

昭和29年11月5日第三種郵便物認可
平成5年5月25日（毎月25日発行）
第860号

Vol. 84 No. 5
May 1993

CODEN : FKIZA4
ISSN 0016-254X

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

第 84 卷 第 5 号 (860)

平成 5 年 5 月 25 日

特 集 号

油 症 と PCB

研 究 報 告 第 14 集

The Fourteenth 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 14 集

(福岡医学雑誌 第 84 卷 第 5 号 平成 5 年 5 月)

目 次

1. 序言吉村 英敏...173
2. Co-planar PCB による肝ビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素の誘導
— モルモットとラット間の顕著な相違 —小栗 一太・古賀 淑子
津田 実・有吉 範高・石井 祐次・山田 英之・吉村 英敏...175
3. 2,4,6,2',4',6'-Hexachlorobiphenyl のイヌにおける *In Vivo* 代謝とそれに関与
する Cytochrome P-450 分子種の予備的検討有吉 範高・重藤 真千
小栗 一太・吉村 英敏...181
4. 高毒性有機塩素化学物質によるヒトリンパ球の小核誘発性 (英文)
.....長山 淳哉・長山 真弓・増田 義人...189
5. Ah 応答性の異なるマウス由来肝ミクロソーム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-benzo-
flavone の作用 (英文)長山 淳哉・増田 義人...195
6. 芳香族炭化水素水酸化酵素活性に対する methylsulphonyl polychlorinated
biphenyl 同族体と 7,8-benzoflavone の作用 (英文)長山 淳哉・増田 義人...203
7. 皮脂, 血液中の PCBs, PCQs 濃度の比較検討 (英文)
.....大神 太郎・渡辺 雅久・田中 敬一・吉田彦太郎
塚崎 直子・野中 薫雄・力岡 有ニ...212
8. 塩素化合物と低濃度グリセオフルビンのポルフィリン代謝に及ぼす複合作用
— 若齢マウスと老齢マウスにおける 0.05 %ヘキサクロロベンゼンと 0.1 %
グリセオフルビンの影響 — (英文)
.....塚崎 直子・野中 薫雄・大神 太郎...217
9. *In Vitro* における Polychlorinated Biphenyls (PCB) および 2, 3, 4, 7, 8-
pentachlorodibenzofuran (PCDF) 毒性軽減の検討 (第 2 報)
— ウルソデオキシコール酸およびケノデオキシコール酸の細胞毒性に与える
影響 —松岡 一忠・野中 薫雄・大神 太郎・吉田彦太郎...222
10. 末梢神経再生における Polychlorinated Biphenyls (PCB) の影響
— 有髄神経に関して —伊藤 聖・吉村 俊朗・大津留 泉・一瀬 克浩
西浦 義博・木下 郁夫・辻畑 光宏・長瀧 重信...227
11. CGRP 含有神経の分布に及ぼす PCB の影響に関する検索
.....橋口 勇・赤峰 昭文・鳥谷 芳和・前田 勝正
青野 正男・福山 宏・奥村 英彦...232
12. 油症患者血液中 PCDF の濃度推移増田 義人・黒木 広明・原口 浩一
斎藤 秀美・John Jake Ryan...236
13. PCB 中毒ミンクの体内に残留するメチルスルホン代謝物
— その構造と由来について —原口 浩一・黒木 広明
斎藤 秀美・増田 義人・Åke Bergman...243

14. 血液中における PCB 水酸化体代謝物の残留性黒木 広明・原口 浩一
斎藤 秀美・増田 義人・Eva Klasson Wehler・Åke Bergman...248
15. 油症患者における米ぬか繊維とコレステラミンの併用投与による Polychlorinated
Dibenzofurans (PCDFs) の糞便中へ排泄促進の試み
.....飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦・中川 礼子・森田 邦正
常盤 寛・辻 博・中山樹一郎・堀 嘉昭...257
16. 油症患者及び対照者の母乳中の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs 濃度の比較
.....松枝 隆彦・飯田 隆雄・平川 博仙
深町 和美・常盤 寛・長山 淳哉...263
17. ラットにおける食物繊維の PCDF 及び PCDD 排泄促進効果森田 邦正
平川 博仙・松枝 隆彦・飯田 隆雄・常盤 寛...273
18. 油症に対する米ぬかファイバー・コレステラミン併用投与の臨床的検討
辻 博・池田 耕一・野見山賢介・藤島 正敏...282
19. 油症患者の全国統一検診結果より
—特に血中 PCB と血清中性脂肪との関連— (英文)廣田良夫・廣畑 富雄
片岡恭一郎・篠原 志郎・常盤 寛...287
20. 1991・1992 年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状
.....中山樹一郎・堀 嘉昭・利谷 昭治・旭 正一...294

The Fourteenth Reports of the Study on Yusho and PCB
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 84, No. 5, 1993)

CONTENTS

1. ForewardH. Yoshimura...173
2. Inducing Ability of Co-planar PCBs toward Bilirubin UDP-glucuronyltransferase of Liver Microsomes: The Remarkable Difference between Guinea Pigs and RatsK. Oguri, Y. Koga, M. Tsuda, N. Ariyoshi, Y. Ishii, H. Yamada and H. Yoshimura...175
3. Metabolism *In Vivo* of 2, 4, 6, 2', 4', 6'-hexachlorobiphenyl in Dog and Partial Characterization of Cytochrome P-450 Isozyme Responsible for Biotransformation of the CongenerN. Ariyoshi, M. Shigeto, K. Oguri and H. Yoshimura...181
4. Frequency of Micronuclei Induced in Cultured Lymphocytes by Highly Toxic Organochlorine Congeners.....J. Nagayama, M. Nagayama and Y. Masuda...189
5. Effects of 3-methylsulphonyl-4, 5, 3', 4',-tetrachlorobiphenyl and 7, 8-benzoflavone on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activities of Murine Hepatic Microsomes Prepared from Inbred Strains with Different Ah Responsiveness.....J. Nagayama and Y. Masuda...195
6. Effects of Methylsulphonyl Polychlorinated Biphenyl Homologues and 7, 8-benzoflavone on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase ActivityJ. Nagayama and Y. Masuda...203
7. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Quaterphenyls (PCQs) Concentrations in Skin Surface Lipids and Blood of Patients with YushoT. Ohgami, M. Watanabe, K. Tanaka H. Yoshida, S. Nonaka, N. Tsukazaki and Y. Rikioka...212
8. The Synergistic Effect of Chlorinated Chemicals and Low Concentration of Griseofulvin on Porphyrin Metabolism — The Effect of 0.05% Hexachlorobenzene and 0.1% Griseofulvin on Young and Old Mice —N. Tsukazaki, S. Nonaka and T. Ohgami...217
9. *In Vitro* Analysis for Cellular Toxicity of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PCDF) on PLC/PRF/5 Cell Proliferation (II) — The Effects of Ursodeoxycholic Acid and Chenodeoxycholic Acid on Cell Toxicity —K. Matsuoka, S. Nonaka, T. Ohgami and H. Yoshida...222
10. Effects of Polychlorinated Biphenyls on Regeneration of the Peripheral Nerve in RatsH. Ito, T. Yoshimura, I. Ohtsuru, K. Ichinose, Y. Nishiura I. Kinoshita, M. Tsujihata and S. Nagataki...227
11. Immunohistochemical Study on the Distribution of CGRP-containing Nerve Fibers in the PCB Poisoned Rats with Experimental PeriodontitisI. Hashiguchi, A. Akamine, Y. Toriya, K. maeda M. Aono, H. Fukuyama and H. Okumura...232
12. Change of PCDF Concentrations in the Blood of Yusho Patients in Recent Ten Years.....Y. Masuda, H. Kuroki, K. Haraguchi, H. Saito and J. J. Ryan...236
13. PCB Methylsulfone Accumulated in Muscle of Mink Dosed with PCB (Clophen A50)K. Haraguchi, H. Kuroki, H. Saito, Y. Masuda and A. Bergman...243

14. Accumulation of Hydroxylated PCB Metabolites in Blood.....H. Kuroki, K. Haraguchi
H. Saito, Y. Masuda, E. Klasson Wehler and A. Bergman...248
15. Therapeutic Trials for Promotion of Faecal Excretion of PCDFs by the
Administration of Rice Bran Fiber and Cholestyramine in Yusho Patients
.....T. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda, R. Nakagawa
K. Morita, H. Tokiwa, H. Tsuji, J. Nakayama and Y. Hori...257
16. Concentration of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in Breast Milk of Yusho
Patients and Normal SubjectsT. Matsueda, T. Iida, H. Hirakawa
K. Fukamachi, H. Tokiwa and J. Nagayama...263
17. Stimulating Effect of Dietary Fiber on Fecal Excretion of Polychlorinated
Dibenzofurans (PCDF) and Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) in
Rats.....K. Morita, H. Hirakawa, T. Matsueda, T. Iida and H. Tokiwa...273
18. Effects of Treatment with Rice Bran Fiber and Cholestyramine on Clinical
and Laboratory Findings in Yusho Patients.....H. Tsuji, K. Ikeda, K. Nomiyama
and M. Fujishima...282
19. Laboratory Findings in the Medical Examination of Chronic "Yusho" (PCB
Poisoning) Patients: With Special Reference to Blood PCB and Serum
TriglycerideY. Hirota, T. Hirohata, K. Kataoka
S. Shinohara and H. Tokiwa...287
20. Dermatological Findings in the Annual Examination of the Patients with Yusho
in 1991-1992J. Nakayama, Y. Hori, S. Toshitani and M. Asahi...294

序 言

厚生省油症治療研究班・班長

中村学園大学教授

吉 村 英 敏

Foreward

Hidetoshi YOSHIMURA

*Chief, Study Group for the Therapy
of "Yusho", the Ministry of Health and Welfare,
and Professor, Nakamura Gakuen College, Fukuoka 814-01*

This is the 14th collection of reports of study on "Yusho" conducted by the members of the Study Group for the Therapy of Yusho. It deals primarily with the results obtained during the past 2 years from April 1991 to March 1993. During this period, our major efforts were made to establish therapeutic methods which can accelerate the fecal excretion of PCBs, PCDFs and the related compounds still retained in the body of Yusho patients, because it seems that these compounds are still exerting some toxic effects on the patients and are also known to be liver carcinogens in animals and possibly in humans. Following the several animal experiments, a clinical trial was made to examine the stimulatory effect of a combination of rice bran fiber and cholestyramine on the fecal excretion of these compounds. The results obtained were not conclusive, but showed a tendency to be rather effective, although the patients examined were only two couples. For obtaining the definite conclusion for this effect, larger numbers of patients were necessary to be examined. Furthermore, these patients should have considerably high blood level of the causal agents, since this method is based on a precise analysis of each congener of these compounds excreted into the feces of patients. We are therefore promoting a cooperative work with the investigators in Taiwan, in order to apply our method to Yu-Cheng patients. Yu-Cheng, which is known to be the same food intoxication as Yusho in Japan, occurred in central Taiwan 11 years after the outbreak of Yusho in 1968. Therefore, there should be more patients having still high blood levels of the causal agents in Taiwan than in Japan. Other valuable findings of the basic researches for better understanding Yusho are also described in this issue, together with some clinical reports. We would sincerely appreciate the comments and advices of readers regarding our studies.

2年毎に刊行される本研究報告は今年第14集を数える。今回収録されているのは、平成3年4月より平成5年3月に至る厚生省油症治療研究班の各班員による2年間の成果である。その序文を書くにあたり、本研究班がこれまでに関与してきた油症治療研究の概略について簡単に回顧してみたい。

1968年10月、現代の奇病として油症がはじめて新聞報道されたが、1カ月も経たぬ内に本症がカネミ倉庫（株）製ライスオイルに起因する食中毒であり、そのライスオイル中には大量のPCBが混入していた事実が明らかにされた。その後、分析技術の進歩とも相俟って、問題のライスオイル中にはPCBのほか微量のPCDFに加えて、PCBの2量体であるPCQのかかなりの含有が見出され、さらに最近ではPCDDまでも混在することが報告されている。

微量とはいえ、これらの塩素化芳香族炭化水素類は、その高い安定性や脂溶性のため生体内貯留性がきわめて高

い、そのため事件発生後 25 年近く経過する現時点においてすら、PCDF や coplanar PCB のような特異の高毒性成分が患者体内になお貯留している。そしてこれらこそ、長年にわたり患者を苦しめてきた本態であることが指摘された。当初みられた本症の悲惨な病態に加え、いまなお憂慮すべきはこれら残留 PCDF, coplanar PCB の発がん性に関する危惧である。これらの成分が動物肝臓に対し発がん性を有することは、内外の多くの研究から明らかであり、かついまだ結論とはされていないが、ヒトにおける可能性についても、油症患者に対する倉恒らの予備的な疫学的研究からの示唆がある。

このことに関連し、国立環境研究所の青木らは昨年注目すべき報告を行っている。それは 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl のような高毒性 coplanar PCB が、ラット肝実質細胞の初代培養において、グルタチオン S-トランスフェラーゼの P 型 (GST-P) を誘導するというものである。この酵素は GST ファミリーの一員で、通常は胎盤、肺、脾臓のような組織で発現し、肝では有意に発現しないことが知られている。ただし、化学発がん剤投与により前がんやがんを誘発した肝では本酵素が検出されるようになる。coplanar PCB がチトクロム P-450 の IA1 および IA2 アイソザイムの誘導と並行して、種々の強い毒性を発現することは衆知の事実であるが、今回さらにがんマーカーとしての GST-P のラット肝細胞での誘導が明らかにされたわけである。

本研究班では早くよりこの発がん問題を重視し、1985 年以降は油症追跡検診においてとくに肝臓がんの早期発見のための検診を行っている。またこの 10 年来、原因物質の体外排泄を図り、発がんへの危惧感をも速やかに拭い去るべく、高毒性 PCDF, PCB の体外への排泄促進を最重要課題としてその解決に取り組んできた。かくして、すでに 1975 年には血中 PCB の小腸管腔内への排出の知見が得られていたことをうけ、まずスクアランがこの系を介してかなり効果的に排泄促進することが見出された。さらにラット、イヌにつき行った 3 カ月の亜急性毒性試験においても、スクアランに特記すべき毒性の発現はまったく認められず、臨床への適用の可能性が膨らんだ。しかしその一方で、イヌにおいては吸収されたスクアランの一部が肝臓に貯留することが認められ、最終的にスクアランの患者への適用は見送られる破目となった。

その後、安全性がすでに確認されているコレステラミン、ついでコレステラミンに加えその安全性が推定される米ぬかファイバーの併用法が浮上し、複数の患者夫妻についてはじめての臨床実験が試みられた。しかし、一部有効例はみられたものの、少数例の実験ということもあり、明確な効果を結論するには至らなかった。この臨床実験は、糞便中の PCB, PCDF のアイソマーの分離定量を含むきわめて困難な超微量分析が基盤となっている。そのため、実験に協力された前記複数の患者ご夫妻のご苦労とともに、分析を担当された福岡県保健環境研究所スタッフの真摯な努力があって、はじめて可能となったものである。かくして、本研究は PCBs, PCDFs のヒトでの排泄に関する世界で最初の貴重な資料となっている。

排泄促進効果の判定は、PCB などの体内貯留量の多い患者ほど有利に行いうると考えられるが、油症発生後 20 数年を経過する現在、このような例を多数集めることはきわめて困難である。それに対し、わが国の 10 年後に発生した台湾油症では、いまなお血中 PCB レベルが比較的高い患者も少なくないと思われる。したがって、現状で明確な結論をうるには、台湾での臨床実験はむしろ必須とさえ考えられた。

幸い平成 3 年度の全国油症治療研究会議に参加された台湾の国立成功大学の郭、涂両教授と協議するチャンスがあり、中華民国台湾省政府の林衛生處長を介し台湾側の両面的協力も得られることとなった。現在、台湾油症患者 31 名についての血中 PCB, PCDF, および PCDD のアイソマー毎の詳細な分析が終了している。このうち血中レベルの比較的高い患者 15 名程度について、前記コレステラミン—米ぬかファイバーによる再度の治療実験が実施される計画である。年月の経過とともに、油症患者の多くは徐々に回復に向かわれているとはいえ、なおかなりの血中 PCB, PCDF レベルを示す患者もみられる。本研究が成功し一日も早い排泄促進法の確立が切望される。

これらの直接的治療研究以外に、油症についての理解を深めるための基礎的研究にも引続き多くの努力が傾注されている。それらの成果の一部は、その後の患者の病像についての報告とともにここに収録されている。これらの成果が今後の油症治療に一層反映されるとともに、問題解決への新たな糸口となることを期待して止みません。

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員の中川樹一郎助教授により行われた。ここに厚く感謝いたします。また、ここに収録された研究成果は、平成 3 年度および平成 4 年度の厚生科学研究費補助金に負うものであり、あわせて深甚なる謝意を表します。

Co-planar PCB による肝ビリルビン UDP-グルクロン酸 転移酵素の誘導：モルモットとラット間の顕著な相違

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

小栗一太・古賀淑子・津田 実

有吉範高・石井祐次・山田英之

中村学園大学家政学部食物栄養学科

吉村英敏

Inducing Ability of Co-planar PCBs toward Bilirubin UDP-glucuronyltransferase of Liver Microsomes: The Remarkable Difference between Guinea Pigs and Rats

Kazuta OGURI, Yoshiko KOGA, Minoru TSUDA,

Noritaka ARIYOSHI, Yuji ISHII and Hideyuki YAMADA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62, Fukuoka 812

Hidetoshi YOSHIMURA

Department of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen College, Fukuoka 814-01

The induction of liver microsomal UDP-glucuronyltransferase (UGT) activity toward bilirubin by pretreatment with 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) and 3-methylcholanthrene (MC) was studied in guinea pigs and rats. In addition, microsomal benzo(a)pyrene 3-hydroxylase and cytosolic DT-diaphorase activities were also measured for the comparison. All of the PenCB, TCB and MC significantly induced the bilirubin UGT activity of guinea pig liver microsomes. The highest induction (6-fold over the control) was seen in the PenCB-treated animal, and MC (3.2-fold) and TCB (2.4-fold) were less effective. On the other hand, the induction of benzo(a)pyrene 3-hydroxylase and DT-diaphorase activities of guinea pigs was not so remarkable as that of bilirubin UGT activity. In the guinea pig, the inducibility of bilirubin UGT activity seemed to be correlated with the toxicity induced with PenCB, TCB and MC. In contrast to the guinea pig, UGT activity toward bilirubin in the rat was significantly decreased by the treatment with the inducers described above. These results suggest that bilirubin UGT activity in the guinea pig can be an index for the toxicity of polychlorinated biphenyls as like as benzo(a)pyrene 3-hydroxylase and DT-diaphorase activities in the rat.

緒 言

Co-planar 型 polychlorinated biphenyl (PCB)や 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)などの高毒性多塩素化芳香族炭化水素の毒性は、その機序がまだよく究明されていないが³, 肝 Ah レセプターを介して発現するものと考えられている¹³。それは、これらの高毒性化合物が 1 A サブファミリーの P450 や DT-ジアホラーゼ等の Ah レセプターを介して発現調節

されている肝酵素を著名に誘導するという事実に基づいている¹³。また、種々の PCB 同族体について酵素誘導能と毒性の強弱との関係が調べられた結果、より高毒性のものほど 1 A サブファミリー P450 や DT-ジアホラーゼの誘導能が高いことが示されている¹⁶⁾²⁰⁾。そのため、肝酵素に対する誘導能は多塩素化芳香族炭化水素の一つの毒性指標として用いられている。

よく知られているように TCDD や co-planar PCB の毒性には著しい動物種差がある。例えば、TCDD の

急性毒性に関して、感受性の高いモルモットと低感受性のハムスターとを比較すると、両者での毒性の違いは約 5,000 倍以上にも達すると言われている¹³⁾。前述の毒性と肝酵素誘導能との相関はラットでは成立するものの、これを他の動物種にまで広げて適用しようとするは無理が生じる。すなわち、感受性の高いモルモットは、P450 や DT-ジアホラーゼの誘導がラットほど顕著には起こらない¹⁹⁾。従って、ラット以外の動物種にまで範囲を広げると、上記 2 種の酵素の誘導性と毒性の間にはよい相関性は認められないことになる。一方、当研究室では 3-methylcholanthrene (MC) の bilirubin (BR) UDP-glucuronyltransferase (UGT) 活性に対する誘導性を検討した結果、モルモットではこの活性が強く誘導されるのに対し、ラットでは増加しないことを既に明らかにしている⁵⁾。このことから、モルモットにおける BR-UGT 活性は、多塩素化芳香族炭化水素のより優れた毒性指標になりうる可能性があると予想した。今回はこの点を確認するため、co-planar PCB の中でも比較的低毒性の 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) と高毒性の 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) の 2 つを用いて、ラットとモルモットにおける誘導性について検討を加えた。

実験方法

1. 実験材料

TCB および PenCB はそれぞれ Nakatsu 等の方法¹⁰⁾ および Saeki 等の方法¹⁴⁾ に従って合成した。BR (Sigma Chemical Co., 米国, St. Louis), MC (和光純薬(株), 大阪), benzo(a)pyrene (Nacalai Tesque Co., 京都) および 2,6-dichlorophenolindophenol (Merck, AG, 西ドイツ, Darmstadt) はそれぞれ記載の製造元から購入した。3-Hydroxybenzo(a)pyrene は九州大学医療技術短期大学部木下洋夫教授より供与された。

2. 薬物投与

Hartley 系モルモット (雄, 7 週令) および Wistar 系ラット (雄, 5 週令) を使用した。TCB および PenCB はモルモットにおいては 0.5 mg/kg/ml corn oil の用量で、またラットにおいては 25 mg/kg/ml corn oil の用量で一回投与した。MC はどちらの動物種に対しても 20 mg/kg/ml corn oil の用量で 3 日間連続投与した。薬物は全て腹腔内に投与し、対照群には corn oil のみを投与した。MC 処理動物のみは最終投与 24 時間後に、また他の群は投与 5 日後に屠殺した。すべての動物は屠殺前一晩絶食させた。

3. 肝酵素液の調製

肝ミクロゾームおよびサイトソールは既報に準じて調製し¹⁷⁾、小分けして使用まで -80°C に保存した。

4. 酵素活性等の測定

BR-UGT 活性は、Van Roy および Heirwegh の方法¹⁵⁾ に従って測定した。Benzo(a)pyrene 3-hydroxylase (arylhydrocarbon hydroxylase, AHH) 活性¹¹⁾ および DT-ジアホラーゼ活性³⁾ は、常法に従って測定した。また蛋白質の定量は Lowry 等の方法により行った⁸⁾。

実験結果

1. モルモットとラットにおける急性毒性の比較

Fig. 1~Fig. 3 に TCB, PenCB および MC 処理後の

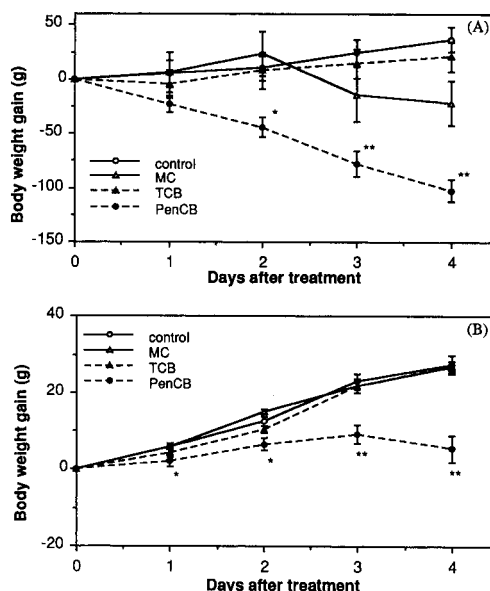


Fig. 1 Effects of pretreatment with 3-methylcholanthrene, 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl on the body weight gain in guinea pigs (A) and rats (B).

PCBs were injected i.p. at a dose of 0.5 mg/kg and 25 mg/kg, respectively, to guinea pigs and rats. MC was injected i.p. at a dose of 20 mg/kg for 3 consecutive days to both animal species.

Each point represents the mean \pm S.D. of four animals.

*Significantly different from the control ($P < 0.05$)

**Significantly different from the control ($P < 0.01$)

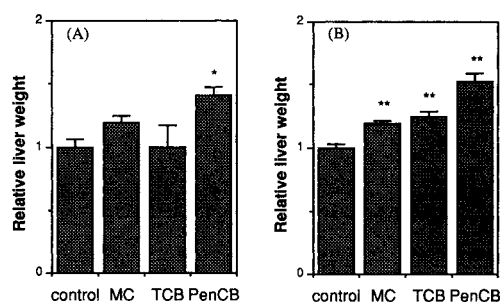


Fig. 2 Effects of pretreatment with 3-methylcholanthrene, 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl on the liver weight of guinea pigs (A) and rats (B).

The same animals as described in Fig. 1 were used in this experiment. The animals were killed one day or 5 days after the last injection of MC or PCBs, respectively, and starved for one night prior to sacrifice.

Liver weights are expressed as the relative values to the control (=1.0). Each bar represents the mean \pm S.D. of four animals. The liver weights (g/100g body weight) of control guinea pigs and rats were 3.12 ± 0.19 and 3.82 ± 0.19 , respectively.

*Significantly different from the control ($P < 0.05$)

**Significantly different from the control ($P < 0.01$)

モルモットおよびラットの体重増加曲線, および屠殺後の肝と胸腺の重量を示す。これらの急性毒性に関する実験は、後述の酵素誘導効果と比較するために行ったものではあるが、モルモットに対するTCBの効果のみは今回が最初の検討である。モルモットおよびラットいずれにおいてもPenCB処理群のみに有意な体重増加抑制が認められた (Fig. 1)。また、モルモットはラットよりも低用量のPenCBであるにもかかわらず、抑制の程度はラットよりも顕著であった。肝肥大および胸腺萎縮は、ラットでは3種の化合物いずれもが有意な変化を惹起し、その程度はMCおよびTCBはほぼ同程度であり、PenCBはそれ以上で最も顕著であった (Fig. 2B, 3B)。モルモットではPenCB処理群のみに有意な臓器重量変化が認められた。 (Fig. 2A, 3A)。また、モルモットではラットと異なって、MCの方がTCBよりも大きい重量変化を示す傾向が認められた。

2. 肝酵素誘導作用

TCB, PenCB および MC 処理動物の肝 BR-UGT

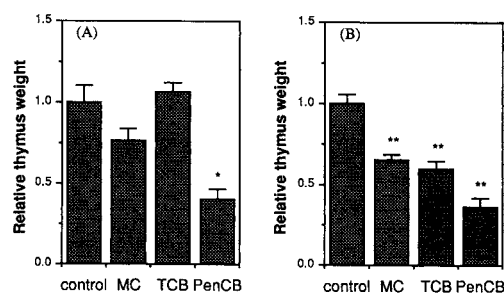


Fig. 3 Effects of pretreatment with 3-methylcholanthrene, 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl on the thymus weight of guinea pigs (A) and rats (B).

Treatments of animals were same as described in Fig. 2.

Thymus weights are expressed as the relative values to the control (=1.0). Each bar represents the mean \pm S.D. of four animals. The thymus weights (g/100g body weight) of control guinea pigs and rats were 0.020 ± 0.002 and 0.331 ± 0.034 , respectively.

*Significantly different from the control ($P < 0.05$)

**Significantly different from the control ($P < 0.01$)

活性を Fig. 4 に示す。以前に行った実験結果⁵⁾と同様に、モルモットの BR-UGT 活性は MC 処理によって対照群の約 3 倍に増加した。今回新たに行った TCB および PenCB 処理でも本活性は明らかに誘導された。しかも、誘導倍率は低毒性の TCB が約 2 倍であるのに対し、高毒性の PenCB では約 6 倍にも達した。しかし、ラットの BR-UGT 活性は MC, TCB および PenCB のいずれの投与によっても減少した。この BR-UGT に対する効果は、モルモットの場合が活性増大であり、全く対照的であった。モルモットの AHH 活性は PenCB 処理によって約 2 倍に増加したが、TCB および MC による誘導効果は、PenCB 以下であり、特に TCB の場合は殆ど対照群と同じレベルであった (Fig. 5)。PenCB によるモルモット DT-diaphorase 活性の誘導は認められなかった (Fig. 6A)。この PenCB による DT-diaphorase 活性の変動は、ラット (Fig. 6B) での倍率と比較すると著しく少なかった。

考 察

モルモットにおける BR-UGT 活性は、PenCB によって最も強く誘導され、次いで MC, TCB の順に有意

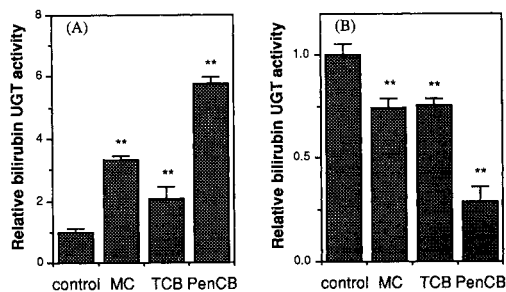


Fig. 4 Change in the bilirubin glucuronyltransferase activity of guinea pig (A) and rat (B) liver microsomes after pretreatment with 3-methylcholanthrene, 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl.

Treatments of animals were same as described in Fig. 2.

The activities are expressed as the relative values to the control (=1.0).

Each bar represents the mean \pm S.D. of four animals. The bilirubin glucuronyltransferase activities of control guinea pigs and rats were 0.151 ± 0.023 and 1.06 ± 0.05 nmol/min/mg protein, respectively.

**Significantly different from the control ($P < 0.01$)

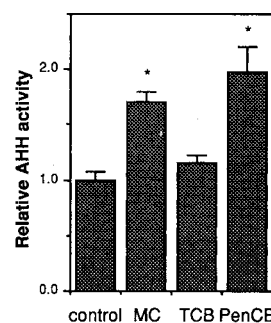


Fig. 5 Change in the arylhydrocarbon hydroxylase activity of guinea pig liver microsomes after pretreatment with 3-methylcholanthrene, 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl.

Treatments of animals were same as described in Fig. 2.

The activities are expressed as the relative values to the control (=1.0).

Each bar represents the mean \pm S.D. of four animals. The arylhydrocarbon hydroxylase activity of control guinea pigs was 0.107 ± 0.013 nmol/min/mg protein.

*Significantly different from the control ($P < 0.05$)

な活性増大が認められた。また、これらの誘導率は、毒性の程度、例えば体重増加抑制の程度とよく相関していた (Fig. 7A)。この事実は BR-UGT の活性増加が少なくともモルモットでは PCB のよい毒性指標となる可能性を示唆している。しかし、今回は PCB として 2 種の化合物を取り上げて比較したのみであるので、この点は、今後多くの同族体、異性体を用いて更に検討する必要がある。一方、ラットにおける BR-UGT 活性は PenCB 等で却って減少した。しかし、ラットの場合も BR-UGT 活性の減少の程度と毒性の程度との間には相関性 (この場合は逆相関) が認められた (Fig. 7B)。コプラナー PCB のモルモットやラットに対する毒性発現と BR-UGT の増減がどのように関連しているのかは現時点では不明である。ただ、変化の方向がモルモットとラットでは正反対であることから、仮にこの酵素レベルの変動が PCB の毒性発現に何か重要な役割があったとしても、その機構は両動物種で異なるものと推定された。

UGT には P450 と同様に分子多様性が存在し、一次構造の類似性に基づき UGT1 および UGT2 の 2 つのファミリーに分類されている²⁾。UGT1 ファミリーの

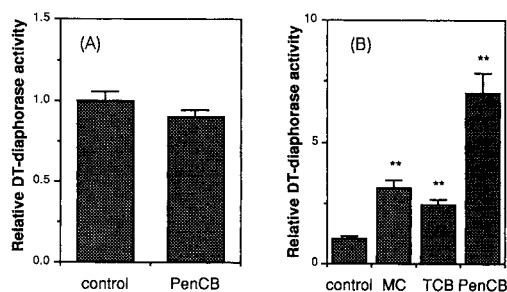


Fig. 6 Change in the DT-diaphorase activities of guinea pig (A) and rat (B) liver microsomes after pretreatment with 3-methylcholanthrene, 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl.

Treatments of animals were same as described in Fig. 2.

The activities are expressed as the relative values to the control (=1.0).

Each bar represents the mean \pm S.D. of four animals. The DT-diaphorase activities of control guinea pigs and rats were 23.2 ± 1.4 and 69.8 ± 7.9 nmol/min/mg protein.

**Significantly different from the control ($P < 0.01$)

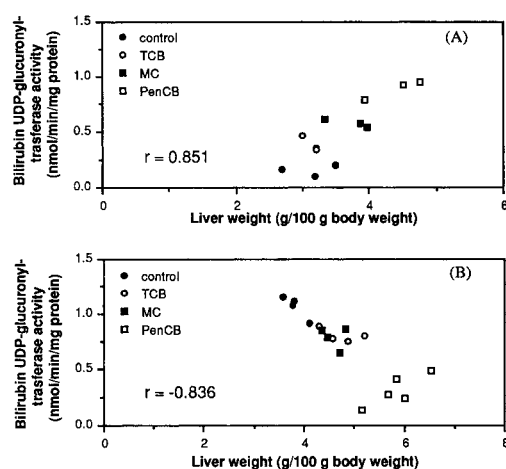


Fig. 7 Correlation between the toxicity and the bilirubin glucuronyltransferase inducibility caused by pretreatment with 3-methylcholanthrene, 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl.
A: Guinea pig; B: rat

中には TCDD 誘導性の分子種が含まれ、また、このファミリーの UGT 中で 4-methylumbelliferone に強い触媒活性を示す分子種は Ah-レセプターを介する機構でその発現が調節されている¹²⁾。本研究の対象となった BR-UGT も上記 UGT1 ファミリーに属し、これの発現調節が Ah-レセプターを介する可能性は十分考えられる。一方、ラットの BR-UGT 活性は clofibrate 等のペルオキシゾーム増殖薬によって誘導されることが知られている⁴⁾。ラット肝サイトソールにはこれらのペルオキシゾーム増殖薬に結合するレセプター (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) が存在することから¹³⁾、コプラナー PCB による BR-UGT の変動が Ah-レセプターではなく、この PPAR を介する現象と予想することも可能であろう。また、かなり以前から、PCB は肝 hemeoxygenase を増加させることが知られている⁹⁾。仮に、BR-UGT の発現量が体内の BR 量によって調節されているのであれば、コプラナー PCB による BR-UGT の増減は hemeoxygenase の誘導とそれに続く BR 量の増加に基づく可能性もある。このように、今回観察した BR-UGT 活性の変動機構については幾つかの機構が予想され、これらのどれかに特定するためには今後の研究が必要である。

本研究では、ラットにおける PenCB の誘導効果を

観察するためにこれを 25 mg/kg の用量で投与した。しかし、当教室の以前の研究結果によれば、benzo(a)-pyrene 水酸化活性および DT-diaphorase 活性の顕著な誘導をラットに起こすには 3~10 mg/kg 程度の用量で十分であることが示されている⁷⁾¹⁸⁾²⁰⁾。当初本研究でも、3 mg/kg で実験を行ったが、この用量では明瞭な酵素誘導を確認できなかった。また、25 mg/kg の用量での実験には再現性が認められた。なお使用した PenCB の純度は、質量、核磁気共鳴および紫外吸収の各スペクトルで確認している。

総 括

PenCB, TCB および MC の BR-UGT 活性に対する誘導効果をモルモットおよびラットを用いて調べた。また、この活性の増減と benzo(a)pyrene 水酸化活性および DT-diaphorase の誘導性並び毒性発現の程度についても合わせて検討した。これらの実験から、次のような知見を得た。

1) PenCB, TCB および MC の 3 種はいずれもモルモット肝の BR-UGT 活性を有意に上昇させた。誘導の程度は PenCB が約 6 倍で最も高く、次いで MC (3.2 倍)、TCB (2.4 倍) の順であった。一方、benzo(a)-pyrene 水酸化活性および DT-diaphorase 活性は化合物前処理によって顕著には変動しなかった (対照群の 2 倍以下)。BR-UGT 活性の増加の程度は、毒性発現の程度と相関するように思われた。

2) モルモットと全く対照的に、ラット肝の BR-UGT 活性は PenCB, TCB および MC の処理によって有意に減少した。

文 献

- 1) Alvares K, Carrillo A, Yuan PM, Kawano H, Morimoto RI and Reddy JK: Identification of cytosolic peroxisome proliferator binding protein as a member of the heat shock protein HSP70 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5293-5297, 1990.
- 2) Burchell B, Nebert DW, Nelson DR, Bock KW, Iyanagi T, Jansen PLM, Lancet D, Mulder GJ, Chowdhury JR, Siest G, Tephly TR and Mackenzie PI: The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell Biol.* 10: 487-494, 1991.
- 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) Fournel S, Magdalou J, Thomassin J, Viloutreix J, Siest G, Caldwell J and Andre J-C: Structure-dependent induction of bilirubin glucuronidation and lauric acid 12-hydroxylation by aryl-carboxylic acids chemically related to clofibrate. *Biochim. Biophys. Acta* 842: 202-213, 1985.
- 5) Hoshikawa Y, Hanioka N, Mitsui T, Oguri K and Yoshimura H: Comparison of inducibility of liver UDP-glucuronyltransferase in rats and guinea pigs. Abstracts of Papers, The Japanese-United States Congress of Pharmaceutical Sciences, Honolulu, U. S. A., December, 1987.
- 6) Issemann I and Green S: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650, 1990.
- 7) 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.
- 8) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 9) Maines MD: Evidence for the catabolism of polychlorinated biphenyl-induced cytochrome P-448 by microsomal heme oxygenase, and the inhibition of δ -amininolevulinate dehydratase by polychlorinated biphenyls. *J. Exp. Med.* 144: 1509-1519, 1976.
- 10) Nakatsu K, Brien JF, Taub H, Racz WJ and Marks GC: Gram quantity synthesis and chromatographic assessment of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl. *J. Chromatogr.* 239: 97-106, 1982.
- 11) Nebert DW and Gelboin HV: Substrate inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. *J. Biol. Chem.* 243: 6242-6249, 1968.
- 12) Owens IS: Genetic regulation of UDP-glucuronyltransferase induction by polycyclic aromatic compounds in mice-Co-segregation with aryl hydrocarbon (benzo [a] pyrene) hydroxylase induction. *J. Biol. Chem.* 252: 2827-2833, 1977.
- 13) Poland A and Kuntson 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.
- 14) 佐伯清太郎, 吉原新一, 内野泰治, 吉村英敏: 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl の合成について. *福岡医誌* 70: 85-87, 1979.
- 15) Van Roy EP and Heirwegh KPM: Determination of bilirubin glucuronide and assay of glucuronyltransferase with bilirubin as acceptor. *Biochem. J.* 107: 507-518, 1968.
- 16) Yoshihara S, Kawano K and Yoshimura H: Toxicological assessment of highly chlorinated biphenyl congeners retained in the Yusho patients. *Chemosphere* 8: 531-538, 1979.
- 17) Yoshihara S, Nagata K, Wada I, Yoshimura H, Kuroki H and Masuda Y: A unique change of steroid metabolism in rat liver microsomes induced with highly toxic polychlorinated biphenyl (PCB) and polychlorinated dibenzofuran (PCDF). *J. Pharmacobio-Dyn.* 5: 994-1004, 1982.
- 18) Yoshihara S, Nagata K and Yoshimura H: Different responsiveness of hepatic and pulmonary microsomal mixed function oxidases to phenobarbital-type and 3-methylcholanthrene-type polychlorinated biphenyls in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 6: 954-962, 1983.
- 19) 吉村英敏, 和田郁夫, 古賀信幸, 永田 清, 山内葉子, 吉原新一, 鎌田 理: 3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニルのモルモットに対する急性毒性, ならびに肝酵素の誘導作用. *福岡医誌* 72: 149-154, 1981.
- 20) Yoshimura H, Yoshihara S, Ozawa N and Miki M: Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320: 179-192, 1979.

2, 4, 6, 2', 4', 6'-Hexachlorobiphenyl のイヌにおける *In Vivo* 代謝とそれに関与する Cytochrome P-450 分子種の予備的検討

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室
有吉 範 高・重藤 真 千・小栗 一 太
中村学園大学家政学部食物栄養学科
吉村 英 敏

Metabolism *In Vivo* of 2, 4, 6, 2', 4', 6'-hexachlorobiphenyl in Dog and Partial Characterization of Cytochrome P-450 Isozyme Responsible for Biotransformation of the Congener

Noritaka ARIYOSHI, Machi SHIGETO and Kazuta OGURI

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

Hidetoshi YOSHIMURA

Department of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen College, Fukuoka 814-01

We reported previously that the dog is a unique species which can metabolize 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (HCB) by unusual mechanism via 2, 3-arene oxide intermediate formation. 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB is known as one of the PCB congeners showing the highest concentration in the blood of Yusho patients at present. Therefore, further investigation on the mechanism of biotransformation of PCB in the dog is very useful to obtain informations about metabolic fates of persistent congeners in the bodies of Yusho patients.

In the present study, we examined *in vivo* metabolic pathways of 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB in a dog, and also a role of cytochrome P-450 isozymes in its metabolism. In these experiments, three major metabolites were found in feces of the dog. These were identified to be 3-hydroxy-2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB (M-1), 4-hydroxy-2, 4, 6, 2', 4', 6'-pentachlorobiphenyl (M-2) and 3, 4-dihydroxy-2, 4, 6, 2', 4', 6'-PenCB (M-3), which were previously identified as the major metabolites *in vitro*. 4-Hydroxy-2, 3, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB has also been isolated as a metabolite *in vitro*, but not detected in this *in vivo* study. In conclusion, the present *in vivo* study supported the previous *in vitro* results that the dog metabolizes this congener at least two mechanisms including direct hydroxylation and arene oxide formation. It was also indicated that cytochrome P-450 isozymes responsible for metabolism of this congener may be in part different from those catalyzing the 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB metabolism.

緒 言

2, 4, 5, 2', 4', 5'-Hexachlorobiphenyl (以下 HCB と略す) は油症原因となったライスオイル中のカネクロール (以下 KC と略す) 400 の主成分ではないが、油症発生当時より 20 数年を経過した現在の油症患者の血中にはもっとも高濃度に検出される異性体の 1 つとな

っている¹⁰⁾。この理由はまぎれもなく KC-400 中の主成分であった四塩素化体はすでに大部分代謝、排泄されてしまったのに対し、本 PCB を代表とする高塩素化ビフェニルは著しく代謝が困難であるためと考えられる。しかし、イヌは本異性体を効率よく代謝、排泄するメカニズムを有しており、すでにわれわれはそれが PCB の代謝ではきわめてまれな 2, 3-arene oxide

中間体を生成する能力に帰する可能性を明らかにし、報告した¹⁾。

現在 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB と同様に体内に多く残留している異性体は、大部分非平面型 PCB であり、これら異性体は coplanar PCB のように TCDD 様の急性毒性を示さないため²⁴⁾、なおざりにされてきた傾向がある。現在の油症患者は、健康人レベルまで健康状態を回復している例が多いが、一部の患者は依然として慢性的な油症症状に苦しんでいる。それら症状と現時点で体内に残留、濃縮されている高塩素化ビフェニルとの正確な因果関係は不明だが、最近、非平面型 PCB には coplanar PCB にはない毒性が明らかにされてきたこと²²⁾や、coplanar PCB や TCDD の作用を増強すると報告されていること^{4,5,12,14,20,21)}などを考えると、これら異性体の体内残留も見過すわけにはいかず、coplanar PCB と同様にその排泄促進研究が急がれるべきであると考えられる。

本研究は、こうした背景のもと非平面型高塩素化ビフェニルを効率よく代謝、排泄できるイヌにおいて、それがどのようなメカニズムで行われているかを検討し、さらにそれに関わる cytochrome P-450 分子種について予備的に検討を加えたものである。

実 験 方 法

1. 実験材料

2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB および 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は Ullmann 反応¹¹⁾により合成し、構造は UV, ¹H-NMR および EI-MS スペクトルにより確認した。3-Hydroxy-2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB は Cadogan 反応⁶⁾により、また 4-hydroxy-2, 6, 2', 4', 6'-pentachlorobiphenyl (以下 PenCB と略) は Colbert 法⁶⁾により合成後、単離精製し、それぞれ¹H-NMR によって構造を確認した²⁾。PCB 合成原料はすべて東京化成工業㈱製を用い、chloramphenicol (以下 CAP と略す) はナカライテスク㈱(京都)より、さらに NADP, glucose-6-phosphate (G-6-P) は協和発酵㈱(東京)より購入したものを用いた。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。Kieselgel 60 および Kieselgel F₂₅₄ は Merck AG (ドイツ, Darmstadt) より、また Wakogel S-I は和光純薬工業㈱(大阪)よりそれぞれ購入した。

2. 実験動物と薬物投与および分析用試料の採取

Hazelton Research Animals, Inc. (Box 5 Cumberland, Va 23040, USA) で生産された雌性 Beagle 犬を日本医科学動物資材研究所㈱より購入し、パナファームラボラトリーズ㈱で飼育馴化後、健康状態が良

好であることを確認して 8 カ月齢で試験に使用した。Phenobarbital-Na (以下 PB と略す) は最新体重をもとに必要な量を算出し、Duignan らの方法⁹⁾にしたがって 2 週間連続経口投与後、2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB を 1/4 オンスのゼラチンカプセルに充填し、200 mg/kg あて 1 回経口投与した。PCB 投与日から 5 日間の糞、および尿を全量採取し、計量して実験まで冷凍保存した。また対照試料としての糞および尿は PCB 投与前日に採取した。また別に雄性 Beagle 犬 2 匹に対し、1 匹は上記と同様の PB 処理のみを施し、他の 1 匹は未処理で屠殺して肝臓を得た。肝臓は適当な大きさに切断後、生理的食塩水で灌流してドライアイスで急速凍結して、使用まで -80 °C で保存した。

3. 尿および糞中代謝物の抽出

得られた 5 日間の尿をそれぞれ 2 倍量のクロロホルムにて充分振盪する操作を 5 回行うことにより遊離代謝物を抽出後、水層に濃塩酸を加えて終濃度 5% として、沸騰水浴上 2 時間加熱加水分解し、放冷後上記同様にクロロホルムで抱合体由来の代謝物を抽出した。得られた有機層は無水芒硝で脱水後、溶媒を留去したのち残渣はメタノールに溶解し、phenyltrimethylammoniumhydroxide を用いてガスクロマトグラフィー (GLC) の注入口でメチル化し、それぞれ代謝物の検索を行った。

糞は凍結状態のまま全量を適当な大きさに切断し、乾燥器で 80 °C にて充分乾燥させたのち市販のコーヒーミルで細粉とし、ソックスレー抽出器を用いクロロホルムで 10 時間連続抽出を行った。ただし糞からは遊離代謝物のみを検索した。無水芒硝で脱水、溶媒留去後、残渣をアセトンに溶解し、炭酸カリウム存在下ジメチル硫酸で 2 時間加熱還流することによりメチル化後、Kieselgel 60 に付し未変化体および代謝物のメチル化体を n-hexane で溶出することによってクリーンアップした。

4. ガスクロマトグラフィー (GLC)

装置は電子捕獲型イオン化検出器 (ECD) 付き島津 GC-3 BE 型ガスクロマトグラフを使用し、カラムは 3 mm×2.1 m のガラスカラムに 1.5% OV-17 をコーティングした Chromosorb W (AW-DMCS) (60-80 mesh) を充填して用いた。キャリアーガスには N₂ を用い、流速は 20 ml/min、カラム温度 235 °C で行った。

5. ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS)

装置は島津 GCMS-QP 1000 を使用し、カラムは

3.3 mm×1.1 m のガラスカラムに 2% OV-17 をコーティングした Chromosorb W (AW-DMCS) (60-80 mesh) を充填した用いた。キャリアガスには He を用い、流速は 38 ml/min, カラム温度 200 °C で行った。イオン化法は電子衝撃イオン化 (EI) 法を用い、イオン化電圧は 70 eV で行った。

6. 糞中代謝物の定量

一日ごとにメチル化した代謝物全量を上記操作でクリーンアップした後、溶媒を完全に留去し、残渣はそれぞれ正確に 20 ml のクロロホルムに溶解し、そのうち 0.2 ml を定量用試料として保存し、残りはすべて代謝物の構造決定に使用した。定量用試料からクロロホルムを完全に留去し、投与後 2 日目の試料のみ 1 ml, 3~5 日目の試料はそれぞれ 0.1 ml の n-hexane に再溶解し、その適量を前記 GLC に付して定量した。なお、定量時はカラム温度を 215 °C に下げて行った。

7. ミクロソーム (Ms) での代謝, CAP による

阻害実験

未処理および PB 処理イヌ肝臓より常法にしたがってミクロソーム (Ms) を調製し、それぞれの Ms 5 mg を用いて *in vitro* 代謝を行った。2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB は終濃度 20 μ M, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は終濃度 10 μ M とし、PCB の carrier としてウシ血清アルブミンを 0.8 mg/ml の濃度で加え、50 mM HEPES buffer (pH 7.4) 中で NADPH 生成系 (NADP 0.33 mM, glucose-6-phosphate 8 mM, MgCl₂ 6 mM, glucose-6-phosphate dehydrogenase 2.5 unit) を添加し、最終容量 5 ml, 反応時間は 20 分とした。また PB 処理イヌ肝 Ms を用いて 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB および 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の代謝によぼす CAP の影響を検討した。CAP はエタノール溶液とし、終濃度は 50 μ M とした。その際エタノール濃度は final 0.1% となるようにし、CAP 添加後 3 分間プレインキュベーション後 NADPH 生成系を加えて反応を開始した。他の条件は上記と同様に行った。

実験結果

1. 尿中代謝物の検索

加水分解前および後の尿よりクロロホルムで抽出した試料につき、それぞれ対照尿のそれと GLC にて比較検討したところ、いずれもまったく同様のクロマトグラムを呈した(データ未掲載)。以上の結果からイヌに経口投与した 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB は少なくとも GLC で検出する程度には未変化体も代謝物(抱合体も含む)も尿中には排泄されないことが明らかとなっ

た。

2. 糞中代謝物の検索

糞総抽出物のメチル誘導体を Kieselgel 60 でクリーンアップ後、GLC に付した結果を Fig. 1 に示す。これより明らかなように、本抽出物中には未変化の 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB を除き対照糞抽出物中にはみられない 3 つの主なピークを認めた。これら 3 つの代謝物と考えられるピークにつき GC-MS 分析を行った結果を Fig. 2 に示す。メチル化 M-1 は分子イオンピークを M/Z 388 に示し、6 塩素化体に特徴的な同位体ピークが認められることから M-1 は monohydroxy-HCB であると推定された。メチル化 M-2 は分子イオンピークを M/Z 354 に示し、5 塩素化体に特徴的な同

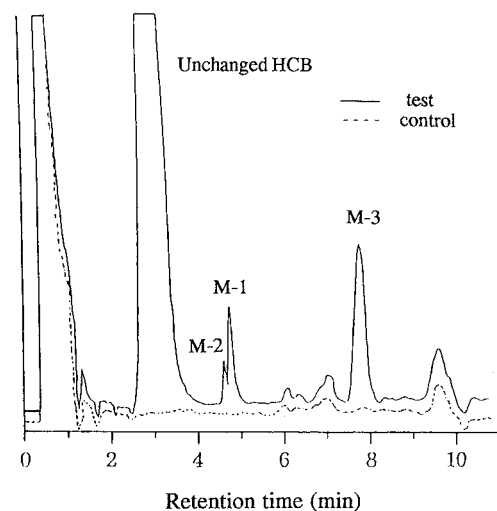


Fig. 1 Gas chromatogram of methylated derivatives of fecal metabolites of 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB.

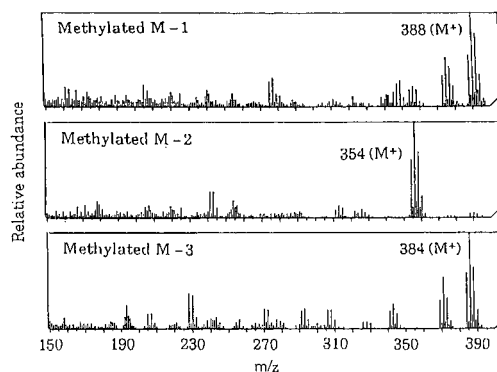


Fig. 2 Mass spectra of three major fecal metabolites of 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB.

位体ピークが認められることから M-2 は monohydroxy-pentachlorobiphenyl (以下 PenCB と略す)であると推定された。最後にメチル化 M-3 は分子イオンピークを M/Z 384 に示し, 5 塩素化体に特徴的な同位体ピークが認められることから M-3 は dihydroxy-PenCB であると推定された。

3. 糞中代謝物の同定

今回糞中から得られた代謝物は微量であったため $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定はできなかった。そこで構造決定は GLC の保持時間および EI-MS スペクトルによって行うこととした。すでにわれわれは PB 処理イヌ肝 Ms を用いて本 PCB の 4 種類の代謝物を単離, 同定しており²⁾, 今回得られた 3 種の代謝物がそれらのいずれに該当するかを検討した。M-1 のメチル化体の GLC における保持時間は *in vitro* 代謝物のうち 3-hydroxy-2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB のメチル化体のそれと完全に一致した。またデータには示さないが, トリメチルシリル (TMS) 化体の保持時間も一致していた。Fig. 3 a には合成した 3-methoxy 体標品の EI-MS スペクトルを示すが, それも代謝物のものと本質的に同一であった。以上の結果より M-1 は 3-hydrox-

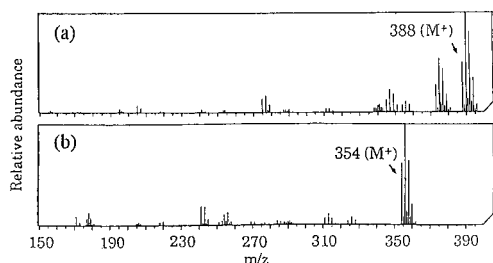


Fig. 3 Mass spectra of methylated derivatives of synthetic 3-hydroxy-2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB (a) and 4-hydroxy-2, 6, 2', 4', 6'-PenCB (b).

y-2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB と同定された。3-hydroxy-2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルはここでは示さないが, 一般則と異なり例外的な化学シフト (5 位プロトンの低磁場へのシフト) を与えるので注意が必要である²⁾。

M-2 は先のマスマスペクトルより塩素が 1 つ脱離するとともに水酸基が 1 つ導入された代謝物と考えられるが, そのメチル化体および TMS 化体の保持時間 (データ未掲載), さらに EI-MS スペクトル (Fig. 3b) との比較から M-2 の構造は 4-hydroxy-2, 6, 2', 4', 6'-PenCB と同定された。4-hydroxy-2, 6, 2', 4', 6'-PenCB の EI-MS スペクトルも一般則と異なり例外的 (M^+-15 の顕著なピークなし) であるので²⁾, そのむね合わせて特記しておく。なお, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは既報を参照されたい²⁾。

最後に M-3 の構造は先のマスマスペクトルより, 塩素が 1 つ脱離するとともに水酸基が 2 つ導入された代謝物と考えられ, その GLC における保持時間からも *in vitro* 代謝で同定された 3, 4-dihydroxy-2, 6, 2', 4', 6'-PenCB と考えられた。興味あることに, 本代謝物は 2 種の mono hydroxy metabolite (M-1, M-2) の共通の 2 次代謝物であると考えられ, すでに報告している²⁾。

In vitro の metabolite として同定されている 4 番目の代謝物, 4-hydroxy-2, 3, 6, 2', 4', 6'-HCB²⁾ は今回の *in vivo* での検討では検出されなかった。

4. 糞中代謝物 M-1 および M-2 の定量

糞中代謝物のうち同定された 2 つの代謝物につき PCB 投与後 5 日間の糞中排泄量を定量した結果を Table 1 に示す。2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB 投与後 5 日間の両代謝物の総排泄量は投与量の 0.01% 以下であり, このことより経口投与による本 PCB の吸収はかなり悪

Table 1 Fecal excretion of two major monohydroxy-metabolites of 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB in a dog pretreated with phenobarbital

Metabolites	Excretion amount (nmol)					
	Days after administration of HCB					Total
	1	2	3	4	5	
3-Hydroxy-2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB (M-1)	N. D.	119.3	10.2	8.7	9.1	147.3 (0.0040)
4-Hydroxy-2, 6, 2', 4', 6'-PenCB (M-2)	N. D.	trace	16.1	9.7	14.4	40.2 (0.0011)

N. D., not detected.

Values in parentheses are % of the dose administered to a dog.

かったのではないかと推察された。

5. 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB 代謝に関わる P-450 分子種の予備的検討

1) 薬物代謝酵素誘導剤の影響

2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB は 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB と同様非平面型 PCB であるが, その薬物代謝酵素の誘導能は後者に比べ比較的弱い¹⁸⁾。しかし酵素誘導剤としてのタイプは古典的分類では後者と同様な PB タイプに属するため, 本 PCB の代謝が PB 処理により促進されるか否かを検討した。その結果を Table 2 に示す。2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の代謝は未処理イヌ肝 Ms ではあまり行われず, PB 処理によって 10 倍以上代謝されるようになっているのに対し, 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB は未処理肝 Ms でもかなり代謝され, PB 処理では 3 倍程度しか増加しなかった。このことは 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の代謝に関わる P-450 分子種は PB 処理によって著しく誘導される 2 B サブファミリーの P-450 である可能性が高く, 一方 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB の代謝に関わる P-450 分子種は, 未処理肝臓にも比較的多く存在しており PB による被誘導率はそれほど高くない可能性が示唆された。

2) 薬物代謝酵素阻害剤の影響

イヌの 2 B サブファミリー P-450 はこれまで Halpert⁹⁾, 中村¹⁷⁾, 白神²³⁾ らによって精製されているが, 本分子種は CAP によりかなり選択的に阻害されることが報告されている⁷⁾。そこで 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB および 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の代謝におよぼす CAP の阻害効果を検討した。その結果を Table 3 に示す。予想通り 50 μ M の CAP によって 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の代謝は約 70% 阻害され, 本 PCB の代謝に 2 B サブファミリー P-450 が関わっていることが強く示唆された。一方, 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB の代謝阻害は 20% にとどまった。CAP はラット肝の P-450 においても 2 B サブファミリーのみではなく, 常在性の P-450 分子種の一部 (2 C サブファミリー) に対しても阻害効果を有することが明らかとなっているので¹⁰⁾, 後者の阻害が本 PCB の代謝に一部関与する 2 B サブファミリー P-450 の阻害によるものか, あるいは常在性 P-450 の阻害によるかは本検討では明らかにできなかった。

Table 2 Effect of phenobarbital treatment on the metabolism of 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB and 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB by dog liver microsomes

Treatment	Substrate disappeared (pmol/min/mg protein)	
	2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB	2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB
Untreated	236.9 \pm 12.1	17.7 \pm 1.5
Phenobarbital	796.1 \pm 11.0 *** \uparrow (3.4)	119.4 \pm 14.5 *** (11.3)

Each value represents the mean \pm S. D. of three determinations except with mark (\uparrow), which represents the mean \pm S. D. of four determinations, and figure in parentheses are relative ratio to the untreated value.

***, Significantly different from the untreated value. ($p < 0.001$)

Table 3 Effect of chloramphenicol (CAP) on the metabolism of 2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB and 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB by phenobarbital-treated dog liver microsomes

Inhibitor	Substrate disappeared (pmol/min/mg protein)	
	2, 4, 6, 2', 4', 6'-HCB	2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB
None	796.1 \pm 11.0 (100)	199.0 \pm 14.5 \uparrow (100)
CAP	637.0 \pm 7.7 *** (80.0)	61.8 \pm 6.5 *** (31.1)

Each value represents the mean \pm S. D. of four determinations except with mark (\uparrow), which represents the mean \pm S. D. of three determinations, and figures in parentheses are percent of the no inhibitor value. Concentration of chloramphenicol was 50 μ M.

***, Significantly different from the control. ($p < 0.001$)

考 察

難代謝性の非平面型高塩素化ビフェニルを効率的に代謝、排泄できるイヌにおける薬物代謝酵素系の反応メカニズムを理解することは、難代謝性高蓄積性のPCB異性体の排泄促進に有意義な情報を提供しうると考え、2,4,5,2',4',5'-HCBの代謝研究に引き続き2,4,6,2',4',6'-HCBの代謝を検討した。

糞中の主代謝物は3種存在し、ラットと共通の代謝物に加え2種の新たな代謝物が検出された。ラットで唯一同定されている3-hydroxy-2,4,6,2',4',6'-HCBはその生成機構として直接水酸化機構が考えられている¹³⁾。イヌにおいて本代謝物がラットと同様直接水酸化で生じているか否かは明らかでないが、イヌの場合少なくとも別の反応機構も働いているものと推察される。その根拠となった事実は4-hydroxy-2,6,2',4',6'-PenCB (M-2)の検出であるが、本代謝物はおそらくarene oxide中間体経路で生成されてきたものと考えられる。Arene oxide中間体生成を支持する直接的な証明は、言うまでもなく中間体の単離であるが、本中間体は一般にきわめて不安定なため単離は容易ではない。そこで従来NIHシフト成績体あるいはtrans-dihydrodiol体の検出、またはグルタチオン抱合体の同定、組織タンパクや核酸塩基との共有結合体の検出などが間接的ではあるが強力な証明とされている。本検討では後者のいずれも検出していないがPB処理イヌ肝ミクロソームを用いた検討ではNIH-shift成績体である4-hydroxy-2,3,6,2',4',6'-HCBが同定されている²⁾。今回この代謝物が検出されなかった理由として、一つは前述した通り、得られた代謝物全量が微量であったため、微量代謝物は検出限界以下であった可能性が考えられる。一方、別の考え方をすれば、本代謝物が生体から排泄されにくい可能性が考えられる。PCBの水酸化体のうち、パラ(4 or 4')位に水酸基を有し、その隣に塩素置換があるものは血中のプレアルブミンと高い親和性を有していることが報告されていること¹⁹⁾から、4-hydroxy-2,3,6,2',4',6'-HCBは2,2',6,6'の位置に塩素置換を有しているにもかかわらずある程度の親和性を有しており、生体内に残留してしまったとの考え方である。

代謝メカニズムについては上述したようにarene oxide経路であると仮定するとM-2の生成には3,4-arene oxide中間体が介在していると予想されるが、それは2,4,5,2',4',5'-HCBが2,3-arene oxide中間体経路で代謝されている事実と対照的なものであった。

このことは一見矛盾しているようにも感じられるが、特異的P-450分子種の誘導剤、阻害剤を用いた検討により、2,4,5,2',4',5'-HCBと2,4,6,2',4',6'-HCBの代謝に関わるP-450分子種が異なると考えられることにより説明可能と考えられる。事実、ビフェニルの2-hydroxy体と4-hydroxy体生成を触媒するP-450分子種が異なることは、古典的な酵素誘導の実験からもよく知られた事例である²⁰⁾。

M-3はすでに*in vitro*における検討からM-1およびM-2の共通2次代謝物であると考えられる²⁾が、その場合、M-1がさらにarene oxide中間体を経由して脱塩素水酸化されて生じる過程と、M-2が単に水酸化されて生じる過程のいずれが生体内では優先しているかは興味深い点である。なぜなら生体への毒性を考慮する場合、少なくともarene oxideを経由する代謝過程は直接水酸化による水溶性獲得よりもリスクを伴うと考えられるからである。ブロムベンゼンの代謝過程で生じる2種のarene oxideのうち、3,4-arene oxideは毒性代謝物であるが、2,3-arene oxideは解毒的代謝物であることが知られている¹⁵⁾。これまでPCBの代謝では今回の2,4,6,2',4',6'-HCBの例のごとくarene oxide中間体を生成する場合、主に3,4-あるいは4,5-の位置にオキシラン環を生じる場合がほとんどであるが、すでにわれわれが報告したように、イヌは2,4,5,2',4',5'-HCBを主に2,3-arene oxide経路で代謝すると考えられる²⁾。このことはイヌは2,4,5,2',4',5'-HCBの代謝が特異的に速いばかりでなく、解毒的機構で代謝している可能性を示唆している。先にわれわれが報告しているように、非平面型PCBの場合、代謝によって母化合物より毒性が増強する例が明らかになっており²⁵⁾、非平面型PCBの排泄促進についてはこのことを充分考慮に入れる必要がある。

以上のことからイヌでは高塩素化ビフェニルを効率よく代謝するメカニズムとして複数のメカニズムが働いていることが予想され、強力な酸素原子の導入能力と脱塩素化を行いうることにより、速やかな排泄が達成されるものと考えられる。今後、この能力は分子レベルで検討することによってさらに詳しく解明できるものと期待される。

結 語

イヌにおける2,4,6,2',4',6'-HCBの*in vivo*代謝を検討することにより以下の結論が得られた。

1. 2,4,6,2',4',6'-HCBは経口投与では吸収されにくいと考えられ、また未変化体および代謝物は尿中に

はまったく排泄されず、糞中にのみ検出された。

2. 糞中に少なくとも3種の主代謝物が検出され、その構造は3-hydroxy-2,4,6,2',4',6'-HCB (M-1), 4-hydroxy-2,6,2',4',6'-PenCB (M-2) および 3,4-dihydroxy-2,6,2',4',6'-PenCB (M-3) と同定された。

3. Cytochrome P-450 分子種の特異的誘導剤および阻害剤を用いた *in vitro* 研究によって 2,4,6,2',4',6'-HCB の代謝に関わる分子種は 2,4,5,2',4',5'-HCB を主に代謝する分子種とは異なる可能性が示唆された。

本研究にあたり GC-MS 分析に御協力いただいた厚生省九州地区麻薬取締官事務所の和田幸子博士および Beagle 犬の飼育、薬物投与、屠殺を行っていただいたパナファームラボラトリーズ㈱の井出博之社長および関係諸氏に深謝致します。

文 献

- 1) Ariyoshi N, Koga N, Oguri K and Yoshimura H: Metabolism of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl with liver microsomes of phenobarbital-treated dog; the possible formation of PCB 2,3-arene oxide intermediate. *Xenobiotica* 22: 1275-1290, 1992.
- 2) Ariyoshi N, Yoshimura H and Oguri K: Identification of *in vitro* metabolites of 2,4,6,2',4',6'-HCB from phenobarbital-treated dog liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.* submitted.
- 3) Billings R E and McMahon R E: Microsomal biphenyl hydroxylation; the formation of 3-hydroxybiphenyl and biphenyl catechol. *Mol. Pharmacol.* 14: 145-154, 1977.
- 4) Birgelen A P J M van, Kolk J van der, Poiger H, Berg M van den and Brouwer A: Interactive effects of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thyroid hormone, vitamin A, and vitamin K metabolism in the rat. *Chemosphere* 25: 1239-1244, 1992.
- 5) Borlakoglu J T, Clarke S, Huang S, dils R R, Haegele K D and Gibson G G: Lactational transfer of 3,3',4,4'-tetrachloro- and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl induces cytochrome P-450 IVA1 in neonates. *Biochem. Pharmacol.* 43: 153-157, 1992.
- 6) Cadogan J I G: A convenient new method of aromatic arylation. *J. Chem. Soc.* : 4257, 1962.
- 7) Ciaccio P J, Duignan D B and Halpert J R: Selective inactivation by chloramphenicol of the major phenobarbital-inducible isozyme of dog liver cytochrome P-450. *Drug Metab. Dispos.* 15: 852-856, 1987.
- 8) Colbert J C and Lacy R M: The effect of substituent groups upon the course of the condensation reaction between benzenediazonium salts and phenols. *J. Am. Chem. Soc.* 68: 270, 1946.
- 9) Duignan D B, Sipes I G, Leonard T B and Halpert J R: Purification and characterization of the dog hepatic cytochrome P-450 isozyme responsible for the metabolism of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl. *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 290-303, 1987.
- 10) Halpert J' Balfour C, Miller N E, Morgan E T, Dunbar D and Kaminsky L S: Isozyme selectivity of the inhibition of rat liver cytochrome P-450 by chloramphenicol *in vivo*. *Mol. Pharmacol.* 28: 290-296, 1985.
- 11) Hutzinger O, Safe S and Zitko V: Polychlorinated biphenyls; synthesis of some individual chlorobiphenyls. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6: 209, 1971.
- 12) Jongh J de, Wondergem F, Seinen W and Berg van den: Toxicokinetic interaction in the liver of the C57BL/6J mouse after administration of a single oral dose of a binary mixture of some PCBs. *Chemosphere*, 25: 1165-1170, 1992.
- 13) Kato, S, McKinney J D and Matthews H B: Metabolism of symmetrical hexachlorobiphenyl isomers in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53: 389-398, 1980.
- 14) Kolk J van der, Birgelen A P J M van, Poiger H and Schlatter C: Interactions of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a subchronic feeding study in the rat. *Chemosphere* 25: 2023-2027, 1992.
- 15) Lau S S, Abrams G D and Zannoni V G: Metabolic activation and detoxification of bromobenzene leading to cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214: 703-708, 1980.
- 16) Masuda, Y, Yamaguchi S, Kuroki H and Haraguchi K: Polychlorinated biphenyl isomers in the blood of recent Yusho patients. *Fukuoka Acta Medica* 76: 150-152, 1985.
- 17) 中村俊弘, 中田 宏, 堀江 透: 前臨床からヒトへの薬物代謝酵素誘導の予測(2). 第6回日本薬物動態学会年会講演要旨集, 福岡, 1991年9月, pp. 161.
- 18) Parkinson A, Safe S H, Robertson L W, Thomas P E, Peik L M and Levin W: Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats. *J. Biol. Chem.* 258: 5967-5976, 1983.
- 19) Rickenbacher U, McKinney J D, Oatley S J and Blake C C F: Structurally specific binding of halogenated biphenyls to thyroxine transport protein. *J. Med. Chem.* 29: 641-648, 1986.
- 20) Sargent L, Dragan Y P, Erickson C, Laufer C J and Pitot H C: Study of the separate and combined effects of the non-planar 2,5,2',5'-and

the planar 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in liver and lymphocytes in vivo. *Carcinogenesis* 12: 793-800, 1991.

21) Sargent L M, Sattler G L, Roloff B, Xu Y, Sattler C A, Meisner L and Pitot H C: Ploidy and specific karyotypic changes during promotion with phenobarbital, 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl, and/or 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in rat liver. *Cancer Res.* 52: 955-962, 1992.

22) Seegal R F, Bush B and Shain W: Neurotoxicology of ortho-substituted polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 23: 1941-1949, 1991.

23) 白神歳文, 岩崎一秀: ビーグル犬肝ミクロゾー

ムに存在するチトクローム P-450 の性状. 第21回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム講演要旨集, 徳島, 1990年10月, pp. 147-148.

24) Silkworth J B and Grabstein E M: Polychlorinated biphenyl immunotoxicity; dependence on isomer planarity and the Ah gene complex. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65: 109, 1982.

25) 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.

Frequency of Micronuclei Induced in Cultured Lymphocytes by Highly Toxic Organochlorine Congeners

Junya NAGAYAMA and Mayumi NAGAYAMA

*Laboratory of Environmental Health Sciences, School of Health Sciences,
Kyushu University 90, Fukuoka 812*

Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815

Abstract Our human bodies have already been contaminated with various chemicals including highly toxic organochlorine compounds such as 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) and 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB). In this study, in order to evaluate the genotoxicity of these three chemicals, we examined their effects on the induction of micronuclei, which has frequently been utilized as indicator of biological and genetic damage due to exposure to carcinogens or mutagens, in cultured human lymphocytes in the absence or presence of α -naphthoflavone (ANF) and the following results were obtained. 1) 4×10^{-5} M ANF alone significantly enhanced the frequency of micronuclei and the combination of ANF and either of TCDD, PenCDF or PenCB seemed to be additive as micronuclei inducers. 2) TCDD, PenCDF and PenCB significantly increased the frequency of micronuclei with almost the same dose-dependent manner in terms of the concentration of TCDD toxic equivalent. 3) TCDD, PenCDF and PenCB were considered to be very potent inducers of micronuclei, because their values of 50% effective concentration in micronuclei enhancement were around only 10 times higher concentration than that in healthy people, namely, 70ppt as TCDD. Consequently, the respective TCDD toxic equivalency factors of 0.5 and 0.2 for PenCDF and PenCB seemed to be reasonable so far as the induction of micronuclei was employed as an indicator of their genotoxic potency. The three chemicals were regarded as highly genotoxic ones and one of the most important problems which should be solved is further comprehensive genotoxicity and health consequences of the mixed contamination of these chemicals to the descendants.

Introduction

Micronuclei enclose acentric chromosome fragments or whole chromosomes that have not been incorporated in the main nuclei at cell division, and enumeration of micronuclei in mitogen-stimulated lymphocytes provides a simpler and statistically more precise method than karyotypic analysis for quantitation of chromosomal damage.

Our bodies have already been contaminated with numerous chemicals and one of those are the highly toxic organochlorine compounds such as polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans

(PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs)⁴⁾¹⁰⁾. In this study, we investigated the induction of micronuclei in mitogen-stimulated lymphocytes by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), the most toxic congener among PCDDs, 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF), the most toxic congener among PCDFs and 3, 4, 5, 3', 4' pentachlorobiphenyl (PenCB), the most toxic congener among Co-PCBs in order to elucidate their genotoxicity¹⁸⁾.

Materials and Methods

1. Chemicals

TCDD and PenCDF were synthesized by Dr.

Y. Masude and PenCB was purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Woburn, USA. Their purities were over 99% by gas chromatography. The sources of chemicals used in this work were as follows: 7, 8-benzoflavone (ANF) from Wako, Osaka, cytochalasin B (CYB) from Sigma, St. Louis, phytohemagglutinin M (PHA) from Difco, Detroit, and penicillin, streptomycin and RPMI 1640 from Gibco, New York. All other chemicals and reagents were of the highest quality commercially available.

2. Mutagenic treatments and lymphocyte culture

We assumed that the total concentration of the organochlorine compounds in the tissues of Japanese people was 70ppt as TCDD toxic equivalent concentration on fat weight basis and that toxic equivalency factors (TEFs, relative to TCDD) were 0.5 for PenCDF and 0.2 for PenCB¹³. Their effects on the induction of micronuclei in peripheral human lymphocytes was examined at doses of about 5, 25 and 50 times higher concentration than 70ppt in TCDD toxic equivalent. Therefore, human lymphocytes in whole-blood cultures were treated with TCDD at 364, 1,470 and 2,940ppt, with PenCDF at 784, 3,948 and 7,896ppt and with PenCB at 1,750, 8,750 and 17,500ppt. These test chemicals were added at the beginning of the culture time and left until harvesting.

Lymphocyte cultures (5.0 ml) were initiated from whole blood (0.3ml) aliquoted into culture tubes containing one of the three test chemicals and RPMI 1640 medium (4.5 ml) supplemented with 15% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, in either the presence or absence of 4×10^{-5} M ANF. 0.15 ml PHA (a final concentration; 3%) was added at culture initiation. The whole blood cultures were then incubated at 37°C in 5.0% CO₂ and 100% humidity. At 71hr after the commencement of the culture, 7 μ M CYB was added and the incubation was further continued for additional 26hr.

3. Slide preparation and scoring

At the end of incubation, whole blood cultures were centrifuged (1,000rpm, 5min), resuspended in 0.1M KCl hypotonic solution for 15min at 37°C and centrifuged. Then cells were fixed 3 times in fresh fixative (methanol: acetic acid, 3:1) at room temperature. Samples for microscopic observations were obtained by carefully dropping cell suspension from a Pasteur pipette onto wet clean slides. Slides were dried in vapor of water and stained with 3% Giemsa (Merck) in distilled water.

Slides were coded and scored blind under a magnification of 1,000 \times . A total of 3,000 binucleate lymphocytes with preserved cytoplasm were scored for each experimental point. Criteria for micronuclei evaluation were those suggested by Countryman and Heddle²¹.

4. Statistical analysis

The results are expressed as the average number \pm S. E. of micronucleated cells, from 3 observations of 1,000 cells each on different slides from the same culture tube. Data were statistically analyzed by Student's *t*-test.

Results

1. Frequency of micronuclei induced by TCDD, PenCDF and PenCB in the absence of ANF

The experimental results are shown in Fig. 1. The frequency of micronuclei in the control culture was $3.1 \pm 0.3\%$, the greatest induction was observed at the highest concentration, about 50 times over the average one in healthy Japanese people, of each chemical and those were $6.0 \pm 0.7\%$ for TCDD, $5.7 \pm 1.5\%$ for PenCDF and $5.3 \pm 0.8\%$ for PenCB. Only TCDD significantly induced the micronuclei at the lowest concentration, about 5 times more than the control healthy level. In the whole-blood culture without ANF, the frequency of micronuclei in the lymphocytes seemed to increase in almost the same proportion to the concentration of TCDD, PenCDF and PenCB in terms of TCDD toxic equivalent. Therefore, our

assumption that TEF values were 0.5 for PenCDF and 0.2 for PenCB was considered to be acceptable.

Based on these findings, we recalculate the frequency of micronuclei at each concentration, adding up the micronuclei values induced by the three chemicals at the same concentration in TCDD toxic equivalent and the result is shown in Fig. 3. The frequency of micronuclei in the acetone treated control group was $3.1 \pm 0.3\%$,

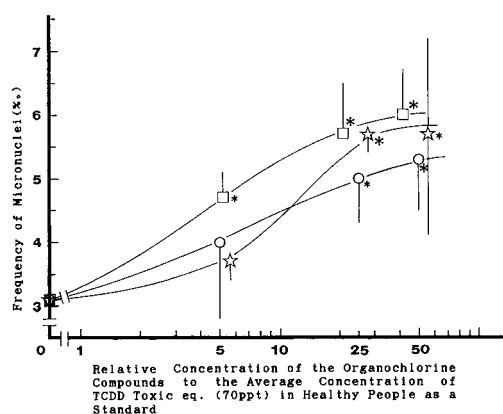


Fig. 1 Effects of TCDD (□), PenCDF (☆) and PenCB (○) on the induction of micronuclei in human whole-blood cultures
*: $P < 0.05$, *: $P < 0.01$

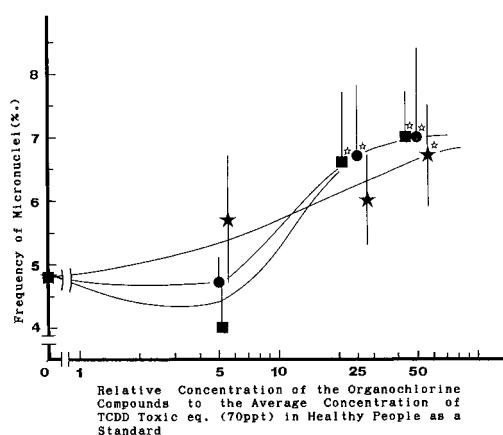


Fig. 2 Effects of the simultaneous treatments of both TCDD (■), PenCDF (★) or PenCB (●) and ANF (4×10^{-5} M) on the induction of micronuclei in human whole-blood cultures
☆: $P < 0.05$

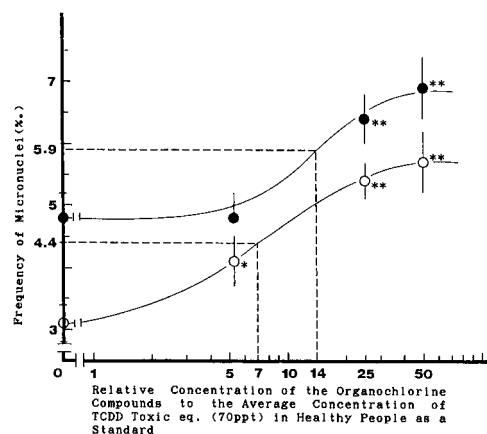


Fig. 3 Mean effects of the three organochlorine compounds (TCDD, PenCDF and PenCB, ○) and these compounds plus ANF (●) on the induction of micronuclei in human whole-blood cultures
*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

enhanced in proportion to the concentration of the chemicals and at the highest concentration that was $5.7 \pm 0.5\%$ which was significantly greater than that in control culture. Fifty % effective concentration for the induction of micronuclei in the lymphocytes cultured in the absence of ANF appeared to be only 7 times higher concentration than the average one in Japanese people, namely, 70ppt as TCDD.

2. Frequency of micronuclei induced by TCDD, PenCDF and PenCB in the presence of ANF

The experimental results are indicated in Fig. 2. The frequency of micronuclei in the solvent (acetone) treated control group was $4.8 \pm 0.4\%$, the largest frequency was observed at the highest concentration of each chemical and those were $7.0 \pm 0.7\%$ for TCDD, $6.7 \pm 0.8\%$ for PenCDF and $7.0 \pm 1.4\%$ for PenCB. At the lowest concentration, the frequency of micronuclei was somewhat smaller in TCDD treated one than that in the control one. In general, however, the three chemicals enhanced the frequency of micronuclei in the lymphocytes of whole-blood culture with ANF with almost the same dose-dependent manner in terms of TCDD

toxic equivalent. Therefore, our assumption concerning TEF values for PenCDF and PenCB seemed to be reasonable not only in the absence of ANF but also in the presence of ANF.

Based on the finding mentioned above, we reevaluated the frequency of micronuclei at each concentration, adding up the micronuclei figures of the three chemicals at the same concentration in TCDD toxic equivalent and the result is indicated in Fig. 3. The frequency of micronuclei in the control culture was 4.8 ± 0.4 ‰, increased in proportion to their concentrations and at the greatest concentration that was 6.9 ± 0.5 ‰, which was significantly higher than that in the control group. Fifty % effective concentration for the induction of micronuclei in the lymphocytes cultured in the presence of ANF seemed to be 14 times higher concentration than the average one in healthy Japanese people, that is, 70ppt as TCDD.

Discussion

The development of TEFs for the toxic halogenated aromatics has been necessitated by the identification of complex mixtures of these compounds in almost every compartment of the global ecosystem. PenCDF is the most highly toxic PCDF congener and its proposed TEF value is 0.5¹⁸⁾. PenCB is the most greatly toxic PCB congener and a range of its proposed TEF value is 0.1 to 0.4³⁾¹⁸⁾. In this study, we assumed that TEF values for PenCDF and PenCB were 0.5 and 0.2, respectively and this assumption seemed to be reasonable because TCDD, PenCDF and PenCB enhanced the frequency of micronuclei in almost the same dose-dependent manner in terms of TCDD toxic equivalent concentration, as indicated in Figs 1 and 2.

PCDDs, PCDFs and PCBs did not bind covalently to DNA, did not produce effects on the sister chromatid exchange (SCE) frequency, and were negative in other short-term genotoxicity tests⁷⁾²⁰⁾. Contrary to the findings concerning SCE frequency mentioned above, more recent investigations indicated that PCDDs,

PCDFs and PCBs significantly increased the frequency of SCE in cultured human lymphocytes¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁹⁾ and that of micronuclei *in vitro*¹⁴⁾, and cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes demonstrated that accidental or occupational exposure to PCBs and/or PCDFs resulted in an enhanced frequency of SCE⁵⁾⁸⁾. Findings of the present study also indicated that TCDD, PenCDF and PenCB were considered to be very potent inducers of micronuclei, because, as shown in Fig. 3, their EC_{50} values of micronuclei enhancement were around only 10 times higher concentration than that in healthy people, that is, 70ppt as TCDD. In the presence of ANF, this modification greatly enhanced the sensitivity of SCE assay in detecting effects of cigarette smoking and accidental exposure to a mixture of PCBs and PCDFs in peripheral lymphocytes⁸⁾⁹⁾. Therefore, we expected that ANF also increased the sensitivity of micronuclei assay in detecting genotoxic effects of halogenated aromatics such as TCDD, PenCDF and PenCB. As indicated in Fig. 3, ANF significantly enhanced the frequency of micronuclei in the absence of TCDD, PenCDF or PenCB and the combination of ANF and either of the three chemicals was considered to be additive as micronuclei inducers.

Several, however, of these chemicals are carcinogenic in animal models, where they have been classified as tumor promoters rather than initiators¹⁾⁶⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. Taking account of recent findings described above and the results of this study, we had better consider that these halogenated aromatics are carcinogenic partly as tumor promoters and partly as tumor initiators, because they are probably strong genotoxic compounds and sometimes seem to act through mechanisms involving direct genetic damage.

Human breast milk has been contaminated with PCDDs, PCDFs and PCBs¹⁰⁾¹¹⁾ and daily intakes of these organochlorine chemicals in breast-feeding babies of healthy mothers were estimated to be about 100 to 200 pg/kg/day as

TCDD equivalent values (TEQs)¹²⁾. These TEQs values were about 100 to 200 times greater than the acceptable daily intake (ADI) value, namely, 1pg/kg/day. Therefore, we should give due attention to the comprehensive genotoxicity and the possible health consequences due to PCDDs, PCDFs and PCBs in the breast milk to breast-feeding babies.

References

- 1) Abernethy OJ, Greenlee WF, Hubrand JC and Boreiko CJ: 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) promotes the transformation of C3H/10T 1/2 cells. *Carcinogenesis* **6**: 651-653, 1985.
- 2) Countryman PI and Heddle JA: The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Res.* **41**: 321-332, 1976.
- 3) Hanberg A, Wern F, Asplund L, Haglund E and Safe S: Swedish dioxin survey: determination of 2, 3, 7, 8-TCDD toxic equivalent factors for some polychlorinated biphenyls and naphthalenes using biological tests. *Chemosphere* **20**: 1161-1164, 1990.
- 4) Hirakawa H, Iida T, Matsueda T, Tokiwa H, Nagata T and Nagayama J: Concentrations and distribution of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in various human tissues. *Organohalo. Comp.* **10**: 93-96, 1992.
- 5) Kalina I, Srám RJ, Konecna H and Ondrussekova A: Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes in workers occupationally exposed to polychlorinated biphenyls. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* **10**: 21-29, 1990.
- 6) Kavanagh TJ, Rubinstein C, Liu PL, Chang C-C, Trosko JE and Sleight SD: Failure to induce mutations in Chinese hamster V79 cells and WB rats liver cells by polybrominated biphenyls, Firemaster BP-6, 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexabromobiphenyl, 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexabromobiphenyl and 3, 3', 4, 4'-tetrabromobiphenyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **79**: 91-98, 1985.
- 7) Kociba R: Banbury Report 18, In Campbell HA and Poland A (eds): Evaluation of the carcinogenic and mutagenic potential of 2, 3, 7, 8-TCDD and other chlorinated dioxins. pp.73-84, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1984.
- 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. *Mutation Res.* **143**: 131-135, 1985.
- 10) Masuda Y: Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compound pollution in human tissues. *Toxicol. Forum* **10**: 566-574, 1987.
- 11) Matsueda T, Iida T, Hirakawa H, Fukamachi K, Tokiwa H and Nagayama J: Comparison of concentrations of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in breast milk of Yusho patients and normal controls. *Organohalo. Comp.* **9**: 143-146, 1992.
- 12) Matsueda T, Iida T, Hirakawa H, Fukamachi K, Tokiwa H and Nagayama J: Toxic evaluation of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in breast-fed babies of Yusho and healthy mothers. *Chemosphere* in pres.
- 13) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Masuda Y: Genotoxicity of organochlorine compounds retained in human body in cultured human lymphocytes. *Chemosphere* in press.
- 14) Nagayama J, Nagayama M and Masuda Y: Genotoxicity of highly toxic organochlorine congeners in cultured human lymphocytes. *Organohalo. Comp.* **10**: 165-168, 1992.
- 15) Nagayama J, Nagayama M, Wada K, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Masuda Y: The effect of organochlorine compounds on the induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Fukuoka Acta Med.* **82**: 221-227, 1991.
- 16) Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA and Poland A: Quantitative evaluation of the promotion by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res.* **40**: 3616-3620, 1980.
- 17) Poland A, Palen D and Glover E: Tumour promotion by TCDD in skin of HRS/J hairless mice. *Nature (London)* **300**: 271-273, 1982.
- 18) Safe S: Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Toxicology* **21**: 51-88, 1990.
- 19) Sargent L, Roloff B and Meisner L: In vitro chromosome damage due to PCB interactions. *Mutation Res.* **224**: 79-88, 1989.
- 20) Wasson JD, Huff JE and Lopriano NA: A review on the genetic toxicology of chlorinated dibenzo-*p*-dioxin. *Mutation Res.* **47**: 141-160, 1977.

(和文抄録)

高毒性有機塩素化学物質によるヒトリンパ球の小核誘発性

九州大学医療技術短期大学部環境科学研究室

長山 淳哉・長山 真弓

第一薬科大学物理分析学教室

増田 義人

私たちの身体はすでに非常に毒性の高い2,3,7,8-四塩化ダイオキシン(TCDD), 2,3,4,7,8-五塩化ダイベンゾフラン(PenCDF)および3,4,5,3',4'-五塩化ビフェニール(PenCB)のような有機塩素系化学物質により汚染されている。本研究では、これら3種の化学物質の遺伝毒性を評価するために、癌原性あるいは変異原性物質への曝露による遺伝的傷害の指標として良く研究されている小核誘発性に対する3化学物質の作用を調べ、次のような結果が得られた。

- 1) この実験系の検出感度を高めることが期待される α -ナフトフラボン(4×10^{-5} M)は小核誘発性を有意に高め、 α -ナフトフラボンとTCDD, PenCDFあるいはPenCBを同時に処理すると、その作用は相加的であった。
- 2) TCDD 毒性当量による濃度に依存して、3化学物質はいずれも同じような量・反応関係により有意

に小核誘発を高めた。

- 3) 日本人の有機塩素系化学物質による平均的汚染濃度はTCDDとして約70 pptであると考えられるが、3化学物質による小核誘発性の50%有効濃度が、この平均的汚染濃度のわずか10倍程度であることが解明された。

以上のような実験結果により、PenCDFおよびPenCBのTCDD毒性当量係数として、この研究で採用したそれぞれ0.5および0.2という値は、遺伝毒性の指標として小核誘発性が用いられる場合には妥当であると考えられる。これら3種の化学物質はいずれも、きわめて強力な遺伝毒性物質であると考えられるので、遺伝子傷害に基づく疾病や子孫への悪影響等について、さらに一層の研究が望まれると同時に、そのような好ましからざる健康影響の予防法に関する研究も重要である。

Effects of 3-methylsulphonyl-4, 5, 3', 4',-tetrachlorobiphenyl and 7, 8-benzoflavone on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activities of Murine Hepatic Microsomes Prepared from Inbred Strains with Different Ah Responsiveness

Junya NAGAYAMA

Laboratory of Environmental Health Sciences, School of Health Sciences, Kyushu University 90, Fukuoka 812

Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815

Abstract In this work, we employed three Ah nonresponsive strains of mice, AKR, DBA and DDD, and three Ah responsive ones, C57, BALB and C3H, and prepared hepatic microsomes after the treatment of 3-methylcholanthrene (MC ; 42 mg/kg, once) and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD ; 20 μ g/kg, 6 times) in order to investigate the effect of 3-methylsulphonyl-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB ; 1.5-45 μ g/ml) and 7, 8-benzoflavone (ANF ; 1.4-42 μ g/ml) on the hepatic microsomal AHH activities and the following results were obtained.

1. In the Ah nonresponsive strains of mice, 70 and 20% of the induced AHH activities with MC and TCDD, respectively, were attributable to the basal control enzyme activity and in the Ah responsive ones, only 4.2 and 1.4% of the induced activities with the two chemicals to the untreated control one, respectively.

2. 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF enhanced or reduced the enzyme activity depending on both their concentrations and kinds of microsomes employed, namely, control-, MC- and TCDD-microsomes. ANF showed higher potency for both the activation and inhibition of the AHH activity than 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB.

3. The effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on the enzyme activity of the MC treated Ah nonresponsive mice and those of the untreated control Ah responsive animals were quite similar and their effects on the AHH activity of the TCDD treated Ah nonresponsive strains were also almost the same as those of the MC or TCDD treated Ah responsive ones.

Based on the experimental results in this study and the findings reported by other scientists, the following considerations will be possible.

1. The stimulation and/or inhibition of the AHH activity by 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF seems to depend on the quality and quantity of cytochrome P-450 (P-450), which catalyzes B(a)P metabolism.

2. When the main P-450 in the microsomes is similar to P-450 IIIA6, the enzyme activity will be probably enhanced well by the two chemicals, and when it is P-450 IA1 type, the enzyme activity will be strongly inhibited by them.

3. The kinds of P-450 induced by MC and TCDD are considered to depend on the grade of the Ah responsiveness of the host and we think that in the liver of the Ah nonresponsive mice, MC seemed to induce P-450s similar to P-450 IIIA6 and P-450 IA2 and TCDD preferentially P-450 IA1 type one, and in the liver of the Ah responsive ones, MC was considered to induce P-450s resembling P-450 IIIA6, P-450 IA2 and P-450 IA1 and TCDD exclusively P-450 IA1 type P-450.

The murine Ah locus has been considered to regulate the activation or inhibition of monooxygenase enzyme activities such as AHH by BP, MC and TCDD via a highly specific binding to the cytosolic Ah receptor. However, the microsomes used in this study did not contain the Ah receptor and the two chemicals enhanced and/or decreased these microsomal AHH activities.

Therefore we think that the Ah receptor is not involved in the action of the two compounds on the AHH activity and that they seem to act directly on P-450 enzyme system.

Introduction

Methylsulphonyl polychlorinated biphenyls (MSF-PCBs) have been determined at relatively high concentration in several tissues of both Yusho patients and healthy subjects as one of the major metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs)²⁾³⁾⁶⁾. There were only two studies about the biological or biochemical effects of one methylsulphonyl polychlorinated biphenyl, namely, 4-methylsulphonyl-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl (4-MSF-2, 5, 2', 5'-TCB), in rats⁵⁾ and in mice¹⁰⁾ before our first report concerning the inhibitory effect of some MSF-PCB congeners on aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in cultured human lymphoblastoid cells was published in 1987¹¹⁾.

Since then, we have reported four papers relating to the effects of MSF-PCB congeners on AHH activity¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. In the last three studies among ones mentioned above, we have employed three Ah responsive strains of mice, C57, BALB and C3H, and three Ah nonresponsive ones, AKR, DBA and DDD. Effects of 3-methylsulphonyl-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB) and 7, 8-benzoflavone (ANF) on the hepatic microsomal AHH activity seemed to vary depending on the Ah responsiveness of the host not only in nontreated control mice but also in ones treated with 3-methylcholanthrene (MC) or 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. Therefore, in this paper we would like to complete the action of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on the murine hepatic AHH activity.

Materials and Methods

1. Chemicals

3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB was synthesized and purified as previously described⁴⁾. Its purity was greater than 99%, as determined by gas

chromatography(GC) and GC-mass spectrometry. TCDD was synthesized by chlorination of dibenzo-*p*-dioxin and the purity was more than 99% by GC. The sources of chemicals used in this work were as follows: benzo(a)pyrene (BP) and MC from Sigma chemical Co., St Louis, Mo, USA, 3-hydroxy-BP (3-OHBP) from Dr. N. Kinoshita, school of Health Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan, and ANF, NADH and NADPH from Wako Pure Chemical Ind.Ltd., Osaka, Japan. All other chemicals and reagents used were of the highest quality commercially available.

2. Treatment of animals

Three Ah responsive inbred strains of mice, C57BL/6NQdj(C57), BALB/cCrj(BALB) and C3H/HeNQdj(C3H) and three Ah nonresponsive ones, AKR/JSea(AKR), DBA/2JCrj(DBA) and DDD: Qdj(DDD) were obtained as described before¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. These animals were housed in disposable cages (4 or 5 mice/cage), and maintained as mentioned before¹³⁾. At 8 weeks of mouse age, TCDD dissolved in olive oil was given IP at a dose of 20 µg/kg once every two weeks (6 times). Control mice were given the vehicle alone in a similar volume and on the same time schedules. MC dissolved in olive oil was given IP once at a dose of 42 mg/kg. Three days after the last treatment, the animals were killed by cervical dislocation.

3. AHH assay

The livers were excised, rinsed, weighed, minced and homogenized by the method described before¹³⁾ and every hepatic microsome was prepared as reported by Noshiro and Omura¹⁹⁾. The reaction media for the AHH assay consisted of 1 to 30 µg of microsomal protein, 100 nmol of BP, 1.1 µmol of NADPH and 12.8 µmol of MgCl₂ in a final volume of 1.1 ml of 50mM Tris-HCl buffer (pH7.5) containing 0.8 mg/ml of bovine serum albumin in company

with 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB (final concentration; 0, 1.5, 3.0, 15 or 45 $\mu\text{g/ml}$) or ANF (final concentration; 0, 1.4, 2.8, 14 or 42 $\mu\text{g/ml}$). The enzyme activity was determined as stated previously¹⁴⁾, using a Hitachi spectrophotofluorometer (model 650-10S, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Specific AHH activities of microsomes prepared from the untreated control, MC and TCDD treated mice (control-, MC- and TCDD-microsomes, respectively) were quite different each other, the enzyme activity of the control-microsome was the lowest and that of the TCDD-microsome the highest. Hence, in order to evaluate the effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on the respective AHH activities, each of the enzyme activities of the three kinds of microsomes incubated with solvent (acetone) alone was regarded as the standard (1.0) and the AHH activities in various concentrations of the two chemicals were revealed as the proportion to the respective standards, namely, relative AHH activity (REA).

4. Statistical analysis

Statistical differences among AHH and REA values were determined using the Student's *t*-test.

Results

1. Effects of MC and TCDD on hepatic microsomal AHH activity

Experimental results are summarized in Table 1. Untreated control AHH activities of both Ah nonresponsive and responsive strains of mice were not so different each other, namely, in case of the Ah nonresponsive animals, the mean of the enzyme activities was 278 pmol/min/mg protein and in the Ah responsive ones, the mean was 222 pmol/min/mg protein. After MC and TCDD treatment, however, the enzyme activity was very much different between both strains of mice. In the Ah nonresponsive animals, the enzyme activity induced by MC was only 1.4 times higher than the control activity and that induced by TCDD about 5 times greater than the control one. In the Ah responsive strains, both MC and TCDD markedly enhanced AHH activity, that is, those activities were 24 and 74 times more than the control, respectively. These differences in the hepatic enzyme induction separate the strains of mice into Ah responsive and nonresponsive ones.

2. Effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on AHH activity of hepatic microsomes prepared from untreated control mice

In order to easily understand the action of

Table 1 Effects of 3-methylcholanthrene (MC) and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity of Ah nonresponsive and responsive strains of mice.

Strain	Specific AHH Activity ^a		
	Control	MC	TCDD
Ah Nonresponsive ^b	278 \pm 135	395 \pm 198 (1.4)	1,340 \pm 974 (4.8)
Ah Responsive ^c	222 \pm 153	5,334 \pm 3,772 (24)	16,399 \pm 9,368 (74)

Figures in parentheses indicate the relative ratios of MC and TCDD induced AHH activities to the respective control enzyme activities.

a: 3-OHBP formed, pmol/min/mg protein (mean \pm S. E.)

b: AKR, DBA and DDD strains of mice

c: C57, C3H and BALB strains of mice

3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on the hepatic microsomal AHH activity, relative AHH activity (REA), which was explained in Materials and Methods, was employed in this study.

Their effects on the enzyme activity of the untreated control microsomes (control-microsomes) were indicated in Fig. 1 in terms of REA. In both the Ah nonresponsive and responsive strains of mice, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB enhanced the AHH activity roughly in proportion to its concentration. In the Ah nonresponsive strains, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB significantly increased the enzyme activity at the concentrations of 15 and 45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the REAs were 1.28 ± 0.06 and 1.36 ± 0.09 , respectively. In the Ah responsive strains, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB significantly elevated the AHH activity even at the lowest concentration (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and the range of REAs was 1.52 to 1.95. ANF, however, maximally enhanced the enzyme activity at the lower concentrations (1.4 or 2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the Ah nonresponsive and responsive strains of mice and the highest REA values were 1.47 ± 0.06 and 2.84 ± 0.22 , respectively. On the contrary, at the higher concentrations (14 and 42

$\mu\text{g}/\text{ml}$), ANF lowered the AHH activity and in case of the Ah nonresponsive strains, the REAs were less than 1.0, namely, 0.81 ± 0.05 at 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.51 ± 0.06 at 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3. Effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on AHH activity of hepatic microsomes prepared from MC treated mice

Results are shown in Fig. 2. In the Ah nonresponsive strains of mice, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB enhanced the AHH activity in almost the same manner as in the Ah responsive untreated control animals (Fig. 1), and ANF significantly raised the enzyme activity at lower concentrations (1.4 and 2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and lowered at higher concentrations (14 and 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$) as those observed in the Ah responsive control mice (Fig. 1).

In the Ah responsive mice, both 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF inhibited the AHH activity in proportion to their concentrations and ANF was much stronger inhibitor than 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB, namely, at the highest concentration, REA for ANF was 0.14 ± 0.03 ($P < 0.01$) and that for 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB 0.54 ± 0.04 ($P < 0.01$).

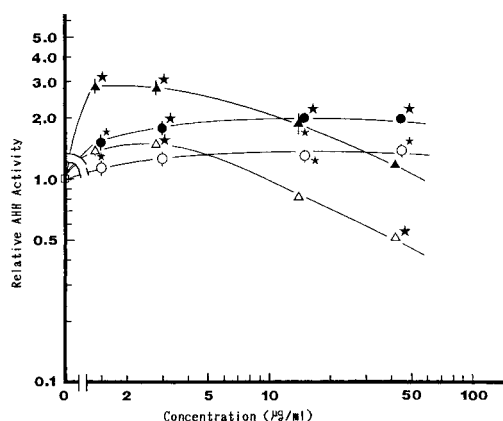


Fig. 1 Effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on hepatic microsomal AHH activity in untreated control mice of Ah nonresponsive and responsive strains.
3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB: (○) Ah nonresponsive, (●) Ah responsive, ANF: (△) Ah nonresponsive, (▲) Ah responsive
★: $p < 0.05$, ★★: $p < 0.01$

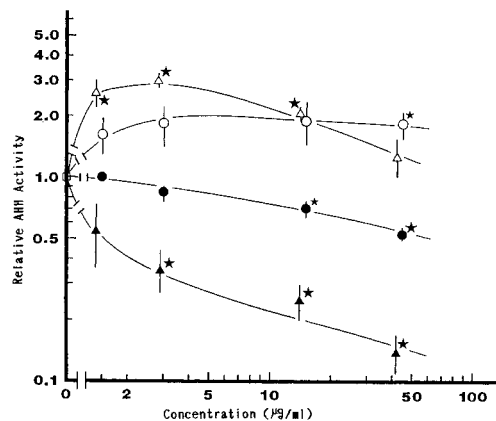


Fig. 2 Effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on hepatic microsomal AHH activity in MC treated mice of Ah nonresponsive and responsive strains.
3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB: (○) Ah nonresponsive, (●) Ah responsive, ANF: (△) Ah nonresponsive, (▲) Ah responsive
★: $p < 0.05$, ★★: $p < 0.01$

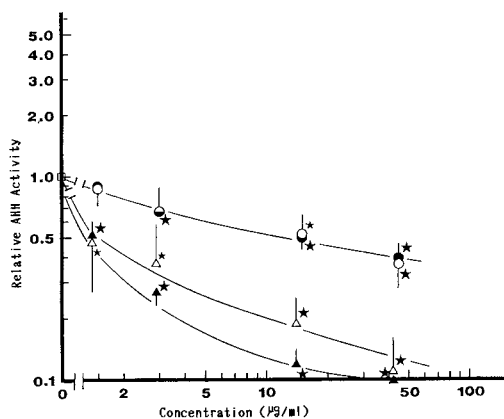


Fig. 3 Effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on hepatic microsomal AHH activity in TCDD treated mice of Ah nonresponsive and responsive strains.

3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB: (○) Ah nonresponsive, (●) Ah responsive, ANF: (△) Ah nonresponsive, (▲) Ah responsive

★: $p < 0.05$, ★★: $p < 0.01$

4. Effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on AHH activity of hepatic microsomes prepared from TCDD treated mice

Results are shown in Fig. 3. 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF lowered the enzyme activity clearly in proportion to their concentrations in both the Ah nonresponsive and responsive animals. ANF showed much greater inhibition than 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB, that is, at the highest concentration, REAs of ANF were 0.11 ± 0.05 ($P < 0.01$) for the Ah nonresponsive strains and 0.09 ± 0.01 ($P < 0.01$) for the Ah responsive ones, and those of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB 0.37 ± 0.09 ($P < 0.01$) and 0.40 ± 0.07 ($P < 0.01$), respectively.

Discussion

As shown in Table 1, in the Ah nonresponsive strains of mice 70 and 20% of the induced AHH activities with MC and TCDD, respectively, were attributable to the noninduced control enzyme activity and in the Ah responsive ones only 4.2 and 1.4% of the induced activities with the two chemicals to the untreated control one, respectively. Therefore the MC- or TCDD-

induced enzyme activity in the Ah responsive mice were considered almost completely different from the noninduced control AHH activity.

The variations in the basal, MC- or TCDD-induced enzyme activity suggested underlying differences among these three microsomal preparations in the concentration of a P-450 enzyme(s) that catalyzes BP metabolism. Treatment of rabbits with TCDD elevated the concentration of hepatic microsomal P-450 I A1 and IA2⁸⁾ and enhanced the concentration of pulmonary microsomal P-450 I A1 but not that of P-450 I A2¹¹⁾. ANF at the concentration of 10 μ M or 25 μ M markedly enhanced BP metabolism catalyzed by P-450 IIIA6 and almost completely inhibited that catalyzed by P-450 I A1 in rabbit liver microsomes^{7,20)}. They also observed similar effects of ANF on BP metabolism by P-450 IIB4, P-450 IIC3 and P-450 IA2 dependent monooxygenase systems and concluded that the enhancement and inhibition of ANF on BP hydroxylation depend on the type of P-450(s) used in the enzyme system. Figs 1, 2 and 3 indicate the same kind of effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on the AHH activities of hepatic microsomes prepared from untreated control-, MC- or TCDD-treated mice. ANF, however, appeared to have higher potency than 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB in the activation and inhibition of the enzyme activities (Figs. 1, 2, and 3). According to the experimental results, the three types of microsomes, namely, control-, MC- and TCDD-microsomes, seemed quite different each other in both quantity and quality of P-450s. Based on the results mentioned in this study and our other results reported before¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾, together with the findings reported by other scientists and described above, in the liver of the Ah nonresponsive strains of mice, MC seemed to mainly induce P-450s similar to P-450 IIIA6 and P-450 IA2 and TCDD preferentially P-450 I A1 type one, and in the liver of the Ah responsive animals, MC was considered to induce P-450s resembling P-450 IIIA6, P-450 IA2 and P-450 I A1 and

TCDD exclusively P-450 I A1 type P-450.

The murine Ah locus has been considered to regulate the activation or inhibition of monooxygenase enzyme activities by polycyclic aromatic compounds such as BP, MC and TCDD via a highly specific binding to the cytosolic Ah receptor^{9,18)}. Therefore we investigated the effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on the AHH activities of several types of hepatic microsomes, namely, control-, MC- and TCDD-microsomes, which did not contain the Ah receptor. As shown in Figs 1, 2 and 3, the two chemicals enhanced and/or decreased the enzyme activities, depending on both the hepatic microsomes employed and the concentrations of the chemicals, so the Ah receptor seemed not to participate in their effects on the AHH activity and they were considered to act directly on P-450 enzyme system.

References

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: polychlorinated biphenyl methylsulphone congeners in human tissues. Identification of methylsulphonyl dichlorobiphenyls. *Chemosphere* 18: 477-484, 1989.
- 4) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Synthesis and characterization of tissue-retainable methylsulfonyl polychlorinated biphenyl isomers. *J. Agric. Fd Chem.* 35: 178-182, 1987.
- 5) Haraguchi K, Kuroki H, Masuda Y, Koga N, Kuroki J, Hokama Y and Yoshimura H: Toxicological evaluation of sulfur-containing metabolites of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in rats. *Chemosphere* 14: 1755-1762, 1985.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Lund BO, Bergman A and Brandt I: Decreased pulmonary drug metabolism in mice treated with the PCB metabolite 4-methylsulphonyl-2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Lett.* 32: 261-267, 1986.
- 11) Nagayama J, Kiyohara C, Mohri N, Hirohata T, Haraguchi K and Masuda Y: Inhibitory effect of 3-methylsulphone-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Fukuoka Acta Med.* 78: 199-203, 1987.
- 12) Nagayama J, Kiyohara C, Mohri N, Hirohata T, Haraguchi K and Masuda Y: Inhibitory effect of methylsulphonyl polychlorinated biphenyls on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Chemosphere* 18: 701-708, 1989.
- 13) Nagayama J, Kuroki H, Masuda Y, Handa S and Kuratsune M: Genetically mediated induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in mice by polychlorinated dibenzofuran isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch. Toxicol.* 56: 226-229, 1985.
- 14) 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.
- 15) Nagayama J and Masuda Y: Effect of methylsulphonyl polychlorinated biphenyl homologues and 7, 8-benzoflavone on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Fukuoka Acta Med.* in press.
- 16) Nagayama J, Mohri N, Haraguchi K, Masuda Y, Kiyohara C and Hirohata T: Effects of 3-methylsulphonyl-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and 7, 8-benzoflavone on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Fukuoka Acta Med.* 80: 201-209, 1989.

- 17) Nagayama J, Wada K, Haraguchi K, Masuda Y and Handa S : 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. *Fukuoka Acta Med.* 82 : 207-214, 1991.
- 18) Nebert DW, Eisen HJ, Negishi M, Lang MA and Hjelmeland LM : Genetic mechanisms controlling the induction of polysubstrate monooxygenase (P-450) activities. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21 : 431-462, 1981.
- 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, 1985.

(和文抄録)

Ah 応答性の異なるマウス由来肝ミクロソーム 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科学研究室

長山 淳 哉

第一薬科大学物理分析学教室

増田 義 人

Ah 非応答性の 3 系統のマウス (AKR, DBA, DDD) と Ah 応答性の 3 系統のマウス (C57, BALB, C3H) の 3-methylcholanthrene (MC; 42mg/kg, 1 回) あるいは 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 20 μ g/kg, 隔週に 6 回) 投与群と対照群から肝ミクロソームを調製し、肝ミクロソーム芳香族炭化水素水酸化酵素 (AHH) 活性に対する 3-methylsulphonyl-4,5,3',4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-4,5,3',4'-TCB; 1.5~45 μ g/ml) と 7,8-benzoflavone (ANF; 1.4~42 μ g/ml) の作用を研究し、次のような結果が得られた。

1) Ah 非応答性系統のマウスでは、対照群の AHH 活性/MC あるいは TCDD 投与群の AHH 活性はそれぞれ 70 あるいは 20 % であるが、Ah 応答性系統ではそれぞれの割合は、わずかに 4.2 および 1.4 % であった。

2) 3-MSF-4,5,3',4'-TCB および ANF により AHH 活性が上昇するか阻害されるかは、これらの化学物質の処理濃度とミクロソームの種類に依存していた。酵素活性を高める場合でも、阻害する場合でも、ANF の作用のほうが 3-MSF-4,5,3',4'-TCB の作用よりも強かった。

3) Ah 非応答性系統の MC 投与群と Ah 応答性系統の対照群の肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-4,5,3',4'-TCB と ANF の作用がよく類似してお

り、また、Ah 非応答性系統の TCDD 投与群と Ah 応答性系統の MC あるいは TCDD 投与群の酵素活性に対する両化学物質の作用がきわめて類似していた。

以上のような研究結果と、これまでの他の研究者の実験結果に基づいて、次のような考察が可能である。

1) 3-MSF-4,5,3',4'-TCB あるいは ANF により AHH 活性が上昇するか阻害されるかは AHH 活性の鍵酵素であるチトクローム P-450 (P-450) の種類と濃度に依存している。

2) MC あるいは TCDD により誘導される P-450 の種類は Ah 応答性の程度に関係しており、Ah 非応答性系統では MC は P-450 IIIA6 と P-450 IA2 に類似する P-450 を誘導し、TCDD はもっぱら P-450 IA1 型 P-450 を誘導すると考えられる。Ah 応答性系統では MC は P-450 IIIA6, P-450 IA2 および P-450 IA1 に類似の、また TCDD はきわめて選択的に P-450 IA1 類似の P-450 を誘導すると考えられる。

AHH などの薬物代謝酵素活性は細胞質の Ah レセプターを介して Ah 遺伝子により調節されていると考えられている。しかしながら、この研究で用いられた肝ミクロソームには Ah レセプターは存在しないので、3-MSF-4,5,3',4'-TCB と ANF の作用には Ah レセプターは関与しておらず、両化学物質は P-450 酵素系に直接的に作用しているものと考えられる。

Effects of Methylsulphonyl Polychlorinated Biphenyl Homologues and 7, 8-benzoflavone on Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity

Junya NAGAYAMA¹⁾ and Yoshito MASUDA²⁾

¹⁾ *Laboratory of Environmental Health Sciences, School of Health Sciences, Kyushu University 90, Fukuoka 812*

²⁾ *Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815*

Abstract First, we investigated the effects of eleven methylsulphonyl polychlorinated biphenyl (MSF-PCB) homologues at 1.5 $\mu\text{g/ml}$ and 7, 8-benzoflavone (ANF) at 1.4 $\mu\text{g/ml}$ on 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, 15 ng/ml)-induced aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity of cultured human lymphoblastoid cells and the following results were obtained. 1) The relative AHH activity (TCDD-induced AHH activity treated with each of the MSF-PCB compounds or ANF/ the enzyme activity treated with acetone, %) of the ANF-treated culture was the smallest value (about 9%). 2) Among MSF-PCB homologues, 3-MSF-4, 5, 3', 4'- and 4-MSF-3, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyls (TCBs) showed the highest inhibition and their relative enzyme activities were about 20%. 3) In the rest of MSF-PCB compounds, the relative AHH activities were as follows: 4-MSF-3, 5, 3', 4', 5'-pentachlorobiphenyl (PenCB); 37%, 3-MSF-4, 5, 2', 3', 4'-PenCB; 50%, 3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB, 3-MSF-4, 5, 2', 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl and 3-MSF-4, 5, 6, 2', 3', 4', 5'-heptachlorobiphenyl; 60 to 64%, 4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB; 77%, 3-MSF-2, 5, 3', 4'-TCB; 88%, 4-MSF-2, 5, 2', 5'-TCB; 93% and 3-MSF-4, 5, 3', 4', 5'-PenCB rather enhanced the TCDD-induced enzyme activity.

Second, we prepared the hepatic microsomes of BALB/c (Ah responsive) and AKR/J (Ah nonresponsive) strains of mice after the treatment of olive oil (as control), 3-methylcholanthrene (MC, 42 mg/kg, once) and TCDD (20 $\mu\text{g/kg}$, 6 times, once every other week) in order to examine the effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB (1.5 to 45 $\mu\text{g/ml}$) and ANF (1.4 to 42 $\mu\text{g/ml}$) on the respective hepatic microsomal AHH activities. The experimental results in this study accorded well with the results previously obtained in our similar investigations, in which we used different strains of mice, and the following considerations will be possible again. 1) The cytosolic Ah receptor is not involved in the action of these chemicals on the AHH activity since the Ah receptor is considered not to be present in the hepatic microsomal preparations and they appear to act directly on P-450 enzyme system. 2) The stimulation and/or inhibition of the AHH activity by them seems to depend on the quality and quantity of cytochromes P-450 (P-450s) present in the microsomes used. 3) When the main P-450 in the microsomes is similar to P-450 III A6, the enzyme activity will be enhanced well by these chemicals, and when it is P-450 I A1 type P-450, the enzyme activity will be strongly inhibited by them. 4) The kinds of P-450 induced by some chemicals are considered to depend on the degree of the Ah responsiveness of the host and we think that in general, MC possibly induces P-450s similar to P-450 III A6, P-450 I A2 and P-450 I A1, and TCDD much more preferentially induces P-450 I A1 type enzyme.

Introduction

Methylsulphonyl polychlorinated biphenyls (MSF-PCBs) which are one of the major metabolites of polychlorinated biphenyls

(PCBs) have been determined in several tissues of patients with Yusho, polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) poisoning that occurred in western Japan in 1968¹⁾⁹⁾²⁰⁾, and of normal people³⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾. According to their analysis, the

concentration of MSF-PCBs was much lower than that of PCBs in the liver and adipose tissue of both Yusho patients and healthy people. In the lungs and blood, however, the concentration of MSF-PCBs was comparable to or higher than that of PCBs. Thus, several tissues of human beings have already been contaminated with MSF-PCBs at comparatively high concentration. Therefore we should give due attention to their biological and toxicological action.

It has been reported that there is a good correlation of toxicity of some organochlorine congeners such as PCBs and PCDFs with their inducing potency of microsomal mixed-function oxidase activities such as aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) and 7-ethoxyresorufin *o*-deethylase (EROD)^{11,13}. We also have already investigated the effects of some compounds of MSF-PCBs on AHH activity in cultured human lymphoblastoid cells and in hepatic microsomes prepared from both aryl hydrocarbon (Ah) responsive and nonresponsive strains of mice^{15,16,21}. Our previous studies mentioned above indicated that some of the MSF-PCBs decreased the enzyme activity in cultured human lymphoblastoid cells and 3-methylsulphonyl-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB) showed the most potent inhibition among the five homologues examined so far. We also observed that AHH activity induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was much more lowered by 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB than that induced by 3-methylcholanthrene (MC). Hence, in this work, first we examined the structure-activity relationship of the potency of the MSF-PCBs with regard to TCDD-induced enzyme inhibition by using the eleven homologues in cultured human lymphoblastoid cells. Second, in order to clarify whether cytosolic Ah receptor is involved in the process of the AHH inhibition by MSF-PCBs or not, we studied the effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and 7, 8-benzoflavone (ANF), a well-known modulator of AHH and EROD^{2,8,27}, on the enzyme activity of hepatic microsomes

prepared from untreated control, MC- or TCDD-treated BALB/cCrj (BALB), Ah responsive and AKR/JSea (AKR), Ah nonresponsive strains of mice²⁵.

Materials and methods

1. Chemicals

Eleven MSF-PCB homologues used in this study were synthesized and purified as previously described⁴. The purities of the MSF-PCB compounds were greater than 99%, as determined by gas chromatography (GC) and GC-mass spectrometry. TCDD was synthesized by chlorination of dibenzo-*p*-dioxin and the purity was more than 99% by GC. The sources of chemicals used in this work were as follows: benzo(a)pyrene (BP) and MC from Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA, 3-hydroxy-BP (3-OHBP) from Dr. N. Kinoshita, School of Health Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan and ANF, NADH and NADPH from Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Osaka, Japan. All other chemicals and reagents used were of the highest quality commercially available.

2. Treatments of cells

Human lymphoblastoid cells derived from apparently healthy volunteers were established and cultured in RPMI-1640 medium as reported before¹⁴. The cells were seeded at a density of approximately 3×10^5 cells/ml and then TCDD (final concentration, 15 ng/ml) dissolved in acetone were added in two or three flasks (induced culture, 10 ml each). Incubation was continued for 48h period at 37°C in an atmosphere of fully humidified air with 5% CO₂, then the cells were harvested by centrifugation and washed twice with RPMI-1640 medium. The cells were seeded again at the same density, each of eleven MSF-PCB homologues (final concentration, 1.5 µg/ml) or ANF (final concentration, 1.4 µg/ml) dissolved in acetone was placed in one flask (treated culture, 10 ml), and to the other flask acetone (5 µl) alone (control culture, 10 ml) was added. Incubation was continued for an additional 48h period, then the

cells were harvested. The viable lymphoblastoid cells were counted by the standard trypan blue dye exclusion criteria.

3. Treatments of animals

Two inbred strains of male mice, BALB and AKR were obtained from Charles River Japan Inc., Atsugi, Japan and Seiwa Experimental Animals Ltd., Yoshitomi, Japan respectively, housed in disposable cages (4 or 5 mice/cage), and maintained as described before¹⁷⁾. At 8 weeks of mouse age, TCDD dissolved in olive oil was given IP at a dose of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once every two weeks (6 times). Control mice were given the vehicle alone in a similar volume and on the same time schedules. MC dissolved in olive oil was given IP once at a dose of 42 mg/kg once. Three days after the last treatments, the animals were killed by cervical dislocation.

4. AHH assays

The cells from each culture flask with over a 90% viability were used for the enzyme assay, using a fluorometric procedure as previously mentioned¹⁴⁾. In order to show the rank order of the potencies of the MSF-PCB homologues in their enzyme inhibition, the AHH activities of the treated cultures were indicated as percentages to that of the control culture, namely, relative AHH activity (I) (REA (I)). The relative enzyme activity was determined three to eight times depending on the MSF-PCB compound.

The livers were excised, rinsed, weighed, minced and homogenized by the method described before¹⁷⁾ and every hepatic microsome was prepared as reported by Noshiro and Omura²⁶⁾. The reaction media for the AHH assay consisted of 1 to 30 μg of microsomal protein, 100 nmol of BP, 1.1 μmol of NADPH and 12.8 μmol of MgCl_2 in a final volume of 1.1 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH7.5) containing 0.8 mg/ml of bovine serum albumin in company with 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB (final concentration; 0, 1.5, 3.0, 15 or 45 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or ANF (final concentration; 0, 1.4, 2.8, 14 or 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The enzyme activity was determined as stated

previously¹⁸⁾, using a Hitachi spectrophotofluorometer (model 650-10S, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Specific AHH activities of microsomes prepared from the untreated control, MC and TCDD treated mice (control-, MC- and TCDD-microsomes, respectively) were quite different each other, the enzyme activity of the control-microsome was the lowest and that of the TCDD-microsome the highest. Hence, in order to evaluate the effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on the respective AHH activities, each of the enzyme activities of the three kinds of microsomes incubated with solvent (acetone) alone was regarded as the standard (1.0) and the AHH activities in various concentrations of the two chemicals were revealed as the proportion to the respective standards, namely, relative AHH activity (II)(REA (II)).

5. Statistical analysis

The results are expressed as the average number \pm S. E. of REA (I). Data were statistically analyzed by Student's *t*-test.

Results

1. Effects of eleven MSF-PCB homologues and ANF on TCDD-induced AHH activity in cultured human lymphoblastoid cells

We examined the effects of MSF-PCB compounds on TCDD-induced AHH activity using eight different human lymphoblastoid cell lines, so at each time the specific enzyme activity was observed to vary about a 5-fold range, 0.048 to 0.237 pmol 3-OHBP formed / 10^6 cells/min, and at each time five to nine homologues of MSF-PCBs were examined. Table 1 summarizes the effects of MSF-PCB compounds on TCDD-induced enzyme activity in cultured human lymphoblastoid cells, together with the effect of ANF in the last three experiments. The REA (I) of the same compound was varied to some extent depending on the cell lines and seemed not so great. Based on the average of the REAs (I), we could find out relative potencies of these MSF-PCB homologues with regard to their inhibition of TCDD-induced AHH activ-

ity.

The REAs (I) of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and 4-MSF-3, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (4-MSF-3, 5, 3', 4'-TCB) was about 20 at the concentration of 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 48h incubation and these two homologues were the most potent inhibitor among the eleven ones examined. The ranking order of the rest of the MSF-PCB compounds as the enzyme inhibitor was as follows: 4-MSF-3, 5, 3', 4', 5'-pentachlorobiphenyl (4-MSF-3, 5, 3', 4', 5'-PenCB) > 3-MSF-4, 5, 2', 3', 4'-pentachlorobiphenyl (3-MSF-4, 5, 2', 3', 4'-PenCB) > 3-MSF-4, 5, 2', 3'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB), 3-MSF-4, 5, 2', 3', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (3-MSF-4, 5, 2', 3', 4', 5'-HCB), 3-MSF-4, 5, 6, 2', 3', 4', 5'-heptachlorobiphenyl (3-MSF-4, 5, 6, 2', 3', 4', 5'-HepCB) > 4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-pentachlorobi-

phenyl (4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB), > 3-MSF-2, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (3-MSF-2, 5, 3', 4'-TCB), 4-MSF-2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl (4-MSF-2, 5, 2', 5'-TCB), > 3-MSF-4, 5, 3', 4', 5'-pentachlorobiphenyl (3-MSF-4, 5, 3', 4', 5'-PenCB) and their respective REAs (I) were 37, 50, 60 to 64, 77, 88 to 93 and 118. As indicated in the REA (I), 3-MSF-4, 5, 3', 4', 5'-PenCB enhanced the enzyme activity by about 20% rather than decreased. ANF lowered the TCDD-induced enzyme activity by over 90% after the 48h incubation at the concentration of 1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and gave about twice stronger inhibition than 3-MSF-4, 5, 3', 4'-and 4-MSF-3, 5, 3', 4'-TCBs (Table 1). The chemical structures of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB, 4-MSF-3, 5, 3', 4'-TCB and 3-MSF-4, 5, 3', 4', 5'-PenCB are shown in Fig. 1.

Table 1 Effects of eleven MSF-PCB Homologues and ANF on TCDD-Induced AHH Activity in Cultured Human Lymphoblastoid Cells

Experiment No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
Specific AHH Activity ^a	0.058	0.051	0.237	0.172	0.061	0.048	0.145	0.208		
MSF-PCB Homologue and ANF	Relative AHH Activity (I) ^b								Mean \pm S.E.	Rank Order ^c
3-MSF-4, 5, 3', 4'-Tetra-CB	24	31	25	7	11	19	19	24	20.0 \pm 2.8	1
4-MSF-4, 5, 3', 4'-Tetra-CB	7	22	25	17	17				17.6 \pm 3.0	
										P<0.01
4-MSF-3, 5, 3', 4', 5'-Penta-CB	38	39	32	38	36				36.6 \pm 1.2	2
										P<0.01
3-MSF-4, 5, 2', 3', 4'-Penta-CB	40	54	67	41	47	65	42	45	50.1 \pm 3.8	3
										P<0.05
3-MSF-4, 5, 2', 3'-Tetra-CB				67	67	52	70	64	64.0 \pm 3.1	4
3-MSF-4, 5, 2', 3', 4', 5'-Hexa-CB	50	63	81	55	78	54	53	72	63.2 \pm 4.3	
3-MSF-4, 5, 6, 2', 3', 4', 5'-Hepta-CB						88	39	54	60.3 \pm 14.5	
										P<0.10
4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-Penta-CB		77		80	74				77.0 \pm 1.7	5
										P<0.02
3-MSF-2, 5, 3', 4'-Tetra-CB				86	98	81	81	93	87.8 \pm 3.4	6
4-MSF-2, 5, 2', 5'-Tetra-CB			93	87	98				92.7 \pm 3.2	
										P<0.02
3-MSF-4, 5, 3', 4', 5'-Penta-CB						108	114	133	118.3 \pm 7.5	7
ANF						13	8	7	9.3 \pm 1.9	

a : pmol 3-OHBP formed/ 10^6 cells/min

b : The definition is given under Materials and methods

c : The rank order in the inhibition of TCDD-induced AHH activity

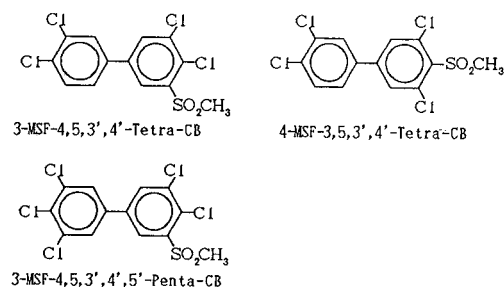


Fig. 1 Chemical structures of 3-MSF-4, 5, 3', 4'- and 4-MSF-3, 5, 3', 4'-TCBs and 3-MSF-4, 5, 3', 4', 5'-PenCB.

2. Effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on AHH activity of hepatic microsomes prepared from untreated control, MC- or TCDD-treated Ah responsive and non-responsive strains of mice.

The lymphoblastoid cells themselves appear to be a rather complicated biological system and in order to investigate the action of 3-MSF-4,5,3',4'-TCB and ANF on AHH activity more in detail, we prepared the hepatic microsomes, much simpler biological system for the enzyme assay, derived from the Ah responsive (BALB) and nonresponsive (AKR) strains of mice after the treatment of MC or TCDD. Their effects on AHH activities of the respective hepatic microsomes (control-, MC- and TCDD-microsomes) were examined and the results are indicated in Figs. 2 and 3. Specific AHH activities of control-, MC- and TCDD-microsomes of BALB mice were 149, 3680 and 7320 pmol 3-OHBP formed/mg/min, respectively and those of AKR were 60, 92 and 1168 pmol 3-OHBP formed/mg/min. These specific enzyme activities were used as the standards of the corresponding REAs (II).

In the control-microsome of BALB mice and in the control and MC-microsomes of AKR mice, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB enhanced the AHH activities roughly in proportion to its concentration and the range of REAs (II) was 1.17 to 2.10. In the same three microsomes, ANF maximally enhanced the enzyme activities at

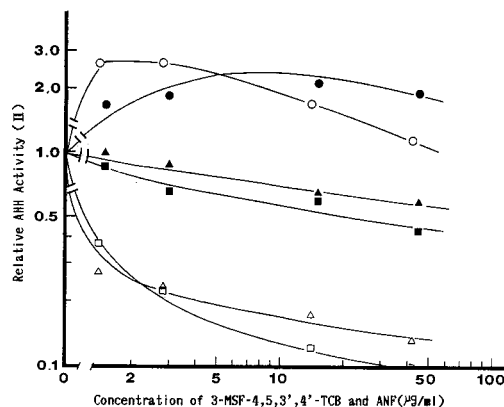


Fig. 2 Effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on AHH activities of hepatic microsomes from untreated control, MC- and TCDD-treated BALB mice

Untreated control; ●: 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ○: ANF, MC-treated; ▲: 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and △: ANF, and TCDD-treated; ■: 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and □: ANF

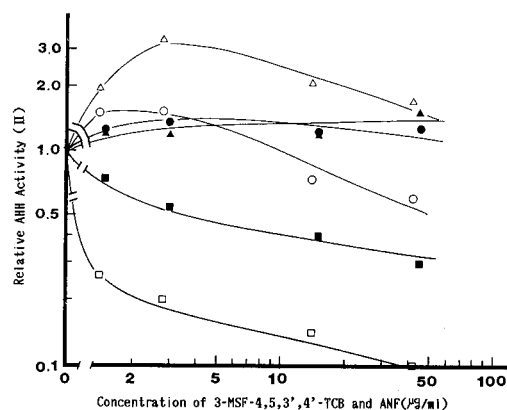


Fig. 3 Effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on AHH activities of hepatic microsomes from untreated control, MC- and TCDD-treated AKR mice

Untreated control; ●: 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ○: ANF, MC-treated; ▲: 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and △: ANF, and TCDD-treated; ■: 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and □: ANF

the lower concentration (1.4 or 2.8 $\mu\text{g/ml}$) and the highest REAs (II) values of respective microsomes were 2.63, 1.53 and 3.35. On the contrary, at the higher concentrations (14 and 42 $\mu\text{g/ml}$), ANF reduced the AHH activities and in case of the control-microsome of AKR mice, the REAs (II) were less than 1.0, namely, 0.73 at 14 $\mu\text{g/ml}$ and 0.6 at 42 $\mu\text{g/ml}$.

In the MC- and TCDD-microsomes of BALB mice and in the TCDD-microsome of AKR mice, both 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF inhibited the enzyme activities in fairly good proportion to their concentrations. In the same three microsomes, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB lowered the enzyme activities by about 40%, 60% and 70%, respectively, at the highest concentration (45 $\mu\text{g/ml}$). On the other hand, ANF decreased the AHH activities by 60 to 70% at the lowest concentration (1.4 $\mu\text{g/ml}$) and by about 90% at the highest one (42 $\mu\text{g/ml}$) in the three microsomes.

ANF appeared to have much greater potency than 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB in the enhancement or inhibition of the enzyme activity of hepatic microsomes prepared from BALB and AKR strains of mice.

Discussion

The variation in the TCDD-induced enzyme activity in human lymphoblastoid cells suggests an underlying difference in the concentration of P-450 enzymes that catalyze BP metabolism among these eight lymphoblastoid cell lines (Table 1). Treatment of rabbits with TCDD elevated the concentration of hepatic microsomal P-450 I A1 and P-450 I A2⁹⁾ and enhanced the concentration of pulmonary microsomal P-450 I A1 but not that of P-450 I A2²⁾. In human lymphoblastoid cells, TCDD seemed to more preferentially induce P-450 similar to P-450 I A1²¹⁾. P-450 I A1 has been shown to be almost completely inhibited by ANF at the concentration of 25 μM or 10 μM ⁸⁾²⁷⁾. As indicated in Table 1, ANF (1.4 $\mu\text{g/ml}$ =5 μM) decreased the TCDD-induced AHH

activity by over 90% and this finding may also support the idea that TCDD exclusively elevates the concentration of P-450 I A1 type enzyme in the human lymphoblastoid cells. Therefore we seemed to examine the action of the eleven MSF-PCB homologues mostly on P-450 similar to P-450 I A1. A change in REA (I) of the same compound in individual cell line may indicate a difference in the proportion of P-450 I A1 type enzyme to the total P-450 enzymes.

Based on the ranking order of the MSF-PCB compounds as the inhibitor of the TCDD-induced enzyme activity (Table 1), substitutions of one chlorine atom and MSF-group at 3 and 4 positions and of three chlorine atoms at 5, 3' and 4' positions in biphenyl ring appeared to be required for the strong inhibition. We expected that both 3-MSF-4, 5, 3', 4', 5'- and 4-MSF-3, 5, 3', 4', 5'-PenCB showed the second potent inhibition because only one chlorine atom at 5' position was added to 3-MSF-4, 5, 3', 4'- and 4-MSF-3, 5, 3', 4'-TCBs, respectively. 4-MSF-3, 5, 3', 4', 5'-PenCB lowered the enzyme activity by more than 60% and was the second potent inhibitor among the MSF-PCB homologues. 3-MSF-4, 5, 3', 4', 5'-PenCB, however, enhanced the enzyme activity by about 20%. The reason of this difference is unclear at present. Both the positional change in chlorine substitution and the increase in the number of chlorine substitution usually decreased the potency of their inhibition of the enzyme activity as compared with those of 3-MSF-4, 5, 3', 4'- and 4-MSF-3, 5, 3', 4'-TCBs, which were considered to be the optimal chemical structure for the inhibition.

Among the eleven MSF-PCB homologues studied in this work, five MSF-PCB compounds, namely, 3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB, 4-MSF-2, 5, 2', 5'-TCB, 3-MSF-4, 5, 2', 3', 4'-PenCB and 4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB were identified in the tissues of healthy people, and 3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB, 4-MSF-2, 5, 2', 5'-TCB and 4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB were deter-

mined at relatively high concentrations; 0.14 to 0.62 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the lungs, 0.12 to 0.47 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the adipose tissues and 0.05 to 0.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the liver⁵). The REAs (I) of 3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and 4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB were 64, 20 and 77, respectively, on the average (Table 1). Although the levels of these MSF-PCB compounds in the tissues of healthy people is about 10^{-4} power lower than those used in this work, they possibly exert some biological effects in human beings because 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB somewhat lowered the TCDD-induced AHH activity in cultured human lymphoblastoid cells at the concentration of 1.5 ng/ml, 10^{-3} times less concentration than that employed in this study¹⁵).

Some scientists have considered that the murine Ah locus regulates the activation or inhibition of monooxygenase enzyme activities by polycyclic aromatic compounds such as MC, BP, TCDD and so forth via a highly specific binding to the cytosolic Ah receptor¹⁰⁾²⁴). Hence, we investigated the effects of 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and ANF on the AHH activities of several hepatic microsomes, which did not contain the Ah receptor, prepared from Ah responsive BALB and nonresponsive AKR strains of mice. As shown in Figs. 2 and 3, the two chemicals enhanced and/or decreased the enzyme activities, depending on the hepatic microsomes employed, so the Ah receptor seemed not to participate in their effects on the AHH activity.

ANF at the concentration of 10 μM or 25 μM markedly increased BP metabolism catalyzed by P-450 III A6 and almost completely inhibited that catalyzed by P-450 I A1 in rabbit liver microsomes⁸⁾²⁷). They also observed similar effects of ANF on BP metabolism by P-450 II B4, P-450 IIC3 and P-450 I A2 dependent monooxygenase systems and concluded that the enhancement and inhibition of ANF on BP hydroxylation depend on the type of P-450 used in the enzyme system. Figs. 2 and 3 indicate the same kind of effects of ANF and 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB on the AHH activities of hepatic mi-

croosomes prepared from untreated control-, MC- or TCDD-treated mice. According to the experimental results, the three types of microsome, namely, control-, MC- or TCDD-microsome, appeared different each other in both quantity and quality of P-450s. Based on the findings reported by Huang et al.⁸⁾ and Rancy and Johnson²⁷⁾, in the liver of Ah responsive BALB mice, MC seemed to induce P-450s similar to P-450 III A6, P-450 I A2 and P-450 I A1 and TCDD mostly P-450 I A1 type enzyme, and in the liver of Ah nonresponsive AKR mice, MC was considered to mainly induce P-450s similar to P-450 III A6 and P-450 I A2 and TCDD preferentially P-450 I A1 type enzyme. The mechanisms of action of ANF and 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB on the enzyme activity might be different to some extent because ANF appeared to have higher potency than 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB in the enhancement and inhibition of the AHH activities (Figs. 2 and 3).

We and others have reported that ANF has some clastogenic or co-clastogenic potency¹¹⁾¹²⁾²²⁾²³⁾, so some MSF-PCB compounds will be expected to elicit similar clastogenic effects to ANF in the induction of micronuclei (MN) and sister chromatid exchanges (SCEs). Such kinds of subjects are now under investigation in our laboratory.

References

- 1) Brunstrom B and Andersson L: Toxicity and 7-ethoxyresorufin O-deethylase-inducing potency of coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) in chick embryos. *Arch. Toxicol.* **62**: 263-266, 1988.
- 2) Domin BA 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: Polychlorinated biphenyl methylsulfone congeners in human tissues: identification of methylsulfonyl dichlorobiphenyls. *Chemosphere* **18**: 477-484, 1989.
- 4) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Synthesis and characterization of tissue-retainable

methylsulfonyl polychlorinated biphenyl isomers. *J. Agric. Fd Chem.* **35**: 178-182, 1987.

5) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Capillary gas chromatographic analysis of methylsulphone metabolites of polychlorinated biphenyls retained in human tissues. *J. Chromatogr.* **361**: 239-252, 1986.

6) Haraguchi K, Kuroki H, 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.

7) Haraguchi K, Masuda Y, Kuroki H and Ohma M: Analysis of PCB- and PCT-methylsulphones in the blood of Yusho patients. *Fukuoka Acta Med.* **80**: 291-295, 1989. (in Japanese)

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) 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.

10) Keys B, Piskorske-Piszynska J and Safe S: Polychlorinated dibenzofurans as 2, 3, 7, 8-TCDD antagonists: in vitro inhibition of monooxygenase enzyme induction. *Toxicol. Letter.* **31**: 151-158, 1986.

11) 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.

12) Lundgren K and Lucier GW: Differential enhancement of sister chromatid exchange frequencies by α -naphthoflavone in cultured lymphocytes from smokers and non-smokers. *Mutation Res.* **143**: 131-135, 1985.

13) Mason G, Sawyer T, Keys B, Bandiera S, Romkes M, Piskorska-Pliszczynska J, Zmudzka B and Safe S: Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs): correlation between in vivo and in vitro structure-activity relationships. *Toxicology* **37**: 1-12, 1985.

14) Nagayama J, Kiyohara C, Masuda Y and Kuratsune M: Genetically mediated induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells by polychlorinated dibenzofuran isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch. Toxicol.* **56**: 230-235, 1985.

15) Nagayama J, Kiyohara C, Mohri N, Hirohata T, Haraguchi K and Masuda Y: Inhibitory effect of methylsulfonyl polychlorinated biphenyls on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Chemosphere* **18**: 701-708, 1989.

16) Nagayama J, Kiyohara C, Mohri N, Hirohata T, Haraguchi K and Masuda Y: Inhibitory effect of 3-methylsulphone-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Fukuoka Acta Med.* **75**: 199-203, 1987. (in Japanese)

17) Nagayama J, Kuroki H, Masuda Y, Handa S and Kuratsune M: Genetically mediated induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in mice by polychlorinated dibenzofuran isomers and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch. Toxicol.* **56**: 226-229, 1985.

18) 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.

19) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with 'Yusho'. *Fd Cosmet. Toxicol.* **15**: 195-198, 1977.

20) 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.

21) Nagayama J, Mohri N, Haraguchi K, Masuda Y, Kiyohara C and Hirohata T: Effects of 3-methylsulfonyl-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and 7, 8-benzoflavone on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Fukuoka Acta Med.* **80**: 201-209, 1989. (in Japanese)

22) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Masuda Y: Genotoxicity of organochlorine compounds retained in human body in cultured human lymphocytes. *Chemosphere* in press.

23) Nagayama J, Nagayama M, Wada K, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Masuda Y: The effect of organochlorine compounds on the induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Fukuoka Acta Med.* **82**: 221-227, 1991. (in Japanese)

24) Nebert DW, Eisen HJ, Negishi M, Lang MA and Hjelmeland LM: Genetic mechanisms controlling the induction of polysubstrate monooxygenase (P-450) activities. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**: 431-462, 1981.

25) Nebert DW, Robinson JR, Niwa A, Kumaki K and Poland A: Genetic expression of aryl hydro-

carbon hydroxylase activity in the mouse. J. Cell. Physiol. **85**: 393-414, 1975.

26) 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.

27) 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, 1985.

(和文抄録)

芳香族炭化水素水酸化酵素活性に対する methylsulphonyl polychlorinated biphenyl 同族体と 7,8-benzoflavone の作用

九州大学医療技術短期大学部環境科学研究室

長山 淳 哉

第一薬科大学物理分析学教室

増田 義 人

第一に、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, 15 ng/ml)により誘導されたヒトリンパ球培養細胞の芳香族炭化水素水酸化酵素 (AHH) 活性に対する 11 種類の methylsulphonyl polychlorinated biphenyl (MSF-PCB) 同族体 (1.5 μ g/ml) と 7,8-benzoflavone (ANF, 1.4 μ g/ml) の作用を研究し、次のような結果が得られた。1) AHH 活性の阻害性は ANF が最も高く、約 91% 阻害した。2) MSF-PCB 同族体では 3-MSF-4,5,3',4'- と 4-MSF-3,5,3',4'-tetrachlorobiphenyls (TCBs) の阻害性が最も高く、約 80% の阻害を示した。3) 残りの MSF-PCB 同族体における AHH 活性阻害性は次のようであった。() 内に阻害率 (%) を示す。4-MSF-3,5,3',4',5'-pentachlorobiphenyl (PenCB) (63%), 3-MSF-4,5,2',3',4'-PenCB (50%), 3-MSF-4,5,2',3'-TCB, 3-MSF-4,5,2',3',4',5'-hexachlorobiphenyl および 3-MSF-4,5,6,2',3',4',5'-heptachlorobiphenyl (40%), 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB (20%), 3-MSF-2,5,3',4'-TCB および 4-MSF-2,5,2',5'-TCB (10%), 3-MSF-4,5,3',4',5'-PenCB は逆に約 20% AHH 活性を高めた。

第二に、Ah 非応答性の AKR マウスと Ah 応答性の BALB マウスについて、対照群、3-methylcholanthrene (MC, 42 mg/kg \times 1) 投与群、TCDD (20 μ g/kg \times 6) 投与群の肝ミクロソームを調製し、各々の肝ミクロソーム AHH 活性に対する 3-MSF-4,5,3',4'-TCB (1.5~45 μ g/ml) と ANF (1.4~42 μ g/ml) の作用を研究し、次のような結果が得られた。1) 調製された肝ミクロソームには細胞質の Ah レセプターは存在しないので、両化学物質の AHH 活性に対する作用には Ah レセプターは関与していない。2) 両化学物質により AHH 活性が上昇するか阻害されるかは酵素活性測定系に存在するチトクローム P-450 (P-450) の質と量に依存している。3) その実験系の主要な P-450 が P-450 III A6 類似型である場合には AHH 活性が上昇し、また P-450 I A1 類似型である場合には活性が強く阻害される。4) どのような種類の P-450 が誘導されるかは宿主の Ah 応答性に依存しているようであるが、MC により P-450 III A6, P-450 I A2 および P-450 I A1 類似の、また TCDD によりきわめて優先的に P-450 I A1 類似の P-450 が誘導されると考えられる。

Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Quaterphenyls (PCQs) Concentrations in Skin Surface Lipids and Blood of Patients with Yusho

Taro OHGAMI, Masahisa WATANABE, Keiichi TANAKA
and Hikotaro YOSHIDA

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

Shigeo NONAKA

Department of Dermatology, School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa 903-1

Naoko TSUKAZAKI

Division of Dermatology, Nagasaki Ekisaikai Hospital, Nagasaki 850

Yuji RIKIOKA

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

Abstract The relationship between PCBs and PCQs concentrations in the skin surface lipids and blood was investigated in this study. PCBs and PCQs concentrations in thirty two patients with PCB poisoning (Yusho) and 20 normal controls were analyzed. The collection of skin surface lipids was performed by the method of cotton pad with 70% ethyl alcohol. The alkaline decomposition method described in the official standard analytical methods for the isolation of PCBs and PCQs fractions was used. In the blood of control group, mean value of PCBs concentration was 2.1 ng/g, and that of PCQs concentration was too low to be detected by our analytical method. On the other hand, the PCBs concentration in the Yusho group were two times higher than those in the control group. The mean value of PCQs concentration was 0.90 ng/g in Yusho group, while it was not detectable in the control group.

In the skin surface lipids of patients with Yusho, the mean value of PCBs concentration was 580.0 ng/g, but was 324.4 ng/g in the control group. The mean value of PCQs concentration in the skin surface lipids of Yusho patients was 25.7 ng/g, although it was not detected in the control group. PCBs and PCQs levels in the skin surface lipids were higher than those in the blood. This means that cutaneous sebaceous system is one of the excreted systems of polyhalogenated chemicals, such as PCBs or PCQs, when these chemicals are precipitated in human or mammals.

Introduction

Concentrations of PCBs and PCQs in the blood of Yusho patients are still high, and that these chemicals are accumulated in the subcutaneous fat tissues after twenty years of contamination⁵⁾. Furthermore, human hairs of Yusho patients contain PCBs and PCQs^{3,4)}. We considered that sebaceous gland has an ability to eliminate these chemicals. PCQs levels in the subcutaneous fat tissues of patients with Yusho

are a hundred times higher than those in normal controls as late as 17 years after intake of contaminated rice-bran oil. PCBs and PCQs can easily be dissolved in the fat tissues. Therefore, we considered that surface lipids had a possibility to be detected these chemicals. In this study, PCBs and PCQs levels in the skin surface lipids of the patients with Yusho were investigated. Furthermore, we compare the levels of these chemicals at different times in same Yusho patients.

Materials and Methods

1) Materials

Twenty three patients with PCB poisoning (Yusho) and twenty controls were used as subjects. Twenty two patients and seven normal controls were analyzed in 1990, and sixteen patients and thirteen normal controls in 1991, and twenty three patients in 1992. Sixteen patients were analyzed every year, 6 patients were done in 1990 and 1992, and one patient in 1992.

2) Samples

Ten milliliters of blood was taken from the cubital vein, and skin surface lipids of face were collected by Oshiro's method (6), that is, lipids were dissolved in a cotton pad with 70% alcohol. The time of collection was fixed at the early morning before washing the face.

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 blood. The procedure for analysis of PCBs and PCQs in skin surface lipids was performed by means of the method of Asada and his co-workers¹⁾.

Results

The results are summarized in Table1.

1) PCBs and PCQs concentrations in the control group.

The PCBs and PCQs concentrations of blood and skin surface lipids of twenty samples were analyzed. Five persons were living in Nagasaki

City, 15 in Goto Islands. Mean of their age was 48.1 year-old, and they were 2 females and 18 males. The mean value of the lipid weight was 14.7mg. The mean value of the PCBs concentration in the blood was 2.1 ng/g, PCQs concentration was below the limit set by our analysis. The mean value of PCBs concentration in the skin surface lipids was 324.4 ng/g and the PCQs concentration was not detectable.

2) PCBs and PCQs concentrations in the Yusho group.

Twenty three samples of Yusho patients were utilized in this study. Twelve patients were living in Naru Island, and 11 were in Tama-noura.

In 1990, twenty two patients were analyzed. The mean value of age was 65.2 year-old. The mean value of lipid weight was 9.7 mg. The mean value of PCBs concentration in the blood was 5.4 ng/g, and PCQs concentration was 0.65 ng/g. The mean value of PCBs concentration in the skin surface lipids was 581.4 ng/g, PCQs concentration was 29.0 ng/g.

Sixteen patients was analyzed in 1991. The mean of age was 67.5 year-old. The mean value of lipid weight was 12.3 mg. The mean value of PCBs concentration in the blood was 6.6 ng/g, and PCQs concentration was 1.31 ng/g. In the skin surface lipids, the mean value of PCBs concentration was 675.6 ng/g, and PCQs concentration was 25.9 ng/g.

In 1992, twenty three patients were analyzed. The mean of their age was 67.4 year-old. The mean value of lipid weight was 6.9 mg. In the blood, the mean value of PCBs concentration

Table 1 MEAN VALUE OF PCB_s AND PCQ_s CONCENTRATIONS OF THE SKIN LIPIDS AND BLOOD IN YUSHO PATIENTS (±SD)

YEAR	N	AGE	SKIN SURFACE LIPIDS			BLOOD	
			WEIGHT(mg)	PCB(ng/g)	PCQ(ng/g)	PCB(ng/g)	PCQ(ng/g)
1990	22 (M/F=13/9)	65.2±6.7	9.7±4.7	581.4±325.1	29.0±12.9	5.4±2.5	0.65±0.55
1991	16 (M/F=12/4)	67.5±5.3	12.3±5.3	675.6±308.9	25.9±11.7	6.6±2.8	1.31±0.86
1992	23 (M/F=14/9)	67.4±6.5	6.9±5.6	862.7±462.5	53.4±23.7	4.8±2.5	0.57±0.36
CONTROL	20 (M/F=18/2)	48.1±11.6	14.7±8.5	324.4±103.6	<10	2.1±0.7	<0.02

was 4.8 ng/g, and PCQs concentration was 0.57 ng/g. In the skin surface lipids, the mean value of PCBs concentration was 862.7 ng/g, and PCQs concentration was 53.4 ng/g.

Influence of the washings their faces was investigated in 1992. The mean value of the skin surface lipids weight was 13.5 mg without washing their faces (13 patients), but was 2.9 mg with washing (10 patients). The former was detected PCQs in all patients, while the latter could not be detected.

From 1990 to 1992, yearly observations of PCBs and PCQs concentration of skin surface lipids in 22 patients (Fig.1 and 2). Considerable patients showed an elevation of PCBs and PCQs levels in the skin surface lipids.

In summary, PCBs levels in the blood and skin surface lipids of Yusho patients were approximately two folds higher than those of controls. PCQs were detected in the blood of all patients with Yusho, while in the skin surface lipids were seventeen of 23 patients. However, PCQs levels in skin surface lipids were higher than those in the blood.

Discussion

In this study, PCBs and PCQs concentrations

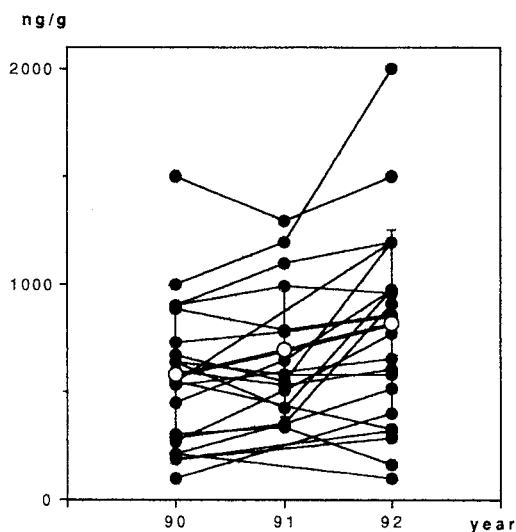


Fig. 1 Yearly PCBs concentrations in the skin surface lipids of YUSHO patients

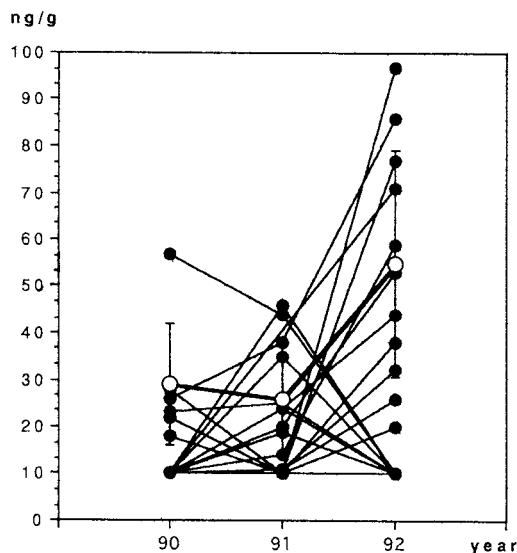


Fig. 2 Yearly PCQs concentrations in the skin surface lipids of YUSHO patients

in the blood were still high in the patients with Yusho. It was also confirmed that PCBs and PCQs levels were high in the skin surface lipids of Yusho patients. The level of PCQs in the skin surface lipids is approximately twenty to ninety folds of that in the blood. Our previous study showed that hair was contaminated with PCBs and PCQs as late as 18 years after the diagnosis³⁾. In comparison with the values of PCBs and PCQs of blood, hair, subcutaneous fat tissues and skin surface lipids from previous studies³⁾⁴⁾⁵⁾, the concentrations of these chemicals in the skin surface lipids were considerably high. However, these levels in the skin surface lipids showed lower than those in the subcutaneous fat tissues. These results suggested that chemicals, such as PCBs or PCQs, might be excreted from sebaceous gland to the skin surface lipids. In other words, it seems probable that sebaceous gland will have an ability to eliminate fat soluble substances from the system.

Skin surface lipids are utilized for a human monitoring procedure of lipophilic environmental pollutants. Oshiro reported that chlordane could be detected in the skin surface lipids of a

male, who lived in a house contaminated with chlordane treatment against termites⁶⁾. He also detected chlorophenothane and dieldrin. These results show that not only endogenous substances, but exogenous pollutants are also contaminated in the skin surface lipids. At present, it seems that there exists few PCQs in the human as environmental pollutants or industrial contamination. Therefore, it is considered that PCQs in the skin surface lipids is endogenously derived from subcutaneous fat tissues or blood. Curiously, mean levels of PCBs and PCQs in the skin surface lipids are increasing with age. It is speculated that the levels of PCBs and PCQs in the subcutaneous fat tissues will be on the decrease year by year, because the contamination of these chemicals has been already ceased. These variation may also depend on the conditions of collecting the skin surface lipids, for PCQs could not be detected after the washing their faces.

We concluded that sebaceous gland played an important role as an excretory pathway for polyhalogenated compounds, such as PCQs or PCBs.

References

- 1) Asada Y, Baba T and Baba M: A study of PCB concentration in the hair of Yusho patients. Report of Nagasaki Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science. 19: 100-102, 1978. (in Japanese)
- 2) Kashimoto T, Muraya H, Yakushiji T and Tanaka R: Analysis of the pattern of PCBs in the blood of patients with Yusho. Fukuoka Acta Med. 76: 145-149, 1985.
- 3) Ohgami T, Nonaka S, Irifune H, Watanabe M, Tsukazaki N, Tanaka K, Yano M, Yoshida H, Murayama F and Rikioka Y: 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. Fukuoka Acta Med. 82: 295-299, 1991.
- 4) 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 biophenyls (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.
- 5) 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.
- 6) Oshiro Z: A human monitoring procedure for lipophilic environmental pollutants using skin surface lipids. Okinawa Prefectural Institute of Public health and Environmental Science. 23: 91-97, 1989. (in Japanese)

(和文抄録)

皮脂，血液中の 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・渡辺 雅久

田中 敬一・吉田 彦太郎

掖済会長崎病院皮膚科

塚崎 直子

琉球大学医学部皮膚科学教室

野中 薫雄

長崎県立公害衛生研究所生化学部門

力岡 有二

1990 年から 1992 年までの 3 年間に，油症患者 23 例の皮脂，血液中の PCB，PCQ 濃度を測定し，経時的な変化を併せて検討した。1990 年は 22 例，1991 年は 16 例，1992 年は 23 例を解析した。皮脂中の平均 PCB 濃度はそれぞれ 581.4 ng/g, 675.6 ng/g, 862.7 ng/g, PCQ 濃度は 29.0 ng/g, 25.9 ng/g, 53.4 ng/g であった。また血液中の平均 PCB 濃度はそれぞれ，5.4 ng/g, 6.6 ng/g, 4.8 ng/g, PCQ 濃度は 0.65 ng/g, 1.31 ng/g, 0.57 ng/g を示した。一方，対照群では皮脂中 PCB 濃度は 324.4 ng/g, PCQ は検出限界値以下であった。血液中 PCB 濃度は 2.1 ng/g, PCQ 濃度は測定

限界値以下であった。また 1992 年に，洗顔後に皮脂を採取したところ，洗顔前に採取した皮脂量は約 5 倍の重量を示し，洗顔後の皮脂中からは PCQ を検出することができなかった。

皮脂中に PCQ が認められることは，油症患者の諸臓器，とくに脂肪組織に沈着しているはずの PCQ が皮脂腺を介して体外へ排泄されていることが想像される。油症に対する有効な治療法に乏しい現在，皮脂の分泌を促進させることも治療の一手段として考慮すべきと思われた。

The Synergistic Effect of Chlorinated Chemicals and Low Concentration of Griseofulvin on Porphyrin Metabolism

—The Effect of 0.05% Hexachlorobenzene and 0.1% Griseofulvin on Young and Old Mice—

Naoko TSUKAZAKI¹⁾, Shigeo NONAKA²⁾ and Taro OHGAMI³⁾

¹⁾ Division of Dermatology, Ekisaikai Nagasaki Hospital, Nagasaki 850

²⁾ Department of Dermatology, School of Medicine, University of the Ryukyus,
Okinawa 903-01 (Director : Prof. S. Nonaka)

³⁾ Department of Dermatology, Nagasaki University School of Medicine,
Nagasaki 852 (Director : Prof. H. Yoshida)

Abstract The difference in the synergistic effect of 0.05% hexachlorobenzene (HCB) and 0.1% Griseofulvin (GF) on porphyrin metabolism between young (4 weeks old) and old (8 weeks old) mice was investigated. These mice were divided into four groups, group A was treated with feeds containing 0.05% HCB and 0.1% GF, group B with 0.05% HCB, group C with 0.1% GF and group D with normal feed. The treatments were continued for 8 and 16 days, after which porphyrins in the erythrocytes, feces and liver were analyzed by a chromatographic method. Hepatic protoporphyrin levels had risen by 8th day in the young mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF, and by 16th day in the young mice treated with 0.1% GF, but no rise in the hepatic protoporphyrin levels in the old mice was seen. Hepatic protoporphyrin level by 16th day in the young mice treated with 0.1% GF had significantly risen compared to that in the old mice with same treatment. Fecal coproporphyrin level had risen at 8th day in the young mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF and by 16th day in the young mice treated with 0.05% HCB. It had also risen by 16th day in the old mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF. Fecal protoporphyrin level in the young mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF, 0.1% GF alone was three to four times higher than those in normal mice. Erythrocytic coproporphyrin and protoporphyrin levels in the young mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF, 0.05% HCB or 0.1% GF alone were generally higher than those in the old mice. From these results, hepatic and fecal protoporphyrin levels in the mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF or 0.1% GF alone had a tendency to be elevated in the young mice than old mice. Furthermore, these abnormalities depend on an influence of GF, not of HCB in the condition of our study. We consider that young mice will be susceptible to the porphyrinopathy of HCB or GF, and the porphyrin abnormalities in this study depend on the influence of GF, not of HCB.

Introduction

Yusho is a disease induced by polychlorinated biphenyls (PCB) contaminated into rice oil. Chlorinated compounds such as hexachlorobenzene (HCB), benzene hexachloride, dichlorodiphenyl-trichloroethan, dieldrin influence the porphyrin metabolism³⁾⁹⁾¹⁵⁾. HCB induces an abnormal porphyrin metabolism

such as porphyria cutanea tarda in rats. However, experimental porphyria is hard to induce in mice by HCB alone. Only HCB with iron succeeded in elevating hepatic uroporphyrin level of mice¹²⁾. Furthermore, combinations of certain chemicals with a low concentration of griseofulvin (GF) sometimes induces protoporphyrin although the chemicals alone can not induce an abnormality¹¹⁾. It is speculated that

use of low concentrations of GF in addition to chemicals may be useful in elucidating the porphyrinopathy in chemicals. In previous study, we investigated whether or not simple chlorinated compounds affect porphyrin metabolism when a low concentration of GF is added to each chlorinated chemical⁷⁾¹⁶⁾. The result shows that the chemicals 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. In this study, an influence of the aging on the synergistic effects due to HCB and low concentration of GF is investigated.

Materials and Methods

1) Animals

Eighty dd-y strain mice aged 4 weeks old and 8 weeks old were used in this study.

2) Chemicals

GF was contributed by Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan. HCB and ordinary chemicals were purchased from Nacarai Tesque Inc., Kyoto, Japan. Porphyrin ester chromatographic maker kit was purchased from Paesel GmbH Co. Frankfurt, Germany.

3) Feed and experimental design

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. HCB was mixed into the feed with or without 0.1% GF in concentration of 0.05% by ourselves. Each young and old mice were divided into 4 groups. Group A was treated with the feed containing 0.05% HCB and 0.1% GF, group B was treated with 0.05% HCB, group C with 0.1% GF and group D with normal feed.

4) Quantitative analysis of porphyrin

Each mouse was anesthetized with ethyl ether and sacrificed on either the 8th and 16th day after treatment. Liver tissue, feces, and blood were taken as samples for the analysis of porphyrins. The methods for porphyrin analysis of erythrocyte, liver and feces have been

described in previous study¹⁰⁾¹⁶⁾.

Results

Results of the experiment are shown in Table 1. In normal mice, there was no difference in the mean liver/body weight ratios. Hepatic uroporphyrin (UP) and coproporphyrin (CP) levels did not elevated in any mice, normal or treated. Hepatic protoporphyrin (PP) levels rose on 8th day in the young mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF, and on 16th day in the young mice treated with 0.1% GF, but no elevation in hepatic PP levels in the old mice was seen. Hepatic PP level by 16th day in the young mice treated with 0.1% GF was significantly higher compared with that in the old mice with same treatment ($p < 0.05$) (Fig. 1). Fecal CP level had risen by 8th day in the young mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF and by 16th days in young mice treated with 0.05% HCB. It had also risen by 16th day in old mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF. Fecal PP levels in young mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF, 0.1% GF alone were three to four times higher than those in normal mice. Fecal PP level after 8 days in young mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF was significantly higher than that in old mice with same treatment ($p < 0.10$). There was no change in fecal PP levels in old mice groups. Erythrocytic CP and PP levels in the young mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF, 0.05% HCB or 0.1% GF alone were generally higher than those in old mice. In summary there were greater elevation in hepatic and fecal PP levels in the young mice than in old mice.

Discussion

In this study, hepatic and fecal PP levels of the mice treated with 0.05% HCB and 0.1% GF, or 0.1% GF alone had a greater tendency to be elevated in the young mice than those in the old mice. However, these abnormalities were mainly composed of an elevation of PP levels in the liver and feces. Therefore, we believe that

Table 1 Summary of porphyrin levels in young and old groups (mean \pm S. D.)

chemicals	duration of treatment	YOUNG							OLD						
		LBWR	Liver (nmol/g. w. w.)		Feces (nmol/g. w. w.)		Erythrocyte (μ g/dl pcv)		LBWR	Liver (nmol/g. w. w.)		Feces (nmol/g. w. w.)		Erythrocyte (μ g/dl pcv)	
			CP	PP	CP	PP	CP	PP		CP	PP	CP	PP	CP	PP
0.05% HCB + 0.1% GF	8 days	0.10 \pm * 0.02	0.38 \pm 0.15	1.83 \pm * 1.12	1.92 \pm * 0.98	2.80 \pm * 1.13	1.79 \pm 2.65	123.23 \pm 38.42	0.07 \pm * 0.01	0.10 \pm 0.21	0.62 \pm 0.44	0.46 \pm 0.48	1.28 \pm 1.24	9.76 \pm 9.85	113.40 \pm 58.49
0.05% HCB		0.09 \pm * 0.01	0.39 \pm 0.16	1.27 \pm 0.51	0.85 \pm 0.43	0.98 \pm 0.54	4.03 \pm 6.12	110.7 \pm 71.32	0.05 \pm 0.01	0.30 \pm 0.20	0.65 \pm 0.32	1.94 \pm 1.92	2.02 \pm 1.70	6.46 \pm 8.29	79.79 \pm 25.07
0.1% GF		0.07 \pm 0.01	0.24 \pm 0.12	0.80 \pm 0.22	0.74 \pm 0.62	3.29 \pm * 2.52	5.10 \pm 7.11	73.40 \pm 24.01	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.06	0.34 \pm 0.15	0.85 \pm 0.90	0.88 \pm 0.36	8.70 \pm 14.11	96.63 \pm 15.88
control		0.06 \pm 0.00	0.25 \pm 0.06	0.88 \pm 0.31	0.69 \pm 0.81	0.79 \pm 0.21	2.47 \pm 2.85	126.95 \pm 24.76	0.05 \pm 0.01	0.31 \pm 0.22	0.84 \pm 0.48	0.81 \pm 0.55	1.63 \pm 1.60	5.66 \pm 4.79	90.13 \pm 19.36
0.05% HCB + 0.1% GF	16 days	0.10 \pm * 0.02	0.29 \pm 0.24	2.51 \pm 2.46	1.00 \pm 0.96	1.96 \pm 1.40	17.35 \pm * 13.23	123.27 \pm 37.71	0.07 \pm 0.01	0.28 \pm 0.19	0.56 \pm 0.27	2.65 \pm * 0.79	3.85 \pm 1.59	2.81 \pm 4.38	38.02 \pm 26.55
0.05% HCB		0.14 \pm * 0.03	0.13 \pm 0.13	0.36 \pm 0.26	2.63 \pm * 2.90	0.99 \pm 0.81	6.00 \pm 7.07	143.31 \pm 79.53	0.07 \pm 0.00	0.38 \pm 0.32	0.57 \pm 0.27	1.54 \pm 1.01	1.17 \pm 0.15	4.08 \pm 5.18	44.98 \pm 5.85
0.1% GF		0.07 \pm 0.01	0.39 \pm 0.15	6.97 \pm * 3.80	0.50 \pm 0.35	2.45 \pm 2.39	3.04 \pm 5.06	359.22 \pm * 438.13	0.06 \pm 0.01	0.28 \pm 0.18	0.39 \pm 0.16	1.34 \pm 1.24	3.27 \pm 2.91	2.78 \pm 3.68	60.41 \pm 43.92
control		0.06 \pm 0.00	0.21 \pm 0.22	0.79 \pm 0.49	0.32 \pm 0.20	0.79 \pm 0.19	3.13 \pm 4.66	56.72 \pm 30.05	0.05 \pm 0.00	0.23 \pm 0.30	0.39 \pm 0.15	0.68 \pm 0.94	1.51 \pm 1.79	3.71 \pm 3.45	53.28 \pm 30.07

* $p < 0.05$

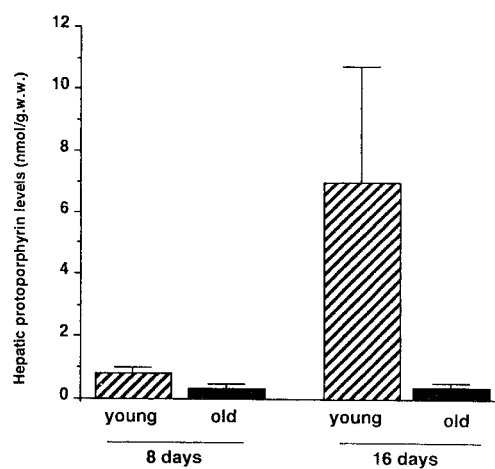
LBWR: Liver/Body weight ratio

g. w. w.: gram wet weight

pcv: packed cell volume

young mice will be more susceptible to the porphyrinopathy of HCB and GF, and the porphyrin abnormalities in this study depend on the influence of GF, not of HCB.

It is well known fact that porphyria was induced by an ingestion of wheat contaminated with HCB in Western Turkey between 1956 and 1961^{1,2)}. Experimental porphyria was also confirmed to induced by HCB ingestion⁸⁾. Generally, concentrations of 0.2% to 0.3% of HCB are used for an induction of experimental porphyria^{4,5,6)}. The term of administration of HCB usually must be longer than 4 weeks. The main enzymatic defect due to HCB is a

**Fig. 1** Hepatic protoporphyrin levels in the mice treated with 0.1% GF

decrease of uroporphyrinogen decarboxylase activity, and that of GF is a decrease of heme synthetase activity. In this study, only an elevation of PP level was main change even with a combination of HCB and GF. From these results, a combination in this study affects heme synthetase activity. Longer administration of the same combination may change the result. Preliminarily, we compared porphyrinogenic differences between rats and mice. The results showed mice had a high susceptibility to abnormal metabolism of porphyrin due to HCB, but a high mortality due to HCB. When a concentration of 0.2% of HCB was added to the mice for two weeks, all mice died. Half were alive at the concentration of 0.1% of HCB. There was no induction of porphyria, although the fecal porphyrin level rose. Therefore, we selected the concentration of 0.05% in this study. In literatures, mice have generally not been used for experimental porphyria due to HCB. Only a combination of HCB and iron have been tried with the mice¹²⁾. The authors described that the combination of a single subcutaneous dose of iron and subsequent treatment with HCB caused a progressive inhibition of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in male mice leading to an accumulation of UP in 4 to 6 weeks. They also reported that female mice were less sensitive than male. There is another report of sex difference on porphyrin metabolism¹³⁾¹⁴⁾. There is no report of a relationship of age and experimental porphyria except one. Experimental porphyria due to HCB is induced more often in older rats than younger rats because of high mortality in the younger³⁾. Clinically, eighty percent of the patients were children under 14 year-old in acquired toxic porphyria cutanea tarda due to HCB¹⁾. These epidemiological studies show the young is easy to induce porphyria, but in this study, only a slight deposition of protoporphyrin and over excretion of fecal protoporphyrin was noted.

In a previous study, seven chemicals did not

seem to affect porphyrin metabolism as much as chemicals like PCB, estrogen, ethyl alcohol and iron, which induced severe porphyriopathy by addition of 0.1% GF¹⁶⁾. These chemicals used alone in this study did not show a potential for inducing porphyria. However, these chemicals may possibly induce slight porphyric abnormalities by the synergistic reaction with another chemicals such as GF. In this study, we investigated only 16 days administration of two chemicals. This experimental period may be insufficient to analyze the effect of both chemicals. Furthermore, it might be necessary to investigate whether the selection of 4 week for the young age and 8 week for the old age in the mice is an appropriate age for the experiment or not.

Acknowledgements

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) Cam C and Nygogosyan G: Acquired toxic porphyria cutanea tarda due to hexachlorobenzene. Report of 348 cases caused by this fungicide. *JAMA* 183: 90-93, 1953.
- 2) Cripps DJ, Gocmen A and Peters HA: Porphyria Turcica. Twenty years after hexachlorobenzene intoxication. *Arch. Dermatol.* 116: 46-50, 1980.
- 3) De Matteis F: Toxic hepatic porphyrias. *Sem. Hematol.* 5: 409-423, 1968.
- 4) Elder GH, Evans JO and Matlin SA: The effect of the porphyrinogenic compound, hexachlorobenzene, on the activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in the rat. *Clin. Sci. Mol. Med.* 51: 71-80, 1976.
- 5) Miura T, Magnus IA, Jones K and Doyle M: Skin porphyrin and photosensitivity in the porphyric rat. *Dermatologica* 151: 80-88, 1975.
- 6) Miura T and Torinuki W: Skin porphyrin and UV-A irradiation. *Tohoku, J. Exp. Med.* 125: 199-204, 1978.
- 7) 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.

8) Ockner RK and Schmid R: Acquired porphyria in man and rat due to hexachlorobenzene intoxication. Nature 189: 499, 1961.

9) Peters HA: Hexachlorobenzene poisoning in Turkey. Fed. Proc. 35: 2400-2403, 1976.

10) Shimoyama T, Nonaka S, Honda T, Murayama F, Ohgami T and Yoshida H: A biochemical studies of experimental porphyria I. The influence of griseofulvin at various concentrations on porphyrin metabolism. J. Dermatol. (Tokyo) 11: 49-55, 1984.

11) 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.

12) Smith AG and Francis JE: Synergism of iron and hexachlorobenzene inhibits hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in inbred mice.

Biochem. J. 214: 909-913, 1983.

13) Smith AG, Francis JET, Dinsdale D, Manson, MM and Cabral JRP: Hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene in rats and the sex difference in hepatic iron status and development of porphyria. Carcinogenesis 6: 631-636, 1985.

14) Smith AG, Francis JET, Green JA, Greig JB and Manson MM: Sex-linked hepatic uroporphyrin and the induction of cytochrome p4501A in rats caused by hexachlorobenzene and polyhalogenated biphenyls. Biochem. Pharmacol. 40: 2059-2068, 1990.

15) Strik JJTWA: Species differences in experimental porphyria caused by polyhalogenated aromatic compounds. Enzyme 16: 224-230, 1973.

16) Tsukazaki N, Nonaka S, Ohgami T, Irifune H, Tanaka K, Yano M and Yoshida H: The synergistic effect with chlorinated chemicals (Trichlorosalicylanilid, 4-chloro-m-cresol, trichloromethiazide, trichlorofon and trichloroacetaldehyde) and low concentrations of griseofulvin on porphyrin metabolism. Fukuoka Acta Med 82: 215-220, 1991.

(和文抄録)

塩素化合物と低濃度グリセオフルビンの ポルフィリン代謝に及ぼす複合作用 —若齢マウスと老齢マウスにおける 0.05% ヘキサクロロベンゼンと 0.1%グリセオフルビンの影響—

掖済会長崎病院皮膚科

塚崎 直子

琉球大学医学部皮膚科学教室

野中 薫雄

長崎大学医学部皮膚科学教室

大神 太郎

0.05%ヘキサクロロベンゼン (HCB) と 0.1%グリセオフルビン (GF) のポルフィリン代謝に及ぼす複合作用について若齢マウス (4 週齢) と老齢マウス (8 週齢) の違いを検討した。若齢マウスでは 0.05% HCB と 0.1% GF の 8 日間の同時投与、および 0.1% GF 単独投与により肝臓中、糞便中のプロトポルフィリンが

有意に増加していた。老齢マウスではこの傾向はほとんど認められず、若齢マウスは老齢マウスに比べ、HCB あるいは GF による影響を受けやすいのではないかと考えた。また、0.05% HCB と 0.1% GF の同時投与による変化は HCB ではなく GF によるものと考えた。

***In Vitro* における Polychlorinated Biphenyls (PCB) および
2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PCDF)
毒性軽減の検討 (第2報)
— ウルソデオキシコール酸およびケノデオキシコール酸の
細胞毒性に与える影響 —**

国立嬉野病院薬剤科

松 岡 一 忠

琉球大学医学部皮膚科学教室

野 中 薫 雄

長崎大学医学部皮膚科学教室

大 神 太 郎・吉田 彦太郎

***In Vitro* Analysis for Cellular Toxicity of Polychlorinated
Biphenyls (PCBs) and 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PCDF)
on PLC/PRF/5 Cell Proliferation (II)
— The Effects of Ursodeoxycholic Acid and
Chenodeoxycholic Acid on Cell Toxicity —**

Kazutada MATSUOKA

Division of Pharmacology, Ureshino National Hospital, Saga 843-03

Shigeo NONAKA

Department of Dermatology, School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa 903-01

Taro OHGAMI and Hikotaro YOSHIDA

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

We investigated the cell toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PCDF) as two kinds of indicator of the quantity of secreting protein, which is an HBV surface antigen (HBsAg) in PLC/PRF/5 cells, and the DNA of those cells was counted the radioactivity for dot hybridization method, respectively. Furthermore, the reductive action of ursodeoxycholic acid (UDCA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) on the PCBs and PCDF toxicity was investigated. HBsAg titer increased to 10 to 15% with the addition of CDCA at the concentration of 0.02×10^{-6} %. However, the slope of the curve of DNA synthesis of HeLa cells at the presense of PCDF was gradually increased at the concentration of 0.02×10^{-4} % of UDCA and CDCA, and it became to overlap with a control group while PCBs did not. These results mean that PCDF cell toxicity was suppressed a little by UDCA and CDCA, but the case of PCBs did not.

は じ め に

われわれはすでに PCB 等の毒性を軽減させる薬剤

の検討を HeLa 細胞の細胞数⁷⁾, PLC/PRF/5 細胞より分泌される B 型肝炎ウイルス表面抗原分泌能さらには polymerase chain reaction を用い m-RNA 量

の検討⁹⁾を *in vitro* の系で行ってきた。その結果、ウルソデオキシコール酸はそれらの毒性を軽減させる作用をもつことが明らかになった。

今回、*in vitro* の毒性軽減の指標を DNA 量 (dot hybridization) と蛋白量 (B 型肝炎ウイルス表面抗原蛋白) を用いてウルソデオキシコール酸の作用が確実であるかを再検し、さらに類似化合物であるケノデオキシコール酸が同様の作用を有するか否かについて検討を行ったので報告する。

実験の方法

1) 使用薬剤

ウルソデオキシコール酸 (98.5%, 東京田辺製薬, 東京, UDCA) およびケノデオキシコール酸 (東京田辺製薬, 東京, CDCA) を用いた。

2) PCB および PCDF

Polychlorinated biphenyls (PCB) は、Polychlorobiphenyl tetra (和光純薬, 大阪) を使用し、希釈は Dimethyl sulfoxide を 10% 含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) で行い、2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PCDF) は第一薬科大学増田義人教授より分与されたアセトン溶液をそれぞれ用いた。

3) HBV フラグメントの精製

Yoneyama 博士より供与された HBV/pBR322 (Adri 25)²⁾ は HBI01 株の大腸菌で増殖させ Bam HI で切断し電気泳動後 HBV のフラグメントを常法⁹⁾により精製した。得られた DNA はサイズマーカーの λ /Hind III と比較し濃度を決定した。

4) プローブの作成および検定

3) HBV フラグメントの精製で得られた HBV DNA をアイソトープ法 (RI 法) と酵素標識法 (Biotin 法) の二種類の方式でラベルした。Biotin 法⁹⁾は、DNA を Nick translation reagent system (BRL, USA) および Biotin-11-dUTP (BRL, USA) を用いて添付文書通りラベルし Sephadex G-50 (Pharmacia, Swed.) で精製した。このプローブを dilution buffer (6×SSC [20×SSC: 3M NaCl, 0.3M Sodium citrate, pH 7.0], salmon sperm DNA 200 ng/ μ l) で 50 pg/ μ l より二段階希釈し Zeta Probe nylon membrane (BioRad Lab. USA, 以後 membrane とする)⁹⁾ にドット (2 μ l) し、80°C, 15 分間乾燥後基質を加えて遮光下で発色させた。

RI 法は、Multiprime DNA labeling system (Amersham, USA) および α -³²P-dCTP (1.8×10⁹ dpm/ μ g, Amersham) を使用し標識した。未反応の RI は

Sephadex G-50 で分離した。

5) 培養細胞

直径 5 cm のペトリディッシュ (コーニング社製) に 2×10⁵ 個の PLC/PRF/5 細胞¹⁾ を RPMI 1640 培養液 (10% 牛胎児血清含有) 5 ml と共に 37°C, 5% 炭酸ガス培養器で培養した。単一層に細胞が増殖した後に 0.05% トリプシン溶液 (0.02% エチレンジアミン四酢酸ナトリウム [EDTA 2Na], リン酸緩衝液, pH 8.0) で剥離させ、96 穴培養プレート (コーニング社製) に一穴当たり 1,000 個の細胞を入れ 7 日間培養した。なお薬剤および PCB, PCDF の場合は細胞を 96 穴培養プレートに移す時に同時に添加した。

6) HBs 抗原の測定

5) 培養細胞で 7 日間培養した後、上清 0.1 ml を用いオースザイム II (ダイナボット社, 東京) で HBs 抗原の測定を添付文書に従い行った。

7) 細胞 DNA の抽出

5) 培養細胞で 7 日間培養した後、培養液を吸引により除去後リン酸緩衝液 (0.15 M NaCl, pH 7.4) で 2 回洗浄した。10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA 2Na, 5% glucose, 1% lysozyme を含む溶液 0.1 ml を加え 5 分間放置後、アルカリ溶液 (蒸留水 0.08 ml, 2N NaOH 0.01 ml, 10% SDS 0.01 ml) 0.1 ml を重層し、培養プレートを遠心し上清液 10 μ l を 96 穴の dot 用プレート (Hybri, Dot, BRL, USA) に予め装着した。membrane に吸引しながら DNA を吸着させた。

8) Dot Hybridization

Biotin ラベル HBV DNA Probe の場合は 250 pg より 0.2 N NaOH (最終濃度) を加えて二段階希釈法で membrane へそれぞれプロットした。prehybridization buffer (50% formamide, 20×SSC, 0.5M phosphate buffer, pH 6.5, 50×Denhard's solution, salmon sperm DNA, 20 μ g/ml) に 42°C, 2 時間 membrane を浸し prehybridization に 42°C, 2 時間 membrane を浸した後、45% formamide, HBV DNA 250 ng/ml の条件で 42°C, 一晚の hybridization を実施した。その後、Buffer 1 (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100) で洗浄し 10% horse serum で 50°C, 20 分 blocking した。

一方、Buffer 10.5 ml, streptavidin 0.5 μ l および biotin alkaline phosphatase (1 mg/ml) 0.5 μ l を室温で 5 分間反応後、新たなバッグにこの溶液と前述の membrane を入れ室温で 10 分間放置した。buffer 1 で membrane を 2 回洗浄した後 buffer 3 (buffer 1 を

pH 8.5 に調整) でさらに 1 回洗った。そして, buffer 36 ml, NBT (nitro blue tetrazolium) 26.4 μ l および BCIP (5-bromo-4-chloroindolyl phosphate) 20 μ l を加え遮光しながら 4 時間室温で放置した。そして 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA で反応を停止させ membrane を蒸留水で洗った後に乾燥させた。

アイソトープラベル HBV DNA Probe の場合も, Biotin ラベルと同様に membrane にプロット後 prehybridization buffer (蒸留水 1.8 ml, deionized formamide 5 ml, 20 \times SSPE [NaCl, 175.5 g, NaH₂PO₄ \cdot H₂O 27.6 g, EDTA 2Na 7.4 g, 以上を 1 L に, pH 7.4] 2 ml, 20% SDS 0.5 ml, 10% Skim milk 0.5 ml, ssDNA 0.1 ml, yeast RNA 0.1 ml) 42 $^{\circ}$ C, 2 時間 membrane を浸し prehybridization を行い, さらに hybridization buffer (蒸留水 1.5 ml, deionized formamide 4.7 ml, 20 \times SSPE 1.5 ml, 20% SDS 0.5 ml, 10% Skim milk 0.5 ml, yeast RNA 0.1 ml, probe DNA 0.5 ml) に HBV DNA 250 ng/ml の条件で 42 $^{\circ}$ C, 一晚の hybridization を実施した。0.05 \times SSC, 0.01 M EDTA 2Na (pH 8.0), 0.1% SDS の溶液で十分に membrane を洗浄後, 乾燥させ, その後オートラジオグラフィーを行った。

結果および考察

Biotin 法でラベルしたプローブの検定の結果, HBV-DNA の発現は 0.025 pg まで発色が確認された。また, hybridization の結果では Biotin および RI 両法ラベルのプローブ共に salmon sperm DNA とはまったく反応せず HBV DNA のみと反応し特異性が確認できた。

Biotin ラベルプローブは 4 pg, また RI ラベルのプローブでは 0.5 pg の HBB DNA を hybridization で検出できた (図 1, RI ラベルの場合は図の写真上は見えないが, フィルム上から観察された結果を示した)。この結果は, 他の RI 法の報告¹⁰⁾¹¹⁾ともほぼ一致した。



Fig. 1

また Back Ground は, Biotin 法より RI 法の方が低かった。これらの結果より, 以後は RI 法のみを使用し dot の濃度は densitometer で測定した。UDCA または CDCA 単独で培養細胞に及ぼす影響のうち HBs 抗原蛋白量の測定結果を図 2 にそれぞれ示した。

in vivo の報告⁴⁾⁵⁾では, 一般に CDCA は UDCA より毒性が強いが今回われわれの *in vitro* の結果も CDCA が UDCA より細胞の HBs 抗原蛋白産生能に影響を及ぼすことが判明した (図 2)。

次に, PCB および PCDF の濃度は前回検討した⁹⁾ごとく PCB 200 μ g/ml および PCDF 500 μ M をそれぞれ用いた。そこで, 上記の実験系に PCB および PCDF を添加して HBs 抗原蛋白産生能を測定した結果のうち CDCA の場合を図 3 に示した。CDCA は 0.0003% の濃度でコントロール群に比べて HBs 抗原蛋白産生能が PCB および PCDF 共に 10~15% 高まった。すなわち, PCB および PCDF の HBs 抗原蛋白産生能に対する抑制効果を CDCA は抑制していた。しかし UDCA の場合 PCDF の細胞毒性が 40~50% も軽減さ

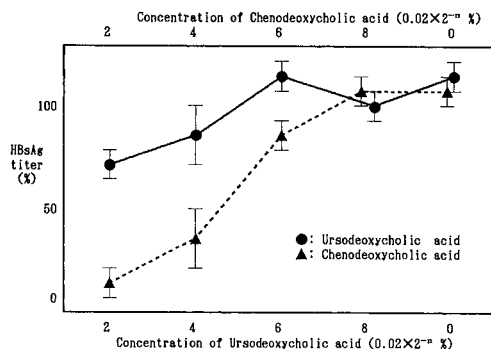


Fig. 2 Influence of Ursodeoxycholic acid or Chenodeoxycholic acid

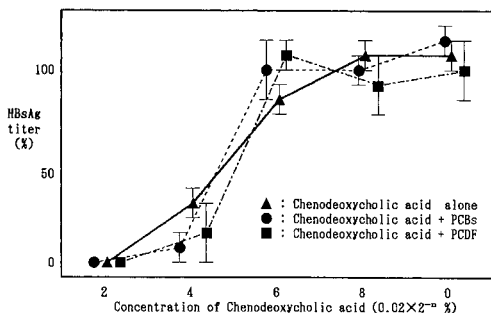


Fig. 3 The efficacy of Chenodeoxycholic acid on PCBs or PCDF

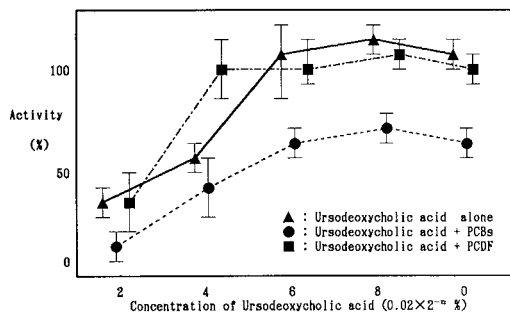


Fig. 4 The efficacy of Ursodeoxycholic acid on PCBs or PCDF

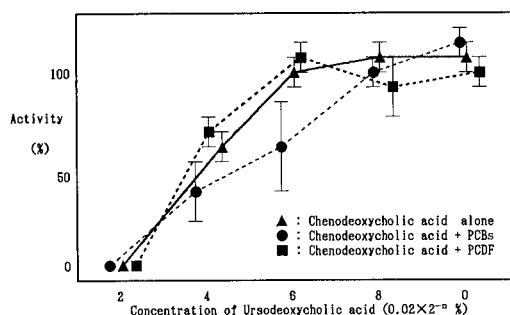


Fig. 5 The efficacy of Chenodeoxycholic acid on PCBs or PCDF

れ HBs 抗原産生能が亢進した結果⁸⁾と比べて, CDCA の場合, 毒性を抑えるは 1/3 であった。

一方, HBV DNA の Dot Hybridization の結果を UDCA (図 4) および CDCA (図 5) に示した。細胞 DNA の量を Dot Hybridization の手法を用いて検討した結果は, 図 4 より UDCA については前報⁹⁾とほぼ同じ結果であった。しかし, CDCA の場合は, UDCA より明らかに PCB または PCDF の毒性を軽減させる結果は得られなかった。

考 察

今回の実験では PCB や PCDF の毒性を PLC/PRF/5 細胞の DNA 量を dot hybridization を用いて, また HBs 抗原蛋白量で測定した。その結果, UDCA は比較的良好に抑制したが, CDCA は UDCA に比べて 1/3 の抑制した示さなかった。この理由は厳密には不明であるが, その原因としてこれらの化合物の立体構造のわずかな違いが推測される。UDCA と CDCA は, 7 位の水酸基が β 配置と α 配置のみが異なる立体異性体である³⁾が, 今回のわれわれの PCB または PCDF

の毒性を軽減させる目的のためには β 配置の UDCA が有効であることが示唆された。そのメカニズムとしては UDCA の包接体の構成により PC または PCDF を体外に排泄しやすくすることが考えられた。これに対して, CDCA が UDCA より充分な効果が得られなかった原因としては構造の違いに伴い CDCA が UDCA より包接体を形成しにくくなり, さらに構造変化に伴う細胞毒性が高まり低濃度の領域でしか実験系が組みなかった事などが推察された。

今後はより細胞毒性のより少ない薬剤の検討がさらに必要と思われた。

PCDF を提供戴いた増田義人教授 (第一薬大) ならびに東京田辺製薬に深謝致します。

文 献

- 1) Alexander J J, Bey E M, Geddes E W 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, Miyanochara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N and Matsubara K: Cloning and structural analysis of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *luciferic acids Res.* 11, 4601-4610, 1983.
- 3) 樋口泰一: ウルソデオキシコール酸, $C_{24}H_{40}O_4$ の構造, *薬学雑誌*, 105, 1115-1121, 1985.
- 4) 細野仁一, 岩崎守男: Ursodeoxycholic acid のラット, マウスに対する急性毒性試験および溶血性試験, *基礎と臨床*, 9, 3159-3166, 1975.
- 5) 岩崎守男, 細野仁一, 石田泰江: Chenodeoxycholic acid の毒性研究, *Chenodeoxycholic acid* のラット, マウスにおける急性毒性試験, *応用薬理*, 15, 915-921, 1978.
- 6) Langer P R, Waldrop A A and Ward D C: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Nobel nucleic acid affinity probes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (11), 6633-6637, 1981.
- 7) 松岡一忠, 村山史男, 大神太郎, 野中薫雄, 吉田彦太郎: HeLa 細胞のコロニー形成法による PCB 毒性の検討, *福岡医学雑誌*, 78, 231-234, 1987.
- 8) Matsuoka K, Nonaka S, Ohgami T, Murayama F and Yoshida H: In vitro analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PCDF) cellular toxicity in PLC/PRF/5 cell proliferation, *Fukuoka Acta Med.* 82 (5): 232-239, 1991.
- 9) Reed K C and Mann D A: Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes: *Nucleic Acids Res.*, 13 (20): 7207-7221, 1985.
- 10) Scotto J Hadchoel M, Hery C, Yvart J,

Tiollais P and Brechot C : Detection of Hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique : Comparison with results for other viral markers. : Hepatology, 3, 279-284, 1983.

11) Ulrich P P, Bhat R A, Seto B, Mack D,

Sninsky J and Vyas N : Enzymatic amplification of hepatitis B virus DNA in serum compared with infectivity testing in chimpanzees, J. Infect. Dis. 160 (1), 37-43, 1989.

末梢神経再生における Polychlorinated Biphenyls (PCB) の影響 —有髄神経に関して—

¹⁾長崎大学医学部内科学教室第一講座

²⁾長崎大学付属医療技術短期大学部

伊藤 聖¹⁾・吉村俊朗¹⁾・大津留泉¹⁾・一瀬克浩¹⁾
西浦義博¹⁾・木下郁夫¹⁾・辻畑光宏²⁾・長瀧重信¹⁾

Effects of Polychlorinated Biphenyls on Regeneration of the Peripheral Nerve in Rats

Hijiri Ito¹⁾, Toshiro YOSHIMURA¹⁾, Izumi OHTSURU¹⁾,
Katsuhiro ICHINOSE¹⁾,
Yoshihiro NISHIURA¹⁾, Ikuo KINOSHITA¹⁾,
Mitsuhiro TSUJIHATA²⁾ and Shigenobu NAGATAKI¹⁾

¹⁾The First Department of Internal Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852

²⁾School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852

The sciatic nerves was crushed at the mid-thigh level on the last day of 32 days oral administration of PCB. Nerve specimens were obtained from the crushed regions at 1, 2, 4 and 8 weeks after crushing.

There was no significant difference between the experimental group and the control group in the density of regenerating fibers and distribution of fiber diameters at 1 and 2 weeks. At 4 and 8 weeks, however, the density of myelinated fibers was higher in the experimental group than in the control group.

These results indicate that PCB may inhibit the regeneration of the crushed nerves. It is, however, still unknown that this adverse effects of PCB on the peripheral nerve depends on the disturbance of the remyelination or regeneration of the axon or both.

結 言

Polychlorinated biphenyls (PCB) は産業行程において広く使用されている物質であり 1936 年以来散発性に職業病として報告されている。本邦に於ては 1968 年九州北部においてカネミ油症として集団発生がみられた。その犠牲者は 2000 人を越えるとされており、症状としては皮膚症状一面皰一によって初発し気付かれる¹⁾。神経学的症状はまれであるが頭痛(59.6%:岩下ら)²⁾、神経麻痺(17.5%)などがあり、また末梢神経障害も 47.6%(黒岩ら)³⁾に認められている。その他眼症状、消化器症状など報告されているが、一般に症状の程度と血中 PCB 濃度は相関しない(岩下、志田)²⁾とされている。末梢神経障害ではその伝導速度の遅延も報告されているが³⁾、これまで神経の再生に関する

PCB の影響をみた報告はない。そこで今回われわれは挫滅された神経の再生への影響を検討した。

方 法

1. 対象

SD 系雄性ラット(8 週齢、体重 200~300 g)を 1 群 12 匹として実験群、対照群の 2 群に分けた。動物は 1 ゲージあたり 3~4 匹とし、プラスチックゲージを用いて飼育した。飼育温度は 22±2°C、昼夜のサイクルを 12 時間/12 時間とした。

餌の日本クレア株式会社、飼育繁殖用固形飼料と水道水は自由に摂取させた。体重は実験開始前および神経挫滅時、神経生検時に測定した。

2. 薬剤及び薬剤の投与

PCB は濃度 42%の PCB-42 を東京化成工業より購

入した。

対照群はサラダ油（にっとうサラダ油，業務用）をラット用胃ゾンデ針を用い経口的に神経挫滅までの3週間で総量 32 ml を投与した。実験群は PCB をサラダ油に 5 mg/ml に溶解し同様に PCB として一匹当たり 1.6 mg/g を経口投与し，サラダ油投与量は 32 ml とした。

3. 神経の挫滅

薬剤投与 3 週間目にジエチルエーテル麻酔下に皮膚を切開し坐骨神経を露出，ペアンにて大腿中央部で 30 mm 一様に挫滅した後皮膚の縫合を行った。

4. 神経生検

実験群，対照群ともに神経挫滅 1 週後，2 週後，4 週後，8 週後に 3 匹づつジエチルエーテル麻酔下に両坐骨神経の挫滅部位より生検を行った。生検した神経は 2.5% グルタルで固定後，エポン 812 に包埋した。ミクロトームにて 1 μ m の切片を作成しトルイジン・ブルーで染色した。

作成した切片を無作為に写真撮影，最終倍率は 2000 倍で有髄線維の直径を求め有髄線維密度及びヒストグラムを作成した。

結 果

1. 体重の変化

図 1 に PCB および対照群各群投与後の体重の変化を示す。

開始時の体重は対照群で 288.8 ± 8.1 g 実験群では 292.7 ± 7.2 g と両者に差は見られなかった。神経挫滅時の体重は対照群 421.0 ± 16.2 g，実験群 393.1 ± 44.9 g であり，増加分の対照群 135.2 ± 14.2 に比べ実験群 100.4 ± 44.5 g は有意に ($p < 0.01$) 体重増加の抑制が認められた。挫滅後の体重は 3 匹づつの計測であるが，11 週目に至るまで体重増加は抑制される傾向を示し

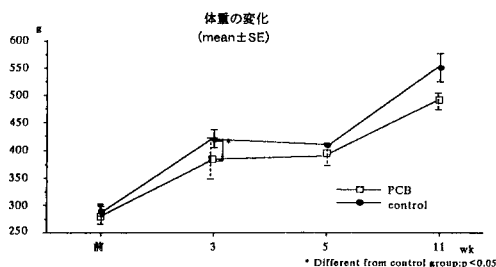


図 1 PCB 投与後の体重の変化
PCB 投与 3 週間目より体重増加の抑制が見られている。

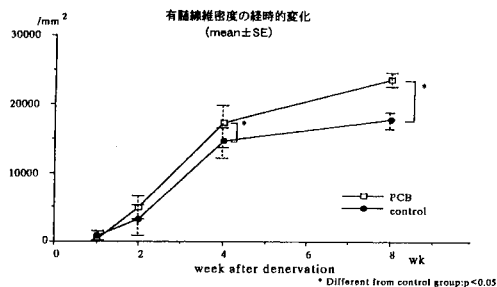


図 2 有髄線維密度の経時的変化：PCB 投与群では対照群よりも増加が著しい

た。

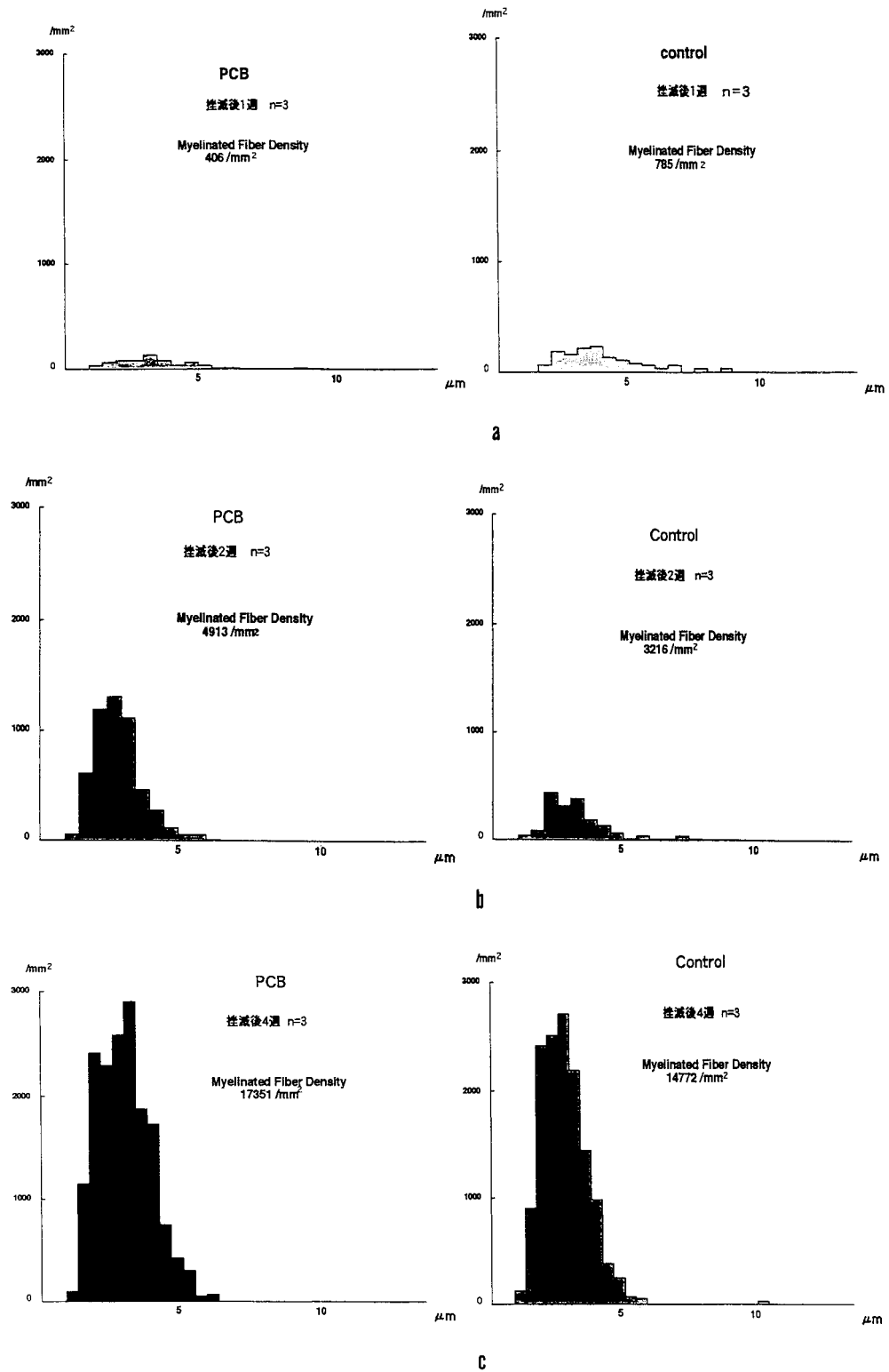
2. 有髄線維密度及びヒストグラム

1 週目及び 2 週目では分布，密度ともに変化はなかった。しかし 4 週および 8 週後では有髄線維密度は対照群に比し有意に増加を示したが分布の型は PCB 群で小径有髄線維の増加のみであり大径有髄線維は対照群に比べ増加を認めなかった。

対照群では 1 週目から 3 μ m にピークを有する 1 相性のヒストグラムを示し，8 週目で 5 μ m 以上にもピークを有する 2 相性のパターンを認めた。（図 3 a, b, c, d 図 4 a, b）。

考 案

慢性油症患者の臨床神経学的検討において頭痛は患者の 58% に²⁾，目眩感は 50%³⁾，また四肢のしびれ感は 46.6%⁴⁾ に認められる。その臨床的特徴は手指のしびれ感，表在知覚鈍麻，異常感覚などである。とくに末梢神経障害に関しては感覚神経優位と報告され，また，50% の例で感覚神経伝導速度の低下が報告されている⁴⁾⁵⁾⁸⁾。また慢性油症患者は暴露後 10 年以上経った時点でも感覚障害を残している⁹⁾。一方末梢神経の実験病理学的報告ではラットを対象として行われた実験でカネクロール 400 を一日 0.3~0.5 ml/Kg 投与し 1 週目から運動神経伝導速度の低下，節性脱髄の初期像と考えられる所見および大径有髄線維の消失が報告されている⁶⁾。しかしながらサルを対象とした実験では中枢及び末梢神経に異常を認めていない⁷⁾ など PCB の末梢神経に対する影響は定説をみない。そこで本実験ではこれらの変化がより明らかになりやすいようにラットの坐骨神経を挫滅しその再生に PCB がどのような影響を及ぼすかを検討した。その結果，小径有髄線維の増加をみる一方で大径有髄線維の再生が障害されていた。一般に末梢神経伝導速度においては大径有髄



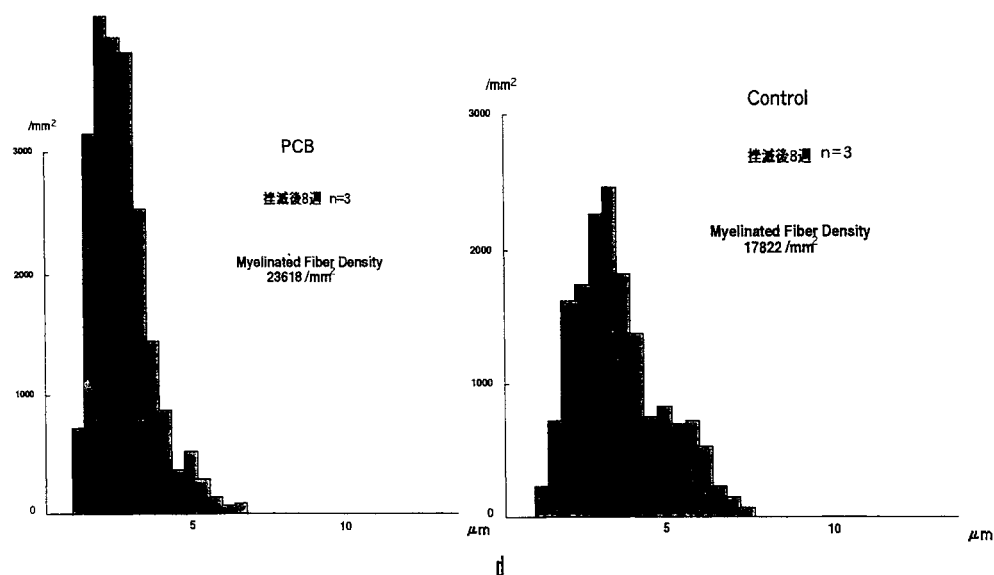


図3 有髄線維ヒストグラムの経時の変化：1週目(a)，2週目(b)，4週目(c)ではPCB投与群および対照群ともに $3\mu\text{m}$ にピークを持つ一相性の分布を示す．8週目(d)において対照群では $5\mu\text{m}$ 以上にもピークを持つ二相性の分布を示している．

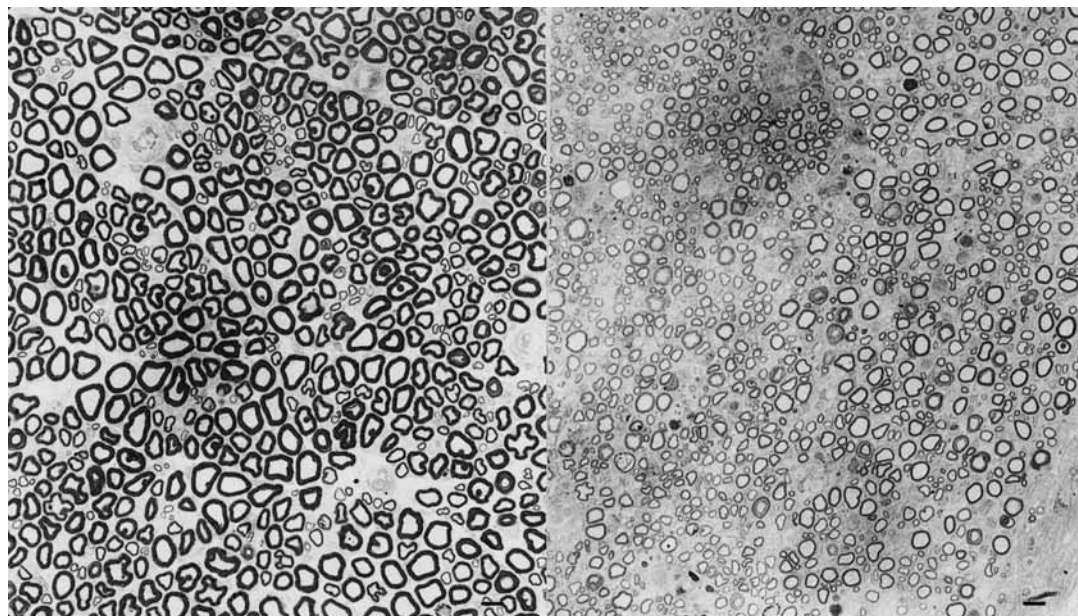


図4 8週目のエポン包埋トルイジンブルー染色標本：対照群(a)に比べてPCB投与群(b)では大径有髄線維の発達が悪い．

線維の機能がその速度に影響を及ぼすと考えられている。従って慢性油症患者で報告されている伝導速度の低下は大径有髄線維の異常を示している可能性がありこの実験結果と矛盾しない。小径有髄線維の増加は神経再生、とくに軸索の発育障害によるものか、あるいは髄鞘形成の障害によるものか不明であり今後の検討課題と考える。

文 献

- 1) Chiappa KH and Ropper AH: Evoked potentials in clinical medicine (second of two parts). N Eng J Med; 306: 1140-50, 1982.
- 2) 岩下 宏, 志田堅四郎, 増田義人: 慢性油症患者における頭痛, 四肢異常感と血中 PCB. 福岡医誌 68: 139-144, 1977.
- 3) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司: 油症患者における神経学的所見. 福岡医誌 60: 462-463, 1969.
- 4) Lie-Gan Chia and Fu-Li Chu: A clinical and electrophysiological study of patients with polychlorinated biphenyl poisoning. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 48: 894-901, 1985.
- 5) Murai Y and Kuroiwa Y: Peripheral neuropathy in chlorobiphenyl poisoning. Neurology. 21. 1173-1176, 1971.
- 6) 小川道子: 塩化ビフェニールによるニューロパターの電気生理学的ならびに形態学的研究. 福岡医誌 62: 74-87, 1971.
- 7) 大西晃生, 岩下 宏: PCB 投与サル of 神経病変. 福岡医誌 70: 150-152, 1979.
- 8) 柴崎 浩: 発病 12 年後の油症患者の臨床神経学的検討. 福岡医誌 72: 230-234, 1981.

CGRP 含有神経の分布に及ぼす PCB の影響に関する検索

九州大学歯学部歯科保存学第一講座（主任：前田勝正教授）

橋口 勇・赤峰昭文

鳥谷芳和・前田勝正

朝日大学歯学部歯科保存学第一講座（主任：青野正男教授）

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

Immunohistochemical Study on the Distribution of CGRP-containing Nerve Fibers in the PCB Poisoned Rats with Experimental Periodontitis

Isamu HASHIGUCHI, Akifumi AKAMINE, Yosikazu TORIYA and Katsumasa MAEDA

*Department of Periodontics and Endodontics, Faculty of Dentistry (Director : Prof. K. Maeda),
Kyushu University 61, Fukuoka 812*

Masao AONO

*Department of Operative Dentistry (Director : Prof. M. Aono),
Asahi University school of Dentistry, Gifu 501-02*

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 have studied immunocytochemically the distribution of CGRP-containing nerve fibers in the PCB poisoned rats introducing experimental periodontitis. The results obtained were as follows.

In the PCB poisoned rats, some specimens obtained from periodontitis-affected sites showed a slight increase in both the intensity of nerve staining and the nerve sprouting. However, no discernible difference in the occurrence and the distribution of nerves has been demonstrated between the PCB poisoned rats and clinically healthy rats. Further studies are needed to confirm the effects of PCBs on the initiation and progression of periodontitis.

はじめに

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 以上のいわゆる病的歯周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、またレントゲン検

査より著明な骨吸収を呈するものも多いことを報告している。ところで、歯周組織には多くの神経線維が認められるが²⁾、近年 Calcitonin gene-related peptide (以下 CGRP と略する) などの神経ペプチドは神経伝達物質として働くのみでなく、炎症や免疫反応ならびに

骨吸収にも深く関与していることが明らかになってきている⁹⁾¹⁰⁾。そこで今回、PCB 投与ラットに実験的に歯周炎を惹起させ、歯周組織における CGRP を含有する神経線維の動態について検索を行った。

実験方法

実験動物としては生後 6 週齢の 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 大白歯と第 2 大白歯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を十分に与え、処置後 10 日目にザンボニ固定液による灌流固定を施し、次いで下顎大白歯相当部を摘出し引き続き同固定液にて浸漬固定を行った。0.1 M リン酸緩衝液にて洗浄後 Plank Rychlo 液にて急速脱灰を行い、30% ショ糖を含む 0.1 M リン酸緩衝液に浸漬した後、約 20~30 μ m の連続凍結切片を作成した。1 次抗体として 4,500 倍希釈抗 CGRP 血清を使用し ABC 法による免疫組織化学染色を施し、歯間部歯周組織の CGRP を含有する神経線維の分布について検索した。なお対照として、下顎第 2 大白歯と第 3 大白歯の間の歯周組織についても同様に連続凍結切片を作成し、ABC 法による免疫組織化学染色を施し検鏡した。

実験結果

PCB 投与群と非投与群との間に著明な差は認められなかったが、それぞれ小窩形成群と小窩非形成群の間に若干の差が観察された。小窩非形成群では、CGRP 様免疫活性を有する神経線維（以下 CGRP 含有神経と略する）は主として接合上皮や歯肉溝上皮下の固有層内の血管周囲に認められ、そこから上皮に向かい上皮直下で神経叢を形成し、さらに接合上皮内に侵入していた（図 1）。また、数は少ないが歯根膜から歯肉まで上行しているものもみられた。一方小窩形成群では、接合上皮内では著変は認められないが、固有層において CGRP 含有神経の数が増加していた（図 2）。また接合上皮の根端側への侵入増殖が著明に見られる場合は、上皮底部から根端側にかけて GRP 含有神経が集束している所見も得られた（図 3）。

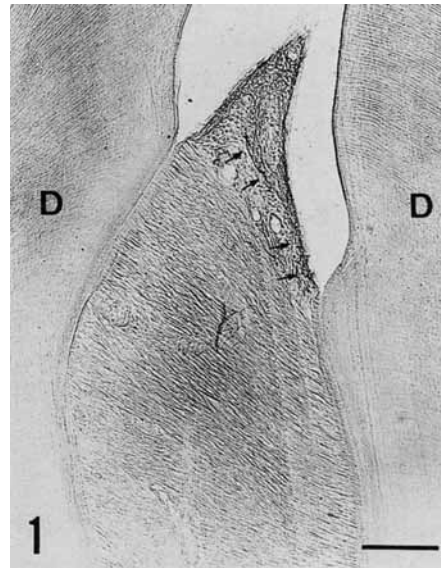


図 1 小窩非形成群（PCB 投与群）
上皮下固有層および接合上皮内に CGRP 含有神経（↑）が認められる。
D：象牙質
（スケールは 100 μ m を示す、 $\times 120$ ）

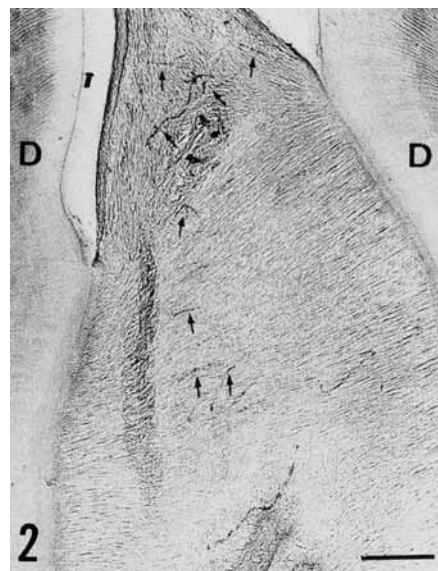


図 2 小窩形成群（PCB 投与群）
固有層において CGRP 含有神経（↑）の数が増加している。
D：象牙質
（スケールは 100 μ m を示す、 $\times 120$ ）

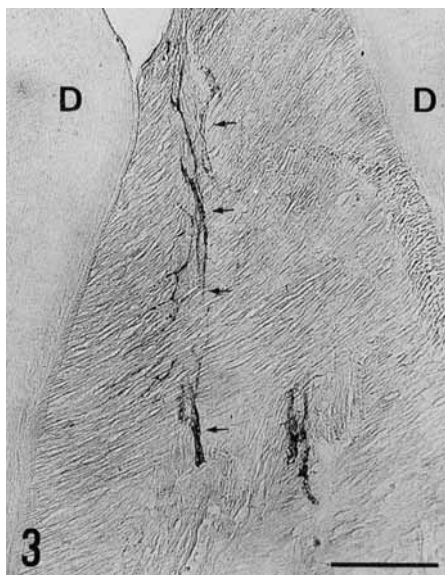


図3 小窩形成群 (PCB 投与群)
根端側に増殖した接合上皮底部より歯根膜にかけて CGRP 含有神経 (↑) が集束している。
D: 象牙質
(スケールは 100 μ m を示す, $\times 170$)

考 察

サルやマウスの PCB 中毒実験では末梢神経には異常は認められないという報告が多い¹³⁾¹⁴⁾。しかしながら、初期油症患者においては知覚神経伝導速度の低下が報告されており⁷⁾、また PenCB 投与ビーグル犬歯肉において神経終末の変性によると思われる変化も観察されている⁹⁾。

ところで近年、末梢神経が種々の神経ペプチドを放出することで組織の修復や炎症反応に重要な役割を担っていることが次第に明らかになってきている⁹⁾。神経ペプチドの一つである CGRP は中枢神経系と末梢神経系のどちらにも存在し、歯肉においても Substance-P (以下 SP と略する) などの tachykinin と共存していることが多いと報告されている⁹⁾。今回小窩形成群の臨床的に正常な歯間部歯肉においては、CGRP 含有神経は数は少ないものの頰側や舌側の歯肉と同様の分布傾向を示した。すなわち、主として接合上皮内や接合上皮直下固有層に見られ、深部固有層には少なかった。一般には、CGRP 含有神経は主として痛覚などの伝達に関与している一次知覚神経であると同時に、血管系にも広く分布し血流の調節にも関与

していると考えられる²⁾。接合上皮は外来の刺激を直接受ける部位であり、また接合上皮直下固有層には豊富な微細血管網が形成されていることより、このような分布を呈していると思われる。一方、小窩形成群においては若干の CGRP 含有神経の数の増加が認められた。前回われわれは、浅い小窩形成後 10 日目に上皮層の破壊や接合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ることを報告した⁴⁾。窩洞形成による歯髄への軽微な催炎性刺激により CGRP 含有神経が多量に芽発することを Taylor ら¹²⁾ が報告しているが、今回の実験においても同様の機序によって CGRP 含有神経の数の増加が生じたと考えられる。CGRP は、血管の拡張や透過性の抗進作用および多型核白血球や肥満細胞などの炎症性細胞を活性化する作用を持ち⁹⁾、いわゆる neurogenic-inflammation を惹起する。同時に、CGRP は血管内皮細胞の増殖や線維芽細胞の増殖作用を持ち、慢性炎症の進展にも深く関与していると考えられる⁹⁾。さらに、CGRP は神経節細胞における SP の分泌を促し、また SP-endorphinase を抑制することで SP の分解を抑制する⁹⁾。SP も CGRP と同様に neurogenic-inflammation を強く惹起させるペプチドであり⁹⁾、加えて in vitro で keratinocyte の増殖を促進することが明らかになっている¹¹⁾。末梢神経に受容されたプロスタグランジンやブラジキニンなどの炎症物質や侵害刺激の一部は、軸索反射によって逆行性に伝わり、神経終末から CGRP や SP が遊離するといわれている⁸⁾。その結果、軸索反射による neurogenic-inflammation はいわゆる悪循環を形成し、炎症を歯周組織全体に広げることで歯周炎の進展に深く関与していると考えられる。

ところで PenCB 投与ビーグル犬においては神経の変性像が観察され報告されているが、今回のわれわれの実験結果では PCB 投与群と非投与群との間に著明な差は認められなかった。この原因として、投与薬剤や種の違いあるいは炎症が非常に軽微であることなどがあげられるが、その詳細は不明である。今後、種々の薬剤を投与し、また深い小窩形成や歯冠部の結紮などの処置を行うと同時に実験期間を延長し、歯周炎の発症や進展に及ぼす PCB の作用について検索を行う予定である。

総 括

実験的歯周炎を惹起させた PCB 投与ラットの歯周

組織の CGRP 含有神経の分布を検索した。

①炎症反応の進展にともない CGRP 含有神経の数が増加した。

② PCB 投与群と非投与群との間に著明な差は認められなかった。

稿を終えるにあたり、本実験に使用した KC-400+PCDF を快く御供与下さいました第一薬科大学増田義人教授に深謝致します。

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 (第一報), 福岡医誌. 76: 248~252, 1985.
- 2) Gibbins IL, Furness JB, Costa M, MacIntyre I, Hillyard CJ and Girgis S: Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs, *Neurosci. Lett.* 57: 125~130, 1985.
- 3) 橋口勇, 赤峰昭文, 原宜興, 前田勝正, 鳥谷芳和, 青野正男, 福山宏, 奥村英彦: PenCB 投与ビーグル犬歯肉の組織学的観察, 福岡医誌. 80: 263~268, 1989.
- 4) 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: 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, 福岡医誌. 82: 256~261, 1991.
- 5) Ishida YA and Tohyama M: Calcitonin gene-related peptide in the nervous tissue, *Prog. Neurobiol.* 33: 335~386, 1989.
- 6) 糸田川徳則: ラット硬口蓋粘膜と歯肉に分布する神経に関する免疫組織化学的研究 1: 各種ペプチド含有神経の分布について, 阪大歯学誌. 35: 78~92, 1990.
- 7) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司: 油症患者における神経学的所見, 福岡医誌. 60: 462~463, 1969.
- 8) Lundberg JM and Saria A: Calcitonin induced desensitization of air way mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants, *Nature.* 302: 251~253, 1983.
- 9) Payan DG, McGillis JP, Renold FK, Mitsuhashi M and Goetzl EJ: Neuropeptide modulation of leukocyte function, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 496: 182~191, 1987.
- 10) Tamura T, Miyaura C, Owan I and Suda T: Mechanism of action of amylin in bone, *J. Cell. Physiol.* 153: 6~14, 1992.
- 11) Tanaka K, Danno K, Ikai K and Imamura S: Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 90: 399~401, 1988.
- 12) Taylor PE, Byers ME and Redd PE: Sprouting of CGRP nerve fibers in response to dentin injury in rat molars, *Brain Res.* 461: 371~376, 1988.
- 13) 山元寅男, 西嶋壮夫, 今山修平, 藤田守: PCB が肝臓, 肺, 末梢神経に及ぼす影響に関する電子顕微鏡的研究, 福岡医誌. 70: 121~134, 1979.
- 14) 吉原新一ほか: サルの PCB 中毒症に関する予備的研究, 福岡医誌. 70: 135~171, 1979.

油症患者血液中 PCDF の濃度推移

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・斎 藤 秀 美

Health and Welfare Canada

John Jake RYAN

Change of PCDF Concentrations in the Blood of Yusho Patients in Recent Ten Years

Yoshito MASUDA, Hiroaki KUROKI,
Koichi HARAGUCHI and Hidemi SAITO

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815

John Jake RYAN

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

The blood of 16 Yusho patients sampled from 1982 (14 years after the incident) to 1992 were analyzed for congeners of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) by high resolution gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection, respectively. Biological half-lives of PCDFs and PCBs were estimated by following the change of blood concentrations of the Yusho patients in the equation of 1-compartment model. The biological half-lives of 2, 3, 4, 7, 8-penta-CDF and 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexa-CDF in 8 individuals varied from 6.0 to 76 years with median 11.7 years and from 4.8 to 26.5 years with median 7.0 years, respectively. The half-lives of 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-hepta-CDF in 4 individuals varied from 2.1 to 15 years. Concentrations of PCBs in 13 individuals were estimated to be slowly decreased and increased with several years half-life in about half-and-half numbers.

は じ め に

1968年西日本においてポリ塩化ビフェニール(PCB), ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)およびポリ塩化クオターフェニー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のが油症事件である¹⁾¹⁵⁾²¹⁾。患者は、塩素座そうを主訴とする特異な慢性症状を示し⁶⁾, 20年以上経過した現在でも症状が残っている。事件後数年を経過した時に油症患者の脂肪組織や肝臓に残留するPCBおよびPCDF異性体の濃度が分析された³⁾⁷⁾⁸⁾¹⁴⁾²⁰⁾。それにより、特定の構造のPCBやPCDFはかなり長期間体内に残留することが分かった。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や濃度が油症の診断基準の1つになっている¹⁹⁾

で、一斉検診の時などでよく調べられている。福岡県の油症患者の血液中PCBの濃度およびパターンは、最近にいたるまであまり変化なく推移している⁴⁾。福岡の油症患者の血液については、その中のPCDF異性体の濃度測定分析がされており²⁾⁹⁾, PCDFは微量ながら血液にも存在することが認められた。しかし、血液中PCDFの経時的な濃度変化については調べられていない。台湾のPCB中毒は1979年に発生した。当時の患者血液中PCDF濃度が高い状態から約10年間の濃度減衰の状態が調べられ、PCDF異性体の体内半減期が2.14~2.56年であることが推定できた¹⁰⁾。第一薬科大学の実験室に1982年頃から油症患者の血液が冷凍保存されているものがあつた。それらの試料について、最近の進歩したガスクロマトグラフ・質量分析法

を用いて、PCDF 濃度を測定することができた。そのデータを解析することにより、この 10 年間の患者血液中の PCDF 濃度の変化を知ることができた。同じ試料で PCB 濃度が分析されているものについては、PCB 濃度の変化の状態も調べた。ここにその結果を報告し、人体における PCDF および PCB 異性体の長期間の濃度変化を推定する。

実験方法

1. 患者血液

福岡の認定油症患者 16 名（1993 年現在 55～94 才、女 11 名、男 5 名）の血液は 1982～1991 年の油症一斉検診の時に採取された。それらは分析されるまで冷凍保存された。

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¹³C-PCDD と³⁷C 1-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 およ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、フラスコで減圧下約 50 ml になるまで濃縮し、少量の無水流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、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 5～10 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、または珪酸セシウム 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、さらに 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 およびトルエン 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 および¹³C-2,2',4,5,5'-penta-CB の各 5 pg/ μ l トルエン溶液 3～5 μ l 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）または、CP-Si 188 極性シアノプロピルのキャピラリーカラム（0.20 mm \times 50 m）を直接二重集束質量分析計（VG Analytical-7070 EQ）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 および PCB では¹²C-および¹³C-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¹²C-の最も大きい 2 つの分子イオンと³⁷C 1-の最も大きい分子イオンを使用した。PCDD および PCDF の濃度は試料の PCDD、PCDF イオンと¹²C-または³⁷C 1-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¹²C-または³⁷C 1-PCDD、PCDF（5 pg/ μ l）に標準 PCDD、PCDF を階段濃度 0.1～25 pg/ μ l になるように加えた溶液の分析で求めた比較応答ファクターおよび秤量した試料量で除して求めた。平面 PCB の濃度は¹³C-PCB のイオンを用い、これと同様に求めた。

(2) PCB の分析

患者の血液約 2～3 g を秤量し、試験管にとり、これに水を加えて 3 ml とし、エタノール 3 ml、水酸化ナトリウム 0.3 g を加えよく振り混ぜ、さらに内標準物質として 2,3,4,5,6,2',5'-Hepta-CB を 5 ng 添加し、65°C 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、無水流酸ナトリウムで乾燥したのち、活性化したシリカゲル（ワコーゲル S-1、140°C 3 時間）0.5 g のカラムクロマトグラフィーにかけた。カラムはヘキサン 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°C

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-9 A 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 CBP 1, 0.2 mm×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°C で 2 分間保持し, 15°C/min の割合で 280°C まで昇温し, その後一定に保った。注入口温度は 300°C 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-G 9 (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-R 3 A (島津) で面積測定および計算をした。

結 果

1. PCDF

分析に用いられた血液 60 検体の平均重量は 5.5 g であり, これらの検体から抽出された脂質重量は平均 16.0 mg であった。これら血液中の脂質量は 0.2 ~ 0.43 % の範囲で, 平均 0.29 % であった。したがって, この血液における PCDF の検出限界は, 脂質ベースで 0.1 ~ 0.15 ppb である。

測定された油症患者血液中の 2,3,4,7,8-penta-CDF および 1,2,3,4,7,8-hexa-CDF の脂質量当たり濃度を Table 1 に示す。2,3,4,7,8-penta-CDF の濃度範囲は 0.49 ~ 4.92 ppb であり, 1,2,3,4,7,8-hexa-CDF は 0.22 ~ 5.20 ppb であった。また,

Table 1 Concentrations and half-lives of PCDFs in the blood of Yusho patients

Sampling year	Yusho patient														
	AT	CM	HH	HM	HY	KAK	KK	MNS	MT	MY	SM	TH	TRM	TS	UT YUM
Concentration of 2, 3, 4, 7, 8-Penta-CDF in blood (Lipid basis, ppb)															
1982	2.17				1.47				1.87	1.46		2.35		1.42	0.94 3.61
1983	1.62		3.45				2.46	1.28			3.00		0.67		1.04 3.57
1985		4.92		0.82		0.79	2.23					1.60		1.09	
1986		4.23													1.95
1987	1.14		2.06			0.42	1.76	1.27				1.53		1.07	0.85
1988	1.11	4.19	1.86	0.49	0.90		2.50	1.10		0.89	2.22		0.38		0.69 1.45
1989			1.94				3.04	2.88	1.14			1.56		0.92	1.92
1990			2.54				2.48					1.07		0.76	1.38
1991			1.93				1.73							0.95	1.31
Half-life (Year) of 2, 3, 4, 7, 8-Penta-CDF															
Lipid basis	6.75	14.76	11.46	3.86	8.58	2.18	75.98	-9.08	9.89	8.41	11.78	8.84	6.17	11.89	13.56 5.98
Whole basis	10.89	7.01	10.38	6.36	12.66	3.47	32.43	-5.29	13.63	8.70	10.57	30.52	5.44	15.56	32.88 6.74
Concentration of 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexa-CDF in blood (Lipid basis, ppb)															
1982	1.87				1.21				2.46	1.24		1.65		1.04	0.95 5.20
1983	1.35		2.30				2.55	1.53			2.75		0.57		0.97 4.40
1985		3.93		0.61		0.39	2.10					0.97		0.70	
1986		3.06													2.69
1987	0.88		1.42			0.22	1.51	1.29				0.83		0.65	0.62
1988	0.94	3.05	1.29	0.36	0.50		2.27	1.10		0.62	2.28		0.33		0.55 1.48
1989			1.24				2.48	2.82	1.53			0.82		0.49	2.08
1990			1.54				2.05					0.65		0.43	1.39
1991			1.28				1.68							0.34	1.52
Half-life (Year) of 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexa-CDF															
Lipid basis	6.25	9.47	10.31	3.94	4.68	2.35	26.52	-16.25	10.30	6.00	18.92	6.66	6.33	6.00	7.24 4.76
Whole basis	7.81	5.45	10.03	5.76	5.72	3.95	20.26	-7.24	14.38	6.19	16.15	8.77	5.50	5.96	10.56 5.38

1,2,3,4,6,7,8-hepta-CDF の濃度範囲は不検出から 0.71 ppb であった。同一患者における血液中 PCDF の濃度減少を 1-コンパートメントモデルで計算し、半減期を求めた。脂質当たりの濃度および全量当たりの濃度を用いて計算した各患者の血液中半減期を Table 1 に示す。半減期の範囲は、脂質当たり濃度で計算した場合、2,3,4,7,8-penta-CDF は 2.18～9.08 年、1,2,3,4,7,8-hexa-CDF は 2.35～16.25 年であった。また、1,2,3,4,6,7,8-hepta-CDF では 2.1～15.0 年であった。一例 (MNS) を除き 15 名の患者は半減期 2～76 年で血液中 PCDF 濃度が減少していたことになる。同じ患者の血液で 2 回しか測定されていない場合および血液中濃度が上昇し、半減期がマイナスで計算された場合は 1 回の測定値が半減期の値に大きく影響しているの、それで計算された半減期は正しい値を示していないことがあると考えられる。それらの場合を除いた、3 回以上測定された 8 例の脂質ベースの半減期は 2,3,4,7,8-penta-CDF では 6.0～76.0 年の範囲で、中央値 11.7 年、1,2,3,4,7,8-hexa-CDF では 4.8～26.5 年の範囲で、中央値 7.0 年である。また、1,2,3,4,6,7,8-hepta-CDF の半減期は 4 例で 2.1～15.0 年の範囲であった。

2. PCB

患者 16 例から 1982～1992 年の間に採血された 57

検体について PCB が分析された。その全血中平均濃度と標準偏差は 2,4,5,3',4'-penta-CB 0.23 ± 0.16 ppb, 2,4,5,2',4',5'-hexa-CB 2.8 ± 1.3 ppb, 2,3,4,5,3',4'-hexa-CB 0.93 ± 0.7 ppb, 全 PCB 7.7 ± 3.1 ppb であった。これらの患者の血液中 PCB 濃度は 1983 年および 1984 年に測定された患者の平均 PCB 濃度¹¹⁾ より 2 倍以上高かった。PCB 異性体の濃度比は 2,4,5,3',4'-penta-CB/2,4,5,2',4',5'-hexa-CB 8.3%, 2,3,4,5,3',4'-hexa-CB/2,4,5,2',4',5'-hexa-CB 33.3% であり、油症に特異的な PCB パターンを示している。

1982～1992 年の間に血液が採取され、2 回以上 PCB が分析されている 13 例の油症患者の PCB 濃度の最高値と最低値を Table 2 に示す。また、同一患者における血液中濃度の変化を 1-コンパートメントモデルで計算した半減期も Table 2 に示す。患者血液中 PCB 濃度の半減期の範囲は 2,4,5,3',4'-penta-CB 2.5～6.2 年、2,4,5,2',4',5'-hexa-CB 2.8～6.2 年、2,3,4,5,3',4'-hexa-CB 2.7～11.4 年、全 PCB 3.3～4.8 年であり、いずれも PCB 濃度は半減期が数年から数十年単位でゆっくり減少または増加していることになる。13 例の患者のうち血液中 PCB 濃度が減少していると計算されたもの (半減期+) 7 例、増加していると計算されたもの (半減期-) 6 例で、ほ

Table 2 Maximum and minimum concentrations of PCBs in the blood of Yusho patients from 1982 to 1992 and biological half-lives

Yusho patients													
	AT	CM	HH	HM	KAK	KK	MNS	MT	MY	TH	TS	UT	YUM
Concentration of 2,4,5,3',4'-Penta-CB in blood (Whole basis, ppb)													
Maximum conc.	0.60	0.49	0.66	0.38	0.12	0.26	0.17	0.18	0.12	0.22	0.35	0.86	0.13
Minimum conc.	0.15	0.29	0.15	0.22	0.10	0.12	0.11	0.15	0.07	0.02	0.11	0.16	0.09
Half-life (Year)	2.69	16.32	40.78	2.53	-7.50	-31.54	11.21	-12.37	-7.74	-6.21	10.97	2.58	7.66
Concentration of 2,4,5,2',4',5'-Hexa-CB in blood (Whole basis, ppb)													
Maximum conc.	3.38	5.28	4.96	2.73	2.19	4.86	2.62	2.80	1.40	3.41	3.95	2.73	7.29
Minimum conc.	2.27	2.62	1.76	0.87	1.94	1.69	2.12	1.13	1.04	0.85	1.54	2.09	1.75
Half-life (Year)	12.17	2.75	15.70	-1.21	-11.29	-77.00	-34.03	4.36	-14.03	-8.02	-18.40	22.73	-2.09
Concentration of 2,3,4,5,3',4'-Hexa-CB in blood (Whole basis, ppb)													
Maximum conc.	1.08	1.54	1.69	0.43	0.38	2.24	0.96	0.49	0.94	0.97	2.64	0.80	4.12
Minimum conc.	0.58	0.64	0.59	0.38	0.36	0.66	0.50	0.35	0.37	0.42	0.25	0.50	1.79
Half-life (Year)	7.89	2.65	-1135.62	11.18	-25.31	59.54	-22.29	-28.63	4.47	84.42	-11.75	12.75	-11.37
Concentration of total PCBs in blood (Whole basis, ppb)													
Maximum conc.	9.65	12.26	11.92	6.60	5.74	11.67	6.60	5.39	6.40	7.00	11.04	8.19	16.14
Minimum conc.	5.90	6.72	7.29	4.94	4.18	6.16	4.79	4.38	3.64	4.45	3.78	4.92	10.98
Half-life (Year)	9.41	3.25	39.04	-4.77	-9.50	-356.72	336.33	30.63	7.39	-387.70	-113.08	9.91	-6.88

ば半数ずつである。全例を平均してみると、血液中 PCB 濃度はこの十年間でほとんど変化していないと考えられる。

平面 PCB の濃度は測定されたほとんどの血液において検出限界以下であり、濃度を示すことができなかった。しかし、血液中 PCB 濃度が高かった患者 (YUM) では 3,4,5,3',4',5'-hexa-CB の濃度を 4 回測定できたので、その状態を Fig. 1 に示す。この患者の 3,4,5,3',4',5'-hexa-CB の血液中半減期は 10.4 年と計算された。Fig. 1 には、同じ患者の PCDF 異性体の濃度変化も示している。Fig. 1 によると、ここに示した 4 種の PCDF および PCB 異性体は、いずれも、最初に測定された時から約 6 年間 (2200 日) は、片対数グラフで直線的に濃度が減少しているが、その後も測定されている 2 種の PCDF 異性体では、その後の濃度減少が以前のようにはっきりとは現れていない。

考 察

油症患者血液中の PCDF 濃度を経時的に測定して、人体における PCDF の生体半減期を求めることができた。台湾の PCB 中毒患者の血液を用いて PCDF の濃度がもっとも高い場合の PCDF の減少状態は調べられている¹⁰⁾。ビルの PCB 火災で生じたススを清掃した作業者の脂肪組織に残留している PCDF が分析され、その濃度変化が調べられた¹⁸⁾。2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-tetra-CDD) については、ベトナム退役軍人の血液中濃度を調べるこ

とで、その体内半減期が求められた¹²⁾。また、トリチウム標識の 2,3,7,8-tetra-CDD を直接摂取することで、その人体内の蓄積、排泄の状態が調べられた¹⁷⁾。これらのデータを Table 3 にまとめた。この表によると、2,3,7,8-tetra-CDD および PCDFs の人体における半減期は 2~12 年で、ラットなどげっし類における 2,3,7,8-tetra-CDD の体内半減期 11~94 日¹⁾と比較すると非常に長い。猿における 2,3,7,8-tetra-CDD の半減期は 1 年¹⁾で、比較的長い。人体における半減期より短い。Table 3 に示されたものの体内半減期は台湾の PCB 中毒患者のように、PCDF 濃度が高い場合は半減期が割合に短い。油症などのようにその濃度が低くなってくると半減期は 5 年以上と、長くなっている。これは人体内の PCDF 等の濃度が低くなってくると、普通の人が食事などを通じてわずかなずつ PCDF を摂取して、一定濃度で体内に蓄積している濃度に近づくためと考えられる。Kiesel らは人体に残留している 2,3,7,8-tetra-CDD の濃度減少の状態を薬物動態モデルで計算して、脂質重量当たりの濃度が 100, 30 および 10 ppt となった場合、その生体内半減期はそれぞれ 4.4, 5.9 および 20 年となるとしている⁵⁾。初期濃度が低くなると 2,3,7,8-tetra-CDD の生体半減期はだんだん長くなるということで、ここで求められた台湾および福岡の PCB 中毒患者における PCDF の体内半減期の違いの説明にもなる。Table 3 に示している油症患者の PCDF 濃度は一般人の約 50 倍高い濃度である²⁾が、台湾 PCB 中毒患者のそれは一

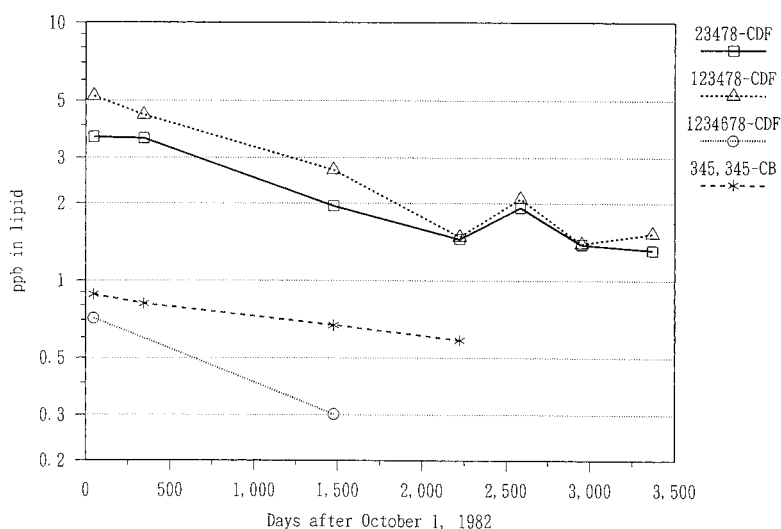


Fig. 1 Elimination of PCDFs and PCB in the blood of a Yusho patient (YUM)

Table 3 Biological half-lives of 2, 3, 7, 8-tetra-CDD and PCDFs in human

	Half-life (Year)	Level in lipid (ppb)	Period examined (Year)	Comment
2, 3, 7, 8-tetra-CDD	5.8	0.003	0.4	³ H-TCDD ingestion ¹⁷⁾
	7.1	0.1	5	Vietnam veteran ¹²⁾
2, 3, 4, 7, 8-penta-CDF	2.14	15.4	8.6	Yu-cheng ¹⁰⁾
	11.7	2.7	9	Yusho
	6.5	0.08	2.3	PCB fire ¹⁸⁾
1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexa-CDF	2.56	37.7	8.6	Yu-cheng ¹⁰⁾
	7.0	2.4	9	Yusho
	3.0	0.14	2.3	PCB fire ¹⁸⁾
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-hepta-CDF	2.32	4.8	8.6	Yu-cheng ¹⁰⁾
	7.7	0.05	2.3	PCB fire ¹⁸⁾

般人の約 500 倍も高かった。

油症患者の血液のうちで初回に測定されたものの全 PCB 濃度の平均は 7.4 ppb であり、この値は、1983 年に測定された一般人血液の全 PCB 濃度の 10 倍であった¹¹⁾。このように油症患者と一般人の PCB 濃度差が PCDF の場合より小さいことが患者体内における PCB の半減期がはっきりと求められなかった原因の 1 つだと考えられる。一般人の 300 倍も PCB 濃度が高かった台湾の PCB 中毒患者では、その半減期がはっきりと計算されている¹⁰⁾。

総 括

油症発生から 14 年経過した 1982 年から 1992 年にかけて、油症患者 16 例より 2 回から 7 回血液を採取し、その中に含まれる PCDF を高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析装置で分析した。その濃度より PCDF の生体半減期を求めた。これらの血液試料のうち、PCB 濃度をガスクロマトグラフ/電子捕獲検出器で測定されているものについては、その濃度より体内 PCB の減少状態を調べた。

1. 患者 16 例における 2,3,4,7,8-penta-CDF の半減期は 2.18～9.08 年の範囲であった。そのうち、3 回以上測定されより正確な値が求められている 8 例の患者では、半減期は 6.0～76 年の範囲であり、中央値は 11.7 年であった。

2. 同じ患者 8 例における 1,2,3,4,7,8-hexa-CDF の半減期は 4.8～26.5 年の範囲で、中央値は 7.0 年であった。

3. 患者 4 例における 1,2,3,4,6,7,8-hepta-CDF の半減期は 2.1～15 年の範囲であった。

4. 2 回以上 PCB が測定された患者 13 例における

PCB の半減期は 3.3～4.8 年の範囲であり、PCB 濃度がゆっくり減少または増加していると計算されたものがほぼ同じ例数であった。

文 献

- 1) Hayes, Jr. W J and Laws, Jr. E R: Classes of pesticides, Handbook of Pesticide Toxicology Vol 3, Academic Press, San Diego, 1991.
- 2) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Nakagawa R, Takenaka S, Morita K, Narazaki Y, Fukamachi K, Takahashi K and Yoshimura H: Levels of polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in the blood of Yusho patients and normal subjects. Toxicol. Environ. Chem. 35, 17-24, 1992.
- 3) 飯田隆雄, 中川礼子, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克己: 油症患者および健康者の皮下脂肪組織中の Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFS). 福岡医誌 85: 296-301, 1989.
- 4) 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.
- 5) Kiesel J G and Robarge G M: Assessing the elimination of 2,3,7,8-TCDD from humans with a physiologically based pharmacokinetic model. Chemosphere 17, 2017-2027, 1988.
- 6) Kuratsune M: Yusho, with reference to Yu-Cheng. In Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products (Kimbrough and Jensen eds, pp 381-400, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1989).
- 7) 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.
- 8) Kuroki H and Masuda Y: Determination of

polychlorinated dibenzofurans isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 7 : 771-777, 1978.

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

10) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一, Ryan J J, 許書刀: 台湾 PCB 中毒患者の血液中 PCDF 及び PCB の濃度減衰, 福岡医誌 82, 262-268, 1991.

11) 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.

12) Michalek J E, Trioathi R C, Caudill S P and Pirkle J L: Investigation of TCDD half-life heterogeneity in veterans of operation Ranch Hand. *J. Toxicol. Environ. Health* 35, 29-38, 1992.

13) 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.

14) 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.

15) 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.

16) 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.

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

18) Schecter A and Ryan J J: Blood and adipose tissue levels of PCDDs/PCDFs over three years in a patient after exposure to polychlorinated dioxins and dibenzofurans. *Chemosphere* 18, 635-642, 1989.

19) 杉山浩太郎: 序言, 福岡医誌 68 : 93-95, 1977.

20) 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. *Toxicol. Environ. Chem.* 34, 215-231, 1989.

21) 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 中毒ミンクの体内に残留するメチルスルホン代謝物

——その構造と由来について——

第一薬科大学物理分析学教室

原 口 浩 一・黒 木 広 明

斎 藤 秀 美・増 田 義 人

ストックホルム大学

Åke BERGMAN

PCB Methylsulfone Accumulated in Muscle
of Mink Dosed with PCB (Clophen A50)

Koichi HARAGUCHI, Hiroaki KUROKI,

Hidemi SAITO and Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815, Japan

Åke BERGMAN

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

Abstract The structural requirements of the parent PCBs for the formation of the retained PCB methylsulfones (MeSO₂-CBs) were investigated in mink (*Mustela vison*) exposed to PCB (Clophen A50). Muscle was analyzed for the MeSO₂-CBs, which were determined by comparison of synthesized reference compounds. Major unmetabolized CBs such as 2, 4, 5, 2', 4'-pentaCB, 2, 4, 5, 2', 3', 4'-hexaCB, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexaCB and 2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'-heptaCB were determined in high concentrations in the mink muscle. All these PCBs are substituted in the 2, 4, 5-positions of at least one of the phenyl rings. On the other hand, CBs with free meta/para-positions were readily metabolized. Thus, at least 25 MeSO₂-CBs were detected at concentration of 16 µg/g in extracted lipids from the muscle, corresponding to one tenth of PCB levels. Most of the methyl sulfone metabolites were 3- and 4-MeSO₂-CB isomers of PCBs known to be rapidly metabolized, e. g. 2, 4, 2', 5'-tetraCB, 2, 3, 6, 4'-tetraCB, 2, 5, 3', 4'-tetraCB, 2, 4, 5, 2', 5'-pentaCB, 2, 3, 4, 2', 5'-pentaCB, 2, 3, 6, 3', 4'-pentaCB, 2, 3, 6, 2', 4', 5'-hexaCB and 2, 3, 6, 2', 3', 4'-hexaCB. 3-MeSO₂-2, 5, 2', 5'-tetraCB and 3-MeSO₂-2, 5, 6, 2', 5'-pentaCB were also found to be retained in the muscle, but their isomeric 4-MeSO₂-CBs were not detected. Both the 3- and 4-MeSO₂-2, 5, 6, 2', 4', 5'-hexaCB isomers were identified in the muscle extracts while no MeSO₂-CB metabolite originating from 2, 3, 2', 4', 5'-pentaCB were detected in the muscle. These results show the PCBs with at least one phenyl ring with 2, 5-dichloro- and 2, 3, 6-trichloro-substitution are strongly favored and may be considered a criterion for the formation of MeSO₂-CBs accumulated in mink muscle. These observations are in accordance with MeSO₂-CBs detected also in other mammals.

は じ め に

油症の原因物質の一つとして知られる polychlorinated biphenyl (PCB) は世界的な環境汚染物質である。近年、北海やバルト海では哺乳動物の固体数の減

少が著しく、この主な原因は PCB 汚染によるとされている⁹⁾。1976 年、アザラシの脂肪組織から PCB の他に高濃度の PCB メチルスルホン (MeSO₂-CB) が検出されて以来¹²⁾、この含硫代謝物の残留性が注目されてきた。PCB の代謝様式は水酸化反応と含硫黄代謝反

応に大別されるが、メルカプツール酸経路¹⁾、腸肝循環によって生成する MeSO₂-CB は高い脂溶性を示し、ある特定の組織に選択的に取り込まれ、長期にわたって貯留することが知られている³⁾⁷⁾。以前、当教室では油症患者の組織から MeSO₂-CB を検出し、これが環境中にも広く分布していることを明らかにした¹⁰⁾。最近では、北欧のアザラシ、カワウソ、ミンク、カナダの北極グマの体内に、多数の MeSO₂-CB が高濃度で蓄積していることから、その構造を推定した⁴⁾⁵⁾⁸⁾が、この代謝物の由来については十分な情報が得られていない。本研究では生体内に残留している MeSO₂-CB の構造とその母化合物との関係を明確にするために Clophen A50 (ドイツの PCB 製品) をミンクに投与し、筋肉組織に残留する PCB および MeSO₂-CB の定性、定量を試み、両者を比較した。

実 験 方 法

1 材料

雌ミンク (*Mustela vison*) 10 匹に Clophen A50 を毎日 2 mg 餌に混せて 3 カ月間投与し、投与後 5 日目に屠殺した。筋肉組織を摘出し、各ミンクからそれぞれ 3 g を取り、合わせて 30 g を分析試料とした。

2 試薬

PCB および MeSO₂-CB の標準物質は従来の方法⁹⁾¹⁶⁾で合成した。内標準物質には PCB 分析のために 2, 3, 4, 5, 3', 4', 5'-heptaCB を、MeSO₂-CB 分析のために 3-SO₂CH₃-4-CH₃-5, 2', 3', 4', 5'-pentaCB (いずれも合成) を用いた。溶媒はすべて残留農薬試験用または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

3 分離、精製法

試料の前処理は前報²⁾¹¹⁾と同様に行った。組織 (30 g) を細切りにし、アセトン：ヘキサン (1:4) 50 ml を加え、Ultra-Turrax homogenizor (model 18/10, Janke & Kunkel, IKA-Werk) でホモジナイズし、3 回抽出を繰り返した。抽出液を濃縮した後、脂肪量を測定し、内標準物質 3-SO₂CH₃-4-CH₃-5, 2', 3', 4', 5'-pentaCB を脂肪ベースで 1 ppm になるように加えた後、ヘキサンを加えて 100 ml とした。次にフェノール性代謝物や酸性物質を除去するために水酸化カリウム (0.5 M, 5 ml) およびエタノール (95%, 2 ml) の水溶液を加えて振盪し、アルカリ溶液を分離した。次にこのヘキサン溶液に無水ジメチルスルホキシド (DMSO) 3 ml を加えて 3 回抽出することにより、PCB (ヘキサン層) と MeSO₂-CB (DMSO 層) を分離した。ヘキサン溶液には内標準として 2, 3, 4, 5, 3', 4', 5'-

heptaCB を加え、そのまま ECD/GC で分析した。一方、DMSO 抽出液は同量の水で希釈した後、メチル-tert-ブチルエーテル：ヘキサン (1:9, 15 ml) で 3 回抽出した。この抽出液は一度濃縮乾固した後、残渣に濃硫酸 5 ml を加えて溶かし、これを同量の氷水で希釈して、再びヘキサン 10 ml で 3 回抽出した。さらにこの抽出液をアルミナカラム (aluminium oxide, 中性, 活性 I, メルク社) 5 g に添加し、まず 8% ジクロロメタン (DCM) 60 ml で洗浄したあと、DCM 50 ml で目的物を溶出した。この液を GC/MS および GC/ECD 分析の試料とした。

4 定性、定量法

PCB の定性、定量は従来の方法に従った²⁾。MeSO₂-CB の定性は Finnigan 4500 GC/MS (Incos 2400 Data System) を用いて負イオン化化学イオンモード (メタンガス) で行った。分析に用いたカラムは Ultra-2 (50 m x 0.2 mm I. D. Hewlett Packard, USA) で、注入はスプリットレス方式で行い、カラム温度は 70°C (2 min) から 230°C まで 30°C/min で昇温し、つづいて 230°C から 290°C まで 4°C/min で昇温し一定に保った。キャリアガスはヘウムを用いた。各ピークの構造は先に合成した標準物質の内標準物質に対する相対保持時間およびマススペクトルとの比較から推定した。

MeSO₂-CB の定量は ⁶³Ni 電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ (島津 GC-14A, Chromatopac C-R3A) を用い、カラムは DB-5 (60 m x 0.25 mm I. D. J & W Scientific Inc, USA) を用いた。カラムの温度条件は GC/MS と同様であった。検出器温度 310°C, 注入口温度 230°C。定量はそれぞれ同定した MeSO₂-CB 成分のピーク面積を合計し、内標準物質に対する面積比から計算した。MeSO₂-CB 成分の相対量は各ピークの全ピーク面積に対する割合 (%) として表し、Clophen A50 中の成分量は Schultz ら¹⁵⁾の文献値を参考にした。

結 果 と 考 察

1 筋肉組織中の PCB

筋肉組織中に残留する主な PCB 異性体は 2, 4, 5, 2', 4'-pentaCB, 2, 4, 5, 2', 3', 4'-hexaCB, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexaCB, 2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'-heptaCB, 2, 3, 4, 5, 2', 3', 4'-heptaCB など、少なくとも 2, 4, 5 および 4'-位が塩素化されたビフェニル骨格をもつ異性体であった。一方、Clophen A50 の主成分のうち 2, 3, 6, 2', 5'-pentaCB, 2, 4, 5, 2', 5'-pentaCB, 2, 3, 4, 2', 5'-pentaCB, 2, 3, 6, 3', 4'-pentaCB, 2, 5, 3', 4'-tetraCB,

2, 5, 2', 5'-tetraCB などは体内から消失した。これらの構造は meta 位と para 位が共に塩素置換されていない骨格を持っており、体内で速やかに代謝または排泄されたものと思われる。田辺ら¹⁷⁾は Kanechlor をラットに投与した場合、隣接未置換領域を多く含む異性体ほどその生物学的半減期が短いことを明らかにしている。本実験でもそのような傾向が見られ、meta/para 位が未置換の異性体の残留性はきわめて低いことが分かった。

2 筋肉組織中の MeSO₂-CB

Fig. 1 に筋肉組織から抽出した MeSO₂-CB の ECD ガスクロマトグラムを示す。負イオン化 GC/MS による分析の結果、少なくとも 25 種のピークが MeSO₂-CB と同定され、合成した標準物質とマススペクトルおよび保持時間を比較することにより 20 種の成分(ピーク番号 1~20)の構造を推定した。主な成分は 3-MeSO₂-2, 5, 6, 4'-tetraCB, 4-MeSO₂-2, 3, 6, 4'-tetraCB, 3-MeSO₂-2, 5, 2', 4', 5'-pentaCB, 4-MeSO₂-2, 5, 2', 4', 5'-pentaCB, 3-MeSO₂-2, 5, 6, 3', 4'-pentaCB, 4-MeSO₂-2, 3, 6, 3', 4'-pentaCB などいずれも 2, 5-dichloro または 2, 5, 6-trichlorophenyl 骨格を有する CB の 3-または 4-位に MeSO₂-基が導

入された代謝物であった。こうして同じ塩素置換を有する 3-MeSO₂および 4-MeSO₂-誘導体が発見されたことは、これらの代謝物が meta/para 隣接未置換領域をもつ PCB に由来することを示唆している。すなわち、このような PCB が 3, 4-エポキシ化を経由して 3-または 4-位でグルタチオン抱合体となり、チオール化、メチルチオ化つづいて酸化といった一連の代謝反応により、MeSO₂-CB に変換されたと考えられることができる。このような生成経路は Bakke ら¹¹⁾により、2, 4', 5-trichlorobiphenyl をモデル化合物としてよく研究されている。また、水谷らはいくつかの 2, 5-dichlorophenyl 骨格を有する PCB をマウスに投与しその糞から 3-および 4-MeSO₂体を検出している¹³⁾。Table 1 に、Clophen A50 中の母化合物の成分量と投与後体内に残留する 3-および 4-MeSO₂体の相対量(%)を示す。3-MeSO₂-体と 4-MeSO₂-体の生成する割合は各母化合物ごとに異なるが、投与前の Clophen 中の各成分量とそれから代謝、蓄積された MeSO₂-CB の量がよく比例していることがわかる。すなわち、少なくとも 2, 5-dichlorophenyl または 2, 5, 6-trichlorophenyl 骨格を有する CB が MeSO₂-CB の生成にとって必要な構造であることを示している。ただし、このような

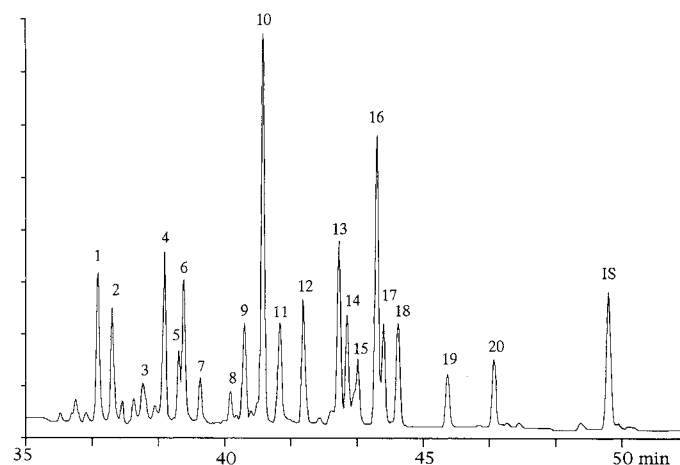


Fig. 1 Gas chromatogram of MeSO₂-CB present in mink muscle after treatment with Clophen A50. Structures identified: peak 1, 3-MeSO₂-2, 5, 2', 5'-tetraCB; 2, 3-MeSO₂-2, 5, 2', 4'-tetraCB; 3, 4-MeSO₂-2, 5, 2', 4'-tetraCB; 4, 3-MeSO₂-2, 5, 6, 4'-tetraCB; 5, 3-MeSO₂-2, 5, 6, 2', 5'-pentaCB; 6, 4-MeSO₂-2, 3, 6, 4'-tetraCB; 7, 3-MeSO₂-2, 5, 6, 2', 4'-pentaCB; 8, 4-MeSO₂-2, 3, 6, 2', 4'-pentaCB; 9, 3-MeSO₂-2, 5, 3', 4'-tetraCB; 10, 3-MeSO₂-2, 5, 2', 4', 5'-pentaCB; 11, 4-MeSO₂-2, 5, 3', 4'-tetraCB; 12, 4-MeSO₂-2, 5, 2', 4', 5'-pentaCB; 13, 3-MeSO₂-2, 5, 2', 3', 4'-pentaCB; 14, 3-MeSO₂-2, 5, 6, 3', 4'-pentaCB; 15, 3-MeSO₂-2, 5, 6, 2', 4', 5'-hexaCB; 16, 4-MeSO₂-2, 3, 6, 3', 4'-pentaCB; 17, 4-MeSO₂-2, 5, 2', 3', 4'-pentaCB; 18, 4-MeSO₂-2, 3, 6, 2', 4', 5'-hexaCB; 19, 3-MeSO₂-2, 5, 6, 2', 3', 4'-hexaCB; 20, 4-MeSO₂-2, 3, 6, 2', 3', 4'-hexaCB. IS, Internal Standard.

Table 1 Relative amount of CBs in Clophen A50 and of MeSO₂-CBs in mink muscle after exposure to this PCB.

Parent CBs	% ¹⁾ in Clophen A50	MeSO ₂ -CB (%) ²⁾ in muscle of mink	
		3-MeSO ₂ -	4-MeSO ₂ -
<u>2,5-Dichlorinated CBs</u>			
2,5,2',4',5'-pentaCB	7.7	18.1	2.8
2,5,2',3',4'-pentaCB	4.2	9.8	4.0
2,5,3',4'-tetraCB	3.8	3.2	3.4
2,5,2',4'-tetraCB	2.0	3.9	1.0
2,5,2',3',5'-pentaCB	1.5	NA	NA
2,5,2',3',5',6'-hexaCB	1.2	NA	NA
2,5,2',3',4',5'-hexaCB	1.0	0.1	0.1
<u>2,3,6-Trichlorinated CBs</u>			
2,5,6,3',4'-pentaCB	6.3	4.0	15.4
2,5,6,2',4',5'-hexaCB	4.5	1.5	2.9
2,5,6,2',3',4'-hexaCB	2.6	1.3	1.9
2,3,6,2',3',5'-hexaCB	1.6	NA	NA
2,3,6,2',4'-pentaCB	0.9	1.1	0.9
2,3,6,4'-tetraCB	0.7	6.3	5.8
<u>2,5-or 2,3-Dichlorinated and 2,3,6-trichlorinated CBs</u>			
2,3,6,2',5'-pentaCB	6.0	2.5	ND
2,5,2',5'-tetraCB	5.5	5.5	ND
2,5,5',6'-tetraCB	2.5	ND	ND
Total amount	46	57.2	38.2

1) ref 15)

2) relative amount (%) according to peak area in Fig. 1

NA=not analyzed, ND=not detected

骨格を2つ有する2,5,2',5'-tetraCBや2,5,6,2',5'-pentaCBからは3-MeSO₂-CBのみが検出された。さらに2,3-dichlorophenyl骨格を有する2,3,2',5'-tetraCBや2,3,2',4',5'-pentaCBから期待されるMeSO₂-CBは検出できなかった。こうしてみるとMeSO₂-CB生成に要求される母化合物の構造はかなり限定されるように思われる。筋肉組織中の残留成分の濃度を比較すると、PCBが180 µg/gであるのに対し、MeSO₂-CBのは16 µg/gであった。このMeSO₂-CBのPCBに対する残留比はアザラシなどの哺乳動物で得られた結果⁶⁾とほぼ一致した。以上の結果を総括すると、PCBのうち少なくとも2,4,5,および4'位が塩素化された異性体、すなわちmeta/para位に隣接未置換領域を持たない異性体は体内に長く滞留する。一方、それ以外の異性体は残留性が低く、速やかに代謝、排泄されるが、そのなかで2,5-または2,5,6-位に塩素

置換を有するPCBは3-または4-MeSO₂-CBとして再び体内に蓄積すると考えられる。Clophen A50はKanechlor 500に相当する製品で、成分の約50%がこのような母化合物から構成され、環境中にも大量に放出されている。いままで分析した自然環境下の哺乳動物の組織中成分はここに示したMeSO₂-CBの残留成分パターン(Fig. 1)と類似した。一方、以前に分析した油症患者の組織中のMeSO₂-CBは、一致する成分もあるが必ずしも類似パターンを示さなかった。これは分析した試料が発症後10年以上経過した時点で死亡した患者の組織であり、また汚染されている環境も異なるためと思われるが、さらにヒトについての調査が必要である。

総 括

Clophen A50 (ドイツのPCB製品)をミンクに餌と

一緒に3カ月間(2 mg/day)投与し、投与終了後5日目に筋肉組織を採取し、その中に残留するPCBおよびMeSO₂-CBの構造およびその濃度を比較した。

1) 筋肉組織中に残留する主なPCBは2,4,5,2',3',4'-hexaCB, 2,4,5,2',4',5'-hexaCB, 2,3,4,5,2',4',5'-heptaCBなど、少なくとも2,4,5および4'-位に塩素置換したPCBであった。一方Clophen A50中の主成分のうち、2,5-位または2,5,6-位に塩素置換したPCBは残留性が低く、体内から速やかに消失した。

2) 筋肉組織中に25種以上のMeSO₂-CBを検出し、そのうち少なくとも20種の成分は2,5-dichlorophenylまたは2,5,6-trichlorophenyl骨格を持つCBの3-または4'-位にMeSO₂基が導入された代謝物であることが分かった。筋肉組織中のMeSO₂-CB濃度は16 μg/gで残留PCB濃度(180 μg/g)の約1/10であった。

3) 2,5-dichlorophenylまたは2,5,6-trichlorophenyl骨格を有する異性体はClophen A50中に約50%含まれており、各成分の相対量はミンクに投与後、組織中に残留するMeSO₂-CBの相対量とほぼ比例した。このMeSO₂-CBの残留成分パターンは自然環境下哺乳動物組織に認められる成分パターンと類似した。

文 献

- 1) Bakke JE, Bergman Å and Larsen GL: Metabolism of 2,4',5-trichlorobiphenyl in the mercapturic acid pathway. *Science*, 217: 645-647, 1982.
- 2) Bergman Å, Athanasiadou M, Bergek S, Haraguchi K, Jensen S and Klasson Wehler E: PCB and PCB methyl sulfones in mink treated with PCB and various PCB fractions. *Ambio*, 21: 570-576, 1992.
- 3) Bergman Å, Brandt I and Jansson B: Accumulation of methylsulfonyl derivatives of some bronchial-seeking polychlorinated biphenyls in the respiratory tract of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 48: 213-220, 1979.
- 4) Bergman Å, Haraguchi K, Kuroki H, Masuda Y and Olsson M: PCB methyl sulphones in animals from the Baltic region, Organohalogen compounds, 8: 12th International Meeting, Dioxin' 92, Finland, 311-312, 1992.
- 5) Bergman Å, Kuroki H, Haraguchi K and Norstrom, R J: PCB methyl sulfones in mammals from Canadian and Swedish environments. *Proc. of the eighteenth annual aquatic toxicity workshop*: Sept. 30-Oct. 3, 1991, Ottawa, Ontario. Niimi, AJ and Taylor, MC (eds). Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1863: 259-263, 1992.
- 6) 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.
- 7) Brandt I and Bergman Å: PCB methyl sulphones and related compounds: Identification of target cells and tissues different species. *Chemosphere*, 16: 1671-1676, 1987.
- 8) Haraguchi K, Athanasiadou M, Bergman Å, Hovander L and Jensen S: PCB and PCB methyl sulfones in selected groups of seals from Swedish waters. *Ambio*, 21: 546-549, 1992.
- 9) 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.
- 10) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Occurrence and distribution of chlorinated aromatic methylsulfones and sulfoxides in biological samples. *Chemosphere*, 19: 487-492, 1989.
- 11) 原口浩一, 増田義人, Bergman Å and Olsson M: 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, 福岡医誌, 82: 269-273, 1991.
- 12) Jensen S and Jansson B: Anthropogenic substances in seal from the Baltic: Methyl sulfone metabolites of PCB and DDE. *Ambio*, 5: 257-260, 1976.
- 13) Mizutani T, Yamamoto K and Tajima K: Sulfur-containing metabolites of chlorobiphenyl isomers, comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 862-866, 1978.
- 14) Preston BD, Miller JA and Miller EC: Reactions of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl-3,4-oxide with methionine, cysteine and glutathione in relation to formation of methylthiometabolites of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl in the rat and mouse. *Chem.-Biol. Interact.* 50: 289-312, 1984.
- 15) Schultz DE, Petrick G and Duinker JC: Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Environ. Sci. Technol.*, 23: 852-859, 1989.
- 16) Sundstrom G: Polychlorinated biphenyl II. Synthesis of some tetra- and pentachlorobiphenyls. *Acta Chem. Scand.*, 27: 600-604, 1973.
- 17) Tanabe S, Nakagawa Y and Tatsukawa R: Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in rats treated with Kanechlor products. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 717-726, 1981.

血液中における PCB 水酸化体代謝物の残留性

第一薬科大学物理分析学教室

黒 木 広 明・原 口 浩 一

斉 藤 秀 美・増 田 義 人

ストックホルム大学

Eva Klasson Wehler・Åke BERGMAN

Accumulation of Hydroxylated PCB Metabolites in Blood

Hiroaki KUROKI, Koichi HARAGUCHI,

Hidemi SAITO and Yoshito MASUDA

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

Eva Klasson Wehler and Åke BERGMAN

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

In order to investigate some potential accumulative properties of hydroxylated PCB metabolites, blood and tissues such as livers, kidneys, lungs and adipose tissue from rats exposed to a commercial PCB (Aroclor 1254) were analyzed for hydroxylated PCBs (OH-PCBs). A large number of OH-PCBs were detected in the liver 1 day after exposure among which almost 13 have been identified in the blood. OH-PCBs were retained selectively in the blood probably due to binding between the OH-PCBs and a protein in serum. One major OH-PCB determined in rat blood was 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB formed from 2, 3, 3', 4, 4'-pentaCB after NIH shift. Blood of a grey seal from the Baltic also contained at least 8 OH-PCB congeners with 2 major compounds determined as 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB and 4-OH-2, 3, 3', 4', 5, 5'-hexaCB. Thus, 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB is the most retainable OH-PCB congener in blood from rats and seal. Human serum have also been found to contain a few number of OH-PCBs at concentration of 0.6 ng/g serum which corresponds to one fourth of PCB level.

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs)は油症の原因物質の一つであるとともに、依然として地球的規模の環境汚染物質である。PCBは体内残留性が高い環境汚染物質ではあるが、PCB同族体の多くは哺乳動物において異性体により代謝速度は異なるものの代謝を受ける。PCBの代謝産物として、チトクロム P-450 により生じたアレノキシサイドを中間体とし、これがさらに代謝をうけた水酸化体代謝物および含硫代謝物¹⁾ (たとえば PCB メチルスルホン)が知られている。このうち、いくつかの PCB メチルスルホンは特定の組織(肺、副腎など)中のタンパク質と高い親和性を示すことが報告されている²⁾¹⁾。また、PCB メチルスルホン

は、人を含めて自然環境下に棲息する哺乳動物の肝、肺、脂肪組織から PCB と比較しうる濃度で検出されており、PCB メチルスルホンは高い体内残留性を示すことが明らかとなってきた³⁾。

一方、PCB 水酸化体 (OH-PCB) については、動物実験における糞中代謝物として数多く報告されているが、その体内残留性に関する知見は少ない。わずかに、Klasson Wehler ら⁴⁾ は 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (tetraCB) を投与したマウスの肝臓、脂肪組織にいくつかの hydroxy tetraCBs が存在することを報告している。Darnerud ら⁵⁾ は 3, 3', 4, 4'-tetraCB を投与した妊娠マウスの胎児に hydroxy tetraCB が蓄積していることを見いだしている。最近、OH-PCBs の体内残留性に関するいくつかの興味ある知見が報告さ

れている。たとえば、Brouwer ら⁴⁾⁶⁾ は 3,3',4,4'-tetraCB を投与したラット血液中に 4-OH-3,3',4',5'-tetraCB が残留していること、また、この PCB 水酸化体代謝物はチロキシン結合タンパク質である throxine-binding prealbumin (Transthyretin, TTR) に対して、チロキシンと競合的に結合することを明らかにした。また、Lindberg ら¹⁰⁾ は 2,3,3',4,4'-pentaCB を投与したマウス血液中に 4-OH-2',3,3',4',5'-pentaCB が未変化体より高濃度で残留していることを報告している。PCB 製品は多数の同族体を含んでいるので、上述の 3,3',4,4'-tetraCB, 2,3,3',4,4'-pentaCB 以外の構造の PCB も代謝を受け、その水酸化体代謝物がチロキシン結合タンパク質と結合し、その結果、血液中に残留するのかどうかに興味がもたれる。

そこで本研究では、OH-PCB の血液中における残留性を検討するため、PCB 混合物である Aroclor 1254 をラットに投与し、血液、肝臓、脂肪組織、肺、腎臓中の OH-PCB を分析した。さらに、環境下に棲息する哺乳動物の血液中に OH-PCB が残留するかどうかを検討するため、バルト海アザラシおよび人の血液についても分析をおこなった。

実験方法

1. 試料

(1) アザラシ血液；Dr Bergman (ストックホルム大学) より供与された grey seal の血液。

(2) 人血液(血清)；福岡県内の二カ所の病院において 1992 年に収集された血清。

2. 実験動物および投与

Wistar 系雄性ラット (8 匹、体重約 200 g) を用い、Aroclor 1254 (150 mg) をピーナツ油 3 ml に溶かし、25 mg/kg b. w. の用量で三日間連続して経口投与した。最終投与後 1 日目および 7 日目に屠殺(各 4 匹)し、血液、肝臓、肺、腎臓および脂肪組織を摘出した。これらの組織はそれぞれプールし、抽出、精製を行うまで冷凍庫に保存した。なお、肝臓は生理食塩水で灌流することなく用いた。

3. OH-PCB の抽出、精製

(1) ラット血液；血液に水：メタノール (1:1) 混液を加え希釈した。この試料に 0.5 M 硫酸を加えて酸性とした後、ヘキサン：*tert*-ブチルメチルエーテル (1:1) で 3 回抽出した。合わせた有機層を濃縮し、得られた脂肪分を秤量した。この脂肪分をヘキサン 70 ml に溶かし、さらに水酸化カリウム溶液 (0.5 M KOH

5 ml, エタノール 2 ml) を加え振とうした。この操作により水酸化カリウム溶液/ヘキサンとの間で分配抽出を行い、フェノール性化合物 (OH-PCB など) を含む分画と中性化合物 (PCB など) を含む分画とに分けた。アルカリ層に 1 M HCl を加え酸性とした後、フェノール性化合物をヘキサン：*tert*-ブチルメチルエーテル (9:1) で 3 回抽出した。溶媒層を分離して留去後、フェノール性化合物を含む抽出物をヘキサン 1 ml に溶かし、これにジアゾメタンのエーテル溶液 (直前に調製) 0.5 ml を加え、室温で 1 時間放置した。この反応により OH-PCB をメトキシ誘導体 (MeO-PCB) とした。反応終了後、ヘキサン溶液に濃硫酸 1 ml を加え振とうし、残留する脂肪分を除いた。硫酸処理されたヘキサン溶液を無水硫酸ナトリウムをつめたカラムに通した後、濃縮し、得られたヘキサン溶液を GC/ECD あるいは GC/MS で分析した。

(2) アザラシ血液；OH-PCBs の抽出までは、すでにストックホルム大学にて行われており、ジアゾメタンによる反応から以降の操作をラット血液の場合と同様に行った。

(3) 人血液；血清約 50 g を用いて行った。ただし、血清に 0.5 M 硫酸を加えて酸性とした後、この試料に 38 ng の内標準物質 (4-OH-2,3,3',4',5,5',6-heptaCB) を加えた。他の操作はラット血液の場合と同様に処理した。

(4) ラット組織(肝臓、肺など)；細片に切った組織 (約 2~18 g) に 30 ml のクロロホルム：エタノール (1:1) 混液を加え、ホモジナイザーで 3 回処理した。抽出液をろ過した後、溶媒を留去し、得られた脂肪分 (260-1100 mg) を秤量した。脂肪を 1 ml のヘキサン：ジクロロメタン (1:1) 混液に溶かし、この溶液をゲルパーミエーションカラム (Bio Beads S-X 3 50 g をヘキサン：ジクロロメタン (1:1) で膨潤させたもの) に加え、同溶媒にて流速 4.0 ml/min で溶出した。このゲルパーミエーションカラムトマトグラフィーにより脂肪分分画 (0-120 ml) と PCB および代謝物分画 (120-200 ml) とに分けた。PCB および代謝物分画を濃縮後、ヘキサン溶液とし、これに 38 ng の内標準物質 (4-OH-2,3,3',4',5,5',6-heptaCB) を加えた。次いで、水酸化カリウム/ヘキサンとの間で分配抽出を行い、ラット血液の場合と同様に処理した。

4. PCB の抽出、精製

水酸化カリウム溶液/ヘキサン分配抽出で得られたヘキサン層 (中性化合物、PCB などを含む) に 1 M HCl 1 ml, エタノール 2 ml を加え溶液を酸性とした

後、塩酸層は取り除いた。これに内標準物質として 50~1000 ng の 2,2',3,4,5,5',6-heptaCB (ラット組織分析の場合) あるいは 25 ng の 2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (人血液分析の場合) を添加した。次に、ヘキサン溶液を濃硫酸で振とうし、残留する脂肪分を取り除いた。ヘキサン溶液を無水硫酸ナトリウムをつめたカラムに通した後、濃縮し、得られたヘキサン溶液を GC/ECD で分析した。

5. ガスクロマトグラフ (GC/ECD)

島津 GC-15 A ガスクロマトグラフ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 ULBON HR-52 (0.25 mm×50 m, 島津) を用いた。カラム温度は最初 70 °C で 2 分間保持し、220 °C まで 20 °C/min で、続いて 280 °C まで 3 °C/min で昇温し、一定に保った。注入口温度は 250 °C に保持した。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-G 9 (島津) で行った。OH-PCBs および PCBs の定量は内標準物質ピークに対する同定した成分ピークの面積比から計算した。ただし、試料中の OH-PCBs あるいは PCBs は置換塩素数に関係なく内標準物質と同じ感度を有すると仮定した。ピーク面積測定はクロマトパック C-R 5 A あるいは C-R 7 A (島津) を用いた。各 MeO-PCB 成分の定性は合成した標準品約 40 種の GC 保持時間およびマススペクトル (EI および NCI モード) と比較して推定した。

6. ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)

ラット血液中の MeO-PCBs は Finnigan ITS 40 GC/MS 装置を用いて電子衝撃 (EI) 法で測定した。GC カラムには DB-5 を用いた。その他の組織中の MeO-PCBs の測定は日本電子 JMS-DX 303 GC/MS (データ処理システム JMA-DA 5000) 装置を用いて、EI 法あるいは負イオン化学イオン化 (NCI) 法 (反応ガス; メタン) で行った。GC に装着した DB-5 (0.25 mm×30 m, J & W Scientific Inc.) キャピラリーカラムを質量分析計のイオン源部へ直接接続した。試料はスプリットレスモードで注入した。カラム温度は 150 °C (3 min) から 280 °C まで 16 °C/min で昇温し、その後、一定に保った。

結 果

1. ラット体内における OH-PCB

投与後 1 日目のラット血液の OH-PCB 分画から少なくとも 6 種の monohydroxy PCBs (五塩化一六塩化) および 5 種の dihydroxy PCBs (四塩化一六塩化) を GC/MS (EI) により検出した。投与後 1 日目の血液

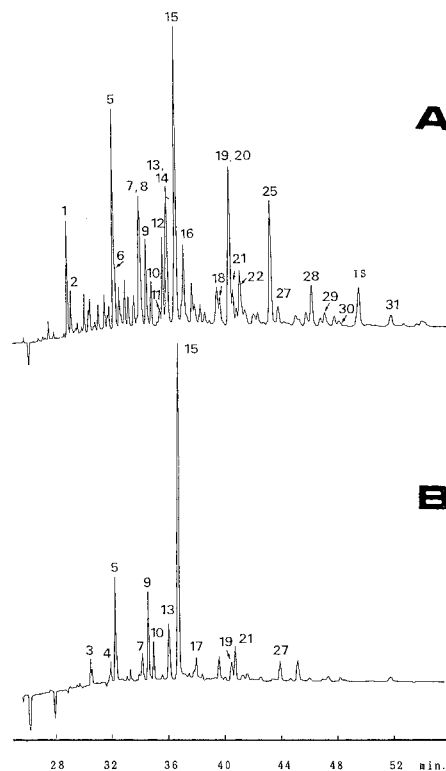
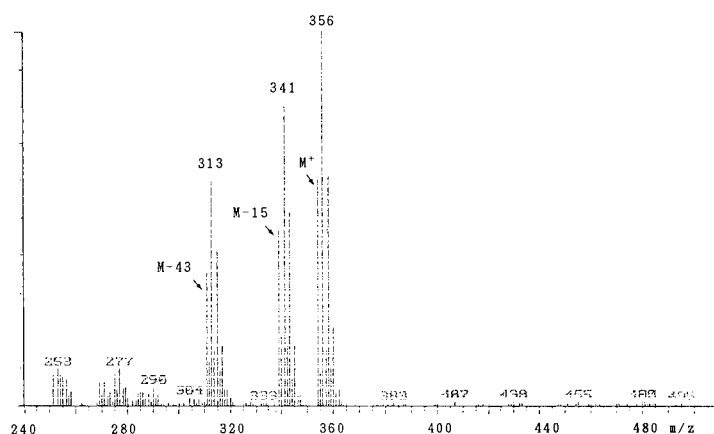


Fig. 1 Gas chromatograms of OH-PCBs in liver (A) and blood (B) from rats 1 day after exposure of Aroclor 1254. The peak numbers correspond to the OH-PCBs structures given in Table 1.

および肝臓中に残留する OH-PCBs の GC/ECD クロマトグラムを Fig. 1 に示す。肝臓中から検出された多数のピークの大部分は、GC/MS (EI) の結果、PCB 水酸化体代謝物であり、これらは少なくとも 17 種の monohydroxy PCBs (四塩化一六塩化) および 5 種の dihydroxy PCBs (四塩化一六塩化) からなることが示された。血液中には肝臓に残留する成分のうちの約 13 種が残留しており、主成分 (peak 15) は 4-MeO-2',3,3',4',5-pentaCB と同定された。さらに両組織中の主な成分の構造は合成した約 40 種の MeO-PCB 標品との比較から、Table 1 に示すように推定された。他の組織では、肺、腎臓からも OH-PCBs が検出されたが、両組織中の OH-PCBs 成分の組成は血液中のそれと類似していた。しかし、脂肪組織から OH-PCBs は検出されなかった。ラット血液に残留する主成分 (peak 15) の EI マススペクトルを Fig. 2 に示す。MeO-PCB の EI マススペクトルは MeO-基の置換位

Table 1 Peak numbers and assigned MeO-PCBs structures detected in bloods from rats dosed with PCB (Aroclor 1254), grey seal and people from Japan

Peak No.	Structure	Peak No.	Structure
1	MeO-tetraCB	17	4-MeO-2, 2', 3, 4', 5, 5'-hexaCB
2	MeO-tetraCB	18	3-MeO-2, 2', 3', 4, 4', 5'-hexaCB
3	(MeO) ₂ -tetraCB	19	3-MeO-2, 2', 3', 4, 4', 5-hexaCB
4	MeO-pentaCB	20	(MeO) ₂ -pentaCB
5	3-MeO-2, 2', 4, 4', 5'-pentaCB	21	(MeO) ₂ -hexaCB
6	MeO-tetraCB	22	MeO-hexaCB
7	3-MeO-2, 2', 3', 4, 4'-pentaCB	23	MeO-heptaCB
8	(MeO) ₂ -tetraCB	24	MeO-heptaCB
9	4-MeO-2', 3, 4', 5, 5'-pentaCB	25	(MeO) ₂ -pentaCB
10	(MeO) ₂ -tetraCB	26	4-MeO-2', 3, 3', 4', 5, 5'-hexaCB
11	MeO-hexaCB	27	4-MeO-2, 3, 3', 4', 5, 5'-hexaCB
12	MeO-pentaCB	28	MeO-hexaCB
13	(MeO) ₂ -pentaCB	29	MeO-hexaCB
14	MeO-pentaCB	30	4-MeO-2, 2', 3, 3', 4', 5, 5'-heptaCB
15	4-MeO-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB	31	MeO-hexaCB
16	MeO-pentaCB		

**Fig. 2** EI mass spectrum of MeO-pentaCB present in blood from rats dosed with Aroclor 1254. This MeO-pentaCB corresponds to the peak 15 in Fig. 1.

置を決定するのに有用である。Fig. 2 に示す MeO-pentaCB は M-15 のフラグメントイオンが強いことから MeO-基がビフェニルの *para*-位に置換していることが示された。

Table 2 に投与後 1 日目, 7 日目の各組織中の OH-PCBs および 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB の濃度を示す。また, 同組織中の PCBs および高い残留性を示す PCB の一つである 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB の濃度および 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB と 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB の濃度比も Table 1 に示す。2, 2', 4, 4', 5, 5'-

-hexaCB の 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB に対する濃度比は肺, 肝臓, 腎臓で 2~7 に対して, 血液の中では 0.1~0.2 であった。この結果から, OH-PCBs とりわけ 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB の血液中における強い残留性が明らかとなった。

2. アザラシ血液中の OH-PCB

環境下に棲息する哺乳動物の血液中における OH-PCB の残留の有無を検討するため, バルト海アザラシの血液を用いて OH-PCB の分析を行った。GC/MS (NCI) 測定の結果, 少なくとも 9 種の OH-PCBs

Table 2 Concentration (ng/mg extracted lipid for tissues and ng/g fresh weight for blood) of PCB, 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB, OH-PCB and 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB in rat tissues, after exposure to Aroclor 1254, and ratio of PCB and OH-PCB retained in rat tissues

Tissue	ΣPCB	I-153	ΣOH-PCB	4-OH-105	I-153 /4-OH-105	ΣPCB /ΣOH-PCB
Blood, day 1	NA	23*	203	103	0.2	—
Blood, day 7	NA	7*	98	60	0.1	—
Lung, day 1	27.7	2.0	0.6	0.3	6.6	46
Lung, day 7	18.9	1.9	0.8	0.5	3.8	24
Liver, day 1	18.5	1.2	1.4	0.2	6.0	13
Liver, day 7	4.4	0.3	0.4	0.2	1.5	11
Kidney, day 1	29.1	1.8	0.6	0.3	6.0	48
Kidney, day 7	0.2	ND	ND	ND	—	—
Adipose tissue, day 1	75.2	5.1	ND	ND	—	—
Adipose tissue, day 7	8.0	1.0	ND	ND	—	—

ΣPCB; total PCBs, ΣOH-PCB; total hydroxy PCBs, I-153; 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB, 4-OH-105; 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB, NA=not analyzed, ND=not detected

*Another rats were dosed with Aroclor 1254 with same conditions in this study and I-153 were determined in Stockholm University.

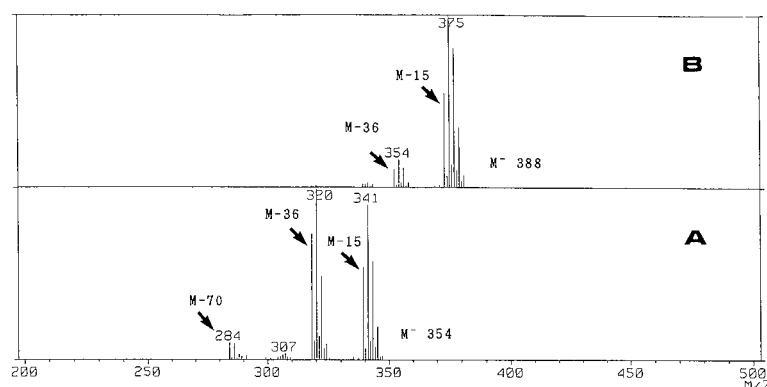


Fig. 3 NCI mass spectra of MeO-penta- (A) and Me-heptaCB (B) detected in blood from a grey seal from the Baltic. A and B correspond to the peak 15 and 27 in Fig. 4, respectively

(MeO-pentaCB 2種, MeO-hexaCB 4種および MeO-heptaCB 3種)が検出された。検出した二つの主成分である MeO-pentaCB と Meo-hexaCB の NCI マススペクトルを Fig. 3 に示す。しかし、ラット血液中にみられた dihydroxy PCBs は、アザラシ血液中からは検出されなかった。アザラシ血液中に残留する OH-PCBs について、さらに GC/ECD による検討を行った。その GC/ECD クロマトグラムを Fig. 4 に示す。ラット血液中において高い残留性を示した 4-MeO-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB はアザラシ血液中においても主成

分として同定された。二番目に大きな成分の構造は 4-MeO-2, 3, 3', 4', 5, 5'-hexaCB と推定された。他の成分について推定された構造を Table 1 に示す。アザラシおよびラットの血液中に残留する OH-PCBs の大部分の構造は類似していたが、その成分組成は両者において違いが認められた。

3. 人血液中の OH-PCB

Fig. 5 に人血液 (血清) 中に残留する OH-PCBs の GC/ECD クロマトグラムを示す。少なくとも 4 種の MeO-PCBs が検出された。これらの成分の構造は

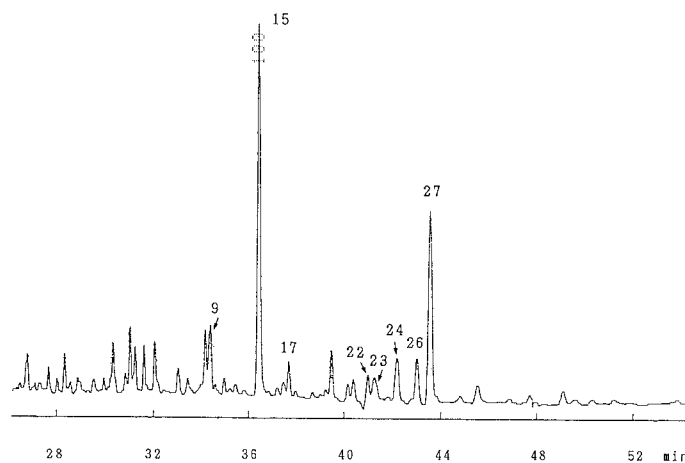


Fig. 4 Gas chromatogram of OH-PCBs in serum extract from a grey seal from the Baltic. The peak numbers correspond to the OH-PCBs structures given in Table 1

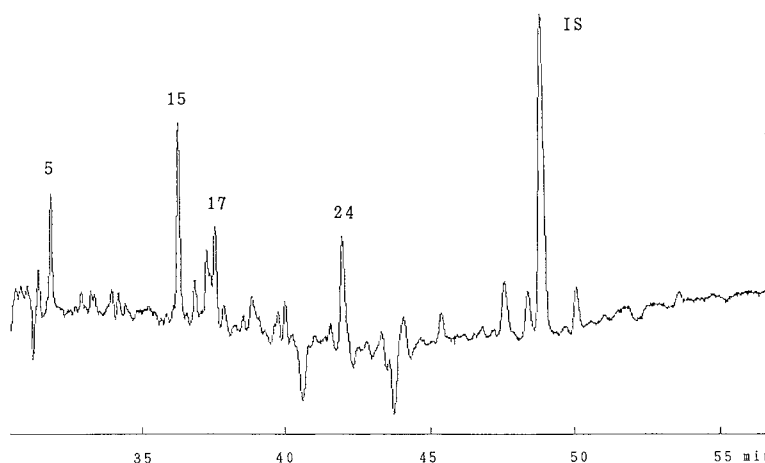


Fig. 5 Gas chromatogram of OH-PCBs in serum extract from a pooled human bloods from Japan. The peak numbers correspond to the OH-PCBs structures given in Table 1.

Table 3 Concentration (ng/g fresh weight) of PCB, 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB, OH-PCB and 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB in pooled human serum

	Concentration (ng/g serum)
ΣPCB	1.2~3.8
I-153	0.3 ~1.0
ΣOH-PCB	0.6
4-OH-105	0.2
Ratio: ΣPCB/ΣOH-PCB	2 ~6.3
Ratio: I-153/4-OH-105	1.5~5

ΣPCB: total PCBs, ΣOH-PCB: total hydroxy PCBs, I-153: 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB, 4-OH-105: 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB

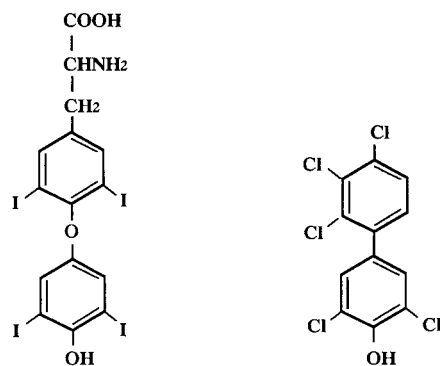
Table 1 に示すように推定された。ラットおよびアザラシ血液中には残留 OH-PCBs の主成分であった 4-MeO-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB は、人血液においても主成分ではないが検出された。Peak 24 の構造は不明である。これらのピークが MeO-PCB であることは GC/MS (NCI) 測定により確認している (データ不掲載)。また、データは示さないが、人血液の同じ OH-PCB 分画からペンタクロロフェノールも検出された。Table 3 に人血液中の OH-PCBs 濃度と 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB の濃度を示す。また、人血液中の PCBs 濃度も高残留性 PCB 成分である 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB の濃度とともに Table 3 に示す。OH-PCBs の濃度 (0.6 ng/g serum) は残留 PCB 濃度 (1.2~3.8

ng/g serum)の約1/2~1/6であり, OH-PCBsの人血液中における高い残留性が示された。

考 察

PCB代謝物の一つであるOH-PCBの体内残留性を調べるため, 多数のPCB同族体混合物からなるAroclor 1254を投与したラット血液および組織(肝臓, 肺など), パルト海に棲息するアザラシの血液および人血液(血清)について, 水酸化カリウム溶液/ヘキサン分配抽出によりPCBおよびOH-PCB分画に分け, GC/ECDおよびGC/MS (EI, NCI)で検討した。ただし, OH-PCB分画はメチル化後, MeO-PCBとして分析した。

投与後1日目および7日目のラット血液から10種以上の, また, 1日目の肝臓から30種以上のmonohydroxyおよびdihydroxy PCBsを検出した。他の組織(肺, 腎臓)からも血液中の成分組成と類似したOH-PCBsを検出したが, Table 2に示すように, 血液中におけるOH-PCBsの選択的な取り込みが顕著であった。とりわけ残留OH-PCBsの主成分である4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCBの血液中の濃度(投与後7日目)は, 残留性の高いPCBの一つとして知られている2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCBの約8倍であり, この水酸化体代謝物の血液中への強い残留性が明らかとなった。4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCBは2, 3, 3', 4, 4'-pentaCBに由来する代謝物であり, 母化合物である2, 3, 3', 4, 4'-pentaCBはAroclor 1254中に3.8%含まれている。この水酸化体代謝物は母化合物の3, 4'-位に塩素置換しているフェニル環のうち, 塩素原子が置換していないmeta-位と, 塩素が置換しているpara-位間でのエポキシ化, 次いでNIHシフトの後, 生じたと考えられる。実際, 2, 3, 3', 4, 4'-pentaCBを投与したマウス血液から4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCBが未変化体より高濃度で見いだされており¹⁰⁾, この報告は上述した2, 3, 3', 4, 4'-pentaCBの代謝過程を支持している。Bro- uwerら⁴⁶⁾は3, 3', 4, 4'-tetraCBの代謝物である4-OH-3, 3', 4', 5-tetraCBが選択的にマウス血液に残留していること, また, 4-OH-3, 3', 4', 5-tetraCBはチロキシン結合タンパク質であるTTRとIn vitroでチロキシンより数倍強く競合して結合することを報告している。血液中に強い残留性を示した4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCBも4-OH-3, 3', 4', 5-tetraCBと同様, 4-OH-3, 5-塩素置換のフェニル基を有している。したがって, 本研究で示された4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCBの血液中への選択的な取り込みもチロキシン結合タン



throxine

4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB

Fig. 6 Structure of throxine and 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCB

パク質との強い結合の結果と考えられる。Fig. 6に示すように, 4-OH-2', 3, 3', 4', 5-pentaCBの構造はチロキシンと類似している。

4-OH-3, 5-塩素置換のタイプを持つ他の構造のOH-PCBsとして, ラット血液から4-OH-2', 3, 3', 4', 5, 5'-pentaCBが検出された。この水酸化体代謝物を与える母化合物は2, 3', 4, 4', 5-pentaCB (Aroclor 1254中に6.4%存在)であり, 先の2, 3, 3', 4, 4'-pentaCBと合わせて, この二つのPCBは1-ortho-PCBである。1-ortho-PCBはダイオキシンと類似した活性を示す¹²⁾ことから, 最近1-ortho-PCBはPCBの毒性評価を考える上で平面PCBと並んで毒性学上, 重要なPCBと考えられている。このような1-ortho-PCBに由来するOH-PCBsが血液から検出されたことは, 1-ortho-PCBの毒性を考える上で興味深い知見と思われる。4'-位にOH-基を有する他のOH-PCBsとしてラット血液から4-OH-2, 2', 3, 3', 4', 5, 5'-hexaCBおよび4-OH-2, 3, 3', 4', 5, 5'-hexaCBが検出された。これらの代謝物もOH-基の両オルト位は塩素原子で置換されている。3'-位にOH-基を有するOH-PCBsとして3-OH-2, 2', 4, 4', 5'-pentaCBおよび3-OH-2, 2', 3', 4, 4', 5-hexaCBが検出されたが, これらの代謝物も同様にOH-基の両オルト位は塩素原子で置換されていた。しかし, 2'-位にOH-基をもつOH-PCBsは見いだされなかった。このように血液から検出されたOH-PCBsは3'-あるいは4'-位にOH-基を有し, OH-基の両オルト位は塩素原子で置換されているという構造上の特徴を有していた。

以上述べたように, ラット血液におけるOH-PCBsの選択的な高い蓄積性が明らかにされたので,

体内 PCBs 濃度が高いことで知られているバルト海アザラシ²⁾の血液にも OH-PCBs が残留しているかどうかを検討した。その結果、少なくとも 8 種の OH-PCBs が検出され、主成分はラットの場合と同様に 4-OH-2',3,3',4',5-pentaCB であった。二番目に大きな成分として 4-OH-2,3,3',4',5,5'-hexaCB が検出されたが、この水酸化体代謝物はラットではむしろ微量成分であった。2,3',4,4',5-pentaCB の NIH シフトによる代謝物である 4-OH-2',3,3',4',5,5'-pentaCB に加えて、2,3,3',4,4',5-hexaCB の NIH シフトによる代謝物、4-OH-2',3,3',4',5,5'-hexaCB も微量成分として検出された。このようにアザラシ血液にも OH-PCBs が残留していることが明らかになった。

人血液からも 4-OH-2',3,3',4',5-pentaCB を主な成分の一つとしていくつかの OH-PCBs が検出されたが、その成分組成はアザラシの場合とは違ったパターンを示した。すなわち、アザラシでは主成分の一つであった 4-OH-2,3,3',4',5,5'-hexaCB は人血液からは検出されず、一方、アザラシでは微量成分であった hydroxy-heptaCB が主成分の一つであった。OH-PCBs の濃度は PCBs 濃度とほぼ同レベルであり、人血液においても OH-PCBs の高い蓄積性が示された。

以上のように、代表的な環境汚染物質である PCB の水酸化体代謝物がアザラシおよび人血液中に選択的に残留していることが明らかにされた。また、合成標品との比較からラット、アザラシおよび人血液中に残留する OH-PCBs の大部分の構造を明らかにした。しかし、PCB の代謝では一つの PCB からいくつかの水酸化体代謝物(例えば、異性体、脱塩素あるいは NIH シフトを伴う水酸化体代謝物など)が生じる。したがって、上に述べた残留成分と同一の GC 保持時間を示す他の構造の OH-PCBs の存在も当然考えられる。したがって、血液中に残留する OH-PCBs の構造をさらに確認するために、今後、単一 PCB を用いた代謝実験を行う必要がある。

Brouwer ら⁹⁾の合成した hydroxy PCBs と TTR との結合性を検討した研究結果から考えると、本研究で示されたアザラシおよび人血液中への OH-PCBs の選択的取り込みは体内で代謝を受け生じた OH-PCBs とチロキシン結合タンパク質との結合の結果ではないかと推定される。Aroclor 1254 を投与したラット肝臓に存在する多数の OH-PCBs のうち、特定の構造を有する約 10 種以上の OH-PCBs のみがラット血液中に残留しているという結果 (Fig. 1) も OH-PCBs

とチロキシン結合タンパク質との結合を強く示唆している。

PCB 投与により血中のビタミン A および甲状腺ホルモン (チロキシン) の濃度が減少することが知られている⁹⁾。また、PCB はいくつかの動物において甲状腺機能低下をもたらす。血中ビタミン A の減少も PCB の水酸化体代謝物とチロキシン結合タンパク質・レチノール結合タンパク質複合体との相互作用によること Brouwer ら⁹⁾により報告されている。さらに、ビタミン A 欠乏症による皮膚症状と PCB による皮膚症状との類似性が指摘されている。このような PCB の毒性発現に、血液中に残留している OH-PCBs が強く関与している可能性が考えられる。人血液中に PCB とほぼ同レベルの OH-PCBs が残留していることを考えたとき、OH-PCBs は生体の正常な生理作用を妨げる可能性があり、今後、OH-PCBs の毒性学的な意義を明らかにしておく必要がある。

総 括

PCB 水酸化体代謝物の血液における残留性を検討するため、Aroclor 1254 を投与したラット血液および肝臓、肺などの組織、バルト海アザラシ血液および人血液 (血清) 中の hydroxy PCB を分析し、次のような知見を得た。

1) ラット血液から 10 種以上の monohydroxy-および dihydroxy-PCBs が検出された。その主成分は 4-OH-2',3,3',4',5-pentaCB と同定された。他の成分は 4-OH-2',3,3',4',5,5'-pentaCB, 3-OH-2,2',4,4',5'-pentaCB, 3-OH-2,2',3',4,4'-pentaCB, 4-OH-2,2',3,4',5,5'-hexaCB, 3-OH-2,2',3',4,4',5-hexaCB, および 4-OH-2,3,3',4',5,5'-hexaCB と推定した。OH-PCBs は肝臓、肺、腎臓と比較して血液中に特異的に高い蓄積性を示した。脂肪組織からは検出されなかった。

2) アザラシ血液に 4-OH-2',3,3',4',5-pentaCB および 4-OH-2,3,3',4',5,5'-hexaCB を主成分とする少なくとも 8 種の OH-PCBs の残留が確認された。ラット血液から検出された他のいくつかの成分もアザラシ血液中に微量成分として残留していた。

3) 人血液中に少なくとも 4 種の OH-PCBs の存在を確認した。その成分組成はアザラシ血液中のそれとは異なっていたが、アザラシ血液中の主成分である 4-OH-2',3,3',4',5-pentaCB も残留していた。しかし、主成分の一つである hydroxy-heptaCB の構造は現在のところ不明である。OH-PCBs の濃度は PCB 濃度の 1/2~1/6 であり、PCB とほぼ同レベルの OH-

PCBsが血液中に残留していた。

4) 以上のことから OH-PCBs の血液中への選択的な取り込みが明らかとなった。ラット、アザラシおよび人血液中に残留する OH-PCBs の構造上の特徴は、OH-基は3-位あるいは4-位に置換しており、OH-基の両オルト位は塩素原子で置換されていた。OH-PCBs の血液中への選択的な残留性は OH-PCBs とチロキシン結合タンパク質との結合による結果と考えられる。

人血液中における OH-PCBs の高い残留性を考えると、今後、PCB の毒性発現における OH-PCBs の毒性学的意義を明らかにしていく必要がある。

文 献

- 1) Bakke JE, Bergman Å and Larsen GL: Metabolism of 2,4',5-trichlorobiphenyl in the mercapturic acid pathway. *Science*. 217: 645-647, 1982.
- 2) 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.
- 3) Brandt I and Bergman Å: PCB methyl sulphones and related compounds: Identification of target cells and tissues different species. *Chemosphere*. 16: 1671-1676, 1987.
- 4) Brouwer A, Klasson Wehler E, Bokdam M, Morse DC and Traag WA: Competitive inhibition of thyroxin binding to transthyretin by monohydroxy metabolites of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere*. 20: 1257-1262, 1990.
- 5) Brouwer A and Van den Berg KJ: Early and differential decrease in natural retinoid level in C57BL/Rij and DBA/2 mice by 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73: 204-209, 1984.
- 6) Brouwer A and Van den Berg KJ: Binding of a metabolite of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85: 301-312, 1986.
- 7) Darnerud PO, Brandt I, Klasson Wehler E, Bergman Å, d'Argy R, Dencker L and Sperber GO: 3, 3', 4, 4'-Tetrachloro [¹⁴C] biphenyl in pregnant mice: enrichment of phenol and methyl sulphone metabolites in late gestational fetuses. *Xenobiotica*. 16: 295-306, 1986.
- 8) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Occurrence and distribution of chlorinated aromatic methylsulfoxides and sulfoxides in biological samples. *Chemosphere*. 19: 487-492, 1989.
- 9) Klasson Wehler E, Bergman Å, Brandt I, Darnerud PO and Wachtmeister CA: 3, 3', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl: excretion and tissue retention of hydroxylated metabolites in the mouse. *Drug Metab. Dispos.* 17: 441-448, 1989.
- 10) Lindberg L, Klasson Wehler E, Jonsson C-J, Brandt I and Bergman Å: Metabolism of 2, 3, 3', 4, 4'-pentachlorobiphenyl in mink and mouse. *Organohalogen Compounds*. 10: 147-148, 1992.
- 11) Lund J, Brandt I, Poellinger L, Bergman Å, Klasson Wehler E and Gustafsson J-A: Target cells for the polychlorinated biphenyl metabolite 4, 4'-bis (methylsulfonyl) 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl. *Mol. Pharmacol.* 27: 314-323, 1985.
- 12) Safe S: Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 21: 51-88, 1990.

油症患者における米ぬか繊維とコレステラミンの 併用投与による Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) の 糞便中へ排泄促進の試み

福岡県保健環境研究所

飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦

中川 礼子・森田 邦正・常盤 寛

九州大学医学部第二内科

辻 博

九州大学医学部皮膚科

中山 樹一郎・堀 嘉昭

Therapeutic Trials for Promotion of Faecal Excretion of PCDFs by the Administration of Rice Bran Fiber and Cholestyramine in Yusho Patients

Takao IIDA, Hironori HIRAKAWA, Takahiko MATSUEDA,
Reiko NAKAGAWA, Kunimasa MORITA and Hiroshi TOKIWA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Fukuoka 818-01*

Hiroshi TSUJI

*Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyushu University 60,
Fukuoka 812*

Juichiro NAKAYAMA and Yoshiaki HORI

Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Kyushu University 60, Fukuoka 812

It is well-known that Yusho disease was caused by polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), and that 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (PnCDF), 1, 2, 3, 4, 7, 8-and 1, 2, 3, 6, 7, 8-Hexachlorodibenzofurans (HxCDFs) still retain in the patient bodies. As patients usually suffer from various chronic syndromes, an effective treatment is extremely needed. In order to assess the rice bran fiber (RBF) and cholestyramine on stimulating faecal excretion of PCDFs, two clinical trials were carried out in 1990 and 1991. In the first trial in 1990, 10 g of RBF (dietary fiber content was 50%) and 4 g of cholestyramine were administered to four Yusho patients three times a day for a week. The stool from patients were collected a week before and during the administration. These were pooled respectively, and then two samples for measurement.

In the second trial in 1991, 10 g of dietary fiber rich RBF (refined-RBF, dietary fiber content was 85%) and 4 g of cholestyramine were administered to four Yusho patients three times a day for two weeks. In this trial, three stool samples were obtained from each patient, i.e., a week before administration, and first and second week during administration. Level of PCDFs was determined by high resolution GC/MS and the following results were obtained.

1) In the first trial (1990) the faecal excretion of PnCDF and HxCDFs increased at the rates of 42-88% and 7-47%, respectively, in three out of four patients.

2) In the second trial (1991) the faecal excretion of PnCDF and HxCDFs increased at the rates of 31-69% and 23-80%, respectively, in two out of four patients. The treatment was found to be

effective. However, a large scale clinical trial is needed to clarify the effect of such treatment.

は じ め に

Polychlorinated biphenyl (PCBs) および Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) で汚染されたライソオイルを摂取することによって 1968 年に日本で、つづいて、1979 年に台湾で、後に、それぞれ「油症」および「Yu-Cheng」と呼ばれる食中毒事件が発生した⁵⁾⁷⁾。われわれは、この中毒事件後 20 年以上経過した現在も、油症患者体内に主原因物質である PCDFs が高濃度に残留しており、残留量に応じ極く微量ではあるが糞便中に排泄されていることを明らかにした¹⁾³⁾。さらに、典型的な油症患者についてコレステラミン投与による PCDFs の排泄促進の臨床治療を試みたが、明確な排泄促進効果は認められなかった²⁾。一方、竹中⁶⁾らはラットに米ぬか繊維 (RBF) とコレステラミンを併用投与することにより PCBs の排泄が 5.7 倍に促進されることを報告している。今回、臨床的に RBF とコレステラミンの併用投与による PCDFs 排泄促進を検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 治療薬の投与および試料の採取

実験 I. 粗製 RBF とコレステラミンの併用投与による排泄促進実験

平成 2 年 10 月から 12 月にかけて、前回のコレステラミンによる治療実験の対象患者のうち 2 組の夫婦 (患者 A, B, C および D: 4 名) を対象とし、クエストラン 9 g (プリストルマイヤーズ[®]製: コレステラミン 4 g を含有) および RBF (食物繊維含量 50%) 10 g を水などに懸濁させ、初日のみ 1 日 2 回、その後は 1 日 3 回を 6 日間連続服用させた。治療薬を投与する前の 6 日間の糞便と投与開始 2 日目からの 6 日間の糞便のすべてを排便毎にビニール袋に採取し分析するまで -20°C で凍結保存した。分析試料の採取方法は、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 量を採取して、投与前および投与中のそれぞれ 6 日分を合せて検体とし、分析した。

実験 II. 精製 RBF とコレステラミンの併用投与による排泄促進実験

平成 3 年 10 月から 11 月にかけて、実験 I の対象患者のうち血液中 PCDFs および PCBs 濃度が最も高い 1 組の夫婦 (患者 A および B) と血液中 PCBs 濃度が

かなり高い値を示す別の 1 組の夫婦 (患者 E および F) を対象として、クエストラン 9 g (プリストルマイヤーズ[®]製: コレステラミン 4 g を含有) および高度に精製した RBF (食物繊維含量 85%) 10 g を水などに懸濁させ、初日のみ 1 日 2 回、その後は 1 日 3 回を 13 日間連続服用させた。治療薬を投与する前の 6 日間の糞便と投与開始 2 日目から 14 日目までの糞便のすべてを排便毎にビニール袋に採取し、分析するまで -20°C で凍結保存した。分析試料の採取方法は、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、投与前 7 日間、投与 2 日目から 7 日目までの 6 日間および投与 8 日目から 14 日目までの 7 日間のそれぞれにまとめて 1 検体として分析した。

2. 試薬

使用した PCDFs の標準品は 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (PnCDF) および 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran (HxCDF) で、また、内部標準物質として ¹³C₁₂-2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran ¹³C₁₂-1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran を用いた。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。AgNO₃-シリカゲルは Merck 社製シリカゲルに 10% (w/w) の AgNO₃ を含有させて調製した。カラム用活性炭は半井製活性炭を熱トルエンで 3 回洗い無水硫酸ナトリウムに 1 mg/g となるよう混合したものを用いた。フロリジルは熱水で 2 回洗い、乾燥後、680°C で活性化して用いた。他の使用した試薬はキシダ化学製の残留農薬用トルエン、フロリジン社製フロリジル、和光純薬工業製の有害金属分析用硫酸、PCB 分析用シリカゲル S-1、PCB フタル酸エステル分析用無水硫酸ナトリウム、残留農薬分析用 1000 のエタノール、ヘキサン、アセトン、ジクロロメタン、残留農薬分析用 300 のクロロホルムおよびメタノールである。

3. 分析方法

試料の採取法の項で述べた混合試料にクロロホルム/メタノール (1:1 v/v) を加えて振とう抽出し桐山ロートでろ過した。ろ液に水を加えて 2 層に分離させクロロホルムを分取した。残渣について同様の操作を 2 回繰り返して抽出液を合せ無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。内部標準物質の n-ノナン溶液 (1 ng/ml) を 0.5 または 1.0 ml 添加し、減圧濃縮した後、クロロホ

Table 1 The excretion levels of PCDFs into the stool from Yusho patients before and after administration of rice bran fiber and cholestyramine

Patient	Sex	Age		Stool weight (g/day)	PnCDF ^{a)} (pg/day)	HxCDFs ^{b)} (pg/day)
A	male	60	before	109	840	850
			after	148	1190	910
B	female	56	before	201	1670	1580
			after	429	2960	2320
C	male	53	before	75	250	260
			after	53	130	78
D	female	49	before	52	260	150
			after	97	488	210

a) 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran

b) 1, 2, 3, 4, 7, 8-and 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexachlorodibenzofurans

Rice bran fiber (50 % content as dietary fiber) was used.

ルムで 100 ml の定容とした。このクロロホルム溶液 50 ml をとり、ヘキサン 75 ml を加え混合した後、濃硫酸 50 ml で 3 回振り混ぜて脱脂した。有機層を水 50 ml で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し 1-2 ml に減圧濃縮した。この濃縮液を活性炭カラムに移しジクロロメタン/ヘキサン (10:90 v/v) 50 ml で、次いでトルエン 100 ml で溶出させた。トルエン画分を 0.5 ml 以下に減圧濃縮後フロリジルカラムに移し、3 %ジクロロメタン/ヘキサン 50 ml で、次いでジクロロメタン 100 ml で溶出させ、ジクロロメタン溶出液を減圧濃縮した。これをヘキサン 2 ml に溶かし濃硫酸 1 ml で洗い、次に水洗後ヘキサン層を分離して室温で一晩放置して溶媒を留去した後 n-ノナン 20 μ l に溶かして Gas Chromatograph/Mass spectrometry (GC/MS)-Selected ion monitoring (SIM) 用試料とした。GC/MS-SIM の機器およ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 290°C, イオン化電圧 70 eV, 加速電圧 5 kV, イオン化電流 1000 μ A, イオン化モード EI モード, 分解能 7000 であった。

結 果

実験 I. 粗製 RBF とコレステラミン併用投与による排泄促進実験

1. 服用回数と排便回数：患者 A は投与 4 日目、6 日目および 7 日目に計画では 1 日 3 回であるが 2 回しか服用しなかった。また、排便回数は投与前が 6 日間で 7 回、投与中が 6 日間で 8 回と 1.3 倍に増加した。患者 B は計画通りコレステラミンと RBF を服用している。この患者は平常時から排便回数が 6 日間で 8 回 (1 日平均 1.3 回) と比較的多いが投与後は 6 日間で 11 回 (1 日平均 1.8 回) と投与前の 1.4 倍に増加した。患者 C は投与開始後 5 日目のみ 3 回で他の日は 2 回であり 7 日目はまったく服用しなかった。投与前、投与中ともに 1 日 1 回規則的に排便している。患者 D は計画通り服用した。投与前は 5 日間で 4 回しか排便がなく、やや、便秘ぎみであったが服用中は 1 日 1 回規則的に排便した。

2. 粗製 RBF とコレステラミン併用投与による PCDFs の糞便への排泄促進

Table 1 に粗製 RBF とコレステラミン併用投与による PCDFs の排泄促進治療の結果を示す。RBF およびコレステラミン投与前と投与中の 1 日排便量を平均値で比べると患者 A で 36%, B で 113% および D で 87% 増加したが、C では 29% 減少していた。次に、患者 A, B, C および D の PnCDF の糞便への排泄量は投与前では、それぞれ、840, 1670, 250 および 260 pg/day であり、これに対して投与中のそれは 1190 (42% 増), 2960 (77% 増), 130 (48% 減) および 488 (88% 増) pg/day であった。一方、HxCDFs の糞便への排泄

量は投与前では、それぞれ、850, 1580, 260 および 150 pg/day であり、これに対して投与中のそれは 910 (7%増), 2320 (47%増), 78 (70%減) および 210 (40%増) pg/day であった。即ち、RBF とコレステラミンの投与により PnCDF の糞中への排泄は 4 名中 3 名で 42~88%, HxCDFs では 7~47%増加した。

実験Ⅱ. 精製 RBF とコレステラミン併用投与による排泄促進実験

1. 服用回数と排便回数：患者 A の服用回数は 1 日 2 回であり計画の 3 分の 2 であった。また、排便回数は投与 1 週目では投与前と変わらないが投与 2 週目では 7 日間で 13 回と投与前に較べて約 2 倍に増加した。糞便試料は 1 週目 6 回中 5 回, 2 週目では 13 回中 8 回しか回収できなかった。これは 1 日の排便のうち 2 回目が勤務先であり回収できなかったことによる。患者 B は計画通り RBF とコレステラミンを服用した。この患者は平常時から排便回数が 1 日平均 1.4 回と比較的多いが投与後は 1 日 2 回と投与前の約 1.4 倍に増加した。患者 E は RBF とコレステラミンを計画通り服用した。平常時は 1 日 1 回規則的に排便している。服用直後 2 日間排便が無かったが 3 日目に 1 回, 4 日目に 3 回 5 日目以降に 1 回ずつ排便しており、1 週目の平均排便回数は投与前とほぼ同じであった。2 週目では毎日 1 回または 2 回の排便があり、排便回数は平均で投与前の 1.4 倍に増加した。患者 B および E では糞便は完全に回収できた。患者 F は RBF およびコレステラミン

を計画通り完全に服用した。排便回数は服用前と較べ 1 週目で 1.4 倍, 2 週目で 1.8 倍と増加した。糞便試料は 1 週目で 8 回中 1 回, 2 週目で 9 回中 2 回が回収できなかった。

2. 精製 RBF とコレステラミン併用投与による PCDFs の糞便への排泄促進

Table 2 に精製 RBF とコレステラミン併用投与による PCDFs の排泄促進治療の結果を示す。RBF およびコレステラミン投与前と投与中 1 週目および 2 週目の 1 日排便量を平均値で比べると患者 A で 32 および 140%, B で 74 および 95%, E で 77 および 181%, F で 96 および 80%の増加で、いずれの患者においても、投与中は投与前に較べて 1.3~2.8 倍に増加していた。次に、患者 A, B, E および F の PnCDF の糞便への排泄量は投与前では、それぞれ、1130, 1130, 420 および 2350 pg/day であり、これに対して投与中のそれは 1 週目が、それぞれ、710 (37%減), 1500 (33%増), 550 (31%増) および 2450 (4%増) pg/day, 投与 2 週目が 1030 (9%減), 1480 (31%増), 710 (69%増) および 2110 (10%減) pg/day あった。一方、HxCDFs の糞便への排泄量は投与前では、それぞれ、1390, 1170, 310 および 2470 pg/day であり、これに対して投与中のそれは 1 週目が、それぞれ、950 (32%減), 2110 (80%増), 380 (23%増) および 2280 (8%減) pg/day で、投与 2 週目が 1140 (18%減), 1500 (28%増), 470 (52%増) および 2210 (11%減) pg/day であった。即ち、

Table 2 The excretion levels of PCDFs into the stool from Yusho patients before and after administration of refined rice bran fiber and cholestyramine

Patient	Sex	Age		Stool weight (g/day)	PnCDF ^{a)} (pg/day)	HxCDFs ^{b)} (pg/day)
A	male	61	before	68	1130	1390
			after 1 week	90	710	950
			after 2 week	163	1030	1140
B	female	57	before	210	1130	1170
			after 1 week	365	1500	2110
			after 2 week	410	1480	1500
E	male	63	before	75	420	310
			after 1 week	133	550	380
			after 2 week	211	710	470
F	female	59	before	80	2350	2470
			after 1 week	157	2450	2280
			after 2 week	144	2110	2210

a) 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran

b) 1, 2, 3, 4, 7, 8-and 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexachlorodibenzofurans

Rice bran fiber (85 % content as dietary fiber) was used.

RBF とコレスチラミンの投与により PnCDF および HxCDFs の糞中への排泄は 4 名中 2 名 (患者 B および E) が投与期間中増加した。それぞれの投与期間中の PnCDF および HxCDFs の 1 日の平均増加率は患者 B が 32 および 52% E が 50 および 38% であった。

考 察

すでに、われわれは 6 名の患者に 6 カ月にわたってコレスチラミンを服用させ PCDFs の糞便中への排泄促進を観察したが、その有効性は確認できなかった。また、患者の糞便中への PCDFs の排泄量は患者の皮下脂肪や血液中 PCDFs 濃度と比例していることを明らかにし、さらに、排泄促進剤のスクリーニングは 1 週間程度の臨床治療実験により可能であることを示した²⁾。竹中らはラットに精製した RBF とコレスチラミンを併用投与することにより PCBs の排泄が 5.7 倍に促進されることを報告している⁶⁾。実験 I では、結果の項で述べたように粗製 RBF とコレスチラミンの投与により PnCDF および HxCDFs の糞中への排泄は、投与前と比較して患者 A、B および D においては、それぞれ、42~88% および 7~47% 増加した。しかし、患者 C のみは、逆に、投与前と比較して 48 および 70% 減少した。この原因の 1 つとして RBF とコレスチラミンの服用回数が 2 回と少なかったことも考えられるが、この患者は前回のコレスチラミン単独投与の場合も投与前の約半分に減少していることからみて、コレスチラミン単独投与あるいは RBF とコレスチラミンの併用投与はこの患者にとって有効に作用しないと考えられた。以上のことから RBF とコレスチラミンの併用投与はコレスチラミンのみの単独投与より排泄促進法としての有効性が示唆された。次に、併用投与の有効性を確認するため、実験 II では投与期間を実験 I の 2 倍の 14 日間とし、また、排泄促進効果の増加を目的として RBF の純度を 85% に精製して臨床実験を行った。その結果、結果の項で述べたように、患者 B および E では RBF とコレスチラミンを併用投与することによって PnCDF および HxCDFs の糞中排泄量は投与前の、それぞれ、31~69% および 23~80% 増加した。これに対して、患者 A および F では PCDFs の糞中排泄量は逆に減少した。これらの原因として、患者 A では投与後の糞便試料が 19 件のうち 13 件しか回収されなかったことと、服用回数が計画では 1 日 3 回であるのに実際には 2 回であったことが考えられる。また、患者 F については、RBF とコレスチラミンの服用は完全に行われているが、糞便の回収が 17 件のうち 14 件

と不完全であった。このため、患者 A および F の PCDFs の糞便中排泄量の結果は治療効果の検討に加えることは適当でないと考えられる。患者 B および E の結果は、RBF とコレスチラミンの併用による PCDFs の排泄促進効果を再確認できたが、当初期待した RBF の投与量の増加 (繊維含有率を 1.7 倍に精製して投与量を実験 I と同じ 10 g としたので繊維の摂取量は実質的に 1.7 倍に増加) による PCDFs の排泄促進効果の向上は達成できなかった。また、投与 2 週間目の PCDFs の排泄量は 1 週目と同程度か、それより多いという結果であるが、今後、長期間の効果についてはさらに検討する必要がある。また、臨床実験では実験 I または II の繊維の投与量以下の投与量でも排泄促進効果を得る可能性も考えられる。RBF 10 g の服用は患者にとって相当の負担であり、繊維の服用量の軽減は長期の治療実験における 1 つの課題である。実験 II で、患者 A は 1 日 2 回しか RBF およびコレスチラミンを服用していないが、これは RBF がかなり量的に多く、また、ざらざらと飲む時に喉に引っかかる感じがあるなど、飲みにくいことも 1 つの原因でありこれが治療効果に影響していると思われる。今後、RBF を細粒化し、服用量も減らすなどして服用しやすくする改善が必要と思われる。

総 括

粗製 RBF (食物繊維含量 50%) とコレスチラミンの 1 週間連続の併用投与によって 4 名の臨床例のうち 3 例で PnCDF および HxCDFs の糞便中排泄が、それぞれ、42~88% および 7~47% 促進された。精製 RBF (食物繊維含量 85%) とコレスチラミンの 2 週間連続の併用投与によって 4 名の臨床例のうち 2 例で PnCDF および HxCDFs の糞便中排泄が、それぞれ、31~69% および 23~80% 促進された。即ち、RBF とコレスチラミンの併用投与によって PCDFs の糞便中排泄が促進されることが示唆された。しかし、両実験はともに治療例数が 4 例と少ない上に、それぞれ、1 例および 2 例で PCDFs の糞便中への排泄が促進されなかった。今後、例数を増す排泄促進効果の確認を行うとともに、長期間投与を可能にするために RBF を服用しやすくする必要がある。

本研究は平成 2 年度および 3 年度の厚生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。

この研究の一部はダイオキシンとその関連化合物に関する第 12 回国際シンポジウム (1992 年 8 月 24-28 日、

Tampere) で発表した。

文 献

1) 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中の Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs). 福岡医誌, 80: 296-301, 1989.

2) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 竹中重幸, 森田邦正, 梶崎幸範, 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.

3) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Nakag-

awa R, Takenaka S, Morita K, Narazaki Y, Fukamachi K, Takahashi K and Yoshimura H: Levels of polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in the blood, subcutaneous adipose tissue and stool of Yusho patients and normal subjects. Toxicolal and Envilonmental chemistry 35: 17-24, 1991.

5) 勝木司馬之助: 序言. 福岡医誌, 60: 407, 1969.

6) 竹中重幸, 森田邦正, 高橋克巳: ミネカ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. 福岡医誌, 82: 310-316, 1991.

7) Wong C K: Foreword. Clin. Med. (Taip ei), 7: 1, 1981.

油症患者及び対照者の母乳中の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs 濃度の比較

福岡県保健環境研究所

松枝隆彦・飯田隆雄・平川博仙

深町和美・常盤 寛

九州大学医療技術短期大学部環境科学研究室

長 山 淳 哉

Concentration of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in Breast Milk of Yusho Patients and Normal Subjects

Takahiko MATSUEDA, Takao IIDA, Hironori HIRAKAWA,
Kazumi FUKAMACHI and Hiroshi TOKIWA

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, Fukuoka 818-01

Junya NAGAYAMA

*Laboratory of Environmental Health Sciences, School of Health Sciences,
Kyushu University 90, Fukuoka 812*

Levels of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs were measured in human breast milk obtained from two Yusho patients and nine healthy subjects. The concentrations of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in the breast milk of respective Yusho patients were 18.2 and 28.9, 168.8 and 418.3, and 23.8 and 55.1 pg Toxic Equivalents (TEQs)/g fat, respectively, and their mean concentrations in normal controls were 8.2, 5.1 and 21.8 pg TEQ/g fat, respectively. The results also indicated that there was a significant difference between Yusho patients and normal subjects in the concentrations of certain isomers of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in the breast milk. For example, the levels of 1,2,3,6,7,8-HxCDD were 4 and 8 times higher than the mean concentration in the normal subjects, and 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF and 1,2,3,6,7,8-HxCDF, so-called 'Yusho isomers' were 15 to 98 times higher than those in the normal subjects. Daily intakes of TEQ values were estimated to be 506 and 2200 pg TEQs/kg/day for breast-feeding babies of Yusho patients, and to be from 97 to 197 pg TEQs/kg/day for healthy subjects. These TEQ values were much greater than the ADI of 1-10 pg/kg/day. therefore, we should give due attention to the possible health effects due to PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in the breast milk of healthy mothers, as well as Yusho mothers.

はじめに

1968年、西日本一帯で発生したカネミライスオイルによる中毒事件は当初カネミライスオイルに混入したポリ塩化ビフェニル (PCBs) が発症原因物質²⁴⁾と考えられたが、その後、PCB製品 (Kanechlor-400)²⁵⁾、加熱されたPCB¹¹⁾ および油症原因カネミライスオイルなどの中からポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs) が検出され¹²⁾、さらに、油症患者の人体組織から高濃度に

PCDFsが検出された⁷⁾¹³⁾。このPCDFsの毒性がきわめて高いことなどから、今日ではカネミライスオイル中に微量含有されるPCDFsが油症発症の主原因物質であると考えられている。一方、PCDFsはポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン (PCDDs) と共にゴミ焼却場排ガス¹⁷⁾、自動車排ガス¹⁾、パルプ工場廃水²¹⁾などに検出され、大気¹⁴⁾、食品²²⁾、土壌¹⁶⁾、人体⁴⁾などを広範に汚染していることが明らかにされてきた。母乳は人体汚染の有力な指標となるうえ、乳児への影響も懸念されるた

め、世界各国で広範な調査がすすんでいる³⁾¹⁹⁾²⁰⁾。しかし、油症患者の母乳の濃度レベルについては、あまり報告がみられない。母乳中の PCDDs および PCDFs による汚染が乳児に与える影響については不明な点が多いが、最近、Koppe ら⁸⁾ は肝臓の酵素誘導、Bleeding に影響を与えると報告している。油症発生初期の段階では直接母乳経由で発生した油症（経母乳油症児）について、明確な証明はなされていないが、一例報告されている²⁷⁾。油症患者の脂肪組織中には油症発生以来 18 年経過した時点でも PCDFs が健常者の 100 倍も高い濃度で検出⁵⁾ されることがから油症患者においても母乳の汚染レベルが高いことが推測される。したがって、油症患者から乳児への汚染を未然に防止する立場からも油症患者の母乳中の PCDDs および PCDFs 濃度を把握しておくことは重要と考えられる。そこで本研究では 2 名の油症患者の協力を得て母乳を採取するとともに、対照として 9 名の健常者の母乳について PCDDs, PCDFs およびこれに匹敵する毒性を有するコプラナー PCBs (Co-PCBs) の分析も同時に行い、授乳によるリスクの評価を試みた。

実 験 方 法

1. 試料

油症患者母乳：油症患者 (M. U. : 年齢 32 歳, 初産) より出産後の初乳およびその翌日から 1 日ごとに、4 日間すべての母乳を採取し、1 日ごとに試料を合わせ分析用試料とした (合計 5 件の母乳 : 50~100 ml, 1988 年 4 月)。油症患者 (S. T. : 年齢 30 歳, 初産) からも同様に出産後の初乳およびその翌日から毎日、6 日間、合計 7 件の母乳を採取 (1990 年 5 月) した。

健常者の母乳：福岡市内の病院において 1991 年 5 月から 6 月にかけて分娩した 9 名の健常者 (年齢 25~32 歳, 平均 30 歳, 初産 4 名, 経産 5 名) より出産後 2 週間以内に 100~250 ml の母乳を採取した。

2. 試薬

内部標準として使用した¹³C-PCDDs, PCDFs および¹³C-コプラナー-PCBs はいずれもケンブリッジ・アイソトープ社製である。試料の抽出および精製に使用した溶媒でトルエンはキシダ化学製残留農薬分析用, エタノール, ヘキサン, アセトン, ジクロロメタンは和光純薬製残留農薬分析用 1000, 石油エーテルおよびジエチルエーテルは和光純薬製残留農薬用 1000 をそれぞれ使用した。その他, 和光純薬製の有害金属用硫酸, メルク社製シリカゲル, PCB・フタル酸試験用無水硫酸ナトリウムなどを使用した。

3. 分析方法

1) 母乳試料の精製

母乳 50~100 ml を採取し,¹³C でラベルした PCDDs, PCDFs および Co-PCBs を内部標準として添加した。この溶液にしゅう酸ナトリウム 1 g とエタノール 50~100 ml を加え, ジエチルエーテルと石油エーテルの混合溶媒 (1:1) 100 ml で 2 回抽出した。有機層を集め水洗した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水した。この試料を予め秤量した 50 ml ナス型フラスコに移し, 溶媒をロータリーエバポレーターで除去し残さを恒量とし, 重量法により脂質含有量を測定した。抽出物をヘキサンに溶解後, 分液ロートに移し, ヘキサン層が着色しなくなるまで硫酸洗浄した。ヘキサン層を水洗した後, 脱水し, ロータリーエバポレーターを使用して 1~2 ml まで濃縮した。ヘキサン溶液は最初に硝酸銀-シリカゲルカラムにより精製した後, 活性炭カラムで処理し, PCBs と他の成分 (PCDDs, PCDFs および Co-PCBs) を分離し, 最後にフロリジルカラムを使用して PCDDs/PCDFs と Co-PCBs を分離した。この方法の詳細は既報⁸⁾ に示す通りである。

2) GC/MS 分析

Co-PCBs の分析はカドレックス社製 OV-17 カラム (0.25 mm×25 m, 膜厚 0.1 μm) を使用した。カラムは, 120 °C で一分間保持した後, 170 °C まで 10 °C/min, 次いで 260 °C まで 20 °C/min で昇温した。キャリアガスはヘリウムを使用し, 線速度は 38 cm/sec に設定した。

PCDDs/PCDFs の分析はスペルコ社製 SP-2331 カラム (0.32 mm×30 m, 膜厚 0.25 μm) を使用した。カラムは, 120 °C で一分間保持した後, 180 °C まで 20 °C/min, 次いで 240 °C まで 5 °C/min で昇温した。最後に 250 °C まで 20 °C/min で昇温した。キャリアガスはヘリウムを使用し, 線速度は 30 cm/sec に設定した。質量分析計の測定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 70 eV, 加速電圧 5 KV, イオン化電流 1000 μA, に調整し, 分解能は 7000~10000 に設定して測定した。モニターイオンは既報⁸⁾ の通りである。

結 果

2 名の油症患者 S. T. および M. U. より採取した母乳中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度 (以後, 単位はすべて脂質重量当たりで表示) の最低, 最高, 平均および標準偏差を Table 1 および 2 に示した。なお, 油症患者 S. T. は出産後の初乳およびそれ以降 6

日間, 毎日採取した計 7 日分のデータをすべて示した。油症患者 U. M. については初乳を含めて以後 5 日間のデータをすべて示した。PCDDs および PCDFs の 2, 3, 7, 8-TCDD Toxic Equivalent (TEQ) の計算は NATO¹⁵⁾ の換算係数を用い, また, Co-PCBs については Safe¹⁸⁾ の報告値を使用した。Table 3 に健常者および油症患者母乳中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度の最低, 最高, 平均および標準偏差を示した。

1. PCDDs

Table 1~3 に示したように健常者および油症患者の母乳中には人体中に残留しやすい 2, 3, 7, 8 位に塩素が置換した PCDD 異性体がすべて検出された。健常者, 油症患者 S. T. および M. U. の母乳中の総 PCDD 濃度は平均でそれぞれ 222.3, 443.4 および 404.3 pg/g であり, やや油症患者の方が高い値を示した。PCDDs/PCDFs の中で最も毒性の高い 2, 3, 7, 8-TCDD の健常者, 油症患者 S. T. および M. U. の母乳中の平均濃度はそれぞれ 1.4, 1.4 および 1.2 pg/g であり, 油症患者と健常者の間に大きな濃度差は認められなかった。また, 健常者, 油症患者 S. T. および M. U. の母乳中の各異性体の平均濃度は次の通りであった。1, 2, 3, 7, 8-PeCDD は 5.7, 11.3 および 15.1 pg/g, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD は 4.3, 1.0 および 2.9 pg/g, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD は 24.2, 95.4 および 189.5 pg/g, 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD は 4.9, 8.6 および 6.1 pg/g, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD は 36.4, 32.1 および 17.8 pg/g, および OCDD は 145.3, 293.6 および 171.8 pg/g であった。最近, 世界各国で母乳中の PCDDs が測定されている。その一部³⁾²⁰⁾を Table 3 に引用した。その結果と比較して 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD, 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD および OCDD の各異性体については油症患者と健常者および外国の調査結果の間に大きな濃度差は認められなかった。一方, 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD はやや油症患者の方が高い値を示した。1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD は油症患者の方が 4 および 8 倍高い濃度を示した。樫本ら⁷⁾は油症患者と健常者の腸間脂肪組織中の PCDD を分析し, HxCDD (1, 2, 3, 4, 7, 8-, 1, 2, 3, 6, 7, 8-, 1, 2, 3, 7, 8, 9-の合計) 濃度が油症患者は健常者の 7 倍であったと報告している。著者ら⁴⁾も油症患者と健常者の皮下脂肪中の HxCDD 濃度に同様の傾向があることを観察した。今回, 母乳についても同様のことが観察され, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD は油症患者の体内に一般の人より多く存在する異性体と考えられた。しかし, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD

の TEF は 2, 3, 7, 8-TCDD の 1/10 で母乳の濃度レベルもさほど高くないことから総 TEQ に占める割合は 4~5% にすぎず, 毒性評価のうえではそれほど問題とされないと考えられる。

2. PCDFs

Table 3 に要約したように健常者, 油症患者 S. T. および M. U. の母乳中の総 PCDF 濃度は平均でそれぞれ 21.5, 456.0 および 1227.4 pg/g であり, 油症患者の方が 21~57 倍高い値を示した。また, 健常者, 油症患者 S. T. および M. U. の母乳中の PCDF 異性体の濃度は次の通りであった。2, 3, 7, 8-TCDF は 2.1, 5.4 および 10.4 pg/g, 1, 2, 3, 7, 8-PeCDF は 0.3, ND および 0.2 pg/g, 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF は 8.5, 309.6 および 745.9 pg/g, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF は 3.3, 94.9 および 322.7 pg/g, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF は 2.3, 38.4 および 117.6 pg/g, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF は 1.7, 5.8 および 29.1 pg/g, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF は 0.5, 1.8 および 0.7 pg/g および OCDF は 2.8, ND および 0.9 pg/g であった。個々の異性体について濃度を比較してみると油症患者は, 2, 3, 7, 8-TCDF では 2.6~5 倍, 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF では 36~88 倍, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF では 29~98 倍, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF では 17~51 倍, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF で 3~17 倍それぞれ健常者より高く, 全体として濃度レベルに顕著な差が認められた。しかし, 1, 2, 3, 7, 8-PeCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF および OCDF については油症患者と健常者の間に濃度差はほとんど認められなかった。すでに油症患者の人体組織中には健常者と比較して遥かに高濃度 (100 倍) の PCDFs が蓄積されていること⁵⁾⁷⁾が分かっており, 今回の結果もその結果とよく一致している。

3. Co-PCBs

Table 3 に示すように健常者, 油症患者 S. T. および M. U. の母乳中の総 Co-PCBs の平均濃度はそれぞれ, 261.5, 374.4 および 950.4 pg/g であった。また, 3, 3', 4, 4'-TeCB (TeCB) の平均濃度は 12.4, 13.1 および 11.5 pg/g, 3, 3', 4, 4', 5-PeCB (PeCB) の平均濃度は 183.4, 111.6 および 160.1 pg/g, 3, 3', 4, 4', 5, 5'-HxCB (HxCB) の平均濃度は 65.7, 249.7 および 778.8 pg/g であった。TeCB および PeCB については油症患者, 健常者ともにほとんど差は認められないが, HxCB については油症患者の濃度レベルは健常者の 4~12 倍とかなり高い値を示している。このような傾向は油症患者の皮下脂肪, 肝臓⁴⁾⁷⁾においても確認されている。Co-PCBs は原因ライスオイル⁷⁾²³⁾, カネクロ

Table 1 Concentration of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in milk samples of Yusho patients (S. T.), pg/g fat basis

Congener	foremilk	Days after the delivery							Max	Mean	SD
		2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days	Min			
2,3,7,8-TCDD	ND	2.9	1.4	2.1	1.0	1.3	1.3	ND	2.9	1.4	0.9
1,2,3,7,8-PeCDD	11.0	18.3	10.8	11.0	9.2	8.7	10.3	8.7	18.3	11.3	3.2
1,2,3,4,7,8-HxCDD	ND	ND	1.8	2.6	ND	ND	2.8	ND	2.8	1.0	1.3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	82.0	137.5	97.1	107.1	90.1	72.3	81.8	72.3	137.5	95.4	21.8
1,2,3,7,8,9-HxCDD	ND	ND	12.8	11.8	11.1	11.3	13.3	ND	13.3	8.6	5.9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	107.0	27.9	23.6	24.4	15.5	11.6	14.5	11.6	107.0	32.1	33.6
OCDD	920.0	416.8	196.7	181.3	144.1	81.4	114.6	81.4	920.0	293.6	296.9
2,3,7,8-TCDF	18.2	4.7	2.8	4.6	2.6	2.3	2.7	2.3	18.2	5.4	5.7
1,2,3,7,8-PeCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
2,3,4,7,8-PeCDF	212.0	429.0	276.6	372.3	311.5	272.4	293.6	212.0	429.0	309.6	71.2
1,2,3,4,7,8-HxCDF	97.1	121.9	87.7	106.0	83.4	79.1	89.3	79.1	121.9	94.9	14.8
1,2,3,6,7,8-HxCDF	31.5	55.2	34.6	41.0	37.9	28.5	40.3	28.5	55.2	38.4	8.7
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	4.5	20.3	3.1	3.6	3.4	2.3	3.1	2.3	20.3	5.8	6.4
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	9.1	ND	1.6	1.5	0.5	ND	ND	9.1	1.8	3.3
OCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
3,3',4,4'-TeCB	11.7	16.9	13.7	15.3	10.1	9.5	14.2	9.5	16.9	13.1	2.7
3,3',4,4',5-PeCB	59.8	180.9	102.6	108.2	131.1	87.3	111.2	59.8	180.9	111.6	37.7
3,3',4,4',5,5'-HxCB	242.2	280.3	240.3	292.5	249.8	205.6	237.4	205.6	292.5	249.7	28.9
Total PCDD	1120.0	603.4	344.2	340.3	271.0	186.6	238.6	186.6	1120.0	443.4	327.0
Total PCDF	363.3	640.2	404.8	529.1	440.3	385.1	429.0	363.3	640.2	456.0	97.0
Total PCDD/PCDF	1483.3	1243.6	749.0	869.4	711.3	571.7	667.6	571.7	1483.3	899.4	336.5
Total Coplanar PCB	313.7	478.1	356.6	416.0	391.0	302.4	362.8	302.4	478.1	374.4	60.7
Total PCDD (TEQ)	15.7	26.5	18.4	20.2	16.0	14.2	16.5	14.2	26.5	18.2	4.1
Total PCDF (TEQ)	120.7	233.0	150.8	201.4	168.2	147.2	160.1	120.7	233.0	168.8	37.3
Total PCDD/PCDF (TEQ)	136.4	259.5	169.2	221.5	184.2	161.4	176.6	136.4	259.5	187.0	41.0
Total Coplanar PCB (TEQ)	18.2	32.3	22.4	25.6	25.7	19.1	23.1	18.2	32.3	23.8	4.7
TEQ (International)	154.6	291.7	191.7	247.1	209.9	180.5	199.7	154.6	291.7	210.8	45.7
Fat (%)	0.4	1.2	1.8	2.0	3.3	3.5	2.1	0.4	3.5	2.0	1.1

Table 2 Concentration of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in milk samples of Yusho patients (M. U.), pg/g fat basis

Congener	Day after the delivery					Min	Max	Mean	SD
	foremilk	2 days	3 days	4 days	5 days				
2,3,7,8-TCDD	1.3	0.7	1.6	1.5	1.0	0.7	1.6	1.2	0.4
1,2,3,7,8-PeCDD	5.0	15.9	16.5	20.0	18.0	5.0	20.0	15.1	5.9
1,2,3,4,7,8-HxCDD	ND	4.2	4.4	3.1	2.6	ND	4.4	2.9	1.8
1,2,3,6,7,8-HxCDD	141.0	216.6	208.5	194.3	186.9	141.0	216.6	189.5	29.5
1,2,3,7,8,9-HxCDD	ND	1.5	10.4	10.4	8.0	ND	10.4	6.1	5.0
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	3.0	22.1	22.4	18.6	23.0	3.0	23.0	17.8	8.5
OCDD	180.0	185.8	170.5	159.3	163.2	159.3	185.8	171.8	11.1
2,3,7,8-TCDF	24.0	4.7	7.1	8.3	7.7	4.7	24.0	10.4	7.7
1,2,3,7,8-PeCDF	ND	ND	0.5	0.4	0.3	ND	0.5	0.2	0.2
2,3,4,7,8-PeCDF	670.0	758.5	793.3	792.1	715.7	670.0	793.3	745.9	52.9
1,2,3,4,7,8-HxCDF	418.6	332.6	307.3	292.2	262.8	262.8	418.6	322.7	59.3
1,2,3,6,7,8-HxCDF	179.4	112.5	108.7	102.8	84.5	84.5	179.4	117.6	36.2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	63.0	24.1	20.3	20.0	17.9	17.9	63.0	29.1	19.1
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	1.0	0.3	0.6	1.4	ND	1.4	0.7	0.6
OCDF	ND	0.7	0.8	1.5	1.5	ND	1.5	0.9	0.6
3,3',4,4'-TeCB	31.2	5.5	8.2	6.3	6.4	5.5	31.2	11.5	11.0
3,3',4,4',5-PeCB	184.2	210.6	148.5	131.3	126.0	126.0	210.6	160.1	36.3
3,3',4,4',5,5'-HxCB	568.9	915.6	832.7	814.6	762.1	568.9	915.6	778.8	129.7
Total PCDD	330.3	446.8	434.3	407.2	402.7	330.3	446.8	404.3	45.3
Total PCDF	1355.0	1234.1	1238.3	1217.9	1091.8	1091.8	1355.0	1227.4	93.4
Total PCDD/PCDF	1685.3	1680.9	1672.6	1625.1	1494.5	1494.5	1685.3	1631.7	80.4
Total Coplanar PCB	784.3	1131.7	989.4	952.2	894.5	784.3	1131.7	950.4	127.6
Total PCDD (TEQ)	18.1	31.3	32.6	32.6	30.1	18.1	32.6	28.9	6.1
Total PCDF (TEQ)	397.8	424.5	439.2	436.6	393.6	393.6	439.2	418.3	21.5
Total PCDD/PCDF (TEQ)	415.9	455.8	471.8	469.2	423.7	415.9	471.8	447.3	25.9
Total Coplanar PCB (TEQ)	47.2	66.9	56.6	53.9	50.8	47.2	66.9	55.1	7.5
TEQ (International)	463.1	522.7	528.3	523.2	474.5	463.1	538.7	502.3	31.0
Fat %	2.7	4.1	4.0	3.8	3.9	2.7	4.1	3.7	0.6

ル-400²³⁾ および食品²²⁾ 中にいずれも検出され、いずれの試料においても TeCB が 90% 以上を占め、HxCB はわずかに 0.1~1% を占めるに過ぎない。健常者の母乳中の TeCB, PeCB および HxCB の割合はそれぞれ 5, 70 および 25% であるが、油症患者の場合は HxCB が 67~82% を占め、いずれも食品またはカネミライスオイルの組成とは非常に異なっている。これは人体内での PCB 異性体の代謝性あるいは排出性の差を反映しているものと推察される。つまり、TeCB は健常者の場合、食品から、油症患者の場合、カネミライスオイルおよび食品から、それぞれ、かなり多く摂取しているが、その残留性が低いため、両者に差がないもの

と考えられる。ところが油症患者はカネミライスオイルを通じて多量の HxCB を摂取したと考えられ、さらに、HxCB の残留性が高いため、油症患者に高いと推察される。

4. TEQ

健常者、油症患者 S. T. および M. U. の母乳中の総 TEQ の平均濃度はそれぞれ、35.0, 210.8 および 502.3 pg/g であり、PCDD-TEQ は 8.2, 18.2 および 28.9 pg/g, PCDF-TEQ は 5.1, 168.8 および 418.3 pg/g, Co-PCB-TEQ は 21.8, 23.8 および 55.1 pg/g であった。油症患者の母乳は健常者の母乳と比較して PCDD レベルは 2.2~3.5 倍、Co-PCB は 1.1~2.5 倍と、や

Table 3 Mean concentration of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in milk samples of Yusho patients and normal subjects, pg/g fat basis

Congener	TEF	Minimum			Maximum			Mean±SD				
		Normal subjects ^a	Yusho patient (S.T) ^b	Yusho patient (M.U) ^c	Normal subject ^a	Yusho patient (S.T) ^b	Yusho patient (M.U) ^c	Normal subjects ^a	Yusho patient (S.T) ^b	Yusho patient (M.U) ^c		
2,3,7,8-TCDD	1.000	0.8	ND	0.7	2.4	2.9	1.6	1.4±0.5	1.4±0.9	1.2±0.4	2.3	3.2
1,2,3,7,8-PeCDD	0.500	2.9	8.7	5.0	10.6	18.3	20.0	5.7±0.5	11.3±3.2	15.1±5.9	4.8	4.6
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.100	ND	ND	ND	11.9	2.8	4.4	4.3±3.7	1.0±1.3	2.9±1.8	—	—
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.100	10.7	72.3	141.0	40.5	137.5	216.6	24.2±11.5	95.4±21.8	189.5±29.5	34.6	18.0
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.100	1.9	ND	ND	8.7	13.3	10.4	4.9±2.7	8.6±5.9	6.1±5.0	6.4	3.9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.010	15.6	11.6	3.0	63.6	107.0	23.0	36.4±16.4	32.1±33.6	17.8±8.5	40.5	32.0
OCDD	0.001	92.3	81.4	159.3	270.3	920.0	185.8	145.3±56.6	293.6±296.9	171.8±11.1	131.7	120.0
2,3,7,8-TCDF	0.100	0.8	2.3	4.7	2.9	18.2	24.0	2.1±0.7	5.4±5.7	10.4±7.7	6.1	2.5
1,2,3,7,8-PeCDF	0.050	ND	ND	ND	0.7	ND	0.5	0.3±0.2	—	0.2±0.2	—	0.9
2,3,4,7,8-PeCDF	0.500	3.7	212.0	670.0	12.3	429.0	793.3	8.5±3.1	309.6±71.2	745.9±52.9	5.2	15.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.100	1.9	79.1	262.8	4.7	121.9	418.6	3.3±1.0	94.9±14.8	322.7±59.3	3.3	5.4
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.100	1.5	28.5	84.5	3.8	55.2	179.4	2.3±0.8	38.4±8.7	117.6±36.2	2.3	7.2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.010	1.0	2.3	17.9	2.5	20.3	63.0	1.7±0.4	5.8±6.4	29.1±19.1	1.1	15.0
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.010	ND	ND	ND	2.6	9.1	1.4	0.5±0.8	1.8±3.3	0.7±0.6	4.5	0.5
OCDF	0.001	0.8	ND	ND	4.4	ND	1.5	2.8±1.3	—	0.9±0.6	—	—
3,3',4,4'-TeCB	0.010	0.4	9.5	5.5	23.0	16.9	31.2	12.4±7.9	13.1±2.7	11.5±11.0	8.1	20.0
3,3',4,4',5-PeCB	0.100	64.0	59.8	126.0	329.0	180.9	210.6	183.4±87.4	111.6±37.7	160.1±36.3	80.5	129.0
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.050	24.0	205.6	568.9	126.0	292.5	915.6	65.7±29.8	249.7±28.9	778.8±129.7	32.7	62.0
Total PCDD		147.9	186.6	330.3	398.2	1120.0	446.8	222.3±72.5	443.4±327	404.3±45.3	220.3	181.7
Total PCDF		16.7	363.3	1091.8	27.7	640.2	1355.0	21.5±4.1	456.0±97.0	1227.4±93.4	22.5	46.8
Total PCDD/PCDF		166.8	571.7	1494.5	425.9	1483.3	1685.3	243.8±74.6	899.4±336.5	1631.7±80.4	242.8	228.5
Total Coplanar PCB		134.0	302.4	784.3	420.0	478.1	1131.7	261.5±103.8	374.4±60.7	950.4±127.6	121.3	211.0
Total PCDD (TEQ)		4.6	14.2	18.1	13.3	26.5	32.6	8.2±3.5	18.2±4.1	28.9±6.1	9.3	8.0
Total PCDF (TEQ)		2.5	120.7	393.6	7.1	233.0	439.2	5.1±1.7	168.8±37.3	418.3±21.5	3.9	10.0
Total PCC/PCDF (TEQ)		7.1	136.4	415.9	20.1	259.5	471.8	13.2±5.0	187.0±41.0	447.3±25.9	13.2	18.0
Total Coplanar PCB (TEQ)		9.5	18.2	47.2	36.5	32.3	66.9	21.8±9.3	23.8±4.7	55.1±7.5	9.8	16.0
TEQ (International)		20.9	154.6	463.1	50.9	291.7	538.7	35.0±10.7	210.8±45.7	502.3±31.0	23.0	34.0
Fat %		3.2	0.4	2.7	6.9	3.5	4.1	4.4±1.5	2.0±1.1	3.7±0.6		

a) n=9 b) n=7 c) n=5 d) Dewailly, É, Weber, J.p., Gingras, S., Laliberté, C.: Coplanar PCBs in human milk in the province of Québec Canada : Are they more toxic than dioxin for breast fed infants? Bull. Environ. Contam. Toxicol. 47: 491-498, 1991. e) Schecter, A., di Domenico, A., Turrio-Baldassarri, L. and Ryan, J.: Dioxin and dibenzofuran levels in the milk of women from four geographical regions in Italy as compared to levels in other countries. Short paper of DIOXIN '92, Organohalogen compounds. 9: 227-229, 1992.

や高い値を示した。一方, PCDF については 33 倍および 82 倍を示し顕著な差が認められ, 総 TEQ は健常者の母乳と比較 6 倍~14 倍高いレベルであった。

考 察

健常者と油症患者の母乳中の PCDDs, PCDFs, Co-PCBs および TEQ の濃度レベルが比較しやすいように, それらの平均濃度を 3 次元グラフ化し, Fig. 1 に示した。この図より油症患者の母乳中には 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDFs, 3,3',4,4',5,5'-HxCB などの化合物および全 TEQ が健常者と比較して際だって高いことが分かる。

母乳中の汚染物質の濃度レベルは母親の出産経歴および出産後の経過日数の影響¹⁰⁾を受けることが分かっている。しかし, 1 週間程度の短期的変動についての報告は見られない。そこで, 今回, 初乳と他の試料を比較したところ, 2 名とも初乳の組成が他の日に採取した試料とかなり異なっていることが分かった。とくに, S. T. の初乳中の 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD および OCDD の濃度が他の日に採取した母乳と比較して 3 倍高い値を示している。これは S. T. の場合, 初乳の脂肪含量が極端に低いことと関係があるようだが, 詳細

は不明である。初乳以外は比較的濃度の変動は少なかった。M. U. の場合も初乳の濃度が平均値からのバラツキが大きい, 他の日のバラツキは比較的少なかった。

油症患者と健常者の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の摂取経路を推定するため, 日本におけるダイオキシン関連物質の食品からの摂取量²²⁾並びにカネミライスオイル中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の分析結果²³⁾をもとにカネミライスオイル, 食品並びに油症患者および健常者の母乳の全 TEQ に対する PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の寄与率を計算した結果を Fig. 2 に示した。油症患者の場合 PCDFs が約 80~83%と最も大きく, ついで Co-PCBs の 7~11%および PCDDs の 6~9%の順であった。この比率は Tanabe²³⁾らのライスオイルの測定結果と比較的よく一致している。一方, 健常者は Co-PCBs が全体の 62%を占め, ついで PCDDs の 23%および PCDFs の 15%の順であった。この比率は食品のそれと近く, 健常者と油症患者では摂取経路の違いがうかがえる。

健常者は主として食品を通じて PCDDs, PCDFs および Co-PCBs を摂取し, その量は TEQ 値で 2~22 pg/kg/day^{21,22)}と推定されている。一方, Masuda⁹⁾は

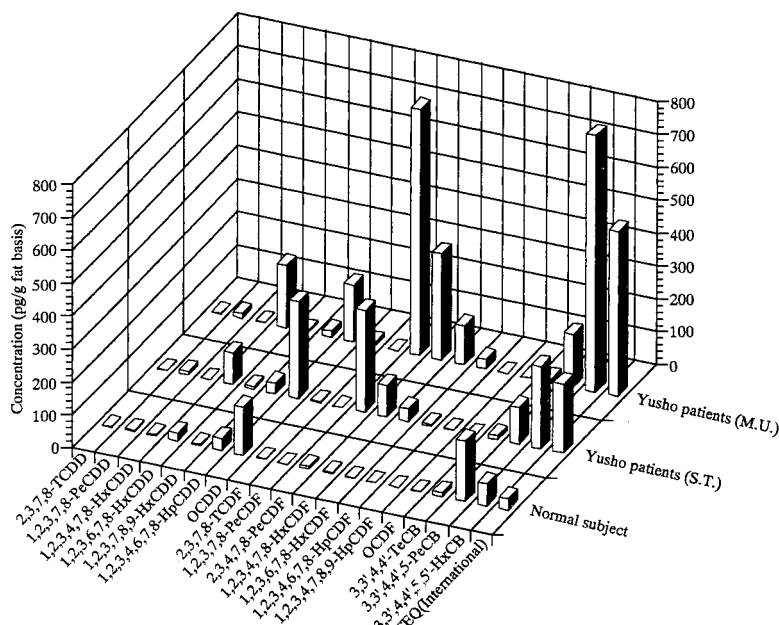


Fig. 1 Concentration of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in the breast milk of Yusho patients and normal subjects

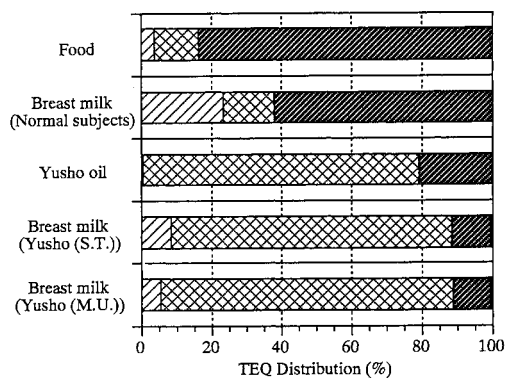


Fig. 2 Contribution of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs to the TEQs in food, Yusho oil, breast milk of Yusho patients and normal subjects
 □: PCDDs ▨: PCDFs ■: Coplanar PCBs

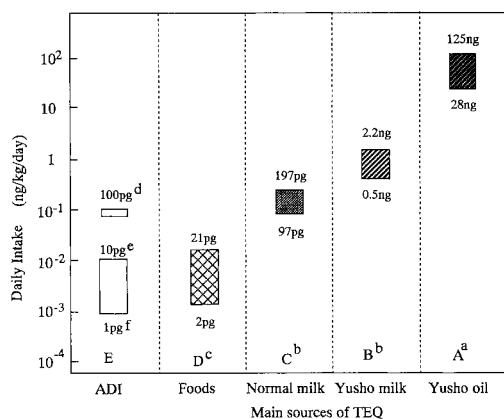


Fig. 3 Comparison of intake levels of TCDD Equivalent by normal babies, Yusho babies, normal adults and Yusho Patients. A: Yusho patients, B: Yusho babies, C: Normal babies, D: Normal adults, E: ADI

^a Quoted from ref. 9 ^b This study ^c Quoted from ref. 2 and 22 ^d Japan (provisional) ^e Germany ^f Italy

油症の最小発症量を 28 ng/kg/day (135 日間摂取) と試算している。これらの報告をもとに油症患者および健康者より授乳される乳児、健康者 (成人) および油症患者の TEQ の一日摂取量を比較検討した結果を Fig. 3 に示す。なお、乳児の一日摂取量は乳児が母親より体重 1 kg 当たり 120 ml の母乳を摂取するものとし

て Table 1-3 に示す脂質含有量と濃度から計算した。油症患者 S. T. の場合乳児の一日摂取量は 506 pg/kg/day, M. U. は 2200 pg/kg/day であり、油症の最低発症量のおよそ 1/20~1/10 であるが、ADI (10 pg/kg/day) の 50~220 倍に達する。一方、健康者の乳児の場合 97~197 pg/kg/day で油症患者の乳児の約 1/10 であった。このように健康者の場合も乳児は母乳を通してかなりの多くの PCDDs, PCDFs および Co-PCBs を摂取していることが分かる。WHO²⁶⁾ は母乳の TCDD などの汚染実態を調査し、汚染が進んでいることを確認しているが、現時点では栄養のバランスなど、総合的に見て母乳による育児を推奨している。しかし、油症発生初期の段階では直接母乳経由で発生した油症 (経母乳油症児) についての報告が見られる²⁷⁾。最近、一般の母親の母乳を授乳しても乳児の肝臓の酵素誘導に影響を及ぼし、さらに母乳中の TCDD 濃度と幼児の bleeding の間に統計的に有意な相関が認められるという報告⁸⁾ もあり、油症患者の母乳中には油症発生以来 18 年経過した時点でも PCDFs などが高濃度に残留し、リスクレベルを高めていることから授乳に対し十分な配慮が必要と考えられた。

総 括

2 名の油症患者および 9 名の健康者より採取した母乳について PCDDs, PCDFs および Co-PCBs を測定し、両者の濃度レベルおよび授乳した場合のリスクを比較検討した。

1. PCDDs について油症患者と健康者の濃度レベルを比較した場合、油症患者は 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD が 4~8 倍高い値を示し、1, 2, 3, 7, 8-PeCDD も、やや高い値を示した。しかし、2, 3, 7, 8-TCDD などそれ以外の異性体は両者にほとんど差は認められなかった。

2. PCDFs について油症患者と健康者の濃度レベルを比較した場合、油症患者は 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF が 36 および 88 倍高い値を示し、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF および 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF も、それぞれ 29~98 倍および 17~51 倍高い値を示した。

1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF はそれほど顕著ではないが、油症患者のほうに 3~17 倍高い値を示した。しかし、2, 3, 7, 8-TCDF など他の異性体は両者にほとんど差は認められなかった。

3. 健康者および油症患者の TEQ 値による一日摂取量を比較検討した結果、油症患者 S. T. の場合、乳児の一日摂取量は 506 pg/kg/day, M. U. は 2200 pg/kg/day であり、油症の最低発症量のおよそ 1/20~1/

10 のレベルで, ADI (10 pg/kg/day) の 220 倍にも達する値であった。一方, 健常者の乳児の場合 97~197 pg/kg/day で油症患者の乳児の約 1/10 であった。

本研究の遂行にあたって貴重な御教示を頂き, さらに, ^{13}C でラベル Co-PCB を供与された, 第一薬科大学, 増田教授に深謝します。

本研究の一部はダイオキシンとその関連化合物に関する第 12 回国際シンポジウム (1992 年 8 月 24~28 日, Tampere, Finland) で発表した。

文 献

- 1) Bingham A G: Determination of PCDDs, PCDFs in car exhaust. *Chemosphere* 19: 669-673 1989.
- 2) Birmingham B, Gimán A, Grant D, Thorpe B, Wile I, Toft D and Armstrong V: PCDD/PCDF multimedia exposure analysis for the Canadian population. Detailed exposure estimation. *Chemosphere* 19: 637-642, 1989.
- 3) Dewailly É, Weber J-P, Gingras S and Laliberté C: Coplanar PCBs in human milk in the province of Québec Canada: Are they more toxic than dioxin for breast fed infants? *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 491-498, 1991.
- 4) 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: 油症患者および対照者の皮下脂肪中の Coplanar PCBs, PCDFs および PCDDs. *福岡医誌* 82: 274-271, 1991.
- 5) 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.
- 6) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Nakagawa R, Takenaka S, Morita K, Narazaki Y, Fukamachi K, Takahashi K and Yoshimura H: Levels of polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in the blood, subcutaneous adipose tissue and stool of Yusho patients and normal subjects. *Toxicol. Environ. Chem.* 35: 17-24, 1992.
- 7) 樫本 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.
- 8) Koppe J G, Pluim H J, Olie K and Wijnen J: Breast milk, dioxins and the possible effects on the health of newborn infants. *The science of the Total Environment*. 106: 33-411, 1991.
- 9) Masuda Y: Toxic evaluation of PCDD and PCDFs by Yusho. *J. Toxicol. Environ. Health*, in press 1992.
- 10) 宮田秀明: PCB. *環境技術* 21: 37-45, 1992.
- 11) Morita M, Nakagawa J, Akiyama K, Mimura S and Isono N: Detailed examination of polychlorinated dibenzofurans in PCB preparations and Kanemi Yusho oil. *Bull. Contam. Toxicol.* 18: 67-73, 1977.
- 12) 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.
- 13) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with Yusho. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 15: 9-13, 1977.
- 14) Nakano T, Tsuji M and Okuno T: Level of chlorinated compounds in atmosphere. *Chemosphere* 16: 1781-1786, 1987.
- 15) NATO: North Atlantic Treaty Organization Committee on the Challenges of Modern Society. Pilot study on international information exchange on dioxins and related compounds. Scientific basis for the development of the international Toxicity Equivalency Factor (I-TEF). Method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. 1988 #178.
- 16) 大崎靖彦, 松枝隆彦, 黒川陽一: 土壌中のダイオキシン類の濃度レベル. *環境化学* 2: 523-531, 1992.
- 17) Olie K, Verneulen P L and Hutzinger O: Chlorodibenzo-p-dioxins and chlorodibenzofurans are trace compounds of flyash and flue gas of same municipal incinerators in Netherland. *Chemosphere* 6: 455-459, 1977.
- 18) Safe S: Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicol.* 21: 51-88, 1990.
- 19) Schecter A, Startin J R, Rose M, Wright C, Parker I, Woods D and Hansen H: Chlorinated dioxin and dibenzofuran levels in human milk from Africa, Pakistan, Southern Vietnam, The Southern U. S. and England. *Chemosphere* 20: 919-925, 1990.
- 20) Schecter A, di Domenico A, Turrio-Baldassarri L and Ryan JJ: Dioxin and dibenzofuran levels in the milk of women from four geographical regions in Italy as compared to levels in other countries. Short paper of DIOXIN'92, Organohalogen compounds. 9, 227-229, 1992.
- 21) Swanson S E, Rappe C and Malmstrom J: Emissions of PCDDs and PCDFs from the pulp industry. *Chemosphere* 17: 681-691, 1988.
- 22) 高山幸司, 宮田秀明, 青笹 治, 味村真弓, 樫本 隆: 日本のお阪地区における食事経路のダイオキシン関連物質の摂取量. *食雑誌* 32: 525-532, 1991.

23) 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 tissue of "Yusho" PCB poisoning victim and in the causal oil. *Toxicol. Environ. Chem.* 24: 215-231, 1989.

24) 塚本久雄他：油症患者が使用したライスオイル中の有害化学物質の検索，-油症研究班分析部会報告書-。福岡医誌 60：496-512, 1969.

25) Vos J G, Koeman J H, van der Mass H I, ten Noever de Brauw M C and de Vos R H: Identifica-

tion and toxicological evaluation of chlorinated dibenzofuran and chlorinated naphthalene in two commercial polychlorinated biphenyls. *Food Cosmet. Toxicol.* 8: 625-633, 1970.

26) WHO. PCBs, PCDDs and PCDFs in breast milk: Assessment of Health Risk. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen (Environmental Health Series, No. 29, 1988).

27) 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 65：74-80, 1974.

ラットにおける食物繊維の PCDF 及び PCDD 排泄促進効果

福岡県保健環境研究所

森田 邦正・平川 博仙・松枝 隆彦

飯田 隆雄・常盤 寛

Stimulating Effect of Dietary Fiber on Fecal Excretion of Polychlorinated Dibenzofurans (PCDF) and Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) in Rats

Kunimasa MORITA, Hironori HIRAKAWA, Takahiko MATSUEDA,
Takao IIDA and Hiroshi TOKIWA

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, Fukuoka 818-01

We investigated the stimulating effect of dietary fiber on fecal excretion of PCDF and PCDD stored in the rat body. Twenty-eight male rats (71-74g body weight) were orally administered with 1ml of the causal rice oil of Yusho disease. The rice oil was contaminated with 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF (691.4ng), 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexaCDF (708.6ng), 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDF (128.4ng), 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDD (7.2ng), 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDD (34.1ng), 1, 2, 3, 7, 8, 9-hexaCDD (20.1ng) and 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptaCDD (115.9ng). The animals were fed a control diet containing 10% cellulose for seven days. Twenty-eight rats consisting of four rats a group were housed and rats of each group were given a treatment diet containing 10% rice-bran-fiber (RBF), 5% cholestyramine, 10% RBF+5% cholestyramine, 10% RBF+5% cholestyramine+1% squalane, 10% burdock-fiber, 10% corn-fiber and 10% soybean-fiber during a period from eight to twenty-one days. The remaining four rats served as controls. PCDF and PCDD in feces, liver, small intestine and gastrointestinal tract were analyzed by high resolution gas chromatography-mass spectrometry. PCDF level in small intestine of rats administered with RBF+cholestyramine showed a decrease of 40% over the level of control rats. However, PCDF level in small intestinal tract showed a 1.6-fold increase over the level of control rats. The fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF in the group fed RBF, cholestyramine, RBF+cholestyramine, RBF+cholestyramine+squalane, burdock-fiber, corn-fiber and soybean-fiber was significantly ($p<0.01$) stimulated 4.5, 3.3, 4.2, 5.3, 1.9, 1.9 and 1.6 times, respectively, as compared with controls. Moreover, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexaCDF and 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDF were excreted in stool at the rate of 2.3, 1.4, 2.1, 2.6, 1.7, 1.6 and 1.6 times, respectively, and 2.2, 1.3, 2.2, 2.3, 1.8, 1.9 and 1.5 times, respectively. The fecal excretion of 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDD in the group fed RBF, cholestyramine, RBF+cholestyramine, RBF+cholestyramine+squalane, burdock-fiber, corn-fiber and soybean-fiber was significantly ($p<0.01$) stimulated 4.3, 4.3, 5.0, 6.1, 1.9, 2.1 and 1.7 times, respectively, as compared to controls. In addition, 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDD, 1, 2, 3, 7, 8, 9-hexaCDD and 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptaCDD were excreted in stool at the rate of 2.7, 2.3, 2.8, 3.7, 1.9, 2.2 and 1.9 times, respectively, 1.9, 1.8, 1.6, 2.6, 1.5, 1.6 and 1.4 times, respectively, and 1.1, 1.0, 1.1, 1.9, 1.0, 1.1 and 1.1 times, respectively. These results suggest that administration of RBF or other dietary fiber is useful for the therapy of Yusho patients.

はじめに

1968年、西日本一帯で発生したカネミ油症事件は

Polychlorinated biphenyls(PCB)の製品である Kane-chlor 400 で汚染されたライスオイルを摂取したこと
による食中毒事件であった。このライスオイルには油

症の原因物質として PCB の他に, Polychlorinated Dibenzofurans(PCDF), Polychlorinated Dibenzodioxins(PCDD)等の組織残留性の高い塩素系化合物が含まれており⁵⁾⁹⁾, 油症患者の体内には今なお微量ながら残留している²⁾³⁾⁴⁾. とくに, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-P₅CDF) は健康者の皮下脂肪中にも ppt レベルで存在する世界的な環境汚染物質である³⁾. 最近, PCB, PCDF 等を体外に排出させる研究が試みられ, コレスチラミン, 流動パラフィン, スクワランは PCDF 等の糞中排泄促進剤としての効果が認められている¹⁾⁴⁾¹⁴⁾. 一方, 食物繊維は生体防御, 体調リズム調節, 疾病の防止と回復等に係わる体調節機能を持つ食品の1つとして, その価値が注目されている. そこで, われわれは油症原因物質が腸管内で食物繊維に吸着し再吸収を抑制され, 糞便中への排泄が促進されるならば油症の治療薬となると考えた. 酵素処理により, 米ぬかから精製した米ぬかファイバー(RBF)を用いて, PCB, PCDF, PCDD の in vitro 吸着実験を行ったところ, RBF は90%以上の吸着効果を示した⁸⁾. さらに, PCB を経口投与したラットを使った実験で, RBF は PCB の糞中排泄促進剤としての効果が認められた¹³⁾. 今回, 油症原因ラيسオイルを経口投与したラットに治療食として RBF 等のファイバーを与え, PCDF, PCDD の排泄促進について検討したので報告する.

実験方法

1. 実験材料

油症原因ラيسオイルは油症患者から提供された未使用のもので, 1 ml 当たり 2,3,4,7,8-P₅CDF が 691.4 ng, 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (1,2,3,4,7,8-P₆CDF) が 708.6 ng, 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzofuran (1,2,3,6,7,8-P₆CDF) が 128.4 ng, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (1,2,3,7,8-P₅CDD) が 7.2 ng, 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin (1,2,3,6,7,8-P₆CDD) が 34.1 ng, 1,2,3,7,8,9-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin (1,2,3,7,8,9-P₆CDD) が 20.1 ng, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin (1,2,3,4,6,7,8-P₇CDD) が 115.9 ng 含まれるものを使用した.

RBF はアミラーゼとパンクレアチンを用いた酵素処理により, 米ぬかから食物繊維 52.0%と 85.4%のものを精製した. 食物繊維の定量は Southgate 法¹²⁾で測定した. 同様に, ゴボウ, コーン, 大豆からそれぞれ食物繊維 90.7, 86.4, 83.6%のゴボウファイバー, コ

ーンファイバー, 大豆ファイバーを精製した.

コレスチラミンはプリストル・マイヤーズ (株) から提供されたものを使用した.

ヘキサン, アセトン, クロロホルム, メタノール, ジクロロメタン, 無水硫酸ナトリウムは和光純薬 (株) 製の残留農薬試験用を, その他の試薬は特級品を使用した.

ラットは成和実験動物 (株) から購入し, ラットの餌のカゼイン, ミネラル混合ハイパー, ビタミン混合ハイパー, グラニュー糖はオリエンタル酵母 (株) 製を使用した.

2. 動物実験

実験-1 小腸および消化管管腔への PCDF 分布量の実験には食物繊維含量 52.0%の RBF を用いた. 4 週齢の Wistar 系雄性ラット (体重 72~80 g) を購入し, 1 群 4 匹として 2 群に分けて使用した. 食餌組成はコントロール食がセルロース 10%, カゼイン 20%, グラニュー糖 60%, コーンオイル 5%, ミネラル混合ハイパー 4%, ビタミン混合ハイパー 0.85%, 塩化コリン 0.15%とした. RBF+コレスチラミン食は RBF 10%, コレスチラミン 5%, グラニュー糖 55%とし, 他はセルロースを除いたコントロール食の組成と同一にした. 2 群とも油症原因ラيسオイル 1 ml を 1 回経口投与した後, コントロール群 (非治療群) はコントロール食で 35 日間飼育し, RBF+コレスチラミン群は 7 日目までコントロール食を与えた後, RBF+コレスチラミン食で 8 日目から 35 日目まで飼育した. 35 日目に, 胃, 小腸, 大腸内の内容物を採取した. なお, 小腸部位は十二指腸, 空腸, 回腸とし, 大腸部位は盲腸, 結腸, 直腸とした.

実験-2 PCDF および PCDD の排泄促進の実験には食物繊維含量 85.4%の RBF を用いた. 4 週齢の Wistar 系雄性ラット (体重 71~74 g) を購入し, 1 群 4 匹として 8 群に分けて使用した. コントロール食は実験-1 で使用した食餌組成にした. 治療食は RBF 群が RBF 10%, コレスチラミン群がコレスチラミン 5%, RBF+コレスチラミン群が RBF 10%とコレスチラミン 5%, RBF+コレスチラミン+スクワラン群が RBF 10%, コレスチラミン 5%及びスクワラン 1%とし, ゴボウファイバー群, コーンファイバー群, 大豆ファイバー群はそれぞれのファイバーを 10%含む食餌組成とし, グラニュー糖で含量を調節した. 他はセルロースを除いたコントロール食の組成と同一にした. 8 群とも油症原因ラيسオイル 1 ml を 1 回経口投与し, コントロール群 (非治療群) はコントロール食で

21 日間, 他の 7 種類の治療群は 7 日目までコントロール食を与えた後, 各々の治療食を 8 日目から 21 日目まで与え飼育した. 実験-1 および 2 のラットは代謝ケージに一匹ずつ入れ, 食餌と水は自由に与えた. 定期的に食餌摂取量, 体重を測定し, 糞は 70°C で一夜乾燥し重量を秤量した.

3. 糞および臓器中の PCDF および PCDD の定量

糞および消化管管腔内の内容物はソックスレー抽出器を用いて, 16 時間クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 150 ml で抽出した. 抽出液に水を加えクロロホルム層を分取したのち無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 濃縮後クロロホルムで 50 ml にした. 臓器はポトリオンでホモジネートし, クロロホルム-メタノール (1:1, v/v) 50 ml で 3 回抽出した. 以下, 抽出液は糞と同様に操作した. クロロホルム抽出液の一部あるいは全部を取り, クロロホルムを留去した後ヘキサン 20 ml を加えた. これに, GC-MS 測定のための内標として $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,7,8- P_5 CDF を 800 pg, $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8- P_6 CDF, $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8- P_5 CDD, $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8- P_6 CDD および $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8- P_7 CDD を 500 pg を添加し, 濃硫酸 10 ml で 5-7 回処理した. このヘキサン溶液を 0.6 g の硝酸銀シリカゲルカラムに注入し, ヘキサン 10 ml で溶出させ 2 ml に濃縮した

のち, さらに, 0.6 g のフロリジルカラムにかけヘキサン 8 ml で PCB を, 続いてジクロロメタン 20 ml で PCDF, PCDD を溶出させた. 溶出液は乾固し, ヘキサン 1 ml を加え硫酸処理を 1 回行った. PCDF 及び PCDD は 50%メチルフェニルシリコンのキャピラリーカラム (25 m×0.25 mm) を装着した GC-MS (Varian3400 Finnigan MAT-90) を用いて分解能 8000 の selected ion monitoring 法で定量した.

実 験 結 果

1. 小腸および消化管管腔への PCDF 分布量

油症原因ライスオイル投与後 35 日目に屠殺したラットの小腸および小腸管腔への PCDF 分布量を Table 1 に示す. 非治療群の小腸への 2,3,4,7,8- P_5 CDF, 1,2,3,4,7,8- P_6 CDF, 1,2,3,6,7,8- P_6 CDF 分布量はそれぞれ投与量の 0.0191 ± 0.0025 , 0.0138 ± 0.0050 , $0.0163 \pm 0.0026\%$ であったのに対し, RBF+コレステラミン群の分布量はそれぞれ 0.0112 ± 0.0033 , 0.0092 ± 0.0026 , $0.0088 \pm 0.0025\%$ と RBF+コレステラミン群の小腸への分布量はそれぞれ非治療群の 58, 66, 54%と有意な低下が認められた. 一方, 小腸管腔への 2,3,4,7,8- P_5 CDF, 1,2,3,4,7,8- P_6 CDF, 1,2,3,6,7,8- P_6 CDF 分布量は非治療群でそれ

Table 1 Effect of RBF+cholestyramine diet on small intestinal distribution of PCDF in rats

	Small intestine		
	Tissue	Tract	Total
Control			
2, 3, 4, 7, 8- P_5 CDF	131.9±17.1 (0.0191±0.0025)	25.5 (0.0037)	157.4 (0.023)
1, 2, 3, 4, 7, 8- H_6 CDF	98.0±35.5 (0.0138±0.0050)	19.4 (0.0027)	117.4 (0.017)
1, 2, 3, 6, 7, 8- H_6 CDF	21.0±3.4 (0.0163±0.0026)	4.2 (0.0033)	25.2 (0.020)
RBF+cholestyramine			
2, 3, 4, 7, 8- P_5 CDF	77.1±22.7** (0.0112±0.0033)	42.4 (0.0061)	119.5 (0.017)
1, 2, 3, 4, 7, 8- H_6 CDF	65.0±18.7* (0.0092±0.0026)	31.4 (0.0044)	96.4 (0.014)
1, 2, 3, 6, 7, 8- H_6 CDF	11.3±3.3** (0.0088±0.0025)	6.9 (0.0054)	18.2 (0.014)

Values represent the mean(pg)±SD for four rats, and the mean of percent of dose in parenthesis.

** Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

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

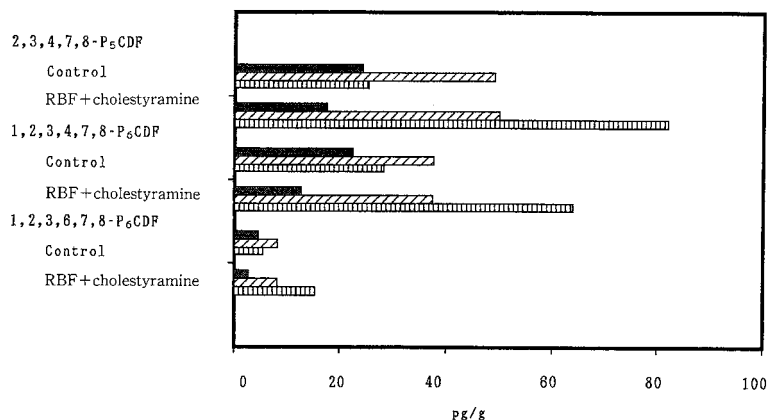


Fig. 1 Concentration of PCDF into gastrointestinal tract

■ Concentration of PCDF into stomach tract
 ▨ Concentration of PCDF into small intestinal tract
 ▤ Concentration of PCDF into large intestinal tract

ぞれ投与量の0.0037, 0.0027, 0.0033%であったのに対し, RBF+コレスチラミン群の分布量はそれぞれ0.0061, 0.0044, 0.0054%とRBF+コレスチラミン群の小腸管腔への分布量はそれぞれ非治療群の1.66, 1.62, 1.65 倍の増加が認められた。

小腸と小腸管腔を合わせた2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-P₆CDF, 1,2,3,6,7,8-P₆CDFの総分布量は非治療群でそれぞれ投与量の0.023, 0.017, 0.020%であったのに対し, RBF+コレスチラミン群はそれぞれ0.017, 0.014, 0.014%と非治療群に比べて20~30%低かったが, 総分布量に対する小腸管腔の割合は非治療群でそれぞれ16, 17, 17%であったのに対し, RBF+コレスチラミン群でそれぞれ35, 33, 38%と非治療群の約2 倍の分布割合が認められた。

Fig. 1 に消化管管腔のPCDF濃度を示す。非治療群の消化管管腔の2,3,4,7,8-P₅CDF濃度は胃で24 pg/g, 小腸で49 pg/g, 大腸で25 pg/gであった。1,2,3,4,7,8-P₆CDF濃度は胃で22 pg/g, 小腸で37 pg/g, 大腸で28 pg/gであった。1,2,3,6,7,8-P₆CDF濃度は胃で4.5 pg/g, 小腸で8.1 pg/g, 大腸で5.3 pg/gであった。非治療群の大腸管腔の2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-P₆CDF, 1,2,3,6,7,8-P₆CDF濃度はそれぞれ小腸管腔の51, 75, 66%といずれも減少が認められ, その減少した比率は2,3,4,7,8-P₅CDFが最も大きかった。一方, RBF+コレスチラミン群の2,3,4,7,8-P₅CDF濃度は胃で17 pg/g, 小腸で50 pg/g, 大腸で82 pg/gであった。1,2,3,4,7,8-P₆CDF濃度は胃で13 pg/g, 小腸で37 pg/g, 大腸で64 pg/gで

あった。1,2,3,6,7,8-P₆CDF濃度は胃で2.6 pg/g, 小腸で8.1 pg/g, 大腸で15 pg/gであった。RBF+コレスチラミン群の大腸管腔の2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-P₆CDF, 1,2,3,6,7,8-P₆CDF濃度はそれぞれ小腸管腔の1.64, 1.72, 1.87 倍といずれも上昇が認められ, その上昇した比率は2,3,4,7,8-P₅CDFが最も少なかった。

2. PCDF および PCDD の糞中排泄に及ぼす治療食の効果

油症原因ライソイル投与後8日目から21日目までの治療食投与期間の体重増加量, 食餌摂取量について大きな差はみられなかったが, 糞量はRBF+コレスチラミン群およびRBF+コレスチラミン+スクワラン群で他の群に対して顕著な増加がみられた (Table 2)。

Table 3 および 4 に糞中に排泄されたPCDFおよびPCDDの総排泄量を示す。油症原因ライソイル投与後7日目までに排泄された総排泄量の8群の平均値はそれぞれ投与量の2,3,4,7,8-P₅CDFで15.7%, 1,2,3,4,7,8-P₆CDFで42.6%, 1,2,3,6,7,8-P₆CDFで36.5%, 1,2,3,7,8-P₅CDDで13.8%, 1,2,3,6,7,8-P₆CDDで36.8%, 1,2,3,7,8,9-P₅CDDで51.8%, 1,2,3,4,6,7,8-P₇CDDで66.3%であった。治療食投与期間中に排泄された2,3,4,7,8-P₅CDFの1日当たりの排泄量は投与量に対して非治療群で0.0031%, RBF群で0.0139%, コレスチラミン群で0.0101%, RBF+コレスチラミン群で0.0129%, RBF+コレスチラミン+スクワラン群で0.0162%, ゴ

Table 2 Effect of diets on body weight gain, food consumption, feces amounts and liver weight in rats administered with rice oil used by Yusho patient

Diet	Body weight gain (g)	Food consumption (g)	Feces amounts (g)	Liver weight (g/100g body weight)
from 1 to 7 days				
Control	52.4±3.3	82.5±3.1	7.5±0.8	
RBF	49.4±16.7	83.5±19.7	8.2±1.7	
Cholestyramine	48.9±11.3	78.7±18.1	7.7±1.8	
RBF+cholestyramine	45.0±8.6	74.6±12.7	7.1±1.0	
RBF+cholestyramine+squalane	47.2±3.0	79.0±4.6	7.8±0.5	
Burdock fiber	53.6±9.6	82.8±14.4	7.4±1.6	
Corn fiber	42.6±10.7	74.5±13.1	7.5±1.2	
Soybeans fiber	40.4±7.5*	72.5±5.7*	6.6±0.5	
from 8 to 21 days				
Control	108.9±8.7	273.3±19.6	28.8±3.0	7.2±0.4
RBF	113.4±15.1	270.0±38.0	26.4±3.2	7.7±0.4
Cholestyramine	109.1±7.7	267.1±21.4	24.1±2.3*	7.4±0.4
RBF+cholestyramine	106.5±6.5	278.4±18.2	49.4±4.1**	6.8±0.2
RBF+cholestyramine+squalane	105.2±5.4	286.2±9.4	53.8±4.4**	6.5±0.2*
Burdock fiber	122.8±3.4*	279.3±19.0	31.1±2.5	7.1±0.3
Corn fiber	124.6±6.1*	281.0±19.2	28.3±2.6	7.3±0.5
Soybeans fiber	116.0±3.7	248.1±5.8*	19.4±1.2**	7.5±0.3

Values represent the mean±SD for four rats

** Significantly different from the control group, $p<0.01$.

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

ボウファイバー群で0.0058%, コーンファイバー群で0.0058%, 大豆ファイバー群で0.0055%であり, 投与量に対してきわめて微量の排泄量であった。治療群のその排泄量は非治療群に対して, RBF群で4.5倍, コレスチラミン群で3.3倍, RBF+コレスチラミン群で4.2倍, RBF+コレスチラミン+スクワラン群で5.3倍, ゴボウファイバー群で1.9倍, コーンファイバー群で1.9倍, 大豆ファイバー群で1.6倍の有意な排泄増加が認められた。

RBF群, コレスチラミン群, RBF+コレスチラミン群, RBF+コレスチラミン+スクワラン群, ゴボウファイバー群, コーンファイバー群および大豆ファイバー群の1,2,3,4,7,8-P₅CDFの排泄量はそれぞれ非治療群に対して2.3, 1.4, 2.1, 2.6, 1.7, 1.6, 1.6倍の排泄増加が認められ, 1,2,3,6,7,8-P₆CDFの排泄量はそれぞれ2.2, 1.3, 2.2, 2.3, 1.8, 1.9, 1.5倍の増加が認められた (Table 3)。

PCDDでは, RBF群, コレスチラミン群, RBF+コレスチラミン群, RBF+コレスチラミン+スクワラン群, ゴボウファイバー群, コーンファイバー群および大豆ファイバー群の1,2,3,7,8-P₅CDDの排泄量はそれぞれ非治療群に対して, 4.3, 4.3, 5.0, 6.1, 1.9,

2.1, 1.7倍の有意な排泄増加が認められ, 1,2,3,6,7,8-P₆CDDの排泄量はそれぞれ2.7, 2.3, 2.8, 3.7, 1.9, 2.2, 1.9倍の増加があり, 1,2,3,7,8,9-P₆CDDの排泄量はそれぞれ1.9, 1.8, 1.6, 2.6, 1.5, 1.6, 1.4倍の増加を示し, 1,2,3,4,6,7,8-P₇CDDの排泄量はそれぞれ非治療群に対して, 1.1, 1.0, 1.1, 1.9, 1.0, 1.1, 1.1倍の排泄増加が認められた (Table 4)。

3. PCDF および PCDD の肝臓分布に及ぼす治療食の効果

油症原因ライスオイル経口投与後21日目の肝臓へのPCDFおよびPCDD分布量について各群の間に有意な差は認められなかった (Table 5 および 6)。肝臓への分布量の8群の平均値は投与量に対して2,3,4,7,8-P₅CDFで51.5%, 1,2,3,4,7,8-P₆CDFで46.4%, 1,2,3,6,7,8-P₆CDFで53.8%, 1,2,3,7,8-P₅CDDで27.8%, 1,2,3,6,7,8-P₆CDDで42.6%, 1,2,3,7,8,9-P₆CDDで28.5%, 1,2,3,4,6,7,8-P₇CDDで20.8%と, 肝臓に大部分が蓄積されていた。

考 察

2,3,4,7,8-P₅CDFの主たる排泄は胆汁を介さず,

Table 3 Effect of diets on fecal excretion of PCDF in rats

Diet	2, 3, 4, 7, 8-P ₅ CDF	1, 2, 3, 4, 7, 8-H ₆ CDF	1, 2, 3, 6, 7, 8-H ₆ CDF
from 1 to 7 days			
Control	15.8±3.1	35.4±7.2	37.7±4.9
RBF	16.5±2.9	39.6±3.0	46.1±6.0
Cholestyramine	15.4±5.0	41.7±7.4	37.7±4.8
RBF+cholestyramine	18.9±4.6	49.1±9.8	34.2±1.4
RBF+cholestyramine+squalane	14.8±2.1	43.9±9.1	30.3±1.7
Burdock fiber	12.2±4.0	39.1±2.7	29.6±4.4
Corn fiber	17.9±2.8	50.6±3.5	36.3±3.7
Soybeans fiber	13.8±5.0	41.7±7.7	37.8±4.3
from 8 to 21 days			
Control	0.043±0.007	0.176±0.019	0.186±0.018
RBF	0.194±0.037**	0.404±0.036**	0.408±0.068**
Cholestyramine	0.142±0.021**	0.250±0.099	0.248±0.015**
RBF+cholestyramine	0.180±0.031**	0.361±0.070**	0.402±0.064**
RBF+cholestyramine+squalane	0.227±0.011**	0.459±0.055**	0.426±0.056**
Burdock fiber	0.081±0.011**	0.296±0.024**	0.329±0.032**
Corn fiber	0.082±0.009**	0.288±0.037**	0.343±0.033**
Soybeans fiber	0.068±0.005**	0.273±0.034**	0.278±0.029**

Values represent the mean of percent of dose±SD for four rats

** Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

Table 4 Effect of diets on fecal excretion of PCDD in rats

Diet	1, 2, 3, 7, 8-H ₅ CDD	1, 2, 3, 6, 7, 8-H ₆ CDD	1, 2, 3, 7, 8, 9-H ₆ CDD	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H ₇ CDD
from 1 to 7 days				
Control	13.8±4.5	36.9±7.5	52.4±6.2	62.9±7.6
RBF	10.9±2.4	36.8±2.4	53.7±3.9	68.6±1.8
Cholestyramine	13.2±3.9	37.6±6.9	52.5±5.9	66.8±4.4
RBF+cholestyramine	16.6±1.4	39.0±4.4	53.8±2.3	69.2±2.7
RBF+cholestyramine+squalane	14.4±1.1	33.1±3.3	51.4±4.5	64.6±2.8
Burdock fiber	11.0±3.3	32.1±5.3	48.6±6.0	63.2±4.7
Corn fiber	17.7±3.3	42.2±5.3	53.0±3.0	68.2±1.7
Soybeans fiber	13.2±4.1	35.7±7.6	48.6±9.1	66.3±6.0
from 8 to 21 days				
Control	0.214±0.050	0.224±0.028	0.422±0.043	0.848±0.251
RBF	0.918±0.085**	0.605±0.045**	0.783±0.103**	0.949±0.197
Cholestyramine	0.929±0.054**	0.525±0.059**	0.747±0.047**	0.857±0.099
RBF+cholestyramine	1.066±0.113**	0.634±0.088**	0.673±0.172*	0.966±0.110
RBF+cholestyramine+squalane	1.295±0.050**	0.824±0.072**	1.092±0.136**	1.585±0.127**
Burdock fiber	0.411±0.059**	0.436±0.049**	0.612±0.032**	0.880±0.127
Corn fiber	0.445±0.038**	0.489±0.025**	0.661±0.091**	0.955±0.133
Soybeans fiber	0.360±0.039**	0.416±0.048**	0.573±0.090*	0.966±0.296

Values represent the mean of percent of dose±SD for four rats

** Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

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

Table 5 Effect of diets on liver distribution of PCDF in rats

Diet	2, 3, 4, 7, 8-P ₅ CDF	1, 2, 3, 4, 7, 8-H ₆ CDF	1, 2, 3, 6, 7, 8-H ₆ CDF
Control	53.8±7.3	49.4±7.0	50.8±8.7
RBF	51.6±5.2	45.0±3.6	47.6±6.7
Cholestyramine	54.4±3.0	47.9±10.1	47.9±2.8
RBF+cholestyramine	48.5±1.4	44.4±1.2	47.9±4.9
RBF+cholestyramine+squalane	50.3±2.5	48.3±5.3	57.0±3.7
Burdock fiber	48.5±3.2	45.9±6.5	60.1±6.0
Corn fiber	50.0±1.9	42.8±1.2	59.8±5.3
Soybeans fiber	54.5±6.4	47.9±5.9	59.6±6.4

Values represent the mean of percent of dose±SD for four rats

Table 6 Effect of diets on liver distribution of PCDD in rats

Diet	1, 2, 3, 7, 8-H ₅ CDD	1, 2, 3, 6, 7, 8-H ₆ CDD	1, 2, 3, 7, 8, 9-H ₆ CDD	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H ₇ CDD
Control	31.1±3.1	40.3±5.9	29.8±5.4	24.1±4.9
RBF	25.5±3.5	38.4±4.5	23.9±4.5	19.0±3.0
Cholestyramine	26.5±3.6	43.5±4.6	27.5±4.1	19.9±2.3
RBF+cholestyramine	28.0±4.8	43.9±2.2	28.6±2.1	21.1±1.9
RBF+cholestyramine+squalane	31.4±4.0	44.1±3.2	31.7±2.4	22.8±3.6
Burdock fiber	29.4±4.0	38.7±5.3	28.3±2.0	20.3±4.6
Corn fiber	26.1±2.0	44.8±2.0	28.8±0.9	19.1±0.7
Soybeans fiber	24.5±1.6	47.3±2.8	29.4±3.4	20.4±3.9

Values represent the mean of percent of dose±SD for four rats

血液から小腸管腔への直接的な移行と考えられている⁴⁾。Table 1 に示すように、RBF+コレステラミン群の小腸管腔への2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-P₆CDF, 1,2,3,6,7,8-P₆CDF 分布量は非治療群に比べて約1.6倍の増加を示し、逆に、小腸分布量は非治療群の約60%と低下が認められた。さらに、小腸と小腸管腔を合わせた2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-P₆CDF, 1,2,3,6,7,8-P₆CDF 総分布量に対する小腸管腔の分布割合はRBF+コレステラミン群が非治療群の約2倍高いことが認められた。これは小腸壁を通して小腸管腔に排出されたPCDFがRBFとコレステラミンの吸着効果により保持され、再吸収を強く抑制された結果、小腸管腔の分布量および分布割合が高くなり、さらに、大腸へ下向した結果、小腸分布量の低下を招いたものと思われる。

Fig. 1 に示すように、2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-P₆CDF, 1,2,3,6,7,8-P₆CDF の小腸管腔濃度はRBF+コレステラミン群と非治療群でほぼ同じであったが、RBF+コレステラミン群の大腸管腔濃度はそれぞれ小腸管腔の1.64, 1.72, 1.87倍と上昇を示し、

逆に、非治療群ではそれぞれ小腸管腔の51, 75, 64%と減少が認められた。これは腸管の加水分解、発酵、吸収作用などにより、非治療群では大腸部位で比較的容易に再吸収されたのに対し、RBF+コレステラミン群では再吸収に強く抵抗したことにより、その濃度が上昇したものと思われる。さらに、小腸管腔に対する大腸管腔の濃度比率でみると、非治療群で2,3,4,7,8-P₅CDF は1,2,3,4,7,8-P₆CDF および1,2,3,6,7,8-P₆CDF に比べてかなり濃度の減少が大きかった。このことは2,3,4,7,8-P₅CDF が1,2,3,4,7,8-P₆CDF および1,2,3,6,7,8-P₆CDF に対して再吸収されやすいことを意味している。RBF+コレステラミン群で2,3,4,7,8-P₅CDF は1,2,3,4,7,8-P₆CDF および1,2,3,6,7,8-P₆CDF に比べて濃度の上昇が少ないが、かなり近似した濃度比率であることから、2,3,4,7,8-P₅CDF は強く再吸収抑制を受けたと考えられる。油症原因ライソイル投与後7日目までに排泄された2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-P₆CDF, 1,2,3,6,7,8-P₆CDF の総排泄量の8群の平均値はそれぞれ投与量の15.7, 42.6, 36.5%であったことから (Table 3), こ

の間にそれぞれ84.3, 57.4, 63.5%は吸収されたものと考えられ, 3種類のPCDFのなかで2,3,4,7,8-P₅CDFの吸収率が最も高い, 以上のことは, 組織残留性の高いPCDFの中で, 腸管での吸収が比較的容易なPCDF異性体ほど, 再吸収抑制による排泄促進効果が高いことを強く示唆している。

スクワランおよびコレステラミンについては, 2,3,4,7,8-P₅CDF (1 mg/kg) を経口投与したラットに, 8%スクワラン食, 5%コレステラミン食を与え, それぞれ非治療群の2.9, 1.8倍の排泄増加が確認されている⁴¹⁾。スクワランはコレステロール生合成の中間体であるスクワレンの水素化体で油状の液体であり, 小腸管腔内の2,3,4,7,8-P₅CDFを溶かし, 保持することでその再吸収を阻止すると考えられている。一方, コレステラミンは陰イオン交換樹脂で, 消化管から吸収されず, 腸管内で胆汁酸と結合してその糞中排泄を増加させる働きのある高コレステロール血症治療剤であり, 腸管腔内で胆汁酸と同じくPCDF, PCDDを吸着, 保持することが考えられる。

8日目から21日目まで, コントロール食から治療食に代えると, 7種類の治療群は非治療群に対してPCDFおよびPCDD排泄量の有意な増加が認められた。その排泄増加はRBF+コレステラミン+スクワラン群で最も高く, 続いてRBF+コレステラミン群, RBF群, コレステラミン群, コーンファイバー群, ゴボウファイバー群, 大豆ファイバー群の順序であった。7種類の治療群にみられるPCDF排泄量の増加は非治療群に対して2,3,4,7,8-P₅CDFが最も高く, 続いて1,2,3,6,7,8-P₆CDF, 1,2,3,4,7,8-P₆CDFと吸収が容易なPCDFほど排泄促進効果が高かった。油症原因ラيسオイル投与後7日目までに排泄された1,2,3,7,8-P₅CDD, 1,2,3,6,7,8-P₆CDD, 1,2,3,7,8,9-P₇CDD, 1,2,3,4,6,7,8-P₇CDDの総排泄量の8群の平均値はそれぞれ投与量の13.8, 36.8, 51.8, 66.3%であったので (Table 4), この間にそれぞれ86.2, 63.2, 48.2, 33.7%は吸収されたものと考えられる。PCDD排泄量の増加は非治療群に対して1,2,3,7,8-P₅CDDが最も高く, 続いて1,2,3,6,7,8-P₆CDD, 1,2,3,7,8,9-P₇CDD, 1,2,3,4,6,7,8-P₇CDDとPCDFと同じく吸収が容易なPCDDほど排泄促進効果が高かった。

RBF+コレステラミンの食餌にRBF, コレステラミンとは性状の異なるスクワランを1%加えて, さらに排泄強化を試みた。その結果, RBF+コレステラミン+スクワラン群は2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-

-P₆CDF, 1,2,3,6,7,8-P₆CDF, 1,2,3,7,8-P₅CDD, 1,2,3,6,7,8-P₆CDD, 1,2,3,7,8,9-P₇CDD, 1,2,3,4,6,7,8-P₇CDDの排泄量で, それぞれ非治療群(コントロール食)に対して5.3, 2.6, 2.3, 6.1, 3.7, 2.6, 1.9倍の排泄促進効果を示した。PCDFおよびPCDDの投与量とコントロール食を与えた7日目までの排泄量の比を計算すると, 投与量/排泄量比はそれぞれ6.4, 2.3, 2.7, 7.2, 2.7, 1.9, 1.5となり, 先のRBF+コレステラミン+スクワラン群の排泄促進効果とかなり近似した数値であったことから, RBF+コレステラミン+スクワラン群は小腸壁から排出されたPCDFおよびPCDDのかんりの部分を排泄したものと推定される。優れた排泄促進効果のある治療薬が開発され, 腸管腔のPCDF, PCDDがすべて糞中に排泄されるとすれば, その治療薬の排泄促進効果は, 治療群の小腸分布量が非治療群に対して低下し, 小腸管腔へのPCDF, PCDD排出量が低下することと, 口腔からの投与と腸管からの排出という投与部位の差を考慮しても, 低レベルの経口投与実験でみられる, 投与量/未吸収量比にきわめて近い値になることが考えられる。

4種類のファイバー投与群は非治療群に対してPCDFおよびPCDD排泄量の有意な増加が認められた。とくに, RBF群では最も良好な排泄促進効果がみられ, その効果はコレステラミン群に匹敵した。コーンファイバー群, ゴボウファイバー群, 大豆ファイバー群の間には大きな差はみられなかった。食物繊維は人の消化酵素によって加水分解されない食物中の難消化成分である。食品によって食物繊維を構成するセルロース, ヘミセルロース, リグニン等の成分も異なるが, 大別すると水溶性のものと水不溶性のものの2つに分類される。使用した4種類のファイバーは水不溶性の食物繊維に相当する。ファイバー投与群のPCDFおよびPCDD排泄量の増加は食物繊維がもつ, 便容積および便重量の増加, 排便回数の増加, 消化管通過時間の短縮等の生理作用にも関与していると考えられるが, 小腸管腔に排出されたPCDFおよびPCDDをファイバーが吸着, 保持し, その再吸収をかなり阻止したためと思われる。

最近, 252食品の食物繊維量が調査され, 国民栄養調査成績から日本人の1日当たりの食物繊維摂取量は1985年で17.3gと計算されている⁴²⁾。人は多くの食品から多種類の食物繊維を摂取しているので, 人を対象とした排泄効果を考えるとき, 国民栄養調査成績⁶⁾にある多くの食品を含む食餌を非治療食とすることが最

適と思われるが、実際にラットに与えるのは困難である。人は精製ファイバーを口にするのではなく、またコーン、ゴボウ、大豆だけを摂取しているわけではないが、これらを平常の食品と考え、コーンファイバー群、ゴボウファイバー群、大豆ファイバー群の排泄量の平均値を非治療群の排泄量として計算すると、RBF 群の 2,3,4,7,8-P₅ CDF, 1,2,3,4,7,8-P₆ CDF, 1,2,3,6,7,8-P₆ CDF, 1,2,3,7,8-P₅ CDD, 1,2,3,6,7,8-P₆ CDD, 1,2,3,7,8,9-P₆ CDD, 1,2,3,4,6,7,8-P₇ CDD 排泄量はそれぞれ 2.5, 1.4, 1.3, 2.3, 1.4, 1.3, 1.0 倍の排泄増加を示し、RBF+コレスチラミン群ではそれぞれ 2.3, 1.3, 1.3, 2.6, 1.4, 1.1, 1.0 倍の排泄増加が見込まれる。この数値は人へ RBF の単独投与あるいは RBF とコレスチラミン併用投与を試みた場合の一応の目安になるものと考えられる。

総 括

油症患者の体内に残留する原因物質を糞便を通じて体外へ排出することが根本的な治療につながると考え、油症原因ラيسオイルを経口投与したラットに米ぬかファイバー等の食物繊維を与え、PCDF および PCDD の糞中排泄について検討した。

- 1) 10%RBF+5%コレスチラミン群は非治療群に比べて、小腸管腔内の PCDF 分布量および分布割合を増加させ再吸収を阻止することにより、糞中への PCDF 排泄量を増加させた。その結果、小腸の PCDF 分布量を減少させた。
- 2) PCDF および PCDD の糞中排泄について、吸収が比較的容易な PCDF および PCDD 異性体ほど、再吸収抑制による排泄促進効果が高かった。
- 3) 各々10%の RBF, コーンファイバー, ゴボウファイバーおよび大豆ファイバー群は非治療群に対して PCDF および PCDD 排泄量の有意な増加が認められた。特に、RBF 群に顕著な排泄促進効果がみられ、その効果はコレスチラミン群に匹敵した。

文 献

- 1) Cohn WJ, Boyllan JJ, Blanke RV, Howell

JA, Fariss MW and Guzelian PS: Treatment of chordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine. N. Engl. J. Med. 298: 243-248, 1978.

2) 飯田隆雄, 中川礼子, 深町和美, 高橋克巳: 油症患者の皮下脂肪中の Polychlorinated Dibenzop-dioxins (PCDDs). 福岡医誌 80: 302-306, 1989.

3) 飯田隆雄, 中川礼子, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克巳: 油症患者および健常者の皮下脂肪中の Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs). 福岡医誌 80: 296-301, 1989.

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) 榎本隆, 宮田秀幸, 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.

6) 国民栄養の現状: 厚生省健康増進栄養課編. 第一出版.

7) 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.

8) 森田邦正, 竹中重幸, 檜崎幸範, 深町和美, 常盤寛, 高橋克巳: 有機塩素系化合物の米ヌカ繊維への in vitro 吸着について. 九州薬学会会報 45: 31-35, 1991.

9) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and rice oils used by patients with Yusho., Fukuoka Acta Med., 66: 593-599, 1975.

10) Richter E, Lay LP, Klein W and Korte F: Paraffin-stimulated excretion of 2, 4, 6, 2', 4'-pentachlorobi [¹⁴C] phenyl by rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 50: 17-23, 1979.

11) 食物繊維成分表: 地方衛生研究所全国協議会編. 第一出版, 1990.

12) Southgate DAT: Determination of carbohydrates in foods. II. unavailable carbohydrates. J. Sci. Food Agric., 20: 331-335, 1969.

13) 竹中重幸, 森田邦正, 高橋克巳: 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. 福岡医誌 82: 310-316, 1991.

14) 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ワランの効果. 福岡医誌 76: 184-189, 1985.

油症に対する米ぬかファイバー・コレステラミン 併用投与の臨床的検討

九州大学医学部第二内科学教室

辻 博・池 田 耕 一
野見山 賢 介・藤 島 正 敏

Effects of Treatment with Rice Bran Fiber and Cholestyramine on Clinical and Laboratory Findings in Yusho Patients

Hiroshi TSUJI, Koichi IKEDA,
Kensuke NOMIYAMA and Masatoshi FUJISHIMA

Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Kyushu University 60, Fukuoka 812

Abstract To investigate the therapeutic effects of rice bran fiber (30 g/day) and cholestyramine (12 g/day) for Yusho, clinical signs and symptoms, and laboratory examinations were studied before, during and after 14 day-treatment in four patients with Yusho.

The increases of bowel movements and abdominal distention were observed in two of these patients, although no effect was seen in physical findings. In peripheral blood cells, red blood cell counts decreased significantly, from $430 \pm 47 \times 10^4/\text{mm}^3$ (mean \pm SD) to $378 \pm 48 \times 10^4/\text{mm}^3$ ($p < 0.01$) after therapy. Hemoglobin as well as hematocrit levels were also reduced significantly after the therapy. However, no significant effect of the treatment was observed in white blood cell counts or platelet counts. In biochemical parameters, a significant depression was observed in total cholesterol levels after the therapy (from 262 ± 31 mg/dl to 179 ± 33 mg/dl; $p < 0.005$). A significant elevations was observed in serum levels of alanine aminotransferase and sodium, while significant depressions were found in serum levels of cholinesterase, total protein, albumin, γ -globulin, and potassium.

はじめに

1968年4月頃より北部九州を中心に発生した油症は24年を経過し、種々の亜急性症状は軽快しているが、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⁶⁾。また、PCBよりさらに強力な毒性をもつ polychlorinated dibenzofuran (PCDF) の体内残留も指摘されている⁷⁾。油症患者の治療に関して多くの試みがなされてきた¹⁾²⁾⁴⁾¹²⁾が、食物繊維の米ぬかファイバーおよびコレステラミンの併用投与によりPCB投与ラットにおいてPCBの糞便中への排泄促進が報告されている¹⁰⁾。われわれは油症患者に対し米ぬかファイバー・コレステラミンを短期間併用投与した予備的検討において、排泄回数の増加傾向および血清総コ

レステロール値の低下を報告してきた¹¹⁾。今回、九大油症研究班ではPCB及びPCDFの糞便中排泄促進を期待して、油症患者に米ぬかファイバーおよびコレステラミンを14日間併用投与し、自覚症状、理学的所見および臨床検査値の変動を検討したので報告する。

対象および方法

対象は4例の油症認定患者(男性2例、女性2例)で、平均年齢は 59.5 ± 2.9 歳(56-63歳)である。対象者の年齢、性別は各々、症例1(S.M.:59歳、女性)、症例2(T.M.:63歳、男性)、症例3(Yu.M.:56歳、女性)、症例4(Ya.M.:60歳、男性)である。

方法は米ぬかファイバー30g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)12gの1日量を3分服で14日間投与した。米ぬかファイバー

は Prosky ら⁶⁾の方法に準じて作製された。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、治療7日後、14日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, 尿酸窒素, 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、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

米ぬかファイバーおよびコレステラミンの併用投与により油症認定患者4例中2例に腹部膨満感を認めた。一方、排便回数は治療前7日間の平均 0.96 ± 0.43 回/日に比べ治療開始後7日間の平均 1.18 ± 0.82 回/日と増加傾向を認め、治療8-14日には平均 1.64 ± 0.49 回/日 ($p < 0.001$) と有意の増加を認めた。治療前後の理

学的所見に変化はみられなかった。

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 に示す。赤血球は治療前の $430 \pm 47 \times 10^3/\text{mm}^3$ から治療7日後には $400 \pm 47 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p < 0.005$) へ、治療14日後には $378 \pm 48 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p < 0.01$) へと有意に減少し、ヘモグロビン、ヘマトクリットも有意に低下した。しかし、白血球および血小板には変化はみられなかった。治療による血液生化学検査値の変化を Table 2 に示す。GPT は治療前の $20 \pm 5 \text{ IU/l}$ から治療7日後には $39 \pm 7 \text{ IU/l}$ ($p < 0.05$) へと有意に上昇したが、治療14日後には $33 \pm 15 \text{ IU/l}$ とやや低下した。コリンエステラーゼは治療前の $466 \pm 54 \text{ IU/l}$ から治療7日後には $442 \pm 44 \text{ IU/l}$ ($p < 0.05$) へ、治療14日後にはさらに $388 \pm 33 \text{ IU/l}$ ($p < 0.01$) へと有意に低下した。総コレステロールは治療前の $262 \pm 31 \text{ mg/dl}$ から治療7日後には $198 \pm 31 \text{ mg/dl}$ ($p < 0.05$) へ、治療14日後には $179 \pm 33 \text{ mg/dl}$ ($p < 0.05$) へと約32%有意に低下した。しかしながら、HDL コレステロールには変化はみられなかった。中性脂肪は治療前の $237 \pm 138 \text{ mg/dl}$ から治療7日後には $261 \pm 116 \text{ mg/dl}$ へ、治療14日後には $270 \pm 322 \text{ mg/dl}$ へと上昇傾向を示したが、いずれの変化も有意ではなかった。総蛋白は治療前の $7.9 \pm 0.1 \text{ g/dl}$ から治療14日後には $7.1 \pm 0.3 \text{ g/dl}$ ($p < 0.05$) へと有意に低下し、アルブミンは治療前の $4.8 \pm 0.1 \text{ g/dl}$ から治療7日後には $4.7 \pm 0.2 \text{ g/dl}$ ($p < 0.05$) へ、治療14日後には $4.3 \pm 0.3 \text{ g/dl}$ ($p < 0.05$) へと有意に低下した。電解質ではカリウムが治療前の

Table 1 Peripheral Blood Cells in 4 Yusho Patients Treated with Rice Bran Fiber and Cholestyramine for 14 Days

		Before	Day 8	Day 15
RBC	($\times 10^4/\text{mm}^3$)	430 ± 47	400 ± 47^b	378 ± 48^a
Hb	(g/dl)	14.2 ± 1.1	13.3 ± 1.2^c	12.5 ± 1.1^b
Ht	(%)	40.2 ± 3.9	37.4 ± 3.8^c	35.3 ± 3.7^a
WBC	($/\text{mm}^3$)	6100 ± 455	5925 ± 737	6325 ± 718
Neutrophil	($/\text{mm}^3$)	3283 ± 487	3657 ± 777	3754 ± 690
Eosinophil	($/\text{mm}^3$)	91 ± 33	103 ± 54	60 ± 70
Basophil	($/\text{mm}^3$)	0 ± 0	0 ± 0	17 ± 33
Monocyte	($/\text{mm}^3$)	451 ± 199	378 ± 129	265 ± 99
Lymphocyte	($/\text{mm}^3$)	2276 ± 262	1858 ± 298	2230 ± 232
Platelet	($\times 10^4/\text{mm}^3$)	24.0 ± 3.4	23.1 ± 3.4	22.8 ± 3.3

Statistical comparisons between pretreatment levels and posttreatment levels were made using the paired Student's t-test.

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.005$, ^c $P < 0.001$.

Table 2 Blood Chemistry in 4 Yusho Patients Treated with Rice Bran Fiber and Cholestyramine for 14 Days

		Before	Day 8	Day 15
GOT	(IU/l)	23±5	26±2	28±6
GPT	(IU/l)	20±5	39±7 ^a	33±15
LDH	(IU/l)	384±38	386±36	369±79
ALP	(IU/l)	195±28	210±24	206±37
γ-GTP	(IU/l)	44±32	55±50	53±42
T. Bil	(mg/dl)	0.6±0.1	0.6±0.3	0.5±0.1
D. Bil	(mg/dl)	0.1±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1
ChE	(IU/l)	466±54	442±44 ^a	388±33 ^b
T. Chol	(mg/dl)	262±31	198±31 ^a	179±33 ^c
HDL	(mg/dl)	50±8	47±9	47±12
TG	(mg/dl)	237±138	261±116	270±322
Total bile acid	(μM/l)	2.4±0.5	2.3±0.6	2.2±0.8
T. P.	(g/dl)	7.9±0.1	7.7±0.3	7.1±0.3 ^a
Alb	(g/dl)	4.8±0.1	4.7±0.2 ^a	4.3±0.3 ^a
γ-glob	(g/dl)	1.0±0.2	0.9±0.2 ^a	0.9±0.2
Amyl	(IU/l)	106±11	119±27	101±8
FBS	(mg/dl)	79±6	77±10	110±58
BUN	(mg/dl)	16±3	14±2	15±2
Creat	(mg/dl)	0.8±0.1	0.7±0.1	0.9±0.1
Uric acid	(mg/dl)	5.5±1.7	4.7±1.5	4.8±1.4
Na	(mEq/l)	142±1	143±1	144±1 ^a
K	(mEq/l)	4.8±0.2	4.4±0.2 ^a	4.2±0.3 ^a
Cl	(mEq/l)	105±4	105±3	108±3
Ca	(mEq/l)	9.4±0.4	9.1±0.2	8.8±0.3
P	(mEq/l)	3.1±0.5	3.4±0.4	3.2±0.6

Statistical comparisons between pretreatment levels and posttreatment levels were made using the paired Student's t-test.

^aP<0.05, ^bP<0.01, ^cP<0.005.

4.8±0.2 mEq/l から治療7日後には4.4±0.2 mEq/l (p<0.05)へ、治療14日後には4.2±0.3 mEq/l (p<0.05)へと有意に低下した。ナトリウムの上昇、γ-Globulinの低下を認めたが、いずれの変化も軽度であった。GOT, LDH アルカリフォスターゼ、γ-GTP, 総ビリルビン、直接ビリルビン、総胆汁酸、アミラーゼ、血糖、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、クロール、カルシウム、リンには有意の変化はみられなかった。

考 察

油症の原因物質であるPCB, PCDFの主要な排泄経路は血液から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されることが考えられる。

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PenCDFの糞便中への排泄を促進することが報告されている⁵⁾。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⁹⁾、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ことが期待される。Takenakaら¹⁰⁾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いる。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。

われわれはPCBおよびPCDFの糞便中へ排泄促進を目的に、米ぬかファイバーおよびコレステラミンを

油症患者に投与する予備的検討として、健康成人において本治療法における安全性を検討した¹¹⁾。その結果、排便回数の増加、白血球増加、血液生化学検査では総コレステロール、HDL コレステロールの低下、中性脂肪の上昇、GPT の軽度上昇、総ビリルビン、総蛋白、 γ -グロブリン、クレアチニン、カルシウムの軽度低下がみられた。さらに、油症患者に対する米ぬかファイバー・コレステラミンを短期間併用投与した予備的検討においては、排便回数の増加傾向および血清総コレステロール値の低下を認めた。

今回の油症患者に対する、米ぬかファイバーおよびコレステラミンの 14 日間併用投与では、治療中に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。さらに、末梢血液検査では、健康成人における予備的検討ではみられなかった赤血球の減少を認めた。米ぬかファイバーおよびコレステラミンの併用投与による赤血球減少の機序は不明であるが、貧血を伴う患者には本治療の施行に慎重を要する。血液生化学検査では、総コレステロールの低下を認めた。しかし、健康成人においてみられた HDL コレステロールの低下、中性脂肪の上昇などの変化はみられなかった。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⁹⁾。したがって、今後症例を増やして HDL コレステロール、中性脂肪の変動を観察する必要がある。コリンエステラーゼ、総蛋白、アルブミン、カリウムの低下も認めたが、これらは本治療による腹部膨満感および排便回数の増加によって食事の摂取量が減少し、あるいは腸管内停滞時間の短縮の結果、消化吸収が低下したためと推測される。本治療により軽度ながらも GPT、ナトリウムの上昇、 γ -グロブリンの低下をみたが、今後、さらに検討する必要がある。

PCB および PCDF の糞便中排泄を促進すると考えられる本治療法は、さらに症例を増やしてその効果を確認する必要があると考えられる。

総 括

PCB および PCDF の糞便中排泄促進を期待して、米ぬかファイバーおよびコレステラミンを油症患者に 14 日間投与し、自覚症状、理学的所見および臨床検査値の変動を検討した。

治療中に腹部膨満感および排便回数の増加をみたが、治療前後の理学的所見には変化を認めなかった。末梢

血液検査では、赤血球は治療前の $430 \pm 47 \times 10^3/\text{mm}^3$ から治療 7 日後には $400 \pm 47 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p < 0.005$) へ、治療 14 日後には $378 \pm 48 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p < 0.01$) へと減少し、その変化は有意であった。ヘモグロビン、ヘマトクリットにも有意の低下を認めた。しかし、白血球および血小板に変化はみられなかった。血液生化学検査では治療により、総コレステロールは治療前の $262 \pm 31 \text{ mg/dl}$ から治療 7 日後には $198 \pm 31 \text{ mg/dl}$ ($p < 0.05$) へと、治療 14 日後には $179 \pm 33 \text{ mg/dl}$ ($p < 0.005$) へと有意に低下した。しかし、HDL コレステロール、中性脂肪には変化はみられなかった。コリンエステラーゼ、総蛋白、アルブミン、 γ -グロブリン、カリウムの低下、GPT およびナトリウムの上昇を認めたが、いずれもその変化は軽度であった。

文 献

- 1) 堀伸二郎, 尾花裕孝, 榎本隆: PCDFs 中毒サルに対するスクアランの治療に関する研究. 福岡医誌. 78: 281-285, 1987.
- 2) 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: 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, 福岡医誌. 82: 317-325, 1991.
- 3) Jones RJ and Dobrilovic L: Lipoprotein lipid alterations with cholestyramine administration. J. Lab. Clin. Med. 75: 953, 1970.
- 4) Kamimura H, Naganuma T, Oguri K and Yoshimura H: Stimulating effect of liquid pataffin and cholestyramine on fecal excretion of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in rats. Eisei Kagaku 32: p-19, 1986.
- 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, 1987.
- 6) 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一: 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニール異性体. 福岡医誌. 76: 150-152, 1985.
- 7) Masuda Y and Yoshimura H: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yosho and their toxicological significance: A Review. Amer. J. Ind. Med. 5: 31-44, 1984.
- 8) Prosky L, Asp N-G, Furda L, Devries JW, 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

11) 辻博, 野見山賢介, 池田耕一, 川床利晴, 蔡剣平, 藤島正敏, 高橋克巳: 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. 福岡医誌 **82**: 330-334, 1991.

12) 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.

Laboratory Findings in the Medical Examination of Chronic “Yusho” (PCB Poisoning) Patients: With Special Reference to Blood PCB and Serum Triglyceride

Yoshio HIROTA and Tomio HIROHATA

*Department of Public Health, Faculty of Medicine,
Kyushu University 60, Fukuoka 812*

Kyoichiro KATAOKA, Shiro SHINOHARA and Hiroshi TOKIWA

Fukuoka Environmental Research Center, Fukuoka 818-01

Abstract Associations of blood PCB concentration with serum levels of triglyceride, γ -GTP, total-, and conjugated-bilirubin were investigated in “Yusho” patients twenty years after outbreak, using the information obtained from the medical examinations in 1988 and 1989. Study subjects were 259 patients in 1988, and 268 patients in 1989, including 190 patients who consecutively received both examinations. Blood PCB concentrations (mean \pm SE) were 4.78 ± 0.22 ppb in 1988, and 4.47 ± 0.17 ppb in 1989. The results of blood-chemical analysis were compared among four categorized concentrations of blood PCB, using the analysis of variance. Significant difference was observed for triglyceride (1988: $p < 0.025$, 1989: $p < 0.005$), but not for γ -GTP, total-, and conjugated-bilirubin. In 1988, the mean triglyceride levels were 108, 137, 145, and 166 mg/dl at <2.7 , ≥ 2.7 , ≥ 4.1 , and ≥ 6.1 ppb of blood PCB, respectively. Corresponding figures in 1989 were 106, 129, 154, and 156 mg/dl at <2.7 , ≥ 2.7 , ≥ 4.0 , and ≥ 5.7 ppb of blood PCB, respectively. Thus, clear positive association between blood PCB and serum triglyceride was observed in the patients twenty years after exposure.

Introduction

“Yusho” is a PCB poisoning characterized by peculiar dermatologic and ophthalmologic lesions and a variety of constitutional symptoms, which occurred in western Japan in the summer of 1968. The extensive investigations disclosed, in November 1968, that this illness was caused by ingestion of rice bran oil contaminated with PCB (polychlorinated biphenyls), which had been utilized as the heat transfer medium in the oil refining process²⁴⁾. A total of 1,862 patients has been officially recognized as Yusho patients as of 1990.

The diagnostic criteria for Yusho was established in 1968, and was amended in 1972 and 1976 to cope with the chronic phase patients. Therefore, the present criteria comprises three

important bases: signs in the skin; eyes; and blood PCB concentration, with referent items involving various subjective symptoms and laboratory findings in blood chemistry⁸⁾. Up to the present, medical examination for Yusho has been conducted annually aiming, in the past, to detect new cases and to follow-up the patients, and in recent days to promote patients' health and to determine the chronic status of this illness.

These examinations have shown that the typical signs for Yusho improved greatly over the 10 years since the outbreak, but they were superseded gradually by systemic disorders such as dullness, headache, numbness of the extremities, and so on^{8,16,21,22,24)}. These features are so complicated as to be indistinguishable from the ones observed in general popula-

tion. Moreover it seems unlikely that such chronic phase patients manifest abnormal findings in blood chemistry peculiar to the pathogenesis of this illness¹⁶⁾. Therefore, little attention has been paid on laboratory findings during recent years. Then the present study was designed to investigate the relation of blood PCB concentration with laboratory findings in chronic Yusho patients twenty years after exposure. This association was not fully studied in the early years after outbreak, because the analysis of blood PCB became possible and started in 1973.

Materials and Methods

Information on the blood PCB concentration and blood-chemical analysis was obtained from the standardized form for the medical examination of Yusho conducted in 1988 and 1989. In 1988, the total number of patients examined was 285 (143 males and 142 females). Of these, 259 patients (136 males and 123 females) whose PCB concentrations in the blood were reported were subjected to the study. In 1989, 302 patients (144 males and 158 females) received examination, and 268 (133 males and 135 females) with the data on blood PCB were subjected to the study. These subjects included 190 patients who consecutively received both examinations in 1988 and 1989. In each year, the peak age distribution was at ages 60-64 with about 20% of total subjects, and at ages 50-69 with 60% and at 40-79 with 85% of subjects.

Relation with blood PCB concentration was

investigated for triglyceride, γ -GTP (γ -glutamyl transpeptidase), total-bilirubin and conjugated-bilirubin in the serum. These blood tests are listed in the diagnostic criteria for chronic phase patients⁸⁾. In each year, study subjects were classified into approximate quartile for blood PCB concentrations, and then relation between PCB and each blood test was assessed using the one-way analysis of variance (ANOVA). When significant difference was observed among four levels of blood PCB, mean values in that test were compared between two levels of blood PCB in each combination, using t-test.

Results

In 1988 (Table 1, Fig. 1), the blood PCB concentrations ranged 0.6-32.0 ppb (mean \pm SE : 4.78 ± 0.22), and they were classified for comparison into four levels ; <2.7 , ≥ 2.7 , ≥ 4.1 , and ≥ 6.1 ppb. Number of subjects at each PCB level was 66 (25.5%), 78 (30.1%), 64 (24.7%), and 51 (19.7%), respectively. Those with the blood test exceeding normal range were 68 (26.3%) for triglyceride, 24 (9.3%) for γ -GTP, 5 (1.9%) for total-bilirubin, and 3 (1.2%) for conjugated-bilirubin. Significant difference among four levels of blood PCB was observed only for triglyceride (F-value : 3.62, $p < 0.025$), but not for γ -GTP (0.65, $p > 0.1$), total-bilirubin (1.19, $p > 0.1$), nor conjugated-bilirubin (0.86, $p > 0.1$), in ANOVA. Mean values of triglyceride increased, with dose-dependent manner, from the lowest to highest quartile of blood PCB concen-

Table 1 Distribution of Study Subjects and Serum Triglyceride by Blood PCB Concentration in 1988

Blood PCB (ppb)	No. of subjects (%)	Triglyceride (mg/dl) ^a
<2.7	66 (25.5)	107.8 ± 8.1
$2.7 \leq, <4.1$	78 (30.1)	137.1 ± 9.5
$4.1 \leq, <6.1$	64 (24.7)	144.5 ± 13.1
$6.1 \leq$	51 (19.7)	165.7 ± 18.5

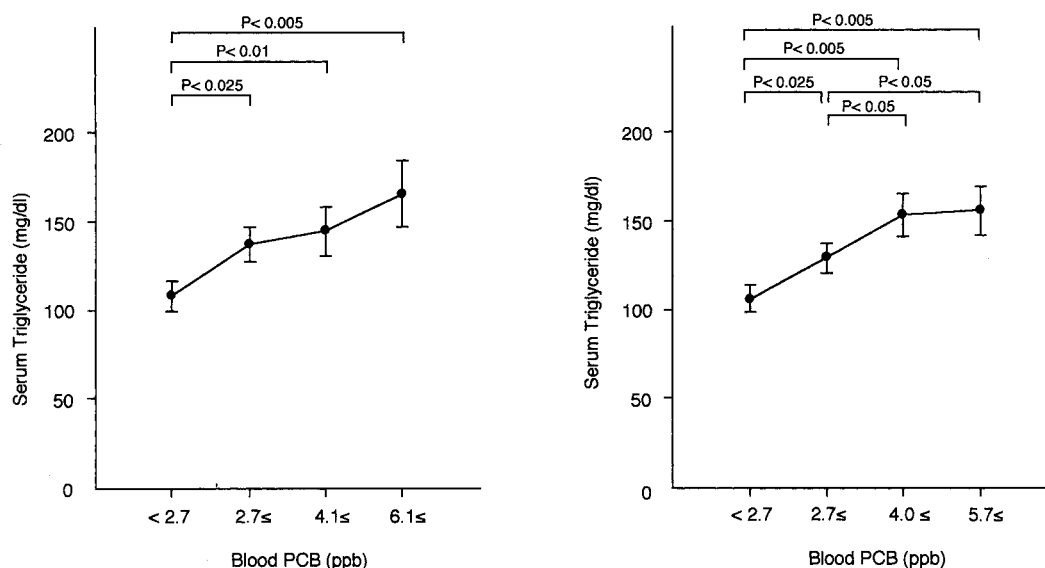
* F-value in ANOVA : 3.617 ($p < 0.025$)

^a mean \pm SE

Table 2 Distribution of Study Subjects and Serum Triglyceride by Blood PCB Concentration in 1989

Blood PCB (ppb)	No. of subjects (%)	Triglyceride (mg/dl) ^a
<2.7	66 (24.6)	105.8 ± 7.2
2.7 ≤, <4.0	60 (22.4)	129.2 ± 8.3
4.0 ≤, <5.7	73 (27.2)	153.5 ± 12.0
5.7 ≤	69 (25.7)	155.7 ± 13.4

* F-value in ANOVA : 4.757 (p<0.005)

^a mean ± SE**Fig. 1** Association between Blood PCB Concentration and Serum Triglyceride Level in Yusho Patients, Twenty Years after Outbreak.

The information was obtained from medical examinations conducted in 1988 (left) and 1989 (right). Figure shows the mean ± SE of serum triglyceride at each level of blood PCB and the results of t-tests of mean values (one-sided test).

trations; 108, 137, 145, and 166 mg/dl.

In 1989 (Table 2, Fig. 1), blood PCB concentrations ranged 0.4-19.4 ppb (mean ± SE : 4.47 ± 0.17), and they were classified into four levels; <2.7, ≥2.7, ≥4.0, and ≥5.7 ppb with the subjects of 66 (24.6%), 60 (22.4%), 73 (27.2%), and 69 (25.7%), respectively. Number of subjects with blood test exceeding normal range was 78 (29.1%) for triglyceride, 33 (12.3%) for γ -GTP, 5 (1.9%) for total-bilirubin, and 6 (2.2%) for conjugated-bilirubin. Significant difference was observed only for triglyceride (F-value : 4.

76, $p < 0.005$), but not for γ -GTP (1.31, $p > 0.1$), total-bilirubin (0.27, $p > 0.1$), nor conjugated-bilirubin (1.08, $p > 0.1$), in ANOVA. Mean values of triglyceride showed a gradient increase from the lowest to highest quartile of blood PCB; 106, 129, 154, and 156 mg/dl.

Thus, two consecutive data of medical examinations in 1988 and 1989 clearly showed gradient increase of serum triglyceride level with increasing blood PCB concentration.

Discussion

After a high concentration of PCB was demonstrated in the causal rice bran oil and in the adipose tissue from patients²³, it was reported that the rice bran oil was also contaminated with a trace amount of PCDF (polychlorinated dibenzofurans) and PCQ (polychlorinated quaterphenyls)^{12,14}. And PCDF was detected in adipose tissue and liver sampled from the Yusho patients in the early years after outbreak^{2,9,13}. Besides, animal experiments demonstrated the manifestation of dermal signs resembling those of Yusho, in cynomolgus monkeys treated with PCDF mixture⁷. Therefore, at present there is a suggestion that PCDF might be the responsible compounds for the development of Yusho⁶.

However, blood PCB concentration is still quite a pertinent index for exposure in Yusho patients, since its concentration in the patients has shown a gradual decrease after outbreak but little or only a slight decrease during the recent years^{4,15,24}. The concentration of blood PCB may reflect the magnitude of a previous acute exposure and current internal exposure to PCB itself as well as to other PCB-related compounds. A recent study has reported that the mean blood PCB concentration in the patients was more than two times than that in healthy people (5.36 vs. 2.43 ppb)¹⁵.

The diagnostic criteria for the chronic Yusho patients lists laboratory findings in blood chemistry as referent items; increase in serum triglyceride and γ -GTP, and decrease in serum bilirubin⁸. Among these blood tests, an association with blood PCB was found only for triglyceride, but not for γ -GTP, total-bilirubin, nor conjugated-bilirubin. The gradient increase of serum triglyceride with increasing blood PCB was confirmed in two consecutive data from medical examinations in 1988 and 1989, in spite of the possible existence of biologic variations within or among individuals.

In the medical examinations conducted in the

early years after outbreak of Yusho, the most prominent finding in blood tests was the elevation of serum lipids, particularly serum triglyceride. Serum specimens of the patients frequently showed lactescence. The proportion of those with elevated serum triglyceride was up to two thirds of the total patients. However, the mean values of serum triglyceride did not differ according to the clinical severity; 181 mg/dl among nine severe cases and 197 among nine mild or moderate cases¹⁷, and no data were available on blood PCB at that time. When routine measurements were begun in 1973, the mean blood PCB concentration was reported to be 5.9 ppb in Yusho patients and 2.1 ppb in normal subjects. The classification of patients by gas-chromatogram pattern showed specifically different values of the mean blood PCB; 7.2 ppb for pattern-A (the gas-chromatogram pattern peculiar to Yusho patients), 4.3 ppb for pattern-B (resembling pattern-A), and 1.7 ppb for pattern-C (similar to PCBs in normal subjects)¹¹. And positive correlation between blood PCB and serum triglyceride was observed in patients ($r=0.49$)¹⁸.

In an early study on patients with abnormally elevated serum triglyceride, ranging from 200 to 600 mg/dl, agarose gel electrophoresis of serum indicated that the elevated triglyceride was of endogenous origin²⁵. However, no further etiologic study was performed from the view of the association between PCB and triglyceride. A persistent hypertriglyceridemia observed at or after the outbreak was restored into normal range by 1975^{16,19}.

A study on workers occupationally exposed to PCB has reported significant correlation between blood PCB and serum triglyceride, total cholesterol or beta-lipoprotein, in which the workers engaged in making marine paints showed blood PCB concentrations beyond 20 ppb with the highest value of 252 ppb²⁰.

In the episode of Taiwan with outbreak of PCB poisoning in May 1979, patients detected until March 1981 also showed correlation

between blood PCB and serum triglyceride. The blood PCB concentration was 89.14 ± 6.90 ppb (mean \pm SE), ranging 3-1, 156 ppb with no significant difference by sex nor age-group. Serum triglyceride levels were significantly different between patients and normal subjects (mean: 201 vs. 123 mg/dl), and 60% of patients showed the levels of 150 mg/dl or over. Based on the finding of significant positive correlation between serum conjugated-bilirubin and triglyceride levels in patients, it was hypothesized that extent of abnormal lipid metabolism is paralleled by the increasing enzyme activity of UDP-glucuronyl transferase in the liver³⁾⁵⁾¹⁰⁾.

Some studies have so far reported on the positive association between blood PCB and serum triglyceride. However, their subjects were the patients at acute or subacute stages where a large part of the patients showed abnormally elevated levels in both blood PCB and serum triglyceride. On the other hand, present study subjects were the patients twenty years after outbreak, whose blood PCB and serum triglyceride were close to normal subjects. If we refer to the former report in which even healthy fishermen who frequently intake fish or shellfish showed relatively high concentration of blood PCB (mean \pm SD: 5.6 ± 3.2 ppb)¹⁾, more than half of the present subjects indicated blood PCB concentrations lower than the mean value in those healthy fishermen.

Although a number of studies on PCB poisoning have been carried out, the mechanism of PCB poisoning remains still unexplained. The clear positive association between blood PCB concentration and serum triglyceride level confirmed even 20 years after exposure might provide a clue to explore the mechanisms or treatment measures for this illness.

This study was supported in part by a Research Grant for Yusho from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

References

- 1) Baba T and Baba H: Blood PCB concentration of healthy persons. The Report of Nagasaki Pref. Inst. Publ. Hlth. Environ. 19: 102-114, 1981.
- 2) Buser HR, Rappe C and Gara A: Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) found in Yusho oil and in used Japanese PCB. *Chemosphere* 7: 439-449, 1978.
- 3) Chang KJ, Chen JS, Huang PC and Tung TC: Study of patients with polychlorinated biphenyls poisoning. I. Blood analyses of patients. *J. Formosan Med. Assoc.* 79: 304-313, 1980.
- 4) Honbo S, Nagae S, Toshitani S and Asahi M: Dermatological findings in the annual examination of the patients with Yusho in 1987-1988. With special reference to the alteration of the skin symptoms in the patients followed up for 20 years. *Fukuoka Acta Med.* 80: 324-330, 1989.
- 5) Ko YC, Jao LT, Cheng CT, Hsu ST, Hsiao HC and Hu HT: The blood level of PCB in the poisoned patients. *J. Formosan Med. Assoc.* 80: 774-779, 1981.
- 6) Kunita N, Hori S, Obana H, Otake T, Nishimura H, Kashimoto T and Ikegami N: Biological effect of PCBs, PCQs and PCDFs present in the oil causing Yusho and Yu-cheng. *Env. Hlth. Perspect.* 59: 79-84, 1985.
- 7) Kunita N, Kashimoto T, Miyata H, Fukushima S, Hori S and Obana H: Causal agents of Yusho. *Am. J. Ind. Med.* 5: 45-58, 1984.
- 8) Kuratsune M, Aono M and Yoshida H: Foreword in the eleventh report of the study on Yusho and PCB. *Fukuoka Acta Med.* 78: 181-192, 1987.
- 9) Kuroki H and Masuda Y: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 7: 771-777, 1978.
- 10) Lü Yc and Wong PN: Dermatological, medical, and laboratory findings of patients in Taiwan and their treatments. *Am. J. Ind. Med.* 5: 81-115, 1984.
- 11) Masuda Y, Kagawa R and Kuratsune M: PCB in Yusho patients and ordinary persons. *Fukuoka Acta Med.* 65: 17-24, 1974.
- 12) Masuda Y and Kuratsune M: Toxic compounds in the rice oil which caused Yusho. *Fukuoka Acta Med.* 70: 229-237, 1979.
- 13) 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.
- 14) Miyata H, Kashimoto T and Kunita N: Studies on the compounds related to PCB (V). Detection and determination of unknown organochlorine compounds in the rice oil. *J. Food Hyg. Soc.* 19: 260-265, 1978.

lorinated compounds in Kanemi rice oil caused the "Yusho." *J. Food Hyg. Soc.* 19: 364-371, 1978.

15) 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.

16) Okumura M: Past and current medical states of Yusho patients. *Am. J. Ind. Med.* 5: 13-18, 1984.

17) Okumura M and Katsuki S: Clinical observation on Yusho (chlorobiphenyls poisoning). *Fukuoka Acta Med.* 60: 440-446, 1969.

18) Okumura M, Masuda Y and Nakamura S: Correlation between blood PCB and serum triglyceride levels in patients with PCB poisoning. *Fukuoka Acta Med.* 65: 84-87, 1974.

19) Okumura M, Yamanaka M and Nakamura S: Ten year follow-up study on serum triglyceride levels in 24 patients with PCB poisoning. *Fukuoka Acta Med.* 70: 208-210, 1979.

20) 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.

Am. J. Ind. Med. 5: 59-68, 1984.

21) Toshitani S: Dermatological findings of the patients with Yusho (PCB poisoning) in general examination in 1971. *Fukuoka Acta Med.* 63: 392-395, 1972.

22) Toshitani S, Asahi M and Urabe H: Dermatological findings in the general examination of Yusho in 1985-1986. *Fukuoka Acta Med.* 78: 349-354, 1987.

23) Tsukamoto H, Makisumi S, Hirose H, Kojima T, Fukumoto H, Fukumoto K, Kuratsune M, Nishizumi M, Shibata M, Nagai J, Yae Y, Sawada K, Furukawa M, Yoshimura H, Tatsumi K, Oguri K, Shimeno H, Ueno K, Kobayashi H, Yano T, Ito A, Okada T, Inagami K, Koga T, Tomita Y, Koga T, Yamada Y, Miyaguchi M, Sugano M, Hori K, Takeshita K, Manako K, Nakamura Y and Shigemori N: The chemical studies on detection of toxic compounds in the rice bran oils used by the patients of Yusho. *Fukuoka Acta Med.* 60: 496-512, 1969.

24) Urabe H, Kodama H and Asahi M: Present state of Yusho patients. *Ann. New York Acad. Sci.* 320: 273-276, 1979.

25) Uzawa H, Ito Y, Notomi A and Katsuki S: Hyperglyceridemia resulting from intake of rice oil contaminated with chlorinated biphenyls. *Fukuoka Acta Med.* 60: 449-454, 1969.

(和文抄録)

油症患者の全国統一検診結果より： 特に血中 PCB と血清中性脂肪との関連

九州大学医学部公衆衛生学講座

廣田良夫・廣畑富雄

福岡県保健環境研究所

片岡恭一郎・篠原志郎・常盤 寛

油症の全国統一検診結果（1988, 1989）を用い、発生後 20 年経過した油症患者における血中 PCB 濃度と血液生化学所見との関連を検討した。各年の検診結果に血中 PCB の記載がある者（1988 年：285 人中 259 人，1989 年：302 人中 268 人）を対象とし、油症診断基準に含まれる中性脂肪， γ -GTP，ビリルビンについて解析した。血中 PCB 濃度は，1988 年が 4.78 ± 0.22 ppb (mean \pm SE)，1989 年が 4.47 ± 0.17 ppb であった。血中 PCB 濃度を 4 区分して（1988： <2.7 , ≥ 2.7 , ≥ 4.1 , ≥ 6.1 ppb，1989： <2.7 , ≥ 2.7 , ≥ 4.0 , \geq

5.7 ppb）検査値を分散分析により比較したところ， γ -GTP，総ビリルビン，直接ビリルビンについては差を認めなかったが，中性脂肪についてのみ両年とも有意差を認めた（1988： $F=3.62$, $p<0.025$ ；1989： $F=4.76$, $p<0.005$ ）。血中 PCB 濃度の各レベルにおける中性脂肪の平均値は，1988 年が 108, 137, 145, 166 mg/dl，1989 年が 106, 129, 154, 156 mg/dl であり，血中 PCB 濃度の上昇に伴い，dose-dependent な中性脂肪の上昇を認めた。

1991・1992 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学教室 (主任: 堀 嘉昭教授)

中山 樹一郎・堀 嘉昭

福岡大学医学部皮膚科学教室 (主任: 利谷昭治教授)

利 谷 昭 治

産業医科大学皮膚科学教室 (主任: 旭 正一教授)

旭 正 一

Dermatological Findings in the Annual Examination of the Patients with Yusho in 1991-1992

Juichiro NAKAYAMA and Yoshiaki HORI

*Department of Dermatology (Director: Prof. Y. Hori), Faculty of Medicine,
Kyushu University 60, Fukuoka 812*

Shoji TOSHITANI

*Department of Dermatology (Director: Prof. S. Toshitani), Faculty of Medicine,
Fukuoka University, Fukuoka 814-01*

Masakazu ASAHI

*Department of Dermatology (Director: Prof. M. Asahi)
University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu 807*

Abstract We reported the skin symptoms and PCB concentrations of the patients with Yusho in the 1991 and 1992 annual examinations. We also reported the alteration of the skin symptoms in 20 patients followed up for 16 years (1977-1992).

Most of the patients examined in 1991-1992 showed low score of skin symptoms which are the same as those in recent 7 years. Approximately 30% of the patients still have comedones and/or acneiform eruptions in 1991-1992. Pattern and concentrations of PCB in the patients have not remarkably changed in recent 5 years.

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油症が発生し、福岡県では 1969 年より年 1 回の定期検診を実施してきた。この年次検診における皮膚症状についてはその内容および推移について随時報告してきた^{1)~8)}。今回その続報として 1991, 1992 年度の検診結果のまとめとこれまでの結果との比較検討を行ったので報告する。また過去 1977 年より現在まで長期に連続して観察し得た患者の分析結果についても併せて報告する。

1991, 1992 年度における検診結果

受診状況

1991 年度の受診者は 102 名 (うち 1 名は皮膚検診のみ) で男性 32 名・女性 70 名, 1992 年度は 88 名 (うち 5 名は PCB 測定および血液検査のみ) で男性 26 名・女性 62 名であった。したがって性差は男性: 女性は各 1: 2.2, 1: 2.4 であった。

皮膚重症度・皮膚重症度得点数の変遷

表 1, 2 に 1991~1992 年度および 1977, 1981, 1985, 1990 の各年度の皮膚重症度¹⁾と皮膚重症度得点数¹⁾を示す。

表 1 年度別皮膚重症度

年度 重症度	1977 年 例数 (%)	1981 年 例数 (%)	1985 年 例数 (%)	1990 年 例数 (%)	1991 年 例数 (%)	1992 年 例数 (%)
0	30 (29.4)	39 (36.4)	61 (39.1)	53 (58.2)	58 (56.9)	48 (57.8)
0 I	10 (22.5)	13 (28.9)	14 (17.9)	3 (6.6)	6 (8.8)	2 (9.6)
I I	7 (18.6)	6 (15.9)	3 (16.7)	7 (14.3)	9 (19.6)	5 (8.4)
II III	11 (24.5)	4 (14.9)	4 (23.7)	10 (19.8)	9 (13.7)	18 (22.9)
III IV	3 (4.1)	3 (3.7)	0 (2.6)	1 (1.1)	1 (1.0)	1 (1.2)
計	102	107	156	91	102	83

表 2 年度別皮膚重症度得点数

年度 得点	1977 年 例数 (%)	1981 年 例数 (%)	1985 年 例数 (%)	1990 年 例数 (%)	1991 年 例数 (%)	1992 年 例数 (%)
0・1	32 (31.1)	52 (48.6)	88 (56.4)	66 (72.5)	70 (68.6)	44 (53.0)
2・3	35 (34.0)	33 (30.8)	42 (26.9)	20 (22.0)	28 (27.5)	32 (38.6)
4・5	22 (21.4)	12 (11.2)	20 (12.8)	4 (4.4)	3 (2.9)	6 (7.2)
6・7	7 (6.8)	7 (6.5)	5 (3.2)	0	1 (1.8)	0
8・9	5 (4.9)	2 (1.9)	1 (0.6)	1 (1.1)	0	1 (1.2)
10~13	0	0	0	0	0	0
14~	2 (1.9)	1 (0.9)	0	0	0	0
計	103	107	156	91	102	83
平均得点	3.13	2.15	1.58	0.96	1.12	1.47

皮膚重症度では重症度 0 の比率が 1991 年度 56.9%、1992 年度 57.8%と 1989~1990 年度の傾向³⁾とほぼ同様の傾向を示した。重症度の推移をみると全体的には軽快しているものの 1985 年以降では II~III (面皰~座瘡様皮疹) の比率は若干の上下変動がみられた。また I~0 I (色素沈着) の比率は 1985 年度以降現時点でも低下がみられた。

皮膚重症度得点数では得点が 3 点以下が 1985 年度では 93.3%と高値となり、それ以降も 90%以上を占めており、1991~1992 年度でも各 96.1%、91.6%であった。1992 年度では 1991 年度に比べ平均得点が 0.35 上昇 ($1.47 - 1.12 = 0.35$) していた。その理由として得点が 0・1 の患者 68.6%から 53.0%と低下し、2・3 の

患者が 27.5%→38.6%、4・5 の患者が 2.9%→7.2%と各増加したためと計算された。これは 1992 年度では 83 名と受診者が減っており、例年より若干の症状を残す者あるいは皮疹が出没するものが多く受診した可能性と診察者の交替による皮疹の判定の微妙な差により生じた可能性が挙げられた。

血中 PCB パターンと皮膚重症度得点数の相関性

表 3 に血中 PCB パターンと皮膚重症度得点数の相関性を示す。1991 年度と 1992 年度ではパターン別の例数の差は余りみられないが、表 2 にも示すごとく 1992 年度の得点数が 1991 年度の得点数より高くなっており、したがって各パターン別の平均得点が 1992 年度の方が高くなっている。この点に関しては今後の動

向を見守る必要があると思われる。

血中 PCB パターンと PCB 濃度

表 4 に PCB パターン別の平均濃度を示す。1991 年度, 1992 年度の平均濃度はともに例年通りの低下傾向で, とくに 1992 年度の全体の平均濃度は 3.91 と低値を示した。

長期観察例の推移

皮膚重症度得点数が 1976 年度よりつけられているが, 今回 1977~1978 年度, 1981~1982 年度, 1986~1987 年度, 1989~1990 年度および今回調査した 1991~1992 年度の 5 期に分け, 各期の両年あるいは各年に必ず受診し, 完全なデータが得られている患者 20 名を選び, 表 5 に各患者の皮膚重症度, PCB パター

表 3 血中 PCB パターンと皮膚重症度得点数の関係

(A) 1977 年			(B) 1981 年			(C) 1985 年		
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	41	2.88	A	59	2.29
B	10	1.90	B	12	1.75	B	17	1.76
BC	5	2.60	BC	4	2.25	BC	9	1.11
C	30	2.33	C	27	1.78	C	53	1.26
計	100	3.17	計	84	2.33	計	138	1.63
(D) 1990 年			(E) 1991 年			(F) 1992 年		
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	1.24	A	38	1.52	A	28	2.00
B	17	0.94	B	17	0.59	B	16	1.50
BC	3	0.33	BC	5	1.20	BC	2	0.00
C	33	0.64	C	41	0.95	C	37	1.22
計	90	0.93	計	101	1.12	計	83	1.51

表 4 血中 PCB パターンと PCB 濃度の関係

(A) 1977 年			(B) 1981 年			(C) 1985 年		
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	46	6.93	A	31	7.38
B	10	3.00	B	12	4.08	B	4	5.0
BC	5	2.20	BC	4	3.00	BC	1	5.0
C	30	2.96	C	28	2.57	C	18	2.13
計	101	5.04	計	90	5.02	計	54	5.64
(D) 1990 年			(E) 1991 年			(F) 1992 年		
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	6.00	A	37	6.20	A	29	6.19
B	17	3.94	B	17	4.11	B	16	3.48
BC	3	3.49	BC	5	2.84	BC	2	3.34
C	33	2.59	C	42	2.69	C	41	2.50
計	90	4.20	計	101	4.22	計	88	3.91

*濃度の単位は ppb

表5 長期観察例の推移

症例	1977～1978年	1981～1982年	1986～1987年	1989～1990年	1991～1992年
1	Ⅲ ¹⁾ ・A 8 ²⁾ ・I ³⁾ Ⅲ・A 10・1	—— Ⅲ・A 7・2	—— Ⅲ・A 10・3	O・A 6.2・0 ——	Ⅱ・A 6.4・1 O・A 6.5・0
2	—— I・A 16・4	—— Ⅲ・A 9・4	O I・A 7・1 ——	—— I Ⅱ・A 7.9・2	Ⅱ・A 9.4・2 I Ⅲ・A 6.1・4
3	Ⅲ・A 15・6 Ⅲ・A 9・9	ⅡⅢ・A 17・8 Ⅲ・A 16・9	O・A 14・0 Ⅲ・A 11・2	Ⅲ・A 15.7・3 ⅡⅢ・A 11.3・4	ⅡⅢ・A 11.3・2 I・A 12.4・2
4	ⅡⅢ・C 3・3 ⅡⅢ・C 2・4	Ⅲ・C 3・6 ⅡⅢ・C 4・4	I Ⅱ・C 4・3 I・C 3・2	Ⅱ・C 4.3・2 Ⅲ・C 4.3・2	O・C 4.5・1 O・C 3.5・0
5	O I・B 3・3 ——	Ⅲ・C 3・2 Ⅱ・C 4・1	I Ⅱ・C 3・1 O・B 2・0	O・C 3.1・1 O・C 2.4・0	—— ⅡⅢ・C 2.0・2
6	I・A 7・2 I・A 6・2	I・A 7・2 O I・B 5・1	O I・B 7・1 O I・A 6・1	O I・B 7.4・1 O・B 6.4・0	O・A 7.2・1 O I・A 7.3・2
7	O・C 2・1 O・C 5・1	O・B 5・0 ——	O・C 2・0 O・C 2.7・0	O・C 1.9・0 O I・C 1.5・1	O・C 1.7・0 O・C 1.7・0
8	—— O I・A 3・2	O・B 5・0 ——	—— O・A 4.1・0	O・A 3.1・0 O・A 2.5・0	Ⅱ・A 2.8・1 O・B 2.7・1
9	I Ⅱ・A 2・4 O・BC 1・3	Ⅲ・C 1・5 ——	Ⅱ・C 1・3 I・C 1・2	ⅢⅢ・C 1.8・2 ——	O・C 1.7・0 I・C 1.4・3
10	O I・A 6・2 ——	I・A 9・2 O・A 5・1	—— O・A 7・0	Ⅱ・A 6.0・1 O・A 3.3・0	O・A 3.5・0 I・A 3.7・1
11	O I・A 5・2 I・A 5・2	I・A 4・2 O I・B 7・1	O・A 3・0 O・A 4・0	O・B 6.4・0 O・B 7.4・0	O・B 5.7・0 O・A 2.4・1
12	Ⅲ・A 13・9 Ⅲ・A 18・6	Ⅲ・A 10・7 ——	Ⅲ・A 7・4 Ⅲ・A 7・3	ⅢⅢ・A 12.6・4 Ⅲ・A 14.4・4	ⅢⅢ・A 13.4・1 I Ⅱ・A 10.1・2
13	I・B 3・2 O I・B 3・1	—— O・B 3・0	O・B 4・0 Ⅱ・B 3・2	O I・B 2.9・1 Ⅱ・B 3.1・2	—— O・B 1.6・1
14	I・A 6・6 O I・A 6・2	I・A 6・2 O I・A 4・4	I・A 5・2 O I・A 6.7・1	—— I Ⅱ・A 3.0・2	I・A 2.9・1 O・A 3.1・1
15	O・BC 4・1 ——	O I・BC 3・1 ——	O・C 4・0 I・B 3・1	O・B 1.8・0 O・C 2.2・0	I Ⅱ・BC 1.8・2 ——
16	—— Ⅱ・C 3・1	—— O・C 2・0	Ⅱ・C 1.7・2 ——	Ⅱ・C 1.0・1 ——	Ⅱ・C 2.3・1 O・C 1.2・2
17	I・C 3・2 ⅡⅢ・C 3・5	Ⅲ・C 3・5 ——	O I・C 3・1 O・C 3.8・0	I Ⅱ・C 2.9・3 O・C 1.9・0	O・C 3.4・0 O・C 3.9・0
18	O I・A 5・3 I・A 4・2	I・A 8・3 I・A 7・2	O・A 5・0 O・A 6.5・0	O・A 5.2・0 O・A 4.0・0	O・A 4.6・0 O・A 9.2・1
19	ⅢⅣ・C 2・5 ⅡⅢ・C 2・2	—— O・C 2・2	O・C 2.5・0 O・C 3.0・0	—— ⅢⅢ・C 1.5・2	I Ⅱ・C 2.9・2 ⅢⅢ・C 2.1・3
20	I Ⅱ・A 8・2 O・A 5・1	O・A 5・0 O・A 5・1	O・A 5・0 O・A 11・0	O・A 6.9・0 O・B 10.6・0	O・A 6.6・0 O・A 6.7・0

¹⁾皮膚重症度 ²⁾PCBパターン・濃度 (ppb) ³⁾皮膚重症度得点数

ン・濃度、皮膚重症度得点数の全データを示した。

各患者の皮膚重症度の推移をみると、重症度Ⅲ、ⅡⅢ、ⅠⅡ、Ⅰ(OⅠ)より明らかに重症度0へ移行した患者が7例みられた。血中PCB濃度の推移をみると1977～1978年度で平均5.76であったものが1986～1987年度が4.94、1989～1990年度が5.20、1991～1992年度が4.72と若干ではあるが低下傾向がみられた(図1)。また平均皮膚重症度得点数の推移をみると1977～1978年度が平均2.47、1981～1982年度が2.66、1986～1987年度が1.00、1989～1990年度が1.12、1991～1992年度が1.08と1986～1987年度で著明な得点数の低下がみられた。

1991～1992年度に受診した全患者のPCBの平均濃度と皮膚重症度得点数の平均得点データと

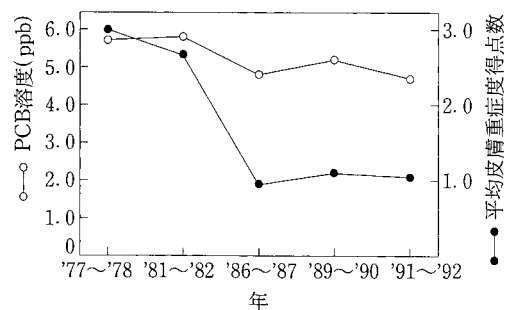


図1 長期観察例のPCB濃度と皮膚重症度得点数の推移

1977～1978 年度以来継続して受診している患者のデータを比較すると、PCB 濃度については前者が 4.22～3.91、後者が 4.72 と長期継続受診者が高い傾向がみられた。皮膚重症度得点数の平均得点の平均得点は前者が 1.12～1.47、後者が 1.08 とみかけ上はむしろ長期継続受診者の方が低値であった。

考 察

昭和 43 年（1968 年）に油症が発生して以来昭和 46 年度（1971 年度）～平成 2 年度までの油症一斉検診の結果が報告され^{1)～5)}、皮膚症状の程度（重症度）および血中 PCB パターン・濃度の推移が全体的にとらえられるようになった。今回 1991～1992 年度の油症検診結果のデータを例年のごとく整理し、過去のデータと比較した。その結果は 1989 年～1990 年のデータ³⁾と比較して全体として大きな変化はなく、この数年間の軽快傾向を確認するものであった。

皮膚重症度および皮膚重症度得点数をみると 1992 年度は 1991 年度よりみかけ上増悪しているという結果であった。これは 1992 年度の受診者が 83 名と少なかったことや皮膚科検診者の変更があったことなどが、この高値となった要因に挙げられた。皮膚症状が現時点で突然増悪することは考えられず（血中 PCB 濃度の上昇はみられない）おそらくこのデータは 1993 年度以降低下するものと思われる。ただし、現在使用中の皮膚重症度基準¹⁾や重症度得点評価案¹⁾ではたとえば痤瘡様皮疹が 1 コあってもⅡ～Ⅲあるいは 1 点と定量化されるが、この重症度分類が現在の皮膚症状が非常に改善した状況にこれまでと同様に適用されるのか考える時期にきていると思われる。

血中 PCB パターンと皮膚重症度得点数の関係をみると 1991～1992 年度でもそれ以前の年度の傾向と同じく A パターンが平均点が高いというものであった。また血中 PCB パターンと PCB 濃度の関係では全体の平均では 1991～1992 年度では各 4.22、3.91 と 1985 年の 5.64 に比べ明らかに低下しており、各パターンでみると A パターンの患者の低下がその大きな要因と思われた。

今回 1977～1978 年以降継続して長期経過観察のできている患者 20 名を選び、各患者の皮膚重症度、PCB パターン・濃度、皮膚重症度得点数の推移を検討したが、この 16 年間に色素沈着も消失し、重症度が 0 となった患者が 7 名にのぼっている一方で、症例 No 2、5、12、19 のごとく面皰～痤瘡様皮疹が依然ほとんど改善せず新生している患者もみられた（表 5 参照）。重症度

の平均得点は 1986～1987 年度に著明に低下しておりそれ以後低い水準で現在まで安定して推移している。また PCB 濃度も徐々ではあるが改善傾向にある。

1989～1990 年度の研究報告³⁾にも述べられているごとく、面皰～痤瘡様皮疹の存在する患者が今回の分析でも同様の頻度（20～30%程度）でみられ、PCB により誘発された慢性の毛包異常の解明が現時点の大きな皮膚科的研究課題のように思われた。

総 括

1991～1992 年度の福岡県油症年次検診の結果をまとめこれまでに報告された検診結果と比較し、油症患者の皮膚症状の推移を検討した。また 1977～1978 年度以降長期観察をしえた 20 例について皮膚症状の重症度および PCB 分析の推移を検討した。

1992 年度の皮膚重症度および皮膚重症度得点数は 1990 年度および 1991 年度のデータより若干の高値を示したが、これはⅡ～Ⅲと評価された数の増加によると思われた。しかし 1992 年度の PCB 濃度はむしろ以前より低下しており、実際に全体として皮膚症状が増悪したとは考えられず 1992 年度における受診数の減少や検診医師の主観的な差が何らかのみかけ上の得点の上昇に関与したのではないかと推測された。1991～1992 年度の PCB パターンや PCB 濃度の変化はとくに認めなかった。

1977～1978 年度以降 1991～1992 年度まで定期的に年次検診を受診し長期にデータが得られている患者 20 名についての分析では皮膚重症度が 0（なし）へ移行している患者の着実な増加が確認され、また重症度得点数は 1986～1987 年度以降著明に低下していることが判明した。また血中 PCB 濃度も軽度であるが減少している傾向がうかがわれた。

文 献

- 1) 旭正一，幸田弘，利谷昭治：昭和 48 年度，49 年度一斉検診における油症皮膚重症度の変動と新しい皮膚重症度評価試案。福岡医誌 66：629-634，1975。
- 2) 旭正一，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。
- 3) 本房昭三，堀嘉昭，利谷昭治，旭正一：1989～1990 年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状。福岡医誌 82：345-350，1991。
- 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 年度一斉検診における油症患者の皮膚所見. 福岡医誌 65:81-83, 1974.

6) 利谷昭治: 昭和 46 年度一斉検診による油症患者の皮膚所見. 福岡医誌 63:392-395, 1972.

7) 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.

8) 利谷昭治, 旭正一, 幸田弘: 昭和 50 年度一斉検診における油症患者皮膚所見の推移. 福岡医誌 68:152-155, 1977.

福岡医学雑誌投稿規定

1. 本誌に掲載する論文等は、原則として原著論文、解説、症例報告、学会報告とする。
2. 原著論文は、和文の場合は英文抄録、はじめに、実験方法、実験結果、考察、総括または結論、謝辞、文献の順とし、英文の場合は、Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, の順で記すものとする。ただし、短報の場合は、この区別をつけなくともよい。図、表の標題、説明文は、英文とすることが望ましい。
3. 和文原著には英文の抄録を、欧文原著には和文抄録を付けることとし、それぞれ本誌印刷1ページ以内とする。
4. 和文は現代かなづかい、平がなまじりの横書きとする。外国語はtypewriterを使用するか、あるいはblock letterで鮮明に記すことが必要である。
5. 数字は算用数字を用い、度量衡の単位は、cm, mm, μ m, nm, g, mg, μ g, ng, ml, dl, μ l, cm^2 など、一般的に用いられる略字を使用する。
6. 原稿の第1ページには、標題、著者の所属（必要あれば指導者名付記）、著者名のみを記し、印刷所要部数を赤で付記する。ランニングタイトルを20字以内（欧文の場合は40文字以内）で鉛筆で付記する。
7. 引用した文献は末尾に一括して、番号を付けて記載し、その順序は第一著者名のalphabet順とし、同一著者が続く場合は次の著者のalphabet順とする。記載の形式は次の例による。
 - 1) 雑誌の場合：著者名、論文表題、雑誌名、巻：最初最終頁、発行年。とする。
著者のfirst and middle nameの省略のピリオドは用いない。
(例) Hatch TP, Miceli M and Silverman JA: Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. J. Bacteriol. 162: 938-942, 1985.
(例) 神村英利, 吉村英敏: 油症原因物質の排泄促進, 福岡医誌 78: 266-280, 1987.
 - 2) 単行本の場合：著者名、書名、第何版、引用頁、発行社、発行地、発行年。
(例) Bloom W and Fawcett DW: A Textbook of Histology 10th ed. pp. 179-227, Saunders Co. Philadelphia, 1975.
 - 3) 分担執筆の場合：著書名、章の表題、編者、書名、第何版、最初最終頁、発行社、発行地、発行年。
(例) Yamada Y: Fat-storing cells, In Yamakawa I (ed): Structure and Function of the Liver. 1st ed. pp. 188-202, Nanzando Tokyo, 1980.
8. 写真原稿は鮮明なものでなければならない。凸版の原稿が不備の場合はtrace料、写植料などの清書費用を別に必要とする。表は1ページに組める大きさであることを要する。
9. 定期号のほかに補冊を刊行することがある。教室論文集などを補冊として発行することの可否は幹事会で決定する。
10. 本誌に掲載する論文は、編集会議で承認を得たものに限る。原稿の受付は福岡医学雑誌編集室（医学旧図書館2階）で行う。
編集幹事：居石克夫（1病理）、太田雅博（口腔生理）、堀 哲郎（生理一）、
田代信維（神経精神）、中島 豊（1病理）
編集委員：天児和暢（細菌）、熊澤浄一（泌尿器科）、名和田新（3内科）

平成5年5月25日発行

発行所 福岡医学学会

〒812 福岡市東区馬出3丁目1番1号（九州大学医学部内）

TEL 代表 641-1151 内線 7516

（日本出版協会準会員番号 B211042 振替福岡 5-2233）

編集兼発行者 居 石 克 夫

印刷所 秀巧社印刷株式会社

福岡市南区向野2丁目13-29