

昭和29年11月5日第三種郵便物認可
昭和62年5月25日（毎月25日発行）
第788号

Vol. 78 No.5
May 1987

CODEN: FKIZA4
ISSN 0016-254X

FUKUOKA ACTA MEDICA

福岡医学雑誌

第78巻 第5号 (788)

昭和62年5月25日

特 集 号

油 症 と P C B

研 究 報 告 第 11 集

The Eleventh Reports of the Study on Yusho and PCB

福岡医誌

Fukuoka Acta med.

油 症 と PCB に 関 す る 研 究

報 告 集 第 11 集

(福岡医学雑誌 第 78 巻 第 5 号 昭和 62 年 5 月)

目 次

1. 序 言..... 倉恒 匡徳・青野 正男・吉田彦太郎…(1)
2. Polychlorodibenzofuran (PCDF) のアルカリ分解によるエトキシ (EtO) 体の生成..... 黒木 広明・原口 浩一・増田 義人…(13)
3. 3-Methylsulphone-4,5,3',4'-Tetrachlorobiphenyl による芳香族炭化水素水酸化酵素活性阻害作用 長山 淳哉・清原千香子・毛利 紀子・廣畑 富雄・原口 浩一・増田 義人…(19)
4. 致死量前後の 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran 投与ラットにおける体内分布と急性毒性..... 古賀 信幸・中嶋 寛・神村 英利・吉村 英敏…(24)
5. 3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl のラットに対する毒性および肝酵素誘導作用の長期経過..... 古賀 信幸・黒木 淳・外間由美子・吉村 英敏…(33)
6. Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) の呼吸器系ならびに免疫系に対する長期の影響に関する実験的研究 (第 1 報) 鐘ヶ江秀明・シャム・ラル・栗田 幸男・重松 信昭…(39)
7. PCDF の発癌に及ぼす影響——腫瘍発生率と光顕的電顕的検討 広瀬 寮二・堀 真・藤田 和夫・山城 一純・宿輪 哲生・吉田彦太郎…(43)
8. HeLa 細胞のコロニー形成法による polychlorinated biphenyls (PCB) 毒性の検討 松岡 一忠・村山 史男・大神 太郎・野中 薫雄・吉田彦太郎…(51)
9. サルの PCB 中毒症に関する研究 (第 3 報) 古賀 信幸・黒木 淳・外間由美子・神村 英利・中嶋 寛・吉村 英敏
増田 義人・原口 浩一・黒木 広明・大間 美和・服部 玲子…(55)
10. 実験的 PCB 中毒サルに対する Cholestyramine および低カロリー食投与の経験——主に血液生化学検査所見について..... 赤木 公博・辻 博・藤島 正敏…(69)
11. 慢性化した実験的 PCB 中毒サルのマイボーム腺病変の組織学的研究 向野 利彦・大西 克尚…(74)
12. 油症患者および PCB 中毒サル歯肉の組織学的検索 橋口 勇・赤峰 昭文・宮武 祥子・原 宜興・前田 勝正・鳥谷 芳和
青野 正男・福山 宏・奥村 英彦…(79)
13. 油症原因物質の排泄促進..... 神村 英利・吉村 英敏…(86)
14. PCDFs 中毒サルに対するスクアランの治療に関する研究..... 堀 伸二郎・尾花 裕孝・榎本 隆…(101)
15. カニクイザルにおける PCB および PCQ の体内分布 (英文) 堀 伸二郎・尾花 裕孝・榎本 隆…(106)
16. 油症患者的死亡に関するコホート研究——予報 (英文) 池田 正人・倉恒 匡徳・中村 好一・廣畑 富雄…(117)

17. 油症患者の芳香族炭化水素水酸化酵素活性に関する研究	長山 淳哉・清原千香子・福田 篤志・中村 好一 廣畑 富雄・旭 正一・吉村 健清…(121)
18. 正常者の血液中ポリ塩化クアテルフェニル濃度	飯田 隆雄・竹中 重幸・中川 礼子・深町 和美・高橋 克巳・旭 正一…(125)
19. ヒト血液と皮下脂肪における PCB 濃度とガスクロマトグラム類似性	中川 礼子・飯田 隆雄・竹中 重幸・深町 和美 森 彬・高橋 克巳・旭 正一…(129)
20. ヒトにおける血中 PCB パターンと皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体の関連性	竹中 重幸・飯田 隆雄・中川 礼子・深町 和美 森 彬・高橋 克巳・旭 正一…(134)
21. 油症患者の皮脂、皮下膿瘍中の PCB および PCDF 分析	黒木 広明・大間 美和・原口 浩一・増田 義人・猿田 隆夫…(140)
22. 高分解能 MS-SIM 法による油症患者組織および原油中の PCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs	樫本 隆・宮田 秀明・高山 幸司・尾垣 淳治…(145)
23. 油症患者の血液および皮下脂肪組織中の polychlorinated biphenyls (PCB), polychlorinated quaterphenyls (PCQ) の濃度と性状について	大神 太郎・野中 薫雄・吉田彦太郎・村山 史男・山下 和徳・益田 宣弘…(157)
24. 油症患者における肝障害および肝細胞癌	辻 博・赤木 公博・村井宏一郎・梶原 英二・藤島 正敏…(163)
25. 昭和 60～61 年度の年次検診における油症皮膚症状の推移	利谷 昭治・旭 正一・占部 治邦…(169)
26. トランスイルミネーションによる油症患者マイボーム腺の観察	向野 利彦・大西 克尚…(175)
27. 油症患者の頬粘膜における PCB, PCQ 濃度, PCB パターンおよび CB% 比について	奥村 英彦・益田 宣弘・赤峰 昭文・青野 正男…(178)

The Eleventh Reports of the Study on Yusho and PCB

(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 78, No. 5, 1987)

CONTENTS

1. ForewordM. Kuratsune, M. Aono, H. Yoshida ... (1)
2. Formation of EtO-PCDF by the Treatment of Alkali Saponification on PCDF
.....H. Kuroki, K. Haraguchi and Y. Masuda ... (13)
3. Inhibitory Effect of 3-Methylsulphone-4, 5, 3', 4',-Tetrachlorobiphenyl on Aryl Hydrocar-
bon Hydroxylase ActivityJ. Nagayama, C. Kiyohara, N. Mohri, T. Hirohata,
K. Haraguchi and Y. Masuda ... (19)
4. Relationship between Tissue Distribution and Acute Toxicity of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlor-
odibenzofuran in Rats given around lethal doseN. Koga, H. Nakashima, H. Kamimura and H. Yoshimura ... (24)
5. Long-Term Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl on the Toxicity and Liver Enzyme
Activities in Rats.....N. Koga, J. Kuroki, Y. Hokama and H. Yoshimura ... (33)
6. Experimental Studies on Long-Term Influence of Polychlorinated Dibenzofurans to Respir-
atory and Immune Status (Preliminary Study).....H. Kanegae, S. Iai, Y. Kurita and N. Shigematsu ... (39)
7. Influences of Polychlorinated Dibenzofuran on Carcinogenesis
.....R. Hirose, M. Hori, K. Fujita, K. Yamashiro, T. Shukuwa and H. Yoshida ... (43)
8. Detection of Polychlorinated Biphenyls (PCB) Toxicity by Colony Formation Methods of
HeLa Cells.....K. Matsuoka, F. Murayama, T. Ohgami, S. Nonaka and H. Yoshida ... (51)
9. Studies on the Experimental PCB Poisoning in Crab Eating Monkeys. III.
.....N. Koga, J. Kuroki, Y. Hokama, H. Kamimura, H. Nakashima, H. Yoshimura,
Y. Masuda, K. Haraguchi, H. Kuroki, M. Ooma and R. Hattori ... (55)
10. The Effects of Cholestyramine and Low-Calorie Diet on Biological Parameter Values in
Rhesus Monkeys with Experimental PCB PoisoningK. Akagi, H. Tsuji and M. Fujishima ... (69)
11. Histopathology of Chronic Meibomian Gland Abnormalities in Experimental PCB Intox-
icated MonkeyT. Kohno and Y. Ohnishi ... (74)
12. Histological Study on the Gingiva in the Patient with Yusho and the PCB Poisoned
MonkeysI. Hashiguchi, A. Akamine, S. Miyatake, Y. Hara, K. Maeda,
Y. Toriya, M. Aono, H. Fukuyama and H. Okumura ... (79)
13. Stimulation of Fecal Excretion of Etiological Compounds of Yusho in Rats
.....H. Kamimura and H. Yoshimura ... (86)
14. Studies on Therapeutic Effect of Squalane on Symptoms of PCDFs Poisoning in Monkeys
.....S. Hori, H. Obana and T. Kashimoto ... (101)
15. Distribution of Polychlorinated Biphenyl (PCB) and Polychlorinated Quaterphenyl (PCQ) in
Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*)S. Hori, H. Obana and T. Kashimoto ... (106)
16. A Cohort Study on Mortality of Yusho Patients—A Preliminary Report
.....M. Ikeda, M. Kuratsune, Y. Nakamura and T. Hirohata ... (117)

17. A Study of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity in Yusho Patients
.....J. Nagayama, C. Kiyohara, A. Fukuda, Y. Nakamura, T. Hirohata,
M. Asahi and T. Yoshimura ... (121)
18. Polychlorinated Quaterphenyls Concentration in the Blood of Normal Persons
.....T. Iida, S. Takenaka, R. Nakagawa K. Fukamachi, K. Takahashi and M. Asahi ... (125)
19. PCBs in Human Blood and Adipose Tissue : Levels and Similarities on Gas Chromatogram
.....R. Nakagawa, T. Iida, S. Takenaka, K. Fukamachi, A. Mori,
K. Takahashi and M. Asahi ... (129)
20. Relation Between the Gas Chromatogram Patterns of PCB in Human Blood and Six
Skeletal Congeners of PCQ in Human Adipose Tissue
.....S. Takenaka, T. Iida, R. Nakagawa, K. Fukamachi, A. Mori, K. Takahashi
and M. Asahi ... (134)
21. Quantitative Analysis of Polychlorobiphenyl (PCB) and Polychlorodibenzofuran (PCDF)
Isomers in the Comedo and Subcutaneous Abscess of Yusho Patients
.....H. Kuroki, M. Ohma, K. Haraguchi, Y. Masuda and T. Saruta ... (140)
22. Levels of PCDDs, Coplanar PCBs and PCDFs in Patients with Yusho and the Causal Oil by
HR-GC•HR-MST. Kashimoto, H. Miyata, K. Takayama and J. Ogaki ... (145)
23. PCB, PCQ Concentration of Blood and Subcutaneous Tissue in Patients with PCB Poison-
ing (Yusho)
.....T. Ohgami, S. Nonaka, H. Yoshida, F. Murayama, K. Yamashita and N. Masuda ... (157)
24. Liver Damage and Hepatocellular Carcinoma in Patients with Yusho
.....H. Tsuji, K. Akagi, K. Murai, E. Kajiwara and M. Fujishima ... (163)
25. Dermatological Findings in the General Examination of Yusho in 1985—1986
.....S. Toshitani, M. Asahi and H. Urabe ... (169)
26. In Vivo Transillumination of Meibomian Gland in Yusho Patients
.....T. Kohno and Y. Ohnishi ... (175)
27. Concentration Levels of the PCB and PCQ, Pattern of the PCB and Ratio of CB% in Buccal
Mucosa of Patients with the PCB Poisoning (Kanemi-Yusho).....
.....H. Okumura, N. Masuda, A. Akamine and M. Aono ... (178)

序 言

厚生省油症治療研究班・班長
中村学園大学・中村学園短期大学学長

倉 恒 匡 徳

九州大学油症治療研究班・班長
九州大学歯学部教授

青 野 正 男

長崎油症研究班・班長
長崎大学医学部教授

吉 田 彦 太 郎

Foreword

Masanori KURATSUNE

*Chief, Study Group for the Therapy of "Yusho", the Ministry of Health
and Welfare, and Dean, Nakamura Gakuen College
and Nakamura Gakuen Junior College, Fukuoka 814, Japan*

Masao AONO

*Chief, Study Group for the Therapy of "Yusho" at Kyushu
University. Professor, Faculty of Dentistry, Kyushu University*

Hikotarô YOSHIDA

*Chief, Study Group for the Therapy of "Yusho" at Nagasaki.
Professor, Nagasaki University, School of Medicine*

This 11th report on Yusho published as a special issue of FUKUOKA ACTA MEDICA consists of collected papers written by the members of the Study Group for the Therapy of "Yusho", the Ministry of Health and Welfare which is composed of the Study Group for the Therapy of "Yusho" at the Kyushu University, the Nagasaki Yusho Research Group, and the Follow-up Study Groups for Yusho in various prefectures. It deals with primarily the results of studies achieved by them but also those of related activities done by the Study Group from 1985 to 1987.

Among many interesting findings reported here, the most notable ones are perhaps those related to the accelerated fecal excretion of the causal agents of Yusho by administration of squalane and those concerning PCBs, PCQs, PCDFs, and related compounds still retained at a significantly high level in the subcutaneous and other tissues of patients. These findings may provide an important clue to the acceleration of cure and improved health care of patients which we have long been eager for. It is our belief that all these findings together with other relevant ones reported in this issue will significantly contribute to the better understanding of this unique poisoning and stimulate many who are concerned about the potential adverse effects of halogenated hydrocarbons.

Publication of this report was made by grants from the Ministry of Health and Welfare and from the City Office of Kitakyushu. It should also be mentioned with gratitude that the report was edited by one of us (M. A.) and his associate, Dr. A. Akamine.

(1)

倉 恒 匡 徳

In 1984, the Ministry of Health and Welfare established a new research team for the development of effective medical treatments for Yusho, that is, Study Group for the Therapy of "Yusho", the Ministry of Health and Welfare, by combining Study Group for the Therapy of "Yusho" at Kyushu University, Nagasaki Yusho Research Group, and Follow-up Study Groups for Yusho in prefectures. The research activities planned and performed by the author as chief of this newly united Study Group as well as a conference held by him as chief of the Study Group at Kyushu University in 1983, will be outlined below.

1. Yusho Conference

In view of the fact that no satisfactorily effective treatments for Yusho have yet been developed by us for all our devoted efforts, a conference was held by the Study Group at Kyushu University in 1983 in order to seek advice and comments of other specialists on our research activities and achievements. Twenty professors of diverse specialities from the Faculties of Science, Agriculture, Engineering, Pharmaceutical Sciences, and Medicine, and the Medical Institute of Bioregulation in Kyushu University and a few others from other universities were invited to the conference. Although no suggestions which can be immediately applicable to the treatment of Yusho were made by these guest scientists, they provided us with quite a few unique ideas related to the biochemical mechanism of the poisoning and to the acceleration of excretion of PCBs and PCDFs from the body.

2. Standardization of Medical Examination for Yusho

The Health Departments of prefectures had done annual medical examinations of Yusho patients on their own scheme, making it hard to sum up or to compare the results of such examinations. A unified form for medical examination of Yusho patients was therefore prepared in 1985 and has been used throughout the nation.

3. Revision of "A Guide for Therapy of Yusho" and Preparation of "A Guide for Healthy Life of Yusho Patients"

"A Guide for Therapy of Yusho" revised in 1972 was slightly revised in 1985 (Table 1) and "A Guide for Healthy Life of Yusho Patients" was for the first time prepared in 1985 (Table 2).

4. Liver Cancer Conference

Since an excess risk for liver cancer was seen among male patients in Fukuoka prefecture by epidemiologic investigations, a conference was held in 1985 to ask advice of specialists in liver cancer in regard to the best methods of prevention, early detection and treatment of the cancer which are well applicable to Yusho patients. Although no conclusive evidence is yet available which indicates that liver cancer is caused by the poisoning, it was unanimously supported that a particular effort should be made for early detection of liver cancer in the annual physical check-up of patients.

5. Workshop for Analytical Methods of PCQs

Yusho patients are known to have ingested a large amount of PCQs together with PCBs and still retain PCQs in their tissue. For standardization of the analytical methods of PCQs, a workshop was held in 1986. It was revealed that the standardization could not readily be made and still requires further study. The information presented at the conference was then printed and distributed to the members of the Study Group.

表 1 油症治療指針

油症治療指針	
	昭和61年 6 月 6 日
1. PCB等の排せつ促進	
現在、油症患者の体内の PCB 等の濃度は、一般に著しく低下しているものと推定されるが、重症者においては今なお一般人よりも高く、PCB 等の排せつを促進することが重要である。しかし PCB 等の特性上、充分有効な排せつ促進剤はまだ見いだされていない。	
現在考えうる PCB 等の排せつ促進法としては、	
(1) 適当な PCB 等の吸着剤の経口投与	
(2) 絶食療法	
などがある。ただし絶食療法については、その適応および実施にあたり慎重な配慮を必要とする。	
2. 治療	
一般的には、各種の症状に対して対症療法が行なわれる。	
1) 神経症状	
末梢神経症状のうち、しびれ感、感覚低下に対してはビタミン複合剤およびビタミン B ₁₂ の投与、痛み（頭痛を含む）に対しては鎮痛剤や頭痛薬の投与、湿布療法等を行なう。	
2) 呼吸器症状	
本症患者の主な呼吸器症状は咳・たんであるが、非喫煙患者では、たんはかたくり様で、水泡音が聴取された例はなかった。そのように、大気汚染による慢性気管支炎と理学的所見も異なり、気道の粘液産生貯溜傾向はなく、気道感染のない時には特別の治療を必要としない。本来、本症患者のたん中には血中濃度の 1/3 ないし 1/10 の PCB の存在を認め、排せつ経路としてのたん症状が考えられる。気道感染の合併によるたんの発現については、たんの検査によって決定し、適切な化学療法を中心とする治療を行う。	
3) 皮膚症状	
皮膚科症状のなかで癬およびアテローム様皮しんの化膿に対しては、抗生物質の内服、切開排膿、アテローム皮しんの切除を行ない、顔面の陥凹性はん痕の大きなものは切除縫合し、小さな浅いものに対してはブレーニング（皮膚剥削術）を行なう。色素沈着に対してはビタミン C やグルタチオン剤等の内服を、皮膚の乾燥・かゆみ等の訴えに対しては抗ヒスタミン剤の内服やステロイド軟膏の外用を、また足底の角化・鶏眼に対してはスピール膏貼布および削除を行なう。第一趾爪の刺入（爪甲湾曲）に対しては、爪囲の腫脹・とう痛のつよい症例では根治術を施行し、軽症例では入浴後に爪甲の両側端をやや深く切らせる。	
4) その他	
眼科、歯科、整形外科においても症状に応じた対症療法が行なわれる。	

表 2 油症患者の生活指針

油症患者の生活指針	
	昭和61年 6 月 6 日
油症患者の中には、脂質代謝その他種々の新陳代謝が正常ではなく、免疫も低下している症例がみられる。従って、油症患者は、蛋白質やビタミンが豊富な、栄養的にバランスのとれた食事の摂取に特に心がけるとともに、喫煙や飲酒をできるだけひかえることが望ましい。	

昭和59年度から厚生省の油症治療研究体制が変わり、九州大学油症治療研究班と、長崎油症研究班と、都道府県の油症追跡研究班が合同し、厚生省油症治療研究班が誕生した。その研究目的は、申すまでもなく、油症の中毒機構を究明するとともに、その治療法並びに油症患者に対する適切な健康管理方法を開発することにある。この研究目的を達成するために、上記の研究体制の一本化は、研究協力体制を確立するとともに、油症患者の全国的集計等それまで実現しなかった新たな研究活動を可能とし、有益であったと考えられる。以下今日に至るまで、新たに編成された班の班長として、私が企画し実行した研究活動について報告する。九州大学油症治療研究班ならびに長崎油症研究班の研究活動の成果については、それぞれの班長が総括して別途報告されるので、ここでは言及しない。なお私が当研究班の班長になる前、九州大学油症治療研究班の班長として企画し開催した油症検討会については未だ報告していないので、この機会に併せて報告しておきたい。

1. 油症検討会の開催

昭和43年に油症が発生して以来、『九州大学油症研究班』や『九州大学油症治療研究班』の努力により、中毒の本態はかなりよく解明されてきたが、その『治療法』に関しては、未だ満足すべき成果が得られていない。そこで、主として治療法に関する今後の研究方向を策定するために、これまでの研究成果を、油症研究班員以外の専門家に批判して頂くとともに、助言と援助を得るために、昭和58年9月8日、福岡市において油症検討会を開催した。この企画は、占部治邦・九大付属病院長や吉村英敏・九大薬学部長（ともに前九大油症治療研究班長）のご協力によるものである。ご出席頂いた班員以外の専門家は下記の通りである。

九州大学

- 理学部 大村恒雄（代謝生理学・教授）
- 岩永貞昭（生体高分子学・教授）
- 農学部 菅野道広（栄養化学・教授）
- 江藤守総（農薬化学・教授）
- 工学部 谷口 宏（応用化学・教授）
- 薬学部 上田 陽（薬品物理化学・教授）
- 酒井 浄（薬化学・教授）
- 後藤 茂（薬剤学・教授）
- 植木昭和（薬理学・教授）
- 医学部 高木康敬（医化学・教授）
- 大槻馨男（臨床薬理学・教授）

- 立石 潤（脳病理学・教授）
- 柳瀬敏幸（内科学・教授）
- 中野仁雄（産婦人科学・教授）
- 上村卓也（耳鼻咽喉科学・教授）

生体防御医学研究所

- 遠藤英也（生化学・教授）
- 野本亀久雄（免疫学・教授）

産業医科大学

- 村井由之（神経内科学・教授）

熊本大学体質医学研究所

- 鶴沢春生（成人体質学・教授）

福岡県衛生公害センター

- 高橋克巳（細菌学・副所長）

この検討会においては、油症の治療に直ちに適用できるような助言・提言は出されなかったが、血しょう交換の応用の可能性やD-ペニシラミンやプロフィブレートの試験の使用などが指摘されたり、患者体内に残留するPCBやPCDFをハブテンとして蛋白と反応させ、その抗体を作り、腎透析の技術によりそれらを排除することの可能性、さらに油症に特有なメラニン産成のこう進や角化異常の生化学的機序の推測など、示唆に富む貴重な意見を多数聞くことができて有益であった。

2. 油症追跡検診個人票の統一

全国の油症患者の検診が毎年1回行われているが、その結果を全国的に集計し、その実感を把握することは極めて望ましいことである。このため、主として九州大学油症治療研究班ならびに長崎油症研究班の班員の協力により、統一検診票（案）が作成され、昭和60年5月30日開催の油症治療研究班会議で検討され承認を得、同年秋から全国的にその使用が開始された。なお、検診によって得られた臨床検査データを集計・解析するためには、各都道府県の臨床検査方法が統一されていることが望ましいが、この問題に対処するため実状調査が行われ、その結果が、昭和62年2月20日、福岡市において、上記2研究班の班員により検討された。幸にして患者の7割を占める福岡県や長崎県においては、全く同一の検査機関において検査が行われていることが判明したが、残り3割の患者については、様々な検査方法が用いられていることが分かったので、それに対して対策が構えられることとなった。

3. 『油症治療指針』ならびに『油症患者の生活指針』の作成

昭和61年6月6日開催の油症治療研究班会議で、油症患者の治療に当る医師等のために『油症治療指針』（表1）が、また油症患者の日常生活の参考のために、『油症患者の生活指針』（表2）が検討され、作成された。生活指針が作られたのは、今回が初めてである。

4. 肝臓がん検討会の開催

これまでの疫学的研究により、福岡県の男子の油症患者の肝臓がん死亡が期待値を上まわっていることが知られている。それが『油症』そのものによって引き起されたものであるかどうかは、今のところ断定し難いが、PCB投与により動物に肝臓がんが生じたという報告もあるので、油症患者の健康管理において、肝臓がんはとりわけ重要視しなければならない問題であると考えられる。従って、肝臓がんの専門家から、油症患者に対して現時点においてとるべき肝臓がん対策、すなわちその予防と早期発見、早期治療について指導・助言を得ておくことは、極めて望ましいことであると考えられたので、昭和60年2月18日、福岡市において、下記の先生方をお招きして、肝臓がん検討会を開催した

肝臓がん予防とB型肝炎対策

九大・内科 講師 柏木征三郎

肝臓がんの早期発見

α -feto 蛋白をめぐる

福大・生化学 教授 松岡雄治

超音波エコーなど

久大・内科 助教授 久保保彦

肝臓がんの治療

肝臓動脈血栓治療について

福大・放射線科 講師 岡崎正敏

化学療法

熊大・微生物 教授 前田 浩

肝臓がんの外科治療

九大・外科 教授 井口 潔

講師 兼松隆之

教室における肝がん外科的治療の経験

長大・外科 教授 土屋涼一

この検討会の結論として、現時点では油症患者全体の肝臓がんリスクが高まっているとは断定できないが、

今後の油症患者の健康管理のために肝臓がんを重要視することは正しいとされた。また油症患者に適応できる極めて有効な肝臓がん予防対策は現時点では存在しないが、少しでも予防に有効な諸手段を集中的・効果的に適用するためにハイリスクグループを特定しておくことが大切であり、そのためにHBs抗原検査は必須であると指摘された。また肝臓がんの早期発見のためにはAFPを中心として、CEAやフェリチン等の腫瘍マーカーを組合わせて検査すること、ならびに超音波エコー検査等が大変有効であり、追跡検診にこれらを含めることが極めて望ましいと考えられた。さらに肝臓がん治療に関しては、今なお治療は困難であるが、最近めざましい進歩が見られ、それらの新しい治療法は油症患者にも十分応用しうると判断された。以上のことは、早期に発見された肝臓がんは治療しうることを物語っており、油症患者に対して肝臓がんの早期発見の努力をなすことが、決して無益でないことを示していると考えられるのである。

5. PCQの分析等に関するワークショップの開催

油症患者はPCBとともにPCQを多量に摂取しており、今なお体内にPCQを保有しているので、その分析は油症の診断や治療に必要である。しかしその分析方法が確立されていないので、分析等に関するワークショップが、分析担当者を集めて昭和61年2月28日、福岡市で開催された。すなわち、PCQ分析の経験を豊富にもっておられる榎本隆班員（摂南大学薬学部教授）、飯田隆雄氏（福岡県衛生公害センター専門研究員）、増田義人班員（第一薬科大学教授）、益田宣弘・本村秀章氏（長崎県公害研究所研究員）、鶴池昭二三氏（広島県海田保健所主任）、坂本征則氏（広島県衛生研究所部長）などに、分析上の問題点等を報告して頂き検討を行った。その内容は小冊にまとめ、班員ならびにPCB分析担当者に配布した。

以上が、班長が中心になって行った研究活動の概要である。

残念ながら、長年の班員の懸命の努力にもかかわらず、油症の根治療法は今なお開発されていない。しかし、最近の吉村英敏班員の研究は、我々に希望を与えるものである。研究班の目的を一日でも早く達成し、患者の期待に応えよう、班員各位と一体になって努力する所存である。

(2)

青 野 正 男

「油症とPCB（塩化ビフェニール）に関する研究報告 第11集」は前回の報告集（昭和60年5月）に引き続き、昭和62年3月に至る九州大学油症治療研究班と長崎油症研究班の研究結果を集録したものである。

厚生省は昭和59年度から油症治療研究体制を整備し、九州大学油症治療研究班と長崎油症研究班、ならびに各都府県の油症追跡研究班をも包含して研究・治療体制を一本化し油症研究を進めることになった。なお、この期間における油症治療研究班員の構成は表1、表2に示す通りである。

この第11集では油症治療研究の変遷を辿る意味も含めて油症診断基準などを掲載した。

昭和43年6月7日九州大学医学部附属病院皮膚科を受診した最初の油症患者発見後、昭和43年10月、油症研究班が組織された。ついで同班により油症の診断基準が作成され、油症診断のガイドラインが設定された（表3）。

その後、Polychlorinated biphenyl (PCB) が油症の原因物質であることが判明し、その血中濃度ならびにPCB パターンの測定が可能となった。この間、油症による急性症状は次第に消退し、慢性症状が主体を始めるようになり昭和47年10月には従来の油症診断基準が改訂された（表4）。さらに昭和51年6月には補遺が加えられることになった（表5）。

また原因食品である典型的ライスオイル中にはPCBの2量体 Polychlorinated quater phenyl (PCQ) がPCBと等濃度（約1,000 ppm）で混入していることが明らかになり、このPCQは現在、PCBのような広範な環境汚染がないため油症の原因物質であるライスオイル摂取の有無を判定するための有用な化合物と考えられ、昭和56年6月表6に示すような診断基準への追加が行われた。

油症患者の発生状況は福岡県においては表7に示すように昭和43～62年の19年間に計817に達している。また昭和61年12月31日までの全国油症患者数は

表1 昭和60, 61年度九州大学油症治療研究班員

班 長	九 大 歯 科 保 存 教 授	青野 正男	班 員	九 大 薬 学 助 教 授	佐伯清太郎
班 員	九 大 医 皮 膚 科 教 授	占部 治邦	班 員	九 大 歯 科 保 存 講 師	赤峰 昭文
班 員	〃 〃 助 教 授	旭 正一	班 員	九 大 理 生 休 高 分 子 教 授	岩永 貞昭
班 員	〃 〃 呼 吸 器 科 教 授	重松 信昭	班 員	福 岡 大 医 第 一 内 科 教 授	奥村 恂
班 員	〃 〃 神 経 内 科 講 師	藤井 直樹	班 員	〃 〃 病 理 教 授	菊池 昌弘
班 員	〃 〃 眼 科 助 教 授	大西 克尚	班 員	〃 〃 皮 膚 科 教 授	利谷 昭治
班 員	〃 〃 第 二 内 科 講 師	赤木 公博	班 員	第 一 薬 大 物 理 分 析 教 授	増田 義人
班 員	〃 〃 公 衆 衛 生 教 授	廣畑 富雄	班 員	福 岡 県 衛 生 公 害 セ ン タ ー	所 長 高橋 克巳
班 員	〃 〃 〃 〃 講 師	長山 淳哉	班 員	〃 〃 〃 〃	教 授 樫本 隆
班 員	〃 〃 〃 〃 助 手	竹下 節子	班 員	〃 〃 〃 〃	教 授 西住 昌裕
班 員	九 大 薬 衛 生 裁 判 化 学 教 授	吉村 英敏	班 員	〃 〃 〃 〃	講 師 赤峰 昭文
班 員	〃 〃 〃 〃 助 教 授	小栗 一太	班 員	〃 〃 〃 〃	
班 員	〃 〃 〃 〃 助 手	古賀 信幸	事 務 局	九 大 歯 科 保 存	

表2 昭和60, 61年度長崎油症研究班員

班 長	長 大 医 皮 膚 科 教 授	吉田彦太郎	班 員	長 大 医 皮 膚 科 医 員	山城 一純
班 員	〃 〃 〃 〃 講 師	堀 真	班 員	〃 〃 〃 〃 研 修 医	宿輪 哲生
班 員	〃 〃 〃 〃 〃 〃	大神 太郎	班 員	〃 〃 〃 〃 医 生	村山 史男
班 員	〃 〃 〃 〃 〃 〃	野中 薫雄	班 員	〃 〃 〃 〃 〃 〃	吉田 和徳
班 員	〃 〃 〃 〃 〃 〃	藤田 和夫	班 員	〃 〃 〃 〃 〃 〃	豊島 弘行
班 員	〃 〃 〃 〃 〃 〃	広瀬 寮二	班 員	〃 〃 〃 〃 〃 〃	鳥山 史

1,854 名であり、その居住地別内訳は表 8 のようである。さらに全国の年次別油症患者発生数の累計は表 9 のように現時点でも新たに認定患者が追加されている。

なお油症患者から出生しその児への移行が考えられる事件後出生患者数の年次別患者状況は表 10 のようである。

本研究班は福岡県における油症検診事業に専門医師の派遣を行ない、油症外来の設置などを通じて協力してきた。このことは油症患者の健康管理と追跡調査、治療法の開発にも関連した重要な事業である。昭和 47 年から昭和 61 年までの油症患者の追跡調査状況は表 11 のようであり、発症当初の受診率に比し近年は横ばい状態となっている。

一方、未認定者検診と認定状況は表 12 のように受診率は認定患者に比べて高率であり、未だに僅小な

ら認定患者が発掘されている現状である。

油症患者の治療については原因物質である PCB, PCQ, などの排泄をはかることが先決であり、本研究班も鋭意研究を行ってきたが、現在まだ有用な排泄促進剤は実用段階に入っていない。したがって現状では対症療法と合併症の治療並に患者の健康管理を十分に行うよう留意するにとどまっている。昭和 47 年 10 月時点での治療指針は表 13 のようであるが、昭和 61 年 6 月に新しい油症治療指針と油症患者の生活指針が作成され公布された。(p.3 表 1, 表 2, 参照)

本報告集における研究成果から明らかになった主要事項は次のようなものである。

1) 油症患者の組織中 PCB, PCQ, PCDDs 量、油症患者の血液中並に生検による皮下脂肪組織中 PCB, PCQ 濃度は肝、腎より 10 倍多く、血液中

表 3 「油症」診断基準 (昭和 43 年)

本基準は、西日本地区を中心に米ぬか油使用に起因すると思われる特異な病像を呈して発症した特定疾病(いわゆる「油症」)に対してのみ適用される。 したがって、食用油使用が発症要因の一部となりうるすべての皮膚疾患に適用されるものではない。 発症参考状況 1) 米ぬか油を使用していること。 2) 家族発症が多くの場合認められる。これが認められない場合は、その理由について若干の検討を要する。 3) 発病は、本年 4 月以降の場合が多い。 4) 米ぬか油を使用してから発病までには、若干の時間を要するものと思われる。 診 断 基 準 症状 上眼瞼の浮腫、眼脂の増加、食思不振、爪の変色、脱毛、両肢の浮腫、嘔気、嘔吐、四肢の脱力感・しびれ感、関節痛、皮膚症状を訴えるものが多い。 特に、眼脂の増加、爪の変色、痤瘡様皮疹は、本症を疑わせる要因となりうる。 また、症状に附随した視力の低下、体重減少等もしばしば認められる。 以下特殊検査に基づかない一般的な本症の所見を述べる。 1. 眼 所 見 眼脂(マイボーム氏腺分泌)の増加、眼球および眼瞼結膜の充血・混濁・異常着色・角膜輪部の異常着色、一過性視力低下が認められる。 なお、他の眼疾患との鑑別上分泌物のギムザ染色検査が望ましい。 2. 皮 膚 所 見 角化異常を主とし、次のような種々の所見が認められる。	1) 爪の変色、時に扁平化をみるが、明らかな変形は認められない。 2) 毛孔に一致した黒点(著明化)。 3) 手掌に発汗過多。 4) 角性丘疹、特に、皮膚汗脂分泌の多い部を侵す(例、腋窩部など)。 5) 痤瘡様皮疹、面皰より集簇性痤瘡とみられる重症型まで、さまざまである。 6) 脂腺部に一致した囊胞(外陰部に多くみられる)。 7) 小児の場合も上記症状をしめすが、若干症状を異にすることもある。すなわち、全身特に四肢屈側に帽針頭大の落屑性紅斑の多発を認める場合があり、多少の痒みを訴える。 8) 癢痒は多くの例にはない。また、あっても軽度であり、癢痕は認めない。 9) 皮膚は、多少汚黄色を呈するが、著明な色素沈着はない場合が多い。 10) 乾性脂漏 11) 口腔粘膜および歯肉に着色をみることがある。 12) 耳垢の増加を認める。 3. 全 身 所 見 1) 貧血、肝脾腫は認めないことが多い。しかし発熱、肝機能障害を認めることがある。 2) 手足のしびれ、脱力感を訴えるが、著明な麻痺は認めない。深部反射は減弱あるいは消失することがある。 四肢末端の痛覚過敏を時に認める。 上記所見は、典型例においては、その大多数が認められるが、手掌の発汗過多、爪の変色、眼脂の分泌増加、頬骨部の面皰形成、および自覚症のいくらかを総合して、疑症をもうけることは必要であろう。
--	---

表 4 油症診断基準（昭和 47 年 10 月 26 日改訂）

油症は PCB の急性ないし亜急性の中毒と考えられるが、現在全身症状には、成長抑制、神経内分泌障害、酵素誘導現象、呼吸器系障害、脂質代謝異常などがあり、局所症状には皮膚および粘膜の病変として痤瘡様皮疹と色素沈着、さらに眼症状などがみられる。 1. 発病条件 PCB の混入したカネミ米ぬか油を摂取していること。 多くの場合家族発生がみられる。 2. 全身症状 1) 自覚症状 ① 全身倦怠感 ② 頭重ないし頭痛 ③ 不定の腹痛 ④ 手足のしびれ感または疼痛 ⑤ 関節部のはれおよび疼痛 ⑥ 咳嗽・喀痰 ⑦ 月経の変化 2) 他覚症状	① 気管支炎様症状 ② 感覚性ニューロパチー ③ 粘液囊炎 ④ 小児では成長抑制および歯牙異常 ⑤ 新生児の SFD (Small-For-Dates Baby) および全身性色素沈着 3) 検査成績 ① 血液 PCB の性状および濃度の異常 ② 血液中性脂肪の増加 ③ 貧血、リンパ球増多、アルブミン減少 ④ 知覚神経伝導性と副腎皮質機能の低下 3. 皮膚粘膜症状 1) 痤瘡性皮疹 顔面、臀部、その他間擦部などにみられる黒色面皰、痤瘡様皮疹とその化膿傾向 2) 色素沈着 顔面、眼瞼粘膜、歯肉、指趾爪などの色素沈着 3) 眼症状 マイボーム腺肥大と眼脂過多、眼瞼浮腫など
--	--

表 5 油症診断基準（昭和 51 年 6 月 14 日補遺）

油症の診断基準としては、昭和 47 年 10 月 26 日に改訂された基準があるが、その後の時間の経過とともに症状と所見の変化がみられるので、現時点においては、次のような診断基準によることが妥当と考えられる。 発病条件 PCB の混入したカネミ米ぬか油を摂取していること。 油症母親を介して児に PCB が移行する場合もある。 多くの場合家族発生がみられる。 重要な所見 1. 痤瘡様皮疹 顔面、臀部、そのほか間擦部などにみられる黒色面皰、面皰に炎症所見の加わったもの、および粥状内容物をもつ皮下囊胞とそれらの化膿傾向。 2. 色素沈着 顔面、眼瞼結膜、指趾爪などの色素沈着（いわゆる“ブラックベイビー”をふくむ） 3. マイボーム腺分泌過多 4. 血液 PCB の性状および濃度の異常	参考となる症状と所見 1. 自覚症状 1) 全身倦怠感 2) 頭重ないし頭痛 3) 四肢のパレステジア（異常感覚） 4) 眼脂過多 5) せき、たん 6) 不定の腹痛 7) 月経の変化 2. 他覚的所見 1) 気管支炎所見 2) 爪の変形 3) 粘液囊炎 4) 血清中性脂肪の増加 5) 血清 γ-GTP 6) 血清ビリルビンの減少 7) 新生児の SFD (Small-For-Dates Baby) 8) 小児では、成長抑制および歯牙異常（永久歯の萌出遅延）
---	---

- 註 1. 以上の発病条件と症状、所見を参考にし、受診者の年齢および時間的経過を考慮のうえ、総合的に診断する。
2. この診断基準は、油症であるか否かについての判断の基準を示したものであって、必ずしも油症の重症度とは関係ない。
3. 血液 PCB の性状と濃度の異常については、地域差職業などを考慮する必要がある。

表 6 油症診断基準（昭和 56 年 6 月 16 日追加）油症治療研究班

1. 油症診断基準（昭和 51 年 6 月 14 日補遺）中、重要な所見「4. 血液 PCB の性状および濃度の異常」の次に「5. 血液 PCQ の性状および濃度の異常」を追加する。 2. 今までの研究により、血中 PCQ の濃度については次のとおり結論した。 (1) 0.1 ppb 以上：異常に高い濃度 (2) 0.03～0.09 ppb：(1) と (3) の境界領域濃度 (3) 0.02 ppb（検出限界）以下：通常みられる濃度
--

表 7 福岡県油症患者発生状況（年次別および累計）

年 次	男	女	計	累 計	年 次	男	女	計	累 計
昭和43年	156	164	320	320	昭和53年	4	4	8	745
44	46	42	88	408	54	2	7	9	754
45	15	13	28	436	55	13	13	26	780
46	9	6	15	451	56	6	8	14	794
47	1	0	1	452	57	5	4	9	803
48	18	17	35	487	58	4	2	6	809
49	33	36	69	556	59	1	0	1	810
50	62	61	123	679	60	4	0	4	814
51	23	22	45	724	61	1	1	2	816
52	5	8	13	737	62	1	0	1	817

表 9 全国油症患者発生数（年次別累計）

年 次	患 者 数
昭和43年	676
44	1,001
45	1,056
46	1,081
47	1,097
48	1,200
49	1,288
50	1,531
51	1,629
52	1,665
53	1,684
54	1,696
55	1,729
56	1,770
57	1,788
58	1,824
59	1,833
60	1,841
61	1,854

表 8 年次別，都道府県別油症患者数

都道府県名	年 次	昭和60年末	昭和61年末
北海道		0	0
青森		1	0
茨城		1	0
栃木		0	0
埼玉		7	7
千葉		15	14
東京		9	8
神奈川		9	8
長野		1	1
岐阜		2	2
静岡		0	1
愛知		31	29
三重		3	3
京都		2	2
大阪		65	65
兵庫		14	13
奈良		23	23
鳥取		2	2
島根		9	9
岡山		4	4
広島		109	112
山口		52	51
愛媛		13	15
徳島		0	0
高知		47	47
福岡		757	759
佐賀		22	22
長崎		599	612
熊本		8	8
大分		25	25
鹿児島		10	10
沖縄		1	1
計		1,841	1,854

PCQ 濃度と相関し，さらに PCQ 骨格異性体の構成比が判明した。

また油症原油中には Coplanar PCBs や 5 塩化～8 塩化ポリ塩化シベンゾ-p-ジオキシン (PCDDs) が存在し，これを摂取した油症患者組織中には正常人より高濃度の Polychloro dibenzo-p-dioxin (PCDDs) が蓄積している。

口腔組織において，油症患者の頬粘膜と血液中の PCB 濃度と PCQ 濃度との関連性について検討したところ，頬部 PCQ は血中 PCQ の約 91 倍の濃度，頬部 PCB は血中 PCB の約 36 倍の濃度で，いずれも高い相関関係が認められた。このことより，油の摂取が頬

表 10 事件後出生患者状況（出生年次別）

年 次	男	女	計
昭和43年	8	5	13
44	5	2	7
45	3	1	4
46	5	5	10
47	1	2	3
48	2		2
49	2	1	3
50	0	0	0
51	2	1	3
52	0	1	1
53	0	0	0
54	0	0	0
55	0	0	0
56	0	0	0
57	1	0	1
計	29	18	47

表 11 油症患者追跡調査状況

区分 年度	対象者数	受 診 希望者数	受診者数(受診率)
47	405	221	130 (32.1)
48	436	206	120 (27.5)
49	502	256	175 (34.9)
50	612	240	100 (16.3)
51	658	166	96 (14.6)
52	665	167	103 (15.7)
53	671	186	127 (18.9)
54	676	195	110 (16.3)
55	707	215	112 (15.8)
56	726	182	114 (15.7)
57	729	167	101 (13.9)
58	728	151	80 (11.0)
59	700	221	125 (17.9)
60	711	247	158 (22.2)
61	711	217	142 (20.0)

粘膜、歯、顎骨など口腔全体に多大の影響を及ぼしていると考えられた。

2) PCB, PCQ, PenCDF の生体内分布

カニクイザルに PCB, PCQ, PCB (Y-PCB) と KC-400 を経口投与した場合、Y-PCB は KC-400 の約 2.5 倍の高濃度で組織に分布し、PCQ は副腎と肝に高濃度に蓄積する。ラットにおいても 2, 3, 4, 7, 8-Pen CDF を投与した場合、胸腺の萎縮がみられ、肝、肺、腎、小腸、脂肪組織に分布する。

特にラット、サル、ヒトの肝には長期間残留し、ラット肝に集積した Pen CDF は肝ミクロゾームに顕

表 12 未認定者検診及び認定状況

区分 年度	受 診 希望者 a	受診 者数 b	受診率 (%) b/a	検 診 結 果			
				患者 c	発現率 (%) c/b	保留	所見 なし
47		45		35	77.8	8	2
48		91		69	75.8	16	6
49	366	258	70.5	123	47.7	93	42
50	171	158	92.4	44	27.8	91	23
51	136	126	92.6	14	11.1	98	14
52	145	118	81.4	8	6.8	73	37
53	128	110	85.9	9	8.2	86	15
54	126	90	71.4	26	28.9	58	6
55	105	82	78.1	14	17.1	47	21
56	83	72	86.7	9	12.5	24	39
57	72	61	84.7	6	9.8	30	25
58	68	39	57.4	1	2.6	21	17
59	68	51	75.0	4	7.8	22	25
60	56	45	80.4	2	4.4	23	20
61	47	32	68.1	1	3.3	11	20

著に誘導される P-450 標品中の p-448 と特異的に結合し、この分布は用量依存的である。

3) PCB 並びに Pen CDF の毒性作用

PCB 中毒症サルにコレステラミン治療実験後、6 カ月期間をあげ再度蒸留 KC-400 (PCB, PCQ, PCDF を含む) を投与すると PCB による肝ミクロゾーム酵素の PB 型誘導に特徴的な BZN 脱メチル化活性が増加する。また PCB のメチルスルホン体は気管支や肺に蓄積しこれらの毒性作用は Pen CDF の毒性が強く影響している。

PCB の中でも強い急性毒性と肝薬物代謝酵素系の MC 型誘導能を示す 3, 4, 5, 3', 4'-Penta chloro biphenyl (Pen CB) の投与ラットにおいて体重増加抑制、胸腺萎縮がみられ Bp-3 水酸化活性と DT-Diaphorase 活性の増加が長期に持続している。

一方、PCBs の生体内代謝産物 Methylsulphone polychlorinated biphenyl (MSF-PCBs) はリンパ球の芳香族炭化水素水酸化酵素 Arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性を阻害する。

4) PCB, PCDF による病理組織学的変化

呼吸器系並びに免疫系への影響として胸腺の早期の萎縮と以後の正常像への復帰と相関する形で羊赤血球に対する足蹠反応は減弱と回復を示した。クララ細胞は早期には変性を呈し、以後、細胞は増生する。

実験的 PCB 中毒サルにおけるマイボーム腺病変は部分的消失、短縮化、肥大、腺房不明瞭などの異常を示し病変は長期化する。

表 13 油症治療指針（昭和 47 年 10 月 26 日改訂）

1. PCB の排泄促進 現在、油症患者の PCB 濃度はかなり低下しているものと推定されるが、PCB の排泄を促進することが最も重要である。ただ PCB の特性上、適当な排泄促進剤はなお報告されていない。 現在考える PCB の排泄促進法としては (1) 絶食 (2) 酵素誘導法 (3) 適当な PCB 吸着剤の経口投与などがあげられている。 ただし、絶食および酵素誘導法については、その適応および実施に慎重な配慮を要する。 2. 対症療法 対症療法としては、種々の解毒剤（たとえば還元型グルタチオン）種々の脂質代謝改善剤などのほか、	脳神経症状にたいしては鎮痛剤、ビタミン B 剤など、呼吸器症状には鎮咳剤などを投与し、また内分泌症状にたいしてはホルモン療法も考えられる。皮膚症状にたいしては、種々の対症療法が行われているが、症例によっては形成手術も行われる。 その他、眼科、整形外科、歯科保存科においては症状に応じた対症療法が行われる。 3. 合併症の治療 油症患者においては、神経、内分泌障害、酵素誘導などの所見がみられるため種々の合併症を生じやすく、また合併症が重症化する傾向があるので慎重に治療する必要がある。 また、酵素誘導により薬物の分解が促進されており、通常の投与量では治療効果があがらぬことも多い。
--	---

油症患者のマイボーム腺の配列異常は高頻度（41％）にみられる。

5) 油症原因物質 PCB, PCDF の排泄促進

スクアラン、流動パラフィン、コレステラミン、活性炭は肝に局在する PCDF の体外排泄を促進し毒性軽減に寄与することが判明した。特にスクアランと活性炭ピーズは排泄促進効果がより顕著である。しかしこれらの薬物は脂肪酸や脂溶性ビタミン、生体に必須の脂質吸収を抑制する可能性があり、今後の臨床応用に際しては種々の臨床試験により安全性を確認することが必要である。

6) 油症患者における肝障害と肝細胞癌等について

油症患者の血液中 PCB 濃度と肝機能検査結果では GOT, GPT, アルカリホスファターゼ, 2-GTP は

対照群と有意差はないが肝障害者に肥満傾向があった。

また油症患者の死亡に関するコホート研究では男の油症患者において肝癌死亡が高くなっている傾向にあるが、これが油症のためであるとは断定できず今後の詳細な研究が望まれる。

このように油症研究に関して研究の進展がみられたが、未だ色素沈着の原因や PCB, PCQ, PCDF の排泄促進に関する研究課題など将来に残された問題も多く、今後の研究が期待される。

本誌に集録した研究成果は「熱媒体の人体影響とその治療等に関する研究」に対する昭和 60 年度および昭和 61 年度厚生科学研究費補助金ならびに同年度の北九州市よりの研究補助金に負うものである。ここに深甚なる謝意を表す。

(3)

吉 田 彦 太 郎

昭和 43 年、カネミライスオイル事件が発生して以来 19 年の歳月が流れ、臨床症状の生々しさは陰を潜めたものの、なお種々の全身的自覚症状に苦しんでいる人々は決して少なくない。そして極めて残念なことであるが、まだ根本的治療法は確立されていない。

今後われわれに課せられたもっとも重要な使命は言うまでもなく有効な治療法の開発であるが、その効果を客観的に把握する物差しが必要であることも事実である。また 19 年間という時間的経過は新しい患者の認定上にも多くの難問を提起しつつある。以前から血液中の PCB, PCQ, PCDF などの測定, PCB パターン, CB% 比の検討などが試みられ、それなりの成果をあげてきたが、新しい患者の認定にはより確実な方法が必要となってきたことも事実である。

一昨年来、われわれは皮下脂肪組織の PCB, PCQ 濃度の測定を試み、油症患者ではそれらの濃度、特に PCQ が著しく高いことを明らかにしてきている。この結果が治療によりどのように推移するかは予測しがたいが、少なくとも新しい患者の認定上極めて有力な判定手段となることは事実であろう。

また、われわれのグループでは HeLa 細胞を培養し、PCB 添加による細胞の障害、死滅までの期間を観察する系を設け、これに油症に対して効果が少しでも期待できそうな薬物を加え、HeLa 細胞への障害防御効果、延命効果などを観察している。すなわち油症に対する治療薬物の開発と理論的裏付けを目標での実験であるが、現在基礎的実験の段階にある。

さらにわれわれは 20 メチルコラントレインによる皮膚の発癌系にも PCB が抑制的に作用することを報告してきたが PCDF にもさらに強力な発癌抑制作用があることも明らかにしている。これも PCDF の強い細胞毒作用の結果であるが、この系も前述の培養細胞の実験と同様、治療薬物の開発に関連する可能性が秘められているであろう。

以上、われわれのグループの研究内容の一端を紹介した。治療の面からは些か物足りない思いをするが、手の届くことから着実に実験を積み重ねたいと思う。そしてこれらの成果が大きく役立つ日のくることを切望している次第である。

Polychlorodibenzofuran (PCDF) のアルカリ分解によるエトキシ (EtO) 体の生成

第一薬科大学物理分析学教室

黒木 広明・原口 浩一・増田 義人

Formation of EtO-PCDF by the Treatment of Alkali Saponification on PCDF

Hiroaki KUROKI, Koichi HARAGUCHI and Yoshito MASUDA

*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Minami-ku,
Fukuoka 815, Japan*

In the analysis of polychlorobiphenyl (PCB), polychlorodibenzofuran (PCDF) and polychlorodibenzo-*p*-dioxin (PCDD), alkali saponification has been employed as one of the analytical procedures. To examine the effect of alkali saponification to PCDF, a mixture of 2, 3, 4, 7, 8-Penta-CDF (20 μ g) and 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexa-CDF (21 μ g) was treated with 50 ml of 1N sodium hydroxide-ethanol (EtOH) solution by refluxing for 1.5 hr and cleaned up by following procedures: n-hexane extraction, treatment with concentrated sulfuric acid and successive chromatography on activated carbon and Florisil columns. The final PCDF fraction was analyzed by capillary column gas chromatography (ECD-GC) and capillary gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). As the results, it was found that EtO-PCDF were formed from the PCDF, probably from 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexa-CDF, by alkali treatment suggesting the nucleophilic displacement of halogen by ethanol followed by elimination of proton. The ECD-GC and GC/MS analysis showed the formation of at least 3 EtO-Penta-CDF and a EtO-Tetra-CDF (trace) isomers. EtO-Penta-CDFs were quantitatively determined by ECD-GC estimating to be 4.3 μ g. This value corresponds to 20 % of 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexa-CDF used.

Nine EtO-PCDF isomers (Cl: 1~5) were prepared as reference compounds and their electron impact (EI) mass spectra were investigated. However, the EI mass spectra of EtO-PCDF provided little useful information with respect to the position of EtO-group.

Polychlorobiphenyl (PCB), Polychlorodibenzofuran (PCDF) および Polychlorodibenzo-*p*-dioxin (PCDD) は一連の類似した構造を有する高毒性化合物であり、環境中の生物、人体組織、母乳、土壌、自動車排ガス、食品あるいは空気などから検出¹⁾されるなど、世界的環境汚染物質である。また、PCB および PCDF はいわゆる油症の原因物質として知られている。これら PCB, PCDF あるいは PCDD の分析法としてこれまで多くの分析法が報告されているが、試料あるいは抽出脂肪を 1N NaOH (あるいは KOH) エタノール溶液あるいはエタノール-40 % KOH 水溶液と加熱する、いわゆるアルカリ分解法は人・動物組織などに対する効果的な方法として頻用さ

れている。例えば、PCB 分析では厚生省 PCB 分析法²⁾にアルカリ分解が含まれており、PCB の分析法として広く用いられている。また、魚、脂肪組織、ミルク³⁾あるいは母乳⁴⁾などの試料の PCDF, PCDD の分析においてもアルカリ分解法が用いられている。アルカリ溶液を試料に加え、室温で振とうする方法も報告⁴⁾されている。

このように、アルカリ分解法は有機塩素系農薬を分解するなどの利点を有し、人・動物組織に対するすぐれた処理法ではあるが、一方、アルカリ分解のもつ問題点も指摘されている。たとえば、PCDD では 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptachloro-, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin などの高塩素 PCDD

はアルカリ分解によってかなりの割合で損失し、アルカリ分解を含めた分析法の回収率が1%以下であることが報告⁹⁾されている。

したがって、当然ながらPCB、PCDFにおいてもアルカリ分解による損失などの問題点が考慮されるが、この点を明らかにした報告はない。そこで今回、著者らはPCDFのうち、高毒性で高残留性を示す異性体である2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) および1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran (HCDF) をモデル化合物として、PCDFにおよぼすアルカリ分解の影響について検討を行った。

実験方法

1. 実験材料

2, 3, 4, 7, 8-PenCDF および1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDFは既報¹⁰⁾の方法にしたがって合成した。活性炭およびFlorisilはそれぞれ半井化学薬品(株)(京都), Floridin Co. (U. S. A) より購入した。

2. アルカリ分解および試料処理法

アルカリ分解は2, 3, 4, 7, 8-PenCDF (20 μ g) および1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF (21 μ g) に1N NaOH エタノール溶液50 mlを加え、約80°の水浴上で1.5時間穏やかに還流して行った。冷後、100 mlの水を加えn-ヘキサン50 mlで3回抽出した。n-ヘキサン抽出液を約15 mlの濃硫酸で3回振った後、n-ヘキサン層を水洗、脱水した。このn-ヘキサン溶液を濃縮し、活性炭カラム(2×0.8 cm I.D.)クロマトグラフィーに付し、まず20 mlジクロロメタン・n-ヘキサン(1:9)で、次いで80 mlトルエンで溶出した。このトルエン溶出液を留去後、n-ヘキサン溶液としフロリジルカラム(14×0.6 cm I.D.)クロマトグラフィーに付し、20 mlジクロロメタン・n-ヘキサン(1:99)および50 mlジクロロメタンで順次溶出した。ジクロロメタン溶出液について溶媒留去後、n-ヘキサン溶液とし、ECD-GCあるいはCapillary GC/MSの試料とした。

3. EtO-PCDF 標品の合成

9種のEtO-PCDF異性体(1~5塩化)は既報¹⁰⁾にしたがって合成した。これらのEtO-PCDFのうち、純度99%以上の異性体のマススペクトルは後述の日本電子JMS DX 300質量分析計/データ処理システムJMA-DA 5000を使用し、直接試料導入、電子衝撃(EI)法により測定した。測定条件は次の通りである。イオン化エネルギー70 eV, イオン化電流300 μ A, 加速電圧3.0 KV, イオン源温度150°C。また、

不純度を含むEtO-PCDF異性体についてはCapillary GC/MSによりEIモードで測定した。

4. ガスクロマトグラフィー (ECD-GC)

島津GC-7AG型ガスクロマトグラフに電子捕獲型検出器(⁶³Ni)を装着したものを使用して行った。カラムにはフューズドシリカキャピラリーカラムULBON HR-52 (0.24 mm I.D.×50 m, 島津)を用いた。カラム温度は最初2分間180°Cに保ち、8°C/分で250°Cまで昇温、その後250°Cで一定に保持した。注入口および検出器温度は280°Cに保った。試料の注入はムービングニードル型ソルベントカット試料装置(島津)を用いて行った。キャリアガスおよびメイクアップガスには高純度窒素ガスを使用した。

5. ガスクロマトグラフィーによるEtO-PCDFの定量

EtO-PCDFの定量はガスクロマトグラフのピーク面積を7-EtO-1, 2, 3, 4, 8-PenCDFのピーク面積と比較することによって行った。ピーク面積の測定はクロマトパックC-R2AX(島津)を用いた。

6. Capillary GC/MS

測定には日本電子JMS-DX300ガスクロマトグラフ/質量分析計/データ処理システムJMA-DA5000を使用しEIモードで行った。ガスクロマトグラフにはフューズドシリカキャピラリーカラムDB 225 (0.252 mm×30 m, J and W社)を取り付け、キャピラリーカラムはイオン源部へ直接接続した。カラム温度は2分間190°Cに保ったのち、8°C/分の割合で250°Cまで昇温させ250°Cにそのまま保持した。キャリアガスにはヘリウムガスを用い、ガス流量はカラム内1.4 ml/minとした。試料はソルベントレス試料導入装置を用いて注入した。その他の測定条件は次の通りである。注入口温度:280°, セパレーター温度:250°, インレット温度:250°, イオン化室温度:200~220°, イオン化エネルギー:70 eV, イオン化電流:300 μ A, 加速電圧:3 KV。

結果

Fig. 1に2, 3, 4, 7, 8-PenCDF (20 μ g) および1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF (21 μ g)の混合物を1N NaOH エタノール溶液でアルカリ分解した試料について、Capillary GC/MSで分析した結果を示す。トータルイオンクロマトグラム(TIC)において、アルカリ分解に用いた2, 3, 4, 7, 8-PenCDFおよび1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDFとは異なるいくつかのピークが認められる。例えば、ピークBのマススペクトルは、Fig. 1に示すように、

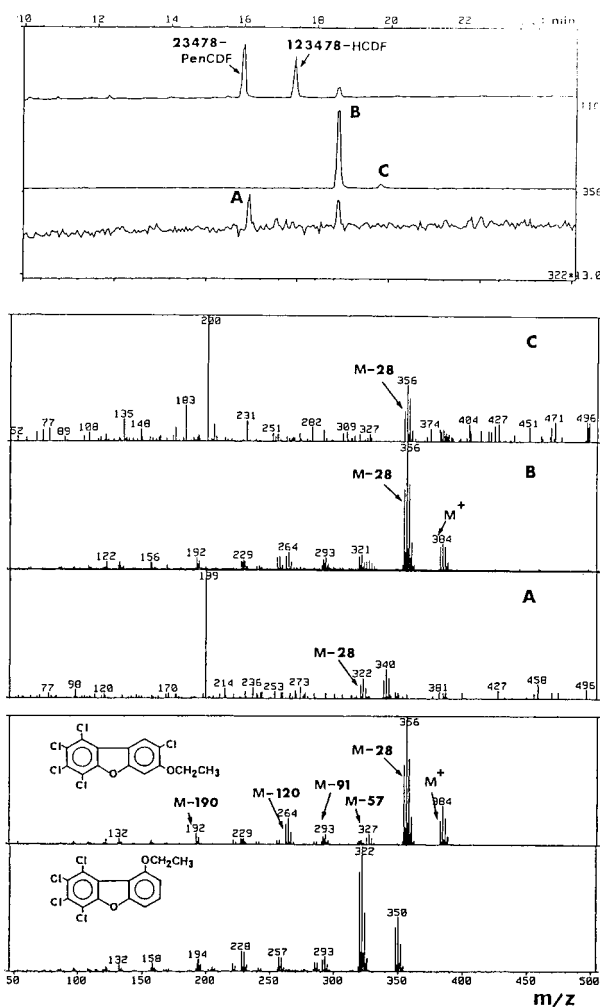
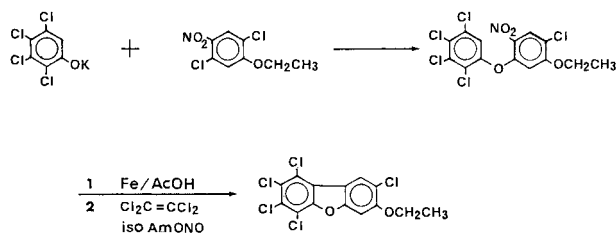


Fig. 1 Total ion chromatogram of a mixture of 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF and 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF treated by alkali saponification; and EI mass spectra of peaks A-C and of authentic samples.



Scheme 1

分子イオン (M^+) を m/z 382 (Cl の同位体ピーク比から五塩化体) に示し、基準ピークとして M^+-28 (m/z 354) が観察された。また、イオン強度

は弱い M^+-63 (m/z 319), M^+-91 (m/z 291), M^+-120 (m/z 262) および M^+-127 (m/z 255) などのフラグメントイオンが認められた。このようなフラ

Table 1 EI Mass spectral data of EtO-PCDF

	M ⁺	-28	-57	-63	-91	-120
1 (9) -EtO-PCDF						
9-EtO-2,3,4-	83	100	14	38	23	20
9-EtO-1,2,3,4-	47	78	7	6	8	11
2 (8) -EtO-PCDF						
8-EtO-2,3-	61	100	11	2	8	14
8-EtO-2,3,4-	49	100	16	3	18	34
3 (7) -EtO-PCDF						
7-EtO-2,3,4-	61	100	17	3	10	11
7-EtO-1,2,3,4-	52	78	6	4	7	8
7-EtO-1,2,3,4,8-	27	63	5	3	5	13
4 (6) -EtO-PCDF						
6-EtO-2-	47	100	7	—	3	10
6-EtO-2,3-	37	100	6	3	5	11

グメント パターンは PCDF には認められないものである。ピーク B の M⁺ (m/z 382) が五塩化ジベンゾフランの M⁺ (m/z 338) よりも 44 mass unit 大きいことや、M⁺-28 のフラグメントイオン (基準ピーク) が認められることなどから、ピーク B の構造は五塩化ジベンゾフランのエトキシ体 (EtO-体) と推定された。同様の理由から Fig. 1 におけるピーク A および C はそれぞれ四塩化ジベンゾフランおよび五塩化ジベンゾフランの EtO-体と推定される。

このように、PCDF のアルカリ分解によって EtO-PCDF の生成が予想されたので、この点を明らかにするため、既法¹⁰⁾ にしたがって EtO-PCDF の合成を行った。Scheme 1 に EtO-PCDF の合成経路を示す。すなわち、フェノール (あるいはエトキシフェノール) の K 塩とクロロエトキシニトロベンゼン (あるいは

はクロロニトロベンゼン) からジフェニルエーテル誘導体を合成したあと、次いで還元、ジアゾ化反応を行い対応する EtO-PCDF を合成した。

Table 1 に合成した 9 種の EtO-PCDF (1~5 塩化) の構造とそれらの EI マススペクトルデータを示す。すべての EtO-PCDF 異性体のマススペクトルにおいて、M⁺-28 (M⁺-C₂H₄) が基準ピークを与え、イオン強度は弱い M⁺-57 (M⁺-C₂H₄-HCO), M⁺-63 (M⁺-C₂H₄-Cl), M⁺-91 (M⁺-C₂H₄-COCl), M⁺-120 (M⁺-C₂H₄-HCO-COCl), M⁺-127 (M⁺-C₂H₄-HCO-Cl₂) および M⁺-190 (M⁺-C₂H₄-HCO-COCl₃) などのフラグメントイオンを与えた。M⁺ のイオン強度は中程度であった。しかしながら、Table 1 に示すように、EtO-基の置換位置の相違に基づくマススペクトルパターンおよびイオン強度の違

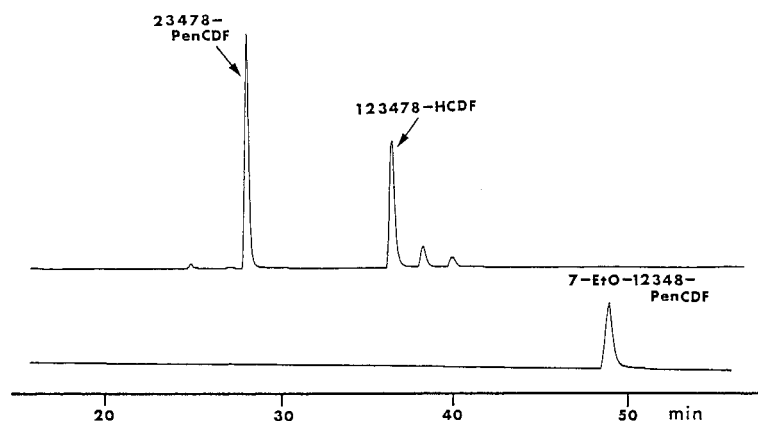


Fig. 2 Gas chromatograms of a mixture of 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF and 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF treated by alkali saponification and of authentic sample.

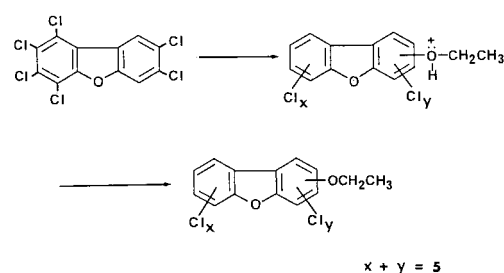
いは、EI マススペクトルからは認められなかった。典型的な EtO-PCDF のマススペクトルの例として、9-EtO-1, 2, 3, 4-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) および 7-EtO-1, 2, 3, 4, 8-PenCDF のマススペクトルを Fig. 1 に示す。Fig. 1 から明らかなように、ピーク B のマススペクトルと合成して得た 7-EtO-1, 2, 3, 4, 8-PenCDF のマススペクトルは完全に一致した。また、ピーク A および C では、それぞれ EtO-TCDF, EtO-PenCDF の基準ピークに相当する $M^+ - 28$ が m/z 320 および m/z 354 に認められる。したがって、ピーク A, B および C の構造は、それぞれ EtO-TCDF, EtO-PenCDF および EtO-PenCDF であり、一般にアルカリ分解によって PCDF から EtO-PCDF が生成することが明らかとなった。また、EtO-hexachlorodibenzofuran (EtO-HCDF) の M^+ および $M^+ - 28$ に相当する m/z 416 および m/z 388 を用いたマスキングマトグラフィーにより EtO-HCDF の検索を試みたが、EtO-HCDF の生成は認められなかった。

次に、アルカリ分解した試料について Capillary-ガス chromatogラフィーにより検討を加えた。Fig. 2 に 50 m ULBON HR-52 キャピラリーカラムで分析したガス chromatogラムを示す。保持時間 (t_R) 38.0 分および 39.6 分に見られる 2 本のピークが Fig. 1 におけるピーク B および C に対応する EtO-PenCDF と考えられる。しかし、これらの t_R は合成した 7-EtO-1, 2, 3, 4, 8-PenCDF の t_R とは Fig. 2 に示すように一致しなかった。また、注入量を増やして分析を行ったところ、さらに EtO-PenCDF と予想される 2 つのピークが認められ、そのうちの 1 つのピークの t_R は Fig. 2 に示す 7-EtO-1, 2, 3, 4, 8-PenCDF の t_R と一致した。なお、7-EtO-1, 2, 3, 4, 8-PenCDF の存在はデータは示さないが、負イオン化学イオン化モードにおける Capillary GC/MS によっても確認された。このように、Capillary-ガス chromatogラフィーによる検討の結果、少なくとも 3 つの EtO-PenCDF 異性体の生成が明らかとなった。ECD-GC により Fig. 2 にみられる 2 種の EtO-PenCDF を定量したところ 4.3 μg であった。

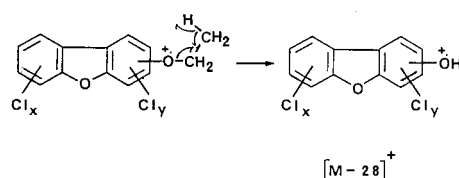
考 察

2, 3, 4, 7, 8-PenCDF および 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF の混合物を 1N NaOH エタノール溶液中 80°C で 1.5 hr 反応することにより、少なくとも 3 種の EtO-PenCDF およびごく少量の EtO-TCDF 1 種が生成することが明らかとなった。これらの EtO-PCDF の生成は、

PCDF の求核置換反応を経由して生じたものと推定されるが、生じた EtO-PCDF の大部分が EtO-PenCDF であることから、PCDF 異性体のうち、主に 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF の求核置換反応によって生じたものであり、一方、2, 3, 4, 7, 8-PenCDF はほとんど反応していないと思われる。Scheme 2 にその推定反応機構を示す。このように、PCDF のアルカリ分解による EtO-体の生成は PCDF の構造に依存していることが示唆されたが、なぜ 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF は EtO-体を生成しがたいのかは不明である。上述した理由により、生成した EtO-PenCDF (4.3 μg) が 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF のみに由来するのであれば、これはもとの 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF (21 μg) の約 20 % にも相当する量である。また、両 PCDF (41 μg) から生成したとしても約 10 % に相当する。1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF は環境あるいは人組織中に残留する PCDF の主成分の一つであることを考慮すれば、アルカリ分解のもつ問題点が明らかとなった。すべての EtO-PCDF 合成標品の EI マススペクトルは Table 1 に示すように $M^+ - 28$ に基準ピークを示したが、この $M^+ - 28$ フラグメントイオンは酸素原子と α -炭素との間でエチル基が切れ、同時にエチル基から酸素原子への水素原子の転位を伴って生じたものと推定される (Scheme 3)。他のいくつかのフラグメントイオンはこの [hydroxy-PCDF] $^+$ イオンより HCO^+ , Cl^+ , あ



Scheme 2



Scheme 3

るいは $\text{COCl} \cdot$ などを失ったフラグメントイオンと推定される。事実, EtO-PCDF の M^+-28 以降におけるマススペクトルパターンと Hydroxy-PCDF のマススペクトルパターンがよく類似している¹¹⁾ことは、このことを裏付けている。Scheme 3 に示すような機構は alkoxy polychlorodiphenyl ether³⁾ や alkoxy-PCDF²⁾ (いずれも alkyl 基は n-heptyl) においても, Deinzer らにより報告されている。また, EtO-PCDF のマススペクトルは, Table 1 に示すように EtO-基の位置に関係なく同じようなフラグメントパターンおよびイオン強度を示すために, EI マススペクトルから EtO-基の位置に関する情報を得ることはできなかった。したがって, PCDF のアルカリ分解によって生じた EtO-PCDF の構造をその EI マススペクトルから明らかにすることはできなかった。以上, アルカリ分解によって PCDF からかなりの割合で EtO-PCDF が生成されることを明らかにした。また, EtO-体の生成には PCDF の構造依存性があることが示唆された。したがって, アルカリ分解によって特定の構造の PCDF 異性体のみが EtO-体を生成する可能性があり, PCDF 異性体ごとの分析にアルカリ分解は不適当であると考えられる。

総 括

PCB, PCDF および PCDD などの分析法においてアルカリ分解は広く取り入れられているが、このうち高塩素 PCDD はアルカリ分解過程において大部分が分解されるため、アルカリ分解は高塩素 PCDD の分析には不適当であることが報告されている。しかし, PCDF の場合については不明な点が多い。そこで, 高残留性を示す 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF および 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF の混合物を用いて, PCDF 分析に及ぼすアルカリ分解の影響について検討した。その結果, PCDF はアルカリ分解 (80° , 1.5 hr) によって一部が求核置換反応をうけ EtO-PCDF を生成することが明らかとなった。また, EtO-PCDF の生成は PCDF の構造に依存していることが示唆され, 生じた EtO-PCDF の量はもとの 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF の約 20% に相当した。合成した EtO-PCDF の EI マススペクトルは強い M^+-28 ($\text{M}^+-\text{C}_2\text{H}_4$) フラグメントイオン (基準ピーク) を示したが, EI マススペクトルから EtO-基の置換位置を区別することはできなかった。また, 合成標品が少いため, アルカリ分解によって生成した EtO-PCDF の構造を明らかにすることはできなかった。

文 献

- 1) 6th. Chlorinated dioxins and related compounds 1986. Chemospher 16: 1987, in press.
- 2) Deinzer, M., Griffin, D., Miller, T., Lamber-ton, J., Freeman, P. and Jonas, V.: Hydroxypolychlorodibenzofurans in technical pentachloro-phenol: Electron capture negative ion chemical ionization mass spectra of alkoxy-polychlorodibenzofurans. Biomed. Mass Spectrum 9: 85-90, 1982.
- 3) Deinzer, M., Griffin, D., Miller, T. and Skinner, R.: Identification of octachlorohydroxydiphenyl ethers in technical pentachlorophenol. Biomed. Mass Spectrum 6: 301-304, 1979.
- 4) Firestone, D.: Determination of polychlorodibenzo-p-dioxins and polychlorodibenzofurans in commercial gelatins by gas-liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 25: 1274-1280, 1977.
- 5) Firestone, D.: Report on oils and fats. J. AOAC. 60: 354-356, 1977.
- 6) Gross, M. L., Sun, Y., Lyan, P. A., Wojinski, S. F. and Hilker, D. R.: Method validation for the determination of tetrachlorodibenzo-dioxin at the low parts-per-trillion level. Anal. Chem. 53: 1902-1906, 1981.
- 7) Harless, R. L., Oswald, E. O., Wilkinson, M. K., Dupuy, A. E Jr., McDaniel, D. D. and Tai, Han: Sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry determination of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Anal. Chem. 52: 1239-1245, 1980.
- 8) Heath, R. G., Harless, R. L., Gross, M. L., Lyan, P. A., Dupuy, A. E. Jr. and McDaniel, D. D.: Determination of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human milk at the 0.1~10 parts-per-trillion level: Method validation and survey results. Anal. Chem. 58: 463-468, 1986.
- 9) 厚生省環境衛生局 PCB 研究班: 昭和 46 年度科学技術特別研究促進調整費による研究成果報告。食品衛生研究 22: 24-249, 1972.
- 10) Kuroki, H., Haraguchi, K. and Masuda, Y.: Synthesis of polychlorinated dibenzofuran isomers and their gas chromatographic profiles. Chemospher 13: 561-573, 1984.
- 11) Kuroki, H., Hattori, R., Haraguchi K. and Masuda, Y.: Synthesis and mass spectral properties of polychlorinated dibenzofuran (PCDF) metabolites. Chemospher 16: 1987, in press.

3-Methylsulphone-4, 5, 3', 4'-Tetrachlorobiphenyl による 芳香族炭化水素水酸化酵素活性阻害作用

九州大学医学部公衆衛生学講座

長 山 淳 哉・清 原 千 香 子

毛 利 紀 子・廣 畑 富 雄

第一薬科大学物理分析学教室

原 口 浩 一・増 田 義 人

Inhibitory Effect of 3-Methylsulphone-4, 5, 3', 4'-Tetrachlorobiphenyl on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity

Junya NAGAYAMA, Chikako KIYOHARA, Noriko MOHRI

Tomio HIROHATA

*Department of Public Health, Faculty of Medicine Kyushu University,
Fukuoka 812, Japan*

Koichi HARAGUCHI, Yoshito MASUDA

*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences
Fukuoka 815, Japan*

3-Methylsulphone-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-TCB), 4-methylsulphone-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl (4-MSF-TCB) and 4-methylsulphone-2, 5, 2', 3', 4'-pentachlorobiphenyl (4-MSF-PCB) are major polychlorinated biphenyls (PCBs) metabolites present in several tissues of Yusho patients and healthy human subjects. After treatment of human lymphoblastoid cells with 3 $\mu\text{g/ml}$ of 3-MSF-TCB, 4-MSF-TCB and 4-MSF-PCB, 3-MSF-TCB and 4-MSF-PCB decreased basal aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in human lymphoblastoid cells by about 85 % and about 40 % respectively, while 4-MSF-TCB did not change or slightly enhance the enzyme activity, as compared to the AHH activity from control cells. At a concentration of 1.5 $\mu\text{g/ml}$ of 3-MSF-TCB, 3-MSF-TCB also reduced 3-methylcholanthrene (MC, 0.7 $\mu\text{g/ml}$)-induced and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, 3 ng/ml)-induced AHH activity by about 15 % and about 50 %, respectively. Consequently, it seems likely that 3-MSF-TCB preferentially inhibit AHH activity especially induced by TCDD. We would like to elucidate the structure-activity relationship, the mechanism and the biological significance of the inhibitory effect of MSF-PCBs on AHH activity.

Polychlorinated Biphenyls (PCBs) の生体における主な代謝産物の1つは Methylsulphone Polychlorinated Biphenyls (MSF-PCBs) である¹⁾。しかし、MSF-PCBs の生体作用についてはあまり研究されていない²⁾³⁾。そこで、人リンパ球培養細胞を用いて MSF-PCBs が発ガン性物質の代謝に関与している芳香族炭化水素水酸化酵素 (Aryl Hydrocarbon Hydroxylase, AHH) 活性に対してどのような影響をおよぼすか調べた。この研究で用いた MSF-PCBs 異性体は油症患者および健常者の種々の組織において

同定されている 3-Methylsulphone-4, 5, 3', 4'-Tetrachlorobiphenyl (3-MSF-TCB), 4-Methylsulphone-2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl (4-MSF-TCB) および 4-Methylsulphone-2, 5, 2', 3', 4'-Pentachlorobiphenyls (4-MSF-PCB) である¹⁾。

研 究 方 法

1. 化学薬品

3-MSF-TCB, 4-MSF-TCB および 4-MSF-PCB は従来の方法¹⁾により合成した。MSF-PCBs の純度

はガスクロマトグラフィー上 99 %以上である。2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), Benzo(a)pyrene (BP), 3-Hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBP), 3-Methylcholanthrene (MC), NADH, NADPH および他の薬品については従来どおりである⁵⁾。

2. 細胞培養, AHH 活性の測定

リンパ球培養細胞株の調製および細胞培養方法については文献(5)を参照されたい。この研究では5名の健康者由来のリンパ球培養細胞5株を用いた。各有機塩素系化合物およびMC処理方法は以下のとおりである。

(実験 I)

細胞濃度を $3 \sim 4 \times 10^5$ cells/ml とし、同一人由来のそれぞれの培養細胞に各 MSF-PCB; $3 \mu\text{g/ml}$, MC; $1.3 \mu\text{g/ml}$ あるいは TCDD; 6 ng/ml 処理する。Control の細胞には Acetone (溶媒) $10 \mu\text{l}$ 処理する (Basal AHH 活性測定のため)。細胞培養を続け、48 時間後に細胞を集めて AHH 活性を測定する。

(実験 II)

細胞濃度を $3 \sim 4 \times 10^5$ cells/ml とし、同一人由来のそれぞれの培養細胞に 3-MSF-TCB; $1.5 \mu\text{g/ml}$, MC; $0.7 \mu\text{g/ml}$, TCDD; 3 ng/ml , 3-MSF-TCB + MC; $1.5 \mu\text{g/ml} + 0.7 \mu\text{g/ml}$, あるいは 3-MSF-TCB + TCDD; $1.5 \mu\text{g/ml} + 3 \text{ ng/ml}$ 処理する。Control の細胞には Acetone (溶媒) $10 \mu\text{l}$ 処理する (Basal AHH 活性測定のため)。

AHH 活性は 3-OHBP の生成量を指標として常法により測定した。AHH 活性測定法の詳細については文献(5)を参照されたい。

結 果

1. 実験 I

3 種類のリンパ球培養細胞株について行った実験結果を Table 1 に示す。Basal AHH 活性は 3 株の細胞についてそれぞれ異っている。MSF-PCBs 3 異性体による Basal AHH 活性阻害の程度についても各リンパ球培養細胞で相違している。また MC あるいは TCDD 処理した場合の AHH 活性 (MC-Induced あるいは TCDD-Induced AHH 活性) も各リンパ球培養細胞で相違している。つまり、Basal AHH 活性には個人差があり、MSF-PCBs による Basal AHH 活性阻害にも個人差があり、さらに MC-Induced あるいは TCDD-Induced AHH 活性にも個人差があるように思われる。リンパ球培養細胞における MC および TCDD の AHH 誘導活性についてはすでに Nagayama らが報告している⁶⁾。新しい知見は MSF-PCBs による Basal AHH 活性の阻害である。4-MSF-TCB は Basal AHH 活性をほとんど阻害しない。逆に活性を高める場合も観察された。Basal AHH 活性を阻害するのは 3-MSF-TCB と 4-MSF-PCB であり、とくに 3-MSF-TCB による酵素活性の阻害が大きい。3-MSF-TCB による Basal AHH 活性の阻害は平均約 85 % である (Table 1)。

Table 1 Inhibitory Effect of 3-Methylsulphone-4, 5, 3', 4'-Tetrachlorobiphenyl (3-MSF-TCB) and 4-Methylsulphone-2, 5, 2', 3', 4'-Pentachlorobiphenyl (4-MSF-PCB) on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase (AHH) Activity in Human Lymphoblastoid Cells.

Cell Line	AHH Activity (pmol/min/ 10^6 cells)					
	Treatment					
	Basal	3-MSF-TCB	4-MSF-TCB ^a	4-MSF-PCB	MC ^b	TCDD ^c
1	0.034 (1.0)	0.003 (0.1)	0.029 (0.9)	0.021 (0.6)	0.229 (6.9)	0.237 (7.0)
2	0.022 (1.0)	0.001 (0.04)	0.027 (1.2)	0.016 (0.7)	0.074 (3.4)	0.127 (5.8)
3	0.075 (1.0)	0.022 (0.3)	0.179 (2.4)	0.042 (0.6)	0.488 (6.5)	1.147 (15.3)
Relative AHH Activity (Mean $\pm$ S. E. M.)	1.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 1.1	9.4 $\pm$ 3.0

Cell culture, treatment of chemicals and enzyme assay were done as described in the text.

Figures in parentheses indicate relative AHH activity to basal AHH activity.

a : 4-Methylsulphone-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl.

b : 3-Methylcholanthrene.

c : 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

2. 実験 II

3-MSF-TCB による Basal AHH 活性阻害作用が観察された。この実験の目的は MC-Inducedあるいは TCDD-Induced AHH 活性に対する 3-MSF-TCB の作用を調べることであり、3-MSF-TCB と MC あるいは TCDD は同時に培養細胞に処理した。各化合物の処理濃度は実験 I の処理濃度の 2 分の 1 である。結果を Table 2 および Fig. 1 に示す。3-MSF-TCB による Basal AHH 活性阻害作用が再確認される。MC および TCDD により AHH 活性は誘導されるが、一般的に TCDD-Induced AHH 活性のほうが MC-Induced AHH 活性よりも高い。3 種類のリンパ球培養細胞の Basal AHH 活性を 1 とした Relative AHH 活性をみると、MC-Induced AHH 活性は 5.5 (Table 1), 5.2 (Table 2) であり、TCDD-Induced AHH 活性は 9.4 (Table 1), 8.3 (Table 2) である。しかし、MC あるいは TCDD と同時に 3-MSF-TCB を処理した場合の Relative AHH 活性はそれぞれ 4.4 と 4.3 であり、大差がない (Table 2, Fig. 1)。このことは 3-MSF-TCB は TCDD によって誘導される AHH 活性を特異的に阻害することを示していると思われる。

考 察

これまで MSF-PCBs の生体影響に関する研究報告は少い²³⁾。両研究とも 4-MSF-TCB を用いており、投与量はいずれも 100 mg/kg で、かなり大量である。Rat を用いた毒性実験では 4-MSF-TCB はほとんど

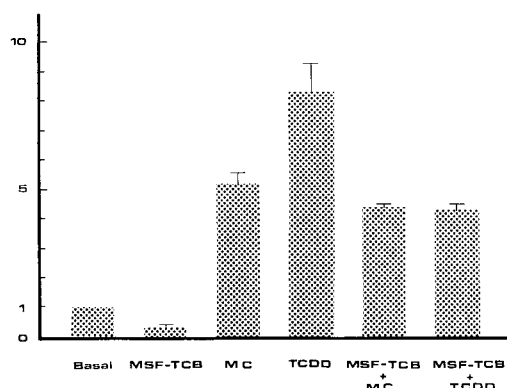


Fig. 1 Inhibitory Effect of 3-MSF-TCB on Basal, and MC- or TCDD-Induced AHH Activity in Human Lymphoblastoid Cells. Cell culture, treatment of chemicals and enzyme assay were done as described in the text. Abbreviations used are the same as shown in the Table 1 except that MSF-TCB is 3-MSF-TCB. Relative AHH activity represents the AHH activity treated with the chemical or combination of the chemicals/Basal AHH activity. Vertical lines indicate S.E.M. of three individual cell lines per group.

毒性を示さなかった²⁾。Mouseを用いた毒性実験では pulmonary N-Demethylation が低下し、hepatic N-Demethylationは上昇している³⁾。N-Demethylase あるいは AHH のようないわゆる薬物代謝酵素の活性が個体の各臓器（組織）でどのようにコントロール

Table 2 Inhibitory Effect of 3-Methylsulphone-4, 5, 3', 4'-Tetrachlorobiphenyl (3-MSF-TCB) on 3-Methylcholanthrene (MC) or 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) Induced Aryl Hydrocarbon Hydroxylase (AHH) Activity in Human Lymphoblastoid Cells.

Cell Line	AHH Activity (pmol/min/10 ⁶ cells)					
	Treatment					
	Basal	3-MSF-TCB	MC	TCDD	3-MSF-TCB+MC	3-MSF-TCB+TCDD
3	0.083 (1.0)	0.030 (0.4)	0.468 (5.6)	0.846 (10.2)	0.351 (4.2)	0.330 (4.0)
4	0.013 (1.0)	0.002 (0.2)	0.071 (5.5)	0.114 (8.8)	0.059 (4.5)	0.061 (4.7)
5	0.021 (1.0)	0.010 (0.5)	0.092 (4.4)	0.123 (5.9)	0.094 (4.5)	0.090 (4.3)
Relative AHH Activity (Mean±S.E.M.)	1.0±0.0	0.3±0.1	5.2±0.4	8.3±1.3	4.4±0.1	4.3±0.2

Cell culture, treatment of chemicals and enzyme assay were done as described in the text. Figures in parentheses indicate relative AHH activity to basal AHH activity.

されているのか解明されていないので明確なことは言えないが、薬物代謝酵素活性調節のメカニズムは臓器(組織)によって質的・量的にかなり相違しているように思われる⁷⁾。今回の私たちの研究では4-MSF-TCBは処理濃度3 ppmで人リンパ球培養細胞のAHH活性にほとんど影響をおよぼさなかった。しかし、3-MSF-TCBと4-MSF-PCBはBasal AHH活性を阻害し、この阻害作用は3-MSF-TCBにおいて顕著であった。この研究で用いたMSF-PCBsの処理濃度はppmのレベルである。油症患者あるいは健常者の組織中MSF-PCBs濃度はその1,000分の1~10,000分の1のレベルである¹⁾。さらに処理濃度を下げ、種々のMSF-PCBs異性体の生体影響について研究する必要がある。

AHH活性の主構成要素はCytochrome P-450 (P-450)であり、P-450には多数の分子種があることが報告されている⁸⁾。したがって、Basal AHH活性、MC-Induced AHH活性あるいはTCDD-Induced AHH活性は単一のP-450ではなく、いくつかの種類のP-450によって発現されている可能性がある。そして3-MSF-TCBはTCDDによって特異的に誘導されるP-450分子種の活性を阻害していると考えられる(Table 2, Fig. 1)。またTCDDによって特異的に誘導されるP-450分子種がBasal AHH活性にどの程度関与しているかによって3-MSF-TCBによるBasal AHH活性の阻害性が個人個人で異ってくるようである(Table 1とTable 2)。私たちはいくつかのP-450に対するMonoclonal抗体を作成している。これらのMonoclonal抗体を用いてMC, TCDD, Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs)などによるAHH活性誘導メカニズムおよび3-MSF-TCBなどのMSF-PCBsによるAHH活性阻害メカニズムを解明したいと考えている。また、これらの誘導性および阻害性における個人差の原因についても解明したいと思っている。

AHHは種々の環境発ガン物質の代謝に関係しており、人の発ガンとの関連性が示唆されている⁹⁾。3-MSF-TCBなどによるAHH活性の阻害が人のガンを含む種々の疾病の発症にどのように関与しているかは今後の研究によるしかない。しかし、3-MSF-TCBによるAHH活性阻害作用がかなり明確に観察されたことはMSF-PCBsの生体影響を解明する糸口の1つとなると考えられる。

総 括

油症患者および健常者の臓器(組織)中にはPCBsの代謝産物としてMSF-PCBsが同定されている。しかし、MSF-PCBsの生体作用についてはほとんど解明されていない。この研究では人リンパ球培養細胞を用いて3種類のMSF-PCBs異性体(3-MSF-TCB, 4-MSF-TCB, 4-MSF-PCB)が発ガン性物質の代謝に関与しているAHH活性に対してどのような影響を及ぶか調べた。その結果以下のようなことが観察された。

1. 3 ppmの処理濃度で3-MSF-TCBと4-MSF-PCBはBasal AHH活性をそれぞれ約85%, 約40%阻害した。しかし4-MSF-TCBはBasal AHH活性を阻害しなかった。MSF-PCBsによるAHH活性阻害作用には構造・活性相関性があるように思われる。
2. 1.5 ppmの処理濃度で3-MSF-TCBはBasal AHH活性を約70%阻害した。また、この濃度で3-MSF-TCBはMC-Induced AHH活性を約15%阻害し、TCDD-Induced AHH活性を約50%阻害した。3-MSF-TCBはTCDDによって特異的に誘導されるAHH活性をほぼ100%阻害するよう思われた。

— 今後の課題 —

1. 3-MSF-TCBあるいは4-MSF-PCBによるAHH活性阻害作用がかなり明確に観察されたので、MSF-PCBsの多くの異性体についてAHH活性に対する作用を研究し、構造・活性相関性を解明するとともに、その作用メカニズムについて解明する必要がある。
2. 動物実験、疫学などによりMSF-PCBsのAHH活性阻害作用が人のガンを含む多くの疾病の発症にどのように関与しているのか解明する必要がある。

文 献

- 1) Haraguchi, K., Kuroki, H. and Masuda Y.: Capillary gas chromatographic analysis of methylsulphone metabolites of polychlorinated biphenyls retained in human tissues. J. Chromatogr. 361: 239-252, 1986.
- 2) Haraguchi, K., Kuroki, H., Masuda, Y., Koga, N., Kuroki, J., Hokama, Y. and Yoshimura, H.: Toxicological evaluation of sulfur-containing metabolites of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in rats. Chemosphere 14: 1755-1762, 1985.
- 3) Lund, B. O., Bergman, Å. and Brandt, I.: Decreased pulmonary drug metabolism in mice

treated with the PCB metabolite 4-methylsulphonyl-2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Lett.* 32 : 261-267, 1986.

4) 長山淳哉：AHH 活性と生活環境要因，癌の臨床。東京，篠原出版（株）。印刷中

5) Nagayama, J., Kiyohara, C., Kuratsune, M. and Masuda, Y.: Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells by chlorinated dibenzofuran isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. In *Chlorinated Dioxins and Dibenzofurans in the Total Environment II*. Keith, L. H., Rappe, C. and Choudhary, C. eds. 285-295, Stoneham, MA, Butterworth Publishers 1985.

6) Nagayama, J., Kiyohara, C., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: Genetically mediated induc-

tion of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells by polychlorinated dibenzofuran isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch. Toxicol.* 56 : 230-235, 1985.

7) Nagayama, J., Kuroki, H., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: A comparative study of polychlorinated dibenzofurans, polychlorinated biphenyls and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on aryl hydrocarbon hydroxylase inducing potency in rats. *Arch. Toxicol.* 53 : 177-184, 1983.

8) 田頭勇作：発癌機構に関与するチトクローム P-450 とその生物学的意義。 *Oncologia* 16 : 45-59, 1986.

致死量前後の 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran 投与ラットにおける体内分布と急性毒性

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室
古賀 信幸・中嶋 寛
神村 英利・吉村 英敏

Relationship between Tissue Distribution and Acute Toxicity of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran in Rats given around lethal dose

Nobuyuki KOGA, Hiroshi NAKASHIMA, Hidetoshi KAMIMURA
and Hidetoshi YOSHIMURA

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812, Japan*

2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (PenCDF), the most important causal agent of Yusho, possesses potent acute toxicity and 3-methylcholanthrene (MC)-type inducing ability of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats and is accumulated almost exclusively in the liver, especially in microsomes binding noncovalently with cytochrome P-448H (P-448H), one of P-450 isozymes induced by PenCDF treatment. We then proposed the hypothesis that P-448H might function as a storage site in the liver of rats. To confirm this hypothesis, the relationship between the distribution of PenCDF and its toxicity at around lethal dose of 1, 3 and 5 mg/kg was investigated in rats. At the dose of 5 mg/kg, the body weight was decreased during 5 days after dosing orally with PenCDF, while at the doses of 1 and 3 mg/kg, it was increased but the rate of growth was suppressed significantly. Atrophies of thymus and spleen were observed in all treated groups. Benzo(a)pyrene 3-hydroxylase and DT-diaphorase, both of which are induced markedly with treatment of MC-type inducers, were increased to 18-fold and 10-fold, respectively, at the dose of 1 mg/kg and reached to maximum at the dose of 3 mg/kg. About 65 % of PenCDF given orally was absorbed in all groups and was mostly distributed into the liver. However, at the dose of 5 mg/kg, PenCDF concentrations in the extrahepatic tissues such as lung, kidney, adipose tissues and small intestine were raised markedly compared to those at 3 mg/kg, suggesting overflow of PenCDF from the liver to other tissues. In liver microsomes, PenCDF concentration was dose-dependently increased with a parallel increase of the content of P-448H, a P-450 isozyme with high spin form which is induced by treatment of rats with PenCDF. These results support our hypothesis as mentioned above and also suggest the possibility that the target for the acute toxicity caused by PenCDF may exist in the tissue(s) other than the liver.

Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) は現在、世界的環境汚染物質としてのみならず、カネミ油症の主たる原因物質として認識されている。油症は、事件発生当初、PCB 製品の Kanechlor 400 による中毒症と考えられていたが、その後、原因ライスオイル中から PCDF および polychlorinated quarterphenyl⁽⁶⁾⁽¹²⁾

が検出されるに至り、その原因物質は、複雑さを増している。しかしながら、このうち PCDF は、発症後 9 年目に死亡した油症患者の肝および脂肪組織中になお検出されたこと⁷⁾、またラット⁽⁵⁾ やマウス⁽¹⁴⁾ を用いた動物実験により、強い毒性を発現すること、さらにサルにおいて、KC-400 単独投与よりも PCDF を併

用した方が発症程度が強いこと²⁴⁾が示され、現在では、PCDF は、油症の原因物質として、PCB 以上に注目されている。

PCDF のなかでもとくに 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) と 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) はラットにおいて最高の肝薬物代謝酵素系の MC 型誘導能と急性毒性を示す²⁰⁾。しかし、両者は肝残留性の点で大きな違いがある。すなわち、TCDF はラットに投与すると、比較的容易に代謝され¹⁷⁾、速やかに排泄される¹⁾が、一方、PenCDF はほとんど代謝されず、ラット⁸⁾、サル⁸⁾およびヒト肝⁷⁾においては、長期にわたり残留する。これらの事実から PenCDF は、油症の原因物質としてとくに重要と考えられる。当教室では、ラットを用いこれら化合物による酵素誘導能と急性毒性との関連について種々検討を加えてきたが、肝ミクロゾームの benzo(a)pyrene (BP) 3-水酸化活性および肝可溶性酵素の DT-diaphorase の誘導の強さと急性毒性指標としての胸腺の萎縮の程度が、きわめてよく相関することを明らかにした²⁰⁾。

一方、PCDF およびその関連化合物の毒性発現機構の解明には、まず、これらの化合物の生体内動態を明らかにすることが重要である。この点に関し、当教室では、ラットに PenCDF を 1 mg/kg あて 1 回経口投与した場合の生体内分布について検討を行い、PenCDF は投与直後、肝以外の組織にもかなりの分布を示すが、投与後 5 日目になると、吸収された PenCDF のほとんどが肝に集積すること、および肝細胞内においては、PenCDF は肝小胞に著しく高い親和性を示し、かつ小胞体に局在する薬物代謝酵素の cytochrome P-450 (P-450) と細胞分画時の挙動が一致することを明らかにした²²⁾。さらに PenCDF 投与によりラット肝ミクロゾームに顕著に誘導される 3 種の P-450 標品 (P-452, P-448H, P-448L) をそれぞれ精製し、それらに含まれる PenCDF 量を定量したところ、PenCDF は、このうち P-448H とほぼ 1:1 の割合で特異的に結合していることが明らかとなった⁹⁾。これらの知見に加え、PenCDF (1 mg/kg) 投与ラット肝では、P-448H 量がミクロゾーム中の総 P-450 量の 50% 以上を占めるようになるという事実から、著者らは、P-448H が肝細胞内における一種の貯蔵部位として機能しているという仮説を提唱した⁹⁾。一方、このような研究の過程で著者らは、ラットにおける PenCDF の致死量は 5~10 mg/kg であり、投与後、1 週間から 10 日間のうちに著しい体重減少を

きたし、死に至ることを認めている。

そこで本研究では、この仮説を明らかにすべく、致死量を含めた 1, 3, 5 mg/kg の PenCDF をラットに投与し、5 日目における生体内分布と急性毒性および酵素誘導能との関連性を調べるとともに、肝ミクロゾーム中の PenCDF 量と、P-448H 量との相関性についても検討した。

実験方法

1. 実験材料

2, 3, 4, 7, 8-PenCDF は既報⁵⁾に従い、2-amino-4, 5, 2', 3', 4'-pentachlorodiphenylether の閉環反応により合成した。PCB 分析用のシリカゲル (Wakogel S-1) および dicoumarol, ガスクロマトグラフィー (GC) 充填剤の 1.5% OV-17 Chromosorb W AW DMCS (60~80 mesh) は和光純薬 (大阪) より購入した。NADPH, NAD(P), glucose-6-phosphate (G-6-P, 2 Na 塩), G-6-P dehydrogenase は Sigma Chemical Company (米国, St. Louis) より、2, 6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) は Merck AG (西ドイツ, Darmstadt) より購入した。

2. 薬物投与

Wistar 系雄性ラット (4 週齢, 体重約 100 g) を 1 群 4 匹として計 4 群に分け、対照群, PenCDF (1, 3, 5 mg/kg) 投与群とした。PenCDF は各投与量をコーン油に溶かし、1 回経口投与した。対照群にはコーン油のみを投与した。ラットは投与後、5 日目に屠殺した。なお、屠殺前 12 時間は絶食させた。

3. 肝細胞分画法

屠殺後、ただちに肝臓を摘出し、既法²⁵⁾により 9000×g 上清を調製した。この 9000×g 上清を 105000×g で 60 分間、遠心分離し、得られた上清を可溶性画分、沈渣をミクロゾーム画分とした。一方、他の組織は PenCDF を GC により定量するまで、-20°C で保存した。

4. 酵素活性などの測定

P-450 含量は肝ホモジネートと 9000×g 上清については Matsubara ら¹¹⁾の方法、ミクロゾームについては Omura と Sato の方法¹⁶⁾に従って定量した。BP3-水酸化活性は Nebert ら¹³⁾の方法により、DT-diaphorase 活性は Ernster ら³⁾の方法によりそれぞれ 9000×g 上清を用いて測定した。肝総脂質の定量は Folch ら⁴⁾の方法により、タンパク質の定量は、Lowry ら¹⁰⁾の方法により行った。

5. PenCDF の定量

糞, 各臓器および肝の各画分の PenCDF の定量は既報²¹⁾に従い ECD-GC を用いて行った。

6. P-450 分子種の抗体による定量

Thomas ら¹⁹⁾の報告による, radial immunodiffusion 法に従い行った。

結 果

1. 急性毒性

Fig. 1 に各群の投与後 4 日目までの体重の変化を示す。PenCDF による著しい体重増加抑制は, 1 mg/kg で観察され, 用量を上げるにつれ, その程度は大きくなった。とくに 5 mg/kg 投与群では, 体重増加はほとんど見られず, 4 日目では, 投与時の体重よりむしろ低下した。これまでの経験から, 5 mg/kg 投与群のような体重の低下は少くとも数日中に死の転帰をとることが知られている。したがって, この結果は 3 mg/kg と 5 mg/kg の投与量の間に生存と死亡の分かれ目があることを示しており, ラットに対し, 5 mg/kg 前後に致死量が存在するという, これまでの観察と一致した。

Fig. 2 には, PenCDF 投与後 5 日目の肝, 脾臓, 胸腺の湿重量および肝の総脂質量の変化を示す。肝は 1 mg/kg 投与群で対照群の約 1.5 倍, 3 mg/kg 投与群で約 1.7 倍, 5 mg/kg 投与群で約 1.8 倍に肥大し

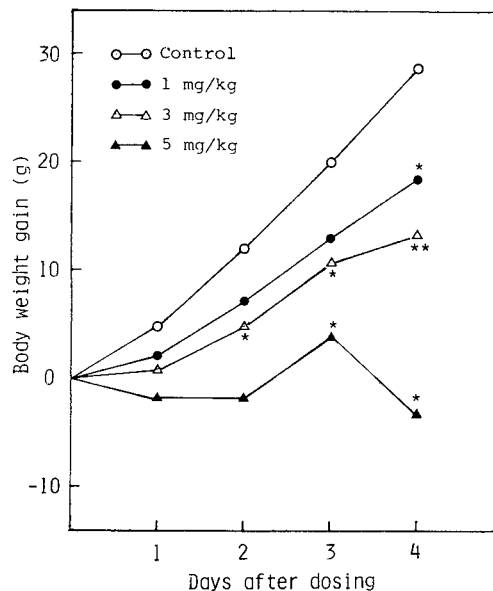


Fig. 1 Effect of PenCDF Dose on Body Weight Gain of Rats.

Each point represents the mean value of body weight gain of 4 rats.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

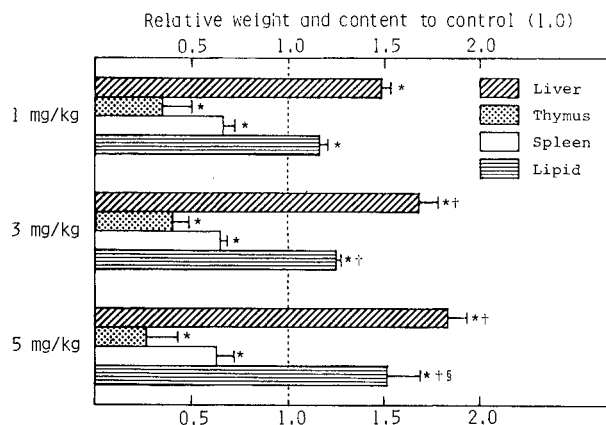


Fig. 2 Effect of PenCDF Dose on Organ Weights and Liver Lipid Content

The tissue weights (g/100 g b. w.) and liver lipid (mg/g liver) in control were: liver 3.933 ± 0.093 , thymus 0.347 ± 0.051 , spleen 0.476 ± 0.033 , lipid 42.25 ± 1.381 .

* Significantly different from control ($p < 0.05$)

† Significantly different from 1 mg/kg group ($p < 0.05$)

‡ Significantly different from 3 mg/kg group ($p < 0.05$)

§ Significantly different from 5 mg/kg group ($p < 0.05$)

た。また肝総脂質量は 1 mg/kg, 3 mg/kg および 5 mg/kg の各投与群で、それぞれ対照群の約 1.16 倍, 1.24 倍, 1.5 倍であった。このように、肝肥大と肝総脂質量の増加は、PenCDF の用量に依存して発現した。これに対し、脾臓と胸腺は各投与群とも顕著な萎縮が観察されたものの、各投与量において用量依存的な相違は認められなかった。

2. 肝酵素誘導作用

Fig. 3 に P-450 含量および PenCDF をはじめとする MC 型誘導剤により顕著に誘導される BP 3-水酸化活性および DT-diaphorase 活性につき、PenCDF 投与量の影響を示す。P-450 含量は、1 mg/kg 投与群で 3.0 倍, 3 mg/kg 投与群で 3.8 倍, 5 mg/kg 投与群で 4.3 倍と誘導された。BP 3-水酸化活性と DT-diaphorase 活性は、1 mg/kg 投与群で、それぞれ対照群の 19 倍, 10 倍, と増加したが、3 mg/kg 投与群では両酵素活性の誘導はほぼ最大に達し、それぞれ 20 倍, 22 倍であった。

3. 糞中排泄および臓器分布

消化管からの、PenCDF の吸収率を求めるために、

投与後 5 日間の糞中 PenCDF 量を定量した。1 mg/kg の用量であれば、投与後 3 日目までに消化管からの吸収は完了し、その後、1 日当り投与量の約 0.1 % あてが小腸管壁より管腔内に排泄されることが明らかとなっている²²⁾。Table 1 に糞中 PenCDF 量の経日変化を示す。1 mg/kg 投与群の場合、1 日目に投与量の約 31 %, 2 日目に約 3 % に相当する PenCDF が糞中に排泄され、これまでの報告の結果と一致した。3 mg/kg 投与群では、1 mg/kg 投与群とほぼ同様の吸収パターンを示した。一方、5 mg/kg 投与群では、1 日目に投与量の約 23 %, 2 日目に約 8 % が排泄され、1, 3 mg/kg 投与群と異なる吸収パターンを示した。しかしながら、投与後 5 日間の糞中 PenCDF 量の合計は、各群で 32~36 % とほぼ一定しており、少くとも約 65~70 % は吸収されたものと考えられた。

次に投与後 5 日目における PenCDF の各臓器中への分布を各用量で比較した。全血液量は体重の 8 % として換算した²²⁾。Table 2 に示すように、いずれの投与群においても PenCDF の分布量は、肝でもっとも多く、投与量の 50~64 % が検出された。前述した 5

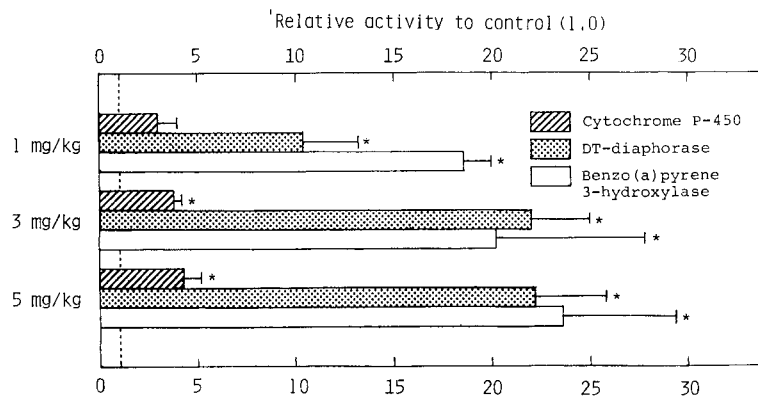


Fig. 3 Effect of PenCDF Dose on Liver Enzyme Activities and Cytochrome P-450 Contents in Rats

The enzyme activities in control were: cytochrome P-450 0.130 ± 0.009 nmol/mg protein, DT-diaphorase 0.210 ± 0.048 μ mol DCPIP reduced/min/mg protein, benzo(a)pyrene 3-hydroxylase 38.68 ± 6.334 pmol 3-hydroxybenzo(a)pyrene formed/min/mg protein.

* Significantly different from the control ($p < 0.05$).

Table 1 Fecal Excretion of PenCDF in Rats

Dose (mg/kg)	PenCDF in feces (% of dose)			Total excretion
	0 - 1	1 - 2	2 - 5 (days)	
1	30.88 ± 3.32	3.34 ± 0.95	2.04 ± 0.41	36.26 ± 2.51
3	28.01 ± 3.10	3.70 ± 1.30	2.32 ± 0.61	34.03 ± 2.94
5	22.69 ± 2.04	7.84 ± 0.84	1.94 ± 0.16	32.47 ± 2.30

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of four rats.

Table 2 Tissue Distribution of PenCDF

Tissue	Dose (mg/kg)		
	1	3	5
		% of Dose	
Liver	64.20±4.48 ^{a)} (10.02±0.78) ^{b)}	50.05±6.23 (22.28±2.60)	59.43±9.11 (46.37±7.16)
Blood	0.45±0.16 (46.08±14.76) ^{c)}	0.10±0.03 (32.87±1.35)	0.00±0.01 (50.17±5.98)
Spleen	0.03±0.01 (85.91±10.40) ^{c)}	0.02±0.01 (180.89±109.92)	0.03±0.00 (518.36±91.08)
Thymus	N. D.	N. D.	N. D.
Lung	N. D.	0.01±0.00 (27.66±11.86) ^{c)}	0.03±0.01* (162.70±94.78)
Kidney	0.02±0.00 (19.26±3.30) ^{c)}	0.02±0.00 (42.51±11.18)	0.08±0.06* (340.51±293.96)
Adipose tissue	0.12±0.01 (123.09±16.44) ^{c)}	0.18±0.04 (494.73±85.54)	0.30±0.12* (1797.50±255.70)
Small intestine	0.10±0.05 (44.02±21.16) ^{c)}	0.07±0.03 (86.68±40.76)	0.25±0.12* (597.31±272.78)

Each value represents the mean±S. D of four rats.

a) % of dose, b) parts per million, c) parts per billion

N.D, not detected.

* Significantly different from groups at doses of 1 mg/kg and 3 mg/kg (P<0.05).

日間の糞中 PenCDF 量の定量結果を考え合わせると、3 mg/kg でいくらか低いものの、吸収された PenCDF はその大部分が肝に分布することが明らかとなった。すでに 1 mg/kg 投与ラットで同様な結果を報告²²⁾しているが、致死量の 5 mg/kg 投与群の場合もほぼ同じであった。肝以外の組織への分布については、肝に比べきわめて少ないが、1 mg/kg の用量で検出できなかった PenCDF の肺への分布が 3 mg/kg 投与群で観察された。また 5 mg/kg 投与群では、肺、腎、脂肪組織および小腸における濃度が 3 mg/kg 投与群のそれぞれ約 6 倍、8 倍、3.6 倍、7 倍と有意に増加した。これらの値は投与量が 1.7 倍であるのに比べ、遙かに大きな倍率である。以上の結果から、5 mg/kg の投与量では、肝における分布率が幾分低下し、その分が、他の組織へと分布していることが示唆された。これに対し 1 mg/kg と 3 mg/kg 投与群の比較では、投与量が 3 倍になっているのに、肝以外の組織での濃度は脂肪組織が 4 倍になっているのを除けば、すべて 2 倍程度にしか分布していない。つまり、5 mg/kg 投与群で、肝以外の組織への分布が急激に増加していることを示している。

4. 肝細胞内分布

前述のように、当教室ではすでに PenCDF の肝細胞内分布を調べ、その分布は P-450 のそれとよく一

致することを明らかにしている。そこで、各用量の PenCDF 投与ラットでの肝中 P-450 含量と肝中 PenCDF 量との関連を調べた。Fig. 4 に示すように、肝中総 PenCDF 量（すなわち肝 Homogenate 中 PenCDF）は、投与量にほぼ比例して増加したが、P-450 量の増加はゆるやかだった。そのため、P-450 1 モル当りの PenCDF 量は著しく増加し、5 mg/kg では P-450 1 モル当り、PenCDF は 1.4 モルであった。

次に常法により得たミクロゾーム画分中の両者の分布を調べたところ、投与量の増加につれ PenCDF 量は増加し、5 mg/kg 投与群で、P-450 1 モル当り、1.1 モルであった。なお、ミクロゾーム画分への P-450 の回収率は、1 mg/kg でホモジネートの 49 %、3 mg/kg で 32 %、5 mg/kg で 20 %と、投与量を増やすにつれて低下した。PenCDF²²⁾と同様に PCB 異性体の中で最強の MC 型酵素誘導能と毒性を示す 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl²³⁾ 投与ラット肝でも、このような分画異常が生じ、小胞体がミクロゾーム以外の分画に分布することが知られているが、今回の結果は、その程度が用量依存であることを示した。

5. P-450 への分布

Kuroki ら⁹⁾は、PenCDF 投与ラット肝ミクロゾームより PenCDF によってとくに強く誘導される 3 種の P-450 を精製し、それらへの PenCDF の分布を調

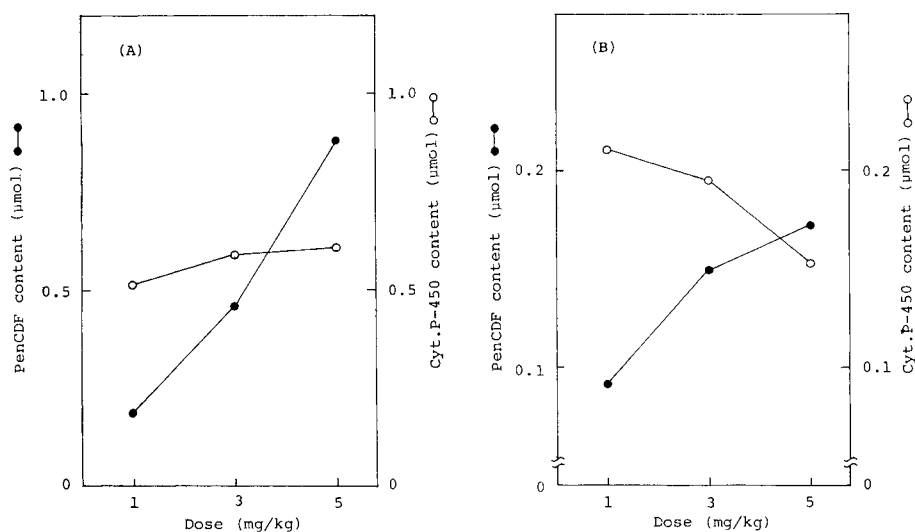


Fig. 4 Distribution of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran and Cytochrome P-450 in Rat Liver Homogenate (A) and Microsomes (B).

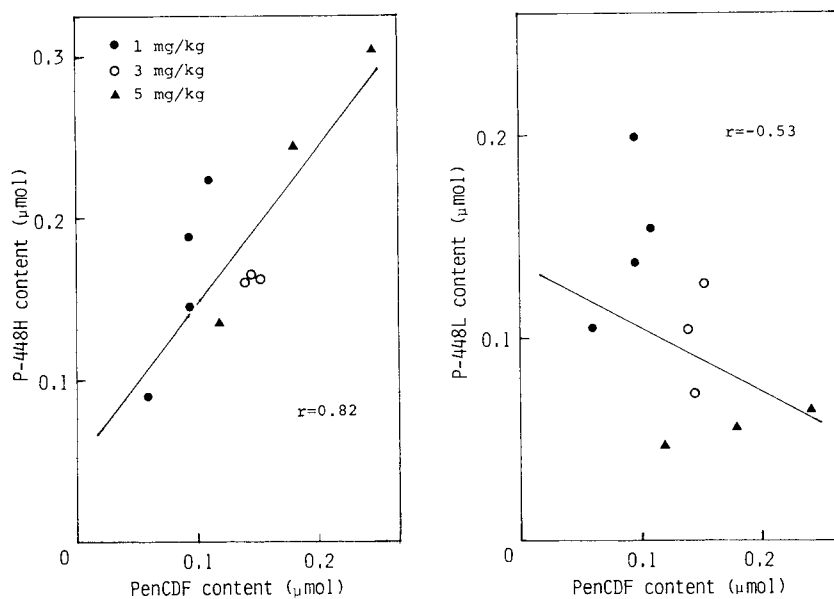


Fig. 5 Correlation between the Contents of 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF and two Cytochrome P-448 Isozymes Induced by PenCDF in Rat Liver Microsomes.

べたところ、PenCDF は高スピン型の P-448H に特異的に多く、P-450 1 モル当り 0.85 モルが結合していることを明らかにした。本研究では各投与群の肝ミクロゾーム中の P-448H および P-448L を免疫化学的手法を用いて定量し、ミクロゾームに分布する PenC-

DF 量との相関性を検討した。Fig. 5 に示すように、ミクロゾーム中 PenCDF 量は、P-448H の量ときわめてよく相関し、相関係数は $r=0.82$ であった。一方、P-448L 量は PenCDF 量の増加に伴ってむしろ減少しており、PenCDF は P-448H にのみ強い親和性

を示し、P-448Lには親和性のないことが示された。前述のように、PenCDF投与時の小胞体は、ミクロゾーム以外の分画中にも多く分布し、そのためP-450はむしろ他の分画中にも多く存在するが、P-448HはそれらのP-450中でも主体であると推察される。このことより考えると、肝中のPenCDF量はP-448H含量に依存し、PenCDFの強い肝残留性が、PenCDF投与によって誘導されてくるP-448H量に起因することが示唆された。

考 察

PenCDFおよび関連化合物の毒性発現機構は、数多くの研究者の努力にもかかわらず、いまだに明確ではなく、不明の点が多い。本研究では、致死量前後のPenCDFを用い、体内分布と急性毒性との関連性について検討を加えた。

急性毒性の指標のうち、体重（生長）に対する作用は、PenCDF 1 mg/kg および 3 mg/kg の1回投与で、その増加率が有意に抑制されたが、なお依然として増加しているのに対し、致死量 5 mg/kg では体重増加そのものがほとんど認められず、むしろ減少した。肝肥大および肝総脂質量は、用量依存的に増大した。とくに肝脂質量は、5 mg/kg で 3 mg/kg に対し、有意に増加していた。また、胸腺および脾臓は 1 mg/kg ですでに顕著に萎縮しており、致死量 5 mg/kg の場合と大差なかった。

肝薬物代謝酵素の誘導を各用量で比較したところ、BP 3-水酸化活性およびDT-diaphoraseは、1 mg/kg で、それぞれ約19倍、約10倍と著しく誘導されたが、両活性は3 mg/kg で最大となった。5 mg/kg では、3 mg/kg と同程度であった。TCDDの毒性に関する研究によると、投与量を増やしていくとある用量までは誘導率が増加していくが、致死量近くの用量では逆に低下する¹⁸⁾。今回の結果は、5 mg/kg 投与群で、1 mg/kg および 3 mg/kg 投与群とは異なり致死的な毒性が発現していることを示唆している。

糞中PenCDFの定量により吸収率を比較したところ、1および3 mg/kg と 5 mg/kg とで初日の吸収率にいくらか違いが認められたが、5日間を合計すると、いずれの投与群においても、少くとも約65%前後は吸収されることが明らかとなった。一方、吸収されたPenCDFの大部分は、いずれの用量でも主として肝に局在するが、3 mg/kg ではじめて、肺にPenCDFが検出されるようになり、5 mg/kg となると肺、腎、脂肪組織、小腸などでは、3 mg/kg の値に対し、有

意に、しかも投与量の増加を著しく上回る増加を示した。この結果は、著者らが提唱した仮説のように、PenCDFの貯蔵部位としての肝において5 mg/kg 投与で必ずしも飽和状態には達していないが、投与量に対する肝への蓄積率が低下し、その分が他の組織での分布量を増加させたものと考えられる。また、5 mg/kg が致死量であることを考えると、肝以外の組織、とくに未知の標的部位におけるPenCDF濃度があるレベルを越えたことが主たる原因となるものと考えられる。現在のところ、直接死因と関連する組織は特定されていないが、われわれはPCBあるいはPCDF投与サルを用いた研究において、著しく衰弱したものでは、これらの化合物の血中濃度が非常に増加することを観察している（未発表データ）。今回5 mg/kg 投与群の血中濃度が、有意でないものの増加傾向を示していることは興味深い。

Kuroki ら²³⁾は肝中PenCDFの細胞下画分中分布がP-450のそれとよく並行することを明らかにした。一方、前述したように、肝中PenCDF濃度は用量に比例して増加するものの、総P-450含量の増加はゆるやかであった。また肝ミクロゾームでは用量を増加させるにつれPenCDFの分布量は増加するが、総P-450含量はむしろ減少した。この結果は、PenCDFが、どのP-450にも均一に分布するのではなく、ある特定のP-450分子種に特異的に結合することを示唆している。実際に、肝ミクロゾームにおいて、PenCDF誘導性の2種のP-448を定量したところ、ミクロゾーム中のPenCDF量はP-448H含量とよく相関した。このことは、P-450のうちP-448HがPenCDFの貯蔵部位として機能しているとする著者らの仮説を支持するものである。

最近、この仮説を支持すると思われる結果が報告された。Birnbaur²⁾は妊娠マウスを用いて、TCDD投与による胎児の口蓋裂の発生頻度が、比較的毒性は弱いMC型誘導能を有する2, 3, 4, 5, 3', 4'-hexachlorobiphenyl (HCB)の同時投与により上昇するのに対し、PB型誘導能を示す2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCBでは、その効果がまったく認められないことを報告した。彼女らはこのような毒性増強の理由として、MC型誘導および毒性の発現を媒介すると考えられ、TCDDに高親和性を示すAh receptor上での2, 3, 4, 5, 3', 4'-HCBとTCDDのinteractionを推定しているが、本研究の結果から考えると、TCDD投与マウスにおいて誘導されたP-448Hに結合していたTCDDが多量の2, 3, 4, 5, 3', 4'-HCBによって置換さ

れ、遊離した TCDD により毒性が強化されている可能性が推察された。

各 PenCDF 投与群の肝細胞を常法により分画したが、ミクロゾーム画分の P-450 の回収が対照群に比べ低下した。この現象は PenCB 投与ラットの場合にも観察されていたが、用量依存的であるところから、その低下はミクロゾームに分布する PenCDF あるいは PenCB に支配されると考えられる。

油症は、種々の PCDF およびその関連化合物による複合汚染であり、その発症機構解明、さらには治療法の開発のためには、単一の PCDF による検討にかぎらず、Ah receptor あるいは P-448H などの蛋白上での MC 型化合物どうしの interaction に関する研究が今後必要であろう。

総 括

PCDF とその関連化合物の毒性発現機構の解明の一環として、致死量の PenCDF (5 mg/kg) をラットに投与し、PenCDF の生体内分布と毒性との関連性について、1 mg/kg および 3 mg/kg 投与群のそれと比較した。投与後 5 日間の体重曲線を見ると、1 mg/kg および 3 mg/kg 投与群では体重増加率の抑制は認められたが、増加そのものは依然観察されたのに対し、5 mg/kg では増加自体がみられず体重はむしろ低下した。急性毒性の指標として用いる胸腺の萎縮は 1 mg/kg 群ですでに認められ、5 mg/kg 群と有意な違いはなかった。一方、BP 3-水酸化活性と DT-diaphorase は 1 mg/kg 群で顕著に誘導されたが、3 mg/kg で最大となった。経口投与された PenCDF はいずれの用量でも約 65 % が吸収され、そのほとんどは肝に分布していた。しかしながら、3 mg/kg 群では、1 mg/kg で検出されなかった肺において、PenCDF が検出され、5 mg/kg 群では、肺、腎、脂肪組織、小腸への分布が 3 mg/kg に対し、有意に、しかも投与量の増加率以上に増加した。このことは 5 mg/kg 投与では肝の PenCDF 蓄積率に低下がみられ、そのため他の組織への分布量が増大したことを示唆している。さらに PenCDF の肝ミクロゾームへの分布を調べたところ、用量依存的に増加し、かつ PenCDF で誘導される P-448H 量とよく相関した。以上の結果は、著者らが提唱した、肝ミクロゾームに局在する P-448H は PenCDF の貯蔵部位として機能するという仮説を支持するとともに、肝以外に PenCDF の標的部位が存在する可能性を示している。

文 献

- 1) Birnbaum, L. S., Decad, G. M. and Matthews, H. B.: Disposition and excretion of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 342-252, 1980.
- 2) Birnbaum, L. S., Weber, H., Harris, M. W., Lamb IV, J. C. and McKinney, J. C.: Toxic interaction of specific polychlorinated biphenyls and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Increased incidence of cleft palate in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77: 292-302, 1985.
- 3) Ernster, L., Danielson, L. and Ljunggren, M.: DT-diaphorase. I. Purification from the soluble fraction of rat liver cytoplasm and properties. *Biochem. Biophys. Acta* 58: 171-188, 1962.
- 4) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S.: Isolation and purification of total lipids from tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509, 1957.
- 5) 深作 昇, 長谷川賢, 黒木広明, 増田義人, 古賀信幸, 吉村英敏: ^{14}C -2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran の合成. *福岡医誌* 74: 202-205, 1983.
- 6) Kamps, L. R., Trotter, W. J., Yung, S. J., Carson, L. J., Roach, J. A. G., Sphon, J. A., Tanner, J. T. and McMahon, B.: Polychlorinated quarterphenyls identified in rice oil associated with Japanese "Yusho" poisoning. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 589-591, 1978.
- 7) Kuroki, H. and Masuda, Y.: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 7: 771-777, 1978.
- 8) Kuroki, H., Masuda, Y., Yoshihara, S. and Yoshimura, H.: Accumulation of polychlorinated dibenzofurans in the livers of monkeys and rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 18: 387-392, 1980.
- 9) Kuroki, J., Koga, N. and Yoshimura, H.: High affinity of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsomes of rats. *Chemosphere* 15: 731-738, 1986.
- 10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 11) Matsubara, T., Koike, M., Touchi, A., Tochino, Y. and Sugeno, K.: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Anal. Biochem.* 75: 596-603, 1976.
- 12) Miyata, H., Kashimoto, T. and Kunita, N.: Studies on the compounds related to PCB (V). Detection and determination of unknown organochlorinated compounds in Kanemi rice oil caused the "Yusho". *J. Food Hyg. Soc.* 19: 364-371, 1978.
- 13) Nebert, D. W. and Gelboin, H. V.: Sub-

strate inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. *J. Biol. Chem.* 243: 6242-6249, 1968.

14) Nishizumi, M.: Acute toxicity of polychlorinated dibenzofurans in CF-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45: 209-212, 1978.

15) Oishi, S., Morita, M. and Fukuda, H.: Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43: 13-22, 1978.

16) Omura, T. and Sato, R.: CO-binding pigment of liver microsomes. (II) Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378, 1964.

17) Poiger, H., Buser, H. R. and Schlatter, C.: The metabolism of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Chemosphere* 13: 351-357, 1984.

18) Deitrich, R. A., Bludeau, P., Stock, T. and Roper, M.: Induction of different rat liver supernatant aldehyde dehydrogenases by phenobarbital and tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Biol. Chem.* 252: 6169-6176, 1977.

19) Thomas, P. E., Korzeniowsky, D., Ryan, D. E. and Levin, W.: Preparation of monospecific antibodies against two forms of rat liver cytochrome P-450 and quantitation of these antigens in microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 192: 524-532,

1979.

20) Yoshihara, S., Nagata, K., Yoshimura, H., Kuroki, H. and Masuda, Y.: Induction effect on hepatic enzymes and acute toxicity of individual polychlorinated dibenzofuran congeners in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59: 580-588, 1981.

21) 吉村英敏, 神村英利, 小栗一太, 佐伯清太郎: 高毒性 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) のラット糞中排泄に及ぼすスクアランの効果. *福岡医誌* 76: 184-189, 1985.

22) Yoshimura, H., Kuroki, J., Koga, N., Kuroki, H., Masuda, Y., Fukasaku, N. and Hasegawa, M.: High accumulation of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran to hepatic microsomes of rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 7: 414-419, 1984.

23) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N. and Miki, M.: Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320: 179-192, 1979.

24) 吉村英敏, 他: サルの PCB 中毒症に関する研究 (第2報). *福岡医誌* 72: 155-184, 1981.

25) 吉村英敏, 和田郁夫, 古賀信幸, 永田 清, 山内葉子, 吉原新一: 3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニルのモルモットに対する急性毒性, ならびに肝酵素の誘導作用. *福岡医誌* 72: 149-154, 1981.

3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl のラットに対する 毒性および肝酵素誘導作用の長期経過

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

古 賀 信 幸・黒 木 淳

外 間 由美子・吉 村 英 敏

Long-Term Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl on the Toxicity and Liver Enzyme Activities in Rats

Nobuyuki KOGA, Jun KUROKI, Yumiko HOKAMA
and Hidetoshi YOSHIMURA

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812*

Long-term effect of a single (0.1 mg/kg) or two (0.05 mg/kg×2) low dose of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB), a highly toxic PCB congener, on the toxicity and liver enzyme activities in Sprague-Dawley rats was investigated during 8 months after the injection.

In both PenCB-treated groups, the body weight were increased during the experiment, but the rate of growth was significantly suppressed from 52 days to 130 days. Such suppression continued up to 8 months after the first PenCB-injection. Even at 8 months, significant atrophy of thymus was still observed in both groups, but the tissue weights of liver and spleen were not affected at all. On the other hand, benzo(a)pyrene (BP) 3-hydroxylase and DT-diaphorase, both of which are typical enzyme activities inducible by MC-type inducers, were increased markedly at 1 month after the injection in both groups. DT-diaphorase level were lowered to the control level at 4 months after the injection. Total P-450 content was induced 1.5-fold in both groups at 1 month after the injection, but was lowered near to the control level at 4 months. BP 3-hydroxylase in 2 injection group still retained 3 times higher level than that of the control at 8 months.

These results showed a surprising persistency of biological effect of PenCB, and suggested that the multiple injections with divided small doses were more effective than a single injection of PenCB at once.

3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl (PenCB) は 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl および 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl とともに肝薬物代謝酵素系の 3-methylcholanthrene (MC) 型誘導能を有する PCB であり、実験動物に対し強い急性毒性を示すことが知られている¹⁸⁾。すなわち、体重の増加抑制、肝脂質の増加、胸腺および脾臓の萎縮などの毒性的変化をもたらし、やがて死に至らしめる。当教室では油症の発生以来、PCB とその関連化合物の毒性発現機構解明の一環として、これらが示す急性毒性と肝酵素誘導能に注目し、種々の検討を加えてきたが、

その結果、ラットにおいて MC 型誘導能が強いもののほど、毒性が強いことを明らかにした¹⁸⁾。また PenCB 投与ラットでは、肝ミクロゾームによる testosterone および progesterone などのステロイド代謝パターンが大きく変動すること¹⁰⁾¹⁵⁾, sulfanilamide および phenacetin による腎毒性が増強されること²⁾などが明らかとなった。

これまで PenCB が油症原因油中および環境中に見い出されていなかったことから、当教室では、猛毒の 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 類似の生物活性を示す 1 つのモデル化合物として使用

してきたが、最近、Kannan⁴⁾により市販のPCB (Kanechlor 400等) およびヒト脂肪組織中にPenCBがそれぞれ3~70 ng/g, 120~730 pg/g存在することが初めて報告された。さらに彼らは、ヒトに蓄積するTCDD, 種々のPCDFおよび平面型PCBの各濃度に、これらの化合物のラット培養細胞におけるbenzo(a)pyrene (BP) 3-水酸化酵素の誘導能を乗じた値を用いて、個々について毒性評価した結果、PenCBの相対毒性値はTCDDおよびPCDFのそれより、はるかに大きいことを示した。このことは油症の原因を考える上で、微量で高毒性のPCDFに加え、PenCBも重要であることを示唆している。

このような背景で、PenCBの示す毒性および肝酵素誘導作用について低用量のPenCB 1~2回投与ラットを用い、投与後8カ月間にわたり長期的な影響を調べた。

実験方法

1. 実験材料

3, 4, 5, 3', 4'-PenCBは佐伯ら¹³⁾の方法に従って当教室で合成した。BP, 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP), dicoumarolはそれぞれ半井化学薬品(株)(京都), Merck AG(西ドイツ, Darmstadt), 和光純薬(株)(大阪)より購入した。Benzphetamine (BZ)・HClはDr. R. A. Neal (Vanderbilt University) より、3-hydroxy BPは九州大

学医療技術短期大学部の木下洋夫教授より供与された。

2. 実験動物および薬物投与

4週令のSprague-Dawley系雄性ラット(体重140~150 g)は日本チャールズ・リバー(株)より購入し、九動(株)安全性研究所でPenCB投与後8カ月間飼育した。PenCBはトウモロコシ油に溶解し、1回投与の場合は実験開始日に0.1 mg/kg/mlを、2回投与の場合は実験開始日および開始後12日目に0.05 mg/kg/mlをそれぞれ経口投与した。動物はPenCB 1回投与群, PenCB 2回投与群, 対照群としてトウモロコシ油2回投与群を設け、1群9匹を使用した。水、餌は自由に与え、実験開始後、1, 4および8カ月目にそれぞれ3匹ずつ屠殺した。

3. 酵素溶液の調製

ラットを屠殺後、十分に放血させ、肝臓、脾臓、胸腺を摘出し秤量した。肝臓はさらに既報¹⁶⁾に準じ、ホモジネート、さらに9000×g上清を調製し、酵素溶液とした。

4. 酵素活性などの測定

cytochrome P-450含量の定量はMatsubaraら⁹⁾の方法に従い行った。BP 3-水酸化活性¹¹⁾, BZ N-脱メチル化活性¹⁵⁾はそれぞれ3-hydroxy BP, HCHOの生成量より求めた。DT-diaphorase活性はErnsterら¹⁾の方法により、DCPIPの還元により求めた。タンパク質の定量はLowryら⁸⁾の方法によった。

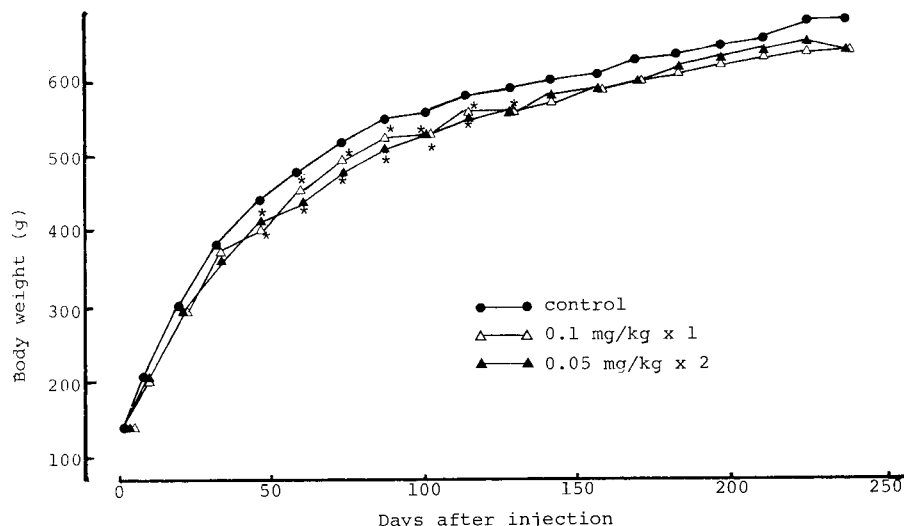


Fig. 1 Long-Term Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl on Body Weight of Rats

* Significantly different from the control, $p < 0.05$.

実験結果

1. 体重曲線におよぼす影響

Fig. 1 に PenCB 投与後から 8 カ月間の体重増加曲線を示す。PenCB 1 回投与群および PenCB 2 回投与群では、いずれも PenCB の初回投与直後より体重増加の抑制傾向が認められた。42 日目から 130 日後までは、その抑制効果は有意であった。その後、この傾向は 8 カ月後まで継続した。ここには示していないが、餌の摂取量は体重増加抑制と時期を同じくし、両群とも 42 日目ごろから有意に低下しており、2 回投与群の方がその程度は大きかった。しかし、1 回投与群と 2 回投与群とは、体重に及ぼす影響にはほとんど差が認められなかった。飲料水の摂取量は PenCB 投与直後、いく分か低下するものの、ほとんど影響は認められなかった。以上の結果より、低用量の PenCB では体重増加の抑制が発現するまでに 6 週間も要すること、さらに体重の回復は 8 カ月後もなお困難であることが明らかとなった。

2. 臓器重量に及ぼす影響

PenCB 投与後 1, 4, 8 カ月後におけるラットの各臓器重量を測定し、対照群のそれと比較した。Fig. 2 に PenCB 投与群の 100 g 体重当たりの臓器重量の変化を示す。肝臓および脾臓については、今回用いた低用量の PenCB では、1 回あるいは 2 回投与群とも、8 カ月の実験期間中に有意な変化は認められなかった。これに対して、胸腺においては、PenCB 2 回投与群で実験開始後 1 カ月で、また PenCB 1 回投与群で 4

カ月後には萎縮傾向が認められた。8 カ月目では両投与群とも有意な萎縮がみられた。このように、胸腺は他の臓器に比べ、PenCB に対する反応性が高く、また一旦、萎縮した後は容易に回復しないことが示された。また、PenCB 1 回投与群よりも 2 回投与群の方が胸腺重量の減少は大きいことから、毒性は単回で大量投与するよりも、少量を数回に分けて投与する方が強く発現することが示唆された。

3. 肝酵素活性に及ぼす影響

これまで当教室では、ラットにおいて PenCB 投与後 5 日目では総 P-450 含量が 3～5 倍に増加するとともに、BP 3-水酸化活性および DT-diaphorase 活性の顕著な増加、BZ N-脱メチル化活性の抑制を起こすことを明らかにしている¹⁸⁾。Fig. 3 に PenCB 投与後 1, 4, 8 カ月の肝酵素活性を示す。投与後 1 カ月では、両投与群とも、BP 3-水酸化活性の約 15 倍の顕著な誘導が認められた。DT-diaphorase 活性も PenCB 1 回投与群で約 3 倍、2 回投与群で約 6 倍も誘導されていた。総 P-450 含量は両群とも 1.5 倍と増加していたが有意ではなかった。なお、BZ N-脱メチル化活性は全く影響を受けなかった。投与後 4 カ月では P-450 含量および DT-diaphorase 活性は対照群と同レベルに戻ったが、BP 3-水酸化活性は両投与群で依然として有意に高かった。投与後 8 カ月では、2 回投与群の BP 3-水酸化活性についてのみ、PenCB 投与による誘導効果が持続しており、対照群の 3 倍であった。一方、BZ N-脱メチル化活性は 8 カ月目にして有意に抑制された。

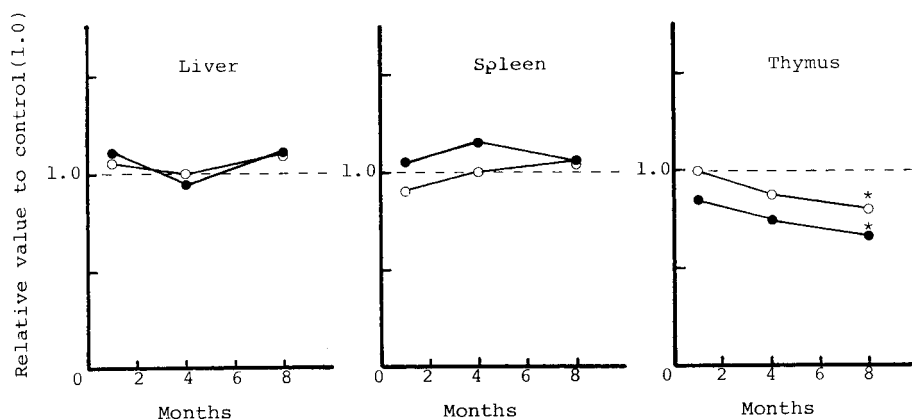


Fig. 2 Long-Term Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl on Organ Weights of Rats

* Significantly different from the control, $p < 0.05$.

○—○, 0.1 mg/kg×1; ●—●, 0.05 mg/kg×2

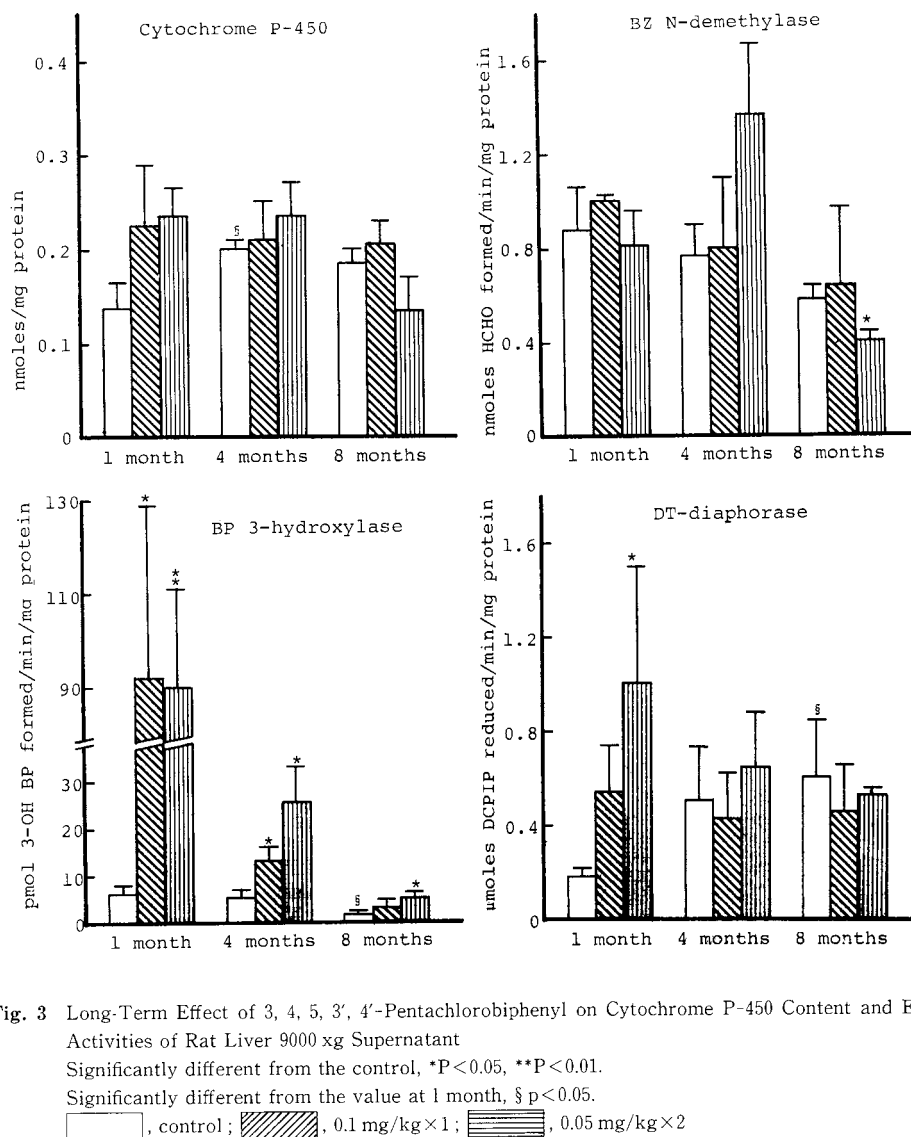


Fig. 3 Long-Term Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl on Cytochrome P-450 Content and Enzyme Activities of Rat Liver 9000 xg Supernatant
Significantly different from the control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.
Significantly different from the value at 1 month, § $p < 0.05$.
□, control; ▨, 0.1 mg/kg x 1; ▩, 0.05 mg/kg x 2

以上の結果から、PenCBは0.1 mg/kgという低用量にもかかわらず、長期に亘り、酵素誘導作用を示すことが明らかとなった。また、単回投与よりも2回に分けて投与する方が、その効果が強いことも明らかとなった。

考 察

本研究では、低用量のPenCBをラットに投与し、8カ月間に亘り、PenCBの毒性（体重増加抑制、胸腺および脾臓の萎縮）と肝酵素誘導作用を追跡した結果、PenCBの示すこれらの生物活性の驚異的な持続

性が明らかとなった。すなわち、今回用いた0.1 mg/kgで1回、あるいは0.05 mg/kgで2回投与により、肝および脾臓の重量は8カ月間を通じてまったく影響を受けなかったが、8カ月後に有意な胸腺の萎縮および投与後50日ごろから4カ月まで有意な体重増加の抑制が認められた。一方、PenCBなどのMC型誘導能を示す多塩素化芳香族炭化水素により顕著に増加するBP 3-水酸化活性とDT-diaphoraseはそれぞれ投与後5日目と12日目に最大に対することが知られているが⁵⁾、BP 3-水酸化活性は8カ月まで、DT-diaphoraseは4カ月まで有意に高い活性が維持されてい

た。

PenCBは5~10 mg/kgを1回ラットに投与すると、投与直後ではなく、7~10日のtime lagの後にラットを死に至らしめるが、本実験で用いた低用量のPenCBでも毒性発現（有意な体重増加抑制）まで50日ものtime lagが存在した。これが何を意味するか不明であるが、PenCBの示す毒性はPenCBが直接、毒性発現のための標的部位に作用するのではなく、各組織の種々の酵素蛋白に対して誘導あるいは抑制作用を起こし、そのことから結果的に生体成分のバランスが乱されるため、毒性発現までに時間がかかるのかもしれない。いずれにしろ、8カ月まで観察されたBP 3-水酸化活性の高レベルはPenCBの高い肝残留性を示唆している。PenCBをラットに経口投与すると、約70%が小腸壁から吸収され、そのほとんどが肝に蓄積される¹⁷⁾。今回、肝中PenCBを定量しなかったが、Oguriら¹²⁾は、PenCBと構造的にも毒性学的にも類似した2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuranの肝中濃度と肝のBP 3-水酸化活性とDT-diaphorase活性の誘導率とが非常によく関連することを明らかにしていることから、8カ月においても、かなりのPenCBが残存していると思われる。また投与総量が同一の場合、1回投与より2回投与の方が毒性が強く発現したが、これは1回の投与量が少ない方が消化管よりの吸収がよいためと考えられる。

これまで、肝薬物代謝酵素活性は加齢に伴ない、大きく変動することが知られている。藤田ら³⁾は生後1.5~28カ月齢雌雄ラットを用いて検討を行い、P-450含量は加齢とともに減少の傾向にあること、雌に比べ雄で高いaminopyrine N-脱メチル化活性、hexobarbital水酸化活性およびlidocaine N-脱エチル化活性は24カ月齢では雌のレベルまで有意に低下することを明らかにし、薬物代謝酵素活性の老化による変動はP-450の量的かつ質的変動によって大きく影響を受けることを示唆した。本研究では彼らの研究に比べ、8カ月と短いせいか、対照群においてP-450量の加齢による減少を観察できなかった。しかしながら、BZ N-脱メチル化活性およびBP 3-水酸化活性については、加齢とともに減少した。一方、DT-diaphorase活性は逆に増加傾向を示した。本酵素は現在、キノン化合物による細胞毒性（活性酸素の生成）に対する生体防御酵素として重要な役割を果たしていると考えられている⁷⁾¹⁴⁾。加齢により増加したDT-diaphorase活性は老化による活性酸素あるいは過酸化脂質の増加とも関連しているのかもしれない。

加えて、当教室ではPenCB (5 mg/kg) 投与ラットにおいて投与後5日目では、DT-diaphoraseの顕著な誘導とともに、活性酸素消去酵素のglutathione peroxidaseおよびcatalaseが約60%に減少する事実⁶⁾を見い出しており、本酵素の生理的機能を考える上で興味深い。

総 括

PCBの中でももっとも強い急性毒性および肝薬物代謝酵素系のMC型誘導能を有する3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB)のラットにおける長期的な作用について検討した。投与量は0.1 mg/kgという低用量とし、1群は単回投与、他群は2回に分けて投与し、投与後1, 4および8カ月目の毒性と肝酵素活性を追跡した。両群において、PenCB投与後50日ごろから有意な体重増加抑制が、8カ月では有意な胸腺の萎縮が観察された。一方、MC型誘導剤に特徴的なBP 3-水酸化活性およびDT-diaphorase活性の有意な増加は、それぞれ8カ月、4カ月後に至っても持続された。また、このようなPenCBの作用は単回投与より2回に分けて投与する方が大であった。

文 献

- 1) Ernster, L., Danielson, L. and Ljunggren, M.: DT-diaphorase I. Purification from the soluble fraction of rat liver cytoplasm and properties. *Biochem. Biophys. Acta* 58: 171-188, 1962.
- 2) Eyanagi, E., Shigematsu, H., Yoshida, K. and Yoshimura, H.: Enhancement of sulfanilamide N⁴-hydroxylase activity in kidney and liver microsomes of rats by pretreatment with 3-methylcholanthrene type-polychlorinated biphenyl. *J. Pharmacobio-Dyn.* 5: 853-858, 1982.
- 3) Fujita, S., Kitagawa, H., Tsai, S. G., Suzuki, M., Matsunaga, T., Tatsuno, J., Kato, M., Nishihara, E., Funamura, M., Suzuki, T. and Kitani, K.: Age-associated changes in hepatic microsomal drug metabolizing enzyme activities. Abstract of papers, the 14th Symp. on Drug Metabolism and Action, Fukuoka, Nov. 18-19, 1982, p. 147.
- 4) Kannan, N., Tanabe, S., Wakimoto, T. and Tatsukawa, R.: A simple method for determining non-ortho substituted PCBs in Kanechlors, Aroclors and environmental samples. Abstract of papers, the 6th Intern. Symp. on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, Fukuoka, Sept. 16-19, 1986, p. 42.
- 5) 古賀信幸, 黒木 淳, 外間由美子, 吉村英

敏：PCB 異性体によるラット肝可溶性酵素の誘導。
福岡医誌 76：160-166, 1986.

6) 古賀信幸, 黒木 淳, 吉村英敏：高毒性 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl (PenCB) の活性酸素防御酵素系に及ぼす影響。日本薬学会 第104年会講演要旨集, p. 618, 1984.

7) Lind, C., Hochstein, P. and Ernster, L.: DT-diaphorase as a quinone reductase: A cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. Arch. Biochem. Biophys. 216: 178-185, 1982.

8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.

9) Matsubara, T., Koike, M., Touichi, Y. and Sugeno, K.: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. Anal. Biochem. 75: 596-603, 1976.

10) Nagata, K., Matsunaga, T., Buppodom, P., Ishimatsu, M., Yamato, H., Yoshihara, S. and Yoshimura, H.: Unique induction of cytochrome P-450 isozymes in rat liver microsomes by treatment with 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl and its effect on testosterone metabolism. J. Pharmacobio-Dyn. 8: 948-957, 1985.

11) Nebert, D. W. and Gelboin, H. V.: Substrate inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. J. Biol. Chem. 243: 6242-6249, 1968.

12) Oguri, K., Kamimura, H., Koga, N. and Yoshimura, H.: Mechanisms for stimulated fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in

rats by treatment with squalane and liquid paraffin. Abstract of papers, the 6th Intern. Symp. on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, Fukuoka, Sep. 16-19, 1986, p. 63.

13) 佐伯清太郎, 吉原新一, 内野泰治, 吉村英敏：3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl の合成について。福岡医誌 70：85-87, 1979.

14) Thor, H., Smith, M. T., Harzell, P., Bel-lomo, G., Jewell, S. A. and Orrenius, S.: The metabolism of menadione (2-methyl-1, 4-naphtho-quinone) by isolated hepatocytes. J. Biol. Chem. 257: 12419-12425, 1982.

15) Yoshihara, S., Nagata, K., Wada, I., Yoshimura, H., Kuroki, H. and Masuda, Y.: A unique change of steroid metabolism in rat liver microsomes induced with highly toxic polychlorinated biphenyl (PCB) and polychlorinated dibenzofuran (PCDF). J. Pharmacobio-Dyn. 5: 994-1004, 1982.

16) 吉村英敏, 和田郁夫, 古賀信幸, 永田 清, 山内葉子：3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニルのモルモットに対する急性毒性, ならびに肝酵素の誘導作用。福岡医誌 72：149-154, 1981.

17) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Koga, N., Nagata, K., Wada, I., Kuroki, J. and Hokama, Y.: Inductive effect on hepatic enzymes and toxicity of congeners of PCBs and PCDFs. Environ. Health Perspec. 59: 113-119, 1985.

18) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N. and Miki, M.: Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. Ann. N. Y. Acad. Sci. 320: 179-192, 1979.

Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) の呼吸器系ならびに 免疫系に対する長期の影響に関する実験的研究 (第1報)

九州大学医学部胸部疾患研究施設

鐘ヶ江 秀 明・シャム・ラル

栗 田 幸 男・重 松 信 昭

Experimental Studies on Long-Term Influence of Polychlorinated Dibenzofurans to Respiratory and Immune Status (Preliminary Study)

Hideaki KANEGAE, Sham Lal, Yukio KURITA,

and Nobuaki SHIGEMATSU

Research Institute for Diseases of The Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University

The influence of polychlorinated dibenzofuran (PCDF) on two T-cell subsets (namely helper and suppressor T-cells) of Yusho patients and experimental studies of PCDF on these T-cells has been done and we found that helper T-cells were selectively damaged in acute phase of the PCDF poisoning. As the further examination, such effects on T-cells and bronchiolar cells were observed for a period of six months.

Intraperitoneal pre-administration of different doses of PCDF, one week, one month, three months and six months before immunization of these mice with sheep red blood cells (SRBC) caused a time- and dose-dependent suppression of delayed foot-pad reaction (DFR) when a challenge injection of SRBC was given into foot-pad of these immune mice. This suppressive effect on DFR was observed in relation to atrophic and ensuing regressive changes of the thymic cortex.

The toxic effect of PCDF caused histologic changes, mainly found in Clara cells, which were cell degeneration in the earlier stages and in the later stages hyperplasia of the cells.

油症患者の病態のうち、呼吸器罹患の実態と免疫学的異常およびその気道感染との関連について、私達は昭和44年より臨床病理学的ならびに生理学的に、また免疫学的に検討してきた⁸⁾⁹⁾¹²⁾。そして一年および二年前の報告集の中において、それらのまとめを行った⁹⁾¹³⁾。

今回は、油症患者の慢性気管支炎様症状や気道感染の反復の要因として、局所の形態学的変化と、免疫系異常の関与評価を更に詳細にするため、前年度に引き続き、PCDFの細胞性免疫系と胸腺組織に及ぼす影響および細気管支上皮の形態変化とその経時的推移について、より長期間にわたり検討を行った。

方 法

生後8週齢のC57/Black系雌マウスに対し、I)

食用油0.1mlのみ、II) PCDF 5 μ g/食用油0.1ml、III) PCDF 50 μ g/食用油0.1mlを、各々腹腔内に1回投与した。各群を更に4つの亜群に分け、i) 1週後、ii) 1カ月後、iii) 3カ月後、iv) 6カ月後、羊赤血球SRBC 10^7 個/生理食塩水0.05mlによって左足に感作し、感作6日後にSRBC 10^8 個/生理食塩水0.05mlによって右足にchallengeを行い、24時間後のfoot padの厚さの変化—delayed foot pad reaction (DFR)—を測定した。1亜群のマウスは5匹である。

結果の比較は、対照群を1とした百分率で表わし%DFRとした。また、各々の群、亜群における肺、胸腺をとり出し、光顕あるいは電顕による組織学的検討を行った。

Table 1 Relationship between the dose of PCDF administration and foot pad reaction induced by SRBC in SRBC-immunized mice.

Treatment	No. of animals	Untreated foot pad reaction (A)	Antigen-treated foot pad R. (B)	Difference A-B
—	5	1.44±0.05	1.6 ±0.04	0.8
5 mcg PCDF	5	1.41±0.07	1.54±0.04	0.13
50 mcg PCDF	5	1.47±0.04	1.47±0.04	0.00

Mice were immunized 1 week before with 10^8 SRBC injected subcutaneously on the left foot pad, and PCDF was administered intraperitoneally one week before immunization.

Table 2 Relationship between the dose of PCDF administration and delayed foot pad reaction induced by SRBC in SRBC-immunized mice.

Treatment	No. of animals	Untreated foot pad (A)	Antigen-treated (B)	Difference A-B
—	5	1.47±0.072	1.57±0.04	0.10 (mm)
5 mcg PCDF	5	1.47±0.02	1.53±0.04	0.07 (mm)
50 mcg PCDF	5	1.47±0.01	1.48±0.08	0.01 (mm)

Mice were immunized one week before with 10^8 SRBC which was injected subcutaneously on the left foot pad. PCDF was administered i.p. one month before.

Table 3 Relationship between the dose of PCDF administration and delayed foot pad reaction induced by SRBC in SRBC-immunized mice.

Treatment	No. of animals	Untreated foot pad (A)	Antigen-treated foot pad (B)	Difference A-B
—	5	1.18±0.04	1.41±0.07	0.23
5 mcg PCDF	5	1.17±0.07	1.36±0.07	0.19
50 mcg PCDF	5	1.11±0.06	1.27±0.06	0.16

Mice were immunized one week before with 10^8 SRBC injected subcutaneously on the left foot pad. PCDF was administered (i.p) 3 months before.

Table 4 Relationship between the dose of PCDF administration and delayed foot pad reaction induced by SRBC in SRBC-immunized mice.

Treatment	No. of Animals	Untreated foot pad (A)	Antigen-treated foot pad (B)	Difference A-B
—	5	1.22	1.27	0.036
5 mcg PCDF	5	1.22	1.26	0.036
50 mcg PCDF	5	1.20	1.25	0.05

Mice were immunized 1 week before with 10^8 SRBC injected subcutaneously on the left foot pad. PCDF was administered i.p. 6 months before.

結 果

1) 細胞性免疫系に対する影響について

表1, 2, 3, 4のように, 時間および量に依存する形でPCDF投与群では, 対照群に比して有意にDFRは低下していた。初期のDFRの低下は, PCDF高濃度投与群において更に顕著であつた。PCDF投与群

でのDFR低下は, 概ね時間的経過につれ改善傾向にあり, 3~6カ月で正常化した。

PCDF投与後1週のマウスの胸腺は著明な萎縮を呈していた(図1A)が, 3カ月後は正常に復していた(図1B)。

2) 細気管支の形態に及ぼす影響について

PCDF投与後1週のマウスのクララ細胞は著明な

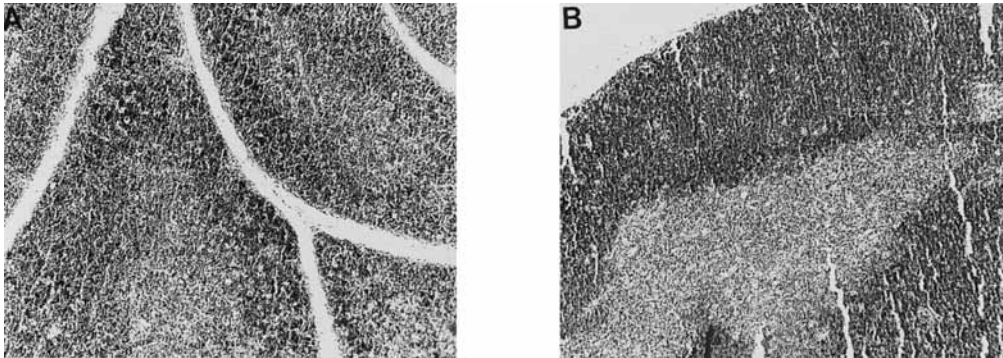


Fig. 1A (upper left): Atrophic changes produced in the cortex of the thymus are seen 2 weeks after administration of PCDF in mice. The cortex is shrunk and corticomedullary junction is indistinct. Magnification $\times 76$.

Fig. 1B (upper right): The cortex of the thymus 6 months after administration of PCDF is seen in normal and pretreated state. Magnification $\times 76$.

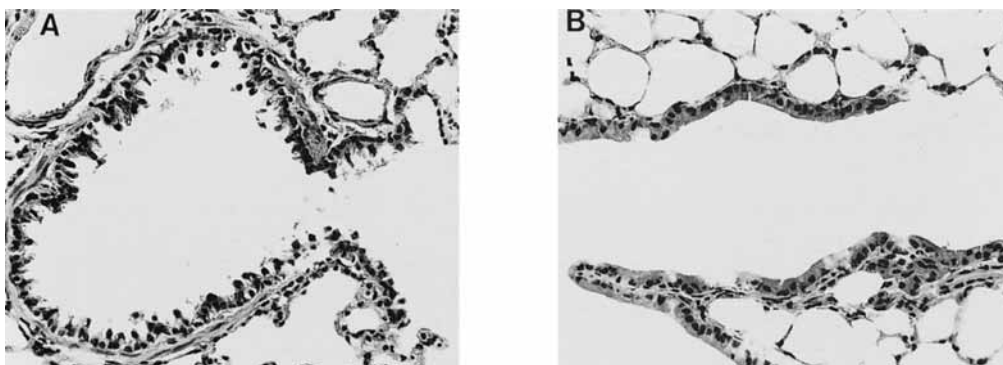


Fig. 2A (upper left): Degeneration of ciliated and non-ciliated cells with denuded nuclei and perinuclear vacuolation 1 week after PCDF administration in mice. Magnification $\times 300$.

Fig. 2B (upper right): Hyperplasia of non-ciliated columnar cells, without cellular atypia in mice treated with PCDF 6 months before. Magnification $\times 300$.

変性脱落を呈する（図 2 A）が、3～6 カ月後は増生を示した（図 2 B）。

考 察

1) 免疫系障害についての検討

既報⁸⁾⁹⁾において、日本および台湾の油症患者の免疫系異常を比較したが、体液性免疫については発症より2年後では血清 IgA 値、IgM 値の低下を認め、3年以降は正常化したこと、細胞性免疫では OKT4/T8 比（ヘルパー/サプレッサー T 細胞比）の低下と PHA に対する反応性の上昇を認めている。これに反し発症より14年目に検討した日本の油症例では、逆に T4/T8 比の上昇と PHA に対する反応性の低下が認められた。

マウスを用いた PCDF 投与実験でも、ヘルパー T 細胞の比率低下が認められ、発症早期にはヘルパー T 細胞が選択的に障害されることが示され、これらは胸腺変化の組織像と大略相関していると思われる⁹⁾。

海外の報告においても、PCDF などが immune response の抑制、細胞性免疫低下を来すこと⁴⁾⁶⁾¹⁴⁾、抗体産生への toxic effect は少ないことなどほぼ同様の結果が述べられている²⁾⁵⁾⁷⁾。また胸腺および脾の萎縮および睾丸の変化の少ないこと、肝の腫大のみられること⁷⁾、更に胸腺の変化ではリンパ球の壊死を認めることのあることが述べられている¹¹⁾。

2) 細気管支クララ細胞の変化について

油症の主たる原因物質は PCDF であることが明らかとなり、Furan 誘導体は細気管支クララ細胞の壊

死をひきおこすが、同物質による細胞障害は作用早期において極めて選択的であること（それに引き続く肺水腫などの肺障害がおこること）が報告され、一昨年の報告ではそれを確認した⁹⁾が、今回は、その障害の長期にわたる修復ないし新生物発生への発展の可能性⁹⁾¹⁰⁾の予備的検討を行った。

海外の報告では既に PCB が発癌のプロモーターである可能性を示唆しており¹⁾、私達の今回の実験でみられた1～3カ月のクララ細胞の増生や他の臓器における上皮の増生⁷⁾は今後の検討を行う必要を示すと考えられる。

ま と め

異なった量の PCDF を腹腔内に1週より6カ月にわたる異なった時期に前投与することによって惹起される SRBC 感作に対する足蹠反応を検討し、同時に呼吸器系の細胞とくにクララ細胞に対する長期の影響を検索した。

1) 胸腺の早期の萎縮と以後の正常像への復帰と相關する形で SRBC に対する足蹠反応は減弱および回復を示した。

2) クララ細胞は早期には変性を示し、以後細胞の増生を来した。これが PCDF のクララ細胞のもつ P-450 酵素活性と関連を有するプロモーター作用を示唆するかについては今後の課題と考えられる。

文 献

- 1) Anderson, L. M., Ward, J. M., Fox, S. D., Isaacs, H. J. and Riggs, C. W.: Effects of a single dose of polychlorinated biphenyls to infant mice on N-nitro-sodimethylamine-initiated lung and liver tumors. *Int. J. Cancer* 38: 109-116, 1986.
- 2) Holsapple, M. P., McNeerney, P. J., Barnes, D. W. and White, K. L., Jr.: Suppression of humoral antibody production by exposure to 1, 2, 3, 6, 7, 8 Hexachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231: 518-526, 1984.
- 3) Kuratsune, M., Nakamura, Y., Ikeda, M. and Hirohata, T.: Analysis of deaths seen among patients with Yusho. 6th Internat. Sympo. Chlorinated Dioxins and Related Compounds: 179, 1986.
- 4) Lubet, R. A., Lemaire, B. N., Avery, D. and

Kouri, R. E.: Induction of immunotoxicity in mice by polyhalogenated biphenyls. *Arch. Toxicol.* 59: 71-77, 1986.

5) Luster, M. I., Faith, R. E. and Moore, J. A.: Effects of polybrominated biphenyls (PBB) on immune response in rodents. *Environ. Health Perspect.* 23: 227-232, 1978.

6) Luster, M. I., Boorman, G. A., Dean, J. H., Harris, M. W., Luebke, R. W., Padarathsingh, M. L. and Moore, J. A.: Examination of bone marrow, immunologic parameters, and host susceptibility following pre- and postnatal exposure to 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Int. J. Immunopharmac.* 2: 301-310, 1980.

7) McConnell, E. E., Moore, J. A., Haseman, J. K. and Harris, M. W.: The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-p-dioxins in mice and guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44: 335-356, 1978.

8) Nakanishi, Y., Shigematsu, N., Kurita, Y., Matsuba, K., Kanegae, H., Ishimaru, S. and Kawazoe, Y.: Respiratory involvement and immune status in Yusho patients. *Environ. Health Perspect.* 59: 31-36, 1985.

9) 中西洋一, 栗田幸男, 鐘ヶ江秀明, 重松信昭: 油症における呼吸器系ならびに免疫系の障害—経過ならびに発症機序について—, 福岡医誌 76: 196-203, 1985.

10) Poland, A. and Glover, E.: 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: segregation of toxicity with the Ah locus. *Molecul. Pharmacol.* 17: 86-94, 1979.

11) Poland, A. and Knutson, J. C.: 2, 3, 7, 8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22: 517-554, 1982.

12) Shigematsu, N., Ishimaru, S., Saito, R., Ikeda, T., Matsuba, K., Sugiyama, K. and Masuda, Y.: Respiratory involvement in polychlorinated biphenyls poisoning. *Environ. Res.* 16: 92-100, 1978.

13) 重松信昭, 石丸秀三: ポリ塩化ビフェニール (PCB) の組織分布とその障害について—呼吸器分布を中心として—, 福岡医誌 70: 246-251, 1979.

14) Vos, J. G. and Moore, J. A.: Suppression of cellular immunity in rats and mice by maternal treatment with 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Int. Arch. Allergy* 47: 777-794, 1974.

PCDF の発癌に及ぼす影響 ——腫瘍発生率と光顕的電顕的検討——

長崎大学医学部皮膚科学教室（主任：吉田彦太郎教授）

広瀬 寮二・堀 真・藤田 和夫
山城 一純・宿輪 哲生・吉田彦太郎

Influences of Polychlorinated Dibenzofuran on Carcinogenesis

Ryoji HIROSE, Makoto HORI, Kazuo FUJITA,
Kazuyoshi YAMASHIRO, Tetsuo SHUKUWA and Hikotaro YOSHIDA

*Department of Dermatology (Director: Prof. H. Yoshida),
Nagasaki University School of Medicine,
Nagasaki, 852, Japan*

Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) has been found to be an ingredient of the rice oil of Yusho.

In order to evaluate the influence of PCDF on carcinogenesis, three different concentrations of PCDF were examined by topical application on mice with or without 20-methylcholanthrene (MC).

The concentrations as low as 0.1 ppm and 1 ppm of PCDF were high enough to act as a promotor, but they did not show any sign of being initiators. Furthermore it is proved that 1 ppm is the most adequate concentration of PCDF when it works as a promotor, because the electron micrographs of the skin treated with 1 ppm PCDF only showed the following three characteristic findings: First a diminishing tendency of keratinization, such as a decrease of tonofilament, an increase of ribosomes and an interdigitation of cells forming villi, occurred. Second a curious cell which has a markedly convoluted nucleus and numerous ribosomes appeared in the granular layer and appeared to protrude toward the surface of the skin, and it could be regarded as a sign of a characteristic change. Finally there was a lymphocyte invading the epidermis.

On the other hand 10 ppm PCDF did not raise the ratio of the occurrence of carcinoma, and its electron micrographs revealed an intense damage to the keratinocytes.

最近 polychlorinated dibenzofuran (PCDF) が、油症発生時のライスオイル中に 5 ppm と微量ながら含まれていることが明らかにされた⁹⁾。しかも polychlorinated biphenyls (PCB) が加熱されることによりさらに多量の PCDF が生成されることもわかった¹⁾⁸⁾¹⁰⁾。その PCDF の毒性は PCB よりはかるかに強力とされ⁷⁾、今日では PCB よりも PCDF が油症の原因と考えられるようになってきている⁶⁾。

さきにわれわれは 150 ppm の濃度の PCB を塗布または経口投与することにより、マウスの 20-methyl-

cholanthrene (MC) による皮膚癌の発生を抑制することを報告した⁴⁾今回は PCDF の発癌に対する影響を検討すると同時に、PCDF の表皮細胞へ及ぼす微細構造上の変化を観察した。

実験材料と方法

生後 3 カ月の d-d 系マウス 210 匹を以下の 7 群に分け、腰背部を抜毛し、実験部位とした。週 2 回、下記の化学物質を 12 週まで 0.2 ml ずつ滴下し、腫瘍発生状況を観察すると共に、8 週および 12 週目に処置

部位の皮膚生検を行い、光顕および電顕に供した。また同時に無処置マウス腰背部の生検も行い、対照とした。

第1群：0.1 ppm PCDF acetone 溶液単独塗布群，30匹

第2群：1 ppm PCDF acetone 溶液単独塗布群，30匹

第3群：10 ppm PCDF acetone 溶液単独塗布群，30匹

第4群：0.1 ppm PCDF-0.3 % MC acetone 溶液併用群，30匹

第5群：1 ppm PCDF-MC 併用群，30匹

第6群：10 ppm PCDF-MC 併用群，30匹

第7群：MC 単独塗布群，30匹

なお、PCDFの濃度設定は、以前に試みた予備実験の結果による。すなわち週2回20 ppm濃度の溶液0.2 mlの塗布を続けたところ、8週までにすべての動物が死亡したため、発癌実験には不適当と考え、濃度を10 ppm以下としたのである。

結 果

1. 腫瘍発生状況

全7群のマウスはいずれも実験開始後4週目まではその活動性は良好であり、PCDFとMCを併用した第4、5、6群とMC単独塗布の第7群のマウスの表皮はわずかに厚くなり、発毛状態がやや悪くなってきた。しかしPCDF単独塗布の第1、2、3群の発毛状態はすべて良好であった。

実験開始後6週目頃よりPCDFとMC併用群、およびMC単独群において腫瘍の発生をみるようにな

り、経過と共に徐々にその数を増していったが、PCDFの単独塗布群では12週目までの全観察期間を通して腫瘍発生は皆無であった。

表1に実験開始8週目と12週目の腫瘍発生状況を示した。8週目では肉眼的にヒトkeratoacanthomaに類似し、かつ組織学的に悪性と考えられるkeratoacanthoma型squamous cell carcinoma (K型SCC)²⁾⁵⁾が0.1 ppm PCDF-MC併用群で30匹中2匹、1 ppm PCDF-MC併用群で2匹、10 ppm PCDF-MC併用群で3匹にその発生をみたに過ぎなかったが、MC単独塗布群では6匹に腫瘍発生をみた。

さらに12週目になると、上記の併用群それぞれに15匹、15匹、4匹のK型SCCの発生をみた。一方MC単独群では若干増加したが、9匹に発生したのみであった。すなわち0.1および1 ppmのPCDFを併用した場合にK型SCCがより多発したのである。

次に組織学的に良性のpapilloma²⁾⁵⁾の発生についてみると、12週目では0.1 ppm PCDF-MC併用群で26匹、1 ppm PCDF-MC併用群で30匹、10 ppm PCDF-MC併用群で18匹のマウスにその出現をみた。MC単独群では25匹であった。したがって7群中1 ppm PCDF-MC群がもっとも高率にpapillomaを発生したことになる。

2. 組織学的所見

処置開始後8週目と12週目に処置部位を生検し、hematoxylin-eosin染色標本を作製し、比較検討を行った。

PCDF単独塗布群の8週目では、その濃度にかかわらず、マウス無処置皮膚と何ら異なる所見はみられなかった。しかしPCDFとMC併用群では8週目で

表1 腫瘍発生状況

群	K型SCC発生 マウス数		Papilloma発生 マウス数		腫瘍発生 マウス数の合計
	8週	12週	8週	12週	
第1群 (0.1ppmPCDF)	0	0	0	0	0
第2群 (1ppmPCDF)	0	0	0	0	0
第3群 (10ppmPCDF)	0	0	0	0	0
第4群 (0.1ppmPCDF+MC)	2	15	4	26	26
第5群 (1ppmPCDF+MC)	2	15	11	30	30
第6群 (10ppmPCDF+MC)	3	4	2	18	21
第7群 (MC)	6	9	8	25	27

表 2-a 生検組織所見 (8 週)

	第 1 群 0.1ppm PCDF	第 2 群 1ppm PCDF	第 3 群 10ppm PCDF	第 4 群 0.1ppmPCDF+MC	第 5 群 1ppmPCDF+MC	第 6 群 10ppmPCDF+MC	第 7 群 MC単独
表皮肥厚	— 顆粒層(1)	— 顆粒層(1)	—	+	+	軽度 顆粒層 1 層	+
細胞異型性	—	—	—	+	+	±	+
脱 毛	—	—	—	—	—	—	—
脂 腺	正常	正常	不明瞭	正常	正常	不明瞭	不 明 瞭
細胞浸潤	—	—	—	リンパ球軽度	リンパ球軽度	リンパ球軽度	リンパ球

表2-b 生検組織所見 (12週)

	第 1 群 0.1ppm PCDF	第 2 群 1ppm PCDF	第 3 群 10ppm PCDF	第 4 群 0.1ppmPCDF+MC	第 5 群 1ppmPCDF+MC	第 6 群 10ppmPCDF+MC	第 7 群 MC単独
表皮肥厚	— 顆粒層2～3層	—	+	++	++	++	++
細胞異型性	少数	核小体多数 なし	核小体多数	++ (基底層)	+	+	++
脱 毛	—	—	—	++	++	—	++
脂 腺	正常	正常	正常	—	Tumor がない ものでは++	正常	少数残存
細胞浸潤	—	軽度	軽度	++	Tumor部に+ Tumorがないも のでは軽度	++	++

表皮の肥厚，基底細胞層における異型性のある核をもつ細胞の出現，リンパ球の軽度の浸潤などがみられた。

12 週目になると，0.1 ppm と 1 ppm PCDF 単独群では 8 週目と大差がないのに比し，10 ppm PCDF 単独群では軽度の表皮肥厚とリンパ球浸潤がみられた。またこの時期の PCDF-MC 併用群では強い表皮肥厚，細胞異型，リンパ球浸潤などがみられた。以上の所見をまとめて表 2 に示した。

3. 電子顕微鏡所見

PCDF 単独塗布群について生検材料の一部より電頭試料を作製し，微細構造の変化を検討した。

1) 無処置マウス

表皮は 2 ～ 3 層から成り，基底細胞は円柱形を示す，核の大きさは多少不揃いであるが，核に切れ込みはみられない。細胞質内には中等量の tonofilament が存在し，ribosome，mitochondria の発達は良好である (図 1)。

2) 0.1 ppm PCDF 単独群，8 週目の所見

顆粒細胞の細胞質内 tonofilament は多少減少する

一方，ribosome を豊富に含んでいる。核周囲には小型の空胞がみられる (図 2)。

3) 0.1 ppm PCDF 単独群，12 週目の所見

基底細胞の細胞質内には中等量の tonofilament と ribosome の増加，さらに polysome の形成を認める (図 3)。

4) 1 ppm PCDF 単独群，8 週目の所見

全層を通して tonofilament の著しい減少傾向がみられる。細胞質内の tonofilament は束を形成することなく散在するのみである。desmosome に接する tonofilament は少量である。細胞質内には拡張した粗面小胞体や大小さまざまな空胞形成もみられる (図 4)。

5) 1 ppm PCDF C 単独群，12 週目の所見

tonofilament の減少に加え，さらにいくつかの変化が出現した。その一つは顆粒細胞の皮膚表面への突出現象である。すなわちきわめて切れ込みの著明な核を有する顆粒細胞が皮膚面から上方へ向って突出する像がみられた (図 5)。この細胞の核と keratohyalin

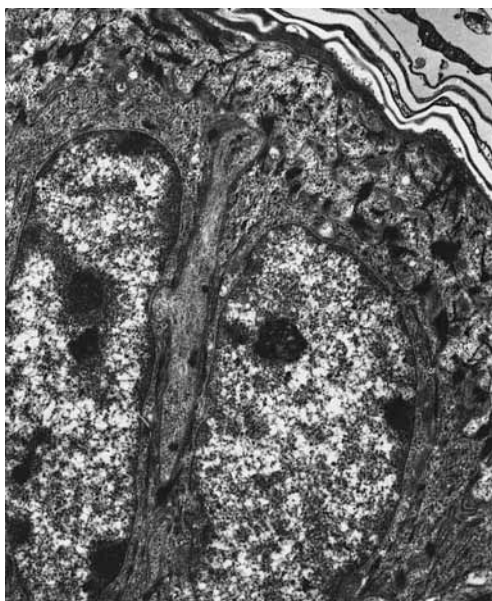


図1 正常マウス、円柱形の基底細胞の核に切れ込みを認めない、細胞質内には中等量の tonofilament をみる。 $\times 5,600$

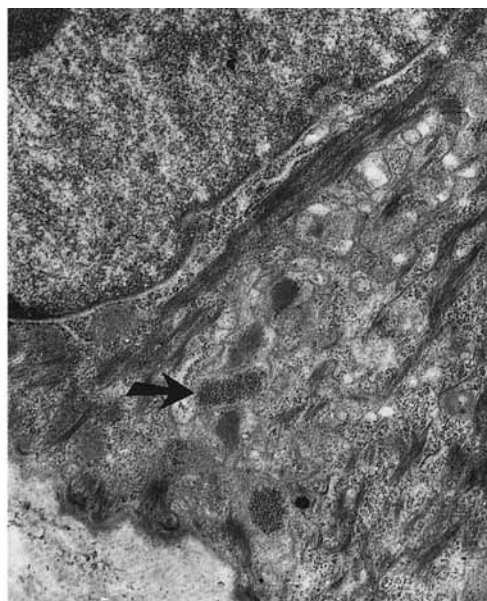


図3 0.1 ppm PCDF 単独, 12 週, 基底細胞の細胞質内にはなお中等量の tonofilament がみられる一方, ribosome が増え, polysome (→) の形成もみられる。 $\times 14,000$

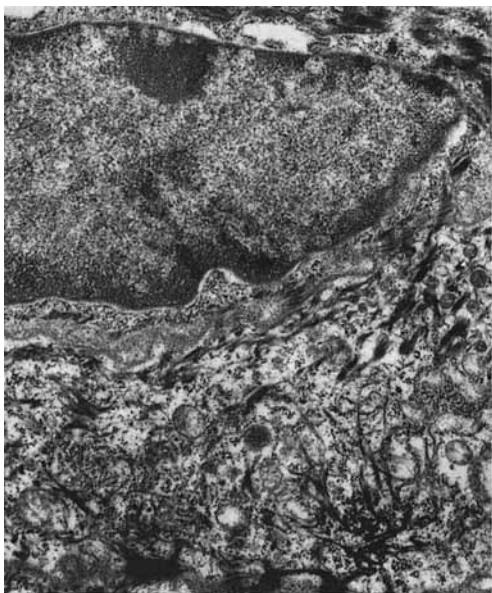


図2 0.1 ppm PCDF 単独, 8 週, 顆粒細胞の核周囲に小型の空胞形成が生じる, tonofilament は多少減少する。 $\times 14,000$

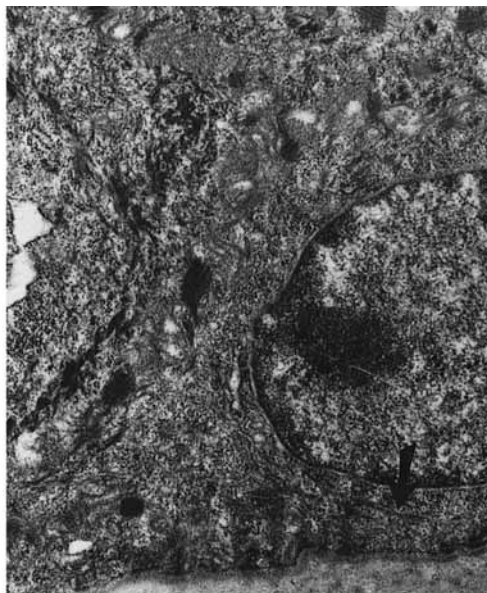


図4 1 ppm PCDF 単独, 8 週, 基底細胞においても著しく減少した tonofilament (→) が細胞質内に散在し, desmosome に接する tonofilament も少量である。 $\times 14,000$

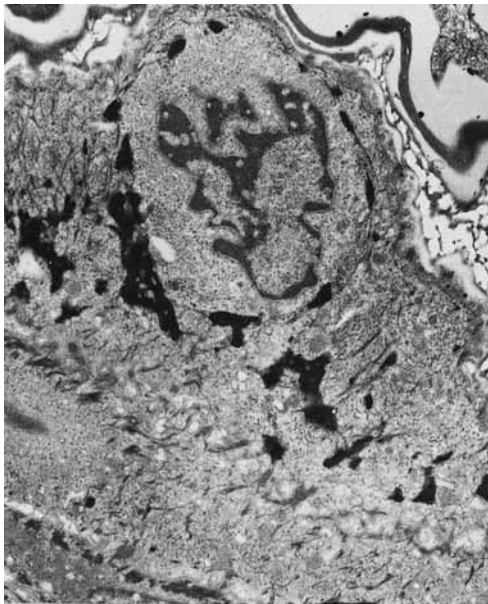


図5 1 ppm PCDF 単独, 12 週, きわめて切れ込みの強い核を有する顆粒細胞が皮表へ向かい突出している。 ×5,600

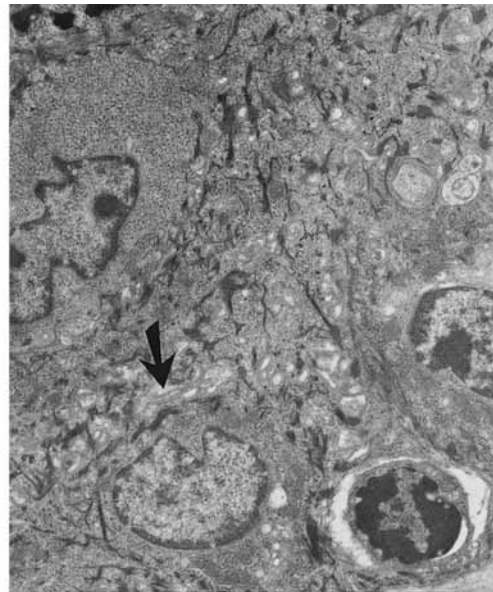


図7 1 ppm PCDF 単独, 12 週, 表皮基底細胞間にリンパ球の侵入像をみる。基底層および有棘層には多数の villi 形成 (→) による細胞接着をみる。 ×5,600

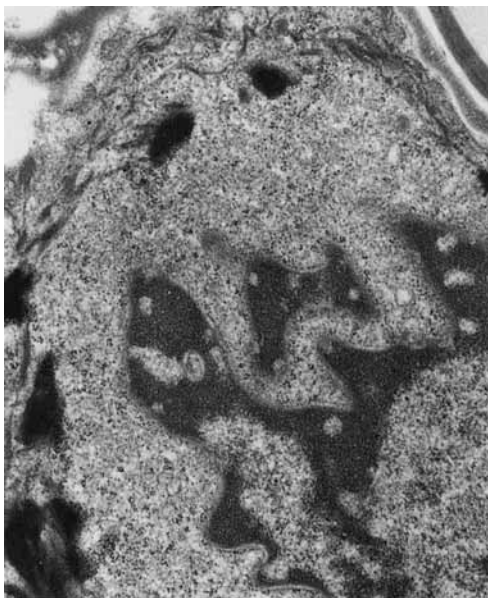


図6 図5の拡大, 異型を示す顆粒細胞の核周囲と keratohyalin granule との間は多くの ribosome で埋められている。 ×14,000

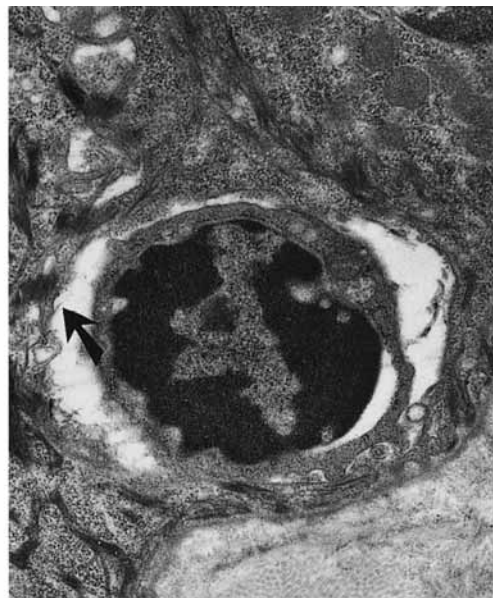


図8 図7の拡大, リンパ球を取り巻く基底細胞には basal lamina はみられない (→) ため, リンパ球は表皮内にあることが分かる。 ×14,000

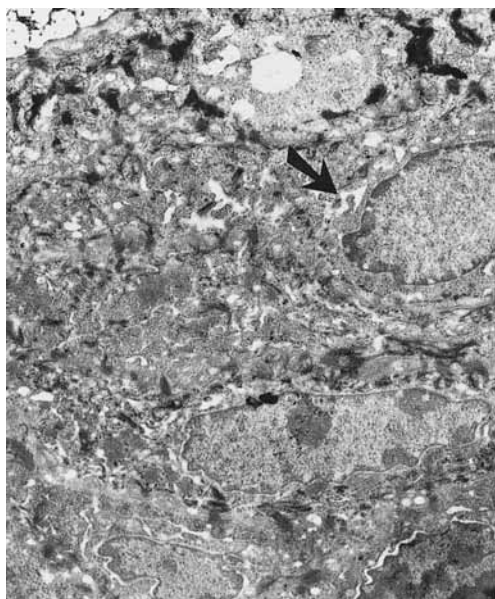


図9 10 ppm PCDF 単独, 12 週. 表皮全層を通して変性性変化を示す. 核の周囲には大小の空胞形成 (→) があり, 細胞質内は多くの ribosome で満たされる. $\times 5,600$

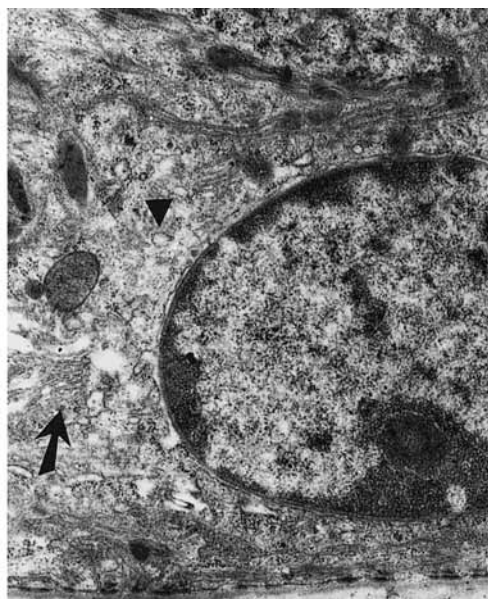


図11 10 ppm PCDF 単独, 12 週. 基底層にみられる Langerhans cell. Golgi apparatus (→) はよく発達している. Birbeck granule (▶) $\times 14,000$

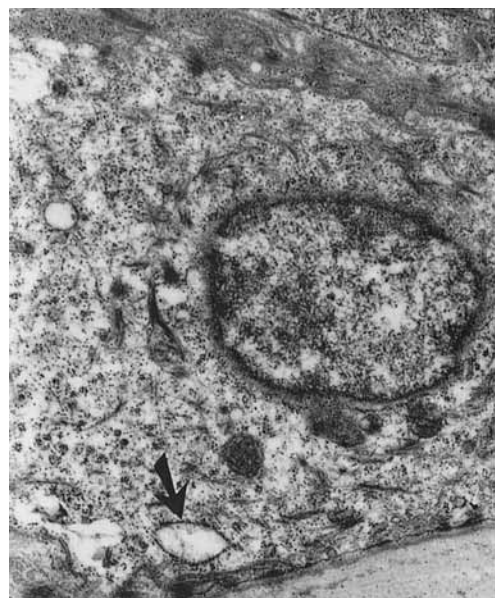


図10 10 ppm PCDF 単独, 12 週. 一見して明るく見える変性した基底細胞. 細胞質は tonofilament に代わり, 拡張した粗面小胞体 (→) や ribosome より成る. $\times 14,000$



図12 10 ppm PCDF 単独, 12 週. 基底細胞にみられた intracytoplasmic desmosome (→). $\times 36,000$

granule との間は著しく拡張し、その間を無数の ribosome が埋めている (図 6)。第 2 の変化は表皮基底細胞間にリンパ球の侵入像がみられたことである (図 7, 8)。第 3 の変化としては基底層および有棘層の各細胞間に多くの villi 形成がみられたことがあげられる (図 7)。

6) 10 ppm PCDF, 12 週目の所見

8 週目では 12 週目と同様の所見が軽度存在したのみであるので、12 週目の所見を記載する。高濃度 (10 ppm) の PCDF による変化は主として次の 3 点である。すなわち第 1 は全層を通して変性変化が認められたことである。核の周囲には多くの大小さまざまな空胞が形成され、細胞質内は多くの ribosome で満たされている (図 9)。時には一見して明るく見える変性した細胞もあり、このような細胞の細胞質はきわめて疎で、多くの拡張した粗面小胞体とそれに付着する ribosome や遊離 ribosome, mitochondria などを見る。しかし tonofilament はきわめて少ない (図 10)。第 2 点としては基底層にきわめてよく発達した Golgi apparatus を有する active な Langerhans cell を認めたことがあげられる (図 11)。第 3 点は、基底細胞の細胞質内に intracytoplasmic desmosome と思われる構造が発見された (図 12) ことである。これらの active な Langerhans cell や intracytoplasmic desmosome は 10 ppm より薄い濃度の PCDF 塗布では観察されなかった。

考 按

今回の実験における腫瘍発生状況を要約すると、8 週目では MC 単独群で 6 匹に K 型 SCC が発生したのに対して、0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm の PCDF 併用群ではそれぞれ 2 匹, 2 匹, 3 匹のマウスに発生を認めており、MC 単独塗布の方が癌を発生させやすい結果が出ている。しかしさらに塗布を継続し 12 週目になると、PCDF-MC 併用群では癌発生数が急増し、MC 単独群では 9 匹に K 型 SCC が発生したのに対し、0.1 ppm, 1 ppm の PCDF 併用群ではそれぞれ 15 匹のマウスに発生をみた。ところが興味深いことに 10 ppm の PCDF 併用群ではわずか 4 匹に K 型 SCC を認めたにすぎない。すなわち 0.1 ppm および 1 ppm の PCDF には promotor として発癌に及ぼす作用があることが示唆された。また PCDF 単独群では、いずれの濃度でも全く癌の発生をみていない事実と考え合わせると、少なくとも PCDF には initiator としての働きはないようである。また 10 ppm では腫瘍発生

数の増加をみなかったことより、PCDF には promotor として働くための至適濃度が存在する可能性が考えられた。

光顕所見では PCDF の濃度差による差異はほとんど認められず、わずかに 10 ppm PCDF 単独群の 12 週目において軽度の表皮肥厚、核小体を多数有する表皮細胞の出現、わずかな炎症性細胞浸潤などがみられたに過ぎなかった。

そこでさらに PCDF の濃度差による形態学的な皮膚への影響を調べるため、PCDF 単独塗布による電顕的検討を行ったのである。その結果、0.1 ppm PCDF 単独塗布群では 8 週目でも 12 週目でも大差なく、わずかに表皮細胞内の tonofilament が多少減少すると共に、それに代わって多くの ribosome が出現しているのみであった。次に 1 ppm PCDF 単独塗布群についてみると、8 週目では ribosome の増加に加えて tonofilament が著しく減少し、粗面小胞体の拡張や大小の空胞形成も生じており、表皮細胞の角化細胞としての性格が不明確となっているように思えた³⁾。そして 12 週目になると、突然多くの変化が出現する。すなわち深い切れ込みを有する核を持つ細胞が顆粒層にみられ、多くの ribosome が keratohyalin granule と核の間に介在する所見がみられた。そしてこの細胞は皮表へ向かい突出する形を示している。この細胞を悪性細胞と見なす根拠はないが、少なくとも正常の顆粒細胞とは形態学的に大きく異なっていることは事実である。また細胞相互の接着様式も変化しており、細胞質は villi を形成して、いわゆる interdigitation を示している。さらに表皮基底層にリンパ球が侵入している所見は何らかの免疫学的反応の存在をも示唆しているのであろう。以上の電顕所見より、表皮細胞は角化傾向を減弱しながら強い細胞の変化を示しており、その極大の時期が肉眼的に腫瘍が多発した時期ときわめてよく合致しているのである。さらに興味深い点は、この時期に出現している腫瘍は keratoacanthoma 型、すなわち強い角化傾向を示す SCC か、または表皮増殖を示す papilloma であったのに対し、この PCDF 単独塗布の非腫瘍部の電顕像では逆に角化の減弱傾向を示し、少量の tonofilament しか認め得なかったことである。なぜこのような角化傾向の弱い細胞から角化傾向の強い腫瘍が出現するのかはまったく不明であるが、PCDF が腫瘍を形成するのではなく、MC による腫瘍発生の際、単に補助的に働くとするれば、PCDF の細胞を変化させる作用だけで発癌に及ぼす作用は果たされたように思える。

なお、10 ppm PCDF 塗布群では、核周囲の多数の空胞化や細胞質の疎な細胞を主徴とする表皮細胞の強い変性が認められた。Langerhans cell の形態や intracytoplasmic desmosome の出現については、なお検討されるべきであるが、この濃度ではなお表皮細胞に与える障害が強過ぎると思われた。

これらの所見より、PCDF は 1 ppm の濃度においては明らかな腫瘍増殖の作用を有し、その 1/10 の濃度でもほぼ同じ作用があるものと思われた。ただし微細構造上は 1 ppm 濃度の場合の明らかな変化に対して、0.1 ppm では何ら変化を示してはおらず、1 ppm 付近に表皮細胞に対する作用のピークがあるように思われる。また PCDF それ自体には発癌性はないことも明らかとなったが、12 週間発癌物質と共に塗布すると、腫瘍の多発をみると、PCDF の腫瘍発生に対する作用は決して initiator ではなく、promotor であり、しかも至適濃度が存在すると結論したい。

また著者らは先にマウス皮膚に MC と vitamin A 誘導体を併用塗布することにより、著明な発癌率の低下を認めた³⁾。同時に電顕的検討を行い、vitamin A が発癌抑制を示す際、表皮細胞の角化傾向の低下が生じ、このため MC の発癌作用に対する感受性の低下をきたし、その結果発癌抑制が生じると考えた。しかしながら本稿においては角化減弱傾向こそが PCDF の promotor としての表皮に及ぼす変化としており、相反する結果となった。この PCDF による tonofilament の減少、ribosome の増加といった電顕所見と発癌率の上昇との関係は明らかではない。今後解決しなければならない興味ある重要課題であろう。

総 括

MC 塗布による皮膚の発癌系に種々の濃度の PCDF を添加し、PCDF の発癌に及ぼす影響を検討した。その結果、

1. PCDF には発癌性は認められなかったが、promotor として作用する場合があることが明らかとなった。
2. PCDF が発癌の promotor として働く至適濃度は 1 ppm 付近と思われた。
3. 1 ppm PCDF 単独塗布により、表皮細胞の tonofilament の減少、ribosome の増加、villi 形成な

ど角化の減弱傾向をきたすことが明らかとなった。また深い切れ込みのある核を有する顆粒細胞の皮表への突出、リンパ球の表皮内侵入などの所見もみられた。

4. 10 ppm PCDF の単独塗布は表皮細胞に強い変性をきたすことが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、PCDF を提供していただきました第一薬科大学教授増田義人博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Buser, H. R., Bosshardt, H. P. and Rappe, C.: Formation of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) from the pyrolysis of PCBs. *Chemosphere* 7: 109-119, 1978.
- 2) 広瀬寮二：化学発癌剤 20-methylcholanthrene 誘発マウス皮膚癌発生に及ぼす vitamin A の影響、第 1 報：発癌過程および発癌率の検討。日皮会誌 95: 1423-1431, 1985.
- 3) 広瀬寮二：化学発癌剤 20-methylcholanthrene 誘発マウス皮膚癌発生に及ぼす vitamin A の影響、第 2 報：電子顕微鏡所見について。日皮会誌 95: 1433-1440, 1985.
- 4) 堀 真, 藤田和夫, 山城一純, 鳥山 史, 広瀬寮二, 宿輪哲生, 豊島弘行, 吉田彦太郎：多塩素化芳香族化合物、およびその類似物質の methylcholanthrene induced mouse skin cancer の発生に及ぼす影響について。福岡医誌 76: 208-214, 1985.
- 5) 堀 真：化学発癌剤 20-methylcholanthrene 誘発マウス皮膚癌の検討、第 1 報：発癌過程の経時的变化およびその発生母地と組織学的分類について。日皮会誌 91: 21-31, 1981.
- 6) 増田義人, 倉恒匡徳：油症を起こしたライスオイル中の毒性物質。福岡医誌 70: 229-237, 1979.
- 7) 宮田秀明：ポリ塩化ダイベンゾパラダイオキシンとその関連物質について。食衛誌 15: 135-146, 1974.
- 8) Morita, M., Nakagawa, J., Akiyama, K., Mimura, S. and Isono, N.: Detailed examination of polychlorinated dibenzofurans in PCB preparations and Kanemi Yusho oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 67-73, 1977.
- 9) Nagayama, J., Kuratsune, M. and Masuda, Y.: Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and "Yusho oil" *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 9-13, 1976.
- 10) 長山淳哉, 増田義人, 倉恒匡徳：カネクロール 400 の加熱による塩化ジベンゾフランの生成について。日本産業衛生学会 p. 558-559, 松本, 1978.

HeLa 細胞のコロニー形成法による polychlorinated biphenyls (PCB) 毒性の検討

国立長崎中央病院 (院長: 寺本成美博士) 薬剤科

松 岡 一 忠

国立長崎中央病院 (院長: 寺本成美博士) 皮膚科

村 山 史 男

長崎大学医学部皮膚科学教室 (主任: 吉田彦太郎教授)

大 神 太 郎・野 中 薫 雄・吉田彦太郎

Detection of Polychlorinated Biphenyls (PCB) Toxicity by Colony Formation Methods of HeLa Cells

Kazutada MATSUOKA

*Department of Pharmacy, Nagasaki-Chuo National Hospital,
Nagasaki, 856, Japan (Director : Dr. S. Teramoto)*

Fumio MURAYAMA

*Division of Dermatology, Nagasaki-Chuo National Hospital,
Nagasaki, 856, Japan (Director : Dr. S. Teramoto)*

Taro OHGAMI, Shigeo NONAKA, Hikotaro YOSHIDA

*Department of Dermatology (Director : Prof. H. Yoshida),
Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, 852, Japan*

Polychlorinated biphenyls (PCB) toxicity and the effects of shohsaiko-toh to PCB toxicity in HeLa cells were investigated by colony formation method of cultures. Cell activities were evaluated by counting the number of colonies in HeLa cell culture. HeLa cells were cultured in the medium contained PCB and the toxicity was examined by the degree of colony formation. There was no influence of PCB to the colony formation of the HeLa cells up to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ of PCB concentration. Although the colony number was not changed at the concentration of 25 $\mu\text{g/ml}$, the diameter of colony was smaller in the medium with PCB than without PCB. Marked decrease of colony formation occurred at the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ and no colony formation showed over the 100 $\mu\text{g/ml}$ of PCB. From these results, this culture system could show PCB toxicity and evaluate the degree of toxicity. The effect of shohsaiko-toh was evaluated to PCB toxicity. The concentration from 1.56 to 100 $\mu\text{g/ml}$ of shohsaiko-toh was added to the culture medium with 50 $\mu\text{g/ml}$ of PCB. There was no change in the colony formation. These results indicated that the shohsaiko-toh has no influence of reactivation in the toxicity of 50 $\mu\text{g/ml}$ of PCB. It would seem that this culture system can be utilized as a screening test to see whether or not drugs have an effect on the reduction of PCB toxicity.

PCB (polychlorinated biphenyls) には培養細胞に対する毒性のあることが知られている。われわれは、その系に効果の期待できそうな薬物を加えた場合に培養細胞への障害作用の緩和、延命効果などを観察できれば、その薬物の臨床効果を予知できるのではないかと

考えたのである。そしてそのような薬物を患者に処方することは少なくとも医学的根拠に基づく医療行為でもあり、有効薬物の開発にも役立つのではないかと期待されるであろう。以下、われわれの試みた手技と、かつて油症患者に用いて若干の自覚症状の改善をみた

小柴胡湯について試みた検討結果を述べてみたい。

実験方法

1. 培養細胞および培養法

HeLa細胞 (2×10^5) を培養液 5 ml とともに直径 5 cm のプラスチックシャーレに入れ、 37°C 、5 %炭酸ガスの条件下で培養した。培養液は Dulbecco の Modified Eagle's Medium (ニッスイ製薬株式会社、東京) に 10 %牛胎児血清 (Gibco, N. Y., USA)、ペニシリン (万有製薬株式会社、東京) 10 単位/ml、硫酸ストレプトマイシン (明治製菓株式会社、東京) 100 μg 、 NaHCO_3 (保栄薬工、大阪) 1.54 mg/ml および L-グルタミン (半井化学、京都) 0.854 mg/ml を加えて調製した。細胞を単層に増殖させた後、0.02 %エチレンジアミン 4 酢酸 (同人化学、熊本) および 0.05 %トリプシン (Gibco, N. Y., USA) を含む磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline: PBS: pH 7.4) で細胞を剥離せしめた。これらの細胞をクローニングに用いた。すなわちピペッティング後、細胞数を数え、96 穴のプレートに細胞を 5 穴当り 1 個になるように調製し散布した。1 週間後、コロニー形成能がもっとも良好であった細胞を剥離し、さらに同様の方法を 3 回繰り返してクローニングを行った。得られた細胞を直径 10 cm のプラスチックシャーレ内で十分増殖させた後、実験に供するまで保護剤として dimethylsulfoxide (DMSO: 和光純薬、大阪) を最終濃度が 10 %になるように添加し -80°C の冷凍庫で保存した。また常法⁴⁾により無処置の培養細胞の倍加時間を 3 回測定した。

2. PCB および小柴胡湯調製法

PCB は polychlorobiphenyl tetra (和光純薬、大阪) を DMSO を用いて 10 %溶液を作製し、保存溶液とした。希釈の場合は PBS を用い、懸濁液として実験に供した。小柴胡湯エキス散 (津村順天堂、東京) は PBS で溶解し実験に供した。

3. コロニー形成法

上記培養細胞 100 個を直径 5 cm のプラスチックシャーレで 1 週間培養後、培養液を捨て PBS で洗浄した。この培養細胞を 10 %ホルマリン液で 30 分間固定し、1 %クリスタルバイオレット (和光純薬、大阪) で 3 分間染色後、肉眼でコロニーの計数を行った。今回の実験では PCB および小柴胡湯無添加の際に生じたコロニー面積の 50 %以上の場合を 1 個のコロニーとして数えた。

4. PCB および小柴胡湯添加法

a) PCB 単独添加: 6 穴のプレートにそれぞれ 100 個の細胞および 3 ml の培養液を加えた。次に PCB 保存溶液を最終濃度が 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し培養を行った。

b) 小柴胡湯単独添加: PCB と同様に細胞と培養液をプレートに加えた後、小柴胡湯を最終濃度が 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し培養を行った。

c) PCB および小柴胡湯添加: PCB 濃度は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に固定し、これに小柴胡湯をそれぞれ 0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度になるように添加し培養を行った。

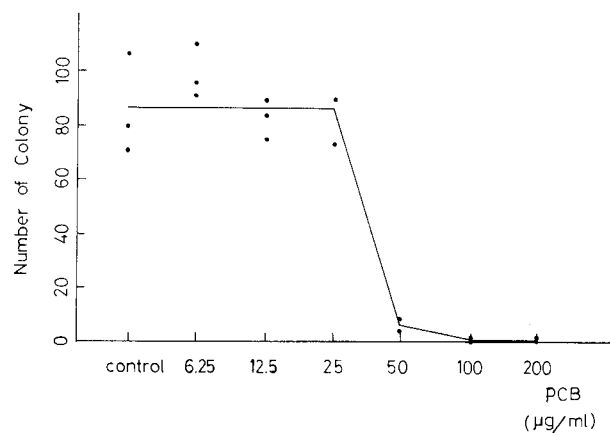


Fig. 1 Toxicity of PCB in MEM.

結 果

実験に用いた HeLa 細胞の倍加時間は平均 1.2 日であった。PCB 単独投与 (Fig. 1) 25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度までは無添加群と同程度のコロニーが計数された。また、PCB 濃度 12.5 $\mu\text{g/ml}$ まではコロニーの大きさは無添加群と比べても差異がみられなかった。しかし 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ではコロニー数の減少とともに、大きさも縮小していた。50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ではコロニー数は著明に減少し、それ以上の濃度ではコロニー形成はみられなかった。

小柴胡湯単独添加の場合 125 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まではコロニーの数と大きさに変化はみられなかった (Fig. 2)。250 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度になるとコロニー数の減少がみられた。しかしコロニー形成は高濃度でもみられ、PCB 添加の場合のような完全な形成抑制はみられなかった。

PCB と小柴胡湯同時添加群 (Fig. 3) では、小柴胡湯添加で PCB 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではコロニー数が

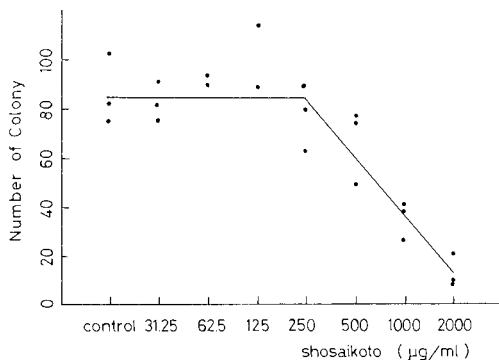


Fig. 2 Influence of shosaikoto in MEM.

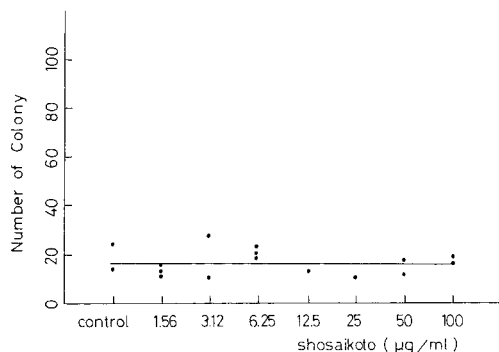


Fig. 3 Efficacy of shosaikoto to PCB toxicity (MEM contained 50 $\mu\text{g/ml}$ of PCB).

平均 20.0 であった。小柴胡湯濃度 1.56 から 100 $\mu\text{g/ml}$ までではコロニー数はほとんど変化がみられなかった。

か ん が え

われわれが *in vitro* での PCB 毒性を観察する上で、今回の方法を試みた理由は、第 1 にヒトの細胞を用いることができること、第 2 にコロニー形成法という簡便な手技を持っていたことなどからである。PCB 単独添加実験では、25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まではコロニー数の減少はみられなかった。しかしコロニーの大きさは無添加群に比べ、12.5 $\mu\text{g/ml}$ の PCB 濃度で明らかに縮小する傾向が認められた。このことから PCB の濃度が 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下では比較的毒性が少く、12.5 から 25.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度より毒性の発現が起こるものと考えられた。50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではコロニー数は著減し、75 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ではコロニー形成はまったく認められなかった。以上の結果は Stadnicki ら⁹⁾、大西ら⁷⁾ および森ら²⁾ の報告にほぼ一致している。

PCB の毒性を *in vitro* で検討する方法は、今までにいくつか報告されている。Murado ら⁸⁾ は *aspergillus* を、Nimmo ら⁹⁾ は *tetrahymena pyriformis* といった真菌あるいは繊毛虫を用いて、PCB の毒性を検討している。その他、ニワトリの胎児細胞¹⁾ や、哺乳類の細胞を用いる方法があり、後者には lymphoma 細胞³⁾ や HeLa 細胞²⁾ を用いる方法などがある。森ら²⁾ は HeLa 細胞を培養し、その形態学的な変化を観察して PCB の毒性を検討している。この方法は PCB の及ぼす影響を、細胞の形態変化として捉えることができるためきわめて有用な手段である。しかし、熟練した手技と常に一定した判断基準をもつ眼が必要とされる。今回のわれわれが用いた方法は *in vitro* で観察できること、培養細胞を用いているにもかかわらず操作が簡便であること、PCB の毒性観察に顕微鏡などの器具を必要とせず、コロニー数を肉眼で計数し判定できることなどの利点がある。しかし、コロニー形成の大きさが PCB 毒性によって縮小することがあるため、コロニー数としては同数であっても、面積の変化がある場合の把握が困難である。

以上の結果から、PCB には培養細胞に対して、dose-dependent に細胞毒作用があることが明らかとなった。そこでこの系に薬物を加え、コロニー数を検討すれば、有効薬物の開発につながるのではないかと考えたのである。そして検討する薬物には小柴胡湯をとりあげた。この薬物は著者の 1 人大神⁶⁾ が以前油症

患者に内服させ、一部の患者に自覚症状の改善をみたことがある薬物である。培養系における PCB 濃度は $50 \mu\text{g/ml}$ とし、小柴胡湯濃度は $100 \mu\text{g/ml}$ までの種々の濃度で検討したのである。その濃度の上限の設定は Fig. 2 に示したように、小柴胡湯の $125 \mu\text{g/ml}$ までは無添加群と同程度のコロニー形成がみられたからであり、もし小柴胡湯に細胞賦活作用、細胞毒に対する防御作用があるとすれば、それ以下の濃度で発現されるのではないかと考えたからである。

結論的には小柴胡湯に PCB 毒性を緩和もしくは中和させる作用を見出すことはできなかった。しかし今回の実験のみでその結論を下すことは危険である。培養系における PCB 濃度を低くした場合の検討、コロニー形成の経時的推移に対する小柴胡湯の影響の観察なども必要であるし、小柴胡湯添加の時期に対する影響なども検討した上で結論すべきことではないかと思われる。

ま と め

ヒト HeLa 細胞を用いてコロニー形成法によって、PCB と小柴胡湯の PCB 毒性に対する解毒効果の有無を検討した。クローニングした HeLa 細胞のコロニー形成数を肉眼的に数えることにより細胞活性を観察した。さらに PCB を培養液に添加して培養を行い毒性の検討をした。その結果、PCB 濃度 $12.5 \mu\text{g/ml}$ までは HeLa 細胞のコロニー形成能に影響はなかった。PCB 濃度 $25 \mu\text{g/ml}$ ではコロニー数は無添加群と差異を認めなかったが、コロニーの大きさは縮小傾向を示した。さらに濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ ではコロニーの数は著減し、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ではまったくコロニーの形成はみられなかった。

PCB $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度小柴胡湯を 1.56 から $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加して培養したが、コロニーの数は小柴胡湯無添加群とほとんど変わらず、PCB 濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ の毒性に対して小柴胡湯に改善作用を認めなかった。

HeLa 細胞のコロニー形成法は、薬物が PCB 毒性を改善する能力を持つか否かをスクリーニングする方

法として利用できる可能性があるものと思われた。

本稿を終えるにあたり、HeLa 細胞をご提供いただいた、長崎大学医学部細菌学教室、宮本勉教授に深謝する。

文 献

- 1) Kawanishi, S., Seki, Y. and Sano, S.: Polychlorobiphenyls that induce delta-amino-levulinic acid system synthetase inhibit uroporphyrinogen decarboxylase in cultured chick embryo liver cells. FEBS 129: 93-96, 1981.
- 2) 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.
- 3) Murado, M. A., Tejedor, M. C. and Baluja, G.: Interactions between polychlorinated biphenyls (PCBs) and soil microfungi. Effects of Aroclor-1254 and other PCBs on *Aspergillus flavus* cultures. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 15: 768-774, 1976.
- 4) 日本組織培養学会編: 組織培養の技術, 朝倉書店, 東京 p. 25-26, 1982.
- 5) Nimmo, D. R., Hansen, D. J., Couch, J. A., Cooley, N. R., Parrish, R. B. and Lowe, J. I.: Toxicity of Aroclor 1254 and its physiological activity in several estuarine organisms. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 3: 22-39, 1975.
- 6) 大神太郎, 野中薫雄, 村山史男, 山下和徳, 吉田彦太郎, 益田宣弘: 油症治療の試み。一漢方製剤を用いた一昭和 59 年度長崎油症研究班研究報告書 p. 8-16, 1984.
- 7) 大西克尚, 荒川哲夫: カネクロール 400 の眼組織に及ぼす影響に関する基礎的研究. 福岡医誌 68: 109-122, 1977.
- 8) Spalding, J. W., Ford, E. and Lane, D.: Effect of 4-chlorobiphenyl on substrate transport and phospholipid metabolism in mouse L5178Y lymphoma cells. Biochem. Pharmacol. 25: 2051-2058, 1976.
- 9) Stadnicki, S. S. and Allen, J. R.: Toxicity of 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl and its metabolites, 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl-4-ol to cultured cells in vitro. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 23: 788-796, 1976.

サルの PCB 中毒症に関する研究 (第3報)

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

古賀 信幸・黒木 淳・外間由美子

神村 英利・中嶋 寛・吉村 英敏

第一薬科大学物理分析学教室

増田 義人・原口 浩一・黒木 広明

大間 美和・服部 玲子

Studies on the Experimental PCB Poisoning in Crab Eating Monkeys. III.

Nobuyuki KOGA, Jun KUROKI, Yumiko HOKAMA,

Hidetoshi KAMIMURA, Hiroshi NAKASHIMA and Hidetoshi YOSHIMURA

Department of Hygienic and Forensic Chemistry,

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

Yoshito MASUDA, Kouichi HARAGUCHI, Hiroaki KUROKI,

Miwa OOMA and Reiko HATTORI

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815, Japan

Effects of treatment of cholestyramine and fasting on body weight gain and level of PCBs were investigated using 11 crab eating monkeys intoxicated by distilled KC-400. This KC-400 which had been used as a heat transfer agent contains not only PCBs but also PCQs and PCDFs. It was administered at daily dose of 1 mg/kg for 24 days and cholestyramine-diet was then given for 5 months. In the experiment of fasting, KC-400 was administered at the similar dose as above for 5 days and followed by the reduction of normal diet from 200 g to 50 g per day for 5 days. Finally, all animals were sacrificed to examine the long-term effect of KC-400 on induction of hepatic drug-metabolizing enzymes and to measure the concentration of PCB-methylsulfone (MSF-PCB) in the tissues. The results obtained were as follows:

1) Distilled KC-400 used in this study exhibited higher toxicity than undistilled one in the previous studies. Four monkeys died with the marked loss of body weight during the experiment. Remarkable loss of hair from the head, neck and chest was observed within 50 days. Cholestyramine treatment resulted in the recovery of the body weight and the hair more rapidly than control group. It was, however, considered that further studies are still necessary to obtain a conclusion.

2) It was observed by gas chromatography that the blood PCB concentrations increased during the KC-400 feeding period and decreased after stopping of the feeding. Some monkeys died within 3 months after their blood PCB levels reached up to 2 ppm by the feeding. The levels of PCBs in the blood and tissues were higher in the monkeys treated with PCBs than in the untreated at 4.5 years after the KC-400 feeding. However, the differences were within about one order of magnitude.

3) In 6 crab eating monkeys, liver enzyme activities were measured and compared to those of the untreated monkey 3.5 years after the fasting experiment. Also, enzyme induction was studied using 2 monkeys given 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) a week before the day of sacrifice.

Although no increase of cytochrome P-450 contents was observed in KC-400-administered

monkeys, benzphetamine N-demethylase activity which is typically induced by phenobarbital (PB)-type inducers in rats was about 1.2 to 1.5 times higher than that of the untreated monkey. This result suggests that PB-type PCB in the causal oil of Yusho affected the induction of hepatic drug-metabolizing enzymes in monkeys rather than 3-methylcholanthrene (MC)-type PCB and PCDF. PenCDF administration resulted in the increase of benzo[a]pyrene 3-hydroxylase, an enzyme activity markedly induced by MC-type inducers in rats, to a lesser extent than rats.

4) Gas chromatography-mass spectrometric analysis showed that the main components were di-, tri- and tetrachlorobiphenylmethanesulfones (MSF-PCBs). About 30 different MSF-PCB isomers were found in all the tissues. The levels of MSF-PCBs in the tissues of monkeys treated with KC-400 were rather higher than those of PCBs, compared with those in the control tissues though the MSF-PCB levels in the fatty tissues were relatively low. There was no correlation between the levels of PCBs and MSF-PCBs retained in these tissues. On the other hand, in the liver and lung of monkeys treated with PCDF, high concentrations of MSF-PCBs were observed, suggesting that PCDF might cause some effect on the formation or accumulation of MSF-PCBs in the liver.

これまで赤毛ザルおよびカニクイザルにおいてカネクロール 400 (KC-400) および KC-400+polychlorinated dibenzofuran (PCDF) を連続投与し、油症様症状を起こさせる試みがなされ¹⁵⁾¹⁸⁾、体重の減少、脱毛および眼瞼の浮腫など、明らかに PCB, PCDF に起因すると考えられる異常が観察された。とくに患者が摂取したライスオイル中の組成に近い KC-400+PCDF 投与群において認められた肝細胞の微細構造の変化や眼瞼マイボーム腺の異常、歯肉上皮の過角化は油症患者の所見とよく一致することが明らかにされた。さらに、これらサルを油症モデルとして利用し、コレステラミン、流動パラフィンおよびグルタチオンの3種について治療薬としての可能性が検討された結果、コレステラミンあるいはグルタチオン処理により、所見によっては一部に有効であると判定されたが、総合的には明確な結論を得るには至らなかった。

そこで本研究では、コレステラミン処理の効果の有無を明確にするため、また長期経過における PCB の残留度などを明らかにするため以下の検討を加えた。前回の報告¹⁸⁾において赤毛ザルに比べ、体重がほぼ一定で個体差も少なかったカニクイザルをこれらの検討に用いた。コレステラミンは現在、血中コレステロール低下剤として利用されているアニオン交換樹脂であるが、田中ら¹³⁾ KC-400 投与マウスにおいて、本剤が腸管から KC-400 の吸収抑制を行うことを示唆した。また Cohn ら²⁾ は有機塩素系殺虫剤 chlordecone 中毒者において、本剤による chlordecone の糞中への排泄促進を報告している。最近、神村ら⁸⁾ は高毒性 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenC-

DF) 投与ラットにおいて、5% (w/w) コレステラミン含有餌により、PenCDF の糞中排泄が約 2 倍に増加することを見出ししている。このようにコレステラミン処置により PCB および PCDF の体外排泄が促進されれば、毒性を軽減することが可能であると考えられる。

本研究ではさらに、コレステラミン治療実験終了後、約 6 カ月の期間をあけ、再度、蒸留 KC-400 投与を行い、次いで減食による血中 PCB レベルに及ぼす影響を調べた。絶食療法は、油症治療指針の中にも、ただし書き付きながら含まれ、一部の有効性が認められている⁶⁾¹¹⁾。

最後に、現在、油症の主たる原因物質として注目されている PenCDF を投与し、サルにおける肝酵素誘導能についても検討した。

実験方法

(古賀信幸, 黒木 淳, 外間由美子, 神村英利, 中嶋 寛, 吉村英敏)

1. 実験材料

KC-400 はカネミ倉庫(株)より収去された使用済のものを蒸留して、低沸点成分を除き、油症原因油中の PCB 組成に一致させたものを用いた。この蒸留 KC-400 には高沸点 PCB, PCQ の他、PCDF が 0.15% (4 塩素化体 0.08%; 5 塩素化体 0.05%; 6 塩素化体 0.02%) 含まれていた。肝酵素誘導実験 (1986, 4, 16) には単一 PCDF の PenCDF を用いた。

2. 実験動物および薬物投与

検疫済みのカニクイザル雄 12 匹 (crab eating

monkey, 体重 2.5~3.2 kg, 平均 2.9 kg) につき, 約 5 カ月間餌付, 観察を行った後, Table 1, Table 2 に示すように, 充分の期間をおいて 3 度にわたり, 蒸留 KC-400 あるいは PenCDF を投与し, またコレステラミン食餌による治療実験, 減食による治療実験を行った。なお, No. 89 は食餌, 観察期間中に尾の切断による腰麻痺を起こし, 衰弱死した。実験開始当初, No. 86 と No. 88 を対照群として設定していたが, No. 86 はコレステラミン治療実験において, 蒸留 KC-400 投与群に加えた。No. 88 は全期間を通して何らの処置を行わず唯一のコントロールとした。当初の対照群 2 匹を除く 9 匹は蒸留 KC-400 投与群として No. 78, 79, 84, 85 の計 4 匹, コレステラミン治療群として No. 80, 81, 82, 83, 87 の計 5 匹とした。

サルの飼育は, 空調を施した飼育室にて一匹ずつス

チール製ケージ中で行い, コレステラミン投与時を除いて, すべてのサルは固型飼料 (船橋農場製サル用, 200 g/day) により飼育した。減食期間中は飼料の量を 50 g/day とした。コレステラミンの投与は, これを 1% (w/w) 含有し, かつビタミン A, E および K を通常の倍量強化したオリエンタル製サル用固型飼料を摂取させて行った。水は自由に摂取させ, 毎日約 50 g のバナナおよび肝油ドロップ 1 錠 (ビタミン A 1000 I. U., D₂ 100 I. U., C 200 mg) を与えた。蒸留 KC-400 および PenCDF は前報¹⁵⁾ に準じてコーン油に溶解し, バナナ中心部に添加して投与した。投与量は, コレステラミン治療実験では B 群および C 群に蒸留 KC-400 を 1 mg/kg/day, 24 日間とした。減食による治療実験では C 群の No. 81, 82, 83 に対し, 同じく 1 mg/kg/day, 5 日間投与した。最後に PenC-

Table 1 Treatments of KC-400 and PCDF in crab eating monkeys.

Monkey No.	First treatment (1981, Oct. 31-1982, May 5)		Second treatment (1982, Oct.26-1982, Nov.15)		Third treatment (1986, April 15-22)	
	Days	Total KC-400 (mg)	Days	Total KC-400 (mg)	Days	Total 2, 3, 4, 7, 8- PenCDF (μ g)
A group 88						
B group 78	24	86.4*				
79	24	72.0*				
84	24	72.0			2	90
85	18	54.0*				
86	24	79.2				
C group 80	24	81.6*				
81	24	79.2	5	18.5		
82	24	76.8	5	16.5		
83	24	84.0	5	20.5	2	1160
87	24	86.4*				

* This monkey died or was killed and dissected for weakening during the first treatment.

Table 2 Summary of methods of cholestyramine-treatment and fasting in crab eating monkeys.

Monkey No.	First treatment (1981, Nov.30-1982, May 5)		Second treatment (1982, Oct.26-1982, Nov.15)	
	Drug	Days	Fasting	Days
A group 88			200 g → 50 g	6
B group 84			200 g → 50 g	6
86			200 g → 50 g	6
C group 80	1 % cholestyramine-diet (1982, Feb. 8 death)	71		
81	1 % cholestyramine-diet	156	200 g → 50 g	6
82	1 % cholestyramine-diet	156	200 g → 50 g	6
83	1 % cholestyramine-diet	156	200 g → 50 g	6
87	1 % cholestyramine-diet (1982, Dec. 8 death)	8		

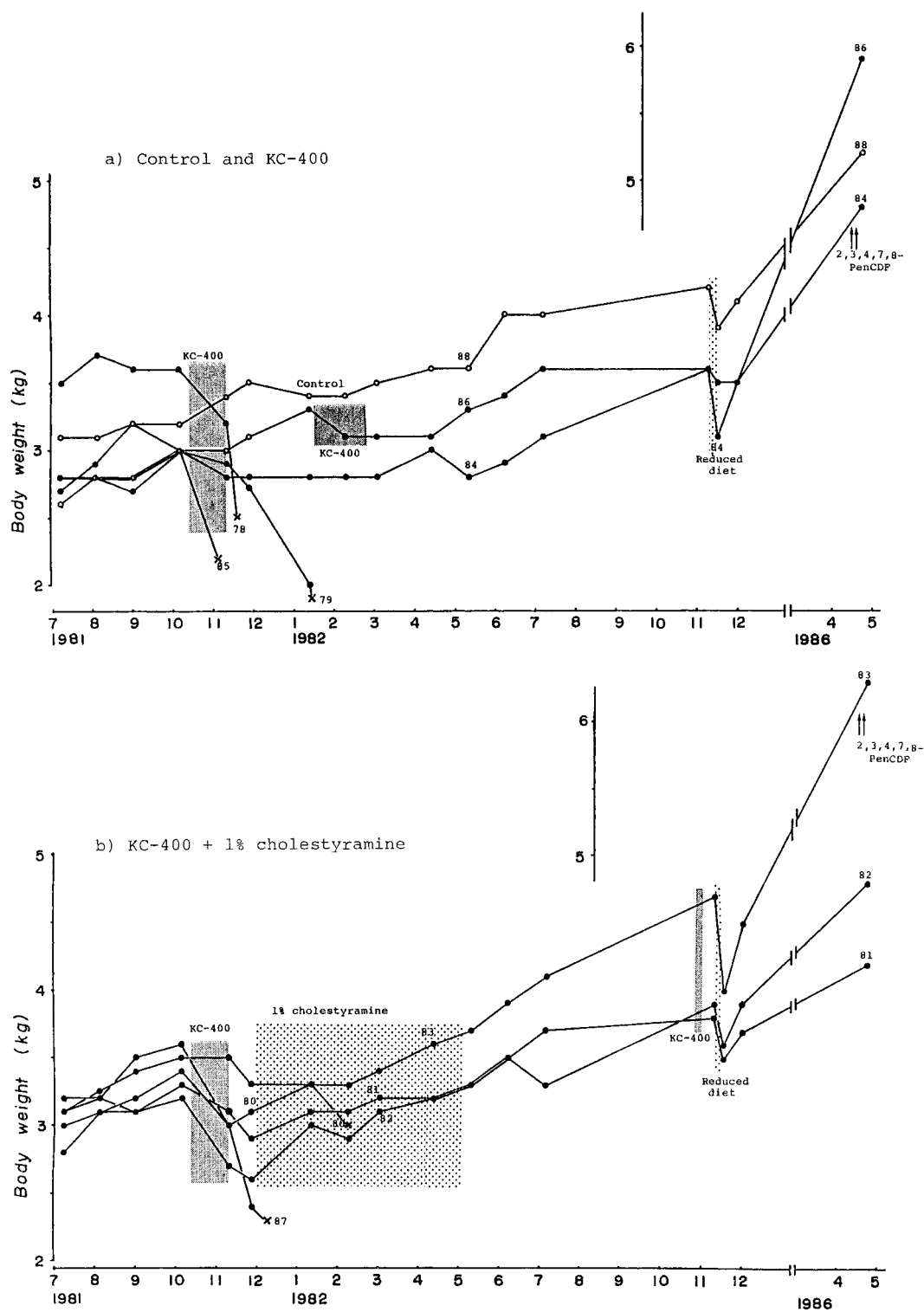


Fig. 1 Growth curves of crab eating monkeys during the experiment.

DF 投与による肝酵素の誘導実験では、生存サルのうち 2 匹 (No. 83, 84) を選び、屠殺日の 12 日前と 7 日前に 2 回に分けて投与した。No. 84 は 2 回合計 1.16 mg, No. 83 は結局、あまり食欲を示さず 90 μ g の投与量となった。これらの投与経過および各個体に対する全投与量は Table 1, に一括して示す。

3. 体重変化の観察

実験開始後、ほぼ 1 カ月ごとにケタラール (塩酸ケタミン) 約 50 mg を大腿部に筋注し、麻酔下に体重測定を行った。

4. 採血

体重測定時に合わせて大腿部静脈より麻酔下に真空採血管を用いて採血を行った。なお、実験期間中、死亡したサル (No. 78, 80) および衰弱の著しかったサル (No. 85, 87, 89) は剖検を施し、開腹後、心臓穿刺により採血した。

5. 剖検

全例につき、最終的には病理解剖を施し、合わせて臓器中の PCB およびその代謝物濃度の測定、病理学のおよび生化学的検討のための試料の採取も行った。

実験結果

1. 蒸留 KC-400 投与サルの体重変化および一般的所見 (古賀信幸, 黒木 淳, 外間由美子, 神村英利, 中嶋 寛, 吉村英敏)

今回は実際に熱媒体として使用されていた KC-400 を蒸留することにより、原因ライスオイル中の PCB 組成と同様のものを作成し、これを投与して発症させた。Fig. 1 に 4 年 9 カ月にわたるサルの体重曲線を示す。第一次処置において蒸留 KC-400 投与開始後、約 1 カ月目の観察では Fig. 1 (b) の No. 83 を除いたいずれのサルも体重が減少した。とくに Fig. 1 (a) の No. 85 は投与開始後 20 日間のうちに 3 kg から 2.2 kg と顕著に減少した (この時点で屠殺)。またコレステラミン非処置群 (Fig. 1 (a)) の No. 78 は蒸留 KC-400 の投与期間 (24 回連続投与) 終了後 1 週間目に、さらには No. 79 が終了後 2 カ月目に死亡もしくは著しく衰弱した。コレステラミン処置群においても No. 87 が治療開始後 1 週間目に死亡した。このように今回用いた蒸留 KC-400 は第 1, 2 報⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾で発症に使用された KC-400 に比べ、はるかに高毒性であった。

投与開始後 1 カ月ともなると、外見的にも毛並が悪くなったり、容易に脱毛したりした。投与終了後 20 日目の観察では、頭部、あご、胸部、腹部の脱毛が顕著となった。これら脱毛の著しいサル 4 匹につき、

1%コレステラミン処置 (C群) をしたところ、いずれも体重が増加し始め、非治療群 (B群) の No. 84 に比較しても回復が早かった。この結果はコレステラミンの PCB および PCDF の排泄促進効果により、毒性が軽減されたものと考えられる。しかし、後述のように血中レベルの低下はコレステラミン処置群、非群ともにみられ、明確には結論し難い。なお、コレステラミン処置群の No. 80 は治療期間中に口および鼻から出血し、死亡していた。原因は不明であるが、これまで体重も順調に回復しており、蒸留 KC-400 の毒性が突然発現したとは考えにくい。一方、生存サルの脱毛は、時間がたつにつれて回復したが、コレステラミン処置群でいくらか早いようであった。

第 2 次処置では蒸留 KC-400 の投与期間が 5 日間と短いせいかとくに目立った外見的变化は認められなかった。なお、当然のことながら、減食による体重減少が認められたが、それ以外はまったく変わらなかった。

2. 血液および臓器中の PCB 濃度

(増田義人, 大間美和, 黒木広明, 原口浩一)

(1) 材料と分析方法

a) 血液

血液約 3 g を採取し、3 ml のエタノールおよび水酸化ナトリウム 0.3 g を加え、よくまぜながら 75°C で 2 時間加温した。冷後 n-ヘキサン 5 ml で 2 回抽出し、n-ヘキサン層を集めて、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、活性化シリカゲル (ワコーゲル S-1) 0.5 g のカラムクロマトグラフィーにかけた。カラムはさらに n-ヘキサン 25 ml で溶出させた。この n-ヘキサンを K-D 濃縮器で濃縮し、ガスクロマトグラフィーの試料とした。ガスクロマトグラフィーは島津 GC-4BM ガスクロマトグラフに電子捕獲型検出器 (⁶³Ni) をつけたものを用い、カラムはガラスカラム (2.5 m×3 mm) に 5% SE-30 を充填したものをを用いた。定量分析は標準に KC-500 を用い、数値化法⁽¹⁴⁾で各ピークの濃度を求め、その総和を PCB 濃度とした。

b) 臓器

PCB 投与後、間もなく死亡したサル (No. 78, 79, 80, 85, 87) では、肺臓、肝臓および脂肪組織をそれぞれ 1~4 g を秤量し、これにエタノール 10 ml, 水 10 ml および水酸化ナトリウム 1~2 g を加え、よくまぜながら 75°C で 2 時間加温した。以後、上記血中 PCB の分析と同様に処理して PCB 濃度を求めた。

最後に屠殺したサル (No. 81, 82, 83, 84, 86,

88) については、肺臓、肝臓、および脂肪組織をそれぞれ 100~500 mg を秤量し、エタノール 3 ml、水 3 ml および水酸化ナトリウム 0.3 g を加え、さらに内部標準物質として 2, 3, 4, 5, 6, 2', 5'-hepta-CB を 2.5~7.5 ng の一定量加えた。これをよくまぜながら 75°C で 2 時間加熱した。以後血液の場合と同様に、n-ヘキサン抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび n-ヘキサンの濃縮を行い、ガスクロマトグラフィーの試料とした。ガスクロマトグラフィーは島津 GC-9A に電子捕獲型検出器 (^{63}Ni) をつけたものを用い、カラムはフューズドシリカキャピラリーカラム (島津 CBPI-M50-0.25) を用いた。カラム温度は初め 2 分間 150°C で、次いで 1 分間に 15°C の割合で昇温させ、以後 270°C で一定温度に保った。定量分析は、2, 4, 3', 4'-tetra-CB, 2, 4, 5, 3', 4'-penta-CB, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexa-CB, 2, 3, 4, 2', 4', 5'-hexa-CB, 2, 3, 4,

5, 3', 4'-hexa-CB, 2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'-hepta-CB, 2, 3, 4, 5, 2', 3', 4'-hepta-CB の生体に蓄積されやすい PCB を標準とし、2, 3, 4, 5, 6, 2', 5'-hepta-CB との内部標準法により、各 PCB 異性体の濃度を求めた。

(2) 結果と考察

サルに蒸留した KC-400 を与えた期間、薬剤投与の期間および減食をさせた期間を Fig. 2 の下部に示し、それに対応する時期のそれぞれのサルの血中 PCB 濃度の変化を Fig. 2 の上部に示す。KC-400 を与えると血中 PCB 濃度が上昇するのは前回のカニクイザルの実験¹⁸⁾と同様である。しかし、PCB の投与は前回 (第 2 報参照) が 45 日間に 52~59 mg であったのに対し、今回は 24 日間に 72~86 mg であり、今回は前回よりも KC-400 投与期間が短く、投与量も多いために、血中 PCB 濃度も前回より高濃度 (270 ppb 以上) に達した。中には 690 ppb を超える高い血中 PCB 濃

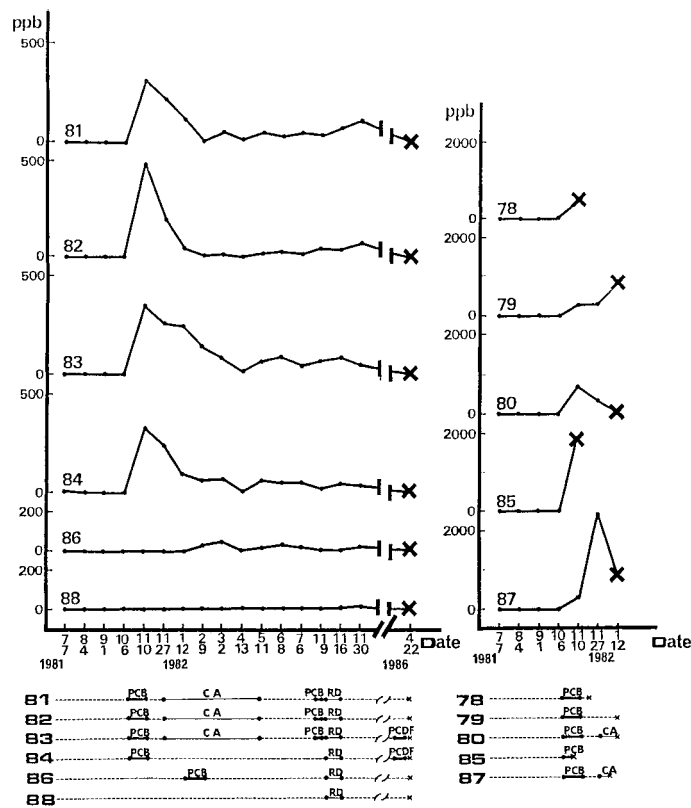


Fig. 2 Treatment of monkeys and time course concentration of blood PCB.

PCB: Feeding of distilled KC-400.

CA: Cholestyramine treatment.

RD: Reduction of diet.

度を示したサル (No. 79, 80, 85, 87) もあり、それらは、その後、衰弱して死亡している。No. 81, 82, 83 のサルには約 1 年後再度 PCB を投与しているが、この時は、血中 PCB 濃度は 70~107 ppb までしか上らなかった。これは投与量が少なかったためとも考えられるが、前回のカンクイザルの PCB の 2 回目投与の時にも見られたように、2 回目投与の場合、1 回目に投与された PCB などの酵素誘導作用で PCB の代謝が促進された状態が保たれているために、2 回目投与の時に血中 PCB の濃度があまり上昇しなかったと考えられる。

1 回目の PCB 投与後、コレステラミンを与えたサル (No. 81, 82, 83) では、その期間血中の PCB 濃度は減少しているが、この状態はコレステラミンを与えなかったサル (No. 84) にも見られた。コレステラミン投与により血中 PCB 濃度が低くなったとは断定しにくい。

2 回目 PCB 投与後に、減食をさせているサル (No. 81, 82, 83) では、その後わずかではあるが血中 PCB 濃度は上がっている。この傾向は、減食直前に PCB を投与していないサル (No. 84, 86) および全然 PCB を投与していないサル (No. 88) にも見られる。

Table 3 PCB concentrations in the tissues of monkeys fed PCBs

No. of monkey	Date of death	PCB concentration (ppm)		
		Liver	Lung	Adipose
78	Nov. 8, 1981	43	9.5	13
79	Jan. 13, 1982	14	1.3	1.1
80	Feb. 9, 1982	1.5	0.2	21
85	Nov. 4, 1981	12	7.1	na
87	Dec. 8, 1981	12	4.3	4.0

na : not analysed

Table 4 Concentration of PCB isomers in the tissues of monkeys fed the PCB mixture

Sample	Concentration of PCB isomers (ppb)							
	2, 4, 3', 4'	2, 4, 5, 3', 4	2, 4, 5, 2', 4', 5'	2, 3, 4, 2', 4', 5'	2, 3, 4, 5, 3', 4',	2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'	2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'	Total
No81 Liver	2.5	120	100	13	45	15	26	321.5
Lung	0.4	8.2	7.1	0.8	2.5	0.7	0.5	20.2
Adipose	3.8	730	650	55	180	58	61	1737.8
Blood	0.17	2.2	1.9	0.2	0.8	0.26	0.16	5.69
No82 Liver	0.7	35	34	4.3	20	3.5	6.9	104.4
Lung	0.4	2.7	2.3	0.5	1.2	0.2	0.4	7.7
Adipose	34	320	220	21	180	41	53	869
Blood	0.18	0.54	0.32	0.10	0.2	0.11	0.07	1.59
No83 Liver	2.1	42	46	7.2	20	6.8	12	136.1
Lung	0.7	7.1	12	1.9	2.9	1.8	1.1	27.5
Adipose	39	530	460	52	150	80	77	1388
Blood	0.22	1.9	1.6	0.23	0.54	0.28	0.18	4.95
No84 Liver	1.0	8.5	47	3.8	14	0.4	1.4	76.1
Lung	0.2	1.1	1.4	0.4	1.1	0.2	0.2	4.6
Adipose	28	120	74	25	99	22	32	400
Blood	0.14	0.4	0.65	0.07	0.2	0.02	0.08	1.56
No86 Liver	1.5	9.5	9.5	2.8	2.5	0.9	1.1	27.8
Lung	0.8	2.7	6.9	0.8	1.0	0.4	0.6	13.2
Adipose	99	130	94	13	21	9.8	7.4	374.2
Blood	0.24	0.47	0.86	0.11	0.04	nd	nd	1.72
No88 Liver	1.7	3.1	6.7	3.9	1.9	0.8	1.5	19.6
Lung	0.5	1.0	1.5	0.7	1.7	0.3	0.4	6.1
Adipose	27	118	42	9.5	2.6	7.0	3.0	109.1
Blood	0.07	0.06	0.43	0.08	0.02	nd	nd	0.66

nd : <0.01

これは、人間の絶食療法⁶⁾においても見られるように、体重減少に伴い、脂肪中にあったPCBが動員され、一時的に血中PCB濃度が上昇するためと考えられる。

サル、肝臓、肺臓および脂肪組織のPCB濃度をTable 3およびTable 4に示す。PCBの投与を始めて割合に早い時期に死亡したサル(Table 3)の臓器中のPCB濃度は、数年は生存したサル(Table 4)より明らかに高く、肝臓で40 ppm、肺臓で10 ppmに達するものまであった。そのうち、臓器中PCB濃度が低いサル(No. 80)では、血中PCB濃度も低かった。PCB投与を始めて4.5年経過したサル(Table 4)では、PCB投与を2回行ったサル(No. 81, 82, 83)で肝臓、脂肪組織中のPCB濃度がもっとも高く、次いで、PCB投与を1回だけ行われたサル(No. 84, 86)で臓器中のPCB濃度が高かった。しかし、PCB投与後数年を経過しているため、PCBを投与したサルの臓器中PCB濃度は、PCBを投与していないコントロールのサル(No. 88)の臓器中PCB濃度に近い濃度を示すものもあった。

最後に屠殺したサルについてはPCBの異性体別分析を行った。これらの異性体のうち、臓器中に存在するものは2, 4, 5, 3', 4'-penta-CBと2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexa-CBが大部分をしめ、全体の半分以上である。これは以前に行ったサルの実験¹⁵⁾¹⁸⁾でPCB投与後長時間経過したサルに残留していたPCBと同じPCB異性体である。油症患者の血中などに特異的に高濃度で存在する2, 3, 4, 5, 3', 4'-hexa-CBは、PCB投与量が多いサル(No. 81, 82, 83, 84)で割合に高い濃度で残留しており、この点では、油症患者の血中PCBの異性体別濃度と同様な状態が見られた。

(3) 小括

サルに蒸留KC-400を投与し、その後、サルにコレステラミン投与および減食をさせ、血液中のPCB濃度を測定した。また、死亡または屠殺したサルの肝臓、肺臓、脂肪組織中のPCB濃度を測定した。

a) 血液PCB濃度はKC-400を投与した時期に上昇し、その後次第に減少した。

b) PCB投与により、血中PCB濃度の上昇が顕著なサルは、その後3カ月以内に死亡した。

c) コレステラミン投与により、とくに血中PCB濃度が減少したとは断定し得ない。

d) 減食させられたことにより、血中PCB濃度は一次的にわずかに上昇したと考えられる。

e) PCB投与後4.5年経過したサルの血液および臓器中のPCB濃度は、PCBを投与されたサルで、明

らかに高かったが、コントロールのサルのそれらの濃度に比べて、約10倍以内の濃度差だった。

3. 蒸留KC-400および2, 3, 4, 7, 8-PenCDF

投与サルの肝酵素活性

(古賀信幸, 黒木 淳, 外間由美子, 神村英利, 中嶋 寛, 吉村英敏)

(1) 材料と方法

a) 動物および前処理

最後まで生存した6匹のサル(No. 88, 81, 82, 83, 84, 86)を屠殺した後、肝を摘出し、以下の生化学的検討に用いた。なお、No. 88は対照であり、No. 81, 82および83はコレステラミンによる治療群、No. 84と86は非治療群である。このうち、No. 83と84は屠殺12日前と7日前に2, 3, 4, 7, 8-PenCDFを2回に分けて経口投与した。投与量はTable 1に示す。

b) 肝9,000×g上清の調製

剖検後、摘出した肝臓はただちに氷冷生理食塩水で冷却後、よくすすぎ、約5gを正確に秤量し、既報¹⁹⁾に準じて9,000×g上清を調製した。

c) 酵素活性の測定

cytochrome P-450含量の定量はMatsubaraら⁹⁾の方法に従い行った。Benzo(a)pyrene(BP)3-水酸化活性¹⁰⁾、benzphetamine(BZ)N-脱メチル化活性²⁰⁾はそれぞれ3-hydroxy BP、HCHOの生成量より求めた。DT-diaphorase活性はErnsterら³⁾の方法より求めた。

(2) 結果と考察

PCBおよびPCDFはいずれも肝薬物代謝酵素の強力な誘導剤としてよく知られているが¹⁷⁾²⁰⁾、塩素数および塩素置換の位置により誘導能の強さが各異性体で異なるとともに、phenobarbital(PB)型と3-methylcholanthrene(MC)型とに分類される。ラットにおいては、いずれの型の誘導剤もP-450含量の増加を伴い、とくにPB型ではBZ N-脱メチル化活性の増加が、MC型ではBP 3-水酸化活性とDT-diaphoraseの著しい増加が特徴的である。

Table 5に肝9,000×g上清の肝酵素活性を示す。P-450含量は蒸留KC-400投与群のいずれのサルにおいても対照(No. 88)に比較し、低く、とくに目立ったPCB投与の影響は認められなかった。BZ N-脱メチル化活性はNo. 81, 83および84でそれぞれ対照の1.5倍、1.2倍、1.5倍と高かった。BP 3-水酸化活性は屠殺前に2, 3, 4, 7, 8-PenCDFを投与したNo. 83および84で高く、それぞれ対照の1.8倍、1.4倍であった。この結果は、ラットと同様に、サルにおいて

Table 5 Activities of drug-metabolizing enzymes in monkey liver 9000×g supernatants

Monkey No.*	Cytochrome P-450 (nmol/min/mg protein)	Benzphetamine N-demethylase (nmol/min/mg protein)	Benzo(a)pyrene 3-hydroxylase (nmol/min/mg protein)	DT- diaphorase (μ mol/min/mg protein)
No. 81	0.281	0.907	0.229	0.044
No. 82	0.328	0.503	0.136	0.079
No. 83	0.351	0.695	0.497	0.086
No. 84	0.309	0.891	0.378	0.061
No. 86	0.197	0.157	0.148	0.057
No. 88	0.401	0.599	0.270	0.067

No. 88, untreated; No. 83 and 84, 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran-treated.

* These monkeys were sacrificed in April 22, 1986.

も BP 3-水酸化活性が MC 型誘導剤により誘導されることを示唆しているが、ラットに比べ、その反応性は低いようであった。本酵素活性は PenCDF 非投与サルの No. 81, 82 および 86 では対照の値より低かった。一方、DT-diaphorase 活性は PenCDF 投与サルの No. 83 で対照の 1.3 倍と高かったが、他はほとんど影響が認められなかった。

なお、No. 86 は P-450 含量、BZ N-脱メチル化活性および BP 3-水酸化活性のいずれも対照 (No. 88) の半分程度であったが、その理由は不明である。成長曲線をみた限りではきわめて順調であることから、個体差といえるかもしれない。前章 (2) に示したように、今回対照とした No. 88 の肝にもかなりの量の PCB が存在しており、No. 88 の各活性がすでに誘導されたレベルを示している可能性も考えられる。

以上の結果から、第 2 次処置後 3 年 6 カ月を経過したサル肝酵素においては BZ N-脱メチル化活性の増加にみられるように、MC 型の PCB および PCDF より PB 型 PCB の影響を強く受けているように思われる。また、前章 (2) に示したように各臓器中の PCB 異性体について検討したところ、PB 型の 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexa-CB および PB 型と MC 型の中間型である 2, 4, 5, 3', 4'-penta-CB が全体の半分以上を占めることが明らかとなったが、本章の結果とよく一致している。このうち中間型の PCB は MC 型の PCB および PCDF に比べて毒性はかなり弱いものの、多量が長期にわたり残留していることを考えると、油症症状の発現に一部寄与していると推定される。

(3) 小括

蒸留 KC-400 投与後、コレステラミン処理および減食により治療を試みたサルにつき、第 2 次処置後 3 年 6 カ月目に屠殺し、肝酵素活性を未処置サルのそれと比較した。また、2 匹を選び屠殺前に PenCDF を投

与し酵素誘導作用も調べた。

1) いずれのサルにおいても P-450 含量の増加は認められなかったが、ラットにおける PB 型誘導能の指標である BZ N-脱メチル化活性が蒸留 KC-400 投与サルにおいて、対照に比べて約 1.2~1.5 倍と高く、PB 型 PCB による影響が示唆された。

2) MC 型 PCB および PCDF 投与ラットで著しく増加する BP 3-水酸化活性は PenCDF 投与サルにおいても増加したが、その程度は小さかった。

4. PCB 中毒サル組織中の PCB-メチルスルホンの濃度

(原口浩一、増田義人、黒木広明、服部玲子)

PCB の含硫代謝物の一つメチルスルホン体は生体内に残留することが知られている⁷⁾¹⁴⁾。そこで PCB (KC-400) および PCDF を投与したサルの肝臓、肺および脂肪組織中の PCB-methylsulfone (MSF-PCB) の濃度を調べた。

(1) 実験材料と方法

a) 材料：サル (No. 81, 82, 83, 84, 86 および 88) の肝臓 (1.1~12 g)、肺 (3.8~7.8 g) および脂肪組織 (脂肪分 2 g) を用いた。

b) 試薬：

1) 溶媒はすべて残留 PCB 分析用または残留農薬試験用を使用した。

2) ゲル：パイオラッド社製 Bio Beads S-X3 (200~400 メッシュ) 50 g をジクロロメタンシクロヘキサン (1:1) 混液で一晩膨潤させ、内径 2.5 cm 長さ 60 cm のガラス管に充填した。

2) アルミナ：メルク社製 (中性、活性度 1, 70~230 メッシュ) 3 g をガラスカラム (内径 2 cm) に乾式で充填した。

4) 標準品：内部標準として 3-MSF-4-Me-5, 2', 3', 4', 5'-penta-CB を用い、定量には 4-MSF-2, 5-di-

CB, 4-MSF-2, 5, 3'-tri-CB および 4-MSF-2, 5, 2', 5'-tetra-CB (いずれも合成品) を用いた。

c) 測定機器

1) ガスクロマトグラフ・質量分析計: 日本電子 DX300-DA5000 データ処理装置を用い, 溶融シリカ Dexsil-410 (30 m, 島津) キャピラリーカラムを接続し, 180°C から 4°C/min で 270°C に昇温し, 分析した。キャリアガスはヘリウムを使用。イオン化エネルギー 70 eV, イオン化電流 300 μ A, EI (Electron impact) モードで各 MSF-PCB 同族体および内部標準の M および M+2 イオン (m/z 300, 302, 334, 336, 368, 370, 402, 404, 416 および 418) で検出した。

2) ガスクロマトグラフ (ECD-GC): 島津 GC-7AG に電子捕獲型検出器 (^{63}Ni) をつけて使用した。カラムおよび温度条件は, GC-MS のそれと同じで, キャリアーガスは窒素を用いた。

d) 分析方法

1) MSF-PCB の分離, 精製法

各試料にそれぞれ 2 ppb になるように内部標準物質 (3-MSF-4-Me-5, 2', 3', 4', 5'-penta-CB) を加え, ジクロロメタンでホモジナイズ後, 抽出し, 溶媒を留去した。残渣をシクロヘキサン-ジクロロメタン (1:1) 混液 4 ml に溶かし, ゲルを充填したカラムに付した。このあと同溶液で溶出させ 130~180 ml の分画を分取した後, アルミナカラム (3 g) にかけて, まず PCB などをジクロロメタン-n-ヘキサン (1:9) 100 ml で除いた後, ジクロロメタン-n-ヘキサン (1:1) で MSF-PCB を溶出させた。次にこの液を n-ヘキサンで置き換えた後アセトニトリルで分配抽出を行った。次いで水で希釈し 20% アセトニトリルとし, 別の n-ヘキサンに逆抽出した液をさらに濃硫酸で分配抽出し, これを水で 50% 硫酸に希釈後, 再び別の n-ヘキサンで逆抽出した。この抽出液は濃縮後その全量を高速液体クロマトグラフィーにかけた。カラムは Waters 社の Bondapak CN (10 cm $\times$ 8 mm) を用い, 移動相は, ジクロロメタン-n-ヘキサン混液を用い, 5% ジクロロメタンから 20 分間で 50% とする直線濃度勾配 (流速 2 ml/min) により MSF-PCB を溶出させ, 分取したものを GC-MS および ECD-GC 分析の試料とした。

2) 定量方法

イ) GC-MS による MSF-PCB 同族体の定量: 2 塩化体は 4-MSF-2, 5-di-CB, 3 塩化体は 4-MSF-2, 5, 3'-tri-CB, 4 塩化体は 4-MSF-2, 5, 2', 5'-tetra

-CB を標準物質として, 内部標準との比から予め検量線を作成した。試料のマスフラグメントグラム上で同定したピークの面積総和を内部標準品のそれと比較し, 検量線より濃度を求めた。

ロ) ECD-GC による 総 MSF-PCB の定量: 4-MSF-2, 5, 2', 5'-tetra-CB を標準物質として, 内部標準との比を求め検量線を作成した。試料のガスクロマトグラム上で 15~35 分の間に現れるピーク面積の総和を内部標準のそれと比較し, 検量線より定量した。

(2) 結果と考察

Fig. 3 にサルの肝臓 (No. 81) から得られた MSF-PCB のマスフラグメントグラムを示す。これは 2 塩化, 3 塩化および 4 塩化の MSF-PCB の M および M+2 イオンでモニターしたもので, 総計約 30 種の異性体ピークを検出した。このほか 5 塩化体も微量に検出されたが, 1 塩化および 6 塩化体は検出できなかった (検出限界 0.2 ppb)。次に, 同試料を ECD-GC で分析したときの結果を Fig. 4 に示す。これは, GC-MS と同一のカラムを用い, ほぼ同じ条件で測定したときのガスクロマトグラムで 15~35 分にみられるピークのほとんどが MSF-PCB に相当すると推定される。各ピーク上に同定した MSF-PCB の塩素数を示す。各組織中の MSF-PCB の同族体別の定量は, GC-MS によって行い, 総 MSF-PCB の定量は ECD-GC を用いた。その結果を Table 6 に示す。KC-400 を投与したサル (No. 81, 82, 86) のうち No. 81 のみがコントロール (No. 88) にくらべてすべての組織で有意に高い値を示した。No. 82 と 86 ではコントロールと同レベルで残留するか, むしろコントロールの肺で高い MSF-PCB 濃度を示した。KC-400 投与後, PCDF を与えたサル (No. 84, 85) の肝臓には 100 ppb 以上の MSF-PCB が残留していた。とくに No. 84 は No. 83 に比べて, PCB 濃度がかなり低いのに対し, 逆に MSF-PCB 濃度は高い値を示した。この傾向は肝のほかに肺でも顕著にみられた。また PCB と MSF-PCB の濃度を比較すると, すべての肺組織で MSF-PCB 濃度が PCB 量を上回った。とくに No. 84 の肺には PCB の約 20 倍量の MSF-PCB が残留していた。しかしいずれの組織でも残留する PCB 量と MSF-PCB 量との間には相関関係はみられなかった。同族体ごとにみると, 全般的に 4 塩化 > 2 塩化 > 3 塩化の順に濃度が高く, なかでも 2 塩化体は No. 84, 84 の肝臓, No. 81, 82 の肺に比較的多く残留した。油症患者の体組織中には 2~6 塩化体が数十 ppb レベルで残留しているが, PCB 中毒サルの場合,

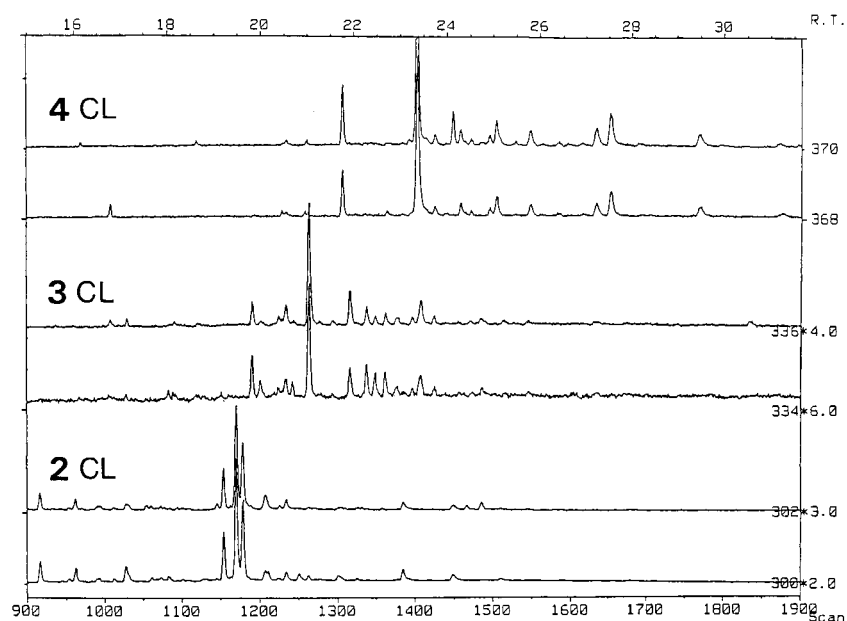


Fig. 3 Mass fragmentograms of MSF-PCB congeners in the liver of a monkey (No. 81).

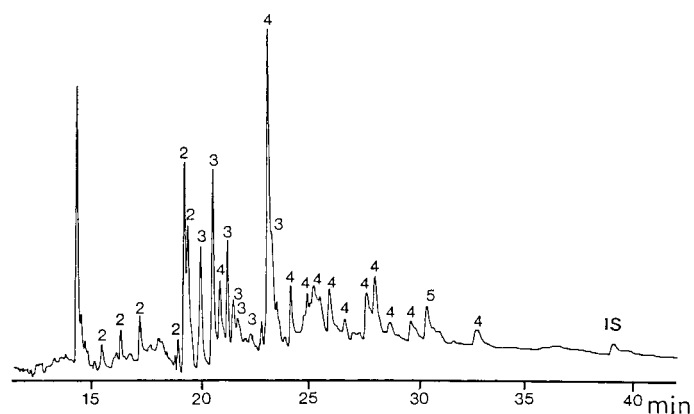


Fig. 4 Gas chromatogram of MSF-PCBs in the liver of a monkey (No. 81).

高塩素化体（5および6塩化体）は検出されないか、存在してもかなり微量であった。その反面、低塩素化体が比較的多く残留しているように思われた。今回の調査で KC-400 を投与して約3年を経過したサルの組織中では MSF-PCB の濃度はコントロールに比較して、とくに高値を示しているとは限らず、残留 PCB 量との相関も見られなかった。ただし、PCDF を投与したサルの肝臓、肺では高濃度の MSF-PCB が残留していることから、PCDF が PCB の代謝、とりわ

け MSF-PCB の生成または蓄積に関与していることも考えられる。

(3) 小括

KC-400 および PCDF を投与したサルの肝臓、肺および脂肪組織中に残留する PCB-メチルスルホン代謝物 (MSF-PCB) の濃度をキャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフィーおよびマスフラグメントグラフィーによって求めた。

1) 分析したすべての組織から20～30種の MSF-

Table 6 Concentration of MSF-PCBs in the tissues of monkeys

Monkey No.	PCB (ppb)	MSF-PCBs (ppb)					Ratio	
		2Cl	3Cl	4Cl	total A	total B	C	D
Liver								
No. 81	321	8.3	9.2	21.2	39	113	0.1	0.3
No. 82	104	5.6	1.8	12.4	20	53	0.2	0.5
No. 83	135	37.2	22.0	55.6	115	346	0.8	2.5
No. 84	76	46.4	21.0	36.9	104	560	1.3	7.3
No. 86	27	4.8	2.9	12.8	21	48	0.7	1.7
No. 88	19	7.3	1.2	7.5	16	34	0.8	1.7
Lung								
No. 81	20	23.6	6.0	38.6	68	115	3.4	5.7
No. 82	8	27.2	4.5	12.0	44	79	5.5	9.8
No. 83	28	10.2	3.1	23.1	36	42	1.2	1.5
No. 84	5	14.8	6.8	74.0	96	108	19.2	21.6
No. 86	13	6.5	1.7	9.5	18	24	1.3	1.8
No. 88	6	10.3	2.7	21.9	35	60	5.8	10.0
Fat								
No. 81	1743	1.1	0.5	21.1	23	191	0.01	0.11
No. 82	868	4.2	1.8	10.6	17	71	0.02	0.08
No. 83	1389	9.7	3.5	18.0	31	190	0.02	0.13
No. 84	399	7.5	1.5	12.3	21	88	0.05	0.22
No. 86	371	6.5	1.4	13.1	21	70	0.05	0.19
No. 88	109	4.9	0.7	7.0	13	47	0.12	0.43

Total A : Total of di-, tri- and tetrachloro congeners by GC-MS

Total B : Total MSF-PCBs by ECD-GC, Ratio C : Total A/PCB, Ratio D : Total B/PCB.

PCBが検出され、その主な組成は2, 3および4塩化体で、そのうち4塩化体をもっとも多数高濃度で残留しているものの、2塩化体もかなり残留していることがわかった。

2) KC-400を投与したサル(No.81, 82, 86)では個体差があり、No.81だけがコントロール(No.88)に比べて、有意に高濃度であった。

3) KC-400のほかにPCDFを投与したサル(No.84, 85)では肝臓に100 ppb以上のMSF-PCBが残留していた。とくにNo.84の肝および肺では、残留PCBがかなり低い値であるにもかかわらず、その約10~20倍量のMSF-PCBが残留していた。

4) すべての肺組織でMSF-PCBがPCBのレベルを上回った。しかし、脂肪組織ではPCBの1/10~1/100量しか残留していなかった。また、PCB濃度とMSF-PCB濃度の間には相関関係はみられなかった。

5) 今回の調査で、MSF-PCBの肺での残留性の高さが示された。一方、PCDFを投与したサルの肝臓や肺では高いMSF-PCBの残留が認められた。このことは、PCDFがMSF-PCBの生成または残留に関与している可能性を示唆する。

総 括

前回の報告で比較的個体差が少いと思われたカニクイザルを用いて、蒸留KC-400を連続投与し、コレステラミン処置および減食の影響について検討するとともに、PCBおよびそのメチルスルホン代謝物の残留性について調査した。今回の実験では投与開始後約1カ月ですでに体重減少および脱毛などの毒性が発現し、また、PCB投与開始からコレステラミン処置期間を通じ、11匹のうち5匹が死亡した。この理由として1回投与量が1 mg/kg/dayと前回に比較し、2~4倍に増量したことに加え、蒸留により低毒性成分を除いたことによると思われる。前回の結果¹⁸⁾によると、カニクイザルは赤毛ザルに比べ全般的にPCBに対する感受性が低いと結論されているが、今回の結果は、蒸留KC-400中に含まれる高毒性PCBあるいはPCDF量が前回よりも多かったことを示唆している。このKC-400にはPCB、PCQをはじめ微量のPCDFが含まれており、毒性学的にみると、Table 4で各臓器中に検出されたPCBは比較的毒性は弱い¹⁹⁾、PCQも胸腺の萎縮や肝酵素誘導能などの生物活性は

きわめて弱い¹²⁾。したがって PCDF による毒性が大きく寄与していると思われる。

治療効果の指標としては、体重、脱毛などの一般的所見と血中 PCB レベルを用いた。コレステラミン処置群では治療開始時点で 5 匹中 4 匹が生存したが、治療開始後、順調な体重の増加を示した。これに対し、非コレステラミン処置群では当初予定していた 4 匹中 3 匹が発症段階で死亡したため、1 匹 (No. 84) となったが、これを処置群と比べると、処置群で体重の回復が No. 84 より早く、コレステラミンの効果が示唆された。血中 PCB レベルに関しては、PCB 投与後急激に上昇し、その後だいに低下してゆくが、コレステラミン処置による影響はとくに認められなかった。

一般に、サルを用いた実験では他の実験動物 (ラット、マウス、ウサギ) に比べ、高価である点および飼育設備の点から、使用される匹数が限られてくるが、さらに個体差も大きい。今回使用したカニクイザルは体重もそろっており比較的個体差は少ないと思われたが、発症および治療の段階で 5 匹が死亡したこともあり、コレステラミンの効果の有無は今回も明確には判定できなかった。

減食実験の場合には、体重の減少に伴い、血中 PCB レベルの上昇が認められた。これは絶食療法を施した油症患者ですでに報告されており⁶⁾、減食により脂肪が減少した結果、その中に分布していた PCB が血中に遊離したためと考えられる。

最後に屠殺したサルにつき肝酵素活性の測定および各臓器中の PCB メチルスルホン体の定量を行った。蒸留 KC-400 投与サルでは対照に比べ、PCB 型誘導剤で特徴的な BZ N-脱メチル化活性の増加が認められた。また屠殺直前に PenCDF を投与したサルでは、MC 型誘導剤で特徴的な BP 3-水酸化活性が誘導された。しかしながら、いずれの活性上昇も対照に比べ、1.5 倍前後であり、ラットより反応性は低かった。

PCB のメチルスルホン体は、気管支および肺に蓄積しやすいことが油症患者および実験動物で報告されているが、サルにおいても同様に肺にもっとも高濃度が検出された。筆者らは 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl のメチルスルホン体の毒性評価を行い、このものはラットにおいて胸腺の萎縮や肝酵素の誘導をまったく示さないことを明らかにした。しかし、PCB のメチルスルホン体の肺への局在性およびその残留性を考えると、胸部疾患と何らかの関連があると思われる。今後も引き続いての研究が望まれる。

本研究は厚生省油症治療研究費にもとづき、九州大学油症研究班の共同研究の一環として実施されたものである。研究費を支弁された厚生省に対し厚く感謝する。

文 献

- 1) Bergman, A., Brandt, I. and Jansson, B.: Accumulation of methylsulfonyl derivatives of some bronchial-seeking polychlorinated biphenyls in the respiratory tract of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48: 213-220, 1979.
- 2) Cohn, W. J., Boylan, J. J., Blanke, R. V., Fariss, M. W., Howell, J. R. and Guzelian, P. S.: Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine. Results of a controlled clinical trial. *New Eng. J. Med.* 298: 243-248, 1978.
- 3) Ernster, L., Danielson, L. and Ljunggren, M.: DT-diaphorase I. Purification from the soluble fraction of rat liver cytoplasm and properties. *Biochem. Biophys. Acta* 58: 171-188, 1962.
- 4) Haraguchi, K., Kuroki, H. and Masuda, Y.: Capillary gas chromatographic analysis of methylsulfone metabolites of polychlorinated biphenyls retained in human tissues. *J. Chromatogr.* 361: 239-252, 1986.
- 5) Haraguchi, K., Kuroki, H., Masuda, Y., Koga, N., Kuroki, J., Hokama, Y. and Yoshimura, H.: Toxicological evaluation of sulfur-containing metabolites of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in rats. *Chemosphere* 14: 1755-1762, 1985.
- 6) 今村基雄, 増田義人, 平山千里: 絶食による血中 PCB 濃度の変化. *医学のあゆみ* 101: 78-79, 1977.
- 7) Jensen, S. and Jansson, B.: Anthropogenic substances in seal from the Baltic: Methyl sulfone metabolites of PCB and DDE. *Ambio* 5: 257-260, 1976.
- 8) Kamimura, H., Naganuma, T., Oguri, K. and Yoshimura, H.: Stimulating effect of liquid paraffin and cholestyramine on fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats. *Eisei Kagaku* 32: p-19, 1986.
- 9) Matsubara, T., Koike, M., Touichi, Y. and Sugeno, K.: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Anal. Biochem.* 75: 596-603, 1976.
- 10) Nebert, D. W. and Gelboin, H. V.: Substrate inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. *J. Biol. Chem.* 243: 6242-6249, 1968.
- 11) 相模成一郎: 慢性 PCB 中毒症の一例. *西日本皮膚科* 36: 656-661, 1974.
- 12) Takenaka, S., Iida, T., Nagase, M., Takata, S., Masuda, Y., Koga, N., Kuroki, J., Hokama, Y. and Yoshimura, H.: Accumulation, excretion

and effects on hepatic enzymes of polychlorinated quaterphenyl congeners in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 8: 571-577, 1985.

13) Tanaka, K. and Araki, Y.: Inhibitory effect of cholestyramine on the intestinal absorption of PCB. *Fukuoka Acta Med.* 65: 53-57, 1974.

14) 鵜川昌弘, 中村彰夫, 樫本 隆: PCB 数値化法に関する研究. *食衛誌* 14: 415-424, 1973.

15) 吉原新一, 他: サルの PCB 中毒症に関する予備的研究. *福岡医誌* 70: 135-171, 1979.

16) Yoshihara, S., Kawano, K. and Yoshimura, H.: Toxicological assessment of highly chlorinated biphenyl congeners retained in the Yusho patients. *Chemosphere* 8: 531-538, 1985.

17) Yoshihara, S., Nagata, K., Yoshimura, H.,

Kuroki, H. and Masuda, Y.: Inductive effect on hepatic enzymes and acute toxicity of individual polychlorinated dibenzofuran congeners in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59: 580-588, 1981.

18) 吉村英敏, 他: サルの PCB 中毒症に関する研究 (第2報) *福岡医誌* 72: 155-184, 1981.

19) 吉村英敏, 和田郁夫, 古賀信幸, 永田清, 山内葉子, 吉原新一: 3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニルのモルモットに対する急性毒性, ならびに肝酵素の誘導作用. *福岡医誌* 72: 149-154, 1981.

20) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N. and Miki, M.: Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320: 179-192, 1979.

実験的 PCB 中毒サルに対する Cholestyramine および 低カロリー食投与の経験：主に血液 生化学検査所見について

九州大学医学部第二内科教室（主任：藤島正敏教授）

赤木 公博・辻 博・藤島 正敏

The Effects of Cholestyramine and Low-Calorie Diet on Biological Parameter Values in Rhesus Monkeys with Experimental PCB Poisoning

Kimihiro AKAGI, Hiroshi TSUJI and Masatoshi FUJISHIMA

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

The effects of cholestyramine and low-calorie diet on biological parameters were studied in Rhesus monkeys with experimental PCB poisoning. By PCB poisoning, body weight and serum levels of total protein, albumin, total cholesterol and phosphate were decreased, and serum transaminase and triglyceride levels were increased. Most of these parameters were improved during cholestyramine treatment, but total cholesterol and bile acid levels were remained low and tended to be increased after the treatment. On the other hand, similar changes of these parameters except transaminase to PCB poisoning were also found by low-calorie diet, and the changes by low-calorie diet for 6 days were almost within 10% of each value before the treatment. These results suggest that most of abnormal biological parameters by PCB poisoning may be due to decreased intake as the secondary effect, and that cholestyramine and low-calorie diet do not disturb the improvement of abnormal parameters by PCB poisoning.

対象ならびに方法

ヒトに最も近い実験動物であるサルを用いて、Allen ら³¹⁾ は塩化ビフェニール (PCB) を長期連続投与することにより油症患者における所見と比較的よく対応した異常を報告している。我々も¹¹²⁾ 赤毛ザルに PCB を投与して、PCB 中毒の発現を試み、体重減少、脱毛および眼瞼の浮腫など、明らかに PCB に起因すると考えられる異常を観察した。これらの異常は形態学的ならびに生化学的検討の結果によっても確かめられた。今回、我々はこの油症モデルを用いて、PCB 排泄促進効果が期待されている cholestyramine¹⁰¹¹²⁾ および低カロリー食投与を試み、その治療中の血液生化学検査値の変動を中心に観察したので、若干の文献的考察を加えて報告する。

1. 実験動物

赤毛ザル 6 匹 (Rhesus monkey, 体重 2.7~3.2 kg) を用い、次の 3 群に分けて実験に供した。

A: 対照 (雄: No. 86, 88)。但し、No. 86 は実験途中 PCB 投与されたため脱落。

B: KC-400 (PCB) 投与 (雄: No. 84)。

C: KC-400+Cholestyramine 投与 (雄: No. 81, 82, 83)。

これらのサルの飼育は固型飼料 (オリエンタル製サル用, 200 g/day) および水を自由に摂取させることにより行った。KC-400 は 0.05 ml/kg の corn oil に溶かし 1 mg/kg/day, バナナ (約 50 g/day) に注入して 4 週間投与し、対照ザルには corn oil のみを同じ期間与えた。PCB 投与中止後 20 日より cholestyramine を 2 g, 5 カ月間投与した。

次にこれらの赤毛ザルを用いて, cholestyramine 投与中止後6カ月目より低カロリー食投与実験を2群に分けて行った。

C: 低カロリー食群 (雄; No. 84, 86, 88)。

D: KC-400+低カロリー食群 (雄; 81, 82, 83)。

KC-400 は corn oil に溶かし 1 mg/kg/day をバナ

ナに注入し, 5日間連続投与し, 低カロリー食群には corn oil のみを同期間投与した。投与終了後10日目より, 固定飼料 50 g/day による低カロリー食を6日間与えた。

2. 体重測定および採血

約1カ月毎にケラタール (塩酸ケタミン約 50 mg) を大腿部に筋注し, 麻酔下に体重測定および真空採血管を用いて採血をした。

実験結果

Cholestyramine 投与による検査成績の変動

体重は PCB 投与にて低下し, cholestyramine 投与開始後, 徐々に増加し, 5カ月後には実験前の体重に復した (Table 1)。一方, cholestyramine 非投与例では復帰がそれより1カ月遅れた。血清総蛋白およびアルブミン値は PCB 投与で低下したが, cholestyramine 投与開始後3カ月で前値に復した (Table 1)。一方, cholestyramine 非投与例ではその低値が持続した。Transaminase (GOT, GPT) 値は, PCB 投与にて上昇したが, 投与終了後2カ月には前値に復し, cholestyramine 投与の有無による差異はみられなかった (Fig. 1)。血中脂質については, Fig. 1のごとく, 中性脂肪値には cholestyramine 投与の影響は認められなかったが, 総コレステロール値は cholestyramine 投与中低値を示す傾向にあり, 終了後に上昇がみられた。一方, cholestyramine 非投与例では一時低値を示したが, 前者より早期に上昇傾向を示した。血中胆汁酸値は cholestyramine 投与開始後低下するが, 1カ月後から安定した値を示し, 異常に低値を示すことはなかった (Fig. 1)。投与終了後

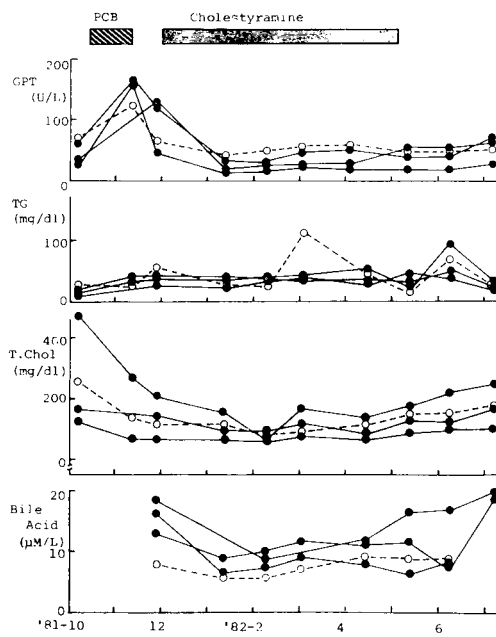


Fig. 1 Effects of cholestyramine on serum levels of GPT, TG, T. Chol and bile acid in Rhesus monkeys with PCB poisoning. Open circle shows the value of the subject without cholestyramine treatment after PCB administration.

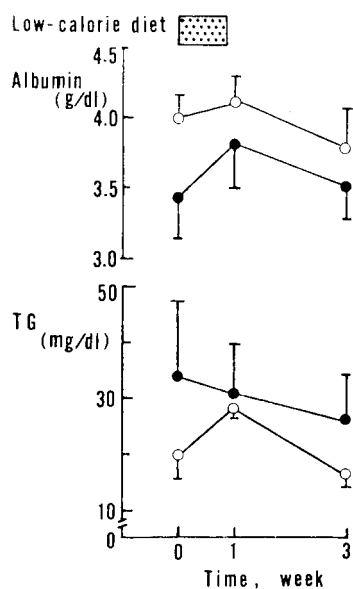
Table 1 Changes of mean biological parameter values by PCB poisoning and cholestyramine administration in Rhesus monkeys

Items	PCB administration		Cholestyramine administration				After 2 M
	before (81.10.6)	1 M (11.11)	before (11.27)	1 M (82.1.12)	3 M (3.2)	5 M (5.11)	
Body weight (kg)	3.3±0.1*	3.1±0.3	2.9±0.3	3.1±0.1	3.2±0.1	3.4±0.2	3.7±0.3
T. Protein (g/dl)	7.7±0.4	7.7±0.2	7.4±0.3	7.3±0.3	7.6±0.2	7.7±0.2	7.3±0.2
Albumin (g/dl)	3.9±0.3	3.8±0.7	3.7±0.3	3.5±0.4	3.8±0.3	3.8±0.2	3.7±0.2
Ca (mg/dl)	9.8±0.6	10.0±0.8	9.2±0.2	9.6±0.3	9.3±0.4	9.5±0.3	9.5±0.5
P (mg/dl)	5.3±1.2	3.7±1.1	4.4±1.8	4.5±0.5	5.0±0.7	4.8±0.5	3.7±0.3
Hb (g/dl)	12.6±0.2	11.3±0.3	10.3±0.3	10.0±0.6	10.1±0.9	11.3±0.5	11.0±0.1
Ht (%)	46.0±0.0	36.8±0.6	33.6±1.4	32.7±1.0	40.0±1.3	37.8±3.9	38.2±1.1
RBC (×10 ⁴ /mm ³)	685±4	675±18	576±30	566±43	638±35	600±53	656±22
WBC (×10 ³ /mm ³)	9.8±2.6	9.2±2.3	8.6±3.3	9.9±2.2	10.4±4.2	10.9±0.5	9.1±0.3

Table 2 Comparison of mean biological parameter values by low-calorie diet in Rhesus monkeys with and without PCB administration

Items	Controls		PCB administration	
	Low-calorie diet	After 2 weeks	Low-calorie diet	After 2 weeks
Body weight	92.1± 4.6*	97.3± 0.2	89.8± 3.3	97.7± 1.8
T. Protein	105.5± 4.2	96.6± 3.4	105.8± 3.0	98.3± 2.3
Albumin	102.5± 2.0	94.9± 4.3	110.8± 2.9	103.0± 2.4
T. Chol	115.1± 9.9	93.8± 9.8	115.8± 9.7	92.3± 10.3
TG	152.7± 37.6	81.0± 39.7	101.0± 23.4	82.3± 12.6
Ca	96.7± 3.3	94.7± 4.1	95.4± 2.6	95.1± 0.5
P	91.6± 12.2	95.9± 11.6	98.3± 7.5	103.2± 11.5
Hb	100.0± 6.0	94.0± 14.7	101.7± 2.6	96.5± 2.6
Ht	102.5± 8.5	93.5± 11.9	95.9± 3.6	97.4± 3.4
RBC	112.4± 15.1	95.4± 17.9	102.9± 6.9	98.2± 4.6
WBC	87.4± 9.7	73.8± 14.6	92.9± 9.2	82.7± 7.1

* Mean±SD

**Fig. 2** The effect of low-calorie diet on serum albumin and TG levels in Rhesus monkeys with (●—●) and without (○—○) PCB administration. Results given are means from 3 subjects and vertical bars represent 1 SD.

には上昇した。従って、この低下は cholestyramine によるものと考えられた。血清電解質 Na, K, Cl には cholestyramine 投与により一定の変化がみられなかった。また、血清 Ca, P は PCB 投与後低下したが、終了後比較的早期に改善傾向を示し、cholestyramine 投与の有無で差異はみられなかった。

PCB 投与により貧血、白血球減少がみられるが、

これらの異常は中止後貧血は 4 カ月、白血球数は 2 カ月目にはそれぞれ投与前値に改復した (Table 1)。Cholestyramine 投与の有無による差異は認められなかった。

低カロリー食投与による検査成績の変動

低カロリー食投与前の値を 100% として、各種検査値の変化をみると (Table 2)、体重は投与終了時に約 8% 低下し、中止後 2 週目には増加傾向にあった。血清総蛋白、アルブミン値は投与中の変動は少なかったが、中止後は 2 週目には低下傾向を示した。血清コレステロール、中性脂肪値は投与中 10% 以上の増加を示し、中止後 2 週間目には低下した。血清 Ca, P 値は低カロリー食投与中低下し、中止後 Ca 値は不変、P 値は増加傾向にあった。末梢血検査では、投与中止後 2 週目には貧血、白血球数の減少を認めた。一方、PCB 投与後に低カロリー食を投与した群でも、PCB 非投与群と似た変化を示す傾向にあったが、PCB 投与群では、低アルブミン血症、中性脂肪の増加がみられたため (Fig. 2)、低カロリー食のみ投与群と異った結果が得られた。しかし、turn-over の遅いアルブミンは低カロリー食では低下し、turn-over の速い中性脂肪は低カロリー食で上昇する傾向がみられ、これらの結果は本質的には PCB の前投与に関係なくみられる変化であると考えられた。

考 察

赤毛ザルに PCB を投与した油症モデルでみられる血液生化学的検査値の異常には、先に報告¹²⁾した血清アルブミン、コレステロール値の低下、貧血に加え、

GOT, GPT の軽度上昇, 血清P値の低下および白血球数の減少がみられた。しかし, これらの PCB 中毒サルは体重減少を伴うため, 検査値の異常が PCB それ自体によるものか, または相対的な食餌の摂取不足に起因するものなのかどうかは, 明らかではなかった。そこで, 今回, 同一サルを用いて低カロリー食を投与し, その前後の検査値の変化を観察した。その結果, 低栄養状態でも GOT, GPT の上昇を除く, 体重減少, アルブミン, コレステロール値の低下, 中性脂肪値の上昇, 血清P値の低下, 貧血, 白血球数の減少など油症モデルサルでみられたと同様の異常が観察された。つまり, GOT, GPT 以外の検査値の異常は, PCB 中毒による食餌摂取能の低下に起因した二次的な変化がある可能性が示唆された。

PCB による一次のおよび二次的にこれらの異常を持つサルに PCB の排泄促進効果を有する cholestyramine¹⁰⁾¹²⁾ を投与し, 本薬剤の検査値に及ぼす影響について検討した。Cholestyramine 非投与例が少ないことから本実験からのみでは十分な結論とはなし得ないが, 体重, 血液生化学および血液学的な異常は cholestyramine 投与開始後比較的早期に改善し, cholestyramine 非投与サルとの間に明らかな差異はないようであった。臨床的には高コレステロール血症の治療薬剤として使用されている⁵⁾¹¹⁾ が今回の実験でも, cholestyramine 投与中血清コレステロール値が持続して低値を示し, 中止後上昇傾向を示した。一方, cholestyramine は胆汁うっ滞症例の胆汁酸値を低下させ, 痒みを軽減する目的で使用されている⁶⁾⁷⁾。しかし, 胆汁うっ滞のない症例に投与し, 胆汁酸値の変化をみた報告は少ない⁸⁾。今回, 本剤投与中に血中胆汁酸値の変動を観察したが, 安定した値を示し, 異常に低下することはなかった。この結果は胆汁うっ滞のみられない油症患者に cholestyramine の投与が可能であることを示唆するものと考えられた。

次に, PCB 中毒サルに普通の 1/4 量に相当する低カロリー食を 6 日間投与し, 検査値の変化を観察した。その変化は投与前値の 10% 内であり, PCB 投与の有無でも本質的な差異は認められなかった。これらの結果より, 普通摂取量の 1/4 程度の低カロリーは生体に著しい変化を及ぼさないことが明らかになった。従って, 生体に沈着した PCB を排泄を促す手段として低カロリー食が有効であればその治療として, 油症患者にも合併症の評価を充分行った上で, 短期間の使用が可能であると考えられた。

総 括

赤毛ザルに PCB を投与して油症モデルを作製した。このモデルに cholestyramine および低カロリー食を与えた場合の各種検査値の変化を観察した。

1. PCB 投与後, 体重減少, 総蛋白, アルブミン, 総コレステロール値の低下, GOT, GPT, 中性脂肪値の上昇, 血清P値の低下および貧血, 白血球減少が認められた。
2. PCB 投与中止後, cholestyramine を投与した。総コレステロールおよび胆汁酸値の低下状態は持続してみられたが, その他の検査値は比較的すみやかに改善する傾向にあった。
3. 低カロリー食を投与すると, 体重減少, 低アルブミン血症, 中性脂肪の増加, 貧血および白血球減少など PCB 投与でみられた所見と類似した変化がみられた。PCB 投与後に低カロリー食を与えた群でも, 前者と低カロリー食による本質的な差異は認められなかった。

文 献

- 1) 赤木公博, 村井宏一郎, 山中正義, 奥村恂, 尾前照雄: サルの PCB 中毒症に関する予備的研究—血液生化学的所見。福岡医誌 70: 142-144, 1979。
- 2) 赤木公博, 村井宏一郎, 尾前照雄: 実験的 PCB 中毒サルの血液生化学所見, 福岡医学誌 72: 164-167, 1981。
- 3) Allen, J. R., Abrahanson, L. J. and Norbach, D. M.: Biological effects of polychlorinated biphenyls and triphenyls on the subhuman primate. Environ. Res. 6: 344-354, 1973。
- 4) Allen, J. R.: Response of the nonhuman primate to polychlorinated biphenyl exposure. Fed. Proc. 34: 1675-1679, 1975。
- 5) Bergen, S. S. Jr., Van Itallie, T. B., Tennent, D. M. and Sebrell, W. H.: Effect of an anion exchange resin on serum cholesterol in man. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102: 676-679, 1959。
- 6) Carey, J. B. Jr.: Lowering of serum bile acid concentrations and relief of pruritus in jaundiced patients fed a bile acid sequestering resin. J. Lab. Clin. Med. 56: 797-798, 1960。
- 7) Carey, J. B. Jr. and Williams, G.: Relief of the pruritus of jaundice with a bile acid sequestering resin. J. Am. Med. Assoc. 176: 432-435, 1961。
- 8) 藤井道也, 浦田怜.: Cholestyramine の臨床第 1 相試験。基礎と臨床 16: 7699-7714, 1982。
- 9) Moutafis, C. D., Simons, L. A., Myant, N. B., Adams, P. W. and Wynn, V.: The effect of cholestyramine on the faecal excretion of bile acids and

neutral steroids in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 26 : 329-334, 1977.

10) Tanaka, K. and Araki, Y. : Inhibitory effect of cholestyramine on the intestinal absorption of PCB. *Fukuoka Acta Med.* 65 : 53-57, 1974.

11) Tannent, D. M., Siegel, H., Zanetti, M. E., Kuron, G. W., Ott, W. H., and Wolf, F. J. : Plasma

cholesterol lowering action on bile acid binding polymers in experimental animals. *J. Lipid Res.* 1 : 469-473, 1960.

12) 吉村英敏 : 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (Pen CDF) の排泄促進に関する研究. 油症治療研究報 (九大油症治療研究班) 1985.

慢性化した実験的 PCB 中毒サルのマイボーム腺病変の 組織学的研究

九州大学医学部眼科学教室
向野利彦・大西克尚

Histopathology of Chronic Meibomian Gland Abnormalities in Experimental PCB Intoxicated Monkey

Toshihiko KOHNO and Yoshitaka OHNISHI
*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka 812, Japan*

Histopathological studies of chronic Meibomian gland abnormalities were performed in experimental models more than 4 years after intoxication of PCB. The lids treated with KOH-glycerin mixture and Sudan III staining demonstrated the figures of Meibomian gland structures. Partial disappearances and enlargements of the Meibomian glands were shown in PCB intoxicated animals. Light microscopy showed abnormal features including dilation of ducts, hyperplasia of the duct epithelium, enlargement of acinus with cystic degeneration, and squamous metaplasia.

Although these pathologic changes were milder than those in acute stages, Meibomian gland abnormalities still remained after prominent clinical signs subsided.

油症は発症からすでに18年を経過し、発生当初見られた重篤な眼症状²⁾は徐々に消退している。しかし、一部の患者では眼瞼を圧迫することにより白色チーズ様のマイボーム腺嚢胞内容物が排出され、依然としてマイボーム腺病変が続いていることを示している³⁾⁷⁾⁸⁾。

先に油症の実験モデルとして実験的PCB中毒サルを作製し、油症患者と同様の眼症状（眼瞼浮腫、マイボーム腺の腫大・分泌過多、白色チーズ様物排出など）を呈すること、マイボーム腺病変の本態が角化嚢胞の形成であること⁴⁾⁵⁾、マイボーム腺嚢胞内容物中にPCBが検出できること⁶⁾、などを明らかにした。さらに瞼板透明標本作製し、マイボーム腺が腫大し、腺房と導管との区別が困難になることも明らかとなった⁹⁾。今回PCB投与後4年余を経過したサルの眼瞼を組織学的に検索し、依然としてマイボーム腺病変が存続していることを明らかにできたので報告する。

材料および方法

PBCの初期投与から50月余を経過したカニクイザル雄5頭（対照1頭）を用いた。PBC投与は蒸留PCB 1mg/kg/dayを1カ月間、さらに10カ月の間

において#81、#82、#83は5日間の追加投与をおこなった。投与総量は#81 87.7mg、#82 93.3mg、#83 104.5mg、#84 72.0mg、#86 79.2mgであった。

処置前から臨床観察を定期的に行ない、PCB投与後マイボーム腺腫大・白色チーズ様物排出によりマイボーム腺病変の発症を確認した。しかし屠殺時には臨床的にはマイボーム腺腫大は明らかではなかった。

サルの両眼の上下眼瞼を切除し、10%ホルマリンにて固定、一眼を瞼板透明標本に、他眼を光顕切片標本に供した。透明標本は瞼板周囲組織を切除後、ズダンIIIを飽和した60%アルコール中に37°Cで2日間放置した。次に水洗し、グリセリンと20%水酸化カリウムを等量混和した透明薬液中に24時間放置し、瞼板を透明化した¹⁾。透明標本はグリセリンに封入し、実体顕微鏡下に観察、写真撮影した。他眼の上下眼瞼は型のとおりパラフィン包埋し、切片はHE染色、PAS染色を施した。

結 果

- 1) 瞼板透明標本によるマイボーム腺の観察(表1)
対照(#88)では上眼瞼瞼板内にも細いマイボーム

表 1 マイボーム腺の組織所見：瞼板透明標本

サル#	マイボーム腺の数 上眼瞼 下眼瞼		全 体 像	腺 房
対照：#88	38本	34本	整	明瞭
投与群：#81	41	41	上瞼板内腺*消失，大小不同，短縮化	消失
#82	30	28	上瞼板内腺消失，棍棒状肥大	消失傾向，形不整
#83	43	40	上瞼板内腺消失，棍棒状肥大	消失
#84	34	36	上瞼板内腺消失，大小不同，長短不揃い	消失傾向，形不整，疎
#86	32	28	整，やや細い	明瞭，小，やや疎

*上眼瞼瞼板内マイボーム腺

腺がみられ，マイボーム腺は瞼縁に垂直によく発達し，平行に規則正しく配列していた．腺房も球状によく発達し，導管周囲に密に存在した（図 1）．下眼瞼マイボーム腺は上眼瞼に比べ短く太くみえた（図 2）．

PCB 投与群では#86を除き顕著な異常がみられた．#86のマイボーム腺は配列のわずかな乱れ，短縮化，疎な腺房を示すほか，対照とほとんど差異がみられなかった．すなわち，瞼板内マイボーム腺も明瞭に認められ，腺房も明瞭に区別できた．他の 4 頭では，上眼瞼瞼板内マイボーム腺は消失し，他の導管も短縮化する例もあり，長短不揃いであった．腺房は区別できず，マイボーム腺全体として棍棒状に肥大していた（図 3，図 4）．腺房を区別できる例でも，個々の腺房は対照に比し小さく，疎な配列を示した．特に#81ではマイボーム腺は極めて不揃いで短縮化し，腺房は区別できなかった（図 5）．

上下眼瞼マイボーム腺の数はとくに増減しなかった．

2) 光顕切片標本によるマイボーム腺の観察(表 2)

対照では腺房がよく発達し，導管も一部に確認できた（図 6）．また上眼瞼瞼板内に疎らにマイボーム腺がみられた（図 7）．上眼瞼瞼板内マイボーム腺は#86では対照と差がなく，#81では痕跡がみられたが，他では消失していた（図 8）．

PCB 投与群では腺房は残存していたがやや小さく

配列は疎らで，扁平上皮化生がみられる例もあった（図 9）．導管は上皮の肥厚があり，一部に PAS 陽性物質をもつ導管上皮がみられた（図 10）．また管腔拡張・角化物蓄積や，嚢胞形成がみられた（図 11）．

考 按

先に著者らは実験的 PCB 中毒サルの臨床的，病理組織学的所見を報告した⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁹⁾．PCB およびその関連物質をサルに投与すると，眼瞼は腫脹し，マイボーム腺は紡錘状に腫大隆起した⁹⁾．これは組織学的にマイボーム腺の角化嚢胞であり，その形成過程が明らかになった⁵⁾⁶⁾．またマイボーム腺角化嚢胞内容物から血液に比べて高濃度の PCB が検出され，それは PCB 投与中止後も継続した⁶⁾．さらに瞼板透明標本により，マイボーム腺の部分的消失，腺房の不明瞭化，マイボーム腺の肥大などが生じること，しかしマイボーム腺の数には異同がないことが明らかとなった⁹⁾．

今回は PCB 投与後 4 年余を経過し，肉眼的には臨床症状が明らかでなくなった，慢性化した実験モデルのマイボーム腺を組織学的に検討した．瞼板透明標本でえられたマイボーム腺の全体像は部分的消失，短縮化，肥大と著しい異常を示し，腺房は不明瞭となっていた．これに比し，光顕切片標本では腺房はやや小さく疎らで，扁平上皮化生を呈し，導管には上皮の肥厚

表 2 マイボーム腺の組織所見：光顕切片標本

サル#	上瞼板内腺*	導 管	腺 房
対照：#88	+		よく発達
投与群：#81	痕跡	管腔拡張，角化物蓄積，一部上皮 PAS (+)	小，疎，一部扁平上皮化生
#82	消失	導管上皮の肥厚，嚢胞形成，一部上皮 PAS (+)	小，疎，一部扁平上皮化生
#83	消失	導管上皮の肥厚，嚢胞形成，一部上皮 PAS (+)	小，一部扁平上皮化生
#84	消失	管腔拡張，導管上皮の肥厚，一部上皮 PAS (+)	小
#86	+	導管上皮軽度肥厚	小，やや疎

*上眼瞼瞼板内マイボーム腺

がみられたが、変化は全体に軽微で、一部に管腔拡張、嚢胞形成がみられたのみであった。マイボーム腺の数も変化なかった。

今回の長期間経過した実験モデルは慢性化した油症患者のマイボーム腺病変に相当すると考えられる。発生当初の油症患者のマイボーム腺は一様に角化嚢胞を形成し、白色チーズ様物の排出が一斉にみられた。一様にマイボーム腺病変を生じることは油症（PCB中毒症）急性期の特徴的所見であった。しかし、マイボーム腺の数が減じないことから、一見消失したかに見えるマイボーム腺は再生し、再び角化嚢胞形成にむかうサイクルが考えられる。慢性化するにつれ、個々のマイボーム腺の病変は軽度となり、また角化嚢胞の形成も一様ではなくなる。しかし依然として病変は存続していることが、臨床的にも、今回の実験モデルからも立証された。

結 語

PCB投与後4年余を経過し臨床症状が明らかでなくなったサルのマイボーム腺病変を瞼板透明標本および光顕切片標本で検討した。

1) 瞼板透明標本ではマイボーム腺は部分的消失、短縮化、肥大と著しい異常を示し、腺房は不明瞭となっていた。しかし、マイボーム腺の数は変化なかった。

2) 光顕切片標本では腺房はやや小さく疎らで、扁平上皮化生を呈し、導管には上皮の肥厚がみられたが、変化は全体に軽微であった。

3) マイボーム腺は消失せず、病変は長期にわたり

継続すると考えられた。

文 献

- 1) 廣瀬金之助：邦人眼瞼ノ形態学的知見補遺 マイボーム氏腺ニ就イテ。九医専雑誌 5：1-44, 1940.
- 2) 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.
- 3) 向野利彦，山名泰生：油症患者の眼症状（第4報）発症10年後の検討。福岡医誌 70：181-186, 1979.
- 4) 向野利彦，大西克尚，石橋達朗：実験的PCB中毒サルにおける瞼板腺（マイボーム腺）の病理組織学的研究。臨床眼科 33：1119-1125, 1979.
- 5) 向野利彦，大西克尚，石橋達朗，菊池昌弘：実験的PCB中毒サルおよび油症患者剖検例における瞼板腺（マイボーム腺）の病理組織学的研究。吉原新一編，サルのPCB中毒症に関する予備的研究。福岡医誌 70：152-161, 1979.
- 6) 向野利彦，大西克尚，廣中博見：実験的PCB中毒サルの眼症状と瞼板腺圧迫排出物中のPCB濃度の推移。吉村英敏編，サルのPCB中毒症に関する研究（第2報）。福岡医誌 72：173-177, 1981.
- 7) 向野利彦，大西克尚，廣中博見：油症患者の眼症状（第5報）瞼板腺圧迫排出物中PCBの検出。福岡医誌 72：237-241, 1981.
- 8) 向野利彦，大西克尚，廣中博見：油症患者の眼症状（第6報）瞼板腺内容物採取の工夫とPCB濃度。福岡医誌 76：244-247, 1985.
- 9) 大西克尚，向野利彦，石橋達朗，篠田泰治：実験的PCB中毒サルの瞼板透明標本によるマイボーム腺の観察。福岡医誌 74：240-245, 1983.

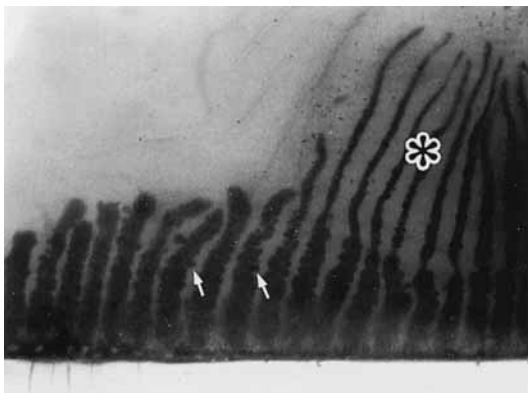


図 1 対照 (#88) 上眼瞼瞼板透明標本。瞼板内 (*) にも細いマイボーム腺がみられ、瞼縁に垂直によく発達している。矢印：腺房，×15

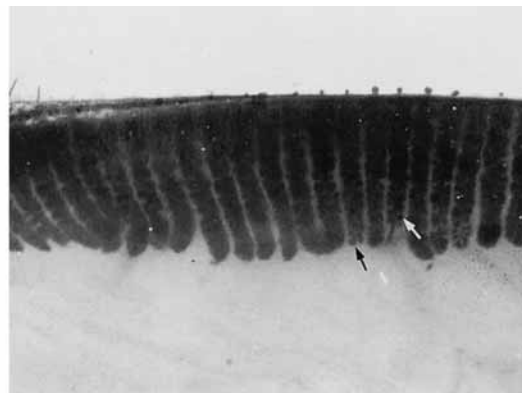


図 2 対照 (#88) 下眼瞼瞼板透明標本。上眼瞼に比べやや太く短いマイボーム腺が一様に並んでいる。矢印：腺房，×15

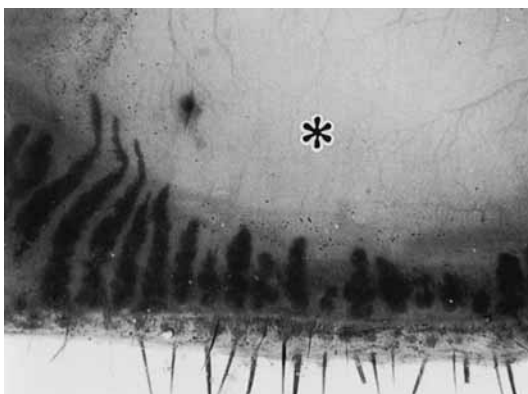


図 3 PCB 投与群 (#82) 上眼瞼瞼板透明標本。瞼板内 (*) のマイボーム腺は消失し、他の導管も長短不揃いである。×15



図 4 PCB 投与群 (#84) 下眼瞼瞼板透明標本。マイボーム腺は太く長短不揃いで、一部に消失がみられる。×15

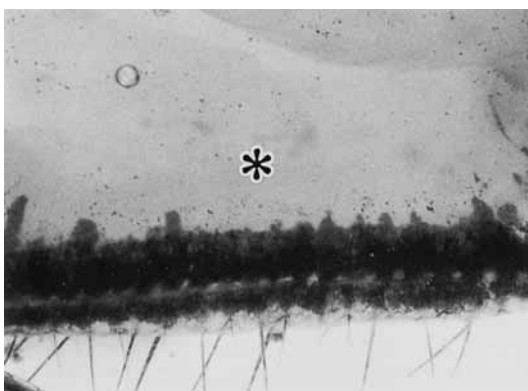


図 5 PCB 投与群 (#81) 上眼瞼瞼板透明標本。マイボーム腺は瞼板内 (*) で完全に消失し、導管は短くなり不揃いである。瞼縁に生理的色素沈着が認められる。×15

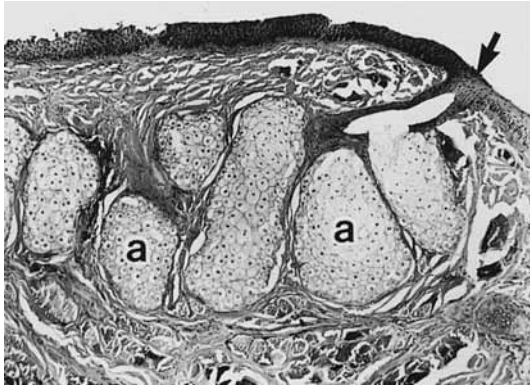


図6 対照(#88)下眼瞼。腺房(a)はよく発達している。矢印:導管, PAS染色, $\times 60$

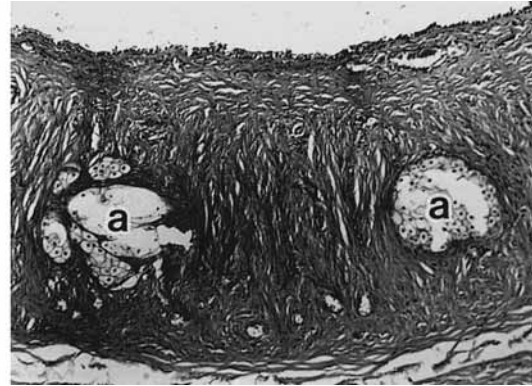


図7 対照(#88)上眼瞼。瞼板内に腺房(a)がみられる。PAS染色, $\times 70$

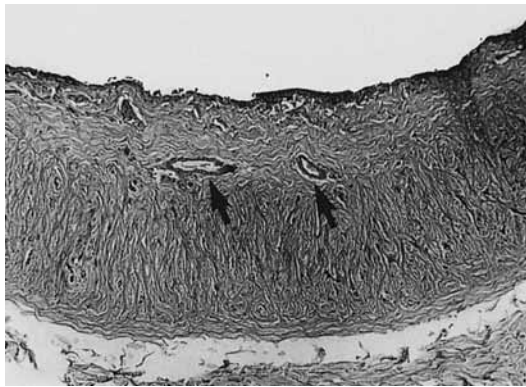


図8 PCB投与群(#81)上眼瞼。瞼板内に萎縮したマイボーム腺(矢印)がみられる。PAS染色, $\times 70$

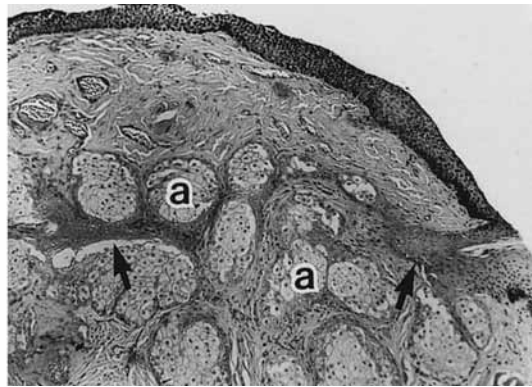


図9 PCB投与群(#83)上眼瞼。腺房(a)はやや小さく、配列は疎らで、扁平上皮化生がみられる。導管上皮も肥厚している(矢印)。PAS染色, $\times 60$



図10 PCB投与群(#84)下眼瞼。導管は拡大し、上皮は肥厚(矢印)、PAS陽性物質を持つ導管上皮(*)がみられる。PAS染色, $\times 60$



図11 PCB投与群(#81)上眼瞼。マイボーム腺の管腔拡張、角化物蓄積があり、嚢胞(*)を形成している。PAS染色, $\times 60$

油症患者および PCB 中毒サル歯肉の組織学的検索

九州大学歯学部歯科保存学第一教室（主任：青野正男教授）

橋 口 勇・赤 峰 昭 文
宮 武 祥 子・原 宜 興
前 田 勝 正・鳥 谷 芳 和
青 野 正 男

九州歯科大学口腔病理学教室（主任：福山 宏教授）

福 山 宏

長崎大学歯学部口腔外科学第一教室非常勤講師（主任：佐々木元賢教授）

奥 村 英 彦

Histological Study on the Gingiva in the Patient with Yusho and the PCB Poisoned Monkeys

Isamu HASHIGUCHI, Akifumi AKAMINE, Sachiko MIYATAKE,
Yoshitaka HARA, Katsumasa MAEDA, Yoshikazu TORIYA
and Masao AONO

*Department of Endodontics and Periodontics, Faculty of Dentistry
(Director : Prof. M. Aono), Kyushu University, Fukuoka 812, Japan*

Hiroshi FUKUYAMA

*Department of Oral Pathology (Director : Prof. H. Fukuyama),
Kyushu Dental College, Kitakyushu 803, Japan*

Hidehiko OKUMURA

*Department of Maxillofacial and Oral Surgery (Director : Prof. M. Sasaki),
School of Dentistry, Nagasaki University, Nagasaki, 852, Japan*

We performed ultrastructural and immunohistochemical investigation on the biopsied gingiva from the patient with Yusho and the PCB poisoned monkeys respectively. The results obtained were as follows.

1) In the ultrastructural examination, we found a great number of melanosomes and melanosome complexes within the basal and suprabasal cells in the biopsied gingiva from the patient with Yusho.

2) In the immunohistochemical examination of the number of infiltrating cells and the ratio of IgG-bearing cells to them, we found no definitive difference between the PCB poisoned monkeys and the clinically healthy monkeys.

ポリ塩化ビフェニール（以下 PCB と略す）の摂取による中毒である、いわゆる油症において、眼所見や皮膚所見等の特徴的な種々の他覚的症狀は経年的に改善が認められる。口腔領域においても健常人と比して顕著な差は認められなくなっているが、色素沈着

や辺縁性歯周炎の発現の頻度が高いことが報告されている¹⁾²⁾。そこで今回は、油症患者の色素沈着部位の歯肉の微細構造について検索を行うとともに、実験的に PCB 中毒をおこさせたサルの歯肉を用いて炎症性細胞および IgG 保有細胞の浸潤の程度について光顕

レベルでの観察を行った。

実験材料および方法

1) 油症患者歯肉の組織学的検索方法

油症と認定された患者の歯肉より色素沈着の認められる部位を浸潤麻酔下にて採取した。Karnovsky 固定液にて前固定後、1%オスミック酸による後固定を行い、通法に従いエポン 812 にて包埋した。約 1 μ m の切片を作製しトルイジンブルー染色後光顕観察を行うとともに超薄切片を作製しクエン酸鉛と酢酸ウランの2重染色を施し日立 H-500 型電子顕微鏡にて超微構造の観察を行った。

2) サル歯肉の免疫組織学的検索方法

PCB 投与群、PCB+コレスチラミン投与群、対照群のサル生検歯肉を 10%ホルマリン固定後通法に従いパラフィン包埋を行い、約 4 μ m の切片を作製した。その後、ウサギ抗サル IgG を一次抗体としたペロキシダーゼ-抗ペロキシダーゼ (PAP) 法を用いて、炎症性細胞の浸潤の程度と、浸潤炎症性細胞に占める IgG 保有細胞の割合を算出した。なお炎症性細胞の浸潤の程度は原ら⁴⁾の用いたスコアによって評価した。

結 果

1) 油症患者生検歯肉の組織学的所見

光顕による観察では、基底細胞層の細胞の胞体内に茶褐色ないしは黄褐色の粒子状物質が瀰漫性にあるいは不規則に沈着しており (図 1)、さらに上皮下固有層にも同様の物質を含む細胞が少数認められた。また基底細胞層の細胞の中には明調な胞体を持った細胞が観察されると同時に、基底細胞層から有棘細胞層にか

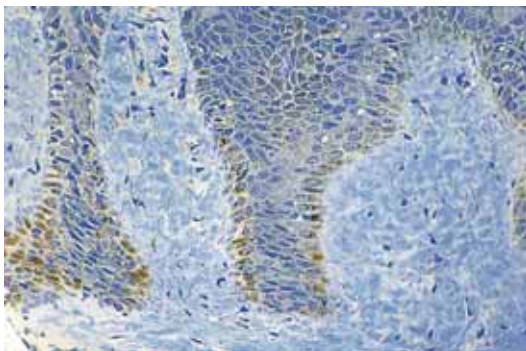


図 1 基底細胞層の細胞内に茶褐色の粒子状物質が認められる (×100)

けて胞体が萎縮して隣接する細胞との間隙に空胞が出現しているかのように見える所見も得られた。しかしながら、基底細胞層→有棘細胞層→顆粒および角質細胞層へスムーズに移行し正常な角化の過程をたどっており、既に報告⁵⁾した実験的 PCB 中毒サルの歯肉においてみられるような dyskeratosis (角化の位置異常) や keratocyst (嚢胞様構造物) は認められなかった。また上皮内および上皮下固有層いずれにおいても炎症性細胞の浸潤の程度は非常に軽度であった。電顕的観察では、基底細胞層に電子密度の低い淡明な細胞質を有し周囲の上皮細胞とのデスモゾームによる結合を欠いている細胞が存在していた。上皮細胞の特徴的所見としては主として基底細胞層ないし上基底層の細胞内に均一な電子密度の高いメラノゾームが多数認められたが、表層の上皮細胞にはほとんど観察されなかった (図 2)。上皮細胞内においては単独で存在するメラノゾームの数は比較的少なく、多くは大小多数のメラノゾームが集積したメラノゾーム複合体の形態をとって存在しており一部は変性像を示すものも認められた。メラノゾーム複合体の分布状態については核の近傍に集まって存在しているものから細胞質周囲に散見しているものまで多様化しており、それらの間に一定の規則性を見出すことはできなかった。その他の上皮細胞内の所見としては基底細胞層から上基底細胞層にかけて細胞間のデスモゾーム結合の数が少なくなり細胞間隙が拡大している部位が認められると同時にそれらの部位にほぼ一致して上皮細胞の変性像が観察された。変性の程度としてはミトコンドリアのクリステの不明瞭化や空胞化を呈しているもの、あるいは核膜腔の拡大がみられるものから、大小さまざまな空胞が細胞内に多数存在しているものまで多様であった。一部の細胞においては細胞膜が不明瞭となったり、あるいは一部消失しているものもみられた。これらの細胞間隙には多くの細胞残渣、破壊した細胞内小器官やメラノゾームなどが認められた。また細胞内には著明な変化を認めないが、細胞の外形が著しく不規則になっているものも存在していた。基底細胞の基底部では多くの場合 lamina densa が連続してみられたが、一部においては lamina densa の淡明化やあるいは消失ないし断裂している部位も観察された (図 3)。Lamina densa の消失している部位の基底細胞には変性像が常に観察され、変性の激しいものは細胞残渣のみ認められることもあった。Lamina densa のさらなる変化としては多層化を生じている部位もあった。上皮下固有層の所見としては、光顕観察での色素沈着に

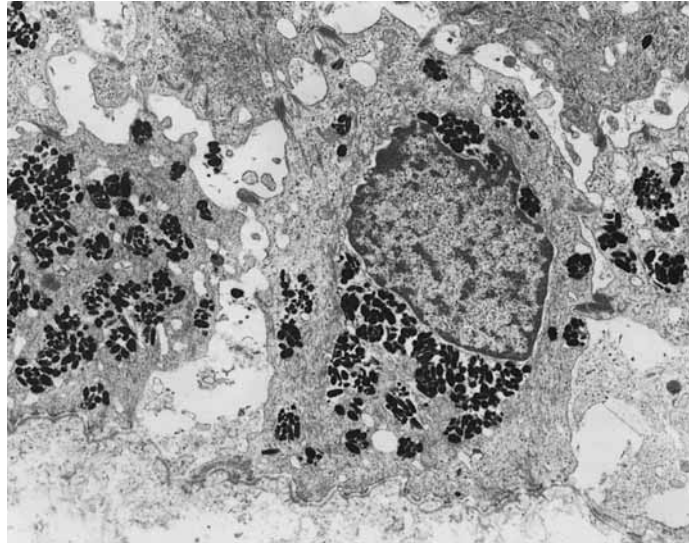


図 2 基底細胞内に多数のメラノゾームやメラノゾーム複合体が存在している (×8,700).

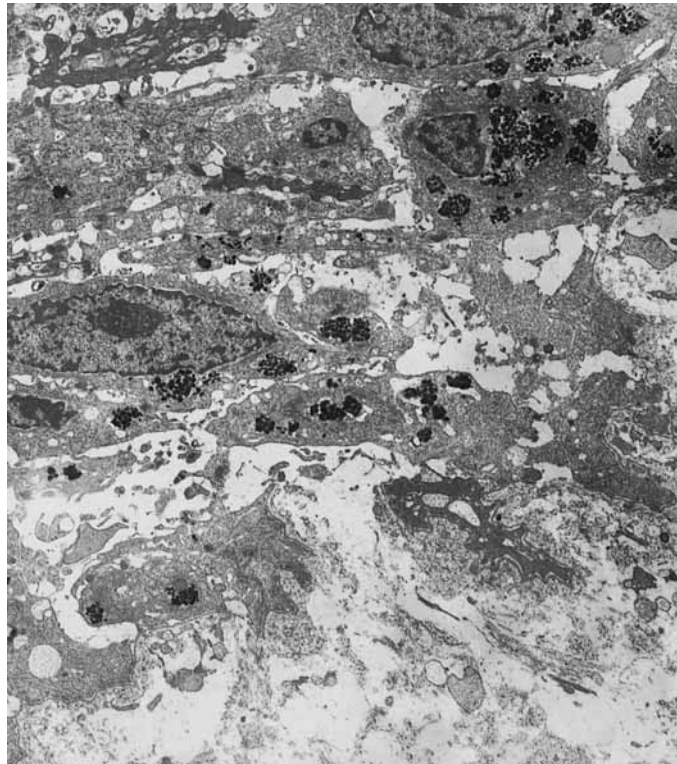


図 3 Lamina densa の一部消失と細胞内空胞が観察される (×4,200).

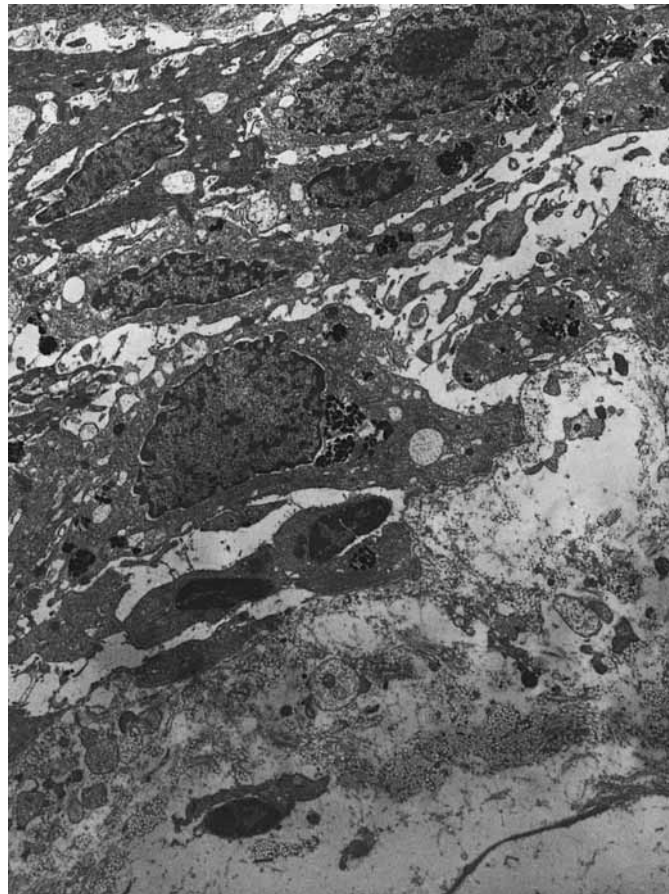


図4 Lamina densa の直下に細胞残渣あるいはコラーゲン線維の発達不良部がみられる (×4,200)。

一致してメラノゾームを含む細胞が少数認められた。この細胞の胞体内には多数のメラノゾームやメラノゾーム複合体を含むことは上皮細胞と同様であるが、上皮細胞内のそれらに比較して崩壊像が強く一部はライソゾーム中に取り込まれ二次ライソゾームを形成しておりメラノファージと思われた。その他の所見として lamina densa 直下の結合組織ではコラーゲンの発達の不良な部位や細胞残渣あるいは崩壊された細胞内小器官が観察される部位も存在したが(図4)、それ以外には著明な変化は認められなかった。

2) 実験的 PCB 中毒サル歯肉の組織所見

i) 対照群および PCB+コレステラミン投与群：高度の炎症性細胞の浸潤が上皮内および上皮下固有層に認められ、上皮と固有層の境界が不明瞭になっていた。浸潤細胞の多くは形質細胞とリンパ球でありその割合は前者の方が多かった。IgG 保有細胞は炎症性細胞浸潤部と同一部位に局在しており、浸潤細胞中に占

める割合は 45～60%であった(表1)。

ii) PCB 投与群：炎症性細胞の浸潤や IgG 保有細胞の局在および割合は対照群と比して著明な差はなかったが、歯肉組織の破壊が強くコラーゲン線維の破壊が著明な所見も一部認められた。また本群において特徴的な所見として dyskeratosis が認められたが、先に報告したような keratocyst は観察されなかった。

考 察

1) 油症患者生検歯肉の組織学的所見

健常人においても口腔領域に限局性の色素沈着がみられることがあり、その原因として人種的特性の他に細菌、食品および薬品等による黒色色素などが挙げられる⁹⁾。また近年、金属焼き付けポーセレンや金属修復物材料中の重元素による色素沈着も日常臨床でしばしば経験するところである。しかしながら黒色色素を原因とするものはそのほとんどが舌にみられるが、油

表 1 浸潤細胞中に占める IgG 保有細胞の比率

	P C B 投 与 群		P C B + コレスチラミン 投 与 群			対 照 群
	No84	No86	No81	No82	No83	No88
細胞浸潤	+	+	+	+	+	+
IgG 保有細胞(%)	46.3	54.9	54.6	55.9	48.5	49.5

症患者においては歯肉に高頻度に出現し舌にはほとんど認められない。また重金属によるものは、主として金属修復物が装着されている歯牙周囲歯肉にみられ、その色調も青紫色などを呈することもあるなどの臨床的所見の他に、組織学的所見においても金属微粒子の存在が認められるなど明らかに油症患者の色素沈着とは異なった様相を呈している¹³⁾。油症患者の色素沈着歯肉を電子顕微鏡にて観察すると、主として基底細胞層から上基底細胞層にかけて均一な高い電子密度を示すメラノゾームあるいはメラノゾーム複合体が多数観察された。光学顕微鏡にて認められた茶褐色あるいは黒褐色の上皮内色素はこれらのメラノゾーム複合体にほぼ一致しており、これによって歯肉の臨床的着色をきたすと考えられた。油症患者の眼科所見においても同様の結果が得られていることからメラニン性着色に PCB が何らかの影響を与える可能性が強く示唆された。皮膚において皮膚色の濃淡を決定する因子としては、メラノサイトのメラニン生成能および周囲上皮細胞のメラノゾーム保持能力が考えられている。上皮細胞の保持能力とは貪食能とみなしてよく、メラノゾームが上皮内に円滑に取り込まれることによりメラノサイトが活発にメラニンを産生すると考えられている。口腔粘膜の色素沈着においても同様に 2 つの因子が関与しているものと思われる。しかしながら油症患者歯肉においては、上皮細胞の一部に変性破壊像が認められたことから上皮細胞の保持能力は低下しているものと推察され、上皮細胞によるメラノサイトの間接的活性化は起こりにくいものと考えられた。このことから油症患者歯肉の色素沈着はメラノサイトのメラニン生成能が上昇しているために生じたものと考えることが可能である。メラノサイトを直接活性化するものとして、下垂体からの MSH や ACTH などのホルモンがよく知られているが PCB による下垂体の障害についての報告はまだないと思われる。しかしながら、カネクロール 400 (KC-400) を投与したラットの副腎では副腎皮質ホルモンの合成能力が低下したという

報告⁹⁾がある。副腎皮質ホルモンは MSH や ACTH の分泌を抑制すると考えられているので、結果としてメラニン生成能が高まったと考えられる。もちろんメラノサイトに作用してメラニン生成を促進したり、あるいはメラニン合成抑制物質を阻害している可能性も考えられるが推測の域を出ない。また上皮細胞内に空胞の出現が観察されたが、実験的 PCB 中毒サル歯肉上皮細胞や同ラットのエナメル芽細胞にも同様の空胞の出現が認められており¹⁰⁾¹¹⁾、PCB による変化であると考えられた。今回新たに、上皮細胞の細胞膜の消失が認められたが、Hela 細胞を使った in vitro の系で PCB の細胞膜破壊作用が報告されており¹⁰⁾、PCB の直接的作用によるものかもしれない。しかし、実験的 PCB 中毒サル歯肉の上皮細胞にはみられず⁵⁾、さらに KC-400 の溶血作用に及ぼす血清インヒビターの検索³⁾でも健常人と油症患者の間に差は認められなかったことからその原因については不明であり、さらなる検索が必要と思われた。また著明な lamina densa の消失あるいは断裂の像も新たな所見として得られた。Lamina densa は上皮細胞が作るものがほぼ明らかになっており、慢性剥離性歯肉炎の組織学的所見¹⁵⁾でも今回の報告と同様に上皮細胞の破壊された部位に一致して lamina densa の消失が観察されたことから、PCB の直接作用による消失ではなく上皮細胞の破壊に伴う 2 次的な変化と考えられた。上皮細胞が basal lamina 形成能を発揮するためには細胞形質膜のハーフデスモゾームへの分化を誘導する固有層内の物質に上皮細胞が付着することが必要とされているが¹⁴⁾、上皮固有層に細胞の破壊像やコラーゲンの発達が悪い部位が認められることも lamina densa の消失の一因となっているのかもしれない。Keratocyst や dyskeratosis がみられなかったことに関しては症状の改善によるものか、種の差あるいは慢性と急性の差によるものなのか判定を下すことは不可能であった。

2) 実験的 PCB 中毒サル歯肉

赤峰ら²⁾は油症患者の歯周ポケットを測定した結果 4 mm 以上のポケットを有するものが健常者よりも高頻度に見られると述べている。病的な歯周ポケットの発現は、歯肉の発赤・腫張や排膿、歯槽骨の吸収などと並んで歯周炎の重要な臨床症状のひとつとされる。歯周病発生の原因としてはプラーク中の細菌の産生酵素や代謝産物あるいは LPS などの細胞成分が考えられる一方、体液性および細胞性免疫反応に基づく組織障害機構が強く関与していると考えられるようになってきた。そこで今回、炎症性細胞および IgG 保有細胞の局在について検索を行った。しかし、いずれの群においても著明な差は認められず形質細胞やリンパ球を主体とする慢性炎症象を呈しており、また浸潤単核細胞の中で IgG 保有細胞が 45~60% という高い割合を占めていた。これらの病態像は慢性辺縁性歯周炎の確定期病変あるいは進展期病変に相当するものと思われる。歯肉腫張や出血がみられたという報告⁵⁾に一致している。差の認められなかったことに関しては角化の異常所見が少なくなったこととあわせて症状の改善によるものかもしれない。油症患者血清中の免疫グロブリン値は発症後しばらくは低下していたが経年的に回復していることが報告されている¹²⁾。今回使用したサルも PCB 投与中止後時間が経っていることから全身あるいは局所の“抵抗力”が回復しているのかもしれない。あるいは西田ら¹¹⁾の報告のように口腔内臨床所見と歯肉組織の免疫グロブリンの局在性との間に相関性がないためかもしれない。T 細胞あるいは他の組織障害因子に対する検索が必要かもしれない。しかしサルにおいては歯周ポケットの深さの値に差がないという報告⁶⁾もあり、局所原因である歯垢や歯石等の局所沈着が高度なために PCB の及ぼす全身的因子による修飾が表面に出て来ていない可能性もある。何故油症患者に病的ポケットの出現率が高いのか。その原因として赤峰ら²⁾はビタミン D や Ca の代謝異常による化骨障害や発育障害を挙げている。それ以外に発症後初期の血清グロブリンの低下も歯周炎を感染症の観点から考えると無視できない。また伊集院ら⁷⁾は内縁上皮細胞がライソゾーム酵素を有し、かつ異物の貪食能を発揮することを見出し有力な細菌阻止を行い得ることを報告しているが、前述したように上皮細胞の変性や細胞膜の破壊をきたしそれらの能力を十分に発揮していないのかもしれない。今後これらの点をふまえてさらに検索を行うことが必要と思われる。

小 括

油症患者の生検歯肉の電子顕微鏡による検索や実験的 PCB 中毒サル歯肉の免疫組織学的検索を行い、次の様な結果が得られた。

- 1) 油症患者生検歯肉においては、基底細胞層や上基底細胞層に多数のメラノゾームやメラノゾーム複合体が認められた。
- 2) サル歯肉においては、炎症性細胞の浸潤およびそれに対する IgG 保有細胞の割合は、PCB 投与群と対照群との間に著明な差は認められなかった。

文 献

- 1) 赤峰昭文, 橋口 勇, 岸 哲也, 古川猛士, 青野正男: 油症患者における口腔内色素沈着の経年的変化. 福岡医誌 74 (5): 284-288, 1983.
- 2) 赤峰昭文, 橋口 勇, 前田勝正, 原宜興, 鎮守信弘, 岩本恭行, 青野正男: 油症患者の歯周疾患に関する疫学的調査 (第 1 報). 福岡医誌 76(5): 248-252, 1985.
- 3) 藤田晃一, 岩坂 剛, 森 良一: PCB の溶血作用に対する血清インヒビターの研究. 福岡医誌 70, 99-101, 1979.
- 4) 原 宜興, 吉村祥子, 前田勝正, 赤峰昭文, 相田宜利, 青野正男: 歯周疾患における免疫系細胞の動態に関する免疫組織学的研究. 1. 世代別にみた免疫グロブリン保有細胞の比率. 日歯周誌 27(4): 795-806, 1985.
- 5) 橋口 勇, 赤峰昭文, 中野嗣久, 青野正男, 福山 宏: 実験的 PCB 中毒サルにおける歯肉上皮の微細構造について. 福岡医誌 74(5): 246-254, 1983.
- 6) 橋口 勇, 赤峰昭文, 原 宜興, 前田勝正, 阿南寿, 阿部隆夫, 青野正男, 福山 宏: PCB 投与ラットにおける歯牙硬組織形成への影響について. 福岡医誌 76(5): 221-228, 1985.
- 7) 伊集院直邦, 二階宏昌, 高田 隆, 山崎章: ラット臼歯部歯肉由来培養上皮細胞の貪食作用について. 歯基礎誌 23: 839-858, 1981.
- 8) Inao. S: Adrenocortical insufficiency induced in rats by prolonged feeding of PCB. Kumamoto med. J., 23: 27, 1970.
- 9) 石川梧郎, 秋吉正豊: 口腔病理学 II, 永末書店, 京都 1975.
- 10) 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.
- 11) 西田 健, 田中昭男, 宮川保夫, 竹内正幸, 三浦康宏, 筒井正弘, 上田雅俊, 飯田正人, 稲田芳樹: 辺縁性歯周疾患の免疫病理学的研究—辺縁性歯周炎と免疫グロブリン (IgG, IgA と IgM) の関係について—1. 歯基礎誌 21: 78-88, 1979.

12) 齊藤玲子, 重松信昭, 石丸秀三: 油症における免疫グロブリン値について, 福岡医誌 63: 408-411, 1972.

13) 坂井貴子: 金属冠装着歯周囲の着色歯肉に関する臨床病理的研究, 歯基礎誌 28: 297-315, 1986.

14) 谷口 滋: 培養ヒト表皮細胞による基底板形成, 日皮会誌 94: 727-736, 1984.

15) 山田 了, 笠井俊一, 佐藤徹一郎: 慢性剥離性歯齦炎に関する病理組織学的検索, 日歯周誌 22: 267-282, 1980.

油 症 原 因 物 質 の 排 泄 促 進

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

神 村 英 利・吉 村 英 敏

Stimulation of Fecal Excretion of Etiological Compounds of Yusho in Rats

Hidetoshi KAMIMURA and Hidetoshi YOSHIMURA

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry,
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka 812, Japan*

Studies on stimulation of fecal excretion of the causal agents of Yusho accumulated in the body, which should be valuable for the treatment of this intoxication, have briefly been reviewed in this paper. Since 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) has been recognized to be most important among various congeners of PCB and PCDF ingested, with respect to toxicity and persistency in the body, we selected this compound for this study and demonstrated, first of all, that accumulated PenCDF in the rat was eliminated, though very gradually, through the intestinal wall into the lumen, and then to feces. Then we investigated by using rats to learn effects of squalane, liquid paraffin, cholestyramine and activated charcoal on enhancement of the fecal excretion of PenCDF. In the case of charcoal, we used charcoal beads instead of the powder. They are the fine beads of agar in which activated charcoal powder is enwrapped.

By 3-week treatments, all these compounds were found to give significant stimulating effects. Treatments with squalane and activated charcoal beads afforded better results than did other two. The effect was due to inhibition of the re-absorption of PenCDF by dissolving or adsorbing, and then excreting efficiently into feces. Enhanced exsorption of PenCDF through the intestinal wall might also contribute to this effect.

Rats given PenCDF were then maintained on a diet containing 5 % squalane or 5 % activated charcoal beads for 12 weeks. Both treatments increased the fecal excretion of PenCDF about 5-fold over the control and concomitantly lowered the blood and the liver level of PenCDF markedly. Appearance of fatty liver and thymus atrophy were also prevented significantly, and no appreciable side effect was observed during these treatments for 12 weeks.

1968年、西日本一帯で発生したカネミ油症事件は、多塩素化ビフェニル (PCB) の製品であるカネクロール 400 (KC-400) で高濃度に汚染されたライスオイルを食したことによる亜急性の食中毒事件であった。発症当初に認められた特徴的な諸症状は、今日までに徐々に回復の傾向を示してきたとはいえ、いまだに種々の慢性症状もみられ、長期におよぶ患者の苦痛はきわめて深刻である。

油症の原因物質として PCB とともに無視してならないのは多塩素化ジベンゾフラン (PCDF) である。PCDF は KC-400 の製造中、およびライスオイルの

脱臭工程で KC-400 を使用中に高温に加熱されて PCB から生じたと考えられる微量の不純物であるが、このものは PCB よりも組織残留性の高い異性体が多く、油症患者の肝からは PCB に比肩しうるレベルで検出されるという²⁴⁾。また、ニワトリ³⁹⁾、ラット¹³⁾³⁰⁾、マウス²⁸⁾において、PCDF は PCB よりも遙かに毒性が強いことが知られている。さらに、筆者ら⁵³⁾および国田ら¹⁷⁾は、未使用の KC-400 に PCDF を混合してサルに与えると、KC-400 のみの投与よりも油症の症状をより明確に発現することを示した。

代表的な原因ライスオイル中に存在する PCDF 異

性体の中で、2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) および 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) はラットにおける急性毒性がきわめて強い⁴²⁾。これらのうち、TCDF はラット³⁾、サル⁴⁾、マウス⁸⁾において比較的容易に代謝され、速やかに糞および尿中に排泄されるのに対し、PenCDF はサル¹⁹⁾、ラット¹⁹⁾⁴²⁾で残留性が高い。また、¹⁴C で標識された PenCDF⁴⁶⁾と非標識のそれ⁴⁴⁾⁴⁵⁾をラットに投与し、糞をそれぞれ放射能およびガスクロマトグラフィーにて分析すると、未変化体のみが検出され、かつその臓器分布量と糞中排泄量の和は、ほぼ投与量に一致するので、もし代謝物が生成したとしても、その量はきわめて少ないものと考えられた。ごく最近、この PenCDF 投与のラット胆汁抽出物をメチル化してガスクロマトマススペクトル (GC-MS) 分析を行い、10 種の代謝物を検出したという報告が為された³²⁾。これらメチル化された代謝物のうち、主なものはフラン環が開裂した dimethoxypentachlorobiphenyl と methoxypentachlorodibenzofuran という、したがってメチル化前の代謝物自体は開環ジフェノール体とモノフェノール体と考えられる。なお、これらの代謝物の量は微量と思われるが、定量はされておらず、また硫酸基の位置も不明である。また発症後 9 年を経過して死亡した油症患者の肝からは、TCDF よりも PenCDF が遙かに高濃度に検出されたこと¹⁸⁾³⁴⁾から、その強い毒性と高い残留性によって、PenCDF は油症の原因物質として特に重要と考えられている²³⁾。

よく知られているように、PCB や PCDF は肝モノオキシゲナーゼの強力な誘導剤であり、塩素の数や置換位置によって、その誘導様式はフェノバルビタール (PB) 型、3-メチルコラントレン (MC) 型およびその中間型に大別される¹¹⁾⁴²⁾⁵⁰⁾。MC 型の誘導とは、チトクローム P-448 を増加させ、それによって触媒されるベンゾ [a] ピレン水酸化 (AHH) 活性を上昇させる。さらに肝可溶性画分の DT-ジアホラーゼを誘導する。加えて、特にラットにおいて PCB や PCDF の MC 型誘導能と毒性とは高い相関性がある⁴²⁾⁵²⁾。PCDF の場合、2, 3, 7, 8 位の少なくとも 3 個に塩素置換を有するものが MC 型の誘導を示す⁴²⁾が、油症患者の体内に現存する主な異性体は、すべてこのタイプである³⁴⁾。

最近、MC 型 PCB 投与ラットでは、チトクローム P-448 の誘導を介する発癌物質アセトアミノフルオレンや Trp-P-2, Glu-P-1 の変異原性の上昇³¹⁾、スルファニルアミドやフェナセチンの腎毒性の増強⁹⁾¹⁰⁾が

示されている。さらに 4-ニトロキノリン N-オキシドの還元に関与する DT-ジアホラーゼも MC 型 PCB により強く誘導されるため、近位発癌物質としての 4-ヒドロキシルアミノキノリン N-オキシドの生成増加をもたらすことにもなる⁵¹⁾。このような知見からすると、今なお MC 型 PCB や PCDF が残存する油症患者が、これら外因性化合物にさらされ 2 次的に危険な状態を招来する可能性も懸念される。

これまで油症の治療には主として対症療法のみが行われ、いまだ根本的な治療法の確立には至っていない。一方、1979 年に台湾でも台中県を中心に日本と同様な油症事件が発生し⁷⁾、またダイオキシン (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: TCDD) を含めてこれら一連の多塩素化芳香族炭化水素による事故が世界各地で勃発している現在、これらの中毒に対する治療法の確立は急務といえる。以前、筆者らは原因物質の体外排除を図るというもっとも原則的な発想から、サルを用いて、流動パラフィンおよびコレステラミンの効果を検討したが、サルの例数が少なく、大きな個体差のために明確な結論を得ないままであった⁵³⁾。そこで、治療法確立の一環として、ラットを用いて、油症の重要な原因物質と考えられる PenCDF の排泄促進に力点を置いて再検討を行った。本稿では、その結果を中心に、内外の関連研究を含めて概説することとする。

PenCDF の生体内運命

PenCDF の排泄促進を行うためには、まずその生体内運命を理解しておく必要がある。

経口投与された PCB は、小腸粘膜でキロミクロンに取り込まれ、胸管リンパを経由して血中に移行する⁶⁾。血中の PCB はキロミクロンの異化に伴ない、次第にアルブミン結合型となり全身に輸送されることが知られている⁶⁾。一方、ラット血漿に PenCDF を添加すると、その約 60 % がアルブミンと結合した²¹⁾。また、これらの血漿成分と結合した PenCDF は遊離

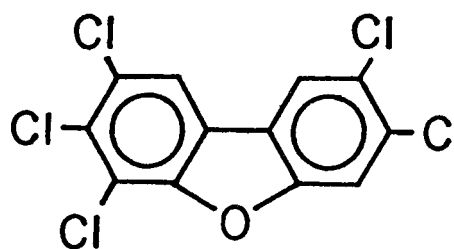


Fig. 1 A structure of 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF

Table 1 Distribution of radioactivity into rat tissues after a single oral dose of 1.0 mg/kg of ^{14}C -PenCDF⁴⁶⁾

	Days after administration					
	1	3	5	8	13	21
	% of dose					
Liver	38.60	57.14	65.15	66.15	67.66	47.64
Thymus	0.04	0.01	ND	ND	ND	ND
Spleen	0.69	0.02	0.06	0.02	0.02	0.02
Lung	0.06	ND	ND	ND	ND	ND
Heart	0.02	ND	ND	ND	ND	ND
Kidney	0.16	0.12	ND	ND	ND	ND
Testis	0.05	ND	ND	ND	ND	ND
Stomach	0.11	0.05	ND	0.02	0.02	0.02
Small intestine	1.16	0.23	0.14	0.10	0.05	0.05
Large intestine	0.21	0.09	0.05	0.03	0.01	0.02
Adipose tissue	2.40	0.70	0.52	0.23	0.11	0.02
Blood	3.37	1.83	3.12	0.93	0.49	0.56
Skin	9.92	1.66	0.48	0.58	0.31	0.48
Muscle	2.35	1.97	0.31	0.36	0.39	0.40

Each value represents the mean of three rats. ND, not detected.

型のそれよりも肝細胞に取り込まれやすいことが判明した²¹⁾。これらの事実から、PenCDFの吸収および輸送機構はPCBの場合と同様であろうと考えられた²¹⁾。

ラットにPenCDFを1 mg/kg あて経口投与すると、このものは投与後1日目に肝をはじめ全身に分布するが、5日目までに各組織から肝へ再分布し、その後は高い肝親和性が維持される (Table 1)⁴⁶⁾。前述したようにPenCDFはきわめて強い、典型的なMC型誘導能を有しているが⁴²⁾、肝中PenCDFはPenCDF誘導性P-448のうち、高スピン型のisozyme (P-448H) とほぼ特異的に結合している²⁰⁾。さらに免疫化学的な定量から、PenCDF 0.5 mg/kg を投与したラットの肝ミクロゾームでは、P-448Hは全チトロームP-450の約60%を占めることが明らかとなっている²⁰⁾。つまり、PenCDFの高い肝親和性と残留性は、主として、それによって誘導されるP-448Hと結合することによって考えられる。このようなラット肝への特異的蓄積はMC型PCB (3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl: PenCB) にも共通にみられ⁵¹⁾、一般のPCB異性体の脂肪組織への蓄積傾向とは異質の、きわめて注目すべき特徴といえる。

PenCDFの排泄は微量あてではあるが、小腸を介して糞中に行われる⁴⁶⁾。Fig. 2にその排泄状況を示す。最初の数日間に比較的多量が排泄されているが、この

分は吸収されなかったPenCDFによるもので、その後の微量ながら一定した糞中排泄は、血中より小腸壁を介して排出されたものと考えられ、長期にわたって、この排出が観察される⁴⁶⁾。有機塩素化合物の小腸壁よりの排出 (exsorption) に関しては、古くWilliamsらが、殺虫剤dieldrinを胆管カニュレーションを施したラットに静脈注射し、糞中に未変化体を検出して、この小腸管腔への排出を推定している⁴⁰⁾。その後、筆者らもKC-400の主要成分の1つである2, 4, 3', 4'-

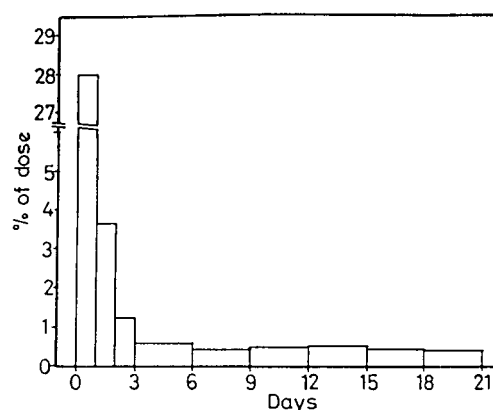


Fig. 2 Fecal excretion of radioactivity from rats given an oral dose of 1.0 mg/kg of ^{14}C -PenCDF⁴⁶⁾
Each value represents the mean of three rats.

Table 2 Billiary excretion of PenCDF in rats²⁹⁾

Rat number	Bile			Feces ^{b)}	Liver ^{a)}
	0—24	24—48	48—72 (hr)		
1	N.D. ^{c)}	—	—	0.031	—
2	N.D.	N.D.	N.D.	0.035	31.49 (72) ^{d)}
3	N.D.	—	—	0.025	38.82 (24)
4	N.D.	N.D.	—	0.007	45.17 (48)

^{a)} Each value represents the percent of dose (0.15 mg/kg, s.c.).

^{b)} Each value represents the percent of dose/day.

^{c)} N.D., not detectable.

^{d)} Figure in parenthesis represents the time of death (hrs) after dosing.

tetrachlorobiphenyl が、ラットに静脈投与すると、未変化体としては胆汁中に排泄されないのに、糞中には微量の未変化体が検出されることから、同様な排泄経路の存在を推定し、その後このことをラットで実験的に初めて証明した⁴⁷⁾。すなわち、PCBのような高脂溶性で難代謝性の多塩素化芳香族炭化水素では、一部代謝されて生成したフェノール体はラットにおいて、主に胆汁を介して糞中に排泄されるのに対し⁴⁸⁾⁴⁹⁾、未変化体は微量あてではあるが、小腸壁からその管腔内へ排出されることが明らかとなった⁴⁷⁾。また、サルにおいて、PCDF 異性体のあるものは胆汁中への排泄も報告されている¹⁴⁾。そこでラットにおける PenCDF の排泄経路を明らかにするために、胆管カニューレーションを施したラットに PenCDF を皮下投与したところ、PenCDF は胆汁中からガスクロマトグラフィによっては全く検出されず、一方、糞中からは 1 日当たり投与量の 0.007~0.035 % が検出された (Table 2)²⁹⁾。つまり、PCB⁴⁷⁾ などと同様に、ラットにおける未変化 PenCDF の主たる排泄は、胆汁を介さず、血液から小腸管腔内への直接的な移行 (exsorption) によると考えられる。最近の報告³²⁾ で、未変化の PenCDF がラット胆汁中に GC-MS により検出されているが、その量は微量に過ぎないと思われる。

このようにして小腸管腔内に排出された PenCDF の一部は、そのまま糞中へ排泄されると考えられるが、大部分は再吸収が行われ、再びリンパ系を介して血中に戻っていると思われる。したがって PenCDF の再吸収を抑制することができれば、生体に影響を与えることなく安全にその体外排泄を促すことができると考えられる。この目的に合致するものとして 2 つの方法が考えられる。その 1 つは活性炭のような吸着剤の使用であり、他の 1 つは溶解剤、すなわち PenCDF をよく溶解しうる脂溶性の化合物で、しかもそれ自体は

消化管より吸収されにくいものである。

活性炭の有機化合物に対する強い吸着能についてはよく知られており、胃腸疾患や急性中毒時の解毒剤として日本薬局方にも薬用炭として収載されている。一方、血清コレステロールの低下剤、コレステラミンは、一種の陰イオン交換樹脂で、胆汁酸の特異的吸着剤として作用する。すなわち胆汁酸を吸着し、その再吸収を阻止して糞中へ排泄させてしまう。そのため胆汁酸の肝臓への流入量が減少し、コレステロールよりの胆汁酸生成が促進され、血清コレステロールの低下をもたらすといわれる。一方、この胆汁酸は PenCDF の腸管吸収にも必須と考えられ、その吸着による有効量の低下は当然、PenCDF の糞中排泄量の増加をもたらす可能性がある。加えてコレステラミンの構造中のベンゼン環は PCB、PCDF の吸着能も賦与されていることが考えられる。

第 2 の方法には日本薬局方収載の流動パラフィンがある。これは炭素数 15~20 の直鎖状炭化水素の混合物であり、高い脂溶性を持つ一方、消化管よりの吸収はあまり良くないことが知られている。これに対し、スクアランは炭素数 30 の分枝鎖炭化水素で、分子が大きくなっているだけ流動パラフィンより腸管吸収が低いことが予想された。

以上の観点から、機構を異にする上記 4 種の薬物について、PenCDF 投与ラットにおいて、PenCDF の排泄促進と毒性軽減効果を検討した。PenCDF は強い毒性を有しており、ラットについてその排泄量の増大とともに毒性の低減をもたらすか否かをチェックすることが可能で、この点、治療薬の追求法としても目的に合致している。

短期投与実験

PenCDF の排泄促進剤としての可能性を検討した

のは、スクアラン⁴⁵⁾、流動パラフィン¹⁵⁾、コレステラミン¹⁵⁾および活性炭⁴⁴⁾である。PCBなどの排泄促進については、すでに2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl³⁷⁾、hexachlorobenzene³⁵⁾についてスクアランが、2, 4, 6, 2', 4'-pentachlorobiphenyl³⁶⁾などについて流動パラフィンが、また有機塩素系殺虫剤 chlordane (Kepone)⁵⁾についてコレステラミンが、それぞれラット糞中排泄量を増加させると報告されている。活性炭については、羊、ヤギ、牝牛(幼若)で有機塩素系殺虫剤 dieldrin の糞中排泄を促進させることが報告されている⁴¹⁾。同様な効果が類縁の構造体である PenCDF に対しても期待されたわけで、Fig. 3 に示すような条件で、まず短期の実験により、いずれの化合物がより有効であるかについて検討した。すなわち、5 週齢の Wistar 系雄性ラットに PenCDF の致死量に近い 1 mg/kg を 1 回経口投与し、8 日目から各薬物を餌に混ぜて投与した。薬物投与を 8 日目から開始したのは、この頃には吸収された PenCDF の全身から肝への再分布が終わっており (Table 1)、PenCDF の糞中への排泄は微量かつ一定のパターン (Fig. 2) を示しているからである⁴⁶⁾。薬物の濃度は、スクアラン、流動パラフィンについては 8 % (w/w)、コレステラミン、活性炭については 5 % (w/w) とした。活性炭を除く他の 3 種の薬物は、設定した濃度ではラットの発育に与える影響を与えないことが確認されており¹²⁾³⁶⁾³⁷⁾、活性炭の場合は、コレステラミンの効果と比較するために 5 % とした。また活性炭は従来の粉末状のものではなく、粉末活性炭を寒天ゲルに包埋した活性炭ビーズ²⁷⁾を用いた。この活性炭ビーズは粉末炭の飛散性が改善されており、しかも粉末炭の優れた吸着能を保持した製剤である^{25)~27)}。

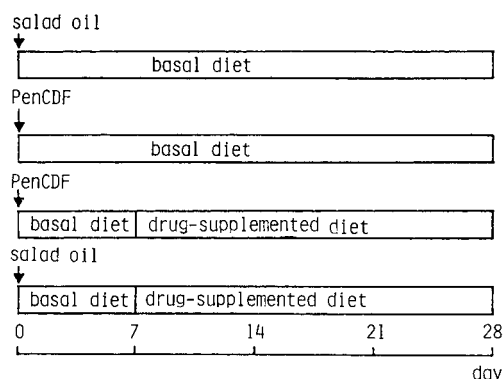


Fig. 3 Treatment with PenCDF and drug-supplemented diet

PenCDF の投与後 8 日目から 28 日目までの間に、非治療群 (basal diet group) では 1 日当たり投与量の 0.1~0.15 % の PenCDF が糞中に排泄され、この期間の総排泄量は 2~3 % であった。これに対し、スクアランおよび活性炭ビーズ投与群では非治療群の約 3 倍、流動パラフィンおよびコレステラミン投与群では約 2 倍の有意な排泄増加が認められた (Table 3)。

PenCDF などの多塩素化芳香族炭化水素をラットに投与すると、体重の増加抑制、肝の肥大および胸腺の萎縮が認められる⁴²⁾⁵²⁾。体重の増加抑制は各種動物にみられる現象で、これによる体消耗は毒性のよい指標となる。また肝の肥大はリビドの蓄積を伴い、特にラットでは著しい脂肪肝を惹起する。胸腺の萎縮は免疫能の低下をもたらすので、油症患者で見られる細気管支などの感染症と相通ずる毒性と思われる。本研究の目的は前述のように、油症の治療法の確立であり、薬物の排泄促進作用そのものよりも、それによって有機塩素化合物の毒性を軽減できるか否かに興味を持たれる。そこで、上述した毒性を指標にして、各薬物の治療効果の判定を行った。

非治療群では対照群に比べて、体重増加は約 50 % に抑制された。この毒性指標は、いずれの薬物を用いた治療群においても改善されなかった。使用した薬物は 3 週間の投与によって PenCDF の排泄を促進させたとはいえ、その量は投与量の 4~9 % に過ぎず (Table 3)、薬物投与を終了した 28 日目においても、なお肝には投与量の約 40 % の PenCDF が存在した。つまり、この程度の排泄増加では体重の増加抑制を改

Table 3 Effects of the drugs on fecal excretion of PenCDF for 3 weeks in rats

Experiments	Dietary treatment	
	Basal	Supplemented
	(% of dose)	
Squalane ⁴⁵⁾	3.17±0.32 (1.0)	9.07±0.80* (2.9)
Paraffin ¹⁵⁾	2.31±0.39 (1.0)	4.98±0.35* (2.2)
Cholestyramine ¹⁵⁾	1.98±0.26 (1.0)	3.62±0.53* (1.8)
Charcoal ⁴⁴⁾	1.96±0.12 (1.0)	5.44±0.25* (2.8)

Each value represents the mean±S.E. of 3 or 4 rats, and relative ratio to individual basal group in parenthesis.

*Significantly different from individual basal group (p<0.05)

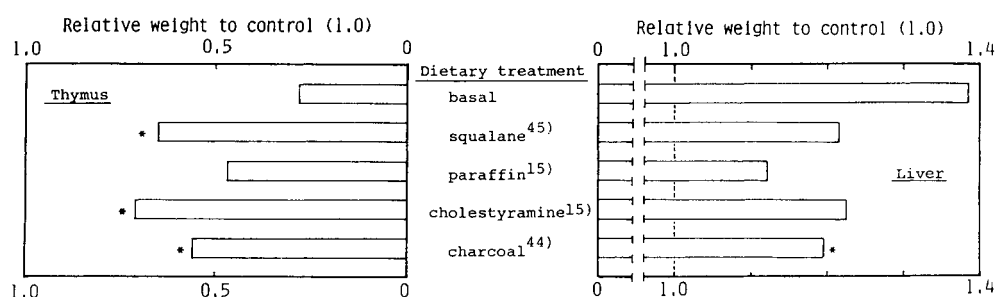


Fig. 4 Summary of effects of the drugs on toxicity of PenCDF in rats

* Significantly different from basal diet group ($p < 0.05$)**Table 4** Effect of paraffin and squalane on fecal excretion and tissue distribution of PenCDF in rats at simultaneous administration.

	Fecal excretion (days after dosing)			Tissue distribution		Blood
	0 - 1	1 - 2	2 - 6	Liver	Adipose	
PenCDF dissolved in salad oil	28.62±3.09 (1.0)	1.91±0.26	0.76±0.03	63.26±2.87	0.11±0.03	0.47±0.05
Paraffin	63.81±1.82 (2.2)	2.19±0.29	0.65±0.04	32.90±1.12	0.05±0.01	0.16±0.01
Squalane	85.50±1.01 (3.0)	1.10±0.24	0.66±0.01	10.75±0.98	0.03±0.01	0.24±0.05

Each value represents the mean±S.E. of 4 rats and the relative ratio to PenCDF-salad oil group in parenthesis.

Table 5 Fecal excretion of paraffin and squalane in rats after oral administration

	Days after dosing				Total excretion
	0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	
Paraffin	66.47±4.38	N.D.	% of dose N.D.	—	66.47±4.38
Squalane	86.99±0.85	5.83±1.66	0.17±0.05	N.D.	93.02±1.74

Each value, represents the mean±S.E. of 4 rats.
N.D., not detectable.

善させるには至らないと考えられる。

一方、臓器重量の変化には明らかな改善が認められた。28日目において、非治療群の肝は対照群の約1.4倍に肥大し、胸腺は約1/4に萎縮したのに対し、治療群では、いずれの薬物を用いた場合も、肝肥大は軽減される傾向を示し、胸腺萎縮は、流動パラフィン群を除いて、有意に改善された (Fig. 4)。これらの結果は、高蓄積性の多塩素化芳香族炭化水素の排泄を促すことで、その毒性の軽減が可能であることを示唆しており、油症患者に残存する PCB や PCDF を体外へ追

い出すことが根本的な治療法の1つであるとの予想を裏付けるものである。

排泄促進メカニズム

3週間の治療実験では、すべての薬物を Fig. 3 に示す条件で与えたにも関わらず、PenCDF の排泄促進効果には若干の差が生じた。このことは、薬物の PenCDF 再吸収抑制の能力またはその機構に差があるためと考えられる。

スクアランは、コレステロール生合成の中間体とし

て知られるスクアレンを接触還元して得られる炭素数 30 の飽和炭化水素であり、流動パラフィンも炭素数 15~20 の n-alkane の混合物である。これらは油状の物質で、小腸腔内に排出された PenCDF を溶解、保持することで、その再吸収を抑制すると考えられる。また管腔側を脂溶性環境に保って、exsorption 自身を促進させている可能性がある。前者の機構を確認するため、両薬物に PenCDF を溶解して、ラットに 0.2 mg/kg あて 1 回経口投与し、その糞中排泄量と毒性を、PenCDF をサラダ油に溶かして与えた場合と比較した²⁹⁾。

投与後 1 日目の PenCDF の糞中排泄量は、流動パラフィン溶解群でサラダ油溶解群の約 2 倍、スクアレン溶解群で約 3 倍であり、これら炭化水素に PenCDF を溶解して投与することで、その排泄量は著明に増加した (Table 4)。なお、この時点で排泄される PenCDF は未吸収分と考えられる。また、1 日目の流動パラフィンおよびスクアレンの糞中排泄量、すなわち未吸収量は、それぞれ投与量の約 67%, 約 87% で (Table 5) で、いずれもかなり吸収されにくく、その吸収されにくさに比例して両群の PenCDF の排泄量が増加することが判明した。

投与後 5 日目に屠殺して、各群の臓器重量を測定したところ、サラダ油溶解群では対照群と比べて、肝は約 1.3 倍に肥大し、そのリポド量は約 1.4 倍に増加した。さらに脾臓と胸腺では有意な萎縮が認められた。流動パラフィン溶解群では肝肥大やリポドの増加の程度はサラダ油溶解群に比べて軽いものであった。スクアレン溶解群では肝肥大を除いて、他の毒性の発現は認められなかった (Table 6)。

PenCDF をラットに投与する場合、肝肥大や胸腺

萎縮は 10 μ g/kg の 1 回腹腔内投与で発現するのに対し、AHH や DT-ジアホラーゼの誘導は 1 μ g/kg の用量で認められる⁴²⁾。また前述のように、ラットでこれらの酵素誘導の程度は、よく毒性の強さに平行する。すなわち PCB や PCDF の毒性を評価する場合、臓器重量の変化よりも、この MC 型の酵素誘導状況を見る方がより高感度である。そこで投与後 5 日目に屠殺した際に、肝 9,000 $\times$ g 上清を調製し、上記の薬物代謝酵素の活性を測定した。その結果、Fig. 5 に示すように、肝リポド量とともに、チトクローム P-450 含量、AHH および DT-ジアホラーゼ活性は PenCDF の肝中レベルと高い相関性が認められた。このことは、PenCDF を溶解保持してその排泄を促進し、その結果、肝残存量を低下させることで PenCDF の毒性を軽減することができることを強く示唆している。

コレステラミンはビニルベンゼンとスチレンの copolymer に 4 級アンモニウム基が導入された構造を持つ陰イオン交換樹脂で、内因性物質の中では胆汁酸に対して、とりわけ強い吸着能を有しているが¹²⁾、同時に PCB や PCDF などにも直接的吸着能力を持つことも推定される。一方、活性炭は自殺目的や誤飲、誤投与などによって過剰に摂取された薬毒物の吸着除去の目的で使用されている。また最近では、一旦、吸収されて体循環に入った薬毒物に対しても、活性炭を繰り返し投与することによって、胆汁を介し、または exsorption により腸管に排出された部分を逃がさず吸着除去するという、いわゆる腸管透析の観点からも注目されている¹⁾²⁾²²⁾²³⁾³⁸⁾。その吸着能力は極性の低い脂溶性の物質に対して、とりわけ強い。これらのことから、両薬物の PenCDF 排泄促進効果の差は、PenCDF の吸着性の差によることが考えられたので、

Table 6 Effect of paraffin and squalane on tissue weight and liver lipid in rats simultaneous administration with PenCDF

	Tissue weight (g/100 g B.W.)			Liver lipid (mg/g liver)
	Liver	Spleen	Thymus	
Control	3.90 $\pm$ 0.06 (100)	0.401 $\pm$ 0.008 (100)	0.297 $\pm$ 0.023 (100)	40.85 $\pm$ 0.97 (100)
PenCDF dissolved in salad oil	5.10 $\pm$ 0.11* (131)	0.335 $\pm$ 0.008* (84)	0.147 $\pm$ 0.026* (50)	55.23 $\pm$ 2.97* (135)
Paraffin	4.71 $\pm$ 0.10* (121)	0.333 $\pm$ 0.011* (83)	0.160 $\pm$ 0.024* (54)	47.25 $\pm$ 0.59* (116)
Squalane	4.45 $\pm$ 0.08*§ (114)	0.394 $\pm$ 0.031 (98)	0.197 $\pm$ 0.042 (66)	42.56 $\pm$ 0.76§ (104)

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 4 rats, and the relative ratio to control in parenthesis.

*Significantly different from control (p<0.05)

§Significantly different from PenCDF-salad oil group (p<0.05).

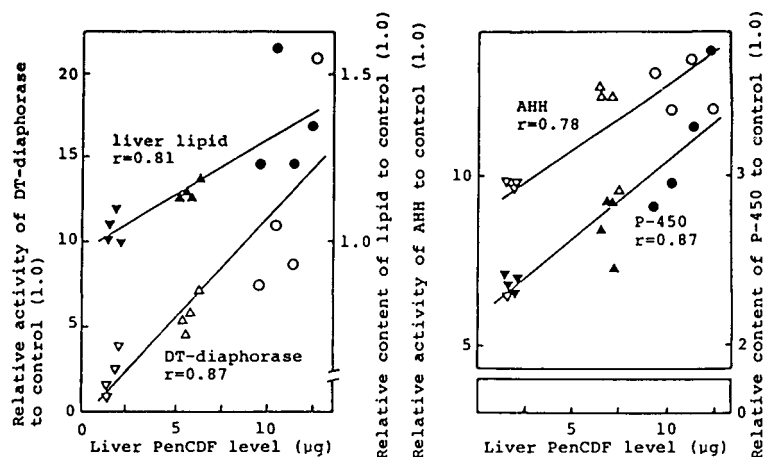


Fig. 5 Liver PenCDF level-response curves for liver lipid and DT-diaphorase activity (left), and for AHH activity and cytochrome P-450 content (right)²⁹⁾

Thymus weight and liver lipid in control (mean $\pm$ S. D.) were 0.297 ± 0.046 mg/100 g body weight and 40.85 ± 1.94 mg/g liver, respectively.

The activities in control (mean $\pm$ S. D.) were cytochrome P-450 0.062 ± 0.06 nmol/mg protein, AHH 0.065 ± 0.012 nmol metabolite formed/min/mg protein, DT-diaphorase 0.174 ± 0.074 μ mol DCPIP reduced/min/mg/ protein.

($\bigcirc$ ●) salad oil groups; ($\triangle$ ▲) liquid paraffin groups; (∇ ▼) squalane groups

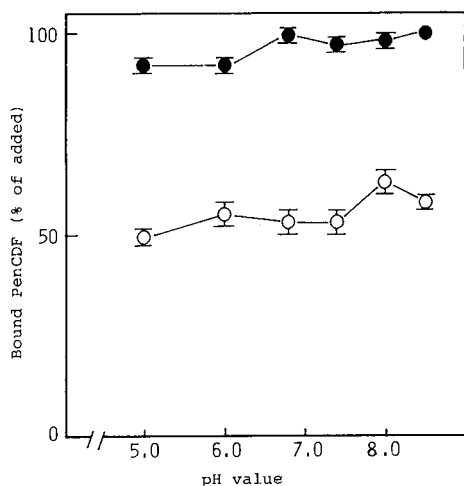


Fig. 6 Effect of activated charcoal beads and cholestyramine on the adsorption of PenCDF at various pH values

The percent binding was determined for 10 mg of adsorbent after equilibrated with 1 ml of buffer containing 0.1μ g PenCDF. Each point represents the mean $\pm$ S. E. of 3 experiments.

●● charcoal beads
○● cholestyramine

pH 5.0~8.5におけるPenCDFの吸着量を比較したところ、Fig. 6に示すように、いずれのpH値においても、コレステラミンは添加量の約50%のPenCDFを吸着したのに対し、活性炭ビーズはほぼ完全に吸着した。つまり、コレステラミンのPenCDF吸着は、脂溶性のco-polymer部分が担っていると思われるが、その関与は低く、むしろPenCDFのリンパ吸収に必要な胆汁酸を吸着することでPenCDFの再吸収を抑制すると考えられる。一方、活性炭ビーズはPenCDFに対して直接的に強い吸着能力を発揮するといえる。

コレステラミンの胆汁酸吸着能力は、共存物質によって低下することが示唆されている。例えば、0.1 M塩化ナトリウムや硫酸ナトリウム、1%ウシ血清アルブミン(BSA)をコール酸ナトリウムと共存させると、コレステラミンの吸着能力は約50%に低下する(Table 7)²⁵⁾。さらに腸液の組成に近い0.15 M塩化ナトリウム含有0.05 M炭酸緩衝液(pH 8.3~8.5)中で、中性脂肪のトリオレインまたは1%BSAの存在下、コール酸ナトリウムおよびデオキシコール酸ナトリウムを吸着する能力をコレステラミン、粉末活性炭、活性炭ビーズで比較したところ、いずれの場合も、活性炭ビーズはコレステラミンより

Table 7 Effects of various substances on the binding of cholale in water at 37°C²⁵⁾

Additive	% of adsorbed ^{a)}		
	Charcoal powder A	Charcoal beads mesh 28/48	Cholestyramine preparation
0.1 M NaCl	54±4	54±6	93±1
0.1 M NaCl	78±1	73±1	49±1
0.1 M Na ₂ SO ₄	79±2	75±1	39±1
2 mM salicylate	59±1	57±1	89±3
1% BSA	73±1	74±3	59±1
2 mM theophylline	50±3	48±3	94±1
2.4 mM triolein	20±4	52±3	82±8

^{a)} When an amount of preparation equivalent to 20 mg of adsorbent was equilibrated with 10 ml of 2 mM cholale in the presence and absence of an additive in water, pH 7.0–7.5. Mean±S.D. (of 2 or 3 determinations).

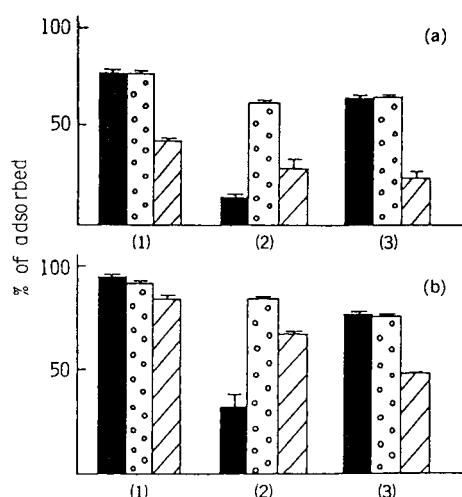


Fig. 7 Effects of triolein and BSA on the adsorption of (a) cholale and (b) deoxycholale at 37°C in bicarbonate buffer, pH 8.3–8.5²⁵⁾. The percent adsorbed was determined for an amount equivalent to 20 mg of adsorbent equilibrated with 10 ml of the buffer containing 20 μ mol of bile salt. (1) control; (2) in the presence of 2.4 mM triolein; (3) in the presence of 1% BSA. ■ charcoal powder A; ▨ beads A (mesh 28/48); ▨ cholestyramine preparation. The vertical bar represents the standard deviation of the mean of 2 or 3 determinations.

も吸着力が上回るといふ (Fig. 7)²⁵⁾。なお、Table 7, Fig. 7 において、粉末活性炭を寒天ゲルで包埋した活性炭ビーズは、粉末炭の吸着能力を上昇させる傾向にあることは特記すべきことである。

このように、無機イオンやタンパク、脂質などが共存する消化管において、コレステラミンの胆汁酸を吸着する能力は低下していると思われ、そうであれば PenCDF はリンパ吸収されやすくなる。一方、活性炭ビーズは PenCDF を直接的に吸着するばかりか、その再吸収に必要な胆汁酸をも吸着し、さらに、その作用は消化管においても、コレステラミンほどには低下しないと考えられる。

以上の結果から、3 週間の治療実験に用いた薬物の PenCDF 排泄促進メカニズムは、小腸内の PenCDF の再吸収抑制であり、各薬物の効果の差は、スクアランと流動パラフィンの場合には、それら自身の吸収されやすさの差、コレステラミンと活性炭ビーズの場合には、再吸収抑制機構の差に基づくことが示された。なお、小腸管腔側の PenCDF が系外に除かれることで、血液から腸管腔内への exsorption の促進も生じると考えられ、これも PenCDF の排泄促進の重要な一因と思われる。

長期投与実験

3 週間の投与で排泄促進効果が特に優れたスクアランと活性炭ビーズについては、12 週間の長期投与を行った²⁹⁾⁴³⁾。これらの薬物を臨床応用する場合、その使用は長期に及ぶことが予想されるため、長期連用による効果の持続性と薬物自体の安全性の検討が必要と考えたからである。なお、Richter らは、すでに蓄積性はあるが低毒性の 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl を投与したラットを 8%スクアラン混合餌で 17 週間処理し、その有意な糞中排泄促進効果を報告しているが³⁷⁾、筆者らは前述のように、その毒性軽減効果をも明らかにすべく、この実験を行った。その際の実験条件を Fig. 8 に示す。つまり、

5週齢のラットに PenCDF を 0.1 mg/kg あて 2 回経口投与し、2 回目投与後 8 日目（1 回目投与後 13 日目）から、スクアランあるいは活性炭ビーズの 1 % (w/w) または 5 % (w/w) 混合餌を 12 週間にわ

たって与えた。

Fig. 9 に示すように、治療群では薬物投与を開始した直後から、期間を通じてほぼ一定の PenCDF の排泄増加が認められ、治療期間の総排泄量は両薬物と

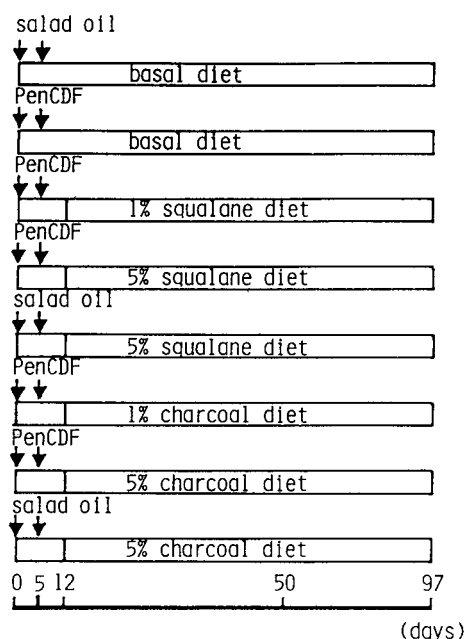


Fig. 8 Treatment with PenCDF, squalane and activated charcoal beads

Table 8 Effect of squalane²⁹⁾ and activated charcoal beads⁴³⁾ on fecal excretion of PenCDF

Dietary treatment	PenCDF in feces 13-97 days (% of dose)
Basal	4.59±0.08 (1.0)
1 % squalane	10.38±0.30* (2.3)
5 % squalane	21.63±0.53*§ (4.7)
1 % charcoal	9.12±0.45* (2.0)
5 % charcoal	17.41±0.60*† (3.8)

Each value represents the mean±S.E. of 3 (basal group) or 4 rats, and relative ratio to basal group.

*Significantly different from basal group (p<0.05)

§Significantly different from 1 % squalane group (p<0.05)

†Significantly different from 1 % charcoal group (p<0.05).

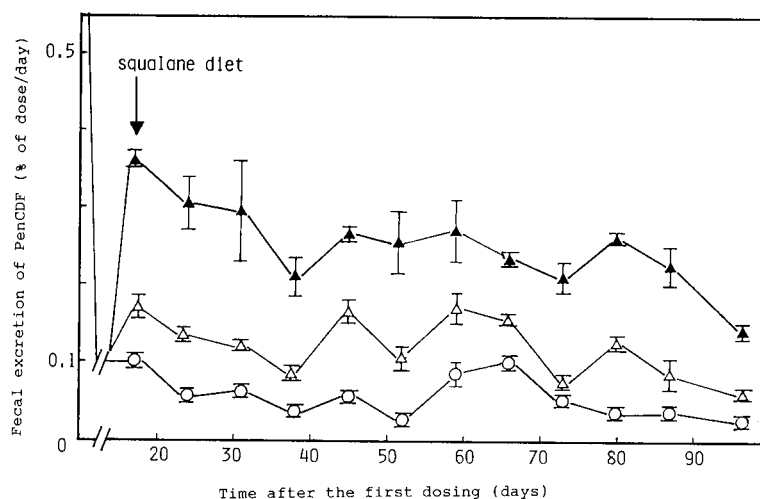


Fig. 9 Effect of squalane on fecal excretion of PenCDF

○—○ basal diet
△—△ 1% squalane diet
▲—▲ 5% squalane diet

Table 9 Effect of squalane and activated charcoal beads on distribution of PenCDF in rats^{29),43)}

	At day 12	At day 97				
		Basal diet	1 % squalane	5 % squalane	1 % A.C.	5 % A.C.
Liver	66.06±2.06	48.56±1.72	36.16±0.96*	27.19±3.67*§	40.28±1.12*	28.85±1.35**
Blood	0.44±0.04 (7.96±0.71)	0.33±0.07 (2.80±0.57)	0.16±0.01* (1.33±0.11)*	0.12±0.01*§ (0.94±0.03)*§	0.29±0.04 (2.39±0.42)	0.15±0.01** (1.23±0.09)**
Spleen	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Thymus	N.D.	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	N.D.
Lung	N.D.	0.02±0.01	0.01±0.00	N.D.	N.D.	N.D.
Kidney	N.D.	0.01±0.00	N.D.	N.D.	0.01±0.00	N.D.
Adipose tissue	0.05±0.01	0.21±0.05	0.11±0.02	0.10±0.03	0.09±0.01*	0.09±0.01*
Small intestine	0.05±0.01	0.69±0.22	0.27±0.04	0.31±0.05	0.59±0.16	0.43±0.06
Skin	1.01±0.15	2.00±0.53	1.35±0.41	1.32±0.24	1.35±0.33	0.77±0.06*

Each value represents the mean of percent of dose ± S.E. of 3 (basal diet group at day 97) or 4 (other groups) rats, and parts per billion in parenthesis.

* Significantly different from basal diet group ($p < 0.05$).

§ Significantly different from 1% squalane diet group ($p < 0.05$).

† Significantly different from 1% A.C. diet group ($p < 0.05$).

Abbreviation used is; A.C., activated charcoal. N.D., not detectable.

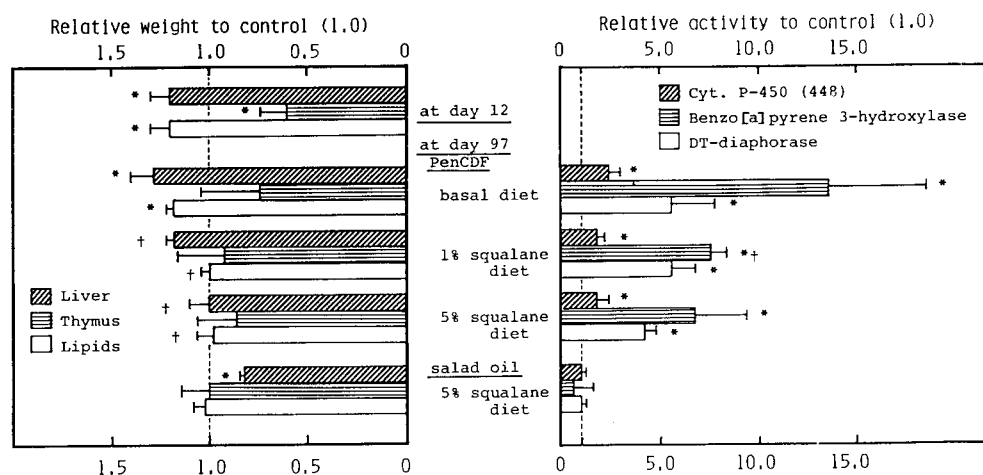


Fig. 10 Effect of squalane on liver enzyme activities (right), tissue weight and liver lipid content (left) in rats. The activities in control (mean±S.D.) were: Cytochrome P-450 (cyt. P-450) 0.099 ± 0.030 nmole/mg protein, Benzo [a] pyrene 3-hydroxylase 0.035 ± 0.004 nmole metabolite formed/min./mg protein, DT-diaphorase 0.110 ± 0.086 μ mole DCPIP formed/min. /mg protein.

The weight of tissues (g/100 b. w.) and liver lipid (mg/g liver) in control were: liver 5.107 ± 0.428 (at day 12), 2.957 ± 0.300 (at day 97), thymus 0.272 ± 0.022 (at day 12), 0.126 ± 0.022 (at day 97), liver lipid 45.42 ± 4.61 (at day 12), 46.74 ± 4.30 (at day 97).

* Significantly different from control ($p < 0.05$)

† Significantly different from PenCDF-basal diet group ($p < 0.05$)

も、1%投与群で非治療群の約2倍、5%投与群で1%投与群の、さらに約2倍であった (Table 8)。

両薬物の排泄促進効果は、各治療群の肝中 PenCDF 量に反映された (Table 9)。つまり、肝中 PenCDF 量は、両薬物の用量に依存して低下しており、こ

の減少分は、各群の排泄増加分とほぼ一致した。このことから、両薬物は投与期間にほぼ比例して PenCDF の排泄を促進し、PenCDF がもっとも多く残留する肝におけるレベルを低下させることが示された。また、PenCDF の血中レベルも両薬物の用量に依存し

て低下し (Table 9), このことは薬物の毒性軽減効果を考える上で興味深い。

スクアラン群の臓器重量と薬物代謝酵素活性を Fig. 10 に示す。治療開始直前の 12 日目において、肝は対照群の約 1.2 倍に肥大し、リビド量も約 1.2 倍に増加した。さらに胸腺は約 40 % の萎縮が認められた。この毒性は 12 週間後もなお維持された。一方、スクアラン群では、いずれの毒性の指標も、ほぼ完全に改善された。また、非治療群では、1 回目投与から 97 日目においても、チトクローム P-450 含量は対照群の約 2 倍、AHH 活性は約 13 倍、DT-ジアホラーゼ活性は約 6 倍と、依然として高い活性が認められたのに対し、スクアラン群では、これらの誘導率は低下する傾向を示した。もっとも、スクアラン群のこれらの酵素活性は、対照群やスクアラン単独投与群に比べて有意に高かった。これは 97 日目において、スクアラン群の肝には投与量の 27~36 % の PenCDF が残存したことによると考えられ、したがって治療期間をさらに延長すれば、これらの誘導は、いずれ対照群のレベルに低下するものと期待される。なお、活性炭ビーズ

群の毒性評価の結果も、スクアラン群のそれと、ほぼ同様であった。

両治療群の体重増加量は、対照群と非治療群の中間値を示し、PenCDF による発育抑制に対しても、これらの薬物は改善の傾向を示した。

これらの治療効果の検討に並行して、スクアランの安全性を検討する目的で、スクアラン自身の糞中排泄量と臓器分布量を測定した。Table 10 に示すように、治療 2, 6, 11 週目において、その週に摂取したと考えられるスクアランが、ほぼ完全に糞から回収された。また Table 11 に示すように、スクアランは小腸および肝から有意な量が検出されたものの、その量は摂取量に比べて、きわめて微量であった。つまり、スクアランは小腸粘膜を通過しにくく、ほとんど吸収されないことが示された。

Fig. 10 で示したように、スクアラン投与により肝重量の有意な低下がみられたが (活性炭ビーズの投与によっても全く同程度の低下がみられた)、これらの肝細胞の光学顕微鏡による病理組織学的検査の結果では、スクアラン群、活性炭ビーズ群とも特に変化は認められなかった。さらに、スクアラン、活性炭ビーズの単独投与群の発育状況は対照群のそれと比べて、何ら遜色はなかった。

一方、極本らは PCDF 混合物を投与したサルに、スクアランを加えた蒸しパンを 1 匹 1 日当たりスクアラン 8 g となるようにして約 4 カ月与え、その治療効果を観察している。その結果、体重の回復傾向がみられるとともに、血清トリグリセリド値、肝臓 PCDFs 蓄積量に若干の改善がみられたという¹⁶⁾。さらに昭和

Table 10 Fecal excretion of squalane

Weeks	1 % diet	5 % diet
% of intake		
2	103.50±2.50	100.18±0.85
6	106.13±3.33	99.45±0.82
11	97.60±0.97	97.33±1.77

Each value represents the mean±S.E. of 4 rats.

Table 11 Distribution of squalane in rat tissues.

	PenCDF basal diet	PenCDF 1 % squalane	PenCDF 5 % squalane	salad oil 5 % squalane
Total amount of squalane ingested with the diet (g)				
	0	19.61±1.12	98.86±5.54	109.71±6.13
Amount of squalane in the tissues (mg/tissue)				
Liver	N.D.	0.51±0.10	0.80±0.09	0.68±0.04
Blood	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Spleen	N.D.	N.D.	N.D.	0.02±0.00
Thymus	N.D.	N.D.	0.01±0.00	0.04±0.02
Lung	N.D.	0.01±0.00	0.03±0.01	0.07±0.03
Kidney	N.D.	N.D.	0.01±0.00	0.01±0.00
Adipose tissue	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Small intestine	N.D.	0.95±0.10	1.70±0.24	1.87±0.16
Skin	N.D.	0.17±0.06	0.74±0.39	—

Each value represents the mean±S.E. of 3 (PenCDF-basal diet group) or 4 (other groups) rats. N.D., not detectable.

61年6月の油症治療研究班会議において、肝臓以外にも腎臓、心臓でPCDFs蓄積量(肝臓の1/1000)がそれぞれ30%, 38%低下し、肝臓の薬物代謝酵素活性も非治療群に比べ若干の減少がみられると報告されている。

今後、さらに長期連用した場合のスクアランおよび活性炭ビーズの安全性など、検討されるべき点はあるものの、本研究で得られた結果で見る限り、両薬物とも高毒性のPenCDFの有用な糞中排泄促進剤であることが結論された。

お わ り に

スクアラン、流動パラフィン、コレステラミンおよび活性炭は、これまでに数種の有機塩素化合物の排泄を促進することが知られていたが、これらの検討で用いられた有機塩素化合物は比較的、低毒性で、また脂肪組織に蓄積するものであった。一方、本研究で、これらの薬物は、肝に局在するPenCDFの体外排泄をも促進すること、さらに排泄促進がPenCDFの毒性軽減につながることを示すことができた。とくにスクアランと活性炭ビーズは、排泄促進効果がより顕著で、しかも安全性の高い薬物であることが示された。ゆえに、これらの薬物は油症の治療薬として有望と考えられる。ただし、これらの薬物は、脂肪酸や脂溶性ビタミンなどの生体に必須の脂質の吸収を抑制する可能性があるため、臨床応用の際には、種々の臨床試験を併用して安全性を確認してゆく必要があると思われる。

文 献

- 1) Berg, M. J., Berlinger, W. G., Goldberg, M. J., Spector, R. and Johnson, G. F.: Acceleration of the body clearance of phenobarbital by oral activated charcoal. *N. Engl. J. Med.* 307: 642-644, 1982.
- 2) Berlinger, W. G., Spector, R., Goldberg, M. J., Johnson, G. F., Quee, C. K., Berg, B. S. and Berg, M. J.: Enhancement of theophylline clearance by oral activated charcoal. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33: 351-354, 1983.
- 3) Birnbaum, L. S., Decad, G. M. and Matthews, H. B.: Disposition and excretion of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 342-352, 1980.
- 4) Birnbaum, L. S., Decad, G. M., Matthews, H. B. and McConnell, E. E.: Fate of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in the monkey. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 57: 189-196, 1981.
- 5) Boylan, J. J., Egle, J. L. and Guzelian, P. S.: Cholestyramine: Use as a new therapeutic approach for chlordecone (Kepone) poisoning. *Science* 199: 893-895, 1978.
- 6) Busbee, D. L., Yoo, J. -S. H., Norman, J. O. and Joe, C. O.: Polychlorinated biphenyl uptake and transport by lymph and plasma components. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 179: 116-122, 1985.
- 7) Chen, P. H., Gaw, J. M., Wong, C. K. and Chen, C. J.: Levels and gas chromatographic patterns of polychlorinated biphenyls in the blood of patients after PCB poisoning in Taiwan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 325-329, 1980.
- 8) Decad, G. M., Birnbaum, L. S. and Matthews, H. B.: Distribution and excretion of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in C57 BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59: 564-573, 1981.
- 9) Eyanagi, R., Shigematsu, H., Yoshida, K. and Yoshimura, H.: Enhancement of sulfanilamide N⁴-hydroxylase activity in kidney and liver microsomes of rats by pretreatment with 3-methylcholanthrene type-polychlorinated biphenyl. *J. Pharmacobio-Dyn.* 5: 853-858, 1982.
- 10) Eyanagi, R., Shigematsu, H., Yoshida, K. and Yoshimura, H.: Metabolism and nephrotoxicity of phenacetin and sulfanilamide. *J. Pharmacobio-Dyn.* 8: 95-105, 1985.
- 11) Goldstein, J. A., Hickman, P., Bergman, H., McKinney, J. D. and Walker, M. P.: Separation of pure polychlorinated biphenyl isomers into two types of inducers on the basis of induction of cytochrome P-450 or P-448. *Chem.-Biol. Interact.* 17: 69-87, 1977.
- 12) Gustafsson, B. E., Angelin, B., Einarsson, K. and Gustafsson, J. -A.: Influence of cholestyramine on synthesis of cholesterol and bile acids in germfree rats. *J. Lipid Res.* 19: 972-977, 1978.
- 13) Hori, S., Obana, H., Tanaka, R. and Kashimoto, T.: Comparative toxicity in rats of polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated quaterphenyls (PCQs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) present in rice oil causing Yusho. *Eisei Kagaku* 32: 13-21, 1986.
- 14) 堀伸二郎, 尾花裕孝, 田中涼一, 榎本 隆, 高松 誠: サルにおける油症PCDFsの生体内分布とその致死量. 第11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集, p.122-124, 1984.
- 15) Kamimura, H., Naganuma, T., Oguri, K. and Yoshimura, H.: Stimulating effect of liquid paraffin and cholestyramine on fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats. *Eisei Kagaku* 32: p-19, 1986.
- 16) 榎本 隆, 堀伸二郎, 尾花裕孝: PCDFs中毒サルに対する13-cis Retinoic Acidおよびスクアランの治療に関する研究. 福岡医誌 76: 190-195, 1985.
- 17) Kunita, N., Hori, S., Obana, T., Nishimura,

- H., Kashimoto, T. and Ikegami, N.: Biological effect of PCBs, PCQs and PCDFs present in the rice oil causing Yusho and Yu-Chen. *Environ. Health Perspect.* 59: 79-84, 1985.
- 18) Kuroki, H. and Masuda, Y.: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho, *Chemosphere* 7: 771-777, 1978.
- 19) Kuroki, H., Masuda, Y., Yoshihara, S. and Yoshimura, H.: Accumulation of polychlorinated dibenzofurans in the livers of monkeys and rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 18: 387-392, 1980.
- 20) Kuroki, J., Koga, N. and Yoshimura, H.: High affinity of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsomes of rats. *Chemosphere* 15: 731-738, 1986.
- 21) 黒木 淳, 中嶋 寛, 古賀信幸, 吉村英敏: 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran の肝細胞内取り込み. 第12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集 p.106-108, 1985.
- 22) Lalonde, R. L., Deshpande, R., Hamilton, P. P., McLean, W. M. and Greenway, D. C.: Acceleration of digitoxin clearance by activated charcoal. *Clin. Pharmacol. Ther.* 37: 367-371, 1985.
- 23) Masuda, Y. and Yoshimura, H.: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance: A Review. *Amer. J. Ind. Med.* 5: 31-44, 1984.
- 24) Nagayama, J., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with Yusho. *Food Cosmet. Toxicol.* 15: 195-198, 1977.
- 25) 中野尚美: 経口用活性炭製剤に関する研究—寒天包埋活性炭ビーズによる内因性及び外因性有毒物質の消化管吸着除去. 銀杏学園紀要 9: 11-27, 1985.
- 26) Nakano, N. I., Funada, S., Honda, Y. and Nakano, M.: In vitro adsorption characteristics of bile salt anions by activated charcoal beads for oral administration. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 4096-4102, 1984.
- 27) Nakano, N. I., Shimamori, Y., Umehashi, M. and Nakano, M.: Preparation and drug adsorption characteristics of activated charcoal beads suitable for oral administration. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 699-707, 1984.
- 28) Nishizumi, M.: Acute toxicity of polychlorinated dibenzofurans in CF-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45: 209-212, 1978.
- 29) Oguri, K., Kamimura, H., Koga, N. and Yoshimura, H.: Mechanisms for stimulated fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats by treatment with squalane and liquid paraffin. 6th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, program and abstracts, p. 63, 1986.
- 30) Oishi, S., Morita, M. and Fukuda, H.: Comparative toxicology of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43: 13-22, 1978.
- 31) Ozawa, N., Watabe, T., Yoshimura, H., Koga, N. and Shudo, K.: Effect of liver S9 from 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl-pretreated rats on the mutagenic activity of the various carcinogens toward salmonella typhimurium TA 98. *J. Pharmacobio-Dyn.* 8: 199-205, 1985.
- 32) Pluss, N., Poiger, H., Schlatter, C. and Buser, H. R.: The metabolism of some pentachlorodibenzofurans in the rat. *Xenobiotica* 17: 209-216, 1987.
- 33) Pond, S., Jacobs, M., Marks, J., Garner, J., Goldshlager, N. and Hansen, D.: Treatment of digitoxin overdose with oral activated charcoal. *The Lancet* 21: 1177-1178, 1981.
- 34) Rappe, C., Buser, H. R., Kuroki, H. and Masuda, Y.: Identification of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 8: 259-266, 1979.
- 35) Richter, E., Fichtl, B. and Schäfer, S. G.: Effects of dietary paraffin, squalane and sucrose polyester on residue disposition and elimination of hexachlorobenzene in rats. *Chem. -Biol. Interact.* 40: 335-344, 1982.
- 36) Richter, E., Lay, J. P., Klein, W. and Korte, F.: Paraffin-stimulated excretion of 2, 4, 6, 2', 4'-pentachlorobi (¹⁴C) phenyl by rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50: 17-23, 1979.
- 37) Richter, E., Schäfer, S. G. and Fichtl, B.: Stimulation of the faecal excretion of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl in rats by squalane. *Xenobiotica* 13: 337-343, 1983.
- 38) Traeger, S. M. and Haug III, M. T.: Reduction of diazepam serum half life and reversal of coma by activated charcoal in a patient with severe liver disease. *Clin. Toxicol. Ther.* 24: 329-337, 1986.
- 39) 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. *Food Cosmet. Toxicol.* 8: 625-633, 1970.
- 40) Williams, R. T., Millburn, P. and Smith, R. L.: The influence of enterohepatic circulation on toxicity of drugs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 123: 110-124, 1965.
- 41) Wilson, K. A. and Cook, R. M.: Use of activated carbon as antidote for pesticide poisoning in ruminants. *J. Agr. Food. Chem.* 18: 437-440, 1970.
- 42) Yoshihara, S., Nagata, K., Yoshimura, H., Kuroki, H. and Masuda, Y.: Inductive effect on hepatic enzymes and acute toxicity of individual

polychlorinated dibenzofuran congeners in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59: 580-588, 1981.

43) Yoshimura, H., Kamimura, H., Koga, N., Oguri, K., Honda, Y. and Nakano, M.: in preparation.

44) Yoshimura, H., Kamimura, H., Oguri, K., Honda, Y. and Nakano, M.: Stimulating effect of activated charcoal beads on fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats. *Chemosphere* 15: 219-227, 1986.

45) 吉村英敏, 神村英利, 小栗一太, 佐伯清太郎: 高毒性 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran のラット糞中排泄に及すスクアランの効果. 福岡医誌 76: 184-189, 1985.

46) Yoshimura, H., Kuroki, J., Koga, N., Kuroki, H., Masuda, Y., Fukasaku, N. and Hasegawa, M.: High accumulation of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran to hepatic microsomes of rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 7: 414-419, 1984.

47) Yoshimura, H. and Yamamoto, H.: A novel route of excretion of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 13: 681-688, 1975.

48) 吉村英敏, 山本弘明, 米沢和明: PCB の代謝

に関する研究 (第 5 報), 2, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニル代謝物の胆汁中排泄について. 福岡医誌 65: 12-16, 1974.

49) 吉村英敏, 山本弘明, 米沢和明: 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. 福岡医誌 66: 555-562, 1975.

50) Yoshimura, H., Ozawa, N. and Saeki, S.: Inductive effect of polychlorinated biphenyls mixture and individual isomers on the hepatic microsomal enzymes. *Chem. Pharm. Bull.* 26: 1215-1221, 1978.

51) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Koga, N., Nagata, K., Wada, I., Kuroki, J. and Hokama, Y.: Inductive effect on hepatic enzymes and toxicity of congeners of PCBs and PCDFs. *Environ. Health Perspect.* 59: 113-119, 1985.

52) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N. and Miki, M.: Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320: 179-192, 1979.

53) 吉村英敏ら: サルの PCB 中毒症に関する研究 (第 2 報). 福岡医誌 72: 155-184, 1981.

PCDFs 中毒サルに対するスクアラン の治療に関する研究

大阪府立公衆衛生研究所

堀 伸 二 郎・尾 花 裕 孝

摂南大学薬学部

梶 本 隆

Studies on Therapeutic Effect of Squalane on Symptoms of PCDFs Poisoning in Monkeys

Shinjiro HORI, Hirotaka OBANA

*Osaka Prefectural Institute of Public Health,
Higashinari-ku, Osaka, Japan*

Takashi KASHIMOTO

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University,
Nagao-togecho, Hirakata 573-01, Japan*

Monkeys were administered polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), 20 μ g/monkey/day, 3 times a week for 3 weeks, observed for Yusho symptoms for the following 2 weeks and then treated with squalane, 8 g/monkey/day, for up to 20 weeks for observation of its therapeutic effect.

1) The PCDFs levels in blood on the monkeys treated with PCDFs were decreased by squalane-treatment.

2) The amount of PCDFs in liver, kidney and heart on the monkeys treated with squalane were 80 %, 70 % and 62 %, respectively, of those of the monkeys treated with PCDFs alone.

3) The increase in drug-metabolizing enzyme activities of hepatic microsome and histopathological alterations (the formation of cytoplasmic vacuoles, atrophy and transformation of nuclear) caused by PCDFs were suppressed by squalane treatment.

油症原因油中には PCBs 以外に PCDFs や PCQs が存在する。著者らはこれらの油症型 PCBs, PCQs および PCDFs をサルおよびラットに経口投与し、その毒性を比較検討してきた^{1)~3)6)7)}。その結果、PCDFs はサルおよびラットに対し PCBs や PCQs よりもはるかに強い毒性を示すと共にサルに油症症状を発現させることなどから³⁾⁶⁾⁷⁾、油症の主原因物質は PCDFs であると結論づけられた。

一方、この PCDFs は患者体内に今なお微量ながら残留している。そこで油症の治療法としてサルを用いてスクアランによる体内残留 PCDFs の除去および毒性軽減効果を検討してきた。その結果スクアランは、PCDFs による体重減少および血清トリグリセライド

値上昇に若干の治療効果が認められることを前報⁵⁾で報告した。

そこで今回著者らは、スクアランによる血中および臓器中の PCDFs 濃度および肝薬物代謝酵素活性、肝臓の病理組織に及ぼす影響を検討した。

実 験 方 法

1. 試料および試薬

PCDFs: 使用溶熱媒体 (KC-400) より宮田ら⁸⁾の方法で分離精製した。

スクアラン (2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyl-tetracosane): 和光純薬より入手した。

アルミナ: メルク社製、中性、活性 1 を含水率

0.8%に調製した。

2. 実験動物

雌のフィリピン産カニクイザル9匹(体重、2.7~2.9 kg)を空調を施した飼育室で別々のケージに入れ、3カ月間餌付、検疫を行った後実験に供した。飼育飼料としてバナナまたはリンゴ、特製の蒸しパン(50 g/day)、市販のサル用固型飼料(70 g/day)を与えた。なお、水は自由に摂取させた。

(1) 投与試料の調整

PCDFs 20 μ g/50 μ l になるようにオリーブ油で調製した。スクアランはスクアラン 8 g を含む蒸しパン(50 g)を研究室で作製した。

(2) 投与方法

9匹のサルをPCDFs単独投与群(3匹)、PCDFs+スクアラン投与群(3匹)および対照群(3匹)に分けた。

PCDFs単独投与群およびPCDFs+スクアラン投与群にPCDFs 20 μ g/monkey/dayを週3回、3週間バナナまたはリンゴに注入して投与した。次に、PCDFs+スクアラン投与群には、PCDFs投与終了後2週間目よりスクアラン 8 g/monkey/day(蒸しパンに混入)を実験終了(約140日間)まで与えた。対照群は実験期間を通じ通常の飼料を与えた。なお、血中PCDFs濃度を観察するためPCDFs投与開始後1カ月毎に大腿部動脈より採血した。

3. 薬物代謝酵素活性の測定

肝ミクロゾームの調製：得られた肝試料を氷冷した1.15% KCl溶液で洗った後細切し、4倍量の1.15% KCl溶液を加えてPotter-Elvehjem型ガラスステフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。これを10,000 $\times$ g、15分間遠心を2回行う。この上清を78,000 $\times$ g、90分間超遠心して沈査を取りミクロゾー

ム分画とし、0.15 M ショ糖溶液に懸濁した。

Cyt. P-450量の測定⁹⁾：常法にしたがって行った。

Benzo(a)pyrene-3-hydroxylase (AHH) 活性の測定¹⁰⁾：66.7 mM Tris buffer 1.5 ml, 35.3 mM MgCl₂ 0.17 ml, 2 mM B(a)P 0.08 ml, マイクロゾーム懸濁液 0.05 ml および 3.6 mM NADPH 0.2 ml からなる最終溶液 2 ml の反応液を、37°C、10分間好氣的にインキュベーションを行った。生成した3-hydroxy-benzo(a)pyreneの定量は蛍光々度法により行った。

Aminopyrine N-demethylase, P-nitroanisole O-demethylase 活性の測定：生化学実験講座第12巻(日本生化学会編)に記載の方法を用いた。

4. 組織中のPCDFsの分析

前報⁵⁾にしたがって行った。

結 果

1. 血液および臓器中のPCDFs

血液中PCDFs：PCDFs投与終了後の最初の血中PCDFs濃度を100とした時の相対濃度変化をFig 1に示した。

血中PCDFs濃度はPCDFs単独投与群およびPCDFs+スクアラン投与群とも経日的に減少したが、その程度はPCDFs+スクアラン投与群の方が大きかった。また、スクアラン投与による血中PCDFs濃度の減少率はPen-CDFsよりもHex-CDFsの方が高かった。すなわち、スクアラン投与によりHex-CDFsの血中濃度が大きく減少した。

臓器中のPCDFs：臓器中の蓄積PCDFs量(Fig 2)は、肝臓(1,360 ng, 1,090 ng)で高く、次に脾臓、腎臓、心臓の順であった。また、スクアラン投与により肝臓、腎臓および心臓などで蓄積PCDFs量の減少が認められ、その減少率はそれぞれ、20%、

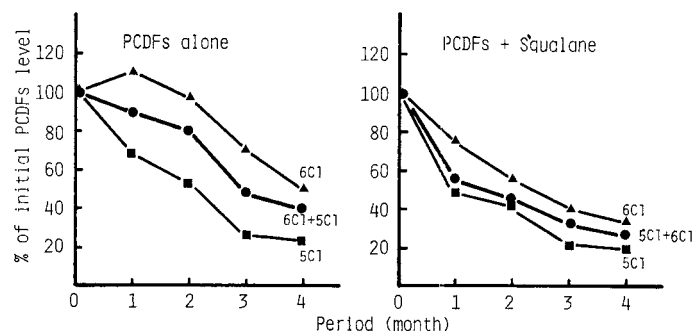


Fig. 1 Changes in PCDFs levels in the blood of treated monkeys.
Initial PCDFs levels — 5C1: 28.4 ppt, 6C1: 44.8 ppt.

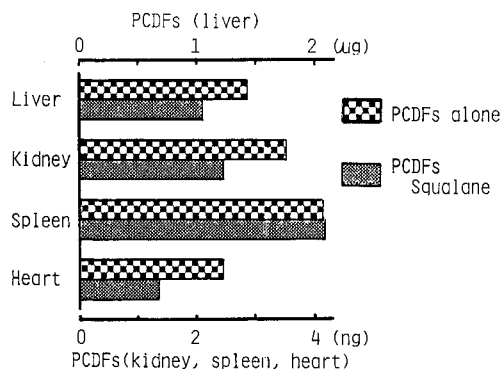


Fig. 2 Accumulations of PCDFs in the tissues of monkeys.

30%, 38%であった。

次に、肝蓄積 PCDFs のガスクロマトグラムおよび臓器中の蓄積 PCDFs 組成比を Fig 3, 4 に示した。

臓器中に蓄積する PCDFs は、1, 2, 4, 7, 8-penta-CDF (ピーク 3), 2, 3, 4, 7, 8-penta-CDF (ピーク 4), 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexa-CDF (ピーク 5) および 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexa-CDF (ピーク 6) などの極く限られた異性体で、油症患者組織中に見られるものと一致していた。また、PCDFs 単独投与群に比べて、PCDFs+スクアラン投与群では明らかに蓄積 PCDFs 組成が異っている。

Fig. 4 から明らかなように、心臓を除く各組織では、血液と同様スクアラン投与により Pen-CDFs に比べて相対的に、Hex-CDFs が低下する。すなわち、スクアランは、Hex-CDFs をもっとも減少さす。

2. 肝薬物代謝酵素活性

PCDFs 投与中止後 5 カ月目の対照群の肝薬物代謝酵素活性を 1 とした時の各投与群の酵素活性を Fig. 5 に示した。

Fig. 5 から明らかなように、PCDFs 投与中止後 5 カ月経過しても Cyt. P-450, benzo(a)pyrene hydroxylase, p-nitroanisole O-demethylase および aminopyrine N-demethylase などの酵素活性は上昇していた。しかし、P-450 を除く benzo(a)pyrene hydroxylase, p-nitroanisole O-demethylase, aminopyrine N-demethylase などの酵素活性はスクアランを投与することにより、それぞれ 24%, 12%, 16% 減少した。

3. 病理組織学的検討

肝臓の電顕像では、PCDFs 単独投与群で核の萎縮および変形、空胞形成、滑面小胞体の増加などが観察された。滑面小胞体の増加を除くこれらの病理組織学的変化に対してスクアランは若干の改善効果が認められた。一方、PCDFs 投与により発現する眼瞼浮腫およびマイボーム腺の膿腫に対してはスクアランによる改善効果は認められなかった。

考 察

著者らは、先に PCDFs 中毒サルを用いて 13-cis retinoic acid (13-CRA) やスクアランによる治療効果を検討した⁵⁾。その結果、スクアランは体重減少の回復や血清トリグリセライド値に若干の改善効果が認められた。さらに、今回の実験からスクアランは肝薬物代謝酵素 (benzo(a)pyrene hydroxylase, p-nitroanisole O-demethylase, aminopyrine N-demethylase) および肝細胞 (核の萎縮および変形、空胞形成) に対して改善効果が見られた。

一方、スクアランは消化管から一部吸収され組織中に蓄積される。したがって、上記のスクアランによる改善効果は、このスクアラン自身によるのか、蓄積 PCDFs の減少によるのかは今後詳しく検討する必要がある。

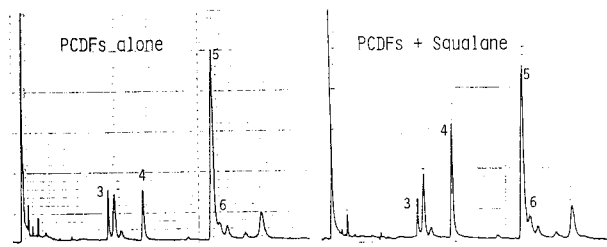


Fig. 3 Gas chromatograms of PCDFs in the liver of treated monkeys. (225°C, 25 m×0.28 mm OV-17 capillary column)

3: 1, 2, 4, 7, 8-penta-CDF 4: 2, 3, 4, 7, 8-penta-CDF
5: 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexa-CDF 6: 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexa-CDF

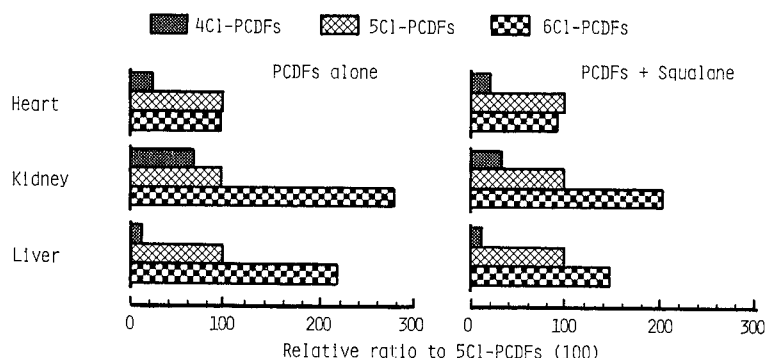


Fig. 4 Relative ratio in PCDFs isomers classified in terms of the number of chlorine atoms in tissues of monkey.

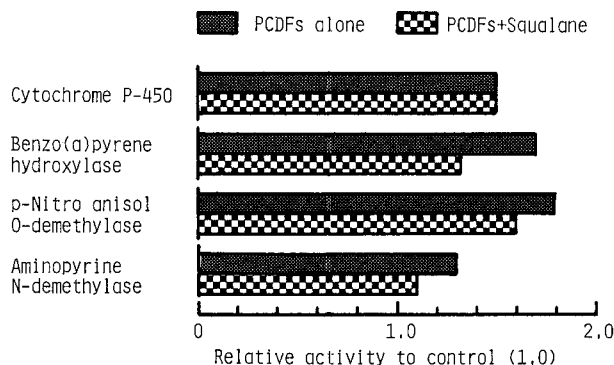


Fig. 5 Hepatic microsomes enzymes activities in treated monkeys.

油症治療において体内 PCDFs の排泄促進は重要課題である。今回用いたスクアランは血中および各臓器中の蓄積 PCDFs 量を低下させると共に蓄積 PCDFs 組成をも変化させた。すなわち、蓄積 PCDFs 組成比 (Hex-CDFs/Pen-CDFs) はスクアラン投与により低下した。

一方、PCDFs 投与サル胆汁中に含まれる PCDFs 組成は他の臓器に比べて極端に Hex-CDFs が多い⁴⁾。さらに、スクアランはラット糞中への 6 塩化 PCB (2, 4, 5-2', 4', 5'-hexa-chlorobiphenyl) 排泄を促進させることが報告されている¹¹⁾。これらの事実を考えると、スクアランは PCDFs の胆汁からの排泄を促進させるか、胆汁や腸管から排泄された PCDFs の腸管からの再吸収を抑制することにより体内蓄積 PCDFs 量が減少するものと考えられる。しかしながら、今回の実験から、投与されたスクアランの一部は消化管より吸収されて各臓器に蓄積される。さらに、毛 (数万 ppm) および皮膚 (数千 ppm) で高濃度の

スクアランが検出された。このことより、皮膚および毛からのスクアラン排泄と共に PCDFs も排泄される可能性もあり、今後詳しく検討する必要がある。

結 論

PCDFs 中毒サルを用いてスクアランの油症治療効果を検討した。

- 1) 血中 PCDFs 濃度はスクアラン投与により減少した。その内、Hex-CDFs の減少がもっとも大きかった。
- 2) 肝臓、腎臓および心臓などの蓄積 PCDFs 量はスクアラン投与によりそれぞれ 20 %, 30 %, 38 % 減少した。
- 3) スクアランは肝薬物代謝酵素活性 (benzo(a)pyrene hydroxylase, aminopyrine N-demethylase, p-nitroanisol O-demethylase) 上昇に若干の改善効果が認められた。
- 4) スクアランは肝臓の病理組織学的変化 (核の萎

縮および変形、空胞形成) に対して改善効果を示した。

文 献

- 1) 堀伸二郎, 榎本 隆, 国田信治, 福田芳生: ラットにおける polychlorinated quaterphenyl (PCQ) の生体内分布とその病理組織学的検索. 大阪府公衛研所報 食品衛生編 10: 171-179, 1979.
- 2) 堀伸二郎, 尾花裕孝, 榎本 隆, 国田信治, 福田芳生: ラットにおける polychlorinated quaterphenyl, polychlorinated dibenzofuran の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素および病理組織におよぼす影響. 大阪府公衛研所報 食品衛生編 12: 27-37, 1981.
- 3) Hori, S., Obana, H., Kashimoto, T., Otake, T., Nishimura, H., Ikegami, N., Kunita, N. and Uda, H.: Effect of polychlorinated biphenyls and polychlorinated quaterphenyls in cynomolgus monkey. Toxicology 24: 123-139, 1982.
- 4) 堀伸二郎, 尾花裕孝, 田中涼一, 榎本 隆, 高松 誠: サルにおける油症 PCDFs の生体内分布とその致死量. 第 11 回 環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム (札幌), 講演要旨集 122-124, 1984.
- 5) 榎本 隆, 堀伸二郎, 尾花裕孝: PCDFs 中毒サルに対する 13-cis retinoic acid およびスクアラン

- の治療に関する研究. 福岡医誌 76: 190-195, 1985.
- 6) Kunita, N., Kashimoto, T., Miyata, H., Fukushima, S., Hori, S. and Obana, H.: Causal agents of Yusho. American J. Industrial Medicine 5: 45-58, 1984.
 - 7) Kunita, N., Hori, S., Obana, H., Otake, T., Nishimura, H., Kashimoto, T. and Ikegami, N.: Biological effect of PCBs, PCQs and PCDFs present in the oil causing Yusho and Yu-Chen. Environmental Health Perspectives 59: 79-84, 1985.
 - 8) Miyata, H. and Kashimoto, T.: Separation and detection of polychlorodibenzofurans on Japanese commercial PCBs and their heated preparation. J. Food Hyg. Soc. Japan 17: 227-230, 1976.
 - 9) Omura, T., Sato, R.: The carbon monoxidebinding pigment of liver microsomes, I. Evidence for its hemoprotein nature, J. Biol. Chem. 239: 265-275, 1964.
 - 10) Nebert, D. W. and Gelboin, H. V.: Substrate-inducible microsomal cell culture, J. Biol. Chem. 243: 6242-6249, 1968.
 - 11) Richter, E., Schafer, S. G. and Fichtl. B.: Stimulation of the fecal excretion of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl in rats by squalane. Xenobiotica 13: 337-343, 1983.

Distribution of Polychlorinated Biphenyl (PCB) and Polychlorinated Quaterphenyl (PCQ) in Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*)

Shinjiro HORI and Hirotaka OBANA

*Osaka Prefectural Institute of Public Health 1-3-69,
Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan*

Takashi KASHIMOTO

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University 45-1
Nagao-togecho, Hirakata 573-01, Japan*

Yusho is complicated polychlorinated biphenyl (PCB) poisoning, since PCB, which has been regarded as a principal causative substance of this poisoning, is composed of a number of isomers of different nature, and since toxic oil causing Yusho contains polychlorinated quaterphenyl (PCQ)⁶⁾¹⁰⁾ and highly toxic polychlorinated dibenzofuran (PCDF)¹¹⁾. Recently, it has been clarified that PCB isomers vary greatly in toxicity⁸⁾⁹⁾¹⁷⁾. Moreover, PCQ⁷⁾ and PCDF¹²⁾ have been detected from blood and some organs of patients with Yusho. Therefore, to understand what Yusho is, it has come to be more and more important to consider the composition of PCB and the presence of PCQ and PCDF.

Then, as part of studies on Yusho, a comparative investigation was carried out with monkeys which have only a small species difference from human beings. In it, KC-400 was distilled under reduced pressure to prepare a PCB sample which had a similar composition to that of PCB contained in the toxic oil. Experimental monkeys were administered with this sample and examined for distribution of isomers of PCB, KC-400, and PCQ in the body.

MATERIALS AND METHODS

1. Animals and treatments.

Six female Cynomolgus monkey (*Macaca*

fascicularis), approximately 2.5 kg were obtained from Malaya, and were reared for 3 months in individual cage in an air-conditioned animal room before starting experiments. During the experimental period for 20 weeks, monkeys were fed daily with bread (30 g), monkey chow (100 g, Oriental Yeast Co. Japan) and banana (50 g), and were given water *ad libitum*.

For oral administration of the PCB or PCQ which were dissolved in olive oil, the daily dose as each sample of PCB or PCQ listed in table 1 was injected into a piece of banana (50 g), and was given to the respective monkeys, once a day except Sunday for 20 weeks.

The monkeys were weighed and bled at 4 weeks-interval throughout the experimental feeding period, finally they were sacrificed, and the tissues and organs were removed and weighed for determination of PCB and PCQ content.

2. Chemicals.

KC-400 and PCQ were offered from Kanegafuchi Chemical Ind. Co.. Alumina (Art. No. 1077) was obtained from Merck Co. (Darmstadt, Germany). Florisil (60-100 mesh) was activated overnight at 130°C. Ethanol, diethyl ether, methylene dichloride, antimony pentachloride and anhydrous sodium sulfate of reagent

Table 1 Experimental groups

Animal	Compound	Daily dose in the diet (mg/monkey* ¹ /day)	Feeding period (Weeks)
No. 1	P-KC-400* ²	5 mg	20
No. 2	Y-PCB* ³	5 mg	20
No. 5	PY-PCB* ⁴	5 mg	20
No. 6	PCQ* ⁵	5 mg	20
No. 7	PCQ* ⁵	0.5 mg	20
No. 8	None (Control)	Olive oil	20

*¹: Female Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) weighing approximately 2.5kg.

*²: P-KC-400 was prepared by removing PCDF fraction from KC-400 by Florisil column chromatography. The composition of PCB in the P-KC-400 was identical to that in the KC-400 (Fig. 1-B).

*³: Y-PCB was prepared from KC-400 by distillation under reduce pressure (1 mHg) for 2 hr. The Y-PCB contains PCDF of approximately 400 ppm, and its chromatographic pattern (Fig. 1-D) is similar to that of the PCB-contaminated Kanemi rice oil sample (Fig. 1-A) which caused Yusho.

*⁴: PY-PCB was prepared by removing PCDF fraction from Y-PCB through Florisil column. The composition of PCB in the PY-PCB was identical to that in the Y-PCB (Fig. 1-C).

*⁵: Mass chromatogram of PCQ is similar to that of the PCQ-contaminated Kanemi rice oil sample which caused Yusho.

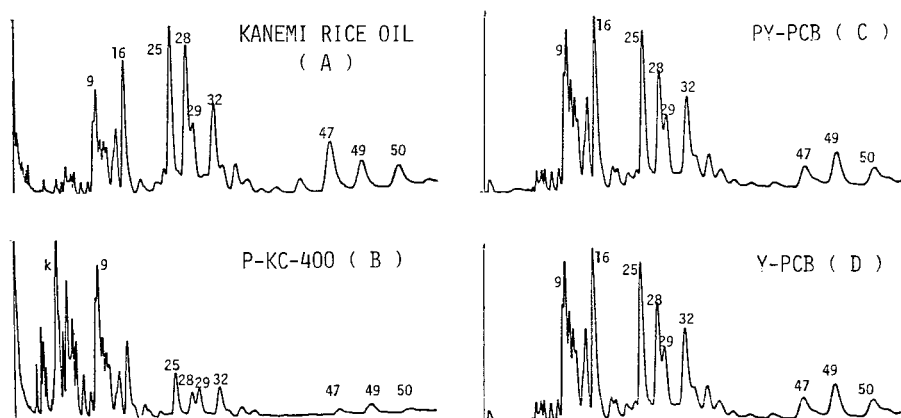


Fig. 1 Gas chromatograms of PCB residues in Kanemi rice oil, P-KC-400, Y-PCB and PY-PCB preparations. GC, Shimadzu 6AM equipped with ⁶³Ni-ECD; condition: column, 5 m×2 mm glass column packed with 2 % Apiezon L on Gas Chrom Q (100/120); injector and detector temp., 270°C; column temp., 235°C; carrier gas, N₂ (20 ml/min)

The numbering system of peak conforms to the method of Jansen¹²⁾ and Nakamura⁹⁾.

grade for PCB analysis were obtained from Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan).

3. Preparation of PCB and PCQ samples used for oral administration.

P-KC-400, Y-PCB and PY-PCB were prepared from KC-400 as described in the legend to Table 1, their respective ECD-gas chromatograms were shown in Fig. 1.

For elimination of PCDF from KC-400, Y

-PCB and PCQ, KC-400, Y-PCB or PCQ was placed on Florisil (40 g) packed in a column (2.5 cm I. D.), and eluted successively with n-hexane (260 ml), with 2 % diethyl ether in n-hexane (80 ml) and with 5 % diethyl ether in n-hexane (180 ml) at an average flow rate of 3 ml/min. The first and second eluates containing PCB were concentrated, and was used for experiment of PCB. The third eluate containing PCQ was

concentrated and used for experiment of PCQ.

4. Analytical procedures.

A piece of tissue (1 g) or blood (2 ml) were saponified with 1.5 N KOH-ethanol solution (15 ml) for 1 hr in a water bath equipped with reflux apparatus. The saponified sample was mixed with water (15 ml), and the resulting aqueous sample was extracted with n-hexane (30 ml), washed twice with 20 ml of water and dried over anhydrous sodium. Each of 25 ml n-hexane extract was placed on Florisil (7 g) packed in a column (1 cm I. D.), then chromatographed as described below.

PCB: The extract sample placed a Florisil column was eluted successively with n-hexane (80 ml) at a flow rate of about 2 ml/min. The eluate was concentrated and analysed for individual PCB isomer by gas chromatography (GC). The quantitation of PCB isomers was made by the method described by Nakamura et al.¹³⁾.

PCQ: The extract sample placed on Florisil column was eluted successively with 3 % diethyl ether in n-hexane (90 ml) at an average flow rate of about 2 ml/min. The elute was concentrated, perchlorinated with antimony pentachloride and cleaned up on an alumina column as described Kashimoto et al.⁷⁾. The elute was concentrated and analyzed for PCQ by GC. The quantitation of PCQ was made by comparison of total areas of the three peaks given by the standard PCQ with those given by the samples analysed under the same GC condition.

RESULTS

1. PCB concentrations in blood and organs.

PCB concentrations in blood: Figs. 2 and 3 show the PCB concentrations in blood at 4 weeks interval and its gas chromatograms.

The blood PCB concentrations in the monkeys on Y-PCB (No. 2), PY-PCB (No. 5) and P-KC-400 (No. 1) increased with the days of feeding. Especially, the blood PCB concentrations of No. 2 and No. 5 monkeys were constantly higher than those of No. 1, and the PCB

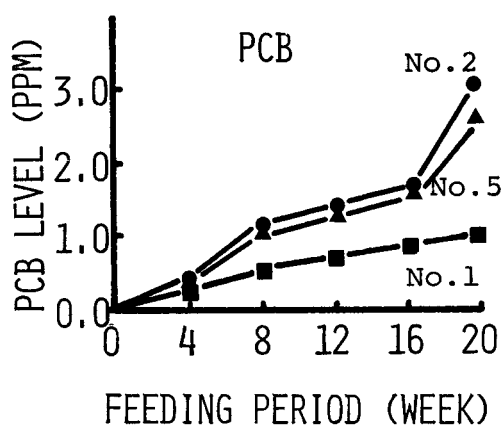


Fig. 2 PCB levels in the blood samples from monkeys.

The No. 1, No. 2 and No. 5 represent animal groups listed in Table 1.

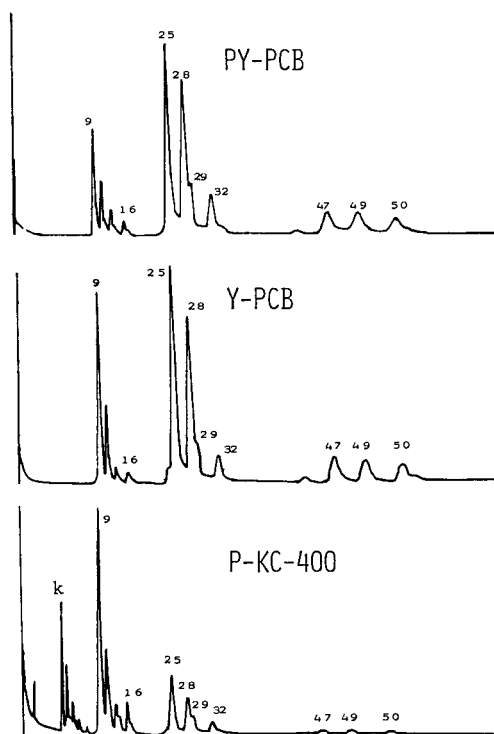


Fig. 3 Gas chromatograms of accumulated PCB in blood of three monkeys on day 140 of feeding.

GC, Shimadzu 6AM equipped with ^{63}Ni -ECD; condition: column, 5 m $\times$ 2 mm glass column packed with 2 % Apiezon L on Gas chrom Q (100/120); injector and detector temp., 270°C; column temp., 235°C; carrier gas, N_2 (20 ml/min).

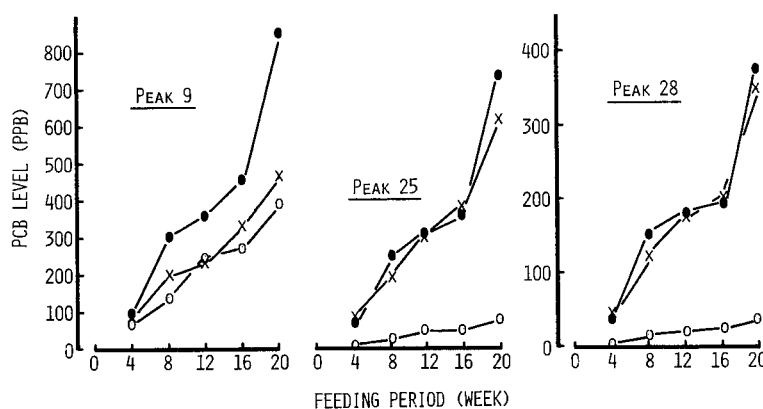


Fig. 4 Individual PCB isomer level in the blood samples from monkeys.

Peak 9: 2, 4-3', 4'-tetrachlorobiphenyl, peak 25: 3, 4-2', 4', 5'-pentachlorobiphenyl, peak 28: 3, 4-2', 3', 4'-pentachlorobiphenyl.

○—○ No.1 (P-KC-400) ●—● No.2 (Y-PCB) ×—× No.5 (PY-PCB)

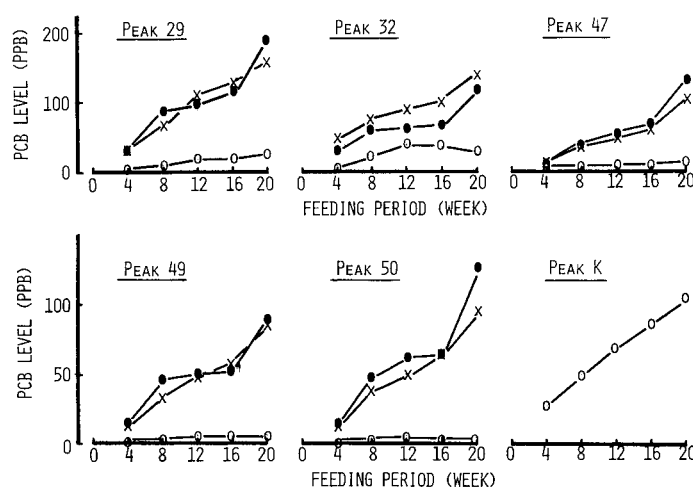


Fig. 5 Individual PCB isomer level in the blood samples from monkeys.

Peak 29: 2, 4, 5-2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl, peak 32: 2, 3, 4-2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl, peak 47: 3, 4-2', 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl, peak 49: 2, 4, 5-2', 3', 4', 5'-heptachlorobiphenyl, peak 50: 2, 3, 4-2', 3', 4', 5'-heptachlorobiphenyl, peak k: 2, 4-4'-trichlorobiphenyl.

○—○ No.1 (P-KC-400) ●—● No.2 (Y-PCB) ×—× No.5 (PY-PCB)

concentrations (No. 2, 3.0 ppm; No. 5, 2.4 ppm) of the former monkeys were about 2.5 times higher than the PCB concentration (1.1 ppm) of No. 1 on Day 140 (the last day of feeding), despite the administration at the equal daily dose (5 mg).

The gas chromatograms (Fig. 3) of the accumulated PCB in the three blood samples taken on Day 140 show the quantitative

differences in the major PCB components.

Figs. 4 and 5 show the concentration of individual PCB isomer (peak) in the blood. Individual peak increased in concentration with the day of feeding. Especially, peaks 9 (2, 4-3', 4'-tetrachlorobiphenyl), 25 (3, 4-2', 4', 5'-pentachlorobiphenyl), and 28 (3, 4-2', 3', 4'-pentachlorobiphenyl) in Nos. 5 and 2 did remarkably, as well as peaks k (2, 4

Table 2 Chlorobiphenyl contents (CB%) of polychlorobiphenyl isomers with same number of chlorine atoms in P-KC-400, Y-PCB and Kanemi toxic oil, and tissues of monkeys fed P-KC-400, Y-PCB and PY-PCB.

Tissue	Feeding period	No. of monkey	Chlorobiphenyl contents (CB%)					PCB concentration (PPB)		
			3Cl	4Cl	5Cl	6Cl	7Cl	Peak 25	Peak 28	Peak 47
Blood	4W	No. 1	9.7	53.5	29.2	6.1	1.5	12	6	1
		No. 2		23.7	49.0	19.0	8.3	71	41	11
		No. 5		21.3	50.1	21.4	7.0	75	47	10
Blood	20W	No. 1	10.7	53.8	28.3	4.6	1.7	73	36	10
		No. 2		28.6	48.8	15.3	7.3	744	380	132
		No. 5		20.0	52.3	20.0	7.7	609	347	105
Liver	20W	No. 1	10.5	52.7	30.8	5.0	1.1	3060	1469	204
		No. 2		28.3	49.9	16.2	5.6	24892	13816	2156
		No. 5		21.9	50.5	20.9	6.7	17010	10290	2590
Adipose tissue		No. 1	9.9	51.4	30.9	6.2	1.6	42745	18540	4120
		No. 2		26.5	49.3	16.6	7.7	403519	192081	59560
		No. 5		18.2	52.5	21.3	7.9	232900	125800	40800
P-KC-400			8.9	57.8	28.1	3.8	1.5	—	—	—
Y-PCB (=PY-PCB)				27.7	46.1	16.3	9.0	—	—	—
Kanemi toxic oil				26.7	49.4	15.8	8.4	—	—	—

The No.1, No.2 and No.5 represent animal groups listed in Table 1.
 Peak 25 : 3, 4-2', 4', 5'-penta-CB Peak 28 : 3, 4-2', 3', 4'-penta-CB Peak 47 : 3,4-2', 3', 4', 5'-hexa-CB.

-4'-trichlorobiphenyl), and 9 in No. 1. No other peaks exhibited an outstanding increase in concentration.

The chlorobiphenyl contents (CB %) of PCB isomer classified by the number of chlorine atoms to total PCB isomers showed Table 2. In the blood samples from No. 2 and No. 5 monkeys on Day 140, the main PCB components were the pentachlorobiphenyls (about 50 % of the total) mainly at the peak 25 and 28, and the hexachlorobiphenyls (about 20 % of the total) chiefly at the peak 29 (2, 4, 5-2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl) and 32 (2, 3, 4-2', 3', 4'-hexachlorobiphenyl). In these blood samples, the tetrachlorobiphenyl shown by the peak 9 was relatively less (about 25 % of the total), and no peak 10 was seen. In contrast to the No. 2, and No. 5, the major PCB components in No. 1 were the peaks 10 and 9 (64.5 % of the total).

PCB concentration in organs: Table 3 presents the PCB concentration of each organ. In Nos. 1, 2 and 5, a relatively high concentration of accumulated PCB was found in adipose tissue, adrenal gland, liver and skin, the concentration being the highest in adipose tissue.

Fig. 6 exhibits the gas chromatograms of accumulated PCB in adipose tissue and liver.

Table 3 PCB levels in tissues of monkeys

Tissues	PCB levels (ppm)		
	No. 1	No. 2	No. 5
Kidney	16.83	30.18	24.14
Heart	1.17	28.82	23.06
Ovaries	8.21	30.05	24.05
Spleen	2.77	12.16	9.73
Adrenal	66.24	124.80	99.84
Liver	40.82	98.38	70.00
Lungs	3.30	8.27	6.61
Muscle	4.91	6.24	4.99
Pancreas	9.12	53.79	43.03
Skin	66.03	58.64	47.61
Hair	6.96	10.01	9.13
Fat	515.36	1489.04	1009.23
Bile	12.12	—	8.37

The No.1, No.2 and No.5 represent animal groups listed in Table 1.

There was a difference in the composition of PCB accumulated in each organ, as well as in blood, between No. 1 and No. 2 or No. 5. The main component of PCB in adipose tissue was 5 Cl-PCB chiefly at peaks 25 and 28 in Nos. 2 and 5 (49.3 and 52.5 % respectively), and 4 Cl-PCB chiefly at peak 9 in No. 1 (51.4 %) (Table 2). There was no large difference in the composition of accumulated PCB between adipose tissue and liver in any group of administration.

PCQ concentration in blood: The PCQ con-

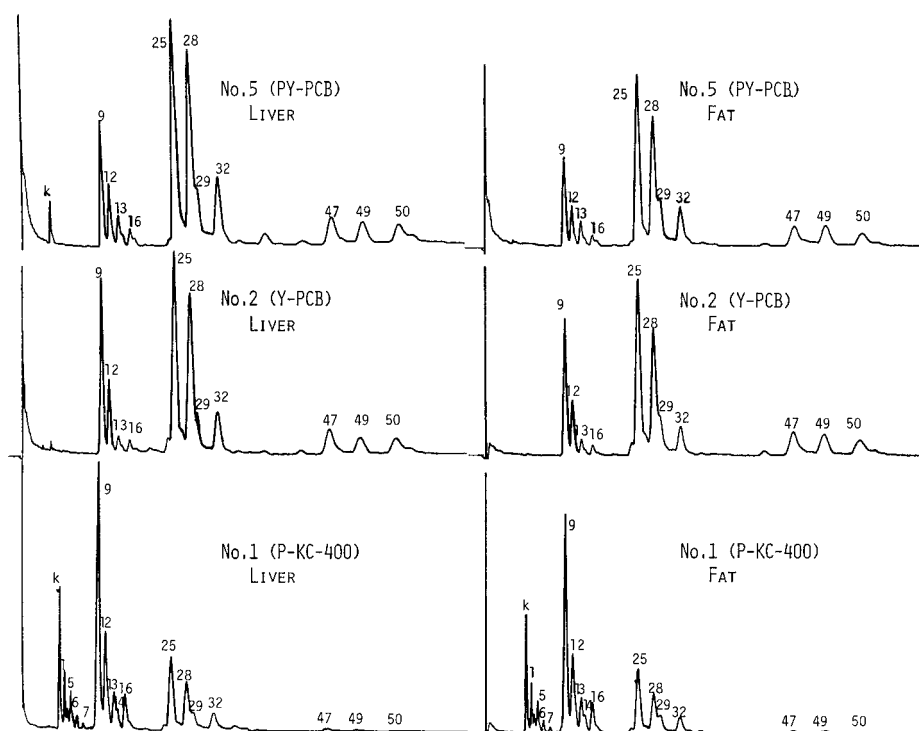


Fig. 6 Gas chromatograms of accumulated PCB in tissues of three monkeys on day 140 of feeding. GC condition is described in legend of Fig. 3.

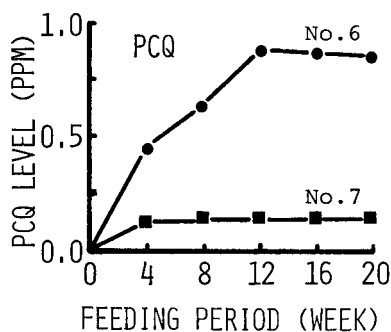


Fig. 7 PCQ levels in the blood samples from monkeys.

The No. 6 and No. 7 represent animal groups listed in Table 1.

centrations show Fig. 7. Feeding with PCQ at the daily dose of 5 mg (No. 6) induced a rapid increase in the blood PCQ concentration, which reached the plateau (0.9 ppm) in the week of 12. The blood PCQ concentration in the No. 7 monkey fed at the 0.5 mg was low and its

maximum concentration was 0.13 ppm in the week of 4, and remained thereafter without change.

Fig. 8 shows the gas chromatogram of accumulated PCQ in blood. In the blood accumulated PCQ consisted mostly of PCQ of high boiling point, which remained in the GC column for a longer time than PCQ used for administration. This tendency was more conspicuous on Day 140 than on Day 28.

Fig. 8 also presents the gas chromatogram of 18-Cl PCQ which was prepared from the sample by perchlorination. As is clear from it, the PCQ used for administration was separated into three peaks, 1 to 3, which were arranged in the decreasing order of height as follows: peak 2 > peak 3 > peak 1. In the blood this order was as follows: peak 3 > peak 2 > peak 1. The longer the period of administration, the more distinct this tendency.

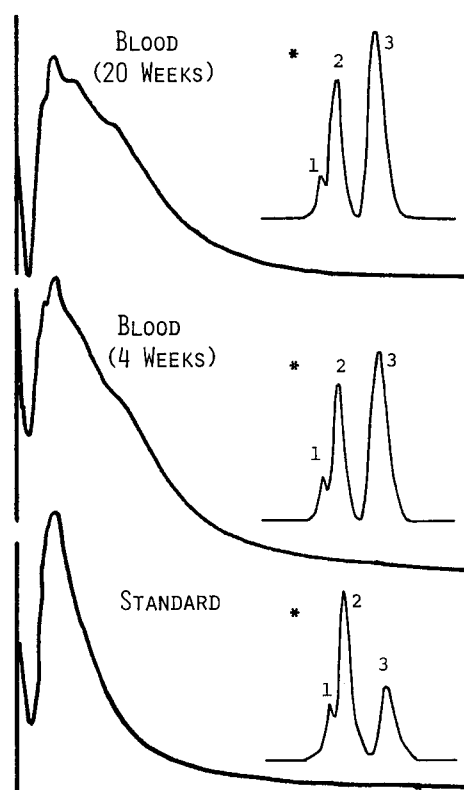


Fig. 8 Gas chromatograms of standard PCQ and accumulated PCQ in monkey blood.

*: Gas chromatograms after perchlorination.

GC, Shimadzu 6AM equipped with ^{63}Ni -ECD, condition: column, 40 cm $\times$ 2 mm glass column packed with 2% OV-210 on Gas Chrom Q (80/100); injector and detector temp., 280°C; column temp., 255°C (chromatograms after perchlorination: 280°C); carrier gas, N_2 (60 ml/min).

PCQ concentrations in organs: The concentration of accumulated PCQ was the highest in the adrenal gland of all the organs and tissues in the monkey. It was considerably high in liver, adipose tissue, and hair (table 4).

Fig. 9 exhibits the GC chromatogram of PCQ accumulated in each organ. A tendency was shown that PCQ accumulated in liver, kidney, and adrenal gland consisted mostly of PCQ of high boiling point (high chlorinated PCQ) than PCQ used for administration. On the contrary, PCQ accumulated in adipose tissue consisted

Table 4 PCQ levels in tissues of monkeys

Tissues	PCQ levels (ppm)	
	No 6	No 7
Kidney	1.57	0.50
Heart	1.73	0.38
Ovaries	11.03	1.12
Spleen	1.34	0.47
Adrenal	32.46	16.07
Liver	11.44	1.64
Lungs	0.31	0.21
Muscle	0.43	0.14
Pancreas	3.33	0.79
Skin	7.97	1.09
Hair	11.00	1.34
Fat	10.21	1.35
Bile	2.32	0.40

The No.6 and No.7 represent animal groups listed in Table 1.

mostly of PCQ of low boiling point (low chlorinated PCQ) than PCQ used for administration. As is clear from the GC chromatogram of the sample which had undergone perchlorination, 18-Cl PCQ in the organ was separated into three peaks, as well as PCQ used for administration. In every organ, especially the liver, peak 3 was higher in 18-Cl PCQ than in PCQ used for administration. The GC pattern of the heart was quite similar to that of PCQ used for administration.

DISCUSSION

Three groups of monkeys were administered with Y-PCB, PY-PCB, and P-KC-400, respectively. Y-PCB was a compound which had a composition similar to that of PCB ingested by patients with Yusho. PY-PCB and P-KC-400 were Y-PCB and KC-400, respectively, from both of which PCDF contained as impurities had been removed. The PCB concentration in the blood was compared among the three groups. It was higher in the group administered with Y-PCB or PY-PCB than in the group administered with P-KC-400, although the three compounds had been administered in an equal dose. The difference in it was derived from that in the composition of PCB in the blood, which had been originated from the

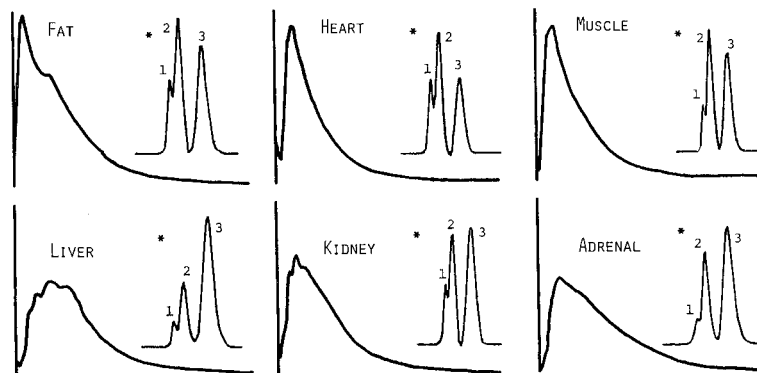


Fig. 9 Gas chromatograms of accumulated PCQ in tissues of three monkeys on day 140 of feeding.

*: Gas chromatograms after perchlorination.

GC condition is described in legend of Fig. 8.

difference in the PCB composition between Y-PCB or PY-PCB and P-KC-400. That is, 3-Cl and 4-Cl PCB presented at peaks k and 9 occupied about 64 % of all in the P-KC-400 group. They had a short biological half-life (B. H. L.)²⁾ and remained to a relatively small extent in the body⁵⁾¹⁴⁾, as compared with the other isomers of PCB. On the other hand, the Y-PCB and the PY-PCB groups contained as much as 50 % of 5-Cl PCB presented chiefly at peaks 25 and 28 and remaining in the body to a larger extent than the PCB isomers presented at peaks k²⁾ and 9. This fact may explain the results obtained.

Recently, it has been elucidated that there is a great variation in biochemical effect among the isomers of PCB, and that those isomers presented at peaks 25, 28, and 47 and contained in human milk¹⁴⁾ and blood were mixed-type inducers of PB and 3-MC types. It has also been mentioned that the intensity of ability to induce the 3-MC type is related to the severity of toxicity in the PCB isomers¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. Then, it is presumed that the toxicity of PCB may be greatly dependent on the residual amounts of those isomers presented at peaks 25, 28, and 47. In the present experiments with monkeys⁴⁾ and rats¹⁰⁾, there was no remarkable difference in toxicity between PY-PCB and P-KC-400, alth-

ough there was a large difference in the residual amounts of isomers at peaks 25, 28, and 47 between the two substances. While these substances had a mild toxicity, Y-PCB was found to be highly toxic. Its toxicity was derived from a minute amount of PCDF contained in it when examined in an experiment with rats³⁾. These results suggest that it may be necessary to pay great attention to the minute amount of PCDF contained in PCB when the toxicity of this substance is evaluated, although it is natural to take the difference in the composition of PCB into consideration. This suggestion is particularly important in the study of Yusho.

The authors have already reported that PCQ differs from PCB, since it is accumulated more abundantly in the liver than in adipose tissue, and that PCQ isomers with a relatively large number of chlorine atoms are contained more abundantly in the liver than in adipose tissue¹⁾.

The present experiment revealed that the adrenal gland presented the highest concentration of PCQ of all the organs of the monkey. When the concentration of residual PCQ was compared, it was about twice as high in the liver as in adipose tissue. This result indicates

*1: Proceedings of the 41th J. Food Hyg. Soc. Japan, May, 14, 15, 1981, Yokohama, Japan, p. 13.

that the concentration of PCQ in adipose tissue was higher in the monkey than in rats. It is interpreted that this result was obtained, because the fat of the whole body is much less in the monkey as a wild animal than in the rat, rather than because of the difference in species between these two animals.

There was a qualitative difference in accumulated PCQ between any two organs. That is, PCQ isomers with a relatively larger number of chlorine atoms (7-Cl and 8-Cl isomers) was accumulated more abundantly in the liver and blood than in the heart, muscle, and adipose tissue. It was also clarified that in addition to the number of chlorine atoms, the difference in basic skeletons (quaterphenyl isomer) of PCQ was an important factor for the accumulation of PCQ. The results obtained from monkeys and mentioned above agreed quite well with those obtained from rats and reported previously by the authors¹⁾. Furthermore, the composition of residual PCQ in the liver of patients with Kanemi Yusho was essentially identical with that in the liver of monkeys determined in the present investigation. These findings seem to be useful for further studies on the rise and fall of PCQ in the body of patients.

SUMMARY

Female Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) were daily fed (6 days per week) for 20 weeks one of the following regimens : 1) Kanechlor 400, PCB from which contaminating PCDF have been removed (P-KC-400, 5 mg/monkey/day), 2) PCB with constituents similar to PCB ingested by Yusho patients (Y-PCB, containing ca. 400 ppm PCDF; 5 mg/monkey/day), 3) PCB obtained from Y-PCB removing PCDF (PY-PCB, 5 mg/monkey/day); and 4) PCQ (5 mg/monkey/day or 0.5 mg/monkey/day).

Groups fed Y-PCB and PY-PCB were found to have blood PCB concentrations (3.0 ppm and 2.4 ppm on Day 140) about 2.5 times higher than that of the group fed P-KC-400 (1.1 ppm on Day

140), although all the groups were fed the same quantity (5 mg/monkey/day). There were also distinctive differences between the above two groups in respect of PCB composition in the blood : e. g. about 64 % of PCB found in the blood of P-KC-400 group was 3 and 4-Cl PCB chiefly at peaks k (2, 4-4'-trichlorobiphenyl) and 9 (2, 4-3', 4'-tetrachlorobiphenyl), whereas in the blood of Y-PCB group and PY-PCB group, about 25 % was 3 and 4-Cl PCB, about 50 % 5-Cl PCB chiefly peaks 25 (3, 4-2', 4', 5'-pentachlorobiphenyl) and 28 (3, 4-2', 3', 4'-pentachlorobiphenyl) and 20 % 6-Cl PCB chiefly peak 29 (2, 4, 5-2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl) and 32 (2, 3, 4-2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl). The similar results were observed in other organs. The PCB concentration in organs were the highest in adipose tissue, and was lower, in order, in the adrenal gland, skin and liver.

Group fed PCQ (5 mg/monkey/day) induced a rapid increase in the blood PCQ concentration which reached the plateau (0.9 ppm) in the week of 12. The blood PCQ concentration in group fed PCQ (0.5 mg/monkey/day) was low and its maximal concentration was 0.1 ppm in the week of 4, and remained thereafter without change. The PCQ concentration in organs was the highest in the adrenal glands, and lower in order in the liver and adipose tissue.

The compositions of the accumulative PCQ in blood differed from that of the PCQ used for administration. That is to say, more highly chlorinated PCQ was observed in the blood compared with PCQ administered. Moreover, the composition of PCQ skeleton (quaterphenyl isomer) differed between blood and PCQ used for administration. There was also qualitative difference in accumulated PCQ between every organs. That is, PCQ isomers with a relatively large number of chlorine atoms (7-Cl and 8-Cl -PCQ) was accumulated more abundantly in the liver than in the heart, muscle, and adipose tissue. It was also clarified that in addition to the number of chlorine atoms, the difference in

basic skeletons of PCQ was an important factor for the accumulation of PCQ.

References

- 1) Hori, S., Kashimoto, T. and Kunita, N.: Distribution and excretion of polychlorinated quaterphenyls in rats. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 21: 294-300, 1980.
- 2) Hori, S., Kashimoto, T. and Kunita, N.: Effect of polychlorinated dibenzofuran on the retention of polychlorinated biphenyl isomers in the liver and adipose tissue of mice. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 23: 167-175, 1982.
- 3) Hori, S., Obana, H., Kashimoto, T., Kunita, N. and Fukuda, H.: Hepatic microsomal and histopathological effect of polychlorinated quaterphenyl and polychlorinated dibenzofuran on rats. *Osaka Prefectural Institute of Public Health, Edition of Food Sanitation* 12: 27-34, 1981.
- 4) Hori, S., Obana, H., Kashimoto, T., Otake, T., Nishimura, H., Ikegami, N., Kunita, N. and Uda, H.: Effect of polychlorinated biphenyls and polychlorinated quaterphenyls in *Cynomolgus* monkey. *Toxicology* 24: 123-139, 1982.
- 5) Jensen, S. and Sundstrom, G.: Structures and levels of most chlorobiphenyls in two technical PCB products and human adipose tissue. *AMBIO* 3: 70-76, 1974.
- 6) Kamps, L. R., Trotter, W. J., Young, S. J., Carson, L. L., Roach, J. A. G., Sphone, J. A., Tanner, J. T. and McMahon, B.: Polychlorinated quaterphenyls identified in the rice oil associated with Japanese "Yusho" poisoning. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 589-591, 1978.
- 7) Kashimoto, T., Miyata, H. and Kunita, N.: The presence of polychlorinated quaterphenyls in the tissues of Yusho victims. *Food Cosmet. Toxicol.* 19: 335-340, 1981.
- 8) McConnell, E. E., McKinney, J. D.: Exquisite toxicity in the guinea pig to structurally similar halogenated dioxins, furans, biphenyls, and naphthalenes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45: 298, 1978.
- 9) McKinney, J. D., Chae, K., Gupta, B. N., Moore, J. A., and Goldstein, J. A.: Toxicological assessment of hexachlorobiphenyl isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in chicks. 1. Relationship of chemical parameters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 36: 65-80, 1976.
- 10) Miyata, H., Kashimoto, T. and Kunita, N.: Studies on the compounds related to PCB (V). Detection and determination of unknown organochlorinated compounds in Kanemi rice oil caused the Yusho. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 19: 364-371, 1978.
- 11) Nagayama, J., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: Chlorinated dibenzofurans in Kanechlor and rice oil used by patients with Yusho. *Fukuoka Acta Med.* 66: 593-599, 1975.
- 12) Nagayama, J., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with Yusho. *Food Cosmet. Toxicol.* 15: 195-198, 1977.
- 13) Nakamura, A. and Kashimoto, T.: Studies on a calculation method for polychlorinated biphenyls (PCBs) isomers. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 18: 1-12, 1977.
- 14) Yakushiji, T., Watanabe, I., Kuwabara, K., Yoshida, S., Koyama, K. and Kunita, N.: Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides in human milk and blood collected in Osaka Prefecture from 1972 to 1977. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 43: 1-15, 1979.
- 15) Yamamoto, H., Yoshimura, H., Fujita, M. and Yamamoto, T.: Metabolic and toxicologic evaluation of 2, 3, 4, 3', 4'-pentachlorobiphenyl in rats and mice. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 24: 2168-2174, 1976.
- 16) Yoshihara, S., Kawano, K., Yoshimura, H., Kuroki, H. and Masuda, Y.: Toxicological assessment of highly chlorinated biphenyl congeners retained in the Yusho patients. *Chemosphere* 8: 531-538, 1979.
- 17) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N. and Miki, M.: Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. In: *Health Effect of Halogenated Aromatic Hydrocarbons*, Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 320 (W. J. Nicholson and J. A. Moore, Eds.), New York Acad. Sci., New York 1979, pp. 179-192.

(和 文 抄 録)

カニクイザルにおける PCB および PCQ の体内分布

大阪府立公衆衛生研究所

堀 伸 二 郎・尾 花 裕 孝

摂南大学薬学部衛生薬学科

樫 本 隆

油症原因物質の生体影響究明の一環として、油症原因油中に含まれる PCB および PCQ 組成に類似の PCB (Y-PCB), PCQ および KC-400 をサルに経口投与し、各物質の体内分布を検討した。

PCB の血中濃度は同量投与 (5 mg/monkey/day) したにもかかわらず Y-PCB 群は KC-400 群の約 2.5 倍高い濃度を示した。さらに、血中 PCB 組成も両群

の間で異りが見られた。すなわち、KC-400 群は 3 ～ 4 塩化 PCB が全体の約 64 %, Y-PCB 群は 5 ～ 6 塩化 PCB が 70 % であった。また、各臓器中についても同様の結果が得られた。

PCQ (5 mg/monkey/day) 群の血中 PCQ 濃度は Y-PCB 群の約 1/3 であった。また、臓器中の PCQ 蓄積は副腎および肝臓で高い濃度が観察された。

A Cohort Study on Mortality of Yusho Patients

—A Preliminary Report—

Masato IKEDA

*Department of Clinical Epidemiology, Institute of Industrial Ecological Sciences,
University of Occupational and Environmental Health,
Kitakyushu-shi 807, Japan*

Masanori KURATSUNE

*Nakamura Gakuen College and Nakamura Gakuen Junior College,
Fukuoka-shi 814, Japan*

Yosikazu NAKAMURA, Tomio HIROHATA

*Department of Public Health, Faculty of Medicine, Kyushu
University, Fukuoka-shi 812, Japan*

In 1968, a mass food poisoning occurred in western Japan involving more than 1,800 people, the majority of whom was residents of Fukuoka and Nagasaki prefectures. The poisoning was named "Yusho" and is now understood to have been caused by ingestion of a commercial brand of rice oil contaminated with polychlorinated biphenyls, dibenzofurans, and quaterphenyls. Analysis of deaths seen among them during the past 15 years is without doubt important not only for understanding of the possible human effects of prolonged exposure to these man-made chlorinated hydrocarbons, but also for providing the victims with a better health care. A cohort analysis was therefore made on their mortality and this paper reports its preliminary results.

Methods

The total number of patients officially registered as Yusho by the end of 1983 was 1,821. Information on name, date of birth, sex, address, date of registration, and place where they were registered was obtained from the Ministry of Health and Welfare and their vital status at the end of 1983 was confirmed by health departments of municipalities where patients lived or still live, and copies of the death certificates for decedents were also collected by these departments. Underlying causes of deaths seen before 1979 were assigned according to the 8th revision of ICD and those of deaths seen in 1979 and thereafter according to the 9th revision of ICD. Excluding 9 patients who had been officially registered as Yusho after death and 51 patients who were lost to follow-up, 1,761 patients (887 males and 874 females) were followed from the date of official registration to the end of 1983,

average duration of follow-up being about 11 years. The deaths seen among them during the observation period were compared with the expected number of deaths which was calculated by applying the national age, sex, and cause specific death rates in 1970, 1975, and 1980 to the person-years at risk.

Results

The total number of deaths observed were 120, consisting of 79 males and 41 females, as shown in Table 1. Male deaths were slightly more than expected but the difference was not statistically significant, while female ones less than expected, again with no statistical significance. Neither significantly elevated nor lowered mortality was seen for tuberculosis, diabetes, heat diseases, hypertensive diseases, pneumonia and bronchitis, gastric and duodenal ulcer, kidney diseases, and accidents. Deaths from cerebrovascular diseases were considera-

Table 1 Observed and Expected Number of Death and SMR (O/E) by Cause of Death

Cause of death	Male			Female		
	Observed	Expected	O/E	Observed	Expected	O/E
Total	79	66.13	1.19	41	48.90	0.84
Tuberculosis	1	1.26	0.79	0	0.50	0.00
Malignant neoplasms	33	15.51	2.13**	8	10.55	0.76
Esophagus	1	0.77	1.30	1	0.18	5.45
Stomach	8	5.69	1.40	0	3.26	0.00
Rectum, sigmoid colon, and anus	1	0.63	1.60	0	0.46	0.00
Liver	9	1.61	5.59**	2	0.66	3.04
Pancreas	1	0.71	1.41	1	0.46	2.18
Lung, trachea, and bronchus	8	2.45	3.26**	0	0.85	0.00
Breast	0	0.01	0.00	1	0.66	1.46
Uterus				1	0.58	1.71
Leukaemia	1	0.45	2.23	0	0.32	0.00
Diabetes	1	0.75	1.34	0	0.69	0.00
Heart diseases	10	9.46	1.06	9	7.65	1.18
Hypertensive diseases	0	1.20	0.00	0	1.39	0.00
Cerebrovascular diseases	8	14.61	0.55	5	12.03	0.42*
Pneumonia and bronchitis	3	3.17	0.95	0	2.33	0.00
Gastric and duodenal ulcer	0	0.73	0.00	1	0.34	2.96
Chronic liver diseases and cirrhosis	6	2.26	2.65	2	0.73	2.74
Nephritis, nephrose syndrome and nephrose	0	0.79	0.00	2	0.71	2.81
Accidents	5	4.66	1.07	2	1.32	1.52

* : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

bly less frequent than expected in both males and females, but significantly so only in females.

For deaths from cancer at all sites, a significantly increased mortality was seen in males while no such in females. Neither significantly increased nor decreased mortality was seen for cancer of the esophagus, stomach, rectum and colon, pancreas, breast, and uterus, and for leukemia. However, a significantly increased mortality was observed for cancer of the respiratory system in males but not in females.

For cancer of the liver, an increased mortality was noted in males, 9 observed deaths against 1.61 expected (SMR=5.59) and in females, 2 observed deaths against 0.66 expected (SMR=3.04), but the excess was statistically significant only in males. Since about 45% and 40% of the patients are residents of Fukuoka and Nagasaki prefectures, respectively, where

liver cancer is known to be prevalent, an additional analysis was by calculating expected number of deaths on the basis of liver cancer death rates in these prefectures instead of using the national average death rates. Again a significantly increased mortality was observed in males (Observed=9, Expected=2.34, SMR=3.85, $p < 0.01$) but not in females (Observed=2, Expected=0.79, SMR=2.53). In view of a long latent period commonly needed for the development of cancer, early liver cancer cases which occurred soon after poisoning can hardly be regarded as caused by the poisoning alone. Excluding such cases, four male deaths from liver cancer which occurred in Fukuoka prefecture more than 9 years after poisoning were compared with the corresponding expected number of deaths which was calculated by the male death rates in Fukuoka prefecture. Again a statistically significant excess mortality was seen (Observed=4, Expected=1.04,

SMR=3.85, $p<0.05$).

In connection with liver cancer, it might be notable that deaths from chronic liver diseases and cirrhosis were also slightly increased in both males and females, although the increase was not statistically significant.

Discussion

The above findings suggest that the poisoning might have caused liver cancer at least in male patients. However, it seems still too early to draw any conclusion on this issue, because contrary to Fukuoka prefecture, in Nagasaki prefecture where patients as many as 550 live, only one death from liver cancer was seen among males and no death among females. Such a remarkably uneven geographical distribution of liver cancer deaths makes it hard to consider the observed increased risk of liver cancer as simply due to the poisoning. Besides, we have not yet examined whether there might be any dose-response relationship between the mortality from liver cancer and the intake of

the toxic rice oil. Needless to say, however, we must be particularly cautious about the possible high risk of liver cancer in Yusho patients, because the tumorigenicity of polychlorinated biphenyls to the liver of animals has been reported (1, 2).

Acknowledgements

This investigation was supported by a grant from the Ministry of Health and Welfare, Japan. The authors thank the Groups of Plaintiffs instituting the United Civil Suit for Kanemi Yusho for their kind assistance to our study.

References

- 1) Kimura, H. and Baba, T.: Neoplastic change in the rat liver induced by polychlorinated biphenyl. Gann 64: 105-108, 1973.
- 2) Nagasaki, H., Tomii, S., Mega, T., Marugami, M. and Ito, N.: Hepatocarcinogenicity of polychlorinated biphenyls in mice. Gann 63: 805, 1972.

(和文抄録)

油症患者の死亡に関するコホート研究 —予 報—

産業医科大学, 産業生態科学研究所, 臨床疫学教室

池 田 正 人

中村学園大学・中村学園短期大学

倉 恒 匡 徳

九州大学医学部, 公衆衛生学講座

中 村 好 一・広 畑 富 雄

1,761名の油症患者(男887,女874)を認定時点から1983年末まで追跡し,この間に起こった観察死亡数を,全国の性別・年齢別・死因別死亡率を上記コホートの人年に適応して得られた期待死亡数と比較し,標準化死亡(SMR)を求めた。その結果,全死因に

よる死亡数は期待死亡数と有意に異ならず,結核,糖尿病,心疾患,高血圧疾患,肺炎・気管支炎,胃・十二指腸潰瘍,腎疾患,事故等による死亡も,期待死亡と有意に異なっていなかった。脳血管疾患の死亡は男女ともに期待値を下まわっていたが,女のみが統計

的に有意であった。

全がん死亡は男に有意の増加がみられたが、女には認められなかった。食道、胃、結腸・直腸、すい臓、乳房、子宮のがん、ならびに白血病による死亡数は、それぞれの期待死亡数と統計的に有意には異なっていなかった。肺がん死亡は有意に男のみに高かった。肺がん死亡は、男は観察死亡数9に対して、期待死亡数1.61 (SMR=5.59) で有意に高かった。女も SMR=3.04 で増加が認められたが有意ではなかった。患者の85%が福岡県と長崎県の住民であるので、期待死亡数をこれら両県の肝がん死亡率で求めてみたが、やはり男のみに有意に死亡増加が認められた。また、

発がんにはかなりの年月を要するので、中毒後9年以上経過して肝がん死亡した福岡県の男のみについて調べてみると、観察死亡数4で、対応する期待死亡数1.04に比して有意に高かった。

以上の所見は、男の油症患者において、肝がんの死亡が高まっていることを示しているが、それが油症のためであるとは、まだ断定できない。なぜならば、肝がんは福岡県の男子に集中して発生しており、多数の患者のいる長崎県においては、男子の肝がん死亡は1例のみで、女子には発生が全くなく、地域差が余りにも著しいからである。

油症患者の芳香族炭化水素水酸化酵素活性に関する研究

九州大学医学部公衆衛生学講座

長山 淳哉・清原千香子・福田 篤志

中村 好一・廣畑 富雄

九州大学医学部皮膚科学教室

旭 正 一

産業医科大学臨床疫学教室

吉 村 健 清

A Study of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity in Yusho Patients

Junya NAGAYAMA, Chikako KIYOHARA, Atsushi FUKUDA

Yoshikazu NAKAMURA and Tomio HIROHATA

*Department of Public Health, Faculty of Medicine Kyushu University,
Fukuoka 812, Japan*

Masakazu ASAH

*Department of Dermatology, Faculty of Medicine Kyushu University,
Fukuoka 812, Japan*

Takesumi YOSHIMURA

*Department of Clinical Epidemiology, Institute of Industrial Ecological Sciences,
University of Occupational and Environmental Health, Japan, Kitakyushu 807, Japan*

We examined aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in 42 Yusho patients in 1985 and in 128 healthy non-smokers in 1985-1986. Basal and 3-methylcholanthrene (MC)-induced AHH activities in the patients were significantly higher than those in the healthy non-smokers. This result may indicate that causative chemicals (mainly polychlorinated dibenzofurans, PCDFs) of Yusho have been exerting influence on the health status of the patients and the AHH activity reflected one of the present effects of the causative agents. We also studied the relationship of the enzyme activity, consumption of causative rice oil of Yusho and concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the blood to severity of skin symptoms of Yusho. Concentration of PCBs in the blood showed the highest correlation with dermatological severity. Induction ratio (MC-induced/basal) was significantly correlated with dermatological severity in those examined in 1969 and not correlated with those examined in 1973-1977 and in 1983-1985. This result suggests that in man, as well as in mice, individual susceptibility to PCDFs is influenced by the degree of AHH activity.

マウスでは3-Methylcholanthrene (MC) 処理により肝臓の芳香族炭化水素水酸化酵素 (Aryl Hydrocarbon Hydroxylase, AHH) 活性が上昇する系統 (AHH 応答性系統) と上昇しない系統 (AHH 非応答性系統) に遺伝的に区別される²⁾. AHH 応答性系統は非応答性系統と比較して Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) や Polych-

lorinated Dibenzofurans (PCDFs) に対して高感受性であることが観察されている⁷⁾⁸⁾. 人の場合にも AHH 活性が個人個人で相違することが観察されている⁹⁾ので, AHH 活性の高低により PCDFs や PCDDs に対する感受性が異なる可能性がある.

カネミ油症患者は PCDFs などによって汚染されたライス油を摂取したことにより発症した人々であり,

PCDFs中毒患者であると考えられている。油症患者の AHH 活性と皮フ症状との関係について調べると、AHH 活性の高い患者は発症初期の皮フ症状が重症であり、マウスで得られた結果が人にも適用できる可能性が示唆された⁶⁾。油症患者の皮フ症状は原因油摂取量によってもっとも影響されることが考えられるが、この研究ではライス油摂取量についての情報が十分に得られなかった。そこで今回、発症初期の皮フ症状の重症度が判明しており、かつ原因油摂取量がわかっている油症患者の AHH 活性を測定し、皮フ症状の重症度と原因油摂取量、AHH 活性などとの関係について解析したので報告する。

研 究 方 法

1. 被験者

(1) 油症患者：福岡県内の福岡地区および田川地区に居住する油症患者で油症発症当時（昭和44年、1969年）の皮フ症状の重症度と原因油摂取量が判明している油症患者に協力していただいた。Table 1 に示してあるように、患者数は42名（男性：16名、女性：26名）で、平均年齢は47歳（29～69歳）である。採血は昭和60年11～12月に行った。

(2) 健常者：福岡市およびその近郊に居住する喫煙しない男性で、職業は公務員である。被験者数は128名で、平均年齢は39歳（20～60歳）である（Table 1）。採血は昭和60年8～10月と昭和61年8月に行った。

2. 皮フ症状の重症度および血中 PCBs 濃度

油症発症当時の皮フ症状の重症度と原因油摂取量は以前に調査していたので、その記録によった。それ以後の皮フ症状の重症度は福岡県が行っている油症一斉検診の検診記録および九州大学医学部皮膚科の油症外来診察記録により、五島と樋口の診断基準¹⁾に基づいて判定した。血中 PCBs 濃度および血中 PCBs パターンは福岡県油症一斉検診の検査記録によった。

3. AHH 活性の測定

全血からリンパ球を分離後 Mitogen を添加し通常の条件により培養する。リンパ球の培養中に AHH 誘導剤である MC 処理した場合の酵素活性を Induced AHH 活性とし、MC 処理しない場合の酵素活性を Basal AHH 活性とする。AHH 誘導比は Induced AHH 活性と Basal AHH 活性の比、つまり Induced AHH 活性 / Basal AHH 活性である。AHH 活性は 3-OH-Benzo(a)pyrene の生成量を指標として常法により測定した。リンパ球の分離・培養法および AHH 活性測定法の詳細については文献（4）を参照されたい。

4. 統計的手法

油症患者と健常者の AHH 活性値の比較および皮フ症状の重症度と他の要因との単相関係数における有意性の検定は Student の *t* 検定によった。

結 果

油症患者と健常者の AHH 活性および AHH 誘導比を Table 1 に示す。油症患者の Basal および Induced AHH 活性の平均値はそれぞれ 0.067 pmol/min/10⁶ 細胞、0.317 pmol/min/10⁶ 細胞であり、健常者におけるそれぞれの活性の平均値 0.046 pmol/min/10⁶ 細胞、0.229 pmol/min/10⁶ 細胞よりも有意に高値であった（*P* < 0.01）。しかし、AHH 誘導比については両者の間で有意差は観察されなかった。

昭和48～52年（1973～1977年）、昭和58～60年（1983～1985年）における油症患者の皮フ症状の重症度と血中 PCBs 濃度について調べたが、十分な情報が得られなかった。とくに昭和48～52年における情報が不足している。このように情報が十分であるとは考えないけれども、油症発症後の各時期における油症患者の皮フ症状の重症度と原因油摂取量、血中 PCBs 濃度、AHH 活性などとの関連性について調べた。その結果を Table 2 に示す。昭和44年の皮フ症状の重

Table 1 Aryl hydrocarbon hydroxylase activity and induction ratio in Yusho patients and healthy subjects (non-smokers)

Subjects	No.	Age Mean/Range	Sex M : F	Specific AHH Activity (pmol/min/10 ⁶ cells)		Induction ^a Ratio (I/B)
				Basal ^a	Induced ^a	
Yusho Patients	42	47/29-69	16 : 26	0.067 ± 0.009**	0.317 ± 0.031**	6.2 ± 0.7
Healthy People	128	39/20-60	128 : 0	0.046 ± 0.003	0.229 ± 0.013	5.9 ± 0.3

^a : Mean ± S.E.

** *p* < 0.01

症度は年齢と負の、また原因油摂取量および血中 PCBs 濃度（昭和 58～60 年）と正の関連性を示した。さらに、この時期の重症度は AHH 誘導比とも正の関連性を示した。昭和 48～52 年の皮フ症状の重症度は原因油摂取量および血中 PCBs 濃度と正の関連性を示した。昭和 58～60 年の皮フ症状の重症度は血中 PCBs 濃度とだけ正の関連性を示した。

単相関による分析では各要因の相互作用を考慮した解析がなされない。要因間の相互作用を考慮して、皮フ症状の重症度との関係を調べるために重回帰分析を行う予定であったが、例数が少くなり、不可能であった。

考 察

油症患者の AHH 活性に関する前回の研究では、油症患者の AHH 活性値は喫煙しない健康者の酵素活性値と比較して有意差が観察されなかった⁶⁾。しかし、今回の油症患者の AHH 活性値は喫煙しない健康者の活性値よりも高値であることが観察された。それでは、前回と今回の油症患者についてどのような相違点があるのだろうか。比較検討してみる。

昭和 56～60 年の皮フ症状の重症度が判明した油症患者は前回が 23 名、今回は 34 名である。これらの油症患者について重症度が 2 以上である患者数（割合）はそれぞれ 8 名（約 35 %）、25 名（約 74 %）である。

Table 2 Simple correlation coefficients between dermatological gradings and specified variables in Yusho patients.

Variable	Dermatological Grading		
	1969 (40,41)	1973-1977 (15-17)	1983-1985 (32,34)
Age	-0.36*	0.13	0.13
Sex	-0.21	-0.12	-0.26
(Toxic Oil Consumption)	0.32*	0.53*	0.35
PCBs Concentration			
1973-1977	0.45 (16)	0.61*	0.69** (16)
1983-1985	0.48** (31)	0.67**	0.43**
AHH Activity			
Basal	-0.16	-0.16	-0.18
Induced	0.16	-0.12	-0.06
Ratio	0.34*	0.05	0.15

Number in parenthesis indicates number of the patients.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

また、前回の油症患者について昭和 48～52 年における皮フ症状の重症度が判明している 34 名のなかで重症度 2 以上の患者数（割合）は 11 名（約 32 %）であり、昭和 56～60 年における割合とほぼ同じである。このことは今回の油症患者は皮フ症状の重症者の占める割合が前回の油症患者よりも高いことを示している。

油症患者の血中 PCBs パターンは A, B, C の 3 つの type に区別可能である³⁾。A type は油症患者に特有のパターンである。昭和 56～60 年における血中 PCBs パターンが判明している油症患者は前回が 29 名、今回は 34 名である。これらの油症患者について A type の患者数（割合）はそれぞれ 15 名（約 52 %）、32 名（約 94 %）であり、A type の患者が占める割合も今回の油症患者のほうが高い。また、昭和 56～60 年の血中 PCBs 濃度は前回（27 名）； 4.5 ± 0.6 ppb、今回（34 名）； 6.8 ± 0.7 ppb であり、血中 PCBs 濃度についても今回の油症患者のほうが高値であった。

このような観察から、今回の油症患者は原因油摂取量が多く、皮フ症状を含む種々の症状が前回の油症患者に比べて重症である可能性が示唆される。また、油症の主要原因物質である PCDFs の影響が現在でも続いており、そのことが AHH 活性にも反映されたと考えることができよう。このように今回の油症患者の Basal および Induced AHH 活性は前回の油症患者の両 AHH 活性とは質的にも相違していると考えられる。前回の油症患者について観察された Basal AHH 活性と皮フ症状の重症度との関連性が今回の油症患者では観察されなかったのはこのような原因によると思われる。しかし、今回の油症患者の AHH 誘導比が発症当時の皮フ症状の重症度と関連性を示したことから、油症の病状の重症度に AHH 活性が関与している可能性はあると考えている（Table 2）。

油症患者の皮フ症状の重症度と最も高い関連性を示したのは血中 PCBs 濃度であった（Table 2）。血中 PCBs 濃度の高い患者は原因油を多量に摂取し、また同時に PCDFs も多量に摂取していると考えれば、この高い関連性は当然であろう。実際、今回の油症患者では血中 PCBs 濃度の高い患者ほど原因油摂取量も多い（ $P < 0.01$ ）。

総 括

油症患者の皮フ症状の重症度とリンパ球 AHH 活性との関係に関する前回の研究では、発症初期の皮フ症状が重症である患者ほど Basal AHH 活性が高いと

いうことを観察した。しかし、この研究では油症発症ともっとも関係があると考えられる原因油摂取量が判明しなかった。そこで今回は油症発症初期の皮フ症状の重症度および原因油摂取量が判明している42名の油症患者についてリンパ球AHH活性を測定し、皮フ症状の重症度と原因油摂取量、AHH活性などの関連性について解析した。その結果以下のようなことが観察された。

1) 今回の油症患者は前回の油症患者に比べ皮フ症状の重症者の占める割合が高く、血中PCBs濃度も高かった。そして、今回の油症患者のBasalおよびInduced AHH活性は喫煙しない男性のそれぞれの活性よりも高値であった ($P < 0.01$)。このことは今回の油症患者では油症原因物質（主にPCDFs）の影響が現在でも続いている可能性があることを示唆している。

2) 1)で記したように、今回の油症患者のAHH活性は前回の油症患者の酵素活性とは質的・量的に相違していると考えられるけれども、油症発症初期の皮フ症状が重症の患者ほどAHH誘導比が高いことが観察された ($P < 0.05$)。油症発症および発症後の種々の疾病発生とAHH活性との関係について研究を続ける必要があろう。

3) 皮フ症状の重症度ともっとも高い正の関連性を示したのは血中PCBs濃度であった。

油症患者の採血に際し、種々のご援助、ご便宜をいただいた福岡県庁公衆衛生課の栗原羊一課長、松尾國雄課長補佐、宮尾武敏係長ならびに田崎弘主任技師に心から感謝いたします。

文 献

1) 五島應安、樋口謙太郎：油症（塩化ビフェニール中毒症）の皮膚科学的症候論。福岡医誌 60：

409-431, 1969.

2) Kouri, R. E. and Nebert, D. W.: Genetic regulation of susceptibility to polycyclic-hydrocarbon-induced tumors in the mouse. In *Origins of Human Cancer (Book B)*. Hiatt, H. H., Watson, J. D. and Winsten, J. A., eds. 811-835, Cold Spring Harbor Laboratory, U. S. A., 1977.

3) 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.

4) Nagayama, J., Kiyohara, C., Kuratsune, M. and Masuda Y.: Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells by chlorinated dibenzofuran isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. In *Chlorinated Dioxins and Dibenzofurans in the Total Environment II*. Keith, L. H., Rappe, C. and Choudhary, C. eds. 285-295, Stoneham, MA, Butterworth Publishers 1985.

5) Nagayama, J., Kiyohara, C., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: Genetically mediated induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells by polychlorinated dibenzofuran isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch. Toxicol.* 56: 230-235, 1985.

6) Nagayama, J., Kiyohara, C., Nakamura, Y., Ikeda, M., Asahi, M. and Hirohata, T.: Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in Yusho patients. *Chemosphere in press*.

7) Nagayama, J., Kiyohara, C., Nishizumi, M., Horie, A., Handa, S., Yamaguchi, S. and Masuda, Y.: Comparative toxicologic study with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in inbred strains of mice. *Chemosphere* 14: 949-952, 1985.

8) Nagayama, J., Kiyohara, C., Nishizumi, M., Horie, A., Handa, S., Yamaguchi, S. and Masuda, Y.: Comparative toxicity of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in inbred strains of mice. *Chemosphere* 14: 953-956, 1985.

正常者の血液中ポリ塩化クアテルフェニル濃度

福岡県衛生公害センター

飯田隆雄・竹中重幸・中川礼子

深町和美・高橋克己

九州大学医学部皮膚科学教室

旭 正 一

Polychlorinated Quaterphenyls Concentration in the Blood of Normal Persons

Takao IIDA, Shigeyuki TAKENAKA, Reiko NAKAGAWA

Kazumi FUKAMACHI and Katsumi TAKAHASHI

*Fukuoka Environmental Research Center, 39, Mukaida, Mukaizano, Dazaifu-shi,
Fukuoka, 818-01, Japan*

Masakazu ASAHI

*Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Kyushu University,
Fukuoka, 812, Japan*

In 1986, levels of six skeletal types of polychlorinated quaterphenyl congeners (PCQs) in the blood were determined individually for 30 normal persons of contrast to Yusho patients, by capillary gas chromatography that was accurate and highly sensitive analytical method.

Results were as follows;

PCQs were detected in 23 samples and others were below to the quantitative limits (<0.001 ppb). One of the samples was abandoned statistically ($P<0.01$). The levels of six skeletal PCQs were 2, 2'-PCQ ($0.0020 \text{ ppb} \pm 0.0014$), 2, 3'-PCQ ($0.0031 \text{ ppb} \pm 0.0024$), 2, 4'-PCQ ($0.0024 \text{ ppb} \pm 0.0018$), 4, 4'-PCQ ($0.0021 \text{ ppb} \pm 0.0014$), 3, 3'-PCQ ($0.0028 \text{ ppb} \pm 0.0021$), and 3, 4'-PCQ ($0.0061 \text{ ppb} \pm 0.0049$), as mean $\pm$ S. D., respectively. And the level of total PCQs was $0.018 \text{ ppb} \pm 0.013$ as mean $\pm$ S. D..

Compositions of six skeletal types of PCQ congeners were 2, 2'-PCQ ($10.9 \% \pm 2.7$), 2, 3'-PCQ ($16.0 \% \pm 4.1$), 2, 4'-PCQ ($12.7 \% \pm 2.5$), 4, 4'-PCQ ($11.9 \% \pm 3.6$), 3, 3'-PCQ ($15.3 \% \pm 3.4$) and 3, 4'-PCQ ($33.8 \% \pm 6.1$), as mean $\pm$ S. D., respectively, for 22 samples in which were detected PCQs.

油症患者が摂取した中毒原因油の中にポリ塩化ビフェニル (PCB) とともに多量のポリ塩化クアテルフェニル (PCQ) が存在することが証明された¹⁾。さらに、樫本らは患者体内にも PCQ が存在することを明らかにした。また、正常者の脂肪組織から PCQ を検出したが正常者の血液中 PCQ は検出限界値 (0.02 ppb) 以下であると報告した²⁾。著者らは、1980 年に正常者の血液中 PCQ 濃度は 0.1 ppb 以下であることを明らかにした³⁾。一般正常者は、血液中の PCQ 濃

度が油症患者に比べて非常に低いか、または検出限界値 (0.02 ppb) 以下であるので、血液中 PCQ 濃度の異常は油症診断基準の一つとして採用された⁴⁾。しかし、この油症診断基準の改定からすでに 6 年が経過し、この間、油症患者および正常者の血液中 PCQ 濃度は変動していると考えられる。現時点での正常者の血液中 PCQ 濃度を正確に把握することは重要と思われる。著者らはキャピラリーカラムを用いた PCQ の正確で高感度な分離分析法を確立した⁵⁾。今回、この方法を

使って正常者の血液中 PCQ 濃度レベルを調査したので報告する。

材料および実験方法

1. 血液

1986年に油症患者の対照として正常者30名について、上部肘静脈からヘパリン入り真空採血管中に10~20 ml採取し、分析するまで4°Cの冷蔵庫中に保存した。

2. 試薬

(1) ポリ塩化クアテルフェニル (PCQ) 標準液：前報⁵⁾の方法で合成した polychlorinated *o*-quaterphenyl (2, 2'-PCQ), 2, 3'-diphenylbiphenyl (2, 3'-PCQ), 2, 4'-diphenylbiphenyl (2, 4'-PCQ), *p*-quaterphenyl (4, 4'-PCQ), *m*-quaterphenyl (3, 3'-PCQ), 3, 4'-diphenylbiphenyl (3, 4'-PCQ) の6種のPCQ骨格異性体をそれぞれクロロホルムで1 mg/mlとなるように溶解させて調製した。

(2) 十八塩化クアテルフェニル (ODCQ) 標準液：PCQを完全塩素化してPCQ濃度で10 µg/mlに相当するODCQ標準原液を調製した。この標準原液をヘキサンで希釈してPCQ濃度で0.005~0.0005 µg/mlのODCQ標準液を調製した。

3. 装置および器具

(1) ガスクロマトグラフ：⁶³Niの電子捕獲型検出器 (ECD) 付島津 GC-7AGPrFEを用いた。

(2) 試料導入装置：ムービングプレカラム式試料導入装置 (島津 SPL-7) を用いた。プレカラムはシラン処理した石英ウールを詰めたものを用いた。

(3) キャピラリーカラム：QUADREX社製化学結合型溶融石英カラム，メチル50%フェニルシリコン (OV-17相当；内径0.32 mm，膜厚0.25 µm，長さ25 m) を用いた。

4. 方法

(1) 試料の調製：前報¹⁾と同様の方法で調製した。すなわち、血液10~20 gをアルカリ分解後、ヘキサンで抽出し、フロリジルカラムでPCB画分とPCQ画分に分離した。PCQ画分について五塩化アンチモンで完全塩素化し、アルミナカラムでクリーンアップし、ヘキサンで定容としてガスクロマトグラフィー用検液とした。

(2) ガスクロマトグラフへの試料の注入方法およびカラム温度の昇温条件：4. (1)で調製した検液10~25 µlをプレカラムに注入し、0.5分間常温で溶媒を留去した後、プレカラムを注入口中に移動させ、

カラム恒温槽温度80°Cで20分カラムトップに試料を吸着させた。プレカラムを引上げ、ただちに280°Cまでカラム恒温槽温度を上げ、280°Cから315°Cまで毎分1°Cの速度で昇温し、315°Cで60分間恒温槽温度を保持した。

なお、検量線は標準液をそれぞれ10 µlずつガスクロマトグラフに注入し、それぞれのピーク高から作成した。6種のPCQ骨格異性体の検量線はそれぞれ5~50 pgの間で原点を通る良好な直線性を示した。定量限界値は、ベースライン変動の5倍の信号に相当するPCQ量として、いずれのPCQ異性体についても5 pgであった。血液試料10 gを分析に用いたガスクロマトグラフィーの検液量を50 µlとし、その25 µlをガスクロマトグラフに注入した場合、血液中PCQの定量限界値はいずれのPCQ骨格異性体についても0.001 ppbであった。

これらの合成PCQ異性体の検量線を用いて大阪府公衆衛生研究所が使用済み熱媒体から分離精製したPCQ標準液を測定すると1.25倍高い値を示した。

結果および考察

Table 1に正常者30名の血液中PCQ濃度の定量結果を示した。Table 1から分かるように30件中23件(76.7%)からPCQが検出されたが残り7件のPCQ濃度は定量限界値以下であった。PCQが検出された検体についてはいずれも6種のPCQ骨格異性体が検出された。

Table 1において、No.1は総PCQ濃度が0.119 ppbと他のデータと比べ非常に高い値を示した。これについてGrubbsの異常値の検定を行ったところ危険率1%で棄却できることが分かった。以後は、No.1を除いた29件について解析を行った。

1. 血液中PCQの濃度

Table 1においてNDを定量限界値の1/2としたとき6種の各PCQ骨格異性体濃度の平均値は0.002~0.06 ppbであった。総PCQ濃度の平均値±標準偏差は0.018 ppb±0.013であった。この結果から一般正常者の血液中総PCQ濃度の平均値および正常範囲は、それぞれ0.012~0.025 ppb (99%の信頼区間) および0.000~0.055 ppb (P<0.01) であると推定された。血液中総PCQ濃度に関して油症診断基準では、

- ① 0.1 ppb以上：異常に高い濃度、
- ② 0.03~0.09 ppb：①と③の境界領域濃度、
- ③ 0.02 ppb (検出限界値) 以下：通常見られる濃

Table 1 Levels of PCQs in the blood of normal persons

No	Sex	Age	2, 2'-PCQ	2, 3'-PCQ	2, 4'-PCQ	4, 4'-PCQ	3, 3'-PCQ	3, 4'-PCQ	Total-PCQ
1	M	28	0.015	0.024	0.014	0.011	0.019	0.036	0.119
2	M	61	0.006	0.010	0.008	0.004	0.007	0.013	0.048
3	M	68	0.003	0.005	0.004	0.006	0.006	0.023	0.047
4	M	71	0.004	0.005	0.005	0.002	0.008	0.007	0.031
5	M	43	0.002	0.004	0.004	0.004	0.003	0.010	0.027
6	M	56	0.002	0.003	0.003	0.004	0.004	0.010	0.026
7	M	75	0.003	0.005	0.004	0.002	0.004	0.006	0.024
8	M	73	0.002	0.003	0.002	0.004	0.003	0.010	0.024
9	M	78	0.002	0.002	0.002	0.003	0.004	0.008	0.021
10	M	47	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.007	0.020
11	M	29	0.002	0.004	0.002	0.002	0.002	0.007	0.019
12	M	40	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.015
13	M	58	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.003	0.009
14	M	46	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.008
15	M	61	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.008
16	M	57	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{b)}
17	M	48	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{b)}
18	M	8	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{b)}
19	M	6	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{b)}
20	M	2	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{b)}
21	F	45	0.004	0.009	0.005	0.002	0.006	0.010	0.036
22	F	42	0.004	0.006	0.004	0.003	0.004	0.008	0.029
23	F	61	0.004	0.005	0.004	0.003	0.003	0.008	0.027
24	F	53	0.003	0.004	0.004	0.003	0.004	0.009	0.027
25	F	26	0.001	0.004	0.003	0.002	0.004	0.009	0.023
26	F	24	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003	0.006	0.020
27	F	73	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.004	0.015
28	F	20	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.004	0.011
29	F	17	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{b)}
30	F	13	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{a)}	ND ^{b)}
Means			0.0025 ^{c)}	0.0038 ^{c)}	0.0028 ^{c)}	0.0024 ^{c)}	0.0033 ^{c)}	0.0071 ^{c)}	0.0217 ^{d)}
S. D.			0.0027 ^{c)}	0.0045 ^{c)}	0.0027 ^{c)}	0.0021 ^{c)}	0.0036 ^{c)}	0.0072 ^{c)}	0.0220 ^{d)}

M and F designate male and female, respectively.

a) ND < 0.001ppb b) < 0.006ppb c) Calculated as ND=0.0005ppb d) Calculated as ND=0.003ppb

度と定められている。

この診断基準は大阪府公衆衛生研究所が使用済み熱媒体から分離精製した PCQ を標準として測定された結果から定められている。今回の測定値は合成した PCQ を標準としているので油症検診で使用している PCQ 標準に換算すると正常者血液中総 PCQ は平均値 0.009~0.020 ppb (99% の信頼区間)、正常範囲は 0.000~0.044 ppb (P < 0.01) であると推定された。これらの結果から現行の診断基準は現在も妥当なものであると考えられた。

2. 血液中 PCQ 骨格異性体の構成比

PCQ が検出された 22 件の 6 種の骨格異性体構成比の平均値および標準偏差は 3, 4'-PCQ (33.8% ± 6.1),

2, 3'-PCQ (16.0% ± 4.1), 3, 3'-PCQ (15.3% ± 3.4), 2, 4'-PCQ (12.7% ± 2.5), 4, 4'-PCQ (11.9% ± 3.6), 2, 2'-PCQ (10.9% ± 2.7) であった。3, 4'-PCQ がもっとも多く全体の約 1/3 を占めており他の PCQ は全体の 1/6~1/10 であった。

総 括

福岡県に居住する正常者 30 名について血液中の PCQ 骨格異性体の濃度を各々 0.001 ppb まで測定した。その結果、30 名中 23 名の血液から 6 種類の PCQ 骨格異性体が検出された。異常値と認められた 1 件を除いた正常者 29 名の血液中総 PCQ 濃度の平均値 ± 標準偏差は 0.018 ppb ± 0.013 であった。今回

の測定値を油症検診で使用している PCQ 標準に換算すると一般正常者血液中総 PCQ 濃度の平均値は 0.009~0.020 ppb (99 %の信頼区間), 正常範囲は 0.000~0.044 ppb ($P < 0.01$) と推定され, 現在使用されている油症診断基準は妥当であると考えられた。

PCQ 骨格異性体構成比の平均値は 3,4'-PCQ (33.8 % $\pm$ 6.1), 2,3'-PCQ (16.0 % $\pm$ 4.1), 3,3'-PCQ (15.3 % $\pm$ 3.4), 2,4'-PCQ (12.7 % $\pm$ 2.5), 4,4'-PCQ (11.9 % $\pm$ 3.6), 2,2'-PCQ (10.9 % $\pm$ 2.7) であった。

本研究に際し貴重な試料を提供していただきました方々に対して深く感謝します。なお, 本研究は昭和 61 年度厚生省科学研究費補助金に負うものであり, ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) 飯田隆雄, 芥野岑男, 高田 智, 中村周三,

高橋克巳, 増田義人: ヒトの血液中におけるポリ塩化ビフェニルおよびポリ塩化クアテルフェニルについて. 福岡医誌 72: 185-191, 1981.

- 2) 飯田隆雄, 竹中重幸, 中川礼子, 深町和美, 高橋克巳: キャピラリーガスクロマトグラフィーによるポリ塩化クアテルフェニルの定量. 分析化学: 投稿中

- 3) 榎本 隆, 宮田秀明, 福島成彦, 国田信治: 油症患者と他の PCB 汚染者の残留塩素化合物の相異. 福岡医誌 72: 198-204, 1981.

- 4) Miyata, H., Kashimoto, T. and Kunita, N.: Study on the compounds related to PCB (V). Detection and determination of unknown organochlorinated compounds in Kanemi rice oil caused the "Yusho". J. Food Hyg. Soc. 19: 364-371, 1978.

- 5) 高田 智, 毛利隆美, 飯田隆雄, 中村周三, 高橋克巳, 増田義人: ポリ塩化クアテルフェニルおよび十八塩化クアテルフェニルの合成. 福岡医誌 75: 193-201, 1983.

- 6) 吉村英敏: 序言. 福岡医誌 75: 193-201, 1983.

ヒト血液と皮下脂肪における PCB 濃度と ガスクロマトグラム類似性

福岡県衛生公害センター

中 川 礼 子・飯 田 隆 雄

竹 中 重 幸・深 町 和 美

森 彬・高 橋 克 巳

九州大学医学部皮膚科学教室

旭 正 一

PCBs in Human Blood and Adipose Tissue: Levels and Similarities on Gas Chromatogram

Reiko NAKAGAWA, Takao IIDA, Shigeyuki TAKENAKA,
Kazumi FUKAMACHI, Akira MORI and Katsumi TAKAHASHI

*Fukuoka Environmental Research Center Mukaizano Dazaifu-shi,
Fukuoka, 818-01, Japan*

Masakazu ASAH

*Department of Dermatology, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka, 812, Japan*

The concentrations of PCBs in the blood and subcutaneous adipose tissue were measured for 48 persons among whom 7 persons had been classified as type A, 2 as type BC, and 39 as type C. The investigation was carried out on the relationship between the PCB concentration of the blood and that in the adipose tissue and also on the relationship between the gas chromatogram pattern of PCBs in the blood and that in the adipose tissue. The results are as follows:

1) It was found that the PCB concentration of the blood and that of the adipose tissue were significantly correlative ($p < 0.01$). The mean values were 7.9 ppb in the blood and 1901 ppb in the adipose tissue of type A and BC persons and were 3.9 ppb in the blood and 925 ppb in the adipose tissue of type C persons.

2) The similarity coefficients between blood and adipose tissue on the PCB peaks of gas chromatogram were higher than 0.97 for most persons.

3) There were significant correlations between the first to second PCB peak heights ratios (1/2 values) in the blood and those in the adipose tissue, and also between the fifth to second PCB peak heights ratios in the blood and those in the adipose tissue. (The orders of peaks are counted after the p, p' -DDE peak.)

4) For both blood and adipose tissue the differences between type A and type C were significant on the distribution of 1/2 values and 5/2 values.

カネミ油中毒事件を契機に PCB の人体および環境汚染が明らかにされてから十数年が経過したが、油症患者の血液中 PCB 濃度の最近 7 年間の減少は非常に緩慢である²⁾。油症研究は現在 PCB よりも毒性が強いとされる PCDF の研究⁴⁾⁸⁾が主流になりつつあるが、

油症の判定手段としては、なおもその有効性かつ便宜性から PCB 分析値が利用されている。

PCB の人体組織蓄積濃度の分布調査³⁾により、脂肪組織への蓄積は肝臓、腎臓よりも約 10 倍多い事が報告され、脂肪組織は PCB の主たる蓄積組織である

と推定されている。我々は油症患者を含む48名の血液および皮下脂肪組織のPCB濃度およびパターンを調査し、組織間においてPCB濃度およびガスクロマトグラムパターンの類似性について考察したので報告する。

対象と方法

1. 対象

昭和61年1月から8月にかけて、48名から血液と皮下脂肪の供与を受け、PCB分析の対象とした。内訳は血中PCBパターンAタイプが7名、BCタイプが2名、Cタイプが39名であった。分析に供するまで血液は4°C、皮下脂肪は-20°Cで保存した。

2. 試薬および標準溶液

(1) PCB標準品：カネクロール (KC-500, KC-600) を用いた。

(2) シリカゲル：ワコーゲル S-1 (和光純薬) を篩別し、100メッシュ以下を取って、使用時に130°Cで4時間活性化した。

(3) ヘキサン、エチルアルコール：残留農薬試験用を用いた。

その他の試薬はすべて特級品以上を用いた。

(4) 標準溶液：KC600+KC500 (1:1) 100 µg/ml ヘキサン溶液を調製し、ガスクロマトグラフィー分析時に0.01~0.1 µg/mlに希釈して用いた。

3. 分析方法

増田らの方法⁹⁾に準じて行った。すなわち、血液は約10g、皮下脂肪は約0.1gをとり、1.5N水酸化カリウム・エチルアルコール溶液20mlを加えて加熱還流してアルカリ分解を行い、ヘキサンで抽出した。この抽出液をシリカゲルカラムで精製後、濃縮してPCB測定用試験液とした。

4. 分析装置および測定条件

装置はECD (⁶³Ni) 付き島津GC-7AG型のガスクロマトグラフを用いた。カラムは、1.5%シリコンSE-30 (Gaschrom Q 80/100メッシュ) 2m×2.6mm i.d. ガラスカラムを用い、カラム温度は200°Cに保った。

5. ガスクロマトグラムパターンの類似率計算

PCB分析の結果、得られた試料のガスクロマトグラム上で*p, p'*-DDEから数えて7番目までのピークの高さを計測し基礎データとした。すなわちXタイプの血中PCBおよび皮下脂肪中PCBのデータは数値群 $A_x(a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, a_6, a_7)$, $B_x(b_1, b_2, b_3, b_4, b_5, b_6, b_7)$ で表されるがこれを位置ベクトル $\vec{OA}_x$, $\vec{OB}_x$ の成分

表示と考えると、 A_x と B_x の間の類似率 $S(A_x, B_x)$ は次式で求められる。

$$S(A_x, B_x) = \cos \theta = \frac{(\vec{OA}_x, \vec{OB}_x)}{|\vec{OA}_x| |\vec{OB}_x|} \\ = \frac{\sum_{i=1}^7 a_i b_i}{(\sum_{i=1}^7 a_i^2 \cdot \sum_{i=1}^7 b_i^2)^{1/2}}$$

$S(A_x, B_x)$ はパターンが近いほど1に近い数値になる⁷⁾。

6. 1/2値および5/2値

ガスクロマトグラム上で*p, p'*-DDEから数えて1番目ピークの2番目ピークに対する相対ピーク高 (1/2値) および5番目ピークの2番目ピークに対する相対ピーク高 (5/2値) を算出し、PCBパターンの比較検討に用いた¹⁾。パターン判定は1/2値と5/2値をもとに、指定の方法に従って行った。PCBパターンAタイプは典型的油症患者に見られるものを、Cタイプは健康者に見られるものを、BおよびBCタイプはその中間のものを示す。

結果

1. 血液および皮下脂肪におけるPCB濃度

Fig. 1 は48組の血液および皮下脂肪の試料についての定量分析結果を示したものであり、血液と皮下脂肪間での相関係数は0.886となり、強い相関 ($p < 0.01$) が見られた。Table 1 に示すように全体での最高値、最低値、そして平均値は、血液においてそれぞれ20.6, 1.0, 4.6 ppbであり、皮下脂肪においては、5710, 178, 1094 ppbであった。したがってPCB濃度は皮下脂肪の方が血液に比べ、個々の試料については129倍から704倍、平均値では238倍も高いことがわかった。タイプ別について見ると、Table 1 に示すようにAおよびBCタイプでは血液での最高値、最低値、および平均値は、それぞれ20.6, 1.7, 7.9 ppbであり、皮下脂肪でのそれは5710, 820, 1901 ppbであった。またCタイプでは、血液での最高値、最低値、および平均値はそれぞれ12.0, 1.0および3.9 ppbであり、皮下脂肪においては、2217, 178および925 ppbであった。したがってAおよびBCタイプとCタイプでは平均値が血液で、2.03倍、皮下脂肪で2.06倍の差があった。

2. 血液と皮下脂肪におけるPCBガスクロマトグラムパターンの類似性

48組の血液と皮下脂肪について、「対象と方法」の5により類似率を計算した。Table 2 に示すように0.97以上が96%、また0.99以上が67%、と高い類似率が得られ、血液PCBと皮下脂肪PCBはガスク

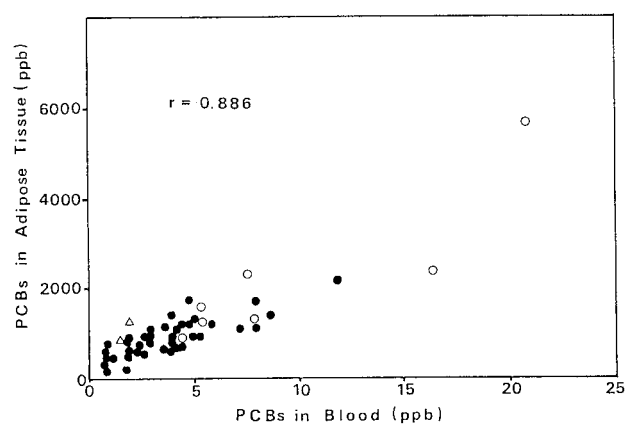


Fig. 1 The distribution of the concentration of PCBs in the blood and the adipose tissue of 48 persons

○ : type A, △ : type BC, ● : type C

Table 1 The concentration of PCBs in the blood and adipose tissue.

sample	No.	mean (ppb)	s.d.	max. (ppb)	min. (ppb)
total (blood)	48	4.6	3.8	20.6	1.0
(adipose tissue)	48	1094	829	5710	178
types A and BC (blood)	9	7.9	6.4	20.6	1.7
(adipose tissue)	9	1901	1523	5710	820
type C (blood)	39	3.9	2.4	12.0	1.0
(adipose tissue)	39	925	432	2217	178

Table 2 The similarity coefficients (s.c.) on gas chromatograms of PCBs between blood and adipose tissue.

sample No.	s.c.	sample No.	s.c.	sample No.	s.c.
type A 1	0.9974	type C 8	0.9931	type C 24	0.9770
2	0.9718	9	0.9964	25	0.9860
3	0.9966	10	0.9964	26	0.9935
4	0.9931	11	0.9981	27	0.9875
5	0.9948	12	0.9970	28	0.9879
6	0.9978	13	0.9917	29	0.9568
7	0.9966	14	0.9992	30	0.9796
type BC 1	0.9938	15	0.9965	31	0.9879
2	0.9862	16	0.9584	32	0.9987
type C 1	0.9961	17	0.9862	33	0.9935
2	0.9967	18	0.9967	34	0.9875
3	0.9936	19	0.9939	35	0.9879
4	0.9970	20	0.9916	36	0.9568
5	0.9946	21	0.9760	37	0.9796
6	0.9978	22	0.9879	38	0.9987
7	0.9986	23	0.9876	39	0.9959

ロマトグラムパターンが非常に似ていることがわかった。

3. 1/2 値および 5/2 値における血中 PCB と皮下脂肪中 PCB の相関性について

Fig. 2 は 1/2 値, 5/2 値について血液と皮下脂肪の関係を見たものである。1/2 値について血液と皮下脂肪の関係を見たものである。1/2 値では相関係数が 0.817, 5/2 値では 0.916, と強い相関 ($p < 0.01$) を示した。そこで 30 組の正常者の血液と皮下脂肪の PCB のデータをもとに, それぞれパターン判定を行った。その結果は 7 件すべてが A (血液 PCB パターン)=A (皮下脂肪 PCB パターン) であった。

さらに, Fig. 3 は, 血液と皮下脂肪の各々について, その PCB ガスクロマトグラムピークの 1/2 値および

5/2 値を示したものである。皮下脂肪中 PCB でも血中 PCB と同様に, A タイプと C タイプは明らかに異なる分布を示した。BC タイプは血中 PCB と皮下脂肪中 PCB において A タイプと C タイプの中間に位置した。

考 察

今回のように A タイプを含む多数の人の皮下脂肪を PCB 分析対象とした事は他に例がない。皮下脂肪の PCB 濃度としては増田らの報告と同程度であった⁹⁾。従来より血液中の PCB は, PCT と異なり, 大部分が脂肪組織由来である⁹⁾と考えられて来た。今回の結果は, すなわち皮下脂肪 PCB のガスクロマトグラムパターンが血液のそれと相似的事であること, および血

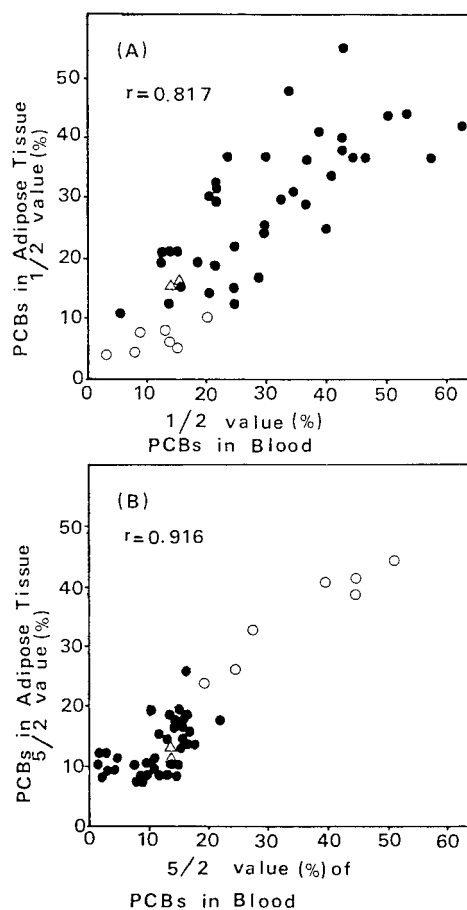


Fig. 2 The correlation between the blood and the adipose tissue on 1/2 values (A) and 5/2 values (B)

○: type A, △: type BC, ●: type C

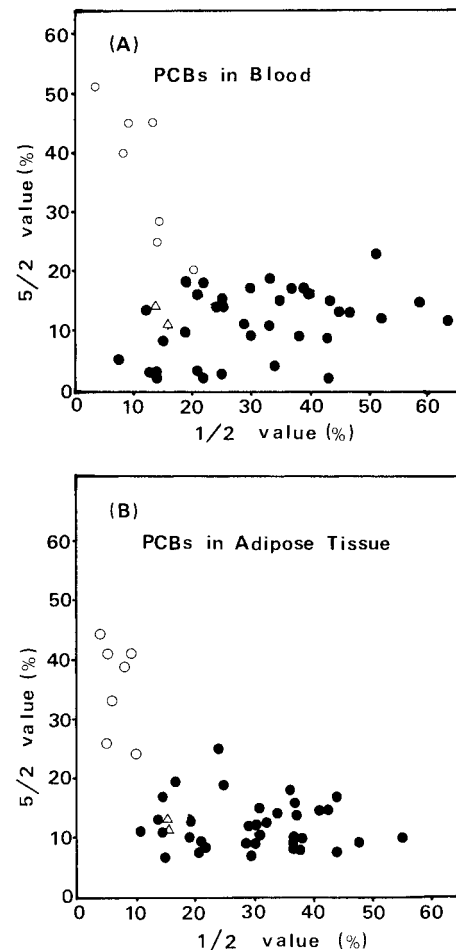


Fig. 3 The distribution of 1/2 and 5/2 values for 48 samples of blood and adipose tissue

○: type A, △: type BC, ●: type C

中 PCB 濃度と皮下脂肪中 PCB 濃度には強い相関があることなど、上の推論を支持するものと考えられる。従って、血液中 PCB を分析することによって人体に蓄積されている全 PCB を推測することが可能であると考えられる。

総 括

1) 血液中 PCB 濃度および皮下脂肪中 PCB 濃度には強い相関があった ($p < 0.01$)。A および BC タイプの血中 PCB 濃度と皮下脂肪中 PCB 濃度の平均値はそれぞれ 7.9, 1901 ppb, C タイプの血中 PCB 濃度と皮下脂肪中 PCB 濃度の平均値は 3.9, 925 ppb であった。A および BC タイプの PCB は C タイプのそれに比べ平均値が、血液で 2.03 倍、皮下脂肪で 2.06 倍高い値であった。

2) 7 本のピーク高により算出された類似率から血中 PCB と皮下脂肪中 PCB はガスクロマトグラム上で相似的であることが明らかになった。

3) PCB の 1/2 値および 5/2 値は血液と皮下脂肪間で各々強い相関を示した。 ($p < 0.01$)

4) A タイプと C タイプは皮下脂肪中 PCB の 1/2 値、5/2 値によってもその違いは明確であった。

本研究に貴重な試料を提供してくださいました方々に深く感謝致します。なお本研究成果は昭和 61 年度厚生省科学研究補助金および同年度北九州市よりの研究補助金に負うものであり、ここに深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克巳, 増田義人: 健常者の血中 PCB 濃度及びガスクロマトグラムピークパターンの経年変化, 福岡医誌 76, 137-144, 1985.
- 2) 片岡恭一郎, 大久保彰人, 篠原志郎, 高橋克巳, 増田義人: 福岡県における油症検診データの統計解析, 福岡医誌 74, 296-301, 1983.
- 3) 厚生省 PCB 等調査委員会: 環境保健レポート No. 44, PCB 等の体内蓄積濃度の分布に関する研究—昭和 48~50 年度における研究の総括—, 日本公衆衛生協会編, 東京, 187-238, 1978.
- 4) Kuroki, H., and Masuda, Y.: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 7, 771-777, 1978.
- 5) 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.
- 6) Masuda, Y., Kagawa, R., and Kuratsune, M.: Comparison of polychlorinated biphenyls in Yusho patients and ordinary persons. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 213-216, 1974.
- 7) 田村真一郎: 分析値のパターンの取り扱い, ぶんせき 6, 379-387, 1987.
- 8) Yoshihara, S., Nagata, K., Yoshimura, H., Kuroki, H., and Masuda, Y.: Induction effect on hepatic enzymes and acute toxicity of individual polychlorinated dibenzofuran congeners in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59, 580-588, 1981.
- 9) Watanabe, I., Yakushiji, T. and Kunita, N.: Distribution differences between polychlorinated terphenyls and polychlorinated biphenyls in human tissues. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 25, 810-815, 1980.

ヒトにおける血中 PCB パターンと皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体の関連性

福岡県衛生公害センター

竹 中 重 幸・飯 田 隆 雄
中 川 礼 子・深 町 和 美
森 彬・高 橋 克 巳

九州大学医学部皮膚科学教室

旭 正 一

Relation Between the Gas chromatogram Patterns of PCB in Human Blood and Six Skeletal Congeners of PCQ in Human Adipose Tissue

Shigeyuki TAKENAKA, Takao IIDA, Reiko NAKAGAWA,
Kazumi FUKAMACHI, Akira MORI and Katsumi TAKAHASHI

*Fukuoka Environmental Research Center, Mukaizano,
Dazaifu-shi, Fukuoka, 818-01, Japan*

Masakazu ASAHU

*Department of Dermatology, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka, 812, Japan*

The human subcutaneous adipose tissue were analyzed for six skeletal congeners of polychlorinated quaterphenyls (PCQs) by gas chromatography with fused silica capillary column. In the A pattern group of polychlorinated biphenyls (PCBs) gas chromatogram patterns in blood, the concentrations of 2, 2'-PCQ, 2, 3'-PCQ, 2, 4'-PCQ, 4, 4'-PCQ, 3, 3'-PCQ and 3, 4'-PCQ were 220, 204, 123, 121, 87.6 and 217 ppb, respectively. In the BC pattern group of PCBs gas chromatogram patterns in blood, those were 10.6, 10.7, 6.30, 3.48, 3.88 and 7.98 ppb, respectively. In the C pattern group of PCBs gas chromatogram patterns in blood, those were 0.81, 1.00, 0.66, 0.68, 0.45 and 1.17 ppb, respectively. The gas chromatogram pattern of PCQs in adipose tissue were estimated among the three pattern groups of PCBs gas chromatogram patterns in blood. The gas chromatogram pattern of PCQs and among the A pattern group and BC pattern group of PCBs gas chromatogram pattern in blood were similar, but others were not similar.

1968年に西日本一帯で座瘡様皮疹、齒肉等の色素沈着を伴った、いわゆる“油症”が発生した。増田らは油症患者及び健康者の血中PCBを分析し、油症患者が一般に濃度が高く、両者のガスクロマトグラム上のピークパターンに差があることを明らかにした⁵⁾。油症の原因となった米糠油の中にはポリ塩化ビフェニル(PCB)やポリ塩化クアテルフェニル(PCQ)が高濃度で存在していることが報告されている⁶⁾⁸⁾¹³⁾。PCQには六種のPCQ骨格異性体があるが、われわれ

はその中でも4,4'-PCQが他のPCQ骨格異性体と比べて非常に速く生体内に取り込まれ、蓄積しやすいことを報告した⁹⁾¹⁰⁾。また、その他のPCQ骨格異性体もその吸収、分布及び排泄の各薬動学的パラメーターに差があり¹⁰⁾、生体内蓄積性も当然違ってくると思われる。そこで、我々は正常者及び油症患者の皮下脂肪に蓄積する各PCQ骨格異性体の構成比を明らかにし、かつ、血中PCBパターンとの関連性についても考察してみた。

実験方法

1. 血液及び皮下脂肪

血液は46名の被検者の上腕部肘静脈よりヘパリン入り真空採血中に採取し、分析するまで冷蔵庫中に4°Cで保存した。

皮下脂肪も46名の被検者の皮膚を切開し、皮下脂肪を採取し、分析するまで冷蔵庫中に-20°Cで保存した。

2. 試薬

ヘキサン：和光純薬残留農薬試験用1000を使用した。

水：蒸留水をヘキサンで洗浄したものを使用した。

五塩化アンチモン：和光純薬製PCB分析用を使用した。

18塩化クアテルフェニル (ODCQ)：高田らの方法¹⁴⁾によって合成した各PCQ骨格異性体を五塩化アンチモンで完全塩素化し、等量混合して調製したものを使用した。

シリカゲル：和光純薬製ワコーゲルS-Iの100メッシュ以下を130°Cで4時間活性化したものを使用した。

フロリジル：フロリジン社製カラムクロマトグラフィー用、60~100メッシュをHallの方法¹⁾で処理したものを使用した。

アルミナ：メルク社製カラムクロマトグラフィー用、中性、活性度I、10~130メッシュに2%含水させて使用した。

その他の試薬は残留農薬試験用、または、試薬特級を使用した。

3. PCB抽出法

増田らの方法⁹⁾に準じて次のとおり行った。すなわ

ち、血液約10gに1.5N水酸化カリウム・エタノール10mlを加え、1時間加熱還流し、アルカリ分解した。冷後、ヘキサン各10mlで3回抽出し、ヘキサン抽出液を合せ、水各50mlで3回洗浄した。その後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、内径10mm、長さ30cmの硝子製クロマト管にシリカゲル2gをヘキサンを用いて湿式充填し、これにヘキサン抽出液を注入した後、ヘキサン100mlで溶出させた。溶出液はクデルナ・ダニッシュ型(KD)濃縮器で約5mlとし、窒素ガス気流中1mlまで濃縮した。これに濃硫酸1mlを加え、混和後、15分間、2,000rpmで遠心分離し、上澄液をとり、ガスクロマトグラフィー用試験液とした。

4. PCQ抽出法

前田らの方法⁹⁾に準じて次のとおり行った。皮下脂肪200mgをPCB抽出法と同じ様にアルカリ分解し、得られたヘキサン抽出液をKD濃縮器で約5mlに濃縮した。これを、内径10mm、長さ30cmの硝子製クロマト管にフロリジル9gをヘキサンを用いて湿式充填したカラムに注入した後、ヘキサン50ml、次に、5%エチルエーテル・ヘキサン100mlで溶出させた。5%エチルエーテル・ヘキサン画分はKD濃縮後、窒素気流中で約1mlに濃縮し、10%発煙硫酸1mlを加え、混和し、遠心分離を行った。その上澄液をとり、さらに、発煙硫酸層をヘキサン各1mlで2回洗い、洗液は上澄液に合せ、反応管(内径10mm×長さ100mm)に注入した。その後、窒素気流中でヘキサンを留去し、減圧デシケーター中で30分間、完全に溶媒を留去した。これに五塩化アンチモン、0.5mlを加え、上端を封管し、200°C、3時間加熱した。冷後、開封して反応物をクロロホルム2mlに溶かし、20%塩酸各2mlで3回洗浄し、次に、水2ml、5%酒石酸溶液2ml、5%炭酸水素ナトリウム溶液2ml、水2

Table 1 Gas chromatographic Conditions

① Operating Conditions of PCB Analysis Column : 2% Silicone OV-1 Gaschrom Q (80-100 mesh) 2.6 mmI.D. × 1.5 m Glass Column. Injector and Detector Temp. : 250° Column Temp. : 220° Carrier Gas (N₂) : 30 ml/min.	② Operating Conditions of PCQ Analysis. Column : Methyl 50 % Phenyl Silicone (OV-17) 0.32 mmI.D. × 25 m Fused Silica Capillary Column Film Thickness 25 μm (QUADREX Corp.) Sample Injector : Moving Precolumn (Shimadzu SPL-7) Precolumn : Glass Column (3 mmI.D. × 10 cm) packing with glass wool. Injector and Detector Temp : 340° Column Temp. : 280°-314°, 1°/min. Carrier Gas (He) : 20 ml/min. Make-up Gas (N₂) : 100 ml/min.
---	--

mlの順で洗浄する。この洗浄が終了すると、無水硫酸ナトリウム、1.5 gを詰めたミニカラム（パスツールピペットを代用）にクロロホルム層を通し、脱水した後に窒素気流中で完全に溶媒を留去する。次に、ヘキサン 1 ml に溶かして 2%含水アルミナ 5 g を硝子製クロマト管（内径 10 mm×長さ 200 mm）にヘキサンを用いて湿式充填したカラムに注入し、2%ジクロロメタン・ヘキサン 50 ml で溶出させる。この溶出液を KD 濃縮して、窒素気流中で完全に溶媒を留去させ、ヘキサン 1 ml に溶かして試験溶液とした。

5. ガスクロマトグラフ分析法

PCB 分析は ^{63}Ni の電子捕獲型検出器 (^{63}Ni -ECD) 付島津 GC-7AG 型を用い、Table 1 の条件で行った。

PCQ 分析は ^{63}Ni -ECD 付島津 GC-7AG 型に島津 SPL-7、ムービングプレカラム試料導入装置を接続して、Table 1 の条件で行った。

6. パターン類似率及びパターン間距離解析法

皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体をキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析し、得られたガスクロマトグラムから PCQ 骨格異性体濃度を計算する。その後、Total-PCQ 濃度と各 PCQ 骨格異性体濃度との比 (%) をとり、各 PCQ 骨格異性体構成比とした。このデータは田村らの方法¹²⁾を用いてパーソナルコンピュータ (PC-9801E, NEC Corp.) を使用したパターン類似率及びパターン間距離計算法の BASIC プログラムで処理した。構成パターン成分は 6 種の PCQ 骨格異性体構成比を用いた。このパターン類似率は $\cos \theta$ で表現され、1 に近づくほど両者のパターンが類似していることになる。また、パターン間距離は θ で表現され、0 に近づくほど両者のパターン間距離が近いことになる。

7. 統計解析法

すべてのデータは F 検定及び Student t-検定を用いて解析した。

結果及び考察

6 種の合成 ODCQ のガスクロマトグラムを Fig. 1 に示した。通常、PCQ の分析は完全塩素化後、SE-54 及び OV-210 のパックドカラムでガスクロマトグラフィーを行い、ピーク A、B 及び C を検出するが、これらのピークの与える情報は少ない。A のピークは 2,2'-PCQ、B のピークは 2,3'-PCQ 及び 2,4'-PCQ、C のピークは 3,3'-PCQ、3,4'-PCQ 及び 4,4'-PCQ の合成ピークである。一方、メチル 50%フェニルシリコン (OV-17 担当) のフューズドシリカキャピラ

リーカラムを用いると、分析時間はバックドカラムに比較して約 13 倍かかるが、定量限界は各 PCQ 骨格異性体について、5 pg であり、かつ、6 種の骨格異性体の全情報を得ることができる。鶴池らは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による 6 種の PCQ 骨格異性体の分離定量法を報告している⁷⁾。彼等の方法に比べて我々の方法は感度は約 500 倍よいが、6 種の PCQ 骨格異性体が完全に分離するまでに約 3 倍の時間がかかる。この方法を用いて血液中 PCB パターンが A、BC 及び C パターン被検者の皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体を分析した。

Table 2 には各血中 PCB パターンに対する 6 種の皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体濃度を示した。A パターンのグループでは Total-PCQ 及び各 PCQ 骨格異性体濃度が BC 及び C パターンのグループに比べて高い濃度を示しており、Total-PCQ 濃度においては BC パターンのグループの約 23 倍、C パターンのグループの約 204 倍もの差が A パターンに認められた。BC と C パターンのグループでは約 9 倍、BC パターンのグループが高い PCQ 濃度を示した。

Fig. 2 には皮下脂肪中の各 PCQ 骨格異性体構成比 (%) を示した。3 グループにおける皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体構成比で有意な差 ($p < 0.01$ または $p <$

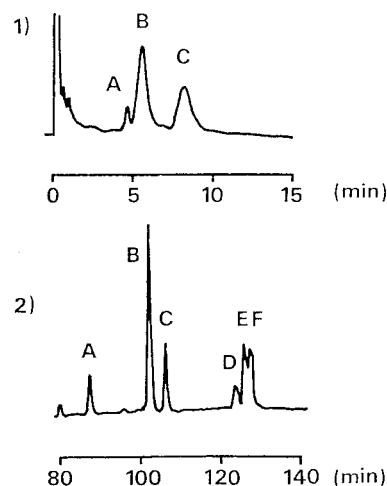


Fig. 1 Gas Chromatograms of Octadecachloro-quaterphenyls (ODCQs)

1) Packed column; 1.5% OV-210

A; 2,2'-PCQ, B; 2,3'-PCQ+2,4'-PCQ, C; 4,4'-PCQ+3,3'-PCQ+3,4'-PCQ

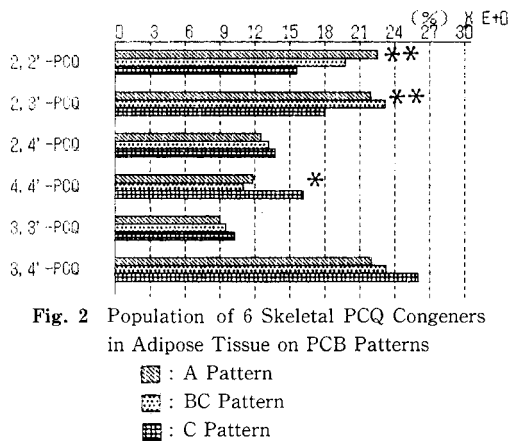
2) Fused silica capillary column; Methyl 50% phenyl Silicone

A; 2,2'-PCQ, B; 2,3'-PCQ, C; 2,4'-PCQ, D; 4,4'-PCQ, E; 3,3'-PCQ, F; 3,4'-PCQ

Table 2 Concentrations of Six Skeletal PCQ Congeners in Adipose Tissue (ppb)^{a)}

Compounds	Types of PCB Pattern in Blood		
	A (N=8) ^{b)}	BC (N=5) ^{b)}	C (N=33) ^{b)}
2, 2'-PCQ	220 ± 119	10.6 ± 13.4	0.81 ± 0.97
2, 3'-PCQ	204 ± 88.7	10.7 ± 11.7	1.00 ± 1.25
2, 4'-PCQ	123 ± 66.6	6.30 ± 7.19	0.66 ± 0.61
4, 4'-PCQ	121 ± 72.9	3.48 ± 3.29	0.68 ± 0.39
3, 3'-PCQ	87.6 ± 48.8	3.88 ± 4.26	0.45 ± 0.33
3, 4'-PCQ	217 ± 114	7.98 ± 8.15	1.17 ± 0.76
Total	973 ± 500	42.92 ± 47.83	4.76 ± 4.07

a) Each value represented the mean ± S. D..

b) Significantly difference, $p < 0.01$.**Fig. 2** Population of 6 Skeletal PCQ Congeners in Adipose Tissue on PCB Patterns

▨ : A Pattern
 ▩ : BC Pattern
 ▤ : C Pattern

Significantly difference, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

0.05) が認められたのは 2,2'-PCQ, 2,3'-PCQ 及び 4,4'-PCQ の構成比であった。しかし、3,4'-PCQ の構成比では、血中 PCB のパターンが A と BC 及び BC と C のグループ間に差が認められなかったが、A と C グループ間には $p < 0.01$ で有意な差が認められた。

PCB の生体内での代謝・排泄等の違いが血液中 PCB パターンに影響することが言われているが、堀らはラットに PCDF を投与し、それを再現した²⁾。この PCDF が PCB パターンに密接に関わりあつているとすると、血中 PCB パターンが A パターンのグループに見られた皮下脂肪中の高濃度 PCQ も PCDF 濃度との関連性が示唆されるのではないかと考えられる。

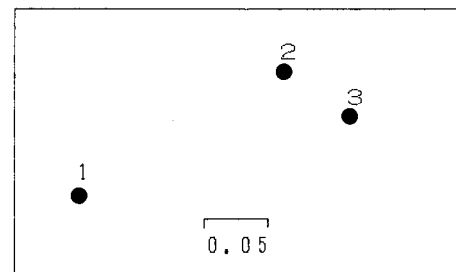
次に、この 3 グループの各 PCQ 骨格異性体構成比の平均値を代表値として、血中 PCB パターンの違いにより皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体構成比のパターン

がどの程度似ているのか、または、違っているのかを数値的に表わすためにパターン類似率を計算し、Table 3 に示した。A パターンと BC パターンの類似率は 0.9968、A パターンと C パターンは 0.9720、BC パターンと C パターンは 0.9782 であった。A パターンと BC パターンは類似率が 0.990 以上であり、A パターンと C パターン及び BC パターンと C パターン間の類似率よりもよく似ていると言うことができる。

また、パターン類似率から $\theta = \arccos \theta$ を計算してパターン間距離を求め、類似率の最も低かった A パターンと C パターンのパターン間距離、0.2373 をベースにして、実際は 100 倍した 23.73 cm の間隔を

Table 3 Similarity of the Patterns of 6 Skeletal PCQ Congeners in Adipose Tissue

PCB Patterns	A Pattern	BC Pattern	C Pattern
A Pattern		0.9968	0.9720
BC Pattern	0.9968		0.9782
C Pattern	0.9720	0.9782	

**Fig. 3** Distance of the Patterns of PCQ Skeletal Congeners in Adipose Tissue
 1: C Pattern Group of PCB in Blood
 2: BC Pattern Group of PCB in Blood
 3: A Pattern Group of PCB in Blood

とり、次に、Aパターンから8.04 cm、Cパターンから20.92 cmで交わる点をBCパターンとして各パターン間距離を Fig. 3 に示した。やはり、前述の類似率と同様、AパターンとBCパターンの距離はAパターンとCパターン及びBCパターンとCパターンの距離と比べると非常に近いことが分かる。

この違いの要因分析を行うために6種の構成パターン成分から1成分を漸次抜いて、5種の構成パターン間距離を計算したものが Table 4 である。AパターンとBCパターンを比較すると、2,2'-PCQ成分を除いてPCQ骨格異性体パターン間距離を計算すると、元の距離が0.0804であったのが、0.0370にまで接近してくる。他のPCQ骨格異性体成分を各々除いても元のパターン間距離とあまり変わりなく、このことから2,2'-PCQ成分はAパターンとBCパターン間を特徴づける重要な要因であることが推測される。また、AパターンとCパターンを比較すると、これもまた2,2'

-PCQ成分を除いた時のPCQ骨格異性体パターン間距離は0.1783で、元のパターン間距離が0.2373であるから、2,2'-PCQ成分はAパターンとCパターン間を特徴づける重要な要因と推測される。さらに、4,4'-PCQ成分を除いた場合では0.2209となり2,2'-PCQを除いた場合ほどパターン間距離は元の距離、0.2373に接近していないが、4,4'-PCQ成分は2つのグループのPCQ骨格異性体パターン間を特徴づける要因と推測される。最後に、BCパターンとCパターンを比較すると、4,4'-PCQ及び2,3'-PCQ成分をそれぞれ除いた時のパターン間距離は0.1700及び0.1876で、元のパターン間距離が0.2092であるから、この2つのピーク成分がこのグループ間を特徴づける要因であると推測される。また、2,4'-PCQ成分を除いてパターン間距離を計算すると、0.2192となり、この成分を取り除いたほうが2つのグループをより特徴づけると推測される。

Table 4 Evaluation of Constituent Factors on Distance of the Patterns of PCQ Skeletal Congeners.

a) Removed the Factor of 2,2'-PCQ

PCB Patterns	A Pattern	BC Patterns	C Pattern
A Pattern		0.0370	0.1783
BC Pattern	0.0370		0.2006
C Pattern	0.1783	0.2006	

c) Removed the Factor of 2,4'-PCQ

PCB Patterns	A Pattern	BC Pattern	C Pattern
A Pattern		0.0826	0.2462
BC Pattern	0.0826		0.2192
C Pattern	0.2462	0.2192	

e) Removed the Factor of 3,3'-PCQ

PCB Patterns	A Pattern	BC Pattern	C Pattern
A Pattern		0.0815	0.2413
BC Pattern	0.0815		0.2139
C Pattern	0.2413	0.2139	

g) Not Removed any Factor

PCB Patterns	A Pattern	BC Pattern	C Pattern
A Pattern		0.0804	0.2373
BC Pattern	0.0804		0.2092
C Pattern	0.2373	0.2092	

b) Removed the Factor of 2,3'-PCQ

PCB Patterns	A Pattern	BC Pattern	C Pattern
A Pattern		0.0864	0.2452
BC Pattern	0.0864		0.1876
C Pattern	0.2452	0.1876	

d) Removed the Factor of 4,4'-PCQ

PCB Patterns	A Pattern	BC Pattern	C Pattern
A Pattern		0.0807	0.2209
BC Pattern	0.0807		0.1700
C Pattern	0.2209	0.1700	

f) Removed the Factor of 3,4'-PCQ

PCB Patterns	A Pattern	BC Pattern	C Pattern
A Pattern		0.0856	0.2469
BC Pattern	0.0856		0.2329
C Pattern	0.2469	0.2329	

総 括

46名の血液について PCB を測定し、パターン分類を行った。その結果、A パターン 8 名、BC パターン 5 名、C パターン 33 名に分類された。

この 3 グループの被検者について皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体を分離能のよいフューズドシリカキャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフ分析法により分析した。

皮下脂肪中 Total-PCQ 骨格異性体濃度の平均値は A パターンのグループが 973 ppb, BC パターンが 42.92 ppb, C パターンは 4.76 ppb であった。各 PCQ 骨格異性体濃度について F 検定を行うと、この 3 グループは有意水準 0.01 で差があることが分った。

皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体構成比 (%) を計算すると、この 3 グループ間で 2,2'-PCQ, 2,3'-PCQ 及び 4,4'-PCQ において有意水準 0.01 ないしは 0.05 で有意に差のあることが認められた。

また、この 3 グループ間の皮下脂肪中 PCQ 骨格異性体構成パターンは A パターンと BC パターン間の類似率が最も高く、A パターンと C パターン間の類似率が最も低かった。A パターンと BC パターン間の非類似性に寄与しているのは 2,2'-PCQ 成分と推測され、A パターンと C パターン間の非類似性に寄与しているのも 2,2'-PCQ 成分と推測された。また、BC パターンと C パターン間の非類似性には 2,3'-PCQ 及び 4,4'-PCQ 成分が寄与しているものと推測された。

本研究に際し、貴重な試料を提供していただいた方々に対して深く感謝いたします。なお、本研究成果は昭和 61 年度厚生省科学研究補助金及び同年度北九州市よりの研究補助金に負うものであり、ここに深く感謝の意を表します。

文 献

1) Hall, E. T.: Variations of florilil activity: Method to increase retentive properties and improve recovery and elution patterns of insectisides. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 54, 1349-1351, 1971.

2) 堀伸二郎, 宮田秀明, 前田浩一郎, 村上保行,

榎木 隆: 油症における体内残留 PCB の質的究明., 食衛誌, 20, 166-172, 1979.

3) 前田浩一郎, 榎本 隆: PCQ 定量法の検討—PCQ 完全塩素化の検討—. 大阪府立公衆衛生研究所報告, 食品衛生編, 9, 89-94, 1978.

4) 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.

5) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 吉田真由美, 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.

6) Miyata, H., Murakami, Y. and Kashimoto T.: Investigation of polychlorinated quaterphenyl in Kanemi rice oils caused the "Yusho"., J. Food. Hyg. Soc., 19, 233-235, 1978.

7) Mochiike, A., Matsuo, T., Kanamori, H., Hoshita, N. and Sakamoto, I.: Determination of PCQ by HPLC and its application to the analysis of Yusho patient blood and toxic rice oil and to the distribution of synthetic PCQs in mice., Chemosphere, 15, 559-606, 1986.

8) Nagayama, J., Masuda, Y. and Kuratune, M.: Chlorinated dibenzofurans in Kanechors and rice oil used by patients with Yusho., Fukuoka Acta Med., 66, 593-599, 1975.

9) Takenaka, S., Iida, T., Nagase, M., Takata, S., Masuda, Y., Koga, N., Kuroki, J., Hokama, Y. and Yoshimura, H.: Accumulation, excretion and effects on hepatic enzymes of polychlorinated quaterphenyl congeners in rats., J. Pharmacobio-Dyn., 8, 571-577, 1985.

10) Takenaka, S., Takahashi, K. and Masuda, Y.: Pharmacokinetics of polychlorinated quaterphenyl congeners in rats after an oral dose., Chemosphere, 15, 739-745, 1986.

11) 高田 智, 毛利隆美, 飯田隆雄, 中村周三, 高橋克己, 増田義人: クアテルフェニール, ポリ塩化クアテルフェニールの合成, 福岡医誌, 74, 193-201, 1983.

12) 田村真八郎: 分析値のパターンの取り扱い, ぶんせき, 6, 379-387, 1987.

13) 油症研究班分析部分: 油症患者が使用したライスオイル中の有毒物質の化学的検索, 福岡医誌, 60, 496-512, 1969.

油症患者の皮脂, 皮下膿瘍中の PCB および PCDF 分析

第一薬科大学 物理分析学教室

黒 木 広 明・大 間 美 和

原 口 浩 一・増 田 義 人

九州大学生体防御医学研究所

猿 田 隆 夫

Quantitative Analysis of Polychlorobiphenyl (PCB) and Polychlorodibenzofuran (PCDF) Isomers in the Comedo and Subcutaneous Abscess of Yusho Patients

Hiroaki KUROKI, Miwa OHMA, Koichi HARAGUCHI

and Yoshito MASUDA

*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences,
Minami-ku, Fukuoka 815, Japan*

Takao SARUTA

*Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
Tsurumi, Beppu 874, Japan*

The comedo sampled in 1982 and 1983, subcutaneous abscess (mamma, groin) sampled between 1977 and 1985, of Yusho patients were analyzed for 7 polychlorobiphenyl (PCB) and polychlorodibenzofuran (PCDF) isomers by capillary gas chromatography and capillary gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical ionization mode. The concentrations of PCB in comedo and subcutaneous abscess (9-15 years after the onset) were similar to those in lung and liver (9 years after the onset) except subcutaneous abscess (mamma). The level of PCB in mamma was significantly higher than other samples. PCDF were detected in the comedo and mamma investigated (9-14 years after exposure). The level of PCDF were much higher than that of control fat.

油症の発生当初, 患者の脂肪組織などとともに皮脂から高濃度の polychlorobiphenyl (PCB) が認められている¹⁾。また, 実験的 PCB 中毒サルおよび患者の瞼板腺から採取された内容物に PCB が存在することが明らかにされている²⁾。このように, 皮脂や瞼板腺の内容物は PCB の排泄経路の 1 つと考えられるが, 最近の皮脂中などの PCB を分析した報告例は見られない。今回, 比較的最近の油症患者の皮脂中の PCB および polychlorodibenzofuran (PCDF) の分析を行った。また, 摘除手術をうけた油症患者の皮下膿瘍についても分析を行った。これらの測定結果について報告する。

実 験 方 法

1. 試料

(1) 皮脂

1982 年および 1983 年に同一患者より採取した皮脂 0.01~0.59 g を用いた。

(2) 皮下膿瘍

九大生体防御医学研究所において 1977 年~1985 年に同一患者より摘除された皮下膿瘍 (左乳房部, 右鼠けい部など) 0.025~0.33 g を用いた。

(3) その他の組織

患者の肝臓および肺組織は九大医学部病理学教室より提供された。

2. 試薬および溶媒

PCB および PCDF 標準物質は当教室で合成したものまたは Analabs 社 (U. S. A.) より購入したものを使用した³⁾⁵⁾。エタノール，n-ヘキサン，無水硫酸ナトリウムおよびシリカゲルはいずれも PCB 分析用のものを用いた。

3. 試料処理方法

(1) 皮脂，皮下腫瘍 (PCB 分析)

前報⁶⁾の方法にしたがって行った。すなわち試料 (0.01~0.02 g) を秤量し試験管にとり，これに水 3 ml，エタノール 3 ml および水酸化ナトリウム 0.3 g を加え，よく振り混ぜて，70°C で 2 時間加熱した。冷後 n-ヘキサン 5 ml で 2 回抽出した。n-ヘキサン層を集めて水洗し，無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち，活性化したシリカゲル (ワコーゲル S-1) 0.5 g のカラムクロマトグラフィにかけた。カラムは n-ヘキサン 25 ml で溶出させ，溶出液をスニードーカラム付試験管で濃縮した。濃縮 n-ヘキサン溶液に，内部標準物質として 2, 3, 4, 5, 6, 2', 5'-hepta-CB を 1 ng 添加し，ガスクロマトグラフの試料とした。

(2) 皮脂，皮下腫瘍 (PCDF 分析)

試料 (0.3~0.6 g) に内部標準物質として ¹³C-2, 3, 7, 8-tetracholorodibenzofuran (TCDF) を 1 ng 添加し，1N NaOH エタノール溶液 20~30 ml を加え 80° で 1.5 時間加熱した。冷後 40~60 ml の水を加え n-ヘキサン 30 ml で 3 回抽出した。n-ヘキサン抽出液を約 20 ml の濃硫酸で数回振った後，n-ヘキサン層を水洗，脱水した。この n-ヘキサン溶液を濃縮し活性炭カラムに付し，まず 20 ml ジクロロメタン+n-ヘキサン (1:9) で，次いで 80 ml トルエンで溶出した。このトルエン溶出液を留去後 n-ヘキサン溶液としフロリジカルカラムに付し，20 ml ジクロロメタン+n-ヘキサン (1:99) および 50 ml ジクロロメタンで順次溶出した。ジクロロメタン溶出液についてマスフラグメントグラフィーの試料とした。

(3) 肝臓，肺 (PCB および PCDF 分析)

PCDF 分析の皮脂，皮下腫瘍と同様に行った。ただし，濃硫酸処理後の n-ヘキサン溶液をアルミナカラムに付し，まず 20 ml ジクロロメタン+n-ヘキサン (1:99) で，次いで 30 ml ジクロロメタン+n-ヘキサン (2:8) で溶出した。前者に PCB が後者に PCDF が溶出される。この PCDF 分画を濃縮し (2) と同様に活性炭カラムに付した。前者に PCB が，後者に PCDF が溶出される。後者のトルエン溶出液を留去後，n-ヘキサン溶液とし PCDF 分析のための

マスフラグメントグラフィーの試料とした。アルミナカラムおよび活性炭カラムの最初の分画を合わせ，これに 2, 3, 4, 5, 6, 2', 5'-hepta-CB を 10~20 ng 加え，PCB 分析の試料とした。

4. ガスクロマトグラフィー

PCB の分析は島津 GC-7AG 型ガスクロマトグラフに電子捕獲型検出器 (⁶³Ni) を装着したものを使用した。カラムは ULBON HR-52 (島津) 0.24 mm×50 m，キャリアガスは高純度窒素ガスを用いた。カラム温度は，180°で最初 4 分，16°/分で 250°まで昇温，その後，250°で一定に保持した。ガス流量はカラム内 1.2 ml/min. とした。試料の注入はムービングニードル形ソルベントカット試料装置 (島津) を用いて行った。

5. マスフラグメントグラフィー

測定には日本電子 JMS-DX300 ガスクロマトグラフ/質量分析計/データ処理システム JMA-DA 5000 を使用し，反応ガスにメタンを用いる負イオン化学イオン化モードで行った。ガスクロマトグラフにはフューズドシリカキャピラリーカラム DB 225 (0.252 mm×50 m，J and W 社) を取り付け，キャピラリーカラムはイオン源部へ直接接続した。キャリアガスにはヘリウムガスを用い，ガス流量はカラム内 1.4 ml/min. とした。カラム温度は 2 分間 190°C に保ったのち，8°C/分で 250°まで昇温させ 250°にそのまま保持した。マスフラグメントグラフィーにおける四塩化，五塩化，六塩化および七塩化 PCDF のモニターイオンとして molecular anion ($M^{-}+2$) および ($M^{-}-Cl+O+2$) あるいは ($M^{-}-Cl+O$) イオンを利用した。八塩化 PCDF では $M^{-}+4$ のみを，¹³C-2, 3, 7, 8-TCDF では ($M^{-}-Cl+O$) イオンのみを用いた。試料はソルベントカット導入装置を用いて溶媒を自然蒸発させた後，注入した。その他の測定条件は次の通りである。メタンガス圧 1×10^{-5} Torr，注入口温度：280°，セパレーター温度：250°，インレット温度：250°，イオン化室温度：250°，イオン化エネルギー：70 eV，イオン化電流：300 μ A，加速電圧：3 KV

6. ガスクロマトグラフィーによる PCB の定量

各 PCB 異性体の定量はピーク面積比による内部標準法により行い，クロマトパック C-R 2 AX (島津) で面積測定および計算をした。

7. マスフラグメントグラフィーによる PCDF の定量

定量は内部標準法により行った。内部標準物質

(IS) として ^{13}C -2, 3, 7, 8-TCDF を用いた。各 PCDF 異性体の定量はマスフラグメントグラムにおける各 PCDF と IS のピーク面積比から行った。

結果および考察

1. PCB 分析

Table 1 に油症患者の発症後 9～17 年後における皮脂および摘除した皮下膿瘍中の主な 7 つの PCB 異性体について定量した結果を示す。比較のため患者の肺、肝臓中の PCB について定量した結果もあわせて Table 1 に示した。発症直後の皮脂から 30～50 ppm の PCB が検出され¹⁾、皮脂は PCB の排泄経路の 1 つであることが知られている。今回の分析においても皮脂から 60～200 ppb の PCB が検出された。これは 9 年後の患者の肝臓、肺における PCB 濃度と同程度であった。一般人の皮脂を分析していないため、患者の皮脂中の PCB 濃度を一般人の場合と比較することができず、14～15 年後においても患者の皮脂への PCB の排泄が持続されているかどうか判断できなかった。皮下膿瘍における PCB 濃度も左乳房部を除き皮脂中の濃度と同程度であった。左乳房部皮下膿瘍（9 年後）の PCB 濃度は 2.4 ppm と、とりわけ高濃度であったが、これがどういう意味をもつのか、あるいは

試料摘除の際に脂肪が混入するなどの分析上の問題に由来するのか明らかでない。

2. PCDF 分析

Table 2 に 2, 3, 7, 8-位に塩素を有する PCDF 異性体について定量した結果を示す。分析した 2 例の皮脂（1982 年）および左乳房部皮下膿瘍（1977 年）いずれからでも PCDF が検出された。その値は一般人脂肪組織の PCDF 濃度（データ未発表）の数倍～数十倍であり、とくに高い PCB 濃度を示した左乳房部皮下膿瘍では PCDF 濃度も高かった。皮脂および左乳房部皮下膿瘍の PCDF 濃度は、それぞれ PCB 濃度の 1/230 および 1/510 であった。Table 2 に示した PCDF のなかでは 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) および 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran (HCDF) が主成分であり、2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) および octachlorodibenzofuran (OCDF) は検出されなかった。上記の PCDF 異性体の他に、マスフラグメントグラフィに用いた 2 つのモニターイオンに同時に認められるピークが多く認められ、しかもそのうちのいくつかのピークの保持時間は PCDF 標品の保持時間と一致した (Fig. 1)。このように定量した PCDF 以外に約 10 種の TCDF～HCDF 異性体の存在をうかがわせ

Table 1 Concentrations of PCB isomers in the tissues of Yusho patients (ppb).

PCB isomer	YM		subcutaneous abscess (SI)			GK	
	Comedo	Comedo	Mamma	Groin	Unknown	Lung	Liver
	(1982) 0.02g	(1983) 0.01g	(1977) 0.07g	(1979) 0.025g	(1985) 0.03g	(1977) 24.1g	(1977) 18.2g
2,4,5,3',4'-Penta-CB	5	7	60	8	4	1	1
2,4,5,2',4',5'-Hexa-CB	60	30	980	160	50	90	10
2,3,4,2',4',5'-Hexa-CB	30	9	660	90	10	40	10
2,3,4,5,3',4'-Hexa-CB	10	6	240	30	6	10	5
2,3,4,5,2',4',5'-Hepta-CB	10	3	200	40	10	20	2
2,3,4,5,2',3',4'-Hepta-CB	80	7	300	30	8	10	20
Total	195	62	2440	358	88	171	48

Table 2 Concentration of PCDF isomers in the tissues of Yusho patients (ppt)

	2,3,7,8- TCDF	2,3,4,7,8- PenCDF	1,2,3,4,7,8- HCDF	1,2,3,6,7,8- HCDF	1,2,3,4,6,7,8- HepCDF	OCDF	Total
YM comedo (1982) 0.59g	ND	360	350	42	100	ND	852
SI mamma (1977) 0.33g	ND	2760	1640	220	170	ND	4790

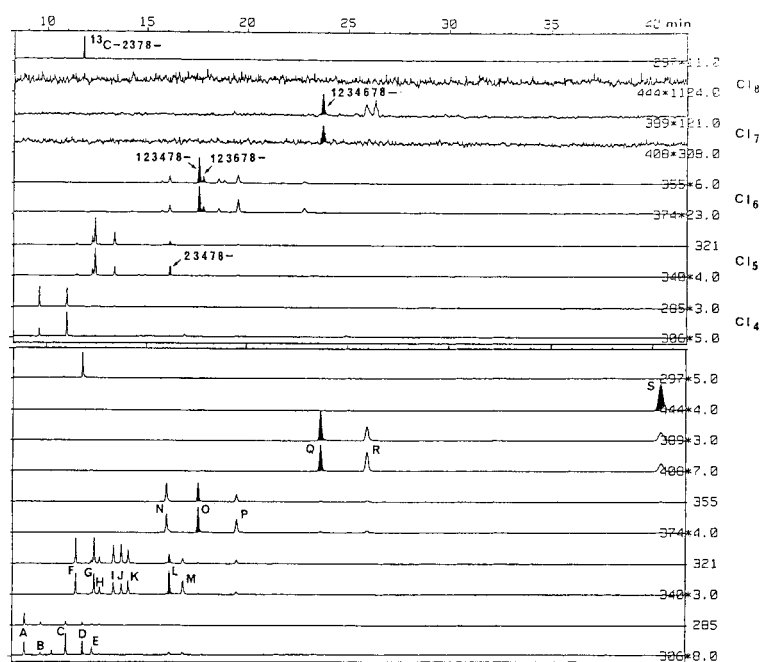


Fig. 1 Mass fragmentograms of the PCDF fraction obtained from the subcutaneous abscess (mamma) of Yusho patient and of PCDF standards. The numbers of chlorine atoms substituted on the dibenzofuran ring are indicated.

Peaks A-S correspond to 1, 3, 6, 8-TCDF, 1, 3, 6, 7-TCDF, 2, 3, 6, 8-TCDF, 2, 3, 7, 8-TCDF, 2, 3, 6, 7-TCDF, 1, 2, 4, 6, 8-PenCDF, 1, 2, 4, 7, 8-PenCDF, 1, 2, 4, 7, 9-PenCDF, 1, 2, 3, 7, 8-PenCDF, 1, 2, 3, 6, 7-PenCDF, 1, 2, 6, 7, 8-PenCDF, 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF, 2, 3, 4, 6, 7-PenCDF, 1, 3, 4, 6, 7, 8-HCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF, 1, 2, 3, 6, 8, 9-HCDF, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HepCDF, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9-HepCDF and OCDF, respectively.

るが、この点についてはさらに検討が必要である。
m/z 389 を用いたマスフラグメントグラフィーにおいて、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HCDF のあとに認められる 2 ~ 3 のピーク (Fig. 1) は、m/z 408 では認められていないことから、HCDF ではなく HCDF のエトキシ体と推定される⁴⁾。また、OCDF は未検出であったが、アルカリ分解処理によって分解した可能性もある。以上、今回用いた PCDF 分析法の問題点もいくつか考えられた。

総 括

油症発症後 9 ~ 15 年経過した 1977 年 ~ 1985 年にかけて、油症患者より採取した皮脂および皮下腫瘍中の 7 つの主な PCB 異性体および 2, 3, 7, 8-位に塩素を有する PCDF 異性体について、ガスクロマトグラフィーにより PCB を、あるいはマスフラグメントグ

フィーにより PCDF を分析した。

1. 14 ~ 15 年後の皮脂および 9 ~ 17 年後の皮下腫瘍中の PCB 濃度は高濃度を示した左乳房部の皮下腫瘍を除き、60 ~ 370 ppb であった。この値は患者の肝臓、肺 (9 年後) の PCB 濃度と同程度であった。
2. 左乳房部皮下腫瘍 (9 年後) 中の PCB 濃度は他の試料にくらべてきわめて高かった。
3. 14 年後の皮脂および 9 年後の左乳房部皮下腫瘍から一般人脂肪組織の数倍 ~ 数十倍の PCDF が検出された。左乳房部皮下腫瘍において濃度が高かった。

文 献

- 1) 五島應安, 樋口謙太郎: 油症 (塩化ビフェニール中毒症) の皮膚科学的症候論。福岡医誌 60: 409-431, 1969.
- 2) 向野利彦, 大西克尚, 廣中博見: 油症患者の眼症状 (第 5 報)。腺板腺圧迫排出物中 PCB の検出。

福岡医誌 72:237-241, 1981.

3) Kuroki, H., Haraguchi, K., Masuda, Y.: Synthesis of polychlorinated dibenzofuran isomers and their gas chromatographic profile. Chemospher 13: 561-573, 1984.

4) 黒木広明, 原口浩一, 増田義人: Polychlorodibenzofuran (PCDF) のアルカリ分解によるエトキシ (EtO) 体の生成. 福岡医誌 78:193-198, 1987.

5) Kuroki, H. and Masuda, Y.: Structures and concentration of the main components of poly-

chlorinated biphenyls retained in patients with Yusho. Chemospher 6: 469-474, 1977.

6) 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一: 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニール異性体. 福岡医誌 76:150-152, 1985.

7) 塚元久雄他: 油症患者が使用したライスオイル中の有毒物質の科学的検索. 福岡医誌 60: 496-512, 1969.

8) 吉村英敏他: サルの PCB 中毒症に関する研究 (第2報). 福岡医誌 72:155-184, 1981.

高分解能 MS-SIM 法による油症患者組織 および原油中の PCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs

摂南大学薬学部

榎 本 隆・宮 田 秀 明

高 山 幸 司・尾 垣 淳 治

Levels of PCDDs, Coplanar PCBs and PCDFs in Patients with Yusho and the Causal Oil by HR-GC·HR-MS

Takashi KASHIMOTO, Hideaki MIYATA, Koji TAKAYAMA
and Junji OGAKI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University,
45-1, Nagaotoge-cho, Hirakata, Osaka 573-01, Japan*

We established a micro-analytical method for coplanar PCBs, PCDDs and PCDFs, consisting of alkaline decomposition for 2 hr at a room temperature, $\text{AgNO}_3 \cdot \text{Silica}/\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{Silica}/\text{KOH} \cdot \text{silica}$ multi-layer column chromatography, activated charcoal silica column chromatography and alumina column chromatography. This method was adapted for Yusho causal oil samples and the tissues of Yusho patients. The final PCDDs/PCDFs fraction was analysed in a SIM technique by using high resolution gas chromatography·high resolution mass spectrometer (resolution 8000 or 9000). Obtained results are as follows.

1) Tentative Coplanar PCBs were detected at the almost same levels in two samples of Yusho causal oil with production date of February 9th and 10th in 1968. The average levels of 3, 4, 3', 4'-tetra-, 3, 4, 5, 3', 4'-penta- and 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorinated biphenyls were 1.3, 0.19 and 0.01 ppm, respectively. The total was 0.94 % of PCBs in the oil.

2) Two patients with Yusho had coplanar PCBs at average levels of 2400 ppt in their small intestine and 800 ppt in their liver, equivalent to 19 and 5.6 times of their corresponding levels in unexposed persons. 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorinated biphenyl resided as a main component in unexposed individuals whereas more toxic 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorinated one resided mainly in Yusho patients.

3) Penta- through octachlorinated dibenzo-p-dioxins were newly detected in the Yusho oil specimens. The total concentration was 0.13 ppm, equivalent to 0.068 times of the PCDF level in the oil. The congener ratios of penta-, hexa-, hepta- and octachlorinated dibenzo-p-dioxins were 10.0, 39.2, 7.1 and 7.1, respectively.

4) Yusho patients had larger tissue levels of PCDDs than did unexposed persons. The main residual component in Yusho patients, as well as in unexposed person, had 2, 3, 7, 8 chlorine substitution in their molecule.

5) Renalysis of the causal oils revealed the present of hepta- and octachlorinated dibenzofurans, which had been never reported in previous papers. In addition, heptachlorinated one was present as a main component with a component ratio of 42.1 %. This gave a fairly different result from the previous data.

6) The levels of PCDFs in the tissue of Yusho patients were two to three digits higher than that of unexposed persons. Heptachlorinated dibenzofuran in the Yusho patient as well as in the causal oil was present as a major constituent.

これまでの研究によって、油症原因油中にはPCBs, PCQsおよびPCDFsが高濃度で含まれていること³⁾⁹⁾¹³⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²¹⁾, さらに, PCQs, PCDFsは一般健康者や職業的PCB汚染者に比べて、油症患者ではその体内残留濃度がきわめて高いことが明らかにされている^{7)~10)}。治療過程の相違²⁾⁴⁾¹¹⁾からPCQs, PCDFsが油症発症に大きく関与していることが推測された¹⁰⁾。同様なことは1979年台湾で発生したYu-Cheng患者においても認められている⁸⁾。その後、実験動物やサルを用いた研究によって、油症発症の主たる原因物質はPCDFsであることが実証された⁵⁾¹²⁾。

上記の一連の研究において化合物の分析過程の前処理は熱アルカリ分解法をいずれも採用している。しかし、この処理法では高塩化PCDFsやPCDDsが容易に分解することが、当研究室におけるPCDD分析法の検討段階で明らかになっている。一方、欧米におけるビル火災により、PCBsからPCDFs, PCDDsが熱反応によって生成すること²⁴⁾や、廃PCB製品中にPCDFsと同濃度のPCDDsの存在する¹⁾ことが確認されている。また、強毒性の2,3,7,8-TCDDや2,3,7,8-TCDFと同種の生物影響を有し、しかも、PCB異性体中とくに強い毒性を示すCoplanar PCBs (Co-PCBs)がPCB製品のカネクロールやアロクロール中に検出され、一般健康者や各種動物体内にも残留していることが報告されている²⁶⁾²⁷⁾。

本研究では上記の新知見を考慮して、油症原因油および患者組織中PCDFsの再解析を行うとともにPCDDsおよびCo-PCBsについて存在の有無を検討した。

実験方法

1. 試薬

(1) n-ヘキサン、塩化メチレン、ベンゼン、エタノールおよび無水硫酸ナトリウム：関東化学工業社製、残留農薬分析用；硝酸銀、水酸化カリウム：和光純薬工業社製特級；濃硫酸：和光純薬工業社製精密分析用

(2) カラムクロマト用アルミナ：メルク社製 (Art. No.1077)、中性、活性度1

(3) カラムクロマト用シリカゲル：メルク社製 Kiesel gel 60 (70~230メッシュ)のものをメタノール洗浄後130°Cで一夜活性化したもの。

(4) 活性炭：Atlas Powder Co.製 Darco G-60を(3)の洗浄済シリカゲルに2% (w/w)の比率で混合し、よく攪拌したもの。

(5) 10%硝酸銀シリカゲル：(3)のシリカゲルに

40%硝酸銀溶液を加えたのちロータリーエバポレーターで水分を除去し、硝酸銀がシリカゲルに対して10% (w/w)になるようにしたもの。

(6) 22%および44%硫酸シリカゲル：(3)の洗浄済シリカゲルに硫酸を22%あるいは44% (w/w)になるようにすばやく添加したのち十分振とうし粉末状にしたもの。

(7) 1.98% KOH シリカゲル：(3)の洗浄済シリカゲルに1N KOH溶液を加えたのちロータリーエバポレーターで水分を除去し、粉末状にしたもので、シリカゲルに対してKOHを1.98%になるように調整したもの。

(8) Coplanar PCB標準品：3, 4, 3', 4'-tetrachlorinated biphenyl (3, 4, 3', 4'-T₄CB)および3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorinated biphenyl (3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB)はAnalab社製3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorinated biphenyl (3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB)は愛媛大学立川涼博士から譲渡されたもの。

(9) PCDD標準品：¹³C-2, 3, 7, 8-T₄CDD, ¹³C-O₈CDD, 1, 2, 3, 4-T₄CDD, 2, 3, 7, 8-T₄CDD, 1, 2, 3, 4, 7-P₅CDD, 1, 2, 3, 7, 8-P₅CDD, 1, 2, 3, 4, 7, 8-H₆CDD, 1, 2, 3, 6, 7, 8-H₆CDD, 1, 2, 3, 7, 8, 9-H₆CDDおよび1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H₇CDDはCambridge Isotope Lab.製, O₈CDDはAnalab Inc.製および1, 3, 6, 8-T₄CDDは日本特殊農薬工業社から譲渡されたもの。

(10) PCDF標準品：2, 3, 6, 8-T₄CDF, 2, 3, 7, 8-T₄CDF, 1, 2, 4, 7, 8-P₅CDF, 2, 3, 4, 7, 8-P₅CDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-H₆CDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-H₇CDFは第一薬科大学増田義人博士より譲渡されたもの。1, 2, 3, 7, 8-P₅CDF, 1, 2, 3, 6, 7, 8-H₆CDF, 1, 2, 3, 7, 8, 9-H₆CDF, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H₆CDFおよび1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H₇CDFはCambridge Isotope Lab.製, およびO₈CDFは和光純薬工業社製。

2. 試料

(1) 油症患者臓器：油症発症1年目と3年目に死亡した2名の男性患者 (case 1は九大病院カルテ No. 15868, 25歳, 1969年7月9日死亡, case 2は九大病院カルテ No. 16634, 46歳, 1972年5月16日死亡)の腸および肝臓。

(2) 健康者臓器：1987年に事故死した人から採取した皮下脂肪および肝臓。

(3) 油症原因油：1968年2月9日および10日製造日のカネミライスオイルでそれぞれのロット No. は8-29-15520および8-210-16793である。

3. 分析法

試料約 10 g を分液ロートにとり、添加回収用内部標準品の ^{13}C -3, 4, 3', 4'- T_4CB , ^{13}C -2, 3, 7, 8- T_4CDD および ^{13}C - O_2CDD を 1~2 ng, さらに, 0.5 N KOH エタノール溶液 150 ml を添加したのち 2 時間室温にて振とうする。アルカリ分解後, 水 75 ml を加え, n-ヘキサン 75 ml で 2 回抽出を行う。n-ヘキサン抽出液を合し, 水 50 ml で 2 回水洗, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, K. D. 濃縮器で約 10 ml に濃縮する。この試料を Fig. 1 に示す硝酸銀シリカ・硫酸シリカ・水酸化カリウムシリカ積層カラムに流入し, n-ヘキサン 2 ml で 2 回試験管およびカラム管壁を洗浄したのち n-ヘキサン 100 ml を流し, PCBs, PCDFs および PCDDs を溶出させる。この溶出液を約 2 ml に濃縮し, 活性炭・シリカゲル混合物 0.5 g (活性炭として 10 mg), その上に無水硫酸ナトリウム 2 g を充填したカラム (0.7 cm ϕ 流入し, n-ヘキサン 1 ml で 2 回試験管およびカラム管壁を洗い込み, まず 2 %ベンゼン・n-ヘキサン混液 200 ml で PCBs および DDE を流下させた。つづいて, 80°C に加温したトルエン 100 ml で Co-PCBs, PCDFs, PCDDs を溶出させる。

第 1 画分を適当量に濃縮後, ECD (^{63}Ni)-GC により分析し, 著者らの数値化法²⁸⁾により PCBs を定量した。

第 2 画分に n-デカン 0.2 ml を添加したのちロータリーエバポレーターを用いて 50°C でトルエンを留去, さらに窒素気流により完全にトルエンを除去した。n-ヘキサンで液量を 2 ml に調整したのちアルミナ 5 g およびその上層に無水硫酸ナトリウム 2 g を充填したカラム (1 cm ϕ) に流入し, 常法通り試験管およびカラム管壁を n-ヘキサンで洗浄したのち流速 1 ml/分で, 2.5 %塩化メチレン・n-ヘキサン混液 200 ml を

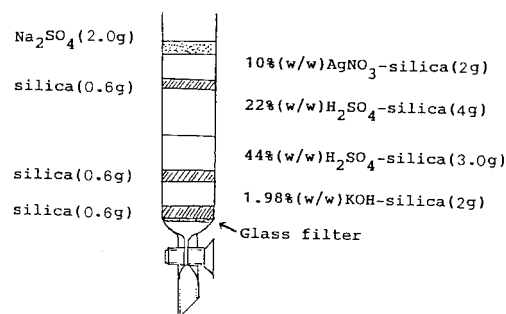


Fig. 1 AgNO_3 -silica· H_2SO_4 -silica·KOH-silica multi-layer column.

流し, Co-PCBs を溶出させる。つづいて 50 %塩化メチレン・n-ヘキサン混液 120 ml で PCDDs, PCDFs を流下させた。

アルミナカラムからの第 1 画分は K. D. 濃縮器を用いて濃縮, 塩化メチレンを n-ヘキサンに置換したのち ECD (^{63}Ni)-GC および GC-MS による同定, 定量を行った。

第 2 画分も濃縮, 塩化メチレンを n-ヘキサンで置換したのち GC-MS 分析を行った。

4. 分析機器

(1) PCB 定量用

^{63}Ni -ECD 装着島津製作所製 GC-7AG ガスクロマトグラフに 2 %OV-1 をコーティングした Gaschrom Q (100~120 メッシュ) を充填したカラム (2.1 m $\times$ 2.6 mm ϕ) を用い, カラム温度 194°C, キャリヤガス (N_2) 流量 30 ml で分析した。

(2) Co-PCBs 分析用

a) ECD-GC 分析

Hewlett-Packard Ultrabond # 2 (5% phenylmethyl silicone, 25 m $\times$ 0.31 mm, 0.17 μm) および Supelco SPB-20 (Carbowax 20, 30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μm) キャピラリーカラムを用いて分析を行った。前者のカラムにおける分析条件はクリーン ECD (^{63}Ni) を装着した島津 GC9A ガスクロマトグラフを用い, 120°C 保持 1 分, 120~180°C を 20°C/分, 180~260°C を 10°C/分, 260~310°C を 20°C/分の割合で昇温し, 310°C で 10 分間保持した。注入方式は splitless 方式である。後者の場合は同種のガスクロマトグラフを用い, cold oncolumn 方式により注入した。カラム温度は 60°C~200°C を 20°C/分, 200~260°C を 6°C/分で昇温し, 260°C で 20 分間保持した。

b) GC-MS 分析

Hewlett-Packard 5790 A ガスクロマトグラフ・JEOL DX 300 質量分析計に Hewlett-Packard Ultrabond # 2 カラムを装着し, $[\text{M}]^+$ と $[\text{M}+2]^+$ (T_4CB), $[\text{M}+2]^+$ と $[\text{M}+4]^+$ (P_5CB と H_6CB) の質量数において SIM 法で分析した。分析条件は以下の通りである。カラム温度 170°C で保持 2 分, 170~295°C を 10°C/分で昇温, 295°C で 5 分保持, 注入口温度 270°C, セパレーター温度 250°C, イオン化電圧 70 eV, 加速電圧 3 kV, イオン化電流 300 μA , イオン化モード EI, 分解能 500 である。

(3) PCDDs および PCDFs 分析用

Hewlett-Packard 5890 A ガスクロマトグラフ・VG 250-70 S 質量分析計を用い, 高分解能 SIM 法により

分析を行った。4 塩化～6 塩化物は高分離能をもつ Supelco 社製 SP-2331 (30 m×0.25 mm, 0.20 μ m) を用, カラム条件は 170°C 2 分保持, 170～240°C を 4°C/分昇温, 240°C で 20 分保持である。7 塩化および 8 塩化物の分析には Quadrex 社製 “007” bonded methyl 50 % phenyl silicone (25 m×0.25 mm, 0.10 μ m) を用い, 100°C 2 分保持, 100～260°C 16°C/分昇温分析を行った。その他の分析条件は以下の通りである。注入口温度 260°C, セパレーター温度 290°C, イオン化電圧 70 eV, 加速電圧 8 kV, イオン化電流 200 μ A, イオン化モード EI, 分解能 9000 (SP-2331 カラムの時) および 8000 (“007” bonded カラムの時)。PCDD, PCDF 各同族体ともに親イオン群と COCl が消失した特徴的なフラグメントイオン群におけるもっとも強いイオンの 2 つの質量数で SIM 分析を行った。

結果および考察

1. 分析法

最近筆者らは PCDD, PCDF 微量分析法を確立し, 貝類, 食品および人体試料の分析を行っている¹⁹⁾²²⁾。その際, 前処理として 0.5 N KOH エタノール室温振とう 2 時間のアルカリ分解操作を採用している。この方法は従来の油症研究で採用されていた 1～1.5 N KOH エタノール還流分解¹³⁾¹⁷⁾²¹⁾ に比べて穏やかな条件であり, 高塩化物, とくに 7 塩化や 8 塩化物が分解しない利点を有する。さらに, この処理後に行う硝酸銀シリカ・硝酸シリカ・KOH シリカ積層カラム精製は着色物質, 炭化水素および硫黄化合物などの分析妨害物をきわめて高率よく除去できる。以上の利点からこの 2 種類の前処理を本法に採用している。

PCDDs, PCDFs のような Coplanar 化合物は活性炭によく吸着されるために他の化合物からの分別分離法として最近よく利用されている⁶⁾¹⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾。しかし,

活性炭は吸着性がきわめて強く微粉状であるためその適用量が微量かつ, カラムへの充填が困難な吸着剤である。そこで多くの場合, 支持材としてポリウレタン²²⁾, ガラスファイバー¹⁴⁾²⁵⁾ などが併用されている。しかし, これらのものは妨害物を含んでいたり, 目的物を吸着することがあるためにその使用に際してあらかじめの溶媒洗浄をしておく必要がある。活性炭を直接使用した場合²⁶⁾²⁷⁾, カラムの充填に 125 mg の活性炭が必要である。したがって, 吸着性の強い PCDDs, PCDFs, とくに O₂CDD や O₂CDF の溶出にトルエンが 800 ml 以上も必要となる。本法ではこれらの欠点を補うために Coplanar 化合物に対してほとんど吸着性を示さないシリカゲルに活性炭を混合, 増量する方法を採用した。この場合, 活性炭 10 mg を含むシリカゲル混合物は 0.5 g になり, 0.7 cm ϕ のカラムに容易に充填することが可能である。さらに, Coplanar 化合物の溶出を容易にするために 80°C のトルエンを採用している。この方法ではわずか 100 ml のトルエンで Coplanar 化合物を溶出することができる。

Co-PCBs と PCDDs や PCDFs のいくつかの異性体 (1, 3, 6, 8-T₄CDD および 1, 3, 6, 8-T₄CDF) の極性が類似しているために現在まで完全な分別定量を行った報告がない。しかし, 中性アルミナ (Merck Art.1077, 活性度 1) を用いた今回の方法により Co-PCBs と PCDDs, PCDFs の分離が初めて可能になった。

2. Co-PCBs

2 種類の極性の異なる高分解能キャピラリーカラム (5 % phenylmethyl silicone 系と Carbowax 20 M 系) による ECD-GC 分析結果では健常者, 油症患者および原因油の Co-PCB 画分のいずれにおいても Co-PCBs である 3, 4, 3', 4'-tetra-(3, 4, 3', 4'-T₄CB), 3, 4, 5, 3', 4'-penta-(3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB) および 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorinated biphenyl (3, 4, 5, 3', 4',

Table 1 Levels (ppm) of tentative coplanar PCBs in Yusho oils and Kanechlor 400

Sample	Coplanar PCBs				PCBs
	3,4,3',4'-T ₄ CB	3,4,5,3',4'-P ₅ CB	3,4,5,3',4',5'-H ₆ CB	total	
Yusho oil					
K-3	1.3	0.17	0.0098	1.48	150
K-4	1.2	0.20	0.01	1.41	160
PCB preparation					
Kanechlor 400 ²⁶⁾	8000	68	0.44	8100	1000000

: Yusho oil K-3 and K-4 have production date of Feb. 9 and Feb. 10 in 1968, respectively

5'-H₆CB) と同一の保持時間を持つ成分が 20 % の誤差範囲内で類似した値を示した。また、5 % phenyl-methyl silicone キャピラリーカラムを用いた GC-MS 分析でも近似した値を示すことから、この画分には多数の夾雑成分が認められるが、これら 3 成分を Co-PCBs と推定し、定量した。

Table 1 に示すように 1968 年 2 月 9 日 (K-3) および 2 月 10 日 (K-4) 製造日の原因油中には類似した濃度の Co-PCBs が含まれていた。K-3 および K-4

油中の total Co-PCBs 濃度は 1.48 および 1.51 ppm であり、total PCB 濃度の約 1.0 % であった。total PCBs 濃度に対する各 Co-PCB 成分濃度の割合は Table 2 に示すように Kanechlor 400 に比べて油症原因油では 3, 4, 3', 4'-T₄CB はほぼ同程度であるが、3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB では約 70 倍になり、さらに 2, 3, 7, 8-TCDD の約 1/200 の毒性¹⁵⁾を示すといわれる 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB はさらに高くなり、約 150 倍になっている。それを詳細に検討するため Table 3 に 3 成

Table 2 Ratios of each tentative coplanar PCB versus PCBs in Yusho victims, unexposed individuals, Yusho oils and Kanechlor 400

Sample	Age	Sex	Coplanar PCBs/PCBs ($\times 10^{-5}$)			
			3,4,3',4'-T ₄ CB	3,4,5,3',4'-P ₅ CB	3,4,5,3',4',5'-H ₆ CB	Total coplanar PCBs
Yusho victim						
Case 1 intestine	25	M	11	9.2	50	69
liver			10	240	360	640
Case 2 intestine	46	M	10	11	39	61
liver			57	44	100	210
Unexposed individual						
Case 1 adipose tissue	54	F	2.3	37	8.0	47
liver			18	50	10	79
Case 2 adipose tissue	54	M	4.1	11	14	29
liver			3.3	21	13	37
Yusho oil						
K-3			870	110	6.5	990
K-4			750	125	6.3	880
PCB preparation						
Kanechlor 400			800	6.8	0.044	810

Table 3 Component ratios (%) of tentative coplanar PCBs in Yusho victims, unexposed individuals, Yusho oils and Kanechlor 400

Sample	Coplanar PCBs (%)		
	3,4,3',4'-T ₄ CB	3,4,5,3',4'-P ₅ CB	3,4,5,3',4',5'-H ₆ CB
Yusho victim			
Case 1 intestine	16.1	13.0	70.9
liver	1.6	39.2	59.2
Case 2 intestine	16.6	17.9	65.5
liver	28.0	21.5	50.5
Unexposed individual			
Case 1 adipose tissue	4.8	78.2	17.0
liver	23.0	63.7	13.3
Case 2 adipose tissue	14.0	39.3	46.7
liver	8.9	56.9	34.2
Yusho oil			
K-3	87.8	11.5	0.7
K-4	85.1	14.2	0.7
PCB preparation			
Kanechlor 400	99.2	0.8	<0.1

分の組成比を示した。Kanechlor 400 では 3, 4, 3', 4'-T₄CB が 99.2 % に対して原因油では 86.5 % に減少し、逆に 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB が 0.8 % から 12.9 %, 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB が <0.1 % から 0.7 % に増加している。このような高塩化物の割合が増加する現象は以前の研究成果¹⁹⁾をもとにして考えると、PCB 製品が油の脱臭槽に漏出したのち Co-PCB 成分の蒸気圧の差異（推測として 3, 4, 3', 4'-T₄CB > 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB > 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB）による蒸発消失量の相違の結果であると推測される。

他の PCBs と同様に Co-PCBs は腸や脂肪組織で肝臓に比べてより高濃度であった (Table 4)。しかし、健常者に対する油症患者の濃度比を比較すると、total PCBs は肝臓で 2.1 倍、腸管で 3.1 倍であるのに対して、total Co-PCBs においては 19 倍および 5.6 倍であり、明らかに高い倍率を示した。total Co-PCBs 濃度に対する各 Co-PCB 成分濃度比 (× 10⁻⁵) をみると (Table 2)、PCB 製品に比べて、健常者や油症患者は 3, 4, 3', 4'-T₄CB の割合が減少し、

3, 4, 5, 3', 4'-H₅CB や 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB が増加している。とくに油症患者の場合、3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB の比が健常者に比べて著しく高いことに注目される。これは油症原因油中の Co-PCBs 組成を反映しているものと推測される。Co-PCB 組成比 (Table 3) から残留主成分は健常者では 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB であるのに対して、油症患者は 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB であった。以上の結果から Co-PCBs も他の PCB 成分と同様に高塩素化合物ほど体内に残留しやすく、油症患者は毒性の強い 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB の高濃度汚染を受けているといえる。

3. PCDDs

油症原因油中の PCDDs 検出に関する報告はなく、これまで原因油中には PCDDs が含まれていないものと考えられていた。しかし、今回、分析法を検討し、高分解能 (分解能 8000 あるいは 9000) において SIM 分析を行った結果、Table 5 に示すように 5 塩化～8 塩化物の存在が確認できた。原因油 (K-4) 中には総濃度として 130 ppb (0.13 ppm) の PCDDs が

Table 4 Levels tentative coplanar PCBs and PCBs in the tissues of Yusho victims and unexposed individuals

Sample	Coplanar PCBs (ppt)				PCBs (ppb)
	3,4,3',4'-T ₄ CB	3,4,5,3',4'-P ₅ CB	3,4,5,3',4',5'-H ₆ CB	total	
Yusho victim					
Case 1 intestine	410	330	1800	2500	3600
liver	22	530	800	1400	220
Case 2 intestine	380	410	1500	2300	3800
liver	52	40	94	190	91
Unexposed individual					
Case 1 adipose tissue	21	340	74	440	930
liver	13	36	7.5	57	72
Case 2 adipose tissue	57	160	190	410	1400
liver	2.5	16	9.6	28	75

Table 5 Levels (ppt) of PCDD congeners in a Yusho victim, unexposed individuals and a Yusho oil

Sample	T ₄ CDDs	P ₅ CDDs	H ₆ CDDs	H ₇ CDDs	O ₈ CDD	Total
Yusho victim (case 1)						
Intestine	NA	110	910	130	2200	3400
Liver	NA	63	1300	670	22000	24000
Unexposed individual ²²⁾						
Adipose tissue*	13	22	130	190	2000	2300
Liver**	3.4	5.0	27	95	1100	1300
Yusho oil						
K-4	NA	13000	51000	57000	9200	130000

NA : not analysed

* : Average of 9 samples, ** : Average of 6 samples.

含まれていた。同じ塩素置換数を持つ PCDF 濃度を 1.0 とした場合、PCDD 濃度比は 5 塩化物での 0.032, 6 塩化物で 0.12, 7 塩化物で 0.071, 8 塩化物で 0.94, 総濃度は 0.068 である (Table 6)。8 塩化物の濃度はほぼ等しいが、他の同族体では約 1 オーダー低いことが判明した。

油症患者 (case 1) 組織中の残留総 PCDD 濃度は肝臓で 24,000 ppt, 腸で 3,400 ppt であり、肝臓は腸より 1 オーダー高かった。肝臓中の濃度は大都市在住者 (1985 年事故あるいは病気で死亡) の 18.5 倍に相当する高い値であった。一方、腸の場合は健常者の脂

肪組織に近い数値を示している。Table 7 に示す同族体組成比をみると、患者の腸では肝臓とかなり相違した組成比を示し、H₆CDDs の組成比がきわめて高く、相対的に O₈CDD の組成比が減少している。PCDF 濃度 (Table 8) と比較すると、総 PCDD 濃度は肝臓で 0.1 倍、腸では低くなり 0.012 倍となっている (Table 6)。同一塩素数を有する PCDF と PCDD を比較すると 5 塩化～7 塩化置換体の場合はいずれも PCDF 残留濃度が圧倒的に高い。しかし、8 塩化体に関しては肝臓で 105 倍、腸で 730 倍と逆に PCDD の残留濃度が高くなっていた。これらの比を

Table 6 Ratios of PCDD versus PCDF congener with a same number of chlorine.

Sample	T ₄ CDDs	P ₅ CDDs	H ₆ CDDs	H ₇ CDDs	O ₈ CDD	Total
Yusho victim (case 1)						
intestine	—	0.021	0.13	0.009	>730	0.012
liver	—	0.003	0.018	0.005	105	0.10
Unexposed individual ²¹⁾						
adipose tissue	0.59	0.56	4.2	7.3	110	16
Yusho oil						
K-4	—	0.032	0.12	0.071	0.94	0.068

Table 7 Congener ratios (%) of PCDD congeners in a Yusho victim, unexposed individuals and a Yusho oil

Sample	T ₄ CDDs	P ₅ CDDs	H ₆ CDDs	H ₇ CDDs	O ₈ CDD
Yusho victim (case 1)					
intestine	—	3.3	27.2	3.9	65.7
liver	—	0.3	5.4	2.8	91.5
Unexposed individual					
adipose	0.6	0.9	5.5	8.1	84.9
liver	0.3	0.4	2.2	7.7	89.4
Yusho oil					
K-4	—	10.0	39.2	43.8	7.1

Table 8 Levels (ppb) of PCDF congeners in a Yusho victim, unexposed individuals and a Yusho oil

Sample	T ₄ CDFs	P ₅ CDFs	H ₆ CDFs	H ₇ CDFs	O ₈ CDF	Total
Yusho victim (case 1)						
intestine	0.13	0.13	5.2	15	TR	28
liver	0.11	0.11	25	140	0.21	240
Unexposed individual ²²⁾						
milk fat*	0.022	0.022	0.039	0.026	0.018	0.14
Yusho oil						
K-4	290 (1200)	290 (850)	410 (190)	800 (—)	9.8 (—)	1900 (2200)

TR : 0.001~0.005ppb

* : Average of 504 samples from residents in Osaka.

Figures in parenthesis show the PCDF concentration in our previous analysis¹⁷⁾.

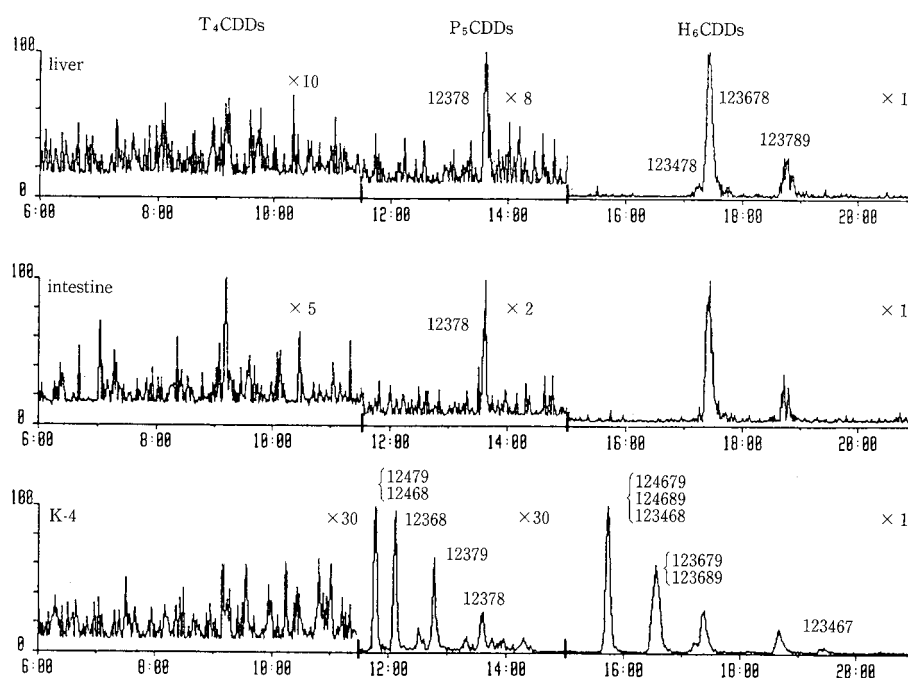


Fig. 2 SIM chromatograms by using HR-GC・HR-MS of T₄CDDs, P₅CDDs and H₆CDDs in a Yusho victim and the causal oil.

患者が摂取した原因油中のものと比較すると、5塩化～7塩化体の比（腸の6塩化体を除く）はいずれも減少しているが、逆に8塩化体では100倍以上も増加していた。これらのことはPCDDsとPCDFsの人体内挙動がかなり相違することを意味している。

Fig. 2および3に原因油（K-4）中PCDDの高分解能SIMクロマトグラムを示す。P₅CDDsの主成分は(1, 2, 4, 7, 9-+1, 2, 4, 6, 8-), 1, 2, 3, 6, 8-, 1, 2, 3, 7, 9-および1, 2, 3, 7, 8-置換体である。H₆CDDsの場合(1, 2, 4, 6, 7, 9-+1, 2, 4, 6, 8, 9-+1, 2, 3, 4, 6, 8-), (1, 2, 3, 6, 7, 9-+1, 2, 3, 6, 8, 9-) および1, 2, 3, 6, 7, 8-置換体が主成分であり、1, 2, 3, 4, 7, 8-, 1, 2, 3, 7, 8, 9-, 1, 2, 3, 4, 6, 7-P₅CDDは副成分として含まれている（Fig. 2）。H₇CDDsの場合、1, 2, 3, 4, 6, 7, 9-と1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-置換体がほぼ同じ濃度で含まれている（Fig. 3）。このような成分組成は焼却場飛灰中PCDDsのそれ²⁰⁾とよく類似している。患者体内に残留しているPCDD成分は健常者の場合²²⁾²³⁾と同様、いずれの同族体も2, 3, 7, 8-位に塩素置換を有する異性体であった（Fig. 2, 3）。

4. PCDFs

油症原因油中のPCDFsの解析は著者ら¹⁷⁾, Nagayama et al.²¹⁾ および Buser et al.³⁾ によって行

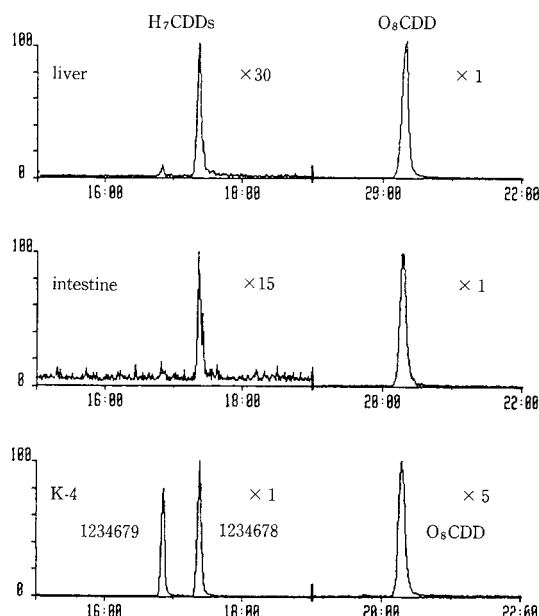


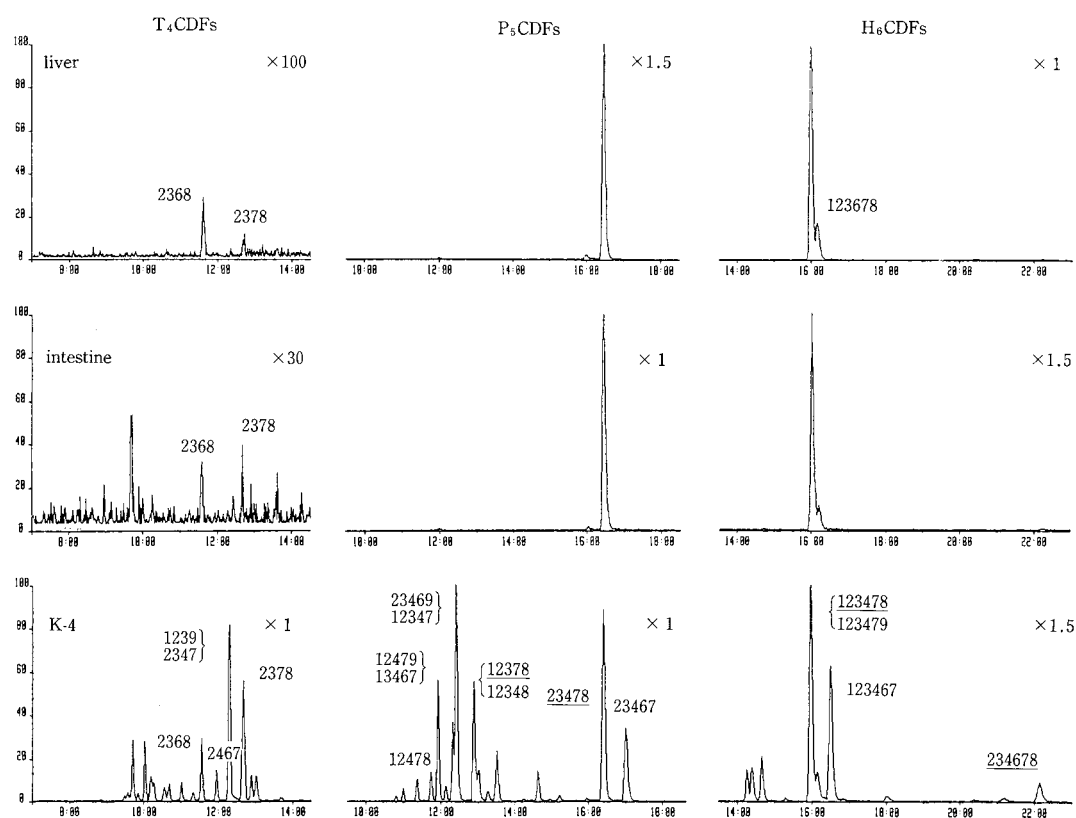
Fig. 3 SIM chromatograms by using HR-GC・HR-MS of H₇CDDs and O₈CDD in a Yusho victim and the causal oil.

われ、いずれも6塩化物以下のPCDF成分の存在が確認されてきた。しかし、Table 8に示すように今

Table 9 Congener ratios (%) of PCDF congeners in a Yusho victim, unexposed individuals and a Yusho oil

Sample	T ₄ CDFs	P ₅ CDFs	H ₆ CDFs	H ₇ CDFs	O ₈ CDF
Yusho victim (case 1)					
Intestine	0.5	18.6	25.7	53.8	<<0.1
Liver	<0.1	10.4	30.0	58.3	<0.1
Unexposed individual ²²⁾					
Milk fat	15.7	27.8	22.1	18.6	12.9
Yusho oil					
K-4	15.3 (54.5)	21.6 (38.6)	22.1 (8.6)	42.1 (-)	0.5 (-)

Figures in parenthesis are values calculated on the basis of the PCDF concentration in our previous analysis¹⁷⁾.

**Fig. 4** SIM chromatograms by using HR-GC • HR-MS of T₄CDFs, P₅CDFs and H₆CDFs in a Yusho victim and the causal oil.

回の分析結果は既報¹⁷⁾の値と大きく相違していた。
() 内に記載した著者らの既報値¹⁾と比較すると総
PCDF 濃度は近似しているが、T₄CDF および P₅CDF
濃度が既報値の約 1/4 および 1/2 にすぎなかった。逆
に、H₆CDF は 2.2 倍に増加している。さらに、従来

報告されていなかった H₇CDFs 濃度がもっとも高く、
800 ppb であり、O₈CDF も 9.8 ppb 含まれているこ
とが明らかとなった。この相違は前処理に用いられて
いるアルカリ分解条件の差異に基づくものであり、還
流アルカリ分解で容易に高塩化物が分解し、低塩化物

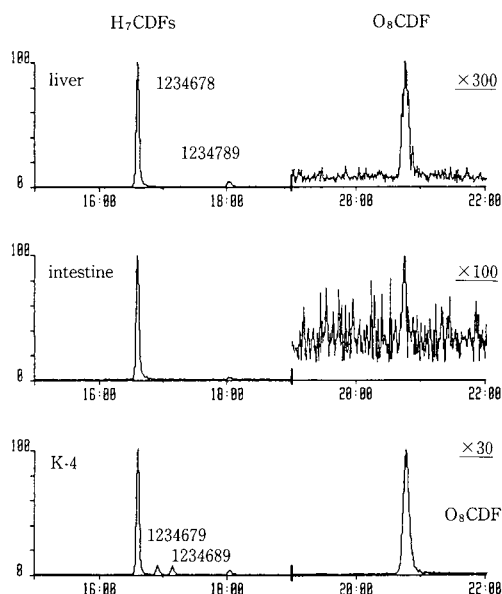


Fig. 5 SIM chromatograms by using HR-GC・HR-MS of H₇CDFs and O₈CDF in a Yusho victim and the causal oil.

に変化するものと考えられる。したがって、既報の分析値や、実験を再考する必要があるものと考えられる。組成比的にみた場合、原因油中には H₇CDFs 42.1% ともっとも高い値を示した (Table 9)。一方、T₄CDF~H₆CDF は近似した値を示している。

油症患者 (case 1) の腸および肝臓中の総 PCDF 濃度は健常者母乳脂の 200 倍および 1,700 倍に達し、患者はきわめて高濃度の汚染をうけている (Table 8)。その汚染程度を患者肝臓について詳細にみると、T₄CDF で 5.0 倍、P₅CDF で 640 倍、H₆CDF で 2,300 倍、H₇CDF で 54,000 倍 および O₈CDF で 12 倍になり、とくに H₆CDF および H₇CDF が高汚染度を示していた。

一般健常者では P₅CDF の組成比がもっとも高く 27.8% であるが、他の同族体の組成比は近似した値であった。しかし、油症患者の場合、T₄CDF および O₈CDF の割合がきわめて低く、逆に、H₇CDF が 50% 以上になっており、特徴的なパターンが認められた。

原因油中 PCDF の高分解能 SIM クロマトグラムを Fig. 4 および 5 に示す。主要残留成分として T₄CDF では 2, 3, 6, 8-, (1, 2, 3, 9-+2, 3, 4, 7-) および 2, 3, 7, 8-置換体、P₅CDF の場合は (2, 3, 4, 6, 9-+1, 2, 3, 4, 7-), (1, 2, 3, 7, 8-+1, 2, 3, 4, 8-) および 2, 3, 4,

7, 8-置換体、H₆CDF では (1, 2, 3, 4, 7, 8-+1, 2, 3, 4, 7, 9-), 1, 2, 3, 4, 6, 7-置換体、H₇CDF では 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-置換体が確認された。

患者体内に残留する成分は Fig. 2~5 に示すように 2, 3, 7, 8-塩素置換体のものが主体である。T₄CDF では 2, 3, 6, 8-, 2, 3, 7, 8-置換体、P₅CDF では 2, 3, 4, 7, 8-置換体、H₆CDF は 1, 2, 3, 4, 7, 8-置換体、H₇CDF では 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-置換体である。このような現象は PCDDs の場合と同様に一般健常者にも認められている。

今後上記したいくつかの新知見に基づき、原因油および患者体内に含まれている化合物について再度毒性評価の検討を行う必要があるものと考えられる。

総 括

1. ECD-GC および GC-MS 分析によって 1968 年 2 月 9 日および 10 日製造日の油症原因油中には Coplanar PCBs (Co-PCBs) と推断される化合物が近似した濃度で存在することが確認された。3, 4, 3', 4'-T₄CB, 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB および 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB の平均濃度はそれぞれ 1.3, 0.19 および 0.01 ppm である。Co-PCBs は油中に含まれる総 PCBs の 0.94% に相当する濃度であった。

2. 油症発症後 1 年目と 3 年目に死亡した患者 2 名の腸および肝臓中の平均 Co-PCBs 濃度は 2,400 および 800 ppt であり、この濃度は健常者の 19 および 5.6 倍に相当した。健常者組織中では 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB が主残留成分 (平均組成比 67.3%) であるのに対して、患者では毒性の強い 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB (71.8%) が主成分であった。

3. 油症原因油中に 5 塩化~8 塩化のポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン (PCDDs) の存在が確認された。総 PCDDs 濃度は 0.13 ppm であり、この値は総 PCDFs 濃度の 6.8% に相当する。P₅CDDs, H₆CDDs, H₇CDDs および O₈CDD の組成比はそれぞれ 3.2, 12, 7.1, 94% であり、O₈CDD が主成分であった。

4. 油症患者組織中に健常者より高濃度の PCDDs が蓄積しており、原因油中の PCDDs 摂取が反映しているものと考えられる。残留成分は健常者の場合と同様に 2, 3, 7, 8 位に塩素置換を持つ異性体がほとんどであった。

5. 既報では未確認の H₇CDFs および O₈CDF が原因油中から検出され、しかも、H₇CDFs (組成比 42.1%) が主成分であり、T₄CDFs (54.5%) や

P₅CDFs (38.6%) が主成分であるとされていた既報の値とまったく異なった結果が得られた。

6. 健康者に比べて油症患者組織中の残留 PCDFs 濃度は 2~3 オーダー高く, 従来報告されていなかった H₇CDFs が主成分として確認された。

謝 辞

本分析を遂行するに当り, 機器分析に多大の援助を頂きました日本食品分析センター, 内部博泰支所長, 足立忠夫部長, 仲村忠雄主任, 井上毅研究員および Co-PCBs 標準品や人体試料を頂きました愛媛大学農学部, 立川涼博士および大阪府監察医事務所, 山田正博士に深謝致します。

文 献

- 1) Adams, R. E., Thomas, M. M., Strother, D. L., James, R. H. and Miller, H. C.: Determination of PCDDs and PCDFs in PCB oil from a hazardous waste site. *Chemosphere* 15: 1113-1121, 1986.
- 2) 旭 正一, 幸田 弘, 占部治邦, 利谷昭治: 油症の皮膚症状-10年間の推移. 福岡医誌 70: 92-100, 1979.
- 3) Buser, H. R., Rappe, C. and Gara, A.: Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) found in Yusho oil and in used Japanese PCB. *Chemosphere* 5: 439-449, 1978.
- 4) Hara, I.: Health status and PCBs in blood of workers exposed to PCBs and of their children. *Environ. Health Persp.* 59: 85-90, 1985.
- 5) Hori, S., Obana, H., Kashimoto, T., Otake, T., Nishimura, H., Ikegami, N., Kunita, N. and Uda, H.: Effect of polychlorinated biphenyls and polychlorinated quaterphenyls in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Toxicology* 24: 123-139, 1982.
- 6) Huckins, J. N., Stalling, D. L. and Smith, W. A.: Foam-Charcoal chromatography for analysis of polychlorinated dibenzodioxins in *Heridices orange*. *J. AOAC* 61: 32-37, 1978.
- 7) 榎本 隆, 宮田秀明, 福島成彦, 国田信治: 油症患者と他の PCB 汚染者の残留塩素化合物の相違. 福岡医誌 72: 198-204, 1981.
- 8) 榎本 隆, 宮田秀明, 福島成彦, 国田信治, 大井 玄, 董 大成: 台湾 PCB 中毒患者血液およびその原因油中の PCBs, PCQs および PCDFs 解析. 福岡医誌 74: 255-268, 1983.
- 9) Kashimoto, T., Miyata, H. and Kunita, N.: Presence of polychlorinated quaterphenyls in the tissue of patients with "Yusho" disease. *Food Cosmet. Toxicol.* 19: 335-340, 1981.
- 10) Kashimoto, T., Miyata, H., Kunita, N., Tung, T., Hsu, S., Chang, K., Tang, S., Ohi, G., Nagasawa, J. and Yamamoto, S.: Role of polychlorinated dibenzofuran in Yusho (PCB poisoning). *Arch. Environ. Health* 36: 321-326, 1981.
- 11) 向野利彦, 山名泰生: 油症患者の眼症状 (第4報) 発症 10 年後の検討. 福岡医誌 70: 101-106, 1979.
- 12) Kunita, N., Kashimoto, T., Miyata, H., Fukushima, S., Hori, S. and Obana, H.: Causal agent of Yusho. *Amer. J. Ind. Med.* 5: 45-58, (1984.)
- 13) Kuroki, H., Haraguchi, K. and Masuda, Y.: Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) congeners in the tissue of patients with Yusho and normal Japanese. *Chemosphere* in press.
- 14) Lawrence, J., Onuska, F., Wilkinson, R. and Afghan, B. K. Method research: Determination of dioxins in fish and sediment, *Chemosphere* 15: 1085-1090, 1986.
- 15) McConnell, E. E. and McKinney, J. D., Exquisite toxicity in the quinea pig to structurally similar halogenated dioxins, furans, biphenyls and naphthalenes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45: 298 (Abstr.), 1978.
- 16) Miyata, H. and Kashimoto, T.: Investigation on organochlorinated compounds formed in Kanemi rice oil caused the "Yusho". *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 20: 1-9, 1981.
- 17) Miyata, H., Kashimoto, T. and Kunita, N.: Detection and determination of polychlorodibenzofurans in normal human tissues and Kanemi rice oil caused "Kanemi Yusho". *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 18: 260-265, 1977.
- 18) Miyata, H., Murakami, Y. and Kashimoto, T.: Determination of polychlorinated quaterphenyl (PCQ) in Kanemi rice oil caused the "Yusho" and investigation on the PCQ formation. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 19: 417-424, 1978.
- 19) Miyata, H., Takayama, K., Ogaki, J. and Kashimoto, T.: Monitoring of PCDDs in Osaka bay by using blue mussel. *Chemosphere*. in press.
- 20) 宮田秀明, 高山幸司, 尾垣淳治, 榎本 隆: 未発表.
- 21) Nagayama, J., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with Yusho. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 15: 195-198, 1977.
- 22) Ogaki, J., Takayama, K., Miyata, H. and Kashimoto, T.: Levels of PCDDs and PCDFs in human tissues and food stuff in Japan. *Chemosphere*, in press.
- 23) Ono, M., Wakimoto, T., Tatsukawa, R. and Masuda, M.: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in human adipose tissue of Japan. *Chemosphere* 15: 1629-1634, 1986.
- 24) Rappe, C., Marklund, S., Bergquist, P.-A. and Hansson, M.: Polychlorinated dibenzo-dioxins, dibenzofurans and other polynuclear aromatics for-

med during incineration and polychlorinated biphenyl fires: chlorinated dioxins and dibenzofurans in the total environment. Choudhary, G., Keith, L. H. and Rappe, C., ed. 99-124 Butterworth publishers, Boston, 1983.

25) Smith, L. M., Stalling D. L. and Johnson, L. Determination of part-per-trillion of polychlorinated dibenzofurans and dioxins in environmental samples. Anal. Chem. 56: 1830-1884.

26) Tanabe, S., Kannan, N., Subramanian, A.,

Watanabe, S., Ono, M. and Tatsukawa, R.: Occurrence and distribution of toxic coplanar PCBs in the biota, Chemosphere, in press.

27) Tanabe, S., Kannan, N., Wakimoto, T., and Tatsukawa R.: Method of the determination of three toxic non-ortho substituted coplanar PCBs in environmental samples at part-per-trillion levels. Int. J. Environ. Anal. Chem. in press.

28) 鶴川昌弘, 中村彰夫, 梶本 隆: PCBの数値化法に関する研究. 食衛誌 14: 415-424, 1973.

油症患者の血液および皮下脂肪組織中の polychlorinated biphenyls (PCB), polychlorinated quaterphenyls (PCQ) の濃度と性状について

長崎大学医学部皮膚科学教室 (主任: 吉田彦太郎教授)

大 神 太 郎・野 中 薫 雄・吉 田 彦太郎

国立長崎中央病院皮膚科 (院長: 寺本成美博士)

村 山 史 男

佐世保総合病院皮膚科 (院長: 須山弘文博士)

山 下 和 徳

長崎県衛生公害研究所衛生化学科 (所長: 湯浅秀博士)

益 田 宣 弘

PCB, PCQ Concentration of Blood and Subcutaneous Tissue in Patients with PCB Poisoning (Yusho)

Taro OHGAMI, Shigeo NONAKA and Hikotaro YOSHIDA

*Department of Dermatology (Director : Prof. H. Yoshida),
Nagasaki University School of Medicine,
Nagasaki, 852, Japan*

Fumio MURAYAMA

*Division of Dermatology, Nagasaki-Chuo National Hospital, Nagasaki, 856,
Japan (Director : Dr. S. Teramoto)*

Kazunori YAMASHITA

*Division of Dermatology, Sasebo General Hospital, Nagasaki, 857, Japan
(Director : Dr. H. Suyama)*

Nobuhiro MASUDA

*Nagasaki Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science,
Nagasaki, 852, Japan (Director : Dr. S. Yuasa)*

Polychlorinated biphenyls (PCB) and polychlorinated quaterphenyls (PCQ) concentrations in the blood and subcutaneous fat tissue of 11 patients with PCB poisoning (Yusho) and 10 controls were analyzed using electron captured gaschromatography. Furthermore, a relationship between cutaneous changes, PCB and PCQ concentration was investigated. The mean blood level of PCB was 1.20 ppb in the control group, but PCQ was not detected. The mean concentration of blood PCB was 6.45 ppb, and that of PCQ was 1.39 ppb in patients with Yusho. The mean concentration of PCB in subcutaneous fat tissue was 1579.45 ppb in Yusho group, this value is 3.9 times higher than that in the control group. The mean concentration level of PCQ was 206.65 ppb, which is 120 times higher than that in the control group. These results show that PCB and PCQ accumulate in the subcutaneous fat tissue of patients with PCB poisoning (Yusho), even 17 years after the occurrence of this disease. There was no correlation among cutaneous changes, PCB and PCQ concentration in the blood and subcutaneous tissues of patients with Yusho.

昭和43年、カネミライスオイル事件が発生して以来19年の歳月が経過したが、なお多数の患者が種々の自覚症状に苦しめられている³⁾。また以前から血液中のPCB (polychlorinated biphenyls), PCQ (polychlorinated quaterphenyls) 濃度などが測定され、診断上・認定上の資料として広く用いられている⁴⁾。そしてそれらのあるものの高値は最近においても指摘されている。これらの臨床的、生化学的所見は患者の体内になおこれらの物質が残留していることを強く示唆していると考えられる¹⁾。

一方、発生後の20年近い時間的経過は血中PCB, PCQ, polychlorinated dibenzofuran (PCDF) 濃度、PCBパターン、CB%比などの測定結果に関連していくつかの問題点を提起しつつある¹⁾。とくに血中PCB, PCQ濃度と皮疹との相関については、検診あるいは油症認定の際われわれを悩ませる問題の一つとなっている。すなわち皮膚症状の欠落あるいは軽減のため、典型的な症状を呈する例が非常に少なくなり⁶⁾、かつ血液中のPCB, PCQ濃度も高値を示す例が減少する傾向にあるためである。これらのことから、より正確な体内PCBおよびその関連物質の分布状態の把握と定量が求められてきている。そのためわれわれは、これらの物質が脂溶性であることから、皮下脂肪組織内PCB, PCQ含有量、PCBパターン、CB%比などを測定し、同時に皮膚症状との関連についても検討を試みた。以下その結果を報告する。

対象および方法

1. 対象

長崎県南松浦郡に在住の油症患者11例について検討した。対照は長崎大学医学部附属病院皮膚科で悪性腫瘍の手術を受けた10例である。

2. 標本の採取

標本は昭和59年11月に採取した。油症患者の臍窩周囲の皮膚に局所麻酔を行い、約500mgの皮下組織を採取した。対照は悪性腫瘍摘出標本に付着している正常脂肪組織である。また患者も対照者も同時に肘静脈から約10mlの採血を行い、PCBおよびその関連物質の測定に供した。

3. 臨床的観察

昭和59年8月に施行された油症検診カルテを用いて皮膚症状を検討した。肉眼的所見を(卅)=3: 著しい皮疹, (++)=2: 中等度の皮疹, (+)=1: 軽度の皮疹, (±)=0.5: 非定型的皮疹と考えられる場合, (—)=0: 皮疹が認められないなどの場合に分けて検討した。

4. PCB, PCQの測定

PCB, PCQの測定は榎本ら⁴⁾の方法に基づき測定した。検体の処理および測定法はFig. 1に示した。

結 果

対照群の皮膚症状、血中および脂肪組織内のPCB, PCQ濃度、PCBパターン、CB%比などは表1に、油症患者のそれらは表2に示した。

Fig 1 Analytical procedure for PCB, PCQ and PCDF in human blood and tissues.

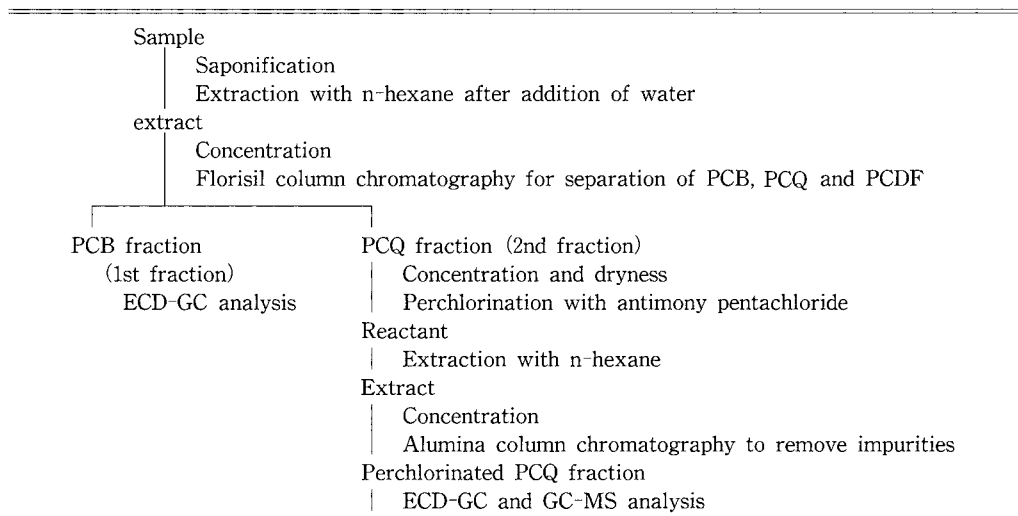


Table 1 Clinical findings, PCB and PCQ levels in blood and subcutaneous fat tissue of controls

No	Age	Sex	Clinical						Blood				Subcutaneous fat tissue					
			Black comedos	Acne like eruption	Tendency of infection	Scars	Pigmentation	Nail changes	Total score	PCB (ppb)	PCQ (ppb)	PCB pattern	CB% ratio	PCB (ppb)	PCQ (ppb)	PCB pattern	CB% ratio	
1	83	M	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	1	<0.02	B	0.6	530	0.7	B	0.8
2	60	F	0	0	0	0	0	0	0	0	1	<0.02	C	0.2	368	1.5	B	0.5
3	77	F	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	1	<0.02	B	0.3	301	1.1	C	0.4
4	64	F	0	0	0	0	0	0	0	0	1	<0.02	B	0.8	289	0.6	B	0.4
5	75	F	0	0	0	0	0	0	0	0	1	<0.02	B	0.3	207	2.1	B	0.3
6	23	M	0	0.5	0	0	0	0	0	0.5	1	<0.02	B	0.7	210	2.5	B	1.1
7	73	F	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	1	<0.02	B	0.8	94	0.7	B	1.1
8	52	M	0	0	0	0	0	0	0	0	3	<0.02	B	1.1	1090	4.9	B	0.9
9	67	M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	<0.02	B	0.7	454	1.6	B	0.4
10	81	M	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	1	<0.02	B	0.7	554	1.7	B	0.7
MEAN										0.25	1.20			0.62	409.70	1.74		0.66
±S.D.										0.26	0.63			0.27	280.63	0.27		0.30

Table 2 Clinical findings, PCB and PCQ levels in the blood and subcutaneous fat tissue of Yusho patients

			Clinical findings							Blood				Subcutaneous fat tissue			
No	Age	Sex	Black comedos	Acne like eruption	Tendency of infection	Scars	Pigmentation	Nail changes	Total score	PCB (ppb)	PCQ (ppb)	PCB pattern	CB% ratio	PCB (ppb)	PCQ (ppb)	PCB pattern	CB% ratio
1	51	M	0	0	0	0	0	0	0	7	0.20	B (A)	1.0	1730	26.2	B	0.7
2	62	M	3	1	1	1	2	0.5	8.5	8	1.28	B (A)	1.9	1880	144	B	2.6
3	48	M	2	0	1	2	0	0	5	7	1.83	B	3.1	2120	428	B	2.1
4	40	F	0.5	0.5	0.5	0	0	0	1.5	3	0.76	B	1.4	904	133	B	1.3
5	57	F	0.5	0	0	0.5	0	0	1	4	1.48	B	2.7	707	144	B	3.7
6	59	M	0	0	0	0.5	0	0	0.5	5	1.86	B	2.6	943	215	B	4.3
7	52	M	2	0.5	0.5	2	0	0	5	5	2.18	A	2.7	1160	225	A	4.8
8	60	M	2	0	0	2	0	0	4	4	1.64	A	2.5	1120	213	A	3.2
9	59	M	0	0	0.5	2	0	0	2.5	9	0.89	A	2.0	2680	123	A	2.3
10	50	M	0	0	0	0	1	1	1	10	2.28	A	2.9	1730	330	B (A)	6.1
11	75	M	0.5	0	0	0.5	0	0	1	9	0.99	A	5.3	2400	292	B (A)	4.4
MEAN									2.72	6.45	1.39		2.55	1579.45	206.65		3.22
±S.D.									2.61	2.38	0.64		1.11	657.40	111.70		1.61

1. 皮膚症状

対照群では 10 例中 4 例に黒色面皰を、1 例に瘡瘡様発疹を認めたが、化膿傾向、瘢痕、色素沈着、爪甲の変形などは認められなかった。平均 score は 0.25 であった。

一方患者群では種々の異常所見が認められ、11 例中 5 例の score は 2.5 以上であった。全症例の平均 score は 2.72 であった。

2. 血液中 PCB 濃度, PCQ 濃度, PCB パターン, CB%比

対照群の血液中 PCB 濃度は 1.20 ppb, PCQ 濃度は全例で検出限界以下であり, PCB パターンは 10 例中 1 例のみが C パターンで, 他はすべて B パターンを示した。CB%比は平均 0.62 であった。

一方、油症患者の血液中 PCB 濃度は平均 6.45 ppb, PCQ 濃度は平均 1.39 ppb と対照群に比べて明らかに高値を示し、とくに PCQ 濃度は検出限界に比し 70 倍以上に上昇していた。PCB パターンは A パターンが 5 例, B (A) が 2 例, B パターンが 4 例であった。CB%比は平均 2.55 と対照群に比べて 4 倍に上昇していた。

3. 皮下脂肪組織中の PCB 濃度, PCQ 濃度, PCB パターン, CB%比

対照群の皮下脂肪組織中 PCB 濃度の平均は 409.70 ppb, PCQ 濃度の平均は、1.74 ppb であり, PCB パターンは B パターンが 9 例, C パターンが 1 例であった。これに比べて、油症患者群の PCB 濃度は平均 1579.45 ppb と対照群の約 3.9 倍に上昇していた。一方、PCQ 濃度は平均 206.65 ppb と対照群の 100 倍以上の値を示した。PCB パターンは A パターン 3 例, B (A) パターン 2 例, B パターン 6 例であった。CB%比は平均 3.22 で対照群のおよそ 5 倍の値を示した。皮膚症状の score 値と血液、皮下脂肪組織中の PCB 濃度, PCQ 濃度, CB%比などの間に相関性はとくに認められなかった。しかし、血液中 PCQ 濃度と皮下脂肪組織中 PCQ 濃度との間には有意の相関性がみられた。PCB 濃度に関しても血液と皮下脂肪組織との間に同様の所見が得られた。

か ん が え

上述のごとく、油症患者の血中および脂肪組織内 PCB, PCQ, CB%比はいずれも対照群に比べて著しい高値を示し、とくに脂肪組織内 PCQ 濃度は対照の約 120 倍の高濃度であることが明らかとなった。この結果は油症患者に特異的であり、診断的価値のある所見

と考えられる。一方、脂肪組織内 PCB 濃度は対照群においてもかなりの高値を示した。これは環境汚染による可能性が高いと考えられるが今後確かめる必要がある問題点であろう。

油症患者における有機塩素化合物の生体内分布を明らかにすることは油症の病態像を解明する上から重要である。しかしこれに関する検討は少なく、わずかに菊池²⁾ら、樫本³⁾らの剖検例による報告があるのみである。菊池らは²⁾発症後 9 年目に死亡した 2 症例において、肝、皮下脂肪組織における PCB 濃度が高いことを報告している。また樫本³⁾は 5 症例について検討し、皮下脂肪組織内の PCB 濃度は健常者の 3 倍であったが、PCQ は数 10 倍ないし数 100 倍の高値を示したと述べている。すなわち、われわれの検討結果と同様 PCQ の著しい高濃度を指摘しているのである。

また樫本³⁾の脂肪組織内 PCB, PCQ 濃度はわれわれの結果より高値を示しているが、これは彼らの測定した症例が発症後 2 年から 10 年にかけての死亡例であるためかと考えられる。しかし脂肪組織内に貯留した PCB, PCQ が徐々にではあっても自然に排泄されるか否かは不明であるため推論の域を出るものではない。むしろ原因油の摂取量の差による可能性が高いのではないかと考えられる。

また、今回の検討においては、皮膚症状と血中、脂肪組織内 PCB, PCQ 値との間に相関は認められなかった。症例 3 は score 5 で脂肪組織内 PCQ も上昇していたが、皮膚症状のもっとも著しい症例 2 では、皮下脂肪組織内の PCQ 濃度はむしろ平均以下を示していた。高松⁴⁾は、皮疹と血中 PCB 濃度との間には関連性がほとんどないとしたが、汚染油摂取後 6 年を経過した時点では、A パターンを示す群に皮膚症状が著しいと述べている。自験例では血中あるいは皮下脂肪組織内 PCB が A パターンを示す例でも皮疹をほとんど認めない例もあり、明確な相関性はみられなかった。むしろ、皮疹を認めないにもかかわらず、高い皮下脂肪組織内 PCQ 濃度を示す例が存在することが問題であろう。

ヒトの脂肪組織は青年男子体重の約 15%、青年女子の約 22%を占めるといわれる⁷⁾。PCQ が平均 200 ppb の濃度であるとする、生体にはおよそ 2 mg 以上の PCQ が存在するものと想像される。これらの蓄積された PCB, PCQ あるいは PCDF などが肝臓、その他の臓器にどのような影響を与えるか、あるいは蓄積されたこれらの物質に対する防御機構が生体に存在するものかどうかなどは今後検討されるべき重要課題であろう。

ま と め

1. 長崎県南松浦郡在住の油症患者 11 例と対照 10 例について、血液および皮下脂肪組織中の PCB, PCQ 濃度を測定した。同時に検診患者カルテの皮膚所見をスコア化し、PCB, PCQ 濃度との相関性を検討した。
2. 患者群の血中 PCB 濃度は 6.45 ppb であり、対照群に比べると約 5.4 倍の高値を示した。PCQ 濃度は 1.39 ppb であり、対照群では検出限界以下 (< 0.02 ppb) であった。CB%比は 2.55 と約 4.1 倍に上昇していた。
3. 皮下脂肪組織中の PCB 濃度は 1579.45 ppb であり、対照群に比べ約 3.9 倍に上昇していた。PCQ 濃度は 206.65 ppb であり約 120 倍の高値を示し、CB%比は 3.22 と約 4.9 倍に上昇していた。
4. PCQ は今なお皮下脂肪組織中に大量に蓄積されていると考えられる。
5. 皮膚症状と血中および皮下脂肪組織中の PCB, PCQ 濃度との間に相関性はみられなかった。
6. 皮下脂肪組織中の PCQ 濃度測定は、油症の診断基準として血液を標本とするよりもより特異的であり、有効な指標となり得ることが示唆された。

(本稿の一部は第 256 回日本皮膚科学会福岡地方会において報告した。)

文 献

- 1) 榎本 隆, 富田秀明, 福島成彦, 園田信治: 油症患者と他の PCB 汚染者の残留塩素化合物の相違. 福岡医誌 72: 198-204, 1981.
- 2) 菊池昌弘, 重松信昭, 梅田玄勝: 発症後 9 年目に死亡した油症患者の 2 剖検例. 福岡医誌 70: 215-222, 1977.
- 3) 倉恒匡徳, 青野正雄, 吉田彦太郎: 油症 (塩化ビフェニール中毒) 研究報告, 第 10 集, 序言. 福岡医誌 76: 117-125, 1985.
- 4) 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一: 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニール異性体. 福岡医誌 76: 150-152, 1985.
- 5) 高松スミ子, 丸田宏幸, 井上義人, 阿部純子, 高松 誠: PCB 汚染油摂取者の皮膚所見と血中 PCB との関係. 福岡医誌 68: 145-151, 1977.
- 6) 利谷昭治, 旭 正一, 本坊昭三, 占部治邦: 昭和 58~59 年度の年次検診における油症皮膚症状の推移. 福岡医誌 76: 239-242, 1985.
- 7) 宇宿源太郎: 白色脂肪組織, 人体組織学, 結合組織, 皮膚とその付属器. 清寺 真ら編集, 朝倉書店, p. 67-81, 1984.

油症患者における肝障害および肝細胞癌

九州大学医学部第二内科 (主任: 藤島正敏教授)

辻 博・赤木公博・村井宏一郎

梶原英二・藤島正敏

Liver Damage and Hepatocellular Carcinoma in Patients with Yusho

Hiroshi TSUJI, Kimihiro AKAGI, Koichiro MURAI,

Eiji KAJIWARA and Masatoshi FUJISHIMA

*Second Department of Internal Medicine (Director: Prof. M. Fujishima),
Faculty of Medicine, Kyusyu University, Fukuoka 812, Japan*

To evaluate chronic effect of PCB on liver damage and hepatocellular carcinoma, liver function tests and tumor marker were examined in 157 patients with Yusho of age 16 years or older (average 49 years) in 1985. Mean values of serum glutamic-oxalacetic transaminase (SGOT), serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT), alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase of Yusho patients did not differ from those of 36 controls (average 49 years). Liver damage (SGOT > 38 K. Units and/or SGPT > 30 K. Units) was found in 13 (8.3 %) of the patients and in 8 (22.2 %) of the controls. Between Yusho patients with and without liver damage, serum concentrations of PCB and the prevalences of positive HBs-Ag and drinker were similar, but a significant increase of body mass index (Quetelet Index) was noticed in the patients with liver damage ($p < 0.05$). On the other hand, elevation of serum alpha fetoprotein level was observed in only a patient, 55-year-old male, who showed serum PCB concentration of 7 ppb and gas chromatogram of C pattern. He had already been diagnosed as hepatocellular carcinoma associated with liver cirrhosis. We conclude that liver damage in patients with Yusho is not frequent and it may be associated with obesity. Whether PCB would promote hepatocellular carcinoma could not be demonstrated, because the patient with hepatocellular carcinoma revealed gas chromatogram of C pattern, that is, the pattern of healthy persons, and also had liver cirrhosis known as the high risk group.

1968年4月頃より polychlorinated biphenyls (PCB) 混入ラジソイル摂取により北部九州を中心に発生した油症では、発症当初に重症例の検査所見において血清アルカリフォスファターゼと BSP 停滯率の軽度上昇、中性脂肪の増加などが報告されている¹⁾。GOT, GPT の上昇例もみられたが、その変化はいずれも軽度で大部分の患者では正常範囲であった。油症発生以来17年を経過し、血中 PCB 濃度は低下し種々の亜急性症状は軽快している。しかし、その組成にはいまだに特徴的なパターンがみられ²⁾、残留性の PCB による慢性中毒に移行していると推定される。今回、我々は油症患者にみられた肝障害について検討し、肝硬変症の経過観察中に発症した肝細胞癌の1症

例を経験したので報告する。

対象ならびに方法

1985年度福岡県油症一斉検診の受診者203名のうち、16才以上の193名を対象者とした。このうち157名が油症患者で、福岡県の1986年3月現在の油症患者765名の20.5%であった。対照群は患者以外の油症検診受診者36名とした。患者群は男性61名、女性96名で平均年齢は49.4才であり、対照群は男性15名、女性21名で平均年齢は48.6才であった。

検診内容は、自覚症、既往症、家族歴の調査、身長、体重の測定、血液生化学検査、AFP、HBs-Ag、血中 PCB 濃度の測定および医師の診察である。肥満の

指標には数式計算（体重/身長²）による Quetelet Index (Q.I.) を用い、志方¹⁴⁾により 25.4 以上を肥満とした。採血は午前中空腹の状態で行なわれ、血液生化学検査は TBA-80 Super（東芝社製）を用いて、AFP、HBs-Ag は RIA 法により日本医学研究所一九州において測定された。また、血液 PCB 分析は福岡県衛生公害センター、北九州市環境衛生研究所、福岡衛生研究所、第一薬科大学物理分析学教室で分担して行なわれ、同一試料による cross test により再現性の正確さが期された。

成 績

油症患者群では対照群に比し血中 PCB 濃度は有意に高かった (Table 1)。しかし、この変化は女性のみで認められ、男性ではみられなかった。血液生化学検査では、GOT, GPT, ALP, γ -GTP のいずれにおいても両群間に差を認めなかった。

油症患者群 157 名中、GOT 31 Karmen Unit 以上あるいは GPT 39 Karmen Unit 以上の肝障害を認めたものは男性 6 名、女性 7 名の計 13 名 (8.3%) であった (Table 2)。一方、対照群 36 名中、肝障害をみたものは 8 名 (男性 4 名、女性 4 名) であった。患者群で肝障害を認めたものの平均年齢は 52.4 才で飲酒者を男性 4 名に認めた。Q.I. が 25.4 以上の肥満者は 7 名みられ、症例 4 は HBs-Ag 陽性であった。症例 5 はネフローゼ症候群、症例 5 は橋本病と高血圧症、症例 12 は Graves' 病と高血圧症を合併していた。患者群の肝障害者と非肝障害者について比較すると、肝障害者の血中 PCB 濃度は 6.3 ± 5.7 ppb (平均 $\pm$ SD, 12 名、) と非肝障害者 4.8 ± 3.8 ppb (127 名) に比し高い傾向はみられたが有意な差ではなかった。肥満の指標である Q.I. は肝障害者 25.6 ± 4.6 (13 名) と非肝障害者 22.4 ± 3.0 (144 名) に比し有意に高かった ($p < 0.05$)。肝障害者と非肝障害者の飲酒者頻度、HBs-Ag 陽性率に差はみられなかった。

1985 年度の検診で油症患者 157 名中、AFP が 35.8 ng/ml と正常上限値 20 ng/ml 以上の上昇を認めたものは男性 1 例で、GOT 37 KU, GPT 25 KU, γ -GTP 45 U/L, HBs-Ag (－), 血中 PCB 濃度は 7 ppb で C パターンであった。本症例は当科にて肝硬変症の経過中に肝細胞癌の発症を認めた油症患者であった。以下、症例を提示する。

症例：52 歳、男性、会社員

主訴：全身倦怠感

既往歴：清酒 2～3 合/日、10 年間。輸血歴はない。

家族歴：家族 7 名中 4 名が油症患者。

現病歴：カネミ製ラيسオイルを家族 7 名で 3.6 l/月常用していた。1970 年頃より顔面、四肢の皮疹、色素沈着および眼脂の過剰分泌が出現した。1977 年、全身倦怠感のため近医を受診し肝障害を指摘されたが放置していた。1979 年 12 月皮疹のため当院皮膚科を受診し油症と診断され、肝障害を認めたため 1980 年 6 月 4 日当科に入院した。

第 1 回目入院時所見

現症：身長 168 cm、体重 64 kg、脈拍 72/分、整、血圧 112/68 mmHg。意識清明。眼瞼結膜に貧血なく、眼球結膜に黄疸を認めなかった。耳後部に黒色面皰、上肢伸側、背部、下腿に痤瘡様皮疹、色素沈着を認め、手掌紅斑、クモ状血管腫をみた。呼吸音、心音に異常なく、腹部では右鎖骨中線上肋弓下に肝腫を 2 横指触知し、辺縁鈍、表面不整、弾性硬であった。胆嚢、脾は触知せず、腹水はなく、下腿に浮腫を認めなかった。神経学的異常を認めなかった。

検査成績 (Table 3)：末梢血液検査では貧血なく、血小板の減少を認めた。検尿に異常なく、便潜血は陰性であった。血液生化学検査では GOT, GPT, γ -GTP の軽度の上昇をみ、血清総蛋白は 7.2 g/dl、 γ -グロブリンは 1.5 g/dl であった。ICG 15 分停滞率は 13.5% と軽度上昇し、プロトロンビン時間、ヘパラスチンテストは低下していた。血清学的検査では HBs-Ag は陰性で AFP は 12.3 ng/ml と正常であった。上部消化管透視では食道、胃、十二指腸に異常なく、肝シンチでは脾、骨髓に RI の集積をみた。腹部超音波検査、CT 検査で肝内腫瘤を認めなかった。腹腔鏡検査では肝の辺縁は鈍、表面は凹凸不整で結節形成をみ、左葉の腫大を認めた。肝生検組織では門脈域を中心とした単核球細胞浸潤と線維の増生により偽小葉形成を認め肝硬変と診断した。

臨床経過：1980 年 6 月退院後、3 カ月毎に超音波検査を行ない経過観察していたが、1983 年 1 月に肝右葉に径 2 cm の低エコー腫瘤 1 個を認めたため 2 月 8 日再入院した。

第 2 回目入院時所見

現症：第 1 回目入院時所見と概ね同様であり、眼球結膜に黄疸なく、肝脾も著変なかった。黒色面皰、痤瘡様皮疹に軽快傾向が認められた。

検査成績 (Table 3)：末梢血液検査で貧血なく、血液生化学検査も前回入院時所見と著変なかった。AFP は 11.7 ng/ml と正常であった。上部消化管透視、肝シンチでも前回入院時所見と変化なかったが、

Table 1 Changes of PCB concentration and biochemical parameters in patients with Yusho

Sex	No.	Age	PCB conc ppb	GOT KU	GPT KU	ALP KAU	γ -GTP U/L
YUSHO							
Male	61	50.2 $\pm$ 14.5	4.8 $\pm$ 3.6 (54)	23.0 $\pm$ 12.9	20.0 $\pm$ 18.9	6.62 $\pm$ 1.50	36.7 $\pm$ 29.9
Female	96	48.9 $\pm$ 14.2	5.0 $\pm$ 4.2 ^a (85)	20.2 $\pm$ 8.6	14.7 $\pm$ 9.5	6.56 $\pm$ 2.00	18.2 $\pm$ 12.5
Total	157	49.4 $\pm$ 14.3	5.0 $\pm$ 4.0 ^b (139)	21.3 $\pm$ 10.6	16.7 $\pm$ 14.1	6.59 $\pm$ 1.82	25.4 $\pm$ 22.8
Control							
Male	15	51.3 $\pm$ 14.9	4.0 $\pm$ 1.4 (7)	27.2 $\pm$ 20.2	23.5 $\pm$ 22.6	6.43 $\pm$ 1.45	32.8 $\pm$ 47.7
Female	21	46.6 $\pm$ 15.6	2.5 $\pm$ 1.3 ^a (14)	21.8 $\pm$ 10.9	15.6 $\pm$ 13.2	6.98 $\pm$ 2.42	30.6 $\pm$ 52.4
Total	36	48.6 $\pm$ 15.3	3.0 $\pm$ 1.5 ^b (21)	24.1 $\pm$ 15.5	18.9 $\pm$ 17.9	6.75 $\pm$ 2.06	31.5 $\pm$ 49.8
Normal range				7—38	1—30	2.8—10.5	<50

^{a, b}: p < 0.001**Table 2** Cases of Yusho associated with liver damage

No.	Case	Age	Sex	Alcohol ml/day	Q.I.	GOT KU	GPT KU	γ -GTP U/L	HBs-Ag	PCB ppb	PCB pattern	Notice
1	Y.N.	46	M	71	23.3	80	77	125	—	3	A	
2	N.Y.	61	M	—	21.3	37	36	32	—	6	A	
3	Y.J.	25	M	71	27.4	36	65	75	—			
4	H.T.	47	M	24	21.4	86	125	55	+	6	A	Chronic hepatitis
5	S.M.	53	M	48	22.8	40	44	82	—	4	A	Nephrotic syndrome
6	K.K.	41	M	—	26.9	31	50	29	—	5	C	
7	U.T.	53	F	—	32.4	55	56	27	—	2	C	
8	H.E.	50	F	—	30.8	42	29	46	—	2	B	
9	M.T.	57	F	—	31.4	42	50	60	—	21	A	Hashimoto's disease
10	M.H.	75	F	—	17.8	61	42	41	—	8	A	
11	S.T.	52	F	—	25.9	31	31	16	—	2	C	
12	H.H.	68	F	—	21.7	43	39	28	—	14	A	Graves' disease
13	K.Y.	40	F	—	30.3	26	37	26	—	3	C	

CT 検査にて肝右葉に類円形の低濃度域を認めた。腹腔動脈造影動脈相では右肝動脈に新生血管像を認め、静脈相では右葉後区域に径 2 cm の腫瘍濃染像を認めた (Fig. 1)。また、上腸管膜動脈造影静脈相では門脈本幹の描出は良好で左胃静脈の著明な拡張、屈曲蛇行を認めた。肝癌の合併が考えられたため、3 月 4 日当院第 1 外科にて肝右葉後下域の亜区域切除を行なった。手術時、肝臓は硬度増強し、リンパ節に転移巣をみなかった。右葉後下域の腫瘍は、2×1.5 cm の黄色で薄い線維性被膜の形成により境界明瞭な類円形の腫瘍であり、組織学的には肝細胞類似の腫瘍細胞が索状、偽腺管状、充実状に増殖し、一部に巨細胞や淡明細胞

を認め、原発性肝癌、肝細胞型と診断された (Fig. 2)。

臨床経過：術後経過良好で、退院後、外来にて定期的に超音波検査を行ない経過観察していたが、1984 年 5 月に肝右葉前区域に径 1 cm の低エコー腫瘍 1 個を認めた。7 月には肝右葉後区域にも腫瘍を認め、AFP が 267.3 ng/ml と上昇したため当科に入院し血管造影にて肝細胞癌の再発と診断された。1985 年 4 月 1 日、7 月 1 日、10 月 21 日に肝動脈塞栓療法を施行し、1987 年 3 月現在、外来通院しながらも社会復帰している。

Table 3 Laboratory data of a Yusho patient with hepatocellular carcinoma

	Normal range	First admission 5, Jun, '80	Second admission 10, Feb, '83
Peripheral blood			
RBC $\times 10^4$		440	527
Hb g/dl		15.2	15.5
Ht %		46	46
WBC		6200	6700
Thrombo $\times 10^4$		8.8	26
ESR mm/hr		8	
Urine		n.p.	n.p.
Feces			
Occult blood	—	—	—
Blood Chemistry			
GOT U/L	0—40	52	55
GPT U/L	0—40	81	93
LDH U/L	120—250	198	207
T. Bil mg/dl	0.2—1.2	0.7	0.6
D. Bil mg/dl	0—0.4	0.2	0.2
ALP U/L	30—110	108	79
γ -GTP U/L	0—60	68	43
T. Chol mg/dl	130—250	166	132
TG mg/dl	50—150	77	59
FBS mg/dl	65—110	82	87
T.P. g/dl	6.5—8.5	7.2	6.9
Alb g/dl	3.9—5.0	3.7	3.9
γ -gl g/dl		1.5	1.1
R ₁₅ ICG %	0—10	13.5	10.8
PT %	80—100	52	90
HPT %	60—120	50	67
BUN mg/dl	7—20	19	15
Creat mg/dl	0.6—1.2	0.8	0.9
Serology			
CRP	—	—	—
RA	—	—	—
HBs-Ag	—	—	—
HBs-Ab	—	—	+
AFP ng/ml	20	12.3	11.7

考 案

肝はPCBに反応する最も鋭敏な臓器であり、マウスにPCBを経口投与すると肝腫大を認め、光顕では肝小葉構造は保持されているが、電顕では滑面小胞体の増加がみられる¹⁰⁾。そして、肝細胞の滑面小胞体の増加は、モルモットにPCB (Kanechlor-400) 100 mg/kgを1回経口投与すると2カ月後にもみられる⁹⁾ことより長期間にわたる変化と考えられる。また、PCBは肝細胞の滑面小胞体膜の構成成分であるミクロゾーム分画の蛋白量、cytochrome P450量の増加、

薬物代謝酵素活性の誘導を引き起こすことが知られている。

油症においてもこれらの変化は認められ、平山ら⁸⁾は油症患者の肝生検を行ない、電顕で肝細胞の滑面小胞体の増加を認めたと報告している。しかし、臨床検査所見では油症患者に重篤な肝障害はみられず、発症当初“chloracne”を伴う重症群でも中等症ないし軽症群に比しALP、BSPの軽度上昇を認めたのみで、GOT、GPTの異常を18例中1例にみだが、その変化は軽度であった¹¹⁾と報告されている。一方、赤木ら¹²⁾は油症発生5年後の1973年度の検診において油

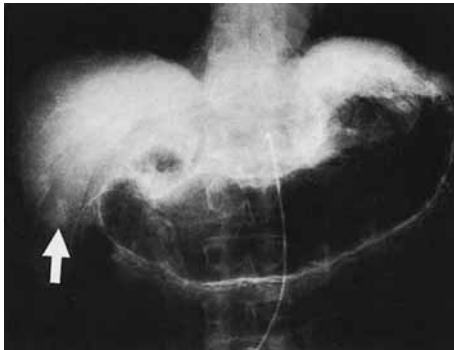


Fig. 1 Celiac angiogram demonstrates a tumor stain in the venous phase (arrow).

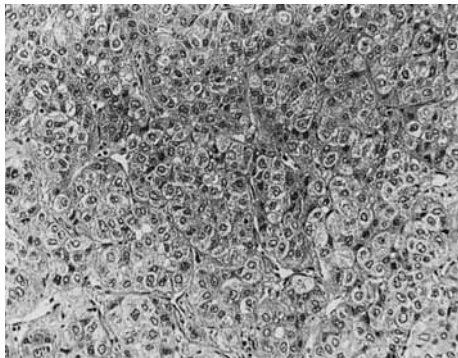


Fig. 2 Microscopic findings of tumor. The tumor cells resembling hepatocytes grow in compact pattern. (H. E. stain, $\times 180$).

症患者の γ -GTP が健常成人の約 2 倍の上昇を示し血中 PCB 濃度と相関を認めたと報告し、PCB により γ -GTP の酵素誘導が引き起こされる可能性を述べている。

油症発生 17 年を経過し、油症患者における血中 PCB 濃度は低下しているが、未だ特徴的なパターンが認められる⁸⁾。今回の検診では油症患者の女性において対照群の女性に比し血中 PCB 濃度の上昇を認めたのみで、GOT, GPT, ALP, γ -GTP では両群間に差をみなかった。さらに、油症患者において肝障害を認める者では、認めない者に比し血中 PCB 濃度に差はなく Q.I. が有意に高かった。以上より、油症発生 17 年後の肝機能検査所見からは、PCB 中毒と肝障害の関係を指摘することはできず、油症患者の肝障害には肥満が関与していると考えられた。

1985 年度の検診において AFP の上昇を 1 名に認め、肝硬変症の経過中に肝細胞癌を発症した症例であった。

PCB と肝腫瘍の関係について、Kimura ら⁷⁾ は Donryu 系雌性ラットに 1 年間以上 PCB (Kanechlor-400) を総量 1.2~1.5 g 経口投与することにより肝に良性腫瘍に属する腺腫様結節を多数認めたと報告している。また、Kimbrough ら⁸⁾ は Sherman 系雌雄ラットに PCB (Aroclor 1260) を 21 カ月間経口投与し、他臓器の腫瘍発生頻度は対照群と変らなかったが、肝細胞癌の発生は対照群 173 匹中 1 匹に対し投与群では 184 匹中 26 匹と高率に認めたと報告している。さらに、Preston ら¹³⁾ は diethylnitrosamine 前処置 Sprague-Dawley 系雄性ラットで 23 週後に肝細胞癌の発生を 16% にみたが、PCB (Aroclor 1254) を追加投与したものでは 64% と高率に発生をみたと報告している。彼らは PCB (Aroclor 1254) 投与のみでは肝細胞癌の発生を認めず、diethylnitrosamine 前処置ラットにおいて PCB が肝発癌の promoter として作用していると述べている。

しかしながら、ヒトの PCB 中毒における肝細胞癌の報告は少ない。1979 年台湾中部において、熱媒体として使用された PCB が混入したライスオイル摂取により発生した油症では 2,061 名の患者が確認され、3.5 年間で患者より出生した新生児 39 名中 8 名および、その他に 24 名の死亡が報告されている⁴⁾。そして、臨床症状、検査所見より 24 名の死亡者の半数が肝癌、肝硬変症および肝腫大を伴う肝疾患で死亡したと報告されている。本邦では Kikuchi ら⁵⁾ が油症患者剖検 12 例中 5 例に癌の合併を認め、その内訳は食道癌 1 例、肺癌 2 例、肝細胞癌 2 例であった。彼らは肝細胞癌 2 例のうち 1 例に肝硬変の合併を認め、他の 1 例では肝硬変の合併をみなかったと報告しており、PCB の組成は 2 例とも健康人と同じ C パターンであったことより油症との関係は考えにくいと述べている。

我々の肝硬変症の経過中に肝細胞癌の発症をみた症例でも PCB の組成は C パターンであったが、当科第 1 回目入院時には黒色面皰、痤瘡様皮疹など“chlor-acne”を認め、油症重症群に該当すると考えられる。また、油症発生当初から油症患者には著明な肝障害は認められないため本症例の肝硬変は PCB 以外の原因によるものと推定される。本症例における肝細胞癌の発症と PCB の関係は不明であるが、肝細胞癌発症の高危険群である慢性肝疾患、特に肝硬変症において PCB が肝発癌の promoter となった可能性は否定できない。

奥村ら¹²⁾ は 1984 年度の油症検診において 124 名に

超音波検査を行ない肝細胞癌をみなかったが、肝細胞癌の高危険群における超音波検査の重要性について述べている。本症例においても定期的な超音波検査により小肝癌を発見した。今後、油症と肝細胞癌の関係を明らかにする上にも、油症患者、特に慢性肝疾患を合併している者では超音波検査を行ない追跡調査する必要があると考えられる。

結 語

1. 1985年度福岡県油症一斉検診の受診者中16才以上の油症患者157名について、患者以外の受診者36名を対照として血中PCB濃度、肝機能検査所見を検討した。血中PCB濃度は対照に比し患者で有意に高かったが、この変化は女性のみで認められ男性ではみられなかった。GOT、GPT、アルカリフォスファターゼ、 γ -GTPはいずれも両群間に差を認めなかった。

2. 油症患者157名中肝障害(GOT>38 KU,あるいはGPT>30 KU)を認めたものは13名(8.3%)でHBs-Ag陽性者を1名にみた。肝障害を認める油症患者と肝障害をみない患者の飲酒者頻度、HBs-Ag陽性率に差はなく、肝障害者に肥満の指標であるQuetelet Indexの有意の上昇を認めた。血中PCB濃度は肝障害者に高い傾向がみられたが有意ではなかった。

3. 油症患者157名中AFPの上昇を男性1名に認めた。本症例は当科にて肝硬変症の経過中に肝細胞癌の発症を認めた油症患者であった。本症例の血中PCB濃度は7 ppbでCパターンであった。

文 献

- 1) 赤木公博, 村井宏一郎, 山中正義, 尾前照雄, 増田義人: 油症患者(塩化ビフェニール中毒症)における血清 γ -Glutamyl Transpeptidaseについて。福岡医誌 67: 297-300, 1976.
- 2) 藤田節治, 辻 宏, 加藤敬太郎, 佐伯清太

郎, 塚元久雄: Biphenyl Chloride 誘導体のラット肝ミクロゾームに与える影響。福岡医誌 62: 30-34, 1971.

3) 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: 455-461, 1969.

4) Hsu, S. T., Ma, C. I., Hsu, S. K. H., Wu, S. S., Hsu, N. H. M., Yeh, C. C. and Wu, S. B.: Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: A four-year followup. Environmental Health Perspectives 59: 5-10, 1985.

5) Kikuchi, M.: Autopsy of patients with Yusho. Am. J. Ind. Med. 5: 19-30, 1984.

6) Kimbrough, R. D., Squire, R. A., Linder, R. E., Strandberg, J. D., Montali, R. J. and Burse, V. W.: Induction of liver tumors in Sherman strain female rats by polychlorinated biphenyl Aroclor 1260. J. Natl. Cancer Inst. 55: 1453-1459, 1975.

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

8) 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一: 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニール異性体。福岡医誌 76: 150-152, 1985.

9) 西原英徳, 山元寅男: 塩化ビフェニール(PCB)と肝滑面小胞体に関する電子顕微鏡的研究。福岡医誌 63: 352-359, 1972.

10) 西住昌裕, 河内清司, 倉恒匡徳: 油症の実験病理学的研究。福岡医誌 60: 539-543, 1969.

11) 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.

12) 奥村恂, 坂口正剛: 油症検診と肝癌早期発見の対策。福岡医誌 76: 229-239, 1985.

13) Preston, B. D., Miller, J. P. V., Moore, R. W. and Allen, J. R.: Promoting effects of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) and polychlorinated dibenzofuran-free Aroclor 1254 on diethylnitrosamine-induced tumorigenesis in the rat. J. Natl. Cancer Inst. 66: 509-515, 1981.

14) 志方 建: 肥満の予後に関する臨床疫学的研究—久山町研究20年間の追跡調査結果—。福岡医誌 75: 252-270, 1980.

昭和 60～61 年度の年次検診における油症皮膚症状の推移

福岡大学医学部皮膚科教室 (主任: 利谷昭治教授)

利 谷 昭 治

九州大学医学部皮膚科教室 (主任: 占部治邦教授)

旭 正 一・占 部 治 邦

Dermatological Findings in the General Examination of Yusho in 1985-1986

Shoji TOSHITANI

*Department of Dermatology (Director: Prof. S. Toshitani),
School of Medicine, Fukuoka University,
Fukuoka 814-01, Japan*

Masakazu ASAH and Harukuni URABE

*Department of Dermatology (Director: Prof. H. Urabe),
Faculty of Medicine, Kyushu University,
Fukuoka 812, Japan*

Dermatological findings in the general follow-up examination of Yusho in 1985-1986 at Fukuoka Prefecture were reported and analyzed statistically.

1) In 1985, coming patients with Yusho showed the largest numbers, one hundred fiftysix, from 1975 to 1986.

2) The skin grading indexes showed much improvement.

3) The relationship of PCB pattern in blood and PCB concentration were changed and we could not find out a definite tendency.

4) 11 cases of Yusho observed in long term showed regulary beautiful improvement of skin symtomes in several cases and in other cases an individual differences.

油症患者の皮膚症状は経年的に軽快をみており、昨年 11 月に行なわれた昭和 61 年度福岡県油症一斉検診 (追跡調査) の成績においてもそれを裏付ける成績を示しており、今回も昭和 60, 61 年度の結果を纏めたので報告する。

結 果**福岡県一斉検診の受診状況**

表 1 は年次別油症患者の受診者数であるが、昭和 60 年度は受診者数が 51 年以来最高で 156 名を数えたが、61 年度は 110 名と各年度のものとは大差なかった。性差では女性が多く、60 年度が 2:3, 61 年度は 1:2

表 1 年次受診者数

性別	年 度	51年	52年	53年	54年	55年	56年	57年	58年	59年	60年	61年
男	子	38	46	54	44	41	45	41	32	54	61	40
女	子	58	57	73	66	66	68	60	46	70	95	70
	計	96	103	127	110	107	113	101	78	124	156	110

表2 皮膚重症度による分類

年 度 重症度	51年 (%)	52年 (%)	53年 (%)	54年 (%)	55年 (%)	56年 (%)	57年 (%)	58年 (%)	59年 (%)	60年 (%)	61年 (%)
0	25 (27.8)	30 (29.4)	42 (34.1)	38 (34.5)	56 (52.3)	39 (36.4)	37 (38.1)	32 (44.4)	46 (38.3)	61 (39.1)	45 (41.3)
0 I	12 (30.0)	10 (22.5)	17 (26.8)	9 (19.1)	15 (20.6)	13 (28.9)	9 (22.7)	12 (41.7)	16 (19.2)	14 (17.9)	17 (19.2)
I II	4 (15.5)	7 (18.6)	3 (9.8)	5 (18.2)	1 (13.1)	6 (15.9)	1 (16.5)	1 (12.5)	2 (14.2)	3 (16.7)	7 (18.3)
II III	14 (22.2)	11 (24.5)	15 (28.5)	10 (24.5)	6 (12.1)	4 (14.9)	5 (20.6)	4 (13.9)	2 (25.8)	4 (23.7)	3 (18.3)
III IV	1 (4.4)	3 (4.1)	0 (0.8)	2 (3.6)	1 (1.9)	3 (3.7)	1 (2.1)	0 (1.4)	2 (2.5)	0 (2.6)	1 (2.8)
計	90	102	123	110	107	107	97	72	120	156	109

表3 皮膚重症度得点数による分類

年 度 重症度	51年 (%)	52年 (%)	53年 (%)	54年 (%)	55年 (%)	56年 (%)	57年 (%)	58年 (%)	59年 (%)	60年 (%)	61年 (%)
0・1	32 (35.2)	32 (31.1)	43 (34.7)	44 (40.0)	63 (58.9)	52 (48.6)	38 (39.2)	43 (59.7)	63 (52.5)	88 (56.4)	69 (63.3)
2・3	24 (26.4)	35 (34.0)	43 (34.7)	29 (26.4)	25 (23.4)	33 (30.8)	28 (28.9)	21 (29.2)	27 (22.5)	42 (26.9)	27 (24.8)
4・5	20 (22.0)	22 (21.4)	13 (10.5)	15 (13.6)	14 (13.1)	12 (11.2)	20 (20.6)	5 (6.9)	11 (9.2)	20 (12.8)	10 (9.2)
6・7	10 (11.0)	7 (6.8)	14 (11.3)	13 (11.8)	2 (1.9)	7 (6.5)	5 (5.2)	2 (2.8)	10 (8.3)	5 (3.2)	3 (2.8)
8・9	3 (3.3)	5 (4.9)	7 (5.6)	6 (5.5)	2 (1.9)	2 (1.9)	4 (4.1)	0	4 (3.3)	1 (0.6)	0
10・13	1 (1.1)	0	2 (1.6)	1 (0.9)	1 (0.9)	0	1 (1.0)	1 (1.4)	5 (4.2)	0	0
14～	1 (1.1)	2 (1.9)	1 (0.8)	2 (1.8)	0	1 (0.9)	1 (1.0)	0	0	0	0
計	91	103	124	110	107	107	97	72	120	156	109
平均点	3.12	3.13	3.05	3.10	1.87	2.15	2.69	1.54	2.36	1.58	1.36

になっている。

皮膚重症度の変遷（表 2, 3）

皮膚重症度は年度によって多少の変動はあっても、軽快傾向にあることは間違いがない。例外的な昭和55, 58年度を除くと、昭和51, 52年度のⅢ～Ⅳ, Ⅳ度が4%程度みられたものが、昭和57年度以降2%前後に減少し、皮膚重症度0すなわち皮膚症状の消失した症例が、昭和51, 52年度30%未満であったものが、昭和61年度には増加して40%を越えたという工合で

ある。ただしⅠ～Ⅱ, Ⅱ度およびⅡ～Ⅲ, Ⅲ度に関してはほとんど年度における変動がみられない（表2）。

皮膚重症度得点数を経年的にその変動をみると、60年度では8.9点が最高点で僅か1人しかなく、61年度では消失している。また最も軽症か無症状の0・1点は昭和58, 59, 60年度でほぼ50%台で変動をみなかったのが、61年度では63.3%と増加しており、油症患者の皮膚症状の軽快化が僅かながらでも進行していることが覗かれる（表3）。

表 4 血中 PCB パターンと皮膚重症度得点数の相関性

(A) 昭和51年度				(B) 昭和55年度			
パターン	総得点	患者数	平均点	パターン	総得点	患者数	平均点
A	190	47	4.04	A	90	36	2.50
B	15	14	1.07	B	16	13	1.33
B C	24	8	3.00	B C	8	7	1.14
C	41	21	1.95	C	77	51	1.51
計	270	90	3.00*	計	191	109	1.79*

(C) 昭和56年度				(D) 昭和57年度			
パターン	総得点	患者数	平均点	パターン	総得点	患者数	平均点
A	118	41	2.88	A	158	37	4.27
B	21	12	1.75	B	23	13	1.77
B C	9	4	2.25	B C	1	1	1.00
C	48	27	1.78	C	45	24	1.88
計	196	84	2.33	計	227	97	3.03

(E) 昭和58年度				(F) 昭和59年度			
パターン	総得点	患者数	平均点	パターン	総得点	患者数	平均点
A	70	26	2.69	A	170	59	2.88
B	0	4	0	B	37	14	2.64
B C	0	1	0	B C	3	5	0.60
C	25	16	1.56	C	73	35	2.09
計	95	47	2.02	計	283	113	2.50

(G) 昭和60年度				(H) 昭和61年度			
パターン	総得点	患者数	平均点	パターン	総得点	患者数	平均点
A	135	59	2.29	A	68	33	2.06
B	13	17	0.76	B	14	10	1.40
B C	10	9	1.11	B C	2	1	2.00
C	67	53	1.26	C	48	53	0.91
計	225	138	1.63	計	132	97	1.36

* 血中 PCB 分析と皮膚症状検診の一方のみおこなった一部の症例は除外しているので、表3の平均得点とはわずかな相違がある。

血中PCBパターンと皮膚重症度得点数との相関性

表4にみられるように、昭和60、61年度のみをとりあげるとその変動は一定しない。すなわち、AおよびCパターンでは低下し、BおよびBCパターンでは上昇するという工合である。過去11年間を通覧しても特別な所見はみうけられない。

血中PCBパターンとPCB濃度との相関性

表5のごとく、昭和60年度と61年度を比較するとAパターンでは平均7.54および7.25ppb、Bパター

ンは3.76ないし4.72ppb、BCパターンでは2.78ないし3.70ppb、Cパターンでは2.69ないし2.88ppbで、Aパターンの濃度は圧倒的に高く、Cパターンが最低である。過去11年間の平均濃度はほとんど全く変動がない。

長期観察例の皮膚重症度・血中PCBの変動

表6のごとく11症例について、初期（昭和43～46年）、中期・前（昭和47～50年）、中期・後（昭和51～55年）、後期（昭和56～61年）にわけて結果を

表5 血中PCBパターンとPCB濃度の相関性

(A) 昭和51年度			(B) 昭和55年度		
パターン	症 例 数	平均濃度	パターン	症 例 数	平均濃度
A	49	8.08*	A	39	7.51
B	14	3.00	B	13	4.23
BC	10	2.20	BC	8	2.00
C	23	3.57	C	52	3.04
計	96	5.65	計	112	4.66
(C) 昭和56年度			(D) 昭和57年度		
パターン	症 例 数	平均濃度	パターン	症 例 数	平均濃度
A	46	6.93	A	40	6.45
B	12	4.08	B	14	3.79
BC	4	3.00	BC	1	1.00
C	28	2.57	C	24	2.67
計	90	5.02	計	79	4.76
(E) 昭和58年度			(F) 昭和59年度		
パターン	症 例 数	平均濃度	パターン	症 例 数	平均濃度
A	31	7.38	A	63	4.69
B	4	5.0	B	14	3.43
BC	1	5.0	BC	5	4.80
C	18	2.83	C	34	3.35
計	54	5.64	計	116	4.15
(G) 昭和60年度			(H) 昭和61年度		
パターン	症 例 数	平均濃度	パターン	症 例 数	平均濃度
A	59	7.54	A	33	7.25
B	17	3.76	B	10	4.72
BC	9	2.78	BC	1	3.70
C	53	2.69	C	53	2.88
計	138	4.90	計	97	4.56

* 濃度の単位はppb

表 6 長期観察例の皮膚重症度・血中 PCB の変化

症例	年齢*・性	初 期 (昭43-46)	中 期 前 (昭47-50)	中期・後 (昭51-55)	後 期 (昭55-61)
1	33 女	Ⅳ*	Ⅳ -55.5A***	Ⅳ-21A-14****	Ⅳ -10A-8****
2	3 女	Ⅳ	ⅢⅣ-25.5A	ⅡⅢ-16A-6	0 -3A-0
3	36 男	I	I -6A	0 -5A-1	0 -4A-0
4	35 女	Ⅲ	Ⅲ -9A	Ⅲ -8A-6	Ⅲ -4A-2
5	51 女	Ⅱ	Ⅲ -16.5B	Ⅲ -15A-6	Ⅱ -14A-1
6	69 男	0 I	Ⅱ -4.5A	0 -6A-I	0 -8A-0
7	40 男	I	I -19.5B	I Ⅱ-13A-5	Ⅲ -10A-3
8	35 男	Ⅲ	ⅢⅣ-4.5B	Ⅲ -2A-9	0 -5B-0
9	9 女	I	I -6A	I -3A-3	0 -2A-0
10	49 女	0 I	I -1.5C	Ⅱ -2C-3	0 I -2C-3
11	44 女	Ⅱ	I -3C	Ⅱ -2C-2	I -4C-2

* 年齢は昭和43年（発症当時）のもの

** 0, I, II, III, IVは皮膚重症度

*** 数字は血中 PCB 濃度 (ppb). A, B, C は PCB パターン

**** 右側の数字は、皮膚重症度得点数

記載する。発症当時最重症成人例は、皮膚重症度、PCB パターンにほとんど変動はみられないが、PCB 濃度は順次低下している。最重症小児例では、皮膚症状が消失し（Ⅳ→Ⅲ・Ⅳ→ⅡⅢ→0）た例もみられる。PCB パターンは変わらないが、PCB 濃度が低下している。また時に逆転（増悪）のみられる症例もある（症例 6, 7, 10, 11 など）が、中期・後で提出した皮膚重症度得点数では、皮膚症状の軽減化に伴って得点数の低下がみられ症状を忠実に示しているように思われる。血中 PCB は同一人では、PCB パターンに変動はないが、A と B が交互に現われてたり、B が A になったりする例外もみられる。PCB 濃度は経年的に減少しているが、下がりにくい例もあり個人差がみられる。

考 按

前回の報告^{1,2,3)}に引続いて昭和 60, 61 年度の油症患者の福岡県一斉検診における皮膚症状の推移に関して報告すると、受診者数は昭和 60 年度に過去最高の 156 名を数えたが、61 年度は 110 名と例年に变りなく、性差はいずれも女性が多く受診した。しかし本年、最高裁の和解勧告があり、それらの事情が受診者数の変動につながったとは考えられない。

皮膚重症度の変動が年度によって認められるものの、軽快傾向にあることは間違いなく、現在では皮膚症状のみられない皮膚重症度 0 が受診者数の 40% を越えたことから推察できる。Ⅱ, Ⅲ度に関しては、面皰形成、痤瘡形成がどこか 1 カ所でも見られれば決定さ

れる関係上一定の変動がみられない。しかし、皮膚重症度得点数ではこの間の事情が更に定量的に評価出来るために、合目的であり、軽快化の様相を掴まえることが出来たと思われる。

血中 PCB パターンと皮膚重症度得点の年次的変動についても、また PCB 濃度との相関性についても必ずしも一定の関係がみられず、両者の関係はほぼ変わらないと考える方がよいようである。

長期観察例 11 例について、初期、中期（これを前後の 2 期に分けた）、後期に分けて皮膚重症度の変動と PCB パターン、PCB 濃度の動きをみたが、PCB パターンは不変であることが実証された。ただし A → B, または交互に変わったりする例もみられ、血中 PCB 測定者の主観なども影響するようである。典型的な症例では重症度の軽快化がみられ、得点がそれを裏付けている。ただし PCB 濃度の下がりにくい例もあり、個人差がみられるようである。

総 括

昭和 60・61 年度の福岡県油症患者の一斉検診の成績から次のことが認められる。

- 1) 受診者数は昭和 60 年度が過去最高の 156 名であったが、昭和 61 年度は 110 名と例年通りの数に止まった。男女比は女性が多く、2:3 または 1:2 となっている。
- 2) 皮膚重症度については、重症度 0 が昭和 61 年度に 41.3% と 40% 台を越えて増加した。皮膚重症度

得点数では高得点の例が次第に減少し、昭和 60 年度では 8・9 点が 1 例のみ、昭和 61 年度は最高得点が 6・7 点でしかも 3 例のみになっている。

3) 血中の PCB パターンと皮膚重症度得点数および PCB 濃度との相関をみたが、一定の結果は得られなかった。

4) 長期観察例 11 例について皮膚重症度、血中 PCB の変化をみた。PCB パターンは不変であり、PCB 濃度も順次減少し、皮膚重症度得点数の軽快化がみられる典型例もあるが、PCB 濃度の下がりにくい例もあり個人差が一部にみられた。

文 献

- 1) 旭 正一, 幸田 弘, 利谷昭治: 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. 福岡医誌 66: 629-634, 1975.
- 2) 旭 正一, 幸田 弘, 占部治邦, 利谷昭治: 油症の皮膚症状 10 年間の推移. 福岡医誌 70: 172-180, 1979.
- 3) 利谷昭治, 旭 正一, 本坊昭三, 占部治邦: 昭和 58~59 年度の年次検診における油症皮膚症状の推移. 福岡医誌 76: 239-243, 1985.

トランスイルミネーションによる 油症患者マイボーム腺の観察

九州大学医学部眼科学教室

向 野 利 彦・大 西 克 尚

In Vivo Transillumination of Meibomian Gland in Yusho Patients

Toshihiko KOHNO and Yoshitaka OHNISHI

*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka 812, Japan*

Meibomian gland transillumination and infrared photography were performed on 52 patients with Yusho (polychlorinated biphenyls poisoning) and 18 unaffected individuals who served as controls. Infrared photography documented rod-like light-transmitted figures of Meibomian gland structure. More than half of the examined eyes with Yusho demonstrated loss of their Meibomian glands, suggesting Meibomian cyst formation. Only 10 % of unaffected eyes in control showed such abnormalities. These data suggest that Meibomian gland abnormalities still remain in Yusho patients 18 years after PCB intoxication and that transillumination and infrared photography have the ability to identify a spectrum of morphologic alterations of the Meibomian glands in Yusho patients.

マイボーム腺（瞼板腺）の病変は油症患者の主要な眼症状のひとつであり，発症当初はマイボーム腺分泌亢進・腫大と記載された²⁾，その後サルの実験的 PCB 中毒症および油症患者剖検例の眼瞼を組織学的に検討し，マイボーム腺分泌亢進とされた臨床所見は，マイボーム腺角化嚢胞の形成とその内容物の排出であることが明らかになった⁴⁾⁵⁾．油症は発症からすでに18年を経過し，発症当初見られた重篤な眼症状は徐々に消退している．マイボーム腺の病変も軽微となり，肉眼的に観察困難な例が増加している．マイボーム腺の腫大が見られる例でも，明らかな角化嚢胞の形成は少くなっている³⁾⁷⁾．しかし，一部の患者では眼瞼を圧迫することにより白色チーズ様のマイボーム腺嚢胞内容物が排出され，依然としてマイボーム腺病変が続いていることを示している⁸⁾．

最近，マイボーム腺を臨床的に観察記録する方法として，眼瞼のトランスイルミネーション（透照法）・赤外線写真撮影法が報告された¹⁰⁾．今回，油症患者の検診においてその方法を試み，マイボーム腺病変の記録・評価に有用であるかを検討したので報告する．

対象および方法

1986年9月～10月に行われた昭和61年度油症患者一斉検診（追跡調査）において，眼科検診を受けた油症患者110名中52名を対象とした．また健常者18名を対照とした．トランスイルミネーター（transilluminator OS-3000, Medical Instrument Research Associates）を眼瞼皮膚に当て下眼瞼を外反し肉眼観察後，下眼瞼結膜面の透照像を赤外線フィルター（Kodak wratten gelatin filter No. 25）を装着した接写撮影装置（Medical-Nikkor C, Nikon）で写真撮影した（図1）．フィルムは高速赤外線フィルム（Kodak high speed infrared film HIEI35-36）をASA 200で使用した．

結 果

油症患者52例92眼，正常対照18例36眼の下眼瞼結膜面の赤外線写真撮影を行った．通常の写真撮影では明瞭でなかったマイボーム腺の全体像が，下眼瞼の一部であるが，透照された．撮影されたマイボーム腺

の影は瞼縁と直角に配列し、明るく太い棒状を呈したが、導管と腺房を区別することはできなかった。

油症患者および対照のマイボーム腺は配列の差異により三型を区別した。もっとも多くみられた型は隣接するマイボーム腺が平行に規則正しく配列するもので、I型とした(図2)。対照のほとんど(81%)がこの型に属し正常と考えたが、油症患者92眼中36眼(39%)にも見られた(図3)。また、隣接するマイボーム腺の間に棒状の暗い部分を示し配列の乱れが軽度の例をII型(図4)、幅広く斑状の暗部を示し配列の乱れがつよい例をIII型(図5)とした。油症患者ではそれぞれ17%、24%にみられた。対照ではII型のみが4眼にみられたが、III型はみられなかった。写真で判定できなかった例は判定不能とした(表1)。

II型、III型にみられた暗い部分はマイボーム腺嚢胞形成あるいはマイボーム腺の欠損部に相当していた。その他、マイボーム腺の長さが不規則な例、全体に短い例、嚢腫の排出部に相当すると考えられる明るい小点を示す例も認められた。



図1 トランスイルミネーターを眼瞼皮膚にあてて下眼瞼を外反、結膜面の赤外線写真撮影を行う。



図2 正常対照, I型. マイボーム腺(矢印)が規則正しく平行に配列している。



図3 油症患者, I型. マイボーム腺(矢印)は正常に比べやや太いが規則正しく平行に配列している。

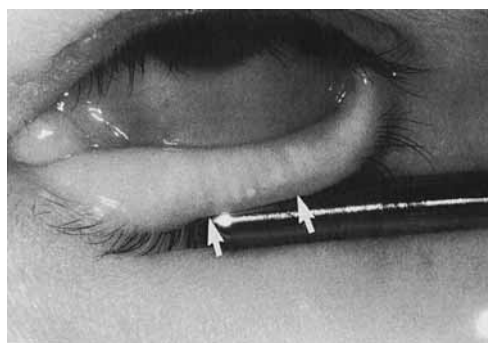


図4 油症患者, II型. 隣接するマイボーム腺の間に棒状の暗い部分(矢印)がみられるが、配列の乱れは軽い。



図5 油症患者, III型. 幅広い斑状の暗部(矢印)がみられ、マイボーム腺の配列は乱れている。

考 察

マイボーム腺の全体像を把握する試みは摘出した眼瞼のズダンIII染色透明標本で組織学的に行われた¹⁾。著者らも実験的PCB中毒サルにおいて瞼板透明標本

表 1 油症患者および正常対照のマイボーム腺配列

	例数	眼数	I 型	II 型	III 型	判定不能
油症	52例	92眼	36眼 (39%)	16眼 (17%)	22眼 (24%)	18眼 (20%)
対照	18	36	29 (81%)	4 (11%)	0 (0%)	3 (8%)

を用い、マイボーム腺の部分的消失、腺房の不明瞭化、マイボーム腺の肥大などが生じることを報告した⁹⁾。しかし、油症患者において肉眼的にマイボーム腺の全体像を把握することは容易でなく、病変を十分評価できなかった。今回、トランスイルミネーションを用い赤外線写真撮影を行うことにより、マイボーム腺の全景を把握できた。

油症患者にはマイボーム腺の配列に異常を呈する例が多くみられた。マイボーム腺の嚢胞形成や消失に相当すると考えられる暗い部分が多くみられ、配列に乱れが生じていた。その程度により三型を区別したが、I 型は正常と区別できず、II 型・III 型はマイボーム腺の異常を示すものと考えられた。

Robin らはマイボーム腺機能異常の例でマイボーム腺の像を詳細に観察することに成功し、導管と腺房を区別して報告した¹⁰⁾。今回の著者らの試みでは、導管と腺房を区別できる詳細な像を得るには至らなかった。これは検診に応用するため装置を簡便にし、十分な解像力をうることができなかったためと考えられる。今後、解像力をあげる工夫をし、油症患者のマイボーム腺病変を臨床的に明らかにする必要がある。

結 語

昭和 61 年度油症患者の一斉検診（追跡調査）において、トランスイルミネーション（透照法）を用いたマイボーム腺の赤外線写真撮影を試みた。

1. 通常の写真撮影では明瞭でなかったマイボーム

腺の全体像を下眼瞼の一部で撮影できた。

2. マイボーム腺の配列の異常は正常対照（11%）に比べ油症患者（41%）で高頻度にみられた。

文 献

- 1) 廣瀬金之助：邦人眼瞼ノ形態学的知見補遺マイボーム氏腺ニ就イテ。九医専雑誌 5：1-44, 1940.
- 2) 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.
- 3) 向野利彦，山名泰生：油症患者の眼症状（第 4 報）発症 10 年後の検討。福岡医誌 70：181-186, 1979.
- 4) 向野利彦，大西克尚，石橋達朗：実験的 PCB 中毒サルにおける瞼板腺（マイボーム腺）の病理組織学的研究。臨床眼科 33：1119-1125, 1979.
- 5) 向野利彦，大西克尚，石橋達朗，菊池昌弘：実験的 PCB 中毒サルおよび油症患者剖検例における瞼板腺（マイボーム腺）の病理組織学的研究。吉原新一編，サルの PCB 中毒症に関する予備的研究。福岡医誌 70：152-161, 1979.
- 6) 向野利彦，大西克尚，廣中博見：実験的 PCB 中毒サルの眼症状と瞼板腺圧迫排出物中の PCB 濃度の推移。吉村英敏編，サルの PCB 中毒症に関する研究（第 2 報）。福岡医誌 72：173-177, 1981.
- 7) 向野利彦，大西克尚，廣中博見：油症患者の眼症状（第 5 報）瞼板腺圧迫排出物中 PCB の検出。福岡医誌 72：237-241, 1981.
- 8) 向野利彦，大西克尚，廣中博見：油症患者の眼症状（第 6 報）瞼板腺内容物採取の工夫と PCB 濃度。福岡医誌 76：244-247, 1985.
- 9) 大西克尚，向野利彦，石橋達朗，篠田泰治：実験的 PCB 中毒サルの瞼板透明標本によるマイボーム腺の観察。福岡医誌 74：240-245, 1983.
- 10) Robin, J. B., Jester, J. V., Nobe, J., Nicolaides, N. and Smith, R. E.: In vivo transillumination biomicroscopy and photography of Meibomian gland dysfunction; a clinical study. Ophthalmology 92：1423-1426, 1985.

油症患者の頬粘膜における PCB, PCQ 濃度, PCB パターンおよび CB% 比について

長崎大学歯学部口腔外科学第1教室非常勤講師 (主任: 佐々木元賢教授)

奥村 英彦

長崎県衛生公害研究所

益田 宣弘

九州大学歯学部歯科保存学第一教室 (主任: 青野正男教授)

赤峰 昭文・青野 正男

Concentration Levels of the PCB and PCQ, Pattern of the PCB and Ratio of CB% in Buccal Mucosa of Patients with the PCB Poisoning (Kanemi-Yusho)

Hidehiko OKUMURA

*Department of Maxillofacial and Oral Surgery (Director: Prof. M. Sasaki)
School of Dentistry, Nagasaki University, Nagasaki, 852, Japan*

Nobuhiro MASUDA

Nagasaki Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

Akifumi AKAMINE and Masao AONO

*Department of Endodontics and Periodontics, Faculty of Dentistry
(Director: Prof. M. Aono), Kyushu University, Fukuoka 812, Japan*

Still now after 19 years of the Kanemi-yusho trouble, patients showed the PCB poisoning-symptoms are sometimes found out and many clinical reports of these symptoms in oral region have been performed in our previous investigations.

The PCB and PCQ were detected in buccal mucosa and blood of all of 27 patients with the PCB poisoning in present study. There was higher significant difference in concentration levels of the PCB and PCQ and ratio of CB% in patients from in general population, and levels of the PCQ and PCB in buccal mucosa were respectively 91 and 36 times as large as in blood with strong correlation of those in mucosa with those in blood. These matters suggest that the Kanemi contaminated oil give some disturbances to the oral area including the buccal mucosa, and moreover, this examination is useful for the diagnosis of this poisoning. In addition, the PCQ was not found in buccal mucosa and blood of general population.

PCB 中毒症の影響と思われる症状が 19 年経過した現在でも種々散見されるようである。われわれは、これまで多くの口腔領域に関する臨床的報告を行ってきた^{3)~10)}が、血液中の PCB, PCQ の諸家の検索等から、今なお油症患者の体内には PCB・PCQ が多量に蓄積されているのではないかと推測されている。

ところで、われわれは、前回 (昭和 58 年) に頬粘膜を採取し、頬粘膜組織内の PCB・PCQ を検索した結果、顕著な症状が認められてない部位の頬粘膜にも

高濃度の PCB・PCQ を認め、その概要を報告¹⁰⁾した。また、われわれと同様に、大神ら²⁾も、皮下脂肪組織において高濃度の PCB・PCQ を認めており、他の重要臓器にも多量に残留している可能性が考えられた。

今回、前回の報告¹⁰⁾の症例に、再検査 1 名、新たに 4 名の油症患者の検査の機会を得たので、これら 27 症例に対し頬部、血液中の PCB, PCQ 濃度、PCB パターン、CB% 比について検討を加えたので報告する。

対象ならびに試料

対象者は、昭和 58 年度長崎県油症検診の 23 名の他に、58 年度の再検査 1 名と現在までに新たに追加した 4 名の計 27 名の油症患者である。その内訳は 18 歳～68 歳までの認定患者 20 名（男性 17 名、女性 3 名）、32 歳～68 歳までの未認定者 7 名（男性）であった。なお福江島在住でカネミ油を摂取していない男性 7 名を健常者群とした。ところで、認定、未認定の判定は、粘膜採取時年度を基準とした。

試料としては、左右どちらかの頬粘膜を局麻下で約 6 mm×10～15 mm ほど切除し、切除後は 1～2 針縫合した。頬粘膜の検体量は 47 mg～245 mg であった。ところで、認定患者 3 名に頬粘膜の色素沈着が認められ、切除部位としては色素沈着部位を採取した。頬粘膜の切除と同時に静脈血を採取し、血中 PCB, PCQ 濃度を測定した。

分 析 方 法

PCB 分析方法としては通法のごとくアルカリ分解度、係数法で定量した。また、PCQ 分析方法は大阪府立衛生研究所の方法に準じて行なった。

結 果

検診者頬粘膜の PCB 濃度、PCQ 濃度を測定した結果は次の通りであった。

1. 頬粘膜の PCB 濃度、PCQ 濃度の検討

1) 油症患者頬粘膜 PCB 濃度の範囲は 26 ppb～860 ppb（平均 278.70 ± 41.41 ppb）で、そのうち認定患者の平均濃度は 298.55 ± 53.81 ppb、未認定者 222.00 ± 35.30 ppb であった。ところで、健常者群では、 15.3 ppb～ 145.8 ppb（平均 64.86 ± 16.15 ppb）で、健常者群と比べて認定患者は 4.6 倍、未認定者 3.4 倍の PCB を含んでおり、認定患者群と未認定者群間を除く各群間においては高度の有意差が認められた（表 1, 2）。

2) 油症患者頬粘膜 PCQ 濃度の範囲は 2 ppb～260 ppb（平均 66.07 ± 13.04 ppb）であった。そのうち認定患者の平均濃度は 81.65 ± 15.84 ppb、未認定者 21.57 ± 9.95 ppb であった。健常者群では全員とも検出限界以下であった。健常者群と各群間はもちろん認定患者群と未認定者群間にも高度の有意差が認められた（表 1, 2）。

2. 血液 PCB, PCQ 濃度の検討

油症患者の血液中 PCB 濃度の範囲は 1～16 ppb

（平均 7.20 ± 0.82 ppb）でそのうち認定患者群の平均濃度は 6.94 ± 1.02 ppb、未認定者群 7.86 ± 1.27 ppb で、健常者群 1.86 ± 0.13 ppb であった。健常者群と各群間は高度の有意差が認められた。

また血液中 PCQ 濃度は 0.03～2.7 ppb（平均 0.79 ± 0.13 ppb）で、そのうち認定患者群の平均濃度は 0.98 ± 0.16 ppb、未認定者群 0.32 ± 0.09 ppb、健常者群の全員とも検出限界以下であり、PCQ は健常者群では認められなかった（表 1, 2）。

3. 頬粘膜、血液中の CB% 比の検討

頬粘膜 CB% 比は、油症患者（ 2.39 ± 0.29 ppb）と健常者群（ 1.03 ± 0.06 ppb）に高度の有意差が認められた。このうち、認定者群（ 2.65 ± 0.37 ppb）、未認定者群（ 1.67 ± 0.22 ppb）で、健常者群に有意差が認められた（表 2, 図 1）。

血液中の CB% 比は油症患者群（ 2.58 ± 0.32 ppb）で、このうち認定者群は、 2.94 ± 0.40 ppb、未認定者群では、 1.63 ± 0.22 ppb であった。なお、健常者群（ 0.90 ± 0.57 ppb）は、油症患者群、認定患者群と有意差が認められた（表 2, 図 2）。

4. 頬粘膜、血液中の PCB パターン検討

頬粘膜の PCB パターン別をみると油症患者 26 例中 12 例（認定者 9 例、未認定者 3 例）が A パターンで、他の 14 例のうち B (A) パターン 4 例、B パターン 10 例で、健常者 7 例のすべてが B パターンであった（表 3）。

血液中の PCB パターンでは、油症患者 25 例中 15 例（認定者 11 例、未認定者 4 例）が A パターンで、B (A) パターン 9 例、B パターン 1 例であった。また、健常者群は、すべて B パターンであった（表 3）。

5. 頬粘膜 PCB 濃度と頬粘膜 PCQ 濃度との関連性について

頬粘膜の PCB 濃度、PCQ 濃度を検討した結果、相関係数 $r=0.691$ と高い相関関係が認められた（図 3）。

6. 頬粘膜と血液中の PCB 濃度と PCQ 濃度との関連性について採血が不可能であった 2 名を除く 25 名を検討したところ頬部 PCQ は血中 PCQ の約 91 倍の濃度、頬部 PCB は血中 PCB の約 36 倍の濃度で、いずれも高い相関関係（ $r=0.880$, $r=0.677$ ）が認められた。なお血中 PCQ と血中 PCB には相関関係は認められなかった（図 4, 5, 6）。

考 察

今までに PCB 油症患者を歯科、口腔外科からの立場から検討した結果、PCB 中毒症の影響としては、

表 1-a 認 定 患 者

No.	姓名	年齢	性	頬 粘 膜				血 液			
				P C B (ppb)	P C Q (ppb)	P C B パターン	C B%	P C B (ppb)	P C Q (ppb)	P C B パターン	C B%
1	K・M	46	F	210	140	B	6.1	5	1.4	B (A)	8.0
2	K・T	25	M	26	14	B	3.1	—	—	—	—
3	D・A	18	F	28	34	B (A)	2.7	1	0.29	A	2.3
4	D・K	20	M	37	30	—	—	5	1.1	A	4.5
5	F・T	57	M	850	180	A	1.9	14	2.5	A	2.3
6	N・H	58	M	860	210	A	4.2	16	1.4	A	4.0
7	N・Y	20	M	160	33	A	1.2	6	0.48	A	2.6
8	N・E	25	M	120	83	A	3.8	4	0.79	A	4.2
9	N・M	41	M	260	40	B	1.6	8	0.57	B (A)	2.6
10	H・K	48	M	620	260	B	3.2	9	2.7	B (A)	2.4
11	M・H	61	M	370	120	B	1.4	7	1.2	B (A)	1.7
12	H・M	68	M	480	39	A	1.9	3	0.52	A	1.6
13	M・B	49	M	300	100	A	4.3	9	1.5	A	4.7
14	O・T	49	M	330	75	A	2.4	—	—	—	—
15	E・T	51	M	260	150	A	6.4	7	0.92	A	4.5
16	M・T	49	M	460	22	B (A)	1.1	15	0.49	A	1.0
17	T・T	49	M	140	29	A	1.8	6	0.15	A	1.3
18	K・M	39	M	170	18	B	0.8	7	0.75	B (A)	1.0
19	Y・H	31	M	100	50	B	2.1	2	0.50	A	2.2
20	S・M	20	F	190	6	B	0.4	1	0.31	B (A)	2.1

表 1-b 未 認 定 者

No.	姓名	年齢	性	頬 粘 膜				血 液			
				P C B (ppb)	P C Q (ppb)	P C B パターン	C B%	P C B (ppb)	P C Q (ppb)	P C B パターン	C B%
1	T・Y	55	M	280	2	A	2.2	12	0.09	A	1.5
2	Y・M	52	M	350	4	B (A)	0.7	8	0.03	B (A)	0.9
3	T・H	32	M	110	15	B (A)	2.3	8	0.62	A	1.5
4	Y・S	46	M	250	8	A	1.9	5	0.12	A	1.7
5	A・K	51	M	94	16	B	0.9	3	0.26	B (A)	1.4
6	O・T	68	M	310	84	A	1.7	6	0.63	A	2.9
7	N・F	49	M	160	22	B	2.0	13	0.48	B (A)	1.5

表 1-c 健 常 者

No.	姓名	年齢	性	頬 粘 膜				血 液			
				P C B (ppb)	P C Q (ppb)	P C B パターン	C B %	P B C (ppb)	P C Q (ppb)	P C B パターン	C B %
1	Y・I	40	M	146	<3	B	1.1	2	<0.02	B	0.9
2	A・S	43	M	36	<2	B	1.2	2	<0.02	B	0.8
3	Y・K	35	M	15	<1.5	B	1.2	2	<0.02	B	1.2
4	H・M	31	M	61	<3	B	0.9	2	<0.02	B	0.8
5	K・T	47	M	96	<3	B	0.8	2	<0.02	B	1.0
6	N・S	27	M	23	<1	B	0.9	1	<0.02	B	0.7
7	S・G	38	M	77	<4	B	1.1	2	<0.02	B	0.9

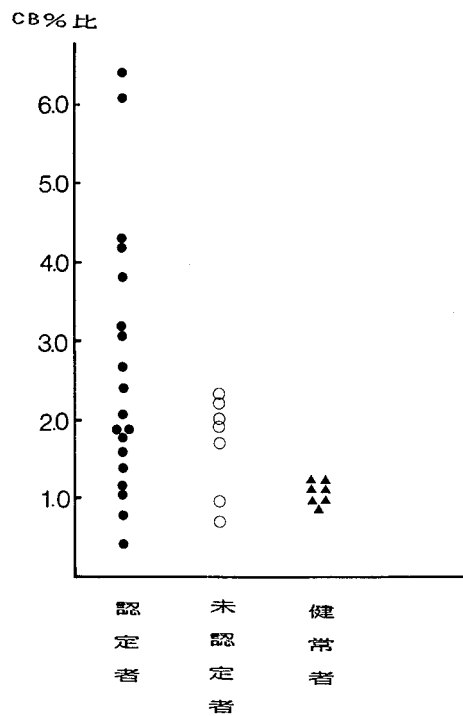


図 1 頬粘膜中 PCB の CB% 比

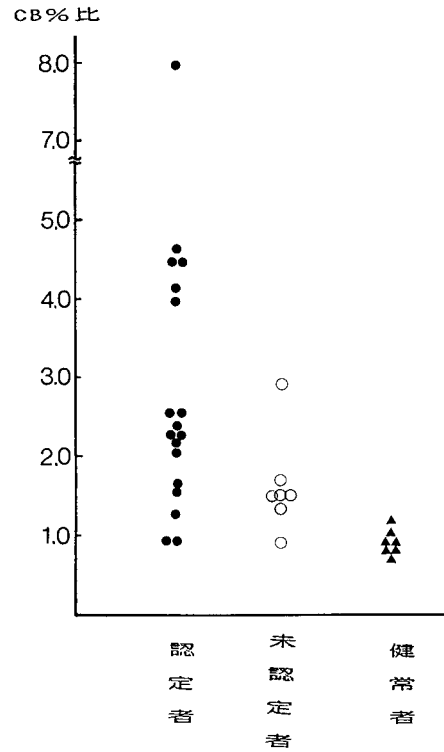


図 2 血液中 PCB の CB% 比

歯、歯胚、顎骨、歯周組織に大別される。主な所見としては、歯牙破折、脱臼・脱落、歯牙挺出感、歯牙発育異常、特に萌出異常、歯肉、頬粘膜などの色素沈着、歯肉からの出血、エナメル質形成不全などがあげられるようである^{3)~9)}。

ところが口腔の発育、成長は複雑であり、口腔の発生を理解しなければ、当中毒症の影響を十分に把握できないのではないかと考えている。つまり摂取時期

(摂取年齢)の違いにより症状の出現時期、種類、程度が異なってくるのが口腔領域の特色かと思っている。

前回 (S 58 年度) の検索¹⁰⁾の結果、大部分の口腔内面を構成し、皮膚所見の一部として色素沈着があげられている口腔粘膜、特に頬粘膜の組織内に大量の PCB, PCQ が含まれていることがわかり、口腔全体に大きな影響を与えていることを認識させられた。

表 2 頬粘膜, 血液中の PCB, PCQ, CB %比

	頬 粘 膜			血 液		
	P C B (ppb)	P C Q (ppb)	C B %比	P C B (ppb)	P C Q (ppb)	C B %比
健 常 者 群	64.86±16.15 (n=7)	限 界 以 下 (n=7)	1.03±0.06 (n=7)	1.86±0.13 (n=7)	限 界 以 下 (n=7)	0.90±0.57 (n=7)
油症患者群	278.70±41.41 (n=27)	66.07±13.04 (n=27)	2.39±0.29 (n=26)	7.20±0.82 (n=25)	0.79±0.13 (n=25)	2.58±0.32 (n=25)
認 定 者 群	298.55±53.81 (n=20)	81.65±15.84 (n=20)	2.65±0.37 (n=19)	6.94±1.02 (n=18)	0.98±0.16 (n=18)	2.94±0.40 (n=18)
未認定者群	222.00±35.30 (n=7)	21.57±9.95 (n=7)	1.67±0.22 (n=7)	7.86±1.27 (n=7)	0.32±0.09 (n=7)	1.63±0.22 (n=7)

(M±m)

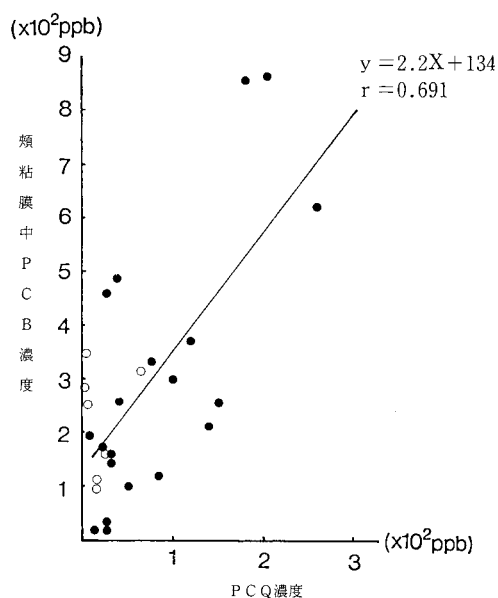
(高度の有意差: $D \geq 3 m \cdot \text{diff}$)(有意差: $D \geq 2 m \cdot \text{diff}$)

図 3 頬粘膜中濃度の関係

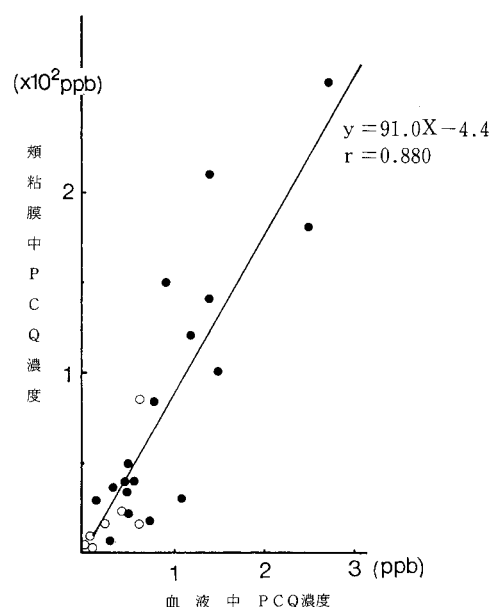


図 4 血液と頬粘膜中 PCQ 濃度の関係

表 3 PCB のパターン別人数

		A	B (A)	B
	血液	11	6	1
頬 粘 膜	認定者	4	3	7
	未認定者			
	健康者			
頬 粘 膜	認定者	9	2	8
	未認定者	3	2	2
	健康者			7

今回、現在までに頬粘膜を採取した 27 症例について PCB, PCQ 組織内濃度, PCB パターン, CB % 比を検索した。その結果, 検出範囲にばらつきがあったものの頬粘膜内 PCB, PCQ は全員に検出された。油症患者の頬粘膜 PCB 濃度の平均値では健康者の約 4.3 倍あり, 健康者と高度の有意差がみられた。また健康者群と認定患者群, 未認定者群とも高度の有意差がみられた。患者全員に検出した頬粘膜 PCQ 濃度は認定者群の平均値 81.65 ± 15.84 ppb で, ほとんど低値である未認定者群の約 3.8 倍の濃度であった。ところで健康者においては PCQ は血液, 頬粘膜に検出さ

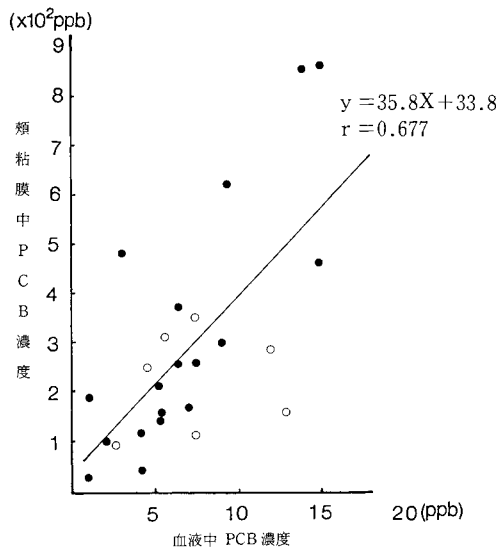


図5 血液と頬粘膜中 PCB 濃度の関係

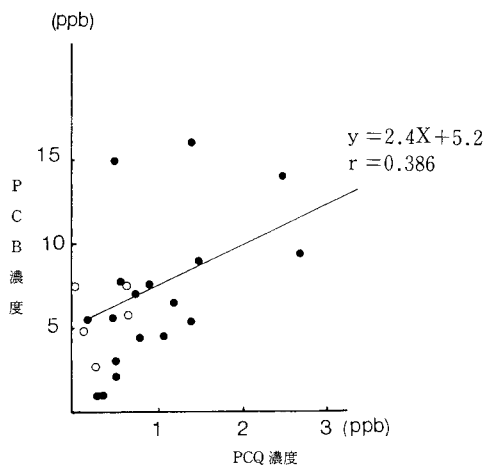


図6 血液中濃度の関係

れず、カネミライスオイルの摂取の判定に有効かと思われた。

血液中 CB% 比では、健康者群 (0.90 ± 0.57) は油症患者群、また認定患者群とは有意差を認め、未認定者群とは認められなかった。ところで馬場¹⁾らは長崎県における健康者のほとんどは 2.0 以下であるのに油症患者群は約 3 割が 2.0 以下であったと述べている。本例の健康者はすべて 1.2 以下であり、油症患者 14 例 (認定患者 18 例中 13 例) が 2.0 以上であった。一方、頬粘膜の CB% 比でも健康者すべて 1.2 以下であり、油症患者群、認定患者群とは高度の有意差、未認定者群とは有意差が認められた。組織別では、大神

ら²⁾は血液と皮下脂肪組織の CB% 比を比較し、皮下脂肪組織のほうが、高値を示す傾向にあると述べているが、血液と頬粘膜においては、血液が少々高いものの、さほど差はないようである。

血液、頬粘膜の PCB パターンをみると、油症患者に特徴的とされる A パターンは血液では 25 例中 15 例 (このうち認定患者 11 例)、頬粘膜では 26 例中 12 例 (認定患者 9 例)、他は B (A) 又は B パターンであった。健康者群はすべて B パターンで、C パターンは 1 例もなかった。また、血液と頬粘膜でパターンが異なっている症例は油症患者 24 例中 11 例 (そのうち認定患者 8 例) であった。本例や大神ら²⁾の報告のように、A パターンは、思ったよりも少なく、また組織によってはパターンの一致はみられない症例もあり、A パターンが油症患者に特徴的とするのは検討の余地があるように思われた。

血液中の PCB は地域、職業、食物等により、一般人でも検出されており、また、本例では油症検診者の血中 PCQ と血中 PCB 間には相関もなく、血液中 PCB の性状濃度による診断の有効性は絶対的ではないように思われる。ところが、頬粘膜 PCQ と頬粘膜 PCB 間には相関がみられ、検体数の問題か、組織によるとりこみや、排泄するなどの親和性の違いかは今後、検討が必要であろう。

ところで、口腔を構成している大きな組織である頬粘膜に血中 PCQ の約 91 倍、血中 PCB の約 36 倍の PCQ, PCB が高い相関関係 ($r=0.880$, $r=0.677$) で認められたことは、歯、顎骨など口腔全体に多大の影響をおよぼしていると考えられた。そのほかに、前回も述べたように、PCB 中毒症の診断に貴重かと思われ、他の組織も含め、詳細な検討が必要であろう。

おわりに

油症患者 27 名全員の頬粘膜に PCB, PCQ が検出され、血中 PCQ 濃度の約 91 倍、血中 PCB の約 36 倍の高い相関関係で認められた。このことは、カネミ汚染油が頬粘膜の周囲組織など口腔全体にも、かなりの影響をおよぼしていることが考えられた。そればかりではなく本症の診断にも有用かと思っている。なお健康者群の頬粘膜、血液中には PCQ は認められなかった。

文献

- 1) 馬場強三, 力岡有二, 吉田一美: 21. 油症認定者と一般健康者の血中 PCB について, 長崎県衛生

公害所報. 16: 110-115, 1976.

2) 大神太郎, 野中薫雄他: 油症患者と非油症患者の PCB, PCQ 濃度, PCB パターン, 及び CB% 比について, 昭和 59 年度長崎県油症治療研究報告, 5-11, 1984.

3) 奥村英彦, 他: PCB 汚染油摂取当時の口腔所見を呈していた油症検診患者の希有な一症例, 日本災害医学会誌 26: 870-875, 1978.

4) 奥村英彦, 他: PCB 汚染地区における児童, 生徒の口腔所見一萌状態, 歯牙形態, 口腔色素沈着について, 長崎油症検診班昭和 55 年度.

5) 奥村英彦, 他: PCB 汚染地区における児童生徒の歯牙発育状態について, 厚生省「母子保健・医療に関する管理体系システム開発に関する研究班」昭和 56 年度研究報告書.

6) 奥村英彦, 他: PCB 汚染地区における児童生徒の歯の萌出状態, 歯列弓の発育について, 厚生省「母子保健・医療に関する管理体系システム開発に關す

る研究班」昭和 57 年度研究報告書.

7) 奥村英彦, 他: PCB 汚染地区における生徒 (S. 43 年度生れ) の口腔所見と歯列弓の発育について, 厚生省「母子保健システムの充実に關する研究班」昭和 58 年度研究報告書.

8) 奥村英彦, 他: PCB 汚染地区における生徒 (S. 44 年度生れから昭和 46 年度生れ) の口腔所見, 厚生省「母子保健システムの充実に關する研究班」昭和 59 年度研究報告書.

9) 奥村英彦, 他: PCB 汚染地区における生徒 (昭和 44 年度から昭和 45 年度生れ) の歯列弓の発育について, 厚生省「母子保健システムの充分に關する研究」昭和 60 年度研究報告書.

10) 奥村英彦, 益田宣弘: 油症検診者の歯および歯周組織の PCB, PCQ 濃度について, 第一報: 頬粘膜での検討, 昭和 58 年度長崎県油症治療研究報告, 55-62, 1983.