

昭和29年11月5日第三種郵便物認可
平成元年5月25日（毎月25日発行）
第812号

Vol. 80 No. 5
May 1989

CODEN : FKIZA4
ISSN 0016-254X

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

第 80 卷 第 5 号 (812)

平成元年 5 月 25 日

特 集 号

油 症 と P C B

研 究 報 告 第 12 集

The Twelfth 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 12 集

(福岡医学雑誌 第80巻 第5号 平成元年5月)

目 次

1. 序 言倉恒 匡徳・吉村 英敏・吉田彦太郎…(1)
2. 油症原因ライソオイルから Polychlorinated Phenylidibenzofurans (PCPDFs) の
検出黒木 広明・大村 裕子・原口 浩一・増田 義人…(11)
3. 芳香族炭化水素水酸化酵素活性に対するダイオキシン関連化合物の作用
.....長山 淳哉・毛利 紀子・増田 義人・清原千香子・廣畑 富雄…(18)
4. 芳香族炭化水素水酸化酵素活性に対する 3-Methylsulphonyl-4, 5, 3', 4'-Tetra-
chlorobiphenyl と 7, 8-benzoflavone の作用
.....長山 淳哉・毛利 紀子・原口 浩一・増田 義人・清原千香子・廣畑 富雄…(23)
5. 鶏胚肝臓酵素誘導能による油症原因物質の影響評価
.....樫本 隆・宮田 秀明・高山 幸司・太田 壮一・味村 真弓…(32)
6. 塩素化合物のポルフィリン代謝に及ぼす影響
.....野中 薫雄・大神 太郎・山下 和徳・入船 弘子・渡辺 雅久
塚崎 直子・田中 敬一・吉田彦太郎…(43)
7. 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran のハムスターにおける生体内分布, 肝酵素
誘導作用及び急性毒性
.....古賀 信幸・中嶋 寛・神村 英利・外間由美子・吉村 英敏…(49)
8. 非致死用量の 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran ならびに 1, 2, 3, 4, 7, 8-
Hexachlorodibenzofuran のラットに対する急性ないし亜急性毒性西住 昌裕…(57)
9. ラットにおける 2, 3, 4, 7, 8-五塩化ジベンゾフランおよび 1, 2, 3, 4, 7, 8-
六塩化ジベンゾフランの発癌性西住 昌裕…(62)
10. 実験的動物発癌に及ぼす PCDF の影響—その濃度差の検討
.....広瀬 寮二・堀 真・豊島 弘行・宿輪 哲生・鶴殿 雅子・吉田彦太郎…(68)
11. 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorinated Biphenyl 投与犬肺組織の形態学的検討
.....永田 忍彦・シャム ラル・重松 信昭…(77)
12. スクアランを投与した実験的 PenCB 中毒ビーグル犬におけるマイボーム腺病変
の病理組織学的研究向野 利彦・大西 克尚…(80)
13. PenCB 投与ビーグル犬歯肉の組織学的観察
.....橋口 勇・赤峰 昭文・原 宜興・前田 勝正・鳥谷 芳和
青野 正男・福山 宏・奥村 英彦…(85)
14. イヌにおけるスクアランの体内動態と安全性
.....神村 英利・古賀 信幸・小栗 一太・吉村 英敏・井上 秀顕・佐藤喜代隆・大久保満伸…(91)
15. PCB 中毒患者における血液中 PCB 異性体の濃度推移
.....大間 美和・黒木 広明・原口 浩一・増田 義人・許 書刀…(103)
16. 判別関数値を用いる血中 PCB パターン解析
.....中川 礼子・篠原 志郎・飯田 隆雄・竹中 重幸・深町 和美・高橋 克巳…(109)

17. 油症患者血液中の PCB-および PCT-Methylsulfone の分析
.....原口 浩一・増田 義人・黒木 広明・大間 美和…(113)
18. 油症患者及び健常者の皮下脂肪組織中の Polychlorinated Dibenzofurans
(PCDFs)飯田 隆雄・中川 礼子・竹中 重幸・深町 和美・高橋 克巳…(118)
19. 油症患者の皮下脂肪組織中 Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins (PCDDs)
.....飯田 隆雄・中川 礼子・深町 和美・高橋 克巳…(124)
20. 長崎地方の油症患者および正常人の血液、皮下脂肪、毛髪中 PCB, PCQ 濃度の比
較検討大神 太郎・野中 薫雄・山下 和徳・入船 弘子・渡辺 雅久
塚崎 直子・田中 敬一・吉田彦太郎・力岡 有二…(129)
21. 長崎県地方住民の血液、皮下脂肪織中 PCB, PCQ 濃度の地域的検討
.....大神 太郎・野中 薫雄・山下 和徳・入船 弘子・渡辺 雅久・塚崎 直子
田中 敬一・吉田彦太郎・力岡 有二…(135)
22. 油症患者における腎機能村井宏一郎・辻 博・藤島 正敏…(140)
23. 昭和62～63年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状および長期追跡例におけ
る皮膚症状の推移本房 昭三・永江祥之介・利谷 昭治・旭 正一…(146)
24. 全国油症患者追跡検診の情報処理システムと昭和61年度検診結果について
.....片岡恭一郎・大久保彰人・篠原 志郎・廣田 良夫・廣畑 富雄…(153)

The Twelfth Reports of the Study on Yusho and PCB

(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 80, No. 5, 1989)

CONTENTS

1. Foreword.....M. Kuratsune, H. Yoshimura, H. Yoshida... (1)
2. Identification of Polychlorinated Phenyl-dibenzofurans (PCPDFs) in the Casual Rice Oil Associated with Yusho
.....H. Kuroki, Y. Ohmura, K. Haraguchi and Y. Masuda... (11)
3. Effects of Dioxin Congeners on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity ...
.....J. Nagayama, N. Mohri, Y. Masuda, C. Kiyohara and T. Hirohata... (18)
4. Effects of 3-Methylsulphonyl-4, 5, 3', 4'-Tetrachlorobiphenyl and 7, 8-Benzoflavone on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity
J. Nagayama, N. Mohri, K. Haraguchi, Y. Masuda, C. Kiyohara and T. Hirohata... (23)
5. Evaluation of Toxic Effects on Yusho Causal Substances by Chick Embryo Hepatic Microsomal Enzymes Activities
.....T. Kashimoto, K. Takayama, M. Mimura, S. Ohta and H. Miyata... (32)
6. The Effect of Chlorinated Chemicals on Porphyrin Metabolism—The Synergistic Effect with Chlorinated Chemicals and Low Concentrations of GriseofulvinS. Nonaka, T. Ohgami, K. Yamashita, H. Irifune, M. Watanabe,
N. Tsukazaki, K. Tanaka and H. Yoshida... (43)
7. Tissue Distribution, Inductive Effect on Liver Enzymes and Acute Toxicity of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran in Golden Syrian Hamsters
.....N. Koga, H. Nakashima, H. Kamimura, Y. Hokama and H. Yoshimura... (49)
8. Acute or Subacute Toxicity of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran and 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran to Rats in Non-lethal DoseM. Nishizumi... (57)
9. Carcinogenicity of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran and 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran in RatsM. Nishizumi... (62)
10. Influences of Polychlorinated Dibenzofuran on Experimental Carcinogenesis in Mice...R. Hirose, M. Hori, H. Toyoshima, T. Shukuwa, M. Uono and H. Yoshida... (68)
11. Morphology of 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorinated Biphenyl-induced Change in Canine LungN. Nagata, S. Lal and N. Shigematsu... (77)
12. Histopathology of Meibomian Gland Abnormalities in Experimental PenCB Intoxicated Beagle Treated with SqualaneT. Kohno and Y. Ohnishi... (80)
13. Histological Study on the Gingiva in PenCB Poisoned Beagle Dogs
.....I. Hashiguchi, A. Akamine, Y. Hara, K. Maeda, Y. Toriya, M. Aono,
H. Fukuyama and H. Okumura... (85)
14. Studies on Distribution, Excretion and Subacute Toxicity of Squalane in Dogs H. Kamimura, N. Koga, K. Oguri, H. Yoshimura, H. Inoue, K. Satoh and M. Ohkubo... (91)
15. Concentration Changes of PCB Isomers in the Blood of Patients with PCB PoisoningM. Ohma, H. Kuroki, K. Haraguchi, Y. Masuda and S-T. Hsu... (103)
16. Statistical Analysis of Subjects with Type A, BC and C Pattern of Blood PCB on GC
R. Nakagawa, S. Shinohara, T. Iida, S. Takenaka, K. Fukamachi and K. Takahashi... (109)

17. Analysis of PCB-and PCT-Methylsulfones in the Blood of Yusho Patients...
.....K. Haraguchi, Y. Masuda, H. Kuroki and M. Ohma... (113)
18. Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) in the Subcutaneous Adipose Tissue
of Yusho Patients and Normal Controls
.....T. Iida, R. Nakagawa, S. Takenaka, K. Fukamachi and K. Takahashi... (118)
19. Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins in the Subcutaneous Adipose Tissue of
Yusho PatientsT. Iida, R. Nakagawa, K. Fukamachi and K. Takahashi... (124)
20. A Comparative Study on Polychlorinated Biphenyls (PCB) and Polychlorinat-
ed Quaterphenyls (PCQ) Concentrations in Subcutaneous Fat Tissue,
Blood and Hair of Patients with Yusho and Normal Control in Nagasaki
Prefecture
...T. Ohgami, S. Nonaka, F. Murayama, K. Yamashita, H. Irifune, M. Watanabe,
N. Tsukazaki, K. Tanaka, H. Yoshida and Y. Rikioka... (129)
21. Regional Differences of PCB and PCQ Concentrations in the Blood and
Subcutaneous Fat Tissue of Residents of Nagasaki.....
.....T. Ohgami, S. Nonaka, K. Yamashita, H. Irifune, M. Watanabe,
N. Tsukazaki, K. Tanaka, H. Yoshida and Y. Rikioka... (135)
22. Renal Function in Patients with YushoK. Murai, H. Tsuji and M. Fujishima... (140)
23. Dermatological Findings in the Annual Examination of the Patients with
Yusho in 1987-1988—With Special Reference to the Alteration of Skin
Symptoms in the Patients Followed up for 20 Years
.....S. Honbo, S. Nagae, S. Toshitani and M. Asahi... (146)
24. Introduction of the Information Processing System of Medical Examinations
of Yusho Patients and Some Results Obtained by the 1986 Survey.....
.....K. Kataoka, A. Okubo, S. Shinohara, Y. Hirota and T. Hirohata... (153)

序 言 (1)

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

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*

During the past 21 years since the outbreak of "Yusho" in 1963, great efforts have been made by the Study Group to develop a treatment method or methods which accelerate the excretion of polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzofurans, and related compounds still retained in the body of patients. To our regret, we have not yet achieved our purpose. Professor H. Yoshimura, chief, Study Group for the Therapy of "Yusho" at Kyushu University, and his associates, however, have rather recently demonstrated an important fact that an oral administration of "Squalane", hardly exerting any toxic effects, facilitates the fecal excretion of the above toxic agents in animals. Other valuable findings for improving the health care of patients have also been made by other members recently. This 12th report on Yusho includes such notable findings. It is our belief that the report will help those interested in this unique poisoning better understand it. Any comment or advice by readers would be highly appreciated.

油症が発生してすでに20有余年が経過した。2年毎に刊行されてきたこの特集号も、早や第12集を数えるに至った。この間、厚生省油症治療研究班（以下研究班と略記）の研究により、油症に対する理解は著しく深まり、中毒初期に比べ、理解に関しては、天地の開きがあると言っても過言ではない。しかし、班員の悲願であるとともに、患者の大きな期待であった、油症の根治療法の開発は、残念ながら、いまだに達成されていない。新たな研究報告集を刊行するにあたり、班長としてその責任を痛感するとともに、一層の努力を期する次第である。またそれと同時に、人類がいまだかつて経験したことのない、この中毒の機構を解明し、その犠牲者の健康回復のために役立つ情報を得るために、ひたすら黙々として研究に献身してこられた、すべての班員に対して改めて心から感謝したい。

以下研究班全体の重点研究課題と、班長が中心となってこの2年間にとくに取り組んできた課題について、その概要を説明し、序文にかえたい。研究班を構成する2つの研究班、すなわち、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については、夫々の班長から説明されるので、ここでは詳細には言及しない。

1. 油症患者の病状の趨勢とそれに対応する研究班の重点的研究課題

油症発生後約21年が経過したが、この間に、患者が当初経口的に摂取し体内に取り込んだ、塩化ビフェニール(PCBs)、塩化ジベンゾフラン(PCDFs)、塩化クオーターフェニール(PCQs)、塩化ジベンゾジオキシン(PCDDs)その他は、ある物は速やかに、ある物は徐々に排出され、患者の病状は次第に改善されてきた。しかし、油症の主要な原因物質と考えられる毒性の強いPCDFsやコプラナーPCBs、それに毒性が比較的弱いと考えられているPCQsなどは、一部の患者においては、今日においても、依然として高濃度に体内に残留し、症状を表わし続けている。したがって体内に残留するこれらの毒物を速やかに排除することが、患者にとってもっとも望ま

しいことである。しかも PCDFs や PCBs は、本研究班や他の研究者の研究により、動物の肝臓に対し発がん性をもっていることが明らかにされ、疫学的研究もまた、一部の患者において肝臓がんの死亡が高まっていることを示している。したがって、がん予防の面からも、これらの毒物を速やかに対外に排出することはきわめて重要である。しかも、患者の多くが、がんの好発年齢に達している現在、このことは緊急を要することである。

研究班は以上のことを考え、まず、毎年行われている油症追跡検診において、肝臓がんの早期発見に重点をおいた検診を約 5 年前から開始するとともに、過去 20 年間努力し続けたがいまだ成功するに至っていない、残留 PCDFs、PCBs などの排出促進方法の開発に、一層の努力を傾注してきたのである。幸にして、最近、吉村英敏教授その他九大油症治療研究班員の研究により、スクアランが上記の目的のために有効であることが判明し、その毒性も低いことが立証され、油症治療にやや希望がでてきた。しかし、現時点では予備実験がいまだ完了していないので、これを臨床応用するまでには至っていない。速やかに、かつ十分に予備実験が行われることが強く要望される。

他方、われわれの目的を達成するために役立つと考えられる欧米の研究者の研究成果については、当然のことながら、研究班として十分に注意を払って検討してきた。例えば、米国 Environmental Protection Agency の Dr. D. W. Schnare などが発表している『PCB などの Body burden 減少法』に関する一連の研究報告をとくに取り上げ、昭和 63 年度の当研究班の班会議において、その油症への応用の可能性について検討した。その結果、Schnare などの方法を、油症患者に应用することは困難であるという結論になった。さらに最近になって、吉村英敏・九大油症治療研究班長を中心に、職業暴露により体内に取り込まれた Chlordecone の排出に、Cholestyramine の投与が有効であるという、バージニア医科大学の Dr. Philip S. Guzelian 一派の研究報告が、慎重に検討された。その結果、この方法は油症に应用してみる価値が十分にあると判断され、すでに患者有志の協力のもとに、臨床実験が開始されようとしている。結果が大いに期待される。

思うに、新しい治療法を開発するためには、人体実験が不可欠である。油症の治療法を開発するためには、ほかならぬ油症患者に被検者になってもらわなければならない。患者と研究者との間の信頼関係が、一層強まることが切に希望される。

2. 油症患者の染色体異常に関する予備的研究

今まで油症患者の染色体を検査したことはないが、その異常が存在する可能性は十分考えられる。そこで、3 人の患者（重症）の血液を広島大学原爆放射能医学研究所の鎌田七男教授に検査をして頂いた。その結果、3 人とも、姉妹染色分体交換率が、細胞当たりであっても、染色体当たりであっても、対照に比して増大していることが分った。今後例数を増やして、この変化が暴露量と量反応関係をもっているかを調べ、患者の健康管理のために、この種の検査を応用すべきか否かをさらに検討することとなった。

3. 油症患者体内の PCBs のパターンについての検討

重症の油症患者の血中 PCBs のガスクロマトグラフは、普通人のそれと異なり特有であることが知られている。この特有なガスクロマトグラフのパターンは、PCBs の血中濃度とともに、油症患者の認定ならびに健康管理に利用されている。しかし、パターンの表現方法は、研究者によってマチマチであり、いまだ統一されていない。そこで、統一のための検討会を開催し、その結果、今後パターン名を用いることを止め、パターンに関係のある、2,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl, 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl, 2,3,4,5,3',4'-hexachlorobiphenyl のそれぞれの絶対濃度で示すこととなった。

最後に、この特集号の編集は九大油症治療研究班長吉村英敏教授、古賀信幸班員によって行われたことを記し、感謝の意を表わしたい。

序 言 (2)

九州大学油症治療研究班・班長
九州大学薬学部教授
吉 村 英 敏

Foreword

Hidetoshi YOSHIMURA

*Chief, Study Group for the Therapy of "Yusho", at Kyushu University Professor,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812*

この第12集は昭和62年5月発行の第11集に引続き、昭和62年4月より平成元年3月に至る2年間の研究成果の集録である。その間の九州大学油症治療研究班員の構成を表1に示す。

昭和43年夏の油症発生以来すでに21年の歳月が経過したが、その間に得られた多くの新知見に基づき、当初の診断基準も改訂(昭和47年)や補遺(昭和51年)、あるいは追加(昭和56年)がなされて現在に至っている(これらについては第11集序言を参照されたい)。原因となったライスオイル中からも、初期のPCBに加えPCDF、PCQが相次いで検出され、また最近まで含有されないといわれていた高毒性のcoplanar PCB (3,4,5,3',4'-penta-chloro-および3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl)やPCDDまでもが微量混入している事実が明らかにされた。

本報告集にはこれらの研究を引継いで多くの重要な成果が収載されている。まず飯田らは血液、皮下脂肪の分析から、前記ライスオイル中のPCDFs、PCDDsがきわめて微量ながら現在もお患者体内に残留していることを明らかにしている。またPCBの代謝産物の一つとして知られているメチルスルホン体は、今回原口らにより、その血中レベルがPCBのそれより高いことが見出されるとともに、新たにPCTのメチルスルホン体の存在も確認されている。一方、これら塩素化芳香族炭化水素によるメチルコラントレン型酵素誘導能の大小は、それらの毒性の強弱とよく並行することが知られているが、榎本らはニワトリ胚(肝)におけるこの誘導能を指標として、油症原因ライスオイルに含まれる(PCDFs+PCDDs)、coplanar PCBs、PCBs、PCQsの毒性評価を行っている。その結果、油症の発症には従来の結論どおりPCDFsがもっとも重要であることを再確認するとともに、coplanar PCBsの関与も無視し得ないことを報告している。

表 1 昭和62, 63年度九州大学油症治療研究班員

班長	九 大 薬	衛生化学 裁判化学	教 授	吉村 英敏	班 員	九 大 薬	衛生化学 裁判化学	助教授	小栗 一太
班員	九 大 医	皮 膚 科	講 師	本房 昭三	班 員	〃	〃	助 手	古賀 信幸
班員	〃	呼吸器科	教 授	重松 信昭	班 員	九 大 理	生体高分子	教 授	岩永 貞昭
班員	〃	神経内科	助 手	藤井 直樹	班 員	福 大 医	第一内科	教 授	奥村 恂
班員	〃	眼 科	助教授	大西 克尚	班 員	〃	病 理 科	教 授	菊池 昌弘
班員	〃	第二内科	助 手	村井宏一郎	班 員	〃	皮 膚 科	教 授	利谷 昭治
班員	〃	公衆衛生	教 授	廣畑 富雄	班 員	第 一 薬 大	物 理 分 析	教 授	増田 義人
班員	〃	〃	助教授	廣田 良夫	班 員	福 岡 県 衛 生	〃	所 長	高橋 克巳
班員	九大医療短	〃	助教授	長山 淳哉	班 員	公害センター	〃	〃	〃
班員	九 大 歯	歯科保存	教 授	青野 正男	班 員	摂 南 大 薬	衛生薬学	教 授	榎本 隆
班員	〃	〃	講 師	赤峰 昭文	班 員	佐 賀 医 大	地域保健	教 授	西住 昌裕
班員	九 大 薬	薬 化 学	助教授	佐伯清太郎	班 員	産 業 医 大	皮 膚 科	教 授	旭 正一
					事務局	九 大 薬	衛生化学 裁判化学	助 手	古賀 信幸

表 2 全国油症患者発生数（年次別累計）

年 次	患 者 数	年 次	患 者 数
昭和43年度	676	昭和54年度	1,696
44	1,001	55	1,729
45	1,056	56	1,770
46	1,081	57	1,788
47	1,097	58	1,824
48	1,200	59	1,833
49	1,288	60	1,841
50	1,531	61	1,854
51	1,629	62	1,857
52	1,665	63	1,860
53	1,684		

表 3 未認定者検診及び認定状況（福岡県）

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
62	35	24	68.6	1	4.1	8	15
63	27	20*	74.1	0	0	9	10

* 受診者 1 名は認定資料不足につき判定不能。

事件発生後 21 年を経過する現在において、もっとも危惧されるのは前記倉恒班長の序言にもあるように、発がんの可能性である。西住は油症にとって PCDFs 中最重要と考えられている 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran および 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran の発がん性をラットについて検討し、その可能性を否定し得ないことを述べている。このような危惧は、原因化合物を体外へ排除しさえすれば解消しうることであり、この数年来スクアランを用いての排泄促進に関する研究が行われてきた。今回神村らは、スクアランの医療応用に不可欠なその安全性を、イヌについて 3 カ月にわたり検討している。その結果、スクアラン投与による特記すべき毒性変化は何ら観察されず、ラットにおけると同様の安全性が示された。しかし、イヌでは一部体内に吸収されたスクアランが肝に貯留する傾向がみられ、引続いての検討が行われている。

このほかにも多くの価値ある知見が収載されており、これらの成果を基盤に、近い将来、臨床応用可能な治療法が確立されることが期待される。なお昭和 62, 63 年に新たに認定された患者数を加え、年次別の全国油症患者発

生数を表 2 に示す。また福岡県における検診と認定状況を表 3 に示す。これらから明らかなように、いまだにわずかながら認定患者が新たに発掘されている。

本報告集に集録した研究成果は昭和 62 年度および昭和 63 年度厚生科学研究費補助金ならびに昭和 62 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る。

序 言 (3)

長崎地方における油症検診の現状と研究方向について

長崎油症研究班・班長
長崎大学医学部教授
吉 田 彦 太 郎

Foreword

Hikotaro YOSHIDA

*Chief, Study Group for the Therapy of "Yusho", at Nagasaki.
Professor, Nagasaki University, School of Medicine, Nagasaki 852*

は じ め に

長崎県内には平成元年2月現在753名が油症患者として認定されている。事件発生以来20年を越えてもなお油症に関しては医学的、社会的に多くの問題が残されている。今回、研究報告集の発刊に際して、長崎県における油症患者の検診と研究を振り返り、今後の問題点の整理を試みたい。

油症患者検診について

長崎県における油症患者の検診状況を表1に示した。発症当初は受診者も多く1,446名にのぼっていたが、時を経るにしたがって減少し、最近では100名台となっている。もしその減少理由が油症の軽快にあるのであれば喜ぶべきことも知れないが、現実には多くの深刻な問題が秘められているようである。

一方、油症患者の認定は検診班の報告をもとに油症対策協議会によって行われている。その認定状況を表2に示した。昭和43年、44年には100名以上の認定がなされているが、その後は数十名単位に減少し、最近では数名が認定されているに過ぎない。

受診者の減少の理由としては、検診が年に1回しか行われていないこと、患者の居住地が離島地区に多いこと、患者の移動が繰り返し行われていること、症状が固定し、患者の油症に対する関心が薄くなったこと、などがあげられると思う。また認定患者の減少理由としては症状が次第に特異的な所見から非特異的な変化へとシフトし、油症の診断が困難となりつつあることが考えられる。

油 症 研 究

長崎地方における油症に関する研究は、事件発生後間もなくの昭和43年、長崎県の呼掛けで長崎大学油症研究班が組織されたことから始まる。そして昭和50年、長崎大学のみならず、県内の研究機関の協力も必要となり、それらを含めた現在の長崎油症研究班に改組された。

昭和59年、厚生省の油症治療研究体制が変わり、長崎油症研究班も全国的に統一された厚生省油症治療研究班に参加し、現在に至っている。現在の班の構成メンバーは表4に示した。なお、現在の厚生省の研究班に参加する以前は、厚生省の特別研究「小児慢性疾患に関する研究」や「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」などの研究費によって研究が行われてきたのである。

皮膚科領域においては主として代謝異常の面から研究が行われてきた。最初の報告は岩崎⁶⁾⁷⁾によって行われ、油症患者の血清と面皰内脂質の異常を明らかにし、それらは皮下脂肪組織の脂質代謝異常によるのではないかと考えられた。

表 1 カネミ油症の検診状況（昭和43～63年度）

年 度	検 診 個 所 数	検 診 受 診 者			備 考
		総 数	油 症 患 者	未 認 定 者	
43	4	709人	一人	709人	うち歯科検診66人（未14人） 健康管理39人（未33人）
44	12	1,446	980	466	
45	6	620	473	147	
46	7	915	513	402	
47	2	262	42	220	
48	5	240	37	203	
49	4	414	19	395	
50	3	315	43	272	
51	4	351	110	241	
52	3	320	114	206	
53	3	325	53	272	
54	3	290	83	207	
55	3	217	80	137	
56	3	200	85	115	
57	3	220	98	122	
58	3	231	126	105	
59	3	192	92	100	
60	3	385	275	110	
61	3	217	129	88	
62	3	139	79	60	
63	3	124	81	43	
計	83	8,132	3,512	4,620	

またその頃、油症患者のうちに1例の晩発性皮膚ポルフィリン症（PCT）が発生したことが報告された⁸⁾。この症例ではPCB汚染とともに大量長期間の飲酒歴があり、PCB汚染がPCTの発症に積極的に関与している可能性が示唆されたのである。そこでわれわれ⁹⁾はPCBのポルフィリン代謝異常におよぼす影響をみるためにKC-400をラットに投与したところ、ポルフィリン症の発症をみたのである。その後PCBが種々の公害物質との複合汚染の一端を担って人体に悪影響をおよぼす可能性があるのではないかと考え、低濃度グリセオフルビン含有飼料とともにPCBをマウスに与えると、それぞれを単独に与えた場合よりも著しい代謝異常が誘発されることが明らかとなった¹³⁾。しかし今回、単純化学構造の塩素化合物とグリセオフルビンとの複合作用を検討したが、ポルフィリン代謝に異常をきたす物質は見出し得なかった⁹⁾。

油症患者の血中PCB濃度の測定は長崎県においても行われてきた。その濃度は他の報告と同様に高値を示す例が多かった²⁾。しかし、カネミライス油を摂取していない人々（対照）のサンプルの中にもPCB濃度がかかなり高値を示す場合がみられ、それらは漁村地域の住民に多くみられた¹⁶⁾。このような所見は他の府県の場合とやや異なった血中PCB濃度の所見である。その理由は明らかではないが、検診時には常に対照を取らねばならないことを示唆するとともに、より特異性が高く、診断の指標となり得る検査法の開発が重要な研究課題となってきたのである。そしてPCBが水に溶けず、脂溶性があることから、皮下脂肪組織内のPCB、PCQ濃度を測定したところ、油症患者ではそれらの著しい沈着がみられることが明らかとなった¹⁰⁾。今回、毛髪中PCB、PCQを測定したが、やはり高値であった¹¹⁾。しかし、皮下脂肪中PCB、PCQ濃度ほど高値ではなかった。その測定は材料が非観血的に採取できる利点はあるものの、油症の診断基準や治療効果の判定に利用できるか否かは今後の検討によらねばならないであろう。

一方、PCB、PCDFなどの発癌に対する影響も肝臓との関連を指摘する報告以後、多くの注目を集めている。長崎大学皮膚科のグループはd-d系マウスに対するPCBをはじめ、いくつかの有機塩素化合物の発癌に対する作用を検討し、PCBはメチルコラントレンによる実験的発癌に対して抑制的に作用することを明らかにし、PCDFは

表 3 地区別カネミ油症患者在住の状況
(昭和63年3月末日現在)

地 区 名	認 定 患 者 数		県 内 在 住 者	
	世 帯	人 員	世 帯	人 員
長 崎 市	20	62	37	83
諫 早 市	1	2	2	3
長 与 町	2	11	5	9
小 長 井 町	1	1		
時 津 町			3	4
琴 海 町			1	1
高 島 町			1	1
多 良 見 町			1	1
島 原 市			1	4
小 浜 町			1	1
高 来 町			1	3
大 村 市			3	3
佐 世 保 市			3	4
有 川 町			1	1
愛 野 町			1	1
上 対 馬 町			1	2
玉 之 浦 町	157	522	115	267
奈 留 町	47	155	39	82
福 江 市			22	28
富 江 町			1	1
岐 宿 町			3	5
三 井 楽 町			1	2
上 五 島 町			1	2
奈 良 尾 町			1	1
若 松 町			1	1
香 焼 町			1	1
計	228	753	247	511

表 2 カネミ油症患者の認定状況
(昭和43年～63年度)

年 度	調査対象者数	認定者	備 考
43	709人	272人	
44	466	156	
45	147	21	
46	402	7	
47	276	30	随検等 56人
48	269	7	〃 66人
49	416	94	〃 21人
50	277	62	〃 5人
51	194	21	
52	206	8	
53	277	2	〃 5人
54	207	3	
55	137	17	
56	116	7	〃 1人
57	122	26	
58	105	8	〃 1人
59	100	4	〃 2人
60	110	6	
61	88	2	〃 1人
62	60	0	
63	43	1	
計	4,727	754	

指摘濃度において promotor として作用することを明らかにしている³⁾。そして今回の検討により、その至適濃度は 0.5 ppm であることが確かめられたのである⁴⁾。

その他、小児科の立場からは PCB 汚染と発育成長の関連についての調査¹⁴⁾¹⁵⁾が行われ、また油症児の体格、体力の検討も行われてきた¹⁵⁾。その結果、昭和 54 年度当時においても油症児の体格はなお正常児に比較して劣っていた。また、体力では年長の油症児は正常児に比較して劣っているが、年少児ではその差が明らかではなくなっていた。同時に油症児の免疫機能に関する検討もなされた¹⁾。油症児のアトピー性疾患を観察すると、油症児の抗ダニ特異 IgE 抗体の陽性率が正常群に比べて高値を示していた。PCB の摂取が IgE 抗体産生機能になんらかの影響を与えていることを推測させる所見であった。歯科口腔外科的には油症児と健康児の口腔所見、歯列弓の発育について検討が行われた¹²⁾。その結果油症児では歯牙発育異常、永久歯の萌出遅延、顎骨発育異常などが観察された。

ま と め

以上の各科にわたる検診結果から、油症がなお人体の成長、新陳代謝などに対して深刻な爪痕を残していることが明らかと思われる。それ故、いっそう根本的な治療法の開発が望まれることになる。しかし残念ながら、人体に沈着した有機塩素化合物を副作用なく排泄させる良い方法は見出されていない。また長期間の体内貯留による悪影響の全貌も明らかではなく、それに対する対症的治療の研究も模索の状態にある。今後一層の努力が強く期待される。

表 4 長崎油症研究班班員名簿

(平成元年 3 月現在)

役 付	氏 名	所 属	職	研究	検診	備 考
班 長	吉 田 彦太郎	長 崎 大 学 医 学 部 皮 膚 科	教 授	○		油症対策協議会
	石 川 武 彦	長 与 病 院	副 院 長		○	医療疫学会会長
	大 塚 喜久雄	唐 比 病 院	院 長			医療疫学会員
	馬場崎 巖	長崎市中央保健所	所 長			〃
	野 中 薫 雄	長 崎 大 学 医 学 部 皮 膚 科	助 教 授	○	○	専 門 調 査 員
	北 村 喬	長崎市立市民病院 内 科	診 療 部 長		○	〃
	富 増 邦 夫	〃 小 児 科	医 長	○	○	〃
	奥 村 英 彦	奥 村 歯 科	院 長	○	○	〃
	広 瀬 寮 二	長 崎 大 学 医 学 部 皮 膚 科	講 師	○		
	堀 真	〃 〃	〃	○		
幹 事	大 神 太 郎	〃 皮 膚 科	助 手	○	○	専 門 調 査 員
	中 村 龍 文	〃 第 一 内 科	〃		○	〃
	山 下 俊 一	〃 〃	〃		○	〃
	今 西 建 夫	〃 第 二 内 科	〃		○	〃
	秋 山 和 人	〃 眼 科	講 師		○	〃
	村 山 史 男	佐世保市立総合病院 皮 膚 科	医 長	○		
	松 岡 一 忠	国立長崎中央病院 薬 剤 科	調 剤 主 任	○		
	竹 内 英 明	長 崎 大 学 歯 学 部 第 一 口 腔 外 科	助 手	○	○	
	石 野 誠	長 崎 県 保 健 環 境 部	部 長			医療疫学会員
	谷 守 隆	長崎県衛生公害研究所 衛 生 研 究 部	部 長	○		
	平 山 文 俊	〃 〃	衛生化学科長	○		
	力 岡 有 二	〃 〃	研 究 員	○	○	
事務局	草 場 平	長 崎 県 環 境 衛 生 課	課 長			
〃	安 田 實 穂	〃	総括課長補佐			
〃	平 野 請 司	〃 食 品 衛 生 係	係 長			
〃	堀 江 拓 生	〃 〃	主 事			

文 献

1) 阿南貞雄, 牛島信雄, 松山俊文, 穂山富雄, 吉田彦太郎, 遠矢芳一, 松下端夫, 辻 芳郎: 油症児の免疫機能に関する研究—PCB 摂取と抗グニ特異 IgE 抗体産生機能との関連について—, 厚生省心身障害研究「母子保健システムの充実に関する研究」報告書, pp. 377-378, 1980.

2) 馬場強三, 力岡有二, 吉田一美: 油症認定者と一般健康者の血中 PCB について, 長崎県衛生公害研究所報 16: 110-115, 1976.

3) 広瀬寮二, 堀 真, 藤田和夫, 山城一純, 宿輪哲生, 吉田彦太郎: PCDF の発癌におよぼす影響—腫瘍

発生率と光顕的電顕的検討－. 福岡医誌 78: 223-230, 1987.

4) 広瀬寮二, 堀 真, 豊島弘行, 宿輪哲生, 鶴殿雅子, 吉田彦太郎: 実験的動物発癌におよぼす PCDF の影響－その濃度差の検討－. 印刷中.

5) Honda T, Nonaka S, Murayama F, Ohgami T and Yoshida H: Effects of KC-400 (polychlorinated biphenyls) on porphyrin metabolism. J Dermatol (Tokyo) 10: 259-265, 1983.

6) 岩崎範理: 油症の脂質代謝 第1報 薄層クロマト法およびガスクロマト法による血清脂質分析. 西日皮膚 33: 498-510, 1971.

7) 岩崎範理: 油症の脂質代謝. 皮脂, 面皰の薄層クロマト法およびガスクロマト法による分析. 西日皮膚 33: 588-601, 1971.

8) Nonaka S, Honda T, Shimoyama T and Yoshida H: Analysis of urinary porphyrins in polychlorinated biphenyls poisoning (Yusho) patients. Chemical porphyria in man, edited by Strik JJTWA et al, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, pp. 69-71, 1979.

9) Nonaka S, Ohgami T, Yamashita K, Irifune H, Watanabe M, Tsukazaki N, Tanaka K, Yoshida H: The effect of chlorinated chemicals on porphyrin metabolism. The synergistic effect with chlorinated chemicals and low concentrations of griseofulvin. 印刷中.

10) Ohgami T, Nonaka S, Watanabe M, Yamashita K, Murayama F, Yoshida H and Masuda N: PCB and PCQ concentrations in subcutaneous tissue from patients with PCB poisoning (Yusho). J Dermatol (Tokyo) 14: 25-28, 1987.

11) Ohgami T, Nonaka S, Murayama F, Yamashita K, Irifune H, Watanabe M, Tsukazaki N, Tanaka K, Yoshida H: A comparative study on polychlorinated biphenyls (PCB) and polychlorinated quaterphenyls (PCQ) concentrations in subcutaneous fat tissue, blood and hair of patients with Yusho and normal control in Nagasaki Prefecture. 印刷中.

12) 奥村英彦, 竹内秀明, 町田澄利, 佐々木元賢, 六反田篤, 西島邦彦: PCB 汚染地区における生徒 (S 43 年生れ) の口腔所見と歯列弓の発育について. 厚生省心身障害研究「母子保健システムの充実に関する研究」報告書, pp. 98-99, 1983.

13) Shimoyama T, Nonaka S, Honda T, Ohgami T, Murayama F and Yoshida H: Biochemical studies on experimental porphyria. II. The influence of porphyrinogenic substances in mice treated with low concentrations of griseofulvin. J Dermatol (Tokyo) 12: 416-420, 1985.

14) 富増邦夫, 辻 芳郎: 油症がその子におよぼす影響について－出生体重についての調査. 厚生省心身障害研究「母子保健システムの充実に関する研究」報告書, pp. 96-97, 1983.

15) 遠矢芳一, 永吉智子, 永末俊郎, 富増邦夫, 辻 芳郎: PCB 汚染地区における児童生徒の体格体力の検討. 昭和 55 年度厚生省「母子保健・医療に関する管理体系システムに関する研究」研究報告書, pp. 373-376, 1980.

16) 山口道雄, 馬場強三, 力岡有二: 健康者の血中 PCB に関する分析学的研究. 長崎県衛生公害研究所報.

油症原因ライスオイルから Polychlorinated Phenyl dibenzofurans (PCPDFs) の検出

第一薬科大学物理分析学教室

黒 木 広 明・大 村 裕 子
原 口 浩 一・増 田 義 人

Identification of Polychlorinated Phenyl dibenzofurans (PCPDFs) in the Casual Rice Oil Associated with Yusho

Hiroaki KUROKI, Yuko OHMURA, Koichi HARAGUCHI
and Yoshito MASUDA

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

The polychlorinated dibenzofuran (PCDF) fractions obtained from the casual rice oils associated with Yusho were analyzed by capillary column gas chromatography with electron capture detection (ECD/GC) and capillary column gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) in negative chemical ionization (NCI) mode. The GC/MS analysis revealed that the PCDF fraction contained, in addition to PCDF congeners, penta-to octa-and probably nona-chlorinated phenyl dibenzofuran (PCPDF) congeners in comparison with retention times and NCI mass spectra of PCPDF standards. The ECD/GC analysis showed the presence of at least 30 different PCPDF congeners in the rice oils.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 189-195, 1989)

はじめに

1968年に西日本一帯でカネミ油症事件が発生してすでに20年が経過している。カネミ油症は患者が使用したライスオイルからPCB製品であるKanechlor 400が多量に検出されたことから、事件発生当初はPCBによる中毒症と考えられていた。しかしその後、原因ライスオイル中からPCBの他にPCB関連化合物として多くの塩素系化合物が検出されている。たとえば、1970年にVos et al.⁹⁾がPCB製品に微量ながら混在する高毒性化合物としてpolychlorinated dibenzofurans (PCDFs)を検出したのを契機として、原因ライスオイル中からもNagayama et al.⁸⁾, Miyata et al.⁵⁾およびBuser et al.¹⁾により、各々5, 2.2~5.4および5.6 ppmのPCDFsの存在が報告されている。また、最近、榎本ら³⁾は熱アルカリ分解処理を含まない分析法により7塩化体を主成分とする4~8塩化体のPCDFs(総濃度1.9 ppm)の検出を報

告している。さらに1978年には原因ライスオイル中にはPCBの二量体であるpolychlorinated quaterphenyls (PCQs)がPCBsと同程度の濃度で混入していることが、Kamps et al.²⁾およびMiyata et al.⁶⁾により明らかにされた。また、最近では、PCB関連化合物のなかでとくに強い毒性を有する化合物として知られているpolychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs)についても、榎本ら³⁾により5塩化~8塩化体のPCDDs(総濃度0.13 ppm)が見出されている。以上のPCBs, PCDFs, PCQsおよびPCDDs以外にも原因ライスオイルに混在する化合物としてpolychlorinated quaterphenyl ethers⁶⁾, polychlorinated terphenyls⁹⁾, polychlorinated naphthalenes⁷⁾およびPCBの三量体であるpolychlorinated sexiphenyls⁷⁾¹⁰⁾が知られている。

このように、原因ライスオイル中にはPCBの他に多くの関連化合物が含まれており、患者はこれらすべての塩素系化合物を摂取したことになる。しかしなが

ら、これらの化合物のうち、PCDFは強い毒性を有することから、現在ではPCDFが油症の主たる原因物質としてとらえられている。今回、原因ライスオイル中のPCBおよび関連化合物を分析する過程でPCDF分画よりPCDFsの他に、これまで報告されていない polychlorinated phenyldibenzofurans (PCPDFs) を新たに検出したので報告する。

実 験 方 法

1. 試薬

1) 溶媒：すべて残留PCB分析用あるいは残留農薬試験用を使用。

2) ゲル：バイオラッド社製 Bio-Beads S-X3 (200~400 mesh) 50 g をシクロヘキサンで一晩膨潤させたものを使用。

3) 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フロリジル PR をジクロロメタンで洗浄後、130°C で12時間活性化したものを使用。

4) 活性炭：メルク社製カラムクロマトグラフィー用 Kieselgel 60 (70~230 mesh) に半井化学薬品(株)のカラムクロマトグラフィー用活性炭素を2% (W/W) の比率で混合したものを使用。

5) 標準品：Octachlorodibenzofuran (OCDF) は既報⁴⁾にしたがい合成した。

2. 試料

油症原因ライスオイルは油症患者が使用していたカネミライスオイル(1968年2月製造)を、対照油としてコーンサラダ油(味の素)を用いた。

3. PCPDF 標品の合成

既報⁴⁾にしたがい3塩化体標品として、8-フェニル-2,3,6-トリクロロジベンゾフラン (TriCDF) を2-クロロ-4-フェニルフェノールと2,4,5-トリクロロニトロベンゼンからジフェニルエーテル誘導体としたあと、還元、ジアゾ化反応により合成した。反応生成物は多くの不純物を含んでいたため、そのマスペクトル測定は後述のキャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフ/質量分析計により行った。同様に、5塩化体標品として8-フェニル-1,2,3,4,6-ペンタクロロジベンゾフラン (PenCDF) を2-クロロ-4-フェニルフェノールとペンタクロロニトロベンゼンから合成し、高速液体クロマトグラフィーにより分離精製を行った。

4. 分析方法

原因ライスオイル (0.24~0.55 g) あるいは対照油 (0.23 g) をシクロヘキサン 5 ml に溶かし、ゲルパー

ミエーションカラム (30×2.2 cm I.D.) に付しシクロヘキサンで溶出した。110~230 ml の分画を分取し、これを約 15 ml の濃硫酸で3回振った後、水洗、脱水した。この濃硫酸処理されたシクロヘキサン溶出液を留去し、少量の n-ヘキサン溶液とした後、活性炭カラム (0.5 g) に付し、まず 70 ml のジクロロメタン・n-ヘキサン (1:9) で、次いで 150 ml の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 (1.5 g) に付し、60 ml n-ヘキサンおよび 60 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、これを PCDF 分画とした。この PCDF 分画について、ECD/GC および GC/MS 分析を行った。

5. 測定機器

1) ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)

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、反応ガスにイソブタン (ガス圧: 1×10^{-5} Torr) を用いる負イオン化学イオン化 (NCI) モードで行った。ガスクロマトグラフにはフェーズドシリカキャピラリーカラム ULBON HR-52 (0.25 mm×30 m, 島津製作所, 微極性) 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約 1.3 ml/min とした。カラム温度は次の2通りで行った。(i) 2分間 190°C に保ったのち、8°C/min で 270° まで昇温させ 270° にそのまま保持。(ii) 2分間 220° に保った後、8°C/min で 330° まで昇温させ 330° にそのまま保持。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°, イオン化室温度: 250°, イオン化電圧: 30 eV, イオン化電流: 300 μ A, 加速電圧: 3 kV。

2) ガスクロマトグラフ (ECD/GC)

島津 GC-15A ガスクロマトグラフ/スプリットレス試料導入装置 SPL-G9 に電子捕獲型検出器 (ECD, ⁶³Ni) を装着したものを使用した。カラムには ULBON HR-52 (0.25 mm×50 m) を用いた。カラム温度は最初 2 分間 180° に保ち、6°C/min で 320° まで昇温、その後 320° で一定に保持した。注入口および検出器温度は 300° に保持した。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。ピーク面積の測定はクロマトパック C-R5A (島津) を用いた。

結 果

1. 合成 PCPDF 標品のマスペクトル

Fig. 1 に合成した 3 塩化および 5 塩化 PCPDF 標品の EI モードでのマスペクトルを示す。いずれの同族体も分子イオン (M^+) が基準ピークを与えた (m/z 346 および 414)。特徴的なフラグメントイオンとして $[M-COCl]^+$ ($M-63$), $[M-Cl_2]^+$ ($M-70$), $[M-COCl_2]^+$ ($M-98$) および $[M-COCl-Cl_2]^+$ ($M-133$) などが観察されたが, これらのイオン強度はいずれも弱かった。また, 2 価イオンとして M^{2+} および $[M-Cl_2]^{2+}$ も観察された。

Fig. 2 には同一 PCPDF 標品の NCI モードでのマスペクトルを示す。分子アニオン (M^-) の他に, $[M-Cl+O]^-$ ($M-19$: 5 塩化体では基準ピーク) および $[M-53]^-$ などのフラグメントイオンが認められ

た。このように PCPDFs の NCI モードでのマスペクトルは M^- および $[M-19]^-$ によって特徴づけられる。

2. GC/MS による検討

原因ライスオイルの PCDF 分画について, NCI モードで GC/MS 測定を行った。Fig. 3 にトータルイオンクロマトグラム (TIC) および 5 塩化 PCPDF の $[M-19]^-$ の同位体ピークに相当する m/z 397 を用いたマスクロマトグラムを示す。TIC において保持時間約 8~20 分に見られるピークは 4 塩化~8 塩化 PCDF であるが (未発表データ), OCDF ($[M-19]^-$ の同位体ピーク: m/z 423, 20.4 分) よりも遅い保持時間に 3 つのピーク A, B および C が認められた。これらの NCI マスペクトルは Fig. 3 に示すように M^- を m/z 414 に, $[M-19]^-$ を m/z 395 に示した。このような NCI マスペクトルは合成した 5 塩化

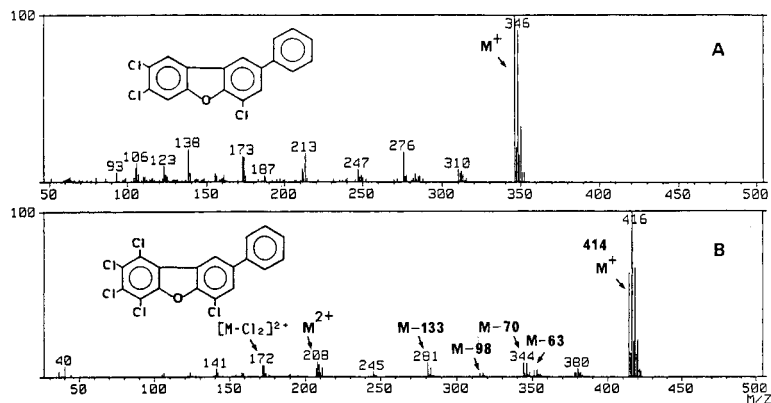


Fig. 1 EI mass spectra of PCPDF standards

(A): 8-phenyl-2, 3, 6-TriCDF (B): 8-phenyl-1, 2, 3, 4, 6-PenCDF

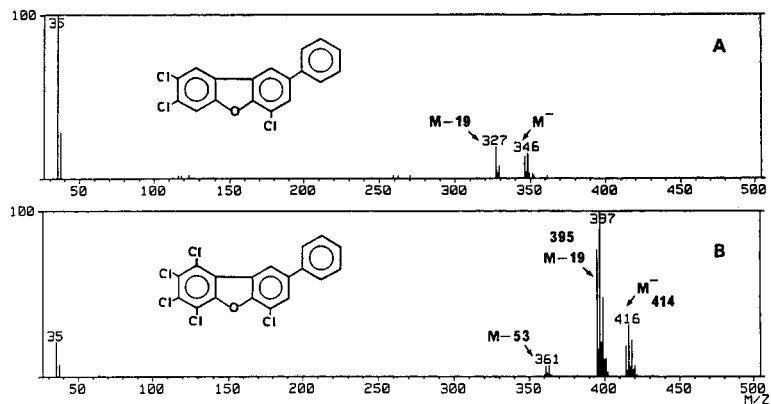


Fig. 2 NCI mass spectra of PCPDF standards

(A): 8-phenyl-2, 3, 6-TriCDF (B): 8-phenyl-1, 2, 3, 4, 6-PenCDF

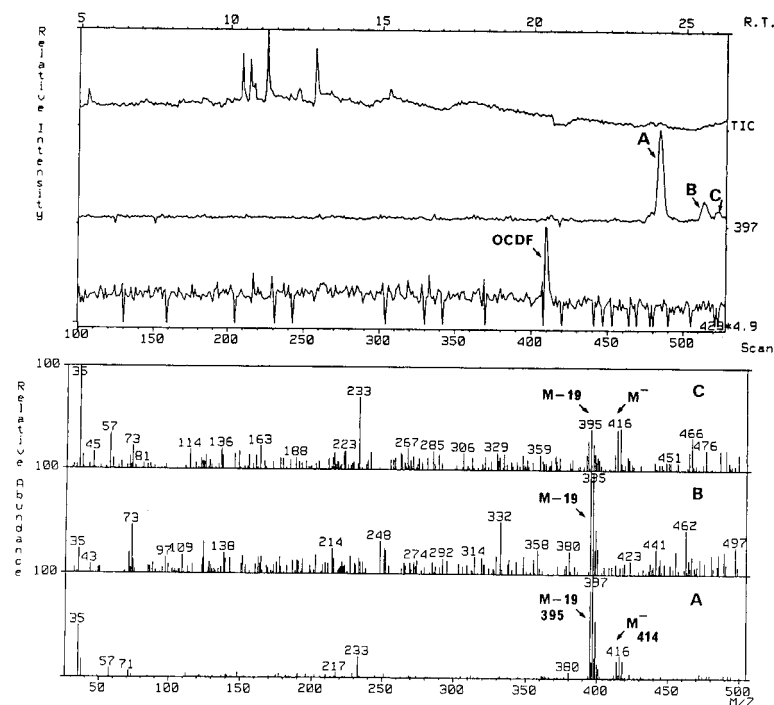


Fig. 3 Total ion chromatogram of PCDF fraction obtained from the rice oil caused Yusho and NCI mass spectra of peaks A, B and C

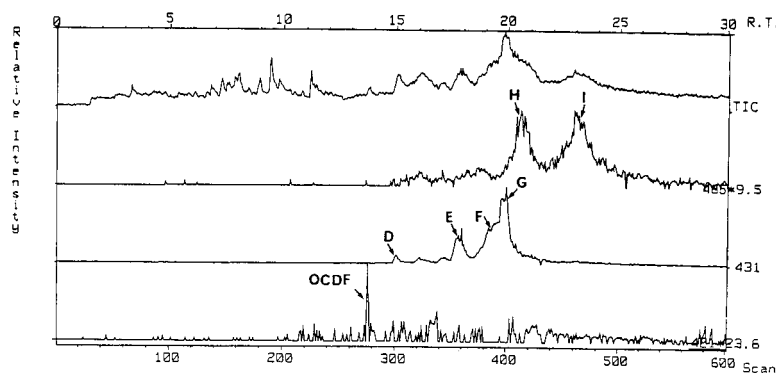


Fig. 4 Total ion chromatogram and mass chromatograms of the PCDF fraction obtained from the rice oil, monitored at $[M-19]^-$ isotope ions of PCPDFs

PCPDF 標品の NCI マススペクトル (Fig. 2) とほぼ完全に一致する。したがってピーク A, B および C をいずれも PCPDF の 5 塩化体と同定した。次に高塩素化 PCPDF の検索を目的として同一試料をカラム温度を高くして測定した。TIC および 6 塩化および 7 塩化 PCPDF の $[M-19]^-$ の同位体ピークに相当する m/z 431 および 465 を用いたマスクマトグラムを Fig. 4 に示す。OCDF (13.6 分) より遅い保持時間

にみられるピーク D, E, F および G (15~20 分) の NCI マススペクトルを Fig. 5 に示すが、これらのマススペクトルはすべて M^- を m/z 448 に与えた。この M^- (m/z 448) は 5 塩化 PCPDF の M^- (m/z 414) より 34 mass unit 大きいことや、 $[M-19]^-$ が m/z 429 に認められることから、ピーク D, E, F および G を PCPDF の 6 塩化体と同定した。同様に Fig. 4 におけるピーク H および I (20~24 分) の NCI マ

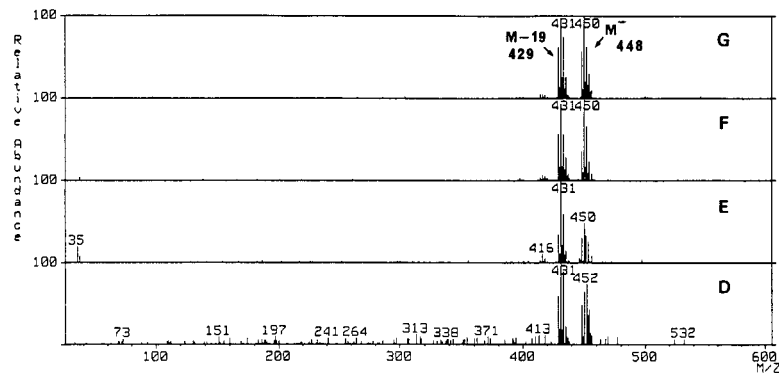


Fig. 5 NCI mass spectra of peaks D, E, F and G

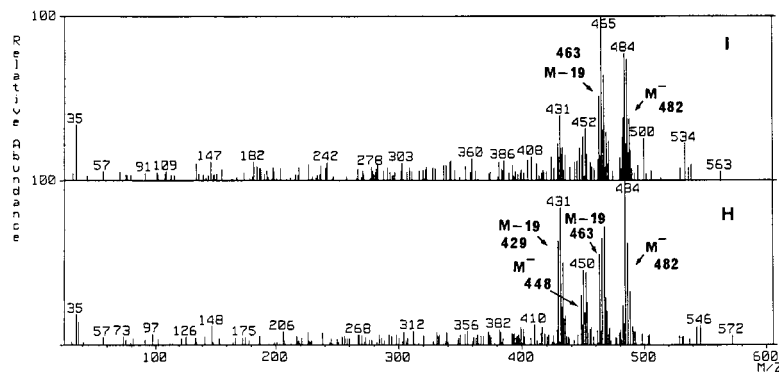
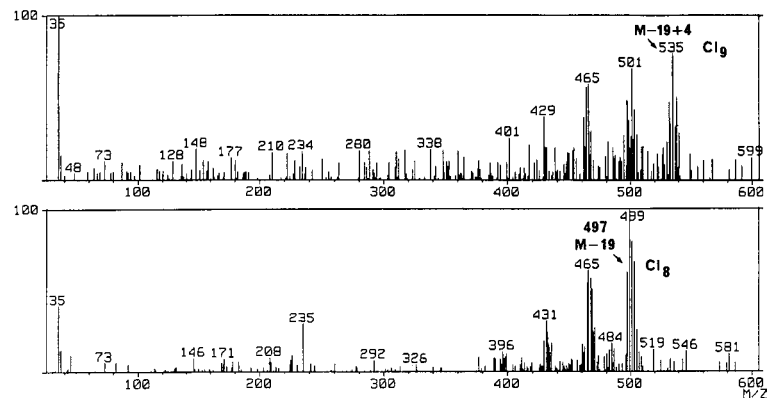


Fig. 6 NCI mass spectra of peaks H and I

Fig. 7 NCI mass spectra of PCPDFs (Cl_8 - Cl_9) detected in the rice oil (alkali saponification)

ススペクトルを Fig. 6 に示す。両スペクトルにおいて、 M^- が m/z 482 に、 $[\text{M}-19]^-$ が m/z 463 に認められることから、これらを PCPDF の 7 塩化体と同定した。なお、6 塩化 PCPDF (M^- : m/z 448, $[\text{M}-19]^-$: m/z 429) のマススペクトルも同時に観察されるので、ピーク H には 6 塩化体も含まれていること

がわかる。

さらに同じ原因ライスオイル（ただしアルカリ分解処理）から 8 塩化体および 9 塩化体と予想される PCPDFs も検出された。それらの NCI マススペクトルを Fig. 7 に示す。8 塩化体の M^- (m/z 516) は認められないものの特徴的な $[\text{M}-19]^-$ が m/z 497 に認

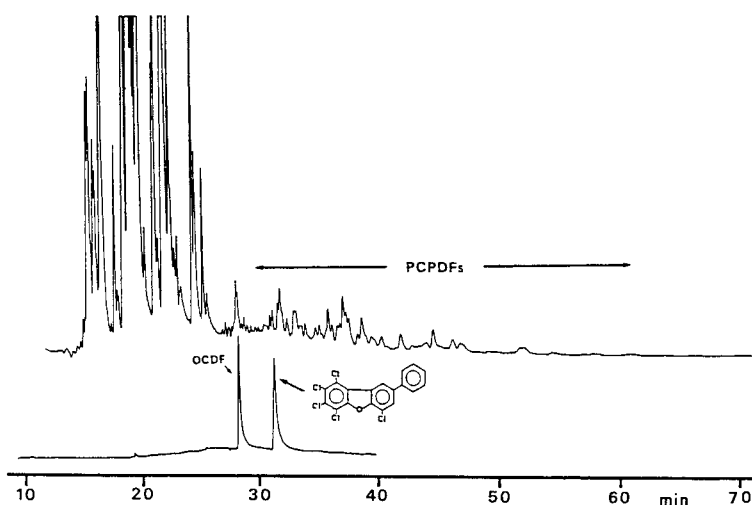


Fig. 8 ECD gas chromatograms of PCDF fraction from (upper) the rice oil and (lower) of OCDF and PCPDF (Cl_5) standards on the ULBON HR-52 column

められることから、これを8塩化体と同定した。同様に m/z 535 付近に観察されるピーク群はイオン強度が非常に弱いながら9塩化体の $[\text{M}-19]^-$ にもとづく同位体ピークと推定される。よって、これを9塩化体と推定した。なお、Fig. 4と同じ測定条件下での5塩化PCPDF標品の保持時間は15.5分であった。このことはGC/MSで検出した一連の化合物群がPCPDFsであることをさらに裏付けている。

3. ECD/GCによる検討

同試料をGC/MS測定で使用したのと同種類のカラムを用いて、ECD/GCにより検討を加えた。Fig. 8に50 m ULBON HR-52キャピラリーカラムで分析したガスクロマトグラムを、OCDFおよび5塩化PCPDF標品のガスクロマトグラムとともに示す。OCDFのピークより後の保持時間約30~60分に約30種のピークが認められるが、これらはGC/MSで検出したPCPDFsに相当すると推定される。他の原因ラيسオイルからもPCPDFsと推定されるピークが検出され、そのガスクロマトグラムパターンはFig. 8に示すそれとほとんど同一であった。なお、市販のコーンサラダ油を原因ラيسオイルの対照油として検討したが、対照油からはPCDFsおよびPCPDFsに相当するピークは認められなかった。同測定条件下でのOCDFおよび5塩化PCPDF標品の保持時間は各々、28.3および31.3分であった。

考 察

異なる原因ラيسオイル2種について、キャピラ

リーカラムを用いたECD/GCおよびNCI GC/MSにより検討した結果、PCDF分画より5塩化~8塩化PCPDFおよび9塩化体と推定されるPCPDFを検出した。われわれの知る限り、これは原因ラيسオイル中のPCPDFに関する最初の報告である。したがって、これまで報告されている原因ラيسオイルのPCDF分画にはPCPDFsが含まれていた可能性が考えられる。

ECD/GCではFig. 8に示すように総計約30種のPCPDFs同族体と推定されるピークがみられるが、GC/MSではせいぜい約10種のピークしか検出されていない。この違いは両測定で同種のカラムを用いているが、測定温度条件がGC/MS測定において幾分高いため、GC/MSではECD/GCほどの分離能が得られず、いくつかのピークが重なっているためと考えられる。したがって、ECD/GCでみられる約30種のピークのいずれが、GC/MSで検出した5塩化~9塩化PCPDFに対応するのか決定できなかった。ただ、Fig. 8に示すように5塩化PCPDF標品の保持時間が31.3分であることから31分前後にみえるいくつかのピークはGC/MSで検出したPCPDFの5塩化体であると考えられる。

PCPDFsの定量に関しては、標品として5塩化体しか利用できないこと、GC/MSでの同族体の分離が不十分であることなどの理由で、同族体別の定量は本研究ではできなかった。したがって、検出されたPCPDFの組成を明らかにするまでに至っていない。ECD/GCにおけるPCPDFと推定されるピーク面積

の合計を PCDF のそれと単に比較したところ約 1/10 であったことから、総 PCPDF 量は総 PCDF 量の約 1/10 と推定されるが、今後、標品を用いて詳細に検討する必要がある。

PCPDF は同数の塩素原子を含む PCDF より分子量が 76 大きいので、PCDF と比較して消化管からの吸収は低下するものと推定される。しかし、PCPDF の生体に対する影響はまったく不明であるため、油症患者組織における PCPDF の残留性および油症の発症にどの程度関与しているのかに関する研究が今後必要である。

総 括

油症原因ライスオイルの PCDF 分画について、キャピラリーカラムを用いた NCI GC/MS および ECD/GC により検討した。合成標品とのマススペクトルおよび保持時間との比較から、PCDF 分画には PCDF の他に 5 塩化～8 塩化の polychlorinated phenyldibenzofurans (PCPDFs) が存在することを明らかにした。また、9 塩化体と推定される PCPDF も検出された。ECD/GC において約 30 種の PCPDFs と考えられるピークを検出したことから原因ライスオイルには 5 塩化～9 塩化 PCPDF の多数の同族体が含まれていたと考えられる。

文 献

- 1) Buser HR, Rappe C and Gara A : Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) found in Yusho oil and in used Japanese PCB. *Chemosphere* 7 : 439-449, 1978.
- 2) Kamps LR, Trotter WJ, Young SJ, Carson LJ, Roach JAG, Sphon JA, Tanner JT and McMa-

hon B : Polychlorinated quaterphenyls identified in rice oil associated with Japanese "Yusho" poisoning. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 20 : 589-591, 1978.

- 3) 榎本 隆, 宮田秀明, 高山幸司, 尾垣淳治 : 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. *福岡医誌* 78 : 325-336, 1987.

- 4) Kuroki H, Haraguchi K and Masuda Y : Synthesis of polychlorinated dibenzofuran isomers and their gas chromatographic profiles. *Chemosphere* 13 : 561-573, 1984.

- 5) 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.* 18 : 260-265, 1977.

- 6) 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.

- 7) 森田昌敏 : カネミライスオイル中の有害成分. 第 5 回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム. p. 15-16, 静岡, 1978.

- 8) Nagayama J, Kuratsune M and Masuda Y : Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and "Yusho oil". *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 15 : 9-13, 1976.

- 9) Vos JG, Koeman JH, van der Mass HL, ten Noever de Brauw MC and de Vos RH : Identification and toxicological evaluation of chlorinated dibenzofuran and chlorinated naphthalene in two commercial polychlorinated biphenyls. *Food Cosmet. Toxicol.* 8 : 625-633, 1970.

- 10) 山口早苗, 増田義人 : 高速液体クロマトグラフィーによる油症油中のポリ塩化クォーターフェニルの分析. *福岡医誌* 76, 132-136, 1985.

芳香族炭化水素水酸化酵素活性に対する ダイオキシン関連化合物の作用

九州大学医療技術短大部公衆衛生学研究室

長山 淳哉・毛利 紀子

第一薬科大学物理分析学教室

増田 義人

九州大学医学部公衆衛生学講座

清原千香子・廣畑 富雄

Effects of Dioxin Congeners on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity

Junya NAGAYAMA and Noriko MOHRI

*Laboratory of Public Health, School of Health Sciences
Kyushu University, Fukuoka 812*

Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences Fukuoka 815

Chikako KIYOHARA and Tomio HIROHATA

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

In this study, we examined the effect of 1,3,6,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (1,3,6,8-TCDD), octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) and 2,4,6,8-tetrachlorodibenzofuran (2,4,6,8-TCDF) on aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in cultured human lymphoblastoid cells. These compounds are considered to be no or less toxic isomers of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (Dioxins) and polychlorinated dibenzofurans (Dibenzofurans). At a concentration of 90 ppb, 1,3,6,8-TCDD induced the enzyme activity about 2 times over the basal (untreated) AHH activity and 2,4,6,8-TCDF reduced the basal enzyme activity by about 40%. At a concentration of 5 ppb, OCDD enhanced the basal AHH activity by about 30%. In case of simultaneous treatment of 1,3,6,8-TCDD, OCDD or 2,4,6,8-TCDF with highly toxic 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD), at a concentration of 7.5 ppb of each compound, the AHH activities induced by 1,3,6,8-TCDD plus 2,3,7,8-TCDD and OCDD plus 2,3,7,8-TCDD were about 25% and 43%, respectively, higher than that induced by 2,3,7,8-TCDD alone. On the contrary, at the same concentration, the enzyme activity treated with 2,4,6,8-TCDF plus 2,3,7,8-TCDD were about 30% less than that treated with 2,3,7,8-TCDD alone. It has been reported that the AHH inducibility of Dioxins and Dibenzofurans correlates well with their toxic potency. Hence, taking the results of this study into account, we should clarify the biological and/or health consequences of the mixed contamination of no or less toxic and highly toxic congeners of Dioxins and Dibenzofurans by animal experiments and epidemiological studies.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 196-200, 1989)

はじめに

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (ダイオキシン), polychlorinated dibenzofurans (ダイベンゾフ

ラン) およびそれらの関連化合物の毒性あるいは生体作用と芳香族炭化水素水酸化酵素 (Aryl Hydrocarbon Hydroxylase, AHH) 誘導活性の間には、高い正の相関性が認められている²⁾⁴⁾⁵⁾。また、最近、私た

ちは polychlorinated biphenyls (PCBs) の主な代謝物である methylsulphonyl PCBs (MSF-PCBs) のある異性体が人リンパ球培養細胞の AHH 活性を阻害することを報告した⁹⁾。このように、ダイオキシンとその関連化合物では AHH 活性の誘導と阻害という、まったく正反対の現象が観察される。この研究では、塩素原子の結合位置から考えて、ダイオキシン、ダイベンゾフランのなかでは比較的毒性が低いと考えられる 1,3,6,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (1,3,6,8-TCDD), 2,4,6,8-tetrachlorodibenzofuran (2,4,6,8-TCDF) および、ダイオキシンのなかではもっとも人体汚染レベルの高い octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) の人リンパ球培養細胞の AHH 活性に対する作用を調べた。さらに、比較のために、ダイオキシンおよび PCBs のなかではもっとも毒性の高い異性体の一つである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD), および 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl (HCB) の AHH 活性に対する作用についても調べた。

研究 方 法

1. 化学薬品

1,3,6,8-TCDD と 2,4,6,8-TCDF は三井東圧化学株式会社 (本社東京) より提供していただいた。純度はガスクロマトグラフィーにより、それぞれ 94.6%, 99% である。OCDD は Analabs, Inc. (North Haven, Conn., USA) より購入した。純度は 99% 以上である。2,3,7,8-TCDD および HCB は従来の方法により合成し、精製した⁹⁾。純度はガスクロマトグラフィーにより、それぞれ 98%, 99% 以上である。その他の薬品についてはこれまで報告しているのと同様である⁹⁾。

2. 細胞培養, AHH 活性の測定

リンパ球培養細胞の調製, 細胞培養法および AHH 活性測定法はこれまでに報告している方法と同様である⁹⁾。各々の実験において、健常者由来のリンパ球培養細胞 3 株を用いた。リンパ球培養細胞の basal AHH 活性 (溶媒であるアセトンのみ処理した場合の AHH 活性) が各々の細胞株で異なるので, basal AHH 活性を基準 (1.0) とする relative AHH 活性 (有機塩素化合物を処理した場合の AHH 活性/basal AHH 活性) を算出した。この指標により各有機塩素化合物の AHH 活性誘導性, あるいは阻害性を表示する。各有機塩素化合物の処理濃度, 処理方法は下記のとおりである。

(実験 I)

リンパ球培養細胞濃度を $3\sim4\times10^5$ cells/ml とし, 各有機塩素化合物を次の最終濃度になるように添加した。1,3,6,8-TCDD, 2,4,6,8-TCDF および HCB は 90 ng/ml, 2,3,7,8-TCDD は 15 ng/ml, OCDD は 5 ng/ml である。コントロールの細胞にはアセトン (溶媒) のみ 0.5 μ l/ml 添加した。添加後 48 時間目に細胞を集め, AHH 活性を測定した。

(実験 II)

リンパ球培養細胞濃度を $3\sim4\times10^5$ cells/ml とし, 1,3,6,8-TCDD あるいは 2,4,6,8-TCDF をそれぞれ最終濃度が 4.5 ng/ml, 9 ng/ml, 22.5 ng/ml, 45 ng/ml, 90 ng/ml となるように添加した。コントロールの細胞にはアセトンのみ 0.5 μ l/ml 添加した。添加後 48 時間目に細胞を集め, AHH 活性を測定した。

(実験 III)

リンパ球培養細胞濃度を $3\sim4\times10^5$ cells/ml とし, 各有機塩素化合物を最終濃度が 7.5 ng/ml となるように添加した。二化合物同時処理の場合の組み合わせは, 2,3,7,8-TCDD と 1,3,6,8-TCDD, 2,3,7,8-TCDD と OCDD, 2,3,7,8-TCDD と 2,4,6,8-TCDF および 2,3,7,8-TCDD と HCB である。コントロールの細胞にはアセトンのみ 1.0 μ l/ml 添加した。添加後 48 時間目に細胞を集め, AHH 活性を測定した。

結 果

1. 実験 I

実験結果を Table 1 に示す。2,3,7,8-TCDD (最終濃度 15 ng/ml) 処理により, 約 5 倍 AHH 活性が上昇する。2,3,7,8-TCDD よりも 6 倍高濃度の処理により, 1,3,6,8-TCDD は約 2 倍酵素活性を高めるが, 2,4,6,8-TCDF は逆に約 40% 活性を阻害した。また, OCDD (アセトンへの溶解性が低いことにより最終濃度は 5 ng/ml) は約 30% AHH 活性を高めた。HCB は 90 ng/ml の処理濃度にもかかわらず, AHH 活性への影響はほとんど観察されなかった。

2. 実験 II

実験 I の結果から, 1,3,6,8-TCDD の AHH 活性誘導性および, 2,4,6,8-TCDF の AHH 活性阻害性が示されたので, この実験では両化合物の AHH 活性に対する作用の量・反応関係を調べた。その結果を Fig. 1 に示す。1,3,6,8-TCDD による活性の誘導は 4.5 ng/ml の低濃度から観察され, 比較的良好な量・反応関係がみられた。2,4,6,8-TCDF による AHH 活性の阻害においても, 量・反応関係が観察され, 4.5 ng/ml の低濃度においても約 30% の活性低下が認められた。

Table 1 Effect of dioxin congeners on basal aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells.

Treatment	Dose (ng/ml)	Relative AHH activity*			Mean±S. E. M.
		Human lymphoblastoid cell line			
		A	B	C	
Acetone	—	1.0	1.0	1.0	1.0
2,3,7,8-TCDD	15	5.8	3.3	5.4	4.8±0.8
1,3,6,8-TCDD	90	2.8	1.6	1.8	2.1±0.4
OCDD	5	1.1	1.2	1.5	1.3±0.1
2,4,6,8-TCDF	90	0.6	0.6	0.7	0.6±0.02
HCB	90	0.9	0.6	1.3	1.0±0.2

Respective basal AHH activities of human lymphoblastoid cell lines of A, B and C were 0.035, 0.039 and 0.020 pmol/min/10⁶ cells.

* AHH activity of the lymphoblastoid cells treated with each organochlorine compound/basal AHH activity of the same cells.

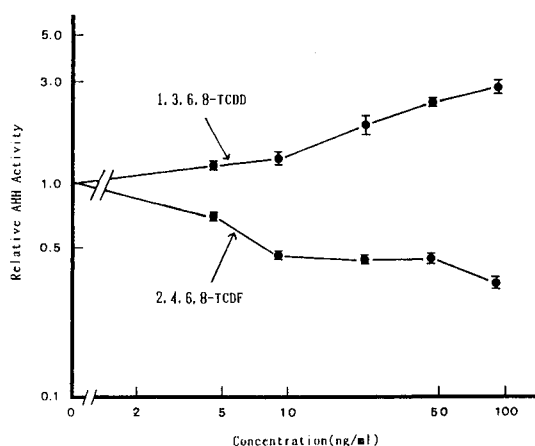


Fig. 1 Correlation between concentration of 1,3,6,8-TCDD or 2,4,6,8-TCDF and relative AHH activity in cultured human lymphoblastoid cells. Relative AHH activity indicates the ratio of AHH activity treated with 1,3,6,8-TCDD or 2,4,6,8-TCDF to basal AHH activity. Each point represents the mean±S. E. M. of relative AHH activities from three individual human lymphoblastoid cells.

3. 実験III

2,3,7,8-TCDDにより容易にAHH活性が誘導される。この2,3,7,8-TCDDにより誘導されるAHH活性に対して、他の有機塩素化合物がどのような作用を示すであろうか。この実験ではこの課題について調べた。つまり、2,3,7,8-TCDDとその他の有機塩素化合物をいろいろと組み合わせて同時にリンパ球培養細胞に添

加し、AHH活性の変化を調べたのである。各化合物の添加濃度はすべて7.5 ng/mlである。この濃度で、2,3,7,8-TCDDにより約5.6倍、1,3,6,8-TCDDにより約50%酵素活性が上昇した。しかし、その他の有機塩素化合物は単独ではAHH活性への作用はほとんど観察されなかった。

2,3,7,8-TCDDと1,3,6,8-TCDDあるいはOCDDを同時にリンパ球培養細胞に処理することにより、2,3,7,8-TCDD単独処理の場合のAHH活性よりも、それぞれ25%、43%酵素活性が上昇した。また、2,3,7,8-TCDDと2,4,6,8-TCDFを同時に処理することにより、2,3,7,8-TCDD単独処理の場合のAHH活性よりも約30%酵素活性が低下した。HCBは2,3,7,8-TCDDにより誘導されるAHH活性に対しても、まったく影響を及ぼさなかった。

考 察

この研究では化学構造から考えて、毒性が低いと考えられるダイオキシン、ダイベンゾフランのAHH活性に対する作用を調べた。90 ng/ml (90 ppb)の濃度で、1,3,6,8-TCDDおよびOCDDはAHH活性を誘導し、2,4,6,8-TCDFはbasal AHH活性を阻害した。また、7.5 ng/ml (7.5 ppb)の低濃度で、2,3,7,8-TCDDにより誘導されるAHH活性を、1,3,6,8-TCDDおよびOCDDはさらに高め、逆に、2,4,6,8-TCDFは阻害した。

1,3,6,8-TCDDは現在の健常人の臓器・組織からは検出されていないが、OCDDは肝臓、脂肪組織に0.1-1 ppbの濃度で検出されている³⁾。このように、OCDD

Table 2 Changes of relative aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells after the treatment of the organochlorine compound and the combination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and the another compound.

Treatment	Dose (ng/ml)	Relative AHH activity*			Mean±S. E. M.
		Human lymphoblastoid cell line			
		D	E	F	
Acetone	—	1.0	1.0	1.0	1.0
2,3,7,8-TCDD	7.5	4.4	7.0	5.4	5.6±0.7 (100)
1,3,6,8-TCDD	7.5	1.4	1.5	1.5	1.5±0.03
OCDD	7.5	0.9	1.1	1.0	1.0±0.06
2,4,6,8-TCDF	7.5	1.1	0.6	0.9	0.9±0.2
HCB	7.5	0.8	0.9	1.0	0.9±0.05
2,3,7,8-TCDD +1,3,6,8-TCDD	7.5+7.5	6.5	9.2	5.4	7.0±1.1 (125)
2,3,7,8-TCDD +OCDD	7.5+7.5	7.6	8.9	7.6	8.0±0.4 (143)
2,3,7,8-TCDD +2,4,6,8-TCDF	7.5+7.5	3.6	4.1	3.9	3.9±0.1 (70)
2,3,7,8-TCDD +HCB	7.5+7.5	4.6	6.5	5.7	5.6±0.5 (100)

Basal AHH activities of the human lymphoblastoid cell lines of D, E and F were 0.058, 0.042 and 0.029 pmol/min/10⁶ cells respectively.

* AHH activity of the lymphoblastoid cells treated with each organochlorine compound or the combination of the two compound/basal AHH activity of the same cells.

Figure in parenthesis indicates the percentage of the relative AHH activity to the 2,3,7,8-TCDD induced relative AHH activity (100%).

はダイオキシン、ダイベンゾフランのなかではもっとも高濃度で人体試料から検出されており、その人体影響を評価することが世界的に重要視されている。この研究で示されたように、OCDD 単独では生体作用が生じないレベルでも、2,3,7,8-TCDD のような高毒性化合物と共存することにより、その作用を高める可能性がある (Table 2)。このことは、他の毒性が低いと考えられているダイオキシン、ダイベンゾフラン、PCBs などの場合にも適用できるかもしれない。今後、ダイオキシン、ダイベンゾフランによる人体汚染がどのように推移するのか明確ではないが、いろいろな環境下で、これらの有機塩素化合物が生成することが観察されている⁹⁾ので、人体濃度がさらに高くなる可能性も否定できない。また、臓器・組織全体の濃度として分析している現在の定量法では、ある細胞、ある部位に局在するような場合の問題は、その対象外のことであり、今後は、このような観点からのアプローチも

重要である。

最近、私たちは PCBs の代謝物である MSF-PCBs が、AHH 活性を阻害することを報告した⁶⁾⁷⁾。この研究でも、予想に反して、2,4,6,8-TCDF が AHH 活性を阻害した。2,4,6,8-TCDF は現在の健常人の臓器・組織からは検出されていない³⁾が、生体作用が低いと考えられている他のダイベンゾフランにおいても、同様の作用があるかどうか調べる必要がある。また、MSF-PCBs や 2,4,6,8-TCDF などによる AHH 活性阻害作用の生物学的意義を解明することも重要である。

コプラナー PCBs は PCBs のなかでは毒性の高い異性体であり、ダイオキシン、ダイベンゾフランと比較すると、人体濃度も高い¹⁾⁹⁾。この研究では、90 ng/ml (90 ppb) の濃度で basal AHH 活性に対する作用はほとんど観察されなかった。また、7.5 ng/ml (7.5 ppb) の濃度で、2,3,7,8-TCDD により誘導される AHH 活性に対しても何ら影響を及ぼさなかった。今

後、コプラナーPCBsの生体影響についても詳細に研究する必要がある。

現在、人体はダイオキシン、ダイベンゾフランをはじめとして、いろいろな化学物質により汚染されている。この複合汚染による生体影響の解明が重要であるが、この解明は人類にとって、きわめて困難な問題でもある。AHH活性の誘導あるいは阻害という現象は、いろいろな化学物質に対して生体が示すもっとも鋭敏な反応の一つと考えられる。このような鋭敏な指標を用いて、試験管内で、しかも短期間のうちに、いろいろな化学物質の、また複合汚染の生体影響を予測し、スクリーニングすることは重要である。そして、そのような研究結果から、それらの生体および人体影響を動物実験あるいは疫学的研究により解明することは、さらに重要である。

ま と め

比較的毒性が低いと考えられる1,3,6,8-TCDD, OCDD, 2,4,6,8-TCDFおよびHCBの人リンパ球培養細胞のAHH活性に対する作用を調べ、下記のような結果が観察された。

1) 90 ppbで1,3,6,8-TCDDは約2倍AHH活性を高め、2,4,6,8-TCDFは逆に、約40%活性を阻害した。5 ppbの低濃度で、OCDDにより約30%AHH活性が上昇した。

2) 1,3,6,8-TCDDによるAHH活性の誘導、2,4,6,8-TCDFによるAHH活性の阻害は、4.5~90 ppbの濃度範囲で量・反応関係が認められた。

3) 7.5 ppbで2,3,7,8-TCDDと1,3,6,8-TCDDあるいはOCDDを同時に処理することにより、2,3,7,8-TCDD単独処理の場合のAHH活性よりも、それぞれ約25%, 43%酵素活性が上昇した。また、2,3,7,8-TCDDと2,4,6,8-TCDFを同時に処理することにより、2,3,7,8-TCDD単独処理の場合のAHH活性よりも約30%活性が低下した。

4) それぞれ90 ppbと7.5 ppbの濃度において、HCBはbasal AHH活性にも、TCDDにより誘導されるAHH活性にも影響を及ぼさなかった。

以上のような研究結果から、今後、次のような点を考慮して、動物実験、疫学的研究などを行うことが重要であろう。

1) 高毒性および低毒性のダイオキシン、ダイベン

ゾフランによる複合汚染と、その生体影響。

2) MSF-PCBsや2,4,6,8-TCDFのような化合物によるAHH活性阻害機構と、その生物学的意義。

3) HCBなどのコプラナーPCBsの環境汚染、人体汚染と、その生体影響。

文 献

- 1) Kannan N, Tanabe S and Tatsukawa R: Potentially hazardous residues of non-ortho chlorine substituted coplanar PCBs in human adipose tissue. Arch. Environ. Health in press.
- 2) Mason G, Sawyer T, Keys B, Bandiera S, Romkes M, Piskorska-Pliszczynska J, Zmudzka B and Safe S: Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs): correlation between in vivo and in vitro structure-activity relationships. Toxicology 37: 1-12, 1985.
- 3) 増田義人: ポリ塩化ダイベンゾダイオキシンなどの人体汚染, トキシコロジーフォーラム 10: 566-574, 1987.
- 4) 長山淳哉: ダイオキシンおよびダイベンゾフランのAHH誘導性と毒性発現, トキシコロジーフォーラム 10: 591-600, 1987.
- 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) 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: 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, 福岡医誌 78: 199-203, 1987.
- 7) Nagayama J, Kiyohara C, Mohri N, Hirohata T, Haraguchi K and Masuda Y: Inhibitory effect of methylsulphonyl polychlorinated biphenyls on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Chemosphere in press.
- 8) Rappe C, Andersson R, Bergqvist P, Brohede C, Hasson M, Kjeller L, Lindstrom G, Marklund S, Nygren M, Swanson SE, Tysklind M and Wiberg K: Overview on environmental fate of chlorinated dioxins and dibenzofurans. Sources, levels and isomeric pattern in various matrices. Chemosphere 16: 1603-1618, 1987.
- 9) Tanabe S, Kannan N, Subramanian An, Watanabe S and Tatsukawa R: Highly toxic coplanar PCBs: occurrence, source, persistency and toxic implications to wildlife and humans. Environ. Pollut. 47: 147-63, 1987.

芳香族炭化水素水酸化酵素活性に対する 3-methylsulphonyl-4,5,3',4'-tetrachlorobiphenyl と 7,8-benzoflavone の作用

九州大学医療技術短大部公衆衛生学研究室

長山 淳哉・毛利 紀子

第一薬科大学物理分析学教室

原口 浩一・増田 義人

九州大学医学部公衆衛生学講座

清原千香子・廣畑 富雄

Effects of 3-Methylsulphonyl-4,5,3',4'-Tetrachlorobiphenyl and 7,8-Benzoflavone on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity

Junya NAGAYAMA and Noriko MOHRI

*Laboratory of Public Health, School of Health Sciences
Kyushu University, Fukuoka 812*

Koichi HARAGUCHI and Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 812

Chikako KIYOHARA and Tomio HIROHATA

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

First, we examined the effects of 3-methylsulphonyl-4,5,3',4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-TCB, 1.5 ppm) and 7,8-benzoflavone (ANF, 1.4 ppm) on aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in cultured human lymphoblastoid cells and we have obtained the following results: (1) 3-MSF-TCB preferentially inhibited the enzyme activity induced by 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and slightly stimulated the enzyme activity induced by 3-methylcholanthrene (MC). (2) ANF reduced well the AHH activities induced by all the three enzyme inducers and more strongly inhibited the PenCDF- or TCDD-induced enzyme activity (about 89%). (3) About 64 and 76% of basal (uninduced) AHH activity was lowered by 3-MSF-TCB and ANF, respectively.

Second, we investigated the effects of 3-MSF-TCB (1.5-45 ppm) and ANF (1.4-42 ppm) on AHH activity of hepatic microsomes from the Ah nonresponsive (DDD) and responsive (C3H) strains of mice and we have got the following results: (1) 3-MSF-TCB and ANF enhanced or reduced the enzyme activity depending on both their concentrations and kinds of microsomes, namely, those prepared from untreated mice (control-microsomes) and mice treated with MC (MC-microsomes) or TCDD (TCDD-microsomes). (2) ANF showed higher potency for both the enhancement and the inhibition of the enzyme activity than 3-MSF-TCB. (3) The AHH activity of TCDD-microsomes seemed to be more greatly reduced with either 3-MSF-TCB or ANF than that of MC-microsomes. (4) The effects of 3-MSF-TCB and ANF on the enzyme activity of MC-microsomes of DDD mice and of control-microsomes of C3H mice were quite similar. The effects of both compounds on the AHH activity of TCDD-microsomes of DDD mice were also quite similar to their effects on the enzyme activity of MC-microsomes of C3H mice.

Taking account of both the experimental results described above and the action of ANF on the enzyme activity, which have been studied so far by other scientists, the following considerations will be possible: (1) The stimulation and/or inhibition of the AHH activity by 3-MSF-TCB and ANF seems to depend on the quality and quantity of cytochromes P-450 (P-450), which

are key enzymes for the AHH activity, present in the microsomes. (2) When the main P-450 in the microsomes is LM3C, the enzyme activity is probably enhanced well by 3-MSF-TCB and ANF, and when it is LM6, the enzyme activity will be strongly inhibited by them. We consider that MC possibly induces LM3C, LM4 and LM6, and PenCDF and TCDD more preferentially induce LM6.

It has been shown that no or less toxic TCDD congeners inhibit the induction of P-450 dependent monooxygenases including AHH by TCDD through the competitive displacement of TCDD with them in the aryl hydrocarbon (Ah) cytosolic receptor. The Ah cytosolic receptor, however, is considered not to be present in the hepatic microsomal preparation used in this study. Hence, we think that the Ah receptor is not involved in the action of 3-MSF-TCB and ANF on the AHH activity and that the two compounds more directly act on P-450.

According to our present study, PenCDF and TCDD seemed to predominantly induce LM6, and this type of P-450 considered to be much more effectively inhibited by 3-MSF-TCB and ANF than the other types of P-450. Our human bodies have already been contaminated with the organochlorine compounds such as 3-MSF-TCB, PenCDF and TCDD. One of the most important problems to be solved will be the biological and/or health consequences of the mixed contamination of these compounds, particularly for the descendants.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 201-209, 1989)

は じ め に

polychlorinated biphenyls (PCBs) の代謝物である methylsulphonyl PCBs (MSF-PCBs) が人間の臓器・組織から検出・定量されている⁵⁾⁷⁾⁸⁾。これまでの分析結果によると、油症患者および健常者の臓器・組織で、二塩化から六塩化の MSF-PCBs が検出されている⁷⁾。油症患者の MSF-PCBs 濃度は肝臓で 10~20 ppb, 肺臓・脂肪組織で 20~60 ppb である。同じ油症患者の PCBs 濃度は肝臓で約 60 ppb, 肺臓で約 45 ppb, 脂肪組織で 4,000~5,000 ppb であるので、肺臓では MSF-PCBs と PCBs の濃度がほぼ同じレベルとなっている。また、健常者の場合には油症患者と比較して、各臓器・組織の MSF-PCBs および PCBs 濃度はともに低値であるが、健常者でも肺臓では MSF-PCBs と PCBs の濃度はほぼ同じレベルである (ただし、脂肪組織では両者の MSF-PCBs 濃度はほぼ同じである)。このように、人体はすでに MSF-PCBs により想像以上に汚染されているにもかかわらず、その生物学的作用はまったく解明されていない。最近、私たちは MSF-PCBs のいくつかの異性体がヒトリンパ球培養細胞の芳香族炭化水素水酸化酵素 (aryl hydrocarbon hydroxylase, AHH) 活性を阻害することを報告した¹⁷⁾¹⁸⁾。AHH はいろいろな環境中ガン原性化学物質の生体内における代謝的活性化に関与することが示唆されており、この観点で多くの研究が世界的に行われている興味ある酵素である²²⁾。これまでの私たち

の研究では、AHH 活性阻害作用のもっとも強い MSF-PCBs は 3-MSF-4,5,3',4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-TCB) である¹⁷⁾¹⁸⁾。また、7,8-benzoflavone (ANF) は AHH 活性阻害作用のある化学物質として、すでに良く知られている²⁾⁹⁾²¹⁾。この研究では、MSF-PCBs による AHH 活性阻害作用をさらに詳しく研究するために、3-MSF-TCB と ANF を用いてヒトリンパ球培養細胞およびマウス肝臓ミクロソームの AHH 活性に対する作用を比較・検討した。

研 究 方 法

1. 化学薬品

3-MSF-TCB は従来の方法により合成し、精製した⁶⁾。その純度はガスクロマトグラフィー (GC) により 99% 以上である。2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) および 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop-dioxin (TCDD) も従来の方法により合成し、精製した¹⁶⁾。純度は GC により、それぞれ 99% 以上、98% である。ANF, NADH および NADPH は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。3-methyl-cholanthrene (MC), benzo (a) pyrene (BP), 3-OH-BP など、その他の薬品については、これまでに報告しているのと同様である¹⁶⁾。

2. ヒトリンパ球培養細胞の AHH 活性に対する 3-MSF-TCB および ANF の作用

ヒトリンパ球培養細胞の調製・培養方法および AHH 活性の測定方法はこれまでに報告している方法

と同様である¹⁶⁾。リンパ球培養細胞濃度を $3 \sim 4 \times 10^5$ cells/ml とし、各化合物を次の最終濃度になるように添加した。3-MSF-TCB は $1.5 \mu\text{g/ml}$ 、ANF は $1.4 \mu\text{g/ml}$ 、MC は $0.7 \mu\text{g/ml}$ 、PenCDF は 7.5 ng/ml 、TCDD は 3 ng/ml である。MC、PenCDF あるいは TCDD により誘導される AHH 活性に対する 3-MSF-TCB および ANF の作用を調べるために、MC、PenCDF あるいは TCDD の添加と同時に、それぞれの培養細胞に 3-MSF-TCB あるいは ANF を添加した。コントロールの細胞にはアセトン（溶媒）のみ $1.0 \mu\text{l/ml}$ 添加した。添加後 48 時間目に細胞を集め、酵素活性を測定した。basal AHH 活性（アセトンのみ処理した場合の酵素活性）を基準（1.0）とする relative AHH 活性（化合物を処理した場合の酵素活性/basal AHH 活性）を算出し、この指標によりヒトリンパ球培養細胞の AHH 活性に対する各処理の作用を表示した。

3. マウスの肝臓ミクロソームの AHH 活性に対する 3-MSF-TCB および ANF の作用

九州大学医学部附属動物実験施設より純系マウスの DDD; Qdj (DDD) および C3H/HeNQdj (C3H) の雄を購入した。8 週齢から、TCDD（オリーブ油に溶解）を 2 週間に 1 回 $20 \mu\text{g/kg}$ （計 6 回）投与した。コントロールのマウスには TCDD 投与と同様のタイム・スケジュールにより、オリーブ油のみ 8.0 ml/kg 投与した。最終投与の 3 日後にマウスを屠殺し、肝臓を摘出した。MC は 8 週齢の両系統の雄に 42 mg/kg （1 回）投与し、3 日後にマウスを屠殺し、肝臓を摘出した。肝臓ミクロソームは Noshiro と Omura の方法²⁰⁾により調製した。

(i) 肝臓ミクロソーム量と AHH 活性

コントロールのマウスおよび、MC あるいは TCDD を投与したマウスの肝臓ミクロソーム（それぞれコントロールミクロソーム、MC-ミクロソーム、TCDD-ミクロソームとする）量と AHH 活性との量・反応関係について検討した。ミクロソーム以外の反応液組成は次のようである。0.8 mg/ml の牛血清アルブミン、0.8 mg/ml の NADPH、1.22 mg/ml の MgCl_2 および 100 nmol の BP が 50 mM のリン酸緩衝液（最終容量 1.0 ml）に含まれている。この反応液にコントロールミクロソームを $3 \sim 100 \mu\text{g}$ 、MC-ミクロソームを $1 \sim 30 \mu\text{g}$ 、あるいは TCDD-ミクロソームを $1 \sim 10 \mu\text{g}$ 添加し、 37°C で 5 分間反応させた。1.0 ml の氷冷アセトンにより反応を停止し、BP の代謝物を 3.5 ml の n-ヘキサンで抽出した。この有機溶

媒層（3.0 ml）を 1.0 ml の 1 N NaOH で抽出し、NaOH 層の蛍光強度を分光蛍光光度計（モデル 650-10 S、日立製作所製、東京）により測定した。AHH 活性および蛋白質の定量法はこれまでに報告している方法¹⁹⁾と同様である。

(ii) 3-MSF-TCB および ANF の作用

この実験では、DDD のコントロール、MC-および TCDD-ミクロソームはいずれも $10 \mu\text{g/ml}$ 、C3H のコントロールミクロソームは $30 \mu\text{g/ml}$ 、MC-および TCDD-ミクロソームは $1 \mu\text{g/ml}$ を用いて、酵素活性を測定した。反応液に 3-MSF-TCB を最終濃度が 1.5, 3.0, 15, $45 \mu\text{g/ml}$ 、また ANF を最終濃度が 1.4, 2.8, 14, $42 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した。コントロールには溶媒であるアセトンのみ $15 \mu\text{l/ml}$ 添加した。AHH 活性の測定法は前記 (i) と同様である。ミクロソームの酵素活性に対する 3-MSF-TCB および ANF の作用を比較するために、それぞれのミクロソームにアセトンのみ添加した場合の酵素活性を基準（1.0）とする relative AHH 活性（コントロール、MC-あるいは TCDD-ミクロソームに各化合物を添加した場合の酵素活性/それぞれのミクロソームにアセトンのみ添加した場合の酵素活性）を算出した。

結 果

1. ヒトリンパ球培養細胞の AHH 活性に対する 3-MSF-TCB および ANF の作用

実験結果を Fig. 1 に示す。3-MSF-TCB および ANF はそれぞれ 1.5 ppm、1.4 ppm の濃度で basal AHH 活性を 64%、76% 阻害した。MC を 0.7 ppm 処理すると酵素活性は 6 倍高くなった。MC と同時に 3-MSF-TCB を 1.5 ppm 処理しても AHH 活性は低下せず、逆に 10% 上昇した。しかし、MC と同時に ANF を 1.4 ppm 処理すると酵素活性は 62% 低下した。PenCDF を 7.5 ppb 処理すると AHH 活性は 2.4 倍上昇した。PenCDF と同時に 3-MSF-TCB を 1.5 ppm、あるいは ANF を 1.4 ppm 処理すると、酵素活性はそれぞれ 65%、89% 低下した。TCDD を 3 ppb 処理すると、AHH 活性は 10 倍高くなった。TCDD と同時に 3-MSF-TCB を 1.5 ppm、あるいは ANF を 1.4 ppm 処理すると、酵素活性はそれぞれ 34%、89% 低下した。MC と 3-MSF-TCB、あるいは TCDD と 3-MSF-TCB を同時に処理した場合の酵素活性はほぼ同じであったが、MC と ANF、あるいは TCDD と ANF を同時に処理した場合の酵素活性は、前者のほうが後者よりも 2 倍高かった。MC と

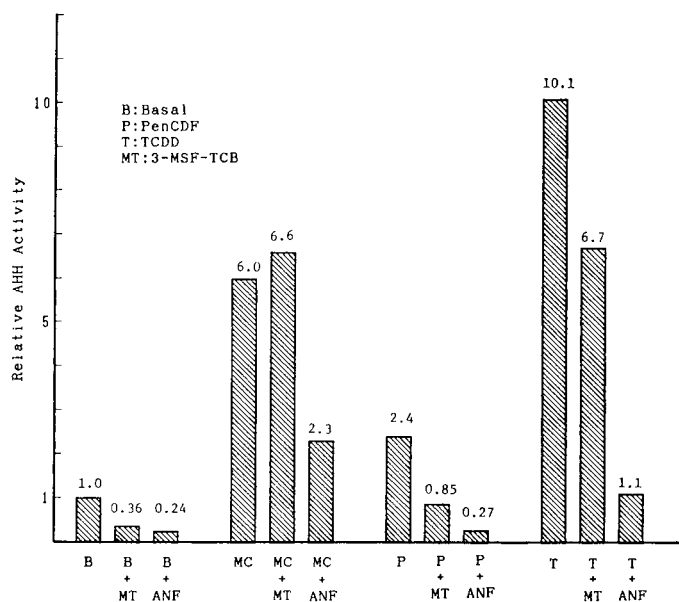


Fig. 1 Effects of 3-MSF-TCB and ANF on the basal, MC-, PenCDF- and TCDD- induced AHH activity in cultured human lymphoblastoid cells. Final concentrations of 3-MSF-TCB, ANF, MC, PenCDF and TCDD in culture medium were 1.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.4 $\mu\text{g/ml}$, 0.7 $\mu\text{g/ml}$, 7.5 ng/ml and 3 ng/ml , respectively. Relative AHH activity represents the ratio of the enzyme activity treated with the chemical or the combination of chemicals to the basal enzyme activity. In this experiment, two individual human lymphoblastoid cell lines were used for the enzyme assay and their respective basal AHH activities, which were used as the standard (1.0) of the relative enzyme activity, were 0.017 and 0.017 $\text{pmol/min}/10^6$ cells. Each figure on the top of the bar indicates the mean of two relative enzyme activities calculated from the two lymphoblastoid cells.

ANFを同時に処理した場合のAHH活性は、PenCDF単独処理の場合の酵素活性とほぼ同じであった。

上記のような研究結果より、次のような考察が可能となる。(1) 3-MSF-TCBはMCではなくて、PenCDFあるいはTCDDにより誘導されるAHH活性を優先的に阻害する。(2) ANFはMC, PenCDFあるいはTCDDにより誘導される酵素活性をいずれも良く阻害するが、PenCDFあるいはTCDDにより誘導される酵素活性をより強く阻害する傾向がある。(3) 3-MSF-TCBあるいはANFにより阻害される酵素成分はbasal AHH活性のなかにも、かなり存在する。

2. マウスの肝臓ミクロソームのAHH活性に対する3-MSF-TCBおよびANFの作用

(i) ミクロソーム量とAHH活性

実験結果をFig. 2とFig. 3に示す。DDDとC3Hのコントロール-ミクロソームのAHH活性は、反応液に添加するミクロソーム量が3~30 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でほぼ同じであったが、100 $\mu\text{g/ml}$ では活性がそれぞれ14%, 18%低下した。この結果より、コントロー

ル-ミクロソームの酵素活性を測定する場合には、反応液に添加するミクロソーム量は10~30 $\mu\text{g/ml}$ とした。DDDのMC-ミクロソームのAHH活性はミクロソーム量が1~10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でほぼ同じ活性値を示したが、30 $\mu\text{g/ml}$ では30%ほど活性が低下した。また、C3HのMC-ミクロソームの酵素活性はミクロソーム量が1~10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で、ミクロソーム量の増加にともない低下した。これらの結果より、MC-ミクロソームのAHH活性を測定する場合のミクロソーム量はDDDでは1~10 $\mu\text{g/ml}$ 、C3Hでは1 $\mu\text{g/ml}$ とした。DDDのTCDD-ミクロソームのAHH活性は、ミクロソーム量が1 $\mu\text{g/ml}$ の場合がもっとも高かったが、10 $\mu\text{g/ml}$ でも活性は10%ほど低下しただけであった。また、C3HのTCDD-ミクロソームの酵素活性は、ミクロソーム量が1 $\mu\text{g/ml}$ と3 $\mu\text{g/ml}$ では、前者のほうが後者よりも37%ほど高かった。これらの結果より、TCDD-ミクロソームのAHH活性を測定する場合のミクロソーム量はDDDでは1~10 $\mu\text{g/ml}$ 、C3Hでは1 $\mu\text{g/ml}$ とした。

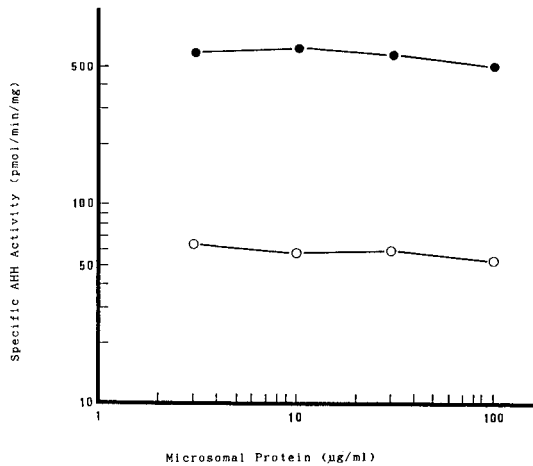


Fig. 2 Relationship between specific AHH activity and concentration of hepatic microsomal protein prepared from control (untreated) DDD (●) and C3H (○) mice.

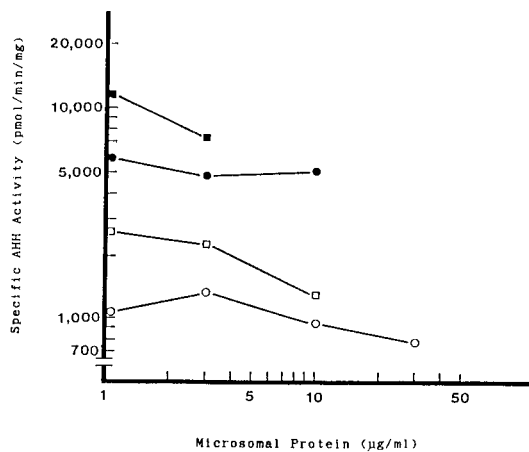


Fig. 3 Correlation of specific AHH activity and concentration of hepatic microsomal protein prepared from DDD mice treated with MC (○) or TCDD (●) and from C3H mice treated with MC (□) or TCDD (■).

(ii) 3-MSF-TCB および ANF の作用

DDD および C3H マウスについての実験結果を、それぞれ Fig. 4, Fig. 5 に示す。まず、DDD について実験結果を記述する。3-MSF-TCB は $3.0 \mu\text{g/ml}$ で、コントロールおよび MC-ミクロソームの AHH 活性を、それぞれ 25%, 2 倍ほど高めた。この上昇した酵素活性は $45 \mu\text{g/ml}$ まで、ほとんど変化しなかった。一方、ANF は 1.4 あるいは $2.8 \mu\text{g/ml}$ で、コントロールおよび MC-ミクロソームの AHH 活

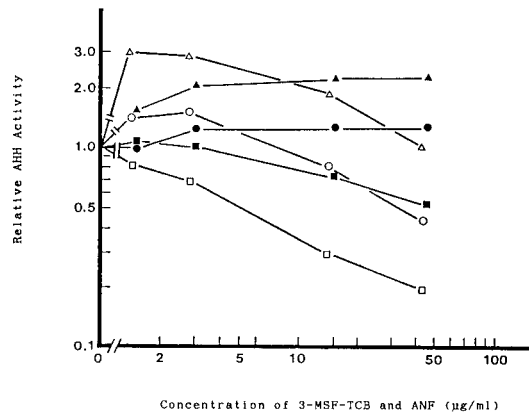


Fig. 4 Effects of concentration of 3-MSF-TCB and ANF on AHH activities of hepatic microsomes from untreated, MC- and TCDD-treated DDD mice. Specific enzyme activities of the untreated, MC- and TCDD-treated mice, the standard (1.0) of each AHH activity, were 413, 644 and 3344 pmol/min/mg protein, respectively. Untreated mice; ●: 3-MSF-TCB and ○: ANF, MC-treated mice; ▲: 3-MSF-TCB and △: ANF, and TCDD-treated mice; ■: 3-MSF-TCB and □: ANF.

性をそれぞれ 50%, 3 倍ほど高めた。しかし、ANF の濃度が高くなると、酵素活性は次第に低下した。ANF の濃度が $42 \mu\text{g/ml}$ で、コントロール-ミクロソームの AHH 活性は 56% 阻害され、また、MC-ミクロソームの relative AHH 活性は 1 近くまで低下した。両化合物は TCDD-ミクロソームの酵素活性を量・反動的に阻害した。3-MSF-TCB が $45 \mu\text{g/ml}$ のとき、この酵素活性は 48% 低下し、また、ANF が $42 \mu\text{g/ml}$ のとき 81% 低下した。

次に、C3H について実験結果を記述する。3-MSF-TCB はコントロール-ミクロソームの AHH 活性を量・反動的に高め、 15 あるいは $45 \mu\text{g/ml}$ で 2 倍に上昇した。ANF は 1.4 あるいは $2.8 \mu\text{g/ml}$ でコントロール-ミクロソームの酵素活性を 2.6 倍高めたが、さらに濃度が高くなると、逆に、この上昇した酵素活性を阻害した。ANF が $42 \mu\text{g/ml}$ のとき、relative AHH 活性は 1 近くまで低下した。両化合物は MC-および TCDD-ミクロソームの AHH 活性を量・反動的に阻害した。3-MSF-TCB が $45 \mu\text{g/ml}$ のとき、MC-および TCDD-ミクロソームの酵素活性は、それぞれ 44%, 52% 低下した。また、ANF が $42 \mu\text{g/ml}$ のとき、MC-および TCDD-ミクロソームの酵素活性

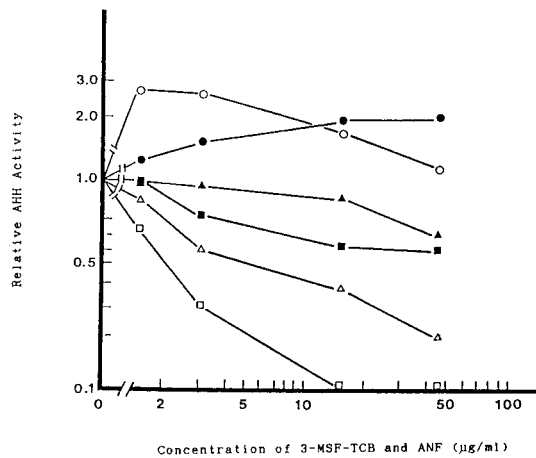


Fig. 5 Effects of concentration of 3-MSF-TCB and ANF on AHH activities of hepatic microsomes from untreated, MC- and TCDD-treated C3H mice. Specific enzyme activities of the untreated, MC- and TCDD-treated mice, the standard (1.0) of each AHH activity, were 52, 2693 and 10275 pmol/min/mg protein, respectively. Untreated mice; ●: 3-MSF-TCB and ○: ANF, MC-treated mice; ▲: 3-MSF-TCB and △: ANF, and TCDD-treated mice; ■: 3-MSF-TCB and □: ANF.

は、それぞれ82%, 90%低下した。

DDDとC3Hのコントロール-, MC-あるいはTCDD-ミクロソームのAHH活性に対する、3-MSF-TCBおよびANFの作用を比較、検討すると、次のような点が明確となる。(1) 酵素活性を高める場合、その作用は3-MSF-TCBよりもANFのほうが強い。(2) 酵素活性を阻害する場合、その作用も3-MSF-TCBよりもANFのほうが強い。(3) 3-MSF-TCBあるいはANFによる酵素活性阻害作用は、MC-ミクロソームよりもTCDD-ミクロソームの酵素に対してより強い。(4) DDDのMC-ミクロソームの酵素活性に対する両化合物の作用と、C3Hのコントロール-ミクロソームの酵素活性に対する両化合物の作用が、きわめて類似している。また、DDDのTCDD-ミクロソームの酵素活性に対する両化合物の作用と、C3HのMC-ミクロソームの酵素活性に対する両化合物の作用がきわめて類似している。

考 察

AHH活性には、いろいろな分子種のcytochrome P-450 (P-450) が関与しており²⁾⁹⁾²¹⁾、その分類は研究

者や動物種により、かなり多様である¹⁰⁾。ANFとAHH活性に関与するP-450との関係は、これまでおもにウサギの肝臓のP-450を用いて研究されている⁹⁾²¹⁾。この考察でも、P-450の分類と命名はウサギのP-450に関するものに従う¹⁰⁾。MCあるいはTCDDにより誘導されると考えられているマウスのP-450は、P₁-450とP₃-450である⁴⁾。P₁-450とP₃-450はここでのウサギのP-450の分類では、それぞれLM6とLM4となり、また、それぞれラットのP-450_cとP-450_dに相当する。

精製した、いろいろなウサギのP-450によるin vitroのAHH活性に対するANFの作用を調べると、ANFは多くのP-450のAHH活性を低めたが、ただLM3Cによる酵素活性のみ高めた²¹⁾。この研究では、また、TCDDあるいはrifampicinを投与したウサギの肝臓からミクロソームを調製し、それらのミクロソームのAHH活性に対するANFの作用も調べている。ウサギの場合TCDDによりLM4とLM6が誘導され¹¹⁾、rifampicinによりLM3Cが誘導される¹⁴⁾。予想されるように、ANFはTCDD投与したウサギのミクロソームのAHH活性を低め、逆に、rifampicin投与したウサギのミクロソームの酵素活性を数倍も高めた²¹⁾。別の研究でも、ANFはLM3CによるAHH活性を高め⁹⁾、LM6による酵素活性をほぼ完全に阻害した²⁹⁾。しかし、LM4による酵素活性に対するANFの作用は、これまでのところ明確ではない。つまり、酵素活性を低めたり、また逆に高めたりするのである⁹⁾²¹⁾。ANFのP-450に対する作用は、上記のように、P-450の分子種により、まったく相違する。ANFがAHH活性を阻害するか、あるいは高めるかはミクロソームに存在するP-450の種類と量比に依存しているようである。

この研究でも、3-MSF-TCBとANFはヒトリンパ球培養細胞およびマウスの肝臓ミクロソームのAHH活性を阻害したり、また逆に、高めたりした(Figs. 1, 4および5)。ヒトリンパ球培養細胞では、3-MSF-TCBはMC処理の場合、酵素活性を10%高め、PenCDFあるいはTCDD処理の場合は、逆に、それぞれ65%, 34%低めた(Fig. 1)。また、ANFはMC, PenCDFあるいはTCDD処理した場合の酵素活性をそれぞれ、62%, 89%, 89%阻害した(Fig. 1)。このような結果は、誘導されるP-450の種類と量が、それぞれの誘導剤により相違しており、その誘導されたP-450分子種に対する3-MSF-TCBあるいはANFの作用も一様でないことを示唆している。同

様の現象は、マウスの肝臓ミクロソームの AHH 活性に対する両化合物の作用についても観察された (Figs. 4 および 5)。3-MSF-TCB は 3.0~45 ppm で DDD のコントロールおよび MC-ミクロソームあるいは C3H のコントロール-ミクロソームの酵素活性を 1.3~2.3 倍高めた。しかし、ANF の作用は 3-MSF-TCB の作用とは異なっていた。つまり、ANF は 1.4 あるいは 2.8 ppm で DDD のコントロールおよび MC-ミクロソームあるいは C3H のコントロール-ミクロソームの AHH 活性を 1.4~3 倍高めたが、濃度がさらに高くなると、この上昇した酵素活性は逆に阻害された。このような実験結果より、3-MSF-TCB あるいは ANF の AHH 活性に対する作用機構の一つとして、次のようなことが示唆される。

(1) 実験した濃度範囲で、ある種の P-450 に対する 3-MSF-TCB の作用部位は 1 か所であり、この部位は酵素活性を上昇させる作用がある。この部位は 1 μ g のミクロソームにつき 0.3~0.5 μ g の 3-MSF-TCB により飽和すると考えられる。(2) 実験した濃度範囲で、ある種の P-450 に対する ANF の作用部位は 2 か所ある。ANF に対して親和性の高い第 1 部位は酵素活性を上昇させる作用があり、親和性の劣る第 2 部位は逆に、酵素活性を低下させる作用がある。第 1 部位は 1 μ g のミクロソームにつき 0.05~0.3 μ g の ANF により飽和し、その後、ANF は第 2 部位に作用する。

DDD は、いわゆる Ah 非応答性系統のマウスであり、C3H は Ah 応答性系統のマウスである¹⁵⁾。したがって、MC 投与により、DDD は肝臓の AHH 活性があまり上昇せず、C3H は容易に上昇する。3-MSF-TCB および ANF は DDD の MC-ミクロソームと C3H のコントロール-ミクロソームの AHH に対して、また、DDD の TCDD-ミクロソームと C3H の MC-ミクロソームの酵素に対して、きわめて類似した酵素活性の上昇あるいは阻害作用を示した (Figs. 4 および 5)。このことは DDD の MC-あるいは TCDD-ミクロソームに存在する P-450 の種類と量比が、それぞれ C3H のコントロール-あるいは MC-ミクロソームに存在するものと類似することを示唆している。また、C3H の TCDD により誘導される P-450 は ANF により、きわめて効率良く、その活性が阻害される (Fig. 5)。

これまでの研究によれば、MC あるいは TCDD により誘導される主な P-450 は LM4 と LM6 と考えられている¹⁰⁾²²⁾。しかし、3-MSF-TCB あるいは ANF

の肝臓ミクロソームの AHH 活性に対する上記のような研究結果を考慮すると、MC あるいは TCDD により誘導される P-450 は、その種類、量ともに相違している可能性がある。つまり、DDD では MC により主に LM3C と LM4 が誘導され、TCDD により主に LM4 と LM6 が誘導されると考えられる。また、C3H では MC により主に LM4 と LM6 が誘導され、TCDD により LM6 が優先的に誘導されると考えられる。さらに、ヒトリンパ球培養細胞の場合について推察すると、MC により LM3C、LM4 および LM6 に相当する P-450 が誘導され、PenCDF により主に LM6 に相当する P-450 が誘導され、TCDD により LM3C、LM4 と同時に LM6 に相当する P-450 がより優先的に誘導されるように思われる。

polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) の毒性の低い異性体や PCBs を TCDD の 1,000~100,000 倍の量、TCDD と同時に培養細胞に処理すると、TCDD 単独処理の場合に誘導される酵素活性が有意に抑制されることが報告されている¹¹⁾²⁾。そして、低毒性の PCDFs 異性体などによる、このような抑制作用は Ah リセプターを介して発現すると考えられている。つまり、Ah リセプターに対する PCDFs 異性体などの拮抗的結合阻害作用がそのメカニズムとして考えられているのである。ヒトリンパ球培養細胞の場合、AHH 活性の測定は生細胞を用いて行うので、3-MSF-TCB あるいは ANF の酵素活性に対する作用に、Ah リセプターが関与しているかどうか、判定が困難である。この研究では、ヒトリンパ球培養細胞の AHH 活性に対する両化合物の作用が、*in vitro* の肝臓ミクロソームの酵素活性に対しても同様に観察された。一般に、Ah リセプターは細胞質に存在すると考えられている¹⁵⁾。この研究で、私たちが調製したミクロソーム分画には細胞質は存在しないので、Ah リセプターも存在しないと考えられる。したがって、3-MSF-TCB や ANF の酵素活性に対する作用発現に Ah リセプターは関与しておらず、両化合物は P-450 に直接作用している可能性が高いと考えている。

3-MSF-TCB および ANF は培養細胞あるいは肝臓ミクロソームの酵素活性に対しては有意な作用を発現した。両化合物のこのような作用は *in vivo* においても同様に観察されるであろうか。ANF は 7,12-dimethylbenz (a) anthracene によるマウス皮膚ガンの発生を抑制したが、AHH 活性の誘導は抑制しなかった¹³⁾。また、ANF は MC による肝臓の AHH 活性の上昇を抑制することなしに、MC による免疫抑制

作用をほぼ完全に無効とした³⁾。このように、ANFの酵素活性に対する作用は *in vivo* では観察されていないが、生物学的には有意な作用を発現している。3-MSF-TCB については、これまで、このような *in vivo* の研究は報告されていない。人体は3-MSF-TCBなどのMSF-PCBsによりすでに、かなり汚染されている⁵⁾⁷⁾⁸⁾。今後、MSF-PCBsの *in vivo* におけるAHHをはじめとするミクロソーム酵素に対する作用とその生物学的意義、あるいは他の有害物質、発ガン物質との相互作用とその生物学的意義などについて解明する必要がある。

ま と め

ヒトリンパ球培養細胞のAHH活性に対する3-MSF-TCBとANFの作用を比較・研究し、次のような結果が得られた。

- 1) 3-MSF-TCBはMCにより誘導される酵素活性ではなく、PenCDFあるいはTCDDにより誘導される酵素活性を優先的に阻害する。
- 2) ANFはMC、PenCDFあるいはTCDDにより誘導される酵素活性をいずれも良く阻害するが、PenCDFあるいはTCDDにより誘導される酵素活性をより強く阻害する。
- 3) 3-MSF-TCBあるいはANFにより阻害される酵素成分はbasal AHH活性の中にも、かなり存在する。

Ah非応答性のDDDマウスおよびAh応答性のC3Hマウスの肝臓ミクロソームのAHH活性に対する3-MSF-TCBとANFの作用を比較・研究し、次のような結果が得られた。

- 1) 3-MSF-TCBおよびANFは濃度により、またミクロソームの種類により酵素活性を高めたり、逆に、阻害したりする。
- 2) 酵素活性を高める場合、その作用は、3-MSF-TCBよりもANFの方が強い。
- 3) 酵素活性を阻害する場合、その作用は、3-MSF-TCBよりもANFのほうが強い。
- 4) 3-MSF-TCBあるいはANFの酵素活性阻害作用は、MC-ミクロソームよりもTCDD-ミクロソームの酵素に対してより強い。
- 5) DDDのMC-ミクロソームの酵素活性に対する両化合物の作用と、C3Hのコントロール-ミクロソームの酵素活性に対する両化合物の作用がきわめて類似している。また、DDDのTCDD-ミクロソームの酵素活性に対する両化合物の作用と、C3HのMC-ミク

ロソームの酵素活性に対する両化合物の作用がきわめて類似している。

このような研究結果と、これまでに他の研究者が行ったAHH活性に対するANFの作用などを考慮して、下記のような考察が可能であろう。

- 1) 3-MSF-TCBやANFのような化合物により酵素活性が高まるか、あるいは逆に阻害されるかはミクロソームに存在するP-450の種類と量比に依存する。
- 2) ミクロソームにP-450としてLM3Cが多く含まれる場合には、3-MSF-TCBやANFにより酵素活性が上昇し、また、LM6が多く含まれる場合には酵素活性が強く阻害されると考えられる。上記の研究結果を考慮すると、MCによりLM3C、LM4およびLM6が誘導され、PenCDFやTCDDによりLM6がより優先的に誘導されるようである。

一部の研究者はAHH活性の阻害機構に細胞質のAhリセプターが関与していると考えている。しかし、この研究で用いたミクロソーム分画にはAhリセプターは存在しないので、3-MSF-TCBやANFの酵素活性に対する作用にAhリセプターが関与している可能性はないと考えている。これらの化合物はP-450に直接的に作用しているのであろう。

この研究により、PenCDFやTCDDによりLM6に相当するP-450が優先的に誘導され、また、LM6は3-MSF-TCBやANFにより他のP-450よりも強く、その活性が阻害されることが示唆された。人体はすでにPenCDF、TCDD、3-MSF-TCBなどにより、複合的に汚染されている。今後は、このような複合汚染の人体影響を解明すること、とくに子孫への影響を解明することが重要な研究課題となると考えている。

文 献

- 1) Bannister R, Davis D, Zacharewski T, Tizard I and Safe S: Aroclor 1254 as a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin antagonist: effects on enzyme induction and immunotoxicity. *Toxicology* 46: 29-42, 1987.
- 2) Domin BA and Philpot RM: The effect of substrate on the expression of activity catalyzed by cytochrome P-450: metabolism mediated by rabbit isozyme 6 in pulmonary microsomal and reconstituted monooxygenase systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 128-142, 1986.
- 3) Frank DM and Blumer JL: Alteration of methylcholanthrene-mediated suppression of cutaneous delayed hypersensitivity by benzoflavone treatment of C57BL/6J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 95: 72-81, 1988.

- 4) Gonzalez FJ, Kimura S and Nebert DW: Comparison of the flanking regions and introns of the mouse 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible cytochrome P₁-450 and P₃-450 genes. *J. Biol. Chem.* 260: 5040-5049, 1985.
- 5) 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.
- 6) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Synthesis and characterization of tissue-retainable methylsulfonyl polychlorinated biphenyl isomers. *J. Agric. Fd. Chem.* 35: 178-182, 1987.
- 7) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Polychlorinated biphenyl methylsulphone congeners in human tissues: identification of methylsulfonyl dichlorobiphenyls. *Chemosphere* in press.
- 8) Haraguchi K, Kuroki H, Masuda Y and Shigematsu N: Determination of methylthio and methylsulphone polychlorinated biphenyls in tissues of patients with 'Yusho'. *Fd. Chem. Toxicol.* 22: 283-288, 1984.
- 9) Huang M-T, Johnson EF, Muller-Eberhard U, Koop DR, Coon MJ and Conney AH: Specificity in the activation and inhibition by flavonoids of benzo(a)pyrene hydroxylation by cytochrome P-450 isozymes from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 256: 10897-10901, 1981.
- 10) 今井嘉郎, 佐藤了: 肝ミクロゾームのチトクローム P-450 分子種の多様性と反応の多様性, 代謝 19: 1723-1735, 1982.
- 11) Johnson EF and Muller-Eberhard U: Resolution of two forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of rabbits treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Biol. Chem.* 252: 2839-2845, 1977.
- 12) Keys B, Piskorska-Pliszczyńska J and Safe S: Polychlorinated dibenzofurans as 2,3,7,8-TCDD antagonists: in vitro inhibition of monooxygenase enzyme induction. *Toxicol. Lett.* 31: 151-158, 1986.
- 13) Kinoshita N and Gelboin HV: The role of aryl hydrocarbon hydroxylase in 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene skin tumorigenesis: on the mechanism of 7,8-benzoflavone inhibition of tumorigenesis. *Cancer Res.* 32: 1329-1339, 1972.
- 14) Lange R, Balny C and Maurel P: Inductive and repressive effects of rifampicin on rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* 33: 2771-2775, 1984.
- 15) 長山淳哉: ダイオキシンおよびダイベンゾフランの AHH 誘導性と毒性発現, トキシコロジーフォーラム 10: 591-600, 1987.
- 16) 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.
- 17) 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: 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, 福岡医誌 78: 199-203, 1987.
- 18) Nagayama J, Kiyohara C, Mohri N, Hirohata T, Haraguchi K and Masuda Y: Inhibitory effect of methylsulphonyl polychlorinated biphenyls on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Chemosphere* in press.
- 19) 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.
- 20) Noshiro M and Omura T: Immunochemical study on the electron pathway from NADH to cytochrome P-450 of liver microsomes. *J. Biochem.* 83: 61-77, 1978.
- 21) Raucy JL and Johnson EF: Variations among untreated rabbits in benzo(a)pyrene metabolism and its modulation by 7,8-benzoflavone. *Mol. Pharmacol.* 27: 296-301, 1984.
- 22) 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.

鶏胚肝臓酵素誘導能による油症原因物質の影響評価

摂南大学薬学部

樫本 隆・高山 幸司・味村 真弓

太田 壮一・宮田 秀明

Evaluation of Toxic Effects on Yusho Causal Substances by Chick Embryo Hepatic Microsomal Enzymes Activities

Takashi KASHIMOTO, Koji TAKAYAMA, Mayumi MIMURA,
Souichi OHTA and Hideaki MIYATA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, 45-1,
Nagaotoge-cho, Hirakata, Osaka 573-01*

PCBs, non-ortho chlorine substituted PCBs (Co-PCBs), PCQs and (PCDFs+PCDDs), all of which contained similar compositions of those corresponding in Yusho oil, were prepared from a PCB preparation used as a heat exchanger fluid. After dissolved in 1,4-dioxane, they were applied into the air sac of white leghorn eggs incubated for 16.5 days at 37.5°C. Forty eight hours after injection, the hepatic benzo(a)pyrene hydroxylase (AHH) and 7-ethoxyresorufin deethylase (EROD) activities were assayed.

The average relative potencies of induction for the two microsomal drug metabolizing enzymes by (PCDFs+PCDDs), Co-PCBs, PCBs and PCQs were 100, 13.4, 0.0006 and 0.0004, respectively. The toxic effects for Yusho disease by these substances were calculated from the relative enzyme induction potencies and the average concentrations in Yusho oils with the production dates of February 9 and 10, 1968. Consequently, the relative toxicities of (PCDFs+PCDDs), Co-PCBs, PCBs and PCQs were 100, 13.2, 0.06 and 0.12, respectively. This result, as well as our previous investigations using rats and monkeys, insists that (PCDFs+PCDDs) are the primary causal agents for Yusho disease. However, the Co-PCBs, which were recently detected in the Yusho oils by us, were revealed to be fairly effective in Yusho manifestation.

In addition, it was cleared that the hepatic enzyme induction by the Co-PCBs fraction, which contained other several PCB isomers, was almost completely contributed by only Co-PCBs such as 3,4,3',4'-tetra- 3,4,5,3',4'-penta- and 3,4,5,3',4',5'-hexachlorinated biphenyls present in the fraction.

A chemical uptake rate from the air sac by the chick embryo decreased significantly in the cases of extremely high doses of PCBs (10,000 µg/egg) and PCQs (3,333 and 10,000 µg/egg), and resultantly the elevations of hepatic enzymes activities were depressed, indicating that the suitable chemical dose amount to be less than about 1,000 µg/egg.

(Fukuoka Acta Med. 80(5) : 210-220, 1989)

はじめに

われわれは、熱媒体使用済 PCB 製品から、油症原因油中に含まれるものと類似の組成をもつ PCBs, PCDFs および PCQs を作製し、ラットおよびサルを用いて油症原因物質を検討してきた⁴⁾⁵⁾⁶⁾¹¹⁾。ラットにおける成長抑制、肝臓肥大、胸腺萎縮、肝臓薬物代謝

酵素誘導能、組織病理学的所見および血液検査所見、サルにおける体重減少、脱毛、クロルアクネ形成、免疫機能低下などの結果から、PCDFs は PCBs や PCQs に較べて、数百倍～数千倍も生体影響の強いことが明らかとなった。その結果、油症の主原因物質は PCDFs であると結論づけられた。

しかし、前報¹⁰⁾で報告したように、新たに開発し

た分析法を用いて油症原因油を再分析した結果、PCDF解析では、従来報告されていなかった高塩化PCDFが検出されたことに付け加え、異性体組成比もかなり異なっていることが確認された。また、PCDFsとほぼ同濃度のコプラナー型PCBsと、約1/10濃度のポリ塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシン(PCDDs)が新たに検出された。さらに、従来の油症患者組織中のPCDF分析結果においては、分析操作過程で生じた高塩化PCDFsの分解生成物である低塩化PCDFsが含まれていることも明らかとなった¹⁰⁾¹⁷⁾。

今回は、これらの新知見をもとに、鶏胚、肝臓薬物代謝酵素誘導能を指標にして原因油中の各種化合物の生物影響評価を検討した。

実験方法

1. 試薬

1) *n*-ヘキサン、塩化メチレン、エタノール、メ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；1,4-ジオキサン：関東化学工業社製、試薬特級；水酸化カリウム、硝酸銀、トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)、エチレンジアミン四酢酸、ブチルヒドロキシトルエン、リン酸二水素カリウム、リン酸一水素カリウム、塩化マグネシウム、水酸化ナトリウム：和光純薬工業社製、試薬特級；グルコース-6-リン酸(G-6-P)、NADP⁺：オリエンタル酵母社製；グルコース-6-リン酸脱水素酵素：Boehringer Mannheim社製。

2) カラクロマト用アルミナ：Merck社製(Art. No. 1077)、中性、活性度I。

3) カラムクロマト用シリカゲル：Merck社製Kiesel gel 60 (70~230 mesh)のものをメタレールで洗浄後一夜活性化したもの。

4) 10%硝酸銀シリカゲル、22%および44%硫酸シリカゲル、1.98%KOHシリカゲル：前報¹⁰⁾の通り。

5) Co-PCB標準品：3,4,3',4'-tetrachlorinated biphenyl (3,4,3',4'-T₄CB)および3,4,5,3',4',5'-hexachlorinated biphenyl (3,4,5,3',4',5'-H₆CB)はAnalab社製、3,4,5,3',4'-pentachlorinated biphenyl (3,4,5,3',4',-P₅CB)は九州大学吉村英敏博士から譲渡されたもの。

6) Resorufin標準品：東京化成工業社製。

7) 7-Ethoxyresorufin標準品：Pierce社製。

8) Benzo(a)pyrene標準品：和光純薬工業社製、試薬特級。

9) 3-Hydroxybenzo(a)pyrene標準品：大阪府立公衆衛生研究所 島田 力博士より譲渡されたもの。

10) 定量用PCDDs, PCDFs標準品：前報⁵⁾の通り。

2. (PCDFs+PCDDs), PCBs Co-PCBsおよびPCQsの作製

㈱鐘淵化学工業から譲渡された熱媒体使用済PCB製品をFig. 1に示す方法に従って分離精製した。熱媒体使用済PCB製品300gを30 mmHgの減圧下200~300°Cで約1/10量になるまで蒸留した。残留物1gを30 mlの*n*-ヘキサンに溶解した後、100 ml分液ロートに移し、0.5 N KOH-エタノール溶液20 mlを加え、室温下で2時間振とうした。次に、35 mlの水を添加、5分間振とうした後、10分間放置し、下層の水層を捨てた。*n*-ヘキサン層は、水20 mlで、2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、前報¹⁰⁾に準じて調製した硝酸銀シリカ・硫酸シリカ・KOHシリカ積層カラムに流入した後、*n*-ヘキサン100 mlで、PCBs, Co-PCBs, PCQs, PCDDs, PCDFsを溶出した。この溶出液を湿式法でアルミナ300gを充填したカラム(70 cm×3.0 cm i. d.)に直接注ぎ込んだ後、まず、1.5%塩化メチレン・*n*-ヘキサン混液3,600 mlでCo-PCBsを除くPCBsを溶出させ、続いて、2.5%塩化メチレン・*n*-ヘキサン混液6,600 mlでCo-PCBsと大部分のPCQs、さらに、50%塩化メチレン・*n*-ヘキサン混液7,200 mlで残りのPCQsとPCDDs, PCDFsをカラムより流下させた。第1画分の*n*-ヘキサン溶出液は100 mlに濃縮した後、アルミナカラム(200 g, 3.0 cm i. d.)で再度精製を行った(溶出液：1.0%塩化メチレン・*n*-ヘキサン混液3,600 ml)。溶出液を濃縮した後、その一部をECD-GC分析に供し、残りを鶏胚投与用とした。

第1回目のアルミナカラムから得られた第2画分および第3画分をK. D.濃縮器で濃縮後、完全に溶媒を留去した。次に、それぞれの残留物を塩化メチレン10 mlずつに溶解した後、既報¹⁶⁾に準じてGPCクロマトグラフィーを行った。第2画分については、Co-PCBsを大部分のPCQs、第3画分については残りのPCQsと(PCDFs+PCDDs)に分離精製した。第2画分および第3画分から得られたPCQs溶出液を合し、PCQs画分とした。

GPCカラムクロマトグラフィーにより得られたCo-PCBs画分、PCQs画分および(PCDDs+PCDFs)画分をそれぞれ5 mlに濃縮した後、それぞれの画分ごとに再度GPCカラム精製を加えた後、それぞれの一部をECD-GCおよびGC-MS分析に供し、解析を行った。

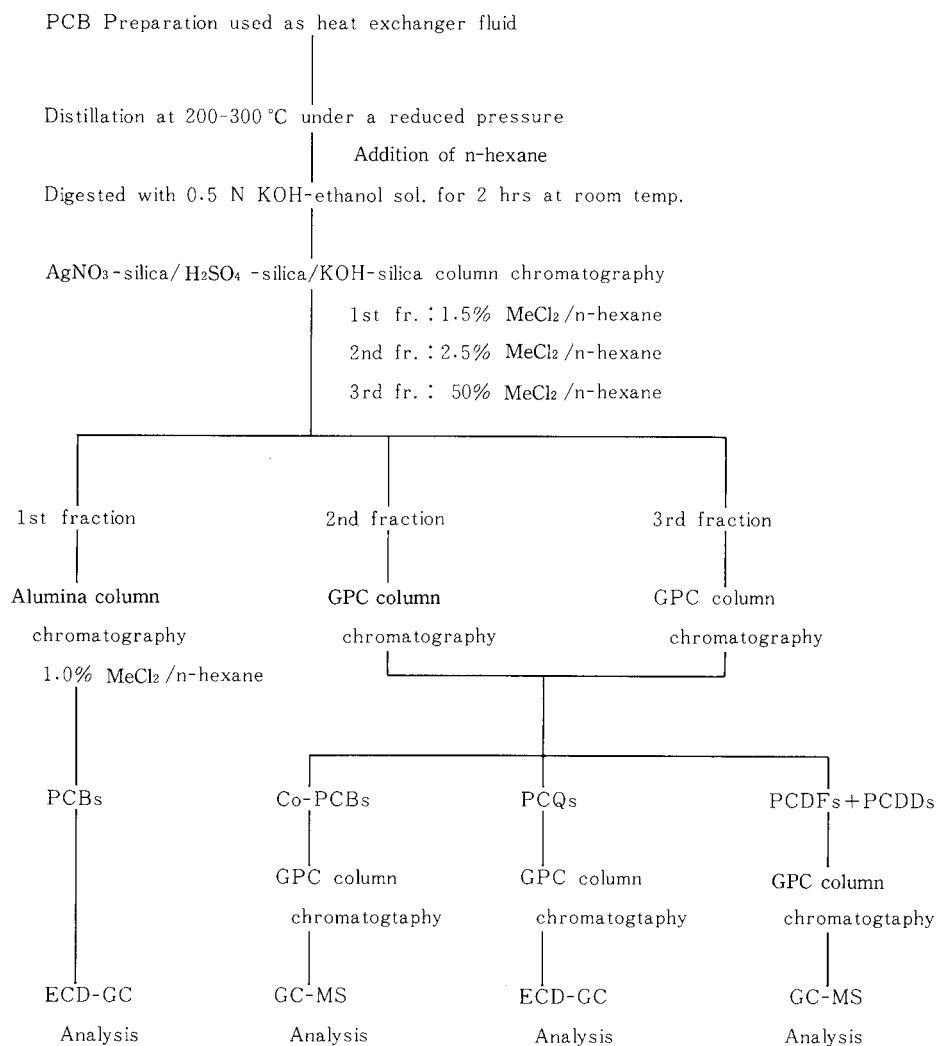


Fig. 1 Outline of analytical method

3. 分析機器

1) PCBs 定量用

⁶³Ni-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 mesh) を充填したカラム (2.1 m×2.6 mm i. d.) を用い、カラム温度 194°C, キャリヤーガス (N₂) 流量 30 ml で分析した。なお定量は、著者らの数値化法²⁴⁾ によった。

2) PCQs 定量用

PCBs 定量用と同種の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 mesh) を充填したカラム (0.5 m×2.6 mm i. d.) を用い、カラム温度 290°C, キャリヤーガス (N₂) 流量

30 ml で分析した。定量は、標準 PCQs の総面積と比較することにより行なった。

3) Co-PCBs 定量用

Hewlett・Packard 5890J ガスクロマトグラフ・JEOL SX102 質量分析計に Hewlett・Packard Ultra bond #1 キャピラリーカラム (25 m×0.31 mm i. d., 0.17 μm) を装着し、[M]⁺ と [M+2]⁺ (T₄CBs, [M+2]⁺ と [M+4]⁺ (P₅CBs と H₆CBs) の質量数において SIM (R: 1,000) で分析した。分析条件は次の通りである。カラム温度 120°C で保持時間 1 分, 120~180°C を 20°C/分, 180~260°C を 10°C/分および 260~300°C を 20°C/分で昇温, 注入口温度 260°C, セパレーター温度 260°C, イオン化電圧 70 eV 加速電圧

10 KV, イオン化電流 1,000 μ A, イオン化モード EI である。

4) PCDDs, PCDFs 定量用

Hewlett-Packard 5890A ガスロマトグラフ・VG 70-250S 質量分析計を用い, 高分解能(R: 9,000) SIM 法により行った。分析条件は, 既報⁹⁾の通りである。

4. 鶏胚投与実験

1) PCBs, PCQs, Co-PCBs および (PCDFs+PCDDs) 画分による生体影響評価

熱媒体使用済 PCB 製品から分離精製した PCBs, PCQs, Co-PCBs および (PCDFs+PCDDs) 画分の溶媒を完全に留去した後, ジオキサンに溶解し, 各画分ともに 3 倍希釈系列を作製した。各画分系列についてその 25 μ l を 37.5°C 保温の 16.5 日齢白色レグホン鶏胚の気室に注入した。各画分の投与量を Table 3 に示す。対照群はジオキサン 25 μ l のみ注入したものであり, 陽性対照群として強毒性の 2,3,7,8- T_4 CDD を投与した。なお, 各投与群ともに 1 群 5 匹の鶏胚を使用し, 3 回投与実験を行った。各画分注入後 37.5°C で 48 時間, 保温を続けた。

2) Co-PCBs 画分に含まれる成分の生物影響評価

後述するように Co-PCBs 画分中には 3 種類の Co-PCBs 成分以外に他の PCB 異性体が存在している。したがって, これら夾雑物による影響評価を目的とした, 3,4,3',4'- T_4 CB, 3,4,5,3',4'- P_5 CB, 3,4,5,3',4',5'- H_6 CB, Co-PCB 混合物 (Co-PCBs 画分中と同一の存在比で Co-PCB 成分を混合したもの) および Co-PCBs 画分をジオキサンに溶解し, 上記と同様な方法で鶏胚に投与した。なお, 1 群 3 匹の鶏胚を用いた。

3) 鶏胚肝ミクロソームの調製

各化合物投与 48 時間後に鶏胚肝臓を摘出, 冷 1.15% KCl 溶液で還流した後, 重量を測定した。実験 1) では 1 群 5 個の肝臓, 実験 2) では 1 群 3 個の肝臓を混合した後, Guengerich の方法⁹⁾に準じてミクロソーム画分を調製した。

4) 肝臓薬物代謝酵素活性などの測定ミクロソーム画分中のタンパク質の定量は Lowry らの方法¹³⁾に従って行った。Benzo(a)pyrene hydroxylase (AHH) および 7-Ethoxyresorufin deethylase (EROD) 活性測定は, それぞれ, Nebert and Gelboin¹⁴⁾ および Lee らの方法¹²⁾に準じた。

実験結果および考察

1. 熱媒体使用済 PCB 製品から分離精製した Co-PCBs および (PCDFs+PCDDs) 画分

Co-PCBs は PCBs の微量成分であり, 市販 PCB 製品であった Kanechlor や Aroclor 中では PCBs のわずか 0.03~0.81% にすぎない⁷⁾。また, PCBs は 209 種類もの多種類の異性体から構成されており, Co-PCBs と類似した極性を示す成分も多いものと推測される。したがって, Co-PCBs を他の PCB 異性体から完全に分離することは困難である。Tanabe et al.²³⁾ はアルカリ分解, 活性炭カラム精製および硫酸洗浄処理を組み合わせた分析法を開発し, Co-PCBs と (PCDDs+PCDFs) を混合のまま他の PCB 成分との分離を試みているが, Co-PCBs 画分には Co-PCB 成分以外に他の PCB 成分が含有されていた。今回, アルミナカラムおよび GPC カラムを用いて熱媒体使用済 PCB 製品から Co-PCBs の分離を試みたが, Fig. 2~4 に示すように Co-PCBs 画分には他の PCB 成分が少量存在していた。4 塩化物の場合, Co-PCB である 3,4,3',4'- T_4 CB が主成分であるが, このピークよりも前に他の成分が認められる (Fig. 2)。5 塩化物では, Co-PCB の 3,4,5,3',4'- P_5 CB は主成分ではなく, 他に 2 種類の 5 塩化 PCB 成分が存在している (Fig. 3)。同様なことは 6 塩化物についても認められた (Fig. 4)。Co-PCB 画分中には, 3,4,3',4'- T_4 CB, 3,4,5,3',4'- P_5 CB, 3,4,5,3',4',5'- H_6 CB それぞれ 92.0, 7.6 および 0.4% の割合で含まれており (Table 1), 3,4,3',4'- T_4 CB が主成分である。1968 年 2 月 9 日および 2 月 10 日製造日の原因油のもの¹⁰⁾と比べて 3,4,3',

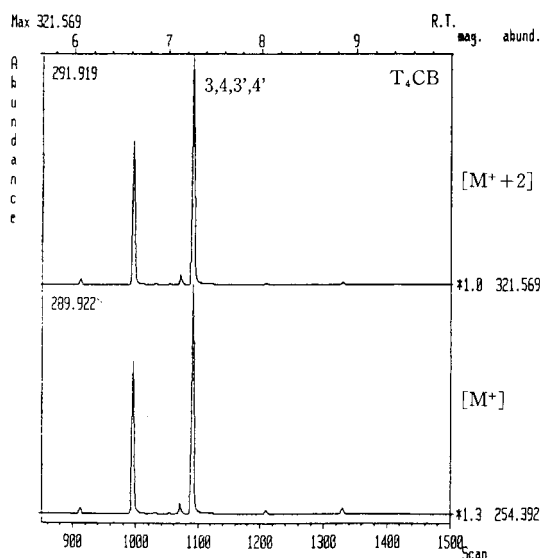


Fig. 2 GC-MS fragmentograms of T_4 CBs in purified Co-PCBs fraction from a PCB preparation used as heat exchanger fluid

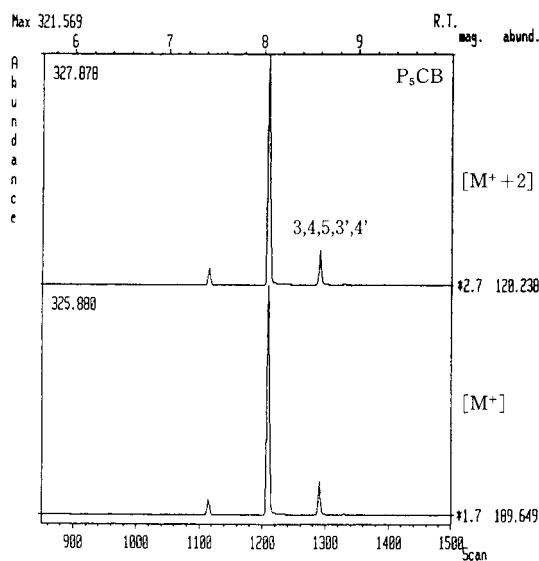


Fig. 3 GC-MS fragmentograms of P₅CBs in purified Co-PCBs fraction from a PCB preparation used as heat exchanger fluid

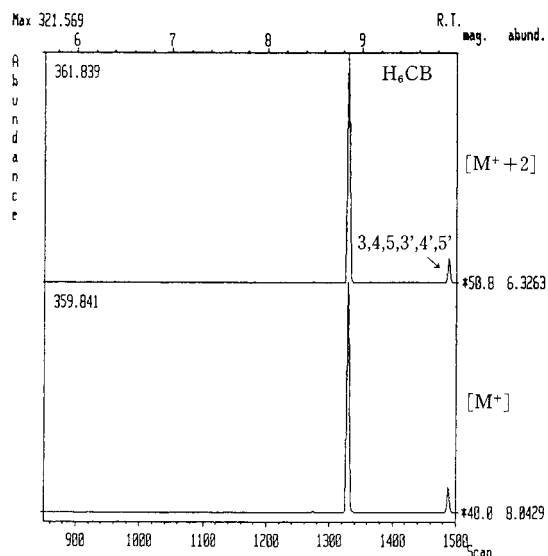


Fig. 4 GC-MS fragmentograms of H₆CBs in purified Co-PCBs Fraction from a PCB preparation used as heat exchanger fluid

Table 1 Congener ratios (%) of coplanar PCBs

Sample	T ₄ CB	P ₅ CB	H ₆ CB
Purified fraction	92.0	7.6	0.4
Yusho oil (2/9)	87.8	11.5	0.7
(2/10)	85.1	14.2	0.7

4'-T₄ CB の割合が若干高く, 3,4,5,3',4'-P₅ CB および 3,4,5,3',4',5'-H₆ CB が低い組成比のものであった。

Table 2 に (PCDFs+PCDDs) 画分および原因油中¹⁷⁾の PCDF, PCDD 同族体組成比を示す。PCDF の場合は, T₄ CDFs の組成比は原因油中のものと類似していたが, P₅ CDFs および O₈ CDF の割合が高く, 逆に, H₆ CDFs および H₇ CDFs が低いものであった。一方, PCDDs では, O₈ CDD の組成比はほぼ近似していたが, T₄ CDD~H₆ CDD の含有率が高く, 逆に H₇ CDDs が低いものであった。

2. PCBs, Co-PCBs, PCQs および (PCDFs+PCDDs) 画分の生体影響評価

われわれは, 種々の鶏胚肝臓薬物代謝酵素について数種の PCDD や PCDF 異性体を用いて, 生体影響評価に使用可能かどうかを検討してきた¹⁹⁾が NADPH-cytochrome P-450 reductase, 7-Ethoxycoumarin O-deethylase, NADPH oxidation enzyme, DT-diaphorase は, いずれもコントロール値が高く, また, 誘導酵素活性は, 最高でコントロール値の 4 倍以下であり, 適用可能な酵素とは考えられなかった。しかし, AHH や EROD の場合は, コントロール値も低く, また, 対照群の約 20 倍以上も誘導されることから使用可能であると判断した。一方, Safe ら²¹⁾²²⁾は PCDD, PCDF および PCB 異性体 28 種類によるラットの体重増加抑制や胸腺萎縮作用とラットの肝腫瘍 H-4-IIIE 細胞を用いた in vitro 実験における AHH および EROD 活性誘導能との間にきわめて有意の相関を報告するとともに, これらの酵素活性誘導能を指標として, PCDDs, PCDFs および PCBs などの生体影響評価が可能であると指摘している。Kannan ら²³⁾はもっとも強く AHH や EROD 活性を誘導する 2,3,7,8-TCDD の LC₅₀ 値に対する各種 PCDD, PCDF および PCB 異性体の相対 LC₅₀ 値 (2,3,7,8-TCDD 相当濃度) を算出し, これを用いて, 野生生物に残留する PCBs, PCDFs, PCDDs および各種 PCB 製品の毒性評価を行っている。

われわれは, 上記の事実に基づいて, 肝臓薬物代謝酵素活性を指標として原因油中に含まれる塩素化合物の影響評価を試みた。

Table 3 に各精製分離画分の AHH および EROD 活性誘導を示す。各画分における投与量 0 群は, 各画分精製に並行して行った試薬ブランク溶液を濃縮, 完全に溶媒を留去した後, ジオキサンに溶解し, 各画分の最高投与量と同じ希釈率にした後に鶏胚に投与したものである。この表に示すように, 各画分における試

Table 2 Congener ratios (%) of PCDFs and PCDDs

Sample	T ₄ CDFs	P ₅ CDFs	H ₆ CDFs	H ₇ CDFs	O ₈ CDF
Purified fraction	21.1	41.6	18.3	4.2	3.6
Yusho oil (2/9)	23.8	31.5	34.7	9.6	0.5
(2/10)	22.7	32.0	32.8	11.7	0.8
Sample	T ₄ CDDs	P ₅ CDDs	H ₆ CDDs	H ₇ CDDs	O ₈ CDD
Purified fraction	2.5	26.2	56.3	9.3	5.3
Yusho oil (2/9)	1.0	11.1	48.1	34.1	5.7
(2/10)	0.9	9.9	38.9	43.5	7.0

Table 3 Effects on AHH and EROD activities in chicken embryo liver

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{egg}$)	AHH (nmoles/min/mg protein)	EROD (nmoles/min/mg protein)
Control	0	0.062 $\pm$ 0.014	0.024 $\pm$ 0.005
	0	0.075 $\pm$ 0.027	0.024 $\pm$ 0.011
	3 $\times 10^{-3}$	0.054 $\pm$ 0.014	0.033 $\pm$ 0.015
	8 $\times 10^{-3}$	0.068 $\pm$ 0.012	0.071 $\pm$ 0.015
	23 $\times 10^{-3}$	0.31 $\pm$ 0.27	0.46 $\pm$ 0.23
	70 $\times 10^{-3}$	0.74 $\pm$ 0.018	1.9 $\pm$ 0.032
	210 $\times 10^{-3}$	1.3 $\pm$ 0.092	4.0 $\pm$ 0.31
PCDFs+PCDDs	0	0.066 $\pm$ 0.023	0.026 $\pm$ 0.006
	23 $\times 10^{-3}$	0.070 $\pm$ 0.013	0.043 $\pm$ 0.003
	69 $\times 10^{-3}$	0.082 $\pm$ 0.019	0.076 $\pm$ 0.018
	208 $\times 10^{-3}$	0.21 $\pm$ 0.034	0.46 $\pm$ 0.21
	625 $\times 10^{-3}$	0.95 $\pm$ 0.034	2.6 $\pm$ 0.13
	1,875 $\times 10^{-3}$	1.3 $\pm$ 0.22	4.2 $\pm$ 0.87
	0	0.062 $\pm$ 0.014	0.024 $\pm$ 0.005
Co-PCBs	124	0.057 $\pm$ 0.022	0.043 $\pm$ 0.011
	370	0.055 $\pm$ 0.011	0.055 $\pm$ 0.016
	1,111	0.054 $\pm$ 0.011	0.093 $\pm$ 0.005
	3,333	0.15 $\pm$ 0.055	0.44 $\pm$ 0.19
	10,000	0.72 $\pm$ 0.30	1.80 $\pm$ 0.97
	0	0.062 $\pm$ 0.014	0.024 $\pm$ 0.005
	124	0.047 $\pm$ 0.006	0.028 $\pm$ 0.010
PCBs	370	0.053 $\pm$ 0.005	0.032 $\pm$ 0.004
	1,111	0.061 $\pm$ 0.023	0.037 $\pm$ 0.009
	3,333	0.055 $\pm$ 0.012	0.028 $\pm$ 0.007
	10,000	0.050 $\pm$ 0.010	0.017 $\pm$ 0.003
	0	0.062 $\pm$ 0.014	0.024 $\pm$ 0.005
	124	0.047 $\pm$ 0.006	0.028 $\pm$ 0.010
	370	0.053 $\pm$ 0.005	0.032 $\pm$ 0.004
PCQs	1,111	0.061 $\pm$ 0.023	0.037 $\pm$ 0.009
	3,333	0.055 $\pm$ 0.012	0.028 $\pm$ 0.007
	10,000	0.050 $\pm$ 0.010	0.017 $\pm$ 0.003

薬ブランクはジオキサンのみ投与した対照群の酵素誘導能とほぼ等しい。この結果から、各化合物の分離精製過程において、大量に使用した有機溶媒およびカラム充填剤などから由来する AHH や EROD 活性上昇物質が各画分に混入していないことが判明した。

Table 3 に示すように、(PCDFs+PCDDs), Co-PCBs, PCBs 画分投与群における AHH および EROD 活性はいずれも、dose response を示している。

AHH と EROD 活性変動は各投与群において密接に正相関しており、相関係数は (PCDFs+PCDDs) 投与群で 0.994, Co-PCBs 投与群 0.997 および PCBs 投与群で 0.995 である。このような事実は他の研究結果でも確認されている²⁾¹⁴⁾²¹⁾²²⁾。一方、今回の結果から 1) 対照群におけるコントロール値は AHH よりも EROD 測定法で明らかに低いこと、および 2) 有意に酵素活性を増加させる最低投与量も EROD の方

が低いこと、および 3) 最大酵素誘導量も AHH 測定法の 1.3 nmoles/min/mg protein よりも EROD の 4.2 nmoles/min/mg protein が大きいことなどが認められた。したがって、生体影響評価指標としては、AHH よりも EROD 活性がより適しているものと考えられる。

Table 3 から、AHH および EROD 活性誘導能は各画分間で大きな相違が認められる。PCQs 画分の場合、10,000 $\mu\text{g}/\text{egg}$ の大量投与にもかかわらず、AHH 活性誘導は観察されなかった。一方鋭敏な EROD 測定法では 370 および 1,111 $\mu\text{g}/\text{egg}$ で酵素活性の増加傾向が確認されたが、さらに高濃度投与群では、逆に低下していた。鶏胚の気室投与の場合、化合物の鶏胚取込量は、投与試料の粘稠性に大きく左右されるものと考えられるために、卵殻膜中の化合物残留量から鶏胚への取込量を調べた結果、PCBs の場合 124~1,111 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ ジオキサン (4,960~44,440 ppm 相当) 投与群では 80~84% であったが、それよりも高投与の 10,000 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ ジオキサン (40 万 ppm) では、58% に低下している。一方、PCQs の場合、PCBs よりも高分子量であるために、その傾向はさらに著しくなる。124~1,111 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ ジオキサン投与群では、75~85% の吸収率で PCBs の場合と同程度であったが、3,333 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ ジオキサン (133,320 ppm) では 56%、10,000 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ ジオキサン投与ではわずか 11.2% の取込率に減少していた。したがって、上述した PCQs 高濃度投与群における EROD 活性の低下傾向は、鶏胚への取込量を反映し

た結果であった。以上の事実から、化合物によっても異なるが、鶏胚気室投与試料濃度は約 5 万 ppm 以下にする必要がある結論が得られた。

各画分の生体影響力を比較するために、AHH の場合は対照群の 7 倍、EROD は 50 倍誘導するために必要な投与量を算出し、Table 4 に示す。AHH および EROD における各化合物の量はきわめて近似した値になり、(PCDFs+PCDDs) 画分がもっとも少量で 0.044~0.049 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 、次に、Co-PCBs で 0.31~0.39 $\mu\text{g}/\text{egg}$ である。PCBs になると 7,300~7,400 $\mu\text{g}/\text{egg}$ に急増し、PCQs はさらに多量を必要としていた。

次に、Table 4 の AHH および EROD の平均値を用いて、各化合物の酵素誘導能を比較すると、(PCDFs+PCDDs) 画分の誘導能を 100 とした場合、Co-PCBs、PCBs および PCQs はそれぞれ 13.4、0.0006 および <0.0004 となり (Table 5)、圧倒的に (PCDFs+PCDDs) 画分の作用力が強い。1968 年 2 月 9 日および 2 月 10 日製造日の原因油中には、各種有機塩素化合物が Table 6 に示す濃度で含まれてい

Table 5 Relative inducibility for liver microsomal enzymes by each purified fraction

PCDFs+PCDDs	Co-PCBs	PCBs	PCQs
100	13.4	0.0006	<0.0004

Table 4 Inducibilities for liver microsomal enzymes by each purified fraction from PCB preparation used as heat exchanger fluid

Assay	Amount (μg)			
	PCDFs+PCDDs	Co-PCBs	PCBs	PCQs
AHH	0.044 ^{a)}	0.31 ^{a)}	7,300 ^{a)}	>10,000 ^{a)}
EROD	0.049 ^{b)}	0.39 ^{b)}	7,400 ^{b)}	>10,000 ^{b)}

^{a)} Amounts required 7 times as much induction as control

^{b)} Amounts required 50 times as much induction as control

Table 6 Concentrations (ppm) of several compounds in Yusho causal oils

Sample	PCDFs	PCDDs	Co-PCBs	PCBs	PCQs
Feb. 9 in 1968	1.60	0.140	1.48	150	490
Feb. 10 in 1968	1.30	0.130	1.41	160	536
Average	1.45	0.135	1.45	155	513

る²⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。この含有量と Table 5 に示す相対酵素活性誘導能から、油症発症における各化合物の相対作用力を算出すると、Table 7 に記載する値が得られた。この表に示すように、従来われわれが行ってきた研究結果⁴⁾⁵⁾⁶⁾¹¹⁾と同様に、(PCDFs+PCDDs)画分が油症発症における主因物質であることが確認された。しかし、新検出物質の Co-PCBs も (PCDFs+PCDDs)画分の 13.2% も油症発症に寄与していたことが明らかとなった。Co-PCBs は原因油中では PCB 総量のわずか 1.4~1.5%¹⁷⁾にすぎないが、総 PCBs による AHH および EROD 活性誘導能は、主として Co-PCBs によるものである。

一方、Table 7 に示すように油症発症因子としての PCBs 画分の作用力 (PCDFs+PCDDs) 画分のわずか 1/1,667 倍にすぎない結果であった。この値は、われわれが行った既報のラットやサルの実験⁴⁾⁵⁾⁶⁾¹¹⁾における PCBs (精製過程において Co-PCB 成分がほぼ完全に除去されているものと推測している)の PCDFs に対する生体影響作用が数百分の 1~数千分の 1 にほぼ一致している。さらに、油症患者体内に残留している PCB (Co-PCBs 成分を含まない) および PCDF 成分と同比率の混合標準品をラットに投与した場合、PCB 混合物による胸腺萎縮作用および体重増加抑制作用は PCDF 混合物の 1/2210 倍および 1/900 倍であり¹⁾、この結果とも比較的近似している。

Table 7 Relative inducibility for liver microsomal enzymes by each compound in Yoshio causal oil

PCDFs+ PCDDs	Co-PCBs	PCBs	PCQs
100	13.2	0.06	<0.12

以上の事実から、今回行った AHH や EROD 活性を指標とする毒性評価法はかなり妥当性が高いものと考えられる。

3. Co-PCBs 画分中の Co-PCB 成分による EROD 活性誘導能

Fig. 2~4 に示したように、今回熱媒体使用済 PCB 製品から分離した Co-PCBs 画分には、Co-PCB 成分である 3,4,3',4'-T₄ CB, 3,4,5,3',4'-P₅ CB および 3,4,5,3',4',5'-H₆ CB 以外に他の種類の PCB 成分が混在していた。したがって、Co-PCBs 画分による酵素誘導能が主として Co-PCB 成分によるものか、あるいは他の PCB 成分にも大きく影響されているのかを検討した。

Co-PCB 標準品、Co-PCBs 画分および Co-PCB 画分中の Co-PCB 成分と同比率の Co-PCB 標準混合物による EROD 活性の用量反応曲線を Fig. 5 に示す。3 種類の Co-PCB 標準品による EROD 活性誘導能はかなり相違しており、3,4,5,3',4'-P₅ CB がもっとも強く、次に 3,4,3',4'-T₄ CB, もっとも弱いものが 3,4,5,3',4',5'-H₆ CB であった。3,4,5,3',4'-P₅ CB, 3,4,3',4'-T₄ CB および 3,4,5,3',4',5'-H₆ CB の ED₅₀ 値は、46.4 ng, 792 ng, 1,970 ng であり、その相対誘導能は 3,4,5,3',4'-P₅ CB (100) ≧ 3,4,3',4'-T₄ CB (5.9) > 3,4,5,3',4',5'-H₆ CB (2.4) となる。[() 内の数字は相対誘導能を示す] (Table 8)。Table 8 に示すように鶏胚の場合、ラット肝臓癌細胞を用いて行なわれた結果²¹⁾²²⁾よりも、3,4,3',4'-T₄ CB および 3,4,5,3',4',5'-H₆ CB は、3,4,5,3',4'-P₅ CB に対して、相対的に強い EROD 誘導能を示し、さらに 3,4,3',4'-T₄ CB と 3,4,5,3',4',5'-H₆ CB の誘導力の強さは逆転していた。しかし、Safe ら²¹⁾²²⁾や Poland ら²⁰⁾による AHH 活性測定においては、3,4,3',4'-T₄ CB は 3,4,5,3',4',5'-H₆ CB

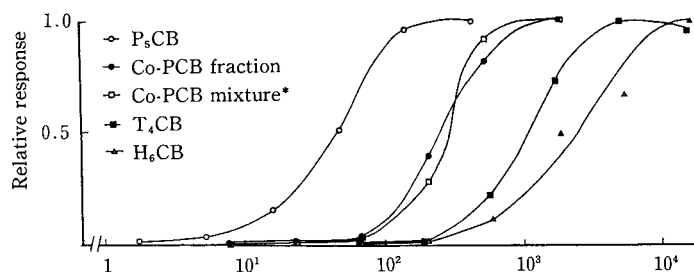


Fig. 5 Log dose-response curves for induction of EROD by coplanar PCB standards and coplanar PCB fraction

*: containing Co-PCB composition identical to that in the Co-PCB fraction

Table 8 Relative potency of induction for EROD and AHH

Compound	EROD		AHH	
	This work	Safe et al. ^{21,22)}	Safe et al. ^{21,22)}	Poland et al. ²⁰⁾
	Chick embryo	Rat hepatoma E-4-II cell	Rat hepatoma E-4-II cell	Chick embryo
3,4,5,3',4'-P ₅ CB	100	100	100	
3,4,3',4'-T ₄ CB	5.9	0.3	0.7	1*
3,4,5,3',4',5'-H ₆ CB	2.4	1	0.4	0.89*

*: Relative potency of 3,4,5,3',4',5'-H₆CB to 3,4,3',4'-T₄CB (=1)

よりも強い誘導を示し (Table 8), 上記の EROD の結果と一致することから, われわれの結果の妥当性は高いものと考えられる. Fig. 5 に示すように, Co-PCB 標準混合物と Co-PCB 画分は類似した EROD 活性誘導能を示しており, その ED₅₀ 値はそれぞれ 275 ng および 250 ng である. この結果から, Co-PCB 画分による EROD 活性誘導は, 夾雑物に影響されず, 主として, Co-PCB 成分によってもたらされたものであることが判明した.

次に, Co-PCB 成分の単独投与と混合投与による EROD 活性に及ぼす影響について考察すると上述のように, Co-PCB 混合物による ED₅₀ 値は 275 ng であり, この時の EROD 値は 2.21 nmoles/min/mg protein である. この場合, 3,4,3',4'-T₄CB, 3,4,5,3',4'-P₅CB および 3,4,5,3',4',5'-H₆CB がそれぞれ 235 ng, 20.9 ng および 1.10 ng の割合で混合されている. これらをそれぞれ単独投与した場合に誘導される EROD 活性をそれぞれの用量反応曲線から算出すると 0.153, 0.918 および <0.001 nmoles/min/mg protein, その総和は 1.07 nmoles/min/mg protein となる. したがって, 混合投与した場合 2.1 倍高い酵素誘導値が得られた. Safe ら²²⁾ は, 油症患者体内残留 PCDF 成分 (2,3,7,8-T₄ CDF: 1,2,4,7,8-P₅ CDF: 1,2,3,7,8-P₅ CDF: 2,3,4,7,8-P₅ CDF: 1,2,3,4,7,8-H₆ CDF=7.4: 6.1: 19.0: 29.4: 38.1) の EROD 活性測定における EC₅₀ 値は, 1.02×10^{-10} M であると報告している.

彼らのデータから各化合物相対誘導能を算出し, それに基づいて計算した時の EC₅₀ 値は 2.72×10^{-10} となる. この場合も PCDF 混合物は, 2.7 倍低い濃度で, 同程度の EROD を誘導する結果が得られた. また, AHH の場合も, 混合物の EC₅₀ 値は, 単独投与から算出したものより 1.3 倍低い数値であった. 以上のことから, 混合投与の場合は, 単独投与から算出し

た酵素誘導量よりも高くなる傾向があった. その原因については現在のところ不明であり, 今後検討する必要があるものと考えられる.

総 括

1. 油症原因油中に含まれる PCBs, Co-PCBs, PCQs, PCDFs および PCDDs と類似のものを熱媒体使用済 PCB 製品から作製し, 鶏肝臓薬物代謝酵素である AHH および EROD 活性誘導能を調べた. その結果, 対照群の 7 倍の AHH 活性を誘導する (PCDFs+PCDDs), Co-PCBs, PCBs および PCQs 画分の投与量は 0.044, 0.31, 7,300 および >10,000 μg, また, 対照群の 50 倍の EROD を誘導する投与量は, それぞれ 0.049, 0.39, 7,400 および >10,000 μg であった. これらの値に基づく, 相対酵素誘導能は (PCDFs+PCDDs): Co-PCBs: PCBs: PCQs=100: 13.4: 0.0006: <0.0004 であり, 両酵素は (PCDFs+PCDDs) および Co-PCBs 画分により強く誘導された.

2. 上記の相対酵素誘導能に, 1968 年 2 月 9 日および 10 日製造日の原因油中分の各化合物濃度を加味した油症発症における相対影響力は, (PCDFs+PCDDs): Co-PCBs: PCBs: PCQs=100: 13.2: 0.06: <0.12 となり, 従来の報告と同様に油症の発症因子は PCDFs である結果が得られた. しかし, 新検出物質の Co-PCBs も油症発症にかなり影響を及ぼしていたことが明らかとなった.

3. PCBs や PCQs の高濃度投与群では, 鶏胚への取込率が低くなり, 酵素誘導量は鶏胚取込量を反映していた.

4. Co-PCBs 画分中には Co-PCB 成分の 3,4,3',4'-T₄CB, 3,4,5,3',4'-P₅CB および 3,4,5,3',4',5'-H₆CB, 以外に他の PCB 成分も含まれていたが, この画分による酵素誘導能は主として, Co-PCB 成分によるもの

であった。また、混合投与の場合、単独投与の結果に基づいて算出した酵素誘導量の総和よりも数値が高くなる傾向が認められた。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、酵素活性測定のご指導いただいた大阪府立公衆衛生研究所、島田力博士、および Co-PCB 標準品を譲渡していただきました九州大学吉村英敏博士に深謝致します。

文 献

- 1) Bandiera S, Farrell K, Mason G, Kelly M, Romkes M, Bannister R and Safe S: Comparative toxicities of the polychlorinated dibenzofuran (PCDF) and biphenyl (PCB) mixtures which persist in Yusho victims. *Chemosphere* 13: 507-512, 1984.
- 2) Bannister R and Safe S: The effects of receptor antagonisms on the AHH induction activity of 2,3,7,8-TCDD in C57BC/6 and DBA/2 mice: 1,3,6,8-Tetrachlorodibenzofuran. *Chemosphere* 16: 1739-1742, 1987.
- 3) Guengerich FP: Microsomal enzymes involved in toxicology-analysis and separation. In Hyes W (ed). *Principles and Methods of Toxicology*. pp. 609-634. Raven Press. New York. 1982.
- 4) 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. 大阪府立公衆衛生研究所報. 食品衛生編 12: 27-37, 1981.
- 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. *Toxicology* 24: 123-139, 1982.
- 6) Hori S, Obana H, Tanaka R, Kashimoto T and Takamatsu M: Distribution and lethal dose of Yusho PCDFs in cynomolgus monkey. *Eiseikagaku* 31: 45, 1985.
- 7) Kannan N, Tanabe S, Wakimoto T and Tatsukawa R: Coplanar polychlorinated biphenyls in Aroclor and Kanechlor mixtures. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70: 451-454, 1987.
- 8) Kannan N, Tanabe S and Tatsukawa R: Potentially hazardous residue of nonortho chlorine substituted coplanar PCBs in human adipose tissue. *Arch. Environ. Health* 43: 11-14, 1988.
- 9) Kannan N, Tanabe S and Tatsukawa R: Toxic potential of non-ortho and mono-ortho coplanar PCBs in commercial preparations: "2,3,7,8-TCDD toxicity equivalent factors approach". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 267-276, 1988.
- 10) 榎本 隆, 宮田秀明, 高山幸司, 尾垣淳治: 高分解能 MS-SIM 法による油症患者組織および原因油中の PCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs, 福岡医誌 78: 325-336, 1987.
- 11) 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.
- 12) Lee Y-2, O'Brien PJ, Payne JF and Rahmtula AD: Toxicity of petroleum crude oils and their effect on xenobiotic metabolizing enzyme activities in the chicken embryo. *OVO. Environ. Res.* 39: 153-163, 1986.
- 13) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 14) Masson G, Denomme MA, Safe L and Safe S: Polybrominated and chlorinated dibenzo-p-dioxins: Synthesis biologic and toxic effects and structure-activity relationships. *Chemosphere* 16: 1727-1731, 1987.
- 15) Miyata H, Nakamura A and Kunita N: Detection and determination of polychlorodibenzofurans in normal human tissues and Kanemi rice oils caused "Kanemi Yusho". *J. Food Hyg. Soc Japan* 18: 260-265, 1977.
- 16) 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: 417-425, 1978.
- 17) Miyata H, Takayama K, Ogaki j, Mimura M, Kashimoto T, Yamada T: Levels of PCDDs, coplanar PCBs and PCDFs in patients with Yusho disease and in the Yusho oil. *Chemosphere* in press.
- 18) Nebert DW and Gelboin HV: Substrate-inducible microsomal cell culture. *J. Biol. Chem.* 243: 6242-6249, 1968.
- 19) 尾垣淳治, 高山幸司, 味村真弓, 宮田秀明, 榎本 隆: 焼却飛灰の生体影響評価. 環境科学シンポジウム 1987 (東京), 講演要旨集: 109, 1987.
- 20) Poland A, Greenlee W and Kende AS: Studies the mechanism of action of the chlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds. In William J, Nicholson J and Moore JA (eds). *Health Effects of Halogenated Aromatic Hydrocarbons*. pp. 214-230, New York Academy Sciences. New York. 1979.
- 21) Safe S: Comparative toxicology and mechanism action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26: 371-399, 1986.
- 22) Safe S: Determination of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors (TEFs). Support for the use

of in vitro AHH induction assay. Chemosphere 16 : 791-802, 1987.

23) Tanabe S, Kannan N, Wakimoto T and Tatsukawa R : Method for the determination of three toxic non-orthochlorine substituted coplanar

PCBs in environmental samples at part-per-trillion levels. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 29 : 199-213, 1987.

24) 鵜川昌弘, 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.

The Effect of Chlorinated Chemicals on Porphyrin Metabolism — The Synergistic Effect with Chlorinated Chemicals and Low Concentrations of Griseofulvin —

Shigeo NONAKA, Taro OHGAMI, Kazunori YAMASHITA,
Hiroko IRIFUNE, Masahisa WATANABE, Naoko TSUKAZAKI,
Keiichi TANAKA and Hikotaro YOSHIDA
*Department of Dermatology, Nagasaki University, School of Medicine,
Nagasaki 852*

Abstract The synergistic effect of chlorinated chemicals and 0.1% griseofulvin on porphyrin metabolism was investigated. Feeds containing 0.1% 4-chloro-m-cresol, 0.1% cumarone or 0.25% trichloroacetic acid with or without 0.1% griseofulvin were given to dd-y strain mice respectively. The treatments were continued for 10 to 450 days, after which coproporphyrin and protoporphyrin in the erythrocytes and liver were analyzed. In the 0.1% griseofulvin alone group, protoporphyrin was induced in 6 of 55 dd-y strain mice, although the other 49 mice did not show any abnormal porphyrin metabolism and the severity of the protoporphyrin was mild in the 6 mice. In the 4-chloro-m-cresol group, a slight elevation of erythrocytic porphyrins was seen, but the difference was not statistically significant. Elevation of the hepatic porphyrins was not seen. Trichloroacetic acid and cumarone did not influence porphyrin metabolism, and also there was no synergistic effect of griseofulvin on porphyrinopathy. These results suggest that the three chemicals selected in this study are not capable of inducing porphyrinopathy.

Introduction

Chlorinated compounds such as hexachlorobenzene, benzene hexachloride, dichlorodiphenyltrichloroethane and dieldrin influence porphyrin metabolism¹⁾¹⁰⁾. It is a well-known fact that toxic porphyria was induced by hexachlorobenzene⁶⁾. Vos et al found that PCBs also possess a porphyrinogenic effect¹¹⁾¹²⁾. We confirmed that KC-400 affected the hepatic porphyrins³⁾. A high concentration of griseofulvin (GF) induces protoporphyrin in mice⁸⁾, but low concentrations induce the protoporphyrin in only part of the mice treated. Furthermore, a combination of certain chemicals and a low concentration of GF sometimes induces protoporphyrin although the chemical alone can not induce the disease⁹⁾. It is

speculated that the use of low concentrations of GF in addition to chemicals may be useful in elucidating the porphyrinopathy in chemicals. In this study, we investigated whether or not simple chlorinated compounds affect porphyrin metabolism when a low concentration of GF is added to each chemical.

Materials and Methods

1) Animals

One hundred and sixty-one dd-y strain mice weighing 20 to 30 grams were used in this study.

2) Chemicals

Griseofulvin (GF) was contributed from Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan. Cumarone, 4-chloro-m-cresol and trichloroacetic acid were purchased from Nacalai Tesque Inc. Kyoto. Japan.

3) Feed and drinking water

Normal feed was purchased from Oriental Yeast Co., Tokyo Japan. GF was mixed into the feed in a concentration of 0.1% by the company. 4-chloro-m-cresol, cumarone and trichloroacetic acid were dissolved in a drinking water in concentrations of 0.1%, 0.1% and 0.25% respectively. The mice were divided into 8 groups. Group A was a control without any treatment, while group B was treated with 0.1% GF, group C with 0.1% GF and 0.1% 4-chloro-m-cresol, group D with 0.1% 4-chloro-m-cresol, group E with 0.1% GF and 0.1% cumarone, group F with 0.1% cumarone, group G with 0.1% GF and trichloroacetic acid and group H with trichloroacetic acid.

4) Quantitative analysis of uroporphyrin (UP), coproporphyrin (CP) and protoporphyrin (PP) (Fig. 1)

Each mouse was anesthetized and sacrificed after treatment. Liver tissue and blood were taken as samples for the analysis of porphyrins.

The method for porphyrin analysis has been described in a previous report³⁾.

Results

The results are shown in Table 1. In normal mice, the mean liver/weight ratio was 5.31%. The hepatic UP could not be detected. The mean value of CP was $0.15 \mu\text{g/g}$ wet weight and PP was $0.39 \mu\text{g/g}$ wet weight. The mean value of erythrocytic CP was $5.50 \mu\text{g/l}$ packed cell volume (pcv), and PP was $48.83 \mu\text{g/dl pcv}$.

In group B (0.1% GF group), the mean liver/weight ratio was 5.55%. Hepatic UP was $0.56 \mu\text{g/g}$ wet weight, CP was $0.37 \mu\text{g/g}$ wet weight and PP was $2.29 \mu\text{g/g}$ wet weight. Six of 55 mice developed protoporphyria. The mean value of porphyrins in the mice of group B, except for the six mice with protoporphyria, was within normal limits. The mean value of erythrocytic CP was $52.14 \mu\text{g/dl pcv}$ and PP was $168.94 \mu\text{g/dl pcv}$. The six mice also showed a high level of erythrocytic PP. There

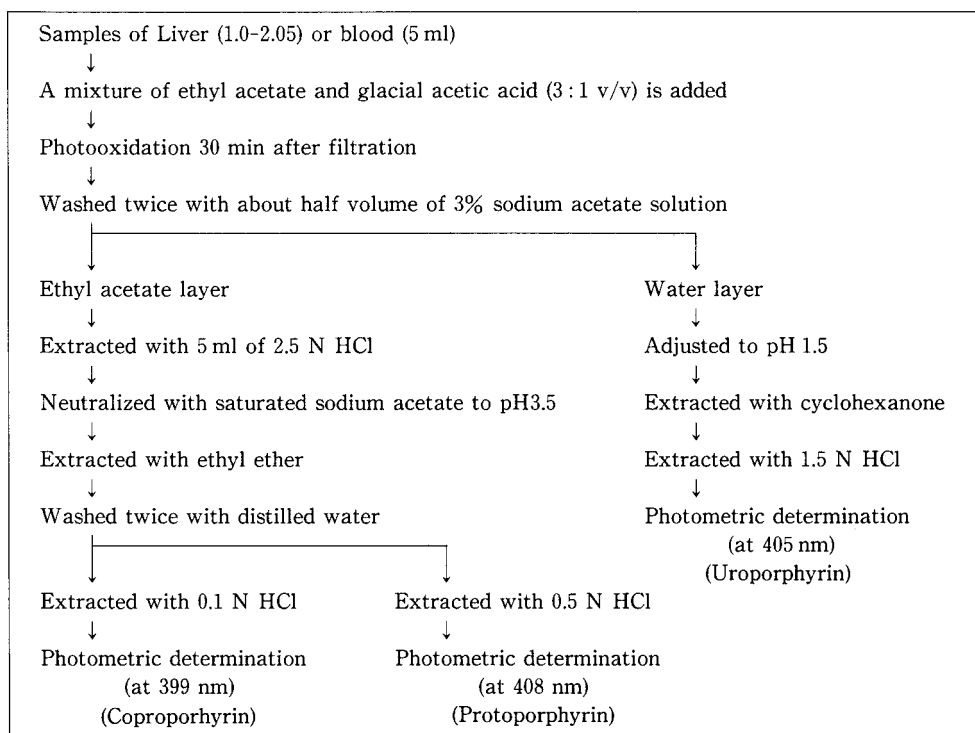


Fig. 1 Quantitative analysis of hepatic and erythrocyte porphyrins.

Table 1 Summary of hepatic and erythrocytic porphyrin levels (mean $\pm$ S. E.)

Group	Treatment	Number of mice	Duration of treatment (Days)	Body weight (g)	Liver weight (g)	Liver/Body weight ratio (%)	Hepatic porphyrins (μ g/g wet weight)			Erythrocytic porphyrins (μ g/dl pcv)	
							U P	C P	P P	C P	P P
A	(-)	54		34.11 $\pm$ 0.93	1.78 $\pm$ 0.04	5.31 $\pm$ 0.19	trace	0.15 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.03	5.50 $\pm$ 0.17	48.83 $\pm$ 2.68
B	0.1% griseofulvin	55	61-450	37.92 $\pm$ 1.10	2.08 $\pm$ 0.06	5.55 $\pm$ 0.14	0.56* $\pm$ 0.03	0.37* $\pm$ 0.03	2.29** $\pm$ 0.90	52.14 $\pm$ 3.67	168.94** $\pm$ 28.12
C	0.1% griseofulvin	10	38-151	43.82 $\pm$	2.26 $\pm$	5.27 $\pm$	0.29 $\pm$	0.33 $\pm$	0.42 $\pm$	46.17 $\pm$	370.35 $\pm$
	0.1% 4-chloro-m-cresol			4.33 $\pm$	0.18 $\pm$	0.22 $\pm$	0.02 $\pm$	0.02 $\pm$	0.03 $\pm$	3.77 $\pm$	215.33 $\pm$
D	0.1% 4-chloro-m-cresol	5	70-100	36.28 $\pm$ 1.35	1.78 $\pm$ 0.09	4.88 $\pm$ 0.14	trace	0.25** $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.01	62.72 $\pm$ 4.34	136.41* $\pm$ 6.62
E	0.1% griseofulvin	5	72-100	30.80 $\pm$	2.04 $\pm$	6.82** $\pm$	trace	0.17 $\pm$	0.34 $\pm$	8.85 $\pm$	114.66 $\pm$
	0.1% cumarone			3.22 $\pm$	0.17 $\pm$	0.84 $\pm$		0.01 $\pm$	0.04 $\pm$	1.00 $\pm$	11.47 $\pm$
F	0.1% cumarone	22	91-240	43.97 $\pm$ 2.03	2.37 $\pm$ 0.19	5.32 $\pm$ 0.20	trace	0.44** $\pm$ 0.06	0.79** $\pm$ 0.12	62.19 $\pm$ 5.54	126.56* $\pm$ 12.60
G	0.1% griseofulvin	5	10- 80	37.66 $\pm$	2.37 $\pm$	6.02 $\pm$	0.01 $\pm$	0.09 $\pm$	0.53 $\pm$	4.23 $\pm$	50.63 $\pm$
	0.25% trichloroacetic acid			5.04 $\pm$	0.50 $\pm$	0.60 $\pm$	0.01 $\pm$	0.02 $\pm$	0.02 $\pm$	0.44 $\pm$	8.55 $\pm$
H	0.25% trichloroacetic acid	5	10- 80	60.06 $\pm$	2.50 $\pm$	4.18* $\pm$	0.04 $\pm$	0.06 $\pm$	0.43 $\pm$	6.39 $\pm$	44.62 $\pm$
				3.18 $\pm$	0.15 $\pm$	0.18 $\pm$	0.01 $\pm$	0.01 $\pm$	0.07 $\pm$	1.16 $\pm$	2.64 $\pm$

Abbreviations : UP=uroporphyrin, CP=coproporphyrin, PP=protoporphyrin

PCV=packed cell volume

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$

was no difference between the 49 mice and the control.

In group C (0.1% GF and 0.1% 4-chloro-m-cresol), the mean liver/body weight ratio was 5.27 %. The mean value of hepatic UP was 0.29 μ g/g wet weight, CP was 0.33 μ g/g wet weight and PP was 0.42 μ g/g wet weight. There was no difference in liver/body weight ratio or hepatic porphyrins between group B and C. The mean value of erythrocytic CP was 46.17 μ

g/dl pcv and PP was 370.35 μ g/dl pcv. There was a high level of erythrocytic PP in group C.

In group D (0.1% 4-chloro-m-cresol), the mean liver/body weight ratio was 4.88%. Only trace amounts of hepatic UP were detected, but the mean value of CP was 0.25 μ g/g wet weight, and PP was 0.43 μ g/g wet weight. The mean value of erythrocytic CP was 62.72 μ g/dl pcv and PP was 136.41 μ g/dl pcv. There was no difference in hepatic porphyrins between group

C and D, but a slight elevation of erythrocytic PP was seen in group D.

In group E (0.1% GF and 0.1% cumarone), the mean liver/body weight ratio was 6.82%. The hepatic UP was only barely detectable, but the mean value of CP was $0.17 \mu\text{g/g}$ wet weight, and PP was $0.34 \mu\text{g/g}$ wet weight. The mean value of erythrocytic CP was $8.85 \mu\text{g/dl pcv}$, and PP was $114.66 \mu\text{g/dl pcv}$. There was no difference of liver/body weight ratio or hepatic porphyrins between group A and E.

In group F (0.1% cumarone), the mean liver/body weight ratio was 5.32%. The hepatic UP was detectable, the mean value of CP was $0.44 \mu\text{g/g}$ wet weight, and PP was $0.79 \mu\text{g/g}$ wet weight. The mean value of erythrocytic CP was $62.19 \mu\text{g/dl pcv}$, and PP was $126.56 \mu\text{g/dl pcv}$. There was a slight elevation of liver/body weight ratio in the F group when compared with the control group. There was no difference in the hepatic porphyrins, but a slight elevation in the erythrocytic porphyrins was seen in group F.

In group G (0.1% GF and 0.25% trichloroacetic acid), the mean liver/body weight ratio was 6.02%. The mean value of hepatic UP was $0.01 \mu\text{g/g}$ wet weight, CP was $0.09 \mu\text{g/g}$ wet weight and PP was $0.53 \mu\text{g/g}$ wet weight. The mean value of erythrocytic CP was $4.23 \mu\text{g/dl pcv}$ and PP was $50.63 \mu\text{g/dl PCV}$. There was no difference in liver/body weight ratio, hepatic porphyrins or erythrocytic porphyrins between group A and G.

In group H (0.25% trichloroacetic acid), the mean liver/body weight ratio was 4.18%. The mean value of hepatic UP was $0.04 \mu\text{g/g}$ wet weight, CP was $0.06 \mu\text{g/g}$ wet weight, and PP was $0.43 \mu\text{g/g}$ wet weight. The mean value of erythrocytic CP was $6.39 \mu\text{g/dl pcv}$ and PP was $44.62 \mu\text{g/dl pcv}$. Slight swelling of the liver was seen, but there was no abnormality in porphyrin metabolism among the mice in this group.

To summarize these results (Fig. 2 and 3), 0.1%GF induced protoporphyria in 6 of 55 dd-y strain mice, although the other 49 mice showed

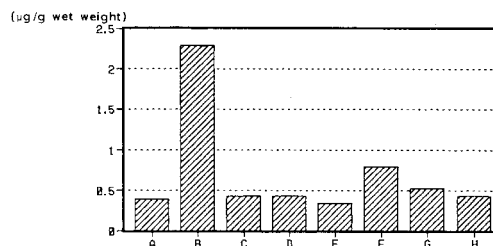


Fig. 2 The mean value of hepatic PP
A: Control, B: 0.1% GF, C: 0.1% GF+0.1% 4-chloro-m-cresol
D: 0.1% 4-chloro-m-cresol, E: 0.1% GF+0.1% cumarone
F: 0.1% cumarone, G: 0.1% GF+0.25% trichloroacetic acid,
H: 0.25% trichloroacetic acid

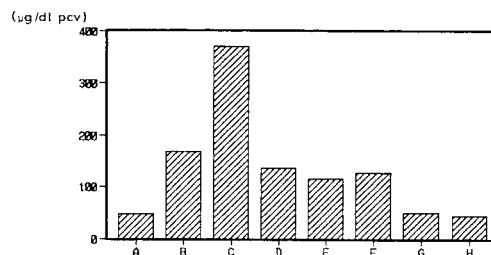


Fig. 3 The mean value of erythrocytic PP
A: Control, B: 0.1% GF, C: 0.1% GF+0.1% 4-chloro-m-cresol
D: 0.1% 4-chloro-m-cresol, E: 0.1% GF+0.1% cumarone
F: 0.1% cumarone, G: 0.1% GF+0.25% trichloroacetic acid,
H: 0.25% trichloroacetic acid

normal porphyrin metabolism. In the 4-chloro-m-cresol group, a slight elevation of erythrocytic porphyrins was seen, but the difference was not statistically significant. Elevation of hepatic porphyrins was not seen. Trichloroacetic acid and cumarone did not influence porphyrin metabolism, and there was also no synergistic effect of griseofulvin on porphyrinopathy.

Discussion

The ingestion of large amounts of griseofulvin induces protoporphyria in mice^{1,3,2)}. Enzymatic abnormality is a decrease of hepatic heme synthetase, resulting in an accumulation of PP in the liver⁴⁾. When various

concentrations of griseofulvin were given to mice, a high degree of metabolic abnormality was seen in all of the GF-0.5% and 1.0% groups, while similar abnormalities were seen in only a few mice of the GF-0.1% group. The most of the mice in the GF-0.1% group were within normal limits despite long exposure to GF⁸⁾. It is ideal, therefore to use a GF concentration of 0.1% to observe the initial or fine changes in GF-induced protoporphyria in mice.

To investigate the influence of various chemicals on porphyrin metabolism, iron, ethyl alcohol, estrogen and polychlorinated biphenyls (PCBs) were given to the mice with and without 0.1% GF. The severity of abnormal porphyrin metabolism were greater in the group treated with both chemicals and 0.1% GF than that in the 0.1% GF-alone and chemicals-alone groups⁹⁾. In this study, three chlorinated chemicals (4-chloro-m-cresol, cumarone and trichloroacetic acid) about which there have been no previous reports of porphyrinopathy, were selected for an investigation of synergistic effects.

4-chloro-m-cresol induced a slight elevation of erythrocytic porphyrins, but it was not increased by the addition of 0.1% GF. Trichloroacetic acid and cumarone did not induce any abnormality in porphyrin metabolism, nor did the addition of 0.1% GF to these chemicals. Therefore, the three chemicals selected in this study do not seem to effect porphyrin metabolism as much as chemicals like PCB, estrogen, ethyl alcohol and iron, which induced severe porphyrinopathy by the addition of 0.1% GF. However, it is not clear whether the elevation of erythrocytic porphyrins, especially the elevation of PP, by 4-chloro-m-cresol occurred as a primary porphyrinopathic effect or as a secondary effect due to erythropoietic abnormalities. The duration of our study was not long enough for the investigation of porphyrinopathy in these chemicals. More lengthy studies are necessary.

Acknowledgments

The authors wish to thank Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan, for the contribution of griseofulvin.

Reference

- 1) De Matteis F: Toxic hepatic porphyrias. *Sem. Hematol.* 5: 409-423, 1968.
- 2) De Matteis F and Rimington C: Disturbance of porphyrin metabolism caused by griseofulvin mice. *Br. J. Dermatol.* 75: 91-102, 1963.
- 3) Honda T, Nonaka S, Murayama F, Ohgami T, Shimoyama T and Yoshida H: Effects of KC-400 (polychlorinated biphenyls) on porphyrin metabolisms. *J. Dermatol. (Tokyo)* 10: 259-265, 1983.
- 4) Lochhead AG, Dagg JH and Goldberg A: Experimental griseofulvin porphyria in adult and foetal mice. *Br. J. Dermatol.* 79: 96-102, 1967.
- 5) Nonaka S, Ohgami T, Murayama F, Yamashita K, Nagato N, Watanabe M, Irifune H and Yoshida H: Biochemical study of fecal porphyrin in porphyria cutanea tarda. *J. Dermatol. (Tokyo)* 14: 291-296, 1987.
- 6) Peters HA: Hexachlorobenzene poisoning in Turkey. *Fed. Proc.* 35: 2400-2403, 1976.
- 7) Sano S and Granick S: Mitochondrial coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrin formation. *J. Biol. Chem.* 236: 1173-1180, 1961.
- 8) Shimoyama T, Nonaka S, Honda T, Murayama F, Ohgami T and Yoshida H: A biochemical study of experimental porphyria. I. The influence of griseofulvin at various concentrations of porphyrin metabolism. *J. Dermatol. (Tokyo)* 11: 49-55, 1984.
- 9) Shimoyama T, Nonaka S, Honda T, Ohgami T, Murayama F and Yoshida H: Biochemical studies of experimental porphyria. II. The influence of porphyrinogenic substances in mice treated with low concentrations of griseofulvin. *J. Dermatol. (Tokyo)* 12: 416-420, 1985.
- 10) Strik JJTWA: Species differences in experimental porphyria caused by polyhalogenated aromatic compounds. *Enzyme* 16: 224-230, 1973.
- 11) Vos JG and Koeman JH: Comparative toxicologic study with polychlorinated biphenyls in chicken with special reference to porphyria. *Toxicol. Appl. Pharm.* 17: 656-668, 1970.
- 12) Vos JG, Strik JJTWA, Hosteyn SWN and Pennings JH: polychlorinated biphenyls as inducers of hepatic porphyria in Japanese quail, with special reference to delta-amino-levulinic acid

synthetase activity, fluorescence and residues in the liver. Toxicol. Appl. Pharm. 20: 232-240, 1971.

13) Weston-Hurst E and Paget GE: Protopor-

phyrin, cirrhosis and hepatomata in the livers of mice given griseofulvin. Br. J. Dermatol. 75: 105-112, 1963.

(和文抄録)

塩素化合物のポルフィリン代謝に及ぼす影響

長崎大学医学部皮膚科学教室

野中 薫雄・大神 太郎・山下 和徳

入船 弘子・渡辺 雅久・塚崎 直子

田中 敬一・吉田彦太郎

低濃度 (0.1%) グリセオフルビン (GF) と種々の化合物を同時にマウスに投与すると、それぞれ単独に投与するよりもより高度のポルフィリン代謝異常を起こすことがある。PCB や hexachlorobenzene のような塩素化合物は単独でもポルフィリン代謝異常を起こす。今回、4-chloro-m-cresol, cumarone, trichloroacetic acid などの単純塩素化合物と 0.1%GF を同時にあるいは単独にマウスに投与し、これらの物質のポルフィリン代謝に及ぼす影響を検討して、その結果、0.1%GF 単独投与では、54 匹中 6 匹に軽度の

protoporphyrinemia を誘発した。0.1%GF と 0.1% 4-chloro-m-cresol 投与群では軽度の肝臓中、血液中、ポルフィリンの増加の傾向を示したが、0.1%単独群との有意差はみられなかった。0.1%cumarone, 0.25%trichloroacetic acid 投与群では単独、併用群ともに異常を認めなかった。以上のことから今回用いた 4-chloro-m-cresol, cumarone, trichloroacetic acid のポルフィリン代謝に及ぼす影響はほとんどないと考えられた。

2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran のハムスターにおける 生体内分布, 肝酵素誘導作用および急性毒性

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

外間由美子・吉村 英敏

Tissue Distribution, Inductive Effect on Liver Enzymes and Acute Toxicity of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran in Golden Syrian Hamsters

Nobuyuki KOGA, Hiroshi NAKASHIMA, Hidetoshi KAMIMURA,

Yumiko HOKAMA and Hidetoshi YOSHIMURA

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

The hamsters have been known to be the least sensitive mammalian species to the acute toxicity of highly toxic polyhalogenated hydrocarbons such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. In the present study, the tissue distribution, inductive effect of liver enzymes and acute toxicity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) in male Golden Syrian hamsters were examined. The highest content (about 48% of dose) of PenCDF was found in the liver 5 days after a single i. p. dose of 1.0 mg/kg. The amount ranging about 5 to 10% of dose was also distributed to mesentery, skin and muscle. In liver, the distribution of PenCDF was just parallel to that of cytochrome P-450 (P-450), marker enzymes of liver endoplasmic reticulum, suggesting that PenCDF binds to P-450. The mode of inductive effects of PenCDF in hamsters was 3-methylcholanthrene-type as reported previously in rats. However, the typical enzymes such as benzo(a)pyrene 3-hydroxylase and DT-diaphorase were induced to a relatively less extent than did in rats. In hamsters pretreated with PenCDF at a dose of 0.5 mg/kg, the potent atrophy of thymus and the 3-fold increase of liver lipid peroxide were observed, whereas the body weight gain was not suppressed at all. These results suggest that the induction of liver enzymes and the atrophy of thymus might not be the direct cause of PenCDF-induced lethality in hamsters. (Fukuoka Acta Med. 80(5): 227-234, 1989)

はじめに

Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) は、周知の通り, polychlorinated biphenyls (PCBs) および polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins とともに世界的環境汚染物質であるばかりではなく、カネミ油症の重要な原因物質の1つである。

これら多塩素化芳香族炭化水素の示す毒性は以下の点でよく共通している。すなわち、多くの場合顕著な体重減少を伴い、1週間から2カ月といった長い時間の経過後死に至ること、および病理所見と致死用量

(LD₅₀) における著しい種差によって特徴づけられている¹⁾。以下 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 投与動物を例にすると、胸腺の萎縮はほとんどの動物において観察されるのに対し、肝障害は、ラットとマウスでのみ認められ、モルモットとハムスターでは認められていない。また LD₅₀ はモルモット<ニワトリ≦ラット<マウス≦ウサギ<ハムスターの順であり、ハムスターでは TCDD の毒性に対しモルモットの実に数 1,000 倍も強い抵抗性を示す。

一方、ハムスターは正常レベルの薬物代謝能が全体的に他の動物に比しかなり高いこと²⁾、加えて benzo-

(a)pyrene³²⁾, phenacetin²⁾²⁶⁾ および aflatoxin B₁²⁴⁾ などの化学発ガン剤の代謝活性化能も高いことが明らかにされている。また、TCDDの代謝パターンに関しても、ラットのそれとかなり異なる³⁵⁾と報告されている。

当教室では PCDF の中でも、2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) と 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) がラットにおいて、もっとも強い急性毒性および肝薬物代謝酵素の 3-methylcholanthrene(MC) 型誘導能を示すこと³⁷⁾、さらに PenCDF は TCDF とは異なり、驚くべき肝への高い残留性を示すこと³⁷⁾³⁸⁾を明らかにしている。そこで本研究では、毒性学的にもっとも重要であると考えられるこの PenCDF を用い、ハムスターにおける体内分布、肝薬物代謝酵素の誘導作用および急性毒性について検討した。また、肝過酸化脂質を定量するとともに過酸化脂質生成の防御酵素系に及ぼす影響についても検討を加えた。

実験方法

1. 実験材料

¹⁴C ラベル PenCDF (1.1 mCi/mmol, 放射化学的純度>99%) および非放射性 PenCDF は、第一化学薬品(株)および九州大学薬学部佐伯清太郎助教授よりそれぞれ供与された。また benzphetamine-HCl 塩 (BZ) および 3-hydroxy-benzo(a)pyrene はそれぞれアップジョンファーマシューティカルズ社および九州大学医療短期大学部木下洋夫教授より供与された。7-ethoxyresorufin (7-ER) は Burke and Mayer の方法⁴⁾により合成した。

NAD(P)H, NAD(P) および glucose-6-phosphate (G-6-P) は協和醸酵工業(株)より、G-6-P dehydrogenase, 還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) は Sigma Chemical 社 (米国, St. Louis) より、estradiol および 2-hydroxy-estradiol は Steraloid 社より、propionaldehyde, 1,2-dichloro-4-nitrobenzene(DCNB) および dicoumarol は和光純薬(株) (大阪) より、pyrazole および benzo(a)pyrene (BP) は半井化学薬品(株) (京都) より購入した。また resorufin, 2,6-dichlorophenolindophenol および 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) はそれぞれ Aldrich Chemical 社 (米国, Milwaukee), Merck AG (西ドイツ, Darmstadt) および東京化成工業(株) (東京) より購入した。

2. 実験動物および投与

5週令の Golden Syrian 系雄性ハムスター (体重約 80 g) (九動(株)) を用い、PenCDF を 0.5 mg/kg の用量で 1 回腹腔内に投与した。PenCDF は体重 1 kg 当り 1 ml のコーン油に溶解し、また対照群にはコーン油のみを投与した。生体内分布の検討では ¹⁴C ラベル PenCDF を 1.0 mg/kg の用量で 1 回腹腔内に投与した。水および餌は自由に与えた。PenCDF 投与 5 日目に屠殺し、各臓器を摘出した。なお、屠殺前 12 時間絶食させた。

3. 肝酵素液の調製

屠殺後ただちに摘出された肝臓は氷冷した生理食塩水で十分灌流して血液を取り除いた。以下、0.25 M sucrose-0.1 mM EDTA-10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液ともに glass-Teflon homogenizer にて 25% ホモジネートを調製した後、9,000 xg で 20 分間遠心分離し、上清を得た。この際、沈渣はさらに同量の前記溶液に懸濁し、再び 9,000 xg で 20 分間遠心分離した。ここで得られた上清を先の上清と合わせ、さらに 105,000 xg で 60 分間遠心分離し、得られた上清をサイトゾル画分とした。一方、沈渣は 0.15 M KCl-50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁した後、105,000 xg で 60 分間遠心分離を行って洗浄し、最後に 0.25 M sucrose-0.1 mM EDTA-10 mM Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁してこれをミクロゾーム画分とした。

4. 酵素活性などの測定

Cytochrome P-450 (P-450) 含量は Omura と Sato の方法³⁰⁾により定量した。BP 3-hydroxylase 活性は Nebert と Gelboin の方法²⁵⁾により、また 7-ER O-脱エチル化および estradiol 2-水酸化の両活性は、それぞれ Burke and Mayer⁴⁾ および Yoshihara ら³⁶⁾の方法により定量した。BZ N-脱メチル化活性⁴⁰⁾は生成される HCHO 量を定量して求めた。以上の測定にはミクロゾーム画分を用いた。

肝可溶性酵素の活性はサイトゾル画分を用いて測定した。すなわち、DT-diaphorase 活性は既報⁹⁾にしたがって、また aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性⁷⁾は propionaldehyde を基質とし、G-6-P dehydrogenase 活性²¹⁾は G-6-P を基質としてそれぞれ NADH, NADPH の生成量を求める常法により測定した。GSH peroxidase 活性は、Lawrence と Burk の方法²²⁾、また GSSG reductase 活性は Scott らの方法³⁴⁾により求めた。GSH S-transferase 活性¹³⁾は CDNB あるいは DCNB を基質とし、その GSH 抱合体の生成量により測定した。

肝ホモジネート中の過酸化脂質および GSH はそれ

それ Ohkawa らの方法²⁷⁾ および Ellman の方法²⁸⁾ により、また catalase 活性は Chance と Maehly の方法²⁹⁾ により定量した。タンパク定量は Lowry らの方法²³⁾ により行った。

5. ¹⁴C ラベル PenCDF の定量

各組織を摘出後秤量し、その約 100 mg を、また血液は 0.2 ml を正確に量り以下の操作を行った。各サンプルに 1 ml NCS (Amersham 社) を加え、56°C で 3 時間加熱して完全に溶解して冷却後、0.2~0.6 ml の 30% 過酸化水素を加えて再び 56°C、30 分間加熱して脱色した。放冷後乳化シンチレーター 10 ml を添加し、液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-903 型) で放射活性を測定した。なお、クエンチングの補正は外部標準チャンネル比法により行い、また血液、筋肉および皮膚の総重量はそれぞれ体重の 8%、50%、および 16%³⁾ とした。

一方、PenCDF の肝細胞内分布は常法により得られた核、ミトコンドリア、ミクロゾームおよびサイトゾルの各画分の 0.2~0.5 ml につき、前記と同様に 1 ml の NCS を加えて可溶化後、10 ml の乳化シンチレーターを加えて測定した。

実 験 結 果

1. 生体内分布

PenCDF はカネミ油症の原因油中に含まれており、油症の発症後 9 年目に死亡した患者の肝および脂肪組織中に、PCDF 成分のうちもっとも高濃度で検出されている¹⁸⁾。また、ラット³⁷⁾、サル¹⁹⁾ などの実験動物における検討の結果、肝が主要な分布臓器であり、かつ長期にわたって残留することが明らかとなっている。

そこで、ハムスターにおける PenCDF の生体内分布を明らかにするため、¹⁴C ラベル PenCDF を 1 mg/kg あて 1 回腹腔内投与し、投与後 5 日目の各臓器中の放射活性を測定した。その結果、Table 1 に示すように、投与量の約 48% が肝臓に分布し、以下分布量は、筋肉、腸間膜脂肪、皮膚の順であった。一方、組織 1 g 当りで比較した場合でも、やはり肝臓にもっとも高濃度で分布しており、次いで腸間膜脂肪、副腎、胸腺の順であった。

以上の結果より、ハムスターにおける PenCDF の分布量は、PenCDF (1 mg/kg) 投与ラット肝における分布量すなわち投与量の約 65% という値³⁷⁾³⁸⁾ に比べて幾分低いもののやはり、肝が主要な分布臓器であることが明らかとなった。一方、筋肉、腸間膜脂肪および皮膚ではラットの 10 倍以上も高いことが明らかと

Table 1 Distribution of ¹⁴C-2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran in the tissues of hamster 5 days after a single i. p. injection of 1.0 mg/kg

Tissue	% of dose	% of dose/g tissue
Liver	47.69±5.28	8.35±1.03
Mesentery adipose	6.37±2.35	2.77±0.72
Adrenal	0.03±0.01	1.30±0.36
Thymus	0.03±0.01	0.69±0.23
Large intestine	0.36±0.06	0.46±0.13
Spleen	0.04±0.02	0.36±0.12
Skin	5.25±0.55	0.32±0.03
Heart	0.13±0.02	0.31±0.04
Stomach	0.62±0.34	0.30±0.20
Testis	0.69±0.37	0.30±0.20
Kidney	0.29±0.01	0.26±0.02
Lung	0.18±0.03	0.25±0.05
Small intestine	0.51±0.10	0.23±0.05
Muscle	10.50±1.25	0.21±0.02
Blood	0.31±0.04	0.04±0.00

Each value represents the mean±S. D. of three hamsters.

Body composition estimates for skin, muscle and blood were 16%, 50% and 8%, respectively.

Table 2 Subcellular distribution of ¹⁴C-2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran and cytochrome P-450 in hamster liver

Subcellular fraction	2,3,4,7,8-PenCDF	Cyt. P-450
% of homogenate		
Nuclear	41.51±3.22	41.85±1.22
Mitochondrial	16.60±2.08	15.43±2.63
Microsomal	26.25±1.30	24.38±2.37
Soluble	1.18±0.08	N. D.

Each value represents the mean±S. D. of three hamsters.

N. D., not detected.

なった。

これまでに Kuroki ら¹⁷⁾ は PenCDF のラット肝内分布を調べた結果、PenCDF の分布が肝小胞体の標識酵素である P-450 の分布とよく相関すること、および P-450 のうち PenCDF によって顕著に誘導される分子種の 1 つと高い親和性をもって結合していることを明らかにしている。そこで同様にハムスター肝細胞内における PenCDF の分布を調べ、P-450 の分布

Table 3 Effect of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran pretreatment on the activities of microsomal and cytosolic enzymes in hamster liver

Enzyme	Control	2,3,4,7,8- PenCDF
Cytochrome P-450 ¹⁾	0.906±0.217 (100)	2.079±0.240* (229)
Benzo(a)pyrene ²⁾ 3-hydroxylase	0.251±0.085 (100)	0.473±0.122* (188)
Benzphetamine ³⁾ N-demethylase	6.393±1.494 (100)	4.913±0.608 (77)
7-Ethoxyresorufin ⁴⁾ O-deethylase	1.341±0.208 (100)	6.315±0.653* (471)
Estradiol 2-hydroxylase ⁵⁾	0.034±0.004 (100)	0.029±0.004 (85)
DT-diaphorase ⁶⁾	0.077±0.026 (100)	0.339±0.040* (441)
Aldehyde dehydrogenase ⁶⁾	0.014±0.001 (100)	0.029±0.005* (205)
Glucose-6-phosphate ⁷⁾ dehydrogenase	5.133±1.016 (100)	5.231±0.816 (102)
Glutathione S-transferase ⁶⁾ CDNB	3.317±0.195 (100)	8.587±0.633* (259)
DCNB	0.010±0.002 (100)	0.041±0.003* (414)

¹⁾ nmol/mg protein, ²⁾ nmol 3-hydroxy-benzo(a)pyrene formed/min/mg protein, ³⁾ nmol HCHO formed/min/mg protein, ⁴⁾ nmol resorufin formed/min/mg protein, ⁵⁾ nmol 2-hydroxy-estradiol formed/10 min/mg protein, ⁶⁾ μ mol/min/mg protein, ⁷⁾ nmol/min/mg protein.

Each value represents the mean±S.D. of three hamsters, and those in parentheses are the relative value to the control.

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

と比較した。Table 2 に示すように、ハムスター肝においても P-450 の分布からわかるように細胞下画分に強い乱れがみられるが、このような異常分画においてもなお PenCDF と P-450 の分布パターンは非常によく一致しており、相関係数は $r=0.999$ であった。この結果から、ハムスターにおいてもラットと同様、PenCDF が P-450 分子種と結合している可能性が示唆された。

2. 肝酵素誘導作用

PenCDF 投与後 5 日目の肝より、ミクロゾームおよびサイトゾルを調製し、各画分に存在する酵素活性に及ぼす影響を調べた (Table 3)。肝ミクロゾームの総 P-450 含量は未処理群の約 2.3 倍に増加しており、この時の CO-還元差スペクトルは 448 nm に極大吸収を示した。また、ラットにおいて PenCDF を含む MC 型誘導剤で顕著に誘導される BP 3-水酸化活性および 7-ER O-脱エチル化活性は、それぞれ未処理

群の約 1.9 倍および約 4.7 倍と、どちらも有意に増加した。このように PenCDF 処理ハムスターにおいても、典型的な MC 型の誘導パターンが示されたが、いずれも誘導率はラットに比較して低いものだった。また、PenCDF 処理ラットで低下が認められる BZ N-脱メチル化活性および estradiol 2-水酸化活性は、有意ではないがハムスターでも同様に減少傾向にあった。

一方、サイトゾル画分の DT-diaphorase 活性は、未処理群の約 4.4 倍に誘導された。この値はラットのそれより低いものであった²⁷⁾。また、ラットにおいて phenobarbital(PB)⁷⁾、TCDD⁷⁾ および 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB)¹⁶⁾ などにより顕著に誘導される ALDH は、PenCDF 処理ハムスターでは未処理群の約 2.1 倍と低いものであった。次に、薬物だけでなく生体成分のグルタチオン抱合を触媒する重要な酵素である GSH S-transferase に関しても、ラットにおいて PB, MC, TCDD¹⁾ および PenCB¹⁶⁾ により

誘導されることが知られているが、ハムスターでも CDNB および DCNB の両基質に対して、それぞれ 2.6 倍および 4.1 倍と誘導された。しかし、G-6-P dehydrogenase に関しては、PenCB 処理ラットで観察された有意な増加¹⁶⁾ はみられなかった。

3. 急性毒性

Fig. 1 に、PenCDF (0.5 mg/kg) 処理ハムスターの投与後 4 日目までの体重増加曲線を示す。PenCDF 投与により投与後 1 日目に体重増加抑制が認められたものの、2 日目以降は、まったく未処理群と同様に体重が増加した。なお今回用いた 0.5 mg/kg の用量は、ラットにおいて体重増加抑制が認められる量であることから、この結果は従来の知見と同様にハムスターが低感受性であることを示唆している。

次に、PenCDF 投与後 5 日目に屠殺し、各臓器重量に及ぼす影響を調べた。Table 4 に示すように、ラットと同様にハムスターにおいても、有意な肝肥大、脾臓と胸腺の顕著な萎縮が観察された。また、胸腺の萎縮の程度は、ラットよりもむしろ大きく³⁷⁾、さらにラットでは認められていない腎臓の萎縮も観察された。

次に肝過酸化脂質量と、その関連酵素系に及ぼす PenCDF の影響について調べた。過酸化脂質は細胞や血液に対し、強い毒性を示すことから、有力な毒性指標の 1 つである。斎藤ら³⁷⁾ は 4 塩素化体を主成分とする PCB 投与ラットにおいて、肝過酸化脂質の増加と、その際過酸化水素などの活性酸素の消去系の 1

Table 4 Effect of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran pretreatment on the tissue weights of hamster

Tissue	Tissue weight (g/100g body weight)	
	Control	2,3,4,7,8-PenCDF
Liver	4.260±0.238 (100)	5.267±0.265* (124)
Thymus	0.099±0.019 (100)	0.028±0.004* (28)
Spleen	0.128±0.046 (100)	0.086±0.007* (67)
Lung	0.790±0.099 (100)	0.660±0.037* (84)
Kidney	1.700±0.133 (100)	1.392±0.066* (82)

Each value represents the mean±S.D. of three hamsters, and those in parentheses are the relative value to the control.

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

つである GSH peroxidase 活性の低下を認めている。Table 5 に示すようにハムスター肝においても過酸化脂質は、PenCDF 投与により未処理群の約 3 倍と有意に増加していた。一方、GSH peroxidase と GSSG reductase、および GSH 含量は、PenCDF 処理による有意な変動を示さなかった。なお、過酸化水素の分解を触媒する catalase は、PenCDF 処理により、有意ではないものの減少傾向を示した。

考 察

本研究では PenCDF の毒性発現機構解明のため、多塩素化芳香族炭化水素に対する感受性をもっとも低い動物種であるハムスターを用い、PenCDF の体内分布、肝酵素誘導作用および急性毒性について調べた。

PenCDF の主要な分布臓器はハムスターにおいても肝であり、投与量の約 48% であった。この値は、ラットの約 65% という値に比較して幾分低く、それとは逆に腸間膜脂肪、皮膚および筋肉への分布はラットの 10 倍近く高かった。Olson ら²⁸⁾ は、致死用量の TCDD を投与して死に至ったハムスターにおいて、モルモットやラットと同様に、脂肪組織と筋肉の消失を観察しているが、今回の結果は、肝臓に加えて脂肪組織が PenCDF の急激な毒性発現を抑制するための貯蔵部位として重要であることを示唆している。このような脂肪組織の貯蔵部位としての重要性は、

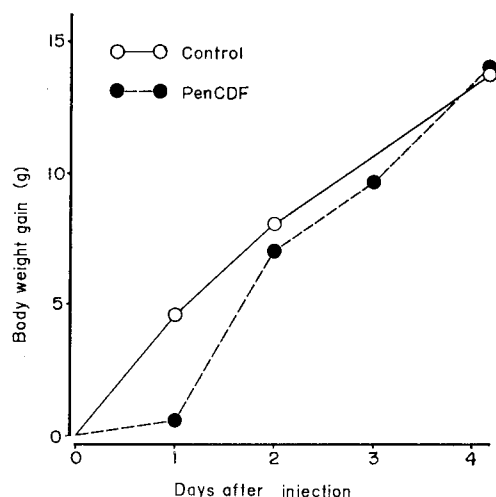


Fig. 1 Effect of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran on body weight gain in hamsters
Each point represents the mean of three hamsters.

Table 5 Effect of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran pretreatment on the contents of lipid peroxide and glutathione, and the activities of the related enzymes in hamster liver

Enzyme	Control	2,3,4,7,8-PenCDF
Lipid peroxide ¹⁾	0.446±0.241 (100)	1.317±0.297*
Glutathione peroxidase ²⁾	0.326±0.014 (100)	0.341±0.055 (105)
H ₂ O ₂		
CuOOH	0.493±0.038 (100)	0.525±0.041 (106)
GSSG reductase ²⁾	0.149±0.013 (100)	0.153±0.011 (103)
GSH content ³⁾	0.112±0.024 (100)	0.134±0.009 (120)
Catalase ²⁾	0.160±0.020 (100)	0.108±0.032 (68)

¹⁾ nmol/mg protein, ²⁾ μ mol/min/mg protein, ³⁾ mg/mg protein.

CuOOH, cumene hydroperoxide; GSSG, oxidized glutathione; GSH, reduced glutathione.

Each value represents the mean±S. D. of three hamsters, and those in parentheses are the relative value to the control.

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

TCDF⁶⁾ および TCDD¹⁰⁾ 投与マウス, TCDD²⁰⁾ 投与ラット, TCDD 投与モルモット¹¹⁾ などで示されている。

薬物代謝酵素の誘導に関しては, ラットと同様, 典型的な MC 型誘導パターンすなわち P-450 分子種の P-448 の増加および BP 3-水酸化, 7-ER O-脱エチル化および DT-diaphorase の各活性の増加が認められた。しかしながら, ラットにおいて MC 誘導剤で数 10 倍と著しく増加する BP 3-水酸化活性はほんの 1.9 倍にすぎず, さらにハムスターでもっとも強く誘導された酵素の 1 つである DT-diaphorase にしても約 4.4 倍と低いものであった。一方, BZ N-脱メチル化および estradiol 2-水酸化の両活性は PenCDF あるいは高毒性 PCB の PenCB 処理ラットにおいて強く阻害を受ける¹⁵⁾⁴⁰⁾ が, 今回ハムスター肝ミクロゾームについても有意ではないが同様に抑制効果が観察された。このような酵素誘導は TCDD などに対し, もっとも高感受性であるモルモットでもっとも小さいことが知られている³¹⁾³⁹⁾ が, 一方, Gasiewicz ら¹²⁾ はもっとも低感受性のハムスターでもラットのそれに比べ, かなり低いことを明らかにしている。彼らはこれに加えて酵素誘導が必ずしも LD₅₀ と関連していないことを報告した。

これまでハムスターは全般的に薬物代謝能が他の動物に比べ高いことが知られている⁴⁾。本研究でも, 未処理における P-450 含量, BP 3-水酸化活性, 7-ER

O-脱エチル化活性, BZ N-脱メチル化および GSH S-transferase (CDNB) 活性は, ラットよりも 3~4 倍高い値を示した。加えて, Olson らはハムスターにおいて, TCDD の代謝, 排泄速度が他の動物種より速いことを明らかにし, このことが TCDD に対する低感受性の一因であろうと報告している²⁹⁾。

われわれはこれまで, ラットおよびモルモットにおいて, 胸腺や脾臓などの萎縮, 肝肥大および体重増加抑制を毒性指標として用いてきた³⁷⁾³⁹⁾⁴⁰⁾ が, いずれの指標もその強さはお互いよく関連していた。本研究のハムスターでも胸腺の萎縮および肝肥大は同様に顕著であり, また肝過酸化脂質も PenCDF 処理で約 3 倍も増加していた。これらの結果から判断すると, 他の動物に劣らずハムスターにおいても毒性が強く発現しているといえる。しかしながら, PenCDF(0.5 mg/kg) 処理ラットで認められた有意な体重増加抑制がハムスターでは認められず, 未処理と同様に順調に成長した。この結果は, ハムスターで認められる各臓器重量の変化および肝過酸化脂質の増加が致死的不是であることを示唆している。

以上の結果を考え合わせると, PenCDF をはじめ高毒性多塩素化芳香族炭化水素の毒性発現におけるハムスターの抵抗性は脂肪組織を中心としたエネルギー代謝系における違いにあるかもしれない。最近, 各種動物における血中甲状腺ホルモン量に差異があることが注目されている。Henry と Gasiewicz¹⁴⁾ は同用量

の TCDD をハムスターとラットに投与し、血中の甲状腺ホルモン (3,5,3'-triiodothyronine および thyroxine) の測定を行い、ラットでは未処理群に比べて、これらが減少したのに対し、ハムスターでは逆に有意な増加を示すことを明らかにした。この結果から、彼らはハムスターにおいては甲状腺ホルモンの増加が、結果的に基礎代謝を維持させ、正常な体重増加を保てるようにしており、このことがハムスターにおける低感受性の一因であろうと考察している。

総 括

PenCDF の毒性発現機構解明の一環として、PCB, PCDF や PCDD の毒性に対してもっとも低感受性のハムスターにおける PenCDF の生体内分布、肝酵素誘導作用および急性毒性について検討を加えた。

1. PenCDF は主として肝 (約 48%) に分布したが、その他脂肪組織、皮膚および筋肉でも投与量の 5~10% と多く分布していた。また肝内では小胞体の標識酵素である P-450 の分布とよく一致していることから、ラットと同様に P-450 に結合していることが示唆された。

2. PenCDF 処理ハムスターにおける肝酵素の誘導パターンはラットと同様に MC 型といえるが、その誘導率は全体的に低く、とくに MC 型の代表的活性である BP 3-水酸化活性および DT-diaphorase 活性はラットに比べかなり低いものであった。

3. PenCDF 投与後 5 日目では、胸腺の顕著な萎縮および肝過酸化脂質の有意な増加が観察されたが、体重増加抑制が認められず順調な成長を示した。

以上の結果は、ハムスターにおいて肝酵素誘導および胸腺萎縮などのいわゆる急性毒性の指標が PenCDF の示す致死的な毒性と直接関連していないことを示唆している。

文 献

- 1) Baars AJ, Jansen M and Breimer DD: The influence of phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on glutathione S-transferase activity of rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2487-2494, 1978.
- 2) Bartsch H, Malaveille C, Camus AM, Martel-Planche G, Brun G, Hautefeuille A, Sabadie N, Barbin A, Kuroki T, Drevon C, Piccoli C and Montesano R: Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. typhimurium* strains and V79 chinese hamster cells in the presence of various metabolizing system. *Mutat. Res.* 76: 1-50, 1980.

- 3) Birnbaum LS, Decad GM and Matthews HB: Disposition and excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 342-352, 1980.
- 4) Burke MD and Mayer RT: Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug metab. Dispos.* 2: 583-588, 1974.
- 5) Chance B and Maehly AC: *Methods in Enzymology II*, p. 764, Academic Press, New York, 1955.
- 6) Decad GM, Birnbaum LS and Matthews HB: Distribution and excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59: 564-573, 1981.
- 7) Deitrich RA, Bludeau, 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.
- 8) Ellman GL: Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77, 1959.
- 9) 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.
- 10) Gasiewicz TA, Geiger LE, Rucci G and Neal RA: Distribution, excretion, and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in C57BL/6J, DBA/2J, and B6D2F1/J mice. *Drug Metab. Dispos.* 11: 397-403, 1983.
- 11) Gasiewicz TA and Neal RA: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin tissue distribution, excretion and effects on clinical chemical parameters in guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 51: 329-339, 1979.
- 12) Gasiewicz TA, Rucci G, Henry EC and Baggs RB: Changes in hamster hepatic cytochrome P-450, ethoxycoumarin O-deethylase, and reduced NAD(P):menadione oxidoreductase following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem. Pharmacol.* 35: 2737-2742, 1986.
- 13) Habig WH, Pabst MJ and Jacoby WB: Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139, 1974.
- 14) Henry EC and Gasiewicz TA: Changes in thyroid hormones and thyroxine glucuronidation in hamsters compared with rats following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 89: 165-174, 1987.
- 15) Hokama Y, Koga N and Yoshimura H: Purification and Characterization of two forms of chicken liver cytochrome P-450 induced by 3,4,5,3',

- 4'-pentachlorobiphenyl. J. Biochem. 104: 355-361, 1988.
- 16) 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, 1985.
- 17) 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.
- 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) Lakshmanan MR, Campbell BS, Chirtel SJ, Ekarohta N and Ezekiel M: Studies on the mechanism of absorption and distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 239: 673-677, 1986.
- 21) Langdon RG: Glucose-6-phosphate dehydrogenase from erythrocytes. Methods in Enzymology IX. pp.126-131, New York, Academic Press 1966.
- 22) Lawrence RA and Burk RF: Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71: 952-958, 1976.
- 23) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
- 24) Mizokami K, Nohmi T, Fukuhara M, Tanaka A and Omori Y: Purification and characterization of a form of cytochrome P-450 with high specificity for aflatoxin B₁ from 3-methylcholanthrene-treated hamster liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 139: 466-472, 1986.
- 25) Nebert DW and Gelboin HV: Substrate inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. J. Biol. Chem. 243: 6242-6249, 1968.
- 26) Nohmi T, Yoshikawa K, Nakadate M and Ishidate M: Species difference in the metabolic activation of phenacetin by rat and hamster liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 110: 746-752, 1983.
- 27) Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351-358, 1979.
- 28) Olson JR, Holscher MA and Neal RA: Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the Golden Syrian hamster. Toxicol. Appl. Pharmacol. 55: 67-78, 1980.
- 29) Olson JR, Gasiewicz TA and Neal RA: Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the Golden Syrian hamster. Toxicol. Appl. Pharmacol. 56: 78-85, 1980.
- 30) Omura T and Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J. Biol. Chem. 239: 2379-2385, 1964.
- 31) Poland A and Knutson JC: 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.
- 32) Schreiber H, Martin DH and Pazmino N: Species differences in the effect of benzo(a)pyrene-ferric oxide on the respiratory tract of rats and hamsters. Cancer Res. 35: 1654-1661, 1975.
- 33) 斎藤衛郎, 池上幸江, 印南 敏, 永山スミ子, 西出英一: PCB 投与ラット肝臓における過酸化脂質の生成と薬物代謝, グルタチオンパーオキシダーゼ, ビタミンEとの関連. 福岡医誌 72: 142-148, 1981.
- 34) Scott EM, Duncan IW and Ekstr V: Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. J. Biol. Chem. 238: 3928-3933, 1963.
- 35) Wroblewski VJ and Olson JR: Effect of monooxygenase inducers and inhibitors on the hepatic metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat and hamster. Drug Metab. Dispos. 16: 43-51, 1988.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 吉村英敏, 和田郁夫, 古賀信幸, 永田 清, 山内葉子, 吉原新一, 鎌田 理: 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.
- 40) 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.

非致死用量の2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran ならびに1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran のラットに対する急性ないし亜急性毒性

佐賀医科大学地域保健科学講座

西 住 昌 裕

Acute or Subacute Toxicity of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran and 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran to Rats in Non-Lethal Dose

Masahiro NISHIZUMI

*Department of Community Health Science
Saga Medical School, Saga 840-01*

Two isomers of polychlorinated dibenzofurans, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran or 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran, both of which are present in the Yusho patients, were subcutaneously administered to rats in a single non-lethal dose to examine acute or subacute toxicity.

Maximal inhibition of increase in body weight and decrease in daily locomotor activity were observed in the rats treated with 370 $\mu\text{g/kg}$ of these compounds at 3 to 4 weeks after treatment, especially with 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran. Histopathologically, hypertrophy of the liver and atrophy of the thymus were noted at 4 weeks after treatment with this dose, while bile duct hyperplasia in the liver was observed at 40 weeks after treatment with 250 $\mu\text{g/kg}$ of these compounds.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 235-239, 1989)

はじめに

油症の原因物質としては当初 polychlorinated biphenyls (PCBs) のみが考えられたが、その後 PCBs の関連物質とされる polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated quaterphenyls (PCQs) など複数の有機塩素化合物の関与が重視されるようになってきている⁵⁾⁶⁾。これらの化合物のうち、PCDF 異性体の1つである 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) および、1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (HCDF) は油症患者の組織中に存在しており³⁾⁴⁾、実験的にもラット肝で高い貯留性と共に高毒性が示唆されている¹⁰⁾が、その毒性についてはいまだ十分明らかではない。

ここでは、この2種の化学物質をラットに非致死用量として比較的少量を投与し、急性ないし亜急性毒性を実験病理学的側面から検討することを目的として実験を行った。

実験方法

実験に使用した 2,3,4,7,8-PenCDF (以下、PenCDF と略記) ならびに、1,2,3,4,7,8-HCDF (以下、HCDF と略記) (いずれも第一薬大、増田教授からの供与による) は、それぞれ 1 mg/ml の濃度でオリーブ油 (和光純薬、大阪) に溶解して使用した。

1) 投与後4週間の急性毒性をみるため、8週齢のウィスター系雄ラット9匹を3群に分け、第1群には PenCDF 100 $\mu\text{g/rat}$ (平均 366 $\mu\text{g/kg}$ 体重)、第2群には HCDF 100 $\mu\text{g/rat}$ (平均 381 $\mu\text{g/kg}$ 体重)、第3群には対照群としてオリーブ油 0.1 ml/rat のみを、それぞれ背部皮下に1回注射し、その後、全身の状態を観察しつつ、毎週2回の体重測定を行った。また、自発運動量の測定を Automex (アステック社、福岡) により、毎週1回、1時間間隔で24時間連続して行った。投与後4週間で屠殺し、肉眼的に各種臓器病変の有無をみると共に、肝、腎、脾、胸腺について

は臓器重量の測定後、HE 染色標本を作成し、組織学的検索を行った。

2) 投与後 40 週までの毒性をみるため、6 週齢のウィスター系雄ラット 18 匹を 3 群に分け、実験群としては PenCDF 40 $\mu\text{g}/\text{rat}$ (平均 260 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重) ないし HCDF 40 $\mu\text{g}/\text{rat}$ (平均 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重) を、対照群としてはオリーブ油 0.04 ml/rat のみを背部皮下に 1 回それぞれ投与した。その後、全身状態の観察を行いつつ毎週 1 回、体重を測定した。投与 40 週後に各群 2 匹を屠殺し、肉眼的に内臓病変の有無をみると共に、肝、腎、脾については臓器重量の測定後、HE 染色標本を作成し組織学的検索を行った。

飼育期間中は、いずれの場合も固型飼料 CE-2 (日本クレア製) と水道水を自由に摂取させた。

実 験 結 果

1. PenCDF 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$, ないし HCDF 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ の皮下投与後 4 週間の変化としては、実験群は対照群に比較して体重減少の傾向がみられ (Fig. 1), とくに PenCDF 投与群で有意 ($P < 0.05$) の体重減少が 3 および 4 週後にみられた。また, Automex による測定結果 (Fig. 2) で 3 週後の自発運動量は PenCDF 投与群では対照群の 75% に減少したが, その他には外見上, 異常はみられなかった。PenCDF 投与後 4 週での屠殺時の肝, 胸腺の平均重量 $\pm$ 標準偏差 (g) はそれぞれ 23.8 ± 1.1 , 0.19 ± 0.07 , HCDF 投与後 4 週でのそれは, 24.4 ± 1.4 , 0.23 ± 0.04 で, これらの数値は対照群の 21.4 ± 2.4 , 0.27 ± 0.03 に対し有意ではないが, PenCDF 投与群, HCDF 投与群いずれも肝重量の増加と PenCDF 投与群で胸腺重量の低下傾向がみられた。なお, 肝重量を体重比 (体重 100 g 当り) でみると, 対照群 4.1 ± 0.5 に対し, PenCDF 投与群で 6.3 ± 0.3 , HCDF 投与群で $6.1 \pm$

0.4 といずれも有意 ($P < 0.01$) に増加していた。

組織学的には, 実験群の肝組織は壊死像はみられないが, 対照群 (Fig. 3) に比し, 肝細胞の腫大と共に胞体には淡明化した部分ないし空胞の出現がみられた (Fig. 4, 5)。なお核は胞状で, 核小体は明瞭に認めら

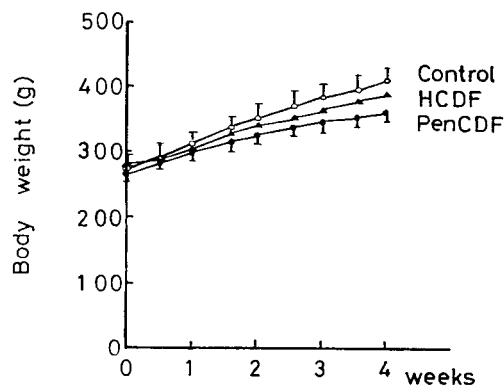


Fig. 1 Changes of mean body weight of rats given PenCDF, HCDF or olive oil alone

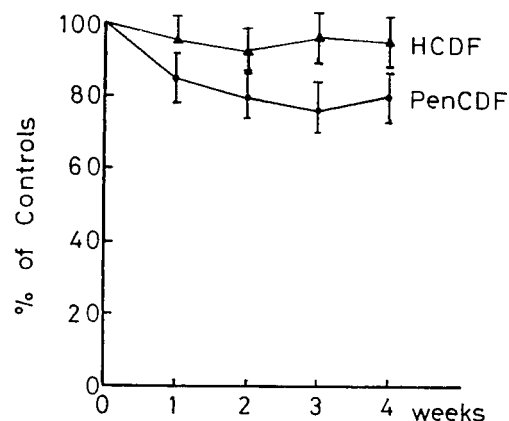


Fig. 2 Changes in mean daily locomotor activity measured by AUTOMEX

Fig. 3 Normal hepatocytes arranged regularly in a control rat liver. H-E stain ($\times 200$)

Fig. 4 Hepatocytes are swollen and some of them contain vacuoles in cytoplasm. The rat liver treated with 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ PenCDF. H-E stain ($\times 200$)

Fig. 5 Mild hypertrophy of the hepatocytes in the rat liver treated with 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ HCDF. H-E stain ($\times 200$)

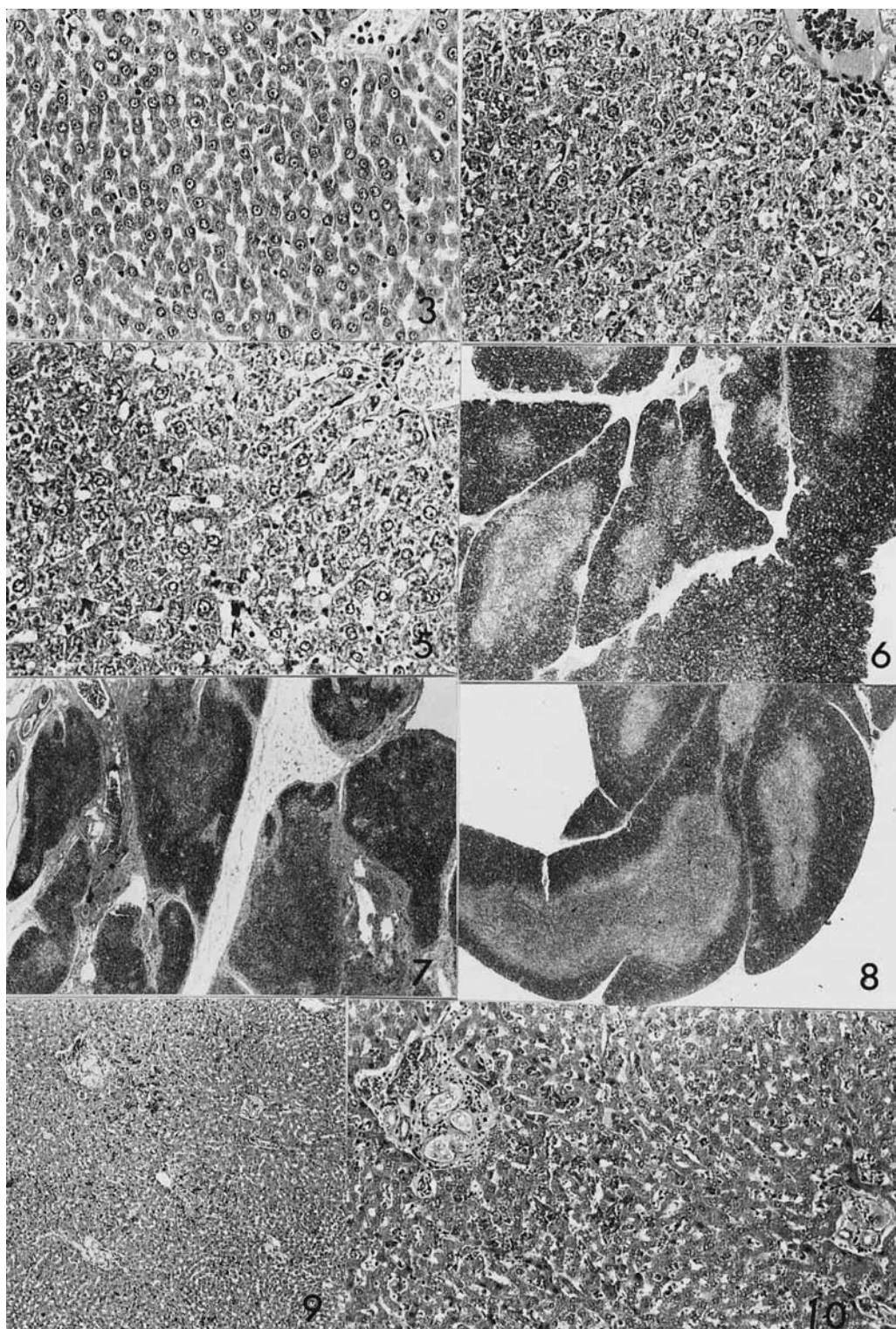
Fig. 6 The thymus tissue in a control rat. H-E stain ($\times 20$)

Fig. 7 Thymic atrophy in the rat given 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ PenCDF. The cortex is shrunk and corticomedullary junction is indistinct. H-E stain ($\times 20$)

Fig. 8 Atrophy of the thymic cortex is slightly seen in the thymus of the rat treated with 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ HCDF. H-E stain ($\times 20$)

Fig. 9 Proliferation of bile ductular cells is seen in the liver of rat treated with 40 $\mu\text{g}/\text{rat}$ PenCDF. H-E stain ($\times 40$)

Fig. 10 Proliferative bile ducts. Same case as in Fig. 9 at a higher magnification, also showing hepatocytes containing small vacuoles in cytoplasm. H-E stain ($\times 100$)



れた。これらの変化は、PenCDF 投与群、HCDF 投与群共にみられたが、PenCDF 投与群でより顕著であった。腎では近位尿管上皮の膨化が若干認められたが、糸球体は正常であった。胸腺は、対照群 (Fig. 6) に比し皮質の菲薄化傾向が認められ (Fig. 7, 8)、とくに PenCDF 投与群では胸腺の萎縮が顕著で皮髄の境界が不鮮明となっていた。脾ではリンパ球の減少を示す所見はみられなかった。

2. HCDF 40 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 投与群の体重増加は対照群と同程度であったが、PenCDF 40 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 投与群では2～6週にかけて、やや体重増加の抑制が認められたものの、その後は対照群との差は縮少した。この他、外見上には異常はみられなかった。投与後40週で屠殺時の肝、胸腺の平均重量(g)は、それぞれ PenCDF 投与群 17.1, 0.10, HCDF 投与群 16.5, 0.14, オリーブ油単独投与群 15.4, 0.17 であった。

組織学的には、実験群の肝では肝細胞索の配列に異常はみられなかったが、一部の肝細胞で胞体に空胞を有するものがみられたほか、PenCDF, HCDF いずれの投与群にも胆管細胞増殖を伴う胆管新生の像がみられた (Fig. 9, 10)。腎では軽度の遠位尿管腔の拡張と上皮の平低化が認められたが、糸球体には変化はみられなかった。

考 察

PCDFsの毒性はもちろん異性体によって異なるであろうが、一般的に polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) ほどに強くはないとしても、PCBs より強い毒性を示すと報告されている⁹⁾¹⁰⁾。本研究に使用した化合物のうち PenCDF は PCDF の異性体の中でも、その生体内動態についての研究がよく行われている化合物²⁾¹⁰⁾であるが、ラットでの経口致死量は5～10 mg/kg 程度で、経口 1 mg/kg で体重増加の抑制、胸腺の萎縮がみられ¹⁾、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも肝における薬物代謝酵素の誘導能¹⁰⁾が報告されている。

本研究は慢性毒性、とくに発癌性試験の前段階として、経口致死量の1/10ないし1/20程度の用量を皮下に投与した場合の急性期ないし亜急性期における毒性をみようとしたものである。結果として、亜急性期での毒性は PenCDF 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ (366 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の投与で体重増加の抑制、肝体重比の増加、胸腺重量の減少がみられたことは、投与方法ならびに用量が異なるものの、他の報告¹⁾と一致している。

病理組織学的にみると、肝、腎、脾、胸腺などにおける変化は軽度であり、私共はこの量の単独投与で2

年後までの生存を確認していることから、長期の経過でも致命的に作用するほどの毒性を示すとは考えられない。ただ、肝組織の変化でみると PenCDF, HCDF いずれも 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ を投与して4週間後では肝細胞の腫大、胞体内の空胞の出現を見ただけであった。40 $\mu\text{g}/\text{rat}$ を投与して40週後に細胆管の新生像がみられたことは、長期間を経過後に発癌に至るような慢性毒性の可能性を考慮する必要がある。腎では、わずかに近位ないし遠位尿管細胞の腫大、膨化がみられるのみであるが、致死量の投与でみられる皮下水腫、腹水の出現⁷⁾⁸⁾と考え合わせると、浮腫の発生機序の面で興味深い。

本研究に使用した2つの化合物の毒性を比較してみると、PenCDF 100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 投与群にみられる毒性は体重増加の抑制、胸腺重量の低下の程度から判断されるように、同量の HCDF 投与群にみられたものより強く、病理組織学的変化も PenCDF 投与群の方がより顕著な変化を示した。ただ、両物質をそれぞれ 40 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 1回投与後40週後の時点で見ると、肝組織にみられた胆管上皮の増殖を伴う胆管の新生像は、いずれにも同程度に観察された。この点では、PenCDF ならびに HCDF の毒性の強さの比較だけでなく、肝における長期残留率を比較してみることが必要であろう。

総 括

ラットに対し非致死用量 (100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ ないし 40 $\mu\text{g}/\text{rat}$) の PenCDF および HCDF を1回、背部皮下に投与し、それぞれ、4週間ないし40週後の毒性の発現を、行動、体重の変化でみると共に、肝、腎、脾、胸腺につき病理組織学的に観察した。体重増加の抑制、肝体重比の増加、胸腺萎縮などに関し、PenCDF の作用は HCDF より明らかに強く、100 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 投与4週後の肝、胸腺の病理組織学的変化も PenCDF 投与群の方が、より顕著な変化を示した。ただ、40 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 投与40週後の肝組織の所見は PenCDF, HCDF 両投与群間の差は顕著でなかった。

文 献

- 1) 古賀信幸, 中嶋 寛, 神村英利, 吉村英敏: 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, 福岡医誌 78: 204-212, 1987.
- 2) 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.

3) Kuroki H and Masuda Y: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 7: 771-777, 1978.

4) 黒木広明, 大間美和, 原口浩一, 増田義人, 猿田隆夫: 油症患者の皮脂, 皮下膿瘍中の PCB および PCDF 分析, 福岡医誌 78: 320-324, 1987.

5) 増田義人, 倉恒匡徳: 油症を起こしたライソオイル中の毒性物質, 福岡医誌 70: 229-237, 1979.

6) Masuda Y and Yoshimura H: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance: a review. *Am. J. Ind. Med.* 5: 31-44, 1984.

7) 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.

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

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

10) 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.

Carcinogenicity of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran and 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran in Rats

Masahiro NISHIZUMI

*Department of Community Health Science,
Saga Medical School, Nabeshima, Saga 840-01*

Abstract In order to examine the carcinogenicity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran, these two chemicals were subcutaneously administered to Wistar strain male rats at the dose of 80 μ g, 40 μ g or 4 μ g per rat. At sacrifice in two years after the start of the experiment, tumors were observed in the subcutaneous tissue and the liver. Although the number of the rats used is small, the tumor occurrence showed some tendency to relate with the dose of the chemicals given.

Introduction

Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), which are closely related in structure and toxicity to other halogenated aromatic hydrocarbons including the polychlorinated dibenzop-dioxins, are important environmental contaminants having the potential for widespread human exposure. Actually, several congeners of PCDFs have been found in the contaminated rice-bran oil and in the liver of a deceased patient of PCB poisoning in Japan ("Yusho")⁽⁸⁾⁽¹¹⁾ and Taiwan ("Yu Chen")⁽²⁾, and they are now regarded as the most important causal compounds in Yusho and Yu Chen incident⁽²⁾⁽¹⁰⁾.

Although some toxicity studies on these compounds have been done⁽¹⁾⁽⁶⁾⁽¹²⁾, no carcinogenicity test on them has been reported. Therefore, we carried out a carcinogenicity test on two isomers of PCDFs, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (HCDF), which were subcutaneously administered to rats.

Materials and Methods

The chemical compounds, 2,3,4,7,8-PenCDF and 1,2,3,4,7,8-HCDF, which were kindly provided by Prof. Y. Masuda, Daiichi College of

Pharmaceutical Sciences, Fukuoka, were used. They were separately dissolved into olive oil at a concentration of 1 mg/ml or 0.1 mg/ml, and were subcutaneously administered in the back once or 4 times with an interval of a week, at a total dose of 80 μ g, 40 μ g or 4 μ g per rat.

Forty Wistar strain male rats, 6 weeks old, were divided into 8 groups; (1) PenCDF 20 μ g/rat, 4 times in a month, (2) PenCDF 40 μ g/rat, once, (3) PenCDF 4 μ g/rat, once, (4) HCDF 20 μ g/rat, 4 times in a month, (5) HCDF 40 μ g/rat, once, (6) HCDF 4 μ g/rat, once, (7) olive oil only 0.02 ml/rat, 4 times in a month, (8) olive oil only 0.04 ml/rat, once. The rats were housed in groups of one to three rats per cage and in an air-conditioned animal room at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with a relative humidity of $55 \pm 5\%$. They were fed a pellet diet, CE-2 (Clea Japan, Inc., Tokyo) and water ad libitum. They were weighed every week for 12 weeks, and then every two weeks for the duration of the study.

The animals survived were sacrificed at 104 weeks after the start of the experiment. Subcutaneous tumors were excised, and their size and weight were recorded. The liver, kidney and spleen were removed and weighed. They were fixed in 10% neutral-buffered formaldehyde solution for histopathological exami-

nation. The other organ; lung, oesophagus, stomach, small and large intestine, and adrenals, were also macroscopically examined. When tumors or nodules were found, they were processed for histopathological examination. Hematoxylin and eosin were used to stain the paraffin-embedded sections.

Results

Although significant depression in body weight gain was observed in groups 1, 2 and 4 as compared with combined control groups 7 and 8 (Fig. 1), almost all of the rats in experimental groups were well tolerated to the test com-

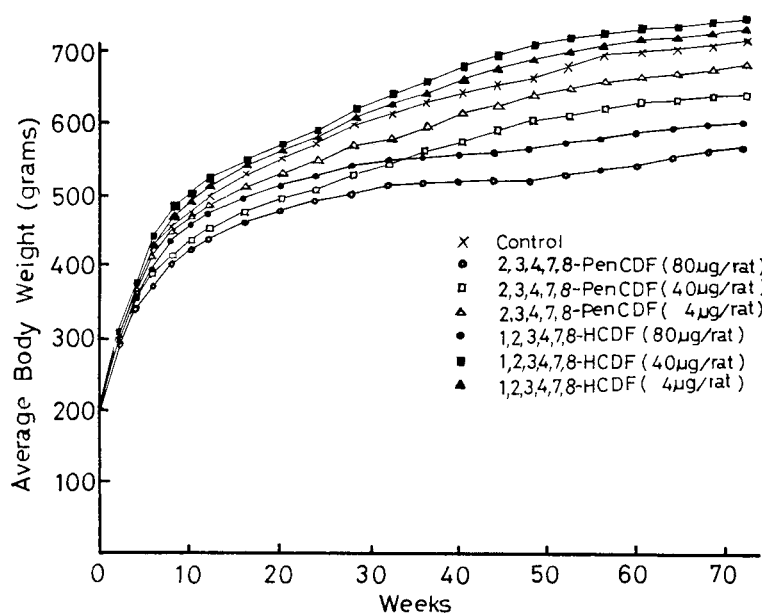


Fig. 1 Growth of rats in a control and six experimental groups.

Table 1 Tumors produced in rats given 2,3,4,7,8-PenCDF or 1,2,3,4,7,8-HCDF

Group	Chemical	Treatment	Number of rats used	Number of rats sacrificed at termination	Number of rats bearing tumors	Liver tumors		Subcutaneous tumors
						Nodules	HCC	
1	2,3,4,7,8-PenCDF	20 µg s. c. × 4	5	5	2	2	1	0
2	"	40 µg s. c. × 1	5	4	2	2	0	1
3	"	4 µg s. c. × 1	5	4	0	0	0	0
4	1,2,3,4,7,8-HCDF	20 µg s. c. × 4	5	5	2	2	0	2
5	"	40 µg s. c. × 1	5	5	2	3	1	1
6	"	4 µg s. c. × 1	5	5	1	0	1	0
7	olive oil only	0.02ml s. c. × 4	5	5	0	0	0	0
8	"	0.04ml s. c. × 1	5	5	0	0	0	0

pounds at dose levels used in this study. Two rats, one dosed 40 μ g of PenCDF and the other dosed 4 μ g of PenCDF, had died of pneumonia at 55 and 70 weeks after the start of the experiment, respectively. Subcutaneous tumors, occurring at thorax, were noticed in a rat each of groups 2 and 5, and in two rats of group 4, at 70 to 75 experimental weeks. They were increased in size, growing to large masses nearly 10 cm in diameter at 104 weeks.

The results of pathological examination of tumors observed among experimental groups at 2 years after the start of the experiment are

summarized in Table 1. Histological findings of subcutaneous tumors showed fibroma for a rat of group 2, lipoma and fibroma each for two rats of group 4, and fibrosarcoma for a rat of group 5 (Figs. 2A and 2B). Liver tumors including hyperplastic nodules were seen in 4 out of 13 rats given PenCDF and in 5 out of 15 rats given HCDF. In this experiment, hepatocellular carcinoma (HCC) was histologically confirmed in a rat each of groups 1, 5 and 6 (Figs. 3A and 3B). Small cysts in the liver were also seen in a few rats in groups 2, 4 and 5. They were associated with focal proliferation of bile ductular cells. In

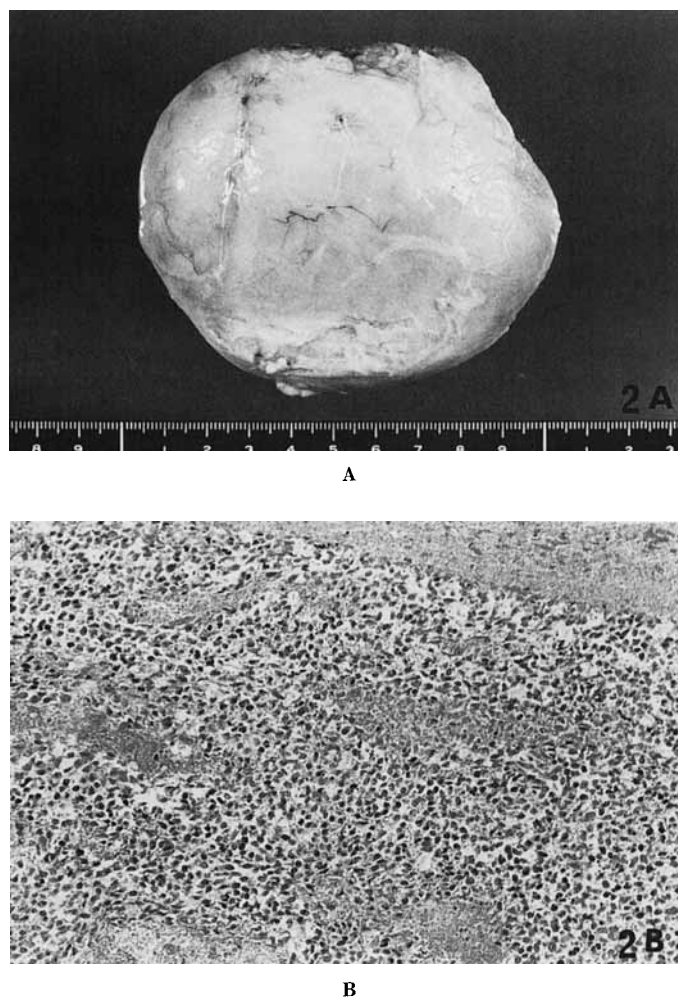


Fig. 2A Subcutaneous tumor in right thorax of rat received 40 μ g of 1,2,3,4,7,8-HCDF.

B Undifferentiated fibrosarcoma. Cellular component being mainly small and stellate in nature, and showing collagen formation in places. HE staining. $\times 150$

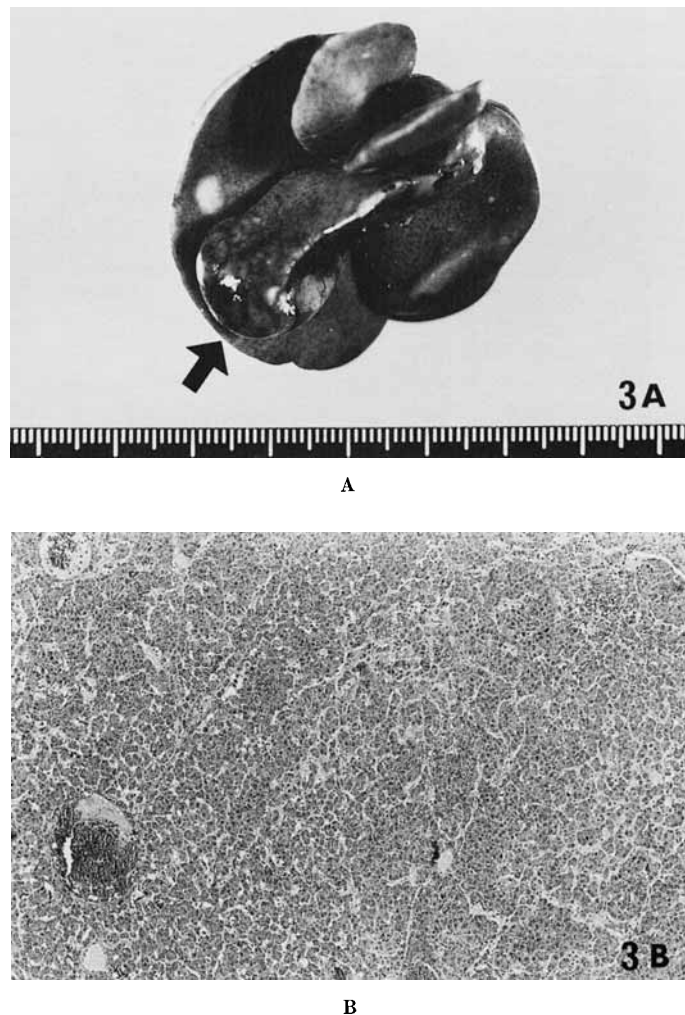


Fig. 3A Liver of a rat received 80 μ g of 2,3,4,7,8-PeCDF. A tumor (arrow) is seen in right lobe.

B Hepatocellular carcinoma showing a well-differentiated type. Tumorous hepatocytes with a trabecular structure have round nuclei with large nucleoli. HE staining. $\times 70$

most of the liver tissue, there were scattered cell foci consisting of the hepatocytes with vacuolated cytoplasm in non-tumorous area. A cystic tumor on right adrenal gland was observed in a rat of group 2, which was bearing a large fibroma in right thorax. This tumor was histologically revealed a haemorrhagic cyst with cortical atrophy. Besides, a polypoid structure, 5 mm in size, in ileum seen in a rat of group 5 was histologically proved a marked lymphoid hyperplasia.

As non-neoplastic lesions, glomerulone-

phrosis in experimental groups were more frequently seen than in control groups. The kidneys were markedly enlarged and pale, and cystic spaces were scatteringly present. Histologically, renal tubules were dilated and contained densely pinkstaining hyaline casts (Fig. 4).

Discussion

In a two-year study, tumors have developed in the subcutaneous tissue, liver and others, by subcutaneous administration of PenCDF or

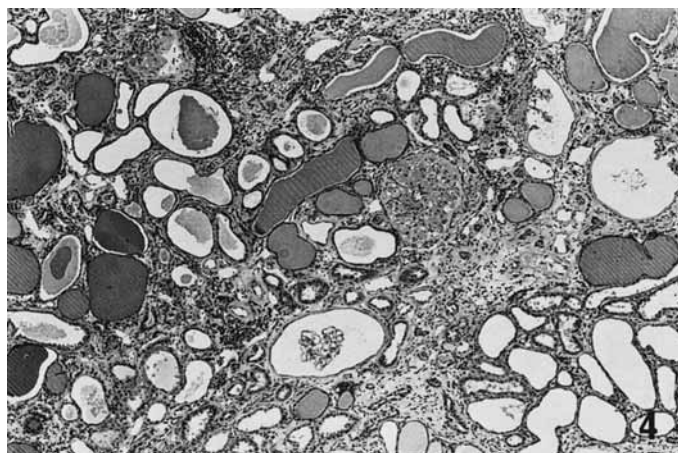


Fig. 4 Glomerulonephrosis in a rat received 40 μg of 1,2,3,4,7,8-HCDF. There is moderate cystic dilatation of tubules, proteinaceous intratubular casts and interstitial inflammation. The changes of the glomeruli are also seen. HE staining. $\times 70$

HCDF to rats. Although the number of rats used is not enough to analyse statistically the dose-response relationships, it is considered to be certain that PenCDF and HCDF has a carcinogenic potency, considering no appearance of tumor in control rats. Moreover, tissues of tumor production fairly coincide with those retained PenCDF in high accumulation rate⁹⁾. The minimum carcinogenic dose of HCDF in the present study is approximately 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ by single application, and this dose might be still reduced by refined regimen of treatment. This carcinogenic dose is quite low, and is comparable to that of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) which caused an increased incidence of hepatocellular carcinomas and other tumors in feeding 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, over a two year period, though route of administration is different⁷⁾.

The liver is the organ most consistently affected by PCBs, PCDFs and TCDD. It is conceivable that high ability of TCDD or PCDFs to induce the hepatic monooxygenase system would have potential role in carcinogenesis. Moreover, it is interesting to observe subcutaneous tissue tumors in this study, since increased risks for soft tissue sarcoma have been reported in the people exposed

to phenoxyacetic acid or chlorophenols, which are contaminated with TCDD⁴⁾⁵⁾. Although it is reported that glomerulonephrosis with cysts formation in the kidney is seen in aged rats³⁾, PenCDF and HCDF might accelerate these changes. Because, these lesions were seen in nearly half of the experimental rats, while similar lesions in lower grade were seen in 2 out of 10 control rats.

Thus, study of chronic effects including carcinogenicity as well as acute effect of PCDF congeners on animals would be important to evaluate human risks of exposure to these chemicals.

References

- 1) Brewster DW, Elwell MR and Birnbaum LS: Toxicity and disposition of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (4 PeCDF) in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93: 231-246, 1988.
- 2) Chen PH-S, Luo M-L, Wong C-K and Chen C-J: Polychlorinated biphenyls, dibenzofurans, and quaterphenyls in the toxic rice-bran oil and PCBs in the blood of patients with PCB poisoning in Taiwan. *Amer. J. Ind. Med.* 5: 133-145, 1984.
- 3) Durand AMA, Fisher M and Adams M: Histology in rats as influenced by age and diet. I. Renal and cardiovascular systems. *Arch. Pathol.* 77: 268-277, 1964.

- 4) Eriksson M, Hardell L, Berg NO, Moller T and Axelsson O: Soft-tissue sarcomas and exposure to chemical substance: a case-referent study. Brit. J. Ind. Med. 348: 27-33, 1981.
- 5) Hardell L, Sandstrom A: Case-control study: soft-tissue sarcomas and exposure to phenoxyacetic acids or chlorophenols. Brit. J. Cancer 39: 711-717, 1978.
- 6) Ioannou YM, Birnbaum LS and Matthews HB: Toxicity and distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in male guinea pigs. J. Toxicol. Environ. Health 12: 541-553, 1983.
- 7) Kociba RJ, Keyes DG, Beyer JE, Carreon CM, Wade CE, Dittenber DA, Kalnin RP, Frauson LE, Park CN, Barnard SD, Hummel RA and Humiston CG: Results of a two year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 46: 279-303, 1978.
- 8) Kuroki H and Masuda Y: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. Chemosphere 7: 771-777, 1978.
- 9) Kuroki H, Masuda Y, Yoshihara S and Yoshimura H: Accumulation of polychlorinated dibenzofurans in the liver of monkeys and rats. Food Cosmet. Toxicol. 18: 387-392, 1980.
- 10) 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.
- 11) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and rice oils used by patients with Yusho. Fukuoka Acta Med. 66: 593-599, 1975.
- 12) 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.

(和文抄録)

ラットにおける 2, 3, 4, 7, 8-五塩化ジベンゾフラン および 1, 2, 3, 4, 7, 8-六塩化ジベンゾフランの発癌性

佐賀医科大学地域保健科学講座

西 住 昌 裕

本研究では、油症患者の体内に残留していることが確認されているポリ塩化ジベンゾフランの発癌性の有無を検討するため、このうち 2 種の異性体をラットに投与し、2 年後の剖検により発生腫瘍の検索を行った。

オリーブ油に溶解した 2, 3, 4, 7, 8-五塩化ジベンゾフランないし 1, 2, 3, 4, 7, 8-六塩化ジベンゾフランを、それぞれに多量投与群 (1 匹当り 80 μ g), 中等量投与群 (1 匹当り 40 μ g), 少量投与群 (1 匹当り 4 μ g) を設定して、1 群 5 匹からなるウィスター系雄ラットの背部皮下に投与した。

2, 3, 4, 7, 8-五塩化ジベンゾフランの中等量投与群と少量投与群のうち、各 1 匹がそれぞれ 55, 70 週後に死亡したが、他のラットはすべて 104 週後の屠殺時

で生存した。屠殺時の病理組織学的検査により、肝細胞癌が 2, 3, 4, 7, 8-五塩化ジベンゾフランの多量投与群の 1 匹と、1, 2, 3, 4, 7, 8-六塩化ジベンゾフランの中等量および少量投与群で各 1 匹に認められた。また、2, 3, 4, 7, 8-五塩化ジベンゾフランの中等量投与群の 1 匹に線維腫、1, 2, 3, 4, 7, 8-六塩化ジベンゾフランの多量投与群の 2 匹で、1 匹に線維腫、他のラットに脂肪腫が、中等量投与群の 1 匹に線維肉腫が、いずれも胸部皮下腫瘍として発生していた。この他、いずれの化合物でも、多量ないし中等量投与群で、肝に過形成性小結節を有するラットが 2~3 匹みられた。少数例についての結果ではあるが、発癌の可能性を有する化合物として、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

実験的動物発癌に及ぼす PCDF の影響 —— その濃度差の検討 ——

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・豊島 弘行
宿輪 哲生・鵜殿 雅子・吉田彦太郎

Influences of Polychlorinated Dibenzofuran on Experimental Carcinogenesis in Mice

Ryoji HIROSE, Makoto HORI, Hiroyuki TOYOSHIMA,
Tetsuo SHUKUWA, Masako UDONO and Hikotaro YOSHIDA

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

To ascertain whether 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PCDF) has the possibility of co-carcinogen, three different concentrations of 0.5, 1 and 5 ppm PCDF was evaluated in the course of experimental carcinogenesis in mice.

Concerning the difference of total number of tumors occurred among the groups of mice with various treatments, the mice treated with 0.5 ppm PCDF and 20-methylcholanthrene (MC) have produced twice as many tumors as those of the other groups. Then the adequate concentration of PCDF to be a promoter was supposed to be 0.5 ppm.

Two kinds of tumors were seen in mice which were treated by MC with or without PCDF, and there was no difference of tumors between the groups by appearance and pathologically. One is a benign papilloma, and the other is a squamous cell carcinoma which tends to keratinize and looks like a keratoacanthoma. The latter had a tendency to arise much more four weeks after the treatments had been done, even though the number of the former increased gradually.

There was no evidence that PCDF of these concentrations could permeate through the skin and could be toxic. Furthermore PCDF seemed to neither stay nor act directly on the follicular epithelium, since there was no acne formation on the back skin of mice.

One of the possible factors to cause malignant changes of epidermal cells was supposed to be a prolonged inflammation of the skin.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 246-254, 1989)

はじめに

油症の原因物質のひとつと目されている 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (以下 PCDF) は肝癌の発生を促進させるとの報告¹⁾がある。そこで皮膚の発癌に対してもなんらかの促進効果があるか否かを明らかにする目的で、以下の検討を試みた。

なお、われわれは前報においてマウス皮膚に対して PCDF の発癌作用は認めなかったが、化学発癌剤 20-methylcholanthrene (以下 MC) と併用した場合に、

ある濃度において promoter としての作用があることを明らかにした。今回の実験はその発癌機序の詳細を明らかにするために計画されたのである。

実験材料と方法

PCDF は第一薬科大学物理分析学教室から提供していただいた。溶媒には acetone を用いた。化学発癌物質には MC (片山化学) を用い、0.3%acetone 溶液として使用した。

実験動物は 15 週齢の ddy マウス 210 匹を用いた。

MC は剪毛した腰背部に滴下，塗布する方法で用いた群（第 I 群）と週 2 回 12 週間連続的に塗布した群（第 II 群）とに分けて観察した。そして両群に PCDF の塗布を併用したが，PCDF の濃度によりそれぞれを下記の 3 群に分けて検討した。

各群の動物数は 30 匹ずつとし，以下の処置を行った（表 1）。

第 I-a 群：0.3%MC 1 回塗布，以後 0.5 ppm PCDF を週 2 回塗布

第 I-b 群：0.3%MC 1 回塗布，以後 1 ppm PCDF を週 2 回塗布

第 I-c 群：0.3%MC 1 回塗布，以後 5 ppm PCDF を週 2 回塗布

第 II-a 群：0.3%MC 週 2 回塗布，8 時間後 0.5 ppm PCDF 週 2 回塗布

第 II-b 群：0.3%MC 週 2 回塗布，8 時間後 1 ppm PCDF 週 2 回塗布

第 II-c 群：0.3%MC 週 2 回塗布，8 時間後 5 ppm PCDF 週 2 回塗布

なお対象として，同一期間，無処置で飼育された動物群，MC 単独塗布群が必要であるが，それぞれに

30 匹のマウスを用意した。また PCDF そのものの塗布による発癌性の有無を知るための対照も必要であるが，すでに前報²⁾において 0.1, 1, 10 ppm の各濃度を用いて検討し，いずれの濃度においても発癌性は認められなかったので，今回は省略した。

第 III 群：0.3%MC 週 2 回塗布

以上の各群につき，12 週まで処置を継続するとともに，4 週目，8 週目，12 週目に各群の腫瘍発生状況を観察し，2 匹ずつから生検を行った。さらに処置終了後の 16 週目と 20 週目に腫瘍発生状況の観察を行った。

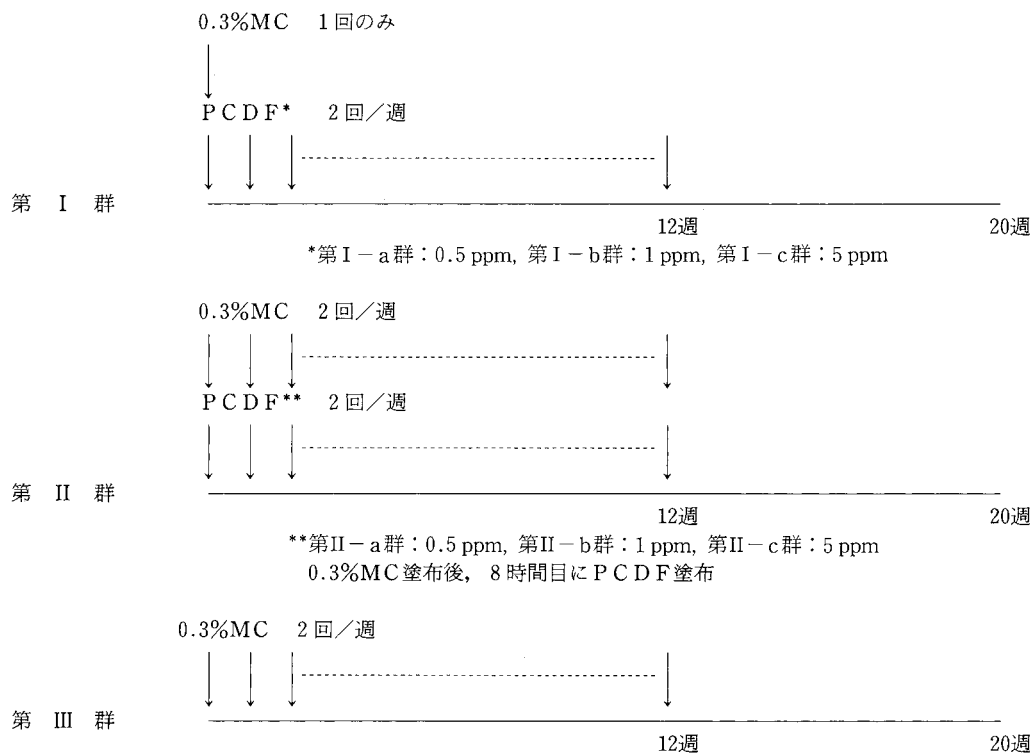
結 果

1. 腫瘍発生率

1) 第 I 群

処置開始後 7 週目まではいずれの群においても腫瘍の発生は認められず，マウスの活動性も良好であった。肉眼的にも，処置部に変化はなく，発毛状態にも変化はなかった。8 週目では，第 I-a 群の 1 匹のみに有茎性の淡紅色腫瘍が出現した。しかし他の群のマウスのいずれにも腫瘍を認めることはなかった。発生した

表 1 実験方法



腫瘍は乳嘴腫様であり、直径9 mmにまで増大したが、それ以上にはならず、腫瘍中央部に痂皮を付着するようになった(第1図)。腫瘍の発生をみないマウス腰背部の4週目ではなんらの変化も認められず(第2図)、8週目では発毛良好となった(第3図)。12週目では、きわめて軽度の皮膚肥厚が観察されたが、腫瘍の発生はみられなかった(第4図)。その後、新たな腫瘍の発生はまったくなかった。

2) 第II群

4週目においてすでに、第I群のマウスと比較し、著明な脱毛傾向が現れ、さらに皮膚の肥厚と粗糙化を認めた。しかし潮紅や落屑はほとんど見られなかった(第5図)。8週目になり初めて出現した腫瘍は有茎性の淡紅色腫瘤であった(第6図)。その後、いずれの動物にも腫瘍は多発し始め、もっとも多い動物では7個の腫瘍の発生をきたしている(第7図)。腫瘍の発生率は表2に示したが、処置終了時の12週目において、第II-a群では30匹に腫瘍発生をみ、腫瘍の合計数は69個に及んだ。同じく第II-b群では18匹に48個、第II-c群では16匹に29個の発生を認めた。すなわちPCDFの濃度が高くなるにつれ、腫瘍発生率が低くなる傾向がみられた。しかし処置終了後の16週目では、第II-a群で、生存マウス27匹中27匹、腫瘍総数は188個と著明な増加を示した。第II-b群では26匹中25匹で105個、第II-c群では29匹中24匹、116個といずれも腫瘍の多発をみている。20週目では急速なマウスの死亡数の増加により、腫瘍総数はいずれの群でも減少している。また腫瘍は、せいぜい直径1 cmまでの有茎性のpapilloma型腫瘍(以下P)(第6図)と、無制限に増殖を続け、中央がクレーター状に陥凹し、中に黒色角化性物質を容れるkeratoacanthoma型腫瘍(以下K)(第8図)の2つのタイプが認められた。それらのうちわけは16週目の第II-a群ではKが14個でPが174個、第II-b群ではそれぞれ24個と81個、第II-c群ではそれぞれ17個と99個であり、圧倒的にPが多かった。しかしマウスの死亡により腫瘍総数の減少した20週目において、Pはいずれの群でも減少しているのに反し、Kはいずれの群でも増加した。すなわち20週目の第II-a群ではK 21個とP 63個、第II-b群ではK 37個とP 31個と、その数が逆転し、第II-c群ではK 31個とP 72個という結果となった。

3) 第III群(対照群)

4週目における脱毛の程度は、第I群より強く、第II群より弱かった。しかし皮膚の肥厚は第II群と同程

度であり、落屑は7群中もっとも顕著であった(第9図)。腫瘍は8週目に初発し、その後は緩徐な増加を示し、10週目ではなお30匹中わずか2匹にみの腫瘍が見られたにすぎなかった。しかし12週目では27匹中16匹に32個の腫瘍発生をみた。そのうちKは2個、Pは30個であった(第10図)。

16週目では25匹中24匹、194個の腫瘍が発生し、Kは21個、Pは73個であった。さらに20週目になると、Kは27個に増加した。

2. 組織学的変化

A. 非腫瘍部

1) 第I群

4週目では、表皮はやや肥厚し約5層となるが、表皮細胞に異型性は認めなかった(第11図)。12週目では、表皮は2~3層と正常化し、異型性は認められなかった(第12図)。

2) 第II群

4週目ではいずれの群においても表皮は約5層で、肥厚の程度は第I群と大差はない。しかし主として基底層における細胞配列の不整が認められた(第13図)。12週目になると、表皮細胞数はやや減少するが、なお正常よりは肥厚していた。毛嚢間表皮の基底細胞の核はクロマチン量を増し、異型性が著しくなった(第14図)。しかし毛嚢に沿った表皮細胞は異型性を示さなかった(第15図)。

3) 第III群

4週目の表皮は、7群中もっとも表皮肥厚が強く、約7層であった。異型性も著しく、ときに核分裂像も見られた(第16図)。

B. 腫瘍部

1) P型腫瘍

いずれの動物に出現したPも基本的には同様の構築、組織像を呈した。すなわち健康皮膚面より上方へ向かって隆起し、多数の襞状突起を示した。突起間は厚い角質で満たされている。表皮は乳頭状に増殖していた(第17図)。表皮部分を拡大すると、約13層の表皮細胞があり、大型の核や、2個以上の核小体を有する核を持つ細胞が認められ、異型性を示す細胞も少なからずみられた。しかし表皮下端はクロマチンに富んだ楕円形の小型の核を有する細胞により明瞭な柵状配列が形成され、真皮との境界は明らかであった(第18図)。すなわち良性のpapillomaの像である。

2) K型腫瘍

表皮から連続性に真皮へ向かい、不規則に巣状ないしシート状に腫瘍細胞が増殖している像がみられる。



第1図 第I-a群, 12週. 直径9mmのP型腫瘍.



第2図 第I-b群, 4週. まったく皮膚に変化は認められない.



第3図 第I-a群, 8週. 発毛良好となる.



第4図 第I-a群, 12週. 軽度の皮膚の肥厚をみるのみである.



第5図 第II-a群, 4週. 脱毛, 皮膚の肥厚および粗糙化をみる.



第6図 第II-b群, 8週. 有茎性淡紅色のP型腫瘍.

腫瘍細胞は大小さまざまな核を有し、一部は真皮深層への浸潤を示している。また強い角化傾向を示し、horn pearlの形成もみられた(第20図)。これらの所見はヒトの悪性度の高いsquamous cell carcinomaに一致すると考えられた。第II-c群に出現したKを示す(第19図)。

考 察

前報²⁾では、0.1, 1, 10 ppmの3つの異なる濃度のPCDFが発癌に及ぼす影響を検討した。その結果、PCDFにはinitiatorとしての作用はないが、1 ppm付近の濃度ではpromoterとして働く可能性がある



第7図 第II-a群, 12週. K型とP型の混在する多発性腫瘍.



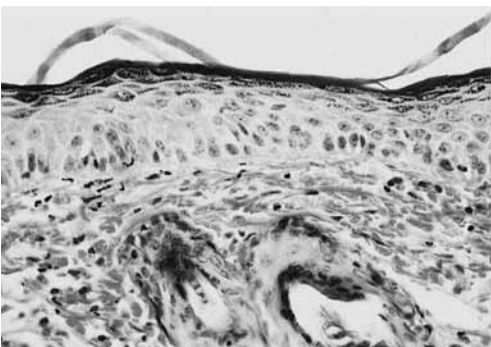
第8図 第II-b群, 12週. 中央に角栓を形成する大型のK型腫瘍.



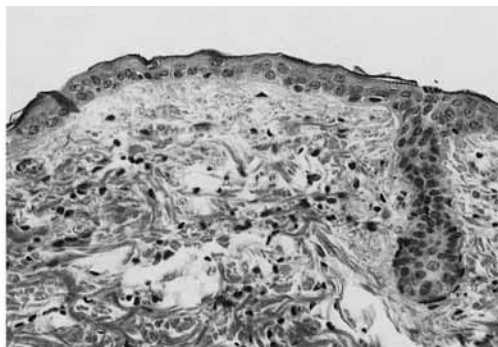
第9図 第III群, 4週. 著明な落屑と皮膚の肥厚をみる.



第10図 第III群, 12週. MC単独外用により生じたK型およびP型腫瘍.



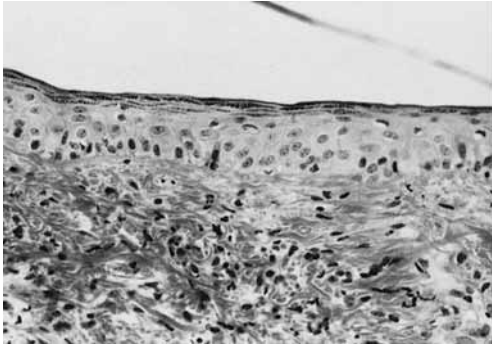
第11図 第I-a群, 4週. 軽度の表皮肥厚を認める. 表皮細胞に異型はない.



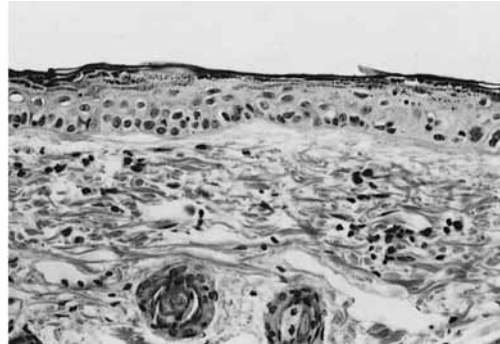
第12図 第I-c群, 12週. 表皮肥厚は消失し, 異型細胞は出現しない.

思われた²⁾. そこで今回は, 0.5, 1, 5 ppm の3種の濃度のPCDFを用い, PCDFのpromoterとしての至適濃度と作用の確認を行ったのである. その結果, 第I群のマウスでは, 経過中に低濃度の0.5 ppm PCDF併用群のわずか1匹にPが出現したのみであ

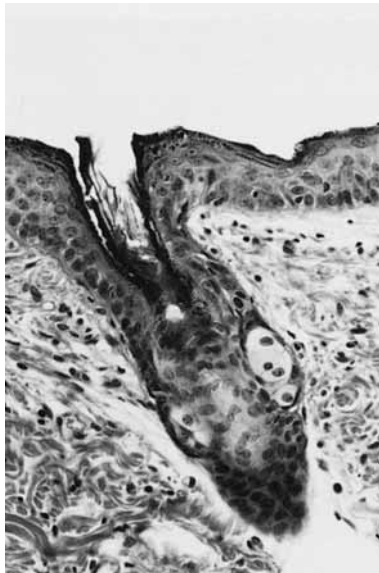
り, また第II群では, 12週間, 週2回MCを塗布し, その8時間後に毎回PCDFを塗布する方法をとったが, 腫瘍発生マウス数と腫瘍総数は16週目において, 0.5 ppm PCDF併用群では27匹中27匹で174個, 1 ppm PCDF併用群では26匹中25匹で105個, 5



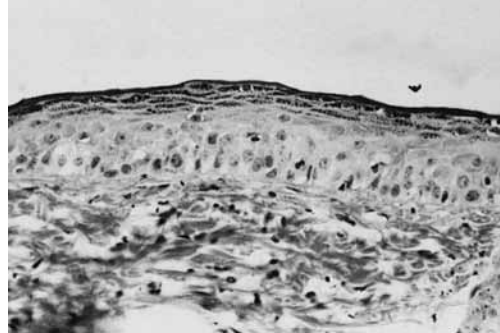
第 13 図 第II-b群, 4週, 軽度の表皮肥厚と基底層の細胞配列の乱れ出現。



第 14 図 第II-b群, 12週, 毛嚢間表皮の基底細胞の変化が強まる。



第 15 図 第II-c群, 12週, 毛嚢表皮細胞に異型性は認められない。



第 16 図 第III群, 4週, 表皮肥厚および異型性は, 全群中もっとも強い。

ppm PCDF 併用群では 29 匹中 24 匹で 116 個であったのに対し, MC 単独では 25 匹中 24 匹で 94 個であった。したがって発生した腫瘍総数は 1 ppm および 5 ppm PCDF 併用では MC 単独群よりやや多い程度であるが, 0.5 ppm PCDF 併用では 2 倍の腫瘍が出現したことになる。このように MC 単独群に比し, 3 種の濃度のいずれの PCDF も MC と併用することにより腫瘍発生率が高くなる結果を示した。したがって PCDF が発癌に際して promoter となりうると思われ, かつその場合の至適濃度は前回の実験で予想された 1 ppm よりむしろ 0.5 ppm より近いと思わ

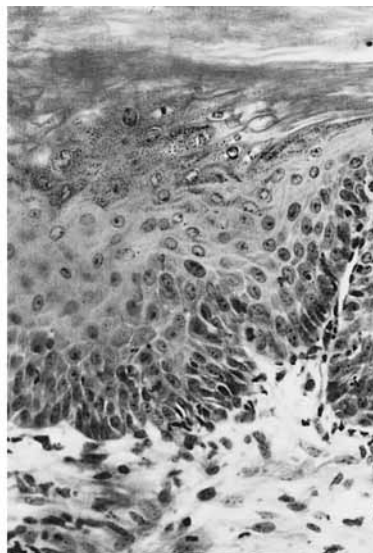
れた。

また PCDF 併用群と非併用群の間における腫瘍の形態上の差は認められず, PCDF に特異的な腫瘍の発生は認められなかった。

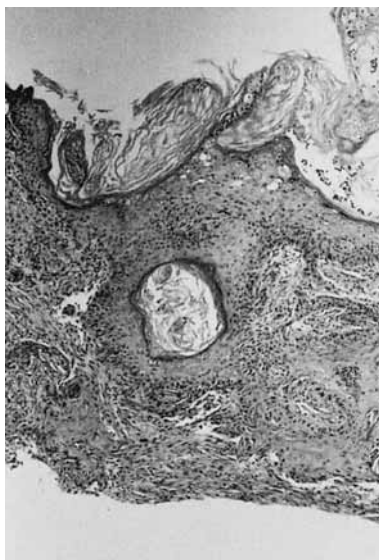
また肉眼的, 光顕的な経時的変化を見ると, 第 I 群では 4 週目に軽度の表皮肥厚を認めたのみで, 肉眼的な炎症所見も持続することなく, 処置開始前に施行した剪毛部は良好な発毛状態を示し, 12 週目では表皮肥厚も消失し, 正常皮膚に類似する組織像に復した。一方, 第 II 群では, すでに 4 週目において肉眼的炎症所見とともに組織学的にも表皮の肥厚, 基底層の細胞配列の乱れや異型性の出現といった皮膚の前癌状態とされる変化が認められた。そして腫瘍発生期になると, 表皮は菲薄化し始めたが, 異型性はむしろ増強した。このような表皮の所見は, 紫外線発癌と考えられているヒトの日光角化症においてよくみられる変化に類似している。また毛嚢表皮には異型細胞はほとんど見られず, 一方, 毛嚢間表皮に明らかな異型細胞が出現し



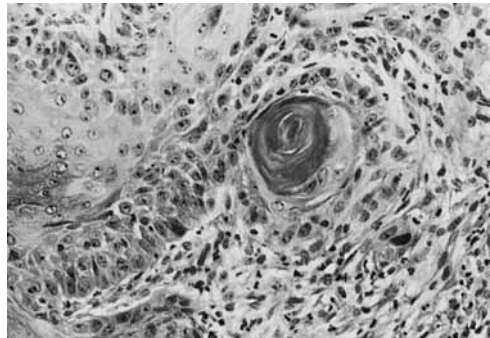
第17図 第I-a群, 12週, P型腫瘍, 皮表へ向かい増殖している。



第18図 第I-a群, 12週, P型腫瘍, 組織学的に悪性所見を認めない。



第19図 第II-c群, 12週, K型腫瘍, 真皮へ向かう浸潤増殖を示す。



第20図 第II-c群, 12週, K型腫瘍, 強い角化傾向を示し, horn pearl 形成も認める。

ていることより, 発癌物質の侵入口と思われる毛嚢より発癌が始まるとは限らないと思われた。

なお組織学的に分類した2種の腫瘍は, 肉眼的にも鑑別は容易であり, 本来異なった性質を持つものと考えたい。すなわちPからKへ, またはKからPへの移行はないと思われる。Pは良性で, せいぜい直径1

cmまでの大きさであり, 自律性に増殖を停止するようである。それに対し, Kは無制限の増殖を示す角化の強い悪性腫瘍である。今回の実験結果では, 処置終了時の12週目では, Kの発生はいずれの群においても少なく, ほとんどの腫瘍はPであったが, 処置終了後4週間を経た16週目においては, 12週目と比較し, いずれの群でも2~4倍のPと3~12倍ものKの出現をみた。さらに20週目では, 多くのマウスは衰弱し, 死亡するものが多くなったにもかかわらず, Kの数はいっそう増加している。何故投与終了後に腫瘍, ことに悪性のKが増えるのかは不明であるが, その理由としてPCDFの経皮吸収や残留性の有無を考慮す

表 2 MC誘発マウス発癌へのPCDFの影響

		生存 マウス数	腫瘍発生 マウス数	腫瘍総数	K型腫瘍	P型腫瘍
第I-a群 30匹 初回MC, 以後0.5ppmPCDF単独	8週	30	1	1	0	1
	12週	29	1	1	0	1
	16週	24	1	1	0	1
	20週	24	1	1	0	1
第I-b群 30匹 初回MC, 以後1ppmPCDF単独	8週	30	0	0	0	0
	12週	29	0	0	0	0
	16週	27	1	1	0	1
	20週	27	1	1	0	1
第I-c群 30匹 初回MC, 以後5ppmPCDF単独	8週	29	0	0	0	0
	12週	29	0	0	0	0
	16週	28	0	0	0	0
	20週	27	0	0	0	0
第II-a群 30匹 MC-0.5ppmPCDF併用	8週	30	3	3	0	3
	12週	30	22	69	4	65
	16週	27	27	188	14	174
	20週	16	16	84	21	63
第II-b群 30匹 MC-1ppmPCDF併用	8週	28	3	4	0	4
	12週	27	18	48	2	46
	16週	26	25	105	24	81
	20週	22	22	68	37	31
第II-c群 30匹 MC-5ppmPCDF併用	8週	30	1	1	0	1
	12週	30	16	29	5	24
	16週	29	24	116	17	99
	20週	25	23	103	31	72
第III群 30匹 MC単独	8週	28	2	2	0	2
	12週	27	16	32	2	30
	16週	25	24	94	21	73
	20週	16	16	73	27	46

る必要があろう。

PCDFの強い毒性については多くの報告があり⁶⁾⁹⁾, 経口摂取は高い危険性を有するとされている。しかし, PCDFの経皮吸収による中毒症状は生じにくいようである⁷⁾。今回も処置経過中および終了後の各群間におけるマウス生存数を比較してみたが, PCDFとMCの併用群のほうがMC単独群より生存数が多く, またPCDFのみ処置した群においてはさらに生存数が多かった。これらの事実より, 0.5, 1, 5ppmのいずれの濃度のPCDFも, 塗布による経皮吸収はないか, あっても軽微と思われた。またPCDFやPCBは, 油症患者の肝および脂肪組織中にながく止どまることがあきらかにされている⁵⁾。これらの残留したPCDFやPCBはその排出過程において, 毛嚢脂腺を通過す

ると考えられており⁴⁾⁷⁾, 油症の皮膚症状は痤瘡の形で現れる。今回のPCDF外用群のマウスでは, 12週間にわたって塗布を続けたにもかかわらず腰背部には痤瘡や面皰の出現はみられず, また組織学的にも毛嚢上皮細胞に明らかな変化が生じなかった。したがってPCDFの残留は考えがたく, またPCDFが直接に毛嚢上皮に作用したとする証拠もない。すなわちPCDFはMCの発癌作用を助けるように毛嚢間の表皮細胞に作用したと考えられる。

処置終了後に腫瘍が遅れて出現するまでに表皮細胞に何が起こったのかは不明であるが, 肉眼的にも組織学的にも持続する表皮肥厚および炎症所見の存在は腫瘍発生の大きな一因であろう¹³⁾。しかし発生腫瘍の悪性度を決定する要因はなお不明と言わざるをえない。

結 論

1. 0.5, 1, 5 ppm の3種の濃度の PCDF につき、それらの promoter としての作用を MC 誘発マウス発癌実験系において検討した。その結果、0.5 ppm がもっとも promoter としての作用が強かった。

2. 肉眼的に2種の腫瘍の発生をみた。ひとつは良性の papilloma 型 (P) であり、他は悪性の keratoacanthoma 型 squamous cell carcinoma (K) であり、これらは互いに移行することはないと思われた。MC 単独の場合と MC と PCDF 併用の場合で、発生した腫瘍の種類に差はなく、PCDF により特有な腫瘍が発生するとは思われなかった。

3. PCDF を外用することによりマウスの死亡率が増加することはないと、経皮吸収による毒性の発揮はないと思われた。さらに PCDF 群では肉眼的に痤瘡を形成することはないと、かつ毛嚢表皮細胞に異型性を生じないことより、PCDF は外用により残留することはないと、毛嚢表皮に直接作用することもないと思われた。

4. MC と PCDF を毎回塗布した群では、MC を初回のみ塗布し、以後 PCDF のみを塗布した群と比較した場合、肉眼的かつ組織学的に炎症所見が持続した。このような炎症の持続が表皮細胞を腫瘍化させる一因であると思われた。

5. 処置終了時に観察された腫瘍は P がほとんどで、K はわずかであった。しかし処置終了後4週目には、P の増加に加え、K がきわめて多発したことより、悪性腫瘍は遅発する傾向にあると思われた。その理由は不明である。

稿を終えるにあたり、実験に用いた PCDF をご提供くださいました第一薬科大学教授増田義人博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) 広瀬 寮二：化学発癌剤 20-methylcholanthrene 誘発マウス皮膚癌発生におよぼす 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.
- 2) 広瀬 寮二，堀 真，藤田和夫，山城一純，宿輪哲生，吉田彦太郎：PCDF の発癌におよぼす影響—腫瘍発生率と光顕的電顕的検討—。福岡医誌 78：43-50, 1987.
- 3) 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.
- 4) 小松富美子，菊池昌弘：結晶 Tetrachlorobiphenyl 塗布によるウサギ皮膚の変化。福岡医誌 63：384-386, 1972.
- 5) Kuroki H and Masuda Y：Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. Chemosphere 7：771-777, 1978.
- 6) Nishizumi M：Acute toxicity of polychlorinated dibenzofurans in CF-1 mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 45：209-212, 1978.
- 7) 西住昌裕，倉恒匡徳，増田義人：Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzofuran および Polychlorinated Dibenzodioxin のウサギ耳塗布による過角化作用の比較。福岡医誌 66：600-604, 1975.
- 8) Nishizumi M and Masuda Y：Enhancing effect of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran on diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in rats. Cancer Letters 33：333-339, 1986.
- 9) Oishi S, Morita M and Fukuda H：Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 43：13-22, 1978.

3,4,5,3',4'-Pentachlorinated Biphenyl 投与犬肺組織の形態学的検討

九州大学医学部胸部疾患研究施設

永田 忍彦・シャムラル・重松 信昭

Morphology of 3,4,5,3',4'-Pentachlorinated Biphenyl-Induced Change in Canine Lung

Nobuhiko NAGATA, Sham LAL and Nobuaki SHIGEMATSU

*Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka 812*

We investigated the light and electron microscopical changes of the lung in dogs treated with 3,4,5,3',4'-pentachlorinated biphenyl (PenCB). Beagle dogs were orally administered with 0.1 mg/kg of PenCB, and sacrificed 3, 5 and 7 weeks after the PenCB administration. Light microscopically, bronchiolar epithelial cells showed cytoplasmic vacuolization, which was most prominent 5 weeks after the PenCB administration. Electron microscopically, nonciliated bronchiolar epithelial cells (Clara cells) revealed degradation of glycogen particles, swollen, irregularly arranged smooth endoplasmic reticulum, and swollen mitochondria, while no significant change was found in other epithelial cells. The endothelial cells also showed no significant change except for increased number of cytoplasmic vesicles. This is a first report on halogenated hydrocarbon-induced degradation of glycogen particles in Clara cells.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 255-257, 1989)

はじめに

クララ細胞は細気管支にみられる無線毛上皮細胞で cytochrome P-450 monooxygenase 系を介して物質の代謝、解毒に関与していると考えられる³⁾。クララ細胞の形態は動物の種により相違があり、また同じ動物でも年令に伴いその形態に変化がみられる。PCB (polychlorinated biphenyl) をラットに投与すると、肺ではクララ細胞に変性がみられると報告されている²⁾。イヌのクララ細胞はラットとはかなり異なる形態をしており、他の哺乳動物の周生期のクララ細胞と形態上類似している³⁾。したがってイヌに PCB を投与した際のクララ細胞の変化はヒトの胎児の PCB 汚染を考えるうえでも興味深い。今回われわれは PCB 投与犬の肺組織を光顕的、電顕的に観察し、イヌでは従来報告されてきた PCB による変化とは異なる所見を呈することを見いだした。

材料および方法

実験動物

雌のビーグル成犬 12 頭を用い、3 頭を対照群、9 頭を実験群とした。餌は 1 日 1 回午後 3 時に与えた。これらの飼育は摂南大学薬物安全科学研究所で行われた。

薬物投与および屠殺

0.05 mg/kg の 3,4,5,3',4'-Pentachlorinated biphenyl (PenCB) を 1 mg/ml になるように corn oil に溶解しゼラチンカプセルにつめて、実験第 1 日目および第 3 日目の午前中に経口投与した (合計投与量は 0.1 mg/kg)。第 1 回 PenCB 投与日より 21 日、35 日、49 日後に対照群 1 頭、実験群 3 頭ずつを屠殺した。屠殺はネンプタール麻酔後、頸動脈より脱血することにより行った。脱血屠殺後開胸を行い、肺組織を切除し一部は 3% グルタルアルデヒドにて浸漬固定を行い電顕標本を作成した。また一部は 10% ホルマリンで固定し光顕標本を作成した。

結 果

光顕所見

対照群では光顕上明らかな変化は見られなかった。

PenCB 投与群では無線毛細気管上皮細胞の細胞質空胞化が特徴的所見としてみられ、この変化は PenCB 投与後 35 日目の群においてもっとも顕著であった。細気管支上皮細胞の壊死、脱落、再生像は全経過を通してみられなかった。線毛細気管上皮細胞にはとくに変化はみられなかった。肺胞では一部に軽度の水腫を認める以外光顕上明らかな変化はみられなかった。

電顕所見

対照群における細気管支は主として無線毛上皮細胞により被覆されており、その間に少数の線毛細胞が介在してみられた。無線毛上皮細胞は核が細胞基底側に位置しており、細胞質の大部分はグリコーゲン顆粒により占められており、他の動物種で報告されている特有の分泌顆粒はみられなかった。小胞体とミトコンドリアは細胞辺縁部に少数存在していた。

PenCB 投与群では光顕上認められた無線毛上皮細胞の細胞質空胞化に一致して、同細胞のグリコーゲン

顆粒の融解がみられ(図1)、このような細胞では滑面小胞体は不規則に拡張し、配列も著しく不規則になっていた。またミトコンドリアの膨化もみられ、一部の膨化したミトコンドリア内には封入体が認められた。内部の密度が不均一な二次ライソゾームも散見された。グリコーゲン顆粒の融解が明らかでない細胞においても、滑面小胞体が拡張しているものがみられた。無線毛細気管上皮細胞以外の細胞では、血管内皮細胞において小胞の増加がみられた以外には明らかな変化はみられなかった。

考 察

PCB によりひきおこされる肺の形態学的変化に関する報告は少ない。ヒトでは油症患者の剖検肺の検討より、気管支、細気管支周囲のリンパ球浸潤や肺胞腔内のマクロファージ集着が見られるとの報告があり⁶⁾、ラットやマウスを用いた実験ではⅡ型肺胞上皮細胞の層状封入体の濃縮像、クララ細胞の壊死などの

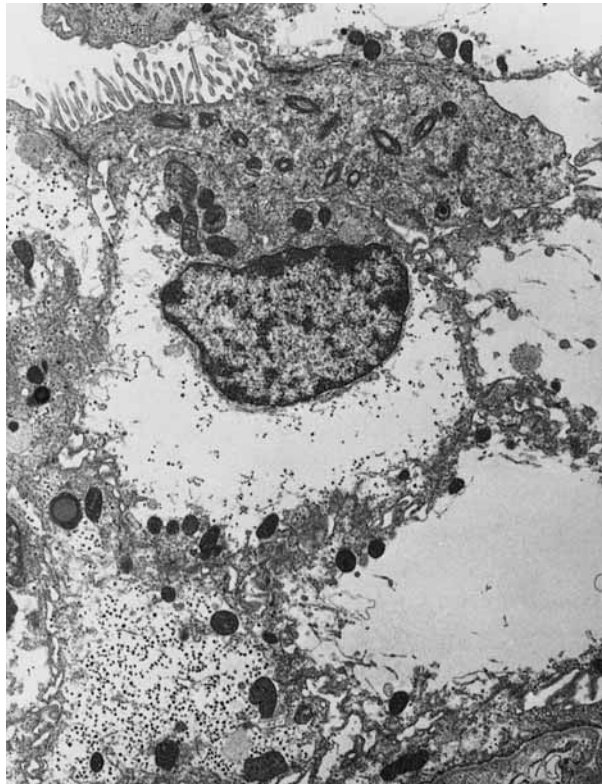


Fig. 1 Electron microscopic figure of canine bronchiolar epithelial cells treated with 3,4,5,3',4'-pentachlorinated biphenyl. Nonciliated bronchiolar epithelial cells (Clara cells) showed degradation of glycogen particles, while ciliated ones revealed no significant change. (×8,000)

所見が見られると報告されている²⁾。ラットやマウスでは投与されたハロゲン化炭化水素はクララ細胞に存在する cytochrome P-450 monooxygenase system により代謝され、その結果生じた代謝物がクララ細胞を障害すると報告されている⁴⁾。ラット、マウスにおける PCB によるクララ細胞の壊死の機序はこれと同様のものと考えられる。今回イヌを用いた実験ではグリコーゲン顆粒の融解が特徴的所見として見られたが、PCB による変化として現在までにこのような所見の記載は見られない。これはひとつは今回実験動物としてイヌを用いたことが原因と思われる。すなわち先にも述べたごとくイヌのクララ細胞の形態はヒトやラット、マウスと大きく異なっており、グリコーゲン顆粒が細胞質の大部分を占めている。PCB 投与によりなぜグリコーゲン顆粒が融解するのかについては不明である。滑面小胞体は脂質の代謝に深く結びついた細胞内小器官であり、脂溶性物質である PCB は細胞内では滑面小胞体に取り込まれると考えられる。事実今回の実験でも滑面小胞体は拡張し配列も不規則化していた。またグリコーゲン融解が明らかでない細胞でも滑面小胞体の拡張、配列の乱れが観察され、かかる変化がグリコーゲン融解に先行するのではないと思われる。イヌではまだ証明されていないが、動物種によっては細気管支上皮細胞に glucose-6-phosphatase が

存在することが報告されており¹⁾、本酵素が PCB により活性化されればグリコーゲン融解が起これと考えられるが、詳細な機序については今後の検討が必要である。

文 献

- 1) Eskenasy A, Ionescu J, Tapu V: The histochemistry of the lung. I. Enzymic activities in the human lung. Relations between lung structure and functions. *Morphol Embryol* 21: 149-155, 1975.
- 2) Nakanishi Y, Shigematsu N, Kurita Y, Matsuba K, Kanegae H, Ishimaru S, Kawazoe Y: Respiratory involvement and immune status in Yusho patients. *Environ Health Perspect* 59: 31-36, 1985.
- 3) Plopper CG: Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell. *Am Rev Respir Dis* 128: S37-S41, 1983.
- 4) Reid WD, Ilett KF, Glick JM, Krishna G: Metabolism and binding of aromatic hydrocarbons in the lung. Relationship to experimental bronchiolar necrosis. *Am Rev Respir Dis* 107: 539-551, 1973.
- 5) Shigematsu N, Ishimaru S, Saito R, Ikeda T, Matsuba K, Sugiyama K, Masuda Y: Respiratory involvement in polychlorinated biphenyls poisoning. *Environ Res* 16: 92-100, 1978.

スクアランを投与した実験的 PenCB 中毒ビーグル犬における マイボーム腺病変の病理組織学的研究

九州大学医学部眼科学教室

向 野 利 彦・大 西 克 尚

Histopathology of Meibomian Gland Abnormalities in Experimental PenCB Intoxicated Beagle Treated with Squalane

Toshihiko KOHNO and Yoshitaka OHNISHI

*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka 812*

In order to examine the effect of squalane to excrete PCB from the intoxicated animals, histopathological studies of Meibomian gland abnormalities were carried out in experimental PenCB (3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl) intoxicated beagles treated with squalane. All experimental animals except a control group showed characteristic changes of Meibomian glands: dilation of the duct and squamous metaplasia of the alveolar cells. According to the degree of these findings, five stages were divided in the processes of Meibomian gland changes. The PenCB intoxicated dogs initially showed mild pathological changes of the glands and later moderate to severe degrees of findings. In the PenCB intoxicated animals treated with squalane, severe degree of Meibomian gland findings were found in the early stage and mild to moderate abnormalities in the late stage. The concentration of PenCB in blood varied in each animal, and the animals with advanced Meibomian gland abnormalities tended to have high level of PenCB concentration in blood. In conclusion, the effect of squalane to excrete PCB from the intoxicated animals were not determined in this study.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 258-262, 1989)

はじめに

油症の原因油中には PCB (polychlorinated biphenyls) のほかに PCDF (polychlorinated dibenzofuran) や PCQ (polychlorinated quaterphenyls) が含まれている。油症の本態は当初、PCB 中毒症と考えられた。しかし、微量の PCDF も強い毒性を有することが明らかになり、これらが複合していると考えられる。そしてこれらの物質を排出するために、活性炭、コレステラミン、流動パラフィン、スクアランなどが有効ではないかと検討されている¹⁾。とくにスクアランは体内残留 PCDF の除去および毒性軽減に効果があると報告されている¹⁾。

油症患者には当初、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がみられた²⁾。これらの所見がマイボーム腺の角化嚢胞の形成による

ことが、実験的 PCB 中毒サルの研究および油症患者剖検例の眼瞼病理組織標本の検討から明らかになった⁵⁾⁶⁾。そして、マイボーム腺の変化は初期、進行期、角化嚢胞期、虚脱期と進行することが明らかとなった⁶⁾。

今回、合成した PCB である 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (以下 PenCB と略) をビーグル犬に投与し PCB 中毒症モデルを作製した。さらにスクアラン squalane を投与し、その PenCB 排出促進効果を、マイボーム腺について病理組織学的に検討したので報告する。

材料および方法

PenCB をビーグル犬に経口投与後、スクアランを連続経口投与する実験は、摂南大学薬物安全科学研究所で施行された。その実験方法を簡単に説明する。

実験動物には6～7カ月齢のビーグル犬24頭(雌)をもちいた。実験動物は対照群(3頭), PenCB 処置群(9頭), PenCB 処置後スクアラン投与群(12頭)の3群に分けた。対照群には何も投与せず, PCBとしては初回投与日を投与1日として, 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB)を投与1日と3日に各1回, 0.05 mg/kg ずつ投与した。スクアランは1日1回, 1,200 mg/kg/day を投与7日から投与を開始し, 投与21日までの15日間および投与35日までの29日間投与した。各群は3分し, 投与22日, 36日, 50日で屠殺した。50日屠殺群はスクアランをPenCB 投与後7日より29日間投与した後, 投与36日から49日までの14日間の回復期間を置いた(表1)。

実験経過中に死亡した#4, #13および#15を除き, いずれも屠殺時に眼瞼を切除し, 10%ホルマリンにて固定した。眼瞼は型のとおりパラフィン包埋切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を施し, 光学顕微鏡観察に供した。

また血中 PenCB 濃度の測定は摂南大学薬学部極本らにより行われた(私信)。

結 果

マイボーム腺を中心に光顕観察を行った。対照群ではマイボーム腺は腺房もよく発達し, 導管の拡大は明らかではなかった(図1)。

PenCB 処置群および処置後スクアラン投与群では, マイボーム腺に変化がみられた。しかし, 両群の間で病変に差はみられず, マイボーム腺の主な変化は導管管腔の拡大と腺房の扁平上皮化生であり, その程度はさまざまであった。

そこで導管管腔の拡大と腺房の扁平上皮化生について次のように程度を判定した。管腔の拡大については, 嚢胞形成の明らかな例を強度とし, それ以下を軽度, 中等度と分けた。腺房の扁平上皮化生は, 腺房細胞が

扁平上皮で置き換えられる程度により, 軽度, 中等度とし, 腺房細胞が消失し, 腺房の痕跡が残存している例を強度, 腺房の痕跡が見られなくなった例を最強度とした(表2)。

サルの実験的 PCB 中毒症の結果⁶⁾を参考に, ビーグル犬のマイボーム腺病変は, 初期, 進行期(前期, 中期, 後期), 嚢胞期の5段階に分けることができた。

初期ではマイボーム腺導管管腔の拡大が見られるが, 扁平上皮化生は軽微であった(図2)。進行期前期では一部に, より顕著な導管管腔の拡大がみられるとともに, 扁平上皮化生が進行した(図3)。進行期中期では導管管腔はさらに拡大し, 管腔壁も厚くなり, 腺房の扁平上皮化生は進行し, 腺房細胞の数は減少した(図4)。進行期後期では導管管腔の拡大は顕著で嚢胞期と差がないが, 腺房の扁平上皮化生はさらに進行し, 腺房細胞はほとんどみられなくなった。しかし, 腺房の痕跡は残存していた(図5)。嚢胞期には腺房の痕跡も消失し, 管腔壁は肥厚し, 管腔は著しく拡大していた(図6)。

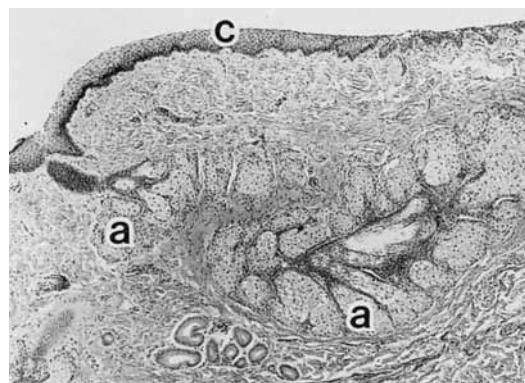


図1 対照群眼瞼矢状断の光学顕微鏡写真
結膜面(c)に近く, マイボーム腺がみられ,
腺房(a)がよく発達している。
ビーグル犬#3, HE染色 ×39

表1 実験群の処置の概要

実験群	投与量	頭数	22日屠殺群	36日屠殺群	50日屠殺群
対照群	—	3	1 (#1)	1 (#2)	1 (#3)
PenCB 処置群	PenCB 0.5 mg × 2	9	3 (#4, 5, 6)	3 (#7, 8, 9)	3 (#10, 11, 12)
PenCB 処置後 スクアラン投与群	PenCB 0.05 mg × 2 + スクアラン 1,200 mg/kg/day	12	4 (#13, 14, 18, 19) スクアラン 15日間投与	4 (#15, 16, 17, 20) スクアラン 29日間投与	4 (#21, 22, 23, 24) スクアラン 29日間投与

表 2 実験的 PenCB 中毒ビーグル犬マイボーム腺の病理組織所見

ビーグル犬 #	導管管腔 の拡大 ^{*1)}	腺房の扁平 上皮化生 ^{*2)}	投与後 6 日目の 血中 PenCB 濃度 (ppb)
対 照 群：			
1 (22日)	—	—	N. D.
2 (36日)	±	—	N. D.
3 (50日)	—	—	N. D.
PenCB 処置群：			
5 (22日)	+	+	進行期前期 0.076
6 (22日)	±	±	初 期 0.104
7 (36日)	+	+	進行期前期 0.055
8 (36日)	+	+	進行期前期 0.114
9 (36日)	±	±	初 期 0.047
10 (50日)	≡	≡	囊 胞 期 0.485
11 (50日)	+	+	進行期中期 0.143
12 (50日)	±	±	初 期 0.085
PenCB 処置後スクアラン投与群：			
14 (22日)	≡	≡	進行期後期 0.900
18 (22日)	+	≡	進行期後期 0.905
19 (22日)	≡	+	進行期中期 0.147
16 (36日)	≡	≡	進行期後期 0.372
17 (36日)	+	±	初 期 0.099
20 (36日)	±	±	初 期 0.054
21 (50日)	≡	≡	進行期後期 0.445
22 (50日)	+	±	初 期 0.127
23 (50日)	±	±	初 期 0.067
24 (50日)	±	+	初 期 N. D.

N. D. < 0.05

注： *¹⁾ ±：軽度

+：中等度

≡：強度（囊胞形成）

*²⁾ ±：軽度

+：中等度

≡：強度（腺房細胞消失，腺房の痕跡残存）

≡：最強度（腺房の痕跡消失）

この程度分類を基に PenCB 処置群と PenCB 処置後スクアラン投与群を比較した。スクアランを投与していない PenCB 処置群ではこの程度分類がほぼ進行の時期に合致した。すなわち PenCB 投与後 22 日，36 日の群では進行期前期以下の軽症例がみられ，50 日群では比較的進行した所見がみられた。

一方，PenCB 処置後スクアラン投与群では，むしろ 22 日群に進行期中期・後期と進行した重症例が多くみられ，36 日，50 日群には症状の軽微な例が多くみられた（表 2）。

考 按

先に著者らは実験的 PCB 中毒サル臨床的，病理組織学的所見を報告した^{5)~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⁵⁾⁶⁾。これは組織学的にマイボーム腺の角化囊胞であり，その形成過程が明らかになった⁶⁾⁷⁾。またマイボーム腺角化囊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⁷⁾。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

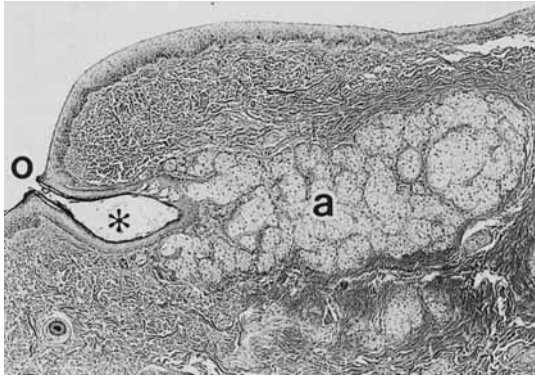


図2 マイボーム腺病変初期の光学顕微鏡写真
マイボーム腺開口部(o)近くで導管管腔(＊)の拡大が軽度みられるが、腺房(a)の扁平上皮化生は軽度である。ビーグル犬#6, PenCB 処置群 HE 染色 ×39

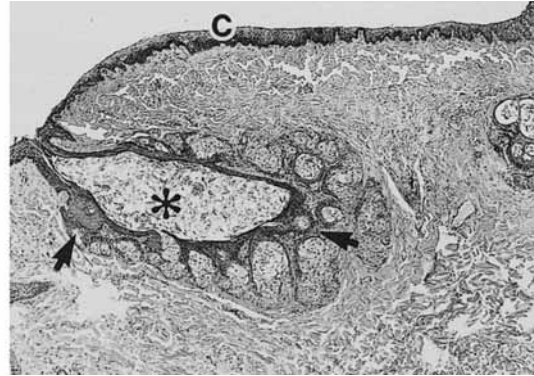


図4 マイボーム腺病変進行期中期の光学顕微鏡写真
結膜面(c)に開口したマイボーム腺の導管管腔(＊)は拡大し、導管壁は肥厚し、腺房は扁平上皮化生(矢印)が顕著で、腺房細胞の数の減少が認められる。ビーグル犬#19, PenCB 処置後スクアラン投与群 HE 染色 ×39

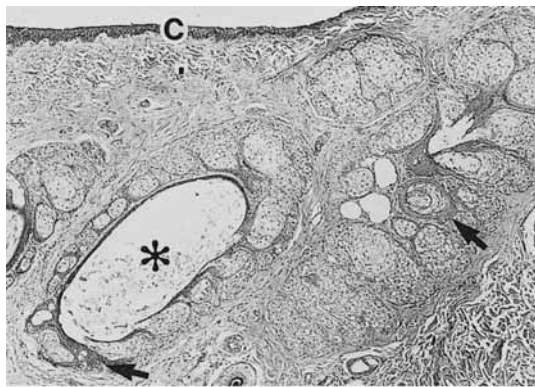


図3 マイボーム腺病変進行期前期の光学顕微鏡写真
結膜面(c)近くにマイボーム腺がみられ、導管管腔(＊)は拡大し、一部の腺房に扁平上皮化生(矢印)が明らかに認められる。ビーグル犬#7, PenCB 処置群 HE 染色 ×39

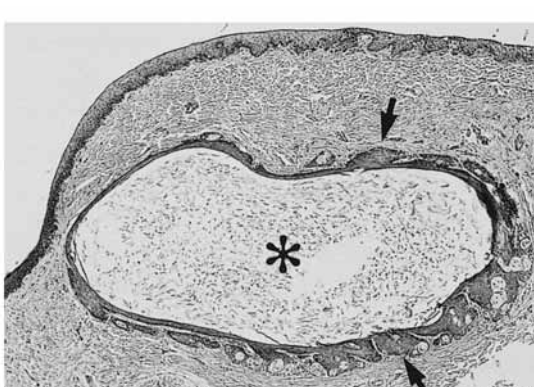


図5 マイボーム腺病変進行期後期の光学顕微鏡写真
マイボーム腺管腔(＊)は著明に拡大し、嚢胞期と差がない。腺房の扁平上皮化生はさらに進行し、腺房細胞はほとんどみられなくなる。しかし、腺房の痕跡(矢印)は残存している。ビーグル犬#16, PenCB 処置後スクアラン投与群 HE 染色 ×39

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⁾。また、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、慢性化したサル実験モデルのマイボーム腺においても、組織学的には依前として病変がみられた⁹⁾。

実験的 PenCB 中毒症ビーグル犬におけるマイボーム腺病変の所見は実験的サル PCB 中毒症のそれとよく一致する⁵⁾⁶⁾。サルで得られた結果を参考に、変化の程度を分けると、初期、進行期、嚢胞期という進行の時期に相当すると考えられる(表2)。

初期にはマイボーム腺導管管腔の拡大も、腺房の扁

平上皮化生も軽度であり、進行期には腺房の扁平上皮化生が進み、導管管腔の拡大もより明らかとなる。この時期は腺房の消失の程度により、前期、中期、後期に分けられ、後期では腺房細胞は消失し、腺房の痕跡が残存している。嚢胞期には腺房の痕跡が消失し、管腔が著明に拡大する。しかし、サルのモデルでみられた虚脱期はビーグル犬モデルではみられなかった。

この程度分類を基に PenCB 処置群と PenCB 処置後スクアラン投与群を比較すると、前者ではこの程度分類がほぼ進行の時期に合致してみられる。後者では

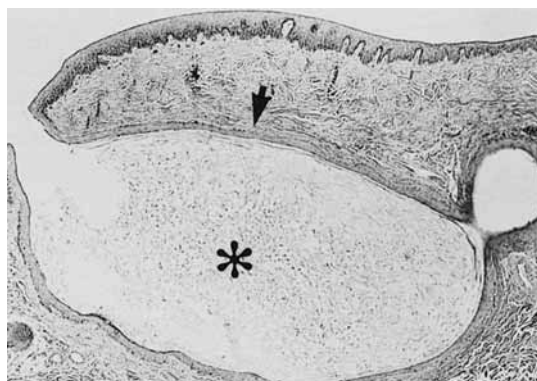


図6 マイボーム腺病変嚢胞期の光学顕微鏡写真
マイボーム腺管腔(*)は著明に拡大し、腺房
の痕跡も消失し、管腔壁は肥厚している(矢
印)。ビーグル犬#10, PenCB処置群 HE 染
色 ×39

早期から進行した重症例が多くみられ、後にはむしろ症状の軽微な例が多くみられた(表2)。

しかし、同一群の中でもマイボーム腺の病理組織所見に差がみられた。実験期間中の血中 PenCB 濃度の最高値(いずれも投与6日)を参照すると(表2)、PenCB 濃度が0.150 ppb以上を示す例に進行期中期以上の病変がみられた。すなわち、血中 PenCB 濃度のバラツキがマイボーム腺病変の程度に影響している可能性があり、スクアラン投与の効果を明らかにできなかった。

結 語

油症の治療薬としてスクアランの PCB 排出促進効果を検討するために、合成した PCB である 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) をビーグル犬に投与し、マイボーム腺について病理組織学的に検討した。

1. PenCB 中毒ビーグル犬のマイボーム腺は導管管腔の拡大と腺房の扁平上皮化生を示し、その程度により初期、進行期(前期, 中期, 後期)、嚢胞期と分

けられた。

2. スquaランを投与しなかった PenCB 中毒ビーグル犬では、投与開始22日, 36日, 50日と病変の程度が進行していた。スクアランを投与した PenCB 中毒ビーグル犬では、早期から進行期中期以降の病変がみられ、後期には病変はむしろ軽微であった。

3. 血中 PenCB 濃度が高値を示すビーグル犬にマイボーム腺病変が重症な例が多く、スクアランの PCB 排出促進効果は明らかにできなかった。

文 献

- 1) 堀伸二郎, 尾花裕孝, 榎本 隆: PCDFs 中毒サルに対するスクアランの治療に関する研究. 福岡医誌 78: 281-285, 1987.
- 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) 神村英利, 吉村英敏: 油症原因物質の排出促進. 福岡医誌 78: 266-280, 1987.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 向野利彦, 大西克尚: 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. 福岡医誌 78: 254-258, 1987.
- 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.

PenCB 投与ビーグル犬歯肉の組織学的観察

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・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 PenCB Poisoned Beagle Dogs

Isamu HASHIGUCHI, Akifumi AKAMINE, 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*

Hiroshi FUKUYAMA

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

Hidehiko OKUMURA

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

We examined toxic effect of PenCB and therapeutic effect of squalane on the gingiva in PenCB poisoned beagle dogs. The results obtained were as follows.

1) PenCB exerted blood level-dependent changes of epithelial cells in which appearance of intracellular vacuoles and swollen mitochondria were observed.

2) Large vacuoles might be caused by degeneration of nerve ending were observed within the supra-basal layers.

3) We could not detect the definitive improvement in the gingiva of the PenCB poisoned beagle dogs followed administration of squalane.

(Fukuoka Acta Med. 80(5) : 263-268, 1989)

はじめに

われわれは先に実験的 PCB 中毒サル歯肉において dyskeratosis や Keratocyst などの異常が生じること、また油症患者生検歯肉において基底細胞の変性像や基底膜の一部断裂像が認められることを報告した³⁾⁴⁾。近年 3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl (PenCB) が Kanechlor-400 (KC-400) やヒトの脂肪組織中に存在することが報告されており⁵⁾、その強い急性毒性を考えると Polychlorodibenzofuran (PCDF) のみでなく PenCB も油症の原因として深く関与していることが

考えられる。そこで今回、PenCB の歯肉に与える影響を観察すると同時に PCB の排泄促進作用を持つと言われるスクアランの効果について検索を行った。

材料および方法

実験材料として雌のビーグル成犬 24 匹を用い以下の 3 群に分けた。

1) 対照群 (3 匹)

2) PenCB 単独投与群 (9 匹) : corn oil に溶解した PenCB を第 1 日目および 3 日目に合計 0.1 mg/kg 投与した。

3) スクアラン投与群 (12 匹): 2) の群と同様に PenCB を投与し実験開始後 7 日目より 28 日間毎日スクアランを 1,200 mg/kg 投与した。

これら 3 群とも実験開始後 21, 35, 50 日目にそれぞれ 1, 3, 4 匹ずつ屠殺し, 採取した上顎前歯部歯肉に対する光顕および電顕観察を行った。

結 果

1. 対照群: 上皮下結合組織や上皮細胞層いずれにおいても著変は認められなかった。

2. PenCB 単独投与群: 今回, 嘔吐などにより実験開始後 6 日目の血中 PenCB 濃度 (以下血中 PenCB 濃度は 6 日目のものをさす) の値に大きなばらつきがみられ, 血中 PenCB 濃度の低いものでは対照群と比べて著明な差は認められなかった。そこで表 1 に示すように比較的高い血中 PenCB 濃度を示すイヌにおける所見について述べる。上皮下結合組織はいずれのイヌにおいても著明な変化は認められなかった。上皮層においては 21 あるいは 35 日例で, 上皮脚部の基底層から有棘層下部にかけて胞体の明調な細胞や小型の単核浸潤細胞が増加している所見が得られた (図 1)。この部位を電顕観察すると, 基底膜は連続して認められるが上皮細胞にはミトコンドリアの膨化やクリステの不明瞭化あるいは小空胞やミエリン様構造物が観察されると同時に細胞間隙の拡大や上皮細胞の扁平化もみられた。また光顕で胞体の明調な細胞に一致して種々の電子密度を示す小顆粒をもつメルケル細胞が観察された (図 2)。50 日例ではさらに著明な変化が認められた。上皮脚部の有棘層下部に大小様々の空胞が認められ, 周囲の上皮細胞や胞体の明調な細胞は圧迫され腎臓形や三日月状を呈していた (図 3)。この部位の電顕観察を行うと, 空胞に見えた部位は不完全ではあるが膜様構造物に取り囲まれ, 内部に変性膨化したミトコンドリアや種々の電子密度を示す物質が認められた (図 4)。空胞の周囲に観察された明調な細胞はメルケル細胞であり, 圧迫されて著しい形態

の変化を示しており周囲の上皮細胞とのデスモゾームも多くは破壊されていた。上皮細胞においても 21, 35 日例に比較して, デスモゾームの破壊が著しく細胞間隙はさらに拡大しており細胞形態の変化や細胞内の変性所見もより著明であった。その他の所見として多くのリンパ球がみられ, 一部のリンパ球は変性像を示す上皮細胞と密に接している所見も得られた。またメルケル細胞に近接して, 空胞内にみられたような変性膨化したミトコンドリアが多数集積している細胞も存在していた (図 5)。さらに細胞を貪食したマクロファージがリンパ球の近くにみられた (図 6)。

3. スクアラン投与群: PenCB 単独投与群と同様に比較的高い血中 PenCB 濃度を示すイヌについて観察を行った (表 1)。21, 35 日例においては, 血中 PenCB 濃度がやや低いイヌ (No. 17) では PenCB 単独投与群とほぼ同様な所見が得られた。しかし血中 PenCB 濃度が高いイヌでは, 有棘層下部に著しい細胞間隙の拡大や空胞のように見える部位が観察され PenCB 単独投与群に比してより著明な変化が生じていた (図 7)。50 日例では, 空胞のようにみえる部位は少なかったが, PenCB 単独投与群と比して著明な差は認められなかった (図 8)。

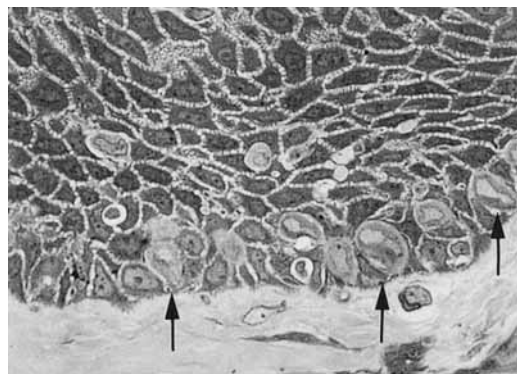


図 1 PenCB 単独投与群 21 日例。上皮脚先端に多くの胞体明調な細胞 (矢印) がみられる。(× 625)

表 1 各群における実験開始 6 日目の血中 PenCB 濃度

屠 殺 時 期 (日)	PenCB 投 与 群				ス ク ア ラ ン 投 与 群					
	21	35	50		21		35		50	
イ ヌ 番 号	6	8	10	11	14	18	16	17	21	22
PenCB 濃 度 (ppb) *	0.104	0.114	0.485	0.143	0.900	0.905	0.372	0.099	0.445	0.127

*血中 PenCB 濃度は榎本らのデータ (私信) による。

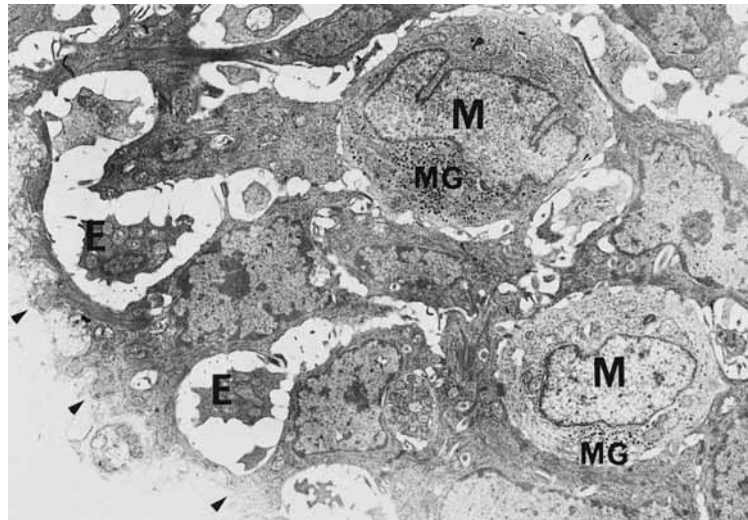


図2 PenCB 単独投与群 21 日例
メルケル細胞 (M) および変性した上皮細胞 (E) がみられる。
MG: メルケル細胞顆粒, 矢印: 基底膜 (×6,800)

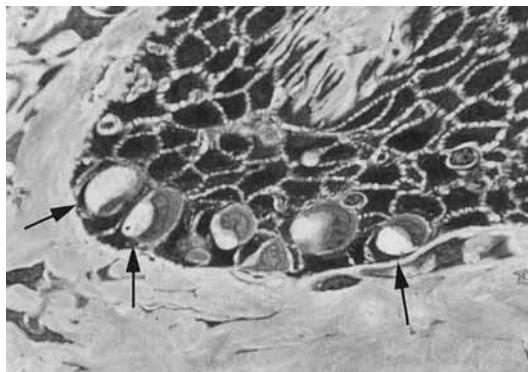


図3 PenCB 単独投与群 50 日例. 上皮脚先端に空胞 (矢印) がみられ, 周囲の明調な細胞は三日月形を呈している. (×625)

考 察

油症患者の口腔内病変としては、色素沈着の他に歯牙萌出遅延や歯根の形態異常などが挙げられる¹⁾。しかし油症患者の症例報告における病理組織学的な所見では歯肉の過角化、錯角化、色素沈着はみられるが、歯牙硬組織をはじめ歯周組織には特異ないし非特異的な所見は認められていない¹⁾。そこで今回 PenCB のおおよす影響について検索を行うに当たり、歯肉を被検材料として選択し過去の報告における変化と比較検討した。

1. PenCB 単独投与群

PenCB 投与群の上皮脚部基底細胞層から有棘細胞層下部の上皮細胞において、細胞間隙の拡大やミトコンドリアの膨化およびクリステの不明瞭化あるいは胞体内への小空胞やミエリン様構造物の出現など、油症患者生検歯肉とほぼ同様の変性所見が得られた。対照群にはこのような所見はほとんど観察されず、また PenCB 単独投与群の中でも血中 PenCB 濃度の高いものにより強い変性所見が得られたことから PenCB 投与の影響によるものと考えられ、PCDF と同様に PenCB も油症の原因の一つであると考えられる。これら所見の中でもっとも高頻度にみられるものとして、ミトコンドリアの変性膨化が挙げられる。Iatropoulos ら⁶⁾によれば PCB 投与により血管内皮細胞が障害を被り、その結果 hypoxia が生じるという。低酸素状態においた心筋細胞にミトコンドリアの膨化が認められており¹⁵⁾、PenCB 投与によって生じた hypoxia による 2 次的な変化とも考えられる。しかし ³H-KC-400 の取り込みを調べた実験において、ミトコンドリアの分画にも高い取り込みがみられるという報告¹⁰⁾、あるいは今回、上皮細胞内において小空胞の出現などの変性所見も得られたことから PenCB が直接ミトコンドリアに作用した結果生じたものと考えられる。ではなぜ主として上皮細胞にこのような変性所見が生ずるのであろうか。上皮細胞は活発な食能を持つことや異物の経上皮の排泄機構も存在すること

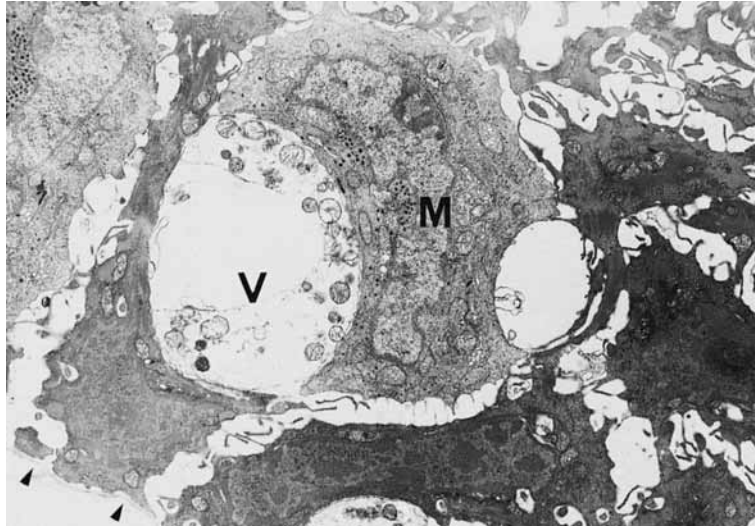


図4 PenCB 単独投与群 50 日例
変性したミトコンドリアを含む空胞 (V) と形態的にいびつなメルケル細胞 (M) がみられる。
矢印：基底膜 (×12,000)

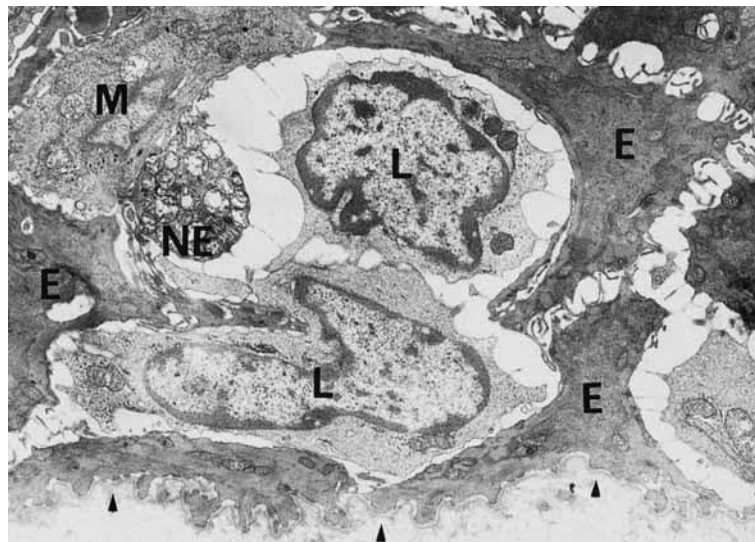


図5 PenCB 単独投与群 50 日例
上皮細胞 (E) に近接してリンパ球 (L) が観察される。
M：メルケル細胞，NE：神経終末，矢印：基底膜 (×10,700)

が知られており⁷⁾¹³⁾，おそらく基底膜を通過してきた PenCB あるいは代謝産物を積極的に取り込んだ結果，他の細胞に比してより強い障害が生じたのであろう。ところで今回の特徴的な所見の一つとして多数のリンパ球の上皮層内浸潤がみられたが，上皮下結合組織に

は対照群と同様に炎症性反応は観察されず，その機序については不明である。最近，広瀬らは PCDF を塗布したマウス腰背部上皮にリンパ球を認め免疫学的反応の存在を示唆しており⁵⁾，また PCDF 投与によって胸腺の萎縮や細胞性免疫の異常も報告されている⁸⁾。

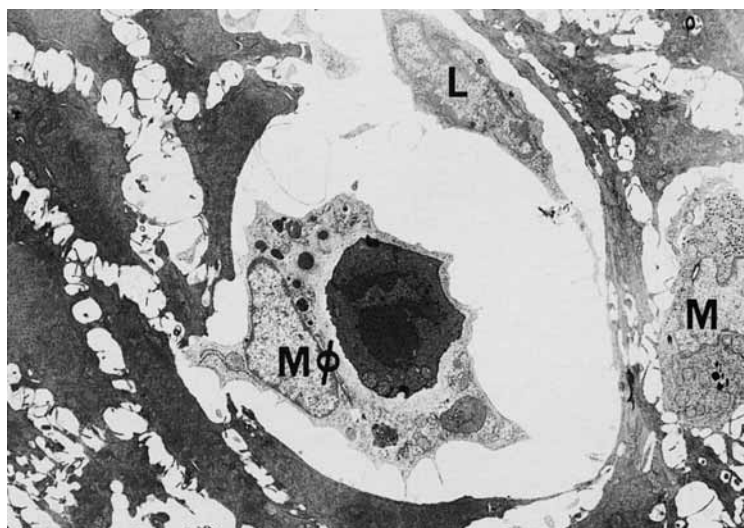


図6 PenCB 単独投与群 50 日例
リンパ球 (L) の近くに細胞を貪食したマクロファージ (Mφ) が存在している。
M: メルケル細胞 (×5,700)



図7 スクアラン投与群 21 日例, 上皮脚先端に著しい細胞間間隙の拡大がみられる。(×625)

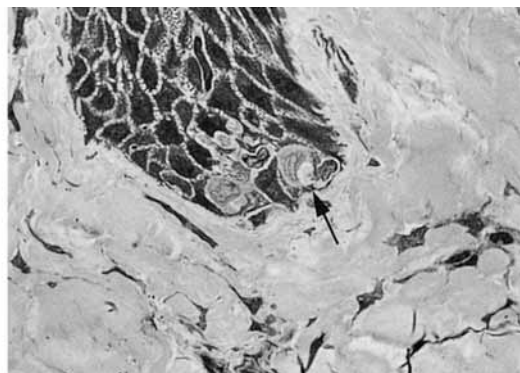


図8 スクアラン投与群 50 日例, 上皮脚先端の明調な細胞に接して小空胞 (矢印) が観察される。(×625)

歯肉においても、リンパ球と変性した上皮細胞が密接しており、またリンパ球の近くに細胞を貪食したマクロファージも認められることから、上皮細胞の変性には PenCB の直接的な作用の他に免疫系の反応の異常も考慮に入れる必要があるのかも知れない。しかしあくまでも推測の域を出ず、今後、リンパ球に対するモノクローナル抗体を使用しさらなる検索を行う必要がある。また今回もっとも著明な変化として挙げられるのが、50 日例において上皮脚部有棘層下部に認められた空胞であろう。光顕レベルの観察では、KC-400 と PCDF を投与したラット分泌期エナメル芽細胞層に認められた嚢胞状構造物⁹⁾と類似していた。しかし

電顕観察では明らかに様相が異なっている。つまり嚢胞状構造物は血管内皮細胞が障害を受け血清成分が障害を受けた中間層あるいは分泌期エナメル芽細胞の間隙を通り抜け貯留することによって生じたものと考えられるが、今回認められた空胞は細胞死の結果生じたもので PenCB の直接あるいは間接の強い細胞毒性を示していると言えよう。PenCB の作用を考える上で死をきたした細胞の同定が必要となってくる。はっきりとした細胞膜に囲まれているが、空胞内に認められるものと同様の変性膨化したミトコンドリアが集積している細胞が認められた。この細胞は触覚に反応す

る知覚細胞であるメルケル細胞に近接しており、また連続切片でもトノフィラメントや核がみられないことから神経終末の一部であると考えられる。ほとんどの場合、空胞はメルケル細胞に近接していることから、神経終末がさらに変性破壊を被ると空胞を生じるのかも知れない。しかしサルの実験やマウスの電子顕微鏡的検査では末梢神経には異常は認められず²¹⁴⁾¹⁶⁾、神経組織はPCBによって鋭敏に冒されるものではないと言われている。一方、黒岩ら¹²⁾は初期油症患者の感覚神経伝導速度の低下を報告しており、今回みられた所見はPenCBの強い急性毒性によって一時的に生じたものかも知れない。今後、神経終末に特異的に陽性を示すneuron specific enolase染色を行ってさらに検索を行う必要がある。

2. スクアラン投与群：21, 35日例では、PenCB単独投与群に比してより著明な変化が認められるものもあった。スクアランの投与によってPenCBの毒性の増悪やスクアラン自体の毒性の負荷が考えられるのかも知れない。しかし、これらの変化を示すものはいずれも血中PenCB濃度が非常に高いのに対して、PenCB単独投与群と同様の血中PenCB濃度を示しているものではPenCB単独投与群とほぼ同様の所見がみられたことから、スクアランの作用ではなくPenCBによる変化と考えられる。50日例においてもPenCB単独投与群と同様の所見が得られたが、血中PenCB濃度がほぼ同程度の試料において比較すると、スクアラン投与群の方が上皮層の破壊はやや軽度で著明な空胞も認められなかったことからスクアランのPCB体外排泄促進剤としての効果を反映しているのかも知れない。しかし、今回は観察の対照とした例数が少なく今後さらに検索を行わねばならない。

結 語

ビーグル犬歯肉におよぼすPenCBおよびスクアランの影響を組織学的に観察を行った。

1. PenCB投与によって血中濃度依存性に歯肉上皮細胞にミトコンドリアの膨化や小空胞の出現が観察された。

2. 有棘層下部に大きな空胞が認められ、神経終末の変性によるものと思われた。

3. スクアラン投与によって著明な症状の改善は認められなかった。

文 献

- 1) 青野正男, 福山 宏：油症PCB中毒研究の

現状。歯界展望 52：1003-1016, 1978。

2) 橋口 勇, 赤峰昭文, 宮武祥子, 原 宜興, 前田勝正, 阿南 壽, 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 76：221-228, 1985。

3) 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：油症患者およびPCB中毒サル歯肉の組織学的検索。福岡医誌 78：259-265, 1987。

4) 橋口 勇, 赤峰昭文, 中野嗣久, 青野正男, 福山 宏：実験的PCB中毒サル歯肉上皮の微細構造について。福岡医誌 78：145-156, 1983。

5) 広瀬寮二, 堀 真, 藤田和夫, 山城一純, 宿輪哲生, 吉田彦太郎：PCDFの発癌におよぼす影響—腫瘍発生率と光顕的電顕的検討—。福岡医誌 78：223-230, 1987。

6) Iatropoulos MJ, Felt GR, Adams HP, Korte F and Coulston F: Chronic toxicity of 2, 5, 4'-trichlorobiphenyl in young rhesus monkeys. II. Histopathology: Toxicol. Appl. Pharmacol 41: 629-638, 1977。

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貧食作用について。歯基礎誌 23：839-858, 1981。

8) 鐘ヶ江秀明, シャム・ラル, 栗田幸男, 重松信昭：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)。福岡医誌 78：219-222, 1987。

9) 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. pp. 42。

10) 加藤敬太郎：ラット肝リソゾームの調整法。生体膜実験法(上), pp. 252-257, 東京, 共立出版 1974。

11) 古賀久保, 上田 忠, 梶山 稔, 福山 宏：油症(塩化ビフェニール中毒症)2例の口腔所見について。日口外会誌 18：126-128, 1972。

12) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司：油症患者における神経学的所見。福岡医誌 60：462-463, 1969。

13) 森下美知子, 佐藤良夫：皮膚の経上皮性異物排除機構。臨床免疫 17：718-726, 1985。

14) 山元寅男, 西嶋壮夫, 今山修平, 藤田 守：PCBが肝臓, 肺, 末梢神経に及ぼす影響に関する電子顕微鏡的研究。福岡医誌 70：121-134, 1979。

15) 安田寛基：糸球体 Mitochondria, 日本病理学会編：電子顕微鏡による細胞病理学図譜, pp. 25-37, 東京, 岩波書店, 1967。

16) 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。

イヌにおけるスクアランの体内動態と安全性

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

神村 英利・古賀 信幸

小栗 一太・吉村 英敏

(株)パナファーム・ラボラトリーズ安全性研究所

井上 秀顕・佐藤喜代隆・大久保満伸

Studies on Distribution, Excretion and Subacute Toxicity of Squalane in Dogs

Hidetoshi KAMIMURA, Nobuyuki KOGA, Kazuta OGURI
and Hidetoshi YOSHIMURA*Department of Hygienic and Forensic Chemistry,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 812*Hideaki INOUE, Kiyotaka SATO and Mitsunobu OHKUBO
*Laboratory of Safety Assessment, Panapharm Laboratories, Co., Ltd.
Uto, Kumamoto 869-04*

In the previous papers, we demonstrated, by using rats, that squalane (2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane) could stimulate the fecal excretion of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, which was regarded as the most important etiologic agent of Yusho among PCB and PCDF congeners found in the causal rice oil. We also reported that, in rats, squalane was not essentially absorbed from the gastrointestinal tract, and did not show any appreciable side effects during the 3-month treatment. In the present paper, we have investigated the distribution, excretion and subacute toxicity of squalane in beagle dogs.

The fecal excretion of squalane accounted for about 83% of dose during the initial 2 days after administration at a single oral dose of 1,200 mg/kg to male dogs. On day 3, absorbed squalane was mostly distributed to the hair and the skin, and the concentrations in these tissues were decreased on day 6. These results suggested that most of squalane administered orally was not absorbed from the gastrointestinal tract, but a part was absorbed and excreted through the hair. In addition, squalane distributed into the liver was found to be eliminated rather slowly.

A long-term (13-week) treatments with squalane orally at doses of 400 mg/kg/day or 1,200 mg/kg/day in male and female dogs, resulted also in accumulation of squalane in the liver at a level of about 3% (400 mg/kg) or about 6% (1,200 mg/kg) of the daily dose. This accumulation of squalane in the liver was highest among all the tissues. Nevertheless, no appreciable toxic signs were observed in the serum biochemical tests and the hepatic functional test for squalane groups. Therefore, squalane accumulating in the liver, did not seem to disturb the hepatic physiological functions. It was suggested also in a long-term treatment that the skin and the hair played the most important role in the elimination of squalane. In conclusion, the present studies on subacute toxicity tests suggested that squalane did not give any significant toxic effects on dogs as well as rats.

(Fukuoka Acta Med. 80(5) : 269-280, 1989)

はじめに

前に筆者らは、油症原因物質たる PCB (polychlor-

inated biphenyl) や PCDF (polychlorinated dibenzofuran) などの多塩素化芳香族炭化水素が、微量あてながら血液中から小腸壁を介してその管腔内に移行

することを見い出している⁴⁷⁾。その再吸収を抑制すれば、生体に影響を与えることなく、安全に原因物質の排泄を促進できると考え、最近その有効な排泄促進剤として、炭素数 30 の飽和炭化水素スクアラン (2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane: Fig. 1) を見い出した⁴⁸⁾。スクアランはその物性 (熱安定性, 化学的安定性, 適度の粘性と湿潤性) から、現在では化粧品やその基剤, さらにガスクロマトグラフの固定相, 工業用オイルなどに活用されている。しかしスクアランを多塩素化芳香族炭化水素の排泄促進剤などの医薬品としてヒトに応用した例はない。

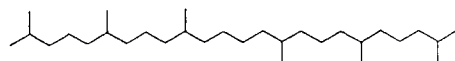
筆者らのラットを用いた検討によると、油症原因物質の糞中への排泄はきわめて緩慢である⁴⁹⁾。このためスクアランを油症の治療薬として臨床応用する場合、その使用は長期に及ぶことが予想され、連用した際のスクアランの体内動態や安全性を把握しておくことは必須と思われる。これまでに Richter らは、スクアランを 8 (w/w)% の濃度で餌に混ぜたものをラットに 17 週間摂食させたところ、とくにみるべき毒性は観察されなかったと報告している⁵⁾。また筆者らも 5 (w/w)% スクアラン混合餌を 3 カ月にわたってラットに与え、本化合物がほとんど消化管より吸収されないこと、および体重増加曲線や臓器重量にも対照群と比べて何ら変化がみられなかったことを報告している²⁾。このように長期連用した場合のスクアランの安全性は、ラットにおいて確認されているが、ヒトでの安全性を予測するためには、さらに他の動物種を用いた検討が必要である。

そこで本研究では、ハロゲン化芳香族炭化水素による中毒の治療に資する目的で、イヌにおけるスクアランの体内動態を調べると共に、スクアランの亜急性毒性試験を行い、その安全性をチェックした。

実 験 方 法

1. 実験材料

スクアランは日誠マリン工業(株)から供与された製品 (純度 99% 以上) を使用した。PCB 分析用シリカゲル (Wako-gel S-1) は和光純薬工業(株)より、またガスクロマトグラフ用充填剤の 1.5% OV-17



Squalane

Fig. 1 Structure of squalane

Chromosorb W AW DMCS は島津製作所からそれぞれ購入した。その他の試薬および有機溶媒は特級品または 1 級品を使用した。

2. 実験動物と薬物投与

ビーグル犬 (5 カ月齢) は日本医科学動物資材研究所から購入し、(株)パナファーム・ラボラトリーズにて約 4 週間、検疫、馴化したのち、6 カ月齢 (体重, 雄 6.7~8.3 kg: 雌 6.5~8.5 kg) で各検討に使用した。スクアランは後述する用量を 1/4 オンスのゼラチンカプセルに充填して投与した。

単回投与実験では雄性ビーグル犬 9 匹にスクアランを 1,200 mg/kg あて 1 回経口投与して、経日的に糞を採取した。併せて投与 1, 3, 6 日後に各 3 匹ずつ屠殺して、肝臓, 肺, 脂肪組織, 小腸, 体毛, 皮膚を採取した。

連続投与実験では、ビーグル犬を 1 群あたり雌雄各 4 匹ずつ 3 群に分け、対照群, 400 mg/kg 投与群, 1,200 mg/kg 投与群とした。400 mg/kg および 1,200 mg/kg 投与群には、スクアランをそれらの用量で 1 日 1 回 13 週間経口投与した。なおスクアランの投与量は週 2 回の最新体重から算出してゼラチンカプセルに充填した。対照群には、空のゼラチンカプセルを投与した。投与 11 週目および 13 週目に糞を採取し、投与終了後に屠殺し、体毛, 皮膚, 肝臓, 脂肪組織, 小腸, 血清を得た。また投与の開始前, 期間中および終了後に以下に述べる亜急性毒性試験を併せて行った。

3. 糞および組織中スクアラン量の測定

糞 (約 1 g) または組織 (2~5 g) を 1 N 水酸化ナトリウムのエタノール溶液 20 ml でホモジナイズし、沸騰水浴中で 2 時間煮沸してケン化した。試料に水 20 ml を加えたのち、不ケン化物を n-ヘキサン 20 ml あて 4 回~6 回抽出した。n-ヘキサン抽出液を合わせて水洗, 脱水, 濃縮後, Wako-gel S-1 (1 g) を充填したカラムに注入し, n-ヘキサン 40 ml~100 ml でスクアランを溶出させた。この溶出液を濃縮したのち、水素炎イオン化型ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用いて試料中のスクアランを定量した。FID-GC の測定条件を Table 1 に示す。

単回投与実験における体毛の洗浄操作および洗浄後の分析は次のようにして行った。すなわち、ひだ折り濾紙を乗せたガラスロートを受器上に置き、ひだ折り濾紙上に秤量済みの体毛 (約 0.5 g) を乗せて、n-ヘキサン 30 ml を徐々に滴下し、体毛を洗浄した。受器中に回収した洗浄液は、そのまま FID-GC に付してスクアランを定量し、洗浄後の体毛は、前記組織

Table 1 Conditions of flame ionization detector-gas chromatography using in this study

Apparatus	Hitachi 163-type
Glass column	3 mm×2 m, 1.5 % OV-17 on Chromosorb W AW DMCS
Carrier gas	N ₂ , 40 ml/min
H ₂	1 kg/cm ²
Air	1.5 kg/cm ²
Column temperature	250°C
Injection port temperature	270°C

中スクアランの抽出操作を行い、FID-GC に付した。
なお、体毛、皮膚の全重量は体表面積から換算した。

4. スクアラン亜急性毒性試験項目

1) 一般状態, 体重, 摂餌量, 摂水量

試験期間中, 毎日午前および午後の 2 回にわたり, 各動物の一般状態および生死の有無を観察した。体重, 摂餌量および摂水量は週 2 回の割合で測定した。摂餌量は給与量の 300 g から食べ残した量を減じた値とし, 摂水量は給与量の 1,800 ml から飲み残した量を減じた値とした。

2) 糞潜血検査

投与開始前および投与 5, 9, 13 週目に全例の糞を採取し, 便潜血スライドシオノギ (オルトリジン法およびグアヤック法, 塩野義製薬㈱) を用いて糞潜血検査を行った。

3) 尿検査

投与開始前, 投与 5, 9, 13 週目に全例について, 午前 9 時~12 時に採取した新鮮尿を用いて, pH, 蛋白質, ブドウ糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血およびウロビリノーゲン (以上マルチスティックスⅢ, マイルス・三共) を検査した。次いで, 尿を 1,500 r. p. m. で 5 分間遠心分離し, 得られた沈渣を鏡検して, 上皮細胞数, 赤血球数, 白血球数, 結晶成分数, 尿円柱数を測定した。24 時間蓄積尿について尿量, 色調, 浸等圧 (氷点降下法, OSMO-METER OM801, VOGEL 社) および比重 (屈折率法, 尿屈折計, ㈱アタゴ) を検査すると共に, 自動分析装置 (736-10 型, ㈱日立製作所) によりクレアチニン量 (Jaffé 法) を測定した。また, 炎光光度計 (750 型, ㈱日立製作所) によりナトリウム (Na) 量 (炎光光度法), カリウム (K) 量 (炎光光度法) および塩素 (Cl) 量 (電量滴定法) を測定した。

4) 血液学的検査

投与開始前, 投与 5, 9, 13 週目に全例の桃側皮静脈より EDTA-2K 1 mg を入れた採血ビン (SB-45,

東亜医用電子㈱) に採取した血液を用いて, 多項目自動血球計数装置 (Sysmex CC-780 型, 東亜医用電子㈱) により赤血球数, 白血球数, 血小板数 (以上, 電気抵抗検出方式), ヘモグロビン量 (オキシヘモグロビン法) およびヘマトクリット値 (血球パルス波高値検出方式) を測定し, さらに赤血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値から Wintrobe の赤血球恒数 (平均血球容積 (MCV), 平均血球色素量 (MCH), 平均血球色素濃度 (MCHC)) を算出すると共に, 血液塗抹標本を作製して白血球百分比 (May-Grünwald-Giemsa 染色) および網状赤血球 (ニューメチレンブルー超生体染色) を算定した。また 3.4% クエン酸ナトリウム 0.1 ml を浸した採血器で採取した血液 1 ml を用いて, 全自動血液凝固測定装置 (CA-3,000, 東亜医用電子㈱) によりプロトロンビン時間 (散乱光検出方式) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (散乱光検出方式) を測定した。

5) 血液生化学的検査

投与開始前, 投与 5, 9, 13 週目に全例の桃側皮静脈より採取した血液を室温で約 60 分間放置後, 3,000 r. p. m. で 10 分間遠心分離して得られた血清を用い, 自動分析装置 (736-10 型, ㈱日立製作所) により glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) 活性 (Karmen 処方), glutamate pyruvate transaminase (GPT) 活性 (Wroblewski-La Due 法), アルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性 (*p*-ニトロフェニルリン酸基質法), 乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性 (Wroblewski-La Due 法), クレアチニンリン酸化酵素 (CPK) 活性 (ドイツ臨床化学会処方), コリンエステラーゼ (ChE) (ヨウ化ブチルコリン基質法), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) 活性, (L- γ -グルタミル-*p*-ニトロアニリド基質法), アミラーゼ活性 (CM-アミロース-DEX 法), 総胆汁酸 (TBA) 量 (3- α -HSD-ジアホラーゼ法), 総ビリルビン法 (アルカリアゾビリルビン法), グルコース量

(グルコキナーゼ・G-6-PDH 法), 総コレステロール量 (COD-DAOS 法), 遊離コレステロール量 (COD-DAOS 法), リン脂質量 (酵素法・DAOS 発色法), トリグリセリド量 (GPO-DAOS 法・グリセリン消去法), 尿素窒素 (BUN) 量 (ウレアーゼ-GIDH 法), クレアチニン量 (Jaffé 法), 尿酸量 (ウレカーゼ-TOOS 法), 総蛋白質量 (ビウレット法), アルブミン量 (BCG 法), カルシウム (Ca) 量 (OCPC 法), 無機リン (IP) 量 (モリブデン酸直接法) および鉄 (Fe) 量 (パソフェナンスロリン法) を測定した。このほか, 炎光光度計 (750 型, ㈱日立製作所) により Na 量 (炎光光度法), K 量 (炎光光度法), Cl 量 (電量滴定法) を測定した。加えて, 全自動電気泳動分析装置 (FED-III 型, コスモ㈱) により血清蛋白質分画を測定し, α_1 -および α_2 -グロブリン比, β_1 -および β_2 -グロブリン比, γ -グロブリン比ならびに A/G 値を算出した。

6) 肝機能および腎機能検査

肝機能検査として, 投与開始前, 投与 5, 9, 13 週目の全例についてインドシアニングリーン (ICG) 注射液 (ジアグノグリーン注射液, 第一製薬㈱) を 0.1 ml/kg (0.5 mg/kg) 静脈内投与し, 15 分後に採血して血清中 ICG 量を二波長自記分光光度計 (557 型, ㈱日立製作所) で比色定量した。

腎機能検査として, 投与開始前, 投与 5, 9, 13 週目の全例についてフェノールスルホンフタレイン (PSP) 注射液 (日本 PSP 注射液, 第一製薬㈱) を 0.2 ml/kg (1.2 mg/kg) 静脈内投与し, 15 および 30 分後に採血して血清中 PSP 量を二波長自記分光光度計 (557 型, ㈱日立製作所) で比色定量した。

7) 眼科的検査

投与開始前, 投与 5, 9, 13 週目に全例について外観を肉眼的に観察したのち, 散瞳剤 (ミドリン P, 参天製薬) を点眼して角膜, 虹彩, 強膜, 水晶体, 硝子体, 眼底を単眼倒像検眼鏡 (BX-13, ナイツ社) で観察し, 眼底カメラ (RC-2, コーフ) で眼底写真を撮影した。

8) 心電図検査

投与開始前, 投与 5, 9, 13 週目に全例について標準誘導法 (パイレーの 6 軸誘導法) にしたがって双極肢誘導 (I, II, III 誘導) および増高単極肢誘導 (aV_R , aV_L , aV_F 誘導) による心電図を記録した。三要素直記式心電計 (503 FB-D 型, フクダ EM ㈱) を用い, 導出した心電図の波形を肉眼的に観察すると共に, 第 II 誘導の波形より心拍数, P-R および Q-T 間

隔, QRS の平均電気軸を求めた。

9) 血圧測定

投与開始前, 投与 5, 9, 13 週目に全例についてマンセット法 (SPHYGMO MANOMETER, TAMANO FACTORY, Ltd) により, 収縮および拡張期圧を測定し, 平均血圧を算出した。

10) 剖検, 臓器重量測定

試験期間終了後, 予め約 16 時間絶食させた全動物をペントバルビタール・ナトリウム静脈内投与 (30 mg/kg) 麻酔下に, 頸動脈にカニユーレを挿入して放血致死させ, 解剖して諸臓器および組織の肉眼的観察を行った。次いで心臓, 脾臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 脳, 下垂体, 胸腺, 副腎, 甲状腺 (上皮小体を含む), 精巣, 前立腺, 卵巣, 子宮, 顎下腺, 小腸の臓器重量 (絶対重量) を測定し, 剖検日の体重をもとに臓器重量体重比 (相対重量) を算出した。

11) 病理組織学的検査

剖検時に採取した臓器と共に, 脊髄, 眼球, 視神経, 瞬膜腺, 下顎リンパ節, 唾液腺, 気管, 舌, 食道, 胃, 大腸, 腸間膜リンパ節, 膀胱, 陰, 大腿骨, 胸骨 (骨髓を含む), 皮膚と乳腺およびその他の異常部位を 10% 中性緩衝ホルマリン (ただし, 眼球は 4% グルタルアルデヒド溶液で前固定) で固定し, パラフィン切片として, ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。

さらに, 各群の 2 例については肝臓および腎臓の一部を細切して, 2.5% グルタルアルデヒドで前固定し, 1% 四酸化オスミウムで後固定した。次いでアセトン上昇系列で脱水し, スパール樹脂に包埋した。包埋後, 超ミクロトーム (Sorvall MT-6000, DUPONT) を用いて超薄切片を作成し, 酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を施した後, カーボンを蒸着して電子顕微鏡 (H-7000 型, ㈱日立製作所) で観察した。

結 果

1. スクアラン単回投与後の体内動態

雄性ビーグル犬にスクアランを 1,200 mg/kg あて 1 回経口投与し, 本化合物の糞中排泄量と組織分布量を経日的に測定した。Fig. 2 にスクアランの累積糞中排泄量を示す。投与後 1 日目および 2 日目のスクアランの糞中排泄量はそれぞれ投与量の約 66%, 17% (累積排泄量, 約 83%) であった。投与後 3 日目以降もスクアランの糞中排泄は少量ずつ (投与量の 0.5~1%) ながら認められ, 投与後 6 日間の累積排

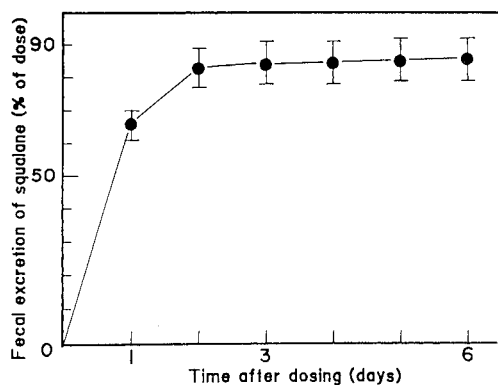


Fig. 2 Cumulative fecal excretion of squalane in beagle dogs after a single oral dose of 1,200 mg/kg
Results shown are the mean $\pm$ S. E. of 3 dogs.

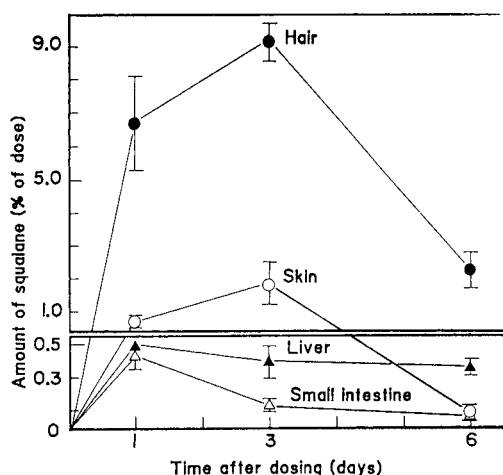


Fig. 3 Time course of distribution of squalane into beagle dog tissues after a single oral dose of 1,200 mg/kg
Results shown are the mean $\pm$ S. E. of 3 dogs.

排泄量は投与量の約86%であった。

Fig. 3に体毛、皮膚、肝臓および小腸におけるスクアラン分布量の経時変化を示す。投与後1日目においてスクアランの分布量は、体毛でもっとも高く、次いで皮膚、肝臓、小腸の順であった。このうち、体毛と皮膚における分布量は投与後3日目で上昇し、6日目で減少した。

すなわち投与後1, 3, 6日目の体毛でのスクアラン分布量は、それぞれ投与量の約6.7%, 9.2%, 2.3%であり、また皮膚における分布量は、それぞれ

投与量の約0.7%, 1.8%, 0.09%であった。一方、小腸からのスクアランの消失は速やかであったが、肝臓からの消失は、緩慢であった。すなわち、小腸中スクアラン量は投与後1日目で投与量の約0.43%, 3日目で約0.12%, 6日目で約0.07%であり、肝臓中スクアラン量はそれぞれ約0.48%, 0.38%, 0.36%であった。なお、Table 2に示すように、体毛をn-ヘキサンで洗浄したところ、投与後1, 3, 6日目の試料とも、体毛分布量の約90%のスクアランが洗液中に回収され、約10%のみ洗浄後の体毛中から検出された。さらに、肺と脂肪組織での分布量は痕跡程度(投与量の0.01~0.03%)であった。

2. スクアラン連続投与後の体内動態

雌雄ビーグル犬にスクアランを13週間にわたって経口投与し、投与後11, 13週目における本化合物の糞中排泄量と実験終了後の組織分布量を測定した。Table 3にスクアランの糞中排泄量を、糞採取日の前日投与量に対するパーセント値で示す。スクアランの糞中排泄量は前日投与量の62~87%であった。雌雄および投与量の違いで有意差はみられない。

Table 4に投与終了後のスクアランの組織分布量を示す。スクアランの分布レベルは血中濃度を除いて、スクアランの用量に依存的であった。単回投与実験においてスクアラン濃度は体毛でもっとも高く、次いで皮膚で高かったが、連続投与実験では、肝臓中のレベルがもっとも高く、次いで体毛、皮膚の順であった。すなわち、スクアランの肝中レベルは、その400 mg/kg投与群で約1,300 ppmであり、1,200 mg/kg投与群で2,200~3,200 ppmであった。これに対して体毛および皮膚におけるスクアランのレベルは400 mg/kg投与群でそれぞれ410~660 ppm、および20~55 ppmであり、1,200 mg/kg投与群でそれぞれ1,700~2,000 ppm, 210~550 ppmであった。スクアランの脂肪組織中濃度は10~17 ppmと、小腸中濃度とほぼ同等であった。

3. 亜急性毒性試験

投与の開始前およびその期間中と終了後に行った亜急性毒性試験の結果を以下に示す。

1) 一般状態、摂餌・摂水量、体重

1,200 mg/kg投与群の全例に投与2~3週目から、また400 mg/kg投与群の半数例に投与5週目から体毛が光沢を帯びるいわゆる油毛が認められた。加えて、スクアラン投与群の全例で、糞中に油状の排泄物が散見された。さらに一部の動物では脱毛、薄毛、痂皮形成がみられた。これらの症状は投与回数を増すにつれ

Table 2 Effect of n-hexane washing on the level of squalane in dog hair

Time after doing (hr)	Squalane level (ppm)			n-Hexane sol. Total $\times 100$
	n-Hexane washing	Washed hair	Total	
0 - 24	1,806 $\pm$ 335	130 $\pm$ 34	1,936 $\pm$ 369	93.6 $\pm$ 0.5
24 - 72	2,333 $\pm$ 87	147 $\pm$ 8	2,479 $\pm$ 88	94.1 $\pm$ 0.4
72 - 144	511 $\pm$ 133	64.2 $\pm$ 11.0	575 $\pm$ 144	88.2 $\pm$ 1.0

Each value represents the mean $\pm$ S. E. of 3 dogs.

Table 3 Fecal excretion of squalane in beagle dogs during 13 weeks treatment

Dose (mg/kg/day)	Squalane in feces (% of intake)			
	Male groups		Female groups	
	11 weeks	13 weeks	11 weeks	13 weeks
400	83.7 $\pm$ 29.9	86.6 $\pm$ 12.3	79.2 $\pm$ 21.3	78.4 $\pm$ 7.0
1,200	86.3 $\pm$ 34.1	65.3 $\pm$ 9.3	63.6 $\pm$ 9.7	61.8 $\pm$ 7.7

Dogs were administered with squalane at doses of 400 or 1,200 mg/kg/day for 13 weeks.

Each value represents the mean $\pm$ S. E. of 4 dogs.

Table 4 Tissue distribution of squalane in beagle dogs after treatment for 13 weeks

Tissues	Male groups (mg/kg/day)		Female groups (mg/kg/day)	
	400	1,200	400	1,200
	parts per million			
Hair	658.9 $\pm$ 106.8	1,651 $\pm$ 302	413.3 $\pm$ 60.2	2,014 $\pm$ 151
Skin	54.8 $\pm$ 15.0	545.4 $\pm$ 61.2	19.6 $\pm$ 3.5	213.6 $\pm$ 67.1
Liver	1,318 $\pm$ 433	3,161 $\pm$ 916	1,266 $\pm$ 124	2,187 $\pm$ 427
Adipose tissue	10.6 $\pm$ 2.7	16.5 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 0.7	15.9 $\pm$ 1.7
Small intestine	9.7 $\pm$ 1.8	21.5 $\pm$ 3.1	13.6 $\pm$ 3.0	20.5 $\pm$ 5.8
Serum	1.2 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.2

Dogs were administered with squalane at doses of 400 or 1,200 mg/kg/day for 13 weeks.

Each value represents the mean $\pm$ S. E. of 4 dogs.

て悪化することはなかった。その他、試験期間中に対照群を含む全てのグループで散発的に嘔吐、軟便、粘液便が観察されたが、頻度的に投与群間で差はなく、しばしばビーグル犬でみられる程度の変化であった。なお、試験期間中、すべての投与群で死亡例は観察されなかった。

Table 5 に摂餌量および摂水量の 1 日平均値を示す。

雌雄のすべての投与群において摂餌量は 1 日平均 260~300 g、摂水量は 800~1,000 ml であり、スクアラン投与による影響はまったく観察されなかった。また Fig. 4 に示すように試験期間中のビーグル犬（雄）の体重の推移についても、対照群とスクアラン投与群

の間に有意な差は認められなかった。雌についても同様であった。

2) 糞潜血検査

対照群を含むすべての投与群において、問題とすべき変化は認められなかった。

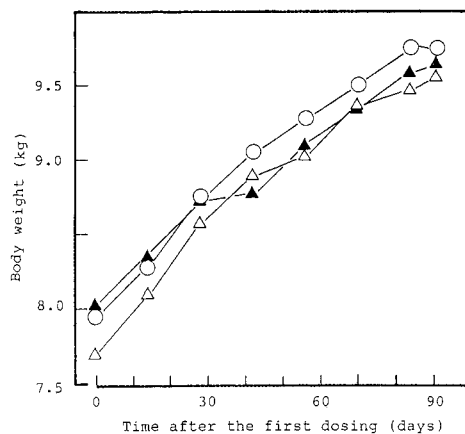
3) 尿検査

雌雄の対照群の尿量は 1 日当たり約 200 ml、浸透圧は 1.77 OSMOL/kg、比重は 1.05、pH は 8.4、1 日当たりのクレアチニン排泄量は約 129 mg、Na、K、Cl の 1 日当たりの排泄量はそれぞれ 9.9、33.1、16.6 mEq であった（いずれも 4 回の平均値）。スクアラン投与群においても下記のごとく一部を除き、他はすべて前記値と有意差は認められなかった。また詳細な

Table 5 Effect of oral treatment with squalane for 13 weeks on food and water consumptions in dogs

	Food consumption (g/day)	Water consumption (ml/day)
Male groups		
Control	282±16	831±45
400 mg/kg	277±17	896±47
1,200 mg/kg	297±3	1,022±108
Female groups		
Control	261±18	802±71
400 mg/kg	285±10	892±50
1,200 mg/kg	284±9	853±26

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

**Fig. 4** Body weight gain of male beagle dogs administered with squalane for 13 weeks

○—○ Control

△—△ Squalane 400 mg/kg/day

▲—▲ Squalane 1,200 mg/kg/day

Results shown are the mean±S. E. of 4 dogs.

データは省略するが、対照群およびスクアラン投与群の尿を1,500 r. p. m. で5分間、遠心分離して得られた沈渣を鏡検したところ、1フィールド当たりの上皮細胞数および白血球数は大むね3個未満、赤血球数は10個未満で、結晶成分は大むね20~30個、尿円柱はまったく認められなかった。

ごく例外的にスクアラン投与群では、投与13週目の雄の1,200 mg/kg投与群のpHが7.9、雌の1,200 mg/kg投与群のクレアチニン排泄量が242 mgと、

Table 6 Serum biochemical tests in control group of male and female dogs

	Mean (Minimum-Maximum)
GOT (IU/l)	27 (15-36)
GPT (IU/l)	32 (20-64)
LDH (IU/l)	175 (72-293)
ALP (IU/l)	146 (85-284)
γ-GTP (IU/l)	2.7 (0-5.7)
ChE (IU/l)	2,354 (1,429-3,625)
Amylase (IU/l)	2,200 (1,759-3,012)
CPK (IU/l)	163 (96-264)
Total cholesterol (mg/dl)	138 (114-180)
Free cholesterol (mg/dl)	33 (25-50)
Triglyceride (mg/dl)	49 (28-90)
Phospholipids (mg/dl)	294 (232-399)
Total bilirubin (mg/dl)	0.06 (0-0.1)
TBA (μmol/l)	8.3 (4.2-25.1)
Glucose (mg/dl)	98 (84-115)
Creatinine (mg/dl)	0.8 (0.6-1.0)
Uric acid (mg/dl)	0.6 (0.2-0.9)
Na (mEq/l)	149.2 (145.5-152.8)
K (mEq/l)	4.84 (4.40-5.34)
Cl (mEq/l)	112.9 (109.5-118.0)
Fe (mEq/l)	171.2 (78.0-336.0)
Ca (mEq/l)	11.0 (9.8-13.2)
IP (mEq/l)	6.1 (4.2-14.9)
Total protein (g/dl)	5.4 (4.4-6.4)
Albumin (g/dl)	3.1 (2.5-3.6)
A/G ratio	1.65 (1.12-2.01)
Albumin (%)	62.0 (57.1-66.8)
α ₁ -Globulin (%)	4.9 (3.8-6.4)
α ₂ -Globulin (%)	7.4 (5.5-11.4)
β ₁ -Globulin (%)	7.2 (5.9-9.7)
β ₂ -Globulin (%)	11.2 (9.3-13.5)
γ-Globulin (%)	7.4 (5.3-10.2)

それぞれの対照群に比べると有意な変動を示した。しかし、これらのデータそのものは対照群での変動範囲内の値であった。

4) 血液検査

雌雄の対照群の検査結果（各4回の平均値）は次の通りであった。赤血球数は6,700,000/mm³、ヘマトクリット値は44.4%、ヘモグロビン量は15.2 g/dlであり、これらの値から算出したMCV値は66 μm³、MCH値は22.7 pg、MCHC値は34.3 g/dlであった。血小板数は278,000/mm³であり、白血球数は11,800/mm³であった。白血球のうち、好酸球比は4.5%、杆状核好中球比は2.3%、分葉核好中球比は51.7%、リンパ球比は38.6%、好塩基球比は0%、単核球比は

3.1%であった。プロトロンビン時間は6.8秒、活性化部分トロンボプラスチン時間は14.8秒であった。

雌のスクアラン投与群はすべての項目について対照群との間に有意差が観察されず、また雄の投与群においても一部の項目以外は、対照群と何ら変わらない結果であった。雄のグループにおける変化としては、投与5週目に400 mg/kg群でプロトロンビン時間の延長(6.8秒)がみられ、投与9週目において1,200 mg/kg群でMCV値の減少(65%)が認められた。また投与13週目において400 mg/kg群でMCV値の減少(65%)、1,200 mg/kg群で単核球比の増加(4.5%)がみられた。しかしこれらのデータは、いずれも対照群での変動範囲内の値でもあった。

5) 血液生化学的検査

Table 6に雌雄の対照群の検査結果(各4回の平均値)を示す。

雄のスクアラン投与群では、投与5週目において400 mg/kg、1,200 mg/kgの両群で α_1 -グロブリン比の上昇(いずれも5.0%)がみられ、また1,200 mg/kg群でNa量の減少(147 mEq/l)とLDH活性の上昇(233 IU/l)が観察された。投与9週目では、両群で γ -GTP活性の低下(400 mg/kg群で2.5および1,200 mg/kg群で1.2 IU/l)がみられ、400 mg/kg群Cl量の増加(116 mEq/l)、1,200 mg/kg群でChE活性の低下(1,777 IU/l)、K量の増加(5.68 mEq/l)、Fe量の減少(92.5 mEq/l)が観察された。さらに1,200 mg/kg群では、アルブミン量およびアルブミン比の減少(それぞれ3.3 g/dl, 55.6%)と、 γ -グロブリン比の増加(9.8%)により、A/G比の低下(1.26)もみられた。投与13週目において、1,200 mg/kg群でChE活性の低下(1,768 IU/l)が認められた。

雌のスクアラン投与群では、投与5週目に両群でアミラーゼ活性の低下(400 mg/kg群で1,910 IU/l、1,200 mg/kg群で1,956 IU/l)がみられ、また1,200 mg/kg群でLDH活性の低下(79 IU/l)が観察された。投与9週目に両群で γ -GTP活性(いずれも1.3 IU/l)およびアミラーゼ活性の低下(400 mg/kg群で2,000 IU/l、1,200 mg/kg群で1,900 IU/l)がみられ、また400 mg/kg群でCPK活性の上昇(240 IU/l)が認められた。投与13週目においては、すべての項目について、対照群と何ら変わらない結果であった。

以上のようにスクアラン投与群では対照群と比べて、若干の項目において有意差が認められたものの、いずれもTable 6に示す対照群の変動範囲内の変化で

Table 7 The hepatic and the renal function tests in control group of male and female dogs (n=8×4=32)

	Mean (Minimum-Maximum)
ICG ¹⁾ 15 min ^{a)} (μ g/ml)	3.22 (1.35-5.00)
PSP ²⁾ 15 min (μ g/ml)	2.25 (1.50-3.20)
PSP ²⁾ 15 min (μ g/ml)	1.42 (0.75-2.00)

a) Time after the drug dosing intravenously
Abbreviations used are: 1) ICG, Indocyanine green, 2) PSP, Phenolsulfonphthalein

あった。

6) 肝機能および腎機能検査

雌雄の対照群での検査結果(各4回の平均値)をTable 7に示す。スクアラン投与群における結果もすべて正常範囲内のもので、かつ対照群との間に有意差は認められなかった。

7) 眼科検査

投与開始前、投与5、9、13週目に実施した検査において、対照群、スクアラン投与群共にまったく異常が認められなかった。

8) 心電図検査

雌雄の対照群での検査結果(各4回の平均値)は次の通りであった(括弧内は最小値、最大値)。心拍数は120(57-159)拍、P-R、Q-T間隔はそれぞれ97(86-116) ms、51(42-66) ms、185(68-204) msであり、QRSの平均電気軸は57°(-33°-86°)であった。

一方、スクアラン投与群において、投与開始前に雄の両グループおよび投与5週目の400 mg/kg群で心拍数が92-101拍と、やや減少し、また投与9週目の雌の400 mg/kg群のQ-T間隔が213 msと、わずかに延長した。しかし投与13週目では、いずれの投与群においても対照群との間に何ら有意差は認められなかった。

9) 血圧測定

雌雄の対照群の各4回の収縮期圧および拡張期圧の平均値はそれぞれ187 mmHgおよび121 mmHgで、これより求めた平均血圧は143 mmHgであった。スクアラン投与群においても対照群と同様な結果であった。

10) 剖検、臓器重量

対照群では雌雄の各1例に盲腸粘膜面に赤色斑点と、雄の1例に肺の暗赤色硬結が観察された。スクアラン

Table 8 Relative organ weights of male beagle dogs treated orally with squalane for 13 weeks

	Control	Squalane	
		400 mg/kg	1,200 mg/kg
		(g/kg b. w.)	
Heart	8.13±0.39	7.82±0.45	7.92±0.14
Spleen	1.85±0.17	2.06±0.18	2.36±0.12
Lung	7.11±0.29	6.67±0.36	7.32±0.56
Liver	24.9 ±0.9	25.4 ±0.8	28.8 ±1.0*
Right kidney	2.23±0.11	2.58±0.19	2.29±0.14
Left kidney	2.33±0.10	2.62±0.26	2.37±0.17
Pancreas	1.55±0.20	1.86±0.19	1.95±0.20
Brain	7.96±0.28	8.76±0.74	7.71±0.58
Pituitary	5.75±0.41	6.53±0.53	6.18±0.46
Thymus	0.88±0.09	0.82±0.11	0.85±0.15
Right adrenal	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
Left adrenal	0.04±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
Right thyroid	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01
Left thyroid	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01
Right testis	0.72±0.06	0.68±0.04	0.64±0.09
Left testis	0.72±0.05	0.67±0.05	0.70±0.09
Prostate	0.38±0.06	0.36±0.05	0.32±0.05
Right submaxillary gland	0.54±0.02	0.47±0.04	0.59±0.02
Left submaxillary gland	0.54±0.01	0.46±0.04	0.57±0.01
Small intestine	28.4 ±0.9	30.3 ±0.6	30.8 ±0.7

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

* Significantly different from control (P<0.05)

の400 mg/kg 投与群では、雌の1例で小腸粘膜面に偽膜様物質の付着および別の1例で胸腺の暗赤色斑点と右心房心内膜面に黒緑色小結節が認められた。また1,200 mg/kg 投与群では、雌の1例で盲腸粘膜面に暗赤色斑点と結腸粘膜面に黒灰色線条がみられた。しかし、これらは、しばしばビーグル犬で認められる程度の変化であった。

Table 8に雄のグループの臓器重量を体重1 kg当たりの相対重量で示す。対照群と比較して肝重量のみ、1,200 mg/kg 群で有意に増加した。しかし、その増加は軽度であり、また絶対重量では有意差は認められなかった。

雌のグループについては、対照群とスクアラン投与群の間で何ら変化が認められなかった。

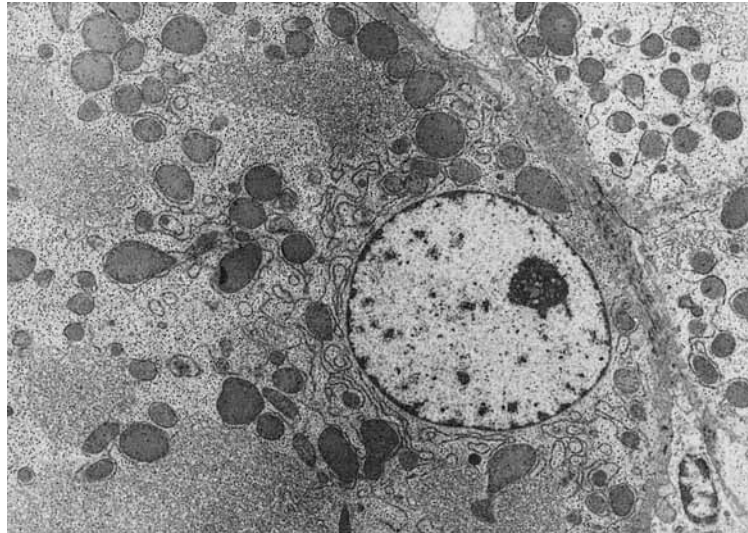
11) 病理組織学的検査

肝臓では対照群の雄2例と雌1例、スクアランの400 mg/kg 投与群の雌2例および1,200 mg/kg 投与群の雌雄の各2例に肝小葉内の軽度の細胞浸潤が認められた。舌では対照群の雌1例に炎症性細胞浸潤がみられた。唾液腺では1,200 mg/kg 投与群の雄1例に軽度の炎症性細胞浸潤がみられた。胃では対照群の雄

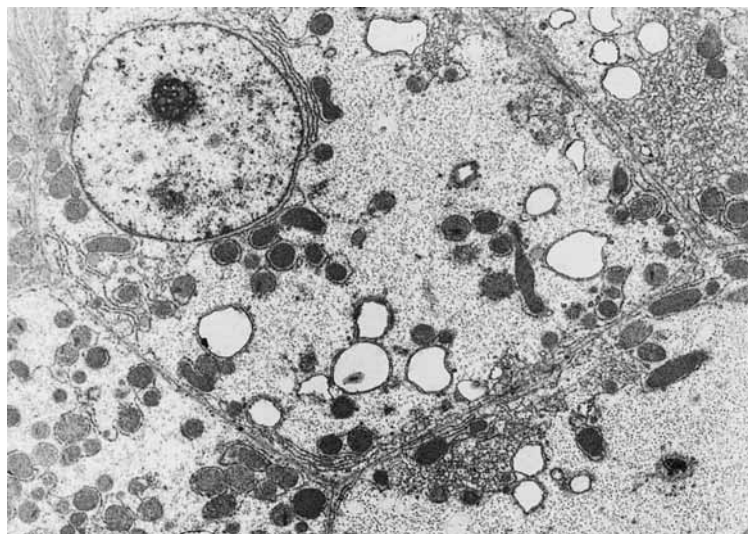
1例、400 mg/kg 群の雌雄の各1例および1,200 mg/kg 群の雌2例に粘膜固有層内のカルシウム沈着がみられた。小腸では対照群の雄1例に炎症性細胞浸潤が認められた。大腸では対照群の雌1例と1,200 mg/kg 群の雌1例に粘膜固有層の充血がみられた。肺では対照群の雄1例と1,200 mg/kg 群の雌1例に泡沫細胞の集簇がみられ、また対照群の雄1例に間質性細胞浸潤、雌1例に寄生虫（虫体の断面）が認められた。胸腺では400 mg/kg 群の雌1例に出血がみられた。心臓では400 mg/kg 群の雌1例に血腫がみられた。下顎部リンパ節では対照群の雄1例と1,200 mg/kg 群の雌2例に褐色色素の沈着がみられた。

腎臓では対照群の雄3例および雌の全例、400 mg/kg 群の雌雄の各2例、1,200 mg/kg 群の雄の全例と雌の3例に髄質内に軽度のカルシウム沈着がみられた。また400 mg/kg 群の雌1例に蛋白円柱が認められた。子宮では対照群の1例に内膜内出血がみられた。

下垂体では対照群の雌1例、400 mg/kg 群の雌雄の各2例、1,200 mg/kg 群の雌1例に嚢胞形成がみられた。上皮小体では対照群、400 mg/kg 群、1,200 mg/kg 群の雄の各1例に嚢胞がみられた。



A



B

Fig. 5 Electronmicroscopic photographs

(A)Male control liver

No remarkable change in hepatocytes.

(B)Male 1,200 mg/kg group liver

Irregular shaped vacuoles are observed in hepatocytes.

食道、脾臓、気管、骨髄、腸間膜リンパ節、脾臓、膀胱、精巣、前立腺、卵巢、腔、乳腺、甲状腺、副腎、脳、脊髄、眼球、瞬膜腺、腹部および背部皮膚には何ら異常は認められなかった。

肝臓の電子顕微鏡写真を Fig. 5 に示す。

対照群の肝臓には特記すべき変化はみられなかった。

スクアラン投与群では雌雄ともに、肝細胞内に不規則な形状の少数の空胞が認められたが、核、粗面および滑面小胞体、ミトコンドリア、グリコーゲン顆粒などの細胞小器官の状態は対照群ととくに違いがなかった。

腎臓においては、電子顕微鏡的に対照群、スクアラン群ともに特記すべき変化が認められず、糸球体、近

位および遠位尿細管の微細構造に異常は認められなかった。

考 察

ラットにおいて、スクアランは消化管からほとんど吸収されず、その12週間の連続投与によっても、毒性学的に問題ないことが証明されている²⁾。そこで本研究ではより大動物のビーグル犬を用いて、スクアランの体内動態と安全性を検討した。

単回投与実験において、雄性ビーグル犬にスクアランを1,200 mg/kg あて1回経口投与したところ、投与後2日間の本化合物の糞中排泄量は投与量の約83%であった。つまり、ラットでの結果と異なり、イヌでは、経口投与されたスクアランの一部は、消化管から吸収されることが明らかとなった。組織中スクアランは体毛中にもっとも高濃度に検出されたが、この体毛をn-ヘキサンで洗浄したところ、洗浄液中に、体毛分布量の約90%のスクアランが回収された。すなわち、体毛に分布したスクアランの多くは体毛の表面への付着分で、おそらく皮膚へ分布したスクアランが皮脂腺から排出され、体毛へ移行したものと考えられる。また投与後3日目の体毛と皮膚におけるスクアランの分布量は投与後1日目に比べて上昇し、この時点の両組織のスクアランの分布量の合計は投与量の約11%で、体内への吸収量の大部分を占めた。さらに投与後6日目の両組織の分布量は、投与後3日目に比べて減少した。このことは体毛へ移行したスクアランがさらに外部環境中へ次第に移行消失していくことを示唆しており、吸収されたスクアランは主として、皮膚を介して排泄されたと考えられた。なお、投与後1日目の分布量が投与量の0.5%と少量ではあるが、小腸と肝臓からもスクアランが検出された。このうち、小腸のスクアランは比較的、速やかに消失したのに対し、肝臓からの消失は緩慢であった。

雌雄ビーグル犬にスクアランを400 mg/kg または1,200 mg/kg ずつ1日1回13週間、経口投与したところ、スクアランの排泄が定常状態にあると思われる投与11週目および13週目の本化合物の糞中排泄量は、前日投与量の62~87%であった。この結果は、単回投与実験での投与後2日目までの糞中排泄量とほぼ一致した。すなわち、イヌにおいてスクアランは一部、吸収されるものの、連続投与しても、その吸収率はほぼ一定であることが判明した。

連続投与実験において、スクアランの分布濃度がもっとも高い組織は肝臓で、次いで体毛、皮膚の順で

あった。体毛と皮膚のスクアラン濃度が比較的、高レベルであったことは、単回投与実験での結果と符合すると思われる。一方、連続投与によってスクアランの肝中濃度が分析組織中、最高レベルとなったのは、本化合物が肝臓中で蓄積したためと考えられる。このことは単回投与実験における肝中スクアランの消失の緩慢さからも推察される。

また電子顕微鏡検査の結果、スクアラン投与群では、肝細胞内にスクアランが取り込まれたためと思われる不規則な形状の少数の空胞が認められた。しかし、空胞以外の細胞小器官の状態は、スクアラン投与群と対照群との間にとくに変化はみられなかった (Fig. 5)。また雄の1,200 mg/kg 投与群で肝臓の相対重量が、対照群よりもわずかに増加したが、絶対重量で比べると有意ではなく、加えて雌の1,200 mg/kg 投与群では肝重量の変化は観察されなかった。さらに血清中ICG濃度の測定結果、あるいは血清酵素 (GOT, GPT, LDH, ALP, γ -GTP, CPK) の活性、総コレステロール値および遊離コレステロール値、総ビリルビン量や尿素窒素量、アルブミンおよびグロブリン量などの血液生化学検査の結果、スクアラン投与による変化と判断されるものはまったくみられなかったことから、スクアランは肝機能に障害的な影響を与えていないと考えられる。

連続投与の期間中および終了後に行った亜急性毒性試験の結果、対照群とスクアラン投与群との間に有意差が認められた検査項目が幾つかあるが、いずれも軽度、かつ正常範囲内での変動であったことから、以下に述べるように、イヌにおいてもスクアランは安全性の高い化合物であると考えられる。すなわち実験期間中、すべての投与群で死亡例はなく、また対照群とスクアラン投与群の間で摂水量、摂餌量、体重曲線に有意な変化はなかったことから、スクアランの連続投与は、イヌの発育にとくに影響を与えないと思われる。

ただし、スクアランの400 mg/kg 投与群では投与5週目から、また1,200 mg/kg 群で投与2~3週目から油毛が観察された。この油毛の本体は、トリグリセリドなどではなく、吸収されたスクアランが皮膚から体毛に高濃度に分布したことに由来する。一方、榎本ら³⁾および堀ら⁴⁾は、カニクイザル (体重2.7~2.9 kg) にスクアランを8 g あて約140日間、経口投与したところ、油毛が観察されたと報告しており、加えて体毛および皮膚からそれぞれ数万 ppm および数千 ppm のスクアランを検出している。したがってサルやイヌでは、スクアランは一部は消化管から吸収され、

皮膚を介して排泄されるため、油毛が生じると考えられる。

スクアラン投与群では、油状物の糞中排泄が観察されたが、この油状物は未吸収のスクアランであると考えられる。また糞潜血検査において、対照群とスクアラン投与群の間で糞潜血の程度や頻度に変化がなかったことから、スクアランは消化管粘膜に障害を与えないと考えられる。尿検査と血清中 PSP 濃度の測定結果から、スクアランは腎機能にも影響しないと考えられる。また血液検査の結果から、スクアランは血球系や造血機能にも影響しないと考えられる。

スクアランは油状の化合物であるため、脂肪酸や脂溶性ビタミンなど、栄養素の吸収を抑制する可能性が考えられた。しかしながらスクアラン投与群の体重曲線は対照群とまったく遜色なく、また、血液生化学検査において、血清中のコレステロール値、トリグリセリド値やリン脂質値、グルコース量や尿素窒素量にもスクアラン投与の影響は観察されなかった。またイヌにおける脂溶性ビタミンの典型的な欠乏症として、ビタミンAによる眼乾燥症や角膜軟化症、ビタミンDによる骨軟化症、上皮小体の肥大、血中フォスファターゼ活性の上昇、ビタミンEによる成長抑制、ビタミンKによるプロトロンビン生成抑制などが知られている。しかし本検討では、眼科検査や血清中 ALP 活性、血液学検査におけるプロトロンビン時間にもとくに変化がみられなかった。したがって、スクアランは少なくとも3カ月程度の投与では、脂溶性ビタミンなどの吸収を抑制して、それらの体内レベルを有意には低下させないと考えられた。

総 括

ラットにおいて、スクアランは消化管からほとんど吸収されず、また毒性学的にも問題ない化合物と評価されているが、ヒトにおける安全性を考える場合、より大動物での検討が必要と考え、ビーグル犬を用いてスクアランの体内動態を明らかにすると共に、その亜急性毒性試験を行った。その結果、イヌにおいて、経口投与されたスクアランの大部分は消化管から吸収されないが、一部は吸収されて、特定の組織（体毛、皮膚、肝臓）に高濃度に分布した。このうち、体毛と皮膚への分布は、スクアランがこれらの組織から排泄されることに由来することが単回投与実験から明らかと

なった。また亜急性毒性試験において、スクアラン投与群では油状物の糞中排泄と油毛が観察された。糞中の油状物は未吸収のスクアランで、油毛はスクアランが体毛に分布したことによると考えられた。肝臓中のスクアランは電顕的には空胞を形成して存在すると思われたが、肝機能検査や血液生化学的検査の結果から、肝臓の機能に障害的な影響を与えていないことが示された。また体重曲線や血液生化学的検査、眼科検査などの結果から、スクアランは脂肪酸や脂溶性ビタミンの吸収を少なくとも顕著には抑制しないことも示唆された。その他の亜急性毒性試験の結果、スクアラン投与群と対照群との間に有意差が観察された項目がわずかにあったが、いずれも軽度、かつ正常範囲内での変化であり、イヌにおいても、スクアランは毒性学的にとくに問題ないと判断された。

謝 辞

スクアランを提供下さいました日誠マリン㈱に深く感謝致します。

文 献

- 1) 堀伸二郎, 尾花裕孝, 樫本 隆: PCDFs 中毒サルに対するスクアランの治療に関する研究. 福岡医誌 78: 281-285, 1987.
- 2) 神村英利, 吉村英敏: 油症原因物質の排泄促進. 福岡医誌 78: 266-280, 1987.
- 3) 樫本 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.
- 4) 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. Chemosphere 16: 1707-1712, 1987.
- 5) Richter E, Schäfer SG 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

PCB 中毒患者における血液中 PCB 異性体の濃度推移

第一薬科大学物理分析学教室

大 間 美 和・黒 木 広 明

原 口 浩 一・増 田 義 人

予防医学研究所 台北

許 書 刀

Concentration Changes of PCB Isomers in the Blood of Patients with PCB Poisoning

Miwa OHMA, Hiroaki KUROKI, Koichi HARAGUCHI
and Yoshito MASUDA

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

Shu-Tao HSU

*National Institute of Preventive Medicine
161 Kun-yang Street, Nankang, Taipei*

The blood of 3 Yu-cheng patients sampled from 1980 to 1985 and of 14 Yusho patients sampled from 1982 to 1988 were analyzed for 7 polychlorinated biphenyl (PCB) isomers by gas chromatography with a capillary column. The concentrations of PCBs in Yu-cheng patients were up to 400 ppb and much higher than those of Yusho patients. The high concentration of PCBs were decreased at biological half lives of about 50 months and 2,4,3',4'-tetra-CB and 2,4,5,3',4'-penta-CB were fastly decreased with time at half lives of about 12 months. Therefore, peculiar gas chromatographic pattern for Yusho patients would be formed 3 years after the onset. The concentration and patterns of blood PCBs of Yusho patient kept in similar levels during 1982 to 1988.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 281-286, 1989)

はじめに

1968年西日本一帯で油症が起こり、その原因はライスオイルに混入されたポリ塩化ビフェニール(PCB)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)およびポリ塩化クオターフェニル(PCQ)を摂取したためとされている⁷⁾⁸⁾¹¹⁾。摂取されたPCBなどは患者体内でどのように残留したかについては、患者の血液は事件後5年経過した1973年頃からしか分析されていないので、それ以前ではよくわかっていない。その後は、血液中のPCB濃度はあまり変化なく推移している¹⁾。血液中PCBのガスクロマトグラムパターンは油症患者と一般人では明らかに異なり、油症患者では一般人よりも2,4,5,3',4'-pentaCBの濃度が低く、2,3,4,5,3',4'

-HexaCBの濃度が比較的高いのが特徴的である⁹⁾。それで、このパターンの違いが油症の診断基準に加えられる⁹⁾。一方、1979年、台湾中部において油症と類似した中毒事件があり、同様に、PCB、PCDFおよびPCQが混入されたライスオイルを摂取したために発生した¹⁰⁾。台湾のPCB中毒患者では、中毒事件後間もない頃の血液を経時的に採取できたので、これを分析して、人体におけるPCB異性体の濃度変化を推定する。また、この変化より油症患者の事件後間もない頃の体内PCB異性体の濃度変化を推定することができる。台湾および福岡県におけるPCB中毒患者の血液中PCB異性体の濃度をガスクロマトグラフィーで分析したので、その濃度の推移について報告する。

実 験 方 法

1. 血液

(1) 台湾患者血液

重症の患者 3 名（血液中 PCB 濃度 100 ppb 以上）より、1980 年 5 月から 1985 年 12 月にかけて数回血液を採取し、凍結保存した。患者の生年月は BS 男 1962 年 2 月、RS 女 1954 年 8 月、SS 男 1946 年 5 月、血液採取年月日は、1980 年 5 月 28 日、1980 年 11 月 15 日、1981 年 7 月 27 日、1983 年 4 月 12 日、1985 年 12 月 13 日である。

(2) 油症患者血液

1982 年から 1988 年のそれぞれ 9 月または 10 月の油症一斉検診の時に採取された重症の患者 14 名の血液を冷凍保存した。油症発生当時の患者の年齢は、男 15~70 才、女 25~53 才。油症認定年度は、1963 年男 2 名女 9 名、1974~1982 年男 2 名女 1 名、1975 年以降の血液中 PCB 濃度は 5~10 ppb の範囲男 3 名女 7 名、10~15 ppb の範囲男 1 名女 3 名である。血液 PCB はいずれも A タイプである⁴⁾。

(3) 人工血液

乾燥血液（西ドイツ Behring 社製）に一定量の水を加えて作る。PCB を分析すると 7 異性体で 0.9 ppb 含まれていた。

2. 試薬および溶媒

PCB 標準物質は当教室で合成したもの³⁾または Analabs 社（米国）より購入したものを使用した。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 分析用のものを使用した。

3. 装置

島津 GC-9A 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、Hi-Cap CBP1, 0.2 mm×50 m（島津）、キャリアガスは 99.999%高純度窒素を用いた。ガス流速は 0.83 ml/min であった。カラム温度は最初 100° で 2 分間保持し、15/min の割合で 280° まで昇温し、その後一定に保った。注入口温度は 300° で一定にした。試料の注入はスプリット・スプリットレス試料導入装置 SPL-G9（島津）で行った。

4. 分析方法

台湾の患者の血液は約 0.5 g、福岡の患者は 1~3 g を秤量し、試験管にとり、これに水を加えて 3 ml とし、エタノール 3 ml、水酸化ナトリウム 0.3 g を加えよく振り混ぜ、さらに内標準物質として 2,3,4,5,6,2',

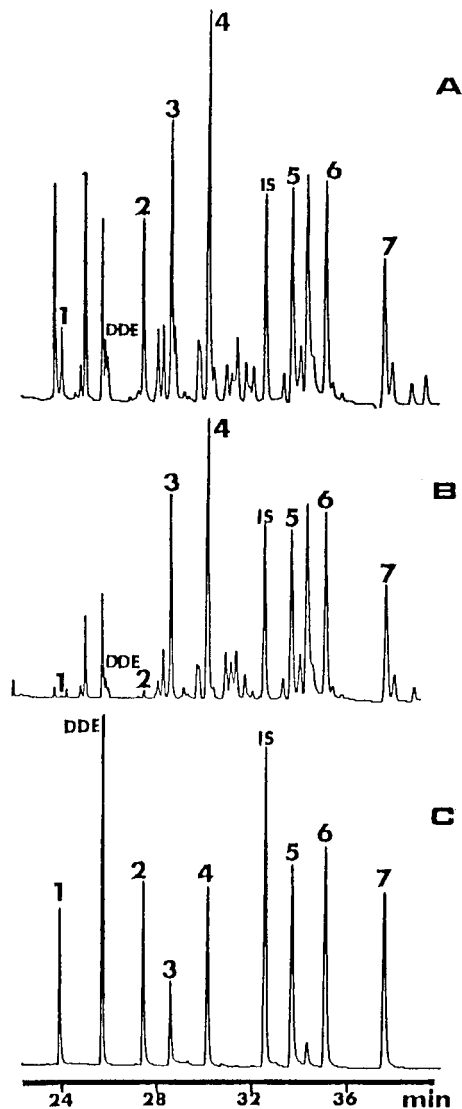


Fig. 1 Gas chromatograms of blood PCBs from a Yu-Cheng patient

A: Sampled from a Yu-Cheng patient in May, 1980.

B: Sampled from the same patient in April, 1983.

C: Authentic PCB isomers.

1: 2,4,3',4'-Tetra-CB

2: 2,4,5,3',4'-Penta-CB

3: 2,4,5,2',4',5'-Hexa-CB

4: 2,3,4,2',4',5'-Hexa-CB

5: 2,3,4,5,3',4'-Hexa-CB

6: 2,3,4,5,2',4',5'-Hepta-CB

7: 2,3,4,5,2',3',4'-Hepta-CB

IS: Internal standard

2,3,4,5,6,2',5'-Hepta-CB

5'-Hepta-CB を 5 ng または 2.5 ng 添加し、65° 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 10 ml を水 2 ml で水洗し、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, 140° 3 時間) 0.5 g のカラムクロマトグラフィーにかけた。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を付けた試験

管で 3 ml まで濃縮した。これをスピッツ試験管に移し、60° に加温して約 0.1 ml まで濃縮し、ガスクロマトグラフの試料とした。各 PCB 異性体の定量は、ピーク面積比による内標準法により行い、クロマトバック C-R3A (島津) で面積測定および計算をした。

実験結果

分析方法の正確さを検討するため、人工血液 (PCB 濃度 0.9 ppb) 3 g に 7 種の PCB 異性体および内標準物質を各 5 ng 添加し、所定の処理をしたのちに PCB 異性体の分析をした。その結果を Table 1 に示す。異性体により多少のばらつきはあるが、添加量の 100% 前後で回収しており、この方法でほぼ正確な測定値が得られるものと考えられる。

台湾の PCB 中毒患者 SS の、事件後 1 年以内および 4 年後の血液中 PCB のガスクロマトグラムを Fig. 1 に示す。このガスクロマトグラムより、はじめ多く存在していた 2,4,3',4'-tetra-CB および 2,4,5,3',4'-Penta-CB ピークが 4 年後では大きく減少していた。その他の PCB 異性体は同じような割合で残留している。

Table 1 Recovery of PCB isomers added to control blood

	Recovery (%)	Concentration (ppb)
2,4,3',4'-TetraCB	89.8±5.64	1.50±0.08
2,4,5,3',4'-PentaCB	106.0±3.69	1.77±0.07
2,4,5,2',4'5'-HexaCB	97.6±2.55	1.63±0.06
2,3,4,2',4'5'-HexaCB	104.2±0.77	1.74±0.07
2,3,4,5,3',4'-HexaCB	111.4±3.94	1.86±0.09
2,3,4,5,2',4'5'-HeptaCB	110.8±3.99	1.85±0.11
2,3,4,5,2',3'4'-HeptaCB	110.8±3.00	1.85±0.09

5 ng Each of PCB isomer was added to 3 g of control blood and the concentrations and recovery of added PCB isomers were obtained by 5 analyses. (Value±S. D.)

Table 2 Concentration and biological half life of PCB isomers in the blood of Yu-Cheng patient from 1980 to 1985

Sample time	Concentration of PCB isomers (ppb)							Total
	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	
RS May, 1980	8.24	25.63	49.27	36.88	12.78	12.67	10.54	156.01
RS Nov., 1980	0.33	13.74	45.46	36.26	13.32	14.92	12.13	136.16
RS July, 1981	5.08	9.24	47.21	35.55	12.19	12.51	10.41	132.24
RS April, 1983	0.29	1.87	43.31	33.85	13.26	16.15	11.48	120.21
SS May, 1980	10.33	20.15	62.68	43.76	18.25	18.14	14.21	187.52
SS Nov., 1980	1.48	12.54	74.91	58.23	28.30	29.16	23.55	228.17
SS April, 1983	0.22	0.90	41.43	27.67	12.05	12.50	9.31	104.08
SS Dec., 1985	0.46	0.76	32.53	20.94	8.54	11.16	8.09	82.48
BS May, 1980	10.88	71.59	128.07	93.67	34.50	33.20	25.95	397.86
BS Nov., 1980	1.50	21.44	64.65	55.32	21.81	22.14	18.07	204.93
BS July, 1981	2.51	10.19	59.02	44.32	16.28	15.94	13.11	161.37
BS April, 1983	0.28	1.59	50.39	36.52	13.28	14.91	10.97	127.94
BS Dec., 1985	0.33	0.80	50.00	37.05	12.81	15.65	11.25	127.89

Biological half life of PCB isomers in the blood (months)								
RS	11.8	10.2	247	302	-1,450	-140	-893	113
SS	17.6	13.8	60	51	47	62	55	48
BS	15.5	11.1	71	65	58	81	67	54

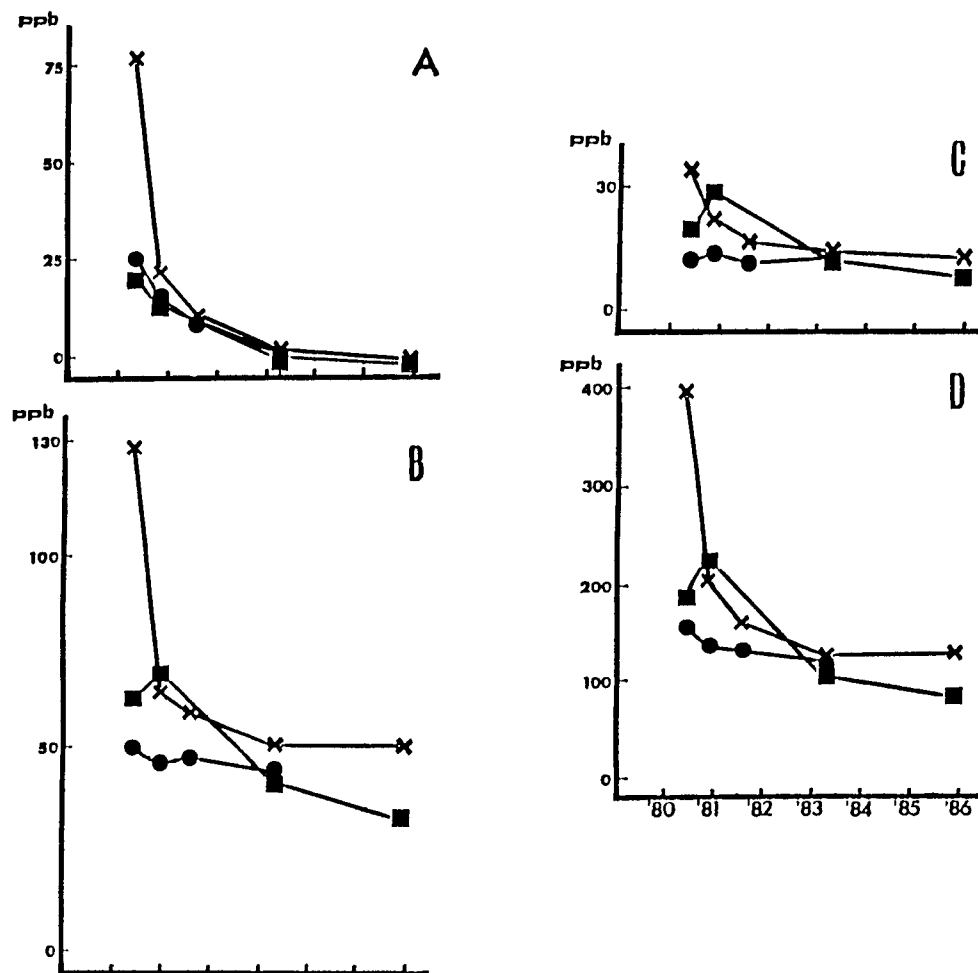


Fig. 2 Time course variation of PCB concentration in the blood of Yu-Cheng patients.

A: 2,4,5,3',4'-Penta-CB
 B: 2,4,5,2',4',5'-Hexa-CB
 C: 2,3,4,5,3',4'-Hexa-CB
 D: Total of 7 PCBs

台湾の3名の患者について分析した PCB 異性体の濃度を Table 2 に示す。また、濃度減少の程度を知るために、各患者における PCB 異性体の半減期を計算したので、これも Table 2 に示す。3 名とも血液中 PCB 濃度は経時的に減少しているが、減少の程度は人により異なる。1980 年に採取した血液の PCB 濃度に比べると、1985 年までに 4 および 5 塩化 PCB では 95~97%、6 および 7 塩化 PCB では 30~50% が代謝され、消失している。2,4,3',4'-Tetra-CB および 2,4,5,3',4'-Penta-CB は半減期が 10~18 カ月であるのに対し、他の PCB では 50 カ月以上であり、対照的

に異なっていた。油症の血液中 PCB パターン判定に使われる 3 種の PCB 異性体 2,4,5,3',4'-Penta-CB、2,4,5,2',4',5'-Hexa-CB および 2,3,4,5,3',4'-Hexa-CB の濃度変化をグラフに示す (Fig. 2)。PCB 全体の濃度は経年的に減少しているが、とくに 2,4,5,3',4'-Penta-CB の濃度減少が非常に大きいことがわかる。

福岡県における油症患者の血液中 PCB の異性体別濃度も分析した。パターン判定に利用される 3 種の異性体の濃度推移を Fig. 3 に示す。人により濃度変化は異なっているようであるが、全体的には同じ程度の濃度で推移している。2,4,5,3',4'-Penta-CB で多少濃

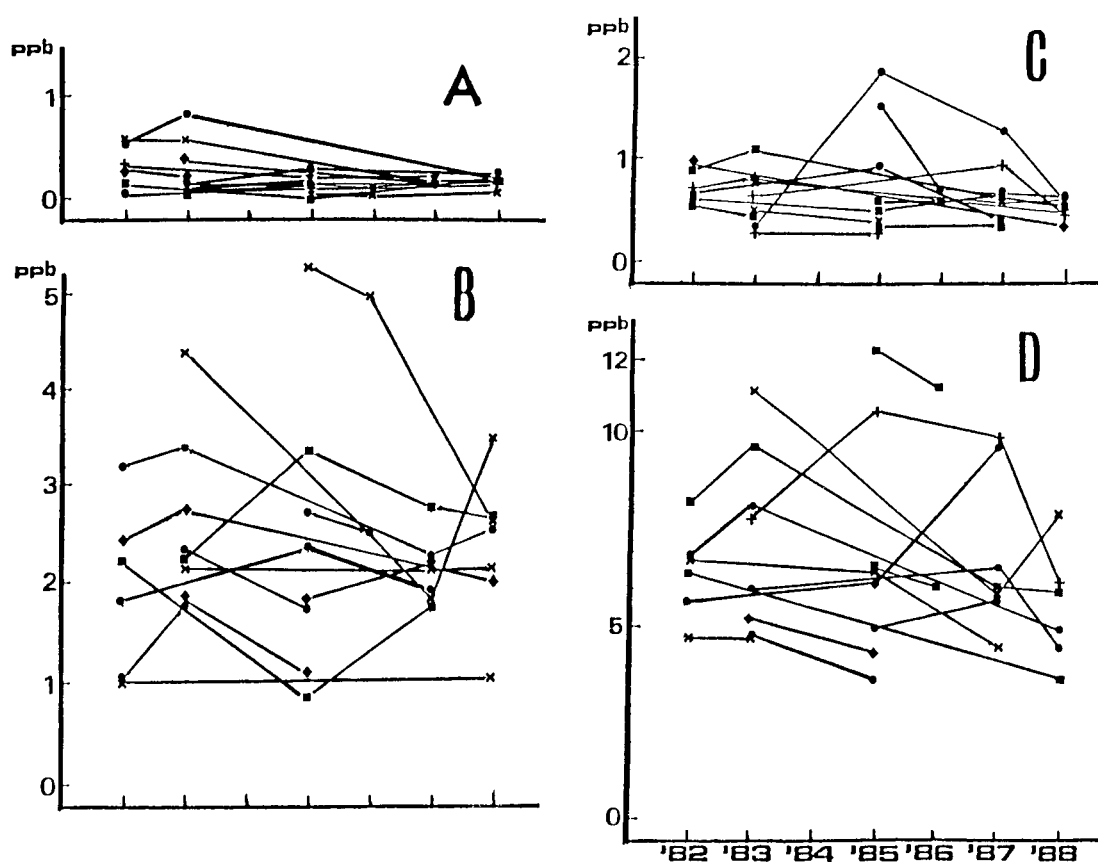


Fig. 3 Time course variation of PCB concentration in the blood of Yusho patients.

A: 2,4,5,3',4'-Penta-CB

B: 2,4,5,2',4',5'-Hexa-CB

C: 2,3,4,5,3',4'-Hexa-CB

D: Total of 7 PCBs

度減少傾向がみられるようだ。これらの患者の全て PCB 濃度の半減期を計算してみると、40 カ月から -770 カ月の間で、平均値では 130 カ月、すなわち約 10 年となった。

考 察

福岡の油症患者では事件後 5 年間は血液中の PCB が分析されてないので、当時の患者の PCB の濃度変化はわからない。その後は、血液中 PCB の分析がされ、患者では一般人よりも 2~3 倍 PCB 濃度が高く、そのガスクロマトグラムの PCB パターンは油症患者に特有であることが知られている⁵⁾。その特異性は油症患者では一般人に比べて、2,4,5,3',4'-Penta-CB の濃度が低く、2,3,4,5,3',4'-Hexa-CB の濃度が高いことである。油症患者体内の PCB 異性体の濃度が一般

人と異なるこの特異性はその後も長期間維持されている⁶⁾。今回分析した結果を示す Fig. 3 に見られるように、油症患者特有の PCB 濃度パターンは 1988 年においても継続されている。

台湾の PCB 中毒患者では、事件の翌年から血液が採取され、その中の PCB 異性体の濃度が分析されたので、事件直後の血液中 PCB 濃度の変化を知ることができた。ここで分析された PCB 異性体の濃度が減少する程度は、Chen ら²⁾が示した患者血液中 PCB の消失割合とよく一致する。血液中 PCB 異性体の経時的濃度変化を示す Fig. 2 によると、2,3,4,5,3',4'-Hexa-CB の濃度減少はゆるやかであるのに対し、2,4,5,3',4'-Penta-CB の濃度減少は大きく、はじめの 3 年間で、1 ppb 程度にまでなっている。油症のパターンを判定するときに使われる 2,4,5,3',4'-Penta

-CB の 2,3,4,5,3',4'-Hexa-CB に対する濃度割合は、1980 年 5 月では 110~210%であったものが、1983 年 4 月には 7~14%となっており、1988 年の油症患者 15 名のその濃度割合の平均値および標準偏差 $7.0 \pm 3.7\%$ に近い値である。油症患者の特有パターンである、2,4,5,3',4'-Penta-CB が少なくなることは、事件後 3 年ぐらいには完成していたものと考えられる。

総 括

台湾の PCB 中毒発生後間もない 1980 年から 1985 年に、3 名の同じ中毒患者より、血液を採取した。また、福岡県の油症患者 14 名より、1982 年から 1988 年に、採取した。これらの血液をキャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフにより、7 種の PCB 異性体の濃度を分析した。

1. 台湾の PCB 中毒患者の血中 PCB 濃度は、福岡県の油症患者の濃度よりも高く、400 ppb に達するものまであった。
2. 台湾の PCB 中毒患者の血中全 PCB 濃度は、半減期 50 カ月程度で減少した。そのうち、2,4,3',4'-Tetra-CB、および 2,4,5,3',4'-Penta-CB は、半減期 12 カ月程度の早さで減少した。
3. 福岡県の油症患者では、血中 PCB の濃度は、ほとんど変化せず、特有のパターンも持続していた。
4. 油症患者特有のガスクロマトグラム PCB パターンは、事件後 3 年ぐらいでできあがっていたものと考えられる。

文 献

- 1) 旭 正一、占部治邦、利谷昭治：昭和 55 年度

～57 年度の年次検診における油症皮膚症状の変化。福岡医誌 74：276-279, 1983.

2) Chen PH, Luo ML, Wong CK and Chen CJ: Comparative rates of elimination of some individual polychlorinated biphenyls from the blood of PCB-poisoned patients in Taiwan. Food Chem. Toxicol. 20: 417-425, 1982.

3) Kuroki H and Masuda Y: Structures and concentration of the main components of polychlorinated biphenyl retained in patients with Yusho. Chemosphere. 6: 469-474, 1977.

4) Masuda Y: Health status of Japanese and Taiwanese after exposure to contaminated rice oil. Environ. Health Perspect. 60: 321-325, 1985.

5) 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.

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) 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.

8) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and rice oil used by patients with Yusho. Fukuoka Acta Med. 66: 593-599, 1975.

9) 杉山浩太郎：序言。福岡医誌 68：93-95, 1977.

10) Wong CK: PCB poisoning special issue. Clin. Med. (Taipei) 7: 1-100, 1981.

11) 油症研究班分析部会：油症患者が使用したライスオイル中の有害物質の化学的検索。福岡医誌 60：496-512, 1969.

判別関数値を用いる血中 PCB パターン解析

福岡県衛生公害センター

中川 礼子・篠原 志郎・飯田 隆雄
竹中 重幸・深町 和美・高橋 克巳Statistical Analysis of Subjects with
Type A, BC and C Pattern of Blood PCB on GCReiko NAKAGAWA, Shiro SHINOHARA, Takao IIDA,
Shigeyuki TAKENAKA, Kazumi FUKAMACHI and Katsumi TAKAHASHI*Fukuoka Environmental Research Center
Mukaisano, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01*

Various combinations of measured data on PCBs, PCQs, and PCDFs in adipose tissue or blood were tested on its discriminating power between normal persons and persons poisoned by Yusho oil.

The most discriminative single parameter was concentration of PCDF in adipose tissue. Furthermore, discriminative power increased by using additional parameters.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 287-290, 1989)

はじめに

1968年夏、西日本一帯で発生したカネミ食用油中毒事件は約1,800人の被害者を出した大規模なもので、これは後にポリ塩化ビフェニール (PCBs), ポリ塩化クアテルフェニール (PCQs), ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs) 等の合成化学物質による人体汚染であることが明らかにされた⁷⁾⁸⁾。中毒の主症状は眼科⁹⁾および皮膚科¹²⁾所見を特徴とする所謂“油症”と言われるものである。現在これら当初の他覚的に明瞭な特異的臨床症状はかなり軽快して来ており、疲労感や頭痛などの自覚的症狀のみの訴えが多くなって来ている。そこで油症の診断の一基準として、臨床所見とともに PCB および PCQ 濃度⁷⁾や PCB 異性体組成比 (PCB パターン⁹⁾) が用いられて来た。しかしながら臨床症状が軽微または非特異的かつその疫学的背景が不明な状況において、実際的にはこれらの人と健常者の区別が極めて困難な例が生じてきた。このような場合、BC タイプについては最終的には油症の原因物質と考えられる PCDFs の皮下脂肪中濃度によって初めて差が認められた¹⁰⁾。そこで今回は油症認定患者 18 名 (カネミ油中毒者群) および健常者群 11 名の合

計 29 名の皮下脂肪中 PCDF, PCQ および PCB 濃度, 血中 PCQ および PCB 濃度, 血中 PCB の 1/2 値および 5/2 値の計 7 個のデータを基礎として、統計的手法により、PCB パターンの解析を行った。その結果、若干の知見が得られたので報告する。

対象と方法

29 名の対象者はすべて生存者であり、その内訳は健常者 11 名、油症認定患者 18 名である。

試料の採取および分析に関しては別報ですでに述べているとおりである²⁾¹⁰⁾¹¹⁾。

解析に用いたデータは対象者の血中 PCB および PCQ 濃度²⁾¹⁰⁾¹¹⁾、皮下脂肪中 PCB, PCDF⁹⁾ および PCQ 濃度、血中 PCB の 1/2 値および 5/2 値の 7 項目である。なおデータは対数変換値を用い、また皮下脂肪中 PCDF の ND 値は 10 ppt として計算した。

判別解析は、18 名の油症認定患者 (カネミ油中毒者群) と 11 名の健常者群の 2 群について行った。

結果と考察

1. 判別解析

7 項目のデータから任意に組合わせを作り、各々に

ついて、カネミ油中毒者群（18名）と健常者群（11名）を判別する関数を計算し、その理論的誤判別率を求めた。

Table 1 はその結果を示したものである。

最小の誤判別率は全7項目を用いた時の18.40%であった。次に小さいのは19.32%であり、これは皮下脂肪中PCDF、皮下脂肪中PCQ、および血中PCQの3項目の組合わせの時に得られた。

項目数別に見ると、1項目のみからなる判別関数の誤判別率については、皮下脂肪中PCDFを用いた時が22.15%と、他の項目の場合に比べて4.8%（5/2値）～14.37%（1/2値）も小さい値であった。次に小さいのは5/2値の26.95%および皮下脂肪中PCQの27.56%であった。

さらに2項目の場合、そのうちの1つに皮下脂肪中PCDFを用いた組合わせでは、平均誤判別率が22.0%であった。一方、皮下脂肪中PCQあるいは血中PCQを用いた組合わせでは、平均誤判別率はそれぞれ26.6%と28.1%であった。以上の結果から、皮下脂肪中PCDFがとくに重要な項目であることが明らかになった。またTable 1により、2項目の組合わせの中で、1/2値と5/2値の組合わせは26.92%の誤判別率であり、5/2値単独の場合の誤判別率に近かったことは、PCBパターンに5/2値のみの使用が可能であることを示唆するものと考えられる。

同様に3項目の場合について見る。3項目の中に皮下脂肪中PCDFがあるので、全般的に誤判別率は減少したが、とくに皮下脂肪中PCDF、皮下脂肪中PCQ、および血中PCQの3項目の組合わせの時に19.32%と顕著に小さくなり、全項目の場合の18.40%とその差は0.92%に縮まった。

2. PCBパターン解析

前節において、皮下脂肪中PCDF、皮下脂肪中PCQおよび血中PCQの3項目の組合わせによる判別が全項目の組合わせによる判別に次いで、その誤判別率が小さいことを示した。そこでこの3項目からなる線形判別関数（理論的誤判別率19.32%）を用いてPCBパターンを考察した。Fig. 1はPCBのパターンの各タイプおよび健常者の一人一人を限界値を0とする判別関数値でプロットしたものである。この図では、Aタイプは7名すべてがカネミ油中毒者群に、BCタイプは3名中1名（33.3%）がカネミ油中毒者群ではなく健常者群に、Cタイプは8名中3名（37.5%）がカネミ油中毒者群ではなく健常者群に、また健常者群は11名中2名（18%）が健常者群では

なくカネミ油中毒者群に判別された。

このように統計上誤判別率が比較的大きいBCおよびCタイプ群については、実際には個々人について総合的に考察されることが望ましいのではないかとと思われる。

今回判別関数にデータの対数変換値を用いたのは、母集団分布を正規近似させるためである。カネミ油中毒者群と健常者群の等分散の検定は、Dempsterによる方法¹⁾によったが、全項目を用いた場合には有意差はなく、皮下脂肪中PCDF、皮下脂肪中PCQおよび血中PCQの3項目を用いた場合には統計的有意水準5%でわずかな差が見られた。そのため、2次判別関数¹⁾で検討したところ、線形判別関数とほとんど差がなかった。一方、Fig. 1に示したように、カネミ中毒者群で判別を誤ったもの4名、健常者群で判別を誤ったもの2名で、実際の誤判別率は29名中6名の20.7%であった。これはTable 1に示した理論的な誤判別率の19.32%に非常に近い、さらにAタイプ（典型的油症患者群）を除いたBCおよびCタイプ群11名と健常者群11名について判別関数を求め、その誤判別を見たところ、理論値が21.64%、実際のデー

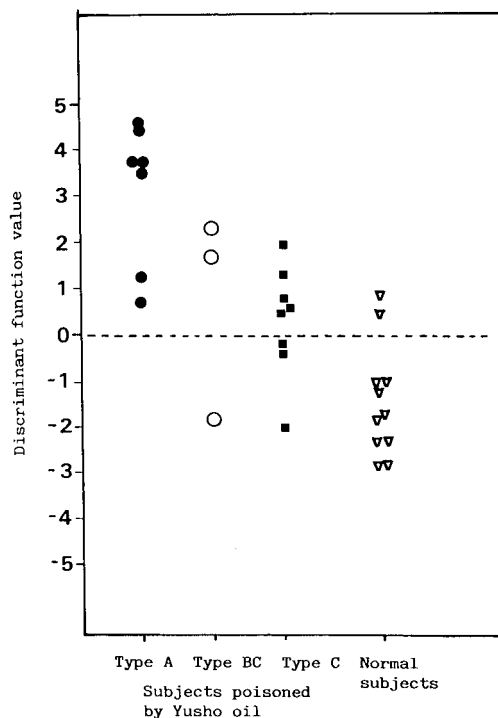


Fig. 1 The distribution of the discriminant function values obtained for 29 subjects

Table 1 Probability of misclassification on 36 combinations of data

Combination	PCDF (A)	PCQ (A)	PCQ (B)	PCB peak ratio (1/2)	PCB peak ratio (5/2)	PCB (A)	PCB (B)	Misclassification probability (%)
1	★							22.15
2		★						27.56
3			★					29.48
4				★				36.52
5					★			26.95
6						★		31.45
7							★	35.51
8	★	★						22.03
9	★		★					21.43
10	★			★				22.15
11	★				★			22.14
12	★					★		22.08
13	★						★	22.01
14		★	★					25.49
15		★		★				27.54
16		★			★			26.67
17		★				★		25.95
18		★					★	27.22
19			★	★				29.36
20			★		★			26.93
21			★			★		27.25
22			★				★	28.88
23				★	★			26.92
24	★	★	★					19.32
25	★	★		★				22.02
26	★	★			★			21.97
27	★	★				★		21.97
28	★	★					★	21.89
29	★		★	★				21.37
30	★		★		★			20.93
31	★		★			★		21.39
32	★		★				★	21.27
33	★			★	★			22.14
34	★			★		★		22.07
35	★			★			★	22.80
36	★	★	★	★	★	★	★	18.40

(A): Adipose tissue (B): Blood

タでは 22 名中 5 名で誤判別率は 22.7%と両者は極めて近い値であった。以上のことから、2 次判別関数を適用することなく、線形判別関数で十分解釈が可能であると考えられる。

以上述べたように、判別関数を用いた統計数量で表

現する方法は、判別が視覚的に簡明である。しかしこの方法は、皮下脂肪中 PCDF および皮下脂肪中 PCQ を測定しなければならないというデメリットを有する点で即実用化には問題があり、将来的には、血中や毛髪中の PCDF 測定値の利用の可能化が期待される。

また PCDF の他にも原因油中に存在したポリ塩化ジベンゾダイオキシン (PCDDs), コプラナー-PCB (Co-PCB) も中毒者群の解析に考慮しておく必要がある。PCDD については、飯田ら⁴⁾や榎本ら⁵⁾の報告を総合すると、現在の生存中毒者の皮下脂肪中残留 PCDD 濃度は健康者群との判別要因としての寄与は小さいと考えられる。そこで、今後は Co-PCB に関して、その寄与を早急に明らかにしなければならない。

結 語

血中 PCB および PCQ 濃度、皮下脂肪中 PCB, PCQ および PCDF 濃度、血中 PCB の 1/2 値および 5/2 値の 7 項目のデータを用い、それらの組合わせについて判別関数を計算した。そしてその関数による理論的誤判別率を求めたところ以下のことが明らかになった。すなわち 1 項目の場合では皮下脂肪中 PCDF が、2 項目の場合では皮下脂肪中 PCDF を含む組合わせが、3 項目の場合では皮下脂肪中 PCDF, 皮下脂肪中 PCQ および血中 PCQ の組合わせが判別に極めて有効であることがわかった。

また油症認定患者の個々の症例を、限界値を 0 とする判別関数値で表現し、それによって PCB パターンを考察したところ、BC および C タイプ群の場合は理論的誤判別率を越える割合で健康者に判別されることがあった。

本研究は、昭和 63 年度厚生省科学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) 後藤昌司：多変量データの解析法。科学情報社 105-176, 1973.
- 2) 飯田隆雄, 竹中重幸, 中川礼子, 深町和美,

高橋克巳, 旭 正一：正常者の血液中ポリ塩化クアテルフェニル濃度。福岡医誌 78: 305-308: 1987.

3) 飯田隆雄, 中川礼子, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克巳：油症患者および健康者の皮下脂肪組織中の PCDFs。福岡医誌 1989.

4) 飯田隆雄, 中川礼子, 深町和美, 高橋克巳：油症患者皮下脂肪組織中の PCDDs。福岡医誌 1989.

5) 榎本 隆, 宮田秀明, 高山幸司, 尾垣淳治：高分解能 MS-SIM 法による油症患者組織および原因油中の PCDDs, Co-planar, PCBs, PCDFs。福岡医誌 78: 325-336, 1987.

6) 向野利彦, 大西克尚, 広中博美：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.

7) Kunita N, Kashimoto T, Miyata H, Fukushima S, Hori S and Obana H: Causal agents of Yusho. In Kuratsune M (ed): Progress in Clinical and Biological Research Volume 137. pp.45-58, Alan R. Liss. Inc. New York, 1984.

8) Kuratsune M, Yoshimura T, Matsuzaka J, Yamaguchi A: Epidemiological study on Yusho. a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. Environ. Health Perspect. 1: 119-128, 1972.

9) 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ル。福岡医誌 65: 25-27, 1974.

10) 中川礼子, 飯田隆雄, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克巳, 旭 正一：血中 PCB パターンが BC タイプを示す症例についての考察。食衛誌 29: 385-389, 1988.

11) Takenaka S, Fukamachi K, Nakagawa R, Iida T and Takahashi K: Polychlorinated quaterphenyl congeners and polychlorinated biphenyl congeners in the blood and adipose tissue of "Yusho patients and normal subjects". Chemosphere 17: 319-330, 1988.

12) Urabe H and Koda H, Asahi M (1979): Present state of Yusho patients. Ann. New York Acad Sci. 320: 273-276, 1979.

油症患者血液中の PCB-および PCT-Methylsulfone の分析

第一薬科大学物理分析学教室

原 口 浩 一・増 田 義 人
黒 木 広 明・大 間 美 和

Analysis of PCB- and PCT-Methylsulfones in the Blood of Yusho Patients

Koichi HARAGUCHI, Yoshito MASUDA, Hiroaki KUROKI
and Miwa OHMA

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

Polychlorinated biphenyl (PCB)- and terphenyl (PCT)-methylsulfones were isolated from the blood of Yusho patients sampled in 1987 and characterized by gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS), electron capture detection (GC/ECD) and flame photometric detection (GC/FPD). GC/MS analysis for PCB-methylsulfones showed that all the blood tested (nine samples) contained the tri- and tetrachloro congeners. The concentrations of PCB-methylsulfones were estimated to be 15-120 ppb. PCT-methylsulfones detected in the same fraction, which were confirmed by GC/MS comparison with authentic samples as well as by GC/ECD and GC/FPD, consisted of tetra-, penta- and hexachloroterphenyl methylsulfone congeners. The levels of PCT-methylsulfones in six samples detected were preliminarily estimated to be 10-270 ppb, on the basis of a PCB-methylsulfone standard. Their origins and biological effects are unclear at present.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 291-295, 1989)

はじめに

Polychlorinated Biphenyl (PCB) の含硫代謝物である PCB-methylsulfone は、1976 年、バルト海のアザラシの体脂肪から最初に検出され⁷⁾、その後種々の動物実験によりその体内蓄積性が明らかにされた¹⁾²⁾。この代謝物は油症患者の体内組織からも検出され³⁾⁵⁾、とくに患者の肺組織中の濃度は一般人のそれよりも高い値を示した。最近、ヒトの肺に PCB-methylsulfone と特異的に結合する target cell の存在が明らかになり⁸⁾、その肺組織への親和性と毒性との関係が注目されている。一方、特定の構造を有する PCB-methylsulfone は 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin によって誘導される芳香族炭化水素水酸化酵素活性を強く阻害することが分かってきた⁹⁾。著者らは油症患者の体組織中の PCB-methylsulfone の組成および濃度をある程度明らかにしている³⁾が、患者

血液中のその分析はまだ行われていない。本研究では、患者血液から PCB-methylsulfone を単離したので、その組成、濃度を明らかにした。また、PCB-methylsulfone 分画のなかに Polychlorinated Terphenyl (PCT)-methylsulfone とみられる数種の異性体が検出されたので、その同定および組成についても報告する。

実験方法

1. 材料および試薬

1987 年に福岡県下に在住する油症患者から採取した血液 9 検体を分析試料とした。アルミナはメルク社製カラムクロマトグラフ用 (中性、活性度 I, 70~230 mesh)、硫酸は精密分析用 (和光純薬)、その他の溶媒はすべて残留農薬試験用または高速液体クロマトグラフィー用を使用した。

2. 測定機器

(1) ガスクロマトグラフ (GC/ECD および GC/FPD)

島津 GC/7AG ガスクロマトグラフに電子捕獲型検出器 (ECD-⁶³Ni) および炎光光度検出器 (FPD, S フィルター付) を装備したものを用いた。カラムは fused silica capillary MPS-50 (25 m×0.25 mm I. D. Quadrex 社) を用いた。カラム温度は 200°C で 2 分間保ち、6°/分 で 280°C まで昇温し、その後一定温度に保った。試料注入はソルベントカット式 (島津ムービングプレアカム SPL-7) で行い、キャリアガスにはヘリウム (カラム内流量 1.2 ml/分)、メイクアップガスには窒素を用いた。

(2) 質量分析計 (GC/MS)

日本電子 JMS-DX300 質量分析計-JMA-DA5000 データシステム装置を EI モードで用いた。カラムは fused silica capillary Dexsil-410 (30 m×0.2 mm I. D. 島津) を用い、カラム温度は 180°C (2 分間保持) から 270°C まで 8°C/分 で昇温分析した。注入口温度 280°C、セパレータおよびインレット温度 250°C、イオン化室温度 220°C、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。スペクトルは 150 a. m. u./秒で測定した。選択イオン検出 (SIM) では 2~6 塩素化 Biphenyl-methylsulfone の M^+ および $[M+2]^+$ イオン、また 3~7 塩素化 Terphenyl-methylsulfone の M^+ および $[M+2]^+$ イオンを用いた。

3. 分析方法

(1) 前処理

血液の前処理は前報³⁾に準じた。すなわち、血液 2 g にエタノール 5 ml、水酸化ナトリウム 0.3 g を加え、2 時間、70°C で加温還流した。冷却後、ヘキサン 10 ml で 2 回抽出、除去したあと、蒸留水を約 15 ml 加え、ヘキサン:ジクロロメタン (1:1) 10 ml で 2 回抽出した。この抽出液を濃縮し、アルミナカラム (3 g, 12 mm I. D.) に付し、まずヘキサン:ジクロロメタン (95:5) 40 ml で洗浄後、ジクロロメタン 50 ml で目的物を溶出させた。この溶出液をヘキサン溶液 10 ml におきかえ、濃硫酸 10 ml で抽出し、分離した硫酸層に水を加えて 50%硫酸とした液を別のヘキサン 10 ml で 2 回逆抽出した。この抽出液はさらに約 0.1 ml のアセトニトリルにおきかえ、高速液体クロマトグラフィで精製した。すなわち、Bondapak CN カラム (10 cm×8 mm I. D. Waters 社) に注入し、移動相として 5%ジクロロメタン/ヘキサンをを用い、20 分間で 50%ジクロロメタンになるような直線

濃度勾配溶出によって、あらかじめ標準品で設定しておいた PCB-methylsulfone 分画を分取し、これを GC/MS, GC/ECD および GC/FPD 分析の試料とした。

(2) 標品の合成と検量線

PCB-methylsulfone: 標準溶液として合成した 4-methylsulfonyl-2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl⁴⁾を用い、GC/MS/SIM におけるピーク面積から検量線を作成し、試料のイオン検出から得られるピーク面積総和を求め濃度を計算した。

PCT-methylsulfone: 血液から得られたマスペクトルを同定するため、4,5 および 6 塩素化体各 1~3 種の標品 (混合異性体) を既報⁴⁾にしたがって合成した。すなわち、Nitroaniline と Chlorobenzene のカップリング反応から Chlorinated nitrobiphenyl を合成し、これを Aniline 化合物に還元し、これと Methylthiochlorobenzene とのカップリング反応によって得られる Methylthio-terphenyl を酸化することで、4,5 および 6 塩素化の Terphenyl-methylsulfone を合成した。現時点では各異性体の純品は得られていないので、PCT-methylsulfone の定量は PCB-methylsulfone の標品 (上記) で代用し、概算値を求めた。

結 果

1. **PCB-methylsulfone**: Fig. 1 に患者血液から得られた PCB-methylsulfone のマスフラグメントを示す。これは 2~4 塩素化の Biphenyl-methylsulfone を M^+ および $[M+2]^+$ イオンでモニターしたもので、主成分として 3 塩素化体 3 種、4 塩素化体 7 種がみられるほか、2 塩素化体も微量ながら検出された。しかし、5 および 6 塩素化体については同定できなかった。これらの成分は分析した 9 検体すべての試料から検出され、その総濃度は 15~120 ppb と算出され、同じ血液中に存在する PCB のレベル (3~12 ppb) より高い値を示した。

2. **PCT-methylsulfone**: Fig. 2 に PCB-methylsulfone 分画の FPD および ECD ガスクロマトグラムを示す。PCB-methylsulfone より、かなりおくれて溶出してくる数種のピークを GC/MS で分析した結果、Fig. 3 (A, C, F) に示すようなマスペクトルが得られた。それらは、それぞれ m/z 444, 478 および 512 に分子イオンをもち、同位元素存在比より、4,5 および 6 塩素化体と考えられた。また GC/FPD (Fig. 2) でみられるピークが ECD のそれと時間的に一致するので、イオウを含む塩素化合物、すな

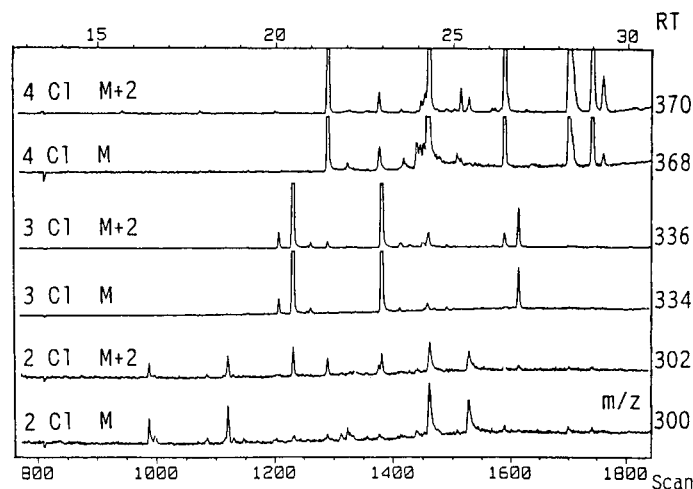


Fig. 1 Selected ion monitoring of PCB-methylsulfones in the blood of a Yusho patient.

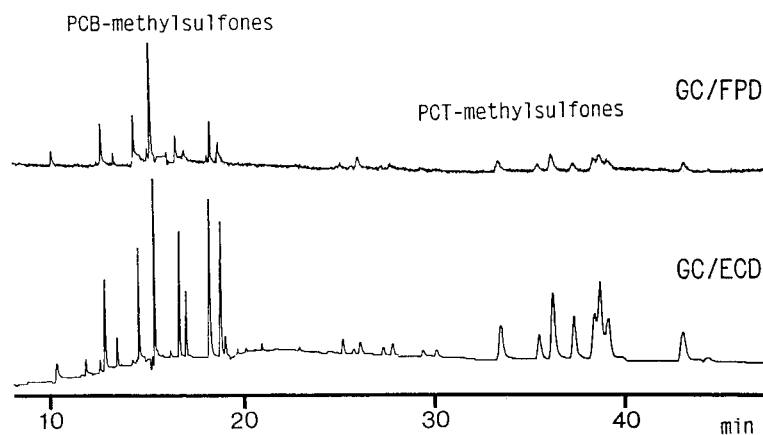


Fig. 2 GC/ECD and GC/FPD profiles of PCB- and PCT-methylsulfones in the blood of a Yusho patient.

わち、PCT-methylsulfoneと推定した。さらに4,5および6塩素化 Terphenyl-methylsulfoneの標品を合成し、そのスペクトル (Fig. 3, B, D, E, G, H) を血液のそれと比較した。主なフラグメントイオン $[M-SO_2CH_3Cl]^+$ が一致し、開裂パターンが PCB-methylsulfone のそれと類似することがわかった。つぎに組成を調べるため SIM 分析を行った結果を Fig. 4 に示す。4 塩素化体 5 種、5 塩素化体 5 種および 6 塩素化体 6 種が検出されたが、ほかの塩素化体は同定できなかった。分析した 9 検体のうち 6 検体から PCT-methylsulfone が検出され、その血中濃度は 10~270 ppb であった。

考 察

本クリーンアップ法による 4-Methylsulfonyl-2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl の回収率は 89% と良好であったが、4-Methylsulfonyl-2,5-dichlorobiphenyl を用いた回収率は約 70% と低かった。これは低塩素化体ほどエタノール溶液からヘキサン系への抽出率が低下するためと思われ、アルカリ処理を含めた前処理法の改良が望まれる。PCT-methylsulfone が PCB-methylsulfone 分画へすべて回収されるかどうかについては純品不足のため不明であるが、合成した 5 塩素化 *para*-PCT-methylsulfone 混合物で調べた限りでは 60% を確保していた。血液中にみられる PCB-methylsulfone の主成分は 4 塩素化体、また PCT-

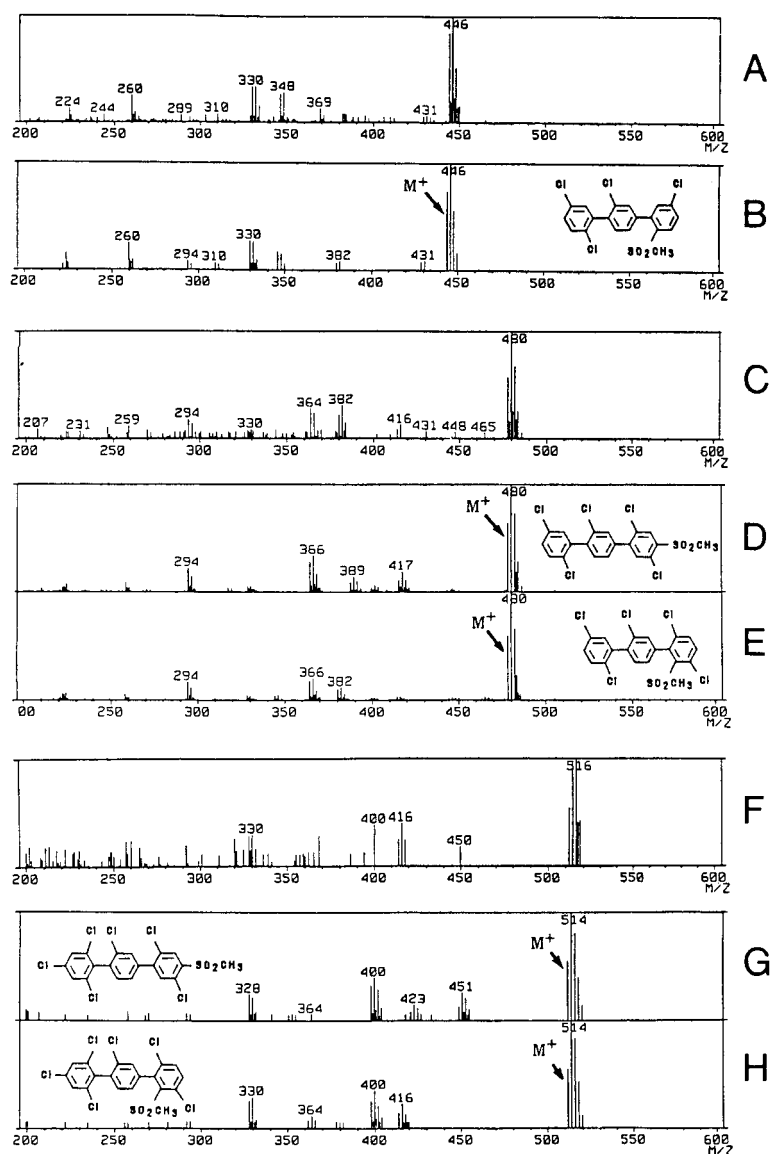


Fig. 3 Mass spectra from the blood of a Yusho patient (A, C, F) and of authentic samples (B, D, E, G, H).

methylsulfone のそれは 5 塩素化体であり、それらの濃度は血中 PCB より高い値が得られたので、今後、残留成分の同定とその毒性について検討したい。血液から得られた PCT-methylsulfone のマススペクトル (Fig. 3) には 2-methylsulfone に特徴的な $[M-98]^+$ イオンが現れている。また Fig. 4 で出現したピークの保持時間が合成した *para*-PCT-methylsulfone のそれより短いことから、血液に存在する成分の一部は *ortho*- または *meta*-PCT の 2-methylsulfone 誘導体と推定される。これらの成分は PCT の代謝により生

じたものと考えられるが、飯田らの報告⁶⁾では、血中 PCT 濃度は 1 ppb 以下、また中毒原因油中の PCT 濃度は約 7 ppm といずれも PCB 濃度の 1/10 以下である。にもかかわらず、PCT-methylsulfone が PCB-methylsulfone と同レベルで検出されたことは興味深い。

総 括

油症患者の血液 9 検体を分析した結果、すべての検体から PCB-methylsulfone が検出され、その主な組

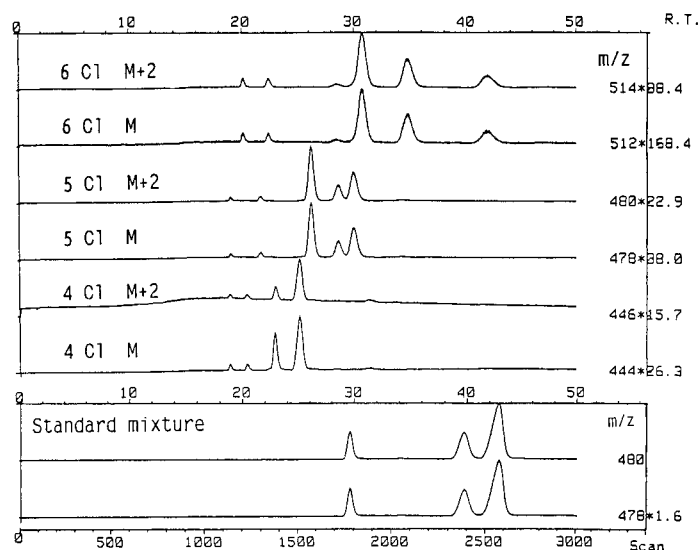


Fig. 4 Selected ion monitoring of PCT-methylsulfones in the blood of a Yusho patient and of synthesized compounds.

成は3塩素化体3種および4塩素化体7種ではかに微量ながら2塩素化体も検出された。患者血液中のPCB-methylsulfoneの濃度は15~120 ppbと算出され、同じ血液中に存在するPCBの濃度より高い値が得られた。

分析した血液9検体中6検体のPCB-methylsulfone分画に不明のピークが認められ、GC/MS分析の結果PCT-methylsulfoneと推定されたので、標準品を合成し、両者のマススペクトルを比較、同定した。その組成は4塩素化体5種、5塩素化体5種および6塩素化体6種からなることがわかった。それらの総濃度は10~270 ppbを示し、個体間でばらつきが大きかった。その由来および毒性については不明であり、今後検討を要する。

文 献

- 1) Bergman Å, 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) Brandt I and Bergman Å: PCB methylsulphones and related compounds: Identification of target cells and tissues in different species. *Chemosphere* 16: 1671-1676, 1987.
- 3) 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.

4) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Synthesis of PCB methylsulfones: Some differences in mass and proton magnetic resonance spectroscopy. *Chemosphere* 16: 2299-2313, 1987.

5) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Polychlorinated biphenyl methylsulfone congeners in human tissues: Identification of methylsulfonyl dichlorobiphenyls. *Chemosphere* in press, 1989.

6) 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克己, 増田義人: 油症原因油および油症患者血液中のPCB, PCQおよびPCT. *福岡医誌* 76: 126-131, 1985.

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) Lund J, Andersson O and Ripe E: Characterization of a binding protein for the PCB metabolites 4,4'-bis (methylsulfonyl)-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl present in bronchoalveolar lavage from healthy smokers and non-smokers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83: 486-493, 1986.

9) 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: 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. *福岡医誌* 78: 199-203, 1987.

油症患者および健常者の皮下脂肪組織中の Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs)

福岡県衛生公害センター

飯田隆雄・中川礼子・竹中重幸
深町和美・高橋克巳

Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) in the Subcutaneous Adipose Tissue of Yusho Patients and Normal Controls

Takao IIDA, Reiko NAKAGAWA, Shigeyuki TAKENAKA,
Kazumi FUKAMACHI and Katsumi TAKAHASHI

*Fukuoka Environmental Research Center,
Mukaizano Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01*

Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) are well known to be the toxic chemicals in both animal experiments and human studies. It is, therefore, important to determine the level of PCDFs still retained in patients for understanding relationship between the concentration of PCDFs and present symptoms of the disease. In this study, the abdominal subcutaneous adipose tissue of 18 Yusho patients and those of 11 normal controls who were all of volunteers were collected, and their levels were determined by high resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry. Results obtained were as follows: The principal compounds detected in the adipose tissue of Yusho patients were 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF), 1,2,3,4,7,8- and 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzofuran (HCDF). The concentration of the compounds in 7 patients, wearing typical symptoms, from 160 to 3,000 ppt for 2,3,4,7,8-PenCDF, from 51 to 1,000 ppt for 1,2,3,4,7,8-HCDF, and from 16 to 220 ppt for 1,2,3,6,7,8-HCDF. In normal controls, 2,3,4,7,8-PenCDF was detected only in five samples at the low level of from 16 to 38 ppt. On an average, PCDF levels in the typical 7 Yusho patients and 11 normal controls were 1,900 ppt and 16 ppt, respectively. On the basis of the results, the concentrations of PCDF congeners in the adipose tissues of the typical 7 patients was 100 times higher than that of the normal controls. Hence, we consider that the present levels of PCDFs in the patients probably play an important role for the symptoms of the Yusho.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 296-301, 1989)

はじめに

1968年、西日本一帯でライスオイル摂取による集団食中毒事件として1,800名もの油症患者が発生した³⁾。この原因ライスオイル中にはPolychlorinated biphenyls (PCBs), Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), Polychlorinated quaterphenyls (PCQs), Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs)などが含まれていることがすでに報告されている¹⁾⁷⁾⁹⁾¹⁴⁾。これらの化合物の中で、とくに、PCDFsおよび

PCDDsはラットやサルに高い毒性を示すことが確認されている⁴⁾⁶⁾。このうち、PCDFsを投与されたこれらの動物は、肝臓の肥大、免疫抑制、胸腺の萎縮を惹起し、また、肝臓の酵素活性を高めることが報告されている⁴⁾⁸⁾¹⁵⁾。一方、環境中において、PCDFsは、都市ごみ焼却場のフライアッシュやPCBsを含む製品の燃焼物などから微量ながら検出されている¹²⁾¹⁵⁾。さらに、一般健常者の脂肪組織などの人体組織からもPCDFsが検出されており、本物質が広範囲に環境を汚染していることが示唆されている²⁾。油症患者の脂

肪組織や肝臓における PCDFs の残留性については、Kuroki および Masuda⁵⁾ が、油症発生後初期 (1969~1977) に採取した患者の脂肪組織および肝臓中の PCDFs を分析し、脂肪組織中の PCDFs 濃度は肝臓中のそれより高いという結果を得た。したがって、油症発生以来すでに 18 年以上を経過した時点における患者の皮下脂肪中の PCDFs レベルを調査して、PCDFs の体外排出状況を把握することは、今後の予後を検討する上で重要である。

本研究は患者の血液中の PCDFs の検出は一般的にはきわめて困難であるため、皮下脂肪中の PCDFs を測定し、皮下脂肪組織への残留レベルを推定して、健常者との比較において、生体内残留量をモニターするものである。

実験方法

1. 試料

認定油症患者 18 名および健常者 11 名の腹部皮下脂肪 2~5 g を外科的に採取した。採取時期は 1986 年 2 月である。各試料は試料採取後 -20°C で凍結保存した。

2. 試薬

使用した PCDF の標準物質を Table 1 に示した。これらの標準物質はすべて第一薬科大学増田教授より供与された。

使用した他の試薬はキシダ化学製の活性炭および残留 PCB 分析用トルエン、和光純薬工業製の残留農薬分析用ヘキサン 1000、ジエチルエーテル 1000、アセトン 1000、ジクロロメタン 1000、有害金属測定用硫酸およびフロリジル、MERCK 社製のアルミナである。

3. 試料の処理方法

試料からの PCDFs の抽出およびクリーンアップは

Ryan¹³⁾ の方法に準じて行った。Fig. 1 にそのフローシートを示した。すなわち、皮下脂肪組織の試料に 0.1 または 1.0 ng の [¹³C₁₂]-2,3,7,8-tetraCDF を内部標準物質として添加し、アセトン・ヘキサン混合溶媒で抽出した。この抽出液に水を加えてヘキサン層を分離した。ヘキサン抽出液は濃硫酸で脂肪を分解除去した。この試料は活性炭、フロリジル、およびアルミナカラムクロマトグラフィーで精製して Gas

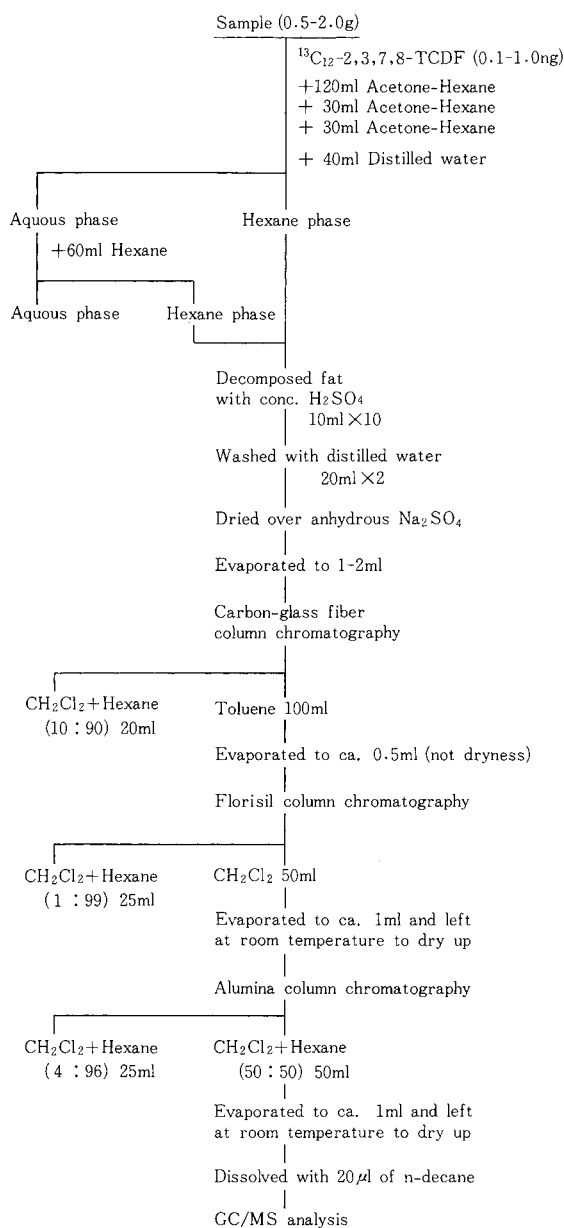


Fig. 1 Analytical method of PCDFs

Table 1 List of PCDF standards used

2,3,6,8-TetraCDF	1,2,6,7,8-PentaCDF
2,4,6,8-TetraCDF	1,2,3,4,7,8-HexaCDF
2,3,7,8-TetraCDF	1,2,3,6,7,8-HexaCDF
1,2,4,7,8-PentaCDF	2,3,4,6,7,8-HexaCDF
1,2,3,7,8-PentaCDF	1,2,4,6,7,8-HexaCDF
2,3,4,7,8-PentaCDF	1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF
1,2,4,6,8-PentaCDF	1,2,3,4,6,7,8,9-OctaCDF
1,2,4,6,8-PentaCDF	[¹³ C ₁₂]-2,3,7,8-TetraCDF <Internal standard>

CDF: chlorinated dibenzofuran

chromatography/mass spectrometry (GC-MS) の Selected ion monitoring (SIM) モードで測定した。

4. GC-MS 分析

Hewlett・Packard 5890A ガスクロマトグラフ・VG70-S 質量分析計を用い、高分解能 SIM 法により分析を行った。データ処理装置は 11-250J+ を使用した。tetra-, penta- および hexa-CDFs の分析には Supelco 社製 SP-2331 キャピラリーカラム (カラム長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.20 μ m) を用いた。カラム温度の条件は、120°C で 2 分間保持し、220°C まで毎分 15°C の速度で昇温、220°C で 15 分間保持した。さらに 240°C まで毎分 20°C の速度で昇温し 240°C で 25 分間保持した。また、tetra-, penta-, hexa-, hepta- および octa-CDFs の分析には Quadrex 社製 OV-17 キャピラリーカラム (カラム長さ 25 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.10 μ m) を用いた。カラム温度の条件は、120°C で 2 分間保持し、230°C まで毎分 15°C の速度で昇温して、230°C で 5 分間保持した。さらに、260°C まで毎分 15°C の速度で昇温し 260°C で 20 分間保持した。その他の条件は、GC 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 モード、分解能 10,000 および 6,000 であった。

結 果

認定患者 18 名の皮下脂肪について GC-MS-SIM で分析した結果を Table 2 に示した。No. 1 と 2, No. 4 と 7, および No. 5 と 6, はそれぞれ同一家族である。No. 1~7 は血液中 PCB が油症特有のガスクロマトグラムピークパターン (GC パターン) を示す典型的な患者 (A type) であるが、No. 11~18 は血液中 PCB が健常者と変らない GC パターンを示す人 (C type) および境界領域のパターンを示す人 (BC type) である。Table 2 に示したように、血液中 PCB が A type を示す 7 名の患者皮下脂肪からは、2, 3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDF および 1,2,3, 6,7,8-hexaCDF が検出され、各 PCDF 同族体の濃度は、それぞれ、160~3,000 ppt, 51~1,000 ppt および 16~220 ppt であった。2,3,7,8-tetraCDF は 7 名中 1 名 (18 ppt) のみから検出された。

一方、血液中 PCB が BC または C type を示す人 (No. 11~18) の皮下脂肪からは 2,3,4,7,8-pentaCDF が 11 試料中 10 試料から検出され、その濃度は 12

Table 2 Levels of PCDFs and PCBs in the subcutaneous adipose tissue of clinically typical and atypical patients with Yusho (ppt on wet weight)

No.	Sex	Age	PCDFs (ppt)					PCBs (ppb)	PCDFs/PCBs (%)	Type of PCB Pattern in Blood
			2,3,7,8-TetraCDF	2,3,4,7,8-PentaCDF	1,2,3,4,7,8-HexaCDF	1,2,3,6,7,8-HexaCDF	Total PCDFs			
1	F	50	18	3,000	1,000	220	4,200	5,700	0.074	A
2	M	54	ND	2,400	900	170	3,500	2,400	0.15	A
3	F	55	ND	2,000	230	64	2,300	1,200	0.19	A
4	F	45	ND	1,400	590	120	1,700	2,300	0.14	A
5	F	43	ND	710	120	37	870	1,300	0.067	A
6	M	45	ND	240	51	16	310	1,200	0.025	A
7	M	50	ND	160	54	22	220	1,000	0.024	A
8	M	54	ND	140	ND	ND	140	1,300	0.011	BC
9	M	64	ND	100	ND	ND	100	1,700	0.0059	C
10	F	59	11	75	4	ND	90	980	0.0092	C
11	M	60	5	61	ND	ND	66	1,800	0.0037	C
12	F	58	4	55	4	ND	63	1,500	0.0042	C
13	F	62	ND	59	ND	ND	59	1,100	0.0054	C
14	F	62	8	52	3	ND	63	1,400	0.0045	C
15	M	57	ND	55	ND	ND	55	900	0.0061	C
16	M	47	ND	15	ND	ND	15	820	0.0061	BC
17	M	54	ND	12	ND	ND	12	580	0.0018	C
18	F	48	ND	ND	ND	ND	ND	1,100	—	C

CDF: chlorinated dibenzofuran

Table 3 Levels of PCDFs and PCBs in the subcutaneous adipose tissue of normal controls (ppt on wet weight)

No.	Sex	Age	PCDFs (ppt)				Total PCDFs	PCBs (ppb)	PCDFs/PCBs (%)	Type of PCB Pattern in Blood
			2,3,7,8- TetraCDF	2,3,4,7,8- PentaCDF	1,2,3,4,7,8- HexaCDF	1,2,3,6,7,8- HexaCDF				
1	M	61	19	39	ND	ND	58	1,200	0.0048	C
2	M	45	ND	31	ND	ND	31	580	0.0053	C
3	M	45	ND	21	ND	ND	21	900	0.0023	C
4	M	56	ND	16	ND	ND	16	1,200	0.0013	C
5	F	53	ND	16	ND	ND	16	660	0.0024	C
6	M	60	ND	ND	ND	ND	ND	1,300	—	B C
7	F	61	ND	ND	ND	ND	ND	930	—	C
8	M	47	ND	ND	ND	ND	ND	920	—	C
9	M	58	ND	ND	ND	ND	ND	970	—	C
10	M	40	ND	ND	ND	ND	ND	710	—	C
11	M	29	ND	ND	ND	ND	ND	440	—	C

CDF: chlorinated dibenzofuran

～140 ppt であり、1,2,3,4,7,8-hexaCDF は 3 試料のみから検出され、その濃度は 3～4 ppt であった。しかし、1,2,3,6,7,8-hexaCDF は検出されなかった。また、2,3,7,8-tetraCDF は 11 試料中 4 試料から 4～11 ppt の濃度で検出された。試料 No. 1～7 の A type の患者の PCBs 濃度は 1,000～5,700 ppb であり、また、PCDFs の PCBs に対する濃度比は 0.024～0.19% であった。他方、BC または C type を示す人では、PCBs 濃度は 580～1,800 ppb であり、また、PCDFs の PCBs に対する濃度比は 0.0018～0.011% であった。

対照として 11 名の健常者の皮下脂肪を採取して PCDF を測定した結果を Table 3 に示した。この結果から、2,3,4,7,8-pentaCDF が 11 試料中 5 名から 16～39 ppt の濃度で検出された。しかし、1,2,3,4,7,8-および 1,2,3,6,7,8-hexaCDF は検出されなかった。また、2,3,7,8-tetraCDF は 11 試料中 1 試料 (19 ppt) のみから検出された。さらに、PCBs 濃度は 580～13,000 ppb であった。以上の結果から、健常者の皮下脂肪組織中の PCDFs は油症患者のそれに比べてかなり低い値であった。

考 察

今回 18 名の患者皮下脂肪について PCDFs を測定した。この 18 名の中には 3 組の同一家族 (No. 1 と 2, No. 4 と 7, および No. 5 と 6) が含まれていた。この 3 組について Table 2 の結果から考察すると、男性より女性の方が脂肪中 PCDFs 濃度が高いことが

分った。これは原因ラيسオイル摂取量が男性より女性の方が多かったことに起因するかもしれない。

Nagayama¹⁰⁾ らは油症事件発生後まもなく死亡した (1969～1972 年) 患者 3 名の脂肪、肝臓などについて PCB および PCDFs を測定した。その結果、皮下脂肪中の PCDFs 濃度は 6,000～13,000 ppt で、肝臓中では 3,000～25,000 ppt であると報告している。一方、Kuroki および Masuda⁵⁾ は 6 名 (1969～1977 年) の患者の脂肪および肝臓中の PCDFs 濃度を測定した。かれらの報告によると肝臓より脂肪組織中の PCDFs 濃度がやや高い結果を得ており、脂肪組織中の PCDFs は 700～9,300 ppt であった。いずれの結果からも PCDFs は脂肪組織に顕著に残留することを示している。そこで、これら油症事件発生後、比較的短期間のうちに死亡した患者の脂肪中 PCDFs 濃度の測定結果と、油症発生から 18 年後の今回の結果を比較検討した。すなわち、GC パターンが A type を呈する典型的な患者 7 名の総 PCDFs 濃度は平均して 1,900 ppt である。これは、Nagayama¹⁰⁾ らの報告結果 (平均 8,600 ppt) と比較すると約 1/5 の濃度に、Kuroki および Masuda⁵⁾ によって報告された結果 (平均 3,300 ppt) と比較すると約 1/2 の濃度に、相当している。これは長い年月の経過とともに、PCDFs が体外へ徐々に排出されていることを示唆している。油症事件発生後まもなく死亡した患者の脂肪中には 2,3,6,8-tetraCDF, 2,3,7,8-tetraCDF, 1,2,4,7,8-pentaCDF, 2,3,4,7,8-pentaCDF, および hexaCDF が同程度の濃度で検出されているが⁵⁾、これに対して、今回の

われわれの結果では2,3,7,8-tetraCDF, 2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDFおよび1,2,3,6,7,8-hexaCDFのみが検出された。これは、PCDFsの中でも構造上高毒性と考えられている2, 3, 7および8位が塩素で置換されたPCDFs¹¹⁾が残留性が高く、なかでも2,3,4,7,8-pentaCDFはとくに生体中に蓄積しやすいことを示唆している。また、今回測定した脂肪中のPCDFs濃度とPCBs濃度の比はNagayamaらの報告¹⁰⁾のそれに比べかなり小さく数分の一であった。これは患者脂肪中のPCBs濃度がNagayamaらの報告¹⁰⁾(1,200~1,300 ppb)に見られるようになり急速に減少し1969~1972年の時点でほぼ健常者と変らない濃度レベルとなっているのに対して、PCDFsは長期間かかって徐々に減少しているためと考えられ、PCDFsの体外排出が困難であることを示唆している。GCパターンがA typeを示す患者皮下脂肪中の2,3,4,7,8-pentaCDF濃度は健常者のそれに比べて約100倍高い結果を得た。これらのことから、今後とも、患者体内に残留する2,3,4,7,8-pentaCDFなどのPCDFsを追跡調査することは油症の病態観察、および治療の上からも重要であると考えられる。

総 括

油症発症後18年目に採取した認定患者18名と11名の健常者の皮下脂肪中のPCDFsを分析し、それらの比較検討を行った。

1. 血液中PCBのGCパターンがA typeを示す7名の患者では総PCDFs濃度の平均値は1,900 pptであった。血液中PCBのGCパターンがBCまたはC typeを示す11名の患者では総PCDFs濃度は61 pptであった。健常者の11名では総PCDFsの平均値は16 pptであった。A typeを示す7名の患者の総PCDFs濃度の平均値は健常者のその約100倍高い値を示した。

2. 患者の皮下脂肪から2,3,7,8-tetraCDF, 2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-および1,2,3,6,7,8-hexaCDFが検出された。これらは、すべて、2,3,7および8の位置が塩素で置換された毒性が高いと考えられているPCDFsであった。今回検出されたPCDFsのうち2,3,4,7,8-pentaCDFがもっとも高い濃度を示したが、これは健常者の脂肪からも微量ながら検出された。

謝 辞

本研究は昭和62年度厚生省科学補助金並びに北九州市

よりの研究補助金に負うものである。ここに記して謝意を表します。本研究を行うにあたって懇切なる指導助言をいただきました第一薬科大学増田教授ならびに摂南大学榎本教授に深謝します。

文 献

- 1) 榎本 隆, 宮田秀明, 高山幸司, 尾垣淳治: 高分解能MS-SIM法による油症患者組織および原因油中のPCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs. 福岡医誌 78: 325-336, 1987.
- 2) Kashimoto T, Takayama K, Mimura M and Matsumoto H: PCDDs, PCDFs, PCBs, Coplanar PCBs and organochlorinated pesticides in human adipose tissues in Japan. *Chemosphere*: In press
- 3) 勝木司馬之助: 序言. 福岡医誌 60: 403-406, 1969.
- 4) Kunita N, Hori S, Obana H, Otake T and Ikegami N: Biological effect of PCBs, PCQs and PCDFs present in the oil causing Yusho and Yu-Cheng. *Environ. Health Perspect.* 59: 79-84, 1985.
- 5) Kuroki H, and Masuda Y: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 10: 771-777, 1978.
- 6) McNulty PW: Toxicity and fetotoxicity of TCDD, TCDD and PCB isomers in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Environ. Health Perspect.* 60: 77-88, 1985.
- 7) 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.
- 8) Nagayama J, Kiyohara C, Masuda Y and Kuratsune M: Inducing potency of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells and mice by polychlorinated dibenzofuran congeners. *Environ. Health Perspect.* 59: 107-112, 1985.
- 9) Nagayama J, Kuratsune M and Masuda Y: Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechors and "Yusho" oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 9-13, 1976.
- 10) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with Yusho. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 15: 195-197, 1977.
- 11) Rappe C: Analysis of polychlorinated dioxins and furans. *Environ. Sci. Technol.* 18: 78A-90A, 1984.
- 12) Rappe C, Marklund S, Kjeller LO, Bergqvist P-A and Hansson M: Strategies and techniques for sample collection and analysis: Experience from the Swedish PCB accidents. *Environ. Health Per-*

spect. 60 : 279-292, 1985.

13) Ryan JJ, Lizotte R and Lau B P-Y : Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and chlorinated dibenzofurans in Canadian human adipose tissue. Chemosphere 14 : 697-706, 1985.

14) 塚元久雄・他 33 名 : 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－油症研究班分析部会報告書－. 福岡医誌 60 : 496-512, 1969.

15) Wakimoto T and Tatsukawa R : Poly-

chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in fly ash cinders collected from several municipal incinerators in Japan. Environ. Health Perspect. 59 : 159-162, 1985.

16) 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.

油症患者の皮下脂肪組織中 Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins (PCDDs)

福岡県衛生公害センター

飯田隆雄・中川礼子

深町和美・高橋克己

Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins in the Subcutaneous Adipose Tissue of Yusho Patients

Takao IIDA, Reiko NAKAGAWA,

Kazumi FUKAMACHI and Katsumi TAKAHASHI

Fukuoka Environmental Reseach Center,

Mukaizano Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01

The abdominal subcutaneous adipose tissues, the mother milk, and the blood samples of Yusho patients were collected between 1986 and 1988, and analyzed for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) by high resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry in selected ion monitoring mode. PCDDs and PCDFs were found all of the samples examined. : 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (pentaCDD), 1,2,3,6,7,8-hexaCDD, octaCDD, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (pentaCDF), and 1,2,3,4,7,8- and 1,2,3,6,7,8-hexaCDF were detected. The levels of PCDDs was several times lower than those of PCDFs in all samples. The concentrations of PCDDs and PCDFs found in the fat of the mother milk were similar to those of the adipose tissues. On the other hand, the levels of PCDDs and PCDFs in the blood samples were several hundred times less than those of the adipose tissues. (Fukuoka Acta Med. 80(5): 302-306, 1989)

はじめに

油症患者が摂食したライスオイル（原因油）中に polychlorinated biphenyls (PCBs)¹⁾, polychlorinated dibenzofurans (PCDFs)⁹⁾, polychlorinated quaterphenyls (PCQs)⁷⁾ 等が混入していたことが明らかにされている。すでに事故から 20 年近く経過した現在も油症患者の体内にはなお、PCBs, PCDFs, PCQs が残留していることが判明した²⁾¹⁰⁾。なかでも、PCDFs は毒性がきわめて高いので、油症の主要な原因と考えられている⁵⁾⁸⁾¹²⁾。加えて、最近、榎本らは原因油と発症後まもなく死亡した患者の肝臓および腸から PCDDs をも検出し、この化合物が油症原因物質の 1 つであると報告した³⁾。PCDDs は著しく毒性が高いことが知られており⁶⁾、現在も患者体内に残留して PCDFs とともに油症の発症に関与していることが危

惧される。今回、PCDDs の患者体内の残留量を把握するため、1986 年に採取した患者の皮下脂肪組織中の PCDDs を測定した。また、患者の母乳および血液中の PCDDs および PCDFs も測定したので合せて報告する。

実験方法

1. 試料

(1) 皮下脂肪

血液中 PCB のガスクロマトグラムが油症患者の特徴的ピークパターンを示す 7 名の患者 (A type) の腹部皮下脂肪組織を用いた。試料の採取は外科的に行った。試料採取時期は 1986 年 2 月である。

(2) 母乳

1988 年 4 月に出産（初産）した患者（32 才）から採取された初乳である。なお、この患者の血液中

PCB のガスクロマトグラムピークパターンは A type であった。

(3) 血液

(1) の皮下脂肪のうち PCBs の濃度が最高値を示した患者の血液と、(2) の母乳を採取した患者の出産前に採血した血液である。

2. 試薬

PCDDs および PCDFs の標準物質は第一薬科大学増田教授より供与された。内部標準物質として第一薬科大学増田教授より供与された $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-tetraCDF およびケンブリッジアイソトープから入手した $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-tetraCDD, $^{13}\text{C}_{12}$ -octaCDD, $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,7,8-pentaCDF および $^{13}\text{C}_{12}$ -octaCDF を使用した。

他の使用した試薬はキシダ化学製の残留 PCB 分析用トルエン、和光純薬工業製の残留農薬分析用エタノール 1000、ヘキサン 1000、ジエチルエーテル 1000、石油エーテル 1000、アセトン 1000、ジクロロメタン 1000、有害金属測定用硫酸、フロリジル、PCDD 分析用活性炭埋蔵シリカゲルである。

3. 試料の処理方法

(1) 脂肪組織

脂肪組織 0.5~1 g について前報²⁾と同様の方法で行った。ただし、活性炭クロマトグラフィーには和光純薬工業製 PCDD 分析用活性炭埋蔵シリカゲルを用いた。内部標準物質として $^{13}\text{C}_{12}$ -tetraCDD, $^{13}\text{C}_{12}$ -octaCDD, $^{13}\text{C}_{12}$ -tetraCDF, $^{13}\text{C}_{12}$ -pentaCDF および $^{13}\text{C}_{12}$ -octaCDF を使用した。また、アルミナカラムクロマトグラフィーは省略し、フロリジルカラムクロマトグラフィーの PCDDs, PCDFs 画分について、再度、濃硫酸による精製を行った。

(2) 血液

血液約 10 g を分液ロートに採りアセトン 30 ml を加えよく混和した後、ヘキサン 30 ml で 3 回振とう抽出した。抽出液を合せ、水 30 ml で 3 回洗浄したものについて脂肪組織と同じクリーンアップをした。

(3) 母乳

母乳にシュウ酸カリウムおよびエタノールを加えジエチルエーテルと石油エーテルの混合溶媒で脂肪を抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去し、重量を測定した。得られた脂肪をヘキサンにとかして、以下、脂肪組織の分析と同様に行った。

4. GC-MS 分析

前報²⁾と同じ Hewlett・Packard 5890A ガスクロマトグラフ・VG70-S 質量分析計を用い、高分解能 selected ion monitoring (SIM) 法により分析を行った。

結果と考察

1. 皮下脂肪

Table 1 に皮下脂肪中の PCDDs の分析結果を示す。この Table から分るように、全ての皮下脂肪の検体から、1,2,3,7,8-pentaCDD が 24~65 ppt (平均 43 ppt) の濃度で、1,2,3,6,7,8-hexaCDD が 56~400 ppt (平均 160 ppt) の濃度で、octaCDD が 73~430 ppt (平均 160 ppt) の濃度で検出された。2,3,7,8-tetraCDD はすべての検体で検出限界値以下であった。一方、Table 2 に示したように、皮下脂肪中の PCDFs はすべての皮下脂肪の検体から、2,3,4,7,8-pentaCDF が 160~3,000 ppt (平均 1,400 ppt) の濃度で、1,2,3,6,7,8-hexaCDF が 51~1,000 ppt (平均 420 ppt) の濃

Table 1 Levels of PCDDs found in subcutaneous adipose tissue of Yusho patients (ppt)

No.	Sex	Age	2,3,7,8-TetraCDD	1,2,3,7,8-PentaCDD	1,2,3,6,7,8-HexaCDD	OctaCDD	Total PCDDs	2,3,7,8-TCDD Equivalent
1	F ^{a)}	55	ND	24	130	120	270	17
2	M ^{b)}	50	ND	38	60	73	170	21
3	F	45	ND	65	190	430	690	40
4	M	54	ND	53	210	140	400	35
5	F	50	ND	56	400	120	580	44
6	M	45	ND	35	56	120	210	20
7	F	43	ND	25	84	120	230	16
Mean			ND	43	160	160	370	28
S. D.				16	120	120	200	12

^{a)} : Female ^{b)} : Male

Table 2 Levels of PCDFs found in subcutaneous adipose tissue of Yusho patients (ppt)

No.	Sex	Age	2,3,4,7,8- PentaCDF	1,2,3,4,7,8- HexaCDF	1,2,3,6,7,8- HexaCDF	Total PCDFs	2,3,7,8-TCDD Equivalent
1	F ^{a)}	55	2,000	230	64	2,300	203
2	M ^{b)}	50	160	54	22	240	17
3	F	45	1,400	590	120	2,100	147
4	M	54	2,400	900	170	3,500	251
5	F	50	3,000	1,000	220	4,200	312
6	M	45	240	51	16	310	25
7	F	43	710	120	37	870	73
Mean			1,400	420	93	1,900	147
S. D.			1,100	410	79	1,500	112

^{a)} : Female ^{b)} : Male

度で、1,2,3,4,7,8-hexaCDF が 16~220 ppt (平均 93 ppt) の濃度でそれぞれ検出された。なお、heptaCDDs, tetraCDFs, heptaCDFs および octaCDF は測定しなかった。

Table 1 および Table 2 の右端に合衆国環境保護局 (EPA) の 1987 年の 2,3,7,8-TCDD 換算係数 (ETFs: 2,3,7,8-TCDD Equivalent factors) を用いて求めた PCDDs および PCDFs の各々の 2,3,7,8-TCDD 換算値 (ETs: 2,3,7,8-TCDD Equivalents) を示す。皮下脂肪中 PCDDs の ETs は 17~44 ppt (平均 28 ppt) であり、PCDFs の ETs は 17~312 ppt (平均 147 ppt) であった。平均値で比べると PCDDs の ETs は PCDFs のそれと比べて約 1/6 程度であった。このことから、平均として、現在の油症患者に対する PCDDs のリスクは PCDFs のその数分の 1 程度と考えられる。

Kashimoto ら⁴⁾ は大阪府、奈良県および沖縄県の各 13 名ずつ計 39 名の健常者脂肪中の PCDDs および PCDFs を測定した。その結果、2,3,7 および 8 の位置が塩素で置換されている PCDDs および PCDFs の濃度は平均として tetraCDD (5.1 ppt), pentaCDD (7.5 ppt), hexaCDD (50.0 ppt), heptaCDD (57.3 ppt), octaCDD (1003 ppt), tetraCDF (3.3 ppt), pentaCDF (12.7 ppt), hexaCDF (13.1 ppt), heptaCDF (13.2 ppt) および octaCDF (4.2 ppt) と報告している。Kashimoto ら⁴⁾ の健常者の結果とわれわれの油症患者の結果を比較してみると、PCDDs では 5 塩化物で約 6 分の 1、6 塩化物で約 3 分の 1 と低い濃度であるが、8 塩化物は逆に健常者の方が油症患者よりも 6 倍高い濃度であった。一方、PCDFs では油症患者の方が健常者よりも 50~100 倍高い濃度を示した。Ka-

shimoto ら⁴⁾ の報告から EPA の ETFs を使用して健常者の ETs を求めると 3.0~38 ppt 平均 17.8 ppt である。一方、われわれの油症患者の結果から ETs は 38~356 ppt, 平均 151 ppt であった。したがって、脂肪中の PCDDs および PCDFs 濃度の ETs からだけみれば、健常者は現在の油症患者の 10 分の 1 程度のリスクを持っていることになり、また、健常者の ETs の最高値と患者の ETs の最低値は同じであった。

2. 母 乳

Table 3 に油症患者の母乳中の PCDDs および PCDFs の分析結果を示す。母乳脂肪あたりの濃度でみると 1,2,3,4,7,8-penta, 1,2,3,6,7,8-hexa および octaCDD は、それぞれ、36, 200 および 200 ppt であった。他方、2,3,7,8-tetra, 2,3,7,8-penta, 1,2,3,4,7,8-hexa および 1,2,3,6,7,8-hexaCDF は、それぞれ、18, 1300, 410 および 81 ppt であった。これらの濃度レベルは油症患者の脂肪組織中のそれと良く似ていた。この母乳には、その他に、PCBs が 67 ppb, PCQs が 11 ppb の濃度で含まれており乳児への授乳はきわめて慎重に検討すべき問題と考えられる。

3. 血 液

Table 4 に血液中の 2 試料の PCDDs と PCDFs の分析結果を示す。この Table から分るように、血液試料からも、1,2,3,7,8-pentaCDD は 1.3 および 1.4 ppt の濃度で、1,2,3,6,7,8HexaCDD は 1.3 および 1.2 ppt の濃度で、2,3,4,7,8-pentaCDF は 9.6 および 11 の濃度で、1,2,3,6,7,8-hexaCDF は 4.2 および 4.4 ppt の濃度で、1,2,3,4,7,8-hexaCDF は 1.1 ppt の濃度で検出された。これらの各化学物質の濃度は脂肪中のそれらの濃度の数 10 分の 1 から数 100 分の 1 であった。血液中の各 PCDDs および PCDFs の濃度の構成比は、

Table 3 Levels of PCDFs and PCDDs found in mother milk of Yusho patient (ppt)

PCDFs	2,3,7,8-TetraCDF	2,3,4,7,8-PentaCDF	1,2,3,4,7,8-HexaCDF	1,2,3,6,7,8-HexaCDF	Total PCDFs
	0.44 (18)	35 (1,300)	11 (410)	2.2 (81)	48 (1,800)
PCDFs	2,3,7,8-TetraCDD	1,2,3,7,8-PentaCDD	1,2,3,6,7,8-HexaCDD	OctaCDD	Total PCDFs
	ND (ND)	0.98 (36)	5.3 (200)	5.4 (200)	12 (440)

(): as is fat bases

Table 4 Levels of PCDFs and PCDDs found in blood and fat of Yusho patients (ppt)

No.	Sex	Age	2,3,4,7,8-PentaCDF	1,2,3,4,7,8-HexaCDF	1,2,3,6,7,8-HexaCDF	1,2,3,7,8-PentaCDD	1,2,3,6,7,8-HexaCDD
1	Female	50					
	Blood		9.6	4.2	1.1	1.3	1.3
	Fat ¹⁾		3,000	1,000	220	56	400
2	Female	32					
	Blood		11	4.4	1.1	1.4	1.2
	Fat ²⁾		1,300	410	81	36	200

¹⁾ Subcutaneous adipose tissue²⁾ Fat was extracted from mother milk

脂肪中のそれと似ていた。このことは血液中の PCDDs および PCDFs を測定することによりそれらの化学物質の患者体内残留の追跡調査が可能であることを示唆している。

総 括

最近の油症患者皮下脂肪、母乳、血液中の PCDDs および PCDFs を分析した。

1. 油症患者皮下脂肪中から 1,2,3,7,8-pentaCDD, 1,2,3,4,7,8-hexaCDD および octaCDD が検出されそれらの濃度は、それぞれ、24~65 ppt (平均 43 ppt), 56~400 ppt (平均 160 ppt) および 73~430 ppt (平均 160 ppt) であった。

2. 油症患者の母乳から 12 ppt の総 PCDDs と 48 ppt の PCDFs が検出された。乳脂肪中の濃度は患者の皮下脂肪中濃度と同程度であった。

3. 油症患者 (2 名) の血液から平均 2.6 ppt の総 PCDDs と 16 ppt の総 PCDFs が検出された。血液中 PCDDs および PCDFs の測定により患者の PCDDs および PCDFs 体内残留を追跡調査できる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は昭和 63 年度厚生省科学補助金に負うものである。ここに記して謝意を表します。本研究を行うにあたって終始有益な助言をいただきました摂南大学榎本教授並びに第一薬科大学増田教授に深謝します。

文 献

- 1) Bellin SJ, Barnes GD: Interim procedures for estimating risks associated with exposures to mixtures of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (CDDs and CDFs). Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D C, 1987.
- 2) 飯田隆雄, 中川礼子, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克巳: 油症患者および健常者の皮下脂肪組織中の polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs), 福岡医誌 80: 296-301, 1989.
- 3) 榎本 隆, 宮田秀明, 高山幸司, 尾垣淳治: 高分解能 MS-SIM 法による油症患者組織および原因油中の PCDDs, Coplaner PCBs, PCDFs. 福岡医誌 78: 325-336, 1987.
- 4) Kashimoto T, Takayama K, Mimura M and

Matsumoto H: PCDDs, PCDFs, PCBs, Coplanar PCBs and organochlorinated pesticides in human adipose tissues in Japan. *Chemosphere*: In press.

5) Kunita N, Hori S, Obana H, Otake T, Ikegami N: Biological effect of PCBs, PCQs and PCDFs present in the oil causing Yusho and Yu-Cheng. *Environ. Health Perspect.* 59: 79-84, 1985.

6) McNulty PW: Toxicity and fetotoxicity of TCDD, TCDF and PCB isomers in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *Environ. Health Perspect.* 60: 77-88, 1985.

7) 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.

8) Nagayama J, Kiyohara C, Masuda Y, Kuratsune M: Inducing potency of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells

and mice by polychlorinated dibenzofuran congeners. *Environ. Health Perspect.* 59: 107-112, 1985.

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) 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: 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. *福岡医誌* 78: 309-313, 1987.

11) 塚元久雄・他 33 名: 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—油症研究班分析部会報告書—. *福岡医誌* 60: 496-512, 1969.

12) 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.

A Comparative Study on Polychlorinated Biphenyls (PCB) and Polychlorinated Quaterphenyls (PCQ) Concentrations in Subcutaneous Fat Tissue, Blood and Hair of Patients with Yusho and Normal Control in Nagasaki Prefecture

Taro OHGAMI, Shigeo NONAKA, Fumio MURAYAMA,
Kazunori YAMASHITA, Hiroko IRIFUNE, Masahisa WATANABE,
Naoko TSUKAZAKI, Keiichi TANAKA and Hikotaro YOSHIDA

*Department of Dermatology, Nagasaki University
School of Medicine, Nagasaki 852*

Yuji RIKIOKA

*Nagasaki Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Science, Nagasaki 852*

Abstract The relationship between PCB and PCQ concentrations in the blood, subcutaneous fat tissue and hair was investigated in this study. PCB and PCQ concentrations in twenty four patients with PCB poisoning (Yusho) and 59 normal controls were analyzed. The alkaline decomposition method described in the official standard analytical methods for the isolation of PCB and PCQ fractions was used. The mean value of PCB concentration was 2.43 ppb, CB% ratio was 0.69 and the PCQ concentration in the blood of the control group was too low to be detected by our analysis. On the other hand, the PCB concentration and CB% ratio in the Yusho group were two times higher than those in the control group. The mean value of PCQ concentration was 1.34 ppb in the Yusho group although it was below the level of detection in the control group. The mean PCB concentration in the hair of patients with Yusho was 28.92 ppb, and 8.06 ppb in the control group. CB% ratio in the hair of patients with Yusho was two times higher than that in the control group. The mean value of PCQ concentration in the hair of patients with Yusho was 0.55 ppb although it was not detected in the control group. The PCB and PCQ concentrations in the hair were not greatly elevated when compared with those in the subcutaneous fat tissue. However, the hair is an excellent sample for the detection of these chemicals because it can be collected simply without operation.

Introduction

Almost 20 years have passed since the discovery of the first case of Yusho (PCB poisoning). Approximately 3,000 patients with Yusho are distributed throughout Japan⁵⁾. They suffer from various symptoms and still have mild cutaneous changes. We found that large amounts of PCB and PCQ were present in the subcutaneous fat tissue even 17 years after contamination⁸⁾. We felt that an analysis of PCB and PCQ concentrations in the subcutaneous fat tissue might be useful in the diagnosis

and the evaluation of the prognosis in this disease. PCB and PCQ accumulate in many other organs. Almost ten years ago, it was reported that PCB also accumulates in the hair¹⁾. It is important to examine whether or not PCB and PCQ accumulate in the hair a long time after the intake of PCB. In this study, we investigated the relationship between PCB and PCQ concentration in the blood, subcutaneous fat tissue and hair.

Materials and Methods

1) Materials

Twenty four patients with PCB poisoning (Yusho) living in Nagasaki Prefecture and 59 controls with no history of PCB intake were used as subjects.

2) Samples

Ten milliliters of blood was taken from the cubital vein, and about 500 mg of subcutaneous fat tissue was taken from the abdominal wall of the patients. The control specimens were obtained during operations for skin tumors. Hair samples of more than 1.0 g were cut from the scalp of the patients and controls. Hair samples were not collected from people using hair tonics or dyes.

3) Analysis of PCB and PCQ

The alkaline decomposition method described in the official standard analytical methods for PCBs and PCQs by Kashimoto et al.²⁾ was used for the isolation of PCB and PCQ fractions. The procedure for analysis of PCB, PCQ and PCDF in human blood and tissue was described in our previous report⁸⁾. The gas chromatogram patterns of PCB in the blood of Yusho patients were distinguished by the method of Masuda et al.⁶⁾. A; peculiar to patients with Yusho; B(A), closely resembling A; B, resembling A; and C, similar to PCBs from an ordinary person. The CB% ratio was calculated by the method of Kashimoto et al.³⁾. The analysis of PCB and PCQ concentration in the hair was performed by means of the method of Asada et al.¹⁾.

Results

The results are summarized in Table 1.

1) PCB and PCQ concentrations in the control group.

The PCB and PCQ concentrations of blood, subcutaneous fat tissues and hair of fifty nine persons were analyzed. Thirty two of the 59 persons were living in Nagasaki City, 4 in Omura City, 3 in Minami-Takagi County, 2 in Narushima Island (Goto Islands), and 1 each in Arikawa (Goto Islands), Kita-Takagi County, Matsuura City, Wakamatsu (Goto Islands) and Sasebo City. Each area is shown in Fig. 1. Thirty two samples of blood were used for the analysis. The mean value of the PCB concentration was 2.43 ppb (1.21 ppb in Nagasaki City, 3.67 ppb in Isahaya City, 3.00 ppb in Naru (Goto Islands) and 4.33 ppb in Fukue City (Goto Islands)). The mean value of CB% ratio was 0.69 (0.66 in Nagasaki City, 0.36 in Isahaya City, 0.70 in Naru and 0.73 in Fukue City). There was no A-type of PCB pattern in the control group. The values of PCQ concentration were below the limit set by our analysis, except 0.03 ppb for one person in Isahaya City.

Nineteen samples of hair were analyzed. The mean value of PCB concentration was 8.06 ppb (7.94 ppb in Nagasaki City). There was no A-type PCB pattern. The PCQ concentration was not detectable.

Forty samples of subcutaneous fat tissue

Table 1 Summary of PCB, CB% and PCQ levels in the blood, subcutaneous fat tissue and hair

Group	Blood			Subcutaneous fat tissue			Hair		
	PCB (ppb)	CB%	PCQ (ppb)	PCB (ppb)	CB%	PCQ (ppb)	PCB (ppb)	CB%	PCQ (ppb)
Controls	N = 32	N = 32	N = 32	N = 40	N = 40	N = 40	N = 19	N = 19	N = 19
Mean ±	2.43	0.69		778.63	0.87	1.40	8.06	0.50	
S. D.	1.74	0.39	<0.02	670.31	0.45	0.96	5.60	0.20	<0.1
Yusho	N = 22	N = 22	N = 22	N = 11	N = 11	N = 11	N = 13	N = 13	N = 13
Mean ±	5.36*	5.18*	1.34*	1579.45	3.23*	206.65*	28.92*	1.07*	0.53*
S. D.	2.51	5.16	1.11	626.86	1.54	106.50	18.09	0.59	0.36

* p < 0.001

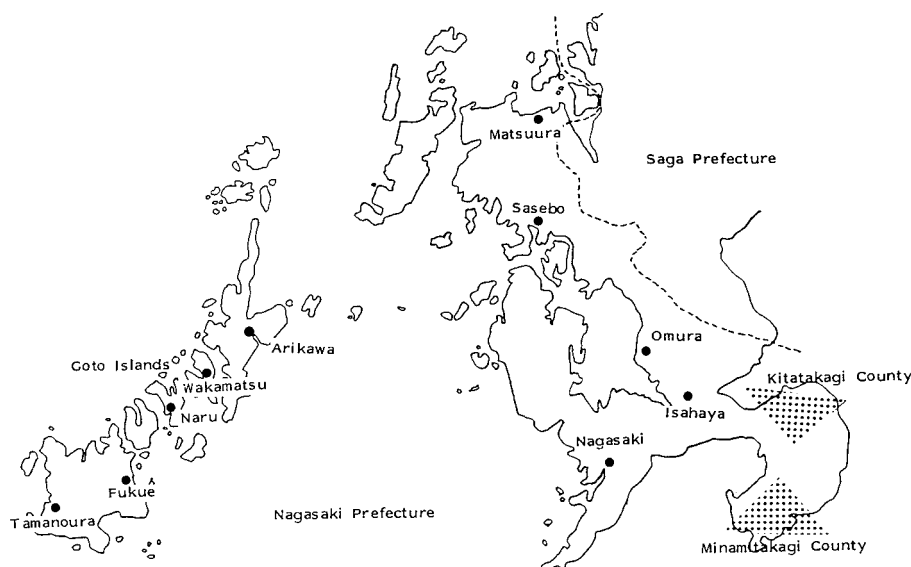


Fig. 1 Map of Nagasaki Prefecture

were analyzed. The mean value of PCB concentration was 778.63 ppb (446.06 ppb in Nagasaki City, 661.43 ppb in Isahaya City, 892.50 ppb in Omura City, 489.33 ppb in Minami-Takagi County, 1090.00 ppb in Naru and 1942.50 ppb in Fukue City). The mean value of the CB% ratio was 0.87 (0.84 in Nagasaki City, 0.70 in Isahaya City, 1.03 in Omura City, 0.90 in Minami-Takagi County, 0.85 in Naru and 1.03 in Fukue City). Only one person in the control group showed an A-type PCB pattern. The mean value of PCQ concentration was 1.40 ppb (1.41 ppb in Nagasaki City, 1.04 ppb in Isahaya City, 2.25 ppb in Omura City, 0.80 ppb in Minami-Takagi County and 1.47 ppb in Fukue City).

2) PCB and PCQ concentrations in the Yusho group

Twenty four cases of Yusho (7 patients in Naru, and 17 patients in Tamanoura) were utilized in this study.

Twenty-two samples of blood were analyzed. The mean value of PCB concentration was 5.36 ppb (6.00 ppb in Naru and 5.07 ppb in Tamanoura). The mean value of CB% ratio was 5.18 (5.93 in Naru and 4.83 in Tamanoura). Fifteen out of 22 patients showed an A-type

PCB pattern in the blood. The mean value of PCQ concentration was 1.34 ppb (1.97 ppb in Naru and 1.05 ppb in Tamanoura).

Thirteen samples of hair were analyzed. The mean value of PCB concentration was 28.92 ppb (51.00 ppb in Naru and 22.30 ppb in Tamanoura). The mean value of CB% ratio was 1.07 (1.23 in Naru and 1.02 in Tamanoura). Two of 13 cases showed an A-type PCB pattern in the hair. The mean value of PCQ concentration was 0.53 ppb (0.93 ppb in Naru and 0.39 ppb in Tamanoura).

Eleven samples of subcutaneous fat tissue were analyzed. The mean value of PCB concentration was 1,579.45 ppb (1,672.50 ppb in Naru and 1,526.29 ppb in Tamanoura). The mean value of CB% ratio was 3.23 (4.10 in Naru and 2.73 in Tamanoura). Three of 11 cases showed an A-type PCB pattern in the subcutaneous fat tissue. The mean value of PCQ concentration was 206.65 ppb (222.75 ppb in Naru and 197.46 ppb in Tamanoura).

In summary (Fig. 2 to 4), hair PCB and PCQ concentrations showed higher levels in the Yusho patients than in the control group. The PCB concentration was approximately three

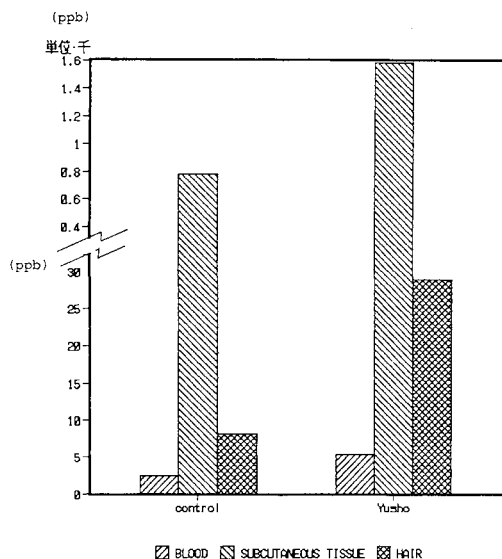


Fig. 2 PCB concentration in the blood, subcutaneous fat tissue and hair

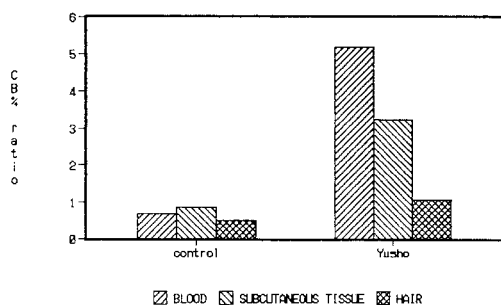


Fig. 3 CB% ratio in the blood, subcutaneous fat tissue and hair

times higher than that of normal controls, and PCQ was detected in the hair of all of the patients with Yusho except one. The value of CB% ratio in the hair was lower than that in the blood although there was no difference in this value between the blood and hair in the control group. The hair PCQ concentration showed high levels in Yusho patients although PCQ was not detected at all in normal hair. The level of PCQ concentration in the blood was two and a half times higher than that in the hair. PCB and PCQ concentrations in the hair were not significantly higher than those in the subcutaneous fat tissue.

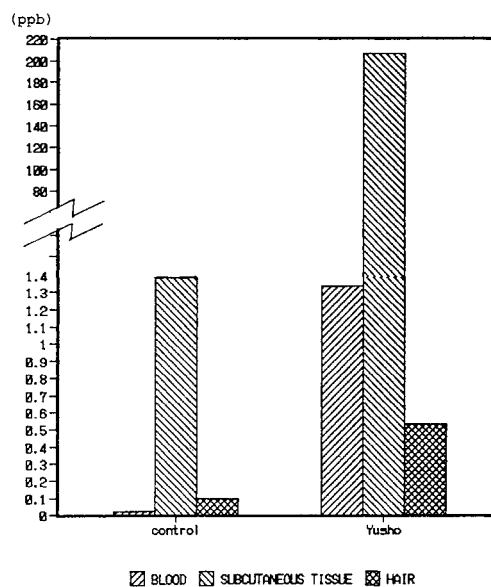


Fig. 4 PCQ concentration in the blood, subcutaneous fat tissue and hair

Discussion

It was confirmed in this study that PCB and PCQ accumulated in the subcutaneous fat tissue of the patients with PCB poisoning (Yusho), as late as 18 years after diagnosis of the disease. Our previous study showed the same results as late as 17 years after the diagnosis⁸⁾. Moreover, in an analysis of the PCB and PCQ concentrations in hair taken from the Yusho patients and normal controls, both PCB and PCQ showed higher levels in the patients than in the control group. The PCB concentration in the hair was approximately three times higher than that in the normal controls, and PCQ was detected in the hair of all of the patients with Yusho except one. Asada et al.¹⁾ reported a high PCB concentration in the hair of patients with Yusho approximately 10 years ago. They also pointed out a strong correlation between the PCB concentrations in the blood and hair. Our data concerning the Yusho group showed a similar correlation between the two samples. PCB concentration revealed the highest level in the subcutaneous fat tissue, followed by the hair. In

the Yusho group, the CB% ratio in the hair was lower than that in the blood, although there was no difference in this value between the blood and hair in the control group. The hair PCQ concentration showed high levels in Yusho patients but was below the level of detection in normal hair. There was a greater difference in the PCQ concentration of hair than in the PCB concentration. The PCQ concentration in the blood was two and a half times higher than that in the hair, although neither the PCB nor PCQ concentrations in the hair were greatly elevated when compared with those in the subcutaneous tissue. This suggests that the process of accumulation, flowing dynamics and excretion of PCB and PCQ differ from each other in various organs. The hair is an excellent sample for the detection of these chemicals because it can be collected simply without operation.

Previously, we reported high concentrations of PCB and PCQ in the subcutaneous fat tissue of patients with Yusho, as late as 17 years after contamination⁸⁾. PCB concentrations were high among in controls living in rural areas, especially fishing villages. This high PCB concentration in the subcutaneous fat tissue, therefore, is not proof for the diagnosis of Yusho, but rather can be interpreted as a contamination of PCB due to the intake of many marine products. A regional difference existed, and will be reported in another study⁹⁾. Although not detected in the hair, PCQ was found in the subcutaneous fat tissue.

References

- 1) Asada Y, Baba T and Baba M: A study of PCB concentrations in the hair of Yusho patients. Report of Nagasaki Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science 19: 100-101, 1978
- 2) Kashimoto T, Miyata H, Fukushima S, Kurita N, Ohi G and Tung TC: PCBs, PCQs and PCDFs in blood of Yusho and Yu-cheng patients. Environ. Health Perspect 59: 73-78, 1985
- 3) Kashimoto T, Muraya H, Yakushiji T and Tanaka R: Analysis of the pattern of PCBs in the blood of patients with Yusho. Fukuoka Acta Med. 76: 145-149, 1985
- 4) Kikuchi M, Kurihara K, Higuchi Y and Umeda G: Two autopsy cases of Yusho patients in 1975. Fukuoka Acta Med 68: 156-161, 1977
- 5) Kuratsune M, Aono M and Yoshida H: The tenth report of the study on Yusho and PCB. Fukuoka Acta Med. 76: 117-125, 1985
- 6) Masuda Y, Kagawa R, Shimomura K, Tokada M and Kuratsune M: Polychlorinated biphenyls in the blood of Yusho patients and ordinary persons. Fukuoka Acta Med. 65: 25-27, 1974
- 7) Masuda Y, Yamaguchi S, Kuroki H, Haraguchi K: Polychlorinated biphenyl isomers in the blood of recent Yusho patients. Fukuoka Acta Med. 76: 150-152, 1985
- 8) Ohgami T, Nonaka S, Watanabe M, Yamashita K, Murayama F, Yoshida H and Masuda N: PCB and PCQ concentrations in subcutaneous tissue from patients with PCB poisoning (Yusho). J. Dermatol. (Tokyo) 14: 25-28, 1987
- 9) Ohgami T, Nonaka S, Watanabe M, Yamashita K, Yoshida Y and Masuda N: A comparative and regional study of PCB and PCQ concentrations in normal controls being in Nagasaki prefecture. Fukuoka Acta Med. in press

(和文抄録)

長崎地方の油症患者および正常人の血液、皮下脂肪、 毛髪中 PCB, PCQ 濃度の比較検討

長崎大学医学部皮膚科学教室

大神 太郎・野中 薫雄・山下 和徳

入船 弘子・渡辺 雅久・塚崎 直子

田中 敬一・吉田彦太郎

長崎県立公害衛生研究所生化学部門

力 岡 有 二

長崎県内に生活する 24 名の油症患者と 59 名の正常人について血液、皮下脂肪、毛髪中の PCB, PCQ 濃度を測定し、比較検討した。PCB, PCQ 濃度の測定はアルカリ分解後、ガスクロマトグラフ法を用いて測定した。

正常人血液中 PCB 濃度は平均 2.43 ppb, PCQ 濃度は 1 名 0.03 ppb を示した以外、他はすべて検出限界値以下であった。CB% は平均 0.69, PCB の性状は A パターンを認めなかった。これに対し油症患者の血液 PCB 濃度は平均 5.36 ppb, PCQ 濃度は平均 1.34 ppb, CB% は平均 5.18 で対照群に比べて高値を示していた。皮下脂肪組織中 PCB 濃度は油症患者群で平均 1,579.45 ppb と対照群の約 2 倍であった。PCQ 濃度は 206.65 ppb と高値を示し、対照群の約 150 倍で

あった。CB% も 3.23 と対照群に比べて高値を示していた。毛髪中 PCB 濃度は 28.92 ppb と対照群に比べて 3.6 倍, CB% は 1.07 と対照群に比べて約 2 倍, PCQ 濃度は 0.53 ppb で対照群がほとんど検出されないのに対して高値を示した。以上の結果から毛髪中 PCB, PCQ 濃度は皮下脂肪組織中ほど高くはなかったが、汚染後 18 年を経過してもなお対照群に比べて著しく高い傾向を示した。皮下脂肪組織中にはなお多量の PCB, PCQ の蓄積が認められ、その結果血液中也高値を示しているものと推測される。また、毛髪中にも PCB, PCQ が多量に含まれていることはこれらの物質の排泄が毛髪の成長によっても行われている可能性も否定できない。

Regional Differences of PCB and PCQ Concentrations in the Blood and Subcutaneous Fat Tissue of Residents of Nagasaki

Taro OHGAMI, Shigeo NONAKA, Kazunori YAMASHITA,
Hiroko IRIFUNE, Masahisa WATANABE, Naoko TSUKAZAKI,
Keiichi TANAKA and Hikotaro YOSHIDA

*Department of Dermatology, Nagasaki University School of
Medicine, Nagasaki 852*

Yuji RIKIOKA

*Nagasaki Prefectural Institute of Public Health and Environmental
Science, Nagasaki 852*

Abstract In this study, we analyzed PCB and PCQ concentrations in the subcutaneous fat tissue of residents of Nagasaki Prefecture, and compared these levels between the blood and subcutaneous fat tissue of people living in various parts of the prefecture. Seventy-one inhabitants were examined. In the blood, PCB concentrations in Tamanoura and Fukue were significantly higher than those in Nagasaki City. The CB% ratio in Tamanoura was significantly higher than that in Nagasaki and Isahaya. PCQ concentrations were below detection level except in one case. PCB concentrations in fishery areas showed higher levels than urban or agricultural areas. PCB concentration in the subcutaneous fat tissue was 100 times higher than that in the blood. PCQs could be detected in almost all of the subcutaneous tissues, but there was no regional difference in the PCQ concentration.

Introduction

In Nagasaki Prefecture, there are more than 600 patients with polychlorinated biphenyls (PCB) poisoning or "Yusho". The PCB and PCQ concentrations in the blood of these patients have been examined every year since 1975. The PCB concentration in the blood of some patients was within normal levels in spite of many symptoms. It is extremely important to investigate the dynamics of PCB and PCQ metabolism in normal humans. There was a regional difference in the PCB concentration of blood taken from the residents of Nagasaki Prefecture¹⁾. Namely, Yamaguchi et al. reported that the PCB concentration in the blood of fishery workers was higher than that in agricultural workers, but they did not present data for polychlorinated quaterphenyls (PCQ). In this study, we analyzed PCB and PCQ concentra-

tions in the subcutaneous fat tissue of residents of Nagasaki, and compared these levels between the blood and subcutaneous fat tissue of people living in various parts of the prefecture.

Materials and Methods

1) Materials

Seventy-one people living in Nagasaki Prefecture with no history of PCB contamination were surveyed for this study.

2) Samples

Ten milliliters of blood was taken from the cubital vein, and approximately 500 mg of subcutaneous fat tissue was taken from the abdominal wall of people with skin tumors.

3) Analysis of PCB and PCQ

The alkaline decomposition method described in the official standard analytical methods for PCB and PCQ by Kashimoto et al.⁴⁾

was used for the isolation of PCB and PCQ fractions. The procedure for analysis of PCB, PCQ and PCDF in human blood and tissue was described in our previous report⁶⁾. The CB% ratio was calculated by the method of Kashimoto et al.⁵⁾.

Results

The results are summarized in Table 1 and 2. The areas in which samples were collected are shown in Fig. 1. Nagasaki, Isahaya and Sasebo are urban areas; Omura and Minamitakagi are agricultural areas; Fukue, Naru, Tamanoura and Arikawa are fishery areas; and Kitatakagi and Matsuura are mixed areas (agricultural and fishery).

1) PCB, CB% ratio and PCQ concentrations in the blood (Table 1)

Seventy-one people were examined. These consisted of 23 inhabitants of Nagasaki; 7 of Isahaya, 13 of Fukue, 12 of Naru, and 10 of Tamanoura. The mean PCB concentrations were 1.39 ppb in Nagasaki, 2.14 ppb in Isahaya and 3.00 ppb in Tamanoura. The PCB concen-

trations in Tamanoura and Fukue were significantly higher than those in Nagasaki. The mean CB% ratio were 0.13 in Nagasaki, 0.43 in Isahaya, 1.10 in Omura, 1.00 in Fukue, 0.91 in Naru and 1.13 in Tamanoura. The CB% ratio in Tamanoura was significantly higher than that in Nagasaki and Isahaya. The PCQ concentrations were below detectable levels except in one case.

2) PCB, CB% ratio and PCQ concentrations in the subcutaneous fat tissue (Table 2)

The mean PCB concentrations were 446.06 ppb in Nagasaki, 661.43 ppb in Isahaya, 892.50 ppb in Omura, 489.33 ppb in Minamitakagi, 1942.50 ppb in Fukue and 1090.50 ppb in Naru. Fishery areas showed a higher level than urban or agricultural areas. The PCB concentration in the subcutaneous fat tissue was 100 times higher than that in the blood. The mean CB% ratios were 0.34 in Nagasaki, 0.70 in Isahaya, 1.03 in Omura, 0.90 in Minamitakagi, 1.03 in Fukue and 0.85 in Naru. Residents of Omura and Fukue showed the highest CB% ratios. The mean PCQ concentrations were 1.41 ppb in

Table 1 Regional mean value of PCB, CB% and PCQ in the blood (Mean±S. D.)

Area	Number of Inhabitant	Regional Characteristics	PCB (ppb)	CB% Ratio	PCQ (ppb)
Nagasaki City	23	Urban	1.39±0.58	0.73±0.37	<0.02
Isahaya City	7	Urban	2.14±2.67	0.43±0.23	<0.02 1 case 0.03
Omura City	1	Agricultural	3	1.1	<0.02
Sasebo City	1	Urban	5	1.7	<0.02
Kitatakagi County	1	Agricultural	2	0.5	<0.02
Minamitakagi Co.	1	Agricultural	1.5	0.35	<0.02
Matsuura City	1	Mixed (Agr. & Fish)	2	0.6	<0.02
Fukue City	13	Fishery	2.53±1.94	1.00±0.35	<0.02
Naru	12	Fishery	2.16±2.08	0.91±0.35	<0.02
Tamanoura	10	Fishery	3.00±2.10	1.13±0.46	<0.02
Arikawa	1	Fishery	6	1.4	<0.02

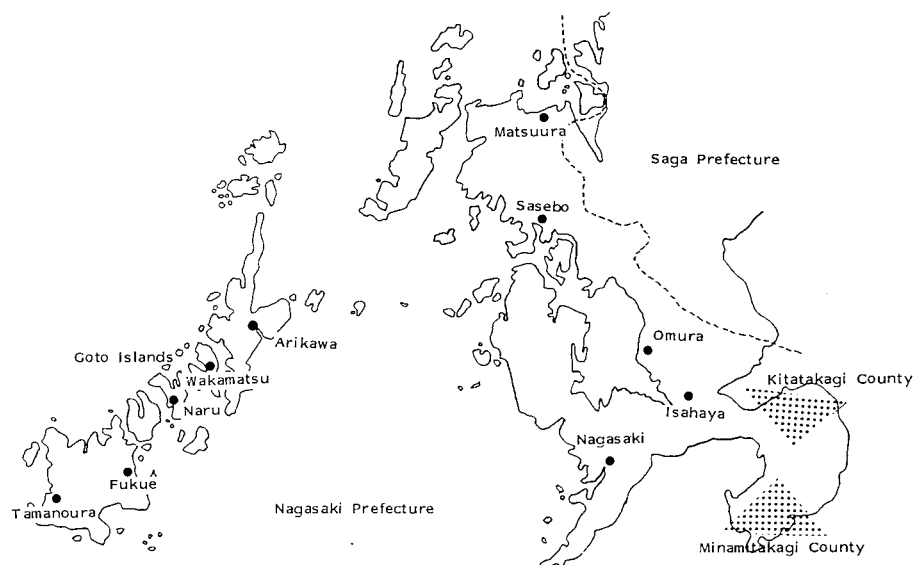


Fig. 1 Map of Nagasaki Prefecture

Table 2 Regional mean value of PCB, CB% ratio and PCQ concentrations in subcutaneous fat tissue (Mean $\pm$ S. D.)

Area	Number of Inhabitants	PCB (ppb)	CB% ratio	PCQ (ppb)
Nagasaki City	16	446.06 $\pm$ 208.99	0.83 $\pm$ 0.55	1.41 $\pm$ 0.69
Isahaya City	7	661.43 $\pm$ 566.18	0.70 $\pm$ 0.15	1.04 $\pm$ 0.94
Omura City	4	892.50 $\pm$ 432.51*	1.03 $\pm$ 0.46	2.25 $\pm$ 1.65
Minamitakagi Co.	3	489.33 $\pm$ 368.24	0.90 $\pm$ 0.28	0.80 $\pm$ 0.29
Fukue City	4	1,942.50 $\pm$ 882.28*	1.03 $\pm$ 0.41	1.47 $\pm$ 0.63
Naru	2	1,090.00 $\pm$ 210.00*	0.85 $\pm$ 0.15	< 0.2
Arikawa	1	2300.00	1.50	1.90
Sasebo City	1	1300.00	1.20	1.90
Matsuura City	1	320.00	0.80	0.50
Kitatakagi County	1	470.00	0.50	1.40

* $P < 0.01$

Nagasaki, 1.04 ppb in Isahaya, 2.25 ppb in Omura, 0.80 ppb in Minamitakagi, and 1.47 ppb in Fukue. The PCQ concentrations in Naru were below detectable level. In summary, PCQs could be detected in almost all of the subcutaneous tissue specimens, but there was no regional difference in the PCQ concentration.

Discussion

In this study, we analyzed PCB and PCQ concentrations in the subcutaneous fat tissue of residents of Nagasaki, and compared regional difference of these levels between blood and subcutaneous fat tissue of residents of Nagasa-

ki Prefecture. In the blood, PCB concentrations in Tamanoura and Fukue were significantly higher than those in Nagasaki. The CB% ratio in Tamanoura was significantly higher than that in Nagasaki and Isahaya. PCQ concentrations throughout the prefecture were below detectable levels except in one case. PCB concentrations in fishery areas showed higher levels than urban or agricultural areas. PCB concentrations in the subcutaneous fat tissue were 100 times higher than those in the blood. PCQs could be detected in almost all of the subcutaneous tissues, but there was no regional difference in the PCQ concentration.

When PCB, CB% ratio and PCQ concentrations were analyzed and compared with other reports, we assumed that the control value in Nagasaki, especially in fishery areas, are different from that in other areas. There have been many reports on the PCB concentration in normal controls in Japan¹⁾²⁾. For example, Iida et al. reported 3.4 ppb²⁾, Kashimoto reported 2.0 ppb and Baba et al. reported 0.8 to 5.6 ppb¹⁾. Baba et al. speculated that the highest blood PCB concentrations were found in fishermen because they eat more fish than the others. Our data showed a similar tendency. These results indicate the necessity to clarify the occupations, diet, living environment and other factors in

normal controls. Furthermore, PCB and PCQ also showed high concentrations in the subcutaneous fat tissue, and these values were considerably higher than those in the blood. It is imperative that these substances be reduced in our environment.

References

- 1) Baba T and Baba H: Blood PCB concentration of healthy persons. The Report of Nagasaki Pref. Inst. Pub. Health Environ. 19: 102-114, 1981.
- 2) Iida T, Fukamachi K, Takahashi K and Masuda Y: Time course variation of PCB levels and peak pattern on gas chromatogram in the blood of normal persons. Fukuoka Acta Med. 76: 126-131, 1985.
- 3) Kashimoto T: Dynamics of polychlorinated quaterphenyl (PCQ) in Yusho patients and environmental pollution. Pharmacia 17: 512-517, 1981.
- 4) Kashimoto T, Miyata H, Fukushima S, Kurita N, Ohi G and Tung TC: PCBs, PCQs and PCDFs in blood of Yusho and Yu-cheng patients. Environ. Health Perspect 59: 73-78, 1985.
- 5) Kashimoto T, Muraya H, Yakushiji T and Tanaka R: Analysis of the pattern of PCBs in the blood of patients with Yusho. Fukuoka Acta Med. 76: 145-149, 1985.
- 6) Ohgami T, Nonaka S, Watanabe M, Yamashita M, Murayama F, Yoshida H and Masuda N: PCB and PCQ concentrations in subcutaneous tissue from patients with PCB poisoning (Yusho). J. Dermatol. (Tokyo) 14: 25-28, 1987.

(和文抄録)

長崎県地方住民の血液、皮下脂肪織中 PCB, PCQ 濃度の地域的検討

長崎大学医学部皮膚科学教室

大神 太郎・野中 薫雄・山下 和徳

入船 弘子・渡辺 雅久・塚崎 直子

田中 敬一・吉田彦太郎

長崎県立公害衛生研究所生化学部門

力 岡 有 二

長崎県地方に在住する住民 71 名について血液、皮下脂肪織中 PCB, PCQ を測定した。血液中 PCB 濃度は玉之浦町と福江市住民が長崎市住民よりも有意に高値を示した。PCQ 濃度は諫早市の 1 名に 0.03 ppb の値が得られた以外、他の 70 名はすべて検出限界 0.02 ppb 以下であった。血液中 PCB 濃度は漁業地域が農

業地域に比べて高値を示していた。40 名の皮下脂肪織中 PCB 濃度は血液より 100 倍以上高濃度を示していた。皮下脂肪織中 PCQ 濃度は 2.25 ppb 以下であったが 25 例を除いて測定可能であった。しかし地域による差は認められなかった。

油症患者における腎機能

九州大学医学部第二内科学教室
村井宏一郎・辻 博・藤島正敏

Renal Function in Patients with Yusho

Koichiro MURAI, Hiroshi TSUJI and Masatoshi FUJISHIMA
Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka 812

Renal functions were examined in 102 patients with Yusho in 1988. Frequencies of proteinuria, microhematuria and history of renal diseases were not different from 20 age-matched controls. The means of blood urea nitrogen, serum creatinine and serum uric acid levels of Yusho patients did not differ from those of controls. The levels of serum β_2 -microglobulin and its urinary excretion showed no difference between two groups. Serum concentrations of sodium, potassium, chloride, calcium and phosphorus revealed no abnormality in all patients except for one who had hypophosphatemia. Urinary excretions of phosphorus, however, were significantly higher in Yusho patients than in controls. Serum PCB levels, which were still higher in Yusho patients, did not correlate with urinary excretions of phosphorus. The mechanism and the clinical significance of this phenomenon remain to be elucidated.
(Fukuoka Acta Med. 80(5) : 318-323, 1989)

はじめに

昭和43年の油症発症当時その中心的所見は爪の変色、黒色面皰、瘡瘡様皮疹などの皮膚症状や眼脂の増加などの眼症状であり、内科的には両肢の浮腫、脱力感、しびれ感、食思不振、吐気、嘔吐、関節痛などの非特異的症状がみられた。昭和47年の診断基準では咳嗽、喀痰などの気管支炎様症状と頭痛、腹痛などの症状が追加されている。油症発生後20年を経た今日、これらの皮膚、眼症状は軽快してきているが多彩な自覚症状は続いている。また血中PCB濃度は依然として正常化しておらず、さらに強力な毒性をもつPCDFの体内残留が問題となっている。

一方、油症患者の腎機能に関しては今日までとくに異常は報告されていない。しかしラットではPCB投与によりフェナセチンやスルファニルアミドの腎毒性が増強されることが報告されている³⁾。油症では頭痛、関節痛などの症状軽減のためフェナセチン、アセトアミノフェンやその他の鎮痛剤が使用される機会は少なくないと思われる。そこで今回はとくに腎障害の有無に焦点をあて検討した。

対象ならびに方法

対象者は昭和63年度福岡県油症一斉検診受診者122名である。このうち102名(男34, 女68)が油症認定患者で平均年齢は54.3歳であった。昭和63年4月時点での福岡県内の全油症患者生存者699名中の14.6%に相当する。対照は油症患者以外の検診受診者20名(男6, 女14)で平均年齢は55.4歳であった(Table 1)。

検診は油症の統一検診票に基づいて行われた。その内容は自覚症状、既往症、家族歴、理学的検査、検尿、血沈、末梢血血計、血液生化学検査、胸部レントゲン検査、心電図、腹部超音波検査などよりなっている。

採血は午前中の空腹時に行い血清分離し、一部は日本医学研究所-九州においてTBA-80 Super(東芝)により血液生化学検査を行い残りは後日の他の検査項目測定のため-20°Cに保存した。採尿も午前中、空腹状態で尿検査を行った。残りの尿は防腐剤としてトルエンを添加し測定まで-20°Cに保存した。

検尿は試験紙法(栄研化学)でpH、蛋白、潜血の各項目を調べた。血清、尿の β_2 -microglobulinは

Table 1 Subjects

	No of cases	Age yrs	M/F	Serum PCB ppb
Yusho	102	54.3±14.9	34/68	4.35±3.72 ^a
Control	20	55.4±13.7	6/14	2.60±1.46 ^a

a: p<0.001

Table 2 Urinalysis

	Protein					Occult blood					pH
	—	±	+	⧻	⧼	—	±	+	⧻	⧼	
Yusho	92	4	5	1	0	81	4	11	4	2	5.9±0.8
Control	19	1	0	0	0	19	0	1	0	0	6.1±0.9

Table 3 Renal function

	BUN mg/dl	S-creatinine mg/dl	S-uric Acid mg/dl	S-beta2 MG mg/l
Yusho	13.8±4.2	1.0±0.3	4.9±1.4	1.9±1.1
Control	14.1±2.8	1.0±0.2	5.4±1.4	1.9±0.4

	U-beta2 MG/Creat ×10 ⁻¹	Beta2 MG clearance/Ccr ×10 ³
Yusho	2.9±10.0	1.3±2.9
Control	1.9±1.8	1.0±1.0

Latex agglutination photometric immunoassay 法 (栄研化学) により, 尿カルシウム (Ca と略) は OCPC 法, 尿無機リン (Pi と略) はモリブデンブルー比色法, 尿クレアチニンはアルカリ性ピクリン酸法によりエス, エム, アイ, プリストルにおいて測定された。

血中 PCB 分析は福岡県公害センター, 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われた。

油症群と対照群の各検査値は平均値と標準偏差を計算し, 両群間の平均値の差を t 検定した。両群の異常値の出現頻度は分割表を用い, χ^2 検定を行った。4 個以下の個数がある場合には Yates の修正を行った。

結 果

1. 血中 PCB 濃度. Table 1 に示すように血中 PCB 濃度は油症患者群の方が対照群に比べて有意に高値であった ($p < 0.001$)。

2. 検尿. Table 2 に示すように油症患者では 102 名中 10 名 (9.8%) に ± 以上の蛋白尿が出現し, 対照群の 20 名中 1 名 (5%) の陽性者に比べて出現頻度に有意差はなかった。尿潜血反応の ± 以上の陽性者は, 油症で 102 名中 21 名 (20.6%), 対照群で 20 名中 1 名 (5%) と油症患者群で出現率が高かったが有意差はなかった。尿 pH の平均値は両群間で有意差を認めなかった。

3. 腎機能. (Table 3) BUN の上昇がみられた例は, 油症患者 102 名中 5 例 (4.9%), 対照群では 20 名中 1 例も認めなかった。BUN の平均は両群間に有意差はなかった。血清クレアチニン増加例は, 油症患者群にみられたネフローゼ症候群の 1 例のみであった。血清クレアチニンの平均値は両群間で有意差を認めなかった。血清尿酸値は低下していた例はなく, 増加がみられた例は油症患者群で 5 例 (4.9%), 対照群に 2 例 (10%) みられた。血清尿酸値の平均値は油症患者群で低かったが有意ではなかった。血清 β_2 -microg-

Table 4 Electrolytes

	S-Na mEq/l	S-K mEq/l	S-Cl mEq/l
Yusho	141.0±1.8	4.1±0.4	103.6±2.4
Control	141.1±1.3	4.1±0.4	103.3±1.8

	S-Ca mg/dl	S-Pi mg/dl	U-Ca/Creat	U-Pi/Creat
Yusho	9.4±0.3	3.2±0.4	0.11±0.07	0.53±0.20 ^a
Control	9.5±0.3	3.3±0.4	0.11±0.06	0.38±0.18 ^a

	C _{Ca} /C _{Cr} ×10 ³	C _{Pi} /C _{Cr} ×10 ³
Yusho	11.2±7.1	168±70 ^a
Control	11.4±6.2	114±55 ^a

a: p<0.005

lobulin は両群間で差はなく、また尿クレアチニン当りの尿 β_2 -microglobulin や、クレアチニンクリアランスに対する β_2 -microglobulin クリアランス比も両群間に有意差を認めなかった。

4. 電解質. Table 4 に示すように血清 Na, K, Cl, Ca については、いずれの例も正常範囲内にあり両群間で有意の差は認めなかった。血清 Pi は、油症患者群に 1 名低下した症例がみられた以外はいずれの例も正常範囲内にあり、両群間に有意差は認められなかった。尿中 Ca 排泄は両群間で差はなかった。一方尿のクレアチニン当りの Pi 排泄量は、油症患者群で有意に増加していた (p<0.005)。これは Pi クリアランス・クレアチニンクリアランス比をみても同様であった。

5. 腎疾患の既往. Table 5 に今回の検診で尿蛋白、尿潜血または腎疾患の病歴のいずれか 1 つ以上を有する症例を示した。尿所見に影響すると考えられる病気または状態を note に記した。いずれかの腎尿路系の疾患の病歴を有するものは油症患者群に 8 例みられた。その内訳はネフローゼ症候群 1 例、腎尿路系感染症 2 例、腎結石症 1 例、蛋白尿の既往者 1 例、尿潜血の既往者 3 例であった。対照群では腎尿路系感染症が 1 例みられた。有病歴者の頻度に差はなかった。今回の検診での理学的検査では、浮腫は未診察の 3 名を除く全例に認められなかった。

6. 血中 PCB 濃度と尿中 Pi 排泄との相関. 対象者全例の 122 名で血中 PCB 濃度と尿クレアチニン当

りの Pi 排泄量、Pi クリアランス・クレアチニンクリアランス比の相関をみた。相関係数は、おのおの r = 0.0926, r = 0.1342 で、いずれも有意ではなかった。

考 察

PCB の直接の腎毒性は現在まで知られていない⁷⁾。しかしラットに PCB を前投与し、フェナセチンやスルホンアミドを投与すると、腎障害が惹起されやすくなることが報告されている³⁾。これは PCB により腎尿細管マイクロゾーム中の薬物代謝酵素である N-hydroxylase が誘導され、腎毒性代謝産物である N-hydroxyphenacetin, p-aminophenol や 4-hydroxylaminobenzenesulfonamide が増加するためとされている。

フェナセチンやその主要代謝産物であるアセトアミノフェン、あるいはアスピリンなどの鎮痛剤による腎障害は、ふつう大量長期連用者に発生すると言われていた。例えばフェナセチンでは毎日 1g 以上を 1~3 年間連用するか、積算量として 3kg を越えた場合に腎障害が起こるとされている。これらの鎮痛剤による腎障害は糸球体腎炎の型ではなく、間質性腎炎を呈すると言われており、蛋白尿や浮腫を呈することは少なく、腎尿細管障害や腎機能障害といった形で認識されることが多い。これらの鎮痛剤による腎障害は薬剤中止により病変の進行が止り、回復することが多い点も特徴とされている⁹⁾。

油症患者では頭痛、関節痛などの自覚症状をもつ例

Table 5 Cases with proteinuria, hematuria and/or history of renal diseases
Yusho

No.	Case	Age Sex	P. H. ^a	Protein	O. B. ^b	Notes
3	T. Y.	46 F	—	±	±	Hypertension
5	S. T.	55 F	+	—	+	Hematuria
14	M. K.	49 M	—	—	+	
15	M. S.	43 F	—	—	±	Hypertension
17	M. M.	20 F	—	—	+	Menstruation
20	E. Y.	56 F	—	—	+	
22	M. Y.	63 M	—	+	—	Diabetes mellitus
24	M. H.	30 F	—	+	—	
31	M. E.	45 F	+	+	—	Proteinuria
34	Y. H.	55 M	—	±	+	
35	M. T.	59 M	—	—	+	
36	M. S.	55 F	—	—	+	
38	M. T.	60 F	—	±	—	Hypertension
39	S. K.	32 F	+	—	—	Renal stone (Rt), Hydronephrosis (Rt)
40	Y. T.	56 M	—	—	±	
46	Y. N.	34 F	—	+	—	
51	I. H.	40 F	—	—	+	Menstruation
54	H. T.	54 M	—	—	±	
73	B. K.	67 M	+	+	+	Nephrotic syndrome, DM
78	M. T.	57 M	—	+	—	Hypertension
83	K. S.	55 F	—	—	+	
84	K. K.	52 F	—	—	+	Myoma uteri
86	Y. M.	60 F	+	—	+	Pyelonephritis
90	T. T.	61 F	+	—	+	Urinary tract infection
99	O. Y.	33 F	—	±	—	
109	S. M.	55 F	+	—	+	Hematuria
112	I. S.	64 F	+	—	+	Hematuria, DM
116	S. T.	61 F	—	—	+	
120	S. S.	38 F	—	—	+	
Control						
No.	Case	Age Sex	P. H. ^a	Protein	O. B. ^b	Notes
32	Y. Y.	56 F	—	—	+	
33	Y. T.	49 M	—	±	—	Hypertension
63	N. F.	71 F	+	—	—	Pyelonephritis

a: past history of renal diseases

b: occult blood

が多い。昭和60年度の福岡県油症一斉検診では、154例中117例(76.0%)の油症患者が頭重・頭痛を訴え、145例中73例(50.3%)が関節痛を自覚していた。これらの自覚症状軽減のため鎮痛剤が使用される機会が多いものと想定されたため、今回腎機能を中心に調査を行った。

今回の結果では尿所見、病歴上とくに油症患者で腎疾患が多いという結果は得られなかった。腎尿細管障

害の有無をみるために血清、尿の β_2 -microglobulinを測定したが、油症患者に異常を認めなかった。

昭和43年の油症発症当時の比較的症状の揃った18例の急性期の内科的所見をみると、尿蛋白陽性者はなくBUNも正常であった¹⁰⁾。さらに本邦より11年経過した1979年に発生した台湾での急性期の油症患者内科的所見の報告中にも腎疾患に関連した症状はみられず、BUNも正常であった⁹⁾。また剖検された油症

患者 12 名の腎には特別の異常は見られなかった⁹⁾。

油症患者に腎障害が多いのではないかと調査前の懸念は今回の調査では否定的であった。これは鎮痛剤をそれほど長期大量に連用する患者がいなかったためであろうと想像している。いずれにしても低下しているとはいえ、いまだに長期残留性の PCB が体内に残っている油症患者での鎮痛剤の長期連用は避けるべきで、その必要性がある場合には腎障害の有無に注意すべきだと考える。

次に今回の調査でみられた油症患者の尿中 Pi の排泄増加について考えたい。尿中 Pi の排泄は副甲状腺ホルモンにより調節される。副甲状腺ホルモンは Pi の再吸収を抑制することで尿中排泄を増加させ、Pi の血中レベルを低下させる一方、骨からの Ca 動員を促進しビタミン D を介して消化管での Ca 吸収を亢進させることで血中 Ca の濃度を増加させる方向に作用する。しかし今回の調査では油症患者に血中 Ca、Pi 濃度の異常は認めなかった。

従来の油症や PCB 中毒実験の報告を、とくに骨代謝、電解質異常の有無に注目し見直してみた。油症発症初期の血液検査で重症群にアルカリフォスファターゼの軽度上昇がみられたがアイソザイム分析では肝源性であった。興味深い点は血中 Ca 濃度異常はなかったものの Cl 濃度の有意の上昇が重症群にみられたことである¹⁰⁾。血清 Pi の測定や血液ガス分析がなされていないが副甲状腺機能亢進状態による代謝性アシドーシスを想像させる所見である。台湾での急性期の油症患者では血中 Ca、Pi 濃度の記載はないものの、アルカリフォスファターゼの上昇が報告されている⁸⁾。また油症患者 12 例の剖検例のうち油症発生 46 カ月後に死亡した 46 歳、男性例に osteitis fibrosa cystica generalisata がみられ⁹⁾、生前に副甲状腺機能亢進症の存在が推定されるが、副甲状腺には組織学的な異常はみられなかった⁹⁾。さらに油症発生 16 年後の昭和 59 年に行われた一斉検診での歯周疾患に関する調査では病的歯周ポケットの発現頻度が油症患者に高いことが報告され注目される²⁾。

一方、動物実験ではサルに PCB を投与すると血清 Ca 濃度に変化はなかったが血清 Pi 濃度の低下がみられた¹⁾。ラットの PCB 投与実験では血清 Ca 濃度は不変であったが腎での Ca 濃度は増加し骨では低下した¹¹⁾。

骨代謝には副甲状腺ホルモンだけでなくその他の因子も関与する。ビタミン D の活性化は腎尿細管ミトコンドリアでの P-450 依存性 mixed function oxidase

系で行われている。PCB はこれらの酵素誘導をひき起こすことからなんらかの骨代謝異常が存在するのではないかと推測されている¹⁷⁾。

以上断片的な知見からではあるが、油症では Ca、Pi の代謝異常が存在することが示唆される。しかし臨床的に骨の異常がどの程度存在するのか、どのような機序によっているのかはいまだ説明されておらず今後の検討が必要と思われる。

総 括

昭和 63 年度福岡県油症一斉検診受診者 122 名を対象にし、腎機能の異常を調査した。油症患者は 102 名で男 34 名、女 68 名、平均年齢は 54.3 歳であった。油症以外の受診者 20 名を対照群とした。対照群は男 6 名、女 14 名、平均年齢 55.4 歳であった。

蛋白尿、血尿の出現頻度や腎疾患の有病歴者の頻度に両群間で差はなかった。また BUN、血清クレアチニン、血清尿酸の平均値に両群間で差を認めなかった。血清、尿 β_2 -microglobulin も両群間で差がなく、油症に腎障害が多いという結論は得られなかった。

血清 Na、K、Cl、Ca は全例正常で、それらの平均値も両群間で差は認められなかった。血清 Pi は油症患者の 1 例で低下していたが両群間で平均値に差はなかった。尿中 Pi 排泄は油症患者で有意に増加していた。尿中 Pi 排泄と血中 PCB 濃度の間に相関は認められなかった。

文 献

- 1) 赤木公博, 辻 博, 藤島正敏: 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: おもに血液生化学検査所見について。福岡医誌 78: 249-253, 1987.
- 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: 248-252, 1985.
- 3) Eyanagi R, Shigematsu H, Yoshida K and Yoshimura H: Metabolism and nephrotoxicity of phenacetin and sulfanilamide. J. Pharmacobio-Dyn, 8: 95-105, 1985.
- 4) 平山千里: PCB 中毒と肝細胞機能。福岡医誌 70: 238-245, 1979.
- 5) Kikuchi M: Autopsy of patients with Yusho. Am. J. Ind. Med. 5: 19-30, 1984.
- 6) 菊池昌弘, 増田義人: PCB 中毒, いわゆる油症患者の剖検所見について。臨床病理 21: 422-428, 1973.
- 7) Kluwe WM and Hook JB: Effects of environmental chemicals on kidney metabolism and

function. *Kidney Int.* 18: 648-655, 1980.

8) Lu Y-C and Wong P-N: Dermatological, medical, and laboratory findings of patients in Taiwan and their treatments. *Am. J. Ind. Med.* 5: 81-115, 1984.

9) Murray T and Goldberg M: Analgesic abuse and renal disease. *Am. Rev. Med.* 26: 537-550, 1975.

10) 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, とくに内科学的所見について. *福岡医誌* 60: 440-446, 1969.

11) Yagi N, Kimura M and Itokawa Y: Sodium, potassium, magnesium and calcium levels in polychlorinated biphenyl (PCB) poisoned Rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16: 516-519, 1976.

昭和 62～63 年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状 および長期追跡例における皮膚症状の推移

九州大学医学部皮膚科教室（主任：堀 嘉昭教授）

本 房 昭 三・永江祥之介

福岡大学医学部皮膚科教室（主任：利谷昭治教授）

利 谷 昭 治

産業医科大学皮膚科教室（主任：旭 正一教授）

旭 正 一

Dermatological Findings in the Annual Examination of the Patients with Yusho in 1987-1988 — With Special Reference to the Alteration of the Skin Symptoms in the Patients Followed up for 20 Years —

Shozo HONBO and Shonosuke NAGAE

*Department of Dermatology (Director : Prof. Y. Hori)
Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812*

Shoji TOSHITANI

*Department of Dermatology (Director : Prof. S. Toshitani)
Faculty of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka 814-01*

Masakazu ASAHU

*Department of Dermatology (Director : Prof. M. Asahi)
University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu 807*

We reported on the skin symptoms of the patients with Yusho in the 1987 and 1988 annual examinations. We also studied the alteration of the skin symptoms in the patients followed up for 20 years.

These patients showed obvious improvement in their skin symptoms during these 20 years. However, about a half of the patients still had comedones and/or acneiform eruptions, although the number of eruptions had decreased. The cases with blood PCB pattern A (typical Yusho pattern) demonstrated higher skin severity grading points than those of the other groups (patterns B and C), but even in these cases the skin eruptions had improved.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 324-330, 1989)

は じ め に

昭和 43 年ライスオイルに混入した PCB あるいはその誘導体の摂取により、北部九州を中心に油症が発生して以来 20 年を経過した。この間福岡県においては油症発生の翌年から毎年 1 回定期的に油症患者の追跡調査（年次検診）を施行し、油症患者の症状を観察、記録してきた。この年次検診の結果に基づき、油症の皮膚症状の推移については逐次まとめ、次第に皮膚症

状の軽快が認められてきていることを報告してきた^{1)~4)7)~9)}が、今回はその続報として昭和 62, 63 年度の成績についてまとめたので報告する。またこれまでは主として各年度における全受診者についての皮膚重症度、皮膚重症度得点数の成績について比較検討してきたが、患者個々の受診状況には大きなむらが見られ、大まかにいえばほとんど毎年年次検診を受診している患者は各年度全受診者の半数に満たないというのが現状であり、この点から各年度全受診者の成績を比

較検討するのみで皮膚症状の推移を判断するのは若干問題があったことは否めない。そこで今回は長期に追跡調査しえた症例を選び出し、これらの長期追跡例についての皮膚症状の推移についても検討を加えたので、その結果もあわせて報告する。

昭和 62, 63 年度における検診結果

受診状況

昭和 62 年度の受診者は 98 名（男性 38 名、女性 60 名）、63 年度の受診者は 100 名（男性 33 名、女性 67 名）であった。男性より女性の受診者が多いのは例年通りである。また昭和 62・63 年度の受診者について、前年にひきつづき受診した者、以前受診したことはあるが前年度は受診しなかった者、新規に受診した者に

分類してみると、前年にひきつづき受診した者は昭和 62 年度 62 名、同 63 年度 63 名であり、以前受診したことはあるが前年度受診しなかった者はそれぞれ 27 名、29 名で、新規に受診した者はそれぞれ 9 名、8 名であった。

皮膚重症度・皮膚重症度得点数の変動

昭和 62, 63 年度の皮膚重症度、皮膚重症度得点数については表 1, 2 に示した（なお重症度得点数については、最初に得点表示を考案した時⁴⁾と異なり、マイボーム腺肥大を採点から除外しているため、最重症で 18 点満点となる）。比較のためにそれぞれ昭和 51, 53, 56, 59 年度の結果も共に記載した。まず皮膚重症度についてみてみると、年々重症度 0 すなわち皮膚症状のまったく認められない者の比率は次第に増加し

表 1 年度別皮膚重症度

年 度	昭和51年	昭和53年	昭和56年	昭和59年	昭和62年	昭和63年
重症度	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
0	25 (27.8)	42 (34.1)	39 (36.4)	46 (38.3)	46 (46.9)	50 (50.0)
0 I	12 (22.5)	17 (26.8)	13 (28.9)	16 (19.2)	8 (15.3)	10 (17.0)
I II	4 (15.5)	3 (9.8)	6 (15.9)	2 (14.2)	0 (14.3)	0 (18.0)
II III	14 (22.2)	15 (28.5)	4 (14.9)	2 (25.8)	2 (21.4)	2 (12.0)
III IV	1 (4.4)	0 (0.8)	3 (3.7)	2 (2.5)	0 (2.0)	1 (3.0)
計	90	123	107	120	98	100

表 2 年度別皮膚重症度得点数

年 度	昭和51年	昭和53年	昭和56年	昭和59年	昭和62年	昭和63年
得 点	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
0・1	32 (35.2)	43 (34.7)	52 (48.6)	63 (52.5)	62 (63.3)	74 (74.0)
2・3	24 (26.4)	43 (34.7)	33 (30.8)	27 (22.5)	28 (28.6)	20 (20.0)
4・5	20 (22.0)	13 (10.5)	12 (11.2)	11 (9.2)	4 (4.1)	4 (4.0)
6・7	10 (11.0)	14 (11.3)	7 (6.5)	10 (8.3)	2 (2.0)	0
8・9	3 (3.3)	7 (5.6)	2 (1.9)	4 (3.3)	0	1 (1.0)
10～13	1 (1.1)	2 (1.6)	0	5 (4.2)	2 (2.0)	1 (1.0)
14～	1 (1.1)	1 (0.8)	1 (0.9)	0	0	0
計	91	124	107	120	98	100
平均点	3.12	3.05	2.15	2.36	1.37	1.08

てきており、とくに昭和63年度は重症度0の比率がはじめて50%に達した。また年度により多少の変動はあるものの、重症度の高い者が次第に重症度の低い方へ移行している傾向がうかがわれる。

次に皮膚重症度得点数についてみると、この傾向はさらに顕著で、無症状あるいはもっとも軽症の0・1点の占める割合は経年的に増加しており、昭和63年度には74%を占めるに至った。しかしながら一方では依然として8・9点以上の者も2例みられた。また総じて前回報告した昭和60、61年度の検診結果⁷⁾より、軽度ながらさらに重症度得点数は低下していた。

血中PCBパターンと皮膚重症度得点数の関係

血中PCBパターン別の皮膚重症度得点数は表3に示した。すでに血中PCBパターンと皮膚症状の重症度がよく相関することは報告されているが⁵⁾、これは表中の昭和51、53年度の結果をみても明らかである。昭和62、63年度の結果についてもやはりAパターンの患者がBパターンやCパターンよりも皮膚重症度得点数が若干高かったが、経年的にみみると得点数は次第に低下してきており、より重症であるAパターンの症例においても昭和63年度にはすでに1.41に低下している。このことは初期のころから皮膚症状が比較的軽かったB、Cパターンについても同様に指摘することができよう。

血中PCBパターンとPCB濃度

表4にPCBパターン別に分類した症例の血中PCB平均濃度を示したが、昭和51年度以降についてみればさほど大きな変動はみられていない。またAパターンの症例がB、Cパターンよりも濃度が高いという点については昭和62、63年度も同様の結果であった。

長期追跡例における皮膚重症度の推移

対象症例

油症患者の追跡調査は油症発生の翌年昭和44年から開始されたが、以後毎年定期的に年次検診を受診してきた患者はわずか数名にすぎない。このため年次検診の開始された昭和44年とその4年後昭和48年に受診し、以後は昭和51～54年、55～58年、59～63年のそれぞれの期間に少なくとも1回は年次検診を受診し、皮膚症状を観察しえた症例を選び出したところ28例であった。この28例について皮膚重症度の推移を検討した。なお皮膚重症度は定性的な皮膚症状の判定規準であるが、昭和51～54年、55～58年、59～63年の期間については便宜上皮膚重症度をそのまま数値におきかえ、それぞれの期間の平均値を算定し、その期間の皮膚重症度とした（その際の端数については0、0 I、I、I II……などのもっとも近い値を採用した）。

一方皮膚重症度得点数による皮膚症状の判定規準は

表 3 血中PCBパターンと皮膚重症度得点数の関係

(A) 昭和51年度				(B) 昭和53年度				(C) 昭和56年度			
パターン	症例数	平均	点	パターン	症例数	平均	点	パターン	症例数	平均	点
A	47	4.04		A	62	3.58		A	41	2.88	
B	14	1.07		B	12	2.58		B	12	1.75	
BC	8	3.00		BC	10	3.20		BC	4	2.25	
C	21	1.95		C	39	2.54		C	27	1.78	
計	90	3.00		計	123	3.12		計	84	2.33	
(D) 昭和59年度				(E) 昭和62年度				(F) 昭和63年度			
パターン	症例数	平均	点	パターン	症例数	平均	点	パターン	症例数	平均	点
A	59	2.88		A	45	1.80		A	37	1.41	
B	14	2.64		B	15	1.80		B	13	0.92	
BC	5	0.60		BC	2	1.50		BC	2	0	
C	35	2.09		C	36	0.64		C	48	0.92	
計	113	2.50		計	98	1.37		計	100	1.08	

表 4 血中PCBパターンとPCB濃度

(A) 昭和51年度			(B) 昭和53年度			(C) 昭和56年度		
パターン	症例数	平均濃度	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	64	6.69	A	46	6.93
B	14	3.00	B	12	3.38	B	12	4.08
BC	10	2.20	BC	11	2.27	BC	4	3.00
C	23	3.57	C	39	2.49	C	28	2.57
計	96	5.65	計	126	4.69	計	90	5.02

(D) 昭和59年度			(E) 昭和62年度			(F) 昭和63年度		
パターン	症例数	平均濃度	パターン	症例数	平均濃度	パターン	症例数	平均濃度
A	63	4.69	A	47	6.94	A	37	6.40
B	14	3.43	B	15	3.26	B	13	4.23
BC	5	4.80	BC	2	2.00	BC	2	2.85
C	34	3.35	C	36	3.27	C	49	2.89
計	116	4.15	計	100	4.97	計	101	4.35

* 濃度の単位は ppb

表 5 長期追跡例における皮膚重症度の推移

年度	昭和44年	昭和48年	昭和51～54年	昭和55～58年	昭和59～63年
重症度	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
0	0	0	2 (7.1)	4 (14.3)	5 (17.9)
0 I	2 (39.3)	2 (46.4)	2 (28.6)	5 (35.7)	4 (21.4)
I I	9 (32.1)	11 (10.7)	6 (21.4)	5 (25.0)	2 (21.4)
I II	1 (32.1)	0 (10.7)	3 (21.4)	1 (25.0)	2 (21.4)
II III	0 (21.4)	2 (14.3)	6 (39.3)	1 (21.4)	7 (35.7)
II III	6 (21.4)	2 (14.3)	5 (39.3)	5 (21.4)	3 (35.7)
III IV	0 (7.1)	5 (28.6)	0 (3.6)	0 (3.6)	0 (3.6)
III IV	2 (7.1)	3 (28.6)	1 (3.6)	1 (3.6)	1 (3.6)
計	28	28	28	28	28

皮膚症状をより定量的に表現し、経年的な皮膚症状の推移を明確にさせるために設けられた判定規準であるが²⁾、皮膚重症度得点数による評価も考慮した追跡調査は昭和52年以降になされているので、昭和52年から57年までを各々2年間に区切り、昭和58年以降は各々3年間に区切って、それぞれの期間に少なくとも1回は年次検診を受診し、皮膚症状を観察しえた症例を選び出した。この条件に合致した症例は44例であり、この44例について皮膚重症度得点数による皮膚

症状の推移を検討した。なお各期間の皮膚重症度得点数はそれぞれの期間の平均値をもって表示した。

皮膚重症度の推移

28例における皮膚重症度の推移は表5に示した。表1に示した各年度別全受診者における皮膚重症度と比較して、重症度0の占める比率は昭和51年以降をみてもきわめて低く、相対的に重症度IIないしIIIの占める比率が高かった。長期追跡例でも重症度0すなわち皮膚症状のみられない症例の数は次第に増加してい

表 6 長期追跡例における皮膚重症度得点数の推移

年度	昭和52・53年	昭和54・55年	昭和56・57年	昭和58～60年	昭和61～63年
平均得点	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
0～1.00	10 (22.7)	15 (34.1)	12 (27.3)	20 (45.6)	32 (72.7)
1.01～3.00	15 (34.1)	16 (36.4)	19 (43.2)	14 (31.8)	9 (20.5)
3.01～5.00	12 (27.3)	5 (11.4)	8 (18.2)	8 (18.2)	1 (2.3)
5.01～7.00	2 (4.5)	4 (9.1)	1 (2.3)	1 (2.3)	1 (2.3)
7.01～9.00	4 (9.1)	2 (4.5)	3 (6.8)	0	1 (2.3)
9.01～	1 (2.3)	2 (4.5)	1 (2.3)	1 (2.3)	0
計	44	44	44	44	44

表 7 長期追跡例における皮膚重症度得点数の推移とPCB濃度

PCB	例数	昭和52・53年	昭和54・55年	昭和56・57年	昭和58～60年	昭和61～63年
パターン		得点 ¹⁾ (濃度) ²⁾	得点 (濃度)	得点 (濃度)	得点 (濃度)	得点 (濃度)
A	21	4.31(8.45)	4.05(7.40)	4.14(8.55)	2.40(6.75)	1.86(7.74)
B	6	2.67(4.33)	1.83(4.50)	1.25(4.50)	1.14(4.53 ³⁾)	0.36(3.36)
C	17	2.35(2.59)	1.85(2.35)	2.15(2.15 ⁴⁾)	1.78(2.53 ⁵⁾)	0.74(2.36)
計	44	3.33(5.63)	2.90(5.06)	2.98(6.16 ⁶⁾)	1.99(4.88 ⁷⁾)	1.22(5.06)
受診者全例の 重症度得点 ¹⁾		3.09	2.49	2.41	1.84	1.27

1) 平均得点, 2) 平均濃度 (ppb), 3) 5例における平均濃度, 4) 10例における平均濃度,
5) 16例における平均濃度, 6) 37例における平均濃度, 7) 42例における平均濃度

るが、一方では依然として皮膚重症度がⅡ（面皰あり）ないしⅢ（痤瘡様皮疹あり）以上の症例が昭和59～63年の期間をみても半数以上を占めていた。

皮膚重症度得点数の推移

44例における昭和52年以降の皮膚重症度得点数の推移は表6に示した。皮膚重症度得点数でみると、昭和52, 53年度は平均得点1.00までの最軽症例は20%強にすぎなかったが、昭和61～63年度においては70%強を占めるに至っており、また得点が高かった症例が次第に得点が低下していった傾向が明瞭にうかがえた。次に長期追跡例44例を血中PCBパターンでA, B, Cの3パターンに分類し、それぞれのパターン別症例における皮膚重症度得点数の平均値と血中PCBの平均濃度を表7に示した。なおBCパターンはこの表ではBパターンに含めている。Aパターンの症例がB, Cパターンよりも重症であることは当然であるが、いずれのパターンの症例をみても重症度得点数（平均値）は次第に低下してきており、とくに昭和58年以降に低下傾向が著明であった。表7の下段に参考のためそれぞれの期間の年次検診全受診者の皮

膚重症度得点数の平均値を示したが、長期追跡例44例についての結果とほぼ同様の傾向を示した。また血中PCB濃度については長期追跡例でもAパターンの症例が濃度が高く、また経年変化はあまり認められないというこれまで指摘された結果と同様の成績であった。

考 察

油症患者の皮膚症状は初期の2年間に大幅な改善を示し⁹⁾、以後は徐々に軽快傾向を示しながら推移してきたことはこれまでにすでに報告されているが^{1)～4)7)～9)}、昭和62・63年度の年次検診の結果もこれまでの報告を支持する結果であった。すなわち昭和63年度には皮膚重症度0すなわち油症の皮膚症状がまったく認められない患者の比率がはじめて全受診者の50%に達し、皮膚重症度得点数でみても得点数0・1の最軽症例が74%を占めるに至っている。これらの成績からみて、油症の皮膚症状が次第に軽快傾向をたどってきていることは間違いないと考えられるが、油症患者の年次検診受診状況をみると個人的にかなり

のむらがあり、昭和 62, 63 年の 2 年間でみても前年度にひきつづき受診した患者の比率は 6 割にとどまり、各年度の全受診者についての検診結果をもってそのまま油症の皮膚症状の推移を比較検討するのは若干問題があると考えられる。この点を考慮し、今回われわれは長期間にわたって皮膚症状の推移を観察しえた症例を選び出し、検討を行ってみた。

追跡調査が開始された昭和 44 年以降ある程度定期的に皮膚重症度を観察、記録しえた症例は 28 例で、このグループは各年度全受診者についての成績と比較した場合に、明らかにより重症の患者が多数を占めていた。重症であったがために熱心に年次検診を受けてきたとも考えられる。この 28 例の長期追跡例においても皮膚重症度 0 の比率は次第に増加してきているので、皮膚症状が軽快傾向にあることは明白であるが、それでも約半数の症例で依然として面皰あるいは痤瘡様皮疹が残存していることは注目される。

一方、皮膚重症度得点数による半定量的皮膚症状の評価が可能な昭和 52 年以降の長期追跡例 44 例についてみると、重症度得点数は大多数の症例で大幅な低下を示しており、また 70%以上の症例が最軽症あるいは無症状を示す 1.00 以内の得点数を示していることから、これら長期追跡例においても皮膚症状は明らかに軽快しているといえる。また昭和 44 年以降の長期追跡例 28 例のほとんどが昭和 52 年以降の追跡例 44 例に含まれていることを考えあわせると、比較的皮膚症状が高度であった症例のうちかなりの症例では現在でも面皰や痤瘡様皮疹の残存はみられるものの、皮疹の数はきわめて少数となっていることがうかがえる。

PCB パターンと皮膚重症度得点数の関係については、これまでに A パターンを呈する症例が得点数が高いことは報告されてきたが、昭和 62, 63 年度の年次検診結果でも、また長期追跡例 44 例についての検討結果でも同様の傾向は認められた。ただし近年は A パターンの症例では重症度得点数はきわめて低下してきたことは注目すべき点であろう。一方 PCB 濃度についてはこの約 10 年間ほとんど変動が認められておらず、プラトー状態を呈している。恐らく今後もこのまま低いプラトー状態で推移するものと考えられる。

以上今回の油症患者の皮膚症状に関する検討結果では、この 20 年間にほとんどの症例において皮膚症状の消退ないしは最軽症化が認められるという結果であったが、一方ではまだかなりの症例で軽度ではあっても皮膚症状が残存していることを決して忘れてはな

らない。また例外的な数例の症例においては依然としてきわめて高度の皮膚症状が持続しており、血中 PCB 濃度も高値の状態を保っている。油症発生後 20 年を経過したが、今後も追跡調査を続けていくことはもちろん、一日も早い治療法の確立がのぞまれる。

総 括

昭和 62, 63 年度の福岡県油症年次検診の成績をまとめ、これまでの検診結果と比較し、主として皮膚症状の推移について検討を加えた。また長期に追跡しえた症例を選びだし、これら長期追跡例についても皮膚症状の推移を検討した。

1. 昭和 62, 63 年度の検診結果をこれまでの成績と比較検討した場合にも、また長期追跡例において検討した結果でも、近年は大部分の症例において皮膚症状は消退するか、あるいは最軽症化していることが明らかとなった。
2. 長期に追跡しえた症例は比較的皮膚症状の高度な症例が多く、これらの症例では皮疹の数はきわめて少ないものの、面皰、痤瘡様皮疹が約半数の症例で残存していた。
3. PCB パターンで A パターンの症例は B, C パターンの症例よりも皮膚重症度得点数は高かったが、A パターンを示す症例においても近年は得点数はきわめて低下していた。
4. 血中 PCB 濃度についてはこの 12 年間にさほど変動はみられなかった。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 旭 正一, 利谷昭治, 日野由和夫, 幸田 弘: 昭和 51 年度～55 年度の年次追跡調査における油症皮膚所見の変化とその他の因子との相関性. 福岡医誌 72: 223-229, 1981.
- 4) 幸田 弘, 旭 正一, 利谷昭治: 昭和 47 年度一斉検診による油症患者の皮膚所見. 福岡医誌 65: 81-83, 1974.
- 5) 幸田 弘, 増田義人: 九州大学附属病院油症外来患者の血中 PCB と臨床症状との関係. 福岡医誌 66: 624-628, 1975.
- 6) 利谷昭治: 昭和 46 年度一斉検診による油症患者の皮膚所見. 福岡医誌 63: 46-49, 1972.

7) 利谷昭治, 旭 正一, 占部治邦: 昭和 60~61 年度の年次検診における油症皮膚症状の推移. 福岡医誌 78: 349-354, 1987.

8) 利谷昭治, 旭 正一, 幸田 弘: 昭和 50 年度一斉検診における油症患者皮膚所見の推移. 福岡医誌 68: 152-155, 1977.

9) 利谷昭治, 旭 正一, 本房昭三, 占部治邦: 昭和 58 年~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.

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

全国油症患者追跡検診の情報処理システムと 昭和 61 年度検診結果について

福岡県衛生公害センター

片岡恭一郎・大久保彰人・篠原志郎

九州大学医学部公衆衛生学講座

廣田良夫・廣畑富雄

Introduction of the Information Processing System of Medical Examinations of Yusho Patients and Some Results Obtained by the 1986 Survey

Kyoichiro KATAOKA, Akito OKUBO and Shiro SHINOHARA

*Fukuoka Environmental Research Center,
Mukaisano, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01*

Yoshio HIROTA, Tomio HIROHATA
*Department of Public Health, Faculty of
Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812*

Information processing system for newly established, unified medical examinations of Yusho patients which started in September 1985 was presented. Some comparative analysis was also shown on the "important findings" in Yusho patients residing in Fukuoka or Nagasaki prefecture.

In the 1986 survey, Fukuoka male patients showed higher percentages of pigmentation in toe nail, gingiva and palpebral conjunctiva than Nagasaki ($p < 0.01$), whereas Nagasaki male patients showed higher percentages of pigmentation in buccal and lip mucosa. Average concentration of PCB in blood was higher in Nagasaki male patients (6.79 ppb) than in Fukuoka patients (4.39 ppb), the difference being significant at 1% level.

(Fukuoka Acta Med. 80(5): 331-341, 1989)

はじめに

昭和 60 年 5 月の全国油症治療研究会において統一検診票の検診項目が決定した。全国 11 箇所で行われている油症患者追跡検診の検診票を統一し、患者の全体的な健康度を把握するとともに、患者個人の健康管理に資するためである。この決定に基づき、同年 7 月検討会が開かれ、検診票をほぼ決定し、同年 9 月の広島県での検診から実施した。例年 7、8 月に予定されている長崎県の場合、昭和 61 年度から統一検診票を使用した。

今回は、この統一検診票の情報処理システムの紹介と初めての全国統一検診による昭和 61 年度検診結果の概要を報告する。この検診は全国の油症治療研究会および検診担当行政機関によって実施されたものであり、集計、解析については厚生省油症治療研究班長

(倉恒匡徳・中村学園大学・中村学園短期大学学長) の依頼により行われたものである。

1. 情報処理システム

統一検診票の情報処理システムのシステムフローの概略を図 1 に示した。システムの主要素について以下簡単に述べる。

(1) 入力データ

統一検診票は内科票（小児は小児科票を用いる）、皮膚科票、眼科票、歯科票および検査票（尿検査および血液検査）に分かれている（付録参照）。検診票の入力項目は大きく共通項目と種別項目の 2 つに分けられる。

共通項目は受診者区分、整理 NO.、氏名（漢字、カタカナ）など 13 項目あるが、このうち氏名、性別および生年月日を患者の識別に用いている。

種別項目は、各検診票別の自覚および他覚所見項目、

血液中のPCBおよびPCQ濃度ならびに臨床検査データなどが入力項目である。

(2) 出力情報

定型的出力情報には、受診者一覧表、検診票別検診状況統計表および血液学的・生化学的検査状況表ならびに臨床所見および検査項目別有所見率（異常率）グラフがある。そのほか、随時出力情報として統計解析に必要な図表がある。

(3) 処理手順

検診担当医が記入した検診票は、事前に配布されている“油症検診票記入要領”に基づき、検診担当の各行政機関によって検診票の件数や記入ミスなどの点検が行われ、厚生省油症治療研究班長のもとに送付され

る。送付された検診票は福岡県衛生公害センターの汎用コンピュータに入力され、図1のフローに示すようにデータ変換（漢字変換や端末機用データ作成など）の後、端末機のOA用ソフトウェアパッケージ機能を用い、データチェックが行われ、確定データになる。このデータから種々の出力情報を得る。

(4) 機器構成

中央処理装置：ACOS430 モデル10（主記憶容量4MB）

端末機器装置：N6300 モデル55（主記憶容量1MB, 60MBハードディスク付加）およびN5200 モデル05 mK II

周辺機器装置：固定磁気ディスク（総記憶容量2.9GB）、日本語ページプリンタ

2. 昭和61年度検診結果

昭和61年度の油症患者追跡検診の受診者は認定患者387人、未認定患者158人の合計545人であった（表1）。そのうち、長崎県（全体の40.9%）、福岡県（26.1%）および広島県（16.5%）で全体の83.5%を占めている。年齢5歳階級別では（表2）、45歳から64歳までが全体の52.1%を占めている。検診票の統一化の一つの目的に全国的動向の把握が上げられるが、今回、患者数の多い福岡県と長崎県の油症認定患者の症状について比較した。比較対象の臨床所見項目は油症診断基準（昭和51年6月14日補遺）⁴⁾の“重要な所見”から取った。もちろん、検診票から得られる情報は非常に多岐に渡っており、今回の解析はその一部にすぎない。

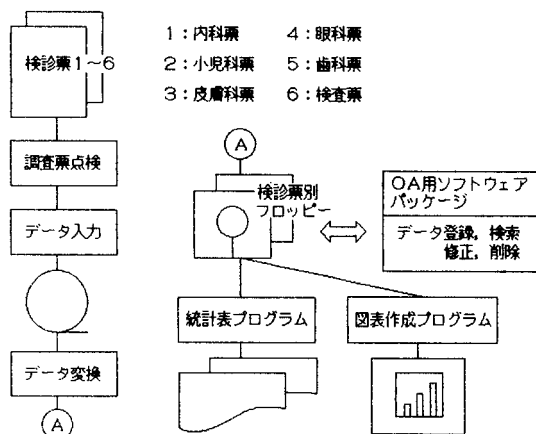


図1 全国油症追跡検診情報処理システムフロー

表1 昭和61年度油症検診受診者数（性・認定区分・府県別）

県 コード	検診場所	男		女		計	
		認 定 (%)	未認定 (%)	認 定 (%)	未認定 (%)	認 定 (%)	未認定 (%)
12	千葉県	1(0.5)	1(1.6)	1(0.5)	0(0)	2(0.5)	1(0.6)
14	神奈川県	0(0)	0(0)	4(2.0)	0(0)	4(1.0)	0(0)
23	愛知県	7(3.9)	1(1.6)	3(1.5)	0(0)	10(2.6)	1(0.6)
27	大阪府	11(6.0)	0(0)	10(4.9)	1(1.0)	21(5.4)	1(0.6)
31	鳥取県	0(0)	0(0)	4(2.0)	0(0)	4(1.0)	0(0)
34	広島県	45(24.6)	24(38.8)	9(4.4)	12(12.5)	54(14.0)	36(22.8)
35	山口県	4(2.2)	0(0)	7(3.4)	0(0)	11(2.8)	0(0)
38	愛媛県	2(1.1)	0(0)	5(2.5)	0(0)	7(1.8)	0(0)
39	高知県	8(4.4)	1(1.6)	13(6.3)	0(0)	21(5.4)	1(0.6)
40	福岡県	40(21.1)	16(26.0)	70(34.3)	16(16.7)	110(28.4)	32(20.3)
42	長崎県	63(34.4)	19(30.7)	74(36.2)	67(70.0)	137(35.4)	86(54.4)
46	鹿児島県	2(1.1)	0(0)	4(2.0)	0(0)	6(1.6)	0(0)
計		183(100)	62(100)	204(100)	96(100)	387(100)	158(100)

表 2 昭和61年度油症検診受診者数（性・認定区分・年齢区分別）

年 齢 区 分	男		女		計	
	認 定 (%)	未認定 (%)	認 定 (%)	未認定 (%)	認 定 (%)	未認定 (%)
0- 4	0(0)	1(1.6)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.6)
5- 9	1(0.1)	1(1.6)	0(0)	1(1.0)	1(0.3)	2(1.3)
10-14	3(1.6)	6(9.7)	1(0.5)	9(9.4)	4(1.0)	15(9.5)
15-19	2(1.1)	2(3.2)	6(2.9)	1(1.0)	8(2.1)	3(1.9)
20-24	11(6.0)	0(0)	3(1.5)	5(5.2)	14(3.6)	5(3.1)
25-29	12(6.6)	1(1.6)	9(4.4)	2(2.1)	21(5.4)	3(1.9)
30-34	10(5.5)	4(6.5)	14(6.9)	3(3.1)	24(6.2)	7(4.4)
35-39	9(4.9)	4(6.5)	12(5.9)	5(5.2)	21(5.4)	9(5.7)
40-44	11(6.0)	5(8.1)	8(3.9)	6(6.3)	19(4.9)	11(7.0)
45-49	8(4.4)	5(8.1)	23(11.3)	11(11.5)	31(8.0)	16(10.1)
50-54	29(15.9)	9(14.5)	26(12.8)	12(12.5)	55(14.2)	21(13.3)
55-59	29(15.9)	8(12.9)	33(16.2)	11(11.5)	62(16.0)	19(12.0)
60-64	28(15.3)	7(11.3)	31(15.2)	14(14.6)	59(15.3)	21(13.3)
65-69	14(7.7)	5(8.1)	14(6.9)	5(5.2)	28(7.2)	10(6.3)
70-74	9(4.9)	0(0)	15(7.4)	8(8.3)	24(6.2)	8(5.1)
75-79	5(2.7)	4(6.5)	6(2.9)	2(2.1)	11(2.8)	6(3.8)
80-84	1(0.6)	0(0)	2(1.0)	1(1.0)	3(0.8)	1(0.6)
85-	1(0.6)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(0.5)	0(0)
計	183(100)	62(100)	204(100)	96(100)	387(100)	158(100)

表 3 福岡県と長崎県における昭和61年度油症追跡検診受診者の有所見率比較（認定患者 男）

重要所見項目	福 岡 県			長 崎 県			検 定 結 果
	例数	有所見数	有所見率 (%)	例数	有所見数	有所見率 (%)	
最近の化膿傾向	39	8	20.51	62	9	14.52	
黒色面皰(顔面)	39	8	20.51	63	20	31.75	
痤瘡様皮疹(顔面)	37	3	8.11	63	7	11.11	
〃(臀部)	39	4	10.26	63	0	0.00	**
色素沈着(顔面)	38	0	0.00	62	4	6.45	
〃(指爪)	39	0	0.00	62	4	6.45	
〃(趾爪)	38	7	18.42	61	6	9.84	
〃(上歯肉)	35	15	42.86	61	17	27.87	
〃(下歯肉)	34	18	52.94	62	24	38.71	
〃(頬粘膜)	27	1	3.70	61	17	27.87	**
〃(口蓋粘膜)	27	0	0.00	61	5	8.20	
〃(口唇粘膜)	27	0	0.00	62	46	74.19	**
眼瞼結膜色素沈着	39	21	53.85	63	12	19.05	**
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	38	17	44.74	47	16	34.04	

**：危険率1%で有意

表3および表4はその結果である。有所見数は土以上の所見患者数である。母比率の検定²⁾の結果、男女とも痤瘡様皮疹(臀部)および眼瞼結膜色素沈着は福岡県が危険率5%以下で有意に高く、口唇粘膜色素沈着は長崎県が危険率1%で有意に高かった。そのほか、男では頬粘膜色素沈着が長崎県で危険率1%で有意に

高く、女では痤瘡様皮疹(顔面)ならびに趾爪、上歯肉および下歯肉の色素沈着はいずれも福岡県が危険率1%で有意に高かった。

表5は男女別に見た血液PCB濃度の福岡県と長崎県の比較である。長崎県男の血液PCB平均濃度6.79ppbは福岡県男の4.39ppbに比べ、t検定の結果、

表 4 福岡県と長崎県における昭和61年度油症追跡検診受診者の有所見率比較（認定患者 女）

重要所見項目	福 岡 県			長 崎 県			検 定 結 果
	例数	有所見数	有所見率 (%)	例数	有所見数	有所見率 (%)	
最近の化膿傾向	69	15	21.74	73	13	17.81	
黒色面皰(顔面)	69	10	14.49	74	11	14.86	
痤瘡様皮疹(顔面)	69	11	15.94	74	3	4.05	*
〃(臀部)	69	6	8.70	74	1	1.35	*
色素沈着(顔面)	70	8	11.43	73	3	4.11	
〃(指爪)	70	7	10.00	73	7	9.59	
〃(趾爪)	70	29	41.43	73	10	13.70	**
〃(上歯肉)	60	19	31.67	73	6	8.22	**
〃(下歯肉)	65	27	41.54	73	12	16.44	**
〃(頬粘膜)	52	1	1.92	72	7	9.72	
〃(口蓋粘膜)	52	1	1.92	72	0	0.00	
〃(口唇粘膜)	51	0	0.00	73	40	54.79	**
眼瞼結膜色素沈着	70	19	27.14	70	2	2.86	**
瞼板腺チーズ様分泌物圧出	68	20	29.41	46	10	21.74	

*：危険率5%で有意，**：危険率1%で有意

表 5 福岡県と長崎県における昭和61年度油症追跡検診受診者の血液 PCB 濃度比較（認定患者）

性	福 岡 県				長 崎 県				平均値の差 の検定結果
	測定数	平均値 (ppb)	標準偏差 (ppb)	中央値 (ppb)	測定数	平均値 (ppb)	標準偏差 (ppb)	中央値 (ppb)	
男	34	4.39	3.13	3.40	60	6.79	5.30	5.50	**
女	65	4.52	3.61	4.00	69	4.88	3.49	4.00	

**：危険率1%で有意

危険率1%で有意に高かった。男女を比べると、福岡県は女より男の方が高い傾向にあるが統計的に有意ではなかった。長崎県は女より男の方が危険率5%で有意に高かった。

考 察

昭和61年度の単年度の解析であるが、色素沈着の所見に福岡県と長崎県の認定患者では有所見率に違いが認められる。福岡県の認定患者では趾爪、歯肉および眼瞼結膜の色素沈着の有所見率が高く、長崎県では頬粘膜および口唇粘膜の色素沈着の有所見率が高かった。昭和57年から昭和60年の各追跡調査班の検診結果をみても今年度と同様な結果が経年的に観察されている。すなわち、趾爪の色素沈着の有所見率は福岡県では約28%から33%であり、長崎県では約4%から10%である。眼瞼結膜のそれは福岡県では約32%から50%であり、長崎県では約6%から17%である。いずれも長崎県より福岡県の方が高い。逆に、頬粘膜

の色素沈着の有所見率は長崎県では約9%から18%であり、福岡県では約2%から11%である。また、口唇粘膜の色素沈着は長崎県では約20%から42%であり、福岡県では23%以下である。このことが種々の偏り（患者の受診傾向、診断基準の違いなど）によるものか、真に症状の違いによるものか現時点では判断しがたい。

PCB濃度では、長崎県の男が平均濃度6.79 ppbできわめて高かったが、これは大神ら¹⁾（報告データから男だけの血液PCB平均濃度を計算すると7.11 ppb）や奥村ら³⁾（同様な計算7.87 ppb）の報告と同様な結果であり、長崎県男の血液PCB濃度は福岡県の男に比べ高い傾向がある。

今後統一検診票によって精度の良い情報を得るためには、検診票の正確な記入に注意を払うとともに、症状判定の基準化も重要な要素であると考えられる。治療研究班員の努力により平成元年度の検診からPCBパターンの記入方法が統一されることは、検診票統一

化の一つの成果であろう。

率 1% で有意に高かった。

総 括

文 献

昭和 60 年 9 月から開始された全国油症追跡検診の情報処理システムの紹介をした。また、これによって得られた昭和 61 年度追跡検診データを用い、福岡県と長崎県の油症認定患者受診者の重要所見の比較を行った。その結果次のことが分かった。

1. 重要所見のうち、福岡県と長崎県受診者では有所見率に違いが認められた。すなわち、福岡県の認定患者では趾爪、歯肉および眼瞼結膜の色素沈着の有所見率が危険率 1% で有意に高く、長崎県では頬粘膜および口唇粘膜の色素沈着の有所見率が危険率 1% で有意に高かった。

2. 血液 PCB 濃度の平均値の差の検定の結果、長崎県男の 6.79 ppb は福岡県男の 4.39 ppb に比べ危険

1) 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: 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。福岡医誌 78: 337-342, 1987.

2) 大崎紘一, 菊池 進, 緒方正名: コンピュータ・プログラムによる統計技術。pp. 74-75, 同文書院, 東京, 1978.

3) 奥村英彦, 益田宣弘, 赤峰昭文, 青野正男: 油症患者の頬粘膜における PCB, PCQ 濃度, PCB 358-364, 1987.

4) 倉恒匡徳, 青野正男, 吉田彦太郎: 序言。福岡医誌 78: 181-192, 1987.

付 録

登録番号				受付No.		
(1) 係別	1	油 症 検 診 票		(2) 受診者区分	1 認定 2 未認定	
				ア 初回 イ 保留 () 回	昭和 年度	
				(3) 整理No.		
(4) フリガナ				(6) 性別	1 男 2 女	
(5) 氏 名	姓 名 旧姓 ()			(7) 生年月日	1. 明治 2. 大正 3. 昭和 () 歳 年 月 日	
(8) 現 住 所	都道府県 市区町村 号 番地 電話: ()			(9) 現在:		
(11) 検診月日	昭和 年 月 日			(12) 検診場所	都道府県 市区町村	
(13) カネミ油採取期間	昭和 年 月 日 ~ 年 月 日			(14) 家族発生有無	(1 無 2 有) () 名中 () 名認定	
内 科 自 覚 症 状 (大人)	(15) 飲 酒	(1 無 2 1日1合未満 3 1~2合 4 3合以上)			約 () 年間	
	(16) 喫 煙	(1 無 2 中止 3 有)			有 () 年 () 月 () 日	
	(17) 主 訴	1 無 2 有 → (1.) 2. ()				
	(18) 既 往 歴	(18) 昭和43年前	1 無 2 有 → (1.) 2. ()			
		(19) 昭和43年後	1 無 2 有 → (1.) 2. ()			
	他 覚 所 見	(20) 全身倦怠感	1 2 3	1 2		
		(21) 頭重・頭痛	1 2 3	1 2		
		(22) 咳	1 2 3	1 2		
		(23) 咯 痰	1 2 3	1 2		
		(24) 腹 痛	1 2 3	1 2		
(25) 下 痢		1 2 3	1 2			
(26) 便秘		1 2 3	1 2			
(27) しびれ感		1 2 3	1 2			
(28) 関節痛		1 2 3	1 2			
(29) 月経異常		1 2 3	1 2			
(30) 他 ()	1 2 3	1 2				
(31) 身長 (cm)						
(32) 体重 (kg)						
(33) 脈拍数 (1/分)						
(34) 血圧 (mmHg)						
(35) 末 養	1 正常 2 肥満 3 痩せ					
(36) 心 音	1 純 2 不純					
(37) 呼吸音	1 正常 2 異常					
(38) 肝 肺	1 - 2 + → () 横指					
(39) 脾 肺	1 - 2 + → () 横指					
(40) 子 肺	1 - 2 + → () 部位 ()					
(41) リンパ節大	1 - 2 + → () 部位 ()					
(42) 四肢けん反射	1 正常 2 低下 3 亢進					
(43) 感覚障害	1 正常 2 異常					
(44) 胸部レ線	1 正常 2 肺野 3 縦隔・心 4 肺野+縦隔・心 9 検査なし					
(45) 心 電 図	1 正常 2 異常 9 検査なし					
(46) 肝・脾エコー	1 正常 2 異常 9 検査なし					
(特記事項)						

1. 胸部レ線 (所見図)

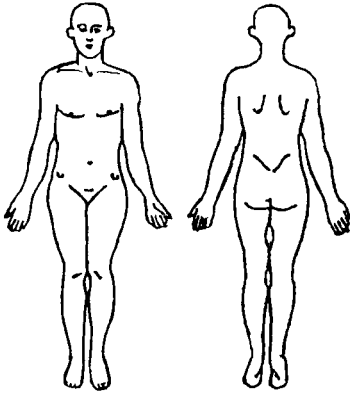
2. 四肢けん反射図

3. 感覚障害図

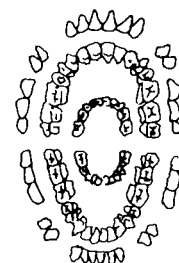
1) 振動覚は () 内に所見計値を記入。
2) 温・痛・触覚は異常部位を () で示し、所見計値を記入。(記入例参照)

記入例

登録番号				受付No.												
(1)種別	2	油症検診票		(2)受診者区分	1 認定 2 未認定	ア 初回 イ 保留 ()回	昭和 年度									
(4)フリガナ				(6)性別	1 男 2 女	(7)生年月日	1.明治 2.大正 3.昭和 ()歳									
(5)氏名	姓	名	田姓	()	()	()	()年()月()日									
(8)現住所	都道府県 市区町村 号番地			主な職業		(9)現在:	()									
(10)検診月日	昭和	()	年	()	月	()	日									
(11)カネミ油採取期間	昭和	()	年	()	月	()	日									
(12)検診場所	都道府県 市区町村			(13)家族発生有無	(1 無 2 有)	()	()名中()名認定									
小児科	(15)病名	1 無 2 有 → (1. () 2. ())														
	既往歴	出生時	(16)身長	()	()	cm	(17)体重	()	()	kg	(18)仮死	(1 無 2 有)	()	(19)黄疸	(1 無 2 有)	()
		発達状況	(20)皮膚の色	1 正 2 異 → ()			(21)栄養	1 母乳 2 ミルク 3 混合	()							
			(22)首のすわりの時期	()	ヵ月	(23)独りすわりの時期	()	ヵ月								
	(24)独り歩きの時期		()	ヵ月	(25)有意語の時期	()	ヵ月									
	(26)生歯の時期	()	ヵ月	その他:			()									
	(27)母親の流・早産	(1 無 2 有) ()			(28)母親の妊娠中毒	(1 無 2 有) ()										
	(29)母親のカネミ油採取時期	昭和	()	年	()	月	()	日	(30)母親の認定区分	(1 認定 2 未認定) ()						
	(31)主訴	1 無 2 有 → (1. () 2. ())														
	科	(32)身長	()	()	cm	(33)体重	()	()	kg	(34)血圧	()	()	mmHg			
(35)栄養		1 正常 2 肥満 3 痩せ			()											
(36)2次性徴		1 正常 2 異常			()											
(37)顔面		1 正常 2 異常			()											
胸部		(38)肺	1 正常 2 異常 → ()			()										
		(39)心音	1 正常 2 異常 ()			()										
腹部		(40)肝臓	1 正常 2 異常 → ()			(41)硬度	1 正 2 硬	()								
		(42)脾臓	1 正常 2 異常 → ()			()										
(43)四肢		1 正常 2 異常 → ()			()											
リンパ節		(44)頸部	1 正常 異常 → (2 右 3 左 4 両方)			()										
	(45)頸下	1 正常 異常 → (2 右 3 左 4 両方)			()											
	(46)腋窩	1 正常 異常 → (2 右 3 左 4 両方)			()											
	(47)鼠径	1 正常 異常 → (2 右 3 左 4 両方)			()											
(48)胸部レ線	1 正常 2 異常 9 検査なし			()												
(49)心電図	1 正常 2 異常 9 検査なし			()												
胸部レ線図 (特記事項)																
																

登録番号										受付No.																																																																																																																																																			
(1)種別	3	油 症 検 診 票				(2)受診者区分	1 認定 2 未認定	ア 初回 イ 保留 () 回	昭和 年度																																																																																																																																																				
(4)フリガナ					(6)性別	1 男 2 女	(7)生年月日	(3)整理No. -																																																																																																																																																					
(5)氏名	姓	名			旧姓 ()			1. 明治 2. 大正 3. 昭和 (歳) 年 月 日																																																																																																																																																					
(8)現住所	都道府県 市区町村 号 番地				主な職業		(9)現在: () (10)過去: ()																																																																																																																																																						
(11)検診月日	昭和 年 月 日	(12)検診場所	都道府県 市区町村																																																																																																																																																										
(13)タネミ油採取期間	昭和 年 月 日 ~ 年 月 日	(14)家族発生有無	(1 無 2 有)		あり () 名中 () 名認定																																																																																																																																																								
皮膚科 <table border="1"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>ランク</th> <th>無</th> <th>有</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(15)最近の化膿傾向</td> <td></td> <td>1</td> <td>2 → ()</td> </tr> <tr> <td>(16)最近の粉りゅう再発傾向</td> <td></td> <td>1</td> <td>2 → ()</td> </tr> <tr> <td>(17)かつての痤疮様皮疹</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>(18)かつての色素沈着</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>項目</td> <td>ランク</td> <td>-</td> <td>±</td> <td>+</td> <td>++</td> <td>+++</td> </tr> <tr> <td>黒 (19)顔面</td> <td>面</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>色 (20)耳介</td> <td>介</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>面 (21)軀幹</td> <td>幹</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>斑 (22)その他:</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>座 (23)顔面</td> <td>面</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>瘡 (24)外陰部</td> <td>部</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>疥 (25)背脊部</td> <td>部</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>皮 (26)軀幹</td> <td>幹</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>疹 (27)その他:</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>皰 (28)顔面</td> <td>面</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>瘡 (29)軀幹</td> <td>幹</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>化 (30)その他:</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>色 (31)顔面</td> <td>面</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>素 (32)手指</td> <td>爪</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>沈 (33)趾趾</td> <td>爪</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>着 (34)その他:</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>(35)爪変形</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table> 												項目	ランク	無	有	(15)最近の化膿傾向		1	2 → ()	(16)最近の粉りゅう再発傾向		1	2 → ()	(17)かつての痤疮様皮疹		1	2	(18)かつての色素沈着		1	2	項目	ランク	-	±	+	++	+++	黒 (19)顔面	面	1	2	3	4	5	色 (20)耳介	介	1	2	3	4	5	面 (21)軀幹	幹	1	2	3	4	5	斑 (22)その他:		1	2	3	4	5	座 (23)顔面	面	1	2	3	4	5	瘡 (24)外陰部	部	1	2	3	4	5	疥 (25)背脊部	部	1	2	3	4	5	皮 (26)軀幹	幹	1	2	3	4	5	疹 (27)その他:		1	2	3	4	5	皰 (28)顔面	面	1	2	3	4	5	瘡 (29)軀幹	幹	1	2	3	4	5	化 (30)その他:		1	2	3	4	5	色 (31)顔面	面	1	2	3	4	5	素 (32)手指	爪	1	2	3	4	5	沈 (33)趾趾	爪	1	2	3	4	5	着 (34)その他:		1	2	3	4	5	(35)爪変形		1	2	3	4	5
												項目	ランク	無	有																																																																																																																																														
												(15)最近の化膿傾向		1	2 → ()																																																																																																																																														
												(16)最近の粉りゅう再発傾向		1	2 → ()																																																																																																																																														
												(17)かつての痤疮様皮疹		1	2																																																																																																																																														
												(18)かつての色素沈着		1	2																																																																																																																																														
												項目	ランク	-	±	+	++	+++																																																																																																																																											
												黒 (19)顔面	面	1	2	3	4	5																																																																																																																																											
												色 (20)耳介	介	1	2	3	4	5																																																																																																																																											
												面 (21)軀幹	幹	1	2	3	4	5																																																																																																																																											
												斑 (22)その他:		1	2	3	4	5																																																																																																																																											
												座 (23)顔面	面	1	2	3	4	5																																																																																																																																											
												瘡 (24)外陰部	部	1	2	3	4	5																																																																																																																																											
												疥 (25)背脊部	部	1	2	3	4	5																																																																																																																																											
												皮 (26)軀幹	幹	1	2	3	4	5																																																																																																																																											
疹 (27)その他:		1	2	3	4	5																																																																																																																																																							
皰 (28)顔面	面	1	2	3	4	5																																																																																																																																																							
瘡 (29)軀幹	幹	1	2	3	4	5																																																																																																																																																							
化 (30)その他:		1	2	3	4	5																																																																																																																																																							
色 (31)顔面	面	1	2	3	4	5																																																																																																																																																							
素 (32)手指	爪	1	2	3	4	5																																																																																																																																																							
沈 (33)趾趾	爪	1	2	3	4	5																																																																																																																																																							
着 (34)その他:		1	2	3	4	5																																																																																																																																																							
(35)爪変形		1	2	3	4	5																																																																																																																																																							
(特記事項)																																																																																																																																																													

登録番号				受付No				
(1)種別	4	油 症 検 診 票		(2)受診者区分	1 認 定 2 未認定	ア 初 回 イ 保 留 () 回	昭和 年度 (3)整理No	
(4)フリガナ				(6)性 別	1 男 2 女	(7)生 年 月 日	1. 明治 2. 大正 3. 昭和 (歳) 年 月 日	
(5)氏 名	姓 名			(8)現 住 所	都道府県 市区町村 号 番地		主な 職業	
				電話: ()		(9)現在: () (10)過去: ()		
(11)検診月日	昭和 年 月 日		(12)検診場所	都道府県 市区町村				
(13)カネミ油採取期間	昭和 年 月 日 - 年 月 日		(14)家族発生有無	(1 無 2 有) () 名中 () 名認定				
眼 科	項目			ランク				
	主 訴 (15)眼 脂 過 多			1	2	3	4	5
	他 (16)眼 瞼 浮 腫			1	2	3	4	5
	覚 (17)眼 瞼 結 膜 色 素 沈 着			1	2	3	4	5
	所 (18)瞼 板 腺 囊 胞 形 成			1	2	3	4	5
見	(19)瞼板腺チーズ様分泌物圧出			1	2	3	4	5 9
(20)担当医師	(特記事項)							

登録番号										受付No.																															
(1)種別	5	油 症 検 診 票				(2)受診者区分	1 認定 2 未認定	ア 初回 イ 保留 () 回	昭和 年度																																
(4)フリガナ						(6)性別	1 男 2 女	(7)生年月日	(3)整理No. -																																
(5)氏 名	姓 名	田姓 ()				(6)性別	1 男 2 女	(7)生年月日	1.明治 2.大正 3.昭和 (歳) 年 月 日																																
(8)現住所	都道府県 市区町村		号 番 地		主な職業		(9)現在: (10)過去:																																		
(11)検診月日	昭和 年 月 日	(12)検診場所		都道府県 市区町村																																					
(13)カネミ油採取期間	昭和 年 月 日 ~ 年 月 日まで	(14)家族発生有無		(1 無 2 有) 名中 名認定)																																					
(15)主訴		1 無 2 有 → 1 歯 痛 2 歯肉出血 3 排 膿 4 歯肉腫脹 5 歯牙挺出感 6 色素沈着 7 その他 ()				該当番号を左づめて記入すること 																																			
歯 科 所 見	項 目		部 位		部位の左肩番号を左づめて記入すること (以下⑦まで同様)																																				
	(16)歯 肉 炎		1 無 2 有		1 7 ~ 4 2 3 ~ 3 3 4 ~ 7																																				
	(17)辺 縁 性 歯 周 炎		1 無 2 有		1 7 ~ 4 2 3 ~ 3 3 4 ~ 7																																				
	(18)歯 牙 萌 出 異 常 (乳歯疎離残存、永久歯出遅延)		1 無 2 有		1 7 ~ 4 2 3 ~ 3 3 4 ~ 7																																				
	(19)歯 牙 着 色		1 無 2 有		1 7 ~ 4 2 3 ~ 3 3 4 ~ 7																																				
	(20)歯 牙 形 成 不 全		1 無 2 有		1 7 ~ 4 2 3 ~ 3 3 4 ~ 7																																				
	(21)咬 合 異 常		1 無 2 有		1 7 ~ 4 2 3 ~ 3 3 4 ~ 7																																				
	(22)そ の 他		1 無 2 有 → ()		1 7 ~ 4 2 3 ~ 3 3 4 ~ 7																																				
<table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr><td>E</td><td>D</td><td>C</td><td>B</td><td>A</td></tr> <tr><td>8</td><td>7</td><td>6</td><td>5</td><td>4</td></tr> <tr><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td></td><td></td></tr> </table> <table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr><td>A</td><td>B</td><td>C</td><td>D</td><td>E</td></tr> <tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr> <tr><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td></td><td></td></tr> </table>												E	D	C	B	A	8	7	6	5	4	3	2	1			A	B	C	D	E	1	2	3	4	5	6	7	8		
E	D	C	B	A																																					
8	7	6	5	4																																					
3	2	1																																							
A	B	C	D	E																																					
1	2	3	4	5																																					
6	7	8																																							
																																									
(29)担当医師																																									
色 素 沈 着 所 見	項 目		一 十 十 卅		部 位		性 状		1 ひまん性 2 斑状 3 点状 4 線状 5 萎 6 皸状 7 嚢腫		色 調 1 黒 2 咖啡 3 茶色 4 黄褐色 5 褐色 6 赤褐色 7 赤黒		(特記事項)																												
	(23)上 歯 肉		1 2 3 4 5		1 7 ~ 4 2 3 ~ 3 3 4 ~ 7																																				
	(24)下 歯 肉		1 2 3 4 5		1 7 ~ 4 2 3 ~ 3 3 4 ~ 7																																				
	(25)右頬粘膜		1 2 3 4 5																																						
	(26)左頬粘膜		1 2 3 4 5																																						
	(27)口 蓋 粘 膜		1 2 3 4 5																																						
	(28)上口唇粘膜		1 2 3 4 5																																						
	(29)下口唇粘膜		1 2 3 4 5																																						
(30)X 線 (パントモ)					1 無 2 有 → フィルム番号 ()																																				
(31)幼児・児童の印象採得					1 無 2 有																																				

登録番号		受付No.	
(1)種別	6 油 症 検 診 票	(2)受診者区分	1 認定 2 未認定
(4)フリガナ	(6)性別 1 男 2 女		
(5)氏名	(7)生年月日		
(8)現住所	(9)現在： (10)過去：		
(11)検診月日	(12)検診場所		
(13)カネミ油採取期間	(14)家族発生有無		
項目		成績	
血液特殊検査	(15)PCB濃度 (ppb)	(16)MCH (pg)	(17)MCHC (%)
(18)PCBハターン	(19)PCBパーセント比	(20)PCQ濃度 (ppb)	(21)総ビリルビン (mg/dl)
(22)尿蛋白	(23)尿糖	(24)尿血反応	(25)ウロビリノーゲン
(26)pH	(27)血沈 (mm)	(28)白血球数 ($\times 10^3/mm^3$)	(29)赤血球数 ($\times 10^4/mm^3$)
(30)血色素量 (g/dl)	(31)ヘマトクリット (%)	(32)MCV (μm^3)	(33)MCH (pg)
(34)MCHC (%)	(35)血小版数 ($\times 10^4/mm^3$)	(36)GOT	(37)GPT
(38)総蛋白 (g/dl)	(39)アルブミン (g/dl)	(40)A/G	(41)クンケル
(42)チモール	(43)アルフォス	(44)LAP	(45) γ -GTP
(46)コリンエステラーゼ	(47)LDH	(48)CPK	(49)コレステロール (mg/dl)
(50)HDLコレステロール (mg/dl)	(51)中性脂肪 (mg/dl)	(52) β リポ蛋白 (mg/dl)	(53)尿酸素 (mg/dl)
(54)クレアチニン (mg/dl)	(55)尿酸 (mg/dl)	(56)Na (mEq/l)	(57)K (mEq/l)
(58)Ca (mg/dl)	(59)無機リン (mg/dl)	(60)アミラーゼ	(61)血糖 (mg/dl)
(62)HbS抗原	(63)AFP (mg/ml)	(64)採血時刻	(65)採血時は食後の
(1-2-3+)	(1.3時間前)	(2.3時間以後)	

福岡医学雑誌投稿規定

1. 本誌に掲載する論文等は、原則として原著論文、解説、症例報告、学会報告とする。
2. 原著論文は、和文の場合は英文抄録、はじめに、実験方法、実験結果、考察、総括または結論、謝辞、文献の順とし、英文の場合は、Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, の順で記すものとする。ただし、短報の場合は、この区別をつけなくともよい。図、表の標題、説明文は、英文とすることが望ましい。
3. 和文原著には英文の抄録を、欧文原著には和文抄録を付けることとし、それぞれ本誌印刷1ページ以内とする。
4. 和文は現代かなづかい、平がなまじりの横書きとする。外国語は typewriter を使用するか、あるいは block letter で鮮明に記すことが必要である。
5. 数字は算用数字を用い、度量衡の単位は、cm, mm, μm , nm, g, mg, μg , ng, ml, dl, μl , cm^2 など、一般的に用いられる略字を使用する。
6. 原稿の第1ページには、標題、著者の所属（必要あれば指導者名付記）、著者名のみを記し、別刷所要部数を赤で付記する。ランニングタイトルを20字以内（欧文の場合は40文字以内）で鉛筆で付記する。
7. 引用した文献は末尾に一括して、番号を付けて記載し、その順序は第一著者名の alphabet 順とし、同一著者が続く場合は次の著者の alphabet 順とする。記載の形式は次の例による。
 - 1) 雑誌の場合：著者名。論文表題。雑誌名。巻：最初最終頁、発行年。とする。
著者の first and middle name の省略のピリオドは用いない。
(例) Hatch TP, Miceli M and Silverman JA: Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. J. Bacteriol. 162: 938-942, 1985.
(例) 神村英利, 吉村英敏: 油症原因物質の排泄促進, 福岡医誌 78: 266-280, 1987.
 - 2) 単行本の場合：著書名。書名。第何版。引用頁。発行社。発行地。発行年。
(例) Bloom W and Fawcett DW: A Textbook of Histology 10th ed. pp. 179-227, Saunders Co. Philadelphia, 1975.
 - 3) 分担執筆の場合：著書名。章の表題。編者。書名。第何版。最初最終頁。発行社。発行地。発行年。
(例) Yamada Y: Fat-storing cells. In Yamakawa I (ed): Structure and Function of the Liver. 1st ed. pp. 188-202, Nanzando Tokyo, 1980.
8. 写真原稿は鮮明なものでなければならない。凸版の原稿が不備の場合は trace 料、写植料などの清書費用を別に必要とする。表は1ページに組める大きさであることを要する。
9. 定期号のほかに補冊を刊行することがある。教室論文集などを補冊として発行することの可否は幹事会で決定する。
10. 本誌に掲載する論文は、編集会議で承認を得たものに限る。原稿の受付は福岡医学雑誌編集室（医学旧図書館2階）で行う。
編集幹事：天児和暢（細菌）、後藤幾生（神経内科）、小橋 修（細菌）、中山文夫（1外科）、
中山宏明（口腔細菌）
編集委員：猪俣 孟（眼科）、栗山 熙（薬理）、居石克夫（1病理）、仁保喜之（1内科）

平成元年5月25日発行

発行所 福岡医学学会

〒812 福岡市東区馬出3丁目1番1号（九州大学医学部内）

TEL 代表 641-1151 内線 7516

（日本出版協会準会員番号 B211042 振替福岡 5-2233）

編集兼発行者 天 児 和 暢

印刷所 秀巧社印刷株式会社
福岡市南区向野2丁目13-29