

油症と PCB (塩化ビフェニル)
に 関 す る
研 究 報 告 第 5 集

昭 和 50 年 10 月

油 症 治 療 研 究 班
九 州 大 学 医 学 部

**The Fifth Reports of the Study on "Yusho"
and PCB (Polychlorinated Biphenyls)**

October, 1975

Study Group for the Therapy of Yusho
*Faculty of Medicine, Kyushu University
Fukuoka 812, Japan*

油 症 と PCB に 関 す る 研 究

報 告 集 第 5 集

(福岡医学雑誌 第 66 巻 第 10 号, 昭和 50 年 10 月)

目 次

1. 序 言.....尾前 照雄...(1)
2. PCB の代謝に関する研究(第 6 報) 2,4,3',4'-テトラクロロビフェニルの代謝と
急性毒性の関連性について.....吉村 英敏・山本 弘明・木下 春喜...(3)
3. PCB の代謝に関する研究(第 7 報) 2,5,2',5'-テトラクロロビフェニルのラット
における代謝.....吉村 英敏・山本 弘明・米沢 和明...(9)
4. ラット肝ミクロソーム膜のリン脂質に及ぼす塩化ビフェニル(PCB)の影響
.....前田 康夫・高橋 慶吉・加藤敬太郎...(17)
5. ポリ塩化ビフェニル(PCB)の培養 HeLa 細胞に及ぼす影響.....
.....森 良一・藤田 晃一・山口みどり・吉村 英敏・山本 弘明...(22)
6. ポリ塩化ビフェニル(PCB)の溶血作用および血球凝集様作用.....
.....藤田 晃一・森 良一・山口みどり・吉村 英敏・山本 弘明...(28)
7. PCB の毒性と栄養Ⅳ. PCB 毒性とビタミン A (3) (英文).....
.....印南 敏・中村 敦子・加藤 勝重・宮崎 基嘉・永山スミ子・西出 英一...(33)
8. PCB の酵素誘導作用に及ぼす他物質併用の影響.....荒木 泰典・日高 賢志・田中 潔...(39)
9. PCB の脳内カテコラミンに及ぼす影響.....
.....末永 典子・山田 勝士・日高 賢志・福田 健夫...(43)
10. カネクロールおよび油症患者使用ライスオイル中の塩化ジベンゾフラン(英文)..
.....長山 淳哉・増田 義人・倉恒 匡徳...(47)
11. Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzofuran および
Polychlorinated Dibenzodioxin のウサギ耳塗布による過角化作用の比較..
.....西住 昌裕・倉恒 匡徳・増田 義人...(54)
12. PCB 汚染油を摂取した母親から生まれた油症児の血漿中 PCB について.....
.....阿部 純子・井上 義人・高松 誠...(59)
13. 血漿中 PCB ならびに DDT, BHC とそれらの組織内残留との関係.....
.....井上 義人・阿部 純子・高松 誠・青木 信雄・三木 昭作・藤原 邦達...(64)
14. 油症患者における血清酵素化学的異常, とくに RNA 分解酵素を中心に.....
.....山中 正義・赤木 公博・平尾 修恭・村井宏一郎...(71)
15. 油症(PCB 中毒)患者における血清トリグリセライドの 6 年間の推移.....
.....奥村 恂・山中 正義・中牟田澄子・鶴沢 春生...(74)
16. 九州大学附属病院油症外来患者の血中 PCB と臨床症状との関係.....幸田 弘・増田 義人...(78)
17. 昭和48年度, 49年度一斉検診における油症皮膚重症度の変動と新しい皮膚重症度評
価試案.....旭 正一・幸田 弘・利谷 昭治...(83)
18. 油症患者の下垂体前葉機能.....楠田 雅彦・永田 行博・中村 正彦...(89)
19. 油症患者の眼症状(第 3 報).....大西 克尚・生井 浩・栗本 晋二・川島謙一郎...(94)
20. 油症患者の眼所見および PCB 投与ラットの眼瞼結膜の組織所見.....青木 昭彦...(96)
21. 絶食療法を実施した油症患者の追跡調査.....今村 基雄...(100)

The Fifth Reports of the Study on "Yusho" and PCB

(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 66, No. 10, 1975)

CONTENTS

1. Foreword..... T. Omae...(1)
2. Metabolic studies on PCBs VI. Contribution of the hydroxylated metabolites to the acute toxicity of 2,4,3',4'-tetrachlorobiphenylH. Yoshimura, H. Yamamoto and H. Kinoshita...(3)
3. Metabolic studies on PCBs VII. Metabolic fate of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl in rats..... H. Yoshimura, H. Yamamoto and K. Yonezawa...(9)
4. Effect of PCB on rat liver microsomal phospholipidsY. Maeda, K. Takahashi and K. Kato...(17)
5. Effect of PCB on HeLa cells.....
... R. Mori, K. Fujita, M. Yamaguchi, H. Yoshimura, and H. Yamamoto...(22)
6. Hemolytic and "hemagglutinating" activity of PCB
... K. Fujita, R. Mori, M. Yamaguchi, H. Yoshimura and H. Yamamoto...(28)
7. PCBs toxicity and nutrition IV. PCBs toxicity and vitamin A (3) ...
..... S. Innami, A. Nakamura, K. Kato, M. Miyazaki,
S. Nagayama and E. Nishide...(33)
8. Influences of some agents on the enzyme-inducing activity of PCB...
..... Y. Araki, T. Hidaka and K. Tanaka...(39)
9. Influences of PCB on the brain catecholamine levels in rats.....
.....N. Suenaga, K. Yamada, T. Hidaka and T. Fukuda ...(43)
10. Chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and rice oils used by patients with Yusho J. Nagayama, Y. Masuda and M. Kuratsune...(47)
11. Comparison of hyperkeratosis induced by PCBs, PCDF and PCDD application M. Nishizumi, M. Kuratsune and Y. Masuda...(54)
12. PCB residues in plasma of Yusho children born to mothers who had consumed oil contaminated by PCB...S. Abe, Y. Inoue and M. Takamatsu...(59)
13. PCB, DDT and BHC levels in human plasma as a measurement of tissue residue.....Y. Inoue, S. Abe, M. Takamatsu, N. Aoki,
S. Miki and K. Fujiwara...(64)
14. Abnormality of serum enzyme in PCB poisoning patients with special reference to ribonucleaseM. Yamanaka, K. Akagi,
N. Hirao and K. Murai...(71)
15. Consecutive six year follow-up study on serum triglyceride levels in patients with PCB poisoning
..... M. Okumura, M. Yamanaka, S. Nakamura and H. Uzawa...(74)
16. Relation between PCB level in the blood and clinical symptoms of Yusho patients H. Kōda and Y. Masuda...(78)
17. Alteration in skin severity grading of Yusho in 1973 and 1974, and presentation of a new standard for the skin severity of Yusho by point count system M. Asahi, H. Kōda and S. Toshitani...(83)
18. Anterior pituitary function of Yusho patients
..... M. Kusuda, Y. Nagata and M. Nakamura...(89)

19. Further ophthalmic studies on patients of chronic PCB poisoning ...
..... Y. Ohnishi, H. Ikui, S. Kurimoto and K. Kawashima...(94)
20. Ocular findings of PCB intoxication and histological changes of the
palpebral conjunctiva in rats fed with Kaneclor 500 A. Aoki...(96)
21. A follow-up study of fasting therapy of Yusho patients.....M. Imamura...(100)

序 言

油症治療研究班長，九州大学医学部教授

尾 前 照 雄

Foreward

Teruo OMAE

*Chief of the Study Group for the Therapy of "Yusho", Professor
of Medicine, Second Department of Internal Medicine, Faculty
of Medicine, Kyushu University, Fukuoka, Japan*

In succession to the 4th report (Fukuoka Acta Medica, Vol. 65, No. 1, January, 1974), the outline of the recent studies made by the Study Group for the Therapy of "Yusho" was described. The total number of the patients reached 1291 on April, 30th, 1975, among which 29 died.

Elevation of blood PCB concentration and abnormality in gas chromatographic pattern of blood PCB, acneiform eruptions, pigmentation (skin, conjunctiva, gingiva or nail) and hypertrophy or hypersecretion of Meibom glands have been considered as most important for the diagnosis of "Yusho". Some changes in clinical profiles were noticed as the time elapsed.

Studies concerning the pathogenesis or pathophysiology of "Yusho" were also described.

既に，油症と PCB に関する研究報告は，第 4 集までが本誌に刊行されている（福岡医学雑誌 60 巻 6 号，昭和 44 年；62 巻 1 号，昭和 46 年；63 巻 10 号，昭和 47 年；65 巻 1 号，昭和 49 年）。今回はその後，昭和 50 年 6 月までの研究成績を第 5 集として論文にまとめたものである。

油症治療研究班は，昭和 50 年 4 月現在，九州大学医学部を中心に，同薬学部，同歯学部，久留米

表 1. 油症治療研究班員（昭和 50 年 5 月 15 日現在）

九 大 医	第二内科	教授	尾 前 照 雄 (班 長)	〃	眼 科	助 手	大 西 克 尚
〃	第三内科	助教授	平 山 千 里 (副班長)	〃	耳鼻咽喉科	〃	林 田 邦 彦
〃	皮 膚 科	教授	占 部 治 邦	九 大 歯	歯科保存	教 授	青 野 正 男
〃	公衆衛生	〃	倉 恒 匡 徳	九 大 薬	衛生裁判化学	〃	吉 村 英 敏
〃	ウィルス学	〃	森 良 一	〃	生 理 化 学	〃	加 藤 敬 太 郎
〃	呼吸器科	助教授	重 松 信 昭	〃	薬 化 学	助教授	佐 伯 清 太 郎
〃	第二内科	助 手	山 中 正 義	福 岡 大 医	第一内科	教 授	奥 村 恂
〃	皮 膚 科	助教授	幸 田 弘 一	〃	皮 膚 科	〃	利 谷 昭 治
〃	〃	講 師	旭 正 一	〃	病 理	〃	菊 池 昌 弘
〃	産婦人科	助教授	楠 田 雅 彦	久 留 米 大 医	第一内科	〃	倉 田 誠
〃	整形外科	助 手	喜 多 正 鎮	〃	小 児 科	〃	山 下 文 雄
〃	神経内科	〃	岩 下 宏	〃	眼 科	〃	吉 岡 久 春
〃	中 検 部	長 大 河 内 一 雄	〃	〃	環 境 衛 生	〃	高 松 誠 人
〃	小 児 科	教 授	合 屋 長 英	〃	〃	助 手	井 上 義 人
〃	〃	講 師	本 田 恵	第 一 薬 科 大 学 分 析 室	分 析 室	教 授	増 田 義 人
				国 立 栄 養 研 究 所	栄 養 改 善 室	室 長	印 南 敏

大学医学部，福岡大学医学部，第一薬科大学の4大学，ならびに東京国立栄養研究所所属の31名の班員で構成されている．おおよそ基礎系10名，臨床系21名である（表1）．本報告集の多くの論文は，班員からのものであるが，関連ある研究論文3編（論文8，9，21）を加えた．

油症患者は昭和50年4月30日現在，総数1,291名，うち死亡29名となっている（表2）．各県別にみると福岡県497名，長崎県479名がとくに多く，次いで広島県95名，高知県46名，山口県35名となっている．前班長の占部教授が記載されている第4集によれば，昭和48年9月の時点での油症患者総数は1,200名であるので，その後91名が追加認定されたことになる．

油症の診断基準と治療指針については，昭和47年10月26日改訂されたものが第4集に詳細に記載されているので，重複を避けるが，診断基準については，その後も検討が重ねられてきた．その点に関しては，昭和47年10月26日改訂の基準のなかで，血液PCBの性状および濃度の異常，痤瘡様皮疹，色素沈着，マイボーム腺の肥大の4項目が重視されてきたが，PCBの性状と濃度については，地区別に検討の必要がある．診断基準に関しては，この点をも含めて近く改訂を行う予定である．

治療に関しては，とくに効果の確認された新しい治療法は，残念ながら未だ開発されていない．内科，皮膚科，小児科，婦人科，眼科など各領域における油症の病態，症状や検査所見の推移については，それぞれの論文を参照されたい．

本症の病因に関する基礎的な研究も継続して行われている．

表 2. 都道府県別油症患者数
（昭和50年4月30日現在）

都 道 府 県	患 者 数
千 葉	6
東 京	3
岐 阜	1
京 都	1
愛 知	13
滋 賀	1
大 阪	29
兵 庫	7
奈 良	17 (1)
鳥 取	1
島 根	6
岡 山	3
広 島	95 (1)
山 口	35 (2)
愛 媛	10
高 知	46
福 岡	497 (9)
佐 賀	23 (2)
長 崎	479 (14)
熊 本	1
大 分	14
鹿 児 島	3
合 計	1,291 (29)

() 内は死亡者数の内数

PCB の代謝に関する研究 (第6報)

2, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニルの代謝と
急性毒性との関連性について

九州大学薬学部衛生裁判化学教室

吉 村 英 敏・山 本 弘 明
木 下 春 喜

Metabolic Studies on Polychlorinated Biphenyls. VI.

Contribution of the Hydroxylated Metabolites to the
Acute Toxicity of 2, 4, 3', 4'-TetrachlorobiphenylHidetoshi YOSHIMURA, Hiro-aki YAMAMOTO
and Haruki KINOSHITADepartment of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty
of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

In our previous study, the acute toxicity of 5-hydroxy-2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), the major metabolite of 2, 4, 3', 4'-TCB, was found to be about 5 times as high as that of 2, 4, 3', 4'-TCB in mice. In order to learn the contribution of this metabolite to the toxicity of the parent compound, it was studied whether 2, 4, 3', 4'-TCB would exert more toxic effect or not after pretreatment of mice with phenobarbital (PB) or 3-methylcholanthrene (3-MC), the typical inducers of liver microsomal drug metabolizing enzymes system. Effects of the same pretreatment of rats on the biliary excretion rate of 5-hydroxy-2, 4, 3', 4'-TCB after iv injection of 2, 4, 3', 4'-TCB and on the *in vitro* metabolic rate of 2, 4, 3', 4'-TCB using liver 9000 g supernatant fraction were also investigated.

By these studies the following findings were obtained.

1. Pretreatment with 3-MC increased the acute toxicity of 2, 4, 3', 4'-TCB, but on the contrary PB pretreatment decreased that toxicity in mice.
2. Liver 9000 g supernatant fraction obtained from the rat pretreated with 3-MC showed much higher activity to hydroxylate 2, 4, 3', 4'-TCB than that of the control rat, but PB pretreatment did not increase the activity at all.
3. By pretreatment with PB or 3-MC, rats increased their biliary excretion of 5-hydroxy-metabolite about 2 times or more than 10 times, respectively, comparing with that of untreated rats, during 24 hr after iv injection of 2, 4, 3', 4'-TCB. It was suggested that the increase of excretion of 5-hydroxy-metabolite in 3-MC pretreated rats should be due to marked elevation of the metabolic rate, whereas that in PB pretreatment could be explained by increase of biliary flow rate.
4. From these results, it was concluded that at least a part of the acute toxicity of 2, 4, 3', 4'-TCB was attributable to the more toxic metabolite, 5-hydroxy-2, 4, 3', 4'-TCB, which was produced in the body.

いわゆる油症の原因物質がカネクロール-400に基づくことが明らかにされ¹⁾, 爾来筆者らはその治療法の確立および中毒機序の解明に手掛りを得る目的で,

今日までカネクロール-400中の主成分 2, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニル (2, 4, 3', 4'-TCB)²⁾³⁾ および 3, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニル (3, 4, 3', 4'-TCB)⁴⁾⁵⁾

の代謝に関する研究を行ってきた。その結果、上記両四塩素化ビフェニルはともに、ラットにおいてモノヒドロキシ-テトラクロロビフェニルに代謝され、そのほとんどが胆汁中に排泄されることを明らかにした。なお、上記 2,4,3',4'-TCB のラットにおける主代謝物は 5-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCB であるが、このものはマウスにおける主代謝物でもある⁶⁾。さらに重要なことは、本代謝物がマウスにおいて母化合物に比べ約 5 倍の急性毒性を呈し、2,4,3',4'-TCB の急性毒性がこのようなフェノール性代謝物に由来するのではないかと推察された点である⁹⁾。

そこで今回、この推論を明確にするため、代謝物の生成を増加させると考えられる薬物を用いて、マウスにおける 2,4,3',4'-TCB の代謝と急性毒性との関連性についての検討を企画した。すなわち肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系のそれぞれ 2 系列の代表的な誘導剤として知られるフェノバルビタール(PB)および 3-メチルコラントレン (3-MC) でマウスを前処理し、2,4,3',4'-TCB の代謝促進を行った際の急性毒性の変動について検討した。さらに、ラットについて *in vivo* で上記誘導剤投与による胆汁中への代謝物の排泄量変化を、またラット肝 9000 g 上清を用いた *in vitro* 研究で、誘導剤による 2,4,3',4'-TCB の代謝促進の有無について検討を加えた。

実験方法

1. PB および 3-MC 前処理方法

PB 溶液は米山薬品工業製(特級)フェノバルビタールナトリウムを使用し、生理食塩水 0.2 ml 中にその 2 mg (マウス用) および 4 mg (ラット用) を含むように調製した。3-MC (和光純薬製特級, mp. 179~180°) は市販食用油(味の素天ぷら油)に溶解し、その 0.2 ml 中に 0.8 mg (マウス用) および 1.6 mg (ラット用) の 3-MC を含有するように調製した。

マウスは CF#1 系, 雄, 体重 16~23 g を用い、1 匹当りに上記 PB または 3-MC 溶液 0.2 ml 前後(それぞれ 100 mg/kg または 40 mg/kg 相当量)をいずれも 1 日 1 回、3 日間連続腹腔内に投与した。対照マウスとしては、生理食塩水あるいは市販食用油のみを上記同様に 3 日間連続投与したものを用いた。

上記薬物最終投与 24 時間後に、2,4,3',4'-TCB をそれぞれ 1.5 g/kg, 2.0 g/kg, 3.0 g/kg の用量含有する各食用油溶液 0.5 ml をマウス腹腔内に投与した。各投与群とも 8 匹を一群として、それぞれ別個の

ケージ中に飼育し、水および飼料は自由に与え、室温は約 20° に保った。各群の 7 日間の死亡数を求め急性毒性の指標とした。

ラットは Wistar 系, 雄, 体重 150~240 g を用い、その 1 匹当りに上記 PB または 3-MC 溶液 0.75~1.2 ml (それぞれ 100 mg/kg または 40 mg/kg 相当量) を、いずれもマウスの場合と同じく 1 日 1 回、3 日間連続腹腔内に投与した。

2. ラット胆管カニューレ留置法

2,4,3',4'-TCB を Tween 80-生理食塩水 (1:3) の溶液に懸濁し、その 0.1 ml 中に 2,4,3',4'-TCB 1.0 mg を含有するように注射試料を調製した。Williams ら⁷⁾の方法に基づき、エーテル麻酔下、ラットに胆管カニューレションを施し(PB および 3-MC 前処理ラットでは最終投与後直ちにカニューレションを行った)、その 24 時間後に上記注射試料 0.1 ml を下腿静脈内に注射した。胆汁は投与後 9 時間までは 1 時間ごとに、それ以後は 10~12, 13~24, 25, 26, 27 および 28~48 時間に分けて採取し、マイクロピペットにより胆汁量を測定した。

3. 胆汁中代謝物の抽出

前記の操作によつて得られた胆汁を希塩酸にて pH 2.0 に調整し、酢酸エチルエステル 2 ml にて 15 分間の振盪抽出を 3 回繰返した。抽出液は水浴上蒸発乾固したのち、デシケーター (CaCl₂) 中で 1 時間減圧乾を行った。かくして得られた残渣を無水ピリジンに溶解し N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) で trimethylsilyl (TMS) 化を行い、ガスクロマトグラフィーのサンプルとした。

4. ラット肝 9000 g 上清の調製法

一夜絶食させた上記前処理ラットを屠殺し、直ちに肝を摘出する。肝は 1.15% KCl 溶液で灌流後、ガラステフロンホモジナイザーを用い、1.15% KCl 溶液で 30% ホモジネートとした。さらに 9000 g にて 20 分間遠心分離した後、上清を綿栓濾過後、約 200 mg 肝/ml となるように 1.15% KCl 溶液にて懸濁した。

5. 酵素活性の測定

反応液は Tris-HCl 緩衝液 300 mM を 0.5 ml, 300 mM の MgCl₂ 溶液, 60 mM の G-6-P 液, 3 mM の NADP 溶液をそれぞれ 0.1 ml ずつ、さらに上記肝 9000 g 上清を 2.0 ml, 基質 および (2,4,3',4'-TCB) 0.1 μmole をメチルセロソルブ 10 μl に溶解したものを加え、これに 1.15% KCl 溶液 0.2 ml を添加し全量を 3.0 ml とした。これを 37°, 3 時間

インキュベートした後、濃塩酸 1 ml を加えて反応を停止させ、ジエチルエーテル各 20 ml を用い、5 分間、3 回振盪抽出した。抽出液は蒸発濃縮後、展開溶媒 *n*-ヘキサン-酢酸エチルエステル-酢酸 (40:10:1) にて下記のシリカゲル 薄層 クロマトグラフィー (TLC) を行つた。代謝物含有のスポット部分のシリカゲルを掻き取り、メタノールにて 3 回振盪抽出した。抽出液は蒸発乾固したのち、残渣を 0.1 ml の無水ピリジン溶液とし、BSA (10 μ l) 処理して、ガスクロマトグラフィー (GLC) により代謝物の定量を行つた。

6. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

シリカゲル (Wakogel B-5UA) により作成した厚さ 0.25 mm のプレートを 105°, 30 分活性化して用いた。展開溶媒には *n*-ヘキサン-酢酸エチルエステル-酢酸 (40:10:1) を使用し、代謝物の確認には UV ランプ (マナスライト工業 K. K., 短波長 253.6 nm) を用いて行つた。

7. ガスクロマトグラフィー (GLC)

装置は島津 GC-3AE 型ガスクロマトグラフィー (エレクトロニックキャプチャー検出器付) を使用し、4 mm $\times$ 2 m または 4 mm $\times$ 2.5 m のガラスカラムに 1.5% SE-30 をコーティングした Chromosorb W (60~80 メッシュ) を充填して用いた。キャリアガスは N_2 を用い、流速 60 ml/min (1.5 kg/cm²)、カラム温度 200° で行つた。

結果および考察

1. PB および 3-MC 前処理マウスにおける 2,4,3',4'-TCB 急性毒性の変動

PB および 3-MC 前処理マウスに対する 2,4,3',4'-TCB の致死効果を正常マウスに対するそれとともに Table 1 に示す。

これから明らかなように、2,4,3',4'-TCB 1.5 g/kg の用量による 7 日間の観察では未処理マウスは 8 匹すべてが生じた。一方 3-MC 前処理マウスでは同用量の投与で 8 匹中 3 匹の死亡が観察された。また 2.0 g/kg および 3.0 g/kg の用量においても、未処理マウスは 8 匹中それぞれ 4 匹および 6 匹の死亡数が認められたのに対し、3-MC 前処理マウスでは 8 匹中 5 匹および 8 匹の死亡数が観察された。

このことは薬物代謝酵素系の誘導剤 3-MC が 2,4,3',4'-TCB の急性毒性の増加を起すことを示すもので、本化合物の急性毒性の少なくとも一部は生体内で生ずるフェノール性代謝物に起因していることを示唆

Table 1. Effects of PB and 3-MC pretreatment on acute toxicity of 2,4,3',4'-TCB in mice

Dose (g/kg) (ip)		Days after administration							Total
		1	2	3	4	5	6	7	
Number of dead mice									
1.5	(1)	0	0	0	0	0	0	0	0/8
	(3)	0	0	0	0	0	2	1	3/8
2.0	(1)	0	1	1	1	0	1	0	4/8
	(2)	0	1	0	0	0	0	0	1/8
	(3)	0	0	0	0	1	3	1	5/8
3.0	(1)	0	1	4	0	0	1	0	6/8
	(2)	0	1	1	0	1	0	0	3/8
	(3)	0	0	3	5	0	0	0	8/8

(1): Untreated mice, (2): PB-treated mice, (3): 3-MC-treated mice

している。すなわちマウスに 3-MC 前処理を行うと、おそらく 2,4,3',4'-TCB の代謝の促進が行われ、毒性の高いフェノール体の生成増加を惹起し、上記のような高毒性が観察されたのであろうと考えられた。しかし 3-MC と異なるタイプの誘導剤である PB による前処理では、上記とまったく逆の結果が得られた。すなわち PB 前処理マウスでは 2,4,3',4'-TCB の 2.0 g/kg 投与で 8 匹中 1 匹、3.0 g/kg の用量でも 8 匹中 3 匹しか死亡せず、未処理マウス (各々の用量でそれぞれ 8 匹中 4 匹および 6 匹が死亡) に比べ死亡数の顕著な減少が認められた。

以上のように、PB および 3-MC がマウスにおける 2,4,3',4'-TCB の急性毒性の減少あるいは増加を起すことが明らかとなったが、その現象がいかなる機作により生ずるのかについて、筆者らは次のように推論した。すなわち 3-MC は 2,4,3',4'-TCB の代謝を強く促進し、高毒性代謝物の生成を増加させるのに対し、PB はほとんどこの効果を持たず、さらにこれに加えて、PB は利胆剤として知られているが、この作用が体内で生じた高毒性フェノール体の胆汁中排泄を促進しているのではないかと考えた。この推論を裏付けるため、実験のより容易なラットを用い *in vitro* および *in vivo* における 2,4,3',4'-TCB の代謝に対する両誘導剤の影響を検討した。

2. 2,4,3',4'-TCB のラット 9000 g 上清による代謝

PB および 3-MC 前処理ラット肝の 9000 g 上清を用いて、2,4,3',4'-TCB の *in vitro* 代謝を検討した。まず 3-MC 前処理ラット肝の 9000 g 上清を酵素

源とし、実験方法の項に記載した方法に従って3時間のインキュベーションを行つた。このエーテル抽出物について展開溶媒 n -ヘキサン-酢酸エチルエステル-酢酸(40:10:1)によるTLCを行い、代謝物の確認および同定を行つた。その結果 R_f 0.50に標品5-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCBに一致するスポットが検出された。さらにこのスポット部分を掻き取り、無水ピリジン溶液中TMS化後、GLCを行うと、 t_R 16.8分と同じく標品の5-ヒドロキシ体と完全に一致するピークが認められた。

上記3-MC前処理ラット肝標品の5-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCBへの代謝率をPB前処理および未処理ラットのそれと比較検討した結果をTable 2に示す。なおこの肝標品の酵素活性を他の報告と比較するためアニリン水酸化活性も合わせて検討した。

Table 2. Effects of PB and 3-MC pretreatment on metabolism of 2,4,3',4'-TCB and aniline to the 9000 g supernatant fraction of rat liver

	Hydroxylation of aniline nmole/g liver/hr	Hydroxylation of 2,4,3',4'-TCB nmole/g liver/hr
Untreated	250.8 $\pm$ 30.2	N. D.
PB-treated	727.7 $\pm$ 35.4	N. D.
3-MC-treated	387.8 $\pm$ 15.6	47.5 $\pm$ 19.1

Values are means $\pm$ S. D. of 3 rats

その結果Table 2から明らかなように未処理およびPB前処理ラットの肝標品においては、本実験条件下いずれにおいても、5-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCBの生成をほとんど認めることができなかった。これに対し、3-MC前処理ラットの肝標品では2,4,3',4'-TCBの代謝活性の著しい増大がみられた。上記結果はラット肝におけるものであるが、すでに著者らが報告したように⁶⁾、マウスにおける2,4,3',4'-TCBの代謝もラットとまったく同様であることから、恐らくマウスにおいても上記誘導剤によつてラットと同様の効果を生ずるものと推定される。このことは3-MC前処理マウスにおいてみられる2,4,3',4'-TCBの急性毒性の増加が、2,4,3',4'-TCBのフェノール性代謝物への代謝促進による可能性を強く示唆するものである。

3. 3-MCおよびPB前処理ラットにおける5-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCBの胆汁中排泄の増加
すでに報告したように、2,4,3',4'-TCBはラットおよびマウスにおいて主として5-ヒドロキシ-2,4,

3',4'-TCBに代謝され³⁾⁶⁾、胆管経路で十二指腸に排泄される⁶⁾。また上記ラットの実験で明白なように、PBは2,4,3',4'-TCBの代謝をほとんど促進しないと考えられた。このことから、すでに述べたPB前処理マウスにおける2,4,3',4'-TCBの急性毒性の減少の原因の一つは、生体内で生じた高毒性のフェノール性代謝物をPBが胆汁中へより速やかに排泄させることによるのではないかと推定させた。このことを確かめるため、PBおよび3-MCを用い、5-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCBの胆汁中への排泄におよぼす影響について検討した。

(1) PB前処理による代謝物の胆汁中排泄の増加

実験方法の項に記載したようにして得られたPB前処理ラットの胆汁抽出物は、GLCによる検討の結果、未処理ラットの代謝物パターンとまったく同一で、遊離のフェノール性代謝物のみを含むことが示され、未変化体およびフェノール性代謝物の抱合型は胆汁中にはまったく検出されなかった。主代謝物5-ヒドロキシ体の排泄状況はFig. 1に示すとおりで、2,4,3',4'-TCBを静脈注射すると、その1時間以内の胆汁中に代謝物が確認され、1時間当りの排泄量は時間とともに徐々に増加し、投与後9時間まではPB前処理ラットもまったく同様の排泄率を示した。しかし投与9時間以降では、未処理ラットの排泄率はほぼ一定値を示し1時間当たり、約0.4 μ gであるのに対し、PB前処理ラットではその後も排泄率は上昇し、13~24時間では1時間当たり0.8 μ gとなり、約2倍の排泄率となることが観察された。

一般に薬物代謝酵素系の誘導剤は胆汁中からの代謝物の排泄を促進させることが知られている⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。こ

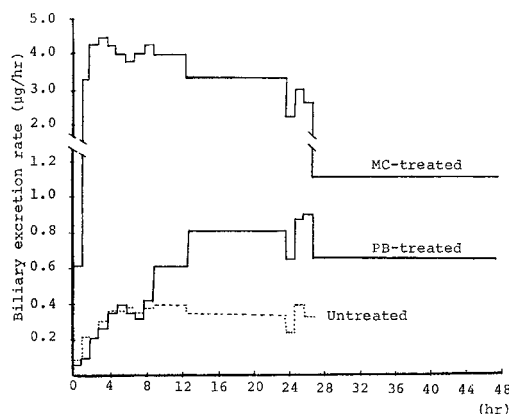


Fig. 1. Biliary excretion pattern of 5-hydroxy-2,4,3',4'-TCB after iv injection of 2,4,3',4'-TCB

の理由は、その律速段階が胆汁中に排泄される極性代謝物の生成にあるためといわれている。例えば PB はビリルビンのビリルビングルクロナイドへの代謝促進を行い、体内のビリルビンの胆汁中排泄を促すことが知られている。しかし 2,4,3',4'-TCB の場合は、すでに *in vitro* 研究で明らかにされているように、PB 前処理による代謝促進はあまり考えられないことから、この場合の排泄はビリルビンの場合と異なるメカニズムであるように思われる。現在の機構について十分明らかではないが、一つの可能な説明としては PB による胆汁流量の増加が考えられる。

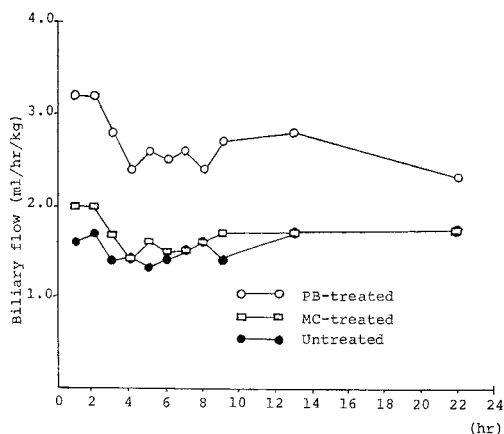


Fig. 2. Effects of PB and 3-MC pretreatment on biliary flow in rat

Fig. 2 に示すごとく、PB 前処理ラットの胆汁流量はすでに知られているとおり⁸⁾、未処理ラットのそれに比し、約 1.5 倍の増加を認めた。このような PB 前処理による胆汁流量増加が結果的に代謝物の排泄促進をもたらしたものと推定される。いずれにせよ、この機構の解明に関してはさらに検討が必要であるが、PB 処理によりマウスに対する PCB の急性毒性が低下することは興味ある知見と考えられる。

(2) 3-MC 前処理による代謝物の胆汁中排泄

PB 前処理に引き続き、3-MC 前処理ラットについてまったく同様の胆汁中代謝物の定性、定量を行った。その結果 3-MC 前処理ラットの胆汁抽出物のガスクログラムは、未処理ラットのそれとまったく同一パターンを示し、同一代謝物を含むことが明らかになった。

Fig. 1 より明らかなように、3-MC 前処理ラットにおける 5-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCB の胆汁中 1 時間当りの排泄量は 2,4,3',4'-TCB 投与後 1 時間で約 0.6 μ g となり、未処理のそれ (0.08 μ g) に比べ

約 8 倍の値を示し、さらに投与 2 時間後においては約 16 倍の排泄率となった。このことは 3-MC が 2,4,3',4'-TCB の代謝を強く誘導することを示しており、既述のラット肝 9000 g 上清を用いた *in vitro* 代謝による結果とよく一致する。また 5-ヒドロキシ体の生成増加は上記のような排泄増加をもたらすだけでなく、必然的に肝臓中、または他の組織中への 5-ヒドロキシ体の移行量を増加させることになると考えられ、このことから推定すると 3-MC 処理マウスに対する 2,4,3',4'-TCB の急性毒性の増加がよく理解できる。

総 括

2,4,3',4'-TCB の急性毒性の本態を明らかにする目的で、薬物代謝酵素系の代表的誘導剤である phenobarbital (PB) および 3-methylcholanthrene (3-MC) でマウスを前処理し、その 2,4,3',4'-TCB の急性毒性に対する影響を検討した。さらにラットを用いて、上記両誘導剤の胆汁中からの高毒性フェノール性代謝物の排泄率に及ぼす影響、あるいはラット肝 9000 g 上清による 2,4,3',4'-TCB の代謝に与える影響を検討し、次のような知見を得た。

1) マウスに 3-MC 前処理を行うと、2,4,3',4'-TCB の急性毒性が未処理マウスに比し、著しく増加した。しかし PB 前処理マウスにおいては、その急性毒性は逆に減少した。

2) ラット肝 9000 g 上清を用いた *in vitro* の研究の結果、2,4,3',4'-TCB のフェノール体への代謝は PB によりほとんど誘導されず、3-MC により強く誘導されることが示された。

3) PB および 3-MC 前処理ラットを使用し、2,4,3',4'-TCB を静注した場合、未処理ラットに比べ高毒性フェノール体の胆汁中への排泄増加が認められた。なお PB 前処理でのフェノール体の胆汁中排泄増加は PB 前処理でみられる胆汁流量増加作用に起因する可能性が示唆されるとともに、3-MC 処理による同現象は、2,4,3',4'-TCB の顕著な代謝促進作用に基づくことが示唆された。

4) 上記結果から、2,4,3',4'-TCB の急性毒性の少なくとも一部は、その高毒性代謝物 5-ヒドロキシ体の関与があるものと考えられた。

文 献

- 1) 塚元久雄ほか：福岡医誌 60: 496, 1969.
- 2) Yoshimura, H., Yamamoto, H. and Saeki,

- S.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 21: 2231, 1973.
- 3) Yamamoto, H. and Yoshimura, H.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 21: 2237, 1973.
- 4) Yoshimura, H. and Yamamoto, H.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 21: 1168, 1973.
- 5) 吉村英敏, 山本弘明: 福岡医誌 65: 5, 1974.
- 6) 吉村英敏, 山本弘明, 木下春喜: 福岡医誌 65: 12, 1974.
- 7) Abou-El-Makarem, M. M., Millburn, P., Smith, R. L. and Williams, R. T.: Biochem. J. 105: 1269, 1967.
- 8) Roberts, R. J. and Plaa, G. L.: Biochem. Pharmacol. 16: 827, 1967.
- 9) Klassen, C. D. and Plaa, G. L.: J. Pharmacol. exp. Ther. 161: 361, 1968.
- 10) Levin, W. G., Millburn, P., Smith, R. L. and Williams, R. T.: Biochem. Pharmacol. 19: 235, 1970.

PCB の代謝に関する研究 (第7報)

2, 5, 2' 5'-テトラクロロビフェニルのラットにおける代謝

九州大学薬学部衛生裁判化学教室

吉 村 英 敏・山 本 弘 明

米 沢 和 明

Metabolic Studies on Polychlorinated Biphenyls. VII.

Metabolic Fate of 2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl in Rats

Hidetoshi YOSHIMURA, Hiro-aki YAMAMOTO
and Kazuaki YONEZAWA

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Kyushu University*

In the previous studies from this laboratory, it was found that both of 2, 4, 3', 4'- and 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) were metabolized to the monohydroxylated derivatives in rats and the metabolites were excreted almost exclusively into their feces. Hutzinger *et al.*, on the other hand, reported that when 2, 5, 2', 5'-TCB was injected intraperitoneally into rats, large quantities of the unchanged material could be extracted from the feces and only a monohydroxy derivative was identified in the urine. In order to confirm this discrepancy for excretion route of the metabolite, we re-investigated the metabolic fate of 2, 5, 2', 5'-TCB orally given to rats and obtained the following results.

1. In the case of 2, 5, 2', 5'-TCB, the major metabolite was excreted mostly in the feces. By GLC analysis, this metabolite excreted during 7 days accounted for about 45 % of the dose, whereas that excreted in the urine during the same days accounted for only 0.4 % of the dose. This metabolic rate was much higher than those of 2, 4, 3', 4'- and 3, 4, 3', 4'-TCB (about 10 % and 3.3 % of the dose, respectively, during 12 days). The structure of this major metabolite was elucidated to be 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB by various spectrometries and finally by comparison with the authentic sample. A trace amount of 4-hydroxy-metabolite was also identified in the urine.

2. In above experiments, about 7 % of the dose was excreted unchanged into 7 days feces, most of which was done in the first day. A trace amount of unchanged material could be detected in the urine. This result also suggested that the absorption rate of 2, 5, 2', 5'-TCB from the gastrointestinal tract was quite higher than those of 2, 4, 3', 4'- and 3, 4, 3', 4'-TCB (the absorption rate of the latter two TCB was calculated to be about 60 % and 40 %, respectively).

3. 2, 5, 2', 5'-TCB was injected intraperitoneally into rats with cannulated bile duct and excretion of the metabolite in the bile was examined by GLC. The result indicated clearly the excretion of 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB as the major metabolite and also of 4-hydroxy-metabolite in a trace amount, but no unchanged material could be detected in the bile. Since 4-hydroxy-metabolite was not excreted in the feces, above result suggested that a part of the metabolites excreted through the biliary system to the small intestine might be re-absorbed from the intestine.

最近著者ら¹⁾²⁾は油症の原因物質であるカネクロール-400 (KC-400)の主成分 2,4,3',4'-テトラクロロビフェニル (2,4,3',4'-TCB)の代謝と毒性に関して検討を行い、主代謝物として5-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCBを、また副代謝物の一つとして3-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCBをラット糞中より単離同定するとともに、得られた主代謝物5-ヒドロキシ体は、母化合物に比べ約5倍も強い急性毒性を示すことを明らかにした。引続き、KC-400の一成分である3,4,3',4'-テトラクロロビフェニル (3,4,3',4'-TCB)の代謝についても研究し³⁾⁴⁾、その主代謝物2-または5-ヒドロキシ-3,4,3',4'-TCBはラットにおいて、上記2,4,3',4'-TCBの代謝物と同様に、その糞中にほとんど排他的に排泄されることを見出した。また Jensen および Sundström も⁵⁾ごく最近、2,4,5,2',4',5'-ヘキサクロロビフェニルが、ラットでわずかではあるがモノヒドロキシ体に代謝され、同じく糞中にも排泄されると報告している。

一方 Hutzinger ら⁶⁾は同じく四塩素化ビフェニルの一つである2,5,2',5'-テトラクロロビフェニル (2,5,2',5'-TCB)のラット、ハトおよびマウスにおける代謝研究を行い、本化合物はマスにおいてはまったく代謝されないが、ラットおよびハトではモノヒドロキシ体に代謝され、かつこの代謝物はラットでは糞中だけでなくつばら尿中にのみ排泄されると報告している。この結果は上記2,4,3',4'-TCBおよび3,4,3',4'-TCB、さらには2,4,5,2',4',5'-ヘキサクロロビフェニルのフェノール性代謝物の主排泄経路とまったく異なっている。

しかし、上記 Hutzinger ら⁶⁾の研究においては、糞中の代謝物の抽出溶媒としてヘキサンが使用されており、この点きわめて大きな問題を含んでいる。なぜなら、本溶媒は著者らの研究から、2,4,3',4'-TCBおよび3,4,3',4'-TCBのフェノール性代謝物をまったく溶解しないことが明らかとされており、このことが糞中より2,5,2',5'-TCBのフェノール体を単離できなかった原因ではないかと考えられるからである。加うるに、この研究の内容は定性的なもので、定量的データはまったく記載されていない。そこで今回この Hutzinger ら⁶⁾の研究の追試を行うとともに、2,5,2',5'-TCBのラットにおける代謝についての詳細な研究を企画した。

実験方法

1. 実験動物および薬物投与方法

Hutzinger ら⁷⁾の方法 (Ullmann 反応) にて合成して得られた 2,5,2',5'-TCB, mp. 86~87° を用い、これを市販食用油 (味の素天ぷら油) に溶かし、その 0.5 ml 中に 25 mg の 2,5,2',5'-TCB を含有する溶液を調製した。実験動物としてはすべて Wistar King 系の成熟雄ラット (体重 156-225 g) を用いた。まず尿および糞中代謝物の単離のため、上記ラット 1 匹当りに 2,5,2',5'-TCB の食用油溶液 0.5 ml (2,5,2',5'-TCB 25 mg 含有) をエーテル麻酔下経口投与した。その2日後さらにもう一度同量を投与し、初回投与から次回投与の4日後までの7日間の糞と尿を別々に採取した。

胆汁中の代謝物の検索には、エーテル麻酔したラット 3 匹を使用し、腹部を切開してカニューレを総胆管に挿入後、腹部を縫合して 1 日放置し、2,5,2',5'-TCB をラット 1 匹につき 25 mg の用量で腹腔内注射した。なお手術開始時から胆汁採取終了まで、5 % グルコース溶液を昼間のみ 1 ml ずつ 2 時間おきに 6 回大腿部に筋注した。また 2,5,2',5'-TCB 投与前 24 時間の胆汁を対照サンプルとし、投与後 48 時間の胆汁を採取して試験サンプルとした。

尿および糞中代謝物の排泄率の測定には、ラット 4 匹を用い、2,5,2',5'-TCB 食用油溶液 0.5 ml を上記の方法にて 1 回経口投与し、各ラットはそれぞれ別個の代謝ケージ中に飼育して、投与後 3 日までは 1 日ごとに、その後 4 日間はまとめて計 7 日間の糞および尿を採取した。これらの試料は測定を行うまで冷蔵庫に保存した。なお水および飼料 (オリエンタル酵母製固型飼料 MF) は自由に与えた。

2. 尿、糞および胆汁中代謝物の抽出ならびに定量

上記の操作によって得られた 7 日間の尿を濃硫酸にて 4N 硫酸溶液としたのち、沸騰水浴上 1 時間加熱加水分解後、さらに濃水酸化ナトリウム溶液で pH 2.0 に調整し、酢酸エチルエステルにて 15 分間 3 回振盪抽出した。抽出液は無水芒硝を用いて脱水し溶媒を留去した。かくして得られた代謝物含有の残渣をアセトンに溶解し、薄層クロマトグラフィー (TLC) および N, O-bis(trimethylsilyl) acetamide (BSA) で trimethylsilyl (TMS) 化してガスクロマトグラフィー (GLC) を行い、それぞれ代謝物を検索した。

なお尿中代謝物の排泄率の測定用尿サンプルは、それぞれのサンプルについて上記と同様の操作にて抽出

を行い、各抽出液とも酢酸エチルエステルにて正確に 100 ml とし定量試料とした。その 0.1 ml をとり溶媒を留去し残渣にアセトン 10 ml を加えて溶かし、これに 0.04 ml の BSA を加えて TMS 化し、その 1~6 ml を用い後記のガスクロマトグラフィーを行い、別途ピーク高により作成した検量線により定量した。各代謝物標準品は本研究で得られた後述の合成標品を使用した。また未変化体の定量は、抽出液 (100 ml 酢酸エチルエステル溶液) をそのまま GLC に注入 (1~5 μ l) し、同じくピーク高により別途作成した検量線を用いて行った。

糞は前記の 7 日分を乾燥後乳鉢中で細粉とし、代謝物の抽出のため約 2 g のメタノールにて 2 日間の冷浸を 3 回、計 6 日間行った。抽出液は溶媒を留去した後アセトンに溶解して TLC および GLC にて代謝物の検索を行った。なお糞中代謝物の排泄率の測定には、尿サンプルの場合と同様に 2,5,2',5'-TCB 投与後 1, 2, 3, 4~7 日の糞を分けて採取し、それぞれメタノール 25 ml にて 15 分間、3 回振盪抽出した後、メタノールにて正確に 100 ml とし定量試料とした。その 0.1 ml をとり溶媒を留去し残渣をアセトン 10~50 ml に溶かし、これに 0.04 ml の BSA を加えて TMS 化を行い、その 1~7 μ l を用い尿サンプルの場合と同様に GLC にて定量した。また未変化体の定量には抽出液 (100 ml メタノール溶液) をそのまま用い、その 1~5 μ l を GLC に注入して定量した。

胆汁は濃硫酸にて pH 2.0 に調整し、酢酸エチルエステルにて 15 分間 3 回振盪抽出を行った。抽出液は無水芒硝を用いて脱水後、溶媒を留去した。かくして得られた遊離代謝物を含む残渣をアセトンに溶解し、TLC, GLC によりそれぞれ代謝物の検索を行った。抽出後の胆汁は濃硫酸を加え、4 N 硫酸溶液としたのち、沸騰水浴上 1 時間加熱加水分解後、さらに濃水酸化ナトリウムで pH 2.0 に調整し、上記同様酢酸エチルエステルにて振盪抽出を行った。得られた抽出物 (抱合体由来の代謝物を含む) はアセトン溶液とし、前記同様 TLC, GLC にて代謝物の検索を行った。

3. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

蛍光物質を添加したシリカゲル (Wakogel B-5 FM) により作成した厚さ 0.25 mm および 0.50 mm (preparative 用) のプレートを 105°, 30 分活性化して用いた。展開溶媒には n-ヘキサン-クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水 (8:28:6:1) を

使用し、UV ランプ (マナスライト、短波長) にてスポットの確認を行った。これによれば 2,5,2',5'-TCB は赤紫色に、その代謝物は青紫色に呈色する。またフェノール性代謝物の呈色には Folin-Ciocalteu 試薬 (青色スポット) を使用した。

4. ガスクロマトグラフィー (GLC)

装置は島津 GC-3 BE 型ガスクロマトグラフ (エレクトロンキャプチャー検出器付) を使用し、カラムは 3 mm $\times$ 1.7 m のガラスカラムに 1.5% の OV-17 をコーティングした Chromosorb W (60~80 メッシュ) を充填して用いた。キャリアガスには N_2 を用い、カラム温度 132° で行った。

実験結果および考察

1. 糞中代謝物の検索および単離

実験方法の項に記載した操作にて得られた糞抽出物のガスクロマトグラムならびに対照糞抽出物のそれを Fig. 1 に示す。

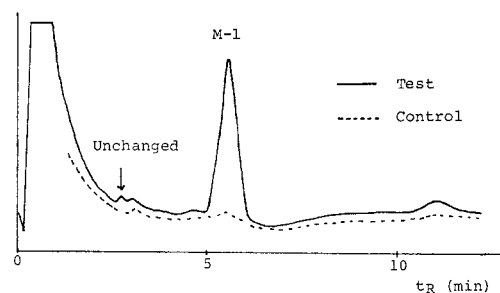


Fig. 1. Gas chromatogram of fecal extract of rat administered orally with 2,5,2',5'-TCB (Trimethylsilylated sample)

Fig. 1 より明らかなように、本抽出物中には保持時間 2.9 分 (unchanged) および 5.6 分 (M-1) にそれぞれ対照糞抽出物にみられない二つのピークを認めた。このうち保持時間 2.9 分のもは 2,5,2',5'-TCB の保持時間とまったく一致した。また M-1 は前記 TLC 上のスポット (Rf 0.33) が Folin-Ciocalteu 試薬に青色に呈色することからフェノール性代謝物であることが示唆された。

このフェノール性代謝物を単離するため、メタノール留去後残渣を少量のクロロホルムに溶解し、クロロホルム中で充填した 10 倍量のフロリジル (米山薬品製 100-200 メッシュ) カラムおよび 100 倍量のシリカゲル (Mallinckrodt 100 メッシュ) カラムによるクロマトグラフィーを続けて行い、代謝物の精製を行つ

た. いずれも展開溶媒はクロロホルムを用い, まずフロリジルカラムクロマトで溶出する未変化体および M-1 のフラクションを前記 TLC (R_f 0.70 および 0.33) により確認して集め, これについてさらにつぎのシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い, 同じく TLC による確認でかなり精製された未変化体および M-1 含有の油状物質が得られた. これをさらに同じく n -ヘキサン-クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水(8:28:6:1)の展開溶媒を用いて, シリカゲル(Wakogel B-5 FM, 0.50 mm)薄層による preparative TLC に付した. この操作により分離した未変化体 (R_f 0.70), および M-1 (R_f 0.33) の各スポット部分のシリカゲルをかき取りメタノールにて溶出, これらを結晶として単離することができた.

2. 代謝物の構造

上記 TLC により単離された R_f 0.70 の化合物は, メタノールより再結晶すると mp. $86\sim 87^\circ$ の無色結晶となり, IR, Mass の各スペクトルが投与化合物 2,5,2',5'-TCB のそれと完全に一致し, 混融試験によつても融点降下を認めなかつた. Fig. 2 に合成 2,5,2',5'-TCB 標品 および 糞抽出物から得られた結晶の IR スペクトルを示す.

M-1 は n -ヘキサン-エチルエーテル (1:2) にて再結晶すると mp. $94\sim 95.5^\circ$ の無色結晶となつた. また本化合物は TLC 上で Folin-Ciocalteu 試薬により青色を呈し, フェノール性化合物であることが示唆されたが, さらに下記のスペクトル分析によりこのことが確認された. すなわち本代謝物はそれぞれ

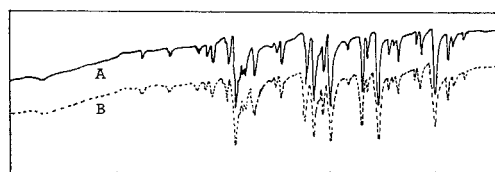


Fig. 2. IR spectra of 2,5,2',5'-TCB
A: Synthetic sample, B: Biological sample

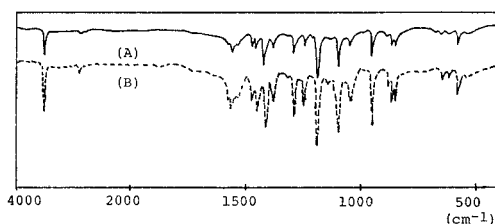


Fig. 3. IR spectra of M-1 (A) and 3-OH-2,5,2',5'-TCB (B) (in CCl_4)

Fig. 3 および 4 から明らかなように, IR スペクトルにて 3540 cm^{-1} に OH の吸収を示し, また Mass スペクトルにて m/e 306 および 308 にそれぞれ M^+ および $(M+2)^+$ イオンピークを示し, これは母化合物のそれ [m/e 290 (M^+), 292 ($M+2$) $^+$] より質量数 16 多く, 酸素原子 1 個を導入したモノフェノール体であることを示している. なおこの $(M+2)^+$ イオンピークは M^+ のピーク強度の約 130% を示し, 本化合物は問題なく四塩素化体である⁸⁾.

以上のことから M-1 の構造はモノヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB であることが判明したが, さらに水酸基の位置を明確にするため合成による検討を加え

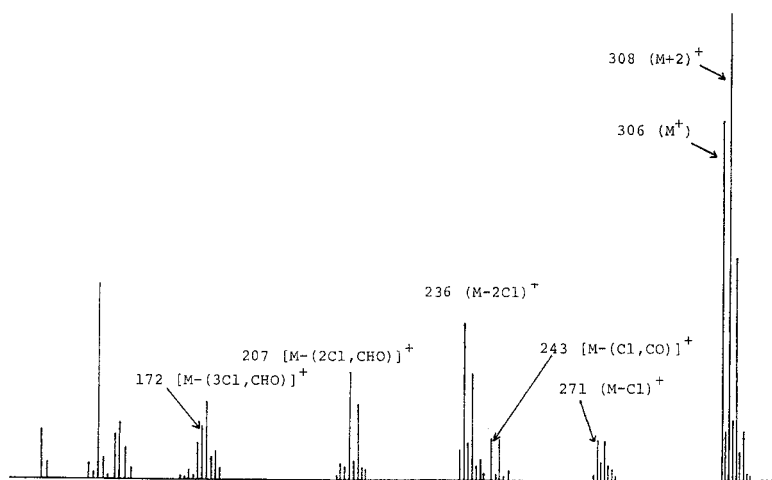


Fig. 4. Mass spectrum of M-1 (3-hydroxy-2,5,2',5'-TCB)

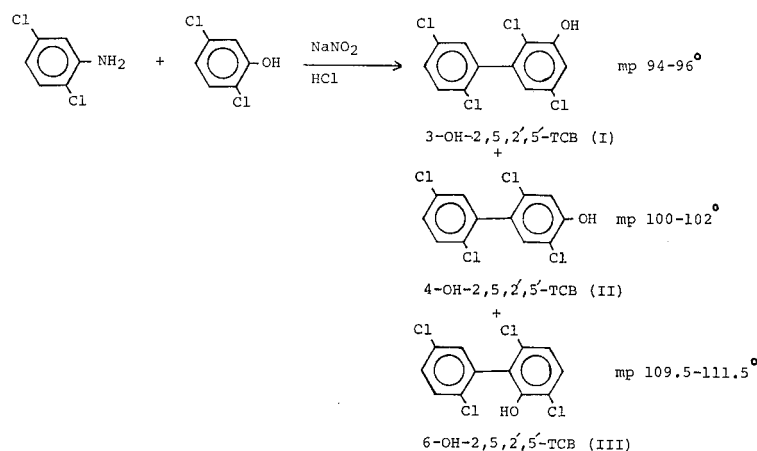


Fig. 5. Synthetic method of possible isomers of monohydroxy-2,5,2',5'-TCB

た。このモノヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB として考えられるすべての異性体は 3-, 4-, および 6-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB (Fig. 5 参照) の 3 種である。

これらのフェニルフェノール誘導体の一般合成法としては Colbert 法⁹⁾ が知られており、本法により 2,5-ジクロロアニリンと 2,5-ジクロロフェノールとの縮合反応を行うと Fig. 5 に示すように、上記 3 化合物が得られるはずである。事実本反応成績体を GLC に付すると、これらの 3 化合物に対応するピーク (t_R : 5.6, 6.0, および 4.0 分) を与え、かつ *n*-ヘキサネ-クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水 (8:28:6:1) の溶媒系による TLC で R_f 0.33 (I), 0.28 (II), および 0.51 (III) に Folin-Ciocalteu 試薬にて青色に呈色するスポットが認められた。さらに各スポット部分をかき取りメタノールにて溶出し、質量スペクトル分析を行うと、いずれも m/e 306 (M^+), 308 [$(M+2)^+$] に顕著なピークを示し、これらの 3 化合物は Fig. 5 に示す縮合反応で理論的に可能な 3 化合物であることが示された。

また上記 3 種の合成化合物を代謝物の単離法と同様に、フロリジル、シリカゲルのカラムクロマト、さらに preparative TLC を行つて単離し、エーテル-ヘキサン (2:1) より再結晶するとそれぞれ (I) mp. 94~96°, (II) mp. 100~102°, および (III) mp. 109.5~111.5° の無色結晶が得られた。なおこれらの化合物 I, II および III はそれぞれ文献既知¹⁰⁾ の 3-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB, 4-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB および 6-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB

と、それぞれ融点および IR スペクトルが完全に一致した。このうち (I) すなわち 3-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB は、糞中の代謝物 M-1 と混融しても融点降下せず、IR (Fig. 3), Mass (Fig. 4) の各スペクトルとも完全に一致した。

以上のことから糞中から見出されたフェノール性代謝物は 3-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB であることが明らかとなった。しかし糞抽出物中には他の二つの水酸化体、すなわち (II) (4-ヒドロキシ体) および (III) (6-ヒドロキシ体) の存在は確認されなかった。

3. 尿中代謝物の検索

4 N 硫酸溶液で加水分解後、酢酸エチルエステルにて振盪抽出して得られた尿抽出物は、アセトン溶液にて TMS 化して GLC サンプルとし、対照尿抽出物のそれと比較検討した。なお対照尿としては、薬物投与前の尿を採取し、試験尿と同様処理して用いた。

その結果 Fig. 6 に示すように、2,5,2',5'-TCB 投与尿抽出物中には t_R 2.9 分 (unchanged), 5.6 分 (M-1) および 6.0 分 (M-2) に、それぞれ対照尿抽出物中にはみられない三つのピークを認めた。このうち 2.9 分の保持時間のものは未変化の 2,5,2',5'-TCB のそれとまったく一致した。また他の二ピークに相当する TLC 上のスポットが Folin-Ciocalteu 試薬の噴霧にて青色に呈色し、いずれもフェノール性代謝物であることが示唆された。なお M-1, M-2 は展開溶媒 *n*-ヘキサネ-クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水 (8:28:6:1) による TLC にて R_f 0.33 および 0.28 を示し、上記合成して得ら

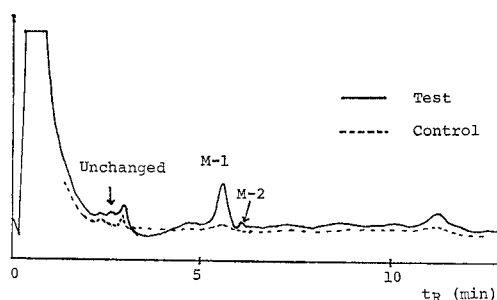


Fig. 6. Gas chromatogram of urinary extract of rat administered orally with 2,5,2',5'-TCB (Trimethylsilylated sample)

れた3-ヒドロキシ-および4-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCBとそれぞれRf値がまったく一致した。さらにGLCによる検討からも、M-1は合成標品の3-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCBの保持時間(5.6分)、M-2は4-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCBの保持時間(6.0分)とそれぞれ完全に一致した。

4. 胆汁中代謝物の検索

実験方法の項に記載したように、胆汁抽出物は、アセトン溶液としてTLCサンプルとし、またBSAにてTMS化したものをGLCサンプルとして、それぞれ対照胆汁抽出物のそれぞれのクロマトグラムと比較した。なおこの対照胆汁としては、薬物投与前の胆汁を採取し、試験胆汁と同様処理して用いた。そのうちGLCの結果をFig. 7に示す。

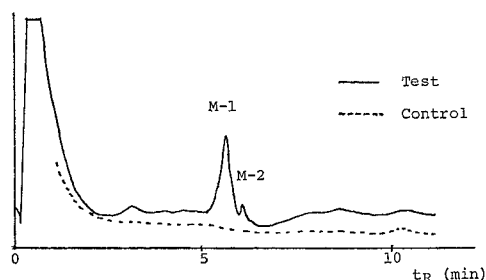


Fig. 7. Gas chromatogram of biliary extract of rat administered intraperitoneally with 2,5,2',5'-TCB (Trimethylsilylated sample)

Fig. 7より明らかなように、本抽出物中には t_R 5.6分および6.0分にそれぞれ対照胆汁抽出物にみられない二つのピークを認め、これらの代謝物は、上記糞あるいは尿中より得られた代謝物3-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB (M-1)、および尿中のみ認められた4-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCB (M-2)の t_R

と完全に一致した。また展開溶媒 n-ヘキサン-クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水(8:28:6:1)によるTLCにおいても代謝物(M-1, M-2)のスポットはFolin-Ciocalteu試薬にて青色に呈色し、そのRf値0.33(M-1)および0.28(M-2)が合成標品の3-ヒドロキシ-および4-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCBとそれぞれ一致した。

このように糞および尿中と同じように胆汁中にもフェノール性代謝物が検出されたが、胆汁中には糞中にみられず尿中のみ検出された4-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCBが排泄されることが明らかとなった。このことは胆汁中から排泄されたフェノール性代謝物の一部は消化管から再吸収される可能性を示すものである。また胆汁中には未変化体はまったく認められなかった。

なお4N硫酸溶液で加熱加水分解後酢酸エチルエステルにて抽出して得られたサンプルについても、上と同様GLC, TLCによる代謝物の検索を行った。その結果、両クロマトグラムとも対照胆汁のそれとまったく同様で、代謝物の存在は認められなかった。このことはフェノール性代謝物が胆汁中に、抱合型でなく遊離型のまま排泄されていることを示している。

5. 尿および糞中排泄率

上記研究によりラットに経口投与した2,5,2',5'-TCBはモノフェノール体に代謝され、未変化体とともに尿および糞中に排泄されることが明らかにされたが、その排泄率を知るため、4匹のラットに1匹当たり25mgの2,5,2',5'-TCBを経口投与し、未変化体および主代謝物3-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCBの7日間にわたる尿および糞中への排泄を検討した。その結果をそれぞれTable 1およびTable 2に示す。なお尿中には4-ヒドロキシ体の排泄も確認されているが、その量はごく微量であった。

Table 1より明らかなように、尿中の未変化体の排泄はきわめて少量であるが、投与後7日間にわたって排泄されることが判明した。また主代謝物3-ヒドロキシ-2,5,2',5'-TCBは、投与後第1日目に約0.03%の排泄を認め、7日間の総排泄量は約0.4%であった。7日間のうち特に3日目の排泄量が目立って多いが、その理由については不明である。胆汁中へ排泄された代謝物が腸管から再吸収されるとすれば、そのことがあるいは一因となっていることも考えられる。

また糞中への未変化体の排泄はTable 2に示されるように、かなりの個体差があるが、7日間での総排泄率は平均約7%で、第1日目にその大部分が排泄さ

Table 1. Excretion rate of unchanged 2,5,2',5'-TCB and its metabolite [3-hydroxy-2,5,2',5'-TCB (M-1)] in the rats urine after oral administration

Days after administration	Excretion rate (% of dose)	
	Unchanged	M-1
1	Trace	0.03±0.01
2	Trace	0.02±0.01
3	Trace	0.31±0.39
4—7	Trace	0.04±0.03
Total	Trace	0.40±0.39

Values are means ± S. D. of 4 rats, Trace<0.01

Table 2. Excretion rate of unchanged 2,5,2',5'-TCB and its metabolite [3-hydroxy-2,5,2',5'-TCB (M-1)] in the rats feces after oral administration

Days after administration	Excretion rate (% of dose)	
	Unchanged	M-1
1	6.7±6.63	15.6±6.49
2	0.3±0.15	19.2±7.11
3	Trace	6.7±2.27
4—7	Trace	3.3±0.60
Total	7.0±6.59	44.8±8.63

Values are means ± S. D. of 4 rats, Trace<0.01

れた。未変化体は胆汁中へは排泄されないで、第1日目にみられる未変化体の排泄は、消化管から吸収されずにそのまま糞中に出てきたものと思われる。このことから考えると、本化合物の消化管からの吸収率は約90%程度であろうと推定された。すでに著者が報告した2,4,3',4'-TCBの消化管からの吸収率は約60%¹⁾、3,4,3',4'-TCBでは約40%程度⁴⁾であることから考えると四塩素化ビフェニル各異性体で消化管からの吸収率の異なることが示唆されると共に、2,5,2',5'-TCBは3者のうち最も吸収され易い化合物であることを示している。ちなみに、この3化合物についていえば、GLCにおける保持時間が短いものほど吸収率がよいという興味ある関係を示している。

投与後7日間の糞中主代謝物の総排泄率は約45%であったが、これは以前報告した2,4,3',4'-TCBの主代謝物の12日間にわたる総排泄率約10%¹⁾、3,4,3',4'-TCBの主代謝物の14日間にわたる総排泄率約3.3%⁴⁾に比べ極めて多量の排泄である。このことは

四塩素化ビフェニル各異性体において、代謝されやすさの相違があることを示唆すると共に、2,5,2',5'-TCBは上述の薬物のうち最も代謝され易い化合物であることを示すものと思われる。またこれら3化合物についていえば、前記の吸収率と代謝率は平行関係にあり、GLCの保持時間の短いものほどよく吸収され、よく代謝される。

以上の実験結果から、2,5,2',5'-TCBはラットにおいてモノヒドロキシ体に代謝され、尿中よりむしろ糞中の方に多量に排泄されることが明らかとなった。このことはHutzingerら⁶⁾が速報した2,5,2',5'-TCBの代謝物モノヒドロキシ体がラットの糞中には検出されず尿中のみ排他的に排泄されるということを否定すると共に、少なくとも四塩素化ビフェニル（またはそれ以上の高塩素化成分）のフェノール性代謝物は、胆汁中への排泄がラットにおける主排泄経路であることを示している。ただし脂溶性がより低い低塩素化体ではこの限りでなく、代謝物の尿中への排泄もより容易となるであろう。他の四塩素化体にくらべ、この2,5,2',5'-TCBでは多少なりとも代謝物の尿中排泄がみられることを今回明らかにしたが、この相異も同じ理由によると考えられる。

またラットと異なり、ウサギは生体異物をあまり胆汁中へ排泄しない動物として知られている¹¹⁾。Gardnerら¹⁰⁾はウサギに2,5,2',5'-TCBを経口投与し、尿中から3-および4-ヒドロキシ体、さらに3,4-ジヒドロ-3,4-ジヒドロキシ-2,5,2',5'-TCBを単離同定し、エポキシド中間体の生成を推定している。また三尾ら¹²⁾は2,5,2',5'-TCBを投与した運動負荷マウスの肝臓抽出物中にガスクロマト直結マススペクトル分析法により、メチルスルホン体と推定される代謝物の存在を報告している。これら新規の代謝物はラット尿中には認められなかったが、これらの代謝物については今後さらに追求する必要があると思われる。

総 括

既報のHutzingerらの研究を追試し、かつより詳細な知見を得るため、2,5,2',5'-テトラクロロビフェニル(2,5,2',5'-TCB)のWistar King系雄ラットにおける代謝を再検討し、つぎのような結論を得た。

1) 2,5,2',5'-TCBをラットに経口投与した場合、主代謝物は大部分が糞中へ排泄され(7日間の総排泄率は投与量の約45%)、尿中には少量(7日間で投与量の約0.4%)しか排泄されず、Hutzingerらの説

は否定された。なおこの主代謝物の構造は各種スペクトル分析, ならびに合成標品との比較により 3-ヒドロキシ- 2,5,2',5'-TCB であることが確認された。また 2,4,3',4'-TCB や 3,4,3',4'-TCB に比べ, かなり代謝され易いことが明らかとなつた。尿中にはこのほかきわめて微量の 4-ヒドロキシ体も排泄されることが GLC, TLC により見出された。

2) 未変化体は, 7日間のラット糞中に投与量の約7%が排泄されるが, その大部分は初日に排泄されており, この分は少なくとも未吸収の 2,5,2',5'-TCB と考えられる。またこのことから 2,4,3',4'-TCB や 3,4,3',4'-TCB に比べ, 2,5,2',5'-TCB は消化管からの吸収率がかなりよいことが明らかにされた。未変化体は尿中にもごく微量が排泄される。

3) 2,5,2',5'-TCB を胆管 カニキュレーションを施したラットに腹腔内投与し, 得られた胆汁について検索した結果, 胆汁中には未変化体としては排泄されず, 主に 3-ヒドロキシ- 2,5,2',5'-TCB として, またきわめて微量は 4-ヒドロキシ体として排泄された。4-ヒドロキシ体は糞中には検出されないことから, 胆汁を介して十二指腸に排泄された代謝物の一部は腸管から再吸収される可能性が示唆された。

文 献

- 1) Yoshimura, H., Yamamoto, H. and Saeki, S.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 21: 2231, 1973.
- 2) Yamamoto, H. and Yoshimura, H.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 21: 2237, 1973.
- 3) Yoshimura, H. and Yamamoto, H.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 21: 1168, 1973.
- 4) 吉村英敏, 山本弘明: 福岡医誌 65: 5, 1974.
- 5) Jensen, S. and Sundström, G.: Nature 251: 219, 1974.
- 6) Hutzinger, O., Nash, D. M., Safe, S., DeFreitas, A. S. W., Norstrom, R. J., Wildish, D. J. and Zitko, V.: Science 178: 312, 1972.
- 7) Hutzinger, O., Safe, S. and Zitko, V.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 6: 209, 1971.
- 8) Silverstein, R. M. and Bassler, G. C., "Spectrometric Identification of Organic Compounds," 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 29, 1967.
- 9) Colbert, J. C. and Lacy, R. M.: J. Amer. Chem. Soc. 68: 270, 1946.
- 10) Gardner, A. M., Chen, J. T., Roach, J. A. G. and Ragelis, E. P.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 55: 1377, 1973.
- 11) Abou-El-Makarem, M. M., Millburn, P., Smith, R. L. and Williams, R. T.: Biochem. J. 105: 1289, 1967.
- 12) 三尾隆弥, 住野公昭, 水谷民雄: 第1回環境汚染物質とそのトキシコロジー シンポジウム 講演要旨, 大阪. p. 23, 1974.

ラット肝ミクロゾーム膜のリン脂質に及ぼす 塩化ビフェニール (PCB) の影響

九州大学薬学部生理化学教室

前 田 康 夫・高 橋 慶 吉
加 藤 敬太郎

Effect of Biphenyl Chloride on Rat Liver Microsomal Phospholipids

Yasuo MAEDA, Keikichi TAKAHASHI
and Keitaro KATO

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu
University Fukuoka, Japan*

The proportion of different phospholipids and fatty acid component of phosphatidyl choline, phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol were studied in rat liver microsomal membranes, after a long period administration (60 days; total dose, 100 mg) of Kanechlor-400 (KC-400). The proportion of different phospholipids did not change, but KC-400 caused the proportion of stearic acid in phosphatidylcholine to increase to 125 % of the control and the proportion of palmitic acid to decrease to 70 %. The effect of a long period administration of KC-400 on drug metabolizing enzymes was also studied, and the relationship between elevation of the enzymes and change of phospholipids was discussed.

緒 言

動物に PCB を投与すると、肝細胞の滑面小胞体が増殖し¹³⁾¹⁹⁾、薬物代謝酵素系の活性が上昇することが知られている¹¹⁾⁹⁾。Phenobarbital を投与した場合には Cytochrome P-450 (Cyt. P-450) が、Methylcholanthrene を投与した場合には Cyt. P-448 が、それぞれ肝ミクロゾームに増加するが²⁾³⁾¹²⁾¹⁸⁾、PCB を投与した場合には Cyt. P-450 と Cyt. P-448 の両者が、肝ミクロゾームに増加することが知られている¹¹⁾⁴⁾。

Phenobarbital と Methylcholanthrene では、さらに、肝ミクロゾーム膜を構成しているリン脂質におよぼす影響が詳細に研究されている。これらの薬物を投与すると、ミクロゾーム膜を構成している各リン脂質の組成には変化が起らないが、Phosphatidylcholine と Phosphatidylethanolamine では、構成脂肪酸組成の変化、特に不飽和脂肪酸組成の変化が起ることが報告されている⁶⁾。このうち Phosphatidylcholine

の脂肪酸組成の変化は、Phenobarbital による薬物代謝酵素系の誘導と密接な関連を持つことが報告されている⁶⁾⁷⁾¹⁷⁾。

Phenobarbital や Methylcholanthrene に比べると、PCB の肝ミクロゾーム膜リン脂質に及ぼす影響についての研究は少ない¹⁴⁾。ラットに投与された PCB が、特に肝ミクロゾーム膜に濃縮されることから考えると⁹⁾、この点についての詳細な研究が必要であると思われる。本報告では、ラットに PCB を長期投与した場合に、肝ミクロゾーム膜にリン脂質の変動が起こるや否やを分析し、さらに肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系の変動についても測定を行い、肝ミクロゾーム膜に起こる薬物代謝酵素系の増加と膜リン脂質の構成脂肪酸組成の関連について考察を加えた。

実 験 方 法

1. 投与方法

動物は Sprague Dawley ラット雄 (約 300 g) を使用した。Kanechlor-400 (KC-400) を Corn oil

に溶解し (10 mg/ml), 0.5 ml を 3 日に 1 回経口投与し, 60 日間継続した (総投与量, 100 mg). 対照には同量の Corn oil を同様な方法で投与したラットを用いた.

2. 肝ミクロソームの調製

24 時間絶食したラットを断頭して殺し, 充分放血した後, 肝を摘出する. 肝を洗浄後ハサミで細片にし, 同量の 0.25 M ショ糖溶液 (pH 7.2) を加えて, Waring blender の最高回転で 20 秒ホモジナイズする. 得られたホモジネートに, 最初に加えた量の 2 倍の 0.25 M ショ糖溶液を加え, 25% ホモジネートとする. このホモジネートを $1000 \times g_{av}$ で 5 分間遠心し, 上清を 0.25 M ショ糖溶液で 2.5 倍に希釈する. 希釈された上清は, $11,000 \times g_{av}$ で 20 分間遠心を行い, その上清をさらに, $105,000 \times g_{av}$ で 60 分間遠心して, 沈殿をとりミクロゾーム分画とする. ミクロゾーム分画を 0.15 M-Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 8.0) で洗浄後, さらに脱イオン水で洗浄し, ミクロゾーム膜分画を得る.

3. 総脂質の抽出

総脂質の抽出は Folch 法⁹⁾に従い, 10 倍容のクロロホルム-メタノール (2:1) の混液を用いて, 窒素気流中で氷冷しながら行う. 抽出は 2 回くり返し, 抽出液を合して濾過する. 溶存蛋白質を除くために, 濾液に 0.2 倍容の 0.7% NaCl 溶液を加え, 攪拌後 -20°C で一夜放置する. クロロホルム層を取り, 窒素気流下で減圧濃縮して乾固する. 残査を石油エーテルに溶かし総脂質とする.

4. リン脂質の分離

リン脂質は Parsons and Patton の方法¹⁰⁾に従い,

Kiesel Ghur HR を用いて, 二次元薄層クロマトグラフィーにより分離した. 各リン脂質は乾燥したプレートを短時間ヨード蒸気にさらすことにより検出した. 各リン脂質の位置に該当するプレート上のシリカゲルをスパーテルでかき取って集め, クロロホルム-メタノール (2:1) 混液で 3 回抽出する. 抽出液は減圧で濃縮し, その一部を取りリンの定量を行う.

5. リン脂質構成脂肪酸の分析

二次元薄層クロマトグラフィー後, 各リン脂質の位置に該当する薄層プレート上のシリカゲルをかき取って集め, 各リン脂質を含むシリカゲルを, それぞれ 2% H_2SO_4 -メタノールと共に封管し, 100°C で 3~4 時間加熱する. 分解後, メチル化された脂肪酸メチルエステルは石油エーテルで抽出し, 抽出液を減圧濃縮後, ガスクロマトグラフィーで分析した. カラムは 150 cm $\times$ 3 mm のガラスカラムに, 15% diethylene glycol succinate polymer をコーティングした Chromosorb-P (100-120 メッシュ) を充填したものをを用い, 分析はカラム温度 200°C で行つた.

6. その他の定量法

リン脂質のリンは Bartlett 法⁵⁾により, 蛋白質は Lowry 法¹¹⁾を用いて定量した. Cyt. P-450 および Cyt. b_5 は大村らの方法¹²⁾により測定した. Aniline hydroxylase 活性は今井¹⁰⁾により, O-dealkylase 活性は辻らの方法 (未発表) を用いて測定した.

実験結果

1. 長期投与した KC-400 のラット肝ミクロソーム薬物代謝酵素系に及ぼす影響

Table 1 に示すように, KC-400 の長期投与により

Table 1. Effect of KC-400 on rat liver microsomal membranes.

The rats were arranged in six groups of three animals. The rats of three groups received 5 mg of KC-400 dissolved in corn oil (10mg/ml) by oral administration every three days over a period of sixty days. Other three groups received corn oil in the same way and were used as a control. The livers of three animals in each group were combined and used for the experiments.

	Control	KC-400
Liver weight (g)	9.4	16.1
Microsomal protein (mg/g liver)	17.5	23.1
Phosphorus of microsomal phospholipid (μ g/mg microsomal protein)	21.0	20.0
Cytochrome P-450*	23.0	53.3
Cytochrome b_5 *	11.6	24.8
O-dealkylase**	20.3	115.1
Aniline hydroxylase**	10.4	22.3

* $m\mu$ moles/g liver

** $m\mu$ moles/min/g liver

肝の肥大がみられ、肝重量あたりのミクロソーム蛋白量が対照の 1.3 倍に増加したが、リン脂質量には変化がみとめられなかった。

薬物代謝酵素系について、KC-400 長期投与群と対照群を比較すると、KC-400 投与群では Cyt. P-450 量が対照群の 2.3 倍に増加している。この増加率は KC-400 を体重 100 g あたり 6.8 mg ずつ 1 日 1 回経口投与し、3 日間連続投与後 4 日目に屠殺した場合 (3.2 倍) より低い値が得られた。O-dealkylase 活性は対照群の 5.7 倍、Aniline hydroxylase 活性は 2.1 倍を示したが、この増加率は 6.8 mg を 3 日間投与した場合とほぼ同様な傾向を示した。KC-400 長期投与群では、Cyt. b₅ の増加がみられ、対照群の 2.1 倍の値が得られた。

2. 長期投与した KC-400 のミクロソーム膜リン脂質に及ぼす影響

Table 2 に示すように、KC-400 の長期投与は肝ミクロソーム膜を構成するリン脂質の組成に、ほとんど影響を及ぼさなかった。この実験では、対照群のラットに Corn oil が長期投与してあるが、Corn oil の長期投与は、膜リン脂質の組成に何ら影響を及ぼさなかった。

Table 2. Composition of the phospholipids prepared from the liver microsomal membranes of rats after treatment with KC-400.

The treatment with KC-400 was performed as described in Table 1. The values are expressed as a molar percentage of the total phospholipids, and are means $\pm$ S. E. of three analyses.

Compounds	Control (% of total phospholipids)	KC-400 (% of total phospholipids)
Phosphatidylcholine	61.8 $\pm$ 7.8	59.7 $\pm$ 1.9
Phosphatidylethanolamine	22.9 $\pm$ 5.4	23.9 $\pm$ 1.9
Phosphatidylinositol	9.8 $\pm$ 2.3	11.2 $\pm$ 1.4
Phosphatidylserine	3.3 $\pm$ 0.7	2.4 $\pm$ 0.5
Sphingomyelin	1.9 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.9
Lysophosphatidylcholine	0.6 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.5

肝ミクロソーム膜総脂質の構成脂肪酸組成を KC-400 投与群と対照群で比較すると、KC-400 投与群では、Palmitic acid (16:0) の減少と Stearic acid (18:0) の増加の傾向がみられた (Fig. 1)。

ミクロソーム膜を構成する各リン脂質を薄層クロマトグラフィーで分離し、各リン脂質の構成脂肪酸組成

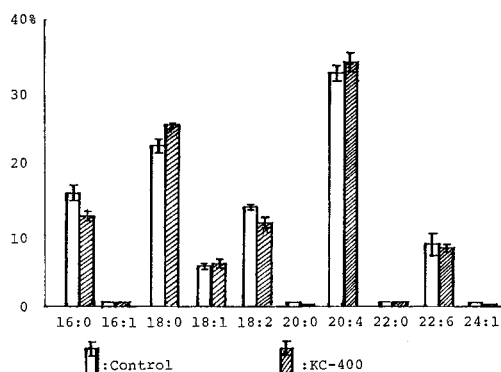


Fig. 1. Fatty acid composition of total lipid prepared from the liver microsomal membranes of rats after treatment of KC-400.

The treatment of KC-400 was performed as described in Table 1. Only main fatty acid esters were determined and individual esters are expressed as percentage by weight of the total of the main fatty acid. Values are means $\pm$ S. E. of three analyses. 16:0, palmitic acid; 16:1, palmitoleic acid; 18:0, stearic acid; 18:1, oleic acid; 18:2, linoleic acid; 20:0, arachidic acid; 20:4, arachidonic acid; 22:6, docosahexaenoic acid; 24:1, nervonic acid.

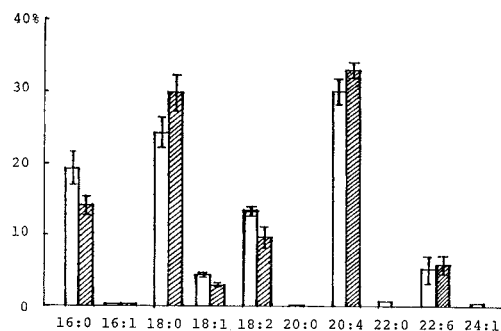


Fig. 2. Fatty acid composition of phosphatidylcholine prepared from the liver microsomal membranes of rats after treatment of KC-400.

The experimental details are described in the legend to Fig. 1.

を分析すると、KC-400 投与群では Phosphatidylcholine の Palmitic acid が対照群の 70% に減少し、Stearic acid が 125% に増加することが認められた (Fig. 2)。Phosphatidylethanolamine では、Stearic acid に増加の傾向が認められるが (Fig. 3)、Phosphatidylinositol では、ほとんど変化がみられなかった (Fig. 4)。

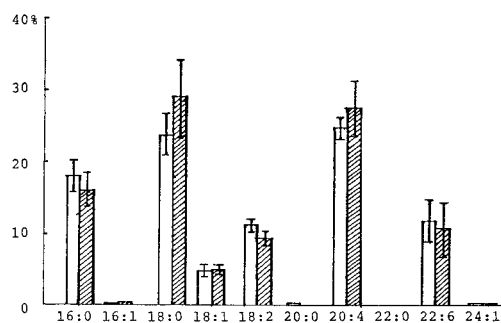


Fig. 3. Fatty acid composition of phosphatidylethanolamine prepared from the liver microsomal membranes of rats after treatment of KC-400.

The experimental details are described in the legend to Fig. 1.

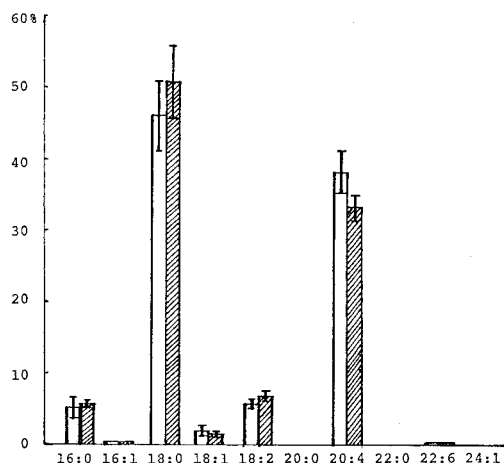


Fig. 4. Fatty acid composition of phosphatidylinositol prepared from the liver microsomal membranes of rats after treatment of KC-400.

The experimental details are described in the legend to Fig. 1.

考 察

ラットに KC-400 を投与すると、肝ミクロゾーム膜に高濃度に分布することが判明している⁹⁾、ミクロゾーム膜リン脂質に及ぼす KC-400 の影響を調べたが、膜リン脂質の組成には変化がみられなかった。永井らは KC-500 の短期投与によつて、ミクロゾームリン脂質組成に変動が起こることを報告している¹⁴⁾、彼らが報告している対照群の肝ミクロゾームリン脂質組成は、現在多くの研究者が報告している値

と異なっている。

ミクロゾーム膜総脂質の構成脂肪酸組成を調べると、KC-400 投与群では Palmitic acid の減少と Stearic acid の増加の傾向がみられたが、膜を構成する各リン脂質について脂肪酸組成を調べると、Phosphatidylcholine に Palmitic acid の減少と Stearic acid の増加が認められた、膜総脂質でみられた上述の傾向は、Phosphatidylcholine の構成脂肪酸変化によるものであろう。永井らはミクロゾームに存在する遊離脂肪酸を分析し、KC-500 投与によつて Palmitic acid が減少し、Stearic acid が増加することを報告している¹⁴⁾。

Davidson and Wills の報告によれば⁶⁾、Phenobarbital を投与したラットの初期の肝ミクロゾーム変化を調べると、Cyt. P-450 の増加と共に Phosphatidylcholine と Phosphatidylethanolamine の Linoleic acid (18:2) の増加が起こり、この増加は Cyt. P-450 の減少とともに消失する。この事実にもとづいて、彼らは、Phenobarbital による膜蛋白質の誘導と膜形成に、 β -位に Linoleic acid を有する Phosphatidylcholine あるいは Phosphatidylethanolamine が必須であろうと推論している。

KC-400 の長期投与による肝ミクロゾーム膜変化を調べると、Table 1 に示すように、誘導によつて増加した薬物代謝酵素系の量が、長期間にわたつて維持されているのが認められるが、膜リン脂質には著しい変化はみられなかった。本報告では、KC-400 投与による初期のミクロゾーム膜変化は調べられていない。しかし phenobarbital と同様に、KC-400 投与によつて初期に膜リン脂質脂肪酸組成に変化が起るとしても、長期にわたつて KC-400 を投与していると、誘導によつて増加した薬物代謝酵素系の量は、そのまま維持されているにもかかわらず、膜リン脂質構成脂肪酸組成は、ほぼ正常にもどつていることが示されている。

Wills らは Phenobarbital の長期投与による肝ミクロゾームの膜変化を調べていないし、われわれは KC-400 投与による初期の肝ミクロゾーム膜リン脂質変化を調べていないので、現在のところ上述の Wills らの推論について適否を論ずるのは妥当でないが、薬物代謝酵素系の誘導に、 β 位に Linoleic acid をもつた Phosphatidylcholine あるいは Phosphatidylethanolamine が必須であるという考えには疑問がもたれる。

本報告では、KC-400 長期投与による肝ミクロゾーム

ム膜の変化について考察を行つたが、KC-400 の毒性との関連については現在のところ不明である。

総 括

ラットに KC-400 を長期投与（60 日，総投与量，100 mg）すると，肝が肥大し，肝重量あたりのミクロゾーム蛋白量が 1.3 倍に増加するが，ミクロゾーム膜を構成するリン脂質の組成には変化がなかつた。膜を構成する各リン脂質の脂肪酸組成を分析すると，Phosphatidylcholine では，Stearic acid が対照群の 125% に増加し，Palmitic acid が対照群の 70% に減少していることが認められた。

KC-400 長期投与の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系に及ぼす影響も同時に調べたが，Cyt. P-450 は対照の 2.3 倍に，O-dealkylase 活性は 5.7 倍にそれぞれ上昇しているのが認められた。その他 Cyt. b₅ が対照の 2.1 倍に増加し，KC-400 短期投与（3 日，総投与量，60 mg）に比べると増加が著しかった。なお，KC-400 長期投与によつて得られた結果と，Wills らの Phenobarbital 投与の結果を比較し，肝ミクロゾーム膜リン脂質の変化と薬物代謝酵素系の変動との関連について考察を行つた。

文 献

- 1) Alvares, A. P., Bickers, D. R. and Kappas, A.: Proc. Nat. Acad. U. S. A. 70: 1321, 1973.
- 2) Alvares, A. P., Shilling, G., Levin, W. and Kuntzman, R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 29: 521, 1967.
- 3) Alvares, A. P., Shilling, G., and Kuntzman, R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 30: 588, 1968.
- 4) Alvares, A. P., and Siekevitz, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 54: 923, 1973.
- 5) Bartlett, J. G.: J. Biol. Chem. 293: 466, 1959.
- 6) Davison, S. C. and Wills, E. D.: Biochem. J. 140: 461, 1974.
- 7) Davison, S. C. and Wills, E. D.: Biochem. J. 142: 19, 1974.
- 8) Folch, J., Leas, M. and G. H. Sloan Stanlay: J. Biol. Chem. 226: 497, 1957.
- 9) 藤田哲治，辻 宏，加藤敬太郎，佐伯清太郎，塚元久雄：福岡医誌 62: 30, 1971.
- 10) Imai, Y. and Ito, A.: J. Biochem. 60: 417, 1966.
- 11) Lowry O. H. and Rousebrough, N. J.: J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.
- 12) Lu, A. Y. H., Kuntzman, R., West, S., Jacobson, M. and Conney, A. H.: J. Biol. Chem. 247: 1727, 1973.
- 13) 西原英徳，山元寅男：福岡医誌 60: 352, 1972.
- 14) 永井諄爾，八戸義明，桶口かおる：福岡医誌 65: 32, 1974.
- 15) Omura, T. and Sato, R.: J. Biol. Chem. 239: 2370, 1964.
- 16) Parsons, J. G. and Patton, S.: J. Lipid Res. 8: 696, 1967.
- 17) Saito, R., Estes, L. W. and Lombardi, B.: Biochim. Biophys. Acta. 381: 185, 1975.
- 18) Sladek, N. E. and Mannering, G. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 24: 668, 1966.
- 19) 山元寅男：細胞生物学シンポジウム，第21集：87, 1970.

ポリ塩化ビフェニール (PCB) の培養 HeLa 細胞に及ぼす影響

九州大学医学部微生物学教室

森 良一・藤田 晃一
山口 みどり

九州大学薬学部衛生裁判化学教室

吉村 英敏・山本 弘明

Effect of Polychlorinated Biphenyls (PCB) on HeLa Cells.

Ryoichi MORI, Koichi FUJITA,
and Midori YAMAGUCHI

*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kyushu
University, Fukuoka*

Hidetoshi YOSHIMURA and Hiroaki YAMAMOTO

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty
of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka*

Suspension of Kanechlor 400 (KC 400), a commercial brand of polychlorinated biphenyls (PCB), was found to have cytotoxic and cytolytic activity against HeLa cells. The minimum effective dose was 3~6 $\mu\text{g/ml}$ in media without serum protein. Time-lapse cinematography revealed that HeLa cells treated with KC 400 25 $\mu\text{g/ml}$ undergo retraction of processes, bleb formations, balloon formations followed by burst of the cells.

ポリ塩化ビフェニール（以下 PCB と略す）の市販品の一つであるカネクロール 400（以下 KC 400 と略す）は、いわゆる油症の原因物質であり¹⁾²⁾³⁾⁴⁾、また長期間ラットに投与すると肝に腫瘍性の変化を生ずる⁵⁾ことが報告されている点でも注目すべき物質である。

従来、この物質の作用については動物実験レベルの研究が主に行われており、試験管内培養細胞を用いての研究報告は見当たらない。筆者らはヒト子宮癌由来の株化細胞である HeLa 細胞を用い、これに及ぼす KC 400 の影響について検討を行ったので報告する。

材 料 と 方 法

薬剤：PCB は主として KC 400 を使用した。KC 400 をジメチルスルフォキシド (DMSO) に 10 mg/ml の濃度に溶解したものを原液とし、この状態で 121 °C、15 分のオートクレイブにより滅菌を行った。これ

を pH 7.2 の磷酸緩衝食塩水 (PBS) または Eagle の minimum essential medium (MEM) に加えて必要な濃度の懸濁液とした。

培養細胞：当教室で角瓶を用い、仔牛血清 10% 加 MEM を培地として継代されている HeLa 細胞 S3 株を用いた。顕微鏡的観察のための容器としてはプラスチックマイクロプレート (Falcon 3040) および 35×10 mm のプラスチックベトリディッシュ (Falcon 3001) を使用した。

色素排除試験：細胞の生死を判定するための色素排除試験は、細胞浮遊液に等量の 0.5% トリパンブルー液を加えて血球計算盤に入れ、染色される細胞を死細胞と判定した。

映画による観察：Falcon 3001 に培養した HeLa 細胞を MEM で 5 回洗ったのち、必要な濃度の KC 400 を含む MEM 2 ml を加え、ビニールテープで容器を封じ、20 倍の DLL 位相差対物レンズをつけ、

37°C に保温した Nikon MD 型倒立顕微鏡で観察しながら間隔 15 秒のコマ落し映画撮影を行った。

実験成績

1. 血清加培地に KC 400 を加え、HeLa 細胞の培養に用いた場合の影響

KC 400 がどの程度の濃度で HeLa 細胞の増殖および形態に影響を及ぼすかを検討するために、KC 400 をそれぞれ 50 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ に含む 10% 仔牛血清加 MEM 培地を用い、HeLa 細胞を 1×10^5 個 Falcon 3001 にうえこみ、炭酸ガス培養装置で培養した。

その結果、図 1 に示すように、50 $\mu\text{g/ml}$ の KC 400 の濃度では HeLa 細胞の増殖がほとんど完全に阻止されたが、KC 400 の濃度が 5 $\mu\text{g/ml}$ 以下では、HeLa 細胞の増殖は正常培地を用いた場合とほぼ同じであることが明らかとなった。

KC 400 を 5 $\mu\text{g/ml}$ に含む培地で 12 回、40 日に

わたりうえつきを行った HeLa 細胞の形態は、KC 400 を含まない 10% 仔牛血清加 MEM を培地としてうえつきを行った場合のそれとの間に顕著な差を見出すことができなかった (図 2)。

以上の実験で、5 $\mu\text{g/ml}$ の KC 400 は血清加培地では HeLa 細胞の増殖、形態にほとんど影響を与えなかったが、血清を加えない MEM を KC 400 の懸濁液作製に用いると、HeLa 細胞の著しい変化が観察されたので、次の実験として血清を含まない培地での KC 400 の HeLa 細胞に及ぼす影響を検討した。

2. PBS に懸濁した KC 400 の単層培養 HeLa 細胞に及ぼす影響

Falcon 3040 に培養した HeLa 細胞を PBS で 5 回洗い、各孔に種々の濃度の KC 400 を含む PBS 0.05 ml を加え、37°C で 4 時間処理したのち、上清をすて、0.03% EDTA 液 0.05 ml を加え、37°C に 1 時間おいて細胞を浮遊させ、これに 0.5% トリパンブルー液 0.025 ml を加えて HeLa 細胞の生死を判

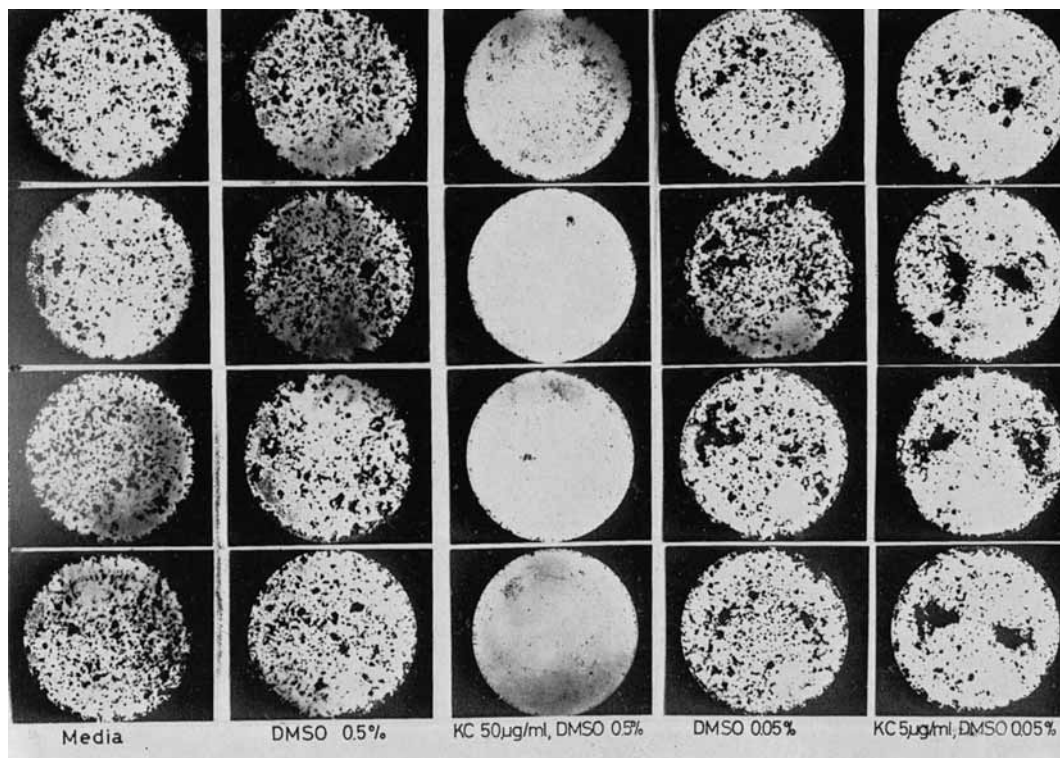


図 1. KC 400 の HeLa 細胞培養に及ぼす影響。

10% 仔牛血清加 MEM 培地を用いて KC 400 をそれぞれ 50 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ に懸濁し、これを培地として HeLa 細胞 $1 \times 10^5/2\text{ml} \times 2\text{ml}$ を Falcon 3001 にうえこみ、炭酸ガス培養装置で 37°C、3 日間培養したのちメタノール固定、ギムザ染色を行ったもの。

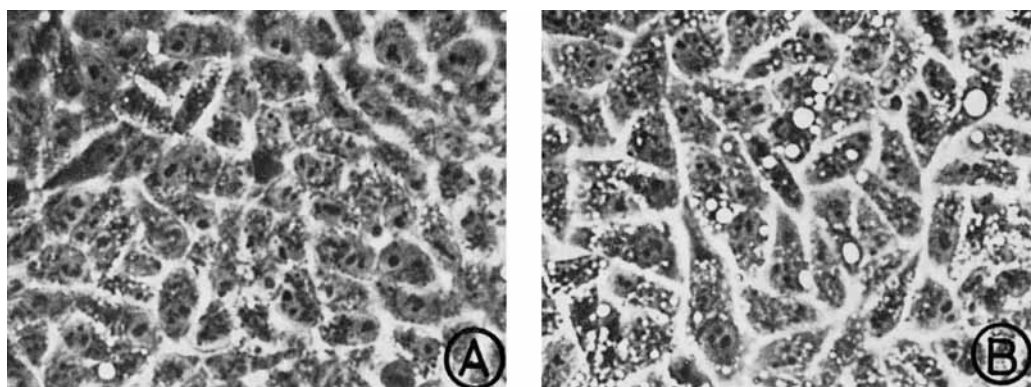


図 2. KC 400 5 $\mu\text{g/ml}$ を含む 10 % 仔牛血清加培地で 12 代, 40 日にわたり継代した HeLa 細胞, および正常培地で継代した HeLa 細胞. ($\times 160$)

A: KC 400 添加

B: KC 400 無添加 (対照)

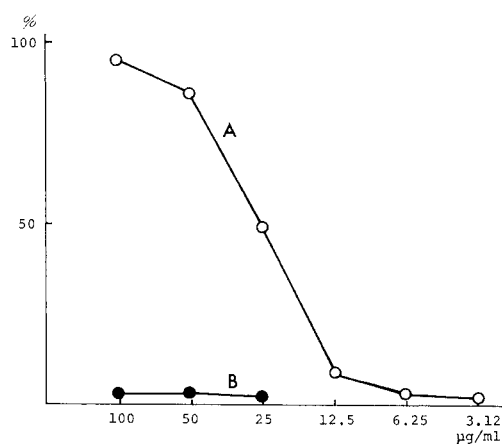


図 3. KC 400 の単層 HeLa 細胞に対する障害試験.

Falcon 3040 にうえた HeLa 細胞層を PBS で 5 回洗い, 100 $\mu\text{g/ml}$ より 3.12 $\mu\text{g/ml}$ まで PBS に懸濁した種々の濃度の KC 400 で 37°C, 4 時間処理したのち吸引し, 0.03 % EDTA 0.05 ml を加えて細胞を浮遊させ, これに 0.5 % トリパンプブルー 0.025 ml を加え, 色素排除試験を行った.

縦軸: 染色した細胞の百分率, 横軸: PCB 濃度 (KC 400, $\mu\text{g/ml}$)

A: KC 400 で処理した場合.

B: KC 400 液に含まれる DMSO と同濃度の DMSO を含む MEM で処理した場合.

定した.

その結果, 図 3 に示すように, KC 400 の濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ では 80 % 以上の細胞がトリパンプブルーで染色された. また KC 400 の濃度が 6.25 $\mu\text{g/ml}$ までは KC 400 を含まない培地に比し, 有意

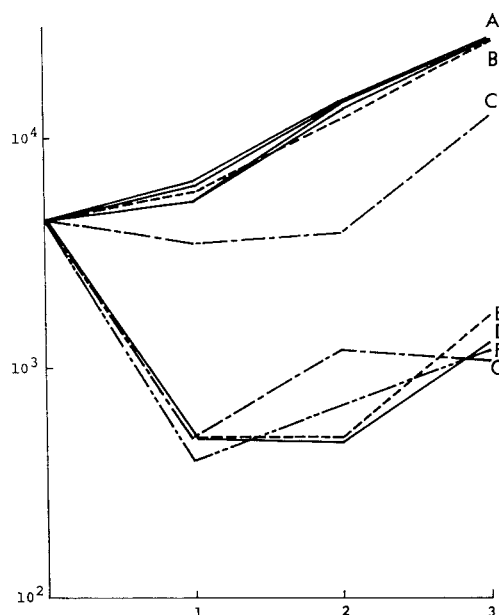


図 4. KC 400 の浮遊 HeLa 細胞に対する障害試験.

角瓶にうえた HeLa 細胞を 0.25 % トリプシン液で処理して細胞浮遊液を作り, PBS で 5 回洗浄し, $4 \times 10^5/\text{ml}$ の浮遊液とし, その 0.4 ml に KC 400 液 0.4 ml を加え, 37°C で 4 時間処理したのち, それぞれの濃度に KC 400 を含む 10 % 仔牛血清加 MEM を培地としてマイクロプレート (Falcon 3040) の各孔に 0.1 ml を入れ培養し, 経日的に細胞数を算え, HeLa 細胞の増殖曲線をえがいたもの.

縦軸: 細胞数, 横軸: 培養日数

A: DMSO 0.0625 ~ 0.5 %, B: DMSO 0.25 % + KC 1.56 $\mu\text{g/ml}$, C: KC 3.12 $\mu\text{g/ml}$, D: KC 6.25 $\mu\text{g/ml}$, E: KC 12.5 $\mu\text{g/ml}$, F: KC 25 $\mu\text{g/ml}$, G: KC 50 $\mu\text{g/ml}$

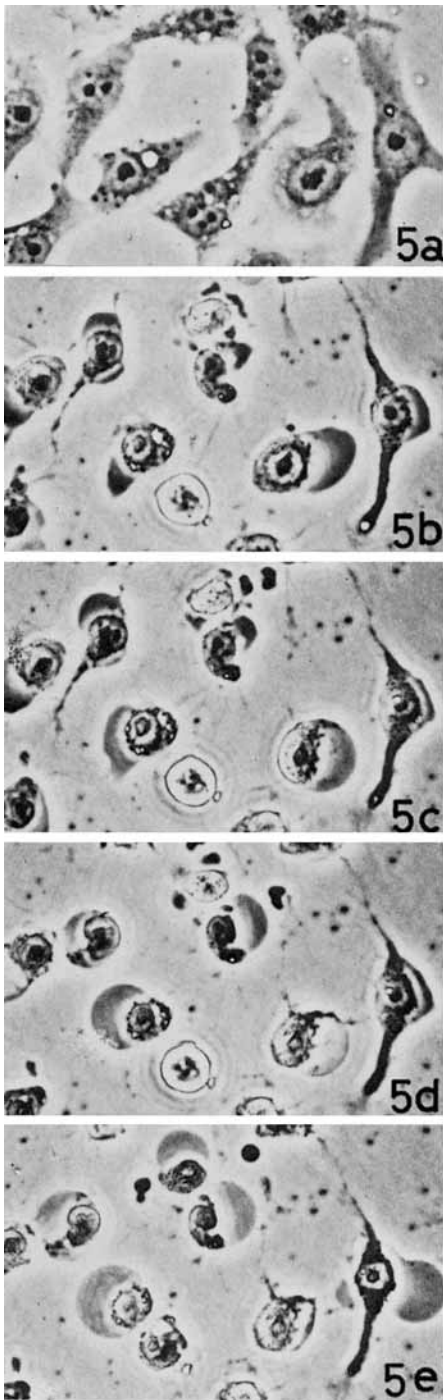


図 5. KC 400 25 $\mu\text{g/ml}$ 存在下での HeLa 細胞の変化. ($\times 210$)
a : KC 400 添加直後, b : 2 時間後, c : 3 時間後, d : 4 時間後, e : 5 時間後.

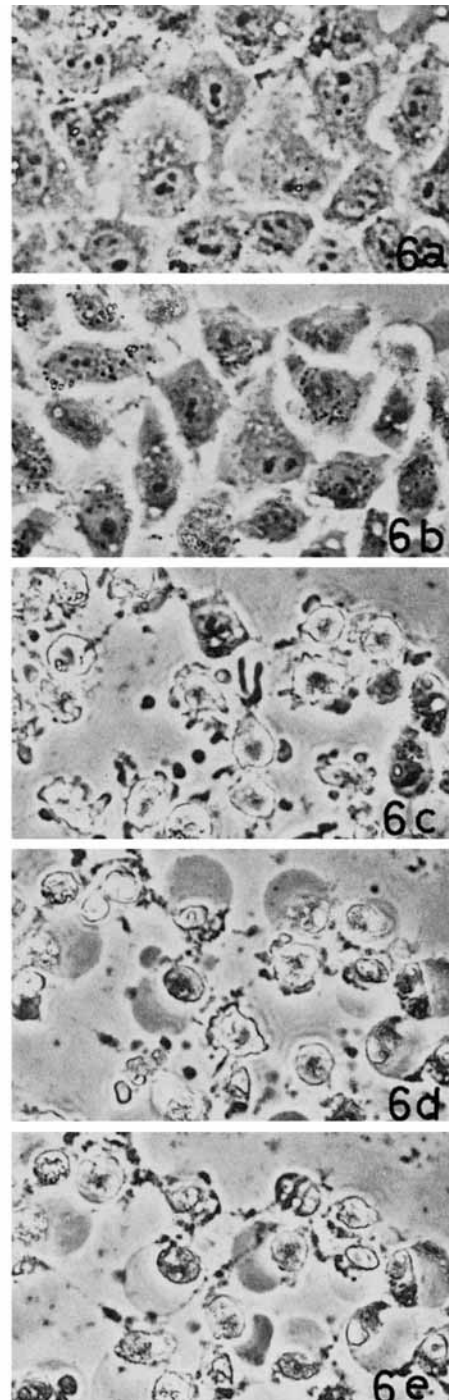


図 6. KC 400 25 $\mu\text{g/ml}$ 存在下での HeLa 細胞の変化. ($\times 210$)
a : KC 400 添加直後, b : 1.5 時間後, c : 3 時間後, d : 5 時間後, e : 6 時間後.

に細胞障害作用が現れることが観察された。

3. PBS 懸濁した KC 400 の浮遊 HeLa 細胞に及ぼす影響

浮遊 HeLa 細胞に対しても KC 400 は障害作用を及ぼすか否かを検討するために、角瓶に培養した HeLa 細胞の単層培養を 0.25 %トリプシン液で処理し浮遊させ、PBS を用いて 5 回洗浄したのち 4×10^5 / ml に PBS に再浮遊させた。細胞浮遊液 0.4 ml と種々の濃度に KC 400 を含む PBS 0.4 ml をウイダル管内で混和し、37°C で 4 時間処理したのち、仔牛血清 10 %加 MEM 培地 7.2 ml を加えて Falcon 3040 に培養し、以後経日的に 1 つの孔あたりの細胞数を数えて細胞の増殖曲線をえがき、細胞障害を判定した。

その結果は図 4 に示すように、この場合も 6.25 μ g/ml の KC 400 で細胞障害が現れ、3.12 μ g/ml の KC 400 でも部分的な細胞障害が現れていることが明らかとなった。

4. KC 400 による細胞障害作用のコマ落し映画撮影による観察

Falcon 3001 に培養した HeLa 細胞層を MEM で 5 回洗い、これに 25 μ g/ml に KC 400 を含む MEM 2 ml を加えてコマ落し映画撮影を行った。

その結果、37°C では次のような細胞障害作用が観察された。すなわち、約 1 時間後に細胞内顆粒の動きが停止し、つづいて細胞は収縮し、多数の小突起を出し、さらにバルーン状にふくらんだのち破裂して細胞は完全に動きを停止した。25 μ g/ml の KC 400 の存在下では以上の反応は約 5 時間以内に完了した。密な HeLa 細胞層および粗な HeLa 細胞層についての一連の変化を図 5 および図 6 に示す。

以上の変化は KC 400 を同濃度に含む 10 %仔牛血清加 MEM を培地として用いた場合には観察されなかった。すなわち、血清成分は KC 400 の細胞障害作用に対して抑制的に働いた。

考 察

PCB 中毒症としての油症¹⁾²⁾³⁾⁴⁾の研究をはじめ、in vivo での PCB の作用についての研究は多数報告されているが、試験管内培養細胞に対する影響についての報告はこれまで見出すことができなかった。筆者らは HeLa 細胞を用い KC 400 の培養細胞に及ぼす影響についての検討を試みた。5 μ g/ml の KC 400 では、10 %仔牛血清加培地を使用するかぎり 1 か月間継代を重ねても細胞の形態、増殖にほとんど変化を

見出すことができなかった。

50 μ g/ml の大量を培地に加えた場合には HeLa 細胞の増殖がほぼ完全に抑制されたが、これはこの濃度の KC 400 が加えられると、あまりにも培地が白濁するために、培養器表面への細胞の附着が阻害されるためと考えられる。

メジウムに血清を含まない状態では KC 400 による強い細胞障害作用が示された。その障害作用は顕微鏡的观察では細胞膜の破壊が本態と考えられたので、KC 400 の溶血作用について検討した。その結果は次報⁵⁾に示すように KC 400 が多くの動物の赤血球に対して強い溶血作用を示すことが明らかとなった。

ビフェニール、1 塩素化ビフェニール、2 塩素化ビフェニールには溶血作用は検出できず、KC 400 の主成分である 4 塩素化ビフェニールおよび 5 塩素化ビフェニールがともに KC 400 とほぼ同濃度まで溶血作用をもつことが示されたので、KC 400 の溶血作用の大部分は 4 塩素化および 5 塩素化ビフェニールによるものと考えても支障はない。したがってこの報告でのべた KC 400 の HeLa 細胞に対する障害作用もまた、4 塩素化および 5 塩素化ビフェニールによるものと考えられる。5 μ g/ml 程度の KC 400 ではメジウムに血清 10 %を含む場合には障害作用がほとんど観察されなかったが、KC 400 の溶血作用が血清添加によって抑制される現象と同じ機序によるものであろう。

KC 400 による細胞の致死の障害は、その過程の形態学的観察から細胞膜に対する作用によるものと考えられる。しかし、映画で観察された現象の一部は、細胞膜に対する KC 400 の作用の結果、細胞が致死的效果をうけ、その二次的变化として HeLa 細胞がバルーン形成、破裂という経過をたどつたものであるかもしれない。この点は PCB 以外の薬物による細胞の形態的变化と比較しながら検討し考察すべきものであろう。

KC 400 についてここで観察されたような細胞障害作用が生体内でどのような意義をもつかは重要な問題である。血清の存在下ではこの作用は強く抑制されることから、生体内でこのような形での細胞障害が現れることはまずないと考えられる。5 μ g/ml の KC 400 を含む 10 %血清加培地で HeLa 細胞を 1 か月間うえついで場合にはほとんど影響を観察できなかったことから、生体内でのこのような直接作用は大体無視できるものと考えられる。しかし、さらに長期の観察については今後の検討が必要であらう。

総 括

PCB の製品である KC 400 が、血清を含まないメジウム中では、3～6 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で HeLa 細胞に障害作用を示すことを観察した。コマ落し映画による観察から、KC 400 の作用を受けた HeLa 細胞は、細胞膜の強い変化をうけ、細胞の収縮、突起形成、バルーン形成、破裂の経過をとり死滅することを明らかにした。

本研究は文部省科学研究費がん特別研究(1)よりの援助を受けた。

文 献

- 1) 油症治療研究班・九大医学部：油症（塩化ビ

フェニール中毒）研究報告。福岡医誌 60: 403-553, 1969.

- 2) 油症治療研究班・九大医学部：油症（塩化ビフェニール中毒）研究報告第2集。福岡医誌 62: 1-181, 1971.

- 3) 油症治療研究班・九大医学部：油症（塩化ビフェニール中毒）研究報告第3集。福岡医誌 63: 347-418, 1972.

- 4) 油症治療研究班・PCB 研究班・九大医学部：油症と PCB（塩化ビフェニール）に関する研究報告第4集。福岡医誌 65: 1-95, 1974.

- 5) Kimura, N. T., and Baba, T.: Neoplastic changes in the rat liver induced by polychlorinated biphenyl. Gann 64: 105-108, 1973.

- 6) 藤田晃一, 森 良一, 山口みどり, 吉村英敏, 山本弘明: ポリ塩化ビフェニール(PCB)の溶血作用および血球凝集様作用に関する研究。福岡医誌 66: 574-578, 1975.

ポリ塩化ビフェニール (PCB) の溶血作用および 血球凝集様作用

九州大学医学部微生物学教室

藤 田 晃 一・森 良 一
山 口 みどり

九州大学薬学部衛生裁判化学教室

吉 村 英 敏・山 本 弘 明

Hemolytic and "Hemagglutinating" Activity of Polychlorinated Biphenyls (PCB).

Koichi FUJITA, Ryoichi MORI
and Midori YAMAGUCHI

*Department of Microbiology, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka*

Hidetoshi YOSHIMURA and Hiroaki YAMAMOTO

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka*

Kanechlor 400 (KC 400) dissolved in dimethylsulfoxide and emulsified in PBS was found to have "hemagglutinating" activity at 4°C and hemolytic activity at 37°C. The "hemagglutinating" phenomenon was not due to the dimer formation or aggregate formation. The phenomenon was blocked by serum protein and cardiolipin. Most of the isomers of tetrachlorobiphenyls, chief components of KC 400, were shown to have hemolytic activity at the same concentration as KC 400.

前報¹⁾でポリ塩化ビフェニール (PCB) の市販品の一つであるカネクロール 400 (KC 400) が、培養 HeLa 細胞に対して細胞障害作用があることについて報告した。その形態学的観察から細胞膜の変化が著しいことが明らかとなつたので、系を簡易化し、PCB と赤血球との反応について検討を行つた。その結果、ある種の動物の赤血球浮遊液は PCB 懸濁液と混合し 4°C に放置すると、赤血球凝集反応にみられると同様な凝集パターンをとることを見出し、また 37°C では溶血反応が観察されたので報告する。なお KC 400 による血球凝集反応の一部についてはすでに報告した²⁾。

材 料 と 方 法

(1) 使用薬物

PCB としては主として KC 400 を使用した。KC 400 はジメチルスルフォキシド (DMSO) に 10 mg/

ml に溶解したものから必要な濃度の懸濁液を作製した。

ビフェニールおよび 1 塩素化ビフェニール (4-クロロビフェニール) は、それぞれ和光純薬および半井化学薬品の製品を購入し、2 塩素化ビフェニール (4,4'-ジクロロビフェニール) はベンチジンのジアゾニウムクロリドを銅粉で処理して合成したものを、また 4 塩素化ビフェニール、5 塩素化ビフェニール (Analabs 社製) は九大医学部倉恒匡徳教授より分与を受けたものを使用した。上記単品の溶血作用の定量には、温エタノールに 5 mg/ml に溶解させたのち、所定の濃度の懸濁液を作製した。

(2) 血球凝集試験

ハムスター、モルモット、マウス、ニワトリより採血し、Alsever 液に保存した血球を燐酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄したのち、最後の遠沈を 1500 rpm, 10 分行い PBS を用いて 0.4% (v/v) の血球

浮遊液を作製した。DMSO 中 10 mg/ml に溶解した KC 400 溶液 1 容に PBS 9 容を加えて乳濁液とした KC 400 0.4 ml を、ウィダル管の系列の中で PBS を用いて倍数希釈を行い、これに血球浮遊液 0.4 ml を加えて振盪したのち、4°C に静置して 4 時間後にパターンを判定した。血球が管底全面に沈降したいわゆる shield パターンを凝集反応陽性とし、血球が管底の中央部に集まつたいわゆる button パターンを陰性と判定した。

(3) 血球凝集抑制試験

KC 400 により血球凝集パターンが生ずる本態を知るために、インヒビターの検討を行った。ウィダル管系列内で 0.2 ml のインヒビターを PBS ので倍数希釈し、これに 4 血球凝集単位の KC 400 懸濁液 0.2 ml を加え室温に 30 分放置したのち、0.4 % ハムスター血球浮遊液 0.4 ml を加え振盪し、4°C に 4 時間以上放置して管底像を判定した。

(4) 溶血試験

血球凝集反応の場合と同様に、PCB の 0.4 ml 希釈系列に 0.4 % ハムスター赤血球浮遊液を 0.4 ml ずつ加え、37°C の湯ぶねに 4 時間放置して溶血の有無を判定した。肉眼的判定で完全溶血がみられる PCB の最終濃度を最小溶血量（濃度）として表した。

(5) 溶血抑制試験

インヒビター 0.2 ml の希釈系列に、4 溶血単位を含む KC 400 を 0.2 ml ずつ加え、室温に 30 分放置したのち、0.4 % ハムスター血球液 0.4 ml ずつを加え、37°C の湯ぶねに 4 時間置いて溶血を判定した。肉眼的に溶血がほとんど完全に阻止されているチューブに含まれているインヒビターの濃度で、インヒビターの能力を表現した。

(6) 溶血の経時的变化の測定

溶血の経時的变化を測定するために、60 $\mu\text{g/ml}$ または 6 $\mu\text{g/ml}$ の KC 400 と等量の 0.4 % ハムスター赤血球浮遊液を混和した試験管を多数準備し、37°C の湯ぶねにつけて経時的に 540 m μ の波長で吸光度を測定し、ヘモグロビンの遊出から溶血量を定量的に表し溶血曲線を描いた。

実 験 成 績

1. KC 400 による種々の動物の赤血球浮遊液の凝集反応パターンの出現

モルモット、CF₁ マウス、白色レグホン、ハムスターの赤血球について凝集陽性パターンが出現するために必要な KC 400 の濃度を比較した成績を表 1 に

表 1. 種々の動物の赤血球浮遊液に対する KC 400 の“凝集”作用および溶血作用。

動 物	系 統	No.	“凝集” に必要な 最小量 ($\mu\text{g/ml}$)	溶血に 必要な 最小量 ($\mu\text{g/ml}$)
マウス	CF ₁	1	125	4
		2	>250	4
		3	125	4
		4	>250	4
		5	250	4
		6	250	8
		7	250	4
		8	>250	4
		9	>250	4
モルモット	ハートレー	1	>250	4
		2	>250	4
		3	>250	4
		4	>250	4
		5	>250	4
		6	>250	4
ニワトリ	白色レグホン	1	4	2
		2	4	2
		3	125	4
		4	125	2
		5	125	4
		6	>250	4
		7	>250	4
		8	>250	8
		9	125	2
		10	>250	16
ハムスター	ゴールデン	1	4	4
		2	4	4
		3	4	4
		4	8	4
		5	8	4

示す。

モルモットの赤血球は凝集パターンを作り難く、またマウス、白色レグホンには個体差がみられた。特に後者においては個体差が顕著であつた。一方、ハムスター赤血球は凝集パターンの産生においても溶血反応においても感受性が高く、個体差が少なく、安定した成績が得られた。したがって以後の実験には主としてハムスター赤血球を用いることにした。

2. 血球凝集パターン産生の本態

血球凝集パターンが KC 400 による血球の dimer 形成によるか否かを検討するために、30 $\mu\text{g/ml}$ の

KC 400 と 0.4% ハムスター血球浮遊液を等量混和し、4°C に 1 時間放置したのち、4°C の冷室内で血球・KC 400 混合液を血球計算盤にとり、顕微鏡下に血球の状態を観察した。しかしながら、顕著な血球の凝集または dimer 形成はみられなかった。またこの血球凝集パターンはマイクロタイター用トイレン内では

表 2. 各種物質の KC 400 にハムスター血球“凝集反応”に対するインヒビター活性

インヒビター	“凝集”阻止に必要な最小量(濃度)
仔牛血清	×3,200
ヒト血清	×200~×400
牛ガンマグロブリン	40 µg/ml
牛血清アルブミン	20 µg/ml
卵白アルブミン	>80 µg/ml
カルジオリピン	4 µg/ml
アルファ-メチルグルコシド	>10 µg/ml
ラク トー ス	>10 µg/ml
マン ノー ス	>10 µg/ml

生じなかった。したがって血球凝集パターンは真の凝集に基づくものでなく、血球とガラス管壁との間の KC 400 による粘着に基づくものではないかと考えられる。

3. 血球凝集パターン産生に対するインヒビターの検討

インヒビターの検討を行った成績を表 2 に示す。血清成分およびカルジオリピンに強いインヒビター活性が示された。したがって、この反応には脂質および蛋白の関与が想像される。

表 3. 仔ウシ血清、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンの溶血阻止作用

インヒビター	最小溶血阻止濃度 ^{a)}
仔ウシ血清	×128
ウシ血清アルブミン	3 mg/ml
卵白アルブミン	>25 mg/ml

a) 4 溶血単位の KC 400 に対する最小溶血阻止濃度

表 4. ビフェニールおよび塩素化ビフェニールのハムスター赤血球に対する溶血作用

Chemicals	Concentration of PCB (µg/ml)							
	125	62.5	31.3	16.5	7.8	3.9	1.9	0.9
Biphenyl	—	—	—	—	—	—	—	—
4 MCB	—	—	—	—	—	—	—	—
4,4' DCB	—	—	—	—	—	—	—	—
2,3,2',3' TCB	+	+	+	+	+	+	—	—
2,4,2',4' TCB	+	+	+	+	+	+	+	—
2,5,2',5' TCB	+	+	+	+	+	+	—	—
2,6,2',6' TCB ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—
3,4,3',4' TCB ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—
2,3,2',5' TCB	+	+	+	+	+	+	+	—
2,4,2',5' TCB	+	+	+	+	+	+	—	—
2,5,3',4' TCB	+	+	+	+	+	+	—	—
2,3,4,5 TCB	+	+	+	+	+	+	+	—
2,3,5,6 TCB	+	+	+	+	+	+	—	—
2,3,4,2',5' PCB	+	+	+	+	+	+	—	—
2,3,6,2',5' PCB	+	+	+	+	+	+	—	—
2,4,5,2',5' PCB	+	+	+	+	+	+	—	—
2,3,4,5,6 PCB	+	+	+	+	+	+	—	—
2,4,5,2',3' PCB	+	+	+	+	+	+	—	—
Kanechlor 400	+	+	+	+	+	+	+	—

MCB: monochlorobiphenyl, DCB: dichlorobiphenyl, TCB: tetrachlorobiphenyl, PCB: pentachlorobiphenyl. —: 溶血なし, +: 溶血, a) 不安定な懸濁液。

4. KC 400 の溶血作用

KC 400 のモルモット、マウス、白色レグホン、ハムスター赤血球に対する溶血作用を測定した結果を表 1 に凝集の成績と併記して示す。表から明らかなように、凝集パターンの産生には動物間、個体間の差が著しいが、溶血に関しては多くの赤血球が約 $4 \mu\text{g/ml}$ の KC 400 に感受性を示した。

5. 溶血作用に対するインヒビターの検討

血清およびその成分について検討を行った成績を表 3 に示す。血清が有効なインヒビターとなることが明らかにされた。

6. PCB 単体の溶血作用

ビフェニールおよび 1 塩素化体・2 塩素化体・4 塩素化体・5 塩素化体の各種異性体について溶血作用を測定した成績を表 4 に示す。4 および 5 塩素化体は溶血作用を示すが、その程度は KC 400 のそれとほぼ同程度であった。

7. KC 400 による溶血の経時的变化

$30 \mu\text{g/ml}$ および $3 \mu\text{g/ml}$ の KC 400 による溶血の程度の経時的变化を図 1 に示す。 $30 \mu\text{g/ml}$ では 37°C において約 90 分で、また $3 \mu\text{g/ml}$ では 37°C において約 3 時間でハムスター赤血球が 100% 溶血する。

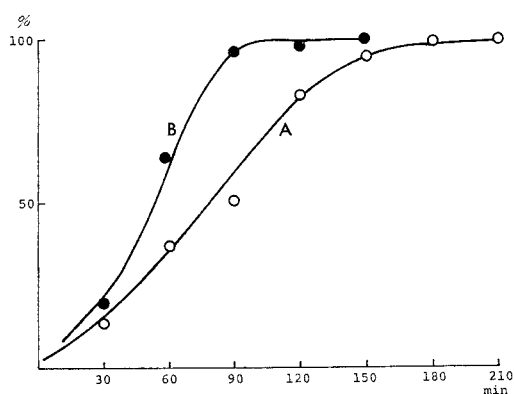


図 1: ハムスター赤血球の KC 400 による溶血

$60 \mu\text{g/ml}$ または $6 \mu\text{g/ml}$ の KC 400 と赤血球浮遊液を等混和し、 37°C に保ち、経時的に $540 \mu\text{m}$ における吸光度を測定し、溶血の割合を算出しプロットした。

縦軸: 溶血のパーセント, 横軸: 培養時間 (分)

A: KC 400 の最終濃度: $3 \mu\text{g/ml}$, B: $30 \mu\text{g/ml}$

考 察

前報で報告したように KC 400 に細胞溶解作用が

見出されたので、系を単純化するために培養細胞の代りに赤血球を使用して KC 400 の作用を検討した。多くの種類の動物の赤血球に対し KC 400 は最低 $3 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ の濃度で溶血作用を示した。但し溶血には時間を要し、最低有効濃度での完全な溶血には 37°C で約 3 時間を要した。この事実および溶血作用に対して血清、血清アルブミンがインヒビターとして働くこと、さらには PCB の脂肪溶解性、脂肪組織内蓄積性³⁾ を考慮に入れると、KC 400 による溶血作用の本態は、血球膜の脂質部分に対する KC 400 の親和性にあるのではないかと想像される。

KC 400 は 4 塩素化ビフェニールを主成分とするが、4 塩素化ビフェニールの溶血作用は KC 400 のそれとほぼ同じであった。またビフェニール、1 塩素化ビフェニール、2 塩素化ビフェニールには用いた定量方法では溶血作用を見出すことができなかった。したがって KC 400 の溶血作用は大部分が、その中に含まれる 4 塩素化体の PCB によるものと考えても支障ないことになる。このことから前報で述べた KC 400 の HeLa 細胞に対する溶解作用も、主として KC 400 の主成分である 4 塩素化体によると推定される。

溶血作用は血清によつて抑制された。したがって KC 400 による溶血作用が生体内でどのような意義をもつかは重要な問題ではあるが、生体内で血球に直接働いて溶血をおこさせるほどの濃度に PCB が蓄積することは、ほとんどありえないと考えられる。

PCB と血球の反応の研究の途中で見出された KC 400 による血球凝集パターンの産生については、それが真の凝集塊形成による凝集反応ではないことが観察された。しかしこのパターンの産生は、脂質または蛋白によつて強く抑制をうけるので、PCB の脂質親和性と関係ある現象ではないかと考えられる。

総 括

KC 400 が種々の動物の赤血球に対し $3 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ の濃度で 37°C において溶血作用を示すことを観察した。この反応は血清によつて抑制された。一部の動物の赤血球は KC 400 とウイダル管内で混和すると、凝集パターンを生ずることを見出したが、この現象は KC 400 による凝集塊または dimer 形成による凝集反応ではないことも明らかにされた。しかしこの凝集反応は血清成分およびカルジオリピンで強く抑制されるので、血球膜の脂質部分と KC 400 との反応に基づくものと考えられる。

多数の4塩素化および5塩素化ビフェニールの異性体を分与していただいた九大医学部倉恒徳教授および第一薬科大学増田義人助教授に感謝します。

本研究は文部省科学研究費がん特別研究(1)よりの援助をうけた。

文 献

- 1) 森 良一, 藤田 晃一, 山口みどり, 吉村 英

敏, 山本弘明: ポリ塩化ビフェニール(PCB)の培養HeLa細胞に及ぼす影響. 福岡医誌 66: 568-573 1975.

- 2) 森 良一, 山口みどり, 藤田晃一: PCB(ポリ塩化ビフェニール)による血球凝集反応. 医学のあゆみ 91: 14-15, 1974.

- 3) 吉村英敏, 山本弘明・他: ^3H -カネクロールのラットにおける体内分布および排泄について. 福岡医誌 62: 12-19, 1971.

Polychlorinated Biphenyls¹⁾ Toxicity and Nutrition IV

PCBs Toxicity and Vitamin A (3)

Satoshi INNAMI, Atsuko NAKAMURA, Katsushige KATO
and Motoyoshi MIYAZAKI

The National Institute of Nutrition, Tokyo 162, Japan

Sumiko NAGAYAMA

Teikyo College, Tokyo 151, Japan

Eiichi NISHIDE

*Department of Fisheries, College of Agriculture and Veterinary
Medicine, Nihon University, Tokyo 154, Japan*

The investigations have been made to elucidate the interaction between PCBs toxicity and vitamin A. The authors (Innami, Tojo *et al.*) have already reported that rats fed for 6 weeks a 0.1 % PCBs diet supplemented with 3,400 IU of vitamin A showed better growth than those fed a 0.1% PCBs diet without supplementation. However, rats given a vitamin A deficient diet with 0.1 % PCBs showed more significant growth retardation than those given a 0.1% PCBs diet without supplementation (Innami, Nakamura *et al.*). All rats which were fed a vitamin A deficient diet with PCBs had a bad coat of fur and closed their eyes 50% or completely at the 3rd week of feeding, and some of them died in the last period of the experiment. But such symptoms were not at all seen in the rats given a 0.1% PCBs diet without supplementation or a vitamin A deficient diet. It was also observed that the vitamin A content in the liver decreased significantly with 0.1% PCBs administration (Innami, Nakamura *et al.*).

This result was not inconsistent with that of Villeneuve *et al.* who demonstrated the decrease of vitamin A content in the livers of rabbits and fetuses receiving Aroclor 1221 and 1254 for 28 days. Therefore, it seemed that the nature of the symptoms which appeared in the rats fed a vitamin A deficient diet with 0.1% PCBs was strongly possible to be of a vitamin A deficiency itself. However, Tanaka *et al.* previously described that almost similar symptoms appeared when rats fed a stock diet were dosed 0.1 g of PCBs per kg per day orally for 4 weeks.

For such reason, the authors have mentioned in the previous paper (Innami, Nakamura *et al.*) that further investigations would be required to clarify the cause of this phenomenon.

In the present study, the experiments have been conducted to determine whether these symptoms would be a characteristic phenomenon of PCBs poisoning or based on vitamin A deficiency.

Methods

Weanling male rats of the Sprague Dawley strain were housed individually in wire cages maintained in a laboratory with 12 hours of light and 12 hours of darkness. The temperature in the animal laboratory was controlled near to 22°C. The composition of the basal diet was (%): milk casein 20.0, sucrose 63.0, soybean oil 9.0, mineral mixture

1) The following abbreviation is used: PCBs, polychlorinated biphenyls.

(Harper, A. E.) 4.0, cellulose flour 2.0, vitamin mixture (Harper, A. E.) 0.85, choline-HCl 0.15 and vitamin oil 1.0 (one gram of this oil contains 300 IU of vitamin A-acetate, 30 IU of vitamin D₂ and 10 mg of α -tocopheryl E-acetate).

In the vitamin A deficient group, vitamin A was removed from vitamin oil and vitamin free casein (Wako Pure Chemical Inc.) was directly used without further purification. One hundred mg of PCBs was added to 100 g of the basal diet in substituting for an equal part of sucrose. PCBs used in this experiment were purchased from Wako Pure Chemical Inc., and were a mixture of the isomers, of which tetrachloride was dominant.

The diets were prepared every two weeks and stored in the refrigerator except feeding time. Six to seven rats of each group were fed the experimental diets. Food and water were given ad libitum throughout the experiment. Food consumption and body weight were recorded 3 times per week.

In the first experiment, rats were fed on the PCBs diets with and without vitamin A for 8 weeks. On the way of feeding, half of the rats receiving a vitamin A deficient diet with PCBs was switched to the diet containing 3,000 IU of vitamin A-acetate per 100 g of the PCBs diet after the characteristic symptoms appeared.

In the second experiment, after the characteristic symptoms appeared each 100 IU of vitamin A-acetate and β -carotene was directly ingested every two days into the stomach of the rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs by using a syringe with a round-top needle (9.5 cm in length). The purity of crystal β -carotene purchased from Merck was found to be 80% by the alumina chromatographic analysis (Tabata *et al.*). Vitamin A-acetate and β -carotene were dissolved in the soybean oil (the Japanese Pharmacopoeia) and the potency was determined every two days.

At the end of experiment the food cups were removed at 7:00 a.m. After fasting for 7~8 hours, the rats were sacrificed by decapitation. The liver was quickly removed, weighed and stored in a freezer maintained under -20°C . As early as possible after sacrifice, the liver vitamin A was determined by a colorimetric method using a mixture of antimony trichloride and glycerol-1, 3-dichlorohydrin following saponification in KOH (Fujita and Kimura).

Results and Discussion

The first experiment was carried out to further clarify whether the characteristic symptoms which appeared in the rats given a vitamin A deficient diet with PCBs in a comparatively early period of the experiment, as previously reported, would be based upon a vitamin A deficiency or not. Rats were fed on the PCBs diets with and without vitamin A for 8 weeks.

As shown in Fig. 1, rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs showed more prominent growth retardation than the PCBs group at the 4th week after feeding started. At this time, all rats of this group had a bad coat of fur and eye mucus, and closed their eyes completely as shown in Fig. 2 (A). The results were completely the same as previously reported (Innami, Nakamura *et al.*).

On the other hand, the growth of the vitamin A deficient group was almost equal to that of the control group until the 4th week after feeding started, and since then the growth of this group tended to slow down slightly as compared with the control group. However, not any eye symptoms in this group have been detected by the end of experiment. Even in the PCBs-fed group, the same was true, but the only difference from the vitamin A deficient group was that two out of 6 rats died at the last week of the experiment. They had a bad coat of fur and a part of hair was lost. In the group on the vitamin A deficient diet with PCBs one out of 7 rats died at the 4th

week of feeding, and after that the remaining rats of this group died successively until the 6th week of feeding.

While, it was found that the rats which were switched from a vitamin A deficient diet with PCBs to the diet containing 3,000 IU of vitamin A-acetate per 100 g of the PCBs diet at the 26th day after feeding started, as shown in Fig. 1, recovered from their body weight loss rapidly and gained significantly over the PCBs group at the end of experiment. They regained a fine coat of fur, and remarkably, their closed eyes opened and the eye mucus disappeared, as seen in Fig. 2(B).

It was also observed in this experiment that the vitamin A content in the liver of rats fed a PCBs diet or a vitamin A deficient diet with PCBs decreased significantly, as shown in Table 1. The vitamin A content in the liver of rats fed 3,000 IU of vitamin A-acetate with 0.1% PCBs was significantly higher than that of rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs.

However, the liver vitamin A content of these rats, despite that a large amount of vitamin A was administered, was much less than that in the previous experiment (Innami, Nakamura *et al.*). The reason may be due to the difference of experimental conditions between the present experiment and the previous one. At any rate, this means that if animals receiving PCBs would once

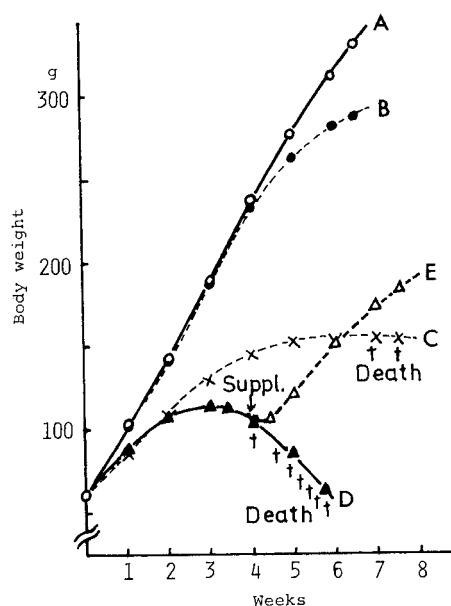


Fig. 1. Effect of vitamin A supplementation on recovery of growth retardation in rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs

A: Control, B: Vitamin A deficient, C: 0.1% PCBs, D: V.A. def.+0.1% PCBs, E: 3,000 IU of V.A-acetate was added to 100g of a 0.1% PCBs diet.



Fig. 2. Appearance of characteristic symptoms in rats received a vitamin A deficient diet with 0.1% PCBs and recovery of these symptoms by vitamin A administration.

(A) A rat received a vitamin A deficient diet with 0.1% PCBs for 4 weeks.

(B) A rat received a diet containing 3,000 IU of vitamin A per 100 g of a 0.1% PCBs diet for 3 weeks after the characteristic symptoms appeared.

Table 1. Effects of vitamin A and β -carotene on weight gain and vitamin A content in liver of rats fed a vitamin A deficient diet with 0.1% PCBs

Experiment number	Group	Body weight gain	Liver weight		Vitamin A content
		g	g	% ¹⁾	IU/g liver
Exp. 1	PCBs (7)	93 $\pm$ 15*	14.39 $\pm$ 1.66	9.47 $\pm$ 0.61	2.57 $\pm$ 0.51
	V.A def. + PCBs (7)	17 $\pm$ 4	8.10 $\pm$ 0.38	10.51 $\pm$ 0.26	1.67 $\pm$ 0.22
	V.A def. + PCBs $\rightarrow$ V.A suppl. ²⁾ + PCBs (7)	137 $\pm$ 21	17.80 $\pm$ 2.10	9.03 $\pm$ 0.53	12.35 $\pm$ 2.70
Exp. 2	V.A def. + PCBs (6)	24 $\pm$ 3	8.03 $\pm$ 0.61	9.60 $\pm$ 0.57	1.17 $\pm$ 0.31
	V.A def. + PCBs $\rightarrow$ V.A dose ³⁾ + PCBs (6)	75 $\pm$ 20	12.42 $\pm$ 1.67	9.35 $\pm$ 0.48	5.55 $\pm$ 2.09
	V.A def. + PCBs $\rightarrow$ β -carotene dose ³⁾ + PCBs (6)	91 $\pm$ 23	14.14 $\pm$ 1.88	10.32 $\pm$ 1.75	0

* Mean $\pm$ S.E.1) (Liver weight) $\div$ (Body weight) $\times$ 100

2) 3,000 IU of vitamin A-acetate was supplemented to 100 g of a 0.1% PCBs diet on and after the 26th day of feeding.

3) Each 100 IU of vitamin A-acetate and β -carotene was ingested every two days into the stomach of rats fed a vitamin A deficient diet with 0.1% PCBs on and after the 33rd day of feeding.

Figures in parentheses are the number of rats used.

become deficient in vitamin A, much time may be needed to restore vitamin A in the liver even though a large amount of vitamin A is supplied.

In the second experiment, the effectiveness of β -carotene on the PCBs toxicity in the vitamin A deficient animals was compared with that of vitamin A.

Each 100 IU of vitamin A-acetate and β -carotene was directly ingested every two days into the stomach of rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs after the characteristic symptoms appeared. The results are shown in Fig. 3 and Table 1. All rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs died until the 6th week of feeding. However, in the groups which ingested either vitamin A or β -carotene orally since the 33rd day of feeding, only one out of 6 rats in each group died within 10 days after the vitamin administration.

There were no differences between vitamin A and β -carotene in the recovery of reduced body weight and the characteristic symptoms caused by a vitamin A deficient diet with PCBs. However, the recovery of growth by vitamin A or β -carotene administration was not remarkable as compared with the first experiment.

The reasons for this or for the appearance of one dead rat in each case of this experiment might be due to the delay of time for the ingestion of vitamins and the low level of vitamin administration as compared with the first experiment.

Vitamin A content in the liver of rats ingested 100 IU of vitamin A every two days was not so high, but higher than that of rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs. On the other hand, vitamin A was not detectable in the liver of rats ingested β -carotene every two days.

This seems to indicate that, as far as the present experimental conditions concern, the ingestion of 100 IU β -carotene every two days is inadequate to store vitamin A in the liver of rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs for few weeks.

At any rate, the above results mean that a large part of the symptoms which appeared in the rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs is based on a vitamin A deficiency. In other words, it means that PCBs act to accelerate vitamin A deficiency in the animals or make animals deficient in vitamin A.

Thus, the possible explanation on the PCBs toxicity is that the toxic effect, at least a part of it, appears through the occurrence of vitamin A deficiency.

However, it is not yet clear whether the symptoms described by Tanaka *et al.* would also be based upon a vitamin A deficiency caused by subacute toxicity of PCBs or not. Further investigations will be needed about it.

Summary

The experiments have been conducted to determine whether the symptoms which appeared in the rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs at an earlier time than expected would be a characteristic phenomenon of PCBs poisoning or based on a vitamin A deficiency.

Rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs showed the characteristic symptoms until the 4th week after feeding started, and all rats in this group died until the 6th week of the experiment. While, the rats whose diet was switched from a vitamin A deficient diet with PCBs to the diet containing 3,000 IU of vitamin A-acetate per 100 g of the PCBs diet at the 26th day of feeding after the characteristic symptoms appeared, restored their body weight rapidly and gained significantly over the PCBs diet group without supplementation at the end of experiment. They regained a fine coat of fur and remarkably, their closed-eyes opened clearly and the eye mucus disappeared.

It was also found from another experiment that there were no differences between vitamin A and β -carotene in the recovery of reduced body weight and the characteristic symptoms caused by a vitamin A deficient diet with PCBs. However, a significant difference was seen in the vitamin A content of the liver between the rats dosed 100 IU of vitamin A and the rats dosed 100 IU of β -carotene.

These results indicate that a large part of the symptoms which appeared in the rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs is based on a vitamin A deficiency. Thus, it is concluded that PCBs act to accelerate vitamin A deficiency in the animals or make animals deficient in vitamin A. Therefore, animals received PCBs require more vitamin A than usual.

References

- 1) Fujita, A. and Kimura, K.: An improved micromethod for fractional determination of vitamin A alcohol and ester and the changes in both types of vitamin A in blood plasma,

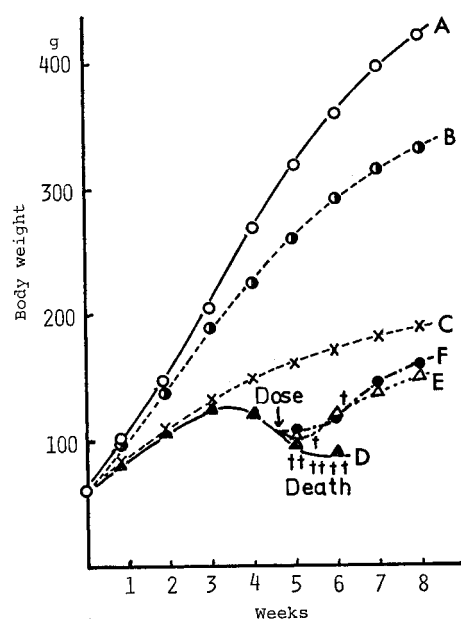


Fig. 3. Effects of vitamin A and β -carotene ingestion on recovery of growth retardation in rats fed a vitamin A deficient diet with PCBs

A: Control, B: Vitamin A deficient, C: 0.1% PCBs, D: V.A. def. + 0.1% PCBs, E: 100 IU of V. A. was ingested, F: 100 IU of β -carotene was ingested.

milk and liver after loading with both types of the vitamin A and β -carotene. J. Vitaminol. 6: 6-15, 1960.

2) Harper, A. E.: Amino acid balance and imbalance 1. Dietary level of protein and amino acid imbalance. J. Nutr. 68: 405-418, 1959.

3) Innami, S., Nakamura, A., and Nagayama, S.: Polychlorobiphenyl toxicity and nutrition II. PCB toxicity and vitamin A (2). J. Nutr. Sci. Vitaminol., 20: 363-370, 1974.

4) Innami, S., Tojo, H., Utsugi, Y., Nakamura, A. and Nagayama, S.: PCB toxicity and nutrition I. PCB toxicity and vitamin A (1). Jap. J. Nutr. 32: 58-66, 1974 (in Japanese).

5) Tabata, R., Baba, H., Fukuba, H., Takai, Y., and Iwao, H.: The determination methods of vitamins in foods (2) The determination method of β -carotene. Jap. J. Nutr. 21: 54-56, 1956 (in Japanese).

6) Tanaka, K., Fujita, S., Komatsu, F. and Tamura, N.: Experimental subacute poisoning of chlorobiphenyls, particularly the influence on the serum lipids in rats. Fukuoka Acta Med. 60: 544-547, 1969 (in Japanese).

7) Villeneuve, D. C., Grant, D. L., Phillips, W. E. J., Clark, M. L., and Clegg, D. J.: Effects of PCB administration on microsomal enzyme activity in pregnant rabbits. Bull. Envir. Contam. Toxicol. 6: 120-128, 1971.

PCB の毒性とビタミン A (3)

国立栄養研究所栄養改善部

印 南 敏・中 村 敦 子
加 藤 勝 重・宮 崎 基 嘉

帝京短期大学

永 山 ス ミ 子

日本大学農獣医学部水産学科

西 出 英 一

シロネズミを PCB を含むビタミン A (以下 V. A) 不足飼料で飼育すると、比較的早期に特有の症状が発現するが、この症状が V. A 欠乏によるものなのか、あるいは PCB に特有の毒性症状であるのかを明らかにしたいと考え実験を行った。

Sprague Dawley 系の雄の幼シロネズミに 0.1% PCB (四塩化物主成分) を含む V. A 不足飼料を与えると、前報同様に飼育開始後 3 週目頃より体重が低下し始め、毛並みの乱れや眼やにが現れ、その後眼瞼がふさがるといった特有の症状が現れた。

そこで飼育後 26 日目にこれらの症状を呈したネズミを 2 群に分け、その 1 群の飼料を 0.1% PCB 飼料 100 g 当たり 3,000 IU の V. A を含む飼料に切換えると、成長は速やかに回復し、投与 3 週後では特有の症状の消失することを認めた。一方、V. A を添加しない他の 1 群では 6 週目末までに 7 匹全部が死亡した。0.1% PCB 群では 7~8 週目にかけて 6 匹中 2 匹死んだが、この 2 匹は毛並みが悪くなっただけで眼瞼症状には異常が認められなかった。

次に、これらの特有症状に対する β -カロチンの回復効果を V. A のそれと比較した。この実験でも、V. A 不足 0.1% PCB 群は 3~4 週目に特有症状を呈し、6 週目末までに全部死亡した。しかしながら、飼育 33 日目に V. A と β -カロチンをそれぞれ 100 IU ずつ 2 日置きに胃に注入したもので、投与後 3 週目までに成長と症状の回復がみられた。

上記の 2 実験において、各群の肝臓 V. A 濃度を測定したところ、PCB 群、V. A 不足 PCB 群共に V. A の著しい減少がみられたが、V. A 投与群では V. A の貯留が認められた。しかし、 β -カロチン投与群では肝臓に V. A を認めることができなかった。

以上のことから、0.1% PCB を含む V. A 不足飼料で飼育した場合に現れる特有症状は、V. A 欠乏によるものであることを認めた。すなわち、PCB は動物に対して V. A 欠乏を促進させるか、あるいは V. A 欠乏を起こさせるように作用すると推定されるので、PCB 投与動物では V. A の要求量が一層増大するといえる。

PCB の酵素誘導作用に及ぼす他物質併用の影響

九州大学医学部薬理学教室

荒木 泰典*・日高 賢志
田中 潔

Influences of Some Agents on the Enzyme-inducing Activity of PCB

Yasunori ARAKI, Tadashi HIDAKA and
Kiyoshi TANAKA

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka, Japan*

The enzyme-inducing activity of PCB was measured pharmacologically with the method of testing hexobarbital sleeping time in young female mice (Araki & Tanaka: Fukuoka Acta Med. 65: 47, 1974). Combination of PCB with a small dose of methyl mercury or clofibrate enhanced the inducing activity, whereas alkylbenzene sulfonate counteracted the activity of PCB.

Cholestyramine strongly inhibited the shortening of hexobarbital sleeping time induced by a mixture of PCB, DDT and BHC, indicating that this anion exchange resin suppressed the intestinal absorption of the mixture.

PCB に対する生体の反応として最も鋭敏なものは、肝の薬物代謝酵素誘導作用であり、これを薬理学的に間接測定する簡便な方法が考案された (Araki & Tanaka). この方法で測ると、PCB は DDT または BHC と協力し、小量ずつの併用で著しい誘導作用を示すことが知られている (荒木・田中). 現在のような複合汚染の時代においては、汚染農薬と PCB との協力は注目すべき現象であるから、他の汚染物質との複合作用も検査する必要がある。

今回は有機水銀と中性洗剤という普遍的汚染物質を取り上げ、PCB と併用したときの誘導作用をみることにした。また誘導性医薬の一つに挙げられる有機塩素系脱コレステロール薬 clofibrate (荒木・天ヶ瀬) と PCB との併用も試みた。一方 PCB の腸内吸収を抑制する薬として cholestyramine が発見されたが (Tanaka & Araki), これが PCB+DDT+BHC の3者複合汚染に対しても有効な防止薬になるかどうかを試験することにした。

実験方法

Araki & Tanaka の方法に従い、体重 15~20 g の若い雌の CF 1 系マウスを使用し、その 10 匹を 1 群として、hexobarbital-Na 100 mg/kg 腹腔内注射による麻酔時間を測定した。PCB としてはカネクロール 400 を CMC で水性懸濁液に作り、胃ゾンデで経口的に応用した。2 日、7 日、14 日 (必要あれば 21 日にも) 後に麻酔実験をして、そのときの対照群の麻酔時間に対する百分率で表示し、麻酔短縮がみられた場合は回復までの経過を曲線に描いた。また平均値 ± 標準誤差 (S.E.) から 2 群間の有意差を検定した。

有機水銀としては塩化メチル水銀の水溶液、中性洗剤としては sodium dodecylbenzenesulfonate (ABS) の水溶液、clofibrate, DDT, BHC 等、水に難溶のものは CMC で水性懸濁液とし、いずれも胃ゾンデで経口投与した。

* 現所属: 岡山大学医学部附属病院薬剤部

実験成績

1. PCB とメチル水銀の併用

メチル水銀単独の 1 mg/kg 1 回応用では有意の麻酔短縮を証明し得ない (図 1 A). 5 mg/kg では麻酔時間が 2 日後に对照の 77% に短縮し, 7~14 日後も同程度で, 21 日後に回復した (B).

このようなナベ底型の回復曲線は, 図には示さなかったが, メチル水銀の用量を増した場合にも共通的に認められた. すなわち 10 mg/kg では, 麻酔時間が最低 65% に達して, ほぼ 3 週間持続し, 20 mg/kg では, 最低 60% の短縮状態が 3 週間, 50 mg/kg では 55% 前後の短縮が 3 週間つづいて, いずれも 4 週後に急に回復するというナベ底曲線であった.

PCB 単独では 10 mg/kg 以下の 1 回応用は有意の麻酔短縮を来さない (図 3 B 参照).

PCB 2.5 mg/kg + メチル水銀 0.25 mg/kg の併用では有意差とはいえないが, 90% 前後の麻酔短縮が 1 週間つづいた (図 1 C).

PCB 5 mg/kg + メチル水銀 0.5 mg/kg の併用では 7 日後 78% に短縮して (有意差), 3 週後に回復した (D).

PCB 10 mg/kg + メチル水銀 1 mg/kg の併用では, 7 日後 69% に短縮し 3 週後に回復した (E).

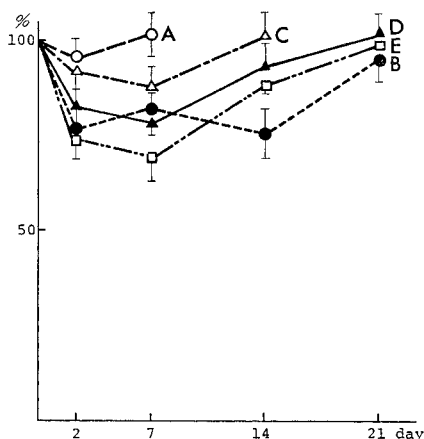


図 1. PCB とメチル水銀併用の hexobarbital 麻酔時間に及ぼす影響

A: メチル水銀 1 mg/kg 単独, B: 同 5 mg/kg 単独, C: PCB 2.5 mg/kg + メチル水銀 0.25 mg/kg, D: PCB 5 mg/kg + メチル水銀 0.5 mg/kg, E: PCB 10 mg/kg + メチル水銀 1 mg/kg, 縦軸: hexobarbital 100 mg i.p. による麻酔時間 (対照に対する%), 横軸: 薬物応用後の日数

これら併用時の麻酔回復曲線は, PCB と水銀の用量増加と共に深さを増し, PCB 単独にみる型 (2 日後最低に下つてやや急に回復する) とは異なる. しかしながら, PCB 単独およびメチル水銀単独のそれぞれ最低有効量以下の組み合わせによつて, どちらか一方の 2 倍量を単独で与えたときよりも, はるかに大きい作用が出現することは確実で, これは両薬が酵素誘導において協力することを意味する.

2. PCB と中性洗剤 (ABS) の併用

ABS 単独では麻酔短縮を来すことなく, 200 mg/kg 以上ではかえつて延長することが, 同じ方法を用いた上田らの研究でわかっている. 100 mg/kg ではわずかに延長の傾向を示すに過ぎない (図 2 A). PCB 100 mg/kg 1 回投与では, 最低 32% に及ぶ典型的な麻酔短縮曲線を示すので (B), これと ABS 各量との併用を試みた.

PCB 100 mg/kg + ABS 25 mg/kg の併用では, 麻酔短縮が軽減され最低 70% にとどまつたが, 回復には 3 週間を要した (C).

PCB 同量 + ABS 50 mg/kg の併用では, 麻酔時間は 2 日後 53% まで下つたが, 2 週間で回復した (D).

PCB 同量 + ABS 100 mg/kg の併用では, 麻酔時間が対照の 90% 以上で有意差なく, ほとんど誘導作用が消失した (E).

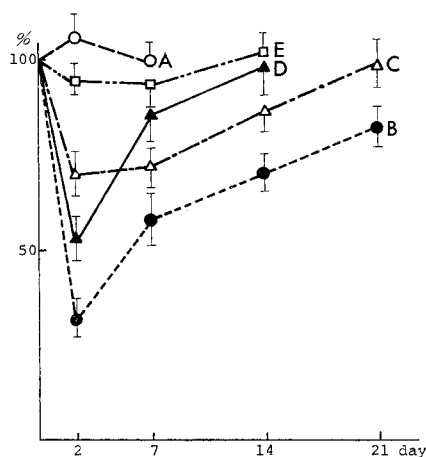


図 2. PCB と中性洗剤 (ABS) 併用の hexobarbital 麻酔時間に及ぼす影響

A: ABS 100 mg/kg 単独, B: PCB 100 mg/kg 単独, C: PCB 100 mg/kg + ABS 25 mg/kg, D: PCB 100 mg/kg + ABS 50 mg/kg, E: PCB 100 mg/kg + ABS 100 mg/kg, 縦軸: 麻酔時間 (対照=100), 横軸: 経過日数

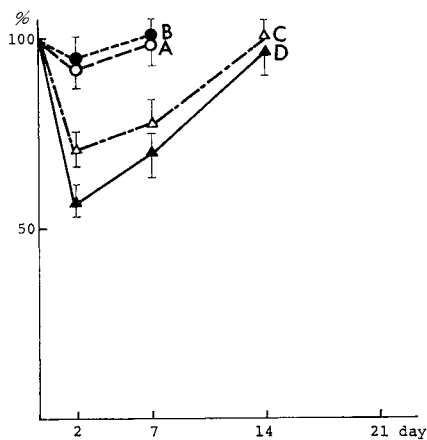


図 3. PCB と clofibrate 併用の hexobarbital 麻酔時間に及ぼす影響

A: clofibrate 100mg/kg 単独, B: PCB 10mg/kg 単独, C: PCB 5mg/kg + clofibrate 25mg/kg, D: PCB 100mg/kg + clofibrate 50mg/kg, 縦軸: 麻酔時間 (対照=100), 横軸: 経過日数

以上のように ABS は麻酔短縮すなわち酵素誘導作用を示さないのみならず, その小量を併用することにより PCB の誘導作用を抑制する。

3. PCB と clofibrate の併用

clofibrate 単独による酵素誘導作用は, 荒木・天ヶ瀬の研究に詳しく報告されているが, 最小有効量は 200 mg/kg であつて, 100 mg/kg 1 回投与ではほとんど麻酔短縮がおこらない (図 3 A). PCB 単独の最小有効量は 20 mg/kg とみなされ (Araki & Tanaka), 10 mg/kg では有意の麻酔短縮はおこらない (B).

PCB 5 mg/kg + clofibrate 25 mg/kg の併用では 2 日後の麻酔時間が対照の 71% に短縮し, 2 週間後に回復した (C).

PCB 10 mg/kg + clofibrate 50 mg/kg の併用では麻酔短縮は最低 57% に達し, 2 週間後に回復した (D).

以上のように, PCB と clofibrate のそれぞれ単独では無作用量を組み合わせることにより, 単独の 2 倍量を用いたときより強い作用が現れるので, 両者は酵素誘導において協力するといえる。

4. PCB, DDT, BHC の 3 者併用に対する陰イオン交換樹脂の影響

PCB, DDT, BHC の 3 者はいずれも酵素誘導作用をもつ物質であつて, その RD 60 (麻酔時間を対照の 60% に短縮する用量) は, それぞれ 50, 370, 400

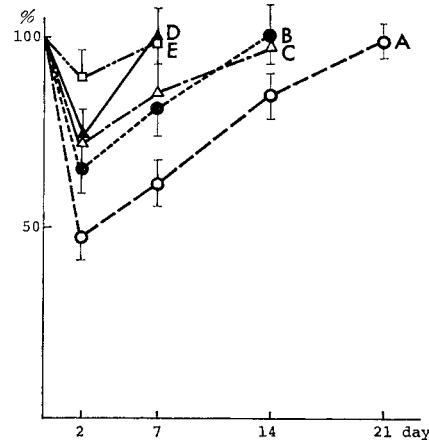


図 4. PCB, DDT, BHC 3 者併用による麻酔短縮に対する陰イオン交換樹脂の影響

A: PCB 17mg/kg + DDT 120mg/kg + BHC 130mg/kg 混合物応用, B: 混合物 + Sephadex DEAE 100mg/kg, C: 混合物 + Sephadex 500mg/kg, D: 混合物 + cholestyramine 100mg/kg, E: 混合物 + cholestyramine 500mg/kg, 縦軸: hexobarbital 100mg/kg i.p. による麻酔時間 (対照=100), 横軸: 経過日数

mg/kg である (Araki & Tanaka). そこで各薬の RD 60 の 1/3 ずつを混合してマウスに投与した. すなわち PCB 17 mg/kg + DDT 120 mg/kg + BHC 130 mg/kg の 1 回投与によつて, 麻酔時間は 2 日後最低の 48% となり, 回復に 3 週間を要した (図 4 A).

陰イオン交換樹脂の一種 Sephadex DEAE を, 3 者混合物応用後 30 分して経口的に投与すると, Sephadex が 100 mg/kg の場合, 麻酔短縮は最低 66%, Sephadex 500 mg/kg では 73% で, いずれも 2 週間で回復した (B, C).

Cholestyramine を 3 者混合物応用後 30 分して与えた場合は, 100 mg/kg の併用で麻酔短縮は著しく軽度となり, 2 日後 74% にとどまり 1 週間で回復した (D). 500 mg/kg を併用すると, 麻酔時間は 2 日後有意差のない 90% を示したのみで (E), 3 者混合の麻酔短縮作用はほぼ完全に抑制された。

以上要するに, cholestyramine は PCB + DDT + BHC 3 者併用による酵素誘導作用を確実に抑制する. 同類の陰イオン交換樹脂 Sephadex DEAE にも抑制作用があるが, cholestyramine に比べると弱い。

考 察

さきに PCB+DDT および PCB+BHC の併用によつて、酵素誘導に協力がみられることを報告したが(荒木・田中), 今回の実験で PCB がメチル水銀とも協力することがわかつた. かくして主要残留性環境汚染物質は, 互いに酵素誘導を増強し合うと考えられ, 複合汚染の影響をこの方面から眺める必要性を感じる. さらに clofibrate のような長期服用する医薬が, 汚染物質と協力して酵素誘導を強める事実も, 一応注目すべきことと思う.

メチル水銀の酵素誘導作用については先人もその存在を認めているが(Pekkanen), 今回の麻酔短縮曲線からみると, 有機塩素系物質(PCB, DDT, BHC等)と異なり, 用量に比例して急速に作用が強くなるという事実がなく, 作用に持続性があり, その結果ナベ底型曲線を示すという特徴がある. 肝細胞の電子顕微鏡所見も PCB とは大分趣を異にするという(山元・西原, 未発表).

中性洗剤 ABS は麻酔短縮作用が全くなく, 量を増せばかえつて麻酔延長が現れる(上田ら). PCB と併用しても協力を全然示さず, 反対に著しい拮抗がみられた. ABS が麻酔延長, すなわち薬物代謝酵素抑制的に働くのは, 一部の学者が主張するように肝臓毒であるためかもしれないが(柳沢), PCB との拮抗は, ABS のもつ下剤的作用によつて, PCB の吸収が抑制されることも一つの因子であろう.

ABS と PCB をラットに併用して, 酵素誘導と ATPase 抑制において協力を認めたという反対の報告があるが(Itokawa), そのとき使われた PCB はカネクロール 500 の 500 ppm という大量で, ABS も 1000 ppm という高濃度を 3 カ月使つたものであるから, 実験条件は全く異なる.

さきに報告した胆汁吸着剤 cholestyramine の, PCB が腸内から吸収されるのを抑制する作用は, PCB+DDT+BHC の 3 者混合物に対しても同様に発揮されることが, 今回の実験で示された. おそらく腸管よりの吸収に胆汁を必要とする多くの脂溶性有機ハロゲン化合物に対して, 共通的に抑制効果があるも

のと期待される.

総 括

1) 若い雌マウスにおける hexobarbital-Na 麻酔の短縮を指標に, 肝酵素誘導作用を試験すると, メチル水銀にも誘導作用があり, それと PCB とは協力的に働く.

2) 中性洗剤 (ABS) は酵素誘導を示さず, かえつて麻酔延長を来し, PCB との併用は PCB の誘導作用を減弱するように働く.

3) 脱コレステロール薬 clofibrate と PCB の併用は, 酵素誘導において協力する.

4) PCB, DDT, BHC の 3 者併用による酵素誘導に対して, cholestyramine は明らかに防止的に働き, Sephadex DEAE もやや弱いながら同様の作用を示す.

文 献

- 1) Araki, Y. and Tanaka, K.: A simple screening method of enzyme-inducing agents of PCB type. 福岡医誌 65: 47-52, 1974.
- 2) 荒木泰典・田中潔: PCB と DDT, BHC との複合作用. 福岡医誌 65: 65-68, 1974.
- 3) 荒木泰典・天ヶ瀬洋正: 脱コレステロール薬による肝酵素誘導現象と肝細胞微細構造の変化. 福岡医誌 65: 465-472, 1974.
- 4) Itokawa, Y., Kamohara, K. and Fujiwara, K.: Toxicity of PCB increased with simultaneous injection of alkylbenzene sulfonic acid salt. Experientia 29: 822-823, 1973.
- 5) Pekkanen, T. J. and Salminen, K.: Inductive effects of methyl mercury on the hepatic microsomes of mice. Acta pharmacol. toxic. 32: 289-293, 1973.
- 6) Tanaka, K. and Araki, Y.: Inhibitory effect of cholestyramine on the intestinal absorption of PCB. 福岡医誌 65: 53-57, 1974.
- 7) 上田潤一・日高賢志・荒木泰典: アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (ABS) の薬理作用補遺. 通信医学 27: 129-132, 1975.
- 8) 柳沢文正: 界面活性剤の中毒. 臨床と研究 43: 1504-1509, 1966.

PCB の脳内カテコルアミンに及ぼす影響

九州大学医学部薬理学教室 (主任 田中潔教授)

末 永 典 子・山 田 勝 士
日 高 賢 志・福 田 健 夫

Influences of PCB on the Brain Catecholamine Levels in Rats

Noriko SUENAGA, Katsushi YAMADA,
Tadashi HIDAKA and Takeo FUKUDA

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka, Japan*

Norepinephrine (NE) levels in the cerebral cortex, brain stem and cerebellum, and dopamine (DA) level in the brain stem were determined fluorometrically in rats treated with PCB (Kaneclor 400). When 100 mg/kg/day of PCB was given to rats for 7 days, NE in the cortex increased and NE in the cerebellum decreased. Methyl mercury chloride in the daily dose of 2~5 mg/kg did not change the NE levels. Combination of PCB with methyl mercury did not potentiate the NE decrease in the cerebellum. In the subacute experiment, in which 20~50 mg/kg of PCB was given twice a week for 7 weeks, a definite and dose-dependent decrease in the cerebellar NE and a slight decrease in the cortical NE were evidenced.

PCB の中枢作用の有無については、現在なお決定的結論を得ていない。油症患者には通常脳波異常を認めないし (永松)、明らかな中枢症状を思わせるものはないが、動物実験では電撃けいれん後の昏睡期が延長し (福田ら)、坐骨神経刺激による大脳皮質誘発電位の潜時延長が認められる (福田)。しかし動物実験でも脳波に変化はなく、電撃けいれんの経過も変らないし (福田ら)、脳内セロトニン量も変化しない (古賀)。

今回はラットに PCB を投与して脳内カテコルアミンを定量し、同時に筋弛緩作用の有無と断頭けいれんへの影響を検して、PCB の中枢作用の有無を判定する新しい資料を提供したいと思う。また先に PCB とメチル水銀の併用が、酵素誘導作用において協力する事実をみたので (荒木ら)、今回の実験でも両者の併用を試みることにした。

実験方法

動物は Wistar King A 系ラットの雌を使用した。PCB はカネクロール 400 を CMC で水性懸濁液に

作り、メチル水銀は methyl mercury chloride に等モルの cysteine を加えて水溶液とし、いずれも胃ゾンデで経口的に応用した。急性実験は PCB を連続 7 日間与え、亜急性実験は週 2 回 7 週間 (計 14 回) 投与した。

筋弛緩作用の試験としては、傾斜板テスト (inclined screen test) を行つた。これは板にラットをのせ、次第に傾けて滑り落ちる最小の角度を測定するものである。

断頭けいれん (decapitation convulsion) は、断頭したあとで一定の潜時をもつて発現する脊髓性の間代性けいれんで、その潜時とけいれん持続時間 (秒) を計測した。

急性実験では薬物応用最終日の午後筋弛緩試験を行い翌日断頭、亜急性実験では最終投与の 2 日後に筋弛緩試験を行い 3 日後に断頭した。断頭後脳をすばやく取出し、大脳皮質、脳幹、小脳の 3 部分につき norepinephrine (NE) を、脳幹では dopamine (DA) をも、螢光分光光度計を用いて Shellenberger らの方法により測定した。

実 験 成 績

1. 急性実験

ラットを次の5群に分けた。

- ①対照群 (CMC のみ) 8 匹
- ②PCB 100 mg/kg 7 日間 (計 700 mg/kg) 応用群 8 匹
- ③メチル水銀 2 mg/kg 7 日間 (計 14 mg/kg) 応用群 7 匹
- ④メチル水銀 5 mg/kg 7 日間 (計 35 mg/kg) 応用群 7 匹
- ⑤PCB 100 mg/kg + メチル水銀 2 mg/kg 7 日間応用群 7 匹

各群の体重の変化 (実験開始日と断頭時の体重), 最終日における傾斜板テストの滑り落ち最小角度, 断頭けいれんの潜時と持続 (秒) を表示すると表 1 となる。

対照群以外の4群は, 最終日において多少とも元気なく, 不活発であった。体重は PCB を与えた群ではほとんど増加しなかった。傾斜板テストでは②~⑤の4群が, いずれも対照群に比して小さい角度で滑り落ち, その差は有意である。しかし PCB + メチル水銀併用群は, それぞれの単独群と差がなく, 併用による

作用の増大は認められなかった。断頭けいれんの潜時と持続はすべての群間に有意差がなかった。

脳内カテコラミン定量の結果は表 2 に示す。

この表でみると, 小脳 NE の量が PCB 単独群で減少したのが最も有意の差として認められ, 次いで大脳 NE の増加が PCB 単独群で有意差を示した。それ以外は⑤の併用群で大脳 NE の増加傾向をみるほか, 有意差を示したものはない。PCB 単独群で有意差を示した小脳 NE の減少はメチル水銀併用群ではまったく認められず, 併用による作用の増大は証明されなかった。

2. 亜急性実験

前項の急性実験では, PCB 単独群においてのみ NE の有意な変動を認めたので, この点を亜急性実験によつて確かめることにした。すなわち急性実験に使用した7日間合計 700 mg/kg を7週間に引き伸して与え, またそれより少量の群も作つて, 次の3群について実験した。

- ①対照群 (CMC のみ) 10 匹
- ②PCB 20 mg/kg 週 2 回 7 週間 (計 280 mg/kg) 応用群 10 匹
- ③PCB 50 mg/kg 週 2 回 7 週間 (計 700 mg/kg) 応用群 10 匹

表 1. 急性実験の各群における体重, 筋弛緩テスト, 断頭けいれんの成績

実 験 群 (1 日量×7)	例 数	体 重 (g)		滑 り 落 ち 最 小 角 度	断頭けいれん	
		開 始 日	終 了 日		潜 時(秒)	持 続(秒)
1) 対 照	8	166±3.9	178±4.9	42.5±0.81	2.3±0.25	16.8±0.63
2) PCB 100mg/kg	8	165±4.1	166±5.1	35.5±1.98*	2.6±0.18	15.5±0.50
3) メチル水銀 2mg/kg	7	167±4.3	173±5.1	36.2±1.21*	2.4±0.20	15.4±0.68
4) メチル水銀 5mg/kg	7	167±4.8	171±4.5	37.6±1.37*	2.3±0.18	16.3±0.42
5) PCB 100mg/kg + メチル水銀 2mg/kg	7	168±6.6	163±4.5*	38.2±1.12*	4.1±1.33	15.3±0.97

* 対照群に比べて有意差 ($P < 0.05$), 数値はすべて平均値 ± S.E.

表 2. 急性実験の各群における脳内 norepinephrine (NE) と dopamine (DA) の定量結果

実 験 群 (1 日量×7)	例 数	大 脳 皮 質 NE(ng/g)	脳 NE(ng/g)	脳 DA(ng/g)	小 脳 NE(ng/g)
1) 対 照	8	209±10.6	436±29.0	143±26.9	197±7.9
2) PCB 100mg/kg	8	245±13.6*	407±40.2	84±16.5	166±5.0**
3) メチル水銀 2mg/kg	7	204±12.9	391±28.8	90±16.5	198±8.5
4) メチル水銀 5mg/kg	7	197±11.0	443±22.7	114±12.5	211±10.0
5) PCB 100mg/kg + メチル水銀 2mg/kg	7	241±17.7	401±34.0	97±15.6	198±7.6

* 対照群に比べて有意差 ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), 数値はすべて平均値 ± S.E.

各群の体重変化、傾斜板テストの最小角度、断頭けいれんの潜時と持続を一括して表3に示す。

実験期間中に対照群と PCB 20 mg/kg 群に各1例の死亡例があつたが、50 mg/kg 群にはなかつた。体重の増加はPCB用量の多いほど抑制され、50 mg/kg 群の最終体重は対照群と比べて有意差で低かつた。PCBを与えた両群のラットは投薬時につかまえたとき、筋緊張の低い感触があるが、傾斜板テストでは有意差が出ない。断頭けいれんの潜時と持続には各群間の差がなかつた。

脳内カテコルアミン定量の結果は表4に示す。

この成績においても急性実験と同様に、小脳 NE の減少は明瞭に認められ、しかも用量に比例して減少が著しくなつた。大脳皮質の NE は、急性実験とは逆に有意差をもつて減少した。脳幹では NE も DA も有意の変化を示さなかつた。

考 察

PCB の中枢作用を知る一助として今回脳内カテコルアミンの変化をみたところ、急性と亜急性の両実験に共通な所見として、小脳の NE が減少する事実が見出された。大脳皮質の NE は急性で増加し亜急性で減少したから一定の傾向とはいいい難い。急性実験では体重増加が完全に抑えられ、傾斜板テストで筋弛緩も著しく、体力的に衰弱していたので、その二次的影響と考えられないこともないが、亜急性実験では体重の増加抑制は少しあるものの、傾斜板テストで証明できるほどの筋弛緩もなく、外観上正常ラットと区別が

つかないのに、小脳の NE が PCB の用量に比例して減少したことは、PCB の中枢直接作用である可能性を示すものとして注目される。

PCB とメチル水銀とは酵素誘導作用において協力するので(荒木)、今回の急性実験において両者併用を試みたが、PCB 単独で有意差のあつた大脳皮質の NE 増加と小脳の NE 減少は、メチル水銀併用によつて有意差がなくなり、またメチル水銀の二つの用量単独では、脳内カテコルアミンに変化を与えなかつた。このことから少なくとも PCB の NE 変動作用は、メチル水銀の存在によつて増強されることはないといえる。また PCB 単独でもメチル水銀単独でも、筋弛緩テストの角度減少を招くのに、両者を併用してもその効果を増強する傾向がない。この点からも両者の中枢における協力は否定される。

メチル水銀が中枢神経を冒し、ことに小脳の組織学的変化を生ずるのは有名であるが、器質的变化の前に何らかの生化学的变化がおこる可能性を考えて、今回の実験には特に小脳を分析の対象に加えたのであるが、予想に反してメチル水銀では特別の変化を生ぜず、意外にも PCB の方に小脳 NE 減少作用が証明された。小脳における NE の役割についての文献は少ないが、脳橋青班核から小脳 Purkinje 細胞への抑制系に transmitter として働いているといわれる(Hoffer ら)。しかしそれと関係のありそうな PCB の中毒作用は知られていない。

有機塩素系農薬 DDT では、ラット脳幹部の NE が減少し(Hrdina ら)、類似薬 dieldrin ではカモ

表 3. 亜急性実験の各群における体重、筋弛緩テスト、断頭けいれんの成績

実験群 (1日量×14)	例 数	体 重 (g)		滑り落ち 最小角度	断頭けいれん	
		開始日	終了日		潜時(秒)	持続(秒)
1) 対 照	9	171±4.1	211±5.4	44.3±0.66	4.0±1.52	17.7±1.45
2) PCB 20mg/kg	9	171±3.2	201±4.9	44.5±0.56	2.7±0.24	16.9±0.48
3) PCB 50mg/kg	10	168±3.6	189±4.6**	44.7±0.48	5.2±1.37	15.0±1.45

表 4. 亜急性実験の各群における脳内 norepinephrine (NE) と dopamine (DA) の定量結果

実験群 (1日量×14)	大 脳 皮 質 NE(ng/g)	脳 幹 NE(ng/g)	脳 幹 DA(ng/g)	小 脳 NE(ng/g)
1) 対 照	239±10.0(9)	395±36.1(9)	65±11.1(9)	187±9.4(8)
2) PCB 20mg/kg	218±6.7(9)	422±37.0(9)	96±23.1(9)	162±4.7(9)*
3) PCB 50mg/kg	196±7.1(6)**	433±27.4(10)	81±15.5(10)	148±4.5(10)**

* 対照群に比べて有意差 ($P<0.05$), **($P<0.01$), 数値はすべて平均値 ±S.E. (括弧内は実験例数)

** 対照群に比べて有意の差 ($P<0.01$), 数値はすべて平均値 ±S.E.

の全脳 NE が用量比例的に低下すると報告されているから (Sharma), 化学的に近い PCB が脳内 NE を減少させてもふしぎでないかもしれない。しかし DDT や dieldrin が, けいれんや脳波異常などの直接中枢作用を示すのに対し, PCB ではそういう行動上の変化がないので, 今のところ小脳 NE 減少がどういう意味をもつかわからない。

断頭けいれんについては, 脳内 カテコラミン を 6-hydroxydopamine で減少させても (Fukuda ら), α -methyltyrosine で減少させても (福田・末永), けいれんが抑制される事実を我々はみているが, 今回の実験では小脳の NE が減つても断頭けいれんに影響がなかった。おそらく NE を強く減らす処置でなければ効果がないか, あるいは小脳が間代性けいれんと関係することが少ないためであろう。

総 括

1) ラットに PCB(カネクロール 400) を 7 日間連続経口投与する急性実験と, 7 週間のまぜる亜急性実験を行い, 大脳皮質, 脳幹, 小脳の norepinephrine (NE) を定量した。

2) 急性実験では, PCB の体重減少, 筋弛緩をおこす量で, 大脳皮質 NE は増加し, 小脳 NE は減少した。メチル水銀の単独で同程度の筋弛緩をおこす量では, 脳内カテコラミンは変化せず, PCB と併用してもその作用を増強しなかった。

3) 亜急性実験では, 体重増加の抑制は軽度で, 筋弛緩もないのに, 大脳皮質および小脳の NE は減少し, ことに後者は用量に比例する減少を示した。

4) 急性, 亜急性の両実験で, 小脳 NE の減少を来したことは, PCB の直接中枢作用の存在を疑わせる所見である。

文 献

- 1) 荒木泰典, 日高賢志, 田中潔: PCB の酵素誘導作用に及ぼす他物質併用の影響. 福岡医誌 66: 585-588, 1975.
- 2) 福田健夫: 坐骨神経刺激による大脳皮質誘発電位に及ぼす PCB の影響. 福岡医誌 63: 378-381, 1972.
- 3) 福田健夫, 森順子, 荒木泰典: PCB の脳波および電撃けいれんに及ぼす影響. 福岡医誌 65: 69-73, 1974.
- 4) 福田健夫, 末永典子: メチルチロシンによる断頭けいれんの抑制. 医学のあゆみ 93: 622-623, 1975.
- 5) Fukuda, T., Araki, Y. and Suenaga, N.: Inhibitory effects of 6-hydroxydopamine on the clonic convulsions induced by electroshock and decapitation. Neuropharmacology 14: 579-583, 1975.
- 6) Hoffer, B. J., Siggins, G. R., Oliver, A. P. and Bloom, F. E.: Activation of the pathway from locus coeruleus to rat cerebellar Purkinje neurons. J. Pharmacol. 184: 553-559, 1973.
- 7) Hrdina, P. D., Singhal, R. Y. and Ling, G. M.: DDT and related chlorinated hydrocarbon insecticides. Adv. Pharmacol. 12: 31-88, 1975.
- 8) 古賀利枝: PCB 投与ラットの脳内セロトニン量. 福岡医誌 63: 36-37, 1972.
- 9) 永松啓爾, 黒岩義五郎: 油症患者における神経学的所見—その脳波所見. 福岡医誌 62: 157-158, 1971.
- 10) Sharma, R. P.: Brain biogenic amines: Depletion by chronic dieldrin exposure. Life Sci. 13: 1245-1251, 1973.
- 11) Shellenberger, M. K. and Gordon, J. H.: A rapid simplified procedure for simultaneous assay of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine from discrete brain areas. Analyt. Biochem. 39: 356-372, 1971.

Chlorinated Dibenzofurans in Kanechlords and Rice Oils Used by Patients with Yusho

Junya NAGAYAMA¹⁾, Yoshito MASUDA²⁾ and
Masanori KURATSUNE¹⁾

*Department of Public Health, Faculty of Medicine, Kyushu University,
Fukuoka, Japan¹⁾ and Daiichi College of Pharmaceutical
Sciences, Fukuoka, Japan²⁾*

It was reported that the causal agent of the epidemic of Yusho which occurred in the Western Japan in 1968 was polychlorinated biphenyls (PCBs)¹⁾. According to the animal experiments by Vos and his associates marked differences in toxicity were seen among foreign commercial brands of PCBs²⁾. They reported that the more toxic brands made in France and West Germany contained 20 and 5 ppm of polychlorinated dibenzofurans (PCDF), respectively, while the less toxic one made in the United States no such contaminants³⁾. It seems quite possible that the toxicity of commercial PCBs is greatly affected by their relatively small amount of contaminants such as PCDF^{3) 4) 5)}. On the other hand, it has been well known that "chick edema factor", the causal agent of an extensive poisoning of chickens which killed more than a million chicks in the United States in 1957, is polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD)^{6) 7)}, and that these compounds are extremely toxic and acnegenic to man, too^{8) 9)}.

All these facts raise a question whether or not PCDF or PCDD are involved in Yusho in any sense. Thus, it is without doubt needed to investigate the possible contamination by these compounds of Kanechlor-400, a commercial brand of PCBs of Japanese make which is known to have caused Yusho epidemic. In view of the fact that very few studies have been made in this respect, we analyzed various types of Kanechlor and samples of the toxic rice oil used by patients with Yusho for PCDD and PCDF. This paper describes the main results of such analysis.

Materials and Methods

1. Materials analyzed

1) Kanechlor-300, 400, 500, and 600: Kanechlor-300 and -500 were those donated Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd. in 1968 and Kanechlor-400 and -600 were supplied by the Ministry of Health and Welfare in 1972.

2) Rice oil used by patients with Yusho ("Yusho oil"): 3 samples of rice oil used by 3 independent families with Yusho in 1968. These samples had been kept in glass bottles with glass stoppers at room temperature in our laboratory until 1974 when the analysis was made.

2. Chemicals

1) n-Hexane, ethanol, water, potassium hydroxide, anhydrous sodium sulphate, and silica gel: Purified as described previously¹¹⁾.

2) Carbon tetrachloride and methylen chloride: Reagent grade, distilled with a fractional distillation column.

3) Activated alumina: Alumina for column-chromatography (about 300 mesh), Wako Pure Chemical Industry, Ltd., activated by heating at 150°C for 12 hours before every use.

4) PCDF and PCDD: Synthesized by chlorination of dibenzofurans or by conden-

sation of 2, 4, 5-trichlorophenol¹²⁾. PCDF consisted mainly of tetra- and penta-chlorodibenzofurans, while PCDD mainly of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

5) Octachlorodibenzofuran and octachlorodibenzo-p-dioxin: Purchased from Analabs Inc., U.S.A.

3. Apparatus

1) Gas chromatograph (ECD-GC): Beckman GC 72-5 with a detector of electron capture type, using a glass column (4mm×2m) containing chromosorb W AW DMCS (100-120 mesh) coated with 2% SE-30. Column temperature was 200°C and helium was used as carrier gas, flow rate 30 ml/min.

2) Gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS): Type D-100, GC-MS, Japan Electron Optic Laboratory. Column used was similar to the one used for gas chromatography. Ionization energy was 25eV.

4. Analytical methods

The alkaline decomposition method described in the official standard analytical methods for PCBs established by the Ministry of Health and Welfare was applied for the isolation of PCBs fraction from samples of Yusho oil (5-10g). Isolation of PCDF and PCDD from the PCBs fraction mentioned above or from Kanechlor samples (0.1-0.5g) was made in the following ways. Each material was placed with 20 ml of n-hexane onto a column (1×7.5 cm) of activated alumina and then eluted with 120 ml of n-hexane containing 20% carbon tetrachloride, 10 ml of n-hexane, and then with 30 ml of n-hexane containing 20% methylenchloride. PCDF and PCDD were expected to be contained in the final eluate. If their separation from PCBs was not adequate, the above chromatographic fractionation was repeated or another similar column chromatography was tried using a shorter column of activated alumina (1×2.5 cm) and a half volume of each of the eluents mentioned above. The eluate consisting of n-hexane containing 20% methylen chloride thus collected was evaporated by a rotary evaporator, then dissolved in n-hexane and subjected to ECD-GC and GC-MS analysis.

Determination of PCDF and PCDD was made by two methods, namely by measuring the gas chromatographic peak heights and by measuring the gas chromatographic peak area after perchlorination of these compounds. The former consists of comparison of each of the peaks of gas chromatogram confirmed as those of PCDF or PCDD by GC-MS with the corresponding one of the synthesized PCDF or PCDD used as standard, assuming that all the PCDF or PCDD have the same peak height sensitivity regardless of the number of chlorine and the site of substitution by chlorine. The latter consisted of chlorination by the BMC reagent¹³⁾ of the evaporation residue of the fraction containing PCDF and PCDD to yield octachlorodibenzofuran and octachlorodibenzo-p-dioxin, followed by the gas chromatographic determination of such octachloro-derivatives.

For determination of PCBs, the peak height calculation method and the perchlorination method, described in the official analytical methods for PCBs set by the Ministry of Health and Welfare, were used.

Results

The gas chromatograms of PCDF fractions separated from Kanechlor-400 and -500 are shown in Fig. 1, while the gas chromatogram of the corresponding fraction from Yusho oil in Fig. 2. Fig. 3 and 4 show the mass-spectra of tetra- and penta-chlorodibenzofurans isolated from these PCDF fractions, together with those of the standard PCDF.

Table 1 summarizes the results of analysis by ECD-GC and GC-MS, indicating that from dichloro to heptachlorodibenzofurans were contained in the samples analyzed. The Kanechlors designated larger numbers, starting from 300 to 600, contained the

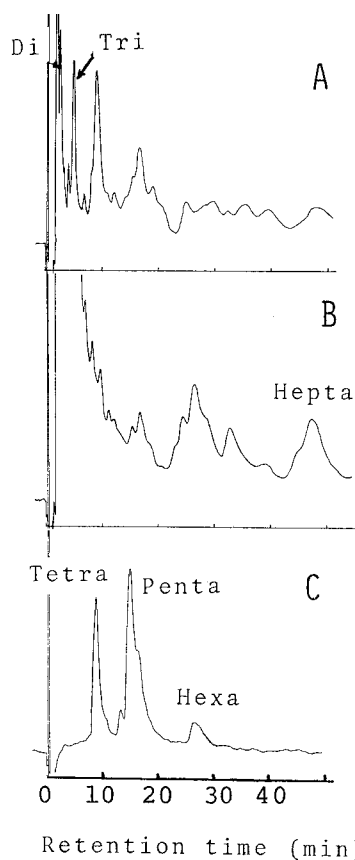


Fig. 1. Gas chromatogram of PCDF fraction
A. Kanechlor-400,
B. Kanechlor-500,
C. Authentic specimen

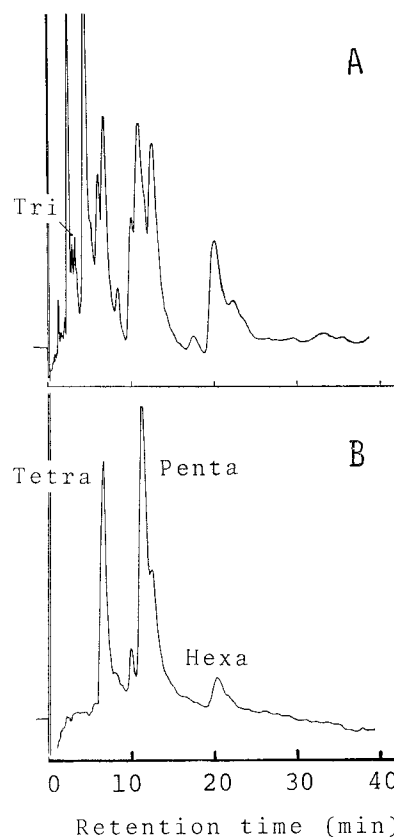


Fig. 2. Gas chromatogram of PCDF fraction.
A. Rice oil ("Yusho oil"),
B. Authentic specimen

Table 1. Concentration of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and "Yusho oil"

Samples		Chlorodibenzofurans						Concentration (ppm)	
		Di	Tri	Tetra	Penta	Hexa	Hepta	a	b
Kanechlors	300			+	+			1	1.5
	400	≡	≡ ≡	≡ ≡	≡			18	17
	500				+	≡	+	4	2.5
	600			+	+	≡	≡	5	3
"Yusho oil"	A		+	≡	≡	+		5	4.5
	B		+	≡	≡	+		4	5
	C		+	≡	≡	+		5	5

a: calculated from peak heights, b: calculated by perchlorination method.

higher chlorinated isomers of dibenzofuran. The concentrations of PCDF in Kanechlor-300, -400, -500, and -600 were 1, 18, 4, and 5 ppm by the peak height calculation method and 1.5, 17, 2.5, and 3 ppm by the perchlorination method, respectively. Thus,

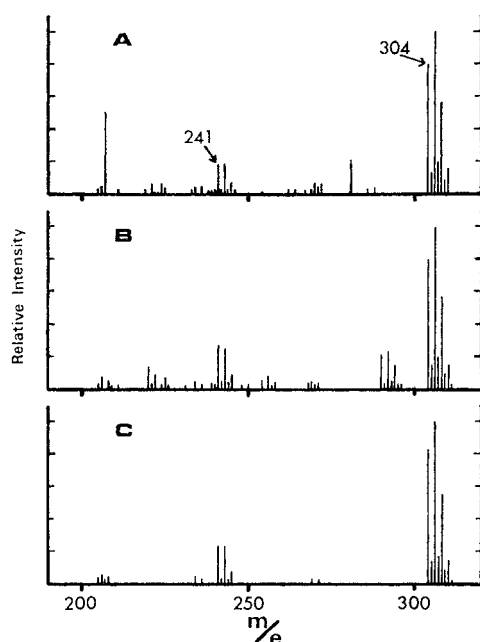


Fig. 3. GC-MS of tetrachlorodibenzofuran.
A. Kanechlor-400,
B. Rice oil ("Yusho oil"),
C. Authentic specimen

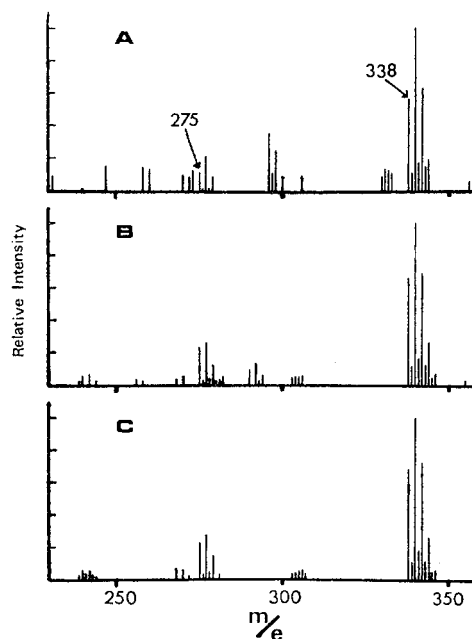


Fig. 4. GC-MS of pentachlorodibenzofuran.
A. Kanechlor-400,
B. Rice oil ("Yusho oil"),
C. Authentic specimen

Table 2. Concentration of PCBs in "Yusho oil"

"Yusho oil"	Concentration (ppm)	
	a	b
A	830	870
B	900	920
C	1,030	980

a: calculated from peak heights

b: calculated by perchlorination method

two methods gave similar results, demonstrating that Kanechlor-400 contains a considerably higher concentration of PCDF than the other types.

Three samples of Yusho oil showed similar gas chromatographic patterns, indicating that the PCDF contained in the oil consisted mainly of tetra- and penta-chlorodibenzofurans together with a small amount of tri- and hexa-chlorodibenzofurans. Both the peak height calculation method and the perchlorination method gave the same figure, 5 ppm of PCDF.

Contrary to the above findings in regard to PCDF, PCDD was not detected in any of the materials examined.

As shown in Table 2, the samples of Yusho oil contained 800–1,000 ppm of PCBs, and both calculations gave very close figures.

In additional experiments, 10 g of a vegetable oil containing 10 mg of Kanechlor-400 was subjected to a series of analytical procedures, the same as those employed in the above analysis, including the alkaline decomposition process maintained for 6 hours.

PCDF found from the oil thus treated was about $0.2\text{ }\mu\text{g}$, just as much as expected from the PCDF content of 10 mg of Kanechlor-400. Similar blank experiments were repeated 3 times, yielding practically the same results. Therefore, any possible transformation of PCBs to PCDF during the analytical procedures could be denied.

The recovery ratio of $1\text{ }\mu\text{g}$ of PCDF added to 10 g of a vegetable oil was determined to be approximately 90%.

Discussion

Analysis of a trace amount of PCDF and PCDD is generally known to be fairly difficult. As mentioned, it is not conceivable that the PCDF found in our analysis were the artificial products due to the analytical procedures employed. In addition, the recovery ratio was also fairly high. Therefore, we can say with confidence that Kanechlors and "Yusho oil" contain PCDF.

It seems to be noteworthy that the concentrations of PCDF in Kanechlor-400 and in Yusho oil, as determined by the present analysis, are considerably higher than the figures so far reported. Roach *et al.*, found about 1 ppm of PCDF in Kanechlor-400¹⁰⁾. According to Vos, Bowes, Space Science Laboratory, University of California, could demonstrate the presence of PCDF in Kanechlor samples and in a sample of "Yusho oil". The figures for the formers have not yet been supplied but the figure for the latter, approximately 1 ppm, have been provided us¹⁴⁾. Thus, the informations so far accumulated do not very precisely coincide with each other, but they agree at least in that both Kanechlors and "Yusho oil" contain PCDF.

Since "Yusho oil" which is known to have been contaminated with Kanechlor-400 contained 5 ppm of PCDF and 1,000 ppm of PCBs, the ratio of the concentration of PCDF to that of PCBs is 5 : 1,000, much larger than the expected ratio 0.018 : 1,000 which can be calculated from our figure concerning PCDF concentration in Kanechlor-400. The reasons for this great discrepancy are not well understood, but it should be noted that the sample of Kanechlor-400 we analyzed was an "unused" one, while the Kanechlor-400 present in "Yusho oil" must be "used" one as heat transfer medium.

Very few studies have been made in which the toxicity of PCDF was directly compared with that of PCBs. Araki observed that PCDF was about 170 times stronger than Kanechlor-400 in the activity of hepatic enzyme induction¹⁵⁾. Nishizumi and Masuda, however, could not observe any marked difference in acnegenicity between PCBs and PCDF when applied to the skin of the ears of rabbits. The ratio of the concentration of PCBs needed to exert a certain degree of acnegenicity to the corresponding concentration of PCDF needed to exert the same degree of acnegenicity was shown to be 1 : 0.3¹²⁾.

There are several studies, however, in which "Yusho oil" and Kanechlor-400 were compared in toxicity. Ikeda reported that "Yusho oil" was twice or more toxic, when fed to broilers, than expected by the concentration of Kanechlor-400 contained in the oil^{16) 17)}. In feeding experiment with CF # 1 mice, it was shown that both a diet added "Yusho oil" to attain about 110 ppm of PCBs in the diet and a diet containing 500 ppm of Kanechlor-400 exerted an approximately similar toxicity. The former diet, however, seemed to affect more the skin and liver than the latter and the authors suggested a possibility that "Yusho oil" might contain some chlorinated compounds which were more toxic than Kanechlor-400¹⁸⁾. In a feeding experiment with chicken, Goto *et al.* observed that a diet containing 5 % of "Yusho oil" showed similar toxic effects to those induced by feeding a diet containing 400 ppm of Kanechlor-400. If the concentration of PCBs in the "Yusho oil" used could be assumed to be about 2,000 ppm, the concentration of PCBs in the diet added "Yusho oil" would be about 100 ppm, considerably

lower than that of the diet added Kanechlor-400¹⁹⁾.

Furthermore, there seems to be a great difference in acute toxicity between PCDF and Kanechlors. LD₅₀ of Kanechlor-400, when fed to mice and rats, was 1.1-1.9 g/kg and that of Kanechlor-300 0.6 g/kg when fed to rabbits¹⁷⁾. PCDF, on the contrary, killed rabbits due to severe liver necrosis after a single oral administration of as little as about 1 mg/kg^{8) 20)}.

Toxicity of PCBs and possibly of PCDF must greatly vary from isomer to isomer. Rational comparison of toxicities of PCBs and PCDF does not seem to be easy. However, in view of all these past findings described above, PCDF seems to be considerably more toxic than PCBs. The possible role played by PCDF in Yusho should not be dismissed.

Summary

In order to answer the question whether or not polychlorinated dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) which are more toxic than PCBs are involved in causation of Yusho, various types of Kanechlor, PCBs of Japanese make, and 3 samples of "Yusho oil" used by Yusho families were analyzed for these compounds.

Kanechlor-300, -400, -500, and -600 were shown to contain 1, 18, 4, and 5 ppm of PCDF, respectively, as calculated by gas chromatographic peak heights and 1.5, 17, 2.5, and 3 ppm of PCDF, as calculated by the perchlorination method. Thus, Kanechlor -400 was most contaminated with PCDF. "Yusho oil" samples also contained about 5 ppm of PCDF, much higher than expected. PCDD, however, was not detected in any materials analyzed. The possible role of PCDF in causation of Yusho was suggested.

References

- 1) Tsukamoto, H. et al.: The chemical studies on detection of toxic compounds in the rice bran oils used by the patients of Yusho. *Fukuoka acta Med.* 60: 496-512, 1969 (In Japanese).
- 2) Vos, J. G. and Koeman, J. H.: Comparative toxicologic study with PCBs in chickens with special reference to porphyria, edema formation, liver necrosis and tissue residues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 17: 656-668, 1970.
- 3) Vos, J. G., Koeman, J. H., Van der Mass, H. L., Ten Noever de Brauw, M. C. and de Vos, R. H.: Identification and toxicological evaluation of chlorinated dibenzofuran and chlorinated naphthalene in two commercial PCBs. *Food Cosmet. Toxicol.* 8: 625-633, 1970.
- 4) Vos, J. G. and Beems, R. B.: Dermal toxicity studies of technical PCBs and fractions thereof in rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19: 617-633, 1971.
- 5) Vos, J. G. and Notenboom-Ram, E.: Comparative toxicity study of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl and PCB mixture in rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23: 563-578, 1972.
- 6) Cantrell, J. S., Webb, N. C. and Mabis, A. J.: Identification and crystal structure of a hydropericardium producing factor. *Chem. Eng. News.* 45: 10, 1967.
- 7) Firestone, D., Flick, D. F., Ress, J. and Higginbotham, G. R.: Distribution of chick edema factor in chick tissues. *J. Ass. offic. Anal. Chem.* 54: 1293-1298, 1971.
- 8) Bauer, H., Schulz, K. H. und Spiegelberg, U.: Berufliche Vergiftungen bei der Herstellung von Chlorphenol-Verbindungen. *Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.* 18: 538-555, 1961.
- 9) Oliver, R. M.: Toxic effects of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo 1,4 dioxin in laboratory workers. *Br. J. Ind. Med.* 32: 49-53, 1975.
- 10) Roach, J. A. G. and Pomerantz, I. H.: The finding of chlorinated dibenzofurans in a Japanese PCB sample. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 338-342, 1974.
- 11) Masuda, Y., Kagawa, R. and Kuratsune, M.: Polychlorinated biphenyls in Yusho patients and ordinary persons. *Fukuoka Acta Med.* 65: 17-24, 1974 (In Japanese).
- 12) Nishizumi, M., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: Comparison of hyperkeratosis induced by PCBs, PCDF and PCDD application. *Fukuoka Acta Med.* 66: 600-604, 1965 (In Japanese).

- 13) Hutzinger, O., Safe, S. and Zitko, V.: Analysis of chlorinated aromatic hydrocarbons by exhaustive chlorination: Qualitative and structural aspects of the perchloroderivatives of biphenyl, naphthalene, terphenyl, dibenzofuran, dibenzodioxin and DDE. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 2: 95-106, 1972.
- 14) Vos, J. G.: From private communication, 1974.
- 15) Araki, Y.: Comparison of enzyme-inducing activities of chlorinated dibenzofuran and chlorinated dibenzodioxin. Fukuoka Acta Med. 65: 61-64, 1974 (In Japanese).
- 16) National Hygienic Laboratory, Ministry of Health and Welfare: Studies on toxic substances in rice-bran oil, with special reference to organochlorine compounds. (5) Studies on toxicity of noxious substances. Special studies on prevention, diagnosis and treatment of Yusho.: 74-124, 1969 (In Japanese).
- 17) Ikeda, Y.: Toxicity of PCB. J. Food Hyg. Soc. Japan. 13: 359-367, 1972 (In Japanese).
- 18) Livestock Hygiene Experiment Station, Ministry of Agriculture and Forestry: Studies on toxic substances in rice-bran oil, with special reference to organochlorine compounds. (5) Studies on toxicity of noxious substances. Special studies on prevention, diagnosis and treatment of Yusho.: 74-124, 1969 (In Japanese).
- 19) Goto, M., Sakaguchi, K. and Ogawa, K.: Hydropericardium assay of rice oil which caused Yusho and of Kanechlor 400 in chickens. Fukuoka Acta Med. 60: 533-538, 1969 (In Japanese).
- 20) Hofmann, H. Th.: Neuere Erfahrungen mit hochtoxischen Chlorkohlenwasserstoffen Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 232: 228-230, 1958.

(和文抄録)

カネクロールおよび油症患者使用ライスオイル中の塩化ジベンゾフラン

九州大学医学部公衆衛生学教室¹⁾

第一薬科大学物理分析学教室²⁾

長 山 淳 哉¹⁾・増 田 義 人²⁾

倉 恒 匡 徳¹⁾

油症の原因に、PCBより毒性の強い塩化ジベンゾフラン(PCDF)あるいは塩化ジベンゾジオキシン(PCDD)が関与しているのではないかという疑問に答えるため、カネクロールおよび油症患者使用ライスオイルからPCDFおよびPCDDの分離、定量を行った。

カネクロール 300, 400, 500 および 600 からピーク高法により、それぞれ1, 18, 4および5 ppmの、また全クロル化法により、それぞれ1.5, 17, 2.5および3 ppmのPCDFを検出した。カネクロール400のPCDF濃度が最も高かった。また油症患者使用ラ

イスオイルからは5 ppmのPCDFが検出された。しかしPCDDはいずれの検体からも検出されなかった。

今回分析したライスオイル中のPCB濃度は800～1,000 ppmであり、今までいわれていた2,000～3,000 ppmにくらべるとかなり低い濃度であった。

PCDFの毒性の評価は、はつきりしていないけれども、油症患者使用ライスオイル中のPCBがカネクロール400よりかなり毒性が強いという報告があり、このPCDFが油症発症にかなり関与している可能性がある。

Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzofuran および Polychlorinated Dibenzodioxin のウサギ耳塗布 による過角化作用の比較

九州大学医学部公衆衛生学講座
西 住 昌 裕・倉 恒 匡 徳
第一薬科大学物理分析学教室
増 田 義 人

Comparison of Hyperkeratosis Induced by PCBs, PCDF and PCDD Application

Masahiro NISHIZUMI and Masanori KURATSUNE
*Department of Public Health, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka*
Yoshito MASUDA
Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka

Polychlorinated biphenyls (Kanechlor 400, a commercial preparation), polychlorinated dibenzofuran (a mixture of tetra- and penta-chloro-dibenzofuran) or polychlorinated dibenzodioxin (2,3,7,8-tetrachloro-dibenzodioxin) was dissolved into acetone in different concentrations, and was applied on the inside of depilated rabbit's ear for consecutive 3 days. The redness on the local skin was followed by thickening of the skin within 1 to 2 weeks.

Judging from the extent of hyperkeratosis induced by these three compounds, PCDD is approximately 1,000 times stronger than PCBs or PCDF as an acnegen.

Polychlorinated Dibenzofuran (PCDF) および Polychlorinated Dibenzodioxin (PCDD) の皮膚に対する毒性として、毛嚢性角化や痤瘡様皮疹の出現はすでに10数年前に報告されているが²⁾³⁾、これらの化合物が化学構造上 Polychlorinated Biphenyls (PCBs) に類似しており、PCBs 製剤中にも不純物として PCDF の存在を確認した報告もある⁶⁾⁷⁾ ことから、油症の場合 PCBs による皮膚症状発現にこれらの化合物が関与している可能性を指摘する人もある。ただ、油症の原因物質とされている Kanechlor 400 中には微量の PCDF の存在は確認されている⁶⁾ が、PCDD の存在は現在までのところ報告されていない。

著者らは、PCDF および PCDD を合成し、PCBs と共にこれら化合物の皮膚に対する作用強度を比較し、これらが混在した場合の皮膚症状発現への影響の

程度を推定する1つの手がかりとするため、この実験を行った。

材 料 と 方 法

(1) PCDF の合成

Dibenzofuran (東京化成) 5g, 塩化第2鉄0.5g ヨウ素0.5g および Chloroform 100ml の混合溶液に、濃塩酸および過マンガン酸カリウムより発生させ濃硫酸で乾燥させた塩素ガスを通じた。塩素化は室温で2.5時間、水浴で加熱しながら5時間行つた。反応終了後すべての固型物を Chloroform により集め、溶媒を留去すれば11g あつた。風乾し、ヨウ素を揮発させた後、1部を Florisil column で n-Hexane および Benzene を用いて精製することにより無色の結晶が得られた (mp 180~195°)。この結晶を GC-MS (日立 PMU-6MG) で測定すると、Fig. 1 (左)

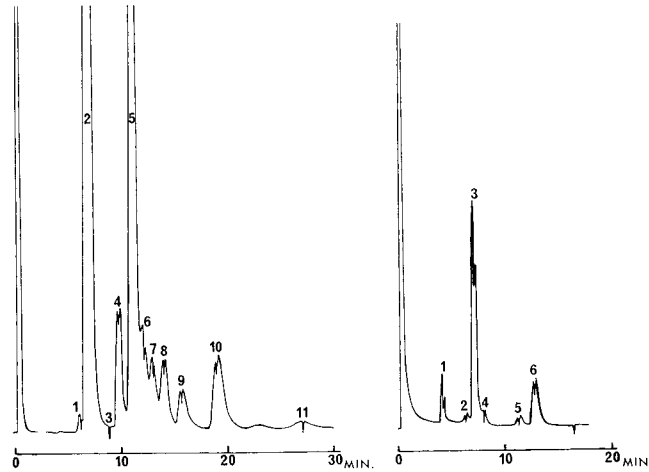


Fig. 1. Total ion monitor gas chromatograms of PCDF (left) and TCDD (right) on 2% OV-17.
 Left; 1—3: $C_{12}H_4OCl_4$, 4—9: $C_{12}H_3OCl_5$, 10—11: $C_{12}H_2OCl_6$.
 Right; 1: $C_{12}H_5O_2Cl_3$, 2—4: $C_{12}H_4O_2Cl_4$, 5—6: $C_{12}H_3O_2Cl_5$.

Table 1. Compound applied and its doses

Rabbit No.	Compound	Concentration applied (%)	Total amount (mg)	Amount per cm^2 (mg)
1	Kanechlor 400 (PCB)	50	7.1×10^2	1.6×10
2		10	1.4×10^2	1.9
3		2	3.5×10	5.3×10^{-1}
4		0.4	7.0	1.1×10^{-1}
5	Chlorinated dibenzofuran (PCDF)	1	1.0×10	1.7×10^{-1}
6		0.3	3.0	4.9×10^{-2}
7		0.05	5.0×10^{-1}	8.9×10^{-3}
8		0.01	1.0×10^{-1}	1.8×10^{-3}
9	Chlorinated dibenzodioxin (TCDD)	0.02	2.0×10^{-1}	3.2×10^{-3}
10		0.004	4.0×10^{-2}	6.5×10^{-4}
11		0.001	8.0×10^{-3}	1.4×10^{-4}

のように4塩化および5塩化 Dibenzo-furan を主成分とし6塩化 Dibenzo-furan を少量含む混合物であった。以下この物質を PCDF と略記する。

(2) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin の合成
 2,4,5-Trichlorophenol のナトリウム塩(東京化成) 5g をフラスコに取り、砂浴で $350 \sim 400^\circ$ に2時間加熱した。内容物が固化したので、フラスコを割って取り出し、乳鉢で粉末にした。この粉末を Benzene で繰り返し抽出した。Benzene 抽出液を10%水酸化ナトリウムおよび水で洗った後、硫酸ナトリウムで乾

燥し、濃縮した。残渣を Florisil column で n-Hexane を使い、フラクションに分けた。各フラクションの一部をガスクロマトグラフに注入し、標品(京都大学、上田氏より提供)と同じ保持時間を有するフラクションを集め、溶媒を留去すると 0.3g の結晶を得た(mp $305 \sim 312^\circ$)。この結晶の GC-MS は Fig. 1 (右) の通りで、主成分の他に少量の3塩化および5塩化 Dibenzo-dioxin を含んでいた。以下、この物質を TCDD と略記する。

(3) 動物試験

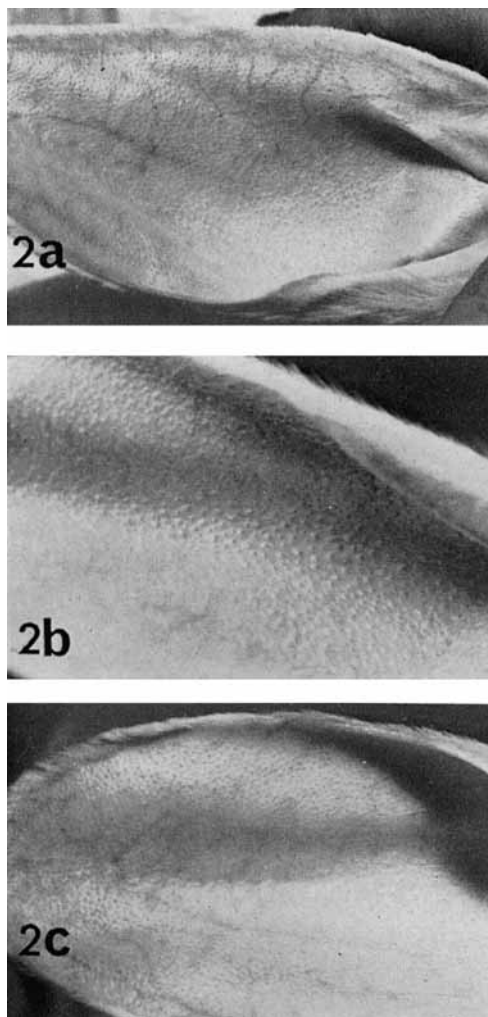


Fig. 2. Skin lesions on the inside of rabbit's ear after application of PCBs, TCDD or PCDF.

- a : after application of PCBs
($1.8\mu\text{M}/\text{cm}^2$, 2 weeks later)
- b : after application of TCDD
($10\text{nM}/\text{cm}^2$, 2 weeks later)
- c : after application of PCDF
($0.5\mu\text{M}/\text{cm}^2$, 2 weeks later)

These photographs show follicular hyperkeratosis in various grade.

体重 3 kg 前後の雄性白色ウサギ 11 匹を使用し PCBs (Kanechlor 400), 上記のように合成した PCDF および TCDD をそれぞれ Acetone に溶解し, 脱毛後の右耳介内面に 3 日間にわたって分割塗布し, その後の局所皮膚変化を Acetone 単独塗布の左耳介内面皮膚の状態と比較し, 経時的に観察した。ま

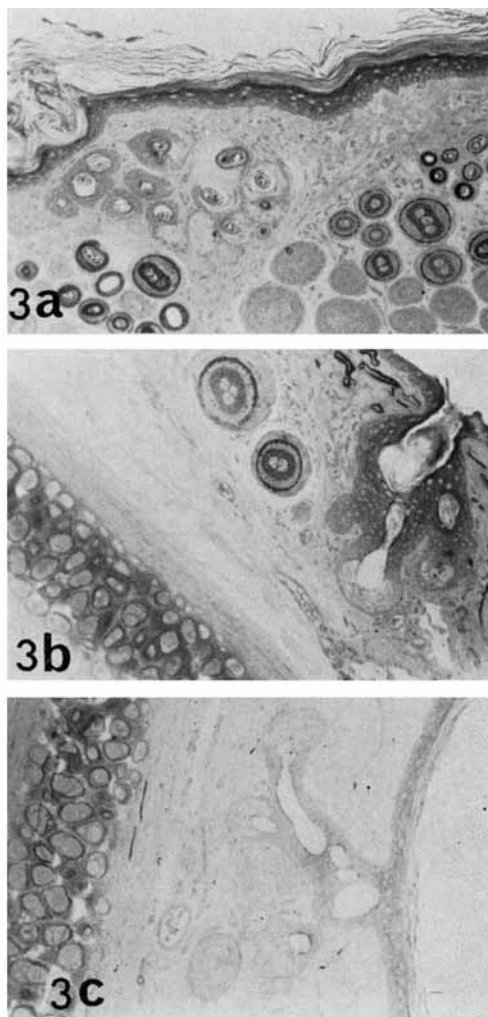


Fig. 3. Histological findings of rabbit's ear after application of PCBs, TCDD or PCDF.

- a : after application of PCBs
($1.8\mu\text{M}/\text{cm}^2$, 4 weeks later)
- b : after application of TCDD
($2\text{nM}/\text{cm}^2$, 4 weeks later)
- c : after application of PCDF
($0.1\mu\text{M}/\text{cm}^2$, 2.5 weeks later)

Follicular hyperkeratosis is clearly seen in 3a and 3b, but slight in 3c. (H. E. $45\times$)

た, これらのウサギは塗布終了後 25 日で屠殺し, 両側耳介内面皮膚および肝組織の一部を採取し, 組織学的な観察も行った。これら 3 種化合物の塗布濃度および塗布総量は Table 1 に示す通りである。

実験結果

右耳介内面に PCDF を塗布したウサギ4匹のうち、高濃度塗布の2匹は塗布終了後10日目頃よりしだいに食欲低下、体重減少を来たして15日目および19日目に死亡したが、他のウサギはすべて屠殺時まで全身状態は良好で体重減少もみられなかった。

耳介内面皮膚の肉眼的変化についてみると、Kanechlor 400 塗布群では塗布終了後数日は局所の発赤状態が持続するが、これはしだいに軽度となり、1週後より2週後にかけてしだいに毛嚢に一致した隆起が認められ、角化傾向が増強する (Fig. 2 a)。2週を経過すると肥厚した表皮角質の剝離が部分的に起こり、少量塗布例では肉眼的にはしだいに常態に復帰する傾向をみせるが、多量塗布例では3週後にも毛嚢の隆起、肥厚した角化部分が島嶼状に依然残存しており、組織学的にも表皮の過角化が認められ、特に毛嚢部に顕著であった (Fig. 3 a)。

局所皮膚変化の時間的な経過は、TCDD 塗布群でもほぼ同様で、高濃度塗布例ほど顕著な変化を示した (Fig. 2 b, 3 b)。しかし、PCDF 塗布群では、上記2群に比し局所皮膚の変化は一般に軽く、総量で10 mg を塗布し15日目に死亡した例では毛嚢に一致した隆起と軽い過角化傾向を認めた (Fig. 2 c) が、屠殺時まで全身状態の良好な0.5ないし0.1 mg 塗布例では、肉眼的にも組織学的にも対照耳に比し過角化の傾向は認められなかった。Acetone 溶液のみ塗布した反対側の耳介内面皮膚は塗布後数時間はやや発赤

状態がみられるが、その後は肉眼的には全く正常で、4週後の組織学的所見でも異常は認められなかった。

各物質の塗布量と局所皮膚の角化状態の関係をみると、Table 2 のようになる。この肉眼的変化は組織学的変化とほぼ一致するので、この過角化の程度から判断すると、Kanechlor 400, PCDF, TCDD の塗布量 ($\mu\text{M}/\text{cm}^2$) の比で1:0.3:0.001の場合、ほぼ同様の過角化作用がみられる。

肝の組織像は、PCDF を総量で10 mg, 3 mg 塗布して、それぞれ15日目、19日目に死亡したウサギでは、小葉中心部の肝実質細胞が空胞変性を示し、Kupffer 星細胞の腫大・膨化を認めたが、他のウサギでは組織学的な異常は認められなかった。

考 察

Vos ら^{7,8)} は Aroclor 1260 (アメリカ製), Clophen A60 (ドイツ製), Phenoclor DP6 (フランス製) の各 PCBs 製剤とその25% diethylether-hexane fractions についてその毒性を比較して、Clophen A60, Phenoclor DP6 が Aroclor 1260 に比し毒性が強い理由として、その中に不純物として共存する PCDF のためと判断しており、さらに Vos & Nottenboom-Ram⁹⁾ は純粋な 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl とそれを主成分とする Aroclor 1260 の毒性を比較し、ほぼ同じ症状を呈するが、皮膚発疹、浮腫、肝障害が Aroclor の方に若干強いとして、Aroclor 1260 にも PCDF の夾雑による影響を疑っている。

Table 2. Hyperkeratosis on the inside of the rabbit's ear

Compound	Amount applied ($\mu\text{M}/\text{cm}^2$)	Hyperkeratosis*		
		after 1 week	after 2 weeks	after 3 weeks
Kanechlor 400 (PCB)	5.5×10	+	++	+++
	6.5	+	+	++
	1.8	+	+	+
	3.8×10^{-1}	—	+	+
Chlorinated dibenzofuran (PCDF)	5.0×10^{-1}	+	+	
	1.4×10^{-1}	—	+	
	2.6×10^{-2}	—	—	—
	5.3×10^{-3}	—	—	—
Chlorinated dibenzodioxin (TCDD)	10.0×10^{-3}	+	++	++
	2.0×10^{-3}	+	+	+
	4.3×10^{-4}	—	+	+

* —: none, +: slight, ++: moderate, +++: marked

Roach ら⁶⁾ は油症の原因物質とみなされている Kanechlor 400 の分析結果でも微量の PCDF の存在を報告したが、最近、教室の長山ら⁵⁾ も Kanechlor 400 中に約 20 ppm, 患者が使用していた汚染ライス油中に 5 ppm の濃度でこれを検出している。一方、これら PCBs 製剤中には PCDD の存在はまだ確認されていないが、PCBs 製剤が熱媒体として使用される過程で酸化によって PCDF, PCDD が生ずる可能性を指摘する人もある。

PCDF および PCDD の毒性は Bauer ら²⁾ のウサギの致死例から概算して PCBs のそれぞれ約 500 倍, 5,000 倍と考えられるが、酵素誘導能力を麻酔短縮現象を利用して比較した数字¹⁾ では PCDF, PCDD はそれぞれ PCBs の 170 倍, 1,250 倍という。従って一般的には PCDF, PCDD が PCBs に比し、かなり強い毒性ないしは生理作用を有するものと考えられる。しかしながら、この比較は肝を主たる target organ としての毒性の比較であり、皮膚に対する毒性についてそのまま適用できるかどうかは疑問である。

本実験において、塗布後 1 週目には異常なく 2 週目に軽度の毛嚢部の角化を示したウサギについて、その塗布量を $\mu\text{M}/\text{cm}^2$ で比較すると、PCBs, PCDF, TCDD の間での比は、ほぼ 1 : 0.3 : 0.001 となり、TCDD のみは他の 2 化合物に比し非常に高い皮膚毒性を示した。しかし、高濃度の PCDF を塗布したウサギが第 3 週に入って死亡したことにより、PCDF については皮膚毒性に比し肝に対する相対的毒性が PCBs, TCDD に比べて強いことが考えられる。ただしこの場合、PCDF による肝毒性の発現はすべて経皮的吸収によるものでなく、皮膚に附着して残存している物質を経口的に摂取した可能性がある。

油症の症状発現に関して PCBs 以外に、これら PCDF, PCDD がどの程度関連しているかは、これからの研究に待たねばならないが、皮膚症状に限つていえば、もし PCDF および PCBs による皮膚の過角化作用がその投与経路に関係なくこのように近似した作用強度で起こるとすれば、Kanechlor の PCBs 量に比し遙かに少ない夾雑物である PCDF の皮膚症状発現への役割はかなり小さいものと考えられる。事実、小松ら⁴⁾ は Kanechlor 400 の塗布による変化は合成した純品 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl による変化と同程度の変化だとして PCBs 製剤中の夾雑物が Kanechlor 400 による皮膚毒性発現に必要なという説に否定的である。なお、PCDD の夾雑物とし

ての存否についてはまだ注意を払うべきであろう。また、これら少量の夾雑物質が肝を含めて他の臓器に PCBs と違った生理的作用や毒性があるとするれば、これはその代謝過程の研究と共に今後さらに追求すべき問題となるであろう。

結 語

Chlorinated dibenzofuran (主成分は 4 および 5 塩化物) および Chlorinated dibenzodioxin (主成分は 4 塩化物) を実験室内で合成し、これをウサギの耳介内面に塗布して、その過角化作用を PCBs (Kanechlor 400) のそれと比較した。その塗布量 ($\mu\text{M}/\text{cm}^2$) と皮膚にみられた変化との関係から、PCBs に比し Chlorinated dibenzofuran はほぼ同量、Chlorinated dibenzodioxin は約 1/1000 量ではほぼ同程度の皮膚の変化を示した。

文 献

- 1) 荒木泰典: Chlorinated dibenzofuran および chlorinated dibenzodioxin の酵素誘導作用。福岡医誌 65: 61-64, 1974.
- 2) Bauer, H., Schulz, K. H. u. Spiegelberg, U.: Berufliche Vergiftungen bei der Herstellung von Chlorphenol-Verbindungen. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. 18: 538-555, 1961.
- 3) Jones, E. L. and Krizek, H.: A technic for testing acnegenic potency in rabbits, applied to the potent acnegen, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. J. Invest. Dermat. 39: 511-517, 1962.
- 4) 小松富美子, 菊池昌弘: 結晶 Tetrachlorobiphenyl 塗布によるウサギ皮膚の変化。福岡医誌 63: 384-386, 1972.
- 5) 長山淳哉, 増田義人, 倉恒匡徳: Kanechlors 中の Dibenzofuran について。日衛誌 30: 126, 1975.
- 6) Roach, J. A. G. and Pomerantz, I. H.: The finding of chlorinated dibenzofurans in a Japanese polychlorinated biphenyl sample. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 12: 338-342, 1974.
- 7) Vos, J. G., Koeman, J. H., Van Der Maas, H. L., Ten Noever De Brauw, M. C. and De Vos, R. H.: Identification and toxicological evaluation of chlorinated dibenzofuran and chlorinated naphthalene in two commercial polychlorinated biphenyls. Fd. Cosmet. Toxicol. 8: 625-633, 1970.
- 8) Vos, J. G. and Beems, R. B.: Dermal toxicity studies of technical polychlorinated biphenyls and fractions thereof in rabbits. Toxic. appl. Pharmacol. 19: 617-633, 1971.
- 9) Vos, J. G. and Notenboom-Ram, E.: Comparative toxicity study of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl and a PCB mixture in rabbits. Toxic. appl. Pharmacol. 23: 563-578, 1972.

PCB 汚染油を摂取した母親から生まれた 油症児の血漿中 PCB について

久留米大学医学部環境衛生学教室

阿 部 純 子・井 上 義 人
高 松 誠

Polychlorinated Biphenyl Residues in Plasma of Yusho Children Born to Mothers Who Had Consumed Oil Contaminated by PCB

Sumiko ABE, Yoshito INOUE and
Makoto TAKAMATSU

*Department of Environmental Health, Kurume University
School of Medicine, Kurume, Japan*

Medical examination and analysis of PCB in plasma were performed on 30 children who were born in the period of February 1967 to December 1973, and on 18 mothers who had taken oil contaminated by PCB in Tamanoura-cho of Nagasaki-ken. Plasma samples were also obtained from 11 ordinary children in Miiraku-cho.

The average PCB concentrations in plasma of Yusho children, mothers and ordinary children were 6.0 ppb, 10.8 ppb and 3.7 ppb, respectively. The average PCB concentration in plasma of Yusho children who had been fed on mother's milk in infancy was higher than that of children fed on none of mother's milk.

Gaschromatograms of PCB in plasma of Yusho children and mothers had a peculiar pattern in most cases.

Though the skin symptoms of the Yusho children had subsided, they still complained of atypical symptoms such as easily getting cold, diarrhea, physical dullness and abdominal pain.

吉村⁹⁾ は昭和 47 年 5 月に長崎県玉之浦町の油症患者家族 108 世帯のなかから、PCB に汚染したカネミ油を摂取した母親から生まれた児 22 名についての疫学的調査を行っている。そして彼は乳児の油症患者は経母乳油症児と経胎盤油症児に分類されること、その可能性のある小児については十分な臨床観察とともに、今後の患者の健康管理を中心とする継続的観察が望まれるといっている。

玉之浦町にはカトリックを信仰する地区があり、宗教の戒律によつて堕胎が禁じられているので、特に玉之浦町では油症児の出生が多かつたものと思われ、疫学的注目をあびることになつた。著者らも昭和 49 年度中 3 回にわたり玉之浦町に赴き、町民の協力をえて、油症患者の精密検査を行うとともに、血漿中 PCB 値を分析することができた。

本論文ではその成績のなかから、カネミ油症の母親と、その母親から生まれた油症児と推定される小児について分析した血漿 PCB 値を中心にして、疫学的問題点をみるとともに検査時の所見とを併せて報告したい。

調 査 方 法

玉之浦町のカネミ油症患者については、この町の患者の会と患者を守る会とで精密な調査に基づく患者名簿ができてゐる。この名簿によつて昭和 49 年 1 月と 7 月とにカネミ油症患者約 500 名の精密検査を行い、血液の提供をうけて血中 PCB 値を分析することができた。そしてこの名簿によつて PCB に汚染したカネミ油を摂取した母から生まれた児を選びだし、その家庭を訪問して諸々の情報を聞きだし油症母子家系の実

情を把握した。

(1) 調査対象

長崎県五島玉之浦町で PCB に汚染したカネミ油を摂取した母親と、その母親から昭和 42 年 2 月から昭和 48 年 12 月までに生まれた油症児とを対象とした。ここで油症児というのは

a) PCB に汚染したカネミ油を摂取した母親の母乳によつて育てられた小児

b) PCB に汚染したカネミ油を摂取した母親から生まれた小児（その中では①母親が妊娠中に PCB を摂取し、出産してきた児、② PCB の摂取後に妊娠して出産してきた児）

を指しており、いわゆる油症としての所見がそなわっているかどうかは、ここでは問題としない。また、認定とか未認定とかいうのは長崎県油症対策協議会が、その要綱にもとづいて油症として認定するかどうかの行政的措置の結果を指しており、ここでは昭和 49 年 8 月の時点における成績について述べた。

(2) 調査時期

昭和 49 年 1 月、7 月および 8 月の 3 回である。

(3) 調査項目

a) 出生児について

① 性、出生年月日、在胎週数、生下時体重、分娩異常の有無

② 生下時所見

③ 発症当時の所見

④ 栄養（授乳方法）

⑤ 現在の身長、体重

⑥ 現在の自・他覚的所見

⑦ 血液の分析（血漿中トリグリセライド、血漿中 PCB 濃度およびガスクロマトグラムパターン）

b) 母親について

① 汚染油摂取量、摂取時期

② 家族内油症患者の有無

③ 血液の分析（出生児と同じ項目）

④ 現在の自・他覚的所見

(4) 血漿中 PCB の分析法

分析には Jensen 法変法²⁾によつて抽出、クリーンアップを行い、シリカゲルドライカラムからのヘキサン溶出液を濃縮して、ECD 付ガスクロマトグラフにかけた。標準物質には KC-500:600=1:1 を使用してピーク高法により定量した。

調 査 成 績

玉之浦町の患者名簿によつて PCB に汚染した母子

家系の家族を選びだすと、22 家系が見出される。その 22 名の母親から昭和 42 年 2 月から昭和 48 年 12 月までに生まれた油症児は 36 名を数える。このうち死亡が 2 名、ほかに転出したものが一世帯 1 名、調査不十分のものが 1 名で、調査できたのは母親 21 名と児 32 名である。このうち血液の提供をうけて血漿 PCB を分析できたのは母親 18 名と児 30 名である。

1. 油症児の成績

油症児 30 名の血漿中 PCB 濃度は表 1 のように 1 ~ 20 ppb の範囲にあつて平均 6.7 ± 4.28 ppb である。

表 1. 血漿中 PCB 濃度

対 象	人数	P C B 濃度 (ppb)		
		範 囲	平 均	標 準 差
油症小児*	30	1 ~ 20	6.7	4.28
油症母親	18	3 ~ 33	11.2	7.32
健常児童**	14	1 ~ 8	3.7	1.97

*: 0 ~ 6 才, **: 隣町の三井楽町に居住。

調査した油症児と同年代 0 ~ 7 才についての健常者の血漿中 PCB についての資料は得られなかったが、玉之浦町に隣接する三井楽町の 10 ~ 12 才健常者児童 14 名では 1 ~ 8 ppb、平均 3.7 ± 1.97 ppb で油症小児より有意に低い濃度であつた。油症児では殊に健常者にはみられない 9 ppb 以上の濃度の児が 30 名中 12 名 (40%) に、3 ~ 7 才に年令をしぼると 25 名中 12 名 (48%) にみられた。

年令別の血漿中 PCB 濃度分布は図 1 の通りである。年令は昭和 49 年度の満年令を示す。3 ~ 7 才の児では年令間では濃度にほとんど差はないが、1・2 才の児には 5 ppb 以上の濃度のものはみられない。3 ~ 7 才の児では同地区の 7 才以上、15 才以下の小児油症患者と血漿中濃度は同程度であつた。

図 2 には授乳方法別の濃度分布を示した。このうち母乳摂取群にはごく短期間母乳を飲んだ児や混合栄養の児を含めている。30 名中 16 名が多少なりとも母乳を摂取しており、母乳を飲んだ児の方が、全く飲まなかった児より濃度が高い傾向にある。

同じ母親から生まれた兄弟で栄養などが同じであっても、必ずしも後から生まれた油症児が低いとは限らなかった。また過去および現在の症状の程度と、血漿中 PCB 濃度とは、0 ~ 2 才の濃度の低い児が症状も軽いものを除いて、必ずしも比例してはいないようである。すなわち低濃度の児で症状のひどい児や、逆にかなり高濃度でも自他覚的所見の少ない児もいるが、

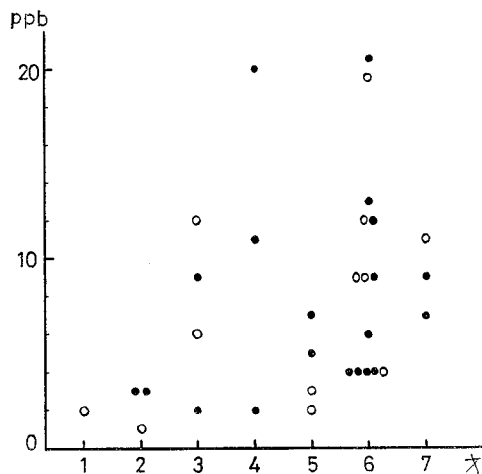


図 1. 年齢別血漿中 PCB 濃度分布

○: 男 ●: 女
縦軸: 血漿中 PCB 横軸: 年齢

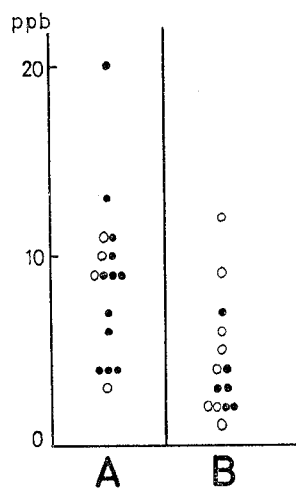


図 2. 乳児期の栄養別血中 PCB 濃度分布

A: 母乳および混合栄養群
B: 人工栄養群
○: 男, ●: 女
縦軸: 血漿中 PCB 濃度

総体的には症状がひどい児では健常者より濃度が高いことが認められる。

血漿中 PCB のガスクロマトグラムのピークパターンを見る上で、既に報告したように福岡県の油症患者における成績では pp'-DDE の次の peak 1 の割合が健常者に比べて非常に低くなり、peak 5 が高くなる特徴を示すことから、図 4 に (peak 1/peak 2) × 100 と (peak 5/peak 2) × 100 の分布を示した。

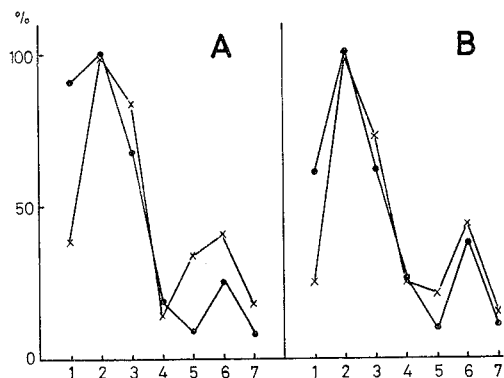


図 3. 血漿中 PCB のガスクロマトグラム・パターン

A: 福岡県成人, ×: 油症患者, ●: 健常者. B: 長崎県五島小児, ×: 油症児 (0~6才), ●: 健常児童 (三井楽町) 縦軸: PCB の相対ピーク高, 横軸: PCB のピーク番号

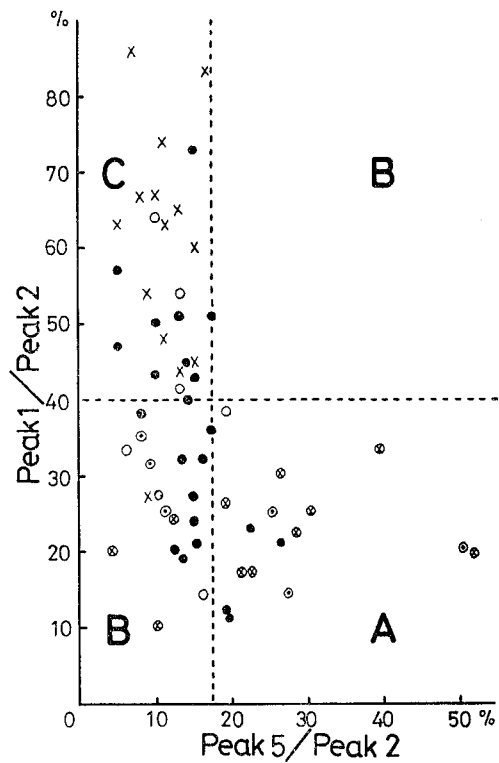


図 4. 血漿中 PCB ガスクロマトグラムの相対ピーク高 (peak 1/peak 2 と peak 5/peak 2) の分布。

A: PCB の典型的な A パターン, B: 中間的な B パターン, C: 非典型的な C パターン.
●: 油症児, ○: 油症児 (認定), ○: 母, ⊗: 母 (認定), ×: 健常児童 (三井楽町).

また図3には福岡県と長崎県五島の油症児（玉之浦町）と健常児（三井楽町）との peak 2 を 100 としたときのピークパターンの差を示した。五島三井楽町の健常児では福岡の健常者より peak 1 の割合が低いことが目立つ。それだけ、油症患者でも福岡より玉之浦町の油症児の方が peak 1 が低いが、健常者との差は小さい。

著者らが今まで調査した範囲では、京都、秋田を含めた都市・農村部の成績では、血漿中 PCB のパターンの地域差はほとんどなかったが、福岡と玉之浦町、三井楽町の健常者ではパターンに多少差が認められた。油症児の (peak 1/peak 2)×100 の分布は 18～73%，三井楽町の健常児では 27～74% で 40% 以下は 1 名のみであった。(peak 5/peak 2)×100 は油症児で 5～50%，健常児で 5～17% であり、(peak 1/peak 2)×100 が健常者域 (40%＞) 以下を示したものは油症児 30 名中 19 名 (63%)，(peak 5/peak 2)×100 では健常者域 (14%＜) 以上のものは 30 名中 9 名 (30%) であった。血漿中 PCB 濃度の高い児でも特徴的なパターンを示さない児もあり、また特徴的なピークパターンを示す児は大体症状が顕著であるように思われた。

調査した油症児のうち 12 例は黒い赤ちゃん (Colababy)¹⁾ として生まれたが、現在の所見としては皮膚疹のあとや色素沈着がみられる程度で、総体に大人にくらべて皮膚症状は少ない。しかし湿疹がしやすいという訴えは数例にみられた。ほとんどの児にみられる症状は風邪をひきやすい、下痢しやすい、体が疲れる、突然腹痛がおこる、歯牙異常などの非特異的症状である。

2. 母親の成績

母親の血漿中 PCB は 3～33 ppb，平均 11.2±7.23 ppb で福岡の成人健常者の平均値 3.7 ppb より顕著に高い (P<0.01)。油症児と比較しても全般に高濃度でその差は有意である (P<0.01)。また、ガスクロマトグラムのピークパターンは、児よりも母親の方に油症に特徴的な A パターンの割合が多く (母親 44%，児 24%)，次に B パターンのものが多く、健常者とかかわらない C パターンのものは母親では 10% であった。児の場合にみられるよりもはつきりと、症状のひどい人は高濃度の血漿中 PCB 濃度を示すか、または中程度濃度でも特徴的な A または B パターンを示した。

血漿中 PCB 値の親子関係をみるため、母親の血中濃度の高い群と低い群とにわけて統計的に解析して

みたが、傾向差があるだけで、高濃度の母親から生まれた児の濃度は必ずしも高くはなかった。低濃度の母親から生まれた児でも高濃度のものもあった。また一般に高濃度の PCB 値の母親より生まれた児には、A または B パターンの PCB が血漿中に残留している傾向にあった。

所見としては、母親には全身症状のほかに関節痛や手足のしびれなどの訴えが多くみられた。

考 察

PCB の親から子への移行はすでに確かめられているが、水谷ら²⁾ は妊娠ラットへの KC-400 投与実験において、胎仔中の PCB 量は少ないが、新生仔臓器中の PCB は日を迫うにつれ顕著に増加することから、母乳からの影響が大きいとみている。増田ら⁴⁾ の報告に、KC-500 の胎仔への移行は胎盤によりかなり制御されているとの推察もある。人間においてもおそらく PCB の母から子への移行は母乳経路の方がより重要であると考えられるが、胎盤経由の移行も確かであるから、その影響も充分考慮に入れなければならない。

著者らの調査した幼児のうち、母乳をいくらか飲んだ児が全く飲まなかった児にくらべて血漿中 PCB 濃度が高いのは、個々の条件の違いを無視したわけ方ではあるが、なおかつある程度上記のことを反映しているものと考えられる。母乳経路の重要性は、母親が検診をうけても油症とは認定されなかったために母乳をのませ、児が発症した例³⁾ によつても実際に証明される。

1～2 才の児では PCB 値が低いが、これは汚染油摂取から 6 年を経過しており、且つ母親も何人も出産したこともあつて、母体内の PCB がある程度少なくなつたためと考えられるが、この年齢の子で且つ人工乳で育てられながら症状がみられるのは、やはり母体から胎盤を通じて PCB をとりこんだことによると推定される。総じて母親も含めた大人に比べると油症児の現在の症状は比較的軽い、血漿中 PCB が健常者より相当高い濃度であつたことは、現在もなお体内に母乳経由、あるいは胎盤経由の母親からの汚染が残留していることを示すと思われる。

ガスクロマトグラムのピークパターンは、健常児童において福岡とは異なっており、DDE の次の peak 1 がかなり低い、それだけ患者のパターンとの差が小さい。健常者の他地域でのパターンの差がほとんどないことを考えると、五島の魚類は PCB 汚染がま

だほとんどないといわれていたが、やはり魚介類が原因ではなかろうか。だとすれば濃度の面においても今後患者との差が小さくなってくる事が考えられる。特に小児の場合は母親ほど健常者とのパターンの差が明らかでなかったが、低濃度で健常者とかわらないパターンであつても症状を訴える児が数人いることは、児らの今後の観察が、体内残留と症状の両面から追跡されるべきことを示唆している。児では風邪ひきやすい、下痢しやすい、体がだるいなど、虚弱傾向の訴えが多いが、母親では皮膚症状のなごり、関節痛、末梢神経症状などが多く、児と母親では症状にかなりの差がある。そしてこれらの症状は初期を除いたその後もほとんど軽減していないようである。

調査時点で油症と認定されていた児はわずかに6名であり、残りの多くの児は未認定として行政的には放置されていた。成人の油症患者はもちろん、特に胎児性の油症児は健康については長期追跡の必要があるので、症状のいかんを問わず、健康管理や医療の面では優先されるべき処置が必要だと思われる。

む す び

乳児、新生児油症児のその後の状況を明らかにするために、長崎県玉之浦町において、PCB 汚染油摂取の母親より、昭和42年2月以降出生した児30名とその母親18名について、健康調査と血漿中残留 PCB の分析を行った結果は次の通りであつた。

1) 油症児の皮膚症状は多くが軽快しているが、風邪ひきやすい、下痢しやすい、体がだるい、腹痛があるなどの非特異的症状が多い。

2) 油症児の血漿中 PCB 濃度平均は 6.7 ± 4.28 ppb で、母親の 11.2 ± 7.23 ppb より明らかに低いが、隣町の健常児童 3.7 ± 1.97 ppb より有意に高値であつた。

3) 多少なりとも母乳を飲んだ児の群は、全く飲んでいない児の群より血漿中 PCB 濃度平均が高かつた。

4) 血漿中 PCB のガスクロマトグラムのピークパ

ターンは、母親ではAタイプが多く(44%)、児ではAタイプが24%、Bタイプが45%、Cタイプが31%であつた。

以上のように、PCB 汚染油を摂取した母親から生まれた油症児は6年を経過した時点においてもなお、健康上に母親を通じての PCB の影響を残していた。すべての油症児は今後とも長期にわたる観察と健康管理が必要である。

血液を提供していただきました玉之浦町の油症患者の方々ならびに試料収集に御協力いただきました玉之浦町町長坂江忠二さん、藤原弁止さん、鳥巢守さん、母子センターの谷口ハマ保健婦さんに厚く感謝いたします。

また、本調査に御協力いただいた久留米大学医学部小児科山下文雄教授、高崎好生講師ならびに小児科学・環境衛生学教室の皆さんに深謝いたします。

文 献

- 1) 船津維一郎・山下文雄・伊藤祐士、他：Chlorobiphenyls による胎児症。福岡医誌 62: 139, 1971.
- 2) Inoue, Y., Abe, S., Esaki, H., and Takamatsu, M.: Polychlorinated biphenyls in human blood. Kurume Med. J. 20: 83-86, 1973.
- 3) Jensen, S.: The PCB story. Ambio. 1: 123, 1972.
- 4) 増田義人・香川梨絵・倉恒匡徳、他：マウスにおける PCB 胎仔への移行。日衛誌 29: 84, 1974.
- 5) 増田義人・香川梨絵、他：油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニール。福岡医誌 65: 25, 1974.
- 6) 水谷泰久・谷口繁、他：PCB の胎仔、新生仔に及ぼす影響。食衛誌 15: 252, 1974.
- 7) 中島裕而・星出道代・梅田玄勝、他：ヒトの血液および組織中の PCB 測定。第46回日本産業衛生学会講演集。360, 1973.
- 8) 高松 誠：カネミ油症の追跡。科学 44: 755-762, 1974.
- 9) 吉村健清：PCB 汚染油を摂取した母親から生まれた児についての疫学的調査。福岡医誌 62: 74, 1974.

血漿中 PCB ならびに DDT, BHC とそれらの 組織内残留との関係

久留米大学医学部環境衛生学教室

井上 義人・阿部 純子・高松 誠

京都市堀川病院

青木 信雄・三木 昭作

京都市衛生研究所

藤原 邦達

PCB, DDT and BHC Levels in Human Plasma as a Measurement of Tissue Residue

Yoshito INOUE, Sumiko ABE and
Makoto TAKAMATSU

*Department of Environmental Health, School of Medicine,
Kurume University, Kurume*

Nobuo AOKI and Shosaku MIKI

Horikawa Hospital, Kyoto

Kunisato FUJIWARA

Kyoto City Institute of Public Health, Kyoto

Polychlorinated biphenyls (PCB) in plasma has been used for diagnosis of Yusho (PCB poisoning) since 1974. But it was not obvious that PCB in plasma reflected the total residue in human body. This study was performed to this relation.

Pair samples of plasma and adipose tissue were obtained from 33 hospital patients at the time of operation. And the other samples—blood samples (21), subcutaneous fat tissue (2), liver tissue (1), and kidney tissue (1) were obtained from 21 persons. The PCB concentrations in plasma and adipose tissue, and the patterns of gaschromatograms were examined. At the same time β -BHC, pp'-DDE, pp'-DDT were measured.

(1) It was observed that PCB, β -BHC, pp'-DDE in plasma reflected the residual condition of these compounds in adipose tissue respectively.

(2) The concentrations of these compounds of the emaciated group were higher than those of non-emaciated group.

(3) The PCB gaschromatograms patterns varied with the type of PCB exposure.

(4) It was found that two cases had very high PCB concentrations in plasma (230 ppb, 92 ppb).

血中 PCB の量と質との分析は、油症患者の診断や追跡調査に極めて有用な示標となることが認められて、昭和 49 年 3 月の油症診断要項にも取り上げられ、広く使用されることになった。しかし血中 PCB による把握は、血液についての現象を見ているのであつて、組織内に残留している PCB の蓄積を考える場

合、血中濃度によつてそれが適確に把握できるという確信は得られていなかった。

すでに有機塩素系農薬については、血中濃度と組織中濃度との間には相関があることが確かめられているので⁷⁾¹⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、PCB についても同じような関係があるかどうかをみて、血液値によつて、PCB の体脂肪中

の蓄積量を推定するという手法の検討を行った。なお、本研究では BHC, DDT 類についても検討を加えるとともに、組織内残留量と体型などの要因との関係についても検討したので、その成績について報告したい。

研究材料および方法

1. 試料

京都市の市中病院と久留米大学附属病院に入院中の患者のうち、胃切除術などの開腹手術を受けた成人男女 33 名から、血液は術前検査用の一部と、体脂肪は切除された臓器付着の脂肪組織の一部の提供を受けた。これらのほかに血液のみを提供してもらった者は 18 名であった。試料提供者の一部に対しては、身長、体重などの基礎資料のほかに嗜好調査や術前一週間の食事調査も行った。

これらの症例のほかに、次のような症例があった。

(その 1) 13 才の油症の女児で昭和 49 年 6 月に久留米大学附属病院小児科に心筋硬塞様の所見があったため入院。心臓カテーテル検査のために大腿部を切開した。その時に PCB 検査のために皮下脂肪を採取した。

(その 2) 46 才の男で、某紡績に勤務していた。国立療養所敦賀病院に入院中、昭和 48 年 6 月に職業性 PCB 中毒の疑いのため、血液と背部皮下脂肪を採取した。

(その 3) 24 才の男で久留米大学附属病院第一内科に入院中であつたが、昭和 49 年 10 月に死亡した。剖検時にホルマリン固定した肝臓、腎臓を後で採取した。

2. 分析方法

試薬：分析に用いた溶媒には、PCB 分析用に特に蒸留精製したものを使用した。また、シリカゲル、無水硫酸ナトリウムなどは上記の n-ヘキサンにて洗浄後、活性化して用いた。

器具：すべてガラス製の器具を用い、使用にあつて、アセトンおよび n-ヘキサンで洗浄後用いた。分析行程での汚染をチェックするため、試料を加えない試薬ブランクテストをも同時に行った。

ガスクロマトグラフ：島津製 GC-5 A・ECD (H³) および GC-4 BM・ECD (Ni⁶³) に、1.5% SE-30, 2% QF-1, 2% OV-17 をつめたガラス製カラムをつけ、カラム温度 200°C で N₂ ガスの流量を 30~40 ml/min にして使用した。

血漿からの抽出：血漿約 4 ml を用いて、アセトニ

トリル 3 ml, ギ酸 1 ml, n-ヘキサン 4 ml を加えて振盪後、遠心分離によつて n-ヘキサン層を集めた。

体脂肪からの抽出：脂肪組織 100 mg から 2 g を秤量後、ホモジナイザーに取り、n-ヘキサンを加えてホモジナイズし、この上澄液を無水硫酸をつめたカラムを通し脱水を行った。この操作を繰り返して、集まった n-ヘキサン層から一定量を取り、粗脂肪量の定量を行い、残りを分析に供した。

試料の精製：血漿、体脂肪の n-ヘキサン抽出液を Jensen 法一変法⁸⁾¹⁰⁾、Holden らの方法⁶⁾ に準じて精製を行った。最後に、シリカゲルのドライカラムクロマトグラフィーにより、PCB, pp'-DDE を含む分画と β-BHC と pp'-DDT などを含む分画に分け、それぞれの適当量をガスクロマトグラフに注入し、標準溶液をもとにして定性、定量を行った。定量には、ピーク高法を用いた。なお PCB 標準溶液には、鐘淵化学株式会社製の工業用カネクロールを用いた。

3. 体型の分類

体型の分類は、身長と体重から求める箕輪¹⁴⁾の体重増減率によつて行った。

これを求める式は次のようである。

$$\text{体重増減率} = \frac{\text{実測体重} - \text{標準体重}}{\text{標準体重}} \times 100\%$$

そして +10% 以上を肥満、-10% 以下をい瘦として、その間を正常とした。

4. その他の調査

アンケート用紙を用いて嗜好調査を行った。また食餌の調査は献立表、および看護日誌をもとに動物性食品の摂取量などを算出した。

結 果

1. 血漿と体脂肪中の濃度

血漿と体脂肪の両者がそろつた 33 例の試料中の PCB, β-BHC, pp'-DDE および pp'-DDT の濃度の成績は表 1 の通りである。

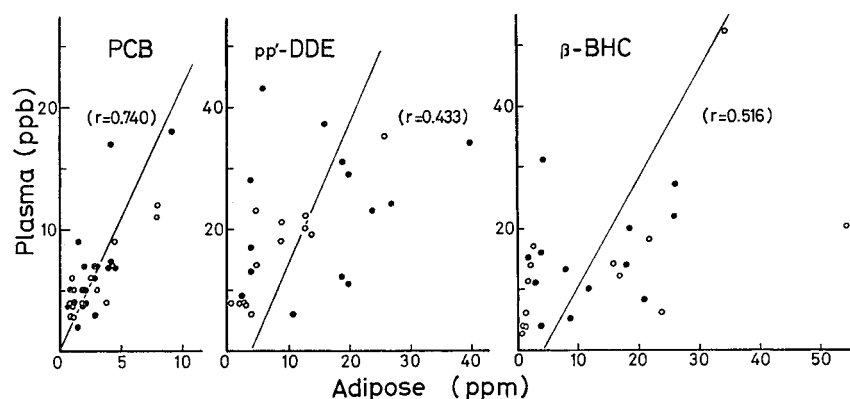
なお、この中からは、表 4 の症例 4 は PCB の値を棄却検定により、症例 1 は小児のため、症例 3 は臓器の採取が剖検後で血液の採取時期とかなりずれるため除いた。これらの 33 例について、それぞれの血漿と体脂肪中の濃度について、両者の間の単純相関を調べると、PCB は $r=0.740$, β-BHC は $r=0.516$, pp'-DDE は $r=0.433$, pp'-DDT は $r=0.197$ であつて、pp'-DDT を除いて他は $P<0.05$ で、血漿と体脂肪との間にそれぞれ相関がみられた (図 1)。

PCB については、図 3 に示したガスクロマトグラ

Table 1. The concentrations of PCB, DDT and BHC in adipose tissues and plasma of 33 persons.

Tissue	Concentration of the compounds ^a			
	PCB	pp'-DDE	pp'-DDT	β -BHC
Plasma	6.1 $\pm$ 3.52	20.1 $\pm$ 10.51 ^b	3.5 $\pm$ 2.50 ^b	14.4 $\pm$ 10.45 ^c
Adipose	2.6 $\pm$ 1.90	11.9 $\pm$ 9.70 ^b	1.4 $\pm$ 1.26 ^b	15.7 $\pm$ 19.78 ^b

^a. Mean $\pm$ SD, plasma (ppb), adipose (ppm), ^b. 27 persons, ^c. 26 persons.

**Fig. 1.** Correlation between plasma and fat concentrations of PCB, DDE and BHC.

● : Male. ○ : Female.

ムでもわかるように、ピークのパターンもよく一致していた。また、このことはピーク2を基準にした相対ピーク高によってそれぞれのピークを検討してもよく一致した。

2. 体型と濃度との関係

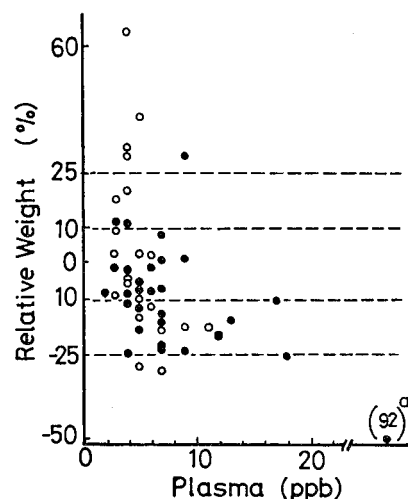
被検者の体型を箕輪らの体重増加率¹⁴⁾を用いて分類し、各群のPCBなどの濃度と体型とを対比させてみた。図2に血漿PCBと体重増減率の関係をプロットした。

例数が少ないため、るい瘦群と正常+肥満群の2群に分けて両群の差の検定を行った。その結果は表2に示したようにPCB、 β -BHC、pp'-DDEのそれぞれは、るい瘦群で有意($P < 0.05$)に高値を示した。pp'-DDTでは差が認められなかった。

PCBを図3に示したピーク pre.1, 1, 3, (5+6+7)のそれぞれについて、ピーク2を基準にした相対ピーク高で両群を比較したところ、るい瘦群はピーク1が低くピーク(5+6+7)が逆に高く、ピーク pre.1と3には両群の差はなかった(表3)。

3. 特異な所見を呈した症例

上述の群から除いた症例を、表4に示した。症例1の油症の女兒からは、成人と同程度のPCBや有機塩

**Fig. 2.** Correlation between relative body weight to standard and PCB concentration in plasma.

● : Male. ○ : Female.

^a: case 3.

素系農薬が検出された。とくに、PCBは長崎県五島の油症患者に典型的なガスクロマトグラムパターンを示した(図3-1)。

Table 2. Comparison of PCB, DDT and BHC concentrations in plasma.

	Concentration of the compounds ^a			
	PCB	pp'-DDE	pp'-DDT	β -BHC
Emaciated	8.4 $\pm$ 4.26 ^e	35.6 $\pm$ 22.65 ^f	4.7 $\pm$ 5.53 ^g	25.5 $\pm$ 22.01 ^g
Non-emaciated	4.7 $\pm$ 2.17 ^c	21.9 $\pm$ 15.95 ^d	3.0 $\pm$ 1.96 ^d	14.3 $\pm$ 11.00 ^d
P ^b	**	*		**

Cases 1~4 and one another case were excluded for special reason.

^a. Mean $\pm$ SD (ppb). ^b. t-test, significant at P<0.05 (*) or P<0.01(**). ^c. 30 persons, ^d. 37 persons, ^e. 19 persons, ^f. 17 persons, ^g. 16 persons.

Table 3. Comparison of component of PCB in plasma by relative peak height.

	Relative peak height of PCB ^a			
	Peak pre. 1	Peak 1	Peak 3	Peak (5+6+7)
Emaciated ^d	42.2 $\pm$ 32.60 ^e	43.5 $\pm$ 20.30	58.5 $\pm$ 9.19	52.6 $\pm$ 14.50
Non-emaciated ^c	45.2 $\pm$ 25.90	63.7 $\pm$ 19.89	45.2 $\pm$ 25.90	39.7 $\pm$ 8.11
P ^b		**		**

^a. Relative peak height was calculated with percentage for Peak 2, Mean $\pm$ SD. ^b. t-test, significant at P<0.01 (**). ^c. 30 persons, ^d. 19 persons, ^e. 17 persons.

Table 4. PCB, DDE and BHC in plasma and tissue.

Case no. Sex & Age Time of sampling	Diagnosis	Tissue (Amount of sample (g))	Fat content (%)	PCB (ppm) Whole base (Fat base)	pp'-DDE (ppm) Whole base (Fat base)	β -BHC (ppm) Whole base (Fat base)
1. Female 13 June, 1974	Yusho	Plasma (4.0) Subcut. fat (0.11)	— ^b 55.5	0.005 0.18 (3.2)	0.013 0.94 (1.6)	0.019 0.26 (0.47)
2. Male 46 June, 1973	PCB chronic poisoning	Whole blood (19.2) Subcut. fat (2.0)	— 40.4	0.011 ^a (0.017) 1.7 (4.2)	— 0.63 (1.5)	— 0.84 (2.0)
3. Male 24 Oct., 1974	Aplastic anemia & Cancer of Stomach	Plasma (3.1) Liver (4.2) Kidney (4.5)	— 0.31 0.54	0.092 0.21 (70) 0.19 (36)	0.18 0.46 (150) 0.41 (76)	0.43 1.5 (490) 1.8 (338)
4. Male 73 Aug., 1974	Cancer of colon	Plasma (4.0) Omentum (0.34)	— 32.5	0.23 45 (140)	0.016 —	0.032 7.4 (23)
5. Male 66 Aug., 1974	Cancer of stomach	Plasma (3.5) Omentum (0.43)	— 32.8	0.007 1.3 (4.1)	0.011 6.7 (20)	0.0036 1.3 (4.1)

^a. The estimated value for plasma by multiplying the whole blood concentration by 1.5.

^b. No measurement.

症例2は、PCBは全血で11ppbで、血漿に換算すると17ppbという高値を示し、ガスクロマトグラムパターンは図3-2のように、職場で熱媒体として

用いられていたカネクロール400に近い特徴的なタイプであった。

症例3は、PCB, DDT, BHCがともに高濃度に検

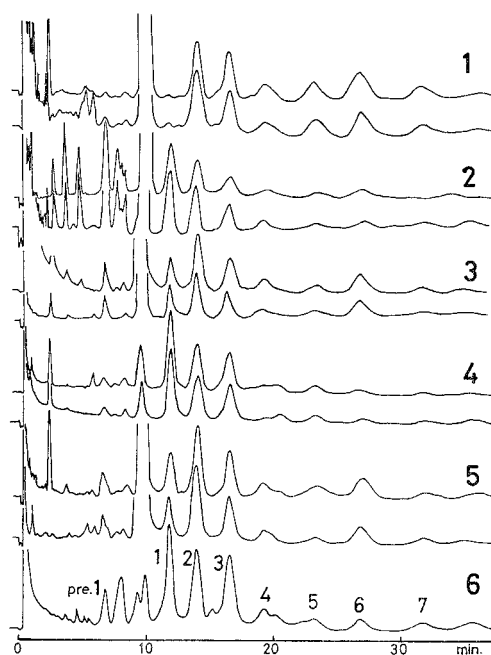


Fig. 3. Gaschromatogram patterns of PCB in tissues.

1. Subcutaneous fat (upper) and plasma (lower) of case 1.
2. Subcutaneous fat and whole blood of case 2.
3. Kidney and plasma of case 3.
4. Omentum and plasma of case 4.
5. Omentum and plasma of case 5 for control.
6. Kanechlor-500

出された。症例4は、PCB 濃度のみ血漿、体脂肪ともに最高であつた。DDT 類、 β -BHC は一般的な濃度であつた。なお、症例5は比較のために示したもので、濃度はほぼ平均的な値であつた。

4. 嗜好調査の結果

嗜好とこれらの有機塩素系化合物の濃度との関係について、両者の間に相関は認められなかつた。

考 察

血液あるいは体脂肪、母乳に含まれる PCB や有機塩素系農薬は、それぞれの組織ごとには数多く報告されているが⁷⁾⁴⁾⁵⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾、血液と体脂肪、血液と母乳というような関係についての報告は少ない。Robinson ら¹⁹⁾ や多くの研究者によつて、有機塩素系農薬のディルドリンや pp'-DDE などについて、その相関を認めたという報告がある⁷⁾¹⁶⁾¹⁸⁾²³⁾。PCB に関しては、母乳と血液との関係について、井上⁹⁾ は有機塩素系

農薬では両者の間に相関を認めたが、PCB では相関を認めなかつたと、また薬師寺ら²⁴⁾ は 124 例で順相関を認めたと報告している。一方、体脂肪と血液の関係では相関がみられたとの中島らの報告¹⁷⁾ がある。

一般に PCB の体内蓄積量は、分析の誤差範囲内に多く集中しているためか、PCB の血液と他の組織との相関を求めるのはかなり困難であつた。著者らは偶然にも、PCB が高濃度に体内に存在した症例を分析する機会があつたため、血漿中 PCB と体脂肪中の PCB の間の相関を認めたのであろう。

また著者らは、両者の濃度の比較において、血液の中でもこれら有機塩素化合物の含有割合が高い血漿を試料として用い、また体脂肪については、脂肪単位重量あたり（脂肪換算）で濃度を示してきた。秋山ら²⁾ が血液の全血単位重量あたりと血液の脂肪換算によつて求めた濃度には両者の間には相関を認めているが、血液については、著者らの分析法では、容量を小さくするという点からも、PCB のほとんどが血漿に存在することからも、血漿が適しているだろうと考えている。

また、脂肪を含む各組織は、それぞれの脂肪の含有率も異なり、個体差もあり、同一個体内でも均一であるとは限らない。そのため採取にあたっては、その組織を十分代表するようにとる必要がある。しかし人体組織の場合はかなり困難である。そのため脂肪換算によつてそれらの組織中の濃度を表示する方法が適当であると思われる。

PCB のガスクロマトグラムパターンは既報²²⁾ では、pp'-DDE よりガスクロマトグラムの保持時間の長いピーク 1 からピーク 7 までを見ていたが、今回はそれらより保持時間の短い pp'-DDE の前のピーク pre.1 からピーク 7 までを合わせて検討した。その結果は各ピークとも、血漿と体脂肪中の PCB はよく対応していた。

ガスクロマトグラムパターンは油症患者と、健常者についてすでに報告したが、これらの例とは異なるガスクロマトグラムのパターンを示す例が 2 例あつた。ひとつは症例の 2 で、職業的慢性 PCB 中毒症と診断されたもので、その PCB は職場で使用されていたカネクロール-400 (KC-400) に近いパターンを示していた。また症例の 4 は、PCB のみが異常に高かつた例で、ピークの pre.1 から pp'-DDE のかきなるピークまでは低いが、それ以後は、KC-500 によく一致したものであつた。これは職場の PCB による異常な汚染によるものと考え、現在その原因を究明中であ

る。

川西ら¹¹⁾は、KC-300, KC-400, KC-500 を飼料にまぜてラットに与え、半年間飼育後屠殺して肝臓中の PCB を定量している。その結果によれば、残留する PCB のガスクロマトグラムパターンは各群とも比較的良好に似ていた。以上のことから、佐藤ら²¹⁾や原ら³⁾の報告のような KC-300 のような低塩素化 PCB を多量に扱っている時点での血液中 PCB を測定する場合を除き、ピーク pre.1 から 7 までを合わせて考慮して判定を行っていけば、現在の組織内残留 PCB の状態を把握することができると思われる。

体内に残留する PCB については高松ら²²⁾が述べているように、その濃度（量）とそのガスクロマトグラムパターン（質）の両面から把握する必要がある、著者らの研究によつて血漿中の PCB の状態によつて、体脂肪中に含まれる PCB の状態を量的および質的の両面から推定できるようになったと思われる。

BHC については、Jensen 法—変法を用いると、現在では β -BHC が測定できるだけで、 α , γ -BHC は検出されなかった。 β -BHC については、Radomski ら¹⁸⁾がすでに血液と体脂肪との間に相関を認めているが、著者らも $r = 0.516$ ($P < 0.01$) とかなり高い確率で相関を認めた。また、pp'-DDE についても同様に認めたが、pp'-DDT については相関を認めなかった。これらの成績は彼らの報告と類似していた。pp'-DDT において相関を認められなかったのは、PCB 同様に蓄積量が低く、そのための影響とも考えられよう。

患者の体型別にこれら塩素系化合物の濃度をみると、PCB, β -BHC, pp'-DDE ではるい瘦群に高いことが認められたが、pp'-DDT では相関を認めなかった。さらに PCB においては、塩素数の多い部分の比率が、るい瘦群で高くなる傾向にあり、また油症患者で特徴的に低くなるピーク 1 についても下がっており、パターンからみると油症患者のパターンに近づくようにも考えられるが、この事を持つ意味は現在のところ明確ではない。しかし、Hesselberg ら⁴⁾が悪液質のあるガン患者で血中 PCB が高値であったと指摘しており、また死亡していた野鳥が、撃ち落した野鳥にくらべて高濃度の PCB を含んでいたという例¹²⁾があるように、PCB が直接の原因でないにしても、死期を早めたということは十分考えられよう。

このことは油症患者に対して、油症班で治療法の一つとしてあげられている断食療法について一つの示唆が与えられていると考えることもできる。すなわち、

断食療法は体内の脂肪を動員させ、同時に PCB を体外に排出しようとするものであろうが、そのために組織中の PCB は濃度が高まる²⁰⁾か、あるいは血液中に遊離してきた PCB が一時的に急激に増加することが考えられる。そのため、この時に患者に体力が十分なければ、急激に増加した PCB などが作用して、体に及ぼす影響が大になる可能性がある。そのため、特に油症患者に対して断食療法をほどこす場合は、さらに細心の注意が払われなければならないだろう。

食事との関係において、嗜好傾向や試料採取前の食事について調べたわけであるが、PCB 濃度などとの関係ははつきり出なかった。この事に関連して薬師寺らの研究²⁴⁾があるが、よほど綿密な調査研究を行わないと明らかにならないようであった。

ま と め

血漿中 PCB による組織内に残留する PCB を量的、質的な両面から把握できるかどうかを明らかにすることを目的として本研究を行った。その結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 血漿中の PCB, β -BHC, pp'-DDE は体脂肪中のそれぞれの化合物の残留状態をよく反映していた。
- 2) PCB はじめこれらの有機塩素系化合物は、るい瘦群に高濃度であることを認めた。
- 3) PCB のガスクロマトグラムパターンは、PCB の種類、濃度、侵入経路および暴露期間といった暴露形式のちがいによつて異なつた。
- 4) 非常に高濃度の PCB を含んだ症例が 2 例あつた。1 例は血漿中濃度が 230 ppb で、職場における PCB 汚染によるものと思われた。他の 1 例は血漿中濃度が 92 ppb で、さらに pp'-DDE が 180 ppb で、 β -BHC が 430 ppb とすべて高く、衰弱によるものと思われた。

貴重な試料の提供をしてくださつた方々に深く感謝の意を表します。また、試料の採取にあつて協力してくださつた京都南病院（院長・笹井外喜雄 博士）、堀川病院（院長・竹沢徳敬 博士）、久留米大学医学部第一外科、第一内科、小児科の各教室の諸先生ならびに国立療養所敦賀病院の吉光外宏先生にお礼を申し上げます。分析にあつて援助していただいた環境衛生学教室の諸氏に感謝します。

文 献

- 1) 秋山和幸、藤谷和正、野牛 弘、大井 玄：母体血および臍血中 PCB の測定。日衛誌 30: 127,

- 1975.
- 2) Biros, F. J., Walker, A. C. and Medbery, A.: Polychlorinated biphenyls in human adipose tissue. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 5: 317-323, 1970.
- 3) 原 一郎, 原田 章, 木村真次ほか: コンデenser工場における PCB 使用中止後の追跡検診 (第1報). 第47回日本産業衛生学会講演集. 331-332, 1974, 名古屋.
- 4) Hesselberg, R. J. and Scherr, D. D.: PCBs and pp'-DDE in the blood of cachectic patients. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11: 202-205, 1974.
- 5) 日高公雄, 大江 武, 藤原邦達: 母乳中 PCB および有機塩素系農薬. *医学のあゆみ* 82: 519-520, 1972.
- 6) Holden, A. V. and Marsden, K.: Single-stage clean-up of animal tissue extracts for organochlorine residue analysis. *J. Chromatog.* 44: 481-492, 1969.
- 7) Hunter, C. G. and Robinson, J.: Pharmacodynamics of Dieldrin (HEOD). *Arch. Environ. Health* 15: 614-626, 1967.
- 8) Inoue, Y., Abe, S., Esaki, H. and Takamatsu, M.: Polychlorinated biphenyls in human blood. *Kurume Med. J.* 20: 83-86, 1973.
- 9) 井上義人, 阿部純子, 高松 誠: 農村主婦の血液中, 母乳中の有機塩素系農薬の残留量について. *農村医学* 23: 396-397, 1974.
- 10) Jensen, S.: The PCB story. *Ambio* 1: 123-135, 1972.
- 11) 川西正祐, 佐野晴洋, 水谷民雄, 松本正義: PCB による実験的ポルフィリン症. *日衛誌* 28: 84, 1973.
- 12) Koeman, J. H. and van Genderen, H.: Tissue levels in animals and effects caused by chlorinated hydrocarbon insecticides, biphenyls and mercury in the marine environment along the Netherlands' coast. *FAO FIR: MP/70/E-21*, 1970.
- 13) 増田義人, 香川梨絵, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人体内のポリ塩化ビフェニール. *福岡医誌* 65: 17-24, 1974.
- 14) 箕輪真一, 高松熙内, 黛 なつ, 宮下弘子: 成人の標準体重に関する研究. *日医事新報* No. 1988: 24-28, 1960.
- 15) 水谷民雄, 松本正義, 藤原邦達: 塩化ビフェニル (PCB) および有機塩素系農薬の人体脂蓄積. *医学のあゆみ* 81: 666-667, 1970.
- 16) Morgan, D. P. and Roan, C. C.: Chlorinated hydrocarbon pesticide residue in human tissues. *Arch. Environ. Health* 20: 452-457, 1970.
- 17) 中島裕而, 星出道代, 梅田玄勝ほか: ヒトの血液及び組織中の PCB 測定. 第47回日本産業衛生学会講演集. 258-259, 1974, 名古屋.
- 18) Radomski, J. L., Deichmann, Wm. B., Rey, A. A. and Merkin, T.: Human pesticide blood levels as a measure of body burden and pesticide exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20: 175-185, 1971.
- 19) Robinson, J., Baldwin, M. K., Crabtree, A. N. and van Dijk, M. C.: Organochlorine insecticides: Concentrations in human blood and adipose tissue. *Arch. Environ. Health* 13: 558-563, 1966.
- 20) 相模成一郎: 慢性 PCB 中毒症の1例. *西日皮膚* 36: 656-661, 1974.
- 21) 佐藤光男, 長谷川弘道: 労働者の血液中 PCB 量について. 第47回日本産業衛生学会講演集. 329-330, 1974, 名古屋.
- 22) 高松 誠, 井上義人, 阿部純子: 血液中 PCB の診断学的意義. *福岡医誌* 65: 28-31, 1974.
- 23) de Vlieger, M., Robinson, J., Baldwin, M. K., Crabtree, A. N. and van Dijk, M. C.: The organochlorine insecticide content of human tissues. *Arch. Environ. Health* 17: 759, 767, 1968.
- 24) 薬師寺積ほか: 母乳, 血液, 食餌中の PCB 分布調査. *日本公衛誌* 20: 417, 1973.

油症患者における血清酵素化学的異常とくに RNA 分解酵素を中心に

九州大学医学部第二内科学教室 (主任 尾前照雄教授)

山 中 正 義・赤 木 公 博

平 尾 修 恭・村 井 宏 一郎

Abnormality of Serum Enzyme in PCB Poisoning Patients with Special Reference to Ribonuclease

Masayoshi YAMANAKA, Kimihiro AKAGI,
Nobuyuki HIRAO and Koichiro MURAI

*Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Kyushu University Fukuoka 812, Japan*

Serological enzyme analysis was performed on 101 sera of patients with PCB poisoning, including RNase, GOT, LDH and alkaline phosphatase. The means $\pm$ SD of RNase activity in young (under 40 yr) and old (above 41 yr) patients were 194 ± 51 and 220 ± 50 , whereas those in each healthy control group were 142 ± 26 and 162 ± 39 , respectively. The enzyme levels in both groups of PCB poisoning were highly significant statistically compared with those of normal subjects ($p<0.005$). The respective abnormal elevation of GOT, LDH and alkaline phosphatase was observed in 6.4, 7.3 and 9.0% of the cases examined. The mean values of abnormal GOT, LDH and alkaline phosphatase activities were 64.8 ± 41.3 (mU/ml), 254 ± 41.5 (mU/ml) and 169 ± 27.9 (mU/ml), respectively. Electrophoretic analysis of alkaline phosphatase on agar gel indicated a single active band of hepatic origin.

油症患者の血清酵素化学的異常として、GOT, LDH, アルカリ性フォスファターゼの上昇が報告されているが¹²⁾, その上昇はいずれも軽度で、大部分の患者では正常範囲にとどまっている。肝臓の光顕的組織所見でも、特別な異常はみられていない⁷⁾。奥村らは¹²⁾, 油症重症患者に血清鉄の低下と銅の上昇を観察し、本症の消耗性疾患としての可能性を示唆している。

そこでわれわれは、白血病⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾, 癌³⁾⁶⁾¹⁹⁾, 腎不全⁴⁾⁸⁾¹⁶⁾などの消耗性疾患で血清 RNA 分解酵素 (以下 RNase) が著明に上昇する知見に基づき、油症患者で本酵素活性を測定し、さらに血清 GOT, LDH およびアルカリ性フォスファターゼ活性についても検討を加えた。

対象ならびに方法

対象は昭和 49 年 1 月に行われた油症追跡調査受診

者のうち、血清 RNase を測定した 101 症例 (福岡地区: 61 人, 北九州地区: 17 人, 久留米地区: 11 人, 大牟田地区: 9 人, 田川地区: 3 人) である。対照として、九州大学職員およびその家族から採血を行った。

血清 RNase の測定は、Anfinsen ら²⁾の方法を改良して使用した。基質としてイースト RNA (Sigma 社) を、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) で 3 日間氷冷中で透析し、0.5% 溶液として用いた。反応は RNA 溶液 1 ml に血清 50 μ l を加え、37°C, 30 分間インキュベートしたあと、0.5% 酢酸ウラニルを含む 3% 過塩素酸を 0.2 ml を加えて反応をとめた。氷冷中に 10 分間放置してから、2,000 $\times$ g で 5 分間遠心後、その上清 0.2 ml を 3 ml の蒸留水で稀釈し、石英セルで 260 nm の吸光度を測定した。この条件下で血清 RNase は、 A_{260nm} が 0.45 まで直線的に RNA を水解する。

血清 GOT, LDH およびアルカリ性フォスファターゼは、九州大学医学部中央検査部で測定した。アルカリ性フォスファターゼのアイソザイムの分析は、鈴木ら¹⁸⁾の方法によった。

成 績

血清 RNase 活性を油症患者 101 人と対照 67 人について、平均値 $\pm$ SD を示したものが表 1 である。血清 RNase 活性は、年齢によって増減を示すことより¹⁾、40 才以下の若年群と 41 才以上の高年群にわけて比較検討した。表 1 に示すように両群とも対照に比し有意に高値をとっている。すなわち対照若年群では、RNase 活性は 142 ± 26 ($n=32$) であるのに対し、油症患者では 194 ± 51 ($n=57$) であつた。高年群では、対照の RNase 活性が 162 ± 39 ($n=35$) を示し、油症患者では 220 ± 50 ($n=44$) であり、40 才以下および 41 才以上の両群ともに対照群と油症患者との RNase 活性の差は有意であつた ($P<0.005$)。

表 2 には、血清 GOT, LDH およびアルカリ性フォスファターゼを測定した患者のうち、異常値をとったものの割合およびその平均値 $\pm$ SD を示した。さらにアルカリ性フォスファターゼ高値を示した 7 人のうち 4 人のアイソザイムパターンを示した。アルカリ性フォスファターゼについては、成長期にある若年者

ではしばしば高い活性を示すのでここでは 20 才以上の患者についてのみ検討した。

GOT, LDH およびアルカリ性フォスファターゼの異常は、それぞれ 6.4%, 7.3%, 9.0% の患者にみられたが、その上昇はいずれも軽度であつた。アルカリ性フォスファターゼのアイソザイムは、いずれもⅡ分画(肝源性)のみを認め、約 6 年前に行つた奥村ら¹²⁾の報告と一致する。さらに GOT, LDH, アルカリ性フォスファターゼ活性と血清 RNase 活性をそれぞれ対比してみたが、相互間に有意の相関性はみられなかつた。

考 察

油症患者を内科的見地から観察すると、特徴的な理学的所見に乏しく、症状も易疲労感、頭痛、手足のシビレ感、関節痛、せき、たんなどと多彩である。血清酵素化学的にも異常を示すものは少なく GOT, LDH, アルカリ性フォスファターゼなどの異常を認めた症例においても、肝胆道系の一疾患単位としては把握するのが現状である。われわれは油症患者において血清 RNase が健常成人に比し有意に高値を示すことを観察したが、本酵素活性の上昇を来す他の疾患を否定したうえで、諸種臨床所見とともに血清 RNase 活性を測定することは油症を観察する上で参考になるであらう。

Table 1. Serum RNase in patients with PCB poisoning

Group	Subject	No. of case	Mean age	RNase activity ($A_{260nm} \times 10^3$)
Under 40 yr	PCB poisoning	57	22	$194 \pm 51^*$
	Control	32	27	$142 \pm 26^*$
Above 40 yr	PCB poisoning	44	51	$220 \pm 50^{**}$
	Control	35	52	$162 \pm 39^{**}$

Mean values $\pm$ SD were presented. * $p<0.005$, ** $p<0.001$.

Table 2. Serum GOT, LDH and AIP in patients with PCB poisoning

Enzyme	Normal range	Total No. of case	Abnormal subject		
			No. of case	Mean $\pm$ SD	Isozyme
GOT	<40 (mU/ml)	94	6 (6.4%)	64.8 ± 41.3	
LDH	100—225 (mU/ml)	96	7 (7.3%)	254.0 ± 41.5	
AIP	30—125 (mU/ml)	78	7 (9.0%)	169.7 ± 27.9	hepatic origin*

* 4 of 7 sera were analyzed for isozyme.

う。

血清 RNase の上昇機序については不明な点が多いが、細胞の破壊⁶⁾⁸⁾¹⁷⁾、尿中への排泄障害⁸⁾¹⁴⁾、その他の諸説¹⁾⁵⁾¹⁵⁾が考えられている。Albanese¹⁾によると、窒素出納が負になった場合に RNase が血中に上昇するとしている。臨床的にはつきりしているのは、悪性腫瘍、腎不全などの消耗性疾患で著明に上昇することである。

今回われわれは油症患者において本酵素活性の上昇を認めたが、その上昇機序については不明である。PCB 中毒発生以来6年を経過した今日では、当初摂取された PCB は相当量体外に排泄され、体内蓄積はかなり低くなっているものと考えられる。しかしながら、増田ら¹¹⁾¹³⁾によると、現在でも油症患者の血中 PCB 濃度は健常人の約2~3倍高い。油症患者において、悪性腫瘍、腎不全などの疾患が認められないにもかかわらず、血清 RNase が上昇していることは、なお体内に蓄積している PCB が、catabolic に作用している可能性がある。今後長期的に本酵素活性の変動を追跡することが必要であろう。

総 括

昭和49年1月に施行した油症追跡調査で受診した油症患者のうち101名について、血清 RNase 活性を測定した。さらに血清 GOT, LDH, アルカリフォスファターゼ活性とそのアイソザイムについて検討した。

1) 血清 RNase は、油症患者において、若年群(40才以下)、高年群(41才以上)ともに、健常成人の対照に比し有意の上昇を示した($P < 0.005$)。

2) GOT, LDH, アルカリ性フォスファターゼ活性の上昇は、それぞれ油症患者の6.4%, 7.3%, 9.0%にみられたが、その上昇はいずれも軽度であった。

3) 油症患者のアルカリフォスファターゼアイソザイムの分析では、肝源性分画のみが認められた。

文 献

- 1) Albanese, A. A., Lorenze, E. J., Orito, L. A., Wein, E. H., Zavattaro, D. N. and Carlo, R. D.: Nutritional and metabolic effects of some newer steroid. VI. Serum ribonuclease. *New York State J. Med.* 19: 1595, 1972.
- 2) Anfinsen, C. B., Redfield, R. R., Choate, W. L., Page, J. and Carrol, W. R.: Studies on the cross structure, crosslinkages, and terminal sequences in ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 207: 201, 1954.
- 3) Chrestien, P. B., Matthews, W. and Twomey, P. L.: Serum ribonucleases in cancer: relation to tumor histology. *Cancer* 31: 175, 1973.
- 4) Connolly, J. H., Herriott, R. M. and Gupta, S.: Ribonuclease in normal and uraemic human blood. *Brit. J. Exp. Path.* 43: 402, 1962.
- 5) Delaney, R.: Chemical, physical and enzymatic properties of several human ribonucleases. *Biochemistry* 2: 438, 1963.
- 6) Fink, K., Adams, W. S. and Skoog, W. A.: Serum ribonuclease in multiple myeloma. *Amer. J. Med.* 50: 450, 1971.
- 7) 平山千里, 入佐俊武, 山元寅男: 油症患者肝臓の形態学的所見. 福岡医誌 60: 455, 1969.
- 8) Houck, J. C. and Berman, L. B.: Serum ribonuclease activity. *J. Appl. Physiol.* 12: 473, 1958.
- 9) Levy, A. L. and Rottino, A.: Effect of disease states on the ribonuclease concentration of body fluid. *Clin. Chem.* 6: 43, 1960.
- 10) Mansson, P. E., Deutsh, A. and Nordon, A.: Ribonuclease-ribonuclease inhibitor patterns in lymphocytes of chronic lymphocytic leukaemia. *Scand. J. Haemat.* 12: 284, 1974.
- 11) 増田義人, 香川梨絵, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニール. 福岡医誌 65: 25, 1974.
- 12) 奥村恂, 勝木司馬之助: いわゆる油症(塩化ビフェニール中毒)の臨床的研究. とくに内科的所見について. 福岡医誌 60: 440, 1969.
- 13) 奥村恂, 増田義人, 中牟田澄子: 油症患者における血中 PCB と血清トリグリセライドとの関係. 福岡医誌 65: 84, 1974.
- 14) Rabinovitch, M. and Dohi, S. R.: Increase in serum ribonuclease activity after bilateral nephrectomy. *Amer. J. Physiol.* 187: 525, 1956.
- 15) Rabinovitch, M.: Plasma ribonuclease uptake by rat kidney cortex. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100: 865, 1959.
- 16) Rabinovitch, M., Liberman, B. and Fausto, N.: Plasma ribonuclease activity in human uremia. *J. Lab. Clin. Med.* 53: 563, 1959.
- 17) Roth, J. S.: The effect of feeding α -acetylaminofluorene on ribonuclease activity in the serum and liver mitochondria of rats. *Cancer Res.* 17: 991, 1957.
- 18) 鈴木宏, 飯野四郎, 織田敏次: 血清アルカリフォスファターゼアイソエンザイムの測定法とその臨床的意義. 内科 24: 43, 1969.
- 19) Zytka, J. and Cantero, A.: Serum ribonuclease in patients with malignant disease. *Canad. Med. Ass. J.* 86: 482, 1962.

油症 (PCB 中毒) 患者における血清 トリグリセライドの6年間の推移

福岡大学医学部第一内科学教室 (主任 奥村 恂教授)

奥 村 恂

九州大学医学部第二内科学教室 (主任 尾前照雄教授)

山 中 正 義・中牟田 澄 子

熊本大学体質医学研究所成人体質学研究部 (主任 鵜沢春生教授)

鵜 沢 春 生

Consecutive Six Year Follow-up Study on Serum Triglyceride Levels in Patients with PCB Poisoning

Makoto OKUMURA

*First Department of Internal Medicine, Fukuoka
University Medical School*

Masayoshi YAMANAKA, Sumiko NAKAMUTA

*Second Department of Internal Medicine, Faculty of
Medicine, Kyushu University*

Haruo UZAWA

*Department of Geriatrics, Institute of Constitutional Medicine,
Kumamoto University, Japan.*

Serum triglyceride (TG) concentrations of 40 subjects (14 males and 26 females) with PCB poisoning were determined at least once a year for 6 years successively from the onset of poisoning in 1969. The determination of TG was carried out under the supervision of cooperative triglyceride standardization program, Georgia, U. S. A. Total number of determinations of serum TG was 219 in 1969, 166 in 1970, 206 in 1972, 75 in 1973, and 46 in 1974, respectively.

In male subjects, the mean values and standard deviations of the results (mg/100 ml) were 159 ± 57 in 1969, 166 ± 55 in 1970, 169 ± 60 in 1971, 174 ± 69 in 1972, 164 ± 68 in 1973, and 160 ± 118 in 1974. No significant change was observed in these values for 6 year follow-up study. Contrarily, in female subjects, values obtained in these 6 years were 155 ± 75 , 161 ± 70 , 155 ± 80 , 153 ± 63 , 129 ± 50 , and 111 ± 56 , respectively. The differences of mean values between 1973 or 1974 and those of 1969 to 1972 were found to be statistically significant. It was suggested that serum TG levels of female subjects with PCB poisoning are decreasing gradually, though those of males still remain in elevated levels through out the term of this study. The mechanism underlying these sex differences is yet to be elucidated.

昭和43年に九州北部を中心に集団発生をみた、いわゆる油症 (塩化ビフェニールあるいは PCB 中毒) も発生以来すでに7年を経過した。本中毒患者は定型的な皮膚症状を伴って発症し、多彩な症状がある。その後の経過とともに皮膚症状は軽快しつつある印象を

受けるが、なおいくつかの愁訴は持続しているものも多い。検査所見では当初から血清中の高グリセライドが目ざされ¹⁾²⁾³⁾、3年間の観察ではほとんど低下傾向がみられないことを先に報告した⁴⁾。

今回は、油症患者のうち発生以来6年にわたり、少

なくとも年に1回は血清トリグリセライド(以下TG)値を定量し得た40例について、この間の推移について検討した成績を述べる。

対象ならびに方法

九州大学医学部附属病院油症外来を受診した患者、および毎年行われる油症追跡検診を受診した本症患者

のうち、1969年より1974年の6年間に、毎年少なくとも1回は血清TGの定量を行い得たものは40例であった。性別は男14例、女26例で初診時の年齢の平均値は男42.0才、女33.4才であった。

血清TGの定量回数は1969年計219回、1970年166回、1971年206回、1972年135回、1973年75回、1974年46回であった(Table 1)。

Table 1. Serum triglyceride levels in forty patients with PCB poisoning

	Case No.	Name	Age	Triglyceride (mg/100 ml)					
				1969	1970	1971	1972	1973	1974
Male	1	Y. K.	11	106(2)	155	125(5)	118(3)	186	236
	2	H. Y.	13	237	97	128	152(2)	141	124
	3	K. K.	32	200	70	123	89	61	33
	4	M. K.	35	182(3)	181(5)	161(6)	197(3)	121(2)	132
	5	K. F.	38	264(4)	184(3)	297	291(3)	180	159
	6	T. S.	39	86(2)	96(7)	98(9)	118(5)	151(3)	53
	7	M. S.	41	84(2)	172	90	65	91(2)	78
	8	A. M.	44	120(6)	199(8)	209(6)	194(4)	204(2)	102
	9	H. M.	44	212(8)	260(6)	202(4)	260(3)	353(2)	488
	10	C. K.	48	153(3)	259(7)	256(5)	232(3)	195	305(2)
	11	T. H.	55	164(11)	166(5)	211(8)	166(5)	149(2)	122
	12	M. K.	55	163	170(3)	160(6)	131(6)	132(3)	121
	13	M. K.	60	162(8)	130(2)	155(6)	262(2)	182	188
	14	U. T.	73	89(10)	186(8)	145(9)	160(2)	146(4)	95
Female	15	K. M.	7	389(5)	296(6)	217(5)	275(5)	133	127
	16	M. K.	9	185(3)	206(8)	171(8)	159(5)	98	80
	17	M. S.	9	98(2)	117(3)	65(2)	82(3)	68	82
	18	K. M.	12	279(6)	312(5)	258(4)	197(2)	226(2)	204
	19	Y. S.	14	148(2)	130	101(3)	137(2)	81(3)	57
	20	H. H.	14	94	216	135	244	111	65
	21	N. K.	14	190(4)	69	133	124	254	127(2)
	22	K. M.	15	162(2)	147(2)	158(2)	173	112(2)	95
	23	M. K.	20	159(3)	130(2)	113(2)	102(2)	119(2)	75
	24	M. M.	29	141	105	76	98	90	49
	25	K. T.	32	139(2)	165(8)	137(2)	146	118	90(2)
	26	M. Y.	35	80	61	63(2)	61(3)	51	67
	27	Y. M.	37	253(17)	246(16)	260(20)	225(11)	185(4)	135
	28	T. U.	38	191(3)	222	130	157	99	132
Female	29	A. K.	40	136(9)	126	153	135	137(2)	93(2)
	30	M. S.	40	112(8)	136(4)	129(3)	105(5)	110(2)	86
	31	C. M.	44	240(7)	281(5)	450	307(2)	208(2)	264(2)
	32	T. K.	44	106(2)	135(4)	142(5)	126(3)	135	117(2)
	33	K. K.	46	155(21)	146(12)	159(34)	171(17)	171(5)	199
	34	N. N.	46	101(2)	67	103	62	64	37
	35	K. K.	48	214(18)	172(8)	179(14)	169(10)	165(3)	193
	36	A. N.	49	49	71	64(2)	62(2)	78	68
	37	M. T.	54	101(6)	177(4)	212(9)	221(5)	165(4)	139
	38	H. H.	56	131(12)	186(2)	171(9)	146(2)	126(3)	173
	39	A. T.	57	100(12)	178(5)	167(5)	150(4)	142(2)	61
	40	S. M.	59	72(7)	89(5)	95	135	98	78
Total	Mean	S.D.	42.0	(62)	(58)	(67)	(43)	(26)	(15)
				159	166	169	174	164	160
Total	Mean	S.D.	33.4	(157)	(108)	(139)	(92)	(49)	(31)
				155	161	155	153	129*	111*
Total	Mean	S.D.	33.4	75	70	80	63	50	56

Number of determination is shown in parentheses. *Mean values of 1973 and 1974 are significantly lower ($p < 0.05$) than those of 1969, 1970, 1971, and 1972.

採血はできるだけ午前中空腹時に肘静脈より採血し、血清分離後は冷凍保存し、定量に臨んで融解した。TG の定量はすでに報告した方法⁵⁾を用いた。本法による正常値は 74 ± 29 である。同一例について、同一年に 2 回以上の血清 TG を測定した場合には、その年の平均値をもってその症例の TG 値とした。

成 績

成績は Table 1 に示すとおりである。対象 40 例を男子 14 例と女子 26 例とにわけて、各年度における血清 TG 値の平均値および標準偏差 (S. D.) を観察した。同一症例についてみると、各年度内に多数回定量の行われたものは、個々の値には相当なばらつきがみられることはすでに述べたとおりである。しかし各年度の平均値は近似したものが多く。

男子 14 例の各年度の推移をみると、下降傾向のみられるものは症例 No. 2, 3, 4, 5, 11, 12 などであり、上昇傾向のみられるものは症例 No. 1, 9, 10 などであるが、14 例の平均値でみるとこの 6 年間の推移は 159, 166, 169, 174, 164, 160 mg/100 ml でほとんど変化がみられない。

一方女子 26 例については、年度ごとに大きな変動を示す No. 19, 21, 37 などの症例もみられるが、1973 年, 1974 年では低下傾向を示すものが過半数である。その年度平均値をみると、155, 161, 155, 153, 129, 111 mg/100 ml であり、1973 年, 1974 年度の平均値は、その前年度までのどの値よりも有意に ($P < 0.05$) 低下している。女子の値は各年度とも男子に比べるとやや低目に経過しているが、最後の 2 年の平均値は同年度の男子の値に比べても明らかな低値を示した。このような 1974 年度の女子平均 TG 値の 111 mg/100 ml も、1969 年当時の正常値である 74 ± 27 mg/100 ml⁵⁾ に比べると、現在もなお正常上界領域にあるということがわかる。

考 察

血清トリグリセライド (TG) が、異常高値を示すという事実は、PCB 中毒の発症当時から特異な生化学検査所見として注目されてきた^{1)~4)}。われわれは先に PCB 中毒発症以来の 3 年間は、血清 TG は高い値を維持し、その間認むべき低下を示さないことを述べた⁴⁾。さらに著者らは、血清 TG 値が、本症の原因中毒物質と考えられる PCB (カネクロール) の血中濃度とよく相関することを報告した⁶⁾。このようなことから、本症における血清 TG 値の変動は、本症の

病態の一面を反映していると考えることができよう。

血清 TG が高値を持続することには多くの要因が想定されるが、PCB 中毒における機序については、ほとんど解明されていないのが現状である。油症発症と同時に、カネクロール中毒によつて生体内 TG の代謝機構のどこかに容易にはもとに戻らない変化が生じていることを推測するにとどまっている⁴⁾。

著者らの一人鶴沢らは⁷⁾、熊本県の一般住民について、肥満、高血圧、尿糖陽性、心電図異常、肝機能検査異常 (ただし総ビリルビン、GOT, CCLF およびアルカリ性フォスファターゼ) のいずれか一つあるいはそれ以上をもつものを除外したものをいわゆる健常者とした場合の TG 値を、本研究と同じ定量法で検討した。その結果は、TG は男子では年令にかかわらずほぼ一定であり、20 才から 69 才の間ではその平均値は 120 から 140 mg/100 ml の範囲内にあつた。これに対して女子では 20 才台後半において最低値をとり (103 mg/100 ml)、その後は 50 才台後半の 140 mg/100 ml まで年令とともにほぼ直線的に上昇していた。

これらの成績から、今回対象とした PCB 中毒症例における血清 TG の 6 年間の変化をみると、男子では高いレベルのまま経過しているということが出来る。これに対して女子の平均値については、1972 年に比べて 1973 年、さらに 1973 年に比べて 1974 年度とそれぞれ有意の低下傾向がみられた。すなわち、女子では最初はもちろん高いレベルにあつたものが、6 年間に一般女子にみられる傾向とは逆に、低下したということができる。

このような男女間にみられる経年変化が、どのような機序によるものか、その解釈は今後の問題であろう。症例に限られているため、PCB 中毒一般について言及することはできないが、持続的に高いレベルにあつた血清 TG が一部の例で下降傾向を示したことは、本症の病態の経過からいえば好ましい現象といえよう。

総 括

油症 (PCB 中毒) 患者のうち、血清トリグリセライド (TG) 値の定量を発症直後の 1967 年以来 6 年間にわたつて、毎年少なくとも 1 回以上実施しえた症例は 40 例であつた。この 40 例のうちわけは、男子 14 例、平均年令 42.0 才と女子 26 例、平均年令 33.4 才であつた。

男子の血清 TG 値の平均値の 6 年間の推移は 159, 166, 169, 174, 164, 160 mg/100 ml でほとんど変

動はみられず高いレベルのまま経過している。これに対し女子の6年間の推移は 155, 161, 155, 153, 129 111 mg/100 ml で, 1973 年と 1974 年の平均値はそれ以前のものより有意の低下傾向がみられた。このような男女間にみられた経年的変化の機序の解明は今後に残された問題であろう。

資料整理にご協力いただいた福岡大学医学部総合研究室西田香苗さんに感謝する。

文 献

- 1) 奥村 恂, 勝木司馬之助: いわゆる油症(塩化ビフェニール中毒)の臨床的研究, とくに内科的所見について. 福岡医誌 60: 440-446, 1969.
- 2) 鵜沢春生, 伊東靖夫, 納富昭光, 勝木司馬之助: 塩化ビフェニールによる高グリセライド血症. 福

岡医誌 60: 449-454, 1969.

- 3) 鵜沢春生, 伊東靖夫, 納富昭光, 堀 澄子, 池浦泰子, 勝木司馬之助: 塩化ビフェニールによる高グリセライド血症の臨床的および実験的研究. 福岡医誌 62: 66-73, 1971.

- 4) 鵜沢春生, 納富昭光, 中牟田澄子, 池浦泰子: 油症患者における血清トリグリセライドの3年間の推移. 福岡医誌 63: 401-404, 1972.

- 5) 鵜沢春生, 中牟田澄子: トリグリセライド. 臨床化学 1: 35-41, 1971.

- 6) 奥村 恂, 増田義人, 中牟田澄子: 油症患者における血中 PCB と血清トリグリセライドとの関係. 福岡医誌 65: 84-87, 1974.

- 7) 中村孝久, 鵜沢春生: Current status of serum total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) in Japanese. 第10回国際栄養学会, 京都, 1975.

九州大学附属病院油症外来患者の血中 PCB と臨床症状との関係

九州大学医学部皮膚科学教室（主任：占部治邦教授）

幸 田 弘

第一薬科大学物理分析学教室（主任教授）

増 田 義 人

Relation between PCB Level in the Blood and Clinical Symptoms of Yusho Patients

Hiromu KōDA

*Department of Dermatology (Director: Prof. H. Urabe),
Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka, Japan*

Yoshio MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka

Blood PCB levels and clinical symptoms were studied in 72 patients with Yusho who had visited at the outpatient department of Kyushu University during April 1973 to March 1974. Blood PCB was analysed with gas chromatography.

Patterns of PCB on gas chromatogram were classified in three types, type A and B which were peculiar to Yusho patients and type C which showed similar pattern to controls. The mean value of blood PCB levels of 72 patients was 5.9 ± 4.5 S. D. ppb. The mean $\pm$ S. D. of PCB levels of type A group composed of 43 patients (59.7 %) was 7.2 ± 4.9 ppb, that of type B group composed of 26 patients (36.1 %) was 4.3 ± 3.1 ppb, whereas that of type C group composed of 3 patients (4.2 %) was 1.7 ± 0.2 ppb.

Clinically, dermatological symptoms were mostly observed in type A group. Type C group hardly showed such symptoms. General signs such as fatigue and headache were noticed on patients with any types of PCB pattern. Same type of PCB pattern in all of the family members was observed in 15 families out of 21 families.

われわれは、昭和48年4月より九大附属病院油症外来患者の血中 PCB の測定を行っているが、その中の油症認定患者について、血中 PCB 濃度と臨床症状とくに皮膚症状との関連を調査し、一応まとめることができたので報告する。

血中 PCB 濃度測定

(1) 対 象

昭和48年4月より1年間に九州大学附属病院油症外来を受診した油症認定患者の72名である。なお油症を心配して来院した9名（非油症患者）についても測定したので、その結果も附記する。

(2) 材 料

PCB 分析用にとくに洗浄したガラス製注射器およ

び瓶を用いて採血し、その血液10gを使用した。

(3) 分析方法

分析方法の詳細については増田ら¹⁾がすでに報告しているもので、それにゆずり、ここでは大略を簡記するにとどめる。

採血した全血10gに10mlのエタノールおよび水酸化ナトリウム2gを加え、1時間加熱する。冷却後ヘキサン10mlで3回抽出し、ヘキサン層を集め、芒硝で乾燥後、シリカゲル1gのカラムを通す。カラムはさらにヘキサン50mlで溶出、さきのヘキサンと合して濃縮し、ガスクロマトグラフ（電子捕獲型検出器付）で分析する。カラムは5% SE-30を使用した。PCBはカネクロール500+600（1:1）を標準物質とし、全ピーク高の和により定量した。

(4) 判 定

油症患者のガスクロマトグラムのパターンを増田ら¹⁾に従いつぎの3種に分類した。

タイプ A……油症患者に特有のパターン

℥ B……タイプ A に近いもの

℥ C……一般人と見分けのつきにくいもの

(5) 結 果

油症認定患者 72 名および非油症患者 9 名の測定結果は Table 1 にまとめた。油症患者すべての平均値は 5.9 ± 4.5 ppb であった。なお非油症患者 9 名ではすべてが C パターンを示し、PCB 濃度は平均値 2.1

± 0.8 ppb で、油症患者の平均値に比べるとかなりのひらきがある。

血中 PCB 濃度と臨床症状

(1) A, B, C パターンと各臨床症状の発現頻度
油症患者検診票の各項目について、A, B, C パターン別に発現頻度をみた (Table 2)。なお臨床症状は PCB 測定時の症状である。

他覚的所見が主となる皮膚症状 (色素沈着, 瘰癧様皮疹, 面皰, 化膿傾向, 爪変形, 脱毛, 歯牙異常および眼脂過多) では、いずれの症状も A パターンの方が

Table 1. PCB in the blood of Yusho patients and others

Group	Pattern	PCB concentration (ppb)																Total number (%)	Average conc. (ppb)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	17	18	26			
Yusho patients	A		1	7	8	2	5	6	5	2	1		2	1	2	1	43(59.7)	7.2±4.9	
	B	1	5	9	5	1	1	1			1	1	1				26(36.1)	4.3±3.1	
	C	1	2														3(4.2)	1.7±0.2	
	A+B+C	2	8	16	13	3	6	7	5	2	2	1	3	1	2	1	72(100)	5.9±4.5	
Others	C	2	4	3													9	2.1±0.8	

Table 2. PCB pattern and incidence of clinical symptoms

Clinical symptoms		PCB pattern		
		A (43 cases)	B (26 cases)	C (3 cases)
Pigmentation	Skin	22(51)*	0	0
	Palpebra	31(72)	5(19)	0
	Gingiva	41(95)	15(58)	2(67)
	Nail	32(76)	9(35)	0
Acneform eruption		15(35)	0	0
Comedo		15(35)	6(23)	0
Infection of skin		14(33)	3(12)	0
Deformation of nail		28(65)	10(38)	0
Alopecia		0	1(4)	0
Disorder in teeth		8(19)	2(8)	0
Hypersecretion of Meibomian gland		40(93)	21(81)	3(100)
Fatigue		21(49)	15(58)	1(33)
Fever		1(2)	1(4)	0
Phymata in articular region		4(9)	2(8)	0
Cough and sputum		28(65)	12(46)	1(33)
Digestive disorder		15(35)	12(46)	2(67)
Headache		20(47)	9(35)	1(33)
Numbness of extremities		15(35)	8(31)	1(33)
Menstrual disturbance		5/17(29)	2/9(22)	

* Percent: e. g. 51%=(22/43)×100

Table 3. PCB pattern and grading of severity of skin manifestations

PCB pattern	Grading of severity (%)					Total (%)
	0	I	II	III	IV	
A	1(2)	16(37)	9(21)	8(19)	9(21)	43(100)
B	8(31)	12(46)	5(19)	1(4)	0(0)	26(100)
C	1(33)	2(67)				3(100)

Table 4. PCB pattern and severity point of general symptoms

PCB pattern	Severity point* (%)						Total case (%)	Average point
	0	1	2	3	4	5		
A	7(16)	7(16)	13(30)	5(12)	8(19)	3(7)	43(100)	2.2
B	4(15)	8(31)	5(19)	1(4)	6(23)	2(8)	26(100)	2.1
C	1(33)	1(33)				1(33)	3(100)	2.0

* Severity point was counted from five main symptoms: fatigue, cough and sputa, digestive disorder, headache, and neuropathy.

発現頻度が高いが、自覚的所見が主となる症状（全身倦怠感、発熱、関節部異常、咳嗽・喀痰、消化器症状、頭痛・頭重、末梢神経症状および月経異常）の発現頻度は、Aパターン、Bパターンの間に一定した傾向はみられなかった。Cパターンは3名のみであるが、皮膚症状はほとんどなく、内科的症状が主であった。

(2) A, B, Cパターンと皮膚重症度

A, B, Cパターンと皮膚重症度（利谷²¹⁾）との関係を調べた（Table 3）。0, I度はBパターンの方が多く、II度を境に逆転し、III, IV度の患者はAパターンでは20%前後みられるのに対し、Bパターンでは急激に減少しIV度は0%であった。

(3) A, B, Cパターンと全身症状重症度

A, B, Cパターンと全身症状との関係を調べた。全身症状の重症度を表す方法として、つぎの5つの症状を各1点とし、点数で表現した。

①全身倦怠感、②咳嗽・喀痰、③消化器症状、④頭痛・頭重、⑤末梢神経症状（手・足のしびれ感）。

Table 4はこれをまとめたものであるが、数字の分布および平均点数からみて各パターンと臨床症状との間に一定した傾向はみられない。

(4) 同一家族内A, B, Cパターンの一致率

油症はPCBがあやまつて混入した食用油を摂取したため発症したものであるため、同じ食事をする家族はほぼ同じパターンを示すことが想像される。油症患者72名中1家族2名以上のもの21家族について、家族内患者のA, B, Cパターンの一致率を調べた。A

パターンの家族9, Bパターンの家族5, Cパターンの家族1で、合計21家族中15家族が同一パターンを示した（一致率71.4%）。

か ん が え

ここでまとめた72名の油症患者は、多くのものが昭和44, 45年までに油症と認定されたもので、油症としての皮膚症状、臨床症状が明瞭であったものが多いと考えられる。

昭和48年すなわち油症事件発生後満5年を経過した段階で血中PCB濃度を測定して、はたしてどれだけの意義があるものか疑問であったが、臨床的にまた疫学的にはつきり油症と断定しうる油症認定患者と、非油症患者との間に明らかに差のみとめられたことは、油症患者体内からのPCB排泄の遅さ、困難さを示すものとしてきわめて重要な意味をもつものと考えられる。

まず血中PCB濃度についてみると、油症患者72名では1ppbから26ppbまであり、平均値5.9±4.5ppbとなつた。これは非油症患者9名の平均値2.1±0.8ppbにくらべると2～3倍の高値である。

つぎに油症患者の全血のガスクロマトグラムのパターンを一般人のそれと比較すると、ピーク1が低く、ピーク5が高い特有のパターンを示すものが多いことがわかつた。これは摂取したラيسオイル中の高沸点部分が依然としてそのまま残存するものと考えられる。油症患者のガスクロマトグラムを、油症に特有の

パターンを示すAパターン、これに近いものをBパターン、そして一般人と見分け難いものをCパターンとして分類してみると、Aパターンのものが43名(59.7%)と約2/3を占め、Bパターンのものが26名(36.1%)、Cパターンのものは3名(4.2%)にすぎなかった。

各パターン別に PCB 濃度の平均値をみると、Aパターン 7.2 ± 4.9 ppb, Bパターン 4.3 ± 3.1 ppb, Cパターン 1.7 ± 0.2 ppb となり、Aパターンのものは非油症患者の約3倍、Bパターンは約2倍、Cパターンは3名にすぎないが非油症患者と同濃度であった。すなわち72名の血中 PCB 測定値が示すかぎりでは、Aパターンのものが最も多く PCB を血中に残存し、また典型的な油症ガスクロマトグラムパターンを示し、Bパターンがこれに次ぎ典型的ではないが明らかに一般人より高い PCB 濃度と異なつたパターンを示し、Cパターンでは一般人と濃度もパターンも差がないという結果となつた。

血中 PCB 濃度および各パターンが油症の臨床症状といかなる関係があるかを知るために、油症患者検診票の各項目について発現頻度を調べた。一部のものは油症発症後すでに5年を経過し臨床症状もかなり軽快し消失しているものも多いが、臨床症状を大きく皮膚症状と全身症状とに分け、各パターン別に発現頻度をみた。

まず皮膚症状ではいずれの症状もAパターンのものがBパターンより高く、皮膚症状からだけでは、血中濃度の高いAパターンの方が臨床症状も重く、相関関係があるように思われるが、全身症状の方では各項目によつて違い、パターン別の一定した相関関係はみられなかつた。また皮膚症状の11症状を各パターン別に、患者が平均いくつの症状を有するかをみると、Aパターンでは6、Bパターンでは3、Cパターンでは2症状となり、明らかに血中 PCB 濃度と皮膚症状との間に相関関係があるように思われた。同様に全身症状についてみると、7症状のうちAパターン、Bパターン、Cパターンいずれも平均2症状となりまったく差がない結果となつた。

また皮膚重症度によつて患者を分類し、各パターン別に各重症度の発現頻度を比べてみたが、0、Ⅰ度ではBパターンが高く、Ⅱ度では逆転してわずかながらAパターンが高くなり、Ⅲ、Ⅳ度はBパターンでは急激に減少し、ほとんどのものがAパターンであつた。全身症状の重症度については従来とくにいわれていないので、主な症状の全身倦怠感、咳嗽・喀痰、消化器

症状、頭痛・頭重、末梢神経症状の5つをとりあげ各項目を1点として点数で表してみたが、各パターン別の一定した傾向はみられなかつた。4点、5点を示す患者がわずかながらBパターンに多くみられた。

皮膚症状は同一家族でも皮脂腺の発達している青壮年者に強く現れ、逆に全身症状は高齢者に強く出る傾向があるので、年齢を考えていない上記の統計だけで、血中 PCB 濃度と臨床症状との相関関係を云々するのは危険であるが、少なくとも皮膚症状に関しては、かなりはつきりした相関関係があるものといつてよいようである。

なお最後に同一家族内患者の各パターンの一致率であるが、21家族中15家族(71%)が同じパターンを示したことは、本症が食品によつておこつたものであることを裏書きするものであると同時に、血中 PCB のガスクロマトグラムによる分析がいかに正確であり、安定性のあるものかを示すものであるといえよう。Aパターンを示す家族内で出張が多く家族と同一の食事をとる機会の少ない主人のみがB～Cパターンを示し、皮膚症状も軽度であつた症例があつたが、血中 PCB 測定結果もそれを明瞭に示していたことは、はなはだ興味あることであつた。

む す び

昭和48年4月より約1年間に九州大学附属病院油症外来を訪れた油症認定患者72名の血中 PCB 濃度と、臨床症状との関係を調べた。油症患者の多くは昭和44、45年までに認定された患者である。油症患者72名の血中 PCB 濃度の平均値は 5.9 ± 4.5 ppb であつた。

A, B, C パターン別にみると、Aパターン43名(59.7%)で平均値 7.2 ± 4.9 ppb, Bパターン26名(36.1%)で平均値 4.3 ± 3.1 ppb, Cパターン3名(4.2%)で平均値 1.7 ± 0.2 ppb であつた。

臨床症状の発現頻度を各パターン別に比べてみると、皮膚症状はいずれの症状もAパターンが最も高く、ついでBパターン、Cパターンは3名と症例も少ないが、皮膚症状はほとんどみられなかつた。皮膚重症度についても比べてみたが、Aパターンでは0度はほとんどなく、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ度が平均していずれも20%前後にみられるのに対し、Bパターンでは0、Ⅰ度がきわめて高く、Ⅲ、Ⅳ度は4～0%であつた。

一方全身症状では各症状の発現頻度にA, B, C パターンで一定した傾向はなく、全身倦怠感、咳嗽・喀痰、消化器症状、頭痛・頭重、手・足のしびれ感を各

1点として全身症状の重症度を点数で表すと、A, B, C各パターンいずれも平均2点となり、それぞれのパターンの間に差はみられなかった。

72名の油症患者中1家族2名以上の家族が21家族あり、うち15家族71%が同じ血中PCBパターンを示した。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜った前九大油症治療研究班長占部治邦教授に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 増田義人, 他: 油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニール. 福岡医誌 65: 25-27, 1974.
- 2) 利谷昭治, 北村公一: 油症の臨床的観察, とくに皮膚所見とその後の経過. 福岡医誌 62: 132-138, 1971.

昭和 48 年度, 49 年度一斉検診における 油症皮膚重症度の変動と新しい 皮膚重症度評価試案

九州大学医学部皮膚科教室 (主任: 占部治邦教授)

旭 正 一・幸 田 弘

福岡大学医学部皮膚科教室 (主任: 利谷昭治教授)

利 谷 昭 治

Alteration in Skin Severity Grading of Yusho in the General Examination in 1973 and 1974, and Presentation of a New Standard for the Skin Severity of Yusho by Point Count System

Masakazu ASAH, Hiromu KōDA

*Department of Dermatology (Director: Prof. H. Urabe) Faculty
of Medicine, Kyushu University, Fukuoka, Japan*

Shoji TOSHITANI

*Department of Dermatology (Director: Prof. S. Toshitani) Faculty
of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan*

Alteration in skin severity grading index of Yusho was investigated by analysing the results of the general examination of Yusho in 1973 and 1974. In the 1973 examination, almost no change was found in the skin severity index and in the 1974 examination, this time about half number of the whole patient showed improvement more or less.

Some problems in the standard for skin severity grading of Yusho was discussed and the new tentative standard for the skin severity was presented. This new standard was characterized by its quantitative nature (point count system).

油症が発生してすでに7年近くが経過した。この期間に油症の皮疹がどのように経過してきたかについては、すでに4回にわたり本誌に報告してきたが^{2)~4)}、今回はこれに続いて昭和48年度、49年度の油症追跡調査の結果をまとめ、皮膚重症度の推移について考察するとともに、従来の皮膚重症度の評価基準の問題点をとりあげ、一つの改良案として、定量的表現の意味をもたせるように考慮した新しい点数方式の評価試案をのべる。

はじめに油症追跡調査(一斉検診)について、その施行年次などに分りにくい点があるので、これまでの実施状況を簡単に記すと、表1にみられるように、油症発生の昭和43年の翌年から始まり、年1回の割合ですでに6回行なわれているが、47年度以降は施行

が半年遅れて、翌年の1月に行つたかたちとなつてゐる。このため実施時期と表示年度に1年のずれが生じていて誤解しやすいが、ここでは県衛生部の通達に従い、公式の表示年度で示すことにした。

本来この検診は、油症発生後間もないころに、急死した症例が続いたりしたため²⁾⁵⁾、患者全員を検診して危険の予測される症例には至急に対策を講じようという目的で開始されたものであるが²⁾、その後急性中毒期をすぎて慢性中毒期に移行するにつれて、そのような緊急対策の意味は薄らぎ、患者の方の受診意欲が低下したこと、患者の一部に検診に対する強い不満が生じ受診拒否の動きが出てきたため、表1にみるように受診者数が47年度まで次第に減少してきた。48、49年度は再び増加する傾向にあるが、このように患

表 1. 油症追跡調査施行状況

年 度	実 施 時 期	受 診 者 数
44年度 (1969)	昭44年 8 月	352 名
45年度 (1970)	昭45年 8 月	205 名
46年度 (1971)	昭46年 8 月	129 名
47年度 (1972)	昭48年 1 月	89 名
48年度 (1973)	昭49年 1 月	119 名
49年度 (1974)	昭50年 1 月	148 名

者群のごく一部しか受診していないので、この検診結果をそのまま油症患者全体にあてはめてよいかどうかや問題であるが、おおよその傾向を推察するには十分なサンプル数であると考えられる。

48, 49年度検診結果について

47年度までの検診結果についてはすでに報告している^{2)~4)}、その後の追跡調査分についてまとめた。

まず48年度には119名の受診者があつたが（未認定者が少数受診したものは除外）、このうち前年度（47年度）にひきつづいて受診した60例について、前年度と比較して皮膚重症度がどのように変わったかを調べた。その結果は表2に示すとおり、変わりなし26例、改善（重症度が減少したもの）17例、増悪（重症度が増加したもの）17例で、全体としては停滞状態である。重症度1/2の差（たとえばⅢⅣ→Ⅲ）は診察医の主観による誤差範囲であるという可能性も考え、このようなものを除外してもこの傾向は変わらず、全体としては前年に比べて変化なしといつてよいだろう。

表 2. 昭和47年度と48年度の皮膚重症度の変動

変わりなし			改 善			増 悪		
昭47	昭48	例数	昭47	昭48	例数	昭47	昭48	例数
0→0	1		I→0	3		0→I	1	
I→I	13		I→0 I	3		I→II	5	
II→II	4		I II→0	1		I→I II	2	
III→III	5		II→0	1		I II→III	1	
IV→IV	3		II→I	2		II→III	4	
			II III→II	2		II III→III	1	
			III IV→II III	2		III→III IV	1	
			III IV→III	3		III→IV	2	
26 例			17 例			17 例		
(43.3%)			(28.3%)			(28.3%)		

次に49年度検診の受診者148名のうち、前年度（48年度）からひきつづいて受診した72例について同様の検討を行ったが、その結果は表3に示すように、われわれの予想とは異なり、改善のみられた症例が半数に達しており、増悪の方は比較的少数である。前年度の場合と同様に1/2度の差しかないものは「変わりなし」のほうへ組み入れてもこの傾向は変わらず、全体としては明らかに改善がみられたといつてよい。

表 3. 昭和48年度と49年度の皮膚重症度の変動

変わりなし			改 善			増 悪		
昭48	昭49	例数	昭48	昭49	例数	昭48	昭49	例数
0→0	1		0 I→0	1		0→I	2	
0 I→0 I	4		I→0	4		0→II	1	
I→I	7		I→0 I	4		0 I→II	1	
I II→I II	1		II→0	2		I→I II	1	
II→II	3		II→I	2		I→II	3	
III→III	3		II III→I II	2		II→II III	1	
IV→IV	5		II III→II	1		II→III	1	
			III→I	3		II III→III	1	
			III→I II	2		III IV→IV	1	
			III→II	7				
			III IV→III	1				
			IV→II	1				
			IV→II III	1				
			IV→III	4				
			IV→III IV	1				
24 例			36 例			12 例		
(33.3%)			(50.0%)			(16.7%)		

新しい皮膚重症度の評価試案

油症の皮膚重症度は、油症発生直後に五島¹⁾が判定基準を記載し（表4）、後に利谷²⁾が判定の便宜を考慮してやや簡略化した基準を作り（表5）、ほぼそれに基づいて用いられてきたが、簡単にいつて、色素沈着と面皰、痤瘡様皮疹の存在を指標とした定性的基準であり、皮疹の数や程度はほとんど考慮されていない。

この基準は、油症発生当時の、いいかえれば急性中毒期の皮疹の表現には非常によい評価法であつたと思われるが、今日のように慢性中毒期に移行して皮疹が少なくなり、程度が軽くなつてくると、皮疹の総合的表現として必ずしも適当とはいえない面が出てきた。

われわれはここ2、3年の追跡調査や九大油症外来

表 4. 油症の皮膚重症度基準原案（五島ら³¹⁾）

重症度	決 定 的 所 見	参 考 的 所 見
第 1 度 (ごく軽症)	マイボーム腺よりのチーズ様眼脂の排泄 色素沈着 (爪)	発汗過多 口腔粘膜歯肉の色素沈着 皮膚の乾燥
第 2 度 (軽 症)	面 皰	関節部四肢伸側の毛孔性角化
第 3 度 (中 等 症)	痤瘡様皮疹 外陰部脂線に一致した囊腫 頸部, 頂部, 前胸部の毛孔の著明化	眼瞼の腫脹 関節部の腫脹
第 4 度 (重 症)	全身の毛孔の著明化 広汎に分布する痤瘡様皮疹	顔面, 下腿の腫脹 高度の二次感染

表 5. 簡略化した油症の皮膚重症度基準
(利谷ら²¹⁾)

0 度	皮膚症状がほとんどなく, 内科的訴え のみのもの
1 度	主として色素沈着 (皮膚, 粘膜とも) のみのもの
2 度	面皰の形成をみるもの
3 度	痤瘡様皮疹をも伴うもの
4 度	以上の皮膚症状が広汎かつ高度で化膿 傾向の強いもの

の診察経験から, 実際に診察したときの実感とこの皮膚重症度とのずれをしばしば感じたが, その理由は, この方法には定量性がないという点にあると思う. たとえば重症度Ⅱは面皰があるものということであるが, 面皰が多数あつても 1 個あつてもⅡとなるので, 前年度には特に皮疹がなく重症度 0 であつた症例が, 本年 1~2 個の面皰をみとめたため一挙にⅡに「増悪」するというようなことがある. また面皰がいくら減少しても完全に消失しないかぎり重症度が減ずることにはないので, その間の経過が表面に現れてこないことになる. このような点をもう少し改善して定量的な表現とし, 同時に近年の皮疹の変化をも考慮にいれて表 6 のような試案を作ってみた.

7 項目の皮疹についてそれぞれ 0~3 の点数をきめ, その合計点を総合的皮膚重症度としようというもので, 満点 (最も重篤なもの) は 21 点となる. 追跡調査の検診記録は, 記載方式が簡単な符号式のものであるため, このような詳細な評価は不可能であるので, 九大油症外来に通院している症例のうちでほぼ定期的, 継続的に受診していて詳しいデータの得られるもの 13 例を選びこの方法を適用してみた (ただしマ

イボーム腺肥大の項はカルテの記載が不十分なため今回は除外し, 6 項目 18 点満点となつている). その結果を現在の皮膚重症度と対比して表 7 に示したが, 皮疹の推移がかなりよく表現されているようである.

ただこの方法は診察に時間がかかり, 多数の受診者のある検診のおりなどに実行するのはかなり大変であるし, また初めからこの基準に合致するように記録しておくことが必要であり, これまでの記録にさかのぼって適用することは不可能である.

考 察

1. 年次検診 (追跡調査) における皮膚重症度の推移について

まずこれまでに報告した皮膚重症度の年次変動について簡単にまとめてみると次のようになる.

a) 44 年度→45 年度の比較ではかなりの改善がみられ, 重症者が減少し軽症者が増加していた²⁾.

b) 45 年度→46 年度の比較では, やや改善してはいるが有意の差とは認められない程度のものであつた³⁾.

c) 46 年度→47 年度の比較では, ほとんど変化なしと考えられる結果であつたが, 初期のころと比較して軽症群は次第に軽快にむかう一方で, 重症群にはあまり改善する傾向がないようであつた⁴⁾.

これにひきつづき本報告の 48 年度, 49 年度では, まず 48 年度には前年との比較で変化なしとみてよさそうである. 次いで 49 年度には, 年々と比べ明らかに改善の傾向が出ており, ここ数年の停滞を破るような結果となつている.

ここまでの経過をまとめてみると, はじめ 1, 2 年

表 6. 油症皮膚の点数評価試案

皮 疹		0 点 (一)	1 点 (十)	2 点 (廿)	3 点 (卅)
色素沈着	爪	な し	指趾の一方のみ, うすい 指趾ともにあるがきわ めてうすい	指趾ともにあり, うすい 指趾の一方のみ, かなり 濃い	指趾ともにあり, 濃い
	顔 面	な し	ようやく異常とみとめ られる程度	明らかな色素沈着があ る	高度の色素沈着がある
面 皰		な し	少数が不規則に散在	ある程度の数が対称性 に散在	皮疹多数
痤 瘡 (面皰に炎症を 伴ったもの)		な し	同 上	同 上	同 上
囊 腫 (面皰がもとに なつて生じた アテローム様 皮疹)		な し	エンドウ大程度のもの が少数	クルミ大までのものが 少数 エンドウ大程度のもの が多数	クルミ大以上 クルミ大までのものが 多数
化膿傾向 (上記痤瘡や 囊腫がもと になつて化 膿したもの)		な し	時に化膿する (年 2, 3 回くらい)	ややしばしば化膿する (月 1 回くらい)	常時化膿を反覆 多数の化膿巣あり
マイボーム腺肥大 (圧迫によりチーズ様眼 脂を排出)		な し	やつとみとめる位	やや多い	多 量

はかなりの改善がみられ, 次いで停滞状態となつたものが最近ようやく一種の臨界点に達して, さらに一段と改善してきたということになるが, この結論をそのまま認めてよいかどうかということになると, 多少問題がある。まず第 1 に, ここにとりあげた症例が油症患者群を正しく代表しているかどうかということ, 第 2 にこの重症度が患者の皮疹を正当に表現しているかどうかということであるが, すでにのべたことと重複するのでこれ以上はのべない。

さらにもうひとつの問題点として判定の個人差の問題がある。表 4, 5 の判定基準をみて分るように, この基準はかなり主観の入る余地がある。ここにいう色素沈着, 面皰, 痤瘡, 化膿などは, いずれも油症に特異的な皮疹ではなく, 油症以外の人にもしばしばみられるものである。したがって単に皮疹のあるなしという単純な問題ではなく, その部位や分布その他の言葉で表現しにくい微妙なニュアンスまで含めてかなり主観的, 経験的に判断しているのが実情であり, 判定者が変わると相当異なつた判定が出る可能性は十分ある。そこで毎年の検診の担当者による個人差が問題と

なるが, 44 年度検診は九大外来で行われ, 45 年, 46 年度は九大, 北九州, 筑豊などで利谷ひとりが担当, 47 年, 48 年度は利谷, 幸田, 旭が担当し, さらに 49 年度はこの 3 名のほか新しく現地皮膚科医の協力を得て行われている。したがって, たとえば 49 年度にかなり著明な改善傾向が出ているが, これには検診参加医師が多くなつたことにより, 前年までと比べていくらか判定にかたよりが出たということが理由の一部となつているのかも知れない。

しかしこれらを考慮に入れても, 上にのべたおおよその傾向は, 一応そのまま認めてよいのではないかというのがわれわれの感想である。

2. 皮膚重症度の判定基準と新しい評価法試案について

従来の基準の問題点については, これまでのべた通りであるが, そのような点になるべく改める意味で新しい点数評価試案を示した。過去にさかのぼって適用できるような症例がわずか 13 例しかなく, この試案の妥当性を検定するには不十分であるが, やや客観性を増した点, 定量的意味をもたせた点では改善された

表 7. 新しい基準による皮膚重症度の年次的推移
(上段: 旧皮膚重症度, 下段: 新評価点数)

症 例	43	44	45	46	47	48	49 (年度)
64 才 ♂	—	Ⅲ 5	Ⅲ 5	Ⅲ 3	Ⅱ 2	Ⅱ 1	Ⅱ 1
56 才 ♀	Ⅲ 7	Ⅲ 7	Ⅱ 5	Ⅱ 4	Ⅱ 4	Ⅱ 7	Ⅱ 4
43 才 ♂	—	Ⅳ 15	Ⅳ 13	Ⅲ-Ⅳ 7	Ⅲ 6	Ⅲ 7	Ⅱ 3
39 才 ♀	Ⅳ 18	Ⅳ 18	Ⅳ 18	Ⅳ 18	Ⅳ 16	Ⅳ 16	Ⅳ 16
12 才 ♀	—	Ⅳ 16	Ⅳ 13	Ⅲ-Ⅳ 10	Ⅲ-Ⅳ 9	Ⅲ 7	Ⅱ 5
9 才 ♀	Ⅳ 11	Ⅳ 13	Ⅳ 12	Ⅳ 13	Ⅳ 12	Ⅲ 9	Ⅲ 9
24 才 ♂	Ⅳ 16	Ⅳ 17	Ⅲ 11	Ⅲ 10	—	Ⅲ 5	Ⅲ 4
48 才 ♀	Ⅳ 16	Ⅳ 17	Ⅲ 16	Ⅲ 15	Ⅲ 14	Ⅲ 14	Ⅲ 13
20 才 ♀	Ⅳ 16	Ⅳ 17	Ⅲ 11	Ⅲ 8	Ⅲ 8	Ⅲ 8	Ⅲ 8
56 才 ♂	—	Ⅱ 2	Ⅲ 1	Ⅲ 2	0 0	Ⅰ 1	0 1
50 才 ♀	Ⅲ 11	Ⅳ 12	Ⅲ 8	Ⅲ 8	Ⅲ 7	Ⅲ 7	Ⅲ 7
22 才 ♀	Ⅲ 9	Ⅲ 9	Ⅱ 3	Ⅰ 2	Ⅰ 2	Ⅲ 3	Ⅲ 3
40 才 ♂	—	Ⅱ 5	Ⅱ 3	Ⅱ 2	Ⅰ-Ⅱ 3	Ⅱ 3	Ⅱ 3

と考えている。しかしこの案といえども純客観的なものからはほど遠く、依然として診察医の主観に依存する要素はあるが、これ以上の客観化は困難であろう。初期からこの基準による評価を行つたとすれば、相当正確に経過を表現することができたのではないかと考えられる。

現在の皮膚重症度は、油症の急性中毒期に提唱されたものである。当時は内科的所見や検査所見に、特異的、客観的な所見があまりに乏しかつたため、この皮膚重症度をもつて油症の全身の重症度とみなす傾向が強かつた¹⁾。当時としては、少なくともある程度以上の重症者においては必ず皮膚症状を伴っていたといつてよいようで、このようなやり方でもおおよその傾向を把握するにはさしつかえなかつたであろうが、その後慢性中毒期に移行するにつれ、皮疹そのものは軽快

してきているにもかかわらず、多彩な内科的愁訴のある症例が増加してきている。このような症例については色素沈着の点だけから重症度 0 などという見方をしたのでは実情とかけはなれたものとなる。すなわち、油症患者の全体像の表現手段としては、皮膚重症度というものの意義が次第に減少してきているといえることができる。

もし可能であれば、皮膚重症度のほかに内科的、眼科的、歯科的症状の評価を含め、さらに血中 PCB のガスクロマトグラフィーのパターンなど⁶⁾、最近開発された有力な検査法の成績も含めて、総合的の重症度とでもいうべきものを決めることが望ましく、そのような試みも多少行われてはいるが、あまりにも症状が多彩なことから、客観化できない要素(自覚症状の評価、他の併存する疾患との関連など)が多いことから、今日まで決定的な案は示されていない。この問題は、油症の社会的意義と関連して非常に重大な問題であるが、いささか大きすぎる問題であるからこれ以上は立ち入らないことにする。

ただ、油症の経過を正確に表現するための基準(本報告に示した案もこれに属する)と、油症であるか否かを決定するための基準とは、かなり異なつた性質のものであるという点と、皮膚重症度はあくまで皮膚症状を表現するものであつて、全身の重症度とは大きなずれがあり得るという点の 2 点をあらためて強調しておきたい。

ま と め

昭和 48 年度、49 年度の油症認定患者の追跡調査の結果をまとめ、皮膚重症度の変化を検討した。受診者は 48 年度 119 名、49 年度 148 名であつたが、このうちそれぞれ前年度にも受診している 60 名、72 名について、前年度との重症度の移動をしらべた。48 年度ではここ数年と同じようにほとんど変化がなかつたが、49 年度では重症度の減少した症例が多く、全体としてやや改善していると考えられた。

次にこの皮膚重症度についての問題点を検討し、定量性、客観性を増すように考慮した点数方式による新しい皮膚重症度評価方法を作り、九大油症外来カルテから 13 例を選んでこの試案を適用した結果を示し、その意義について検討を加えた。

文 献

- 1) 五島応安, 樋口謙太郎: 油症の皮膚科学的症候論. 福岡医誌 60: 409-431, 1969.

2) 利谷昭治, 北村公一: 油症の臨床的観察とくに皮膚所見のその後の経過. 福岡医誌 62: 132-138, 1971.

3) 利谷昭治: 昭和46年度一斉検診による油症患者の皮膚所見. 福岡医誌 63: 46-49, 1972.

4) 幸田 弘, 旭 正一, 利谷昭治: 昭和47年度一斉検診による油症患者の皮膚所見. 福岡医誌 65: 81-83, 1974.

5) 菊池昌弘, 御鍵観治, 橋本美智雄, 小嶋 亨: いわゆる油症患者の2剖検例. 福岡医誌 62: 89-103, 1971.

6) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 高田真由美, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニール. 福岡医誌 65: 25-27, 1974.

油 症 患 者 の 下 垂 体 前 葉 機 能

九州大学医学部産婦人科学教室（主任：滝一郎教授）

楠 田 雅 彦・永 田 行 博

中 村 正 彦

Anterior Pituitary Function of “YUSHO” Patients (Polychlorinated Biphenyls Poisoning)

Masahiko KUSUDA, Yukihiro NAGATA
and Masahiko NAKAMURA

*Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. I. Taki)
Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan*

Twelve patients, consisting of 9 women and 3 men who had been suffering from “YUSHO” (polychlorinated biphenyls poisoning), were subjected to this study.

Anterior pituitary function was examined with regard to basal levels of gonadotropins and its response to synthetic LH-Releasing Hormone in total number of 16 times. One hundred mcg. of LH-RH was administered intravenously, blood was drawn just before the injection and 15, 30, 60, and 120 minutes after that. Serum specimens were kept at -20°C until assayed. All samples from the same patient were assayed with the same radioimmunoassay system.

Criterion on pituitary response to LH-RH was settled as indicated in Table 1. Results obtained were listed in Table 2-B and Table 3-B and these were compared with the control groups (Table 2-A, 3-A). In 10 cases out of 11 patients normal basal levels of LH and FSH were noted, and pituitary response to LH-RH also revealed “good response” in each phases of menstrual cycles, postmenopausal women, a castrated woman, and men, respectively. One patient in which the test was performed in pre-ovulatory phase showed rather high basal level and strong response. However, in mid-follicular phase it showed normal “good response”. Although pituitary response of “YUSHO” patients seems high in normal range, any decisions could not be drawn, because criteria on “abnormally strong response” have not been established as yet.

From these results it can be mentioned: anterior pituitary lobe function concerning with gonadotroph is not deteriorated at least. Consequently, the cause of abnormality of sexual function might be pursued in hypothalamus or peripheral steroid metabolism.

著者はさきに、油症婦人の性機能について検索し、月経周期の乱れ、月経血の量的、質的变化、持続や間隔の異常等が高率に認められること、また一部婦人においては尿中諸ホルモンの濃度や排泄量にも異常がみられることを報告し、油症婦人では何らかの機序で性機能が障害されていることを推定した¹⁾。その後、油症患者の下垂体前葉機能をゴナドトロピン産生・放出能の面から検索する機会を得たので、これまでの成績について報告する。

研究対象ならびに方法

九大病院油症外来に通院する患者の中、あらゆる面から診断が確定している女子9名、男子2名について、のべ16回の合成 LH-RH (LRF または Gn-RH) 負荷による下垂体前葉刺激試験を施行し、正常男女の対照群と比較検討した。なお女子の2例は閉経後婦人、1例は子宮頸癌根治手術後3年目の婦人である。6名の性周期を有する婦人に対しては基礎体温の測定を依頼し、その体温表から、測定していない婦人

では問診によつて、試験施行の日を、卵胞初期、卵胞中期、排卵前期、黄体初期、黄体中期、黄体後期等に区分した。

LH-RH は第一製薬研究部で合成された DB-2521 DF を使用し、その 100 μ g を生理食塩水 10 ml に溶解して約 1 分間かけて静注した。投与直前と、15 分、30 分、60 分、120 分後に肘静脈より採血し、直ちに 4°C に保存し、おそくとも 2 時間以内に血清を分離してホルモン測定まで -20°C 以下に保存した。なお測定系間の誤差を防ぐため同一患者からの資料は必ず同一測定系内で測定した。human luteinizing hormone (LH) と human follicle stimulating hormone (FSH) の測定は既報²⁾ の二抗体法ラジオイムノアッセイによつて行い、標準品としては 2 nd IRP HMG を用い、測定値は mIU/ml で表した。

Table 1. Criteria of LH-RH test

1. Basal LH level			
Low		less than 5 mIU/ml	
Normal		5 - 20 mIU/ml	
Mod. high		20 - 30 mIU/ml	
High		more than 30 mIU/ml	
2. Criteria of pituitary response (LH)			
Response	Maximum-fold increase	Maximum increase	Area index
Good (+)	>3 times	>50mIU/ml	>150 units
Moderate (+)	3>>2	50>>20	150>>50
Uncertain ($\pm$)	2 >	20>	50>
No (-)	0	0	0

LH-RH に対する下垂体前葉の反応の評価法については、諸家の見解は必ずしも一定していない、著者らは過去における多数例の検討^{3) 4) 5)} から、表 1 に示

するような判定基準を設定しているの、今回もこれに従つて判定した。表 2-A は対照とした正常成熟婦人と男子の月経周期の各期における血中 LH の反応値を、表 3-A は FSH の反応値を示したものである。

成 績

油症患者に LH-RH を投与した際の血中 LH 濃度の変動を表 2-B に、FSH の変動を表 3-B に示した。正常婦人においても性周期による差や個人差も大きく、今回の例数が少ないためあえて平均値を求めるような処理は行わず、各個症例について濃度の変動を表示した。

LH についてみると、1 例の排卵前期に施行した負荷試験で非常に強い反応を示したほかはすべて正常であつた。FSH については現在のところ判定の基準はないが、同症例の反応がやや強いような印象をうけるのみで、他は正常と思われる。

考 按

PCB 中毒患者の内分泌機能に関する報告はきわめて乏しく、わずかに渡辺ら¹⁰⁾、永井ら⁹⁾、Lincer ら⁸⁾、Koller ら⁶⁾ の報告を散見するのみである。ことに間脳・下垂体・性腺系の検討は著者の報告¹⁾ のみに留まり、下垂体ゴナドトロピン放出予備能に関する報告はまだみられない。

内分泌腺の機能検査法としては静止状態における体液中のホルモン濃度や排泄量を経時的、経目的に追跡して変動パターンを観察する方法と、刺激物質に対する反応から推定する方法があるが、油症患者について前者を応用することは不可能に近い。また、下垂体前葉からは 7 種のホルモンが産生、放出されている。これらの機能を総合的に検索することは極めて困難なため、今回は性腺系のみを対象として、ゴナドトロピン

Table 2-A. Pituitary response after injection of LH-RH in normal adult women and men (LH)

Phase of cycle	LH levels after LH-RH (mIU/ml)					Area units ($\pm$ SE)
	Basal ($\pm$ SE)	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.	
Early follicular	19.0 $\pm$ 2.2	37.9	63.3	47.3	39.1	210.2 $\pm$ 19.1
Mid follicular	13.4 $\pm$ 2.3	58.1	78.0	58.7	59.6	370.3 $\pm$ 83.3
Preovulatory	30.5 $\pm$ 1.8	112.2	166.0	142.5	131.3	1081.4 $\pm$ 141.9
Early luteal	13.6 $\pm$ 1.8	103.9	134.5	109.0	81.5	693.4 $\pm$ 128.5
Mid luteal	14.0 $\pm$ 1.9	65.2	95.7	60.5	39.4	397.0 $\pm$ 59.8
Late luteal	8.2 $\pm$ 1.7	46.4	52.3	50.6	34.1	284.3 $\pm$ 84.3
Male	10.5 $\pm$ 2.4	41.2	58.8	47.3	25.1	243.1 $\pm$ 73.4

Table 2-B. Pituitary response after injection of LH-RH in patients with "YUSHO" (LH)

Case Age	LH levels after LH-RH (mIU/ml)					Area units	Grade of response	Phase of menstrual cycle
	Basal	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.			
K. M. 19	2	59	63	22	18.5	241.5	++	early follicular
20	7	32	38	28	17.4	155.3	++	late luteal
20	11.2	43	59	44	34.5	248.5	++	mid follicular
K. K. 46	19	80	121	108	83	609	++	early luteal
46	4	9.4	15.5	52	92	342.7	++	mid follicular
K. A. 39	7.3	52	81	72	47	428.8	++	early luteal
M. Y. 37	7.3	24	42.5	43	33	228	++	mid follicular
37	105	310	530	300	390	1997.5	++	preovulatory
K. M. 21	30	93	190	132	73	695	++	preovulatory
N. M. 35	40	112	140	145	125	707	++	preovulatory
H. H. 55	73	210	240	162	120	748.5	++	postmenopausal
T. M. 55	63	115	170	175	140	702.5	++	castrated
K. K. 49	31	84	118	111	105	571.5	++	postmenopausal
K. K. 23	2	79	99	79	50	549.5	++	male
24	7.1	44	32.5	35	17.3	179.1	++	male
M. Y. 38	5.8	56	83	74	48	455	++	male

の基礎値と LH-RH 負荷に対する反応をみた。

今日、合成 LH-RH として容認、使用されている deca peptide は LH を産生・放出させることは確実であるが、FSH との関係はいまだ明らかでない。従つて今回の成績も LH の動きを中心に論じられるべきである。

LH-RH 投与前の LH の基礎値は、成熟期婦人に比べて閉経婦人では相応に高く、他はそれぞれ周期の時期に相当した範囲内にあり、これは 3 例の男子も同様である。1 例のみ (M. Y. 例) 排卵前期ではあるが 105 mIU/ml と異常に高い値がみられたが、同一症例の卵胞中期では 7.3 mIU/ml と正常域の値を示している。

LH-RH に対する反応を検討する際には種々の指標が用いられているが、われわれは表 1 のような判定基準で判定している³⁾⁵⁾。これによるとすべて (++) の反応と判定され、(-) ~ (+) は皆無である。対照正常群の反応も (++) であり、この点からは差はないと言える。ただしわれわれの基準は主に無〜低反応群に主眼点をおいて設定したもので、特に強い反応あるいは異常に高い反応値をどこにおくかについては検討されていない。前述の M. Y. 例の排卵前期は基礎値も高く、反応も正常範囲を越えて強いように思われる。しかし正常反応域と、異常に強い反応の境界の設定はきわめて困難であるため、この点に関する検討はいまだ全くなされないので詳しい考察はできない。

Table 3-A. Pituitary response after injection of LH-RH in normal adult women and men (FSH)

Phase of cycle	FSH levels after LH-RH (mIU/ml)				
	Basal	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.
Early follicular	13.1	17.1	20.8	21.2	22.0
Mid follicular	10.6	14.4	20.6	24.1	21.5
Preovulatory	10.7	13.9	15.7	22.5	27.8
Early luteal	8.8	14.1	14.2	19.0	12.0
Mid luteal	7.6	11.1	12.4	13.8	15.9
Late luteal	5.5	8.5	7.8	10.4	8.6
Male	11.5	13.9	15.3	19.6	17.7

Table 3-B. Pituitary response after injection of LH-RH patients with "YUSHO" (FSH)

Case Age	FSH levels after LH-RH (mIU/ml)					Phase of menstrual cycle
	Basal	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.	
K. M. 19	11.2	16	21.5	17.2	18.9	early follicular
20	7.7	5.5	7.2	6	6.5	late luteal
20	12.5	20.5	14	17.2	21	mid follicular
K. K. 46	20.3	21.8	28.5	19.3	20.2	early luteal
46	5.7	5.7	5	9.5	15.5	mid follicular
K. A. 39	12	15.3	19.2	22.3	18	early luteal
M. Y. 37	20.1	19.4	36	34	40	mid follicular
37	19.5	31.5	44	47.5	64	preovulatory
K. M. 21	15.2	16.5	17.8	20	19.8	preovulatory
N. M. 35	3.7	9.2	14.2	12.3	15.5	preovulatory
H. H. 55	77	93	103	82		postmenopausal
T. M. 55	92	115	127	140	131	castrated
K. K. 49	72	91	65	90	245	postmenopausal
K. K. 23	7.3	9.8	16	16.3	13.8	male
24	5.8	12.3	10.5	12.5	14	male
M. Y. 38	9	15.5	18	22.5	22	male

負荷後の FSH 濃度のピークは LH のそれより 30～60 分おけて発現することは、今日では広く認められており、油症患者についても同様な傾向を認めた。基礎値や反応の強さも性別、年齢別、性周期別にみて、それぞれに相応の値を示している。もつとも、一般的にみて正常範囲内ではやや強い反応のようである。

今回の研究では対象例数の不足からして断定はできないが、血中ゴナドトロピンの基礎値と、LH-RH に対する反応からみて、下垂体前葉の gonadotroph の機能は低下していないことが強く推定される。むしろ反応は対照正常域の中でも良い、あるいは強い方に属し、ごく一部にやや過剰とも思われる反応を示したものがあつた。これを過剰反応とみなすか否かは前述の理由から現時点ではできない。理論的には、末梢性ステロイド、特に PCB 摂取動物の肝ミクロゾーム酵素活性の上昇が estradiol の代謝を促進させ⁶⁾、子宮萎縮を来するという報告⁶⁾ から考えると、フィードバック作用の強い estradiol の低下が起因していることも考えられる。しかし、PCB 投与によつて estradiol の向子宮作用は増強するとする報告⁷⁾ もあり、尿中 estrogen の分画測定でも estron + estradiol の total estrogen に対する比率は必ずしも低下してはいない¹⁾。

このように性機能異常の原因を究明することは容易

でなく、より多面的なアプローチを必要とする。臨床的に高頻度にみられた性周期の異常が事実であるならば、現時点で言えることは、その原発障害部位は少なくとも下垂体前葉そのものではなく、間脳視床下部の性中枢、あるいは、末梢における estradiol を中心とする性ステロイドの代謝異常(亢進)によるものと推定される。

総 括

明かな臨床症状その他の諸検査で油症と確診された患者 11 名(女子 9 名、男子 2 名)に対して、延べ 16 回の LH-RH 負荷試験を行つた。

血中 LH、FSH の基礎値は性別、年齢別、性周期別にみてほぼ正常範囲内にあつたが、少数例については、やや高い値が認められた。

LH-RH 負荷に対する下垂体前葉の反応も、全般的にやや高い傾向がうかがえるが、対照正常群と比べて正常反応と判定された。

排卵前期に負荷試験を行つた 1 例の反応は正常より強いようであるが、これを異常反応とみなして良いか否かは不明である。

以上から油症患者の下垂体前葉ゴナドトロピン産生、放出機能は少なくとも低下はしていないものと結論して良いと思われる。油症患者の性機能障害の原因は、より上位の間脳視床下部、あるいは末梢の性ステ

ロイド代謝異常によるものと推定される。

滝教授の御校閲を感謝します。

文 献

- 1) 楠田雅彦：油症と女性一米ぬか油中毒症婦人の性機能に関する研究一。産と婦 38：1063-1072, 1971.
- 2) 楠田雅彦, 中村正彦, 尾上敏一：二抗体法 Radioimmunoassay による血中 FSH, LH の測定. 正常人, 排卵障害婦人および LH-RH 投与時における変動. 産婦の世界 25：543-551, 1973.
- 3) Kusuda, M., Nagata, Y., Nakamura, M. and Onoue, T.: Pituitary reserve function test using synthetic LH-releasing hormone on the primary and secondary amenorrhea with special reference to some interesting cases. *In* LH/FSH releasing hormone (Ed. Y. Yamamura et al.), 173-179, Tokyo, 1973.
- 4) 楠田雅彦, 永田行博, 中村正彦, 尾上敏一：正常性周期婦人における下垂体性ゴナドトロピン放出予備能：LH-Releasing Hormone への反応. 日産婦誌 26：975-982, 1974.
- 5) 楠田雅彦, 永田行博, 中村正彦, 倉野彰比右, 尾上敏一：合成 LH-RH の無月経症の病態診断上の意義—特に無月経の grading と関連して. ホと臨床 23：463-469, 1975.
- 6) Koller, L. D. and Zinkl, J. G.: Pathology of polychlorinated biphenyls in rabbits. *Am. J. Pathol.* 70：363-378, 1973.
- 7) 小松富美子：PCB の女性ホルモン増強作用. 福岡医誌 63：374-377, 1972.
- 8) Lincer, J. F. and Peakall, D. B.: Metabolic effects of polychlorinated biphenyls in the American kestrel. *Nature* 228：783-784, 1974.
- 9) 永井諄爾他 3 名：尿17-ケトステロイドの比色定量とガスクロマトグラフィによるその分別定量—油症患者への応用. 福岡医誌. 62：51-65, 1971.
- 10) 渡辺斌他 3 名：油症の内分泌機能, 福岡医誌 62：159-162, 1971.

油 症 患 者 の 眼 症 状 (第 3 報)

九州大学医学部眼科学教室

大 西 克 尚・生 井 浩

北九州市立小倉病院眼科

栗 本 晋 二

久留米大学医学部眼科学教室

川 島 謙 一 郎

Further Ophthalmic Studies on Patients of Chronic Chlorobiphenyls Poisoning ("Yusho")

Yoshitaka OHNISHI, Hiroshi IKUI, Shinzi KURIMOTO
and Kenichiro KAWASHIMA

*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka, Japan*

Since 1968 many patients have been registered as chronic chlorobiphenyls poisoning in the western part of Japan. One hundred and forty-seven registered patients (male 67 and female 80) of the disease were re-examined for follow-up study on January, 1975. Hypersecretion of the Meibomian gland and abnormal pigmentation of the conjunctiva, which are main ocular signs of the disease, have been improved.

昭和 43 年 6 月以来、西日本一帯に発生した油症患者の眼症状についてはさきに報告¹⁾²⁾したが、その後も、随時あるいは一斉検診において、症状の把握と治療に努めてきた。

昭和 50 年 1 月 27 日から 5 日間にわたり、厚生省委託による昭和 49 年度油症患者の一斉検診（追跡調査）を、九州大学附属病院、久留米大学附属病院および北九州市立休日急診療センターで行った。その際受診した患者 175 名中、未認定者を除外した 147 名についての眼所見について報告する。

1. 対 象

集計の対象とした 147 名の油症患者の年齢および性

別分布は表 1 に示した通りである。

2. 油症患者の自覚症状

検診の際、受診者に問診票を配り、自覚症状を記入させ、また診察の際にその訴えを聞き、自覚症状の把握に努めた。眼科的な自覚症状がないものは皆無に等しく、例えば眼脂を例にとつてみると表 2 のようになる。眼脂のほかに「眼が痛くなる」、「時々涙が出る」などの愁訴が多かった。また特徴的なのは、「眼やにが出て、眼に膜を張つたようになり、新聞や本が読みにくくなる」という訴えであつた。

表 1. 年齢別・性別患者数

年 令	0~10	11~20	21~30	31~40	41~50	51~60	61~	計
男	8	8	7	7	19	10	8	67
女	4	10	12	14	19	19	2	80
計	12	18	19	21	38	29	10	147

表 2. “眼やにが出来ますか”という質問に対しての回答

回 答	男	女	計
はい			
朝 だ け	37	34	137
一 日 中	23	33	
朝 と 夕 方	1	2	
時 々		7	
“はい” だけ			
いいえ	4	3	7
回答なし	2	1	3
計	67	80	147

3. 眼 症 状

他覚的眼所見として著明なものは、やはり瞼板腺の分泌亢進と結膜の色素沈着であり、眼瞼浮腫は著しく減少していた。症状の重症度を(+)～(++)の三段階にわけ、判定困難なものを(±)とした。発生から6年以上も経過しているためか、全般的に他覚所見は軽くなっている、判定困難な症例が増加していた(表3)。

(1) 瞼板腺の分泌亢進

自覚症状のほとんどがこの瞼板腺(マイボーム腺)の分泌亢進に起因しているものと思われた。重症例では眼瞼を反転すると、瞼縁に直交し、縦に並列した瞼板腺の主管に黄白色の分泌物が充満しているのが認められた。眼瞼を圧迫すると、チーズ様の分泌物が、瞼板腺開口部より、勢いよく圧出されてきた。また視診で瞼板腺の肥大をみないものでも、指先で眼瞼を圧迫すると、前記のチーズ様の分泌物が圧出される例があった。瞼板腺の圧迫により透明な黄色の油性分泌物が少量圧出される場合には正常と判定した。

表 3. 油症患者の他覚的眼所見

所 見	男				女			
	+	++	±	-	+	++	±	-
眼瞼結膜色素沈着	1	11	12	43	1	12	7	60
マイボーム腺肥大		17	10	40		25	8	47
眼 瞼 浮 腫		3	1	63		0	0	80

(2) 結膜の色素沈着

昭和43年油症発症当時のような強い色素沈着を示した重症例は男、女それぞれ1名ずつであった。しかしそれらにも瞼結膜の充血や混濁は認められなかった。またろ胞の形成や乳頭の増殖などもみられなかった。男11名(16.4%), 女12名(15.0%)に軽い結膜の色素沈着が認められ、特に内眼角側でその程度が強いように思われた。

(3) その他の眼症状

眼瞼の浮腫が発症当時から継続しているような症例はなかった。以前に認められた角膜の点状びらんを示す例もなく、中間透光体、虹彩、眼底などにも油症に起因すると思われる異常所見は認められなかった。1例で緑内障様の自覚症状を訴える症例があったが、精査の結果異常なかった。

4. 治 療

前回報告時の角膜の変化はもはや認められなくなっていたので、治療としては専ら二次感染防止のために抗生物質の水性点眼液を処方するにとどめた。油性点眼液は刺激が強いので使用していない。

5. ま と め

昭和49年度油症患者の一斉検診(追跡調査)の結果を報告した。その結果、瞼板腺の分泌亢進と結膜の色素沈着は発症当時よりは軽くなっているとはいえ、依然として認められ、血中のPCB濃度、皮膚所見と共に、本症の診断のための重要な所見であった。

文 献

- 1) 生井浩, 杉健児, 宇賀茂三: 油症患者の眼症状および油症患者結膜の電子顕微鏡組織学的所見. 福岡医誌 60: 432-439, 1969.
- 2) 加納正昭, 中尾文紀, 生井浩: 油症患者の眼症状(続報). 福岡医誌 62: 167-168, 1971.

油症患者の眼所見および PCB 投与 ラットの眼瞼結膜の組織所見

久留米大学医学部眼科学教室 (主任: 吉岡久春教授)

青 木 昭 彦

Ocular Findings of Chlorobiphenyls Intoxication and Histological Changes of the Palpebral Conjunctiva in Rats Fed with Kaneclor 500

Akihiko AOKI

Department of Ophthalmology, Kurume University
School of Medicine

Light and electron microscopic observations of the palpebral conjunctiva including the fornix in rats, fed with Kaneclor 500 in the dose of 50 mg/kg 4 times a week, were carried out. Light microscopically, marked lymphocytic and plasmacytic infiltrations were recognized in the submucosal area, and slightly in the Meibomian gland which contained condensed secretion.

Electron microscopically, no abnormal findings could be seen in the pigment epithelium and in the visual cells of the retina. In the palpebral conjunctiva, an increase of melanin-like pigment was recognized.

昭和 43 年西日本を中心として、家族的に集団発生した油症は、ライスオイルの製造中に塩化ビフェニール混入による中毒と判明してから、やがて 7 年を経過している。今回久留米大学眼科教室も福岡県衛生部の依頼で油症患者の追跡調査のため検診を行った。本症の臨床の特徴は、関係各科より報告されているが、九大油症治療研究班の診断基準にもとづいて、眼所見についてのみ検討を行った。また一方、実験的にラットにカネクロール 400 より毒性の強いといわれているカネクロール 500 を投与し、円蓋部を含めた眼瞼結膜を試料として、顕微鏡および電顕観察を行ったので報告する。

油症患者の眼症状

昭和 49 年 8 月および昭和 50 年 1 月に、油症の末認定、認定患者の検診を行ったが、今回は久留米、大牟田地区に在住する油症認定患者で、昭和 50 年 1 月に検診を行った患者 25 名についてのみ報告する。25 名のうちわけは、男 12 名、女 13 名で、年齢は、6 才より 58 才までであった。

眼検査所見としては、①眼瞼結膜色素沈着、②マイ

ボーム腺肥大、③眼脂過多、④眼瞼浮腫について検討し、その程度が高度なもの(++)、強度なもの(+), かすかにある(±)、なし(-)と分類した。

検診結果をまとめると表 1 となるが、高度なもの(++) の患者は 1 名も見られなかった。

ラットにおける実験

体重 85~105 g のラット 7 匹に、カネクロール 500 を 50 mg/kg の割合で 1 週中に 4 回、強制的に経口投与し、合成固形飼料で 4 週間飼育後に断頭した。円蓋部を含む眼瞼結膜を採取し、顕微鏡試料を作成し HE 染色を行った。また 1 部は Luft 法に従って電顕用試料を作成し、日本電子 T7S 電顕で観察した。

顕微鏡的には、眼瞼結膜の粘膜下にびまん性のリンパ球とプラズマ細胞を主体とする細胞浸潤が高度に見られる。また近傍のマイボーム腺にも軽度のリンパ球浸潤を認め、1 部腺腔内にも褐色色素の沈着を認めた(図 1, 2)。

電顕による観察では、眼瞼結膜の表皮下に多数のメラニン顆粒が細胞質中にびまん性に存在していた。また散在性に直径 2~3 μ 程度の不定形な dense body

表 1. 油症の眼症状 (25人中の該当者数)

所 見	程 度		
	十	十	一
眼瞼結膜色素沈着	1	3	21
マイボーム腺肥大	3	8	14
眼 脂 過 多	7	4	14
眼 瞼 浮 腫	0	1	24

が同じく細胞質中に見られた。また遊離リボゾムの増加、トノフィラメントの増加が認められる (図 3, 4)。

考 察

九大油症治療研究班によって、油症の診断基準が設けられているが、そのうち眼症状としては、眼瞼結膜色素沈着、マイボーム腺肥大、眼脂過多、眼瞼浮腫がある。油症発生より7年を経過した現在では、初期に見られた眼瞼浮腫はほとんど見られなくなっており、またマイボーム腺の指圧によるチーズ様眼脂の排出も少なくなっている。また全体として、上記の眼症状の程度も軽くなっている。しかし眼瞼結膜の色素沈着は、以前より程度は軽くなっているが、依然として残存しているものが少なくない。これらは、まだ顔面の瘡癤様皮疹が残存しているものに多く見られた。患者さんの訴えとしては、眼脂過多および視力障害が多いようである。視力障害は、油症とは別の原因が考えられる。すなわち老人性白内障や眼底出血、屈折異常等があつた。生井らが報告しているように、眼脂の増加による一過性の視力障害も多いと思われる。

実験的にラットにカネクロール 500 を投与して、そのうちの1眼を電顕で観察したが、視細胞層、色素上皮層には著明な変化を認めなかつた。光顕による観察で、眼瞼結膜のびまん性のリンパ球浸潤は、臨床的にも結膜炎が考えられ、眼脂過多を訴える原因となるであろう。またマイボーム腺内の褐色色素は、PCB の体外排泄を意味しているのかもしれない。眼瞼結膜の

表皮下のメラニンの増加や、2～3 μ 程度の巨大な dense body は、PCB の蓄積を思わせる。

この特異な dense body については、今までの油症の報告では見られないようで、この本態については全く不明である。今回の実験では短期間に多量のカネクロール 500 を投与していることが関係しているかもしれない。生井らの報告では、人眼の球結膜における電子顕微鏡観察で 400 Å 程度の電子密度の高い微粒子が多数認められている。しかし 2～3 μ の巨大な dense body はなく、今後の検討が必要と思われる。なお実験ラットの PCB 血中濃度は 799±351 ppb であることが、久留米大学環境衛生学教室で確認されている。

む す び

油症認定患者 25 名を検診して、眼所見としては、全体として症状の程度は軽くなっているが、眼瞼結膜の色素沈着、眼脂過多を認めた。初期に多かつた眼瞼浮腫はほとんど見られなかつた。

ラットのカネクロール投与実験による光顕電顕による観察で、眼瞼結膜の粘膜下に、びまん性のリンパ球を主とする細胞浸潤が見られた。電顕では眼瞼の表皮下にメラニン顆粒の増加と、2～3 μ 程度の不定形な電子密度の高い物質が見られた。

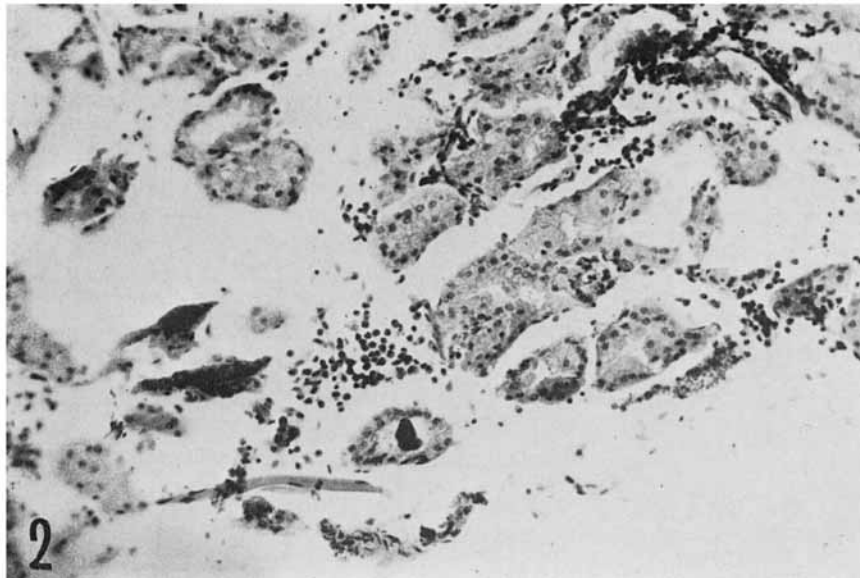
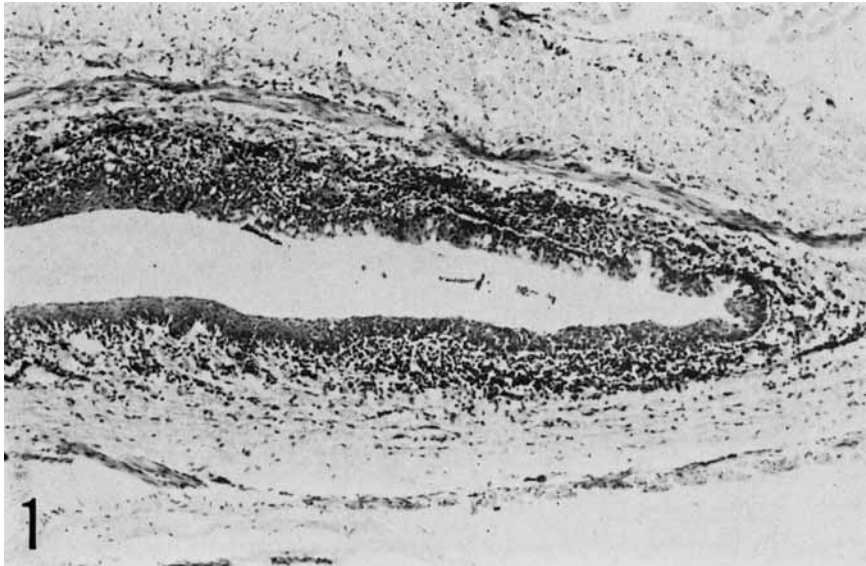
実験動物のラットを提供された、久留米大学医学部環境衛生学教室高松教授と井上義人先生に感謝致します。

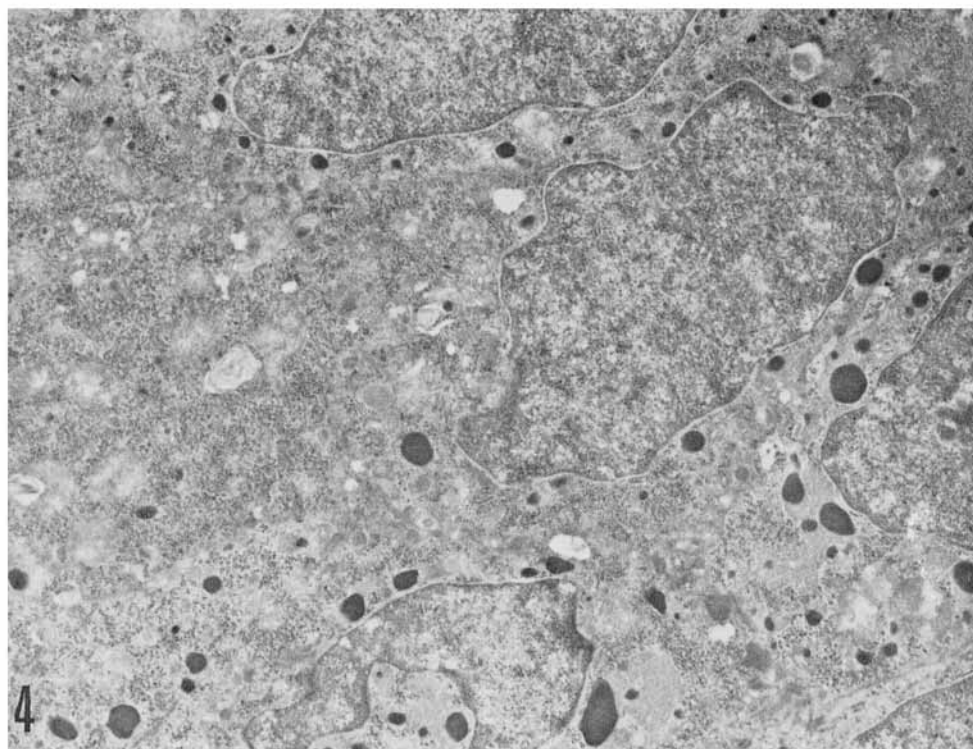
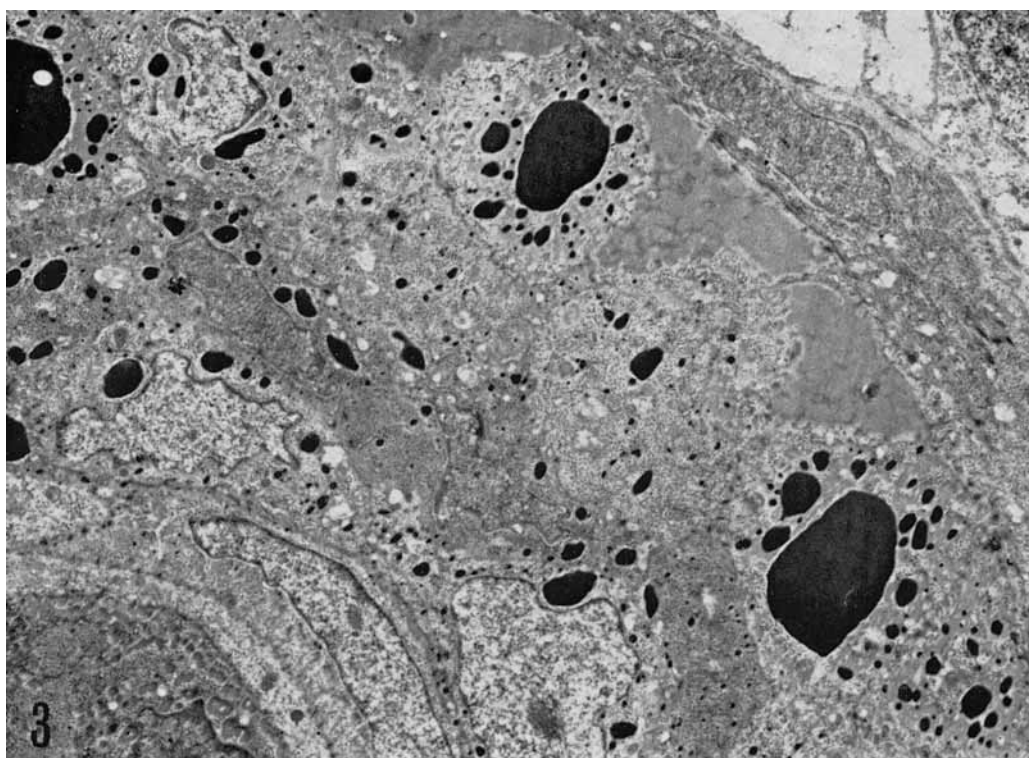
文 献

- 1) 生井浩, 杉健児, 宇賀茂三: 油症患者の眼症状および油症患者結膜の電子顕微鏡組織学的所見. 福岡医誌 60: 432-439, 1969.
- 2) 重松信昭ほか: 油症における呼吸器障害の臨床的ならびに実験的研究 (続報). 福岡医誌 65: 88-95, 1974.
- 3) 西住昌裕ほか: 油症の実験病理学的研究. 福岡医誌 60: 539-543, 1969.
- 4) 山元寅男ほか: 油症患者肝臓の形態学的所見補遺. 福岡医誌 62: 85-88, 1971.

付 図 説 明

- 図 1. 光顕所見, 眼瞼結膜の粘膜下にリンパ球を主とする細胞浸潤. $\times 100$
- 図 2. マイボーム腺内の褐色色素. $\times 200$
- 図 3. 電顕所見, 眼瞼表皮下のメラニン顆粒の増加と 2～3 μ 程度の無定形な dense body. $\times 3400$
- 図 4. 遊離リボゾムの増加. $\times 6000$





絶食療法を実施した油症患者の追跡調査

兵庫県津名郡（淡路島）五色町都志診療所

今 村 基 雄

A Follow-up Study on Fasting Therapy of Yusho Patients

Motoo IMAMURA

Tsushi Clinic, Goshikicho, Tsunagun, Hyogoken

Thirty three patients with Yusho, who had submitted to a fasting therapy more than once, were followed up. Beneficial effects of the therapy were still confirmed in 79 percent of the patients 0.3~4.6 years after leaving hospital. The mechanism responsible for the symptomatic relief resulted from this this therapy was discussed.

私は1970年10月から1975年7月までに34名の油症患者に絶食療法を実施した。その成績はすでに2回発表したが^{21,22)}、その効果が認められて1972年10月には厚生省の「油症治療指針」に正式採用された。

今回は1975年2月までに退院した33名について、退院時の成績と退院後4カ月～4年8か月経過した時点における成績を追跡調査し、両者を比較してその推移を観察した。

1. 対 象

(1) 患者の年齢、性別、地域

年齢	16～67才
性別	男性 14名, 女性 19名
地域	福岡県 25名
	長崎県 3名
	広島県 3名
	岡山県 2名

(2) 絶食日数

8日	1名
10日	16名
12日	10名
14日	6名

(3) 絶食の回数

1回	24名
2回	8名
3回	1名

2. 絶食の方法と心身の変化

私の方法を簡単に述べる。

- 1) 準備期 絶食前1～2日間はカユ食。
- 2) 絶食期の第1日目に下剤を与え、その後も2～3日目ごとに下剤または完腸で排便をはかる。
- 3) 絶食期の初め2日間は水だけ1日量1500～2000ml与える。
- 4) 絶食期の3日目よりジュース(数種の生野菜と果物の絞り汁)を200mlずつ午前、午後2回与える(厳法)。
- 5) 年齢、体力、併発症等を考慮して絶食5～6日目より更に牛乳を朝、夕200mlずつ与えることもある(緩法)。
- 6) 厳法20名、緩法13名であった。
- 7) 復食期になるとオモユ、三分ガユ、五分ガユ、全ガユ、常食と2日ごとに上がっていく。常食は1日量約1800～2000Calくらいである。
- 8) 全期を通じて体力に応じた軽い運動(散歩、釣、その他)を励行させる。
- 9) 絶食者の80%くらいは、絶食初日の夜から2日目にかけて脱力感、軽い吐き気、頭重を訴えるが、3～4日目になれば気分良好となる。
- 10) 油症患者は、絶食3、4日ごろまでは激しい頭痛発作を訴える者があるので、その都度、堪えられぬほどの激痛の場合はパピナールアトロピン、ノブロンA等の鎮痛剤の注射を行つた(33名中3名)。
- 11) 水分補給、栄養補給のための注射による補液はやらない。

3. 症状好転の時期と程度

- 1) 全身症状(全身倦怠感、頭痛、頭重、不定の腹

痛、吐き気、関節痛、手足のしびれ感、咳、痰、ラッセル等の気管支炎様症状）は好転しやすく、絶食期の4、5日目ごろから徐々に軽快し始める。10日目ごろにはほとんど消失するかまたは著明に軽減する。一般的に一進一退しながら軽快していくが、時として激しい頭痛や吐き気が突然消失する例もある。全身症状は6年以上の歳月を経た今日でも、著明に好転する例が多い。

2) 皮膚症状（瘡瘍様皮疹、色素沈着、毛孔の黒点、膿疱）は発病後3～4年ころまではかなり著明な軽快が見られたが、年月が経つにつれ治り難くなつていく。最近では1回の絶食では著明な好転は期待できない。

4. 治療成績判定の方法

今回は退院者33名に往復ハガキを発送し、アンケートの回答を集計した。

成績の判定は、1972年油症研究班により改訂された①全身症状と②皮膚症状の両面から、患者自身が判定したものである。

A. 退院時の治療成績

- ① 大変よくなった。
- ② まあまあ少しはよくなった。
- ③ 絶食前と変りない。
- ④ かえって悪くなった。

B. 現在の時点での治療成績

- ① 相変わらず大変よい。
- ② 退院時と変りなく、まあまあ少しはよい方だ。
- ③ 少しぶり返したが、絶食前よりよい方だ。
- ④ 絶食前と変りない。
- ⑤ かえって悪くなった。

5 治療成績と考察

表1、2のように、退院時は著効13名、軽快16名無効4名で有効率88%、退院後4ヵ月～4年8ヵ月経過した時点では、著効5名、軽快21名、無効7名で有効率79%である。

33名の中でアンケートの回答が来なかった3名は現時点での成績は無効例に入れた。

退院時と現時点の成績を比較すれば、有効率は、88%から79%に減少し、著効例は13名から5名に減っているが、これは退院後年月を経るにつれ、消失していた症状が徐々に再現した者があるためである。

現在もなお著効の状態が持続している者は、2回3

表 1. 油症33の退院時と4ヵ月～4年8ヵ月後の治療成績

例 No.	年齢	性別	絶食 日数	絶食 回数	治 療 成 績	
					退院時	4ヵ月～ 4年8ヵ 月後
1	32	女	10	3	◎	◎
2	34	女	10	2	○	×
3	28	女	10	1	○	○
4	25	女	12	2	○	○
5	23	男	10	1	◎	○
6	46	女	12	2	◎	○
7	26	女	12	1	×	×
8	22	女	10	1	○	×
9	25	男	12	1	◎	○
10	23	男	10	2	◎	○
11	17	男	8	2	○	○
12	47	女	14	1	◎	○
13	22	女	12	1	◎	○
14	40	男	14	2	◎	◎
15	50	女	12	2	◎	◎
16	21	女	10	1	◎	○
17	19	女	10	1	○	○
18	19	男	10	2	○	◎
19	16	女	12	1	◎	○
20	39	女	10	1	○	○
21	20	男	14	1	○	◎
22	20	男	12	1	◎	○
23	48	女	10	1	○	○
24	45	男	12	1	◎	○
25	18	男	14	1	○	○
26	23	男	10	1	×	×
27	18	女	12	1	×	×
28	34	男	14	1	○	○
29	67	男	10	1	○	○
30	27	男	14	1	○	×
31	18	女	10	1	○	○
32	16	女	10	1	○	○
33	40	女	10	1	×	×

◎著効 ○軽快 ×無効

表 2. 有 効 率

退 院 時		退院後4ヵ月～4年8ヵ月	
著効	13	著効	5
軽快	16	軽快	21
無効	4(12%)	無効	7(21%)
29(88%)		26(79%)	

回と絶食を繰り返した者と、退院時は軽快の程度だったのが、その後次第に回復し、現在ではほとんど健康体に復した者である。

いずれにしても 79% は、絶食後かなりの歳月を経た今日でも絶食前より好転している。現在なお裁判続行中の油症患者の心理状態はまことに微妙なもので、今回の患者自身による成績判定は、かなりきびしいものであるが、それでも私の予想以上の好成績であった。そしてほとんどすべての者が、絶食療法をもう一度やりたいと希望している。

6. 治療機序についての考察

1) PCB が体内に入ると、脂肪組織とかたく結合して、体外に自然排泄されることは非常に困難であるが、絶食すれば体脂肪の燐焼と同時に PCB が遊離して血中に入り肝臓、胆道を通つて腸内に排泄され、糞便に混つて体外に出る。すなわち、絶食は PCB の体外排泄を助長する。九大田中潔教授は、1972 年絶食により PCB が動員されて再び肝臓を通る可能性を動物実験により示したが、類似の事実は DDT や BHC についても知られている (Dale, 大柴)。

1973 年大津日赤病院の相模は、慢性 PCB 中毒患者に 14 日間の絶食療法を行い、絶食中に血中の PCB と糞中の PCB が著明に増加したこと、腹壁脂肪の PCB が絶食後は絶食前に比し著明に減少したこと、油症患者とほとんど同じ皮膚症状 (瘰癧様皮疹、色素沈着、癢痒感) も絶食後著しく軽快したことを報告し

た。

2) 絶食により新陳代謝の大変調を来し、自律神経系、内分泌系に強烈な刺激を与えることも、油症の症状を好転させる一因ではないかと考える。

7. む す び

過去 4 年 8 か月間に絶食療法を実施した油症患者のうち、既に退院して 4 か月～4 年 8 か月を経過した 33 名について、退院時と現在の時点における治療成績を追跡調査したところ、現在もなお 79% は絶食前より好転していることが判明した。

文 献

- 1) Dale, W. E., Gaines, T. B. and Hayes, W. J.: Storage and excretion of DDT in starved rats. Toxic. appl. Pharmacol. 4: 89-106, 1962.
- 2) 今村基雄: 油症患者に対する絶食療法の効果. 福岡医誌 63: 412-415, 1972.
- 3) 今村基雄: カネミ油症 (PCB 中毒症) に対する絶食療法. 日本医師会雑誌 70: 668-671, 1973.
- 4) 大柴恵一: 連続摂取による生体内 β および γ -BHC の消長に関する実験的研究. 阪大医誌 21: 1-19, 1972.
- 5) 相模成一郎: 慢性 PCB 中毒症の一例. 西日本皮膚科 36: 656-661, 1974.
- 6) 田中潔, 小松富美子: 微量 PCB によるラットの麻酔短縮現象. 福岡医誌 63: 360-366, 1972.

昭和50年10月25日 発行

発行所 〒812 福岡市東区馬出3丁目1-1
九州大学医学図書館内

福岡医学会

編集者 遠城寺 宗 知

印刷所 福岡市南区塩原1194
秀巧社印刷株式会社

頒価 500 円