

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340043

研究課題名(和文) PCBの血中甲状腺ホルモン濃度低下作用発現に関する新規メカニズムの実体解明

研究課題名(英文) Study on the possible mechanism for the polychlorinated biphenyl-induced liver-selective accumulation of thyroxine

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たに提唱した血中サイロキシン(T4)濃度低下作用メカニズムの本質となるT4の肝臓への蓄積メカニズムを解析し、ラットにおいてpolychlorinated biphenyl (PCB)による肝実質細胞へのT4の取り込み量の増加には、肝臓のT4のトランスポーター、LAT1およびOatp2の mRNAの発現量の増加が、また肝臓からT4の抱合体の排出には、Mrp3 mRNAの発現量の増加が関与している可能性を示唆した。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 strongly suggested that the decrease in serum thyroxine (T4) level caused by exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) occurs mainly through increased accumulation of T4 in the liver. We suggested that the PCB-mediated liver-selective accumulation of T4 might occur, at least in part, through the increased expression of T4 influx transporters, such as LAT1 and oatp2. We further suggested that the PCB-mediated decrease in serum T4 levels occurs through the enhanced hepatic accumulation of T4 and, at least in part, through increases in the Mrp3-mediated excretion of T4 conjugate(s), not only through the induction of T4-UDP-glucuronosyltransferase. Further studies on the effects of PCBs on hepatic T4-transporters would be necessary to understand the exact mechanism for the PCB-induced decrease in serum T4 level.

研究分野：薬物の体内動態と薬効・毒性発現メカニズムの解明

キーワード：甲状腺ホルモン攪乱 サイロキシン PCB 肝臓 トランスポーター

### 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、肝臓の薬物代謝酵素の誘導、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、バルト海や米国五大湖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、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。また最近、脳障害を受けた子供の続発性甲状腺機能低下症、双極性精神疾患のリチウム長期治療や C 型慢性肝炎治療、糖尿病治療患者などの医薬品や病態における甲状腺機能低下症が問題となっているが積極的な解決策は見出されていない。

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、環境由来因子や薬物摂取により変動する。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・分泌系への作用、代謝・分解系への作用が複雑に絡み合っている。特に、PCB などの化学

物質によるラットの血中  $T_4$  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。それらに関して矛盾や疑問も多かったが、申請者が新規メカニズムを提唱するまで、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、実験動物でさえ解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、新たに提唱した血中  $T_4$  濃度低下作用メカニズムの本質となる  $T_4$  の肝臓への蓄積メカニズムの実体を解析し、本作用メカニズムの全貌を解明する。特に、 $T_4$  の肝臓への取り込み、排出に関わるトランスポート機構を明らかにする。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し、ヒトでの 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の低下作用) 発現メカニズムを解明することを本研究の目的とする。また、異なる核内レセプターに結合する PCB の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、血中甲状腺ホルモン濃度の低下作用を誘発する PCB などの化学物質や医薬品の毒性に対する安全性対策及び医薬品のリスク評価や副作用の回避に応用する。

### 3. 研究の方法

(1) ラットおよびマウスに Kanechlor-500 (KC500) を投与し、肝実質細胞の精製を行ない、肝実質細胞懸濁液を調製し、肝実質細胞への  $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$  の取り込み量を算出した。  
(2) 甲状腺ホルモンの血管側細胞膜から肝実質細胞への取り込みにおいて、トランスポーターの関与を明らかにするため、KC500 をラット、マウス、モルモット、ハムスターに投与後、  
、  
を測定し、それらの関係性を調べた。

血清中甲状腺ホルモン (総  $T_4$ 、遊離  $T_4$ ) 濃度

各動物の肝切片を用いて、甲状腺ホルモンの輸送に関わるトランスポーターとして、L 型アミノ酸トランスポーター (LAT1、LAT2)、有機アニオン輸送ポリペプチド (Oatp1、Oatp2、Oatp3、Oatp4) 及びタウロコール酸共輸送ペプチド (Ntcp) の遺伝子レベルでの発現変動への影響を、RT-PCR 法を用いて測定した。

$[^{125}\text{I}]\text{T}_4$  の各種組織 (下垂体、甲状腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、十二指腸、小腸など) への移行量

(3) 甲状腺ホルモンの胆管側細胞膜及び胆管上皮細胞で働くトランスポーターの関与を明らかにする。(2) の各動物の肝切片を

用いて、甲状腺ホルモンのグルクロン酸抱合体の輸送に関わるトランスポーターとして、ATP 結合カセットトランスポーター(Mrp2、Mrp3)の遺伝子レベルでの発現変動への影響を、RT-PCR 法を用いて測定した。

(4) ラット及びヒト腸マイクロソームの T<sub>4</sub> のグルクロン酸抱合反応の解析を行い、腸の UDP-グルクロナルトランスフェラーゼ (UDP-GT) の T<sub>4</sub> のグルクロン酸抱合への関与を検討した。

以上、PCB による血中 T<sub>4</sub> 濃度の低下において提唱した新規メカニズムである肝臓への T<sub>4</sub> の蓄積量の増加の要因を解明することを試みた。

#### 4. 研究成果

本研究では、KC500 投与によりラット十二指腸、空腸および回腸における T<sub>4</sub>-UDP-GT が誘導され、ラット十二指腸、空腸における T<sub>4</sub> の代謝に UGT1A2、UGT1A1 および UGT1A7 が関与していることが示唆された。また、ヒトの T<sub>4</sub> のグルクロン酸抱合には小腸の UDP-GT も関与していること、その UGT 分子種は UGT1A1、UGT1A8、UGT1A10 である可能性が示唆された。PCB の T<sub>4</sub> 濃度の低下作用メカニズムの一因として、小腸での T<sub>4</sub> のグルクロン酸抱合体への代謝もさらに検討する必要がある。

また、Wistar 系ラットに油症の原因となった KC500 を処置することにより、その取り込み量は有意に増加し、KC500 投与後のラットにおける肝実質細胞への T<sub>4</sub> の取り込み量の増加には、肝臓の LAT1 および Oatp2 mRNA の発現量の増加が、また肝臓から T<sub>4</sub> の抱合体の排出には、Mrp3 mRNA の発現量の増加が関与している可能性が示唆された。一方、KC500 を処置したマウスの肝臓の Oatp2 および Mrp3 mRNA の発現量は増加したが、LAT1 mRNA 発現量に変化は認められなかった。また、ハムスターおよびモルモットではいずれも、KC500 投与により、肝臓の LAT1 mRNA の発現量に変化は見られなかった。

以上、KC500 投与後のラットにおける結果と異なり、マウス、ハムスター、モルモットにおける肝臓への T<sub>4</sub> の移行量の増加の機序について、さらに追究する必要がある。

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 類の血中甲状腺ホルモン、T<sub>4</sub> 濃度低下作用メカニズムの本質となる T<sub>4</sub> の肝臓への蓄積メカニズムの実体解析を試み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、さらなる研究が必要である。

#### 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 8 件)

1. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Aki Fujii, Yukiko Fujii, Osamu Kimura, Chiho Ohta, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga, Shizuo Yamada, and Masakuni Degawa : Induction of hepatic T<sub>4</sub> transporters by polychlorinated biphenyl in rats. *Organohalogen Compounds*, (2016) 78, 873-876. 査読有
2. Chiho Ohta, Yukiko Fujii, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Osamu Kimura, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga : Metabolism of 2,2',3,4,4',5,6'-heptachlorobiphenyl (CB182) by rat, guinea pig and human liver microsomes. *Organohalogen Compounds*, (2016) 78, 870-872. 査読有
3. Osamu Kimura, Yukiko Fujii, Koichi Haraguchi, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo: Effect of quercetin on the uptake and efflux of aristolochic acid I from Caco-2 cell monolayers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (2016) 68, 883-889. DOI: 10.1111/jphp.12557 査読有
4. Tetsuya Endo, Osamu Kimura, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Yoshihisa Kato, Yukiko Fujii, Koichi Haraguchi: Metal concentrations in the liver and stable isotope ratios of carbon and nitrogen in the muscle of silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) culled off Ishigaki Island, Japan: changes with growth. *PLoS One*, (2016) Feb 9;11(2):e0147797. doi: 10.1371/journal.pone.0147797 査読有
5. 太田千穂、原口浩一、加藤善久、遠藤哲也、木村 治、古賀信幸: 2,2',3,4,4',5,5'-七塩素化ビフェニル(CB180)の動物肝マイクロゾームによる代謝. 福岡医学雑誌、(2015) 106、176-183. 査読なし
6. 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. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.019 査読有
7. Osamu Kimura, Koichi Haraguchi, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Yoshihisa Kato, Tetsuya Endo: Uptake of aristolochic acid I into Caco-2 cells by the monocarboxylic acid transporters. *Biol. Pharm. Bull.*, (2014) 37, 1475-1479. <http://doi.org/10.1248/bpb.b14-00219> 査読有
8. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Mao Onishi, Shinichi Ikushiro, Tetsuya Endo, Chiho Ohta, Nobuyuki Koga, Shizuo Yamada, and 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.

<http://doi.org/10.1248/bpb.b13-00775> 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 太田千穂, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 木村 治, 遠藤哲也, 古賀信幸 (2017). 「2,2',3,4,4',5,6'-七塩素化ビフェニル(CB182)の動物およびヒト肝ミクロゾームによる代謝」日本薬学会第 137 年会, 27PA-pm127, 3月24~27日, 仙台.
2. 木村 治, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 太田千穂, 古賀信幸, 遠藤哲也 (2017). 「Caco-2 細胞におけるペルフルオロオクタン酸の取り込み」日本薬学会第 137 年会, 27PA-pm044, 3月24~27日, 仙台.
3. 加藤善久 (2016). 「化学物質による血中甲状腺ホルモン濃度低下作用機構の薬物動態学的解明」第 2 回バイオシグナル研究会「バイオシグナルと環境応答」, 11月10日, 神戸.
4. Yoshihisa Kato, Koichi Haraguchi, Aki Fujii, Yukiko Fujii, Osamu Kimura, Chiho Ohta, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga, Shizuo Yamada, and Masakuni Degawa (2016). Induction of hepatic T<sub>4</sub> transporters by polychlorinated biphenyl in rats. 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Abst. Cod: 1.1010, 28 August-2 September, Firenze, Italy.
5. Chiho Ohta, Yukiko Fujii, Koichi Haraguchi, Yoshihisa Kato, Osamu Kimura, Tetsuya Endo, Nobuyuki Koga (2016). Metabolism of 2,2',3,4,4',5,6'-heptachlorobiphenyl (CB182) by rat, guinea pig and human liver microsomes. 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Abst. Cod: 1.1009, 28 August-2 September, Firenze, Italy.
6. 加藤善久 (2015). 「医薬品や化学物質による血中甲状腺ホルモン濃度低下作用機構の解明」静薬学友会四国支部大会, 11月29日, 徳島.
7. 加藤善久 (2015). 「PCB による血中甲状腺ホルモン濃度低下作用機構の解明」第 3 回 PCB 講演会, 7月31日, 神戸.
8. 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.

〔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