

昭和29年11月5日第三種郵便物認可  
平成7年5月25日（毎月25日発行）  
第884号

Vol. 86    No. 5  
May        1995

CODEN : FKIZA4  
ISSN    0016-254X

# 福岡医学雑誌

## *FUKUOKA ACTA MEDICA*

第 86 卷    第 5 号    (884)

平成 7 年 5 月 25 日

---

特    集    号

油    症    と    P C B

研 究 報 告        第 15 集

The Fifteenth 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 15 集

(福岡医学雑誌 第 86 巻 第 5 号 平成 7 年 5 月)

### 目 次

1. 序 言 .....吉村 英敏…( 1 )
2. Coplanar PCB による脂質代謝への影響：ラットとモルモット間の顕著な相違  
.....初村 恵・石田 卓巳  
.....石井 祐次・有吉 範高・小栗 一太・吉村 英敏…( 3 )
3. コプラナー PCB によるモルモット肝ペルオキシソーム酵素活性の変化  
.....岩崎 優・加藤 晴敏・有吉 範高・小栗 一太…( 12 )
4. 2 C サブファミリー P 450 を介した PCB の毒性作用発現に関する研究  
.....有吉 範高・伊藤 正一  
.....奥平 章子・三瀬 雅史・松末 公彦・山田 英之・小栗 一太…( 21 )
5. 2, 2', 4, 4', -Tetrachlorobiphenyl の水酸化体およびメチルスルホン代謝物のラット  
.....における組織残留性 .....原口 浩一・増田 義人・加藤 義久・木村 良平…( 31 )
6. ラット血液中における PCDF 水酸化体代謝物の残存性に関する予備的検討  
.....黒木 広明・石村 憲子  
.....増田 義人・Eva Klasson-Wehler・Åke Bergman…( 37 )
7. 台湾及び福岡油症患者の血液中 PCDF および PCB の 25 年間の濃度推移  
.....増田 義人・原口 浩一・黒木 広明・John Jake Ryan…( 46 )
8. 2, 3, 4, 7, 8-五塩化ダイベンゾフランとその同族体によるヒトリンパ球培養細胞の  
.....姉妹染色分体交換誘発性 (英文)  
.....長山 淳哉・長山 真弓・原口 浩一・黒木 広明・増田 義人…( 52 )
9. サイトカインシスブロック法によるメチルスルホン PCBs 同族体のヒトリンパ  
.....球培養細胞の小核誘発性 (英文)  
.....長山 淳哉・長山 真弓・原口 浩一・黒木 広明・増田 義人…( 58 )
10. In Vitro における Polychlorinated Biphenyls (PCBs) および 2, 3, 4, 7, 8-pentach-  
.....lorodibenzofuran (PCDF) 毒性軽減の検討 (第 3 報)  
.....— 細胞賦活剤および高脂血症用剤の細胞毒性に与える影響 —  
.....松岡 一忠・塚崎 直子・吉田彦太郎…( 65 )
11. 皮脂, 血液中 Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Polychlorinated Quaterphenyls  
.....(PCQs) 濃度の比較検討  
.....— 1992, 1993 年の比較 — .....田中 敬一・塚崎 直子  
.....吉田彦太郎・入船 弘子・渡辺 雅久・谷村 義則…( 70 )
12. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) のポルフィリン代謝に及ぼす影響  
.....— PCBs 1 回大量投与によるマウス実験的ポルフィリン症の検討 —  
.....塚崎 直子・吉田 彦太郎・入船 弘子・渡辺 雅久・田中 敬一…( 75 )
13. 食物繊維の PCB 吸着作用  
.....— in vivo と in vitro の比較 — .....森田 邦正・濱村 研吾・飯田 隆雄…( 80 )
14. PCDF の糞中排泄及び肝臓分布に対する食物繊維の効果  
.....森田 邦正・松枝 隆彦・飯田 隆雄…( 86 )

15. 台湾 Yu-Cheng 患者における米ぬか繊維及びコレステラミンによる PCDF および  
PCB の排泄促進 (英文) .....飯田 隆雄  
中川 礼子・平川 博仙・松枝 隆彦・森田 邦正・濱村 研吾  
中山樹一郎・堀 嘉昭・郭 育良・張 峰鳴・蕭 博文  
林 克昭・余 梅琳・賴 德仁・陳 信昭・徐 澄清…(94)
16. 台湾 Yu-Cheng 患者における PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs の血液中濃度  
および糞便中排泄量 .....飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦・中川 礼子  
森田 邦正・濱村 研吾・中山樹一郎・堀 嘉昭  
郭 育良・張 峰鳴・蕭 博文・林 克昭  
余 梅琳・賴 德仁・陳 信昭・徐 澄清…(102)
17. ラットのインスリン感受性に対する PCBs の影響 .....西住 昌裕・檜垣 靖樹…(109)
18. 発生後 20 年を経過した油症患者の血中 PCB 濃度と検診所見 (英文)  
.....廣田 良夫・廣畑 富雄・片岡恭一郎・篠原 志郎…(115)
19. 油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学的調査  
.....橋口 勇・鳥谷 芳和・阿南 壽・前田 勝正  
赤峰 昭文・青野 正男・福山 宏・奥村 英彦…(124)
20. 末梢血ならびに気管支肺胞洗浄液中の白血球における PCBs と PCDFs の影響 (英文)  
.....中西 洋一・野元 吉二・松木 裕暁・國武 律子・原 信之…(129)
21. Polychlorinated Biphenyls (PCB) の末梢神経再生へおよぼす影響  
.....伊藤 聖・吉村 俊朗  
古屋 孝文・辻野 彰・末永 章人・長瀧 重信…(135)
22. 油症患者における臨床検査所見の推移: 油症発生 26 年後の検討  
.....辻 博・池田 耕一・鈴木 統久・藤島 正敏…(141)
23. 1993・1994 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…(145)

# The Fifteenth Reports of the Study on Yusho and PCB

## (FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 86, No. 5, 1995)

### CONTENTS

|                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                    |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Foreword .....                                                                                                                                                                                                                                        | H. Yoshimura···                                                                    | ( 1 )  |
| 2. Effect of a Coplanar PCB on Lipid Metabolism : The Remarkable Difference<br>between Rats and Guinea Pigs.....                                                                                                                                         | M. Hatsumura, T. Ishida, Y. Ishii, N. Ariyoshi, K. Oguri and H. Yoshimura···       | ( 3 )  |
| 3. Alteration of Peroxisomal Enzyme Activities in the Liver of Guinea Pigs<br>Caused by Coplanar PCB .....                                                                                                                                               | M. Iwasaki, H. Kato, N. Ariyoshi and K. Oguri···                                   | ( 12 ) |
| 4. Studies on PCB Toxicity Involving 2C Subfamily Cytochrome P450 .....                                                                                                                                                                                  | N. Ariyoshi, S. Ito, A. Okudaira, M. Mise, K. Matsusue, H. Yamada and K. Oguri···  | ( 21 ) |
| 5. Tissue Retention of Hydroxy and Methylsulfonyl Metabolites of 2, 2', 4, 4'-<br>Tetrachlorobiphenyl in Rats ···                                                                                                                                        | K. Haraguchi, Y. Masuda, Y. Kato and R. Kimura···                                  | ( 31 ) |
| 6. Preliminary Studies on the Retention of Hydroxylated PCDF Metabolites in<br>Rat Blood .....                                                                                                                                                           | H. Kuroki, N. Ishimura, Y. Masuda, E. Klasson-Wehler and Å Bergman···              | ( 37 ) |
| 7. Change of PCDF and PCB Concentrations in the Blood of Yucheng and Yusho<br>Patients for 25 Years .....                                                                                                                                                | Y. Masuda, K. Haraguchi, H. Kuroki and J J Ryan···                                 | ( 46 ) |
| 8. Effect of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran and Its Analogues on Induction<br>of Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes .....                                                                                                   | J. Nagayama, M. Nagayama, K. Haraguchi, H. Kuroki and Y. Masuda···                 | ( 52 ) |
| 9. Influence of Five Methylsulphonyl PCB Congeners on Frequency of Micronu-<br>cleated Cells in Cultured Human Lymphocytes by Cytokinesis Block<br>Method ···                                                                                            | J. Nagayama, M. Nagayama, K. Haraguchi, H. Kuroki and Y. Masuda···                 | ( 58 ) |
| 10. In Vitro Analysis for Cellular Toxicity of Polychlorinated Biphenyls (PCBs)<br>and 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (PCDF) on HeLa Cell Prolifera-<br>tion (III) — The Effect of Cytoactivator and Antilipemic Agents on Cell<br>Toxicity ..... | K. Matsuoka, N. Tsukazaki and H. Yoshida···                                        | ( 65 ) |
| 11. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Quaterphenyls (PCQs)<br>Concentrations in Skin Surface Lipids and Blood of Patients with Yusho<br>.....                                                                                         | K. Tanaka, N. Tsukazaki, H. Yoshida, H. Irifune, M. Watanabe<br>and Y. Tanimura··· | ( 70 ) |
| 12. Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on Porphyrin Metabolism<br>— Experimental Porphyria Induced by Large Single Doses of PCBs —<br>.....                                                                                                     | N. Tsukazaki, H. Yoshida, H. Irifune, M. Watanabe and K. Tanaka···                 | ( 75 ) |
| 13. Binding of PCB by Several Types of Dietary Fiber in vivo and in vitro .....                                                                                                                                                                          | K. Morita, K. Hamamura and T. Iida···                                              | ( 80 ) |
| 14. Effect of Dietary Fiber on Fecal Excretion and Liver Distribution of PCDF in<br>Rats .....                                                                                                                                                           | K. Morita, T. Matsueda and T. Iida···                                              | ( 86 ) |



15. Clinical Trial of a Combination of Rice Bran Fiber and Cholestyramine for Promotion of Fecal Excretion of Retained Polychlorinated Dibenzofuran and Polychlorinated Biphenyl in Yu-Cheng Patients .....  
T. Iida, R. Nakagawa, H. Hirakawa, T. Matsueda, K. Morita, K. Hamamura  
J. Nakayama, Y. Hori, Y-L L Guo, F-M Chang, P-W Hsiao, K-C Lin  
M-L Yu, T-J Lai, S-J Chen and C-C Hsu... ( 94 )
16. Levels of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in the Blood and Stool of Taiwanese Yu-Cheng Patients.....  
T. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda, R. Nakagawa, K. Morita, K. Hamamura  
J. Nakayama, Y. Hori, Y-L L Guo, F-M Chang, P-W Hsiao, K-C Lin  
M-L Yu, T-J Lai, S-J Chen and C-C Hsu... (102)
17. Effect of PCBs on Insulin Sensitivity in Rats.....  
.....M. Nishizumi and Y. Higaki... (109)
18. Blood Polychlorinated Biphenyls and Manifestation of Symptoms in Chronic “Yusho” Patients.....Y. Hirota, T. Hirohata, K. Kataoka and S. Shinohara... (115)
19. An Epidemiologic Examination on the Prevalence of the Periodontal Diseases and Oral Pigmentation in Yusho Patients .....  
.....I. Hashiguchi, Y. Toriya, H. Anan, K. Maeda. A. Akamine, M. Aono  
H. Fukuyama and H. Okumura... (124)
20. Effect of Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Dibenzofurans on Leukocyte in Peripheral Blood and Bronchoalveolar Lavage Fluid .....  
.....Y. Nakanishi, Y. Nomoto A. Matsuki, R. Kunitake and N. Hara... (129)
21. Effects of Polychlorinated Biphenyls on Regeneration of the Peripheral Nerve in Rats.....  
.....H. Ito, T. Yoshimura T. Furuya, A. Tsujino, A. Suenaga and S. Nagataki... (135)
22. Laboratory Findings in Patients with Yusho : 26 Year Follow-up Study .....  
.....H. Tsuji, K. Ikeda, N. Suzuki and M. Fujishima... (141)
23. Dermatological Findings in the Annual Examination of the Patients with Yusho in 1993-1994 .....J. Nakayama, Y. Hori, S. Toshitani and M. Asahi... (145)

## 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

## Foreword

Hidetoshi YOSHIMURA

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

This is the 15th 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 1993 to March 1995. During this period, our major efforts were made to establish therapeutic methods which can accelerate the fecal excretion of PCBs, PCDFs and PCDDs still retained in the tissues of Yusho patients. For this purpose, a clinical trial of the combination of rice bran fiber and cholestyramine was performed on Yu-Cheng patients in Taiwan. The results showed that four out of six patients excreted the most important etiological agent, 2,3,4,7,8-PenCDF, 2 to 3 times more into their stool during the trial than before, establishing this method as an applicable treatment of Yusho. PCBs and related compounds were considered to be eliminated not only through this intestinal route, but also through the sebaceous gland. In fact, these compounds were detected in a trace amount in the skin surface lipids, but more in the patients than the controls. Therefore, the therapeutic method utilizing this pathway should be also worthy to examine for acceleration of elimination of PCBs and related compounds in the patient tissues. Other valuable findings of the basic researches for better understanding Yusho are also included in this collection, together with some clinical reports. We would appreciate any comments and advices of readers regarding our studies.

「現代の奇病」の見出しで油症がはじめて新聞報道されて以来、今年で早くも27年目を迎え、本研究報告は第15集を数える。この報告集は2年毎に刊行されており、第15集には平成5年4月より平成7年3月に至る、厚生省油症治療研究班の各班員による2年間の成果が収録されている。すなわち、本研究班を構成する九州大学油症治療研究班（班長：九州大学医学部堀嘉昭教授）と長崎油症研究班（班長：長崎大学医学部吉田彦太郎教授）、ならびに油症患者が居住する都道府県の衛生部などが行ってきた研究成果の2年間のまとめといえる。

本研究の目的の第一は治療法の速やかな開発である。そのためには、患者体内に今なお残留する高毒性のPCDFsなどの排泄促進が最重要と考えられる。かくして、種々の基礎的検討が行われた結果、コレステラミンと米ぬかファイバーの併用療法が、まず推進すべき方法として取り上げられた。最初は複数の油症患者ご夫婦についての臨床実験が行われたが、確たる結論が得られないまま、わが国の油症より10年後に発生した台湾油症の患者の多数例について、さらに検討を実施する運びとなった。

この遂行に当っては、堀嘉昭九大油症治療研究班長はじめ、福岡県保健環境研究所飯田隆雄氏を中心とするスタッフのみなみなならぬ盡力と、台湾当局の全面的協力があり、その結果、長年の懸案にはじめて一応の結論が出さ

れた。今回行われた台湾油症患者に対する臨床実験の目的は、わずかに2週間の投薬に対する有効性の確認にあったが、投薬前の1週間を含む3週間の糞便の採取と包装・輸送、さらにそれらの糞便中のPCDFsなどの超微量分析など、患者と分析者の双方にとって、ともにきわめて気骨が折れる困難な実験であった。しかし、これらの努力の結果、判定の対象となり得た6例の患者のうち、4例において薬物投与前にくらべ、2～3倍のPCDFsなどの排泄増加がみられることがわかった。またわずかに2週間の投薬実験ではあったが、上記6例における血液中レベル(whole base)も、油症にとって最重要の毒性化合物2,3,4,7,8-PeCDFについていえば、有意な低下が認められたという。かくして、コレステラミンと米ぬかファイバーの併用投与は、油症に有効であろうとの実験的基盤が得られたことになる。

このように一応の結論は得られたものの、両薬物の一回の投与量(コレステラミン4g、米ぬかファイバー6g)はかなりの大量で、この量を一日3回、長期間にわたって連用することは、患者にとって必ずしも容易なことではない。しかし、今回の実験により、食物センイを多く含む食事をするよう、積極的に患者にすすめられる方針が得られたことは評価すべきであろう。増田らは福岡および台湾油症患者血液中の主たるPCB、PCDF成分の過去25年間の推移を検討しているが、それによれば、発症より14年後までの初期の体内半減期(PCBs 約4年、PCDFs 約2年)にくらべ、それ以降の半減期(PCBs 10～12年、PCDFs 7～8年)は遙かに長くなっているという。このことは、現状における有毒成分の体内からの自然消失が、如何に容易でないかを示している。このような事態の改善に、食物ファイバーの日常的摂取が多少なりとも役立つことを願っている。

排泄促進の第2の可能性は、この数年来長崎油症研究班が取り組んできたPCBs、PCQsの皮脂腺を介する排泄に求めることができる。油症発生当初、患者の皮脂中に高濃度のPCBsが含まれることは明らかにされていたが、現在もお微量ながらその皮脂中への排泄が確認されている。何らかの方法により、その排泄を促進させることができれば、それも油症の有効な治療法となり得る。そのためには、まず高毒性のPCDF成分を含む塩素化芳香族炭化水素の一日排泄量を明確にすることが必要である。腸管を介する排泄促進法に一応の決着がつけられたこともあり、今後はこの皮脂腺を介する排泄促進法の開発が緊急の検討課題となるであろう。

油症の多様な症状、あるいはその原因物質たる塩素化芳香族炭化水素の各種実験動物に対する種々の毒性を考えると、それらの発現機作を一元的に説明することはかなり困難である。一方、これまでの多くの研究から、高毒性の塩素化芳香族炭化水素が実験動物で、活性酸素の生成系を強く促進する事実はよく知られている。さらに、これが重要な毒性発現機作となっているとの指摘も多い。これら生成系の促進に加えて、今回、小栗らはコプラナーPCBが活性酸素の消去系の活性を低下させることを見出している。すなわち、ラットやモルモットにおいて、3,4,5,3',4'-PenCBの投与がグルタチオン パーオキシダーゼ、グルタチオン レダクターゼ、あるいはカタラーゼなどの酵素活性の低下をもたらし、またグルタチオン レベル自体も低下させるという。前記のような活性酸素の生成系の促進とともに、この消去系の低下が相まって、一層、酸化ストレスを増強させているというものである。このような酸化ストレスの増加が、油症の多様な症状の重要な誘因となっているか否かは、高毒性のPenCBやPenCDFを投与した動物における毒性が、活性酸素消去剤の投与により軽減し得るか否かで確かめ得るであろう。これに対する早急な結論が待たれるところである。

本報告集には、PCBなどによる毒性発現に関するなお多くの基礎的知見や、その後の患者の病像などについての報告も収載されている。これらの知見が油症についての理解を一層深め、今後の治療に役立つことを願っている。本研究班の目的は、第一に治療法の開発ではあるが、発症以来27年にもわたり不安に悩まされてきた患者に対し、健康管理法を確立することも重要な目的の一つである。このためにも、基礎的研究の推進に一層の努力が望まれる。

なお本研究報告集の編集は九州大学油症治療研究班長堀嘉昭教授ならびに同班員の中川樹一郎助教授により行われた。また、ここに収録された研究成果は、平成5、6年度の厚生科学研究費補助金に負うものであり、ここに合せて深甚なる謝意を表したい。

## Coplanar PCB による脂質代謝への影響： ラットとモルモ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

初村 恵・石田卓巳・石井祐次

有吉範高・小栗一太

中村学園大学食物栄養学科

吉 村 英 敏

## Effect of a Coplanar PCB on Lipid Metabolism : The Remarkable Difference between Rats and Guinea Pigs

Megumu HATSUMURA, Takumi ISHIDA, Yuji ISHII, Noritaka ARIYOSHI  
and Kazuta OGURI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62,  
Fukuoka 812-82*

Hidetoshi YOSHIMURA

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

We studied the effect of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) on lipid metabolism by determining the level of triacylglycerol and total cholesterol in rats and guinea pigs. Male Wistar rats and male Hartley guinea pigs received PenCB in corn oil once at a dose of 25 mg/kg i. p. and 0.5 mg/kg i. p., respectively. Pair-fed control group of both species were treated with the vehicle and given the amount of chow matched with that taken by the PenCB-treated animals. Free-fed control group was treated with vehicle and was given the chow *ad libitum*. The plasma was collected on the day 5 after the treatment and the liver was removed. The plasma triacylglycerol level in guinea pigs treated with PenCB was significantly higher than those in free- and pair-fed controls, whereas no significant difference was observed in PenCB-treated rats from both control groups. The plasma cholesterol level was also higher in PenCB-treated guinea pigs than in the two control groups, though the level in rats was significantly lower than the corresponding control values. The hepatic triacylglycerol and cholesterol levels were increased significantly in both species by the PenCB treatment. Although lipid metabolism was disordered in both animals by treatment with PenCB, the responsiveness was remarkably different between guinea pigs and rats. These differences could be associated with species difference in susceptibility toward toxic chlorinated aromatic hydrocarbons.

### 緒 言

Coplanar polychlorinated biphenyl (PCB) や polychlorinated dibenzofuran に代表される高毒性多塩素化芳香族炭化水素は、油症の原因物質として知られているが、その毒性の発現機序は十分には解明されてい

ない。おそらくサイトゾールに存在する Ah レセプターが関与すると考えられている<sup>32)</sup>。それは、これらの高毒性化合物が CYP1A1, NAD (P)H : quinone oxidoreductase, class-3 aldehyde dehydrogenase および glutathione S-transferase Y<sub>a</sub> subunit などの Ah レセプターを介して発現調節されている肝酵素を著明に

誘導するという事実があり<sup>28)32)41)42)</sup>, 誘導性の高い Ah-responsive なマウスの方に, これが低い Ah-nonresponsive なマウスよりも毒性が高く発現するという理由からである<sup>9)</sup>. Ah レセプターについては, マウスで cDNA 単離の報告が 1992 年になされ, その転写因子としての性質も次第に明かとなってきた<sup>8)10)</sup>. しかし, Ah レセプターは, 種を通じてほぼ同程度存在するにも関わらず, coplanar PCB や 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の毒性には著しい動物種差がある<sup>9)16)18)23)25)26)30)36)</sup>.

TCDD や coplanar PCB で処理されたラットには, 摂餌量の減少とともに顕著な体重増加の抑制が認められ, いわゆる wasting syndrome が引き起こされる<sup>32)</sup>. ラットにおいては, この現象に著しい糖新生阻害が寄与していると報告された<sup>40)</sup>. これに対し著者らは, TCDD や coplanar PCB に感受性の高いモルモットの場合には, coplanar PCB の毒性に糖新生への影響は寄与しないことを明らかにしている<sup>29)</sup>.

油症患者の典型的な症状の 1 つとして, 高脂血症が知られている. 油症事件後, 半年以上という長い期間にわたって油症患者の多くに高トリグリセリド血症が認められている<sup>39)</sup>. このときの血中トリアシルグリセロールレベルの増加は, アガロースゲル電気泳動における pre- $\beta$  バンドの増加, すなわち, 内因性トリアシルグリセロールレベルの増加によるものであった<sup>39)</sup>. また, 油症患者には, 塩素痤瘡が見られることも何らかの脂質代謝異常に由来すると思われる<sup>15)</sup>. このような脂質代謝異常は, PCB や TCDD を投与した実験動物にも認められており<sup>1)14)24)35)</sup>, 毒性を考えるうえで重要である. 脂質は生体膜の構成成分であるため生体内の脂質レベルの異常は, 膜の流動性, 可塑性に影響を与える<sup>4)38)</sup>. また, 生理活性脂質である, ジアシルグリセロール, 血小板活性化因子 (PAF) およびアラキドン酸代謝物への影響も懸念される.

本研究では, coplanar PCB に対する感受性が比較的低いことが知られているラットと, 最も感受性が高いモルモットにおける脂質代謝への影響を比較検討した. Coplanar PCB としては, 最強の毒性を示す 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) を用いて, 血漿中, 肝臓中のトリアシルグリセロールおよびコレステロールレベルへの影響を調べた. また, PenCB 処理によって引き起こされる摂餌量の減少の対照群として, pair-fed コントロール群を設け, 同様に検討を加えた.

## 実 験 方 法

### 1. 実験材料

PenCB は Saeki らの方法<sup>34)</sup> に従って合成した.

### 2. 薬物投与

4 週齢 Hartley 系雄性モルモット (体重 350~400 g) は梶谷動物店 (福岡) より, 3 週齢 Wistar 系雄性ラットは Charles River Japan (東京) よりそれぞれ購入し, 九州大学薬学部動物舎にて 1 週間馴化させた後, 実験に供した. PenCB はモルモットにおいては 0.5 mg/kg/2 ml corn oil の用量で, またラットにおいては 25 mg/kg/4 ml corn oil の用量で腹腔内に単回投与し, 一日当りの摂餌量を記録した. 対照群には, free-fed コントロール群と pair-fed コントロール群を設けた. Free-fed コントロール群には corn oil を腹腔内投与し, 食餌と水を自由に与えた. Pair-fed コントロール群には同じく corn oil を腹腔内投与し, 体重当りの摂餌量を PenCB 投与群と揃え, 水は自由に与えた. 絶食は行わず, 投与 5 日後に断頭してヘパリンを含む試験管 (ベノジェクトチューブ, テルモ, 東京) に採血し血漿を調製した. また, 肝臓を摘出し, 生理食塩液で灌流した.

### 3. 肝脂質の抽出

肝脂質は, 灌流した肝より Folch ら<sup>11)</sup> の方法に従って抽出し, 抽出液は小分けして使用まで -20°C に保存した.

### 4. 脂質の定量

トリアシルグリセロールの定量には, トリグリセリド G-テストワコー (和光, 大阪) を使用した. コレステロールの定量には, コレステロール E-テストワコー (和光, 大阪) を使用し, 総コレステロールを測定した. 血漿中脂質の測定には, 血漿をそのまま用いた. 肝脂質の場合には, 抽出して得た脂質分画のクロロホルム-メタノールを窒素気流下に揮発させた後, 残渣に 1% Triton X-100 を含む 10% isopropanol 100  $\mu$ l を加えて溶解させ試料とした.

## 実 験 結 果

### 1. ラットとモルモットにおける急性毒性の比較

PenCB 処理ラットでは, 摂餌量の減少とともに, 有意な体重増加の抑制が認められた. また, pair-fed コントロール群にも, 有意な体重増加の抑制が認められ, その程度は投与後の日数が経過するに従って, PenCB 投与群に近づく傾向にあった. PenCB 処理ラットには, 肝肥大, 胸腺および脾臓の萎縮も観察された.

PenCB 処理モルモットでは、摂餌量の減少に伴い、著しい体重減少が認められた。モルモットに対する PenCB の投与量はラットに対するそれに比べ 50 分の 1 であるにもかかわらず、PenCB 処理による体重への影響は、モルモットにおいてラットより顕著であった。Pair-fed コントロール群にも体重増加抑制が認められたが、PenCB 投与群の体重減少を摂餌量の減少だけから説明するのは困難と思われた<sup>29)</sup>。PenCB 処理モルモットには、有意な肝肥大が認められたが、脾臓の萎縮は観察されなかった。PenCB の毒性の指標として用いた胸腺や脾臓の萎縮は、モルモットではあまりよい指標とは思われない。これに対し、体重への影響はモルモットに対する毒性の指標として優れていると思われた。

## 2. ラットとモルモットにおけるトリアシルグリセロールレベルの比較

PenCB 投与が血漿中トリアシルグリセロールレベルに与える影響は、ラットとモルモットで大きく異なっていた (Fig. 1)。ラットの場合、PenCB 投与群には free-fed コントロール群、pair-fed コントロール群のいずれとも有意な差は認められなかった。しかし、pair-fed コントロール群の血漿中トリアシルグリセロールレベルは、free-fed コントロール群の約 50% と有意

に低いものであった。一方モルモットの PenCB 投与群には free-fed コントロール群の約 10 倍、pair-fed コントロール群の約 3.3 倍と、有意に高い血漿中トリアシルグリセロールレベルが認められた。また、pair-fed コントロール群では free-fed コントロール群の約 3 倍有意に高かった。このように PenCB 投与 5 日後のモルモットには、高トリグリセリド血症が認められ、油症患者の場合と同様の傾向であった<sup>39)</sup>。

Fig. 2 に示すように、肝臓のトリアシルグリセロール含量は、ラットでは PenCB 投与群で free-fed コントロール群、pair-fed コントロール群のいずれよりも有意に 2 倍以上高かった。モルモットの場合には、PenCB 投与群に free-fed コントロール群と比べて有意に高い値が認められたが、pair-fed コントロール群との間に有意な差は認められなかった。Pair-fed コントロール群の肝トリアシルグリセロール含量は、free-fed コントロール群と比べて有意に高いものであった。このような傾向は PenCB 投与群および pair-fed コントロール群の少ない摂餌量に由来する可能性がある。

## 3. ラットとモルモットにおけるコレステロールレベルの比較

Fig. 3 に投与 5 日後の血漿中コレステロールレベル

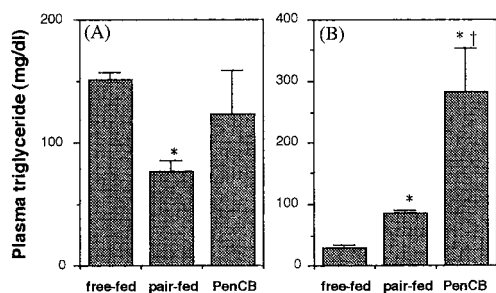


Fig. 1 Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl treatment on plasma triglyceride concentration in rats (A) and guinea pigs (B). On the five days after treatment, the blood was collected in heparinized test tube (VENOJECT II; TERMO, Tokyo, Japan) after decapitation of animals and plasma was prepared. Triglyceride in plasma was assayed using Triglyceride G-Test Kit Wako (Wako, Osaka, Japan). \*Significantly different from free-fed control ( $p < 0.05$ ); †Significantly different from pair-fed control ( $p < 0.05$ ); The value represents the mean  $\pm$  S. E.

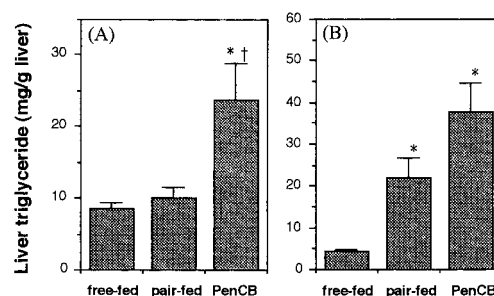
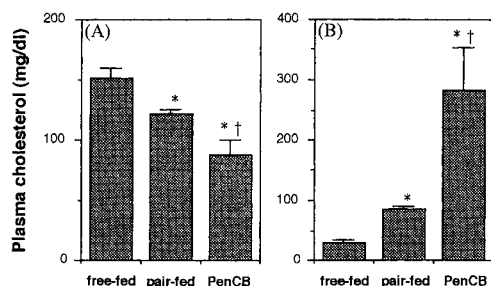
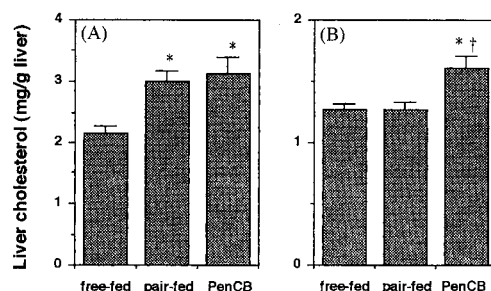


Fig. 2 Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl treatment on liver triglyceride concentration in rats (A) and guinea pigs (B). On the five days after treatment, the liver was removed after decapitation of animals and the lipids were extracted according to Folch *et al.*<sup>11)</sup> Solvent was evaporated from the extracts under nitrogen stream. The residue was then dissolved in 10% isopropanol containing 1% Triton X-100 and a 100  $\mu$ l aliquot was submitted to the triglyceride assay described in legend to figure 1. \*Significantly different from free-fed control ( $p < 0.05$ ); †Significantly different from pair-fed control ( $p < 0.05$ ); The value represents the mean  $\pm$  S. E.



**Fig. 3** Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl treatment on plasma total cholesterol concentration in rats (A) and guinea pigs (B). Preparation of plasma was described in legend to figure 1. Total cholesterol in plasma was determined using Cholesterol E-Test kit Wako (Wako, Osaka, Japan). \*Significantly different from free-fed control ( $p < 0.05$ ); † Significantly different from pair-fed control ( $p < 0.05$ ); The value represents the mean  $\pm$  S. E.



**Fig. 4** Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl treatment on liver total cholesterol concentration in rats (A) and guinea pigs (B). Liver lipid samples were prepared as described in legend to figure 2. Total cholesterol was assayed as described in legend to figure 3. \*Significantly different from free-fed control ( $p < 0.05$ ); † Significantly different from pair-fed control ( $p < 0.05$ ); The value represents the mean  $\pm$  S. E.

を示す。ラットの PenCB 投与群では、free-fed コントロール群の約 60%，pair-fed コントロール群の約 73%と有意な低下が認められた。これに対して、モルモットの PenCB 投与群では、free-fed コントロールの約 6.6 倍、pair-fed コントロールの約 2.3 倍と有意な血漿中コレステロールレベルの上昇が認められた。摂餌量制限の影響はラットとモルモットでは異なり、摂餌量の減少によってラットでは血漿中コレステロールレベルの有意な低下、モルモットでは有意な上昇が惹起されている。

Fig. 4 に肝臓のコレステロール含量を示す。ラットでは、PenCB 投与群で free-fed コントロール群に比べ有意に 1.5 倍高かった。しかし、pair-fed コントロール群との間に有意な差はなかった。絶食によりラットでは肝脂質が増加するとされていることから<sup>35)</sup>、pair-fed コントロール群では、少ない摂餌量によって絶食した場合と類似の影響を与えたことになる。一方、モルモットの PenCB 投与群における肝コレステロール含量は、free-fed コントロール群および pair-fed コントロール群いずれからも約 1.3 倍有意に高いものであった。Pair-fed コントロール群には肝コレステロールレベルの上昇は認められなかった。このように摂餌量制限に対するレスポンスは、ラットとモルモットでは異なっており、ラットでは肝コレステロールレベルが上昇したが、モルモットでは変化が認められなかった。PenCB 投与したモルモットにおける肝コレステ

ロールレベルの上昇は、摂餌量に依存していなかった。

#### 4. PenCB の脂質代謝へ及ぼす影響(pair-fed コントロール群との比較)

PenCB の脂質代謝への影響を pair-fed コントロールと比較して Table 1 にまとめた。ラットとモルモットでは PenCB に対するレスポンスがかなり異なっていた。PenCB 投与 5 日後のラットでは、血漿中コレステロールレベルが低下し、肝トリアシルグリセロールレベルが増加していた。これに対し、モルモットでは、肝トリアシルグリセロールに有意な差こそなかったものの上昇の傾向があり、その他の血漿中トリアシルグリセロール、血漿中コレステロール、肝コレステロールはいずれも上昇していた。

#### 考 察

ラットに PCB mixture を投与した実験によると、血中トリアシルグリセロールレベルは、投与後一過性に上昇し、その後に通常レベルまで戻ると報告されている<sup>22)</sup>。本研究では投与 5 日後の血漿中トリアシルグリセロールレベルを比較しており、PenCB 処理群と 2 つのコントロール群との間に有意な差は認められなかった。しかし、PenCB 投与 1 日後などについては検討を加えていないため、一過性の血漿トリアシルグリセロールレベルの上昇が起こっていた可能性はある。TCDD の投与量の違いによって肝脂質のプロフィールが変化することも報告されている<sup>1)</sup>。また、PenCB 投

**Table 1** Modification of lipid metabolism by 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl treatment comparing between rats and guinea pigs

|             | cholesterol |       | triglyceride |       |
|-------------|-------------|-------|--------------|-------|
|             | blood       | liver | blood        | liver |
| rats        | ↓           | →     | →            | ↑     |
| guinea pigs | ↑           | ↑     | ↑            | →     |

Arrow shows increasing or decreasing tendency of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl-treated groups of rats and guinea pigs in cholesterol or triglyceride levels in the plasma and liver, compared with the corresponding pair-fed control group.

与ラットの肝トリアシルグリセロールレベルが上昇していたことは、TCDD (60  $\mu$ g/kg, p. o.) 投与ラットの結果からも支持されている<sup>35)</sup>。TCDD 投与によってラット肝の遊離脂肪酸のレベルが上昇するが、これが *de novo* 脂肪酸合成に由来するか否かには、相反する報告がある。その1つは TCDD 処理により、*de novo* 脂肪酸合成が阻害されるというものであり<sup>24)</sup>、もう1つは、TCDD は甲状腺ホルモン triiodothyronine レベルの上昇を通じて、*de novo* 脂肪酸合成を促進するというものである<sup>13)14)</sup>。これらの報告は、投与量がかなり異なっているので、肝脂質のプロフィールが異なっているのかも知れない。本研究における PenCB 投与ラットの肝トリアシルグリセロールレベルの上昇が、遊離脂肪酸レベルに影響を受けているか否かは明らかではない。トリアシルグリセロールを多く含む血漿リポタンパク質は、主にキロミクロンと VLDL である。キロミクロンは食餌性である。そのため、食餌量の少ない PenCB 処理ラットにおいては、血漿中トリアシルグリセロールは主に VLDL に由来すると思われる。しかし、これも推測の域を出ない。

一方、モルモットでは、PenCB 投与群に、高トリグリセリド血症が認められた。これは、TCDD を用いて行われた実験結果をよく支持している<sup>6)7)12)</sup>。PenCB 処理群の肝トリアシルグリセロールレベルは、pair-fed コントロール群との間に有意な差こそ無かったものの上昇傾向にあり、free-fed コントロール群と比較すると有意に上昇していた。このことは、血漿中トリアシルグリセロールレベルの上昇としてよく反映されていると思われる。

TCDD 処理したモルモットでは、血中の LDL と VLDL の増加が報告されている<sup>5)</sup>。肝臓より分泌された VLDL は、末梢組織の毛細血管内皮細胞の表面に存在する酵素、lipoprotein lipase (LPL) の働きを受ける。そして、大部分のトリアシルグリセロールは分解される<sup>6)7)</sup>。TCDD 処理したモルモットには、脂肪組織の LPL 活性の著しい低下が報告されている<sup>6)7)</sup>。このことも、PenCB 処理モルモットにおける高トリグリセリド血症の一因と考えられる。なお、LPL 活性は、VLDL 上に存在する apolipoprotein CII (Apo CII) によって活性化されることが知られているが<sup>33)</sup>、モルモットでは Apo CII が存在するにもかかわらず、*in vitro* でモルモットの血漿を LPL に加えても、活性化は起こらない<sup>2)</sup>。*In vivo* で、モルモットの LPL 活性がどのように調節されているのかはまだ明らかではないが、それでも正常モルモットが高トリグリセリド血症になっていないという事実から、何らかの有効なトリアシルグリセロール分解メカニズムをもつものと推測されている<sup>7)</sup>。TCDD 処理したラットでは LPL 活性は低下しないと報告されている<sup>6)7)</sup>。このことは、PenCB 処理ラットの血漿中トリアシルグリセロールレベルに、いずれのコントロールとも有意な差が認められなかったことを支持している。

次にコレステロールレベルについて述べる。ラットでは PenCB 投与により肝臓中のレベルが増加したが、pair-fed コントロールと同程度であった。このことは、摂餌量の減少に由来する可能性もある。しかし、ラットに PCB mixture を投与すると、コレステロール生合成の key enzyme である HMG CoA reductase



の mRNA レベルが上昇すると報告されている<sup>22)</sup>。また、HMG CoA reductase は甲状腺ホルモンより正の調節を受けており<sup>13)</sup>、このことは TCDD が triiodothyronine のレベルを上げることからも支持されている<sup>13)14)</sup>。これらのことから、PenCB 投与ラットの肝では、コレステロールの生合成が促進されている可能性がある。コレステロールはエステル型として、VLDL および HDL の成分として肝から放出される。VLDL は、中間型リポ蛋白 (IDL)、LDL と代謝されてゆく。肝へ取り込まれるコレステロールの 70% が、LDL 中のコレステロールエステルとして肝細胞に存在している LDL レセプターにより処理される。リポタンパク質の代謝過程において重要な働きをするタンパク質として cholesteryl ester transfer protein (CETP) がある<sup>31)</sup>。CETP は、コレステロールエステルを HDL から VLDL や IDL に運びそれらが LDL に変化することで肝へコレステロールを戻す役割 (コレステロール逆転送系) を演じている。また、反対にトリアシルグリセロールを VLDL および IDL から HDL へ運ぶ働きもしている<sup>31)32)</sup>。CETP は、ウサギに多く、ラットには少ないことが知られており、ヒトにおける発現量は、ラットとウサギの中間ぐらいとされている<sup>27)</sup>。しかし、モルモットの CETP については、いまのところ報告されていない。ラットは、CETP 欠損モデル動物であることから、コレステロール逆転送系がヒトの場合とかなり異なると考えられている<sup>20)</sup>。CETP 欠損が、PenCB 処理ラットにおける血漿中コレステロールレベルの低下に寄与している可能性もある。TCDD や PCB 処理によって、このような低コレステロール血症が起こるという報告はこれまでに無く、非常に興味深い。

PenCB 処理モルモットにおいても肝コレステロールレベルは増加していたが、pair-fed コントロール群には、肝コレステロールレベルの上昇は認められなかった。このことから、モルモットの場合には、摂餌量の低下は肝コレステロールレベルへあまり寄与していないと思われる。モルモットにおける肝コレステロールレベルの増加は PenCB の作用によると考えられるが、ラットのように HMG CoA reductase の mRNA レベルが上がるか否かは確認されていない。モルモットの場合、PenCB 投与によって、血漿中のコレステロールレベルも増加している。これは、TCDD を用いた結果からも支持されている<sup>12)</sup>。このような血漿中レベルの増加には肝コレステロールレベルが反映されているように思える。しかし、PenCB 投与群の血漿中コレ

ステロールレベルは free-fed コントロール群の約 6 倍と非常に高いので、肝での生合成以外の因子が存在する可能性がある。

エステル型のコレステロールは、LDL の成分として肝臓に戻るが、TCDD 処理モルモット肝 LDL レセプターレベルの低下が報告されている<sup>3)</sup>。このことから、PenCB 処理モルモットにおける高コレステロール血症は、肝への LDL の取り込みが減少したためと考えれば説明可能である。しかし PenCB 処理ラットにおいて、血漿中トリアシルグリセロールおよび血漿中コレステロールのレベルは、いずれも肝臓中の含量を反映していなかった。血漿中コレステロールレベルは、年齢、性別、ストレスにより影響を受けるとされている<sup>7)33)</sup>。本研究の結果は、PenCB 処理ラットにおいては、肝からのリポタンパク質放出が影響を受けることを示唆しているのかも知れない。

ここに興味深い知見がある。それは、セレン欠乏食を与えたラットでは、肝 VLDL の放出が促進されるというものである<sup>37)</sup>。最近、著者らは、PenCB 処理によってラット肝細胞質に、マウスのセレン結合性タンパク質に対応するラットのタンパク質が強く誘導されることを見出している<sup>21)</sup>。このことと併せて考えると、肝臓におけるこのタンパク質の増加が肝臓中のセレンの存在量を増加させ、その結果、VLDL 放出を抑制している可能性がある。このように PenCB の脂質代謝に及ぼす影響は複雑であり、脂質代謝異常はラットとモルモットでは異なった形で現れることが分かった。これが PenCB の毒性の一部を担っている可能性があると考えられる。

油症患者においては、油症発生から半年後にも著しい高トリグリセリド血症が認められている<sup>39)</sup>。また、Hirota らは、油症発生から 20 年後の油症患者の血中トリアシルグリセロールレベルが血中 PCB レベルと有意な相関を示したと報告している<sup>17)</sup>。PenCB 処理モルモットにおいても著しい高トリグリセリド血症が認められた。モルモットでは PenCB 処理により脱毛が認められるようになるが、これは、皮膚症状によるものかも知れない。ヒトにおいて、塩素痤瘡や著しい眼脂の分泌などの脂質代謝異常が起こることを考え合わせると<sup>15)</sup>、モルモットは毒性としての脂質代謝異常をヒトに外挿するよいモデルになる可能性がある。PenCB 処理によって起こる脂質代謝異常を正常な状態に戻す方法を確立することは、油症患者の新たな治療方針につながる可能性がある。

## 総 括

PenCBの脂質代謝に対する影響を明らかにする目的で、毒性の現れる量のPenCBをラットとモルモットに投与し、血漿中および肝臓中のトリアシルグリセロールとコレステロールのレベルを調べた。対照群は、PenCB投与群と摂餌量を揃えたpair-fedコントロール群と、自由に摂餌させたfree-fed群の2群とし、PenCBによる摂餌量減少の影響も併せて検討した。これらの実験より、次のような知見を得た。

1) PenCB処理モルモットには、著しい高トリグリセリド血症および高コレステロール血症がみとめられた。また、肝臓コレステロール含量も有意に増加していた。肝臓トリアシルグリセロールにも増加の傾向があったが、pair-fedコントロール群との間に有意な差は認められなかった。肝コレステロールはPenCB処理によって有意に増加した。

2) PenCB処理ラットの場合には、血漿中コレステロールレベルの有意な低下が認められた。血漿中トリアシルグリセロールレベルは、pair-fedコントロール群で有意に低下していたが、PenCB投与群においては、2つのコントロール群との間に有意な差は認められなかった。肝臓のトリアシルグリセロール含量は、PenCB処理によって有意に増加した。また、肝臓コレステロール含量の増加は、PenCB投与群とpair-fedコントロール群のいずれにも認められたことから、摂餌量の減少に由来することが示唆された。

## 文 献

- 1) Albro, PW, Corbett, JT, Harris, M and Lawson, LD: Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on lipid profiles in tissue of the Fischer rat. *Chem.-Biol. Interact.* 23: 315-330, 1978.
- 2) Andersson Y, Thelander L and Bengtsson-Olivecrona G: Demonstration of apolipoprotein CII in guinea pigs. Functional characteristics, cDNA sequence, and tissue expression. *J. Biol. Chem.* 266: 4074-4080, 1991.
- 3) Barter PJ and Johnes ME: Kinetic studies of the transfer of esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 21: 238-249, 1980.
- 4) Bernert JJ Jr and Groce DF: Acute response of rat liver microsomal lipids, lipid peroxidation, and membrane anisotropy to a single oral dose of polybrominated biphenyls. *J. Toxicol. Environ. Health* 13: 673-687, 1984.
- 5) Bombick DW, Matsumura F and Madhuker BV: TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) causes reduction in the low density lipoprotein (LDL) receptor activities in the hepatic plasma membrane of the guinea pig and rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118: 548-554, 1984.
- 6) Brewster DW and Matsumura F: Reduction of adipose tissue lipoprotein lipase activity as a result of *in vivo* administration of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to the guinea pig. *Biochem. Pharmacol.* 37: 2247-2253, 1988.
- 7) Brewster DW and Matsumura F: Differential effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on adipose tissue lipoprotein lipase activity in the guinea pig, rat, hamster, rabbit, and mink. *Comp. Biochem. Physiol.* 93: 49-53, 1989.
- 8) Burbach KM, Poland A and Bradfield CA: Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8185-8189, 1992.
- 9) Chapman DE and Schiller CM: Dose-related effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 78: 147-157, 1985.
- 10) Ema M, Sogawa K, Watanabe N, Chujoh Y, Matsushita N, Gotoh O, Funae Y and Fujii-Kuriyama Y: cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 246-253, 1992.
- 11) Folch J, Less M and Sloane-Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509, 1951.
- 12) Gasiewicz TA and Neal RA: 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin tissue distribution, excretion, and effects on clinical chemical parameters in guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 51: 329-339, 1979.
- 13) Gebhard RL, Stone BG, Andreini JF, Duane WC, Evans CD and Prigge W: Thyroid hormone differentially augments biliary sterol secretion in the rat. I. The isolated-perfused liver model. *J. Lipid Res.* 33: 1459-1966, 1992.
- 14) Gorski JR, Weber LWD and Rozman K: Tissue-specific alteration of *de novo* fatty acid synthesis in 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-treated rats. *Arch. Toxicol.* 62: 146-151, 1988.
- 15) 五島應安, 樋口謙太郎: 油症(塩化ビフェニール中毒症)の皮膚科学的症候論. 福岡医誌 60: 409-431, 1969.
- 16) Henck JM, New MA, Kociba RJ and Rao KS: 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: acute oral toxicity in hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59: 405-407, 1981.
- 17) Hirota Y, Kataoka K, Tokunaga S, Hiro-

- hata T, Shinohara S and Tokiwa H: Association between blood polychlorinated biphenyl concentration and serum triglyceride level in chronic "Yusho" (polychlorinated biphenyl poisoning) patients. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65: 221-225, 1993.
- 18) Hochstein JR, Aulerich RJ and Bursian SJ: Acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to mink. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17: 33-37, 1988.
- 19) Ihm J, Quinn DM, Busch SJ, Chataing B and Harmony JA: Kinetics of plasma protein-catalyzed exchange of phosphatidylcholine and cholesterol ester between plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 23: 1328-1341, 1982.
- 20) 稲津明広, 小泉順二, 馬淵宏: 血漿リポ蛋白異常症の病態と遺伝子解析. CETP 欠損症. *日本臨床* 52: 3216-3220.
- 21) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N and Oguri K: Coplanar PCB induces a selenium binding protein as a major cytosolic protein in rats. *in abstracts of papers, 14th international symposium on chlorinated dioxins, PCB and related compounds* (Kyoto, Japan, November 21-25, 1994) *Organohalogen Compounds* 21: 423-426, 1994.
- 22) Jenke HS: Polychlorinated biphenyls interfere with the regulation of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase activity in rat liver via enzyme-lipid interaction and at the transcriptional level. *Biochim. Biophys. Acta* 837: 85-93 (1985).
- 23) Kleeman JM, Olson JR and Peterson RE: Species differences in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity and biotransformation in fish. *Fundam. Appl. Toxicol.* 10: 206-213, 1988.
- 24) Lackshman MR, Compbell BS, Chirtel SJ and Ekarohita N: Effects 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on *de novo* fatty acid and cholesterol synthesis in the rat. *Lipids* 23: 904-906, 1988.
- 25) McConnell EE, Moore JA and Dalgard DW: Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following a single oral dose. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43: 175-187, 1978.
- 26) McConnell EE, Moore JA, Haseman JK and Harris MW: The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins in mice and guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44: 335-356, 1978.
- 27) 中谷矩章: リポ蛋白代謝に関与する酵素と転送蛋白の分子生物学. コレステロール転送蛋白 (CETP). *日本臨床* 52: 3164-3169, 1994.
- 28) Nebert DW, Petersen DD and Fornance AJ, Jr.: Cellular responses to oxidative stress: the [Ah] gene battery as a paradigm. *Environ. Health Perspect.* 88: 13-25, 1990.
- 29) Oguri K, Hatsumura M, Ishii Y, Koga Y, Ariyoshi N and Yoshimura H: Modification of the gluconeogenesis is not involved in the co-planar PCB toxicity in highly sensitive guinea pigs. *Chemosphere* 27: 2295-2303, 1993.
- 30) Olson JR, Holscher MA and Neal RA: Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the golden Syrian hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 67-78, 1980.
- 31) Pattnaik NM and Zilversmit DB: Interaction of cholesterol ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 254: 2782-2786, 1979.
- 32) Poland A and Knutson JC: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22: 517-554, 1982.
- 33) Pownall HJ, Morrisett JD, Sparrow JT, Smith LC, Shepherd J, Jackson RL and Gotto AJ: A review of the unique features of HDL apoproteins. *Lipids* 14: 428-434, 1979.
- 34) Saeki S, Yoshihara S, Uchino S and Yoshimura H: Improved method of the synthesis of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl. *Fukuoka Acta Medica* 70: 85-87, 1979.
- 35) Schiller CM, Adcock CM, Moore RA and Walden R: Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and fasting on body weight and lipid parameters in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 356-361, 1985.
- 36) Schwetz BA, Norris JM, Sparschu GL, Rowe UK, Gehring PJ, Emerson JL and Gerbig CG: Toxicology of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ. Health Perspect.* 5: 87-99, 1973.
- 37) Scott RL, Kheshti A, Heimberg M, Wilcox HG and Stone WL: The role of selenium in the secretion of very-low-density lipoprotein in the isolated perfused rat liver. *Biochem. J.* 279: 741-745, 1991.
- 38) Spector AA and Yorek MA: Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* 26: 1015-1035, 1985.
- 39) 鶴沢春生, 伊藤靖夫, 納富昭光, 勝木司馬之助: 塩化ビフェニールによる高グリセライド血症. *福岡医誌* 60: 449-454, 1969.
- 40) Weber LWD, Lebofsky M, Stahl BU, Gorski JR, Muzi G and Rozman K: Reduced activities of key enzymes of gluconeogenesis as possible cause of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicology* 66: 133-144, 1991.
- 41) Yoshihara S, Kawano K and Yoshimura H: Toxicological assessment of highly chlorinated biphenyl congeners retained in the Yusho patients.

Chemosphere 8 : 531-538, 1979.

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

(受付 1995-2-27)

## コプラナー PCB によるモルモット肝 ペルオキシソーム酵素活性の変化

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

岩 崎 優・加 藤 晴 敏  
有 吉 範 高・小 栗 一 太

### Alteration of Peroxisomal Enzyme Activities in the Liver of Guinea Pigs Caused by Coplanar PCB

Masaru IWASAKI, Harutoshi KATO,  
Noritaka ARIYOSHI and Kazuta OGURI

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Kyushu University 62, Fukuoka 812-82*

The hyperlipidemia is a well-known typical symptom in Yusho patients and experimental animals treated with PCBs. We have found a significant induction of CYP4A1, which catalyzes  $\omega$ -hydroxylation of fatty acids, in guinea pigs by the treatment with a coplanar PCB, 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB), though the P450 is reduced in the treated rats. Peroxisome has  $\beta$ -oxidation enzymes distinct from mitochondrial enzymes, and also play an important role in lipid metabolism. Peroxisome proliferators have been shown to regulate the expression of CYP4A1 and peroxisomal enzymes by the same mechanism in the rat.

In the present study, we examined the effect of PenCB treatment on peroxisomal enzymes in the liver of guinea pigs. As a result, the enzyme activities of hepatic peroxisome, e. g. fatty acid oxidizing system, catalase and urate oxidase, had a rising tendency by the treatment with PenCB in the animal. The results suggest that the regulation of peroxisomal enzymes and CYP4A1 is also associated in guinea pigs, and PenCB provides a similar effect of peroxisomal proliferators to the animal. The possible toxicity through the peroxisomal alteration was discussed.

#### 緒 言

PCBの毒性の一つとして脂質の代謝および体内動態の異常があることは周知の事実であるが、その分子機構についてはいまだ十分に解明されていない。最近著者らは、コプラナーPCBである3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl(以下PenCB)が、脂質代謝を触媒するcytochrome P 450であるCYP 4 A 1の発現をモルモット肝臓では誘導し、ラット肝臓では逆に著しく抑制することを明らかにし、報告した<sup>28)</sup>。このCYP 4 A 1はある種の高脂血症薬の投与<sup>15)</sup>や病態によっても誘導され<sup>5)</sup>、そのさいしばしばペルオキシソームの増殖も認められる。ペルオキシソームにはミトコンドリアとは異なる脂肪酸の $\beta$ -酸化系があることが知られており<sup>30)</sup>、通常この $\beta$ -酸化活性は細胞全体の活性の15%程度にすぎないが、高脂血症薬の投与や高

脂肪食の摂取<sup>22)</sup>によって著しく誘導され、g 肝臓あたりの活性の60%を占めるまでに至る<sup>42)</sup>。この活性の誘導はペルオキシソームの増殖に由来するものであるが、ペルオキシソームの増殖には動物種差があることが知られており<sup>37)</sup>、ラットでは顕著に増殖が見られるがモルモット、ヒトではほとんど増殖しないか、わずかなのである<sup>9)14)29)38)41)43)</sup>。また、この種差はCYP 4 A 1の誘導においても同様に認められている<sup>15)</sup>。これらのことからCYP 4 A 1の誘導とペルオキシソームの増殖の間には関連性があると考えられているが<sup>6)16)</sup>、厳密に言えば、ペルオキシソームの増殖に先立ち、CYP 4 A 1のmRNA<sup>7)</sup>、およびタンパク質の発現<sup>10)</sup>が起こることから、これら2つの現象は同一のメカニズムを介していない可能性も考えられる。事実、PCB処理においてはCYP 4 A 1の誘導とペルオキシソームの増殖との間の関連性は明確にされておらず<sup>11)</sup>、CYP 4 A 1だけを問

題にしても誘導されるという報告<sup>10)11)18)21)28)</sup>と誘導されないという相反する報告<sup>13)21)28)</sup>がなされており、動物種やPCBのcongenerに依存するものと思われる。一方、油症患者においては高脂血症が認められており<sup>47)</sup>、これがCYP4A1やペルオキシソームの変動の原因であるか、あるいはそれらを引き起こす要因となっているかについてはまったく不明である。PenCB処理を行ったモルモットでは油症患者と類似した高脂血症が起こること<sup>20)</sup>、またモルモットは高脂血症薬に対するペルオキシソームの応答性がヒトと類似していると考えられること<sup>29)</sup>から、今回著者らは実験動物としてモルモットを選択し、PenCB処理モルモットにおけるペルオキシソーム酵素活性の変化を明らかにすることでPCB処理におけるCYP4A1の誘導とペルオキシソーム増殖との間の関連性を解明する手掛かりとし、かつペルオキシソーム酵素活性変化を介したPCBの毒性作用発現機序を明らかにする試みを行った。

## 実験方法

### 1. 実験材料

3, 4, 5, 3', 4'-PenCBは既報<sup>40)</sup>に従って当教室で合成した。NADおよびcoenzyme Aは協和発酵(株)より、FADはSigma Chemical社製のものを用いた。抗カタラーゼ抗体はRockland社より、また、clofibrateは和光純薬工業(株)よりそれぞれ購入した。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

### 2. 実験動物および動物処理

Hartley系雄性モルモット(体重370-450g)を梶谷動物(福岡)より購入し、一週間馴化後、実験に供した。PenCB処理群ではPenCBを0.5 mg/kg体重/2

ml corn oilとして腹腔内に単回投与した。対照群として自由に摂取させるfree-fed control群と、体重あたりの摂取量がPenCB処理群と同じになるように餌を与えるpair-fed control群をもうけ、いずれの群もPenCB処理群と同量のcorn oilを投与し、水は自由に与えた。前日の絶食は行わず、投与5日目に屠殺し、摘出した肝臓はCohenらの方法<sup>12)</sup>に従い灌流を行い、phosphate buffered saline (PBS)にて10%ホモジネートを調製した。

また、酵素活性測定のために、Wistar系の雄性ラットをCharles River Inc. Japanより購入し、一週間馴化したのち、corn oilに溶解したclofibrateを400 mg/kg体重あて1日2回4日間、5日目は1回の計9回投与し、clofibrate投与群とした。対照群には同量のcorn oilのみを投与してモルモットと同様に屠殺、肝ホモジネートを調製した。

### 3. 分析機器

日立U-3210型自記分光光度計またはU-1100型分光光度計を用いて測定した。

### 4. Western blotting

先に報告した方法<sup>3)</sup>に従って行った。

### 5. 酵素活性測定法

ペルオキシソームのシアン非感受性 $\beta$ -酸化活性は、OsumiらのFatty acid oxidizing system (FAOS)活性測定法<sup>38)</sup>に従って行った。尿酸酸化酵素活性はBergmeyerの方法<sup>8)</sup>を用いて行った。カタラーゼ活性の測定はAebiの方法<sup>1)</sup>を用い、非線型最小二乗法を用いて一次反応速度定数を算出し、 $1 \text{ sec}^{-1}$ を1 unitとして活性値を求めた。

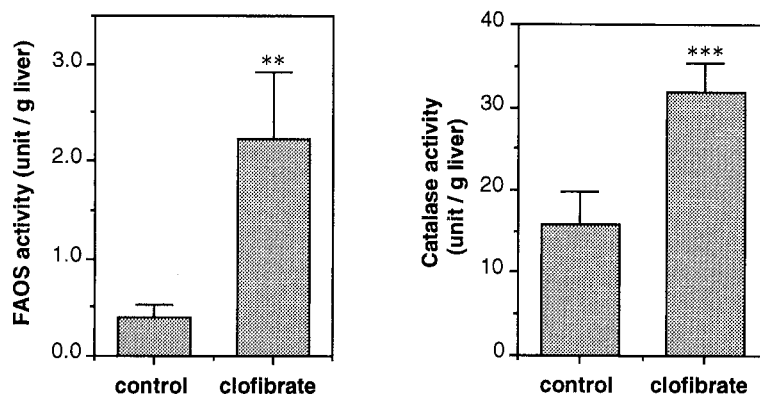


Fig. 1 Effect of clofibrate treatment on peroxisomal FAOS and catalase activity of rats. Significantly different from control; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Values represent the means  $\pm$  S. E.

## 実 験 結 果

### 1. 酵素活性測定条件の確立

ラットにペルオキシソーム増殖剤（以下 PPs; peroxisome proliferators）を投与するとペルオキシソームの  $\beta$ -酸化活性は約 4~10 倍と著しく上昇するのに対し、カタラーゼ活性の上昇は高々 1.3~3 倍程度とされている<sup>37)39)41)</sup>。そこでまず最初に当研究室の測定条件においても同様の結果が得られるか否かを確認めた。Fig. 1 にその結果を示す。PPs としては clofibrate を用いたところ、 $\beta$ -酸化活性は 5.7 倍に、カタラーゼ活性は約 2 倍に有意に上昇し、当研究室の測定条件で以後の検討が可能であることが確かめられた。

### 2. PenCB 投与による急性毒性

Fig. 2 に PenCB 処理後屠殺までの体重変化を、

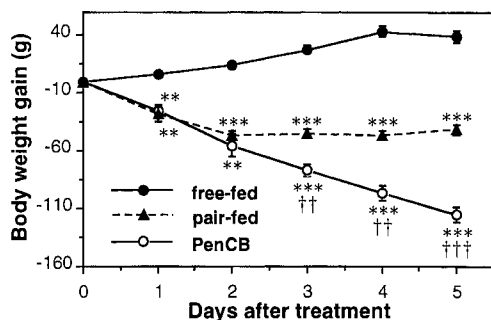


Fig. 2 Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl treatment on body weight gain of guinea pigs. Significantly different from free-fed control; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Significantly different from pair-fed control; †,  $p < 0.01$ ; ††,  $p < 0.001$ . Values represent the means  $\pm$  S. E.

Table 1 に屠殺時の臓器重量を示す。PenCB 処理群は屠殺時まで顕著な体重減少が認められたのに対し、pair-fed control 群では PenCB 処理群と同量の飼料摂取量であるにもかかわらず、投与後 2 日目からはほぼ横這いとなり、PenCB 群のプロフィールとは明らかに異なっていた。一方、肝重量は pair-fed control 群で有意に減少し、PenCB 処理群では pair-fed control 群に対して有意に増加していた。また、脾臓については有意な変化は認められなかった。

### 3. ペルオキシソーム局在酵素活性の変化

モルモットに PenCB を投与すると飼料摂取量が激減する。ペルオキシソームは絶食によっても増殖することが知られているので<sup>23)</sup>、PenCB 処理群に見出される変化から、摂食量減少に起因する変化を除外するためには PenCB 処理群の摂食量に対して pair-feeding

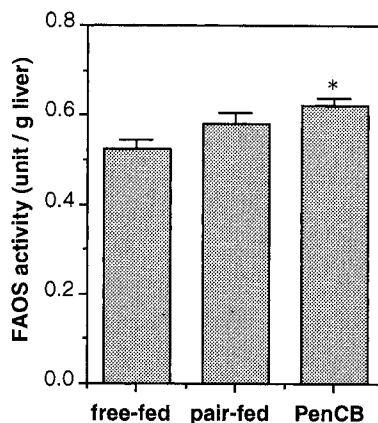


Fig. 3 Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl treatment on peroxisomal FAOS activity of guinea pigs. Significantly different from free-fed control; \*,  $p < 0.05$ . Values represent the means  $\pm$  S. E.

Table 1 Effect of PenCB treatment on tissue weight of guinea pigs

|                     | tissue weight (g/100g body weight) |                   |
|---------------------|------------------------------------|-------------------|
|                     | liver                              | spleen            |
| Free-fed control(4) | 4.11 $\pm$ 0.093                   | 0.178 $\pm$ 0.017 |
| Pair-fed control(4) | 2.66 $\pm$ 0.039***                | 0.153 $\pm$ 0.023 |
| PenCB (4)           | 4.26 $\pm$ 0.074†††                | 0.156 $\pm$ 0.009 |

The figure in parenthesis represents the number of animals used.

Significantly different from free-fed control; \*\*\*,  $p < 0.001$

Significantly different from pair-fed control; †††,  $p < 0.001$

Values represent the means  $\pm$  S. E.

を行った control (pair-fed control 群) を設置することが望ましいと考えられる。まず, Fig. 3 にはペルオキシソーム  $\beta$ -酸化 (FAOS) 活性の変化を記した。Pair-fed control 群では free-fed control 群に対して有意ではないが, 上昇の傾向が認められた。一方, PenCB 処理群では free-fed control 群に対して有意に上昇していたが, pair-fed control 群との比較ではやはり上昇傾向が認められたものの, 有意な変化ではなかった。

Fig. 4 にはペルオキシソーム局在酵素の一つ, 尿酸酸化酵素の変化を示した。本酵素は PenCB 処理群のみで free-fed および pair-fed の 2 つの control 群と比較して約 2 倍と有意に上昇した。

さらに Fig. 5 では通常ペルオキシソームマトリクスの最も主要な酵素であるカタラーゼの変化を示した。本酵素の活性は pair-fed control 群では free-fed control 群に比較して有意に減少したが, PenCB 処理群では free-fed control 群と比肩する活性となっており, pair-fed control 群に対して有意に上昇していた。

#### 4. カタラーゼのタンパク質レベルでの変化

Fig. 5 で認められたカタラーゼ活性の変化が酵素タンパク質量の変化であるか否かを調べるために, 抗カタラーゼ抗体を用いて immunoblot 分析を行った。その結果を Fig. 6 に示す。さらにこの結果を数値化したものを Table 2 に示す。PenCB 投与群の酵素タンパク質量は活性のデータをほぼ支持していたが, pair-fed control 群の酵素タンパク質量は活性で見られた

程の低下は認められなかった。

#### 考 察

PenCB 処理群では投与後屠殺時まで継続した体重減少が認められ, これは先のわれわれの報告<sup>36)</sup>と一致するものであった。同じ食餌量である pair-fed control 群の体重が 2 日目に降ほぼ一定値を保つことを考えると, PenCB 投与群の体重減少が単に摂食量減少によるものではないことが明らかである。PenCB 投与群

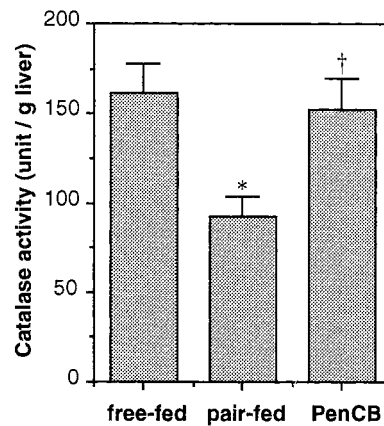


Fig. 5 Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl treatment on catalase activity of guinea pigs. Significantly different from free-fed control; \*,  $p < 0.05$  Significantly different from pair-fed control; †,  $p < 0.05$  Values represent the means  $\pm$  S. E.

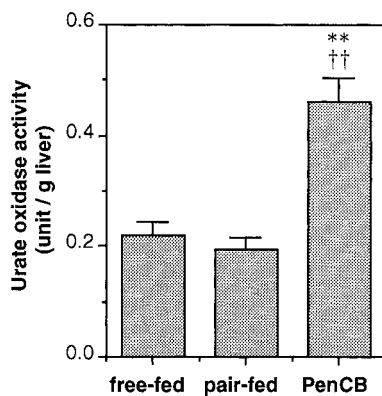


Fig. 4 Effect of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl treatment on urate oxidase activity of guinea pigs. Significantly different from free-fed control; \*\*,  $p < 0.01$  Significantly different from pair-fed control; ††,  $p < 0.01$  Values represent the means  $\pm$  S. E.

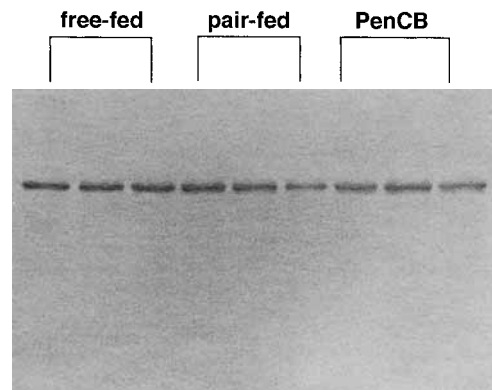


Fig. 6 Immunoblot analysis of guinea pig liver homogenate with anti-bovine liver catalase antibody. All samples were electrophoresed (10% polyacrylamide gel) in amount of 60 ng liver.



**Table 2** Measurement of the intensity of immuno-reactive bands of guinea pig homogenate with anti-bovine liver catalase antibody

|                      | relative band intensity |
|----------------------|-------------------------|
| Free-fed control (3) | 1.00±0.073              |
| Pair-fed control (3) | 0.678±0.123             |
| PenCB-treated (3)    | 0.801±0.061             |

The figure in parenthesis represents the number of animals used.

Free-fed control=1.0

Values represent the means ± S. E.

の FAOS 活性は free-fed control 群に対し有意に上昇しているが, pair-fed control 群との比較ではその上昇は有意ではなかった. Pair-fed control 群の活性上昇傾向は絶食による効果と類似のものと考えられるが, 今回のデータのみでは PenCB 投与群における活性上昇が PenCB 処理によるものであるか否かは判定できないものと思われる.

尿酸酸化酵素は核酸を構成するプリン塩基の分解過程において尿酸をアラントインに分解する酵素であるが, ヒトおよびその他の霊長類では欠落しているためプリン体分解の最終産物は尿酸である. 興味あることにプリン体の分解は高等動物ほど不完全であり, 進化の過程で選択的に脱落したことが示されている<sup>35)</sup>. このことが進化的にどのような意味を持つかは明らかにされていないが, 尿酸には抗酸化作用が明らかにされている<sup>31)</sup> ことを考え合わせるとプリン代謝の酵素系が陸棲生物において欠落していったことは生体における活性酸素防御<sup>2)</sup> のために意味のあることと推察される. よく知られているように霊長類ではアスコルビン酸合成系酵素が欠損しているため, 進化の過程で尿酸がアスコルビン酸の役割を代替し, 補完したと考えられる<sup>32)</sup>. 事実, PPs 処理ラットにおいて FAOS 活性が顕著に誘導されるさいにおいても本酵素活性は不変であるかむしろ低下するように見える. このことは, あたかも FAOS 活性の上昇に伴う酸化的ストレス生起の危険性を回避するかのような応答と感じられる. そのように考えると, 今回 PenCB 処理モルモットで見られた尿酸酸化酵素活性の上昇は, オキシダーゼ反応による過酸化水素の過剰生成と尿酸の消失という両反応が相俟って, 酸化的ストレスの危険性が高まるものと推察される.

一方, カタラーゼ活性は pair-fed control 群で有意

に低下したが, タンパク質レベルでの検討結果と相関していなかったことから, 摂食制限による酵素タンパク質の発現抑制以外にも何らかの作用機序で酵素活性が阻害されている可能性も考えられる.

前述したように PPs 処理ラットにおいて誘導される FAOS 活性に比べカタラーゼ活性上昇の割合はかなり低い. このことより通常, 細胞内のカタラーゼ含量は充分豊富であり, かなりの酸化的ストレス負荷にも対応できるものと推察される. 事実, 2 年間にわたり PPs を投与したラットでは, 過酸化水素消去系酵素の単位肝重量あたりの絶対活性は, 顕著に増加した過酸化水素産生系酵素 (主たるものは FAOS) の絶対活性を大きく上回っていたと報告されている<sup>44)</sup>. モルモット肝臓でのカタラーゼ含量はラットに比べてかなり高い<sup>41)</sup>. モルモット肝臓においては Se 依存性のグルタチオンペルオキシダーゼがほとんど発現していないことが知られており<sup>46)</sup>, おそらくその不利な条件を補償するために多量のカタラーゼを発現しているものと考えられる.

今回の検討では PenCB 処理モルモットの尿酸酸化酵素活性が顕著に上昇していたが, 本反応はペルオキシソームのオキシダーゼ活性の多くを占めるアシル CoA オキシダーゼ活性 (FAOS の初発反応) と比較すると, 絶対活性は決して高いものではない. したがって今回の結果からはモルモット肝臓において酸化的ストレスが誘起される可能性は低いものと推察される. 実際 TCDD 処理ラット肝臓では著しい脂質過酸化が起こるが, TCDD 処理モルモット肝臓では過酸化の程度はわずかである<sup>19)</sup>.

ペルオキシソームに局在する酵素はカタラーゼやオキシダーゼばかりではない. 種々の脱水素酵素, アミノ基転位酵素, エーテル脂質合成酵素など現在 40 種以

上の酵素の存在が確認されており、脂肪酸ばかりでなくアミノ酸、グリオキシル酸、アルコールやアルデヒド、リジンの中間代謝物ピペコリン酸、フィトールの酸化物フィタン酸、エイコサノイドなどの代謝を行う一方で、コレステロール、胆汁酸、糖鎖生成に重要な中間体であるドリコールなどのアルコール、プラスマローゲンなどのエーテルリン脂質の合成など、多くの同化、異化反応を触媒している。よって、PenCBがこれらの酵素に対し、尿酸酸化酵素にみられたような著しい活性変化をもたらす、毒性に関与する可能性も考えられる。

今回の結果と PenCB 処理モルモットにおいては CYP 4 A 1 および bilirubin UDP-glucuronyltransferase が顕著に誘導されるという過去のわれわれの知見<sup>28)</sup>を併せて考えると、モルモットにおいては PenCB が PPs 様の作用を持つ可能性が示唆される。しかし PenCB が PPs の共通な基本構造と考えられている難代謝性脂溶性アニオンとは異なること、また尿酸酸化酵素活性を著しく変化させることなど、一致しない点も認められることから、PPs とは別の作用機序で類似の変化をもたらしている可能性も否定できない。PPs の作用機序については近年かなり明らかになりつつあり、ステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーに属する peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) が retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成して核に移行し、標的酵素の遺伝子上流域に存在する peroxisome proliferator responsive element (PPRE) と結合して遺伝子の転写を促進すると考えられている<sup>25)26)</sup>。しかし PPAR には幾つかの isoform が存在し、PPs の作用に対し抑制的に働くものがある<sup>27)</sup> こと、構造的に多様な PPs が同一の PPAR に特異的な親和性を持つとは考え難いこと、さらに PPAR に対する PPs の直接結合が証明されていないことなど<sup>24)</sup> から、ペルオキシソーム酵素誘導機構に他の経路が介在している可能性も指摘されている。興味深いことにカルシウムアンタゴニストはペルオキシソーム酵素の誘導を抑制することが見出されており<sup>48)</sup>、このことから誘導過程に  $\text{Ca}^{2+}$ 、カルモジュリン、protein kinase C (PKC) 系、phosphatidylinositol (PI) 系などの関与が推定されている。TCDD や PCB は一過性に細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させることが知られている<sup>4)33)</sup> ことから、仮に coplanar PCB が現在不明である PPAR の内因性のリガンドの濃度に影響を与えるようなことが起こり得るならばペルオキシソームの酵素活性に影響を及ぼす可能性は否定できない。

一方、TCDD や coplanar PCB 処理動物の毒性の一つとしてよく知られているものに vitamin A 濃度の低下があるが、興味深いことに TCDD の腹腔内単回投与後 1-7 日目までの肝臓中 vitamin A 濃度はラットでは control の半分以上に低下するに対し、モルモットでは control の 1.1~1.6 倍と高いことが報告されている<sup>17)</sup>。このことと PPAR による転写促進作用が retinoic acid 添加により RXR を介して顕著に増加すること<sup>26)</sup> を考えあわせると、今回モルモットで得られた結果は説明が可能であるかもしれない。今後、肝臓の vitamin A 含量変化がモルモットとは逆であるラットにおいて検討することによって、coplanar PCB の肝ペルオキシソームへの影響をさらに明確にできるものと考えられる。

## 結 語

PCB による脂質代謝異常の原因解明の一環として、coplanar PCB のモルモット肝ペルオキシソーム酵素活性に及ぼす影響を検討した。PenCB 処理により、ペルオキシソームの脂肪酸  $\beta$ -酸化 (FAOS) 活性は上昇の傾向を示したが、本動物種では PPs によっても誘導がかかりにくいことから、今回見られた上昇傾向が PenCB 処理に由来するものであるか否かは判断出来なかった。一方、尿酸酸化酵素は明らかに PenCB 処理で上昇し、この変化はヒトと同様にアスコルビン酸合成酵素を欠いているモルモットにとっては酸化的ストレス生起への毒性的変化と考えられた。これに対し、カタラーゼ活性は PenCB 処理によって不変であるか、むしろ上昇するものと考えられた。以上の変化を総合的に考えると、モルモットにおいては PenCB 処理時においてもなお抗酸化能力が上回っていると考えられ、過去の実験事実<sup>19)</sup> と整合性の得られるものと推察された。

このような変化がヒト肝臓のペルオキシソームにおいても見られるか否かは現時点では不明である。TCDD 処理ラットではペルオキシソームの変化は認められないとする報告<sup>34)45)</sup> もあり、今回得られた結果がモルモットに特異的であった可能性も否定できない。ラットは PPs に対しては応答性が高いため、一般に変化が見やすいと予想されること、PCB 類縁化合物に対する感受性や TCDD 暴露時における vitamin A 含量変化がモルモットと大きく異なることなどから、ラットを用いた検討を行うことで coplanar PCB の肝ペルオキシソームに及ぼす影響をさらに明確にすることが可能であろうと推測される。この点に関しては現在検

討中である。

今回の検討で、PenCB 処理によってモルモット肝ペルオキシソーム酵素活性はいずれも上昇（傾向）した。この事実と、モルモットでは CYP 4 A 1 が誘導される事実から、少なくともモルモットにおいては PCB 処理による両現象が関連していることが示された。この PCB 処理による CYP 4 A 1 とペルオキシソーム酵素活性変化との関連についての疑問も CYP 4 A 1 が逆に減少するラットで検討することにより、明らかに出来るものと期待している。

## 文 献

- 1) Aebi H: Catalase. *Meth. Enz. Anal.* 2, 2nd ed. pp. 673-684, Academic Press, New York, 1974.
- 2) Ames B N, Cathcart R, Schwiers and Hochstein P: Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6858-6862, 1981.
- 3) Ariyoshi N, Tanaka M, Ishii Y and Oguri K: Purification and characterization of dog liver microsomal epoxide hydrolase. *J. Biochem.* 115: 985-990, 1994.
- 4) Atzori L, Flore C, Corrigan A M, Cherchi P, Casula D and Congiu L: Mechanisms of PCBs mixture toxicity on isolated rat hepatocytes. *Ind. Health.* 29: 57-64, 1991.
- 5) Barnett C R, Gibson G G, Wolf C R, Flatt P R and Ioannides C: Induction of cytochrome P450 III and P450 IV family proteins in streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. J.* 268: 765-769, 1990.
- 6) Bars R G, Bell D R and Elcombe C R: Induction of cytochrome P450 and peroxisomal enzymes by clofibrate acid in vivo and in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 45: 2045-2053, 1993.
- 7) Bell D R and Elcombe C R: Induction of acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 IVA1 RNA in rat primary hepatocyte culture by peroxisome proliferators. *Biochem. J.* 280: 249-253, 1991.
- 8) Bergmeyer H U, Gawehn K and Grassl M: Uricase. *Meth. Enz. Anal.* 2, 2nd ed. pp. 518, Academic Press, New York, 1974.
- 9) Bieri F and Lhuguenot J C: Toxicity of peroxisome proliferators. *Biochimie* 75: 263-268, 1993.
- 10) Borlakoglu J T, Edward-Webb J D, Dils R R, Wilkins J G P and Robertson L W: Evidence for the induction of cytochrome P452 in rat liver by aroclor 1254, a commercial mixture of polychlorinated biphenyls. *FEBS Lett.* 247: 327-329, 1989.
- 11) Borlakoglu J T, Clarke S, Huang S, Dils R R, Haeghele K D and Gibson G G: Lactational transfer of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl and 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl induces cytochrome P450 IVA1 in neonates. *Biochem. Pharmacol.* 43: 153-157, 1992.
- 12) Cohen G, Dembiec D and Marcus J: Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 34: 30-38, 1970.
- 13) Dirven H A A M, Van Den Broek P H H, Peters J G P, Noordhoek J and Jongeneelen F J: Microsomal lauric acid hydroxylase activities after treatment of rats with three classical cytochrome P450 inducers and peroxisome proliferating compounds. *Biochem. Pharmacol.* 43: 2621-2629, 1992.
- 14) Elcombe C R: Species differences in carcinogenicity and peroxisome proliferation due to trichloroethylene; a biochemical human hazard assessment. *Arch. Toxicol. Suppl.* 8: 6-17, 1985.
- 15) Gibson G G, Orton T C and Tamburini P P: Cytochrome P450 induction by clofibrate. *Biochem. J.* 203: 161-168, 1982.
- 16) Gibson G G: Co-induction of cytochrome P450 4A1 and peroxisome proliferation: a causal or casual relationship? *Xenobiotica* 22: 1101-1109, 1992.
- 17) Hakansson H, Johansson L, Manzoor E and Ahlberg U G: Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the vitamin A status of Hartley guinea pigs, Sprague-Dawley rats, C57BL/6 mice, DBA/2 mice, and Golden Syrian hamsters. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 37: 117-138, 1991.
- 18) Hansell M M and Ecobichon D J: Effect of chemically pure chlorobiphenyls on the morphology of rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 28: 418-427, 1974.
- 19) Hassan M Q, Stohs S J and Murray W J: Comparative ability of TCDD to induce lipid peroxidation in rats, guinea pigs, and Syrian Golden hamsters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 649-657, 1983.
- 20) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N and Oguri K: Effect of a coplanar PCB on lipid metabolism: the remarkable difference between rats and guinea pigs. *Fukuoka Acta Medica* submitted, 1995.
- 21) Huang S and Gibson G G: Species and congener specific induction of hepatic cytochrome P450 4A by polychlorinated biphenyl. *Biochem. Pharmacol.* 43: 637-639, 1992.
- 22) Ishii H, Fukumori N, Horie S and Suga T: Effects of fat content in the diet on hepatic peroxisomes of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 617: 1-11, 1980.
- 23) Ishii H, Horie S and Suga T: Physiological role of peroxisome  $\beta$ -oxidation in liver of fasted rats. *J. Biochem.* 87: 1855-1858, 1980.

- 24) Issemann I and Green S: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-649, 1990.
- 25) Issemann I, Prince R A, Tugwood J D and Green S: The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* 75: 251-256, 1993.
- 26) Kliewer S A, Umesono K, Noonan D J, Heyman R A and Evans R M: Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358: 771-774, 1992.
- 27) Kliewer S A, Forman B M, Blumberg B, Ong E S, Borgmeyer U, Mangelsdorf D J, Umesono K and Evans R M: Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7355-7359, 1994.
- 28) Koga Y, Tsuda M, Ariyoshi N, Ishii Y, Yamada H, Oguri K, Funae Y and Yoshimura H: Induction of bilirubin UDP-glucuronyltransferase and CYP4A1 P450 by coplanar PCBs: different responsiveness of guinea pigs and rats. *Chemosphere* 28: 639-645, 1994.
- 29) Latruffe C P N: Biochemical properties of liver peroxisomes from rat, guinea pig and human species and the influence of hormonal status on rat liver acyl-CoA oxidase mRNA content. *Biochimie* 75: 235-242, 1993.
- 30) Lazarow P B and De Duve C: A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisome; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2043-2046, 1976.
- 31) Matsushita S, Ibuki F and Aoki A: Chemical reactivity of the nucleic acid bases. I. Antioxidative ability of the nucleic acids and their related substances on the oxidation of unsaturated fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 102: 446-451, 1963.
- 32) Matsushita S: Uric acid. *Protein, Nucleic acid and Enzyme* 33: 3000-3004, 1988.
- 33) McConkey D J, Hartzell P, Duddy S K, Hakansson H and Orrenius S: 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin kills immature thymocytes by  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated endonuclease activity. *Science* 242: 256-259, 1988.
- 34) Mustonen R, Elovaar E, Zitting A, Linnainmaa K and Vainio H: Effects of commercial chlorophenolate, 2, 3, 7, 8-TCDD, and pure phenoxacetic acids on hepatic peroxisome proliferation, xenobiotic metabolism and sister chromatid exchange in the rat. *Arch. Toxicol.* 63: 203-208, 1989.
- 35) Noguchi T, Takada Y and Fujiwara S: Degradation of uric acid to urea and glyoxylate in peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 254, 5272-5275, 1978.
- 36) Oguri K, Hatsumura M, Ishii Y, Koga Y, Ariyoshi N and Yoshimura H: Modification of the gluconeogenesis is not involved in the coplanar PCB toxicity in highly sensitive guinea pigs. *Chemosphere* 27: 2295-2303, 1993.
- 37) Orton T C, Adam H K, Bentley M, Holloway B and Tucker M J: Clobuzarit: Species difference in the morphological and biochemical response of the liver following chronic administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73: 138-151, 1984.
- 38) Osumi T and Hashimoto T: Enhancement of fatty acyl-CoA oxidizing activity in rat liver peroxisomes by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *J. Biochem.* 83: 1361-1365, 1978.
- 39) Permadi H, Lundgren B, Anderson K, Sundberg C and DePierre J W: Effect of perfluorofatty acids on peroxisome proliferation and mitochondrial size in mouse liver: dose and time factors and effect of chain length. *Xenobiotica* 23: 761-770, 1993.
- 40) Saeki S, Yoshihara S, Uchino S and Yoshimura H: Improved method of the synthesis of 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl. *Fukuoka Acta Medica* 70: 85-87, 1979.
- 41) Sakuma M, Yamada J and Suga T: Comparison of the inducing effect of dehydroepiandrosteron on hepatic peroxisome proliferation-associated enzymes in several rodent species. A short-term administration study. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1269-1273, 1992.
- 42) Shindo Y and Hashimoto T: Acyl-coenzyme A synthetase and fatty acid oxidation in rat liver peroxisomes. *J. Biochem.* 84: 1177-1181, 1978.
- 43) Svoboda D J, Grady H and Azarnoff D L: Microbodies in experimentally altered cells. *J. Cell. Biol.* 35: 127-152, 1967.
- 44) Tamura H, Iida T, Watanabe T and Suga T: Long-term effect of peroxisome proliferators on the balance between hydrogen peroxide-generating and scavenging capacities in the liver of Fischer-344 rats. *Toxicology* 63: 199-213, 1990.
- 45) Tomaszewski K E, Montgomery C A and Melnick R L: Modulation of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in F344 rats by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Chem-Biol Interact.* 65: 205-222, 1988.
- 46) Toyoda H, Himeno S and Imura N: The regulation of glutathione peroxidase gene expression relevant to species difference and the effect of dietary selenium manipulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1008: 301-308, 1989.
- 47) Uzawa H, Ito Y, Notomi A and Katsuki S: Hyperglyceridemia resulting from intake of rice

oil contaminated with chlorinated biphenyls. Fukuoka Acta Medica 60 : 449-454, 1969.

48) Watanabe T and Suga T : Suppression of clofibrate-induced peroxisome proliferation in rat

liver by nicardipine, a calcium antagonist. FEBS Lett. 232 : 293-297, 1988.

(受付 1995-3-13)

## 2C サブファミリー P 450 を介した PCB の 毒性作用発現に関する研究

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

有吉 範高・伊藤 正一・奥平 章子・三瀬 雅史

松末 公彦・山田 英之・小栗 一太

### Studies on PCB Toxicity Involving 2C Subfamily Cytochrome P450

Noritaka ARIYOSHI, Shouichi ITO, Akiko OKUDAIRA, Masashi MISE,  
Kimihiko MATSUSUE, Hideyuki YAMADA and Kazuta OGURI

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of  
Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62, Fukuoka 812-82*

It has been demonstrated that PCB metabolism is mainly catalyzed by 1A and 2B subfamily cytochrome P450s, CYP 1A1/2 and CYP 2B1/2. These studies were conducted mostly with hepatic enzymes in rodents. The 1A and 2B subfamily P 450 s are constitutively expressed little, but markedly induced by xenobiotics such as 3-methylcholanthrene and phenobarbital in rodents. On the other hand, the recent studies showed that cytochrome P450s in human liver are remarkably different from isoform of rodents in constitution and enzyme activities.

In the present study, we first tried to metabolize some PCBs with 2C subfamily cytochrome P450 (CYP 2C) purified from dog liver microsomes. The data suggested that CYP 2C may not be involved in PCB metabolism. Since CYP 2C is the same most abundant enzyme as 3A subfamily P450 in human liver and plays a major role for metabolism of many drugs used clinically, and may also play an important role for metabolism of some steroid hormones, we further studied the inhibition of CYP2C-catalyzed steroid metabolism by typical PCB congeners. CYP 2C-mediated steroid metabolism is greatly inhibited by 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl, but not by 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl. On the contrary, 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl markedly suppressed CYP 2C expression in the dog liver. These results suggest that residual PCBs may affect the current situation of steroid hormones in Yusho patients, and may cause PCB-drug interactions.

### 緒 言

これまで PCB の代謝研究は主に 1A および 2B サブファミリーの P 450 を用いて行われており、それらはほとんどラットなど齧歯類の肝臓より精製された P 450 分子種が用いられている<sup>16)19)21)23)24)</sup>。これら 1A および 2B サブファミリーの P 450 はラットにおいては構成的にはほとんど発現していないか、発現していても肝臓の総 P 450 量のわずかに数%を占める程度のマイナーな分子種であり、ある種の化合物の投与によって著しく誘導されるいわゆる薬物代謝型の酵素である<sup>6)7)8)</sup>。すなわち生体が最初に PCB 類に暴露された場

合、それらの代謝に関与する分子種とは考え難い。一方、最近のヒト P 450 の研究の進展によりヒト肝に存在する P 450 は分子種組成や触媒活性において、齧歯類とはかなり異なる可能性が示唆されている<sup>22)32)39)51)</sup>。たとえば benzo (a) pyrene や dimethylbenzo (a) anthracene の代謝活性化に関わる P 450 はラットでは CYP 1A1 であるがヒトでは同じ反応を CYP 3A4 が触媒する<sup>41)</sup>。代謝活性については、種が異なると別の分子種が触媒するのに対し、酵素誘導剤に対する応答分子種は類似しているため、齧歯類のデータをヒトに外挿するのは困難である。仮に phenobarbital 処理によって、ラットとヒトにおいて 2B subfamily の P 450

が誘導されるとしても, *in vivo* において同じ代謝活性の亢進が見られるとは限らない. ヒト肝 P 450 は人種差や個体差が大きいものの構成的には 3 A<sup>20)38)</sup>, および 2 C<sup>40)</sup>サブファミリーの P 450 が主要な分子種であり, これら酵素が臨床応用されている多くの薬物の代謝に関与していることが明らかになりつつある<sup>5)9)11)14)27)37)43)44)47)</sup>.

2 C サブファミリー P 450 (以下 CYP 2 C) はまた, ステロイドホルモンの代謝に重要な役割を担っていることが知られている<sup>3)26)31)45)</sup>. 油症患者において報告されているホルモン代謝異常の原因の一部は PCB により誘導された 1 A および 2 A サブファミリー P 450 のステロイド代謝活性によると考えられている<sup>28)50)</sup>が, 構成的にステロイド代謝に関与している可能性のある CYP 2 C の発現抑制または PCB 代謝に動員されることによる正常なステロイド代謝活性の減少, さらに PCB の直接作用によるステロイド代謝活性の阻害という機序も否定できない.

以上の背景から今回, CYP 2 C の PCB 代謝能力, PCB による CYP 2 C の発現およびステロイド代謝活性への影響に関する検討を行った. CYP 2 C は齧歯類より大型の哺乳類として, また薬物の動態, 毒性試験に汎用されているイヌより精製し, 実験に供した, 以下その結果について述べる.

## 実 験 方 法

### 1. 実験材料

2, 4, 5, 2', 4', 5'-Hexachlorobiphenyl (HCB) および 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) は当教室で合成したものを用い, 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl (TCB) および 3, 4, 3', 4'-TCB は中村学園大学の古賀信幸博士より供与されたものを用いた. 2  $\alpha$ -および 16  $\beta$ -hydroxytestosterone は塩野義製薬中野正行博士より供与された. Progesterone および estradiol-17  $\beta$  代謝物は STERALOIDS 社より購入した. 7-Ethoxycoumarin, glucose-6-phosphate dehydrogenase は Sigma 社製のものを購入し, NADP は協和発酵<sup>株</sup>より, glucose-6-phosphate はオリエンタル酵母工業<sup>株</sup>より得たものを使用した. Sepharose 4 B, DEAE-Sephacel, CM-Sephadex C-50, 2', 5'-ADP-Sepharose, Protein A Sepharose ゲルは Pharmacia Fine Chemical 社より, Biogel HTP は Bio-Rad 社より, また DEAE-5 PW は東ソー<sup>株</sup>より購入した. その他の試薬は市販の特級試薬を用いた.

### 2. 実験動物

Hazelton Research Animals, Inc の雌性 Beagle 犬を日本医科学動物資材研究所<sup>株</sup>より購入し, パナファームラボラトリーズ<sup>株</sup>で飼育後, 8 カ月齢で phenobarbital を経口投与<sup>8)</sup>して, 最終投与後 24 hr で屠殺し肝臓を得た. 肝臓は適当な大きさに切断し, 生理食塩水にて灌流後, 凍結して使用まで -80°C に保存した. また, PenCB 処理はコーンオイルに溶解した PenCB をゼラチンカプセルに充填し, 1 日目と 3 日目に計 0.1 mg/kg となるように経口投与した. Charles River Japan, Inc の Wistar 系雄性ラットは九動<sup>株</sup>より購入し, 常法にしたがって phenobarbital 投与後, 屠殺して肝臓を得た. 肝臓は同様に使用まで -80°C に保存した.

### 3. 酵素の精製

イヌ凍結肝臓より常法にしたがいミクロソームを調製し, コール酸で可溶化後  $\omega$ -aminooctyl-Sepharose 4 B, hydroxylapatite, DEAE-5 PW の各カラムクロマトグラフィーを用い, ラット CYP 2 C 11 抗体に対する交差反応性を指標に精製を行った. また, cytochrome b<sub>5</sub>は $\omega$ -aminooctyl-Sepharose 4B, hydroxylapatite, DEAE-Sephacel, Sephadex G-75 の各カラムで精製した. NADPH-cytochrome P 450 reductase は phenobarbital 処理ラット肝臓より, Yasukochi & Masters の方法<sup>49)</sup>を改良して精製した.

### 4. 抗体の調製および Western blotting

先に報告した方法<sup>2)</sup>にしたがって行った. ただし, 調製した抗血清は既報<sup>33)</sup>にあるように, 2 B subfamily の P 450 も認識したため, 当教室で別に精製した 2 B subfamily の P 450 である P 450<sub>GP-1</sub>を用いて免疫沈降を行い, 2 C subfamily P 450 に対する特異性を上げた後に使用した.

### 5. N 末端アミノ酸配列の分析

Applied Biosystems 社 473 A 自動プロテインシーケンサーを用いて分析した.

### 6. 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に 3 mm×2.1 m のガラスカラムを取付けたもの, あるいは ECD 付き日立 263-70 型ガスクロマトグラフに 3 mm×1.5 m のガラスカラムを取付けたものを用いた. カラム充填剤は 1.5% OV-17 をコートした Chromosorb W (AW-DMCS) を使用した. キャリアーガスには N<sub>2</sub> を用いた.

### 7. 再構成実験

反応溶液は全量 1 ml 中に P 450 0.1 nmol,

NADPH - cytochrome P 450 reductase 0.5 unit, dilauroylphosphatidylcholine 15  $\mu$ g, potassium phosphate buffer (pH 7.4), bovine serum albumin 0.8 mg, PCB congener 40  $\mu$ M, NADPH generating system (NADP 0.5 mM, glucose-6-phosphate 8 mM,  $MgCl_2$  6 mM, glucose-6-phosphate dehydrogenase 0.1 unit), これに必要な場合は cytochrome  $b_5$  を P 450 と同モル添加した。37°C 3 min のプレインキュベーションの後、反応は NADPH 生成系の添加により開始し、10 min インキュベーションした。反応停止および抽出は既報<sup>1)</sup>にしたがって行った。また、精製 P 450 活性の positive control として benzphetamine および aminopyrine の *N*-脱メチル化活性<sup>29)</sup>、7-ethoxycoumarin の *O*-脱エチル化活性<sup>10)</sup>、aniline の *p*-水酸化活性<sup>13)</sup> を測定した。また、steroid 水酸化、酸化活性は HPLC を用いて測定した。

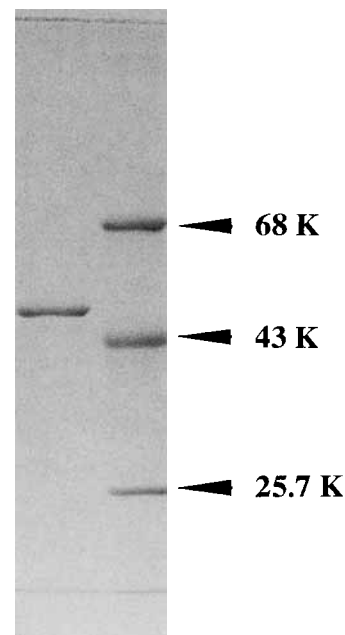
## 実験結果

### 1. CYP2C の精製

イヌ肝臓ミクロソームからの精製過程を Table 1 に要約する。最終精製標品は電気泳動的に単一であり、分子量は約 48.5 K と見積られた(Figure 1)。精製したタンパク質が確かに 2C subfamily に属する P 450 であるか否かを確認するために *N* 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、本 P 450 はすでに Komori らが未処理雄ビーグル犬より精製した P 450-D 1<sup>26)</sup> および Shiraga らが phenobarbital 処理雄ビーグル犬より精製した DPB-2<sup>42)</sup> と *N* 末端アミノ酸配列が完全に一致することを確認した。著者らは P 450<sub>DL-3</sub> と命名したが、これは CYP 2C 21 と呼ばれる分子種に相当する P 450 と考えられた。

Table 2 には精製したイヌの CYP 2C とヒトの CYP 2C の *N* 末端アミノ酸配列を比較した結果を示

す。ヒトの CYP 2C には幾つかの分子種の存在が知られている<sup>30)</sup> が、今回使用するイヌの分子種と比較したところ、アミノ酸レベルで約 70 % の高い相同性が認められた<sup>26)</sup>。以上のことから今回著者らが精製した分子種を用いることによってヒト CYP 2C において同様の検討を行った場合の予測がある程度可能であるもの



### 2C std

Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified P450<sub>DL-3</sub> (CYP2C21). Loaded amount of purified enzyme (2C) was 1.4  $\mu$ g, and molecular weight marker proteins (std) used were bovine serum albumin, ovalbumin and chymotrypsinogen A.

Table 1 Purification of CYP2C from dog liver microsomes

| Step                   | Total protein (mg) | Total content (nmol) | Specific content (nmol/mg protein) | Yield (%) |
|------------------------|--------------------|----------------------|------------------------------------|-----------|
| Microsomes             | 4272               | 3288                 | 0.77                               | 100       |
| Solubilized microsomes | 3963               | 3300                 | 0.83                               | 100       |
| Octylamino-Sephadex    | 344                | 1878                 | 5.46                               | 57        |
| Hydroxylapatite        | 34                 | 345                  | 10.05                              | 10        |
| DEAE-5PW               | 2.6                | 40                   | 15.00                              | 1.2       |



**Table 2** Comparison of  $NH_2$ -terminal amino acid sequence of P-450<sub>DL-3</sub> with human 2C sub-family P450<sub>s</sub>

|                      | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13  | 14  | 15  | 16  | 17  | 18  | 19  | 20  | 21  | 22  | 23  |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P450 <sub>DL-3</sub> | Met | Asp | Leu | Phe | Ile | Val | Leu | Val | Ile | X   | Leu | Ser | X   | Leu | Ile | X   | Phe | Phe | Leu | Trp | Asn | Gln | X   |
| CYP 2 C 8            | Met | Gln | Pro | Phe | Val | Val | Leu | Val | Leu | Cys | Leu | Ser | Phe | Met | Leu | Leu | Phe | Ser | Leu | Trp | Arg | Gln | Ser |
| CYP 2 C 9            | Met | Asp | Ser | Leu | Val | Val | Leu | Val | Leu | Cys | Leu | Ser | Cys | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Trp | Arg | Gln | Ser |     |
| CYP 2 C 18           | Met | Val | Pro | Ala | Val | Ala | Leu | Val | Leu | Cys | Leu | Ser | Cys | Leu | Phe | Leu | Ile | Ser | Leu | Trp | Arg | Gln | Ser |
| CYP 2 C 19           | Met | Asp | Pro | Phe | Val | Val | Leu | Val | Leu | Cys | Leu | Ser | Cys | Leu | Leu | Leu | Ser | Ile | Trp | Arg | Gln | Ser |     |

The same amino acids residue are shown in boxes.

**Table 3** Metabolic activities of purified P450<sub>DL-3</sub> in reconstituted system

| Substrate            | reaction                   | product formed (nmol/min/nmol P-450) |                 |
|----------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------|
|                      |                            | -b <sub>s</sub>                      | +b <sub>s</sub> |
| Benzphetamine        | <i>N</i> -demethylation    | 18.0                                 | 13.1(73)        |
| Aminopyrine          | <i>N</i> -demethylation    | 21.5                                 | 12.5(58)        |
| 7-Ethoxycoumarin     | <i>O</i> -deethylation     | 1.4                                  | 1.1(78)         |
| Aniline              | <i>p</i> -hydroxylation    | 6.1                                  | 4.1(68)         |
| Testosterone         | 2 $\alpha$ -hydroxylation  | N. D.                                | N. D.           |
|                      | 16 $\alpha$ -hydroxylation | 19.8                                 | —               |
|                      | 17-oxidation               | 17.3                                 | —               |
| Progesterone         | 2 $\alpha$ -hydroxylation  | N. D.                                | N. D.           |
|                      | 16 $\alpha$ -hydroxylation | 13.8                                 | 7.8(57)         |
| Estradiol-17 $\beta$ | 2-hydroxylation            | 5.0                                  | 2.6(52)         |
|                      | 16 $\alpha$ -hydroxylation | 2.3                                  | 0.7(30)         |

Figures in parentheses are the % of values in the absence of b<sub>s</sub>.

N.D., not detected —, not determined

**Table 4** PCB metabolism with purified P450<sub>DL-3</sub> in reconstituted system

| Substrate               | IUPAC PCB No. | product formed (nmol/min/nmol P-450) |                 |
|-------------------------|---------------|--------------------------------------|-----------------|
|                         |               | -b <sub>s</sub>                      | +b <sub>s</sub> |
| 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB | 153           | N. D.                                | N. D.           |
| 2, 5, 2', 5'-TCB        | 52            | N. D.                                | —               |
| 3, 4, 3', 4'-TCB        | 77            | N. D.                                | —               |

N. D., not detected —, not determined

と考えた。

## 2. P450<sub>DL-3</sub> の代謝活性

精製した酵素が活性を持つものであることを確認するために、ラット肝より精製した NADPH-cytochrome P 450 reductase とイヌ肝より精製した cytochrome b<sub>s</sub> の存在下、再構成系で異物代謝活性およびステロイド代謝活性を測定した。その結果を Table 3 に示す。その結果、本 P 450 は異物代謝活性も有するも

の、ステロイド代謝活性がきわめて高く、その活性はテストステロンに対し同様の regioselectivity をもつイヌの 2B サブファミリー P 450 のそれぞれ 5.4 倍 (16  $\alpha$ -hydroxylation 活性)、18.6 倍 (17-oxidation 活性) であった。

## 3. 精製 CYP2C による PCB 代謝

つぎに精製 P 450<sub>DL-3</sub> を用いた再構成系において PCB が代謝されるか否かを検討した。その結果を

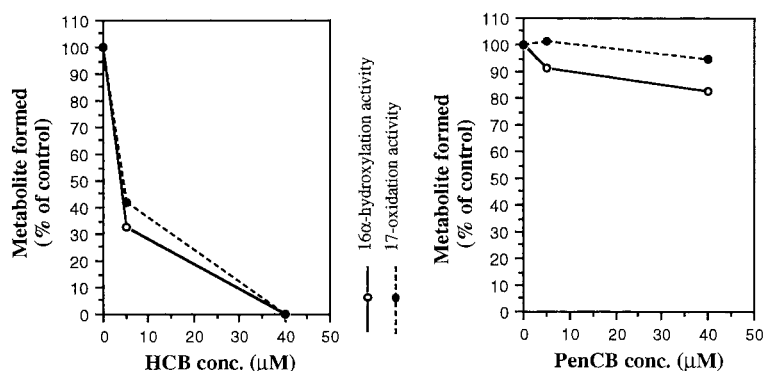


Fig. 2 Inhibition study of CYP2C-catalyzed testosterone metabolism by 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB (left panel) and 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB (right panel)

Table 4 に示す, PCB としては現在油症患者の体内に最も高濃度で検出される 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (HCB), 易代謝性 non-planar PCB の代表として 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl (TCB) および coplanar PCB の原型である 3, 4, 3', 4'-TCB を選んで代謝実験を行った。その結果, 今回の分析条件においてはいずれの代謝物も検出されなかった。

#### 4. CYP2C の代謝活性におよぼす PCB の直接作用

つぎに PCB が CYP2C の代謝活性にどのような影響をおよぼすかについての検討をテストステロンを基質として *in vitro* 系で検討した。PCB としては前述の 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB と最強の急性毒性を示す coplanar PCB として知られる 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) を用い, 再構成系においてまずこれら congener と CYP2C を 25°C, 30 分間インキュベートしたのち基質を添加して反応を開始した。その結果を figure 2 に示す。Figure に示す通り, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は濃度依存的に CYP2C の触媒するテストステロン代謝活性を阻害したのに対し, 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB は若干阻害の傾向を示したものの著しい効果はなかった。2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の CYP2C 代謝反応の阻害機構を推定するために, P 450<sub>DL-3</sub> に本 PCB を添加して基質結合にともなうスペクトル変化が見られるか否かを検討した。その結果を figure 3 に示す。2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の添加により P 450<sub>DL-3</sub> は 386 nm に山を, 422 nm に谷を有する典型的な Type I 型<sup>35)</sup>の基質結合差スペクトルを与えたのに対し, 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB はいずれのタイプの基質差スペクトルも与えなかった(データ未記載)。以上のことから 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は CYP2C の基質結合部位に結合しうることが明らかとなった。

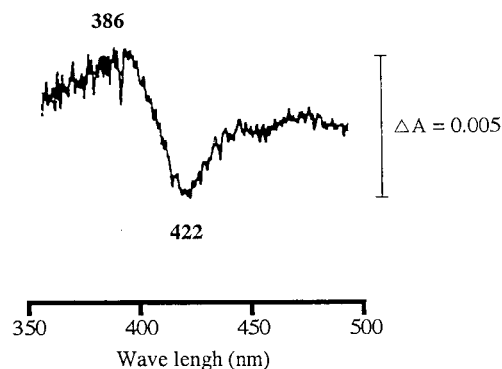
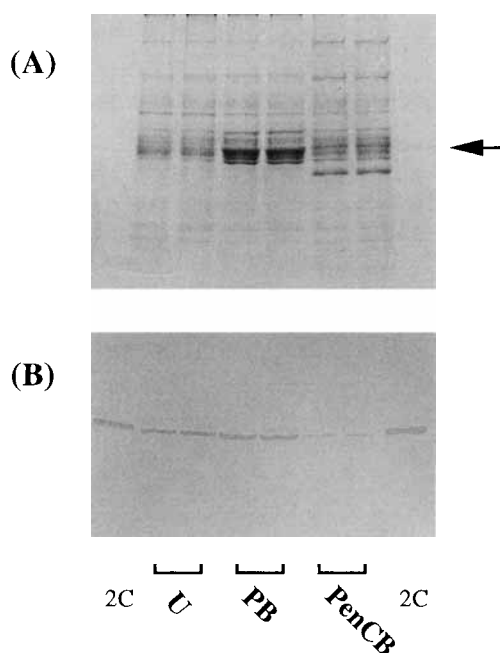


Fig. 3 Substrate difference spectrum of purified CYP2C21 induced by addition of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB  
The amount of enzyme and PCB used were 80 pmol and 1 nmol in a final volume of 220  $\mu$ l, respectively.

#### 5. CYP2C の発現レベルにおよぼす PCB の効果

常在性の P 450 分子種は, 薬物代謝酵素誘導剤処理時には一般にその発現に変動が認められる。そこで動物を PCB 処理した場合に CYP2C の発現にどのような影響がみられるか否かを検討した。検討に先立ち, イヌにおいて CYP2C の発現に性差が見られるか否かを調べた。CYP2C はラットでは性差の著しい分子種であるから, イヌでも同様の現象が認められる場合, 検討結果に普遍性が持たないと判断されたためである。なお本 P 450 含量の性差については現在まで明確にされていない<sup>26)42)</sup>。

未処理の雌雄イヌ肝臓における CYP2C の発現レベルは雄で 125 pmol/mg protein, 雌で 100 pmol/mg protein で大差がなく, また雄では未処理肝臓の P 450



**Fig. 4** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A) and Western blot (B) analysis of liver microsomes of untreated (lane U), phenobarbital-treated (lane PB) and 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB-treated dog (lane PenCB). Each microsomes was applied in the amount of 10  $\mu$ g. Lane 2C contained purified CYP2C21 (0.4  $\mu$ g). Arrow indicates the position of CYP2C21 protein.

総量の約 14% を占めていた。ただしこの検討では一匹ずつのイヌしか用いることができず、また CYP 2C の比含量は immunoblotting で測定したのに対し、総 P 450 含量は分光学的に求めたものであるので多少のずれがあるものと推測される。

Figure 4 に未処理, phenobarbital (PB) 処理および PenCB 処理イヌ肝ミクロソームの電気泳動と immunoblotting の結果をならべて示す。今回 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 処理のイヌ肝臓を用意できなかったが、本 PCB が PB type の誘導剤であることが知られている<sup>34)50)</sup> ため、PB 処理イヌ肝ミクロソームを用いて代用予測することとした。その結果 PB 処理では誘導の傾向が認められるのに対し PenCB 処理では著しい発現の抑制が認められた。Figure 4 の結果を数値化したデータを Table 5 に示す。Table に示す通り、CYP 2C は PB 処理で約 1.3 倍に増加していたのに対し、PenCB 処理では約 1/8 に低下していた。今回データに

**Table 5** Comparison of 2C subfamily P450 content expressed in the liver of dog

| Treatment     | relative band intensity |
|---------------|-------------------------|
| untreated     | 1.00                    |
| phenobarbital | 1.34                    |
| PenCB         | 0.13                    |

Values represent the mean of two determinations

は示さないが CYP 2B 含量も PenCB 処理によって著しく減少していた。

## 考 察

イヌより精製した 2C subfamily P 450 は再構成系において今回用いたすべての PCB congener を代謝できなかったことから、本 P 450 は PCB の代謝にほとんど関与しないか、関与してもわずかなものであるものと考えられた。しかし、P 450 は分子種によっては再構成系で生体内での活性を再現できない場合が知られている<sup>12)15)</sup>。したがって、*in vivo* での関与を言及する場合、阻害剤を用いるか、抗体を用いて阻害実験を試みることが不可欠である。前者として sulphaphenazole が知られているが、この化合物はヒトの CYP 2C inhibitor として使用されるものであり、今回用いた P 450<sub>DL-3</sub> の活性をどの程度選択的かつ強力に阻害するかは明らかになっていない。一方後者は阻害剤に比べはるかに選択性が高いが、実験方法 4 に記したように、今回得られた抗体は CYP 2C のみを選択的に認識するものではなかった。したがって今回は抗体による阻害の検討は行わなかった。今後、CYP 2C に特異性の高い抗体を調製し、再検討する余地があるものと思われる。その理由となった事実は、少なくとも今回用いた PCB congener のうち、2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は CYP 2C の基質結合部位に結合することが示された点である。ヒトの CYP 2C がステロイド代謝にどれほど寄与しているかは現時点では明確ではない。ヒトの場合 testosterone の主代謝物は 6  $\beta$ -水酸化体であり、この反応を触媒するヒト P450 は 3A subfamily P 450 である<sup>20)46)</sup> が、Kawano らは P 450 human 2 (CYP2C9) に testosterone 16 $\beta$ -水酸化活性と 17-酸化活性を見出している<sup>20)</sup>。さらに Jurima らはヒト肝で CYP 2C で触媒される mephenytoin 水酸化活性が、検討したステロイド化合物の中ではとくに cortisone と ethynylestradiol によって強く阻害されることを

見出しており<sup>18)</sup>、これらのホルモン代謝にも関与している可能性は否定できない。今回 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB はテストステロンの 1/20 の濃度において、その水酸化活性を 60~70% 阻害した。したがって 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB が CYP 2C の基質結合部位を占有し、上記ステロイド代謝活性を阻害する可能性は無視できないと考えられる。また、同活性は最強毒性の PCB と考えられている 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB ではほとんど影響されず、これまでも指摘されているように<sup>30)</sup> 毒性によっては non-planar PCB の毒性の方が高い例があることを強く示唆しているものとして興味深い。

一方、肝臓での CYP 2C 発現におよぼす影響を検討したところ、coplanar PCB は、その発現を顕著に抑制するものと考えられた。また、PenCB 処理肝臓ではみかけの分子量 35 K 付近に著しく誘導されているタンパク質が認められたので (Figure 4 参照)、その本体に興味を持たれる。今回 non-planar PCB でのデータは得られなかったが、phenobarbital 処理の結果から類推して、2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 単独では CYP 2C 発現量は上昇傾向を示すものと考えられる。しかし、本 PCB の場合、発現量は増加しても代謝活性は阻害することから、暴露された量や他の要因との関連で毒性は複雑に変化してくるものと推測される。今回 PenCB で見られたような P 450 発現抑制の機序に関しては全く不明であるが、仮に Ah-receptor を介する応答であるとすれば、2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は coplanar PCB の毒性を相乗的に高めるとの報告もある<sup>4)17)25)</sup> ことから、coplanar PCB による CYP 2C の発現抑制を高める作用と、自らの代謝活性阻害作用が相俟って CYP 2C の触媒する反応を著しく阻害するものと推察される。結果に記したように PenCB は CYP 2B の発現も抑制していた。ヒトにおいて CYP 2B は構成的にマイナーな分子種であり、その発現量には個人差が大きいことが知られている。その生理的役割は現在のところ不明であるが齧歯類の CYP 2B のように異物代謝活性が強いとは考えられていない。

あらためて重要なことは、CYP 2C は現在臨床応用されている多くの薬物の代謝に関与している点である。すなわち抗不安薬、非ステロイド系抗炎症薬、経口抗糖尿病薬、抗癲癇薬、抗凝血薬などの代謝にヒト CYP 2C が関与することが明らかとなっており、本 P 450 で代謝される薬物はさらに増えるものと予想されている。前述したように 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は現在の油症患者体内に最も高濃度で検出される congener であることから、これら薬物と PCB の間に

CYP 2C を介した PCB-drug 相互作用が起こる危険性が考えられ、今後考慮すべき問題と思われる。

## 結 語

これまでも多数の PCB 毒性発現機構に関する研究があるが、その多くは TCDD や強毒性の coplanar-PCB を用いて生体の劇的な変化を追跡したものである。これらの成果から得られた機序は油症発症当時の毒性を考察する上では確かに有用なものと考えられるが、すでに四半世紀を経過した現在の患者の毒性に大きく寄与しているとは考え難い。こうした観点から著者らは残留性が高く現在の患者体内に最も高濃度に蓄積されている 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の体内消失に関する研究を行っている。しかし、本 congener は従来蓄積性は高いが毒性は低いと考えられており、軽視されがちであった。最近になって、PCB 毒性研究も様変わりをはじめており、細胞レベルから分子レベル、さらに遺伝子レベルでの研究も行われるようになってきている。当研究室でもすでに着手しているが、その場合は whole body での毒性に関与しているか否かが問題であり、分子レベルの変化だけにとらわれない検討が必要である。また、近年単一 congener での毒性研究が盛んであったが、混合物の毒性は、それぞれの congener が示す毒性の単なる総和では説明がつかない事実が報告されるようになっており、混合物の投与が見直されつつある。事実 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は混合物として投与した場合、他の congener の毒性を相乗的に高めることなどから、今後毒性学的にも無視できない化合物と思われる。前述したように 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の毒性作用についてはまだ未知であるが、今回見出された CYP 2C 酵素活性の抑制作用は 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 単独での毒性として明確に提示された最初の例であると考えられる。緒言に記したようにヒト肝臓での主要な P 450 分子種としては他には CYP 3A があり、また、含量は少ないが CYP 2D も重要な役割を担っていることから、これら分子種における検討は現在準備中である。極く最近になってヒト P 450 発現系が市販され初めたので、今後はこれらを用いた研究も予定している。

本研究にあたり、Beagle 犬の飼育、薬物処理、屠殺に御尽力いただきましたパナファームラボラトリーズ (株) の関係諸氏に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Ariyoshi N, Koga N, Oguri K and Yo-

- shimura 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, Tanaka M, Ishii Y and Oguri K: Purification and characterization of dog liver microsomal epoxide hydrolase. *J. Biochem.* 115: 985-990, 1994.
- 3) Arlotto MP, Trant JM and Estabrook RW: Measurement of steroid hydroxylation reactions by high-performance liquid chromatography as indicator of P 450 identity and function, In Waterman MR and Johnson EF (ed): *Methods Enzymol.* 206 pp. 454-462. Academic Press, Inc San Diego, 1991.
- 4) Birgelen van APJM, Kolk van der J, Berg van den M 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) Chang TKH, Gonzalez FJ and Waxman DJ: Evaluation of triacetyloleandomycin,  $\alpha$ -naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochrome P 450. *Arch. Biochem. Biophys.* 311: 437-442, 1994.
- 6) Christou MC, Wilson NM and Jefcoate CR: Expression and function of three cytochrome P 450 isozymes in rat extrahepatic tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 258: 519-534, 1987.
- 7) Dannan GA, Guengerich FP, Kaminsky LS and Aust SD: Regulation of cytochrome P 450. *J. Biol. Chem.* 258: 1282-1288, 1983.
- 8) Duignan DB, Sipes IG, Leonard TB and Halpert JR: Purification and characterization of the dog hepatic cytochrome P 450 isozyme responsible for the metabolism of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl. *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 290-303, 1987.
- 9) Goldstein JA, Faletto MB, Romkes-Sparks M, Sullivan T, Kitareewan, S, Raucy JL, Kasker JM and Ghanayem BI: Evidence that CYP 2C 19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry* 33: 1743-1752, 1994.
- 10) Greenlee WF and Poland A: An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C 57 BL/6 J and DBA/2 J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205: 596-605, 1978.
- 11) Guengerich FP: Characterization of human microsomal cytochrome P 450 enzymes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 241-264, 1989.
- 12) Halvorson M, Greenway D, Eberhart D, Fitzgerald K and Parkinson A: Reconstitution of testosterone oxidation by purified rat cytochrome P 450 p(3A1). *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 166-180, 1990.
- 13) Imai Y, Ito A and Sato R: Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.* 60: 417-428, 1966.
- 14) Imaoka S, Enomoto K, Oda Y, Asada A, Fujimori M, Shimada T, Fujita S, Guengerich FP and Funae Y: Lidocaine metabolism by human cytochrome P 450 s purified from hepatic microsomes: comparison of those with rat hepatic cytochrome P450s. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 1385-1391, 1990.
- 15) Imaoka S, Terano Y and Funae Y: Constitutive testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase in rat liver. *J. Biochem.* 104: 481-487, 1988.
- 16) Ishida C, Koga N, Hanioka N, Saeki HK and Yoshimura H: Metabolism in vitro of 3, 4, 3', 4'-and 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P 450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14: 276-284, 1991.
- 17) Jongh de J, Wondergem F, Seinen W and Berg van den M: Toxicokinetic interaction in the liver of the C 57 BL/6 J mouse after administration of a single oral dose of a binary mixture of some PCBs. *Chemosphere* 25: 1165-1170, 1992.
- 18) Jurima M, Inaba T and Kalow W: Mephenytoin hydroxylase activity in human liver: inhibition by steroids. *Drug Metab. Dispos.* 13: 746-749, 1985.
- 19) Kaminsky LS, Kennedy MW, Adams SM and Guengerich FP: Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P 450. *Biochemistry* 20: 7379-7384, 1981.
- 20) Kawano S, Kamataki T, Yasumori T, Yamazoe Y and Kato R: Purification of human liver cytochrome P 450 catalyzing testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation. *J. Biochem.* 102: 493-501, 1987.
- 21) Kennedy MW, Carpentier NK, Dymerski PP and Laurence S: Metabolism of dichlorobiphenyls by hepatic microsomal cytochrome P 450. *Biochem. Pharmacol.* 30: 577-588, 1981.
- 22) Kitada M, Kato T, Ohmori S, Kamataki T, Itahashi K, Guengerich FP, Rikihisa T and Kanakubo Y: Immunochemical characterization and toxicological significance of P 450 HFLb purified from human fetal livers. *Biochim. Biophys. Acta* 1117: 301-305, 1992.
- 23) Koga N, Kikuichi-Nishimura N, Hara T, Harada N, Ishii Y, Yamada H, Oguri K and Yoshimura H: Purification and Characterization of a

newly identified isoform of cytochrome P 450 responsible for 3-hydroxylation of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl in hamster liver. Arch. Biochem. Biophys. in press.

24) Koga N, Nishimura N, Kuroki H, Masuda Y and Yoshimura H: Metabolism of 3, 5, 3', 5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P 450 1A1. *Xenobiotica* 24: 775-783, 1994.

25) Kolk van der J, Birgelen van APJM, Poiger H and Schlatter C: Interactions of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a subchronic feeding study in the rat. *Chemosphere* 25: 2023-2027, 1992.

26) Komori M, Shimada H, Miura T and Kamataki T: Interspecies homology of liver microsomal cytochrome P 450. *Biochem. Pharmacol.* 38: 235-240, 1989.

27) Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ and Meyer UA: Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P 450 3 A 4. *Mol. Pharmacol.* 36: 89-96, 1989.

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

29) Nash T: Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416-421, 1953.

30) Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Fagerlaen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K and Nebert D: The P 450 super family: update on new sequences, gene mapping, accession number, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12: 1-51, 1993.

31) Oguri K, Yamada H and Yoshimura H: Regiochemistry of cytochrome P 450 isozymes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 251-279, 1994.

32) Ohgiya N, Yokota H and Yuasa A: Purification and properties of cytochrome P 450 generally acting as a catalyst on benzo (a) pyrene hydroxylation from liver microsomes of untreated rats. *J. Biochem.* 105: 234-238, 1989.

33) Parkinson A and Gemzik B: Production and purification of antibodies against rat liver P 450 enzymes, In Waterman MR and Johnson EF (ed): *Methods Enzymol.* 206 pp. 233-245. Academic Press, Inc San Diego, 1991.

34) Parkinson A, Safe SH, Robertson LW, Thomas PE, Ryan DE, Reik LM and Levin W: Immunochemical quantitation of cytochrome P 450 isozymes and epoxide hydrolase in liver mi-

croosomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats. *J. Biol. Chem.* 258: 5967-5976, 1983.

35) Schenkman JB: Studies on the nature of the Type I and Type II spectral changes in liver microsomes. *Biochemistry* 9: 2081-2091, 1970.

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

37) Shah RR: Clinical pharmacokinetics: current requirements and future perspectives from a regulatory point of view. *Xenobiotica* 23: 1159-1193, 1993.

38) Shaw PM, Barnes TS, Cameron D, Engeset J, Melvin WT, Omar G, Petrie JC, Rush WR, Snyder CP, Whiting PH Wolf CR and Burke MD: Purification and characterization of an anticonvulsant-induced human cytochrome P 450 catalysing cyclosporin metabolism. *Biochem. J.* 263: 653-663, 1989.

39) Shimada T and Guengerich FP: Evidence for cytochrome P 450 NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 462-465, 1989.

40) Shimada T, Iwasaki M, Martin MV and Guengerich FP: Human liver microsomal cytochrome P 450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in *Salmonella typhimurium* TA 1538/pSK 1002. *Cancer Res.* 49: 3218-3228, 1989.

41) Shimada T, Martin MV, Pruess-Schwartz L, Marnett L J and Guengerich FP: Role of individual human cytochrome P 450 enzymes in the bioactivation of benzo (a) pyrene, 7, 8-dihydroxy-7, 8-dihydrobenzo (a) pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 49: 6304-6312, 1989.

42) Shiraga T, Iwasaki K, Nozaki K, Tamura T, Yamazoe Y, Kato R and Takanaka A: Isolation and characterization of four cytochrome P 450 isozymes from untreated and phenobarbital-treated beagle dogs. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 22-28, 1994.

43) Srivastava PK, Yun CH, Beaune PH, Ged C and Guengerich FP: Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P 450 enzymes. *Mol. Pharmacol.* 40: 69-79, 1991.

44) Veronese ME, Mackenzie PI, Doecke CJ, McManis ME, Miners JO and Birkett DJ: Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human liver cytochrome P 450 2C9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 1112-1118, 1991.

45) Waxman DJ: Rat hepatic P 450 2 A and 2

C subfamily expression using catalytic, immunochemical, and molecular probes, In Waterman MR and Johnson EF (ed): *Methods Enzymol.* 206 pp. 249-267. Academic Press, Inc San Diego, 1991.

46) Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP and Lapenson DP: Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 $\beta$ -hydroxylase cytochrome P 450 enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 424-436, 1988.

47) Wrighton SA and Stevens JC: The human hepatic cytochrome P 450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 22: 1-21, 1992.

48) Yamazoe Y, Shimada M, Murayama N and Kato R: Suppression of levels of phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P 450 by pituitary hormone. *J. Biol. Chem.* 262: 7423-7428, 1987.

49) Yasukochi Y and Masters BSS: Some

properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P 450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 251: 5337-5344, 1976.

50) 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 PCB and PCDF. *J. Pharmacobio. Dyn.* 5: 994-1004, 1982.

51) Yun CH, Shimada T and Guengerich FP: Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P 450 2 A 6. *Mol. Pharmacol.* 40: 679-685, 1991.

52) Yun CH, Shimada T and Guengerich FP: Roles of human liver cytochrome P 450 2 C and 3 A enzymes in the 3-hydroxylation of benzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 52: 1868-1874, 1992.

(受付 1995-3-13)

## 2, 2', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl の水酸化体およびメチルスルホン代謝物のラットにおける組織残留性

第一薬科大学物理分析学教室

原 口 浩 一・増 田 義 人

静岡県立大学薬学部薬理学教室

加 藤 善 久・木 村 良 平

### Tissue Retention of Hydroxy and Methylsulfonyl Metabolites of 2, 2', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl in Rats

Koichi HARAGUCHI and Yoshito MASUDA

*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka 815*

Yoshihisa KATO and Ryohei KIMURA

*School of Pharmaceutical Science, University of Shizuoka, 52-1, Yada, Shizuoka 422*

**Abstract** Previously, we have identified a large number of methylsulfonyl metabolites in tissues of mink treated with Clophen A50. Most of them were found to be derived from CBs with a 2, 5-dichlorophenyl or a 2, 3, 6-trichlorophenyl ring. It is further necessary to investigate if CBs with a 2, 4-dichlorophenyl ring could be biotransformed to the sulfur-containing metabolites in animals.

In the present study, 2, 2', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) was administered i.p. to rats, and liver, lung, kidney, adipose tissue and blood were analyzed for the unchanged CB and its metabolites. Both hydroxy and methylsulfonyl metabolites were detected in all tissues analyzed. Major metabolites were identified as 3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, 5-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, 5-MeSO<sub>2</sub>-2, 2', 4, 4'-TCB and 6-MeSO<sub>2</sub>-2, 2', 4, 4'-TCB. Total level of the four metabolites was estimated to be 1.5 µg/g wet weight in the liver, corresponding to similar level of the unchanged CB. The concentration ratios of 3-OH- to 5-OH-TCB and 5-MeSO<sub>2</sub>- to 6-MeSO<sub>2</sub>-TCB were about 2:3 and 2:1, respectively, in liver and kidney. These results indicate that CBs with a 2, 4-dichlorophenyl ring can provide both hydroxy and methylsulfonyl metabolites that are retainable in tissues of rats.

### はじめに

ポリ塩化ビフェニル (PCB) の含硫代謝物の一つであるメチルスルホン体は体内残留性が高く、人間を含む多くの哺乳動物の組織から検出、定量されている<sup>3)9)</sup>。PCB 汚染の深刻なバルト海のアザラシの場合、約 30 種の PCB-メチルスルホン体が残留 PCB の約 1/20 の濃度で脂肪組織に残留している<sup>10)</sup> ほか、肝臓や肺組織には特定の構造を有するメチルスルホンが PCB とほぼ同レベルで選択的に蓄積していることが明らかになっている<sup>11)</sup>。最近、当教室で PCB 混合物 (Clophen A 50) をミンクに投与したあとの組織内残

留成分を分析したところ、野生動物中の組成と類似したメチルスルホン代謝物を確認し、それらは 2, 5-dichlorophenyl または 2, 3, 6-trichlorophenyl 骨格を有する PCB に由来していることを明らかにした。また、2, 2', 4, 5, 5'-pentaCB をラットに投与すると、生体内で 3-および 4-MeSO<sub>2</sub> 体が生成し、組織中に蓄積する<sup>15)</sup>。そのうち 3-MeSO<sub>2</sub> 体は強力なフェノバルビタール型の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素誘導作用を示し、また芳香族炭化水素水酸化酵素活性を投与量 0.5 µmol/kg で有意に上昇させることが分かった<sup>15)16)</sup>。こうして 2, 5-ジクロロフェニル基を有する PCB の酵素誘導作用には残留するメチルスルホン代謝物が深く関与して



いることが示唆された。

一方、4位に塩素置換したPCBは一般に代謝速度が遅く、そのような異性体から含硫代謝物の生成、体内分布に関する報告は少ない。水谷<sup>19)</sup>は2, 2', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (2, 2', 4, 4'-TCB)のマウスにおける糞中代謝物として2種のメチルチオ体と2種のメチルスルホン体を同定し、メチルスルホン体のみを肝臓で検出している。またDarnerudら<sup>7)</sup>は3, 3', 4, 4'-TCBを投与した妊娠マウスの胎児にメチルスルホン体が残留するのを確認している。PCBの水酸化体については糞中代謝物として多くの報告<sup>17)</sup>があるものの、体内分布については十分に検討されていない。しかし最近、3, 4-dichlorophenyl基を有する異性体から生じる水酸化代謝物が血液中に残留しやすいことがわかり、それらの残留構造と毒性との関連性が注目されている<sup>4)5)18)</sup>。

本研究では4位塩素置換を有する異性体の代謝研究の一環として、2, 2', 4, 4'-TCB投与ラットの体内残留成分の検索を行い、代謝物の組織残留性について検討した。

## 実 験 方 法

### 1. 材料

動物はWistar系雄性ラット(体重約180g)を用い、屠殺前約18時間絶食させた。投与物質はバナセート810に溶解し、342  $\mu\text{mol/kg}$ を腹腔内に1回投与した。投与96時間後に肝臓、腎臓、肺、脂肪組織、血液を取りだし、分析試料とした。

### 2. 試薬

2, 2', 4, 4'-TCBはUllman反応<sup>13)</sup>により合成し、その構造は<sup>1</sup>H-NMRおよびEI-GC-MSにより決定した。3-MeO-2, 2', 4, 4'-TCBは2, 4-dichloroanilineと2, 6-dichloroanisoleからCadogan coupling反応<sup>6)</sup>にて合成し、5-MeO-2, 2', 4, 4'-TCBは2, 4-dichloroanilineと2, 4-dichloroanisoleを用いて同反応により合成した。5-MeSO<sub>2</sub>-2, 2', 4, 4'-TCBの合成は既報<sup>5)</sup>に従い、6-MeSO<sub>2</sub>-2, 2', 4, 4'-TCBは2, 4-dichloroanilineと3, 5-dichlorothioanisoleのCadogan反応、つづいて酸化反応によって合成した。内標準物質は3-MeSO<sub>2</sub>-4-Me-2', 3', 4', 5', 5'-pentaCBを用いた。溶媒は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. 試料の精製

#### 1) 抽出

既報<sup>7)</sup>に準じて試料の精製を行った。肝臓、腎臓、肺

組織それぞれ約1gを内標準物質220 ngを含むアセトン：ヘキサン(1:1)混液30 mlに加え、ポリトロンホモジナイザー(KINEMATICA)で2回抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水、ろ過した。抽出液をヘキサン溶液とし、それに約30 mlのリン酸水溶液(0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.9% NaCl)を加えて振り混ぜ、ヘキサン層を取りだし、濃縮して残渣(脂肪分)を秤量した。血液はその約1 mlを内標準物質を含む1 M KOH/エタノール(7:3)溶液4 mlに加え、50~60°Cで約1時間加温した。その後、6 M 塩酸1 mlで酸性としたあと、ヘキサン：tert-ブチルメチルエーテル(9:1)の混液5 mlで3回抽出した後、濃縮して脂肪分を秤量した。脂肪組織は肝臓などと同様にホモジナイザーで処理した後、濃縮し、そのまま脂肪量を測定した。

#### 2) ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)

Bio Beads S-X 3 (200~400 mesh, バイオラッド)約50 gをヘキサン：ジクロロメタン(1:1)混液に加え、一晚膨潤させたものをカラム管(SR 25/45, ファルマシア)に充填し、送液ポンプ(LC-6 A, 島津)から流速4 ml/minで同溶媒を流した。各抽出物は同溶媒約1.5 mlに溶かした液を2 mlのループを取付けたサンプルインジェクタ(7725, レオダイン)でカラムに導入し、約140~180 mlの分画をフラクションコレクタ(FCV-100 B, SCL-6 A, 島津)で分取した。分画した液は濃縮後、ヘキサン溶液としGC/MSおよびGC/ECD分析の試料とした。

### 4. 定性、定量

#### 1) ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)

代謝物の同定は日本電子JMS-AX 505質量分析計-JMA-DA 5000装置を用いて、EIモードで測定した。GCカラムにはDB-5 (30 m×0.25 mm内径, J&W Scientific Inc)を用い、スプリットレスで70°C(2 min)から220°Cへ20°C/minで、つづいて280°Cへ3°C/minで昇温し、30分間一定に保った。メチルスルホン代謝物の定性は合成した代謝物のGC保持時間およびマススペクトルより行った。水酸化体についてはGPCによる溶出液をヘキサン溶液(約5 ml)とし、1 M KOH/エタノール(7:3)溶液2 mlで抽出した。分離した水層に6 M 塩酸1 mlを加えて酸性にし、ヘキサン：tert-ブチルメチルエーテル(9:1)10 mlで2回抽出した。この液を濃縮し、ジアゾメタンのエーテル溶液(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineとNaOH水溶液との反応により調製)を加え、1時間放置した後、GC/MSを測定し、スペクトルおよびGC保

持時間を合成したメトキシ体と比較した。

## 2) ガスクロマトグラフィー (GC/ECD)

主な代謝物の定量はGPCによる精製後にメチル化を行わずにGC/ECDで定量した。定量値は得られたクロマトグラムの代謝物の内標準物質に対するピーク面積比を求め、代謝物ピークと内標準ピークは同一量で同一面積であると仮定して計算した。

## 結 果

Fig. 1 に 2, 2', 4, 4'-TCB を投与して 4 日後の肝臓および肺組織の抽出物の GC/ECD を示す。未処理ラットには見られない I, II, III および IV のピークが両組織で確認された。GC/MS 分析 (Fig. 2) の結果, I および II のマススペクトルはそれぞれ質量数 306 の分子イオンを与え、同位体存在比から 4 塩素化の水酸化体と推定された。両水酸化体の構造を確定するために、

抽出物をジアゾメタンでメチル化した誘導体を合成標準品と比較した。Table 1 に示すように, I, II の誘導体はともに  $M^+-15$  ( $M^+-CH_3$ ),  $M^+-43$  ( $M^+-COCH_3$ ) および  $M^+-113$  ( $M^+-COCH_2Cl_2$ ) などのフラグメントイオンを与えることからいずれも 3-MeO 体である<sup>14)</sup>と予想された。最終的に、合成した標準品の GC 保持時間との比較によって, I は 3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, II は 5-OH-2, 2', 4, 4'-TCB に相当するピークであると推定した。一方, III, IV のマススペクトルは質量数 368 の分子イオンを与えるため, 4 塩素化のメチルスルホン体と推定した。III は M-35 のイオンが基準ピークとなる特徴的なフラグメントイオンを与えることから, メチルスルホンのオルト位置換体と推定された。こうして合成標品との比較により, III は 6-MeSO<sub>2</sub>-2, 2', 4, 4'-TCB, IV は 5-MeSO<sub>2</sub>-2, 2', 4, 4'-TCB と同定された。

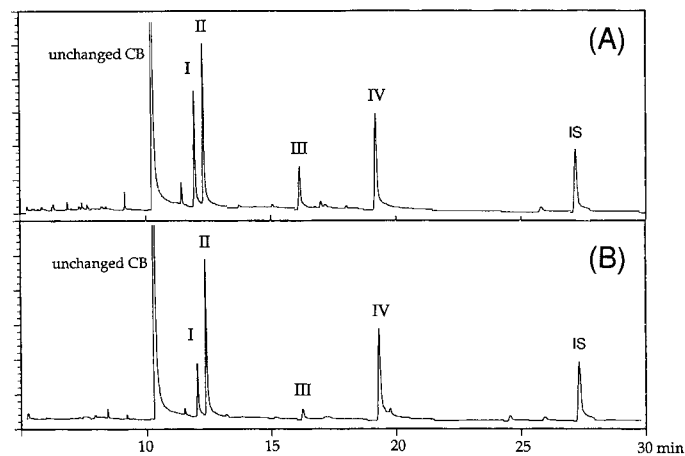


Fig. 1 ECD gas chromatograms of extracts from liver (A) and lung (B) of rats treated with 2, 2', 4, 4'-TCB.

Table 1 Identification of methylated derivative of hydroxy metabolites (I and II) in liver of rats dosed with 2, 2', 4, 4'-TCB.

|                        | GC retention time<br>(relative to IS) | m/e | Relative abundance (%) |      |      |       |
|------------------------|---------------------------------------|-----|------------------------|------|------|-------|
|                        |                                       |     | M                      | M-15 | M-43 | M-113 |
| I (methylated)         | 0.4499                                | 320 | 78                     | 20   | 22   | 10    |
| II (methylated)        | 0.4772                                | 320 | 80                     | 15   | 25   | 32    |
| 3-MeO-2, 2', 4, 4'-TCB | 0.4502                                | 320 | 77                     | 18   | 28   | 10    |
| 5-MeO-2, 2', 4, 4'-TCB | 0.4775                                | 320 | 80                     | 12   | 33   | 35    |

IS: internal standard, 3-MeSO<sub>2</sub>-4-Me-2',3',4',5,5'-pentaCB

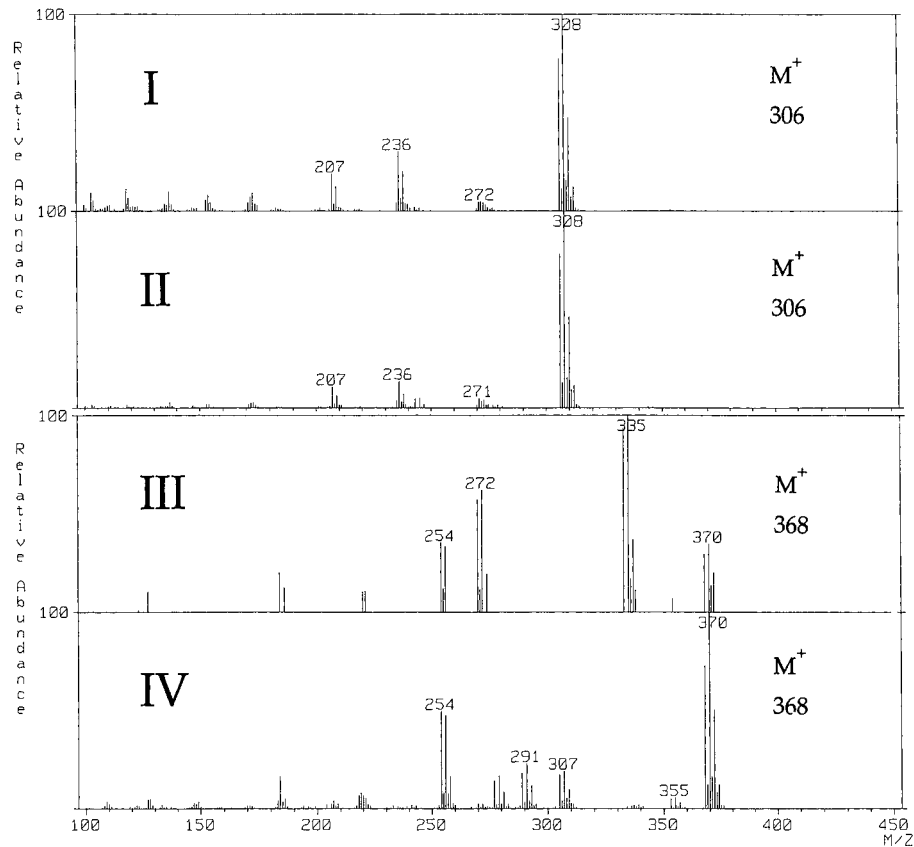


Fig. 2 EI mass spectra of metabolites I, II, III and IV in liver extract.

Table 2 Concentrations ( $\mu\text{g/g}$  wet weight) of unchanged CB and its metabolites in tissues of rats treated with 2, 2', 4, 4'-TCB.

| compounds                                         | Liver           | Lung            | Kidney          | Adipose         |
|---------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB                             | $0.46 \pm 0.11$ | $0.12 \pm 0.05$ | $0.21 \pm 0.09$ | ND              |
| 5-OH-2, 2', 4, 4'-TCB                             | $0.61 \pm 0.23$ | $0.44 \pm 0.14$ | $0.33 \pm 0.16$ | ND              |
| ratio (3-OH/5-OH)                                 | 0.75            | 0.27            | 0.64            | —               |
| 6-MeSO <sub>2</sub> -2, 2', 4, 4'-TCB             | $0.13 \pm 0.05$ | $0.01 \pm 0.01$ | $0.11 \pm 0.04$ | $0.35 \pm 0.13$ |
| 5-MeSO <sub>2</sub> -2, 2', 4, 4'-TCB             | $0.28 \pm 0.09$ | $0.37 \pm 0.13$ | $0.29 \pm 0.10$ | $1.08 \pm 0.32$ |
| ratio (6-MeSO <sub>2</sub> /5-MeSO <sub>2</sub> ) | 0.46            | 0.03            | 0.38            | 0.32            |
| unchanged CB                                      | $1.34 \pm 0.42$ | $1.30 \pm 0.36$ | $1.00 \pm 0.33$ | $113 \pm 41.7$  |
| total metabolites                                 | $1.48 \pm 0.48$ | $0.94 \pm 0.33$ | $0.94 \pm 0.39$ | $1.43 \pm 0.45$ |
| ratio (unchanged CB/metabolites)                  | 0.91            | 1.38            | 1.06            | 79.0            |

Values are means  $\pm$  S. E. for four rats.

同定した4種の代謝物の各組織中の残留濃度をTable 2に示す。肝臓、腎臓および肺組織では水酸化体およびメチルスルホン体がほぼ同レベルで検出され、

代謝物の濃度の合計は未変化体の濃度とほぼ同じであった。一方、脂肪組織には未変化体が $113 \mu\text{g/g}$ の濃度で残留し、その約1/80に相当するメチルスルホン体が

残留した。しかし水酸化体は検出されなかった。血液中には未変化体と同レベルの水酸化体 ( $0.08 \mu\text{g/ml}$ ) およびメチルスルホン体 ( $0.06 \mu\text{g/ml}$ ) が検出されたが、組織中の濃度に比べるとかなり低いことが分かった。代謝物の濃度を異性体別にみると、肝臓および腎臓で3-OH-と5-OH-TCBの残留比は約2:3、一方5-MeSO<sub>2</sub>-と6-MeSO<sub>2</sub>-TCBの残留比は約2:1であった。肺組織では3-OH体、および6-MeSO<sub>2</sub>体の濃度がかなり低かった。

### 考 察

ノンコプラナー PCB である2, 5-ジクロロフェニル基を有する PCB 異性体は体内でメチルスルホン体として体内に残留し、多くの野生動物体内からも検出されている。しかし、4位に塩素置換した PCB から含硫代謝物の生成の有無、体内分布については十分検討されていない。本研究では2, 4-ジクロロフェニル基を有する PCB がどのような代謝物を与えるかを探索し、その組織内残留性を検討した。その結果、2, 2', 4, 4'-TCB をラットに投与すると水酸化体およびメチルスルホン体の両代謝物が組織から高濃度で検出された。その残留濃度は2, 3', 4', 5-TCB 投与によって生ずるメチルスルホン代謝物と比較すると、1/5~1/10の濃度(未発表)であるが、4-位塩素置換の PCB の与える代謝物としては予想以上に高い残留濃度であるように思われる。水谷<sup>19)</sup>は2, 2', 4, 4'-TCB をマウスに投与したとき肝臓にメチルスルホンが残留し、その濃度は未変化体の約1/80であると報告しているが、今回のラットによる実験では未変化体の約1/3に相当するメチルスルホンの肝臓内分布が認められた。

一方、水酸化体の体内残留性については十分検討されていない。最近の2, 3', 4', 5-TCB のラット体内動態研究(未発表)では、水酸化代謝物の組織残留性は低い。しかし、本研究で2, 4-ジクロロフェニル基を有する PCB から代謝される水酸化体はメチルスルホン体と同程度の残留性を有することが明らかとなった。吉村ら<sup>21)22)</sup>はカネクロール400の成分の1つである2, 3', 4, 4'-TCB をラットに投与し、フン中代謝物として3-OH-2, 3', 4, 4'-TCB および5-OH-2, 3', 4, 4'-TCB を同定している。本研究で検出された水酸化体の構造も同じ置換体であることから、2, 4-ジクロロ置換タイプの PCB はラット体内で共通の代謝過程を経て、分布することが予想される。

最近、Bergman ら<sup>2)</sup>はアザラシやヒトの血液に PCB 水酸化体が選択的に蓄積していることを明らか

にし、その構造上の特徴は4-OH-3, 5-dichloro-または3-OH-2, 4-dichloro-置換を有すると報告している。このような構造を有する水酸化体は血液中のチロキシン結合タンパク質との相互作用によって毒性を生じることが指摘されている<sup>4)5)</sup>。本実験で同定した3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB もそのような構造上の特徴を有するが、血液中への選択的な取り込みは見られなかった。しかし、血液中の代謝物は未変化体と同レベルで検出された。

われわれは2, 5-ジクロロ置換タイプの PCB の与える代謝物のうち、3-MeSO<sub>2</sub>体はフェノバルビタール型の強力な酵素誘導能を有し、このタイプの PCB の酵素誘導作用に3-MeSO<sub>2</sub>体が重要な役割を果たしていることを明らかにしている。水酸化体については、2, 3', 4, 4'-TCB の代謝物である5-OH-2, 3', 4, 4'-TCB の急性毒性は母化合物よりもはるかに強いことが山本ら<sup>23)</sup>によって報告されている。2, 2', 4, 4'-TCB は PCB 製品中の主成分ではない<sup>20)</sup>が、水酸化体およびメチルスルホン体が高濃度で組織に残留していることは、このタイプの PCB の毒性発現にこれらの代謝物が関与している可能性がある。

### 総 括

2, 2', 4, 4'-TCB をラットに腹腔内投与し、その代謝物の組織内分析を行った結果、2種の水酸化体および2種のメチルスルホン体が肝臓、腎臓および肺組織から検出された。その代謝物の構造はGC/MS における合成標準品との比較の結果、3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, 5-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, 5-MeSO<sub>2</sub>-2, 2', 4, 4'-TCB および6-MeSO<sub>2</sub>-2, 2', 4, 4'-TCB であると推定された。組織のうち肝臓、腎臓および肺では両代謝物が未変化体と同濃度で残留した。肝臓および腎臓では水酸化体は3-OH:5-OH=2:3、またメチルスルホン体は5-MeSO<sub>2</sub>:6-MeSO<sub>2</sub>=2:1の残留比を示した。肺では3-OH体および6-MeSO<sub>2</sub>体の濃度は、かなり低かった。一方、脂肪組織中には未変化体濃度の約1/80に相当するメチルスルホン体が残留したが、水酸化体は検出されなかった。血液中でも両代謝物が未変化体と同濃度で検出された。本研究の結果、2, 4-ジクロロフェニル骨格を有する PCB の代謝物の組織残留性は高いことが明らかになった。

### 文 献

- 1) 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.
- 2) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuroki H: Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspect.* 102: 464-469, 1994.
- 3) Bergman Å, Norstrom RJ, Haraguchi K, Kuroki H and Beland P: PCB and DDE methyl sulfones in mammals from Canada and Sweden. *Environm. Toxicol. Chem.* 13: 121-128, 1994.
- 4) Brouwer A, Klasson-Wehler E, Bokdam M, Morse DC and Traag WA: Competitive inhibition of thyroxine binding to transthyretin by monohydroxy metabolites of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere*, 20: 1257-1262, 1990.
- 5) Brouwer A, Lans MC, de Haan LHJ, Murk AJ and Morse DC: Formation and toxicological aspects of phenolic metabolites of polychlorobiphenyls (PCBs), and related compounds. *Organohalogen compounds* 20: 465-469, 1994.
- 6) Cadogan JIG: A convenient new method of aromatic arylation. *J. Chem. Soc.*, 4257-4258, 1962.
- 7) Darnerud PO, Brandt I, Klasson-Wehler E, Bergman Å, d'Argy R, Dencker L and Sperber GO: 3, 3', 4, 4'-Tetrachloro [<sup>14</sup>C] 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: Synthesis of PCB methylsulfones: Some differences in mass and proton magnetic resonance spectroscopy, *Chemosphere* 16: 2299-2313, 1987.
- 9) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Occurrence and distribution of chlorinated aromatic methylsulfones and sulfoxides in biological samples. *Chemosphere*, 19: 487-492, 1989.
- 10) 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.
- 11) Haraguchi K, Bergman Å, Jakobsson E and Masuda Y: Negative ion chemical ionization mass spectrometry in the analysis of polychlorinated biphenyl methylsulphones. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 347: 441-449, 1993.
- 12) 原口浩一, 黒木広明, 斎藤秀美, 増田義人, Bergman Å: 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, 福岡医誌, 84, 243-247, 1993.
- 13) Hutzinger O, Safe S and Zitko V: Polychlorinated biphenyls: synthesis of some individual chlorobiphenyls. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6: 209, 1971.
- 14) Jansson B and Sundstrom G: Mass spectrometry of the methyl ethers of isomeric hydroxybiphenyls -- potential metabolites of chlorobiphenyls. *Biomed. Mass Spectrom.* 1: 386-392, 1974.
- 15) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Masuda Y and Kimura R: Induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem.-Biol. Interact.* in press, 1995.
- 16) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Isogai M, Masuda Y and Kimura R: Characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners. *Chem.-Biol. Interact.* in press, 1995.
- 17) 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.
- 18) Klasson-Wehler E: Selective retention of hydroxylated PCB metabolites. *Organohalogen compounds* 20: 437-440, 1994.
- 19) Mizutani T: Identification of sulfur-containing metabolites of 2, 4, 2', 4'-tetrachlorobiphenyl in mice. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 20: 219-226, 1978.
- 20) 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.
- 21) Yoshimura H, Yamamoto H and Saeki S: Metabolic studies on polychlorinated biphenyls. II. Metabolic fate of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl in rats. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 21: 2231-2236, 1973.
- 22) 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.

(受付 1995-3-30)

## ラット血液中における PCDF 水酸化体代謝物の残存性に関する予備的検討

第一薬科大学環境化学教室

黒 木 広 明・石 村 憲 子

第一薬科大学物理分析学教室

増 田 義 人

ストックホルム大学

Eva Klasson-Wehler・Åke Bergman

## Preliminary Studies on the Retention of Hydroxylated PCDF Metabolites in Rat Blood

Hiroaki KUROKI, Noriko ISHIMURA and Yoshito MASUDA

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

Eva KLASSON-WEHLER and Åke BERGMAN

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

We recently reported that certain hydroxylated PCB (OH-CB) metabolites were selectively retained in blood of rats experimentally dosed with PCB (Aroclor 1254), and also in blood of seals and humans environmentally exposed to PCBs. We also showed that metabolism *in vivo* of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) gave rise to a large number of hydroxylated PCDF (OH-CDF) metabolites, excreted in faeces, after oral administration to rats of PCDFs mixture (1, 2, 7, 8-tetraCDF 14%, 2, 3, 7, 8-tetraCDF 35%, 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF 48%). These results suggest that OH-CDFs could be present in blood. In the present study, potential retention of OH-CDF metabolites in blood (serum) was investigated in a female Wistar rat exposed to the PCDFs mixture. Serum was analyzed for the methylated OH-CDFs by gas chromatography (GC) and GC-mass spectrometry. Two major metabolites were determined in serum 1 day after oral administration. These were identified to be 3-OH-2, 4, 7, 8-tetraCDF (A) and 3-OH-2, 4, 7, 8, 9-pentaCDF (B) by comparison with synthesized reference compounds. 3-OH-2, 4, 7, 8-tetraCDF and 3-OH-2, 4, 7, 8, 9-pentaCDF were possibly produced from 2, 3, 7, 8-tetraCDF and 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF, respectively, *via* 3, 4(6, 7)-epoxide intermediate and subsequent NIH-shift of the 3(7)-chlorine to the 4(6)-position. The amounts of 3-OH-2, 4, 7, 8-tetraCDF and 3-OH-2, 4, 7, 8, 9-pentaCDF in the serum (5.72 g) analyzed accounted for 0.018% of 2, 3, 7, 8-tetraCDF and 0.003% of 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF dosed, respectively. The both OH-CDF metabolites detected in rat serum were quite similar in structure for the retained OH-CBs in blood, i.e. two chlorine atoms substituted adjacent to the hydroxy-group. These results indicate a profound similarity in structural requirement and mechanism for the selective retention of OH-CDFs and OH-CBs in blood.

### は じ め に

Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs)は polychlorinated biphenyls (PCBs)や polychlorinated diben-

zo-*p*-dioxins (PCDDs)などと共に地球的規模での環境汚染物質である。また、PCDFsはその強い毒性の故、1968年西日本一帯で発生したPCB中毒症であるカネミ油症の主たる原因物質と見なされている。これ

ら PCB, PCDF および PCDD は程度の差はあれ、互いに類似した毒性を示す。しかし、その毒性発現機構は十分に解明されているとはいえない。特定の構造のもの、例えば 3, 4, 3', 4'-tetraCB に代表される Coplanar PCB や 2, 3, 7, 8-tetraCDD などの平面構造を有するものの毒性・生物活性は細胞内 Ah レセプターを介して発現するものと考えられている<sup>21)</sup>。しかし、この機序のみで多様な PCB の毒性や非平面型 PCB の毒性を説明できるものではない。

最近、われわれは PCB の代謝産物の一つである PCB 水酸化体 (OH-CB) が PCB 製品を投与したラットの血液中のみならず、環境汚染を介してアザラシやヒトの血液中にも特異的に残存していることを明らかにした<sup>11)2)</sup>。このような OH-CBs は構造上の特徴として 3-位あるいは 4-位に水酸基を有し、両隣は塩素置換されているという共通の類似性を有していた。さらに最近 OH-CB そのものの生物学的作用についても明らかにされつつある。例えば、プレアルブミンに対する親和性<sup>13)22)</sup>、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の脱共役<sup>14)17)</sup>、エストロゲンレセプターへの親和性<sup>9)</sup>、細胞間情報伝達への影響<sup>5)</sup>、発生 (胎児) 毒性に及ぼす影響<sup>16)</sup> などが報告されている。したがって、今後 PCB の毒性発現に OH-CB 自体が関与する新たなメカニズムが期待される。

PCDF も水酸化体を主代謝物として与えることが知られている<sup>9)</sup>。したがって PCB の場合と同様に、PCDF 水酸化体 (OH-CDF) のうち、上述したような水酸基および塩素置換の構造を有するものは特異的に血液中に取り込まれる可能性が考えられる。さらに PCDF の毒性に OH-CDFs が関与していることも予想され、ひいては PCB, PCDF, PCDD に共通したこれらの水酸化体代謝物による毒性発現メカニズムが期待される。今回はこのような観点から PCDF の中でも高毒性の 2, 3, 7, 8-tetraCDF および 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF を主成分として含む PCDFs 混合物をラットに投与し、ラット血液 (血清) 中における OH-CDF の選択的残留性について予備的な検討を加えた。

## 実 験 方 法

### 1. 試薬

投与された PCDFs 混合物はジベンゾフランを塩素化することにより合成した<sup>11)</sup>。その組成は 1, 2, 7, 8-tetraCDF (14%), 2, 3, 7, 8-tetraCDF (35%), 1, 2, 4, 7, 8-pentaCDF (1%), 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF (48%), 1, 2, 6, 7, 8-pentaCDF (1%), 2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF (1%),

1, 2, 3, 4, 7, 8-hexaCDF (1%) および 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexaCDF (0.5%) である<sup>11)</sup>。Methoxy-PCDFs の標準物質は既報<sup>10)</sup> に従い合成した (未発表データ)。OH-CDFs 分析のための内標準物質 (IS) として 4-hydroxy(OH)-2, 3, 5, 6, 3', 4', 5'-heptaCB (合成品) を用いた。溶媒は PCB 分析用あるいは残留農薬試験用を用いた。

### 2. 実験動物、薬物投与および血清の採取

Wistar 系雌性ラット (1 匹, 体重 420 g) にコーンサラダ油に溶解した PCDFs 混合物を 10 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 1 日後に心臓採血 (エーテル麻酔下) により採血した。採取した血液をしばらく放置して凝固させ、にじみ出た血清 (5.72 g) を得た。なお血清には溶血が認められた。

### 3. PCDF 水酸化体代謝物の抽出、精製法

得られた血清からの水酸化体代謝物の抽出、精製は前報<sup>12)</sup> の人血清の場合と同様に行った。すなわち、血清 (5.72 g) に水:メタノール (1:1) 6 ml を加え希釈し、さらに 0.5 M 硫酸を加えて酸性とした。この試料溶液に IS (4-OH-2, 3, 5, 6, 3', 4', 5'-heptaCB) 38 ng を加えた後、ヘキサン:tert-ブチルメチルエーテル (1:1) で 3 回抽出した。抽出液を濃縮し得られた脂肪分 (20 mg) をヘキサン 2 ml に溶かし、このヘキサン溶液に水酸化カリウム水溶液 (0.5 M, 5 ml) およびエタノール 2 ml を加えて振盪後、アルカリ溶液を分離した。この操作により水酸化カリウム水溶液/ヘキサンとの間で分配抽出を行い、フェノール性代謝物などの酸性物質をアルカリ溶液に抽出した。アルカリ層にこれと同量の 1 M 塩酸を加え酸性とした後、フェノール性代謝物をヘキサン:tert-ブチルメチルエーテル (1:1) 20 ml で 3 回抽出した。抽出物 (脂肪分 10 mg) をヘキサン 2 ml に溶かし、これにジアゾメタンのエーテル溶液 (使用直前に調整) 1 ml を加え室温で一晩放置した。この反応によりフェノール性代謝物をメチル誘導体とした。反応後、濃硫酸処理 (1 ml) により残留する脂肪分を取り除いた。ヘキサン層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 および GC/MS 分析の試料とした。

### 4. ガスクロマトグラフィー (GC)

装置は<sup>63</sup>Ni 電子捕獲型検出器 (ECD) 付き島津ガスクロマトグラフ GC-15 A を使用し、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、検出器温度はそれぞれ 250°C および 340°C で行った。キャリアガスには N<sub>2</sub> を用いた。

##### 5. ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメリー (GC/MS)

装置は日本電子 JMS-AX 505 W GC/MS (データ処理システム JMA-DA 5000) を使用し、カラムは DB-5 (0.25 mm×30 m, J & W Scientific Inc.) を用いた。カラムは質量分析計のイオン源部へ直接接続した。イオン化法は電子衝撃イオン化 (EI) 法および負イオン化学イオン化 (NICI) 法 (反応ガス: メタンガス) で行った。カラム温度は 150°C (3 min) から 280°C まで 16°C/min で昇温し一定に保った。キャリアガスにはヘリウムを用いた。NICI モードによる GC/MS の測定は Finnigan 4021 GC/MS (4500 ion source, Inco 2400 Data System) 装置によっても行った。カラムには DB-5 (0.32 mm×30 m) を用い、カラム温度は 70°C (1 min) から 320°C (20 min) まで 10°C/min で昇温した。キャリアガスにはヘリウムを用い、反応ガスにはメタンガス (0.45 torr) を用いた。イオン源温度は 120°C に保った。

##### 6. 血清中代謝物の定量

OH-CDFs の定量は GC (ECD) における OH-CDF のピーク面積を内標準物質に対する面積比から計算した。ピーク面積測定は C-R 7 A (島津) を用いた。

#### 実験結果

##### 1. 代謝物の EI マススペクトルによる検討

血清から抽出した水酸化体分画につき、メチル誘導体とした後、GC (ECD) に付した結果を Fig. 1 に示す。これから明らかなように IS 以外に水酸化体代謝物と予想される 2 つの主なピーク A および B が認められた。これらのピークについて EI モードの GC/MS (日本電子 AX 505 W) で分析した結果、Fig. 2 に示すような A のマススペクトルが得られた。A は分子イオン (M<sup>+</sup>) を m/z 334 に示し、同位体ピーク比より 4 塩素化体と考えられることから、A は methoxy-tetra-CDF であると推定された。しかし、B のマススペクトルは感度不足のために得ることができなかった。

Fig. 3 にメトキシ基の置換位置が異なる methoxy-tetra-CDF 3 種および methoxy-penta-CDF 1 種の EI マススペクトルを示す。いずれの場合も [M-15 (M-CH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>, [M-43 (M-CH<sub>3</sub>CO)]<sup>+</sup> および [M-106 (M

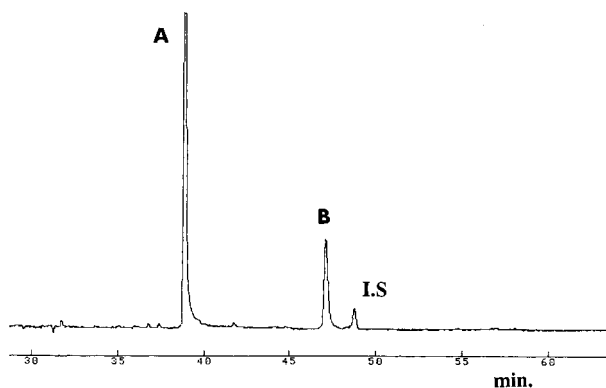


Fig. 1 Gas chromatogram of methylated OH-CDFs in rat serum on a DB-5 fused silica capillary column.

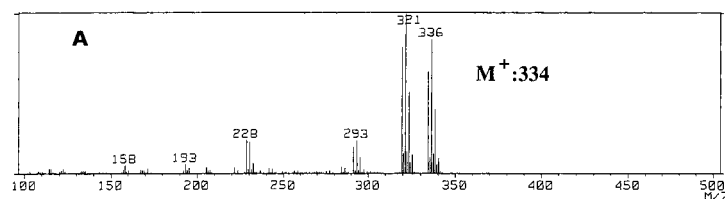


Fig. 2 EI mass spectrum of methylated OH-CDFs in rat serum.



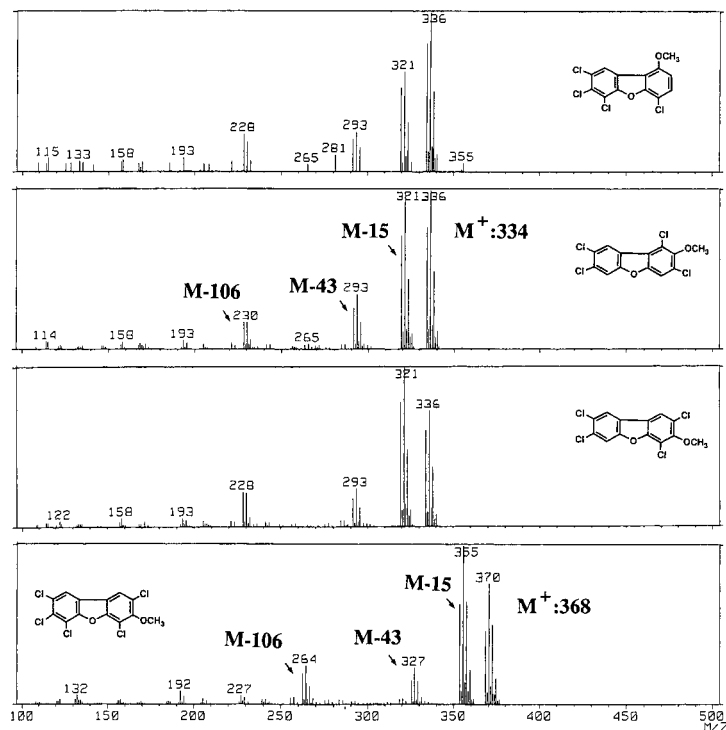


Fig. 3 EI mass spectra of methoxy-CDF standards.

$-\text{CH}_3\text{CO}-\text{COCl}]^+$ を主なフラグメントイオンとして与えるため、フラグメントパターンに基づきこれら異性体を互いに区別することはできなかった。これらのフラグメントピークの相対イオン強度は異性体によって幾分異なっている (Fig. 3) が、相対イオン強度はメトキシ基の置換位置のみならず、おそらく塩素原子の数や置換位置によっても影響されるためと思われる。したがって、A の EI マススペクトル (Fig. 2) からそのメトキシ基の置換位置を決定することはできなかった。

たが、A は Fig. 3 に示す合成標品のうち 3-methoxy-2, 4, 7, 8-tetraCDF とまったく同一のマスパターンを示した。

## 2. 代謝物の NICI マススペクトルによる検討

水酸化体代謝物と予想される Fig. 1 のピーク A および B につき、NICI モードでの GC/MS 分析 (日本電子 AX 505 W) を行った結果を Fig. 4 に示す。先の EI モードの GC/MS では検出できなかった B も NICI モードではそのマススペクトルを測定することができ

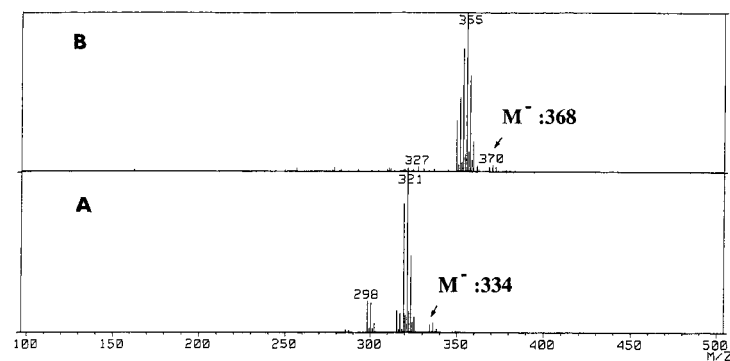


Fig. 4 NICI mass spectra of methylated OH-CDFs in rat serum.

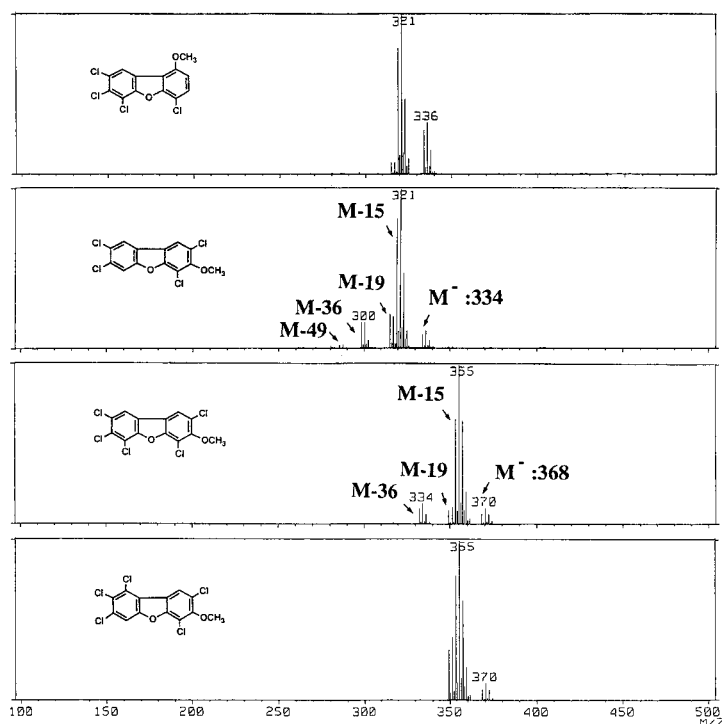


Fig. 5 NICI mass spectra of methoxy-CDF standards.

た、A および B はイオン強度は弱いながら、分子イオン ( $M^-$ ) をそれぞれ  $m/z$  334 および 368 に示し、また 4 塩素化体および 5 塩素化体の特徴的な同位体ピークが認められることから、A および B はそれぞれ methoxy-tetraCDF および methoxy-pentaCDF であると推定された。A については先の EI GC/MS による検討の結果と一致する。

Fig. 5 に合成したいくつかの methoxy-tetraCDF および methoxy-pentaCDF の NICI マススペクトルを示す。いずれの異性体においても分子イオン ( $M^-$ ) のイオン強度は弱い、主なフラグメントイオンとして  $[M-15 (M-CH_3)]^-$ ,  $[M-19 (M-Cl+O)]^-$ ,  $[M-36 (M-Cl-H)]^-$  および  $[M-49 (M-CH_2Cl+H)]^-$  などが認められた。これらの標品は 1-位あるいは 3-位にメトキシ基を有する異性体だけの比較ではあるが、Fig. 5 に示すようにメトキシ基の置換位置を特徴づけるようなフラグメントパターンは認められなかった。このように NICI マススペクトルにおいても methoxy-PCDF のメトキシ基の置換位置に関する情報は得られなかった。しかし、A および B の NICI マススペクトルは Fig. 5 に示す標品のうち、それぞれ 3-methoxy-2, 4, 7, 8-tetraCDF および 3-methoxy-2, 4, 7, 8, 9-

pentaCDF のそれと完全に一致した。

NICI モードの GC/MS による分析は Finnigan Mat 4021 を用いても行った。Fig. 6 にそのトータルイオンクロマトグラムを示す。この分析により代謝物 A および B 以外にも、微量成分としてさらに 6 種の methoxy-tetraCDFs が検出された。Fig. 6 のピーク上に記した数字はマススペクトルから明らかとなった置換塩素数を示したものである。PCB 混合物を投与したラットの肝臓中には monohydroxy 体の他に、微量ではあるが dihydroxy 体代謝物も見いだされている<sup>12)</sup>。しかし、今回の PCDFs 混合物を投与したラット血液からは PCDF の dihydroxy 体は検出されなかった。

### 3. 血清中代謝物の同定および定量

代謝物の構造の決定は Fig. 3 および Fig. 5 に示した methoxy-PCDF 標品の保持時間と比較して行った。その結果、A の GC および GC/MS における保持時間は 3-methoxy-2, 4, 7, 8-tetraCDF のそれと一致した。また、代謝物 A の EI および NICI 両モードにおけるマススペクトル (Fig. 2 および Fig. 4) は上述したように、この標品の両モードのマススペクトル (Fig. 3 および Fig. 5) と同一であった。以上の結果より、A は 3-methoxy-2, 4, 7, 8-tetraCDF と同定された。

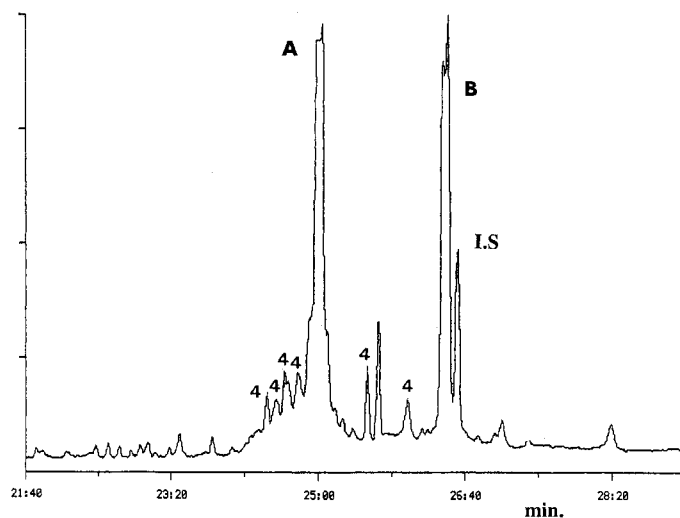


Fig. 6 NICI total ion chromatogram of methylated OH-CDFs in rat serum. The numbers above the peaks indicate the number of chlorine atoms on the OH-CDFs.

B の GC および GC/MS における保持時間は 3-methoxy-2, 4, 7, 8, 9-pentaCDF のそれと一致した。さらに代謝物 B の NICI マススペクトル (Fig. 4) は上述したように、この標品の NICI マススペクトル (Fig. 5) と同一であったことから、B は 3-methoxy-2, 4, 7, 8, 9-pentaCDF と同定された。しかし、Fig. 6 に示す微量成分 (methoxy-tetraCDFs) の構造は決定できなかった。

血清中代謝物のうち同定された代謝物 A および B については定量も行った。A (3-methoxy-2, 4, 7, 8-tetraCDF) および B (3-methoxy-2, 4, 7, 8, 9-pentaCDF) の濃度はそれぞれ 140 ng/g 血清および 33 ng/g 血清であった。A および B は後述するように、それぞれ 2, 3, 7, 8-tetraCDF および 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF に由来する代謝物と考えられる。したがって、両代謝物の血清中 (5.72 g) における残存量はそれぞれ投与された 2, 3, 7, 8-tetraCDF および 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF の 0.018% および 0.003% に相当した。しかし分析した血清 (5.72 g) がラット全血清量のどの程度であるのか不明であるため、全血液 (血清) 中における残存量 (%) は求められなかった。また、未変化体については定量していないため、血清中における未変化体と水酸化体代謝物との割合は不明である。

## 考 察

PCDF 水酸化体代謝物の血液中における残留性を調べるため、1, 2, 7, 8-tetraCDF, 2, 3, 7, 8-tetraCDF

および 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF を主成分とする PCDFs 混合物を投与したラット血清中の OH-CDFs について検討した。2, 3, 7, 8-tetraCDF および 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF の 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (tetraCDD) に対する毒性等価係数はそれぞれ 0.1 および 0.05 であり、両化合物は PCDF 同族体の中で毒性の強い異性体である。また、両化合物は人を含めた生物試料中に残留する PCDF 同族体の一成分として広く環境中から検出<sup>15)</sup>されている異性体でもある。

代謝物の構造決定のためマススペクトルを利用することは、よく用いられる手段の一つである。例えば methoxy-PCB では、その EI マススペクトルはメトキシ基の置換位置を決定するのに有用であることが知られている<sup>6)24)</sup>。しかし、methoxy-PCDF の場合、EI マススペクトルは有用でない<sup>23)</sup>とされている。そこで本研究においても methoxy-PCDF のメトキシ基の置換位置を知る目的で、いくつかの methoxy-PCDF 標品を用い、NICI および EI マススペクトルを測定した。しかしながら、EI モードのみならず NICI モードにおいても、それらのマススペクトルからメトキシ基の置換位置に関する情報は得られなかった。このことは PCDF の水酸化体代謝物の構造解析において、メトキシ基の置換位置を知るのにマススペクトルのみでは不十分であることを意味している。

血清中の代謝物として 3-OH-2, 4, 7, 8-tetraCDF (A) および 3-OH-2, 4, 7, 8, 9-pentaCDF (B) が同定された。投与された PCDFs 混合物中の主成分の一

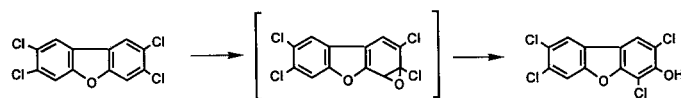


Fig. 7 The postulated pathway for the formation of hydroxylated metabolites of 2,3,7,8-tetraCDF in rats.

つである 2,3,7,8-tetraCDF は、ラットにおいて比較的容易に代謝され<sup>19)</sup>、速やかに排泄される<sup>2)</sup>ことが知られている。また、ラットにおける主代謝物として OH-tetraCDF および (OH)<sub>2</sub>-triCDF (いずれも構造不明)が見いだされている<sup>19)</sup>。これらのことを考慮すると、本研究により主代謝物として検出された 3-OH-2,4,7,8-tetraCDF は、おそらく 2,3,7,8-tetraCDF から生成されたものと思われる。すなわち、Fig. 7 に示すように 3,4-位のエポキシ化後、3-位の塩素原子が 4-位にシフトした NIH シフト成績体として本代謝物が生成したと考えることができる。

もう一つの代謝物である 3-OH-2,4,7,8,9-pentaCDF は 1,2,3,7,8-pentaCDF から同様に 7,8-位の arene oxide を中間体として、さらに NIH シフトを伴い生成されたものと考えられる。1,2,3,7,8-pentaCDF の代謝物の構造に関する報告は見あたらないが、本化合物は比較的速やかに代謝され、胆汁を介して糞中に排泄されることが知られている<sup>3)20)</sup>。この事実も 3-OH-2,4,7,8,9-pentaCDF が 1,2,3,7,8-pentaCDF からの代謝物であることを示唆していると考えられる。1,2,3,7,8-pentaCDF に由来する水酸化体代謝物として、3,4-位の arene oxide を中間体とする 3-OH-1,2,4,7,8-pentaCDF の生成の可能性も考えられるが、この点に関しては今後の検討課題であろう。血清中微量代謝物である 6 種の OH-tetraCBs (Fig. 6) については 2,3,7,8-tetra- および/あるいは 1,2,7,8-tetraCDF に由来する代謝物であるのみならず、1,2,3,7,8-pentaCDF から脱塩素を伴った代謝物 (構造不明)<sup>20)</sup>も含まれると推定される。

上述した機構 (arene oxide 中間体の生成、それに引き続く塩素原子の 1,2-シフト) によると思われる水酸化体代謝物の生成は 2,3,7,8-tetraCDF とは構造が類似している 2,3,7,8-tetraCDD や PCB 同族体である 3,4,3',4'-tetraCB, 2,3,4,3',4'-pentaCB においても認められている事例である。例えば、2,3,7,8-tetraCDD を投与したビーグル犬の胆汁中から主代謝物として 3,4-arene oxide を中間体とし、3-位の塩素原子が 4-位 (1-位) に移動したと考えられる 2-OH-1,3,7,8-tetraCDD が検出されている<sup>18)</sup>。また、3,4,3',

4'-tetraCB (ラット、マウス) および 2,3,4,3',4'-pentaCB (マウス、ミンク) からは、それぞれ 4-OH-3,5,3',4'-tetraCB<sup>25)</sup> および 4-OH-2,3,5,3',4'-pentaCB<sup>7)</sup> が代謝物として知られている。このような水酸化体を与える母化合物、例えば 2,3,7,8-tetraCDF, 2,3,7,8-tetraCDD および 3,4,3',4'-tetraCB の構造を比較すると、それぞれの骨格上における塩素原子の置換パターンが互いに類似していることに気が付く。1,2,3,7,8-pentaCDF と 2,3,4,3',4'-pentaCB においても同様である。すなわち、これら 5 つの化合物は共通してビフェニール骨格では 2,3,4-trichloro-あるいは 3,4-dichloro-, ジベンゾダイオキシンおよびジベンゾフラン骨格では 1,2,3-trichloro-あるいは 2,3-dichloro-置換タイプであることがわかる。したがってこのような塩素置換パターンを有する PCB, PCDF および PCDD 異性体からは、PCB では 3,4-位 (4,5-位) に、PCDD/PCDF では 3,4-位 (6,7-位) に arene oxide 中間体を生じ、これに引き続きパラ位 (PCB) あるいは 3(7)-位 (PCDF, PCDD) の塩素原子が 1,2-シフトするという共通のメカニズムにより水酸化体代謝物が生成するものと考えられる。

本研究により同定されたラット血清中の OH-CDFs は、いずれも 3-位に水酸基を有し、その両隣が塩素原子で置換されていることは非常に興味深い。なぜなら最近われわれが報告しているように、OH-CBs のうち 3-位あるいは 4-位に水酸基を有し、両隣が塩素置換されているものは選択的に血液中に残留することが明らかにされている<sup>1)12)</sup> からである。このように血液 (血清) 中に残留しやすい OH-CBs および OH-CDFs には共通した構造上の特徴が認められた。また、このような構造をもつ OH-CBs はブレイアルブミンに対し高い親和性を有することが報告されている<sup>13)22)</sup>。さらに、OH-CBs と血中甲状腺ホルモン、ビタミン A の減少との関連性<sup>4)</sup>や発生 (胎児) 毒性における OH-CBs の寄与<sup>16)</sup>などが示唆されており、PCB の毒性発現に OH-CBs が強く関与していることが示唆されている。一方、OH-CDFs とブレイアルブミンとの結合性を検討した例は少ないが、PCB の場合と同様に、水酸基に隣接した塩素置換をもつものは親和性が高いことが報告さ

れている<sup>13)</sup>。したがって、このような構造を有する OH-CDFs も血中の thyroxine-binding proteins (プレアルブミンなど) と結合する結果、血液中に選択的に存在することが考えられる。1, 2, 3, 7, 8-PentaCDF はラットにおいて (OH)<sub>2</sub>-tetraCDFs (5 種, 主代謝物), OH-tetraCDF (2 種), OH-pentaCDF (1 種) など多数の代謝物を与えることが報告されている<sup>20)</sup>。これらのうち、本研究において血清中より 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF の代謝物として 3-OH-2, 4, 7, 8, 9-pentaCDF のみが検出されたことは、血中の thyroxine-binding proteins と特定の構造の OH-CDFs との結合性を強く裏付けるものであろう。また、PCB の場合と同様に OH-CDFs が PCDF の毒性発現に関与していることも十分に予想される。

以上のことから PCB, PCDF おそらく PCDD を含めて共通のメカニズムとして、水酸基に隣接する塩素置換をもつこれら水酸化体代謝物の血液中における選択的な取り込みが示唆された。同時に、これら水酸化体は共通の機構でそれぞれの毒性発現に関与していることが予想される。今後、血液中におけるこのような水酸化体代謝物の残留性や毒性・生物活性との関連を検討することによって、これら環境汚染物質の新たな毒性発現メカニズムを解明できるものと期待される。

### 総 括

PCDFs 混合物 (1, 2, 7, 8-tetraCDF 14%, 2, 3, 7, 8-tetraCDF 35%, 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF 48% を主成分とする) をラットに 3 日間連続して経口投与し、最終投与 1 日目の血清中に残存する OH-CDFs を分析することにより次のような知見を得た。

- 1) 血清中に少なくとも 2 種の OH-CDFs が検出され、主成分の構造は 2, 3, 7, 8-tetraCDF に由来する 3-OH-2, 4, 7, 8-tetraCDF (A) と同定された。もう一方の成分は 1, 2, 3, 7, 8-pentaCDF に由来する 3-OH-2, 4, 7, 8, 9-pentaCDF (B) と同定された。
- 2) 血清中から検出された 2 種の OH-CDFs はいずれも水酸基 (3-位) の両隣 (2-位および 4-位) が塩素原子で置換されており、血液中に選択的な残留性を示す OH-CB と同様な構造上の類似性を示した。
- 3) 水酸基に隣接した塩素原子を有する OH-CDF, OH-CB は (おそらく OH-CDD を含めて) 血液中に特異的に残存することが示唆された。

### 文 献

- 1) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuro-

ki H: Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspect.* 102: 464-469, 1994.

- 2) Birnbaum LS, Decad GM and Matthews HB: Disposition and excretion of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 242-252, 1980.

- 3) Brewster DW and Birnbaum LS: Disposition of 1, 2, 3, 7, 8-pentachlorodibenzofuran in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 95: 490-498, 1988.

- 4) Brouwer A and Van den Berg K: Binding of a metabolite of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85: 301-312, 1986.

- 5) De Haan LHJ, Van Dijk L and Brouwer A: Effects of hydroxylated PCB metabolites on the gap-junctional intercellular communication between mouse hepalclc7 cells. *Organohalogen Compounds* 20: 491-495, 1994.

- 6) Jansson B and Sundstrom G: Mass spectrometry of the methyl ethers of isomeric hydroxybiphenyls-potential metabolites of chlorobiphenyls. *Biomed. Mass Spectrom.* 1: 386-392, 1974.

- 7) Klasson-Wehler E, Lindberg L, Jonsson CJ and Bergman Å: Tissue retention and metabolism of 2, 3, 3', 4, 4'-pentachlorobiphenyl in mink and mouse. *Chemosphere* 27: 2397-2412, 1993.

- 8) Korach KS, Sarver P, Chae K, McLachlan JA and McKinney JD: Estrogen receptor binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol. Pharmacol.* 33: 120-126, 1987.

- 9) Kuroki H, Haraguchi K and Masuda Y: Metabolism of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in rats. *Chemosphere* 20: 1059-1064, 1990.

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

- 11) Kuroki H, Masuda Y, Yoshihara S and Yoshimura H: Accumulation of polychlorinated dibenzofurans in the livers of monkeys and rats. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 18: 387-392, 1980.

- 12) 黒木広明, 原口浩一, 斉藤秀美, 増田義人, Klasson Wehler E and Bergman Å: 血液中における PCB 水酸化体代謝物の残留性. *福岡医誌* 84: 248-259, 1993.

- 13) Lans MC, Klasson-Wehler E, Willemsen M, Meussen E, Safe S and Brouwer A: Structure-dependent, competitive interaction of hydroxy-polychlorobiphenyls, -dibenzo-*p*-dioxins and -dibenzofurans with human transthyretin. *Chem.*

Biol. Interact. 88 : 7-21, 1993.

14) Lans MC, Kubiczak G, Douwes J and Brouwer A : In vitro effects of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and its hydroxy metabolites on mitochondrial function. *Organohalogen Compounds* 1 : 103-106, 1990.

15) 松枝隆彦, 飯田隆雄, 平川博仙, 深町和美, 常磐寛, 長山淳哉 : 油症患者および対照者の母乳中の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs 濃度の比較. *福岡医誌* 84 : 263-272, 1993.

16) Morse D, Brouwer A and Klasson-Wehler E : Perinatal accumulation of hydroxylated polychlorobiphenyl metabolites in rats following maternal Aroclor 1254 exposure. *Organohalogen Compounds* 20 : 513-516, 1994.

17) Narasimhan TR, Kim HL and Safe S : Effects of hydroxylated polychlorinated biphenyls on mouse liver mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Biochem. Toxicol.* 6 : 229-236, 1991.

18) Poiger H and Buser HR : Structure elucidation of mammalian TCDD-metabolites. ed. by Tucker RE, Young AL and Gray AP : *Human and Environmental Risks of Chlorinated Dioxins and Related Compounds*. pp. 483-492, Plenum Press New York and London, 1983.

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

20) Poiger H and Pluess N : The metabolism of selected PCDFs in the rat. *Chemosphere* 18 : 259-264, 1989.

21) Poland A and Kuntoson 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.

22) Rickenbacher U, McKinney JD, Oatley SJ and Blake CCF : Structurally specific binding of halogenated biphenyls to thyroxine transport protein. *J. Med. Chem.* 29 : 641-648, 1986.

23) Tulp MTM and Hutzinger O : Identification of hydroxylated chlorodibenzo-*p*-dioxins, chlorodibenzofurans and chloronaphthalenes as their methyl ethers by gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.* 5 : 224-231, 1978.

24) Tulp MTM, Olie K and Hutzinger O : Identification of hydroxyhalobiphenyls as their methyl ethers by gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.* 4 : 310-316, 1977.

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

(受付 1995-3-30)

## 台湾および福岡油症患者の血液中 PCDF および PCB の 25 年間の濃度推移

第一薬科大学物理分析学教室

増 田 義 人・原 口 浩 一

第一薬科大学環境化学教室

黒 木 広 明

Health and Welfare Canada

John Jake Ryan

## Change of PCDF and PCB Concentrations in the Blood of Yucheng and Yusho Patients for 25 Years

Yoshito MASUDA, Koichi HARAGUCHI and Hiroaki KUROKI

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

John Jake RYAN

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

The blood samples of 3 Yucheng patients collected 6-7 times from 1980 to 1993 and 5 Yusho patients collected 6-8 times from 1982 to 1993 were analyzed for congeners of polychlorinated dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB) by high resolution gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-electron capture detection. In the blood of Yucheng patients, the high concentrations of 3 PCDF congeners, 2, 3', 4, 4', 5-penta-CB and 5 PCB congeners were eliminated at half-lives of 2.4 ~ 2.9, 1.7 and 4.1 ~ 6.1 years, respectively, while in Yusho patients, 14 years after the incident, their half-lives were converted to longer times as observed 3.2 ~ 13.4, 24.0 and 13.7 ~ 34.2 years, respectively. In the same Yucheng and Yusho patients, the half-lives of the 5 PCB congeners were about twice longer than those of the 3 PCDF congeners. PCBs are more retainable than PCDFs in human blood.

### 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ー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<sup>1)</sup>. 患者は, 塩素痤瘡を主訴とする特異な慢性症状を示し<sup>2)</sup>, 25年以上経過した現在でも症状が残っている. 事件当時は, 血液中 PCB のように微量の混合物を正確に分析する方法が確立されていなかったため, 患者体内の PCB 異性体などの分析データは報告されていない. 患者血液中の PCB が分析され始めたのは, 事件後 5 年

経過した 1974 年頃からである<sup>3)</sup>. 血液中の PCDF が正確に分析されだしたのは事件後 20 年以上経過した 1989 年頃からである<sup>4)</sup>. 1979 年台湾で PCB, PCDF などの混合物が混入されたライスオイルを摂取した油症と同様の中毒事件が起きた<sup>5)</sup>. 台湾の油症患者については, 事件当時から採血が行われ, その中の PCB, PCDF 異性体の分析が行われ, その結果が 1991 年に報告されている<sup>6)</sup>. 台湾の油症患者の血液中データと最近 12 年間の福岡油症患者の血液中データを連続して考えると, 油症発生当時から現在までの 25 年間の油症患者体内における PCB および PCDF の残留状態を推定できる. 台湾油症患者 3 名および福岡油症患者 5

名の血液を経時的に採取し、PCBおよびPCDF異性体をそれぞれ分析し、それらの濃度推移を知ることができた。これにより、人体に残留するPCBおよびPCDFの長期間にわたる残留および減衰状態が推定できる。

## 実験方法

### 1. 患者血液

台湾の重症PCB中毒患者3名より、1980年5月から1993年8月にかけて6-7回血液を採取し凍結保存した。患者の生年月はBS:男 1962年2月, RK:女 1954年8月, SS:男 1946年5月である。福岡の重症患者5名より1982年10月から1993年10月にかけて、それぞれ6-8回血液を採取し、凍結保存した。患者の生年月はKK:女 1937年10月, TS:女 1927年2月, YUM:女 1935年4月, TH:女 1921年1月, HH:女 1917年7月である。

### 2. 分析方法

#### (1) PCDFの分析

血液中PCDFの分析法は前報<sup>9)</sup>の通りである。概略の分析法を示す。血液5mlに<sup>13</sup>C-PCDDおよび<sup>37</sup>Cl-PCDFの100pg程度の一定量を内標準物質として加えて混合し、ヘキサンで抽出した。ヘキサンを完全に蒸発させ、脂質の量を求めた。脂質試料をヘキサンに溶かし、濃硫酸、1% NaOH、水で順次洗い濃縮した。濃縮したヘキサン溶液を硫酸/シリカゲルと珪酸セシウム/シリカゲルの積層カラムおよび活性フロリジルカラムにかけ、ヘキサン、2%ジクロロメタン/ヘキサンおよびジクロロメタンで溶出させた。ジクロロメタン溶出液を完全に濃縮し、ヘキサンに溶かし、Carbopack C/セライト545の活性炭カラムにかけ、ヘキサン、シクロヘキサン/ジクロロメタン、トルエンなどで順次溶出させた。トルエン溶液を減圧濃縮し、ガスクロマトグラフ(DB-5カラム)・2重収束質量分析計(VG Analytical-70 70EQ)でPCDF異性体を分析した。

#### (2) PCBの分析

患者の血液約2~3gを秤量し、試験管にとり、これに水を加えて3mlとし、エタノール3ml、水酸化ナトリウム0.3gを加えよく振り混ぜ、さらに内標準物質として2, 2', 3, 4, 5, 5', 6-hepta-CBを5ng添加し、65°で2時間加温した。冷却後、ヘキサン5mlで2回抽出し、ヘキサン層10mlを水2mlで水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち、活性化したシリカゲル(ワコーゲルS-1, 140° 3時間)0.5gのカラムクロマトに

かけた。カラムはヘキサン25ml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3mlまで濃縮した。これをスピッツ試験管に移し、60°に加温して約0.1mlまで濃縮し、ガスクロマトグラフの試料とした。ガスクロマトグラフは島津GC-9Aに電子捕獲型検出器(<sup>63</sup>Ni)を装着したものを使用した。カラムは、DB-5 MS, 0.25mm×60m (J & W Scientific), キャリアーガスは99.999%高純度窒素を用いた。ガス流速は1ml/minであった。カラム温度は最初100°で2分間保持し、15/minの割合で260°まで昇温し、その後一定に保った。注入口温度は300°で一定にした。試料の注入はスプリット・スプリットレス試料導入装置SPL-G9(島津)で行った。各PCB異性体の定量は、ピーク面積比による内標準法により行い、クロマトパックC-R3A(島津)で面積測定および計算をした。

## 結果と考察

### 1. PCDF

台湾の油症患者3名および福岡の油症患者5名のPCDF異性体の濃度推移を、血液重量当たり濃度で計算したものをFig.1に、脂肪重量当たり濃度で計算したものをFig.2に示す。中毒事件が新聞などで一般に公表された日(福岡油症では1968年10月10日、台湾油症では1979年10月8日)を初日として、その後の経過日数を横軸に示した。台湾の油症患者では、事件後1年間では血液中PCDF濃度が多少上昇しているものも見られたが、事件後2000日(5.5年)までは、対数濃度のグラフで見るとほぼ直線的に濃度減衰している。その後は濃度減衰がゆっくりとなっており、5000日(13.7年)以後の福岡油症患者では、台湾油症の濃度減衰に引き続いた状態でゆっくりと血液中濃度が減少している。事件後5100日(14年)の時点では、2, 3, 4, 7, 8-penta-CDFの濃度は福岡油症患者においては台湾油症患者よりも5倍程度高い状態である。これは、台湾および福岡油症のライスオイル中のPCDF異性体の含有割合が異なっていたので<sup>9)</sup>、2, 3, 4, 7, 8-penta-CDFの事件当時の摂取量が、福岡の油症患者で多かったためと考えられる。

患者血液中のPCDF異性体の濃度変化を1-コンパートメントモデルとして、生体内半減期を計算し、Table 1に示す。台湾油症患者では2, 3, 4, 7, 8-penta-CDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexa-CDFおよび1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-hepta-CDFの半減期はそれぞれ平均値で2.5, 2.9および2.4年であるのに対し、福岡油症患者ではそれらの半減期はそれぞれ中央値で13.4, 8.6および3.2



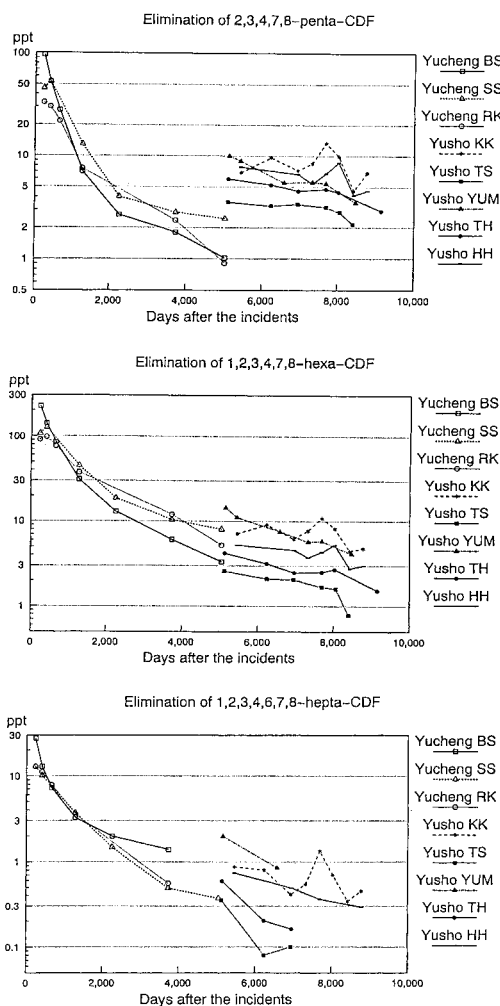


Fig.1 Elimination of PCDF congeners in Yucheng and Yusho patients (Whole blood basis, ppt)

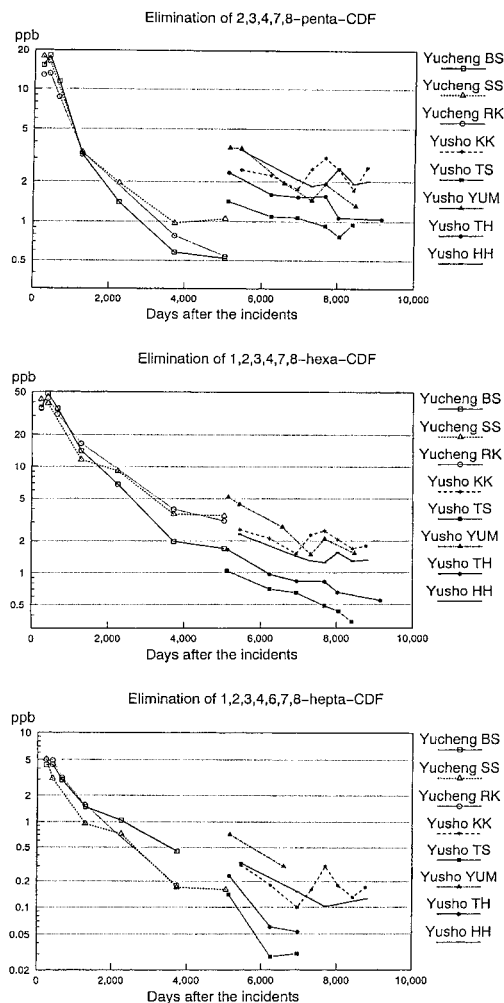


Fig.2 Elimination of PCDF congeners in Yucheng and Yusho patients (Lipid weight basis, ppb)

年であった。いずれの PCDF 異性体においても、事件後 14 年 (5100 日) 以降の福岡油症患者の方が生体半減期が長い。時間が経過し体内濃度が低くなってからは、体内 PCDF 濃度の減衰は一段とゆっくりとなった。

## 2. PCB

台湾および福岡の油症患者の血液中異性体の濃度推移を Fig. 3 に示す。台湾油症患者では、いずれの PCB 異性体も、事件後時間経過と共に、血液中濃度が減少している。福岡の油症患者では、いずれの PCB 異性体も、事件後 5100 日 (14 年) 以降では、多少濃度減少の傾向が見られるが、ほとんど同じ程度の濃度で推移している。事件後 5100 日 (14 年) の時点で、2, 3', 4, 4',

5-penta-CB の血液中濃度は、台湾油症患者と福岡油症患者で同じ程度であるが、他の PCB 5 種の血液中濃度は、台湾油症患者の方が福岡油症患者よりも 5 倍程度高かった。これは台湾油症のライスオイルの PCB はカネクロール 500 (KC-500) タイプであるのに対し、福岡油症のライスオイルには KC-400+KC-500 (1:1) タイプの PCB が存在していた<sup>8)</sup>、すなわち、台湾ライスオイルの方が塩素数 5~7 個の PCB をより含んでいたためと考えられる。

患者血液中 PCB 異性体の濃度変化を 1-コンパートメントモデルとして計算した生体内半減期を Table 1 に示す。台湾油症患者では、2, 3', 4, 4', 5-penta-CB,

**Table 1** Half-lives of Congeners of PCDFs and PCBs in Yucheng and Yusho patients

| PCDFs/PCBs                      | Biological half-life, Year |              |              |                  |                |              |               |                |
|---------------------------------|----------------------------|--------------|--------------|------------------|----------------|--------------|---------------|----------------|
|                                 | Yucheng                    |              |              | Yusho            |                |              |               |                |
|                                 | BS                         | SS           | RK           | KK               | TS             | YUM          | TH            | HH             |
| 2, 3, 4, 7, 8-penta-CDF         | 2.1<br>(2.4)               | 2.9<br>(3.1) | 2.6<br>(2.8) | 44.2<br>(-58989) | 16.6<br>(12.5) | 6.7<br>(6.0) | 12.1<br>(9.6) | 13.4<br>(13.4) |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexa-CDF       | 2.3<br>(2.6)               | 3.2<br>(3.5) | 3.2<br>(3.4) | 15.9<br>(24.9)   | 6.8<br>(6.0)   | 5.4<br>(4.9) | 8.6<br>(7.3)  | 12.0<br>(12.0) |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-hepta-CDF   | 2.5<br>(2.9)               | 2.5<br>(2.6) | 2.1<br>(2.0) | 11.0<br>(15.9)   | 2.6<br>(2.1)   | 3.2<br>(3.2) | 2.6<br>(2.3)  | 6.6<br>(6.0)   |
| 2, 3', 4, 4', 5-penta-CB        | 1.6                        | 1.9          | 1.5          | -54.3            | 4.1            | 24.0         | 38.6          | 4.8            |
| 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexa-CB     | 3.5                        | 4.3          | 4.5          | 27.4             | 14.6           | -46.1        | 245.2         | 4.9            |
| 2, 2', 3, 4, 4', 5'-hexa-CB     | 4.8                        | 4.2          | 5.7          | 55.5             | 7.6            | 20.6         | -24.7         | 8.0            |
| 2, 3, 3', 4, 4', 5-hexa-CB      | 3.9                        | 5.9          | 6.2          | 56.5             | 7.3            | -502.0       | 34.2          | 12.6           |
| 2, 2', 3, 4, 4', 5, 5'-hepta-CB | 4.5                        | 6.5          | 7.2          | -23.2            | 8.5            | 20.9         | 8.4           | -66.6          |
| 2, 2', 3, 3', 4, 4', 5-hepta-CB | 5.1                        | 6.1          | 6.7          | 13.7             | 6.2            | 55.3         | 8.8           | 47.0           |

Half-lives are calculated from the concentrations in whole blood basis.

The values in parentheses are calculated from the lipid basis concentrations.

2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexa-CB, 2, 2', 3, 4, 4', 5'-hexa-CB, 2, 3, 3', 4, 4', 5-hexa-CB, 2, 2', 3, 4, 4', 5, 5'-hepta-CB および 2, 2', 3, 3', 4, 4', 5-hepta-CB の半減期はそれぞれ平均値で 1.7, 4.1, 4.9, 5.3, 6.1 および 6.0 年であった。2, 3', 4, 4', 5-penta-CB の半減期は他の PCB のそれよりも小さく、生体での代謝速度が比較的速い特異な PCB である。この PCB 異性体が油症患者特有の PCB パターン<sup>9)</sup> (2, 3', 4, 4', 5-penta-CB の濃度が比較的低く、2, 3, 3', 4, 4', 5-hexa-CB の濃度が高い)を形成するものと考えられる。他の 5 種の PCB の半減期は 4.1~6.1 年であり、同じ患者体内の PCDF の半減期 2.4~2.9 年よりも 2 倍程度長い。これらの PCB 異性体は PCDF 異性体よりも体内残留性が高い。福岡油症患者では、これら PCB の半減期は、それぞれ中央値で 24.0, 27.4, 20.6, 34.2, 20.9 および 13.7 年であった。いずれも PCB の半減期は 20 年程度であり、事件後 5100 日 (14 年) 以降は、血液中 PCB の濃度減少が非常に遅い。同じ患者の血液中 PCDF の半減期が 3.1~13.4 年であるので、これら PCB は PCDF よりも人体残留性が高いと考えられる。

### 総 括

台湾油症患者 3 名および福岡油症患者 5 名の血液を、それぞれ事件後 1~14 年の間および 14~25 年の間に数回採取し、それに含まれる PCDF および PCB 異性体の濃度を高分離能ガスクロマトグラフ・高分解能質

量分析装置又は高分離能ガスクロマトグラフ・電子捕獲検出器で分析した。

1. 台湾油症患者では事件当初高濃度 (全血中、~0.2 ppb) であった 2, 3, 4, 7, 8-penta-CDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexa-CDF および 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-hepta-CDF は半減期の平均値がそれぞれ 2.5, 2.9 および 2.4 年の速さでゆっくりと減衰した。福岡の油症患者では、事件後 14 年以降、それぞれの半減期の中央値が 13.4, 8.6 および 3.2 年となり、濃度減少がさらに遅くなった。

2. 台湾油症患者では、2, 3', 4, 4', 5-penta-CB, 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexa-CB, 2, 2', 3, 4, 4', 5'-hexa-CB, 2, 3, 3', 4, 4', 5-hexa-CB, 2, 2', 3, 4, 4', 5, 5'-hepta-CB および 2, 2', 3, 3', 4, 4', 5-hepta-CB の半減期はそれぞれ平均値で 1.7, 4.1, 4.9, 5.3, 6.1 および 6.0 年であり、2, 3', 4, 4', 5-penta-CB が比較的速く濃度減少しているが、他の PCB の血液中濃度の減衰が遅く、より長期間体内に残存した。福岡の油症患者では、これら PCB の半減期はそれぞれ中央値で 24.0, 27.4, 20.6, 34.2, 20.9 および 13.7 年であり、事件後 14 年以降は、血液中 PCB の残留性がより高くなっていた。

3. 事件後 14 年経過する前の時期 (台湾油症) および後の時期 (福岡油症) のいずれにおいても、2, 3', 4, 4', 5-penta-CB を除く PCB 異性体の生体半減期は同じ患者の PCDF 異性体の半減期より 2 倍程度長い。PCB の方が PCDF よりも人体における残留性が高い

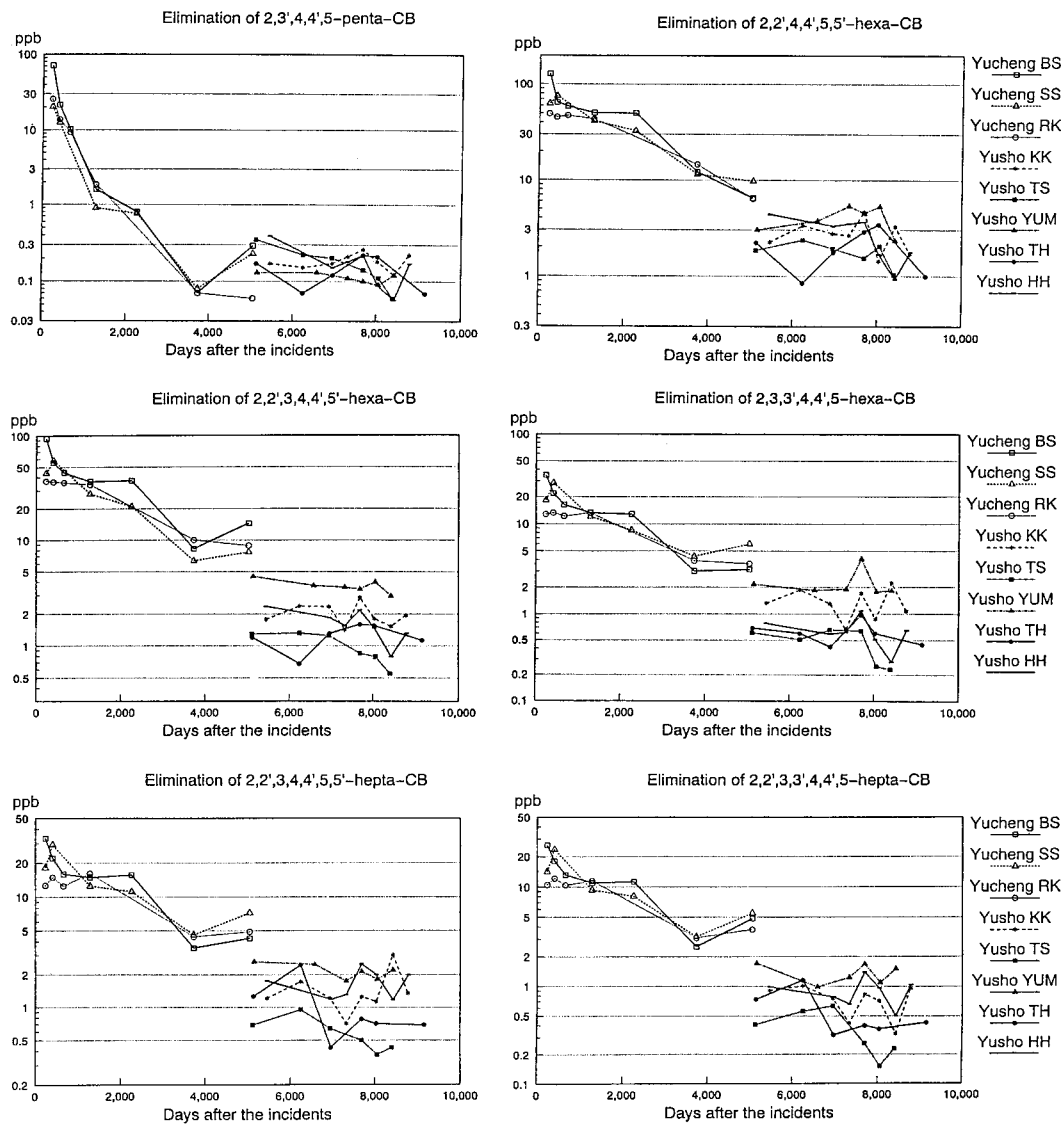


Fig. 3 Elimination of PCB congeners in Yucheng and Yusho patients  
(Whole blood basis, ppb)

と考えられる。

## 文 献

- 1) Hsu S-T, Ma C-I, Hsu SK-H, Wu S-S, Hsu NH-M, Yeh C-C and Wu S-B: Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: A four-year follow-up, *Environ. Health Perspect.* 59: 5-10, 1985.
- 2) 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.

- 3) Masuda Y: The Yusho rice oil poisoning incident. In *Dioxins and Health* (Schecter ed) pp 633-659, Plenum Publishing Corp., New York, 1994.

4) 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.

- 5) Masuda Y, Kuroki H, Haraguchi K and

Nagayama J: PCDFs and related compounds in humans from Yusho and Yucheng incidents. *Chemosphere* 15: 1621-1628, 1986.

6) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一, 斉藤秀美, Ryan JJ: 油症患者血液中 PCDF の濃度推移, 福岡医誌 84: 236-242, 1993.

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

8) Masuda Y, Kuroki H, Yamaryo T, Haragu-

chi K, Kuratsune M and Hsu ST: Comparison of causal agents in Taiwan and Fukuoka PCB poisonings. *Chemosphere* 11: 199-206, 1982.

9) 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.

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

(受付 1995-3-30)

## Effect of 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran and Its Analogues on Induction of Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes

Junya NAGAYAMA and Mayumi NAGAYAMA

*Laboratory of Environmental Health Sciences, School of Health Sciences,  
Kyushu University 90, Fukuoka 812-82*

Koichi HARAGUCHI, Hiroaki KUROKI and Yoshito MASUDA

*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815*

**Abstract** We have been already 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 (Co-PenCB). In this study, in order to evaluate the genotoxicity of the three chemicals, we have examined their effects on the induction of sister chromatid exchanges (SCEs), which has been frequently utilized as an indicator of biological and genetic damage due to exposure to carcinogens or mutagens, in cultured human lymphocytes in the absence or presence of 7, 8-benzoflavone (ANF) and the following results were obtained. 1) TCDD, PenCDF and Co-PenCB significantly increased the frequency of SCEs with almost the same dose-dependent manner in terms of the concentration of TCDD toxic equivalent. 2)  $8 \times 10^{-5}$  MANF significantly enhanced the frequency of SCEs and the simultaneous treatment of ANF and either of TCDD, PenCDF or Co-PenCB seemed to exert an additive effect as SCEs inducer. 3) TCDD, PenCDF and Co-PenCB were considered to be very potent inducers of SCEs, because their 50% effective concentration in SCEs enhancement were only 5 to 10 times higher than the level of the adipose tissue in healthy Japanese, namely, 70ppt as TCDD.

Consequently, the respective TCDD toxic equivalency factors of 0.5 and 0.2 for PenCDF and Co-PenCB seemed to be reasonable so far as the induction of SCEs was employed as an indicator of the genotoxic potency. The three chemicals are 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 our descendants.

### Introduction

Recently, cytogenetic changes such as the induction of micronucleated cells (MNs) and sister chromatid exchanges (SCEs) have frequently been utilized as indicators of biological damage due to exposure to different carcinogens or mutagens. These two cytogenetic changes are considered to occur as results of different mechanisms to DNA or chromosome damage. MNs have been considered to be the result of chromosome fragments or whole chromosomes lagging behind the genome at cell

division. On the other hand, SCEs are formed during the S phase after an initial change in the form of DNA base damage<sup>23)</sup>, when quadriradials as mitotic chiasmata are a consequence of mitotic crossing over<sup>22)</sup>.

Many studies indicate that we have been already contaminated with numerous chemicals which have been intentionally or accidentally made by man and some of those are highly toxic organochlorine compounds such as polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs)

<sup>5)11)</sup>. In this study, we have investigated the induction of SCEs 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 (Co-PenCB), the most toxic congener among Co-PCBs, in order to elucidate their genotoxicity.

## Materials and Methods

### 1. Chemicals

TCDD and PenCDF were synthesized by Dr. Y. Masuda and his colleagues and Co-PenCB was purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Woburn, USA. Their purities were over 99% by gas chromatography. The sources of chemicals used in this study were as follows: demecolcin, 7, 8-benzoflavone (ANF) and hoechst 33258 from Wako, Osaka, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BUdR) 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. Chemical treatment and lymphocyte culture

We assumed that the total concentration of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in the adipose tissue of Japanese people was 70ppt as TCDD toxic equivalent value on fat weight basis and that the toxic equivalency factors (TEFs, relative toxic potency to TCDD) were 0.5 for PenCDF and 0.2 for Co-PenCB. Their effects on the induction of SCEs in peripheral human lymphocytes were examined at doses of about 5, 25 and 50 times higher concentrations than 70ppt as TCDD. 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 Co-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.

Heparinized peripheral blood samples were obtained by venipuncture from healthy females (mean age: 37 years old). Lymphocyte cultures (5.0ml) were initiated from whole blood (0.3ml) aliquoted into culture tubes containing RPMI 1640 medium (4.5ml) supplemented with 15% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin, in either the presence or absence of  $8 \times 10^{-5}$  MANF. Hundred  $\mu$ M BUdR and 0.15ml PHA (a final concentration; 3%) were added at culture initiation. The whole blood cultures were then incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity. Seventy hrs later and 3 hrs before fixation,  $2 \times 10^{-7}$  M demecolcin was added. The cells were then collected by centrifugation, exposed to 0.075M KCl hypotonic solution for 15 min at 37°C and fixed 3 times in methanol: acetic acid (3:1 v/v) at room temperature.

### 3. Slide preparation and scoring

Samples for microscopic observation were obtained by carefully dropping the lymphocyte suspensions from Pasteur pipettes onto pre-cleaned wet slides and dried in vapor of the water. The slides were stained for SCEs analyses using a little modification of the fluorescence (Hoechst 33258) plus Giemsa (FPG) technique<sup>3)</sup>. Slides were coded and scored blind under a magnification of 1,000 fold. SCEs were analyzed in 30 to 64 metaphases for each point and scored.

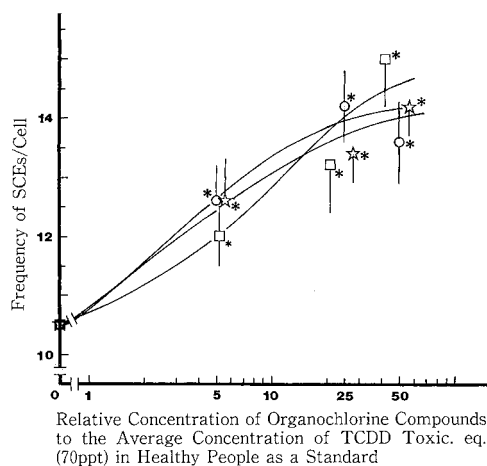
### 4. Statistical analysis

The results were expressed as the average number  $\pm$  S. E. of SCEs per metaphase. Data were statistically analyzed by Student's *t*-test.

## Results

### 1. Frequency of SCEs induced by TCDD, PenCDF and Co-PenCB in the absence of ANF

The experimental results are shown in Fig. 1. The frequency of SCEs/cell in the control culture was  $10.5 \pm 0.4$ , and the three chemicals significantly enhanced the SCEs formation even at the lowest concentration, namely, about 5

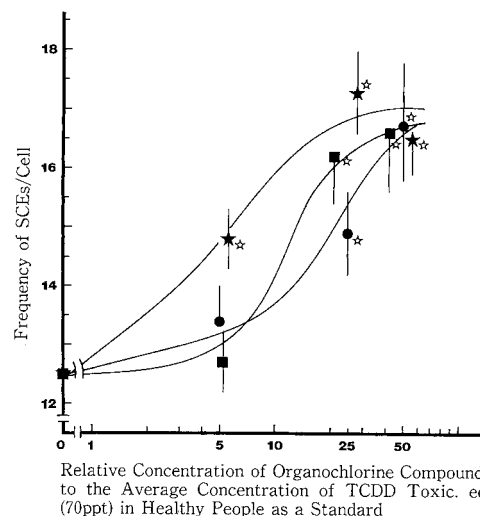


**Fig. 1** Effect of TCDD (□), PenCDF (☆) or Co-PenCB (○) on the induction of SCEs in human lymphocytes of whole-blood cultures

\* :  $P < 0.05$ , \* :  $P < 0.01$

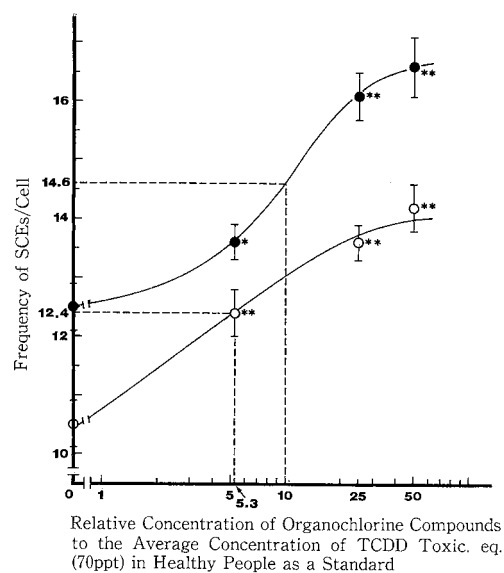
times more than the average Japanese level. The greatest SCEs induction was observed at about 25 or 50 times over the mean level in Japanese and those were  $15.0 \pm 0.8$  SCEs/cell for TCDD,  $14.2 \pm 0.5$  SCEs/cell for PenCDF and  $14.2 \pm 0.6$  SCEs/cell for Co-PenCB. In the whole-blood culture without ANF, the frequency of SCEs in human lymphocytes seemed to increase in almost the same proportion to the concentration of TCDD, PenCDF and Co-PenCB in terms of TCDD toxic equivalent level. Therefore, our assumption that TEF values are 0.5 for PenCDF and 0.2 for Co-PenCB is considered to be acceptable.

Based on these findings, we recalculate the frequency of SCEs/cell values induced by the three chemicals at the same concentration in the toxic equivalent of TCDD and the result is shown in Fig. 3. The frequency of SCEs in the control culture was  $10.5 \pm 0.4$ /cell, enhanced in proportion to their concentration and at the highest one it was  $14.2 \pm 0.4$ /cell. Fifty % effective concentration ( $EC_{50}$ ) for the induction of SCEs in the lymphocytes cultured without ANF appeared to be only 5.3 times higher concentration than the average one in Japanese, namely,



**Fig. 2** Effect of simultaneous treatment of both TCDD (■), PenCDF (★) or Co-PenCB (●) and ANF ( $8 \times 10^{-5} M$ ) on the induction of SCEs in human lymphocytes of whole-blood cultures

☆ :  $P < 0.01$



**Fig. 3** Means in effects of the three organochlorine compounds (TCDD, PenCDF and Co-PenCB: ○) and these chemicals plus ANF (●) on the induction of SCEs in human lymphocytes of whole-blood cultures

\* :  $P < 0.05$ , \* :  $P < 0.01$

70ppt as TCDD.

## 2. Frequency of SCEs induced by TCDD, PenCDF and Co-PenCB in the presence of ANF

The results are indicated in Fig. 2. The frequency of SCEs in the control culture was  $12.5 \pm 0.4/\text{cell}$ , PenCDF significantly induced the SCEs formation even at the lowest concentration and the other two chemicals from about 25 times over the mean Japanese level. The greatest SCEs formation was seen at about 25 or 50 times more than the mean level in Japanese and those were  $16.6 \pm 1.0\text{SCEs}/\text{cell}$  for TCDD,  $17.3 \pm 0.7\text{SCEs}/\text{cell}$  for PenCDF and  $16.8 \pm 1.0\text{SCEs}/\text{cell}$  for Co-PenCB. In general, the three chemicals enhanced the frequency of SCEs in the lymphocytes of whole-blood cultures in the presence of ANF with almost the same dose-dependent manner in terms of TCDD toxic equivalent. Therefore, our assumption concerning TEF values for PenCDF and Co-PenCB seems to be reasonable not only in the absence of ANF but also in its presence.

Based on the findings mentioned above, we reevaluated the frequency of SCEs at each concentration, adding up the SCEs/cell of the three chemicals at the same concentration in TCDD toxic equivalent and the result is indicated in Fig. 3. The frequency of SCEs in the control culture was  $12.5 \pm 0.4/\text{cell}$ , increased significantly in proportion to their concentration and at the greatest concentration it was  $16.6 \pm 0.5/\text{cell}$ . Their  $\text{EC}_{50}$  for the induction of SCEs in the human lymphocytes cultured in the presence of ANF seemed to be 10 times higher concentration than the average one in Japanese people, namely, 70ppt as TCDD.

## Discussion

The development of TEFs for PCDDs and related compounds has been necessitated by the identification of complex mixtures of these chemicals in almost every compartment of the global ecosystem. PenCDF is the second toxic congener among PCDDs, PCDFs and Co-PCBs

and its proposed TEF value is 0.5<sup>20)</sup>. Co-PenCB is the most toxic PCB congener and the range of its proposed TEF value is 0.1 to 0.4<sup>23)4)20)</sup>. In this study, we assumed that TEF values for PenCDF and Co-PenCB were 0.5 and 0.2, respectively and this assumption seemed to be reasonable because TCDD, PenCDF and Co-PenCB enhanced the frequency of SCEs in almost the same dose-dependent manner in terms of the TCDD toxic equivalent concentration, as indicated in Figs 1 and 2.

PCDDs, PCDFs and PCBs did not bind covalently to DNA, did not affect the frequency of SCEs and were negative in other short-term genotoxicity tests<sup>8)24)</sup>. Contrary to the findings mentioned above, the present study and other recent investigations indicated PCDDs, PCDFs and PCBs significantly increased the frequency of SCEs in cultured human lymphocytes<sup>14)15)17)21)</sup> and that of micronucleated cells in vitro<sup>15)16)</sup>, and cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes demonstrated that accidental or occupational exposure to PCBs and/or PCDFs resulted in an enhanced frequency of SCEs<sup>6)9)</sup>.

The present study also indicated that TCDD, PenCDF and Co-PenCB seemed very potent inducers of SCEs, because, as shown in Fig. 3, their  $\text{EC}_{50}$  values of SCEs induction were only 5.3 and 10 times higher concentration than that in healthy Japanese, that is, 70ppt as TCDD in the absence and presence of ANF, respectively. ANF greatly enhanced the sensitivity of SCEs assay in detecting effects of cigarette smoking and accidental exposure to a mixture of PCBs and PCDFs in peripheral lymphocytes<sup>9)10)</sup>. As indicated in Fig. 3, ANF significantly enhanced the frequency of SCEs in the control culture and the simultaneous treatment of ANF and either of the three chemicals was considered to be additive in SCEs induction. This kind of effect has been seen in our former study on the induction of micronucleated cells with the same chemicals<sup>16)</sup>.

Several, however, of these chemicals are carcinogenic in animal models, where they have



been classified as tumor promoters rather than initiators<sup>1)7)18)19)</sup>. 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 promoters and partly as initiators, because they are probably potent genotoxic compounds and sometimes seem to act through mechanisms involving direct genetic damage.

Human breast milk has been also contaminated with PCDDs, PCDFs and Co-PCBs<sup>11)12)</sup> and daily intakes of these chemicals in breast-feeding babies of healthy mothers have been estimated to be about 100 to 200 pg/kg/day as TCDD equivalent values (TEQs)<sup>13)</sup>. These TEQs values are 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 possible health consequences due to PCDDs, PCDFs and related chemicals 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/10T1/2 cells. *Carcinogenesis* 6: 651-653, 1985.
- 2) Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJGM, Feeley M, Golor G, Hanberg A, Larsen JC, Liem AKD, Safe SH, Schlatter C, Wern F, Younes M and Yrjanheikki E: Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere* 28: 1049-1067, 1994.
- 3) Goto K, Maeda, S, Kano Y and Sugiyama T: Factors involved in the differential Giemsa staining of sister chromatids. *Chromosoma* 66: 351-359, 1978.
- 4) Hanberg A, Wern F, Asplund L, Hanglund 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.
- 5) 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.
- 6) Kalina I, Sram 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Lundgren K and Lucier GW: Differential enhancement of sister chromatid exchange frequencies by  $\alpha$ -naphthoflavone in cultured lymphocytes from smokers and non-smokers. *Mutation Res.* 143: 131-135, 1985.
- 11) Masuda Y: Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compound pollution in human tissues. *Toxicol. Forum* 10: 566-574, 1987.
- 12) 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.
- 13) 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* 27: 187-194, 1993.
- 14) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Masuda Y: Effects of highly toxic organochlorine compounds retained in human body on induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Chemosphere* 29, 2349-2354, 1994.
- 15) Nagayama J, Nagayama M and Masuda Y: Genotoxicity of highly toxic organochlorine congeners in cultured human lymphocytes. *Organohalo. Comp.* 10: 165-168, 1992.
- 16) Nagayama J, Nagayama M and Masuda Y: Frequency of micronuclei induced in cultured lymphocytes by highly toxic organochlorine congeners.

Fukuoka Acta Med. 84: 189-194, 1993.

17) 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.

18) 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.

19) Poland A, Palen D and Glover E: Tumour promotion by TCDD in skin of HRS/J hairless mice. Nature (London) 300: 271-273, 1982.

20) Safe S: Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: environmental and me-

chanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). Toxicology 21: 51-88, 1990.

21) Sargent L, Roloff B and Meisner L: In vitro chromosome damage due to PCB interactions. Mutation Res. 224: 79-88, 1989.

22) Therman E and Kuhn EM: Mitotic crossing over and segregation in man. Hum. Genet. 59: 93-100, 1981.

23) Uggla AH and Natarajan AT: X-ray-induced SCEs and chromosomal aberrations in CHO cells. Influence of nitrogen and air during irradiation in different stages of the cell cycle. Mutation Res. 122: 193-200, 1983.

24) Wasson JD, Huff JE and Lopriano NA: A review on the genetic toxicology of chlorinated dibenzo-*p*-dioxin. Mutation Res. 47: 141-160, 1977.

(Received for publication March 27, 1995)

(和文抄録)

## 2, 3, 4, 7, 8-五塩化ダイベンゾフランとその同族体による ヒトリンパ球培養細胞の姉妹染色分体交換誘発性

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・環境化学研究室

原口 浩一・黒木 広明・増田 義人

カネミ油症患者は言うに及ばず、健常者もきわめて毒性の高い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)や3, 4, 5, 3', 4'-五塩化ビフェニール(Co-PenCB)により汚染されている。この研究では、これら3種類の化学物質のS依存型遺伝毒性を評価するために、ヒトリンパ球培養細胞の姉妹染色分体交換(SCEs)誘発性について研究した。この際、SCEs誘発実験系の感度を高めることが示唆されている7, 8-ベンゾフラボン(ANF)が共存する場合のSCEs誘発性についても検討した。そして、次のような結果が得られた。1) TCDD毒性当量による濃度において、TCDD, PenCDFおよびCo-PenCBはほぼ同様の量・反応関係により有意なSCEs誘発性を

示した。2) ANF( $8 \times 10^{-5}$  M)は有意にSCEs頻度を高め、ANFとTCDD, PenCDFあるいはCo-PenCBが共存する場合のSCEs誘発性は相加的であった。3) これら3種類の有機塩素化学物質のSCEs誘発の50%有効濃度が健常者の脂肪組織中濃度(TCDDとして約70 ppt)の5~10倍というきわめて低いレベルにあった。

以上のような研究結果により、これらの有機塩素化学物質はいずれも強力なSCEs誘発性があり、また、S依存型遺伝毒性物質であると考えられる。従って、遺伝子や染色体の傷害に基づく疾病や子孫への影響などについて、一層の研究が望まれると同時に、そのような悪影響の予防法に関する研究も重要と考えられる。

## Influence of Five Methylsulphonyl PCB Congeners on Frequency of Micronucleated Cells in Cultured Human Lymphocytes by Cytokinesis Block Method

Junya NAGAYAMA and Mayumi NAGAYAMA

*Laboratory of Environmental Health Sciences, School of Health Sciences,  
Kyushu University 90, Fukuoka 812-82*

Koichi HARAGUCHI, Hiroaki KUROKI and Yoshito MASUDA

*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815*

**Abstract** The lungs and blood of Yusho patients and healthy Japanese people have already been contaminated with methylsulphonyl polychlorinated biphenyls (MSF-PCBs) at relatively high concentration. Therefore, we should give due attention to their biological and toxicological effects to man. In this study, in order to mainly evaluate non-S-dependent genotoxicity of five MSF-PCB congeners, namely, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), 3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB, 3-MSF-2, 5, 2', 4', 5'-pentachlorobiphenyl (PenCB), 4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB and 4-MSF-2, 5, 2', 3', 5', 6'-hexachlorobiphenyl (HCB). We have examined their effects on the induction of micronucleated cells, which has been frequently used to estimate the dose of ionizing radiation and truly radiomimetic, non-S-dependent, clastogens, in cultured human lymphocytes in the absence or presence of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF), 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) or 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (Co-PenCB). The following results were obtained. 1)  $4 \times 10^{-5}$  M 7, 8-benzoflavone (ANF) significantly enhanced the frequency of micronucleated cells and all of the five MSF-PCB congeners failed to induce the formation of micronucleated cells at doses of 5.2 to 9.6 ppm, which were about 35,000 times higher than the concentrations in the lungs and adipose tissue of healthy Japanese people. 2) In the simultaneous treatment of one of the five MSF-PCB congeners and PenCDF (3.9 ppb), TCDD (1.5 ppb) or Co-PenCB (8.8 ppb), the combination of 3-MSF-2, 5, 2', 4', 5'-PenCB (5.2 ppm) and PenCDF only significantly enhanced the formation of micronucleated cells and the frequency rate was two times greater than that of the control culture, which was treated with PenCDF alone.

Based on the results of this study, the five MSF-PCB congeners examined are considered not to be or very weak non-S-dependent genotoxic chemicals. We, however, have not studied yet whether some MSF-PCBs are S-dependent genotoxic compounds or not. Therefore, their effects on the induction of sister chromatid exchanges (SCEs), which has proved to be the most sensitive mammalian endpoint for determining exposure to S-dependent DNA insults, in cultured human lymphocytes are now under investigation in our laboratory.

### 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 diben-

zofurans (PCDFs) poisoning that occurred in western Japan in 1968, and of healthy Japanese people<sup>6)7)8)9)10)</sup>. According to their analysis, the concentrations of MSF-PCBs were much lower than those of PCBs in the liver and adipose tissues of both Yusho patients and healthy people. However, in the lungs and blood their

concentrations were comparable to or higher than those of PCBs. Thus, several tissues of Japanese people have already been contaminated with MSF-PCBs at relatively high concentration. Therefore, we should give due attention to their biological and toxicological action.

We have already investigated the effects of some MSF-PCB congeners on aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in cultured human lymphoblastoid cells and in hepatic microsomes prepared from both aryl hydrocarbon (Ah) responsive and nonresponsive strains of mice<sup>(15)(16)(17)(18)(19)(25)</sup>. Our studies mentioned above indicated that some congeners of MSF-PCBs decreased and/or enhanced the enzyme activity in both cultured human lymphoblastoid cells and murine hepatic microsomes. Therefore, some MSF-PCB congeners have been expected to elicit biological or toxicological effect in man.

Micronuclei, which have been thought to reflect chromosomal or genetic damage from carcinogenic insults such as smoking and irradiation, enclose acentric chromosome fragments or whole chromosomes that have not been incorporated in the main nuclei at cell division, and enumeration of micronuclei or micronucleated cells in mitogen-stimulated lymphocytes provides a simpler and statistically more precise method than karyotypic analysis for quantitation of chromosomal damage. A cytokinesis-block method, using cytochalasin B (CYB), an inhibitor of actin assembly<sup>(1)</sup>, was firstly reported in 1985<sup>(5)</sup>, and the prevention of cytoplasmic division after nuclear division by CYB, resulting in binucleated cells, facilitates the scoring of micronuclei or micronucleated cells and increases the precision of the assay.

In this study, we investigated the induction of micronucleated cells in mitogen-stimulated lymphocytes by five MSF-PCB congeners, which were major ones among MSF-PCBs determined in the tissues of Yusho patients and healthy Japanese people<sup>(8)</sup>, in order to elucidate

their genotoxicity in terms of inducer of micronucleated cells.

## Materials and Methods

### 1. Chemicals

Five MSF-PCB congeners, 3-MSF-4, 5, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), 3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB, 3-MSF-2, 5, 2', 4', 5'-pentachlorobiphenyl (PenCB), 4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB and 4-MSF-2, 5, 2', 3', 5', 6'-hexachlorobiphenyl (HCB), 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) were synthesized by Dr. Masuda and his colleagues. 3, 4, 5, 3', 4'-Pentachlorobiphenyl (Co-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, penicillin, streptomycin and RPMI 1640 from Gibco, New York. All other chemicals and reagents were of the highest quality commercially available.

### 2. Chemical treatment and lymphocyte culture

Final concentrations of test chemicals in whole-blood cultures were as follows: 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB; 6.8 ppm, 3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB; 7.1 ppm, 3-MSF-2, 5, 2', 4', 5'-PenCB; 5.2 ppm, 4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB; 5.8 ppm, 4-MSF-2, 5, 2', 3', 5', 6'-HCB; 9.6 ppm, TCDD; 1.5 ppb, PenCDF; 3.9 ppb, Co-PenCB; 8.8 ppb and ANF;  $4 \times 10^{-5}$ M (11 ppm).

Lymphocyte cultures (5.0 ml) were initiated from whole blood (0.3 ml) aliquated into culture tubes containing the test chemical(s) as described later and RPMI 1640 medium (4.5 ml) supplemented with 15% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin.

Firstly, these whole-blood cultures were incubated with either acetone (solvent) alone, ANF or one of the five MSF-PCBs. Secondly, the whole-blood cultures were treated with one

of the five MSF-PCB congeners in the presence of either TCDD, PenCDF or Co-PenCB. These test chemicals were added at the beginning of the culture time and left until harvesting.

PHA (0.15 ml and a final concentration: 3%) was added at culture initiation. The whole-blood cultures were then incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity. At 71 hrs after the commencement of the culture, 7μM CYB was added and the incubation was further continued for additional 26 hrs.

### 3. Slide preparation and scoring

At the end of incubation, the whole-blood cultures were centrifuged (1,000 rpm×5 min), resuspended in 0.1M KCl hypotonic solution for 15 min 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 observation 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 magnification of 1,000 fold. A total of 1,500 binucleated lymphocytes with preserved cytoplasm were scored for each experimental group. Criteria for evaluation of micronucleated cells were those suggested by Countryman and Heddle<sup>3)</sup>.

### 4. Statistical analysis

The results are expressed as the average number±S.E. of micronucleated cells from 3 observations of 500 binucleated cells each on different slides from the same group. Data were statistically analyzed by Student's *t*-test.

### Results

#### 1. Frequency of micronucleated cells induced by each of the five MSF-PCB congeners in the absence or presence of PenCDF.

The experimental results are shown in Table 1. The frequency of micronucleated cells in the control culture was 2.7±0.4 per 500 binucleated lymphocytes, and the treatment of PenCDF (3.9 ppb) did not enhance the micronuclei formation. ANF (4×10<sup>-5</sup>M), however, significantly induced the micronucleated cells and the frequency rate was 4.3±0.4 per 500 binucleated lymphocytes.

In the five MSF-PCB congeners, significant increase of the micronucleated cells was not observed after their single treatment in the absence of PenCDF, and the range of micronucleated cell rates was 2.7 to 4.0 per 500 binucleated lymphocytes. However, in the presence of PenCDF, 3-MSF-2, 5, 2', 4', 5'-PenCB only significantly enhanced the frequency of micronucleated cells and the rate was 4.0±0.7 per 500 binucleated lymphocytes even at the lowest

**Table 1** Statistical analysis of the effect of the five MSF-PCB congeners on micronucleated cell rates in the absence or presence of PenCDF

| MSF-PCB congener and ANF       | Dose(ppm) | Micronucleated cells<br>(per 500 binucleated lymphocytes) |                 |
|--------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------|-----------------|
|                                |           | PenCDF(-)                                                 | PenCDF(3.9 ppb) |
| Control                        | —         | 2.7±0.4                                                   | 2.0±0.4         |
| 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB         | 6.8       | 2.7±0.4                                                   | 2.7±0.4         |
| 3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB         | 7.1       | 3.0±0.7                                                   | 3.0±0.7         |
| 3-MSF-2, 5, 2', 4', 5'-PenCB   | 5.2       | 3.7±0.4                                                   | 4.0±0.7*        |
| 4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB   | 5.8       | 3.3±0.4                                                   | 2.7±0.4         |
| 4-MSF-2, 5, 2', 3', 5', 6'-HCB | 9.6       | 4.0±0.7                                                   | 3.3±0.4         |
| ANF                            | 11        | 4.3±0.4*                                                  | —               |

\*: Significantly different from respective control figures, *p*<0.05

dose (5.2 ppm) among the MSF-PCB congeners. The rest of them did not show any significant effect on the induction of the micronucleated cells.

**2. Frequency of micronucleated cells induced by each of the five MSF-PCB congeners in the presence of TCDD or Co-PenCB.**

The experimental results are indicated in Table 2. Respective micronucleated cell rates after the treatment of TCDD (1.5 ppb) and Co-PenCB (8.8 ppb) were  $3.7 \pm 0.4$  and  $2.3 \pm 0.8$  per 500 binucleated lymphocytes and these rates were not significantly different from that in control culture, which was  $2.7 \pm 0.4$ , as shown in Table 1.

Simultaneous treatment of TCDD and one of the five MSF-PCB congeners did not show any significant effect on the induction of the micronucleated cells and the range of the frequency rates was 3.3 to 4.7 per 500 binucleated lymphocytes. In the presence of TCDD, 3-MSF-2,5,2',4',5'-PenCB showed the highest frequency rate per 1 ppm dose in the five MSF-PCB congeners.

Simultaneous treatment of Co-PenCB and one of the five MSF-PCB congeners did not significantly enhance the formation of micronucleated cells and the range of the frequency rates was 3.3 to 3.7 per 500 binucleated lymphocytes. As in the case of TCDD, the highest rate per 1 ppm dose was observed after

the simultaneous treatment of 3-MSF-2,5,2',4',5'-PenCB and Co-PenCB.

**Discussion**

We have already reported that ANF and 3-MSF-4,5,3',4'-TCB, one of the MSF-PCB congeners examined in this study, inhibit or enhance aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in mice and human lymphoblastoid cells, probably depending on the quantity and quality of cytochrome P-450 (P-450) enzymes, which catalyze benzo(a)pyrene (BP), a substrate of the AHH assay, metabolism<sup>15)16)17)19)25)</sup>. We have also investigated the effect of eleven MSF-PCB congeners on AHH activity of cultured human lymphoblastoid cells treated with TCDD and demonstrated that the TCDD-induced enzyme activity was mostly inhibited with them by 10 to 80%, depending on congeners<sup>18)</sup>. Three of the eleven MSF-PCBs were 3-MSF-4,5,3',4'-TCB, 3-MSF-4,5,2',3'-TCB and 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB, which were used in this study, and respective rates of the enzyme inhibition were about 80%, 40% and 20% at the dose of  $1.5 \mu\text{g/ml}$ , in other words, 1.5 ppm which was about 4 to 5 times lower concentration than those used in this study, namely 5.8 to 7.1 ppm. In that experiment, ANF showed the highest AHH inhibition at the dose of  $1.4 \mu\text{g/ml}$  (1.4 ppm), which was about 8 times lower concentration than that ( $4 \times 10^{-5}\text{M}$ ) used

**Table 2** Statistical analysis of the effect of the five MSF-PCB congeners on micronucleated cell rates in the simultaneous treatment of TCDD or Co-PenCB

| MSF-PCB congener          | Dose(ppm) | Micronucleated cells<br>(per 500 binucleated lymphocytes) |                   |
|---------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------|-------------------|
|                           |           | TCDD(1.5 ppb)                                             | Co-PenCB(8.8 ppb) |
| Control                   | —         | $3.7 \pm 0.4$                                             | $2.3 \pm 0.8$     |
| 3-MSF-4,5,3',4'-TCB       | 6.8       | $3.3 \pm 0.4$                                             | $3.3 \pm 0.4$     |
| 3-MSF-4,5,2',3'-TCB       | 7.1       | $3.7 \pm 0.4$                                             | $3.7 \pm 0.4$     |
| 3-MSF-2,5,2',4',5'-PenCB  | 5.2       | $4.7 \pm 1.1$                                             | $3.3 \pm 0.8$     |
| 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB  | 5.8       | $3.7 \pm 0.4$                                             | $3.3 \pm 0.4$     |
| 4-MSF-2,5,2',3',5',6'-HCB | 9.6       | $4.7 \pm 0.8$                                             | $3.7 \pm 0.8$     |

in this study, that is, about  $11\mu\text{g/ml}$  (11 ppm) and the inhibition rate was about 90%. Like this, some MSF-PCB congeners such as 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB and 3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB have been expected to demonstrate the same biological action as ANF.

At doses of  $4 \times 10^{-5}\text{M}$  to  $8 \times 10^{-5}\text{M}$ , ANF has been shown to elicit some clastogenic or co-clastogenic potency<sup>2)12)13)14)20)21)22)23)24)</sup>, so we anticipated that some MSF-PCB congeners including those mentioned above also could evoke similar clastogenic or co-clastogenic effect to ANF and this study was carried out. As the results of this study,  $4 \times 10^{-5}\text{M}$  ANF significantly enhanced the frequency of micronucleated cells per 500 binucleated lymphocytes. However, as shown in Tables 1 and 2, any of the five MSF-PCB congeners did not induce the formation of micronucleated cells by themselves and 3-MSF-2, 5, 2', 4', 5'-PenCB only significantly elevated the micronucleated cell rate in case of the simultaneous treatment with PenCDF. Based on the results of this study, the five MSF-PCB congeners examined including 3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB, which is probably the most effective AHH inhibitor among MSF-PCBs, are considered not to be an effective inducer of micronucleated cells in man, because their final concentrations used in this study were about 35,000 times higher than those in the lungs and adipose tissue of healthy Japanese people<sup>8)</sup>.

The types of mutations which could contribute to spontaneous micronucleated cells include (a) mutations to kinetochore proteins, centromeres and spindle apparatus that could lead to unequal chromosome distribution or whole chromosome loss at anaphase, and (b) unrepaired DNA-strand breaks induced endogenously or as a result of exposure to environmental mutagens which may result in acentric chromosome fragments<sup>4)</sup>. Therefore, the assay of micronucleated cells can detect both clastogens and spindle poisons and can be preferentially used to estimate the dose of ionizing radiation

or truly radiomimetic (non-S-dependent) chemicals to which people have been exposed.

According to the results of this study, the MSF-PCB congeners examined are considered not to be or very weak non-S-dependent genotoxic chemicals. We, however, have not investigated yet whether some MSF-PCBs are S-dependent genotoxic compounds or not. Sister chromatid exchanges (SCEs), which are not readily induced by ionizing radiation or non-S-dependent clastogens, have proved to be the most sensitive mammalian genotoxic endpoint for determining exposure to S-dependent chemicals, because SCEs occur during the S-phase of the cell cycle<sup>27)</sup>, probably at DNA replication forks or sites where replication is incomplete<sup>11)26)</sup>. Consequently, in order to clarify whether some MSF-PCB congeners have the potency to elicit the genotoxicity such as S-dependent DNA insults, effects of the five MSF-PCBs on the induction of SCEs in cultured human lymphocytes are now under investigation in our laboratory.

## References

- 1) Brown SS and Spudich JA: Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments. *J. Cell Biol.* 83: 657-662, 1979.
- 2) Collman GW, Lundgren K, Shore D, Thompson CL and Lucier GW: Effects of  $\alpha$ -naphthoflavone on levels of sister chromatid exchanges in lymphocytes from active and passive cigarette smokers: dose-response relationships. *Cancer Res.* 46: 6452-6455, 1986.
- 3) Countryman PI and Heddle JA: The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Res.* 41: 321-332, 1976.
- 4) Fenech M: The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Res.* 285: 35-44, 1993.
- 5) Fenech M and Morley AA: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.* 147: 29-36, 1985.
- 6) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Polychlorinated biphenyl methylsulfone congeners in human tissues: identification of methylsulfonyl dichlorobiphenyls. *Chemosphere* 18: 477-484, 1989.

- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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)
- 11) Ishii Y and Bender MA: Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 79: 19-32, 1980.
- 12) Lundgren K, Andries M, Thompson C and Lucier GW: Dioxin treatment of rats results in increased in vitro induction of sister chromatid exchanges by  $\alpha$ -naphthoflavone: an animal model for human exposure to halogenated aromatics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85: 189-195, 1986.
- 13) 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.
- 14) Lundgren K and Lucier GW: Differential enhancement of sister chromatid exchange frequencies by  $\alpha$ -naphthoflavone in cultured lymphocytes from smokers and non-smokers. *Mutation Res.* 143: 131-135, 1985.
- 15) 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.
- 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.* 78: 199-203, 1987. (in Japanese)
- 17) Nagayama J and Masuda Y: 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 responsive-ness. *Fukuoka Acta Med.* 84: 195-202, 1993.
- 18) Nagayama J and Masuda Y: Effects of methylsulphonyl polychlorinated biphenyl homologues and 7,8-benzoflavone on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Fukuoka Acta Med.* 84: 203-211, 1993.
- 19) 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.
- 20) Nagayama J, Nagayama M, Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Effect of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran and its analogues on induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Fukuoka Acta Med.* in press.
- 21) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Masuda Y: Effects of highly toxic organochlorine compounds retained in human body on induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Chemosphere* 29: 2349-2354, 1994.
- 22) Nagayama J, Nagayama M and Masuda Y: Frequency of micronuclei induced in cultured lymphocytes by highly toxic organochlorine congeners. *Fukuoka Acta Med.* 84: 189-194, 1993.
- 23) Nagayama J, Nagayama M and Masuda Y: Genotoxicity of highly toxic organochlorine congeners in cultured human lymphocytes. *Organohalo. Comp.* 10: 165-168, 1992.
- 24) 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)
- 25) 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. (in Japanese)
- 26) Painter RB: A replication model for sister-chromatid exchange, *Mutation Res.* 70: 337-341, 1980.
- 27) Wolff S, Bodycote J and Painter RB: Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. *Mutation Res.* 25: 73-81, 1974.

(Received for publication March 27, 1995)



(和文抄録)

## サイトカイネシスブロック法によるメチルスルホニル PCBs 同族体の ヒトリンパ球培養細胞の小核誘発性

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・環境化学研究室

原口 浩一・黒木 広明・増田 義人

カネミ油症患者や健常者の肺や血液は相対的に高濃度のメチルスルホニル PCBs (MSF-PCBs) により汚染されている。この研究では 5 種類の MSF-PCBs 同族体、つまり 3-メチルスルホニル-4, 5, 3', 4'-四塩化ビフェニール (3-MSF-4, 5, 3', 4'-TCB), 3-メチルスルホニル-4, 5, 2', 3'-四塩化ビフェニール (3-MSF-4, 5, 2', 3'-TCB), 3-メチルスルホニル-2, 5, 2', 4', 5'-五塩化ビフェニール (3-MSF-2, 5, 2', 4', 5'-PenCB), 4-メチルスルホニル-2, 5, 2', 3', 4'-五塩化ビフェニール (4-MSF-2, 5, 2', 3', 4'-PenCB) および 4-メチルスルホニル-2, 5, 2', 3', 5', 6'-六塩化ビフェニール (4-MSF-2, 5, 2', 3', 5', 6'-HCB) の非 S 依存型遺伝毒性を評価するために、ヒトリンパ球培養細胞の小核誘発性について研究した。また、カネミ油症の主要原因化学物質である 2, 3, 4, 7, 8-五塩化ダイベンゾフラン (PenCDF) や毒性が非常に高い 2, 3, 7, 8-四塩化ダイオキシン (TCDD), 3, 4, 5, 3', 4'-五塩化ビフェニール (Co-PenCB) が共存する場合の小核誘発性についても検討した。そして、次のような研究結果が得られた。1) ポジティブコントロール化学物質として用いた 7, 8-ベンゾフラボン ( $4 \times 10^{-5}$  M) は有意な小核誘発性を示したが、5 種類の

MSF-PCBs 同族体は 5.2~9.6 ppm の濃度では、いずれも小核誘発性を示さなかった。2) いずれか 1 種類の MSF-PCBs 同族体と PenCDF (3.9 ppb), TCDD (1.5 ppb) あるいは Co-PenCB (8.8 ppb) を同時にリンパ球培養細胞に処理した場合、3-MSF-2, 5, 2', 4', 5'-PenCB (5.2 ppm) と PenCDF 処理群でのみ有意に高い小核誘発性が観察された。

この研究で用いた MSF-PCBs 同族体の濃度は健常者の肺や脂肪組織のおよそ 35,000 倍も高い濃度であることから、実際には MSF-PCBs により小核誘発のような非 S 依存型遺伝毒性は生じないと考えられる。また、一般に、MSF-PCBs はこのタイプの遺伝毒性物質とはみなされないか、たとえそのような作用があるとしても非常に弱いと考えられる。

今後の課題として、MSF-PCBs の S 依存型遺伝毒性が研究される必要がある。S 依存型遺伝毒性の指標として、最も良く用いられるのは姉妹染色分体交換 (SCEs) 誘発性である。現在、私どもはこれら 5 種類の MSF-PCBs 同族体の SCEs 誘発性についても研究している。

## In Vitro における Polychlorinated Biphenyls(PCBs)および 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran(PCDF) 毒性軽減の検討 (第3報)

—細胞賦活剤および高脂血症用剤の細胞毒性に与える影響—

国立療養所菊池病院薬剤科

松 岡 一 忠

長崎大学医学部皮膚科学教室

塚 崎 直 子・吉 田 彦太郎

## In Vitro Analysis for Cellular Toxicity of Polychlorinated Biphenyls(PCBs) and 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran(PCDF) on HeLa Cell Proliferation(III)

—The Effect of Cytoactivator and Antilipemic Agents on Cell Toxicity—

Kazutada MATSUOKA

*Division of Pharmacology, National Kikuchi Hospital for Mental  
and Nervous Diseases, Kumamoto 861-11*

Naoko TSUKAZAKI 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 indicators of the optical density (280nm) which is total protein in HeLa cells. Furthermore, the reductive action of cytoactivator and antilipemic agents on the PCBs and PCDF toxicity were evaluated. The quantity of total cellular protein increased to 20% with the addition of sodium dextran sulfate (2.5%) at the presence of PCBs, and 25% in the case of PCDF. However, the slope of the curve of cell proliferation of HeLa cells at the presence of PCBs or PCDF became to overlap with a control group at the presence of any other drugs except for sodium dextran sulfate. These results mean that PCBs and PCDF cell toxicity were suppressed a little by sodium dextran sulfate, but the case of other cytoactivator and antilipemic agents did not.

### はじめに

In vitro で培養細胞に PCB 毒性が及ぼす影響を軽減させる薬剤の検索の指標には様々な方法<sup>1)~3)</sup>が考えられる。それらの方法のなかで細胞の蛋白量を指標にする手法が比較的簡便であるため多くの薬剤の検索には最適と思えたので、今回は対象の薬剤として細胞賦活剤の8種類と高脂血症用剤の8種類を用い、さらに難溶性薬剤の可溶化剤の試みも行ったので報告する。

### 実験の方法

#### 1) 使用薬剤

実験に使用した薬剤は、細胞賦活剤としてトラビジル(持田, 東京), マレイン酸シネバアジド(第一, 東京), イノシン(森下, 大阪), 塩酸インデロキサジン(山之内, 東京), 塩酸メクロフェノキサート(大日本, 大阪), ナパジル酸アクラトニウム(富山, 東京), ソルコセリル(大鵬, 東京), 塩酸ビフェメラン(藤沢, 大阪)および高脂血症用剤としてソイステロール(森下ルセル, 大阪), シンバスタチン(万有, 東

京), デキストラン硫酸ナトリウム (興和, 名古屋), ニコーモール (杏林, 東京), ベザフィブラート (キッセイ, 松本), クリノフィブラート (住友, 大阪), ポリエノスファチジルコリン (日本商事, 大阪), プロブコール (第一, 東京) の合計 16 種類を用いた。

## 2) PCB および PCDF

PCB は polychlorobiphenyl tetra (和光純薬, 大阪) を使用した。希釈は dimethylsulfoxide を 10% 含むリン酸緩衝液で行い, また 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。濃度は最終濃度を前者は 100  $\mu\text{g/ml}$ , 後者は 2 mM ですべて実施した。

## 3) 培養細胞

直径 5 cm の培養シャーレに  $2 \times 10^6$  個の HeLa 細胞を 10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培養液で 5% 炭酸培養器, 37°C で培養させた。単一層に増殖後 0.05% トリプシン溶液 (0.02% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムとリン酸緩衝液を含む, pH 8.0) で細胞を剥離させ以下の実験に用いた。

## 4) 培養細胞数の検討

上記細胞を 24 穴プレート (コーニング社製) に一穴当たり  $10^7$  個から 7 種類の 10 倍希釈溶液を作成し 7 日間培養した。0.1 M リン酸緩衝液で二度洗滌後 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を 1 ml 加え 10 分間放置し, 0.5 ml の上澄み液を静かに分取し分光光度計 (日立, U-3210) で 280 nm の吸光度を測定した。

## 5) 可溶化剤の検討

可溶化剤として Tween-20 (和光純薬, 大阪), Triton X-100, ケイツ注射液 (1 ml 中メナテトロン 10 mg, ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60.74 mg, プロピレングリコール 50 mg, ブドウ糖 50 mg, ゴマ油 6 mg, エーザイ, 東京), Nonidet-P 40 (和光純薬, 大阪) および  $\alpha$ -シクロデキストリン (和光純薬, 大阪) を用いた。これら可溶化剤自身の細胞に対する影響を検討する目的で HeLa 細胞に各種可溶化剤を各種濃度で加え doubling time を算出した。

## 6) 各種薬剤の至適濃度

細胞賦活剤は各種濃度の薬剤および HeLa 細胞 200 個を加えた培養液 (全量 0.2 ml) を 96 穴培養プレート中で 7 日間培養した。難溶性の薬剤は 10% DMSO 溶液で一昼夜抽出 (YAMATO SHAKER Model SA-31) 後最終濃度 1% DMSO として培養に使用した。その後培養細胞数の検討と同じ手法で吸光度を測定した。高脂血症用剤はデキストラン硫酸ナトリウムの場合は薬剤を粉碎化後 0.2 M リン酸緩衝液 (0.15 M NaCl 含

む, pH 7.4) に加えて薬剤の重量の 1% 溶液を調整した。一分間激しく振騰後 15,000 回転で 2 分間遠心分離を行い澄みきった層を薬剤の原液とした。また他の薬剤は粉碎化または油性の場合は注射器より採取しアセトンに溶解した。その後 10%  $\alpha$ -シクロデキストリン溶液を加えて室温で 3 時間激しく攪拌しさらに 40°C で 24 時間乾燥させた<sup>4)</sup>。つぎに上記高脂血症用剤の各種薬剤を含むシクロデキストリン複合体を様々な濃度に希釈して培養細胞に影響を及ぼさない濃度を求めた。

## 7) 各種薬剤と PCB および PCDF の培養細胞に及ぼす影響

96 穴培養プレートに 6) で検討した各種薬剤の培養細胞に影響を及ぼさない濃度より 10 倍濃い濃度から二段階希釈法にて希釈し PCB および PCDF のいずれかを加え HeLa 細胞 200 個および培養液を追加し全量を 200  $\mu\text{l}$  にして 7 日間培養後 280 nm の吸光度を測定した。

## 結 果

本実験に用いた HeLa 細胞は以前の報告<sup>1)</sup>と同様に doubling time が 1.2 日であった。細胞数の検討の結果は図 1 に示した。以後の実験では細胞数を 1 穴当たり 24 穴のプレートの場合は  $10^3$  個, 96 穴では 200 個とした。

細胞賦活剤自身の細胞毒性の検討の結果 (図 2) 吸光度 0.5 付近の値を示した薬剤の濃度を示した。高脂血症用剤の使用薬剤の一覧およびその薬剤の溶解性を図 3 に示した。8 種類の薬剤のうち 7 種類が難溶性であった。また可溶化剤の検討の結果を図 4 にそれぞれ

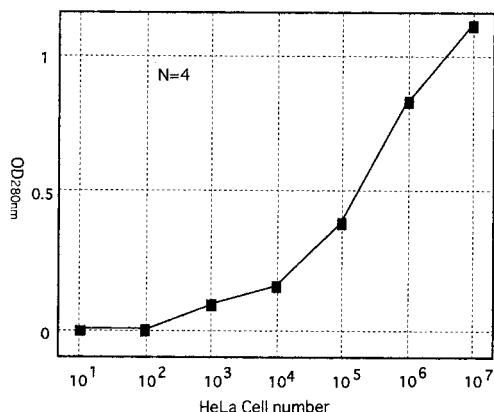


Fig. 1 Relationship between HeLa cell number and OD<sub>280nm</sub>

Fig 2 The reference of optimum concentrations on each drug

| Drugs                                   | The Ualue of OD 280 nm |      |      |      |      |      |
|-----------------------------------------|------------------------|------|------|------|------|------|
|                                         | 1 <sup>1)</sup>        | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |
| Trapodil (Mochida, Tokyo) <sup>2)</sup> | 0.00 <sup>3)</sup>     | 0.06 | 0.15 | 0.36 | 0.44 | 0.90 |
| Cimepazide Maleate (Daiichi, Tokyo)     | 0.34                   | 0.65 | 1.34 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| Inosine (Morishita, Osaka)              | 0.26                   | 0.57 | 1.23 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| Indeloxazine HCl (Yamanouchi, Tokyo)    | 0.00                   | 0.04 | 0.11 | 0.30 | 1.28 | 2.00 |
| Meclofenoxate HCl (Dainippon, Osaka)    | 0.11                   | 0.34 | 0.92 | 1.78 | 2.00 | 2.00 |
| Aclatonium napadisilate (Toyama, Tokyo) | 0.00                   | 0.00 | 0.20 | 0.76 | 1.39 | 2.00 |
| Solcoseryl (Taiho, Tokyo)               | 0.02                   | 0.10 | 0.10 | 0.43 | 0.87 | 1.54 |
| Bifemelane HCl (Fujisawa, Osaka)        | 0.00                   | 0.06 | 0.23 | 0.75 | 1.76 | 2.00 |

1): dilutions ( $\times 10^{-n}$ )

2): concentration is 1 mg/ml respectively except for Solcoseryl(%)

3): N=3

Fig 3 The List of Antilipemic Agents and its Solubiity

| Drugs                                            | Solubility     |
|--------------------------------------------------|----------------|
| Sodium Dextran Sulfate (Kowa, Nagoya)            | Soluble        |
| Probucol (Daiichi, Tokyo)                        | slight soluble |
| Clinofibrate (Sumitomo, Osaka)                   | slight soluble |
| Nicomol (Kyorin, Tokyo)                          | slight soluble |
| Bezafibrate (Kissei, Matsumoto)                  | slight soluble |
| Soystrol (Roussel Morishita, Osaka)              | slight soluble |
| Polyenephosphatidylcholine (Nippon shoji, Osaka) | slight soluble |
| Simvastatin (Banyu, Tokyo)                       | slight soluble |

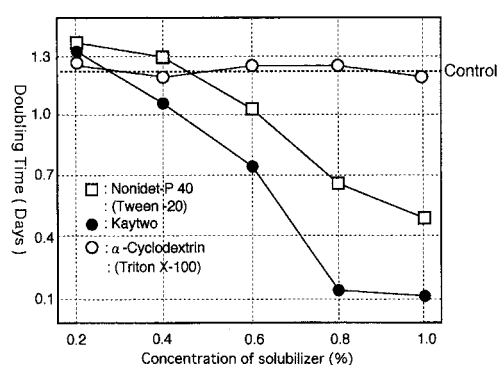


Fig. 4 The efficacy of solubilizer

示した。その結果ケイツー注射液は細胞毒性が強かったが $\alpha$ -シクロデキストリンとTriton X-100は対象群とほぼ同じような doubling time であり、細胞への影響はほとんど認められなかった。さらに Nonidet-P 40 と Tween-20 は前述の両者の可溶化剤の中間ほどに位置した。この結果より $\alpha$ -シクロデキストリン

および Triton X-100 が細胞への影響がほとんど無いことが判明した。つぎに Triton X-100 の可溶化の効果と $\alpha$ -シクロデキストリンの複合体形成<sup>5)</sup>を考慮した場合手法として後者は煩雑であるものの難溶性の物質に应用可能なので以後の実験では $\alpha$ -シクロデキストリンを使用した。次に薬剤の本実験系に影響を及ぼさない高脂血症用剤濃度の検討を行い1%の領域においてはいずれも培養細胞に影響がなかった。(図5)。

そこで各種薬剤に PCB または PCDF のいずれかを細胞とともに培養を行い図6に塩酸メクトフェノキサートと図7にデキストラン硫酸ナトリウムの例をそれぞれ示した。しかし上記2種以外の14種類の薬剤ではPCBなどによる細胞毒性の軽減は観察されなかった。

## か ん が え

今までわれわれは様々な角度から PCB などにより引き起こされた細胞毒性の軽減させるであろう薬剤の検索とその手法を検討してきた。培養細胞の数(コロニー数の計数)、細胞より分泌される蛋白(B型肝炎ウ

Fig 5 The efficacy of Antilipemic Agent

| Drugs                      | OD 280            |      |      |      |      |
|----------------------------|-------------------|------|------|------|------|
|                            | Concentrations(%) |      |      |      |      |
|                            | 2.0               | 1.5  | 1.0  | 0.5  | 0.1  |
| Sodium Dextran Sulfate     | 0.38              | 0.44 | 0.48 | 0.49 | 0.57 |
| Probucol                   | 0.43              | 0.48 | 0.49 | 0.53 | 0.57 |
| Clinofibrate               | 0.44              | 0.46 | 0.54 | 0.52 | 0.52 |
| Nicomol                    | 0.42              | 0.50 | 0.49 | 0.54 | 0.51 |
| Bezafibrate                | 0.24              | 0.30 | 0.46 | 0.41 | 0.50 |
| Soysterol                  | 0.51              | 0.45 | 0.44 | 0.50 | 0.48 |
| Polyenephosphatidylcholine | 0.40              | 0.38 | 0.41 | 0.45 | 0.52 |
| Simvastatin                | 0.37              | 0.39 | 0.43 | 0.58 | 0.55 |

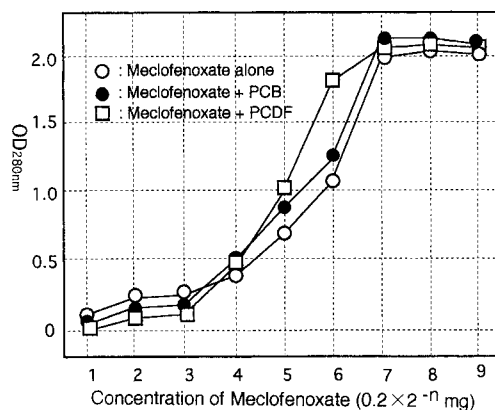


Fig. 6 The efficacy of PCB or PCDF to HeLa cells proliferation

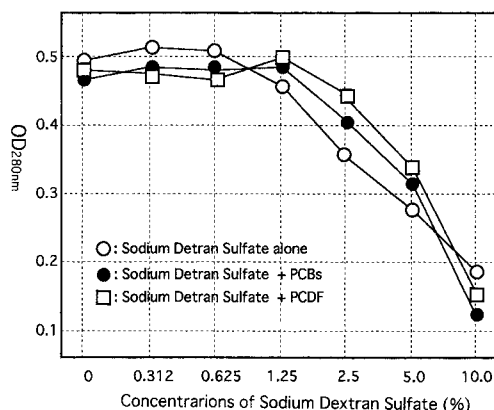


Fig. 7 The efficacy of Sodium Dextran Sulfate on PCBs or PCDF

ウイルス表面抗原), DNA 量 (Dot Hybridization) および RNA (PCR 法) などと各種指標を試みた。それぞれ一長一短があったが取り分け手技の煩雑さは否めなかった。今回細胞の蛋白量を測定する単純な方法を用いることにより本来の主目的であった多種類の薬剤のスクリーニングが比較的容易になった。

細胞賦活剤の 8 薬剤では中枢神経賦活作用<sup>6)</sup>や脳代謝促進作用<sup>7)</sup>として使用されている塩酸メクトフェノキサートが対象群よりわずかに細胞の増殖が見られた(図 6, 有意差は認められなかった)。高脂血症用剤の検討結果は図 7 に示したように唯一の水溶性薬剤であったデキストラン硫酸ナトリウムのみが対象群に比べて 2.5% の濃度領域で PCDF で 25%, また PCB で 20% と細胞賦活作用が観察された。従来デキストラン硫酸ナトリウムは抗高脂血症剤<sup>8)</sup>として使用されている薬剤であるが、その作用の一つとして抗脂血作用が

あげられコレステロールを低下させる報告<sup>9)</sup>では in vivo の実験で血清コレステロールのクリアランスの促進が証明されている。一方他の難溶性の高脂血症用薬剤はすべて無効であった。

可溶化剤の検討では  $\alpha$ -シクロデキストリンの複合体を作成することにより培養系にはほとんど影響を及ぼさないことが解った。薬剤が水溶性や難溶性などの性質には影響されず in vitro の実験が組めることは意義あるものと考えられたものの前処理の煩雑さは今後の課題であろう。

今回われわれの報告は in vitro の系でしかも対象の物質が PCB や PCDF であるので多少条件は異なるが効果の上からは同様な結果が得られた。今後もさらに他の種類の薬剤のスクリーニングを引き続き継続しより効果が期待される薬剤の検索をほぼ確立した本法を用いて実施したい。

## 文 献

- 1) 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 polychlorinated biphenyls (PCBs) 毒性の検討, 福岡医誌 78: 231-234, 1987.
- 2) 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: 232-239, 1991.
- 3) 松岡一忠, 野中薫雄, 大神太郎, 吉田彦太郎: In vitro における polychlorinated biphenyls(PCB)および 2, 3, 4, 7, 8-pentachloro-dibenzofuran(PCDF)の毒性軽減の検討 (第 2 報), 福岡医誌 84: 222-226, 1993.
- 4) Matsunaga H, Katano M, Yamamoto H, Fujito H, Mori M and Takata K: Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in Panax ginseng C. A. Mayer, Chem. Pharm. Bull. 38(12): 3480-3482, 1990.
- 5) Matsunaga H, Katano M, Tasaki M, Yamamoto H, Mori M and Takata K: Inhibitory effect of cis-dehydromatricaria ester isolated from *Solidago altissima* on the growth of mammalian cells, Chem. Pharm. Bull. 38(12): 3483-3484, 1990.
- 6) 安原基弘, 内藤博江, 伊勢森教子: Meclofenoxate hydrochloride の中枢神経作用機序に関する電気生理学的研究, 脳と神経, 26: 717-725, 1974.
- 7) Nickel J, Breyer U, Claver B und Quadbeck: Zur Wirkung von Aminoethanol-Derivaten auf das Zentralnervensystem, Arzneim.-Forsch. 21: 984, 1971.
- 8) 山田弘三, 葛谷文男: ヘパリン及びヘパリノイドの臨床応用, 最新医学, 17: 2605-2617, 1962.
- 9) 武内望: デキストラン硫酸の脱コレステロール作用に関する検討について, 基礎と臨床, 3(4): 221-226, 1969.

(受付 1995-3-24)

**皮脂, 血液中 Polychlorinated Biphenyls (PCBs),  
Polychlorinated Quaterphenyls (PCQs) 濃度の比較検討**  
—1992, 1993 年の比較—

長崎市立市民病院皮膚科

田 中 敬 一

長崎大学医学部皮膚科

塚 崎 直 子・吉 田 彦太郎

国立嬉野病院皮膚科

入 船 弘 子

大村市立市民病院皮膚科

渡 辺 雅 久

長崎県衛生公害研究所

谷 村 義 則

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

Keiichi TANAKA

*Division of Dermatology, Nagasaki Municipal Hospital, Nagasaki 850*

Naoko TSUKAZAKI and Hikotaro YOSHIDA

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

Hiroko IRIFUNE

*Division of Dermatology, Ureshino National Hospital, Saga 843-03*

Masahisa WATANABE

*Division of Dermatology, Ohmura City Hospital, Ohmura 856*

Yoshinori TANIMURA

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

**Abstract** The relationship between Polychlorinated Biphenyls (PCBs), and Polychlorinated Quaterphenyls (PCQs) concentrations in the skin surface lipids and blood was investigated in twenty two patients with PCB poisoning (Yusho) and 9 control subjects 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 as "the official standard analytical methods for the isolation of PCBs and PCQs fractions" was used. In the blood of control group, the mean value of PCBs concentration was 1.8 ng/g, and that of PCQs concentration was very low and undetectable by our analytical method. On the other hand, the PCBs concentration in the Yusho group was three times higher than those in the control group. The mean value of PCQs concentration was 1.90 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 668.6 ng/g, but was 256.7 ng/g in the control group. The mean value of PCQs concentration in the

skin surface lipids of Yusho patients was 35.4 ng/g, although it was not detected in the control group. These values of the skin surface lipids in 1993 were decreased as compared with those in 1992. PCBs and PCQs levels in the skin surface lipids were higher than those in the blood. These findings suggests that cutaneous sebaceous system is one of the excretory systems of polyhalogenated chemicals, such as PCBs or PCQs, when these chemicals are precipitated in human or mammalian.

### はじめに

われわれは1990年度, 1991年度, 1992年度の研究報告で, ①ほとんどすべての油症患者の皮脂中に

Polychlorinated Biphenyls (以下 PCBs) が検出されること, ②汚染地区以外に在住している健康人からも少量ながらも皮脂中に PCBs が検出されること, ③ Polychlorinated Quaterphenyls (以下 PCQs) も高頻

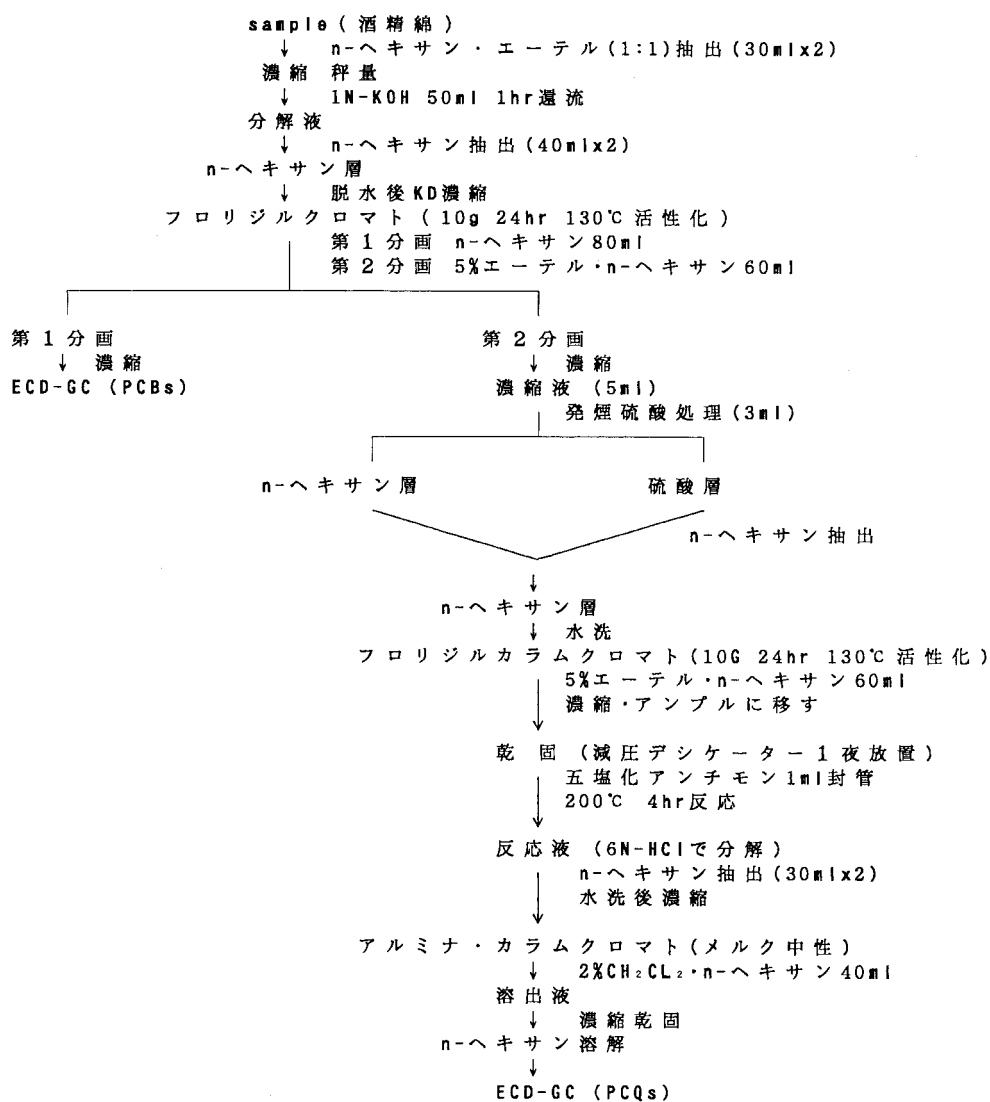


Fig.1 分析フローチャート (皮脂)



度に油症患者皮脂中に存在すること、などから、毛嚢脂腺系がこれら有機塩素化合物の排泄器官としての役割を担っている可能性を指摘してきた。今回(1993年度)の研究ではさらに同一患者を中心に症例の追加を試み、前年度(1992年)の結果と比較検討した。

#### 対象および方法

- 1) 対象：インフォームドコンセントの得られた五島奈留地区、玉之浦地区在住の油症患者22名、長崎市在住の健常者9名。
- 2) 皮脂の採取：前額部より大城<sup>9)</sup>の方法に準じて、70%アルコール綿で採取した。今回は採取時間を起床直後の洗顔前とし、皮脂の量をより多く採取するため3日間連続で行った。
- 3) 血液の採取：10 mlを肘静脈より採取した。
- 4) 測定方法：血液中のPCBs, PCQs濃度の測定は榎本ら<sup>2)</sup>の方法を用い、皮脂については浅田ら<sup>1)</sup>、力

岡ら<sup>10)</sup>が毛髪について記載した方法に準じて行った。測定方法のフローチャートをFig. 1に示す。

#### 結 果

表1に1992年度との比較を含め、1993年度のデータの概要を示す。Fig. 2, Fig. 3に各年度における個人値の変化を示す。

##### 1993年度

##### ① 油症患者

皮脂重量の平均は19.4 mg, PCBsは全22例で検出され、その濃度の平均は668.6 ng/gであった。PCQsは22例中8例(36.4%)で検出され、その平均は35.4 ng/gであった。血液中PCBsは全例で検出され、その濃度の平均は5.6 ng/g, PCQsは21例で検出され、平均は1.9 ng/gであった。

##### ② 健常者

皮脂重量の平均は72.1 mg, PCBsは9例中6例

表1 1992. 93年度油症患者皮脂, 血液中PCBs, PCQs濃度 (MEAN±SD)

| 年 度  | 人 数            | 皮脂重量<br>(mg) | 皮脂 (ng/g)     |             | 血液 (ng/g) |             |
|------|----------------|--------------|---------------|-------------|-----------|-------------|
|      |                |              | PCBs          | PCQs        | PCBs      | PCQs        |
| 1992 | 23(M/F = 14/9) | 6.9 ± 5.6    | 862.7 ± 462.5 | 53.4 ± 23.7 | 4.8 ± 2.5 | 0.57 ± 0.36 |
| 1993 | 22(M/F = 13/9) | 19.4 ± 14.7  | 668.6 ± 437.0 | 35.4 ± 13.3 | 5.6 ± 2.7 | 1.9 ± 1.4   |
| 健常者  |                |              |               |             |           |             |
| 1992 | 20(M/F = 18/2) | 14.7 ± 8.5   | 324.4 ± 103.6 | <10         | 2.1 ± 0.7 | <0.02       |
| 1993 | 9(M/F = 8/1)   | 72.1 ± 56.3  | 256.7 ± 99.1  | <10         | 1.8 ± 0.4 | <0.1        |

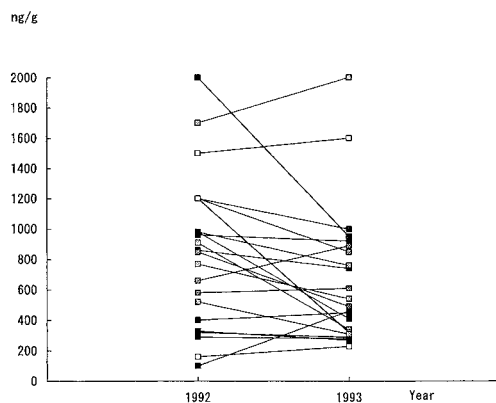


Fig. 2 PCBs concentration of skin surface lipids in individual Yusho patients in 1992 and 1993

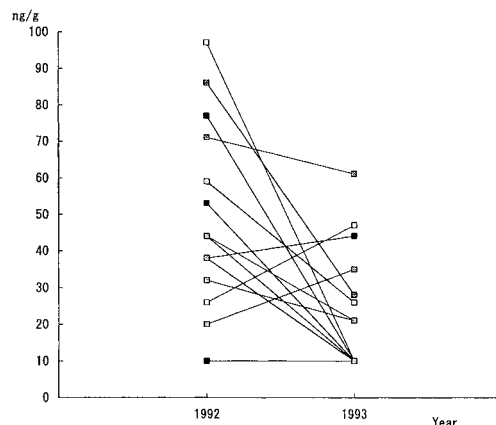


Fig. 3 PCQs concentration of skin surface lipids in individual Yusho patients in 1992 and 1993

(66.7%)で検出され、その平均は256.7 ng/g、PCQsは全例とも検出不能であった。血液中 PCBs は4例で検出され、その濃度の平均は1.8 ng/g、PCQs はすべて検出限界以下であった。

#### 1992 年度の結果

##### ① 油症患者

23 人の油症患者について検討した。皮脂重量の平均は6.9 mg、PCBs は22例に検出され、その濃度の平均は862.7 ng/gであった。PCQs は13例で検出され、その濃度の平均は53.4 ng/gであった。血液中 PCBs、PCQs は全例に検出され、その濃度の平均はPCBs 4.8 ng/g、PCQs 0.57 ng/gであった。

##### ② 健常者

長崎市在住の健常男性18名、女性2名をコントロールとした。皮脂重量の平均は14.7 mg、PCBs は18例で検出され、その濃度の平均は324.4 ng/g、PCQs は全例とも検出不能であった。血液中 PCBs は17例で検出され、その濃度の平均は2.1 ng/g、PCQs はすべて検出限界以下であった。

### 考 察

これまでにわれわれは油症患者の皮下脂肪組織中に多量の PCBs、PCQs が蓄積していること<sup>5)7)</sup>、また長崎県五島列島在住の健常人の皮下脂肪組織中にも PCBs 蓄積濃度が比較的高いこと<sup>4)6)</sup>、油症患者のみならず健常人の毛髪にも PCBs が存在すること<sup>3)6)</sup>、また油症患者の毛髪には PCQs が含まれていること<sup>4)</sup>などの成果を報告してきた。1993 年の Ohgami ら<sup>8)</sup>の報告とあわせ、さらに今回の結果から PCBs、PCQs は依然として経皮的に皮脂中に排泄されていることが明らかになった。蓄積したこれらの有機塩素化合物を積極的に体外に排泄させることが、油症治療の原則である。しかしながらこれまでは消化器系からの排泄促進、油症発症後しばらく用いられた絶食療法など以外に、いまだ満足いく方法は開発されていない。体内脂肪と強く結合している有機塩素化合物は、肺、消化管、毛髪、皮脂などを介して体外に排泄されると推測されている (Fig. 4)。このことはこれらの器官に積極的に働きかければ、それだけ排泄促進に役立つであろうと思われる。発毛促進あるいは発汗および皮脂の分泌を増大させれば、有機塩素化合物の排泄が促進させられると考えられる。油症患者に痤瘡様発疹、アテロームが多いのは、生体の防御反応のひとつかもしれない。

今回の測定では皮脂中の PCBs、PCQs をより正確に測定するために、できるだけ多くの皮脂を採取する

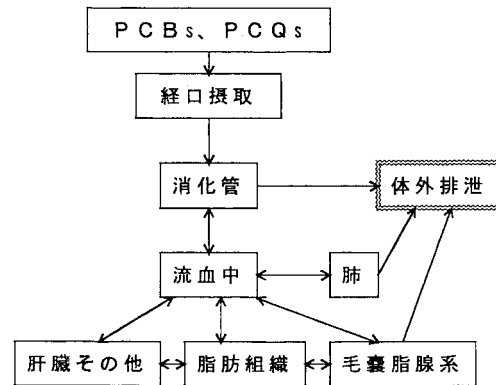


Fig. 4 摂取された PCBs、PCQs の運命？

目的で、3日間連続での皮脂の採取を行った。その結果、従来の一回皮脂採取法とほぼ同様の測定値が得られ、PCBs、PCQs はより正確な値が得られたものと思われた。また前年度 (1992 年) の結果と比較してみると、皮脂中の PCBs、PCQs はいずれも前年度より若干減少しているようである (Fig. 2, 3)。この変化が経時的なものかどうかは今後も同様の測定を行い、とくに同一症例についての経時的な検討が必要と思われた。

油症患者の皮脂中に PCQs 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 PCQs あるいは血中の PCQs が皮脂腺を介して体外へ排泄されていることが推察される。今回の結果からも毛嚢脂腺系からは依然として PCBs、PCQs が排泄されていることは明らかである。油症に対する有効な治療法に乏しい現在、今後もさらに皮脂の分泌機構の解明を進め、脂腺からの有機塩素化合物の排泄を亢進させる方法を検討していくことが必要と思われた。

### 参 考 文 献

- 1) 浅田要一郎, 馬場強三, 馬場 資: 19. PCB 汚染地区住民の毛髪中 PCB について. 長崎県衛生公害研究所報, 19: 100-101, 1978.
- 2) 櫻本 隆, 宮田秀明, 福島成彦, 国田信治: 油症患者と他の PCB 汚染者の残留塩素化合物の相異. 福岡医誌 72: 198-204, 1981.
- 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 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.
- 5) Ohgami T, Nonaka S, Watanabe M, Yamashita M, Murayama F, Yoshida H and Masuda N: PCB and PCQ concentrations in subcutaneous tissue from PCB poisoning (Yusho). *J Dermatol (Tokyo)* 14: 25-28, 1987.
- 6) Ohgami T, Nonaka S, Watanabe M, Yamashita K, Yoshida H and Rikioka Y: Regional differences of PCB and PCQ concentrations in the blood and subcutaneous fat tissue of residents of Nagasaki. *Fukuoka Acta Med* 80: 313-317, 1989.
- 7) 大神太郎, 野中薫雄, 吉田彦太郎, 村山史男, 山下和徳, 益田宣弘: 油症患者の血液および皮下脂肪組織中の polychlorinated biphenyls (PCB), polychlorinated quaterphenyls (PCQ) の濃度と性状について. *福岡医誌* 78(5): 337-342, 1987.
- 8) Ohgami T., Watanabe M, Tanaka K, Yoshida H, Nonaka S, Tsukazaki N and Rikioka Y: Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Quaterphenyls (PCQs) Concentrations in Skin Surface Lipids and Blood of Patients with Yusho. *Fukuoka Acta Med* 84: 212-216, 1993.
- 9) 大城善昇: 脂溶性環境汚染物質に関する皮脂を用いたヒューマンモニタリング法(1). *沖縄県公害衛生研究所報*, 23: 91-97, 1989.
- 10) 力岡有二, 馬場強三, 仁位敏明, 平山文俊: 毛髪中の PCB および PCQ について. *長崎県衛生公害研究所報*, 31: 127-129, 1988.

(受付 1995-3-24)

## Polychlorinated Biphenyls (PCBs) のポルフィリン代謝に 及ぼす影響

### —PCBs 1 回大量投与によるマウス実験的ポルフィリン症の検討—

長崎大学医学部皮膚科学教室

塚崎 直子・吉田 彦太郎

国立嬉野病院皮膚科

入 船 弘 子

大村市立病院皮膚科

渡 辺 雅 久

長崎市民病院皮膚科

田 中 敬 一

## Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on Porphyrin Metabolism —Experimental Porphyria Induced by Large Single Doses of PCBs—

Naoko TSUKAZAKI and Hikotaro YOSHIDA

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

Hiroko IRIFUNE

*Division of Dermatology, Ureshino National Hospital, Saga 843-03*

Masahisa WATANABE

*Division of Dermatology, Ohmura City Hospital, Ohmura 856*

Keiich TANAKA

*Division of Dermatology, Nagasaki Municipal Hospital, Nagasaki 850*

The effects of large single doses of PCBs and iron overload on porphyrin metabolism were investigated in male C57BL/6 mice. A single intraperitoneal dose of Kanechlor-500 (10 mg/mouse) caused urinary uroporphyrin to increase three days after injection. This increase was transient without porphyrin accumulation in the liver. Iron overload (12.5 mg/mouse) showed a tendency to prolong the action of PCBs.

### は じ め に

Polychlorinated biphenyls (PCBs) はニワトリ、ラット、ウサギにウロポルフィリンの尿中排泄、および肝臓への蓄積を中心とするポルフィリン代謝異常を惹起することが知られている<sup>2)4)11)</sup>。また、従来は PCBs による実験的ポルフィリン症は起こし得ないとされていたマウスについても C57BL/6 系マウスで同様の変化が確認されている<sup>6)</sup>。しかし、これらの報告のほと

んどでは PCBs は経口で持続的にあるいは皮下に頻回に投与されており、一回投与による影響の検討は少ない。一方、PCBs と類似のポルフィリン代謝異常を来す hexachlorobenzene (HCB)、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) は鉄によりその作用が増強されることが報告されている<sup>7)9)</sup>。今回は、比較的大量に一回投与した PCBs のポルフィリン代謝に及ぼす影響、および PCBs と鉄負荷の相互作用を検討するために以下の実験を行った。

## 実 験 方 法

**実験 1**：7 週齢，雄 C 57 BL/6 系マウス，5 匹を用いた。カネクロール KC-500 (ジーエルサイエンス株式会社，東京都)，10 mg/mouse を corn oil 0.2 ml に溶解し腹腔内注射し，3 日後および 1 週間後に尿中ポルフィリン体排泄パターンを high performance liquid chromatography (HPLC) 法により検討した。また 1 週後に屠殺し，肝臓，糞便，血液中のポルフィリン体を測定した。

**実験 2**：7 週齢，雄 C 57 BL/6 系マウス，20 匹を 4 群に分け，A 群；PCBs+鉄投与群，B 群；PCBs 単独投与群，C 群；鉄単独投与群，D 群；無処置対象群とした。A 群および B 群にはカネクロール KC-500，10 mg/mouse を，A 群および C 群にはシデフェロン (日本臓器製薬株式会社，大阪市) 0.5 ml (鉄として 12.5 mg)/mouse を各々腹腔内注射した。尿中ポルフィリン体を経時的に HPLC 法により測定し，また 5 週後に屠殺し，肝臓，糞便，血液中ポルフィリン体を定量し，群間比較を行った。

### ポルフィリン体測定法

#### (1) 尿中ポルフィリン体測定

マウス尿を 3000 rpm，20 分間遠心分離し，上清を 0.05% ヨウ素酢酸溶液と 1:1 に混合し攪拌したものを HPLC 用のサンプルとした。標準サンプルとしては PORPHYRIN PRODUCTS 社の porphyrin acid chromatographic marker kit を用いた。カラムは Waters  $\mu$ Bondasphere C 18 (3.9 mm x 15 cm) を用いた。分析条件は流速 1.0 ml/min，注入量は 20  $\mu$ l，移動相の組成および gradient は Table 1，2 に示し

Table 1 HPLC の移動相の組成

|     | 50mM酢酸アンモニウム | 氷酢酸   | アセトニトリル |
|-----|--------------|-------|---------|
| A 液 | 71.4 %       | 4.6 % | 24 %    |
| B 液 | 20.6 %       | 6.4 % | 73 %    |

Table 2 HPLC の移動相の gradient

| TIME (min) | % A | % B |
|------------|-----|-----|
| 0.0        | 100 | 0   |
| 30.0       | 0   | 100 |
| 45.0       | 100 | 0   |

た。検出には励起波長 404 nm，蛍光波長 620 nm を用いた。

#### (2) 肝臓，糞便中ポルフィリン体測定

実験動物はクロロホルム麻酔下で屠殺後，下大静脈より全採血を行い，その後，肝臓，および大腸，直腸内糞便を摘出し，ポルフィリン体測定用の試料とした。肝臓，糞便中のポルフィリン体は溶媒抽出法とクロマトグラフィー法を併用して測定<sup>10)</sup>した。

#### (3) 赤血球中ポルフィリン体測定

赤血球中のポルフィリンの定量は Sano ら<sup>5)</sup>の方法を変更した方法<sup>3)</sup>を用いて行った。

## 実 験 結 果

### (1) 実験 1

PCBs 投与前には検出されなかった尿中ウロポルフィリン (UP)，ヘプタカルボキシールポルフィリン (7-P) がカネクロール投与 3 日後よりすべてのマウスに出現し，UP/コプロポルフィリン (CP) 比の平均値は  $0.45 \pm 0.14$  ( $0.24 \sim 0.26$ ) であった。投与 7 日後には UP/CP 比は  $0.97 \pm 0.29$  ( $0.66 \sim 1.40$ ) とさらに増加した (Fig. 1)。7 日後の肝臓/体重比は  $10.46 \pm 0.38\%$  と著明に増加していたが，肝臓，糞便の UP は検出されず，その他のポルフィリン体および，血液中ポルフィリン体値の上昇は認められなかった。

### (2) 実験 2

投与 1 週間後，A 群および B 群のすべてのマウスに尿中 UP が出現したが，UP/CP 比に有意差はなかった。2 週後には A 群のうちの 3 匹，B 群のうちの 2 匹では UP が検出できなくなった。5 週後では，A 群では 5 匹中 3 匹でなお尿中 UP が認められたが，B 群で

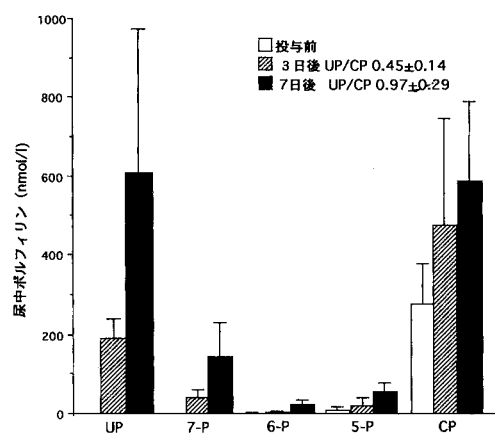


Fig. 1 PCBs 投与後の尿中ポルフィリン体の変動

**Table 3** 尿中 Uroporphyrin/Coproporphyrin 比の経時的変化  
(実験 2)

| group | treatment | mouse No. | Uroporphyrin/Coproporphyrin ratio |         |         |         |         |
|-------|-----------|-----------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|       |           |           | 1 week                            | 2 weeks | 3 weeks | 4 weeks | 5 weeks |
| A     | PCBs+Fe   | 1         | 0.43                              | 0.46    | *       | 0.36    | *       |
|       |           | 2         | 0.35                              | *       | *       | 0.31    | *       |
|       |           | 3         | 0.51                              | *       | *       | *       | 0.18    |
|       |           | 4         | 0.41                              | *       | 0.32    | *       | 0.24    |
|       |           | 5         | 0.90                              | 1.05    | 1.23    | 1.00    | 0.84    |
| B     | PCBs      | 1         | 1.35                              | 0.62    | 0.28    | 0.44    | *       |
|       |           | 2         | 0.22                              | 0.27    | *       | *       | *       |
|       |           | 3         | 0.32                              | *       | 0.03    | *       | *       |
|       |           | 4         | 0.29                              | *       | 0.09    | *       | *       |
|       |           | 5         | 0.43                              | 0.28    | *       | *       | 0.21    |
| C     | Fe        | 1         | *                                 | *       | *       | *       | *       |
|       |           | 2         | *                                 | *       | *       | ND      | *       |
|       |           | 3         | *                                 | *       | *       | ND      | *       |
|       |           | 4         | *                                 | 0.06    | 0.04    | *       | *       |
|       |           | 5         | *                                 | 0.05    | *       | *       | *       |
| D     | control   | 1         | *                                 | ND      | ND      | ND      | ND      |
|       |           | 2         | *                                 |         |         |         |         |
|       |           | 3         | *                                 |         |         |         |         |
|       |           | 4         | *                                 |         |         |         |         |
|       |           | 5         | *                                 |         |         |         |         |

\* ; uroporphyrin : trace

ND ; not done

は 1 匹に認められたのみであった。C 群では 2 週後と 3 週後に一部のマウスで UP のピークを認めたが UP/CP 比は低値であった (Table 3)。5 週後の肝/体重比は A 群, B 群で D 群より有意に上昇しており, また A 群は B 群より有意に高値であった。すべての群で肝臓, 糞便中に UP は認められなかったが, C 群では肝臓中 CP の軽度上昇および糞便中 CP, プロトポルフィリン (PP) の上昇を認めた (Table 4)。

### 考 察

PCBs 大量 1 回投与のポルフィリン代謝に及ぼす影

響について, Goldstein ら<sup>2)</sup> はラットに Alocor 1254, 1000 mg/kg を 1 回投与すると  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase (ALA-s) の上昇は来すが尿中ポルフィリン体の増加は認められなかったとしている。今回の実験では, C57 BL/6 系マウスにカネクロール 500, 約 500 mg/kg という大量の PCBs を 1 回投与することにより, 3 日後より尿に UP, 7-P の出現というポルフィリン排泄パターンの変化が生じることを確認することができた。この変化は軽度ではあるが過去のラット<sup>2)</sup>, 家兎<sup>4)</sup> における連続投与の結果とほぼ一致するものと思われる。また, この変化は投与 1 週目をピーク

Table 4 投与5週後の肝体重比および肝臓、糞便、赤血球中のポルフィリン体値 (実験2)

| Group | Treatment | Liver/Body weight ratio (%) | Liver (nmol/g.w.w.) |                     | Feces (nmol/g.w.w.)  |                      | Erythrocyte (ng/dl p.c.v.) |                      |
|-------|-----------|-----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|
|       |           |                             | CP                  | PP                  | CP                   | PP                   | CP                         | PP                   |
| A     | PCBs+Fe   | 6.95<br>±*<br>0.54          | 0.034<br>±<br>0.015 | 0.566<br>±<br>0.075 | 0.104<br>±<br>0.078  | 0.798<br>±<br>0.236  | 21.25<br>±<br>12.77        | 69.30<br>±<br>31.79  |
| B     | PCBs      | 5.88<br>±*<br>0.51          | 0.092<br>±<br>0.046 | 0.488<br>±<br>0.062 | 0.078<br>±<br>0.058  | 0.630<br>±<br>1.660  | 8.91<br>±<br>6.53          | 42.22<br>±<br>22.39  |
| C     | Fe        | 5.29<br>±<br>0.56           | 0.180<br>±<br>0.070 | 0.680<br>±<br>0.090 | 0.200<br>±*<br>0.160 | 1.230<br>±*<br>0.520 | 43.75<br>±<br>32.72        | 152.12<br>±<br>49.67 |
| D     | control   | 4.99<br>±<br>0.59           | 0.092<br>±<br>0.060 | 0.640<br>±<br>0.064 | 0.078<br>±<br>0.041  | 0.524<br>±<br>0.194  | 22.57<br>±<br>12.24        | 122.93<br>±<br>72.31 |

g.w.w.; gram wet weight

pcv; packed cell volume

CP; coproporphyrin

PP; protoporphyrin

\*: p&lt;0.05

としその後徐々に正常化していく傾向が認められ、肝臓へのポルフィリン体沈着は伴わなかった。SEKI ら<sup>8)</sup>はC57BL/6系マウスにPCBs含有飼料で飼育することにより肝臓へのUPの沈着, uroporphyrinogen decarboxylase (uro-D)の低下, およびALA-sの上昇をきたすことを報告している。肝臓へのポルフィリン体沈着や尿中UPの著明かつ持続的な増加を来すにはPCBsに一定期間連続的に曝露することが必要なのかもしれない。

PCBsと類似のポルフィリン代謝異常を来すhexachlorobenzen (HCB), 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)はC57BL/6あるいは10系マウスにおいて鉄負荷によりその作用が増強されることが報告されている<sup>7-9)</sup>。PCBsのポルフィリン代謝における鉄の影響については, Verneuil ら<sup>1)</sup>はニワトリの胚肝細胞にPCBsを添加して培養するとALA-sの増加, uro-Dの低下およびポルフィリンの蓄積を来すことを報告しているが, 鉄の添加はこの系に変化を与えず, キレート剤を添加するとポルフィリンの蓄積が減少するとしている。今回のわれわれの検討では1週後のUP/CP比に鉄負荷の影響は認められなかった。しかし, 投与5週後にPCBsと鉄を併用した群で半数以上のマウスになおUPの排泄がみられそのうちの1匹ではUP/CP比が比較的高いままであったことは興味深

いと思われる。Siersema<sup>7)</sup>らはC57BL/10系マウスにHCBと鉄の併用あるいは鉄の単独投与で尿中UPの増加や肝のuro-D抑制を来すことを確認しているが鉄のみを投与した場合, 尿中のUPが増加しはじめるのは9週後であるとしている。したがって鉄負荷の影響を確認するためにはもう少し長期の観察が必要であると考えられる。

## 文 献

- 1) De Verneuil H, Sassa S and Kappas A: Effects of polychlorinated biphenyl compounds, 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, phenobarbital and iron on hepatic uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. J* 214: 145-151, 1983
- 2) Goldstein JA, Hickman P and Jue DL: Experimental hepatic porphyria induced by polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol* 27: 437-448, 1974
- 3) Honda T, Nonaka S, Murayama F, Ohgami T, Simoyama T and Yoshida H: Effects of KC-400 (polychlorinated biphenyls) on porphyrin metabolism. *J Dermatol (Tokyo)* 10: 259-265, 1983
- 4) 三浦 創, 大森昭子, 加藤みさ子: PCBによる実験的ポルフィリア. *日衛誌* 28: 83, 1973
- 5) Sano S and Granick S: Mitochondrial coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrin formation. *J Biol Chem* 236: 1173-1180, 1961

- 6) Seki Y, Kawanishi and Sano S : Mechanism of PCB-induced porphyria and Yusho disease. Mechanisms of chemical-induced porphyriopathies. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 514. 222-234, New York. 1987
- 7) Siersema PD, Helvoirt RP, Ketelaars DAM, Cleton MI, De Bruijn WC, Wilson JHP and Van Eijk HG : Iron and uroporphyrin in hepatocytes of inbred mice in experimental porphyria : A biochemical and morphological study. Hepatology 14 : 1179-1188, 1991
- 8) Smith AG and Francis JE : Synergism of iron and hexachlorobenzene inhibits hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in inbred mice. Biochem. J 214 : 909-913, 1983
- 9) Sweeny GD, Lones KG, Cole FM, Basford D and Krestynski F : Iron deficiency prevents liver toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Science 204 : 332-335, 1979
- 10) 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
- 11) Vos JG and Koeman JH : Comparative toxicologic study with polychlorinated biphenyls in chicken with special references to porphyria. Toxicol Appl Pharmacol 17 : 656-668, 1970

(受付 1995-3-24)



## 食物繊維の PCB 吸着作用 —in vivo と in vitro の比較—

福岡県保健環境研究所

森田 邦正・濱村 研吾・飯田 隆雄

### Binding of PCB by Several Types of Dietary Fiber in vivo and in vitro

Kunimasa MORITA, Kengo HAMAMURA and Takao IIDA

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

We investigated the binding of PCB by dietary fiber in vivo and in vitro. Forty male rats consisting of four rats a group were housed and rats of each group were given a treatment diet containing rice-bran fiber, spinach fiber, burdock fiber, cabbage fiber, soybean fiber Japanese-radish fiber, carrot fiber, corn fiber and cellulose for five days. The remaining four rats were fed a non-fiber diet as controls. The animals were administered with 0.5 ml of the rice-bran oil used by Yusho patients and kept on the same diets for five days. Fecal excretion of PCB in the group fed rice-bran fiber and spinach fiber was significantly ( $p < 0.01$ ) stimulated 6.6 and 4.1 times, respectively, as compared with controls.

Dietary fiber was suspended in distilled water, and methanolic solution of PCB was added to these suspensions. The mixtures were then incubated. After centrifugation, the unbound PCB in supernatant was analyzed by gas chromatograph. Rice-bran fiber and spinach fiber bound more PCB than any of the other dietary fiber. A significant correlation existed between the amounts of binding PCB in vitro and fecal PCB output in rats by eight types of dietary fiber ( $r = 0.986$ ,  $p < 0.01$ ).

#### はじめに

精製された食品は未精製の食品と比べて、大腸がん発生のリスクが高くなるという仮説<sup>2)</sup>が1971年に提唱されて以来、栄養学的に不消化成分であると考えられていた食物繊維の生理的価値が注目されるようになってきた<sup>3)</sup>。食物繊維の化学的性質に発がん物質<sup>1)</sup>および変異原物質<sup>8)</sup>を吸着する作用や、胆汁酸塩<sup>10)14)</sup>と結合する作用がある。人による実験で、胆汁酸塩およびコレステロールの腸管吸収を抑制し、糞中排泄を増加させ、血清コレステロール値を下げる働きが認められている<sup>9)11)</sup>。食物繊維は生体防御、体調リズム調節、疾病の予防と回復等に係わる体調調整機能を持つ食品であることが認識されるようになり、日本においても1994年に食物繊維の摂取目標値として20-25g (10g/1000 kcal)がはじめて設定された<sup>3)</sup>。しかし、その生理作用はまだ完全には解明されていないのが現状である。そこで筆者らは8種類の食物繊維を製造し、in vivoで

のPCBの糞中排泄に及ぼす効果とin vitroでのPCB吸着について比較検討したので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試薬および材料

アミラーゼおよびパンクレアチンは天野製薬(株)製のアミラーゼAHアマノおよびパンクレアチンFを使用した。

ヘキサン、アセトン、クロロホルム、メタノール、無水硫酸ナトリウム、フロリジルは和光純薬工業(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。

ガラス繊維製円筒ろ紙はADVANTEC社製の86R, 33mm×120mmを使用した。

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工業(株)製を使用した。

原因ライス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 PCB が 780  $\mu\text{g}$  (853  $\mu\text{g/g}$ ) 含まれるものを使用した。

吸着試験に使用した 2, 4, 5, 2', 4', 5'-Hexachlorobiphenyl (2, 4, 5, 2', 4', 5'-H<sub>6</sub>CB), 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF) および 1, 2, 3, 4-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (1, 2, 3, 4-T<sub>4</sub>CDD) は第一薬科大学増田義人教授より供与された。

## 2. 装置

ガスクロマトグラフは島津製作所製の ECD 付き GC-7 AG 型を使用した。ガスクロマトグラフ条件は 1.5% OV-1 (chromosorb W, AW-DMCS, 80-100mesh) の充填剤を、2.1 m×2.6 mmφ のガラスカラムに充填し、カラム温度 205°C、検出器温度 300°C、窒素ガス流量 40 ml/分で測定した。

洗濯機は松下電気産業製の愛妻号 NA-F 45 Y 6 型と NA-F 50 L 1 型を使用した。

コーヒーマルはカリタ製のハイカットミルタテ型を使用した。

## 3. 食物繊維の製造法

米ぬか繊維の製造法を代表して示す。脱脂米ぬかを 24 mesh のステンレス製ふるいを用いて、モミガラなどを取り除いた後、横 26 cm、縦 54 cm の麻製の袋に 1.5 kg 詰め、その 2 袋を洗濯機で 6 回水洗した。水洗には水道水を用い、1 回的水洗時間は洗濯の 12 分、脱水 3 分とした。麻袋を 27 l のなべ 2 個にそれぞれ入れ、水約 10 l を加えて 1 時間加熱し、水洗を 9 回行った。米ぬかを麻袋からなべに移し、水道水 10 l、pH 7 の 0.2 M リン酸緩衝液 500 ml、アミラーゼ 30 ml を順次加え、90°C で 1 時間酵素処理した。約 45°C まで放冷後、4%水酸化ナトリウムで pH 8 に調整し、pH 8 の 0.2 M リン酸緩衝液 1 l、パンクレアチン 30 g を加え、45°C で 3 時間酵素処理した後、再度麻袋に詰め水洗を 6 回行った。これに水道水 5 l を加え、0.4 N 塩酸で pH 1.5 に調整し、約 30 分間放置した後 9 回水洗した。麻袋を熱風乾燥器に入れ、80°C で一夜加熱し大部分の水分を除き、2~3 倍容量のアセトンで 3 回、続いてヘキサンで 1 回それぞれ 5 分間超音波抽出法で脱脂した。風乾後、熱風乾燥器を用いて 80°C で一夜加熱し、室温まで放冷した後、コーヒーマルを使って粉砕し、米ぬか繊維を製造した。なお、脱水時のバランスをとるため、麻袋 2 袋を同時に洗濯水洗した。

ダイズ、コーンは水を加えて一夜湿潤し、おだやかに数時間加熱した。放冷した後、ミキサーで粉砕したものを麻袋に詰め、6 回水洗し、以下米ぬか繊維と同

じ操作を行った。

ホウレンソウ、ゴボウ、キャベツ、ダイコン (根)、ニンジン細かく切ってミキサーで粉砕したものを麻袋に詰め、6 回水洗し、以下、米ぬか繊維と同じ操作を行った。

## 4. 食物繊維の定量

食物繊維は Southgate 法<sup>15)</sup> に準じて、ヘミセルロース、セルロースおよびリグニンの 3 画分に分け、ヘキソースはアンスロン硫酸法<sup>4)</sup> によりグルコースとして、ペントースはオルシノール鉄塩酸法<sup>4)</sup> によりキシロースとして、ウロン酸はカルバゾール硫酸法<sup>4)</sup> によりガラクトuron酸として測定し、ヘミセルロースおよびセルロースを定量した。リグニン画分は 105°C で乾燥した後、525°C で灰化し、乾燥重量と灰化重量との差をリグニン量とした。

## 5. 実験動物

ラットは成実験動物(株)から 5 週齢の Wistar 系雄ラット (平均体重 126 g) を購入し、1 群 4 匹として 10 群に分け、Table 1 に示す食餌組成で 5 日間予備飼育した。ラットは代謝ケージに 1 匹ずつ入れ、飼料と水は自由に与えた。飼料を完全に摂取させるため一夜絶食させ、原因ライスオイル 0.5 ml を添加した各々の飼料 4 g を 1 回 4 時間投与し、引き続き、同じ飼料で 5 日間飼育した。糞は 70°C で一夜乾燥し重量を測定した。

Table 1 Composition of diet (g/100 g)

|                             | Non-fiber diet | Fiber diet |
|-----------------------------|----------------|------------|
| Dietary fiber <sup>1)</sup> | 0              | 10         |
| Sucrose                     | 70             | 60         |
| Casein                      | 20             | 20         |
| Corn oil                    | 5              | 5          |
| Mineral mixture             | 4              | 4          |
| Vitamine mixture            | 0.85           | 0.85       |
| Choline chloride            | 0.15           | 0.15       |

<sup>1)</sup>Rice-bran fiber, Spinach fiber, Burdock fiber, Cabbage fiber, Soybeans fiber, Japanese-radish fiber, Carrot fiber, Corn fiber, Cellulose

## 6. PCB の定量

糞はガラス繊維製円筒ろ紙に入れ、ソックスレー抽出器を用いて、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 150 ml で 10 時間抽出した。抽出液は約 5 ml まで濃縮した後、クロロホルムで 50 ml にした。クロロホルム抽

出液 1 ml を 10 ml のガラス製遠沈管にとり、窒素ガスでクロロホルムを除去した後、1 N 水酸化カリウムエタノール溶液 2 ml を加え、80°C で 1 時間アルカリ分解した。放冷後、水 1 ml、ヘキサン 2 ml を加え振とう抽出した後、2000 rpm で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層を分取した。さらに、ヘキサン 2 ml および 1 ml を用いて同様に抽出した。ヘキサン抽出液を合わせ、水 1 ml で洗った後、無水硫酸ナトリウム約 2.5 g で脱水した。ヘキサン抽出液は約 1 ml まで濃縮し、あらかじめヘキサン 10 ml を流した 0.6 g のフロリジルカラムに注入し、ヘキサン 6 ml で PCB を溶出させた。溶出液は乾固し、ヘキサンを加えて 2 ml とし、硫酸 0.5 ml で洗った後、PCB をガスクロマトグラフで係数法を用いて定量した。

#### 7. in vitro 吸着試験

食物繊維 30.0 mg を 10 ml のガラス製遠沈管にとり、水 3 ml を加え湿潤した後、0.4 µg/ml の 2, 4, 5, 2', 4', 5'-H<sub>6</sub>CB メタノール溶液 3 ml を加え、37°C で 30 分間インキュベート後、2500 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄液 2 ml をとり、これに 2% 硫酸ナトリウム溶液 2 ml およびヘキサン 4 ml を加え、振とう抽出した。ヘキサン抽出液は硫酸で 1 回洗った後、ガスクロマトグラフで未吸着の 2, 4, 5, 2', 4', 5'-H<sub>6</sub>CB を定量した。2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF および 1, 2, 3, 4-T<sub>4</sub>CDD についても同様に操作した。

#### 8. 統計処理

各々の食物繊維間の平均値の差の検定は Student-t テストによって、危険率 1% 以下をもって有意とした。

### 結果および考察

#### 1. 食物繊維の組成

8 種類の食品素材から製造した食物繊維の組成を Table 2 に示す。食物繊維の含量はいずれも 85% 以上含まれ、本法により、比較的容易に高純度の精製繊維

を製造することができた。食物繊維を構成するヘミセルロース、セルロース、リグニンの比率はそれぞれの食物繊維によって差が認められた。とくに、リグニンは米ぬか繊維、ゴボウ繊維およびハウレンソウ繊維に比較的多く含まれていた。

#### 2. PCB の糞中排泄に及ぼす効果

Table 3 に示すように、食物繊維を配合した飼料に原因ライスオイルを添加して投与すると、5 日間の PCB の糞中排泄量は Non-fiber 食が 6.7 µg であったのに対して、米ぬか 44.3 µg、ハウレンソウ 27.7 µg、ゴボウ 19.1 µg、キャベツ 12.1 µg、ダイズ 10.4 µg、ダイコン 12.3 µg、ニンジン 8.6 µg およびコーン繊維が 10.9 µg、セルロースが 9.9 µg になり、食物繊維投与群は Non-fiber 食と比べて PCB 排泄量がいずれも増加した。その排泄増加を米ぬか、ハウレンソウ、ゴボウ、キャベツ、ダイズ、ダイコン、ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれ Non-fiber 食の 6.6, 4.1, 2.8, 1.8, 1.6, 1.8, 1.3, 1.6 倍であり、セルロースのそれぞれ 4.5, 2.8, 1.9, 1.2, 1.1, 1.2, 0.9, 1.1 倍になった。食品素材の違いによって異なる排泄効果がみられた。とくに、米ぬかおよびハウレンソウ繊維は Non-fiber 食に対して顕著な排泄増加を示し (P<0.01)、その他の 6 種類の繊維の平均排泄量と比べてもそれぞれ 3.6, 2.3 倍とかなりの増加がみられた。先に筆者らは 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF の体外排泄についてラットを使って検討を行い、米ぬか繊維はセルロースと比べて 4.5 倍、ゴボウ、コーン、ダイズ繊維と比べて 2.5 倍の高い糞中排泄効果があることを明らかにした<sup>13)</sup>。さらに今回の実験において米ぬか繊維には、PCDF と同様、有効な PCB の吸着作用が認められた。

5 日間の乾燥糞量および脂質排泄量を Table 3 に示した。8 種類の食物繊維投与群の糞重量は Non-fiber 食と比べて 5.7~7.8 倍の増加を示したが、糞重量と PCB 排泄量との間に有意な相関はみられなかつ

Table 2 Composition of dietary fiber (g/100 g)

|                       | Dietary fiber | Hemicellulose | Cellulose | Lignin | Water |
|-----------------------|---------------|---------------|-----------|--------|-------|
| Rice-bran fiber       | 85.4          | 43.2          | 23.5      | 18.7   | 1.1   |
| Spinach fiber         | 85.6          | 42.7          | 33.8      | 9.1    | 0.6   |
| Burdock fiber         | 90.8          | 20.6          | 54.9      | 15.3   | 1.1   |
| Cabbage fiber         | 94.7          | 45.4          | 45.2      | 4.1    | 0.4   |
| Soybeans fiber        | 85.9          | 38.2          | 45.5      | 2.2    | 6.3   |
| Japanese-radish fiber | 92.8          | 28.6          | 56.4      | 7.8    | 0.7   |
| Carrot fiber          | 95.2          | 34.5          | 58.2      | 2.5    | 0.5   |
| Corn fiber            | 86.4          | 65.2          | 18.3      | 2.9    | 2.6   |

**Table 3** Effect of diets on fecal excretion of PCB and fecal data in rats

| Diet                  | PCB in feces<br>( $\mu\text{g}/5$ days) | Feces<br>(g/5 days)               | Fat in feces<br>(mg/5 days)      |
|-----------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Non-fiber             | 6.7 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup> (1.0)        | 1.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> (1.0)  | 189 $\pm$ 42 <sup>b</sup> (1.0)  |
| Cellulose             | 9.9 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup> (1.5)        | 10.1 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup> (7.7) | 530 $\pm$ 38 <sup>ab</sup> (2.8) |
| Rice-bran fiber       | 44.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup> (6.6)       | 8.7 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup> (6.6)  | 869 $\pm$ 114 <sup>a</sup> (4.6) |
| Spinach fiber         | 27.7 $\pm$ 5.2 <sup>ab</sup> (4.1)      | 7.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup> (5.7)  | 832 $\pm$ 74 <sup>a</sup> (4.4)  |
| Burdock fiber         | 19.1 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup> (2.8)      | 10.2 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup> (7.8) | 515 $\pm$ 98 <sup>ab</sup> (2.7) |
| Cabbage fiber         | 12.1 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup> (1.8)       | 8.2 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup> (6.2)  | 383 $\pm$ 47 <sup>ab</sup> (2.0) |
| Soybeans fiber        | 10.4 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup> (1.6)       | 7.4 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup> (5.7)  | 392 $\pm$ 96 <sup>ab</sup> (2.1) |
| Japanese-radish fiber | 12.3 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup> (1.8)       | 8.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup> (6.5)  | 359 $\pm$ 129 <sup>b</sup> (1.9) |
| Carrot fiber          | 8.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup> (1.3)        | 8.6 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup> (6.6)  | 356 $\pm$ 56 <sup>ab</sup> (1.9) |
| Corn fiber            | 10.9 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup> (1.6)       | 9.1 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup> (6.9)  | 493 $\pm$ 82 <sup>ab</sup> (2.6) |

Values represent the mean $\pm$ SD for four rats, and numbers in parenthesis show ratio to a non-fiber group.

a Significantly different from a non-fiber group,  $p<0.01$ .

b Significantly different from a rice-bran fiber group,  $p<0.01$ .

**Table 4** Binding of PCB, PCDF and PCDD in vitro by eight types of dietary fiber

|                       | 2, 4, 5, 2', 4', 5'-H <sub>6</sub> CB<br>Bound (%) | 2, 3, 5, 4, 7, 8-P <sub>5</sub> CDF<br>Bound (%) | 1, 2, 3, 4-T <sub>4</sub> CDD<br>Bound (%) |
|-----------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Rice-bran fiber       | 85.9*                                              | 90.0                                             | 83.8                                       |
| Spinach fiber         | 64.7                                               | 81.2                                             | 68.9                                       |
| Burdock fiber         | 45.2                                               | 65.4                                             | 50.8                                       |
| Cabbage fiber         | 44.2                                               | 63.0                                             | 50.2                                       |
| Soybeans fiber        | 38.7                                               | 56.8                                             | 51.9                                       |
| Japanese-radish fiber | 38.2                                               | 56.2                                             | 40.1                                       |
| Carrot fiber          | 36.2                                               | 44.3                                             | 35.7                                       |
| Corn fiber            | 35.2                                               | 45.0                                             | 36.5                                       |

\* Percent bound; 30 mg of each substance was incubated for 30 min. at 37°C with 3 ml of distilled water and 0.4 ppm PCB in 3 ml methanolic solution.

た、糞中の脂質排泄量は食物繊維を投与することによりかなり増加がみられ、脂質排泄量が多い食物繊維はPCB排泄量も多くなる傾向を示し、両者の間には有意な相関が認められた ( $r=0.888$ ,  $p<0.01$ )。このことから、食物繊維は腸管腔に排出された脂溶性成分の再吸収と食物に含まれる脂質成分の吸収に変化を与えていることが示唆される。しかし、セルロースのPCB排泄量は脂質排泄量がほぼ同量であったゴボウ繊維と比べると有意な低下がみられ、必ずしも、PCB排泄量と脂質排泄量は一定した傾向を示さなかった。

PCB投与量 (390  $\mu\text{g}$ ) に対して5日間のその排泄量はNon-fiber食1.7%, セルロース2.5%, 米ぬか11.4%, ホウレンソウ7.1%, ゴボウ4.9%, キャベツ3.1

%, ダイズ2.7%, ダイコン3.1%, ニンジン2.2%およびコーン繊維が2.8%であった。これを未吸収分と考えると、ほとんど大部分のPCBが吸収されていた。

### 3. 食物繊維へのin vitro吸着

2, 4, 5, 2', 4', 5'-H<sub>6</sub>CBと2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDFは患者および健常者の体内に残留していることが知られているPCBおよびPCDF同族体の1つである<sup>7)12)</sup>。この2種類の化合物と1, 2, 3, 4-T<sub>4</sub>CDDを用いて、なるべく水系に近い状態で溶けるように水・メタノール (1:1) 溶液でin vitro吸着試験を行った。その結果、米ぬかおよびホウレンソウ繊維は他の6種類の食物繊維と比べてきわめて良好な吸着効果が認められた (Table 4)。それぞれの吸着率について2, 4, 5, 2', 4', 5'-H<sub>6</sub>CB,

2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF および 1, 2, 3, 4-T<sub>4</sub>CDD を比較した場合、2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF は他の 2 種類より若干吸着率が高い値であったが、それぞれの食物繊維に対する吸着率の強弱の傾向はほぼ一定していた。したがって、PCB, PCDF および PCDD 同族体に対する食物繊維の吸着作用の強弱の判定は 3 種類の化合物の内いずれを用いても可能であると考えられた。

Table 2 に示した食物繊維の組成との関連でみると、リグニン含量の多い食物繊維ほど 2, 4, 5, 2', 4', 5'-H<sub>6</sub>CB, 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF および 1, 2, 3, 4-T<sub>4</sub>CDD の吸着率が高い傾向を示した ( $p < 0.01$ )。しかし、ハウレンソウ繊維はゴボウ繊維と比べて吸着率は高かったがリグニンは多くはなかった。この原因として、変異原物質を吸着する性質があり、緑色野菜に存在するクロロフィルがハウレンソウ繊維に含まれ、吸着に関与したのかもしれない<sup>6)</sup>。

PCB の糞中排泄量と 2, 4, 5, 2', 4', 5'-H<sub>6</sub>CB の in vitro 吸着率との関係をみてみると、in vitro 吸着率の高い食物繊維ほど PCB の糞中排泄量が多くなる傾向が認められ、両者の間には有意な正の相関関係が認められた ( $r = 0.986$ ,  $P < 0.01$ )。したがって、この結果は食物繊維の in vitro 吸着作用から in vivo における PCB, PCDF および PCDD の糞中排泄に及ぼす効果を推測することが可能であることを示している。

## 総 括

8 種類の食物繊維を製造して、PCB の in vitro 吸着作用と PCB の糞中排泄に及ぼす効果について検討した。

1) 2 種類の酵素を使った食物繊維の製造法により、米ぬかおよびハウレンソウなどの野菜類から比較的容易に 85% 以上の高純度の精製繊維を製造することができた。

2) 米ぬかおよびハウレンソウ繊維は Non-fiber 食と比べて、それぞれ 6.6 倍、4.1 倍の顕著な PCB 排泄増加がみられ、米ぬかおよびハウレンソウ繊維はゴボウ、キャベツ、ダイズ、ダイコン、ニンジンおよびコーンの 6 種類の繊維の平均排泄量と比べてもそれぞれ 3.6, 2.3 倍とかなりの増加を示し、消化管腔内における PCB 吸着作用の有効性が認められた。

3) 米ぬか繊維は他の食物繊維と比べて多くの 2, 4, 5, 2', 4', 5'-H<sub>6</sub>CB, 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF および 1, 2, 3, 4-T<sub>4</sub>CDD を in vitro 吸着し、それぞれ、吸着率は 85.9, 90.0, 83.8% であった。続いて、ハウレンソウ繊維に比較的良好な吸着がみられた。また、リグニン

含量の高い食物繊維ほど吸着率が高い傾向を示した。

4) in vitro 吸着効果の高い食物繊維ほど PCB の糞中排泄量が多い傾向が認められ、両者の間に有意な正の相関関係が認められた ( $r = 0.986$ ,  $P < 0.01$ )。この結果は食物繊維の in vitro 吸着作用から in vivo における PCB, PCDF および PCDD の糞中排泄に及ぼす効果を推測することが可能であることを示している。

2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF などの試薬を供与していただきました増田義人教授（第一薬大）に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Barbaro PS, Hanson D and Reddy BS: Carcinogen binding to various types of dietary fiber. JNCI. 67: 495-497, 1981.
- 2) Burkitt DP: Cancer 28: 3-13, 1971.
- 3) 第 5 次改訂日本人の栄養所要量: 厚生省保健医療局健康増進栄養課監修, 第一出版, 1994.
- 4) 福井作蔵: 還元糖の定量法 (生物化学実験法), 東京大学出版会, 1969.
- 5) がん予防と食生活: 厚生省公衆衛生局栄養課編, 日本栄養食品協会, 1983.
- 6) 早津彦哉, 有元佐賀恵, 根岸友恵: ヒトが暴露される環境変異原とその抑制因子ーボルフィリンによる多環性発がん物質の捕捉, 環境変異原研究, 15: 195-201, 1993.
- 7) 飯田隆雄, 中川礼子, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克巳: 油症患者および健康者の皮下脂肪中の Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs). 福岡医誌, 80: 296-301, 1989.
- 8) Kada T, Kato M, Aikawa K and Kiriya S: Adsorption of pyrolysate mutagens by vegetable fibers. Mutation Res. 141: 149-152, 1984.
- 9) Kesaniemi YA, Tarpila S and Miettinen TA: Low vs high dietary fiber and serum, biliary, and fecal lipids in middle-aged men. Am. J. Clin. Nutr. 51: 1007-1012, 1990.
- 10) Kritchevsky D and Story JA: Binding of bile salts in vitro by nonnutritive fiber. J. Nutr. 104: 458-462, 1974.
- 11) Lampe JW, Slavin JL, Baglien KS, Thompson WO, Duane WC and Zavoral JH: Serum lipid and fecal bile acid changes with cereal, vegetable, and sugar-beet fiber feeding. Am. J. Clin. Nutr. 53: 1235-1241, 1991.
- 12) 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.
- 13) 森田邦正, 平川博仙, 松枝隆彦, 飯田隆雄, 常盤寛: ラットにおける食物繊維の PCDF および PCDD 排泄促進効果, 福岡医誌, 84: 273-281, 1993.
- 14) Story JA and Kritchevsky D: Comparison

of the binding of various bile acids and bile salts in vitro by several types of fiber. J. Nutr. 106 : 1292-1294, 1976.

15) Southgate D. A. T. : Determination of

carbohydrates in foods. II. Unavailable carbohydrates. J. Sci. Food Agric., 20 : 331-335, 1969.

(受付 1995-3-27)

## PCDF の糞中排泄および肝臓分布に対する食物繊維の効果

福岡県保健環境研究所

森田 邦正・松枝 隆彦・飯田 隆雄

### Effect of Dietary Fiber on Fecal Excretion and Liver Distribution of PCDF in Rats

Kunimasa MORITA, Takahiko MATSUEDA and Takao IIDA

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

Forty male rats (126 g body weight) consisting of four rats a group were housed and rats of each group were given a treatment diets containing cellulose, rice-bran fiber, spinach fiber, burdock fiber, cabbage fiber, soybean fiber, Japanese-radish fiber, carrot fiber and corn fiber for five days. The remaining four rats were fed a non-fiber diet as controls. The animals were orally administered with 0.5 ml of the rice-bran oil used by Yusho patients and kept on the same diets for five days. The rice-bran oil was contaminated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (2, 3, 7, 8- $T_4$ CDF, 458.7 ng/ml), 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (2, 3, 4, 7, 8- $P_5$ CDF, 802.4 ng/ml) and 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran (1, 2, 3, 4, 7, 8- $H_6$ CDF, 752.3 ng/ml). PCDF in feces and liver were analyzed by high resolution gas chromatography-mass spectrometry. The fecal excretion of 2, 3, 7, 8- $T_4$ CDF in the group fed rice-bran fiber and spinach fiber was significantly ( $p < 0.01$ ) stimulated 11.3 and 6.8 times, respectively, as compared with controls. Moreover, 2, 3, 4, 7, 8- $P_5$ CDF and 1, 2, 3, 4, 7, 8- $H_6$ CDF were excreted in stool at the rate of 4.1 and 3.4 times, respectively and 2.1 and 2.2 times, respectively, as compared with controls. These results suggest that administration of dietary fiber is useful for a new approach to therapy of Yusho patients.

### はじめに

1968年に発生したカネミ油症の原因ラシスオイル中には Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated quaterphenyls (PCQ) のほかに、微量の Polychlorinated dibenzofurans (PCDF), Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) の混入が認められている<sup>3)10)</sup>。油症の主要な原因物質と考えられている PCDF 同族体の中で、2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran (2, 3, 4, 7, 8- $P_5$ CDF) は、代謝されにくく、組織残留性がきわめて高いため、発症後 20 数年経過した患者体内に微量であるが存在している<sup>1)3)6)</sup>。また、2, 3, 4, 7, 8- $P_5$ CDF は一般家庭ゴミおよび産業廃棄物の焼却場などから発生し、さらに汚染された食物を通じて<sup>7)</sup>、一般健常者の皮下脂肪中にも ppt レベルの蓄積が認められている環境汚染物質でもある<sup>1)</sup>。PCB は吸収された後、胆汁を経由することなく小腸の管壁から管腔へ排出され、糞便を通じて排泄される経

路が存在することが指摘されたことから<sup>12)</sup>、腸管内で PCB および PCDF の再吸収をおさえ、効率よく体外へ排除するという基本的な考えをもとに、数種類の排泄促進剤が検討された<sup>11)</sup>。われわれは原因ラシスオイルを投与したラットに食物繊維を与え、食物繊維が PCDF の糞中排泄に及ぼす影響を調べた。その結果、米ぬか繊維はセルロースと比べて 4.5 倍、ゴボウ、コーン、ダイズ繊維と比べて 2.5 倍、消化管腔内に排出された 2, 3, 4, 7, 8- $P_5$ CDF の排泄を促進することを明らかにした<sup>8)</sup>。患者の治療と健康の維持、向上をはかるうえで、PCDF の排泄に有効な食物繊維あるいはその食物繊維の素材となる食品を摂取することは大切なことと考える。しかし、玄米あるいは胚芽米は食べられているが、米ぬかそのものを食することは困難である。そこで筆者らは、日常摂取している食品の中から米ぬかと同様な効果のあるものを探索するため、国民栄養調査成績<sup>9)</sup>から比較的摂取量の多いハウレンソウ、ゴボウ、キャベツ、ダイズ、ダイコン、ニンジンおよび

コーンを選び PCDF の糞中排泄について検討を行った。

## 実験方法

### 1. 実験材料

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、フロリジルは和光純薬㈱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。

原因ライス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 PCB が 780  $\mu\text{g}$  (853  $\mu\text{g/g}$ )、PCDF が 9.3  $\mu\text{g}$  (10.2  $\mu\text{g/g}$ ) を含む米ぬか油を使用した。主な PCDF 同族体の濃度を Table 1 に示した。

食物繊維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、85%以上の純度の米ぬか、ハウレンソウ、ゴボウ、キャベツ、ダイズ、ダイコン、ニンジンおよびコーン繊維を製造した<sup>9)</sup>。

ラットは成和実験動物㈱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㈱製を使用した。

### 2. 動物実験

体重約 126 g (5 週齢) のウイスター系雄ラットを、1 群 4 匹として 10 群に分け、Table 2 に示す食餌組成の飼料で 5 日間予備飼育した。一夜絶食させた後、飼料 4 g に原因ライスオイル 0.5 ml を添加して投与し、引き続き、同じ飼料で 5 日間飼育した。PCDF の総投与量は 37  $\mu\text{g/kg}$  であり、このうち 2, 3, 7, 8- $\text{T}_4\text{CDF}$

は 1.8  $\mu\text{g/kg}$ 、2, 3, 4, 7, 8- $\text{P}_5\text{CDF}$  は 3.2  $\mu\text{g/kg}$  に相当する。ラットは代謝ゲージに 1 匹ずつ入れ、食餌と水は自由に与えた。肝臓は生理食塩水で十分洗浄して血液を除いた。糞は 70°C で一夜乾燥し重量を秤量した。

### 3. 糞および肝臓中の PCDF の定量

糞はソックスレー抽出器を用いて、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 150 ml で 10 時間抽出した。抽出液は約 5 ml まで濃縮し、クロロホルムで 50 ml にした。肝臓はメタノール 32 ml、クロロホルム 16 ml を加え、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジネートした後、クロロホルム 16 ml を加え再度ホモジネートし、水 16 ml を加えて吸引ろ過した。さらに、残さにクロロホルム 30 ml を加えホモジネートした後、吸引ろ過した。クロロホルム層を分取し無水硫酸ナトリウムで脱水後、約 30 ml まで濃縮し、クロロホルムで 50 ml にした。糞の抽出液 4 ml および肝臓の抽出液 8 ml をそれぞれ 10 ml の試験管にとり、窒素ガスでクロロホルムを除去後、ヘキサン 1 ml を加えた。これに安定同位体である  $^{13}\text{C}$ -2, 3, 4, 7, 8- $\text{P}_5\text{CDF}$  を 720 pg,  $^{13}\text{C}$ -2, 4, 6, 7- $\text{T}_4\text{CDF}$ ,  $^{13}\text{C}$ -1, 2, 3, 7, 8- $\text{P}_5\text{CDF}$ ,  $^{13}\text{C}$ -1, 2, 3, 4, 7, 8- $\text{H}_6\text{CDF}$  および  $^{13}\text{C}$ -1, 2, 3, 4, 6, 7, 8- $\text{H}_7\text{CDF}$  をそれぞれ 500 pg,  $^{13}\text{C}$ - $\text{O}_8\text{CDD}$  を 1000 pg 内標準物質として添加し、1 N 水酸化カリウムエタノール溶液 1 ml を加え室温で一夜アルカリ分解した。ヘキサン 2 ml、水 0.5 ml を加え振とうし、水層を除去した後、さらにヘキサン層を水 1 ml で洗浄後、濃硫酸 2 ml で 5 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 6 ml で溶出した後 1 ml に濃縮した。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 を溶出した。溶出液は乾固し、ヘキサン 1

Table 1 Concentrations of PCDF in the rice-bran oil used by Yusho patients

|                                             | ng/g  | ng/ml |
|---------------------------------------------|-------|-------|
| 2, 3, 7, 8- $\text{T}_4\text{CDF}$          | 501.6 | 458.7 |
| 2, 3, 6, 8- $\text{T}_4\text{CDF}$          | 191.4 | 175.1 |
| 1, 2, 4, 7, 8- $\text{P}_5\text{CDF}$       | 459.3 | 420.0 |
| 2, 3, 4, 7, 8- $\text{P}_5\text{CDF}$       | 877.4 | 802.4 |
| 1, 2, 3, 4, 6, 8- $\text{H}_6\text{CDF}$    | 109.8 | 100.4 |
| 1, 2, 4, 6, 7, 8- $\text{H}_6\text{CDF}$    | 163.2 | 149.2 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9- $\text{H}_6\text{CDF}$    | 11.9  | 10.9  |
| 2, 3, 4, 6, 7, 8- $\text{H}_6\text{CDF}$    | 224.3 | 205.1 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8- $\text{H}_6\text{CDF}$    | 822.6 | 752.3 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8- $\text{H}_6\text{CDF}$    | 128.9 | 117.8 |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8- $\text{H}_7\text{CDF}$ | 321.9 | 294.4 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9- $\text{H}_7\text{CDF}$ | 16.9  | 15.4  |
| $\text{O}_8\text{CDF}$                      | 38.0  | 34.7  |

Table 2 Composition of diets (g/100 g)

|                             | Non-fiber diet | Fiber diets |
|-----------------------------|----------------|-------------|
| Dietary fiber <sup>1)</sup> | 0              | 10          |
| Sucrose                     | 70             | 60          |
| Casein                      | 20             | 20          |
| Corn oil                    | 5              | 5           |
| Mineral mixture             | 4              | 4           |
| Vitamine mixture            | 0.85           | 0.85        |
| Choline chloride            | 0.15           | 0.15        |

1) Rice-bran fiber, Spinach fiber, Burdock fiber, Cabbage fiber, Soybeans fiber, Japanese-radish fiber, Carrot fiber, Corn fiber, Cellulose



mlを加え硫酸処理を1回行った。PCDFはスペルコ社製 SP-2331のキャピラリーカラム(0.32 mm×30 m)を装着したGC-MS (Varian3400-Finnigan MAT-90)を用いて分解能8000に設定して Selected Ion Monitoring (SIM)法で定量した。

#### 4. 統計処理

各食物繊維間の平均値の差の検定は Student-t テストによって、危険率1%以下をもって有意とした。

### 実験結果

#### 1. 食物繊維の飼料摂取量, 体重, 肝臓重量および糞中の脂質量に及ぼす影響

PCDFの腸管吸収は飼料中の栄養素などによって複雑な影響を受けることが考えられるので Table 2に示すように食物繊維量をグラニュー糖で補正し, そのほかの組成は各群とも同一にした。その結果, 食物繊維投与群の飼料摂取量, 体重および肝臓重量はコントロール群の Non-fiber 食とセルロースと比べて大きな変化はみられなかった (Table 3)。しかし, 食物繊維投与群の脂質排泄量は Non-fiber 食と比べてかなり多くなり, 米ぬか, ホウレンソウ, ゴボウ, キャベツ, ダイズ, ダイコン, ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれ4.6, 4.4, 2.7, 2.0, 2.1, 1.9, 1.9, 2.6倍に増加していた。

#### 2. PCDFの糞中排泄に及ぼす食物繊維の効果

Table 1に示した PCDF 同族体の中から4塩化体の2, 3, 6, 8- $T_4$ CDF, 2, 3, 7, 8- $T_4$ CDF, 5塩化体の1, 2, 4, 7, 8- $P_5$ CDF, 2, 3, 4, 7, 8- $P_5$ CDF, 6塩化体の1,

2, 4, 6, 7, 8- $H_6$ CDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8- $H_6$ CDF, 7塩化体の1, 2, 3, 4, 6, 7, 8- $H_7$ CDF および8塩化体の $O_8$ CDFの8種類について, 原因ライスオイル投与後5日間の糞中排泄量を Table 4および Table 5に示す。Non-fiber 食の排泄量は投与量に対して4塩化体で約1%, 5塩化体で2~5%, 6塩化体で9~20%, 7塩化体で49%, 8塩化体で52%になり, 排泄量(%)はクロル置換の数が多い PCDF 同族体の方が多かった。

それぞれの PCDF 同族体について, コントロール群と食物繊維投与群の排泄量を比較すると, 2, 3, 6, 8- $T_4$ CDF および2, 3, 7, 8- $T_4$ CDF は米ぬか, ホウレンソウおよびゴボウ繊維がそれぞれ Non-fiber 食の10.4, 6.0, 3.4倍および11.3, 6.8, 3.6倍にかなりの高比率で増加していた ( $P<0.01$ )。キャベツ, ダイズ, ダイコン, ニンジンおよびコーン繊維のその排泄量はそれぞれ Non-fiber 食の約2倍に増加していた。

1, 2, 4, 7, 8- $P_5$ CDF は米ぬか, ホウレンソウ, ゴボウ, キャベツ, ダイズ, ダイコン, ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれ Non-fiber 食の5.7, 4.9, 3.7, 2.4, 2.3, 2.9, 2.3, 2.1倍に排泄増加していた。2, 3, 4, 7, 8- $P_5$ CDF は米ぬか, ホウレンソウ, ゴボウおよびダイコン繊維がそれぞれ Non-fiber 食の4.1, 3.4, 2.3, 1.9倍およびセルロース食の3.6, 3.0, 2.0, 1.7倍に増加し ( $P<0.01$ )。キャベツ, ダイズ, ニンジンおよびコーン繊維のその排泄量は Non-fiber 食の約1.5倍に達していた。

1, 2, 4, 6, 7, 8- $H_6$ CDF および1, 2, 3, 4, 7, 8- $H_6$ CDF は米ぬか, ホウレンソウ, ゴボウ, キャベツ, ダイズ,

Table 3 Food intake, body weight, liver weight and fecal data in rats

| Diet                  | Food intake<br>(g/5 days) | Body weight<br>(g) | Liver weight<br>(g/100 g) | Fat in feces<br>(mg/5 days) |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Non-fiber             | 99.8±1.3                  | 197.5±9.0          | 9.4±0.47                  | 189±42 <sup>b</sup>         |
| Cellulose             | 104.2±5.1                 | 205.6±12.3         | 8.5±0.28                  | 530±38 <sup>ab</sup>        |
| Rice-bran fiber       | 96.7±9.4                  | 206.0±16.8         | 8.0±0.64                  | 869±114 <sup>a</sup>        |
| Spinach fiber         | 96.7±3.0                  | 190.5±15.3         | 8.7±0.71                  | 832±74 <sup>a</sup>         |
| Burdock fiber         | 104.0±8.4                 | 204.8±9.2          | 8.5±0.38                  | 515±98 <sup>ab</sup>        |
| Cabbage fiber         | 98.8±10.1                 | 203.2±14.8         | 8.4±0.45                  | 383±47 <sup>ab</sup>        |
| Soybeans fiber        | 94.5±11.7                 | 189.4±13.7         | 8.9±0.46                  | 392±96 <sup>ab</sup>        |
| Japanese-radish fiber | 85.8±9.4                  | 192.4±15.5         | 8.5±0.94                  | 359±129 <sup>b</sup>        |
| Carrot fiber          | 97.1±1.5 <sup>a</sup>     | 195.7±9.6          | 8.7±0.60                  | 356±56 <sup>ab</sup>        |
| Corn fiber            | 102.0±4.3                 | 202.2±15.8         | 9.1±0.61                  | 493±82 <sup>ab</sup>        |

Values represent the mean ± SD for four rats

a Significantly different from a non-fiber group,  $p<0.01$ .

b Significantly different from a rice-bran fiber group,  $p<0.01$ .

**Table 4** Effect of diets on fecal excretion of T<sub>4</sub>CDF and P<sub>5</sub>CDF for 5 days after administration

| Diet                  | 2, 3, 6, 8-<br>T <sub>4</sub> CDF | 2, 3, 7, 8-<br>T <sub>4</sub> CDF | 1, 2, 4, 7, 8-<br>P <sub>5</sub> CDF | 2, 3, 4, 7, 8-<br>P <sub>5</sub> CDF |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Non-fiber             | 0.86±0.35                         | 0.73±0.31                         | 2.4±0.4                              | 4.9±0.3                              |
| Cellulose             | 1.87±0.89                         | 1.48±0.65                         | 4.0±1.7                              | 5.5±1.6                              |
| Rice-bran fiber       | 8.91±1.19 <sup>ab</sup>           | 8.30±0.83 <sup>ab</sup>           | 13.6±2.1 <sup>ab</sup>               | 19.8±1.1 <sup>ab</sup>               |
| Spinach fiber         | 5.18±0.97 <sup>ab</sup>           | 4.97±0.96 <sup>ab</sup>           | 11.5±2.6 <sup>ab</sup>               | 16.4±2.4 <sup>ab</sup>               |
| Burdock fiber         | 2.91±0.57 <sup>a</sup>            | 2.61±0.42 <sup>a</sup>            | 8.8±1.0 <sup>ab</sup>                | 11.2±1.5 <sup>ab</sup>               |
| Cabbage fiber         | 2.01±0.82                         | 1.65±0.66                         | 5.7±1.6 <sup>a</sup>                 | 7.5±1.9                              |
| Soybeans fiber        | 1.71±0.52                         | 1.45±0.40                         | 5.3±0.7 <sup>a</sup>                 | 7.0±1.2                              |
| Japanese-radish fiber | 1.81±0.45                         | 1.50±0.46                         | 6.9±1.3 <sup>a</sup>                 | 9.2±0.64 <sup>ab</sup>               |
| Carrot fiber          | 1.51±0.73                         | 1.31±0.72                         | 5.5±1.9                              | 8.1±1.9                              |
| Corn fiber            | 1.75±0.38                         | 1.42±0.29                         | 5.0±1.2 <sup>a</sup>                 | 7.2±1.1 <sup>a</sup>                 |

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

a Significantly different form a non-fiber group, p<0.01.

b Significantly different form a cellulose group, p<0.01.

**Table 5** Effect of diets on fecal excretion of H<sub>6</sub>CDF H<sub>7</sub>CDF and O<sub>8</sub>CDF for 5 days after administration

| Diet                  | 1, 2, 4, 6, 7, 8-<br>H <sub>6</sub> CDF | 1, 2, 3, 4, 7, 8-<br>H <sub>6</sub> CDF | 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-<br>H <sub>7</sub> CDF | O <sub>8</sub> CDF     |
|-----------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------|
| Non-fiber             | 9.1±0.6                                 | 19.8±2.5                                | 48.6±3.0 <sup>b</sup>                      | 52.1±4.1               |
| Cellulose             | 11.3±3.8                                | 21.2±3.1                                | 58.7±2.7 <sup>a</sup>                      | 64.5±1.2 <sup>a</sup>  |
| Rice-bran fiber       | 28.5±4.6 <sup>ab</sup>                  | 40.8±3.4 <sup>ab</sup>                  | 72.9±5.6 <sup>a</sup>                      | 72.5±7.4 <sup>ab</sup> |
| Spinach fiber         | 28.5±5.3 <sup>ab</sup>                  | 42.6±4.0 <sup>ab</sup>                  | 75.5±4.3 <sup>ab</sup>                     | 71.9±6.3 <sup>ab</sup> |
| Burdock fiber         | 23.8±3.5 <sup>ab</sup>                  | 34.8±4.9 <sup>ab</sup>                  | 67.3±2.7 <sup>ab</sup>                     | 65.1±7.3 <sup>b</sup>  |
| Cabbage fiber         | 16.0±3.9                                | 26.1±4.2                                | 61.5±4.8 <sup>a</sup>                      | 65.6±1.4 <sup>a</sup>  |
| Soybeans fiber        | 14.4±2.4 <sup>a</sup>                   | 26.6±3.5                                | 63.7±5.1 <sup>a</sup>                      | 78.8±8.4 <sup>a</sup>  |
| Japanese-radish fiber | 21.1±2.0 <sup>ab</sup>                  | 33.5±2.1 <sup>ab</sup>                  | 64.8±3.6 <sup>a</sup>                      | 71.7±5.8 <sup>ab</sup> |
| Carrot fiber          | 17.2±4.9                                | 30.2±4.6 <sup>a</sup>                   | 60.8±5.5 <sup>a</sup>                      | 73.2±5.2 <sup>a</sup>  |
| Corn fiber            | 14.6±2.9                                | 26.3±3.1                                | 62.6±3.9 <sup>a</sup>                      | 81.5±5.2 <sup>a</sup>  |

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

a Significantly different form a non-fiber group, p<0.01.

b Significantly different form a cellulose group, p<0.01.

ダイコン、ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれ Non-fiber 食の 3.1, 3.1, 2.6, 1.8, 1.6, 2.3, 1.9, 1.6 倍および 2.1, 2.2, 1.8, 1.3, 1.7, 1.5, 1.3 倍に増加し、米ぬか、ホウレンソウ、ゴボウおよびダイコン繊維の 6 塩化体の排泄量は Non-fiber 食およびセルロース食と比べて顕著に増加していた (P<0.01)。

1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H<sub>7</sub>CDF および O<sub>8</sub>CDF は米ぬか、ホウレンソウ、ゴボウ、キャベツ、ダイズ、ダイコン、ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれ 1.5, 1.6, 1.4,

1.3, 1.3, 1.3, 1.3, 1.3 倍および 1.4, 1.4, 1.3, 1.3, 1.5, 1.4, 1.4, 1.6 倍と Non-fiber 食に対して有意な排泄増加がみられた。

### 3. PCDF の吸収に及ぼす食物繊維の効果

Table 4 および Table 5 に示した 5 日間の排泄量を未吸収分と考えると、Non-fiber 食の PCDF 吸収量は投与量に対して 4 塩化体では 99%, 5 塩化体では 95~98%, 6 塩化体では 80~91%, 7 塩化体では 51%, 8 塩化体では 48% となり、吸収率はクロル置換の数が少ない PCDF 同族体の方が高かった。これに対し

て、8種類の食物繊維投与群の吸収率はNon-fiber食に対して4塩化体では1~8%、5塩化体では2~15%、6塩化体では5~21%、7塩化体では12~24%、8塩化体では13~20%の低下を示し、食物繊維による吸収率の減少はクロル基の置換数の多いPCDF同族体の方がむしろ大きなものになっていた。

#### 4. PCDFの肝臓分布に及ぼす食物繊維の効果

原因ラيسオイル投与5日後のラット肝臓中のPCDF分布量をTable 6およびTable 7に示す。それぞれのPCDF同族体についてコントロール群と食物繊維投与群の肝臓分布量を比較すると、2, 3, 6, 8-T<sub>4</sub>CDF分布量は米ぬか、ハウレンソウ、ゴボウ、キャベ

ツおよびダイズ繊維がそれぞれNon-fiber食の49, 44, 52, 54, 48%と有意な低下がみられた(P<0.01)。コーン繊維ではNon-fiber食およびセルロースと比べて分布量が高かった。2, 3, 7, 8-T<sub>4</sub>CDF分布量は米ぬか、ハウレンソウ、ゴボウ、キャベツ、ダイズおよびダイコン繊維がそれぞれNon-fiber食の78, 63, 80, 75, 47, 95%に低下していたが、反対に、ニンジンおよびコーン繊維では分布量が多かった。

1, 2, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF分布量は米ぬか、ハウレンソウ、ゴボウ、キャベツ、ダイズ、ダイコン、ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれNon-fiber食の41, 38, 48, 51, 47, 57, 75, 94%といずれも減少していた。一方、

**Table 6** Liver distribution of T<sub>4</sub>CDF and P<sub>5</sub>CDF 5 days after administration

| Diet                  | 2, 3, 6, 8-T <sub>4</sub> CDF | 2, 3, 7, 8-T <sub>4</sub> CDF | 1, 2, 4, 7, 8-P <sub>5</sub> CDF | 2, 3, 4, 7, 8-P <sub>5</sub> CDF |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Non-fiber             | 2.08±0.47                     | 0.73±0.07                     | 1.72±0.53                        | 65.9±5.0                         |
| Cellulose             | 1.49±0.12                     | 0.70±0.19                     | 1.34±0.15                        | 74.8±5.0                         |
| Rice-bran fiber       | 1.02±0.21 <sup>ab</sup>       | 0.57±0.15                     | 0.71±0.13 <sup>ab</sup>          | 67.3±2.8                         |
| Spinach fiber         | 0.91±0.16 <sup>ab</sup>       | 0.46±0.12 <sup>a</sup>        | 0.65±0.03 <sup>b</sup>           | 73.1±1.5                         |
| Burdock fiber         | 1.09±0.19 <sup>a</sup>        | 0.58±0.12                     | 0.82±0.13 <sup>b</sup>           | 78.0±3.7 <sup>a</sup>            |
| Cabbage fiber         | 1.12±0.18 <sup>a</sup>        | 0.54±0.12                     | 0.87±0.14 <sup>b</sup>           | 82.0±6.0 <sup>a</sup>            |
| Soybeans fiber        | 1.00±0.06 <sup>b</sup>        | 0.34±0.15 <sup>a</sup>        | 0.81±0.08 <sup>b</sup>           | 83.3±5.8 <sup>a</sup>            |
| Japanese-radish fiber | 1.63±0.32                     | 0.69±0.15                     | 0.97±0.18                        | 71.1±4.4                         |
| Carrot fiber          | 2.09±0.58                     | 0.93±0.16                     | 1.28±0.26                        | 75.8±1.1 <sup>a</sup>            |
| Corn fiber            | 2.42±0.26 <sup>b</sup>        | 0.81±0.11                     | 1.61±0.16                        | 74.8±3.9                         |

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

a Significantly different form a non-fiber group, p<0.01.

b Significantly different form a cellulose group, p<0.01.

**Table 7** Liver distribution of H<sub>6</sub>CDF, H<sub>7</sub>CDF and O<sub>8</sub>CDF 5 days after administration

| Diet                  | 1, 2, 4, 6, 7, 8-H <sub>6</sub> CDF | 1, 2, 3, 4, 7, 8-H <sub>6</sub> CDF | 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H <sub>7</sub> CDF | O <sub>8</sub> CDF   |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|----------------------|
| Non-fiber             | 1.30±0.65                           | 48.1±7.7                            | 30.5±5.5                               | 13.1±4.6             |
| Cellulose             | 0.90±0.13                           | 54.1±5.2                            | 29.1±4.0                               | 11.7±2.4             |
| Rice-bran fiber       | 0.38±0.05 <sup>b</sup>              | 43.7±2.1 <sup>b</sup>               | 18.2±1.3 <sup>ab</sup>                 | 6.3±0.7 <sup>b</sup> |
| Spinach fiber         | 0.32±0.02 <sup>b</sup>              | 42.4±3.1 <sup>b</sup>               | 14.9±1.5 <sup>ab</sup>                 | 5.1±0.4              |
| Burdock fiber         | 0.45±0.08 <sup>b</sup>              | 50.1±2.5                            | 20.5±2.1 <sup>b</sup>                  | 7.2±0.8              |
| Cabbage fiber         | 0.54±0.09 <sup>b</sup>              | 56.8±5.4                            | 23.8±4.1                               | 8.9±2.0              |
| Soybeans fiber        | 0.52±0.09 <sup>b</sup>              | 60.6±7.5                            | 24.1±3.7                               | 8.7±1.8              |
| Japanese-radish fiber | 0.56±0.15                           | 50.1±3.5                            | 24.3±2.5                               | 8.6±0.9              |
| Carrot fiber          | 0.67±0.08                           | 54.7±4.5                            | 27.8±4.2                               | 10.7±0.6             |
| Corn fiber            | 0.98±0.11                           | 62.2±3.0                            | 32.0±3.2                               | 9.6±1.4              |

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

a Significantly different form a non-fiber group, p<0.01.

b Significantly different form a cellulose group, p<0.01.

PCDF 同族体の中で最も生体内残留性が高い 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF は米ぬか, ホウレンソウ, ゴボウ, キャベツ, ダイズ, ダイコン, ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれ Non-fiber 食の 102, 111, 118, 124, 126, 108, 115, 113%といずれも分布量が増加していた。

1, 2, 4, 6, 7, 8-H<sub>6</sub>CDF 分布量は米ぬか, ホウレンソウ, ゴボウ, キャベツ, ダイズ, ダイコン, ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれ Non-fiber 食の 30, 24, 35, 41, 40, 43, 52, 75%と顕著に低下していた。Table 5 に示したようにラットの体内に取り込まれた 6, 7 および 8 塩化体の PCDF 量は Non-fiber 食と食物繊維との間でかなり大きな差がみられたため, 肝臓への影響は吸収された量に対する肝臓分布量(肝臓分布量/吸収量)についても検討した。その結果, 肝臓分布量/吸収量に換算するとそれぞれ Non-fiber 食の 38, 31, 41, 45, 43, 50, 57, 80%といずれも減少していた。一方, 1, 2, 3, 4, 7, 8-H<sub>6</sub>CDF 分布量は米ぬかおよびホウレンソウ繊維がそれぞれ Non-fiber 食の 91, 88%に低下し, 反対にゴボウ, キャベツ, ダイズ, ダイコン, ニンジンおよびコーン繊維ではそれぞれ 104, 118, 126, 104, 114, 129%に増加していた。しかし, 肝臓分布量/吸収量に換算すると, 米ぬか, ホウレンソウ, ゴボウ, キャベツ, ダイズ, ダイコン, ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれ Non-fiber 食の 123, 123, 128, 128, 138, 126, 131, 141%といずれも増加していた。

1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H<sub>7</sub>CDF および O<sub>8</sub>CDF の分布量は米ぬか, ホウレンソウ, ゴボウ, キャベツ, ダイズ, ダイコン, ニンジンおよびコーン繊維がそれぞれ Non-fiber 食の 60, 49, 67, 78, 79, 80, 91, 105%と 48, 39, 55, 68, 67, 65, 82, 73%に達し, 肝臓分布量/吸収量に換算すると, それぞれ Non-fiber 食の 113, 102, 105, 104, 112, 116, 120, 144%と 84, 66, 76, 94, 151, 111, 147, 190%に達していた。

## 考 察

8 種類の食物繊維の中で米ぬか繊維は PCDF の排泄効果が最も高く, 続いてホウレンソウ繊維が顕著であった。次にゴボウ繊維が続く, 続いてキャベツ, ダイズ, ダイコン, ニンジンおよびコーンの 5 種類の繊維は同じ程度の効果を示した。米ぬか繊維は, 日常比較的多く食べられている食品である 7 種類の繊維の排泄量の平均値と比べて, 4 塩化体で約 4 倍, 5 塩化体で約 2 倍, 6 塩化体では約 1.5 倍の排泄増加を示した。米ぬか繊維とホウレンソウ繊維の排泄量を比較した場

合, 4 塩化体の 2, 3, 6, 8-T<sub>4</sub>CDF および 2, 3, 7, 8-T<sub>4</sub>CDF では米ぬか繊維がホウレンソウ繊維の 1.7 倍と高い値であったが ( $P < 0.01$ ), 5 塩化体の 1, 2, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF および 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF で 1.2 倍, 6, 7 および 8 塩化体で 1.0 倍とほぼ同じ効果であり, 5~8 塩化体ではホウレンソウ繊維は米ぬか繊維と同等な効果があるものと思われた。

前に, われわれは原因ライスオイルを投与したラットに食物繊維を与え, 体内に蓄積する 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF の体外排泄について検討を行ったところ, 米ぬか繊維は 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF の腸管内での再吸収を抑制し, ゴボウ, ダイズおよびコーン繊維の平均値と比べて 2.5 倍糞中排泄を促進させた<sup>9)</sup>。今回の 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF の結果においても, 米ぬか繊維はゴボウ, ダイズおよびコーン繊維の平均値と比べて 2.3 倍の排泄増加を示し, 先の実験とほぼ一致した結果が得られた。

2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF の吸収率は米ぬか繊維が 80.2%であったのに対し, Non-fiber 食が 95.2%, 7 種類の繊維の平均値が 90.5%であった。吸収抑制の観点からみると, 米ぬか繊維の方が Non-fiber 食より 15%低く, 7 種類の繊維の平均値よりも約 10%低い値であったが, その減少量はさほど大きくないことが分かった。このことは消化管内に存在した 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF を, 米ぬか繊維が 1/5 程度, その他の 7 種類の繊維が平均 1/10 程度吸着保持し排泄したことを示している。言い換えると, 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF には米ぬか繊維の効果の数倍の排泄増大の余地あるいは可能性があるということを示し, これから, さらなる検討を要するところである。

PCDF の排泄量と吸収量について, それぞれの同族体の挙動を比較した場合, 4 塩化体はコントロール群の排泄量に対する食物繊維投与群の排泄量の比がかなり高く, 8 塩化体より排泄促進効果が高いことを示していた (4>5>6>7>8 塩化体), 反対に, 8 塩化体はコントロール群の吸収量に対する食物繊維投与群の吸収量の比が 4 塩化体に比べて低下し, かなりの吸収抑制を受けたことが判明した (8>7>6>5>4 塩化体)。このことから, 腸管を介して PCDF を体外へ排出するための排泄促進剤の効果の判定には吸収されやすい 4~5 塩化体の糞中排泄量の挙動から判断すると明瞭であることが分かる。反対に, 排泄促進剤による PCDF の体内蓄積量の減少効果の判定はクロル基の置換数が少ないものより 7~8 塩化体の方が明解な結論が得られるものと考えられる。

PCDF の肝臓蓄積に与えた影響について検討する

と、肝臓蓄積性の高い 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-H<sub>6</sub>CDF および 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H<sub>7</sub>CDF の分布量は食物繊維投与群が Non-fiber 食よりわずかに高い傾向がみられた。反対に、上記 3 者より肝臓蓄積性の低い 2, 3, 6, 8-T<sub>4</sub>CDF, 2, 3, 7, 8-T<sub>4</sub>CDF, 1, 2, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF および 1, 2, 4, 6, 7, 8-H<sub>6</sub>CDF 分布量は食物繊維投与群がわずかに低い傾向がみられた。食物繊維は PCDF の排泄を増加させたが、5 日間の排泄量を Non-fiber 食でみると 4 塩化体では 1%, 5 塩化体では 2~5%, 6 塩化体では 9~20% と少なく、米ぬか繊維でみると 4 塩化体では 8~9%, 5 塩化体では 14~20%, 6 塩化体では 29~41% と低い値であり、肝臓分布量の変化は PCDF 排泄量の増加が主たる原因とは考えられない。また、肝臓分布に対する食物繊維の影響について、肝臓分布量/吸収量に換算して検討しても同様な傾向が得られた。Table 3 に示したように、糞中の脂質量は Non-fiber 食に比べて食物繊維投与群でかなりの増加がみられ、8 種類の食物繊維では 2, 3, 4, 7, 8-P<sub>5</sub>CDF 排泄量と脂質排泄量との間に有意な相関が認められ ( $r=0.911$ ,  $P<0.01$ )、消化管内での食物繊維の作用と各種脂溶性成分の腸管吸収機構の複雑さが推察された<sup>2)</sup>。これらの結果から、PCDF の肝臓分布の変化は、脂質排泄量の増加に伴って、脂肪などの組織から血中を通じて肝臓へ流入する量が多くなり、難代謝性の PCDF は肝臓に蓄積し、代謝されやすい PCDF は代謝促進し排泄され、肝臓蓄積を減少させたものと推測される。

PCDF などの環境汚染物質が人体に侵入する経路として、口、皮膚、肺が考えられるが、この中で経口的に摂取される場合が一般的である。食物中に PCDF などの生体異物を捕捉する効果のある食物成分が含まれていれば、摂取された汚染物質の吸収と排泄はその食物成分によって変化し、吸収されてからの運命にも影響を与えるものと考えられる。さらに胆汁を介して排出される汚染物質およびその代謝物ならびに小腸壁から管腔へ直接排出される汚染物質の再吸収を抑制すれば、侵入した汚染物質の体内滞留時間を短縮し、体内蓄積量を減少させることになり、人の健康に与える影響や種々の疾病の予防および回復あるいは治療に対して防護的效果が期待される。筆者らの結果から、食物繊維は環境汚染物質の腸管吸収機構に変化を与える食物成分の 1 つと考えられる。

## 総 括

野菜類の中で比較的摂取量の多いハウレンソウ、ゴ

ボウ、キャベツ、ダイズ、ダイコン、ニンジンおよびコーンから食物繊維を製造し、ラットを用いて PCDF の糞中排泄および吸収の変化と肝臓分布に対する効果について実験を行い、米ぬか繊維に続く有効な食品を検索した。

1) 米ぬか、ハウレンソウ、ゴボウ、キャベツ、ダイズ、ダイコン、ニンジンおよびコーンの食物繊維は Non-fiber 食およびセルロースと比べて PCDF の糞中排泄量を増加させた。その排泄効果は米ぬか繊維が最も高く、続いてハウレンソウ繊維にもきわめて良好な効果が得られた。次にゴボウ繊維が続く。キャベツ、ダイズ、ダイコン、ニンジンおよびコーン繊維はほぼ同じ程度の効果がみられた。

2) Non-fiber 食に対する食物繊維の PCDF 排泄促進効果は吸収が容易な 4 塩化体の方が高い値を示した (4>5>6>7>8 塩化体)。反対に、食物繊維の PCDF 吸収抑制効果は吸収率が低い 8 塩化体の方が高い値を示した (8>7>6>5>4 塩化体)。

## 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) 印南 敏, 桐山修八編: 食物繊維. 第一出版, 1982.
- 3) 榎本 隆, 宮田秀明, 高山幸司, 尾垣淳治: 高分解能 MS-SIM 法による油症患者組織および原因油中の PCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs. 福岡医誌 78: 325-336, 1987.
- 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) 国民栄養の現状: 厚生省健康増進栄養課編. 第一出版.
- 6) 松枝隆彦, 飯田隆雄, 平川博仙, 深町和美, 常盤 寛, 長山淳哉: 油症患者および対照者の母乳中の PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs 濃度の比較. 福岡医誌 84: 263-272, 1993.
- 7) 宮田秀明: ダイオキシン関連物質の環境, 人体, 食物汚染の現状と問題点. 食衛誌 34: 1-11, 1993.
- 8) 森田邦正, 平川博仙, 松枝隆彦, 飯田隆雄, 常盤 寛: ラットにおける食物繊維の PCDF および PCDD 排泄促進効果. 福岡医誌 84: 273-281, 1993.
- 9) 森田邦正, 濱村研伍, 飯田隆雄: 食物繊維の PCB 吸着作用—in vivo と in vitro の比較—. 福岡医誌 86: 212-217, 1995.
- 10) Nagayama J, Kuratsune M and Masuda Y: Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and "Yusho oil". Bull. Environ. Contam.

Toxicol., 15 : 9-13, 1976.

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

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

(受付 1995-3-27)

## Clinical Trial of a Combination of Rice Bran Fiber and Cholestyramine for Promotion of Fecal Excretion of Retained Polychlorinated Dibenzofuran and Polychlorinated Biphenyl in Yu-Cheng Patients

Takao IIDA, Reiko NAKAGAWA, Hironori HIRAKAWA,  
Takahiko MATSUEDA, Kunimasa MORITA and Kengo HAMAMURA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,  
39, Mukaizano, Dazaifu-shi, Fukuoka, 818-01*

Juichiro NAKAYAMA and Yoshiaki HORI

*Department of Dermatology, Faculty of Medicine,  
Kyushu University 60 Maedashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-82*

Yue-Liang LEON GUO

*Department of Environmental Occupational Health, National  
Cheng Kung University Medical College, Tainan, Taiwan, R. O. C.*

Fong-Ming CHANG, Po-Wun HSIAO and Ko-Chow LIN

*Taiwan Provincial Health Department, R. O. C.*

Mei-Lin YU

*Department of Public Health, National Cheng Kung University*

Te-Jen LAI, Shin-Jaw CHEN and Chen-Chin Hsu

*Department of Psychiatry, National Cheng Kung University  
Medical College, Tainan, Taiwan, R. O. C.*

**Abstract** A clinical trial using the combination of rice bran fiber (RBF) and cholestyramine (CHO) was carried out on Yu-Cheng patients in 1993-1994. By the analysis of blood and stool samples collected from the patients before and after (or during in the case of stool), it was verified that the administration of RBF and CHO is effective for excretion of polychlorinated biphenyl (PCB) ( $p < 0.05$ ) and polychlorinated dibenzofuran (PCDF), especially 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran ( $p < 0.05$ ). However, the degree of effectiveness varied upon individual patients from 60 to 160% for 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran, from 30 to 110% for 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran and from 50 to 190% for PCB, respectively.

### Introduction

In 1968, a PCB and polychlorinated dibenzofuran (PCDF) contaminated rice-oil poisoning occurred in western Japan<sup>4)</sup>. That disease was named Yusho. Yusho patients are now still suffering from various Yusho symptoms<sup>8)</sup>. Therefore the availability of various therapies have been considered by Yusho researchers and it is suggested that removal of the toxic chemicals is

the most effective therapy. In animal test, it was clarified cholestyramine (CHO) and rice bran fiber (RBF) have an ability of promoting PCB and PCDF excretion, the former by Kamimura et al.<sup>5)</sup> and the latter by Takenake and Morita et al.<sup>10),6)</sup>, respectively. Especially the combined administration of cholestyramine and RBF was greatly effective and the excretion enhancement of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran was 4.2 folds in rats.

On the other hand, we have previously reported that the level of polychlorinated dibenzofuran in the subcutaneous adipose tissue of Yusho patients is 100 times higher than that in normal subjects, and that the fecal PCDF excretion by these patients corresponds to its concentration in subcutaneous adipose tissue as well as in blood<sup>2)</sup>. Therefore, at first, a clinical trial of the combination of RBF and CHO was carried out in Japanese Yusho patient in 1989-1992. In that study, upon administration, a tendency of excess fecal excretion was observed, however, the effect of the therapy could not be confirmed<sup>3)</sup>. In this study, results of the second trial that was carried out on Yu-Cheng patients in Taiwan in 1993-1994 to examine the degree of enhancement of excretion of residual PCDF and PCB are described.

## Materials and Methods

### 1. Materials

Cholestyramine (CHO) was purchased from Bristol Co. LTD. RBF containing 85% dietary fiber (23.5% cellulose, 43.2% hemicellulose and 18.4% lignin) was prepared following the Prosky method<sup>9)</sup>.

Chaff and other debris are removed from the defatted rice bran by using a 24 mesh sieve. 1.5kg of the refined rice bran is filled in a bag made of hemp cloth (26cm×54cm). The bag is sealed firmly and then washed in a washing machine for twelve minutes and spin-drying for three minutes. After repeating the process for 6 times, the bag is moved into a 27 liter pot. Ten liters of tap water is added and heated for an hour, and then washed for nine times. The rice bran is taken out of bag, moved into the pot. Ten liters of tap water, 500 ml of pH 7 0.2M phosphoric acid buffer solution and 30 ml of amylase are added and the mixture is treated enzymatic at 90°C. The mixture is let to cool down to 45°C, and then it is adjusted to pH 8 by using 4% sodium hydroxide solution. One liter of pH 8 0.2M phosphoric acid buffer solution and 30g of pancreatin are added and after

enzyme treating for three hours at 45°C the rice bran is filled into the bag again and the pH is adjusted to 1.5 by 0.4N hydrochloric acid, and after 30 minutes the rice bran fiber is washed for nine times. The bag with the fiber in it is dried in a drying machine overnight at 80°C. The fat that still remains in the treated rice bran is extracted by washing the bag (contained rice bran) with acetone for three times and then hexane for one time for five minutes each in an ultrasonic washing machine. The bag is let to dry at room temperature and moved into a drying machine overnight at 80°C. The fiber is let to cool down at room temperature and then it is ground by coffee mill.

As the fiber particles still rough, they are fine-ground by using electric stone-mill.

### 2. Administration of drugs and collection of blood and stool samples.

Eight Yu-Cheng patients were administered orally 6g of RBF and 4g of CHO suspended in a cup of water three times a day after meals for two weeks. Prior to the administration, all samples of stool excreted by the patients were collected for a 7-day period. During the administration, all samples of stool excreted by the patients were collected for a 14-day period. Twenty milliliters of blood was obtained from each patient before and after the clinical trial.

### 3. Preparation of specimens for determination of PCDF and PCB

#### *Blood sample*

For determination of PCB in the blood, to a portion of sample (2g) was added 2ml of 1N KOH-ethanol. The mixture was heated at 80°C for one hour, then extracted with hexane. The extract was cleaned up with a silica gel column and analyzed with ECD/GC. For PCDF determination in the blood, a portion of the sample (10g) was extracted three times with acetone/hexane (2:1, v/v), and after the addition of distilled water, the hexane layer was collected. Then, the extract was concentrated to dryness and weighed. The extract was dissolved with hexane and was cleaned up with



an AgNO<sub>3</sub>-silica gel column, charcoal column, Florisil column and concentrated sulfuric acid, and analyzed with GC/MS.

#### Stool sample

Stool samples of each patient were pooled together for each period separately (7-day period prior to administration, 6-day period from the second to the seventh day, and 7-day period from the eighth to fourteenth day after beginning of administration). Samples for each period were homogenized. For determination of PCB and PCDF, 100g of each sample was used, and about 300g of sample was stored in a freezer at -20°C. PCB and PCDF in the stool were extracted 3 times with chloroform/methanol (1:1, v/v). The extracts were filtered through glass filter paper, and after dilution with distilled water, the chloroform layer was collected. Then, the chloroform layer was concentrated to dryness and weighed. A portion (20ml) of 1N KOH-ethanol was added to the extracts. Then, it was mixed and left at room temperature over night, and extracted with hexane. The hexane extracts were concentrated and adjusted to 10ml. A portion (2ml) of hexane solution was cleaned up with Florisil column for the determination of PCB with ECD-GC, and another portion of the solution (8ml) was cleaned up with concentrated sulfuric acid, an AgNO<sub>3</sub>-silica gel column, charcoal and Florisil column for the determination of PCDF with GC/MS.

#### **4 . Determination of cholestyramine excreted into stools**

One to four grams of stool were weighed into 50ml centrifuge tube. To it 2N KOH-ethanol was added and then it was heated at 80°C for one hour. After mixture with distilled water, it was centrifuged at 2000 rpm. The water-ethanol supernatant was removed and the pellet was washed with acetone. Subsequently, to the residus was added 2.5% of NaOCl and was left at room temperature overnight. Distilled water was added and the mixture was centrifuged at 2000 rpm. The water supernatant was removed

and the pellet was washed with acetone. Subsequently, cold 72% of sulfuric acid was added to the pellet and mixed, then it was left at 4°C overnight. Finally, the mixture was filtered with a G-4 glass filter and the trapped material was washed with distilled water, hot water, acetone and hexane. G-4 glass filter and the trapped material were let to dryness at 105°C for 4 hours and after cooled they were weighed (A). Then, they were heated at 525°C for 4 hours, and weighed after cooled (B). The difference in weight between A and B was considered as the weight of cholestyramine.

### **Results and Discussion**

#### **1 . PCDF and PCB levels in blood and stools before and after administration of RBF and Cholestyramine**

Table 1 shows the concentrations of PCDD, PCDF, Co-PCB (coplanar PCB) and PCB in the blood obtained from each patient before and after the clinical trial on a whole base. After the treatment, most of the average congener concentrations decreased compared with the ones before the treatment. The decrease in the concentrations of 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD, 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF, Total TEQ was statistically significant ( $p < 0.01$ ) and the decrease in fat concentration was also significant ( $p < 0.05$ ).

Table 2 shows the fecal excretion levels of PeCDF (2, 3, 4, 7, 8-PeCDF), HxCDF (1, 2, 3, 4, 7, 8- and 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF) and PCB into stools during the three periods of measurements. The fecal excretion data of patients D 14 and D 15 were eliminated in Table 2, because the collection of stool samples were not complete before the treatment in two patients. Stool weight was  $212 \pm 45$  g/day before treatment,  $245 \pm 50$  g/day during the first week of administration, and  $215 \pm 61$  g/day during the second week. The fecal excretion level of PeCDF was  $837 \pm 449$ ,  $919 \pm 516$  and  $945 \pm 461$  pg/day, respectively. The fecal excretion level of HxCDF was  $2894 \pm 1421$ ,  $2556 \pm 1183$  and  $2536 \pm 1006$  pg/day, respectively. On the other

**Table 1** Concentrations of PCDD, PCDF, coplanar PCB and PCB in blood of Yu-Cheng patients (pg/g, whole basis)

| Congener               | A 01         | A 02         | A 03         | D 04         | D 05         | D 12         | D 14         | D 15         | Mean         |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2,3,7,8-TCDD           | ND<br>0.02   | 0.02<br>0.01 | 0.03<br>0.01 | ND<br>0.01   | ND<br>0.01   | 0.01<br>0.01 | 0.03<br>0.01 | ND<br>0.01   | 0.02<br>0.01 |
| 1,2,3,7,8-PeCDD        | 0.05<br>0.04 | 0.07<br>0.03 | 0.13<br>0.08 | 0.02<br>0.03 | 0.04<br>0.03 | 0.04<br>0.03 | 0.04<br>0.03 | 0.03<br>0.04 | 0.05<br>0.04 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD      | 0.31<br>0.28 | 0.42<br>0.33 | 0.92<br>0.72 | 0.18<br>0.17 | 0.33<br>0.22 | 0.36<br>0.18 | 0.36<br>0.26 | 0.44<br>0.39 | 0.41<br>0.32 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD    | 0.21<br>0.24 | 0.13<br>0.14 | 0.29<br>0.24 | 0.23<br>0.14 | 0.21<br>0.13 | 0.25<br>0.15 | 0.15<br>0.14 | 0.17<br>0.19 | 0.21<br>0.17 |
| OCDD                   | 1.7<br>1.8   | 2.9<br>2.4   | 4.6<br>4.0   | 1.3<br>1.0   | 1.1<br>1.7   | 2.0<br>1.4   | 1.8<br>1.4   | 1.6<br>1.5   | 2.1<br>1.9   |
| 2,3,7,8-TCDF           | 0.05<br>0.03 | 0.07<br>0.03 | 0.06<br>0.03 | 0.02<br>0.02 | 0.04<br>0.03 | 0.03<br>0.06 | 0.03<br>0.04 | 0.03<br>0.03 | 0.04<br>0.03 |
| 1,2,3,7,8-PeCDF        | 0.05<br>0.04 | 0.06<br>0.02 | 0.08<br>0.04 | 0.05<br>0.02 | 0.03<br>0.02 | 0.04<br>0.06 | 0.02<br>0.03 | 0.03<br>0.04 | 0.04<br>0.03 |
| 2,3,4,7,8-PeCDF        | 2.6<br>2.0   | 3.5<br>3.0   | 3.8<br>2.8   | 1.3<br>1.0   | 1.9<br>1.3   | 1.0<br>0.5   | 1.9<br>1.2   | 2.7<br>2.3   | 2.3<br>1.8   |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF      | 5.4<br>4.9   | 9.7<br>10.8  | 15.8<br>13.1 | 3.8<br>3.1   | 5.2<br>4.0   | 5.3<br>3.3   | 4.7<br>4.2   | 8.7<br>10.1  | 7.3<br>6.7   |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF    | 0.19<br>0.20 | 0.40<br>0.28 | 0.44<br>0.32 | 0.16<br>0.16 | 0.21<br>0.13 | 0.17<br>0.20 | 0.13<br>0.24 | 0.16<br>0.20 | 0.23<br>0.22 |
| 3,3',4,4'-TeCB         | 0.10<br>0.17 | 0.16<br>0.06 | 0.12<br>0.09 | 0.07<br>0.06 | 0.06<br>0.05 | 0.07<br>0.13 | 0.09<br>0.10 | 0.05<br>0.09 | 0.09<br>0.09 |
| 3,3',4,4',5-PeCB       | 0.21<br>0.31 | 0.21<br>0.14 | 0.53<br>0.50 | 0.21<br>0.19 | 0.22<br>0.17 | 0.34<br>0.29 | 0.34<br>0.26 | 0.96<br>0.65 | 0.38<br>0.31 |
| 3,3',4,4',5,5'-HxCB    | 0.16<br>0.20 | 0.13<br>0.11 | 0.41<br>0.45 | 0.07<br>0.08 | 0.09<br>0.11 | 0.18<br>0.14 | 0.14<br>0.14 | 0.36<br>0.31 | 0.19<br>0.19 |
| Total TEQ <sup>a</sup> | 2.0<br>1.6   | 2.9<br>2.7   | 3.8<br>2.9   | 1.1<br>0.9   | 1.6<br>1.2   | 1.2<br>0.7   | 1.6<br>1.1   | 2.5<br>2.3   | 2.1<br>1.7   |
| PCB (ng/g)             | 11<br>11     | 10<br>9      | 45<br>32     | 13<br>12     | 23<br>22     | 18<br>19     | 21<br>13     | 64<br>38     | 26<br>20     |
| Fat (%)                | 0.46<br>0.38 | 0.43<br>0.40 | 0.80<br>0.56 | 0.34<br>0.33 | 0.37<br>0.33 | 0.54<br>0.41 | 0.44<br>0.39 | 0.48<br>0.40 | 0.48<br>0.40 |

a: Calculated by TCDD equivalent factors in reference 1 and 7.

Upper line data shows the measurements in the blood collected in January 1993 (before clinical trial) and lower line data shows the measurements in the blood collected in August 1994 (after clinical trial).

**Table 2** PCDF and PCB fecal excretion of Yu-Cheng patients

| Patient | Administration | Stool<br>(g/day) | PeCDF<br>(pg/day) | HxCDF<br>(pg/day) | PCB<br>(ng/day) |
|---------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| A 01    | Before         | 280              | 1000              | 2800              | 500             |
|         | First week     | 300              | 980               | 2500              | 600             |
|         | Second week    | 330              | 1100              | 2600              | 650             |
| A 02    | Before         | 220              | 1300              | 3300              | 420             |
|         | First week     | 240              | 1600              | 3400              | 500             |
|         | Second week    | 210              | 1500              | 2900              | 390             |
| A 03    | Before         | 210              | 900               | 4100              | 540             |
|         | First week     | 200              | 840               | 2900              | 590             |
|         | Second week    | 230              | 1200              | 3500              | 580             |
| D 04    | Before         | 210              | 430               | 1400              | 380             |
|         | First week     | 300              | 520               | 1300              | 470             |
|         | Second week    | 190              | 470               | 1300              | 430             |
| D 05    | Before         | 210              | 1200              | 4600              | 1100            |
|         | First week     | 220              | 1400              | 4200              | 1500            |
|         | Second week    | 180              | 1100              | 3600              | 1000            |
| D 12    | Before         | 140              | 170               | 1100              | 460             |
|         | First week     | 180              | 210               | 1100              | 630             |
|         | Second week    | 160              | 290               | 1300              | 600             |

hand, the fecal excretion level of PCB was  $565 \pm 267$ ,  $716 \pm 394$  and  $613 \pm 223$  ng/day, respectively. These findings indicate that due to the administration of RBF and CHO, the quantity of stools, and the fecal PeCDF and PCB excretion level became slightly increased. However, the fecal excretion of HxCDF during administration was less than that before treatment.

## 2. Determination of cholestyramine excreted into stools

Table 3 shows the results of the determination of CHO excreted into daily stools by Yu-Cheng patients during the administration peri-

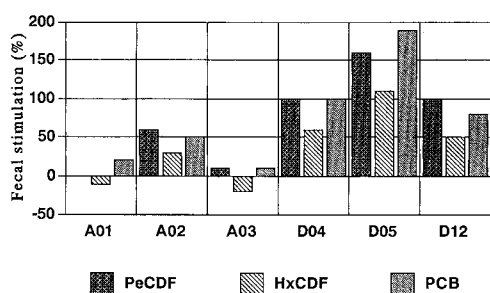
od. CHO is an anion exchange resin, and it is not absorbed or metabolized. Moreover, over 96% of CHO was excreted into feces within 24 hours on rat. As 12 g/day CHO was administered to every patient, it is obvious that similar amounts should be excreted into the stools. As to Patient A01, the amount regarded as CHO was 15.4 g/day in the first week, and 14.6 g/day in the second week of administration. At present, we have no explanation regarding the higher amount of CHO. In Patient A03, the amount regarded as CHO coincided with 12g. In Patients A02, D04, D05 and D12, the amount

**Table 3** Determination of CHO in the stools of Yu-Cheng patients (g/day)

| Administration | A 01 | A 02 | A 03 | D 04 | D 05 | D 12 |
|----------------|------|------|------|------|------|------|
| Before         | 0.01 | 0.2  | 0.06 | 0.3  | 0.1  | 0.1  |
| First week     | 15.4 | 7.9  | 12.3 | 8.7  | 6.5  | 9.8  |
| Second week    | 14.6 | 9.2  | 11.7 | 3.9  | 3.6  | 9.3  |

**Table 4** Calibrated data of PCDF and PCB fecal excretion of Yu-Cheng patients by the cholestyramine in the stools

| Patient | Administration | Stool<br>(g/day) | PeCDF<br>(pg/day) | HxCDF<br>(pg/day) | PCB<br>(pg/day) |
|---------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| A 01    | Before         | 280              | 1000              | 2800              | 500             |
|         | First week     | 300              | 980               | 2500              | 600             |
|         | Second week    | 330              | 1100              | 2600              | 650             |
| A 02    | Before         | 220              | 1300              | 3300              | 420             |
|         | First week     | 360              | 2500              | 5100              | 760             |
|         | Second week    | 270              | 1900              | 3800              | 510             |
| A 03    | Before         | 210              | 900               | 4100              | 540             |
|         | First week     | 200              | 840               | 2900              | 590             |
|         | Second week    | 230              | 1200              | 3500              | 580             |
| D 04    | Before         | 210              | 430               | 1400              | 380             |
|         | First week     | 410              | 720               | 1800              | 640             |
|         | Second week    | 580              | 1400              | 4000              | 1300            |
| D 05    | Before         | 210              | 1200              | 4600              | 1100            |
|         | First week     | 410              | 2500              | 7700              | 2800            |
|         | Second week    | 600              | 3700              | 12000             | 3400            |
| D 12    | Before         | 140              | 170               | 1100              | 450             |
|         | First week     | 220              | 260               | 1300              | 780             |
|         | Second week    | 200              | 370               | 1740              | 800             |

**Figure 1** Stimulation of PeCDF, HxCDF and PCB excretion into the stools by administration of RBF and cholestyramine

ranged from 3.6 to 9.8g/day. It is suggested that the patients had failed to collect all the stools they discharged.

The data in Table 2 were calibrated according to the data shown in Table 3 and the new data are shown in Table 4.

Figure 1 shows the increase in the percentage

of excretion of PeCDF, HxCDF and PCB into stool compared with that before the treatment. In Patients A02, D04, D05 and D12, the increase in excretion was 60 to 160% for PeCDF, 30 to 110% for HxCDF, and 50 to 190% for PCB. However, no increase in excretion was noticed in Patients A01 and A03 regarding PeCDF, HxCDF and PCB. Administration of 18g/day of RBF, and 12g/day of CHO for two weeks caused an increase in excretion of PeCDF, HxCDF and PCB from 30 to 190% in four out of six treated Yu-Cheng patients.

The promotion of fecal excretion for pentachlorodibenzofuran and PCB could be statistically confirmed by analysis of variance method and t-test, but the promotion of fecal excretion for hexachlorodibenzofuran was not clear.

### Conclusions

1. Administration of rice bran fiber and cholestyramine increased the excretion of pentachlorodibenzofuran, hexachlorodibenzofuran and PCB. Statistic analysis proved that this treatment is effective for pentachlorodibenzofuran and PCB.

2. The degree of effectiveness varied upon individual patients from thirty to one hundred and ninety percent in Yu-Cheng patients.

### Acknowledgment

This study was supported by a Research Grant from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

### References

- 1) Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJGM, Feeley M, Golor G, Hanberg A, Larsen JC, Liem AKD, Safe SH, Schlatter C, Warn F, Younes M and Yrjanheikki E: Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. Report on a WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993. *Chemosphere* 28, 1049-1067, 1994.
- 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, subcutaneous adipose tissue and stool of Yusho patients and normal subjects. *Toxicol. Environ. Chem.* 35: 17-24, 1992.
- 3) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Fukamachi K, Tokiwa H, Tsuji H and Hori Y: Clinical trials of cholestyramine and a combination of rice bran fiber and cholestyramine for promotion of fecal excretion of retained polychlorinated dibenzofurans in Yusho patients. 12 th International Symposium on Dioxins and Related Compounds, Tampere, Finland, August, 24-28, 1992.
- 4) Kuratsune M, Yoshimura T, Matsuzaka J and Yamaguchi A: Epidemiological study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Perspect.* 1: 119-128, 1972.
- 5) Kamimura H and Yoshimura H: Stimulation of fecal excretion of etiological compounds of Yusho in Rats. *Fukuoka Acta Med.*, 78: 266-280, 1987.
- 6) Morita K, Hirakawa H, Matsueda T, Iida T and Tokiwa H: Stimulating effect of dietary fiber on fecal excretion of polychlorinated dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated-p-dioxins (PCDD) in rat. *Fukuoka Acta Med.* 84: 273-281, 1993.
- 7) 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 (1-TEF). Method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. 1988 #178.
- 8) Okumura J and Katsuki S: Clinical observation on Yusho (Chlorobiphenyl poisoning). *Fukuoka Acta Med.* 60: 440-446, 1969.
- 9) 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.
- 10) Takenaka S, Morita K, Takahashi K: Stimulation of the fecal excretion of polychlorinated biphenyls (KC-600) by diets containing rice bran fiber and cholestyramine. *Fukuoka Acta Med.* 82: 310-316, 1991.

(Received for publication April 13, 1995)

(和文抄録)

## 台湾 Yu-Cheng 患者における米ぬか繊維および コレステラミンによる PCDF および PCB の排泄促進

福岡県保健環境研究所

飯田隆雄・中川礼子・平川博仙  
松枝隆彦・森田邦正・濱村研吾

九州大学医学部皮膚科学教室

中山樹一郎・堀 嘉昭

國立成功大学醫學院工業衛生學科

郭 育良

臺灣省政府衛生處

張 峰鳴・蕭 博文・林 克炤

國立成功大学醫學院公共衛生學科

余 梅琳

國立成功大学醫學院精神醫學科

賴 徳仁・陳 信昭・徐 澄清

台湾の Yu-Cheng 患者 8 名に米ぬか繊維とコレステラミンを 2 週間投与して体内に残留している PCDF および PCB の糞便への排泄促進を試みた。糞便試料の回収ができた 6 名のうち 4 名で 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF), 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (HxCDF) および PCB が 60

-160%, 30-110% および 50-190% の排泄促進が認められた。PeCDF の糞中排泄量の増加は統計的に有意であった。8 名の患者の治療薬投与後の血中 PCDF および PCB 濃度は投与前に比べて減少していた。治療薬投与による血中 PeCDF 濃度および脂質含量の減少は統計的に有意であった。

## 台湾 Yu-Cheng 患者における PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs の血液中濃度および糞便中排泄量

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・濱村研吾

九州大学医学部皮膚科学教室

中山樹一郎・堀嘉昭

國立成功大學醫學院工業衛生學科

郭育良

臺灣省政府衛生處

張峰鳴・蕭博文・林克炤

國立成功大學醫學院公共衛生學科

余梅琳

國立成功大學醫學院精神醫學科

賴德仁・陳信昭・徐澄清

## Levels of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in the blood and stool of Taiwanese Yu-Cheng patients

Takao IIDA, Hironori HIRAKAWA, Takahiko MATSUEDA  
Reiko NAKAGAWA, Kunimasa MORITA and Kengo HAMAMURA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,  
39, Mukaizano, Dazaifu-shi, Fukuoka, 818-01*

Juichiro NAKAYAMA and Yoshiaki HORI

*Department of Dermatology, Faculty of Medicine,  
Kyushu University 60 Maedashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-82*

Yue-Liang LEON GUO

*Department of Environmental Occupational Health, National  
Cheng Kung University Medical College, Tainan, Taiwan, R. O. C.*

Fong-Ming CHANG, Po-Wun HSIAO and Ko-Chow LIN

*Taiwan Provincial Health Department, R. O. C.*

Mei-Lin YU

*Department of Public Health, National Cheng Kung University*

Te-Jen LAI, Shin-Jaw CHEN and Chen-Chin HSU

*Department of Psychiatry, National Cheng Kung University  
Medical College, Tainan, Taiwan, R. O. C.*

**Abstract** Levels of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs were measured in the blood and stool obtained from seventeen patients with Yu-Cheng in Taiwan. The average total concentrations of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in the blood collected from Yu-Cheng patients in January

1993 and August 1994 were 590 and 570 pg Toxic Equivalents (TEQs)/g lipid, respectively.

The concentrations of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in the blood of patients were 21, 540 and 10 pg TEQs/g fat, respectively. On the other hand, the fecal excretion of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs were 26, 720 and 15 pg TEQs/day, respectively. The composition of congeners in the feces was quite similar to the one in the blood. The half lives were estimated as 9.1 and 8.6 years for 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran and 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran based on fecal excretion, respectively.

## はじめに

1968年に日本で油症が発生してから11年後の1979年に台湾でこの油症に似たYu-Chengが起こった<sup>7)18)</sup>。両事件の原因はともにポリ塩化ビフェニル(PCBs)製品である熱媒体で汚染されたライスオイルであり、これらの原因油からはPCBsの他にポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)が検出されている<sup>3)14)</sup>。PCDFsはPCBsを加熱すると生成するので熱媒体が使用されている間に生成したと考えられている<sup>12)13)</sup>。このPCDFsは毒性が非常に高いので油症やYu-Cheng事件の原因物質とされている<sup>8)11)</sup>。さらに、油症患者やYu-Cheng患者の血液等の生体試料からPCDFsが検出されており、それらが患者体内に残留していることが明らかにされている<sup>2)15)</sup>。我々はすでに日本の油症患者体内に残留しているPCBsやPCDFsが糞便中に排泄されていることを報告した<sup>6)</sup>。今回、台湾のYu-Cheng患者17名の血液および糞便試料についてPCBsやPCDFs等の体内残留と排泄状況を検討した。

## 実験方法

### 1. 試料

台湾の患者血液：1994年2月および1994年8月に17名のYu-Cheng患者から約20 mlの末梢血をヘパリン入り真空採血管に採取した。血液は分析されるまで4°C以下で保存した。

患者の糞便試料：17名の台湾の患者について、1993年8月9日から29日の21日間(3週間)の糞便全量を採取した。試料は分析されるまで-20°Cで保存した。

### 2. 試薬

内部標準として使用した<sup>13</sup>C-PCDDs, PCDFsおよび<sup>13</sup>C-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のうち、トルエンはキシダ化学製残留農薬分析用、メタノール、エタノール、ヘキサン、アセトン、クロロホルムおよびジクロロメタンは和光純薬製残留農薬分析用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、PCB・フタル酸試験用無水硫酸ナトリウム等を使用した。

### 3. 分析方法

#### 3-1 試料の精製

##### 3-1-1 血液試料

PCDDs, PCDFsおよびCo-PCBsの分析は患者試料では血液5~10 gを健常者では50~100 g採取し、<sup>13</sup>C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。この溶液にアセトンとヘキサンの混合溶媒(2:1) 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上で乾燥した。この試料を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留去し、予め重量を求めた約2 gの秤量びんに移し室温で一夜放置し溶媒を揮散させた後、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、硝酸銀シリカゲルカラムおよび活性炭カラムで精製した。最後に、濃硫酸とともに振り混ぜて精製し溶媒を室温で蒸散させたのち、n-ノナンに溶解してGC/MS用試料とした。

##### 3-1-2 糞便試料

一週間分の糞便試料をポリトロン®で均一にし、その100 gを密閉ガラス容器に採取してメタノール・クロロホルムを加えて30分振とうした後、石英ろ紙を用いて桐山ロートでろ過した。ろ紙上の抽出残滓を先のガラス容器に入れメタノール・クロロホルム(2:1)を加えて5分間超音波抽出し再び桐山ロートでろ過した。ろ液を分液ロートにあわせ、蒸留水を加えてクロロホルム層を分離させた。クロロホルム層を分取し無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒をロータリーエバポレーターで留去した。抽出物(3 g以下)に<sup>13</sup>CでラベルしたPCDDs, PCDFsおよびCo-PCBsを内部標準として添加し、0.5 Nの水酸化ナトリウム・エタノール溶液20 mlを加え一夜室温で放置してアルカリ分解した。ヘキサンで2回抽出し、ヘキサン抽出液は水洗し無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒をロータリーエバポレーターで留去し残さをヘキサンに溶解させ濃硫酸1 mlを加えて振り混ぜた後、遠沈しヘキサン層を



分離した。以下、このヘキサン層について血液と同様に硝酸銀シリカゲルカラム、活性炭カラム、濃硫酸処理を行い、溶媒を室温下で蒸散させ *n*-ノナンに溶解させ GC/MS 用試料とした。

### 3-2 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/DFs の分析はスベルコ社製 SP-2331 カラム (0.32 mm×60 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<sup>4)</sup> の通りである。

## 結 果

17 名の台湾 Yu-Cheng 患者より採取した血液中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度 (単位はすべて脂質量当たりで表示) 測定値を Table 1 に示した。Table 2 に台湾 Yu-Cheng 患者 17 名の糞便中への PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 排泄量を示した。PCDDs および PCDFs の 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) Toxic Equivalent (TEQ) の計算は NATO<sup>10)</sup> の換算係数を用い、Co-PCBs については WHO<sup>1)</sup> の報告値を使用した。血液中および糞中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の TEQ 換算値を Table 3 に示した。

### 1. 台湾 Yu-Cheng 患者血中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度

Table 1 に示したように 2 回の分析値は octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) を除いてよく一致した値を示した。OCDD は 2 回の分析値が異なるケースがあり、平均値 (380 および 550 pg/g) でみても差があった。PCDDs の中でも OCDD が最も高い値を示し、平均値でみると 2, 3, 7, 8-TCDD (5 および 4 pg/g), 1, 2, 3, 7, 8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (PeCDD) (14 および 13 pg/g), 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin (HxCDD) (93 および 83 pg/g) および 1, 2, 3, 4,

6, 7, 8-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin (HpCDD) (56 および 49 pg/g) であった。PCDFs では 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzofuran (HxCDF) (1,700 および 1,900 pg/g) が最も高い値を示し、ついで 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (PeCDF) (750 および 690 pg/g), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptachlorodibenzofuran (HpCDF) (49 および 56 pg/g) および 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) (10 および 13 pg/g) が検出された。また、Co-PCBs では 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TeCB) (23 および 20 pg/g), 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PeCB) (79 および 81 pg/g) および 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (HxCB) (39 および 49 pg/g) が検出された。これら PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の 2, 3, 7, 8-TCDD の換算値の総和 (総 TEQ) は平均値で 590 および 570 pg/g とよく一致していた。一方、血液中の脂質濃度の 2 回の測定値は平均値で 0.50 および 0.42% とかなり異なる値を示した。これは、患者 C02 の血中脂質濃度が 1 回目 1.62% に対して 2 回目 0.51% と大きく変化したことが影響している。

### 2. 台湾 Yu-Cheng 患者の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の糞中排泄

Table 2 に示すように PCDDs の排泄 (平均値±SD) では OCDD (1,200±520 pg/day) が最も多くついで 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD (120±59 pg/day), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD (78±35 pg/day), 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD (19±14 pg/day), 2, 3, 7, 8-TCDD (3±2 pg/day) の順であった。また、PCDFs の排泄は 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF (2,600±1,700 pg/day) が最も多くついで 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF (910±580 pg/day), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF (84±49 pg/day), 1, 2, 3, 7, 8-PeCDF (24±18 pg/day), 2, 3, 7, 8-TCDF (13±8 pg/day) であった。Co-PCBs の排泄は PeCB (110±120 pg/day) が最も多くついで TeCB (78±92 pg/day), HxCB (65±51 pg/day) であった。Fig. 1 に血中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度 (脂質ベース) と糞中排泄量の平均値を図示した。この図から分かるように排泄量はほぼ血中濃度を反映した結果となっていた。

### 3. 血液および糞中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の TEQ 換算値

Table 3 に示したように血液中の総 TEQ (脂質ベース) は平均で 580 pg/g でこの大部分 (94%) は PCDFs によるもので PCDDs および Co-PCBs の寄与は、それぞれ、4 及び 2% にすぎなかった。また、PCDFs の寄与のほとんどすべては 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF および 1,

Table 1 Concentration of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in blood of Yu-Cheng patients in Taiwan (pg/g lipid basis)

| Congener            | A04   | A05      | B01      | B02  | B03   | B04  | B06   | C02   | C04   | D01   | D02   | D03   | D06   | D09   | D10   | D11   | D13   | Mean  | SD    | Min  | Max   |
|---------------------|-------|----------|----------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 2,3,7,8-TCDD        | 5     | 4 ND(<7) | 6 ND(<2) | 7    | 2     | 2    | 2     | 4     | 17    | 7     | 13    | 4     | 8     | 3     | 3     | 3     | 3     | 5     | 3     | 2    | 13    |
|                     | 2     |          | 5        | 2    | 2     | 2    | 2     | 4     | 17    | 7     | 8     | 2     | 3     | 4     | 3     | 2     | 1     | 4     | 4     | 1    | 17    |
| 1,2,3,7,8-PeCDD     | 8     | 11       | 19       | 15   | 10    | 25   | 15    | 16    | 13    | 16    | 14    | 10    | 11    | 14    | 11    | 13    | 10    | 14    | 4     | 8    | 25    |
|                     | 8     | 7        | 10       | 14   | 14    | 12   | 7     | 15    | 44    | 13    | 18    | 8     | 11    | 9     | 14    | 8     | 9     | 13    | 9     | 7    | 44    |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD   | 60    | 81       | 120      | 87   | 92    | 63   | 110   | 120   | 91    | 140   | 56    | 78    | 81    | 110   | 110   | 76    | 100   | 93    | 23    | 56   | 140   |
|                     | 48    | 73       | 79       | 83   | 82    | 46   | 89    | 100   | 110   | 110   | 68    | 60    | 77    | 110   | 96    | 82    | 92    | 83    | 20    | 46   | 110   |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 55    | 53       | 72       | 60   | 36    | 170  | 47    | 15    | 45    | 40    | 82    | 45    | 42    | 50    | 42    | 48    | 40    | 56    | 33    | 15   | 170   |
|                     | 44    | 36       | 27       | 54   | 30    | 110  | 29    | 30    | 110   | 22    | 68    | 42    | 42    | 47    | 38    | 41    | 57    | 49    | 26    | 22   | 110   |
| OCDD                | 610   | 320      | 530      | 410  | 280   | 580  | 310   | 130   | 330   | 250   | 530   | 330   | 510   | 310   | 300   | 270   | 330   | 380   | 130   | 130  | 610   |
|                     | 2,100 | 450      | 420      | 470  | 350   | 800  | 330   | 240   | 700   | 440   | 870   | 470   | 440   | 270   | 320   | 280   | 440   | 550   | 440   | 240  | 2,100 |
| 2,3,7,8-TCDF        | 10    | 6        | 14       | 11   | 6     | NA   | 9     | 6     | 13    | 15    | 14    | 7     | 14    | 9     | 5     | 9     | 7     | 10    | 3     | 5    | 15    |
|                     | 4     |          | 9        |      |       | 8    | 6     | 8     | 26    | 9     | 12    | 10    | 63    | 11    | 9     | 18    | 13    | 13    | 14    | 4    | 63    |
| 2,3,4,7,8-PeCDF     | 420   | 810      | 840      | 420  | 650   | 350  | 430   | 1,300 | 870   | 2,100 | 570   | 890   | 460   | 1,300 | 610   | 260   | 520   | 750   | 460   | 260  | 2,100 |
|                     | 380   | 850      | 720      | 450  | 550   | 200  | 370   | 1,000 | 630   | 2,400 | 550   | 650   | 520   | 1,300 | 640   | 190   | 330   | 690   | 520   | 190  | 2,400 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF   | 580   | 1,300    | 2,200    | 870  | 1,500 | 850  | 1,600 | 2,900 | 1,900 | 3,900 | 1,500 | 1,500 | 1,200 | 2,800 | 1,400 | 1,500 | 1,200 | 1,700 | 840   | 580  | 3,900 |
|                     | 620   | 1,500    | 2,300    | 960  | 1,600 | 650  | 1,400 | 4,500 | 1,500 | 5,200 | 1,600 | 1,400 | 1,300 | 2,900 | 1,600 | 1,800 | 1,500 | 1,900 | 1,200 | 620  | 5,200 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 30    | 46       | 75       | 37   | 36    | 67   | 81    | 36    | 39    | 67    | 56    | 49    | 60    | 33    | 43    | 35    | 49    | 16    | 30    | 81   |       |
|                     | 28    | 42       | 67       | 48   | 39    | 31   | 73    | 54    | 85    | 67    | 72    | 56    | 61    | 58    | 41    | 68    | 65    | 56    | 16    | 28   | 85    |
| 3,3',4,4'-TeCB      | 33    | 20       | 38       | 34   | 15    | 9    | 18    | 7     | 16    | 35    | 27    | 13    | 29    | 19    | 9     | 22    | 44    | 23    | 11    | 7    | 44    |
|                     | 15    | 12       | 21       | 28   | 10    | 19   | 15    | 23    | 11    | 16    | 24    | 15    | 13    | 30    | 18    | 39    | 30    | 20    | 8     | 10   | 39    |
| 3,3',4,4',5-PeCB    | 30    | 29       | 62       | 66   | 66    | 115  | 46    | 140   | 70    | 100   | 47    | 88    | 38    | 52    | 91    | 140   | 170   | 79    | 42    | 29   | 170   |
|                     | 39    | 40       | 62       | 69   | 56    | 67   | 64    | 160   | 53    | 92    | 82    | 64    | 63    | 96    | 100   | 120   | 150   | 81    | 35    | 39   | 160   |
| 3,3',4,4',5,5'-HxCB | 24    | 27       | 36       | 49   | 35    | 61   | 30    | 68    | 38    | 45    | 27    | 30    | 24    | 29    | 42    | 37    | 56    | 39    | 13    | 24   | 68    |
|                     | 33    | 38       | 41       | 65   | 54    | 31   | 49    | 83    | 37    | 57    | 41    | 34    | 41    | 44    | 82    | 34    | 77    | 49    | 17    | 31   | 83    |
| Total-TEQ           | 290   | 560      | 670      | 330  | 500   | 300  | 400   | 970   | 670   | 1,500 | 470   | 630   | 380   | 990   | 480   | 320   | 490   | 590   | 320   | 290  | 1,500 |
|                     | 270   | 590      | 610      | 360  | 460   | 190  | 350   | 1,000 | 530   | 1,800 | 470   | 490   | 420   | 970   | 520   | 310   | 350   | 570   | 380   | 190  | 1,800 |
| Fat (%)             | 0.44  | 0.42     | 0.34     | 0.46 | 0.70  | 0.36 | 0.40  | 1.62  | 0.44  | 0.56  | 0.35  | 0.49  | 0.35  | 0.36  | 0.51  | 0.37  | 0.37  | 0.50  | 0.03  | 0.34 | 1.62  |
|                     | 0.50  | 0.45     | 0.42     | 0.37 | 0.59  | 0.33 | 0.42  | 0.51  | 0.43  | 0.54  | 0.29  | 0.37  | 0.36  | 0.36  | 0.42  | 0.35  | 0.31  | 0.41  | 0.08  | 0.29 | 0.59  |

Upper line data shows the measurements in the blood collected in January 1993

and lower line data shows the measurements in the blood collected in August 1994.

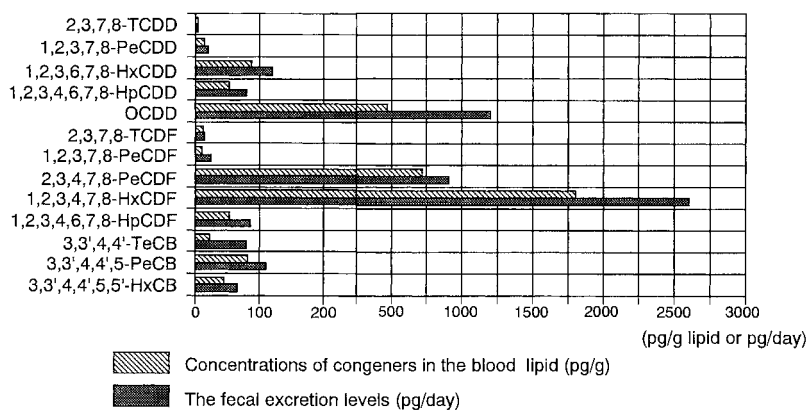
Table 2 Fecal excretion levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in Yu-Cheng patients in Taiwan (pg/day)

| Congener                  | A04   | A05   | B01   | B02   | B03   | B04   | B06   | C02   | C04   | D01   | D02   | D03   | D06   | D09   | D10   | D11   | D13 | Mean  | SD    | Min | Max   |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-----|-------|
| 2,3,7,8-TCDD              | 3     | 1     | 4     | 3     | 2     | 3     | 4     | 5     | 2     | 1     | 6     | 2     | 3     | 2     | 6     | 4     | 1   | 3     | 2     | 1   | 6     |
| 1,2,3,7,8-PeCDD           | 13    | 8     | 18    | 16    | 13    | 23    | 14    | 25    | 7     | 7     | 33    | 10    | 40    | 13    | 57    | 21    | 4   | 19    | 14    | 4   | 57    |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD         | 68    | 94    | 65    | 130   | 120   | 57    | 190   | 96    | 67    | 64    | 79    | 140   | 160   | 200   | 240   | 180   | 38  | 120   | 59    | 38  | 240   |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD       | 150   | 56    | 40    | 110   | 90    | 140   | 88    | 49    | 49    | 41    | 59    | 85    | 87    | 99    | 97    | 73    | 19  | 78    | 35    | 19  | 150   |
| OCDD                      | 1,800 | 930   | 1,100 | 1,000 | 1,000 | 1,200 | 1,700 | 940   | 560   | 670   | 1,300 | 1,200 | 1,200 | 2,600 | 1,300 | 1,300 | 330 | 1,200 | 520   | 330 | 2,600 |
| 2,3,7,8-TCDF              | 7     | 7     | 13    | 7     | 6     | 18    | 15    | 15    | 8     | 6     | 9     | 15    | 13    | 31    | 28    | 23    | 3   | 13    | 8     | 3   | 31    |
| 2,3,4,7,8-PeCDF           | 470   | 930   | 570   | 570   | 690   | 230   | 1,400 | 960   | 660   | 600   | 820   | 1,400 | 980   | 2,400 | 1,900 | 730   | 170 | 910   | 580   | 170 | 2,400 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF         | 900   | 2,000 | 1,700 | 1,300 | 2,200 | 940   | 6,100 | 3,700 | 1,100 | 1,200 | 2,300 | 3,100 | 2,700 | 6,300 | 3,300 | 4,400 | 620 | 2,600 | 1,700 | 620 | 6,300 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF       | 52    | 59    | 74    | 67    | 82    | 38    | 200   | 64    | 33    | 30    | 73    | 110   | 79    | 160   | 150   | 140   | 20  | 84    | 51    | 20  | 200   |
| 3,3',4,4'-TeCB            | 33    | 22    | 17    | 57    | 37    | 40    | 81    | 270   | 26    | 37    | 43    | 48    | 39    | 62    | 160   | 340   | 16  | 78    | 92    | 16  | 340   |
| 3,3',4,4',5-PeCB          | 28    | 35    | 36    | 100   | 46    | 63    | 180   | 110   | 49    | 51    | 68    | 89    | 120   | 92    | 490   | 300   | 54  | 110   | 120   | 28  | 490   |
| 3,3',4,4',5,5'-HxCB       | 27    | 31    | 24    | 76    | 38    | 42    | 130   | 51    | 41    | 34    | 49    | 60    | 75    | 69    | 220   | 100   | 21  | 65    | 51    | 21  | 220   |
| TEQ (International & WHO) | 350   | 690   | 470   | 460   | 600   | 240   | 1,400 | 890   | 470   | 450   | 680   | 1,000 | 820   | 1,900 | 1,400 | 880   | 160 | 760   | 460   | 160 | 1,900 |

**Table 3** Concentration of PCDDs, PCDFs and Co-PCB congeners in the blood lipid and fecal excretion of patient with Yu-Cheng in Taiwan

|            | Concentration in blood lipid (pg/g) |                       | Fecal excretion level (pg/day) |                       |
|------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|
|            | Mean±SD                             | Range                 | Mean±SD                        | Range                 |
| PCDD-TEQ   | 21±5<br>(4±3%)*                     | 15-37<br>(2-9%)*      | 26±13<br>(3±2%)*               | 7-61<br>(2-7%)*       |
| PCDF-TEQ   | 550±340<br>(94±3%)*                 | 210-1600<br>(87-98%)* | 720±440<br>(95±2%)*            | 150-1800<br>(89-98%)* |
| Co-PCB-TEQ | 10±4<br>(2±1%)*                     | 5-19<br>(1-5%)*       | 15±14<br>(2±1%)*               | 4-60<br>(1-4%)*       |
| Total TEQ  | 580±340<br>(100%)                   | 250±1600              | 760±460<br>(100%)              | 160-1900              |

\*: Percentage to the total TEQ

**Fig. 1** Concentration of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs congeners in the blood (pg/g lipid) and fecal excretion levels (pg/day) of those congeners in the patients with Yu-Cheng in Taiwan

2, 3, 4, 7, 8-HxCDF によるもので、それぞれ、総 TEQ の 61 および 32% であった。一方、糞便中に排泄されている PCDFs 等の総 TEQ は平均で 760 pg/day で血中濃度の場合場合と全く同様に大部分 (95%) は PCDFs によるもので PCDDs および Co-PCBs の寄与は、それぞれ、3 および 2% であり、また、PCDFs の寄与は 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF および 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF によるもので、それぞれ、総 TEQ の 60 および 34% であった。このことから台湾の Yu-Cheng を考える上で 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF および 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF は最も重要な化学物質といえる。

### 考 察

台湾 Yu-Cheng 患者 17 名の 1993 年 1 月と 1994 年 8 月に採取された血液 PCDDs, PCDFs および Co-

PCBs の分析結果は、それぞれよく一致していた。これはこれらの化合物が約 1 年 7 月の間にあまり減少しなかったことを示唆している。しかし、OCDD は他の分析項目と比べて 2 回の分析結果が異なるケースが多く、平均値でも 380 pg/g および 550 pg/g とかなりの変動を示した。これは OCDD のバックグラウンド値が高く日常的に摂取される食事からの影響を受け易いためと考えられる<sup>17)</sup>。

我々は 7 例の油症の既往歴が否定される培検例から摘出された組織試料(肝臓、血液、皮下脂肪組織、脳)中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度を調べた<sup>5)</sup>。その結果、皮下脂肪組織と血液のこれらの化合物の脂肪ベースの濃度は比較的よく一致し、血液中のこれらの化合物の脂質ベースの濃度から体内の脂質中濃度の推定が可能と考えられる。また、脂肪組織中の濃

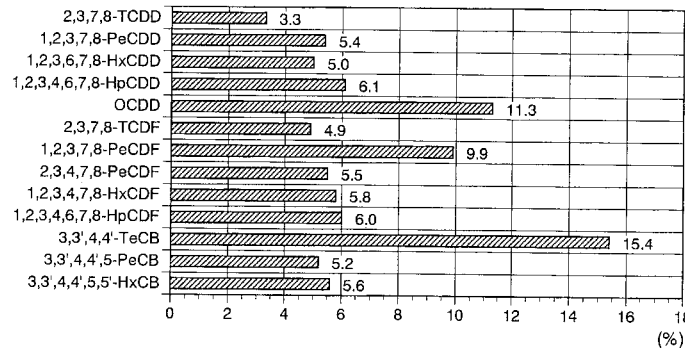


Fig. 2 Estimation of the fecal excretion rate (%/year) to the residual congeners of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in Yu-Cheng patients in Taiwan

度は他の組織中の濃度と比べてきわめて高い値を示し量的にも多い(体重の約18%)<sup>19)</sup>ことからこれらの化合物は大部分脂肪中に残留していると考えられる。そこで、体内残留量はTable 1に示した各患者の血液中の脂質ベース濃度に体内脂肪量(各患者の体内脂肪量を10 kgと仮定)を乗じて求めた。また、年間排泄量はTable 2の一日排泄量から求めた。Fig. 2に各化合物の患者体内の残留量(推定値)に対する年間の糞中排泄量の割合を示す。この図から分かるように残留量に対する排泄量の割合が大きいのはTeCB(平均値±SD:15±18%/year)、OCDD(11±7.5%/year)であり、逆に少ないのは2,3,7,8-TCDD(3.3±2.3%/year)で、その他は、1,2,3,7,8-PeCDD(5.4±4.1%/year)、1,2,3,4,7,8-HxCDD(5.0±2.3%/year)、1,2,3,4,6,7,8-HpCDD(6.1±2.8%/year)、2,3,7,8-TCDF(4.9±3.8%/year)、2,3,4,7,8-PeCDF(5.5±3.5%/year)、1,2,3,4,7,8-HxCDF(5.8±3.4%/year)、1,2,3,4,6,7,8-HpCDF(6.0±3.5%/year)、3,3',4,4',5-PeCB(5.2±5.2%/year)、3,3',4,4',5,5'-HxCB(5.6±3.3%/year)と年間の排泄量は4.9から6.1%の範囲にあった。これらの化合物は環境汚染物質で、主として食品を通して人体に取り込まれているので排泄速度はその影響を受ける。しかし、2,3,4,7,8-PeCDFおよび1,2,3,4,7,8-HxCDFは台湾Yu-Cheng患者では体内残留量が環境汚染の影響を無視できる程大きいのでその排泄速度は比較的正確と考えられる。排泄量の絶対値が変わらず排泄経路が糞中排泄のみと仮定して単純に2,3,4,7,8-PeCDFおよび1,2,3,4,7,8-HxCDFの半減期を求めると、それぞれ、9.1および8.6年となる。増田らは台湾のYu-Cheng事件発生からまもない1980年から1989年にかけて採

取したYu-Cheng患者の血液中のPCDFs濃度を経時的に測定し2,3,4,7,8-PeCDFおよび1,2,3,4,7,8-HxCDFの半減期を2.14および2.56年と報告している<sup>9)</sup>。また、油症発生から14年の後1982年から1991年にかけて採取した日本の油症患者の血液中の2,3,4,7,8-PeCDFおよび1,2,3,4,7,8-HxCDFの濃度減少から1コンパートメントモデルで計算した半減期を中央値で、それぞれ、11.7および7.0年としている<sup>10)</sup>。今回の台湾Yu-Cheng患者のPCDFsの糞便中への排泄から推定したその半減期は日本の油症患者のそれに近い値を示した。これは台湾Yu-Chengも事件発生後すでに十数年を経過しているためと考えられる。

## 総 括

17名の台湾Yu-Cheng患者より採取した血液についてPCDDs, PCDFsおよびCo-PCBsを測定し、さらに、これらの化合物の糞便中排泄量を測定した。

1. 台湾Yu-Cheng患者17名の血中PCDDs, PCDFsおよびCo-PCBs濃度(脂質ベース)の1993年1月における測定値と1994年8月における測定値の平均は2,3,7,8-TCDD 5および4 pg/g、1,2,3,7,8-PeCDD 14および13 pg/g、1,2,3,4,7,8-HxCDD 93および83 pg/g、1,2,3,4,6,7,8-HpCDD 56および49 pg/g、OCDD 380および550 pg/g、2,3,7,8-TCDF 10および13 pg/g、2,3,4,7,8-PeCDF 750および690 pg/g、1,2,3,4,7,8-および1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,700および1,900 pg/g、1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 49および56 pg/g、3,3',4,4'-TeCB 23および20 pg/g、3,3',4,4',5-PeCB 79および81 pg/g、3,3',4,4',5,5'-HxCB 39および49 pg/gであり、OCDDを除いて各化合物の2回の測定値は、それぞれ、同程度の値で、

減少傾向は認められなかった。

2. 台湾 Yu-Cheng 患者の糞便から PCDDs, PCDFs および Co-PCBs が検出され、それらの一日の糞中排泄量(平均値)は、2,3,7,8-TCDD(3ng), 1,2,3,7,8-PeCDD (19pg), 1,2,3,4,7,8-HxCDD (120pg), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD(78pg), OCDD(1,200pg), 2,3,7,8-TCDF (13pg), 2,3,4,7,8-PeCDF (910pg), 1,2,3,4,7,8-HxCDF (2,600pg), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (84pg), TeCB(78pg), PeCB(110pg) および HxCB (65pg) であった。これらの排泄量はほぼ血中濃度に対応していた。

## 謝 辞

本研究は平成6年度の厚生科学研究補助金によるものである。ここに記して謝意を表します。

## 文 献

- 1) Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJGM, Feeley M, Golor G, Hanberg A, Larsen JC, Liem AKD, Safe SH, Schlatter C, Warn F, Younes M and Yrjanheikki E: Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. Report on a WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993. *Chemosphere* 28, 1049-1067, 1994.
- 2) Chen PH and Hites RA: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in the tissues of deceased patient with Yu-Cheng in Taiwan. *Chemosphere* 12: 1507-1516, 1983.
- 3) Chen PH, Cheng KT, Lu YD: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in the toxic rice-bran oil that caused PCB poisoning in Taichung. *Bull. environ. contam. Toxicol.* 262: 489-495, 1981.
- 4) 平川博仙, 松枝隆彦, 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克己, 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) 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. Short paper of DIOXIN'92, Organohalogen compounds. 9, 93-96, 1992.
- 6) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Nakagawa R, Takenaka S, Morita K, Narazaki Y, Fukamachi K, Takahashi K, 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) 勝木司馬之助: 序言. *福岡医誌* 60: 403-406, 1969.
- 8) Kunita N, Hori S, Obana H, Otake T and Ikegami N: Biological effect of PCBs, PCQs and PCDFs present in the oil causing Yusho and Yu-cheng. *Environ. Health Perspect.* 59: 79-84, 1985.
- 9) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一, Ryan JJ, 許書刀: 台湾 PCB 中毒患者の血液中 PCDF および PCB の濃度減衰, *福岡医誌* 82: 262-268 1991.
- 10) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一, 斎藤秀美, Ryan JJ: 油症患者血液中 PCDF の濃度推移, *福岡医誌* 84: 236-242 1993.
- 11) -2McNulty PW: Toxicity and fetotoxicity of PCDD, PCDF and PCB isomers in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Environ. health Perspect.* 60: 77-88, 1985.
- 12) Miyata H and Kashimoto T: Investigation on organochlorinated compounds formed in Kanemi Rice Oil that caused the "Yusho". *J. Food Hyg. Soc. Japan* 20: 1-9, 1979.
- 13) 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.
- 14) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Chlorinated dibenzofurans in Kanechlor and rice oil used by patients with Yusho. *Fukuoka Acta Med.* 66: 593-599, 1975.
- 15) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with Yusho. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 15: 9-13 1977.
- 16) 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.
- 17) 高山幸司, 宮田秀明, 青笹治, 味村真弓, 櫻本隆: 日本的大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. *食衛誌* 32: 525-532 1991.
- 18) Wong CK: Foreword. *Clin. Med. (Taipei)* 7: 1-2, 1981.
- 19) Widdowson EM, McCance RA and Spray CM: *Clin. Sci.*, 110: 113, 1951.

(受付 1995-4-13)

## ラットのインスリン感受性に対する PCBs の影響

佐賀医科大学地域保健科学講座

西 住 昌 裕・檜 垣 靖 樹

### Effect of PCBs on Insulin Sensitivity in Rats

Masahiro NISHIZUMI and Yasuki HIGAKI

*Department of Community Health Science  
Saga Medical School, Saga 849*

Insulin sensitivity was assessed by euglycemic insulin clamp method in the rats given Kanechlor (KC)-400 for 1 to 12 weeks.

As a result, insulin sensitivity was depressed increasingly with period of administration of KC-400. Increases in total cholesterol, HDL-C, triglyceride, lipid peroxide and  $T_3$  in blood plasma were also observed in the experimental rats. Voluntary daily activity of rats given KC-400, especially in a later half of night-time, had been depressed since approximately 9 weeks after start of the experiment.

It was concluded that depression of insulin sensitivity might be related to not only disturbance of glucose and lipid metabolism, but reduced daily activity in conjunction with disturbed thyroid function.

#### は じ め に

油症患者の初期症状として眼科・皮膚科学的所見と共に、全身倦怠感、食欲不振、易疲労感などの全身症状<sup>14)</sup>が報告されているが、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) はマウス、ラットなどの実験動物に対しても、体重増加の抑制を示す程度の投与量によって摂餌量の減少、日常活動量の低下がみられる<sup>13)17)</sup>。また、ポリ塩化ジベンゾダイオキシン (PCDD)<sup>6)</sup>や、ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF)<sup>12)</sup>の投与では、より著明な摂餌量の減少、活動量の低下と共に体重減少が進行して死亡に至る wasting syndrome<sup>15)</sup>として報告されている。このような生体の状況においては、体内での糖質の利用をはじめとしたエネルギー代謝も障害されている可能性が考えられる。

この点を検討するため、カネクロール (KC)-400 を最長 12 週間にわたってラットに投与し、インスリン・クランプ法<sup>7)</sup>によってインスリン感受性をみることに より PCBs の糖代謝への影響を観察した。なお、同時に血中のグルコース、インスリン、脂質、甲状腺ホルモン、性ホルモンおよび肝機能指標としての若干の酵素活性なども測定して、エネルギー代謝全般に対する

影響についても考察した。

#### 実 験 方 法

5~10 週齢の Wistar 系雄ラット 45 匹を用い、PCBs として KC-400 をオリーブ油に溶解し、体重 1 kg 当たり 100 mg を強制経口的に、週 2 回の頻度で 1 週間投与する群、4 週間投与する群、8 週間投与する群および 12 週間投与する群の 4 群と、それぞれの群に対してオリーブ油のみを投与する対照群を設けた。投与期間が各群で異なるため、実験データへの加齢による影響を少なくするために、インスリン・クランプ実験を行う時の週齢をほぼ同一時期 (11~16 週齢) となるように設定し、KC-400 の投与開始時期を逆算して決定した。飼育の期間中、室温は 24°C に保ち、明暗サイクルは明期を AM 7:00~PM 7:00 の 12 時間とし、飼料の CE-2 (クレア製) および水は各群とも自由に摂取させた。なお、KC-400 を 12 週間投与する群と対照群のラット、それぞれ 2 匹について、毎週 5 日、回転式運動量測定器により自発運動量を測定した。

各群、最後の KC-400 投与終了後 2 日以上の間隔をあげ、インスリン・クランプ実験を行った。インスリン・クランプ実験は、Kraegen らの方法<sup>7)</sup>に従った。

概要は以下の通りである。12時間の絶食状態の後、ペントバルビタールの腹腔内投与(5 mg/100 g 体重)による麻酔下で、左頸動脈および右頸静脈にカテーテルを挿入し、前者を血液サンプルの採取に、後者をグルコースおよびインスリン注入のために利用した。30分間の安静の後、血中のトリグリセライド、総コレステロールおよび過酸化脂質の測定のために、500  $\mu$ l の血液を採取した。その後、アクトラピッド MC インスリン(40 U/ml, ノボ社製)を 5 mU/kg/min の速度で持続的に注入した。注入開始後、5 分毎に 60  $\mu$ l の血液を採取し、直ちに血漿グルコース値を測定し、常に 120 mg/dl を維持するように外因的な 10%グルコースの注入速度を調節した。血漿インスリン値は、インスリン注入開始後 60 分に 250  $\mu$ l の血液を採取し、測定した。この一連の実験は被検動物の体温低下を防ぐために約 38 °C に設定したヒーティング・ケット上で行った。血漿グルコース値の測定は固定化酵素法(グルコース・アナライザー 2300 STAT, YSI 社製)により、血漿インスリン値は RIA 法により測定した。インスリン・クランプ終了後、血液を採取し、その血漿につきトリグリセライド(酵素法)、総コレステロール(COD-POD 酵素法)、過酸化脂質(蛍光八木法)、 $T_4$ (RIA 固相法)、 $T_3$ (RIA 固相法)、テストステロン(RIA 固相法)、エストラジオール(E2)(RIA 固相法)、GOT

(試験紙法)、GPT(試験紙法)の測定を行った。また、肝、腎、脾、胸腺などの主要臓器は摘出、重量測定後、病理組織学的検索に供した。

KC-400 投与群と対照群の各種測定値につき平均値の差の検定には、Student's t-test を用い、有意差の限界は 5%未満とした。

## 実験結果

KC-400 投与群は対照群に比し、投与後 8 週から体重増加の有意の抑制(Table 1)のほか、食餌の摂取量が減少した(投与開始後、10 週で対照群の 85%)が、全身状態で特別な異常は認められなかった。ただ、2 対のラットで回転式運動量測定器による 1 日運動量を測定したところ、対照ラットは実験初期(5~8 齢)に比し、後期(13~16 週齢)では、むしろ運動量が増加したのに対し、実験群のラットは同じ週齢(KC-400 投与開始後 9~12 週)では、実験初期に比べ、70%程度に低下していた。これを 1 日運動量の大部分を占める夜間の運動量についてみると、実験群、対照群ともに実験開始初期(1~4 週)では夜間前半(18 時~24 時)の活動量は夜間後半(0 時~6 時)の運動量の 2~3 倍であるが、実験中・後期(5~12 週)になると対照群では夜間後半の運動量が増加して、夜間の前半と後半がほぼ同程度となってくる。しかし、実験ラットでは実

**Table 1** Changes in the values of blood chemical analysis and organ weights in the rats administered Kanechlor 400 and received insulin clamp.

| Period of administration<br>Item                         | 1 week           |                  | 4 weeks          |                 | 8 weeks          |                 | 12 weeks         |                 |
|----------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
|                                                          | Control<br>(n=6) | KC-400<br>(n=10) | Control<br>(n=5) | KC-400<br>(n=7) | Control<br>(n=5) | KC-400<br>(n=6) | Control<br>(n=5) | KC-400<br>(n=8) |
| Body weight (g)                                          | 348±8            | 347±8            | 356±5            | 337±9           | 380±11           | 338±10*         | 484±9            | 391±9*          |
| Liver weight (g)                                         | 16.8±0.4         | 17.1±0.4         | 17.0±0.3         | 21.8±0.7*       | 13.1±0.7         | 20.6±0.7*       | 15.7±0.4         | 21.6±0.7*       |
| Relative liver weight<br>(liver weight/100g body weight) | 4.8±0.1          | 4.9±0.1          | 4.8±0.1          | 6.5±0.3*        | 3.4±0.1          | 6.1±0.1*        | 3.2±0.1          | 5.5±0.1*        |
| Thymus weight (g)                                        | 0.61±0.04        | 0.59±0.03        | 0.45±0.03        | 0.39±0.02       | 0.54±0.03        | 0.32±0.05*      | 0.46±0.05        | 0.21±0.02*      |
| Fasting blood sugar (mg/dl)                              | 113±3            | 118±3            | 122±5            | 120±8           | 115±7            | 123±3           | 112±3            | 116±3           |
| Total cholesterol (mg/dl)                                | 96±7             | 112±5            | 100±7            | 140±7*          | 80±6             | 181±10*         | 75±4             | 166±9*          |
| Triglyceride (mg/dl)                                     | 19±6             | 21±4             | —                | 21±5            | 22±7             | 24±7            | —                | 50±17           |
| Lipid peroxide (nmol/ml)                                 | 2.3±0.1          | 2.4±0.1          | 2.1±0.1          | 2.9±0.1*        | 1.7±0.1          | 3.4±0.2*        | 1.8±0.1          | 3.2±0.2*        |
| HDL (mg/dl)                                              | 26±2             | 33±2*            | 33±4             | 51±4*           | 22±2             | 66±5*           | 28±3             | 67±4*           |
| $T_4$ ( $\mu$ g/dl)                                      | <1.0             | <1.0             | <1.0             | <1.0            | —                | —               | 2.2±1.0          | <1.0            |
| $T_3$ (ng/dl)                                            | <25              | 27±1             | <25              | 38±7            | <25              | 36±3            | 46±7             | 59±1*           |
| Testosterone(ng/dl)                                      | 99±26            | 110±19           | 170±27           | 152±39          | 165±59           | 209±48          | 142±30           | 199±29          |
| E2(pg/ml)                                                | <10              | <10              | <10              | <10             | —                | —               | —                | —               |
| GOT(U/l)                                                 | 83±9             | 114±9*           | 77±5             | 86±2            | 100±24           | 99±21           | 63±10            | 117±14*         |
| GPT(U/l)                                                 | 29±2             | 43±4*            | 34±1             | 29±4            | 36±6             | 49±13           | 28±2             | 60±10*          |

\* : significantly ( $P<0.05$ ) differed from control group.

**Table 2** The values of blood sugar and plasma insulin levels during insulin clamp.

| Period of administration | Control             |                              | KC-400              |                              |
|--------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|
|                          | Blood sugar (mg/dl) | Plasma insulin ( $\mu$ U/ml) | Blood sugar (mg/dl) | Plasma insulin ( $\mu$ U/ml) |
| 1 week                   | 121 $\pm$ 1(6)      | 91 $\pm$ 3                   | 121 $\pm$ 1(9)      | 91 $\pm$ 6                   |
| 4 weeks                  | 120 $\pm$ 1(5)      | 113 $\pm$ 16                 | 123 $\pm$ 1(7)      | 127 $\pm$ 18                 |
| 8 weeks                  | 120 $\pm$ 1(4)      | 111 $\pm$ 12                 | 123 $\pm$ 1(5)      | 101 $\pm$ 14                 |
| 12 weeks                 | 123 $\pm$ 1(4)      | 119 $\pm$ 7                  | 121 $\pm$ 1(4)      | 115 $\pm$ 7                  |

Number in parenthesis shows number of rats measured.

験の中・後期には、双方共に減少するが、とくに夜間後半の運動量の低下が著明で、夜間前半の活動量の1/3程度となる現象が観察され、1日の運動量の低下は主としてこの夜間後半の運動量の低下によると考えられた。

インスリン・クランプ実験前の空腹状態での血糖値はKC-400投与群と対照群との間での有意差は認めず (Table 1), またインスリン・クランプ実験中の血漿グルコース値およびインスリン値は Table 2 に示したように、各群間に有意差はみられなかった。

本実験においてインスリン感受性の指標としたインスリン・クランプ開始後60分から120分の平均グルコース取り込み率はKC-400投与期間が長くなるにつれ、低下傾向を示し、投与開始後8週で対照群に比し有意な低下を示した (Table 3, Fig. 1)。

血中の脂質はインスリン注入により影響を受ける可能性があるため、インスリン・クランプ実験前の血漿について測定したが、KC-400投与群の総コレステロールおよび過酸化脂質は投与4週後から12週までのすべてで対照群に比し有意な高値を示し、HDL値はすでに1週後から対照群に比し、有意な高値を示し、12週まで高値を持続していた。一方、トリグリセライド値も漸増の傾向があり、12週では実験群で1週の値の2倍を越える高値がみられたが、1週ないし8週の時点では対照群と比べて有意な増加とはなっていない (Table 1, Fig. 2, 3, 4, 5)。

甲状腺ホルモンの $T_3$ はすでに投与1週後から対照群に比し、高値を示し、投与期間に依存して増加傾向がみられたが、 $T_4$ 値の上昇はみられず、12週後では、むしろ対照群の方が高い値を示した。

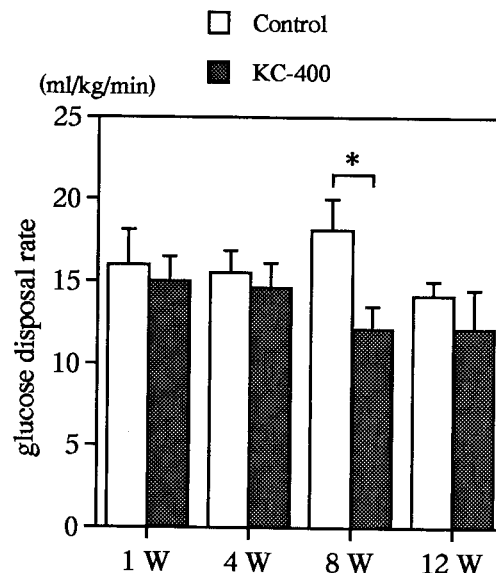
性ホルモンとして測定したtestosteroneは8週、12週と増加傾向にあるものの、対照群と有意差はなく、estradiol (E2)は対照群と同様に低値を示した。

血中GOT, GPTは共に1週後および12週後に対

**Table 3** Effects of administration of KC-400 on glucose disposal rate (mg/kg/min)

| Period of administration | Control           | KC-400             |
|--------------------------|-------------------|--------------------|
| 1 week                   | 15.9 $\pm$ 2.2(6) | 15.0 $\pm$ 1.4 (9) |
| 4 weeks                  | 15.4 $\pm$ 1.4(5) | 14.6 $\pm$ 1.5 (7) |
| 8 weeks                  | 18.1 $\pm$ 1.9(4) | 12.1 $\pm$ 1.4*(5) |
| 12 weeks                 | 14.1 $\pm$ 0.9(4) | 12.1 $\pm$ 2.3 (4) |

\*: significantly ( $P < 0.05$ ) differed from control group. Number in parenthesis shows number of rats measured.



**Fig. 1** Effect of KC-400 on glucose disposal rate measured by insulin clamp method.

照群に比べ有意な高値を示した。

主要臓器については、4週後以降、肝重量ならびに肝体重比の増加と共に、脾ならびに胸腺重量の減少が観察された (Table 1)。肝組織では、4週後に一部の



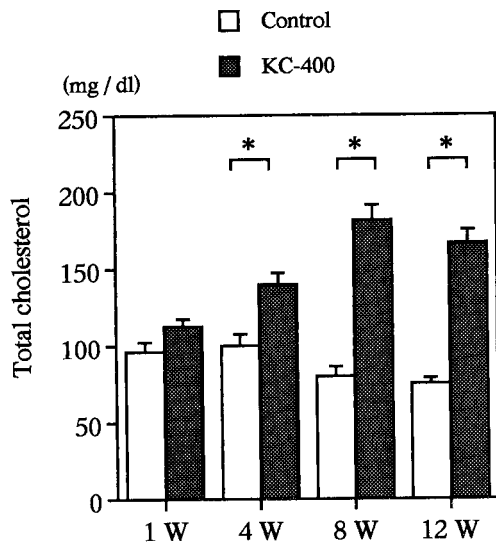


Fig. 2 Effect of KC-400 on plasma cholesterol concentration.

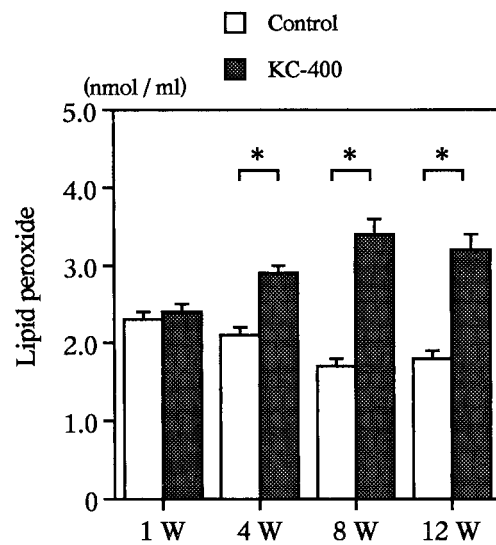


Fig. 3 Effect of KC-400 on plasma lipid peroxide concentration.

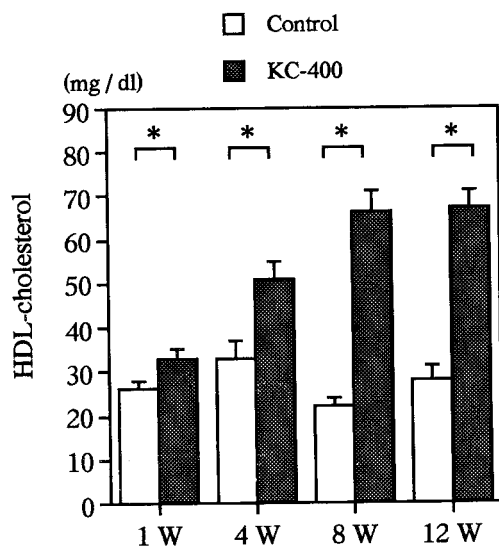


Fig. 4 Effect of KC-400 on plasma HDL-C concentration.

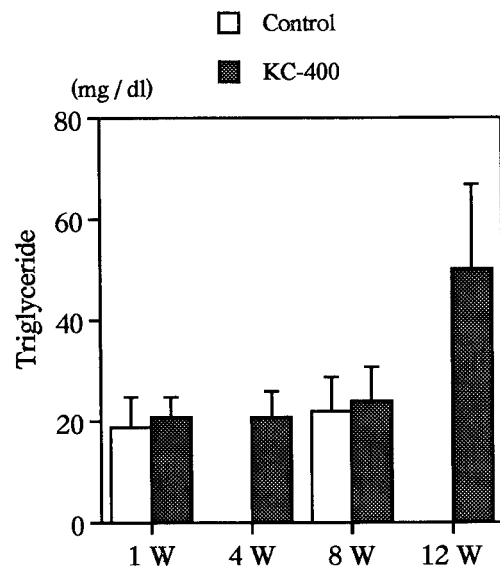


Fig. 5 Effect of KC-400 on plasma triglyceride concentration.

肝細胞に腫大，胞体内の空胞の出現がみられるようになり，8週後，12週後には一層この変化が顕著となり，とくに小葉中心部の細胞の変化が顕著で，一部に脂肪変性を呈する像もみられた。胸腺では，皮質の菲薄化が認められた。

## 考 察

これまでのKC-400ないしKC-500の投与による動物実験の報告<sup>16)</sup>と同様に，本実験でも，体重増加の抑制，肝の腫大，血中のトリグリセライド，総コレステロール，HDL，過酸化脂質，GOT，GPTの各値の上昇がみられたが，ここでは本実験の結果でみられたイ

ンスリン感受性の低下に関連した考察を試みたい。

本実験ではインスリン感受性を euglycemic insulin clamp 法により、グルコースの取り込み率で推定したが、KC-400 の投与期間と共にその感受性は低下傾向を示した。これまで、油症患者のインスリン感受性についての報告はないが、初期の患者に関して、糖質負荷後の血糖変動では、過血糖状態はみられないが、正常人型の変動を示す者のほか、糖質負荷後 60 分の血糖値の上昇が軽度で負荷後 3 時間でもなお、空腹時の血糖値より増加している異常型がみられたとの報告<sup>10)</sup>がある。このような患者でのインスリン感受性がどうなっていたかを知りたい所である。今回の実験ラットの空腹時血糖値および血中インスリン値は変化がみられないので、糖尿病の際のような糖代謝異常は考えられないであろうが、糖質代謝の細部における再検討が必要と思われる。

一方、糖質代謝におけるインスリン感受性と血中コレステロールの変化に有意の相関があるとの報告<sup>9)</sup>やインスリン感受性が低下するとインスリン感受性が正常人でみられるインスリンによる血中 LDL の低下作用がみられないとの報告<sup>11)</sup>などがあり、このような脂質代謝にもおよぶ作用機作は油症患者にみられた血中トリグリセライドの高値の発現<sup>18)</sup>にかかわっていることも考えられる。

今回のわれわれの採用した方法と同じ euglycemic insulin clamp 法を用いた報告で、非肥満 NIDDM 患者のグルコース取り込み率が対照者に比べて低下しているのは主として筋組織でのインスリン抵抗性によるとされ、筋肉でのグルコース輸送の障害を想定している<sup>9)</sup>。このような機作が、肝機能障害による影響と共に作用して行動量の低下に関与している可能性がある。この点ではさらに甲状腺機能の低下<sup>1)</sup>の可能性も考慮する必要がある。今回は TSH は測定していないが、対照群に比べ、血中の  $T_4$  値は 12 週後に低下がみられた。 $T_3$  値は KC-400 投与 1 週後から高値を示し、投与期間に依存して増加傾向を示したことから、明らかな機能低下とは考え難い。しかし、PCBs が末梢組織で  $T_4$  から  $T_3$  への転換を直接増強する作用があるとの示唆<sup>3)</sup>があり、Aroclor 1254 の 4 日間の経口投与で血中  $T_3$  値は正常であるが  $T_4$  値が低下するとの報告<sup>2)</sup>、同じ Aroclor 1254 の 4 週から 12 週までの投与で血中  $T_4$  は PCBs 投与中は低下したとの報告<sup>9)</sup>のように機能低下を示唆するものがある。このような諸報告と本実験結果の違いが PCBs の塩素数および投与量の差によるものかどうかは不明である。いずれにしても、

甲状腺ホルモンの日常行動量への影響も無視できない。なお、女性の油症患者のみに血中  $T_3$ ,  $T_4$  値が対照群に比べて高いとの報告<sup>9)</sup>があるが、これは発症後 16 年の時点での調査である。

このようなインスリン感受性の低下は PCBs 投与中止後も長期間持続するとは考え難いが、isomers の種類、投与量、投与期間などの違いによりどのように変化するのか、また、直接ないしは間接的に糖質、脂質、内分泌代謝の面でどの程度係わってくるのか、検討すべき課題は多い。

## 結 論

PCBs のインスリン感受性に対する影響をみるためラットに KC-400 を 1 週間から最長 12 週間にわたって経口投与し、インスリン・クランプ法によりグルコース取り込み率を測定するとにより、インスリン感受性を評価した。

この結果、グルコースの取り込み率は KC-400 の投与期間が長くなるにつれ、低下傾向を示し、8 週間投与群では対照群に比し、有意な低下を示した。同時に行った血液化学分析では、KC-400 投与ラットで総コレステロール、HDL-C、過酸化脂質、トリグリセライドの増加、 $T_3$  の増加と  $T_4$  の減少を認めた。また一部のラットでの回転輪走行による自発運動量の測定で、KC-400 投与 9 週目頃から夜間後半の運動量の減少を認めた。

これらの結果から、PCBs のインスリン感受性低下の作用は、耐糖能をはじめとする糖代謝さらには脂質代謝への影響のほかに、PCBs による甲状腺機能低下とも相まって、自発運動量の低下に至る過程の一部を説明出来ると考えられる。

## 文 献

- 1) Barsams CP: Environmental factors altering thyroid function and their assessment. Environ. Health Perspect. 38: 7-82, 1981.
- 2) Bastomsky CH: Effects of a polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254) and DDT on biliary thyroxine excretion in rats. Endocrinology 95: 1150-1155, 1974.
- 3) Bastomsky CH, Murphy PVN and Banovac K: Alteration in thyroxine metabolism produced by cutaneous application of microscope immersion oil effects due to polychlorinated biphenyls. Endocrinology 98: 1309-1314, 1976.
- 4) Collins Jr. WT, Capen CC, Kasza L, Carter C and Dailey RE: Effect of polychlorinated bi-

phenyl (PCB) on the thyroid gland of rats - Ultrastructural and biochemical investigations. Am. J. Pathol. 89: 119-136, 1977.

5) DeFronzo RA: Lilley lecture. The triumvirate:  $\beta$ -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. Diabetes 37: 667-687, 1988.

6) Harris MW, Moore JA, Vos JG and Gupta BN: General biological effects of TCDD in laboratory animals. Environ. Health Perspect. 5: 101-109, 1973.

7) Kraegen EW, James DE, Bennett SP and Chisholm DJ: *In vivo* insulin sensitivity in the rat determined by euglycemic clamp. Am. J. Physiol. 245 (Endocrinol. Metab. 8): E1-E7, 1983.

8) 森田須美春, 中田邦也, 田中 力, 笠間敏雄, 芳野 原, 吉田康昭, 土井邦紘, 馬場茂明: Glucose clamp 法による血中中性脂肪, コレステロールにおよぼすインスリンの急性効果, 糖尿病 28: 845-848, 1985.

9) 村井宏一郎, 辻 博, 梶原英二, 赤木公博, 藤島正敏: 油症患者の甲状腺機能. 福岡医誌 76: 233-238, 1985.

10) 永井醇爾, 古川ミチヨ, 八戸義明, 池田宣久: 油症患者の臨床生化学的検査 — とくに血清脂質分析に重点をおいて — 福岡医誌 60: 475-488, 1969.

11) 中田邦也, 森田須美春, 石田芳彦, 笠間敏雄, 岩谷逸平, 芳野 原, 吉田泰昭, 土井邦紘, 馬場茂明: インスリン非依存性糖尿病患者における glucose

clamp 法によるインスリン投与の血中脂質およびリポ蛋白におよぼす影響. 動脈硬化 13: 1379-1384, 1986.

12) 西住昌裕: 非致死用量の 2, 3, 4, 7, 8-Pentachlorodibenzofuran ならびに 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzofuran のラットに対する急性ないし亜急性毒性. 福岡医誌 80: 235-239, 1989.

13) 西住昌裕, 河内清司, 倉恒匡徳: 油症の実験病理学的研究. 福岡医誌 60: 539-543, 1969.

14) 奥村 恂, 勝木司馬之助: いわゆる油症(塩化ビフェニル中毒)の臨床的研究, とくに内科的所見について. 福岡医誌 60: 440-446, 1969.

15) Peterson RE, Seefeld MD, Christian BJ, Potter CL, Kelling CK and Keesey RE: In biological mechanisms of Dioxin action, Banbury Report 18 (Kimbrough, RD and Poland A. Eds.) pp. 291-308, Cold Spring Harbor Labs, New York, 1984.

16) 田中 潔: PCB と複合汚染の医学, 第 1 版, 39-68, 九州大学出版会, 福岡, 1976.

17) 田中 潔, 藤田節治, 小林富美子, 田村典子: 塩化ビフェニル亜急性中毒実験 — ことにラット血清脂質におよぼす影響 —. 福岡医誌 60: 544-547, 1969.

18) 鶴沢春生, 伊東靖夫, 納富昭光, 勝木司馬之助: 塩化ビフェニルによる高グリセライド血症. 福岡医誌 60: 449-454, 1969.

(受付 1995-3-22)

## Blood Polychlorinated Biphenyls and Manifestation of Symptoms in Chronic "Yusho" Patients

Yoshio HIROTA and Tomio HIROHATA

*Department of Public Health, Faculty of Medicine,  
Kyushu University 60, Fukuoka 812-82*

Kyoichiro KATAOKA and Shiro SHINOHARA

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

**Abstract** The correlation between blood PCB concentration and clinical manifestation of symptoms was investigated in 259 chronic "Yusho" patients, using the information obtained from the nationwide health examination conducted in 1988, twenty years after the outbreak. Concentrations of blood PCBs ranged 0.6-32.0 ppb (mean; 4.78), and they were categorized into approximate quartile for analysis. For general fatigue, odds ratios at 2.7+, 4.1+, and 6.1+ ppb were 2.4, 3.6, and 3.1, respectively, with a reference category of <2.7 ppb (test for trend;  $p < 0.005$ ). For numbness in extremities, the corresponding odds ratios were 2.8, 2.8, and 2.9 ( $p < 0.005$ ). For comedone, they were 1.4, 1.0, and 4.0 on face ( $p < 0.025$ ); and 3.6, 4.6, and 9.5 on trunk ( $p < 0.005$ ), respectively. A distinctive increase in odds ratio was observed at 2.7 ppb for these two subjective symptoms; and at 6.1 ppb for skin symptoms. The blood PCB concentrations among patients were relatively close to the normal subjects. Therefore, the observed correlations may be due to the effects of PCBs with a peculiar pattern in components, PCQs or PCDFs, taken and retained in the patients. Association with blood PCBs was also suggested for headaches; abnormal breath sounds; and acneiform eruptions in the genital region, but were statistically insignificant. None of the eye symptoms showed significant association with blood PCBs.

### Introduction

In 1968, sporadic outbreaks of an illness with peculiar skin symptoms occurred in western Japan, mainly in Fukuoka and Nagasaki Prefectures. This illness was characterized by clinical manifestations, such as follicular accentuation, acneiform eruptions, pigmentation of the skin and nails, and hypersecretion of the Meibomian gland. At that time it became well-known as "Yusho" which means "oil disease" in Japanese. Epidemiological investigations revealed that it was caused by the use of the rice bran oil, contaminated with PCBs (polychlorinated biphenyls), which had been utilized as the thermic conductor in the oil refining process<sup>25</sup>. A total of 1,862 patients have been officially identified as Yusho patients as of

1990.

Since the initial outbreak, health examinations have been carried out for case detection as well as for follow-up of the patients, in accordance with the diagnostic criteria established in 1968, and amended in 1972 and 1976 to cope with the chronic phase patients<sup>8</sup>). These examinations have shown that the typical symptoms for Yusho improved greatly over the 10 years since the outbreak, but they were superseded gradually by systemic disorders, such as dullness, headaches, numbness of the extremities, and so on<sup>21)23-25</sup>). These features are so complicated as to be indistinguishable from the ones observed in the general population.

In 1986, a nationwide annual health examination for Yusho was started using the standardized examination form, in order to promote

patients' health and to determine the health status of the chronic patients. A whole system for data-processing has been arranged through the efforts of two-years' work<sup>3)</sup>. Here, we present the correlation between blood PCB concentration and the clinical manifestation of symptoms in Yusho patients at the chronic stage twenty years after exposure, using the information obtained from that health examination in 1988. These correlations were not fully studied in the early years after the outbreak, because the routine analysis of blood PCBs only became possible and started in 1973.

### Subjects and Methods

The total number of patients who received the 1988's health examination was 285 (143 males and 142 females), and registration was voluntary, not obligatory. of these, 259 patients (136 males and 123 females) whose blood PCB concentrations were reported, were later subjected to the analysis. The peak age distribution was between ages 60-64 with about 20% of total study subjects, and between ages 50-69 with 60% and between 40-79 with 85% of these subjects.

PCBs in the blood were analyzed by saponification with 1N NaOH ethanol solution, extraction with n-hexane, column chromatography on silica gel, and then gas chromatography with electron capture detection<sup>12)14)</sup>. The blood PCB concentration for the subjects ranged 0.6-32.0 ppb (mean  $\pm$  SE;  $4.78 \pm 0.22$ ), and they were classified for comparison into approximate quartile; <2.7, 2.7+, 4.1+, and 6.1+ ppb. Numbers of subjects at each PCB level were 65, 79, 64, and 51, respectively.

Information on symptoms corresponding or relating to the diagnostic criteria for Yusho at the chronic phase was obtained from the standardized examination form. A total of 32 items were selected; general fatigue, headaches, coughing, sputum, abdominal pain, diarrhea, numbness in extremities, troubles with menstruation, abnormal breath sounds,

hepatomegaly, splenomegaly, paresthesia in extremities, and abdominal ultrasonography, from the examinations in internal medicine. Liability to suppuration, comedones (face, auricle, trunk, and other regions), acneiform eruptions (face, genital region, gluteal region, trunk, and other regions), pigmentation (face, finger nails, toe nails, and other regions), and deformity of nails, from the examinations in dermatology. Hypersebum, pigmentation in palpebral conjunctiva, and cystic degeneration or hypersecretion of the Meibomian gland, from the examinations in ophthalmology.

The standardized form indicates the results by a semiquantitative scale for most of the examination items, e.g., -, +, and # for subjective symptoms; -,  $\pm$ , +, #, and ## for signs in the skin or eyes. Then each result was classified into two categories for analysis; absence/presence, i.e., -/+ or -/ $\pm$  +, #, ##, respectively.

The result of each examination item was summarized into a two by four contingency table, i.e., two categories of each symptom by four levels of blood PCBs. The distributions of subjects at four levels of blood PCBs were compared between two categories with or without each symptom, using the Kolmogorov-Smirnov (K-S) test and Mann-Whitney test. Since similar results were obtained from the two tests, only the results of the K-S test are shown hereinafter. Concerning the symptoms for which statistically significant differences were observed or suggested by the K-S test, the odds ratio and its 95% confidence interval (95% CI) were calculated at each level of blood PCBs with a reference category of the lowest level. The test for trend in increasing blood PCB levels was performed using the Mantel-extension method.

### Results

A frequency of each symptom is shown in Table 1. The proportions of those with subjective symptoms in internal medicine (No. 1-8)

**Table 1** Frequencies of Symptoms Corresponding or Relating to the Diagnostic Criteria for Yusho at the Chronic Stage

| Symptoms                                  | Proportion(%) |                        |
|-------------------------------------------|---------------|------------------------|
| Internal medicine                         |               |                        |
| 1. General fatigue                        | 76.1          | (194/255) <sup>a</sup> |
| 2. Headaches                              | 67.3          | (173/257)              |
| 3. Coughing                               | 51.0          | (131/257)              |
| 4. Sputum                                 | 52.0          | (133/256)              |
| 5. Abdominal pain                         | 43.2          | (111/257)              |
| 6. Diarrhea                               | 42.0          | (108/257)              |
| 7. Numbness in extremities                | 61.9          | (159/257)              |
| 8. Troubles with menstruation             | 19.3          | (16/83)                |
| 9. Abnormal breath sounds                 | 2.7           | (7/257)                |
| 10. Hepatomegaly                          | 7.8           | (20/257)               |
| 11. Splenomegaly                          | 0.0           | (0/256)                |
| 12. Paresthesia in extremities            | 7.5           | (19/235)               |
| 13. Abdominal ultrasonography             | 33.7          | (60/178)               |
| Dermatology                               |               |                        |
| 14. Liability to suppuration              | 16.6          | (14/247)               |
| 15. Comedones on face                     | 12.1          | (31/256)               |
| 16.           on auricle                  | 7.4           | (19/256)               |
| 17.           on trunk                    | 11.8          | (30/254)               |
| 18.           in other regions            | 2.9           | (4/139)                |
| 19. Acneiform eruptions on face           | 4.7           | (12/255)               |
| 20.           in genital region           | 4.7           | (12/256)               |
| 21.           in gluteal region           | 3.5           | (9/255)                |
| 22.           on trunk                    | 6.3           | (16/255)               |
| 23.           in other regions            | 1.5           | (2/136)                |
| 24. Pigmentation of face                  | 2.7           | (7/256)                |
| 25.           of finger nails             | 2.3           | (6/256)                |
| 26.           of toe nails                | 6.3           | (16/256)               |
| 27.           in other regions            | 0.0           | (0/132)                |
| 28. Deformity of nails                    | 10.3          | (26/253)               |
| Ophthalmology                             |               |                        |
| 29. Hypersebum                            | 15.3          | (38/249)               |
| 30. Pigmentation in palpebral conjunctiva | 4.4           | (11/248)               |
| 31. Meibomian gland, cystic degeneration  | 12.0          | (30/249)               |
| 32.           hypersecretion              | 4.6           | (9/196)                |

<sup>a</sup>Number of subjects with symptoms in numerator, and number of total subjects examined in denominator.

ranged 19% for troubles with menstruation to 76% for general fatigue. The symptoms in which the prevalence exceeded 60% were general fatigue, headaches, and numbness in extremities. Abnormal findings in abdominal ultrasonography (No. 13) were present in 34% of the examinees. As to the examinations in dermatology, comedones or acneiform eruptions in specific regions (No. 15-17, and 19-22)

were observed in 7-12% and 4-6% of the subjects, respectively. The proportions of the subjects with positive signs in the eyes (No. 29-32) ranged 4% for pigmentation in palpebral conjunctiva to 15% for hypersebum.

Table 2 shows the distributions of subjects at four levels of blood PCBs, along with the results of the K-S test. Between groups with or without each symptom, significant differences in

**Table 2** Distributions of Subjects with or without Selected Symptoms by Blood PCB Level, and Results of Kolmogorov-Smirnov Test

| Symptom and category                  | No. of subjects by PCB level (ppb) |        |        |         | Total | K-S <sup>a</sup> test |
|---------------------------------------|------------------------------------|--------|--------|---------|-------|-----------------------|
|                                       | <2.7                               | 2.7+   | 4.1+   | 6.1+    |       |                       |
| General fatigue                       |                                    |        |        |         |       |                       |
| Presence                              | 39(20) <sup>b</sup>                | 60(51) | 53(73) | 42(100) | 194   | p<0.01                |
| Absence                               | 26(43)                             | 17(71) | 9(85)  | 9(100)  | 61    |                       |
| Headaches                             |                                    |        |        |         |       |                       |
| Presence                              | 33(19)                             | 62(55) | 44(80) | 34(100) | 173   | p<0.02                |
| Absence                               | 32(38)                             | 16(57) | 19(80) | 17(100) | 84    |                       |
| Numbness in extremities               |                                    |        |        |         |       |                       |
| Presence                              | 28(18)                             | 53(51) | 43(78) | 35(100) | 159   | p<0.01                |
| Absence                               | 37(38)                             | 25(63) | 20(84) | 16(100) | 98    |                       |
| Abnormal breath sounds                |                                    |        |        |         |       |                       |
| Presence                              | 0( 0)                              | 1(14)  | 5(86)  | 1(100)  | 7     | p<0.10                |
| Absence                               | 65(26)                             | 77(57) | 58(80) | 50(100) | 250   |                       |
| Comedones on face                     |                                    |        |        |         |       |                       |
| Presence                              | 5(16)                              | 8(42)  | 5(58)  | 13(100) | 31    | p<0.05                |
| Absence                               | 59(26)                             | 70(57) | 58(83) | 38(100) | 225   |                       |
| Comedones on trunk                    |                                    |        |        |         |       |                       |
| Presence                              | 2( 7)                              | 8(33)  | 8(60)  | 12(100) | 30    | p<0.05                |
| Absence                               | 62(28)                             | 69(59) | 54(83) | 39(100) | 224   |                       |
| Acneiform eruptions in genital region |                                    |        |        |         |       |                       |
| Presence                              | 1( 8)                              | 2(25)  | 6(75)  | 3(100)  | 12    | p<0.10                |
| Absence                               | 63(26)                             | 76(57) | 57(80) | 48(100) | 244   |                       |

<sup>a</sup>Kolmogorov-Smirnov test, one-sided test.<sup>b</sup>Cumulative relative frequency (%) in parenthesis.

cumulative relative frequency by blood PCB levels were observed for general fatigue ( $p<0.01$ ); headaches ( $p<0.02$ ); numbness in extremities ( $p<0.01$ ); comedones on face ( $p<0.05$ ) and on trunk ( $p<0.05$ ). The differences were also suggested for abnormal breath sounds; and acneiform eruptions in the genital region, but were statistically insignificant. The symptoms not mentioned in Table 2 showed no significant or suggestive difference in the K-S test.

The odds ratios at each level of blood PCBs and the results of the test for trend are shown in Table 3. For general fatigue, the odds ratios at blood PCB levels of 2.7+, 4.1+, and 6.1+ ppb were 2.35, 3.63, and 3.11, respectively. For numbness in extremities, the corresponding odds ratios were 2.80, 2.84, and 2.89, respectively. For comedones, they were 1.35, 1.02, and

4.04 on face; and 3.59, 4.59, and 9.54 on trunk, respectively. Thus, an increase in the odds ratio with increasing blood PCB level was evident for general fatigue (test for trend;  $p<0.005$ ); numbness in extremities ( $p<0.005$ ); and comedones on face ( $p<0.025$ ) and on trunk ( $p<0.005$ ). For general fatigue and numbness in extremities, a distinctive increase in the odds ratio was observed at a blood PCB level of 2.7 ppb. For comedones on face and on trunk, the odds ratio clearly increased at 6.1 ppb of PCBs. Although significant increases in the odds ratio at some of the blood PCB levels was found for headaches, abnormal breath sounds, and acneiform eruptions in the genital region, the trend was not statistically significant.

As a whole, the symptoms for which significant results were obtained both in the K-S test and in the test for trend were; general fatigue;

**Table 3** Odds Ratios and Dose-response Correlation for Selected Symptoms

| Symptom                               | PCB level (ppb)   | Odds ratio | 95% CI   | p-Value | Trend   |
|---------------------------------------|-------------------|------------|----------|---------|---------|
| General fatigue                       | <2.7              | 1.0        |          |         |         |
|                                       | 2.7+              | 2.4        | 1.1-4.9  | p<0.05  |         |
|                                       | 4.1+              | 3.6        | 1.7-9.1  | p<0.01  | p<0.005 |
|                                       | 6.1+              | 3.1        | 1.3-7.3  | p<0.01  |         |
| Headaches                             | <2.7              | 1.0        |          |         |         |
|                                       | 2.7+              | 3.8        | 1.8-7.7  | p<0.01  |         |
|                                       | 4.1+              | 2.3        | 1.1-4.6  | p<0.05  | p<0.100 |
|                                       | 6.1+              | 1.9        | 0.9-4.1  | p<0.10  |         |
| Numbness in extremities               | <2.7              | 1.0        |          |         |         |
|                                       | 2.7+              | 2.8        | 1.4-5.5  | p<0.01  |         |
|                                       | 4.1+              | 2.8        | 1.4-5.8  | p<0.01  | p<0.005 |
|                                       | 6.1+              | 2.9        | 1.4-6.2  | p<0.01  |         |
| Abnormal breath sounds                | <4.1 <sup>a</sup> | 1.0        |          |         |         |
|                                       | 4.1+              | 12.2       | 2.2-69.0 | p<0.01  | p<0.100 |
|                                       | 6.1+              | 2.8        | 0.2-41.4 | p>0.10  |         |
| Comedones on face                     | <2.7              | 1.0        |          |         |         |
|                                       | 2.7+              | 1.4        | 0.4-4.4  | p>0.10  |         |
|                                       | 4.1+              | 1.0        | 0.3-3.7  | p>0.10  | p<0.025 |
|                                       | 6.1+              | 4.0        | 1.4-11.7 | p<0.01  |         |
| Comedones on trunk                    | <2.7              | 1.0        |          |         |         |
|                                       | 2.7+              | 3.6        | 0.8-16.2 | p<0.10  |         |
|                                       | 4.1+              | 4.6        | 1.1-20.1 | p<0.05  | p<0.005 |
|                                       | 6.1+              | 9.5        | 2.5-36.3 | p<0.01  |         |
| Acneiform eruptions in genital region | <2.7              | 1.0        |          |         |         |
|                                       | 2.7+              | 1.7        | 0.2-18.4 | p>0.10  |         |
|                                       | 4.1+              | 6.6        | 1.0-44.1 | p<0.05  | p<0.100 |
|                                       | 6.1+              | 3.9        | 0.5-33.7 | p>0.10  |         |

<sup>a</sup>Since the number of subjects with abnormal breath sounds at the blood PCB level less than 2.7 ppb was zero, two levels of <2.7 and 2.7-4.0 ppb were combined for reference.

numbness in extremities; and comedones on the face and trunk. The association with blood PCBs was also suggested for headaches; abnormal breath sounds; and acneiform eruptions in the genital region, but was statistically insignificant.

### Discussion

#### 1) Blood PCB Concentration as an Index for Exposure

After the initial outbreak in 1968, it became clear that the causal oil was also contaminated with a trace amount of PCDFs (polychlorinated dibenzofurans) and PCQs (polychlorinated quarterphenyls)<sup>2)16)</sup>. Highly toxic PCDFs were detected in adipose tissue and liver samples

from the Yusho patients in the early years after the outbreak, as were PCQs in the blood<sup>4)10)15)</sup>. In addition, animal experiments demonstrated the manifestation of dermal symptoms resembling those of Yusho, in cynomolgus monkeys treated with the PCDF mixture<sup>6)</sup>. Therefore, presently, PCDFs are suggested to be the responsible compounds for the development of Yusho<sup>7)</sup>. It can be outlined that the causal rice oil was contaminated with 150-1,000 ppm of PCBs and 2-7 ppm of PCDFs, and 500-1,000 ppm of PCQs<sup>16)17)</sup>.

However, blood PCBs are still regarded as a pertinent index for exposure in Yusho patients, since its concentration has shown a gradual decrease after outbreak but diminishing to a



slight decrease during recent years<sup>3)20)25)</sup>. The concentration of blood PCBs may well reflect the magnitude of the previous acute exposure and current internal exposure to PCBs themselves as well as to other PCB-related compounds involved.

## **2) Validity of Data from Health Examination**

Since the present examinees account for only 15% of all officially-identified Yusho cases, the representativeness of the sample should be taken into consideration. Possible selection bias, such as the involvement of more patients with high health consciousness or with poor health conditions, should be taken into account. However, the dose-dependent association observed between blood PCBs and several items in the health examination cannot be fully explained by such a selection bias.

According to the study in dermatology<sup>3)</sup>, comedones and acneiform eruptions were present in half of the patients who were followed for up to a twenty year period. The observed high prevalence of symptoms was probably because the patients with severe conditions had remained in the study. In the present health examination, however, the proportion of the subjects with comedones or acneiform eruptions was 12% and 6% at most, respectively. Therefore, those who received the present health examination are to be more representative of the Yusho patients twenty years after exposure.

## **3) Association between Blood PCBs and Symptoms**

In the diagnostic criteria for Yusho at chronic stage, three important bases are listed; symptoms on the skin; and eyes; and blood PCB concentration. Contrarily, subjective symptoms are listed as only referent items<sup>8)</sup>. In fact, it seems unlikely that subjective symptoms are of any crucial importance for diagnosing individual cases as Yusho at twenty years after the outbreak. However, when subjective symptoms were collectively investigated in the present

study, close associations with blood PCB concentration were observed for general fatigue and numbness in extremities. For these subjective symptoms, statistically significant elevated risks were indicated at all of the three higher PCB levels with clear dose-response relationships. A distinctive risk increase was found at the level of 2.7 ppb. For headaches, correlation with blood PCBs was also suggested, but dose-response relationships were not clear.

The diagnostic criteria includes the manifestation of respiratory symptoms similar to chronic bronchitis, characterized by coughing and sputum. In the medical examination conducted one year after the outbreak, about 40% of smokers with Yusho complained of coughing with sputum<sup>22)</sup>. Although respiratory symptoms gradually improved during the subsequent ten years, they have shown little improvement in recent years<sup>19)</sup>. In particular, patients with high concentrations of blood PCBs or with chronic respiratory infections have been suffering from inveterate respiratory symptoms<sup>22)</sup>. A recent study suggested the existence of the target cells in human lungs to which certain PCB-methylsulfones bind specifically<sup>11)</sup>. In the present examination, about 50% of the subjects complained of coughing or sputum, but no association was found between coughing or sputum and blood PCB concentrations. On the other hand, although the subjects with abnormal breath sounds were only seven (2.7%), association with blood PCBs was suggested in the K-S test.

Skin symptoms in Yusho patients improved moderately during the first two years after the outbreak, although they still persisted in non-exposed areas, such as the genital region<sup>23)</sup>. Those areas too have shown a tendency toward gradual improvement<sup>24)</sup>. In general, the skin symptoms are the most important features for Yusho, both at the time of outbreak and at present. From among 15 examination items in dermatology (No.14-28 in Table 1), associations with blood PCBs were clearly observed

for comedones on the face and trunk, and suggested for acneiform eruptions in the genital region. As for comedones on the face and trunk, a dose-dependent risk increase was indicated among four levels of blood PCBs, with a distinctive risk increase at 6.1 ppb. Among five regions with acneiform eruptions (No. 19–23 in Table 1), association with blood PCBs was suggested only in the genital region, although the proportion of subjects with acneiform eruptions in the genital region was the same as that of faces. These findings may be related to the previous report which showed persisting acneiform eruptions in non-exposed areas, in contrast with the favorable progress in exposed areas, such as the face<sup>23)</sup>.

None of the eye symptoms showed significant association with blood PCBs, although they were the most characteristic symptoms for Yusho at the time of outbreak<sup>25)</sup>. A high frequency of abnormal results in abdominal ultrasonography (No. 13 in Table 1) may be due to the inclusion of findings which bear no pathological meaning.

#### 4) Interpretation of the Positive Association between Blood PCBs and Symptoms

Several years after the outbreak, the average concentrations of PCBs in the adipose tissue, liver, and blood of patients were 1.9 ppm, 0.08 ppm, and 6.7 ppb, respectively, and were only about two times higher than those of ordinary persons<sup>12)</sup>. Major parts of the PCBs ingested by the patients had been eliminated from the bodies, and the remaining PCBs became shown as the peculiar pattern in components of PCB congeners as compared to that of normal subjects; higher concentration of 2, 3, 3', 4, 4', 5-hexa-CB, and lower concentration of 2, 3', 4, 4', 5-penta-CB, in the blood<sup>9)</sup>. Among about 40 PCDF congeners detected in the contaminated rice oil<sup>2)</sup>, the main components retained in patients were 2, 3, 6, 8-tetra-, 2, 3, 7, 8-tetra-, 1, 2, 4, 7, 8-penta-, 2, 3, 4, 7, 8-penta-, 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexa-, and 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexa-CDF in the adipose tissue or liver<sup>10)13)</sup>, whereas no detect-

able amount of PCDFs was demonstrated in normal subjects<sup>18)</sup>. Thus, certain PCB isomers and PCB-related compounds, such as PCQs and PCDFs, which were determined in the causal oil and are specifically retained in the Yusho patients, have been suggested to relate to the pathogenesis of this persisting illness<sup>7)</sup>.

The present health examination for Yusho patients at the chronic stage, twenty years after the outbreak, revealed close associations with blood PCB concentration, for general fatigue; numbness in extremities; and comedones on the face and trunk, with clear dose-response relationships. A distinctive risk increase was observed at the PCB level of 2.7 ppb for these two subjective symptoms, and at the level of 6.1 ppb for skin symptoms. It has been reported that even healthy fishermen who frequently intake fish or shellfish show relatively high concentrations of blood PCBs (mean  $\pm$  SD;  $5.6 \pm 3.2$  ppb)<sup>1)</sup>. Therefore, it is hardly possible that such a low level of blood PCBs directly correlates to the manifestation of symptoms, if patients' blood PCBs are comparable in components to those of natural origin. Thus, it might be a more appropriate interpretation to say that the present blood PCB concentration is the general index for exposure, and that PCBs with a peculiar pattern in components, PCQs or PCDFs taken and retained in the patients have played a role in bringing about these associations. It is also plausible that the increased risk for subjective symptoms reflects the lasting discomforts of Yusho patients due to the previous acute exposure, and that a clear risk increase for skin symptoms at the level of 6.1 ppb or more suggests the persisting effects of the previous acute exposure as well as the effects of the current internal exposure.

In summary, the present study on Yusho patients at the chronic stage, twenty years after the outbreak, revealed close associations with blood PCB concentration, for general fatigue; numbness in extremities; and comedones on the face and trunk, with a clear dose-response

relationship, even though their concentrations of blood PCBs were relatively close to the normal subjects. These associations may be due to the effects of small amounts of PCBs, in which components differ from those in normal subjects, or their related compounds, PCQs or PCDFs, retained in the patients. Associations with blood PCBs were also suggested, for headaches; abnormal breath sounds; and acneiform eruptions in the genital region. No association was observed for acneiform eruptions in regions other than in the genital region, nor for any symptoms in the eyes.

### 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. (in Japanese)
- 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) 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. (in Japanese)
- 4) Kashimoto T, Miyata H and Kunita N: The presence of polychlorinated quaterphenyls in the tissues of Yusho victims. Food Cosmet. Toxicol. 19: 335-340, 1981.
- 5) Kataoka K, Okubo A, Shinohara S, Hirota Y and Hirohata T: Introduction of the information processing system of medical examinations of Yusho patients and some results obtained by the survey. Fukuoka Acta Med. 80: 331-341, 1989. (in Japanese)
- 6) 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.
- 7) Kunita N, Hori S, Obana H, Otake T, Nishimura H, Kashimoto T and Ikegami N: Biological effect of PCBs, PCQs and PCDFs present in the oil causing Yusho and Yu-cheng. Env. Hlth. perspect. 59: 79-84, 1985.
- 8) Kuratsune M, Aono M and Yoshida H: Foreword in the Eleventh Reports of the Study on Yusho and PCB. Fukuoka Acta Med. 78: 181-192, 1987. (in Japanese)
- 9) Kuroki H and Masuda Y: Structures and concentration of the main components of polychlorinated biphenyls retained in patients with Yusho. Chemosphere 6: 469-474, 1977.
- 10) Kuroki H and Masuda Y: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. Chemosphere 7: 771-777, 1978.
- 11) Lund J, Anderson O and Ripe E: Characterization of a binding protein for the PCB metabolites 4, 4'-bis (methyl-sulfonyl)-2, 2', 5, 5', 5'-tetrachlorobiphenyl present in bronchoalveolar lavage from healthy smokers and non-smokers. Toxicol. Appl. Pharmacol. 83: 486-493, 1986.
- 12) Masuda Y, Kagawa R and Kuratsune M: Comparison of polychlorinated biphenyls in Yusho patients and ordinary persons. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 11: 213-216, 1974.
- 13) Masuda Y and Yoshimura H: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance: A review. Am. J. Ind. Med. 5: 31-44, 1984.
- 14) Masuda Y and Schecter A: Exposed and control human blood levels from Guam and Binghamton workers and Yusho patients. Chemosphere 25: 1091-1094, 1992.
- 15) 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.
- 16) Miyata H, Kashimoto T and Kunita N: Studies on the compounds related to PCB (V). Detection and determination of unknown organochlorinated compounds in Kanemi rice oil caused the "Yusho." J. Food Hyg. Soc. 19: 364-371, 1978.
- 17) Nagayama J, Kuratsune M and Masuda Y: Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and "Yusho oil." Bull. Environ. Contam. Toxicol. 15: 9-13, 1976.
- 18) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with "Yusho." Food Cosmet. Toxicol. 15: 195-198, 1977.
- 19) Nakanishi Y, Kurita Y, Kanegae H and Shigematsu N: Respiratory involvement and immune status in polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans poisoning. Fukuoka Acta Med. 76: 196-203, 1985. (in Japanese)
- 20) 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) concentra-

tions in subcutaneous fat tissue, blood and hair of patients with Yusho and normal control in Nagasaki prefecture. Fukuoka Acta Med. 80: 307-312, 1989. (in Japanese)

21) Okumura M: Past and current medical states of Yusho patients. Am. J. Ind. Med. 5: 13-18, 1984

22) Shigematsu N, Ishimaru S, Ikeda T and Masuda Y: Further studies on respiratory disorders in polychlorinated biphenyls (PCB) poisoning. relationship between respiratory disorders and PCB concentrations in blood and sputum. Fukuoka Acta Med. 68: 133-138, 1977. (in Japanese)

23) Toshitani S: Dermatological findings of the patients with Yusho (PCB poisoning) in general examination in 1971. Fukuoka Acta Med. 63: 392-395, 1972. (in Japanese)

24) 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. (in Japanese)

25) Urabe H, Kodama H and Asahi M: Present state of Yusho patients. Ann. NY. Acad. Sci. 320: 273-276, 1979.

(Received for publication March 27, 1995)

(和文抄録)

## 発生後 20 年を経過した油症患者の 血中 PCB 濃度と検診所見

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

慢性期油症患者における血中 PCB 濃度と自覚症状の関連を、1988 年(油症発生後 20 年)の全国統一検診結果を用いて検討した。対象は同年の検診受診者 285 人中、血中 PCB 濃度が測定された 259 人である。血中 PCB 濃度は 0.6-32.0 ppb (平均 4.78) であり、これを 4 区分して (<2.7, 2.7+, 4.1+, 6.1+ ppb) 各カテゴリー間の有所見者の分布を比較した。自覚症状は油症診断基準 (1976 年補遺) に合致または関連する 32 項目を統一検診票から抽出した。血中 PCB 濃度と強い関連を認めたのは、全身倦怠感、四肢しびれ感、黒色面皰(顔面、軀幹)であった。最低濃度レベル (<2.7 ppb) と比較した 3 濃度レベルのオッズ比 (OR) は、全身倦怠感: 2.4, 3.6, 3.1 (傾向性

の検定  $p < 0.005$ )、四肢しびれ感: 2.8, 2.8, 2.9 ( $p < 0.005$ )、黒色面皰・顔面: 1.4, 1.0, 4.0 ( $p < 0.025$ )、同・軀幹: 3.6, 4.6, 9.5 ( $p < 0.005$ ) であった。前者 2 項目の自覚症状については OR の増大を 2.7 ppb で、後者 2 項目の皮膚症状については 6.1 ppb 以上で認めた。これら血中 PCB 濃度は健常人と大きく異なるレベルではない。したがって、油症発生後 20 年を経過してもなお継続するこれらの症状は、油症患者が摂取し、今なお体内に保留している特異なパターンを示す PCB 異性体、あるいは PCQs, PCDFs に関連するものと考えられる。その他、頭痛、呼吸音異常、痤瘡様皮疹(外陰部)に関しても血中 PCB 濃度との関連を示唆する結果を得た。

## 油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学的調査

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・鳥 谷 芳 和

阿 南 壽・前 田 勝 正

九州大学歯学部歯科保存学第二講座（主任：赤峰昭文教授）

赤 峰 昭 文

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

奥村歯科医院

奥 村 英 彦

## An Epidemiologic Examination on the Prevalence of the Periodontal Diseases and Oral Pigmentation in Yusho Patients

Isamu HASHIGUCHI, Yoshikazu TORIYA, Hisashi ANAN and Katsumasa MAEDA

*Department of Conservative Dentistry 1, Faculty of Dentistry (Director : Prof. K. Maeda)  
Kyushu University, Fukuoka 812-82*

Akifumi AKAMINE

*Department of Conservative Dentistry 2, Faculty of Dentistry (Director : Prof. A. Akamine)  
Kyushu University, Fukuoka 812-82*

Masao AONO

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

Hiroshi FUKUYAMA

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

Hidehiko OKUMURA

*Okumura Dental Clinic, Nagasaki 852*

**Abstract** An epidemiologic examination was carried out to reveal the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in Yusho patients 26 years after PCB exposure.

The results obtained were as follows.

- 1) 158 teeth of the total 284 examined teeth had the periodontal pockets deeper than 3 mm and the lower left first molar showed the highest prevalence of the periodontal pocket among the examined six index teeth. There was no definitive difference not only between sexes but also between age groups. However, 42 teeth had the periodontal pockets deeper than 4 mm.
- 2) Oral pigmentation was observed in 25 Yusho patients (33.8%). Chronological examination revealed that the prevalence of oral pigmentation seemed to be higher in the patients below the age of 49 than in those beyond the age of 50, but there was no definitive difference between sexes. It was of particular interest that the incidence of oral pigmentation appeared to decrease with

decrease of the teeth present in number.

## はじめに

いわゆる油症において、口腔病変として口腔粘膜の色素沈着、歯牙の萌出遅延、歯胚欠如などが知られている<sup>1)</sup>。なかでも、色素沈着は顕著な疾患で、実態ならびに経年的推移について報告がなされている<sup>1)3)4)</sup>。しかしながら、油症患者において歯周疾患罹患率が高いことが報告されているものの<sup>2)</sup>、経年的な変化についての報告はない。今回は、平成6年度の福岡県における油症患者の一斉検診時の結果をもとに、歯周疾患の経年的変化について検討を加えると共に、色素沈着の実態についても調査を行った。

## 検 診 方 法

平成6年度の福岡県油症一斉検診を受診した油症認定患者を対象に、問診、視診ならびに歯周ポケット診査を行った。歯周ポケット診査は、上顎右側第一大臼歯〔6〕、上顎左側中切歯〔1〕、上顎左側第一小臼歯〔4〕、下顎右側第一小臼歯〔4〕、下顎右側中切歯〔1〕、下顎左側第一大臼歯〔6〕を対象歯として、各歯牙の近心頬側歯肉溝に約25gの荷重下でポケット探針PCP-11(Hu-Friedy社)を挿入し、3mm以上の歯周ポケットを有する歯牙についてmm単位で測定を行った。また、全員のX線写真(パントモグラフ)の撮影を行い、歯槽骨吸収の程度や残存歯の状態を把握するための資料とした。

## 結 果

平成6年度の福岡県油症一斉検診において、歯科を受診した油症認定患者は74名(男性23名,女性51名)

表1 油症患者の年代別受診者数

| 年代  | 男性     | 女性     | 計      |
|-----|--------|--------|--------|
| 30代 | 1(1)   | 3(3)   | 4(4)   |
| 40代 | 2(2)   | 6(6)   | 8(8)   |
| 50代 | 1(1)   | 6(6)   | 7(7)   |
| 60代 | 11(9)  | 23(21) | 34(30) |
| 70代 | 6(2)   | 10(7)  | 16(9)  |
| 80代 | 2(0)   | 3(1)   | 5(1)   |
| 計   | 23(15) | 51(44) | 74(59) |

( ) : 歯周ポケット検査対象歯が少なくとも1歯以上残存している患者数

であった(表1)。問診にて口腔内の病変ないし不快症状を訴えた患者数は35名で、その内訳は歯牙挺出感(9名)、義歯不適合(7名)、歯肉出血(6名)、歯痛(6名)、歯肉腫脹(3名)、その他14名で、歯周組織の異常の訴えが多く、歯肉色素沈着による審美障害の訴えはなかった。

歯周ポケット診査は、無歯顎患者ならびに歯周ポケット診査対象歯をすべて喪失している患者を除いた59名(男性15名,女性44名)に行った。深さ3mm以上のいわゆる病的な歯周ポケットを有する歯数を男女別、年代別に分けると表2の通りであった。それによると、深さ3mm以上の歯周ポケットを1歯以上有する者55名(93.2%)と高い割合を示したが、男女間、年代間に顕著な差は認められなかった。深さ3mm以上の歯周ポケットの発現頻度をみると、総被検歯284歯のうち158歯(55.6%)と過半数の歯牙に歯周ポケットが認められ、部位別では〔6〕が73.8%と最も高く、次いで〔4〕、〔4〕、〔1〕、〔1〕の順であった(表3)。しかしながら、深さ4mm以上の歯周ポケットを有する者は24名(40.7%)と減少し、総被検歯284歯

表2 3mm以上の歯周ポケットの分布状態

| 罹患歯数<br>性別 | 0 |   | 1 |    | 2 |   | 3 |   | 4 |   | 5 |   | 6 |   | 計<br>(名) |
|------------|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----------|
|            | 男 | 女 | 男 | 女  | 男 | 女 | 男 | 女 | 男 | 女 | 男 | 女 | 男 | 女 |          |
| 30代        | 0 | 2 | 0 | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4        |
| 40代        | 0 | 0 | 1 | 3  | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 8        |
| 50代        | 0 | 1 | 1 | 3  | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 7        |
| 60代        | 0 | 0 | 2 | 6  | 0 | 6 | 2 | 2 | 4 | 3 | 0 | 4 | 1 | 0 | 30       |
| 70代        | 1 | 0 | 0 | 0  | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 9        |
| 80代        | 0 | 0 | 0 | 0  | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1        |
| 計(名)       | 1 | 3 | 4 | 12 | 1 | 8 | 2 | 7 | 6 | 5 | 0 | 7 | 1 | 2 | 59       |

表3 部位別の3 mm以上の歯周ポケットを有する歯牙数

| 部位 |       | 6     | 1     | 4     | 4     | 1     | 6     | 計     |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 男性 | 罹患歯数  | 7     | 4     | 6     | 10    | 6     | 9     | 42    |
|    | 総被検歯数 | 11    | 10    | 11    | 13    | 14    | 12    | 71    |
|    | %     | 63.64 | 40.00 | 54.54 | 76.92 | 42.86 | 75.00 | 59.15 |
| 女性 | 罹患歯数  | 15    | 20    | 19    | 26    | 14    | 22    | 116   |
|    | 総被検歯数 | 29    | 38    | 34    | 41    | 41    | 30    | 213   |
|    | %     | 51.72 | 52.63 | 55.88 | 63.41 | 34.15 | 73.33 | 54.46 |
| 計  | 罹患歯数  | 22    | 24    | 25    | 36    | 20    | 31    | 158   |
|    | 総被検歯数 | 40    | 48    | 45    | 54    | 55    | 42    | 284   |
|    | %     | 55.00 | 50.00 | 55.56 | 66.67 | 36.37 | 73.81 | 55.63 |

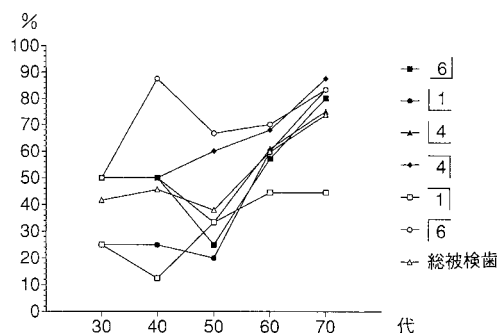


図1 年代別にみた3 mm以上の歯周ポケットの発現率

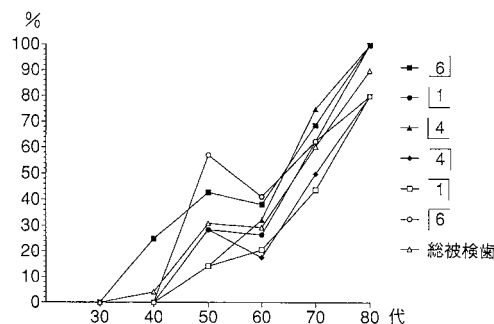


図2 年代別にみた歯周ポケット診査対象歯の喪失率

のうち42歯(14.8%)にみられたのみであった。年代別にみると24名中22名が60歳以上で、性別では男性に多い傾向がみられた。図1は、3 mm以上の歯周ポケットの発現率を年代別に示したものである。6歯牙合計でみると、50代で若干の減少はあるものの加齢と共に発現率は増加していた。部位別にみると、1, 1以外の歯牙は30, 40代においても50%以上の発現率を示し、とくに6は87.5%と非常に高い頻度で歯周ポケットを有していた。しかしながら、50代の患者では1, 4を除いては発現率の低下が認められ、とくに6, 6において著しかった。図2は、年代別にみた歯周ポケット診査対象歯牙の喪失率を示したもので、加齢と共に喪失率の増加がみられた。部位別にみると、大白歯や小臼歯の喪失率が前歯部の喪失率に比べて高い傾向にあった。なかでも、6と6は比較的若い年代においても喪失率が高く、とくに50代ではそれぞれ57.1%と42.9%の歯牙が喪失していた。なお、各年代における第三大臼歯以外の歯牙の残存率は、歯周ポケット診査対象歯牙の残存率に近似していた(図3)。

色素沈着を有するものは25名(33.8%)で、男女間に顕著な差は見られなかったが、50歳未満の患者や歯牙の残存数が多い患者において発現頻度が高い傾向を示した(表4, 図3)。部位別にみると、歯肉の色素沈着を有する者が最も多く(21名, 28.4%)、次いで頬粘膜(6名, 8.1%)、口唇(1名, 1.4%)、口蓋粘膜(1名, 1.4%)の順であった。色素沈着の程度をみると、+が最も多く、次いで±, #の順で#はみられなかった(表5)。

## 考 察

福岡市内の40歳以上の健常者54名を対象に行った歯周ポケット診査では、1歯でも深さ3 mm以上の歯周ポケットを持つものは23名(42.6%)であり、総被検歯257歯のうち41歯(16.0%)が深さ3 mm以上の歯周ポケットを有していた<sup>2)</sup>。この結果と比較すると、今回の油症患者における歯周ポケットの発現頻度は非常に高く、1歯でも深さ3 mm以上の歯周ポケットを持つものは59名中55名(93.2%)であり、総被検歯284歯のうち158歯(55.6%)が深さ3 mm以上の歯周

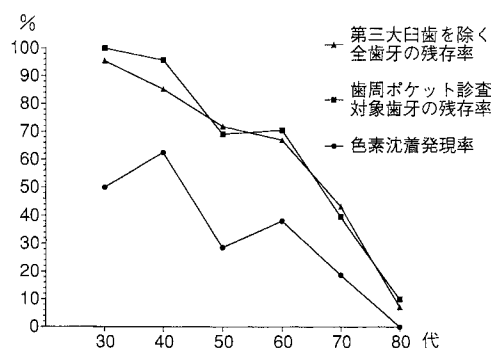


図3 年代別にみた歯牙の残存率と色素沈着発現率

表4 色素沈着を有する患者数

| 年代  | 性別 | 男性 | 女性 | 計 (%)    |
|-----|----|----|----|----------|
| 30代 |    | 1  | 1  | 2(50.0)  |
| 40代 |    | 1  | 4  | 5(62.5)  |
| 50代 |    | 0  | 2  | 2(28.6)  |
| 60代 |    | 6  | 7  | 13(38.2) |
| 70代 |    | 0  | 3  | 3(18.8)  |
| 80代 |    | 0  | 0  | 0(0)     |
| 計   |    | 8  | 17 | 25       |

%は各年代の受診患者数に対する百分率

表5 部位別の色素沈着を有する患者数

| 部位<br>程度 | 上顎歯肉  |       | 下顎歯肉  |       | 頬粘膜  |      | 口唇 |      | 口蓋 |      |
|----------|-------|-------|-------|-------|------|------|----|------|----|------|
|          | 男性    | 女性    | 男性    | 女性    | 男性   | 女性   | 男性 | 女性   | 男性 | 女性   |
| ±        | 2     | 3     | 1     | 2     | 1    | 1    | 0  | 0    | 0  | 0    |
| %        | 8.69  | 5.88  | 4.35  | 3.92  | 4.35 | 1.96 | 0  | 0    | 0  | 0    |
| +        | 3     | 9     | 5     | 6     | 1    | 2    | 0  | 1    | 0  | 1    |
| %        | 13.04 | 17.65 | 21.74 | 11.76 | 4.35 | 3.92 | 0  | 1.96 | 0  | 1.96 |
| ++       | 1     | 0     | 1     | 3     | 0    | 1    | 0  | 0    | 0  | 0    |
| %        | 4.35  | 0     | 4.35  | 5.88  | 0    | 1.96 | 0  | 0    | 0  | 0    |
| 計        | 6     | 12    | 7     | 11    | 2    | 4    | 0  | 1    | 0  | 1    |
| %        | 26.09 | 23.53 | 30.43 | 21.57 | 8.69 | 7.85 | 0  | 1.96 | 0  | 1.96 |

%は、受診患者数（男性23名、女性51名）に対する百分率

ポケットを有していた。赤峰らも同様に油症患者における歯周ポケットの発現頻度が高いことを報告しており、その原因の一つとしてPCBによって生じた歯槽骨の石灰化障害によるものかも知れないと述べている<sup>2)</sup>。また、油症患者の辺縁性歯周炎罹患歯肉の免疫組織学的検索で、IgAやIgM保有細胞の比率の低下やCD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>値の増加が認められたことより<sup>7)</sup>、PCBによって生じた免疫反応の異常が関与している可能性も考えられる。しかしながら、部位別の3mm以上の歯周ポケットの発現率をみると、各歯牙間に差がみられ、 $\overline{6}$ が最も高く73.8%の歯牙が歯周ポケットを有しているのに対し、 $\overline{1}$ は36.4%と発現率は低く $\overline{6}$ の約半分であった。また、総被検歯における歯周ポケットの発現率を年代別にみると、50歳代で低下がみられるものの加齢と共に増加しており、70歳以上では73.2%の歯牙が歯周ポケットを有していた。歯種別にみると、50歳未満では小臼歯や大臼歯の発現率が高く、とくに $\overline{6}$ は40歳代では87.5%の歯牙が3mm以上の歯周ポケットを有していた。下顎の第一大臼歯は永久歯の

中で最初に萌出してくる歯牙であり<sup>10)</sup>、また前歯部に比べて小臼歯や大臼歯はデンタルプラークの沈着が多く歯牙の清掃も困難であるといわれている<sup>9)</sup>。一般に辺縁性歯周炎の発症にはデンタルプラークなどの局所因子が非常に重要な役割を担っており、全身的な因子はむしろ補助的な役割を果たしていると考えられている<sup>9)</sup>。同様に油症患者においても、辺縁性歯周炎の発症の直接の原因としてはデンタルプラークなどの局所因子があげられ、PCB中毒といった全身的な因子は二次的に作用しているものと考えられる。今回、50歳代の患者では歯周ポケットの発現率が低下する傾向がみられ、 $\overline{6}$ と $\overline{6}$ において顕著であった。50歳代の患者では他の歯牙に比べて $\overline{6}$ と $\overline{6}$ は喪失率が高いことから、深い歯周ポケットを有する歯牙が抜去され比較的浅い歯周ポケットを有する歯牙のみが残存している可能性が考えられるが、はっきりとした原因は不明で今後の検索が必要であろう。ところで赤峰らの報告によると<sup>2)</sup>、昭和59年度の福岡県の油症一斉検診を受診した油症患者118名のうち4mm以上の歯周ポケットを1歯



以上有するものは67名(56.8%), また4 mm以上の歯周ポケットの発現頻度は総被検歯594歯のうち24.9%であった。これに対し、今回は3 mm以上の歯周ポケットの発現頻度は高いものの、4 mm以上の歯周ポケットを有する者は24名(40.7%)で、総被検歯284歯のうち42歯(14.8%)にみられたのみであった。この理由の一つとして、局所環境の改善が挙げられる。われわれは、口腔内清掃の重要性を機会あるごとに説いてきた。今回、視診やX線診において著明な歯石沈着が認められず、口腔内清掃も比較的良好であったことは、口腔内清掃の重要性に対する認識が高いことを示唆していると思われる。あるいは、血中PCB濃度は減少傾向にあり<sup>14)</sup>、他科領域においても他覚的症狀の改善がみられることから<sup>8)9)</sup>、PCBの減少が歯周組織に反映している可能性も考えられる。すなわち、局所因子によって発症した辺縁性歯周炎を憎悪させる全身因子としてのPCB中毒症狀の改善の結果、深い歯周ポケットの発現頻度が低下したのかもしれない。

福山<sup>14)</sup>や赤峰<sup>15)</sup>は、油症患者の口腔内色素沈着は経年的に減少しているものの健常人に比べると発現率は高く、また女性や若年者に多くみられることを報告している。これらの報告と比較すると、口腔内色素沈着の発現率は33.8%と著明に低下しており、程度別にみてもⅢの症例は認められず逆にⅠの症例が増加していた。また、男女間に差は認められなかった。PCB中毒における色素沈着の発現機序はいまだ明確にされていないが、眼科や皮膚科領域においても特異的な色素沈着は次第に減少しており<sup>8)9)</sup>、他の症狀に比べてPCB中毒からの“脱却”が生じやすいのかもしれない。しかしながら今回得られた口腔内色素沈着の発現率は、青野<sup>16)</sup>の報告した健常人あるいは油症未認定者の口腔内色素沈着の発現率(9.3%)より高く、今後追跡調査を続けていく必要がある。ところで、残存歯数と口腔内色素沈着の発現率の間に関連性がある可能性が示唆されたことは非常に興味深い。歯周ポケット診査対象歯の残存率と口腔内全体の歯牙の残存率は必ずしも一致しない。しかし、両者は非常に近似していることから、今後は残存している歯周ポケット診査対象歯をより詳細に検索することで、歯牙と口腔内色素沈着の関連性についても検討を加えるつもりである。

## 結 論

油症患者における歯周疾患の罹患状態や口腔内色素沈着の発現頻度の経年的変化を把握するために、平成6年度油症一斉検診受診者を対象に調査を行い、次のような結果を得た。

1. 深さ3 mm以上の歯周ポケットの発現頻度は総被検歯284歯のうち158歯(55.6%)であったが、そのほとんどが深さ4 mm未満であった。
2. 口腔内色素沈着の発現率は33.8%であった。年代別では30代や40代の患者に多かったが、男女間に差は認められなかった。

## 参 考 文 献

- 1) 赤峰昭文, 橋口 勇, 岸 哲也, 古川猛士, 青野正男: 油症患者における口腔内色素沈着の経年的変化, 福岡医誌 74: 284-288, 1983.
- 2) 赤峰昭文, 橋口 勇, 前田勝正, 原 宜興, 鎮守信弘, 岩本恭行, 青野正男: 油症患者の歯周疾患に関する疫学的調査(第1報), 福岡医誌 76: 248-252, 1985.
- 3) 青野正男, 岡田 宏: 油症患者の口腔所見について, 福岡医誌 60: 468-470, 1969.
- 4) 福山 宏, 阿南ゆみ子, 赤峰昭文, 青野正男: 油症患者における口腔病変の推移, 福岡医誌 70: 187-198, 1979.
- 5) Genco RJ: Microbiologic and host response factors in periodontal disease, In Goldman HM and Cohen DW (eds): Periodontal therapy. 6th ed. pp. 72-104, C. V. Mosby St. Louis, 1980.
- 6) Hall W and Douglass G: Plaque control, In Schluger S, Yuodelis RA and Page RC (eds): Periodontal Disease. pp. 344-369, Lea & Febiger Philadelphia, 1977.
- 7) 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: 歯周組織におよぼす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.
- 8) 本房昭三, 堀 嘉昭, 利谷昭治, 旭 正一: 1989, 1990年度の福岡油症年次検診における皮膚症狀, 福岡医誌 82: 345-350, 1991.
- 9) 向野利彦, 大西克尚: 油症患者の眼症狀(第7報), 福岡医誌 82: 342-344, 1991.
- 10) 大江規玄: 歯の発生学一形態編一, pp. 90-123, 医歯薬出版, 東京, 1968.  
(受付 1995-3-22)

## Effect of Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Dibenzofurans on Leukocyte in Peripheral Blood and Bronchoalveolar Lavage Fluid

Yoichi NAKANISHI, Yoshitsugu NOMOTO, Akihiro MATSUKI,  
Ritsuko KUNITAKE and Nobuyuki HARA

*Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine,  
Kyushu University 60, Fukuoka 812-82*

**Abstract** In order to investigate immunological abnormalities induced by polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans, we have performed bronchoalveolar lavage in the rats given polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans. We have administered 5.0 mg of polychlorinated biphenyls or 0.5 mg of polychlorinated dibenzofurans to Sprague-Dawley rats intraperitoneally. Four weeks after the administration, mild necrosis of bronchiolar Clara cells and mild edema associated with chronic inflammatory infiltration in the alveoli were seen in both groups. In the peripheral blood, percentage of T-lymphocyte, helper T-cell and suppressor T-cell decreased significantly both in polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans given rats. On the other hand, in the bronchoalveolar lavage fluid, percentage of T-cell increased only in polychlorinated dibenzofurans given rats and percentage of suppressor T-cell increased in both groups.  $O_2^-$  release by alveolar macrophage increased significantly both when stimulated with wheat germ lectin and with phorbol myristate acetate. These results indicate that immunological alternation may be different between peripheral blood and respiratory system as one of the target organs of these chemicals. Further examination is needed for the analysis of immunological abnormalities in the target organs of polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans poisoning.

### Introduction

"Yusho" is a mass food poisoning caused by ingestion of a commercial brand of rice oil contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs) and their related compounds. The major causal agents responsible for the early as well as late clinical manifestations of Yusho are now generally thought to be polychlorinated dibenzofurans (PCDFs)<sup>7)</sup>.

One of the target organs of PCBs and PCDFs is the respiratory system. Cough, sputum expectoration and wheezing were the major identifiable symptoms of Yusho, and respiratory distress was often exacerbated by viral or bacterial infection<sup>13)</sup>. Animal experimental model suggests that PCDFs rather than PCBs cause pathologic changes in respiratory sys-

tem; necrosis of the bronchiolar Clara cells and inflammation of alveoli<sup>12)13)</sup>. In addition, there are several reports suggesting immunologic disorders both in patients with Yusho and Yu-Cheng, and in animals given PCBs and their related compounds<sup>8)9)12)14)16)</sup>. However, there are few reports on the immunological change of respiratory system in spite of emphasis of respiratory involvement in patients with Yusho and Yu-Cheng. We have performed bronchoalveolar lavage in the rats given PCBs or PCDFs in order to analyze immune disorder of respiratory system.

### Materials and Methods

#### 1) Animal Experiments

Female rats of the Sprague-Dawley strain, 8-week of birth, were given 5.0 mg of PCBs

(Kanechlor 400) in 2 ml of corn oil (PCBs group), 0.5 mg of PCDFs in 2 ml of oil (PCDFs group) or only 2 ml of oil (control group) intraperitoneally. Four weeks after the administration, each group of the animals was anesthetized with ether and peripheral blood was collected from left ventricle using a heparinized syringe. White blood cells were counted with hemocytometer and lymphocyte count was determined by May-Giemsa stain. Lung tissues were prepared for light microscopy. Bronchoalveolar lavage was performed 2 times with PBS (calcium- and magnesium-free phosphate-buffered saline) after placing intravenous catheter in the trachea. Aliquots of the lavage fluid were divided for cell count, assay of surface marker of lymphocytes and determination of  $O_2^-$  release.

## 2) Analysis of Surface Markers of Lymphocytes

The monoclonal antibodies used were MAS 010 for pan T-cell, MAS 1131 for helper T-cell and MAS 041 for suppressor T-cell, respectively<sup>11,17</sup>. The surface marker of lymphocytes were measured as described<sup>11</sup> with minor modifications. In brief, peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid were incubated at 4°C for 45 min with saturating concentrations of each antibody. After washing, the cells were incubated with fluorescein-conjugated rabbit

anti-mouse immunoglobulin and washed again. After removal of red blood cells with sodium ammonite, cell surface markers were examined in the FACS.

## 3) Production of by $O_2^-$ alveolar macrophage

The release of  $O_2^-$  was assayed by the previously reported method, the superoxide dismutase-inhibitable reduction of cytochrome c, with minor modifications<sup>15</sup>. In brief, aliquot of the lavage fluid was centrifuged at  $220 \times g$  for 10 min at 4°C. Cell pellets were incubated at 37°C for 7 min after being suspended in 0.83%  $NH_4Cl$  and 170 mM Tris-HCl (9:1, vol/vol) at pH 7.5 for hemolysis of red blood cells. The cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma, St Louis, USA) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum and poured into plastic petri dishes and incubated for 1 hour at 37°C followed by washing with phosphate-buffered saline to remove nonadherent cells and debris. The cells ( $4 \times 10^5$  cells) were suspended in 5 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 160  $\mu M$  cytochrome c and 1 mM  $CaCl_2$ . After preincubation for 5 min at 37°C, the cells were first stimulated with cytochalasin E (10  $\mu g/ml$ ), followed in 3 min by wheat germ lectin (100  $\mu g/ml$ ) or phorbol myristate acetate (2.5  $\mu g/ml$ ). The change in absorbancy at 550 nm in reference to 540 nm was followed on a recorder by

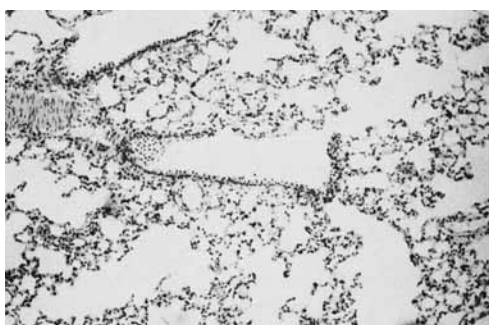


Fig. 1a

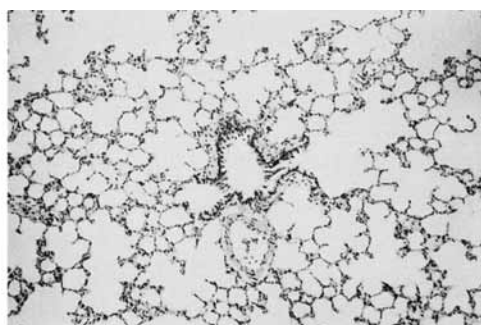


Fig. 1b

Tissue from lungs of rats given PCDFs (Fig. 1a). Clara cells are hyperplastic but more scarcely seen in terminal bronchiole, and mild edema with chronic inflammatory cell infiltration were seen in alveoli, compared with controls (Fig. 1b).

using a dual wave length spectrophotometer (Hitachi 556, Tokyo, Japan) and converted to superoxide release with a molar absorption coefficient of the reduced minus the oxidized cytochrome c as  $19.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

## Results

### 1) Pathologic changes in the lung

In rat lungs given PCDFs, Clara cells were hyperplastic but more scarcely seen in terminal bronchiole, and mild edema with chronic inflammatory cell infiltration were seen in alveoli, compared with controls (Fig. 1). In rat lungs given PCBs, these pathologic changes were more mild than those given PCDFs.

### 2) Effect of PCBs and PCDFs on Peripheral Blood

The changes of peripheral white blood in the rats given PCBs, PCDFs and oil alone as a control are summarized in table 1. Total count of white blood cells and lymphocytes tended to

decreased in the rats given PCBs and PCDFs. Percent T-lymphocyte, helper T-cell and suppressor T-cell decreased significantly in both PCBs and PCDFs given rats, although the ratios of helper T-cell to suppressor T-cell were not different significantly in both groups.

### 3) Effect of PCBs and PCDFs on bronchoalveolar lavage fluid

In each procedure, recovery of the lavage fluid was more than 90%, and viable cells determined by trypan blue staining were more than 95%. The percentage of lymphocytes in the lavage fluid decreased both in PCBs and PCDFs given rats without significant difference. The percentage of T-cell significantly increased only in the lavage fluid of PCDFs given rats. Measurement of T-cell subsets revealed that percentage of suppressor T-cell increased significantly in both group, but that of helper T-cell was not different. The ratio of helper T-cells to suppressor T-cells was 0.79 for control,

**Table 1** Effect of administration of PCBs and PCDFs on peripheral white blood cells.

| Group                        | Control         | PCBs             | PCDFs            |
|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| WBC ( $\mu\text{l}$ )        | 6783 $\pm$ 2417 | 6317 $\pm$ 2348  | 5333 $\pm$ 1571  |
| lymphocyte ( $\mu\text{l}$ ) | 6391 $\pm$ 2241 | 5646 $\pm$ 2446  | 4818 $\pm$ 1349  |
| % T-cell                     | 66.5 $\pm$ 12.2 | 48.0 $\pm$ 16.2* | 47.7 $\pm$ 12.1* |
| % Helper T                   | 47.5 $\pm$ 6.9  | 33.7 $\pm$ 8.2*  | 33.7 $\pm$ 7.2*  |
| % Suppressor T               | 29.1 $\pm$ 5.2  | 19.0 $\pm$ 7.1*  | 19.8 $\pm$ 6.7*  |
| ratio                        | 1.67 $\pm$ 0.11 | 1.91 $\pm$ 0.30  | 1.78 $\pm$ 0.13  |

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

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

**Table 2** Effect of administration of PCBs and PCDFs on bronchoalveolar lavage fluid.

| Group          | Control         | PCBs             | PCDFs             |
|----------------|-----------------|------------------|-------------------|
| % lymphocytes  | 71.9 $\pm$ 17.7 | 52.0 $\pm$ 7.56  | 51.2 $\pm$ 15.4   |
| % T-cell       | 8.80 $\pm$ 1.38 | 8.00 $\pm$ 2.58  | 12.85 $\pm$ 15.4* |
| % Helper T     | 5.20 $\pm$ 2.63 | 6.20 $\pm$ 2.58  | 5.73 $\pm$ 1.23   |
| % Suppressor T | 6.43 $\pm$ 1.31 | 9.03 $\pm$ 1.50* | 11.10 $\pm$ 3.25* |
| H/S Ratio      | 0.79 $\pm$ 0.36 | 0.67 $\pm$ 0.24  | 0.54 $\pm$ 0.10   |

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

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

**Table 3** Effects of administration of PCBs and PCDFs on superoxide producing activities of alveolar macrophages.

| trigger | Production of $O_2^-$ (nmol/min/ $2 \times 10^5$ cells) |                         |                   |
|---------|---------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|
|         | control                                                 | PCBs                    | PCDFs             |
| WGA     | $0.14 \pm 0.05$                                         | $0.31 \pm 0.07^\dagger$ | $0.31 \pm 0.07^*$ |
| PMA     | $0.13 \pm 0.05$                                         | $0.29 \pm 0.06^*$       | $0.34 \pm 0.07^*$ |

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

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

$^\dagger$  Significantly different from the control ( $P < 0.05$ ).

0.67 for PCBs group, and 0.54 for PCDFs group. However, the difference was not statistically significant (table 2).

#### 4) Effect of PCBs and PCDFs on production of $O_2^-$ by alveolar macrophage

Release of  $O_2^-$  by alveolar macrophage is shown in table 3. When wheat germ lectin was used as a trigger of  $O_2^-$  release,  $O_2^-$  production increased significantly both in the rats given PCBs and PCDFs. Phorbol myristate acetate also stimulated  $O_2^-$  production with a statistical significance. There was no statistically significant difference in  $O_2^-$  production by alveolar macrophage between PCBs group and PCDFs group.

### Discussion

The respiratory symptoms as well as skin seem to be strongly associated with higher blood PCB level and to be pathognomonic for Yusho, even twenty years after exposure<sup>2)</sup>. The major causal agents responsible for clinical manifestations of Yusho are generally thought to be PCDFs<sup>7)</sup>. In rats given PCBs and PCDFs by gastric intubation, necrosis of Clara cells, mild edema and vascular congestion in the lung were induced<sup>12)</sup>. In this experiment, we adopted single administration of these chemicals by intraperitoneal injection in order to minimize the chance of infection and to give precise dose. Similar morphological changes were induced by intraperitoneal administration of PCBs and PCDFs, while 0.5 mg of PCDFs caused more

severe pathologic changes than 5 mg of PCBs.

In patients with Yu-Cheng, various kinds of immunological abnormalities are reported<sup>9)</sup>; decrease of serum IgA and IgM, negative skin test to tuberculin and to streptokinase/streptodornase antigen, decrease of T-cells and  $T_\mu$ -cells (helper T-cells) in peripheral blood, the increased response of lymphocytes to phytohemagglutinin, to pokeweed mitogen and to tuberculin. In animal experiments, decrease of gammaglobulin levels<sup>8)14)16)</sup> and decrease of skin sensitivity to tuberculin<sup>14)</sup> and to sheep red blood cell<sup>9)</sup> has been noted. In our experiment, percentage of T-cell, helper T-cell and suppressor T-cell in peripheral blood were significantly decreased both in PCBs and PCDFs given rats. Clinical observation of the patients with Yu-Cheng revealed that T-cell and helper T-cell (but not suppressor T-cell) decreased in peripheral blood<sup>9)</sup>. Our former report revealed that T-cell (Thy-1<sup>+</sup> cell) and helper T-cell (Lyt-1<sup>+</sup> cell) decreased in mice given PCDFs<sup>11)</sup>. The discrepancy between these former reports and the experiments using rats may result from difference of species, exposure period to the chemicals (one year vs. 4 weeks), difference of assay system or antibodies for lymphocyte subsets, although the details are not known. However, there are general accordance that abnormalities of T-cell and helper T-cell are seen in an early stage of this poisoning.

There are few reports on the immunological changes of respiratory system, although respiratory involvement in PCBs and PCDFs poisoning was reported. Bronchoalveolar lavage was performed in order to analyze lymphocyte subsets of lavage fluid and  $O_2^-$  generation by alveolar macrophage. Although a mild decrease of lymphocytes in the lavage fluid was seen in both groups, significant increase of percent T-cell was seen only in PCDFs given rats. The results of analysis of T-cell subset in the lavage fluid were generally opposite to those in peripheral blood; increase of percent suppressor T-cell and decrease of helper T-

cell/suppressor T-cell ratio. The discrepancy between systemic immune system and respiratory immune system is seen in several immunological disorders involving lung; In sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis and chronic berylliosis, systemic cell-mediated immunity is lowered in spite of enhanced immunity in the involved organs. Although the mechanism may be different between these diseases and PCBs and PCDFs poisoning, immunological abnormalities in target organs may not always reflect systemic immune function. In such a sense, investigation of abnormalities in target organ would be important for the better understanding of this poisoning.

Contrary to our expectations, increased  $O_2^-$  generation by alveolar macrophages was seen in both PCBs and PCDFs given rats.  $O_2^-$  is believed to injure cells by oxidizing cell membrane lipids and enhancing the permeability of lung vessels<sup>10)</sup>. Pathological study of lung specimens from autopsy patients disclosed pulmonary hemorrhage and pulmonary edema<sup>4)5)6)</sup>. In our experimental system, mild inflammation of the alveoli was seen by the administration of PCBs and PCDFs. Therefore, in PCBs and PCDFs given rats, increase of  $O_2^-$  producing activities by alveolar macrophage might contribute to the pathogenesis of interstitial changes of the lung.

### Acknowledgments

We thank Yoshito Masuda (Daiichi College of Pharmaceutical Sciences) for generous supply of PCBs and PCDFs and for valuable discussion.

### References

- 1) Brideau RJ, Carter PB, McMaster R, Mason DW and Williams AF: Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 10: 609-615, 1980.
- 2) Hirota Y, Hirohata T, Kataoka K, Shinohara S and Takahashi K: Association between blood level and symptoms of Yusho patients, twenty years after outbreak. *Fukuoka Acta Med.* 82: 335-341, 1991.
- 3) Kanegae H, Sham L, Kurita Y and Shigematsu N: Experimental studies on long-term influence of polychlorinated dibenzofurans to respiratory and immune status (preliminary study). *Fukuoka Acta Med.* 82: 219-222, 1987.
- 4) Kikuchi M: An autopsy case of PCB poisoning with liver cirrhosis and liver cell carcinoma. *Fukuoka Acta Med.* 63: 387-391, 1972.
- 5) Kikuchi M, Hashimoto M, Hozumi M, Koga K, Oyoshi S and Nagakawa M: An autopsy case of stillborn of chlorobiphenyls poisoning. *Fukuoka Acta Med.* 60: 489-195, 1969.
- 6) Kikuchi M, Mikagi Y, Hashimoto M and Kojima T: Two autopsy cases of chronic chlorobiphenyls poisoning. *Fukuoka Acta Med.* 62: 89-103, 1971.
- 7) Kuratsune M: Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products, In Kimbrough and Jensen (eds): *Yusho*, with reference to Yu-Cheng. pp.381-400, Elsevier Science Publishers Co. New York, USA, 1989.
- 8) Loose LD, Pittman KA, Benitz K-F and Silkworth JB: Polychlorinated biphenyl and hexachlorobenzene induced humoral immunosuppression. 22: 253-271, 1977.
- 9) Lü YC and Wu YC: Clinical findings and immunological abnormalities in Yu-Cheng patients. *Environ. Health Perspect.* 59: 17-29, 1985.
- 10) Martin W, Gadek J, Hunnighake G and Crystal RG: Oxidant injury of lung parenchymal cells. *J. Clin. Invest.* 68: 1277-1288, 1981.
- 11) Nakanishi Y, Kurita Y, Kanegae H and Shigematsu N: Respiratory involvement and immune status in polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans poisoning. *Fukuoka Acta Med.* 76: 196-203, 1985.
- 12) Nakanishi Y, Shigematsu N, Kurita Y, Matsuba K, Kanegae H, Ishimaru S and Kawazoe Y: Respiratory involvement and immune status in Yusho patients. *Environ. Health Perspect.* 59: 31-36, 1985.
- 13) Shigematsu N, Ishimaru S, Saito R, Ikeda T, Matsuba K, Sugiyama K, and Masuda Y: Respiratory involvement in polychlorinated biphenyls poisoning. *Environ. Res.* 16: 92-100, 1978.
- 14) Street JC and Sharma RP: Alteration of induced cellular and humoral immune response by pesticides and chemicals of environmental concern: quantitative studies of immunosuppression by DDT, Aroclor 1254, carbaryl, carbofuran, and methylparathion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32: 587-602, 1975.
- 15) Sumimoto H, Takeshige K and Minakami S: Superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes stimulated by leukotriene B<sub>4</sub>. *Biochem. Biophys. Acta* 803: 271-277, 1984.

16) Vos JG and de Roij T: Immunosuppressive activity of a polychlorinated biphenyl preparation on the humoral immune response in guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 21: 549-555, 1972.

17) Williams AF, Galfrè G and Milstein C: Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma-

hybrid antibodies: differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell* 12: 663-673, 1977.

(Received for publication March 22, 1995)

(和文抄録)

## 末梢血ならびに気管支肺胞洗浄液中の白血球における PCBs と PCDFs の影響

九州大学胸部疾患研究施設

中西洋一・野元吉二・松本裕暁

國武律子・原 信之

PCBs および PCDFs によって引き起こされる免疫系の異常を検討するために、PCBs ならびに PCDFs 投与ラットに気管支肺胞洗浄を施行した。5.0 mg の PCBs または 0.5 mg の PCDFs を Sprague-Dawley rat の腹腔内に投与した。投与 4 週後、細気管支クララ細胞の軽度の壊死性変化と慢性炎症細胞浸潤を伴った軽度の間質の浮腫が両群にみられた。末梢血では、T 細胞、ヘルパー T 細胞、サブレッサー T 細胞の比率が有意に低下していた。一方、気管支肺胞洗浄液中では、

PCDFs 投与群に T 細胞比率の上昇がみられ、サブレッサー T 細胞の増加が両群でみられた。肺胞マクロファージによる  $O_2^-$  産生は、wheat germ lectin 刺激でも、phorbol myristate acetate 刺激でも有意に増加していた。これらの結果は、免疫系の変動は、末梢血とこれらの化学物質の標的臓器とは異なることを示唆している。PCBs, PCDFs の標的臓器における免疫異常の解析をさらに進める必要性があらう。

## Polychlorinated Biphenyls (PCB)の末梢神経再生へおよぼす影響

<sup>1)</sup>長崎大学医学部内科学教室第一講座

<sup>2)</sup>長崎大学附属医療技術短期大学部作業療法学科

伊藤 聖<sup>1)</sup>・吉村俊朗<sup>2)</sup>・古屋孝文<sup>1)</sup>

辻野 彰<sup>1)</sup>・末永章人<sup>1)</sup>・長瀧重信<sup>1)</sup>

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

Hijiri ITO<sup>1)</sup>, Toshiro YOSHIMURA<sup>2)</sup>, Takafumi FURUYA<sup>1)</sup>  
Akira TSUJINO<sup>1)</sup>, Akihito SUENAGA<sup>1)</sup> and Shigenobu NAGATAKI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>The First Department of Internal Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852

<sup>2)</sup>School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852

The effects of polychlorinated biphenyls (PCB) on regeneration of the peripheral nerves were investigated in rats. The sciatic nerves were crushed at the mid-thigh level on the last day of 32 days of oral administration of PCB. The sciatic nerves were biopsied from the crushed regions at 1, 2, 4, 8 and 12 weeks after crushing. Myelin thickness on the axon diameter was smaller in the PCB administered group than in the control group. There was no difference between the experimental group and the control group in the density of regenerating fibers and distribution of fiber diameters in unmyelinated fibers. After 12 weeks the number of large diameter myelinated fiber densities was lower in the experimental group than in the control group. These results indicate that PCB may affect the remyelination of the regenerating nerve.

#### 緒 言

Polychlorinated biphenyls (PCB) 慢性中毒による神経症状として頭痛<sup>1)</sup>, 異常感覚<sup>2)</sup>, 末梢神経障害<sup>3)</sup>などの報告があり, 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<sup>4)</sup>ものの病理学的な検討は少ない。これまでに我々は神経再生過程に於いて8週までにPCB投与で大径有髄線維の発育が抑制されることを明らかにした<sup>5)</sup>。しかしながら無髄線維についてはその再生過程での障害の有無は明らかでない。そこで今回我々是有髄線維に加え無髄線維についてもPCBの神経再生への影響を検討したので報告する。

#### 方 法

##### 1. 対象

Sprague-Dawley系ラット(8週齢)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ケージあたり3~4匹とし, プラスチックゲージを用いた。飼育温度は22±2℃, 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。

##### 2. 薬剤および薬剤の投与

PCBは濃度42%のPCB-42を東京化成工業より購入した。

対照群はサラダ油をラット用ゾンデ針を用い経口的に神経挫滅までの3週間で総量32ml投与した。実験群はPCBをサラダ油に5mg/mlに溶解し同様にPCBとして一匹あたり1.6mg/gを経口投与し, サラダ油投与量は32ml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30mm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, 12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より生検を行った。生検した神経は2.5%グルタルアルデヒドにて固定, エボ



ン 812 に包埋した。マイクロームで  $1\ \mu\text{m}$  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意に写真撮影、最終倍率 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。さらに超薄切片を作成、鉛染色後日本電子 1200 EX 電子顕微鏡にて写真撮影し髄鞘の厚さにたいする軸索の直径の比をもとめ、また無髄線維密度およびヒストグラムを作成した<sup>2)</sup>。またオスミウム固定、グリセリン浸漬後解きほぐしによる検討も併せ行った。

## 結 果

### 1. 体重の変化

PCB 投与前の体重は対照群で  $288.8 \pm 8.1\ \text{g}$ 、PCB 投与群では  $292.7 \pm 7.2\ \text{g}$  と両者に差はみられなかった。神経挫滅時には対照群  $421.0 \pm 16.2\ \text{g}$ 、PCB 投与群  $393.1 \pm 44.9\ \text{g}$  であり PCB 投与により体重増加は抑制されていた。

### 2. 有髄線維密度およびヒストグラム

12 週目において PCB 投与群で有髄線維密度の増加があった。また分布の型は PCB 投与群で  $3\ \mu\text{m}$  を中心に一峰性を示し、対照群では  $5\ \mu\text{m}$  以上にもピー

クを呈する 2 相性のパターンを形成していた (図 1)。

### 3. 無髄線維密度およびヒストグラム

1 週目では無髄線維の同定はできなかったが 2 週目より 12 週目の無髄線維においては PCB 投与群と非投与群で密度をよび分布に差は認めなかった (図 2)。

### 4. 軸索直径と髄鞘の厚さとの比について

PCB 投与群及び対照群において有髄線維の軸索の直径に対応する髄鞘の厚さを測定した結果、8 週目および 12 週目において PCB 投与群で対照に比し髄鞘の薄いものが増加していた (図 3)。

### 5. 解きほぐし

8 週目においては PCB 投与群と対照群のあいだであきらかな差は認められなかった。12 週目では対照群に比し、PCB 投与群においては髄鞘の径の割にはランヴィエ紋輪間の距離が短いものが多かった (図 4)。

## 考 察

今回の検討で PCB 投与によっては無髄線維に異常を認めなかった。有髄線維においては大径有髄線維が減少し軸索の直径に比し髄鞘の厚さが薄いものが増加していた。この髄鞘の変化は軸索の障害、髄鞘形成障

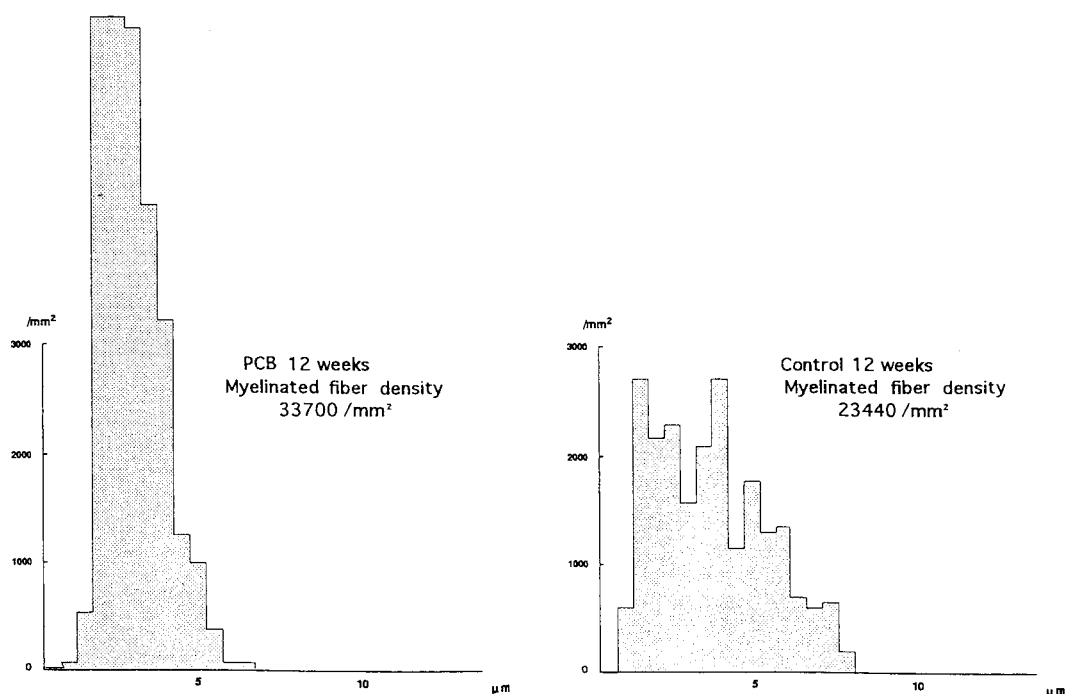


図 1 有髄神経線維のヒストグラム：12 週目において PCB 投与群では有髄線維密度が対照群に比し高く、一峰性である。対照群では  $5\ \mu\text{m}$  以上にもピークをもつ二相性の分布を示している。

害, またはPCB投与群での体重増加が少ないので間接的に髄鞘形成に影響が出現した可能性が考えられる。しかしながら, 無髄線維には対照群と差がないことから軸索の障害によるものとは考え難い。髄鞘の構成には脂質が多く, PCBが脂溶性であることから髄鞘の形成もしくは維持に影響を及ぼしうる。ヒトでのPCB中毒の神経系の障害の報告は中枢神経系の発育障

害<sup>5)9)</sup> や末梢神経障害<sup>6)</sup> がある。末梢神経障害は自覚的にはしびれ感であり, 検査上は神経伝導速度の遅延である<sup>8)</sup>。今回検討した末梢神経障害は大径有髄線維の障害であり, 神経伝導速度の低下は主に大径有髄線維の障害と密接な関連があることが報告されており<sup>1)</sup>, これらの結果は油症患者での末梢神経伝導速度遅延と矛盾しない。

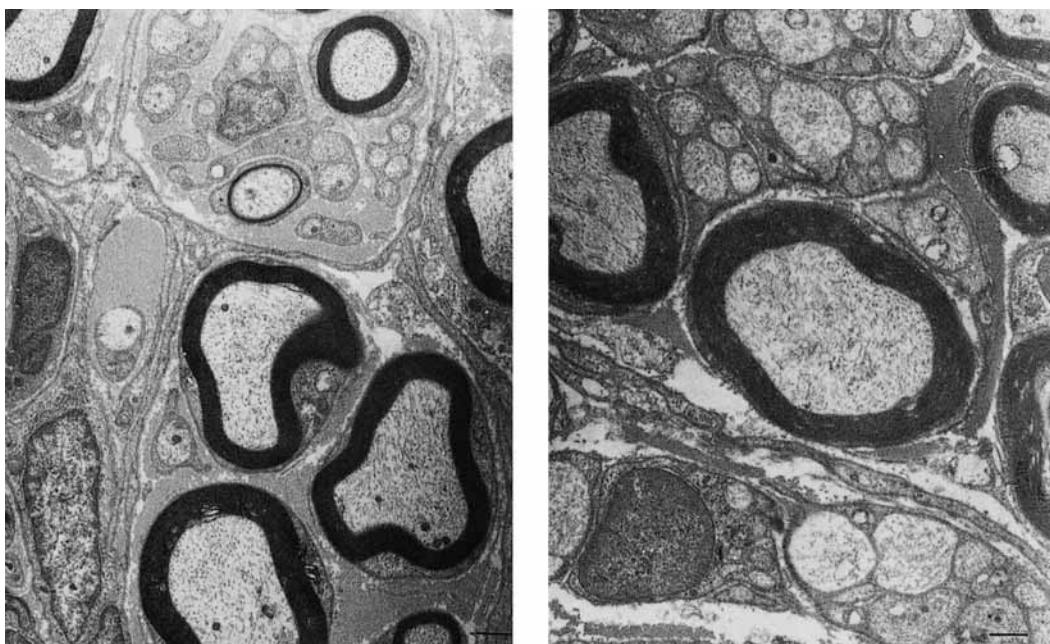
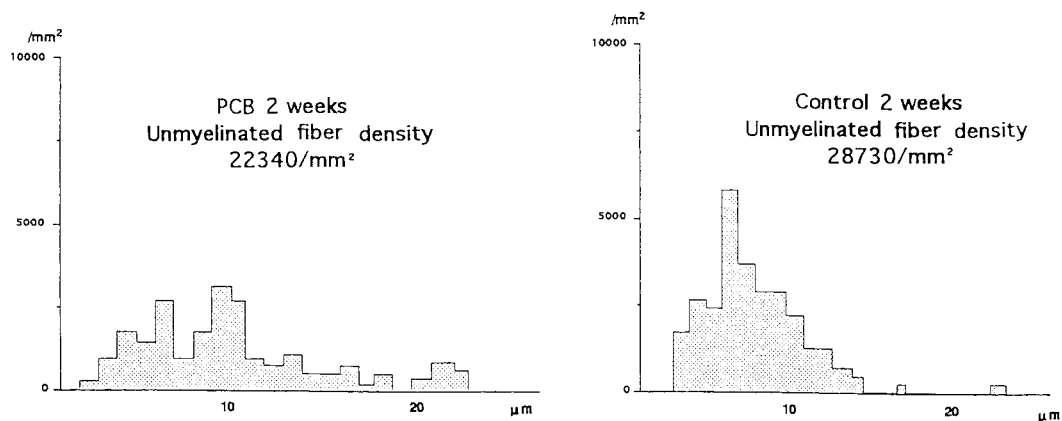


図2 a) 電子顕微鏡写真にみる8週目での対照群とPCB投与群での無髄線維: PCB投与群(右)において無髄線維は対照群(左)と比してもその形成に差はない。(Bar = 1  $\mu$ m)



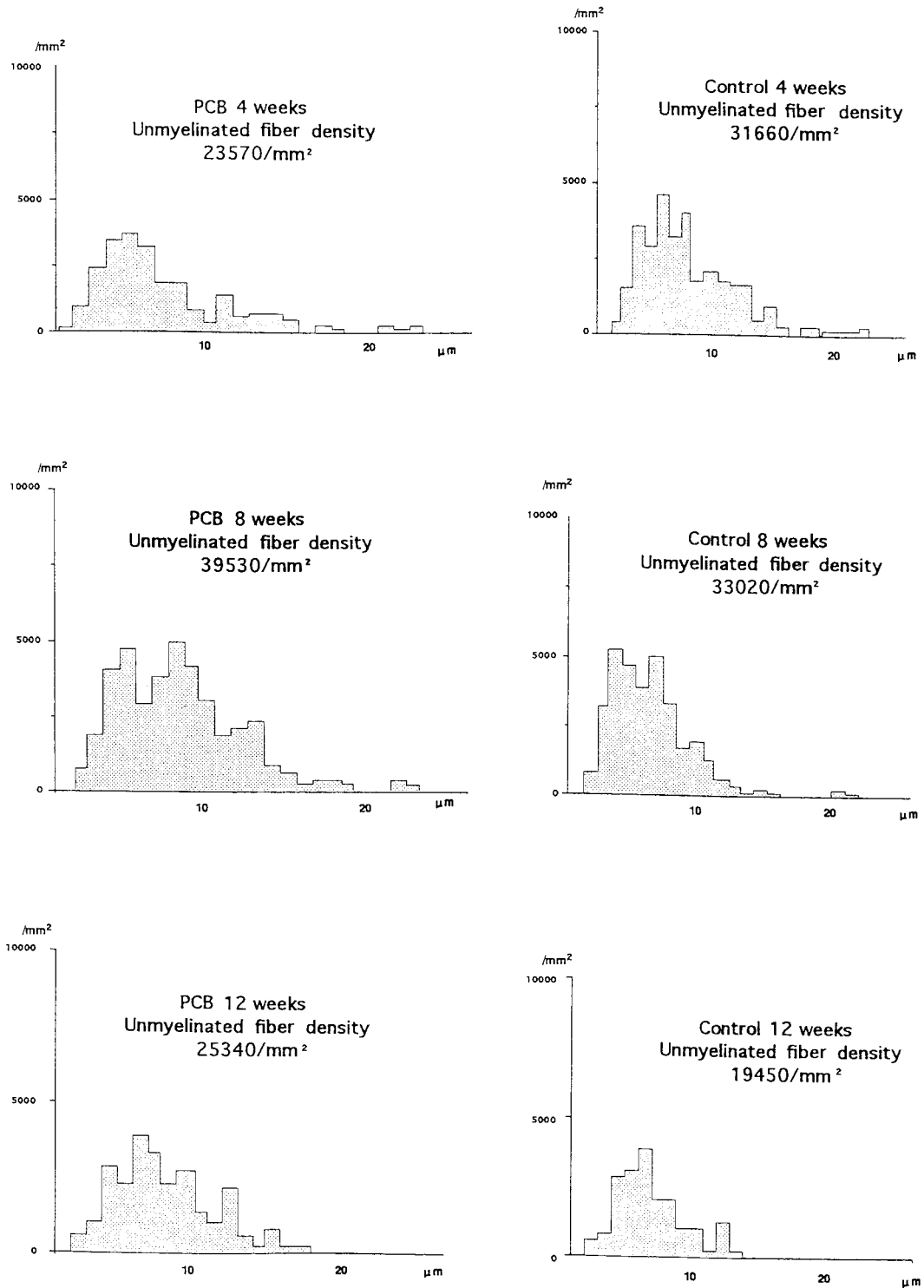


図2 b) 無髄線維ヒストグラムの経時的変化：2週目から12週目までPCB投与群と対照群に密度、分布とも差をみとめない。

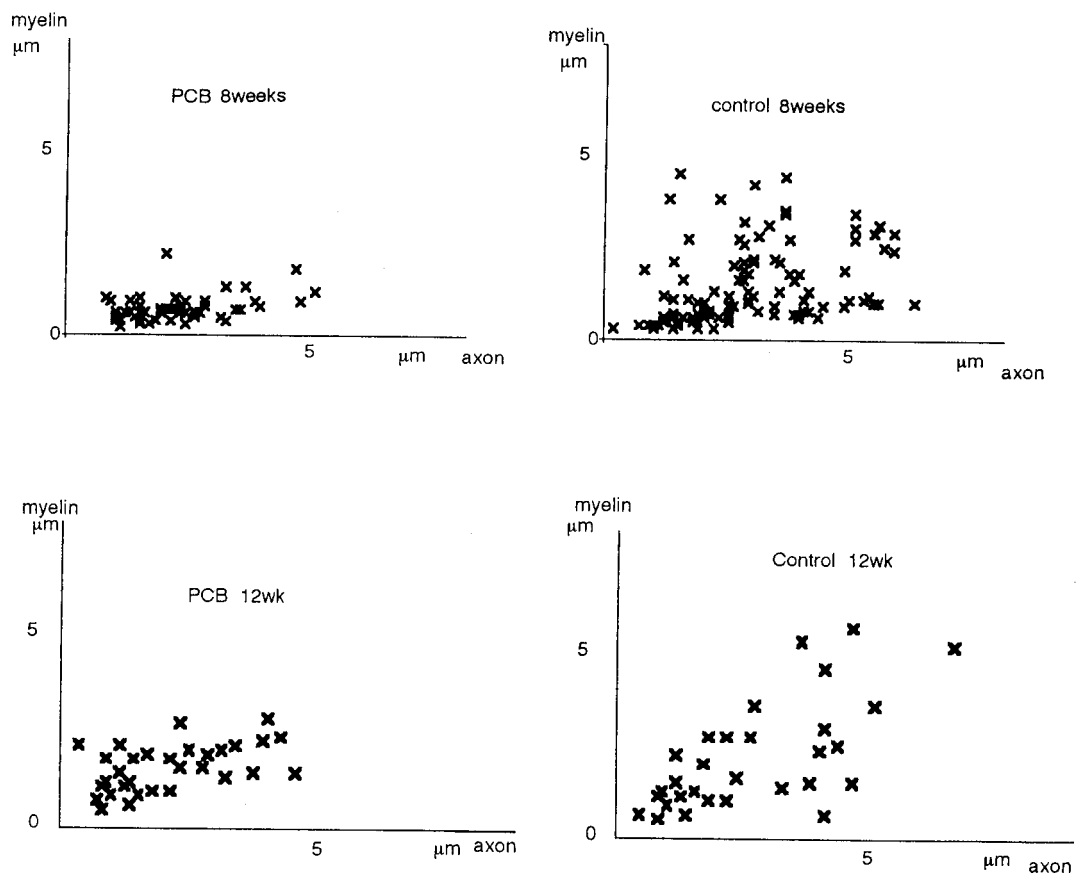


図3 8週目および12週目での軸索の直径に対する髄鞘の厚さ：PCB投与群では軸索の径に比して髄鞘の薄いことが対照との比較でわかる。

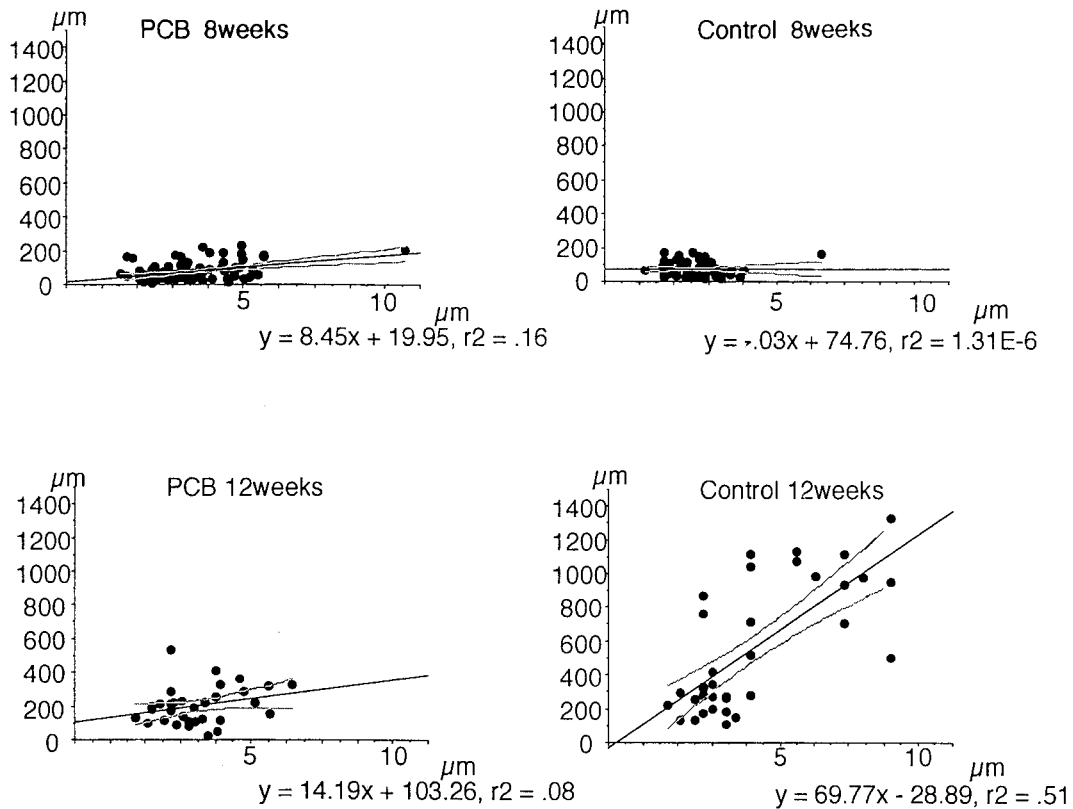


図4 解きほぐし標本による髄鞘の径(横軸)とランヴィエ絞輪間の距離(縦軸)との相関: 8週目では対照群との間に差は認められないものの、12週目では大径有髄線維の減少と対照群に比してランヴィエ絞輪間の距離の短いものが多い。

## 文 献

- 1) Bolton CF, Gilbert JJ, Girvin JP and Hahn A: Nerve and muscle biopsy: Electrophysiology and morphology in polyneuropathy. *Neurology* 29: 354-362, 1979.
- 2) Dyck PJ, Karnes J, Lais A, Lofgren EP and Stevens JC: Pathologic alterations of the peripheral nervous system of humans. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R (eds) *Peripheral neuropathy*, 2nd edn. Saunders, Philadelphia 760-870, 1984.
- 3) 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: 末梢神経再生における Polychlorinated Biphenyls (PCB) の影響—有髄神経に関して—. *福岡医誌* 84: 227-231, 1993.
- 4) 岩下 宏, 志田堅四郎, 増田義人: 慢性油症患者における頭痛, 四肢異常感覚と血中 PCB. *福岡医誌* 68: 139-144, 1977.

5) Jacobson JL and Jacobson SW: Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children. *Neurotoxicology and teratology* 12: 319-326, 1990.

6) 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.

7) Chia L-G and Chu F-L: A clinical and electrophysiological study of patients with polychlorinated biphenyl poisoning. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 48: 894-901, 1985.

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.

9) Chen Y-J and Hsu CC: Effects of prenatal exposure to PCBs on the neurological function of children: neuropsychological and neurophysiological study. *Developmental Medicine and Child Neurology* 36: 312-320, 1994.

(受付 1995-3-27)

## 油症患者における臨床検査所見の推移： 油症発生 26 年後の検討

九州大学医学部第二内科学教室

辻 博・池 田 耕 一  
鈴木 統 久・藤 島 正 敏

### Laboratory Findings in Patients with Yusho : 26 Year Follow-up Study

Hiroshi TSUJI, Koichi IKEDA, Norihisa SUZUKI  
and Masatoshi FUJISHIMA

*Second Department of Internal Medicine (Director : Prof. M. Fujishima), Faculty of Medicine,  
Kyushu University 60, Fukuoka 812-82*

To evaluate chronic effect of PCBs on laboratory findings, peripheral blood cells and biochemical parameters were studied in 74 patients with Yusho in 1994. Serum level of triglyceride was elevated in 21 cases (28.4%) of these patients. Serum triglyceride levels showed statistically significant correlation with body mass index (Quetelet Index) and blood PCB concentration. We conclude that hypertriglyceridemia in patients with Yusho is not frequent and it may be associated with both obesity and blood PCB concentration.

#### は じ め に

1968 年 4 月頃より, polychlorinated biphenyls (PCB) 混入ライスオイル摂取により北部九州を中心に発生した油症では, 発症当初の重症例の検査所見において軽度の貧血, 白血球増多, 赤血球沈降速度の亢進, アルブミンの低下, 血清アルカリフォスファターゼと BSP 停滞率の軽度上昇, 中性脂肪の増加などが報告されている<sup>9)</sup>. 油症発生以来 26 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<sup>7)</sup>. 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おり<sup>8)</sup>, 慢性中毒に移行していると推定される. 今回, われわれは油症発生 26 年後における臨床検査値の推移について検討したので報告する.

#### 対象および方法

1994 年度福岡県油症一斉検診の受診者 78 例のうち油症認定患者 74 例を対象者とした. 福岡県の 1994 年

11 月現在の全油症認定患者 683 名の 10.8%であった. 油症患者の内訳は男性 23 例, 女性 51 例で, 平均年齢は  $63.9 \pm 11.9$  歳 (31-87 歳) であった.

検診の内容は自覚症状, 既往歴, 家族歴, 理学的所見, 検尿, 赤血球沈降速度, 末梢血液検査, 血液生化学検査, 胸部レントゲン検査, 心電図および腹部超音波検査などよりなっている. 肥満の指標には数式計算 (体重/身長<sup>2</sup>) による Quetelet Index (Q.I.) を用いた<sup>11)</sup>. 採血は午前中の空腹時に行い, 末梢血液血球数および血液生化学パラメーターについて検討した. 血清総蛋白, アルブミン, GOT, GPT, LDH, アルカリフォスファターゼ,  $\gamma$ -GTP, 総ビリルビン, 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,  $\beta$ -リポ蛋白, 尿素窒素, クレアチニンは日立 736-60 E (日立製作所製) を用い測定した. また, PCB の測定は福岡県保健環境研究所, 福岡市衛生試験場, 北九州市環境科学研究所および第一薬科大学物理分析で行った.

結果は平均±標準偏差 (mean±S. D.) で表し, 油症発生当時の 1968 年 10 月の重症例の臨床検査値, 油症発生 11 年後の 1979 年 11 月の油症一斉検診における

臨床検査値と比較した。

### 結 果

1994年度油症一斉検診において末梢血液検査あるいは血液生化学検査で異常値を示した油症患者数をTable 1に示す。末梢血液検査では貧血を6例(8.1%)に認め、白血球増多を2例(2.7%)、白血球減少を4例(5.4%)に認めた。血液生化学検査では中性脂肪の上昇を21例(28.4%)と最も高頻度に認めた。次いでHDLコレステロールの低下を16例(21.6%)、 $\beta$ リポ蛋白の増加を10例(13.5%)、総コレステロールの上昇を8例(10.8%)と血中脂質および $\beta$ リポ蛋白の異常を高頻度に認めた。また、LDHの上昇を16例(21.6%)に、アルカリフォスファターゼの上昇を8例(10.8%)に、GOTの上昇および $\gamma$ -GTPの上昇を6例(8.1%)に、コリンエステラーゼの低下を5例(6.8%)に、GPTの上昇を4例(5.4%)に認めた。

1968年10月油症発生当時の重症例における臨床検査所見、油症発生11年後の1979年11月および26年後の1994年10月の油症一斉検診の臨床検査所見を比較した(Table 2)。油症発症当初の重症例の検査所見においてみられた軽度の貧血、白血球増多、赤血球沈

**Table 1** Numbers of patients with Yusho showing abnormal laboratory data (total 74 cases)

|                  | No. | (%)    |
|------------------|-----|--------|
| Peripheral blood |     |        |
| RBC              | 6   | (8.1)  |
| WBC              | 6   | (8.1)  |
| Plt              | 4   | (5.4)  |
| Blood Chemistry  |     |        |
| T. P.            | 1   | (1.4)  |
| Alb              | 1   | (1.4)  |
| GOT              | 6   | (8.1)  |
| GPT              | 4   | (5.4)  |
| LDH              | 16  | (21.6) |
| ALP              | 8   | (10.8) |
| $\gamma$ -GTP    | 6   | (8.1)  |
| T. Bil           | 2   | (2.7)  |
| ChE              | 5   | (6.8)  |
| T. Chol          | 8   | (10.8) |
| HDL-Chol         | 16  | (21.6) |
| TG               | 21  | (28.4) |
| $\beta$ -LP      | 10  | (13.5) |
| BUN              | 0   | (0)    |
| Creat.           | 1   | (1.4)  |

**Table 2** Laboratory data of patients with Yusho in 1968, 1979 and 1994

|                       | 1968.10<br>N=9   | 1979.11<br>N=110                    | 1994.10<br>N=74                |
|-----------------------|------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Peripheral blood      |                  |                                     |                                |
| RBC ( $\times 10^4$ ) | 382 $\pm$ 30     | 446 $\pm$ 49                        | 439 $\pm$ 39                   |
| WBC                   | 10300 $\pm$ 2800 | 6000 $\pm$ 1400                     | 5764 $\pm$ 1993                |
| ESR (mm/hr)           | 27 $\pm$ 27      | 14 $\pm$ 15                         | 15 $\pm$ 12                    |
| Blood Chemistry       |                  |                                     |                                |
| T.P.                  | 6.8 $\pm$ 0.7    | 7.5 $\pm$ 0.4<br>(6.4–8.4g/dl)*     | 7.5 $\pm$ 0.4<br>(6.4–8.4g/dl) |
| Alb                   | 3.9 $\pm$ 0.3    | 4.4 $\pm$ 0.3<br>(3.6–5.1g/dl)      | 4.5 $\pm$ 0.3<br>(3.6–5.1g/dl) |
| GOT                   | 23 $\pm$ 7.7     | 21 $\pm$ 6.0<br>(7–38units)         | 27 $\pm$ 14.8<br>(10–40IU/L)   |
| GPT                   | 23 $\pm$ 11.9    | 14 $\pm$ 9.4<br>(1–30units)         | 23 $\pm$ 16.2<br>(5–40IU/L)    |
| ALP                   | 14.9 $\pm$ 9.3   | 6.3 $\pm$ 3.2<br>(2.8–10.5KA units) | 150 $\pm$ 49<br>(68–220IU/L)   |
| T.Chol                | 167 $\pm$ 47     | 188 $\pm$ 37<br>(99–243mg/dl)       | 217 $\pm$ 34<br>(130–260mg/dl) |
| TG                    | 181 $\pm$ 88     | 124 $\pm$ 66<br>(35–150mg/dl)       | 123 $\pm$ 68<br>(35–150mg/dl)  |
| BUN                   | 12 $\pm$ 2.1     | 14 $\pm$ 3.6<br>(6–21mg/dl)         | 14 $\pm$ 3.3<br>(6–21mg/dl)    |

\*Normal ranges in 1979 or in 1994.

降速度の亢進, アルブミンの低下, アルカリフォスファターゼの上昇および中性脂肪の増加は11年後の1979年の油症一斉検診において改善を認めた。そして, 1994年度油症一斉検診の臨床検査所見では1979年に比べ有意の変化はみられなかった。

次に, 血清脂質および $\beta$ リポ蛋白と肥満あるいは血中PCB濃度との関連について検討した。中性脂肪( $r=0.33, p<0.005$ ),  $\beta$ リポ蛋白( $r=0.43, p<0.001$ )はbody mass index (Q.I.)と有意の正の相関を, HDLコレステロール( $r=-0.56, p<0.001$ )は有意の負の相関を認めた。しかし, 血清総コレステロール( $r=0.11$ )はbody mass index (Q.I.)と相関をみなかった。また, 中性脂肪( $r=0.24, p<0.05$ ), 総コレステロール( $r=0.25, p<0.05$ ),  $\beta$ リポ蛋白( $r=0.31, p<0.01$ )は血中PCB濃度と有意の正の相関を認めたが, HDLコレステロール( $r=-0.14$ )は血中PCB濃度との間に相関をみなかった。

## 考 察

油症発症当初には重症例の臨床検査所見において軽度の貧血, 白血球増多, 赤血球沈降速度の亢進, アルブミンの低下, 血清アルカリフォスファターゼの軽度上昇, BSP停滯率の軽度上昇, 中性脂肪の増加などがみられたことが報告されている<sup>9)</sup>。油症発症26年後の1994年の臨床検査所見において中性脂肪の増加が油症患者の28.4%と最も高頻度に認められた。血清中性脂肪の増加は本症における基本的代謝異常の一つである脂質代謝異常によるものであり, PCB中毒実験動物においても油症患者に類似した異常がみられることが報告されている<sup>3)12)</sup>。中性脂肪の増加は発症当初より注目されており, 奥村ら<sup>10)</sup>は, 油症発症直後の1969年より10年間にわたり中性脂肪の経過を追跡し得た24例を検討し, 男性9例では6年間, 女性15例では4年間は中性脂肪が高値を保っていたが, 以後正常範囲への下降がみられたと報告している。しかし, 血清中性脂肪の増加は1979年の油症一斉検診においても110例中26例(23.6%)と最も頻度の高い異常所見であった<sup>1)</sup>。今回の検討においても中性脂肪の増加は最も頻度の高い異常であったことより, 中性脂肪の増加は持続しているものと考えられる。さらに,  $\beta$ リポ蛋白の増加, HDLコレステロールの低下, 総コレステロールの上昇も高い頻度で認められることより, 他の血清脂質およびリポ蛋白の異常も持続しているものと考えられる。

油症患者では発症26年後の臨床検査所見において

も血清中性脂肪の増加を認め, 実験動物とは異なった変化が観察された。PCB投与サルでは投与中には中性脂肪が増加するが, 投与中止後2カ月以内に投与前のレベルに低下することが報告されている<sup>12)</sup>。油症患者における長期にわたる中性脂肪の増加が種差によるものか, 中性脂肪増加の機序の違いによるものかは不明である。今回の検討では油症患者の血清中性脂肪はbody mass index (Q.I.)および血中PCB濃度との間に相関を認めた。油症患者における血清中性脂肪の増加の機序として, 肥満および残留PCBの双方が関与していることが示唆される。また, 血清総コレステロールあるいは $\beta$ リポ蛋白も血中PCB濃度と正の相関を認めることより, PCBが他の血清脂質および $\beta$ リポ蛋白の異常にも関与している可能性も考えられる。

中性脂肪の増加は動脈硬化の危険因子であることが報告されている<sup>4)5)</sup>。PCBと動脈硬化との関連について, Kreissら<sup>6)</sup>はPCB濃度は年齢, 性およびbody mass indexと独立して高血圧と関連していたと報告している。しかし, 油症患者における検討ではPCB濃度と高血圧との関連は認められなかった<sup>2)</sup>。油症においては血清中性脂肪の増加は長期にわたり持続していると考えられるので今後の経過を追跡する必要があると考えられる。

## 総 括

1994年度福岡県油症一斉検診の受診者のうち油症認定患者74例を対象に臨床検査所見を検討した。血液生化学検査では中性脂肪の増加を21例(28.4%)と最も高頻度に認め, 次いでHDLコレステロールの低下を16例(21.6%),  $\beta$ リポ蛋白の増加を10例(13.5%), 総コレステロールの上昇を8例(10.8%)と血中脂質および $\beta$ リポ蛋白の異常を高頻度に認めた。また, LDHの上昇を16例(21.6%)に, アルカリフォスファターゼの上昇を8例(10.8%)に認めた。しかし, 油症発症当初の重症例の臨床検査においてみられた異常所見は改善しており, 1979年度油症一斉検診の臨床検査所見に比べ変化はみられなかった。中性脂肪,  $\beta$ リポ蛋白はbody mass index (Q.I.)と正の相関を, HDLコレステロールは負の相関を認め, 中性脂肪, 総コレステロール,  $\beta$ リポ蛋白は血中PCB濃度との間に正の相関を認めた。

## 文 献

- 1) 赤木公博, 村井宏一郎, 志方建: 油症患者の臨床検査所見, とくにリポ蛋白について. 福岡医誌 72:



245-248, 1981.

2) Akagi K and Okumura M: Association of blood pressure and PCB level in Yusho patients. *Environ. Health Persp.* 59: 37-39, 1985.

3) Barsotti DA, Marlar RJ and Allen JR: Reproductive dysfunction in rhesus monkeys exposed to low levels of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1248). *Food Cosmet. Toxicol.* 14: 99-103, 1976.

4) Carlson LA and Bottiger LE: Risk factors for ischemic heart disease in men and women. *Acta Med. Scand.* 218: 207-211, 1985.

5) Castelli WP, Wilson PW, Levy D and Anderson K: Cardiovascular risk factors in the elderly. *Am. J. Cardiol.* 63: 12H-19H, 1989.

6) Kreiss K, Zack MM, Kimbrough, RD, Needham LL, Smrek AL, and Jones BT: Association of blood pressure and polychlorinated biphenyl levels. *J. Am. Med. Assoc.* 65: 17-24, 1974.

7) 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.

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

9) 奥村恂, 勝木司馬之助: いわゆる油症(塩化ビフェニール中毒)の臨床的研究. とくに内科的所見について. *福岡医誌* 60: 440-448, 1969.

10) 奥村恂, 山中正義, 中牟田澄子: 油症(PCB中毒)患者における血清トリグリセライド値の10年間の推移. *福岡医誌* 70: 208-210, 1979.

11) 志方建: 肥満の予後に関する臨床疫学的研究——久山町研究20年間の追跡調査結果——. *福岡医誌* 75: 252-270, 1984.

12) 吉村英敏ほか: サルのPCB中毒症に関する研究. *福岡医誌* 72: 155-184, 1981.

(受付 1995-4-4)

## 1993・1994 年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状

九州大学医学部皮膚科教室 (主任: 堀 嘉昭教授)

中 山 樹一郎・堀 嘉 昭

福岡大学医学部皮膚科教室 (主任: 利谷昭治教授)

利 谷 昭 治

産業医科大学皮膚科教室 (主任: 旭 正一教授)

旭 正 一

### Dermatological Findings in the Annual Examination of the Patients with Yusho in 1993-1994

Juichiro NAKAYAMA and Yoshiaki HORI

*Department of Dermatology (Director: Prof. Y. Hori), Faculty of Medicine,  
Kyushu University 60, Fukuoka 812-82*

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 grades of severity of skin symptoms and the blood PCB patterns and concentrations in Yusho patients who were examined in the annual examinations in 1993 and 1994. The skin severity grades and skin severity scores showed the same tendency as recorded in the last 15 years. Approximately 20% of the patients, however, claimed the tendency of recurrence of skin infections and/or infected epidermal cysts, and still approximately 30% of the patients exhibited acneiform eruptions. Ten patients recorded with more than 6 points of skin severity scoring in these examinations were further investigated their initial skin severity grades and blood PCB patterns and concentrations. It was found that most of their blood PCB patterns showed the A pattern, and the level of the blood PCB in one patient was 55.5 ppb in the initial stage. Five patients out of 10 patients still have more than 10 ppb of blood PCB concentration. Thus, it is concluded that small populations of Yusho patients still have active skin symptoms with considerable blood PCB levels even at present.

### は じ め に

1993 年 (平成 5 年度) および 1994 年 (平成 6 年度) に実施された一斉油症患者検診時の皮膚症状について、最近の細菌感染傾向および粉瘤再発傾向、面皰形成、瘰癧様皮疹の新生、色素沈着、爪変形についてその程度を数字で記録し、各患者の皮膚重症度<sup>4)</sup>および皮膚重症度得点数<sup>1)</sup>を算定した。同時に各患者で測定された PCB パターン<sup>3)</sup>および PCB 濃度と皮膚症状との

相関性を求めた。

油症の発生以来 27 年が経過したが、現時点でも依然として皮膚の細菌感染や粉瘤、瘰癧の新生を繰り返している患者が散見される。今回、平成 5 年度あるいは 6 年度に皮膚重症度得点数が 6 以上と算定された患者の初診時から現在までの臨床経過についても検討したのであわせて報告する。

## 1993, 1994 年度における検診結果

## 受診状況

1993 年度の受診者は 89 名(うち 3 名は PCB 測定および血液検査のみ)で, 男性 29 名・女性 60 名, 1994 年度は 78 名で男性 25 名・女性 53 名であった。性差(男性:女性)は各 1:2.07, 1:1.12 であった。

## 皮膚重症度・皮膚重症度得点数

表 1, 2 に 1993~1994 年度および 1977, 1981, 1985, 1990, 1992 の各年度の皮膚重症度<sup>4)</sup>および皮膚重症度得点数<sup>2)</sup>を示す。1993 年度および 1994 年度の皮膚重症度ではほとんど皮膚症状のない患者が各 47.7%, 43.4%とほぼ半数を占め, 1990 年度~1992 年度の値よりは若干低下していた。痤瘡様皮疹の新生が

軽度であっても依然みられる症例が各 33.7%, 30.8%と以前にくらべ 10%程度高値であった。重症度が III または IV を示した症例が各年度 3 例ずつみられ, 依然皮膚症状が高度にみられる症例がごく少数ではあるが(3%台)見いだされた。同様に皮膚重症度得点数では点数が 0・1 の患者が各年度で 59.3%, 52.6%と約半数を占めた。以下得点が 2・3 が 24.4%と 23.1%, 4・5 が 8.1%と 14.1%, 6・7 が 4.7%と 5.1%, 8・9 が 3.5%と 3.8%, 10~13 が 1994 年度に 1 名(1.3%)が見られた。皮膚重症度では, 患者の分布は 2 峰性(重症度 0 と II または III にピーク)を示すのに対し, 皮膚重症度得点数では得点数の少ない方から多い方へほぼ直線的に減少していた。平均の得点数は各 1.79 と 2.00 で, ほぼ例年の数値に近い値であった。

表 1 年度別皮膚重症度

| 年齢<br>重症度 | 1977 年   | 1981 年   | 1985 年   | 1990 年   | 1992 年   | 1993 年   | 1994 年   |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|           | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    |
| 0         | 30(29.4) | 39(36.4) | 61(39.1) | 53(58.2) | 48(57.8) | 41(47.7) | 37(47.4) |
| 0 I       | 10(22.5) | 13(28.9) | 14(17.9) | 3(6.6)   | 2(9.6)   | 7(12.7)  | 4(14.1)  |
| I         | 13       | 18       | 14       | 3        | 6        | 4        | 7        |
| I II      | 7(18.6)  | 6(15.9)  | 3(16.7)  | 7(14.4)  | 5(8.4)   | 2(2.3)   | 1(3.8)   |
| II        | 12       | 11       | 23       | 6        | 2        | 0        | 2        |
| II III    | 11(24.5) | 4(14.9)  | 4(23.7)  | 10(19.8) | 18(22.9) | 21(33.7) | 18(30.8) |
| III       | 14       | 12       | 33       | 8        | 1        | 8        | 6        |
| III IV    | 3(4.1)   | 3(3.7)   | 0(2.6)   | 1(1.1)   | 1(1.2)   | 3(3.5)   | 3(3.8)   |
| IV        | 2        | 1        | 4        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| 計         | 102      | 107      | 156      | 91       | 102      | 86       | 78       |

表 2 年度別皮膚重症度得点数

| 年度<br>得点 | 1977 年   | 1981 年   | 1985 年   | 1990 年   | 1992 年   | 1993 年   | 1994 年   |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|          | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    | 例数(%)    |
| 0・1      | 32(31.1) | 52(48.6) | 88(56.4) | 66(72.5) | 44(53.0) | 51(59.3) | 41(52.6) |
| 2・3      | 35(34.0) | 33(30.8) | 42(26.9) | 20(22.0) | 32(38.6) | 21(24.4) | 18(23.1) |
| 4・5      | 22(21.4) | 12(11.2) | 20(12.8) | 4(4.4)   | 6(7.2)   | 7(8.1)   | 11(14.1) |
| 6・7      | 7(6.8)   | 7(6.5)   | 5(3.2)   | 0        | 0        | 4(4.7)   | 4(5.1)   |
| 8・9      | 5(4.9)   | 2(0.9)   | 1(0.6)   | 1(1.1)   | 1(1.2)   | 3(3.5)   | 3(3.8)   |
| 10~13    | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1(1.3)   |
| 14~      | 2(1.9)   | 1(0.9)   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| 計        | 103      | 107      | 156      | 91       | 83       | 86       | 78       |
| 平均得点     | 3.13     | 2.15     | 1.58     | 0.96     | 1.47     | 1.79     | 2.00     |

## 血中 PCB パターンと皮膚重症度得点数の相関性

表3に1993年度および1994年度のPCBパターンと皮膚重症度得点数の相関性を示す。1981年度以来各A, B, Cパターンの例数の比率はほとんど変わらず、また、各パターンでの平均の皮膚重症度得点数も油症特有のパターンといわれるAが各2.27, 2.29, Bが1.43, 1.18, Cが1.30, 1.71とほぼ例年通りの数値に近い値であった。

## 血中 PCB パターンと PCB 濃度

表4に1993年度および1994年度のPCBパターン別の平均濃度を示す。1993年度でのAパターンの平均濃度は7.03とほぼ例年通りの数値であったが、正常人のパターンといわれるCパターンの平均濃度が3.27と例年よりやや高値であった。1994年度ではA, B, Cのいずれのパターンの平均濃度も例年通りの値を示した。

表3 血中 PCB パターンと皮膚重症度得点数の相関性

| (A) 1981 年 |    |      | (B) 1985 年 |     |      | (C) 1990 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          | 41 | 2.88 | A          | 59  | 2.29 | A          | 37  | 1.24 |
| B          | 12 | 1.75 | B          | 17  | 1.76 | B          | 17  | 0.94 |
| B C        | 4  | 2.25 | B C        | 9   | 1.11 | B C        | 3   | 0.33 |
| C          | 27 | 1.78 | C          | 53  | 1.26 | C          | 33  | 0.64 |
| 計          | 84 | 2.33 | 計          | 138 | 1.63 | 計          | 101 | 0.93 |
| (D) 1992 年 |    |      | (E) 1993 年 |     |      | (F) 1994 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          | 28 | 2.00 | A          | 37  | 2.27 | A          | 34  | 2.29 |
| B          | 16 | 1.50 | B          | 21  | 1.43 | B          | 11  | 1.18 |
| B C        | 2  | 0.00 | B C        | 1   | 1.00 | B C        | 2   | 2.50 |
| C          | 37 | 1.22 | C          | 30  | 1.30 | C          | 31  | 1.71 |
| 計          | 83 | 1.51 | 計          | 89  | 1.72 | 計          | 78  | 1.91 |

表4 血中 PCB パターンと PCB 濃度の相関性

| (A) 1981 年 |    |                   | (B) 1985 年 |    |      | (C) 1990 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          | 46 | 6.39 <sup>★</sup> | A          | 31 | 7.38 | A          | 37 | 6.00 |
| B          | 12 | 4.08              | B          | 4  | 5.0  | B          | 17 | 3.94 |
| B C        | 4  | 3.00              | B C        | 1  | 5.0  | B C        | 3  | 3.49 |
| C          | 28 | 2.57              | C          | 18 | 2.13 | C          | 33 | 2.59 |
| 計          | 90 | 5.02              | 計          | 54 | 5.64 | 計          | 90 | 4.20 |
| (D) 1992 年 |    |                   | (E) 1993 年 |    |      | (F) 1994 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          | 29 | 6.19              | A          | 37 | 7.03 | A          | 34 | 6.34 |
| B          | 16 | 3.48              | B          | 21 | 4.22 | B          | 11 | 3.57 |
| B C        | 2  | 3.34              | B C        | 1  | 1.60 | B C        | 2  | 4.28 |
| C          | 41 | 2.50              | C          | 30 | 3.27 | C          | 31 | 2.60 |
| 計          | 88 | 3.91              | 計          | 89 | 5.04 | 計          | 78 | 4.41 |

★濃度の単位は ppb

## 最近の皮膚の細菌感染・粉瘤再発傾向

表5に一斉検診時に調査した最近の細菌感染および粉瘤再発傾向についての結果を示す。1993年度および1994年度のいずれも全体の患者の20%程度が何らかの再発傾向がある、と答えており、現在でも油症の皮膚症状は軽度ではあるが一部続いていることが判明した。

表5 最近の細菌感染・粉瘤再発傾向

| 年度    | 最近の細菌感染傾向<br>(-)       | 最近の細菌感染傾向<br>(+) | 最近の粉瘤再発傾向<br>(-) | 最近の粉瘤再発傾向<br>(+) |
|-------|------------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1993年 | 70 <sup>*</sup> (81.4) | 16 (18.6)        | 69 (80.2)        | 17 (19.8)        |
| 1994年 | 61 (79.2)              | 16 (20.8)        | 55 (71.4)        | 22 (28.6)        |

★ ( ) ; %

## 高い皮膚重症度得点数を示した症例の臨床経過

今回、1993年度あるいは1994年度のいずれかで皮膚重症度得点数が6以上を示した10名の油症患者の皮膚症状および血中PCB濃度の推移を表6に示す。油症発生当時(昭和44年)より現在までほぼ毎年一斉検診を受けている患者が10例中6例に見られ、発症当時から今まで強い病悩があったことがうかがわれる。当時の重症度判定<sup>2)</sup>はII, III, IVが各2名ずつ見られているが、現在でも重症度はII・IIIからIII・IVであり、

症状の改善度がきわめて遅いことが示唆された。血中PCBのパターンはほとんどがAパターンであり、ごく一部にBあるいはCパターンへの変動が見られている。PCBの血中濃度は昭和44年の初診時最高で55.5 ppbを示した症例があり、現在でも10例中5例が10 ppb以上であった。

## 考 察

1993年度および1994年度の一斉検診を受けた油症患者の皮膚症状の程度、および血中PCBパターン、濃度についてのデータをまとめ、さらに1997年より1992年までの数値と比較した。

皮膚重症度では、重症度0が46%~47%を示し、約半数の患者が皮膚症状の全くない状況にあった。また色素沈着ないし軽度の面皰形成のある患者が10%台を示した。今回の調査結果の特徴としては、重症度II・III~IIIの患者、すなわち、痤瘡様皮疹を依然呈する患者が全体の約30%見られたことであった。例年上記重症度を示す患者は全体の15%~25%程度であり(表1参照)、1993~1994年度では5%程度の高値が認められた。この理由として最近では何らかの皮膚症状を呈する患者が検診を受ける傾向が高まっていることが考えられるが、今後の受診状況については注意深く見守る必要があると思われる。

皮膚重症度の得点数をみると、得点0・1が50%台にのり、上記皮膚重症度0の値とほぼ一致している。次

表6 高い皮膚重症度得点数を示した症例の臨床経過

| 患者  | 性 | 年 齢 |    | S 44 | S 48      | S 54<br>~S 56             | S 54<br>~S 56            | S 57<br>~S 60            | S 61<br>~S 63            | H 1<br>~H 2                  | H 3<br>~H 4                  | H 5<br>~H 6                               |
|-----|---|-----|----|------|-----------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|
|     |   | 初診時 | 現在 |      |           |                           |                          |                          |                          |                              |                              |                                           |
| N・M | F | 55  | 65 |      |           |                           |                          | III-A 2-9<br>III-A 4-4   | -A 5.4-                  | III-A 3.2-3                  | III-A 4.3-8                  | I II-A 4.6-3<br>III-A 6.5-8               |
| K・Y | M | 48  | 65 | III  | IV-A 21   | III-A 6-6                 | III-A 4-5                | III-A 6-5                | III-A 4.8-4              |                              |                              |                                           |
| I・T | M | 62  | 78 |      |           |                           |                          |                          | X-C 3.6-X                | II-C 2.8-3<br>III-C 1.5-3    |                              | III-A 1.2-8<br>III-C 3.2-6<br>III-C 3.3-6 |
| E・Y | F | 46  | 63 | II   | II-A 9    | II III-A 4-5<br>I-A 4-3   | II-B 5-2                 | I-A 5-2<br>III-B 4-4     | III-B 4-4<br>III-B 3-3   | II III-A 3.2-2<br>II-B 2.6-3 | 0-C 2.1-0                    | III-B 3.0-6                               |
| M・M | F | 56  | 61 |      |           |                           |                          |                          |                          | III-A 19.4-5<br>III-A 11.3-5 | II III-A 16.6-3              | III-A 17.8-8<br>III-A 14.7-10             |
| M・C | F | 49  | 66 | II   | IV-A 12   | III-A 12-9<br>III-A 15-8  | III-A 14-5<br>III-A 12-8 | III-A 9-7<br>III-A 21-5  | II III-A 12-4<br>I-B 8-1 | II III-B 8.7-2               | 0-B 13.9-1                   | II III-A 11.5-6<br>III-A 4.7-6            |
| Y・T | F | 42  | 52 |      |           |                           |                          | III-A 3-10<br>III-A 10-2 | III-A 9-4<br>III-A 12-2  | II III-A 11.7-3<br>0-A 9.4-0 |                              | III-A 4.7-6<br>III-A 4.6-4                |
| M・Y | M | 46  | 63 | IV   | IV-A 9.5  | III-A 17-8<br>III-A 18-12 | II III-A 17-8            | III-A 8-6<br>IV-A 25-7   | III-A 15-4<br>II-A 18-4  | III-A 11.1-5                 | 0-A 10.4-1<br>II-A 11.8-5    | II III-A 15.4-6                           |
| M・Y | F | 42  | 59 | IV   | IV-A 55.5 | IV-A 32-19<br>IV-A 29-14  | IV-A 24-15<br>IV-A 30-16 | IV-A 25-15<br>IV-A 10-8  | IV-A 25-7<br>IV-A 32-10  | III-A 24.8-8                 | III-A 16.4-6<br>III-A 18.2-8 | III-A 26.8-8<br>0 I-A 24.0-2              |
| K・N | F | 45  | 62 | III  | III-A 9   | II III-A 15-5<br>I-A 16-4 | III-A 7-10               | III-A 9-4<br>III-A 5-6   | 0 I-A 7-1<br>III-A 8-4   | III-A 7.9-2                  | II-A 9.4-2<br>III-A 6.1-4    | III-A 11.5-8                              |

F：女性，M：男性，皮膚重症度-PCBパターン PCB濃度-皮膚重症度得点数で表示

いで得点 2・3 が 20% 台であり、得点が 0～3 までの患者をあわせると全体の約 80% が皮膚症状が全くないか、ごく軽微であるか、という状況にある。この結果はここ 15 年の状況とほぼ一致したものである。痤瘡様皮疹が軽度でも、実際に生じていると皮膚重症度では II・III または III と判定されるが、この場合皮膚重症度得点数ではごく少数の痤瘡様皮疹では 1 点としか評価されず、こちらの方が現在の皮膚症状の程度をより客観的に反映していると考えられる。

血中 PCB パターンについては 1993～1994 年度では例年とあまり差は認められなかった。A パターンが B あるいは C パターンより依然多く見られた。PCB パターンと PCB 濃度との相関性でも、各 PCB パターンにおける PCB 平均濃度も A パターンが高いという例年通りの結果であった。ただし、1993 年度の C パターンの平均 PCB 濃度は 3.27 と 1981 年以来最高値を示した。1994 年度は 2.60 と元に戻っており、1993 年度の結果は一過性の現象と思われるが今後の追跡が必要と思われる。

最近の細菌感染傾向あるいは粉瘤再発傾向についての調査では、1993 年度および 1994 年度のいずれも約 20% の患者が上記傾向を示しており、現時点でも油症の皮膚症状が完全にはとまっていないことが明らかであった。また、今回の皮膚重症度得点数が 6 以上を示

した 10 名の患者について過去の皮膚症状の推移と血中 PCB の経時的変動を調査した。油症発生翌年(昭和 44 年)に一斉検診を受診した患者がこれら 10 名中 6 名にみられ、それらの患者の初診時皮膚重症度は II～IV であった。現時点でも皮膚重症度は II・III～III がほとんどであり、とくに痤瘡様皮疹が依然みられている。血中 PCB 濃度では、初診時最高 50 ppb をこす症例があったが、現在でも 10 ppb 以上を示す症例が 10 例 5 例あり、PCB の体外排泄がきわめて緩慢なものであることが示唆された。今後このような油症患者の注意深い経過観察が必要と考えられる。

## 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) 五島應安, 樋口謙太郎: 油症(塩化ビフェニール中毒症)の皮膚科学的症候論. 福岡医誌 60: 409-431, 1969.
- 3) 増田義人, 香川梨絵, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人体内のポリ塩化ビフェニール. 福岡医誌 65: 17-24, 1974.
- 4) 利谷昭治, 北村公一: 油症(塩化ビフェニール中毒症)の臨床的観察, とくに皮膚所見のその後の経過. 福岡医誌 62: 132-138, 1971.

(受付 1995-3-27)

## 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,  $\mu$ m, nm, g, mg,  $\mu$ g, ng, ml, dl,  $\mu$ l,  $\text{cm}^2$  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ページに収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：井上尚英（衛生学）、太田雅博（口腔生理学）、堀 哲郎（生理学1）、  
田代信維（神経精神医学）、榎田裕之（衛生学）  
編集委員：小宮山莊太郎（耳鼻咽喉科学）、赤池紀生（生理学2）、久保千春（精神身体医学）、  
桑野信彦（生化学1）

平成7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 01750-2-2233）

編集兼発行者

井 上 尚 英

印刷所

秀巧社印刷株式会社

福岡市南区向野2丁目13-29