

昭和29年11月5日第三種郵便物認可
平成3年5月25日（毎月25日発行）
第836号

Vol. 82 No. 5
May 1991

CODEN : FKIZA4
ISSN 0016-254X

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

第 82 卷 第 5 号 (836)

平成 3 年 5 月 25 日

特 集 号

油 症 と PCB

研 究 報 告 第 13 集

The Thirteenth 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 13 集

(福岡医学雑誌 第82巻 第5号 平成3年5月)

目 次

1. 序 言倉恒 匡徳…189
2. 2,5,2',5'-Tetrachlorobiphenyl とその主代謝物3-Hydroxy-2,5,2',5-tetrachlorobiphenyl のラットに対する毒性評価埴岡 伸光・佐伯和枝エレーナ
石田 忠三・古賀 伸幸・吉村 英敏…191
3. 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-*a*-dioxin のラットにおける急性毒性、肝酵素誘導作用及び肝への分布古賀 伸幸・黒木 淳・中嶋 寛
黒木 (外間) 由美子・吉村 英敏・黒木 広明・増田 義人…197
4. Ah 応答性系統と Ah 非応答性系統のマウスの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 の作用長山 淳哉・和田 健一・原口 浩一
増田義人・半田 純雄…207
5. 塩素化合物 (Trichlorosalicylanilid, 4-Chloro-*m*-Cresol, Trichlorophenoxyacetic acid, Trichloroethanol, Trichloromethiazide, Trichlorofon, Trichloroacetaldehyde) と低濃度 Griseofulvin のポルフィリン代謝に対する複合作用 (英文)塚崎 直子・野中 薫雄
大神 太郎・入船 弘子・田中 敬一・矢野 光政・吉田彦太郎…215
6. ヒトリンパ球の姉妹染色分体交換誘発性に対する有機塩素系化学物質の作用長山 淳哉・長山 真弓・和田 健一・飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦・増田 義人…221
7. PCDF の pUC18 Plasmid DNA に及ぼす影響堀 真・鶴殿 雅子
豊島 弘行・広瀬 寮二・吉田彦太郎…228
8. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) および2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (PCDF) の PLC/PRF/5 細胞増殖に対する影響
—Ursodeoxycholic Acid, 茵蔯五苓散, 小柴胡湯の PCBs, PCDF 毒性抑制効果について—(英文)松岡 一忠・野中 薫雄・大神 太郎 吉田彦太郎・村山 史男…232
9. 発癌過程における表皮細胞の PCDF による変化の検討広瀬 寮二・堀 真
豊島 弘行・宿輪 哲生・鶴殿 雅子・吉田彦太郎…240
10. 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ラットへの経口投与による発癌性西住 昌裕…246
11. Polychlorinated biphenyls (PCBs) 及びその関連化学物質と発癌
—とくに肺癌との関連を中心に—中西 洋一・重松 信昭…251
12. 歯周組織に及ぼす PCB の影響に関する免疫組織学的ならびに病理組織学的検索橋口 勇・赤峰 昭文・宮武 祥子・阿南 壽・前田 勝正
青野 正男・福山 宏・奥村 英彦…256
13. 台湾 PCB 中毒患者の血液中 PCDF 及び PCB の濃度減衰増田 義人・黒木 広明
原口 浩一・John Jake Ryan・許 書刀…262

14. PCB メチルスルホン：バルト海アザラシと油症患者組織における残留成分の比較	原口 浩一・増田 義人・Åke Bergman・Mats Olsson	269
15. 油症患者及び対照者の皮下脂肪組織中の Coplanar PCBs, PCDFs 及び PCDDs	平川 博仙・松枝 隆彦・飯田 隆雄 深町 和美・高橋 克巳・長山淳哉・永田 武明	274
16. PCB 及びその関連化合物体内残留濃度の油症診断への適用に関する研究	中川 礼子・高橋 克巳	280
17. 油症患者および長崎県在住健常人の血液，毛髪中 PCBs, PCQs 濃度の比較検討 (英文)	大神 太郎・野中 薫雄・入船 弘子・渡辺 雅久 塚崎 直子・田中 敬一・矢野 光政・吉田彦太郎・村山 史男・力岡 有二	295
18. スクアランのビーグル犬における 2 週間経口投与による残留性経験	神村 英利・瀬上 勝野・井上 秀顕・児玉 龍平・吉村 英敏	300
19. 米ぬか繊維及びコレステラミン投与ラットにおける消化管内 PCBs の濃度推移	檜崎 幸範・森田 邦正・深町 和美・常盤 寛・高橋 克巳	305
20. 米ぬかファイバーおよびコレステラミンを用いたラット糞便中への PCB 排泄促進	竹中 重幸・森田 邦正・高橋 克巳	310
21. コレステラミン投与による油症原因物質の糞便中への排泄促進の試み	飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦・中川 礼子・竹中 重幸 森田 邦正・檜崎 幸範・深町 和美・常盤 寛・高橋 克巳・吉村 英敏	317
22. 油症患者的コレステラミンによる PCB 等の便中排泄促進 —内科的効果について—	村井宏一郎・辻 博・藤島 正敏	326
23. 油症における米ぬかファイバー・コレステラミン併用投与の予備的研究	辻 博・野見山顕介・池田 耕一・川床 利晴 蔡 剣平・藤島 正敏・高橋 克巳	330
24. 油症患者的血中 PCB 濃度と自覚症状の関連 —全国油症患者追跡検診結果の比較研究—	廣田 良夫・廣畑 富雄 片岡恭一郎・篠原 志郎・高橋 克巳	335
25. 油症患者的の眼症状（第 7 報）	向野 利彦・大西 克尚	342
26. 1989・1990 年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状	本房昭三・堀 嘉昭・利谷 昭治・旭 正一	345

The Thirteenth Reports of the Study on Yusho and PCB

(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 82, No. 5, 1991)

CONTENTS

1. ForewordM. Kuratsune...189
2. Toxicological Assessment of 2,5,2',5'-Tetrachlorobiphenyl and Its Major Metabolite, 3-Hydroxy-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in RatsN. Hanioka, H. K. Saeki, C. Ishida, N. Koga and H. Yoshimura...191
3. Acute Toxicity, Inductive Effects of Liver Enzymes and Distribution in the Liver of 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-*p*-dioxin in RatsN. Koga, J. Kuroki, H. Nakashima, Y. H. Kuroki, H. Yoshimura, H. Kuroki and Y. Masuda...197
4. Effects of 3-methylsulphonyl-4,5,3',4'-tetrachlorobiphenyl and 7,8-benzoflavone on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity in Ah Responsive and Ah Nonresponsive Strains of MiceJ. Nagayama, K. Wada, K. Haraguchi, Y. Masuda and S. Handa...207
5. The Synergistic Effect of Chlorinated Chemicals (Trichlorosalicylanilid, 4-Chloro-*m*-Cresol, Trichlorophenoxyacetic Acid, Trichloroethanol, Trichloromethiazide, Trichlorofon and Trichloroacetaldehyde) and Low Concentrations of Griseofulvin on Porphyrin MetabolismN. Tsukazaki, S. Nonaka, T. Ohgami, H. Irifune, K. Tanaka, M. Yano and H. Yoshida...215
6. The Effect of Organochlorine Compounds on the Induction of Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human LymphocytesJ. Nagayama, M. Nagayama, K. Wada, T. Iida, H. Hirakawa T. Matsueda and Y. Masuda...221
7. Influences of Polychlorinated Dibenzofuran on pUC18 Plasmid DNAM. Hori, M. Udonon, H. Toyoshima, R. Hirose and H. Yoshida...228
8. In Vitro Analysis of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (PCDF) Cellular Toxicity in PLC/PRF/5 Cell Proliferation—The Effect of Ursodeoxycholic Acid, Inchin-Gorei-San and Shou-Saiko-To on Cell Toxicity—K. Matsuoka, S. Nonaka, T. Ohgami, H. Yoshida and F. Murayama...232
9. A Study Epidermal Alterations Induced by PCDF on Experimental CarcinogenesisR. Hirose, M. Hori, H. Toyoshima, T. Shukuwa, M. Udonon and H. Yoshida...240
10. Carcinogenicity of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran and 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran When Given by Gavage to RatsM. Nishizumi...246
11. Carcinogenic Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Their Derivatives, Including Carcinogenicity to the LungY. Nakanishi and N. Shigematsu...251
12. Immunohistological and Histopathological Study of the Effect of PCB on the Periodontal TissueI. Hashiguchi, K. Akamine, S. Miyatake, H. Anan, K. Maeda, M. Aono, H. Fukuyama and H. Okumura...256
13. Elimination of PCDF and PCB Congeners in the Blood of Patients with PCB Poisoning in TaiwanY. Masuda, H. Kuroki, K. Haraguchi, J. J. Ryan and S. T. Shu...262

14. PCB Methyl Sulphone : Comparison of Tissue Levels in Baltic Grey Seals and Yusho PatientK. Haraguchi Y. Masuda, Å. Bergman and M. Olsson...269
15. Coplanar PCBs PCDFs and PCDDs in the Subcutaneous Adipose Tissue of the Yusho Patients and Normal ControlsH. Hirakawa, T. Matsueda, T. Iida, K. Fukamachi, K. Takahashi, J. Nagayama and T. Nagata...274
16. Studies on the Application of Residual PCBs, PCQs and PCDFs Concentrations to Yusho DiagnosisR. Nakagawa and K. Takahashi...280
17. A Comparative Study on the Concentrations of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Quaterphenyls (PCQs) in the Blood and Hair of "Yusho" Patients and Inhabitants of Nagasaki PrefectureT. Ohgami, S. Nonaka, H. Irifune, M. Watanabe, N. Tsukazaki, K. Tanaka, M. Yano, H. Yoshida, F. Murayama and Y. Rikioka...295
18. Studies on Distribution and Excretion of Squalane in Dogs Administered for 2 weeks.....H. Kamimura, K. Fuchigami, H. Inoue, R. Kodama and H. Yoshimura...300
19. Concentration Profile of PCBs in the Digestive Tract of Rat Fed Cholestyramine and Rice Bran Fiber DietY. Narazaki, K. Morita, K. Fukamachi, H. Tokiwa and K. Takahashi...305
20. Stimulation of the Fecal Excretion of Polychlorinated Biphenyls (KC-600) by Diets Containing Rice Bran Fiber and CholestyramineS. Takenaka, K. Morita and K. Takahashi...310
21. Therapeutic Trial for Promotion of Fecal Excretion of PCDFs and PCBs by the Administration of Cholestyramine in Yusho Patients.....T. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda, R. Nakagawa, S. Takenaka, K. Morita, Y. Narazaki, K. Fukamachi, H. Tokiwa, K. Takahashi and H. Yoshimura...317
22. Treatment of Yusho Patients with CholestyramineK. Murai, H. Tsuji and M. Fujishima...326
23. Effects of Rice Bran Fiber and Cholestyramine on Peripheral Blood Cells and Biochemical Parameters in YushoH. Tsuji, K. Nomiya, K. Ikeda, T. Kawatoko, J. P. Cai M. Fujishima and K. Takahashi...330
24. Associations between Blood PCB Level and Symptoms of Yusho Patients, Twenty Years after Outbreak.....Y. Hirota, T. Hirohata, K. Kataoka, S. Shinohara and K. Takahashi...335
25. Ocular Manifestations of Yusho 22 Years after the OnsetT. Kohno and Y. Ohnishi...342
26. Dermatological Findings in the Annual Examination of the Patients with Yusho in 1989-1990S. Honbo, Y. Hori, S. Toshitani and M. Asahi...345

序文

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
1991 年 3 月 31 日

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*

This 13th collection of reports of study on "Yusho" contains papers describing the results of studies conducted by the members of the Study Group during the past 2 years. All of these papers, I believe, are informative and useful for better understanding of this unique disease which was caused by ingesting a specific group of man-made chlorinated compounds. Our primary purpose is, of course, to find out therapeutic methods which can reduce polychlorinated biphenyls (PCBs) and dibenzofurans (PCDFs) and related compounds still persisting in the tissues of patients. For this purpose, a few clinical trials were for the first time made and are still in progress, testing the possible beneficial effect of oral administration of cholestyramine. In these studies, a precise analysis of each isomer of PCBs and PCDFs excreted into the feces of patients was needed and successfully conducted, demonstrating that a very long time, probably 50 years or so, would be needed for complete spontaneous elimination of PCDFs from the patient's body. These quite original findings together with other similarly interesting ones are included in this collection. We would appreciate any comment and advice of readers regarding our studies.

油症が発生してすでに 23 年が経過し、研究班の研究報告も第 13 集を数えるに至った。報告集は 2 年毎に刊行されるので、第 13 集も最近 2 年間の班員の研究成果を収録している。すなわち、本班を構成する九州大学油症治療研究班（班長：九州大学薬学部吉村英敏教授—1989 年、九州大学医学部堀嘉昭教授—1990 年以降）と長崎油症研究班（班長：長崎大学医学部吉田彦太郎教授）、ならびに油症患者が居住する都道府県の衛生部等が行ってきた最近の研究の成果が纏められている。研究は、従来どうり、つぎの 4 つの目的を達成するために行われてきた。

- 1) 患者の体内に残留している、毒性の高い塩化ジベンゾフラン（PCDFs）等の排泄を促進する方法の開発。
- 2) 患者の健康状態を把握するための検診の実施。
- 3) 患者のより良い健康管理方法の開発。
- 4) 上記の諸目的を達成するために必要な中毒の本態の究明。

これまで度々本研究班が報告してきたように、患者は極めて徐々に回復しているが、依然として正常人に比して異常に高濃度の PCDFs 等が体内に残留し、それを取り除くことが患者の健康のために最も大切なことであり、かつ急がれる。しかし、このことは、問題の性質上、本質的に大変困難な問題であり、未だに成功していない。本報告集はそうにして至難な問題に取り組んできた班員の汗の結晶の集積である。

上記のように、我々の抱えている問題は極めて困難な問題であるが、この 2 年間に、従来にない重要な成果を挙げたことも事実である。すなわち、これまで吉村英敏教授を中心に行われてきた研究により、squalane 投与が

もっとも有効であり、しかも毒性が少なく、臨床実験の可能性が強く示唆されたが、肝臓への残留性が比較的に高いことがその後判明し、どうしても臨床実験に踏み切ることができなかった。一方 chlordecone の体外排出に、cholestyramine が有効であることが報ぜられ、また同化合物が PCBs 等の排泄に有効であることが、吉村英敏教授等の動物実験によりすでに分かっていたので、九州大学油症治療研究班が油症患者の協力のもとに臨床実験を行った。しかし、残念ながら、その排出促進効果を確認することはできなかった。ただ米ぬかファイバーを摂取すると、cholestyramine の効果が強まることも分かったので、その臨床実験が現在行われている。このように、油症患者の協力のもとに、相次いで臨床実験が行われたことは、研究班が結成されて以来初めてのことであり、私は極めて意義深いことであると考えている。

さらにまた、これらの臨床実験を行うに当たり、糞便中の PCBs や PCDFs の排泄が異性体ごとに詳細に調べられ、油症患者の体内に蓄積しているこれらの有機塩素化合物の各異性体が自然に排泄される速度が、初めて確認された。これは人体内に取り込まれた PCBs や PCDFs が、糞便を通してどのような速度で排泄されるかを、異性体毎に詳細に調べた世界で最初の研究であり、この研究により、油症患者の体内に残留する PCDFs が自然に排泄されるためには、約 50 年を必要とすることも分かったのである。これらのことは、本研究班の最近の最も注目すべき研究成果であると思う。臨床実験がさらに発展することが強く期待される。また、本報告集を刊行するにあたり、広く識者の批判と問題解決のための助言を、改めてお願いする次第である。

なお、本研究報告集の編集は、九州大学油症治療研究班長堀嘉昭教授ならびに同班の本房昭三講師によって行われた。ご労苦に対し深く感謝いたします。

2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl とその主代謝物 3-Hydroxy-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl の ラットに対する毒性評価

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

埴岡 伸光・佐伯和枝エレーナ・石田 忠三

古賀 信幸*・吉村 英敏*

Toxicological Assessment of 2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl and Its Major Metabolite, 3-Hydroxy-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in Rats

Nobumitsu HANIOKA, Helena Kazue SAEKI, Chuzo ISHIDA

Nobuyuki KOGA and Hidetoshi YOSHIMURA

Department of Hygienic and Forensic Chemistry,

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62, Fukuoka 812

We observed previously that polychlorinated biphenyl (PCB) could be classified to two groups, 3-methylcholanthrene (MC)-type and phenobarbital (PB)-type, in term of inducibility of the hepatic enzymes. MC-type PCBs such as 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) and 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (HexCB) exhibited high acute toxicity in parallel with their induction ability of microsomal benzo[*a*]pyrene 3-hydroxylase and cytosolic DT-diaphorase. On the contrary, PB-type PCBs such as 2, 5, 2', 5'-TCB and 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HexCB which induce microsomal benzphetamine *N*-demethylase and NADPH-cytochrome P-450 reductase activities showed virtually no or very low toxicity.

In the present study, we examined effects of 2, 5, 2', 5'-TCB and its major metabolite 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB on body weight gain, organ weights and activities of hepatic enzymes in rats and assessed acute toxicity of these compounds. As the results, in both 2, 5, 2', 5'-TCB and 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB groups, the body weights were increased during the experiment, but the rate of growth was significantly suppressed after 3 days. Significant hypertrophy of the liver and decrease of total liver lipid content were observed in 2, 5, 2', 5'-TCB group, but the atrophy of spleen and thymus was not affected in both groups. On the other hand, in 2, 5, 2', 5'-TCB group, benzo[*a*]pyrene 3-hydroxylase and benzphetamine *N*-demethylase activities were increased to 2.4-fold and 1.5-fold, respectively, but were not increased in 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB group. After injection of 2, 5, 2', 5'-TCB, 45% of the dose was excreted as 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB in feces for 5 days. On the other hand, 40% of unchanged 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB was also excreted after injection of 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB for 2 days. These results suggest that 2, 5, 2', 5'-TCB possesses only low toxicity and its major metabolite, 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB is also an inactive metabolite.

結 言

Polychlorinated biphenyl (PCB) は、油症の原因物質の一つであるとともに世界的な環境汚染物質でもあ

る。当教室では油症発生以来、PCBの毒性発現機構の解明、あるいは環境汚染物質としての毒性評価のため、PCBおよびその類縁化合物の毒性学的検討を種々行ってきた。その一環としてのラットおよびマウスを用いた単一PCBの実験より、PCBはその塩素置換位置により、肝薬物代謝酵素系の誘導の性質が異なる、

* 現在 中村学園大学家政学部食物栄養学科

3-methylcholanthrene (MC) 型と phenobarbital (PB) 型に大別できることを報告した¹⁰⁾。すなわち, 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB), 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (HexCB) に代表される MC 型 PCB は, 肝ミクロゾームの benzo[a]pyrene 3-hydroxylase や可溶性画分の DT-diaphorase を誘導し, 他方, 2, 5, 2', 5'-TCB, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HexCB に代表される PB 型 PCB は, 肝ミクロゾームの benzphetamine *N*-demethylase および NADPH-cytochrome P-450 reductase などを誘導することが明らかとなった。さらに, 体重増加抑制, 肝肥大, 脾臓および胸線の萎縮などの急性毒性は, これらの PCB のうち MC 型にのみ強く発現し, その強度は肝臓で誘導されてくる benzo[a]pyrene 3-hydroxylase および DT-diaphorase 活性の誘導の強さときわめてよい相関性を有することも明らかとなった⁹⁾¹⁵⁾。

一方, 当教室では油症の原因物質である Kanechlor 400 (KC-400) の主成分の一つ 2, 4, 3', 4'-TCB の代謝と毒性に関して検討を行い, その主代謝物として 5-hydroxy-2, 4, 3', 4'-TCB を, また副代謝物の一つとして 3-hydroxy-2, 4, 3', 4'-TCB をラット糞中より単離同定し, かつマウスでの 5-hydroxy-2, 4, 3', 4'-TCB の急性毒性は, 母化合物のそれに比べ約 5 倍強いことを見出した⁸⁾¹²⁾。さらに, KC-400 の一成分である 3, 4, 3', 4'-TCB の代謝と毒性についても検討を行い, 5-hydroxy-3, 4, 3', 4'-TCB および 4-hydroxy-3, 5, 3', 4'-TCB が主代謝物として糞中に排泄され, ラットではいずれの代謝物も解毒的代謝物であることも報告してきた¹⁴⁾。また, 2, 5, 2', 5'-TCB についても当教室で, ラットでは 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB が主代謝物として糞中に排泄されることを明らかにしている¹³⁾。Stadnicki と Allen は 2, 5, 2', 5'-TCB の中間代謝物である 3, 4-epoxy-2, 5, 2', 5'-TCB および微量代謝物の 4-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB の毒性について検討し, HeLa 細胞および L-929 細胞を用いた培養細胞系において, これら代謝物は母化合物よりも強い毒性を示すことを報告している⁷⁾。しかし, 2, 5, 2', 5'-TCB の主代謝物である 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB の毒性に関しての報告はなく, この代謝物の毒性が母化合物より強いのか否かについてはまだ明らかにされていない。

そこで本研究では, ラットでの 2, 5, 2', 5'-TCB とその主代謝物 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB の毒性を明らかにするためこれら化合物をラットに投与し, 5 日目における急性毒性を体重増加抑制, 臓器重量および肝

酵素誘導能を指標として母化合物の毒性と比較した。

実 験 方 法

1. 実験材料

2, 5, 2', 5'-TCB は, Hutzinger ら³⁾の方法(Ullmann 反応)に従って合成した。3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB は, 吉村ら¹³⁾の方法に従い, ラットの糞中より単離精製した。3-hydroxy-benzo[a]pyrene は, 九州大学医療技術短期大学部木下洋夫教授より, また benzphetamine-HCl は Upjohn Company より供与された。NADPH および NADP は協和発酵工業(東京)より, glucose-6-phosphate (G-6-P, 2 Na 塩) および dicumarol は和光純薬(大阪)より, G-6-P dehydrogenase は Sigma Chemical Company (米国, St. Louis)より, 2, 6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) は Merck AG (西ドイツ, Darmstadt)より購入した。

2. 薬物投与

Wistar 系雄性ラット(4 週齢, 体重 100~120 g)を 1 群 4 匹として計 3 群に分け, 対照群, 2, 5, 2', 5'-TCB 投与群 (240 mg/kg) および 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB 投与群 (253 mg/kg) とした。両者の投与量は等モル (0.82 mmol) となるようにした。2, 5, 2', 5'-TCB および 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB は各投与量をコーン油 2 ml に溶かし, 1 回腹腔内投与した。対照群にはコーン油のみを投与した。ラットは投与後, 5 日目に屠殺した。なお, 屠殺前 12 時間は絶食させた。

3. 肝 9,000×g 上清の調製法

ラットを屠殺後, 充分放血させ, 肝臓, 脾臓および胸腺を摘出し秤量した。肝臓は既報¹⁶⁾に準じ, ホモジネート, さらに 9,000×g 上清を調製し, 酵素溶液とした。

4. 酵素活性などの測定

Cytochrome P-450 (P-450) 含量の測定は, Matsubara⁹⁾の方法に従って行った。Benzo[a]pyrene 3-hydroxylase 活性⁶⁾および benzphetamine *N*-demethylase 活性¹⁵⁾は, それぞれ 3-hydroxybenzo[a]pyrene および HCHO の生成により, DT-diaphorase 活性は, Ernster ら¹⁾の方法により, DCPIP の還元により求めた。肝総脂質の定量は Folch ら²⁾の方法により, また蛋白の定量は Lowry ら⁴⁾の方法により行った。

実 験 結 果

1. 急性毒性

Fig. 1 に各群投与後 4 日目までの体重増加の経日変化を示す。対照群に比較して、2, 5, 2', 5'-TCB 投与群および 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB 投与群ともに 3 日目から有意な体重増加抑制が認められ、特に 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB 投与群の 1 日目の体重は、投与時の体重よりむしろ減少した。

Table 1 にはコーン油、2, 5, 2', 5'-TCB および 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB 投与後 5 日目の 100 g 体重当りの肝臓、脾臓および胸腺の湿重量および肝臓 1 g あたりの総脂質量の変化を示す。肝臓は 2, 5, 2', 5'-

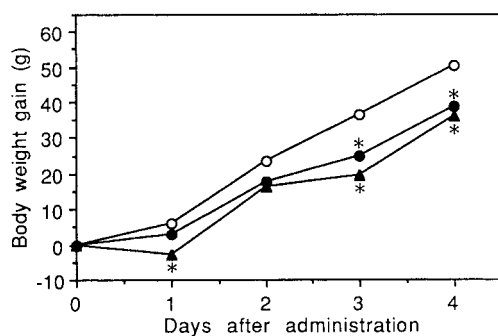


Fig. 1 Effect of 2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl and 3-Hydroxy-2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl on Body Weight Gain of Rats. Open circle, closed circle and closed triangle represent the mean of body weight gain of rats injected with corn oil, 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl and 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl, respectively. *Significantly different from the control group ($p < 0.05$).

TCB 投与群で対照群の約 1.1 倍に肥大した。また肝総脂質量は 2, 5, 2', 5'-TCB 投与は対照群に比べ有意に減少した。これに対し、脾臓および胸腺の重量は各群になんら差は認められなかった。

2. 肝酵素誘導作用

Table 2 に P-450 含量および各酵素活性を示す。2, 5, 2', 5'-TCB 投与群では benzo[a]pyrene 3-hydrox-

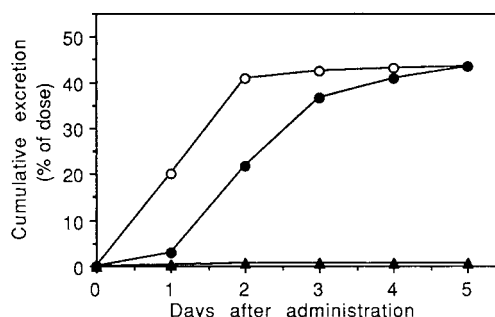


Fig. 2 Cumulative Fecal Excretion of 2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl and 3-Hydroxy-2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl in Rats Injected with 2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl or 3-Hydroxy-2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl. Cumulative excretion of 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl and 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in rats injected with 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl is shown as closed circle and triangle, respectively, and that of 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl after injection of 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl is shown as open circle. Each point represents the mean of 4 rats.

Table 1 Effect of 2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl and 3-Hydroxy-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl on Organ Weight and Liver Lipid Content in Rats

	Organ weight (g/100 g body weight)			Total lipid (mg/g liver)
	Liver	Spleen	Thymus	
Control (n=4)	3.80±0.08 (100)	0.478±0.044 (100)	0.371±0.019 (100)	47.6±1.2 (100)
2, 5, 2', 5'-TCB (n=4)	4.19±0.10* (110)	0.455±0.012 (95)	0.350±0.037 (94)	40.4±0.9* (85)
3-Hydroxy- 2, 5, 2', 5'-TCB (n=4)	4.02±0.10 (106)	0.471±0.068 (99)	0.318±0.021 (86)	44.3±1.7 (93)

Each value represents the mean±S. E. M. of 4 rats, and those of in parentheses are relative ratio to the control.

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

Table 2 Effect of 2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl and 3-Hydroxy-2, 5, 2', 5'-Tetrachlorobiphenyl on Liver Enzyme Activity and Cytochrome P-450 Content in Rats

	Benzo[<i>a</i>]pyrene 3-hydroxylase ^a	DT-diaphorase ^a	Benzphetamine N-demethylase ^b	Cytochrome P-450 content ^c
Control (n=4)	10.5 ± 3.0 (100)	0.290 ± 0.024 (100)	0.882 ± 0.076 (100)	0.117 ± 0.008 (100)
2, 5, 2', 5'-TCB (n=4)	24.8 ± 2.8* (236)	0.278 ± 0.016 (96)	1.301 ± 0.045* (147)	0.108 ± 0.003 (92)
3-Hydroxy- 2, 5, 2', 5'-TCB (n=4)	8.52 ± 1.74* (81)	0.335 ± 0.071 (122)	0.871 ± 0.073* (99)	0.099 ± 0.05 (85)

^a μmol 2, 6-dichlorophenolindophenol reduced/min/mg protein.^b nmol metabolite formed/min/mg protein.^c nmol/mg protein.Each value represents the mean $\pm$ S. E. M. of 4 rats, and those in parentheses are relative ratio to the control.* Significantly different from the control group ($p < 0.05$).* Significantly different from the 2, 5, 2', 5'-TCB group ($p < 0.05$).

ylase および benzphetamine *N*-demethylase 活性はそれぞれ対照群の 2.4 倍および 1.5 倍と有意な誘導が認められた。また、これらの値は 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB 投与群の値ともそれぞれ有意に大きかった。これに対し、DT-diaphorase 活性および P-450 含量は各群に有意な差は認められなかった。

3. 糞中排泄

Fig. 2 に 2, 5, 2', 5'-TCB 投与群の未変化体 2, 5, 2', 5'-TCB および 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB の糞中排泄率および 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB 投与群の未変化体 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB の糞中排泄率を示す。2, 5, 2', 5'-TCB 投与ラットからの 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB の排泄は速やかで投与量の約 45% が 5 日間で排泄されたのに対し、未変化体 2, 5, 2', 5'-TCB は 1% しか排泄されなかった。一方、3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB 投与ラットからの未変化体の排泄も極めて速やかで 2 日目までに投与量の約 40% が排泄された。

考 察

ラットでは肝ミクロゾームの benzo[*a*]pyrene 3-hydroxylase 活性および肝可溶性酵素の DT-diaphorase 活性の誘導の強さと急性毒性指標としての脾臓および胸腺の萎縮の程度がきわめてよく相関するという当教室の知見から、本研究では、油症の原因物質である KC-400 の一成分 2, 5, 2', 5'-TCB およびその主代謝物である 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB をラットに投与し、それらの急性毒性と肝酵素誘導作用を追跡

した。その結果、いずれの投与群も 3 日目からわずかながら体重増加抑制が観察されたが、脾臓および胸腺の萎縮は認められなかった。一方、3, 4, 3', 4'-TCB などの MC 型誘導能を示す多塩素化芳香族炭化水素により顕著に増加する benzo[*a*]pyrene 3-hydroxylase 活性は 2, 5, 2', 5'-TCB 投与群で 2.4 倍に増加したが、この程度の増加は PB 型でも認められる範囲のものである。これに対し、3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB では本活性の増加はなく、母化合物と有意な差を示した。一方、MC 型 PCB で誘導される DT-diaphorase 活性に対しては、有意な増加は認められなかった。また、benzphetamine *N*-demethylase 活性は PB 型 PCB によって顕著に誘導されることが知られているが、今回の投与量では 2, 5, 2', 5'-TCB 投与群のみ 1.5 倍誘導されたにすぎず、3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB 投与群では有意な誘導はみられなかった。2, 5, 2', 5'-TCB を投与したラットからは 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB が 5 日目までに約 45% 糞中に排泄され、また 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB を投与した場合、約 40% が 2 日目までに未変化体として糞中に排泄され、いずれの化合物も速やかに排泄されることが明らかとなった。以上のようにより 2, 5, 2', 5'-TCB の主代謝物 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB はいずれの毒性のパラメータにおいても対照群と有意な違いは観察されず、解毒的代謝物であることが示唆された。一方、2, 5, 2', 5'-TCB はかなり代謝されやすい KC-400 成分であり、また肝肥大、体重増加抑制および benzo[*a*]pyrene の誘導が軽度認められ

たものの、MC 型の PCB のような顕著な変化は観察されず、毒性の低い PCB であることが示された。

Yamamoto と Yoshimura⁸⁾ は、2, 5, 2', 5'-TCB と同様 PB 型 PCB とされている 2, 4, 3', 4'-TCB の主代謝物 5-hydroxy-2, 4, 3', 4'-TCB がマウスで母化合物より約 5 倍強い急性毒性を示すことを LD₅₀ により明らかにしている。さらに吉村ら¹¹⁾ は、MC および PB 前処理マウスにおける 2, 4, 3', 4'-TCB の急性毒性について検討し、MC 前処理により 2, 4, 3', 4'-TCB の毒性は一層増加し、これに対し、PB を前処理することにより毒性は減弱されることを報告している。そしてこの現象について MC は 2, 4, 3', 4'-TCB の代謝を強く促進し、高毒性代謝物の生成を増加させるのに対し、PB はほとんどこの効果をもたず、さらに PB が利胆剤として働いているため、高毒性フェノール体の胆汁中排泄を促進しているのではないかと推論している。

先にも述べたように 2, 5, 2', 5'-TCB とその中間代謝物 3, 4-epoxy-2, 5, 2', 5'-TCB および微量代謝物 4-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB の毒性が培養細胞系で検討されており、これら代謝物は母化合物に比べより強い毒性を示し、活性代謝物であることが報告されている⁷⁾。これらの知見、並びに前述の 3, 4, 3', 4'-TCB についての知見¹⁴⁾ を考えると高毒性の coplanar PCB では解毒的に代謝され、non-coplanar PCB の代謝では毒性化が起こるのではないかと推定されていた。しかし今回の結果からは主代謝物 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB はラットにおいて解毒的代謝物であることが示され、必ずしも上記の推定は正しくないことが確認された。またラットに 2, 5, 2', 5'-TCB を投与すると 5 日目までに投与量の約 45% が 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB として糞中に排泄され、2, 4, 3', 4'-TCB に比べきわめて代謝されやすいことから 2, 5, 2', 5'-TCB の毒性が低いことが考えられる。

総 括

2, 5, 2', 5'-TCB とその主代謝物 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB の毒性評価をラットを用いて行った。投与量は 2, 5, 2', 5'-TCB は 240 mg/kg、3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB は 253 mg/kg とし、投与後 5 日目の毒性と肝酵素活性を追跡し、次のような知見を得た。

1) いずれの投与群においても 3 日目から有意な体重増加抑制が観察された。また、2, 5, 2', 5'-TCB 投与群では対照群に比べ、肝肥大および総脂質量の低下が認められたが、3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB 投与群では臓器重量および肝総脂質量に有意な差はみられなかつ

た。

2) Benzo[*a*]pyrene 3-hydroxylase 活性および benzphetamine *N*-demethylase 活性の有意な増加は 2, 5, 2', 5'-TCB 投与群でのみ認められたがその増加率は顕著なものではなかった。

3) 2, 5, 2', 5'-TCB は 5 日目までに約 45% が 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB として、また 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB は 2 日目までに未変化体として約 40% が糞中から検出され、いずれの化合物も速やかに排泄された。

4) 上記結果から、2, 5, 2', 5'-TCB の主代謝物 3-hydroxy-2, 5, 2', 5'-TCB は解毒的代謝物であることが明らかになった。

文 献

- 1) Ernster L, Danielson L and Ljunggren M: DT diaphorase I. Purification from the soluble fraction of rat liver cytoplasm and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 58: 171-188, 1962.
- 2) Folch J, Lees M and Stanley GHS: Isolation and purification of total lipids from tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509, 1957.
- 3) Hutzinger O, Safe S and Zitko V: Polychlorinated biphenyls. Synthesis of some individual chlorobiphenyls. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 6: 209-219, 1971.
- 4) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 5) Matsubara T, Koike M, Tsuchi A, Tochino Y and Sugeno K: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Anal. Biochem.* 75: 596-603, 1976.
- 6) Nebert DW and Gelboin HV: Substrate inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. *J. Biol. Chem.* 243: 6242-6249, 1968.
- 7) Stadnicki SS and Allen JR: Toxicity of 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl and its metabolites, 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl-3, 4-oxide and 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl-4-ol to cultured cells *in vitro*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 788-796, 1979.
- 8) Yamamoto H and Yoshimura H: Metabolic studies on polychlorinated biphenyls. III. Complete structure and acute toxicity of the metabolites of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 21: 2237-2242, 1973.
- 9) 吉原新一, 永田 清, 和田郁夫, 古賀信幸, 吉村英敏: 3-Methylcholanthrene 型 PCB による肝酵

素誘導作用と毒性発現について。福岡医誌 74 : 209-216, 1983.

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

11) 吉村英敏, 山本弘明, 木下春喜: PCB の代謝に関する研究 (第6報). 2, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニルの代謝と急性毒性との関連性について。福岡医誌 66 : 549-554, 1975.

12) Yoshimura H, Yamamoto H and Saeki S: Metabolic studies on polychlorinated biphenyls. II. Metabolic fate of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl in rats. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 21 : 2231-2236, 1973.

13) 吉村英敏, 山本弘明, 米沢和明: PCB の代謝に

関する研究 (第7報). 2, 5, 2', 5'-テトラクロロビフェニルのラットにおける代謝。福岡医誌 66 : 555-562, 1975.

14) Yoshimura H, Yonemoto Y, Yamada H, Koga N, Oguri K and Saeki S: Metabolism *in vivo* of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats. Xenobiotica 17 : 897-910, 1987.

15) 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.

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

1, 2, 3, 7, 8-Pentachlorodibenzo-*p*-dioxin のラットにおける 急性毒性, 肝酵素誘導作用及び肝への分布

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

古賀 信幸*・黒木 淳・中嶋 寛

黒木 (外間) 由美子・吉村 英敏*

第一薬科大学物理分析学教室

黒木 広明・増田 義人

Acute Toxicity, Inductive Effects of Liver Enzymes and Distribution in the Liver of 1, 2, 3, 7, 8-Pentachlorodibenzo-*p*-dioxin in Rats

Nobuyuki KOGA, Jun KUROKI, Hiroshi NAKASHIMA,
Yumiko HOKAMA-KUROKI and Hidetoshi YOSHIMURA

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University 62, Fukuoka 812*

Hiroaki KUROKI and Yoshito MASUDA

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

Acute toxicity, inductive effects of liver enzymes and liver persistency of 1, 2, 3, 7, 8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (PenCDD) were compared with those of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) using male Wistar rats.

1, 2, 3, 7, 8-PenCDD treatment at a dose of 0.1 μ mol/kg resulted in significant depression of growth of rats from a day to 28 days after treatment. However, the effect was relatively less than that of 2, 3, 7, 8-TCDD. On 5 days, similarly to 2, 3, 7, 8-TCDD-treated group, liver hypertrophy and thymic atrophy were observed in 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD-treated groups. In addition, 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD showed potent 3-methylcholanthrene-type inducing ability. For example, the activities of benzo(a)pyrene 3-hydroxylase and DT-diaphorase were 25-fold and 10-fold of control, respectively. On 30 days, about 50% of the inductive effects on 5 days were maintained in both 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD- and 2, 3, 7, 8-TCDD-treated groups. Amount of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD distributed to the liver on 5 days was about 80-90% of dose and was about 1.5 times greater than that of 2, 3, 7, 8-TCDD. About 50% of dose of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD remained even on 30 days after treatment.

From these results, it is suggested that 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD possessing the potent acute toxicity comparable to 2, 3, 7, 8-TCDD and higher persistency in the liver might be more important than 2, 3, 7, 8-TCDD in terms of the chronic toxicity.

はじめに

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) は, polychlorinated biphenyls (PCBs) 及び polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) とともに世界的環境汚

染物質として知られているが, 中でも 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は人工的産物として最強の毒性を有するといわれる¹⁴⁾.

McConnell ら⁹⁾ は 2, 3, 7, 8-TCDD に加え, 2, 3, 7, 8-TCDD の 1 位にさらに 1 個塩素置換された 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD の LD₅₀ 値がモルモットで 3.1 μ g/kg, マウスで 338 μ g/kg であり, 2, 3, 7, 8-TCDD の LD₅₀ 値

* 現在 中村学園大学家政学部食物栄養学科

(モルモット, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$; マウス, 284 $\mu\text{g}/\text{kg}$) に匹敵するほどの強い毒性を示すことを報告している。また, Bradlaw と Casterline²⁾ は, これらのラット hepatoma cell における benzo(a)pyrene (BP) 3-水酸化活性の誘導能について調べ, 2,3,7,8-TCDD を 100 とした場合, 1,2,3,7,8-PenCDD は 1.9~23 にすぎないと報告している。

一方, 当教室ではこれまで, PCDFs の中でも 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) と 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) がほぼ同等に, 最も強い急性毒性及び肝酵素誘導能を示すのに対し, 肝蓄積性は置換塩素が 1 個多い 2,3,4,7,8-PenCDF で著しく上回ることを明らかにした²³⁾。さらに coplanar PCB の 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) 及び 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) についても同様に, 塩素数が 1 個多い 3,4,5,3',4'-PenCB では肝蓄積性が TCB に比べ, 著しく増大するのに加え, 急性毒性及び 3-methylcholanthrene (MC) 型の肝薬物代謝酵素の誘導能も格段に増強されることも明らかにした²⁶⁾²⁷⁾。

そこで, 本研究では 2,3,7,8-TCDD の場合, このものが有する強い急性毒性, 肝酵素誘導作用及び肝蓄積性が 1 位への塩素 1 個の置換によってどのように変動するかについて, 1,2,3,7,8-PenCDD と 2,3,7,8-TCDD を用いて, 検討を加えた。なお, 5 塩素化体であるが塩素の置換位置が異なる 1,2,3,4,7-PenCDD についても同様に検討した。

実験方法

1. 実験材料

2,3,7,8-TCDD は既報¹⁹⁾ に従い, 合成した。1,2,3,7,8-PenCDD 及び 1,2,3,4,7-PenCDD は Dr. J. J. Ryan (Health and Welfare Canada, Ottawa, Canada) より供与された (Fig. 1)。また benzphetamine $\cdot$ HCl (BZ) 及び 3-hydroxy-BP はそれぞれアップジョンファーマシューティカルズ社 (筑波) 及び九州大学医療短期大学部木下洋夫教授より供与さ

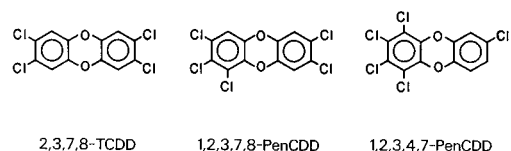


Fig. 1 Chemical structures of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins used in this study

れた。NAD(P)H, NAD(P), 及び glucose-6-phosphate (G-6-P) は協和発酵 (株) (東京) より, G-6-P dehydrogenase は Sigma Chemical 社 (米国, St. Louis) より, BP はナカライテスク (株) (京都) より購入した。また 2,4-dichlorophenolindophenol (DCPIP) は Merck AG (西ドイツ, Darmstadt) より購入した。

2. 実験動物及び投与

5 週令の Wistar 系雄性ラット (体重約 150 g) を用い, 各 PCDD 異性体を 0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ あるいは 0.28 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の用量で 1 回腹腔内に投与した。各異性体は体重 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。PCDD 投与後 5 日目及び 30 日目に屠殺し, 肝臓, 胸腺及び脾臓を摘出した。なお, 屠殺前 12 時間絶食させた。

3. 肝酵素液の調製

屠殺後直ちに摘出し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) 溶液とともにガラス-テフロンホモジナイザーにて 25% ホモジネートを調製した後, 9000 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 9000 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, 9000 xg 上清とした。

4. 酵素活性等の測定

チトクロム P-450 含量の測定は Matsubara らの方法⁸⁾ に従って行った。BP 3-水酸化活性¹²⁾ 及び BZ N-脱メチル化活性²⁸⁾ はそれぞれ 3-hydroxy-BP 及び HCHO の生成量を測定した。DT-diaphorase 活性は, DCPIP の還元量から求める常法³⁾ に従った。肝総脂質量は, Folch らの方法⁴⁾ により求め, さらにタンパク定量は Lowry らの方法⁷⁾ により行った。

5. 肝中 PCDD の定量

肝 0.5 g に 1 N NaOH-エタノール溶液 20 ml を加え, アルカリ分解後 n-ヘキサン 20 ml で 3 回抽出した。この n-ヘキサン抽出液は脱水後濃縮し, シリカゲルカラム (Wakogel S-I, 0.5 g) に注加した。PCDD は 40 ml の n-ヘキサンで溶出されるので, この分画を電子捕獲型検出器を装着した島津 GC-7AG 型ガスクロマトグラフに付した。カラムは fused silica capillary column ULBON HR-54 (0.24 mm $\times$ 50 m) を, またキャリアガスは高純度窒素 (99.999%) を用いた。ガス流量は 1 ml/min, カラム温度は最初の 2 分間を 150°C で, つぎに 250°C まで 1 分当り 16°C で昇温し, あとは 250°C を保持した。定量は 2,3,4,5,6,2',5'-

heptachlorobiphenyl (HepCB) を内部標準物質として、内部標準法により行った。なお、この条件下での保持時間は次の通りであった。

2, 3, 7, 8-TCDD, 20.7 min ; 1, 2, 3, 4, 7-PenCDD, 27.1 min ; 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD, 27.8 min ; 2, 3, 4, 5, 6, 2', 5'-HepCB, 22.7 min

6. P-450 c 及び P-450 d の精製と抗血清の作製

両 P-450 の精製は既報¹⁰⁾に従い行った。またこれらの P-450 に対するウサギ抗血清は既報¹⁰⁾に従い作製した。

7. 9000 xg 上清中の P-450 c 及び P-450 d 含量の免疫化学的定量

Thomas らの方法¹⁸⁾を用いて行った。すなわち、1 M glycine-NaOH 緩衝液 (pH 7.4), 86 mM NaCl, 0.54 M glycerol, 15 mM NaN₃, 0.2% Emulgen 911, 及び 0.5% Na cholate を含む 0.9% agarose を煮沸溶解後、56°C に加温しておき、これに両 P-450 に対するウサギ抗血清 (0.5~1 ml) を加え、直径 9 cm のシャーレに流し込み放置した。固化したゲルに直径 3 mm の穴をあけ、これに試料を注入後、室温で 1~2 日放置し形成した白色円の面積を求め、精製 P-450 標品

により作成した検査線により定量した。試料の 9000 xg 上清には 0.4% cholic acid 及び 0.2% Emulgen 911 を添加して用いた。

実験結果

1. 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD の急性毒性

Fig. 2 に 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 及び 2, 3, 7, 8-TCDD をそれぞれ 0.1 μ mol/kg でラットの腹腔内に 1 回投与した場合の 29 日間の体重増加曲線を示す。両 PCDD 群ではいずれも投与後 1 日目で早くも、有意な体重増加抑制効果を示した。すなわち、対照群で 29 日間に約 215 g 増加したのに対し、1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 投与群では 191 g, 2, 3, 7, 8-TCDD 投与群では 93 g に過ぎなかった。この結果から、2, 3, 7, 8-TCDD の方が 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD に比べ、ラットの成長に及ぼす影響がかなり強いことが示された。

次に、1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 及び 2, 3, 7, 8-TCDD 投与後 5 日目及び 30 日目の臓器重量を比較した。これまでに、2, 3, 7, 8-TCDD 投与ラットでは肝肥大、胸線の萎縮が観察されている¹⁴⁾。Table 1 に示すように、2, 3, 7, 8-TCDD 群では投与後 5 日目ですでに肝重量は

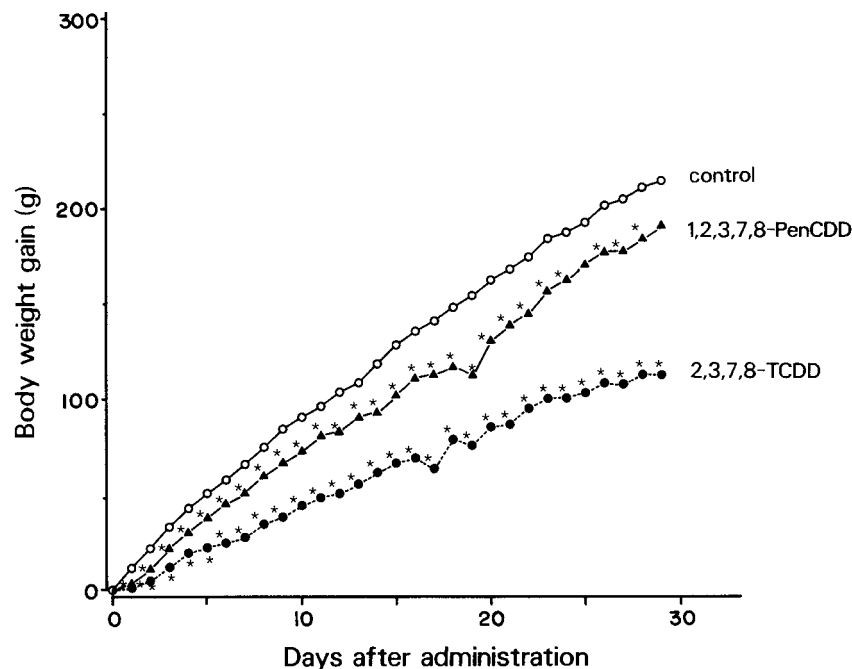


Fig. 2 Effects of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD and 2, 3, 7, 8-TCDD on body weight gain in rats
Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.1 μ mol/kg. Each point represents the mean of four rats.

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

対照群の1.45倍に、また胸腺は対照群の49%へと著しく変化していた。一方、1,2,3,7,8-PenCDD群でも2,3,7,8-TCDD群に匹敵する有意な変化が観察された。すなわち、対照群に対し肝重量は1.26倍であり、また胸腺は50%と萎縮していた。脾臓に対しては2,3,7,8-TCDD群で萎縮傾向が見られたが、1,2,3,7,8-PenCDD群では変化は見られなかった。投与後30日目では、両PCDD投与群ともに5日目に観察された結果と同様であり、臓器重量の変化はほとんど改善されていなかった。

2. 1,2,3,7,8-PenCDDの肝酵素誘導作用

1,2,3,7,8-PenCDD及び2,3,7,8-TCDDの投与後5日目あるいは30日目において肝9000 xg上清を調製し、両PCDDが肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響を比較した (Table 2)。投与後5日目のP-450含量は2,3,7,8-TCDD群で対照群の約3.3倍、1,2,3,7,8-PenCDD群で約2.9倍であった。また、MC型誘導剤で著しく誘導されるBP 3-水酸化活性とDT-diaphorase活性はそれぞれ、2,3,7,8-TCDD投与群においては対照群の約26倍と約14倍であり、これに対し1,2,3,7,8-PenCDD投与群ではそれぞれ約25倍と約10倍であった。投与後30日目では、2,3,7,8-TCDD投与群のDT-diaphorase活性が対照群の約16倍と5日目の誘

導効果が維持されていたのに対し、P-450含量及びその他の活性はいずれのPCDD投与群でも5日目の約60%から50%以下へと低下していた。一方、phenobarbital型誘導剤で強く誘導されるが、逆にMC型誘導剤で活性低下を受けるBZ N-脱メチル化活性は、5日目の両PCDD群ではほとんど影響を受けなかったが、投与後30日目の2,3,7,8-TCDD群では減少傾向を示した。このように1,2,3,7,8-PenCDDは2,3,7,8-TCDDに匹敵するほど強い誘導能を有していた。

3. 1,2,3,4,7-PenCDDの急性毒性と肝酵素誘導作用

1,2,3,4,7-PenCDD (0.28 μ mol/kg)を腹腔内に投与し、投与後5日間の体重増加曲線を観察した。その結果、1,2,3,4,7-PenCDD投与群は、2,3,7,8-TCDD (0.28 μ mol/kg, ip)投与群で観察された著しい体重増加抑制効果は全く認められず、対照群と全く同じ体重増加曲線を示した (Fig. 3)。次に臓器重量への影響を調べたが、Table 3に示すように、1,2,3,4,7-PenCDD投与群では前述の両PCDDにより示された肝肥大、胸腺の萎縮などの臓器重量の変化は全く観察されなかった。さらに肝薬物代謝酵素活性に及ぼす影響をみたところ、BP 3-水酸化活性及びDT-diaphorase活性で平均値として対照群の約2倍の誘導効果が観察さ

Table 1 Effect of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD and 2, 3, 7, 8-TCDD on the tissue weights of rats

Treatment	Tissue weight (g/100 g body weight)		
	Liver	Thymus	Spleen
<i>On 5 days</i>			
Control	3.10 $\pm$ 0.15 (100)	0.340 $\pm$ 0.023 (100)	0.288 $\pm$ 0.068 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	4.48 $\pm$ 0.33* (145)	0.168 $\pm$ 0.039* (49)	0.254 $\pm$ 0.025 (88)
1, 2, 3, 4, 8-PenCDD	3.92 $\pm$ 0.19* (126)	0.171 $\pm$ 0.013* (50)	0.325 $\pm$ 0.069 (113)
<i>On 30 days</i>			
Control	3.22 $\pm$ 0.20 (100)	0.181 $\pm$ 0.026 (100)	0.253 $\pm$ 0.026 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	4.40 $\pm$ 0.53* (137)	0.078 $\pm$ 0.016* (43)	0.328 $\pm$ 0.034 (130)
1, 2, 3, 4, 8-PenCDD	3.89 $\pm$ 0.15* (121)	0.111 $\pm$ 0.006* (61)	0.246 $\pm$ 0.026 (97)

Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.1 μ mol/kg.

Each value represents the mean $\pm$ S. D. of three or four rats and those in parentheses are the relative ratio to the control.

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

Table 2 Effect of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD and 2, 3, 7, 8-TCDD on the enzyme activities of 9000 xg supernatants of rat liver

Treatment	P-450 content ¹⁾	BP 3- hydroxylase ²⁾	BZ N- demethylase ³⁾	DT- diaphorase ⁴⁾
<i>On 5 days</i>				
Control	0.149±0.026 (100)	28.8±10.0 (100)	0.664±0.071 (100)	0.130±0.046 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	0.493±0.039* (332)	747.9±71.2* (2594)	0.612±0.049 (92)	1.798±0.476* (1384)
1, 2, 3, 7, 8-PenCDD	0.431±0.045* (289)	727.6±48.1* (2530)	0.620±0.042 (93)	1.298±0.301* (999)
<i>On 30 days</i>				
Control	0.177±0.016 (100)	67.4±22.5 (100)	0.995±0.163 (100)	0.089±0.023 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	0.393±0.057* (230)	708.4±87.5* (1052)	0.678±0.208 (68)	1.383±0.515* (1552)
1, 2, 3, 7, 8-PenCDD	0.382±0.049* (216)	814.4±73.8* (1209)	1.179±0.140 (118)	0.505±0.210* (567)

Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.1 μ mol/kg. Each value represents the mean $\pm$ S. D. of three or four rats and those in parentheses are the relative ratio to the control.

¹⁾ nmol/mg protein, ²⁾ pmol/min/mg protein, ³⁾ nmol/min/mg protein,

⁴⁾ μ mol/min/mg protein.

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

Table 3 Effect of 1, 2, 3, 4, 7-PenCDD on the tissue weights of rats

Treatment	Tissue weight (g/100 g body weight)		
	Liver	Thymus	Spleen
Control	3.14±0.06 (100)	0.302±0.037 (100)	0.364±0.039 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	4.72±0.42* (150)	0.131±0.020* (43)	0.281±0.041* (77)
1, 2, 3, 4, 7-PenCDD	3.09±0.12 (98)	0.264±0.035 (87)	0.320±0.038 (88)

Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.28 μ mol/kg. Each value represents the mean $\pm$ S. D. of four rats and those in parentheses are the relative ratio to the control.

れたが、いずれも有意ではなかった (Table 4)。

4. 各 PCDD の肝蓄積性

次に各 PCDD 投与後 5 日目あるいは 30 日目における各異性体の肝への分布を調べた。Table 5 に示すよ

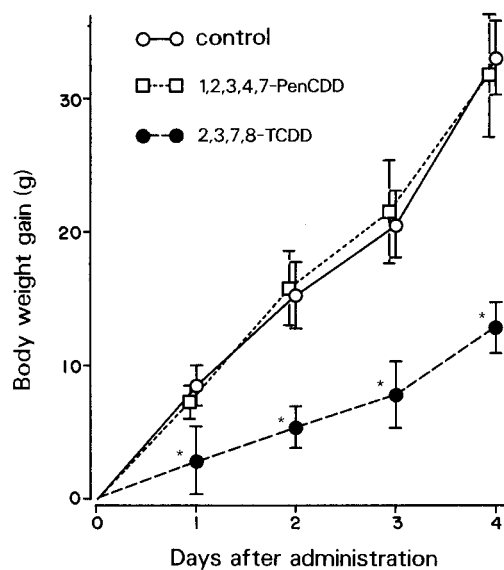


Fig. 3 Effects of 1,2,3,4,7-PenCDD and 2,3,7,8-TCDD on body weight gain in rats. Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.28 μ mol/kg. Each point represents the mean $\pm$ S. D. of four rats.

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

うに、2,3,7,8-TCDD は 10, 32.2 及び 100 μ g/kg のいずれの用量でも投与量の約 46~62%が投与後 5 日目の肝で検出された。これに対し 1,2,3,7,8-PenCDD は 10 及び 35.6 μ g/kg の用量で、それぞれ 78%及び 93%が肝に分布していた。また、投与後 30 日目の肝では、2,3,7,8-TCDD は投与量の約 22%と投与 5 日目の 50%以下に減少していたが、1,2,3,7,8-PenCDD は投与量の約 49%であり、投与 5 日目の 50~60%は維持されていた。この結果は、1,2,3,7,8-PenCDD の肝への親和性が 2,3,7,8-TCDD に比べ、かなり高いことを示している。

一方、1,2,3,4,7-PenCDD は、10 及び 100 μ g/kg のいずれの用量の場合にも、投与 5 日目の肝には投与量の約 0.1%しか分布していなかった。

5. 1,2,3,7,8-PenCDD 及び 2,3,7,8-TCDD 投与ラット肝 9000 xg 上清中 P-450 c 及び P-450 d の定量

MC 型誘導能を有する PCB 及び PCDF 異性体は、ラット肝ミクロゾームの P-450 分子種の中でも特に、P-450 a, P-450 c 及び P-450 d を顕著に増加させることが知られている¹¹⁾¹³⁾。また、著者らは肝蓄積性が著しく高い 2,3,4,7,8-PenCDF が、P-450 分子種のうち最も含有率の高い P-450 d とモル比約 1 : 1 で結合していることを明らかにしている⁶⁾。そこで、1,2,3,7,8-PenCDD 及び 2,3,7,8-TCDD 投与後 30 日目のラット肝より 9000 xg 上清を調製し、これに含まれる各 P-450 分子種を免疫化学的手法により定量した。その結果、Table 6 に示すように、対照群では検出限界

Table 4 Effect of 1, 2, 3, 4, 7-PenCDD on the enzyme activities of rat liver

Treatment	P-450 content ¹⁾	BP 3-hydroxylase ²⁾	BZ N-demethylase ³⁾	DT-diaphorase ⁴⁾
Control	0.184 $\pm$ 0.024 (100)	33.9 $\pm$ 9.1 (100)	0.778 $\pm$ 0.018 (100)	0.096 $\pm$ 0.003 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	0.501 $\pm$ 0.027* (275)	614.2 $\pm$ 91.9* (1812)	0.532 $\pm$ 0.065* (68)	3.538 $\pm$ 0.834* (3676)
1, 2, 3, 4, 7-PenCDD	0.171 $\pm$ 0.024 (93)	64.4 $\pm$ 22.9 (190)	0.722 $\pm$ 0.080 (93)	0.229 $\pm$ 0.076 (236)

Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.28 μ mol/kg. Each value represents the mean $\pm$ S. D. of four rats and those in parentheses are the relative ratio to the control.

¹⁾ nmol/mg protein, ²⁾ pmol/min/mg protein, ³⁾ nmol/min/mg protein,

⁴⁾ μ mol/min/mg protein.

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

(0.002 nmol/mg protein) 以下であった P-450 d 及び P-450 c が, 2, 3, 7, 8-TCDD 投与群ではそれぞれ 0.142 及び 0.388 nmol/mg protein と著しく誘導されていた。これらの値はそれぞれ総 P-450 量の 35% と 96% であった。一方, 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 投与群でも 2, 3, 7, 8-TCDD 群と同様に P-450 d 及び P-450 c の著しい増加が観察され, それぞれ総 P-450 量の 26% と 85% を占めていた。このように両 PCDD 群の肝中 P-450 のうち, いずれも P-450 c 及び P-450 d が主要な分子種になっており, 特に P-450 c 含量は P-450 d 含量の約 3 倍であった。なお, 1, 2, 3, 4, 7-PenCDD 群は前述のように, 全く肝 P-450 量を誘導しなかったが, 総 P-450 含量のうち P-450 c 及び P-450 d はいずれも検出限界以下であった (データ不掲載)。

考 察

2 種の PenCDD, 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 及び 1, 2, 3, 4, 7-PenCDD のラットにおける急性毒性, 肝酵素誘導能及び肝蓄積性を調べ, 2, 3, 7, 8-TCDD のそれと比較した。

1, 2, 3, 7, 8-PenCDD は肝肥大, 胸腺の萎縮などの臓器重量変化を急性毒性の指標にした場合, 2, 3, 7, 8-TCDD にわずかに劣りはするが, それに匹敵するほどの強い毒性を有することが明らかとなった。この結果は先の McConnell ら⁹⁾の結果と一致するものである。また, 肝酵素誘導能についてもこれまでの報告²⁾と同様に, 2, 3, 7, 8-TCDD に比べ若干弱いものの, それに匹敵する程の強さであった。これらの結果は, PCBs の 3, 4, 3', 4'-TCB や PCDFs の 2, 3, 7, 8-TCDF の場合とは異なり, 2, 3, 7, 8-TCDD の 1 位への塩素置換に

Table 5 Concentration of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in rat liver at 5 or 30 days after a single i. p. injection

Compound	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	% of dose	
		5	30 (days)
2, 3, 7, 8-TCDD	10	45.67 $\pm$ 25.48	—
	32.2	62.49 $\pm$ 23.72	22.14 $\pm$ 3.91
	100	49.21 $\pm$ 12.61	—
1, 2, 3, 7, 8-PenCDD	10	77.98 $\pm$ 9.21	—
	35.6	92.94 $\pm$ 10.19	49.33 $\pm$ 12.79
1, 2, 3, 4, 7-PenCDD	10	0.13 $\pm$ 0.16	—
	100	0.06 $\pm$ 0.08	—

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

—, not determined.

Table 6 Immunochemical quantitation of two forms of P-450 in liver 9000 xg supernatants from 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD- or 2, 3, 7, 8-TCDD-treated rats

Treatment	Total P-450	P-450 d (nmol/mg protein)	P-450 c
Control	0.177 $\pm$ 0.016	<0.002	<0.002
2, 3, 7, 8-TCDD	0.406 $\pm$ 0.058 (100)	0.142 $\pm$ 0.043 (35)	0.388 $\pm$ 0.029 (96)
1, 2, 3, 7, 8-PenCDD	0.382 $\pm$ 0.049 (100)	0.099 $\pm$ 0.017 (26)	0.326 $\pm$ 0.057 (85)

Rats were killed on 30 days after a single i. p. dose of 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ of PCDD. Each value represents the mean $\pm$ S. D. of four rats and those in parentheses are the relative value to total contents of P-450.

より急性毒性及び肝酵素の誘導能が減弱することを示している。

このような、2,3,7,8-TCDDをはじめとする高毒性多塩素化芳香族炭化水素が生物活性を発現するには、まず細胞可溶性画分に存在する Ah-receptor との結合が必要であるといわれている¹⁵⁾。Safe 一派は2,3,7,8-TCDDをはじめとする14種のPCDD異性体の細胞可溶性画分に存在する Ah-receptor との結合親和性 (EC_{50}) を調べ¹⁶⁾、2,3,7,8-TCDDの EC_{50} 値は 1.0×10^{-8} Mと最も小さく、これに次いで1,2,3,7,8-PenCDDが 7.9×10^{-8} Mであることを報告している。本研究の結果は、彼らの結果をよく支持している。なお、1,2,3,4,7-PenCDDは急性毒性、肝酵素誘導能をほとんど示さなかったが、このことは従来の報告¹⁴⁾のように、2,3,7,8位への4個の塩素置換が上記の様な生物活性を発現するために必須であることを示している。

Van den Berg ら²⁰⁾は都市焼却場の飛散灰のトルエン抽出物をラットに投与し、2日後及び14日後にPCDDsの肝への分布を調べたところ、いずれの場合にも1,2,3,7,8-PenCDDの方が2,3,7,8-TCDDの約2倍多く分布することを報告している。今回のように単一のPCDDを用いた場合にも、混合物を使用した彼らの結果と同様に、1,2,3,7,8-PenCDDの方が2,3,7,8-TCDDより多く肝へ集まり、さらに肝からの消失も遅いことが明らかとなった。

これまでに、肝蓄積性が著しく高い3,4,5,3',4'-PenCBや2,3,4,7,8-PenCDFはラット肝ミクロゾームのP-450分子種のP-450 dと高い親和性を有していることが明らかになっている⁶⁾²¹⁾。本研究でも1,2,3,7,8-PenCDD及び2,3,7,8-TCDD投与ラット肝のP-450 dを定量したところ、それぞれ総P-450量の約35%及び26%と顕著に増加していた。この結果を、先の結果と考え合わせると、両PCDDの肝蓄積性はP-450 d量と密接に関連していることが示唆される。しかしながら、両PCDDの肝への分布量にかなりの差が認められることから、このような肝蓄積性は肝P-450 d量ばかりでなく、その代謝されやすさも大きな要素となる。

PCDFsやPCBsの中でも、2,3,7,8-TCDFや3,4,3',4'-TCBは肝蓄積性は低い、この理由として比較的代謝を受けやすいことが明らかにされている¹⁾²⁵⁾、また今回、1,2,3,4,7-PenCDDは肝にほとんど分布していなかったが、これは1,2,3,4,7-PenCDDが隣接水素を有していることから、速やかに代謝され、肝外への

排泄されたものと考えられる。一方、5塩素化体の2,3,4,7,8-PenCDFと3,4,5,3',4'-PenCBとなるとほとんど代謝されない²⁴⁾⁵⁾。現在のところ、2,3,7,8-TCDDについては、ラット及びハムスター肝ミクロゾームやラット遊離肝細胞により代謝物の生成が報告されている²²⁾¹⁷⁾が、1,2,3,7,8-PenCDDについては全く報告はない。

一方、体重増加曲線に及ぼす影響をみると、1,2,3,7,8-PenCDDは投与1日目ですでに有意な増加抑制作用を示したものの、2,3,7,8-TCDDと比較するとその作用はかなり弱いものであった。もし、肝以外に標的臓器が存在すると仮定するならば、この結果は次のように考えられる。すなわち、1,2,3,7,8-PenCDDと2,3,7,8-TCDDにおける肝蓄積性の違いにより、標的臓器における濃度が大きく異なり、その結果、両PCDDの体重増加抑制作用に大きな差異が認められたのかも知れない。以上のように、1,2,3,7,8-PenCDDの著しく高い肝蓄積性は短期的には毒性を抑制する方向に働いているともいえるが、長期的には慢性毒性発現のための最大の要因となるであろう。

総 括

猛毒の2,3,7,8-TCDDにさらに1個塩素置換された1,2,3,7,8-PenCDDのラットにおける急性毒性、肝酵素誘導能及び肝蓄積性を調べ、2,3,7,8-TCDDと比較した。

- 1) 1,2,3,7,8-PenCDD (0.1 μ mol/kg) 投与ラットにおいて、投与後1日目で体重増加の有意な抑制が観察され、この抑制は少なくとも28日間は持続した。しかしながら、このような体重曲線に及ぼす影響は2,3,7,8-TCDDと比較すると、かなり弱いものであった。
- 2) 1,2,3,7,8-PenCDD投与後5日目のラットにおいて、著しい肝肥大及び胸腺の萎縮が観察された。この強さは2,3,7,8-TCDD群に匹敵するものであった。なお、このような臓器重量変化は両PCDD群ともに30日目においてもほとんど改善されなかった。
- 3) 1,2,3,7,8-PenCDDは2,3,7,8-TCDDと同程度の強いMC型誘導能を示した。すなわち、投与後5日目においてBP 3-水酸化活性及びDT-diaphorase活性は対照群のそれぞれ25倍及び10倍に誘導されていた。投与30日目では、5日目の約50%の誘導率が維持されていた。
- 4) 1,2,3,7,8-PenCDDの投与後5日目の肝への分布量は投与量の約80~90%であり、2,3,7,8-TCDDの分布量を大きく上回った。投与後30日目において

も、1,2,3,7,8-PenCDDは約50%が残存しており、2,3,7,8-TCDD群の2倍以上の高さであった。

以上のよう、1,2,3,7,8-PenCDDが、2,3,7,8-TCDDに比肩しうほどの強い急性毒性を示すこと、さらに2,3,7,8-TCDDより高い肝蓄積性に有することを考えると、慢性毒性の面でより重要であると思われる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Bradlaw JA and Casterline Jr. JL: Induction of enzyme activity in cell culture: a rapid screen for detection of planar polychlorinated organic compounds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62: 904-916, 1979.
- 3) Ernster L, Danielson L and Ljunggren M: DT-diaphorase I. Purification from the soluble fraction of rat liver cytoplasm and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 58: 171-188, 1962.
- 4) Folch J, Lees M and Stanley GHS: Isolation and purification of total lipids from tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509, 1957.
- 5) Koga N, Beppu M and Yoshimura H: Metabolism *in vivo* of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolite in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 13: 497-506, 1990.
- 6) 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.
- 7) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 8) Matsubara T, Koike M, Tsuchi A, Tochino Y and Sugeno K: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Anal. Biochem.* 75: 596-603, 1976.
- 9) McConnell EE, Moore JA, Haseman JK and Harris MW: The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-*p*-dioxin in mice and guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44: 335-356, 1978.
- 10) Nagata K, Buppodom P, Matsunaga T, Ishimatsu M, Yamato H, Yoshihara S and Yoshimura H: Purification and characterization of seven distinct forms of liver microsomal cytochrome P-450 from untreated and inducer-treated male Wistar rats. *J. Biochem.* 97: 1755-1766, 1985.
- 11) Nagata K, Matsunaga T, Buppodom P, Ishimatsu M, Yamato H, Yoshihara S and Yoshimura H: Unique induction of cytochrome P-450 isozymes in rat liver microsomes by treatment with 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and its effect on testosterone metabolism. *J. Pharmacobio-Dyn.* 8: 948-957, 1983.
- 12) Nebert DW and Gelboin HV: Substrate inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. *J. Biol. Chem.* 243: 6242-6249, 1968.
- 13) Parkinson A, Safe SH, Robertson LW, Thomas PE, Ryan LM and Levin W: Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyls-treated rats. *J. Biol. Chem.* 258: 5967-5976, 1983.
- 14) 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.
- 15) Poland A and Glover E: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Segregation of toxicity with the Ah locus. *Mol. Pharmacol.* 17: 86-94, 1980.
- 16) Safe SH: Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26: 371-399, 1986.
- 17) Sawahata T, Olson JR and Neal RA: Identification of metabolites of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) formed on incubation with isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105: 341-346, 1982.
- 18) Thomas PE, Korzeniowsky D, Ryan DE and Levin W: Preparation of monospecific antibodies against two forms of rat liver cytochrome P-450 and quantitation of these antigens in microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 192: 524-532, 1979.
- 19) 富田真雄, 上田伸一, 成定昌幸: Dibenzo-*p*-dioxin (Diphenylene Dioxide) 誘導体の研究 (第27報) Polyhalodibenzo-*p*-dioxin の合成, 薬学雑誌 79: 186-192, 1959.
- 20) Van den Berg M, Meerman L, Olie K and Hutzinger O: Retention of PCDDs and PCDFs in the liver of the rat and hamster after oral administration of a municipal incinerator fly ash extract. *Toxicol. Environ. Chem.* 12: 267-284, 1986.
- 21) Voorman R and Aust SD: Specific binding of polyhalogenated aromatic hydrocarbon inducers of cytochrome P-450 d to the cytochrome and inhibition of its estradiol 2-hydroxylase activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90: 69-78, 1987.
- 22) 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.

23) 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.

24) 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.

25) Yoshimura H, Yonemoto Y, Yamada H, Koga N, Oguri K and Saeki S: Metabolism *in vivo*

of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats. Xenobiotica 17: 897-910, 1987.

26) 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.

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

**Ah 応答性系統と Ah 非応答性系統のマウスの
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期大学部環境医学研究室

長山 淳哉・和田 健一

第一薬科大学物理分析学教室

原口 浩一・増田 義人

九州大学医学部附属動物実験施設

半田 純雄

**Effects of 3-methylsulphonyl-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and
7, 8-benzoflavone on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity
in Ah Responsive and Ah Nonresponsive Strains of Mice**

Junya NAGAYAMA and Ken-ichi WADA

*Laboratory of Environmental Medicine, School of Health Sciences, Kyushu University 90,
Higashi-ku, Fukuoka 812*

Koichi HARAGUCHI and Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences Minami-ku, Fukuoka 815

Sumio HANDA

*Laboratory of Animal Experiments, Faculty of Medicine, Kyushu University 60,
Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan*

In general, C57BL/6NQdj (C57) and DBA/2JCrj (DBA) strains of mice are considered to be the aryl hydrocarbon (Ah) responsive and Ah nonresponsive strains of mice, respectively, which are determined by whether the hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity is enhanced (Ah responsive) or not (Ah nonresponsive) after the treatment of 3-methylcholanthrene (MC). In this study, first, we examined that the Ah responsiveness was systemically regulated in the lungs and kidneys as well as in the liver and observed its systemic control in these three organs in the two strains of mice. Then, we prepared the hepatic microsomes of the two strains of mice after the treatment of MC (42 mg/kg, once), 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, 20 μ g/kg, 6 times) and 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF 60 μ g/kg, 6 times) in order to investigate the effects of 3-methylsulphonyl-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-TCB, 1.5~45 μ g/ml) and 7, 8-benzoflavone (ANF, 1.4~42 μ g/ml) on the respective hepatic microsomal AHH activities and the following results were obtained.

1. As compared with the control enzyme activity, TCDD-induced AHH activity was the highest, PenCDF-induced one the second and MC-induced the lowest in both strains of mice. The inductions of the enzyme activity by these chemicals were much more remarkable in the Ah responsive C57 strain than those in the Ah nonresponsive DBA strain.
2. 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 control mice and mice treated with MC, TCDD or PenCDF. ANF showed higher potency for both the enhancement and the inhibition of the enzyme activity than 3-MSF-TCB. The hepatic microsomal AHH activity of TCDD or PenCDF treated animals seemed to be more greatly

reduced by both 3-MSF-TCB and ANF than that of MC treated ones.

3. The effects of 3-MSF-TCB and ANF on the enzyme activity of the MC treated DBA mice and of the nontreated control C57 mice were quite similar and their effects on the AHH activity of the PenCDF and TCDD treated DBA strain were also almost the same as those of the MC and TCDD treated C57 strain, respectively.

The experimental results mentioned above accorded with the results previously obtained in our similar investigation, in which we used different strains of mice, and the following consideration will be possible again.

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 AHH activity, in the microsomes.
2. When the main P-450 in the microsomes is LM3C, the enzyme activity will be probably enhanced well by 3-MSF-TCB and ANF, and when it is LM6, the enzyme activity will be strongly inhibited by them.
3. The kinds of P-450 induced by some chemical are also considered to depend on the grade of the Ah responsiveness of the host and we think that in general MC possibly induces LM3C, LM4 and LM6, and TCDD and PenCDF more preferentially induce LM6.

Some investigators observed that no or less toxic organochlorine compounds such as polychlorinated biphenyls (PCBs) and some isomers of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) inhibited the induction of monooxygenases including AHH by highly toxic organochlorine congeners such as TCDD and PenCDF, and speculated that cytosolic Ah receptor played an important role in the inhibition of the enzyme activity possibly due to the competitive displacement of TCDD or PenCDF by PCBs or less toxic PCDF isomers in the complex of the Ah receptor and the ligand. The cytosolic Ah receptor, however, is considered not to be present in the hepatic microsomal preparations 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 seem to act directly on P-450 enzyme system.

One of the most important problems to be solved will be the biological and/or health consequences of the mixed contamination of the organochlorine compounds such as PCBs, methylsulphonyl PCBs, PCDFs and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), particularly for the descendants since our human bodies have already been contaminated by these compounds and several flavonoids, which are similar to ANF in chemical structure, are normally occurring constituents of the human diet.

は じ め に

油症患者および健常者の臓器・組織から polychlorinated biphenyls (PCBs) の代謝物である methylsulphonyl PCBs (MSF-PCBs) が検出・定量されており、その汚染レベルはかなり高いことが報告されている³⁾⁴⁾⁵⁾。しかし、MSF-PCBs の生物学的作用はほとんど解明されていない。これまで、私たちは MSF-PCBs のいくつかの異性体についてヒトリンパ球培養細胞あるいはマウスの肝ミクロソームの芳香族炭化水素酸化酵素 (aryl hydrocarbon hydroxylase, AHH) 活性に対する作用を研究し、興味ある知見を報告してきた¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁸⁾。AHH はいろいろな環境中癌原性化学物質の生体内における代謝的活性化などに関与することが示唆されている興味ある酵素である。これまでの私たちの研究により、MSF-PCBs 異性体のなかでは 3

-methylsulphonyl-4, 5, 3'-4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-TCB) がヒトリンパ球の AHH 活性を最も阻害し、特に 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) あるいは 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) により誘導される AHH 活性は最も効率よく阻害されることが認められている¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁸⁾。また、マウスの場合、3-methylcholanthrene (MC) 投与により、肝 AHH 活性が誘導される系統 (Ah 応答性系統) と誘導されない系統 (Ah 非応答性系統) に遺伝学的に区別されるが、この両系統のマウスの肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB の作用は、系統により相違する¹⁸⁾。つまり、Ah 応答性系統の C3H マウスでは MC あるいは TCDD 投与後の酵素活性が阻害されるが、Ah 非応答性系統の DDD マウスでは TCDD 投与後の酵素活性のみが阻害される。この研究では Ah 応答性系統と考えられている C57 マウスお

および Ah 非応答性系統と考えられている DBA マウスに MC, TCDD あるいは PenCDF を投与し、それらの肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB および 7,8-benzoflavone (ANF) の作用を比較研究し、興味ある知見を得たので、その研究結果等について報告する。

実験方法

1. 化学薬品

3-MSF-TCB, TCDD および PenCDF は増田義人先生（第一薬科大学教授，福岡）より供与された。純度はガスクロマトグラフィーにより、それぞれ 99%，99%，95% である。3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBP) は木下洋夫先生（九州大学医療技術短期大学部教授，福岡）より供与された。benzo(a)pyrene (BP) および MC は the Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) より、また ANF および NADPH は和光純薬工業（株）（大阪）より購入した。その他のすべての薬品および試薬は市販されている最高級品を使用した。

2. 動物の飼育と薬物の投与

Ah 応答性系統の C57BL/6N_Qdj (C57) は九州大学医学部附属動物実験施設（福岡）より、また Ah 非応答性系統の DBA/2J_{Crj} (DBA) は日本 Charles River（株）（厚木）より、それぞれの雄を購入した。動物は 1 ケージあたり 4～5 匹として、ディスポケージを用いて飼育した。飼育室は温度 (22±1°C) と湿度 (55±5%) を一定に保ち、昼夜のサイクルを 12 時間/12 時間とした。餌の CE-2、日本 Clea（株）（東京）、と水は自由

に摂取させた。

MC は 8 週齢の両系統のマウスに 42 mg/kg 体重を 1 回腹腔内投与し、また、その対照群には等量のオリーブ油 (8.0 ml/kg 体重) を 1 回腹腔内投与した。投与の 3 日後に動物を頸部の脱臼により屠殺し、肝、肺および腎を摘出した。また、8 週齢からオリーブ油に溶解した TCDD (20 μg/kg 体重) あるいは PenCDF (60 μg/kg 体重) を 2 週間に 1 回、合計 6 回腹腔内投与した。対照群には薬物投与群と同様のタイムスケジュールにより等量のオリーブ油 (8.0 ml/kg 体重) を腹腔内投与した。最終投与の 3 日後にマウスを頸部の脱臼により屠殺し、肝を摘出した。

3. AHH 活性の測定

肝は 9 容の、肺と腎は 4 容の氷冷 0.02 M N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES) 緩衝液 (pH 7.4, 0.15 M KCl を含む) によりホモジナイズした。このホモジネートを 4°C, 9,000 g で 15 分間遠心分離後、上清 (S-9) を AHH 活性測定に用いた。また、肝ミクロソームは Noshiro と Omura (1978) の方法¹⁹⁾ により調製し、酵素活性測定に用いた。AHH 活性測定用反応液 (1.05 ml) の組成は次のようである。125 μmol の HEPES (pH 7.4), 0.53 μmol の NADPH, 3.6 μmol の MgCl₂, 100 nmol の BP および蛋白質量として 4～8 mg/ml の S-9, あるいは 1～30 μg/ml の肝ミクロソームである。肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB あるいは ANF の作用を調べる場合には、上記の反応液に 3-MSF-TCB を 1.5, 3.0, 15, 45 μg/ml, または ANF

Table 1 Effects of 3-methylcholanthrene (MC) on aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in the liver, lungs and kidneys of C57 (Ah responsive) and DBA (Ah nonresponsive) strains of mice.

Organ	Treatment	AHH Activity*	
		C57	DBA
Liver	Control	220±9	112±6
	MC	2457±209	95±8
	MC/Control	11.2	0.8
Lungs	Control	6.6±0.7	6.8±0.4
	MC	32.9±3.4	15.1±1.3
	MC/Control	5.0	2.2
Kidneys	Control	0.2±0.01	1.8±0.3
	MC	3.5±0.3	1.7±0.2
	MC/Control	17.5	0.9

* 3-OHBP formed, pmol/min/mg protein (mean±S. E.)

を1.4, 2.8, 14, 42 $\mu\text{g/ml}$ 加えた。酵素活性測定法の詳細は Nagayama らの研究¹⁷⁾¹⁸⁾と同様である。

実験結果

1. MC 投与後の肝、肺および腎の S-9 AHH 活性の変化

実験結果を Table 1 に示す。両系統の対照群では肝の酵素活性が最も高く C57; 220 および DBA; 112 pmol/min/mg protein, ついで肺 C57; 6.6 および DBA; 6.8 pmol/min/mg protein, 腎が最も低く C57; 0.2 および DBA; 1.8 pmol/min/mg protein であった。上記のように、対照群の AHH 活性では、腎において両系統間の活性比 ($1.8/0.2=9$) が最も大きく、ついで肝 ($220/112=2$)、肺はほぼ同程度の活性であった。

MC 投与により、Ah 応答性系統の C57 では、いずれの臓器でも酵素活性が高くなり、対照群の活性に比べて腎では約 18 倍、肝では約 11 倍、肺でも約 5 倍高くなっていた。また、Ah 非応答性系統の DBA では MC 投与による酵素活性の上昇は肝と腎ではまったく認められず、肺で約 2 倍高くなる程度であった。一般に、Ah 応答性の有無は MC 投与により肝の AHH 活性が上昇するか否かで判定されるが、肝以外の肺や腎でも肝と同様の傾向にあることが認められた。

2. MC, TCDD および PenCDF 投与後の肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB および ANF の作用

1) Ah 応答性系統の C57 について

実験結果を Fig. 1 に示す。対照群, MC 投与群, TCDD 投与群および PenCDF 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性はそれぞれ 466, 12,386, 31,601 および 12,867 pmol/min/mg protein であった。つまり, MC あるいは PenCDF により 27~28 倍, また TCDD により約 68 倍酵素活性が高くなっている。このように、各群で酵素活性が大きく相違しているため、それぞれの肝ミクロソーム AHH 活性への 3-MSF-TCB および ANF の作用を比較・検討するために、3-MSF-TCB あるいは ANF を添加しない場合の各群の酵素活性を基準 (1.0) とする相対的 AHH 活性を用いて図示した (Fig. 1)。

各群の肝ミクロソームを用いた酵素活性測定用反応液に 3-MSF-TCB を 1.5~45 $\mu\text{g/ml}$ 加えると、対照群の酵素活性は約 2 倍高くなるが、その他の群では 3-MSF-TCB の増加とともに酵素活性が低下した。MC 投与群では約 50%, TCDD 投与群では約 70%, また

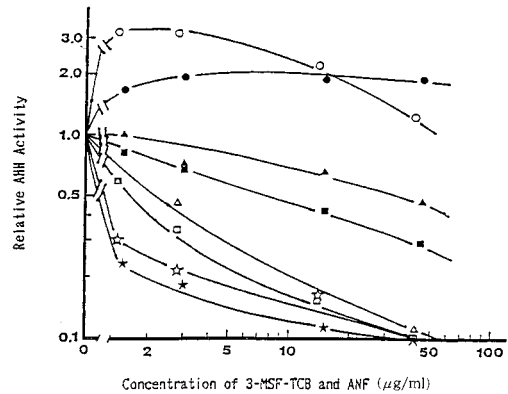


Fig. 1 Effects of 3-MSF-TCB and ANF on AHH activities of hepatic microsomes from untreated, MC-, TCDD- and PenCDF-treated C57 mice.

Untreated mice; ●: 3-MSF-TCB and ○: ANF, MC-treated mice; ▲: 3-MSF-TCB and △: ANF, TCDD-treated mice; ■: 3-MSF-TCB and □: ANF and PenCDF-treated mice; ★: 3-MSF-TCB and ☆: ANF.

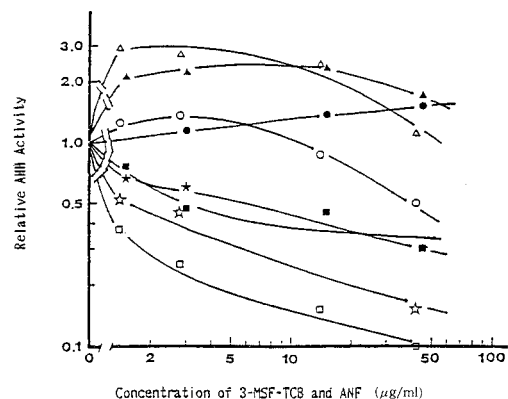


Fig. 2 Effects of 3-MSF-TCB and ANF on AHH activities of hepatic microsomes from untreated, MC-, TCDD- and PenCDF-treated DBA mice.

Untreated mice; ●: 3-MSF-TCB and ○: ANF, MC-treated mice; ▲: 3-MSF-TCB and △: ANF, TCDD-treated mice; ■: 3-MSF-TCB and □: ANF and PenCDF-treated mice; ★: 3-MSF-TCB and ☆: ANF.

PenCDF 投与群では約 90% の活性阻害が観察された。

次に、酵素活性測定用反応液に ANF を 1.4~42 $\mu\text{g/ml}$ 加えると、対照群では低濃度域 (1.4 および 2.8 $\mu\text{g/ml}$) で酵素活性が約 3 倍高くなるが、高濃度域

(14 および 42 $\mu\text{g/ml}$)では逆に活性が低下し、相対的 AHH 活性値は基準値 (1.0) に近くなる。また、その他の群では ANF 濃度の増加とともに、すみやかに酵素活性が低下し、いずれの群でも最終的に約 90% の活性阻害が認められた。

2) Ah 非応答性系統の DBA について

実験結果を Fig. 2 に示す。対照群, MC 投与群, TCDD 投与群および PenCDF 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性はそれぞれ 360, 448, 902 および 748 pmol/min/mg protein であった。各化学物質による酵素活性上昇の度合は Ah 応答性系統の C57 と比較してかなり低い。MC により約 1.2 倍, TCDD により約 2.5 倍, また PenCDF により約 2.1 倍高くなる程度である。DBA の場合にも, C57 の場合と同様に, 各群の肝ミクロソーム AHH 活性への 3-MSF-TCB および ANF の作用を比較・検討するために, 3-MSF-TCB あるいは ANF を添加しない場合の各群の酵素活性を基準 (1.0) とする相対的 AHH 活性を用いて図示した (Fig. 2)。

各群の肝ミクロソームを用いた酵素活性測定用反応液に 3-MSF-TCB を 1.5~45 $\mu\text{g/ml}$ 加えると, 対照群の酵素活性は処理濃度に対応して直線的に高くなり, 最終的に約 1.5 倍となった。また, MC 投与群では 1.5~15 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で酵素活性は 2.1~2.3 倍と高くなったが, 45 $\mu\text{g/ml}$ では活性上昇の度合が低下し約 1.7 倍であった。TCDD および PenCDF 投与群では 3-MSF-TCB の濃度が高くなるとともに AHH 活性が低下し, 両群とも最終的に約 70% の活性阻害が認められた。

各群の肝ミクロソーム AHH 活性に対する ANF の作用については以下のものであった。対照群および MC 投与群では ANF の低濃度域 (1.4 および 2.8 $\mu\text{g/ml}$) では酵素活性が上昇し, それぞれ約 1.4 倍, 約 3 倍高くなったが, 高濃度域 (14 および 42 $\mu\text{g/ml}$) では酵素活性の阻害が観察され, 最終的に対照群と MC 投与群の相対的 AHH 活性値はそれぞれ約 0.5, 約 1.1 となった。TCDD および PenCDF 投与群では ANF 濃度の増加とともに酵素活性が低下し, 最終的にそれぞれ約 90%, 約 85% の活性阻害が観察された。

考 察

マウスでは MC による肝の AHH 誘導性が系統により遺伝学的に異なることが観察されており, Ah 応答性と Ah 非応答性の系統に分けられ, 肝の AHH 誘導性は常染色体優性遺伝すると考えられている¹³⁾。こ

の研究では, まず, Ah 応答性系統の C57 と Ah 非応答性系統の DBA について MC 投与後の肝, 肺および腎の酵素活性の誘導性について調べた。その結果, Ah 応答性は肺や腎においても肝と同様の傾向を示すことが示唆された (Table 1)。

このような両系統のマウスについて, あらかじめ動物に MC, TCDD あるいは PenCDF を投与し, それぞれの投与群の動物から肝ミクロソームを調製し, 各群の肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB および ANF の作用を調べたのである。これまでの研究で, 肝ミクロソーム AHH 活性測定の実験条件などについて検討している¹⁸⁾。上記の研究では Ah 応答性系統のマウスとして C3H を, Ah 非応答性系統のマウスとして DDD を用い, また, 動物に投与した薬物は MC と TCDD であり, PenCDF の投与は行われていなかった。そこで, まず, 前回と今回の両系統のマウスについて, 対照群, MC 投与群および TCDD 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB と ANF の作用について比較・検討してみる。3-MSF-TCB あるいは ANF を加えない場合の酵素活性は, 前回と同様に, Ah 応答性系統の C57 でも Ah 非応答性系統の DBA でも TCDD 投与群が最も高く, ついで MC 投与群, 対照群の順であり, 特に C57 で MC あるいは TCDD による酵素活性の上昇がきわめて顕著である。また, 両系統の各群の肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB および ANF の作用も前回の研究結果と類似していた。つまり, 3-MSF-TCB と ANF は Ah 応答性系統の C57 の対照群と Ah 非応答性系統の DBA の MC 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性に対して, また, C57 の MC あるいは TCDD 投与群と DBA の TCDD 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性に対して, 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. 1 および 2)。AHH 活性にはいろいろな分子種の cytochrome P-450 (P-450) が関与している²¹⁾²²⁾。上記のような研究結果に基づいて, C57 の対照群と DBA の MC 投与群あるいは C57 の MC および TCDD 投与群と DBA の TCDD 投与群の各肝ミクロソームには質・量ともに類似の P-450 が存在すると考えられる。

C57 の PenCDF 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性は 3-MSF-TCB と ANF の両化学物質により著しく活性が低下する。その阻害は TCDD 投与群の酵素活性のそれをはるかに上回っている。このような実験結果はヒトリンパ球培養細胞の AHH 活性を PenCDF

により誘導した際の酵素活性に対する 3-MSF-TCB の作用についても観察されている¹⁸⁾。また、DBA の PenCDF 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性は 3-MSF-TCB あるいは ANF により量・反応的に低下し、阻害される。3-MSF-TCB による阻害は TCDD 投与群の場合と同程度であるが、ANF のそれは TCDD 投与群の場合よりやや軽度である。

ウサギの種々の P-450 による AHH 活性に対する ANF の作用に関する研究報告から、ANF は P-450 のなかでも LM3C による酵素活性を高め、LM6 による酵素活性をほぼ完全に阻害し、また、LM4 による酵素活性については明確でない⁸⁾¹⁰⁾¹²⁾²⁰⁾。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⁹⁾²¹⁾。しかし、肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB や ANF の作用に関するこの研究結果を考慮すると、MC、TCDD あるいは PenCDF により誘導される P-450 は、質的にも量的にも相違していることが示唆される。つまり、Ah 応答性系統の C57 では MC により主に LM4 と LM6 が誘導され、TCDD あるいは PenCDF により LM6 がきわめて優先的に誘導されると考えられる。また、Ah 非応答性系統の DBA では MC により主に LM3C と LM4 が誘導され、TCDD あるいは PenCDF により主に LM6 が誘導されると考えられる。このように、同一の化学物質であっても宿主の Ah 応答性のレベルにより、誘導される P-450 の種類と量が変化する可能性のあることが³⁾、前回の研究¹⁸⁾と同様に、この研究によっても示唆された。

TCDD など毒性の高い polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) や polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) により誘導される AHH 活性が PCBs や低毒性の PCDFs により有意に抑制され、このような抑制作用は細胞質の Ah リセプターを介して発現すると考えられている¹¹⁾¹²⁾。この研究で、私たちが調製した肝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。従って、前回の研究結果¹⁸⁾と同様に、C57 や DBA の TCDD あるいは PenCDF 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB や ANF の活性阻害作用の発現に Ah リセプターは関与しておらず、両化学物質は P-450 酵素系に直接作用していると考えられる。

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³⁾⁴⁾⁵⁾。また、ANF に化学構造が類似する flavonoids が食品中に存在することも知られている⁶⁾⁷⁾。今後、MSF-PCBs や flavonoids の

in vivo における生物学的作用や、他の有害物質などとの相互作用による生体影響を解明する必要がある。特に子孫への影響などを含めた遺伝毒性に関する研究が最も重要な課題の一つであると考えている。

総 括

C57 マウスと DBA マウスは一般にそれぞれ Ah 応答性系統と Ah 非応答性系統であると考えられている。この Ah 応答性は MC 投与後、肝の AHH 活性が上昇するか、しないかによって判定される。この研究ではまず、Ah 応答性が肝以外の他の臓器、つまり肺および腎でも観察されるかどうか調べた。その結果、肺と腎においても概ね、肝と同様の Ah 応答性と Ah 非応答性が systemic に認められた。

次に、C57 と DBA の両系統のマウスに MC、TCDD あるいは PenCDF を腹腔内投与し、その後、各投与群の肝ミクロソームを調製し、それぞれの肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-TCB および ANF の作用を比較・研究し、次のような結果が得られた。

- 1) 両系統のマウス肝ミクロソーム AHH 活性は対照群の酵素活性と比較して、TCDD 投与群が最も高く、次に PenCDF 投与群、MC 投与群の順であった。特に、Ah 応答性系統の C57 では酵素活性の上昇が顕著であった。
- 2) 3-MSF-TCB および ANF はそれらの濃度により、また、ミクロソームの種類により酵素活性を高めたり、また逆に、阻害したりした。酵素活性を高める場合でも、阻害する場合でも、それらの作用は 3-MSF-TCB よりも ANF の方が強かった。また、3-MSF-TCB あるいは ANF の酵素活性阻害作用は、MC 投与群の肝ミクロソームよりも TCDD および PenCDF 投与群の肝ミクロソームの酵素に対して強かった。
- 3) 3-MSF-TCB と ANF は C57 の対照群と DBA の MC 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性に対して、また C57 の MC あるいは TCDD 投与群と DBA の TCDD 投与群の肝ミクロソーム AHH 活性に対して、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。PenCDF 投与群では、いずれの系統でも、3-MSF-TCB と ANF は肝ミクロソーム AHH 活性を阻害したが、Ah 応答性系統の C57 においてより顕著な阻害作用を示した。

上記のような研究結果は、これまでの私たちの研究結果とほぼ同様であり、したがって、これまでと同じ

様な下記の結論が推察される。

- 1) 3-MSF-TCB や ANF のような化学物質により AHH 活性が高まるか、また逆に阻害されるかはミクロソームに存在する P-450 の種類と濃度に依存する。
- 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、両化学物質により酵素活性は上昇し、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。
- 3) MC, TCDD あるいは PenCDF によりどのような P-450 が誘導されるかは宿主の Ah 応答性のレベルに依存して変化するようであるが、一般的には MC により LM3C, LM4 および LM6 が誘導され、TCDD や PenCDF により LM6 がより優先的に誘導される。

また、一部の研究者は AHH 活性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が、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 AHH 活性に対する作用には Ah リセプターは関与しておらず、これらの化学物質は P-450 酵素系に直接作用していると考えられる。

人体はすでに TCDD, PenCDF, 3-MSF-TCB などにより複合的に汚染されており、また ANF に類似する flavonoids を食品から摂取している。今後は、このような複合汚染の人体影響を解明すること、特に子孫への影響などを含めた遺伝毒性を解明することが最も重要な研究課題の一つであろう。

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) 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: Polychlorinated biphenyl methylsulphone congeners in human tissues: Identification of methylsulfonyl dichlorobiphenyls. *Chemosphere* 18: 477-484, 1989.
- 5) 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.
- 6) Harborne JB: *Phytochemistry*. In Miller LP (ed): Vol II. pp.344-380, Van Nostrand Reinhold Co. New York, 1973.
- 7) Harborne JB, Mabry TJ and Mabry H (eds): *Flavonoids*. Academic Press New York, 1975.
- 8) 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.
- 9) 今井志郎, 佐藤 了: 肝ミクロソ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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Nagayama J, 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.
- 15) 長山淳哉, 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.
- 16) Nagayama J, Mohri N, Hirohata T, Haraguchi K and Masuda Y: Inhibitory effect of methylsulphonyl polychlorinated biphenyls on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Chemosphere*

18: 701-708, 1989.

17) 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.

18) 長山淳哉, 毛利紀子, 原口浩一, 増田義人: 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. 福岡医誌 80: 201-209, 1989.

19) 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.

20) 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.

21) 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.

The Synergistic Effect of Chlorinated Chemicals (Trichlorosalicylanilid, 4-Chloro-*m*-Cresol, Trichlorophenoxyacetic Acid, Trichloroethanol, Trichloromethiazide, Trichlorofon and Trichloroacetaldehyde) and Low Concentrations of Griseofulvin on Porphyrin Metabolism

Naoko TSUKAZAKI, Shigeo NONAKA, Taro OHGAMI,
Hiroko IRIFUNE, Keiichi TANAKA, Mitsumasa YANO
and Hikotaro YOSHIDA

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

Abstract The synergistic effect of chlorinated chemicals and 0.1% griseofulvin (GF) on porphyrin metabolism was investigated. Drinking water containing 0.03% trichlorosalicylanilid, 0.1% 4-chloro-*m*-cresol, 0.1% trichlorophenoxyacetic acid, 0.3% trichloroethanol, 0.1% trichloromethiazide, 0.3% trichlorofon and 0.1% trichloroacetaldehyde was given separately to dd-y strain mice. Each group was divided into two subgroups, one treated with feed containing 0.1% GF and the other treated with normal feed. The treatments were continued for 45 to 165 days, after which porphyrins in the erythrocytes, feces and liver were analyzed by a chromatographic method.

In the 0.03% trichlorosalicylanilid and 0.1% GF group, 0.1% 4-chloro-*m*-cresol and 0.1% GF group, 0.1% trichlorophenoxyacetic acid and 0.1% GF group and 0.3% trichloroethanol and 0.1% GF group, a slight elevation of fecal coproporphyrin and protoporphyrin was seen. There was no elevation of hepatic and erythrocytic porphyrins. This result shows that the chemicals used in this study did not have a potential for porphyria, but that they are capable of inducing slight porphyrin abnormalities in a synergistic reaction with 0.1% GF.

Introduction

Yusho is a disease induced by polychlorinated biphenyls (PCBs) contaminating rice oil. Chlorinated compounds such as benzene hexachloride, dichlorodiphenyltrichloroethane, dieldrin and hexachlorobenzene exert an influence on porphyrin metabolism^{1),5),7)}. PCBs also display a porphyrinopathic effect^{8),9)}. KC-400, a contaminant in rice oil, has been shown to affect the hepatic porphyrins²⁾. Furthermore, a combination of certain chemicals and a low concentration of griseofulvin (GF) sometimes induces protoporphyria when the chemical alone cannot induce an abnormality⁶⁾. It is speculated that the use of low concentrations of GF in addition to chemicals may be useful in elucidating the porphyrinopathy of those chemicals. In a previous study, we investigated

whether or not simple chlorinated compounds affect porphyrin metabolism when a low concentration of GF is added to each chlorinated chemical⁴⁾. The result showed that three chemicals, that is, 4-chloro-*m*-cresol, cumarone and trichloroacetic acid, did not seem to affect porphyrin metabolism as much as chemicals like PCBs, estrogen, ethyl alcohol and iron. However, the insufficient number of animals made it impossible to confirm the porphyrinopathic action of these chemicals. In this study, we investigated seven chlorinated chemicals for porphyrinopathy and employed a different procedure for the analysis of porphyrins.

Materials and Methods

1) Animals

One hundred and fifty dd-y strain mice weigh-

ing 20 to 30 grams were used in this study.

2) Chemicals

Griseofulvin (GF) was provided by Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan. Trichlorosalicylanilid (TCSA), 4-chloro-m-cresol (CMC), trichlorophenoxyacetic acid (TPAA), trichloroethanol (TCE), trichloromethiazide (TCM), trichlorofon (TCF), and trichloroacetaldehyde (TCAA) were purchased from Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan. Porphyrin ester chromatographic marker kit was purchased from Paesel GmbH Co. Frankfurt, Germany.

3) Feeds 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 Oriental Yeast Co. TCSA, CMC, TPAA, TCE, TCM, TCF and TCAA were dissolved in drinking water in concentrations of 0.03%, 0.1%, 0.1%, 0.3%, 0.1%, 0.3% and 0.1% respectively.

a) The first experiment

The mice were divided into 8 groups. Group A was a control without any treatment. Group B was treated with 0.1% GF, group C with 0.03% TCSA, group D with 0.1% GF and 0.03% TCSA, group E with 0.1% CMC, group F with 0.1% GF and 0.1% CMC, group G with 0.1% TPAA, and group H with 0.1% GF and 0.1% TPAA.

b) The second experiment

The mice were divided into 5 groups. Group I was treated with 0.1% GF, group J with 0.1% GF and 0.3% TCE, group K with 0.1% GF and 0.1% TCM, group L with 0.1% GF and 0.3% TCF, and group M with 0.1% GF and 0.1% TCAA.

4) Quantitative analysis of porphyrin

Each mouse was anesthetized with ethyl ether and sacrificed after treatment. Liver tissue, feces, and blood were taken as samples for the analysis of porphyrins. The method for erythrocytic porphyrin-analysis has been described in a previous study⁵⁾, and that for liver and feces is shown in Fig. 1. Porphyrin marker kit was used as the standard marker in the thin layer chromatography (Fig. 2).

Results

Results of the first experiment are shown in Table 1. In normal mice, the mean liver/body weight ratio was 5.49%. Hepatic uroporphyrin (UP) could not be detected. The mean value of hepatic coproporphyrin (CP) and protoporphyrin (PP) was 0.16 nmol/g wet weight and 0.75 nmol/g wet weight. Fecal UP could not be detected. The mean value of fecal CP and PP was 0.23 nmol/g wet weight and 0.57 nmol/g wet weight. The mean value of erythrocytic CP

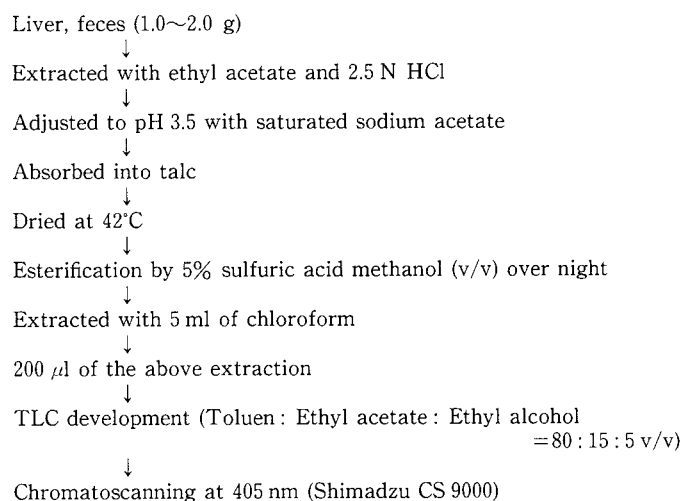


Fig. 1 Scheme of chromatographic porphyrin analysis

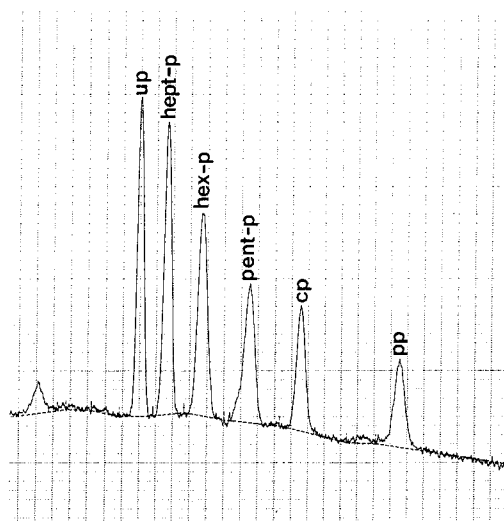


Fig. 2 Chromatogram of porphyrin marker kit using SHIMADZU CS9000

Abbreviations : up=uroporphyrin, hept-p=heptacarboxylporphyrin, hex-p=hexacarboxylporphyrin, pent-p=pentacarboxylporphyrin, cp=coproporphyrin, pp=protoporphyrin

and PP was 5.07 $\mu\text{g}/\text{dl}$ packed cell volume (pcv) and 40.39 $\mu\text{g}/\text{dl}$ pcv respectively. There was no difference in mean liver/body weight ratio, hepatic CP and PP, fecal UP, CP and PP, erythrocytic CP and PP between groups A and B (0.1% GF group).

In group C (0.03% TCSEA), group E (0.1% CMC) and group G (0.1% TPAA), there was also no difference in mean liver/body weight ratio, hepatic, fecal and erythrocytic porphyrins compared with group A. In group D (0.1% GF and 0.03% TCSEA), the mean liver/body weight ratio was 6.21%. Fecal CP and PP were 0.78 nmol/g wet weight and 1.46 nmol/g wet weight. There was a slight elevation of the mean value of liver/body weight ratio and fecal CP and PP, but no difference in the mean value of hepatic and erythrocytic porphyrins between groups B and D. In group F (0.1% GF and 0.1% CMC), fecal CP and PP were 1.50 nmol/g wet weight and 6.72 nmol/g wet weight. There was a slight elevation of fecal CP and PP in group F as compared with group B, but, hepatic and eryth-

Table 1 Summary of fecal, hepatic and erythrocytic porphyrin levels in the first experiment (mean $\pm$ S. E.)

	TREATMENT	No. OF MICE	DAYS OF TREATMENT	BODY WEIGHT (G)	LIVER WEIGHT (G)	LIVER/BODY WEIGHT RATIO (%)	FECAL PORPHYRINS (nmol/g. w. w)			HEPATIC PORPHYRINS (nmol/g. w. w)			ERYTHROCYTIC PORPHYRINS ($\mu\text{g}/\text{dl}$ pcv)	
							UP	CP	PP	UP	CP	PP	CP	PP
A	(-)	15		49.75 $\pm$ 8.20	2.63 $\pm$ 0.32	5.49 $\pm$ 0.74	t	0.23 $\pm$ 0.21	0.57 $\pm$ 0.44	t	0.16 $\pm$ 0.11	0.75 $\pm$ 0.29	5.07 $\pm$ 3.68	40.39 $\pm$ 22.90
B	0.1% GF	9	165	55.64 $\pm$ 8.96	2.96 $\pm$ 0.48	5.34 $\pm$ 0.33	t	0.11 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.66	t	0.42 $\pm$ 0.74	0.38 $\pm$ 0.07	3.19 $\pm$ 1.90	33.65 $\pm$ 11.42
C	0.03% TCSEA	10	51	52.35 $\pm$ 4.33	2.48 $\pm$ 0.18	4.75 $\pm$ 0.39	t	0.28 $\pm$ 0.27	0.71 $\pm$ 0.52	t	0.14 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.17	6.74 $\pm$ 5.09	60.09 $\pm$ 41.92
D	0.1% GF 0.03% TCSEA	14	45	46.46 $\pm$ 3.12	2.88 $\pm$ 0.40	6.21* $\pm$ 0.48	t	0.78 $\pm$ 0.28	1.46 $\pm$ 0.63	t	0.17 $\pm$ 0.08	1.33 $\pm$ 1.73	3.85 $\pm$ 2.84	31.55 $\pm$ 13.61
E	0.1% CMC	10	52	47.42 $\pm$ 3.19	2.45 $\pm$ 0.18	5.19 $\pm$ 0.76	t	0.44 $\pm$ 0.21	0.94 $\pm$ 0.61	t	0.20 $\pm$ 0.17	0.66 $\pm$ 0.42	11.46 $\pm$ 6.71	38.07 $\pm$ 27.91
F	0.1% GF 0.1% CMC	15	52	42.01 $\pm$ 5.39	2.22 $\pm$ 0.60	5.26 $\pm$ 0.99	t	1.50 $\pm$ 0.94	6.72 $\pm$ 8.88	t	0.15 $\pm$ 0.08	0.87 $\pm$ 0.75	5.01 $\pm$ 4.45	26.06 $\pm$ 16.68
G	0.1% TPAA	10	50	50.14 $\pm$ 4.40	2.75 $\pm$ 0.36	5.50 $\pm$ 0.75	t	0.55 $\pm$ 0.20	1.02 $\pm$ 0.42	t	0.14 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.15	3.80 $\pm$ 1.74	38.67 $\pm$ 15.18
H	0.1% GF 0.1% TPAA	14	59	43.63 $\pm$ 5.95	2.86 $\pm$ 0.70	6.51* $\pm$ 0.91	t	0.33 $\pm$ 0.17	1.90 $\pm$ 1.34	t	0.15 $\pm$ 0.12	0.50 $\pm$ 0.30	4.35 $\pm$ 2.44	60.05 $\pm$ 45.83

(t=trace) (*p<0.05)

rocytic porphyrins were not elevated. In group H (0.1% GF and 0.1% TPAA), the mean liver/body weight ratio was 6.51%. The mean value of fecal CP and PP was 0.33 nmol/g wet weight and 1.90 nmol/g wet weight. A slight elevation of the liver/body weight ratio and fecal CP and PP was seen.

Results of the second experiment are shown in Table 2. The data obtained in group I (0.1% GF) was similar to that in group B (0.1% GF) of the first experiment. In group J (0.3% TCE and 0.1% GF), there was no difference in the liver/body weight ratio and erythrocytic porphyrins compared with group I. There was a slight elevation in fecal CP and PP, but hepatic PP was relatively reduced. In group K (0.1% TCM and 0.1% GF), the mean value of liver/body weight ratio was reduced. There was a slight elevation in hepatic CP but no difference between group I and group K for either hepatic PP or fecal and erythrocytic porphyrins. In group L (0.3% TCF and 0.1% GF), liver/body weight ratio and hepatic PP were decreased. There was no difference between group I and group L for other hepatic porphyrins and fecal and erythrocytic porphyrins. In group M (0.1% TCAA and 0.1% GF), liver/body weight ratio was slightly elevated, but hepatic PP was rela-

tively reduced and there was no difference for other hepatic porphyrins and fecal and erythrocytic porphyrins.

Discussion

In this study, TCSA, CMC and TPAA alone did not induce any abnormality in porphyrin metabolism. By the addition of 0.1% GF to these chemicals, however, a slight elevation of fecal CP and PP appeared. TCE and 0.1% GF induced a similar abnormality in fecal CP and PP. TCM, TCF and TCAA with 0.1% GF did not induce any abnormality in porphyrin metabolism. In a previous study, mice treated with CMC and 0.1% GF showed a slight elevation of erythrocytic protoporphyrin level⁴⁾. In the present study, however, there were no changes in erythrocytic protoporphyrin. This may be due to the fact that the exposure time of CMC in this study was shorter than that in the previous study. Fecal porphyrins were analyzed in addition to hepatic and erythrocytic porphyrins, fecal porphyrins were also analyzed in this study. Furthermore, a chromatographic procedure was used for the porphyrin analysis. Each porphyrin can be separated more accurately by the chromatographic method than by the extraction method. The fecal porphyrins in the

Table 2 Summary of fecal, hepatic and erythrocytic porphyrin levels in the second experiment (mean $\pm$ S. E.)

	TREATMENT	No. OF MICE	DAYS OF TREATMENT	BODY WEIGHT (G)	LIVER WEIGHT (G)	LIVER/BODY WEIGHT RATIO (%)	FECAL PORPHYRINS (nmol/g. w. w.)			HEPATIC PORPHYRINS (nmol/g. w. w.)			ERYTHROCYTIC PORPHYRINS (μ g/dl pcv)	
							UP	CP	PP	UP	CP	PP	CP	PP
I	0.1% GF	10	108	46.34 $\pm$ 6.81	2.45 $\pm$ 0.38	5.34 $\pm$ 0.59	t	0.50 $\pm$ 0.31	1.17 $\pm$ 0.38	t	0.09 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 1.70	7.44 $\pm$ 8.33	47.18 $\pm$ 36.28
J	0.1% GF 0.3% TCE	11	96~102	55.23* $\pm$ 6.60	2.87* $\pm$ 0.36	5.26 $\pm$ 0.84	t	1.46 $\pm$ 0.94	2.94 $\pm$ 1.96	t	0.35 $\pm$ 0.32	0.50 $\pm$ 0.24	1.78 $\pm$ 0.55	37.26 $\pm$ 26.43
K	0.1% GF 0.1% TCM	11	110~115	48.35 $\pm$ 3.83	2.27 $\pm$ 0.22	4.71* $\pm$ 0.36	t	0.91 $\pm$ 0.81	2.20 $\pm$ 2.11	t	0.27 $\pm$ 0.21	1.64 $\pm$ 2.24	2.30 $\pm$ 0.95	36.63 $\pm$ 23.85
L	0.1% GF 0.3% TCF	11	92	46.03 $\pm$ 9.64	2.13 $\pm$ 0.66	4.70* $\pm$ 0.45	t	0.77 $\pm$ 0.76	1.74 $\pm$ 1.23	t	0.26 $\pm$ 0.34	0.50 $\pm$ 0.26	6.89 $\pm$ 3.43	56.67 $\pm$ 31.49
M	0.1% GF 0.1% TCAA	10	97~99	47.17 $\pm$ 4.11	2.81 $\pm$ 0.56	6.20* $\pm$ 1.15	t	0.67 $\pm$ 0.42	1.85 $\pm$ 1.47	t	0.16 $\pm$ 0.10	0.41 $\pm$ 0.19	2.71 $\pm$ 1.61	45.11 $\pm$ 17.41

(t=trace) (*p<0.05)

groups of three chemicals, that is TCSA, CMC and TPAA, with 0.1% GF showed a similar slight elevation, but the level of hepatic and erythrocytic porphyrins did not change. In some mice treated with TCSA or CMC, however, an accumulation of porphyrin was observed in the liver by fluorescence microscope. Thus, it is speculated that the elevation of fecal CP and PP in the mice treated with these chlorinated chemicals and 0.1% GF is due to an increase of fecal excretion from hepatic porphyrins. It is also considered the hepatic porphyrin level does not increase if porphyrin excretion into the feces is active despite the acceleration of porphyrin production in the liver³⁾. It is necessary to investigate the mechanism of these changes in further studies.

The seven chemicals selected in this study do not seem to affect porphyrin metabolism as much as chemicals like PCBs, estrogen, ethyl alcohol and iron, which induced severe porphyria by addition of 0.1% GF⁶⁾. The chemicals used alone in this study did not display any potential for porphyria. These chemicals may, however, be able to induce slight porphyrin abnormalities by the synergistic reaction with another chemicals such as GF. Some polyhalogenated chemicals have a strong potentiation for porphyria, but there is a great difference among chemicals. Patients with porphyria cutanea tarda are exposed to many chemicals including ethyl alcohol, estrogen, and other polyhalogenated chemicals. We consider it important to investigate chemicals not yet reported as porphyriopathic substances. This was underlined by one of our colleagues, who discovered the porphyriopathic potentiation of isonicotinic acid hydrazide¹⁰⁾. People are exposed to a tremendous variety of chemicals in daily life, including drugs, food additives and environmental pollutants. The seven chemicals used in the present study are only a fraction. It is important, therefore, to investigate the porphyriopathic potential of various other chemicals, especially chlorinated chemicals.

Acknowledgments

The authors wish to thank Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan for the contribution of griseofulvin. We are also grateful to Miss Yoshiko Iwahashi for her porphyrin analysis.

References

- 1) De Matteis F: Toxic hepatic porphyrias. *Sem. Hematol.* 5: 409-423, 1968.
- 2) 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.
- 3) Irifune H: Reversibility of griseofulvin induced protoporphyria in the mice. *Jap. J. Dermatol.* 97: 801-804, 1987 (in Japanese).
- 4) Nonaka S, Ohgami T, Yamashita K, Irifune H, Watanabe M, Tsukazaki N, Tanaka K and Yoshida H: The effect of chlorinated chemicals on porphyrin metabolism—The synergistic effect with chlorinated chemicals and low concentrations of griseofulvin— *Fukuoka Acta Med.* 80: 221-226, 1989.
- 5) Peters HA: Hexachlorobenzene poisoning in Turkey. *Fed. Proc.* 35: 2400-2403, 1976.
- 6) Shimoyama T, Nonaka S, Honda 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.
- 7) Strik JJTWA: Species differences in experimental porphyria caused by polyhalogenated aromatic compounds. *Enzyme* 16: 224-230, 1973.
- 8) Vos JG and Koeman JH: Comparative toxicologic study with polychlorinated biphenyls in chicken with special reference to porphyria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 17: 656-668, 1970.
- 9) Vos JG, Strik JJTWA, Hosteyn SWN and Penning JH: Polychlorinated biphenyls as inducers of hepatic porphyria in Japanese quail, with special reference to delta-aminolevulinic acid synthetase, fluorescence and residues in the liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20: 232-240, 1971.
- 10) Watanabe, M: The synergistic effect of isonicotinic acid hydrazide (INH) and griseofulvin (GF) on porphyrin metabolism. *J. Dermatol. (Tokyo)* 18: 39-42, 1991.

(和文抄録)

塩素化合物(Trichlorosalicylanilid, 4-Chloro-*m*-Cresol, Trichlorophenoxyacetic acid, Trichloroethanol, Trichloromethiazide, Trichlorofon, Trichloroacetaldehyde) と低濃度 Griseofulvin のポルフィリン代謝に対する複合作用

長崎大学医学部皮膚科学教室

塚崎直子・野中薫雄・大神太郎

入船弘子・田中敬一

矢野光政・吉田彦太郎

塩素化合物と 0.1% griseofulvin のポルフィリン代謝に対する複合作用を検討した。0.03% trichlorosalicylanilid, 0.1% 4-chloro-*m*-cresol, 0.1% trichlorophenoxyacetic acid, 0.3% trichloroethanol, 0.1% trichloromethiazide, 0.3% trichlorofon, 0.1% trichloroacetaldehyde を溶解した水を飲料水として dd-y 系マウスに投与した。各群をさらに 2 群に分け、一群は 0.1% griseofulvin 含有飼料を、他群には正常飼料を投与した。45 日から 165 日間飼育後、赤血球、糞便、肝臓中のポルフィリン体をクロマトグラフィー法を用いて測定した。

その結果、0.03% trichlorosalicylanilid, 0.1% 4-chloro-*m*-cresol, 0.1% trichlorophenoxyacetic acid, および 0.3% trichloroethanol と 0.1% griseofulvin を併用した群では糞便中 coproporphyrin と protoporphyrin の軽度の上昇がみられた。赤血球、肝臓のポルフィリン値の上昇はなかった。以上のことから今回用いた塩素化合物はポルフィリン症を誘発することはできなかった。しかし、0.1% griseofulvin との複合作用によって軽度のポルフィリン代謝異常を引き起こし得ることが判明した。

ヒトリンパ球の姉妹染色分体交換誘発性に対する 有機塩素系化学物質の作用

九州大学医療技術短期大学部環境医学研究室
長山 淳哉・長山 真弓・和田 健一
福岡県衛生公害センター
飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦
第一薬科大学物理分析学教室
増田 義人

The Effect of Organochlorine Compounds on the Induction of Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes

Junya NAGAYAMA, Mayumi NAGAYAMA and Ken-ichi WADA
*Laboratory of Environmental Medicine, School of Health Sciences,
Kyushu University 90, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan*
Takao IIDA, Hironori HIRAKAWA and Takahiko MATSUEDA
Fukuoka Environmental Research Center, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01, Japan
Yoshito MASUDA
Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Minami-ku, Fukuoka 815, Japan

In this study, first, we investigated the effect of 7,8-benzoflavone (ANF), mitomycin C (MMC), a well-known genotoxic compound, and ANF plus MMC on the induction of sister chromatid exchanges (SCEs) in human whole-blood cultures. Second, we examined the effect of mixture of organochlorine compounds, which very resembled their contamination of healthy people in its composition, on the induction of SCEs in the same blood culture system in order to clarify their genotoxicity as a whole. The following results were obtained.

1. ANF and MMC significantly enhanced the number of SCEs/cell at the concentrations of 4×10^{-5} M and 10^{-8} M, respectively. When both of the compounds were simultaneously added in the blood cultures, their effects on the induction of SCEs seemed to be additive.
2. Without ANF in the blood culture system, namely, an usual system of the SCEs experiment, we could not find a dose-response relationship between the concentration of the mixture of organochlorine compounds and the induction of SCEs/cell. With ANF, however, we observed a fairly good dose-response relationship between them.
3. In the whole-blood culture system with ANF, we found significantly great number of SCEs/cell at the level of twenty times higher concentration of the organochlorine compounds than the ordinary level.

According to the results described above and of our other studies, 50% effective concentration (EC_{50} , about 2 SCEs/cell higher than control SCEs/cell) of the mixture was considered to be about 5 times greater level over the general one.

We have already reported that methylsulphonyl polychlorinated biphenyls (MSF-PCBs), one of the major metabolites of PCBs, which are also one of the main contaminants of human body among organochlorine compounds, show almost the same enhancing and inhibiting effects on aryl hydrocarbon hydroxylase activity both of cultured human lymphoblastoid cells and of hepatic microsomes prepared from mice as ANF, so some of MSF-PCB isomers will be expected to elicit similar clastogenic effect to ANF in the induction of SCEs. One of the most important problems

to be solved will be the comprehensive genotoxicity and/or health consequences to the descendants of the mixed contamination of the organochlorine compounds such as PCBs, MSF-PCBs, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins since our human bodies have already been contaminated by these chemicals and several flavones and flavonoids, which are very similar to ANF in chemical structure, are normally occurring constituents of the human diet.

はじめに

近年, 新しい染色体変異として姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchanges, SCEs) 現象が注目されてきた. この SCEs 現象は, 1938 年に McClintock が maize (トウモロコシ) の細胞における環状染色体の形態変化から, その存在を予測していたものである¹⁰⁾. 具体的に細胞遺伝学的な手法において, 最初にこの SCEs の現象を観察したのは Taylor であった²⁰⁾. しかし, Taylor の観察から 10 年以上もの間, この現象は研究上殆ど顧みられることがなかった. 1972 年, Zakharov と Egolina²³⁾ により SCEs 観察のより簡便な実験技法が報告されたのを契機に, SCEs に関する基礎的研究が始まった. さらに, 彼らの技法は Latt⁵⁾ や Perry と Wolff¹⁷⁾ により改良され, ここ 10 年以上, SCEs 研究は細胞遺伝学上の重要な研究課題となっている.

SCEs とは細胞の複製によって同一の染色体から生じた相同な染色分体 (姉妹染色分体) が, その相同な一部分を相互に交換する現象である (Fig. 1 参照). この交換反応には, 染色体 DNA の切断と再結合の過程が関与しているので, SCEs の分析は DNA 交換を細



Fig. 1 Harlequin stained chromosomes of a metaphase. Arrows show some SCEs.

胞学的に検出する極めてすぐれた実験方法である. 近年, SCEs 誘発性と変異原性あるいは癌原性との高い相関が種々の薬剤について観察されるにおよび, SCEs 分析は変異原性物質, 癌原性物質による DNA 損傷をモニターする高感度の検出系としても注目されるようになった¹¹⁾²¹⁾.

さて, すでに私たちの身体は種々の有機塩素系化学物質により汚染されている (Table 2 参照). これまでの私たちの研究から, 単独ではある種の酵素活性に変化を及ぼさなくても, 他の有機塩素系化学物質が存在する場合には, 相加的あるいは相乗的に作用を及ぼすことを認めている¹⁶⁾. このような研究結果に鑑み, この研究では, 現在の私たちの身体を汚染している有機塩素系化学物質の個々の遺伝毒性を研究することよりも, まず, そのような有機塩素系化学物質が全体として, どの程度の遺伝毒性作用を示すかを研究することを目的とし, 遺伝毒性の指標として SCEs 誘発性を用いた. その研究結果について報告する.

実験方法

1. 化学薬品

Table 2 に示されている polychlorinated bi-

Table 1 The effect of ANF, MMC and ANF plus MMC on the frequency of SCEs in cultured human peripheral blood lymphocytes

Chemical	SCEs/Cell (Mean $\pm$ S. E.)	
	Subject ; Sex, Age, Smoking Habit	
	Male, 45, Nonsmoker	Male, 48, 20 cigarettes/day
Control	7.0 $\pm$ 0.9	10.7 $\pm$ 1.3
ANF (4×10^{-5} M)	10.1 $\pm$ 0.9*	15.7 $\pm$ 0.6**
MMC (10^{-8} M)	19.9 $\pm$ 1.5**	19.9 $\pm$ 1.2**
ANF (4×10^{-5} M) + MMC (10^{-8} M)	23.6 $\pm$ 1.7**	28.2 $\pm$ 1.2**

* : Significantly different from the corresponding control value at $P < 0.05$ (Student's *t* test).

** : Significantly different from the corresponding control value at $P < 0.01$ (Student's *t* test).

Table 2 Mean concentrations of PCBs, PCQs^a, PCDFs, PCDDs and coplanar PCBs of the adipose tissue samples^b and the composition of the mixture^c of these organochlorine compounds

Organochlorine Compound	Mean Concentration	Composition
PCBs	891 ppb	8.9mg ^d
PCQs	4 ppb	—
PCFDs		
2,3,7,8-tetra	6 ppt	60 ng
2,3,4,7,8-penta	22 ppt	220 ng
1,2,3,4,7,8-hexa	9 ppt	90 ng
1,2,3,6,7,8-hexa	7 ppt	70 ng
1,2,3,4,6,7,8-hepta	3 ppt	30 ng
Octa	0 ppt	—
PCDDs		
2,3,7,8-tetra	2 ppt	20 ng
1,2,3,7,8-penta	8 ppt	80 ng
1,2,3,6,7,8-hexa	27 ppt	270 ng
1,2,3,4,6,7,8-hepta	33 ppt	330 ng
Octa	781 ppt	—
Coplanar PCBs		
3,4,3',4'-tetra	30 ppt	300 ng
3,4,5,3',4'-penta	192 ppt	1920 ng
3,4,5,3',4',5'-hexa	139 ppt	1390 ng

a: Polychlorinated quaterphenyls.

b: The adipose tissue samples were taken from eleven healthy people who were living in Fu-kuoka, Japan.

c: The mixture was used in this study

d: The mixture of the same quantity of Kanechlor 500 and 600.

phenyls (PCBs, Kanechlor 500 と 600 の等量混合物), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) および Coplanar PCBs (Co-PCBs) の各異性体は共同研究者の増田義人教授より提供された。PCDFs, PCDDs および Co-PCBs 各異性体の純度はガスクロマトグラフィー上 99% 以上である。5-bromo-2'-deoxyuridine (BUdR) は the Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) より, phytohemagglutinin M (PHA) は Difco Laboratories (Detroit, Mich, USA) より, penicillin と streptomycin および RPMI 1640 培地は GIBCO, ライフテックオリエンタル(株) (東京) より, また, mitomycin C (MMC), demecolcin および 7,8-benzoflavone (ANF) は和光純薬工業(株) (大阪) より購入した。その他の薬品, 試薬などは市販されている

最高級品を使用した。

2. ヒト末梢血リンパ球の培養と SCEs の計測

ヒト末梢血リンパ球の培養は全血培養法により行った。つまり, RPMI 1640 培地(牛胎児血清 15%, penicillin 100 U/ml および streptomycin 100 μ g/ml を含む)4.5 ml に血液 0.3 ml, BUdR 100 μ M, 各種の化学物質あるいは溶媒および PHA 0.15 ml (最終濃度 3%) を加え, 培養する(全量 5.0 ml)。培養条件は温度 37°C, 湿度 100%, 二酸化炭素 5% である。この全血培養液に加えた各種の化学物質の濃度は以下のとおりである; ANF 4×10^{-5} M, MMC 10^{-8} M, ANF 4×10^{-5} M + MMC 10^{-8} M, および Table 2 に示した有機塩素系化学物質による平均的人体汚染レベルの 2 倍あるいは 20 倍の濃度の混合溶液。69 時間後, 全血培養液に demecolcin (2×10^{-7} M) を加え, その 3 時間後に培養を停止する。

全血培養液を遠沈し, 上清を捨て, 0.075 M KCl 5 ml を加えて攪拌し, 37°C で 15 分間静置する。遠沈の操作は常に一定しており, 1,000 r. p. m. で 5 分間である。この混合液にカルノア液(酢酸:エタノールが 1:3 の混合固定液)5 ml を加え, 攪拌し, 5 分間室温で静置する。この後, 遠沈し, 上清を捨て, カルノア液 10 ml を加え, 攪拌後, 30 分以上室温で静置する。遠沈からカルノア液添加の操作をもう一度繰り返し, リンパ球細胞の固定を完了する。

あらかじめメタノールに浸し, -20°C で冷却しておいた清浄済みスライドガラス上にカルノア固定細胞浮遊液をピペットから 3 滴, 滴下し, 蒸気固定法によりスライドガラス標本を作成する。Hoechst 33258 (1/15 M リン酸緩衝液に 50 μ g/ml) 溶液にスライドガラス標本を 18 分間浸し, tub-water により洗浄する。このスライドガラス標本上に 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を 3 滴落し, カバーグラスをつける。この後, 60°C の hot-plate 上で 8 分間紫外線照射し, 氷冷 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 中でカバーグラスをはずす。次に 3% ギムザ液 (1/15 M リン酸緩衝液, pH 6.8) に 15 分間浸し, ギムザ染色を行う。この染色後, 46 本の染色体の揃った分裂期にある細胞の SCEs を同一群につき 25 細胞以上計測する (SCEs の計測に適する細胞はすべて写真に撮り, 保存している)。なお, この計測はブラインド下で 2~3 名の研究者により再チェックされた。

対照群との統計学的有意差は Student の t 検定 (両側) により検討した。

実 験 結 果

1. ANF および MMC の SCEs 誘発性

46 歳の男性非喫煙者と 48 歳の男性喫煙者（約 20 本/日）の末梢血リンパ球の SCEs 誘発性に対する ANF, MMC および ANF+MMC の作用について、その実験結果を Table 1 に示す。この両名の対照群の SCEs/細胞は非喫煙者で 7.0, 喫煙者で 10.7 であり、非喫煙者の方が有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。ANF ($4 \times 10^{-5} \text{M}$) は各々の対照群と比較して、SCEs 形成を有意に高め、喫煙者において上昇の度合いが大であった。MMC (10^{-6}M) も SCEs 形成を有意 ($P < 0.01$) に高めたが、この場合、両者の SCEs/細胞は同じ数値 (19.9) を示した。また、ANF ($4 \times 10^{-5} \text{M}$) と MMC (10^{-6}M) を同時にリンパ球に作用させた場合にも、SCEs/細胞は有意 ($P < 0.01$) に高くなり、この場合、両化学物質の作用は相加的であった。

2. 人体を汚染している有機塩素系化学物質混合溶液の SCEs 誘発性

26 歳の男性非喫煙者と 36 歳の女性非喫煙者の末梢血リンパ球の SCEs 誘発性に対する健康者を汚染している有機塩素系化学物質混合溶液 (Table 2 参照) の作用について、その実験結果を Table 3 に示す。有機塩素系化学物質混合溶液の濃度は人体汚染レベルの 2 倍 (Mixture I) と 20 倍 (Mixture II) を用いた。通常の SCEs 実験系では ANF は使用されないの、ま

ず、通常の実験系での結果を記述する。対照群の SCEs/細胞は男性よりも女性において高い傾向にあるが、これは他の研究者によっても観察されている一般的な傾向である²¹⁾。通常の SCEs 実験系では低濃度の Mixture I のほうが高濃度の Mixture II よりも SCEs 誘発性が高い傾向にあり、特に女性の場合には対照群よりも有意 ($P < 0.01$) に高くなった。つまり、どちらかと言えば負の量・反応関係が認められた。通常の SCEs 実験系に ANF ($4 \times 10^{-5} \text{M}$) を加えると、正の量・反応関係が明確に観察され、男性では Mixture I と II の両方で、女性では Mixture II の場合に対照群と比較して有意 ($P < 0.01$) に高い SCEs の誘発が認められた。上記のような研究結果から、ANF は有機塩素系化学物質の遺伝毒性作用を SCEs 誘発性を指標として研究する場合、必要不可欠の化学物質であると考えられた。

考 察

一般に、SCEs は環境変異原性物質および環境癌原性物質への人間の曝露を評価するための、極めて鋭敏な細胞遺伝学的実験法であると考えられている⁹⁾。現在までに行われた SCEs に関する研究報告において、SCEs 形成に影響を及ぼすと考えられる内因性の要因は、性、年齢、遺伝的素因などであり、また外因性の要因は、喫煙、多量の飲酒、コーヒー摂取などである¹⁸⁾²¹⁾。一般集団と比較して、癌死亡率が低く、平均寿命の長い Seventh-Day Adventists (SDAs)、卵と牛乳は摂取する菜食主義の人々、では SCEs 形成頻度も有意な低値を示す²²⁾。

従来の研究結果³⁾⁹⁾¹⁸⁾²¹⁾と同様に、この研究においても、喫煙者は非喫煙者よりも SCEs 値が高く、また女性は男性よりも高い SCEs 値を示した (Tables 1 と 3)。さらに、MMC も 10^{-6}M という低い濃度で喫煙者および非喫煙者の SCEs 値を顕著に高めた (Table 1)。このような実験結果により、この研究において用いた細胞培養条件および SCEs 計測技術は十分に信頼できるレベルにあると考える。

ANF と SCEs の関係に関しては、アメリカ合衆国の National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS, 国立環境保健研究所) の Lucier の研究グループにより種々の研究報告がなされている。彼らはまず、非喫煙者、間接喫煙者および喫煙者の末梢血リンパ球の SCEs 誘発性を、リンパ球の培養中に ANF を加えた場合と加えない場合について比較検討し、ANF を加えることにより、喫煙量と SCEs 誘発性

Table 3 The induction of SCEs in cultured human lymphocytes exposed to the mixture of the organochlorine compounds or the mixture plus ANF

Treatment	SCEs/Cell (Mean $\pm$ S. E.)	
	Subject ; Sex, Age, Smoking Habit	
	Male, 26, Nonsmoker	Female, 36, Nonsmoker
Control	8.8 $\pm$ 0.7	10.9 $\pm$ 0.4
Mixture I ^a	10.7 $\pm$ 0.8	13.8 $\pm$ 0.8**
Mixture II ^a	10.0 $\pm$ 0.5	11.9 $\pm$ 0.8
Mixture I + ANF ^b	12.8 $\pm$ 0.7**	11.2 $\pm$ 0.7
Mixture II + ANF ^b	15.1 $\pm$ 0.8**	16.5 $\pm$ 0.8**

a: Mixture I and II contain twice and 20 times higher concentrations of the average level of the organochlorine compounds, respectively, listed in Table 2 in the adipose tissue samples.

b: Concentration of ANF is $4 \times 10^{-5} \text{M}$.

** : Significantly different from the corresponding control value at $P < 0.01$ (Student's t test).

との量・反応関係が明確となり、喫煙量に対する検出感度が有意に高まることを報告した³⁾⁹⁾。具体的には、通常の SCEs 実験系では 1 日 20 本以上の喫煙でないと非喫煙者と比較して、有意に高い SCEs 値が得られないが、ANF を加えることにより、1 日 5 本程度の喫煙でも有意に高い SCEs 値が得られるというのである。次に、彼らは 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を経口投与したラットと投与しないラットの血液リンパ球の SCEs 誘発性について比較・研究した⁷⁾。そして、細胞培養中に ANF を加えない場合には 0~30 $\mu\text{gTCDD/kg}$ において、対照群と比較して有意に高い SCEs 値は得られなかったが、ANF を加えると 0~3 $\mu\text{gTCDD/kg}$ の範囲で、量・反応関係をもって、TCDD により SCEs が誘発された。この場合、3~30 $\mu\text{gTCDD/kg}$ では SCEs 値はほぼ同じ高値を示した。同様の研究結果が台湾の油症患者群と対照群の間でも観察された⁸⁾。つまり、末梢血リンパ球の培養中に ANF を加えない場合には、両群の SCEs 値に差異は認められないが、ANF を加えることにより油症患者群の SCEs 値が有意 ($P < 0.001$) に高くなった。上記のように喫煙の場合にも、また、TCDD や台湾の油症患者 (PCDFs が原因物質であると考えられている) の場合にも ANF を培養液に加えることにより、環境要因の遺伝毒性作用を従来の方法よりも極めて高感度に検出可能であることが認められている。

$4 \times 10^{-6}\text{M}$ において、ANF は非喫煙者および喫煙者のリンパ球細胞の SCEs 値をそれぞれの対照群の値よりも有意に高めた (Table 1)。ANF によるこのような作用は上記のように Lucier の研究グループによっても認められている。そして、ANF によるこのような clastogenic な作用は minor な代謝物である 9,10-dihydro-9,10-dihydroxy-ANF のような代謝物により生ずると考えられている¹⁾。Table 3 に示されているように、一般的な SCEs 実験系では有機塩素系化学物質混合溶液による SCEs 誘発性に量・反応関係が認められず、むしろ低濃度の方が高い SCEs 誘発性を示す傾向が観察された。しかし、通常の SCEs 実験系に ANF を加えることにより、有機塩素系化学物質混合溶液の濃度と SCEs 誘発性の間に正の量・反応関係が認められるようになった。このような量・反応関係をさらに詳細に研究したところ、従来の SCEs 実験系では、量・反応関係は観察されず、ANF を用いることにより比較的良好な量・反応関係が認められた¹³⁾。この後者の実験系により有機塩素系化学物質混合溶液による SCEs 誘発性の 50% 有効濃度 (約 2 SCEs/細胞の増加) は現在

の人体汚染レベルの約 5 倍のところにあることが示唆された。

PCBs のなかでは毒性が高いと考えられている 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl (3,4,3',4'-TCB), Co-PCBs 異性体の一種、はリンパ球培養細胞系で染色体切断作用を示すが、Co-PCBs ではない 2,5,2',5'-TCB にはそのような作用は観察されなかった。しかし、両異性体を同時にリンパ球細胞に作用させると、3,4,3',4'-TCB の遺伝毒性作用は相乗的に高くなった¹⁹⁾。また、PCBs に曝露したと考えられる労働者では *fos* と *ras* という癌遺伝子由来の蛋白質が血清中に検出され、発癌のリスクが高くなっていると考えられている²⁾。さらに PCBs の代謝物であり、人体をかなり高濃度に汚染している methylsulphonyl PCBs (MSF-PCBs) には ANF と同様の酵素活性化作用および阻害作用のあることが認められている¹⁴⁾¹⁵⁾ ので、MSF-PCBs にも ANF と同様の clastogenic な作用がある可能性が考えられる。有機塩素系化学物質の染色体あるいは遺伝子に対する作用は、単一の化学物質についてのみ研究するのではなく、複合的な人体汚染を考慮して研究することも、極めて重要である。また、ANF に化学構造が類似している flavones や flavonoids が自然界、主に野菜に広く存在しており、これらの化学物質のある異性体にも突然変異原性のあることが報告されている⁴⁾¹²⁾。従って、人体汚染のみならず、食物からの他の化学物質の摂取も考慮した、より総合的な観点から有機塩素系化学物質の遺伝毒性作用や子孫への影響等を研究することは最も重要な課題の一つであると考えられる。

結 論

ヒト末梢血リンパ球の全血培養法を用いて ANF, MMC, ANF+MMC および人体を汚染している有機塩素系化学物質混合溶液の遺伝毒性作用を姉妹染色分体交換 (SCEs) 誘発性を指標として研究し、下記のような研究結果が得られた。

1. ANF は $4 \times 10^{-6}\text{M}$ の濃度で、また MMC は 10^{-8}M の濃度で有意に高い SCEs 誘発性を示した。また、ANF と MMC を同時にリンパ球細胞に処理した場合、両化学物質による SCEs 誘発性は相加的であった。
2. 人体を汚染している有機塩素系化学物質混合溶液の SCEs 誘発性については、通常の SCEs 実験系では量・反応関係が認められなかったが、この系に ANF を加えることにより、比較的良好な正の

量・反応関係が得られた。

3. ANFを加えた SCEs 実験系において、有機塩素系化学物質濃度が現在の人体汚染よりも 20 倍高いレベルで有意 ($P < 0.01$) に高い SCEs 誘発性が観察された。

このような研究結果および私たちの他の研究結果から、有機塩素系化学物質濃度が現在の人体汚染レベルの約 5 倍のところに 50% 有効濃度 (約 2 SCEs/細胞の増加) があると考えられる。また、PCBs の代謝物である MSF-PCBs には ANF と同様の酵素活性化作用および阻害作用があることから、MSF-PCBs にも ANF と同様の clastogenic な作用がある可能性がある。さらに、ANF に化学構造が類似する flavones 類が野菜などに広く分布している。以上のような知見を総合して考えると、有機塩素系化学物質の遺伝毒性作用や子孫への影響等を研究する場合、人体汚染だけでなく、食物からの他の化学物質の摂取なども考慮した、より包括的な観点からの研究が最も重要な課題の一つであると考えられる。

謝 辞

SCEs に関する実験技法については大阪大学医学部環境医学教室 (森本兼義教授) の教室員の方々に大変お世話になりましたので、ここに記して深謝致します。

文 献

- 1) Andries M, Lucier GW, Lundgren K and Thompson CL: Metabolic activation of α -naphthoflavone by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-dioxin-induced rat liver microsomes. Chem.-Biol. Interact. 67: 33-47, 1988.
- 2) Brandt-Rauf PW and Himan HL: Serum screening for oncogene proteins in workers exposed to PCBs. Br. J. Ind. Med. 45: 689-693, 1988.
- 3) Collman GW, Lundgren K, Shore D, Thompson CL and Lucier GW: Effects of α -naphthoflavone on levels of sister chromatid exchanges in lymphocytes from active and passive cigarette smokers: Dose-response relationships. Cancer Res. 46: 6452-6455, 1986.
- 4) Elliger CA, Henika PR and MacGregor JT: Mutagenicity of flavones, chromones and acetophenones in Salmonella typhimurium. Mutat. Res. 135: 77-86, 1984.
- 5) Latt SA: Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3395-3399, 1973.
- 6) Latt SA, Allen J, Bloom SE, Carrano A, Falke E, Kram D, Schneider E, Schrenk R, Tice R, Whitfield B and Wolf S: Sister chromatid exchanges: A report of the Gene-Tox program. Mutat. Res. 87: 17-62, 1981.
- 7) Lundgren K, Andries M, Thompson C and Lucier GW: Dioxin treatment of rats results in increased *in vitro* induction of sister chromatid exchanges by α -naphthoflavone: An animal model for human exposure to halogenated aromatics. Toxicol. Appl. Pharmacol. 85: 189-195, 1986.
- 8) Lundgren K, Collman GW, Wang-Wuu S, Tiernan T, Taylor M, Thompson CL and Lucier GW: Cytogenetic and chemical detection of human exposure to polyhalogenated aromatic hydrocarbons. Environ. Mol. Mutagen. 11: 1-11, 1988.
- 9) Lundgren K and Lucier GW: Differential enhancement of sister-chromatid exchange frequencies by α -naphthoflavone in cultured lymphocytes from smokers and non-smokers. Mutat. Res. 143: 131-135, 1985.
- 10) McClintock B: The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. Genetics 38: 251-260, 1938.
- 11) 森本兼義: リンパ球培養による人間集団のモニタリング, トキシコロジーフォーラム 7: 384-394, 1984.
- 12) Nagao M, Morita N, Yahagi T, Shimizu M, Kuroyanagi M, Fukuoka M, Yoshihira K, Natori S, Fujino T and Sugimura T: Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. Environ. Mutagen. 3: 401-419, 1981.
- 13) 長山淳哉: 人体を汚染している有機塩素系化学物質の遺伝毒性について, 日衛誌 46: 印刷中.
- 14) Nagayama J, Mohri N, Haraguchi K and Masuda Y: Inhibitory effect of methylsulphonyl polychlorinated biphenyls on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Chemosphere 18: 701-708, 1989.
- 15) 長山淳哉, 毛利紀子, 原口浩一, 増田義人: 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, 福岡医誌 80: 201-209, 1989.
- 16) 長山淳哉, 毛利紀子, 増田義人: 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, 福岡医誌 80: 196-200, 1989.
- 17) Perry P and Wolff S: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 251: 156-158, 1974.
- 18) Reidy JA, Joseph LA, Chen ATL and Welty TK: Increased sister chromatid exchange associated with smoking and coffee consumption. Environ. Mol. Mutagen. 12: 311-318, 1988.

- 19) Sargent L, Roloff B and Meisner L : In vitro chromosome damage due to PCB interactions. *Mutat. Res.* 224 : 79-88, 1989.
- 20) Taylor JH : Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics* 43 : 515-529, 1958.
- 21) Wulf HC : Monitoring of genotoxic exposure of humans by the sister chromatid exchange test. Methodology and confounding factors. *Dan. Med. Bull.* 37 : 132-143, 1990.
- 22) Wulf HC, Iversen AS, Husum B and Niebuhr E : Very low sister-chromatid exchange rate in Seventh-Day Adventists. *Mutat. Res.* 162 : 131-135, 1986.
- 23) Zakharov AF and Egorina NA : Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* 38 : 341-365, 1972.

PCDF の pUC18 Plasmid DNA に及ぼす影響

長崎大学医学部皮膚科学教室 (主任: 吉田彦太郎教授)

堀 真・鵜殿雅子・豊島弘行
広瀬 寮二・吉田彦太郎

Influences of Polychlorinated Dibenzofuran on pUC18 Plasmid DNA

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

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

We investigated an effect of polychlorinated dibenzofuran (PCDF) on pUC18 plasmid DNA. The mixtures of pUC18 and PCDF were introduced into the competent cells derived from *E. coli*. The competent cells were cultured on Luria-Bertani agar plate containing ampicillin. The number of colonies was not decreased in compared with it of *E. coli* inserted non-treated pUC18. The pUC18 re-extracted from the *E. coli* with PCDF-treated pUC18 were digested with 15 kinds of restriction enzymes and agarose gel electrophoresed. As the results no changes were found in compared with non-treated pUC18. Those findings suggested that the PCDF did not react with pUC18.

発癌物質には DNA に直接作用して癌を誘発するものと、その物質を生体が代謝するさいに発生する産物が DNA に作用して発癌性をしめす場合の 2 種類がある¹⁾。いづれにしても、発癌物質は何らかの形で DNA に作用し、その塩基配列に mutation を引き起こすことが一般的に認められてきている。

今回、われわれは polychlorinated dibenzofuran (PCDF) が vector である pUC18 plasmid DNA (以下 pUC18) に何らかの直接的な作用をしめすか否かを pUC18 とその competent cell である *E. coli* を使用して検討した。また、ヒト白血球 DNA に対する PCDF の結合の有無を知るために分光光度計による吸光度曲線を検討した。

実験材料と方法

1. pUC18 に対する PCDF の作用

E. coli (JM105) より competent cell を作製した²⁾。pUC18 (タカラ) の 0.2 ng, 1 ppm PCDF, アセトン溶液で処置した pUC18 の 0.2 ng を上記 competent cell に取りこませた。37°C, 11 時間, アンピシリン加 Luria-Bertani medium (L・B medium) を入れた寒天培地で

培養し、発生したコロニー数をコロニーカウンターでかぞえた。

両者より、それぞれ、5 個のコロニーを LB medium 中で 37°C, 10 時間 water bath 中で振盪培養した。pUC18 を *E. coli* より回収³⁾ 後、15 種類の制限酵素 *EcoRI*, *SacI*, *Hind III*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI*, *PvuI*, *HaeIII*, *HincII*, *ScaI*, *VspI* (タカラ) で消化し、1% アガロースゲル上で電気泳動した。

2. ヒト白血球に対する PCDF の作用

27 歳から 48 歳までの健康な男 5 人より 30 ml ずつ、ヘパリン加採血をおこない、以下の 3 群に分類し、それぞれから Geever²⁾ らの方法に準じて DNA を抽出した。

a 群: 10 ml のヘパリン加血液を無処置のまま、遠心沈殿し、白血球分画をあつめ常法にしたがって DNA をフェノール抽出した。

b 群: 血液 10 ml にあらかじめ PCDF の溶媒であるアセトンを 100 μ l 加え、室温で 2 時間反応させた後、DNA を抽出した。

c 群: 血液 10 ml に 100 ppm PCDF・アセトン溶液

100 μ l (最終濃度 1 ppm PCDF) を加え、室温で 2 時間、反応させた後、DNA を抽出した。

抽出した DNA は 200 μ l の TE buffer に溶解し、その 3 μ l を 3 ml の distilled water に加え、分光光度計で 300 nm~200 nm 間の吸光度曲線を作製した。また、a 群の抽出 DNA 3 μ l に 1 ppm PCDF 1 μ l を加え、distilled water 3 ml の中に溶解し、350 nm~200 nm 間の吸光度曲線を作製した。DNA 3 μ l, PCDF 1 μ l をそれぞれ 3 ml の distilled water に混じた試料を対照とした。

結 果

1. pUC18 に対する PCDF の作用

PCDF で処置した pUC18 をとりこみ、LBプレート上で増殖した *E. coli* のコロニー数は 2229 個であった。無処置の pUC18 をとりこんだ群のコロニー数は 2275 個であった。両者とも青色調を帯びたコロニーの形成がみられた。pUC18 を加えていない *E. coli* を植えた培地では、コロニーはみられなかった (図 1)。

両者より回収した pUC18 を 15 種類の制限酵素で消化し、アゲロースゲル上で電気泳動をおこなった結果、本来の pUC18 と異なる所見はみられなかった。図 2 には pUC18 を 1 カ所で切断する酵素 *Hind* III, *Sac* I, *Eco* RI による消化後の泳動所見をしめした。いずれも 1 カ所のみで切断され、2700 bp のあたりにバンド形成がみられた。

2. ヒト白血球 DNA に対する PCDF の作用

a 群 (無処置で抽出した白血球 DNA) と c 群 (PCDF で処置後抽出した DNA) では抽出した DNA の量に差がみられるが、その吸光度曲線にちがいはみられなかった。そのピークは 260 nm の付近にみられる。b 群 (アセトン処置後抽出した DNA) では 265 nm に吸収のピークがみとめられる (図 3)。

未処置のヒト白血球 DNA の吸光度曲線は図 4-C にしめした。その吸収のピークは 257 nm である。PCDF・アセトン溶液の吸光度曲線は図 4-B でしめしたごとく、そのピークは 265 nm である。DNA に PCDF・アセトン溶液を作用させた群は図 4-A である。その吸収波長のピークは 265 nm である。

考 按

すでに、われわれはマウスをつかった皮膚の発癌実験系において、化学発癌剤である、20-methyl-cholanthrene に PCB あるいは PCDF を併用し⁴⁾、1 ppm PCDF がプロモーターとして作用する可能性が

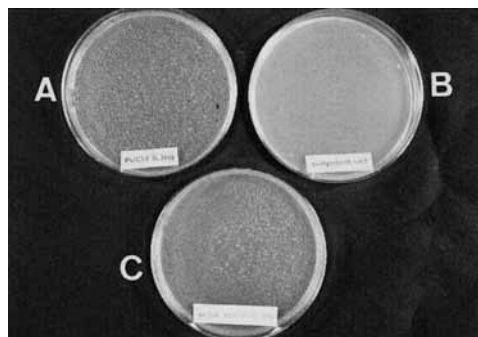


図 1 L. B. plate 上での competent cell の培養所見

- A : 未処置の pUC18 を挿入した competent cell コロニー数 : 2275 個
 B : competent cell のみ : コロニーはみられない
 C : PCDF 処置 pUC18 を挿入した competent cell コロニー数 : 2229 個



図 2 *E. coli* より回収した pUC18 の制限酵素消化後のアゲロースゲル電気泳動。

いずれも 1 カ所で切断され 2700 bp のあたりにバンド形成がみられる。

P : phy 分子量マーカー

1. pUC18
2. *E. coli* より回収した未処置の pUC18
3. *E. coli* より回収した PCDF 処置 pUC18
4. pUC18
5. 2 に同じ pUC18
6. 3 に同じ
7. pUB18
8. 2 に同じ
9. 3 に同じ
- 1, 2, 3 は *Hind* III 消化
- 4, 5, 6 は *Sac* I 消化
- 7, 8, 9 は *Eco* RI 消化

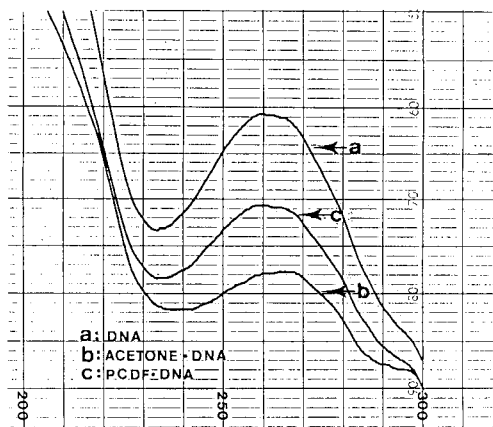


図3 300 nm～200 nm間のヒト白血球 DNA の吸光度曲線

a, c はいずれも 260 nm 付近に吸光のピークがみられる。b は 265 nm にピークがある。

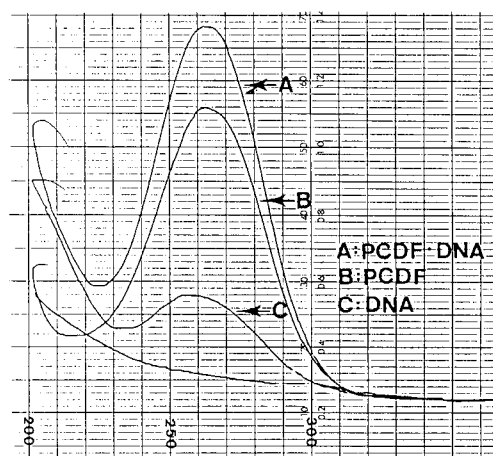


図4 350 nm～200 nm間のヒト白血球 DNA の吸光度曲線。

A = B + C となっている。

あることを報告した³⁾。しかし、PCDF の DNA に対する作用などはなおあいまいである。従来、carcinogen は直接的、あるいは間接的に DNA に作用するといわれている。今回、われわれは PCDF の DNA に対する直接作用の有無を検討する目的で、vector である pUC18 とその competent cell である E. coli を使用して実験をおこない上記のごとき結果をえた。

pUC18 に uvB や uvC などの紫外線や 8-methoxy-psoralen (8MOP) の存在下に uvA を照射するとそれぞれ、チミンダイマーや 8MOP の cross link が

pUC18 におこる。これらの pUC18 を E. coli に挿入後、培養すると、E. coli の増殖はつよく抑制される⁵⁾⁶⁾。PCDF が pUC18 に対して何らかの直接的な作用があれば、pUC18 は denative な状態となり、その活性が失われることは十分に考えられる。したがって、denative な状態の pUC18 をとりこんだ E. coli の増殖は抑制される可能性がある。しかしながら、われわれの実験結果からは E. coli のコロニー数は無処置の pUC18 を挿入した E. coli のコロニー数と同等であった。すなわち、PCDF は pUC18 に何らの作用もおこなっていないと考えられる。

また、PCDF を処置した pUC18 をとりこんだ E. coli のコロニーから回収した pUC18 は各種制限酵素切断により、電気泳動上、異常な分子量をしめすバンドの形成はみられていない。この事実も PCDF の pUC18 に対する直接作用が認められないことを考えさせる。

ヒトの血液にあらかじめ PCDF を作用させて後、その白血球より抽出した DNA も、抽出後、PCDF を作用させた DNA も分光光度計による吸光度曲線は PCDF を作用させていない DNA と何ら異なる所見はみられなかった。第4図に示めた吸光度曲線 A (PCDF + DNA) は B (PCDF) と C (DNA) の和になっているにすぎず、PCDF が DNA に結合して、異種の DNA が形成されたとは考えがたい。

以上のような事実より、われわれは PCDF が DNA に直接的に作用することはないであろうと考えた。今後は、PCDF の代謝過程に出現するであろう物質が DNA に作用しうるか否かを検討していく必要がある。

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

文 献

- 1) Birnboim HC and J Doly : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids. Res. 7 : 1513-1523, 1979.
- 2) Geever RF, Wilson LB, Nallaseth FS, Milner PF, Bittner M, Wilson JT : Direct identification of sickle cell anemia by blot hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 : 5081-5085, 1981.
- 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 の発癌に及ぼす影響—腫瘍発生率と光顕的・電顕的検討—福岡医誌 78 : 223-230, 1987.

4) 堀 真, 藤田和夫, 山城一純, 鳥山 史, 広瀬寮二, 宿輪哲生, 豊島弘行, 吉田彦太郎: 多塩素化芳香族化合物, および, その類似物質の methyl-cholanthrene induced mouse skin cancer の発生に及ぼす影響について. 福岡医誌 76: 208-214, 1985.

5) Hori M, Udonon M, Hirose R and Yoshida H: A study on site of pUC18 targeted with uvB and proliferation of E. coli inserted uvB-irradiated pUC18. Jour. Dermatol. Science 1: 395, 1990.

6) Hori M, Udonon M, Toyoshima R, Hirose R

and Yoshida H: Studies on puvA-induced DNA damage and its influence to the host cell. 16th annual meeting of Japanese Society for Invest. Derm. Tuly 1991.

7) Kushner SR: An improved method for the transformation of Esherichia coli with ColE1-derived plasmids. 17-23. In H. B. Boyer, S. Nicosia (ed). Genetic Engineering. Elsevier.

8) 松島泰次郎: 環境発癌物質の生体での運命, がん (山村雄一, 杉村隆編) p. 23-28, 共立出版, 1978.

**In Vitro Analysis of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and 2,3,4,7,8
-Pentachlorodibenzofuran (PCDF) Cellular Toxicity in
PLC/PRF/5 Cell Proliferation
—The Effect of Ursodeoxycholic Acid, Inchin-Gorei-San
and Shou-Saiko-To on Cell Toxicity—**

Kazutada MATSUOKA

*Division of Pharmacology, Ureshino National Hospital, Saga, 843-03
(Director : Dr. N. Hirota)*

Shigeo NONAKA, Taro OHGAMI and Hikotaro YOSHIDA

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

Fumio MURAYAMA

*Division of Dermatology, Sasebo General Hospital, Sasebo, 857
(Director : Dr. H. Suyama)*

Abbreviations PCBs, polychlorinated biphenyls, PCDF, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, DNA, deoxyribonucleic acid, RNA, ribonucleic acid, EDTA, ethylenediamine tetra acetic acid, HBsAg, hepatitis B surface antigen, HBcAg, hepatitis B core antigen, HBV, hepatitis B virus, EtOH, ethyl alcohol, PCR, polymerase chain reaction

Abstract We investigated the cell toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PCDF) as an indicator of the quantity of m-RNA, which synthesizes the HBV core antigen region, and secreting protein, which is an HBV surface antigen in PLC/PRF/5 cells. The determination of m-RNA was conducted according to the methods of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. Furthermore, the reductive action of ursodeoxycholic acid, shou-saiko-to and inchin-gorei-san on the PCBs and PCDF toxicity was investigated. The cell number of 1×10^5 /ml and concentrations of 200 μ g/ml for PCBs and 500 μ M for PCDF were used in these experiments.

The titer of HBsAg was gradually increased from 1 in 1×10^3 /ml of cell numbers to 100 in 1×10^6 /ml of cell numbers. The curve became a plateau in 1×10^6 /ml of cell numbers. The cell number of 1×10^5 /ml was used in the experiments. The titer of HBsAg decreased following in the increase of concentration of PCBs. The HBsAg, even in the PCBs concentration of 1000 μ g/ml showed a titer of 22.5%. However, the highest concentration of PCDF in this study, that is, 500 μ M of PCDF, did not show any decrease of HBsAg activity. The concentrations of 200 μ g/ml for PCBs and 500 μ M for PCDF were used in the investigation of drug effects.

A high titer HBsAg was observed in high concentrations of shou-saiko-to in comparison with a control group. Ursodeoxycholic acid and inchin-gorei-san exhibited a similar tendency. HBsAg titer increased to 40 to 50% with the addition of inchin-gorei-san or shou-saiko-to.

The m-RNA sythesis increased following the decrease of concentrations of PCBs and PCDF. The slope of the curve for PCBs suddenly increased in comparison with that for PCDF. The concentrations of 100 μ g/ml of PCBs and 1 mM of PCDF were used for the observation of m-RNA synthesis. Ursodeoxycholic acid and inchin-gorei-san alone suppressed m-RNA synthesis at the concentration of 0.02×2^{-2} to $0.02 \times 2^{-6}\%$. The concentration of $0.02 \times 2^{-4}\%$ to $0.02 \times 2^{-6}\%$ of ursodeoxycholic acid inhibited the suppression of m-RNA by PCBs and PCDF toxicity.

Introduction

Many attempts have been made to treat Yusho (PCBs poisoning) patients. The production of PCBs themselves is now prohibited, but PCBs compounds are still serious environmental pollutants. The investigation of acute and chronic toxicity of PCBs by animal experiments is hampered by the risk of environmental pollution. In western Japan, especially the Nagasaki area, many cases of Yusho were caused by rice oil contaminated with PCBs⁸⁾, and the establishment of a therapeutical methodology is urgently required. We already attempted a drug screening system *in vitro* by the colony formation method in cell culture⁵⁾. However, the results are not applicable to clinical use because the concentration of drugs was too high in the experimental condition. In this study, we investigated the cell toxicity of PCBs and PCDF as an indicator of the quantity of m-RNA, which synthesizes the HBV core antigen region, and secreting protein, which is an HBV surface antigen, in PLC/PRF/5 cells¹⁾. The determination of m-RNA was conducted according to the methods of reverse transcriptase⁶⁾ and polymerase chain reaction⁷⁾. Furthermore, the effect of ursodeoxycholic acid and the Chinese herbal medicines (shou-saiko-to and inchin-gorei-san) on PCBs and PCDF cell toxicity was investigated.

Materials and Methods

1) Culture cells

Using culture petri dishes, five centimeters in diameter, we cultured the 3×10^5 PLC/PRF/5 cells in 5 ml of RPMI-1640 (Nissui Co., Ltd., Tokyo) with 20% fetal calf serum in a CO₂ incubator at 37°C. After achieving a monolayered condition, cells were harvested with 0.01% trypsin and 0.02% EDTA in phosphate buffered saline (pH 7.4) and culture was continued with a new medium of 10% fetal calf serum in the appropriate culture dish.

2) Determination of HBsAg titers

In the 24 culture dish wells, 1×10^6 PLC/PRF/5 cells were seeded by ten-fold dilution. After seven days, the titer of the hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the supernatant of the culture medium was determined. Assay for HBsAg titers was performed by enzyme immunoassay using a commercially available kit (Auszyme II, Daiabbot Co., Ltd., Tokyo).

3) Reagents and Drugs

Polychlorobiphenyl tetra (Wako Chemicals, Osaka) was diluted with 10% dimethylsulfoxide in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran was kindly provided by Prof. Y. Masuda (Daiichi Pharmaceutical College, Fukuoka) as acetone solution. Ursodeoxycholic acid (98.5%, Tokyo Tanabe Co., Ltd., Tokyo), inchin-gorei-san (870117001 PO, Tsumura, Tokyo) and shou-saiko-to (714332, Tsumura, Tokyo) were supplied by the respective company.

4) Purification of HBV DNA fragment

HBV-DNA from the recombinant plasmid *adr-125*, containing full-length HBV sequences cloned at the Bam HI site of the pBR322 vector, was supplied by Dr. T. Yoneyama²⁾. The *adr-125* was digested with 4 units of the restriction endonuclease Bam HI (Bethesda Research Lab. Inc.) in 40 μ l of buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.2, 5 mM MgCl₂, 2 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM NaCl) for one hour at 37°C. Purification of the DNA fragment in 5 μ l of the mixture was confirmed on a 0.7% agarose gel for visualization by the staining of ethidium bromide. Electrophoresis was carried out at 5 mA per gel using a Tris-borate-EDTA buffer (89 mM Tris borate pH 8.3, 2.5 mM Na₂ EDTA). Purification of the remainder was performed by a second preparative gel method.

5) Extraction of HBV DNA from sera

The HBV DNA was extracted from the plasma of a HBeAg positive carrier according to the method of Kaneko et al³⁾. 100 μ l of proteinase K (100 μ g/ml, Boehringer Mannheim, Germany), 0.5% sodium dodecyl sulfate, 5 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) was

added and digested for three hours at 70°C. HBV DNA was extracted with phenol and chloroform from the aliquate, precipitated with EtOH, dried and resuspended with 100 μ l of 100 mM tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA.

6) Extraction of cellular DNA and RNA

The extraction of DNA and RNA in proliferated PLC/PRF/5 cells was performed using the standard techniques in the method of Maniatis et al⁴⁾.

7) Synthesis of template DNA

cDNA was synthesized using Ohara's method⁵⁾, so that 5 μ l of total-RNA was incubated with 20 μ l of buffer (1 mM dNTP, RNasin 1 unit/ μ l, random hexamer 100 pM) and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (BRL, MD, USA) 200 units for one hour at 37°C, and treated for 10 minutes at 95°C.

8) Synthesis of PCR primer

HBV core antigen region oligonucleotide primers were synthesized to HBC-1 (GAGTGTGGATTCGCACTCCT, 2140-2159) and HBC-3 (TCCCGAGATTGAGATCTTCT, anti-sense, 2292-2311) using a DNA synthesizer (380 A, Applied Biosystems, CA, USA) and purified by high performance liquid chromatography (150 A Applied Biosystems, CA, USA).

9) Polymerase chain reaction (PCR)

PCR was performed in a total volume of 100 μ l of reaction mixture. Amplification was carried out in a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, USA), that provided, per

cycle, 30 seconds of incubation at 94°C to denature DNA, 37°C to anneal primers, and 70°C to extended primers. After the last cycle, the samples were incubated for an additional 5 min. at 70°C for final extension. Detection of amplified DNA was performed by electrophoresis as described above.

Results

1) HBsAg-secreting ability of PLC/PRF/5 cells in normal medium

The HBsAg-secreting ability of PLC/PRF/5 cells is shown in Fig. 1. The titer of HBsAg gradually increased from 1 in 1×10^3 /ml of cell number to 100 in 1×10^6 /ml of cell numbers. The curve became a plateau in 1×10^6 /ml of cell numbers. Therefore, the cell number of 1×10^5 /ml was used in the subsequent experiments.

2) HBsAg-secreting ability of PLC/PRF/5 cells in the medium with PCBs and PCDF

The data on PCBs or PCDF toxicity is shown in Table 1. The titer of HBsAg decreased with the increase in the concentration of PCBs. Even in the PCBs concentration of 1000 μ g/ml, HBsAg appeared at a titer of 22.5 %. However, the highest concentration in this study, that is 500 μ M of PCDF, did not show any decrease of HBsAg activity. Therefore, the concentration of 200 μ g/ml on PCBs and 500 μ M on PCDF were used in the subsequent experiments.

3) The effect of drugs on PCBs and PCDF

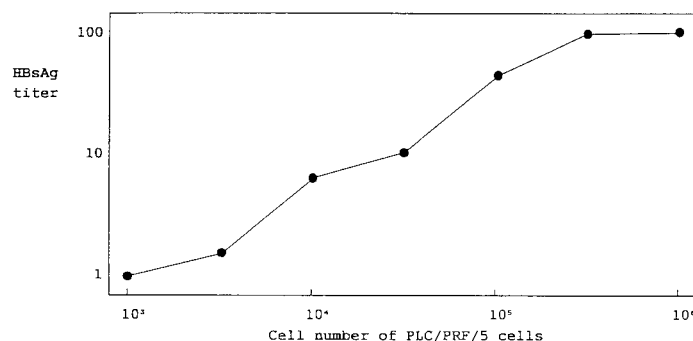
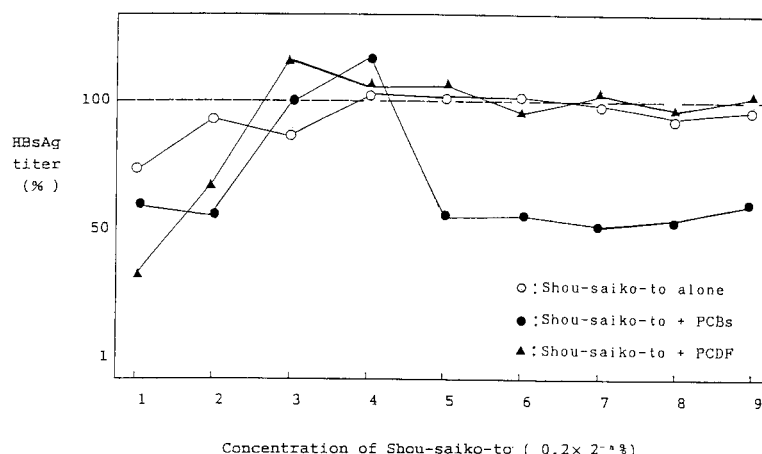


Fig. 1 HBsAg-secreting ability of PLC/PRF/5 cells

Table 1 Effect of PCBs and PCDF toxicity on PLC/PRF/5 Cells

Concentration of PCBs ($\mu\text{g/ml}$)	1000	500	250	125	100	50	0
Titer of HBsAg (%)	22.5	64.3	76.8	76.8	84.3	95.0	100
Concentration of PCDF (μM)	500	250	125	62.5	31.5	0	0
Titer of HBsAg (%)	98.7	102.4	99.5	107.3	96.8	100	100

**Fig. 2** HBsAg-secreting ability of PLC/PRF/5 cells
(Shou-saiko-to+PCBs or PCDF)

cell toxicity

The effect of three drugs, that is, shou-saiko-to, ursodeoxycholic acid and inchin-gorei-san on PCBs and PCDF toxicity is shown in Fig. 2 to 4. The HBsAg titer in the shou-saiko-to alone showed a high level at the concentration of $0.02 \times 2^{-4}\%$ to $0.02 \times 2^{-5}\%$. With regard to the effect of shou-saiko-to on PCBs cell toxicity (Fig. 2), a high titer of HBsAg was observed at high concentrations of shou-saiko-to as compared to the control group, although the reason for the downward shift of shou-saiko-to with PCBs in the low concentration of shou-saiko-to was not clear. A similar tendency was observed in the shou-saiko-to with PCDF group. Both shou-saiko-to with PCBs and with PCDF showed a decrease of HBsAg titer in the high concentrations of shou-saiko-to.

The effects of ursodeoxycholic acid and inchin-gorei-san on PCBs and PCDF toxicity are shown in Fig. 3 and 4. Ursodeoxycholic acid and inchin-gorei-san showed an elevation

of HBsAg titer only at the concentration of $0.02 \times 2^{-4}\%$ of ursodeoxycholic acid and $0.2 \times 2^{-4}\%$ of inchin-gorei-san. PCBs and PCDF with ursodeoxycholic acid showed a similar elevation at these concentrations. The increase in HBsAg titer reached 40 to 50% with a concentration of $0.02 \times 2^{-3}\%$ to $0.02 \times 2^{-4}\%$ of ursodeoxycholic acid.

4) Quantization of m-RNA

The results of the quantization of HBcAg region m-RNA are shown in Fig. 5. The 1st lane, shows purified HBV DNA, the 2nd extracted HBV DNA from HBeAg positive carrier serum, the 3rd synthesized c-DNA from m-RNA of PLC/PRF/5 cell, and the 4th to 10th synthesized c-DNA from m-RNA of PLC/PRF/5 cells in PCBs concentrations of 1000, 500, 250, 125, 100, 50 and $0 \mu\text{g/ml}$ respectively. M shows $\phi \times 174/\text{Hae III}$ of the sized marker. The band thickness of 171 base pair in the 7th to 10th lanes was macroscopically graded into a score of 1 to 4, where no band was score 0.

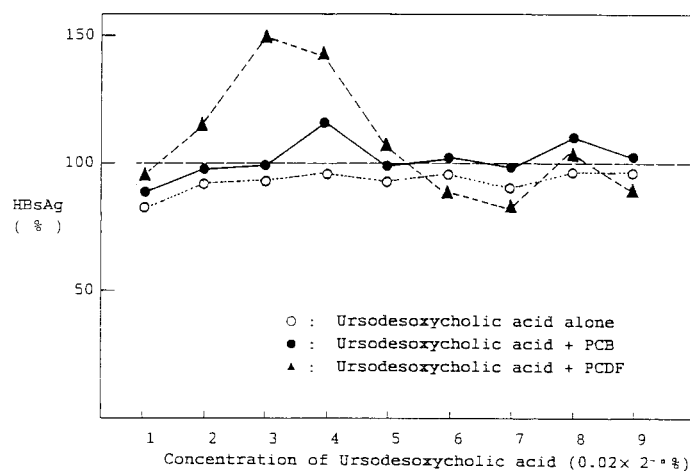


Fig. 3 HBsAg-secreting ability of PLC/PRF/5 cells
(Ursodesoxycholic acid+PCB or PCDF)

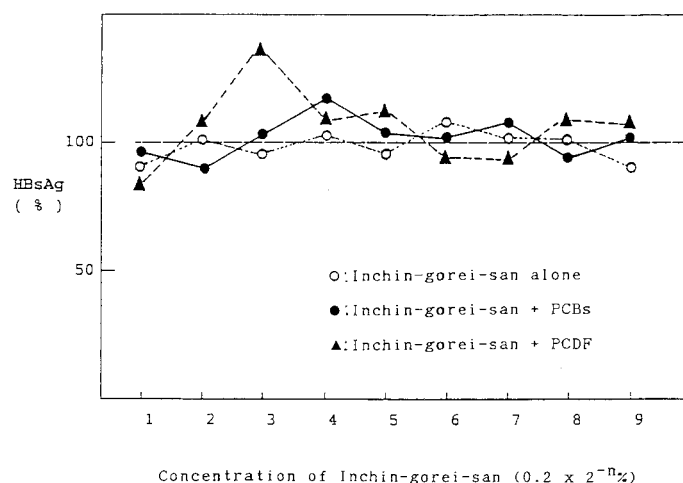


Fig. 4 HBsAg-secreting ability of PLC/PRF/5 cells
(Inchin-gorei-san+PCBs or PCDF)

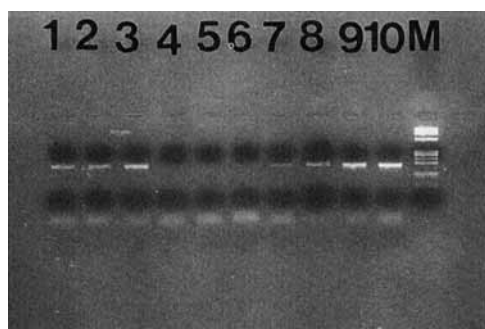


Fig. 5 Photograph of electrophoresis gel after PCR

5) The effect of PCBs and PCDF on m-RNA synthesis and the efficacy of drugs on PCBs and PCDF toxicity

The effect of PCBs and PCDF on m-RNA synthesis is shown in Fig. 6. The score of m-RNA synthesis rose with the decrease in the concentrations of PCBs and PCDF. The slope of the curve for PCBs showed a sudden increase as compared with that for PCDF. The concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for PCBs and 1 mM for PCDF were used for the m-RNA synthesis.

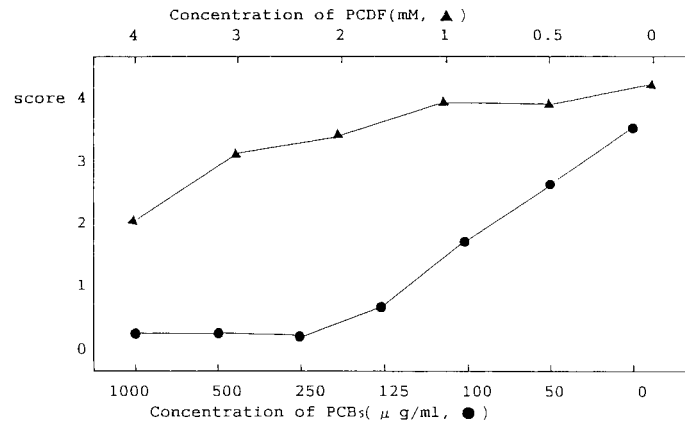


Fig. 6 The efficacy of PCBs or PCDF concentration on culture cells

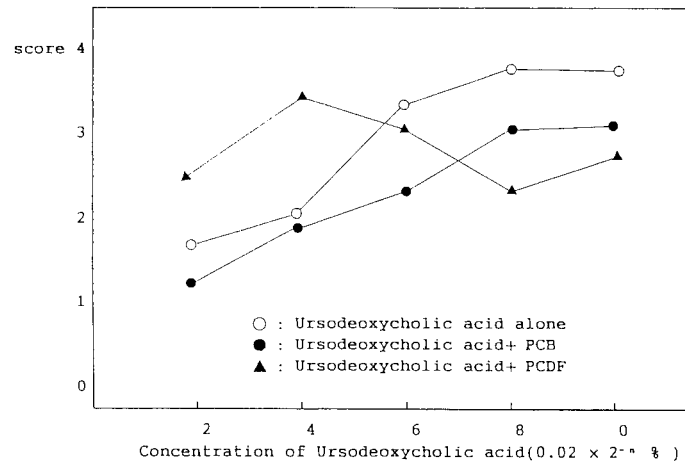


Fig. 7 The efficacy of ursodeoxycholic acid on PCBs or PCDF

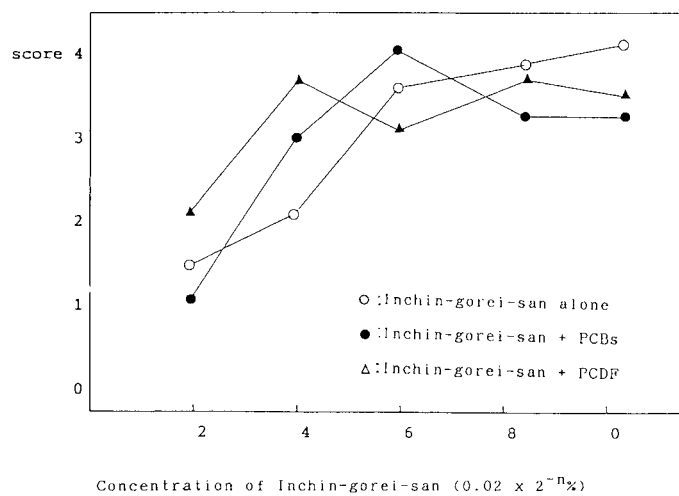


Fig. 8 The efficacy of Inchin-gorei-san to PCBs or PCDF

The efficacy of ursodeoxycholic acid on PCBs and PCDF toxicity is shown in Fig. 7. Ursodeoxycholic acid itself suppressed m-RNA synthesis at the high concentrations. There was a slight elevation in the score for the effect of ursodeoxycholic acid and inchin-gorei-san on PCBs and PCDF toxicity at the concentrations of 0.02×2^{-4} to $0.02 \times 2^{-6}\%$ of ursodeoxycholic acid or $0.2 \times 2^{-4}\%$ to $0.2 \times 2^{-6}\%$ of inchin-gorei-san.

Discussion

We confirmed in this study that PCBs suppressed the titer of HBsAg while PCDF did not. Unlike that of PCBs, the concentration of PCDF may not be sufficient in the measurement of HBsAg titers. The maximum concentration used in the measurement of HBsAg titers was that of the original solution of PCDF supplied for this study. Higher concentrations of PCDF should be investigated in future studies. PCBs and PCDF both suppressed the production of m-RNA. This means that PCDF inhibits the production of m-RNA but not protein synthesis, while PCBs inhibits both. It is very interesting that there was a different reaction between PCBs and PCDF. It is possible that the indicator used in this study differs from the indicator that expresses the relationship between m-RNA and protein synthesis. Basically, an indicator that expresses the same m-RNA, protein and DNA should be selected. However, DNA to HBV surface antigen is less stable than that of core antigen. We chose DNA to HBV core antigen as an indicator of cell toxicity for this reason. In a previous study, PCBs suppressed cell growth⁵⁾. This means that PCBs suppressed cell functions as well as cell growth. Our data shows that this system can also be utilized for the detection of PCBs cell toxicity.

In the effort to find chemicals that exert a reductive effect on PCBs and PCDF cell toxicity, we tried a drug screening system in vitro using the colony formation method in culture⁵⁾. However, the result could not be applied to

clinical use because the concentration of drugs was too high in the experimental condition. We selected three drugs in this study, that is, shou-saiko-to, inchin-gorei-san and ursodeoxycholic acid, and investigated whether or not these drugs exert a reductive effect on PCBs or PCDF toxicity. The result showed that inchin-gorei-san and ursodeoxycholic acid reinstated the suppressed synthesis of HBsAg protein by PCBs and PCDF. These drugs also relieved the decrease of m-RNA expression of HBcAg by PCBs. It is very interesting that these two systems, that is, the colony formation method and protein synthesis method, showed similar results. Ursodeoxycholic acid and inchin-gorei-san are drugs for the treatment of obstructive bile duct or hepatic dysfunction. These drugs may have a possibility to utilize for the clinical use. Further clinical studies and animal experiments are necessary, therefore, to elucidate the mechanism of these drugs in the reduction of PCBs and PCDF toxicity.

Acknowledgement

The authors wish to thank Prof. and Dr. Y. Masuda (Daiichi Pharmaceutical College, Fukuoka, Japan) for the contribution of PCDF. We are also grateful to Tsumura Company and Tokyo Tanabe Company for their contributions.

References

- 1) Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW and Lecatsas G: Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S. Afr. Med. J.*: 50: 2124-2128, 1976.
- 2) Fujiyama A, Miyano-hara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N and Matsubara K: Cloning and structural analysis of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucleic Acids Res.* 11: 4601-4610, 1983.
- 3) Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N and Purcell RH: Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 312-316, 1989.

4) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., p 85-93, 1982.

5) Matsuoka K, Murayama F, Ohgami T, Nonaka S and Yoshida H: Detection of polychlorinated biphenyls (PCB) toxicity by colony formation methods of HeLa cells. Fukuoka Acta Med. 78: 231-234, 1987 (in Japanese)

6) Ohara O, Dorit RL and Gilbert W: One-sided polymerase chain reaction: The amplification

of cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5673-5677, 1989.

7) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullisand KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491, 1988.

8) Yoshimura H: The Twelfth Reports of the study on Yusho and PCB. Foreword (2). Fukuoka Acta Med. 80: 181-183, 1989 (in Japanese)

(和文抄録)

Polychlorinated Biphenyls (PCBs) および 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (PCDF) の PLC/PRF/5 細胞増殖に対する影響 —Ursodeoxycholic acid, 茵陳五苓散, 小柴胡湯の PCBs, PCDF 毒性抑制効果について—

国立療養病院長薬剤科 (院長: 廣田典祥博士)

松岡 一 忠

長崎大学医学部皮膚科教室 (主任: 吉田彦太郎教授)

野中 薫 雄・大神 太 郎・吉田彦太郎

佐世保市立総合病院皮膚科 (院長: 須山弘文博士)

村山 史 男

PCBs, PCDF の細胞毒性を PLC/PRF/5 細胞の表面蛋白 (HBsAg) 分泌能, B 型肝炎ウイルスコア抗原領域を合成する m-RNA 生成を指標として検討した。m-RNA の測定は reverse transcriptase および polymerase chain reaction 法を用いて行った。さらに ursodeoxycholic acid, 茵陳五苓散, 小柴胡湯が PCBs, PCDF 毒性を抑制するか否かについて検討した。PLC/PRF/5 細胞数は 1×10^5 /ml を, PCBs の濃度は $200 \mu\text{g/ml}$, PCDF の濃度は $500 \mu\text{M}$ を用いた。前実験として培養液無処置で HBsAg 分泌能を検討した。

HBsAg の分泌能は 1×10^3 /ml の細胞数で titer 1 から 1×10^6 /ml の細胞数で titer 100 まで上昇した。 1×10^6 /ml の細胞数でプラトーに達した。それ故、以後の実験では 1×10^5 /ml の細胞数を用いた。

PCBs の毒性を検討するために培養液中に PCBs を添加して細胞培養を行った。HBsAg 分泌能は PCBs 濃度が増加するに従って低下した。しかし、 $1000 \mu\text{g/ml}$ の PCBs 濃度においても無処置時の 22.5% の

HBsAg 分泌能を示した。PCDF は最高濃度 ($500 \mu\text{M}$) でも HBsAg 分泌能の低下は示さなかった。PCBs, PCDF 毒性に対する薬物の影響を調べるために、PCBs は $200 \mu\text{g/ml}$, PCDF は $500 \mu\text{M}$ の濃度を用いた。

Ursodeoxycholic acid, 茵陳五苓散, 小柴胡湯をそれぞれ培養液中に添加すると、HBsAg 分泌能は亢進した。茵陳五苓散, 小柴胡湯では PCBs, PCDF 単独処置に比べて 40~50% の活性亢進をみた。

さらに PCBs, PCDF 負荷による m-RNA 合成を観察すると、PCBs, PCDF 濃度が高くなるに従って、m-RNA 合成は抑制された。そのカーブの勾配は PCBs が PCDF に比べて著しく、すなわち PCBs が PCDF に比べて m-RNA 合成をより著しく抑制した。Ursodeoxycholic acid, 茵陳五苓散の単独添加は $0.02 \times 2^{-2}\%$ から $0.02 \times 2^{-6}\%$ の濃度で m-RNA 合成を抑制した。しかし、 $0.02 \times 2^{-4}\%$ から $0.02 \times 2^{-6}\%$ の濃度で PCBs, PCDF 毒性による m-RNA 合成の低下を明らかに抑制した。

発癌過程における表皮細胞の PCDF による変化の検討

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

A Study of Epidermal Alterations Induced by PCDF on Experimental Carcinogenesis

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*

An effect of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PCDF) as a promoter on a course of experimental skin carcinogenesis in mice by chemicals 20-methylcholanthrene (MC) has been proved by our previous studies.

Details of ultrastructural epidermal alterations induced by MC and PCDF were observed and an attempt to differentiate benign tumor from malignant one in which a combined application of MC and PCDF on mice skin resulted was done electron microscopically.

Four significant findings as follows were detected. First of all even the epidermal cells without tumor had some atypicality. Secondly both of benign tumor and normal-appeared skin without tumor had giant and round-shaped keratohyalin granules (KHGs) which show a tendency of less keratinization. Thirdly cytoplasmic projections of epidermal cells increased in number and sparse tonofilaments scattered in the cytoplasm of benign tumor. This is also an appearance of mucous metaplasia of keratinocytes as well as the form of KHGs mentioned above. Finally benign tumor had thick horny cells including numerous lipid droplets, and that is a sign of acceleration of epidermal turn over. Since epidermal cells have little chance to be exposed to carcinogens when they quickly keratinize, they rarely form a cancer.

When epidermal cells have such tendency as less keratinization or more keratinization, they are supposed to be less sensitive to any stimuli of carcinogens, and consequently they incline to be benign tumor instead of malignant one.

はじめに

我々は油症の原因物質のひとつである 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (以下 PCDF) が皮膚の発癌に関与しているか否かを検討してきたが^{6)~8)}, 化学発癌剤 20-methylcholanthrene (以下 MC) によるマウスの皮膚癌発生過程に PCDF を併用処置することにより, PCDF が promoter 効果を示すことをさきに報告した。本稿では PCDF によりもたらされる表皮細胞の変化や PCDF を promoter として発生した腫瘍のうち悪性と良性とを分ける目安となる形態学的な差をさぐることを目的とし, 透過型電顕を用いてその詳細

を検討した。

実験材料と方法

前報⁹⁾において詳細を記述したが, ddy マウス 210 匹を次の 7 つの群に分け, 処置し, 標本は処置開始後 4 週目, 8 週目, 12 週目に採取し, 発生した腫瘍については適宜生検した。

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

第 III 群：0.3% MC 週 2 回塗布

結 果

I. 発生腫瘍の分類

発生した腫瘍はつぎの 2 つであった。ひとつは肉眼的に乳嘴腫様を呈し，組織学的には良性の表皮増殖を示す小型の papilloma (以下 P 型腫瘍)，他は肉眼的に無制限の増殖を続け，中央に角質塊を容れ，組織学的には角化の強い悪性の表皮増殖を示す keratoacanthoma 型 squamous cell carcinoma (以下 K 型腫瘍) であった。

II. 電子顕微鏡所見

処置後の表皮細胞の微細構造の変化，ことに腫瘍発生とその処置との関連性についてしらべるため，下記の試料について詳細な検討を加え，記載する。

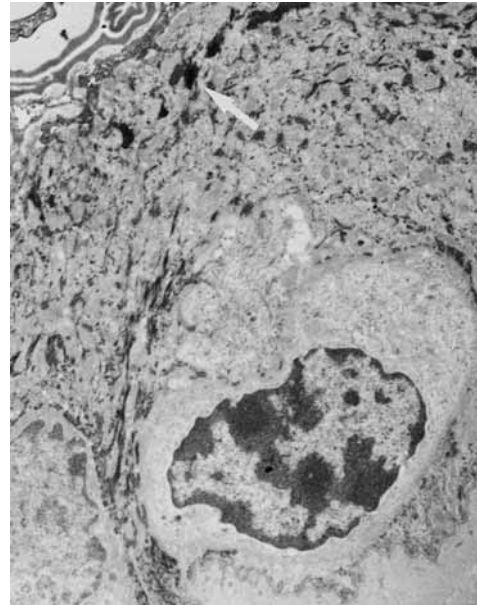
1. 腫瘍の発生なし

1) 第 I-c 群 (MC 1 回+5 ppm PCDF 12 週間塗布)：表皮は 2~3 層の細胞より成り，顆粒細胞は 1 層のみである。Keratohyalin granules (以下 KHGs) は星芒状を呈し，大型である。これらの所見は正常に比し大差ないが，基底細胞の核周囲の tonofilament の数は明らかに減少している (第 1 図)。

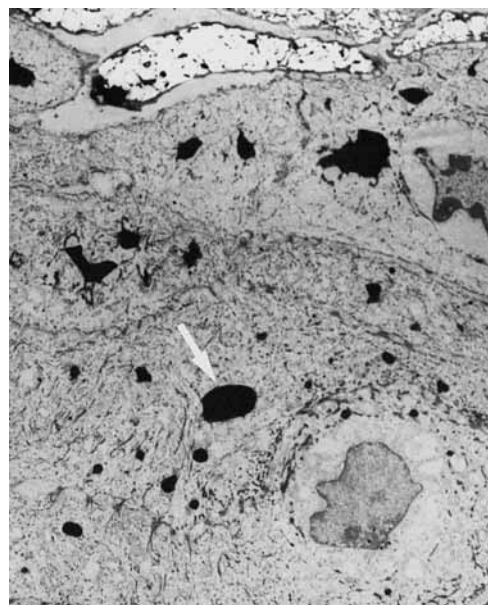
2) 第 II-b 群 (MC+1 ppm PCDF 12 週間塗布)：表皮は 5 層以上に肥厚しており，顆粒細胞も 3 層以上に増えている。KHGs はもはや星芒状を呈さず，丸味を帯びており，きわめて大型である。Tonofilament は核周囲のみならず，表皮全体に疎に存在するのみである (第 2 図)。有棘細胞の核はきわめて凹凸不整となるが，desmosome はよく保たれている。しかし，desmosome に牽引される tonofilament は少量である。基底細胞の核は何ら異型性を示さず，desmosome-tonofilament complex もよく保たれている (第 4 図)。

2. P 型腫瘍

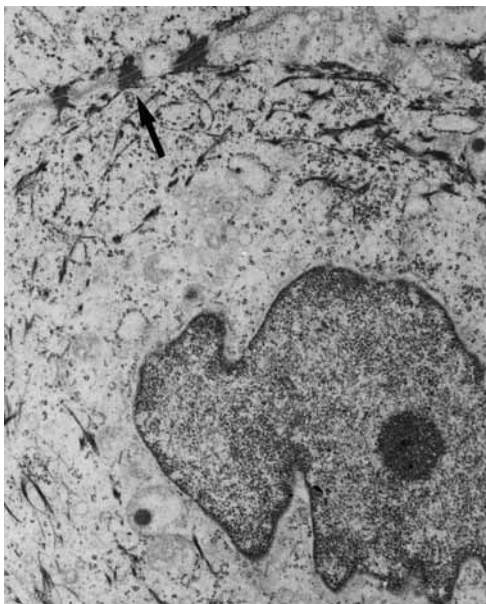
1) 第 I-a 群 (MC 1 回+0.5 ppm PCDF 12 週間塗布)：角層は 20 層以上を示しており，各細胞は様な厚さで規則正しく積み重なっている。顆粒細胞には少数の KHGs と少数の tonofilament をみるのみであ



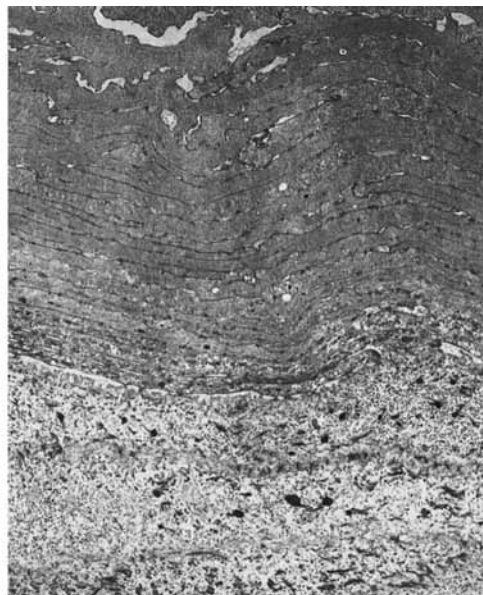
第 1 図 第 I-c 群，腫瘍なし。
表皮は 2~3 層で，KHGs (←) は大型で星芒状を呈する。(×2,700)



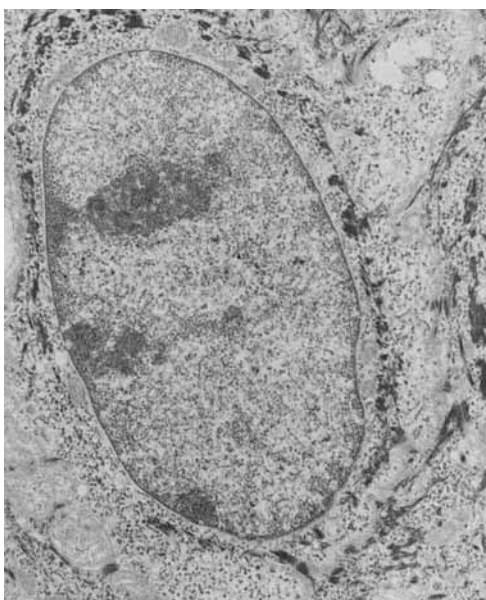
第 2 図 第 II-b 群，腫瘍なし。
表皮は 5 層以上に肥厚し，顆粒細胞の増加あり，KHGs (←) は大型で円形となる。(×1,500)



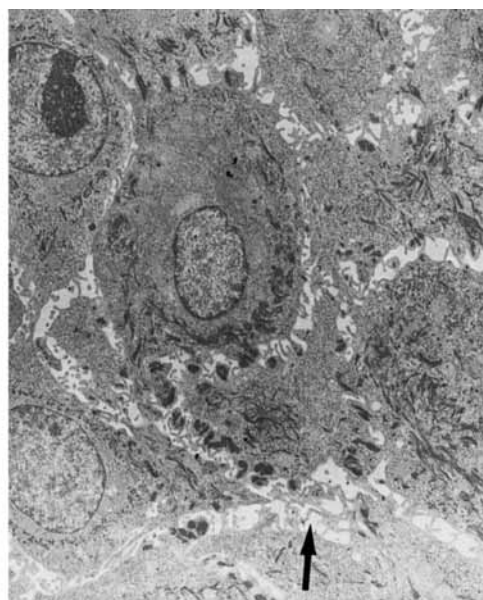
第3図 第II-b群, 腫瘍なし, 有棘細胞.
核は凹凸不整を示す, tonofilament は少ない
が desmosome(←)はよく保たれている. (×
3,500)



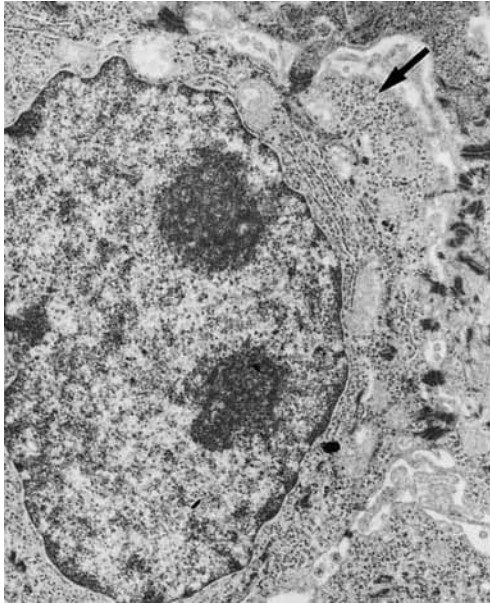
第5図 第I-a群, P型腫瘍, 角層～顆粒層, 角質細胞
に異常なく, 顆粒細胞には少数の KHGs と
少数の tonofilament をみる. (×1,500)



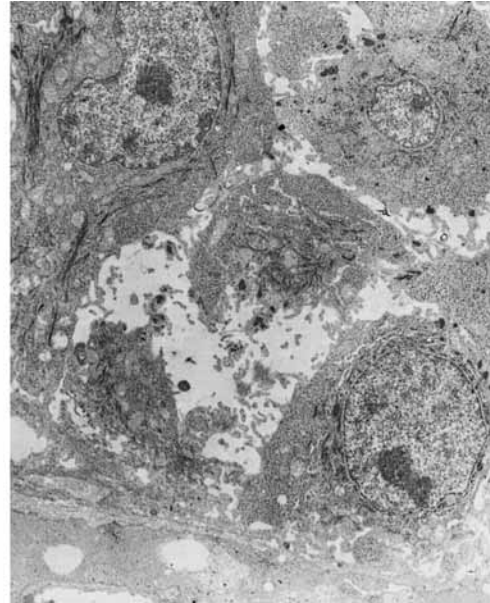
第4図 第II-b群, 腫瘍なし, 基底細胞.
核に異型性なし, desmosome-tonofilament
complex は保たれている. (×4,200)



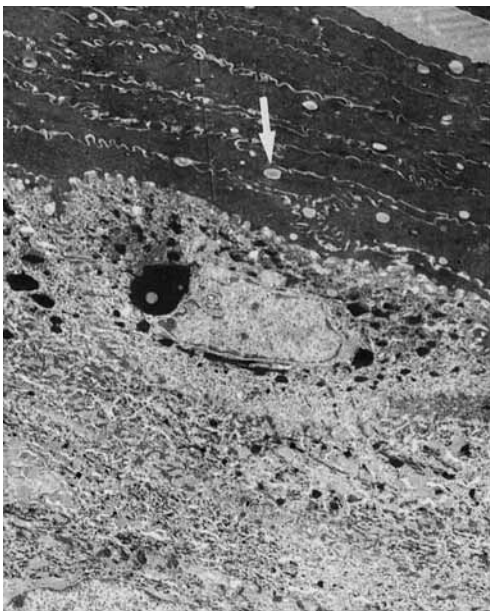
第6図 第I-a群, P型腫瘍, 基底層.
核の異型性なし, 小型の細胞質突起(←)多
し. (×1,500)



第7図 第I-a群, P型腫瘍, 基底細胞. ごく少数の tonofilament と多数の ribosome (←) をみる. (×4,200)



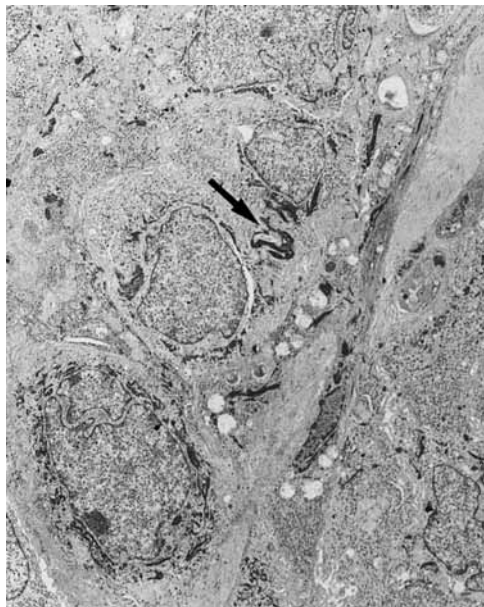
第9図 第II-b群, P型腫瘍, 基底層.
細胞間開大と細胞質突起の増加を示す。(×1,500)



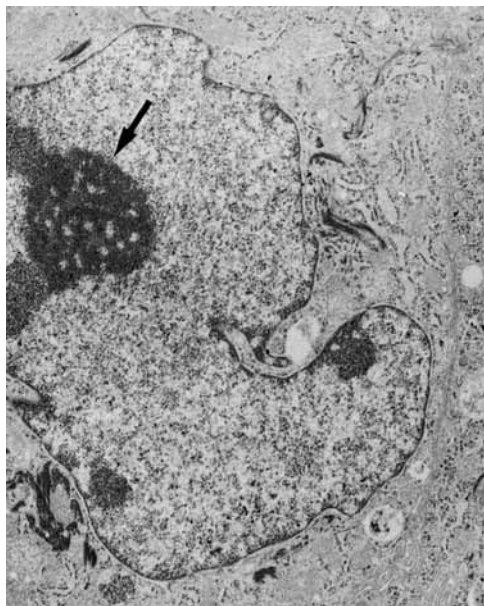
第8図 第II-b群, P型腫瘍, 角層～顆粒層.
角質細胞内に多くの lipid (←) を含んでいる. 顆粒細胞内には大型円形の KHGs をみる. (×1,500)



第10図 第II-b群, P型腫瘍, 基底細胞.
tonofilament (←) は少ないが, desmosome は保たれている. (×4,200)



第11図 第II-b群, K型腫瘍, 腫瘍巣. 凹凸著明な核を有する細胞の増殖を示す. ときに集束した tonofilament (←) をみる. (×1,500)



第12図 第II-b群, K型腫瘍, 腫瘍細胞. きわめていびつな核と大型の nucleolonema (←) をみる. (×4,200)

る(第5図). 基底層の細胞は小型の細胞質突起を多数有するが, おおむね健康皮膚に類似する(第6図). 基底細胞の細胞質内には tonofilament はごく少数見られるのみであるが, desmosome はなお良く保たれている. 細胞質突起は小型で, 粗面小胞体と ribosome が目立っている(第7図).

2) 第II-b群 (MC+1 ppm PCDF 12週間塗布): 角層は20層以上を数え, 角質細胞内には多くの lipid を含んでいる. 顆粒細胞は多くの大型円形の KHGs を形成している(第8図). 基底層の細胞は細胞間開大が強く, 細胞質突起も増加しているが, 核に異常は認めない(第9図). 基底細胞内には tonofilament が少ないが, desmosome は存在する. また多くの粗面小胞体と ribosome をみる(第10図).

3. K型腫瘍

1) 第II-b群 (MC+1 ppm PCDF 12週間塗布): きわめて凹凸の著明な核を有する腫瘍細胞がシート状に表皮と連続性に増殖している. 腫瘍細胞間には密に接着しており, ときに集束した tonofilament もみられる(第11図). 腫瘍細胞の核はいびつであり, 核小体は nucleolonema と呼ばれる構造を呈する. 細胞質内は tonofilament 束と粗面小胞体などがみられる(第12図).

考 察

MC+1 ppm PCDF により発生したK型腫瘍では, 以前著者が報告したMC単独で発生したK型腫瘍⁹⁾と比較し, なんら特徴的な微細構造の変化を捉えることはできなかった. したがってPCDFによる癌化促進の徴候を明らかにするために, さきに我々が示した promoter としての至適濃度である0.5 ppmおよび十分な promoter 効果のみられた1 ppmと5 ppmのPCDFをMCと併用した場合のP型腫瘍および腫瘍発生に至らなかった皮膚について詳細な検討を加えてみた. その際PCDFを同一期間塗布したが, MCは初回に1回のみ塗布し, 発癌に至らなかった群を比較対照に用いた. そうすることにより発癌過程におけるPCDFの作用を明らかにすることができると考えたのである.

その結果, 対照群に比し有意な差を生じた項目を以下に挙げ, 考察を加えたい.

1) 顆粒～有棘層における異型細胞の出現(腫瘍なしマウス).

腫瘍発生をみなかったマウス皮膚においてさえその微細構造上はすでに異型細胞が出現していたことより,

PCDF は確実に表皮細胞に damage を与えていることが明らかとなった。

2) 大型化, 円形化した KHGs (P 型腫瘍マウス, 腫瘍なしマウスの両者)

正常皮膚においては KHGs は星芒状を呈しているが, 脂腺導管部の細胞では円形の KHGs を示すとされる³⁾。したがって円形の KHGs を有する細胞はすでに角化細胞としての形態を逸脱しているように思える。

3) 細胞質突起の数の増加 (P 型腫瘍マウス)

表皮細胞は元来 desmosome により強く結合しており, desmosome は多数の tonofilament により牽引されている⁴⁾。しかし著者らは, vitamin A 酸の誘導体である retinoid をマウス皮膚に作用させることにより, 表皮細胞間の開大と多数の細胞質突起の出現を確認している⁵⁾。さらに retinoid による発癌抑制^{1), 6)}を著者らも明らかにしており⁵⁾, その作用は, retinoid が角化細胞を腺細胞様に変化させるためと考えている。したがって KHGs の形態的变化と併せて考えると, MC による癌化への過程で, PCDF による腺細胞様変化を伴った場合, 悪性の K 型腫瘍を形成することなく, 良性の P 型腫瘍となるものと考えた。

4) 角質細胞内の lipid の出現 (P 型腫瘍マウス)

表皮細胞は角化細胞であるが, ときに病的な角化亢進を示す場合がある。その臨床モデルが尋常性乾癬であり, 表皮は肥厚するが決して腫瘍とはならない。またこの疾患においては角質細胞内に多くの lipid が出現することが知られている²⁾。また著者はアトピー性皮膚炎の皮疹部においても同様の角層内 lipid を確認しており, このような所見は光顕上の parakeratosis と同様に turn over の亢進を示す重要な電顕所見と思われる。したがって PCDF も turn over を亢進させる作用があると考ええる。すなわち発癌刺激を受ける細胞がながく表皮に停ると発癌のチャンスが増すと考えるならば, turn over が亢進することにより発癌刺激を受けにくくなると考えられよう。

以上の如く, 表皮細胞は角化細胞らしからぬ細胞, つまり腺細胞様への変化, あるいは角化の著しい亢進のいずれかの態度を示すなら, 発癌刺激に対する感受性が低くなり, その結果, 発生した腫瘍は良性の P 型腫瘍になるものと考えた。

結 論

PCDF を作用させることにより肉眼的に腫瘍を形成する以前に, すでに異型核を有する細胞が表皮上層に出現していることがわかった。また円形の KHGs の形成や多数の表皮細胞の細胞質突起の出現といった異常角化すなわち腺細胞化の所見や多量の lipid を含有する角質細胞の出現といった turn over の亢進は腫瘍が良性であることを意味すると思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, PCDF を御提供下さった第一薬科大学教授増田義人博士に深謝致します。

文 献

- 1) Bollag W: Prophylaxis of chemically induced epithelial tumors with an aromatic retinoic acid analog (Ro10-9359). *Europ. J. Cancer* 11: 721-724, 1975.
- 2) Braun-Falco O and Christophers E: Structural aspects of initial psoriatic lesions. *Arch. Derm. Forsch.* 251: 95-110, 1974.
- 3) 橋本 健: 脂腺; 皮膚の電顕のみかた, 東京, 金原出版, p. 225, 1979.
- 4) 橋本 健: 表皮角化細胞の概要; 皮膚の電顕のみかた, 東京, 金原出版, p. 6, 1979.
- 5) 広瀬寮二: 化学発癌剤 20-methylcholanthrene 誘発マウス皮膚癌発生に及ぼす vitamin A の影響, 第2報: 電子顕微鏡所見について, *日皮会誌* 95: 1433-1440, 1985.
- 6) 広瀬寮二, 堀 真, 藤田和夫, 山城一純, 宿輪哲生, 吉田彦太郎: PCDF の発癌に及ぼす影響—腫瘍発生率と光顕的電顕的検討—, *福岡医誌* 78: 43-50, 1987.
- 7) 広瀬寮二, 堀 真, 豊島弘行, 宿輪哲生, 鶴殿雅子, 吉田彦太郎: 実験的動物発癌に及ぼす PCDF の影響—その濃度差の検討—, *福岡医誌* 80: 246-254, 1989.
- 8) 堀 真, 藤田和夫, 山城一純, 鳥山 史, 広瀬寮二, 宿輪哲生, 豊島弘行, 吉田彦太郎: 多塩素化芳香族化合物, およびその類似物質の methylcholanthrene induced mouse skin cancer の発生に及ぼす影響について, *福岡医誌* 76: 208-214, 1985.
- 9) Lasnitzki I: The influence of a hyper-*vitaminosis A* on the effect of 20-methylcholanthrene on mouse prostate glands grown in vitro. *Br. J. Cancer* 9: 434-441, 1955.

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ラットへの経口投与による発癌性

佐賀医科大学地域保健科学講座
西住昌裕

Carcinogenicity of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran and 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran When Given by Gavage to Rats

Masahiro NISHIZUMI

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

Previous studies showed that 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) and 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran (HCDF) could produce tumors in the liver and subcutaneous tissues of rats by subcutaneous administration. The present study have examined the carcinogenicity of the same compounds in rats by oral administration.

Wistar strain male rats were sacrificed at two years after oral administration (0.2 mg/rat) of 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF or 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF. Among rats given 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF, a cholangiohepatoma and a osteosarcoma were revealed in a rat each. Moreover, a few hepatic nodules were found in two rats in each experimental group. These results suggest that these compounds of polychlorinated dibenzofurans have a tumorigenic potency by oral administration.

はじめに

ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs) は、ポリ塩化ジベンゾジオキシン (PCDDs) と共にポリ塩化ビフェニル (PCBs) 関連環境汚染物質の1つとみなされ、可燃廃棄物焼却中の発生¹⁾が社会的問題ともなっている。その毒性については、実験的には、PCDFsのうちでも多塩化物のある種のは、高毒性と共に肝への蓄積性が指摘されている²⁾⁷⁾⁸⁾。他方、PCDFsは油症発症の主要な原因物質の1つとして認識されるようになって来ている³⁾が、この物質の毒性、特に発癌性を含めた慢性毒性については不明な点が多い。

我々は、先に油症患者体内にも存在すると報告されている、2, 3, 4, 7, 8-五塩化ジベンゾフラン (PenCDF) および1, 2, 3, 4, 7, 8-六塩化ジベンゾフラン (HCDF) をラットに皮下投与した場合、皮下腫瘍と共に肝腫瘍の発生をみたことを報告した⁴⁾が、こゝではラットへの経口投与においても肝腫瘍の発生を見たことを報告する。

実験材料および方法

実験に使用した2, 3, 4, 7, 8-PenCDFおよび1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDFは、前回の実験に使用したものと同一のものである⁴⁾。これらは、それぞれ別個にオリーブ油に1 mg/mlの濃度となる様に溶解し、1回当りその0.02 mlを、1週2回の割合で、5週間に亘り、計10回、ラット胃内に強制注入した。

実験動物としては、5週齢のウイスター系雄ラット34匹を次の3群

- (1) 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF 投与群
- (2) 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF 投与群
- (3) オリーブ油単独投与 (対照) 群

に分け使用した。飼育は、1ケージ当り2~3匹ずつとし、室温22±2℃、相対湿度55±5%の室内で行なった。飼料は固型飼料CE-2 (日本クレア製) を水道水と共に、自由に摂取させた。

薬物投与開始後、各動物は最初12週間は毎週1回、以後は2週間に1回、体重測定を行うと共に、実験終了まで全身状態の観察を続けた。実験終了前に死亡し

たラットは剖検により各臓器の変化を確認し、実験開始後 104 週で全ラットを屠殺した。胸腔、腹腔内各臓器は肉眼的な異常の有無を確認後、肝、脾、腎は臓器重量を測定し、他の臓器は必要に応じ、10%フォルマリン液にて固定した。これらはパラフィン包埋切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を行い、病理組織学的に観察した。

実験結果

2, 3, 4, 7, 8-PenCDF 投与群のラットは、1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF 投与群および対照群のラットに比べ、実験開始後 8 週から 50 週にかけ有意 ($P < 0.01$) な体重増加の抑制がみられた (Fig. 1)。この傾向は、その後も続き、2, 3, 4, 7, 8-PenCDF 投与群は対照群に比し、実験

終了 (104 週) の時点でも有意 ($P < 0.05$) な体重減少を示した。実験期間中、第 1 群で 4 匹、第 2 群で 3 匹、対照群で 2 匹のラットが肺感染症により死亡したが、他は実験終了時まで生存し、その間、外見上は異常を認めなかった。

104 週での屠殺時、実験群では肝腫大がみられ、2, 3, 4, 7, 8-PenCDF 投与群、1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF 投与群でのラット肝体重比 (体重 100 g 当り) は、それぞれ 4.49 ± 0.72 , 4.24 ± 0.66 で対照群の 3.69 ± 0.41 に比し、有意 ($P < 0.05$) に大であった。

実験群でみられた悪性腫瘍は、2, 3, 4, 7, 8-PenCDF 投与群で直径 7 mm の肝腫瘍を有するラットと左胸腔内に左肺組織、肋骨と癒着した直径 2.5 cm の腫瘍を有するラットが 1 匹ずつみられた (Table I)。組織学

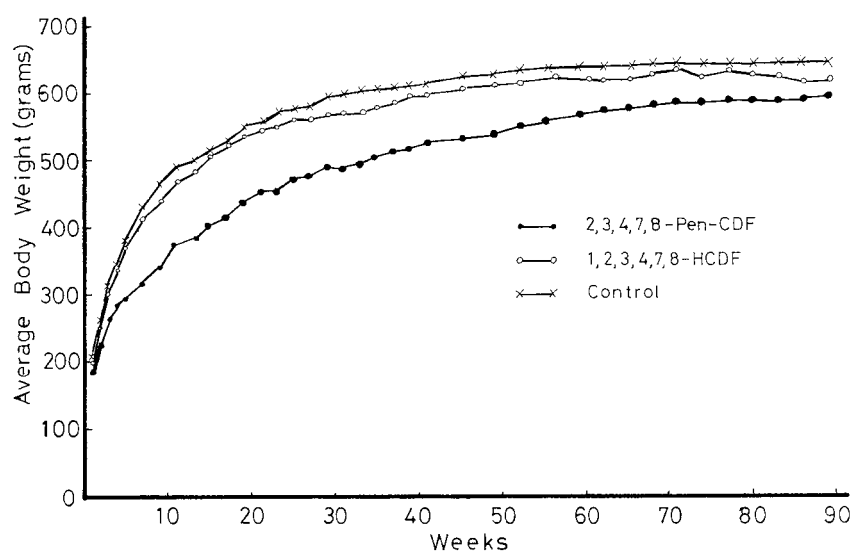


Fig. 1 Body Weight Curve of Rats given 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF and 1, 2, 3, 4, 7, 8-HCDF by Gastric Intubation.

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

Group No.	Chemicals	Treatment	Number of rats used	Number of rats sacrificed at termination	Number of rats bearing tumors	Liver tumors		Other tumor
						Nodules	CH ^{a)}	
1	2,3,4,7,8-Pen-CDF	20 μ g p.o. $\times$ 10	12	8	3	2	1	1 ^{b)}
2	1,2,3,4,7,8-HCDF	20 μ g p.o. $\times$ 10	12	9	2	2	0	0
3	olive oil only	0.02 ml p.o.	10	8	0	0	0	0

a) Cholangiohepatoma

b) Osteosarcoma

的に、肝腫瘍は腺管構造のみられる混合型肝癌 (Fig. 2) で、胸腔内腫瘍は骨肉腫 (Fig. 3) の像を示した。

このほか、肝に直径 2~3 mm の小結節を有するラットが、2,3,4,7,8-PenCDF 投与群に 2 匹、1,2,3,4,7,8-HCDF 投与群にも 2 匹みられた (Table I)。このうち 2,3,4,7,8-PenCDF 投与群の 1 匹は、先に述べた混合型肝癌が観察されたラットである。これら小結節は、組織学的には過形成性細胞ないしは胞体内に空胞を有する肝細胞の集団からなるもの、あるいはこれらの細胞の混在から成るものであった (Fig. 4, 5)。

腫瘍ないし小結節以外の肝細胞は全般に腫大し、胞体内に空胞を有する肝細胞が 10 数個集合している細胞巣が散在するほか、小胆管の増殖像が屢々みられた。

腎組織は、第 1 群、第 2 群でそれぞれ 2 匹のラットで、尿細管の拡張、尿細管内腔に蛋白様物質の存在と共に著明な囊腫形成を認めた。なお、多くのラット腎で、間質への小円形細胞の滲潤がみられた。

なお、対照群のラットでは、肝をはじめ各種臓器に

腫瘍の発生はみられず、組織学的にも異常を認めなかった。

考 察

先に、2,3,4,7,8-PenCDF ならびに 1,2,3,4,7,8-HCDF のラットへの皮下投与により、局所の線維肉腫、線維腫、ないし脂肪腫などの発生と共に肝腫瘍の発生を報告した⁴⁾が、今回、同一の物質をラットへ経口的に投与することにより、少数ではあるが肝腫瘍の発生がみられたことは、これら化合物が肝発癌性を有することを、より確実に示したものと考えて良い。本実験では化合物の入手量に限界があったこと、慢性毒性の程度が十分に判明していないこともあり、使用動物数、投与量ならびに投与回数も出来るだけ抑えた実験計画を立てた。5 週間に亘る経口的投与総量 0.2 mg/rat は、2,3,4,7,8-PenCDF に関しては体重増加の抑制以外は、取り上げる程の毒性を示さず、1,2,3,4,7,8-HCDF については体重増加の抑制も軽度で

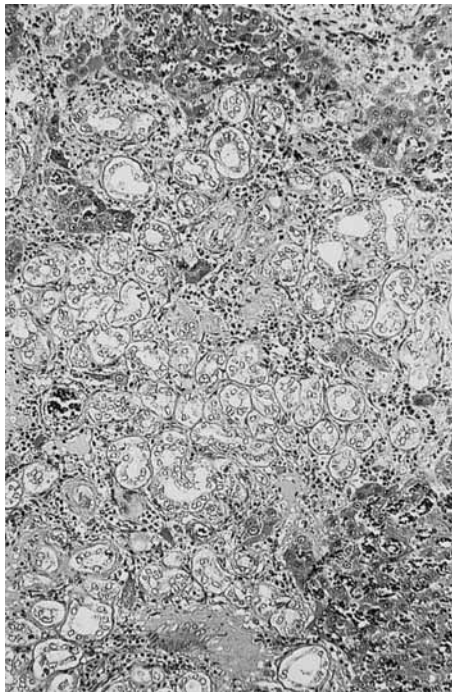


Fig. 2 Cholangiohepatoma in the rat given 2,3,4,7,8-PenCDF, showing glandular differentiation together with infiltration of the surrounding parenchyma. H-E stain, $\times 100$.

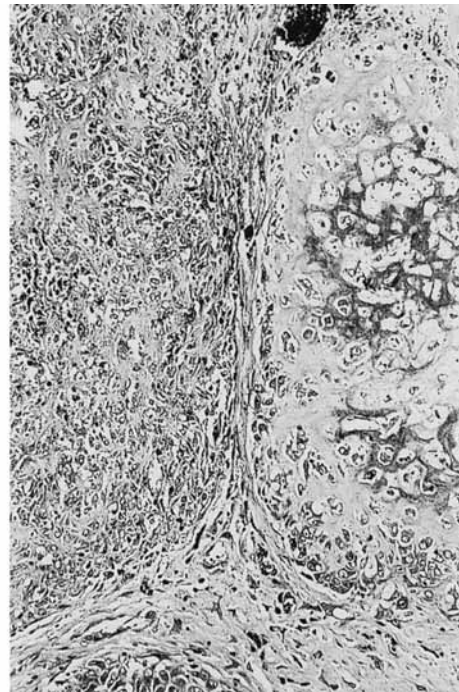


Fig. 3 Osteosarcoma in thoracic cavity of the rat given 2,3,4,7,8-PenCDF, which is composed of osteoid tissue and pleomorphic malignant stroma comprising tumorous osteoblasts and spindle cells. H-E stain, $\times 100$.

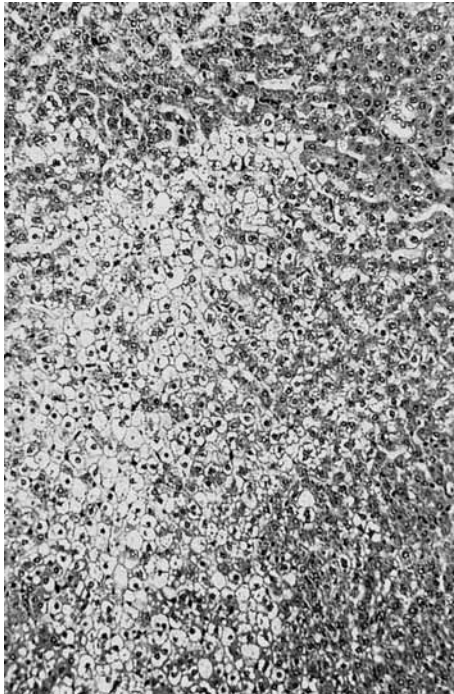


Fig. 4 Hyperplastic nodule in the rat liver given 1,2,3,4,7,8-HCDF. The cells are extensively foamy in character. H-E stain, $\times 100$.

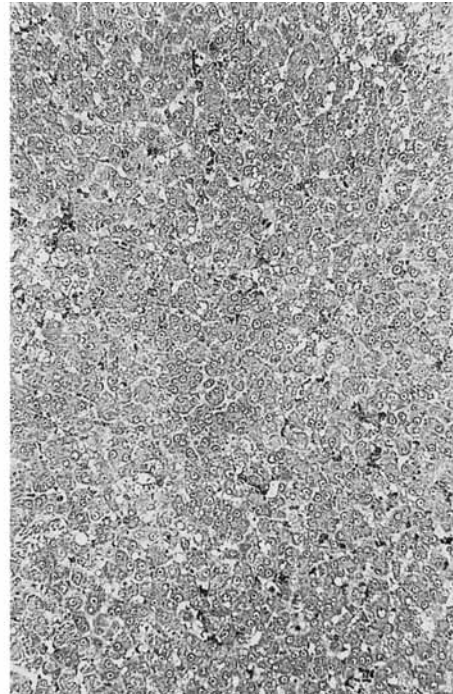


Fig. 5 Another hyperplastic nodule in the rat liver given 2,3,4,7,8-PenCDF. The nodule is composed of moderately large hepatocytes with cytoplasmic 'ground glass' appearance. H-E stain, $\times 100$.

あった。従って、明白な臓器障害を示す程の慢性毒性を惹起させるためには、本実験での投与量の数倍以上の投与量が必要であろう。本実験で、肝癌は1例のみであったが、一般的な化学的発癌に際しては量・反応関係があることから、両物質共に、投与量の増量により腫瘍発生率も増加すると考えられる。また、過形成性結節はラット肝においては発癌過程の中で前癌段階の変化とみなされている¹⁾ことから、さらに数カ月から1年の life span に亘る観察を続けた場合、癌への進展の可能性を考えてもよからう。

この他、2,3,4,7,8-PenCDF 投与群のラット1匹にみられた胸腔内の骨肉腫は、1例のみで投与物質による発癌と断定することは出来ないが、ラットにおける自然発生腫瘍としては文献的にも稀で、私共のこれまでの wistar 系ラット1,000匹に近い例の中でみられたことはなく、極めて稀なものと考えられる。従って、2,3,4,7,8-PenCDF の投与と何等かの関連性を考慮する必要がある。実験的骨腫瘍は、放射性物質や2,3の発癌性化学物質、いくつかのウイルスによる発生

が知られているが、経口的に与えてラットの骨腫瘍の発生を認めたのは1-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea による報告²⁾のみであるので、本実験の結果は興味深い。

総 括

2,3,4,7,8-PenCDF ないし1,2,3,4,7,8-HCDF をラットに1匹当たり総量0.2 mgを経口的に投与し、2年後に屠殺した結果、2,3,4,7,8-PenCDF を投与したラット群で、肝癌1例、骨肉腫1例がみられ、その他、肝に小結節を有する動物は各実験群に2例ずつ観察された。この結果は、両物質、特に2,3,4,7,8-PenCDF の肝発癌性を示唆するものと考えられる。

文 献

- 1) Farber E: Hyperplastic liver nodules. In Bush H (ed): Methods in Cancer Research VII. 1st ed. pp. 345-375, Academic Press, New York, 1973.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Nishizumi M: Carcinogenicity of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran and 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran in rats. Fukuoka Acta Med. 80: 240-245, 1989.
- 5) Pelfrene A, Mirrish SS and Gold B: Induction of malignant bone tumors in rats by 1-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea. J. Natl. Cancer Inst. 56: 445-446, 1976.
- 6) Rappe C, Nygren M and Gustafson G: Human exposure to polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. In Chooudhary G, Keith LH and Rappe C (ed): Chlorinated Dioxins and Dibenzofurans in the Total Environment. 1st ed. p 355, Butterworth Publishers, Boston, 1983.
- 7) Van den Berg M, Van Wijnen J, Wever H and Seinen W: Selective retention of toxic polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in the liver of the rat after intravenous administration of a mixture. Toxicology 55: 173-182, 1989.
- 8) 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.

Polychlorinated biphenyls (PCBs) 及び その関連化学物質と発癌 —とくに肺癌との関連を中心に—

九州大学医学部胸部疾患研究施設

中 西 洋 一・重 松 信 昭

Carcinogenic Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Their Derivatives, Including Carcinogenicity to the Lung

Yoichi NAKANISHI and Nobuaki SHIGEMATSU

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

PCBs are compounds whose physical/chemical properties led to their wide spread commercial use. The persistence and stability of PCBs have resulted in a world wide distribution. PCDFs, ones of PCB derivatives, are primary causal agents of mass food poisoning, called Yusho in Japan and Yu-Cheng in Taiwan. Several epidemiologic studies on the carcinogenicity of PCBs in both occupational exposure and accidental intoxication suggest that PCBs might be a potent carcinogen in liver and lung. Many investigators reported that PCBs induced hepatocellular carcinoma in rat and mice. Although either mutagenic or genotoxic effects of PCBs are not definit, their tumor promoting effects have been repeatedly demonstrated in the liver. The effects of PCBs as tumor promoter in the lung have also been reported. PCB congeners that efficaciously promote carcinogenesis increase cytochrome P-450-dependent monooxygenases, which are abundant both in bronchiolar Clara cells and in hepatocytes. PCB congeners which are inducers of P-450 may be active as tumor promoter by inhibiting intercellular communication and/or by stimulating cell proliferation. Furan derivatives like PCDFs have high affinity to bronchiolar Clara cells and hepatocytes. PCDFs induce necrosis and epoxide formation to their target cells, which might result in carcinogenesis of liver and lung.

は じ め に

PCBは1929年商業ベースでの生産が開始されて以来、先進国を中心に、変圧器、潤滑油の添加剤、殺虫剤、塗料や糊料への添加剤、その他に広く使用されてきた⁴²⁾。そして、1970年代を境に生産は中止ないし制限された¹⁶⁾が、物理的、化学的安定性の高い物質であるために、廃棄物や土壌中に残留し、PCBによる世界的な汚染¹⁹⁾は現在もなお無視することはできない。

人における大量の中毒事件は、1968年本邦において(油症)、1979年台湾において(Yu-Cheng)発生した¹¹⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁷⁾⁴⁰⁾。油症は1968年以降福岡県をはじめとした西日本各地に多くの患者を認め、1983年までに1、

821名が登録されており¹⁴⁾²⁶⁾、発症より23年が経過した現在でも、いまだに皮膚その他の臨床症状を有しているものが見られる。そして、今までの研究により油症の主たる原因物質は Polychlorinated Dibenzofuran (PCDF) であることが解明されてきた²⁰⁾³⁶⁾。

1979年に台湾で2,000名以上の規模で発生した Yu-Cheng¹¹⁾も、油症と同様に米ぬか油に混入した PCB, PCDF が原因であると報告されている²⁸⁾。また、諸外国における職業的 PCB 曝露が生体に及ぼす影響に関する報告も見られている^{2)3)5)~7)}。PCB, PCDF はその安定性に加えて、生体内に長年にわたって残留することが報告³⁰⁾³⁵⁾されており、動物実験における発癌性の問題も詳細な研究や review があり⁸⁾、これら

PCB ならびにその類縁物質を体内に残した油症その他の患者においては、今後の発癌のリスクという点に関して無視できないと思われる。

したがって、現在までの油症患者の発癌に関し、また、PCB、PCDF についての発癌機序の考察を行い、環境汚染と発癌の問題を含め今後の研究の課題を考えたい。

油症の臨床症状と死因とくに発癌について

油症発症早期におけるもっとも著名な変化は“PCB acne”という言葉で表される皮膚病変⁴¹⁾と、マイボーム腺の腫大と結膜色素沈着など²²⁾であり、全身症状としては発熱、頭痛、黄疸、四肢のしびれ感、ならびに咳嗽、かたくり様の喀痰等の呼吸器症状がみられた²³⁾³⁴⁾³⁸⁾³⁹⁾。一方、肝機能障害を呈した症例は比較的少なかった²⁵⁾が、電顕レベルにおける形態学的変化⁹⁾や、細気管支のクララ細胞にも同様の変化³³⁾³⁴⁾がみられた。これらは Xenobiotics による変化とされている。また、3-methylcholanthrene によって誘導されるリンパ球の Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity の上昇が見られたという³¹⁾。

一方、油症患者死亡例に関する報告が以下のようになされている。1984 年、Kikuchi らは 12 例の油症患者の剖検例を報告した²¹⁾。死産児 2 例を除く 10 例中 5 例が悪性腫瘍（肝癌 2 例、肺癌 2 例、食道癌 1 例）を有していた。Urabe らは 1,665 名の油症患者を追跡調査し、1977 年までに 51 名が死亡したが、うち 11 名 (35.4%) が癌死であり、本邦の平均 21.1% より多かったと述べている⁴²⁾。池田らは 1,761 名の油症患者を設定時点から 1983 年まで追跡し、この間に生じた観察死亡数を、全国の性別、年齢別、死因別死亡率を上記コホートの人年に適応して得られた期待死亡数と比較し標準化死亡を求めた¹⁴⁾。その結果、全死因による死亡数は期待死亡数と有意に異ならなかったものの、全癌死亡は男性に有意の増加を認めたと報告している。中でも肺癌（呼吸器系の癌）ならびに肝癌死亡が有意に高かったと述べている。彼らは油症と発癌との関連を結論付けるには、さらに今後の解析を重ねる必要があるとしているが、後述のように動物実験において PCB が肝、肺の発癌に関与するという諸報告（review 8 参照）がみられており、油症と発癌の関連は、今後のきわめて重要な問題と思われる。

肺癌などの発癌と PCB、PCDF について

我々は 1970 年から 1989 年にかけて九州大学附属病院呼吸器科に入院した 1,092 名の肺癌患者を年次的に性別、組織型別に解析したところ、非喫煙者女性肺癌の比率が有意に増加していることを見いだした¹⁵⁾。この傾向は他施設での解析においても同様に見られており¹²⁾、喫煙以外の発癌因子の存在を示唆する成績として重要である。食摂中の脂肪の比率や、4-ipomeanol, BP2, 3 などの化学物質とともに、PCB ならびにその類縁物質がなんらかの関与をしている可能性を考えさせる報告⁴⁾がみられる（後述）。

本油症研究班の従来の研究では、現在油症と関係のない健康者の糞便中には必ず PCB とその関連物質が検出されている（unpublished observation）こと、それら健康者の皮下脂肪にも検出されることが明らかにされている¹³⁾。上記の私達の研究では、増加している非喫煙者肺癌の 70% はクララ細胞ないし肺泡 II 型細胞由来であった¹⁵⁾が、これらの物質は後述のようにクララ細胞等への高親和性を有しており、肺癌と PCB との関連は油症患者に限られた問題ではないのかもしれない。PCB によるマウス、ラットへの発癌実験の成績は多くの報告がみられる⁸⁾。Nagasaki ら³²⁾、Ito ら¹⁷⁾¹⁸⁾は PCB 混合物である Kanechlor-500 をマウスに経口投与したところ、高率に肝腫瘍（nodular hyperplasia, hepatocellular carcinoma）が発生したことを報告している。同時に、PCB は benzene hexachloride により引き起こされる腫瘍の promoting effect を有すると述べている³²⁾。これに引き続いて多くの PCB 混合物、中でも Kanechlor-500, Aroclor 1260, Clophen A60 などの塩素をより多く含むものが、実験動物に肝癌を引き起こすことが報告された⁸⁾。

また、Anderson ら¹¹⁾は N-nitrosodimethylamine による肺ならびに肝腫瘍の promoting effect を PCB が有することを報告している。

このように PCB は肝ならびに肺、胃、皮膚の発癌に関与する可能性が in vivo モデルから報告されている。

一方、油症の主たる原因物質である PCDF が発症に関与する可能性については、PCB に比し in vivo モデルでは十分な解析が少ない⁸⁾¹⁰⁾。しかし、これまでの疫学調査において肝癌、肺癌との関連が報告されており¹⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾、今後解析を重ねる必要があると考えられる。

PCB および PCDF 発癌の機序

PCB による催奇性については Armes らによって開発された *Salmonella* を使ったの催奇性実験が多くの施設によってなされているが、大半の PCBs についてのその催奇性は証明されていないようである⁸⁾。また、種々の染色体異常、性腺への影響、DNA 損傷に関する実験においても genotoxicity は明確には証明されていないようである⁹⁾。

一方、先述のように、initiating agent を作用させた実験系における発癌の報告は数多く¹⁷⁾¹⁸⁾³²⁾³⁷⁾、肝癌、肺癌、皮膚癌における tumor promotor としての作用は疑いようがないと思われる¹⁾。肝癌における promoting effect が強い PCB 混合物は cytochrome P-450-dependent monooxygenase を含む肝由来の酵素を増加させる。Cytochrome P-450 を誘導するタイプの PCB は intercellular communication の阻害や細胞増殖 (hypertrophy, hyperplasia, endoplasmic reticulum の増生) を通じて tumor promoting effect を発揮している可能性があると思われる⁶⁾。

また現在迄のところ、フラン代謝物についてはクララ細胞と他の気管支上皮細胞に与える影響の差異が詳しく検討されている⁴⁾。その一つとして、4-ipomeanol はクララ細胞を特殊な target 細胞としており、その necrosis を引き起こす。そのような点について、フラン誘導体は in vivo の代謝過程で活性化され、肝においてはミクロゾームが aflatoxin B1 の dihydrofuran 部分の epoxide 形成を誘起すること、epoxide は aflatoxin 1 という肝癌誘起物質の発癌に関与するものと考えられている。Furosemide もフラン構造の腎や肝での代謝活性過程でその necrosis を来すこととの相関が考えられる。その根拠はチトクローム P-450-dependent mixed function 酸化代謝によって in vivo で形成された 4-ipomeanol の毒性のある代謝物が肺で形成されることによる。そして、その代謝物は肺におけるチトクローム-P-450-dependent mixed function 酸化酵素活性の部位であるクララ細胞にみられることによる。

ま と め

PCB, PCDF と発癌とくに肺癌発生との関係につき、環境汚染の中で本邦のみならず、海外で検討されている問題点を検索し、今後の研究の基本となるべき点を考察した。

- 1) 油症患者では肺癌、肝癌の発生率が高い。

- 2) 細気管支のクララ細胞と肝細胞は共に癌原生物質の代謝を行うチトクローム P-450 の活性が高い。
- 3) PCB は発癌において主として promoting activity があるとされている。
- 4) PCDF については furan 誘導体がクララ細胞に対し特異的 affinity があり、その necrosis や発癌に関連の深い epoxide 形成が行われる可能性が高い。

文 献

- 1) Anderson LM, Ward JM, Fox SD, Isaaq HJ and Riggs CW: Effects of a single dose of polychlorinated biphenyls to infant mice on N-nitrosodimethylamine-initiated lung and liver tumors. *Int. J. Cancer*. 38: 109, 1986.
- 2) Bahn AK, Grover P, Rosenwaike I, O'Leary K and Stellman J: PCB? and melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 296: 108, 1977.
- 3) Bertazzi, PA, Riboldi, L, Pesatori, A, Radice, L and Zocchetti, C: Cancer mortality of capacitor manufacturing workers. *Am. J. Ind. Med.*, 11: 165, 1987.
- 4) Boyd MR: Metabolic activation of pulmonary toxins. In: *Mechanisms in Respiratory Toxicology*, vol 2. Witschi Hand Nettesheim P (eds), CRC Press, 85-112, 1982.
- 5) Brown DP: Mortality of workers exposed to polychlorinated biphenyls: an update. *Arch. Environ. Health* 42: 333-339, 1987.
- 6) Brown DP and Jones, M: Mortality and industrial hygiene study of workers exposed to polychlorinated biphenyls, *Arch. Environ. Health*, 36: 120-129, 1981.
- 7) Davidorf FH and Knupp JA: Epidemiology of ocular melanoma, incidence and geographical relationship in Ohio (1967-1977). *Ohio State Med. J.*, 75: 561, 1979.
- 8) Eric M, Silberhorn EM, Goauert HP and Roberson LW: Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCB and PBBs. Vol 20, Issue 6: pp 440-496.
- 9) 平山千里, 入佐俊武, 山元寅男: 油症患者肝臓の形態学的所見. *福岡医誌* 60: 455-461, 1969.
- 10) 広瀬泰二, 堀 真, 豊原利行, 宿輪哲生, 鶴殿雅子, 吉田彦太郎: 実験動物発癌に及ぼす PCDF の影響—その濃度差の検討—. *福岡医誌* 80: 246-254, 1989.
- 11) Hsu S-T, Ma C-I, Hsu S K-H, Wu S-S, Hsu NH-M and Yeh C-C: *Am. J. Ind. Med.* 5: 71-79, 1984.

- 12) 家城隆次, 工藤翔二, 岡村 樹, 平山正清, 植竹健司, 木村 仁, 加勢田静, 池田高明, 深山正久, 小池盛雄: 過去 13 年間の肺癌における組織型の推移. 肺癌 31: 1-6, 1991.
- 13) 飯田隆雄, 中川礼子, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克己: 油症患者及び健常者の皮下脂肪組織中の Polychlorinated didenzofurans (PCDFs). 福岡医誌 80: 296-301, 1989.
- 14) Ikeda M, Kuratsune M, Nakamura Y, Hirohata T: A cohort study on mortality of Yusho patients—A preliminary report—. Fukuoka Acta Med. 78: 297-300, 1987.
- 15) Ikeda T, Kurita Y, Inutuka S, Tanaka K, Nakasishi Y, Shigematsu N and Nobutomo K: The changing pattern of lung cancer by histological type—A review of 1,151 cases from a university hospital in Japan, 1970-1989. Lung Cancer, 1991 (in press).
- 16) International Agency for Research on Cancer (IARC): IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Biphenyls. Vol. 18, IARC, Lyon, France, 1978.
- 17) Ito N, Nagasaki H, Arai M, Makiura S, Sugihara S and Hirao K: Histopathologic studies on liver tumorigenesis induced in mice by technical polychlorinated biphenyls and its promoting effect on liver tumors induced by benzene hexachloride. J. Natl. Cancer Inst. 51: 1637-1642, 1973.
- 18) Ito N, Nagasaki H, Makiura S and Arai M: Histopathological studies on liver tumorigenesis in rats treated with polychlorinated biphenyls. Gann. 65: 545-549, 1974.
- 19) Jensen, S: A new chemical hazard. New Sci. 32: 612, 1966.
- 20) Kashimoto T and Miyata H: Differences between Yusho and other kinds of poisoning involving only PCBs. In: PCB and the Environment. Vol 3, Waid JS (Ed), CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.
- 21) Kikuchi, M. Autopsy of patients with Yusho Am. J. Ind. Med. 5, 19-30, 1984.
- 22) 向野利彦, 大西克尚, 廣中博見: 油症患者の眼症状 (第 6 報) 眼板腺内容物採取の工夫と PCB 濃度. 福岡医誌 76: 244-247, 1985.
- 23) Kuratsune, M Environ. Health Perspect. Experimental Issue 5, 129-136, 1972.
- 24) Kuratsune, M: Yusho, in Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products. Kimbrough, RD, (Ed), Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 1980, chap. 9B1.
- 25) Kuratsune, M: Yusho, with reference to Yu-Cheng. In: Halogenated biphenyls. Terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. Kimbrough and Jensen (eds.) Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), 1989.
- 26) Kuratsune M, Ikeda M, Nakamura Y and Hirohata T: A cohort study on mortality of "Yusho" patients: A preliminary report. Unusual occurrence as clues to cancer etiology, RW Miller et al. (eds.) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, Taylor & Francis, Ltd, pp 61-66, 1988.
- 27) Kuratsune, M and Shapiro, RE: PCB poisoning in Japan and Taiwan, Alan R Liss, New York, 1984.
- 28) Masuda, Y, Kuroki, H, Haraguchi, K and Nagayama, J.: PCFDs and related compounds in humans from Yusho and Yu-Cheng incidents. Chemosphere 15, 1621-1628, 1986.
- 29) Masuda Y, Kuroki H, Haraguchi K and Nagayama J: PCB and PCDF congeners in the blood and tissues of Yusho and Yu-Cheng patients. Environ. Health Perspect. 59: 53-58, 1982.
- 30) 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.
- 31) 長山淳哉, 清原千香子, 福田篤志, 中村好一, 廣畑富雄, 旭 正一, 吉村健清: 油症患者の芳香族炭化水素水酸化酵素活性に関する研究. 福岡医誌 78: 301-304, 1987.
- 32) Nagasaki H, Tomii S, Mega T, Marugami M and Ito N: Hepatocarcinogenicity of polychlorinated biphenyls in mice. Gann. 63: 805, 1972.
- 33) 中西洋一, 栗田幸男, 鐘ヶ江秀明, 重松信昭: 油症における呼吸器系ならびに免疫系の障害—経過ならびに発症機序について—. 福岡医誌 76: 196-203, 1985.
- 34) Nakanishi Y, Shigematsu N, Kurita Y Matsuba K, Kanegae H, Ishimaru S and Kawazoe Y: Respiratory involvement and immune status in Yusho patients. Environ. Health Perspect. 59: 31-36, 1985.
- 35) Rappe C, Nygren M, Buser HR, Masuda Y, Kuroki H and Chen PH: Identification of polychlorinated dioxin (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in human samples. Occupational exposure and Yusho patients. Paper presented at 2nd International Workshop on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, Arlington, VA, 1981.
- 36) Safe S: PCBs and human health, in Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology, Safe S (Ed), Springer-Verlag, Berlin, 133, 1987.
- 37) Schaeffer E, Greim H and Goessner W: Pathology of chronic polychlorinated biphenyl (PCB) feeding in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 75: 278-288, 1984.
- 38) 重松信昭, 石丸秀三: ポリ塩化ビフェニール (PCB) の組織分布とその障害について呼吸器分布を中心として. 福岡医誌 70: 246-251, 1979.

- 39) 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.
- 40) 塚元久雄, 牧角三郎, 広瀬 広, 小嶋 享, 福元久子, 福本孝三郎, 倉恒匡徳, 西住昌裕, 柴田紀子, 永井諄爾, 八戸義明, 沢田 啓, 古川ミチヨ, 吉村英敏, 辰巳 淳, 小栗一太, 占野廣司, 上野景平, 小林宏, 矢野太陸, 伊藤敦子, 岡田登志江, 稲神 馨, 古賀友英, 富田裕一郎, 古賀民穂, 山田芳雄, 宮口尹男, 菅野道広, 堀 康二, 竹下健次郎, 真子憲治, 中村幸男, 重森伸康: 油症患者が使用したライソ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一, 福岡医誌 60: 496-512, 1969.
- 41) Urabe H and Koda H in PCB poisoning and pollution (Higuchi, K., ed.), pp. 105-123. Kodansha Ltd., Tokyo, and Academic Press, New York., 1976.
- 42) Urabe H, Koda H, and Asahi M: Present state of Yusho patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320: 273-276, 1979.
- 43) World Health Organization (WHO): Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls. *Environment Health Criteria* 2, WHO, Geneva, Switzerland, 1976.

歯周組織に及ぼす PCB の影響に関する免疫組織学的 ならびに病理組織学的検索

九州大学歯学部歯科保存学第1教室（主任：青野正男教授）

橋口 勇・赤峰昭文・宮武祥子

阿南 壽・前田勝正・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第1教室非常勤講師（主任：佐々木元賢教授）

奥村英彦

Immunohistological and Histopathological Study of the Effect of PCB on the Periodontal Tissue

Isamu HASHIGUCHI, Akifumi AKAMINE, Sachiko MIYATAKE,

Hisashi ANAN, Katsumasa MAEDA and Masao AONO

Department of Endodontics and Periodontics, Faculty of Dentistry (Director: Prof. M. Aono)
Kyushu University 61, 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 performed immunohistochemical and histopathological investigation on the inflamed gingiva from the patient with Yusho and on the periodontal tissue from PCB poisoned rats respectively. The results obtained were as follows.

1) In the gingiva from the Yusho patients, the proportions of plasma cells, B cells, T cells in the inflammatory cells and CD4/CD8 ratio were 47.9%, 18.3%, 10.7%, and 2.84, respectively.

2) In the periodontal tissue from rats with experimental periodontitis, we found no definitive difference between the PCB poisoned rats and the clinically healthy rats.

はじめに

油症患者の口腔内所見としては、歯肉の色素沈着、歯牙の萌出遅延、歯胚の欠損や歯根の形態異常などが挙げられる¹⁾。一方、油症患者の検診時には、上記病変以外にも歯牙挺出感、歯肉腫脹や出血といったいわゆる歯周疾患の訴えも数多くみうけられる。そこで今回、我々は PCB の歯周組織に及ぼす作用を検討するために、油症患者歯周炎罹患歯肉を免疫組織化学的に検索するとともに実験的歯肉炎を惹起させ病理組織学的検

索を行った。

実験方法

1. 油症患者歯肉に及ぼす影響について

油症患者と認定された 55 才の女性より、排膿や歯肉の発赤腫脹が認められ 10 mm 以上の深い歯周ポケットを有し、重度の辺縁性歯周炎と診断された 17 の歯肉を浸潤麻酔下にて採取した。佐藤ら¹⁵⁾が報告した AMex 法に従って固定後包埋し、厚さ約 6 μ m の連続切片を作製した。検索に使用した一次抗体は、ポリク

ローナル抗体として DAKO 社製ウサギ抗ヒト IgA, IgE, IgG および IgM をモノクローナル抗体として Becton-Dickinson 社製 Leu シリーズ, マウス抗ヒト Leu 4+5b (T 細胞: CD3, CD2), Leu 14 (B 細胞: CD22), Leu 2a (T S/C 細胞: CD8), Leu 3a×3b (T H/I 細胞: CD4), Leu M₅ (組織マクロファージ: CD11c) を用い, ABC 法にて免疫組織学的染色を行った。そして 500 倍光学顕微鏡下で 7 mm 四方のグリッド (オリンパス社製, 接眼マイクロメーター) 内の各陽性細胞数を計測し, 単位面積当りの浸潤細胞総数中に占める比率を算出した。なお切片の一部は, ヘマトキシリン・エオジン染色を施し病理組織学的検索を行った。

2. 実験的歯周炎における PCB の影響について

実験動物としては生後 6 週令の WKA 系ラットを用いて, 以下の二つの群に分けて観察を行った。

1) PCB 投与群

KC-400+PCDF をサラダ油に溶かし, 50 mg/kg を腹腔内に投与した。

2) PCB 非投与群

PCB 投与群と同量のサラダ油を腹腔内に投与した。

上記 2 群のラットにおいて投与 1 日後に, 下顎第 1 大臼歯 (M₁) と第 2 大臼歯 (M₂) 接触部辺縁隆線の一部にカーバイド NO 1/2 のラウンドバーを用いて浅い小窩を形成した。処置直後から通常固形飼料 (オリエンタル社) を十分に与え, 処置後 5 日及び 10 日目に屠殺した。下顎骨を摘出後 10% 中性ホルマリン固定および EDTA 脱灰を行った。その後通法に従いパラフィン包埋を行い, 約 6 μm の近遠心的切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。なお対照群として, 無処置の第 2 大臼歯 (M₂) と第 3 大臼歯 (M₃) の歯間部歯周組織を検索した。

実 験 結 果

1. 油症患者歯肉の免疫組織学的検索

高度の炎症性細胞の浸潤が上皮内および固有層に認められ, 上皮と固有層の境界が不明瞭になっていた。浸潤細胞の多くは形質細胞とリンパ球であり, リンパ

球の subset では B 細胞が T 細胞より優位であった (表 1)。形質細胞としては, IgG 保有細胞が 42.0% (全浸潤細胞中に占める比率, 以下同じ) と最も多く, 次いで IgA 保有細胞 (4.6%), IgM 保有細胞 (0.7%), IgE 保有細胞 (0.6%) の順であった。T 細胞の subset としては, CD₄ 陽性の T H/I 細胞が 12.8%, CD₈ 陽性の T S/C 細胞が 4.5% と T H/I 細胞が多く, CD₄/CD₈ は 2.84 であった。

2. 実験的歯周炎の病理学的検索

1) 対照群 (小窩非形成)

PCB 投与および PCB 非投与群とも, 実験期間を通じて歯周組織はほぼ正常な組織像を呈していた (図 1)。乳頭部歯肉はほぼ三角形の形態を保っており, 付着上皮はエナメル・セメント境界に位置しており深部への増殖は認められなかった。炎症性細胞は上皮内および上皮直下に局限して観察されたがその数は少なく, また歯間水平線維の走行の乱れや歯槽骨の吸収も認められなかった。

2) 実験群 (小窩形成)

i) 5 日例

PCB 投与群および PCB 非投与群ともほぼ同様の所見を呈していた。乳頭部歯肉上皮表層に飼料の圧入が認められるが, 乳頭部歯肉の形態はほぼ三角形であり, 付着上皮はエナメル・セメント境界に位置していた。炎症性細胞浸潤の程度や歯間水平線維の走行および歯槽骨の状態は対照群と同様であった (図 2)。

ii) 10 日例

この時期になると, 5 日例に比較して飼料の圧入がより深部に認められ, それに伴い上皮の陥凹や上皮細胞の変性消失といった所見も観察されるようになった (図 3)。また, 上皮細胞の変性破壊に伴って付着上皮の根端側への軽度の侵入増殖が認められた。加えて歯間水平線維層の表層にも軽度の炎症性細胞の浸潤や線維の配列の乱れといった所見も得られたが, 深部組織の変化は認められなかった (図 4)。多くの試料では上記所見を呈するのみであったが, PCB 投与群の一部の試料においては, より著明な組織変化が観察されるものがあつた。すなわち, 炎症性細胞の著明な浸潤は認

表 1 浸潤細胞中に占める各免疫担当細胞の比率

免疫担当細胞	形質細胞	T 細胞	B 細胞	マクロファージ	その他
比率 (%)	47.9	10.7	18.3	4.6	18.5

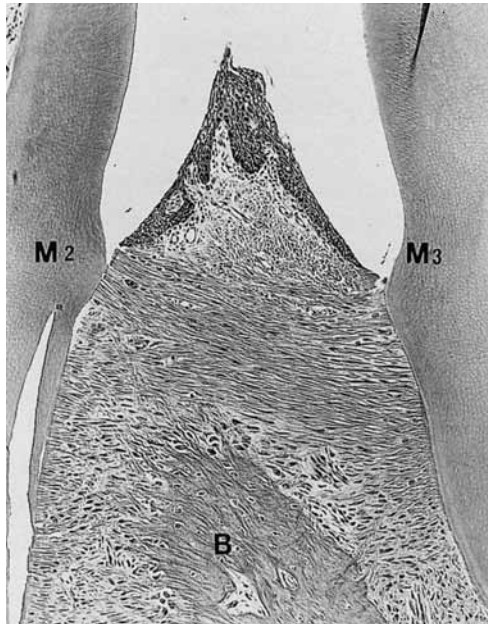


図 1 小窩非形成群 (PCB 投与群)
正常な歯周組織所見を呈している。
M₂: 第 2 大白歯, M₃: 第 3 大白歯,
B: 歯槽骨 (×94)

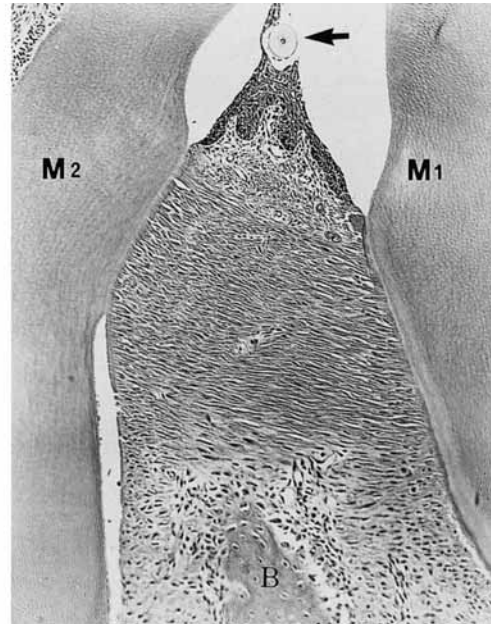


図 2 小窩形成後 5 日例 (PCB 投与群)
圧入食片 (↑) が観察されるが, 著明な組織変化は認められない。M₁: 第 1 大白歯,
M₂: 第 2 大白歯, B: 歯槽骨 (×94)

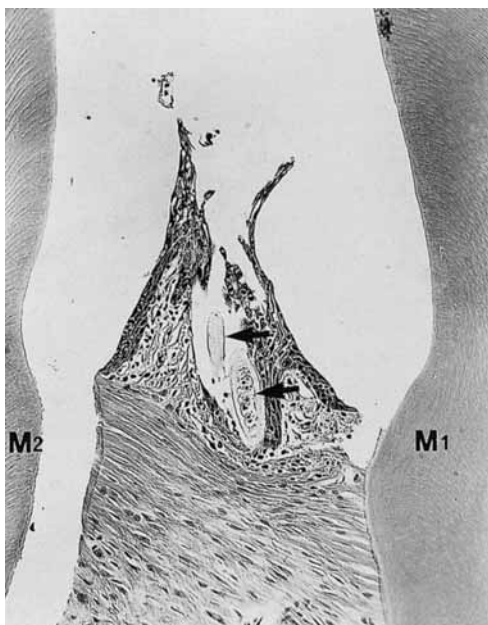


図 3 小窩形成後 10 日例 (PCB 投与群)
圧入食片 (↑) の深部迷入と共に, 上皮の陥凹
や歯間水平線維の配列の乱れが認められる。
M₁: 第 1 大白歯, M₂: 第 2 大白歯 (×140)

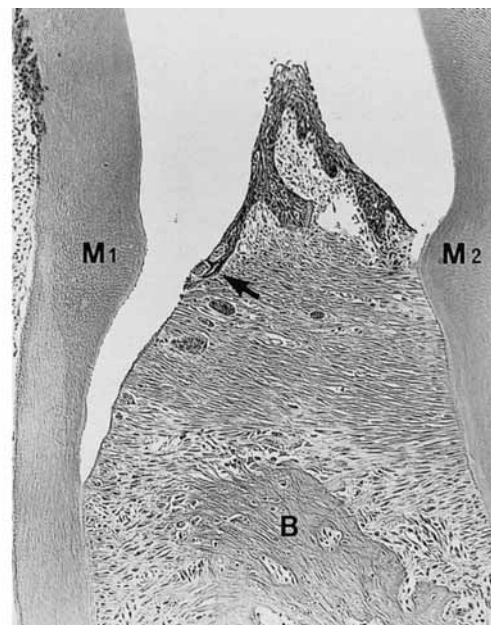


図 4 小窩形成後 10 日例 (PCB 投与群)
上皮の根端側の侵入増殖 (↑) が観察されるが,
深部組織の変化は認められない。
M₁: 第 1 大白歯, M₂: 第 2 大白歯,
B: 歯槽骨 (×94)

められないものの、M₁ 側の歯間水平線維の乱れが著明となり、それと同時に M₁ 側歯槽骨および相対する M₂ 歯根に吸収が認められ同部の線維の配列も乱れていた (図 5)。

考 察

1. 油症患者歯肉に及ぼす影響について

赤峰ら¹⁾は油症患者の歯周ポケットを測定した結果、4 mm 以上のポケットを有するものが健常者よりも高頻度に認められると述べている。病的な歯周ポケットの発現は、歯肉の発赤腫脹や排膿、歯槽骨の吸収と並んで歯周炎の重要な臨床症状の一つとされる。歯周病発症の原因としてはプラーク中の細菌の産生酵素や代謝産物あるいは LPS などの細胞成分が考えられる一方、体液性および細胞性免疫反応に基づく組織障害機構が強く関与していると考えられるようになってきた。免疫担当細胞の動態に関する過去の報告¹⁶⁾では、進行した歯周炎では形質細胞と B 細胞が主体であるとされている。今回の我々の検索でも同様の結果が得られ、臨床的所見と一致していた。油症発症後初期においては血清 IgA 値、IgM 値が低下していることが報告され

ているが¹⁴⁾、我々の結果でも原ら⁹⁾の報告に比べて IgA および IgM 保有細胞の比率が低い値を示した。しかし、症例が少なく、また免疫グロブリン保有細胞の比率に関しては不一致がみられることや⁵⁾¹⁶⁾、油症発症 3 年以上経過すると血清中の値が正常化する¹⁴⁾ことから PCB の影響によるものとは断言できず、症例数を増やす必要がある。

ところで、近年の免疫学的手法の発達により歯周炎病巣が一元的な B-cell lesion ではなく T 細胞も重要な役割を果たしていることが明らかになってきており⁹⁾、今回の結果でも T 細胞が B 細胞に次いで多く認められた。木田⁹⁾は歯周炎罹患歯肉抽出細胞中の全有核細胞の約 35% が T 細胞であると報告しているが、我々の結果では約 10% とかなり低い値を示した。PCDF をマウスに投与した中西ら¹²⁾の報告によると、血液中の T 細胞の比率の減少が生じている。しかしこの減少はヘルパー T 細胞の減少によるものであり、サブレッサー T 細胞の減少が大きかった今回の結果とは異なるものである。また同じ中西ら¹²⁾の報告の中で、発症後 14 年経過した油症患者末梢血では健常者に比べほぼ同じ比率を示したこと、PCB の作用による比率の減少ではないであろう。北村ら¹⁰⁾は細胞浸潤の程度が強くなるにつれて形質細胞の増加が T 細胞の増加よりも優位となり、その結果として T 細胞の比率の減少が生じると述べている。今回検索した歯肉内には非常に多くの炎症細胞の浸潤が認められ、かつ臨床的にも非常に重度の歯周炎の症状を呈していたことから、炎症反応の進展と共に免疫担当細胞の局在に変化が生じ結果として T 細胞比率の減少が起きたものと考えられる。T 細胞の subset のうちヘルパー T 細胞とサブレッサー T 細胞の比率は免疫調節機構のバランスを示す一つの指標とされている。我々の結果ではこの比率は 2.84 と高い値を示していた。このことは局所の免疫調節機構に何らかの異常があることを示唆しているのかも知れないが、全身疾患を有しない歯周炎罹患歯肉でも同様の傾向を示すことが報告されており¹⁰⁾油症患者に特有の病態像とは言えないであろう。一方、発症後長期間経過した時点での油症患者末梢血ではヘルパー T 細胞が高くサブレッサー T 細胞は低い傾向を示し、この傾向は血中 PCB 濃度が高い患者において特に著明であった¹²⁾。病巣局所と末梢血の T 細胞の subset の比率は異なるという報告もみられる⁸⁾。しかし侵襲局所での免疫応答は末梢循環系からの免疫担当細胞の供給を受けて開始されることより、免疫応答の初期には末梢血リンパ球の傾向が反映されと考えられそ

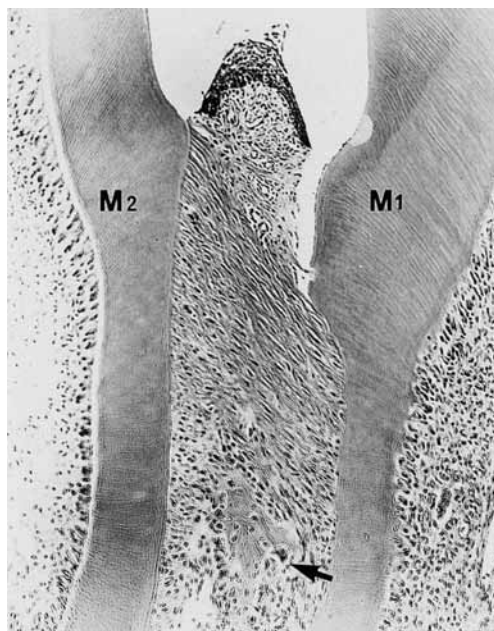


図 5 小窩形成後 10 日例 (PCB 投与群)
歯間水平線維の配列の乱れが著明となり、骨吸収 (↑) も認められる。
M₁: 第 1 大臼歯, M₂: 第 2 大臼歯 (×94)

の結果上記病態像が生じた可能性もあり、PCBの直接あるいは間接的な影響を完全に否定することはできないであろう。今後症例数を増やし、これらの点に留意して検索を続けていく必要がある。

2. 実験的歯周炎における影響について

バーやリーマー等を用いて臼歯歯間部に小窩を作製し、食片圧入を誘発させて実験的歯周炎を惹起させた系における病理組織学的報告は数多くみられる³⁾⁶⁾。これらの系においては、圧入食片は経時的に増加し、かつ深部へと迷入していく。これに伴って歯周組織に対する機械的刺激が増大し、その結果歯周組織病変が進行していくと考えられている。今回の検索でも、5日例よりも10日例の方がより強く食片が歯肉を圧迫しており、上皮層の破壊と付着上皮の根端側への侵入増殖が認められ、また同時に歯肉固有層への軽度の炎症性細胞の浸潤の増加および歯間水平線維の走行の乱れなどが観察された。一方、多くの試料で深部組織の変化はみられなかったが、保母⁹⁾は同様の系において、食片圧入後1日より炎症性細胞の深部への浸潤や歯槽骨の吸収がみられることを報告している。歯周組織の破壊には炎症性細胞浸潤による為害作用が大きく影響しており、炎症性細胞の浸潤が歯根膜腔に及ぶと歯槽骨の吸収を生じると考えられている。藤本³⁾は浅い小窩形成では深部への炎症性細胞の浸潤は認められないと述べており、我々の系でも食片の圧入力が弱く機械的刺激による歯周組織の破壊が生じにくかったためと思われる。ところで一部の試料ではあるが、PCB投与群においてM₁側に著明な骨吸収が観察された。しかしながら、これらの試料においても同部の歯根膜組織にまで及ぶ著明な炎症性細胞の浸潤は認められなかった。生理的条件下では炎症性細胞浸潤の有無に関わらず骨の再構築が起こっているが、今回M₁側に生じた骨吸収は生理的な歯牙の遠心移動によって惹起されたものではないことは多くの試料に骨吸収が認められないことから明らかであろう。阿南²⁾は実験的根尖性歯周炎を惹起させた系において、初期には炎症性細胞の浸潤が無いにも関わらず破骨細胞が出現することを報告しており、歯根膜に対する圧迫によって生じたものと述べている。今回、骨吸収の認められた試料においては上皮の破壊や歯間水平線維の配列の乱れがM₁側においてより強く認められたことから、小窩形成時に辺縁隆線の削除が不均衡でありそのためにM₁により強い食片圧入力が加わったものか、あるいは小窩形成の際にM₁により強い振動刺激が加わった結果によるものかも知れない。一方、骨吸収を誘発する因子の一つと

して微小循環系の障害が挙げられる¹³⁾。Moyersら¹¹⁾は、極めて弱い力でも作用時間が長いと歯根膜を変形せしめ、その結果、毛細血管などに障害を与える可能性があることを報告している。またIatropoulosら⁷⁾によれば、PCBを投与することで血管内皮細胞に障害が生じるという。これらのことよりPCBとM₁側への機械的刺激との相乗効果によってより強い循環障害が生じ、その結果M₁側に骨吸収が生じた可能性も否定できない。

ところでPCB投与群においてもM₂とM₃の歯間部歯周組織はほぼ正常な組織所見が得られたことより、少なくとも歯周炎の発症の開始にはPCB中毒という全身的因子よりも機械的刺激などの局所因子が強く関与している可能性が示唆されたが、更に長期間の観察を行う必要があると思われる。

総 括

歯周組織に及ぼすPCBの影響について免疫組織学的及び病理組織学的検索を行い、次のような結果が得られた。

1. 油症患者歯周炎罹患歯肉においては、形質細胞やB細胞に次いで細胞が多く認められた。ヘルパーT細胞とサブプレッサーT細胞の比率は2.84と高かった。
2. ラットにおける実験的歯周炎の検索では、PCB投与群と非投与群の間に著明な差は認められなかった。

文 献

- 1) 赤峰昭文, 橋口 勇, 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.
- 2) 阿南 壽: 実験的根尖性歯周炎の病理組織学的研究—骨リモデリングの組織学的ならびに組織定量的解析—, 日歯保誌 32: 1169-1190, 1989.
- 3) 藤本芳弘: 食片圧入が歯周組織に及ぼす影響に関する実験病理組織学的研究—食片圧入程度なりびに食餌の性状の差について—, 日歯周誌 30: 802-826, 1988.
- 4) 福山 宏, 阿南ゆみ子, 赤峰昭文, 青野正男: 油症患者における口腔病変の推移, 福岡医誌 70: 187-198, 1979.
- 5) 原 宜興, 吉村祥子, 前田勝正, 赤峰昭文, 相田宜利, 青野正男: 歯周疾患における免疫系細胞の動態に関する免疫組織学的研究 1. 世代別にみた免疫グロブリン保有細胞の比率, 日歯周誌 27: 795-806, 1985.
- 6) 保母良基: 実験的食片圧入による歯周組織の変化について, 日歯周誌 26: 201-222, 1984.

- 7) Iatropoulos TG, 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.
- 8) 葛西康弘: 成人性歯周炎患者における細胞機能の検討, 阪大歯学雑誌 32: 496-513, 1987.
- 9) 木田友信: 歯周炎患者における免疫担当細胞の検索—T リンパ球, B リンパ球, Fc レセプター保有細胞について—, 日歯周誌 24: 84-105, 1982.
- 10) 北村哲朗, 宮武祥子, 原 宜興, 前田勝正, 赤峰昭文, 青野正男: 歯周疾患における免疫系細胞の動態に関する免疫組織学的研究 3. T cell サブセットの解析, 日歯周誌 29: 1084-1093, 1987.
- 11) Moyers RE and Bauer JL: The periodontal response to various tooth movements, Am. J. Orthodont. 36: 572-580, 1950.
- 12) 中西洋一, 栗田幸男, 鐘ヶ江秀明, 重松信昭: 油症における呼吸器系ならびに免疫系の障害, 経過ならびに発病機序について, 福岡医誌 76: 196-203, 1985.
- 13) Polson AM, Meitner SW and Zander HA: Trauma and progression of marginal periodontitis in squirrel monkeys. IV. Reversibility of bone loss due to trauma alone and trauma superimposed upon periodontitis, J. Periodont. Res. 11: 290-298, 1976.
- 14) 齊藤玲子, 重松信昭, 石丸秀三: 油症における免疫グロブリン値について, 福岡医誌 63: 408-411, 1972.
- 15) 佐藤雄一, 向井 清, 広橋説雄: パラフィン切片を使用した免疫組織化学, 病理と臨床 6, 臨床増刊号: 66-72, 1988.
- 16) Seymour GJ and Greenspan JS: The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease, J. Periodont. Res. 14: 39-46, 1979.

台湾 PCB 中毒患者の血液中 PCDF 及び PCB の濃度減衰

第一薬科大学物理分析学教室

増田 義人・黒木 広明・原口 浩一

Health and Welfare Canada

John Jake RYAN

行政院衛生署

許 書 刀

Elimination of PCDF and PCB Congeners in the Blood of Patients with PCB Poisoning in Taiwan

Yoshito MASUDA, Hiroaki KUROKI and Koichi HARAGUCHI

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

John Jake RYAN

Health and Welfare Canada, Health Protection Branch, Ottawa, Ontario, K1A 0L2, Canada

Shao-Tao SHU

Department of Health, Executive Yuan, Taipei, Taiwan, Republic of China

The blood of 3 Yu-cheng patients sampled from 1980 to 1989 were analyzed for congeners of polychlorinated dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB) by high resolution gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-electron capture detection. The high concentrations of 2, 3, 4, 7, 8-penta-, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexa- and 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-hepta-CDFs (15.4, 37.7 and 4.8 ppb in lipid basis, respectively) were eliminated from the blood at half-lives of 2.14, 2.56 and 2.32 years, respectively. The high concentrations of 8 PCB congeners in the blood were also decreased with time at half-lives of 1.16~4.56 years. The half-lives of retainable PCB congeners were about 2 times longer than those of the PCDF congeners.

はじめに

1968 年福岡県及び長崎県を中心にポリ塩化ビフェニール(PCB)による中毒事件が発生した。また、1979 年台湾で同様の中毒事件が起きた。この 2 つの中毒事件はいずれも PCB, ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)及びポリ塩化クォーターフェニルが混入されたライスオイルを摂取したために発生したものである⁹⁾¹⁰⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。PCB 中毒(油症)患者の脂肪組織や肝臓に残留する PCB 及び PCDF 異性体の構造や濃度は分析されており¹¹⁾⁴⁾⁵⁾⁸⁾¹⁶⁾、かなり長期間体内に残留することが分かっている。患者血液数例については、その中の PCDF 異性体の分析がされ⁷⁾、PCDF は微量ながら血液にも存在することが認められたが、その経時的な濃度変化については調べられていない。患者血液中の PCB は、そ

のガスクロマトグラフ上のパターンが油症の診断基準の 1 つになっている¹⁵⁾ので、よく調べられている。福岡県の油症患者の血液中 PCB の濃度及びパターンは、最近にいたるまであまり変化なく推移している³⁾。しかし、油症発生後、5 年間は血液中の PCB の分析がされなかったため、その時の血液中 PCB の濃度変化は分かっていない。台湾の PCB 中毒では、中毒事件後間まもない頃の患者の血液が採取できたので、これを分析することにより²⁾¹²⁾人体中の PCB 異性体の濃度変化はある程度推定することができている。最近、同じ台湾の中毒患者から血液が提供された。これらの血液中の PCDF 異性体の濃度を高分離能ガスクロマトグラフ・質量分析計により初めて分析することができた。また、PCB 異性体についても 10 年間にわたる濃度変化を分析することができた。これらの濃度推移につい

て報告し、人体における PCDF 及び PCB 異性体の減衰状態を推定する。

実験方法

1. 患者血液

台湾の重症 PCB 患者 3 名より、1980 年 5 月から 1989 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、RK：女 1954 年 8 月、SS：男 1946 年 5 月である。

2. 分析方法

1) PCDF の分析

血液約 5 ml をフラスコに取り、2, 3, 7, 8 の位置が塩素置換された ^{13}C -PCDD と ^{37}Cl -PCDF を 50~250 pg の一定量加えた。この溶液にエタノール 50 ml、ヘキサン 100 ml 及び飽和硫酸アンモニウム溶液 50 ml を加え、ホモジナイザー (Polytron) で混合した。静置して分離した後、上層を分取し、下層にはヘキサン 100 ml を加えて再度抽出した。このヘキサン抽出液を合わせ、水 20 ml で 2 回洗浄した後、250 ml フラスコで減圧下濃縮し、少量の無水硫酸ナトリウムで乾燥した。このヘキサン溶液をあらかじめ秤量した 50 ml フラスコに移し、溶媒を完全に蒸発させた。このフラスコの重量が一定になった時に秤量し、残留する脂質の量を求めた。脂質試料はヘキサン 150 ml に溶かし、250 ml の分液ロートに移し、濃硫酸 20 ml と振とうした後、濃硫酸はすてた。この濃硫酸による洗浄はヘキサン溶液が透明になるまで 5 回繰り返した。このヘキサン溶液を少量の水、1%水酸化カリウム溶液、水で順次洗い、乾燥して 1~2 ml に濃縮した。

ヘキサン溶液は次の 2 つの連結したカラムを通した。第 1 のカラムは硫酸 0.5 g を含むシリカゲル層に珪酸セシウム 0.5 g を含んだシリカゲルを積層させたもの、第 2 のカラムは 130°C で活性をつけたフロリジル 1.5 g をつめたものである。ヘキサン溶液は、第 1 カラムに入れ、流出液は第 2 カラムに直接流入させた。第 1 カラムは、更に 8 ml のヘキサンを流して第 2 カラムに入れた後、取り除いた。第 2 のカラムは 2%ジクロロメタン/ヘキサン 20 ml を流した後、50 ml ジクロロメタンで溶出させた。この溶液にはポリ塩化ジベンゾジオキシン (PCDD)、PCDF、平面 PCB が含まれる。このジクロロメタン溶出液を完全に濃縮し、ヘキサン 1~2 ml に溶かした。このヘキサン溶液を 18% Corbopack C 0.25 g をセライト 545 に混合させて作った活性炭カラムに注入した。活性炭カラムはヘキサン 2 ml、シクロヘキサン・ジクロロメタン (1:1) 1 ml、ジクロ

ロメタン・メタノール・トルエン (75:20:5) 1 ml 及びトルエン 15 ml で順次溶出させた。このトルエン溶液には PCDD、PCDF、平面 PCB が含まれる。トルエン溶液を減圧濃縮した後、1, 3, 6, 9-tetra-CDD, 1, 2, 4, 6, 7, 9-hexa-CDD 及び ^{13}C -2, 2', 4, 5, 5'-penta-CB の各 5 pg/ μl トルエン溶液 3~5 μl を添加した。これは内標準物質の回収率を測定するためのものである。

ガスクロマトグラフに装着した DB-5 無極性メチルシリコンのシリカキャピラリーカラム (0.25 mm $\times$ 25 m) を直接二重束質量分析計 (VG Analytical -7070EQ) に導入した装置を使用した。キャリアーガスにはヘリウム 30~45 cm/sec を用い、電子衝撃法でイオン化し、分解能 2,000 で分析した。VG 11/250 データシステムで制御した多重イオン検出法を用い、PCDD 及び PCB では ^{12}C -及び ^{13}C -のそれぞれ最も大きい 2 つの分子イオンでモニターした。PCDF では ^{12}C -の最も大きい 2 つの分子イオンと ^{37}Cl -の最も大きい分子イオンを使用した。PCDD 及び PCDF の濃度は試料の PCDD、PCDF イオンと ^{12}C -または ^{37}Cl -PCDD、PCDF イオンの応答比に、加えた内標準物質の量を乗じ、内標準の ^{12}C -または ^{37}Cl -PCDD、PCDF (5 pg/ μl) に標準 PCDD、PCDF を段階濃度 0.1~25 pg/ μl になるように加えた溶液の分析で求めた比応答ファクター及び秤量した試料量で除して求めた。

2) PCB の分析

患者の血液約 0.5 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、更に内標準物質として 2, 3, 4, 5, 6, 2', 5'-Hepta-CB を 5 ng 添加し、65° で 2 時間加温した。冷後、ヘキサン 5 ml で 2 回抽出し、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, 130° 3 時間) 0.5 g のカラムクロマトグラフにかけた。カラムはヘキサン 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。ガスクロマトグラフは島津 GC-9A に電子捕獲型検出器 (^{63}Ni) を装着したものを使用した。カラムは、Hi-Cap CBP1, 0.2 mm $\times$ 50 m (島津)、キャリアーガスは 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)で行なった。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、クロマトパック C-R3A (島津) で面積測定及び計算をした。

結 果 と 考 察

1. PCDF

台湾の PCB 中毒患者 3 名の血液中 PCDF 異性体の濃度推移を、脂質重量当たりで計算したものを Table 1 に、湿重量当たりで計算したものを Table 2 に示す。これらの濃度変化を分かりやすくするために、3 つの PCDF 異性体について、それぞれ縦軸を濃度の対数としたグラフを Fig. 1 及び Fig. 2 に示す。中毒事件が起きたのは 1979 年であるので、その翌年の 1980 年では、患者血液中の PCDF 濃度は 200 ppt に達するものであり、非常に高かった。また、その年の 11 月では

5 月よりも濃度が高くなっているものもあった。その後はいずれの PCDF 異性体の濃度も時間と共に次第に減少しているが、はじめの 3 年間は、対数濃度のグラフで見ても、それらの減少が大きく、その後の減少がだんだんと小さくなっている。しかし、全体的にみると、血液中 PCDF の対数濃度は時間経過と共に殆ど直線的に減少している。すなわち、ほぼ一時速度式に従って濃度減衰している。

患者血液中の PCDF 異性体の全期間にわたる半減期を計算して、それぞれ Table 1 及び Table 2 に示す。2,3,4,7,8-penta-CDF, 1,2,3,4,7,8-hexa-CDF 及び 1,2,3,4,6,7,8-hepta-CDF の血液中半減期は 3 名の患者の平均で、脂質重量当たりではそれぞれ 2.14, 2.56 及び 2.32 年、湿重量当たりではそれぞれ 2.12, 2.54 及び 2.23 年である。これらの半減期は Poiger

Table 1 Elimination of PCDF congeners in the blood of Yucheng patients (Lipid basis)

Date of Sampling	Days after First sampling	Concentration in lipid, ppb								
		2,3,4,7,8-Penta-CDF			1,2,3,4,7,8-Hexa-CDF			1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDF		
		BS	RK	SS	BS	RK	SS	BS	RK	SS
May 28, 1980	0	15.30	12.90	17.90	35.60	35.00	42.40	4.37	5.01	5.07
November 15, 1980	171	18.10	13.20	16.30	48.00	43.40	38.80	4.43	4.93	3.09
July 27, 1981	425	11.40	8.71		35.00	30.90		2.97	3.16	
April 12, 1983	1049	3.21	3.31	3.32	14.10	16.50	11.60	1.48	1.56	0.95
December 13, 1985	2025	1.40		1.96	6.79		9.08	1.04		0.72
December 29, 1989	3502	0.58	0.78	0.97	1.97	3.97	3.56	0.45	0.18	0.17
Half life (Days)		682	850	813	769	1042	989	1053	721	771

Table 2 Elimination of PCDF congeners in the blood of Yucheng patients (Wet weight basis)

Date of Sampling	Days after First sampling	Concentration in whole blood, ppt								
		2,3,4,7,8-Penta-CDF			1,2,3,4,7,8-Hexa-CDF			1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDF		
		BS	RK	SS	BS	RK	SS	BS	RK	SS
May 28, 1980	0	95.60	33.10	45.50	223.00	91.60	108.00	27.40	12.80	12.90
November 15, 1980	171	52.70	29.90	53.20	140.00	97.90	127.00	12.90	11.10	10.10
July 27, 1981	425	27.70	21.70		85.30	76.90		7.23	7.87	
April 12, 1983	1049	7.06	7.57	12.90	31.00	37.70	45.00	3.26	3.56	3.67
December 13, 1985	2025	2.67		4.01	12.90		18.60	1.98		1.48
December 29, 1988	3502	1.80	2.36	2.81	6.08	12.00	10.40	1.39	0.56	0.48
Half life (Days)		619	923	782	688	1149	945	908	781	738

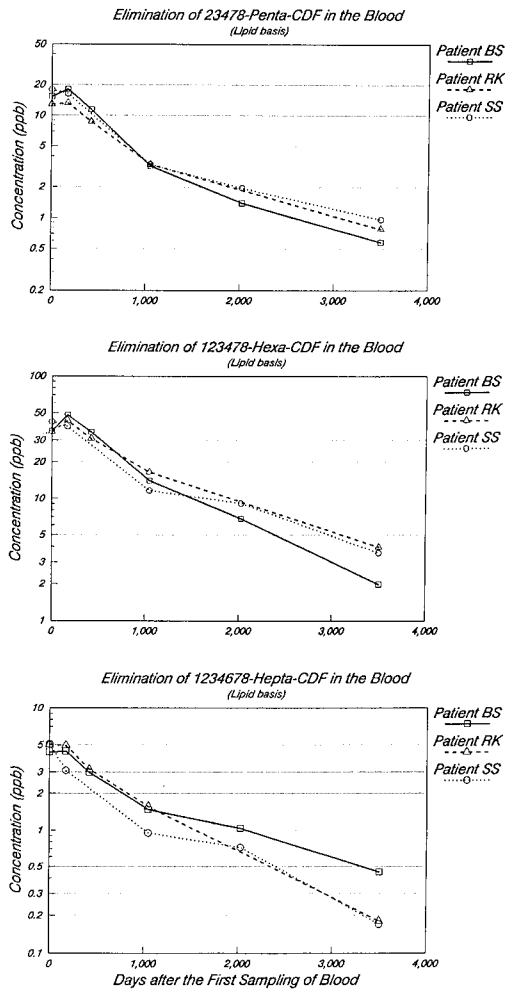


Fig. 1 Elimination of PCDF congeners in the blood of Yucheng patients (Lipid weight basis)

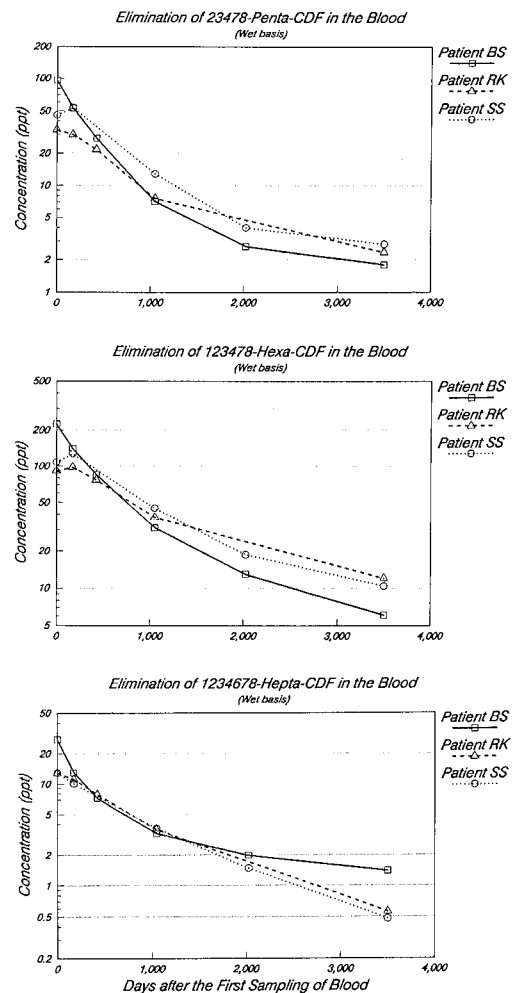


Fig. 2 Elimination of PCDF congeners in the blood of Yucheng patients (Wet weight basis)

ら¹⁴⁾が人体実験で測定した2,3,7,8-tetra-CDDの生体半減期5.8年よりも短い。これは患者がライソイルを摂取して間もない頃で、体内のPCDF濃度が非常に高い時であるので、PCDFの人体半減期が比較的小さいのであろうと考えられる。今後、患者体内のPCDF濃度が減少してからは、その生体半減期は2,3,7,8-tetra-CDDの場合と同じように大きくなるであろう。

中毒事件後10年経過した1989年の患者3名の血液中の2,3,4,7,8-penta-CDF、1,2,3,4,7,8-hexa-CDF及び1,2,3,4,6,7,8-hepta-CDFの脂質重量当

たりの濃度はそれぞれ580~970, 1970~3970及び170~450 pptであった。一般の人の血液中のこれらPCDFの濃度については、Päpkeら¹³⁾がそれぞれ43.2, 17.5及び23.8 ppt, Nygrenら¹¹⁾がそれぞれ19.2, 11.5及び19.6 pptであると報告している。10年経過した患者の血液中PCDF濃度はまだ一般人の濃度の10~200倍高い状態である。現在の患者の血液中PCDF濃度が一般人のレベルになるには、今までの状態で減衰するとして計算すると、これから7~17年かかる。今後患者体内でPCDFの半減期がもっと長くなるとすると、更に長年月経過してから一般人のレベル

となる。

2. PCB

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 3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 3に示す。患者血液中のPCB異性体濃度は一時的に多少大きくなっていることもあるが、この10年間ではいずれも時間経過と共に減衰している。総PCBの血液中半減期は3名の平均で3.79年である。蓄積性が高いPCB異性体、2,4,5,2',4',5'-hexa-CB, 2,3,4,5,3',4'-hexa-CB, 2,3,4,5,2',4',5'-hepta-CB及び2,3,4,5,2',3',4'-hepta-CBの血液中半減期の平均値はそれぞれ4.28, 4.21, 4.56及び4.12年であり、これは同じ患者のPCDF異性体の半減期2.12~2.54年の約2倍である。PCB異性体の方がPCDF異性体よりも人体血液中の濃度減少が少なく、

人体蓄積性が高いと考えられる。

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及び2,3,4,5,3',4'-hexa-CBの人体半減期の平均値は1.16, 4.28及び4.21年である。2,4,5,3',4'-penta-CBの半減期が他のPCB異性体と比較して特に小さい。このPCBの濃度減少は比較的大きいので、台湾PCB中毒患者の血液中PCBのパターンは時間の経過と共に福岡の油症患者の血液中PCBパターンに近づいていると考えられる。

PCB中毒事件後、10年経過した1989年12月の3名の患者の血液中総PCB濃度は30~36 ppbとなっている。この値は福岡の油症患者で特に重症の人の発症後10~20年経過したときの血液中濃度⁶⁾と殆ど同じレベルである。福岡の油症患者の中で重症の人の最近の血液中総PCB濃度は10~20 ppbである¹²⁾ので、

Table 3 Elimination of PCB congeners in the blood of Yucheng patients (Wet weight basis)

Date of Sampling	Days after First sampling	Concentration in whole blood, ppb											
		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		
		BS	RK	SS	BS	RK	SS	BS	RK	SS	BS	RK	SS
May 28, 1980	0	10.88	8.24	10.33	71.59	25.63	20.15	128.07	49.27	62.68	93.67	36.88	43.76
November 15, 1980	171	1.50	0.33	1.48	21.44	13.74	12.54	64.65	45.46	74.91	55.32	36.26	58.23
July 27, 1981	425	2.51	5.08		10.19	9.29		59.02	47.21		44.32	35.55	
April 12, 1983	1049	0.28	0.29	0.22	1.59	1.87	0.90	50.39	43.31	41.43	36.52	33.85	27.67
December 13, 1985	2025	0.33		0.46	0.80		0.76	50.00		32.53	37.05		20.94
December 29, 1989	3502	0.19	0.22	0.29	0.07	0.07	0.08	12.20	14.62	11.54	8.29	10.03	6.36
Half life (Days)		739	961	916	384	425	461	1323	1970	1394	1235	1801	1199

Date of Sampling	Days after First sampling	Concentration in whole blood, ppb											
		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			Total PCB		
		BS	RK	SS	BS	RK	SS	BS	RK	SS	BS	RK	SS
May 28, 1980	0	34.50	12.78	18.25	33.20	12.67	18.14	25.95	10.54	14.21	397.86	156.01	187.52
November 15, 1980	171	21.81	13.32	28.30	22.14	14.92	29.16	18.07	12.13	23.55	204.93	136.16	228.17
July 27, 1981	425	16.28	12.19		15.94	12.51		13.11	10.41		161.37	132.24	
April 12, 1983	1049	13.28	13.26	12.05	14.92	16.15	12.50	10.97	11.48	9.31	127.94	120.21	104.08
December 13, 1985	2025	12.81		8.54	15.65		11.16	11.25		8.09	127.89		82.48
December 29, 1989	3502	3.01	3.91	4.37	3.50	4.41	4.58	2.52	3.10	3.19	29.78	36.36	30.41
Half life (Days)		1199	1955	1460	1338	2096	1556	1249	1828	1431	1173	1692	1285

台湾の患者はこの濃度よりもまだ高い状態にある。

総 括

台湾の PCB 中毒発生の翌年の 1980 年から 1989 年 12 月にかけて、3 名の重症中毒患者の血液を 5 又は 6 回採取し、その中に含まれる PCDF 及び PCB 異性体の濃度を高分離能ガスクロマトグラフ・質量分析装置又はガスクロマトグラフ・電子捕獲検出器で分析した。

1. 患者血液中の高濃度の 2,3,4,7,8-penta-CDF, 1,2,3,4,7,8-hexa-CDF 及び 1,2,3,4,6,7,8-hepta-CDF (脂質重量当たり、それぞれ 15.4, 37.7 及び 4.8 ppb) は生体半減期がそれぞれ 2.14, 2.56 及び 2.32 年の速さで減少し、かなり人体に残留した。

2. 同じ患者の血液中の 2,4,3',4'-tetra-CB 及び 2,4,5,3',4'-penta-CB (初期濃度、湿重量当たり 8~11 及び 20~72 ppb) は半減期がそれぞれ 2.39 及び 1.16 年の比較的速い速度で減少した。

3. 血液中の 2,4,5,2',4',5'-hexa-CB, 2,3,4,5,3',4'-hexa-CB, 2,3,4,5,2',4',5'-hepta-CB 及び 2,3,4,5,2',3',4'-hepta-CB (初期濃度、湿重量当たり 11~128 ppb) の生体半減期は 4.12~4.56 年であった。これは PCDF 異性体の半減期の約 2 倍であり、人体内で濃度減少が非常に遅い。

文 献

1) Chen PH and Hites RA: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in the tissues of deceased patient with Yucheng in Taiwan. *Chemosphere* 12: 1507-1516, 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) 片岡恭一郎, 大久保彰人, 篠原志郎, 高橋克己, 増田義人: 福岡県における油症検診データの統計解析, 福岡医誌 74: 296-301, 1983.

4) 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.

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

6) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 高田真由美,

倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニール, 福岡医誌 65: 25-27, 1974.

7) Masuda Y, Kuroki H, Haraguchi K and Nagayama J: PCB and PCDF congeners in the blood and tissues of Yusho and Yu-cheng patients. *Environ. Health Perspect.* 59: 53-58, 1985.

8) Miyata H, Takayama K, Ogaki J, Mimura M, Kashimoto T and Yamada T: Levels of PCDDs, coplanar PCBs and PCDFs in patients with Yusho disease and in the Yusho oil. *Chemosphere* 18: 407-416, 1989.

9) 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.

10) 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.

11) Nygren M, Hansson M, Sjöström M, Rappe C, Kahn P, Gochfeld M, Velez H, Ghent-Guenther T and Wilson WP: Development and validation of a method for determination of PCDDs and PCDFs in human blood plasma. A multivariate comparison of blood and adipose tissue levels between Viet Nam veterans and matched control. *Chemosphere* 17: 1663-1692, 1988.

12) 大間美和, 黒木広明, 原口浩一, 増田義人, 許書刀: PCB 中毒患者における血液中 PCB 異性体の濃度推移, 福岡医誌 80: 281-286, 1989.

13) Päpke O, Ball M, Lis ZA and Scheunert K: PCDD/PCDF in whole blood samples of unexposed persons. *Chemosphere* 19: 941-948, 1989.

14) Poiger H and Schlatter C: Pharmacokinetics of 2,3,7,8-TCDD in man. *Chemosphere* 15: 1489-1494, 1986.

15) 杉山浩太郎: 序言, 福岡医誌 68: 93-95, 1977.

16) Tanabe S, Kannan N, Wakimoto T, Tatsukawa R, Okamoto T and Masuda Y: Isomer-specific determination and toxic evaluation of potentially hazardous coplanar PCBs, dibenzofurans and dioxins in the tissues of "Yusho" PCB poisoning victim and in the causal oil.

17) Wong CK: PCB poisoning special issue.

Clin. Med. (Taipei) 7:1-100, 1981.

18) 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.

PCB メチルスルホン：バルト海アザラシと油症患者組織 における残留成分の比較

第一薬科大学物理分析学教室

原口 浩一・増田 義人

ストックホルム大学

Ake BERGMAN

スウェーデン自然歴史博物館

Mats OLSSON

PCB Methyl Sulphone: Comparison of Tissue Levels in Baltic Grey Seals and a Yusho Patient

Koichi HARAGUCHI and Yoshito MASUDA

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

Ake BERGMAN

Environmental Chemistry, Wallenberg Laboratory, Stockholm University S-106 91 Stockholm, Sweden

Mats OLSSON

*Swedish Museum of Natural History, Section of Vertebrate Zoology,
Box 50007, S-104 05 Stockholm, Sweden*

Methyl sulphone metabolites of PCB and DDE were isolated from different tissues of a Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*). Main components in the seal blubber were identified as 3-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB, 4-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB, 3-MeSO₂-p, p'-DDE, 4-MeSO₂-2, 2', 3', 4', 5-pentaCB and 4-MeSO₂-2, 2', 3, 4', 5', 6-hexaCB. Liver and lung in the seal contained different MeSO₂-PCB pattern compared to all other tissues. These levels in the both tissues were estimated to be 28 and 15 ppm (lipid basis) which corresponded to the same level as the PCB. Concentrations of MeSO₂-PCB in any tissues of a Yusho patient were low compared to those in the seal.

はじめに

北欧では有機塩素系化合物による海洋汚染が深刻で、特にバルト海に棲息するアザラシや淡水沼に住むカワウソの固体数が近年著しく減少している。これは主として PCB の高濃度汚染による生殖機能の低下に起因すると考えられている¹⁾。たとえば、ある Grey Seal の毎日の PCB の摂取量は 30~70 μg/kg 体重にも達すると推定され、これは油症事件で患者が摂取していた量に近い値⁶⁾である。多くのアザラシが腎臓障害、副腎異常などの徴候を呈しているなかで、Sweden では 1988 年から Seal Project が発足し、海洋生物の病変と PCB 汚染との因果関係についての研究が進められ

ている⁷⁾。それと関連して、残留性の強い PCB-メチルスルホンについても注目され、アザラシ、カワウソ、ミンクなどの組織内の残留成分の分析および毒性研究が行われるようになった。本研究ではアザラシの組織に残留する PCB-メチルスルホンの濃度および構造の一部を明らかにするとともに、それらの成分、濃度を油症患者組織のそれと比較した。

実験方法

材料：アザラシ 1 (*Halichoerus grypus*)、2 歳、雄 92 kg、ボスニアアン海、Gavle 北部。副腎、前立腺、腸、精巣、肝臓、肺臓、筋肉、脳、腎臓、脂肪組織を収集。アザラシ 2 (*Halichoerus grypus*)、1 歳前後、

雄 60 kg, ポスアニアン海, Holmsund 南東部, 脂肪組織を収集。油症患者, 52 歳, 1979 年死亡後肝臓, 肺臓, 脂肪組織を譲与される。

試薬:

- 1) 溶媒はすべて残留農薬試験用を使用した。
- 2) ゲルクロマトグラフィー: バイオラッド社製, Bio Beads S-X3 (200-400 メッシュ) 50 g をヘキサン: ジクロロメタン (1:1) 混液で膨潤させたものをカラムに充填した。
- 3) アルミナカラムクロマトグラフィー: メルク社製アルミナ (中性, 活性度 I, 70-230 メッシュ) 3 g をガラスカラムに乾式で充填した。
- 4) 標準品: 内標準として 3-MeSO₂-4-Me-5, 2', 3', 4', 5'-pentaCB を用いた。成分同定のための標準化合物は以前に合成した約 83 種の MeSO₂-PCB を用いた³⁾。

分離, 精製法:

1) 抽出

細切りにした組織 20 g あたり 45 ml のアセトン: ヘキサン (35:10) 混液を加え, ホモジナイザー (KINEMATICA GmbH) で抽出, ろ過した後, 残渣をさらにヘキサン 10 ml で 2 回抽出した。抽出液を分液ロートに移して, 75 ml のリン酸水溶液 (0.1 M H₃PO₄, 0.9% NaCl) を加え振とうさせ, ヘキサン層を分離し, 残りはさらに別のヘキサン 20 ml で抽出を繰り返した。この抽出液を濃縮し, 残渣 (脂肪分) を秤量した。この脂肪分 1 g あたり 100 ng の内標準 (3-MeSO₂-4-Me-2', 3', 4', 5, 5'-pentaCB) を加え, 脂肪組織についてはつぎに述べるゲルろ過法からアルミナカラム処理に移った。その他の組織については 3) DMSO 法から硫酸処理を経てアルミナ処理を行った。

2) ゲルろ過法

脂肪 0.5 g を 3 ml のヘキサン: ジクロロメタン (1:1) 混液に溶かし, つぎに述べるゲルパーミエーションカラムで分画した。膨潤させたゲルをガラス管 (SR 25/45, 内径 25 mm×450 mm, ファルマシア) に充填し, 島津 LC-6A ポンプで流速を 4 ml/min に設定し, 5 ml のテフロンループ付のサンプルインジェクターで試料をカラムに導入した。流出液は UV 254 nm でモニターし, フラクションコレクター (FRAC-100, ファルマシア) で 10 ml ずつ試験管に分取し, PCB および MeSO₂-PCB 分画 (120~160 ml) を集め, 濃縮した。

3) DMSO 法

残渣をヘキサン溶液 (約 70 ml) とし, 分液ロートに

移した後, ジメチルスルホキシド (DMSO) 3 ml を加え, 振とう抽出し, DMSO を分離した。さらにこの操作を 2 回繰り返し, 集めた DMSO 液をヘキサン 4 ml で 2 回洗浄した。次に DMSO 液に同量の蒸留水を加え, ヘキサン: tert-ブチルメチルエーテル (9:1) 4 ml で 3 回抽出した。

4) 硫酸処理

試料をヘキサン 10 ml 溶液とし, 濃硫酸 4 ml を加えて抽出し, 硫酸層を分離した。分離した硫酸層に同量の氷水を加え, 50% に希釈したあと, ヘキサン 4 ml で 3 回抽出した。

5) アルミナカラムクロマトグラフィー

アルミナ 3 g をカラム (内径 10 mm) に充填し, 無水硫酸ナトリウム 1 g をその上に添加して, ジクロロメタン約 20 ml でカラムを洗浄した。次にヘキサン 30 ml を流し平衡化した後, 試料を添加した。まず, ヘキサン: ジクロロメタン (92:8) 50 ml を流し, ついでジクロロメタン 50 ml で MeSO₂-PCB などを溶出させた。この液を適当に濃縮したあと GC/MS または GC/ECD で分析した。

定性, 定量法:

1) GC/MS

試料中の MeSO₂-PCB の同定には Finnigan 4500 GC/MS 装置 (Incos 2400 データシステム) を用いて負イオン化化学イオンモードで分析した。GC カラムには DB-5 (30 m×0.25 mm 内径, J & W Scientific Inc.) を用いスプリットレスで 70°C (2 min) から 220°C へ 30°C/min で, つづいて 280°C へ 3°C/min で昇温し, 一定に保った。各 MeSO₂-PCB 成分の同定は先に合成した標準異性体 83 種³⁾ の GC 保持時間およびそれらのマススペクトルから推定した。

2) GC/ECD

MeSO₂-PCB の定量は電子捕獲型検出ガスクロマトグラフ (島津 GC-9A, Chromatopac C-R3A) を用いて, 試料の内標準ピークに対する総成分ピークの面積比を求め, あらかじめ作成した検量線から濃度を計算した。GC の温度条件は GC/MS と同様にした。PCB の定量は内標準として 2, 2', 3, 4, 5, 5', 6-heptaCB を用い, ピーク面積比により濃度を求めた。

結 果, 考 察

1) PCB 代謝物の単離

本分析法は試料から PCB, OH-PCB および MeSO₂-PCB を一斉に単離する方法の一部であり, OH-PCB の組織内残留の有無および微量分析法については検討

中である。本抽出法では簡便なホモジナイズ法を用いたが、同じ溶媒を使ったソクスレー抽出でも同様の結果を得た。Fig. 1 にアザラシの脂肪 0.5 g を 3 ml のジクロロメタン：ヘキサン混液に溶かし、GPC を行ったときのクロマトグラムを示す。脂肪分が最初の 40 から 70 ml の間に流出してくるのに対し、PCB および MeSO₂-PCB は 130 から 170 ml の間に溶出した。本操作はカラムへの負荷量に限界(脂肪分 2 g 以下)があるが、精製効率が高いので、この分画は、このあとアルミナ処理により、MeSO₂-PCB を PCB から分離することで、それぞれ容易に微量分析ができる。一方、DMSO 法ではヘキサンと DMSO の分配抽出によって PCB と MeSO₂-PCB を分離しようとするもので、人体試料の場合、約 30% の脂肪分がヘキサンから DMSO に移行した。この移行を防ぐために、あらかじめヘキサン溶液を 1 M KOH : EtOH (2 : 1) 混液で抽出処理することで、DMSO に分配されるはずの脂肪分の約 90% が除去可能である。この KOH/EtOH 抽出操作は OH-PCB の単離分析に応用されようとしている。

2) 組織中の MeSO₂-PCB の同定

Fig. 2 にアザラシの肝臓、脂肪および油症患者の脂肪中に残留する MeSO₂-PCB の GC/ECD クロマトグラムを示す。アザラシの脂肪中には 30 種以上の MeSO₂-PCB と 2 種の MeSO₂-DDE が検出され、主な成分の構造は次のように推定された。Peak 1: 3-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB, Peak 2: 4-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB, Peak 3: 3 - MeSO₂- p, p'-DDE, Peak 7: 4-MeSO₂-2, 2', 3', 4', 5-pentaCB,

Peak 8: 4-MeSO₂-2, 2', 3, 4', 5', 6-hexaCB, Peak 9: 4-MeSO₂-2, 2', 3, 3', 4', 6-hexaCB。アザラシの肝臓および肺中の成分は 5 塩化体 1 種 (Peak a), 6 塩化体 2 種 (Peak b, c) および 7 塩化体 1 種 (Peak d) からなり、脂肪組織のそれと大きく異なる成分パターンを示した (Fig. 2)。しかし、ほかの 7 種の組織 (副腎、前立腺、腸、精巣、筋肉、脳および腎臓) 中の成分パターンは脂肪中のそれと類似した。このような特定の異性体のある器官への局在は MeSO₂-PCB に特異的に結合するタンパク質の存在を予想させる。一方、油症患者脂肪組織中の MeSO₂-PCB の主成分は 4-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB, 4 - MeSO₂- 2, 2', 3', 4', 5 - pentaCB, 4-MeSO₂-2, 2', 3, 3', 4', 6-hexaCB などであり、アザラシ組織中の主成分である 3-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB は微量にしか検出されなかった (Fig. 2)。これらの成分比は患者の組織間では大きな相違はみられなかった。また 3-MeSO₂-p, p'-DDE も各組織中の残留成分の一つであり、この毒性についても注目されている⁹⁾。

3) MeSO₂-PCB 濃度の比較

Table 1 に分析した組織中の PCB および MeSO₂-PCB の濃度 (脂肪量あたり) を示す。アザラシの各組織中の PCB 濃度が脂肪分あたり 2~28 ppm で脳以外大きな濃度差は見られないのに対し、MeSO₂-PCB 濃度は組織間でかなり片寄っている。特に、肝臓および肺中の MeSO₂-PCB 濃度はそれぞれ、28 および 15

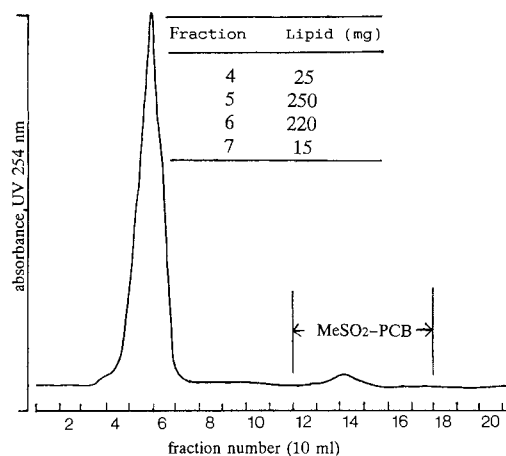


Fig. 1 Gel permeation chromatography of seal blubber (0.5 g).

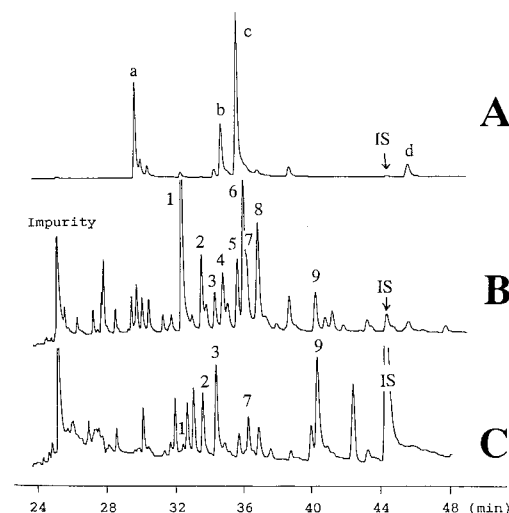


Fig. 2 ECD gas chromatograms of MeSO₂-PCBs in seal liver (A), seal blubber (B) and human adipose (C).

Table 1 Tissue levels of PCBs and MeSO₂-PCBs in grey seals and a Yusho patient

	Tissue	Weight (g)	Fat (mg)	PCB (ppm)	MeSO ₂ -PCB (ppm)
Seal 1	Blubber	9.2	7480	27.4	NA
	Adrenal	5.8	860	9.8	2.7
	Prostate	10.7	530	21.0	0.6
	Intestine	10.9	70	17.3	0.7
	Testis	10.0	120	15.3	0.7
	Liver	10.4	140	27.1	28.5
	Lung	12.3	80	20.1	15.0
	Muscle	10.3	70	12.3	0.5
	Brain	10.6	610	2.1	0.4
	Kidney	10.6	200	13.8	1.5
Seal 2	Blubber	2.3	2000	NA	3.0
Yusho patient	Adipose	15.2	10190	1.3	0.07
	Liver	38.2	1040	0.9	0.16
	Lung	28.1	990	0.8	0.67

NA: Not Analyzed

ppm と非常に高く、同じ組織に含まれる PCB 濃度に近い値を示した。副腎では PCB の約 1/4 量に相当する MeSO₂-PCB が検出され、この MeSO₂-PCB 濃度は湿重量あたりで計算すると 0.4 ppm となり全組織中最も高い。アザラシの病変の多くが副腎皮質の障害によってもたらされている¹⁾ことを考えると、MeSO₂-PCB の関与も否定できない。アザラシ脂肪組織では、両者のレベル比較はできなかったが、別の分析結果から MeSO₂-PCB 濃度比は約 1/10 と推定された。1976 年、Jensen らはアザラシの脂肪中に 16 ppm の MeSO₂-PCB (残留 PCB 量の約 1/20 に相当)を検出した⁴⁾。最近の数十種のアザラシの脂肪を分析した結果、最高 20 ppm の MeSO₂-PCB の残留 (未発表) が認められ、これらの濃度は種差、性差、年齢差、および生活環境に大きく依存すると考えられる。一方、患者の組織中の MeSO₂-PCB 濃度は肺で比較的高く、PCB と同じレベルにあるものの、肝臓および脂肪ではアザラシよりかなり低い値を示した。分析した試料は油症事件後、10 年後に死亡した患者の残留分析の結果であり、一般人の組織中レベルと大きく変わらない²⁾。

総 括

バルト海アザラシ組織に高濃度で残留する MeSO₂-PCB の構造の一部を明らかにし、組織間の濃度および

成分を油症患者組織中のそれと比較した。

1) アザラシの脂肪組織中には 30 種以上の MeSO₂-PCB と 2 種の MeSO₂-DDE の残留が確認された。その主成分は 3-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-penta CB, 4-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB, 4-MeSO₂-2, 2', 3', 4', 5-pentaCB および 4-MeSO₂-2, 2', 3, 4', 5', 6-hexaCB と推定した。

2) アザラシの肝臓および肺中の MeSO₂-PCB の主成分は 5 塩化体 1 種、6 塩化体 2 種および 7 塩化体 1 種からなり、脂肪中の成分と大きく異なったが、そのほかの組織中成分は脂肪中のパターンと一致した。特に肝臓、肺中の濃度はそれぞれ 28, 15 ppm で残留する PCB 濃度に近い値を示した。

3) 油症患者の脂肪中の MeSO₂-PCB 成分は 4-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB, 4-MeSO₂-2, 2', 3, 3', 4', 6-hexaCB など、アザラシの成分と幾分異なるものも見られた。しかし、患者の肝臓や肺では脂肪中の成分との明確な違いは見られなかった。それらの濃度はアザラシのそれよりかなり低かったが、肺ではその残留 PCB レベルに近い値を示した。

謝 辞

本研究は主として Swedish Environmental Protection Agency からの援助金に負うものであり、ここに深く感謝します。

文 献

- 1) Bergman Å and Olsson M: Pathology of Baltic grey seal and ringed seal females with special reference to adrenocortical hyperplasia: Is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome? Finnish Game Research, 44, 47-62, 1985.
- 2) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Occurrence and distribution of chlorinated aromatic methylsulfones and sulfoxides in biological samples. Chemosphere, 19, 487-492, 1989.
- 3) 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.
- 4) Jensen S and Jansson B: Anthropogenic substances in seal from the Baltic: Methyl sulfone metabolites of PCB and DDE. Ambio, 5, 257-260, 1976.
- 5) Lund B -O, Bergman A and Brandt I: Metabolic activation and toxicity of a DDT - metabolite 3-methylsulphonyl-DDE in the adrenal (*zona fasciculata*) in mice. Chem.-Biol. Interactions, 65, 25-40, 1988.
- 6) Masuda Y, Kuroki H, Haraguchi K and Nagayama J: PCDFs and related compounds in humans from Yusho and Yu-cheng incidents. Chemosphere, 15, 1621-1628, 1986.
- 7) Olsson M, Bergman Å, Jensen S, Kihlstrom J E: Effects of various fractions of PCB on mink reproduction. Preliminary results from experimental studies with the swedish seal project. Organohalogen Compounds, 1, 393-396, 1990, from 10th International Meeting, Dioxin 90, Bayreuth.

油症患者及び対照者の皮下脂肪組織中の Coplanar PCBs, PCDFs 及び PCDDs

福岡県衛生公害センター

平川 博仙・松枝 隆彦・飯田 隆雄

深町 和美・高橋 克巳

九州大学医療技術短大部環境医学研究室

長山 淳哉

九州大学医学部法医学教室

永田 武明

Coplanar PCBs, PCDFs and PCDDs in the Subcutaneous Adipose Tissue of the Yusho Patients and Normal Controls

Hironori HIRAKAWA, Takahiko MTSUEDA, Takao IIDA,

Kazumi FUKAMACHI and Katsumi TAKAHASHI

Fukuoka Environmental Research Center, Mukaizano Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01

Junya NAGAYAMA

Laboratory of Environmental Medicine, School of Health Sciences,

Kyushu University 90, Fukuoka 812

Takeaki NAGATA

Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Kyushu University 60,

Maedashi, Higashi-ku, Fukuoka 812

3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (T_4CB), 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (P_5CB) and 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (H_6CB) (Co-PCBs) in the subcutaneous adipose tissue of seven Yusho patients and eight normal controls were determined to assess the contribution in the risk caused by the Yusho causal agents (PCBs, PCDFs, PCDDs and Co-PCBs) by using high resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry in selected ion monitoring mode.

3, 4, 3', 4'- T_4CB , 3, 4, 5, 3', 4'- P_5CB and 3, 4, 5, 3', 4', 5'- H_6CB were detected in the subcutaneous adipose tissue of the Yusho patients at the levels, of 6 to 29 ppt, of 32 to 130 ppt and of 160 to 1,140 ppt, respectively. The TCDD-Eq (Equivalents) value calculated by TCDD-TEFs (Toxic Equivalent factors) was from 8 to 30 ppt.

On the other hand, 3, 4, 3', 4'- T_4CB , 3, 4, 5, 3', 4'- P_5CB and 3, 4, 5, 3', 4', 5'- H_6CB were detected in the subcutaneous adipose tissue of normal controls at the levels, of 3 to 9 ppt, of 41 to 280 ppt and of 47 to 200 ppt, respectively. The TCDD-Eq value calculated by TCDD-TEFs was from 9 to 57 ppt.

In the Yusho patients, the average TCDD-Eq value calculated by TCDD-TEFs of the residual Co-PCBs, PCDFs and PCDDs was 17, 491 and 24 ppt, respectively. Therefore, we concluded that the typical symptoms for the Yusho patients are caused mostly by PCDFs.

は じ め に

油症患者が摂取したライスオイル（原因油）中に polychlorinated biphenyls (PCBs)⁸⁾, polychlorinated

dibenzofurans (PCDFs)⁷⁾, polychlorinated quaterphenyls (PCQs)⁵⁾, polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs)⁹⁾ 等が混入していたことが明らかにされている。榎本らは原因油から Coplanar PCBs (Co-

PCBs) を検出し、また患者及び健常者からも Co-PCBs を検出した⁴⁾⁶⁾。最近、Co-PCBs の中で 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl の毒性が 2, 3, 7, 8-TCDD の 10 分の 1 から 5 分の 1 と考えられ⁹⁾²⁾、注目されている。

油症患者は原因油から多くの PCBs を摂取しており患者の現在までに知られているリスク評価の上に、更に Co-PCBs による毒性を加算して患者のリスクを評価する必要がある。現在までに知られている高毒性油症関連物質である PCDDs, PCDFs に Co-PCBs を加えて分析した、我々は患者の脂肪組織について Co-PCBs, PCDDs 及び PCDFs を再分析して再評価し、対照として 8 名の皮下脂肪組織を分析し比較検討して、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

1) 皮下脂肪

血液中 PCBs 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 (A type) を示す 7 名の患者の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。対照者としては、油症の既往歴が否定される剖検例から摘出された皮下脂肪組織を用いた。

2. 試薬

Co-PCBs, PCDDs 及び PCDFs の標準物質は九州大学吉村教授及び第一薬科大学増田教授より供与された。使用した Co-PCBs, PCDDs 及び PCDFs の内部標準物質を Table 1 に示した。このうち Co-PCBs は第一薬科大学増田教授より供与され、PCDDs 及び PCDFs はケンブリッジアイソトープから入手した。

他の使用した試薬はキシダ化学製の活性炭、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 1,000、アセトン 1,000、ジクロロメタン 1,000、有害金属測定用硫酸及びフロリジルである。

3. 試料の処理方法

患者脂肪組織は 0.5~1 g について、対照者皮下脂肪組織は 10~30 g について前報³⁾に準じて行なった。ただし、活性炭クロマトグラフィーは前報で使用した活性炭を熱トルエンで洗浄し無水流酸ナトリウムに混和して用いた。フロリジルカラムクロマトグラフィーで溶出後の PCDDs, PCDFs 画分は、再度、濃硫酸による精製を行った。

4. GC-MS 分析

Varian 3400 ガスクロマトグラフ・Finngan MAT

-90 質量分析計に Quadrex 製 OV-17 キャピラリーカラム (長さ 25 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.10 μ m) を用い、高分解能 selected ion monitoring (SIM) 法により分析を行なった。

Co-PCBs 測定におけるカラム温度条件は、120°C で 1 分間保持し、260°C まで毎分 10°C で昇温後、さらに 260°C で 10 分間保持した。GC 注入口温度は 260°C で、トランスファーライン温度は 250°C に設定した。

PCDFs, PCDDs 測定におけるカラム温度条件は、120°C で 1 分間保持し、180°C まで毎分 25°C, 240°C まで毎分 15°C, 265°C まで毎分 20°C で昇温後、さらに 265°C で 10 分間保持した。GC 注入口温度は 260°C で、トランスファーライン温度は 260°C に設定した。

質量分析計の条件は次のとおりである。EI イオン化モードにて、イオン化電圧は 70 eV, 加速高圧は 5 kV, イオン化電流は 70 μ A に調整し、分解能は 7,000 であった。

モニターイオンの測定については、Table 2 に示したとおりである。

結果と考察

Table 3 に皮下脂肪中の Co-PCBs の分析結果を示した。7 名の患者からは、3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (T₄CB), 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (P₅CB) 及び 3, 4, 5, 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (H₆CB) が、それぞれ、6~29 ppt, 32~130 ppt, 及び 160~1,140 ppt 検出され、いずれの患者でも 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB が極めて高く、次に 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB で、3, 4, 3', 4'-T₄CB は最も低い値であった。これらの濃度を Hanberg ら²⁾が示した TCDD-TEFs (2, 3, 7, 8-TCDD -Toxic Equivalent factors: 2, 3, 7, 8-TCDD 換算計数) を用いて、TCDD-Eq (2, 3, 7, 8-TCDD Equivalents: 2, 3, 7, 8-TCDD 換算値) に換算すると、8~30 ppt であった。一方、8 名の対照者では、3, 4, 3', 4'-T₄CB, 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB 及び 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB が、それぞれ、3~9 ppt, 41~280 ppt 及び 47~200 ppt 検出され、3, 4, 3', 4'-T₄CB が最も低く、うち 2 名は 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB が 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB よりやや高かったが、その他は 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB が最も高かった。同様に TCDD-Eq に換算すると、9~57 ppt であった。

患者と対照者の Co-PCBs 濃度を平均値で比較すると、3, 4, 3', 4'-T₄CB は患者が対照者より約 2 倍高く、3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB では対照者が患者より約 2 倍高く、また、3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB では患者が対照者より約

Table 1 Composition of internal standard

Compound	Number of ^{13}C	Concentration (ng/ml)
2,3,7,8-TCDD	$^{13}\text{C}_{12}$	20
1,2,3,7,8-PnCDD	$^{13}\text{C}_{12}$	20
1,2,3,6,7,8-HxCDD	$^{13}\text{C}_{12}$	20
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	$^{13}\text{C}_{12}$	20
OCDD	$^{13}\text{C}_{12}$	204
2,3,7,8-TCDF	$^{13}\text{C}_6$	20
1,2,3,7,8-PnCDF	$^{13}\text{C}_6$	20
2,3,4,7,8-PnCDF	$^{13}\text{C}_{12}$	48
1,2,3,4,7,8-HxCDF	$^{13}\text{C}_6$	20
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	$^{13}\text{C}_6$	20
OCDF	$^{13}\text{C}_{12}$	20
3,4,3',4'-T ₄ CB	$^{13}\text{C}_{12}$	50
3,4,5,3',4'-P ₅ CB	$^{13}\text{C}_{12}$	50
3,4,5,3',4',5'-H ₆ CB	$^{13}\text{C}_{12}$	50

Table 2 Monitor ion of compound

Compound	Traget	Internal standard
TCDDs	$[\text{M}+2]^+321.894$	$[\text{M}+2]^+333.934$
PnCDDs	$[\text{M}+2]^+355.855$	$[\text{M}+2]^+367.895$
HxCDDs	$[\text{M}+2]^+389.816$	$[\text{M}+2]^+401.856$
HpCDDs	$[\text{M}+2]^+423.777$	$[\text{M}+2]^+435.817$
OCDD	$[\text{M}+4]^+459.735$	$[\text{M}+4]^+471.775$
TCDFs	$[\text{M}+2]^+305.899$	$[\text{M}+2]^+317.939$
PnCDFs	$[\text{M}+2]^+339.860$	$[\text{M}+2]^+351.900$
HxCDFs	$[\text{M}+2]^+373.821$	$[\text{M}+2]^+385.861$
HpCDFs	$[\text{M}+2]^+407.782$	$[\text{M}+2]^+419.822$
OCDF	$[\text{M}+4]^+443.740$	$[\text{M}+4]^+455.780$
3,4,3',4'-T ₄ CB	$[\text{M}]^+289.922$	
	$[\text{M}+2]^+291.919$	$[\text{M}+2]^+303.960$
3,4,5,3',4'-P ₅ CB	$[\text{M}]^+323.883$	
	$[\text{M}+2]^+325.880$	$[\text{M}+2]^+337.921$
3,4,5,3',4',5'-H ₆ CB	$[\text{M}]^+357.844$	
	$[\text{M}+2]^+359.842$	$[\text{M}+2]^+371.882$

Table 3 Levels of Co-PCBs found in subcutaneous adipouse tissue of Yusho patients and normal controls (ppt)

	Sex	Age	3,4,3',4'-T ₄ CB	3,4,5,3',4'-P ₅ CB	3,4,5,3',4',5'-H ₆ CB	TCDD-Eq. c)
Patient 1	F ^{a)}	55	6	63	300	15
Patient 2	M ^{b)}	50	13	72	220	16
Patient 3	F	45	29	130	570	30
Patient 4	M	54	8	44	190	10
Patient 5	F	50	8	32	160	8
Patient 6	M	45	9	75	470	18
Patient 7	F	43	8	73	1140	23
Mean		49	11	70	436	17
Control 1	M	19	5	59	58	12
Control 2	M	24	5	83	79	17
Control 3	M	2	8	180	100	37
Control 4	M	41	9	160	100	33
Control 5	M	52	6	280	200	57
Control 6	M	20	7	83	120	17
Control 7	F	20	6	190	82	39
Control 8	M	47	3	41	47	9
Mean		32	6	135	100	28

a) Female, b) Male

c) By Toxic Equivalancy Factors of Hanberg et al.
(Chemosphere 20 p. 1161-1164 1990)

4 倍高かった。TCDD-Eq で比較すると、対照者が患者より約 2 倍高かった。

以上の結果から、患者と対照者における 3 種の Co-PCBs の相対比は非常に異なっており、患者にとって Co-PCBs は毒性的に見ると余り重要な因子ではないと考えられる。

Table 4 に皮下脂肪中の PCDFs の分析結果を示した。患者では、2, 3, 7, 8-TCDF, 2, 3, 4, 7, 8-PnCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF 及び 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF が、それぞれ、5~34 ppt, 100~1,730 ppt, 77~1,100 ppt, 23~340 ppt 及び ND~110 ppt 検出された。これらの濃度を TCDD-TEFs を用いて¹⁾ TCDD-Eq に換算すると、69~1,013 ppt であった。一方、対照者では 2, 3, 7, 8-TCDF, 2, 3, 4, 7, 8-PnCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF 及び 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF が、それぞれ、1~7 ppt, 8~31 ppt, 3~13 ppt, 3~20 ppt 及び 2~8 ppt 検出された。患者と同様に、対照者の脂肪中 PCDFs の TCDD-Eq は、4~19 ppt であった。脂肪中 PCDFs 濃度について患者と対照者の TCDD-Eq を平均値で比較すると、患者は対照者の約 50 倍高い値を示した。

Table 5 に皮下脂肪中の PCDDs の分析結果を示す。この表に示したように、7 名中 4 名の患者から 1, 2, 3, 7, 8-PnCDD が 20~50 ppt の濃度で、また全ての患者で 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF 及び OCDD が、それぞれ、46~450 ppt 及び 10~200 ppt の濃度で検出された。これらの濃度を TCDD-TEFs を用いて¹⁾ TCDD-Eq に換算すると、5~70 ppt であった。分析に用いた患者の脂肪試料が 0.43 g~1.02 g と非常に少量であったので 2, 3, 7, 8-TCDD の検出限界値が約 10 ppt と高くなり、患者では検出できなかった。一方、対照者では 2, 3, 7, 8-TCDD, 1, 2, 3, 7, 8-PnCDD, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD 及び OCDD が、それぞれ、1~5 ppt, 4~18 ppt, 21~130 ppt 及び 180~1,330 ppt 検出された。患者の場合と同様にして求めた対照者の脂肪中 PCDDs の TCDD-Eq は、5~24 ppt であった。患者と対照者の脂肪中 PCDDs 濃度について、それらの平均値で比較すると、1, 2, 3, 7, 8-PnCDD では患者と対照者は同程度であり、1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD では患者が対照者の約 2 倍高い値を、また OCDD は逆に対照者が患者の約 5 倍高い値を示した。また、脂肪中 PCDDs の TCDD-Eq では、患者と対照者は同程度であった。

Table 4 Levels of PCDFs found in subcutaneous adipose tissue of Yusho patients and normal controls (ppt)

	Sex	Age	2,3,7,8-TCDF	2,3,4,7,8-PnCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-HxCDF	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	TCDD Eq. c)
Patient 1	F ^{a)}	55	5	1290	500	130	29	709
Patient 2	M ^{b)}	50	32	100	110	42	33	69
Patient 3	F	45	18	850	610	160	110	505
Control 4	M	54	33	160	77	31	0	94
Control 5	F	50	28	420	130	23	0	228
Control 6	M	45	24	1370	1010	300	0	818
Control 7	F	43	34	1730	1100	340	72	1013
Mean		49	25	846	506	148	35	491
Control 1	M	19	1	9	3	5	3	5
Control 2	M	24	2	15	6	6	6	9
Control 3	M	2	7	29	11	12	4	17
Control 4	M	41	2	31	13	20	8	19
Control 5	M	52	2	30	7	8	3	17
Control 6	M	20	1	19	6	8	4	11
Control 7	F	20	3	14	7	7	5	9
Control 8	M	47	1	8	7	3	2	4
Mean		32	3	21	7	9	5	11

a) Female, b) Male, c) By International Toxic Equivalency Factors

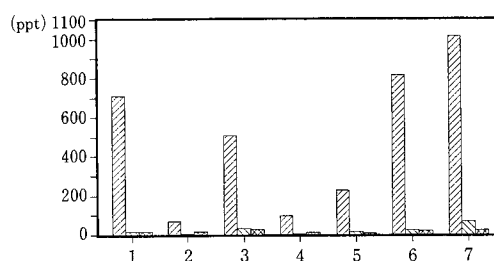
Table 5 Levels of PCDDs found in subcutaneous adipose tissue of Yusho patients and normal controls (ppt)

	Sex	Age	2,3,7,8-TCDD	1,2,3,7,8-PnCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDD	OCDD	TCDD-Eq. c)
Patient 1	F ^{a)}	55	0	0	170	10	17
Patient 2	M ^{b)}	50	0	0	53	120	5
Patient 3	F	45	0	27	170	150	31
Patient 4	M	54	0	0	46	200	5
Patient 5	F	50	0	20	65	46	16
Patient 6	M	45	0	20	150	130	25
Patient 7	F	43	0	50	450	64	70
Mean		49	0	17	158	103	24
Control 1	M	19	1	7	130	280	18
Control 2	M	24	2	10	120	550	19
Control 3	M	2	5	15	68	790	20
Control 4	M	41	3	13	55	1330	16
Control 5	M	52	3	18	72	180	19
Control 6	M	20	3	17	120	320	24
Control 7	F	20	2	14	79	520	18
Control 8	M	47	1	4	21	250	5
Mean		32	3	14	70	563	17

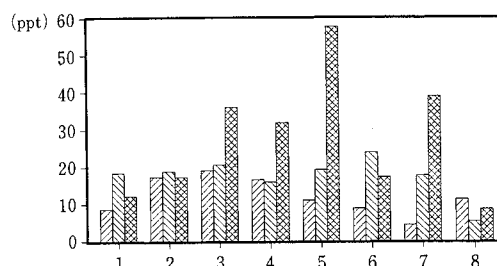
a) Female, b) Male, c) By International Toxic Equivalency Factors

患者及び対照者の PCDFs, PCDDs 及び Co-PCBs の TCDD-Eq を Fig. 1 及び Fig. 2 に示した。Fig. 1 から明らかなように、全ての患者で脂肪中に蓄積されている高毒性の油症関連物質である PCDFs, PCDDs 及び Co-PCBs のうち PCDFs がリスク評価として極めて大きな割合を占めていることが分った。Fig. 2 の対照者では、脂肪中に蓄積されている PCDFs, PCDDs 及び Co-PCBs は何れもリスク評価としてそれほど大きな差はないが、Co-PCBs が PCDFs 及び PCDDs と同等かそれ以上のリスク評価があることが分った。

Fig. 3 に患者及び対照者の PCDFs, PCDDs 及び Co-PCBs の TCDD-Eq の平均値を示した。Fig. 3 から明らかなように、患者では PCDFs が油症原因物質として、重要な因子であり、PCDDs 及び Co-PCBs は、わずかにすぎないことが分った。一方、対照者では PCDFs, PCDDs 及び Co-PCBs の TCDD-Eq の相対的割合は、それぞれ、21%、27%及び 49%であり、患者の場合とは著しく異なった結果を示した。対照者のこれら 3 種の化合物によるリスク評価と患者のそれとを比較するとき、PCDFs のみについて見ると前者は後者の 40 分の 1 程度であり、PCDFs 及び PCDDs については前者は後者の 18 分の 1 であり、PCDFs,

**Fig. 1** The TCDD-Eq value calculated by TCDD-TEFs of PCDFs, PCDDs and Co-PCBs in 7 Yusho patients

▨ PCDFs ▤ PCDDs ▩ Co-PCBs

**Fig. 2** The TCDD-Eq value calculated by TCDD-TEFs of PCDFs, PCDDs and Co-PCBs in 8 normal controls

▨ PCDFs ▤ PCDDs ▩ Co-PCBs

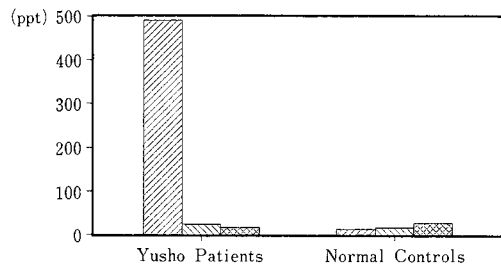


Fig. 3 The average TCDD-Eq value calculated by TCDD-TEFs of PCDFs, PCDDs and Co-PCBs in 7 Yusho patients and 8 normal controls

□ PCDFs □ PCDDs □ Co-PCBs

PCDDs 及び Co-PCBs では前者は後者の約 8 分の 1 であった。即ち、PCDFs に PCDDs 及び Co-PCBs を加えて考えると、対照者レベルの汚染によるリスク評価は患者のそれにかかなり近くなることが明らかになった。また、Co-PCBs のリスク評価の大部分は 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB であり、動物に比べて人間のほうが 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB の蓄積性が高いという報告もある⁹⁾ので今後、環境汚染物質として極めて注目される化合物である。

総 括

最近の油症患者皮下脂肪組織中の Co-PCBs, PCDDs 及び PCDFs を分析した。

1. 油症患者皮下脂肪中に 3, 4, 3', 4'-T₄CB, 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB 及び 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB が、それぞれ、6~29 ppt, 32~130 ppt, 及び 160~1,140 ppt 検出された。これらの濃度を TCDD-TEFs を用いて TCDD-Eq に換算すると、8~30 ppt であった。

一方、対照者では、3, 4, 3', 4'-T₄CB, 3, 4, 5, 3', 4'-P₅CB 及び 3, 4, 5, 3', 4', 5'-H₆CB が、それぞれ、3~9 ppt, 41~280 ppt 及び 47~200 ppt 検出された。これらの濃度を TCDD-TEFs を用いて TCDD-Eq に換算すると、9~57 ppt であった。

2. 油症患者の Co-PCBs, PCDFs 及び PCDDs の TCDD-Eq の平均値は、それぞれ、17 ppt, 491 ppt 及び 24 ppt であった。患者の脂肪中に蓄積されている高毒性の油症関連物質である PCDFs, PCDDs 及び Co-PCBs のリスク評価の 90%以上は PCDFs によるものであり、PCDDs 及び Co-PCBs は 5%及び 3%に過ぎなかった。

謝 辞

本研究は平成 2 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。本研究を行なうにあたって終始有益な助言を戴きました当センター副所長常盤 寛博士に深謝します。

文 献

- 1) Frederic W, Kutz., Donald G, Barnes., David P, Bottimore., Helmut, Greim. and Erich W, Bretthauer: The international Toxicity Equivalency Factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of Dioxins and related Compounds. *Chemosphere* 20: 751-757, 1990.
- 2) Hanberg, A., Wern, F., Asplund, L., haglund, E. and Safe, S: Swedish Dioxin survey: Determination of 2,3,7,8-TCDD Equivalent factors for some Polychlorinated Biphenyls and Naphthalenes using biological tests. *Chemosphere* 20: 1161-1164, 1990.
- 3) 飯田隆雄, 中川礼子, 竹中重幸, 深和和美, 高橋克巳: 油症患者及び健常者の皮下脂肪組織中の Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs). *福岡医誌* 80: 296-301, 1989.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Miyata, H., Takayama, K., Ogaki, J., Mimura, M., Kashimoto, T. and Yamada, T.: Levels of PCDDs, Coplanar PCBs and PCDFs in patients with Yusho disease and in the Yusho oil. *Chemosphere* 18: 407-416, 1989.
- 7) Nagayama, J. Kuratsune, M. and Masuda, Y.: Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechior and "Yusho oil". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 9-13, 1976.
- 8) 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一. *福岡医誌* 60: 496-512, 1969.
- 9) Tanabe, S., Kannan, N., Sabramanian, An., Watanabe, S. and Tatsukawa, R.: Highly toxic Coplanar PCBs: Occurrence, Source, Persistency and Toxic Implications to Wildlife and Humans. *Environmental pollution*. 47: 147-163, 1987.

PCB 及びその関連化合物体内残留濃度の 油症診断への適用に関する研究

福岡県衛生公害センター
中川 礼子・高橋 克巳

Studies on the Application of Residual PCBs, PCQs and PCDFs Concentrations to Yusho Diagnosis

Reiko NAKAGAWA and Katsumi TAKAHASHI

Fukuoka Environmental Research Center, Mukaisano, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01

Results of Yusho annual inspection were reviewed from the view point of correlation of PCBs, PCQs and PCDFs concentration in blood or subcutaneous adipose tissue and clinical findings. To make discussion quantitative, fifteen terms of clinical findings on Yusho disease were quantified on the severity by evaluating (+) as 2 points, (+ -) as 1 point and (-) as 0 point. First, the temporal variations of the severity of clinical findings on 5 Yusho patients were figured. Additionally, the temporal variations of blood triglyceride and PCBs concentration, and GOT were also surveyed. The adopted terms of clinical findings were general malaise, cough, sputum, headache, abdominal pain, peripheral neuropathy, soreness of joints, deformity of nails, comedo formation, acne-like eruption, secondary infection, scar formation, disorder of Meibomian glands, edema of eye lids and increased discharge from the eyes. During the investigated period from 1972 to 1988 the total score of clinical findings clearly decreased on two patients who had high score, tended to decrease on two other patients, and was not clear on another patient. Secondly, the correlation coefficients were calculated between each of PCDFs, PCBs or PCQs concentration in subcutaneous adipose tissue or blood and the total score at the year in which the adipose tissue and blood were taken. For the female patients the correlation coefficient of PCDFs concentration in subcutaneous adipose tissue and total score of clinical findings was the highest of all ($r=0.9885$). However, for the male patients it was not available because the number of the subjects was only two. Thus far it has been reported that the powers of PCBs gas chromatogram pattern and PCQs concentration as criteria for Yusho diagnosis are low as for the subjects who belonged to the border area between Yusho patients and normal persons. This survey suggests that PCDFs concentration in subcutaneous adipose tissue can be a potent criterion that has a high correlation with the clinical findings of Yusho.

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あった²²⁾。さらに 1979 年台湾⁹⁾においてもやはりライスオイルによる同様の中毒事件が発生しており, これらの事件はいずれも食用油製造の脱臭工程で使用された熱媒体がライスオイルに混入したために生じた惨事であった。カネミ油に混入した熱媒体には 4 塩化ビフェニール (PCB, 鐘ヶ淵化学社製 KC400, Fig. 1) が

使用されていたので事件発生当初は PCB 中毒と考えられていた⁴⁵⁾。後に, ポリ塩化クアテルフェニル¹⁵⁾ (PCQ, Fig. 1) やポリ塩化ジベンゾフラン³⁰⁾

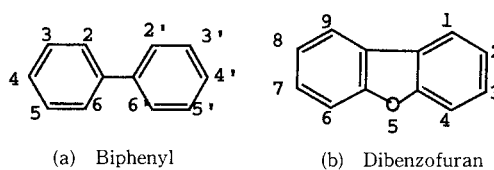


Fig. 1 Parent structures of PCB (a) and PCDF (b)

(PCDF, Fig. 1) が原因油中に検出され, これらは PCB の加熱酸化によって生成することも明らかにされた²⁹⁾⁴⁹⁾。さらに主成分の PCB のラットなど動物への投与実験では油症での強い毒性の明確な発現が再現できなかったが, 微量成分 PCDF の強毒性が証明され, 事件は, その後 PCDF と同程度の毒性を有することが分かったコプラナー PCB を含む PCB 関連化学物質による経口摂取では人類史上初めての人体汚染であることが徐々に明らかになった。中毒の主症状は眼科²¹⁾及び皮膚科所見⁴⁷⁾を特徴とする所謂“油症”と言われるものである。行政では事件発生後毎年検診を実施し, 中毒の被害者を油症患者として認定して, 救済する措置をとってきた。後の調査⁴⁵⁾で, カネミ油に PCB が混入していたのは, びん詰では主として 2 月 7~19 日前後の製造物であり, 油症はこれらの汚染ロットを摂取した人のみに発生したと現在では解釈される。約 20 年を経過した今日, 他覚的に明瞭であった油症の諸症状は次第に希薄化⁴⁴⁾し, 自覚的症状の訴えが相対的に強くなってきている。そこで, 臨床所見のみではなく, 血液など組織中の原因物質の濃度や性状についての客観的データが診断の重要な項目であると考えられるようになってきた。したがって, 現在では油症の診断は (1) 自覚的及び他覚的臨床所見によるもの, と (2) 原因物質の一つである PCB や PCQ の血中濃度と PCB ガスクロマトグラムパターン²⁵⁾⁴⁰⁾のような性状によるもの, の二つの側面から進められている。油症の診断に際しては臨床所見では典型的油症患者にどれだけ近い自覚的及び他覚的症状をもっているか, また原因物質がどれだけ健常者に比べて異常な濃度レベルや性状であるかが判断の決め手となる。これら 2 つの要素が相補的に働き, 患者を救済するという本来の目的が達成されなければならない。そのためには典型的油症患者の臨床症状の経時的変化を把握することと, PCB 及び PCQ について採用されている診断基準の合理性を同時に検証してゆくことが必要である。そこで, (1) 典型的油症患者における自覚的・他覚的臨床所見及び一部の生化学検査結果の 20 年間の推移, (2) PCB 及び PCQ の油症判別因子としての有用性の検証, (3) PCDF の油症判別能について検討した。

1. 典型的油症患者における自覚的・他覚的臨床所見及び一部の生化学検査結果の 20 年間の推移

症例は過去の油症検診受診回数が多かった AF (女, 中毒時 33 才), AM (男, 同 37 才), BF (女, 同 27

才), BM (男, 同 32 才), CF (女, 同 25 才) の 5 例である。油症の特徴的な自覚的及び他覚的症状とされる項目について, 発症から 1988 年までの約 20 年間の検診結果を症例別に Fig. 2~6 に示した。以下は個々の症状別に総括したものである。なお, 臨床所見の評価方法はここでは + を 2 点, +- を 1 点, - を 0 点と評価する 3 段階評価法を採った。なお #, ## は + (2 点), + (ときどき) は +- (1 点) とした。

1) 全身倦怠感及び咳嗽または咯痰

5 例のうち, 3 例 (AF, AM, BM) は 1986-1988 年にかけてなお全身倦怠感を持ち, 1 例 (BF) は 1972 年に訴えがあったが, その後は軽快の傾向がある。咳嗽または咯痰では, 5 例中本症状を最も多く訴えているのは AF で, 1980 年に初めて - (0) に転じた。その他 2 例 (AM, CF) で初期に + (2) になっているが, 総じて早い時期に, - (0) か +- (1) になり, 現在では希薄な症状の一つである。

2) 頭痛・頭重及び腹痛

5 例のうち女の 2 例 (AF, CF) は中毒初期の 1971-1975 年には頭痛・頭重及び腹痛を共に訴えることがあったが, 男の 2 例 (AM, BM) は主として頭痛・頭重が多かった。1987-1988 年では 5 例中女 2 例がまだ頭痛・頭重あるいは腹痛を訴えている。

3) 末梢神経症状

これには指のしびれ感などが含まれている。女の 1 例 (AF) は依然として + (2) であり, 他の 4 例の症状の変化は全く波動的である。しかし, 1988 年にはこれらは +- (1) に近づく傾向にあった。

4) 関節部異常

この症状は症例間の差が著しい。男の 1 例 (AM) については 1972-1988 年まで全く異常がなかった。女の 1 例 (CF) は 1978, 1983, 1988 年に異常を訴えている。2 例 (AF, BM) はそれぞれ 1973-1975 年, 1972-1976 年に継続して異常を訴えているが, 1987-1988 年には両症例とも +- (1) に軽快した。また女の 1 例 (BF) は 1972 年に + (2) であり, それ以降 1976 年まで +- (1) または - (0) であったが, 1979-1981 年に異常に転じ, その後は再び - (0) または +- (1) に軽快した。

5) 爪の変形

この症状は拇指爪の扁平化などをさす。5 症例中 2 例 (CF, AM) は顕著ではなかったが, 他の 3 例は 1972-1980 年間で + (2) であることが多い傾向にあった。1987-1988 年には 1 例 (BM) が + (2) であったが, 他の 4 例は - (0) に転じた。

6) 黒色面皰及びび瘡様皮疹

これらの症状は皮膚の角質化から生じた二次的症狀といわれる。症状の評価方法に由来して、皮疹の数に立脚した重篤度の推移は詳細には図示できていない。しかし、珍しく初期(1971年)から－(0)であったCFを除くと、典型的油症患者の大多数において今も継続して現れる症状であり、これは本房⁷⁾らの報告と一致している。

7) 色素沈着

皮膚、歯肉、口唇、眼瞼結膜あるいは指趾爪などに色素沈着があれば、＋(2)とした。AF、BF、CFは初期から最近まで＋(2)であったが、AMは1986年に、BMは1987年に－(0)に転じた。

8) 化膿傾向及び癰痕化

2例(AF、AM)については20年間ほぼ継続的に＋(2)であったが、他の2例(BF、CF)では化膿傾向は1972年以降は散発的で、癰痕化の方が＋(2)の頻度が多かった。またBMは1974年には化膿傾向及び癰痕化のいずれも－(0)になり、その後3回化膿傾向で＋(2)になったが、1986-1987年には再び軽快した。

9) マイボーム腺肥大及び眼瞼浮腫

マイボーム腺に関する異常はマイボーム腺の肥大の他に、嚢胞形成、チーズ様分泌物圧出などの症状もあるがここではそれらも含めて評価した。1987-1988年でも＋(2)であるのは5例中3例(AF、AM、BM)であり、他の2例BF及びCFは1972、1977年以前には＋(2)であったがその後は主として－(0)か＋(1)である。眼瞼浮腫は1例(AM)を除き他の症例は1973年以前にのみ＋(2)であり、現在ではすべての症例において－(0)である。

10) 眼脂過多

新生児から高齢者まで中毒時にはほとんどすべての患者に見られた症状である。5例中4例が1987-1988年現在に至るまで継続的あるいは波状的に異常を訴えている。

11) 自覚・他覚所見についての評価合計点

検診票の臨床所見項目が現在とほぼ同じになった1972年からの変動について考察する。初期(1972-1973年)における評価合計点はAF 29、AM 24、BF 22、BM 14、CF 14であった。1986-1988年にはAF 20、AM 12、BF 12、CF 12、BM 9となり、初期の評価合計点との差はAM Δ 12、AF Δ 9、BF Δ 10、BM Δ 5、CF Δ 2であった。BFは評価合計点の変動は極めて波状的であるが全体的にはその評価合計点は減少傾向にあ

り、症状が改善していることを示したが、BMの評価合計点のその変動は減少傾向が認められない波状的なものであるため、減少点数 Δ 5は信頼性に乏しい。またCFの評価合計点はあまり減少してないように思われる。したがって、1972-1988年の間に明らかな症状の改善が認められたのは高評価合計点を示したAMとAFの2例であった。

12) 中性脂肪

五島⁵⁾らや奥村³⁵⁾が報告しているように、中毒初期には特に若年者に多く的高中性脂肪が見られること、食事由来の中性脂肪を輸送するキロミクロンではなく、肝製の中性脂肪を輸送する β -リポ蛋白が多く検出されたことから、血清中の高中性脂肪は油症の一特徴であるとされた⁴⁸⁾。初期には5例の全例とも正常域(35~150 mg/dl)の上限を越えていた。その後、低下傾向にあったが、3例(AF、AM、BM)は、1988年には再び高値になった。この最近の高値は、途中の軽快を考慮すると、油症によるものと言うより、加齢による体質の変化に由来するのではないと思われる。

13) GOT

GOTは肝機能の指標とされ、正常域は7~38ユニットである。五島⁵⁾は重症度の高い油症ほど、GOTの平均値が高いことを報告している。Fig. 2~6でも初期1972年には5例中4例のGOTは高く、その後低下傾向にあることから、これが油症に関連した性状の一つであることは明らかである。最近(1988年)では、GOTはすべての症例で正常域内にある。

14) 血中PCB濃度

1973-1974年の血中PCB濃度は最高39 ppb、最低3 ppbであり、AF>AM>BF>BM>CFの順であった。台湾での同様な事例²⁾から推察すると、中毒から5年を経過した1973年には血中濃度はすでに低下した後であったと解釈されている。その後の経過によって、1988年までにさらに半減した症例(BM)、3/4-2/3になった症例(AF、BF)、余り変わらなかった症例(AM、CF)に分類される。

2. PCB及びPCQの油症判別因子としての有用性の検証

1) PCBについて

Table 1に1986年に採取した油症患者及び健康人の血中及び皮下脂肪中PCB濃度を示しているが、重症(表中のAタイプ)の油症患者7名(内5名は前項で示した症例と同一)を除くと、油症患者と健康人の血中PCB濃度に大きな差異がなくなっている。

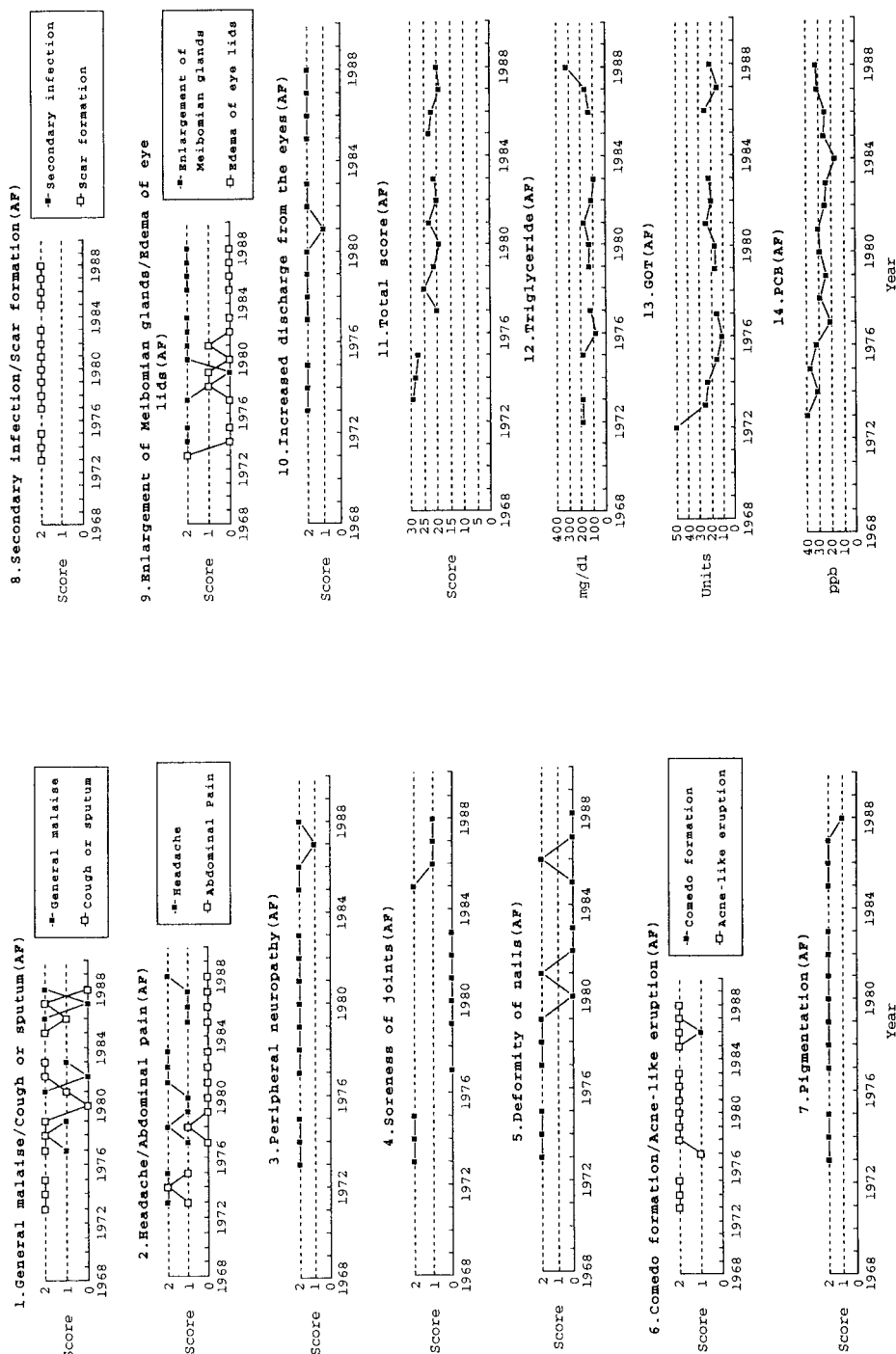


Fig. 2 Temporal variation of clinical findings' scores and of levels of triglyceride, GOT and PCB in blood of Yusho patient AF.

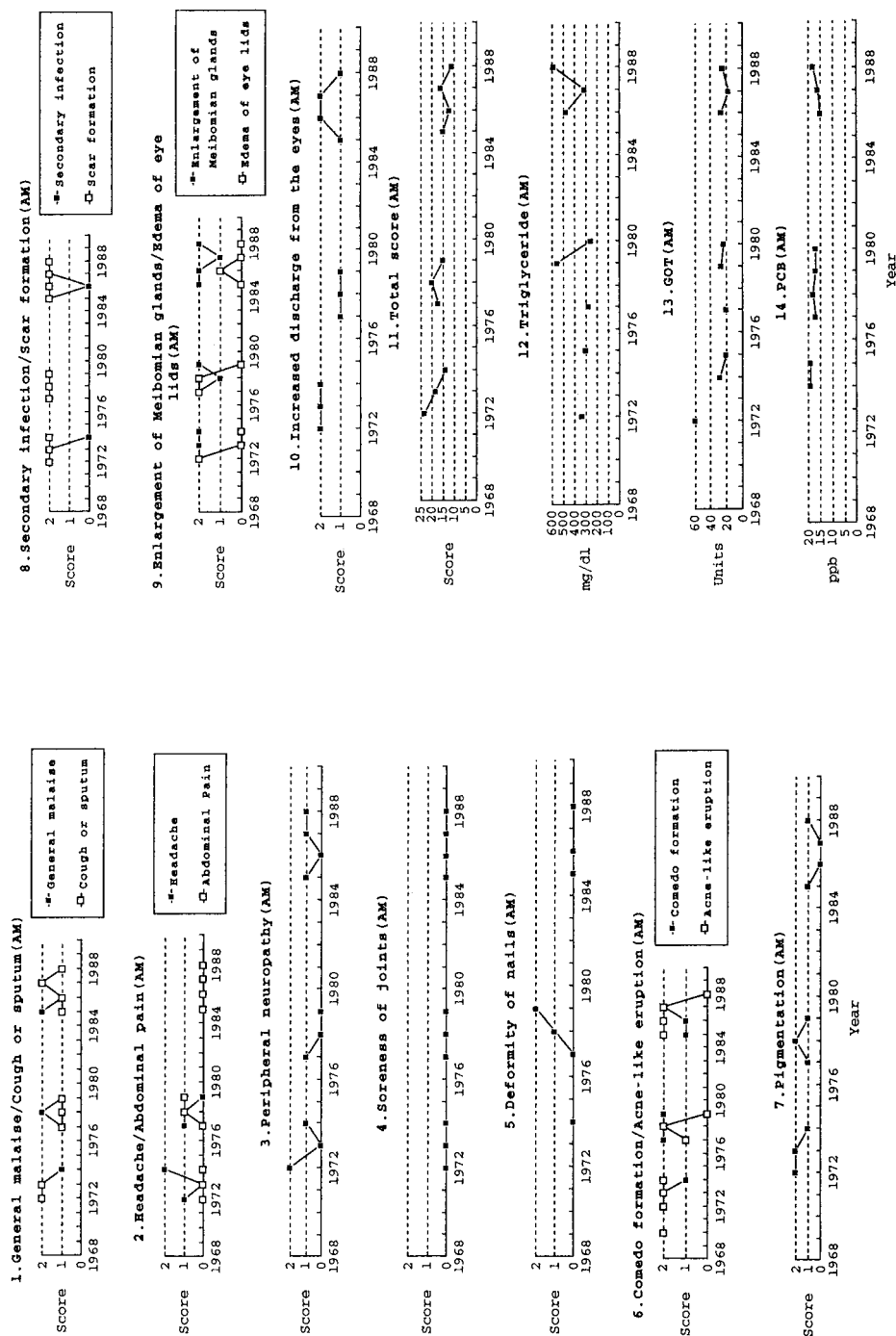


Fig. 3 Temporal variation of clinical findings, GOT and PCB in blood of Yusho patient AM.

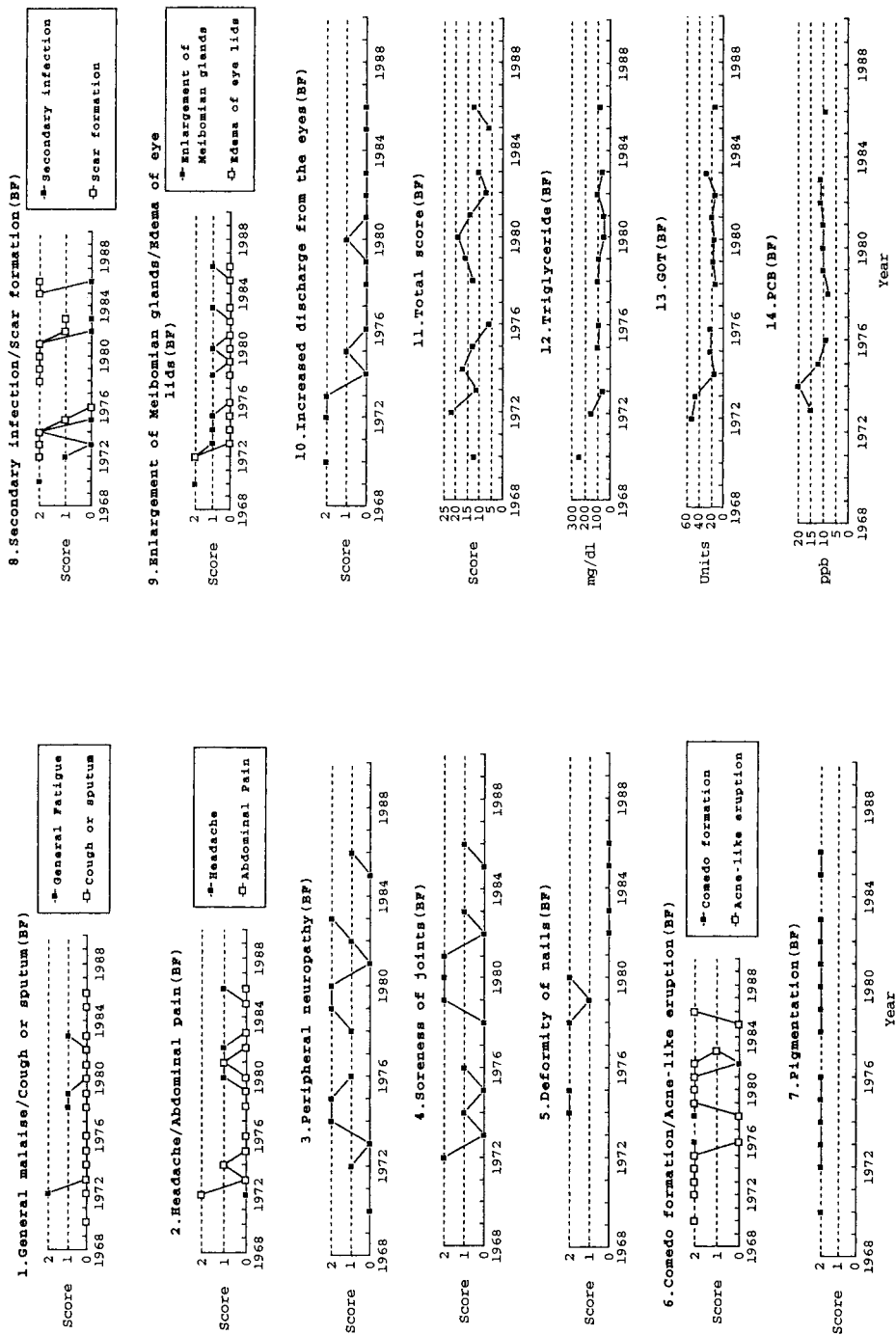


Fig. 4 Temporal variation of clinical findings' scores and of levels of triglyceride, GOT and PCB in blood of Yusho patient BF.

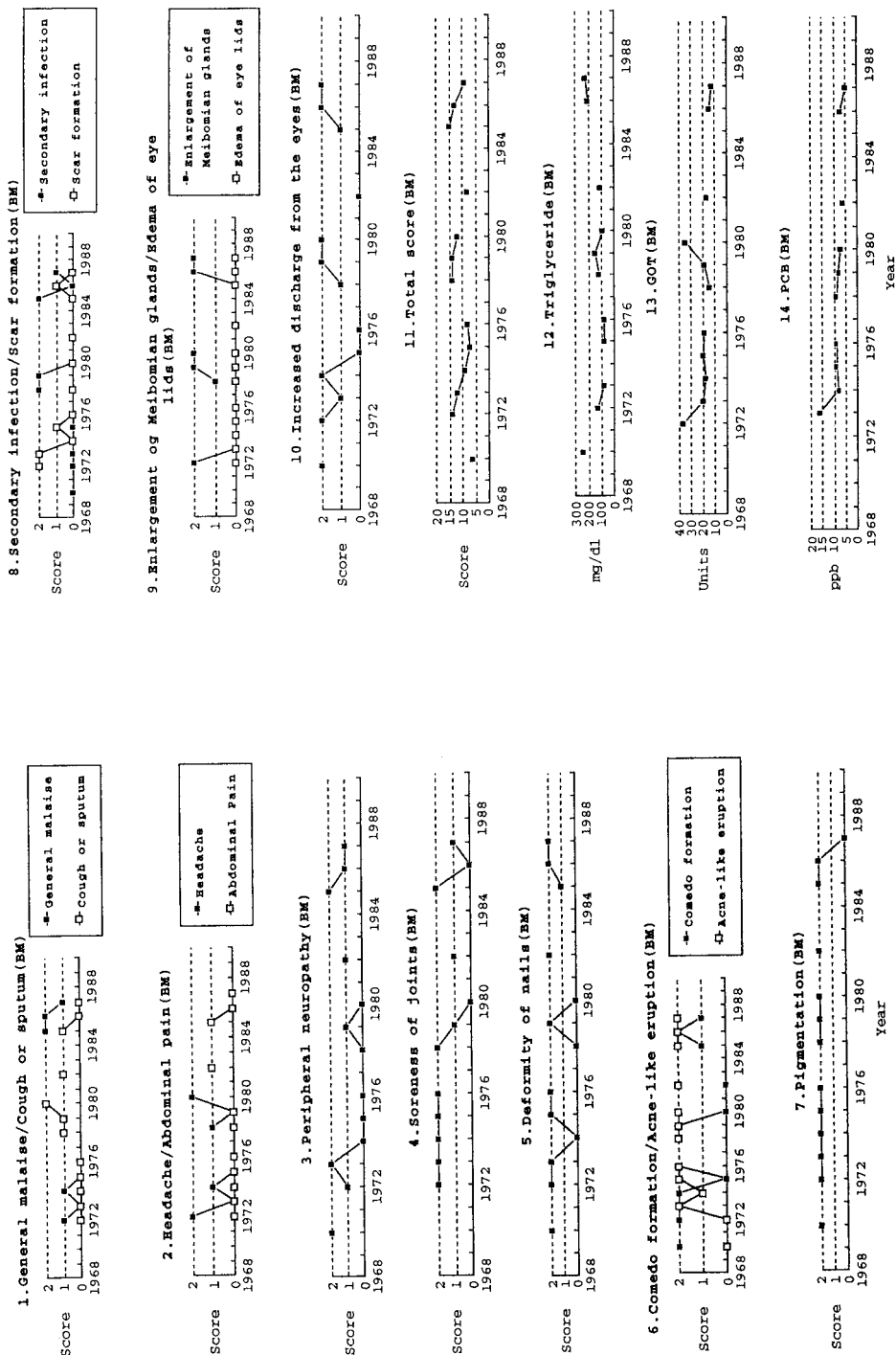


Fig. 5 Temporal variation of clinical findings' scores and of levels of triglyceride, GOT and PCB in blood of Yusho patient BM.

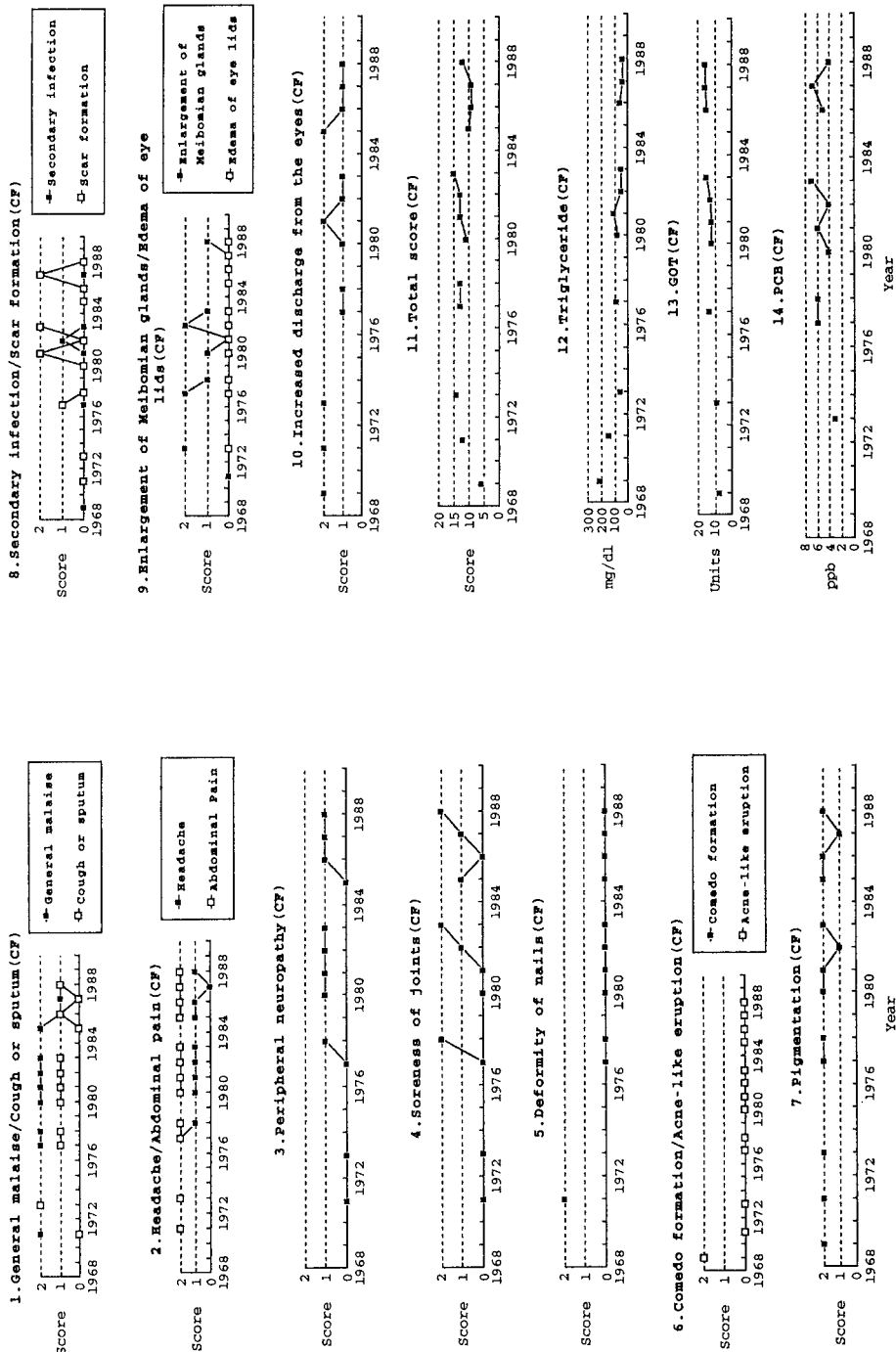


Fig. 6 Temporal variation of clinical findings' scores and of levels of triglyceride, GOT and PCB in blood of Yusho patient CF.

Table 1 The concentration of PCBs and PCQs in the blood and subcutaneous adipose tissue of Yusho patients, non Yusho patients and normal persons.

	No.	Blood		Adipose tissue	
		PCBs (ppb) mean $\pm$ S. D. (Min. ~Max.)	PCQs (ppb) mean $\pm$ S. D. (Min. ~Max.)	PCBs (ppb) mean $\pm$ S. D. (Min. ~Max.)	PCQs (ppb) mean $\pm$ S. D. (Mix. ~Max.)
Yusho patients Type A	7	9.65 $\pm$ 6.34 (2.03~20.60)	6.97 $\pm$ 3.38 (3.86 ~13.89)	2,150 $\pm$ 1,660 (1,000~5,710)	1,060.00 $\pm$ 469.00 (555 ~1,997)
Type BC	3	3.06 $\pm$ 1.72 (1.67~ 5.48)	0.075 $\pm$ 0.067 (0.010~ 0.168)	1,183 $\pm$ 268 (820~1,460)	23.08 $\pm$ 24.11 (1.38~ 56.70)
Type C	8	5.53 $\pm$ 2.28 (2.22~ 8.80)	0.023 $\pm$ 0.010 (0.010~ 0.041)	1,191 $\pm$ 376 (580~1,750)	5.38 $\pm$ 2.14 (1.38~ 8.22)
Non Yusho patients	20	3.15 $\pm$ 2.63 (1.00~12.00)	0.051 $\pm$ 0.137 (0.001~ 0.638)	786 $\pm$ 457 (178~2,217)	10.69 $\pm$ 25.88 (0.03~ 120.29)
Normal persons	11	3.84 $\pm$ 1.32 (1.29~ 5.95)	0.021 $\pm$ 0.012 (0.010~ 0.051)	893 $\pm$ 262 (440~1,250)	4.15 $\pm$ 3.82 (1.65~ 15.20)

Takamatsu⁴¹⁾らによって、職業的に暴露された人の血中 PCB 濃度が~数百 ppb と極めて高いことが報告され、他覚的所見や油症の原因となった油を摂取したという疫学的状況が明らかでない場合には、油症の診断要素として絶対でないことが明らかにされた。一方 1974 年に増田²⁵⁾や高松⁴⁰⁾によって、典型的な油症患者の血液の PCB ガスクロマトグラムパターンは健常者や職業的に暴露された人の血液のそれと異なっていることが報告された。それは即ち *p, p'*-DDE のピークから数えて 2 番目のピーク *b* (2, 4, 5, 2', 4', 5'-HexaCB) の高さを 100 としたとき、患者では健常者に比べ 1 番目のピーク *a* (2, 4, 5, 3', 4'-PentaCB) が低く、5 番目のピーク *c* (2, 3, 4, 5, 3', 4'-HexaCB) が高いというパターンであった (Fig. 7)。彼等は典型的油症患者に見られるパターンを A とし、健常者に見られるパターンを C、その中間のパターンを B, BC とすることによって、血中 PCB パターンを区別できることを示した。この PCB パターンは油症患者の血清中性脂肪値とよく相関し³⁶⁾、診断に極めて有用であることが証明された。これが、以後 PCB パターンが油症の判定基準として採用されてきた所以である。このパターンの発現時期に関して、中毒後約 1 年を経過した 1969 年 7 月に術後の心不全で死亡し剖検された典型的油症患者の皮膚抽出物のガスクロマトグラム¹⁸⁾が A パターンを示していることを最近著者らは見出ししたが、これは榎本¹⁷⁾が有症の台湾油症患者において、中毒後 0.5 年で A パターンを検出していることとほぼ一致し

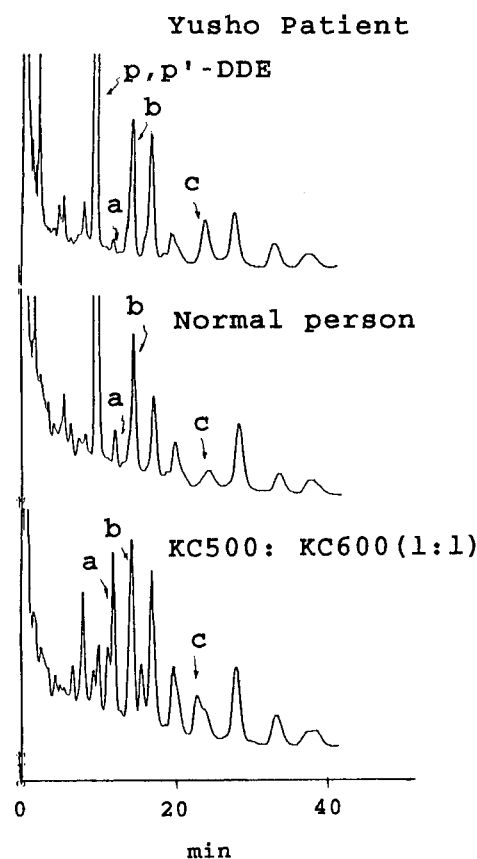


Fig. 7 Gas chromatograms of PCB in blood. Column 2% Silicon OV-1 chromosorb W (AW DMCS) 80~100 mesh

ている。次に a, b, c 各異性体の絶対濃度について示したのが Table 2 である。表中の試料はすべて 1989-1990 年の油症検診を受診した A タイプの患者の血液で、濃度は数値化法⁴⁶⁾で示した。a の 2, 4, 5, 3', 4'-PentaCB では 1 例を除き、健常者の平均血中濃度 (0.11 ppb) の 1/2 程度であり、また C の 2, 3, 4, 5, 3', 4'-HexaCB では健常者の平均血中濃度 (0.10 ppb) の 4~39 倍であった。a が低くなる原因は PCDF⁸⁾ やコプラナー PCB などカネミ油中の毒性成分によって誘導された酵素が a を代謝した結果であろうと考えられ、今も A タイプ患者においてはこの毒性が継続していることを示唆している。酵素誘導は^{51)~53)}ラットなどを用いた動物実験でも明らかのように、他の急性毒性に比し少量で発現することから、毒物の生体への影響や暴露の強度を推測する上でも重要な指標である。しかし残念なことに、中毒当時には明瞭であった a の油症患者・健常者間の差異も最近の健常者における a の低下傾向によって、上記のように 1/2 に接近した¹¹⁾。健常者の a の低下傾向は一つには環境汚染物²⁾³⁸⁾などの外来因子に由来するのかもしれない。

一方、c の 2, 3, 4, 5, 3', 4'-HexaCB は吉原ら⁵¹⁾によって、3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl (PentaCB) に比べてその毒性は低い、患者の血中に見られる PCB の中ではラットにおける酵素誘導能、肝肥大、胸腺萎縮などかなりの毒性を有するものであると報告されている。また、Birnbbaum ら¹¹⁾によって、2, 3, 7, 8

-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2, 3, 7, 8-TCDD) との同時投与で 2, 3, 4, 5, 3', 4'-HexaCB が 2, 3, 7, 8-TCDD の毒性 (マウスの口蓋裂) を相乗的に増強することも明らかにされている。したがって、2, 3, 4, 5, 3', 4'-HexaCB は油症の原因とされる PCDF の毒性を増強しているのかもしれない。さらに、これが患者に特異的に高く検出されるなど残留性も大きいことから、毒性学上 PCDF や Co-PCB と並び追跡調査されなくてはならない化合物である。

中毒以後 20 年間の PCB パターンの変動を調査した結果は以下のとおりである。1988-1990 年に油症検診を受けた油症患者についてみると、Table 3 に示したように、1974-1975 年に A であった人が 1988 年以降に A であったのは 21 名中 17 名 (80.9%)、B, BC に変化したのは各々 3 名 (14.3%)、1 名 (4.8%) であった。B の 1 名は C に変化していた。BC の 8 名については未変化が 1 名 (12.5%)、B, C に変化したのが各々 2 名 (25%)、5 名 (62.5%) であった。また C の 24 名については未変化が 23 名 (95.8%)、BC に変化したのが 1 名 (4.2%) であった。このように、約 15 年間に亘っておおよそ PCB パターンは変動が少なく極めて安定であるといえ、一部の B や BC (A に比べ軽い中毒であったと思われる) の C への変化については約 15 年の間の軽快によるものと考えられる。また A から BC に移行した 1 例は原因油使用妊婦から出生した児で、所謂新生児油症であった¹⁹⁾⁵⁰⁾⁵⁴⁾。この場合、

Table 2 The concentration of PCBs in blood of 10 Yusho patients who underwent the 1990 (or 1989)'s medical inspection for Yusho

Subjects	ppb				(c)/(a) *100(%)
	Total PCBs	2,4,5,3',4'- PentaCB (a)	2,4,5,2',4',5'- HexaCB (b)	2,3,4,5,3',4'- HexaCB (c)	
Patient 1	3.45	0.04	0.66	0.41	1020
2	4.02	0.05	0.93	0.82	1523
3	2.42	0.03	0.50	0.62	1976
4	2.90	0.06	0.73	0.46	709
5	2.54	0.05	0.54	0.58	1202
6	3.87	0.07	0.95	0.75	936
7	2.68	0.01	0.58	0.70	9936
8	2.01	0.05	0.48	0.39	722
9	14.00	0.06	2.75	3.89	6483
10	8.50	0.18	1.96	1.06	607
Normal persons (mean, n=30)	1.1	0.11	0.41	0.10	91

Table 3 The transition profile of PCB gas chromatogram pattern of Yusho patients

PCB Pattern in 1974~1975	PCB pattern in 1988~1990	No. of subjects	%
A	A	17	80.9
A	B	3	14.3
A	BC	1	4.8
Total		21	
B	C	1	100.0
Total		1	
BC	BC	1	12.5
BC	B	2	25.0
BC	C	5	62.5
Total		8	
C	C	23	95.8
C	BC	1	4.2
Total		24	

おそらく胎盤や母乳²⁶⁾ 経由で PCB, PCDF などの原因物質に暴露されたと考えられるが、間接的な暴露であったので、絶対的暴露量としては少なかったであろうこと、さらに体の成長特に肝臓や皮下脂肪の増大²⁰⁾ による希釈効果などがパターン変化の主たる原因ではないかと思われる。

以上のことから PCB パターンは総括的には判定基準として有用であることが検証された。しかし軽症者の PCB パターンについてはその取扱いに注意しなくてはならないことも示唆された。

2) PCQ について

PCQ は PCDF と同様高温下で PCB から生成する。飯田らは¹⁰⁾、PCQ が未使用の KC400 中では 63 ppm (0.0063%) であるのに、熱媒体として使用済の KC400 中では 60,000 ppm (6.0%) と増加していることを明らかにした。さらに油症原因油中には PCB が 110 ppm, PCQ は 380 ppm 含有され、これらはすでに Miyata ら²⁸⁾ が報告した値と一致するものであった。職業的 PCB 汚染者の血中 PCQ が 0.02 ppb 未満であったという Takamatsu ら⁴¹⁾ の報告や、油症患者の血液には健常者のそれに見られない高濃度の PCQ が検出されたという Kashimoto らの報告¹⁶⁾ から、PCQ が油症の診断の有用な因子として 1981 年に採用された。

PCQ は PCB の 2 分子縮合物であり、塩素の数や置換位置の違いからその異性体の数は膨大なものであるため、著者らは 6 種の骨格異性体として定量した¹³⁾³⁹⁾⁴³⁾。その結果、典型的油症患者の皮下脂肪には 2,

2'-PCQ, 2,3'-PCQ, 3,4'-PCQ が各々 128~460 ppb, 140~394 ppb, 120~439 ppb と、2,4'-PCQ, 4,4'-PCQ, 3,3'-PCQ の各 71~263 ppb, 53~246 ppb, 42~195 ppb に比べ、多く含まれていた。血液では 3,4'-PCQ が他の骨格異性体に比べて多く検出される傾向が見られ、その濃度は 1.09~4.43 ppb であった。血中 PCQ の骨格異性体によるパターンでは、PCB と異なり、健常者の血中濃度が低濃度であるため油症患者・健常者間の差異を見出すことはできなかった。全濃度では皮下脂肪で 555~1,997 ppb, 血液で 3.86~13.9 ppb であった。これは健常者の平均皮下脂肪中 PCQ 濃度 (4.15 ppb), 平均血中 PCQ 濃度 (0.021 ppb) の各々 134~481, 184~662 倍である。また、血中 PCQ 濃度は PCB パターンの要素であるピーク高比 c/b (Fig. 7) とよく相関し³²⁾、油症の判定手段となりうるとした榎本らの報告¹⁶⁾¹⁷⁾ と一致した結論を得た。しかし、例外的に健常者の中には通常の健常者レベル (~0.044 ppb¹²⁾) を超え、かつ、PCB パターンが BC を示すものもあった。この場合には皮下脂肪中 PCDF が不検出 (検出限界値 10 ppt) であったこと、一方同様の PCB パターン及び PCQ 濃度を有する油症患者の皮下脂肪中には PCDF が検出されたことによって、両者の客観的な判別が可能になった³²⁾。

PCQ の化学的性質では、Table 4 に示すように、血中濃度/皮下脂肪中濃度の比が PCB の場合より大きい傾向が認められることから、PCB よりも容易に血液に移行しやすい化合物であることが推察される。この性質は PCQ の残留性が PCB や PCDF より低い要因

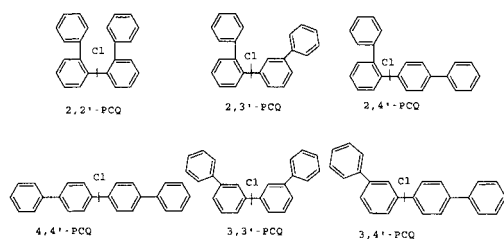
Table 4 PCQs and PCBs concentration in blood and subcutaneous adipose tissue of Yusho patients.

Subjects		PCBs (ppb)		A=1000 X/Y	PCQs (ppb)		B=1000 X*/Y*	B/A
		Blood (X)	Adipose (Y)		Blood (X*)	adipose (Y*)		
Patient	AF	20.6	5710	3.6	13.89	2000	6.9	1.92
	AM	16.5	2360	7.0	6.70	970	6.9	0.98
	BF	7.63	2250	3.4	7.69	1270	6.1	1.78
	BM	4.23	1000	4.2	5.10	550	9.3	2.20
	CF	5.15	1300	4.0	3.86	1000	3.9	0.97
	CM	5.35	1220	4.4	4.37	760	5.8	1.32
	DF	8.07	1180	6.8	7.16	860	8.3	1.22
Mean±SD.		9.65±5.87	2150±1540	4.8±1.4	6.97±3.13	1060±436	6.7±1.6	1.48±0.45

Table 5 The correlation of the total score with PCDFs, PCBs or PCQs concentration in subcutaneous adipose tissue or blood of Yusho patients.

Subjects	Male	Female	Correlation coefficient (r)					
			2,3,4,7,8- pentaCDF	1,2,3,4,7,8- HexaCDF	1,2,3,6,7,8- HexaCDF	Total PCDFs	PCBs	PCQs
AF,AM,BF, BM,CF, and DF	2	4	0.4836	0.4416	0.5291	0.4833	0.7484 0.6386*	0.5881 0.7499*
AF,BF,CF and DF		4	0.9804	0.8645	0.9073	0.9885	0.9063 0.9773*	0.8471 0.9751*

The correlation values with the mark * are for blood, while values without * are for adipose tissue.

**Fig. 8** Skeletal structures of polychlorinated quaterphenyl congeners

とも考えられる。さらに毒性面では、PCQ は酵素誘導能、肝肥大、胸腺萎縮、体重増加抑制などを指標とした動物実験結果⁽⁴²⁾ から毒性が弱いと判断されるため、境界領域の症例の場合には究極的な判別手段とはなりえない事態が生じてくることも有り得る。しかしそれ以外の場合では PCDF に次ぐ相関を示す (Table 5) ことから高分解能 GC/MS を必要とする PCDF に比べ PCQ は簡便な判別手段として機能することが毎年の油症検診で示されている。

3. PCDF の油症判別能

PCDF は、1) 油症原因油⁽³⁰⁾ 及び油症患者の組織中⁽³¹⁾ に検出されたこと、2) 代表的ポリ塩化ダイオキシンである 2,3,7,8-TCDD の胸腺萎縮、体重抑制、皮膚の角質化、肝肥大、肝酵素誘導作用及び致死作用⁽³⁷⁾ などに類似した毒性を有すること、また、3) 油症の症状の一つがクロルアクネであり、2,3,7,8-TCDD による中毒症状も同じクロルアクネであること。以上のことから、油症の主たる原因物質が PCDF であることが示唆されてきた⁽³⁴⁾。PCDF の化学的性状については PCB と若干異なっていることがわかってきた。例えば、Masuda ら⁽²⁷⁾ によって、台湾油症新生児及び成人油症患者の各々の肝臓及び皮下脂肪中の PCDF 濃度が測定されているが、新生児において肝臓中濃度の方が皮下脂肪中濃度よりも高く、一方、成人では皮下脂肪中濃度の方が高いこと、さらに、ラットを用いた実験において、PCDF (特に 2,3,4,7,8-PentaCDF) が高スピン型 P-450 (P-448) へ親和性を有すること⁽²³⁾、などを総合すると、PCDF が、PCB と同様に親油性化合物と

して皮下脂肪に蓄積すると同時に、一方では肝臓の酵素蛋白に結合したまま代謝されずに蓄積するという、言わば二面性を有した特異な化合物であるといえる。筆者らは発症後18年を経過した油症患者（症例AF-CF及び2名）の計7名の皮下脂肪中PCDFを測定した結果、検出された4種のPCDF（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）のうち2,3,4,7,8-PentaCDFの濃度比が大きいことを確認している¹⁴⁾。毒性についても、2,3,4,7,8-PentaCDFは2,3,7,8-TCDDの2分の1当量に相当すると言われている²⁴⁾。したがって、非代謝性、残留性及び毒性の面から、油症では特に2,3,4,7,8-PentaCDFによる生体影響が大きいことが示唆される。筆者らはさらにAタイプの7名に加え、Aタイプではない軽症の油症患者11名及び健常者11名合計29名の皮下脂肪中PCB, PCQ及びPCDF濃度、血中PCB及びPCQ濃度、PCBピーク高比1/2値（Fig. 7におけるbのピーク高に対するaのピーク高比と同義）、PCBピーク高比5/2値（Fig. 7におけるbのピーク高に対するcのピーク高比と同義）の7項目を使って、その1～3項目からなる組み合わせ34組、ピーク高比・1/2値と5/2値の組み合わせ1組及び全項目の組み合わせ1組の合計36の組み合わせを作り、その各々について油症患者と非患者の判別関数を求めた³³⁾。各関数が有する誤判別率から、1～3項目を用いたいづれの組み合わせでもPCDF濃度を含む組み合わせの誤判別率が低かった。特に皮下脂肪中PCQ濃度、PCDF濃度及び血中PCQ濃度の3項目による判別関数の誤判別率は全項目による判別関数の誤判別率に最も近かった。これらの結果からもPCDFが臨床症状に密接に関わっていることが示唆される。そこで、皮下脂肪採取年（1986年）の検診結果から得られた自覚・他覚的症状の評価合計点とPCDF, PCB, PCQ濃度との関係について調べた。Table 5は典型的油症患者における自覚・他覚的症状の評価合計点（Score）と測定した各化合物の濃度との相関係数を示したものである。データを得ることのできた全症例（DFが新たに加わって計6名になっている）の場合では、血中PCQ濃度が0.7499と最も高い相関を示した。なおDFは女性で中毒時は38才であった。性別で見ると、女性の患者4名では、皮下脂肪中2,3,4,7,8-PentaCDF濃度及び全PCDF濃度は他の皮下脂肪中及び血中のPCBやPCQ濃度よりも高い相関を示した。即ち、相関係数が全PCDF濃度で0.9885であり、3種の異性体の中では2,3,4,7,8-PentaCDF濃度の

0.9804が最も大きかった。男性については2名と少数であったため考察できなかった。したがって典型的油症患者の1986年の症状の強さが当時の皮下脂肪中PCDF濃度と量-反応関係になると解釈されうる。なお一方の性だけにPCDFと高い相関が得られた理由の一つには異性間における、動物（マウス）の種差に見られるような代謝、特に脂質代謝の差異の存在⁴⁾が考えられる。

以上の結果をもとに考察すると、皮下脂肪中（あるいは血中）のPCDFが、油症発現に寄与していると考えられているコプラナーPCBと併せて境界領域のPCBパターンやPCQ濃度を示す油症検診受診者の油症診断に今後採用される可能性も十分考えられる。

総 括

PCBやPCQの分析データはこれらが油症の原因油に多量に含有され、かつ油症の原因物質の一部として考えられたところから、それぞれ1972年と1981年に油症の診断基準として加えられた項目である。本稿では発症から約20年を経た今日まで、PCB及びPCQのデータが診断上どのような役割をしてきたかを検証し、その意義や限界について考察した。また、個々人の臨床所見を数量化し、その経時的な推移を明らかにした。さらに、化学分析データと数量化した油症症状との関連性について考察した結果、油症患者の皮下脂肪中PCDF濃度と臨床所見とには高い相関があることを見出し、皮下脂肪中（或いは血中）PCDF濃度が可能な次の診断基準であることを示唆した。

謝 辞

本研究の遂行にあたって、増田義人第一薬科大学教授に貴重な御教示を頂いた。また松尾國雄福岡県保健環境部生活衛生課長には検診票の利用に便宜を図って頂いた。

文 献

- 1) Birnbaum L S, Weber H, Harris M W, Lambiv, J D and Mckinney J C: Toxic interaction of specific polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Increased incidence of cleft palate in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 77: 292-302, 1985.
- 2) Chen P H, Gaw J M, Wong C K and Chen C J: Levels and gas chromatographic patterns of polychlorinated biphenyls in the blood of patients after PCB poisoning in Taiwan., Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25: 325-329, 1980.

- 3) Davies K: Concentration and dietary intake of selected organochlorines, including PCBs, PCDDs and PCDFs, *Chemosphere*, 17: 263-276, 1988.
- 4) Decad G M, Birnbaum L S and Matthews H B: Distribution and excretion of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzofuran in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 59: 564-573, 1981.
- 5) 五島應安, 樋口謙太郎: 油症(塩化ビフェニール中毒症)の皮膚科学的症候論, 福岡医誌 60(6): 409-431, 1969.
- 6) Hebert C D, Harris M W, Elwell M R and Birnbaum L S: Relative toxicity and tumor-promoting ability of 2, 3, 7, 8-tetrachlorobenzo-*p*-dioxin (TCDD), 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (PCDF), and 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran (HCDF) in hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 102: 362-377 (1990).
- 7) 本房昭三, 永江祥之介, 利谷昭治, 旭 正一: 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, 福岡医誌 80(5): 324-330, 1989.
- 8) 堀 伸二郎, 宮田秀明, 前田浩一郎, 村上保行, 樫本 隆: 油症における体内残留PCBの質的究明, 食衛誌 20: 166-172, 1979.
- 9) Hsu S, Ma C, Hsu S, Wu S, Hsu N and Yeh C: Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan. In Kuratsune M and Shapiro R E (eds): *Progress in Clinical and Biological Research*, Volume 137. pp. 71-79, Alan R. Liss, Inc. New York, 1984.
- 10) 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克巳, 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(5): 126-131, 1985.
- 11) 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克巳, 増田義人: 健常者の血中PCB濃度およびガスクロマトグラムピークパターンの経年変化, 福岡医誌 76(5): 137-144, 1985.
- 12) 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(5): 305-308, 1987.
- 13) 飯田隆雄, 深町和美, 竹中重幸, 中川礼子, 高橋克巳: ポリ塩化クアテルフェニルのキャピラリーガスクロマトグラフィーによる定量, 分析化学 37: 230-235, 1988.
- 14) 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(5): 296-301, 1989.
- 15) Kamps L R, Trotter W J, Young S J, Carson L J, Roach J A G, Sphon J A, Tanner J T and McMahon B: Polychlorinated quaterphenyls identified in rice oil associated with Japanese "Yusho" poisoning, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 589-591, 1978.
- 16) Kashimoto T, Miyata H and Kunita N: The presence of polychlorinated quaterphenyls in the tissues of Yusho victims. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 19: 335-340, 1981.
- 17) 樫本 隆, 宮田秀明, 福島成彦, 国田信治, 大井 玄, 董 大成: 台湾PCB中毒患者血液およびその原因一油中のPCBs, PCQsおよびPCDFs解析, 福岡医誌 74(5): 255-268, 1983.
- 18) 菊池昌弘, 御鍵儼治, 橋本美智雄, 小嶋 亨: いわゆる油症患者の2剖検例, 福岡医誌 62(1): 89-103, 1971.
- 19) 菊池昌弘, 橋本美智雄, 宝角 衛, 古賀康八郎, 大吉繁男, 永川正敏: いわゆる油症(塩化ビフェニール中毒)死産児の1剖検例, 福岡医誌 60(6): 489-495, 1969.
- 20) 古賀信幸, 中嶋 寛, 神村英利, 外間由美子, 吉村英敏: 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, 福岡医誌 80(5): 227-234, 1989.
- 21) 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(4): 181-186, 1979.
- 22) Kuratsune M, Yoshimura T, Matsuzaka J and Yamaguchi A: Epidemiological study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with commercial brand of polychlorinated biphenyls, *Environ. Health Perspect.* 1: 119-128, 1972.
- 23) Kuroki J, Koga N and Yoshimura H: High affinity of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran to cytochrom P-450 in the hepatic microsomes of rats. *Chemosphere*, 15: 731-738, 1986.
- 24) Kuts F W, Barnes D G, Bottimore D P, Greim H and Bretthauer E W: The international toxicity equivalency factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. *Chemosphere*, 20: 751-757, 1990.
- 25) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 高田真由美, 倉恒匡徳: 油症患者及び一般人の血液中のポリ塩化ビフェニル, 福岡医誌 65(1): 25-27, 1974.
- 26) Masuda Y, Kagawa R, Kuroki H, Kuratsune M, Yoshimura T, Taki I, Kusuda M, Yamashita F and Hayashi M: Transfer of polychlorinated biphenyls from mothers to fetuses and infants. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 16: 543-546, 1978.
- 27) Masuda Y, Kuroki H, Haraguchi K and Nagayama J: PCB and PCDF congeners in the blood and tissues of Yusho and Yu-cheng patients. *Environ. Health Perspect.*, 59: 53-58, 1985.
- 28) Miyata H, Kashimoto T and Kunita N: Studies on the compounds related to PCB (V); Detection and determination unknown organochlorinated compound in Kanemi rice oil caused the "Yusho". *J. Food Hyg. Soc.* 19: 364-371, 1978.

- 29) Morita M, Nakagawa J and Rappe C: Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) formation from PCB mixture by heat and oxygen. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 665-670, 1978.
- 30) Nagayama J, Kuratsune M and Masuda Y: Determination of chlorinated dibenzofurans in kaneychlor and "Yusho oil". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 15: 9-13, 1976.
- 31) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with "Yusho"., *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 15: 195-198, 1977.
- 32) 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.
- 33) 中川礼子, 篠原志郎, 飯田隆雄, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克巳: 判別関数値を用いる血中 PCB パターン解析. *福岡医誌* 80(5): 287-290, 1989.
- 34) Oishi S, Morita M and Fukuda H: Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43: 13-22, 1978.
- 35) 奥村 恂, 勝木司馬之助: いわゆる油症(塩化ビフェニール中毒)の臨床的研究, とくに内科的所見について. *福岡医誌* 60(6): 440-446, 1969.
- 36) 奥村 恂, 増田義人, 中牟田澄子: 油症患者における血中 PCB と血清トリグリセライドとの関係. *福岡医誌* 65(1): 84-87, 1974.
- 37) Poland A, Greenlee W F and Kende A S: Studies on the mechanism of action of the chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320: 214-230, 1979.
- 38) Shecter A, Ryan J J and Constable J D: Chlorinated dioxins and dibenzofurans in human from Japan, India, and the united states of America., *Chemosphere*, 18: 975-980, 1989.
- 39) 高田 智, 毛利隆美, 飯田隆雄, 中村周三, 高橋克巳, 増田義人: クアテルフェニール, ポリ塩化クアテルフェニールおよび十八塩化クアテルフェニールの合成. *福岡医誌* 74(5): 193-201, 1983.
- 40) 高松 誠, 井上義人, 阿部純子: 血液中 PCB の診断学的意義. *福岡医誌* 65(1): 28-31, 1974.
- 41) Takamatsu M, Oki M, Maeda K Inoue Y, Hirayama H and Yoshizuka K: PCBs in Blood of workers exposed to PCBs and their health status. In Kuratsune M and Shapiro R E (eds): *Progress in Clinical and Biological Research*, Volume 137. pp. 59-68, Alan R. Liss, Inc., New York, 1984.
- 42) Takenaka S, Iida T, Nagase M, Takata S, Masuda Y, Koga N, Kuroki J, Hokama Y and Yoshimura H: Accumulation, excretion and effects on hepatic enzymes of polychlorinated quaterphenyl congeners in rats., *J. Pharmacobio.-Dyn.*, 8, 571-577, 1985.
- 43) 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.
- 44) 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(5): 349-354, 1987.
- 45) 塚元久雄他: 油症患者が使用したライソオイル中の有毒物質の化学的検索. *福岡医誌* 60(6): 496-512, 1969.
- 46) 鶴川昌弘, 中村彰夫, 榎本 隆: PCB の数値化法に関する研究. *食衛誌* 14: 415-424, 1973.
- 47) Urabe H and Asahi M: Past and current dermatological status of Yusho patients. In Kuratsune M and Shapiro R E (eds): *Progress in Clinical and Biological Research*, Volume 137. pp.5-12, Alan R. Liss, Inc. New York, 1984
- 48) 鶴澤春生, 伊東靖夫, 納富昭光, 勝木司馬之助: 塩化ビフェニールによる高グリセライド血症. *福岡医誌* 60(6): 449-454, 1969.
- 49) 山領智子, 宮崎徳光, 増田義人, 長山淳哉: ポリ塩化ビフェニールの加熱によるポリ塩化クォーターフェニールの生成. *福岡医誌* 70(4): 88-92, 1979.
- 50) 山口敦子, 吉村健清, 倉恒匡徳: 塩化ビフェニール汚染油を摂取した妊婦より生まれた児に関する調査. *福岡医誌* 62(1): 117-122, 1971.
- 51) 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.
- 52) Yoshimura H, Yoshihara S, Ozawa N, and Miki M: Possible correlation between induction mods of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320: 179-192, 1979.
- 53) Yoshimura H, Yoshihara S, Koga N, Nagata K, Wada I, Kuroki J and Hokama Y: Inductive effect on hepatic enzymes and toxicity of congeners of PCBs and PCDFs. *Environ. Health Perspec.* 59: 113-119, 1985.
- 54) 吉村健清: PCB 汚染油を摂取した母親から生まれた児についての疫学的調査. *福岡医誌* 65(1): 74-80, 1974.

A Comparative Study on the Concentrations of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Quaterphenyls (PCQs) in the Blood and Hair of "Yusho" Patients and Inhabitants of Nagasaki Prefecture

Taro OHGAMI, Shigeo NONAKA, Hiroko IRIFUNE,
Masahisa WATANABE, Naoko TSUKAZAKI, Keiichi TANAKA,
Mitsumasa YANO and Hikotaro YOSHIDA

Department of Dermatology, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki 852

Fumio MURAYAMA

Division of Dermatology, Sasebo General Hospital, Sasebo 857

Yuji RIKIOKA

Nagasaki Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Nagasaki 852

Abstract The relationship between polychlorinated biphenyl (PCB) and polychlorinated quaterphenyl (PCQ) concentrations in the blood and hair was investigated. The materials in this study consisted of 49 blood samples and hair obtained from 27 patients with PCB poisoning (Yusho) and 22 normal controls. The alkaline decomposition method described in the official standard analytical methods for the isolation of PCB and PCQ fractions was used. In the blood of the control group, the mean concentration of PCBs was 2.25 ppb, while the concentration of PCQs was too low to be detected by our analytical method. On the other hand, the mean concentration of PCBs in the Yusho group was about 2.8 times higher than that in the control group. The mean concentration of PCQs in the blood was 0.61 ppb in the Yusho group, but PCQs were not detectable in the control group.

In the hair, the mean concentration of PCBs was 25.85 ppb and 9.41 ppb in the Yusho group and control group respectively. The mean concentration of PCQs in the hair of Yusho patients was 0.44 ppb, but PCQs were not detected in the control group. The PCB level in the hair was higher than that in the blood, but the PCQ level in the hair was lower than that in the blood. These results suggest a difference of excretory system among polyhalogenated compounds such as PCBs or PCQs. We consider that PCBs display a greater affinity than PCQs for the pilosebaceous system of the human skin. On the basis of these results and speculations, as well as the ease of collecting samples, we concluded that the long-term analysis of these chemicals in the hair is both necessary and feasible.

Introduction

Almost 22 years have passed since the discovery of the first case of Yusho (PCB poisoning), a disease induced by the intake of rice-bran oil contaminated by PCBs, PCQs and PCDFs. Affected persons suffer from various symptoms and still exhibit mild cutaneous changes. Clinical diagnosis was relatively easy because of the marked cutaneous manifestations in the initial

stages, but this became increasingly difficult in subsequent years. As a result, the concentration and the nature of PCBs and PCQs became important criteria in the diagnosis of Yusho. Recently, however, the concentration in the blood has also diminished. Acne-like eruptions and hyperpigmentation of the nails, which were characteristic of Yusho patients, gradually disappeared. We found large amounts of accumulated PCBs and PCQs in the subcutaneous

fat tissue even 17 years after contamination⁶⁾. We felt, therefore, that an analysis of PCB and PCQ concentrations in the subcutaneous fat tissue might be useful in the diagnosis of this disease and in the evaluation of the prognosis. PCBs and PCQs accumulate in many other organs. Almost twelve years ago, for example, it was reported that PCBs had accumulated in the hair⁷⁾. It is important, therefore, to investigate whether or not PCBs and PCQs are present in the hair a long time after the intake of contaminated rice-bran oil. In a previous study, we investigated the relationship between concentrations of PCBs and PCQs in the blood, subcutaneous fat tissue and hair. These results showed that a high concentration of PCQs remained in the hair of patients with Yusho⁸⁾. In this study, we compare the concentrations of PCBs and PCQs in the blood and hair of Yusho patients with those of normal controls.

Materials and Methods

1) Materials

Nine patients with PCB poisoning (Yusho) and 18 normal controls in 1988, and 18 patients and four normal controls in 1989 were used as subjects.

2) Samples

Ten milliliter samples of blood were taken from the cubital vein, and hair samples of more than 1.0 g were taken from the scalp of the Yusho patients and controls. Blood and hair samples were always taken as a pair. Hair samples were not collected from people using hair tonics or dyes.

3) Analysis of PCBs and PCQs

The alkaline decomposition method described in the official standard analytical methods for PCBs and PCQs by Kashimoto and his co-workers²⁾ was used for the isolation of PCB and PCQ fractions. We described the procedure for analysis of PCBs and PCQs in human blood and tissues in a previous report⁹⁾. The analysis of PCB and PCQ concentrations in the hair was performed by means of the method of Asada and his co-workers¹⁾.

Results

The results are summarized in table 1.

1) Concentrations of PCBs and PCQs in the control group

The concentrations of PCBs and PCQs in the blood and hair of 22 persons were analyzed. Eight of the 22 persons were residents of Nagasaki City, six of Narushima Island (Goto Islands), three of Fukue City (Goto Islands) and five of Tamanoura (Goto Islands). The locations are shown in Fig. 1. The mean of age was 37.00 years. There were four females and 18 males. The mean concentration of PCBs in the blood was 2.25 ppb, while that of PCQs was below the limit set by our analysis. The mean concentration of PCBs in the hair was 9.41 ppb while PCQs were not detectable.

2) Concentrations of PCBs and PCQs in the Yusho group

Twenty-seven cases of Yusho (11 patients living in Narushima and 16 patients in Tamanoura) were utilized in this study. The mean concentration of PCBs in the blood was

Table 1 Summary of PCB and PCQ levels in the blood and hair

Group (Number)		Age	Blood (ppb)		Hair (ppb)	
			PCB	PCQ	PCB	PCQ
Control (22)	Mean	37.00	2.25		9.41	
	$\pm$ SD	11.00	0.92	<0.02	5.55	<0.10
Yusho (27)	Mean	51.89	6.41	0.61	25.85	0.44
	$\pm$ SD	8.60	3.17	0.50	19.31	0.38

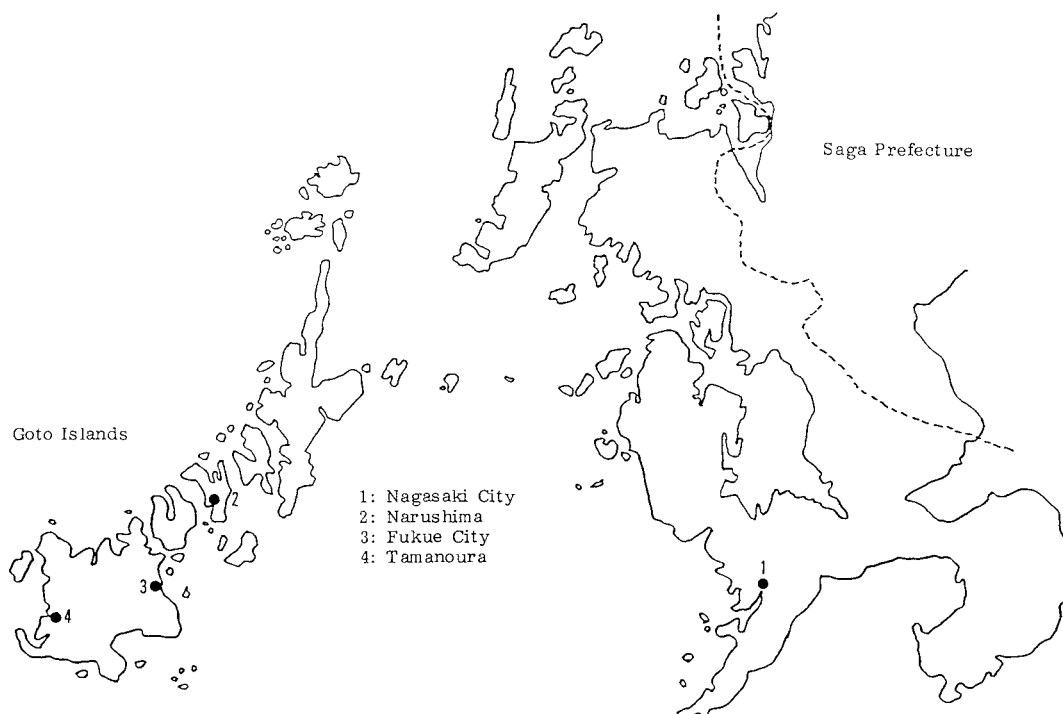


Fig. 1 Map of Nagasaki Prefecture

6.41 ppb while that of PCQs was 0.61 ppb. The mean concentration of PCBs in the hair was 25.85 ppb while that of PCQs was 0.44 ppb.

In summary, the concentrations of PCBs in the blood and hair of Yusho patients were 2.8 times higher than those of the control group. PCQs were detected in the hair of 18 patients with Yusho but not in that of normal controls. The concentration of PCBs in the hair was about 4.0 times higher than that in the blood, although the concentration of PCQs in the hair was lower than that in the blood.

Discussion

This study revealed that concentrations of PCBs and PCQs in the blood of Yusho patients are still high, and that PCBs and PCQs had accumulated in the hair of these patients. Our previous study showed similar results as late as 18 years after diagnosis⁵⁾. Although the values of PCBs and PCQs in the hair were lower in the

present study, no PCQs at all were detected in the hair of healthy controls. The fact that PCQs are detected in the hair raises two possibilities; first, that it is a valuable diagnostic finding of Yusho when there is no epidemiological evidence of the intake of rice-bran oil, and second, that it indicates the importance of the hair as an excretory pathway for polyhalogenated compounds. In 1976, Matthews and his co-workers⁵⁾ reported that chlorinated hydrocarbon insecticides and PCBs were found in human hair at concentrations less than 1.0 ppm, and they⁴⁾ speculated that excretion via the hair may be a significant means of eliminating chlorinated hydrocarbons that resisted metabolism. In patients with Yusho, high concentrations of PCBs were detected in the sebum⁷⁾ and in the contents of the tarsal gland³⁾. The present study showed that not only PCBs but also PCQs were present in the hair of Yusho patients. These results suggest that the

pilosebaceous system may play an important role as an excretory pathway for polyhalogenated compounds.

It is an interesting phenomenon that the concentration of PCBs in the hair was higher than that in the blood of Yusho patients, while the concentration of PCQs in the hair was lower than that in the blood. These results suggest that the excretory mechanism may differ among polyhalogenated compounds such as PCBs or PCQs. We consider that PCBs display a greater affinity than PCQs for the pilosebaceous system of the human skin. On the basis of these results and speculations, as well as the ease of collecting samples, we concluded that the long-term analysis of these chemicals in the hair is both necessary and feasible.

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 (in Japanese)
- 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) Kohno T, Ohnishi Y and Hironaka H: Polychlorinated biphenyls in the tarsal gland contents of Yusho Patients. Fukuoka Acta Med. 72: 237-241, 1981 (in Japanese)
- 4) Matthews HB, Domanski JJ and Guthrie FE: Hair and its associated lipids as an excretory pathway for chlorinated hydrocarbons. Xenobiotica 6: 425-429, 1976.
- 5) Ohgami T, Nonaka S, Murayama F, Yamashita K, Irifune H, Watanabe M, Tsukazaki N, Tanaka K, Yoshida H and Rikioka Y: A comparative study on polychlorinated biphenyls (PCB) and polychlorinated quaterphenyls (PCQ) concentrations in blood and hair of patients with Yusho and normal control. Fukuoka Acta Med. 80: 307-312, 1989.
- 6) 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.
- 7) Tsukamoto H, Makisumi S et al: The chemical studies on detection of toxic compounds in the rice bran oils used by the patients with Yusho. Fukuoka Acta Med. 60: 496-512, 1969 (in Japanese)

(和 文 抄 録)

油症患者および長崎県在住健常人の血液、 毛髪中 PCBs, PCQs 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・入船 弘子
渡辺 雅久・塚崎 直子・田中 敬一
矢野 光政・吉田 彦太郎

佐世保市立総合病院皮膚科

村山 史男

長崎県立公害衛生研究所生化学部門

力岡 有二

1988 年から 1989 年にかけて長崎県在住の油症患者 27 例、健常人 (対照群) 22 例より血液および毛髪をベアで採取し、それぞれの PCBs, PCQs 濃度を測定し比較検討した。対照群血液の平均 PCBs 濃度は 2.25 ppb, PCQs 濃度はすべて測定限界値以下であった。油症群血液の平均 PCBs 濃度は 6.41 ppb, PCQs 濃度は 0.61 ppb であった。すなわち PCBs 濃度は油症群血液の方が約 2.8 倍高値を示した。また毛髪では対照群の PCBs 平均濃度は 9.41 ppb, 油症群では 25.85 ppb を示し、やはり油症群の方が約 2.8 倍高値であった。一方毛髪中平均 PCQs 濃度は、対照群では検出限界値以下、油症群で 0.44 ppb であった。油症群、対照群とも

に PCBs 濃度は毛髪の方が血液よりも高値を示し、油症群の PCQs は血液の方が毛髪よりも高濃度であった。毛髪は毛嚢脂腺系の一部であり、以上の結果を加味して考えると、PCBs は PCQs よりも毛嚢脂腺系に親和性が強いことが示唆され、またこれらの塩素化合物の排泄経路として毛嚢脂腺系の重要性が窺われる。また毛髪中に PCQs が検出されれば、油症の原因である米ぬか油の摂取は明らかと思われる。毛髪は容易に標本として利用できることから、毛髪中の PCBs, PCQs などの測定を続ける意義は大きいものと考えられる。

スクアランのビーグル犬における2週間経口投与による残留性試験

株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所

神村英利・瀧上勝野

井上秀顕・児玉龍平

九州大学薬学部 衛生化学・裁判化学教室

吉村英敏

Studies on Distribution and Excretion of Squalane in Dogs Administered for 2 Weeks

Hidetoshi KAMIMURA, Katsuya FUCHIGAMI, Hideaki INOUE
and Ryuhei KODAMA

Laboratory of Safety Assessment, Panapharm Laboratories, Co., Ltd., Uto, Kumamoto 869-04

Hidetoshi YOSHIMURA

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University 62, Fukuoka 812*

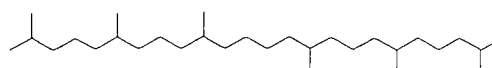
In the previous papers, we demonstrated, by using rats, that squalane (2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane) could stimulate the fecal excretion of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, the most important etiologic agent of Yusho, which was accumulated in the body of rat. We also reported that, in rats and dogs, squalane did not show any appreciable toxic signs during 3-month treatment, though a part of squalane was absorbed from gastrointestinal tract of dogs. In the present paper, we have investigated the elimination of absorbed squalane in beagle dogs.

During the treatment with squalane orally at a dose of 1200 mg/kg/day for 14 days, the fecal excretion of squalane per day was 65-90% of the daily dose. After the treatment (on the day 14), squalane levels in blood and hair were about 30 ppm and 14640 ppm, respectively. On the day 56 after the first dosing, squalane was not detected in blood. On the day 70, squalane level in hair was reduced to about 1% of that on the day 14. Squalane levels in skin, liver, adipose tissue and small intestine on the day 70 were also reduced compared with that on the day 42. Moreover, small amount of squalane was still excreted into feces from the day 15 to the day 70. These results suggested that absorbed squalane was gradually excreted through feces and skin in dogs.

はじめに

スクアラン (2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracosane, Fig. 1) は、特記すべき副作用なしに油症原因物質の排泄促進を行うことがラットで証明されている¹⁾。一方、本化合物はイヌにおいても毒性学的に問題ないものの、その連用は、いわゆる油毛と肝臓への蓄積を生じることが報告されている²⁾。また、雄性ビーグル犬にスクアランを 1200 mg/kg あて 1 日 1 回 3 週間経口投与すると、投与終了 2 週間後においてもなお、本化合物は体毛および肝臓から検出されるという³⁾。

そこで本研究では、ビーグル犬におけるスクアランの体内残留性を明らかにする目的で、本化合物を 1200 mg/kg あて 2 週間経口投与し、その後 8 週間にわたって休薬し、投与期間および休薬期間における本化合物の体内動態を検討した。



Squalane

Fig. 1 Structure of squalane

実験方法

1. 実験材料

スクアランは、九州大学油症研究班より提供された製品（日誠マリン工業株式会社，Lot No. 610811，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，ガスクロマトグラフ用充填剤の 2% OV-17 Chromosorb W AW DMCS はガスクロ工業（株）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

Hazleton Research Animals, Inc. (Box 5 Cumberland, Va 23040, U. S. A.) で生産された 5 カ月齢の雄性ビーグル犬 4 匹を株式会社日本医科学動物資材研究所（東京都練馬区春日町 6-10-40）より購入し，検疫馴化したのち，健康状態が良好であることを確認して，9 カ月齢で試験に使用した。スクアランの投与量は 1200 mg/kg とし，最新体重（週 1 回測定）をもとに必要量を算出して，1/8 オンス・ゼラチンカプセルに充填した。これをさらに 1/4 オンス・ゼラチンカプセルに充填し，1 日 1 回 14 日間連続経口投与した。

3. 分析用試料の採取および分析法

スクアラン初回投与後 2, 7, 14, 28, 42 日目（以上，各 4 匹），並びに初回投与後 56, 70 日目（以上，各 2 匹）に糞，血液，体毛を採取した。また血液と体毛は初回投与後 1 日目にも採取した。糞は全重量を測定した後，水で 50% ホモジネートとし，その約 50 ml を分析用試料とした。採血は橈側皮静脈より行い，採血量は 10 ml とした。体毛は背部の被毛を 5 cm × 5 cm の範囲で採取した。なお体毛の全重量は体表面積を基にして換算した。

スクアラン初回投与後 42 日目および 70 日目に各 2 匹を剖検し，組織を採取した。すなわち 16～18 時間絶食させた後，ペントバルビタール・ナトリウムを 30 mg/kg あて静脈内投与して麻酔し，頸動脈にカニユーレを挿入して放血致死させ，小腸，皮膚（背部の 5 cm × 5 cm），肝臓，腎臓，肺，腸間膜脂肪を採取した。採取した皮膚は重量を測定し，またその他の組織は全重量を測定した後，それぞれ約 10 g を分析用試料とした。

以上の全ての試料は分析に供するまで -80°C で凍結して保存した。

各試料中のスクアランの分析は，神村らの方法²⁾で行った。すなわち試料に 1 N 水酸化ナトリウム・エタノール 20 ml を加えて，沸騰水浴中で 2 時間煮沸後，

n-ヘキサン 20 ml ずつで 4～6 回抽出し，抽出液を合し，予め n-ヘキサンで洗浄した水 80 ml ずつで 3 回，抽出液を洗浄した。この抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後，ロータリー式エバポレーター（RE-46, Yamato）で約 5 ml に濃縮して，シリカゲル（Wako gel S-1, 和光純薬工業株式会社製）0.5 g を充填したカラムに注入した。カラムに n-ヘキサン 40～100 ml を注入してスクアランを溶出し，溶出液を適量に濃縮または希釈して，水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）にて分析した。なお，FID-GC による測定は Table 1 に示す条件で行った。

結 果

雄性ビーグル犬にスクアランを 1200 mg/kg あて 14 日間連続投与し，スクアランの糞中排泄量，血中濃度および体毛中濃度を経日的に測定した。その結果を Table 2 に示す。

投与期間中（初回投与後 14 日目まで）のスクアランの糞中排泄量は前日投与量の 65～90% 相当で，既報値¹⁾にほぼ一致した。初回投与後 28 日目（休薬 2 週目）および 42 日目（休薬 4 週目）におけるスクアランの糞中排泄量は投与最終日の投与量のそれぞれ約 0.44%，約 0.11% であり，56 日目（休薬 6 週目）および 70 日目（休薬 8 週目）における排泄量は，いずれも約 0.02% であった。

スクアランの血中濃度は，初回投与後 1 日目で約 4.5 ppm であり，以後，投与を重ねるにつれて上昇し，14 日目に約 30 ppm に達した。休薬 2 週目および 4 週目の血中スクアラン濃度は約 1 ppm で，休薬 6 週目および 8 週目では検出限界（0.1 ppm）以下となった。

スクアランは初回投与後 7 日目までは積算投与量の約 3% 相当が体毛に移行した。つまり毎日，その日の投

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

Apparatus	Hitachi 263-80 type
Glass column	3 mm × 2 m 2% OV-17 on Chromosorb W AW DMCS
Carrier gas	N ₂ , 30 ml/min
H ₂	1.2 kg/cm ²
Air	1.0 kg/cm ²
Column temperature	250°C
Injection port temperature	270°C

Table 2 Time course of fecal excretion, blood concentration and hair distribution of squalane in beagle dogs

	Fecal excretion	Blood concentration	Hair distribution
	% of dose	ppm	ppm (% of cumulative dose)
Day 1		4.48 ± 0.36	1474 ± 1360 (3.24 ± 3.06)
Day 2	65.29 ± 11.06	5.84 ± 0.96	3031 ± 1254 (3.61 ± 1.56)
Day 7	85.93 ± 3.16	12.63 ± 2.76	14417 ± 6860 (3.67 ± 1.68)
Day 14	89.56 ± 5.96	29.86 ± 10.55	14640 ± 10701 (1.97 ± 1.41)
Day 28	0.44 ± 0.46	1.29 ± 0.23	2542 ± 1956
Day 42	0.11 ± 0.04	1.52 ± 0.08	890 ± 603
Day 56	0.02	N. D.	156
Day 70	0.02	N. D.	126

Dogs were administered squalane at doses of 1200 mg/kg/day for 14 days.

Each value represents the mean ± standard deviation of 4 dogs, and figures at the day 56 and 70 represent the mean of 2 dogs.

N. D., not detectable (detection limit < 0.1 ppm)

与量の約3%ずつが体毛に移行したことになる。しかし体毛より外部環境に移行する量が不明であるので、1日当たり、どれだけのスクアランが体毛に移行するか、正確には不明である。7日目以後は投与終了の14日目までスクアランの体毛中濃度は定常状態となった。休薬6および8週目の体毛におけるスクアラン濃度は、それぞれ約156 ppm、約126 ppm、と、14日目のレベル（約14640 ppm）の1/100程度に低下した。なお、初回投与後7日目頃から油毛が観察されたが、休薬2週目頃には消失した。

休薬4週目および8週目におけるスクアランの組織分布量を Table 3 に示す。

休薬4週目（初回投与後42日目）における肝中スクアラン濃度は約1116 ppm（総投与量の0.13～0.20%）であったのに対して、休薬8週目では約82 ppm（総投与量の0.001～0.01%）であった。

休薬4週目において、スクアランは皮膚、腸間膜脂肪および小腸から検出され、それらの濃度はそれぞれ約120 ppm、約90 ppm、約21 ppmであった。休薬8週目（初回投与後70日目）では、2例中1例はこれらの組織からスクアランは検出されなかった。別の1例では腸間膜脂肪のみからスクアランが検出されたが、その濃度は約28 ppmで、休薬4週目の2例のデータ（約90 ppm）と比べると低かった。

Table 3 Tissue distribution of squalane in beagle dogs

	At day 42	At day 70
	ppm	
Skin	120.30	N. D.
Liver	1115.92	81.66
Lung	N. D.	N. D.
Kidney	N. D.	N. D.
Adipose tissue	90.19	28.01*
Small intestine	20.68	N. D.

Dogs were administered squalane at doses of 1200 mg/kg/day for 14 days. Each value represents the mean of 2 dogs.

* The value is from one dog and that of the other is N. D.

N. D., not detectable (detection limit < 0.1 ppm)

考 察

炭素数30の飽和炭化水素であるスクアランは、ラットにおいて油症原因物質の糞中排泄を促進し、その毒性を軽減することが知られている¹⁾。さらに本化合物は、長期連用しても毒性学的に特に問題がないこともラットおよびイヌを用いて証明されている¹⁾²⁾。このうちラットでは、スクアランは消化管からほとんど吸収されないのに対して¹⁾、イヌではわずかに吸収され、吸収量の少量は糞中に排泄されるが、大部分は皮膚から

排出され、体毛に移行付着する²⁾。この体毛への付着性のため、高用量のスクアランを長期間投与したイヌでは、いわゆる油毛が生じる²⁾。加えてイヌにおいて肝臓に分布したスクアランの消失は緩慢であるため、長期間の連用によって蓄積される²⁾。以上の結果に基づき、ビーグル犬にスクアラン 1200 mg/kg あて 1 日 1 回 14 日間経口投与した後、8 週間にわたって休薬し、投与期間および休薬期間における本化合物の体内動態を検討した。

投与期間中におけるスクアランの糞中排泄量は前日投与量の 65–90% 相当であり、また投与終了後において、スクアランの糞中排泄量は経日的に減少したものの、休薬 8 週目においても投与最終日の投与量の約 0.02% が認められた。投与期間中におけるスクアランの多量の糞中排泄は、主として未吸収分と考えられる。一方、肝臓をはじめ検討した全ての組織において、休薬 8 週目のスクアラン濃度は休薬 4 週目のそれよりも低かったことから、休薬期間におけるスクアランの糞中排泄は、投与期間中の吸収分の一部が排泄されることによると考えられる。

これまでにビーグル犬にスクアランを 1200 mg/kg あて 1 回経口投与すると、体毛におけるスクアランは投与後 3 日目頃にピークとなり、投与後 7 日目までに大部分が消失すること、および体毛を n-ヘキサンで洗浄すると、体毛分布量の約 90% が洗液中に回収されることが明らかにされている²⁾。今回の検討において、スクアランの体毛分布量は、初回投与後 7 日目まで 1 日当たり、投与量の約 3% ずつ増加した。7 日目以後、投与終了時までには定常状態となり、その後は休薬期間の長さに依存して減少した。これらの結果は、吸収されたスクアランが皮膚から排出され、体毛を経て外部環境中に移行したためと考えられる。事実、本研究において初回投与後 7 日目頃から観察された油毛は、休薬 2 週目頃には、ほぼ消失した。なお、体毛に分布したスクアランの約 10% は、その実質中に存在する²⁾。今回、休薬 8 週目において皮膚からスクアランは検出されなかったのに対して、体毛からは約 126 ppm の濃度で認められたこと、および休薬 8 週目における体毛中スクアラン濃度は休薬 6 週目のそれ（約 156 ppm）と大差ないことから、休薬 6 および 8 週目に体毛から検出されたスクアランは、その実質中に存在したものと考えられる。

すでに述べたように、イヌ肝臓中からのスクアランの消失が緩慢であることは、本化合物の体内動態の特徴である。たとえば雄性ビーグル犬にスクアランを

1200 mg/kg あて 1 日 1 回 3 週間、経口投与したところ、投与終了後 14 日目においても、終了時（約 3450 ppm）の約 27% に当たる約 929 ppm のスクアランが肝臓中に存在しているという³⁾。このことから、高用量のスクアランを連用すると、投与を中断した後も比較的長期にわたって本化合物が肝臓中に残留することが予想される。今回、休薬 8 週目においてもなお、スクアランは肝臓中から検出された。しかし、そのレベルは約 82 ppm であり、休薬 4 週目のそれ（約 1116 ppm）の約 7% であった。今回は投与終了時の肝中スクアラン濃度を測定していないが、得られたデータでみれば、8 週間の休薬期間で、かなりの量のスクアランは肝臓中から消失することが明らかとなった。

総 括

雄性ビーグル犬にスクアランを 1200 mg/kg あて 1 日 1 回 14 日間経口投与した後、8 週間にわたって休薬し、投与期間および休薬期間における本化合物の体内動態を検討した。

1) 投与期間中のスクアランの糞中排泄量は、前日投与量の 65–90% 相当で、経口投与されたスクアランの多くは未吸収のまま排泄されることが確認された。休薬期間において、スクアランの糞中排泄量は経日的に減少したが、休薬 8 週目においてもなお、わずかながら認められた。休薬期間における糞中スクアランは、投与期間中の吸収分の一部が排泄されることによると考えられる。

2) 吸収されたスクアランの大部分は、皮膚を介して体毛に移行するため、今回の本化合物の体毛分布パターンは、投与 7 日目まで経日的に増加、以後、投与終了時まで定常状態であり、その後は休薬期間の長さに依存して低下するというものであった。

3) 肝臓からのスクアランの消失は緩慢であるため、本化合物は連用によって、肝臓に高濃度で蓄積するが、今回の検討によると、休薬 8 週目には、かなりの量のスクアランが肝臓から消失することが明らかとなった。

以上の結果から、スクアランの臨床応用の際に、患者体内に本化合物を高濃度に残留させることなく、油症原因物質の排泄促進を行うためには、その投与スケジュールの中に、ある程度の休薬期間を設置することが適切と考えられる。

謝 辞

スクアランを提供下さいました日誠マリン（株）に深く感謝致します。

文 献

- 1) 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) 神村英利, 古賀信幸, 小栗一太, 吉村英敏, 井上秀頭, 佐藤喜代隆, 大久保満伸: イヌにおけるスクアランの体内動態と安全性, 福岡医誌 80: 269-280, 1989.
- 3) 摂南大学薬学部 (樫本 隆): ビーグル犬におけるスクアランの 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl 排泄促進効果に関する報告書 (1988).

米ぬか繊維及びコレステラミン投与ラットにおける 消化管内 PCBs の濃度推移

福岡県衛生公害センター 保健科学部
檜崎 幸範・森田 邦正・深町 和美
常盤 寛・高橋 克巳

Concentration Profile of PCBs in the Digestive Tract of Rat Fed with Cholestyramine and Rice Bran Fiber Diet

Yukinori NARAZAKI, Kunimasa MORITA, Kazumi FUKAMACHI,
Hiroshi TOKIWA and Katsumi TAKAHASHI

*Department of Health Science, Fukuoka Environmental Research Center, 39
Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-01*

The aim of this study is to examine the inhibitory effect of rice bran fiber (RBF) and cholestyramine for intestinal absorption of polychlorinated biphenyls (PCBs).

Sixteen rats were orally given at the dose of 100 mg of PCBs per kg of the animal, and were divided into four groups (A-D): Rats in each group were housed with the normal diet for the first 7 days, and subsequently, were given with the same diet as control for group A, with the diet containing 10% RBF for group B, with the diet containing 5% cholestyramine for group C and with the combined diet containing 10% RBF and 5% cholestyramine for group D for the next 10 days.

All rats were sacrificed on the 17th day after PCBs administration, and PCBs in contents of the digestive tracts were determined: small and large intestine resected was divided into two parts each of the same length, and the contents were chemically analyzed to determine PCBs.

PCBs concentration in rats of group A decreased in order of upper portions (1.0 $\mu\text{g/g}$) and then lower (0.6 $\mu\text{g/g}$) of small intestine, and upper (0.5 $\mu\text{g/g}$) and then lower (0.4 $\mu\text{g/g}$) of large intestine. Decreasing the PCBs concentration might be due to re-absorption in the intestine.

In the case of groups B-D, PCBs concentration was in order of upper and then lower of small intestine, and large intestine.

It was indicated that PCBs re-absorption in intestine is inhibited by the intake of RBF, cholestyramine, and RBF and cholestyramine.

は じ め に

一般に有機塩素化合物は脂溶性かつ難代謝性で、一旦体内に吸収されると体外への排出は容易でない。しかしながら、昭和43年西日本一帯で発症したカネミ油症患者の体内PCBs濃度はわずかながら減少している事実がある。これは、乳腺⁷⁾や皮脂腺⁴⁾からの分泌及び胃腸からの排泄によるものとされており、吸収されたPCBsは動物実験でラットの小腸壁を通じて腸管腔に排泄されることが確認されている¹⁴⁾。また、ヒトの

大便中への排泄も認められている。ただ、油症患者の体内にはPCBs等油症関連物質が今なお高濃度に蓄積しており、早期の排泄促進が望まれている。

油症治療法の一環として検討されたコレステラミンは、殺虫剤クロルデコン中毒患者の治療に投与経験を持つことで知られており²⁾³⁾、PCBsの排泄にも効果があると報告されている¹²⁾⁶⁾。また、非水溶性の食物繊維は、消化管機能への影響が認められ、腸の運動を亢進し便秘の解消、糞便量の増加及び大腸癌の予防効果等の生理作用を有する他、化学物質の吸着作用も指摘さ

れている¹⁰⁾。我々は油症原因物質の一つである PCBs を対象とし、米ぬか繊維 (RBF) 及びコレステラミンをラットに経口投与した。その結果、RBF、コレステラミン共に PCBs の糞中排泄の促進が確認され、さらにその併用による効果が最も顕著であることも判明した¹¹⁾。

未変化の PCBs の排泄は尿中からはわずかで、ほとんどが糞中に確認されている。一般に、量的には重要視されていないが、胃腸から薬物排泄の可能性は確認されており、胃では塩基性物質が、小腸以下では弱酸性化合物が排泄されることが証明されている。PCBs の主な排泄部位は小腸壁と云われており、容易に代謝を受けず、安定な PCBs をわずかでも体外に排泄する意義は大きい。

油症治療の課題は蓄積組織からの原因物質の排泄促進による毒性軽減はもちろんであるが、消化管内に排泄される PCBs の再吸収抑制機能の検討もまた重要とされる。本研究では RBF、コレステラミンを用い、PCBs を経口投与したラットの消化管内容物中の PCBs 量を測定し、腸管腔に排泄された PCBs が糞中に排泄されるまでの濃度推移を検討した。

実験方法

1. 試薬

PCBs は和光純薬工業 (株) 製 KC 600 を用いた。コレステラミンは (株) ブリストル・マイヤーズから供与されたものを使用した。RBF は Prosky-AOAC 法⁸⁾ に準じて、米ぬかから精製した。飼育期間中にラットに摂食させたコントロール食の組成はセルロース (10%)、カゼイン (20%)、シュクロース (60%)、オリエンタル酵母社製ビタミン混合 (0.85%)、オリエンタル酵母社製ミネラル混合 (4%)、コーンオイル (5%)、塩化コリン (0.15%) であった。

ヘキサンは和光純薬工業 (株) 製残留農薬用を、硫酸は有害金属用を用いた。その他の試薬はすべて同社の試薬特級を用いた。

2. 動物実験

ウィスター系雄性ラット (4 週齢、平均体重 71 g) を 1 群 4 匹として 4 群 (A-D 群) に分けて使用した。各群には PCBs 100 mg/kg を 1 回経口投与した。最初の 1 週間はコントロール食で飼育した後、8 日目からは B-D 群にはそれぞれ 10% RBF 食、5% コレステラミン食及び 10% RBF と 5% コレステラミンの割合で配合した食餌を自由に与えた。なお A 群は引き続きコントロール食で飼育した。

各群のラットを 17 日目に屠殺して、胃、小腸上部、小腸下部、大腸上部、大腸下部の 5 部位に分け内容物を採取した。なお、小腸 (十二指腸、空腸、回腸を含む)、大腸 (盲腸、結腸、直腸を含む) はそれぞれ 2 等分し、上部、下部とした。各部位の消化管内容物は、70° で一夜乾燥させ重量を測定した。

3. PCBs の測定

消化管内容物は全量を用い、1.5 N 水酸化カリウム-エタノール溶液 10 ml を加え、80° 水浴中で 1 時間アルカリ分解を行った。その後、水 10 ml を加え n-ヘキサン 10 ml で 3 回抽出した。抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、硫酸処理し ECD 付きガスクロマトグラフ (GC) で分析した。

GC は ⁶³Ni-ECD 付きの島津 GC-7A を使用した。カラムは 1.5% シリコン OV-1、クロモソルブ W (AW-DMCS), 80~100 mesh を充填したガラスカラム (2.1 m×2.6 mmφ) を使用した。キャリアガスには窒素ガスを使用し、40 ml/min で流した。カラム及び検出器温度はそれぞれ、210° 及び 280° に維持した。PCBs は既知量の KC-600 を標準物質として、標準物質の総ピーク高さを検体の総ピーク高さと比較し、定量した。

実験結果及び考察

1. ラットの体重及び食餌摂取量

Table 1 に示すように 8 日目以降、食餌を変えてもコントロール食群、10% RBF 食群、5% コレステラミン食群、10% RBF と 5% コレステラミン併用食群にそれぞれ有意な体重差は認められなかった。また各群のラットの食餌摂取量にも顕著な変化はなかった。さらに、17 日目の外観上の変化及び消化管の肉眼的異常も観察されず、飼育期間中、栄養障害等の発育に与える影響は認められなかった。

2. 消化管内容物の乾燥重量

PCBs の糞中排泄量が安定する 17 日目に屠殺し、採取した消化管内容物の乾燥重量を Table 2 に示した。各群における消化管内容物の部位別重量に有意な差は認められなかった。

消化管内容物の全量をコントロール食群と比較すると、10% RBF 食群が 0.5 倍、5% コレステラミン食群が 1.0 倍、10% RBF と 5% コレステラミン併用食群が 1.5 倍であった。

10% RBF と 5% コレステラミン併用食群の消化管内容物の重量が各群より高いのは食餌に含まれる難消化性物質の含量が多いためである。また、10% RBF 食群の重量が低いのは、RBF の特性である腸内通過時間

Table 1 Body weight gain and food consumption of rats administered with PCBs (100 mg/kg, p. o.)

Diet	Body weight		Food consumption	
	first	final	from 1 to 7 days	from 8 to 17 days
Control diet	69.9	186.8	94.7	137.3
10% RBF diet	72.0	167.7	92.9	127.7
5% Cholestyramine diet	71.3	163.2	107.7	136.9
10%RBF and 5%Cholestyramine diet	69.5	169.9	109.3	143.1

Each data represents the mean value of body weight (g) and food consumption (g) for four rats.

Table 2 Distribution of contents in digestive tract of rats

Diet	Stomach	Small intestine		Large intestine	
		upper	lower	upper	lower
Control diet	0.692	0.130	0.279	0.402	0.862
10%RBF diet	0.318	0.052	0.156	0.260	0.500
5% Cholestyramine diet	0.782	0.084	0.383	0.516	0.645
10% RBF and 5% Cholestyramine diet	1.742	0.180	0.473	0.469	0.586

Each data represents the mean value of dry weight (g) of content for three or four rats.

Table 3 Excretion of PCBs into digestive tract of rats

Diet	Stomach	Small intestine		Large intestine	
		upper	lower	upper	lower
Control diet	123.4	121.0	270.7	179.1	294.8
10% RBF diet	160.7	24.4**	169.7	341.9*	664.4**
5% Cholestyramine diet	132.7	34.2**	272.6	436.9*	513.2
10% RBF and 5% Cholestyramine diet	272.7	151.3	413.2	608.3**	725.4**

Each data represents the mean value of PCBs (ng) for three or four rats.

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

** Significantly different from the control ($p < 0.01$)

の短縮や保水性により RBF が膨潤し体積増加を起こしたためと推測される。

3. 消化管内容物中の PCBs 量

消化管内容物中における PCBs 量を Table 3 に示した。胃、小腸上部、小腸下部、大腸上部、大腸下部の全ての内容物から PCBs は検出され、体内に取り込まれた PCBs が再び消化管内へ分泌されていることが確認された。

10% RBF 及び 5% コレスチラミン食群における小腸上部内の PCBs 量が有意に低いのは、内容物量が極めて少なかったためと思われる。大腸内 PCBs 量は 10% RBF と 5% コレスチラミン併用食群が最も高く、コントロール食群の 2.8 倍、10% RBF、5% コレスチラミン食群ではそれぞれ 2.1 倍、2.0 倍であった。

PCBs 投与後、17 日目に消化管内に分泌された PCBs の総量は投与量に対しコントロール食群、10% RBF 食群、5% コレスチラミン食群及び 10% RBF と

5% コレスチラミン併用食群でそれぞれ 0.014、0.019、0.020、0.031% であった。また同様にコントロール食群と比べてそれぞれ 1.4 倍、1.4 倍、2.2 倍に増加した。

4. 消化管内容物中の PCBs 濃度

各部位における内容物中の PCBs 濃度を Fig. 1 に示した。コントロール食群での消化管内容物中の PCBs 濃度は、小腸上部がもっとも高く、胃の 4.7 倍に増加した。PCBs 濃度は小腸下部、大腸と減少し、大腸内濃度は小腸の 50.5% であった。PCBs 濃度が小腸上部を最高にして減少傾向を示したのは小腸壁から分泌された PCBs が再吸収されることを示している。また、大腸上部と下部の間では PCBs 濃度に大きな差は認められず、大腸が PCBs の吸収、排泄に影響しないことを示唆している。

10% RBF 食群、5% コレスチラミン食群及び 10% RBF と 5% コレスチラミン併用食群の消化管濃度推

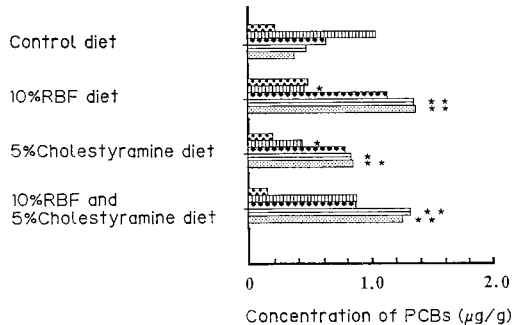


Fig. 1 Concentration of PCBs in digestive tract in rats

■ Stomach,
 ■ Small intestine (upper),
 ■ Small intestine (lower),
 ■ Large intestine (upper),
 ■ Large intestine (lower),

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

** Significantly different from the control ($p < 0.01$)

PCBs concentration histogram was represented as the mean value for three or four rats.

移をみるといずれも小腸上部より下部あるいは大腸での濃度の方が高く、コントロール食群とは逆の傾向を示した。また、大腸内濃度はコントロール食群に対し有意に高く、それぞれ3.2倍、2.0倍、3.0倍に増加した。

一種の陰イオン交換樹脂で難吸収性高分子化合物であるコレステラミンはPCBsのリンパ吸収に必要な胆汁酸とイオンの吸着によりPCBsの糞中排泄量を増加させると云われている。

一方、ヒトの十二指腸に分泌される胆汁酸の95%以上は回腸から再吸収されるが¹³⁾、食物繊維に吸着された胆汁酸は回腸からの再吸収を阻害し、糞中排泄を高める⁹⁾。その能力はコレステラミンの20~60%に相当し、非イオンの比較的弱い結合であるとされている⁵⁾。RBFのPCBs排泄機構に及ぼす影響は、胆汁酸の吸着によるコレステラミンと同様の作用やコレステロールなどの脂溶性物質の吸着¹⁾により、これに溶解したPCBsが同時に排泄されるのかもしれない。また、RBFは吸水性のあるセルロースの他、脂溶性のリグニン等からなり、PCBsの吸着はこの脂溶性部位への直接的な吸着の可能性もある。

さらに、RBFとコレステラミンとの併用は試験管内で水中拡散を抑制させる。腸管内のPCBsミセルの拡散阻害は、腸管内の吸収上皮への接触を抑制し、間接的にPCBsの再吸収を抑え、排泄促進を助長するものと考えられる。

総 括

我々は、一旦吸収されたPCBsが再度消化管内に分泌される事実を確認すると共に、それが体外に排泄されるまでの濃度推移を検討した。PCBs(100 mg/kg)を1回経口投与したラットを用い、コントロール食群、10% RBF食群、5%コレステラミン食群、10% RBFと5%コレステラミン併用食群に分け、17日目の各消化管内内容物中のPCBs量を測定した。

10% RBF食群、5%コレステラミン食群及び10% RBFと5%コレステラミン併用食群における17日間の飼育ではラットの成長に特に影響は認められなかった。胃、小腸上部、小腸下部、大腸上部、大腸下部の全部位の内容物中からPCBsは検出された。PCBsは胆汁中に排泄されないことが確認されており、胃腸壁はラットにおける重要な排泄部位と思われる。

コントロール食群のPCBs濃度推移は小腸上部を最高に小腸下部、大腸の順で減少傾向を示し、腸管腔におけるPCBsの再吸収が確認された。また、10% RBF食群、5%コレステラミン食群及び10% RBFと5%コレステラミン併用食群では消化管の下方ほどPCBs濃度は増加し、腸管腔での再吸収抑制機能が認められた。PCBs濃度の増加はコレステラミンの胆汁酸吸着による間接的な作用やRBFのコレステラミン様作用及び直接的な吸着等により、消化管内内容物に保持されたPCBsの再吸収を阻害することで説明される。

以上の結果から、今回の排泄促進は、胃腸管腔に分泌されたPCBsをRBF、コレステラミンの物理化学的作用及び両者の併用による効果によって、そのまま糞中に蓄積させることで排泄を促進している事実を明らかにした。

文 献

- 1) Balmer J and Zilversmit DB: Effect of dietary roughage on cholesterol absorption, cholesterol turnover and steroid excretion in the rat. *J. Nutr.* 104: 1319, 1974.
- 2) Boylan JJ, Egle JL and Guzelian PS: Cholestyramine use as a new therapeutic approach for chlordecone (Kepone) poisoning. *Science* 199: 893-895, 1978.
- 3) Cohn WJ, Boylan JJ, Blanke RV, Fariss MW, Howell JR and Guzelian PS: Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine. Results of a controlled clinical trial. *New Eng. J.*

Med. 298:243-248, 1978.

4) 五島應安, 樋口謙太郎: 油症(塩化ビフェニール中毒症)の皮膚科学的症候論, 福岡医誌 60: 409-431, 1969.

5) 印南 敏, 武田秀敏, 桐山修八: 食物繊維 1, pp 57-79, 第一出版, 東京, 1985.

6) Kamimura H, Koga N, Oguri K, Yoshimura H, Honda Y and Nakano M: Enhanced faecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats by long term treatment with active charcoal beads. *Xenobiotica* 18:585-592, 1988.

7) Masuda Y, Kagawa R and Kuratsune M: Comparison of polychlorinated biphenyls in Yusho patients and ordinary persons. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11:213-216, 1974.

8) Prosky L, Asp N-G, Furda I, Devries JW, Schweizer TF and Harland BF: Determination of total dietary fiber in foods and food products, Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68: 677-679, 1985.

9) Reddy BS, Watanabe K and Sheinfil A:

Effect of dietary wheat bran alfalfa, pectin and carrageenan on plasma cholesterol and fecal bile acid and neutral sterol excretion in rats. *J. Nutr.* 110:1247-1254, 1980.

10) Takenaka S, Morita K, Tokiwa H and Takahashi K: Binding of PCBs, PCDFs and PCDDs to rice bran fiber. *Eisei Kagaku* 35:33, 1989.

11) Takenaka S, Morita K, Tokiwa H and Takahashi K: Effect of rice bran fibre and cholestyramine on the faecal excretion of Kanechlor 600 (PCBs) in rats. *Xenobiotica* in press.

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

13) 内田清久: 胆汁酸の代謝回転, 代謝 10: 1090-1106, 1973.

14) 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.

米ぬかファイバーおよびコレスチラミンを用いた ラット糞便中への PCB 排泄促進

福岡県衛生公害センター

竹中重幸・森田邦正・高橋克巳

Stimulation of the Fecal Excretion of Polychlorinated Biphenyls (KC-600) by Diets Containing Rice Bran Fiber and Cholestyramine

Shigeyuki TAKENAKA, Kunimasa MORITA and Katsumi TAKAHASHI

*Fukuoka Environmental Research Center, 39 Mukaeda Mukaizano,
Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01*

Among the eight kinds of dietary fiber tested, rice bran fiber (RBF) mostly bound Kanechlor 600 (PCB) *in vitro*. The PCB bound to dietary fiber was in proportion to the lignin content in dietary fiber. We investigated whether RBF, lignin, cholestyramine and their combination stimulate the fecal excretion of PCB in rats.

In the group fed a diet containing 10% (w/w) RBF, fecal excretion of PCB was stimulated. In the group fed a diet containing 10% (w/w) RBF and 5% (w/w) cholestyramine, more PCB was excreted in the feces. However, the group fed a diet containing 10% (w/w) RBF and 5% (w/w) lignin excreted the same amount of PCB as the group fed a diet containing 10% (w/w) RBF. The total PCB excreted into the feces for 21 days in the groups fed 10% (w/w) RBF, 10% (w/w) RBF and 5% (w/w) lignin, 5% (w/w) cholestyramine and 10% (w/w) RBF and 5% (w/w) cholestyramine diet was 3.4, 3.8, 2.3 and 5.7 times, respectively, that of the control. The stool transit time of rats fed 10% (w/w) RBF and 5% (w/w) cholestyramine diet was one hour faster than that of rats fed a 5% (w/w) cholestyramine diet. Therefore, we concluded that RBF has the greatest effect when administered in combination with cholestyramine on the fecal excretion of PCB.

はじめに

1968年に西日本一帯で発生したカネミ油症事件は発生後、23年を経過し、患者は発症当初の特異的臨床諸症状はほとんど認められなくなりつつあるが、患者体内には健常者に比べ、高濃度の Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated dibenzofurans (PCDF), Polychlorinated quaterphenyls 等の原因物質が残留していることが証明された²⁾。これらの原因物質を体外に排除する油症の根本的な治療実験の一環として最近、コレスチラミン、スクアランおよび活性炭ビーズにより2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (PenCDF) のラットにおける糞中排泄を促進することが報告されており³⁾⁴⁾¹²⁾¹³⁾、コレスチラミンによる油症患者への治療実験も試みられた。一方、食物繊維である米ぬかファイバー (RBF) は便秘改善効果

に加え、*in vitro* において有機塩素系農薬を始めとする PCB, PCDF, Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin をよく吸着することから⁷⁾、患者体内に残留する油症原因物質の糞便中への排泄促進効果が期待される。

カネミ油症事件はカネクロール 400 で高濃度に汚染されたライソオイルを摂取したことによる亜急性中毒であるが、23年を経た現在、患者の血液、臓器等に残留する PCB は高塩素化合物が多く、必ずしも KC-400 のガスクロマトグラムにみられるピーク組成を反映していない。さらに、静脈内投与された 2,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl および PenCDF の未変化体は微量ながら糞便中に排泄されることがラットを用いた実験により確認されており⁸⁾¹¹⁾、PCB および PCDF の未変化の高塩素化体は同様に糞便を経由し排泄されると考えられる。そこで、我々はカネクロール 600 (KC-600) を用いて、食物繊維の PCB (KC-600) 吸着能および

ラットにおける PCB の糞便中への排泄に及ぼす RBF とコレステラミンの効果を検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬

PCB 標準物質としての KC-600 は和光純薬工業（株）製を、コレステラミンおよびリグニンはそれぞれ、アルドリッチ社製および東京化成（株）製を使用した。ヘキサン、エタノールおよび無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業（株）製、残留農薬試験用を使用した。カルミンレッドは東京化成工業（株）製を、その他の試薬は市販の試薬特級を使用した。

2. 食物繊維の調整

8 種類の食物繊維（米ぬか、とうもろこし、小麦ふすま、椎茸、ほうれん草、ひじき、おから、さつまいもおよびごぼう）は Prosky らの方法⁶⁾ に準じて調整した。また、動物実験に使用した RBF の組成は van Soest らの方法⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ で分析し、タンパク質（14.1%）、脂質（0.2%）、灰分（19.3%）、ヘミセルコース（28.5%）、セルコース（14.0%）、リグニン（11.4%）、水分（6.0%）および可溶性無窒素物（6.5%）であった。

3. *in vitro* における食物繊維の PCB 吸着能

PCB の食物繊維への吸着能の測定は前報⁷⁾ に準じて行った。すなわち、各々の食物繊維 40 mg を精秤し、蒸留水 2 ml で湿潤し、2 ml のメタノールに溶かした PCB（4 μ g）を加え、37°C で 30 分インキュベートした。その後、2,500 rpm で 10 分間、遠心分離を行い、上清 2 ml を採取した。この上清に 2%（w/v）硫酸ナトリウム溶液 2 ml を加え、ヘキサン 1 ml で 1 回抽出を行った。抽出液は硫酸処理後、未吸着の PCB を ⁶³Ni 電子捕獲型検出器（⁶³Ni-ECD）付きガスクロマトグラフ（GC）を用いて分析した。

4. 動物実験

a) 実験-1

ウィスター系雄性ラット、4 週令、体重 80~100 g を成和実験動物（株）より購入し、1 群 4 匹として 4 群（A~D 群）に分けて使用した。ラットは実験を開始するまでコントロール食（オリエンタル酵母社製、AIN-76A 配合）で飼育した。コントロール食の組成はコーンスターチ（41.5%）、カゼイン（25%）、アルファスターチ（10%）、セルコースパウダー（8%）、サラダオイル（6%）、ミネラル混合（3.5%）、ビタミン混合（0.8%）、グラニュー糖（5%）および重酒石酸コリン（0.2%）である。各群共にサラダオイルに溶かした

PCB を 100 mg/kg、経口投与し、A 群はコントロール食で 4 週間飼育し、B、C および D 群は 1 週間目までコントロール食で飼育した後、8 日目からそれぞれ、10%（w/w）RBF、5%（w/w）RBF および 1%（w/w）RBF の割合でコントロール食と混合した食餌で 3 週間飼育した。ラットは代謝ケージに個別に収容し、水と食餌は自由に与えた。排泄された糞便は毎日採取し、70°C で一晩乾燥した後、重量を測定した。食餌量および体重も定期的に測定した。

b) 実験-2

上記と同様のラットを 1 群 3 匹、6 群（A~F 群）に分けて使用した。A 群はサラダオイルを経口投与後、コントロール食で 4 週間飼育した。B~F 群は同条件で PCB を投与した後、B 群はコントロール食で 4 週間、他の群は 1 週間目までコントロール食で飼育し、8 日目からそれぞれ、10%（w/w）RBF、10%（w/w）RBF と 5%（w/w）リグニン、5%（w/w）コレステラミンおよび 10%（w/w）RBF と 5%（w/w）コレステラミンの割合でコントロール食に配合した食餌で 3 週間飼育した。ラットの飼育条件、体重および食餌量の測定は上記の通りである。また、実験終了後は血液、肺臓、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、胸腺および腸間膜脂肪組織を採取した。小腸は生理食塩水で 3 回洗浄し、内容物を洗い落とした。

c) 実験-3

上記と同様のラットを 1 群 4 匹、5 群（A~E 群）に分けて使用した。カルミンレッドを 0.5%（w/w）の割合で、コントロール食、10%（w/w）RBF 食、10%（w/w）RBF と 5%（w/w）リグニン併用食、5%（w/w）コレステラミン食および 10%（w/w）RBF と 5%（w/w）コレステラミン併用食に添加し、それぞれ、A、B、C、D および E 群とした。ラットが食餌を摂取し始めるのを確認した後、糞便中にカルミンレッドの赤色が認められるまでの時間を測定し、消化管内滞留時間とした。

4. PCB の抽出と分析

血液は 5 g、腸間膜脂肪組織は 1 g、糞便は 0.1~2 g、脾臓、腎臓、肝臓、肺臓、胸腺、および小腸はすべてを分析に供した。これらの検体は 1.5 N 水酸化カリウム-エタノール 20 ml で 1 時間、80°C でアルカリ分解を行い、ヘキサン 10 ml で 3 回抽出した。抽出液は蒸留水 10 ml で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。この抽出液をヘキサンで 50 ml に定容し、一部を 1 ml の 5%（v/v）発煙硫酸で処理した後、2,500 rpm で遠心分離し、ヘキサン層を GC で分析した。

GCの分析条件は以下のとおりである。GCは ^{63}Ni -ECD付きの島津GC-6Aを使用した。カラムは2%シリコンOV-1, クロモソルブW (AW-DMCS), 80~100 meshを充填したガラスカラム (2.1 m×2.6 mmφ)を使用した。キャリアガスには窒素ガスを使用し, 40 ml/min (2 kg/cm²)で流した。カラムおよび検出器温度はそれぞれ, 210° および 280° に維持した。

PCBは既知量のKC-600を標準物質として, 標準物質の総ピーク高さを検体の総ピーク高さと比較して, 定量した。

結 果

1. *in vitro* における食物繊維のPCB吸着能

Fig. 1 に 8 種類の食物繊維のリグニン含量と食物繊維のPCB吸着能との相関を示した。米ぬかの食物繊維であるRBFはとうもろこし, 小麦ふすま, 椎茸, さつまいも等に比較すると, PCBの吸着能は約1.6~2.5倍であり, リグニン含量は約6.7倍であった。これ

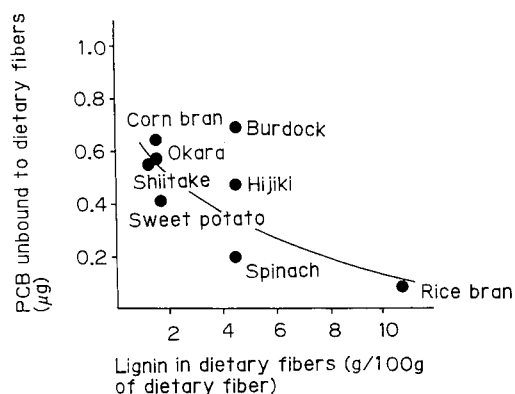


Fig. 1 Correlation between the content of lignin and the binding of PCB in various dietary fibers.

PCB dissolved in methanol was added to the dietary fiber (40 mg), and the final concentration in the incubation medium was 1 μg/ml of PCB. The incubation mixture was incubated at 37°C for 30 min, and centrifuged at 2,500 rpm for 10 min. A 2% (w/v) of sodium sulfate solution was added to the upper layer, which was then extracted with *n*-hexane. The *n*-hexane layer was treated with conc. sulfuric acid, and analyzed by ^{63}Ni -ECD-GC (Shimadzu GC-6A). Lignin was analyzed by the methods of Van Soest *et al.* (Ref. 8, 9, 10) Each point represents the mean of two determinations.

らの結果から, 食物繊維のリグニン含量とPCB吸着能との間には正の相関が認められるが, ごぼうや, ほうれん草の食物繊維のようにリグニン含量だけではPCBの吸着が説明できないものもあった。この実験により, 最もPCB吸着能が高かったRBFを以後の実験に使用した。

2. 糞便中へのPCB排泄に及ぼす食餌中へのRBF添加量

Fig. 2 はコントロール食に10%, 5%および1%のRBFを混合した食餌でラットを3週間飼育した時の糞便中へ排泄されたPCB量を示したものである。PCB (100 mg/kg) を経口投与後, コントロール食で1週間飼育した間に糞便中に排泄されたPCBの総量は各群共に約13%程度であった。8日目から各食餌に交換し, 3週間飼育した結果, 糞便中に排泄されたPCB量は9日目にピークに達し, 徐々に減少していった。この3週間に排泄されたPCBの総量は10% RBF食群でコントロール食群の約3.4倍, 5% RBF食群で約1.6倍であった。1% RBF食群では有意な差を認めることができなかった。この糞便中へのPCBの排泄促進は排泄される糞便重量と比例しており, 10% RBF食群ではコントロール食群の1.7倍, 5% RBF食群では1.3倍の糞便の排泄があった。次に, RBFのPCB吸着能にリグニン含量との正の相関がみられることを

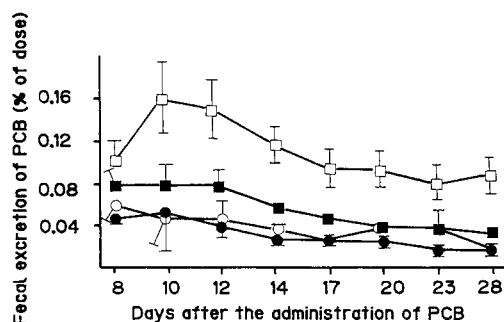


Fig. 2 Influential rate of RBF containing in diet on the fecal excretion of PCB in rats.

—○— Group A (Control diet), —□— Group B (10% RBF diet), —■— Group C (5% RBF diet), —●— Group D (1% RBF diet)

Each point represents the mean (% of dose) ± SD for four rats. Each group was given its diet on the 8th day following the administration of PCB (100 mg/kg). The fecal excretion of PCB for 21 days of the diets for Groups B and C significantly differed from that of Group A, $p < 0.05$.

上述したが、このリグニン含量を増加させた場合、また、油症治療実験に使用されたコレステラミンには副作用として便秘等が挙げられているが、このコレステラミンを併用させた場合、糞便中への PCB の排泄がどう変化するか、実験を行った。

3. 糞便中への PCB 排泄に及ぼすコレステラミンおよびリグニン添加 RBF 食

in vitro において RBF の PCB の吸着はリグニン含量と相関があったこと、PCB の糞便中排泄に及ぼす RBF の添加量は 10% RBF 食群において最も効果が高かったことは既に述べたとおりである。そこで、10% RBF 食をベースとして 5% (w/w) コレステラミンおよび 5% (w/w) リグニンを添加した場合に、PCB の糞便中排泄がどう変化したかを Fig. 3 に示した。PCB (100 mg/kg) を経口投与した後、1 週間目までの糞便中への PCB の排泄は上述した実験結果とさほど変化がなかった。8 日目から 21 日間に排泄された糞便中 PCB の総量は 10% RBF と 5% リグニン併用食群と 10% RBF 食群とを比較して、有意な差は認められな

かったが、10% RBF と 5% コレステラミン併用食群では 5% コレステラミン単独食群に比べ、2.5 倍の糞便中への PCB の排泄が確認された。コントロール食群との比較では 10% RBF 食、10% RBF と 5% リグニン併用食、5% コレステラミン食および 10% RBF と 5% コレステラミン併用食群でそれぞれ、3.4、3.8、2.3 および 5.7 倍の糞便中への PCB の排泄増加が認められた。しかし、この PCB の糞便中排泄促進は上述した糞便重量の増加と必ずしも相関しておらず、PCB の排泄促進が中程度であった 10% RBF と 5% リグニン併用食群の糞便重量がコントロール食群の 2.6 倍あったのに対し、最も PCB 排泄促進効果が高かった 10% RBF と 5% コレステラミン併用食群の糞便重量は約 2 倍であった。したがって、PCB の糞便中への排泄増加と糞便量の増加が相関しているとは限らないと言う結果が得られた。

4. コレステラミンおよびリグニン添加 RBF 食による PCB の体内残留および臓器・組織重量に及ぼす影響

Table 1 には 3 週間、各食餌で PCB (100 mg/kg) を経口投与されたラットを飼育した時の体内に残留する PCB の濃度を示した。最も顕著な差が認められたのは小腸で、10% RBF 食群がコントロール食群の約 2/5、10% RBF と 5% リグニン併用食群は約 1/5、5% コレステラミン食群は約 3/10 および 10% RBF と 5% コレステラミン併用食群は約 2/5 の濃度であった。その他の臓器・組織では顕著な差は認められなかった。小腸は RBF、リグニンおよびコレステラミンの作用を直接的に受けており、Table 2 に示したように、小腸の湿重量が 3 週間の飼育期間でコントロール食群の 1.2~1.6 倍ほどに増加していた。

5. 食餌の消化管内滞留時間に及ぼす RBF 食、コレステラミンおよびリグニン添加 RBF 食の影響

Table 3 には各食餌に 0.5% カルミンレッドを添加してラットに与え、各食餌が消化され、糞便として排泄されるまでの時間を消化管内滞留時間として示した。最も消化管内滞留時間が短かった群は 10% RBF と 5% リグニン併用食群でコントロール食群より約 1.6 時間程早く糞便が消化管内を通過した。また、最も遅かった 5% コレステラミン食群は約 2.2 時間程遅く、これに 10% RBF を併用することで約 1 時間程早く糞便が排泄されることがわかった。

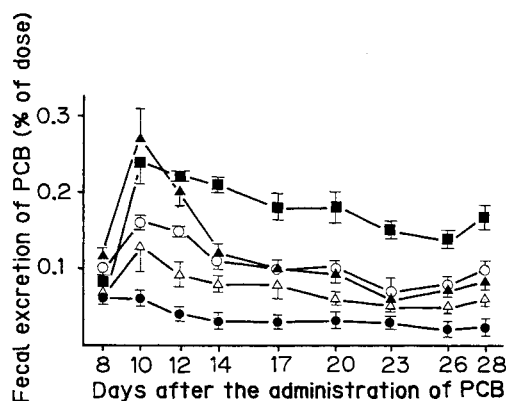


Fig. 3 Stimulation of the fecal excretion of PCB by the diet containing RBF and cholestyramine in rats.

—●— Group B (Control diet), —○— Group C (10% RBF diet), —▲— Group D (10% RBF + 5% lignin diet), —△— Group E (5% Cholestyramine diet), —■— Group F (10% RBF + 5% cholestyramine diet)

Each point represents the mean (% of dose) $\pm$ SD in three rats. Each group was given its diet on the 8th day following the administration of PCB (100 mg/kg). The fecal excretion of PCB for 21 days of the diets for Groups C, D, E and F significantly differed from that of Group B, $p < 0.01$.

Table 1 Distribution of PCB in the rat blood and tissues on the 28th day after a single oral dose of PCB (100 mg/kg)

Groups Diets	Group B Control	Group C 10% RBF	Group D 10% RBF +5% Lignin	Group E 5% Cholestyramine	Group F 10% RBF+5% Cholestyramine
Blood	0.36±0.07	0.25±0.07	0.22±0.04*	0.28±0.18	0.18±0.10
Lung	2.43±0.53	2.10±0.62	2.01±0.31	2.12±0.64	1.93±0.63
Spleen	0.86±0.18	0.46±0.07	0.39±0.06*	0.52±0.30	0.39±0.27*
Kidney	1.87±0.42	1.28±0.32	1.66±0.19	1.70±0.49	1.71±0.21
Thymus	2.45±0.97	2.54±0.94	1.48±0.10	1.87±0.26	1.30±0.91
Liver	2.41±0.26	2.78±1.02	2.51±0.26	2.30±1.03	2.49±0.55
Small intestine	2.57±0.33	0.93±0.12**	0.59±0.06**	0.71±0.23**	1.10±0.13**
Adipose tissue	79.8±10.8	73.7±10.5	71.9±3.32	72.6±20.0	71.0±6.57

Each value represents the mean (ppm)±SD of 3 rats.

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

** Significantly different from the control (Group B), $p<0.01$.

Table 2 Effect of diets on relative tissue weight in rats on the 28th day after a single oral dose PCB (100 mg/kg)

Groups Diets	Group A Control	Group B Control	Group C 10% RBF	Group D 10% RBF +5% Lignin	Group E 5% Cholestyramine	Group F 10% RBF+5% Cholestyramine
Lung	0.52±0.02	0.49±0.02	0.53±0.01	0.45±0.02*	0.61±0.02*	0.57±0.02*
Spleen	0.26±0.02	0.26±0.02	0.27±0.01	0.26±0.01	0.27±0.02	0.27±0.01
Kidney	0.83±0.08	0.96±0.10	0.83±0.04	0.84±0.04	1.01±0.18	0.85±0.01
Thymus	0.24±0.08	0.32±0.08	0.26±0.03	0.26±0.02	0.29±0.07	0.28±0.01
Liver	4.82±0.25	4.56±0.23	4.62±0.06	4.28±0.18	4.74±0.21	4.58±0.08
Small intestine	2.10±0.05	2.08±0.04	2.54±0.21*	2.54±0.15**	3.28±0.10**	3.11±0.24**

Each value represents the mean relative tissue weight (g/100 g body weight)±SD of 3 rats.

* Significantly different from Group A, $p<0.05$.

** Significantly different from Group A, $p<0.01$.

Table 3 Stool transit time in the digestive tract of rats fed diets containing RBF, cholestyramine, RBF plus lignin and RBF plus cholestyramine.

Diets	Time (hr)
Control diet	7.0±0.1
10% RBF plus 5% lignin diet	4.4±0.1
10% RBF diet	5.4±0.1
5% Cholestyramine diet	9.2±0.3
10% RBF plus 5% cholestyramine diet	8.2±0.1

Each value represents the mean±SD of 4 rats.

考 察

油症原因物質とされる PCB, PCDF 等は油症患者体内より少量ずつではあるが今も糞便中に排泄されている。この排泄を促進する目的で、PCB (KC600) をモデル薬物として、ラットに RBF およびコレステラミン等を含む食餌を与え、その糞便中への排泄促進を検討した。

RBF は *in vitro* 実験の結果より、8 種の食物繊維の中でも PCB の吸着が特に優れており、そのリグニン含量に正比例して PCB の吸着能が上がっていること (Fig. 1), また、米ぬかから抽出したリグニンが PCB をよく吸着し⁷⁾, RBF の PCB 吸着のほとんどをこのリグニンの吸着能で説明できることから、RBF の PCB 吸着にはリグニンが主として関与していると考

えられる。

一方、コレステラミンは陰イオン交換樹脂で、胆汁酸、脂肪酸や多くのステロイド化合物を吸着することが知られている医薬品である⁵⁾。コレステラミンは小腸に排泄されたクロルデコン¹⁾、PenCDF³⁾を吸着し、その糞便中への排泄を促進することが知られている。本実験では 10% RBF 食にさらに、5% リグニンを添加した場合のラット糞便中 PCB 排泄量と 5% コレステラミンを添加した食餌を PCB 投与ラットに与えた場合の PCB 排泄量を比較した結果、約 1.5 倍の排泄促進効果が観察された。リグニン添加 RBF 食群では RBF 単独食群に比べて、糞便中への PCB 排泄促進効果は認められず、リグニン増量の効果は期待されなかった。これは食餌中に添加したリグニンが木材をアルカリ抽出して得られたものであり、RBF 中のリグニンとは構造が異なることが関係しているものと思われるが、コレステラミンの PCB 吸着能はリグニンに比べ高いと推定される。また、食餌の消化管内通過時間にみられるように、RBF とコレステラミンを併用した食餌ではコレステラミン単独の食餌よりも糞便の排泄時間が早く、しかも、糞便量も増加し、吸着した PCB をより早く、多く糞便中に排泄したものと考えられる。

ラットにおいては、体内に吸収された未変化の高塩素化 PCB は徐々にではあるが糞便を経て体外へ排泄される¹¹⁾。本実験により、PCB の排泄が促進されたとはいえ、わずかに投与量の数%である。それ故、大部分はまだ、体内に残留しており、それは実験終了後の臓器・組織中の PCB 濃度をみても小腸以外の臓器・組織で著しい減少が確認できないことからわかる。小腸は食餌に添加された化合物の作用を直接的に受けており、他の臓器・組織よりも早く、PCB が減少したものと考える。油症治療においては RBF およびコレステラミンの併用でも長期間にわたり投与する必要がある、この長期にわたる投与により臓器・組織等、特に小腸にみられた湿重量の増加、肥厚が生体にどのような影響をもたらすのか今後も検討する必要があると考える。

総 括

油症の根本的治療を目的として、米ぬかファイバー (RBF)、コレステラミン等によるカネクロール 600 (PCB) の糞便中排泄促進効果をラットを用いて検討した。

PCB の RBF への吸着は *in vitro* において RBF の構成成分であるリグニンが主体であることがわかった。

しかし、リグニンへの PCB の吸着は *in vivo* においては非常に弱く、コレステラミンよりもかなり弱いと考えられた。そこで、PCB (100 mg/kg) を経口投与したラットをコレステラミン単独配合食で飼育したところ、PCB の糞便中への排泄がコントロール食群の 2.8 倍増加したのに対し、RBF とコレステラミンの併用配合食では 5.7 倍にも増加した。これは消化管内滞留時間がコレステラミン単独配合食では 9 時間程であったのが、RBF とコレステラミンの併用配合食投与によって更に、1 時間早くなり、RBF による便秘改善効果がコレステラミンの PCB 吸着力をより効果的に引きだしたものと考えられる。

謝 辞

本研究に際し、米ぬかファイバーの調整に御協力いただきましたカネミ倉庫 (株)、和田誠氏に対し深く感謝いたします。また、本研究成果は平成元年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) Boylan JJ, Cohn WJ, Egle JL, Jr, Blanke RV and Guzelian PS: Excretion of chlordecone by the gastrointestinal tract.: Evidence for a nonbiliary mechanism., Clin. Pharmacol. Ther., 25: 579-585, 1979.
- 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)., 福岡医学雑誌, 80: 296-301, 1989.
- 3) 神村英利, 吉村英敏: 油症原因物質の排泄促進., 福岡医学雑誌, 78: 266-280, 1985.
- 4) Kamimura H, Koga N, Oguri K, Yoshimura H, Honda Y and Nakano M: Enhanced faecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats by long-term treatment with active charcoal beads., Xenobiotica, 18: 585-592, 1988.
- 5) Kay RM and Strasberg SM: Origin, chemistry, physiological effects and clinical importance of dietary fiber., Clin. Invest. Med., 1: 9-24, 1978.
- 6) Prosky L, Asp, N-G, Furda L, Devries J W, Schweizer TF and Harland BF: Determination of total dietary fiber in food and food products: Collaborative study., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68: 677-679, 1985.
- 7) Takenaka S, Morita K, Hirakawa H, Tokiwa H and Takahashi K: Binding of PCBs, PCDFs and PCDDs to rice bran fiber., Eisei Kagaku, 35: P-33, 1989.
- 8) van Soest PJ: Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the

determination of fiber and lignin., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 46 : 829-835, 1963.

9) van Soest PJ and Wine RH : Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV. Determination of plant cell-wall constituents., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 50 : 50-55, 1967.

10) van Soest PJ and Wine RH : Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 51 : 780-785, 1968.

11) 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.

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

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

コレステラミン投与による油症原因物質の 糞便中への排泄促進の試み

福岡県衛生公害センター

飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦
中川 礼子・竹中 重幸・森田 邦正
檜崎 幸範・深町 和美
常盤 寛・高橋 克巳
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室
吉村 英敏

Therapeutic Trial for Promotion of Fecal Excretion of PCDFs and PCBs by the Administration of Cholestyramine in Yusho Patients

Takao IIDA, Hironori HIRAKAWA, Takahiko MATSUEDA,
Reiko NAKAGAWA, Shigeyuki TAKENAKA, Kunimasa MORITA,
Yukinori NARAZAKI, Kazumi FUKAMACHI,
Hiroshi TOKIWA and Katsumi TAKAHASHI
*Fukuoka Environmental Research Center, Mukaizano Dazaifu-shi,
Fukuoka 818-01*

Hidetoshi YOSHIMURA

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

Any effective therapy for elimination of causal agents remaining in Yusho patients was not found until now. To know the profile of fecal excretion of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs), the amounts of PCDFs and PCBs in the stool of the six Yusho patient with the typical symptoms were determined. The stool samples of Yusho patients were collected in 1989. PCDFs, i. e., 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF), 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PnCDF), 1, 2, 3, 4, 7, 8- and 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexachlorodibenzofurans (HxCDFs), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptachlorodibenzofuran (HpCDF) and octachlorodibenzofuran (OCDF) were detected in all of the samples. PCDFs found in the stool samples were mostly PnCDF and HxCDFs. Of PCDFs detected, PnCDF and HxCDFs contributed to $42 \pm 4.7\%$ and $43 \pm 5.5\%$ as mean $\pm$ SE, respectively. The fecal excretion of PnCDF and HxCDFs in Yusho patients was 720 ± 490 pg/day and 790 ± 620 pg/day as mean $\pm$ SE, respectively. On the other hand, the fecal excretion of PnCDF and HxCDFs in normal controls was 32 ± 13 pg/day and 47 ± 5.2 pg/day as mean $\pm$ SE, respectively. The fecal excretion of PnCDF and HxCDFs in Yusho patients was about 23 times and 17 times each higher than that in normal controls. The fecal excretion of PCBs in Yusho patients and normal controls was 400 ± 430 ng/day and 150 ± 39 ng/day, respectively, as mean $\pm$ SE.

In order to promote the excretion of these toxic chemicals in the stool of Yusho patients, the patients were continuously administered with cholestyramine, an anion exchange resin, at a dose of 4 g, 3 times a day, for 6 months. At the time of 2, 4 and 6 months after the beginning of administration, the stool samples of patients for 6 days were collected and analyzed. In the cases of two samples, by the cholestyramine administration, the promotion of PnCDF excretion in the stool was at the rate of maximal 36%. In the case of one sample, the promotion of HxCDFs

excretion in the stool was at the rate of maximal 42%. In the cases of two samples, the promotion of PCBs excretion in the stool was at the rate of maximal 46%. On other hand, the promotion of PCDFs and PCBs in the stool was not found in the other four cases.

はじめに

Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) はカミネ油症の原因物質として知られており¹⁰⁾, 事件後, 20 年以上経過した現在も, 患者体内に残留している³⁾. 典型的な患者の皮下脂肪中には 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (PnCDF), 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran 及び 1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran (HxCDF) が, それぞれ, 160~3000 ppt, 54~1000 ppt 及び 16~220 ppt という高濃度で残留しており, これらの値の平均値は健常者のそれと比べて約 100 倍高い³⁾. PnCDF 及び HxCDF は毒性が高いと考えられており⁷⁾, 2,3,4,7,8-PenCDF 及び 1,2,3,4,7,8-HxCDF は発癌性も示唆されている¹¹⁾. これらの化合物は患者の血液中にも数 ppt の濃度レベルで検出されており⁴⁾, 肝臓等の臓器に対して影響を及ぼしていることが危惧される. そこで, PCDFs の排泄状況を把握するため患者及び健常者の糞便中 PCDFs 量を測定し, 両者の比較を行った. また, PCDFs と同様な挙動を示すと思われる糞便中 Polychlorinated biphenyls (PCBs) についても測定した. さらに, これらの原因物質の体外排除を目的として, 高コレステロール血症治療薬で有機塩素系農薬中毒の治療にも使われているコレステラミン¹⁾を患者に投与し, 原因物質の糞便中への排泄促進を試みた. コレステラミン投与開始後, 2 カ月, 4 カ月及び 6 カ月目の患者の糞便中の PCDFs 及び PCBs 量を測定し, コレステラミン投与によるこれらの化合物の排泄促進効果を検討した.

実験方法

1. 対象

血液中の PCBs のガスクロマトグラムパターンが A タイプ⁹⁾を示す 3 組の夫婦 (計 6 名) 及び福岡県衛生公害センターの職員 3 名を対象とした.

2. コレステラミンの投与

患者 6 名にクエストラミン 9 g (プリストルマイヤーズ (株) 製: コレステラミン 4 g 含む) を水に懸濁させ, 1 日 3 回食後服用させた.

3. 検体の採取

(1) 患者糞便

コレステラミン投与前の 6 日間の糞便とコレステラミン投与開始後 2 カ月, 4 カ月及び 6 カ月目の各々 6 日間の糞便を, 1 日毎に, それぞれ, 採取した. コレステラミン投与前とコレステラミン投与開始後 2 カ月目の検体は 1 日分の糞便を 1 検体として分析した. 4 カ月目及び 6 カ月目の検体は 1 日分の糞便をよく混和し, その検体から, 重量の 5 分の 1 量ずつをそれぞれ採取して合わせ, 1 検体として分析した.

(2) 健常者糞便

6 日間の糞便を 1 日毎に採取し, 1 日分の糞便をよく混和し, それぞれの検体から, 重量の 2 分の 1 量又は, 3 分の 1 量ずつをそれぞれ採取し合わせて 1 検体として分析した.

4. 試薬

使用した PCDFs の内部標準物質を Table 1 に示す. これらの標準物質はいずれもケンブリッジアイソトープ社製である. 他の使用した試薬はキシダ化学製残留農薬用分析トルエン, 和光純薬工業製残留農薬分析用 1000 のエタノール, ヘキササン, アセトン, ジクロロメタン, 残留農薬分析用 300 のクロロホルム, メタノール, フロリジル, 有害金属分析用硫酸, ダイオキシン分析用活性炭埋蔵シリカゲル, PCB 分析用シリカゲル S-1 及び PCB フタル酸試験用無水硫酸ナトリウムである.

5. 分析法

(1) PCDFs

糞便を AOAC 法に従って²⁾, クロロホルム及びメタノールで抽出し, 抽出液に蒸留水を加えてクロロホルム層を分離させた. 分離したクロロホルムは無水硫酸ナトリウムで乾燥し, Table 1 に示した内部標準物質

Table 1 List of the stable isotope labeled PCDFs used as internal standards

¹³ C ₆ -2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzofuran
¹³ C ₆ -2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran
¹³ C ₆ -1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran
¹³ C ₆ -1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-Heptachlorodibenzofuran
¹³ C ₁₂ -1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-Octachlorodibenzofuran

の *n*-ノナン溶液 [Tetrachlorodibenzofuran (TCDF), Pentachlorodibenzofuran (PnCDF), Hexachlorodibenzofuran (HxCDF) 及び Heptachlorodibenzofuran (HpCDF) は 1 ng/ml, Octachlorodibenzofuran (OCDF) は 10 ng/ml] を 0.5 または 1.0 ml 添加し、濃縮した。濃縮液をヘキサン/クロロホルム (60:40 v/v) に溶解させ、50%硫酸及び濃硫酸で精製し、0.5 N 水酸化カリウム/エタノールによる常温アルカリ分解法⁹⁾を行ない、既報⁴⁾と同様の方法で活性炭-シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。ジクロロメタン/ヘキサン (10:90 v/v) で PCBs を、続いてトルエンで PCDFs を溶出した。第 2 画分についてフロリジルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを行った。さらに、5%発煙硫酸で処理後、Gas Chromatograph/Mass spectrometry (GC/MS)-Selected ion monitoring (SIM) で分析した。GC/MS-SIM の機器及び分析条件は次の通りである。

Varian Model 3400 ガスクロマトグラフ・Finnigan Mat 90 質量分析計を用い、高分解能 SIM 法により分析を行った。カラムは 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、カラム温度は、120°C で 1 分間保持し、170°C まで毎分 10°C の速度で昇温して、さらに、260°C まで毎分 20°C で昇温した。その他の条件は、GC 注入口温度 260°C, セパレーター温度 260°C, イオン化電圧 70 eV, 加速電圧 5 kV, イオン化電流 70 μ A, イオン化モード EI モード, 分解能 7000 であった。

(2) PCBs

増田らの方法⁹⁾に準じて、5 (1) の活性炭-シリカゲルカラムの第 1 画分を水酸化カリウム/エタノールでアルカリ分解した後、ヘキサンで抽出し、シリカゲルカラムでクリーンアップし、電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ (ECD-GC) で測定した。カラムは OV-1 を Chromosorb W AW-DMCS (80~100 mesh) に 2%コーティングし、内径 2.6 mm, 長さ 2.1 m のガラスカラムに充填して使用した。試料注入口温度、カラム温度及び検出器温度は、それぞれ、260, 200 及び 260°C に保った。

結 果

1. 糞便の試料採取方法の簡略化

実験方法の 3. 検体の採取の項で述べたように、患者のコレスチラミン投与前と投与開始後 2 カ月目の検体は一日分ずつ分析した。ヒトの糞便量は人によって大きな差があり (64 $\pm$ 21 g~213 $\pm$ 128 g: 平均値 $\pm$ 標準

誤差), また、日によって大きく変動 (最小 44 g~最大 402 g) することが分かった。また、PCDFs や PCBs の糞便中濃度及び 1 日糞便中排泄量も日間変動がかなりあることも明らかになった。これらのことから、コレスチラミンによる油症原因物質の排泄促進効果をみるためには、1 日の糞便中排泄量の平均値で比較することが最も良いと考えられた。各患者の PCDFs などの糞便中への 1 日平均排泄量を知るためには、各 1 日分の糞便を均一に良く混和し、それぞれから重量の一定割合の量を採取して合わせて 1 検体として分析することでも可能と考えられる。そこで、6 日間の糞便中の PCDFs などを個別に測定して得られる 1 日平均排泄量の値とそれぞれから一定割合の量ずつ採取して合せた検体から得られる 1 日平均排泄量の値が一致するかどうかを確認するため、患者の糞便 6 日分について次のような検討を行った。まず、各 1 日分毎に糞便を良く混和し、重量の 1/3 量ずつを試料として採取し、各々、PnCDF 及び HxCDFs を測定し、それらの 1 日排泄量を求めた。別に 6 日間の糞便から重量の各 1/5 量ずつ採取して合せた試料について PnCDF 及び HxCDFs を測定した。6 日間の試料を個別に分析して得られた PnCDF 及び HxCDFs の 1 日排泄量の平均値 $\pm$ 標準誤差は 2230 $\pm$ 860 pg 及び 1860 $\pm$ 810 pg であった。一方、6 日間の試料を混合した試料を分析して得られた PnCDF 及び HxCDFs の 1 日排泄量の平均値は 2430 pg 及び 1900 pg であった。これら 2 つの方法で求めた PnCDF 及び HxCDFs の 1 日排泄量の平均値は良く一致しており、両者の相違は分析誤差の範囲内と判断される。後者の方法は試料採取に煩雑さを伴うものの、検体数が 1/6 となり、分析に要する時間と試薬などの費用を大幅に減少させることができる。これらの理由によりコレスチラミン投与開始後 4 及び 6 カ月目の検体と健常者の検体の分析は、6 日間の混合試料について行った。

2. 患者及び健常者の糞便中の 1 日平均 PCDFs 及び PCBs 排泄量

(1) PCDFs の 1 日平均糞便中排泄量

Fig. 1 に患者及び健常者の PCDFs 1 日平均糞便中排泄量を示す。糞便中から検出された PCDFs は、2, 3, 7, 8-TCDF, 2, 3, 4, 7, 8-PnCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-及び 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF 及び OCDF であった。患者の糞便中 TCDF 排泄量は 33~160 pg/日で、これらは、健常者の TCDF の平均値 64 pg/日 (52~77 pg/日) の 0.5~2.5 倍であり、糞便中の TCDF 量では、患者と健常者の間に差は認められ

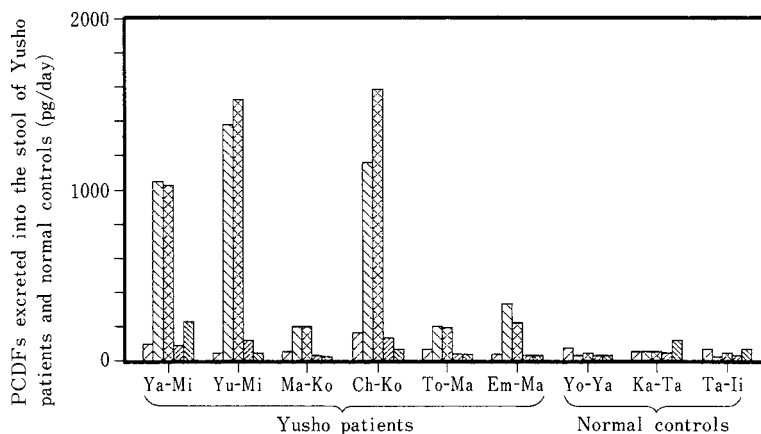


Fig. 1 Fecal Excretion of PCDFs in Yusho patients and normal controls

- 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzofuran
- 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran
- 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran
and 1, 2, 3, 6, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran
- 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-Heptachlorodibenzofuran
- 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-Octachlorodibenzofuran

なかった。患者糞便中 PnCDF 量は 200~1380 pg/日、これは、健常者の糞便中 PnCDF の平均値 32 pg/日 (19~49 pg/日) と比べて、約 6~43 倍高い値であった。また、患者の糞便中 HxCDFs は 190~1530 pg/日、これは、健常者の糞便中 HxCDFs の平均値 46 pg/日 (42~54 pg/日) と比べて、約 4~35 倍高い値であった。他方、患者の糞便中 HpCDF 及び OCDF は、28~130 pg/日及び 31~231 pg/日で、これらは、健常者の糞便中 HpCDF の平均値 35 pg/日 (28~46 pg/日) 及び OCDF の平均値 72 pg/日 (28~121 pg/日) と比べて、それぞれ、0.8~3.7 倍及び 0.4~1.7 倍であり、糞便中の HpCDF 及び OCDF 量では、患者と健常者の間に差は認められなかった。患者の糞便中 PCDFs は、PnCDF 及び HxCDFs が相対的に多く、両者とも、同程度の量が排泄されていた。

(2) 糞便中 1 日平均 PCBs 排泄量

Fig. 2 に患者及び健常者の PCBs 1 日糞便中排泄量の平均値を示す。患者の糞便中 PCBs 量は、320~1370 ng/日で、これは、健常者の平均値 150 ng/日 (100~180 ng/日) と比べて、2.2~9.3 倍高い値であった。

3. コレスチラミン投与による PCDFs 及び PCBs の排泄促進効果

(1) 糞便への PCDFs の排泄

コレスチラミン投与前、投与開始後 2 カ月、4 カ月及び 6 カ月目における TCDF、PnCDF、HxCDFs、HpCDF 及び OCDF の 1 日糞中排泄量を、それぞれ、Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 及び Fig. 7 に示す。Fig. 3 から明らかなように、TCDF では 6 名全て投与前と投与開始後で糞便中排泄量の顕著な増加は認められなかった。Fig. 4 から分るように、PnCDF の 1 日糞便中排泄量は、Ya-Mi 及び Yu-Mi の 2 名では、投与前の 1050 pg/日及び 1380 pg/日に対し、投与後 2 カ月目で 1260 pg/日 (19%増) 及び 1610 pg/日 (17%増) であり、4 カ月目では 1430 pg/日 (36%増) 及び 1800 pg/日 (31%増)、6 カ月目では 1200 pg/日 (14%増) 及び 1240 pg/日 (10%減) であり、コレスチラミン投与による若干の排泄促進効果が示唆された。しかし、他の 4 名では排泄促進効果は認められなかった。また、Fig. 5 から分かるように、HxCDFs の 1 日糞中排泄量は、Ya-Mi では、投与前の 1030 pg/日に対し、投与開始後 2 カ月目で 1170 pg/日 (16%増)、4 カ月目で 1460 pg/日 (42%)、6 カ月目で 1220 pg/日 (18%増) となり、コ

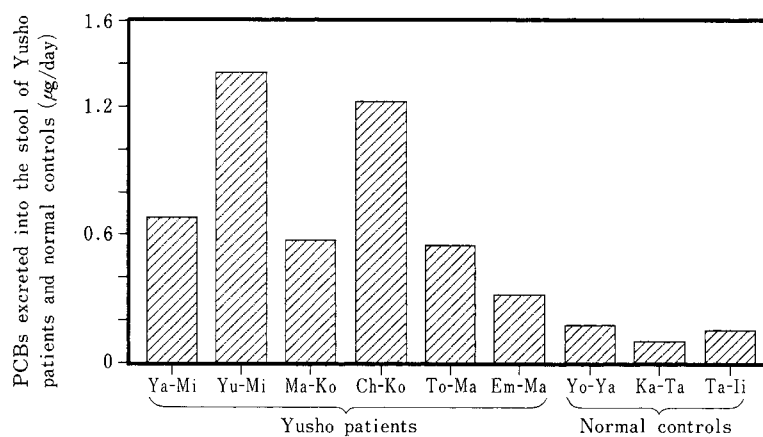


Fig. 2 Fecal Excretion of PCBs in Yusho patients and normal controls

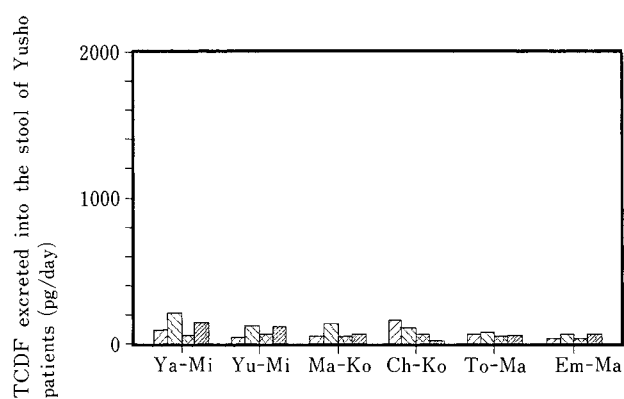


Fig. 3 Fecal Excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in Yusho patients

-  Before the administration of cholestyramine
-  Two months after the administration of cholestyramine
-  Four months after the administration of cholestyramine
-  Six months after the administration of cholestyramine

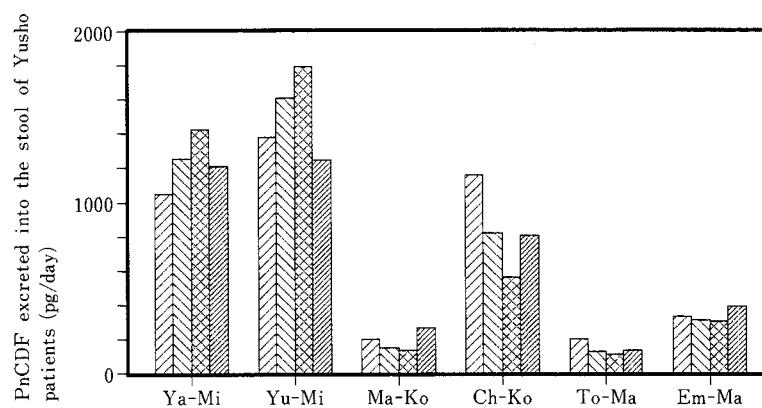


Fig. 4 Fecal Excretion of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran in Yusho patients

- Before the administration of cholestyramine
- Two months after the administration of cholestyramine
- Four months after the administration of cholestyramine
- Six months after the administration of cholestyramine

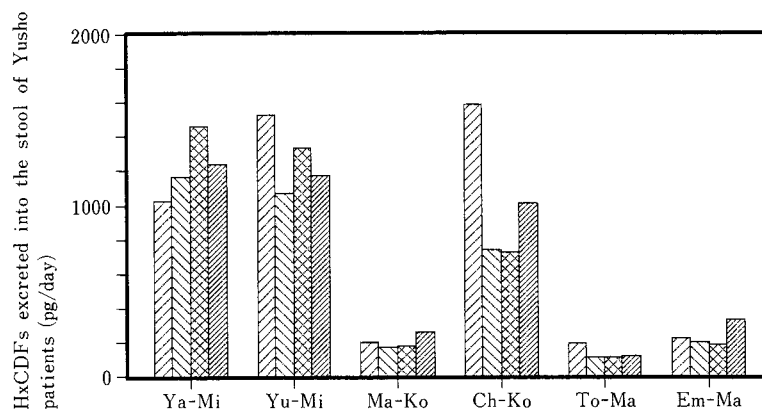


Fig. 5 Fecal Excretion of Hexachlorodibenzofurans in Yusho patients

- Before the administration of cholestyramine
- Two months after the administration of cholestyramine
- Four months after the administration of cholestyramine
- Six months after the administration of cholestyramine

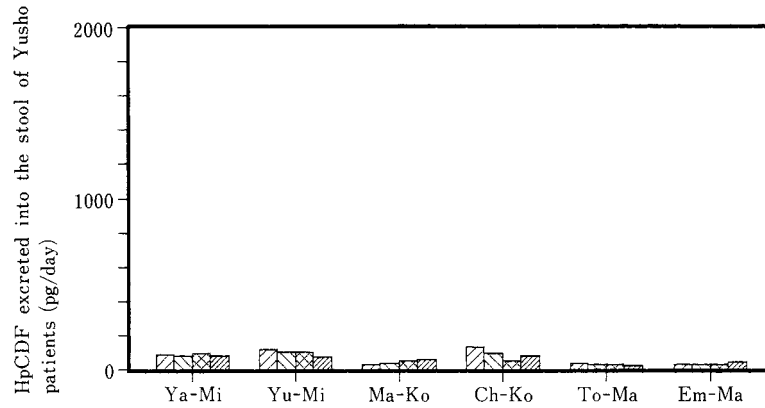


Fig. 6 Fecal Excretion of Heptachlorodibenzofuran in Yusho patients

- Before the administration of cholestyranine
- Two months after the administration of cholestyranine
- Four months after the administration of cholestyranine
- Six months after the administration of cholestyranine

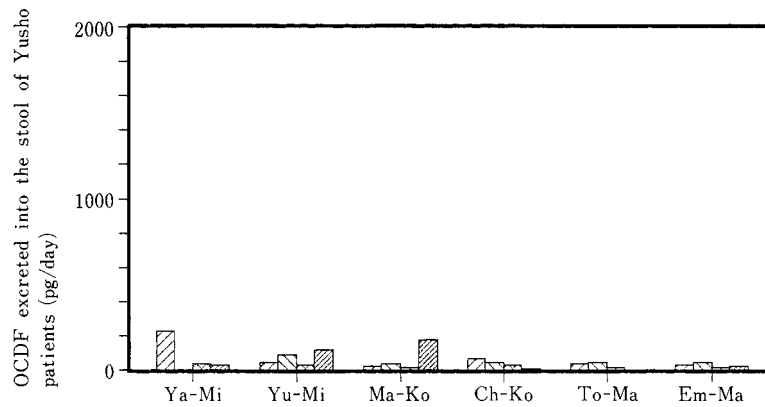


Fig. 7 Fecal Excretion of Octachlorodibenzofuran in Yusho patients

- Before the administration of cholestyranine
- Two months after the administration of cholestyranine
- Four months after the administration of cholestyranine
- Six months after the administration of cholestyranine

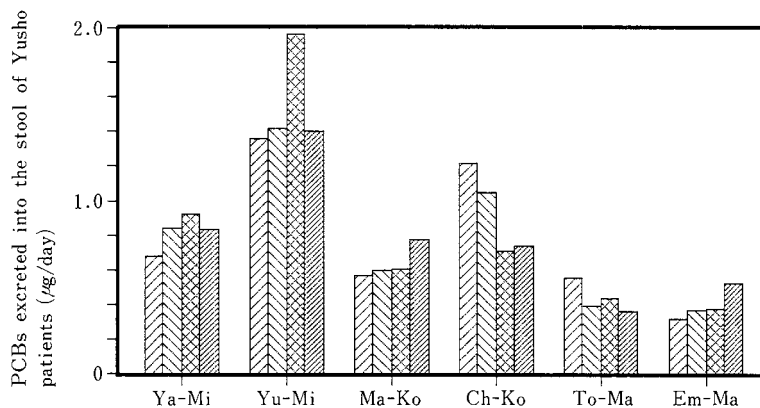


Fig. 8 Fecal Excretion of PCBs in Yusho patients

- Before the administration of cholestyramine
- Two months after the administration of cholestyramine
- Four months after the administration of cholestyramine
- Six months after the administration of cholestyramine

レスチラミン投与による排泄促進効果が示唆されたが、他の5名では排泄促進効果は認められなかった。Fig. 6及び7から明かなように、HpCDF及びOCDFでは6名全て治療前と治療開始後で糞便中排泄量に差は認められなかった。

(2) 糞便へのPCBsの排泄

投与前、投与開始後2カ月、4カ月及び6カ月目におけるPCBs糞便中排泄量を、Fig.8に示す。Fig.8から分かるように、Ya-Mi及びYu-Miの2名では、PCBs 1日糞便中排泄量は投与前の680 ng/日及び1370 ng/日に対し、投与開始後2カ月目で840 ng/日(24%増)及び1500 ng/日(9%増)であり、4カ月目では920 ng/日(35%増)及び1980 ng/日(45%増)と増加し、6カ月目でも830 ng/日(22%増)及び140 ng/日(2%増)であり、治療による排泄促進効果が示唆された。しかし、他の4名では排泄促進効果は認められなかった。

考 察

結果の項で述べたように、6名の患者の糞便中に検出されたPCDFsは主としてPnCDF及びHxCDFsであり、それらはPCDFs全体の $42 \pm 4.7\%$ 及び $43 \pm 5.5\%$ (平均値 $\pm$ 標準誤差)にあたる。また、6名の患者の1日あたりPnCDF及びHxCDFsの排泄量は200~1380 pg及び190~1530 pg(6日間の平均値)であった。これらの値は、健常者の1日の糞便中に排泄

されるPnCDFの平均値(32 pg)及びHxCDFsの平均値(47 pg)と比べて、約4~35倍及び約6~43倍高い値であった。既報³⁾で述べたように、これらの患者の皮下脂肪中にはPnCDF及びHxCDFsが160~3000 ppt及び67~1220 pptという高い濃度で残留している。油症事件から20年以上経過した現在も患者体内に残留しているPCDFsがごく微量ではあるが糞便を通して排泄されているものと考えられる。

6名の患者のうち最もPCDFsの糞便中排泄が多い2名については、コレステラミン投与により、僅かながらPCDFsの糞中排泄促進が示唆された。しかし、他の4名についてはPCDFsの糞中排泄促進は全く認められなかった。

また、患者の糞便中のPCBsの排泄についてもPnCDFs及びHxCDFsの排泄と同様の傾向を示した。神村ら⁵⁾はPnCDFを1 mg/kg経口投与したラットにコレステラミンを5%含む餌を与えることによって、コントロール群と比べてPnCDFの糞便中排泄量が1.8倍に増加したと報告している。今回の治療実験で、2名の患者については、コレステラミンの投与によってPnCDF及びHxCDFsの糞中排泄が一時的ではあるが最高36%及び42%増加したことは注目される。神村らの動物実験に比べて、今回のコレステラミンの体重あたりの投与量はかなり低く、また、体内に残留しているPCDFsのレベルも非常に低いことから、臨床

実験では動物実験で得られた80%の増加には達しなかったものと思われる。一方、CohnらはChlorodecone (Kepone) 中毒患者に対してコレステラミンを一日あたり24g投与して糞便中排泄量が3.3から17.8倍に増加したと報告している¹⁾。PCDFs中毒に比べて、Chlorodecone中毒ではコレステラミンによる排泄促進効果が顕著である。今回の臨床実験のコレステラミン投与量は一日あたり12gでCohnらの報告と比べて1/2である。Yoshimuraらは2,4,3',4'-Tetrachlorobiphenylが胆汁中からはほとんど検出されないが¹²⁾、腸管壁からごく微量、直接、腸の管腔中に排泄されることを見出している¹³⁾。この排泄経路はPnCDFやHxCDFsやPCBsの高塩素化体にも共通のものと考えられる。一方、Chlorodeconeは胆汁中にかなり排泄される¹⁾。PCDFsとChlorodeconeに対するコレステラミン投与による排泄促進効果の大きな差違は、これらの化合物の腸管腔への排出経路と排泄量の違いに起因すると考えられる。

今回の臨床実験の結果から、糞便中のPCDFsなどに対する排泄促進剤スクリーニングは6日間程度の短期実験でも可能と考えられる。この事は、今後、油症治療のみならず、環境汚染に起因する人体汚染物質の体外排泄の観察にも有効な手段であると考えられる。

総 括

油症患者の糞便中に健常者のそれと比べて数倍～数十倍のPnCDF及びHxCDFsが排泄されていることを初めて明らかにした。糞便中のPCDFsを測定することは、現在試みられているPCDFsの排泄促進効果を評価する上で最も有効である。また、6日間程度の短期の実験でPCDFsなどの体外排泄促進治療の効果のスクリーニングが可能と考えられた。

コレステラミン投与開始後の患者糞便中へのPCDFs及びPCBsの排泄量(1日平均値)は投与前のそれに比べて、6名中2名でPnCDFが最高36%増加し、1名でHxCDFsが最高42%増加し、2名でPCBsが最高46%増加した。コレステラミン投与による糞便中PCDFs及びPCBsの排泄促進効果は明確には認められなかった。

謝 辞

本研究は平成元年度厚生省科学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。

文 献

- 1) Cohn WJ, Boyllan JJ, Blanke RV, Howell JA, Fariss MW, Guzelian PS: Treatment of chlorodecone (Kepone®) toxicity with cholestyramine., N. Engl. J. Med. 298: 243-248, 1978.
- 2) Horwitz W: Official methods of analysis of the association of official analytical chemists., Association of official analytical chemists, Washington, 1980, p. 778.
- 3) 飯田隆雄, 中川礼子, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克巳: 油症患者及び健常者の皮下脂肪中の Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs), 福岡医誌, 80: 296-301, 1989.
- 4) 飯田隆雄, 中川礼子, 深町和義, 高橋克巳: 油症患者の皮下脂肪中の Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs), 福岡医誌, 80: 302-306, 1989.
- 5) 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, 1974.
- 6) 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.
- 7) Kutz FW, Barnes DG, Bottimore DP, Greim H, Bretthauer EE: The international toxicity equivalency factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of Dioxins and related compounds., Chemosphere, 20: 751-757, 1990.
- 8) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 高田真由美, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニール, 福岡医誌 65: 25-27, 1974.
- 9) Masuda Y, Kagawa R, Kuratsune M: Comparison of polychlorinated biphenyls in Yusho patients and ordinary persons., Bull. Env. Contam. Toxicol., 11: 213-217, 1974.
- 10) Nagayama J, Masuda Y, Kuratsune M: Chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and rice oils used by patients with Yusho., Fukuoka Acta Med., 66: 593-599, 1975.
- 11) Nishizumi M: Carcinogenicity of 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran and 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran in Rat., Fukuoka Acta Med., 80: 240-245, 1989.
- 12) 吉村英敏, 山本弘明, 木下春喜: PCB に関する研究 (第5報) 2,4,3',4'-テトラクロロビフェニール代謝物の胆汁排泄について, 福岡医誌 65: 12-16, 1974.
- 13) Yoshimura H, Yamamoto H: A novel route of excretion of 2,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl in rats., Bull. Env. Contam. Toxicol., 13: 681-688, 1975.

油症患者のコレステラミンによる PCB 等の 便中排泄促進～内科的効果について

九州大学医学部第二内科

村井宏一郎*・辻 博・藤島正敏

Treatment of Yusho Patients with Cholestyramine

Koichiro MURAI, Hiroshi TSUJI and Masatoshi FUJISHIMA

Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Kyushu University 60, Fukuoka 812

Six typical Yusho patients (3 men, 48~58 years old, and 3 women, 45~55 years old) were treated with cholestyramine, 8~12 g/day, for 24 weeks.

Improvement of some symptoms, such as arthralgia and malaise, was observed in 2 men, although this effect was non-specific. None of the patients showed increment of excretion of polychlorinated biphenyl or polychlorodibenzofuran into feces.

緒 言

1968 年のカネミ油症発生以来、22 年経過し、発症時に見られた特徴的な亜急性性症状は軽快してきているが、未だに種々の症状が多くの患者にみられる。

油症の原因となったライスオイル中には当初の塩化ビフェニール (PCB) 以外に塩化ジベンゾフラン (PCDF), 塩化クォーターフェニール (PCQ), 塩化ジベンゾジオキシン (PCDD) が新たに発見され複雑な様相を呈している¹⁾。この中で特に毒性が高く油症の発生に関与していると考えられている PCDFs は現在もなお患者体内に蓄積が確認されており²⁾、しかも PCDFs には発癌性が推定されている³⁾。したがって PCB 等の塩素化芳香族炭化水素の体外排泄を促進することは症状軽減や発癌阻止を図る上で極めて重要と考えられる。

最近、有機塩素系農薬である chlordecone (Kepone) 中毒の治療にコレステラミンがその体外排泄を促進し有効であったとの報告があり⁴⁾、九大油症治療研究班でも血中 PCB 濃度の未だに高い一部の油症患者にコ

レステラミンを投与し、PCB 等の排泄促進効果を検討することになった。この論文ではその内科的効果について報告する。

対象ならびに方法

対象者は油症認定患者のうち、現在も血中 PCB 濃度の高い Mi (58 才男, 55 才女), Ko (53 才男, 48 才女) と Ma (48 才男, 45 才女) の 3 組の夫婦である。コレステラミン 12 g (商品名クエストラン 27 g) を一日量として 3 分服を基本とした。投与は 1989 年 4 月より 9 月までの 6 カ月間行なわれた。

採血ならびに排便を治療前、治療開始後 2, 4, 6 カ月目に行なった。また各採血日に自覚症状、内科的理学所見を統一油症検診票に基づいて調査した。

検査項目としては PCB 等の各成分の定量以外に、コレステラミンの効果と副作用のチェックのために血中脂質、肝機能、血清電解質、血中脂溶性ビタミン A, D を測定した。

服薬状況は 1 カ月毎に問診して確認した。

* 連絡先: 〒 820-11

福岡県嘉穂郡額田町大字口原 1061

町立額田病院 TEL 09496-2-2131

表 1 自覚症状

患者名	年	性	全身倦怠感		頭重, 頭痛		咳嗽		喀痰	
			前	後	前	後	前	後	前	後
Ma T.	48	M	+	-	-	-	+	+	+	+
Ko M.	53	M	-	+	-	+	+	+	+	+
Mi Y.	58	M	+	+	-	-	+	-	+	-
Ma E.	45	F	+	+	+	-	-	-	-	-
Ko C.	48	F	-	-	-	-	-	-	-	-
Mi Y.	55	F	+	+	+	+	-	+	+	+

患者名	腹痛		下痢		便秘		しびれ感	
	前	後	前	後	前	後	前	後
Ma T.	+	-	-	-	-	-	+	-
Ko M.	-	-	-	-	-	-	+	+
Mi Y.	-	-	-	-	+	-	+	+
Ma E.	-	+	-	-	-	-	+	-
Ko C.	-	-	-	-	+	+	-	+
Mi Y.	-	-	-	-	-	-	+	+

患者名	関節痛		月経異常	
	前	後	前	後
Ma T.	+	+		
Ko M.	+	+		
Mi Y.	-	-		
Ma E.	+	+	-	+
Ko C.	+	+	-	-
Mi Y.	+	-	-	-

結 果

1. 服薬状況：男性 3 名は仕事を持っているため昼間に飲み忘れる事が多く、実際の服用量はコレステラミン 8 g/日であった。女性は当初の計画どおり 12 g/日を 6 カ月間服用した。

2. 自覚症状と理学所見：問診票に基づく各症例のコレステラミン投与前と 6 カ月目の自覚症状の変化を表 1 に示した。投与前開始前に 6 名中 3 名以上の患者が全身倦怠感、咳嗽、喀痰、しびれ感や関節痛を訴えていた。コレステラミン投与後には男性 2 例で自覚症状の改善が見られた。Ma 夫ではコレステラミン投与前の 6 個の自覚症状が 3 個に、Mi 夫では 5 個の自覚症状が 2 個に減っていた。とくに Ma 夫では指関節痛、膝関節痛が軽減し、疲労感が消失した。しかし表 2 に示すように全体的にみるとコレステラミン投与により自覚症状が改善したとは言えなかった。理学的所見については有意の変化は認められなかった。

3. 副作用：Ko 妻にコレステラミンの副作用と考

表 2 自覚症状の変化

	有症状者		症状の推移		
	前	後	軽快	不変	悪化
全身倦怠感	4	4	1	2	3
頭重, 頭痛	2	2	1	3	2
咳 嗽	3	3	1	4	1
喀 痰	4	3	3	2	1
腹 痛	1	1	1	4	1
下 痢	0	0	0	6	0
便 秘	2	1	2	4	0
しびれ感	5	4	2	3	1
関 節 痛	5	4	2	4	0
月 経 異 常	0	1	0	2	1

えられる便秘の悪化がみられたが、緩下剤の投与により軽減したためコレステラミンの投与は続行した。

表 3 にコレステラミン投与前と投与中の臨床検査成績の変化を示した。血中脂質のうちコレステロールは投与前値 (100%) に比べ 2, 4, 6 カ月時点では平均で各々 87.7, 88.9, 98.7% と低下した。HDL-コレステロールは各々 110, 118, 98% と軽度の増加がみられた。

表3 コレスチラミン投与前, 中の血液生化学変化

項 目	正常値	前	2 カ月	4 カ月	6 カ月
T. Cholesterol	120-250 mg/dl	231± 25	202± 21	206± 27	227± 13
Triglyceride	30-150 mg/dl	181±174	239±209	189±124	191±148
HDL-Cholesterol	M 35-60 mg/dl	43±10	48± 7	53±14	45±13
	F 40-70 mg/dl	62± 5	65± 6	70± 6	58± 9
Albumin	4.0-5.0 g/dl	4.4±0.2	4.3±0.1	4.4±0.1	4.5±0.2
T. Bilirubin	0.2-1.1 mg/dl	0.4±0.1	0.4±0.1	0.5±0.2	0.5±0.2
GOT	7-33 IU/L	17± 5	20± 8	20± 5	22± 4
GPT	5-30 IU/L	14± 5	19±12	18± 8	19± 8
LDH	260-480 IU/L	335± 40	342± 38	377± 61	356± 41
ALP	80-250 IU/L	144± 32	163± 45	158± 34	163± 36
γGTP	5-55 IU/L	19± 6	25±13	23± 9	23±11
Na	135-148 mEq/L	141± 2	142± 1	143± 2	145± 2
K	3.3-4.7 mEq/L	4.2±0.3	4.3±0.3	4.3±0.5	4.1±0.4
Cl	96-110 mEq/L	104± 3	107± 2	105± 2	107± 3
Ca	8.5-10.5 mg/dl	9.3±0.3	9.3±0.2	9.5±0.4	9.4±0.2
P	2.5-4.5 mg/dl	3.0±0.2	3.1±0.2	3.2±0.4	3.4±0.5
Vitamin A	410-1200 ng/ml	573±190	628±169	680±146	639±153
25-OH Vit. D	12-62 ng/ml	15± 3	16± 3	24± 9	24± 8

一方中性脂肪は Mi 夫が高値であったが、全例の平均で 136, 124, 120%と増加した。

肝機能検査ではアルブミン、総ビリルビン、GOT、GPT、LDH、ALP、γGTP のいずれも有意の変化を認めなかった。血清電解質にも有意の変化はなかった。血中ビタミン A および 25-OH ビタミン D もコレスチラミン投与で有意の変動なく正常範囲であった。

以上のようにコレスチラミンの副作用と思われる検査の異常は認めなかった。

考 察

PCB や PCDF 等の生体内動態については神村と吉村の詳しい総説がある⁴⁾。簡単に紹介すると以下のようである。動物実験で PCB や PCDF が経口投与されると、これらは小腸粘膜から吸収される。この際に胆汁酸が必須である。吸収された PCB や PCDF はカイロミクロン中に取込まれ、胸管リンパを經由して全身に分布する。PCB はその代謝産物を含めて主に脂肪組織、肝、肺に蓄積するが、PCDF のうち特に毒性の強い PenCDF ではいったん全身臓器に分布した後肝に再分布する。これは PenCDF が肝のチトクローム P-448H と高い親和性を有するためと考えられている。これら体内に蓄積した PCB の極く一部は代謝され胆汁中に排泄され、未変化の PCB は小腸壁から直接排泄される。一方 PCDF も微量の便中排泄が認められるが大部分は小腸壁から直接排泄される。消化管に排泄

された PCB や PCDF の一部は再び吸収され腸肝循環を行なう。

コレスチラミンは陰イオン交換樹脂で、胆汁酸と結合し、便中への胆汁酸排泄を促進する作用をもっている。したがって PCB や PCDF の腸管からの吸収に必須の胆汁酸を吸着することでこれらの便中排泄を増加させることが期待される。事実 PenCDF 投与ラットの実験ではコレスチラミン投与により PenCDF の便中排泄が約 2 倍増加した⁴⁾。しかしながら今回の油症患者での臨床試験では PCB や PCDFs の便中排泄促進は確認できなかった³⁾。

今回投与したコレスチラミン量は高コレステロール血症の治療に使用される常用量 (12 g/日) であるが、血中コレステロールが 10%程度低下したことから考えると胆汁酸を十分に吸着し便中に排泄していたと考えられる。2名の患者でみられた自覚症状の改善は非特異的な効果であり、コレスチラミンは PCB 等の排泄促進剤としては無効と考えられた。

油症患者の体内に蓄積された PCB 等の排泄促進を図ることは油症治療における最優先課題であるが、未だに有効な治療法は確立されていない。今後も可能性のある種々の治療法を試みる必要がある。

文 献

- 1) Cohn W. J., Boylan J. J., Blanke R. V., Fariss M. W., Howell J. R. and Guzelian P. S.: Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine. Results of a controlled clinical trial. N. Engl. J. Med. 298: 243-248, 1978.
- 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) 飯田隆雄, 森田博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 竹中重幸, 森田邦正, 檜崎幸範, 深町和美, 常盤 寛, 高橋克巳, 吉村英敏: コレスチラミン投与による油症原因物質の糞便中への排泄促進の試み. 福岡医誌 82: 317-325, 1991.
- 4) 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, 1978.
- 5) 倉恒匡徳: 油症と PCB に関する研究報告集 第 12 集 序言 (1). 福岡医誌 80: 179-180, 1989.
- 6) Nishizumi M.: Carcinogenicity of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran and 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran in rats. Fukuoka Acta Med. 80: 240-245, 1989.

油症における米ぬかファイバー・コレステラミン 併用投与の予備的研究

九州大学医学部第二内科学教室

辻 博・野見山賢介・池田耕一
川床利晴・蔡 剣平・藤島正敏
福岡県衛生公害センター
高橋克巳

Effects of Rice Bran Fiber and Cholestyramine on Peripheral Blood Cells and Biochemical Parameters in Yusho

Hiroshi TSUJI, Kensuke NOMIYAMA, Koichi IKEDA,
Toshiharu KAWATOKO, Jian Ping CAI and Masatoshi FUJISHIMA
Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Kyushu University 60, Fukuoka 812

Katsumi TAKAHASHI
Fukuoka Environmental Research Center, Mukaizano Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01

To investigate clinical effects of rice bran fiber and cholestyramine therapy in Yusho, peripheral blood cells and biochemical parameters were studied before and after therapy in eleven healthy volunteers and four patients with Yusho who were treated with rice bran fiber 30 g/day and cholestyramine 12 g/day for 7 days.

In healthy volunteers, a significant elevation in total leukocyte counts as well as lymphocyte counts was observed after therapy (leukocyte $p < 0.005$, and lymphocyte, $p < 0.01$). In lymphocyte subpopulations, significant elevations were found in CD3⁺ and B1⁺ positive cells (CD3, $p < 0.05$ and B1, $p < 0.001$). However, no significant effect of the treatment was observed in reticulocyte counts or platelet counts. In biochemical parameters, total cholesterol levels decreased significantly, from 208 ± 36 mg/dl (mean $\pm$ SD) to 173 ± 30 mg/dl ($p < 0.001$), after therapy. HDL-cholesterol levels were also reduced significantly after therapy (from 50 ± 12 to 46 ± 13 mg/dl; $p < 0.05$). Serum triglyceride levels increased significantly, from 155 ± 96 to 195 ± 133 mg/dl ($p < 0.05$), after therapy. A significant increase was observed in serum levels of alanine aminotransferase, while significant depressions were found in serum levels of total bilirubin, total protein, γ -globulin, creatinine, and calcium.

In four Yusho patients who received rice bran fiber and cholestyramine therapy twice with more than one month interval, the clinical effects of therapy in addition to biochemical effects were studied. An only significant effect was observed in serum levels of total cholesterol. The increases of bowel movements and abdominal distention were observed in these patients as well as healthy volunteers.

はじめに

1968年4月頃より polychlorinated biphenyl (PCB) が混入したライスオイル摂取により北部九州を中心に発生した油症は23年を経過し、種々の亜急性

症状は軽快している。しかし、重症例においては体内のPCB濃度が今なお高く、血中PCBの組成にはいまだに特徴的なパターンがみられる⁵⁾ ことより残留性のPCBによる慢性中毒に移行していると推定される。また、さらに強力な毒性をもつ polychlorinated diben-

zofuran(PCDF)の体内残留が問題となっている⁹⁾。油症患者の治療に関して多くの試みがなされてきたが、未だ有効な治療法は確立されていない¹⁾³⁾¹⁰⁾。最近、PCBを投与したラットに食物繊維の米ぬかファイバーおよびコレステラミンを併用投与し PCB の糞便中への排泄促進が報告されている⁹⁾。そこで今回、九大油症研究班では健康成人に米ぬかファイバーおよびコレステラミンを併用投与し、その安全性および臨床検査値の変動を検討した。さらに、PCB および PCDF の糞便中排泄促進を期待して 4 例の油症患者に本法療法を施行したので報告する。

対象および方法

対象は健康成人 11 例（男性 10 例、女性 1 例）および 4 例の油症認定患者（男性 2 例、女性 2 例）である。健康成人の平均年齢は 42.4±8.2 才(28~53 才)、油症認定患者の年齢および性は各々、症例 1 (Yu. M.: 55 才、女性)、症例 2 (Ya. M.: 59 才、男性)、症例 3 (T. M.: 50 才、男性)、症例 4 (E. M.: 47 才、女性)であった。

方法は米ぬかファイバー 30 g およびコレステラミン(クエストラン、プリストル・マイヤーズ社) 12 g の 1 日量を 3 分服で 7 日間投与した。4 例の油症認定患者では 1 カ月以上の間隔をおいて 2 回の本治療を施行した。米ぬかファイバーは Prosky ら⁷⁾の方法に準じて、福岡県衛生公害センターで作製された。治療前および治療中の自覚症状、排便回数を調査し、治療前後の理学的所見を観察した。また、治療前後の空腹時に採血を行ない、得た各々の血液試料について末梢血液

血球数、血液生化学パラメーターを観察した。血清 GOT, GPT, LDH, アルカリフォスファターゼ, γ -GPT, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, コリンエステラーゼ, 総コレステロール, HDL コレステロール, 中性脂肪, 総胆汁酸, 総蛋白, アルブミン, アミラーゼ, 血糖, 尿素窒素, クレアチニン, 尿酸, ナトリウム, カリウム, クロール, カルシウム, リンは TBA-80 Super (東芝社製)を用い測定した。 γ -グロブリン値は総蛋白に蛋白電気泳動により得られた γ -グロブリン分画濃度比を乗じて算出した。また、リンパ球亜集団の測定は抗ヒトマウスモノクローナル抗体を用い免疫蛍光染色法により、標識マーカーとして成熟 T 細胞に CD3 (OKT3) を、B 細胞に B1 を使用して施行し (Ortho 社および Coulter 社)、リンパ球亜集団の絶対密度で示した。また、治療前後の血液、治療前および治療中に蓄便した糞便中の PCB, PCDF の測定は福岡県衛生公害センターで行なった。

統計学的処理は、結果を平均±標準偏差(mean±S.D.)で表し、有意差検定には paired Student's t test を用い、治療中あるいは治療後の値を治療前値と比較した。

結 果

健康成人 11 例全例において 7 日間の米ぬかファイバー・コレステラミン併用投与が終了した。自覚症状では治療中に腹部膨満感を 6 例、腹痛を 3 例に認めたが、いずれも軽度であった。治療中の排便回数は平均 1.47±0.75 回/日と治療前の平均 1.03±0.56 回/日に比べ有意の増加 ($p<0.001$) を認めた。治療前後の理

Table 1 Effects of Rice Bran Fiber and Cholestyramine on Peripheral Blood Cells in 11 Healthy Volunteers

		Before	After	p
RBC	($\times 10^4/\text{mm}^3$)	476±41	469±35	NS
Hb	(g/dl)	14.6±0.9	14.5±0.8	NS
Ht	(%)	45.2±2.6	44.5±2.5	NS
WBC	(/mm ³)	5409±1044	6100±996	<0.005
Neutrophil	(/mm ³)	2784±851	3106±757	NS
Eosinophil	(/mm ³)	219±300	140±199	NS
Basophil	(/mm ³)	10±22	0±0	NS
Monocyte	(/mm ³)	311±135	332±144	NS
Lymphocyte	(/mm ³)	2077±600	2544±435	<0.01
T cell	(/mm ³)	1436±456	1718±407	<0.05
B cell	(/mm ³)	242±114	380±94	<0.001
Platelet	($\times 10^4/\text{mm}^3$)	22.3±3.5	22.3±3.5	NS

Statistical comparisons between pretreatment levels and posttreatment levels were made using the paired Student's t-test. NS; not significant.

学的所見には異常を認めなかった。米ぬかファイバー・コレステラミン併用投与による末梢血液検査の変化を Table 1 に示した。赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリットおよび血小板に変化はみられなかったが、白血球が治療前 $5,409 \pm 1,044/\text{mm}^3$ より治療後 $6,100 \pm 996/\text{mm}^3$ と有意の増加 ($p < 0.005$) を認めた。治療により好中球、好酸球、好塩基球、単球には変化がみられず、リンパ球が治療前 $2,077 \pm 600/\text{mm}^3$ より治療後 $2,544 \pm 435/\text{mm}^3$ と有意に増加 ($p < 0.01$) したことより、リンパ球増加が白血球増加の原因と考えられた。さらに、リンパ球亜集団の検討では CD3 陽性成熟 T 細胞および B1 陽性 B 細胞はともに有意の増加 (CD3 , $p < 0.05$; B1, $p < 0.001$) を示した。血液生化学検査値の治療前後の変化を Table 2 に示した。総コレステロールは治療前 $208 \pm 36 \text{ mg/dl}$ より治療後 $173 \pm 30 \text{ mg/dl}$ と約 17% の有意の低下 ($p < 0.001$) を認め、HDL コレステロールも治療前 $50 \pm 12 \text{ mg/dl}$ より治療後 $46 \pm 13 \text{ mg/dl}$ と約 8% の有意の低下 ($p < 0.05$) を認めた。

中性脂肪は治療前 $155 \pm 96 \text{ mg/dl}$ より治療後 $195 \pm 133 \text{ mg/dl}$ と有意の上昇 ($p < 0.05$) を認めた。GPT の上昇、総ビリルビン、総蛋白、 γ -グロブリン、クレアチニンおよびカルシウムの低下を認めたが、いずれの変化も軽度であった。GOT, LDH, アルカリフォスファターゼ、 γ -GTP, 直接ビリルビン、コリンエステラーゼ、総胆汁酸、アルブミン、アミラーゼ、血糖、尿素窒素、尿酸、ナトリウム、カリウム、クロール、リンに有意の変化はみられなかった。

油症認定患者 4 例に対する米ぬかファイバー・コレステラミン併用投与では、腹部膨満感を 1 回目の投与中に 4 例中 2 例に認めたが、2 回目にはみられなかった。治療中の排便回数は平均 1.04 ± 0.60 回/日と治療前の平均 0.86 ± 0.59 回/日に比べ増加傾向を認めたが、有意ではなかった。計 8 回の本治療における治療前後の理学的所見に変化はみられず、検査所見では総コレステロールのみに有意の低下 ($p < 0.001$) を認め治療前 $231 \pm 39 \text{ mg/dl}$ より治療後 $189 \pm 28 \text{ mg/dl}$ となっ

Table 2 Effects of Rice Bran Fiber and Cholestyramine on Biochemical Parameters in 11 Healthy Volunteers

		Before	After	p
GOT	(IU/l)	26 ± 16	26 ± 12	NS
GPT	(IU/l)	23 ± 17	33 ± 17	< 0.05
LDH	(IU/l)	419 ± 127	373 ± 45	NS
ALP	(IU/l)	164 ± 21	172 ± 22	NS
γ -GTP	(IU/l)	27 ± 15	32 ± 24	NS
Total bilirubin	(mg/dl)	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	< 0.05
Direct bilirubin	(mg/dl)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.04	NS
ChE	(IU/l)	363 ± 86	361 ± 84	NS
Total cholesterol	(mg/dl)	208 ± 36	173 ± 30	< 0.001
HDL cholesterol	(mg/dl)	50 ± 12	46 ± 13	< 0.05
Triglyceride	(mg/dl)	155 ± 96	195 ± 133	< 0.05
Total bile acid	($\mu\text{M/l}$)	2.8 ± 2.8	2.2 ± 4.3	NS
Total protein	(g/dl)	7.6 ± 0.6	7.4 ± 0.5	< 0.05
Albumin	(g/dl)	4.6 ± 0.3	4.5 ± 0.3	NS
γ -Globulin	(g/dl)	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.3	< 0.05
Amylase	(IU/l)	89 ± 18	91 ± 17	NS
Glucose	(mg/dl)	73 ± 7	71 ± 5	NS
BUN	(mg/dl)	14 ± 3	13 ± 4	NS
Creatinine	(mg/dl)	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	< 0.05
Uric acid	(mg/dl)	6.1 ± 1.2	6.0 ± 1.1	NS
Na	(mEq/l)	145 ± 1	144 ± 1	NS
K	(mEq/l)	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	NS
Cl	(mEq/l)	108 ± 1	108 ± 2	NS
Ca	(mEq/l)	9.2 ± 0.3	9.0 ± 0.4	< 0.05
P	(mEq/l)	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.4	NS

Statistical comparisons between pretreatment levels and posttreatment levels were made using the paired Student's t-test. NS; not significant.

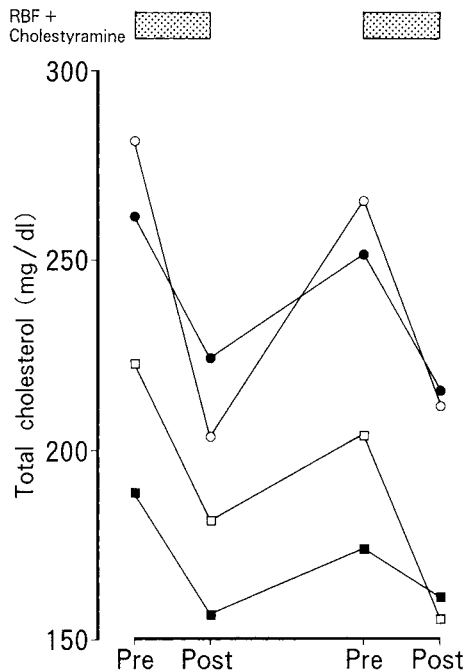


Fig. 1 Sequential determinations of total cholesterol (mg/dl) in each patient with Yusho who received rice bran fiber (RBF) and cholestyramine therapy for 7 days with more than one month interval. ○—○; case 1, ●—●; case 2, □—□; case 3, ■—■; case 4.

た、各症例における2回の治療前後の総コレステロールの変化では、全例で治療による低下を認めた (Fig. 1)。

考 察

油症の原因物質である PCB は動物実験において経口投与後、小腸粘膜でカイロミクロンに取り込まれ胸管リンパを経由して血中に移行することが知られている⁴⁾。血中の PCB はカイロミクロンの異化に伴ないアルブミン結合型となり全身に輸送され、脂肪組織へ蓄積される。また、油症原因油中に含まれていた PCDF 異性体の一つである Pentachlorodibenzofuran (PenCDF) はさらに強力な毒性をもち、同様な経路を経て吸収され肝に特異的に蓄積される。PCB, PCDF の主要な排泄経路は血中より小腸管腔内への直接的な移行であるが、小腸管腔内へ排泄されたものの大部分は小腸粘膜より再吸収されると考えられている。したがって PCB および PCDF の再吸収を抑制することにより、これらの原因物質の排泄が促進できると考えられる。

コレステラミンは胆汁酸の特異的吸着剤として作用することより高脂血症の治療薬として使用されている陰イオン交換樹脂であり、PenCDF の糞便中への排泄を促進することが報告されている⁴⁾。一方、米ぬかファイバーは *in vitro* において PCB, PCDF をよく吸着することが報告されており⁸⁾、その便通改善効果とともに PCB および PCDF の糞便中への排泄を促進すると考えられる。最近、Takenaka ら⁹⁾ は PCB (Kanechlor 600) を投与したラットに米ぬかファイバーおよびコレステラミンを投与し PCB の糞便中排泄量が対照の 5.7 倍に増加したと報告しており、油症患者においてもこれらの併用投与により PCB および PCDF の糞便中排泄促進が期待される。

今回の検討では、健康成人、油症患者ともに治療中、米ぬかファイバーによる糞便量の増加によると考えられる腹部膨満感の出現および排便回数の増加を認めた。一方、コレステラミンには副作用として便秘が知られているが、米ぬかファイバーの併用により便通の改善が計られたと考えられる。

健康成人における米ぬかファイバー・コレステラミン併用投与の検討では総コレステロールおよび HDL コレステロールの低下を認めた。HDL コレステロールの低下は約 8% と総コレステロールの低下約 17% に比べ少ないことより、総コレステロールの低下は主に LDL コレステロールの低下によると考えられ、総コレステロール中の HDL コレステロールの比率はむしろ上昇していた。今回の検討では中性脂肪の上昇を認めたが、コレステラミンには胆汁酸排泄に伴う食事性脂肪吸収の減少により脂肪組織中の蓄積脂肪が移動し高中性脂肪血症をしばしば引き起こすことが知られている²⁾。油症患者 4 例に対する計 8 回の米ぬかファイバー・コレステラミンの併用投与では中性脂肪の上昇を認めなかったが、長期投与においては中性脂肪を定期的に観察する必要があると考えられる。

健康成人において本治療により GPT の上昇、総ビリルビン、総蛋白、 γ -グロブリン、クレアチニン、カルシウムの低下を認めたが、いずれも軽度であった。また、末梢血リンパ球の増加を認め、T 細胞、B 細胞ともに増加していたが、本治療によるリンパ球の増加については今後、さらなる検討が必要と考えられる。

油症患者 4 例に対する計 8 回の米ぬかファイバー・コレステラミンの併用投与では有意差を認めたものは総コレステロールの低下のみであった。福岡県衛生公害センターの分析結果では本治療により油症患者糞便中の PCB および PCDF の排泄量増加がみられること

より、本治療法による PCB および PCDF の糞便中排泄促進を今後症例を増し検討する必要があると考えられる。

総 括

油症における PCB および PCDF の糞便中排泄促進を目的とした米ぬかファイバーおよびコレステラミン併用投与の予備的研究として、健康成人 11 例に本治療を施行し安全性および臨床検査値の変動を検討した。さらに、油症患者 4 例に米ぬかファイバーおよびコレステラミンの併用投与を行なった。

1. 健康成人 11 例に対する検討では、治療中に腹部膨満感、腹痛と排便回数の増加を認めたが、治療前後の理学的所見に異常を認めなかった。末梢血液検査では赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリットおよび血小板に変化なく、白血球増加を認めた。これは主としてリンパ球の増加によるもので、リンパ球亜集団の検討では T 細胞、B 細胞ともに増加を認めた。血液生化学検査では治療後、総コレステロールは治療前 208 ± 36 mg/dl より 173 ± 30 mg/dl と有意の低下 ($p < 0.001$) を認め、HDL コレステロールも治療前 50 ± 12 mg/dl より 46 ± 13 mg/dl と有意の低下 ($p < 0.05$) を認めた。中性脂肪は前値 155 ± 96 mg/dl より治療後には 195 ± 133 mg/dl と有意の上昇 ($p < 0.05$) を認めた。GPT の上昇、総ビリルビン、総蛋白、 γ -グロブリン、クレアチニン、カルシウムの低下を認めたが、いずれも軽度であった。

2. 油症認定患者 4 例に対する 2 回の米ぬかファイバー・コレステラミン併用投与では、腹部膨満感を 1 回目の投与中に 2 例に認めたが、2 回目にはみられなかった。投与中の排便回数の増加傾向を認め、全例において投与による血清総コレステロール値の低下を認めた。

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) Jones, R. J. and Dobrilovic, L.: Lipoprotein lipid alterations with cholestyramine administration. J. Lab. Clin. Med. 75: 953, 1970.
- 3) Kamimura, H., Naganuma, T., Oguri, K. and Yoshimura, H.: Stimulating effect of liquid paraffin and cholestyramine on fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats. Eisei Kagaku 32: p-19, 1986.
- 4) 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.
- 5) 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ル異性体. 福岡医誌 76: 150-152, 1985.
- 6) 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.
- 7) Prosky, L., Asp, N.-G., Furda, L., Devries, J. W., Schweizer, T. F. and Harland, B. F.: Determination of total dietary fiber in food and food products. Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68: 677-679, 1985.
- 8) Takenaka, S., Morita, K., Hirakawa, H., Tokiwa, H. and Takahashi, K.: Binding of PCBs, PCDFs and PCCDs to rice bran fiber. Eisei Kagaku 35: p-33, 1989.
- 9) Takenaka, S., Morita, K., Tokiwa, H., and Takahashi, K.: Effects of rice bran fiber and cholestyramine on the fecal excretion of Kanechlor 600 (PCBs) in rats. Xenobiotica 21: 351-357, 1991.
- 10) Yoshimura, H., Kamimura, H., Oguri, K., Honda, Y. and Nakano, M.: Stimulating effect of activated charcoal beads on fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats. Chemosphere 15: 219-227, 1986.

油症患者の血中 PCB 濃度と自他覚症状の関連 —全国油症患者追跡検診結果の比較研究—

九州大学医学部公衆衛生学講座

廣田良夫・廣畑富雄

福岡県衛生公害センター

片岡恭一郎・篠原志郎・高橋克巳

Associations between Blood PCB Level and Symptoms of Yusho Patients, Twenty Years after Outbreak

Yoshio HIROTA, Tomio HIROHATA

Kyushu University, School of Medicine, Department of Public Health

Kyoichiro KATAOKA, Shiro SHINOHARA, Katsumi TAKAHASHI

Fukuoka Environmental Research Center

To investigate relationships between blood PCB (polychlorinated biphenyls) level and symptoms of Yusho patients, twenty years after outbreak, a comparative study was designed in accordance with the results of medical examination conducted in 1988. For this examination, standardized forms were introduced in 1986, and a whole system for data-processing has been completed through two-years' efforts. Study subjects were 259 Yusho patients (male: 136, female: 123) for whom PCB concentration in blood was reported, among a total of 285 patients examined (91%). And 31 examination items which correspond or relate to the diagnostic criteria for Yusho (1976) were selected from the examination form for analysis. Mean blood PCB concentration in the subjects was 4.78 ppb ranging 0.6~32.0 ppb. The subjects were stratified for four blood PCB levels, ≤ 2.6 ppb; ≤ 4.0 ppb; ≤ 6.0 ppb; > 6.0 ppb, by dichotomized categories (normal/abnormal) for the results of each examination. This two-by-four table was transformed to two-by-two table with a cut-off point where the largest χ^2 -value was obtained. Then the odds ratio (OR) adjusted for gender and age was calculated for the examination item which showed a statistically significant decrease or increase in crude odds ratio, to assess the association between blood PCB level and symptoms of Yusho patients. Higher blood PCB level was associated with positive signs for general fatigue (OR: 1.8, 95%CI: 0.9~3.7, 90%CI: 1.0~3.3); heaviness in the head or headache (2.1, 1.1~3.9, 1.2~3.5); abnormality of breath sound (7.6, 1.0~57.1, 1.4~41.5); tendency of suppuration (2.9, 1.3~6.1, 1.5~5.4); comedones in face (2.8, 1.2~6.4, 1.4~5.6); comedones in trunk (4.5, 1.2~16.4, 1.5~13.3); acneiform eruptions in genital region (4.3, 1.2~15.7, 1.5~12.8). The respiratory and skin symptoms seem to be strongly associated with higher blood PCB level and to be pathognomonic for Yusho, even twenty years after exposure.

はじめに

最初の油症患者が1968年に報告されて以降、1990年までの患者発生数は1,862人に達している¹⁾。発生以降、時間の経過とともに油症の急性症状は消滅し慢性症状が主体を占めてきたことから、当初研究班によ

り作成された診断基準は1972年に改訂され、更に1976年には補遺が出されている。また全国の油症患者に対する検診が毎年行われてきたが、慢性症状の把握に加えて患者の健康管理をも適切に行う観点から、1985年には統一検診票が作成され、1986年から全国一律に本統一検診票を用いた検診が行われることとなっ

た。一方、油症の原因食品であるライスオイルが高濃度の PCBs (polychlorinated biphenyls) により汚染されていたことが判明して以降³⁹⁾、血中 PCB 濃度ならびに PCB パターンの測定が可能となり、1972 年改訂診断基準には「血中 PCB の性状および濃度の異常」についても追記された。更に原因食品であるライスオイル中には PCB の 2 量体 PCQs (polychlorinated quaterphenyls) が PCB と等濃度で混入していたことが明らかにされて後²¹⁾、この PCQ は PCB のような自然環境暴露がないため、原因食品であるライスオイル摂取の有無を判定するための有用な指標と考えられ、1981 年に診断基準への追加が行われた。これら PCB・PCQ ともに統一検診票の項目に加えられているが、PCQ 濃度が測定される例数は限られている。

今回統一検診票から得られた情報をもとに、油症発生以降 20 年が経過した時点での患者の慢性症状の特性を観察することを目的として、血中 PCB 濃度と検診項目の有所見との関連を検討したので報告する。

対 象 と 方 法

統一検診票による全国一斉検診が 1986 年に開始されて以降、当初 2 年間は検診情報の比較性の検討や情報処理システムの構築¹⁰⁾に努力が払われてきた。この結果システムフローが安定的に整備された後の 1988 年の検診結果について解析することとした。同年検診受診者 373 人のうち認定患者は 285 人(男:143, 女:

142)であり、このうち血中 PCB 濃度の数値が記載されている 259 人 (91%) を解析の対象とした。男女別内訳は 136 人と 123 人であり、受診認定患者に占める割合はそれぞれ 95%, 87%である。

解析対象者の血中 PCB 濃度の分布幅は 0.6~32.0 ppb であり、平均 4.78 ppb (標準偏差 3.50) であった。得られた測定値の四分位数を求め、血中 PCB 濃度別に ≤ 2.6 ppb : 65 人, ≤ 4.0 ppb : 79 人, ≤ 6.0 ppb : 64 人, > 6.0 ppb : 51 人, の 4 レベルに分類した。

検討する項目は統一検診票の項目の中から油症診断基準 (1976 年補遺) に述べられている重要所見および参考所見と合致または関連するものを抽出した。最終的に内科検診票からは自覚症状として、全身倦怠感、頭重・頭痛、咳嗽、喀痰、腹痛、しびれ感、月経異常、他覚症状として呼吸音、肝腫、脾腫、感覚障害、肝・胆・脾エコー、皮膚科検診票からは問診による最近の化膿傾向、他覚所見として黒色面皰 (顔面、耳介、軀幹、その他)、痤瘡様皮疹 (顔面、外陰部、臀部、軀幹、その他)、色素沈着 (顔面、指爪、趾爪、その他)、爪変形、眼科検診票からは主訴として眼脂過多、他覚所見として眼瞼結膜色素沈着、瞼板腺嚢胞形成、瞼板腺チーズ様分泌物圧出を抽出し、合計 31 項目を検討の対象とした。これらの検診結果を、(所見あり/所見なし)、または (異常/正常) の 2 つのカテゴリーに分類した。結果の記載が 3 つ以上のカテゴリーに分類されている場合、内科自覚症状項目に関しては (+ま

Table 1 Relationship between blood PCB level and positive sign in medical examination (Internal medicine).

Items of examination	PCB level (ppb) ^{a)}	OR ^{b)}	95% CI ^{c)}	90% CI ^{c)}
Subjective Symptom				
General fatigue ^{d)}	$> 2.6 / \leq 2.6$	1.84	0.91- 3.71	1.02- 3.32*
Heaviness in the head or headache ^{d)}	$> 2.6 / \leq 2.6$	2.07	1.09- 3.92*	1.21- 3.54*
Numbness ^{e)}	$> 2.6 / \leq 2.6$	1.63	0.84- 3.15	0.93- 2.84
Abnormality of menstruation ^{d)f)}	$> 2.6 / \leq 2.6$	0.40	0.09- 1.81	0.11- 1.43
Objective Sign				
Abnormality of breath sound ^{e)}	$> 4.0 / \leq 4.0$	7.60	1.01-57.13*	1.39-41.52*
Enlargement of the liver ^{e)}	$> 6.0 / \leq 6.0$	1.63	0.58- 4.59	0.68- 3.90

a) PCB level in denominator corresponds to the unity in odds ratio.

b) Odds ratio was adjusted for gender and age through the Mantel-Haenszel's method.

c) Confidence interval was calculated through the Miettinen's method.

d) Referent sign of the diagnostic criteria for Yusho.

e) Sign related to paresthesia of extremities, bronchitis-like symptoms or decrease of serum bilirubin of the diagnostic criteria for Yusho.

f) Data for 83 reported cases. Data were unreported for 40 among 123 women examinees.

* Statistically significant.

たは+)を所見あり, (一)を所見なし, 皮膚科他覚所見項目と眼科検診項目に関しては(+, #, または#)を所見あり, (一または土)を所見なし, とした。

血中 PCB 濃度 4 レベルと各検診結果の 2 カテゴリーによる 2×4 分割表をもとに, 最大の χ^2 値が得られる cut-off point を設けて 2×2 分割表を作成し, crude odds ratio (crude OR) および 95% CI (信頼区間) と 90% CI を求めた。crude OR の有意な上昇または低下が認められた検診項目に関し, Mantel-Haenszel 法¹⁵⁾により性・年齢を補正した adjusted OR, 及び Miettinen 法¹⁶⁾により 95% CI と 90% CI を計算した。補正に用いた年齢階層は, -39, 40-, 50-, 60-, 70-, である。

結 果

血中 PCB 濃度の高濃度側で OR の有意な上昇 (危険率 5%, 片側検定) を認めた検診項目は, 内科検診の全身倦怠感, 頭重・頭痛, 呼吸音異常, 皮膚科検診の化膿傾向, 黒色面皰 (顔面, 軀幹), 痤瘡様皮疹 (外陰部) であった。特に呼吸音異常では血中 PCB 高濃度側

で OR が 7.60 と大きな上昇を認めた。しかしながら 95% CI は 1.01~57.13, 90% CI は 1.39~41.52 と大きな幅を示している。有意差を認めた皮膚科検診項目のいずれにおいても血中 PCB 高濃度側で 2 を超える OR を示し, 特に黒色面皰 (軀幹) と痤瘡様皮疹 (外陰部) に関しては OR は 4 を超えている。

内科検診でのしびれ感, 月経異常, 肝腫, 皮膚科検診での黒色面皰 (耳介), 痤瘡様皮疹 (顔面) 眼科検診での眼瞼結膜色素沈着に関しては, 血中 PCB 高濃度側で crude OR の有意な上昇または低下を認めたものの, 性・年齢を補正して得られた adjusted OR は有意に到らなかった。今回解析の対象として抽出した検診項目のうち, 内科検診での咳嗽, 喀痰, 腹痛, 脾腫, 感覚障害, 肝・胆・脾エコー, 皮膚科検診での黒色面皰 (その他), 痤瘡様皮疹 (臀部, 軀幹, その他), 色素沈着 (顔面, 指爪, 趾爪, その他), 爪変形, 眼科検診での眼脂過多, 瞼板腺嚢胞形成, 瞼板腺チーズ様分泌物圧出, に関しては, 血中 PCB 高濃度側で crude OR の有意な上昇は認められなかった。

Table 2 Relationship between blood PCB level and positive sign in medical examination (Dermatology).

Items of examination	PCB level (ppb) ^{a)}	OR ^{b)}	95% CI ^{c)}	90% CI ^{c)}
Subjective Symptom				
Tendency of supuration ^{d)}	>6.0/≤6.0	2.85	1.34- 6.08*	1.51- 5.39*
Objective sign				
Comedones (face) ^{d)}	>6.0/≤6.0	2.77	1.21- 6.35*	1.38- 5.57*
Comedones (auricle) ^{d)}	>6.0/≤6.0	2.32	0.84- 6.39	0.99- 5.45
Comedones (trunk) ^{d)}	>2.6/≤2.6	4.47	1.22-16.37*	1.50-13.33*
Acneiform eruption (face) ^{d)}	>2.6/≤2.6	0.73	0.15- 3.62	0.19- 2.81
Acneiform eruptions(genital region) ^{d)}	>4.0/≤4.0	4.33	1.19-15.67*	1.46-12.78*

^{a)} PCB level in denominator corresponds to the unity in odds ratio.

^{b)} Odds ratio was adjusted for gender and age through the Mantel-Haenszel's method.

^{c)} Confidence interval was calculated through the Miettinen's method.

^{d)} Important sign of the diagnostic criteria for Yusho.

* Statistically significant.

Table 3 Relationship between blood PCB level and positive sign in medical examination (Ophthalmology).

Items of examination	PCB level (ppb) ^{a)}	OR ^{b)}	95% CI ^{c)}	90% CI ^{c)}
Objective Sign				
Pigmentation in palpebral conjunctiva ^{d)}	>6.0/≤6.0	2.81	0.74-10.66	0.92-8.64

^{a)} PCB level in denominator corresponds to the unity in odds ratio.

^{b)} Odds ratio was adjusted for gender and age through the Mantel-Haenszel's method

^{d)} Important sign of the diagnostic criteria for Yusho.

考 察

油症発生当時、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、本疾患は PCB 中毒症と考えられた。その後、PCB 製品に微量の polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) が混在すること⁴¹⁾、PCB が加熱されることにより PCDFs が生成すること³⁾²²⁾が報告されるとともに、原因ライスオイル中からも PCDFs が検出された⁴⁾¹⁹⁾。またライスオイル中からは PCB の 2 量体である PCQ が PCB と等濃度で混入していたことも明らかにされている²¹⁾。なかでも PCDFs は毒性が極めて高いことから、今日では油症の重要な原因と考えられている¹²⁾⁴³⁾。この他、原因ライスオイル中にはコプラナー型 PCBs, polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) を始め、多くの PCB 関連塩素系化合物が検出されている⁹⁾²⁰⁾⁴²⁾。

患者の血中 PCB 濃度は油症発生後 5 年経過した 1973 年頃から分析されているが、PCDFs についても油症発生後初期に採取した患者の脂肪組織や肝臓から⁶⁾、PCDDs については患者の肝臓・腸および血液から検出されている⁷⁾⁹⁾。このように油症の病態そのものの原因としては多くの PCB 関連化合物の関与が考えられており、また血中 PCB に関しては一般健康人においても、特に魚食頻度の高い人で比較的高濃度に検出されている²⁾。以上のことを考慮すると血中 PCB 濃度と検診有所見との関連を検討することが適切であるかどうかの疑問が生ずる。しかしながら、油症患者の血中 PCB 濃度の平均は一般健康人に比べて 2 倍以上を示していること³³⁾、患者の血中 PCB 濃度はあまり変化なく推移していること¹⁾、油症患者特有の血中 PCB ガスクロマトグラムパターン¹⁵⁾は発生後 3 年位でできあがっていたと推定され³⁴⁾、そのパターンは発生後 15 年経過した時点においても維持されていること¹⁷⁾、油症患者特有の GC パターン A タイプと BC タイプの人の血中 PCB 濃度の平均は、健康人特有の C タイプの人の約 2 倍を示していること²⁹⁾、などが報告されている。従って今回の認定患者のみを対象として、血中 PCB 濃度を指標とし、それと検診有所見の関連を検討したことは、病態と直接関与することが示唆される多くの PCB 関連塩素系化合物全体としての長期バクロの指標としては妥当と考えられる。

油症の症状は 1968 年の診断基準でも記されているように、眼所見および皮膚所見を主としている²³⁾⁴⁰⁾。しかしながら時間の経過とともに患者の訴えが多様化し

たことに伴い、1972 年からは診断基準に数種の自覚症状が付け加えられている。このうち全身倦怠感と頭重・頭痛について血中 PCB 濃度との関連を認めた。油症に伴う呼吸器系の主症状は慢性気管支炎様の症状、すなわち咳嗽と喀痰であり、患者の訴えでは「かたくり色の痰」という表現が特徴的とされている³⁰⁾。また発症 1 年後の調査では非喫煙者の 40% が喀痰を伴う咳嗽を訴えており³⁶⁾、その後 10 年間の追跡調査では徐々に軽快傾向を示しているものの最近 5 年間では大半の症例で改善の兆候は認められず³⁰⁾、特に血中 PCB 濃度が高値を示している症例と、慢性気道感染症を有する症例でその傾向が強いことが報告されている³⁶⁾。今回の解析結果では、呼吸音異常について血中 PCB 高濃度側の OR は 7.6 という大きな値を示している。これは前報告に記されているように³⁶⁾、血中 PCB 濃度と呼吸器症状が強く関連すること、また油症患者で呼吸器症状が長期に続いていることを示すものであろう。また喀痰・咳嗽について有意差を認めなかったのは、喫煙の影響³⁶⁾を考慮していないことも関係していると考えられる。ヒト肺に PCB-methylsulfone と特異的に結合する target cell が存在することや¹⁴⁾Furan 誘導体による細気管支クララ細胞の壊死に関する報告もあり³⁰⁾、今回血中 PCB 濃度と呼吸器症状との強い関連が認められたのは興味深い。

発症後 9 年目に死亡した油症患者の肝で PCDF が検出されたことから、PCDF は長期にわたってヒト肝に残留すると考えられている¹³⁾。またラットやマウスを用いた動物実験でも高い蓄積性や強い毒性が確認されている³¹⁾³⁵⁾、肝がんの発生との関与についても報告されている³²⁾。今回の解析では血中 PCB 濃度と肝腫の関連を示唆する結果を得たが、補正した OR は有意には到らなかった。また肝・胆・脾エコーの有所見との関連も認められなかった。

患者の皮膚症状は初期の 2 年間に大幅な改善を示し³⁷⁾、以後は徐々に軽快傾向を示しながら推移していることが報告されている³⁸⁾。また血中 PCB の GC 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皮膚症状は一般に高度であるが、A パターンを示す症例においても近年は改善傾向にあること、他方長期追跡し得た症例には比較的皮膚症状が高度な例が多く、これらの症例では皮疹の数は極めて少ないもの、面皰、痤瘡様皮疹が約半数の症例で残存していることが報告されている⁵⁾。今回、認められた化膿傾向、黒色面皰(顔面、軀幹)、痤瘡様皮疹(外陰部)と血中 PCB 濃度との関連は、従来の報告と一致する。特に黒色面皰(軀

幹)と痤瘡様皮疹(外陰部)に関しては血中 PCB 高濃度側で 4 を超える OR を示している。

油症患者には当初、眼瞼浮腫、瞼板腺の腫大・分泌過多、白色チーズ様物排出などが認められており⁸⁾、これらの所見は瞼板腺の角化嚢胞の形成によることが実験的 PCB 中毒サル、及び油症患者の剖検例の組織学的検索により明らかにされている²⁶⁾²⁷⁾。これらの重篤な眼症状は徐々に消滅し、瞼板腺の病変も軽微となり、肉眼的に観察困難な例が増加していること、瞼板腺の腫大が認められる例でも明らかな角化嚢胞の形成は少なくなっていることが報告されている²⁴⁾²⁸⁾。一方、一部の患者では眼瞼を圧迫することにより白色チーズ様の瞼板腺嚢胞内容物が排出され、依然として瞼板腺病変が続いていることも報告されている²⁵⁾。今回の解析では血中 PCB 濃度と眼脂過多、瞼板腺嚢胞形成、瞼板腺チーズ様分泌物圧出との関連は認められず、眼瞼血膜色素沈着との関連が示唆されるに留まった。

統一検診票による全国一斉検診が実施され、これに関する情報処理体制が整備されたことから、今回既に発生より 20 年を経た患者の病状と暴露指標としての血中 PCB 濃度との関連を、1988 年の検診結果より検討した。その結果血中 PCB 濃度と関連ある検診項目として、全身倦怠感、頭重・頭痛、呼吸音異常、化膿傾向、黒色面皰、痤瘡様皮疹を認めた。特に呼吸器症状と皮膚症状は今日においても血中 PCB 濃度と強く関連しながら患者の主症状を形成していると考えられる。しかしながら今回の解析が単年度のみの解析であること、血中 PCB レベルの区分設定に当たってはかなり人為的操作を加えていることから、血中 PCB 濃度と症状との関連を結論付けるには、更に継続的に同様の観察・検討を繰り返す必要がある。

総 括

統一検診票が導入され、このための情報処理システムが整備されたことから、1988 年の検診結果をもとに血中 PCB 濃度と検診項目有所見との関連を検討した。

1) 対象は 1988 年検診受診認定患者 285 人のうち、血中 PCB 濃度が記載されている 259 人(男 136, 女 123)(91%)である。

2) 解析の対象とした検診項目は、統一検診票の項目で油症診断基準(1976 年補遺)に述べられている重要所見および参考所見と合致または関連する 31 項目である。

3) 各検診項目の所見を 2 カテゴリーに分類し、血中 PCB 濃度の 4 分位数をもとに最大の χ^2 値が得ら

れる cut-off point を設けて 2×2 分割表を作成し、血中 PCB レベルの低濃度側と高濃度側、各検診項目の所見あり、所見なしとの関連を性・年齢補正 odds ratio により検討した。

4) 血中 PCB 濃度と関連を認めた検診項目は、全身倦怠感、頭重・頭痛、呼吸音異常、化膿傾向、黒色面皰(顔面、軀幹)、痤瘡様皮疹(外陰部)であった。特に呼吸器症状と皮膚症状は今日においても血中 PCB 濃度と強く関連しながら患者の主症状を形成していると考えられる。

5) 本解析は単年度分であること、また血中 PCB レベルの区分設定に関し、かなり人為的操作を行っていることから、血中 PCB 濃度と症状の関連の結論を得るには継続的に同様の検討を行う必要がある。

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) Baba T and Baba H: Blood PCB concentration of healthy persons. The Report of Nagasaki Pref. Inst. Pub. Health Environ. 19: 102-114, 1981.
- 3) Buser HR, Bosshardt HP and Rappe C: Formation of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) from the pyrolysis of PCBs. Chemosphere 7: 109-119, 1978.
- 4) Buser HR, Rappe C and Gara A: Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) found in Yusho oil and in used Japanese PCB. Chemosphere 7: 439-449, 1978.
- 5) 本房昭三, 永江祥之介, 利谷昭治, 旭 正一: 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. 福岡医誌 80: 324-330, 1989.
- 6) 飯田隆夫, 中川礼子, 深町和美, 高橋克巳: 油症患者および健康者の皮下脂肪中の Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs), 福岡医誌 80: 296-301, 1989.
- 7) 飯田隆夫, 中川礼子, 深町和美, 高橋克巳: 油症患者の皮下脂肪組織中 Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs). 福岡医誌 80: 302-306, 1989.
- 8) 生井 浩, 杉 健児, 宇賀茂三: 油性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.
- 9) 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.
- 10) 片岡恭一郎, 大久保彰人, 篠原志郎, 廣田良

- 夫, 廣畑富雄: 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. 福岡医誌 80: 331-341, 1989.
- 11) 厚生省生活衛生局食品保健課集計. 1990.
- 12) 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.
- 13) Kuroki H and Masuda Y: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 7: 771-777, 1978.
- 14) Lund J, Andersson O and Ripe E: Characterization of a binding protein for the PCB metabolites 4,4'-bis(methyl-sulfonyl)-2,2',5,5',5-tetrachlorobiphenyl present in bronchoalveolar lavage from healthy smokers and non-smokers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83: 486-493, 1986.
- 15) Mantel N and Haenszel W: Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 22: 719-748, 1959.
- 16) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 高田真由美, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニール. 福岡医誌 65: 25-27, 1974.
- 17) 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.
- 18) Miettinen OS: Estimability and estimation in case-referent studies. *Am. J. Epidemiol.* 103: 226-236, 1976.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Morita M, Nakagawa J, Akiyama K, Mimura S and Isono N: Detailed examination of polychlorinated dibenzofurans in PCB preparations and Kanemi Yusho oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 67-73, 1977.
- 23) 向野利彦, 大西克尚, 廣中博見: 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.
- 24) 向野利彦, 大西克尚, 廣中博見: 油症患者の眼症状(第5報): 瞼板腺圧迫排出物中 PCB の検出. 福岡医誌 72: 237-241, 1981.
- 25) 向野利彦, 大西克尚, 廣中博見: 油症患者の眼症状(第6報) 瞼板腺内容物採取の工夫と PCB 濃度. 福岡医誌 76: 244-247, 1985.
- 26) 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線(マイボーム腺)の病理組織学的研究. *臨床眼科* 33: 1119-1125, 1979.
- 27) 向野利彦, 大西克尚, 石橋達朗: 実験的 PCB 中毒サルおよび油症患者剖検例における瞼板線(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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 中西洋一, 栗田幸夫, 鐘ヶ江秀明, 重松信昭: 油症における呼吸器系ならびに免疫系の障害, 経過ならびに発病機序について. 福岡医誌 76: 196-203, 1985.
- 31) Nishizumi M: Acute toxicity of polychlorinated dibenzofurans in CF-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45: 209-212, 1978.
- 32) 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.
- 33) Ohgami T, Nonaka S, Murayama F, Yamashita K, Irifune H, Watanabe M, Tsukazaki N, Tanaka K, Yoshida H and Rikioka Y: 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. *Fukuoka Acta Med* 80: 307-312, 1989.
- 34) 大間美和, 黒木広明, 原口浩一, 増田義人, 許書刀: PCB 中毒患者における血液中 PCB 異性体の濃度推移. 福岡医誌 80: 281-286, 1989.
- 35) Oishi S, Morita M and Fukuda H: Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43: 13-22, 1978.
- 36) 重松信昭, 石井秀三, 池田東吾, 他: 油症における呼吸器障害と血中ならびに喀痰中の PCB 濃度との関係. 福岡医誌 68: 133-138, 1977.
- 37) 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.
- 38) 利谷正治, 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

68 : 152-155, 1977.

39) 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一. 福岡医誌 60 : 496-512, 1969.

40) Urabe H, Koda H and Asahi M : Present state of Yusho patients. Ann. New York Acad. Sci. 320 : 273-276, 1979.

41) 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.

42) 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ブタジエンの分析. 福岡医誌 76 : 132-136, 1985.

43) 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.

油症患者の眼症状 (第7報)

九州大学医学部眼科学教室
向野利彦・大西克尚

Ocular Manifestations of Yusho 22 Years after the Onset

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

Ocular manifestations were studied in 91 Yusho patients who took the contaminated rice oil 22 years ago. Tear film dysfunction was examined using the rose bengal test.

Eighty-seven percent of the patients complained eye discharge, although edema of the eyelid and pigmentation of the conjunctiva were rarely seen. Cystic swelling of the tarsal glands was seen in 16 patients (18%) and white cheese-like contents in the tarsal glands were detected in 7 patients (8%).

Twenty-five patients showed positive staining with the rose bengal test, although the intensity of the staining was slight. From this study it appears that there may not be tear film dysfunction in Yusho patients.

緒 言

ライスオイルに混入した有機化合物による中毒症である油症は、1968年(昭和43年)の発症から20数年を経過し、患者数は1,800名を越えた。油症の本態は当初、塩化ビスフェニール(PCB)中毒症と考えられたが、原因油中には他に塩化ジベンゾフラン(PCDF)、塩化クオターフェニール(PCQ)、塩化ジベンゾジオキシン(PCDD)などの種々の物質が含まれていたことが明らかにされ、これらの作用が複合していると考えられるようになった¹⁾。

油症の発症当初、眼脂の増加、眼瞼の腫脹、視力減退、眼痛などの眼に関する訴えを初発症状とする患者が数多くみられた¹⁾。そして主な眼所見は瞼板腺(マイボーム腺)分泌亢進、結膜の異常色素沈着であると記載された²⁾。その後、サルの実験的PCB中毒症および油症患者剖検例の眼瞼の病理組織学的検討から、瞼板腺分泌亢進とされた臨床所見が、瞼板腺角化嚢胞の形成とその内容物の排出であることが明らかにされた³⁾⁹⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。また実験的PCB中毒サルおよび油症患者の瞼板腺から採取した内容物に血液中に比べ数十倍の濃度でPCBが存在することが明らかとなり、瞼板

腺角化嚢胞の形成にPCBなどの有機化合物が直接関与した可能性が示された⁶⁾⁷⁾⁸⁾¹⁸⁾。

眼の臨床症状については年1回行われる油症患者一斉検診において追跡調査を行い、適宜報告した²⁾³⁾⁶⁾⁷⁾¹⁰⁾¹²⁾。眼症状は明らかに軽快しているが、瞼板腺排出物中には依然PCBが検出され、また瞼板腺の形状もトランスイルミネーションを用いた検索で、異常が認められている⁴⁾。瞼板腺は皮脂腺であり、分泌物は涙液の最表層の油層を構成し、涙液の蒸発の防止や涙液層の安定化に寄与している¹⁵⁾。

これまで油症患者の涙液に関する検討はなされていない。今回の追跡調査では、変性した角膜、結膜の上皮細胞を染色するローズベンガル試験を行ったので、眼症状の推移とともに報告する。

対象および方法

1990年10月～11月に行われた平成2年度油症患者一斉検診(追跡調査)において、眼科検診を受けた91名の油症患者を対象とした。検診は眼脂過多、眼瞼浮腫、眼瞼結膜色素沈着、瞼板腺嚢胞形成、瞼板腺白色チーズ様物排出の5項目について、問診と前眼部検査を行い、明らかに油症と関係ある所見を(+), 疑わし

いが他疾患による可能性を否定できない所見を（±）とした。とくに瞼板腺排出物の観察では検者の指で患者の下眼瞼をつまみ、瞼板腺の内容物を排出させて観察した。排出物が白色チーズ様を呈した例を（+）、その他の排出物を確認した例を（±）とした。

涙液に関しては、流涙、乾燥感の有無を尋ねた。ローズベンガル試験は、1%ローズベンガルを硝子棒にて下眼瞼結膜に少量塗布したのち、瞬目を繰り返させ、肉眼で観察し、1倍のマクロカメラで写真撮影した。結果は肉眼観察の結果と撮影したスライドを投影して判定した。また対照として、九州大学医学部附属病院眼科を受診した患者のうち、前眼部に異常所見を認めない患者11例にローズベンガル試験を行い、肉眼および細隙燈顕微鏡による判定をおこなった。

結 果

眼脂過多、眼瞼浮腫、眼瞼結膜色素沈着、瞼板腺嚢胞形成、瞼板腺白色チーズ様分泌物排出の各項目の判定結果は表1に示した。

眼脂過多は87%の患者が訴えた。眼瞼浮腫は見られず、眼瞼結膜の色素沈着の頻度も軽度であった。瞼板腺嚢胞形成は陽性18%、疑陽性29%、瞼板腺白色チーズ様物排出は陽性8%、疑陽性19%であった。

涙に関する訴えは、流涙28例(31%)、乾燥感25例(27%)であり、ローズベンガル試験は25例(27%)に陽性であった。対照では11例中2例に肉眼にて陽性

であった。細隙燈検査では8例に小点状のローズベンガルにて染色される部位を認めた。しかし、乾性角結膜炎に相当する、瞼裂に一致する多数の角結膜染色点の集合はみられなかった。

考 察

多くの油症患者が眼脂過多を訴えたが、発症初期に比べ明らかに軽度であった。眼瞼浮腫は見られず、眼瞼結膜の色素沈着も特異的ではなかった。

瞼板腺の病変は油症の急性期には分泌亢進、腫大と記載された²⁾。しかしその後の検討により、瞼板腺の角化嚢胞の形成がその本態であることが明らかとなった⁵⁾⁹⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。そして、発症20年後のトランスイルミネーションによる観察から、油症患者の24%に瞼板腺形状の著しい異常が、16%に軽度の異常がみつかった。対照ではそれぞれ0%、11%であった⁴⁾。これは油症患者に依然として瞼板腺の異常が残存していることを示唆している。今回の検診でも、嚢胞形成や白色チーズ様物が排出される例が散見されたが、瞼板腺に一樣にみられる所見ではなかった。

瞼板腺の病変は本来分泌されるべき脂質とは異なるものを分泌している可能性を示唆している。異常な分泌物にPCBが含まれていること以外は、その内容は明らかにできていないが、異常な脂質は涙液の油層を形成できず、涙液は三層構造を維持できないと考えられる。涙液の表面に適切な油層が存在しないため、涙

表1 油症患者の眼症状

年齢/性別		21-30		31-40		41-50		51-60		61-70		71-		計
		男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	
		3	2	1	5	3	7	8	21	7	17	9	8	91
眼脂過多	+	1			1	3	1	1	7	2	4	2	3	25
	±	2	1	1	3		5	6	10	3	12	6	5	54
	-		1		1		1	1	4	2	1	1		12
眼瞼浮腫	+													
	±													
	-	3	2	1	5	3	7	8	21	7	17	9	8	91
眼瞼結膜色素沈着	+						1	2	2		1			1
	±													7
	-	3	2	1	5	3	6	6	19	6	16	8	8	83
瞼板腺嚢胞形成	+			1		1	1		3	2	5	2	1	16
	±	2	1			1	1	5	5	2	5	2	2	26
	-	1	1	1	4	1	5	3	13	3	7	5	5	49
瞼板腺白色チーズ様物排出	+			1				1		2		2	1	7
	±	1						2	5	1	2	3	3	17
	-	2	2	1	3	3	7	5	16	6	13	4	4	66

液の水層は非常に蒸発しやすくなり、角膜の上皮細胞は構造を保つことが困難で、多くの上皮障害を惹き起こす。このような予想から変性した角膜、結膜の上皮を染色できるローズベンガル試験を施行した。

流涙、乾燥感は約 1/4 の例で訴えがあり、約 27% にローズベンガルによる染色が観察できた。しかし、何等訴えがなく、前眼部に異常を認めない対照患者でもかなりの頻度でローズベンガルによる結膜・角膜の染色が見られることを確認した。また 1,100 名の屈折異常以外に異常のない健常者を対象とした報告では、全例にローズベンガルによる染色がみられ、4% は乾性角結膜炎と同程度であったと報告されている¹⁶⁾。

今回の検診では乾性角結膜炎と診断できた患者は見られず、検診の限界と考えられた。涙液に関しては、検診の方法を含めて、今後さらに検討を要すると考えた。

文 献

- 1) 五島應安, 樋口謙太郎: 油症(塩化ビフェニール中毒症)の皮膚科学的症候論. 福岡医誌 60: 409-431, 1969.
- 2) 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) 加納正昭, 中尾文紀, 生井 浩: 油症患者の眼症状(続報). 福岡医誌 62: 167-168, 1971.
- 4) 向野利彦, 大西克尚: トランスイルミネーションによる油症患者マイボーム腺の観察. 福岡医誌 78: 355-357, 1987.
- 5) 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.
- 6) 向野利彦, 大西克尚, 廣中博見: 油症患者の眼症状(第 5 報) 瞼板腺圧迫排出物中 PCB の検出. 福岡医誌 72: 237-241, 1981.
- 7) 向野利彦, 大西克尚, 廣中博見: 油症患者の眼症状(第 6 報) 瞼板腺内容物採取の工夫と PCB 濃度. 福岡医誌 76: 244-247, 1985.
- 8) 向野利彦, 大西克尚, 廣中博見: 油症患者の瞼板腺囊胞内容物中の PCB の検出. 臨床眼科 41: 826-827, 1987.
- 9) 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.
- 10) 向野利彦, 山名泰生: 油症患者の眼症状(第 4 報) 一発症 10 年後の検討. 福岡医誌 70: 181-186, 1979.
- 11) 倉恒匡徳: 序言(1). 福岡医誌 80: 179-180, 1989.
- 12) 大西克尚, 生井 浩, 栗本晋二, 川島謙一郎: 油症患者の眼症状(第 3 報) 福岡医誌 66: 640-641, 1975.
- 13) Ohnishi Y, Kohno T: Polychlorinated biphenyls poisoning in monkey eye. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 18: 981-984, 1979.
- 14) 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.
- 15) Stulting RD, Waring GO III: Diagnosis and management of tear film dysfunction. In Leibowitz HM (ed): Corneal Disorders: Clinical Diagnosis and Management. pp. 445-468, WB Saunders, Philadelphia, 1984.
- 16) van Bijsterveld OP: Diagnostic test in the sicca syndrome. Arch. Ophthalmol. 82: 10-14, 1969.
- 17) 吉原新一, 小沢直記, 吉村英敏, 増田義人, 山領智子, 黒木広明, 村井宏一郎, 赤木公博, 山中正義, 尾前照雄, 奥村 恂, 藤田 守, 山元寅雄, 大西克尚, 岩下 宏, 向野利彦, 大西克尚, 石橋達朗, 菊池昌弘, 福山 宏, 阿南ゆみ子, 赤峰昭文, 青野正男: サルの PCB 中毒症に関する予備的研究. 福岡医誌 70: 135-171, 1979.
- 18) 吉村英敏, 吉原新一, 古賀信幸, 河野希世志, 永田 清, 和田郁夫, 山内葉子, 増田義人, 山領智子, 黒木広明, 原口浩一, 赤木公博, 村井宏一郎, 尾前照雄, 藤田 守, 山元寅雄, 向野利彦, 大西克尚, 廣中博見, 福山 宏, 赤峰昭文, 青野正男: サル PCB 中毒症に関する研究(第 2 報). 福岡医誌 72: 155-184, 1981.

1989・1990 年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状

九州大学医学部皮膚科教室 (主任：堀 嘉昭教授)

本房昭三・堀 嘉昭

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 1989-1990

Shozo HONBO and Yoshiaki HORI

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 ASAH

Department of Dermatology (Director : Prof. M. Asahi)

University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu 807

We reported the skin symptoms of the patients with Yusho in the 1989 and 1990 annual examinations. We also studied the alteration of the skin symptoms in 33 patients followed up for 14 years (1977-1990).

Most of these patients showed obvious improvement in their skin symptoms during 12 years (1977-1988). However, a remarkable improvement was not observed in recent 3 years and approximately 40% of the patients still had comedones and/or acneiform eruptions.

はじめに

1968年ライスオイルに混入したPCBおよびその誘導体の経口摂取により、北部九州を中心に油症が発生して以来、既に22年を経過した。福岡県では油症発生の翌年1969年より年1回定期検診を実施し、油症患者の症状を観察、記録し、追跡調査を施行してきた。これら年次検診における油症患者の皮膚症状については随時まとめ、次第に皮膚症状は軽快してきていることを報告してきた^{1)~5)8)~11)}。今回はその続報として、1989, 1990年度の成績について報告するとともに、これまでの成績と比較検討を行い、またこれまで定期的に皮膚症状を観察しえた症例33例について皮膚症状の推移を検討したのであわせて報告する。

1989, 1990 年度における検診結果

受診状況

1989年度の受診者は108名(男性41名, 女性67名), 1990年度の受診者は91名(男性31名, 女性60名)で、例年通り男性より女性の受診者が多かった。また1989, 1990年度の受診者のうち前年度にひきつづき受診した者は1989年度60名, 1990年度58名で、過去に受診したことはあるが前年度受診しなかったものはそれぞれ29名, 31名, 新規に受診したものはそれぞれ19名, 2名であった。例年に比較して1989年度は新規受診者が多かった。

皮膚重症度・皮膚重症度得点数の変動

1989, 1990年度の皮膚重症度, 皮膚重症度得点数に

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点²⁾と異なり, マイボーム腺肥大を採点から除外しているのも最重症で18点となる). 比較のため皮膚重症度については1976, 1979, 1983, 1988年度の成績を, 皮膚重症度得点数については1977, 1979, 1983, 1988年度の成績とともに記載した.

まず皮膚重症度についてみると, 皮膚症状のまったく認められない者(皮膚重症度0)の比率は1989年度47.2%, 1990年度58.2%であり, ほぼ半数の症例で皮膚症状はまったく認められなくなってきている. また以前の検診結果と比較すると, 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える. しかしながら1983年度以降についてみると, 重症度IIないしIII(面皰ないし痤瘡様皮疹)の比率はほとんど変動がみられていない. 一方重症度Iおよび0I

(色素沈着のみ)の比率は1983年度以降も次第に低下してきており, それと比例して重症度0の比率が増加している.

次に皮膚重症度得点数についてみると, 1988年度以降の3年間は3点以下の軽症例が約95%を占めており, この3年間にさほど大きな変動は認められていない. 平均得点でも1989年度は1.17と, 1988年度の1.08に比較して若干増加しているが, 1990年度は0.96と減少しているので最近2年間は皮膚症状はほぼ横ばい状態にあるものと考えられる.

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. 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以前より指摘されていることであるが⁶⁾, 最近3年間はAパターンの患者においても皮膚重症度得点数は減少してきており, B, Cパターンの症

表1 年度別皮膚重症度

年度 重症度	1976年 例数 (%)	1979年 例数 (%)	1983年 例数 (%)	1988年 例数 (%)	1989年 例数 (%)	1990年 例数 (%)
0	25(27.8)	38(34.5)	32(44.4)	50(50.0)	51(47.2)	53(58.2)
0 I	12 (30.0)	9 (19.1)	12 (41.7)	10 (17.0)	8 (11.1)	3 (6.6)
I	15	12	8	7	4	3
I II	4 (15.5)	5 (18.2)	1 (12.5)	0 (18.0)	10 (16.7)	7 (14.3)
II	10	15	8	18	8	6
II III	14 (22.2)	10 (24.5)	4 (13.9)	2 (12.0)	12 (24.1)	10 (19.8)
III	6	17	6	10	14	8
III IV	1 (4.4)	2 (3.6)	0 (1.4)	1 (3.0)	0 (0.9)	1 (1.1)
IV	3	2	1	2	1	0
計	90	110	72	100	108	91

表2 年度別皮膚重症度得点数

年度 得点	1977年 例数 (%)	1979年 例数 (%)	1983年 例数 (%)	1988年 例数 (%)	1989年 例数 (%)	1990年 例数 (%)
0・1	32(31.1)	44(40.0)	43(59.7)	74(74.0)	70(64.8)	66(72.5)
2・3	35(34.0)	29(26.4)	21(29.2)	20(20.0)	33(30.6)	20(22.0)
4・5	22(21.4)	15(13.6)	5(6.9)	4(4.0)	4(3.7)	4(4.4)
6・7	7(6.8)	13(11.8)	2(2.8)	0	0	0
8・9	5(4.9)	6(5.5)	0	1(1.0)	0	1(1.1)
10~13	0	1(0.9)	1(1.4)	1(1.0)	1(0.9)	0
14~	2(1.9)	2(1.8)	0	0	0	0
計	103	110	72	100	108	91
平均得点	3.13	3.10	1.54	1.08	1.17	0.96

例の重症度得点数とさほど差がなくなっている。

血中 PCB パターンと PCB 濃度

PCB パターン別に分類した症例の血中 PCB 濃度は表 4 に示した。A パターンの症例が B, C パターンの症例よりも濃度が高いという傾向は 1989, 1990 年度においても認められたが, 1976 年度以降は各パターンの PCB 濃度についてはさほど大きな変動はみられていない。

長期追跡例における皮膚症状の推移

対象症例

油症発生の翌年 1969 年から油症患者の追跡調査が

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数名を数えるのみである。また皮膚症状の推移をより明確にするために設定された皮膚重症度得点数による皮膚症状の判定基準は 1977 年以降に適用されているので, 1977 年から 1982 年までを各々 2 年間に区切り, 1983 年から 1988 年までを 3 年間に区切り, 1989, 1990 年の 2 年間に 1 区切りとして, 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ところ, 33 例がこの条件に合致した。そこでこの 33 例について皮膚重症度, 皮膚重症度得点数による皮膚症状の推移を検討した。なお皮膚重症度は定性的な皮膚症状の判定基準で

表 3 血中 PCB パターンと皮膚重症度得点数の関係

(A) 1977年度			(B) 1979年度			(C) 1983年度		
パターン	例数	平均点	パターン	例数	平均点	パターン	例数	平均点
A	55	3.91	A	51	4.31	A	26	2.69
B	10	1.90	B	8	1.88	B	4	0
BC	5	2.60	BC	11	1.45	BC	1	0
C	30	2.33	C	40	2.18	C	16	1.56
計	100	3.17	計	110	3.07	計	47	2.02

(D) 1988年度			(E) 1989年度			(F) 1990年度		
パターン	例数	平均点	パターン	例数	平均点	パターン	例数	平均点
A	37	1.41	A	31	1.29	A	37	1.24
B	13	0.92	B	20	1.05	B	17	0.94
BC	2	0	BC	6	1.05	BC	3	0.33
C	48	0.92	C	50	1.00	C	33	0.64
計	100	1.08	計	107	1.16	計	90	0.93

表 4 血中 PCB パターンと PCB 濃度

(A) 1977年度			(B) 1979年度			(C) 1983年度		
パターン	例数	平均濃度	パターン	例数	平均濃度	パターン	例数	平均濃度
A	56	6.77*	A	51	6.04	A	31	7.38
B	10	3.00	B	8	2.15	B	4	5.00
BC	5	2.20	BC	11	1.82	BC	1	5.00
C	30	2.96	C	40	2.75	C	18	2.83
計	101	5.04	計	110	4.14	計	54	5.64

(D) 1988年度			(E) 1989年度			(F) 1990年度		
パターン	例数	平均濃度	パターン	例数	平均濃度	パターン	例数	平均濃度
A	37	6.40	A	31	5.73	A	37	6.00
B	13	4.23	B	20	3.84	B	17	3.94
BC	2	0.85	BC	6	5.05	BC	3	3.49
C	49	2.89	C	50	3.26	C	33	2.59
計	101	4.35	計	107	4.19	計	90	4.20

*濃度の単位は ppb

あるが、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, II…などのもっとも近い値を採用した）。また皮膚重症度得点数についてはそれぞれの期間の平均値で表示した。

皮膚重症度の推移

33例における1977年以降の皮膚重症度の推移を表

5に示した。1981・1982年度は1979・1980年度に比較して、総じて重症度がやや高い方へ移行しているが、この期間を除くと1988年までは重症度の高い者が次第に重症度の低い方へ移行してきた傾向が認められる。また1989・1990年度については1986～1988年度に比較して重症度0の比率は変化しないものの、重症度Ⅲの比率が若干増加している。

表5 長期追跡例における皮膚重症度の推移

年度 重症度	1977・1978年 例数(%)	1979・1980年 例数(%)	1981・1982年 例数(%)	1983～1985年 例数(%)	1986～1988年 例数(%)	1989・1990年 例数(%)
0	3(9.1)	7(21.2)	5(15.2)	7(21.2)	12(36.4)	12(36.4)
0 I	6 (45.5)	8 (33.3)	8 (42.4)	6 (39.4)	5 (30.3)	4 (21.2)
I	9	3	6	7	5	3
I II	3 (18.2)	3 (24.2)	2 (15.2)	4 (21.2)	2 (21.2)	4 (15.2)
II	3	5	3	3	5	1
II III	2 (21.2)	1 (18.2)	2 (24.2)	3 (15.2)	2 (9.1)	4 (24.2)
III	5	5	6	2	1	4
III IV	1 (6.1)	0 (3.0)	0 (3.0)	0 (3.0)	0 (3.0)	1 (3.0)
IV	1	1	1	1	1	0
計	33	33	33	33	33	33

表6 長期追跡例における皮膚重症度得点数の推移

年度 平均得点	1977・1978年 例数(%)	1979・1980年 例数(%)	1981・1982年 例数(%)	1983～1985年 例数(%)	1986～1988年 例数(%)	1989・1990年 例数(%)
0 ～1.00	4(12.1)	11(33.3)	11(33.3)	14(42.4)	24(72.7)	19(57.6)
1.01～3.00	12(36.4)	14(42.4)	12(36.4)	13(39.4)	6(18.2)	10(30.3)
3.01～5.00	12(36.4)	3(9.1)	6(18.2)	4(12.1)	1(3.0)	2(6.1)
5.01～7.00	1(3.0)	2(6.1)	1(3.0)	1(3.0)	0	0
7.01～9.00	3(9.1)	1(3.0)	2(6.1)	0	1(3.0)	1(3.0)
9.01～	1(3.0)	2(6.1)	1(3.0)	1(3.0)	0	0
計	33	33	33	33	33	33

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 パターン	例数	1977・1978年 得点 ¹⁾ (濃度 ²⁾	1979・1980年 得点(濃度)	1981・1982年 得点(濃度)	1983～1985年 得点(濃度)	1986～1988年 得点(濃度)	1989・1990年 得点(濃度)
A	17	4.41(8.68)	3.94(7.41)	4.00(8.74)	2.25(7.05)	1.52(7.48)	1.44(7.44)
B	6	2.75(2.67)	1.83(3.00)	2.08(2.92)	1.32(2.70 ³⁾)	0.80(2.78)	1.00(2.79)
C	10	2.80(2.75)	1.50(2.60)	2.10(2.30 ³⁾)	2.27(2.60)	0.73(2.40)	1.10(2.41)
計	33	3.62(5.79)	2.82(5.15)	3.06(6.34 ⁴⁾)	2.09(4.98 ⁵⁾)	1.15(5.09)	1.26(5.07)
受診者全 例の重症 度得点 ¹⁾		3.09	2.49	2.41	1.84	1.27	1.07

¹⁾ 平均得点 ²⁾ 平均濃度(ppb) ³⁾ 5例における平均濃度

⁴⁾ 28例における平均濃度 ⁵⁾ 32例における平均濃度

皮膚重症度得点数の推移

33 例における 1977 年以降の皮膚重症度得点数の推移を表 6 に示した。1988 年までの期間は得点数の高かった症例が次第に得点数が低下していった傾向がうかがえるが、最近 2 年間は逆に平均得点数 1.00 までの最軽症例がやや減少し、1.01～3.00 までの軽症例の比率が相対的に増加している。またこれら 33 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 パターンは症例数が少ないため、この表では B パターンに含めている。皮膚重症度得点数は A パターンの症例では最近 2 年間に於いても若干減少傾向が認められるが、B、C パターンの症例においては逆にやや増加しており、全体でみると表 5 で示した結果を裏付けるように、1988 年までは順調に減少していったものが、最近 2 年間はやや増加している。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、1977 年以降は PCB 濃度の値には時間的経過による変動はあまり認められないというこれまでの結果と同様な成績であった。

考 察

油症患者の皮膚症状は油症発生直後の 2 年間に大幅に改善し⁷⁾、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報告してきた^{11)～5)8)～11)}。今回 1989、1990 年度の検診結果をみると、皮膚重症度、皮膚重症度得点数のいずれの評価でも 1988 年度の検診結果に近い成績を示しており、この 3 年間でさほどの変動はみられていない。また 1989 年度に限ってみると、皮膚症状は 1988 年度よりも若干増悪したという成績であるが、これは 1989 年度に新規に受診した患者が 19 名と例年に比して多かったこと、またこれらの新規受診者の皮膚症状が過去に検診を受診したことがある患者の皮膚症状よりもより重症であったことに起因するものと考えられる(ちなみに新規受診者 19 名の重症度得点数の平均値は 1.47 であった)。この点を考慮するとこの 3 年間は油症患者の皮膚症状はほぼ横ばい状態にあると考えられる。同様の傾向は長期に経過を観察しえた 33 例についてもみとめられており、これら 33 例においては 1989・1990 年度の最近 2 年間の成績は 1986～1988 年度の成績よりも若干劣っていたものの、重症度得点数 3 点以下の軽症例の比率は 1986～1988 年度と 1989・1990 年度のいずれにおいても約 95% を占めており、油症患者の皮膚症状はこれま

で少しずつでも改善傾向を示してきたものが、油症発生後 20 年を経過した時点ではほぼ横ばい状態になってきたことがうかがえる。また皮膚重症度の推移をみると、1983 年度以降皮膚重症度 I すなわち色素沈着のみの患者の比率は低下し、それとともに皮膚症状がまったく認められない皮膚重症度 0 の比率が増加しているのに対し、皮膚重症度 II ないし III (面皰ないし痤瘡様皮疹)の比率には 1983 年度以降大きな変動はみられていない。これらの点を考えあわせると、油症患者の皮膚症状は色素沈着については次第に軽快傾向がみられるものの、面皰および痤瘡様皮疹についてはこの数年間大きな変動はみられず、約 3 割の患者が依然として面皰あるいは痤瘡様皮疹の存在に苦しんでいることが想像されよう。

また血中 PCB 濃度と皮膚重症度得点数の関係については、これまで A パターンの症例が重症度得点数が高いことが報告されてきたが、この数年間は A パターンの症例でも重症度得点数が低下してきたことに伴い、この特徴が目立たなくなってきた。血中 PCB 濃度も 1976 年度以降は低いプラトー状態が持続しており、このままの状態でも今後も推移するものと考えられる。

総 括

1989、1990 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、油症患者の皮膚症状の推移について検討を加えた。

また長期間経過を観察しえた 33 例についても皮膚症状の推移を検討した。

1989、1990 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、長期追跡例について検討した結果でも、油症患者の皮膚症状は 1988 年までは徐々に軽快傾向を示してきたものの、この 3 年間は軽快傾向が認められず、ほぼ横ばい状態を呈していることが明らかとなった。また皮膚症状のうち、色素沈着については依然として軽快傾向が認められるものの、面皰ないし痤瘡様皮疹についてはこの数年間さほどの改善がみられないという傾向が認められた。

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) 本房昭三, 永江祥之介, 利谷昭治, 旭 正一：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。福岡医誌 80：324-330, 1989.

5) 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.

6) 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.

7) 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 63：392-395, 1972.

8) 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, 1977.

9) 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.

10) 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.

11) 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.