

3,3',4,4',5-PeCB を暴露した
ラット肝ヘム錯体の結晶場解析

吉 川 宏

2002

3,3',4,4',5-PeCB を暴露したラット肝へム錯体の結晶場解析

Crystal Field Analysis of Heme-Complexes in Rat Liver Exposed to
3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl

吉川 宏

2002

目 次

第1章 緒 論	
本研究の背景	----- 4
1. EPR 法	----- 6
2. 内分泌かく乱物質と PCBs	----- 8
3. PCBs の相対毒性と定量	----- 10
4. PCBs の毒性と P-450	----- 14
本研究の目的	----- 17
第2章 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl を経口投与した Sprague-Dawley ラットの血清値および肝ミクロソーム画分における Ethoxyresorufin-O-deethylase および Acetanilide-4-hydroxylase の検出	
緒 言	----- 19
材 料	
1. 供試動物	----- 20
2. 供試試薬	
a) PCB126 暴露モデル動物作出ならびに剖検用試薬	----- 20
b) ミクロソーム調製用試薬	----- 21
c) ウエスタンブロッティング法による抗体試験用試薬	----- 21
方 法	
1. PCB126 暴露動物の作出, および肝臓ならびに血液の採取	----- 23
2. 血清値の測定	----- 24
3. ミクロソームの調製	----- 24
4. ウエスタンブロッティング法による抗体試験	----- 25
5. 統計処理	----- 26
結 果	
1. 実験動物	----- 26
2. 血清値	----- 26
3. PCB126 投与による肝臓での CYPIA1 および CYPIA2 の検出	----- 27
考 察	----- 28
要 約	----- 31
第3章 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl を経口投与した Sprague-Dawley ラットの脳, 脾臓, 腎臓, 肝臓および肝ミクロソーム画分の EPR スペクトル	
緒 言	----- 33
材 料	----- 34
方 法	

1. PCB126 暴露動物の作出, および各臓器の摘出	-----	35
2. 肝ミクロソームの調製	-----	35
3. EPR 測定		
a) サンプル調製および充填	-----	35
b) 装置設定および掃引	-----	35
c) データ処理	-----	38
d) g 値の測定	-----	38
結果		
1. 脳の EPR スペクトル	-----	39
2. 脾臓の EPR スペクトル	-----	41
3. 腎臓の EPR スペクトル	-----	42
4. 肝臓の EPR スペクトル	-----	43
5. 肝ミクロソームの EPR スペクトル	-----	44
考察	-----	45
要約	-----	51

第4章 2.49種-P450 シグナルの特異性, ならびに, そのシグナル強度による 暴露量の検討

緒言	-----	52
材料		
1. 供試動物	-----	54
2. 供試試薬		
a) PCB126 暴露妊娠モデル動物作出用試薬	-----	54
b) 肝障害モデル動物作出用試薬	-----	54
c) PCB169 暴露モデル動物作出用試薬	-----	55
d) 2,3,7,8-TCDD 暴露モデル動物作出用試薬	-----	55
e) GC/MS 用試薬	-----	55
方法		
1. PCB126 を暴露した妊娠動物からの胎児および子供の作出	-----	55
2. 肝障害モデル動物の作出	-----	56
3. PCB169 および 2,3,7,8-TCDD 暴露動物の作出	-----	56
4. PCB126 を単回もしくは 4 回暴露したモデル動物の作出	-----	56
5. EPR 測定		
a) ベースラインの算出	-----	56
b) g 値 2.49 および 2.40 シグナル強度の数値化	-----	57
6. GC/MS 分析による PCB126 の定量	-----	58
結果		
1. 実験動物	-----	58
2. 肝障害モデル SD ラット肝臓の EPR スペクトル	-----	59
3. PCB169 もしくは 2,3,7,8-TCDD を暴露した SD ラット肝臓の		

EPR スペクトル	-----	59
4. 妊娠期間中に PCB126 暴露を受けた胎児および子供 SD ラット肝臓の EPR スペクトル	-----	60
5. g 値 2.49 および 2.40 シグナル強度の数値化	-----	61
6. GC/MS による肝臓中の PCB126 の定量	-----	62
考 察	-----	63
要 約	-----	66
第 5 章 処理による結晶場解析ならびに結晶場ダイアグラムによる 2.49 種-P450 の軸配位子の同定		
緒 言	-----	67
材 料		
1. 供試試薬		
a) 還元性試薬	-----	69
b) リポポリサッカライド	-----	69
方 法		
1. PCB126 暴露動物の作出および肝臓サンプルの調製	-----	70
2. PCB126 を暴露したラットの LPS 処理	-----	70
3. 肝臓およびマイクロソームの還元剤処理	-----	70
4. EPR 測定および g 値の決定	-----	70
5. Bohan の結晶場解析に基づく g_x , g_y , g_z の決定	-----	70
6. Rhombicity および Tetragonality の決定および 結晶場ダイアグラム	-----	71
結 果		
1. LPS 投与ラット肝臓の EPR スペクトル	-----	71
2. PCB126 暴露ラット肝臓の還元剤処理による EPR スペクトルの変化	-----	72
3. PCB126 暴露ラット肝マイクロソームの MeIm 処理による EPR スペクトルの変化	-----	73
4. 2.49 種-P450 の結晶場解析および結晶場ダイアグラム	-----	74
考 察	-----	76
要 約	-----	78
第 6 章 総 括	-----	80
謝 辞	-----	85
参考文献	-----	87

第1章 緒論

本研究は、内分泌かく乱物質 (EDCs; Endocrine Disrupting Chemicals) に対する生体影響評価として、生体への EDCs 暴露量ならびに肝臓中の解毒酵素の構造に及ぼす影響を電子常磁性共鳴吸収 (EPR; electron paramagnetic resonance) 法により検討を行ったものである。

EPR は、同義語として電子スピン共鳴 (ESR; electron spin resonance) も使用されるが、本論文では EPR の表記に統一した。この理由として、EPR の測定対象は不対電子を持つ物質や遷移金属などの常磁性物質となるが、ESR と表記すると測定対象は電子のみであると捉えられる懸念があるからである。

また、ペンタクロロビフェニル (penta chlorobiphenyl) を PCB と略するのが一般的であるが、本論文ではポリ塩化ビフェニル[類] (PCB[s]; polychlorinated biphenyl[s]) と区別するためペンタクロロビフェニルを PeCB と略す。一方、PCB に続く「No.」は同族体での通し番号であり、本論文ではすべて IUPAC (International Union of Pure and Applied Physics) によって提唱されたナンバリングシステムを用い、番号のみで表記した。PCBs の構造式と IUPAC ナンバーについては、本章の「内分泌かく乱物質と PCBs」および「PCBs の毒性評価と定量」に記す。

内分泌かく乱化学物質は、生殖系をかく乱するホルモン様物質としてだけでなく、催奇形性や発育不良などの様々な毒性を示す物質である。わが国では、内分泌かく乱作用を示す、あるいは示すと思われる 70 種近くの化学物質を EDCs とし、その疫学的調査、汚染状況、および毒性評価を行っている。それら EDCs の中において近年、特に注目される化学物質の一つに PCBs が挙げられている。この PCBs の工業的な製造は 1972 年に禁止されたものの、その高い安定性から

今なお環境中に遍在し、多大な生体影響を引き起こしている。

一般に、「環境ホルモン」という言葉からヒトにおける暴露経路は汚染された大気を呼気と共にとり入れたことによるものと考えられがちであるが、実際に多くの場

合、汚染した食物を直接摂取することによる経口暴露であり、地域に大差なく、大気からの暴露に比べて2~20倍程度にも達する(表1)[1]。また、最大の暴露経路である食物において、食物別の摂取量を表2に示したが、その多くが畜産食品や水産食品であることが伺える。この様な現状を踏まえると、PCBs等のダイオキシン類によって過度の汚染を受けた動物性食品を取り除くことは、我々において重要な課題であると考ええる。

しかしながら、現在のところPCBs等の検出には高度な技術に加え、時間がかかり経済面においての負担が非常に高いなどいくつかの懸案があり、今後、よりシンプルな検出手段の開発ならびに改善が必要である。

本研究ではPCBsを暴露したラットを畜産動物のモデルとし、その暴露量を検討する手段として肝臓のヘム錯体を指標にEPR法による検討を行った。この有用な知見は我々が今後、さらなるPCBs等の汚染から免れる上で、大きな貢献をもたらすものと考えられる。

我々の体内にはすでにある程度のPCBsが蓄積されている。PCBsは生体内に

表2. 食物種類別のダイオキシンの摂取量^[1]

食物	東北 A 県		関東 B 県		関西 C 県	
	pg/day	%	pg/day	%	pg/day	%
肉	5.93	14.03	7.64	16.74	6.88	16.30
魚	25.21	59.63	23.69	51.89	17.33	41.07
野菜	1.27	3.00	5.42	11.87	5.02	11.90
卵	1.89	4.47	2.42	5.30	2.29	5.43

とり込まれると、その性質として体内から排泄されにくく、また代謝を受けにくい。その結果、長

表1. わが国の一般的な生活環境からのダイオキシン類暴露状況^[1]

経路	大都市地域 pg/kg/day	中小都市地域 pg/kg/day
食物	0.26 ~ 3.26	0.26 ~ 3.26
大気	0.18	0.15
水	0.001	0.001
土壌	0.084	0.084
計	0.52 ~ 3.53	0.50 ~ 3.50

期にわたり様々な生体影響を引き起こす要因となる可能性がある。そこで PCBs が生体にとり込まれた際に、解毒のメカニズムを解明することは、非常に重要であると考えられる。本研究では、肝臓におけるヘム錯体、すなわち肝解毒酵素に注目し、EPR 法による構造に及ぼす影響を検討した。これは、生体毒性のメカニズムを解明していく上で、解毒酵素に及ぼす PCBs の影響を明らかにすることが可能であると考えられ、非常に意義を持つであろう。

本研究において、PCB126 の生体暴露量を評価する上で、PCB126 に起因するヘム錯体への影響を生体指標として、EPR 法による検出手法の検討と共に、PCB126 が示す生体毒性メカニズムを解明する上でヘム錯体の構造に及ぼす影響を解明することを目的とした。

1) EPR 法

1925 年 Uhlenbeck と Houdsmitt により、電子の永続的かつ基本的性質の一つとして電子スピンの存在が仮定された。この仮定により、電子、原子核、原子および分子のスピンの現象に関連するすべての理論は、矛盾なく理解された。しかしながら電子スピンの存在が実際に観察されたのは、彼らの報告から 20 年の歳月を経た 1945 年のことであった。Zavoisky[2]は、遷移金属イオンの一つである Cu^{2+} を対象として、電子スピンの共鳴現象を観測した。その後の 10 年間で EPR 法の実験的理論[3]は確立され研究技術として応用されるに至った。

EPR 法とは、電子スピンの低エネルギー状態から高エネルギー状態への遷移を測定する方法である。原子や分子中の起動には、通常 2 個の電子が存在し、互いに相反するスピン (自転運動) を行っており、これに外部から磁場を加えると、スピン量子数に依存し電子が分裂する (ゼーマン効果)。この時、2 個に分裂した軌道のうち、1 個にのみ電子が存在する場合には、電

子は低エネルギー軌道に入り、この状態の電子に電場(高周波エネルギー)を与えることによって、高エネルギー軌道へと遷移する。EPR法は、この遷移に伴うマイクロ波の吸収による共鳴現象を

表 3. EPR 法の測定対象とその応用例

対 象	不対電子の所在	代表的応用例
磁性体	磁性イオン中の 3d, 4f 軌道	YIG, 磁気バブル記憶素子
金属	伝導バンド	アルカリ金属, Cu, Al
半導体	伝導バンド, 不純物準位	グラファイト, Si, Ge
カラーセンター	F, U センター	アルカリハライド結晶, 石英
気相のフリーラジカル	原子, 分子の軌道	H, N, O ₂ , NO
錯体, 無機化合物	金属イオンの d, f 軌道	Ti ³⁺ , VO ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ³⁺
高分子化合物	重合系の生長ラジカル	MMA, 酢酸ビニル
有機ラジカル	非結合性軌道	DPPH, TANOL, スピンラベル剤
有機金属	HOMO, LUMO, 伝導バンド	TTF 塩, TCNQ 塩
金属酵素, 金属蛋白, 血液	金属イオン, 配位子, 結合活性酸素種	HRP, ヘモグロビン, フェルドキシシ
ビタミン, 補酵素	ラジカル	ビタミン C, E, K, NADPH
血液成分, 組織, 食品	光, 熱, 圧力損傷位置	メラニン, 過酸化脂質
化石, 岩石	宇宙線損傷位置	歯, 人骨, 貝, 石英
石炭, 石油	C [•] , COO [•] , VO ₂	石炭の風化, 石油の変性
宝石	C [•] , NO ₂ , メラニン	宝石の品質検査

観測する技術である[4, 5]。

EPR 法による測定対象は不対電子を持つものに限られるが、不対電子を持つ物質は、それを持たない物質の数に比べて圧倒的に少ない。対象物質が非常に制限されることで EPR 法の選択性(selectivity)が高まる。また、本来は不対電子を持たないが、物理的または化学的手段により対象物内に不対電子を保持させること(常磁性化)によって測定対象を拡げる手法も確立された。表 3 には本来、不対電子を有するものをいくつかに分類したものを示し、表 4 に常磁性化させるための物理的・化学的手法について示した[5]。

EPR 装置は 1,000 mT 以下の磁場と、0.1 mT 以下のマイクロ波変調磁場を用いる。これらをエネルギーに換算すると、せいぜい 10⁴ eV 程度であり、測定物質をエネルギー的に破壊することはない。したがって、EPR 法は非破壊

表 4. 常磁性化法によって EPR 対象となりうる物質とその具体的な方法

常磁性化法	具体例
物理的方法	アミノ酸やタンパク質への γ 照射
放射線照射	ビタミン類への β 照射
光励起	皮膚やその細胞の光照射
熱励起	加熱によるタンパク質変性とラジカル発生
超音波照射	超音波処理によるタンパク質の変性とラジカル発生
化学的方法	
化学合成	医薬品に安定ラジカルを統合させ、その体内動態の検討
酸化	金属酵素や金属タンパク質中の金属イオンを酸化して常磁性化する
還元	金属酵素や金属タンパク質中の金属イオンを還元して常磁性化する
電気化学的酸化還元	金属酵素・金属タンパク質などの触媒活性と金属イオンの酸化状態
活性ラジカル種との反応	キサンチン酸化酵素系や Fenton 系で発生させた $\cdot O^2$ や $\cdot OH$ と生体物質との反応性
スピントラップ法	不安定活性酸素($\cdot O^2$, 1O_2 , $\cdot OH$)や $\cdot NO$ のトラップ剤による安定化
スピンラベル法	タンパク質や生体膜のスピンラベル化による構造解析
錯体形成	常磁性金属錯体をタンパク質や酵素に統合させ、構造解析する

的分析法であり[4]、本手法の大きな特徴である。

EPR 法は定量性においても非常に高い検出感度を示す。原子核を対象とする NMR (核磁気共鳴) 法と比べると、かなり高感度であると推測されている [6, 7]。例えば、生体中の常磁性金属イオンや $NO \cdot ^1O_2$ などのフリーラジカルの検出が可能であり、実際に定量に用いられている [8-11]。このように、EPR 法はフリーラジカル・常磁性核種の定量性において非常に高感度であり、原子吸収法や誘導結合高周波プラズマ分光分析法にも匹敵すると考えられている。これら EPR 法の特徴により、現在では学問体系の確立もなされ材料科学分野での基礎研究を経て、医薬・生物学の分野に応用されるに至っている。

2) 内分泌かく乱物質と PCBs

1997 年 1 月に米国大統領府科学技術委員会が環境保護局と共同で、EDCs の定義を「生体の恒常性・生殖発生あるいは行動に関与する種々の生体性ホルモンの合成、分泌、体内輸送、受容体結合し、そのホルモン作用そのもの、あるいはそのクリアランスなどの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質」と提言した。また世界保健機構・化学物質安全性計画

(WHO/IPCS) では「内分泌系に変化を与え、無処置の生物もしくはその後世代に、障害性の健康影響を与える外来性物質もしくはその混合物」として
いる[12]。

ヒトの内分泌系は、甲状腺、卵巣、精巣などのホルモン産生臓器、そのホルモン産生をコントロールする下垂体、さらに下垂体をコントロールする脳の視床下部などがネットワークを構築し、血中のホルモン濃度やその周期性などを保持・調節している。

内分泌系の機能を阻害する EDCs の特徴の一つは、ホルモンが受容体へ結合し生物活性を発現するメカニズムに介入しホルモンの作用を阻害することである。ホルモン 1 分子が受容体 1 分子に結合して作用を発現するメカニズムを考えれば、EDCs が微量であっても生体に影響をおよぼす可能性が考えられ、限りなく低濃度での障害性が問題となるのも EDCs の問題点の特徴である。また、内分泌系のホルモンは受精卵から胎児へと発達・成長を遂げる発生過程で、器官の形態形成や機能形成過程あるいは生後の成長や性的成熟過程において重要な役割を果たしており、EDCs はこれらの過程を阻害することが指摘されている。

環境庁において内分泌かく乱作用があるのではと疑われる化学物質として 67 項目がリストアップされている。それら化学物質を用途・相互関連性をもとに分類し表 5 に示した[12, 13]。

表 5 において A に分類される化学物質のポリ塩化ビフェニル(PCBs)は、近年もっとも注目される EDCs の一つである。PCBs はビフェニルを鉄触媒下に置き塩素ガスを導入して製造され、塩素化の程度により多くの塩素数の異なった製品からなる。1921 年、スワン社によって最初に製品化されると共に、モンサント社が Arochlor を、鐘淵化学工業が Kanechlor を製品化した。1972 年以降、その毒性から製造ならびに使用が禁止されるまで、全世界の累積

表 5. 環境庁によって示された内分泌かく乱作用があるのではと疑われる化学物質

用途・相互関連性に基づく分類	主な化学物質
A. 非意図的の生成物, 難燃剤, 絶縁油等	Benzo(a)pyrene, Polychlorinated biphenyls, Polychlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins
B. 助走・殺虫剤等, 農薬 1)カーバメイト系殺虫剤 2)ジチオカーバメイト系殺菌剤 3)有機塩素系殺虫剤 4)合成ピレスロイド系殺虫剤 5)ドリアジン系除草剤 6)フェノキシ系除草剤 7)その他	Aldicarb, Methomyl, Vinclozolin Mancozeb, Zineb, Ziram Aldrin, Oxychlorane, DDT, Endrin Cypermethrin, Esfenvalerate, Permethrin Atrazine, Metribuzin, Simazine 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid Alachlor, Amitrole, Nitrofen, Octachlorostyrene
C. プラスチック可塑剤, 樹脂関連物質 1)プラスチック可塑剤 2)樹脂関連物質 3)スチレン	Phthalate, Diethylhexyl adipate Bisphenol A, Nonylphenol, <i>p</i> -Octylphenol Styrene
D. その他 1)スズ化合物 2)紫外線吸収剤, 合成中間体	Tributyltin Bis(tributyltin) oxide Benzophenone, 4-Nitrotoluene

総生産量は 100 万トン以上であると推定されている[14]。この理由として、PCBs は 1)不燃性であり加熱・冷却による変性がない, 2)絶縁性に優れている, 3)化学的に安定で、酸・アルカリ変性を受けにくい, 4)難水溶性であるが有機溶媒によく溶ける などの利点から、特に発電所や工場の電気設備において絶縁体として重宝されたことによるものである[15-18]。製造中止から 30 年が経とうとするが、環境中や生体の脂肪組織中において PCBs が容易に検出されるのも、この安定性および脂溶性が要因である。

PCBs による人的災害事例は少なくないものの、わが国では 1968 年、カネミ倉庫会社で、熱媒体として使用していた PCBs のパイプ漏れによって直接ライソオイルに、混入した油症事件が起きた[19]。また、カナダ、スウェーデン、オランダでは環境中で生体濃縮した PCBs によって経口暴露を受けた母子に、神経の発達障害、生長抑制がみられ、血中 PCBs 濃度が高いことが報告されている[20-22]。

3) PCBs の相対毒性と定量

PCBs の構造は図 1 に示したように 2 つのベンゼン環が 1 ヶ所で架橋され

たビフェニル骨格に 1~10 個の塩素が結合した非常に簡単な構造をとり、塩素の結合数および結合位置によって理論的に 209 種の化合物が考えら

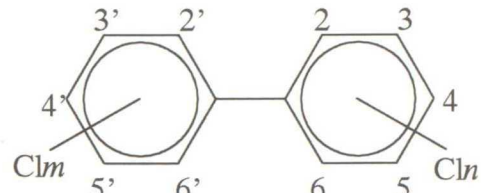


図 1. PCBs の基本骨格構造

れ、IUPAC や BZ (Ballschmider と Zell が提唱) などのナンバリングシステムにより塩素結合数の少ない方から順に 209 番までの番号が付けられている。

PCBs は、1 架橋という点でポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン類 (PCDDs) やポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs) の 2 ヶ所架橋と大きく異なり、このことは PCBs 種による毒性強度の違いに大きな影響を与える。すなわち、左右のベンゼン環はこの架橋軸に関してフリーローテーションであり、そのため左右のベンゼン環が同一平面状に展開する場合がある。左右のベンゼン環が同一表面上に展開するか否かは 4 ヶ所のオルト位に配位する塩素数に左右され、その数が少なければ少ないほど平面構造をとるので、「同一平面」という意味の数学用語の「コプラナー (co-planar)」を用い、コプラナー PCBs (Co-PCBs) という呼称でよばれてきたが、近年ではオルト位に塩素がまったく配位していない non-ortho PCBs を Co-PCBs と呼ぶ [23,24]。この Co-PCBs は他の PCBs に比べ、平面構造をとることから生体内での代謝を受けにくく、生体内に長く蓄積することから、その強い毒性が懸念されている [25-28]。特に、3,3',4,4'-tetra chlorobiphenyl (PCB77)、3,3',4,4',5-PeCB (PCB126)、および 3,3',4,4',5,5'-hexa chlorobiphenyl (PCB169) は、その毒性が PCDDs や PCDFs に匹敵して非常に高いことから、現在、ダイオキシン類に包含して考えられている。

一般に、PCBs が生体内にとり込まれるとミクロソーム酵素 (薬物代謝酵素) であるアクリルヒドロカーボンヒドロキシラーゼ (AHH) およびエトキシレソルフイン-O-ジエチラーゼ (EROD) が誘導される [29]。この P-450 薬物代謝酵素誘

導能と毒性との関係を、毒性等価係数として評価する[25]。この際、基準としてダイオキシン類で最も強い毒性を示す 2,3,7,8-tetra chlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD)を1として、各同属体の相対毒性 (Toxicity Equivalence Factor: TEF)を表す。すなわち、これらの毒性の程度は酵素誘導能と比例するということから酵素誘導能を相対毒性の指標とし、この TEF が環境影響評価の指針として利用されている[18, 29, 30]。1997年、WHO によって再評価された TEF の一覧を表 6 に示した[31]。この表から Co-PCBs の毒性強度が比較的高いこと、PCBs において塩素の結合位置によって毒性の強度が大きく影響することがわかる。

Krishnan ら[32]は、MCF-7(ヒト乳ガン細胞)を用い 17βエスタジオールが誘導した procathepsin D (Ah レセプターはこのタンパクの阻害に参与)の阻害効果を調べ、抗エストロゲン作用強度の指標とした。抗エストロゲン作用の強さは PCBs で PCB126 > PCB169, PCB77 > PCB157 > PCB105, PCDDs, そして PCDFs で 2,3,7,8-TCDD > 2,3,7,8-TCDF > 1,2,3,7,9-PCDF > 1,3,6,8-TCDF の順であると報告している。また、Steinberg[33]は C57BL/6 雌マウスに対する PCB126 および 2,3,7,8-TCDD の急性および亜慢性毒性を hepatic microsomal enzyme (EROD)活性、免疫機能、その他のパラメータを取り上げて比較検討し報告している。これらの研究は WHO で評価された

表 6. WHO によって提唱された TEF の一覧

化学物質	TEF
PCDDs	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01
OCDO	0.0001
PCDFs	
2,3,7,8-TCDF	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01
OCDF	0.0001
Co-PCBs	
3,4,4',5'-TCB (81)	0.0001
3,3',4,4',-TCB (77)	0.0001
3,3',4,4',5'-PeCB (126)	0.1
3,3',4,4',5,5'-HxCB (169)	0.01
PCBs	
2,3,3',4,4'-PeCB (105)	0.0001
2,3,4,4',5'-PeCB (114)	
2,3',4,4',5'-PeCB (118)	0.0001
2',3,4,4',5'-PeCB (123)	0.0001
2,3,3',4,4',5'-HxCB (156)	0.0005
2,3,3',4,4',5'-HxCB (157)	0.0005
2,3',4,4',5,5'-HxCB (167)	0.00001
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (189)	0.0001

()内は IUPAC#

TEF が非常に有効であることを示した。

哺乳類、特にヒトにおいて PCBs による生体影響を考える上で、生体にとり込まれた際の TEF と同様に、それら化学物質が等量経口投与された場合の生体への取り込み量が検討される必要があるだろう。PCBs の分析方法として最も一般的な方法は、図 2 に示したシリカゲルカラムクロマトグラフィーによるサンプル濃縮を経て、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) による分析である[34, 35]。本手法は質量分析を経ることで非常に高い分画能を示すが、その反面、サンプル調製に費やす時間が大きいと共に、1 サンプルにかかる経費が非常に高いことから、簡便な検査法として用いにくいという点が指摘されている。現在、多くの研究者によって、より簡便で安価な方法が模索されており、とりわけ使用頻度の多いのが ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) による方法である。

Goksoyr ら[36]は、ウサギチトクローム P-450 IA1 IgG ポリクローナル抗体を用いた ELISA 法によって魚の環境調査および毒性評価した上で幅広いサンプルに応用できるとする反面、サンプルが小さかったり少量の組織であった時、サンプルの保存状態の悪さによる活性失活、および活性阻害物質の存在によって測定が困難もしくは不可能であることを報告している。その他、Stanker ら[37]によるダイオキシンのモノクローナル抗体を用いた手法や Donnelly ら[38]による Ohmicron 社製 PCB RaPID 分析キットを用いた免疫分析などがあるが、分析感度や多くの内分泌かく乱物質との特異性

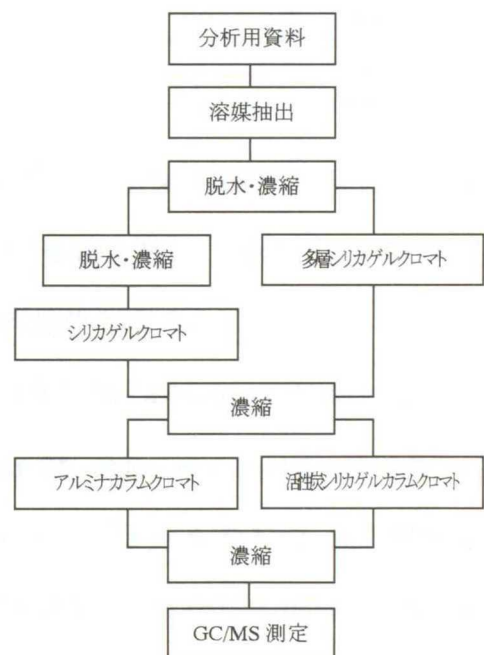


図 2. PCBs の一般的分析法のフロー[24]

などの点で GC/MS 手法と比べて問題が残されている[39]。

4) PCBs の毒性と P-450

一般に、生体における発達・性分化などの機構は、多くの遺伝子とホルモンが適切な量だけ順序正しく働くことによって制御される。

EDCs はホルモン様の作用として、1) 内因性ホルモン同様な作用による発現過剰(図 3-A)、2) 内因性ホルモンの反する作用による発現阻害(図 3-B)、3) 内因性ホルモンや受容体の合成および代謝の阻害(図 3-C)に大別される [40]。特に新生

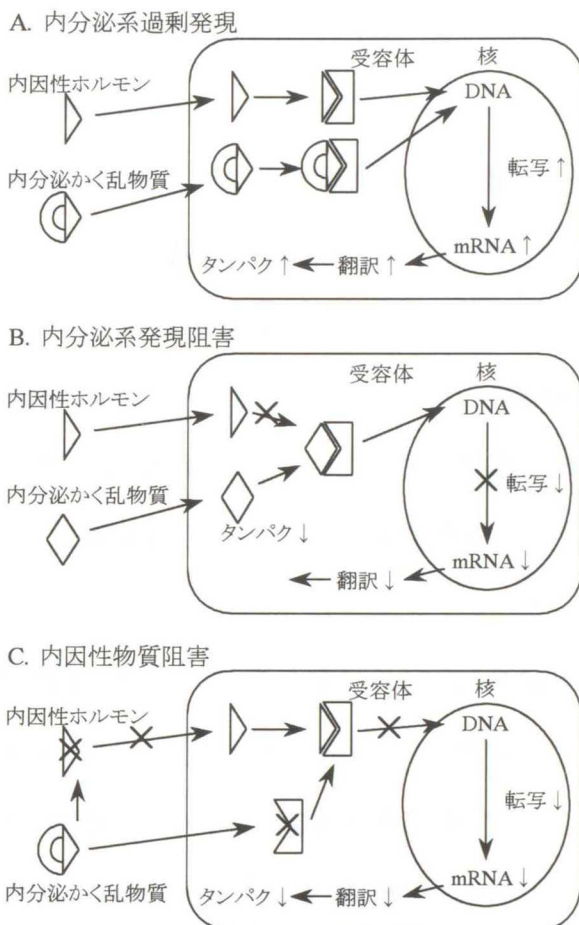


図 3. 内分泌形に及ぼす EDCs の作用機序

児期・乳児期には、微量といえども上記の作用を示す EDCs が生体内に侵入することにより、生殖腺の正常な性分化・発達を乱し、しかも生後何年も経ってから予想もされない症状が発現する可能性が考えられる。

PCBs のホルモン様作用は、そのヒドロキシ体 (4-hydroxy-2',4',6'-TCB, 4-hydroxy-2',3',4',5'-TCB, 4,4'-dihydroxy-2'-chlorobiphenyl など) によるエストロゲン作用が認められ、活性強度はエストラジオールの 1/42~1/90 程度であると報告されている[41]。それに対し、内分泌かく乱作用の機序は、Ah レセプターを介したものであることが認められているが、PCB の 3,3',4,4'-TCB

において抗エストロゲン作用という相反する作用があることも報告されている[32]。

PCBs やダイオキシン類は甲状腺ホルモンの環境(構造および機能)に影響を及ぼし[42-44], さらにミトコンドリアの機能に作用し ATP の産生を傷害することが知られている[45]。甲状腺ホルモンは一生を通して神経系の機能に重要な働きをしており, 胎児期あるいは新生児期の甲状腺機能障害は運動機能障害および認知障害をもたらす。甲状腺ホルモンの恒常性の維持やミトコンドリアの機能障害がある場合には, 甲状腺ホルモンの環境を変動させるような PCBs などの内分泌かく乱物質に曝されることにより, 認知, 運動機能や代謝障害を起こしやすくなる。疫学的事例では, アメリカで胎児期に臍帯血や乳汁を介して高濃度の PCBs に曝された子供の甲状腺機能低下からの知能低下が報告されている[46]。

一方, 動物における急性毒性では, PCBs のうち代謝されにくい高塩素化 PCBs が一般的に強い毒性を有することが報告されており, ヒヨコやアカゲザルを用いた研究では高塩素化の PCBs の中でも, 塩素置換位置によって急性毒性に差があることが認められている[47,48]。さらに, PCB77, PCB126 や PCB169 など PCBs の毒性強度を試験した結果, オルト位に塩素置換のない PCBs が強い急性毒性を示し, 中でも PCB126 は 10 mg/kg の腹腔内投与でラット 5 匹すべてが 6~8 日で斃死するなど, 強い急性毒性を有することを示した[47]。また, 低塩素化 PCBs でも, その代謝物では高い毒性を有することが報告されており[47, 49], 比較的代謝されやすい低塩素化 PCBs でも生体に対する影響を無視することはできないであろう。

PCBs は一般に代謝されにくく, 肝臓に貯留しやすい難代謝物質であるが, 少なからず肝小胞体で酸化的代謝を受け, この代謝には肝解毒酵素チトクローム P-450 (P-450) が大きく関与している。

P-450とは、活性中心にFeをもつ酸素添加酵素(オキシゲナーゼ)であり、酸化還元反応を行うタンパク質の総称である。還元状態でCOと結合して450 nmに吸収最大を示す色素であることからP-450(Pigment 450)と命名された[50]。発見当初、P-450は肝と副腎のミクロソームに見出されたが、高等動物では腎臓、精巣、卵巣、小腸粘膜、肺、大脳、胎盤など体内のいろいろな臓器に分布していることが明らかとなっている。特に、肝ミクロソームのP-450の量や種類は動物の種類、性別、年齢などの内的要因や、薬物投与などの外的要因によってかなり影響を受けることが知られている[50]。

P-450はPCBsによって誘導される[29]。その機構は図4に示すように、生体内にとり込まれたPCBsは受容体であるAhレセプターと結合し、事前に結合していたHSP90が解離し、Ahレセプター-PCBs結合物は核内に移行する。移行した結合物は核内でArntと呼ばれる転写因子とヘテロダイマーを形成し、P-450などのpromoter/enhancer領域のxenobiotic-responsive element(XRE)に結合し転写を活性化することによってP-450が誘導される[40]。この誘導されたP-450はPCBsを水酸化することによって解毒作用を行う。

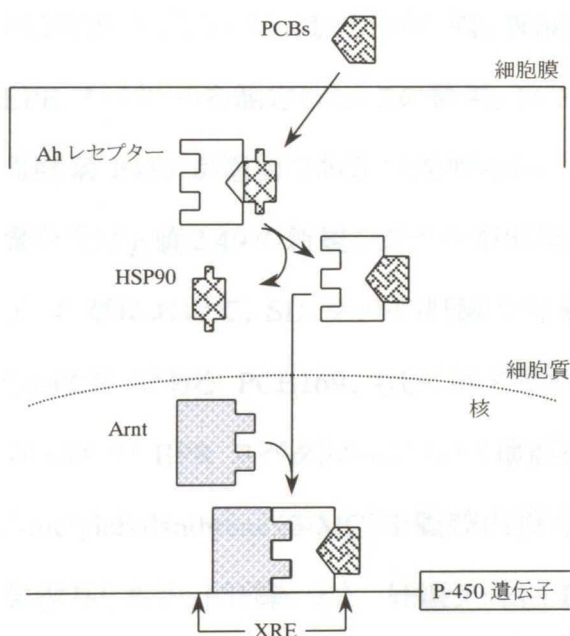


図4. PCBsによるP-450遺伝子の転写調節機構

一方で、P-450は基質を選ぶことなく酸素添加反応をおこし正常細胞をも酸化する。難代謝性のPCBsが肝臓中に蓄積していればP-450が誘導され続け、結果的にPCBs暴露によって副次的に酸化ストレスが引き起こされることが危惧されており、現在、多くの研究者によってその作用機序や、PCBs暴露のバイオマーカーとし

て O_2^- の産生, 脂質酸化, DNA 損傷などの酸化ストレスパラメーターについての研究が盛んに行われている [17,51-57]。これらの結果は, 3,3',4,4',5,5'-HCB 単独投与による血漿中サイロキシンレベルの用量相関的な現象や, 脳での thyroxine 5'-deiodinase 活性の増加に伴うサイロキシンレベル低下による神経毒性の機序 [58] に加え, 新たに, 脳内の酸化ストレスによる神経障害毒性という有力なメカニズムを示唆した。

本研究では, PCBs 暴露動物のモデル系として Sprague-Dawley ラット (SD ラット) に Co-PCBs の中で最も毒性の高い PCB126 を経口投与し, その肝臓の EPR スペクトルの変化から暴露量の検討を行うと共に, 肝解毒酵素 P450s に及ぼす影響について試験した。

第 2 章では, ヒトが 80 年間で被曝されるであろうと推定される EDCs の総量と毒性等価量の PCB126 (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/単回) を基準に投与量を定め, SD ラットに経口投与し, 投与 24 時間後の血清値の測定ならびにミクロソーム画分の CYP1A1 および 1A2 の検出を行った。第 3 章では, 生体内へム錯体を対象に PCB126 を投与した SD ラットの脳, 脾臓, 腎臓, 肝臓および, 肝ミクロソームの EPR スペクトルを測定した。この結果, PCB126 暴露の影響を見る上で肝臓の解毒酵素 P450 が適切であることを明らかにすると共に, この P450 が何らかの影響を受け g 値 2.49 の新規シグナルが出現することを見出した。この結果を受け, 第 4 章において, SD ラットの肝臓を対象に PCB126 と同様の EDCs であり Co-PCB である PCB169, もしくはダイオキシンで最も強毒性を示す 2,3,7,8-TCDD の EPR スペクトルについて検討を行うと共に, 肝障害誘発物質である 3-methylcholanthrene (3-MC) を腹腔内投与, carbon tetrachloride (CCl_4) を尾静脈投与したラット肝臓, また, 妊娠ラットに PCB126 を経口投与し, その胎児および子供における肝臓の EPR スペクトルについても検討した。 g 値 2.49 シグナルと

PCB126 の投与濃度および肝臓蓄積との相関について試験した。得られた知見は、PCB126 などのダイオキシン類に暴露した生体においてその暴露量を推定する上で、EPR による暴露量の推定のコンセプトを着想させるものであり、その数値化を試みた。第 5 章において PCB126 を暴露した SD ラットより得られた肝臓を、強還元剤であり Fe との親和性が高い *N*-methylimidazole で処理し、結晶場解析に基づく結晶場ダイアグラムによって P450 の軸配位子を同定した。

第2章 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl を経口投与した Sprague-Dawley ラットの血清値および肝ミクロソーム画分における Ethoxyresorufin-O-deethylase および Acetanilide-4-hydroxylase の検出

緒言

ダイオキシン類として認識される Co-PCBs は、1972 年に製造が禁止されて以来、環境中の汚染濃度は徐々に低下を辿るものの、30 年近く経過した現在においても残留濃度は高く、生体暴露の危険性が指摘されている。わが国の厚生労働省において、ダイオキシン類の最大暴

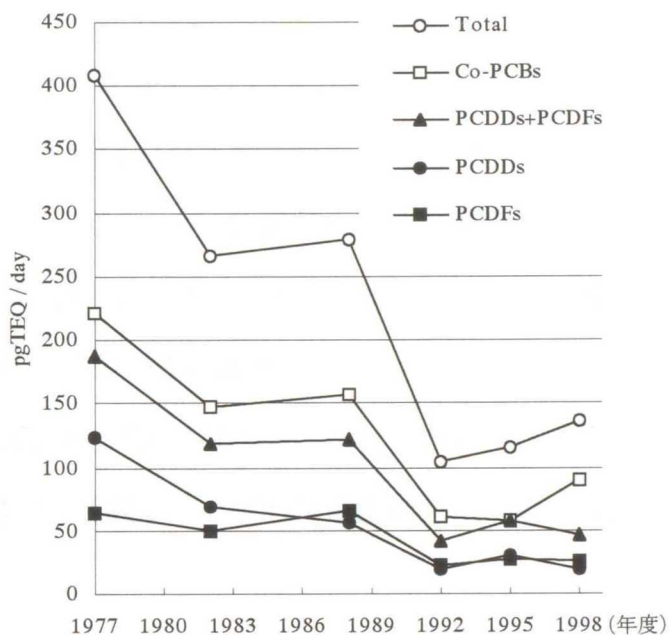


図5. トータルダイエツト試料由来のダイオキシン類における1日摂取量の経年変化

露経路である食物を指標に食事経由での1日摂取量の経年変化に関する疫学的調査を報告した(図5)[59]。それによると、Co-PCBsの1日摂取毒性等価量(TEQ/day)が1977年度以降の6回の調査(77, 82, 88, 92, 95, 98年度)において221.4, 148.0, 157.1, 61.5, 57.5, および90.0 pgTEQ/dayと、いずれの調査年においてもPCDDsとPCDFsの合計値187.7, 118.1, 121.8, 42.1, 57.6, および46.0 pgTEQ/dayと比較して高いもしくは同等である。また、Co-PCBsのTEQ/dayが増加した1998年の調査では、このCo-PCBsの増加に起因して総摂取量が増加する傾向に至り、あらためてCo-PCBsの生体影響力の強さが指摘された。

本研究では、Co-PCBs において最も毒性の高い PCB126 を対象に、畜産動物のモデルとして SD ラットを用い、その暴露量に関する検討、ならびに生体影響に関する研究を目的とした。

本研究における PCB126 の投与量について検討する上で、様々なダイオキシン類に関する各種毒性試験において報告のある最少無毒性量 (LOAEL: lowest observed adverse effect level) もしくは最小影響量 (LOEL: lowest observed effect level) を参考に [59-76], ヒトが一生で被爆するであろうと考えられる等価毒性量 (TEQ) を算出し、それに基づき、本研究の投与量を決定した。

本章では、PCBs 暴露によってパラメータに影響があるとして報告されている血清値の変化について測定した [77-81]。また、解毒に対して重要な作用を示す P450 の一種である CYP1A1 と CYP1A2 の誘導に関して、ウエスタンブロッティング法による抗体試験法により分析した [17,56,80,82-85]。すなわち、本研究で定めた PCB126 暴露量が生体で引き起こす一般的な毒性影響について検討した。

材 料

1) 供試動物

6 週齢-雌雄-SD ラット (Crj:CD[IGS], 日本 SLC 株式会社)

2) 供試試薬

a) PCB126 暴露モデル動物作出ならびに剖検用試薬

・3,3',4,4',5-PeCB 溶液

3,3',4,4',5-PeCB (Wellington Laboratories 社; 純度 >99.99%)

コーンオイル (Hayashi Chemicals 社)

体重当たりの総投与液量が同じ割合になるように、それぞれの投与条件 0.3, 3.0, 30, および 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw (body weight) に適当量の最終濃度 0.12,

1.2, 12, および 40 $\mu\text{g/ml}$ に, 3,3',4,4',5-PeCB をコーンオイルにて十分に溶解した。

•1.15 % (w/v) KCl 緩衝液

Potassium chloride 11.5 g

蒸留水 988.5 ml で十分に溶解した。pH 調整は行わず, 使用時まで 4 $^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

b) ミクロソーム調製用試薬

•0.1 mM EDTA および 20 μM 2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol 含有 1.15 % KCl 溶液 (EB-KCl)

EDTA 2.922 mg

2,6-Di-*t*-butyl-4-methylphenol 0.4407 mg

1.15 % KCl 100 ml で十分に溶解した。pH 調整は行わず, 使用時まで 4 $^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

c) ウェスタンブロッティング法による抗体試験用試薬

•0.5 M Tris-HCl バッファー, pH 6.8

Tris base 6.0 g

上記成分を蒸留水で溶解し, 塩酸にて pH 6.8 に調整し, 100 ml にメスアップした。使用時まで 4 $^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

•トリスバッファー (TBS), pH 7.6

Tris base 12.1 g

Sodium chloride 40.0 g

上記成分を蒸留水で溶解し, 塩酸にて pH 7.6 に調整し, 5,000 ml にメスアップした。使用時まで 4 $^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

•TBS-Tween (TBS-T)

Tween-20 0.1 ml

上記成分を TBS (pH 7.6) バッファー 99.9 ml で十分に溶解した。使用時まで 4 °C にて保存した。

・リン酸バッファー (PBS), pH 7.5

Di-sodium hydrogen orthophosphate, anhydrous	11.5 g
Sodium dihydrogen orthophosphate, hydrated	2.96 g
Sodium chloride	5.84 g

上記成分を蒸留水で溶解し, pH 7.6 に調整し, 1,000 ml にメスアップした。使用時まで 4 °C にて保存した。

・電気泳動バッファー

Tris base	12.12 g
Glycine	57.6 g
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	4.0 g

上記成分を蒸留水 4,000 ml で十分に溶解した。pH 調整は行わず, 使用時まで 4 °C にて保存した。

・転写バッファー

Tris base	7.6 g
Glycine	36.0 g
Methanol	800 ml

上記成分を蒸留水 3,200 ml で十分に溶解した。pH 調整は行わず, 使用時まで 4 °C にて保存した。

・10 % (w/v) SDS 溶液

SDS	10 g
-----	------

上記成分を蒸留水 90 ml で十分に溶解した。pH 調整は行わず, 使用時まで室温にて保存した。

・0.05 % (w/v) Pyronin Y 溶液

Pyronin Y (Sigma 社製) 0.05 g

上記成分を蒸留水 99.95 ml で十分に溶解した。pH 調整は行わず、使用時まで室温にて保存した。

・ローディングバッファー

0.5M Tris-HCl, pH 6.8 1.0 ml

Glycerol 0.8 ml

10 % SDS 1.6 ml

β -Mercaptoethanol 0.4 ml

0.05 % Pyronin Y 0.5 ml

上記成分を十分に混和し、使用時まで暗所にて室温で保存した。調製した溶液は 2 週間以内に使用した。

・その他の抗体試験用試薬

上記以外の抗体試験用試薬は Rat cytochrome P450 IA1 もしくは IA2 ECL Western blotting kit (Amersham Pharmacia Biotech 社) の標準試薬を用いて行った。キット添付試薬の内訳は以下の通りである。

- Molecular weight markers (MW)
- Membrane blocking reagent (MBR)
- Anti-rat cytochrome P450 IA1/IA2 antibody (IA1/IA2-antibody)
- Anti-rabbit Ig-biotinylated species-specific whole antibody (Ig-antibody)
- Detection reagent 1 (DR-1)
- Detection reagent 2 (DR-2)

方法

1) PCB126 暴露動物の作出, および肝臓ならびに血液の採取

実験動物は体重約 230 g 前後の 6 週齢の SD ラットを用いた。SD ラットは

試験に用いる前に 1 週間の馴致期間を設けた。SD ラットの飼育は、温度 21 ± 2 °C、湿度 55 ± 5 %に設定した実験室にて行い、試料として固形試料 CE-2(日本クレア株式会社)および水道水を自由給与した。投与量が体重 kg 当たり 2.5 ml になるように調製した PCB126 およびコントロール群のコーンオイルは、ゾンデを用い経口からの強制投与を行った。投与回数は単回投与と 4 日間連続投与の 2 つの条件で行い、いずれも最終投与 24 時間後に剖検を行った。SD ラットをクロロフォルムで麻酔し安楽死させた後、後大静脈より採血し、腹腔内より肝臓を摘出した。血液は直ちに遠心分離を行い血清画分を得て血清分析に供した。肝臓は直ちに 1.15 % KCl による還流洗浄を行い、重量を測定した後、ミクロソーム調製に供した。本論文で行った研究は麻布大学動物実験ガイドラインに従って実施した。麻布大学動物実験ガイドラインは OPRR (Office for Protection from Research Risks) の承認を受けたものである (承認番号:A5393-01)。

2) 血清値の測定

血清分析は、ディスクリート方式臨床科学自動分析装置 COBAS MIRAS 28-3408 (Roche Diagnostics Division 社)を用い、総タンパク量 (S-TP: serum total protein), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST: aspartate aminotransferase), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT: alanine aminotransferase), アルカリフォスファターゼ (ALP: alkaline phosphatase), γ -グアノシン 5'-三リン酸 (γ -GTP: γ -guanosine 5'-triphosphate), 総コレステロール (Tch: total cholesterol), トリグリセリド (TG: triglyceride), 血清ビリルビン (T-Bil: total bilirubin), および乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH: L-lactate dehydrogenase) について測定した。

3) ミクロソームの調製

肝臓約 4 g を氷上にて $2 \sim 8$ °C 程度に保ちながらメス等で細かく切り刻み、

2~3 倍量の EB-KCl にて十分に混和した後、ポッター型ホモジナイザー (IUCHI 社) で 1,200 rpm で 10 分間の均質化を行った。得られた均質液を 9,000×g で 20 分間遠心分離し上清を得た。得られた上清は超遠心で 105,000×g で 60 分間の遠心を行い、赤色の沈査をマイクロソーム画分として得た。マイクロソームは次の実験に供試するまで -80 °C にて保存した。

4) ウェスタンブロッティング法による抗体試験

適当量のマイクロソームに 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) を等量添加し、Ultrasonic (Nissei 社) で均質化を行った後、タンパク量の最終濃度が 1.04 mg/ml となるように同上の Tris-HCl で希釈し調製した。タンパク量の測定は DC プロテインアッセイキット (Bio-Rad 社) による Lowry 法にて算出した。調製したサンプル 93 ml をローディングバッファー 100 ml と十分に混和し SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供した。また、陽性コントロールとして 3-MC によって肝障害を誘発させた SD ラット肝臓より調製したマイクロソームを用いた。

泳動用ゲルは濃縮ゲル 4 %, 分離ゲル 12 % のプレキャストゲル レディゲル J (Bio-Rad 社) を使用し、ミニプロティアン 3 Cell システム (Bio-Rad 社) にて 100 V で 2 時間の泳動を行った。なお、分子量マーカーには ECL Western blotting kit の分子量マーカー (Phosphorylase b, 97,400; Catalase, 58,100; Alcohol dehydrogenase; 39,800; Carbonic anhydrase, 29,000; Trypsin inhibitor, 20,100; Lysozyme, 14,300) を用いた。泳動後、ミニトランスブロットシステム (Bio-Rad) により、ニトロセルロースメンブラン (Amersham Pharmacia Biotech 社) に転写した。次に、メンブランに転写したタンパク質を ECL Western blotting kit の MBR 固定試薬にて固

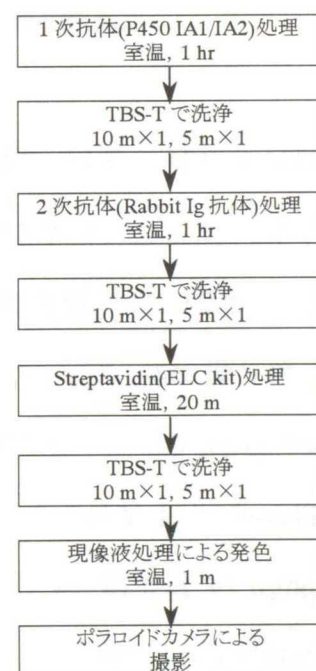


図 6 抗体検出のフローチャート

定した。固定したタンパクは図 6 のフローチャートの順に基づいて免疫染色し、ポラロイドカメラにて撮影した。

5) 統計処理

すべての統計処理は Microsoft Excel にて行った。血清値 S-TP, AST, ALT, ALP, Tch, TG, T-Bil, および LDH は、採択域を 98 % に設定し棄却検定を行い、得られたデータの投与群ごとの平均値において t 検定による分析を行った。血清値 γ -GTP は、データの投与群ごとの平均値において t 検定による分析を行った。

結 果

1) 実験動物

本研究のすべての PCB126 投与条件において、実験動物が死亡することはなかった。PCB126 投与による SD ラットの体重減少および体重当たりの肝臓重量の増加は雌雄ともに見られなかった。解剖所見において、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw) の PCB126 単回もしくは 4 回投与ラットでは胃腔内残余物が少なく、試料の摂取量が低下していることが示唆された。

2) 血清値

PCB126 を単回投与したラットの血清値の S-TP, AST, ALT, ALP, γ -GTP, Tch, TG, T-Bil, および LDH の値 (平均 \pm 標準偏差) を表 7 に示した。なお、雌雄におけるデータの差が見られなかったため雄の血清値について示した。その結果、S-TP, AST, ALP, および LDH において、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群まで各血清値は増加傾向を示し、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群において 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群と同等レベルまで血清値が減少する傾向を示した。ALT および γ -GTP 値では 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群においてのみ、Tch および TG 値では 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群以上において、それぞれの値が増加した。T-Bil はいずれの

表 7 PCB126を経口投与した単回投与したSDラットのS-TP, AST, ALT, ALP, γ -GTP, Tch, TG, T-Bil, およびLDH値(n=8)

投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg bw}$)	S-TP (g/dl)	AST (unit/liter)	ALT (unit/liter)	ALP (unit/liter)
PCB126				
0 (Control)	2.70 \pm 0.72	41.0 \pm 8.8	23.8 \pm 3.3	226.8 \pm 24.6
0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3.28 \pm 0.78	56.3 \pm 10.2	25.3 \pm 4.9	253.5 \pm 84.6
3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3.60 \pm 0.51	52.0 \pm 5.3	26.8 \pm 3.3	267.2 \pm 50.8
30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4.30 \pm 0.42*	77.2 \pm 9.8*	38.3 \pm 3.1*	366.8 \pm 34.5*
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3.40 \pm 0.06	59.2 \pm 14.7	26.6 \pm 3.3	273.0 \pm 17.2*

投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg bw}$)	γ -GTP (unit/liter)	Tch (mg/dl)	TG (mg/dl)	T-Bil (mg/dl)	LDH (unit/liter)
PCB126					
0 (Control)	0.13 \pm 0.05	22.3 \pm 1.5	68.4 \pm 13.0	0.16 \pm 0.026	243.8 \pm 95.0
0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.25 \pm 0.06	27.2 \pm 7.0	52.0 \pm 15.3	0.15 \pm 0.036	274.0 \pm 74.2
3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.13 \pm 0.06	26.8 \pm 5.1	63.3 \pm 14.5	0.20 \pm 0.040	441.0 \pm 91.0*
30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.38 \pm 0.12	36.5 \pm 1.7*	111.9 \pm 26.5*	0.23 \pm 0.062	506.9 \pm 212.7*
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.25 \pm 0.06	33.0 \pm 4.1*	96.2 \pm 11.9*	0.19 \pm 0.021	386.0 \pm 143.9

* コントロールに対して危険率5%で有意差が認められたもの

PCB126投与条件においても数値の変化は見られなかった。

各血清値においてコントロール群に対する各 PCB126 投与群における *t*-検定を行ったところ、S-TP, AST, および ALT は 30 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群において、ALP, Tch, および TG は 30 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ および 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群において、LDH では 3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ および 30 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群においてそれぞれ有意差が認められた ($p < 0.05$)。 γ -GTP および T-Bil ではいずれの投与群においてもコントロールに対して有意差は認められなかった。

3) PCB126 投与による肝臓での CYPIA1 および CYPIA2 の検出

図 7 に PCB126 を 0, 0.3, 3, 30, および 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ で 4 日間連続経口投与した SD ラット肝臓ミクロソーム画分における CYPIA1 の誘導について示した。3-MC を 20 mg/kg bw 条件で 4 日間連続経口投与した SD ラット肝臓ミクロソーム画分を陽性コントロールとしてレーン G に泳動した。その結果、3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群以上で分子量約 58,000 にバンドを検出し CYPIA1 の誘導を確認した。PCB126 の投与量に依存してバンド濃さが増す傾向にあった。また、PCB126 を単回投与した場合も 3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 以上で CYPIA1 の誘導は確認で

き、投与濃度が増すにつれその誘導量(バンドの濃さ)も増加した(データ省略)。

一方、PCB126 を 0, 0.3, 3, 30, および 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ で 4 日間連続経口投与した SD ラット肝臓マイクロソーム画分における CYP1A2 の誘導について図 8 に示した。その結果、CYP1A1 の場合と同様、3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群以上で分子量約 58,000 に CYP1A2 の誘導を確認した。単回投与試験には 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上でその誘導を確認した(データ省略)。

考 察

本 研 究 で は ，

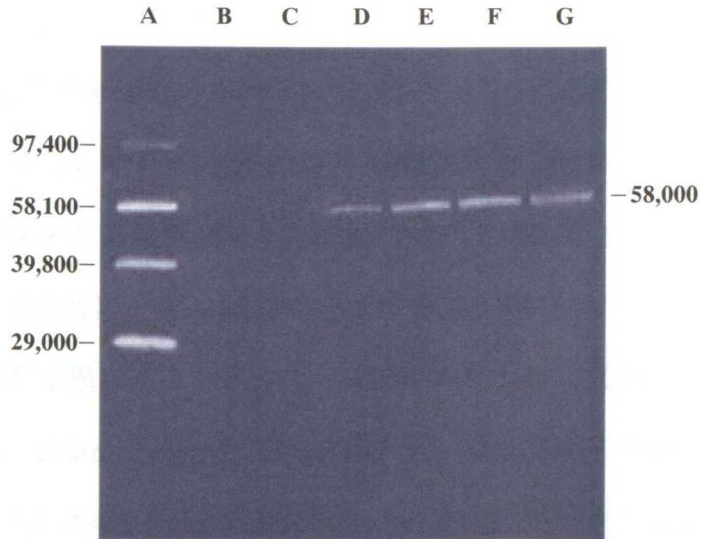


図7 PCB126を4日間連続で経口投与したSDラット肝臓マイクロソーム画分の抗体試験によるCYP1A1の検出

- A: 分子量マーカー(ELC-kit)
- B: コントロール群(コーンオイル)
- C: 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4回 経口投与群
- D: 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4回 経口投与群
- E: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4回 経口投与群
- F: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4回 経口投与群
- G: 3-MC(陽性コントロール)

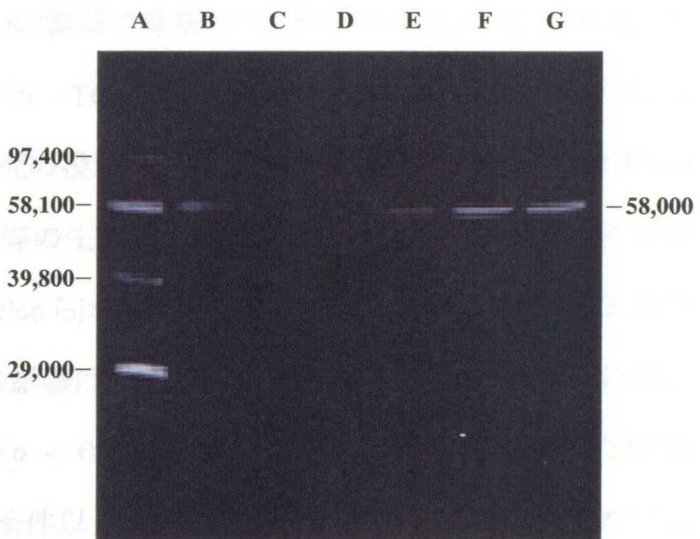


図8 PCB126を4日間連続で経口投与したSDラット肝臓マイクロソーム画分の抗体試験によるCYP1A2の検出

- A: 分子量マーカー(ELC-kit)
- B: 3-MC(陽性コントロール)
- C: コントロール群(コーンオイル)
- D: 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4回 経口投与群
- E: 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4回 経口投与群
- F: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4回 経口投与群
- G: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4回 経口投与群

PCB126 を暴露したラットの体重および肝臓重量について測定を行ったが、いずれの投与条件でもそれらに及ぼす影響はみられず、これは PCB126 の投与量が大量ではなく、また投与終了後 24 時間の比較的時間を置くことなく剖検を行ったことによるものと考えられる。種々の実験動物による試験において PCBs を生体に暴露すると、体重が減少すると共に一部の臓器が肥大することが知られているが、PCB 種によりその影響は異なるようである。DeVito ら[62]は、TCDD、PCB126、2,3,3',4,4'-Penta chlorobiphenyl (PCB105)、2,3',4,4',5-Penta chlorobiphenyl(PCB118)、2,3,3',4,4',5-Hexa chlorobiphenyl(PCB156)、もしくは 3,3',4,4',5,5'-Hexa chlorobiphenyl(PCB169)を、WHO に基づく毒性等価量に換算し B6C3F1 マウスに1週間当たり5回の条件で13週間経口投与した際の体重当たりの肝臓、脾臓、胸腺、子宮、および肺の重量について報告している。PCB126 における総投与量は 2.925 ~ 97.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と、本研究の単回投与条件量とほぼ同様である。その結果、PCB105、118、および 156 において13週間の投与を経て、肝臓やいくつかの臓器で重量がコントロールに比べて2倍近く肥大しているのに対し、PCB126、TCDD および 169 で臓器重量に変化がないことを明らかにしており、本研究の投与条件下における結果と一致した。PCB126 による体重減少や肝臓肥大等の生体影響は、非常に高濃度の暴露量で引き起こされるようであり、Van Birgelen ら[86]の報告では1日当たり7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で13週間連続暴露条件下で体重への影響はなく、同じく50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の条件下において影響がみられるとしており($p < 0.05$)、Chu らの報告[80]では1日当たり10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で13週間連続暴露条件以上において、肝臓/体重値がコントロールに比べて高としている($p < 0.05$)。

PCBs や PCDDs 等のダイオキシンが一定量暴露されると、主に肝障害の指標となる血清値に変化がみられることが知られている。ヒトにおいて、Smith ら[87]はアメリカの Bloomington の発電所で働く 228 人について AST, g-GTP, TG, およ

び Tch が一般の人よりも高いことを, Steinberg ら[79]はジョージア州内の蓄電、発電関連工場のワーカーで AST および ALT が高いことを報告している。また、ラットでは7.4 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ で2週間、飼料からPCB126を経口投与したラットの ALP, AST, Tch および T-Bil において、コントロールと比較して高い値を示す一方で($p < 0.05$), その差はわずかであったことが報告された[80]。本研究では, S-TP, AST, ALT, ALP, Tch, TG および LDH で 30 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /単回投与レベルにおいてコントロールより高い値を示し($p < 0.05$), 一般的な肝障害に比べて差がわずかであるという Chu ら[80]の結果とほぼ一致した。肝障害モデル動物作製に有機溶剤の1つである CCl_4 を用いる系が知られている。PCB126 との毒性量の相関は難しいものの、一般的モデル系での暴露量である 1.3 $\text{g}/\text{kg bw}$ /単回の CCl_4 を尾静脈投与した際に得られる血清値 AST, ALT, および LDH の値はそれぞれ 225 ± 39 , 98 ± 34 , および 332 ± 44 unit/litter であり[88], 肝・胆道疾患や急性肝炎の顕著な指標となりうる AST および ALT 値は, 表 7 に示した本研究結果よりもオーダーレベルで高く, PCB126 による肝障害は比較的に低いものと推察される。いずれの血清値も, 最も高い 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /単回投与条件の値よりも 30 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /単回条件の値の方が低い値を示したが, これは 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /単回が肝機能自体を抑止する投与濃度であったものと推察される。一方, 血清値変化の投与量依存性であるが S-TP および LDH の 0~30 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /単回の投与条件において, その傾向がみられるものの 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /単回投与では一連の傾向が伺えず, 血清値を指標とする PCBs 暴露量の測定は難しいものと思われる。

既知報告[17,80,83-85]と同様に, 本研究の PCB126 投与条件においても, SD ラット肝臓で CYPIA1 および CYPIA2 の誘導が確認された。PCB126 高濃度投与量である 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 量の 4 回投与で CYPIA1 および CYPIA2 の誘導量が増しており(図 7, 8), 高濃度暴露量での投与量依存性について生体指標としての可能性が示唆された。正常な状態であっても微量ではあるが CYPIA1 およ

び CYPIA2 は肝臓中に存在することが知られている。しかし、本研究でのコントロール群や PCB126 低濃度暴露群でそれらのバンドが検出されなかったが、これは抗体試験法における検出限界を下回ったことによるものと考えられる。図 8 の D レーンや低濃度条件での PCB126 単回投与において、バンドが確認できなかったことが CYPIA1 もしくは CPYIA2 の誘導がなされなかったとの結論には至らないと考える。

本研究で設定した投与量が実験動物を死亡させることなく、モデル暴露量の試験において適当であることを認めた。また、P450s の誘導は PCB126 の高濃度暴露条件においても投与量に依存した増加傾向を示し、この結果は PCBs 暴露量の定量として、生体内ヘムが指標となることを示唆するものであった。

要 約

本章では PCBs 暴露のモデル系として、ヒトが一生で暴露されるであろう総量を算出し、その量を基準に 50 倍量を上限に短期間に暴露した際の生体影響について検討することを目的とした。

PCB126 を 0.3, 3.0, 30, および 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 条件で単回もしくは 4 回経口投与した SD ラットを、PCBs 暴露モデル動物として供試した。投与終了 24 時間後に安楽死させ血液および肝臓を採取し、血清値を測定し、肝臓中のマイクロソーム画分において CYPIA1 および CYPIA2 を検出した。血清値では S-TP, AST, ALT, ALP, Tch, TG, および LDH で PCB126 投与による数値の変化がみられたが、投与量依存的な変化はなかった。CYPIA1 では 3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /単回もしくは 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /4 回投与条件以上で、CYPIA2 では 30 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /単回および 3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /4 回投与条件において共に誘導が確認され、それぞれの誘導量は投与濃度に依存して増加する傾向にあった。

すなわち、本研究で設定した PCBs 暴露モデル動物の作出において PCB126

の投与量が適切であることを示すと共に、PCBs の暴露量を検討していく上で、生体内へムである P450 が生体内指標となりうる可能性を示唆した。

第3章 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl を経口投与した Sprague-Dawley ラットの脳, 脾臓, 腎臓, 肝臓および肝マイクロソーム画分の EPR スペクトル

緒言

P450s は多くの動植物組織, カビ, 酵母のマイクロソーム, 一部の動物組織のミトコンドリア内膜に結合しているほか, ある種の細菌では可溶性の形で存在している[50]。機能的には, 各種のステロイドホルモン, 胆汁酸, プロスタノイドの合成・分解反応, 脂肪酸の ω 酸化, ビタミン D の活性化反応など多岐にわたる生体物質のほか, 無数の外来薬物や体内にとり込まれた環境汚染物質などの酸化分解反応に関与し[50,89], PCBs の暴露においても P450s は誘導される。第2章において計算したが, ヒトが一生で被曝するであろうと考えられる等価毒性量を基準に PCB126 (3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$) を経口暴露した SD ラット肝マイクロソーム画分において, ヘム錯体である P450s (CYPIA1 および CYPIA2) が投与量に依存して誘導されることを確認した。

P450s による PCBs の代謝は, 4-mono chlorobiphenyl を投与したウサギ尿中に, 主として 4'-ヒドロキシ体やグルクロニドの排泄がみられるとの報告により, 既知の脂溶性生体異物と同様に水酸化を受けることが初めて推察された[47]。その後の研究により単一 PCB の代謝研究が精力的に行われ, 現在では以下に示した事実が明らかとなってきた[90,91]。

- ①4 塩素化体以下の低塩素化 PCB は, ほとんどすべてモノフェノール体に代謝されるが, 一部ではジフェノール体も生成される。
- ②5 および 6 塩素化 PCB のあるものは, モノフェノール体に酸化されるが, その速度はかなり遅い
- ③7 塩素化体以上の高塩素化 PCB は, ほとんど代謝されない。
- ④同じ塩素数を有する PCB では, 隣り合わせに未置換部があるものやオルト

位に塩素置換を有するものの方が代謝されやすい。

P450s は PCBs を水酸化し脂溶性物質から水溶性物質へと代謝、すなわち PCBs を排出する過程で大きな役割を担っている。しかしながら、過度な P450s の誘導は様々な酸化ストレスを引き起こす。PCBs の暴露によってそれらが最も蓄積されるであろうと考えられる肝臓では、P450s の過度な誘導が活性酸素種を多量に産生し発ガンに関与していると示唆されている[92,93]。また、誘導された P450s によってキノン類が形成され、それが肝臓にダメージを与えているなどの報告もある[94]。魚類では、環境汚染による疾患のメカニズムは肝臓における活性酸素種の過剰生成によるものであるとしている[52]。P450s は肝臓以外の臓器に存在するが、脳でも PCBs の暴露によって誘導され、活性酸素や過酸化脂質産生および DNA 損傷が誘導され、結果的に神経障害などを引き起こすことが示唆されている[51,54,58,94,95]。その他、腎臓や脾臓においても P450s 由来の活性酸素による酸化ストレスの可能性が示唆されている[56,57,96-98]。

本章では、PCB126 を経口投与したラットの脳、脾臓、腎臓、肝臓、および肝ミクロソームにおいてヘム錯体の、主に、P450s について EPR 法による検出を試み、それらが PCB126 暴露の指標となるかを検討した。

EPR 法の対象はラジカルや遷移金属などの常磁性物質をもつ物質であり、P450s はその 1 つである。ヘム鉄は+1 価～+4 価までの 4 つの酸化状態をとるが [99]、EPR 法で検出可能なのは+3 価の状態であり、P450s も+3 価の状態をとりうる。また、検出感度においても、EPR 法は可視吸収スペクトル、赤外吸収スペクトル、ラマンスペクトルや、同じ原理である NMR 等に比べて非常に高いことが知られており[6]、本研究ではその利点に着目した。

材 料

PCB126 暴露モデル動物に関する供試動物および供試試薬については第 2

章の通りである。

方 法

1) PCB126 暴露動物の作出, および各臓器の摘出

PCB126 暴露動物の作出方法および肝臓の摘出は第 2 章の記載に準じた。なお, PCB126 の投与回数はすべての実験を単回にて行った。脳, 脾臓, および腎臓は摘出後 1.15 % KCl 緩衝液中で十分に還流し, それぞれの重量を測定した後, EPR 法に供試した。

2) 肝マイクロソームの調製

肝マイクロソームの調製は第 2 章に準じた。

3) EPR 測定

a) サンプル調製および充填

各臓器はメスを用いて適当なサイズ(3 mm 角程度)に細かく切り刻み, 2.5 ml シリンジ(TERUMO 社)に 800 mg 程度充填した。次に, 充填専用の注射針(310 mm, ϕ 1.8 mm, 特注)を用い EPR 石英サンプルチューブ LST-5HS(LABOTEC 社)に, 体積量約 600 cc(サンプルチューブ底面より約 5 cm)のサンプルを気泡が入らないように留意しながら充填し, サンプルチューブ専用キャップで密閉した後, 液体窒素にて急速凍結を行った。なお, 凍結の際はサンプル膨張によるチューブ破損に注意しながら, チューブ底面部より, 徐々に凍結した。凍結したサンプルチューブは測定まで液体窒素中にて保持した。

b) 装置設定および掃引

本研究で用いた EPR 装置 JES-TE300(日本電子社)は図 9 に示すように分光計ユニット(TE: 日本電子社), 励磁電源ユニット, X-バンドマイクロ波発振ユニット, 電磁石, および TE モードキャビティとデータ制御用パー

ソナルコンピュータ(PC)から構成される。EPR装置は、解析用PCの電源ならびに電磁石冷却水の還流を確立し、次にTE分光計ユニット(図9, A)にある主電源にて装置全体を起動する。起動後TE分光計ユニットのタッチ

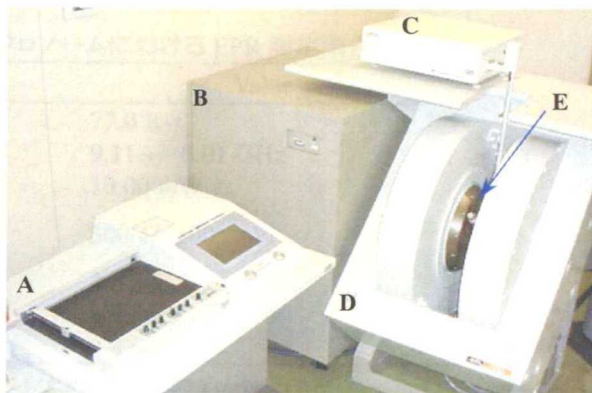


図9 EPR装置 JES-TE300(日本電子社)

- A: TE分光計ユニット
- B: 励磁電源ユニット
- C: X-バンド マイクロ波発振ユニット
- D: 電磁石
- E: TEモードキャビティ

パネル上に表示される自己診断結果で異常がないことを確認した後、サンプルセッティング画面(SHF)に移行する。

一方、データ制御用PCのMicrosoft Windows 98上にてEPR analyzerアプリケーションソフト(日本電子社)を起動し、MS-DOSモード上でEPR analyzerが起動することを確認する。次に、TEモードキャビティ(図9, E)に窒素ガスを循環させる(液体窒素条件下で測定の場合)。また、液体窒素を満たしたデュワ内にサンプルチューブをセットし、TEモードキャビティにデュワをセットし、TE分光計ユニットのタッチパネルにてキャビティ状態を調整する。調整後、データ制御PCから測定条件を設定する。

脳および脾臓の測定条件を表8に、腎臓、肝臓、および肝マイクロソーム

表8 脳および脾臓におけるEPR測定条件

Parameter	Value
Temperature (T) * ¹	77.0 K
Frequency (Fr) * ¹	9.11 +/- 0.01 GHz
Power (Pw) * ¹	10.00 mW
Center Field (Fd) * ¹	310 +/- 50* ² , 130 +/- 50* ²
Sweep Width (SW) * ¹	
Sweep Time (ST) * ¹	4.0 min
Modulation Width (MW) * ¹	0.32 mT
Time Constant (TC) * ¹	0.3 sec

*¹ ()内は略語。日本電子社に基づくものであり一般的な略語ではない。

*² パラメータ値は Fe +/- SW で記載。

表 9 腎臓、肝臓および肝マイクロソームにおける EPR 測定条件

Parameter	Value
Temperature (T) * ¹	77.0 K
Frequency (Fr) * ¹	9.11 +/- 0.01 GHz
Power (Pw) * ¹	10.00 mW
Center Field (Fd) * ¹	300 +/- 100* ²
Sweep Width (SW) * ¹	300 +/- 100* ²
Sweep Time (ST) * ¹	4.0 min
Modulation Width (MW) * ¹	0.32 mT
Time Constant (TC) * ¹	0.3 sec

*¹ ()内は略語。日本電子社に基づくものであり一般的な略語ではない。

*² パラメータ値は Fe +/- SW で記載。

の測定条件を表 9 にそれぞれ示した。すなわち脳および脾臓は 310 ± 50 および 130 ± 50 mT の磁場領域で、腎臓、肝臓、および肝マイクロソームは 300 ± 100 mT の磁場領域で測定した。

測定条件を設定した後、EPR 掃引を開始し、測定結果をデータコンバータによって Windows プラットフォームのファイル形式に変換保存した。こ

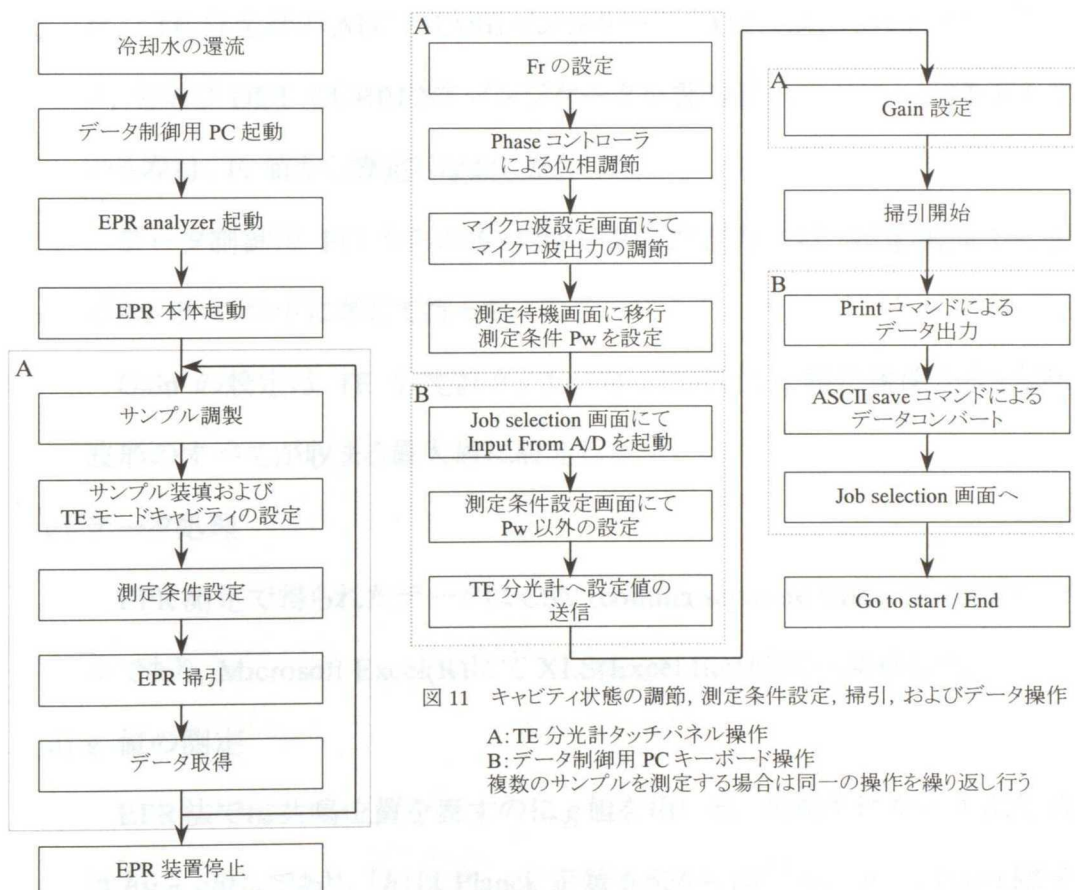


図 10 EPR 測定のプロフローチャート

サンプル数が複数の場合は作業 A を繰り返す。

図 11 キャビティ状態の調節, 測定条件設定, 掃引, およびデータ操作

A: TE 分光計タッチパネル操作

B: データ制御用 PC キーボード操作

複数のサンプルを測定する場合は同一の操作を繰り返す。

の一連の作業のフローチャートを図 10 に示した。また、キャビティ状態調節、測定条件の設定からデータの取得ならびに保存までの詳細な手順を図 11 にフローチャートとしてそれぞれ示した。

図 11 の Frequency (Fr)の設定において、極端にマイクロ波位相がずれる、マイクロ周波数の位相が逆転するなどの場合は、EPR 本体のリファレンスアームを off にした状態で周波数を可変した。位相調節においては SHF 画面上に表示される V 字型波形の左右が対称的になるように調節を行った。マイクロ波の出力は TE 分光計の DET CURRENT インジケータを指標に、Power の増減によるマイクロ波の出力が安定することを確認した。不安定な場合は Coupling パラメータ値を変更し、安定する状態を検索した。Coupling パラメータ値を変更した際は、再度、位相調節を行った。この時点で TE 分光計の AFC PHASE インジケータ、AFC BALANCE インジケータ、および DET CURRENT インジケータが警告値(レッドゾーン)を示している際は、Fr 値から設定しなおした。

データ制御用 PC からの各パラメータの設定方法は、設定画面下に表示されるコマンドに準じて行った。

Gain の設定は TE 分光計タッチパネルにて行い、特に説明がない限り波形のすべてが収まる最大値に設定した。

c) データ処理

EPR 測定で得られたデータは CSV (comma separate value) 形式のファイルであり、Microsoft Excel(R)にて XLS(Excel file)形式へ変換した。

d) g 値の測定

EPR 法では共鳴位置を表すのに g 値を用いる。共鳴条件を示す関係式は $h\nu = g\beta H_0$ であり、「h」は Planck 定数 6.626×10^{-34} Js、「 β 」は Bohn 磁子 9.72×10^{-34} Js を示す。また、「 ν 」は光の振動数すなわちマイクロ波周波数

を、「 H_0 」は磁場強度を示す。よって $g = (h / \beta) \cdot (\nu / H_0)$ であり、 g 値は共鳴時のマイクロ波周波数と磁場との比を表すものであり、したがって、マイクロ波の周波数帯が変化しても、共鳴磁場が変化しても、同一の試料に対して g 値は不変の値を示す[100-102]。

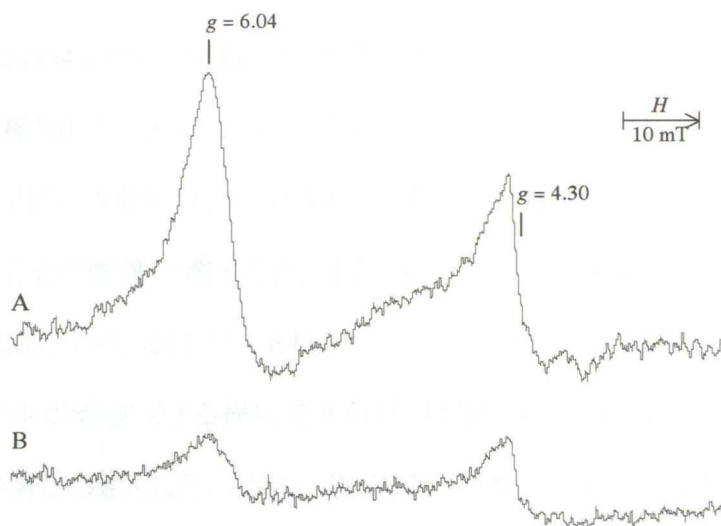
g 値の決定は、一般的には既知の標準物質を指標とする比較によって行われる。代表的な標準物質として DPPH(ジフェニルピクリルヒドラジル)の $g = 2.0036$ や 2 価のマンガン(Mn^{2+})の低磁場側より 3 本目の $g = 2.034$ 、同じく 4 本目の $g = 1.981$ がある。また、近年ではコンピュータによる算出法も可能となっている[101]。

本研究では、サンプルが生体試料であることを考慮し、コンピュータによる g 値の決定を試みた。また、生体中に Mn^{2+} 等の指標となる化学物質が検出される場合は、それらを基準に g 値の補正を行った。また、 g 値の誤差を限りなく小さくするため、数値の決定を行う際は掃引幅が 200 mT 以内のデータを用いた。これは広範囲の磁場での測定を行うと EPR 装置の性能に依存して磁場の変動が必ずしも正比例的に増加しないことによるからである。

結果

1) 脳の EPR スペクトル

コントロールおよび PCB126 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与 SD ラット脳の低磁場領域での EPR スペクトル



を図 12 に、同じくそ

図 12 PCB126 を経口投与した SD ラット脳の低磁場領域での EPR スペクトル
A: コントロール群(コーンオイル投与)
B: PCB126 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群

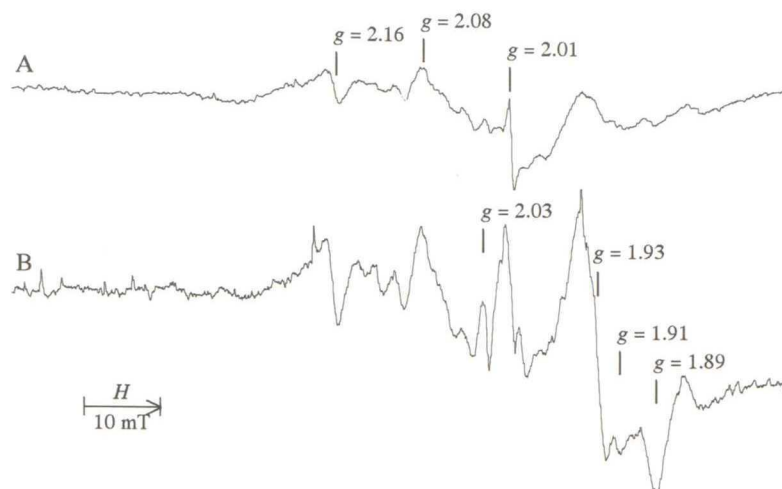


図 13 PCB126 を経口投与した SD ラット脳の高磁場領域での EPR スペクトル

A: コントロール群 (コーンオイル投与)

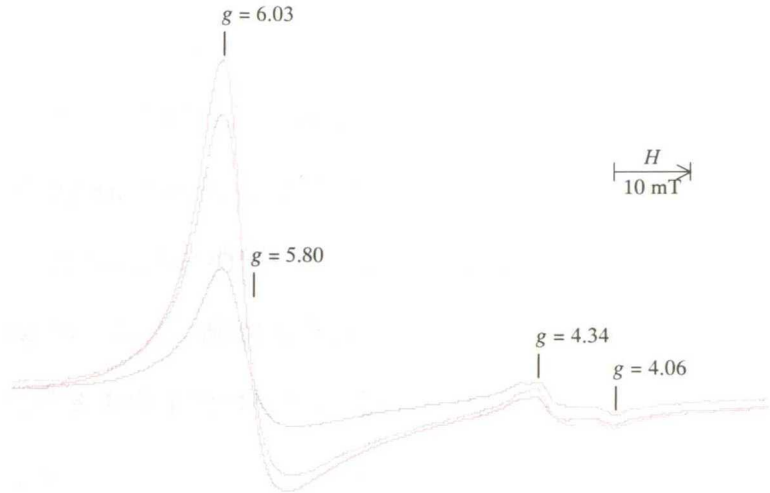
B: PCB126 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群

の高磁場領域の EPR スペクトルを図 13 にそれぞれ示した。まず、低磁場領域では正常ラットおよび PCB126 投与ラットのいずれにおいても、 $g = 6.04$ にピークをもつシグナルと $g = 4.30$ を中心にピークをもつシグナルの 2 つのシグナルが検出された。なお、PCB126 を投与した脳のスペクトルではいずれのシグナルもその強度において、減少する傾向を示した。この傾向は 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与条件以上でみられ、最大投与条件 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw でもシグナルは消失しなかった。また、このシグナル変化において投与濃度との相関性は示されなかった。

一方、高磁場領域ではコントロールおよび PCB126 投与群においていずれも複数のシグナルを検出した。 $g = 2.16$ を中心にピークをもつシグナルと、 $g = 2.08$ および 2.01 にピークをもつシグナルは正常な脳で検出されたが、PCB126 の投与によってその強度が増大した。また、 $g = 1.93$ を中心にピークをもつシグナルと $g = 2.03$, 1.91, および 1.89 にピークは、正常ラットにおいて痕跡レベルでのシグナルが確認できる程度であるが、PCB126 の投与によってそのシグナル強度が著しく増大した。なお、PCB126 が及ぼす影響は、いずれのシグナルも低磁場と同様に 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与条件以上で見られ、シグナル強度の変化において投与濃度との相関は認められなかった。

2) 脾臓の EPR スペクトル

PCB126 を経口投与した SD ラット脾臓の低磁場領域での EPR スペクトル



を図 14 に示した。

図 14 PCB126 を経口投与した SD ラット脾臓の低磁場領域での EPR スペクトル

その結果, $g =$

- : コントロール群(コーンオイル投与)
- : PCB126 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群
- : PCB126 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群

5.80 で交差し, g

$= 6.03, 4.34, \text{ および } 4.06$ にピークを持つ 3 つのシグナルを検出した。 $g = 6.03$ のシグナルは正常ラットでも検出され, PCB126 の投与によってそのシグナル強度が増大した。また, このシグナル強度は PCB126 の投与濃度が増すにつれて強くなる傾向にあり, PCB126 投与濃度とシグナル強度の相関を認めた。一方, $g = 4.34$ および 4.06 シグナルは PCB126 の投与による強度の変化はみられなかった。

図 15 に PCB126 を経口投与したラット脾臓の高磁場領域での EPR スペクトルを示した。正常ラット脾臓の EPR スペクトルでは $g = 2.011$

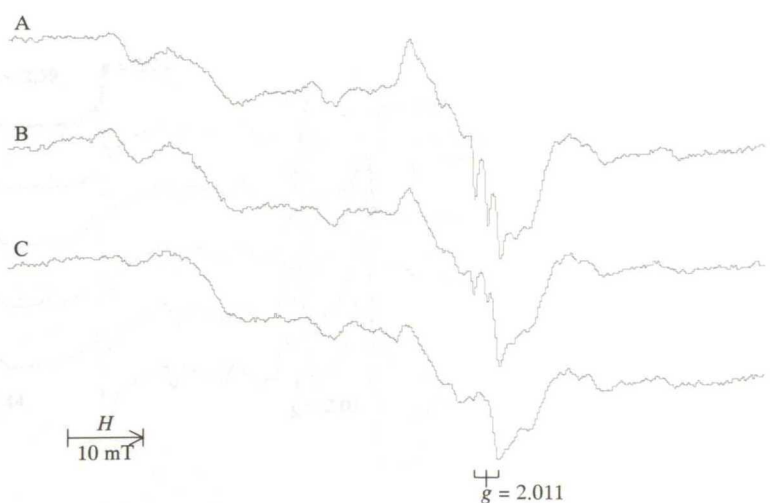


図 15 PCB126 を経口投与した SD ラット脾臓の高磁場領域での EPR スペクトル

- A: コントロール群(コーンオイル投与)
- B: PCB126 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群
- C: PCB126 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群

を中心に3本の超微細構造を示すシグナルが検出された。PCB126投与によるこのシグナルへの影響は0.3および3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bwでは認められなかった(データ省略)。一方, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw投与条件でシグナルの強度が弱くなり, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw条件下ではほとんど消失した。投与濃度とシグナル強度との相関において, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw以上の高濃度条件では若干のシグナル減少傾向がみられたものの, 低濃度条件下ではそれは認められなかった。

3) 腎臓のEPRスペクトル

PCB126を経口投与したSDラット腎臓の高磁場領域のEPRスペクトルを図16に示した。なお, 低磁場領域でのEPRスペクトルでは, 弱いシグナルのみで大きな変化はなかった(データ省略)。

腎臓の高磁場領域でのスペクトルも正常ラットおよびPC126投与ラットのいずれにおいても非常に複数のシグナルが確認された。なお, どちらか片方のみで特異的に検出されるシグナルも検出されなかった。PCB126の投与による変化は $g = 2.24$ を中心にピークをもつシグナルと $g = 2.39$ および 1.90 にピークを持つシグナルで確認され, 前者は3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw投与条件以上で, 後者は30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw投与条件以上でそれぞれそのシグナル強度が増大した。い

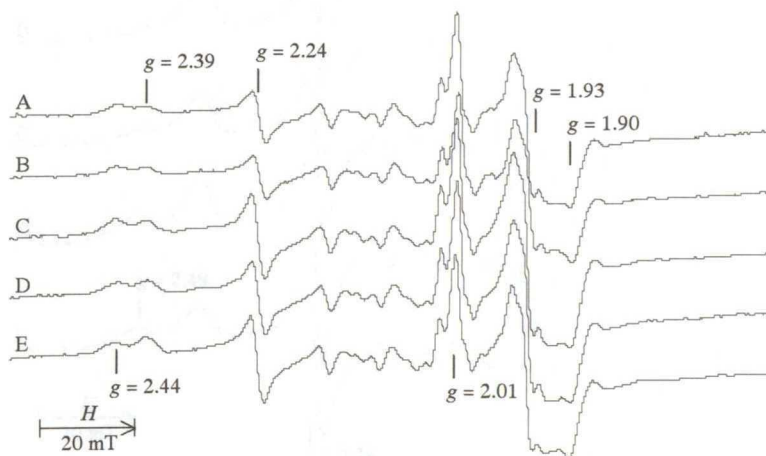


図16 PCB126を経口投与したSDラット腎臓の高磁場領域のEPRスペクトル

- A: コントロール群(コーンオイル投与)
- B: PCB126 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群
- C: PCB126 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群
- D: PCB126 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群
- E: PCB126 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与群

ずれのシグナル強度の変化においても投与濃度との依存における相関は認められなかった。

4) 肝臓の EPR スペクトル

PCB126 を経口投与した SD ラット腎臓の高磁場領域の EPR スペクトルを図 16 に示した。なお、低磁場領域での EPR スペクトルでは PCB126 投与による一切のシグナル変化が認められなかった(データ省略)。

正常ラット肝臓の EPR スペクトルにおいて複数のシグナルを確認した。 $g = 2.24$ を中心にピークをもつシグナルおよび $g = 2.40$ にピークをもつシグナルは $3 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与条件以上で、 $g = 1.93$ にピークをもつシグナルは $100 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与条件でいずれもそのシグナル強度が弱まった。

一方、PCB126 を投与したラット肝臓の EPR スペクトルでは、正常ラットで検出されたシグナルに加え、 $g = 2.49$ にピークをもつシグナルが $3 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与条件以上で新たに検出され、投与濃度が増すにつれシグナル強度が増大

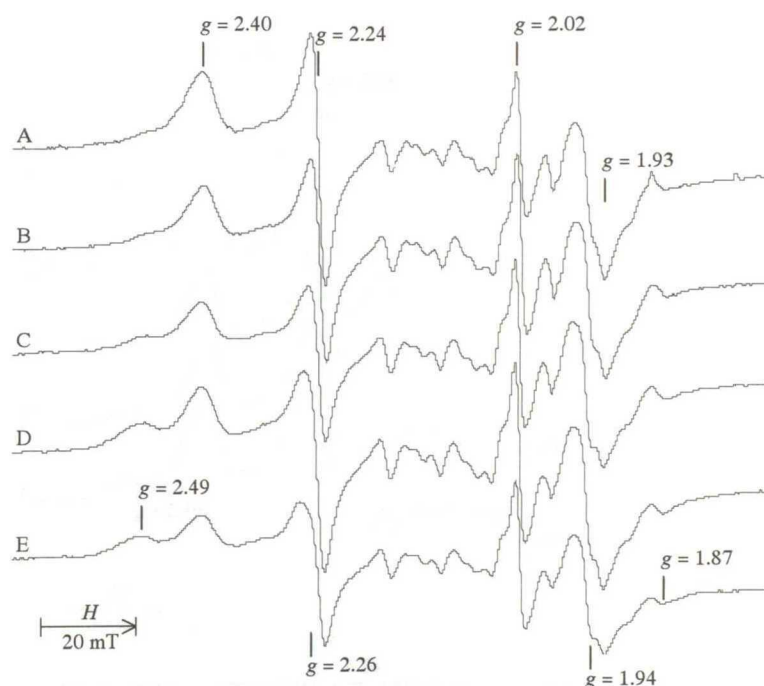


図 17 PCB126 を経口投与した SD ラット肝臓の高磁場領域の EPR スペクトル

- A: コントロール群(コーンオイル投与)
- B: PCB126 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群
- C: PCB126 3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群
- D: PCB126 30 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群
- E: PCB126 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群

する傾向を確認した。また、 $g = 1.87$ にピークをもつシグナルは $0.3 \mu\text{g/kg bw}$ 投与条件以上において、わずかであるがそのシグナル強度が増大した。さらに、PCB126を投与した肝臓のEPRスペクトルにおいて、新たに $g = 2.26$ を中心にピークをもつシグナルが $100 \mu\text{g/kg bw}$ 投与条件で明らかに確認された。これは、 $0.3 \mu\text{g/kg bw}$ 投与条件以上でも $g = 2.24$ のシグナルにおいて低磁場方向への歪みが生じ、全体のシグナル強度が低下し幅広いシグナルが出現する現象、すなわち $g = 2.24$ と $g = 2.26$ シグナルの複合型と思われるシグナルが検出された。

なお、 $g = 2.02$ および $g = 1.94$ にみられるシグナルについては後述する。

5) 肝マイクロソームの EPR スペクトル

肝臓サンプルより調製した肝マイクロソームのEPRスペクトルを図18に示した。正常ラット肝臓でも検出される $g = 2.40$, 2.24 , および 1.93 のシグナルはマイクロソーム画分でも同様に検出された。また、PCB126 投与群においても肝臓で

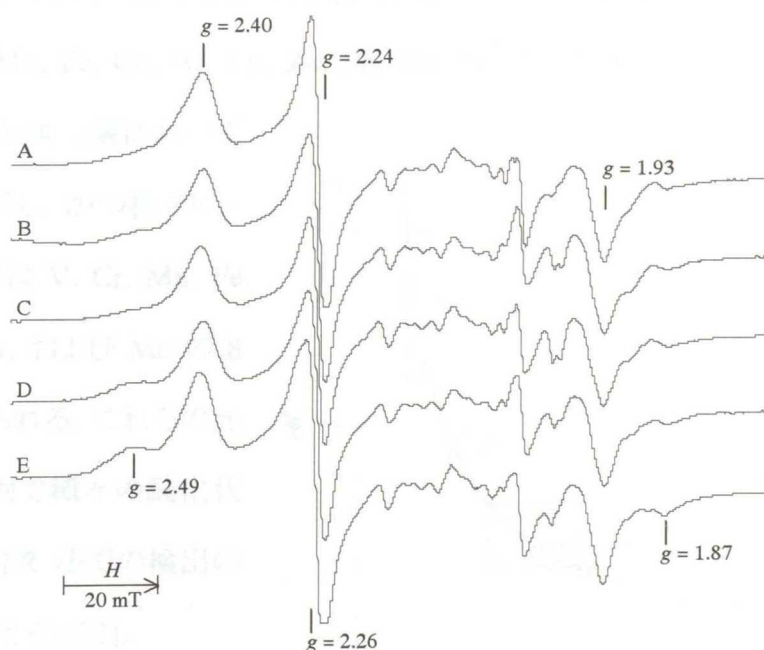


図18 PCB126を経口投与したラット肝マイクロソームの高磁場領域のEPRスペクトル

- A: コントロール群(コーンオイル投与)
- B: PCB126 $0.3 \mu\text{g/kg bw}$ 投与群
- C: PCB126 $3 \mu\text{g/kg bw}$ 投与群
- D: PCB126 $30 \mu\text{g/kg bw}$ 投与群
- E: PCB126 $100 \mu\text{g/kg bw}$ 投与群

検出される $g = 2.49, 2.26$, および 1.87 のシグナルが同様に検出され、また、これらシグナルの変化の強弱に若干の差はあるものの、その傾向は同様であった。肝臓とマイクロソームでの大きな違いは、肝臓で検出される $g = 2.02$ シグナルの強度が非常に弱いこと、肝臓で検出される $g = 1.94$ のシグナルが消失することの 2 点であり、PCB126 投与によって引き起こされた $g = 2.49, 2.26$, および 1.87 シグナルに対する影響はまったく確認されなかった。

考 察

地球上には 100 種類を超える元素が存在するが、生物は主としてタンパク質、核酸そして炭水化物などの有機化合物からなり、これらは C, H, O, N, S, および P の 6 大元素から構成される。しかし、生物が生命活動を営むには 6 大元素だけでは不十分であり、多種類の元素を必要とする。実際、生体においてほとんどすべての元素が見出されている。しかし、これら元素の中でも、ヒトを含めた哺乳動物の生存に不可欠とされる生元素は約 30 種類であり、そのうち、金属元素は V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Mo, Sn, および Pb の 12 種類である。この 12 種の金属元素において

常磁性を示し、かつ核スピンをもち元素は V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, および Mo の 8 種類に限られる。これらの元素は生体内で種々の酸化状態をとり、EPR 法での検出の対象となり得る[103]。

X-band における遷移金属イオンの観測される g 値分布

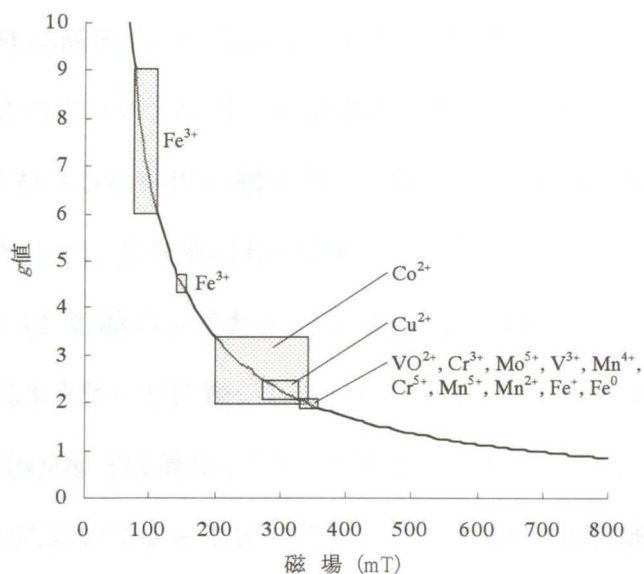


図 19 X-band における遷移金属イオンの観測される g 値分布[104]

$$\nu = 9.5 \text{ kHz}$$

$$g = 678.75 / x \text{ (mT)}$$

を図 19 に示したが、ここからもわかるように、低磁場領域に検出される Fe^{3+} 以外の遷移金属は 300 mT 前後に密集して検出される[104]。本章の図 12 および 14 に示した低磁場領域で検出されたシグナルがわずかであるのに対して、図 13, 15, 16, 17, および 18 で示した高磁場領域で検出されたシグナルが複数であることが理解できる。

一方、鉄を含むタンパク質は、ヘムタンパク質と非ヘムタンパク質に分けられる[105]。ヘムタンパク質は PCB126 投与によって誘導された P450s の他に、ヘモグロビン、ミオグロビン、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ等があり、後者の非ヘムタンパク質は、鉄-硫黄タンパク質であるフェレドキシソキシソ類やルブレドキシソ類と、フェリチンやトランスフェリンなどの鉄含有タンパク質があり生体では多岐にわたって存在している[105]。本章の各臓器においても PCB126 投与によって、高磁場および低磁場領域において様々な鉄含有タンパク質の発現が誘導もしくは抑制すると考えられる。

脳の低磁場領域の EPR スペクトルにおいて $g = 6.04$ と 4.30 にシグナルを検出した。生体試料において低磁場領域で得られるシグナルは Fe^{3+} であり、マイクロ波のエネルギーによって分裂した高スピン状態と中スピン状態であることが知られているが[105,106], $g = 6.04$ は高スピン状態に、 $g = 4.30$ は中スピン状態に当たると考えられる。また、この 2 つのシグナルはヘム錯体に典型的な EPR シグナルであり、ヘムの立体構造における対称性が軸対称から斜方的に歪んだ場合に分裂することに由来しており[107], 歪み率によって検出されるシグナルの g 値が異なる。既知の歪み率と図 12 の脳のシグナルとを比較すると、検出されたヘム錯体は哺乳類で検出されるカタラーゼに類似していることが示されるとともに、同じく哺乳類で検出される P450s とは異なることが示唆された[105]。一方、高磁場領域での EPR スペクトルにおいて $g = 2.40, 2.24, および 1.93$ 付近に典型的なシグナルをもつ P450s は検出されなかった(図 13)。正常ラット脳の高磁

場領域での $g = 2.1$ 付近のシグナルは Mn^{5+} に由来する[108,109], また, $g = 1.9$ 付近のシグナルは Cr^{3+} に由来するシグナルであると思われる[110-112] (図 13-A)。また, PCB126 を投与したラット脳のスペクトルにおいて強度が増した $g = 2.03, 1.93, \text{ および } 1.91$ のシグナルは Ohnishi ら[113]や King ら[114]の報告にあるコハク酸デヒドロゲナーゼの鉄-硫黄中心の EPR スペクトルに非常によく類似していた。コハク酸デヒドロゲナーゼはクエン酸回路や呼吸鎖において重要な酵素の一つであるが, それと PCB126 暴露による因果関係は現在のところ不明であり, 今後さらなる検討が必要であると思われる。

PCB126 投与による脳内における神経障害毒性が, P450s 等によって多量に産生される活性酸素が引き起こす酸化ストレスによるものであるとの報告を前述したが, 図 12, 13 に示した低磁場および高磁場領域の EPR スペクトルにおいて P450s と思われるシグナルは検出されなかった。一方で, 低磁場領域においてカタラーゼであると考えられるシグナルを検出した。カタラーゼは H_2O_2 を分子状酸素 (O_2) と H_2O に置換することを考えると, 脳内における酸化ストレスの新たなメカニズムの可能性を示唆するものである。しかしながら, 脳における EPR スペクトルは PCB126 暴露の指標とする点では不適切であると思われた。

図 14 および図 15 にラット脾臓の EPR スペクトルを示した。低磁場領域で検出された $g = 5.80$ に中心をもつシグナルは酸化型ヘモグロビンの典型的な波形を示しており, PCB126 の暴露によってその量が増したことがわかる。すなわち, 活性酸素種による酸化的ストレスが生じたものと思われる。しかしながら, 低磁場および高磁場領域のいずれにおいても P450s にみられる典型的な波形は, 正常ラット脾臓および PCB126 投与群の脾臓のいずれにおいても検出されなかった。これは, 脾臓においてヘモグロビンが酸化を受けたのではなく, 他の臓器において酸化を受けたヘモグロビンが脾臓にて検出されたことを示唆するものである。一方, 高磁場領域で検出された $g = 2.011$ を中心にもつ 3 本の超微細構造のシ

グナルは核スピンの影響して検出されるニトロシルヘム特有のシグナルであり、由来はニトロシルヘモグロビン(NOHb)である。この NOHb は、動脈血において酸素飽和度に依存して超微細構造を示すシグナル強度・形が変化することが知られており、酸素飽和度が低下するとその強度が増し、酸素飽和度が上昇するとその強度は減少を示す[115]。すなわち、図 15 において正常ラットでみられる超微細構造が PCB126 の暴露に伴って徐々に強度が減少し 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 投与条件で消失したことは、血中の酸素飽和度が増したことを示唆しており、この結果は図 14 に示した酸化型ヘモグロビンのシグナル強度が増したことと一致する。しかしながら、この現象は PCB126 の暴露のみに限らず、リポポリサッカライドなどのサイトカインにおいて容易に引き起こされ、本章の目的である PCB126 の暴露量の指標として用いるには難しいと思われた。

腎臓の低磁場領域での EPR スペクトルはシグナルがほとんど検出されず、結果を省略したが、シグナルが検出されなかったことが Fe^{3+} はまったく存在しないということを示しているわけではない。これは、本研究の測定温度である 77 K よりもさらに低温の液体ヘリウム温度(4 K)付近で検出されるシグナルがあるからである[107]。すなわち、液体窒素温度条件下において腎臓ではシグナルが検出されなかったことを意味する。一方、図 16 に示した高磁場領域での EPR スペクトルでは複数のシグナルが検出された。ラット脳のエPR スペクトルにみられた Mn^{2+} や Cr^{3+} のシグナルの他に、 $g = 2.01$ 付近に Mo^{5+} に由来すると思われるシグナルが検出された[116-118]。P450s に関しては、典型的なシグナル波形と非常に類似した $g = 2.39, 2.24$, および 1.93 にシグナルをもつ P450(2.39 種-P450)と、 $g = 2.44, 2.24$, および 1.90 にシグナルをもつ P450(2.44 種-P450)の 2 種 P450s を検出した。このことは $g = 2.24$ 付近のシグナルは少なくとも 2 種の P450s の複合的なシグナルであると考えられ、2.39 種-P450 シグナルにおいて $g = 2.39$ シグナルが 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw 量の PCB126 投与群以上でシグナル強度が増したのに対して、

$g = 2.24$ および 1.93 シグナルが $3 \mu\text{g/kg bw}$ 量の PCB126 投与群以上で強度を増したのは、2.44 種-P450 のシグナル強度に起因しているものと思われる。すなわち、2.39 種-P450 は $30 \mu\text{g/kg bw}$ 量の PCB126 投与群以上で、2.44 種-P450 は $3 \mu\text{g/kg bw}$ PCB126 投与群以上でそのシグナル強度が増大したものと考えられ、腎臓における P450s の誘導を認めた。しかしながら、どちらのシグナルもある一定の PCB126 投与濃度以上で強度が増すものの、濃度に依存した強度の変化は見出されず、腎臓の低磁場領域での EPR スペクトルは PCB126 暴露の指標とする点では不適切であると思われた。

肝臓および肝ミクロソームの高磁場領域での EPR シグナルを図 17 および図 18 に示した。肝臓においては PCB126 を暴露させることにより P450s が誘導されることがすでに知られており[29,40]、本研究の投与濃度においても誘導が起きることを第 2 章にて証明した。一般に P450s はミクロソーム画分中に存在することが知られており[56,80,83]、肝臓のサンプルと同時にミクロソーム画分における EPR 測定をも行ったが、 $g = 2.02$ にみられる Mo^{5+} のシグナル強度以外に両者におけるシグナルの大きな違いは認められなかったので、以後、肝臓サンプルを対象にした実験について述べる。

肝臓の高磁場領域での EPR スペクトルは腎臓に類似しており、正常ラットおよび PCB126 投与ラットのいずれにおいても $g = 2.1$ 付近に Mn^{+2} のシグナルを、 $g = 2.02$ に Mo^{5+} のシグナルを検出するとともに、 $g = 2.40, 2.24, \text{および } 1.93$ にシグナルをもつ P450 (2.40 種-P450) のシグナルを検出した (図 17-A)。これは第 2 章の結果を裏付けるものである。一方、PCB126 を暴露したラット肝臓において新たに $g = 2.49, 2.26, \text{および } 1.87$ にシグナルをもつ P450 (2.49 種-P450) を検出した (図 17-B~E)。腎臓における 2 種 PCBs の 2 つ目の g 値は共に 2.24 に中心をもつシグナルであり、どちらか片方もしくは両方のシグナル強度が増すことによって、 $g = 2.24$ シグナル全体の強度が増した。肝臓では、一方の g 値が $g =$

2.24 であるのに対し、もう片方が $g = 2.26$ であり、2.49 種-P450 の強度が増すことにより、結果的に 2.24 シグナルと 2.26 シグナルが複合し、シグナル全体がやや幅広い波形を示すと共に、低磁場方向へ歪んでいることが見出された(図 17-E)。ここにおいて注目すべき点は PCB126 暴露によって得られた 2.49 種-P450 の $g = 2.49$ シグナルが投与濃度に依存したシグナル強度変化の傾向を示すと共に、正常ラットにおいてこのシグナルがほとんど検出されないことがあげられる(図 17-A)。また、PCB126 の投与量が増すにつれて $g = 2.26$ 付近のシグナルの歪みが大きくなり低磁場方向へ移行していることから、濃度依存性について相関があることが推察される。

本章において、PCB126 を暴露したラットの脳、脾臓、腎臓、肝臓および肝ミクロソームについて EPR 試験を行い P450s の誘導について検討すると共に、得られたシグナル強度と投与量との相関について調べた。その結果、各臓器において様々なヘム錯体は影響を受け、シグナルが変化して検出された。その中でも特に肝臓の EPR シグナルにおいて、PCB126 の暴露による g 値 2.49 の新規シグナルの検出を認め、このシグナルは PCB126 の投与量においてある程度の依存性を示していた。これは PCBs の暴露量の定量において非常に大きな意義があり、肝臓の EPR スペクトルが PCBs 暴露の生体指標となり得ることを示唆するものである。著者は次章において 2.49 種-P450 の特異性について検討するために、肝障害誘発物質、PCB126 以外のダイオキシン類を暴露した時のラットの肝臓 EPR スペクトルについて試験するとともに、濃度依存性について検討するため 2.49 種-P450 のシグナル強度による PCB126 暴露量の定量性について試験した。なお、本章において肝臓の EPR スペクトルにおける雌雄ラットでの差が無いことを認めたので(データ省略)、以降の試験は可能な限り雄の SD ラットを用いて実験を行った。

要 約

PCB126 を投与したラットの脳、脾臓、腎臓、肝臓、および肝ミクロソームについて EPR 試験を行った。

脳の EPR スペクトルでは、PCB126 暴露によりカタラーゼと思われるシグナル強度の減少が確認された。これは、PCBs 暴露による脳内の神経毒障害に新たなメカニズムの可能性を提案するものであった。脾臓の低磁場領域での EPR スペクトルにおいて、PCB126 暴露により脾臓中のヘモグロビンが酸化ストレスを受け酸化型ヘモグロビンが増加することが示された。また、この結果は高磁場領域でニトロシルヘモグロビンが減少することからも裏付けられた。しかし、脾臓における酸化ストレスは脾臓由来の P450s によるものではないことが示唆された。腎臓の EPR スペクトルにおいて、PCB126 暴露により P450s の誘導を確認した。脳、脾臓、および腎臓において検出されたいずれのシグナルも、PCB126 投与量との依存性を示すものは認められなかった。

しかし、肝臓の EPR スペクトルにおいて、PCB126 暴露による新規シグナル($g = 2.49$)の検出を認め、このシグナルは PCB126 の投与量に対してある程度の強度依存性を示した。これは、PCB 暴露量を定量する際の生体内指標として、肝臓 EPR スペクトルが有用であることを示唆するものであった。

第4章 2.49種-P450シグナルの特異性,ならびに,そのシグナル強度による暴露量の検討

緒言

PCB126 は,ダイオキシン類として認識される Co-PCBs であり, Co-PCBs の中でも最も強い毒性を示すことが知られている。第2章において,この PCB126 をヒトが一生で被曝されるであろうと考えられる等価毒正量(3 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$)を基準に経口投与したラット肝臓で, P450s が誘導することを確認した。また,第3章において,誘導される P450 は g 値 2.40, 2.24, および 1.93 に EPR シグナルをもつ正常ラットの P450 と同時に, g 値 2.49, 2.26, および 1.87 に EPR シグナルをもつ 2.49 種-P450 が誘導されることを明らかにした。

P450s は動物組織のミトコンドリア内膜に存在し電子伝達系を介して様々な生体機能面に関与しているほか,薬物代謝,すなわち生体異物の代謝に大きく関与している[50,51]。ヒトを含む動物では,ウイルス,細菌,高分子有機化合物の生体異物などの侵入に対して,免疫による生体防御機構が働く。それに対し,比較的 low molecular weight の有機化合物の生体異物では,それが水溶性の高い化合物であればほとんど変化を受けずに速やかに尿中に直接排出される。一方,脂溶性の生体異物は細胞膜を良く通過するため,腎臓の糸球体からろ過された後,尿細管から血中に再吸収される(図20)[119]。したがって,脂溶性薬物は体内に残留し,再吸収された脂溶性の生体異物は肝臓に運ばれ,水溶性が増した物質へと変化を受け尿中に排泄される。すなわち,脂溶性の生体異物を酸化,還元,加水分解,および抱合により水溶性の化合物に変える酵素系を

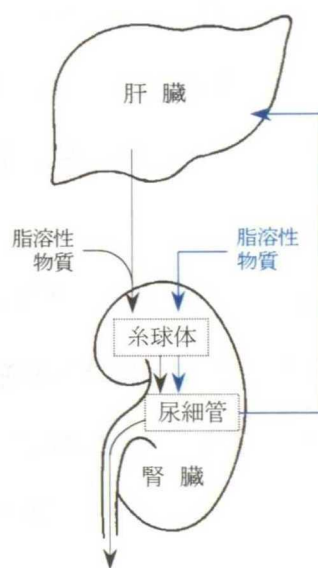


図20 生体異物である低分子有機化合物の体内排泄機構[119]

薬物代謝酵素系と呼び、その酸化反応系の大部分を P450s が担っている[119]。したがって、種々脂溶性の生体異物の暴露により、生体内の肝臓障害に起因して様々な P450s が誘導される。

本章では、SD ラット肝臓を EPR 解析に供し PCB126 によって誘導された新規な 2.49 種-P450 の特異性について試験することを目的として、肝臓害誘発物質および他の EDCs を暴露した際の SD ラット肝臓の EPR 解析を行った。

肝臓害誘発物質には CYP1A1 誘導物質としても知られ、第 2 章の抗体試験に陽性コントロールとして用いた 3-MC[120-122]、そして肝臓害誘発モデル系に古くから用いられている CCl₄ を用い[123-125]、Chamulitrat ら [88] の報告に基づき毒性量を定め、それぞれ腹腔内投与した。EDCs は、PCB126 と同様の Co-PCBs でありダイオキシン類として認識される PCB169 と、ダイオキシン類において最も強い毒性を示す 2,3,7,8-TCDD をそれぞれ表 6 に示した TEF に基づき、前章の PCB126 と等しい毒性量を経口投与した。また、ヒトを含む哺乳動物において PCBs 等の暴露を妊娠期間中に受けることによって胎児の催奇形生率が増すことが知られている。これは PCBs が容易に胎盤を通過し、臍帯血を介し、胎児生体内に蓄積するものによるものである[40]。例として、PCB169 を単回投与した妊娠ラットの子供において、妊娠率の低下およびドーパミン量の低下を認めたり[126]、PCB77 や PCB126 を投与した妊娠ラットの子供において、血漿中 T4 レベルの抑制が認められることが実験的に証明された[127]。そこで、妊娠した SD ラットに PCB126 を暴露し、その胎児および子供より得た肝臓の EPR スペクトルについても検討を行った。

前章において 2.49 種-P450 スペクトルの g 値 2.49 シグナルの強度が投与量に依存して増す傾向が示唆された。そこで、EPR シグナル強度の数値化を試み PCB126 暴露量の定量性について検討を行うことを目的とした。なお、EPR による定量性において、そのサンプルチューブの容積やサンプル量に依存してシグナル強度が影響を受けることが知られている。そこで、肝臓中に検出される Mn²⁺シグナルを指標

に、目的シグナルの相対強度を求めた。また、本研究の投与条件量における SD ラット肝臓中での PCB126 の蓄積量を、PCBs やダイオキシン類など EDCs の定量において一般的な分析手法であるガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) によって検討し、EPR 法と比較した。

材 料

特に言及しない限り第 2 章で使用したものと同一ものを用いた。

1) 供試動物

6 週齢-雄-SD ラット

15 週齢-雌雄-SD ラット (Crj:CD[IGS], 日本 SLC 株式会社)

2) 供試試薬

a) PCB126 暴露妊娠モデル動物作出用試薬

・3,3',4,4',5-PeCB 溶液

3,3',4,4',5-PeCB

コーンオイル

コーンオイルにて十分に溶解し、1.2 $\mu\text{g/ml}$ に調製した。

b) 肝障害モデル動物作出用試薬

・3-MC 溶液

3-methylcholanthren (3-MC: Sigma-Aldrich 社)

コーンオイル

コーンオイルにて十分に溶解し、10 mg/ml に調製した。

・ CCl_4 溶液

四塩化炭素 (CCl_4 : Sigma-Aldrich 社)

コーンオイル

コーンオイルにて十分に溶解し、325 mg/ml に調製した。

c) PCB169 暴露モデル動物作出用試薬

・3,3',4,4',5,5'-HCB 溶液

3,3',4,4',5,5'-HCB (New Haven 社)

コーンオイル

コーンオイルにて十分に溶解し、12 µg/ml に調製した。

d) 2,3,7,8-TCDD 暴露モデル動物作出用試薬

・2,3,7,8-TCDD 溶液

2,3,7,8-TCDD

コーンオイル

コーンオイルにて十分に溶解し、4.0 µg/ml に調製した。

e) GC/MS 用試薬

・標準試薬

標準試薬として PCB77, PCB81, PCB105, PCB114, PCB118, PCB123, PCB126, PCB156, PCB157, PCB167, PCB169, および PCB189 を用い、いずれの標準試薬も WELLINGTON 社(カナダ)より購入した。

・分析試薬

ヘキサン, アセトン, および無水硫酸ナトリウムは関東化学社製の PCB 分析用を, ジクロロメタン, ジエチルエーテル, およびエタノールは関東化学社製の残留農薬試験用を, トルエンは関東化学社製のダイオキシン分析用をそれぞれ用いた。塩酸および硫酸は和光純薬の試薬特級を用いた。シリカゲルは和光純薬製のワコーゲル S-1 を用いた。

方法

1) PCB126 を暴露した妊娠動物からの胎児および子供の作出

馴致ならびに飼育方法は第 2 章に述べた。交配は、15 週齢の雌雄 SD ラット

を終夜同一のケージに同居させ、翌朝、雌 SD ラットの膣垢内の精子の有無を調べ、精子が確認された日を妊娠 0 日とした。PCB126 は妊娠 7 日～21 日までの 15 日間で、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw の投与条件量を 1 日 1 回、ゾンデによる経口投与を行った。妊娠動物を 2 群に分け、その内の 1 群は妊娠 22 日目に剖検を行い胎児を摘出した。さらに得られた胎児より肝臓を摘出した。もう 1 群は分娩を待ち、分娩確認日を生後 0 日とし子供ラットを得た。得られた子供ラットは生後 21 日目に剖検を行い、肝臓の摘出を行った。剖検および摘出方法は、2 章に述べた。

2) 肝障害モデル動物の作出

馴致ならびに飼育方法は第 2 章に述べた。3-MC は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw の投与条件で、 CCl_4 は 0.65 g/kg bw の投与条件でそれぞれ単回腹腔内投与した。それぞれ投与 24 時間後に剖検し、肝臓を得た。

3) PCB169 および 2,3,7,8-TCDD 暴露動物の作出

馴致ならびに飼育方法は第 2 章に述べた。PCB169 は 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw の投与条件量で、2,3,7,8-TCDD は 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw の投与条件でそれぞれ 4 回、ゾンデによる経口投与した。それぞれ投与 24 時間後に剖検し、肝臓を摘出した。

4) PCB126 を単回もしくは 4 回暴露したモデル動物の作出

馴致、飼育方法、および投与条件量は第 2 章に述べた。投与回数は単回に加え、4 回(1 回/day)の条件で投与し、それぞれ投与 24 時間後に剖検し、肝臓を摘出した。

5) EPR 測定

サンプル調製および充填・装置設定および掃引・データ処理・g 値の測定は第 3 章、EPR の測定条件は表 9 に従った。また、以下に述べる「ベースラインの算出」および「g 値 2.49 および 2.40 シグナル強度の数値化」は、Microsoft Excel でテンプレートを構築することにより、自動処理を可能にした。

a) ベースラインの算出

EPR 測定し Windows ファイル形式のデータに置換した CSV ファイルの EPR スペクトルは 4096 点のデータより成る。そこで本研究では低磁場側、すなわちスペクトル左側の開始点を「1」に定め、高磁場側の終了点まで昇順に x 軸数値を Point として定めた。EPR 装置のデータ解析用 PC によって任意に算出された y 軸数値を Value として定めた。

Point 2030~2130 の間で最も高い Value 値を示した Point を MnP_{max} とし、そのときの Value を MnV_{max} とした。同じく Point 2030~2130 の間で最も小さい Value 値を示した Point を MnP_{min} とし、そのときの Value を MnV_{min} とした。次に MnP_{max} と MnP_{min} の平均を MnP_{cen} とし、 MnV_{max} と MnV_{min} の平均を MnV_{cen} とした。また、 MnP_{cen} から 1085 point 低磁場方向の Point を LeP とし、 LeP 値の ± 15 Point 間の Value 値の平均を LeV とした。

LeP を x, LeV を y として得られる座標点 $Base1(LeP, LeV)$ と、 MnP_{cen} を x, MnV_{cen} を y として得られる座標点 $Base2(MnP_{cen}, MnV_{cen})$ を結ぶ直線を、肝臓 EPR スペクトルのベースラインとした(図 21 - 線)。

b) g 値 2.49 および 2.40 シグナル強度の数値化

g 値 2.49 点から x 軸へ垂線を下ろした際のベースラインとの交点までの

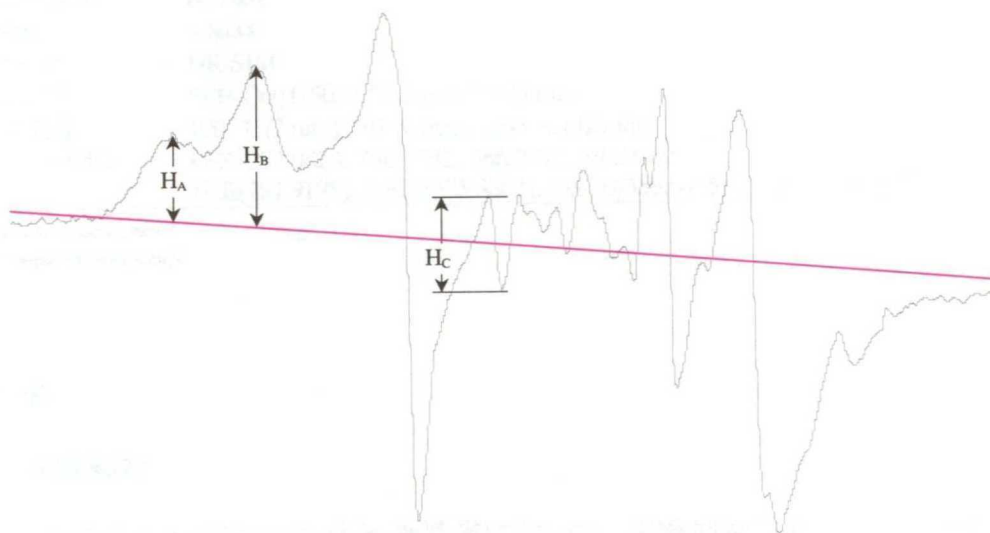


図 21 PCB126 を暴露したラット肝臓 EPR スペクトルのベースラインおよび g 値 2.49 および 2.40 シグナル強度

Value 値を H_A とし, g 値 2.40 点から x 軸へ垂線を下ろした際のベースラインとの交点までの Value 値を H_B とした。 MnV_{max} と MnV_{min} の Value 値の差, すなわち Mn^{2+} の 1 本目のシグナル強度を H_C とした(図 21)。この際, H_A/H_C で求められる値を $S_{2.49}$ と定め g 値 2.49 の相対シグナル強度とし, H_A/H_C で求められる値を $S_{2.40}$ と定め g 値 2.40 の相対シグナル強度とした。

6) GC/MS 分析による PCB126 の定量

GC/MS のサンプル調製および抽出は Lang の方法[128]に従った。PCB126 の抽出はソックスレー抽出による脂肪抽出を行ない, 次に, アルカリ鹼化処理による不純物の分解を行い, 再び, ヘキサンによる抽出および濃縮後, GC/MS に供試した。

GC/MS の測定は MStation JMS-700 (日本電子社) および SPB-Octyle (50 m × 0.2 mm × 0.25 μm) を用い, 表 10 に示した測定条件で HR-SIM 法により測定した。

表 10 GC/MS 法における測定条件

Parameter	Value
注入口温度	250 °C
注入方法	スプリットレス(2 min)
イオン源温度	280 °C
イオン化電圧	70 eV
イオン化電流	600 μA
分解能	> 8,000
測定方法	HR-SIM
使用カラム	SPB-Octyl (50 m * 0.2 mm * 0.25 μm)
カラム温度	100 °C(2 min) - 30 °C/min - 260 °C(32 min)
モニターイオン	PFK (292.9824, 330.9792, 366.9792, 392.9760) TCB(291.9195), PeCB(325.8804), HxCB(359.8415)*1, HpCB(393.8027)*2

*1 HxCB: hexa chlorobiphenyl

*2 HpCB: hepta chlorobiphenyl

結果

1) 実験動物

本研究のいずれの生体異物暴露において, 実験動物が死亡することはなかった。また, 妊娠中に暴露を受けたラットの胎児および子供において, 生体形成

異常はみられなかった。

2) 肝障害モデル SD ラット 肝臓の EPR スペクトル

肝障害モデル動物として 3-MC を腹腔内投与したラット肝臓の EPR スペクトルを図 22-B に、 CCl_4 を腹腔内投与したラット肝臓の EPR スペクトルを図 22-C に示した。また、スペクトル全体の強度は Mn^{2+} の 1 つ目のシグナルを基準に統一した。

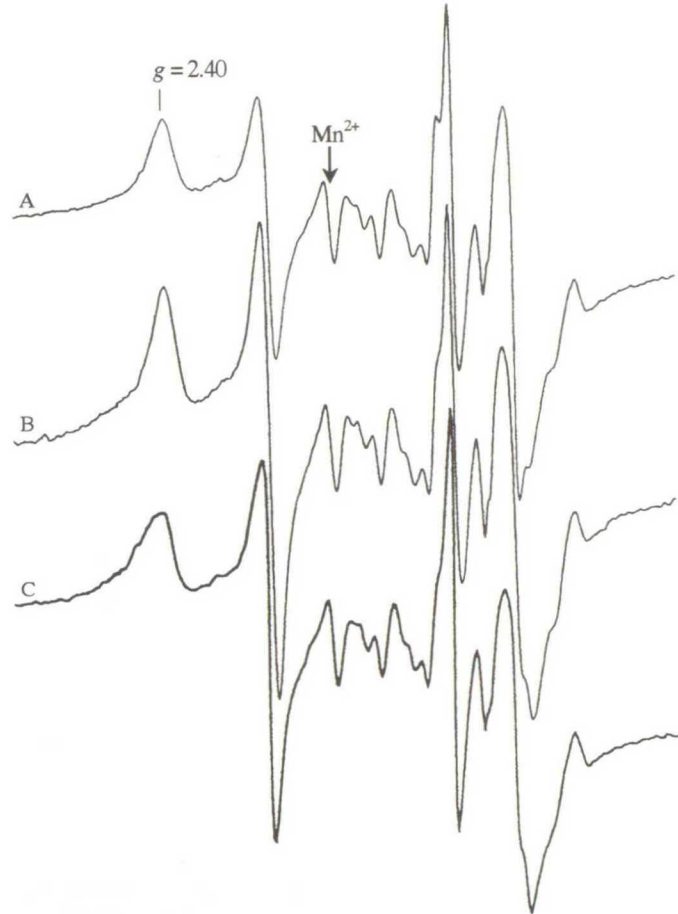


図 22 正常ラットおよび肝障害モデルラット肝臓の EPR スペクトル

A: 正常 SD ラット
B: 3-MC 暴露 SD ラット
C: CCl_4 暴露 SD ラット

3-MC もしくは CCl_4 暴露ラット肝臓のいずれにおい

ても、PCB126 暴露によって検出される g 値 2.49 における新規シグナルは検出されなかった。3-MC 暴露群では、 g 値 2.40 シグナルの強度が正常ラットのそれと比べて強かった ($n = 4$)。また、 CCl_4 暴露群では g 値 2.40 シグナルの強度は正常ラットのそれと比べて大差はないものの、波形が低磁場方向に広がるややブロードなシグナルであった。

3) PCB169 もしくは 2,3,7,8-TCDD を暴露した SD ラット肝臓の EPR スペクトル

PCB169 を暴露した SD ラット肝臓の EPR スペクトルを図 23-C に、2,3,7,8-TCDD を暴露した SD ラット肝臓の EPR スペクトルを図 23-D に示した。その結果、2,3,7,8-TCDD を暴露した SD ラット肝臓において、PCB126 暴露によって検出される g 値 2.49 のシグナルが検出されると共に (図 23-B, D), g 値 2.26 付近

のシグナルが低磁場方向へシフトする傾向も同様に確認した。しかしながら g 値 2.40 シグナルでは PCB126 暴露と異なり、3-MC 暴露によって得られた g 値 2.40 シグナルに類似したブロードなシグナルが検出された。

一方、PCB169 を暴露した SD ラット肝臓では、PCB126 と非常に類似しているが g 値 2.49 にピークをもつシ

グナルとは異なり、 g 値 2.47 にピークをもつシグナルを検出した。また、 g 値 1.87 に得られたシグナルはブロードであり、PCB126 暴露した SD ラット肝臓で見られるシグナルと異なる波形を示した。

4) 妊娠期間中に PCB126 暴露を受けた胎児および子供 SD ラット肝臓の EPR スペクトル

妊娠期間中に PCB126 を暴露し、妊娠 22 日目に得られた胎児の肝臓と、分娩し、生後 21 日目まで飼育した子供ラット肝臓を EPR 法によって試験したところ、いずれのサンプルにおいても、その EPR スペクトルにおいて g 値 2.49 にシグナルを検出すると共に、 g 値 2.26 付近のシグナルが低磁場方向にシフトする傾向を明らかにした(データ省略)。得られた EPR スペクトルは図 17-E に示した PCB126

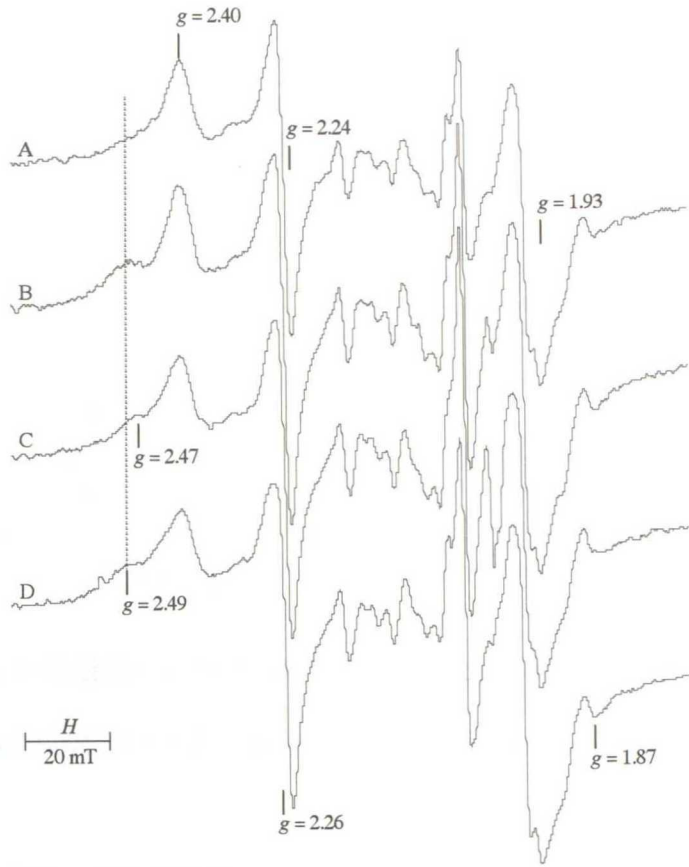


図 23 PCB169 もしくは 2,3,7,8-TCDD を 4 回経口投与した SD ラット肝臓の高磁場領域での EPR スペクトル
 A: コントロール群(コーンオイル 4 回投与)
 B: PCB126 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/4 回投与群
 C: PCB169 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/4 回投与群
 D: 2,3,7,8-TCDD 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/4 回投与群

を暴露したラット肝臓の EPR スペクトルの結果と一致するものであった。

5) g 値 2.49 および 2.40 シグナル強度の数値化

図 24 に PCB126 を単回投与したラット肝臓における $S_{2.49}$ 値を左 y 軸に、 $S_{2.40}$ 値を右 y 軸にそれぞれ

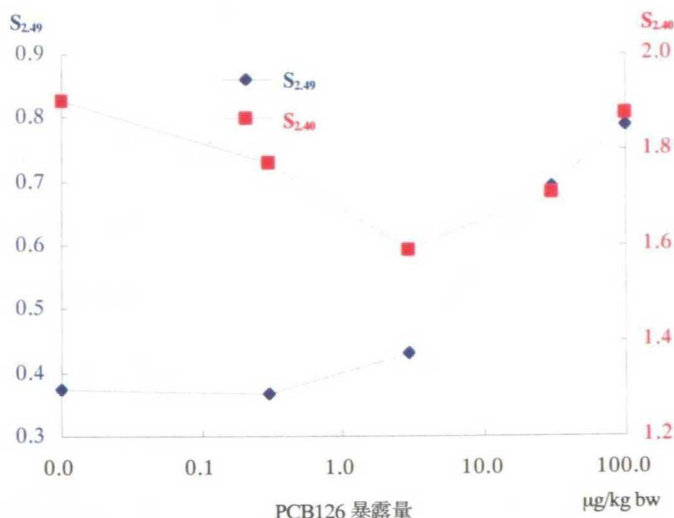


図 24 PCB126 を単回投与したラット肝臓における暴露量による $S_{2.49}$ および $S_{2.40}$ の変化

示した。x 軸は PCB126 の暴露量を対数目盛にて示した。なお、コントロール、0.3, 3, および 30 $\mu\text{g/kg bw}$ 投与群は $n = 2$ の平均を、100 $\mu\text{g/kg bw}$ 投与群は $n = 4$ の平均を示した。

$S_{2.49}$ の投与群ごとの平均および標準偏差はコントロールから順に 0.375 ± 0.14 , 0.366 ± 0.022 , 0.43 ± 0.014 , 0.692 ± 0.036 , および 0.789 ± 0.055 であり 3.0 $\mu\text{g/kg bw}$ 投与条件以上でシグナル強度に影響がみられ、投与量に依存した傾向を示しながらその強度は増大した。一方、 $S_{2.40}$ の投与群ごとの平均および標準偏差はコントロールから順に 1.903 ± 0.122 , 1.774 ± 0.023 , 1.59 ± 0.19 , 1.712 ± 0.033 , お

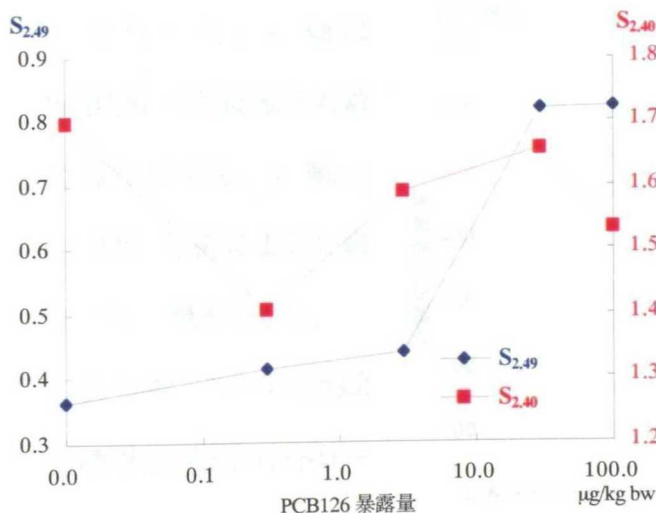


図 25 PCB126 を 4 回投与したラット肝臓における暴露量による $S_{2.49}$ および $S_{2.40}$ の変化

よび 1.876 ± 0.241 であり、3.0 $\mu\text{g/kg bw}$ 投与条件までそのシグナル強度が減少する傾向を示し、それ以上で増大する傾向を示した。

図 25 に PCB126 を 4 回投与したラット肝臓における $S_{2.49}$ 値を左 y 軸に、 $S_{2.40}$ 値を

右 y 軸にそれぞれ示した。x 軸は PCB126 の暴露量を対数目盛にて示した。なお、いずれの投与条件群も $n = 4$ にて行い、その平均を示した。

$S_{2.49}$ の投与群ごとの平均および標準偏差はコントロールから順に 0.364 ± 0.045 , 0.416 ± 0.099 , 0.44 ± 0.076 , 0.82 ± 0.087 , および 0.823 ± 0.108 であり、投与濃度の増加に伴ってシグナル強度が増大した。一方、 $S_{2.40}$ の投与群ごとの値 (平均および標準偏差) はコントロールから順に 1.697 ± 0.301 , 1.405 ± 0.27 , 1.589 ± 0.126 , 1.658 ± 0.211 , および 1.534 ± 0.237 であり、低濃度暴露量でシグナル強度が減少し、以降、投与濃度が高くなるにつれシグナル強度が増大する傾向を示した。しかし、 $S_{2.40}$ でのシグナル強度の変化はいずれも大きなものではなかった。

単回および 4 回投与の $n = 3$ 以上の投与条件群において採択域 98% での棄却検定を行ったが、いずれのデータも母集団を外れるものはなく、また、EPR スペクトルの視覚的なシグナル強度と、本研究で提案する数値化によって求められた $S_{2.49}$ および $S_{2.40}$ の示す傾向はほぼ一致した。

6) GC/MS による肝臓中の PCB126 の定量

PCB126 を経口したラット肝臓中の残留量に関して、GC/MS による分析結果を図 26 に示した。いずれのサンプルも PCB126 を単回投与したもので、各群は $n =$

3 で行った。x 軸は PCB126 の暴露量を対数目盛にて示し、y 軸は GC/MS 分析による肝臓中の残存量を示した。

投与群ごとの平均および標準偏差はコントロールから順に 1.49 ± 0.31 ,

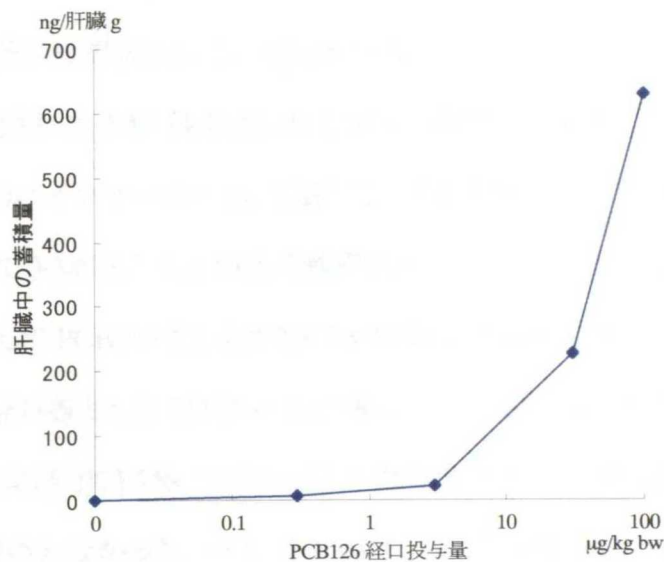


図 26 PCB126 を経口投与したラット肝臓における蓄積量

4.82 ± 0.72, 21.0 ± 1.12,
225.37 ± 16.2, および
628.3 ± 39.6 ng/g であり,
残留率は 0.3 µg/kg bw で
84.2 %, 3 µg/kg bw で

表 11 ラット肝臓における GC/MS による PCB126 の定量

投与量(µg/kg bw)	蓄積量(ng/肝臓 g ^{*1})* ²
0	1.49 ± 0.31
0.3	4.82 ± 0.72
3	21.0 ± 1.12
30	225.37 ± 16.2
100	628.3 ± 39.6

*1 肝臓の重量は湿重量

*2 値の意味は平均 ± 標準偏差

38.8 %, 30 µg/kg bw で 47.27 %, 100 µg/kg bw で 41.27 % であった(表 11)。また、コントロールでも非常にわずかであるが PCB126 を検出した。

考 察

P450s は原核生物、植物からヒトにいたる多岐の生体内に遍在し、脂肪族や芳香族分子の水酸化に触媒作用をおよぼす b 型ヘムタンパク質であり、様々な生体異物の代謝に大きく関与している。また、P450s は多種の構造異性体が存在し、基質に対し選択的に誘導されることが知られている[129-134]。

誘導される P450s は PCBs やダイオキシン類の種類、暴露量、および、動物種によって異なり、サブファミリーとして CYP1A, CYP2A, CYP3A, CYP4A, CYP11A, CYP1B, CYP2B, CYP2C, CYP2E, および CYP2H などの 1 種もしくは複数種が同時に誘導されることが報告されており、誘導された P450s を EDCs 暴露に対するバイオマーカーとすることが確立あるいは提案されている[135-157]。

本章では前章において検出された 2.49 種-P450 の EDCs の種特異性について試験し、この P450 が PCB126 のバイオマーカーとして適しているかを検討することを目的として、肝障害モデルとして 3-MC もしくは CCl₄ を腹腔内投与した SD ラットを、また、PCB126 以外の EDCs として PCB169 もしくは 2,3,7,8-TCDD を TEF に基づいて PCB126 との等価毒性量を経口投与した SD ラットの肝臓について EPR 法に供した。その結果、3-MC, CCl₄, および PCB169 ではシグナル強度や波形に影響はあったものの 2.49 種-P450 は検出されなかった。一方、2,3,7,8-TCDD 投与群において

PCB126 暴露と同様に g 値 2.49 にシグナルをもつ 2.49 種-P450 を検出した。3-MC, CCl₄, および PCB169 においても種々の P450 が誘導されていることが報告されており[153,158-160], これら生体異物で誘導されず PCB126 および 2,3,7,8-TCDD でのみ誘導される P450 の報告は現在のところなく, ある程度の基質特異性をもつことを明らかにすると共に, PCB126 および 2,3,7,8-TCDD の毒性の高い EDCs におけるバイオマーカーとして有効である可能性が示唆された。また, PCB126 と PCB169 は共にコプラナーPCBs に属すが, PCB169 では g 値 2.47 にシグナルをもつスペクトルが検出され, g 値 2.49 と同様にバイオマーカーとしての可能性を示唆するものであった。また, 妊娠動物において PCBs は臍帯血を介して胎児生体内にも蓄積することが報告されているが[40], 妊娠期間中に PCB126 暴露を受けた胎児および子供 SD ラットの肝臓において 2.49 種-P450 の検出が可能であることを明らかにし, EPR 法による PCB126 暴露動物の検出が広範囲において有効な手法であることを示した。

上記の結果を踏まえ, PCB126 暴露によって得られる g 値 2.49 シグナルと, 正常ラットにおいても検出される g 値 2.40 シグナルを数値化することによって, それらシグナル強度から PCB126 の暴露量の定量性について検討した。まず, シグナルの強度を決定する上で重要となる 1 つに EPR スペクトルのベースラインがあげられる。一般に液体窒素温度レベルでの測定の場合, 掃引中にデュワ内の液体窒素に空気中の酸素が溶け込むことによってベースラインが右下がりに傾く[161]。そこで本研究では, 低磁場側の任意の 30 point の平均と肝臓中の Mn²⁺ シグナルの中心点を結ぶことによって得られる直線をベースラインにすることによって補正した。次に, サンプルチューブの違いによって生じるキャビティ内の容積変化がシグナル強度に影響を与えるので[161], 生体内 Mn²⁺ の 1 本目のシグナル強度との対象シグナルとの相対強度によってサンプル間の相関をもたせた。肝臓中の Mn²⁺ はサンプル間においてその量に大差がなく, Mn を含む飼料を与えた場合でも, EPR で測定可能な肝臓中の 2 価の Mn 量は変化しないことが報告[8]されていることから生体内指標として

十分であると判断した。棄却検定による統計処理においてデータのばらつきが少ないことを明らかにし、 g 値 2.49 および 2.40 シグナル強度の数値化が確かであることを示すものである。

以上の方法によって数値化した g 値 2.49 シグナル強度である $S_{2.49}$ および g 値 2.40 シグナル強度である $S_{2.40}$ 暴露量の相関について検討した結果、 $S_{2.49}$ において投与濃度に依存したシグナル強度の増加が見られ(図 24, 25), これは GC/MS による肝臓中の蓄積濃度の分析結果と傾向が一致した(図 26)。その一方で、総トータル投与量が $0.3 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 以下でシグナル強度に変化は見られず(図 25), また、総トータル投与量が $120 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ を越えた時点でシグナル強度が上限に達し変化しないことを明らかにした(図 25)。これらの結果から、EPR 法による PCB126 蓄積量の定量は、測定限界値が GC/MS に比べて高濃度であり、さらに、狭い範囲に限られることなどから、推定にとどまる。しかしながら、EPR 法は GC/MS 法に比べて非常に簡便、迅速、かつ安価であると共に、試験による汚染範囲をサンプルチューブのみにとどめることが可能であり、例えば、ヒトの最大暴露経路である動物性食品などの検査等において、PCB126 など EDCs の暴露量の検討において有効な手法であると考えられた。

一方、PCB126 および正常ラットのいずれにおいても、 $S_{2.40}$ は低濃度投与条件で明らかに減少傾向を示し、増加傾向を示したのは総トータル投与量が $1.2 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 以上であった。通常、PCB126 などの生体異物の暴露を受けると本研究の投与条件レベルでは明らかに数種の P450s が誘導されており、 $S_{2.40}$ が増すと考えられる。PCB126 暴露によって誘導された P450 が仮に単一であり g 値 2.49 のみにシグナルを示すとしても $S_{2.40}$ の減少は考えにくく、これらの結果は $S_{2.49}$ と $S_{2.40}$ に相関性が示唆され、 $S_{2.49}$ の増加に伴い $S_{2.40}$ が減少することが考えられる。すなわち、2.40 種-P450 の一部もしくは多くが何らかの影響を受け 2.49 種-P450 に変性した可能性を示すものであった。

要 約

PCB126 の暴露によって SD ラット肝臓で検出された 2.49 種-P450 の特異性について検討することを目的として 3-MC, CCl₄, PCB169, および 2,3,7,8-TCDD を投与した SD ラット肝臓について EPR 試験を行った。その結果, 2,3,7,8-TCDD を投与した SD ラット肝臓においてのみ g 値 2.49 にシグナルを検出し, その特異性が非常に高いことを明らかにした。また, 妊娠期間中に PCB126 暴露を受けた胎児および子供 SD ラットの肝臓において 2.49 種-P450 を検出し, PCB126 暴露の検討において EPR 法が広範囲において有効であることを示した。

g 値 2.49 および g 値 2.40 シグナル強度の数値化を試み, 相対強度 $S_{2.49}$ および $S_{2.40}$ で示すことを可能とした。その結果, PCB126 暴露量に依存した $S_{2.49}$ の増加を認め, この結果は GC/MS による定量の結果と傾向が一致したが, 定量には至らなかった。しかしながら, EPR 法はヒトへの暴露経路として最も多いと考えられる動物性食品などの検査において, PCB126 など EDCs の暴露量の簡易的推定において有効な検出法となり得ることを示唆するものであった。

一方, $S_{2.49}$ および $S_{2.40}$ の相関性に関して, $S_{2.49}$ の増加に伴う $S_{2.40}$ の減少は, 2.49 種-P450 の由来が PCB126 によって何らかの影響を受けた 2.40 種-P450 が変性して生じた P450 である可能性を示唆するものであった。

第5章 結晶場解析ならびに結晶場ダイアグラムによる 2.49 種-P450 の軸配位子の同定

緒言

P450s は脂溶性の生体異物の代謝に働き、基質を水酸化触媒する薬物代謝酵素で、その本体はヘム鉄タンパク質である。P450s は、脂溶性の生体異物が生体内に取り込まれると、主に肝臓において選択的に数種が誘導され、対象基質の水溶性の促進に関与し、代謝を助ける。この薬物代謝系は PCBs や PCDDs などの EDCs においても同様のメカニズムであり、EDCs の種類によって種々の P450s が誘導されることが知られている[135-157]。本研究対象である PCB126 では CYP1A や CYP1B サブファミリーなどが誘導されることが報告されている[149,153,154]。しかしながら、前章までの EPR 解析によって検出された g 値 2.49 にシグナルをもつ 2.49 種-P450 は、他の EDCs 等の生体異物による EPR 試験の結果から基質特異性が高いことが示されると共に、EPR スペクトルにおける新たな P450 シグナルであることを示唆した。しかしその一方で、 $S_{2.49}$ および $S_{2.40}$ の投与濃度に依存したパラメータ値の推移から、この 2.40 種-P450 と 2.49 種-P450 に相関性があることが示されると共に、2.40 種-P450 が PCB126 暴露によって何らかの影響を受け 2.49 種-P450 に変性した可能性を前章にて明らかにした。本章では EPR 試験によって得られた結果をもとに、PCB126 がラット肝臓 P450 のヘムの構造に及ぼす影響について検討することを目的とし、結晶場解析および結晶場ダイアグラムによる軸配位子の同定を行った。

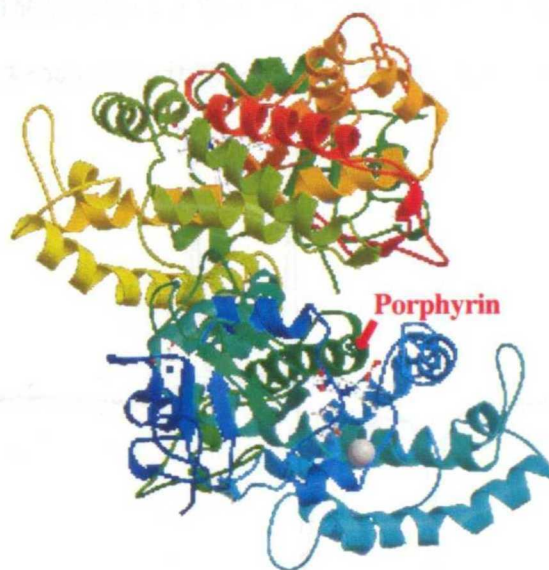


図 27 *Pseudomonas putida* 由来の Cytochrome P450-cam の結晶構造 (Schlichtin ら[162]の図を引用)

図 27 に示したのは Schlichtingら [162] が X 線構造解析によって明らかにした、*Pseudomonas putida* 由来の Cytochrome P450cam (P450cam) の結晶構造である。P450cam は細菌由来の P450 であるので大量に調製可能であることから、初めて結晶構造が明らかにされた P450 であり、

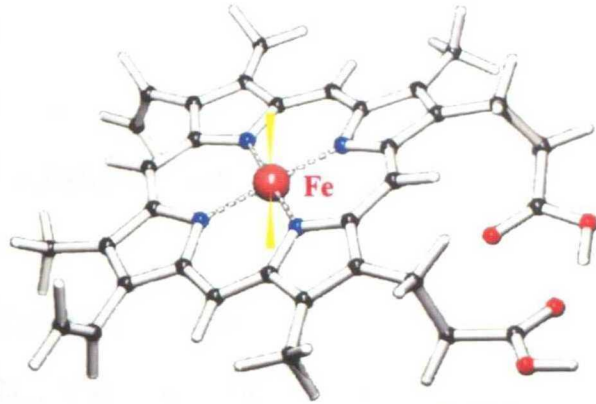


図 28 Fe を中心金属にもつポルフィリンの構造模式図
黄色で示した矢印は Fe の第 5 および第 6 配位座
青は鉄と配位している部位
黒はポルフィリンカーン

後の多くの P450s の構造研究はこれに由来する[89]。また、ヒトなどの哺乳類で見られる P450s とほぼ同様の構造をとるものと推察されており、図 28 に示すようにヘムを中心金属にもつポルフィリンを構成成分として含むタンパク質である。ヘム鉄タンパク質の分光学的・磁氣的性質は、主に、ポルフィリンのヘム鉄の電子状態およびヘム鉄に対する面内配位子場と軸配位子場によって決定される。したがって、ヘムの構造変化はそれらによって引き起こされる磁性を対象に EPR 法によって解析することが可能となる。

ヘム鉄は+1 価から+4 価までの 4 つの酸化状態をとり得るが、通常の状態は+2 価と+3 価であり[99]、EPR で検出可能な状態は 3 価(Fe^{3+})の状態である。3 価のヘムは高スピン、中スピン、低スピンの 3 つのスピン状態をとりうる。特に、低スピンのヘムは配位子場の対称性が立方対称よりも低下しており、磁場の影響を受け結晶場分裂を起こし、EPR スペクトルにおいて異方性をもつ 3 つの g 値が検出される(図 29)[163]。これら 3 つの g 値から Fe^{3+} の配位子場の状態を評

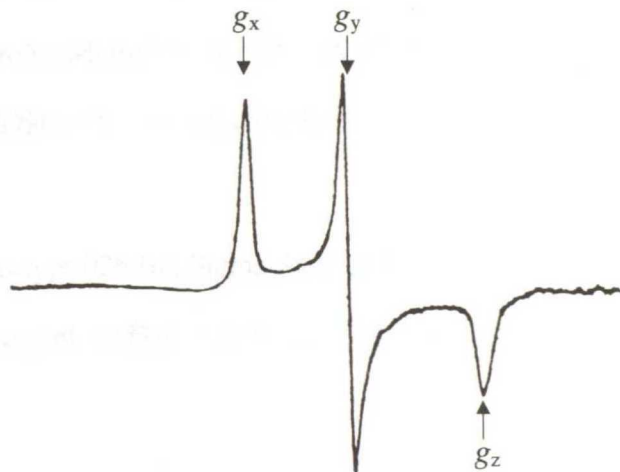


図 29 ヘムタンパク質の EPR スペクトルにおける異方性[163]

価することが可能となり、結晶場解析法としてTaylor[164]や Bohan[165]など多くの研究者によってその理論が展開され確立された。

本章ではBohanの結晶場解析によるP450のヘム鉄の配位子を同定することを主な目的とした。

ヘム鉄の配位座に何らかの配位子が結合している場合、還元剤処理や LPS 処理を行うことによって配位結合に影響し、正常の場合と異なった変化が見られることが考えられる。また、この変化が EPR スペクトルの波形に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、アスコルビン酸ナトリウム、アジ化ナトリウム等の還元性物質による化学処理を肝臓およびマイクロソームサンプルに直接添加した。LPS 処理は PCB126 を投与した SD ラット生体に投与した。それぞれ得られた肝臓およびマイクロソームは EPR 法に供した。次に、PCB126 を投与した SD ラット肝臓の EPR スペクトルと化学処理をしたサンプルより得た EPR スペクトルの結果をもとに、Bohan によって提唱された結晶場解析法による軸配位子の同定を試みた。

材 料

1) 供試試薬

a) 還元性試薬

還元剤として L-アスコルビン酸ナトリウム、アジ化ナトリウム、亜二チオン酸ナトリウムおよび 1-methylimidazole (MeIm) を用いた。試薬はすべて Nacalaitesque 社の試薬特級もしくは同等のグレードのものを使用した。

b) リポポリサッカライド

リポポリサッカライド(LPS, serotype 026:B6, Sigma-Aldrich 社)

生理食塩水で溶解し、100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製した。投与量は以下の実験方法に記述した。

方 法

1) PCB126 暴露動物の作出および肝臓サンプルの調製

PCB126 暴露動物の作出および肝臓サンプルの摘出については第 2 章に準じて行った。PCB126 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw) を 4 回投与した。必要であれば、肝臓からそのマイクロソーム画分を得た。

2) PCB126 を暴露したラットの LPS 処理

PCB126 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/1 回) もしくは CCl_4 (1.3 g/kg bw/1 回) をそれぞれ SD ラットに投与し、そのラットの LPS 処理は Chamulitrat ら[88]の方法に基づき、投与 20 時間後に LPS を 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/1 回、尾静脈より投与した。剖検は LPS 投与 4 時間後に行い、肝臓サンプルを得た。

3) 肝臓およびマイクロソームの還元剤処理

L-アスコルビン酸ナトリウム、アジ化ナトリウムおよび亜二チオン酸ナトリウムは最終濃度が 1.0 % (w/w) になるように直接、肝臓に添加した。MeIm は 20 μl (> 99.9%) を湿重量 480 μg の肝臓もしくはマイクロソームに直接添加した (v/w)。いずれの試薬も添加後、十分に混和し、試薬を添加してから 10 分後に EPR 法に供した。

4) EPR 測定および g 値の決定

サンプル充填、EPR 測定、および g 値の決定は第 3 章に準じて行った。EPR 測定の条件は表 9 に基づいて行った。得られた EPR シグナルの g 値は Bohan の結晶場解析[165]に基づいて処理した。

5) Bohan の結晶場解析に基づく g_x , g_y , g_z の決定

ハミルトンおよびゼーマンの公式をもとに、 g_x , g_y , g_z はそれぞれ

$$g_x = |2(\sqrt{2 \cdot A + B})(\sqrt{2 \cdot C - B})|$$

$$g_y = |2(\sqrt{2 \cdot A + B})(\sqrt{2 \cdot C + B})|$$

$$g_z = |2(\sqrt{2 \cdot A + B})(\sqrt{2 \cdot A - B})|$$

と展開された。このとき A, B, C は係数である。

$$A^2 + B^2 + C^2 = k$$

とおき、この際の「k」を規格定数とよび、 g_x, g_y, g_z が同一の P450 種由来のシグナルであるとき、「 $k = 1$ 」が成り立つ。すなわち、EPR スペクトルより特定した 3 つの g 値より

$$A^2 + B^2 + C^2 \doteq 1$$

が成り立つ。

6) Rhombicity および Tetragonality の決定および結晶場ダイアグラム

上記 5) において述べた係数 A, B, C は

$$A = (g_x + g_y - 2g_z) / 4(g_x + g_y - g_z)^{1/2}$$

$$B = (g_y + g_x) / 2\{2(g_x + g_y - g_z)\}^{1/2}$$

$$C = (g_y - g_x) / 4(g_x + g_y - g_z)^{1/2}$$

と示すことができ、この時ヘム鉄における軸対称性の歪みを「 μ 」、斜方性の歪みを「R」、電磁波の波長を「 λ 」とし、結晶場解析における二つのパラメータである Rhombicity ($|R/\mu|$) および Tetragonality ($|\mu/\lambda|$) は

$$|\mu/\lambda| = [-A^2 + B^2 + C^2 + (AB + BC^2/A) / \sqrt{2}] / \sqrt{2(-AB + BC^2/A)}$$

$$|R/\mu| = |(2AC + \sqrt{2}BC) / (C^2 - A^2) / (\mu/\lambda)|$$

で求める。

ここで得られた「 $|\mu/\lambda|$ 」を x 軸に、「 $|R/\mu|$ 」を y 軸にとり、Blumberg と Peisach[166] によって報告された結晶場ダイアグラムにプロットし、軸配位子の同定を行った。

結果

1) LPS 投与ラット肝臓の EPR スペクトル

CCl_4 投与によって肝障害を誘発させたラットを、さらに LPS 処理をして 4 時間

後(LPSを投与してからiNOSが誘導されるまでに要する時間)に得られた肝臓のEPRスペクトルを得たところ、図30に示すように、正常ラット肝臓でみられるP450のシグナル($g = 2.40, 2.24, 1.93$)を検出した。また、 g 値2付近にP450が還元されて生じたP420にNOが配位した、3本の超微細

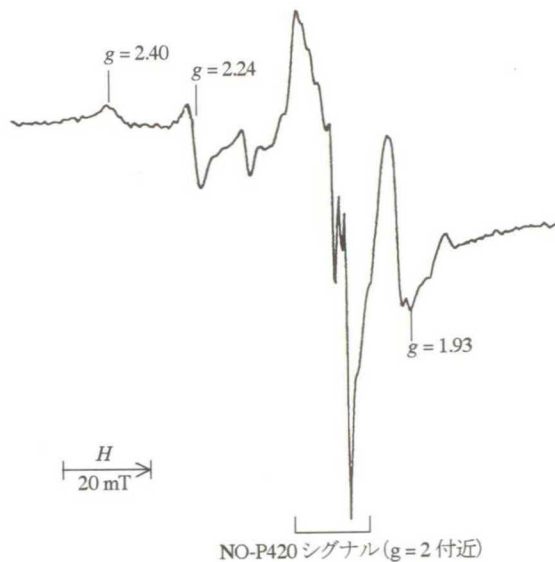


図30 LPS処理した肝障害モデルラット肝臓のEPRスペクトル

構造をもつNO-P420のシグナルを検出した。この結果は、Chamulitratら[88]の結果と一致した。一方、PCB126暴露ラット肝臓のEPRスペクトルでは、LPS処理によって肝障害モデルラットの肝臓でみられたNO-P420は検出されず、また、 $g = 2.49$ シグナルにおいても何の影響も見られなかった(データ省略)。このことから、 2.49 種-P450のヘム鉄にはNOより親和性の高い物質の結合が考えられる。

2) PCB126暴露ラット肝臓の還元剤処理によるEPRスペクトルの変化

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bwの条件でPCB126を単回投与したラット肝臓を還元性物質のアスコルビン酸ナトリウム、アジ化ナトリウム、もしくは亜二チオン酸ナトリウムで処理した。これらの還元性物質で処理した肝臓のEPRスペクトルにおいて、 g 値2.49シグナルへ及ぼす強度および波形における変化はみられなかった(データ省略)。

図31にMeImで処理したラット肝臓のEPRスペクトルを示したが、コントロール群で検出される g 値2.40シグナルは、MeIm処理によって消失し、新たに g 値2.45にシグナルを検出した。また、 g 値1.93シグナルも消失し g 値1.90に新たなシグナルを検出した(図31-B)。一方、PCB126を投与したラット肝臓をMeIm処理したところ、コントロールと同様に g 値2.40シグナルおよび g 値1.93が消失し、

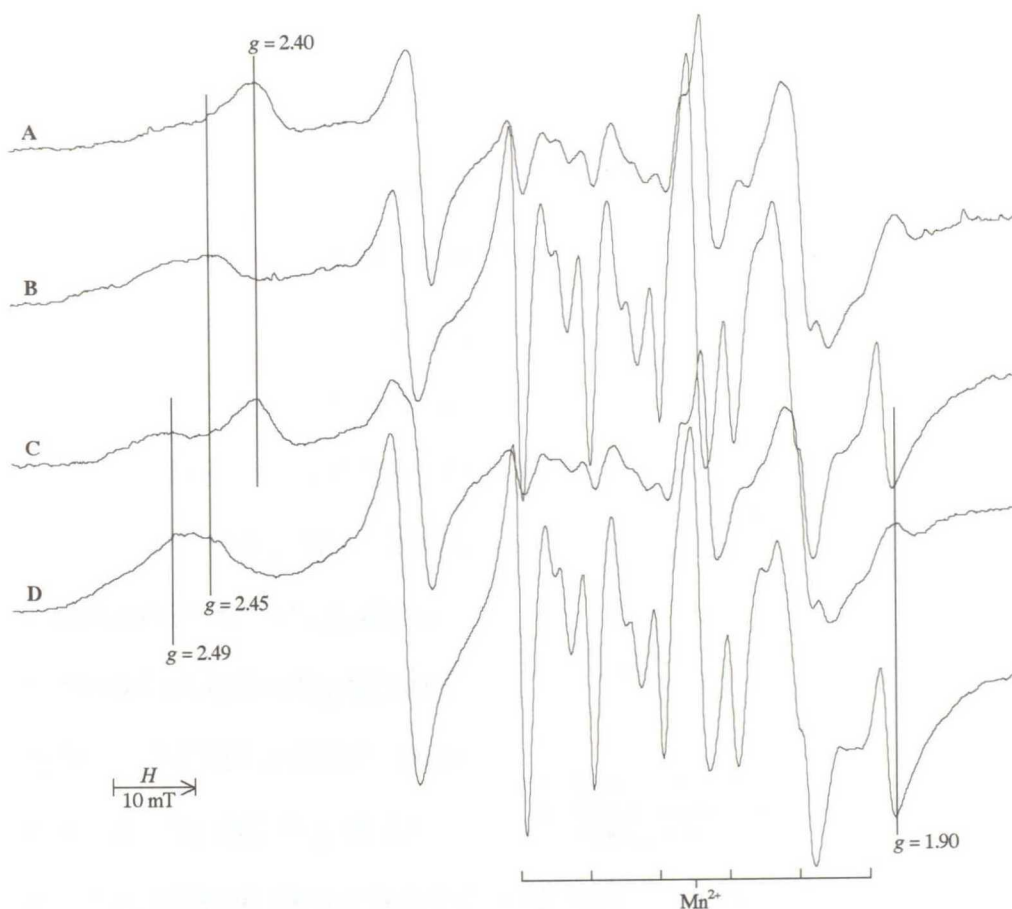


図 31 MeIm で処理した肝臓の EPR スペクトル
 A: コーンオイル投与したラット肝臓
 B: サンプル A を MeIm 処理した肝臓
 C: PCB126 100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ /単回投与したラット肝臓
 D: サンプル C を MeIm 処理した肝臓

g 値 2.45 および 1.90 にシグナルがみられた。PCB 投与によって検出される g 値 2.49 シグナルは、イミダゾール添加によって出現した g 値 2.45 シグナルと複合したことによると思われる、 g 値 2.45~2.49 にはっきりとしないシグナルピークをもち、コントロールに比べてブロードなシグナルとなった(図 31-D)。

コントロール群および PCB126 投与群のいずれの肝臓においても、MeIm 処理によって Mn^{2+} シグナルの強度が増加した。これは、EPR サイレントな Mn が MeIm の還元性によって化学的な還元を受け、EPR で測定可能な 2 価の Mn に変わったことによるものであり、Sakurai らの報告[8]と一致した。

3) PCB126 暴露ラット肝マイクロソームの MeIm 処理による EPR スペクトルの変化

100 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ の条件で PCB126 を単回投与したラット肝臓より得たマイクロソーム

画分についてEPR測定を行い、その結果を図32に示した。コントロール群のミクロソームをMeIm処理したEPRスペクトルでは、肝臓と同様にg値2.40シグナルが消失し、g値2.45に新たなシグナルを検出した(データ省略)。一方、PCB126投与群のミクロソームをMeIm処理したEPRスペクトルでは、肝臓サンプルでハッキリしなかったg値2.45付近のピークが明らかになり、MeIm処理によって出現したg値2.45シグナルと、PCB126投与に由来するg値2.49シグナルが検出された。これは、

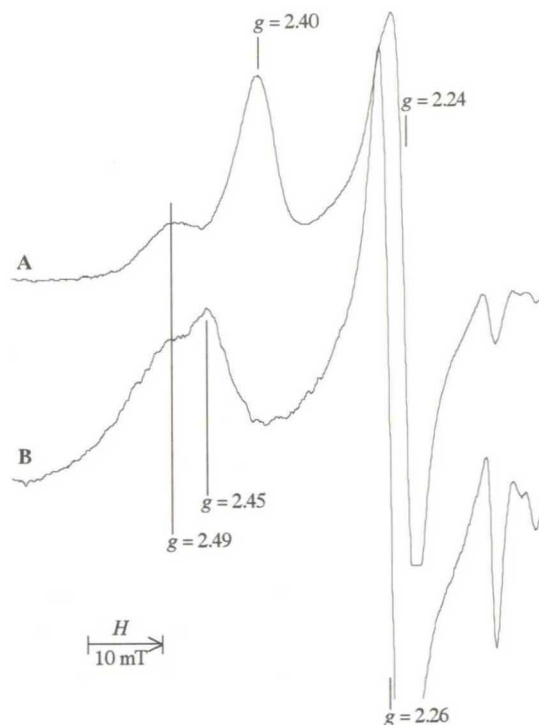


図32 MeImで処理した肝ミクロソームのEPRスペクトル
 A: PCB126 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/単回投与ラット肝ミクロソーム
 B: A + MeIm 処理

MeImによって2.49種-P450の配位子が還元されなかったことを示すものであった。

4) 2.49種-P450の結晶場解析および結晶場ダイアグラム

表12に結晶場解析結果を、図33にそれに基づいた結晶場ダイアグラムを示

表12 2.49種-P450の結晶場解析

# ^{*1}	サンプル	g_x	g_y	g_z	k	$ \mu/\lambda $	$ R/\mu $	Ref.
1	コントロール群	2.40	2.24	1.93	1.0077	6.670	0.446	本研究
2	PCB126投与群	2.49	2.26	1.87	1.0014	5.351	0.504	本研究
3	コントロール + MeIm	2.45	2.25	1.90	1.0051	5.950	0.489	本研究
4	P450PB ^{*2}	2.41	2.25	1.92	1.0066	6.359	0.426	Rufら[167]
5	P450PB + MeIm	2.54	2.26	1.88	1.0094	5.457	0.602	Rufら[167]
6	P450PB + n-Oct.amine ^{*3}	2.49	2.25	1.90	1.0093	5.849	0.573	Rufら[167]
7	P450PB + metyrapone	2.48	2.26	1.89	1.0070	5.716	0.517	Rufら[167]
8	P450MIT ^{*4}	2.42	2.26	1.91	1.0056	6.081	0.408	Luら[168]

*1 番号は図33と呼応

*2 P450PB: フェノバルビタール処理したラット肝臓

*3 n-Oct.amine: n-octylamine

*4 P450MIT: ミトコンドリアから調製したP450

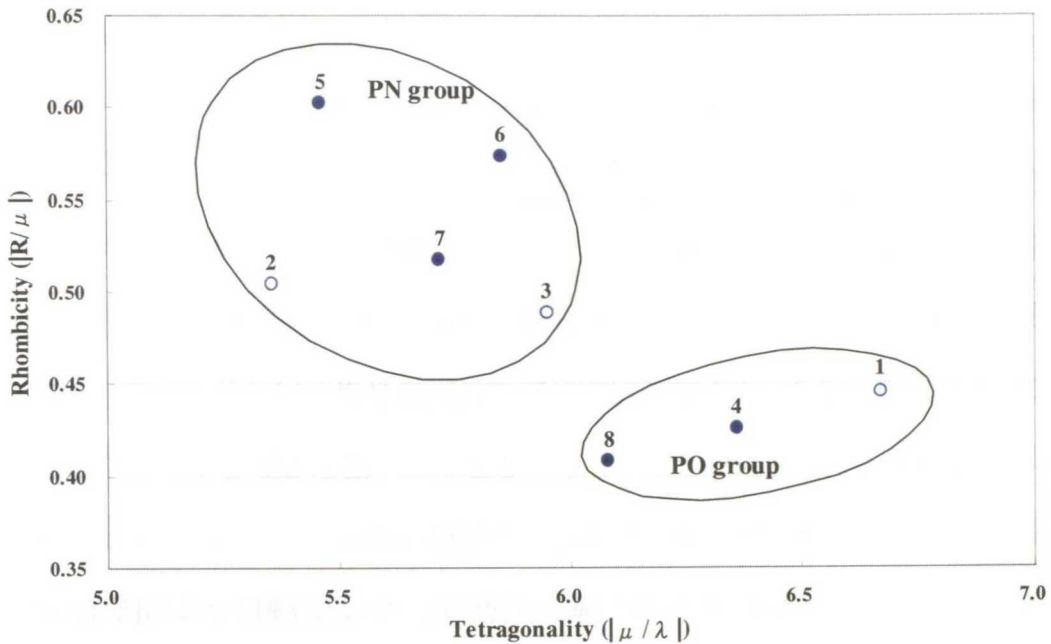


図 33 2.49 種-P450 の第 6 配位座における結晶場ダイアグラムによる軸配位子の比較
 ○本研究結果
 ●参考データ(表 12 に呼応)

した。2.40 種-P450, 2.49 種-P450, および 2.45 種-P450 (MeIm 処理に由来) のそれぞれの 3 つの g 値は, $g = 2.40, 2.24, 1.93$, $g = 2.49, 2.26, 1.87$, および $g = 2.45, 2.25, 1.90$ の時, 「 k 」がそれぞれ 1.0077, 1.0014, および 1.0051 と「 $k \approx 1$ 」が成り立った。この 3 つの g 値より求まる Rhombicity および Tetragonality は, 2.40 種-P450 で 6.670 と 0.446, 2.49 種-P450 で 5.351 と 0.504, および 2.45 種-P450 で 5.950 と 0.489 であった。

x 軸に Tetragonality を, y 軸に Rhombicity をとり, 得られたデータを結晶場ダイアグラムにプロットしたところ, 2.40 種-P450, 2.49 種-P450, および 2.45 種-P450 のいずれも Blumberg と Peisach [166] によって分類された P 群 (第 5 配位座にシステイン残基のチオレート硫黄をもつ) に属した。さらに, P 群は細分化されるが [169,170], 2.40 種-P450 は PO 群 (第 6 配位座に酸素を配位原子にもつ) に, PCB126 投与群で検出される 2.49 種-P450 および MeIm 処理群で検出される 2.45 種-P450 は, とともに PN 群 (第 6 配位座に窒素を配位原子にもつ) に分類された。したがって, 2.49 種-P450 は第 5 配位座にシステイン残基のチオレート硫黄を有し,

第 6 配位座に窒素を配位原子として有する P450 であった。

考 察

ヘムタンパク質の磁氣的性質は、ヘム鉄に対する面内配位子場と軸配位子場に影響を受ける。EPR 法においてヘム鉄は異方性をもつ 3 つのシグナルが観測されるが、この g 値も面内配位子場や軸配位子場に影響を受けてその値が変化する。また、得られる 3 つの g 値から軸の歪みを表す 2 つのパラメータである Rhombicity と Tetragonality を算出し、ヘム鉄の軸配位子を特定することが可能であり、この理論は Bohan[165]によって確立された。この理論に基づきすでに軸配位子が明らかである様々なヘム錯体の Rhombicity と Tetragonality が決定された。これら基礎的研究結果は Blumberg と Peisach[166]によって結晶場ダイアグラムとしてまとめられ、ヘム鉄タンパク質は、ヘム鉄に対する軸配位子の種類によって大きく、C, B, H, O, および P の 5 群に分類された。すなわち、C, B, H, および O は第 5 配位子としてヒスチジン残基のイミダゾールを有し、C 群は第 6 配位子にチオエーテル硫黄を、B 群はヒスチジンのイミダゾール窒素を、H 群は N_{δ} 位のプロトンが解離または水素結合しているヒスチジンのイミダゾール窒素、O 群は水酸化物イオンを有すヘム鉄タンパク質と分類された。一方、P 群は第 5 配位子としてシステイン残基のチオレート硫黄を有する。本研究において検出されたいずれの P450 も結晶場解析の結果、この P 群に属した。

P 群はさらに細分化され、第 6 配位子に H_2O を有す PO 群と、イミダゾールの窒素を有す PN 群に帰属する。本研究で検出した 2.40 種-P450 は PO 群に属し、PCB126 投与によって検出された 2.49 種-P450 および、肝臓をイミダゾール処理して得られた 2.45 種-P450 は PN 群に属すことを明らかにした。このことは PCB126 暴露によって正常な P450 が変性を受け、第 6 配位子に窒素が配位していることを意味している。肝臓において遊離した窒素源が存在する場合、窒素原子が酸素原子よりも

へム鉄との親和性が高いことに起因し[171], 正常ラットにおいて P450 が第 6 配位座に窒素原子を有する PN 群に属することが考えられるが, この理論はコントロール群の肝臓 EPR スペクトルより得られた 3 つの g 値 ($g = 2.40, 2.24, 1.93$) に基づく結晶場解析によって 2.40 種-P450 が PO 群に帰属することから否定される。このことから P450 において窒素原子の由来として考えられるのは, リシン残基のアミノ基の窒素かとヒスチジン残基のイミダゾール基の窒素に限られる。一方, PO 群および PN 群は共通して第 5 配座にシステイン残基のチオレート硫黄を有しており, へム鉄とチオレート硫黄の親和性は非常に高い[172]。さらに, この親和力に起因したトランス効果によって, へム鉄がシステイン残基のチオレート硫黄側に引き寄せられるため, へム鉄の第 6 配位座に有する物質はへムとの親和性が非常に高い物質に限られる。よって, へム鉄との親和性がヒスチジン残基のイミダゾール基の窒素よりも低いリシン残基のアミノ基の窒素が第 6 配位に有することはなく, このことは P450 のモデル実験系の本研究結果と一致する[161]。

以上より, 2.49 種-P450 は第 6 配位座に遠位ヒスチジン残基のイミダゾール基を有することを明らかにした。すなわち, 図 34-B に示した構造が推察された。これは PCB126 を投与したラット肝臓においてアスコルビン酸ナトリウム, アジ化ナトリウム,

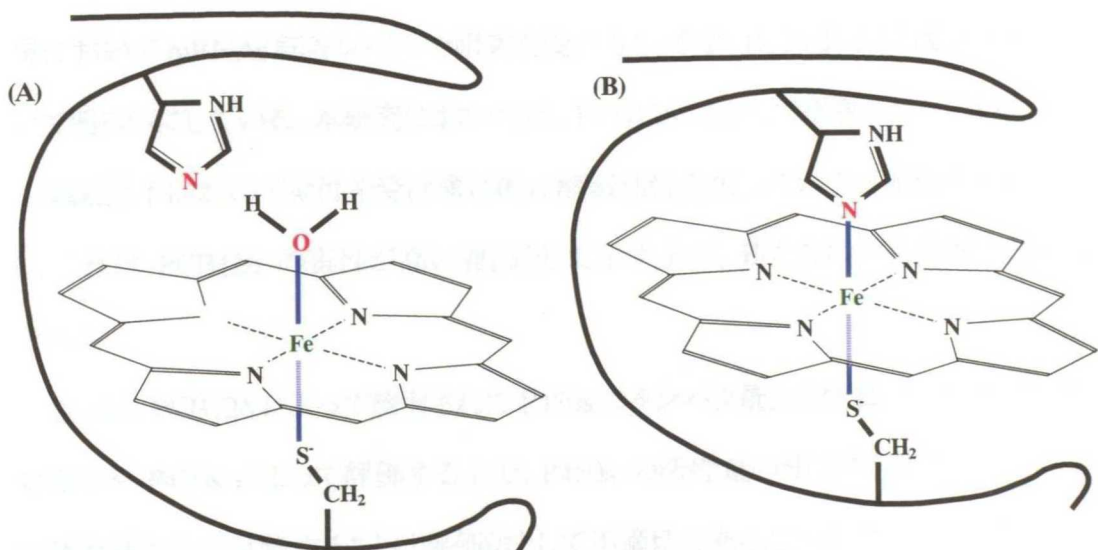


図 34 休止状態の P450 (2.40 種-P450) と 2.49 種-P450 の配位構造モデル
 A: 休止状態の P450 (2.40 種-P450)
 B: PCB126 によって誘導された 2.49 種-P450

および MeIm で処理した際に、 g 値 2.49 シグナルがまったく影響を受けなかったこと (図 32-B), また, PCB126 を投与しさらに LPS 投与したラット肝臓で NO-P420(P450) のシグナルが検出されなかったこと (P450 が誘導された状態で LPS を投与すると第 6 配位座が還元するとともに, 刺激を受けて産生されるマクロファージ由来の NO が P450 と結合する[88])から裏付けられる。

P450 は脂溶性の生体異物を水酸化することによって, その代謝に寄与する肝臓薬剤代謝酵素である。P450 の活性中心はポルフィリンのヘム鉄の第 6 配位座にあり, NAD(P)H に由来する 2 個の電子と分子状酸素を用いて一原子酸素添加反応を触媒する[173-175]。しかしながら, PCB126 の暴露によって誘導された P450 の一部もしくは大部分は, 構造変化を受け, 第 6 配位子に遠位ヒスチジン残基のイミダゾールの窒素を有した P450 であり, この 2.49 種-P450 は薬剤代謝能が失活した P450 であることが考えられる。

相対毒性が高い PCB126 など Co-PCBs が強毒性を示す理由として, 主にその塩素配位位置に依存した代謝の受けにくさによる生体内蓄積が原因としてあげられる [25,47,48]。また, Pang ら[176]は, Co-PCBs の生体への影響力が強い理由として, それら Co-PCBs によって誘導される P450IA および P450IB ファミリーが, P450s の発現において mRNAs 転写レベルで阻害を受けることを PCB126 および PCB169 について明らかにしている。本研究においては, PCB126 によって誘導された P450 がその軸配位子において変性を受け構造的に酵素活性を失っている可能性を明らかにし, これは PCB126 の毒性が高い要因として示す上で, 新たな機序を提案するものである。

さらに, PCB126 によって誘導された P450s のタンパク量と活性量は一致せず, 相対毒性を P450s によって評価する上で, P450s の活性量の測定を伴わず, タンパクの誘導量のみで試験することは評価法として不適切であること示した。

抗体試験において P450IA1/IA2 が PCB126 投与濃度に依存して誘導されること,

EPR 法において PCB126 によって誘導される P450 が、特異的な 2.49 種-P450 であることを示し、これらの結果は P450IA1/IA2 と 2.49 種-P450 の分子量が非常に近いことを意味し、2.49 種-P450 が P450IA1/IA2 の変性に由来する可能性を示唆するものであり、本研究結果である「PCB126 による P450 の構造変性」の結果を裏付けるものである。

要 約

前章において PCB126 の投与によって EPR 法で新たに検出された 2.49 種-P450 は、正常なラット肝臓で検出される 2.40 種-P450 が何らかの影響を受けて変性した可能性が示唆された。本章では 2.49 種-P450 の構造について試験することを目的とし、PCB126 を投与した後、LPS 処理したラット肝臓の EPR スペクトルの変化、PCB126 を投与して得られた肝臓を還元剤処理した際の EPR スペクトルの変化、また、ヘム鉄の異方性によって EPR 法で検出される 3 つの g 値に基づく結晶場解析を行なった。その結果、2.49 種-P450 のヘム鉄の第 6 配位子として遠位ヒスチジン残基のイミダゾールの窒素が配位していることを同定した。これは誘導された P450 もしくは既存の P450 が、PCB126 によって構造的変化を受けヘム鉄の配位子が親和性の高い窒素に置換し、P450 の酵素活性が構造上失活した可能性を示唆し、これは PCB126 が肝臓において代謝されにくい要因として新たな機序を提案するものである。

第6章 総括

内分泌かく乱化学物質(endocrine disrupting chemicals; EDCs)は、生殖系をかく乱するホルモン様物質として働くだけでなく、催奇形性や発育不良などの様々な毒性を示す物質である。わが国では、67種の化学物質をEDCsとしているが、世界中でその疫学調査、汚染状況および毒性評価を行っている。EDCsの中で、近年、特に注目される化学物質の一つにポリ塩化ビフェニル(polychlorinated biphenyls; PCBs)がある。PCBsの最大暴露経路はこれらに汚染された食品に由来する経口暴露であるので、PCBs汚染された食品を迅速に検出し流通から排除することはヒトの被曝を防ぐと考えられる。また、PCBsの生体内安定性・解毒メカニズムを理解することは、生体からのPCBsの排泄および代謝促進に有益な情報をもたらすであろう。

本研究では、PCBs投与したラットをPCBs暴露畜産動物のモデルとして、その際の生体への影響を検討する手段として肝臓へム錯体を指標にした電子常磁性共鳴吸収(EPR)法による解析を行った。PCBsには最も毒性の高い3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl(PCB126)を用いた。投与量は厚生省生活衛生局の研究報告データ(1999年)に基づきヒトが80年間で被曝されるであろうEDCsの総量を算出し、等価毒性量のPCB126(3 µg/kg bw)を定めた。すなわち、PCB126を0.3, 3.0, 30, および100 µg/kg body weight (kg bw)量で単回もしくは4回経口投与したSprague Dawleyラット(SDラット)を、PCBs暴露モデル動物として供試した。

まず、短期間にその量で被曝した際の血清値変化およびチトクローム P450s (P450s)の一種であるCYPIA1およびCYPIA2の誘導について検討した。PCB126を投与終了24時間後に安楽死させ血液および脳、脾臓、腎臓、肝臓を採取し、血清値および肝臓中のミクロソーム画分のCYPIA1およびCYPIA2を検出した。PCB126投与により血清値は若干変化したが投与量に依存した変化はみられず、一般的な肝障害でみられるような血清値の挙動は認められなかった。PCB126を3

μg/kg bw/単回もしくは 0.3 μg/kg bw/4 回投与量以上で CYPIA1 の誘導が、30 μg/kg bw/単回および 3 μg/kg bw/4 回投与量以上において CYPIA2 の誘導が、各々 ウェスタンブロッティング法により確認され、誘導量は検出したバンドの濃さから PCB126 投与量に依存して増加する傾向にあった。

PCB126 を投与した SD ラットの脳、脾臓、腎臓、肝臓および肝マイクロソームにおけるヘムタンパク質の解析を EPR 法によって行った。脳の EPR スペクトルは、PCB126 暴露によりカタラーゼと思われる EPR シグナルの減少が確認された。このことから、PCBs 暴露によって脳内に生じた活性酸素が消去されず酸化ストレスによって神経毒障害が引き起こされる可能性が示唆された。脾臓では低磁場領域での EPR スペクトルにおいて、PCB126 暴露により脾臓中のヘモグロビンが酸化ストレスを受け酸化型ヘモグロビンに変化し、結果的に高磁場領域でニトロシルヘモグロビンが減少していた。腎臓の EPR スペクトルにおいて、PCB126 投与によって P450s に由来すると思われる特異的な 3 つのシグナル波形と類似したシグナル波形を確認したが、PCB126 投与量に依存したシグナル強度の変化は認められなかった。脳、脾臓および腎臓から検出されたいずれの EPR スペクトルも、PCB126 投与量とのシグナル強度依存性を示すものは認められなかった。

肝臓の EPR スペクトルにおいて、正常ラットおよび PCB126 投与ラットのいずれでも検出されるシグナル ($g = 2.40, 2.24, 1.93$) と、PCB126 投与によってみられるシグナル ($g = 2.49, 2.26, 1.87$) の検出を認めた。両者のシグナルは P450s にみられる特異的なシグナル波形を示すので、それぞれの由来から、以下、2.40 種-P450 および 2.49 種-P450 と表記する。2.49 種-P450 は PCB126 の投与量に対してシグナル強度依存性を示した。これは、PCB 暴露量の生体内指標として、肝臓 EPR スペクトルが有用であることを示唆するものであった。また、2.49 種-P450 の EPR シグナルは妊娠期間中に PCB126 暴露を受けた胎児および子 SD ラットの肝臓からも検出された。

PCB126 の暴露により SD ラット肝臓で検出された 2.49 種-P450 の特異性について

検討することを目的として、3-メチルコラントレン、四塩化炭素、3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB169) あるいは 2,3,7,8-tetra chlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD)を投与した SD ラット肝臓について EPR 解析を行った。その結果、3-メチルコラントレン、四塩化炭素および PCB169 投与群の SD ラット肝臓では 2.49 種-P450 は検出されず、2,3,7,8-TCDD 投与群においてのみ g 値 2.49 にシグナルを検出した。このことから 2.49 種-P450 がいくつか特定の EDCs によって誘導されることを示唆した。一方、 g 値 2.49 および g 値 2.40 シグナル強度の数値化を試み、肝臓中の Mn シグナルを指標とした相対強度 $S_{2.49}$ および $S_{2.40}$ で表した。この結果、PCB126 暴露量に依存した $S_{2.49}$ の増加を認めると共に、GC/MS による定量の結果と傾向が一致し、被曝量の検討における EPR 法の有効性が示された。すなわち、EPR 法はヒトへの暴露経路として最も多いと考えられる家畜(哺乳動物)に関して、PCB126 など EDCs 暴露の有無あるいは被曝量の簡易的推定における簡便な検出法となり得ることを示唆するものであった。

2.49 種-P450 の構造について検討することを目的とし、PCB126 を投与しリポポリサッカライド(LPS)処理したラット肝臓の EPR スペクトルの変化、PCB126 を投与して得られた肝臓を還元性試薬で処理した際の EPR スペクトルの変化、また、ヘム鉄の異方性に由来して検出される 3 つの EPR シグナルの g 値に基づく結晶場解析を行なった。生体を LPS 処理すると、マクロファージが刺激され NO が誘導されるのに伴って、肝臓中にある P450 の 6 配位座がヘム鉄との親和性に依存して H_2O から NO に置換される。すなわち、正常な P450 の場合、 g 値 2.0 付近に NO-P450 特有の超微細構造をもつ EPR シグナルが検出されるが、2.49 種-P450 ではこの NO-P450 シグナルが検出されなかった。この結果より 2.49 種-P450 のヘム配位座に NO より親和性の高い物質が配位していることが示された。また、肝臓を適量の還元性試薬(アスコルビン酸ナトリウム、アジ化ナトリウム、亜二チオン酸ナトリウム、1-メチルイミダゾール)で処理した際、P450 のヘム配位座が還元を受けシグナル波形が変化することが

考えられるが、2.49 種-P450 はいずれの還元性試薬処理においても g 値 2.49 のシグナル波形において変化せず、この結果は LPS 処理の結果を支持するものであった。

次に、2.49 種-P450 由来の 3 つのシグナル ($g = 2.49, 2.26, 1.87$) を用い、Bohan (1977) によって確立された結晶場解析法に基づき 2 つの軸配位子同定パラメーターである rhombicity と tetragonality を求め、Blumberg と Peisach (1971) によって確立された結晶場ダイアグラムで分析した。正常ラットでみられる 2.40 種-P450 は rhombicity が 0.446, tetragonality が 6.670 で PO 群 (第 5 配位座にシステイン残基のチオレート硫黄を有し、第 6 配位座に酸素を配位原子として有するヘム鉄) に帰属した。P450s は休止状態において第 6 配位座に H_2O を有しているが、正常ラットで検出される 2.40 種-P450 は結晶場解析の結果より、休止状態の P450 であることを示した。一方、PCB126 投与に由来する 2.49 種-P450 は rhombicity が 0.504, tetragonality が 5.351 であるので PN 群 (第 5 配位座にシステイン残基のチオレート硫黄を有し、第 6 配位座に窒素を配位原子として有するヘム鉄) に帰属した。第 5 配位座にシステイン残基のチオレート硫黄を有した P450s において窒素原子の由来として考えられるのはイミダゾールに限られ、2.49 種-P450 は第 6 配位子として遠位ヒスチジン残基のイミダゾール基の窒素を有する P450 であることを同定した。以上の結果は、誘導された P450 もしくは既存の P450 が、PCB126 の被曝によって構造的な変化を受けヘム鉄の配位子が H_2O から親和性の高い窒素に置換し、この構造では P450 の酵素活性が失活していることを示唆するものであった。これは PCB126 による P450 の構造変性に伴った解毒酵素の不活化による EDCs 代謝の低下という新たな機序を提案するものである。

以上、本研究は PCB126 を投与したラット肝臓を対象に EPR 法を用いて 2.49 種-P450 の存在を明らかにし、この P450 が PCB126 被曝の検出における生体指標とな

ることを示した。また、結晶場解析により、2.49種-P450はPCB126の被曝に起因して構造変性をうけたこと明らかにしたものであり、この構造に起因したP450酵素活性の低下が示唆された。

謝 辞

本研究の実施にあたりまして麻布大学獣医学部動物応用科学科の坂田亮一教授にご指導を頂き、学位審査におきまして主査をお引き受け頂きました。本学位論文の提出にあたりまして、ここに深くお礼申し上げます。

また、学位審査の副査をお引き受け頂きました麻布大学獣医学部動物応用科学科の政岡俊夫教授ならびに太田光明教授におきましては有益なご指導を賜り、深くお礼申し上げます。

麻布大学獣医学部動物応用科学科の森田英利助教授には、本研究計画、実施、論文作成はもとより学生生活全般において、長期間に渡り多大なご指導ならびにご助言を賜りました。また、学位審査におきましては副査をお引き受け頂き、心よりお礼申し上げます。

財団法人山形県企業振興公社・生物ラジカル研究所副所長の吉村哲彦先生には、本研究の実施において有益なご示唆を頂戴し、特に EPR 研究分野における技術ならびにデータ解析において多大なご指導ならびにご助力を賜り、心よりお礼申し上げます。

麻布大学獣医学部獣医学科の赤堀文昭教授ならびに白井明志助教授には、本研究の実施において、環境ホルモン物質の取扱いにおいてご助力頂くと共に、抗体試験の分野において多大なご指導ならびにご助言を賜り、深くお礼申し上げます。

麻布大学獣医学部動物応用科学科の滝沢達也助教授には、本研究の実施において有益なご支援を頂戴し、特に実験動物の分野において多大なご指導ならびにご助力を賜り、深くお礼申し上げます。

麻布大学環境保健学部の中明賢二教授ならびに今野登助手には、ガスクロマトグラフ質量分析における PCBs の定量において、ご指導ならびにご助力を賜

り、深くお礼申し上げます。

日本電子(株)分析機器技術本部 応用研究センター ESR 応用研究室の増水章季氏には、電子常磁性共鳴吸収装置のオペレーティングにおいて多大なご指導ならびにご助言を賜り、深くお礼申し上げます。

本研究を実施するに当たり、麻布大学獣医学部食品科学研究室の大学院生、4年生、3年生の皆様の多大なるご協力に感謝致します。

本論文の作成に当たり、学生時代からご協力ならびにご支援いただいた現(株)セントラルフーズの山田真希子女史にお礼申し上げます。

最後に、私が麻布大学大学院 獣医学研究科において研究ならびに学生生活を行うに当たり、終始暖かく見守り支えていただいた両親に、深く感謝致します。

- [11] Kobayashi M., Masuda T., and Hara T. (1998) Effect of dietary protein on the production of ammonia in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science*, 86, 454-467.
- [12] 石本真久. (1998). 牛の飼料と健康. 日本畜産学会誌, 72, 1-10.
- [13] 石本真久. (1998). 牛の飼料と健康. 日本畜産学会誌, 72, 1-10.
- [14] Johnson J. D. (1994) Role of ammonia in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53, 271.
- [15] Klotzel G. (1972) Sulfur nutrition of the cow. *Proceedings of the Nutrition Society*, 31, 100.
- [16] Park D. J. and Lewis J. L. (1972) The effect of dietary protein on the production of ammonia in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society*, 31, 100.
- [17] Takagishi T. P., O'Rourke D. J., and Johnson J. D. (1994) The effect of dietary protein on the production of ammonia in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53, 271.

参考文献

- [1] 環境庁ダイオキシン評価研究会監修. (1997). *ダイオキシンのリスク評価*. 93-96. 中央法規出版. 東京.
- [2] Zavoisky E. (1945). *J. Phys. (USSR)*. **9**, 211, 245.
- [3] Abragam A., Bleaney B. (1970). *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*, Clarendon Press.
- [4] 河野雅弘. (1996). *バイオサイエンス ESR -I-*. 第2章 ESR の基礎. 桜井弘編著. 5-17. 広川書店. 東京.
- [5] 大矢博昭, 山内淳. (1989). *電子スピン共鳴 素材のマイクロキャラクタリゼーション*. 第2章 ESR の特徴と対象. 5-13. 講談社サイエンティフィク. 東京.
- [6] Di Giuseppe S., Placidi G., and Sotgiu A. (2001). New experimental apparatus for multimodal resonance imaging: initial EPRI and NMRI experimental results. *Phys. Med. Biol.* **46**, 1003-1016.
- [7] Fuchs J., Groth N., Herrling T., Milbradt R., Zimmer G., and Packer L. (1992). Electron paramagnetic resonance (EPR) imaging in skin: biophysical and biochemical microscopy. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 713-719.
- [8] Sakurai H., Nishida M., Yoshimura T., Takada J., and Koyama M. (1985). Partition of divalent and total manganese in organs and subcellular organelles of MnCl₂-treated rats studied by ESR and neutron activation analysis. *Biochem. Biophys. Acta.* **841**, 208-214.
- [9] Lecour S., Maupoil V., Zeller M., Laubriet A., Briot T., and Rochette L. (2001). Levels of nitric oxide in the heart after experimental myocardial ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **37**, 55-63.
- [10] Hojo Y., Okado A., Kawazoe S., and Mizutani T. (2000). *In vivo* singlet-oxygen generation in blood of chromium(VI)-treated mice: an electron spin resonance spin-trapping study. *Biol. Trace. Elem. Res.* **76**, 85-93.
- [11] Kohno M., Masumizu T., and Mori A. (1995). ESR demonstration of nitric oxide production from nitroglycerin and sodium nitrite in the blood of rats. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 451-457.
- [12] 青木直人. (1999). *内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体影響*. 1-5. 東京都立衛生研究所毒性部. 東京.
- [13] 宮崎奉之. (1998). *内分泌かく乱化学物質データ集*. 1-71. 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科. 東京.
- [14] Beltchly J. D. (1984). *Proceedings of PCB seminar*, ed. by Barros, M. C., Koemann H., and Visser R. Ministry of Housing, Physical Planning and Environment, the Netherlands. 343-372.
- [15] Murphy P. G. (1972). Sulfuric acid for the cleanup of animal tissues for analysis of acid-stable chlorinated hydrocarbon residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **55**, 1360-1362.
- [16] Paris D. F., and Lewis D. L. (1973). Chemical and microbial degradation of ten selected pesticides in aquatic systems. *Residue Rev.* **45**, 95-124.
- [17] Twaroski T. P., O'Brien M. L., Larmonier N., Glauert H. P., and Robertson L. W. (2001).

- Polychlorinated biphenyl-induced effects on metabolic enzymes, AP-1 binding, vitamin E, and oxidative stress in the rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **171**, 85-93.
- [18] Safe S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* **21**, 51-88.
- [19] Kuratsune M., Yoshimura T., Matsuzaka J., and Yamaguchi A. (1972). Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Perspect.* **1**, 119-128.
- [20] Jacobson J. L., and Jacobson S. W. (1997). Evidence for PCBs as neurodevelopmental toxicants in humans. *Neurotoxicology* **18**, 415-424.
- [21] Rylander L., Stromberg U., Dyremark E., Ostman C., Nilsson-Ehle P., and Hagmar L. (1998). Polychlorinated biphenyls in blood plasma among Swedish female fish consumers in relation to low birth weight. *Am. J. Epidemiol.* **147**, 493-502.
- [22] Lanting C. I., Fidler V., Huisman M., and Boersma E. R. (1998). Determinants of polychlorinated biphenyl levels in plasma from 42-month-old children. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, 135-139.
- [23] Risebrough R. W., Rieche P., Peakall D. B., Herman S. G., and Kirven M. N. (1968). Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature* **220**, 1098-1102.
- [24] 吉田 隆. (1999). 環境ホルモン汚染対策 -測定・評価から企業対応まで-. 255-292. 株エヌ・ティ・エス. 東京.
- [25] Tanabe S., Kannan N., Subramanian An., Watanabe S., and Tatsukawa R. (1987). Highly toxic coplanar PCBs: Occurrence, source, persistency and toxic implications to wildlife and humans. *Environ. Pollut.* **47**, 147-163.
- [26] Poland A., Greenlee W. F., and Kende A. S. (1979). Studies on the mechanism of action of the chlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **31**, 214-230.
- [27] Mason G., Sawyer T., Keys B., Bandiera S., Romkes M., Piskorska-Pliszczyńska J., Zmudzka B., and Safe S. (1985). Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs): correlation between *in vivo* and *in vitro* structure-activity relationships. *Toxicology* **37**, 1-12.
- [28] Ryan J. J., Gasiewicz T. A., and Brown J. F. Jr. (1990). Human body burden of polychlorinated dibenzofurans associated with toxicity based on the yusho and yucheng incidents. *Fundam. Appl. Toxicol.* **15**, 722-731.
- [29] De Vito M. J., Maier W. E., Diliberto J. J., and Birnbaum L. S. (1993). Comparative ability of various PCBs, PCDFs, and TCDD to induce cytochrome P450 1A1 and 1A2 activity following 4 weeks of treatment. *Fundam. Appl. Toxicol.* **20**, 125-130.
- [30] Safe S. H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 87-149.
- [31] Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld, A. T. C., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P. Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S. W., Kubiak, T., Larsen, J. C., van Leeuwen, F. X R., Liem, A. K. D., Nolt, C., Peterson, R. E., Poellinger, L., Safe, S.,

- Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Warn, F., and Zacharewski, T., (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health. Perspect.* **106**, 775-792.
- [32] Krishnan V., and Safe S. (1993). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**, 55-61.
- [33] Steinberg M. (1993). DIOXIN '93, Human exposure toxicology epidemiology. organohalogen compounds **13**, 357-360.
- [34] Matsumura T., Ito H., Yamamoto T. and Morita M. (1994). Development of pre-concentration system for PCDDs and PCDFs in seawater. *Organohal. Comp.* **19**, 109-112.
- [35] Matsumura T., Tsubota H., Ikeda Y., Chisaki Y., Ito H., and Morita M. (1998). Response factor of all 209 chlorobiphenyl compounds on capillary column SGE HT8. *Organohal. Comp.* **35**, 141-144.
- [36] Goksoyr A., Larsen H. E., and Husoy A. M. (1991). Application of a cytochrome P-450 IA1-ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **100**, 157-160.
- [37] Stanker L. H., Watkins B., Rogers N., and Vanderlaan M. (1987). Monoclonal antibodies for dioxin: antibody characterization and assay development. *Toxicology* **45**, 229-243.
- [38] Donnelly J. R., Grange A. H., Herron N. R., Nichol G. R., Jeter J. L., White R. J., Brumley W. C., and Van Emon J. (1996). Modular methodology for determination of polychlorinated biphenyls in soil as Aroclors and individual congeners. *J. AOAC Int.* **79**, 953-61.
- [39] Zajicek J. L., Tillitt D. E., Schwartz T. R., Schmitt C. J., and Harrison R. O. (2000). Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to gas chromatography (GC) –measurement of polychlorinated biphenyls (PCBs) in selected US fish extracts. *Chemosphere* **40**, 539-548.
- [40] Miyachi Y., Yamamoto N., Ichijo T., and Manome M. (2000). Environmental disrupters and endocrine disorders. *BIO Clinica* **15**, 108-113.
- [41] Safe S., Astroff B., Harris M., Zacharewski T., Dickerson R., Romkes M., and Biegel L. (1991). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds as antioestrogens: characterization and mechanism of action. *Pharmacol. Toxicol.* **69**, 400-409.
- [42] Collins W. T. Jr., and Capen C. C. (1980). Fine structural lesions and hormonal alterations in thyroid glands of perinatal rat exposed in utero and by the milk to polychlorinated biphenyls. *Am. J. Pathol.* **99**, 125-142.
- [43] Hurst J. G., Newcomer W. S., and Morrison J. A. (1974). Some effects of DDT, toxaphene and polychlorinated biphenyl on thyroid function in Bobwhite quail. *Poult. Sci.* **53**, 125-133.
- [44] Byrne J. J., Carbone J. P., and Hanson E. A. (1987). Hypothyroidism and abnormalities in the kinetics of thyroid hormone metabolism in rats treated chronically with polychlorinated

- biphenyl and polybrominated biphenyl. *Endocrinology* **121**, 520-527.
- [45] Sher E. S., Xu X. M., Adams P. M., Craft C. M. and Stein S. A. (1998). The effects of thyroid hormone level and action in developing brain: are these targets for the actions of polychlorinated biphenyls and dioxins? *Toxicol. Ind. Health*. **14**, 121-158.
- [46] Longnecker M. P., Gladen B. C., Patterson D. G. Jr., and Rogan W. J. (2000). Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in relation to thyroid hormone levels in neonates. *Epidemiology* **11**, 239-241.
- [47] 吉原新一, 吉村秀敏. (1980). 科学の領域増刊 環境汚染物質と毒性 有機物質篇. ポリ塩化ビフェニル(PCB)と関連化合物. 129, 57-68. 南江堂. 東京
- [48] McNulty W. P., Becker G. M., and Cory H. T. (1980). Chronic toxicity of 3,4,3',4'- and 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyls in rhesus macaques. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **56**, 182-190.
- [49] Yoshimura H. (1991). Our drug metabolism studies during the last four decades. *Yakugaku Zasshi* **111**, 737-55.
- [50] 武森重樹, 小南思郎. (1990). チトクロムP-450. 第1章チトクロムP-450の発見と沿革. 1-11. 東京大学出版会. 東京.
- [51] Hassoun E. A., Li F., Abushaban A., and Stohs S. J. (2000). The relative abilities of TCDD and its congeners to induce oxidative stress in the hepatic and brain tissues of rats after subchronic exposure. *Toxicology* **145**, 103-113.
- [52] Livingstone D. R., Mitchelmore C. L., O'Hara S. C., Lemaire P., Sturve J., and Forlin L. (2000). Increased potential for NAD(P)H-dependent reactive oxygen species production of hepatic subcellular fractions of fish species with *in vivo* exposure to contaminants. *Mar. Environ. Res.* **50**, 57-60.
- [53] Twarosk T. P., O'Brien M. L., and Robertson L. W. (2001). Effects of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on hepatic glutathione, glutathione-related enzymes, and selenium status: implications for oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 273-281.
- [54] Hassoun E. A., Li F., Abushaban A., and Stohs S. J. (2001). Production of superoxide anion, lipid peroxidation and DNA damage in the hepatic and brain tissues of rats after subchronic exposure to mixtures of TCDD and its congeners. *J. Appl. Toxicol.* **21**, 211-219.
- [55] Jin X., Kennedy S. W., Di Muccio T., and Moon T. W. (2001). Role of oxidative stress and antioxidant defense in 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced toxicity and species-differential sensitivity in chicken and duck embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**, 241-248.
- [56] Schlezinger J. J., and Stegeman J. J. (2001). Induction and suppression of cytochrome P450 1A by 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl and its relationship to oxidative stress in the marine fish scup (*Stenotomus chrysops*). *Aquat. Toxicol.* **52**, 101-115.
- [57] Schilderman P. A., Maas L. M. Pachen D. M., de Kok T. M., Kleinjans J. C., and van Schooten F. J. (2001). Induction of DNA adducts by several polychlorinated biphenyls. *Environ. Mol. Mutagen.* **36**, 79-86.
- [58] Birnbaum L. S., Harris M. W., Miller C. P., Partt R. M., and Lamb J. C. (1986). Synergistic interaction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and hydrocortisone in the induction of

- cleft palate in mice. *Teratology* **33**, 29-35.
- [59] Van den Heuvel, J. P., Clark, G. C., Kohn, M. C., Tritscher, A. M., Greenlee, W. F., Lucier, G. W., and Bell, D. A. (1994). Dioxin-responsive genes: examination of dose-response relationships using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* **54**, 62-68.
- [60] Neubert, R., Jacob-Muller, U., Stahlmann, R., Helge, H., and Neubert, D. (1990). Polyhalogenated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans and the immune system. 1. Effects on peripheral lymphocyte subpopulations of a non-human primate (*Callithrix jacchus*) after treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Arch. Toxicol.* **64**, 345-359.
- [61] Burleson, G. R., Lebecq, H., Yang, Y. G., Ibanes, J. D., Pennington, K. N., and Birnbaum, L. S. (1996). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on influenza virus host resistance in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **29**, 40-47.
- [62] DeVito, M. J., Menache, M. G., Diliberto, J. J., Ross, D. G., and Birnbaum L. S. (2000). Dose-response relationships for induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzyme activity in liver, lung, and skin in female mice following subchronic exposure to polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **167**, 157-162.
- [63] Schwetz, B. A., Norris, J. M., Sparschu, G. L., Rowe, U. K., Gehring, P. J., Emerson, J. L., and Gerbig, C. G. (1973) Toxicology of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ. Health Perspect.* **5**, 87-99.
- [64] Faqi, A. S., Dalsenter, P. R., Merker, H. J., and Chahoud, I. (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.
- [65] Schantz, S. L., and Bowman, R. E. (1989). Learning in monkeys exposed perinatally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol. Teratol.* **11**, 13-19.
- [66] Rier, S. E., Martin, D. C., Bowman, R. E., Dmowski W. P., and Becker, J. L. (1993). Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.* **21**, 433-441.
- [67] Ohsako, S., Miyabara, Y., Nishimura, N., Kurosawa, S., Sakaue, M., Ishimura, R., Sato, M., Takeda, K., Aoki, Y., Sone, H., Tohyama, C., and Yonemoto, J. (2001). Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5 α -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol. Sci.* **60**, 132-143.
- [68] Mably, T. A., Moore, R. W., Goy, R. W., and Peterson, R. E. (1992). In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **114**, 108-117.
- [69] Gehrs, B. C., Riddle, M. M., Williams, W. C., and Smialowicz R. J. (1997). Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to

- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. II. Effects on the pup and adult. *Toxicology* **122**, 229-240.
- [70] Gray, L. E. Jr., Ostby, J. S., and Kelce, W. R. (1997). A dose-response analysis of the reproductive effects of single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evan hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **146**, 11-20.
- [71] Gray, L. E. Jr., Wolf, C., Mann, P., Ostby, J. S. (1997). In utero exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol.* **146**, 237-244.
- [72] Narasimhan, T., Craig A., Arellano, L., Harper, N., Howie, L., Menache, M., Birnbaum, L., and Safe, S. (1994). Relative sensitivities of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced Cyp1a-1 and Cyp1a-2 gene expression and immunotoxicity in female B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **23**, 598-607.
- [73] Mably, T. A., Bjerke, D. L., Moore R. W., Gendron-Fitzpatrick, A., and Peterson, R. E. (1992). In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **114**, 118-126.
- [74] Courtney K. D. and moore, J. A. (1971). Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **20**, 396-403.
- [75] Kociba, R. J., Keyes, D. G., Beyers, J. E., Carreon, R. M., Wade, C. E., Dittenber, D. A., Kalnins, R. P., Frauson, L. E., Park, C. N., Barnard, S. D., Hummel, R. A., and Humiston C. G. (1978). Results of two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **46**, 279-303.
- [76] Couture, L. A., Harris, M. W., and Birnbaum, L. S. (1990). Characterization of the peak period of sensitivity for the induction of hydronephrosis in C57BL/6N mice following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.* **15**, 142-150.
- [77] Baumann, M. (1979). Short term effects of Clophen A 50 and of dichlorobiphenyl in rats. *Arch. Toxicol. Suppl.* **2**, 311-314.
- [78] Lawton, R. W., Ross, M. R., Feingold, J., and Brown, J. F. Jr. (1985). Effects of PCB exposure on biochemical and hematological findings in capacitor workers. *Environ. Health Perspect.* **60**, 165-184.
- [79] Steinberg, K. K., Freni-Titulaer, L. W., Rogers, T. N., Burse, V. W., Mueller, P. W., Stehr, P. A., Miller, D. T., and Steele, G. (1986). Effects of polychlorinated biphenyls and lipemia on serum analyses. *J. Toxicol. Environ. Health* **19**, 369-381.
- [80] Chu, I., Villeneuve, D. C., Yagminas, A., LeCavalier, P., Poon, R., Feeley, M., Denedy, S. W., Seegal, R. F., Hakansson, H., and Ahlborg, U. G. (1994). Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in the rat. I. Clinical, biochemical, hematological, and histopathological changes. *Fundam. Appl. Toxicol.* **22**, 457-468.
- [81] Stehr-Green, P. A., Welty E., Steele, G., and Steinberg, K. (1986). Evaluation of potential health effects associated with serum polychlorinated biphenyl levels. *Environ. Health Perspect.* **70**, 255-259.

- [82] Van Der Burght, A. S., Kreikamp, A. P., Horbach, G. J., Seinen, W., and Van Den Berg, M. (1998). Characterization of CYP1A in hepatocytes of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and induction by different substituted polychlorinated biphenyls (PCBs). *Arch. Toxicol.* **72**, 630-636.
- [83] Sinjari, T., Tornwall, U., and Darnerud, P. O. (1993). Induction of 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in mice fetuses by the PCB-congener 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Xenobiotica* **23**, 107-114.
- [84] Diliberto, J. J., Burgin, D. E., and Birnbaum, L. S. (1999). Effects of CYP1A2 on disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in CYP1A2 knockout and parental (C57BL/6N and 129/Sv) strains of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **159**, 52-64.
- [85] DeVito, M. J., Diliberto, J. J., Ross, D. G., Menache, M. G., and Birnbaum, L. S. (1997). Dose-response relationships for polyhalogenated dioxins and dibenzofurans following subchronic treatment in mice. I. CYP1A1 and CYP1A2 enzyme activity in liver, lung, and skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **147**, 267-280.
- [86] Van Birgelen, A. P., Van der Kolk, J., Fase, K. M., Bol, I., Poiger, H., Brouwer, A., and Van den Berg, M. (1994). Toxic potency of 3,3,4,4,5-pentachlorobiphenyl relative to and in combination with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a subchronic feeding study in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127**, 209-221.
- [87] Smith, A. B., Schloemer, J., Lowry L. K., Smallwood, A. W., Ligo, R. N., Tanaka, S., Stringer, W., Jones, M., Hervin, R., and Glueck, C. J. (1982). Metabolic and health consequences of occupational exposure to polychlorinated biphenyls. *Br. J. Ind. Med.* **39**, 361-369.
- [88] Chamulitrat, W., Jordan, S. J., and Mason, R. P. (1994). Nitric oxide production during endotoxic shock in carbon tetrachloride-treated rats. *Mol. Pharmacol.* **46**, 391-397.
- [89] 武森重樹, 小南思郎. (1990). チトクロムP-450. 第2章チトクロムP-450の構造と機能. 14-29. 東京大学出版会. 東京.
- [90] Higuchi, K. (1976). PCB Poisoning and Pollution. Tokyo and Academic Press. Kodansha. New York.
- [91] Sundstrom, G., Hutzinger, O., Karasek, F. W., and Michnowicz, J. (1976). Environmental chemistry of substitutes for polychlorinated biphenyls. I Composition and properties of an alkylchlorobiphenyl product. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **59**, 982-988.
- [92] Whysner, J., and Wang, C. X. (2001). Hepatocellular iron accumulation and increased cell proliferation in polychlorinated biphenyl-exposed Sprague-Dawley rats and the development of hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Sci.* **62**, 36-45.
- [93] Davies R., Clothier, B., and Smith, A. G. (2000). Mutation frequency in the lacI gene of liver DNA from lambda/lacI transgenic mice following the interaction of PCBs with iron causing hepatic cancer and porphyria. *Mutagenesis* **15**, 379-386.
- [94] Lin, P. H., Sangaiiah, R., Ranasinghe, A., Upton, P. B., La, D. K., Gold, A., and Swenberg, J. A. (2000). Formation of quinonoid-derived protein adducts in the liver and brain of Sprague-Dawley rats treated with 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Chem. Res. Toxicol.* **13**,

710-718.

- [95] Maier, W. E. Kodavanti P. R., Harry G. J., and Tilson, H. A. (1994). Sensitivity of adenosine triphosphatases in different brain regions to polychlorinated biphenyl congeners. *J. Appl. Toxicol.* **14**, 225-229.
- [96] Niwa, Y. (1999). Oxidative injury and its defense system in vivo. *Rinsho. Byori.* **47**, 189-209.
- [97] De Matteis F., Dawson, S. J., Boobis, A. R., and Comoglio, A. (1991). Inducible bilirubin-degrading system of rat liver microsomes: role of cytochrome P450IA1.
- [98] Hoffman, D. J., Melancon, M. J. Klein, P. N. Rice, C. P., Eisemann, J. D., Hines R. K., Spann, J. W., and Pendleton, G. W. (1996). *Fundam. Appl. Toxicol.* **34**, 188-200.
- [99] Scheidt, W. R., and Gouterman, M. (1983). Part I, Iron Porphyrins. ed. by Lever, A. B. P., and Gray, H. B. p91-139. Addison-Wesley, London.
- [100] 大矢博昭, 山内淳. (1989). 電子スピン共鳴 素材のマイクロキャラクタリゼーション. 第5章 ESR測定の実際. 35-54. 講談社サイエンティフィック. 東京.
- [101] 牧野圭裕. (1996). バイオサイエンス ESR-I. 第4章2節 ESRスペクトルの解析法. 桜井弘編著. 39-53. 広川書店. 東京.
- [102] 桐野豊, 小沢俊彦. (1991). エッセンス ESR. 第1章 ESR入門. 3-15. 広川書店. 東京.
- [103] 桜井弘. (1996). バイオサイエンス ESR-II. 第6章2節 生体関連金属イオンの ESR. 桜井弘編著. 297-321. 広川書店. 東京.
- [104] 河野雅弘. (1996). バイオサイエンス ESR-I. 第4章3節 ESRスペクトル測定の実際. 桜井弘編著. 54-66. 広川書店. 東京.
- [105] Palmer, G. (1979). The Porphyrins, Vol. IV. ed. by Dolphin, D. p313-353. Academic, New York.
- [106] Palmer, G. (1983). Iron Porphyrins, Part II. ed. by Lever, A. B. P., and Gray, H. B. p43-88. Addison-Wesley, London.
- [107] Peisach, J., Blumberg, W. E., Ogawa, S., Rachmilewitz, E. A., and Oltzik, R. (1971). The effects of protein conformation on the heme symmetry in high spin ferric heme proteins as studied by electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.* **246**, 3342-3355.
- [108] Armbrrecht, H. J., Gunter, T. E., Puskin, J. S., and Terepka, A. R. (1976). An electron paramagnetic resonance study of Mn^{2+} uptake by the chick chorioallantoic membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **426**, 557-569.
- [109] Buttlair, D. H., Reed, G. H., and Himes, R. (1975). Electron paramagnetic resonance and water proton relaxation rate studies of formyltetrahydrofolate synthetase-manganous ion complexes. Evidence for involvement of substrates in the promotion of a catalytically competent active site. *J. Biol. Chem.* **250**, 261-270.
- [110] Hori, H., Tsubaki, M., Yu, N. T., and Yonetani, T. (1991). Light absorption, electron paramagnetic resonance and resonance Raman characteristics of nitridochromium(V) protoporphyrin-IX and its reconstituted hemoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1077**, 392-399.
- [111] Gupta, R. K., Fung, C. H., and Mildvan, A. S. (1976). Chromium(III)-adenosine

- triphosphate as a paramagnetic probe to determine intersubstrate distances on pyruvate kinase Detection of an active enzyme-metal-ATP-metal complex. *J. Biol. Chem.* **251**, 2421-2430.
- [112] Marino, A. A., and Becker, R. O. (1969). Temperature dependence of the EPR signal in tendon collagen. *Nature* **222**, 164-165.
- [113] Ohnishi, T. Lim, J., Winter, D. B., and King, T. E. (1976). Thermodynamic and EPR characteristics of a HiPIP-type iron-sulfur center in the succinate dehydrogenase of the respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **251**, 2105-2109.
- [114] King, T. E., Ohnishi, T., Winter, D. B., and Wu, J. T. (1976). Biochemical and EPR proves for structure-function studies of iron sulfur centers of succinate dehydrogenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **74**, 182-227.
- [115] Kosaka, H., Sawai, Y., Sakaguchi, H., Kumura, E. Harada, N., Watanabe, M., and Shiga, T. (1994). ESR spectral transition by arteriovenous cycle in nitric oxide hemoglobin of cytokine-treated rats. *Am. J. Physiol.* **266**, 1400-1405.
- [116] Bastian, N. R., Kay, C. J., Barber, M. J., and Rajagopalan, K. V. (1991). Spectroscopic studies of the molybdenum-containing dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **266**, 45-51.
- [117] Toghrol, F., and Southerland, W. M. (1983). Purification of *Thiobacillus novellas* sulfite oxidase. Evidence for the presence of heme and molybdenum. *J. Biol. Chem.* **258**, 6762-6766.
- [118] Johnson, J. L., and Rajagopalan, K. V. (1977). Tryptic cleavage of rat liver sulfite oxidase Isolation and characterization of molybdenum and heme domains. *J. Biol. Chem.* **252**, 2017-2025.
- [119] 武森重樹, 小南思郎. (1990). チトクロム P-450. 第9章薬物(ゼノバイオティクス)代謝. 116-131. 東京大学出版会. 東京.
- [120] Astorg, P. Gradelet, S., Leclerc, J., and Siess, M. H. (1997). Effects of provitamin A or non-provitamin A carotenoids on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in mice. *Nutr. Cancer* **27**, 245-249.
- [121] Tomita, S., Okuyama, E., Ohnishi, T., and Ichikawa, Y. (1996). Characteristic properties of a retinoic acid synthetic cytochrome P-450 purified from liver microsomes of 3-methylcholanthrene-induced rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1290**, 273-281.
- [122] Matsuda, T., Imaoka, S., Funae, Y., Otori, K., and Fukushima, S. (1995). Induction of CYP isoenzymes in various organs of rats by 3-methylcholanthrene of beta-naphthoflavone. *Cancer Lett.* **97**, 137-143.
- [123] Bastien, M. C., Leblond, F., Pichette, V., and Villeneuve, J. P. (2000). Differential alteration of cytochrome P450 isoenzymes in two experimental models of cirrhosis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **78**, 912-919.
- [124] Nomura, A., Sakurai, E., and Hikichi, N. (1998). Effect of carbon tetrachloride-induced hepatic injury on stereoselective N-demethylation of chlorpheniramine by rat hepatic cytochrome P450 2C11 isozyme. *Yakugaku Zasshi* **118**, 317-23.
- [125] Wang, P. Y., Kaneko, T., Tsukada, H., Nakano, M., Nakajima, T., and Sato, A. (1997). Time

- courses of hepatic injuries induced by chloroform and by carbon tetrachloride: comparison of biochemical and histopathological changes. *Arch. Toxicol.* **71**, 638-645.
- [126] Sauer, P. J., Huisman, M., Koopman-Esseboom, C., Morse, D. C., Smits-van Prooije, A. E., van de Berg, K. J., Tuinstra, L. G., van der Paauw C. G., Boersma, E. R., and Weisglas-Kuperus, N. (1994). Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins on growth and development. *Hum. Exp. Toxicol.* **13**, 900-906.
- [127] Seo, B. W., Li, M. H., Hansen, L. G., Moore, R. W., Peterson, R. E., and Schantz, S. L. (1995). Effects of gestational and lactational exposure to coplanar polychlorinated biphenyl (PCB) congeners or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (RCDD) on thyroid hormone concentrations in weanling rats. *Toxicol. Lett.* **78**, 253-262.
- [128] Lang, V. (1992). Polychlorinated biphenyls in the environment. *J. Chromatogr.* **595**, 1-43.
- [129] Gunsalus, I. C., and Sligar, S. G. (1978). Oxygen reduction by the P450 monooxygenase systems. *Adv Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **47**, 1-44.
- [130] Sligar, S. G., Gelb, M. H., and Heimbrook, D. C. (1984). Bio-organic chemistry and cytochrome P-450-dependent catalysis. *Xenobiotica* **14**, 63-86.
- [131] Ullrich, V. (1979). Cytochrome P450 and biological hydroxylation reactions. *Top Curr. Chem.* **83**, 67-104.
- [132] Waterman, M. R., and Estabrook, R. W. (1983). The induction of microsomal electron transport enzymes. *Mol. Cell Biochem.* **53**, 267-278.
- [133] Coon, M. J. (1983). Cytochrome P-450: a multifaceted catalyst. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **41**, 41-48.
- [134] Lewis, D. F. (1986). Physical methods in the study of the active site geometry of cytochromes P-450. *Drug Metab. Rev.* **17**, 1-66.
- [135] Fouchecourt, M. O., Berny, P., and Riviere, J. L. (1998). Bioavailability of PCBs to male laboratory rats maintained on litters of contaminated soils: PCB burden and induction of alkoxyresorufin *O*-dealkylase activities in liver and lung. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, 680-687.
- [136] Machala, M., Neca, J., Drabek, P., Ulrich, R., Sabatova, V., Nezveda, K., Raszyk, J., and Gajduskova, V. (1998). Effects of chronic exposure to PCBs on cytochrome P450 systems and steroidogenesis in liver and testis of bulls (*Bos taurus*). *Comp Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **120**, 65-70.
- [137] Machala, M., Drabek, P., Neca, J., Kolarova, J., and Svobodova, Z. (1998). Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in trout liver. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **41**, 107-111.
- [138] Schiestl, R. H., Aubrecht, J., Yap, W. Y., Kandikonda, S., and Sidhom, S. (1997). Polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induce intrachromosomal recombination *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **57**, 4378-4383.
- [139] Otto, D. M., Sen, C. K., Casley, W. L., and Moon, T. W. (1997). Regulation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl induced cytochrome P450 metabolism by thiols in tissues of rainbow trout. *Comp Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **117**, 299-309.

- [140] White, R. D., Shea, D., Solow, A. R., and Stegeman, J. J. (1997). Induction and post-transcriptional suppression of hepatic cytochrome P450 1A1 by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Biochem Pharmacol.* **53**, 1029-1040.
- [141] Bandiera, S. M., Torok, S. M., Letcher, R. J., and Norstrom, R. J. (1997). Immunoquantitation of cytochromes P450 1A and P450 2B and comparison with chlorinated hydrocarbon levels in archive polar bear liver samples. *Chemosphere* **34**, 1469-1479.
- [142] Ikegwuonu, F. I., Ganem, L. G., Larson, M. C., Shen, X., and Jefcoate, C. R. (1996). The regulation by gender, strain, dose, and feeding status of the induction of multiple forms of cytochrome P450 isozymes in rat hepatic microsomes by 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **139**, 33-41.
- [143] Lake, B. G., Charzat, C., Tredger, J. M., Renwick, A. B., Beaman, J. A., and Price, R. J. (1996). Induction of cytochrome P450 isoenzymes in cultured precision-cut rat and human liver slices. *Xenobiotica* **26**, 297-306.
- [144] Machala, M., Matlova, L., Svoboda, I., and Nezveda, K. (1996). Induction effects of polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons and other widespread aromatic environmental pollutants on microsomal monooxygenase activities in chick embryo liver. *Arch. Toxicol.* **70**, 362-367.
- [145] Dubois, M., De Waziers, I., Thome, J. P., and Kremers, P. (1996). P450 induction by Aroclor 1254 and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in cultured hepatocytes from rat, quail and man: interspecies comparison. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **113**, 51-59.
- [146] Madra, S. Mann, F., Francis, J. E., Manson, M. M., and Smith, A. G. (1996). Modulation by iron of hepatic microsomal and nuclear cytochrome P450, and cytosolic glutathione S-transferase and peroxidase in C57BL/10ScSn mice induced with polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **136**, 79-86.
- [147] Beebe, L. E., Fornwald, L. W., Alworth, W. L., Dragnev, K. H., Lubet, R. A. (1995). Effect of dietary Aroclor 1254 exposure on lung and kidney cytochromes P450 in female rats: evidence for P4501A2 expression in kidney. *Chem. Biol. Interact.* **97**, 215-227.
- [148] De Jongh, J., DeVito, M., Nieboer, R., Birnbaum, L., and Van den Berg, M. (1995). Induction of cytochrome P450 isoenzymes after toxicokinetic interactions between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in the liver of the mouse. *Fundam. Appl. Toxicol.* **25**, 264-270.
- [149] Koga, N., Kikuichi, N., Nishimura, N., and 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.
- [150] Koga, N., Nishimura, N., Kuroki, H., Masuda, Y., and Yoshimura, H. (1994). Metabolism of 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P4501A1. *Xenobiotica* **24**, 775-783.
- [151] Bouwman, C. A., Van Dam, E., Fase, K. M., Koppe, J. G., Seinen, W., Thijssen, H. H. Vermeer, C., and Van den Berg, M. (1999). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

- or 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on vitamin K-dependent blood coagulation in male and female WAG/Rij-rats. *Chemosphere* **38**, 489-505.
- [152] Schlezinger, J. J., and Stegeman, J. J. (2000). Dose and inducer-dependent induction of cytochrome P450 1A in endothelia of the eel, including in the swimbladder rete mirabile, a model microvascular structure. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 701-708.
- [153] Pang, S., Cao, J. Q., Katz, B. H., Hayes, C. L., Sutter, T. R., and Spink, D. C. (1999). Inductive and inhibitory effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls on estrogen metabolism and human cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 29-38.
- [154] Koga, N., Kanamaru, T., Oishi, N., Matsushima, Y., Kato, S., Yoshimura, H., and Kuroki, H. (1999). Comparative study on metabolism of three tetrachlorobiphenyls with animal liver microsomes. *Fukuoka Igaku Zasshi* **90**, 220-230.
- [155] Hugla, J. L., and Thome, J. P. (1999). Effects of polychlorinated biphenyls on liver ultrastructure, hepatic monooxygenases, and reproductive success in the barbell. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **42**, 265-273.
- [156] Korytko, P. J. Casey, A. C., Bush, B., and Quimby, F. W. (1999). Induction of hepatic cytochromes P450 in dogs exposed to a chronic low dose of polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Sci.* **47**, 52-61.
- [157] Ertl, R. P., Alworth, W. L., and Winston, G. W. (1999). Liver microsomal cytochromes P450-dependent alkoxyphenoxazone *O*-dealkylation *in vitro* by alligator and rat: activities, inhibition, substrate preference, and discrimination factors. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **13**, 17-27.
- [158] Ronis, M. J., Rowlands, J. C., Hakkak, R., and Badger, T. M. (2001). Inducibility of hepatic CYP1A enzymes by 3-methylcholanthrene and isosafrole differs in male rats fed diets containing casein, soy protein isolate or whey from conception to adulthood. *J. Nutr.* **131**, 1180-1188.
- [159] Weaver, R. J., Dunbar, B., Dickins, M., Melvin, W. T., Fothergill, J., and Burke, M. D. (1994). Evidence for a new cytochrome P450 form induced by 3-methylcholanthrene in rats. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1457-1460.
- [160] Alterman, M. A., Carvan, M. J., and Busbee, D. L. (1995). Dose-dependent induction of the microsomal monooxygenase system by Phenobarbital and 3-methylcholanthrene in the *ad libitum* and calorie-restricted female rat. *Xenobiotica* **25**, 17-26.
- [161] 吉村哲彦. Personal communication.
- [162] Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A. M., Maves, S. A., Benson, D. E., Sweet, R. M., Ringe, D., Petsko, G. A., and Sligar, S. G. (2000). The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science* **287**, 1615-1622.
- [163] Yonetani, T., and Schleyer, H. (1967). Studies on cytochrome *c* peroxidase. IX. The reaction of ferrimyoglobin with hydroperoxides and a comparison of peroxide-induced compounds of ferrimyoglobin and cytochrome *c* peroxidase. *J. Biol. Chem.* **242**, 1974-1979.
- [164] Taylor, C. P. (1977). The EPR of low spin heme complexes. Relation of the t2g hole model

- to the directional properties of the *g* tensor, and a new method for calculating the ligand field parameters. *Biochim. Biophys. Acta* **491**, 137-148.
- [165] Bohan, T. L. (1977). Analysis of low-spin ESR spectra of ferric heme proteins: a reexamination. *J. Mag. Res.* **26**, 109-118.
- [166] Blumberg, W. E., and Peisach, J. (1971). Probes of structure and function of macromolecules and membranes, Vol. 2, ed. Chance, B., Yonetani, T., and Mildvan, A. S. Academic, New York. 215-229.
- [167] Ruf, H. H., Ahr, H., Nastainczyk, W., Ullrich, V., Mansuy, D., Battioni, J. P., Montiel-Montoya, R., and Trautwein, A. (1984). Formation of a ferric carbanion complex from halothane and cytochrome P-450: electron spin resonance, electronic spectra, and model complexes. *Biochem.* **23**, 5300-5306.
- [168] Lu, A. Y., Levin, W., West, S. B., Jacobson, M., Ryan, D., Kuntzman, R., and Conney, A. H. (1973). Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. VI. Different substrate specificities of the cytochrome P450 fractions from control and phenobarbital-treated rats. *J. Biol. Chem.* **248**, 456-460.
- [169] Yoshimura, T., and Ozaki, T. (1984). Imidazole, imidazolate, and hydroxide complexes of (protoporphyrin IX) iron (III) and its dimethyl ester as model systems for ferric hemoproteins: electron paramagnetic resonance and electronic spectral study. *Arch. Biochem. Biophys.* **230**, 466-482.
- [170] Sakurai, H., and Yoshimura, T. (1985). Models for coordination site of cytochrome P-450, characterization of heme-thiolate complexes with S, O, and N donor ligands by electronic absorption and electron spin resonance spectra. *J Inorg. Biochem.* **24**, 75-96.
- [171] Tan, A. L., De Young, A., and Noble, R. W. (1972). The pH dependence of the affinity, kinetics, and cooperativity of ligand binding to carp hemoglobin, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.* **25**, 2493-2498.
- [172] Chevion, M., Peisach, J., and Blumberg, W. E. (1977). Imidazole, the ligand trans to mercaptide in ferric cytochrome P-450. An EPR study of proteins and model compounds. *J. Biol. Chem.* **252**, 3637-3645.
- [173] Poulos, T. L., and Raag, R. (1992). Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation and electron transfer. *FASEB J.* **6**, 674-679.
- [174] Andersson, L. A., Johnson, A. K., and Peterson, J. A. (1997). Active site analysis of P450 enzymes: comparative magnetic circular dichroism spectroscopy. *Arch Biochem. Biophys.* **345**, 79-87.
- [175] Vidakovic, M., Sligar, S. G., Li, H., and Poulos, T. L. (1998). Understanding the role of the essential Asp251 in cytochrome P450cam using site-directed mutagenesis crystallography, and kinetic solvent isotope effect. *Biochemistry* **37**, 9211-9219.
- [176] Pang, S., Cao, J. Q., Katz, B. H., Hayes, C. L., Sutter, T. R., and Spink, D. C. (1999). Inductive and inhibitory effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls on estrogen metabolism and human cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 29-38.