,8- と 2,3,4,7,8-PenCDF の代謝され易さをラットで比較した。その結果、2,3,4,7,8-PenCDF の方が 1,2,3,7,8-PenCDF よりはるかに代謝されにくいことが明らかになった (95,96)。この事実は PCDF の 1 位(あるいは 9 位)よりは、4 位(あるいは 6 位)の方が P450 による酸化を受けやすい部位であることを示唆している。

さらに、PCDF 代謝に関する特徴として、① 量的には少ないが、PCB の場合と同様に塩素が NIH 転位を起こした代謝物が生成される、② 各芳香環への置換塩素数が少なくとも 3 個になると極端に代謝されにくくなる、という 2 点を挙げることができる。

#### 6.1.7. PCDD の代謝

1986 年、榎本らは高分解能 MS-SIM 分析法を用いて、油症原因油及び油症患者の肝と腸につき PCDD を測定したところ、5 個から 8 個の塩素が置換された PCDD の存在を明らかにした (97)。興味あることに、五塩素化体 (PenCDD)、六塩素化体、七塩素化体及び八塩素化体 (OctaCDD) の存在比をみると、原因油では 1 (13,000 ppt) : 4 : 4 : 1, 油症患者の肝では 1 (63 ppt) : 21 : 11 : 349 であった。これらのことから六塩素化体以上の高塩素化 PCDD は体内残留性が高いこと、特に OctaCDD は顕著であることが明らかである。この報告が発表されるまで油症原因油中には PCDD が含まれていないと考えられていたこともあり、わが国の研究者による PCDD 代謝に関する報告は全くない。

Tulp と Hutzinger は PCDD 異性体として、1-と 2-monochlorodibenzo-*p*-dioxin (MCDD), 2,3-と 2,



7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin, 1, 2, 4-trichlorodibenzo-*p*-dioxin (TriCDD) 及び 1, 2, 3, 4-TCDD をラットに投与したところ、いずれの PCDD の場合にも糞中より一水酸化体及びジオール体が検出されたと報告した (98)。また、尿中より MCDD の S 含有代謝物も微量ながら検出したという。これらの PCDD はいずれも塩素が一方の芳香環にのみ置換されたもので、容易に代謝されたものと思われる。

PCDD に限らず PCB 及び PCDF を含めたすべての異性体中で最強の毒性を示すといわれる 2, 3, 7, 8-TCDD の代謝研究は比較的多く、次のような成果が報告されている (99–107)。すなわち、①動物における 2, 3, 7, 8-TCDD の代謝速度は *in vivo* 系及び *in vitro* 系のいずれの場合にもかなり遅いこと、②母化合物より極性の高い代謝物(例えば、一水酸化体やグルクロン酸抱合体)が生成されること、などである。その中で、Sawahata らは 2, 3, 7, 8-TCDD の代謝物 2 種類の同定に成功した (102)。彼らは <sup>3</sup>H-標識した 2, 3, 7, 8-TCDD をラット遊離肝細胞とともに 37°C で 8 時間インキュベートした後、上清中の放射活性を HPLC で追跡したところ、2 種類の代謝物を見出し、それらが 1-hydroxy-2, 3, 7, 8-TCDD 及び 2-hydroxy-3, 7, 8-TriCDD であることを明らかにした。さらに、Poiger らはイヌに 2, 3, 7, 8-TCDD を投与した後、胆汁中の代謝物を調べ、5 種類のフェノール性代謝物(水酸化体)を検出するとともに、そのうちの 1 つが NIH 転位を示す代謝物の 2-hydroxy-1, 3, 7, 8-TCDD であることを明らかにした (103)。このように、PCDD の場合も PCDF とほとんど同様な代謝パターンで進行すると考えることができる。

一方、油症患者の肝臓に高濃度残留していた Octa CDD の急性毒性は先の 2, 3, 7, 8-TCDD に比べ、ほとんど問題にならないほど弱いとされているが、Birnbaum と Couture は、ラットにおける体内動態を調べ、次のことを明らかにした。すなわち、①小腸からの吸収はかなり悪く、投与量の 10% 以下であること、②代謝物は糞、尿及び各臓器中から全く検出されないこと、③主要な貯蔵部位は肝臓であり、次いで脂肪組織、皮膚の順であること、などが明らかとなった (108)。

## 文 献

- 1) 吉村英敏, 大島美奈子 (1971) カネクロール成分のマウスにおける残留性について. 福岡医誌 62, 5–11.
- 2) Grant, D. L., Philips, W. E. J., Villeneuve, D. C. (1971) Metabolism of a polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) mixture in the rat. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 6, 102–112.
- 3) Hutzinger, O., Nash, D. M., Safe, S., et al. (1972) Polychlorinated biphenyls: Metabolic behavior of pure isomers in pigeons, rats, and brook trout. Science 178, 312–314.
- 4) Matthews, H. B., Anderson, M. W. (1975) Effect of chlorination on the distribution and excretion of polychlorinated biphenyls. Drug Metab. Dispos. 3, 371–380.
- 5) Yoshimura, H., Yamamoto, H. (1973) Metabolic studies on polychlorinated biphenyls. I. Metabolic fate of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl in rats. Chem. Pharm. Bull. 21, 1168–1169.
- 6) Yamamoto, H., Yoshimura, H. (1973) Metabolic studies on polychlorinated biphenyl. III. Complete structure and acute toxicity of the metabolites of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl. Chem. Pharm. Bull. 21, 2237–2242.
- 7) 吉村英敏, 山本弘明, 米沢和明 (1975) PCB の代謝に関する研究(第7報). 2, 5, 2', 5'-テトラクロロビフェニルのラットにおける代謝. 福岡医誌 66, 555–562.
- 8) Sipes, I. G., McKelvie, D. H., Collins, R. (1979) Excretion of hexachlorobiphenyls and 2, 4, 5, 2', 4', 5'-Hexabromobiphenyl in the dog. Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, A155.
- 9) Sipes, I. G., Slocumb, M. L., Perry, D. F., et al. (1982) 2, 4, 5, 2', 4', 5'-Hexachlorobiphenyl: Distribution, metabolism, and excretion in the dog and the monkey. Toxicol. Appl. Pharmacol. 65, 264–272.
- 10) Ariyoshi, N., Oguri, K., Koga, N., et al. (1997) Metabolism of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl in guinea pigs.



- Xenobiotica 27, 973–983.
- 11) Bloch, W. D., Cornish, H. H. (1959) Metabolism of biphenyl and 4-chlorobiphenyl in the rabbit. *J. Biol. Chem.* 234, 3301–3302.
  - 12) Koga, N., Shin'yama, A., Ishida, C., et al. (1992) A new metabolite of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl in rat feces. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 3338–3339.
  - 13) 吉村英敏, 山本弘明 (1974) PCB の代謝に関する研究(第4報). カネクロール 400 の一成分 3, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニルの生体内変化. *福岡医誌* 65, 5–11.
  - 14) Yoshimura, H., Yonemoto, Y., Yamada, H., et al. (1987) Metabolism *in vivo* of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats. *Xenobiotica* 17, 897–910.
  - 15) Koga, N., Beppu, M., Ishida, C., et al. (1989) Further studies on metabolism *in vivo* of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl in rats: identification of minor metabolites in rat faeces. *Xenobiotica* 19, 1307–1318.
  - 16) Klasson-Wehler, E., Bergman, A., Brandt, I., et al. (1989) 3, 3', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl: Excretion and tissue retention of hydroxylated metabolites in the mouse. *Drug Metab. Dispos.* 17, 441–448.
  - 17) Haraguchi, K., Kato, Y., Masuda, Y., et al. (1997) Metabolism of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl via sulphur-containing pathway in rat: liver-specific retention of methylsulphonyl metabolite. *Xenobiotica* 27, 831–842.
  - 18) Gardner, A. M., Chen, J. T., Roach, J. A. G., et al. (1973) Polychlorinated biphenyls: Hydroxylated urinary metabolites of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl identified in rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1377–1384.
  - 19) Yamamoto, H., Yoshimura, H., Fujita, M., et al. (1976) Metabolic and toxicologic evaluation of 2, 3, 4, 3', 4'-pentachlorobiphenyl in rats and mice. *Chem. Pharm. Bull.* 24, 2168–2174.
  - 20) Kuroki, H., Masuda, Y. (1977) Structures and concentrations of the main components of polychlorinated biphenyls retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 6, 469–474.
  - 21) Klasson-Wehler, E., Lindberg, L., Jonsson, C.-J., et al. (1993) Tissue retention and metabolism of 2, 3, 4, 3', 4'-pentachlorobiphenyl in mink and mouse. *Chemosphere* 27, 2397–2412.
  - 22) Haraguchi, K., Kato, Y., Masuda, Y., et al. (1998) Hydroxylation and methylthiolation of mono-ortho-substituted polychlorinated biphenyls in rats: Identification of metabolites with tissue affinity. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1508–1515.
  - 23) Chen, P. R., McKinney, J. D., Matthews, H. B. (1976) Metabolism of 2, 4, 5, 2', 5'-pentachlorobiphenyl in the rat. Qualitative and quantitative aspects. *Drug Metab. Dispos.* 4, 362–367.
  - 24) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N., et al. (1979) Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320, 179–192.
  - 25) Koga, N., Beppu, M., Yoshimura, H. (1990) Metabolism *in vivo* of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolite in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 13, 497–506.
  - 26) 原口浩一, 広瀬由美子, 増田義人, 等 (1999) 3, 3', 4, 4', 5-Penta-および 2, 2', 3, 3', 4, 4'-Hexachlorobiphenyl の代謝研究. *福岡医誌* 90, 210–219.
  - 27) Kato, S., McKinney, J. D., Matthews, H. B. (1980) Metabolism of symmetrical hexachlorobiphenyl isomers in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53, 389–398.
  - 28) Sundstrom, G., Hutzinger, O., Safe, S. (1976) The metabolism of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl by rabbits, rats and mice. *Chemosphere* 5, 249–253.
  - 29) Norback, D. H., Mack, E., Reddy, G., et al. (1981) Metabolism and biliary excretion of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 32, 71–85.
  - 30) Ariyoshi, N., Koga, N., Oguri, K., et al. (1992) Metabolism of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl with liver microsomes of phenobarbital-treated dog, the possible formation of PCB 2, 3-arene oxide intermediate. *Xenobiotica* 22, 1275–1290.
  - 31) Goto, M., Hattori, M., Sugiura, K. (1975) Metabolism of pentachloro- and hexachlorobiphenyls in the rat. *Chemosphere*, 177–180.
  - 32) Ariyoshi, N., Yoshimura, H., Oguri, K. (1993) Identification of *in vitro* metabolites of 2, 4, 6, 2', 4', 6'-hexachlorobiphenyl from phenobarbital-treated dog liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.* 16, 852–857.
  - 33) Mio, T., Sumio, K., Mizutani, T. (1976) Sulfur-containing metabolites of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl, a major component of commercial PCB's. *Chem. Pharm. Bull.* 24, 1958–1960.

- 34) Jensen, S., Jansson, B. (1976) Methylsulphone metabolites of PCB and DDE. *AMBIO* 5, 257–260.
- 35) Haraguchi, K., Athanasiadou, M., Bergman, A., et al. (1992) PCB and PCB methyl sulfones in selected groups of seals from Swedish waters. *AMBIO* 21, 546–549.
- 36) Haraguchi, K., Kuroki, H., Masuda, Y., et al. (1984) Determination of methylthio and methylsulphone polychlorinated biphenyls in tissues of patients with ‘Yusho’. *Food Chem. Toxicol.* 22, 283–288.
- 37) Haraguchi, K., Kuroki, H., Masuda, Y. (1986) Capillary gas chromatographic analysis of methylsulphone metabolites of polychlorinated biphenyls retained in human tissues. *J. Chromatogr.* 361, 239–252.
- 38) Haraguchi, K., Kato, Y., Kimura, R., et al. (1997) Comparative study on formation of hydroxy and sulfur-containing metabolites from different chlorinated biphenyls with 2-substitution in rats. *Drug Metab. Dispos.* 25, 845–852.
- 39) Klasson-Wehler, E., Hovander, L., Lund, B.-O. (1996) 2, 2', 4, 5, 5'-Pentachlorobiphenyl: Comparative metabolism in mink (*Mustela vison*) and mice. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1340–1349.
- 40) Bergman, A., Brandt, I., Darnerud, P. O., et al. (1982) Metabolism of 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl: formation of mono- and bis-methyl sulphone metabolites with a selective affinity for the lung and kidney tissues in mice. *Xenobiotica* 12, 1–7.
- 41) Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., et al. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1–42.
- 42) Kaminsky, L. S., Kennedy, M. W., Adams, S. M., et al. (1981) Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P-450. *Biochemistry* 20, 7379–7384.
- 43) Ishida, C., Koga, N., Hanioka, H., et al. (1991) Metabolism in vitro of 3, 4, 3', 4'- and 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyls by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P-450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14, 276–284.
- 44) Koga, N., Nishimura, N., Kuroki, H., et al. (1994) Metabolism of 3, 5, 3', 5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P4501A1. *Xenobiotica* 24, 775–783.
- 45) Duignan, D. B., Sipes, I. G., Leonard, T. B., et al. (1987) Purification and characterization of the dog hepatic cytochrome P-450 isozyme responsible for the metabolism of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl. *Arch. Biochem. Biophys.* 255, 290–303.
- 46) Graves, P. E., Elhag, G. A., Ciaccio, P. J., et al. (1990) cDNA and deduced amino acid sequences of a dog hepatic cytochrome P450IIB responsible for the metabolism of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl. *Arch. Biochem. Biophys.* 281, 106–115.
- 47) Hasler, J. A., Harlow, G. R., Szklarz, G. D., et al. (1994) Site-directed mutagenesis of putative substrate recognition sites in cytochrome P450 2B11: Importance of amino acid residues 114, 290, and 363 for substrate specificity. *Mol. Pharmacol.* 46, 338–345.
- 48) Liu, J., He, Y. A., Halpert, J. R. (1996) Role of residue 480 in substrate specificity of cytochrome P450 2B5 and 2B11. *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 167–173.
- 49) Harlow, G. R., He, Y. A., Halpert, J. R. (1997) Functional interaction between amino-acid residues 242 and 290 in cytochromes P-450 2B1 and 2B11. *Biochim. Biophys. Acta* 1338, 259–266.
- 50) Koga, N., Kikuichi-Nishimura, N., Yoshimura, H. (1995) Effect of cytochrome P450 inducers on liver microsomal metabolism of tetrachlorobiphenyls in rats, guinea pigs and hamsters. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 705–710.
- 51) Koga, N., Kikuichi-Nishimura, N., Hara, T., et al. (1995) Purification and characterization of a newly identified isoform of cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in hamster liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 464–470.
- 52) Koga, N., Kikuichi, N., Kanamaru, T., et al. (1998) Metabolism of 2, 3', 4', 5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. *Chemosphere* 37, 1985–1904.
- 53) Koga, N., Kikuichi, N., Kanamaru, T., et al. (1996) Hamster liver cytochrome P450 (CYP2A8) as a 4-hydroxylase for 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 685–688.
- 54) Koga, N., Kanamaru, T., Kikuichi, N., et al. (1998) Guinea pig liver cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 60, 898–903.
- 55) Ariyoshi, N., Oguri, K., Koga, N., et al. (1995) Metabolism of highly persistent PCB congener, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 455–460.
- 56) Matsusue, K., Ariyoshi, N., Oguri, K., et al. (1996) Involvement of cytochrome b<sub>5</sub> in the metabolism of

- tetrachlorobiphenyls catalyzed by CYP2B1 and CYP1A1. *Chemosphere* 32, 517–523.
- 57) Safe, S., Jones, D., Hutzinger, O. (1976) Metabolism of 4, 4'-dihalogenobiphenyls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 357–359.
  - 58) Forgue, S. T., Allen, J. R. (1982) Identification of an arene oxide metabolite of 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl by gas chromatography-mass spectroscopy. *Chem. -Biol. Interactions* 40, 233–245.
  - 59) Schmoldt, A., Herzberg, W., Bente, H. F. (1977) On the inhibition of microsomal drug metabolism by polychlorinated biphenyls (PCB) and related phenolic compounds. *Chem. -Biol. Interactions* 16, 191–200.
  - 60) Hesse, S., Mezger, M., Wolff, T. (1978) Activation of [<sup>14</sup>C]chlorobiphenyls to protein-binding metabolites by rat liver microsomes. *Chem. -Biol. Interactions* 20, 355–365.
  - 61) Shimada, T., Sato, R. (1980) Covalent binding of polychlorinated biphenyls to rat liver microsomes *in vitro*: Nature of reactive metabolites and target macromolecules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 490–500.
  - 62) Shimada, T., Imai, Y., Sato, R. (1981) Covalent binding of polychlorinated biphenyls to proteins by reconstituted monooxygenase system containing cytochrome P-450. *Chem. -Biol. Interactions* 38, 29–44.
  - 63) Shimada, T., Sawabe, Y. (1983) Activation of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl to protein-bound metabolites by rat liver microsomal cytochrome P-448-containing monooxygenase system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 70, 486–493.
  - 64) Preston, B. D., Miller, J. A., Miller, E. C. (1983) Non-arene oxide aromatic ring hydroxylation of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl as the major metabolic pathway catalyzed by phenobarbital-induced rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 258, 8304–8311.
  - 65) Bakke, J. E., Bergman, A., Larsen, G. L. (1982) Metabolism of 2, 4', 5-trichlorobiphenyl in the mercapturic acid pathway. *Science* 217, 645–647.
  - 66) Bakke, J. E., Feil, V. J., Bergman, A. (1983) Metabolism of 2, 4', 5-trichlorobiphenyl in rats. *Xenobiotica* 13, 555–564.
  - 67) Bakke, J. E., Bergman, A. L., Brandt, I., et al. (1983) Metabolism of the mercapturic acid of 2, 4', 5-trichlorobiphenyl in rats and mice. *Xenobiotica* 13, 597–605.
  - 68) Mizutani, T., Yamamoto, K., Tajima, K. (1978) Sulfur-containing metabolites of chlorobiphenyl isomers, a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 26, 862–866.
  - 69) Stadnicki, S. S., Allen, J. R. (1979) Toxicity of 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl and its metabolites, 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl-3, 4-oxide and 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl-4-ol to cultured cells *in vitro*. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 23, 788–796.
  - 70) 埴岡伸光, 佐伯和枝エレーナ, 石田忠三, 等 (1991) 2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl とその主代謝物 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl のラットに対する毒性評価. *福岡医誌* 82, 191–196.
  - 71) Haraguchi, K., Kuroki, H., Masuda, Y., et al. (1985) Toxicological evaluation of sulfur-containing metabolites of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in rats. *Chemosphere* 14, 1755–1762.
  - 72) Kato, Y., Haraguchi, K., Kawashima, M., et al. (1995) Characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners. *Chem. -Biol. Interactions* 95, 269–278.
  - 73) Kato, Y., Haraguchi, K., Kawashima, M., et al. (1995) Induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem. -Biol. Interactions* 95, 257–268.
  - 74) Kato, Y., Haraguchi, K., Tomiyasu, K., et al. (1997) Structure-dependent induction of CYP2B1/2 by 3-methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3, 137–144.
  - 75) Brouwer, A., Van den Berg, K. J. (1986) Binding of a metabolite of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85, 301–312.
  - 76) Brouwer, A., Klasson-Wehler, E., Bokdam, M., et al. (1990) Competitive inhibition of thyroxin binding to transthyretin by monohydroxy metabolites of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere* 20, 1257–1262.
  - 77) Brouwer, A. (1991) The role of enzymes in regulating the toxicity of xenobiotics. Role of biotransformation in PCB-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone metabolism in laboratory and wildlife species. *Biochem. Soc. Transact.* 19, 731–737.

- 78) Bergman, A., Klasson-Wehler, E., Kuroki, H. (1994) Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspec.* 102, 464–469.
- 79) Kato, Y., Haraguchi, K., Shibahara, T., et al. (1998) Reduction of thyroid hormone levels by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Arch. Toxicol.* 72, 541–544.
- 80) Kato, Y., Haraguchi, K., Shibahara, T., et al. (1999) Reduction of thyroid hormone levels by methylsulfonyl metabolites of tetra- and pentachlorinated biphenyls in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 48, 51–54.
- 81) Korach, K. S., Sarver, P., Chae, K., et al. (1988) Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol. Pharmacol.* 33, 120–126.
- 82) Jansen, H. T., Cooke, P. S., Porcelli, J., et al. (1993) Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reprod. Toxicol.* 7, 237–248.
- 83) Connor, K., Ramamoorthy, K., Moore, M., et al. (1997) Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 111–123.
- 84) Lund, J., Brandt, I., Poellinger, L., et al. (1985) Target cells for the polychlorinated biphenyl metabolite 4, 4'-bis (methylsulfonyl)-2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl. Characterization of high affinity binding in rat and mouse lung cytosol. *Mol. Pharmacol.* 27, 314–323.
- 85) Larsen, G. L., Bergman, A., Klasson-Wehler, E. (1990) A methylsulfonyl metabolite of a polychlorinated biphenyl can serve as a ligand for  $\alpha_2\mu$ -globulin in rat and major-urinary-protein in mice. *Xenobiotica* 20, 1343–1352.
- 86) Kato, Y., Kenne, K., Haraguchi, K., et al. (1998) Inhibition of cell-cell communication by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rat liver epithelial IAR 20 cells. *Arch. Toxicol.* 72, 178–182.
- 87) Kuroki, H., Masuda, Y. (1978) Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 7, 771–777.
- 88) Veerkamp, W., Wever, J., Hutzinger, O. (1981) The metabolism of some polychlorinated dibenzofurans by rats. *Chemosphere* 10, 397–403.
- 89) Poiger, H., Buser, H. R., Schlatter, C. (1984) The metabolism of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Chemosphere* 13, 351–357.
- 90) Poiger, H., Pluess, N., Buser, H. R. (1989) The metabolism of selected PCDFs in the rat. *Chemosphere* 18, 259–264.
- 91) Pluess, N., Poiger, H., Schlatter, C., et al. (1987) The metabolism of some pentachlorodibenzofurans in the rat. *Xenobiotica* 17, 209–216.
- 92) Kuroki, H., Hattori, R., Haraguchi, K., et al. (1989) Metabolism of 2, 8-dichlorodibenzofuran in rats. *Chemosphere* 19, 803–808.
- 93) Kuroki, H., Haraguchi, K., Masuda, Y. (1990) Metabolism of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in rats. *Chemosphere* 20, 1059–1064.
- 94) Burka, L. T., McGown, S. R., Tomer, K. B. (1991) Identification of the biliary metabolites of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Chemosphere* 21, 1231–1241.
- 95) Brewster, D. W., Birnbaum, L. S. (1987) Disposition and excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90, 243–252.
- 96) Brewster, D. W., Birnbaum, L. S. (1988) Disposition of 1, 2, 3, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 95, 490–498.
- 97) 檜本 隆, 宮田秀明, 高山幸司, 等 (1987) 高性能 MS-SIM 法による油症患者組織および原油中の PCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs. *福岡医誌* 78, 325–336.
- 98) Tulp, M. T. M., Hutzinger, O. (1978) Identification of hydroxylated chlorodibenzo-*p*-dioxins, chlorodibenzofurans, chlorodiphenyl ethers and chloronaphthalenes as their methyl ethers by gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.* 5, 224–231.
- 99) Poiger, H., Schlatter, C. (1979) Biological degradation of TCDD in rats. *Nature* 281, 706–707.
- 100) Olson, J. R., Gasiewicz, T. A., Neal, R. A. (1980) Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the golden syrian hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 56, 78–85.
- 101) Ramsey, J. C., Hefner, J. G., Karbowski, R. J., et al. (1982) The *in vivo* biotransformation of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65, 180–184.

- 102) Sawahata, T., Olson, J. R., Neal, R. A. (1982) Identification of metabolites of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) formed on incubation with isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 341–346.
- 103) Poiger, H., Buser, H.-R., Weber, H., et al. (1982) Structure elucidation of mammalian TCDD-metabolites. *Experientia* 38, 484–486.
- 104) Kleeman, J. M., Olson, J. R., Chen, S. M., et al. (1986) Metabolism and disposition of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83, 391–401.
- 105) Olson, J. R. (1986) Metabolism and disposition of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85, 263–273.
- 106) Wroblewski, V. J., Olson, J. R. (1985) Hepatic metabolism of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the rat and guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81, 231–240.
- 107) Wroblewski, V. J., Olson, J. R. (1988) Effect of monooxygenase inducers and inhibitors on the hepatic metabolism of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat and hamster. *Drug Metab. Dispos.* 16, 43–51.
- 108) Birnbaum, L. S., Couture, L. A. (1988) Disposition of octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) in male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93, 22–30.

## 6.2. 実験動物における PCB および関連化学物質による肝臓酵素の誘導作用と毒性

吉原新一，吉村英敏

### 6.2.1. 序 論

医薬品や環境汚染物質など本来生体内には存在しない外来性の化学物質(生体異物; Xenobiotics)が体内に侵入した場合，生体はそれを速やかに体外に排泄するための自己防御機構を備えている。その最も重要なものが肝などにおける薬物(異物)代謝酵素の働きである(前節 6.1 参照)。そして PCB の曝露を受けた動物に見られる最も顕著な生化学的応答の一つが，肝のミクロソームに存在する薬物代謝酵素系 (Mixed function oxidase system; MFO) に対する強力でかつ長期にわたる酵素誘導作用である (1, 2)。この酵素系はヘムたんぱく質の一種であるチトクロム P-450 (P450) とその還元酵素であるフラビンたんぱく質の NADPH-P450 還元酵素により構成されるが，ともに PCB による誘導を受ける。また，このほかにも種々の肝酵素が影響を受けることが知られている。PCB 曝露の結果起こる MFO 誘導作用は，侵入した生体異物の代謝，排泄の促進を図るための一種の適応現象と考えられるが，この MFO を構成する P450 分子種の中には医薬品や環境汚染物質などの生体異物ばかりでなく，ステロイドや脂肪酸，さらには脂溶性ビタミンなど生理的に重要な一部の内因性物質を基質とするものもあり生体恒常性への影響が危惧される。

MFO による代謝の本来的意義は脂溶性の高い基質化合物の酸化による極性の増大化を通して水溶性を高め，体外への排泄促進をはかるところにあるが，基質の化学構造の変換を伴うため結果的に生物活性の変化がもたらされる。通常本来の活性が減弱される(代謝的不活性化; 薬効低下や解毒)ことが多いが，時としてかえって生物活性が増大したり，新たに活性を獲得する(代謝的活性化; 薬効増大や毒性化)ようになるケースもある。このような事実を背景として考えれば，これらの代謝活性を長期にわたり高レベルで維持し続ける PCB による MFO の誘導現象が，生体にとって何らかの有害な影響をもたらすであろうことは容易に想像しうる。従って油症の毒性発現機構を明らかにする基礎的研究の重要な柱の一つとして，PCB や PCDF などの油症原因物質による MFO をはじめとする数種の肝酵素に対する誘導作用と毒性との関連性について，実験動物を用いて検討を加えた。

### 6.2.2. PCB 混合物(カネクロール)による肝 MFO に対する誘導作用

ある種の化合物の前投与によって薬物代謝活性が高まるという酵素誘導現象は，MFO の本態がミクロソーム画分の P450 であるということが明らかにされる (3) 以前に，発癌性多環芳香族炭化水素の一種である 3-メチルコラントレン (MC) (4) やバルビツール酸系催眠薬のフェノバルビタール (PB) (5) について既に知られていた。しかし，環境汚染物質として注目されはじめていた PCB に，同様の酵素誘導作用があることが見いだされたのは 1968 年 Risebrough ら (6) によってである。彼



らは Monsanto 社の PCB 製品の一つアロクロール 1260 (AC-1260) を前投与したハトの肝ではエストラジオールの代謝が促進されることを見いだした。一方、油症事件発生後間もなくして、小松および田中 (7) は油症原因物質となったカネクロール 400 (KC-400) や KC-500 を前投与したラットで、催眠薬ヘキソバルビタールによる睡眠時間が短縮されることを観察した。相前後して藤田ら (1) により KC-400, KC-500 および KC-600 など塩素化度が異なる PCB 製品で前処理したラット肝ミクロソームによる、*p*-ニトロフェネトールの O-脱エチル化、*p*-クロロ-N-メチルアニリンの N-脱メチル化およびアニリン水酸化などの薬物代謝活性が、代謝反応の種類によって程度は異なるもののいずれも顕著に増加することが見いだされた。

現在までラットやマウスなどの実験動物の肝 MFO に対する酵素誘導剤としては多種多様な化合物が報告されているが、それらの多くは以下に述べるような幾つかの特徴点に基づいて PB 型もしくは MC 型のどちらかに大別しうる (8)。PB 型誘導剤はエチルモルヒネやベンツフェタミンなどを含む幅広い基質の代謝活性を増大するのに対して、MC 型誘導剤は発癌性多環芳香族のベンツピレンなど比較的限られた化合物の代謝能を上昇させるという特徴がある。さらにこれら PB 誘導性 P450 と MC 誘導性 P450 では基質特異性の他に、P450 を特徴付ける分光学的性質、即ち還元型ヘムに一酸化炭素 (CO) が配位した時の差スペクトルのピーク位置が前者では 450 nm 付近を与える (PB P450) のに対して後者は 448 nm 付近を示す (MC P448) という特徴がある。その後現在に至りラット肝ミクロソーム中には 20 種を超える薬物代謝型 P450 分子種が存在すること、そのうち P450 2B1 と P450 2B2 は PB 型誘導剤によって誘導される主要分子種であり、一方 P450 1A1 と P450 1A2 は MC 型誘導剤によって誘導される主要分子種であることが明らかにされた。つまり、MFO 誘導剤としての特徴は、結局はそれによって誘導される P450 分子種の違いに帰せられることが判った。

しかし、P450 の分子多様性が未だ充分には明らかにされていなかった 1973 年、Alvares ら (9) は AC-1254 で前処理したラット肝ミクロソームでは、PB P450 の指標活性の一つと考えられていたエチルモルヒネの N-脱メチル化活性と MC P448 の指標活性であるベンツピレンの 3-位水酸化 (AHH) 活性の両者が増加することを見いだした。そして、その CO 差スペクトルが 448 nm を示すことなどから、AC-1254 で誘導される P450 分子種は MC P448 とは異なる性質のものであるか、または AC-1254 は PB P450 と MC P448 の両者を誘導しうるのか、いずれにしても PCB は従来にない新しいタイプの誘導剤ではないかと報告した。しかしながら、上記のような誘導特性を示す AC-1254 が平均塩素含量 54% を与える種々の PCB 混合物からなる製品であることを考慮するともう一つ新たな可能性が考えられた。つまり、PCB 混合物製品中の個々の PCB には実は PB 型誘導能をもったものと MC 型誘導能を持ったものとが混在するのではないかという可能性である。

そこで我々はこの疑問に答えるべく、まず平均塩素含量 48% の PCB 混合物製品である KC-400 中の主要構成 PCB 数種を化学的に別途合成し、KC-400 とこれら単一 PCB との MFO 誘導能の比較検討から着手した。そしてその結果は表 6.2.1 に示すように、KC-400 の誘導能は Alvares らが報告した AC-1254 のそれと同じく PB と MC を同時投与した時のパターンを示したのに対し、個々の PCB は PB 型誘導能を示すもの (4, 4'-dichlorobiphenyl; 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl (TCB); 2, 4, 3', 4'-TCB) と MC 型誘導能を示すもの (3, 4, 3', 4'-TCB; 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB); 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (HCB)) とに分類しうるということが明らかとなった (10)。即ち、観察された

表 6.2.1. KC-400 および各種単一 PCB が及ぼすラット肝薬物代謝酵素系に対する誘導作用

| 前処理                     | アミノピリン<br>N-脱メチル化     | アニリン<br>水酸化           | チトクロム<br>P-450 量      | チトクロム<br>b <sub>5</sub> 量 | NADPH-チトクロム C<br>還元酵素活性 |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| 未処理                     | 100 ± 2               | 100 ± 1               | 100 ± 3               | 100 ± 6                   | 100 ± 1                 |
| MC                      | 115 ± 13              | 174 ± 7 <sup>a</sup>  | 157 ± 8 <sup>a</sup>  | 118 ± 13                  | 107 ± 9                 |
| PB                      | 214 ± 11 <sup>a</sup> | 202 ± 9 <sup>a</sup>  | 242 ± 10 <sup>a</sup> | 154 ± 9 <sup>a</sup>      | 195 ± 7 <sup>a</sup>    |
| MC + PB                 | 230 ± 2 <sup>a</sup>  | 281 ± 8 <sup>a</sup>  | 326 ± 14 <sup>a</sup> | 159 ± 2 <sup>a</sup>      | 214 ± 0 <sup>a</sup>    |
| 未処理                     | 100 ± 2               | 100 ± 3               | 100 ± 4               | 100 ± 6                   | 100 ± 2                 |
| 4, 4'-DCB               | 210 ± 7 <sup>a</sup>  | 161 ± 7 <sup>a</sup>  | 176 ± 1 <sup>a</sup>  | 152 ± 5 <sup>a</sup>      | 143 ± 4 <sup>a</sup>    |
| 2, 5, 2', 5'-TCB        | 153 ± 4 <sup>a</sup>  | 142 ± 5 <sup>a</sup>  | 160 ± 7 <sup>a</sup>  | 146 ± 1 <sup>a</sup>      | 138 ± 3 <sup>a</sup>    |
| 2, 4, 3', 4'-TCB        | 197 ± 12 <sup>a</sup> | 198 ± 6 <sup>a</sup>  | 203 ± 9 <sup>a</sup>  | 164 ± 6 <sup>a</sup>      | 179 ± 13 <sup>a</sup>   |
| 3, 4, 3', 4'-TCB        | 99 ± 2                | 140 ± 4 <sup>a</sup>  | 172 ± 1 <sup>a</sup>  | 94 ± 2                    | 95 ± 0                  |
| 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB   | 84 ± 14               | 162 ± 1 <sup>a</sup>  | 182 ± 1 <sup>a</sup>  | 120 ± 10                  | 94 ± 4                  |
| 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB | 107 ± 9               | 199 ± 9 <sup>a</sup>  | 163 ± 9 <sup>a</sup>  | 105 ± 3                   | 108 ± 2                 |
| DecaCB                  | 186 ± 4 <sup>a</sup>  | 148 ± 2 <sup>a</sup>  | 174 ± 5 <sup>a</sup>  | 122 ± 1 <sup>a</sup>      | 116 ± 2 <sup>a</sup>    |
| KC-400                  | 215 ± 11 <sup>a</sup> | 297 ± 21 <sup>a</sup> | 277 ± 15 <sup>a</sup> | 187 ± 19 <sup>a</sup>     | 196 ± 13 <sup>a</sup>   |

PB (90mg/kg)は1日1回2日間皮下投与, MC (40mg/kg)は1日1回2日間腹腔内投与し, 最終投与24 hr後に屠殺. DCB, 2, 5, 2', 5'-TCB, Deca CB および KC-400 は各 100 mg/kg を, 3, 4, 3', 4'-TCB は 50 mg/kg を1日1回3日間腹腔内投与し, 初回投与後5日目に屠殺. また, 2, 4, 3', 4'-TCB (100 mg/kg), 3, 4, 5, 3', 4'-Pen CB (0.5 mg/kg)および3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB (1mg/kg)は, 1回腹腔内投与し, 5日目に屠殺し実験に供した.

アミノピリン N-脱メチル化, アニリン水酸化および NADPH-チトクロム C 還元酵素の各活性ならびにミクロソーム中のチトクロム P-450 およびチトクロム b<sub>5</sub> の各含量はいずれも未処理ラットの各数値(100)に対する相対値(3~7匹のラットの平均値 ± 標準誤差)として示した.

<sup>a</sup>: 未処理ラットに比し統計的に有意な差(P<0.05).

文献 10)より引用.

AC-1254 や KC-400 などの PCB 混合物製品が PB と MC の両者の誘導能を合わせ持つという一見ユニークな性質は, それぞれのタイプの誘導能を示す個々の単一 PCB の混在によってもたらされていることが結論された。

### 6.2.3. 単一 PCB による肝 MFO および DT-ジアホラーゼの誘導と毒性

個々の単一 PCB の多くは MFO 誘導能に関して PB 型と MC 型のどちらかに大別しようという我々の結論とほぼ同じ結果が, アメリカの研究者グループによっても独立して報告された(11)。そして MC 型 MFO 誘導能に関する構造活性相関については, 少なくともビフェニル骨格の 3, 4, 3' および 4' 位への塩素置換を要するというのも, この時点で両グループが到達した共通の認識であった。他方, Poland と Glover (12) は肝性ポルフィリン症の生化学的背景に関する研究の過程で, 鶏胚肝の AHH 活性や  $\delta$ -アミノレブリン酸合成酵素活性が用量依存的に 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; ダイオキシン)によって強く誘導されることを見いだした。さらに彼らは MC P448 の指標活性でもある AHH 活性の誘導能に関する構造活性相関について詳細に検討を加えた結果, dibenzo-*p*-dioxin 類 (13) をはじめ dibenzofuran 類 (13), azoxybenzene 類 (14) および biphenyl 類 (15) など, 各種のハロゲン置換芳香族化合物のうち平面構造(コプラナー: coplanar)を取りうるものが AHH 誘導能(MC 型誘導能)を示すことを明らかにした。その後この構造活性相関は肝サイトソーム中に存在する受容体タンパク質(Ah-レセプター)に対する親和性と関連すること, さらにこの Ah-レセプ

ターがダイオキシン類による毒性発現にも関与している可能性が示唆された(16)。

しかし一方、個々の単一 PCB の毒性に関する研究は 1970 年代後半にかかるまで余り多く見受けられないが、わずかに Goldstein らは対称的位置に塩素置換を有する 5 種の 6 塩素化ビフェニル (2, 3, 4, 2', 3', 4'-, 2, 3, 6, 2', 3', 6'-, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-, 2, 4, 6, 2', 4', 6'- および 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB) について、ヒヨコを用いた毒性研究を行なっている(17, 18)。その結果、MC 型誘導能を持つ 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB においてのみ胸腺の萎縮や水腫など 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) と類似した毒性が発現されることを認めている。

そこでこれらの背景をもとに、我々は PCB による酵素誘導作用と毒性との関連性を明らかにすべく、PB 型もしくは MC 型に分類される数種の単一 PCB の誘導能と急性毒性についてラットを用いて検討を開始した(19)。その結果は図 6.2.1 (右) に示すように、MFO 誘導能に関しては 2, 5, 2', 5'- および 2, 4, 3', 4'-TCB と 2, 3, 4, 3', 4'-PenCB は未処理群 (1.0) に比し PB P450 の指標活性であるベンズフェタミン N-脱メチル化活性 (BZ 脱メチル化) (20) を増加させるのに対して、3, 4, 5, 3', 4', 5'-PenCB および 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB は MC P448 の指標活性であるベンツピレン 3-水酸化 (AHH) 活

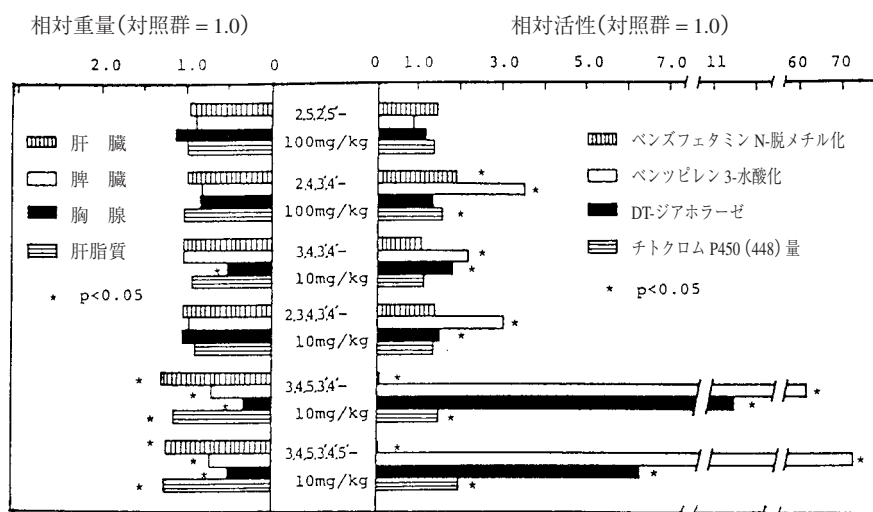


図 6.2.1. 各種単一 PCB が及ぼすラット肝薬物代謝酵素活性ならびに臓器重量への影響

(右) 各酵素活性およびチトクロム P450 (448) 含量は以下に示す対照群の各数値(平均値 ± 標準偏差)に対する相対値として示した。

ベンズフェタミン N-脱メチル化活性,  $12.93 \pm 1.52$  nmol HCHO 生成 / mg タンパク / 15 分間; ベンツピレン 3-水酸化活性,  $1.35 \pm 0.06$  nmol 3-OH ベンツピレン生成 / mg タンパク / 5 分間; DT-ジアホラーゼ活性,  $0.583 \pm 0.072$   $\mu$ mol DCPIP 還元 / mg タンパク / 1 分間; チトクロム P450 (448) 含量,  $0.144 \pm 0.008$  nmol / mg タンパク。

(左) 各臓器重量(g/100g 体重)および肝脂質量(mg/g 肝重量)は以下に示す対照群の各数値(平均値 ± 標準偏差)に対する相対値として示した。

肝臓重量,  $3.60 \pm 0.25$ ; 脾臓重量,  $0.558 \pm 0.091$ ; 胸腺重量,  $0.252 \pm 0.058$ ; 肝脂質量,  $44.79 \pm 4.98$ 。

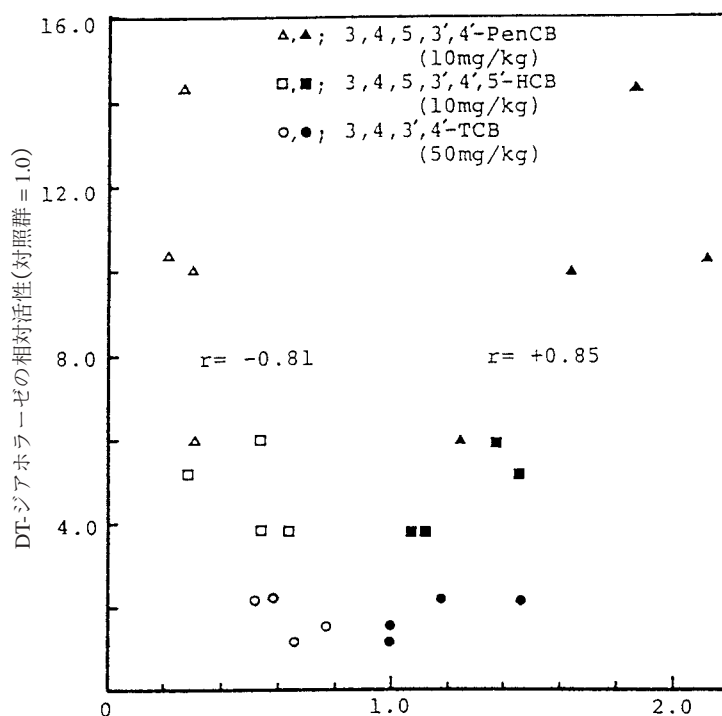
文献 19) より引用。

性 (20) を著しく増大させた。また、MC 型 PCB の原型とみなされる 3, 4, 3', 4'-TCB は 10 mg/kg の腹腔内単回投与では弱い誘導能しか示さなかったが、50 mg/kg では十分に強い誘導能が認められた。これらの結果は概ね表 6.2.1 のそれと一致するものであった。

さらに MC 型 PCB の酵素誘導能に関して新たに明らかになった興味深い点は、DT-ジアホラーゼ [NAD(P)H: (quinone-acceptor) oxidoreductase, EC 1.6.99.2] に対する強力な誘導作用である。サイトソールに局在するフラビン酵素の一種であるこの DT-ジアホラーゼについては、NADH および NADPH の両者をほぼ等しく電子供与体としてキノン類をヒドロキノンにまで還元することによりキノンやセミキノン・ラジカルの毒性を軽減することが知られている (21)。また以下に述べるように、ある種のニトロ化合物の還元を触媒しうることなども知られているが、生理的意義の詳細は余り明らかではない。この酵素の誘導現象については 2, 3, 7, 8-TCDD (22) や MC (23) によって誘導されることは知られていたが、MC 型 PCB による誘導は今回初めて明らかとなった。またその誘導能は 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB において最も強く、ついで 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB, 3, 4, 3', 4'-TCB の順となり、各 MC 型 PCB による AHH と DT-ジアホラーゼに対する誘導能の強さは概ねパラレルな関係にあった。もしこのことが共通の誘導メカニズムの存在を示唆するものであれば機能も細胞内局在性も異なる両酵素の誘導現象の生物学的意義を考えるうえで極めて興味深い。DT-ジアホラーゼの誘導現象に関する毒性学的意義の一つは、本酵素が典型的な化学発癌剤の一種である 4-ニトロキノリン N-オキシド (4-NQO) の活性化反応を触媒する (24) という点であろう。事実、1 mg/kg の 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 前投与ラットでは肝、肺および皮膚組織で 4-NQO を究極の発癌体である 4-ヒドロキシアミノキノリン N-オキシドへ還元する活性が顕著に高くなることが確かめられ (25)、MC 型 PCB 曝露ラットにおける 4-NQO による発癌の危険性の増大が予想される。

次にこれら 6 種の単一 PCB の急性毒性を、酵素誘導作用を検討した同じラットについて、臓器重量や肝脂質量の変化を未処理ラットの体重 100 g 当たりの各臓器重量および肝脂質量に対する相対値として示したのが図 6.2.1 (左) である。2 種の PB 型 PCB 2, 5, 2', 5'- および 2, 4, 3', 4'-TCB 100 mg/kg または中間型 PCB と考えられる 2, 3, 4, 3', 4'-PenCB 10 mg/kg 単回投与後 5 日目の各指標は殆ど影響を受けなかった。それに対して 3 種の MC 型 PCB (3, 4, 3', 4', -TCB; 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB; 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB) 10 mg/kg 投与では MC 型誘導能の強さとほぼ相関して肝重量や肝脂質量の増加と胸腺や脾臓の萎縮が観察された。これらの毒性指標のうち肝肥大や脂肪肝については PCB 混合物製品投与ラット (26, 27) で、また胸腺や脾臓の萎縮については PCB 製品およびその関連化合物による毒性の鋭敏な指標として既に報告されていたものである (28)。今回の結果から、AC-1254 や KC-400 などの PCB 混合物製品投与によって認められる脂肪肝や胸腺の萎縮は、その構成 PCB として含まれている MC 型 PCB によるものであることが明らかとなった。そしてこれら MC 型 PCB の毒性の強さ (肝脂質量の増加や胸腺の萎縮) は、それらが有する MC 型誘導能 (DT-ジアホラーゼの誘導) の強さとよく相関することが判る (図 6.2.2)。強力な MC 型誘導能を示す PCB の急性毒性は、単回投与後、5 日間にわたる体重減少 (3, 4, 5, 3', 4'-PenCB) や体重増加の抑制 (3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB) としても現れた。

油症の病像を考察するうえで大きな関心をもたれるのは、油症患者に摂取され、依然として体内に残留する PCB の毒性評価である。患者体内に摂取された原因油中の脂溶性の高い各種 PCB も長



胸腺の相対重量(白抜き記号)または肝脂質の相対重量(黒塗り記号)(対照群 = 1.0)

図 6.2.2. 各種 MC 型 PCB 前処理ラットにおける肝 DT-ジアホラーゼの誘導と毒性との相関性  
文献 19) より引用.

い時間の経過とともに、特に代謝されやすい塩素化度の低いものを中心に徐々に体外へと排泄されていくことになる(第 4 章および第 6 章 6.1 参照)。従って、油症事件発生後 9 年の時点では代謝され難い 6 および 7 塩素化 PCB など数種の高塩素化 PCB が有意に高い残留を示した (29)。それらはいずれもそれぞれのフェニル環の 3, 4, 5 位に塩素置換を有するものであり、その構造からなにがしかの MC 型誘導能が予想される。そこで油症患者体内に高濃度で残留する高塩素化 PCB のうち 2, 4, 5, 3', 4'-PenCB, 2, 3, 4, 5, 3', 4'-HCB, 2, 3, 4, 5, 2', 3', 4'- および 2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'-heptachlorobiphenyl (HepCB) の 4 種の単一 PCB について前記同様、ラットを用いて酵素誘導能と急性毒性を検討した (30)。その結果、図 6.2.3 (右) に示すように、比較対照に用いた最強の毒性を示す 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB に比べるとかなり弱いものの、2, 3, 4, 5, 3', 4'-HCB には明瞭に AHH と DT-ジアホラーゼの誘導作用が認められた。2, 4, 5, 3', 4'-PenCB によってもさらに弱い MC 型誘導能が示された。一方、2, 3, 4, 5, 2', 3', 4'- および 2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'-HepCB の両者は AHH よりも BZ 脱メチル化活性の誘導が優位となる、いわゆる PB 型誘導剤の特徴を示した。これらの誘導能を反映して MC 型 PCB の 2, 3, 4, 5, 3', 4'-HCB と 2, 4, 5, 3', 4'-PenCB の 2 者には弱いながらも有意な肝肥大と胸腺の萎縮が認められた(図 6.2.3 左)。従って、事件発生後 9 年をへても患者体内に高濃度で残留する MC 型 PCB が持続する症状の一因となっている可能性は否定できない。また、ここで対照に用いた最強の毒性を示す 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB は当初モデル化合物として我々によって初めて合成された PCB



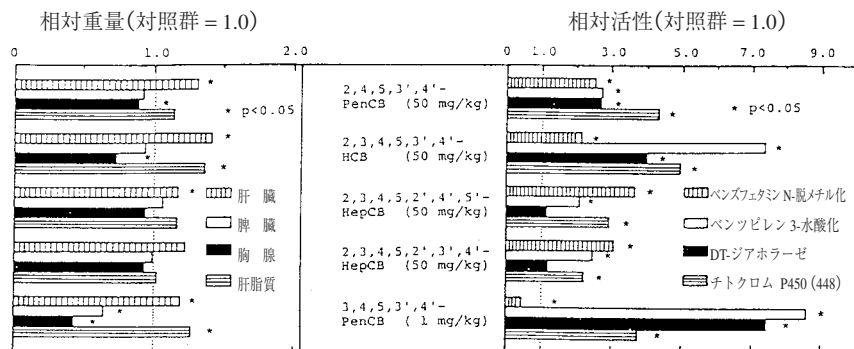


図 6.2.3. 油症患者体内に残留する高塩素化 PCB が及ぼすラット肝薬物代謝酵素活性ならびに臓器重量への影響

(右) 各酵素活性およびチトクロム P450 (448) 含量は以下に示す対照群の各数値(平均値±標準偏差)に対する相対値として示した。

ベンゾフルオレン N-脱メチル化活性,  $17.77 \pm 2.45$  nmol HCHO 生成/mg タンパク/15 分間; ベンツピレン 3-水酸化活性,  $0.109 \pm 0.033$  nmol 3-OH ベンツピレン生成/mg タンパク/15 分間; DT-ジアホラーゼ活性,  $0.134 \pm 0.052$   $\mu$ mol DCPIP 還元/mg タンパク/1 分間; チトクロム P450 (448) 含量,  $0.214 \pm 0.016$  nmol/mg タンパク。

(左) 各臓器重量(g/100g 体重)および肝脂質量(mg/g 肝重量)は以下に示す対照群の各数値(平均値±標準偏差)に対する相対値として示した。

肝臓重量,  $4.04 \pm 0.10$ ; 脾臓重量,  $0.556 \pm 0.044$ ; 胸腺重量,  $0.456 \pm 0.019$ ; 肝脂質量,  $50.78 \pm 2.77$ 。

文献 30) より一部改変引用。

(10, 31) であったが、その後このものの相対毒性 (toxic equivalency factor: TEF) は 2, 3, 7, 8-TCDD の 1/10 に相当すること (32) が明らかにされるとともに、極めて低濃度ではあるが原因油中のみならず患者体内からも検出された (33) ことは注目に値する。

いずれにしてもこれまでの実験結果から、PCB による急性毒性は PB 型 PCB よりも MC 型 PCBの方がはるかに強いこと、また MC 型 PCB による毒性は MC 型誘導能と高い相関性を示すことが明らかとなった(図 6.2.1 および図 6.2.2 参照)。しかし、現在のところ PCB による急性毒性と MC 型誘導能とがいかなる関連でつながるのかという点是不明である。また一方では MC 型誘導剤の原型である MC 自身には弱い肝肥大傾向やわずかな胸腺の萎縮は認められるものの、その他の多くの MC 型 PCB に特徴的な毒性は認められない。これらの意味するところも今後の研究にまたねばならない。

表 6.2.2 は油症原因油中に存在する多くの PCB のうち、これまで検討した 17 種の単一 PCB を MFO 誘導剤としての性質に基づいて分類した結果である (34)。これから判るように、単一 PCB の MFO 誘導剤としての性質とそれらの塩素置換構造との間には次のような一定の構造-活性相関がうかがえる。すなわち、① MC 型誘導能を発揮するための最低条件は、ビフェニル骨格の両外側 6 カ所(メタ位およびパラ位; 3, 4, 5, 3', 4' および 5') のうち少なくとも隣り合う 4 カ所に塩素置換を有する。つまり、このような構造の PCB は 2 つのフェニル基の近接位(オルト位; 2, 2', 6 および 6')に塩素



表 6.2.2. 各種単一 PCB の肝薬物代謝酵素系に対する PB 型および MC 型誘導剤としての分類

| 塩素置換数 | PB 型 PCB                                           | 中間型 PCB                              | MC 型 PCB                                    |
|-------|----------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|
| 2     | 4, 4'-<br>3, 3'-                                   |                                      |                                             |
| 4     | 2, 4, 3', 4'-<br>2, 5, 2', 5'-<br>2, 4, 2', 4'-    |                                      | 3, 4, 3', 4'-                               |
| 5     |                                                    | 2, 4, 5, 3', 4'-<br>2, 3, 4, 3', 4'- | 3, 4, 5, 3', 4'-                            |
| 6     | 2, 4, 5, 2', 3', 4', 5'-<br>2, 3, 4, 2', 3', 4'-   |                                      | 3, 4, 5, 3', 4', 5'-<br>2, 3, 4, 5, 3', 4'- |
| 7     | 2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'-<br>2, 3, 4, 5, 2', 3', 4'- |                                      |                                             |
| 8     | 2, 3, 4, 5, 2', 3', 4', 5'-                        |                                      |                                             |
| 10    | 2, 3, 4, 5, 6, 2', 3', 4', 5', 6'-                 |                                      |                                             |

文献 34)より引用.

置換を有しないため(ノン・オルト PCB), 立体的障害をうけずに両フェニル基の自由な回転が可能となり, 結果的に両フェニル基の平面性(coplanarity)が維持される。従って, 3, 4, 3', 4'-TCB がその基本型となるようなこの種の構造特性を有する一群の PCB をコプラナー(coplanar) PCB と呼ぶ。

② MC 型の基本型 3, 4, 3', 4'-TCB の残るメタ位(5 および 5') へのさらなる塩素置換(3, 4, 5, 3', 4'-PenCB および 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB) は MC 型誘導能の増強をもたらす。一方, この基本型のオルト位への塩素置換(2, 3, 4, 3', 4'- および 2, 4, 5, 3', 4'-PenCB; モノ・オルト PCB) は PB 型誘導能を付与される結果, 中間型を示すようになる。

③ 4 カ所のオルト位のうち, 2 カ所以上に塩素置換(2, 5, 2', 5'-TCB, 2, 4, 5, 2', 4', 5'- および 2, 3, 4, 2', 3', 4'-HCB, 2, 3, 4, 5, 2', 3', 4'- および 2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'-HepCB; ジ・オルト PCB) が起こると PB 型誘導能を示すようになる。一般的にはその構造特性を保持したままで塩素化度が増せばそのタイプの誘導能は強まる傾向を示す。

#### 6.2.4. PCDF による肝 MFO および DT-ジアホラーゼの誘導と毒性

事件発生当初は原因油中の汚染化学物質としては, ライスオイルの製造工程で加熱媒体として使用された PCB 製品の KC-400 に由来する PCB だけが注目された。しかし, その後の精査により原因油中には PCB と同程度のポリ塩素化クォーターフェニル(PCQ) (35) の他に, PCB の 1/100 以下程度ではあるがポリ塩素化ジベンゾフラン(PCDF) (36) の混在が明らかとなった(第 4 章参照)。これらの PCB 関連化合物は患者体内からも検出(37, 38)されるに至り, その毒性評価が新たな課題となった。特に PCDF 混合物についてはヒヨコ(39), ラット(40) およびマウス(41)において, PCB 混合物と類似するが, それよりもはるかに強い毒性を示すことが報告されているため, その存在量は少ないものの油症原因物質としての寄与は無視出来ないと予想された。しかし, 我々が系統的研究を開始するまでは, 理論上 135 種の異性体の存在の可能性がある個々の単一 PCDF の毒性に

については、わずかに 1, 4, 8-trichlorodibenzofuran (42), 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) (17, 43) および 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) (43) の例しか見当たらなかった。

一方、鶏胚肝での AHH 活性の誘導における構造活性相関について検討した Poland ら (13) は、PCDF の AHH 誘導能(MC 型)には 2, 3, 7 および 8 位への塩素置換が重要であることを見いだしている。ここで PCDF 分子の構造上の特徴について見れば、その基本構造であるジベンゾフラン環はダイオキシンの基本構造であるジベンゾ-*p*-ダイオキシン環と同様、もともと平面構造が確定されている。従って、PCB やダイオキシン類などの多塩素化芳香族化合物の MC 型誘導能において明らかとなった構造活性相関(前項参照)に照らせば、PCDF には PB 型誘導能は認められず、その MC 型誘導能の強さ、ひいては毒性の強さには塩素置換の位置と数が大きく関与することが予想された。そこでこれらを確認するべく、油症患者の体内に残留していることが知られている数種の多塩素化 PCDF を含む合計 13 種の単一 PCDF について、その肝酵素誘導能と急性毒性に関して PCB の場合と同様にラットを用いて検討した (44)。

表 6.2.3 に今回検討した単一 PCDF の構造特性を示す。このうち 9 種は原因油中に存在することが確かめられたものであり、さらにそのうち 6 種は患者体内から検出された PCDF である (45)。一旦摂取された PCDF の体内からの消失速度は一般にはそのものの代謝され易さによって規定される。この種の化合物ではジベンゾフラン環上に塩素置換を受けない水素原子が隣り合わせに存在するものほど代謝され易いと考えられ、実際にもその傾向がうかがえる。そして先の構造活性相関からジベンゾフラン環の両外側 4 カ所 (2, 3, 7 および 8 位; lateral position) のうち 3 カ所以上に塩素置換があれば MC 型誘導能が期待される。

その結果は図 6.2.4 (右)に示す通り、2, 3, 7 および 8 位のうち 3 カ所以上に塩素置換を有する 9 種

表 6.2.3. 油症患者体内に残留する単一 PCDF の構造特性

| 単一 PCDF           | 存在確認 <sup>a</sup> |      | 隣り合わせの<br>H 原子の有無 <sup>b</sup> | 両外側に 3 個以上<br>の塩素置換の有無 <sup>c</sup> |
|-------------------|-------------------|------|--------------------------------|-------------------------------------|
|                   | 原因油中              | 患者体内 |                                |                                     |
| 2, 8-             | —                 | —    | ○                              |                                     |
| 1, 2, 7, 8-       | —                 | —    | ○                              | ○                                   |
| 1, 3, 6, 7-       | —                 | —    | ○                              |                                     |
| 1, 3, 6, 8-       | —                 | —    |                                |                                     |
| 2, 3, 6, 7-       | +                 | 不検出  | ○                              | ○                                   |
| 2, 3, 7, 8-       | +++               | +    |                                | ○                                   |
| 1, 2, 3, 7, 8-    | ++                | +    |                                | ○                                   |
| 1, 2, 4, 6, 8-    | +                 | 痕跡程度 |                                |                                     |
| 1, 2, 6, 7, 8-    | ++                | 痕跡程度 | ○                              | ○                                   |
| 2, 3, 4, 6, 7-    | ++                | 不検出  | ○                              | ○                                   |
| 2, 3, 4, 7, 8-    | +++               | +++  |                                | ○                                   |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7- | ++                | 不検出  | ○                              | ○                                   |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8- | ++                | +++  |                                | ○                                   |

<sup>a</sup>: 文献 (45) より引用。—: 未同定; +: 低濃度; ++: 中濃度; +++: 高濃度。

<sup>b</sup>: ジベンゾフラン環上の塩素置換されない H 原子が隣り合って存在するもの。

<sup>c</sup>: ジベンゾフラン環の両外側 (2, 3, 7, 8- 位) 4 カ所のうち、3 カ所以上に塩素置換のあるもの。

(1, 2, 7, 8-, 2, 3, 6, 7- および 2, 3, 7, 8-TCDF, 1, 2, 3, 7, 8-, 1, 2, 6, 7, 8-, 2, 3, 4, 6, 7- および 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF, 1, 2, 3, 4, 6, 7- および 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran) すべてに程度の差はあれ AHH および DT-ジアホラーゼ活性に対する誘導能(MC 型)が認められた。そしてその必要条件を満たさない 4 種 (2, 8-dichlorodibenzofuran, 1, 3, 6, 7- および 1, 3, 6, 8-TCDF, 1, 2, 4, 6, 8-PenCDF) には MC 型誘導は認められず, また検討したすべての PCDF に BZ 脱メチル化活性の誘導 (PB 型)は認められなかった。今回我々がラットにおいて観察した MC 型誘導能における構造活性相関は先に Poland ら (13) が鶏胚肝での AHH 活性の誘導に関して見いだした結果とよく一致した。

一方, これらによる急性毒性は図 6.2.4 (左)に示すように前項の PCB の場合と同様, MC 型誘導能を示した PCDF においてのみ, ほぼ MC 型誘導能の強さと相関した顕著な胸腺の萎縮と肝肥大が認められた。

また, ここには示さないが, 図 6.2.4 において同等の強い MC 型誘導能を示した 2, 3, 7, 8-TCDF と 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF の 2 者について改めて用量反応曲線を求めた実験では, 両者とも 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  単回腹腔内投与でも AHH および DT-ジアホラーゼ活性の誘導を示し, これらが極めて強い MC 型誘導能を有することが確認された (44)。さらにこの実験で明らかとなった興味深い点は, 構造上の差異はわずかに 4 位の塩素置換の有無にしか過ぎないこの両 PCDF の肝残留性に大きな差が認められたことである。即ち, 各用量の単回腹腔内投与後 5 日目の肝臓中濃度は, 投与量の如何にかかわらず 2, 3, 7, 8-TCDF では投与量の約 3% であるのに対し, 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF は約 60% の残留性を示した。ラットにおいて観察されたこの両者の肝残留性の差は, 両者が原因油中にはほぼ同程度の濃度で存在するにもかかわらず, 患者体内では 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF の方がはるかに高濃度で検出されるという事実とよく一致する (38)。当時はこの両 PCDF が何故このような顕著な肝残留性の差を与えるのかという理由は不明であったが, その後 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF は 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF 自身, および高毒性 PCB である 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB などによって選択的に誘導される肝 P-448H (P450 1A2) (6.2.8 の項参照)に対し, 極めて高い親和性で非共有結合的に結合することが明らかとなった (46)。このことが 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF の高い肝残留性の少なくとも一部を説明する要因としてクローズアップされた。

いずれにしろ今回の我々の研究を通して明らかとなったことは, 原因油中や患者体内に見いだされる PCDF の多くが MFO や DT-ジアホラーゼなどの肝酵素に対して強い MC 型誘導能とともに強い急性毒性を示すという事実である。このことは油症原因油中には PCB や PCQ に比べかなり低い濃度でしか存在しない PCDF ではあるが, その強い毒性や高い残留性を考慮すれば重要な油症原因物質候補であることを示唆するものである。

#### 6.2.5. PCB および PCDF による肝 MFO 誘導が及ぼすステロイド代謝への影響

女性の油症患者では月経周期の異常や月経困難症などホルモンバランスの乱れと関連する症状とともに血清中のケトステロイド濃度の変動などが見られた (47)。一方, サルなどの実験動物においても低濃度の PCB 製品を混じた餌を与えることにより, 雌サルでは月経周期の著しい変動や生殖機能障害など (48, 49) 油症患者と類似した変化が観察されている。また, マウスやラットでも PCB 混合物の投与により, 子宮の萎縮や卵巣間質の変化および血中プロゲステロン濃度の低下などが報

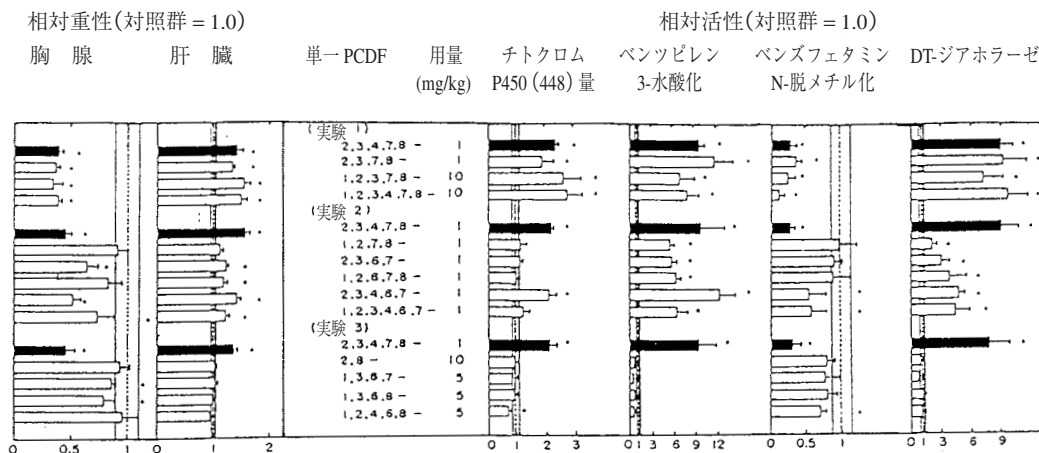


図 6.2.4. 各種単一 PCDF が及ぼすラット肝薬物代謝酵素活性ならびに臓器重量への影響

(右) 各酵素活性およびチトクロム P450 (448) 含量は以下に示す対照群の各数値(平均値 $\pm$ 標準偏差)に対する相対値として示した。

チトクロム P450 (448) 含量,  $0.242 \pm 0.039$  nmol/mg タンパク; ベンツピレン 3-水酸化活性,  $67.1 \pm 9.7$  pmol 3-OH ベンツピレン生成/mg タンパク / 1 分間; ベンズフェタミン N-脱メチル化活性,  $1.37 \pm 0.20$  nmol HCHO 生成 / mg タンパク / 1 分間; DT-ジアホラーゼ活性,  $0.233 \pm 0.024$   $\mu$ mol DCPIP 還元 / mg タンパク / 1 分間。

(左) 各臓器重量(g / 100g 体重)は以下に示す対照群の各数値(平均値 $\pm$ 標準偏差)に対する相対値として示した。肝臓重量,  $3.67 \pm 0.10$ ; 胸腺重量,  $0.313 \pm 0.035$ 。

斜線域は 3 回の実験における対照群の各パラメーターの標準偏差の範囲。

文献 44) より引用。

告されている (50, 51)。その当時, PCB およびその関連化合物によるこれら内分泌系関連の生体影響についてのメカニズムの詳細は余り明らかではなかった。一方, ステロイドが代表的な MFO の内因性基質であることを考えれば, PCB などによる MFO の誘導現象を通してもたらされるであろうステロイド代謝の変動が関与している可能性は容易に想像できた。しかしながら, その実態についてはわずかに PCB 混合物製品によりハト (6) やラット (52) でステロイド代謝の促進が起こることが報告されていた以外, 個々の単一 PCB や PCDF によるステロイド代謝への影響についての知見は殆ど見られなかった。

そこで我々はこの点を明らかにすべく, 単一 PCB や PCDF 前処理がラット肝ミクロソーム (P450) によるプロゲステロンおよびテストステロンの代謝にどのように影響するかについて検討を加えた (53)。その結果, 比較的到低毒性である PB 型および MC 型の混合型誘導能を示す KC-400 や PB 型誘導能を示す 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB (6.2.2 項参照) では, 両ステロイドとも主要な異化代謝反応である  $16\alpha$ -,  $7\alpha$ - および  $6\beta$ - 位の水酸化反応が有意に増加し, 結果的にこれら両ステロイドの全体的な代謝の促進が認められた。これに対して高毒性の MC 型 PCB である 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 前処理では両ステロイドとも  $7\alpha$ - 水酸化が選択的に増大する反面, 主要経路である  $6\beta$ - や  $16\alpha$ - 水酸化が顕著に抑制されるほか, プロゲステロンの  $2\alpha$ - 水酸化やテストステロンからアンドロステンジオンへの代謝反応も強く阻害された。同様の結果は高毒性の MC 型誘導能を有する 2, 3, 7, 8-TCDF や 2,

3, 4, 7, 8-PeCDF によっても得られ、これら MC 型誘導能を示す化合物に共通の特徴であることが示唆された。さらにこれら毒性の高い PCB や PCDF は、 $\Delta^4$ -ステロイドの異化代謝の律速反応である 5 $\alpha$ -還元反応をも低下させるなど、結果的に両ステロイドの代謝は全般的に強く抑制されることとなった。このような PB 型もしくは MC 型誘導能を示す PCB や PCDF 前処理によってもたらされる特徴的なステロイドの異化代謝の変化は、それぞれの化合物によって誘導される P450 (448) 分子種の質的あるいは量的な差異に起因する (6.2.8 項参照)。図 6.2.5 には高毒性の MC 型 PCB によるステロイドの異化代謝の変動と毒性(胸腺の萎縮)との関連性を示しているが、これらのことから油症患者や実験動物で見られた内分泌系関連の毒性症状の背景には、MC 型 PCB や PCDF によるステロイド代謝の異常が関与していることが示唆された。

#### 6.2.6. PCB による肺 MFO に対する誘導作用

油症患者の呼吸器症状として咳や喀痰の増加を始めとした慢性気管支炎症状が認められ、しかもこれらの症状の多くは患者の血中 PCB 濃度と相関することが報告されている(第 7 章 7.3 節参照)。一方、ラットなどの実験動物においては、PCB 混合物前投与により細気管支の肺泡マクロファージやタイプ II 細胞の形態異常が電顕的に示されている (54)。さらにその後、クララ細胞の壊死や肺

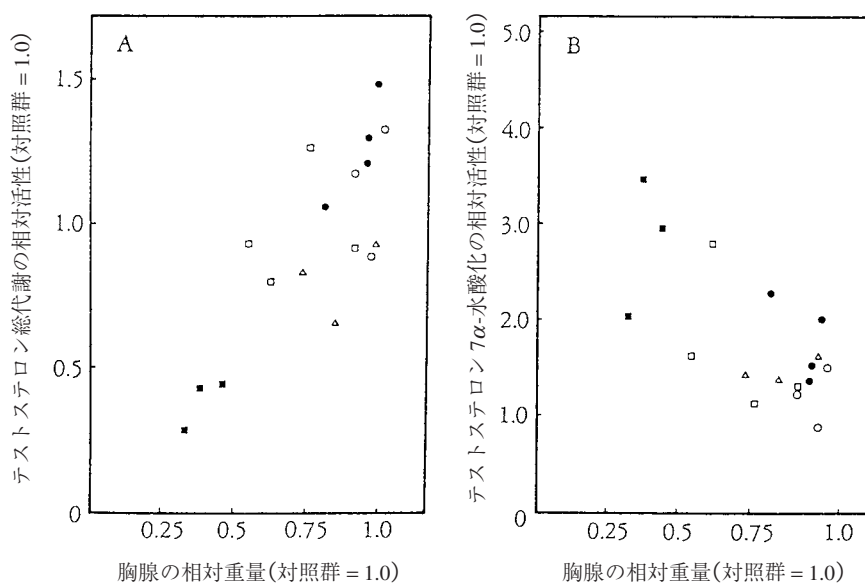


図 6.2.5. 各種単一 PCB および PB, MC 前処理ラットにおけるテストステロン代謝活性の変動と胸腺萎縮との相関性

ラットの前処理は以下の通り. ●: PB 100mg/kg, 3 回; △: MC 20mg/kg, 3 回; □: KC-400 300mg/kg, 単回; ○: 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 20mg/kg, 単回; ■: 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 5mg/kg, 単回.

(A) テストステロンの総代謝活性 ( $r=0.817$ ,  $\alpha<0.001$ )

(B) テストステロン 7 $\alpha$ -水酸化活性 ( $r=-0.686$ ,  $\alpha<0.01$ )

文献 53)より引用.



水腫などの細気管支障害の程度は、PCB よりも PCDF 混合物投与によってはるかに強く認められることなども明らかにされた (55)。これらと関連して興味深い点は、肺組織の MFO 活性が主としてクララ細胞に見いだされるという知見である (56)。また、Brandt ら (57) は肺組織への PCB の蓄積傾向には一定の構造活性相関があることも見いだしている。これらの事実を考慮すれば、油症患者の呼吸器症状をもたらした生化学的背景を明らかにする上で、肺 MFO に及ぼす PCB の誘導効果について検討することは意義深いと思われた。それまで肺 MFO に対する PCB の誘導作用については、わずかに PCB 混合物 (AC-1254) を用いたラットでの検討例 (58, 59) がある以外は、単一 PCB について検討された例は見当たらなかった。

そこで肝においてそれぞれ PB 型もしくは MC 型誘導能を示すことが明らかとなった低毒性の 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB と高毒性の 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB の、肺 MFO に及ぼす影響について PCB 混合物 (KC-400) や PB および MC のそれらと合わせて比較検討した (60)。その結果、肝 P450 (448) 含量が上記すべての処理で増加するのに対して、肺 P450 (448) 含量は MC 型誘導能を有する 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB や MC および混合型誘導能 (PB + MC) を示す KC-400 においてのみわずかに増加が認められるものの、PB 型の 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB による P450 の増大は観察されなかった。そのことは肺 P450 (448) 含量の増大をもたらした 3 者によってのみ MC 型誘導の指標活性である AHH 活性の著しい誘導が認められたのに対し、PB 型誘導の指標活性である BZ 脱メチル化活性は変わらないか (MC 型および混合型前処理)、むしろやや減少傾向 (PB 型前処理) を示すという触媒活性の面からも裏付けられた。即ち、このことは肝と肺では PCB による MFO の誘導作用に関して感受性が異なるという臓器特異性が存在することを示しており、PCB や PCDF の毒性応答が臓器によって異なることを説明する背景要因の一例と考えられる。

#### 6.2.7. PCB および PCDF による肝酵素誘導と毒性発現における動物種差

多塩素化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン (PCDD) を始め PCDF や PCB などのいわゆるポリハロゲン化芳香族化合物は、いずれも共通した特徴的な毒性、たとえば衰弱、胸腺の萎縮、遅発性の致死、過角質化や塩素ニキビ (クロルアクネ) などを示すことが知られている (61)。この種の化合物による毒性発現のもう一つの特徴は、その毒性に対する感受性に極めて顕著な動物種差や臓器特異性が見られる点である (第5章参照)。例えば 2, 3, 7, 8-TCDD の LD<sub>50</sub> (50% 致死量) についてみれば、高感受性のモルモットと低感受性のハムスターでは実に 5,000 倍もの差がある。一方、標的臓器に関してみれば、これらの毒性に対し中程度の感受性を示すラットやマウスにおいては肝は主要な標的であり、肝肥大や脂肪肝さらには壊死などが認められるのに対し、高感受性のモルモットでは肝の病変は余り顕著には現れない。また、先に述べたようにラットやマウスにおいては毒性の強さはこれらの化合物の MFO に対する MC 型誘導能の強さとよく相関することが示唆されている (16, 19)。従って、このような相関性が他の動物種においても見られるのか否か、また毒性に対する感受性の種差に MC 型誘導に対する応答性の差が関与しているのかという点を明らかにすることは、この種のハロゲン化芳香族化合物による毒性発現機構を考えるうえで重要である。

そこでまず、MC 型誘導に対する応答性の差が毒性発現にどのような影響を与えるのかという点について明らかにすべく、MC 型誘導に対する応答性が遺伝的に異なることが知られている 2 系統



の近交系マウスを用いて、MC 型 PCB による誘導と毒性発現との関連を見た (62)。MC 型誘導に対して遺伝的に高感受性 (Ah-responsive) を示す C57BL/6 マウスと、低感受性 (Ah-nonresponsive) の DBA/2 マウス (63) に対して、最強毒性の MC 型 PCB である 3,4,5,3',4'-PenCB を前投与し、両系統マウスの誘導現象および毒性発現における応答性を比較した。その結果を図 6.2.6 に示す。図 6.2.6 (右) の結果から明らかなように、DBA/2 マウスでは低感受性を反映して低用量 (1 mg/kg) では

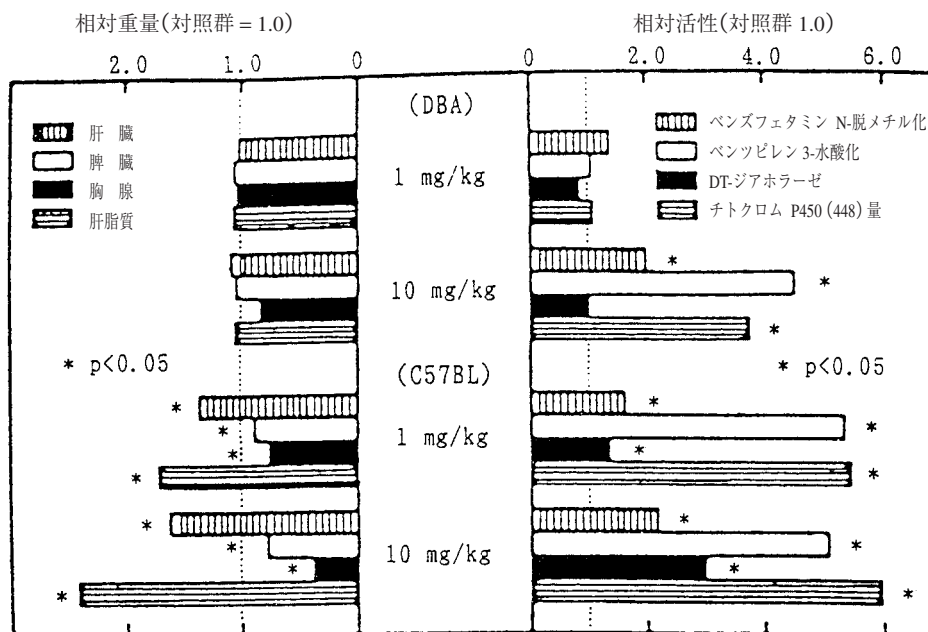


図 6.2.6. 3,4,5,3',4'-PenCB が及ぼす DBA 系および C57BL 系マウスの肝薬物代謝酵素活性ならびに臓器重量への影響

(右) 各酵素活性およびチトクロム P450 (448) 含量は以下に示す対照群の各数値(平均値 ± 標準偏差)に対する相対値として示した。

[DBA 系マウス] ベンズフェタミン N-脱メチル化活性,  $9.06 \pm 1.76$  nmol HCHO 生成 / mg タンパク / 15 分間; ベンツピレン 3-水酸化活性,  $0.044$  nmol 3-OH ベンツピレン生成 / mg タンパク / 5 分間; DT-ジアホラーゼ活性,  $0.012$   $\mu$ mol DCPIP 還元 / mg タンパク / 1 分間; チトクロム P450 (448) 含量,  $0.132 \pm 0.010$  nmol/mg タンパク。

[C57BL 系マウス] ベンズフェタミン N-脱メチル化活性,  $8.13 \pm 0.51$  nmol HCHO 生成 / mg タンパク / 15 分間; ベンツピレン 3-水酸化活性,  $0.165$  nmol 3-OH ベンツピレン生成 / mg タンパク / 5 分間; DT-ジアホラーゼ活性,  $0.019$   $\mu$ mol DCPIP 還元 / mg タンパク / 1 分間; チトクロム P450 (448) 含量,  $0.128 \pm 0.006$  nmol / mg タンパク。

(左) 各臓器重量 (g/100g 体重) および肝脂質量 (mg/g 肝重量) は以下に示す対照群の各数値(平均値 ± 標準偏差)に対する相対値として示した。

[DBA 系マウス] 肝臓重量,  $4.05 \pm 0.22$ ; 脾臓重量,  $0.344 \pm 0.047$ ; 胸腺重量,  $0.123 \pm 0.039$ ; 肝脂質量,  $93.31 \pm 5.14$ 。

[C57BL 系マウス] 肝臓重量,  $4.28 \pm 0.24$ ; 脾臓重量,  $0.279 \pm 0.009$ ; 胸腺重量,  $0.223 \pm 0.019$ ; 肝脂質量,  $91.83 \pm 7.76$ 。

文献 62) より引用。

MC 型誘導が認められないのに対し、高感受性の C57BL/6 マウスでは同用量でも強い MC 型誘導が認められ、その感受性の差はおよそ 10~20 倍程度であると考えられた。一方、図 6.2.6 (左)に示す毒性指標の結果から Ah-responsive な C57BL/6 マウスにおいてのみ、ラットの場合と同様に MC 型誘導の強さと相関した有意な肝肥大、胸腺や脾臓の萎縮および肝脂質の蓄積が認められることが判る。このことより、少なくともマウスやラットにおける MC 型 PCB による毒性発現には、MC 型誘導に対する感受性、つまり Ah-レセプターの関与が強く示唆された。ほぼ同様の結論は 2,3,7,8-TCDD についても得られている (16)。今回の我々の実験で明らかになったもう一つの興味深い事実は、単回投与 5 日後の 3,4,5,3',4'-PenCB の肝残留性においても、C57BL/6 マウスの方が 2 倍程高い(投与量の約 80%)という系統差が認められた点である。このことは先述のラット肝における 2,3,4,7,8-PenCDF の高残留性が、誘導された P-448H (P450 1A2) との強い親和性に起因するという知見(6.2.4 項参照)との類似性を想起させた。

次に 2,3,7,8-TCDD の毒性に対して極めて強い感受性を示すことが知られているモルモット (61) に、高毒性の 3,4,5,3',4'-PenCB を投与し肝酵素誘導と毒性発現との関連性について、ラットとの比較検討を行なった (64, 65, 66)。

まず、単回腹腔内投与後 4 日間の体重変動を見たところ、ラットでは 5 mg/kg または 25 mg/kg では体重増加の抑制は見られるものの体重減少は見られないのに対し、モルモットでは 0.1 mg/kg または 0.5 mg/kg でも顕著な体重減少が認められ、モルモットはラットに比し MC 型 PCB に対しても高感受性を示すことが示唆された。次にラットにおいては MC 型誘導能と高い相関が認められた毒性指標である肝肥大と胸腺萎縮に関しては、25 mg/kg 投与ラットで見られると同程度の毒性変化がモルモットでは 0.5 mg/kg 投与で認められ、この点でもモルモットの高感受性が示された。しかし一方では、モルモット肝ではラットとは異なり MC 型誘導の指標である AHH や DT-ジアホラーゼ活性の顕著な増大は観察されず、両種の動物間では MC 型誘導に対する応答性に種差が存在することが示唆された。ほぼ同様の結果は、2,3,7,8-TCDD 処理に対する応答性に関しても報告されている (67, 68)。つまり、このことは少なくともモルモットにおいてはラットの場合とは異なり、MC 型 PCB による毒性の強さと肝酵素に対する MC 型誘導能との間に単純な相関は見いだせないことを示している。高毒性の MC 型 PCB に対するこの両動物種の応答性の差は、P450 4A サブファミリーによって触媒されと考えられているラウリル酸の  $\omega$ -位の酸化活性 (69) に関しても見られた。即ち、この脂肪酸の  $\omega$ -位の酸化活性は 3,4,5,3',4'-PenCB のような MC 型 PCB 前処理によりモルモット肝では 4 倍以上に活性が高まるのに対し、ラットではむしろ有意な減少が認められた (66)。

ハムスターはモルモットとは逆に 2,3,7,8-TCDD による急性毒性に対しては、かなり強い抵抗性を有する動物種として知られている (61)。そこで次にハムスターにおける MC 型誘導能と毒性発現との関連について高毒性の 2,3,4,7,8-PenCDF を用いて検討した (70)。2,3,4,7,8-PenCDF 0.5 mg/kg 単回投与によりその後の体重増加に影響は認められないものの、肝肥大や胸腺、脾臓および腎臓の萎縮がもたらされるとともに、肝臓中の脂質過酸化物量は対照群の約 3 倍へと増加した。一方、肝の AHH や DT-ジアホラーゼ活性についてはラットの場合よりやや弱い、それらの明瞭な誘導が観察された。これらの結果から、ハムスターは MC 型 PCB や PCDF の毒性に対して中等度の感受性を示すラットやマウスに準ずる感受性を有することが示唆されたが、その致死毒性はラットやマ

ウスに比べはるかに低いものであった。

ヒヨコが PCB およびその関連化合物による毒性に対して極めて高い感受性を示すことは、油症事件発生に先立つ数ヵ月前に油症原因油と同じ起源の PCB およびその関連化合物によって汚染された飼料用排油(ダーク油)の摂取によって起こった 200 万羽におよぶヒヨコの斃死事件(ダーク油事件)からも判る(第 5 章および付録 5 参照)。実際に実験的に PCB 混合物を与えたヒヨコでは体重減少、水腫、肝肥大および脾臓の萎縮などが観察されている(39, 71)が、肝酵素類への影響については余り明らかにされてはいない。そこで、ヒヨコにおける MC 型誘導と毒性との関連を明らかにすべく、高毒性の MC 型 PCB (3, 4, 5, 3', 4'-PenCB) と低毒性の PB 型 PCB (2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB) を用いて比較検討を行なった(72)。その結果、わずか 5  $\mu\text{g/kg}$  の 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB によって肝ミクロソームの P450 含量の増加や AHH 活性の増大とともに、心水囊症や肝肥大、脾臓の萎縮などの MC 型 PCB に特徴的な毒性が惹起されたのに対し、2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は 10  $\text{mg/kg}$  でも殆ど見るべき変化を与えなかった。このようにヒヨコに対する PCB の毒性も他の動物種と同様、MC 型 PCB に負うところが大きいことが判る。

さらに油症治療研究班では油症の実験モデルの作出を目的として、サル(アカゲザルおよびカニクイザル)に対して原因油中に含まれていたとほぼ同組成の KC-400 と PCDF (200:1) の混合物、または両化合物単独での長期連続経口投与を試みた(73, 74)。その結果、KC-400 (0.25  $\text{mg/kg/day}$ ) と PCDF (1.25  $\mu\text{g/kg/day}$ ) の混合物の投与開始後 2 ヶ月以内に頭部や頸部および腕の顕著な脱毛が出現したが、油症患者に特徴的な皮膚症状であるクロルアクネ(塩素ニキビ)は観察されなかった(73)。但し、アカゲザルにおいても PCB (AC-1248) による皮膚症状としてクロルアクネの発症を報告した例(75)もあり、今回の我々の結果との相違の原因については不明である。また、前記の 1/2 の一日当たり投与量(KC-400: 0.125  $\text{mg/kg/day}$ ; PCDF: 0.625  $\mu\text{g/kg/day}$ ) を 4 ヶ月間与えたサルの肝生検の電子顕微鏡像では、肝細胞内への粗大な脂肪滴の出現とともに、小管状および小胞状の滑面小胞体の異常な増殖やクリスタの変形を伴うミトコンドリアも観察された(74)。これらの所見は同用量の PCDF 単独投与例では幾分軽減傾向がうかがえ、PCB と PCDF の相乗効果の可能性が示唆された。一方、他の多くの動物種で観察された肝 AHH と DT-ジアホラーゼ活性の誘導現象はサルにおいても認められ、PCB や PCDF 連続投与により増大したこれらの活性はそれらの投与中止後、DT-ジアホラーゼ活性では 6 ヶ月間、また AHH 活性では 9 ヶ月間の長期にわたり持続した(74)。これらは前記の滑面小胞体の異常な増殖などを認めた解剖学的所見とよく対応するものである。今回の実験的 PCB 中毒サルで観察されたその他の異常所見を含めその幾つかは、油症患者の症状に近似しうるものと考えられたが、PCB や PCDF の血中レベルを含め大きな個体差の存在も明らかとなった。

以上述べたように、PCB や PCDF による毒性発現や肝 MFO および DT-ジアホラーゼに対する酵素誘導作用への応答性は動物種によって大きく異なることが判る。ほぼ同様の結論は 2, 3, 7, 8-TCDD による毒性や誘導現象についても明らかにされている(61)。表 6.2.4 には我々の研究を通して明らかとなったそれぞれの同族体の中で最強の毒性を示すと考えられる 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB および 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF による毒性と肝酵素誘導の動物種差をまとめて示す。

表 6.2.4. 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB および 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF による肝酵素誘導作用と毒性発現における応答性の動物種差

| 動物種                | 化合物                                       | 毒性応答                            | MC 型誘導                                                                                       | 引用文献                     |
|--------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| ラット (Wistar)       | PenCB <sup>a</sup><br>PenCDF <sup>b</sup> | 中程度の毒性,<br>肝臓への影響顕著             | 応答性(ベンツピレン 3-水酸化,<br>EROD <sup>c</sup> , ステロイド代謝)<br>P448H, P448L, P452 および DT-ジア<br>ホラーゼの誘導 | 19)<br>53)<br>79)<br>80) |
| マウス<br>(C 57 BL 系) | PenCB                                     | 高毒性(高感受性)                       | 強い応答性(ベンツピレン 3-水酸<br>化, DT-ジアホラーゼ)                                                           | 62)                      |
| (DBA 系)            |                                           | 低毒性(低感受性)                       | 弱い応答性                                                                                        | 64)                      |
| モルモット              | PenCB                                     | 高毒性(顕著な体重減少), 但<br>し, 肝臓への影響は軽度 | 比較的弱い応答性                                                                                     | 65)                      |
| ハムスター              | PenCDF                                    | 部分的な毒性, 但し致死毒<br>性は低い           | 応答性(ベンツピレン 3-水酸化,<br>EROD, DT-ジアホラーゼ), しか<br>し, ラットに比しやや弱い.                                  | 70)                      |
| ヒヨコ                | PenCB                                     | 高毒性, 但し, 肝脂質の増<br>加はない          | 応答性(ベンツピレン 3-水酸化,<br>EROD), 但し, DT-ジアホラーゼ<br>活性の誘導は弱い.                                       | 72)                      |

<sup>a</sup>: 3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニル<sup>b</sup>: 2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン<sup>c</sup>: 7-エトキシレゾルフィン O-脱エチル化

### 6.2.8. 高毒性の単一 PCB および PCDF により誘導される P450 分子種

生体異物を代謝する機能をもったヘムタンパクとして P450 がウサギやラットの肝ミクロソーム中に最初に見いだされて以来 30 年以上を経過するが, 現在その分布は哺乳動物はもとより細菌から植物にいたるまで広い生物種に及ぶことが明らかとなっている。これまで知られている約 1,000 種にも及ぶこれらの P450 は一つのスーパーファミリーを形成しており, アミノ酸配列の相同性に基づきさらにファミリー, サブファミリーへと分類しうる (76)。ヒトでは現在 16 ファミリーに分類される 40 種の遺伝子の存在が明らかにされており, そのうちいわゆる薬物代謝型と呼ばれる P450 分子種は通常 CYP1, CYP2 および CYP3 のファミリーに属し, 一部 CYP4 ファミリーにも異物代謝能を有する分子種がある。副腎や生殖器などに存在するステロイド生合成など生命現象の根幹にかかわる P450 分子種は, 他の酵素種と同様にかなり厳格な基質特異性を有しているのに対し, 生体異物の代謝極性化を触媒する薬物代謝型 P450 分子種は, 幾分曖昧な基質特異性のもとに互いに一部重複した触媒活性を示す特徴がある (77)。この薬物代謝型 P450 分子種のブロードな基質スペクトルは, 多種多様な生体異物への曝露によってもたらされるであろう有害作用に対する自己防御機能という点から見れば理にかなうものともいえる。

前にも述べたように, PCB や PCDF で動物を前処理すると肝ミクロソーム (P450) のベンツピレン水酸化 (AHH) 活性や BZ 脱メチル化活性などの異物代謝活性, およびテストステロンやプロゲステロンなどの内因性基質の異化代謝活性が, 未処理動物のそれらと比べ大きく変動する。例えば, 高毒性の 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB や 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF で前処理されたラット肝ミクロソームでは, テ

ストステロンやプロゲステロンの  $7\alpha$ -水酸化は著しく増強されるが、 $2\alpha$ - や  $6\beta$ - および  $16\alpha$ -水酸化は逆に強く抑制される (53)。一方、このようなテストステロンの位置特異的および立体選択的水酸化は、互いに異なる P450 分子種によって触媒されていることが明らかにされた (78)。従って、これら二つの実験事実を考え合わせれば、高毒性の PCB や PCDF で前処理された動物肝ではある特定の P450 分子種の選択的誘導や発現抑制が起こり、結果的にミクロソーム中の P450 の分子種構成が大きく変化していることが推察される。

その点を確認するため、我々はまず 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 前処理ラット肝ミクロソーム中の主要な P450 分子種を数種精製し、それらの酵素化学的ならびに免疫化学的性質を明らかにするとともに、前記の異物代謝やステロイド代謝活性の変動要因について検討を加えることにした (79, 80)。その結果、未処理および 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB (5 mg/kg, 単回腹腔内投与), MC (20 mg/kg, 一日一回 3 日間腹腔内投与), PB (100 mg/kg, 一日一回 3 日間腹腔内投与) の各誘導剤処理した Wistar 系雄性ラット肝ミクロソームから、合計 9 種 (2 種の同一分子種を含む) の P450 分子種が電気泳動的に単一な純度まで精製された (図 6.2.7)。表 6.2.5 にはそれらの見かけの分子量ならびに分光学的な性質を、ま

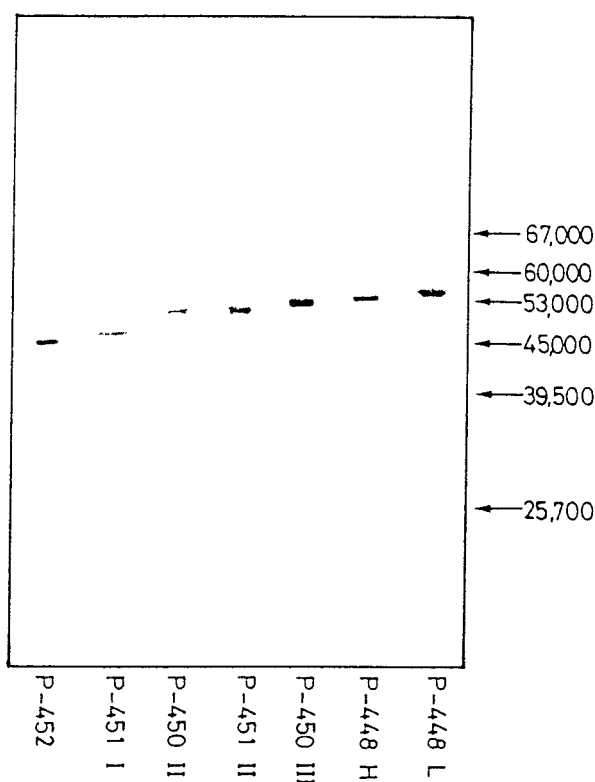


図 6.2.7. 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 前処理ラット肝ミクロソームから精製された 7 種の P450 分子種の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
電気泳動は Laemmli 法に従い 0.1% SDS を含む 8%ゲルを用いて行なった。各レーンには  $1.5 \mu\text{g}$  タンパク量の精製 P450 を用いた。  
文献 79)より引用。

表 6.2.6 には異物代謝活性の特徴を示す。これらの結果は MC および PenCB 前処理肝から得られた P448 L ならびに P448 H がそれぞれ同一分子種であること、従って残る 7 種は互いに異なる分子種であることを明瞭に示している。このうちの 5 種については触媒活性や誘導剤に対する応答性などから判断して、その後アミノ酸配列の相同性に基づく新しい命名法 (81) によって分類命名された以下の各分子種との対応が推定された。つまり、未処理ラットからの P451 II は P450 2C11, PB 処理ラットからの P450 III は P450 2B2, PenCB 処理ラットからの P452 は P450 2A1, PenCB および MC 処理ラットからの P448 L は P450 1A1, また PenCB および MC 処理ラットからの P448 H は P450 1A2 にそれぞれ相当するものと思われた。

表 6.2.7 には精製した各 P450 分子種によるテストステロンの各部位に対する代謝活性を示しているが、分子種により位置特異的な酸化が起こることが判る。一方、表 6.2.8 は 4 種の P450 分子種に

表 6.2.5. 各精製 P450 分子種の見かけの分子量および分光学的特徴

| P450 分子種   | 前処理      | 見かけの<br>分子量 <sup>a</sup> | 絶対スペクトルの極大吸収 (nm) |        |        |                    |        |                    |        |                                         |
|------------|----------|--------------------------|-------------------|--------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|-----------------------------------------|
|            |          |                          | 酸化型               |        |        | 還元型                |        | CO 結合還元型           |        |                                         |
| P-451 I    | 未処理      | 49,000                   | 415.0,            | 532.0, | 566.0  |                    | 409.0, | 546.0              | 451.0, | 552.0                                   |
| P-451 II   | 未処理      | 52,000                   | 416.0,            | 536.0, | 569.0, | 660.0 <sup>b</sup> | 413.0, | 547.0              | 451.0, | 554.0                                   |
| P-450 II   | PB 処理    | 52,000                   | 418.0,            | 534.0, | 570.0  |                    | 410.5, | 543.0              | 450.0, | 550.5                                   |
| P-450 III  | PB 処理    | 53,500                   | 416.0,            | 534.5, | 568.0  |                    | 420.0, | 550.0 <sup>b</sup> | 450.0, | 421.0 <sup>c</sup> , 554.0 <sup>b</sup> |
| P-452      | PenCB 処理 | 48,000                   | 416.5,            | 536.8, | 568.0  |                    | 410.0, | 543.0              | 452.0, | 553.0                                   |
| P-448 L    | PenCB 処理 | 56,000                   | 417.5,            | 532.0, | 569.0  |                    | 407.0, | 542.0              | 447.5, | 550.0                                   |
| MC-P-448 L | MC 処理    | 56,000                   | 417.5,            | 533.0, | 568.0  |                    | 408.0, | 542.0              | 447.5, | 550.0                                   |
| P-448 H    | PenCB 処理 | 54,000                   | 393.0,            | 644.0  |        |                    | 408.0, | 542.0              | 447.5, | 548.0                                   |
| MC-P-448 H | MC 処理    | 54,000                   | 392.0,            | 644.0  |        |                    | 408.0, | 542.0              | 447.5, | 550.0                                   |

<sup>a</sup>: 見かけの分子量は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動より求めた。

<sup>b</sup>: ブロードなピークのため、やや不正確。

<sup>c</sup>: 精製過程で生成した不活性型 P420 を含む。文献 79) より引用。

表 6.2.6. 各精製 P450 分子種の触媒活性

| 基 質                 | 未処理 <sup>a</sup> |          | PB 処理 <sup>a</sup> |           | MC 処理 <sup>a</sup> |         | PenCB 処理 <sup>a</sup> |         |         |
|---------------------|------------------|----------|--------------------|-----------|--------------------|---------|-----------------------|---------|---------|
|                     | P-451 I          | P-451 II | P-450 II           | P-450 III | P-448 L            | P-448 H | P-452                 | P-448 L | P-448 H |
| ベンズフェタミン            | 12.51            | 51.11    | 17.57              | 18.57     | 10.82              | 12.71   | 4.27                  | 16.38   | 12.51   |
| アミノピリン              | 8.04             | 11.22    | 8.94               | 7.55      | 4.86               | 13.60   | 3.28                  | 10.92   | 12.91   |
| ベンツピレン              | 0.23             | 1.66     | 0.20               | 0.33      | 1.92               | 0.07    | 0.08                  | 2.12    | 0.08    |
| 7-エトキシマリン           | 1.83             | 2.06     | 0.11               | 3.20      | 56.91              | 0.80    | 0.23                  | 109.3   | 1.03    |
| ビフェニル               |                  |          |                    |           |                    |         |                       |         |         |
| 4-OH 化              | 2.20             | 24.14    | 3.75               | 6.93      | 17.59              | 13.35   | 0.33                  | 34.72   | 16.75   |
| 2-OH 化              | ND               | 0.65     | ND                 | 0.74      | 6.49               | 2.69    | ND                    | 7.75    | 3.40    |
| エストラジオール-17 $\beta$ |                  |          |                    |           |                    |         |                       |         |         |
| 2-OH 化              | 3.48             | 23.42    | 3.48               | 0.79      | 1.45               | 12.05   | 0.65                  | 1.66    | 17.05   |

<sup>a</sup>: 精製に用いたマイクロソーム源。各触媒活性は、nmol 代謝物生成/nmol P450/1 分間。ND: 検出されず。文献 79) より引用。



表 6.2.7. 各精製 P450 分子種のテストステロン水酸化活性

| 水酸化反応            | 未処理     |          | PB 処理    |           | MC 処理      |            | PenCB 処理 |         |         |
|------------------|---------|----------|----------|-----------|------------|------------|----------|---------|---------|
|                  | P-451 I | P-451 II | P-450 II | P-450 III | MC-P-448 L | MC-P-448 H | P-452    | P-448 L | P-448 H |
| 7 $\beta$ -水酸化   | 4.27    | ND       | ND       | ND        | 0.07       | ND         | 10.92    | 0.09    | ND      |
| 16 $\alpha$ -水酸化 | 0.63    | 8.31     | 0.56     | 1.49      | 痕跡         | 痕跡         | 0.43     | 痕跡      | 痕跡      |
| 6 $\beta$ -水酸化   | 1.13    | 1.64     | 0.10     | 痕跡        | 0.28       | 0.24       | 0.48     | 0.72    | 0.28    |
| 2 $\alpha$ -水酸化  | 0.44    | 8.33     | 0.40     | ND        | ND         | ND         | ND       | ND      | ND      |

各水酸化活性 (nmol 代謝物生成 / nmol P450 / 1 分間) は、2 回の実験結果の平均値。ND: 検出されず。  
文献 80) より引用。

表 6.2.8. 免疫拡散法により求めた各種誘導剤前処理ラット肝ミクロソーム中の 4 種の P450 分子種組成

| ミクロソーム   | 総 P450 | P-451 II    | P-452           | P-448 L     | P-448 H     |
|----------|--------|-------------|-----------------|-------------|-------------|
| 未処理      | 0.83   | 0.52 (62.7) | < 0.008 (< 1.0) | BD          | BD          |
| PB 処理    | 2.37   | 0.46 (19.4) | 0.037 (1.6)     | BD          | BD          |
| MC 処理    | 1.45   | 0.43 (29.7) | 0.027 (1.9)     | 0.99 (68.3) | 0.47 (32.4) |
| PenCB 処理 | 2.69   | 0.11 (4.1)  | 0.098 (3.6)     | 0.85 (31.6) | 1.69 (62.8) |

総 P450 含量は CO 結合型差スペクトル法により求めた。各 P450 分子種含量 (nmol/mg タンパク) は各前処理ラット肝ミクロソームについての 2 回の定量値の平均。( ) 内の値は各総 P450 含量に占める割合(%)。

BD: 定量限界以下。

文献 80) より引用。

対して得られた各ウサギ抗体を用いた免疫拡散法 (radial immunodiffusion method) により、未処理および各種誘導剤前処理ラット肝ミクロソーム中のそれぞれの分子種を定量した結果である。果たして予想通り、高毒性の 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB で前処理したラット肝ミクロソーム中の分子種構成は、未処理のそれに比し劇的に変化していることが明らかとなった。即ち、未処理ラット肝ミクロソーム中の主要分子種 (62.7%) である P451 II の顕著な減少の一方で、未処理ラット肝では極めて少量もしくは検出限度以下でしか存在しない P452 や P448 L および P448 H の比含量の増加が著しい。特に注目すべきは、P448 L (31.6%) および P448 H (62.8%) のわずか 2 つの分子種で、3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 前処理ラット肝ミクロソーム中の全 P450 比含量 (2.69 nmol/mg protein) の殆どを占める有様となっている点である。ほぼ同様の結果が Parkinson ら (82) によっても得られている。

このような 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 前処理による特定の P450 分子種の増減を酵素活性の面から見ると以下のような結論になる。まずテストステロンの 7 $\alpha$ -水酸化の増大は主に新たに誘導された P452 に負うところが大きいこと (表 6.2.7) が、抗 P452 抗体による阻害実験の結果からも裏付けられた。また 7-エトキシマリンの脱エチル化や AHH 活性の顕著な増加は主に P448 L の誘導に、一方エストラジオールの 2-水酸化やビフェニルの 4-水酸化は P448 H の誘導によることが示唆された (表 6.2.6)。さらに P448 H の誘導に関して注目すべきは、この分子種 (P450 1A2) は、2-アセチルアミノフルオレン (83) や Trp-P-2 あるいは Glu-P-1 (84) など多くの発癌性芳香族アミン類やアミノ酸加熱分解物の代謝的活性化を触媒するという点や、先に述べた高毒性の 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF を非共

有結合的に結合する(46)点である。前者は3,4,5,3',4'-PenCBに曝露されたラットは、これらによる化学発癌に対して高い感受性を有する可能性を意味し、また後者は2,3,4,7,8-PenCDFの極めて高い肝残留性(44,85)との関連を示唆するものといえる。以上のことより、高毒性の3,4,5,3',4'-PenCBや2,3,4,7,8-PenCDFによってもたらされるラット肝ミクロソームにおけるステロイド代謝の異常(53)や、薬物代謝活性の大きな変動(86)は、特定のP450分子種の増減による肝ミクロソーム中のP450分子種構成の変化に起因すると結論しうる。

ハムスターはPCDDやPCDFによる毒性に対して最も抵抗性を示す動物の一種として知られているが、この動物種はラットに比べ指標酵素活性で見ると、MC(87)や2,3,4,7,8-PenCDF(70)によるMC型誘導に対して低い応答性しか示さない。そこで2,3,4,7,8-PenCDFによるP450誘導の動物種差を明らかにするため、2,3,4,7,8-PenCDF前処理ハムスター肝からP450の精製を試みたところ、2種の分子種(高スピン型のハムスターP448Hと低スピン型のハムスターP448L)が得られた(88)。これらはN-末端アミノ酸配列の比較からそれぞれラットのP448HとP448Lに対応することが示唆されたが、分子量(ハムスターP448H, 52KDa; ハムスターP448L, 54KDa)やCO差スペクトル(446 nm)などの点で幾分異なる性質を示した。その差は酵素活性の面でも示され、両分子種ともラットやマウスでの指標活性であるAHHや7-エトキシクマリンおよび7-エトキシレゾルフィンのO-脱エチル化活性はそれほど高くはなく、むしろともにテストステロンの7 $\alpha$ -水酸化や2 $\alpha$ -水酸化を効果的に触媒した。さらに免疫拡散法により求めた2,3,4,7,8-PenCDF前処理ハムスター肝中に占める両分子種の割合は、ハムスターP448Hが61%、ハムスターP448Lが31%となり、先のラットの場合と同様これら2つの分子種で全構成P450の大部分を占めることが明らかとなった。両分子種に対する同様の誘導能(ハムスターP448H>ハムスターP448L)はMCや3,4,5,3',4'-PenCBおよびイソサフロールによっても示されたが、 $\beta$ -ナフトフラボンではむしろハムスターP448Lを優勢に誘導した。いずれにしても、前述のハムスターがMC型誘導に対して低い応答性しか示さないという事実は、誘導されるP450分子種の触媒活性における種差に起因することが判る。また、ハムスターP448Hも2,3,4,7,8-PenCDF結合能を示すが、その程度はラットP448Hのそれに比べると幾分弱いものであった(46)。

3,4,5,3',4'-PenCBによる毒性やMC型誘導に対して比較的に高い感受性を示すヒヨコ(72)の肝からも、CO差スペクトルを448 nmに与えるヒヨコP448L(56 KDa)およびヒヨコP448H(54 KDa)の2種の分子種が精製された(89)。このうちヒヨコP448Lは7-エトキシレゾルフィンのO-脱エチル化に対して極めて強い活性を示すとともに、AHHやテストステロンの16 $\beta$ -水酸化に対しても比較的に高い活性を示したが、7-エトキシクマリンのO-脱エチル化や

-

ニトロアニソールのO-脱メチル化、およびエストラジオールの2-水酸化活性などは見られなかった。一方、ヒヨコP448Hにはエストラジオールの2-水酸化活性のほか、弱いながらもテストステロンの6 $\beta$ -水酸化活性が認められた。また、アミノピリンやBZおよびエチルモルヒネの各O-脱メチル化に関しては両分子種とも中程度の活性を示したが、どちらかといえばヒヨコP448Lの方により高い活性が認められた。免疫化学的な定量的結果、未処理肝中の両分子種の存在量は無視しうる程度であるのに対し、3,4,5,3',4'-PenCB前処理のヒヨコ肝では全P450の実に82%をヒヨコP448Lが占め、ヒヨコP448Hは7%を占めるに過ぎなかった。

その後、多くの研究者 (90, 91) によって 2, 3, 7, 8-TCDD による P450 1A1 (P448 L) の誘導機構が徐々に明らかにされてきた。それらを要約すると以下の通りである。① サイトソール中に存在する熱ショック蛋白質 90 (hsp 90) と会合した不活性型受容体 (Ah-レセプター) に 2, 3, 7, 8-TCDD などの誘導剤 (リガンド) が結合することにより, hsp 90 が外れて活性型 Ah-レセプターになる。② 活性型 Ah-レセプターが核内に移行し, 核内蛋白因子 (Arnt) と会合して転写活性化能を有する 3 者複合体 (liganded Ah-receptor-Arnt complex) を形成する。③ この転写活性化複合体が P450 1A1 構造遺伝子の 5' 側の 5' 上流の転写調節領域にあるダイオキシン応答要素 (Dioxin Responsive Element; DRE または Xenobiotic Responsive Element; XRE) の特定の塩基配列に結合することにより, P450 1A1 構造遺伝子の転写活性化が起こる。④ 増大した mRNA の翻訳の結果として, P450 1A1 の誘導がもたらされる。

この誘導メカニズムに従えば, P450 1A1 (P448 L) に対する酵素誘導能の強さは Ah-レセプターとの親和性の強さに比例することになり, 我々がラットやマウス肝において観察した 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB や 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF などのコプラナー PCB や PCDF による P450 1A1 (P448 L) 誘導現象も, 恐らく同じ機構によるものと考えられる。

#### 6.2.9. PCB および PCDF により誘導されるその他の肝酵素

PCDD や PCDF, PCB などのいわゆるポリハロゲン化芳香族化合物による特徴的な毒性の発現機構をより深く理解するためには, 前項までに紹介した MFO や DT-ジアホラーゼに対する誘導現象以外の生化学的な応答変化の実態を明らかにすることは極めて重要である。従来グルタチオン S-転移酵素 (GST) (92) やアルデヒドデヒドロゲナーゼ (93), さらにある種の間代謝系の酵素 (94) などが, 最強の毒性化合物である 2, 3, 7, 8-TCDD 前処理によって影響を受けるという報告は見られたが, 油症原因物質となった PCDF や PCB, 特にそれらの単一化合物についての検討はあまり例を見なかった。そこでまず高毒性の 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB (MC 型 PCB) と低毒性の 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB (PB 型 PCB) で前処理したラットの肝サイトソール中の幾つかの酵素に着目して誘導作用を比較した (95)。その結果図 6.2.8 に示すように, 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB の 0.5 mg/kg 単回経口投与 12 日後には DT-ジアホラーゼ活性が 10 倍になるほか, GST 活性が 3 倍, アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が 18 倍, グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性も 2 倍に増大することが明らかとなった。さらに興味深い点はミクロソーム酵素である P450 の誘導は投与後 5 日目で最大になるのに対し, これらサイトソール中の酵素の誘導は 12 日目に最大となり, さらに 20~30 日目の時点でもかなり高い誘導現象の持続が見られることである。一方, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 前処理ラットにおいてもこれらの酵素活性の増加が見られたが, その程度は 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB に比べるとはるかに弱いものであった。

2, 3, 7, 8-TCDD によって誘導される GST (92) やアルデヒドデヒドロゲナーゼ (93) は, PB によって誘導されるものとは異なることが示されていることから, 今回の MC 型 PCB と PB 型 PCB によって誘導されたそれぞれの酵素も互いに異なるアイソザイムである可能性が高い。一方, 数種のアイソザイムが存在する GST の誘導現象に関しては, 初代培養肝細胞において 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB や 3, 4, 5, 3', 4', 5'-HCB などの高毒性のコプラナーつまり MC 型 PCB によってのみ, GST アイソザ

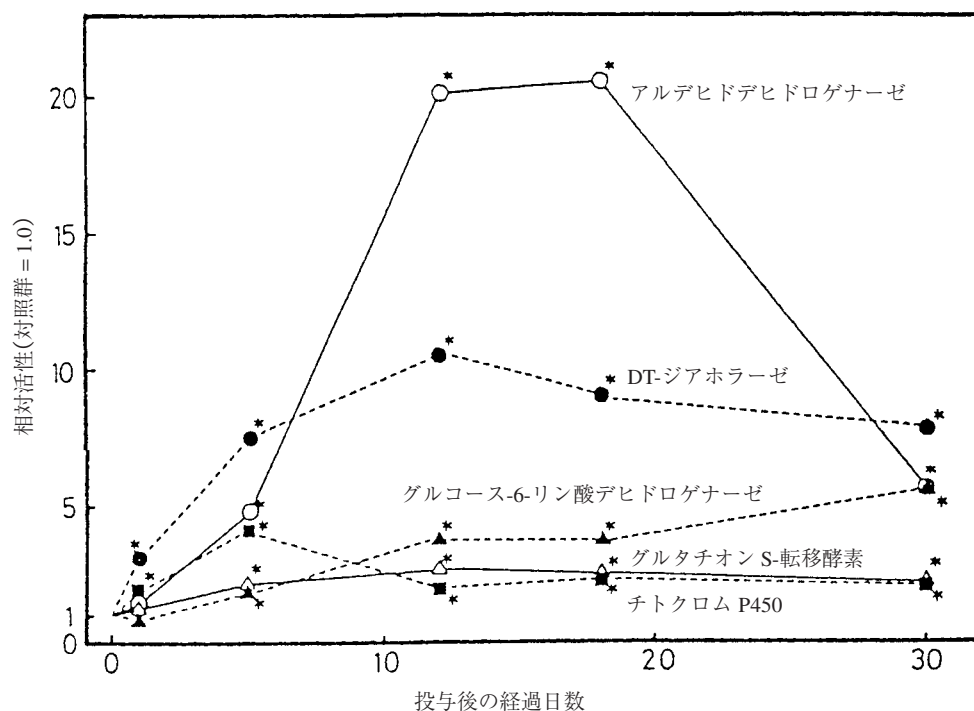


図 6.2.8. 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 単回投与後の肝酵素誘導作用の経日変化  
 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB は 0.5mg/kg を 1 回経口投与.  
 \* 対照群に比し, 統計的に有意な差 ( $P < 0.05$ ).  
 文献 95) より引用.

イムの P-型が誘導されるという興味ある事実が示されている (96)。この GST アイソザイムの P-型は通常は胎盤や肺, 脾臓には見られるものの, 肝では余り有意な発現が見られないアイソザイムであり (97), 肝での発現は化学発癌剤による前癌状態や肝癌時に認められる (98) ことから, 肝癌病変の病理学的指標として用いられている酵素でもある (99)。

また有害な過酸化脂質の消去能を有するグルタチオンパーオキシダーゼ活性は 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 前処理によってのみ減少したが, 生成する過酸化脂質の量には両 PCB 間で差は見られなかった。この知見は 0.05% PCB 混合物を含有する餌をラットに与えたところ, グルタチオンパーオキシダーゼ活性の低下とともに過酸化脂質量の増大を認めたという斎藤ら (100) の結果とは異なるが, その違いの原因は目下のところ不明である。

ダイオキシン類に対する毒性に比較的に強い抵抗性を示すハムスターでは, 0.5 mg/kg の 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF 単回投与により GST やアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の中程度の増加は見られたが, 解糖系酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性への影響は認められなかった (70)。一方, ダイオキシン類による毒性に対し高感受性を示すモルモットでは, AHH や DT-ジアホラーゼなどの典型的な MC 型誘導の指標については余り顕著に増大しないことは既に述べた (6.2.7 項参照) が, 新たに肝ミクロソームの UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ活性が, 3, 4, 3', 4'-TCB や 3,

4, 5, 3', 4'-PenCB などの MC 型 PCB により有意に増加することが明らかとなった (65, 66)。しかもその誘導の強さは毒性(肝肥大)の強さによく相関することも示された (図 6.2.9)。他方, ラットにおいては MC 型 PCB により UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ活性は有意に減少し, 肝肥大とは負の相関となり, ここでも PCB や PCDF に対する生化学的, 毒性学的応答には大きな動物種差が存在することがあらためて明らかとなった。

#### 6.2.10. PCB および関連化合物による毒性発現機構

この章を通して少なくともラットやマウスにおいて毒性を示す PCB や PCDF は, 例外なく肝 MFO や DT-ジアホラーゼに対して MC 型誘導能を示すこと, またその逆に MC 型誘導能を示す PCB や PCDF は強い毒性を有することを繰り返し述べてきた。しかも, その両者の間には高い相関性がうかがえることも示した。ほぼ同様の結果は Pland ら (16) によっても PCDD や PCDF, PCB など一

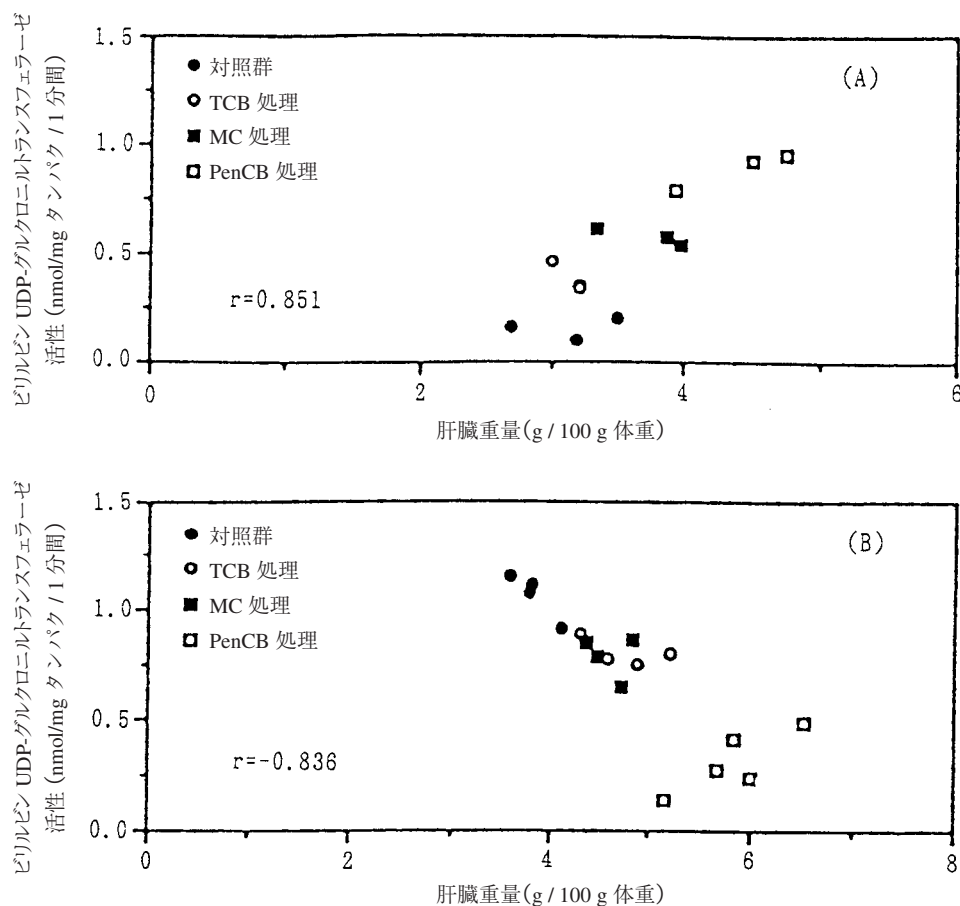


図 6.2.9. MC および MC 型 PCB (3, 4, 3', 4'-TCB; 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB) 前処理によるビリルビン UDP-グルクロニルトランスフェラーゼの誘導と肝肥大との相関性における動物種差。(A) モルモット, (B) ラット  
文献 65) より引用。



連の有毒なコプラナーなポリハロゲン化芳香族化合物について報告された。さらに彼らはこれらの化合物による MC 型誘導能の発現にはサイトソール中の Ah-レセプターが関与していること、また毒性の強さは Ah-レセプターに対する親和性の強さと極めて近似していることを明らかにした。そして実際に遺伝的に Ah-レセプターの感受性が異なる 2 系統の近交系マウス (Ah 応答性 C57BL マウスと Ah 非応答性 DBA マウス) を用いて、毒性と誘導能についての比較検討を行なった。その結果、胸腺の萎縮などの毒性は Ah 応答性の C57BL マウスにおいてより高感度に発現するという Ah-レセプターの関与が示された (16, 62)。

以上のことから、少なくともマウスやある系統のラットでのコプラナーなポリハロゲン化芳香族化合物の毒性発現は、これら化合物の Ah-レセプターへの結合が必須の初発反応であることが強く示唆される。一方、その結果として起こる肝 MFO や DT-ジアホラーゼに対する MC 型誘導そのものと毒性とが、どのような因果関係で繋がるのかという点の詳細については必ずしも明らかではない。しかしながら、両者を関連付ける要因の一部として少なくとも以下のような幾つかの可能性が考えられよう。まず第一点は MC 型誘導により肝 P450 分子種構成に劇的変化がもたらされ、それによりステロイドホルモンや脂肪酸など内因性生理活性基質の代謝が乱れることに起因する直接的な有害作用である。前述したように、3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 前処理ラット肝ではテストステロンやプロゲステロンの異化代謝が大きく変化することが確かめられている (53, 80)。また、最近アラキドン酸からエイコサテトラエン酸のモノヒドロキシ体 (HETEs) やエポキシ体 (EETs) への酸化反応も、P450 により触媒されることが明らかにされたが (101)、実際に 2, 3, 7, 8-TCDD や 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 前処理によりアラキドン酸代謝が影響をうけることが示され、そのことによる直接的、間接的なプロセスを通しての毒性発現の可能性も示唆されている (102, 103, 104)。第二点は誘導された特定の P450 分子種による、ある種の生体異物の代謝的活性化(毒性化)によってもたらされる間接的な有害作用の可能性である。例えば 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB によって顕著に誘導される P450 1A2 (P448 H) は 2-アセチルアミノフルオレンなどの発癌性芳香族アミン類 (83)、および Trp-P-2 や Glu-P-1 など (84) タンパク質食品の焼け焦げ中に含まれる強力な化学発癌剤の活性化を触媒する分子種であることが示されている。さらに 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB はラット腎ミクロソームによるスルファニルアミドの N<sup>4</sup>-水酸化反応を著しく高めることも明らかとなり、そのこととこの薬物による腎毒性との関連の可能性が疑われている (105)。加えて MC 型誘導によって顕著に誘導されるもう一つの酵素である DT-ジアホラーゼには、4-NQO を究極の発癌性代謝物である 4-ヒドロキシアミノキノリン N-オキシドへと活性化する機能があり (24)、実際に 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB 前処理ラットでは肝や肺、皮膚において、この活性化反応が著しく高くなる (25) ことは既に 6.2.3 項で述べた。

しかしながら、一方ではポリハロゲン化芳香族化合物による毒性発現機構における Ah-レセプター関与の必然性については、現段階では説明がつかない幾つかの疑問点があるのもまた事実である (61, 106)。その主なものは以下の通りである。① 誘導された MFO (AHH) 自身の毒性発現への関与は果たしてどれほどあるのか? 確かにステロイドや脂肪酸、脂溶性ビタミンなど生理的に重要な内因性基質の代謝が大きく変動することは事実としても、そのことだけでこの種の化合物による特徴的で多彩な毒性スペクトルを一義的に説明するのは困難である。もしかすると MFO や DT-ジアホラーゼの誘導自身が毒性発現に直接係わっているのではなく、むしろこれらの誘導現象は一種の毒



性的レスポンスそのものではないかということも考えられる。② Ah-レセプターの組織中レベルや親和性の差が毒性発現の感受性を規定するのか？ 前述のように、PCB や PCDF などのポリハロゲン化芳香族化合物による毒性発現には顕著な動物種差が認められる。例えば、2,3,7,8-TCDD の致死毒性 (LD<sub>50</sub>) に関しては、高感受性のモルモットと低感受性のハムスターでは実に 5,000 倍の差がある。にもかかわらず、肝サイトソール中の Ah-レセプターの結合親和性や組織中濃度は、ラットや Ah 応答性の C57BL マウス、ウサギのみならずモルモットとハムスター間においても余り大きな種差は認められない。さらに、2,3,7,8-TCDD の致死毒性に対してかなり異なる感受性を示す Han-Wistar ラットと Long-Evans ラットにおいても、肝の Ah-レセプターのレベルや MFO 活性には差が認められないという報告もある (107)。③ ポリハロゲン化芳香族化合物と多環芳香族化合物との毒性に質的な違いがあるのは何故か？ この両種の化合物はともに Ah-レセプターを介した AHH や DT-ジアホラーゼ活性の誘導能を示すが、クロルアクネや強い致死毒性などポリハロゲン化芳香族化合物に特徴的な毒性は、MC やベンツピレンなどの多環芳香族化合物では見られない。これら諸々の事実はポリハロゲン化芳香族化合物による毒性発現には、Ah-レセプターが関与しない機構を含めて多様なメカニズムの存在を示唆するものである。

その一つが Brouwer と van den Berg (108) によって提起されたビタミン A や甲状腺ホルモンのチロキシンの作用の乱れを介する機構である。MC 型 PCB の原型である 3,4,3',4'-TCB 前処理によりラットの血清中ビタミン A 濃度の著しい低下が認められること、また 3,4,3',4'-TCB の水酸化代謝物が血清中のチロキシン結合タンパクのトランスチレチン (transthyretin) と結合しうることが明らかにされた。他の MC 型 PCB である 3,4,5,3',4',5'-HCB によってもマウスの血清中ビタミン A の減少が認められたが、PB 型 PCB である 2,4,3',4'-TCB や 2,4,5,2',4',5'-HCB では認められなかったという。トランスチレチンはチロキシンのキャリアータンパクであるばかりでなく、ビタミン A 輸送担体でもあることから、3,4,3',4'-TCB の水酸化代謝物の結合によりこれら重要な生理活性物質の動態に変化を来し、ひいてはトランスチレチン関与の生理的機能が乱されると推定される。高毒性の MC 型 PCB や PCDF などによる衰弱症状などはこれらの延長線上にある毒性とも考えられる。しかしながら、果たして 3,4,3',4'-TCB 以外の高毒性の MC 型 PCB や PCDF 自身、もしくはその代謝物にもトランスチレチン結合能があるのかどうか、またトランスチレチンの機能の乱れがチロキシンなどの甲状腺ホルモンの働きにどのように影響を与えるのかなどの詳細は不明である。

また最近、ある特定の構造を有する PCB の水酸化代謝物自身に、近年高い社会的関心を集めている内分泌攪乱(いわゆる環境ホルモン)作用があることが明らかにされつつあり、MC 型 PCB 以外の PCB の毒性評価という点で興味深い。例えば 4'-hydroxy 2,4,6-TCB のようなビフェニル環の一方にのみ塩素置換を有する PCB の、置換塩素がないフェニル基の p-位の水酸化代謝物にはエストロゲン作用 (109) が、一方逆に 4-hydroxy 2,3,5,6,2',4',5'-HepCB のような 6 塩素化以上の高塩素化 PCB のフェノール性代謝物には、抗エストロゲン作用 (110) が見いだされている。内分泌攪乱化学物質の胎児への生体影響は極めて低レベルでも認められる (111) ということを考慮すれば、経胎盤曝露を受けた胎児性油症患者に見られる症状との係わりも推察される。

さらに最近、Ah-レセプターとの相互作用を介するが結果的に MFO や DT-ジアホラーゼの誘導現象とは無関係な新たな毒性発現機構が提唱された (106)。“タンパク質リン酸化経路 (protein phos-

phorylation pathway)”と呼ばれるこの機構は、2, 3, 7, 8-TCDD 処理によりラット肝細胞膜のタンパク質リン酸化 (protein kinase) 活性が上昇するという知見に基づく、細胞内シグナル伝達系の変動に起因するというものである。すなわち、その仮説ではまずサイトソール中で hsp とともに Ah-レセプターと複合体を形成している不活性型 protein kinase SRC が、2, 3, 7, 8-TCDD などのリガンドの結合により遊離し活性型となる。次いでこの活性化された SRC により RAS や MAP kinase などの活性化などを通して、いわゆる“成長因子シグナル伝達 (growth factor signal transduction)”系が作動し、ついには AP-1 などの転写因子のリン酸化が起こる。その結果として、即時型遺伝子 (immediate early genes) の転写活性化を通して、さまざまな細胞機能の変調へとつながるというものである。また活性化された SRC はサイトソールや細胞膜の重要な機能を担うほかのタンパク質をリン酸化することによっても正常な機能を逸脱させる可能性がある。

以上述べてきたように、現在までのところ PCB や PCDF, PCDD などのポリハロゲン化芳香族化合物による共通した毒性の発現機構に関しては、様々な実験事実をもとに幾つかの説が提起されているが、いずれも部分的あるいは不完全なものにとどまっている。おそらくその実相は単一のメカニズムで説明しうるほど単純なものではなく、多岐にわたる複雑な機構の総合されたものであろう。この毒性発現機構の総合的な理解のためにはさらに多面的な角度からのアプローチが必要である。その具体的試みの一つとして新たな視点から分子レベルでの生化学的検討が進められているが、その詳細については本節に続く本章 6.3 を参照されたい。

#### 文 献

- 1) 藤田節治, 辻 宏, 加藤敬太郎, 等 (1971) Biphenyl chloride 誘導体のラット肝ミクロゾームに与える影響. 福岡医誌 62, 30–34.
- 2) Litterst, C. L., Farber, T. M., Baker, A. M., et al. (1972) Effect of Polychlorinated biphenyls on hepatic microsomal enzymes in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 112–122.
- 3) Cooper, D. Y., Rosenthal, O., Levine, S., et al. (1965) Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase system. Science 147, 400–402.
- 4) Conney, A. H., Miller, E. C., Miller, J. A. (1956) The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. Cancer Res. 16, 450–460.
- 5) Remmer, H., Merker, H. T. (1963) Drug induced changes in the liver endoplasmic reticulum: Association with drug metabolizing enzymes. Science 142, 1657–1658.
- 6) Risebrough, R. W., Reiche, P., Peakall, D. B., et al. (1968) Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. Nature (London) 220, 1098–1102.
- 7) 小松富美子, 田中 潔 (1971) Chlorobiphenyls による hexobarbital 麻酔短縮現象と血清中性脂肪の変動. 福岡医誌 62, 35–41.
- 8) Conney, A. H. (1976) Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharmacol. Rev. 19, 317–366.
- 9) Alvares, A. P., Bickers, D. R., Kappas, A. (1973) Polychlorinated biphenyls, a new type of inducer of cytochrome P-448 in the liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1321–1325.
- 10) Yoshimura, H., Ozawa, N., Saeki, S. (1978) Inductive effect of polychlorinated biphenyl mixture and individual isomers on the hepatic microsomal enzymes. Chem. Pharm. Bull. 26, 1215–1221.
- 11) Goldstein, J. A., Hickman, P., Bergman, H., et al. (1977) Separation of pure polychlorinated biphenyl isomers into two types of inducers on the basis of induction of cytochrome P-450 or P-448. Chem. Biol. Interact. 17, 69–87.
- 12) Poland, A., Glover, E. (1973) Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins: Potent inducers of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase and aryl hydrocarbon hydroxylase. Mol. Pharmacol. 9, 736–747.

- 13) Poland, A., Glover, E., Kende, A. S. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of ary hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 251, 4936–4946.
- 14) Poland, A., Glover, E., Kende, A. S., et al. (1976) 3, 4, 3', 4'-Tetrachloroazoxybenzene and azobenzene: Potent inducers of ary hydrocarbon hydroxylase. *Science* 194, 627–630.
- 15) Poland, A., Glover, E. (1977) Chlorinated biphenyl induction of ary hydrocarbon hydroxylase activity: A study of the structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 13, 924–938.
- 16) Poland, A., Greenlee, W. F., Kende, A. S. (1979) Studies on the mechanism of the action of the chlorinated dibenzo-*p*-dioxin and related compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320, 214–230.
- 17) McKinney, J. D., Chae, K., Gupta, B. N., et al. (1976) Toxicological assessment of hexachlorobiphenyl isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in chicks. I. Relationship of chemical parameters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 36, 65–80.
- 18) Goldstein, J. A., McKinney, J. D., Lucier, G. W., et al. (1976) Toxicological assessment of hexachlorobiphenyl isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in chicks. II. Effects on drug metabolism and porphyrin accumulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 36, 81–92.
- 19) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N., et al. (1979) Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320, 179–192.
- 20) Ryan, D. E., Lu, A. Y. H., Kawalek, J., et al. (1975) Highly purified cytochrome P-448 and P-450 from rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 1134–1141.
- 21) Thor, H., Smith, M. T., Hartzell, P., et al. (1982) The metabolism of menadione (methyl-1, 4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implication of oxidative stress in intact cells. *J. Biol. Chem.* 257, 12419–12425.
- 22) Beatty, P. W., Neal, R. A. (1976) Induction of DT-diaphorase by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 197–204.
- 23) Lind, C., Ernster, L. (1974) A possible relationship between DT-diaphorase and the ary hydrocarbon hydroxylase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 392–400.
- 24) Sugimura, T., Okabe, K., Nagao, M. (1966) The metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide, a carcinogen. III. An enzyme catalyzing the conversion of 4-nitroquinoline 1-oxide to 4-hydroxylaminoquinoline 1-oxide in rat liver and hepatoma. *Cancer Res.* 26, 1717–1721.
- 25) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Koga, N., et al. (1985) Inductive effect on hepatic enzymes and toxicity of congeners of PCBs and PCDFs. *Environ. Health Perspec.* 59, 113–119.
- 26) Kimbrough, R. D., Linder, R. E., Gaines, T. B. (1972) Morphological changes in livers of rats fed polychlorinated biphenyls. *Arch. Environ. Health* 25, 354–364.
- 27) Hansell, M. M., Ecobichon, D. J. (1974) Effects of chemically pure chlorobiphenyls on the morphology of rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 28, 418–427.
- 28) Kimbrough, R. D. (1974) The toxicity of polychlorinated polycyclic compounds and related chemicals. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 2, 442–498.
- 29) Kuroki, H., Masuda, Y. (1977) Structures and concentration of the main components of polychlorinated biphenyls retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 6, 469–474.
- 30) Yoshihara, S., Kawano, K., Yoshimura, H., et al. (1979) Toxicological assessment of highly chlorinated biphenyl congeners retained in the Yusho patients. *Chemosphere* 8, 531–538.
- 31) 佐伯清太郎, 吉原新一, 内野泰治, 等 (1979) 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl の合成について. 福岡医誌 70, 85–87.
- 32) Ahlborg, U. G., Becking, G. C., Birnbaum, L. S., et al. (1994) Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere* 28, 1049–1067.
- 33) 樫本 隆, 宮田秀明, 高山幸司, 等 (1987) 高分解能 MS-SIM 法による油症患者組織および原油中の PCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs. 福岡医誌 78, 320–324.
- 34) 吉村英敏, 吉原新一 (1979) Ames 試験の有効性をめぐって II. 代謝活性化に用いられる PCB の誘導効果, 変異原と毒性 6, 46–57.
- 35) Miyata, H., Kashimoto, T., Kunita, N. (1978) Studies on the compounds related to PCBs (V). Detection and

- determination of unknown organochlorinated compounds in Kanemi rice oil caused the Yusho. *J. Food Hyg. Soc.* 19, 364–371.
- 36) Nagayama, J., Kuratsune, M., Masuda, Y. (1976) Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and “Yusho oil”. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15, 9–13.
- 37) Nagayama, J., Masuda, Y., Kuratsune, M. (1976) Determination of chlorinated dibenzofurans in tissues of patients with “Yusho”. *Food Cosmet. Toxicol.* 15, 195–198.
- 38) Kuroki, H., Masuda, Y. (1978) Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 7, 771–777.
- 39) Vos, J. G., Koeman, J. H. (1970) Comparative toxicologic study with polychlorinated biphenyl in chickens with special reference to porphyria, edema formation, liver necrosis and tissue residues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 17, 656–668.
- 40) Oishi, S., Morita, M., Fukuda, H. (1978) Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43, 13–22.
- 41) Nishizumi, M. (1978) Acute toxicity of polychlorinated dibenzofurans in CF-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45, 209–212.
- 42) 佐伯清太郎, 小沢直記, 吉村英敏 (1977) 2-Chloro および 1, 4, 8-Trichlorodibenzofuran の合成とそのマウス成長ならびにラット肝ミクロゾーム薬物代謝酵素に及ぼす影響. *福岡医誌* 68, 96–103.
- 43) Moore, J. A., McConnell, E. E., Dalgard, D. W., et al. (1979) Comparative toxicity of three halogenated dibenzofurans in guinea pigs, mice and rhesus monkeys. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320, 151–163.
- 44) Yoshihara, S., Nagata, K., Yoshimura, H., et al. (1981) Inductive effect on hepatic enzymes and acute toxicity of individual polychlorinated dibenzofuran congeners in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59, 580–588.
- 45) Rappe, C., Buser, H. R., Kuroki, H., et al. (1979) Identification of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 8, 259–266.
- 46) Kuroki, J., Koga, N., Yoshimura, H. (1986) High affinity of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsomes of rats. *Chemosphere* 15, 731–738.
- 47) Kuratsune, M., Yoshimura, T., Matsuzaka, J., et al. (1972) Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Perspec.* 1, 119–128.
- 48) Allen, J. R., Barsotti, D. A. (1976) The effects of transplacental and mammary movement of PCBs on infant rhesus monkeys. *Toxicology* 6, 331–340.
- 49) Kimbrough, R. D., Buckley, J., Fishbein, L., et al. (1978) Animal toxicology. *Environ. Health Perspec.* 24, 173–184.
- 50) Öberg, J., Kihlström, J. E. (1973) Effect of long-term feeding of chlorinated biphenyls (PCB, Clophen A60) on the length of the oestrous cycle and on the frequency of implanted ova in the mouse. *Environ. Res.* 6, 176–179.
- 51) Jonsson, H. T., Jr., Keil, J. E., Gaddy, R. G., et al. (1976) Prolonged ingestion of commercial DDT and PCB: Effects on progesterone levels and reproduction in mature female rat. *Arch. Environ. Contam.* 3, 479–490.
- 52) Derr, S. K. (1978) *In vivo* metabolism of exogenous progesterone by PCB treated female rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 729–732.
- 53) Yoshihara, S., Nagata, K., Wada, I., et al. (1982) A unique change of steroid metabolism in rat liver microsomes induced with highly toxic polychlorinated biphenyl (PCB) and polychlorinated dibenzofuran (PCDF). *J. Pharm. Dyn.* 5, 994–1004.
- 54) Shigematsu, N., Ishimaru, S., Saito, R. (1978) Respiratory involvement in polychlorinated biphenyls poisoning. *Environ. Res.* 16, 92–100.
- 55) 中西洋一, 栗田幸男, 鐘ヶ江秀明, 等 (1985) 油症における呼吸器系ならびに免疫系の障害——経過ならびに発病機序について. *福岡医誌* 76, 196–203.
- 56) Boyd, M. R. (1977) Evidence for a Clara cell as a site of cytochrome P-450 dependent mixed function oxidase activity in lung. *Nature (London)* 269, 713–715.
- 57) Brandt, I., Bergman, A., Wachtmeister, A. (1976) Distribution of polychlorinated biphenyls: Structural requirements for accumulation in the mouse bronchial mucosa. *Experientia* 32, 497–498.

- 58) Lake, B. G., Collins, M. A., Harris, R. A., et al. (1979) The induction of hepatic and extrahepatic xenobiotic metabolism in the rat and ferret by a polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254). *Xenobiotica* 9, 723–731.
- 59) Ueng, T.-H., Eiseman, J. L., Alvares, A. P. (1980) Inhibition of pulmonary cytochrome P-450 and benzo[a]pyrene hydroxylase in rabbits by polychlorinated biphenyl (PCBs). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1743–1749.
- 60) Yoshihara, S., Nagata, K., Yoshimura, H. (1983) Different responsiveness of hepatic and pulmonary microsomal mixed function oxidases to phenobarbital-type and 3-methylcholanthrene-type polychlorinated biphenyls in rats. *J. Pharm. Dyn.* 6, 954–962.
- 61) Poland, A., Knutson, J. C. (1982) 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 517–554.
- 62) 吉原新一, 永田 清, 和田郁夫, 等 (1983) 3-Methylcholanthrene 型 PCB による肝酵素誘導と毒性発現について. *福岡医誌* 74, 209–216.
- 63) Kumaki, K., Jensen, N. M., Shire, J. G., et al. (1977) Genetic differences in induction of cytosol reduced-NAD (P): menadione oxidoreductase and microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase in the mouse. *J. Biol. Chem.* 252, 157–165.
- 64) 吉村英敏, 和田郁夫, 古賀信幸, 等 (1981) 3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニルのモルモットに対する急性毒性ならびに肝酵素の誘導作用. *福岡医誌* 72, 149–154.
- 65) 小栗一太, 古賀淑子, 津田 実, 等 (1993) Coplanar PCB による肝ビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素の誘導——モルモットとラット間の顕著な相違——. *福岡医誌* 84, 175–180.
- 66) Koga, Y., Tsuda, M., Ariyoshi, N., et al. (1994) Induction of bilirubin UDP-glucuronyltransferase and CYP 4A1 P450 by co-planar PCBs: Different responsiveness of guinea pigs and rats. *Chemosphere* 28, 639–645.
- 67) Holcomb, M., Yao, C., Safe, S. (1988) Binding and toxic effects of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran congeners in the guinea pig. Quantitative structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 37, 1535–1539.
- 68) Beaty, P. W., Neal, R. A. (1978) Factors affecting the induction of DT-diaphorase by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem. Pharmacol.* 27, 505–510.
- 69) Bains, S. K., Gardiner, S. M., Mannheiler, K., et al. (1985) Immunochemical study on the contribution of hypolipidaemic-induced cytochrome P452 to the metabolism of lauric acid and arachidonic acid. *Biochem. Pharmacol.* 34, 3221–3229.
- 70) 古賀信幸, 中嶋 寛, 神村英利, 等 (1989) 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran のハムスターにおける生体内分布, 肝酵素誘導および急性毒性. *福岡医誌* 80, 227–234.
- 71) 五島応安, 坂口謙徳, 小川清文 (1969) 油症患者使用ライスオイルならびにカネクロール 400 の鶏における毒性試験. *福岡医誌* 60, 533–538.
- 72) 外間由美子, 永野磯美, 古賀信幸, 等 (1985) 3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニルのニワトリ(ヒナ)に対する急性毒性並びに肝酵素誘導作用. *福岡医誌* 76, 167–174.
- 73) 吉原新一, 小沢直記, 吉村英敏, 等 (1979) サルの PCB 中毒症に関する予備的研究. *福岡医誌* 70, 135–171.
- 74) 吉村英敏, 吉原新一, 古賀信幸, 等 (1981) サルの PCB 中毒症に関する研究(第2報). *福岡医誌* 72, 155–184.
- 75) Barsotti, D. A., Marlar, R. J., Allen, J. R. (1976) Reproductive dysfunction in rhesus monkeys exposed to low levels of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1248). *Food Cosmet. Toxicol.* 14, 99–103.
- 76) Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., et al. (1996) P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1–42.
- 77) Gonzalez, F. J. (1989) The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacol. Rev.* 40, 243–288.
- 78) Wood, A. W., Ryan, D. E., Thomas, P. E., et al. (1983) Regio- and stereoselective metabolism of two C<sub>19</sub> steroids by five highly purified and reconstituted rat hepatic cytochrome P-450 isozymes. *J. Biol. Chem.* 258, 8839–8847.
- 79) Nagata, K., Buppodom, P., Matsunaga, T., et al. (1985) Purification and characterization of seven distinct forms of liver microsomal cytochrome P-450 from untreated and inducer-treated male Wistar rats. *J. Biochem.* 97, 1755–1766.
- 80) Nagata, K., Matsunaga, T., Buppodom, P., et al. (1985) Unique induction of cytochrome P-450 isozymes in rat



- liver microsomes by treatment with 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl and its effect on testosterone metabolism. *J. Pharm. Dyn.* 8, 948-957.
- 81) Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., et al. (1987) The P-450 superfamily: Recommended nomenclature. *DNA* 6, 1-11.
- 82) Parkinson, A., Safe, S. H., Robertson, L. W., et al. (1983) Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats. A study of structure-activity relationships. *J. Biol. Chem.* 258, 5967-5976.
- 83) Goldstein, J. A., Weaver, R., Sundheimer, D. W. (1984) Metabolism of 2-acetylaminofluorene by two 3-methylcholanthrene-inducible forms of rat liver cytochrome P-450. *Cancer Res.* 44, 3768-3771.
- 84) Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., et al. (1983) A high-spin form of cytochrome P-450 highly purified from polychlorinated biphenyl-treated rats. Catalytic characterization and immunochemical quantitation in liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* 24, 146-155.
- 85) Kuroki, H., Masuda, Y., Yoshihara, S., et al. (1980) Accumulation of polychlorinated dibenzofurans in the livers of monkeys and rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 18, 387-392.
- 86) Ozawa, N., Yoshihara, S., Yoshimura, H. (1979) Selective induction of rat liver microsomal cytochrome P-448 by 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl and its effect on liver microsomal drug metabolism. *J. Pharm. Dyn.* 2, 309-319.
- 87) Wroblewski, V. J., Gessner, T., Olson, J. R. (1988) Qualitative and quantitative differences in the induction and inhibition of hepatic benzo[a]pyrene metabolism in the rat and hamster. *Biochem. Pharmacol.* 37, 1509-1517.
- 88) Koga, N., Ariyoshi, N., Nakashima, H., et al. (1990) Purification and characterization of two forms of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran-inducible cytochrome P-450 in hamster liver. *J. Biochem.* 107, 826-833.
- 89) Hokama, Y., Koga, N., Yoshimura, H. (1988) Purification and characterization of two forms of chicken liver cytochrome P-450 induced by 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl. *J. Biochem.* 104, 355-361.
- 90) Gonzalez, F. J., Liu, S.-Y., Yano, M. (1993) Regulation of cytochrome P450 genes: Molecular mechanisms. *Pharmacogenetics* 3, 51-57.
- 91) Whitelaw, M., Pongrantz, I., Wilhelmsson, A., et al. (1993) Ligand-dependent recruitment of the Arnt coregulator determines DNA recognition by the dioxin receptor. *Mol. Cell Biol.* 13, 2504-2514.
- 92) Baars, A. J., Jansen, M., Breimer, D. D. (1978) The influence of phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on glutathione S-transferase of rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 27, 2487-2494.
- 93) Deitrich, R. A., Bludeau, P., Stock, T., et al. (1977) Induction of different rat liver supernatant aldehyde dehydrogenases by phenobarbital and tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Biol. Chem.* 252, 6169-6176.
- 94) Neal, R. A., Beaty, P. W., Gasiewicz, T. A. (1979) Studies of the mechanisms of toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320, 204-213.
- 95) 古賀信幸, 黒木 淳, 外間由美子, 等 (1985) PCB 異性体によるラット肝可溶性酵素の誘導. 福岡医誌 76, 160-166.
- 96) Aoki, Y., Satoh, K., Sato, K., et al. (1992) Induction of glutathione S-transferase P-form in primary cultured rat liver parenchymal cells by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Biochem. J.* 281, 539-543.
- 97) Kano, T., Sakai, M., Muramatsu, M. (1987) Structure and expression of a human class  $\pi$  glutathione S-transferase messenger RNA. *Cancer Res.* 47, 5626-5630.
- 98) Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., et al. (1985) Purification, induction and distribution of placental glutathione transferase: A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3964-3968.
- 99) Sato, K. (1989) Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 52, 205-255.
- 100) 斎藤衛郎, 池上幸江, 印南 敏, 等 (1981) PCB 投与ラット肝臓における過酸化脂質の生成と薬物代謝酵素, グルタチオンパーオキシダーゼ, ビタミン E との関連. 福岡医誌 72, 142-148.
- 101) Capdevila, J., Chacos, N., Werrigloer, J., et al. (1981) Liver microsomal cytochrome P-450 and oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5362-5366.
- 102) Rifkind, A. B., Gannon, M., Gross, S. S. (1990) Arachidonic acid metabolism by dioxin-induced cytochrome P-450: A new hypothesis on the role of P-450 in dioxin toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 1180-1188.
- 103) Huang, S., Gibson, G. G. (1991) Differential induction of cytochromes P-450 and cytochrome P-450-dependent



- arachidonic acid metabolism by 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl in the rat and the guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108, 86–95.
- 104) Huang, S., Gibson, G. G. (1992) Species and congener specific induction of hepatic cytochrome P450 4A by polychlorinated biphenyls. *Biochem. Pharmacol.* 43, 637–639.
  - 105) Eyanagi, R., Shigematsu, H., Yoshida, K., et al. (1982) Enhancement of sulfanilamide N<sup>4</sup>-hydroxylase activity in kidney and liver microsomes of rats by pretreatment with 3-methylcholanthrene type polychlorinated biphenyl. *J. Pharm Dyn.* 5, 853–858.
  - 106) Matsumura, F. (1994) How important is the protein phosphorylation pathway in the toxic expression of dioxin-type chemicals? *Biochem. Pharmacol.* 48, 215–224.
  - 107) Pohjanvirta, R., Juvoneu, R., Karenlampi, S., et al. (1988) Hepatic Ah-receptor levels and the effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on hepatic microsomal monooxygenase activities in a TCDD-susceptible and resistant rat strain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92, 131–140.
  - 108) Brouwer, A., van den Berg, K. J. (1986) Binding of a metabolite of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85, 301–312.
  - 109) Korach, K. S., Sarver, P., Chae, K., et al. (1988) Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: Conformationally restricted structural probes. *Mol. Pharmacol.* 33, 120–126.
  - 110) Moore, M., Mustain, M., Daniel, K., et al. (1997) Antiestrogenic activity of hydroxylated polychlorinated biphenyl congeners identified in human serum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 160–168.
  - 111) vom Saal, F. S., Cooke, P. S., Buchanan, D. L., et al. (1998) A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Indust. Health* 14, 239–260.

### 6.3. 油症発症機構に関する生化学的研究

石井祐次, 小栗一太

#### 6.3.1. 序 論

油症の治療を困難にしている理由の一つに、原因物質による毒作用の機構が完全には理解されていないことが挙げられる。しかし、油症原因物質が広範な生化学的変化を及ぼすことがかなり明らかになってきた。肝臓のシトクロム P450 など薬物代謝酵素の誘導現象もその一つである。原因物質は、その受容体としての役割を有する AhR (芳香属炭化水素レセプター, Ah-receptor) というタンパク質に結合する。AhR は、タンパク質の発現を制御する転写調節因子であり、原因物質が結合した AhR が、その制御支配をうけるタンパク質の発現を増大したり、減少するために生体の機能に変調を来すと考えられている。この作用機構は、ダイオキシン類に共通する作用機構である。すなわち、油症はダイオキシン類で汚染された食用油によって起こった食中毒事件であると基本的に捉えて研究をすすめることができる。この項では、PCB 同族体の内でも最も毒性の高い化合物 PCB 126 をモデル化合物として行なった生化学的研究について述べる。

この項の研究において使用した 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB, PCB 126) あるいは 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 169) のように、オルト位に塩素置換がなく平面構造を取り得る PCB 同族体は、コプラナー PCB と呼ばれている。これらの同族体は、2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) や 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, いわゆるダイオキシン) と類似の毒性を示すとともに、シトクロム P450 1A1 (CYP1A1) に代表される薬物代謝酵素の誘導作用を有している (1) (図 6.3.1)。また、ダイオキシンおよびこれら類縁化合物は、いずれも AhR に強い結合性をもつリガンドでもあって、マウスやラットでの AhR を介した酵素誘導能の強さが、毒性の強さとはよく相関することから、AhR はダイオキシン類の毒性発現に関わっていると考えられてきた (2-4)。

AhR は、1992 年にクローン化の報告がなされた (5)。そのアミノ酸配列から、PAS ドメインをもつ転写調節因子ファミリーの一員であることが明らかになり、現在では、AhR のノックアウトマウ

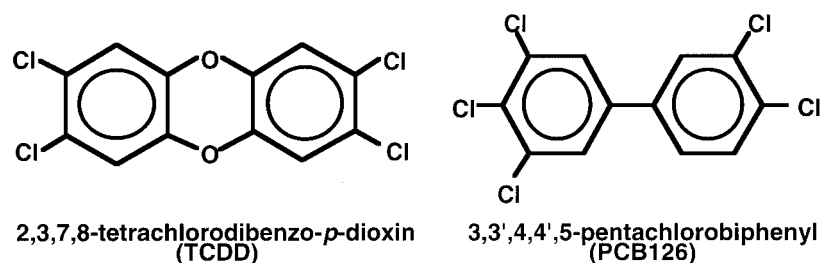


図 6.3.1. TCDD および PCB 126 の構造

スも作成されるに至っている。AhR ノックアウトマウスを用いた研究から、催奇形性などの毒作用が消失することから、AhR がダイオキシンの毒性発現に大きく関わるものと考えられている (6-8)。さらに、以前から知られていた Ah-応答性の C57BL マウスと Ah-弱応答性の DBA マウスの応答性の違いは、AhR のアミノ酸配列に基づく一次構造の違いから機能に差が生じていることが明らかにされ、ダイオキシンや 3-メチルコラントレン (3-MC) への著しい生体の反応性の差は、AhR のリガンドとの結合性の違いが反映されていることも明らかにされた (4)。このような AhR の構造と機能をヒトに適用して考えるとき、ヒトの AhR は、Ah-弱応答性の DBA マウスのそれと類似していることも明らかにされたので、あるいはヒトは、ダイオキシン類に弱応答性なのかも知れない (9)。このように、ダイオキシン類の毒性における AhR の関わり的重要性には客観的証拠が揃って、油症原因物質が結合するレセプターの研究は、周辺領域の研究の進展と共にかなり明らかになってきた。しかし、AhR が本来機能している内因性のリガンドは未だに明確にはなっていないので、AhR はオーファンレセプター(孤児レセプター)に分類されている。

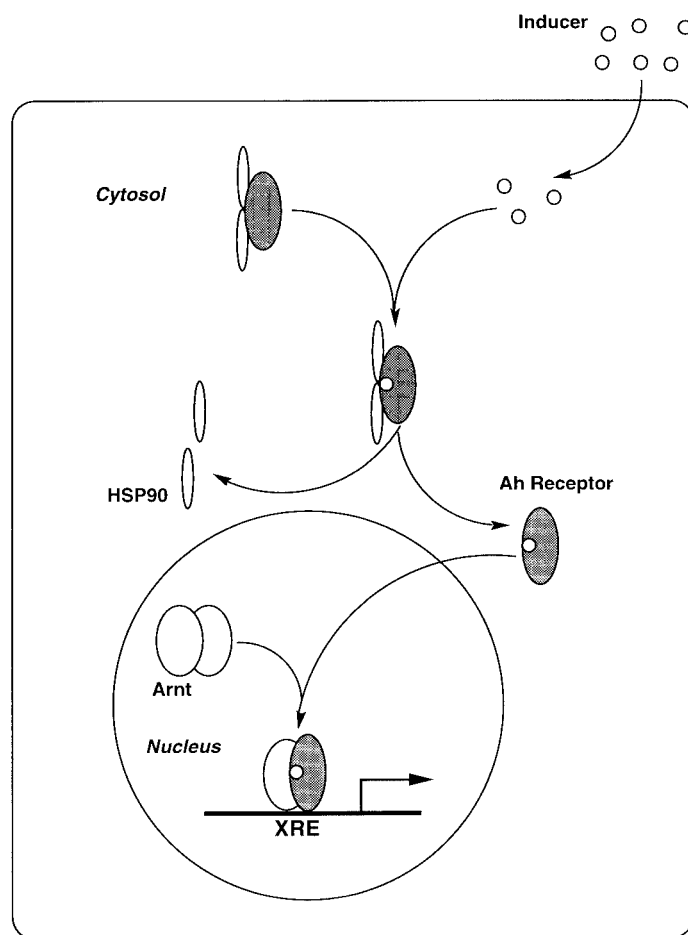


図 6.3.2. Ah-レセプターを介した異物応答性遺伝子の誘導  
(Sogawa & Fujii-Kuriyama, 1997; ref 4) より改変

AhR を介するダイオキシン類の作用機構はかなり明らかになってきた。細胞質内にあってリガンドと結合した AhR は核内に移行し、PAS タンパク質である Arnt (AhR nuclear translocator) とヘテロ 2 量体を形成する。ついで、遺伝子の転写調節領域に存在する XREs (xenobiotic responsive elements) というコンセンサス配列を認識して、転写調節因子として結合し、転写の活性化を引き起こすことが分かっている (4) (図 6.3.2)。これまで、ラットやマウスを用いた PCB の作用の検討は、薬物代謝酵素、特にシトクロム P450 の誘導を中心に検討されてきている (1)。コプラナー PCB は、CYP1A1 および CYP1A2 の強い誘導能を示すが、その誘導能は、各々の PCB 同族体の毒性の強さとはよく相関することが分かっており、これらは、毒性の発現に AhR が関わることを強く支持している (1)。このような P450 の誘導現象を、コプラナー PCB を解毒代謝するための酵素を増加させる誘導現象と捉えることはできる。しかしながら、AhR を介さないダイオキシン類の毒性発現機構が存在することも示されつつある (10)。コプラナー PCB の作用は、消耗症候群 (wasting syndrome) をはじめとして極めて多面的であることを毒性の特徴としている。生化学的にも、シトクロム P450 の他に PCB 126 によって、NAD(P)H: キノンオキシドレダクターゼ (DT-ジアホラーゼ) などの可溶性酵素の誘導も同時に起こることが明らかにされている (1)。このことから、PCB 126 の毒性を理解するには、同じあるいは逆のベクトルで起こっている重要な生化学的な変化についても、研究する必要があると思われる。

ダイオキシンの毒性には、著しい動物種差があり、モルモットは最も感受性が高いが、ハムスターはもっとも感受性が低い。その反応性の差は、数百から数千倍もあることが分かっている。ラットの感受性は、その中間にあたる (表 6.3.1) (2, 11)。このことから、種差について検討を行なうこ

表 6.3.1. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin の急性毒性<sup>a</sup>

| 動物種 性別(系統)               | 投与経路 | LD 50(μg/kg) |
|--------------------------|------|--------------|
| モルモット (Hartley)          |      |              |
| ♂                        |      | 0.6          |
| ♂                        | 経口   | 2.0          |
| 淡水魚 (Yellow perch)       | 腹腔内  | 2-4          |
| 淡水魚 (Blue gill)          | 腹腔内  | 12-23        |
| ミンク, ♂                   | 経口   | 4.2          |
| サル, ♀                    | 経口   | < 70         |
| ラット (Sprague-Dawley)     |      |              |
| ♂                        | 経口   | 222          |
| ♀                        | 経口   | 45           |
| ラット (Hans/Wistar)        |      | > 1,400      |
| ウサギ                      | 経口   | 115          |
| ウサギ                      | 皮膚   | 275          |
| マウス, ♂                   |      |              |
| (C57B1/6)                | 経口   | 284          |
| (C57B1/6)                | 経口   | 182          |
| (DBA/2)                  | 経口   | 2,570        |
| ハムスター, ♂ (golden Syrian) | 腹腔内  | > 3,000      |
| ハムスター (golden Syrian)    | 腹腔内  | 5,051        |

<sup>a</sup> Gasiewicz, 1991 (9; refs. therein).

とを通じて、油症の発症機構解明への手掛かりが得られる可能性もあると考えた。このような背景から、著者らは、PCB 同族体中で最強の毒性を示す PCB 126 をモデル化合物として、これまで、あまり目を向けられていなかった分野へと研究を展開した。

### 6.3.2. PCB126 のビリルビン UGT および CYP4A1 への影響

PCB 126 に感受性が高いモルモットにおいては、CYP1A1 に代表される芳香属炭化水素水酸化活性 (aryl hydrocarbon hydroxylase, AHH 活性) の誘導は毒性指標には適さない。当研究室では、既に 3-MC によってモルモット肝のビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 活性が数倍に誘導されることを見いだしていた (12)。そこで消耗症候群の認められる PCB126 用量として、ラットでは 25 mg/kg (i.p.), モルモットでは 0.5 mg/kg (i.p.) を投与し、体重の経日変化を調べた。PCB126 処理ラットでは体重増加の有意な抑制が見られ、PCB126 処理モルモットでは、有意かつ顕著な体重減少が認められた。投与 5 日後、摘出臓器の重量を比較した。PCB126 処理ラットにおいては、胸腺と脾臓の萎縮、肝肥大が有意であった。PCB126 処理モルモットでは、胸腺の萎縮は認められるものの、ラットほど顕著ではなかった。脾臓については、萎縮の傾向が認められるにとどまった。肝肥大はラットと同様に認められたが、生化学的検査を除けば、体重減少がモルモットにおける PCB126 の毒性指標として最も適しているようであった。

モルモット肝のビリルビン UGT 活性は、PCB126 (0.5 mg/kg, i.p.) 処理によって、約 6 倍に誘導されることが分かった。これに対し、AHH 活性の誘導は有意ではあるものの 2 倍程度であり、ラットに見られる顕著な誘導はモルモットでは見られなかった。一方、ラットにおいてはビリルビン UGT 活性は抑制を受け、逆の相関があることも明らかになった (13)。ラットにおいてビリルビン UGT 活性は、クロフィブレートのようなペルオキシソーム増殖剤によって誘導されることが分かっていた (14)。現在では、ラットにおいてビリルビンのグルクロン酸抱合を司る酵素は、UGT1A1 であることが分かっている (15)。ペルオキシソーム増殖剤で誘導される P450 には CYP4A1 があるが、PCB126 処理によって CYP4A1 も、モルモットでは誘導、ラットでは抑制を受けることを明らかにした (16)。

現在では、ペルオキシソーム増殖剤による誘導は、転写調節因子、ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) とレチノイド-X レセプター (retinoid-X receptor, RXR) とのヘテロダイマーによるアップレギュレーションとして理解されるようになっている (17-19)。一方、モルモットでは、ペルオキシソーム増殖剤クロフィブレートで処理しても、ペルオキシソームの  $\beta$  酸化活性や CYP4A1 の活性であるラウリン酸  $\omega$  水酸化活性へはほとんど影響がないと報告されている (20)。しかしながら、最近クローン化された、モルモットの PPAR  $\alpha$  の機能解析の結果からは、モルモットの PPAR  $\alpha$  も *in vitro* では転写調節因子としてペルオキシソーム増殖剤へレスポンスするに十分な活性があることが示されている。*In vivo* では、その発現量の低さから、ペルオキシソーム増殖剤へのレスポンスが弱いと考えられている。ヒトはペルオキシソーム増殖剤へのレスポンスがない、あるいは非常に弱いとされており、モルモットは、ペルオキシソーム増殖剤の作用をヒトへ外挿するためのモデルになると期待されている (21,22)。しかしながら、このビリルビン UGT 活性や CYP4A1 の PCB126 へのレスポンスに見られる種差のメカニズムは明ら

かではない。モルモットにおける PPAR  $\alpha$  発現レベルの低さもその要因の一つであろうが、これらの酵素の遺伝子構造がモルモットでは分かっておらず、モルモットの AhR のクローン化も未だ成されていない。PPAR のリガンドになる脂肪酸やその代謝物、RXR のリガンドである 9-シスレチノイン酸、RXR とヘテロダイマーを作りうる他のホルモンレセプターおよびそのリガンド、RXR のホモダイマー、PPAR や RXR の AhR とのクロストークの有無など PCB126 の毒性との関係を明らかにするには、更なる検討が必要である。

### 6.3.3. PCB126 の脂質代謝への影響

油症に見られる特徴的な所見に高脂血症が知られている。油症事件後、半年以上という長期間に亘って、油症患者の多くに高脂血症が認められている (23)。また、油症発症から 20 年を経過した後も、油症患者の血中トリアシルグリセロール (TG) レベルと血中 PCB レベルとに有意な相関があることが報告されている (24)。ダイオキシンによる脂質代謝異常に関する報告も多いが、そのメカニズムには未解明な点が多く残されている。

#### 6.3.3.1. トリアシルグリセロールとコレステロール量への影響：モルモットとラットでの比較

まず肝臓と血漿中のトリアシルグリセロールとコレステロールレベルへの PCB 126 の影響をラットとモルモットで比較した (25)。対照群は PCB126 処理群と摂餌量を揃えた摂餌対照 (pair-fed) 群と、自由に摂餌させた自由摂餌 (free-fed) 群の 2 群とし、PCB126 による摂餌量の減少の影響も併せて検討した。PCB126 投与 5 日後の肝臓と血漿を試料とした。PCB126 (0.5 mg/kg, i.p.) 処理したモルモットでは、著しい高トリアシルグリセロール血症および高コレステロール血症が認められ、肝臓コレステロール含量も有意に増加していた。肝トリアシルグリセロール含量には増加の傾向があったが、摂餌対照群との間に有意な差は認められなかった。PCB126 (25 mg/kg, i.p.) 処理したラットの場合には、血漿中コレステロールの有意な低下が認められた。血漿中トリアシルグリセロールレベルは、摂餌対照群で有意に低下していたが、PCB126 処理群では、2 つの対照群と有意な差は認められなかった。これに対し、肝臓のトリアシルグリセロール含量は、PCB126 処理によって有意に上昇した。また、肝臓のコレステロール含量の増加は、PCB126 投与群と摂餌対照群のいずれにも認められたことから、摂餌量の減少に由来することが示唆された。このように、脂質代謝への影響にも大きな種差が存在した。

#### 6.3.3.2. 不飽和化酵素の抑制を通じたアラキドン酸生合成の抑制

このような脂質代謝異常が惹起されるメカニズムをより詳細に知る目的で、PCB126 (25 mg/kg, i.p.) を処理したラット肝の脂肪酸組成について検討した (26)。すべてのグリセロ磷脂質において、構成脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合が、摂餌対照群に比べて有意に低下していた。アラキドン酸は、エイコサノイドなど生理活性物質の前駆体であるとともに、生体膜の物性にも影響する高度不飽和脂肪酸である。油症とこの作用を直ちに関連付けることは困難であるが、注目される作用である。

アラキドン酸の組成の低下について、さらに詳細な検討が行なわれた。この作用に対応して、そ



の生合成の原料となるリノール酸の割合が有意に増加していた。また、オレイン酸の割合も増加した。このような結果は、 $\Delta 9$  不飽和化酵素活性が PCB126 処理によって増加している可能性を示している。また、ラット肝の脂肪酸組成に占めるアラキドン酸の割合の低下現象は、PCB126 に用量依存的であり、アラキドン酸の割合と、胸腺重量および体重増加の間には正の有意な相関が認められた。一方、リノール酸の割合の増加現象とは、負の有意な相関が認められた。このように、PCB126 の毒性指標である胸腺の萎縮および体重増加の抑制との間に有意な相関が見られることが明らかになった。リノール酸とアラキドン酸のモル比は、アラキドン酸生合成の程度を知るための指標となることが知られている。アラキドン酸は必須脂肪酸であり、前駆体である必須脂肪酸リノール酸から、 $\Delta 6$  不飽和化酵素、鎖長伸長酵素群および  $\Delta 5$  不飽和化酵素により肝臓の小胞体で生合成される。この生合成系では、 $\Delta 6$  不飽和化酵素のステップが律速段階である。PCB 126 処理によって、 $\Delta 5$  不飽和化酵素および  $\Delta 6$  不飽和化酵素活性は、それぞれ摂餌対照群の 17% および 13% にまで有意に低下していた (27)。これに対し、組成に影響すると考えられるアラキドン酸やリノール酸を燐脂質へ転移する反応を司る、1-acylglycerophosphorylcholine アシル転移酵素と 1-acylglycerophosphate アシル転移酵素の活性には、PCB126 処理によるアラキドン酸の割合の低下を説明し得る変化は見られなかった。

その他に、ミクロソーム電子伝達系への影響も観察されたが、アラキドン酸生合成に直接影響するほどのものはなかった。PCB126 により誘導される CYP1A1 がアラキドン酸を代謝することから (28)、これがアラキドン酸組成の低下の一因であることは否めないが、リノール酸とアラキドン酸のモル比の低下に加え、アラキドン酸生合成の律速酵素の  $\Delta 6$  不飽和化酵素活性が低下している事

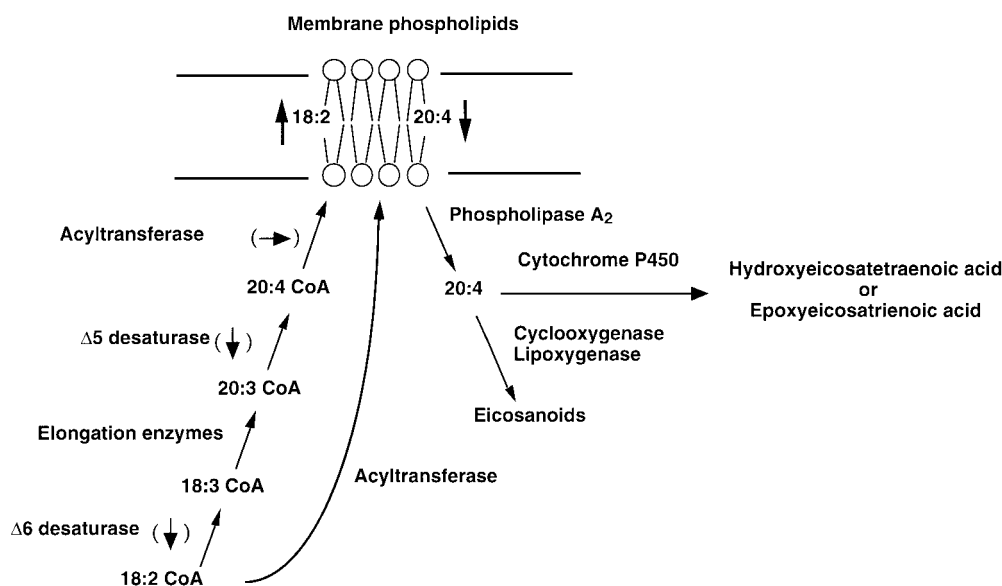


図 6.3.3. アラキドン酸 (20:4) の生合成とリン脂質への取り込みに及ぼす 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) の影響  
矢印は、酵素活性あるいは脂肪酸組成に占める割合の増減を示す。

実から、PCB126によってアラキドン酸生合成が低下することが示唆された(27)(図6.3.3)。アラキドン酸は、それ自身が転写調節因子であるPPARのリガンドであるばかりでなく、エイコサノイドなど生理活性脂質の前駆体でもある。CYP4A1, PEPCK, ペルオキシソーム $\beta$ 酸化系酵素などは、遺伝子上流域にPPARにレスポンスする調節配列をもって調節されているので(29; refs. therein), これらの酵素はPCB126処理ラットにおいて活性低下あるいはタンパク質レベルが低下することと関連している可能性がある(16, 30, 31)。また、TCDD処理ラットでは、PEPCKのmRNAレベルの低下も示されている(32)。ラットではこのようなアラキドン酸の生合成の抑制を通じて、PPARで構成的に発現制御される遺伝子が抑制されているのかも知れない。本研究では、ラット肝の脂肪酸組成に占めるアラキドン酸の割合の低下作用が、消耗症候群の指標と有意に相関することを示している。このことを基にして考えると、PCB126がアラキドン酸生合成を抑制した結果、消耗症候群が引き起こされるのかもしれない。

### 6.3.4. PCB126の糖中間代謝への影響

#### 6.3.4.1. PEPCK活性への影響の種差

PCB混合物の糖新生系酵素への影響が最初に報告されたのは1970年代のことである(33, 34)。TCDD処理によって低血糖が引き起こされることが知られており、TCDDがラットにおいて糖新生の鍵酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK), ピルビン酸カルボキシラーゼとグルコース-6-リン酸ホスファターゼ活性を低下させることが示されている(35)。そこで、糖新生の障害がPCB126による消耗症候群を説明できるのであれば、それは感受性の高いモルモットにおいて、より顕著に現れるであろうと考えて、PCB126の糖新生への影響をラットとモルモットで比較検討した(30)。PCB126(25 mg/kg, i.p.)処理したラットにおいては、血糖値の有意な低下が引き起こされた。また、ラット肝サイトソルのPEPCK活性は、PCB126処理によって著しく低下した。これに対し、消耗症候群が認められる用量である、PCB126(0.5 mg/kg, i.p.)処理したモルモットでは、PEPCK活性はむしろ増加しており、血糖値には認むべき大きな変化はなかった。アラニンは、グルコース-アラニンサイクルを通じて、糖新生の前駆体となる糖原性アミノ酸である。この血漿中の濃度については、ラットではPCB126処理群に有意な上昇が見られており、これは糖新生の低下に対するレスポンスであると考えられた。これに対し、モルモットでの血漿中アラニンの変化は有意でなく、増加傾向にとどまった。また、PEPCK活性の抑制に関わるとされるトリプトファンの血漿中レベルについては、PCB126処理によるPEPCK活性の抑制が顕著なラットにおいて有意な増加が認められている。一方、PCB126処理によってPEPCK活性の上昇したモルモットにもトリプトファンレベルの上昇が認められており、このことから、血漿中トリプトファンの増加という現象は種を超えて共通しているが、PEPCKへの影響には動物種差があるものと推定される。近年、トリプトファンは、AhRの内因性リガンドの候補の一つにあげられている(36, 37)。PCB126処理によるトリプトファンレベルの上昇の意義は明らかでないが、ラットにおけるPEPCKの抑制にAhRが関与している可能性は否定できない。このように、PCB126の糖新生への影響には、著しい動物種差があり、ラットにおいては大きな影響があると考えられるが、PCB126への感受性が高いモルモットにおける毒性には寄与していないと考えられた。

#### 6.3.4.2. アルドラーゼ B の抑制

ラットにおいては、PCB 126 の糖新生への影響が示されたが、糖中間代謝には鍵酵素だけでなく、可逆的反応を触媒する酵素群がある。アルドラーゼは、フルクトース-1,6-ジリン酸をグリセルアルデヒド-3-リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸にする酵素である。アルドラーゼには、3つのイソ酵素が知られており、筋肉にはA型、肝臓にはB型、脳にはC型がそれぞれ多く発現している(38)。なかでもB型はフルクトース-6-リン酸も同様に良い基質とすることが知られている。アルドラーゼは分子量約40Kのサイトソル酵素である。著者らは、PCB126処理によるラット肝サイトソルタンパク質の発現パターンの変化について検討をして、その際に発現レベルの低下するタンパク質としてアルドラーゼBを同定していた。そこで、PCB126のラット肝アルドラーゼに対する影響を検討し、フルクトース-1,6-ジリン酸およびフルクトース-6-リン酸を基質としたアルドラーゼ活性が著しく低下することを明らかにした。また、抗アルドラーゼ抗体を産生して行なった一次元および二次元電気泳動後のイムノブロットより、PCB126によりアルドラーゼBの発現が抑制されることが強く示唆された(39)。アルドラーゼの関与する反応は、解糖系と糖新生系いずれにおいても関わるステップである。このことから、アルドラーゼの著しい抑制は、ダイオキシシン類による消耗症候群の原因の一つではないかと思われた。

#### 6.3.4.3. トリオースリン酸代謝酵素群の活性の低下

上記のようにアルドラーゼは、トリオースリン酸の代謝に関わっていることから、PCB126によるアルドラーゼBの抑制は、単なる糖新生の阻害に止まらない可能性がある。そこで、さらにトリオースリン酸代謝酵素群(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、グリセロキナーゼ、トランスアルドラーゼ、およびトランスケトラーゼ)に及ぼすPCB126の影響を調べた。また、PCB126によるアルコール脱水素酵素(ADH)の発現抑制が、どの程度トリオースリン酸代謝に影響を及ぼしているかを、トータルのグリセロール-3-リン酸生成活性へのADH活性の寄与を指標に検討した。PCB126処理により、これら酵素群の活性はいずれも50%程度まで有意に低下していた。ADHは、タンパク質レベルで著しく抑制されていることが、イムノブロットから明らかとなり(40)、NAD依存的なグリセルアルデヒド-3-リン酸およびジヒドロキシアセトンリン酸の代謝のうち、ピラゾールで阻害される活性をADH由来とした場合、ADHは約30%の寄与があることが分かり、特にこの部分への抑制が顕著であった。トリオースリン酸は、嫌氣的解糖系や糖新生系だけでなくペントースリン酸経路にも向かうことから、エネルギー代謝、脂質代謝、核酸代謝への重要な中間代謝物でもある。このことは、PCB126による毒性影響が多面的であることを支持しているように思われる。摂餌対照群とPCB126処理群では肝臓中のトリオースリン酸の含量が、自由摂餌群に比べて著しく低かった(41)。このことは、トリオースリン酸含量が摂餌に依存することを示しているように思われるが、PCB126処理群においては、トリオースリン酸の代謝酵素の活性が全体的に低下していることから、PCB126処理によってトリオースリン酸代謝の回転が落ち、栄養を補給してもエネルギーとして利用されにくいシステムが出来ている可能性がある(図6.3.4)。



観察された。DBA マウスにも AhR は存在するが、C57BL マウスのそれと一次構造に違いがあることが分かっている (4)。PCB126 (25 mg/kg, i.p.) 処理ラットにおいては、G6PDH 活性は約 4 倍程度にまで誘導されたが、PCB126 (0.5 mg/kg, i.p.) 処理モルモットではむしろ低下していた。このように、ラットやマウスにおける G6PDH の誘導には、AhR が関与していると考えられたが、一方で PCB126 処理モルモットでは低下した。また、2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran 処理したハムスターでは G6PDH 活性は変化しないことも分かっており (45)、AhR を介した誘導と毒性の程度については、ラットとマウス以外には当てはまらないという結果になった。

### 6.3.5. PCB126 による酸化的ストレスについて

PCB126 や TCDD の毒性の一部は、これらの化合物によって惹起される酸化的ストレスによって説明されると考えられている。それは、抗酸化剤を併用した場合に、TCDD 処理ラットの死亡率が低下するという事実からも支持されている (46)。TCDD 類による酸化的ストレスには、脂質過酸化の増大、細胞内 SH 基の減少、細胞膜流動性の増加、および DNA single strand 切断などがある (47; refs. therein)。これらの現象が引き起こされる機構の詳細は知られていないことから、我々の研究室においても、活性酸素の消去系の障害がその原因の一つと位置付けて、それによって引き起こされる酸化的ストレスがコプラナー PCB の毒性発現にどの程度の寄与があるのかについて検討した。

#### 6.3.5.1. カタラーゼの抑制

ペルオキシソーム増殖剤で誘導されるビリルビン UGT 活性や CYP4A1 が、PCB126 処理によって抑制されることから (13, 16)、ペルオキシソームへの PCB126 の影響に興味をもたれた。ペルオキシソームには、シアン非感受性の  $\beta$  酸化経路があり、極長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化を行なっている。そこで生成される過酸化水素の分解に、カタラーゼは非常に重要な役割を担っている。PCB 126 は、ラット肝ペルオキシソームの脂肪酸酸化システム (FAOS) およびカタラーゼ活性を著しく低下させた。光学顕微鏡下に、ペルオキシダーゼ染色を行なうと、PCB126 処理ラットの肝ではペルオキシダーゼ活性を示す顆粒が著しく減少していた。しかし、これは明らかな、形態的な変化を伴わなかった。このことから、カタラーゼ活性の低下は、タンパク質の発現レベルの低下によると思われる。PCB126 処理によってペルオキシソーム  $\beta$  酸化活性および尿酸オキシダーゼ活性も有意に低下していた (31)。一方、モルモットにおいては、PCB126 (0.5 mg/kg, i.p.) 処理によって FAOS 活性は上昇する傾向にあったが、カタラーゼ活性にはほとんど変化がなかった。しかしながら、尿酸オキシダーゼ活性は顕著に誘導された。このように、PCB126 の尿酸オキシダーゼへの影響は、ラット、モルモットいずれにおいても、ビリルビン UGT や CYP4A1 への影響 (13, 16) に類似していたが、FAOS 活性とカタラーゼ活性には、モルモットにおける反応性に違いが見られた (48)。

#### 6.3.5.2. グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)-還元系システムに対する影響

Se 依存性グルタチオンペルオキシダーゼ (Se-GPx) は、カタラーゼとともに細胞内の過酸化水素や過酸化脂質の消去に重要な役割を担っている (49)。また、Se-非依存性の GPx としてグルタチオン-S-転移酵素 (GST) が存在する。GST には分子多様性があるが、幾つかの分子種には強力な過酸



化物還元活性がある(50)。本研究では、この2つのGPxについて、マウス、ラットおよびモルモットを用いて検討した(51, 52)。PCB126処理ラットでは、いずれのGPx活性も低下した。このことは、還元型グルタチオン含量低下、グルタチオン還元酵素および $\gamma$ -グルタミナーゼ( $\gamma$ -GTP)活性の低下とよく符合していた。一方、モルモットではSe非依存性のGPx活性がPCB126処理によって増加したが、Se依存性GPxの活性には変化はなかった。モルモットにおいては、グルタチオンの供給に関係のある酵素の顕著な変化は観察されなかった。このことから、GPx-還元系システムへの影響は、少なくともラットにおけるコプラナーPCBの毒性であることが示唆され、TCDDのラットへの影響と一致していた(53)。しかしながら、モルモットでは、この系への影響は賦活であり、毒性には別の機構があるものと考えられた。次に、AhRの高親和性リガンドPCB126、これに比べると親和性の弱いリガンドである3, 3', 4, 4'-TCB(PCB77)、親和性の低いノンプラナーPCBである2, 2', 5, 5'-TCB(PCB52)を用意し、Ah-応答性と弱応答性のマウスを用いることによりAhRの関与を調べた(52)。C57BLマウス肝Se依存性GPx活性は、PCB126および高用量のPCB77によって抑制されたが、PCB52は影響を与えなかったこと、また、このような抑制がDBAマウスには見られなかったことから、コプラナーPCBによるマウス肝Se依存性GPx活性の抑制にはAhRが関与することが示唆された。しかしながら、一方で、Ah-応答性マウスには、 $\theta$ クラスGSTが誘導されており、コプラナーPCBによる酸化ストレスを部分的に緩和していると思われた。このように、GPx-還元系システムやカタラーゼの抑制に見たコプラナーPCBの毒性としての酸化ストレスは、ラットとマウスに顕著に現れると考えられた。

### 6.3.6. 一次元および二次元電気泳動後のタンパク染色パターンを利用したPCB126にレスポンスする蛋白質のスクリーニングを基盤とした研究展開

#### 6.3.6.1. 54Kタンパク質の誘導

「コプラナーPCBやTCDDによって毒性が発現する状態では、毒性発現に関わるタンパク質レベルに著しい変化を伴う。」という作業仮説を立て、PCB126がラット肝臓のサイトソルタンパク質の発現パターンに及ぼす影響を検討した。サイトソルタンパク質は、SDS-電気泳動(SDS-PAGE)で分離し、Coomassie Blue染色してバンドの強弱を比較した。また、非平衡pHグラジエントゲル電気泳動とSDS-電気泳動からなる二次元電気泳動も併せて行ない、発現量の変化の著しいバンドを回収して、ペプチドマッピングすることにより得られた断片のアミノ酸配列を決定した。ラット肝サイトソルでは、分子量54Kと58Kのタンパク質の誘導が顕著であった。58Kは腫瘍関連アルデヒド脱水素酵素(クラス3)であり、TCDDで誘導されることが既に分かっている酵素であった(54)。これに対し、54Kタンパク質は、ラットの新規タンパク質であり、マウスのセレン結合性タンパク質(55)とアセトアミノフェン結合性タンパク質(56)に高い相同性を示すことが明らかになった(57, 58)。このタンパク質の生理的機能は、まだ十分には解明されていないが、癌に抑制的な役割をもつ可能性も示されている(55)。そこで、54Kタンパク質をタンパク質等電点分取装置で精製し、それに対する抗体を調製し、これを一次抗体としてイムノプロットを行なった。イムノプロットの結果からも54Kタンパク質がPCB126および3-MCで誘導されることが明らかであった(59)。代表的な薬物代謝酵素誘導剤の影響を調べた結果、抗酸化剤(antioxidant)であるジブチルヒドロキシル



エン (BHT) が 54 K タンパク質を誘導することが分かった。このことは、NAD(P)H: キノンオキシドレダクターゼの誘導とよく一致しており (60), AhR-XRE の Ah battery としてだけでなく, Nrf2-, antioxidant response element (ARE) の介在 (61) によっても調節されうると予想している。この 54 K タンパク質の精製にさらに改良を加え, セレン含量を定量したところ, その含量は Se-GPx のそれに比べるとかなり低いことが分かった (62)。このような 54 K タンパク質の PCB126 による著しい誘導が, コプラナー PCB の毒性発現あるいは毒性軽減へのレスポンスの現れであるかについては, 未だ明確でないが, そのセレンとの関わり, 生理的機能の解明が油症研究の新しい局面を開く可能性があると思われる。

#### 6.3.6.2. 炭酸脱水酵素 III (CAIII) の抑制

PCB126 処理によって, ラット肝サイトソルの 40K と 27K のタンパク質が著しく発現抑制されることが明らかになり, 40 K がアルドラーゼ B と ADH, 27K が炭酸脱水酵素 III (CAIII) であることを, 内部アミノ酸配列から明らかにした (40)。CAIII に対する特異的抗体 (63) を用いたイムノブロットから, CAIII の発現抑制は, PCB 126 の用量依存的であることが明らかになった。CAIII は筋肉型が報告されていたが (64), 肝臓型とは異なっている可能性があったため, Wistar ラット肝から CAIII cDNA をクローン化した。PCB126 (10 mg/kg, i.p.) 処理で最も強く CAIII が抑制されたことから, この用量での CAIII mRNA レベルの変化をノーザンブロットで解析し, CAIII の発現が mRNA レベルで抑制されていることを明らかにした (65)。CAIII は, サイトソルの約 5% を占めるタンパク質である。炭酸脱水酵素としての活性は, CAI や CAII に比べかなり低い (66)。しかしながら, 量的に多いためその作用を無視することはできないと思われる。CAIII は, グルタチオン化によって活性が調節されており (67), 細胞内の酸化還元状態に影響を受けられる。グルタチオン含量は, PCB 126 処理によって有意に低下することから (51), タンパク質レベルの低下だけでなく, 酸化還元状態によっても活性が負に調節されている可能性がある。CAIII は, チロシンホスファターゼ活性をもつ酵素でもあり (67), そのシグナルトランスダクションへの影響に興味がもたれる。しかしながら, この点については, あまり進展しておらず今後の研究展開を待たねばならない。

#### 6.3.6.3. GRP78, GRP94 の抑制

細胞内において, 形質膜やゴルジ体, リソソームのような細胞内小器官に輸送されるタンパク質もしくは細胞外へ分泌されるタンパク質は, 小胞体においてポリペプチドの折り畳み (folding) や会合 (assembly) を受けると考えられている。グルコース調節タンパク質 (GRP) は, ストレスタンパク質の一種で, 当初繊維芽細胞を飢餓状態にしたときに誘導されるタンパク質として発見されたが, その後, 小胞体内にタンパク質を蓄積させるような種々のストレスにより誘導されることがわかり, タンパク質の折り畳みや会合などを調節する, いわゆる分子シャペロンであることが示唆されている (68, 69)。PCB 126 (25 mg/kg, i.p.) 処理 4 週齢 Wistar 系雄性ラット肝ミクロソームを, 抗 GRP78 抗体および抗 GRP94 抗体 (70) でイムノブロットした結果, GRP78 および GRP94 のタンパク質レベルが著しく低下していることが明らかになった (71)。タンパク質の品質管理をしている分

子シャペロンが影響を受けることから、その介在によって機能的なタンパク質へとなる過程が影響を受ける可能性があり、PCB 126 の多面的な毒性を理解するために重要な現象であると推察している。

#### 6.3.6.4. 分子シャペロン HSP70 と HSP90 の誘導

熱ショックタンパク質 70 (Heat shock protein 70, HSP70) および HSP90 に代表される細胞質の分子シャペロンは、タンパク質合成における折り畳み (folding) と会合 (assembly) の調節だけでなく、既につくられたタンパク質分子の細胞内輸送や品質管理、転写調節因子の調節やシグナル伝達およびシグナル受容体の調節、さらには分解に至るまで、極めて広範な細胞機能に関わっている (72)。PCB126 処理ラット肝ミクロソームでは GRP78 と GRP94 の抑制が観察されたので、細胞質の HSP70 と HSP90 レベルへの PCB 126 の影響を調べた。6 週齢 Wistar 系雄性ラットの肝サイトソルにおいては、HSP90 の 2 つの isoform HSP90  $\alpha$  と HSP90  $\beta$  のいずれも PCB126 (0.5–25 mg/kg, i.p.) の範囲で用量依存的に誘導された。HSP70 については、摂餌量の減少を考慮した摂餌対照群においても若干誘導されたが、PCB126 処理群での誘導がはるかに強かった。HSP70 の誘導は、PCB126 (0.5 mg/kg, i.p.) においても顕著であり、PCB126 (1 mg/kg, i.p.) で最も強く誘導された。5 mg/kg (i.p.) 以上の用量での誘導率は、PCB126 (0.5 mg/kg, i.p.) のそれとあまり違いはなかった (73)。

このような HSP70 および HSP90 の誘導は、ラット精巣ライディッヒ細胞においても顕著に認められることを明らかにした。HSP70 の誘導は、環境中の PCB126 レベルとほぼ同じ 10 pM で引き起こされる (74)。その誘導された HSP が、PCB126 という外的ストレスに対して、細胞を防御していると思われる。ダイオキシン類が酸化ストレスを受けることは、上にも述べたが、これは細胞内に損傷を受けたタンパク質が生成する原因と捉えることができ、この修復のために HSP が働いている可能性がある。また、ステロイドホルモンレセプターのリガンド結合能、細胞内局在、ならびに遺伝子転写調節活性を調節している HSP90 が高濃度に存在すると、エストロゲンレセプターの転写調節領域への結合を抑制することも報告されており (75)、このことがダイオキシン類の内分泌攪乱作用を惹起している可能性もある。直接ヒトに外挿するには、ダイオキシン類への感受性の差を考慮する必要があるが、HSP が誘導される状態を、ストレスにさらされた状態であると考えれば、油症患者だけでなく健常人にとってもダイオキシン類が脅威であることは事実だと思われる。

#### 6.3.7. 結 び

本研究では、ダイオキシン類がアップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションしている複数の酵素あるいはタンパク質を新たに見いだした (表 6.3.2)。ダイオキシン類によって正に調節される機構は、Ah-gene battery としてよく知られているが、負に発現調節される機構については、現段階では知見が乏しい。これまで TCDD により、上皮成長ホルモン (EGF) レセプター、エストロゲンレセプター、プロラクチンレセプターおよび主要組織適合抗原 Q1<sup>b</sup> (major histocompatibility Q1<sup>b</sup>, MHC Q1<sup>b</sup>) の発現が抑制され、これらの抑制機構に AhR の関与が示唆されている (76–80)。また、カテプシン D のエストラジオールによる誘導は TCDD により抑制されるが、この場合は、調節領域であるエストロゲンレセプター/Sp1 複合体結合領域の中に XRE 様配列も存在し、そこに AhR 複

表 6.3.2. 3, 3', 4, 4', 5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126) 処理により実験動物に観察された生化学的变化(本研究より)

| 指標                          | ラット  | モルモット | マウス (C57BL) |
|-----------------------------|------|-------|-------------|
| 脂質代謝                        |      |       |             |
| トリアシルグリセロール(肝)              | 増加   | N.S.  | n.d.        |
| トリアシルグリセロール(血漿)             | N.S. | 増加    | n.d.        |
| コレステロール(肝)                  | N.S. | 増加    | n.d.        |
| コレステロール(血漿)                 | 減少   | 増加    | n.d.        |
| 脂肪酸組成(肝)                    |      |       |             |
| オレイン酸                       | 増加   | n.d.  | n.d.        |
| $\alpha$ -リノール酸             | 増加   | n.d.  | n.d.        |
| アラキドン酸                      | 減少   | n.d.  | n.d.        |
| $\Delta 5$ 不飽和化酵素           | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| $\Delta 6$ 不飽和化酵素           | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| 糖新生と中間代謝                    |      |       |             |
| PEPCK                       | 低下   | 上昇    | n.d.        |
| 血糖値(血漿)                     | 低下   | N.S.  | n.d.        |
| アラニン(血漿)                    | 増加   | N.S.  | n.d.        |
| トリプトファン(血漿)                 | 増加   | 増加    | n.d.        |
| アルドラーゼ B                    | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| グリセルアルデヒド-3-リン酸             | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| 脱水素酵素                       |      |       |             |
| グリセロキナーゼ                    | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| トランスアルドラーゼ                  | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| トランスケトララーゼ                  | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| トリオースリン酸イソメラーゼ              | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| トリオースリン酸含量                  | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| グルコース-6-リン酸脱水素酵素            | 上昇   | 低下    | 上昇          |
| 薬物代謝酵素                      |      |       |             |
| ビリルビン UGT                   | 低下   | 上昇    | n.d.        |
| CYP4A1                      | 低下   | 上昇    | n.d.        |
| ペルオキシソーム酵素                  |      |       |             |
| カタラーゼ                       | 低下   | N.S.  | n.d.        |
| 脂肪酸酸化システム                   | 低下   | N.S.  | n.d.        |
| 尿酸オキシダーゼ                    | 低下   | 上昇    | n.d.        |
| グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)-還元システム |      |       |             |
| Se-GPx                      | 低下   | N.S.  | 低下          |
| non-Se-GPx                  | 低下   | 上昇    | 低下          |
| GST activity                | 上昇   | 上昇    | n.d.        |
| GST $\alpha/\mu$            | n.d. | n.d.  | 上昇          |
| GST $\pi$                   | n.d. | n.d.  | n.d.        |
| GST $\theta$                | n.d. | n.d.  | 上昇          |
| 還元型グルタチオン                   | 減少   | 増加    | 増加          |
| $\gamma$ -GTP               | 低下   | 上昇    | 低下          |
| グルタチオン還元酵素                  | 低下   | 上昇    | 上昇          |
| サイトソルタンパク質                  |      |       |             |
| 54K タンパク質                   | 増加   | n.d.  | n.d.        |
| アルデヒド脱水素酵素 (class 3)        | 増加   | n.d.  | n.d.        |
| アルコール脱水素酵素 (class I)        | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| 炭酸脱水素 III                   | 低下   | n.d.  | n.d.        |
| HSP70                       | 増加   | n.d.  | n.d.        |
| HSP90                       | 増加   | n.d.  | n.d.        |
| ミクロソームタンパク質                 |      |       |             |
| GRP78 (BiP)                 | 減少   | n.d.  | n.d.        |
| GRP94                       | 減少   | n.d.  | n.d.        |

生化学的变化の方向性は対照群との有意な差を基に表示している。N.S. は、有意差なし。n.d. は、検討せず。

合体が結合することにより、エストロゲンレセプター/Sp1 複合体の結合を妨げるというメカニズムが示唆されている (81)。しかし、まだ直接的に AhR を介して負に調節される、タンパク質の抑制機構が完全に明らかにされた例はない。TCDD はいくつかの種類のサイトカインのレベルを上昇させることが知られおり、特に、インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) は AhR を介してその発現が上昇する (82)。また、IL-1 $\beta$  の上昇は IL-6 のレベルの上昇をもたらすが (83)、IL-6 が IL-1 $\beta$  とは別の調節を受けていることも否定できない。IL-6 はアルドラーゼ B の発現を、チロシキナーゼを活性化することにより抑制するとされており (84)、TCDD 処理によりチロシキナーゼが活性化されることを併せて考えると (85)、PCB 126 によるアルドラーゼ B の発現抑制機構には、IL-6 レベルの上昇が関与している可能性がある。

このように、ダイオキシン類による発現抑制には、AhR が関与するにしても、正の調節とは別の機構が存在することは間違いないと思われる。本節では、アラキドン酸生合成の抑制 (27) を通じた発現抑制の可能性についても言及したが、PPAR、消耗症候群との関係については、今後、転写調節因子のクロストークや、サイトカインの影響なども考慮して、更なる検討を加える必要がある。

この節では、PCB126 を油症原因物質のモデル化合物として、酵素活性あるいはタンパク質の発現に及ぼす影響について検討した結果について述べた。すべての酵素活性あるいはタンパク質の発現に、PCB126 が影響しているのではないことは確かであった。しかし、検討したかなり多くの酵素の活性やタンパク質の発現に影響があったことも事実である。PCB126 を用いて、油症原因物質の生化学的な作用を帰納的に明確にする試みは、これまでのところ特定の作用に収斂させて説明することは困難であった。むしろ、それを想起させるように、油症原因化学物質などのダイオキシン類の作用は広範であると共に、遅発性であることを特徴としている。AhR ノックアウトマウスを用いた検討から、ダイオキシン類の毒性は、AhR ではほとんど説明しうると考えられているものの、高用量における肺や肝のネクロシスなどの影響は依然として現れることも分かっており、既知の AhR 以外にも、ダイオキシン類の作用機構があることも予想されている (10)。AhR のパートナーである Arnt には Arnt2, Arnt3 というホモログが知られている (86, 87)。また、サカナには、役割は分かっていないものの、2 種の AhR ホモログが見いだされている (88)。これらのことから、哺乳類にも AhR のサブタイプが存在して類似のメカニズムが作動する可能性や、全く別の機構が存在する可能性も残されている。油症の発症に最も関わると思われる AhR についての最大の疑問は、その生理的な役割が明らかにされていないところにある。内因性のリガンドが存在するのかについても明確ではない。脊椎動物のみに存在すると推定されている AhR のオーソログ遺伝子、すなわち進化的に起源を同じくする遺伝子が線虫 (*C. elegans*) に見いだされた (89)。しかし、その遺伝子産物には、ダイオキシン類の結合能はないと言われている。多細胞の高等な動物のみに存在する、ダイオキシン類に応答する転写調節因子としての AhR の役割のより詳細な解明が、油症原因物質の毒作用機構に基づく治療方法を開発するために待たれる。

## 文 献

- 1) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N., and Miki, M. (1979) Possible correlation between induction modes of

- hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320, 179–192.
- 2) Poland, A., and Knutson, J. C. (1982) 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26, 517–554.
  - 3) Safe, S. (1990) Polychlorinated Biphenyl (PCB s), dibenzo-*p*-dioxin (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 21, 51–88.
  - 4) Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama Y. (1997) Ah Receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J. Biochem.* 122, 1075–1079.
  - 5) Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1992) cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 246–253.
  - 6) Fernandes-Salgureo, P., Pineau, T., Hilbert, D. M., McPhail, T., Lee, S. S. T., Kimura, S., Nebert, D. W., Rudikoff, S., Ward, J. M., and Gonzalez, F. J. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722–726.
  - 7) Schmidt, J. V., Su, G. H.-T., Reddy, J. K., Simon, M. C., and Bradfield, C. A. (1996) Characterization of murine Ahr null allele: Involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 6731–6736.
  - 8) Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997) Loss of teratogenic response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Genes Cells* 2, 645–654.
  - 9) Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S., and Fujii-Kuriyama, Y. (1994) Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 27337–27343.
  - 10) 三村純正, 藤井義明 (1999) ダイオキシン毒素の発症メカニズム. 蛋白質 核酸 酵素 44, 2384–2389.
  - 11) Gasiewicz, T. A. (1991) Nitro compounds and related phenolic pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*, Vol. 3, Classes of Pesticides (Hayers, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr. eds.), Academic Press, San Diego, pp. 1191–1269.
  - 12) Hoshikawa, Y., Hanioka, N., Mitsui, T., Oguri, K., and Yoshimura, H. (1987) Comparison of inducibility of liver UDP-glucuronosyltransferase in rats and guinea pigs. Abstracts of papers, The Japanese-United States Congress of Pharmaceutical Sciences, Honolulu, U.S.A., December, 1987.
  - 13) 小栗一太, 古賀淑子, 津田 実, 有吉範高, 石井祐次, 山田英之, 吉村英敏 (1993) Co-planar PCB による肝ビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素の誘導: モルモットとラット間の顕著な相違. 福岡医誌 84, 175–180.
  - 14) Fournel-Giglux, S., Magdalou, J., Thomassin, J., Villoutreix, J., Siest, G., Caldwell, J., and Andre, J. -C. (1985) Structure-dependent induction of bilirubin glucuronidation and lauric acid 12-hydroxylation by arylcarboxylic acids chemically related to clofibrate. *Biochim. Biophys. Acta* 842, 202–213.
  - 15) Clarke, D. J., Keen, J. N., and Burchell, B. (1992) Isolation and characterisation of a new hepatic bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. Absence from Gunn rat liver. *FEBS Lett.* 299, 183–186.
  - 16) Koga, Y., Tsuda, M., Ariyoshi, N., Ishii, Y., Yamada, H., Oguri, K., Funae, Y., and Yoshimura, H. (1994) Induction of bilirubin UDP-glucuronyltransferase and CYP4A1 P450 by co-planar PCBs: different responsiveness of guinea pigs and rats. *Chemosphere* 28, 639–645.
  - 17) Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., and Evans, R. M. (1992) Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771–774.
  - 18) Issemann, I., Prince, R. A., Tugwood, J. D., and Green, S. (1993) The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* 75, 251–256.
  - 19) Waxman, D. (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 11–23.
  - 20) Thomas, H., Schladt, L., Knehr, M., Post, K., Oesch, F., Boiteux-Antoine, A. F., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., and Siest, G. (1989) Effect of hypolipidemic compounds on lauric acid hydroxylation and phase II enzymes.



- Biochem. Pharmacol. 38, 1963–1969.
- 21) Bell, A. R., Savory, R., Horley, N. J., Choudhury, A. I., Dickins, M., Gray, T. J., Salter, A. M., and Bell, D. R. (1998) Molecular basis of non-responsiveness to peroxisome proliferators: the guinea-pig PPAR $\alpha$  is functional and mediates peroxisome proliferator-induced hypolipidaemia. *Biochem. J.* 332, 689–693.
  - 22) Tugwood, J. D., Holden, P. R., James, N. H., Prince, R. A., and Roberts, R. A. (1998) A peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) cDNA cloned from guinea-pig liver encodes a protein with similar properties to the mouse PPAR $\alpha$ : implications for species differences in responses to peroxisome proliferators. *Arch. Toxicol.* 72, 169–177.
  - 23) 鵜沢春生, 伊藤靖夫, 納富昭光, 勝木司馬之助 (1969) 塩化ビフェニールによる高グリセライド血症. 福岡医誌 60, 449–454.
  - 24) Hirota Y, Kataoka K, Tokunaga S, Hirohata T, Shinohara S and Tokiwa H: Association between blood polychlorinated biphenyl concentration and serum triglyceride level in chronic “Yusho” (polychlorinated biphenyl poisoning) patients. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65, 221–225, 1993.
  - 25) 初村 恵, 石田卓巳, 石井祐次, 有吉範高, 小栗一太, 吉村英敏 (1995) Coplanar PCB による脂質代謝への影響: ラットとモルモット間の顕著な相違. 福岡医誌 86, 135–143.
  - 26) Matsusue, K., Ishii, Y., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1997) A highly toxic PCB produces unusual changes in the fatty acid composition of rat liver. *Toxicol. Lett.* 91, 99–104.
  - 27) Matsusue, K., Ishii, Y., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1999) A highly toxic coplanar polychlorinated biphenyl compound suppresses  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturase activities which play key roles in arachidonic acid synthesis in rat liver. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1158–1165.
  - 28) Capdevila, J. H., Karara, A., Waxman, D. J., Martin, M. V., Falck, J. R., and Guengerich, F. P. (1990) Cytochrome P-450 enzyme-specific control of the regio- and enantiofacial selectivity of the microsomal arachidonic acid epoxidase. *J. Biol. Chem.* 265, 10865–10871.
  - 29) 河田照雄 (1998) 脂質代謝関連レセプター——Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) の構造, 機能, 発現と分類——. 日本臨床 56, 1722–1728.
  - 30) Oguri, K., Hatsumura, M., Ishii, Y., Koga, Y., Ariyoshi, N., and Yoshimura, H. (1993) Modification of the gluconeogenesis is not involved in the co-planar PCB toxicity in highly sensitive guinea pigs. *Chemosphere* 27, 2295–2303.
  - 31) Ariyoshi, N., Iwasaki, M., Kato, H., Tsusaki, S., Hamamura, M., Ichiki, T., and Oguri, K. (1998) Highly toxic coplanar PCB126 reduces liver peroxisomal enzyme activities in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 5, 219–225.
  - 32) Stahl, B. U., Beer, D. G., Weber, L. W. D. and Rozman, K. (1993) Reduction of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is due to decreased mRNA levels. *Toxicology* 79, 81–95.
  - 33) Mehlman, M. A., Tobin, R. B., Friend, B., and Mackerer, C. R. (1975) The effects of a polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254) on liver gluconeogenic enzymes of normal and alloxan-diabetic rats. *Toxicology* 5, 89–95.
  - 34) Messner, B., Berndt, J., and Still, J. (1976) Inhibition of PEP-carboxykinase in rat liver by polychlorinated biphenyl. *Nature* 263, 599–600.
  - 35) Weber, L. W. D., Lebofsky, M., Stahl, B. U., Gorski, J. R., Muzi, G., and Rozman, K. (1991) Reduced activities of key enzymes of gluconeogenesis as possible cause of acute toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicology* 66, 133–144.
  - 36) Miller, C. A. 3rd (1997) Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J. Biol. Chem.* 272, 32824–32829.
  - 37) Heath-Pagliuso, S., Rogers, W. J., Tullis, K., Seidel, S. D., Cenijn, P. H., Brouwer A., and Denison, M. S. (1998) Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 37, 11508–11515.
  - 38) Penhoet, E., Rajkumar, T., and Rutter, W. J. (1966) Multiple forms of fructose diphosphate aldolase in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 1275–1282.
  - 39) Ishii, Y., Kato, H., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1997) Significant suppression of rat liver aldolase B by a toxic coplanar polychlorinated biphenyl, 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl. *Toxicology* 116, 193–199.



- 40) Kato, H., Ishii, Y., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1997) Significant suppression of aldolase B, carbonic anhydrase III and alcohol dehydrogenase in liver cytosol of rats treated with highly toxic coplanar PCB. *Jpn. Toxicol. Environ. Health* 43, s-20.
- 41) 加藤晴敏, 中山伊知郎, 石井祐次, 有吉範高, 小栗一太 (1996) 高毒性コプラナー PCB によるトリオースリン酸代謝に関わる酵素の著しい抑制. 第 13 回日本薬学会九州支部大会(熊本, 1996 年 11 月)講演要旨集, p. 19.
- 42) 古賀信幸, 黒木 淳, 外間由美子, 吉村英敏 (1985) PCB 異性体によるラット肝可溶性酵素の誘導. *福岡医誌* 76, 160-166.
- 43) Kelling, C. K., Menahan, L. A., and Peterson, R. E. (1987) Hepatic indices of thyroid status in rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem. Pharmacol.* 36, 283-291.
- 44) Hori, M., Kondo, H., Ariyoshi, N., Yamada, H., and Oguri, K. (1997) Species-specific alteration of hepatic glucose 6-phosphate dehydrogenase activity with coplanar polychlorinated biphenyl: evidence for an Ah-receptor-linked mechanism. *Chemosphere* 35, 951-958.
- 45) 古賀信幸, 中嶋 寛, 神村英利, 外間由美子, 吉村英敏 (1989) 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran のハムスターにおける生体内分布, 肝酵素誘導作用および急性毒性. *福岡医誌* 80, 227-234.
- 46) Stohs, S. J., Hassan, M. Q., and Murray, W. J. (1984) Effects of BHA, *d*- $\alpha$ -tocopherol and retinol acetate on TCDD-induced changes in lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and survival. *Xenobiotica* 14, 533-537.
- 47) Stohs, S. J., Shara, M. A., Alsharif, N. Z., Wahba, Z. Z., and al-Bayati, Z.A.F. (1990) 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced oxidative stress in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106, 126-135.
- 48) Flohe, L. (1989) The selenoprotein glutathione peroxidase. In *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects, Part A* (Dorphan, D., Poulson, R., and Avramovic, O. eds.), Wiley, New York, pp. 643-731.
- 49) 岩崎 優, 加藤晴敏, 有吉範高, 小栗一太 (1995) コプラナー PCB によるモルモット肝ペルオキシソーム酵素活性の変化. *福岡医誌* 86, 144-152.
- 50) Hiratsuka, A., Kanazawa, M., Nishiyama, T., Okuda, H., Ogura, K., and Watabe, T. (1995) A subfamily 2 homodimeric glutathione S-transferase mYrs-mYrs of class theta in mouse liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212, 743-750.
- 51) 堀 美穂, 有吉範高, 山田英之, 小栗一太 (1997) Co-planar PCB の肝 glutathione peroxidase-redox system に関する影響: ラットおよびモルモットでの検討. *福岡医誌* 88, 144-148.
- 52) Hori, M., Kondo, H., Ariyoshi, N., Yamada, H., Hiratsuka, A., Watabe, T., and Oguri, K. (1997) Changes in the hepatic glutathione peroxidase redox system produced by coplanar polychlorinated biphenyls in Ah-responsive and less-responsive strains of mice: mechanism and implications for toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3, 267-275.
- 53) Wahba, Z. Z., Murray, W. J., Hassan, M. Q., and Stohs, S. J. (1989) Comparative effects of pair-feeding and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on various biochemical parameters in female rats. *Toxicology* 59, 311-323.
- 54) Jones, D. E. Jr., Brennan, M. D., Hepmel, J. and Lindahl, R. (1988) Cloning and complete nucleotide sequence of a full-length cDNA encoding a catalytically functional tumor-associated aldehyde dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1782-1786.
- 55) Bansal, M. P., Mukhopadhyay, T., Scott, J., Cook, R. G., Mukhopadhyay, R., and Medina, D. (1990) DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium's mechanisms of action in cancer prevention. *Carcinogenesis* 11, 2071-2073.
- 56) Lanfear, J., Fleming, J., Walker, M., and Harrison, P. (1993) Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14, 335-340.
- 57) Ishii, Y., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1996) A coplanar PCB induces a selenium binding protein as a major cytosolic protein in rat liver. *Chemosphere* 32, 509-515.
- 58) Ishii, Y., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N., and Oguri, K. (1996) Significant induction of a 54-kDa protein in rat liver with homologous alignment to mouse selenium binding protein by a coplanar polychlorinated biphenyl, 3,

- 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene. *Toxicol. Lett.* 87, 1-9.
- 59) 石田卓巳, 石井祐次, 田崎健二, 有吉範高, 小栗一太 (1997) ラット肝サイトソル 54kDa タンパク質に対する特異的抗体の産生——Coplanar PCB による著しい誘導の検証——. *福岡医誌* 88, 135-143.
- 60) Ishida, T., Tasaki, K., Fukuda, A., Ishii, Y., and Oguri, K. (1998) Induction of a cytosolic 54 kDa protein in rat liver that is highly homologous to selenium-binding protein. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6, 249-255.
- 61) Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313-322.
- 62) Ishida, T., Fukuda, A., Yoshioka, Y., Maji, D., Ishii, Y., and Oguri, K. (1999) An improved method for the purification and characterization of a 54 kDa protein in rat liver which has recently been identified as a selenium-binding protein. *J. Health Sci.* 45, 203-208.
- 63) Nishita, T., and Matsushita, H. (1988) Comparative immunochemical studies of carbonic anhydrase III in horses and other mammalian species. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B, 91-96.
- 64) Kelly, C. D., Carter, N. D., Jeffery, S., and Edwards, T. H. (1988) Characterization of cDNA clones for rat muscle carbonic anhydrase III. *Biosci. Rep.* 8, 401-406.
- 65) Ikeda, M., Ishii, Y., Kato, H., Akazawa, D., Hatsumura, M., Ishida, T., Matsusue, K., Yamada, H., and Oguri, K. (2000) Suppression of carbonic anhydrase III in rat liver by a dioxin-related toxic compound, coplanar polychlorinated biphenyl, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Arch. Biochem. Biophys.* in press.
- 66) Maren, T. H., and Sanyal, G. (1983) The activity of sulfonamides and anions against the carbonic anhydrases of animals, plants, and bacteria. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 439-459.
- 67) Cabisco, E., and Levine, R. L. (1996) The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4170-4174.
- 68) Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething M. J., and Sambrook, J. (1988) The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462-464.
- 69) Melnick, J., Dul, J. L., and Argon, Y. (1994) Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370, 373-375.
- 70) Csermely, P., Miyata, Y., Schnaider, T., and Yahara, I. (1995) Autophosphorylation of grp94 (endoplasmic reticulum chaperone). *J. Biol. Chem.* 270, 6381-6388.
- 71) 田崎健二, 石井祐次, 石田卓巳, 小栗一太 (1999) コプラナー PCB による小胞体局在性ストレスタンパク質の発現抑制. *福岡医誌* 90, 251-258.
- 72) Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- 73) 福田亜弥子, 石井祐次, 田崎健二, 松末公彦, 石田卓巳, 小栗一太 (1999) 高毒性コプラナー PCB によるラット肝分子シャペロン HSP70 および HSP90 の誘導. *福岡医誌* 90, 259-271.
- 74) Fukuda, A., Kurogi, R., Tasaki, K., Ishida, T., Ishii, Y., and Oguri, K. (1999) Effect of dioxins on molecular chaperones HSP70 and HSP90 in rat Leydig cells. *J. Health Sci.* 45, P-36.
- 75) Sabbah M., Radanyi C., Redeuilh G. and Baulieu E. E. (1996) The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. *Biochem. J.* 314, 205-213.
- 76) Madhukar, B. V., Brewster, D. W., and Matsumura, F. (1984) Effects of in vivo-administered 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on receptor binding of epidermal growth factor in the hepatic plasma membrane of rat, guinea pig, mouse, and hamster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7407-7411.
- 77) Zacharewski, T., Harris, M., and Safe, S. (1991) Evidence for the mechanism of action of the 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated decrease of nuclear estrogen receptor levels in wild-type and mutant mouse Hepa 1c1c7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 41, 1931-1939.
- 78) Lu, Y.-F., Sun, G., Wang, X., and Safe, S. (1996) Inhibition of prolactin receptor gene expression by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in MCF-7 human breast cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 332, 35-40.
- 79) White, T. E., and Gasiewicz, T. A. (1993) The human estrogen receptor structural gene contains a DNA sequence that binds activated mouse and human Ah receptors: a possible mechanism of estrogen receptor regulation by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 956-962.
- 80) Dong, L., Ma, Q., and Whitlock, J. P. Jr. (1997) Down-regulation of major histocompatibility complex Q1<sup>b</sup> gene

- expression by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Biol. Chem.* 272, 29614–29619.
- 81) Krishnan, V., Potter, W., Santostefano, M., Wang, X., and Safe, S. (1995) Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6710–6719.
  - 82) Sutter, T. R., Guzman, K., Dold, K. M., and Greenlee, W. F. (1991) Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 $\beta$ . *Science* 254, 415–418.
  - 83) Aloisi, F., Care, A., Borsellino, G., Gallo, P., Rosa, S., Bassani, A., Cabibbo, A., Testa, U., Levi, G., and Peschle, C. (1992) Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* 149, 2358–2366.
  - 84) Huang, Y., Shinzawa, H., Togashi, H., Takahashi, T., Kuzumaki, T., Otsu, K., and Ishikawa, K. (1995) Interleukin-6 down-regulates expressions of the aldolase B and albumin genes through a pathway involving the activation of tyrosine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 203–209.
  - 85) Bombick, D. W., and Matsumura, F. (1987) 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin causes elevation of the levels of the protein tyrosine kinase pp60c-src. *J. Biochem. Toxicol.* 2, 141–154.
  - 86) Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1996) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt 2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol. Cell. Biol.* 16, 1706–1713.
  - 87) Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N., and Fujii-Kuriyama, Y. (1998) Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt 3, with HIF-1  $\alpha$ , HLF, and clock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 789–794.
  - 88) Hahn, M. E., Karchner, S. I., Shapiro, M. A., and Perera, S. A. (1997) Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13743–13748.
  - 89) Powell-Coffman, J. A., Bradfield, C. A. and Wood, W. B. (1998) *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2844–2849.