

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：36102
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2014
課題番号：23510083
研究課題名(和文) PCBによるヒト甲状腺ホルモン攪乱作用発現メカニズムの解明を目指した包括的研究

研究課題名(英文) Study on the exact mechanism for the polychlorinated biphenyl-induced decrease in the serum thyroxine level

研究代表者
加藤 善久(KATO, Yoshihisa)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：90161132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット、マウスのpolychlorinated biphenyl(PCB)による血中サイロキシン(T4)濃度の低下は、主として肝臓へのT4の蓄積量の増加に起因し、一部は、核内レセプターに結合するPCBのタイプによって異なり、胆汁中へのT4のグルクロン酸抱合体の排泄の増加や肝肥大、T4とトランスサイレチンとの結合阻害も関与していることを明らかにした。今後、ヒトを含む多くの動物種のPCBによる血中甲状腺ホルモン濃度の低下作用発現メカニズムを解明するために、さらに研究する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that polychlorinated biphenyl(PCB)-mediated decrease in serum thyroxine (T4) level in rats and mice occurred mainly through increased accumulation of T4 in the liver and partially through increased excretion of biliary T4 metabolite(s), development of liver hypertrophy and/or the inhibition of a T4-transthyretin complex formation. Since the several transporters, including apical and basolateral T4-transporters, are reported to exist in the liver cells, further studies on PCB-mediated changes in the expression and activity of hepatic T4 transporter(s) are necessary to understand the liver-selective accumulation of T4.

研究分野：薬物の体内動態と薬効・毒性発現メカニズム

キーワード：PCB 甲状腺ホルモン攪乱 サイロキシン UDP-グルクロン酸転移酵素 トランスサイレチン

1. 研究開始当初の背景

Polychlorinated biphenyl (PCB)は、日本では「カネミ油症事件」あるいは台湾の「Yu-cheng 事件」の原因物質であると考えられ、患者に見られる肝臓障害、内分泌機能障害、特に甲状腺機能障害などの慢性症状は、体内に残留している PCB と深い関係があることが報告されている。PCB は世界の先進諸国では、現在使用禁止あるいは制限されているが、食物連鎖や生物濃縮により、ヒト及び多くの野生生物から検出されている。PCB のラット、マウス、モルモットなどの実験動物に対する主な毒性は、体重増加の抑制、胸腺や脾臓の萎縮、肝臓での薬物代謝に関わる種々の酵素の誘導、肝臓及び甲状腺障害などである。サルなどの動物種においては、それらに加えて血中の甲状腺ホルモンバランスやステロイドホルモンバランスの異常などの内分泌機能障害、癌の誘発などを引き起こすことが知られている。また、フロリダのワニ、バルト海のズイルカ、米国五大湖のセグロカモメなどの多くの野生動物において、PCB をはじめとする環境汚染物質が、生体内でホルモン様作用を示し、血中甲状腺ホルモン濃度の異常、生殖能力の低下、免疫機能の低下などを引き起こしている可能性が指摘されている。これらの毒性の発現機構は複雑であり、動物種によって感受性や標的臓器、病理所見などは様々である。さらに、ヒトにおいても、PCB 類が蓄積した魚を摂取した妊婦から生まれた子供は、頭囲が小さい、言語テストや記憶テストの成績が悪い、集中力や視聴覚性ワーキングメモリーが低下しているなど、甲状腺ホルモンの異常と考えられる症例が報告されている。さらに、近年は、PCB などの化学物質と子供の注意欠陥多動性障害 (ADHD)、学習障害 (LD)、高機能自閉症 (アスペルガー症候群)との関連性が指摘されている。しかし、ヒトにおいては、疫学的研究にとどまり、このような報告がわずかにされている程度である。従って、PCB 類の内分泌攪乱作用に関する毒性の中で、特に甲状腺ホルモン攪乱作用発現メカニズムの解明に関する研究、及びその作用発現メカニズムの動物種差に関する研究、さらにヒトにおけるその作用発現メカニズムの解明に関する応用研究はほとんど進められていない。

甲状腺ホルモンは、生物の恒常性、正常な脳の発達に必須であり、胎児にとって極めて重要である。甲状腺ホルモンは、先天的な理由、内因性あるいは環境由来因子により変動する。その変動のメカニズムは複雑で十分に解明されていない。甲状腺ホルモンの変動メカニズムは、主に視床下部、下垂体、甲状腺のレセプターへの作用、甲状腺ホルモンの合成あるいは分泌系への作用、甲状腺ホルモンの代謝あるいは分解系への作用が複雑に絡み合っていると考えられる。特に、PCB などの化学物質によるラットの血中サイロキシン(T_4)濃度の低下は、 T_4 のグルクロン酸抱合

の律速酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素(UGP-GT)活性の増加により血中 T_4 の代謝が促進されること、あるいは PCB の水酸化(OH)代謝物などが血中 T_4 の輸送タンパクであるトランスサイレチン(TTR)と競合的に結合し、 T_4 の生体内動態が変化することにより引き起こされると報告され、これまで信じられてきた。しかし、それらに関して矛盾や疑問も多く、未だに血中 T_4 濃度の低下メカニズムは、ヒトや野性動物どころか、実験動物でさえ十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、新たに提案した血中 T_4 濃度低下作用機構における T_4 の肝臓への蓄積メカニズムの実体を解析し、その作用メカニズムの全貌を解明する。さらに、本研究では、実験動物を応用して、ヒトに発展させて PCB の甲状腺ホルモン攪乱作用 (特に血中甲状腺ホルモン濃度低下作用) 発現メカニズムを解明することを本研究の目的とする。さらに、その作用発現メカニズムの動物種間の相違を解明するとともに、異なる核内レセプターに結合する (異なるタイプの) PCB による甲状腺ホルモン濃度低下作用発現メカニズムの違いを明らかにする。さらに、本研究の成果を甲状腺ホルモン攪乱作用を誘発する PCB などの化学物質及び医薬品の毒性に対する安全性対策及びリスク評価や副作用の回避に応用する。

3. 研究の方法

(1) Aryl hydrocarbon receptor (AhR)非リガンドの PCB、AhR と constitutive androstane receptor (CAR)の両リガンドである PCB において、血中 T_4 濃度低下作用における肝臓への T_4 の蓄積量の増加の寄与率の違いを明確にするため、3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl(CB77)及び 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl(CB118)を2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)に高感受性マウス、TCDD に低感受性マウスに投与し、 T_4 、 T_3 、 T_4 を測定し、それらの関係を調べた。

血清中甲状腺ホルモン(総 T_4 、遊離 T_4 、総トリヨードサイロニン(T_3)、遊離 T_3 、甲状腺刺激ホルモン(TSH)濃度)

甲状腺ホルモンの代謝に関わる UGT 分子種の発現量及び T_4 -UDP-GT 活性、脱ヨード化及び硫酸抱合酵素活性

血清及び肝臓中 PCB 及びその水酸化体濃度

また、各 PCB を各動物に投与し、さらに $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ を静脈内投与し、 T_4 を算出し、 T_4 を測定した。

血中 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の消失速度定数、半減期、分布容積

血中 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ と T_4 輸送タンパク(TTR、サイロキシン結合グロブリン(TBG)、アルブミン(Alb))との結合量

$[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の各種組織(脳、下垂体、甲状腺、心

臓、肺、肝臓、腎臓、胃、十二指腸、小腸、脂肪などへの移行量、胆汁中^{[125]I}T₄及び^{[125]I}T₄のグルクロン酸抱合体の排泄量

(2) PCB 投与による血中 T₄ 濃度の低下において、T₄-UDP-GT 活性の増加による T₄ の胆汁排泄の増加の関わりについて明らかにするため、Kanachlor-500 (KC500) を Gunn ラット(遺伝的に UGT1 欠損ラット)に投与し、(1) ~ を測定し解析した。また、Gunn ラットに PentaCB を投与し、続いて^{[125]I}T₄ を静脈内投与し、(1) を算出し、(1) 、 を測定した。

(3) PCB 投与による血中 T₄ 濃度の低下に甲状腺ホルモン輸送タンパク、TTR が関与しているか否かについて明らかにするため、2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl(PentaCB) を TTR 遺伝子欠損マウスに投与し、(1) ~ を測定し解析した。また、TTR 遺伝子欠損マウスに PentaCB を投与し、続いて^{[125]I}T₄ を静脈内投与し、(1) を算出し、(1) 、 を測定した。

以上、異なる核内レセプターを指向する PCB を甲状腺ホルモン濃度の低下のカギになる酵素やタンパク質を欠損させた遺伝子組み換え動物などに投与し、血中甲状腺ホルモン濃度の低下に関わる様々なパラメーターの変動を、薬物動態学的及び分子生物学的に *in vivo* と *ex vivo* で包括的に解析し、ヒトでの PCB の甲状腺ホルモン攪乱作用発現メカニズムを解明することを試みた。

4. 研究成果

本研究では、TCDD タイプであるが AhR 非依存的であることが報告されている PCB、CB77 による血清中 T₄ 濃度の低下は、主として肝臓への T₄ の蓄積によって起こり、胆汁中への T₄ のグルクロン酸抱合体の排泄の増加や肝肥大も一部関与していることを明らかにした。また、TCDD 様作用とフェノバルビタール様作用を併せ持つ混合タイプの PCB、CB118 による血清中 T₄ 濃度の低下は、主として肝臓への T₄ の蓄積によって起こり、胆汁中への T₄ のグルクロン酸抱合体の排泄の増加も一部関与していることを明らかにした。次に、Wistar 系ラット及び UGT1 ファミリーを欠損した Gunn ラットに KC500 を投与した実験結果から、KC500 を投与した Wistar 系ラットでは、T₄ のグルクロン酸抱合体の胆汁中排泄は起こるが、それを大きく上回る肝臓への T₄ の移行量の増加が血清中 T₄ 濃度の低下の主要な要因となることを明らかにした。さらに、T₄ の輸送タンパクである TTR をノックアウトしたマウスに、PentaCB を投与することにより、野生型マウスにおいて、PentaCB による血清中 T₄ 濃度の低下は、T₄ の血中から肝臓へ蓄積によって起こることを明らかにした。また、PentaCB による T₄ と TTR との結合阻害は、血清中 T₄ 濃度の低下を促進することを明らかにした。

以上、本研究では、PCB による血中 T₄ 濃

度の低下は、主として肝臓への T₄ の蓄積量の増加に起因し、胆汁中への T₄ のグルクロン酸抱合体の排泄の増加や肝肥大、T₄ と TTR との結合阻害も一部関与していることを明らかにした。本研究は、ヒトを含む多くの動物種に対する内分泌系への影響が懸念されている PCB 類の甲状腺ホルモン攪乱作用発現機構の解明を目的として、その新しい作用メカニズムを解明した学術的に特色のある研究であると考えられる。今後、ヒトを含む多くの動物種の PCB による血中甲状腺ホルモン濃度の低下作用発現メカニズムを解明するために、さらに研究する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件)

1. Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo, Osamu Kimura, Nobuyuki Koga : Distribution and excretion of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB187) and its metabolites in rats and guinea pigs. *Chemosphere*, (2015) **118**, 5-11. 査読有
doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.019
2. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Mao Onishi, Shinichi Ikushiro, Tetsuya Endo, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Shizuo Yamada, Masakuni Degawa: 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl-mediated decrease of serum thyroxine level in C57BL/6 and DBA/2 mice occurs mainly through enhanced accumulation of thyroxine in the liver. *Biol. Pharm. Bull.*, (2014) **37**, 504-509. 査読有
<http://doi.org/10.1248/bpb.b13-00775>
3. Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga : The participation of rat CYP3A enzymes in the metabolism of 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB101). *Organohalogen Compounds*, (2014) **76**, 466-469. 査読有
4. Yoshihisa Kato, Mao Onishi, Koichi Haraguchi, Shinichi Ikushiro, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Tetsuya Endo, Shizuo Yamada, Masakuni Degawa: A possible mechanism for 2,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, (2013) **36**, 1594-1601. 査読有
<http://doi.org/10.1248/bpb.b13-00440>
5. 太田千穂、原口浩一、加藤善久、遠藤哲也、古賀信幸 : 2,2',3,4',5,5'-六塩素化ビフェニル(CB146)の*in vitro*代謝の動物種差。福岡医学雑誌、(2013) **104**、161-169. 査読有
6. Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo, Osamu Kimura, Nobuyuki Koga : *In vitro* metabolism of

- 2,2',4,4',5'-pentachlorobiphenyl (CB99) by rat and guinea pig liver microsomes. *Organohalogen Compounds*, (2013) **75**, 587-590. 査読有
7. Yoshihisa Kato, Sekihiro Tamaki, Koichi Haraguchi, Shin-ichi Ikushiro, Masashi Sekimoto, Chiho Ohta, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga, Shizuo Yamada, Masakuni Degawa: Comparative study on 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level between C57BL/6 and its transthyretin-deficient mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (2012) **263**, 323-329. 査読有
doi:10.1016/j.taap.2012.07.004
 8. Yoshihisa Kato, Syohei Okada, Kazutaka Atohe, Tetsuya Endo, Koichi Haraguchi: Selective determination of mono- and dihydroxylated analogs of polybrominated diphenyl ethers in marine sponges by liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2012) **404**, 197-206. 査読有
doi 10.1007/s00216-012-6132-2
 9. Yoshihisa Kato, Sekihiro Tamaki, Koichi Haraguchi, Shin-ichi Ikushiro, Masashi Sekimoto, Chiho Ohta, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga, Shizuo Yamada, Masakuni Degawa : 2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl-mediated inhibition of a serum T₄-transthyretin complex formation is one of causes for the PCB-induced changes in the serum and hepatic T₄ levels in mice. *Organohalogen Compounds*, (2012) **74**, 1377-1380. 査読有
 10. Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga : Involvement of rat CYP3A enzymes in the metabolism of 2,2',3,4',5',6-hexachlorobiphenyl (CB149). *Organohalogen Compounds*, (2012) **74**, 1475-1478. 査読有
 11. Yoshihisa Kato, Mao Onishi, Koichi Haraguchi, Shinichi Ikushiro, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Tetsuya Endo, Shizuo Yamada, Masakuni Degawa: A possible mechanism for 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (2011) **254**, 48-55. 査読有
doi:10.1016/j.taap.2011.04.020
 12. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Mao Onishi, Shinichi Ikushiro, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Tetsuya Endo, Shizuo Yamada, Masakuni Degawa : 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice. *Organohalogen Compounds*, (2011) **73**, 726-729. 査読有
 13. Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga : Metabolism of 2,3',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB120) by liver microsomes of rats and guinea pigs. *Organohalogen Compounds*, (2011) **73**, 2251-2254. 査読有
- [学会発表](計8件)
1. Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga (2014). The participation of rat CYP3A enzymes in the metabolism of 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB101). 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Abst. p795-798, 31 August-5 September, Madrid, Spain.
 2. Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo, Osamu Kimura, Nobuyuki Koga (2013). *In vitro* metabolism of 2,2',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB99) by rat and guinea pig liver microsomes. 33rd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Abst. No. P-0239, 25-30 August, Daegu, Korea.
 3. 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸 (2013). 「2,2',4,4',5-五塩素化ビフェニル(PCB99)の動物肝ミクロゾームの代謝」日本薬学会第133年会, 講演要旨集3, p.254, 3月27~30日, 横浜.
 4. Yoshihisa Kato, Sekihiro Tamaki, Koichi Haraguchi, Shin-ichi Ikushiro, Masashi Sekimoto, Chiho Ohta, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga, Shizuo Yamada, Masakuni Degawa (2012). 2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl-mediated inhibition of a serum T₄-transthyretin complex formation is one of causes for the PCB-induced changes in the serum and hepatic T₄ levels in mice. 32nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Abst. No. G4.1, 26-31 August, Queensland, Australia.
 5. Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga (2012). Involvement of rat CYP3A enzymes in the metabolism of 2,2',3,4',5',6-hexachlorobiphenyl (CB149). 32nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Abst. No. G8.2, 26-31 August, Queensland, Australia.
 6. 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸 (2012). 「PCB101の*in vitro*代謝におけるラット肝CYP3A酵素の関与」日本薬学会第132年会, 講演要旨集3, p.269, 3月28~31日, 札幌.
 7. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Mao Onishi, Shinichi Ikushiro, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Tetsuya Endo, Shizuo Yamada, Masakuni Degawa (2011). 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice. 31st International Symposium on

Halogenated Persistent Organic Pollutants,
Abst. No. 1809, 21-25 August, Brussels,
Belgium.

8. Chiho Ohta, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga (2011). Metabolism of 2,3',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB120) by liver microsomes of rats and guinea pigs. 31st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Abst. No. 5102, 21-25 August, Brussels, Belgium.

〔その他〕

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph17/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 善久 (KATO, Yoshihisa)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：90161132