

第 3 部

基礎研究

第1章 ダイオキシンの後世代影響とその機構

山田英之, 石井祐次, 石田卓巳

1.1 はじめに

ダイオキシン曝露患者から出生した児には、性比の偏りや知能発育の遅延が危惧されている(1~4) [油症における状況は、第2部第4章参照]。動物実験においても、性比の変動(5)を含む種々の後世代影響(6)が報告されている。これらは、消耗症をはじめとする一般的毒性よりもかなり低用量のダイオキシンで出現することから(7, 8)、問題が大きい。しかし、これらの機構は十分に理解されているとは言えず、従って、その対策についても考案されるに至っていない。

ダイオキシンの生殖や発生に及ぼす影響は、その機構として性ステロイドホルモン作用の失調に注目した研究が多い。すなわち、動物実験を中心とする研究では、①エストロゲン受容体の発現低下(9, 10)；②エストロゲン受容体依存的情報伝達の変動(11, 12)；あるいは③ステロイドホルモン不活性化の亢進(13)等が報告されている。しかし、これらの研究は思春期前あるいはそれ以降の動物を用いたものが多く、胎児期や新生児での状況は必ずしも十分には解析されていなかった。そこで当研究室では、最強毒性のダイオキシンである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を用い、これを妊娠 Wistar ラットに投与後、胎児や出生児での状況を観察した。その結果、TCDDは周産期特異的にステロイドホルモン合成を抑制し、これによって出生後のある種の障害をインプリントすることを明らかにした。また、ステロイドホルモン合成系抑制の機構についてもかなりの知見が得られた。本章では、これらの成績を紹介する。

1.2 TCDD のステロイドホルモン合成への影響

妊娠15日目(GD15)のWistarラットにTCDDを1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量で経口投与し、GD20の胎児での状況を観察した。その結果、胎児精巣および卵巣のステロイドホルモン合成系タンパク質の多くは、そのmRNAレベルが顕著に低下することが見いだされた(図1.1)(14~16)。抑制されるものの中には、ステロイドホルモン合成の律速段階(コレステロールのミトコンドリア外膜から内膜への輸送)に関与するsteroidogenic acute-regulatory protein (StAR)や性ステロイド合成に必須なcytochrome P450 17 (CYP17)等が含まれていた。StARやCYP17ではタンパク質レベルでの低下も確認している。これらの変動は、他のステロイドホルモン生産臓器である副腎では全く認められず(14)、生殖組織に特異的であった。TCDDの投与量に関する検討から、上記障害は0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では認められず、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度の用量が必要であった。また、投与時期については、GD8の母ラット処理によっても(TCDD 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、同様の障害が認められている(14)。一方、児に障害が発生する時期については、TCDD処理母(処理日：GD15)から出生

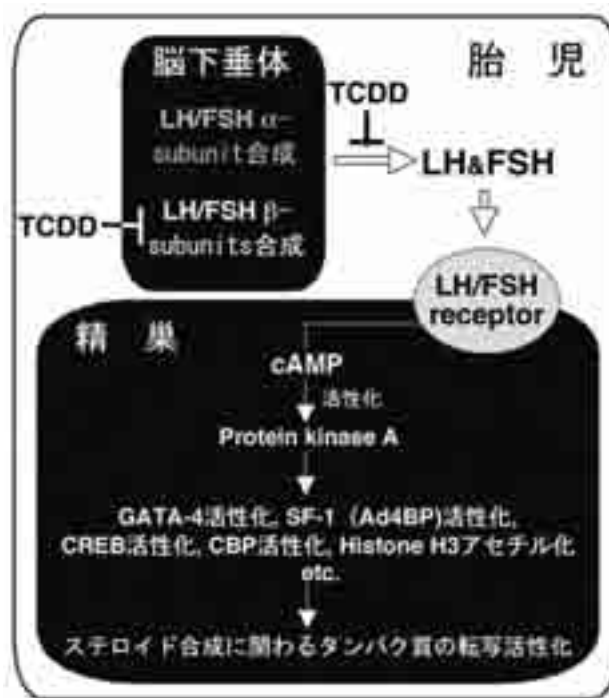


図 1.2 TCDD による胎児ステロイドホルモン合成系の障害の機構
Protein kinase A による転写因子の活性化などの詳細については文献 (18) 参照。

略記: GATA-4: GATA-binding protein 4, SF-1 (Ad4BP): steroidogenic factor-1, CREB: cAMP response element-binding protein, CBP: CREB-binding protein

LH) や卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH) が中心的な役割を演じる。そこで、TCDD 曝露母の胎児の脳下垂体ホルモンを分析したところ、LH と FSH の β -サブユニット mRNA が有意に低レベルであることが明らかとなった (14, 16)。 α -サブユニット (LH と FSH とで共通) やプロラクチンの mRNA には低下が認められず (16)、TCDD 依存的な抑制は LH/FSH の β -サブユニットに特異的である。脳下垂体での mRNA 水準変動と符合して、胎児血中の LH や FSH のホルモンレベルも TCDD 母体曝露によって有意に低下した (14, 16)。ステロイド合成系の発現低下は、生殖腺の LH/FSH 受容体が減少しても起こり得る。しかし、これらの受容体は TCDD 処理母の胎児において正常レベルであった (14, 16)。これらの実験結果を総合すると、TCDD は脳下垂体の LH/FSH 合成を抑制し、これが起点となって生殖腺ステロイド合成系の発現が抑制されるものと考えられた (図 1.2)。TCDD の曝露 (GD15) を受けた胎児に LH 様ホルモンであるウマ絨毛性ゴナドトロピン (equine chorionic gonadotropin, eCG) を直接注入すると (GD17), GD20 胎児における精巣や卵巣のステロイドホルモン合成系タンパク質の発現が正常水準に復帰した (14~16)。この事実は、上記の推定をよく支持する。

LH や FSH の生合成には、視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) が上位の制御因子として働いている。しかし、ラット胎児の視床下部 GnRH レベルは、TCDD の母体曝露によっても変動せず (14)、少なくともこれの量的変動では LH/FSH 発現抑制を説明できない。LH β 遺伝子の転写促進には、steroidogenic factor 1 (SF-1), early growth response protein 1 (Egr-1) あるいは stimulating protein 1 (SP-1) 等の種々の転写因子も関与する (19~22)。一方、筆者らの検討では、TCDD 曝露胎児の精巣において、SF-1 レベルが低下することを観察している (14)。もし同様の変化が脳下垂体においても生起すれば、LH β 発現抑制を説明する機構の一つであろう。一般に、ダイオキシン類は、転写因子である芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) を活性化することによって、多くの毒性を惹起すると信じられている (23, 24)。これと関連して、ラット LH β 遺伝子の 5'-上流域には AhR 結合エレメントのコア配列が存在する (-GCGTG-, -580 bp)。推論に過ぎないが、活性化 AhR がこの領域と相互作用して LH β 遺伝子発現を抑制する可能性は否定できない。これらの可能性も含めて、TCDD が LH や FSH の β -サブユニット遺伝子転写を抑制する機構は、まだ今後の研究課題である。

TCDD によるラット LH や FSH の発現抑制が胎児期に特異的である理由もよく分かっていない。一つには、TCDD の脳移行性の年齢差で説明ができる可能性が考えられる。すなわち、胎児は血液-脳関門の未成熟のため、TCDD の脳移行性が高く、このために脳下垂体ホルモン障害が生起するとの推定である。この検証のための一環として、我々は ^{14}C -TCDD を用い、体内分布を成獣と胎児間で比較した。雌雄の成熟 Wistar ラット (7 週齢) に 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で経口投与し、5 日後に脳残存率 (投与量に対する %/組織) を調べた結果、両性ともに投与量の約 0.01~0.02 % が検出された。一方、妊娠ラット (GD15) に投与したのち、胎児 (GD20) 移行量を基準として脳残存率を算出すると、約 3 % であり、予想通り、胎児での脳移行率は成獣よりも遥かに高いことが判明した。ただ、胎児 (GD20) へは母体を経由しての移行であるため、絶対量としては多くない (0.0001~0.0002 % : 母親への投与量に対する %/組織)。結局、胎児と成獣では、脳組織 g 当たりの TCDD 移行量は、0.3~0.4 ng TCDD/g 組織であり、ほぼ同じ水準となった。従って、TCDD の脳内含量の違いが脳下垂体ゴナドトロピン障害の胎児特異性を規定するとは考え難い。また、成獣での不応答性が TCDD 濃度の不足に起因するのなら、脳室内に十分量の TCDD を直接注入することによって胎児と同様の LH/FSH 合成低下が起きるはずである。しかし、この実験を実施しても、LH/FSH の低下は観察されなかった (16)。この成績は上記の推論をよく支持する。

1.4 ゴナドトロピン障害と性行動抑制のインプリンティング

生殖組織の成熟や性特異的な種々の形質、例えば交尾能力の獲得には周産期児の脳や末梢組織が必要量のテストステロン曝露を受けるか (雄)、またはこの刺激の欠如 (雌) が必要と考えられている (25, 26)。テストステロンはこれ自体が分化、発達に必要であると共に、脳や末梢組織でより強力な男性ホルモンであるジヒドロテストステロンや女性ホルモンの 17 β -エストラジオールに変換され、これらも成熟や形質獲得において必須の役割を演じる (27, 28)。17 β -エス

トラジオールはこれに高親和性の血清タンパク質が存在するため (29), 末梢で生産されたものを脳へ供給することができない。従って, 雄への性分化のためには, 精巣で生産された前駆物質テストステロンが脳等の必要組織へ供給され, そこで 17β -エストラジオールに変換されて利用される。このように, 胎児精巣でのテストステロン合成は, 雄への分化, 発達に不可欠な要素である。脳の性分化は, ‘臨界期 (critical period)’ と呼ばれる時期に必要な量のテストステロン曝露を受ける必要があると考えられており, この時期はラットでは, 受精後 18~27 日目あたりと言われている (25, 26)。

このような背景から, TCDD による胎児後期の LH/FSH 抑制とこれに起因する生殖腺ステロイド合成の抑制は, 性特異的な組織発達や形質獲得の障害に直結すると予想される。当教室では, この可能性の検証を目的として性行動と組織発達を指標とした検討を行った。TCDD 処理母ラット (GD15, $1\text{ }\mu\text{g/kg}$, 経口投与) から出生した雄児は, 1 回目のマウント (発情雌への馬乗り行動) までに要する時間 (潜在性) が対照と比べて有意に遅延した (16)。また, マウントと生殖器挿入回数は有意に減少した。関連する成績は, 他の研究グループからも報告されている (30~33)。これらの障害のほとんどは, TCDD 曝露 (GD15) 後の胎児 (GD17) に eCG を直接注入することによって, 対照水準へ復帰する (16)。前述の通り, 雌への分化には, 性ステロイド刺激の欠如が必要と基本的には考えられている。しかし, 雌への分化においても, 雄に必要な濃度よりも低レベルの性ステロイドの刺激が必要との説がある (34)。これと符合して, 雌に特徴的な性行動であるロードシス (のけぞり行動) は TCDD 母体曝露によって障害されるが, これは胎児期の eCG 処置によって回復する, ないしその傾向が観察された (16)。これらの結果は, TCDD による臨界期の LH/FSH 障害が性ステロイド合成不全を通して性分化を障害し, これによって性特異的な形質の獲得・発現の失調が規定されてしまうことを強く示唆する。さらに, 我々の研究成果によれば, TCDD の母体曝露は, 出生雄児の成長 (体重) や前立腺の発育を抑制するが, これらも胎児期の eCG 処置によって回復した (16)。雌児においても, TCDD 母体曝露による卵巣などの発育抑制は, 胎児期の eCG 補給で正常へ復帰した (16)。従って, TCDD による臨界期のゴナドトロピン障害は, 生殖組織などの発育にも悪影響を及ぼすことが必至と考えられる。

1.5 おわりに

この数年来の当研究室での検討により, TCDD はステロイドホルモン合成を生殖腺および周産期特異的に抑制し, 出生後の種々の障害をインプリントすることが実証された。また, ステロイドホルモン合成系の抑制は, 脳下垂体での LH や FSH 合成抑制に起因することも明らかにすることができた。我々の研究では, 妊娠ラットへの TCDD 投与量が $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ であり, これは WHO 等から推奨されているヒト一日許容摂取量 ($1\sim 4\text{ pg/kg/day}$) より遥かに多い。しかし, げっ歯類でのダイオキシン類の体内半減期はヒトより短いこと等から, げっ歯類に障害を惹起するにはヒトに対する用量の 100 倍以上を要すると推定されている (8)。このような差異もあって, ダイオキシン類の生体への影響は ‘摂取量’ ではなく, 吸収効率, 半減期などをも考慮した ‘体内負荷 (body burden)’ を基準に評価するのが望ましいと考えられている (8)。動物実験デー

タを基に、性行動に障害をもたらすに要するヒト体内負荷は、9.5 pg/kg と推定されている(8)。この値は上記の一日許容摂取量と比較して、そう大きな数字ではなく、ダイオキシンによる次世代への影響には今後も注意深く対処することが必要と思われる。我々の研究から、次世代の障害が脳下垂体ホルモン低下を起点とすることが明らかとなったので、これを基盤として、障害消去法の研究を展開することも今後の重要な課題と考えられる。

文 献

- 1) Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, et al. (1996) Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 348, 409.
- 2) Mocarelli P, Gerthoux PM, Ferrari E, et al. (2000) Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offsprings. *Lancet* 355, 1858-1863.
- 3) Moshammer H. and Neuberger M. (2000) Sex ratio in the children of the Austrian chloracne cohort. *Lancet* 356, 1271-1272.
- 4) Lai TJ, Guo YL, Guo NW, et al. (2001) Effect of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls on cognitive development in children: a longitudinal study in Taiwan. *Brit. J. Psychiat.* 178, s49-52.
- 5) Ikeda M, Tamura M, Yamashita J, et al. (2005) Repeated in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure affects male gonads in offspring, leading to sex ratio changes in F2 progeny. *Toxicol Appl Pharmacol* 206, 351-355.
- 6) 石田卓巳, 益崎泰宏, 山田英之 (2003) ダイオキシン類の生殖毒性と後世代への影響並びにその機構. *福岡医誌* 94, 183-195.
- 7) Peterson RE, Theobald HM. and Kimmel GL. (1993) Developmental and reproductive toxicities of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol* 23, 283-335.
- 8) Larsen JC. (2006) Risk assessments of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in food. *Mol. Nut. Food Res.* 50, 885-896.
- 9) Tian Y, Ke S, Thomas T, et al. (1998) Transcriptional suppression of estrogen receptor gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67, 17-24.
- 10) Ohtake F, Baba A, Takada I, et al. (2007) Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566.
- 11) Chaffin CL, Peterson RE, Hutz RJ. (1996) In utero and lactational exposure of female Holtzman rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: modulation of the estrogen signal. *Biol Reprod* 55, 62-67.
- 12) Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, et al. (2003) Modulation of oestrogen receptor signaling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550.
- 13) Badawi AF, Cavalieri EL. and Rogan EG. (2000) Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17beta-estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 21, 1593-1599.
- 14) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, et al. (2006) Fetal pituitary gonadotropin as an initial target of dioxin in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. *Endocrinology* 147, 927-936.
- 15) Taketoh J, Mutoh J, Takeda T, et al. (2007) Suppression of fetal testicular cytochrome P450 17 by maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: a mechanism involving an initial effect on gonadotropin synthesis in the pituitary. *Life Sci* 80, 1259-1267.
- 16) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, et al. (2009) Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 329, 1091-1099.
- 17) 武藤純平, 石田卓巳, 石井祐次, 他 (2007) ダイオキシン類母体曝露がマウス胎児精巣の性ステロイドホルモン生合成系発現に及ぼす影響. *福岡医誌* 98, 203-207.

- 18) 廣井久彦, Strauss JF, 武谷雄二 (2005) StAR protein (steroidogenic acute regulatory protein) の転写調節機構の解析. 日本内分泌学会誌, 10, 29-36.
- 19) Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, et al. (1994) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Gene Dev* 8, 2302-2312.
- 20) Lee SL, Sadovsky Y, Swirloff AH, et al. (1996) Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 273, 1219-1221.
- 21) Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, et al. (1997) Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 12, 107-122.
- 22) Kaiser UB, Sabbagh E, Chen MT, et al. (1998) Sp1 binds to the rat luteinizing hormone β (LH β) gene promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone-stimulated expression of the LH β subunit gene. *J Biol Chem* 273, 12943-12951.
- 23) Poland A. and Knutson JC. (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.
- 24) Mimura J. and Fujii-Kuriyama Y. (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619, 263-268.
- 25) MacLusky NJ. and Naftolin F. (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211, 1294-1302.
- 26) Arnold AP. and Gorski RA. (1984) Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Ann Rev Neurosci* 7, 413-442.
- 27) Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, et al. (2004) Sexual differentiation of the brain: role of testosterone and its active metabolites. *J. Endocrinol. Invest.* 27 (6 Suppl), 120-127.
- 28) Carlson RL. (2007) *Physiology and Behavior*, 9th ed., Pearson Education, Boston, USA.
- 29) Bakker J. and Baum MJ. (2008) Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 29, 1-16.
- 30) Mably TA, Moore RW, Goy RW, et al. (1992) *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 114, 108-117.
- 31) Bjerke D, Brown TJ, MacLusky NJ, et al. (1994) Partial demasculinization and feminization of sex behavior in male rat by *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is not associated with alterations in estrogen receptor binding or volumes of sexually differentiated brain nuclei. *Toxicol Appl Pharmacol* 127, 258-267.
- 32) Gray Jr. LE, Kelce WR, Monosson E, et al. (1995) Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol* 131, 108-118.
- 33) Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ, et al. (1998) Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol Appl Pharmacol* 150, 383-392.
- 34) Döhler KD, Hancke H, Srivastava SS, et al. (1984) Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain: neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence. *Prog. Brain Res* 61, 99-117.

第2章 ダイオキシン毒性を軽減する物質の探索

—— 食用食物成分を中心として ——

石田卓巳, 石井祐次, 山田英之

2.1 緒 論

カネミ油症事件の発生からほぼ40年が経過した現在、発生初期の油症患者に観察された所見の多くは軽快し、消失している。しかし、油症患者の血中ダイオキシン類濃度は未だ健常人に比べ高く (1, 2)、倦怠感など種々の症状に悩まされている患者も多い。また、近年のダイオキシン類対策特別処置法による排出規制に伴い、ダイオキシン類による環境汚染の状況は改善される傾向にあるが (平成19年度ダイオキシン類に関わる環境調査結果, 環境省, 平成20年12月発表資料参照)、ゴミの焼却などに伴う非意図的な発生やそれに伴う環境中への拡散は未だ問題視されている。従って、ダイオキシン中毒の発症機構の解明、並びにそれに対する有効な予防法や治療法の開発は、社会的な急務となっている。

ダイオキシン類による中毒症状のほとんどは、細胞の可溶性画分に存在する芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR) を起点として惹起されると考えられている (図2.1)。この概念は、1990年代に作成された AhR 欠損マウスを用いた毒性試験の結果からも支持されている (3, 4)。多くの研究者はこれが中心的な毒性発現機構であることを承認すると思われ、これについてまとめられた総説も多い (5~7)。一方、ダイオキシン類による毒性の発現には、酸化的ストレスの関与も示唆されている (図2.1)。ダイオキシン類の曝露に伴い、脂質過酸化の増加 (8)、細胞内 SH 基の減少 (9)、細胞膜流動性の減少 (10)、および DNA 鎖切断 (11) が引き起こされる。また、油症患者は、健常人に比べ尿中 8-isoprostane (12)、および血中 Total Anti-oxidant Power 値 (13) の上昇が認められており、長期間に亘って酸化的ストレスに曝されていることが予想されている。

油症治療研究班では、これまでに油症患者の症状緩和を目的とした取り組みとして、ダイオキシン類の排泄促進を目指した検討が行われてきた。その内容については、「油症研究 — 30年の歩み —」に詳しい (14)。加えて、最近ではコレステラミン (15) や発酵玄米健康補助食品 (16) などを用いた検討が行われ、一定の有効性を期待させる結果も得られている。患者の症状緩和に向けたさらなる取り組みとして、中毒症状の改善を目的とした対処法の開発は必須である。このような背景のもと、当研究室では、食用食物成分に注目し、ダイオキシン中毒症状に対して有効な成分の探索とその評価を行ってきた。本章では、その結果についてまとめると共に、その有効性と問題点について考察する。

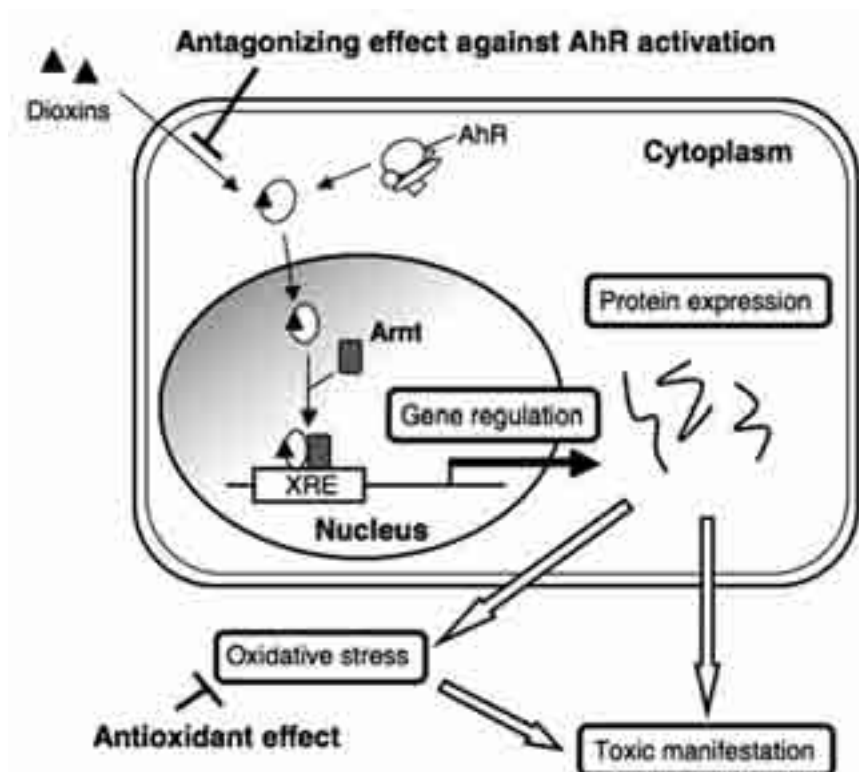


図 2.1 Postulated mechanisms of dioxin toxicity. AhR: aryl hydrocarbon receptor, Arnt: AhR nuclear translocator, XRE: xenobiotic responsive element.

2.2 食用食物成分によるダイオキシン毒性の軽減

2.2.1 Curcumin, quercetin, および piperine によるダイオキシン毒性の軽減

油症患者に象徴されるように、ダイオキシン類による中毒症状は長期化する。従って、有効な予防薬や治療薬の条件として、AhRの活性化や酸化ストレスに対して有効であることに加え、長期間の摂取が患者にとって耐えうるものでなければならない。このような条件を考えた場合、通常の食事より摂取可能な食用食物成分は、最も適したものの一つであると考えられる。そこで、我々の研究室では、ダイオキシン毒性軽減を促す候補として、curcumin, quercetin, piperine, および resveratrol (次項参照) を選択し、その有効性を検証した。図 2.2 に構造式を示す。

Curcumin はポリフェノールの一種であるクルクミノイドに分類される。本物質は生薬であるウコンの有効成分の一つであり、カレーのスパイスにも含まれていることから、一般人がかなりの頻度で摂取する物質と考えられる。Quercetin はフラボノイドの一種であり、タマネギやリンゴなどに多く含まれている。Piperine は、黒コショウの辛味成分であり、アルカロイドに分類されるものの一つである。これらの成分は、いずれも 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, 図 2.2) による AhR の活性化に対して antagonist 様作用を示す (17)。また、抗酸化的

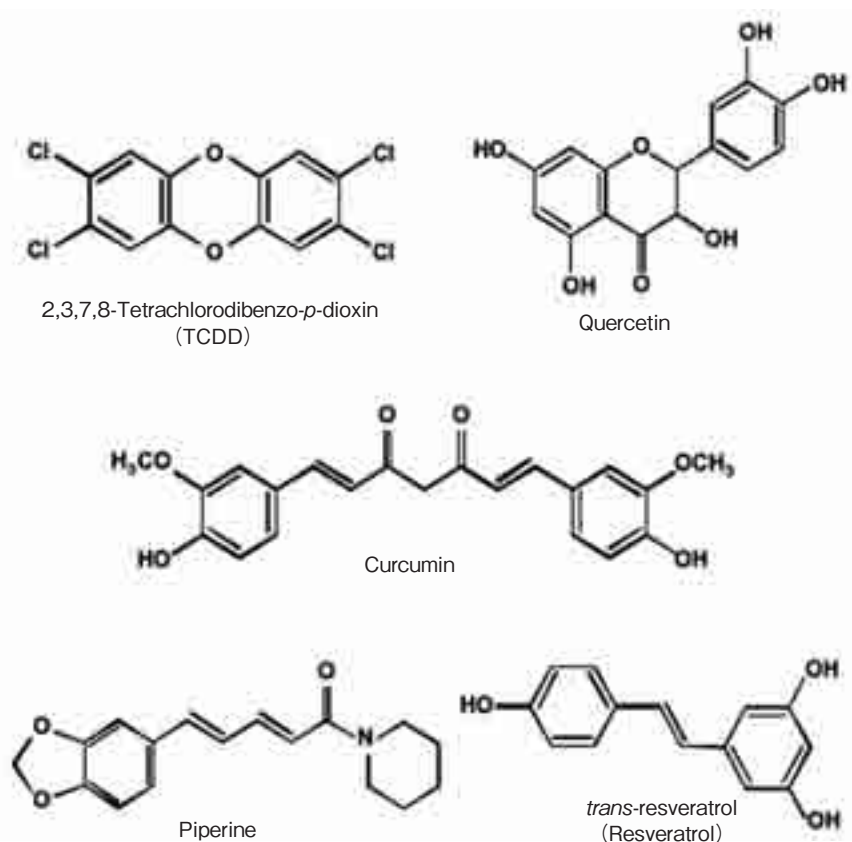


図 2.2 Chemical structures of TCDD and candidate compounds which attenuate dioxin toxicity.

ストレス作用も有していることから (18~20), ダイオキシン毒性に対する有効性が期待された。そこで, ダイオキシン感受性の C57BL/6J マウスを用い, TCDD による急性毒性に対する影響を観察した。その結果, curcumin, もしくは quercetin を投与した場合, TCDD による体重増加抑制が有意に軽減された (表 2.1)。また, piperine の場合, 有意差は認められなかったものの, TCDD による体重増加抑制が軽減される傾向を示した。これら食物成分による体重増加抑制軽減効果は, いずれも観察初期では認められず, 20 日目以降に認められた。従って, 食用食物成分による毒性軽減効果の発現には, 長期間の摂取が必要である可能性が示された。一方, TCDD 誘発性の臓器重量変化に対する食用食物成分の効果は, quercetin による肝肥大の軽減を除いて認められなかった。さらに, 食物成分による毒性軽減機構を解析するため, AhR 活性化の指標である ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) 活性, および酸化的ストレスの指標である thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) 値を測定した。その結果, TCDD による EROD 活性の上昇が quercetin によって増強されたことを除いて, 影響は認められなかった。

表 2.1 Effects of components in edible plants on dioxin toxicity *in vivo*.

Component	Wasting syndrome	Hepatomegaly	Atrophy		Steatosis ^b	cyplal ^c induction	Oxidative ^c stress
			Thymus	Spleen			
Curcumin ^a	improved	n.i.	n.i.	n.i.	–	n.i.	–
Quercetin ^a	improved	improved*	n.i.	n.i.	–	enhanced*	n.i.
Piperine ^a	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	–	n.i.	n.i.
Resveratrol ^a							
p.o.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	improved	n.i.	n.i.
s.c.	improved	n.i.	n.i.	n.i.	improved	improved*	improved**

See references 33 (curcumin), 34 (quercetin), 35 (piperine) and 36 (resveratrol) for the details.

^aTCDD (100 µg/kg) was given by gavage after initial treatment of each compound.

^bThe hepatic lipid accumulation was assessed by oil-red O stain.

^cEROD activity and the concentration of TBARS were measured as indices of AhR-mediated cyplal induction and oxidative stress, respectively.

Significant difference from TCDD-treated group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$. –: no data. n.i.: not improved.

2.2.2 Resveratrol によるダイオキシン毒性の軽減

Resveratrol は、赤ワインやピーナッツの渋皮、日本の民間薬であるイタドリの根などに多く含まれるスチルベン骨格を有するポリフェノールであり、*trans*-と *cis*-体が存在する（以下、*trans*-resveratrol を resveratrol とする）。フランス人は、脂肪の多い食事を頻繁にとるにもかかわらず心疾患の発症率が少ない、いわゆる「フレンチパラドックス」と呼ばれる現象が知られている。この要因として、フランス人におけるワイン摂取量の多さが挙げられているが⁸、resveratrol は、疾患防止効果を有する成分の一つとして赤ワインより単離されたものである。ダイオキシン毒性に対する resveratrol の影響に関する報告は多く、AhR を介した *CYP1A1* や *CYP1B1* 遺伝子の転写活性化の阻害 (21, 22), *cyclooxygenase-2* 遺伝子転写活性化の阻害 (23), およびアポトーシスの抑制 (24) などが *in vitro* 実験系において報告されている。さらに、*in vivo* において、多環芳香族炭化水素によるラット肺と腎臓の *CYP1A1* 誘導の抑制 (25) や TCDD 母体曝露マウスにおける胎児の口蓋裂や水腎症の軽減 (26) が明らかとなっている。Resveratrol によるダイオキシン毒性の軽減機構は、未だ完全に明らかになっていない。しかし、前述の食用食物成分と同様、resveratrol は、TCDD による AhR の活性化に対する antagonist 様作用 (17)、並びに抗酸化ストレス作用 (27, 28) を有している。従って、これらが作用の少なくとも一部を担うものと考えられる。我々の研究室では、ダイオキシンの急性毒性に対する resveratrol の有効性を検証するため、C57BL/6J マウスを用いて *in vivo* での検討を行った。その結果、TCDD による体重増加抑制や肝臓への脂質の蓄積が、resveratrol の経口投与により軽減される傾向が観察された (表 2.1)。これに対し、臓器障害に対する効果は認められなかった。さらに、resveratrol を皮下投与した場合、TCDD による体重増加抑制は未処理群のレベルまで回復した。また、肝臓における脂質の蓄積も、経口投与時と同程度の改善効果を示した。続いて、肝臓の EROD 活性、並びに TBARS 値に対する resveratrol の影響を検討した。その結果、resveratrol を経口

投与した場合では両指標に対する影響は見られなかった。これに対し、皮下投与の場合、TCDDのみを処理した場合に比べ両指標とも有意な改善を示した。この時、血中の resveratrol 濃度－時間曲線下面積は、経口投与時に比べ皮下投与時で大きく増加していた。以上の結果から、resveratrol による TCDD 毒性軽減効果は、生物学的利用率 (bioavailability) の改善に伴い増強すると考えられた。

2.2.3 食用食物成分によるダイオキシン毒性軽減の可能性と問題点

今回検討に用いた食用食物成分は、いずれも TCDD による体重増加抑制に対して軽減、もしくは軽減傾向を示した (表 2.1)。また、resveratrol の場合、TCDD による脂肪肝に対しても有効であった。これに対し、TCDD による EROD 活性や TBARS 値の上昇に対して、resveratrol の皮下投与時を除いて、いずれの成分も顕著な影響を示さなかった。ダイオキシン毒性を軽減するにもかかわらず、その発症機構の根幹である AhR の活性化や酸化的ストレスに対して影響を及ぼさないという結果は、明らかな矛盾である。この原因については不明であるが、食用食物成分の生理作用は多岐に亘るため、AhR に対する antagonist 様作用や抗酸化的ストレス作用以外の作用が毒性軽減に働いた可能性も否定できない。また、一般的に、食物成分の代謝速度は速く、摂取後数時間以内に血中より消失する。従って、サンプリング時に AhR の活性化や酸化的ストレスなどに対する影響が消失していた可能性も否定できない。これが事実ならば、食用食物成分による毒性軽減効果は、その bioavailability に依存することになる。この点に関して、resveratrol の bioavailability の改善に伴い TCDD 毒性に対する軽減効果の増強が認められた。この事実は、上記推論を裏付けるものと思われる。経口的に与えられた食用食物成分は、小腸より吸収される際に初回通過効果を受けるものが多い。従って、bioavailability を改善する手段として、経皮吸収のような小腸を介さない吸収形態の選択が挙げられる。また、他の食物成分を利用することで bioavailability の改善を図ることも有効である。例えば、resveratrol の場合、グルクロン酸抱合、もしくは硫酸抱合により速やかに代謝される (29)。そこで、これら抱合反応を受けやすいフラボノイド類を多く含む食事との併用で resveratrol 代謝の拮抗を試み、それに伴って bioavailability を改善することも考え得る。

日常的な摂取によるダイオキシン毒性軽減のためには、食用食物成分の過剰摂取に伴う副作用の可能性も考慮せねばならない。Resveratrol の安全性に関する報告では、750 mg/kg の用量で 90 日間ラットに経口投与した場合、血液学的所見や生化学的所見、さらに臓器重量に対して異常は認められていない (30)。同量の resveratrol を妊娠ラットに与えた場合でも、胎児への影響は認められなかった。これに対し、resveratrol 1 g/kg body weight/day を 24 日間経口投与した場合、生体の抗酸化応答と思われる薬物代謝第二相酵素の mRNA レベルの上昇が報告されている (31)。また、レポータージーンアッセイでは、resveratrol が AhR agonist として作用することも報告されており (32)、条件次第ではダイオキシン毒性を増強する可能性も否定できない。現在インターネットなどを通じて日本国内で入手可能な健康補助食品 (サプリメント) において、resveratrol の 1 日あたりの摂取量は 2~2,600 mg である。安易なサプリメントの摂取は、かえって患者の健康を脅かす結果になることも予想される。他の食用食物成分に関する詳細な毒

性試験の結果は不明であるが、同様の問題は無視できない。従って、安全な臨床応用のためには、十分な基礎研究を踏まえた問題の解決が必要と考えられる。

2.3 おわりに

油症事件発生より現在に至るまで、中毒患者の症状の緩和、並びに生活の質の向上に向けた様々な取り組みがなされてきた。しかし、油症病像の複雑さから根本的な解決策は未だ確立されていない。本章では、主に食用食物成分に注目し、ダイオキシン中毒症状に対する対処法としての可能性や問題点についてまとめた。検討に用いた成分は、いずれも TCDD 毒性の一部に対して有効である可能性を示したが、臨床への応用を考えた場合、その bioavailability の改善は不可欠である。一方で、特定の食物成分の高用量摂取が、患者の健康へ悪影響を及ぼす可能性も否定できない。この点については、動物実験などを通じた適切な服用法と毒性軽減機構の解明を待つ必要がある。さらに、ダイオキシン類排泄促進との併用など、臨床応用に向けた研究展開が必要と思われる。

文 献

- 1) 増田義人, 吉村健清, 梶原淳睦, 他 (2007) 油症発生より 38 年間の患者血液中 PCBs, PCDFs の濃度変遷. 福岡医誌 98, 182-195.
- 2) 堀 就英, 安武大輔, 戸高 尊, 他 (2007) 福岡県油症検診 (2006 年度) 受診者における血液 PCB 濃度と性状. 福岡医誌 98, 176-181.
- 3) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, et al (1996) Aryl-hydrocarbon receptor deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 140, 173-179.
- 4) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, et al (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. Genes Cells 2, 645-654.
- 5) Poland, A. and Knutson, J (1982) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol 22, 517-524.
- 6) Wilson CL and Safe S (1998) Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. Toxicol Pathol 26, 651-671.
- 7) Mimura J and Fujii-Kuriyama Y (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. Biochim Biophys Acta 1619, 263-268.
- 8) Stohs SJ, Shara MA, Alsharif NZ, et al (1990) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced oxidative stress in female rats. Toxicol Appl Pharmacol 106, 126-135.
- 9) Hori M, Kondo H, Ariyoshi N, et al (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.
- 10) Alsharif NZ, Grandjean CJ, Murray WJ, et al (1990) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced decrease in the fluidity of rat liver membranes. Xenobiotica 20, 979-988.
- 11) Alsharif NZ, Schlueter WJ and Stohs SJ (1994) Stimulation of NADPH-dependent reactive oxygen species formation and DNA damage by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat peritoneal lavage cells. Arch Environ Contam Toxicol 26, 392-397.
- 12) Shimizu K, Ogawa F, Thiele JJ, et al (2007) Lipid peroxidation is enhanced in Yusho victims 35 years

- after accidental poisoning with polychlorinated biphenyls in Nagasaki, Japan. J. Appl. Toxicol. 27, 195-197.
- 13) 清水和宏, 小川文秀, 佐藤伸一 (2007) 油症認定患者血中 Total Antioxidant Power の検討. 福岡医誌 98, 141-142.
 - 14) 第9章 PCB および PCDF の排泄促進. (2000) 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編, 油症研究—30年の歩み—, pp. 257-302, 九州大学出版会, 福岡.
 - 15) Mochida, Y., Fukata, H., Matsuno, Y., et al (2007) Reduction of dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human body. Fukuoka Acta Med. 98, 106-113.
 - 16) 長山淳哉, 平川博仙, 梶原淳陸, 等 (2009) 発酵玄米健康補助食品摂取による油症原因物質の体外排泄促進—PCDFs と PCDDs の場合—. 福岡医誌 100, 192-199.
 - 17) Amakura Y, Tsutsumi T, Sasaki K, et al (2003) Screening of the inhibitory effect of vegetable constituents on the aryl hydrocarbon receptor-mediated activity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Biol Pharm Bull 26, 1754-1760.
 - 18) Priyadarsini, K., Maity, D., Naik, G., et al (2003) Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. Free Radic Biol Med 35, 475-484.
 - 19) Salah, N., Miller, N. J., Pagaga, G., et al (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain breaking antioxidants. Arch Biochem Biophys 322, 339-346.
 - 20) Srinivasan, K (2007) Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. Crit Rev Food Sci Nutr 47, 735-748.
 - 21) Ciolino HP, Daschner PJ, and Yeh GC (1998) Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 *in vitro* preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. Cancer Res. 58, 5707-5712.
 - 22) Mollerup S, Ovrebø S. and Haugen A (2001) Lung carcinogenesis: Resveratrol modulates the expression of genes involved in the metabolism of PHA in human bronchial epithelial cells. Int J Cancer 92, 18-25.
 - 23) Degner SC, Kemp MQ, Hockings JK, et al (2007) Cyclooxygenase-2 promoter activation by the aromatic hydrocarbon receptor in breast cancer mcf-7 cells: Repressive effects of conjugated linoleic acid. Nutr J Cancer 59, 248-257.
 - 24) Puebla-Orsorio N, Ramos KS, Falahatpisheh MH, et al (2004) 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin elicits aryl hydrocarbon receptor-mediated apoptosis in the avian DT40 pre-B-cell line through activation of caspase 9 and 3. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 138, 461-468.
 - 25) Casper RF, Quesne M, Rogers IM, et al (1999) Resveratrol has antagonist activity on aryl hydrocarbon receptor: Implications for prevention of dioxin toxicity. Mol. Pharmacol. 56, 784-790.
 - 26) Jang JY, Park D, Shin S, et al (2008) Antiteratogenic effect of resveratrol in mice exposed *in utero* to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Eur J Pharmacol 591, 280-283.
 - 27) Frankel EN, Waterhouse AL, and Kinsella JE (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet 341, 1103-1104.
 - 28) Fuhrman B, Lavy A. and Aviram M (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. Am J Clin Nutr 61, 549-554.
 - 29) Marier JF, Vachon P, Gritsas A, et al (2002) Metabolism and disposition of resveratrol in rats: Extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by linked-rat model. J Pharmacol Exp Ther 302, 369-373.
 - 30) Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, et al (2009) Safety studies conducted on high-purity *trans*-resveratrol in experimental animals. Food Chem. Toxicol. 47, 2170-2182.
 - 31) Hebbar V, Shen G, Hu R, et al (2005) Toxicogenomics of resveratrol in rat liver. Life Sci 76, 2299-2314.
 - 32) Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, et al (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using *in vitro* reporter gene assay. Biol. Pharm. Bull. 26,

532-539.

- 33) Ishida T, Taketoh J, Nakatsune E, et al (2004) Curcumin anticipates the suppressed body weight gain with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mice. J Health Sci 50, 474-482.
- 34) Ishida T, Naito E, Mutoh J, et al (2005) The plant flavonoid, quercetin, reduces some forms of dioxin toxicity by mechanism distinct from aryl hydrocarbon receptor activation, heat-shock protein induction and quenching oxidative stress. J Health Sci 51, 410-417.
- 35) Ishida T, Ishizaki M, Tsutsumi S, et al (2008) Piperine, a pepper ingredient, improves the hepatic increase in free fatty acids caused by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. J Health Sci 54, 551-558.
- 36) Ishida T, Takeda T, Koga T, et al (2009) Attenuation of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity by resveratrol: A comparative study with different routes of administration. Biol Pharm Bull 32, 876-881.

第3章 高残留性 PCB 類の代謝および代謝物の毒性評価

古賀信幸，太田千穂

3.1 はじめに

PCB 類の代謝研究は、1968 年のカネミ油症事件を契機として、わが国をはじめ世界中で始められ、現在までに、次のようなことが明らかにされている。すなわち、① PCB 類は肝小胞体に局在するチトクロム P450 (P450) によって代謝される、② 主代謝物は一水酸化 (OH) 体で、次いで、二水酸化 (diOH) 体、メチルチオ (CH_3S) 体およびメチルスルホン (CH_3SO_2) 体が比較的多く、さらに、微量代謝物として、ジヒドロジオール体や、塩素が 1 個脱離した OH 体も見いだされている、③ これらの代謝物は、主に胆汁を介して糞中へ排泄される、④ 置換塩素数が 5 個以上になると極端に代謝されにくくなり、特に、2,4,5-三塩素置換ベンゼン環を有するものは脂肪組織、肝および血液などへの残留性が高くなる、⑤ PCB 代謝活性の強さは動物間で大きく異なっており、例えば、イヌやモルモットでは他の動物に比較し、難代謝性の CB153 に対し代謝活性が高い、などである。なお、詳細については前書を参考にされたい (1)。

このように PCB の代謝に関しては、かなりの点が解明されていることから、わが国を含め世界的には、緊急な研究課題ではなくなっている。最近の 10 年間をみると、高毒性であるコプラナー PCB に関する報告が減少し、逆に、低毒性ではあるが血液や肝臓に高濃度で残留しているものに関する報告が増えている。残留性の高い PCB 異性体には、図 3.1 に示すような CB153, CB138, CB180 および CB146 などの 2,4,5-三塩素置換ベンゼン環を有し、かつ 5 個以上の塩素原子が置換されたものや PCB 代謝物の 4-OH 体や S-含有代謝物などがあるが、後述の

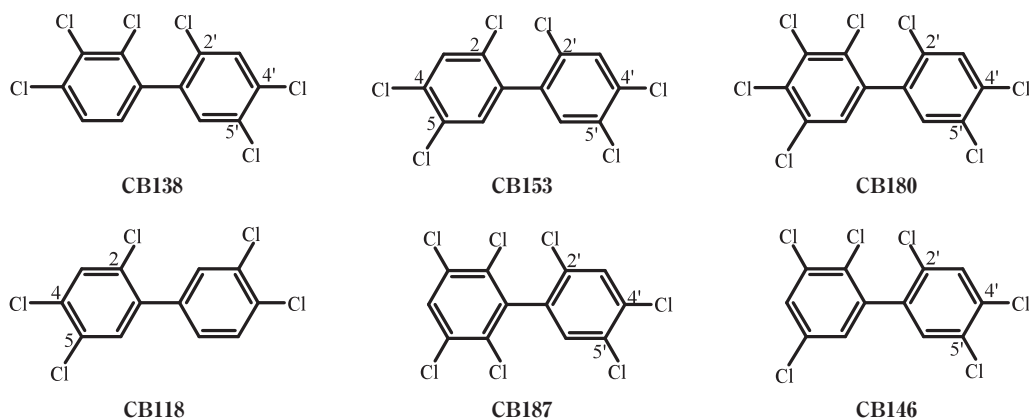


図 3.1 ヒトを含む動物組織に高濃度で残留している 2,4,5-三塩素置換 PCB 異性体

ように、今や PCB 研究の世界的な興味は、低毒性 PCB 類およびこれら PCB 代謝物の毒性発現機構の解明へと向かっている。最近では、特に女性ホルモンおよび甲状腺ホルモンなどの内分泌の攪乱作用を介した作用、すなわち、脳神経系への影響および次世代への影響といった新たな展開が見られている。

本章では、PCB 代謝および PCB 代謝物の毒性（生理作用）に関して 1990 年代後半以降に報告された研究につき、紹介する。表 3.1 と表 3.2 にはそれぞれをまとめた。

3.2 PCB の水酸化反応とメチルチオ化反応

PCB の代謝経路は、水酸化反応とそれに続く CH_3S 化反応であるといえることができる。一般に、水酸化反応は動物肝ミクロゾームの P450 によって触媒されるが、直接水酸化と epoxide 中間体生成の 2 つの経路で進行するといわれている。後者の場合、塩素原子の NIH 転位を伴ったり、あるいはグルタチオン抱合を受け、さらにはチオール (SH) 体、 CH_3S 体を経由し、最終的に S-酸化反応を受け CH_3SO_2 体に至ることが知られている (1)。ところで、最近十数年の PCB の *in vivo* 代謝研究をみると、原口らの一連の研究が注目される (2, 3, 6~11)。彼らは、1997 年以来、OH 体や diOH 体への水酸化反応、および CH_3S 体や CH_3SO_2 体などへの CH_3S 化反応に注目し、塩素数や置換位置が異なった PCB 異性体で両代謝反応がどのような割合になるのか、さらに各代謝物の組織への分布および両反応の動物種差などを精力的に調べている。

彼らはまず、4 種類の 2,5-二塩素置換 PCB (CB31, CB70, CB101 および CB141) をラットに腹腔内投与し、4 日後の糞中代謝物を調べ、興味ある結果を見いだした。すなわち、2,5-二塩素置換されていない環の塩素数が増加するにつれて、① 3-および 4-OH 体が、3-および 4- CH_3S 体よりは糞へ多く排泄されること、また、② OH 体のうち、3-OH 体の方が、4-OH 体より糞中への排泄が増加することを明らかにした。さらに、3-および 4- CH_3SO_2 体の組織分布をみると、① 塩素数が増加するにつれて組織中の CH_3SO_2 体の総量が減少していくこと、② いずれも肝と脂肪組織に高濃度で分布するが、4- CH_3SO_2 体は選択的に肺に多く検出されることも明らかになった (2)。この報告は、置換塩素数が水酸化反応と CH_3S 化反応との割合に大きく影響を及ぼすことを示した。

次に、3,4'-二塩素置換された mono-*ortho* 型の 3 種類の PCB 異性体 (CB105, CB118 および CB156) につき、ラットでの代謝物の分布を調べた。まず、血中代謝物を調べ、CB105 投与では 4-OH-CB105 が、また CB118 投与では 4 位の塩素原子が NIH 転位して生成された 4-OH-CB107 が、いずれも未変化体の 7~10 倍多く検出されることを明らかにした。また、CB118 および CB156 投与ラット血中からは、微量ながら、それぞれの 4'-OH 体 (4'-OH-CB120 および 4'-OH-CB159) も検出した (3)。これらの結果は、PCB の 4-あるいは 4'-OH 体が血中に高い親和性を有するというこれまでの報告 (4) をさらに支持した。また、4-OH-CB107 は、後述のように、ヒト血中で 3 番目に多く検出される残留性の高い PCB 代謝物であるが、CB118 から生成されることが証明された。一方、この報告では、3 種類の PCB 異性体のいずれからでも、5'-および 6'- CH_3SO_2 体が肝および脂肪組織に検出された。これらはユニークな代謝物であり、*ortho-meta* 位での 5',6'-epoxide 体の生成に引き続き、グルタチオン抱合を受けたことを意味してい

表 3.1 1997 年以降に報告された *ortho* 位塩素置換 PCB 異性体の代謝物

PCB 異性体	動物種	代謝物	引用文献
<u>mono-ortho-triCB</u>			
CB31	ラット	3-OH, 4-OH, 3-and 4-CH ₃ S, 3-and 4-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (2)
<u>mono-ortho-tetraCB</u>			
CB70	ラット, ハムスター, モルモット	3-OH, 4-OH	Koga et al. (36)
CB70	ラット	3-OH, 4-OH, 3-and 4-CH ₃ S, 3- and 4-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (2)
CB70	チャイニーズハムスター	4-OH	Koga et al. (37)
<u>di-ortho-tetraCB</u>			
CB52	チャイニーズハムスター	4-OH	Koga et al. (37)
CB52	ウサギ	3-OH, 4-OH, 3,4-diOH	Ohta et al. (41)
<u>mono-ortho-pentaCB</u>			
CB105	ラット	5-OH, 5'-OH, 4-OH-CB107, 4-OH-CB56, 4'-OH-CB108, 5-, 5'-, 6- and 6'-CH ₃ S, 5'- and 6'-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (3)
CB105	ハムスター	4-OH-CB107, 4'-OH-CB108	Koga et al. (31)
CB118	ラット	4-OH-CB70, 4-OH-CB107, 5'-OH, 4'-OH-CB120, 5'- and 6'-CH ₃ S, 5'- and 6'-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (3)
CB118	モルモット	2-OH-CB126	Ohta et al. (33)
<u>di-ortho-pentaCB</u>			
CB101	ラット, マウス, モルモット, ハムスター	3-OH, 3'-OH, 4'-OH, 3',4'-diOH, 3'- and 4'-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (7)
CB101	ラット	3'- and 4'-OH, 3',4'-diOH, 3'- and 4'-CH ₃ S, 3'- and 4'-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (2,6,9)
CB101	ラット, ハムスター, モルモット	3-OH, 3'-OH, 4'-OH, 3',4'-diOH	Ohta et al. (36)
<u>mono-ortho-hexaCB</u>			
CB156	ラット	5'-OH, 4'-OH-CB159, 5'- and 6'-CH ₃ S, 5'- and 6'-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (3)
CB167	ラット	4-OH-CB124, 4-OH-CB162	Haraguchi et al. (10)
<u>di-ortho-hexaCB</u>			
CB128	ラット	5-OH, 5- and 6-CH ₃ S	Haraguchi et al. (11)
CB138	ラット, ハムスター, モルモット	3'-OH, 2'-OH-CB157, 6'-OH-CB105, 5'-OH-CB85	Koga et al. (26)
CB141	ラット	3'-OH, 4'-OH, 3'- and 4'-CH ₃ S 3'- and 4'-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (2)
CB146	モルモット, ラット, ハムスター	3'-OH, 4-OH	Ohta et al. (29)
<u>tri-ortho-hexaCB</u>			
CB132	ラット, マウス, モルモット, ハムスター	4'- and 5'-OH, 4',5'-diOH 4'- and 5'-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (7)
CB149	ラット	4- and 5-OH, 4'- and 5'-CH ₃ S, 4'- and 5'-CH ₃ SO ₂	Haraguchi et al. (6)
<u>tri-ortho-heptaCB</u>			
CB183	モルモット, ラット, ハムスター	3'-OH, 5-OH	Ohta et al. (23,24)
CB187	モルモット, ラット ハムスター	4'-OH-CB178, 4-OH, 5-OH-CB151	Ohta et al. (20,21)

る。1997 年、有吉らはモルモットの CB153 代謝物で、また 2,3-epoxide の生成を示唆する 2-OH 体 (2-OH-CB167) を初めて報告しており (5)、この反応がモルモットだけでなく、ラットにおいても起こっていることが示された。

さらに、CB101 あるいは CB149 をラットに投与し、S 含有代謝物の経日的な分布を調べた。まず、糞中代謝物を調べたところ、両 PCB ともに投与後 3 日目に 4-CH₃S 体と 3-CH₃S 体が最も多く排泄され、特に 4-CH₃S 体の方が 7~9 倍多いことが明らかになった。また、3-および 4-CH₃SO₂体はそれらに比べ量的には少ないものの 5 日目に最も多く排泄された (4-CH₃SO₂体 > 3-CH₃SO₂体)。さらに、投与後 42 日間の 3-および 4-CH₃SO₂体の組織分布を調べると、前述の 2,5-二塩素置換 PCB と同様に、両 PCB の 3-CH₃SO₂体は次第に脂肪組織および肝へと、一方、4-CH₃SO₂体は肺へと特異的に分布することが明らかとなった (6)。

2005 年、原口と筆者らは CB101 と CB132 の代謝物として OH 体、diOH 体および CH₃SO₂体に注目し、ラット、マウス、ハムスターおよびモルモットでの投与後 4 日目の組織分布を調べた。その結果、①ラットとマウスは代謝パターンが非常によく似ていること、②CB101 投与ラット、マウスおよびハムスター肝では 3'-OH 体が主であるが、モルモット肝では 3-OH 体が最も多いこと、③3',4'-diOH-CB101 および 4',5'-diOH-CB132 は、ハムスター血中に最も多く検出されるが、逆に、肝および血中の CH₃SO₂体は動物中で最も少ないことを明らかにした (7)。

また、PCB 製品の Kanechlor 500 をラット、ハムスターおよびモルモットに投与し、5 日目の肝および血液への分布の動物種差を調べたところ、①肝では、いずれの動物でも 2,4-および 2,3,4-塩素置換の PCB 異性体が多く検出されること、さらに、②モルモット肝ではコプラナー PCB が多く分布していること、③血中代謝物として、ラットでは 4-OH-CB107 が、モルモットでは 3-OH-CB99 が、ハムスターでは両代謝物に加え CB101、CB110 および CB149 の diOH 体が多いことが明らかとなった (8)。さらに、Kanechlor 500 を Gunn ラットと Wistar ラットに投与し、各種代謝物の 4 日後の肝および血液への分布を比較した。Gunn ラットはビリルビンのグルクロン酸抱合を触媒するグルクロン酸転移酵素 (UGT1A) が遺伝的に欠損しているラットである。その結果、Gunn ラットの肝と血液のいずれでも diOH 体の生成が Wistar ラットの数十倍と多いこと、また、Gunn ラット肝における 3-および 4-CH₃SO₂体の生成が 5 分の 1 と少ないことが明らかになった (9)。この結果は、UGT1A の欠損が、diOH 体と CH₃SO₂体との生成比率を大きく変えていることを示唆している。しかしながら、PCB の OH 体は UGT1A の基質にはなりにくいという報告もあり (12)、現在のところ、この理由は不明である。

このように、PCB 異性体の代謝パターンおよび各代謝物の組織分布には大きな動物種差が明らかとなったが、今後、どの動物が最終的にヒトに近いかを明らかにする必要がある。

3.3 ヒト血中に残留する PCB 代謝物の親 PCB の探索

Bergman らは、CB153、CB138 および CB180 などの PCB 異性体に加え、ある種の PCB 異性体の 4-OH 体が、比較的高濃度でスウェーデン人血液中に局在することを報告した (13~16)。最も高濃度のものは、4-OH-CB187 で、次いで 4-OH-CB146 および 4-OH-CB107、さらに 3-

OH 体の 3-OH-CB153 および 3'-OH-CB138 であった。その後、フェロー諸島 (17)、オランダ (18)、ケベック (19) およびスロバキア (20) などの住民の血液でも、ほぼ同様な結果が報告されている。後述のように、PCB 代謝物の毒性がいろいろと見いだされていることもあり、ヒト血中に高濃度で残留する PCB の OH 体がどの PCB 異性体由来であるかを明らかにすることは非常に重要であると思われる。図 3.2 のように、PCB の OH 体は、その生成の際に、時々塩素原子の NIH 転位を伴うことから、親 PCB として 2~3 種類の PCB 異性体が考えられる。そこで、この点を明確にするため、以下の検討を加えた。

3.3.1 4-OH-CB187

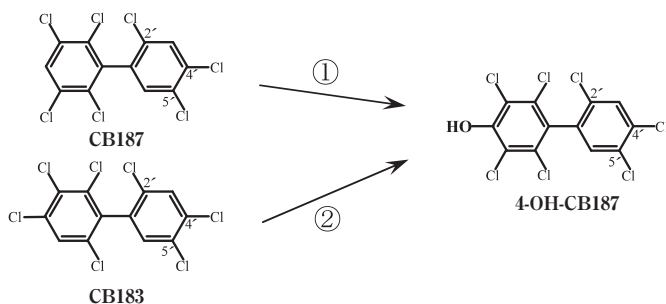
4-OH-CB187 は、図 3.2 に示すように、CB187 あるいは CB183 から生成される可能性が考えられる。すなわち、CB187 の場合、4 位に直接水酸化反応で生成されると考えられるが、一方、CB183 の場合には、4,5-エポキシド生成を経由して、4 位の塩素原子が 5 位に NIH 転位することにより生成されると考えられる。

そこで筆者らは、まず CB187 についてラット、ハムスターおよびモルモット肝ミクロゾームによる *in vitro* 代謝を調べ、4-OH-CB187 が生成されるか否かを調べた。酵素源として、未処理肝ミクロゾームとともに、代表的な P450 誘導剤の phenobarbital (PB) あるいは 3-methylcholanthrene (MC) 前処理した動物の肝ミクロゾームを用いて比較検討した。CB187 を各種肝ミクロゾームとともに、NADPH 存在下、37℃で 60 min、好氣的にインキュベートした後、CB187 とその代謝物を有機溶媒で抽出、さらにメチル化後、GC-ECD および GC-MS で分析した。その結果、図 3.3 のように、① 3 種類の代謝物 (4'-OH-CB151, 4'-OH-CB178 および 4-OH-CB187) が生成され、主代謝物は 4'-OH-CB178 であること、② 代謝活性の強さはモルモット>ラット>ハムスターの順であること、③ いずれの動物でも PB 誘導性 P450 (すなわち、CYP2B) により触媒されること、さらに、④ PB 誘導性のモルモット肝 P450 である CYP2B18 に対する抗血清により 3 種類の代謝物の生成がいずれも強く阻害されることから、モルモット肝では CYP2B18 が CB187 代謝全般に強く関与していることが明らかとなった (21)。この報告は、高残留性 PCB 代謝物である 4-OH-CB187 の親 PCB が CB187 であることを証明した初めてのものとなった。

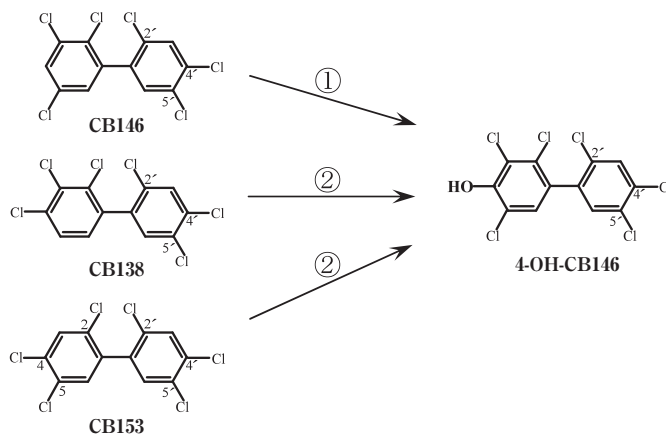
次に、肝で生成された 4-OH-CB187 が血中へと分布することを確かめるために、CB187 をモルモットの腹腔内に投与し、投与後 30 日間にわたり、代謝物 3 種類の糞、肝および血液への分布を調べた。その結果、図 3.4 のように、主代謝物の 4'-OH-CB178 は、血中では投与後 4 日目に最も高濃度になるものの、速やかに減少し糞中へと排泄されることが明らかとなった (22)。一方、4-OH-CB187 は、血中においてゆっくりと増加し、投与後 16 日目で最も高濃度になった。その後、投与後 30 日目までゆるやかに減少した。なお、投与期間中、全く糞中には検出されなかった。このように、4-OH-CB187 と 4'-OH-CB178 は構造的に非常によく似ているにもかかわらず、生体内動態が大きく違っていることは興味深い。

2004 年、Malmberg らは 4-OH-CB187 および 4-OH-CB107 をラットに静注後、それらの血中半減期を比較したところ、それぞれ 15.4 日と 4.3 日であることを報告した (23)。4-OH-CB107

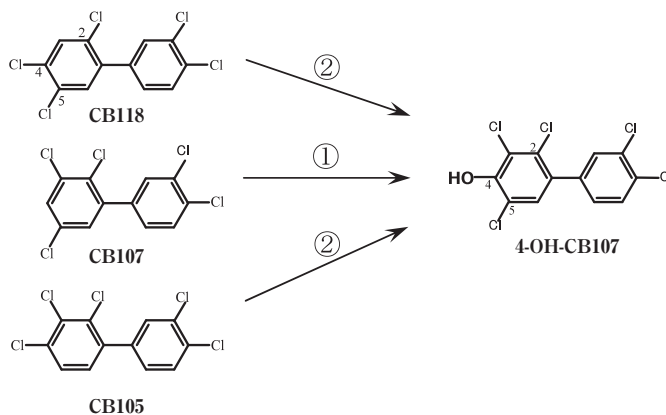
1. 4-OH-CB187



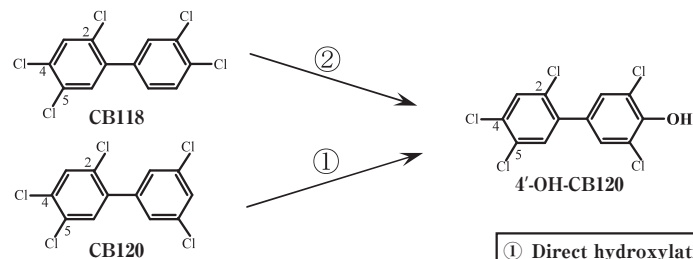
2. 4-OH-CB146



3. 4-OH-CB107



4. 4'-OH-CB120



① Direct hydroxylation
② via epoxide and NIH-shift

図 3.2 ヒト血中 PCB 水酸化体の予想される親化合物

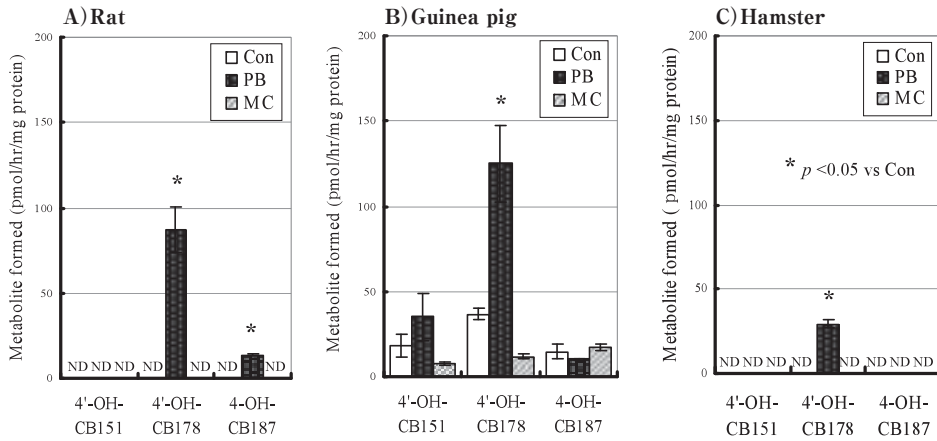


図 3.3 動物肝ミクロゾームによる CB187 代謝に及ぼす P450 誘導剤の影響

Each column represents the mean $\pm$ S.D. (vertical bars) of three animals.

* Significantly different from untreated animals ($p < 0.05$).

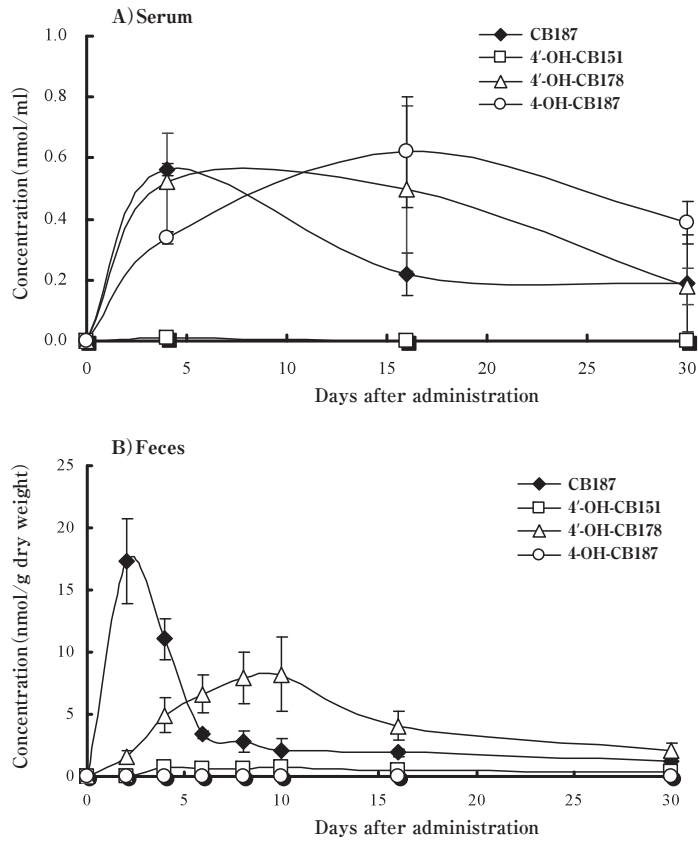


図 3.4 CB187 投与モルモットの血中 (A) および糞中 (B) における CB187 代謝物の経日変化

Each point represents the mean $\pm$ S.D. of four guinea pigs.

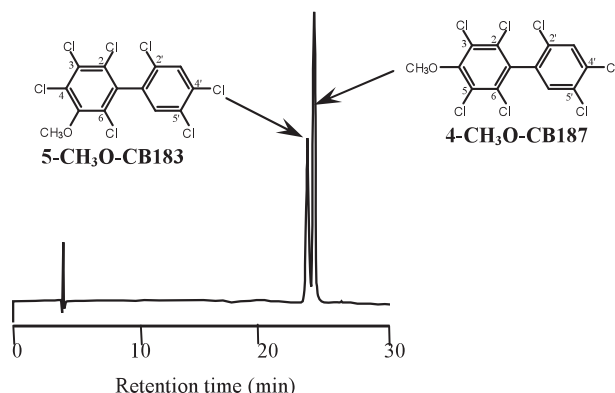


図 3.5 4-CH₃O-CB187 および 5-CH₃O-CB183 の SP2330 カラムによる分離

はヒト血中では 4-OH-CB187 および 4-OH-CB146 に次いで 3 番目に多いことが知られている (13~20)。これらの結果を考え合わせると、4-OH-3,5-二塩素置換の構造を有していても、塩素数とその置換位置の違いで、血中 transthyretin (甲状腺ホルモン運搬タンパク質) との親和性が大きく異なることが示唆される。

続いて、筆者らは親 PCB として可能性がある CB183 につき、上記同様に、動物肝ミクロゾームによる代謝を調べた。その結果、2 種類の OH 体 (M-1 および M-2) が生成されたが、これらの生成量は CB187 代謝の場合と異なり、ラット>モルモット=ハムスターであった。また、CB187 と同様に、PB 誘導性の P450 (CYP2B) により触媒されることが明らかになった (24)。さらに、GC-MS における保持時間およびマススペクトルの結果から、M-1 および M-2 はそれぞれ 3'-OH-CB183 および 4-OH-CB187 と推定された。これらの結果から、4-OH-CB187 が、CB183 から生成されうるとの結論を出したのであるが、その後、これが間違いであることが判明した。

すなわち、CB183 をラットに腹腔内投与し、投与後 4 日目の糞中および血中への M-1 と M-2 の分布を調べたところ、4-OH-CB187 と推定していた M-2 が血中だけでなく、糞中からも比較的高濃度で検出されるに至った (25)。この事実は、CB187 の *in vivo* 代謝の結果と矛盾していることから、別の予想代謝物として 5-CH₃O-CB183 を合成し、4-CH₃O-CB187 と比較したところ、両者は DB-1 カラム (長さ 30 m) における GC 保持時間が完全に一致した。そこで、両者を分離するための GC 条件を検討したところ、最終的に SP2330 カラム (長さ 30 m) により、完全に分離することに成功した (図 3.5)。次に、この GC 分析条件下で、CB183 由来の M-2 を調べたところ、M-2 (メチル化体) は 5-CH₃O-CB183 と保持時間が完全に一致することが明らかとなった (25)。以上の結果から、ヒト血中に高濃度で残留する 4-OH-CB187 は、CB187 からのみ生成され、CB183 からは全く生成されないことが決定的となった。図 3.6 には、CB187 と CB183 の代謝経路をまとめた。両 PCB 異性体は PCB 製品の Clophen や Aroclor には、実際、極微量しか含まれていないが (26)、ともに非常にゆっくり代謝され、代謝物のうち 4-OH-CB187 のみが血中に長期にわたり保持されるものと考えられる。

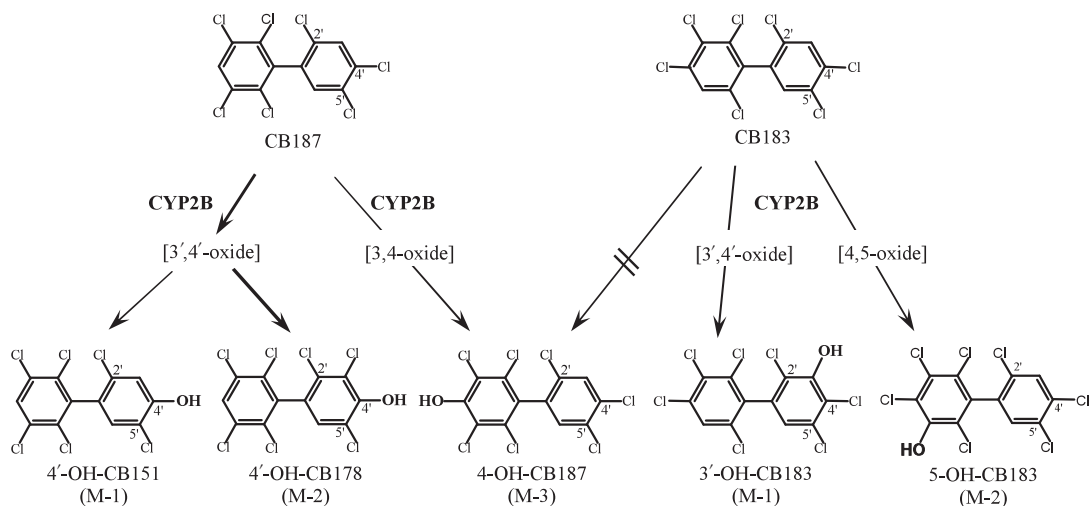


図 3.6 動物肝における CB187 と CB183 の代謝経路

3.3.2 4-OH-CB146

4-OH-CB146 の場合、親 PCB としては CB146 だけではなく、CB138 および CB153 が考えられる (図 3.2)。しかしながら、これまでの筆者らの研究では、CB138 および CB153 から 4-OH-CB146 が生成された事実は見つかっていない (5, 27, 28)。ここでは、CB146 の動物肝ミクロゾームによる *in vitro* 代謝を調べた。その結果、量的には非常に少ないものの、3 種類の OH 体の生成が確認され、このうち 2 つは 3'-OH-CB146 と 4-OH-CB146 であることが明らかとなった。また、両代謝物の生成は前述の CB187 や CB183 と同様に、PB 前処理により促進されること、さらに 4-OH-CB146 の生成量を比較すると、ラット>モルモットであり、ハムスターでは全く生成されないことも明らかとなった (29)。

以上の結果より、ヒト血中において 2 番目に高濃度で検出される 4-OH-CB146 は、ラットでは特に PB 誘導性 P450 (CYP2B) により、主として CB146 から直接水酸化で生成されることが確認された。

3.3.3 4-OH-CB107

4-OH-CB107 はヒト血中において、3 番目に多く検出される PCB 水酸化体である。親 PCB としては CB118, CB107 および CB105 が考えられる。すなわち、CB107 からは 4 位への直接水酸化反応により、一方、CB118 あるいは CB105 からは、それぞれ 3,4-あるいは 4,5-epoxide および NIH 転位を経由して生成されると考えられる (図 3.2)。

原口らは、前述のように CB118 投与ラットの血中と糞中に 4-OH-CB107 および 4'-OH-CB120 を検出したが、前者の方が約 10 倍多く生成されることを報告した (3)。一方、CB105 からの可能性について Klasson-Wehler らは、CB105 投与マウスから、高濃度の 4-OH-CB107 の生成を認めている (30)。筆者らも CB105 投与ハムスターの、投与後 5 日目の血中から、4-OH-

CB107 を検出した (31)。原口らも CB105 投与動物の糞中だけでなく、血中および肝中に 4-OH-CB107 を検出している (3)。これらの報告から、本代謝物の場合、実験動物によって CB118 と CB105 の両方から生成されることが確認された。一方、CB107 からの可能性も残されているが、Kanechlor 400 や Kanechlor 500 中の含量を比べると、CB107 は CB118 の 10 分の 1 以下であることから (8, 32)、CB118 よりは寄与が少ないと思われる。

ところで、筆者らはモルモット肝ミクロゾームを用いて CB118 代謝を調べ、ラットと異なる代謝物を 1 種類見いだした。予想代謝物を合成し、GC-MS で比較したところ、この代謝物は 2,3-epoxide を経由し、2 位の塩素原子が NIH 転位してできたと思われる 2-OH-CB126 であることが判明した (33)。また、原口と筆者らは Kanechlor 500 投与モルモット血中において、ラットやハムスターとは異なり、4-OH-CB107 を検出できなかったが、モルモット特有と思われる OH-CH₃S 体や OH-CH₃SO₂ 体を検出した (8)。このように、モルモットは CB118 や CB153 のような 2,4,5-三塩素置換 PCB に対し、ユニークな代謝系を有していることがわかる。

3.3.4 4'-OH-CB120

2007 年、Linderholm らは油症発症後 37 年を経た油症患者の血中 PCB 代謝物を調べ、その結果、上記の 4-OH-CB187、4-OH-CB146 および 4-OH-CB107 と並び、4'-OH-CB120 が健常者に比べ明らかに高濃度で検出されることを報告した (34)。本代謝物の親 PCB としては図 3.2 に示したように CB118 と CB120 が考えられるが、原口らは、すでに、CB118 投与ラット血中から微量代謝物として、本代謝物を検出している (3)。一方、1977 年、黒木と増田らは油症患者の血中 PCB パターンの特徴として、血中の CB105 と CB118 が健常者に比べ著しく低いことを報告している (35)。また、三村らは、油症原因油中の全 PCB 異性体のうち CB118 が最も多く、7.1~8.8 % を占めているが、CB120 は全く検出されなかったと報告している (32)。これらの結果から、油症患者では CB118 からより多くの 4'-OH-CB120 が生成され、さらに血中に強く保持されたものと考えられる。

3.3.5 3',4'-diOH-CB101

CB101 単独投与あるいは Kanechlor 500 投与ハムスター血中から、ラットやモルモットよりも多くの 3',4'-diOH-CB101 が検出されている (8, 9)。本代謝物の場合、親 PCB としては CB101 以外考えられないことから、ここではラット、ハムスターおよびモルモット肝ミクロゾームを用いて CB101 から 3',4'-diOH-CB101 までの代謝経路を調べた。その結果、いずれの動物においても PB 前処理により 3'-OH 体および 3',4'-diOH 体の生成が強く促進された。また、MC 前処理により 4'-OH 体の生成が促進されたが、4'-OH 体の生成はハムスターで特に顕著であった。さらに、3'-および 4'-OH 体から 3',4'-diOH 体への酸化も、PB 前処理で著しく促進された (36)。

以上の結果から、図 3.7 に示すように、3',4'-diOH-CB101 は、3'-OH 体あるいは 4'-OH 体の両方を經由して、PB 誘導性 P450 の CYP2B 酵素によって主に生成されることが示唆された。

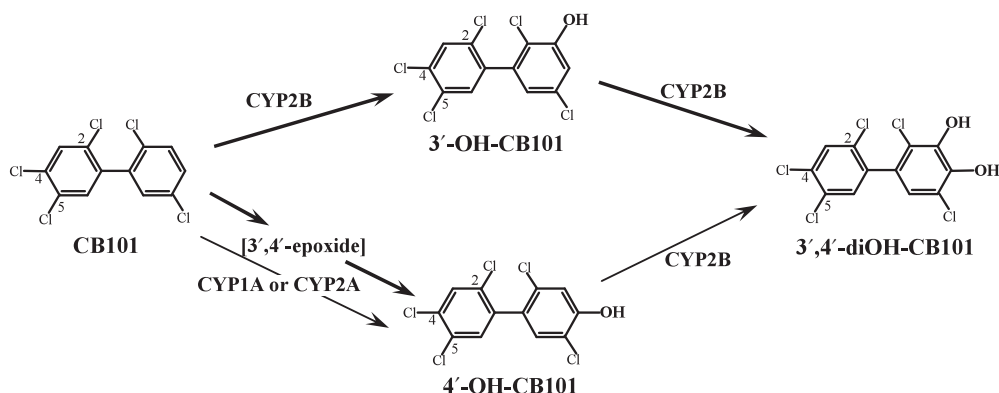


図 3.7 動物肝ミクロゾームによる CB101 の代謝

3.4 PCB 代謝に関与するチトクロム P450

PCB 異性体の水酸化反応には、P450 分子種として、3つの CYP サブファミリー、すなわち、CYP1A (ラット CYP1A1, ハムスター CYP1A2), CYP2B (ラット CYP2B1, ハムスター CYP2B, イヌ CYP2B11, モルモット CYP2B18, ヒト CYP2B6) および CYP2A (ハムスター CYP2A8) が関与している (1)。この 10 年間で、新たにいくつかの P450 分子種が報告されたので、以下に述べる。

1999 年筆者らは、チャイニーズハムスターが他の実験動物と異なる代謝酵素系を有することを見いだした。すなわち、肝ミクロゾームによる CB52 および CB70 の代謝を調べたところ、主代謝物はいずれも 4-OH 体であり、またこの生成は PB 前処理により促進されること、さらにこの P450 分子種は coumarin 7-水酸化活性を有することが明らかとなった (38)。後に、この P450 分子種が CYP2A14 であることが判明した (39)。

2006 年、McGraw と Waller はヒト CYP2A6 が CB101 の 4'-水酸化を触媒することを報告した (40)。すでに、筆者らはハムスター CYP2A8 が CB52 の 4-水酸化を強く触媒することを見いだしていたが (41)、この報告により、CYP2A サブファミリーが動物種を越えて PCB 代謝に強く関与することが示された。

ごく最近、筆者らはウサギ肝ミクロゾームによる CB52 の代謝を調べ、主代謝物として 3-OH 体と 4-OH 体がほぼ 1 : 1 の比率で生成されること、また、P450 抗体を用いた検討により、両代謝物の生成が PB 誘導性の P450、すなわち CYP2B4 によって触媒されることを明らかにした (42)。

3.5 PCB 代謝物の毒性評価

ダイオキシン類の毒性評価には、WHO が提唱する毒性等価係数が用いられている (43)。これは最も毒性が強い 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の毒性を 1 として、他のダイオキシン類の毒性の強さを換算したもので、主に Ah-レセプターを介した毒性を表している。

図 3.1 に示した高残留性 PCB 異性体の中では、CB118 のみが 0.00003 と評価されているに過ぎない。しかしながら、CB118 以外の、CB101, CB138, CB153, CB154, CB167 および CB180 も強い PB 型薬物代謝酵素、すなわち CYP2B 酵素の誘導能を有することが明らかにされている (44, 45)。一方、本来解毒産物であるはずの PCB 代謝物の中にも、前述の OH 体、diOH 体あるいは CH_3SO_2 体のように、高レベルで長期にわたり生体に残留し、さらに親化合物より強い生理作用を有するものが見つかっている。表 3.2 には、最近数十年に報告されたものをまとめた。これを見ると、大きく 5 つの生理作用に分けられる。

まず第 1 に、PCB 代謝物の酵素誘導作用である。1985 年、原口と筆者らは CB52 の 4- CH_3S 体および 4- CH_3SO 体がラット肝の PB 型薬物代謝酵素の誘導作用を示すことを初めて報告した (46)。1995 年、加藤らは CB70, CB87, CB101 および CB141 の 3- CH_3SO_2 体が母化合物より強い PB 型の薬物代謝酵素 (CYP2B1) の誘導能を有することを明らかにした (47)。さらに、加藤らは 7 種の PCB 異性体 (CB49, CB70, CB87, CB101, CB132, CB141, CB149) の 3- CH_3SO_2 体および CB101 の 4- CH_3SO_2 体がラット肝においてグルクロン酸転移酵素分子種の UGT1A6 を、また、CB149 の 4- CH_3SO_2 体が UGT2B1 を誘導することを明らかにした (48)。これらの酵素は、医薬品や、PCB 類のような環境汚染物質だけではなく、ステロイド、ビタミン、脂肪酸およびホルモンなどの内在性物質の代謝にも関与していることから、このような PCB 代謝物の酵素誘導作用は生体恒常性を乱す可能性が考えられる。

第 2 に、酵素阻害作用である。Schoor らは甲状腺ホルモン前駆体 3,3'-diiodothyronine の硫酸抱合反応において、4'-OH-CB108 が硫酸転移酵素に対し強い競合的阻害を示すことを明らかにした (49)。また、Kester らは CB78, CB108, CB127 および CB130 の 4'-OH 体、CB107 の 4-OH 体および 4,4'-diOH-CB80 がヒトエストロゲンの硫酸抱合反応を触媒する硫酸転移酵素を強く阻害することを報告した (50)。さらに、Garner らは PCB の diOH (特にカテコール) 体がカテコール *O*-メチル基転移酵素 (COMT) によるカテコール型エストロゲン (2-あるいは 4-OH-エストロゲン) のメチル化を阻害することを示した (51)。カテコール型エストロゲンは乳がんとの関連で注目されていることから、PCB カテコール体の何らかの生体影響が示唆される。

第 3 は、培養細胞に対する作用である。1979 年の Stadnicki と Allen の論文が最も古い。彼らは、L-929 細胞の増殖に対し、CB52 代謝物である 3,4-epoxy 体および 4-OH 体が親化合物 CB52 より強く阻害すること (3,4-epoxy > 4-OH) を報告した (52)。1998 年、加藤らは PCB 類の CH_3SO_2 体がラット肝上皮細胞 IAR20 における細胞間コミュニケーションを阻害することを報告した (53)。このような細胞間コミュニケーションの阻害は発がんプロモーター (例えば、2,3,7,8-TCDD, コプラナー PCB 類など) において共通した作用の 1 つと考えられている。2004 年、Machala らも同様に、4-OH-CB187, 4-OH-CB146, 4-OH-CB107 および CB5 と CB12 の 3',4'-diOH 体が、ラット肝上皮細胞 WB-F344 のギャップジャンクションにおける細胞間コミュニケーションを阻害することを報告した (54)。翌年、Vondráček らはラット肝上皮細胞 WB-F344 に対し、コプラナー PCB の CB126 と同様に、4'-OH-CB79 が細胞増殖を誘導することを報告した (55)。

第 4 は、PCB 代謝物のエストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用である。すでに前書

表 3.2 PCB 代謝物の生理作用

報告年	PCB 代謝物	生理作用	引用文献
1979	4-OH-CB52	培養細胞の増殖抑制	Stadnicki & Allen (52)
1985	3-CH ₃ S-PCB	薬物代謝酵素系の誘導作用	Haraguchi et al. (46)
1986	4-OH	血中甲状腺ホルモン輸送タンパク trans-thyretin と高親和性	Brouwer & van den Berg (61)
1988	4'-OH-CB30	エストロゲン受容体と高親和性	Korach et al. (56)
1995	3-CH ₃ SO ₂ -PCB	薬物代謝酵素 (CYP2B1) の誘導作用	Kato et al. (47)
1997	OH	エストロゲンおよび抗エストロゲン様作用	Connor et al. (57)
1997	OH	ヒトがん細胞 MCF7 における抗エストロゲン様作用	Kramer et al. (58)
1998	4'-OH-CB108	甲状腺ホルモン (T2) 硫酸抱合酵素 (硫酸転移酵素) の阻害	Schuur et al. (49)
1998	CH ₃ SO ₂	ラット肝細胞 IAR20 における細胞間コミュニケーションの阻害	Kato et al. (53)
1998	3-and 4-CH ₃ SO ₂	ラット血中甲状腺ホルモンの低下作用	Kato et al. (62)
1999	3-and 4-CH ₃ SO ₂	ラット血中甲状腺ホルモンの低下作用	Kato et al. (63)
1999	3,4-diOH	<i>In vitro</i> 系において弱いエストロゲン様作用	Garner et al. (59)
2000	3-CH ₃ SO ₂	ラット肝グルクロン酸転移酵素 (UGT1A6, UGT2B1) の誘導作用	Kato et al. (48)
2000	4(or 4')-OH 4,4'-diOH-CB80	エストロゲン硫酸抱合酵素 (硫酸転移酵素) の阻害	Kester et al. (50)
2000	3,4-diOH	カテコール型エストロゲンの代謝に関与するカテコール-O-メチル転移酵素の阻害	Garner et al. (51)
2002	CH ₃ SO ₂	バイオアッセイ系における抗エストロゲン様作用	Letcher et al. (60)
2004	OH	ギャップジャンクションにおける細胞間コミュニケーションの阻害	Machala et al. (54)
2004	4-OH-CB107	ラット脳の発達, 行動等に及ぼす影響	Meerts et al. (68)
2005	4'-OH-CB106 4'-OH-CB159	マウス小脳の神経細胞の発達に及ぼす影響	Kimura-Kuroda et al. (69)
2005	OH	ラット肝細胞の増殖促進	Vondráček et al. (55)
2005	OH	甲状腺ホルモン様作用	Kitamura et al. (71)
2006	4-OH-CB106	甲状腺ホルモン受容体のアゴニスト	You et al. (72)
2007	4'-OH-CB121	マウス小脳の神経細胞の発達に及ぼす影響	Kimura-Kuroda et al. (70)
2009	4-OH-CB187	ラット血中甲状腺ホルモンの低下作用	Kato et al. (67)

(1) に述べたように, 1988 年 Korach らは 4'-OH-CB30 がエストロゲン受容体への高い親和性を有することを明らかにした (56)。この報告は, PCB の OH 体が内分泌攪乱作用を有することを示した最初のものである。1997 年には, ある種の PCB の OH 体につき, ヒト乳腺ガン細胞 MCF-7 を用いた *in vitro* 系による検討がなされ, エストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を有することが示された (57, 58)。例えば, Kramer らの報告によると, 4'-OH-CB159 および 4,4'-diOH-CB111 はエストロゲン様作用を示すが, その他の PCB の OH 体は逆に, 抗エストロゲン様作用を示したという。その後, Garner らは Hela 細胞 (エストロゲンレポーター遺伝

子とマウスエストロゲン受容体 cDNA をトランスフェクトしたもの)を用いて, CB9 および CB30 の 3',4'-diOH 体が弱いエストロゲン様作用を示すことを報告した (59)。また, Letcher らは CB49 および CB101 の 3-および 4-CH₃SO₂体につき, ヒト乳がん細胞およびコイ肝細胞を用いたバイオアッセイ系を用いて抗エストロゲン様作用を調べたところ, 両 PCB の 4-CH₃SO₂体のみが強い抗エストロゲン様作用を有することを示した (60)。このように PCB 代謝物の構造活性相関は非常に複雑であることから, メカニズムの詳細はよくわかっていない。

第5に, 甲状腺ホルモンの攪乱作用である。1986年, Brouwer と van den Berg の報告が契機となった。彼らは, CB77 の主代謝物の 4-OH 体が, 血中の甲状腺ホルモン輸送タンパク質である transthyretin と高い親和性を有することを明らかにし, 結果的に, 甲状腺ホルモンの生体での恒常性を攪乱する可能性を示唆した (61)。ところで, 甲状腺ホルモンには, triiodothyronin (T₃) と thyroxine (T₄) があり, これらは甲状腺から分泌された後, 血液を介して全身の細胞に運ばれ, そこで, 細胞の代謝率を亢進させる。生理活性は T₃のほうが T₄の数倍は強いが, 血中ではそのほとんどが T₄であるといわれている。1998年, 加藤らは, ある種の PCB 類の 3-CH₃SO₂体がラットやマウス血中の T₃および T₄を減少させることを報告した (62, 63)。彼らは, さらに, このような PCB 代謝物が起こす血中甲状腺ホルモンの低下作用のメカニズムを解明するため一連の研究をスタートさせた (64~67)。まず, 放射性物質の¹²⁵I を標識した T₄を用いて検討した結果, PCB の 3-CH₃SO₂体投与ラットでは¹²⁵I が肝に多く分布すること, また, それと同時にラット肝に局在するグルクロン酸転移酵素 UGT1A が誘導されることを明らかにした。さらに, Kanechlor 500 投与ラットでも血中 T₄の減少を観察し, これが UGT1A 酵素の誘導に伴い T₄のグルクロン酸抱合反応が促進されたのではなく, T₄の肝への再分布が増加した結果であることを示唆した。最近, 4-OH-CB187 投与マウスでも同様に, T₄の肝への再分布が増加した結果, 血中 T₄の減少が起こることを示した (67)。

このような PCB とその代謝物による甲状腺ホルモンの低下が, 実際, どのような毒性として発現するかという点は非常に重要である。2004年, Meerts らは 4-OH-CB107 を妊娠 10 日目から 16 日目まで母ラットに毎日経口投与して曝露させ, 生後 4 日目の子ラットの血中甲状腺ホルモンレベルを調べるとともに, 生後約 300 日までの行動を観察した。その結果, 血中甲状腺ホルモンレベルの低下とともに, 行動の一部に発達障害を起こすことも明らかになった (68)。また, 最近, 黒田らは, マウス小脳培養液中において, ブルキンエ細胞の樹状突起の発達のうち, 甲状腺ホルモン依存性の発達が, 4'-OH-CB106, 4'-OH-CB159 および 4'-OH-CB121 によって有意に阻害されることを報告した (69, 70)。

一方, PCB 代謝物の OH 体が甲状腺ホルモン様作用を有することが報告された。2005年, 北村らはラット下垂体由来の GH3 細胞に対し, 4-OH-CB146, 4'-OH-CB78 および 4,4'-diOH-CB80 が増殖作用を示すこと, さらに甲状腺ホルモン依存性と思われる成長ホルモンの生成を促進させることを見いだした (71)。翌年, You らは, 4'-OH-CB106 が GH3 細胞において, ヒト甲状腺ホルモン受容体 (TRβ1) に結合し, さらに T₃と同様に, 成長ホルモン mRNA を有意に増加させることを報告した (72)。これらの事実は, これらの OH 体が甲状腺ホルモン受容体のアゴニストとして作用していることを示唆している。

3.6 最後 に

以上述べてきたように、残留性の高いPCB異性体およびそれらの代謝物が明らかになった。まず、PCB異性体の特徴は、塩素数が5~7個置換されていること、次に、一方のベンゼン環が2,4,5-三塩素置換されていること、が挙げられる。一方、高残留性PCB代謝物としては、まず、親PCBが元々高残留性であること、次に、親PCBからの代謝が非常に遅いこと、さらに、OH基やCH₃SO₂基が *meta* 位あるいは *para* 位に置換されていることが挙げられよう。特に、4-OH体や4-CH₃SO₂体は、エストロゲンおよび甲状腺ホルモン様作用を有するものや逆に阻害を示すものがあり興味を持たれるが、最終的な作用機構はよくわかっていない。最近ではようやく、脳神経系への影響や次世代への影響に関する研究が見られるようになってきており、今後の研究が期待される。また、3-CH₃SO₂体や3'-OH-CB138は血中よりも、肝臓に高濃度で分布するがその理由はよくわかっていない。PCBとその代謝物の毒性発現機構をよく理解するためには、PCB代謝物の特異的分布を左右する因子としてのトランスポーターおよび高親和性を有する生体成分についても、さらなる研究が必要であろう。

文 献

- 1) 古賀信幸, 吉村英敏 (2000) PCBと関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆 編「油症研究——30年の歩み——」九州大学出版会, 93-110.
- 2) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R, Masuda Y (1997) Comparative study on formation of hydroxy and sulfur-containing metabolites from different chlorinated biphenyls with 2, 5-substitution in rats. *Drug Metab Dispos* 25, 845-852.
- 3) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R, Masuda Y (1998) Hydroxylation and methylthiolation of mono-*ortho*-substituted polychlorinated biphenyls in rats: identification of metabolites with tissue affinity. *Chem Res Toxicol* 11, 1508-1515.
- 4) Brouwer A, Morse, DC, Lans MC, Schuur AG, Murk AJ, Klasson-Wehler E, Bergman Å, Visser TJ (1998) Interactions of persistent environmental organohalogens with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol. Ind. Health* 14, 59-84.
- 5) Ariyoshi N, Koga N, Yoshimura H, Oguri K (1997) Metabolism of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) in guinea pig. *Xenobiotica* 27, 973-983.
- 6) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R, Masuda Y (1999) Tissue distribution of methylsulfonyl metabolites derived from 2, 2', 4, 5, 5'-penta- and 2, 2', 3, 4', 5', 6-hexachlorobiphenyls in rats. *Arch. Environ. Contam Toxicol* 37, 135-142.
- 7) Haraguchi K, Kato Y, Koga N, Degawa, M (2005) Species differences in the tissue distribution of catechol and methylsulphonyl metabolites of 2, 4, 5, 2', 5'-penta- and 2, 3, 4, 2', 3', 6'-hexachlorobiphenyls in rats, mice, hamsters and guinea pigs. *Xenobiotica* 35, 85-96.
- 8) Haraguchi K, Koga N, Kato Y (2005) Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls and tissue distribution of persistent metabolites in rats, hamsters, and guinea pigs. *Drug Metab Dispos* 33, 373-380.
- 9) Haraguchi K, Kato Y, Koga N, Degawa M (2004) Metabolism of polychlorinated biphenyls by Gunn rats: identification and serum retention of catechol metabolites. *Chem Res Toxicol* 17, 1684-1691.
- 10) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R, Masuda Y (1998) Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls with 2, 4, 5-trichloro substitution in rats: regioselective formation of hydroxyl metabolites with high blood affinity. *Organohalogen Compounds* 37, 401-404.

- 11) 原口浩一, 広瀬由美子, 増田義人, 加藤善久, 木村良平 (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.
- 12) Tampal N, Lehmler HJ, Espandiari P, Malmberg T, Robertson LW (2002) Glucuronidation of hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs). Chem. Res. Toxicol. 15, 1259-1266.
- 13) Bergman Å, Klasson-Wehler E, Kuroki H (1994) Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. Environ Health Perspect 102, 464-469.
- 14) Sjödin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Björk J, Bergman Å (2000) Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish men. Environ Health Perspect 108, 1035-1041.
- 15) Hovander L, Malmberg T, Athanasiadou M, Athanassiadis I, Rahm S, Bergman Å, Klasson-Wehler E (2002) Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. Arch Environ Contam Toxicol 42, 105-117.
- 16) Guvenius DM, Aronsson A, Ekman-Ordeberg G, Bergman Å, Norén K (2003) Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorobiphenylols, and pentachlorophenol. Environ Health Perspect 111, 1235-1241.
- 17) Fängström B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P, Bergman Å (2002) Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. Environ Health Perspect 110, 895-899.
- 18) Soechitram SD, Athanasiadou M, Hovander L, Bergman Å, Sauer PJ (2004) Fetal exposure to PCBs and their hydroxylated metabolites in a Dutch cohort. Environ Health Perspect 112, 1208-1212.
- 19) Sandau CD, Ayotte P, Dewailly E, Duffe J, Norstrom RJ (2000) Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs (OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit. Environ Health Perspect 108, 611-616.
- 20) Park JS, Linderholm L, Charles MJ, Athanasiadou M, Petrik J, Kocan A, Drobná B, Trnovec T, Bergman Å, Hertz-Picciotto I (2007) Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) in pregnant women from eastern Slovakia. Environ Health Perspect 115, 20-27.
- 21) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Koga N (2005) *In vitro* metabolism of 2, 2', 3, 4', 5, 5', 6-heptachlorobiphenyl (CB187) by liver microsome from rats, hamsters and guinea pigs. Xenobiotica 35, 319-330.
- 22) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Koga N (2005) *In vivo* metabolism of 2, 2', 3, 4', 5, 5', 6-heptachlorobiphenyl (CB187) in guinea pigs. Organohalogen Compounds 67, 2343-2345.
- 23) Malmberg T, Hoogstraate J, Bergman Å, Klasson-Wehler E (2004) Pharmacokinetics of two major hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites with specific retention in rat blood. Xenobiotica 36, 581-589.
- 24) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Ozaki M, Koga N (2006) *In vitro* metabolism of 2, 2', 3, 4, 4', 5', 6-heptachlorobiphenyl (CB183) with liver microsomes from rats, guinea pigs and hamsters. Organohalogen Compounds 68, 1733-1736.
- 25) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Matsuoka M, Endo T, Koga N (2007) The distribution of metabolites of 2, 2', 3, 4, 4', 5', 6-heptachlorobiphenyl (CB183) in rats and guinea pigs. Organohalogen Compounds 69, 1761-1764.
- 26) Ballschmitter K, Rappe C, Buser HR (1989) Chemical properties, analytical methods and environmental levels of PCBs, PCTs, PCNs and PBBs. In Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, debenzodioxins and related products. Kimbrough R and Jensen AA, eds. Elsevier, 47-69.
- 27) 古賀信幸, 金丸知代, 大石奈穂子, 加藤善久, 木村良平, 原口浩一, 増田義人 (2001) 2,4,5,2',3',4'-六塩素化ビフェニルの *in vitro* 代謝における動物種差. 福岡医誌 92, 167-176.
- 28) Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, Yoshimura H, Funae Y (1995) Metabolism of highly persistent PCB congener, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. Biochem Biophys Res Commun

- 212, 455-460.
- 29) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Endo T, Matsuoka M, Koga N (2008) Metabolism of 2, 2', 3', 4, 5, 5'-hexachlorobiphenyl (CB146) by liver microsomes of rats, guinea pigs, hamsters and humans. *Organohalogen Compounds* 70, 1185-1188.
 - 30) Klasson-Wehler E, Lindberg L, Jonsson C-J, Bergman Å (1993) Tissue retention and metabolism of 2, 3, 4, 3', 4'-pentachlorobiphenyl in mink and mouse. *Chemosphere* 27, 2397-2412.
 - 31) 古賀信幸, 金丸知代, 黒木広明, 原口浩一, 加藤善久, 木村良平 (2003) 2,3,3',4,4'-五塩素化ビフェニル (CB105) のハムスターにおける代謝. *福岡医誌* 94, 174-182.
 - 32) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人 (1999) 油症患者母乳及び血液中の全 PCB 異性体の分析. *福岡医誌* 90, 202-209.
 - 33) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 古賀信幸 (2005) 2,3',4,4',5-五塩素化ビフェニル (CB118) のモルモット肝ミクロゾームによる代謝. *福岡医誌* 96, 232-240.
 - 34) Linderholm L, Masuda Y, Athanasiadou M, Bergman Å (2007) PCB and PCB metabolites in serum from Yusho patients 37 years after the accident. *Organohalogen Compounds* 69, 2141-2144.
 - 35) Kuroki H, Masuda Y (1977) Structures and concentrations of the main components of polychlorinated biphenyls retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 6, 469-474.
 - 36) 太田千穂, 衿岡樹子, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸 (2007) 2,2',4,5,5'-五塩素化ビフェニル (CB101) のラット, ハムスターおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝. *福岡医誌* 98, 236-244.
 - 37) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H (1998) Metabolism of 2, 3', 4', 5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. *Chemosphere* 37, 1895-1904.
 - 38) Koga N, Kanamaru T, Oishi N, Kuroki H, Haraguchi K, Masuda Y, Yoshimura H (1999) Metabolism of tetrachlorobiphenyls by Chinese hamster liver microsomes. *Organohalogen Compounds* 42, 181-184.
 - 39) Fukuhara M, Kurose K, Aiba N, Matsunaga N, Omata W, Kato K, Kimura M (1998) A major phenobarbital-inducible P450 isozyme, CYP2A14, in the Chinese hamster liver: purification, characterization, and cDNA cloning. *Arch Biochem Biophys* 359, 241-248.
 - 40) McGraw Sr, JE, Waller DP (2006) Specific human CYP450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC#101). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 129-133. CB101.
 - 41) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H (1996) Hamster liver cytochrome P450 (CYP2A8) as a 4-hydroxylase for 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 685-688.
 - 42) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸 (2009) 2,2',5,5'-四塩素化ビフェニル (CB52) のウサギ肝ミクロゾームによる代謝. *福岡医誌* 100, 200-209.
 - 43) Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE (2006) The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 93, 223-241.
 - 44) Yoshihara S, Kawano K, Yoshimura H, Kuroki H, Masuda Y (1979) Toxicological assessment of highly chlorinated biphenyl congeners retained in the Yusho patients. *Chemosphere* 8, 531-538.
 - 45) Parkinson A, Safe SH, Robertson LW, Thomas PE, Ryan DE, Reik LM, Levin W (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.
 - 46) Haraguchi K, Kuroki H, Masuda Y, Koga N, Kuroki J, Hokama Y, Yoshimura H (1985) Toxicological evaluation of sulfur-containing metabolites of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in rats. *Chemosphere* 14, 1755-1762.

- 47) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Isogai M, Masuda Y, Kimura R (1995) Characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners. *Chem.-Biol Interact* 95, 269-278.
- 48) Kato Y, Haraguchi K, Shibahara T, Shinmura Y, Masuda Y, Kimura R (2000) The induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase by the methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem.-Biol Interact* 125, 107-115.
- 49) Schuur AG, van Leeuwen-Bol I, Jong WM, Bergman Å, Coughtrie MW, Brouwer A, Visser TJ (1998) In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by polychlorobiphenyls: isozyme specificity and inhibition kinetics. *Toxicol Sci* 45, 188-194.
- 50) Kester MH, Bulduk S, Tibboel D, Meinel W, Glatt H, Falany CN, Coughtrie MW, Bergman Å, Safe SH, Kuiper GG, Schuur AG, Brouwer A, Visser TJ (2000) Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology* 141, 1897-1900.
- 51) Garner CE, Burka LT, Etheridge AE, Matthews HB (2000) Catechol metabolites of polychlorinated biphenyls inhibit the catechol-O-methyltransferase-mediated metabolism of catechol estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 162, 115-123.
- 52) Stadnicki SS, Allen JR (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 Contam Toxicol* 23, 788-796.
- 53) Kato Y, Kenne K, Haraguchi K, Masuda Y, Kimura R, Warngard L (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.
- 54) Machala M, Bláha L, Lehmler HJ, Plíšková M, Májková Z, Kapplová P, Sovadinová I, Vondráček J, Malmberg T, Robertson LW (2004) Toxicity of hydroxylated and quinoid PCB metabolites: inhibition of gap junctional intercellular communication and activation of aryl hydrocarbon and estrogen receptors in hepatic and mammary cell. *Chem Res Toxicol* 17, 340-347.
- 55) Vondráček J, Machala M, Bryja V, Chramostová K, Krčmář P, Dietrich C, Hampl A, Kozubík A (2005) Aryl hydrocarbon receptor-activating polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites induce cell proliferation in contact-inhibited rat liver epithelial cell. *Toxicol Sci* 83, 53-63.
- 56) Korach KS, Sarver P, Chae K, McLachlan JA, McKinney JD (1988) Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol Pharmacol* 33, 120-126.
- 57) Connor K, Ramamoorthy K, Moore M, Mustain M, Chen I, Safe S, Zacharewski T, Gillesby B, Joyeux A, Balaguer P (1997) Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 111-123.
- 58) Kramer VJ, Helferich WG, Bergman Å, Klasson-Wehler E, Giesy JP (1997) Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites are anti-estrogenic in a stably transfected human breast adenocarcinoma (MCF7) cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 144, 363-376.
- 59) Garner CE, Jefferson WN, Burka LT, Matthews HB, Newbold RR (1999) In vitro estrogenicity of the catechol metabolites of selected polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol* 154, 188-197.
- 60) Letcher RJ, Lemmen JG, van der Burg B, Brouwer A, Bergman Å, Giesy JP, van den Berg M (2002) In vitro antiestrogenic effects of aryl methyl sulfone metabolites of polychlorinated biphenyls and 2, 2-bis (4-chlorophenyl) -1,1-dichloroethene on 17 β -estradiol-induced gene expression in several bioassay systems. *Toxicol Sci* 69, 362-372.
- 61) Brouwer A, Van den Berg KJ (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 thyroxine. *Toxicol Appl Pharmacol* 85, 301-312.
- 62) Kato Y, Haraguchi K, Shibahara T, Masuda Y, Kimura R (1998) Reduction of thyroid hormone levels

- by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Arch Toxicol* 72, 541-544.
- 63) Kato Y, Haraguchi K, Shibahara T, Yumoto S, Masuda Y, Kimura R (1999) Reduction of thyroid hormone levels by methylsulfonyl metabolites of tetra- and pentachlorinated biphenyls in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 48, 51-54.
- 64) Kato Y, Haraguchi K, Yamazaki T, Ito Y, Miyajima S, Nemoto K, Koga N, Kimura R, Degawa M (2003) Effects of polychlorinated biphenyls, Kanechlor-500, on serum thyroid hormone level in rats and mice. *Toxicol Sci* 72, 235-241.
- 65) Kato Y, Ikushiro S, Haraguchi K, Yamazaki T, Ito Y, Suzuki H, Kimura R, Yamada S, Inoue T, Degawa M (2004) A possible mechanism for decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in Wistar and Gunn rats. *Toxicol Sci* 81, 309-315.
- 66) Kato Y, Ikushiro S, Takiguchi R, Haraguchi K, Koga N, Uchida S, Sakaki T, Yamada S, Kanno J, Degawa M (2007) A novel mechanism for polychlorinated biphenyls-induced decrease in serum thyroxine level in rats. *Drug Metab Dispos* 35, 1949-1955.
- 67) Kato Y, Haraguchi K, Kubota M, Seto Y, Ikushiro S, Sakaki T, Koga N, Maeda S, Yamada S, Degawa M (2009) 4-Hydroxy-2, 2', 3, 4', 5, 5', 6-heptachlorobiphenyl (4-OH-CB187)-mediated decrease in serum thyroxine level in mice occurs through increase in accumulation of thyroxine in the liver. *Drug Metab Dispos* 37, 2095-2102.
- 68) Meerts IA, Lilienthal H, Hoving S, van den Berg JH, Weijers BM, Bergman Å, Koeman JH, Brouwer A (2004) Developmental exposure to 4-hydroxy-2, 3, 3', 4', 5-pentachlorobiphenyl (4-OH-CB107) : long-term effects on brain development, behavior, and brain stem auditory evoked potentials in rats. *Toxicol Sci* 82, 207-218.
- 69) Kimura-Kuroda J, Nagata I, Kuroda Y (2005) Hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls inhibit thyroid-hormone-dependent extension of cerebellar Purkinje cell dendrites. *Brain Res Dev Brain Res* 154, 259-263.
- 70) Kimura-Kuroda J, Nagata I, Kuroda Y (2007) Disrupting effects of hydroxy-polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on neuronal development of cerebellar Purkinje cells : a possible causal factor for developmental brain disorders? *Chemosphere* 67, S412-S420.
- 71) Kitamura S, Jinno N, Suzuki T, Sugihara K, Ohta S, Kuroki H, Fujimoto N (2005) Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology* 208, 377-387.
- 72) You SH, Gauger KJ, Bansal R, Zoeller RT (2006) 4-Hydroxy-PCB106 acts as a direct thyroid hormone receptor agonist in rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 257, 26-34.