

昭和29年11月5日第三種郵便物認可
平成9年5月25日（毎月25日発行）
第908号

Vol. 88 No. 5
May 1997

CODEN : FKIZA4
ISSN 0016-254X

福岡医学雑誌

FUKUOKA ACTA MEDICA

第 88 卷 第 5 号 (908)

平成 9 年 5 月 25 日

特 集 号

油 症 と P C B

研 究 報 告 第 16 集

The Sixteenth 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 16 集

(福岡医学雑誌 第 88 巻 第 5 号 平成 9 年 5 月)

目 次

1. 序 言.....吉村 英敏…(1)
2. ラット肝サイトソル 54 kDa タンパク質に対する特異的抗体の産生
— Coplanar PCB による著しい誘導の検証 —
.....石田 卓巳・石井 祐次・田崎 健二・有吉 範高・小栗 一太…(3)
3. Co-planar PCB の肝 glutathione peroxidase-redox system に対する影響：ラットおよびモ
ルモットでの検討.....堀 美穂・有吉 範高・山田 英之・小栗 一太…(12)
4. 油症患者血液中 PCB, PCDF の 20 年経過後の状態.....増田 義人・黒木 広明・原口 浩一
Arnold Schecter・Olaf Päpke…(17)
5. カネクロール 400 メチルスルホン代謝物のマウス体内分布.....原口 浩一・増田 義人…(25)
6. ラットにおける PCB, PCDF 及び PCDD の消化管吸収に及ぼす抹茶の効果
.....森田 邦正・松枝 隆彦・飯田 隆雄…(30)
7. 油症患者 83 名の血液中 PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs 濃度
.....飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦・中川 礼子…(37)
8. 油症患者の皮脂および血液中の PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs 濃度
.....飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦
堀 就英・中尾 知子・中山樹一郎…(45)
9. セラミックサンドバスによるヒトの皮脂からの PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs の体
外への排出促進の検討.....飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦・中村 又善・堀 就英…(54)
10. 高毒性有機塩素化学物質の混合溶液による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・飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦…(61)
11. TCDD 投与ラットにおける急性期の糖・脂質・内分泌代謝の異常西住 昌裕・檜垣 靖樹…(68)
12. 皮脂中 PCB 濃度の年次推移と季節変動渡辺 雅久・田中 敬一・鳥山 史…(73)
13. *In vitro* における Polychlorinated Biphenyls (PCBs) 毒性軽減の検討 (第 4 報)
— 漢方製剤の細胞毒性に与える影響 —松岡 一忠・渡辺 雅久・鳥山 史…(75)

14. Polychlorinated Biphenyls (PCB) の末梢神経髄鞘におよぼす影響について
.....吉村 俊朗・沖田 実・上山 裕文
伊藤 聖・後藤 公文・末松 貴史…(79)

15. カネミ油症検診者におけるクレアチンキナーゼ上昇の意義
.....吉村 俊朗・沖田 実・東 登志夫・上山 裕文・伊藤 聖…(84)

16. 油症患者の自他覚症状と血中 PCB 濃度
—— 発生 25 年後の検診結果より ——廣田 良夫・徳永 章二・片岡恭一郎・篠原 志郎…(88)

17. 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 (第二報)
.....橋口 勇・阿南 壽・前田 勝正
赤峰 昭文・福山 宏・奥村 英彦…(94)

18. 油症患者における甲状腺機能：油症発生 28 年後の検討辻 博・佐藤 薫・下野 淳哉
東 晃一・橋口 衛・藤島 正敏…(99)

19. 1995・1996 年度の福岡県年次検診における皮膚症状
—— 各年齢層で血中 PCB 濃度と皮膚重症度との相関性 ——
.....中山樹一郎・堀 嘉昭・利谷 昭治・旭 正一…(104)

The Sixteenth Reports of the Study on Yusho and PCB
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 88, No. 5, 1997)

CONTENTS

1. ForewordH. Yoshimura··· (1)
2. Production of Antibody against Cytosolic 54kDa Protein in Rat Liver
 — Evidence of the Significant Induction by a Highly Toxic Coplanar Polychlorinated Biphenyl —T. Ishida, Y. Ishii, K. Tasaki, N. Ariyoshi and K. Oguri··· (3)
3. Effect of Co-planar Polychlorinated Biphenyl on the Hepatic Glutathione Peroxidase Redox System in Rats and Guinea PigsM. Hori, N. Ariyoshi, H. Yamada and K. Oguri··· (12)
4. The Condition of PCBs and PCDFs in the Blood of Yusho Patients 20 Years after the OnsetY. Masuda, H. Kuroki, K. Haraguchi, A. Schecter and O. Päpke··· (17)
5. Tissue Distribution of Methylsulfonyl Metabolites Derived from Kanechlor 400 in MiceK. Haraguchi and Y. Masuda··· (25)
6. Effect of Green Tea (Matcha) on Gastrointestinal Tract Absorption of Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzofurans and Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins in RatsK. Morita, T. Matsueda and T. Iida··· (30)
7. Concentrations of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in Blood of 83 Patients with YushoT. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda and R. Nakagawa··· (37)
8. Levels of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in Sebum and Blood of Yusho PatientsT. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda, T. Hori
 T. Nakao and J. Nakayama··· (45)
9. Stimulation for Sebum Excretion of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs on Bathing Ceramic sand BathT. Iida, H. Hirakawa, T. Matsueda
 M. Nakamura and T. Hori··· (54)
10. Induction of Micronuclei in Cultured Human Lymphocytes with the Mixture of Highly Toxic Organochlorine Compounds Retained in Human BodyJ. Nagayama, M. Nagayama, T. Iida, H. Hirakawa and T. Matsueda··· (61)
11. Studies on Mechanism of Wasting Syndrome in TCDD-intoxicated Rats.....M. Nishizumi and Y. Higaki··· (68)
12. Yearly and Seasonal Fluctuation of PCB Concentration in Skin Surface LipidM. Watanabe, K. Tanaka and F. Toriyama··· (73)
13. *In Vitro* Analysis for Cellular Toxicity of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on HeLa Cellular Proliferation (IV)
 — The Effect of Kanpo Preparations on Cellular Toxicity —K. Matsuoka, M. Watanabe and F. Toriyama··· (75)

14. Effects of Polychlorinated Biphenyls on Regenerating Myelin of Peripheral Nerve in Rats.....T. Yoshimura, M. Okita, H. Ueyama, H. Ito, H. Goto and T. Suematsu···(79)
15. Elevation of Serum Creatine Kinase in the Patients with Kanemi Yusho.....
.....T. Yoshimura, M. Okita, T. Higashi, H. Ueyama and H. Ito···(84)
16. Symptoms and Blood PCB Level among Chronic Yusho Patients, Twenty-five Years after OutbreakY. Hirota, S. Tokunaga, K. Kataoka and S. Shinohara···(88)
17. An Epidemiologic Examination on the Prevalence of the Periodontal Diseases and Oral Pigmentation in Yusho Patients in 1996
.....I. Hashiguchi, H. Anan, K. Maeda, A. Akamine, H. Fukuyama
and H. Okumura···(94)
18. Thyroid Function in Patients with Yusho : 28 Year Follow-up Study
.....H. Tsuji, K. Sato, J. Shimono, K. Azuma, M. Hashiguchi and M. Fujishima···(99)
19. Dermatological Findings in the Annual Examination of the Patients with Yusho in 1995 -1996J. Nakayama, Y. Hori, S. Toshitani and M. Asahi···(104)

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 16th 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 1995 to March 1997. We have already established a therapeutic method utilizing a combination of rice bran fiber and cholestyramine as accelerator of the fecal excretion of PCDFs and related compounds still retained in the tissues of Yusho patients. In practice, this method seems good, but not so excellent with respect to the effectiveness and so our efforts have further been made to continue to find out better methods. As the result, chlorophyll and its derivatives, and also green tea powder were suggested to be much more effective excreting agents for PCDFs than rice bran fiber. Apart from the elimination through this intestinal route, that through the sebaceous gland was also examined extensively for PCDFs and related compounds in Yusho patients, but a trial to develop methods to accelerate the elimination of PCDFs through this route has not yet been attempted. 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.

1968年の油症発生から今年早くも29年目を迎える。また、厚生省油症治療研究班の各班員による本研究報告集は第16集を数えることとなる。2年毎に刊行される本報告集には、大むね平成7年4月より平成9年3月までの主な成果が収載されている。一口に29年というが、この歳月は勿論決して短いものではない。油症発生当時40歳の働き盛りであった患者さんも、今では70歳の高齢者であり、生れて間もない油症児も、30歳の若者に成長されていることを思うと、正に感無量である。油症発生の当初から原因究明や治療に当られ、中心的役割を果たされた多くの研究者や医師も、定年を迎えられたりすでに故人となられており、かなりの班員がその都度新たに本研究班に参入されてきている。

油症を惹起した原因物質については、いち早く解明されたものの、肝心の治療法の開発は遅々として進展せず苦悩の研究が暫時続いた。しかし努力の甲斐あり、最近ようやく米ぬか繊維とコレステラミンの併用療法の有効性が、わが国の油症と台湾油症の患者さんの協力もあって確認された。しかしこの方法も、かなり大量の薬を連日服用して、体内残留の原因物質の排泄を、ようやく2~3倍促進させるというものである。したがって、本法の適用が期待されるのは、PCDF等の血中レベルの高い患者さんということになり、現在その該当者はきわめて少ない。引き

続きより効率の高い安全な PCDF 等の体外排泄促進法の開発が切望される。

幸いその後もクロロフィルやその誘導体に、米ぬか繊維を 10 倍近く上回る PCDF 等の吸収抑制作用を有することが見出され、期待がもたれている。この吸収抑制作用というのは、血中より微量ながら小腸管腔に排出される PCDF 等を、その再吸収を妨げてそのまま糞中へ排泄させることを意味し、体内残留 PCDF 等のすぐれた排泄促進剤となる可能性を秘めている。その意味で、この作用が強力といわれるクロレラ等につき、さらに検討が進められることが望まれる。これに加え、今回わが国で古くから日常飲用されている抹茶が新たに登場し、クロレラより多少劣るものの、米ぬか繊維を上回る PCDF 吸収抑制作用を有することが見出されている。抹茶には勿論クロロフィルが含まれ、上記の作用を発揮すると思われるが、別の主要成分として抗酸化作用の強い（一）エピカテキン類を豊富に含有している。前の第 15 集でも触れたが、PCDF 等の毒性発現機作の 1 つとして酸化的ストレスがあげられている。したがって、抹茶は PCDF 等により増加すると推定されるこの活性酸素の消去にも、力を発揮することが考えられる。これらについての一層の研究推進が期待される。

消化管からの排泄とともに、皮脂を介する PCDF 等の排泄についても、数年来関心が寄せられている。長崎油症研究班では、前回の報告に引続き 1994 年、1995 年度に採取した皮脂について、総 PCB の排泄状況を調査、検討している。これによると、年次による皮脂中への排泄量の変動はあまりなく、毎年ほぼ一定した排泄が行われていることが確認されている。また夏期に比し冬期ではこの排泄が有意に減少しているという。九州大学油症治療研究班では、患者の顔面皮脂と血中の両方について PCDF 等の濃度分析を行っており、皮脂中と血中のそれには強い相関があり、かつ一般健常者にくらべ患者の皮脂、血中の濃度は、ともに高値であることが示されている。この経路を介しての排泄促進法の開発も重要課題の 1 つであるが、その後の進展はあまりみられていない。

発症以来約 30 年を経過する患者体内に、なおどれ位の病因物質が残存するかを明らかにすることは、きわめて重要と考えられるが、今回 1995 年の一斉検診の受診患者の血液について、PCDD、PCDF および PCB の各異性体の詳細な分析データが明らかにされた。最も重要な病因物質と考えられている 2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン (PenCDF) の患者血中濃度は、いまなお一般健常者のそれより遙かに高く推移していることがわかった。これとは別に、数名の油症患者血液についても同様な検討が行われているが、PCB 中最高急性毒性を示す 3,4,5,3',4'-ペンタクロロビフェニル (PenCB) は、患者血中の方が一般健常者のそれより低くなっているという興味深い知見も得られている。大変な作業ではあるが、今後ともこのような追跡調査の継続は必須と思われる。

基礎的研究においても毒性発現機作と結びつくいくつかの成果が得られている。その 1 つは前回に述べた高毒性 PenCB による活性酸素消去系の損傷と、それに基づく酸化的ストレスの上昇に関する問題の検討である。これまでの研究から、PenCB 等に最も感受性の高いモルモットにおいては、これより低感受性のラットよりも活性酸素消去系の障害が強いと考えられた。しかし、結果は逆で、消去系の 1 つであるグルタチオンパーオキシダーゼ活性は、ラットでは有意に低下したが、モルモットではむしろ逆に増加したという。動物種による毒性発現機作の違いが示唆され、一筋なわでは行かぬ困難さの一端をみせつけられた思いである。

もう 1 つは PenCB により毒性が発現した状態において、ラット肝サイトソル中、著しく誘導される 54 KDa タンパク質についての研究である。今回その毒性学的意義を解明するため、このタンパク質の精製およびその特異的抗体の産生が行われ、種々の基礎知見を得るとともに、今後の毒性発現機構解明への新しい布石となることが期待された。

本研究班の最近の成果と今後の方向について触れたが、本報告集にはなお多くの臨床的、基礎的研究成果が収載されており、これらが油症についての理解を一層深め、また患者の治療や生活指針に生かされることを願っている。なお本報告集の編集は九州大学油症治療研究班長堀嘉明教授、並びに事務局の中山樹一郎助教授により行われたものであることを付記し、ここに感謝したい。またここに収録された研究成果は平成 7、8 年度厚生科学研究費補助金によるものであり、あわせて深甚なる謝意を表したい。

ラット肝サイトソル 54 kDa タンパク質に対する特異的抗体の産生 — Coplanar PCB による著しい誘導の検証 —

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室
石田 卓巳・石井 祐次・田崎 健二
有吉 範高・小栗 一太

Production of Antibody against Cytosolic 54kDa Protein in Rat Liver — Evidence of the Significant Induction by a Highly Toxic Coplanar Polychlorinated Biphenyl —

Takumi ISHIDA, Yuji ISHII, Kenji TASAKI, Noritaka ARIYOSHI
and Kazuta OGURI

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

We have reported that a 54kDa protein in rat liver cytosol is highly inducible by treatment with 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) or 3-methylcholanthrene (MC) using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Internal amino acid sequences of this protein in the rat liver were highly homologous to those of selenium binding protein (SeBP) or acetaminophen binding protein (APBP) in mouse liver cytosol. In this paper, the purification and characterization of this protein were demonstrated. MC was given at a dose of 20 mg/kg for 3 consecutive days. The liver cytosolic 54kDa protein was purified twice from the MC-treated male Wistar rats by Rotofore Cell™ procedure to apparent single on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the rabbit antiserum against this protein was obtained.

Male Wistar rats were given PenCB in corn oil at a single dose of 25 mg/kg i. p. The liver cytosol was prepared on the 5th day after the treatment and subjected to immunoblot analysis. The 54kDa protein was markedly induced in the liver cytosol of PenCB-treated rats. Immunoblot analysis after two-dimensional gel electrophoresis suggested that there could be isoforms of 54kDa protein. The induction of the 54kDa protein with PenCB was assumed to be mediated through Ah-receptor. The physiological role of the 54kDa protein was discussed together with SeBP and APBP, the role of which has not yet been elucidated.

緒 言

Polychlorinated biphenyl (PCB) は、ビフェニルに塩素が置換した化合物の総称であり、2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran に代表される高毒性の多塩素化芳香族炭化水素の一つである。また、PCB は、カネミ油症の原因物質の一つとして知られている。実験動物を用いた研究から、PCB ならびにその類縁化合物は、体重増加抑制、胸腺萎縮、脂質代謝異常などの毒性を示すことが知られている¹⁹⁾³⁰⁾⁴⁰⁾⁴⁵⁾⁵¹⁾。油症患者に

対する治療法としては、米ぬかファイバー⁴⁹⁾やコレステラミン²¹⁾⁴⁹⁾による排泄促進が試みられている。しかし、その毒性発現機構については、未解明な点が多く残されており、根本的な治療法は、いまだ確立されていない。

ジベンゾフラン類やコプラナー PCB の引き起こす急性毒性は、サイトソル分画に存在する Ah-receptor を介して発現すると考えられている³⁹⁾⁴³⁾。Ah-receptor に対する親和性の高い PCB 異性体は、強い急性毒性を示す³⁹⁾⁴³⁾。また、マウスやラットでは、Ah-receptor

により up-regulate されていることが知られている CYP1A subfamily に属するシトクロム P450 の誘導の程度と PCB の急性毒性の強さとの間に良好な相関がみられる⁷⁾¹⁴⁾³⁹⁾⁴³⁾。これらの事実が、Ah-receptor を介した毒性発現機構を考える大きな理由である。1992 年に、マウスの Ah-receptor の cDNA がクローン化され⁹⁾¹³⁾、Ah-responsive の C 57 BL/6 系マウスと Ah-non responsive の DBA/2 J 系マウスの Ah-receptor の一次構造の違いも明らかになっている¹⁴⁾。現在までに、マウスおよびヒトから Ah-receptor の cDNA がクローン化され¹¹⁾¹²⁾¹⁴⁾、その転写因子としての機能が明らかにされているが、コプラナー PCB や TCDD の毒性は、多面的であり、その毒性発現機構については、未解明な点が多く残されている。

当教室では、これまで、PCB による毒性発現機構を解明する目的で、コプラナー PCB に対する感受性が高いモルモットと比較的感受性が低いラットを用いて研究を行ってきた。その結果、コプラナー PCB によって、肝の bilirubin UGT 活性²⁸⁾³⁸⁾、CYP4A1²⁸⁾、ペルオキシソーム脂肪酸 β 酸化系酵素活性²⁵⁾²⁶⁾ および糖新生の key enzyme である phosphoenol pyruvate carboxykinase 活性³⁷⁾ が、モルモットでは誘導され、ラットでは抑制されることが明らかになった。また、ラットにおいては、解糖系酵素である Aldolase の肝型 isoform である Aldolase B が、タンパクレベルで著しく低下することも明らかになっている²²⁾。

近年、当教室では、コプラナー PCB により毒性が発現した状態においては、重要な機能をもつタンパク質の発現量が著しく変化するという作業仮説をたて、コプラナー PCB によるサイトソルタンパク質の発現量の変化を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。その結果、PCB 最強の急性毒性を示すコプラナー PCB, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) 処理により、ラット肝サイトソル中の分子量 54 kDa タンパク質が著しく誘導されることが明らかになった²³⁾。この 54 kDa タンパク質は、マウスのセレン結合性タンパク質 (SeBP)³⁾ およびアセトアミノフェン結合性タンパク質 (APBP)⁵⁾ に極めて相同性が高く、これらの counterpart であることが示唆された。さらに、54 kDa タンパク質は、PenCB と同様に、Ah-receptor を介して CYP1A1 などの酵素を誘導することが知ら

れている 3-methylcholoranthrene (MC) によっても増加することも明らかにしている²⁴⁾。

Glutathione peroxidase¹⁰⁾ や type-I iodothyronine 5'-deiodinase⁶⁾ などのセレン含有タンパク質は、その分子内にセレノシステインとしてセレンを含んでいることが知られている。これに対して、マウスの 56 kDa SeBP は、セレノシステインをもたずにセレンと結合することが明らかにされているが²⁾、その結合様式は、いまだ明らかになっていない。しかしながら、SeBP については、セレンによる DNA 合成阻害効果とマウスの SeBP のセレンの取り込みの量が parallel であること³⁴⁾、SeBP の臓器分布と selenite の制ガン効果を示す臓器がほぼ一致すること³³⁾ などから、セレンの制ガン効果との関連性が注目されており、その機能の解明は、コプラナー PCB の作用機序を考えるうえで非常に重要であると考えられる。

一方、APBP は、解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンの大量摂取によって生じる肝細胞壊死に深い関わりがあるとされるタンパク質である。アセトアミノフェンによるこの現象は、ミクロソームに存在する薬物代謝酵素である P450 によってアセトアミノフェンが代謝活性化されて生じる N-acetyl-*p*-quinone imine (NAPQI) が原因であると考えられている¹⁷⁾²⁷⁾³²⁾⁴¹⁾。APBP の機能についても未解明な点が多いが、アセトアミノフェンと APBP の結合が、細胞障害の程度と parallel であること⁴⁾⁸⁾ から、NAPQI と APBP の結合が、細胞壊死の一過程を担っているという報告がある。

PenCB による 54 kDa タンパク質の誘導に関する知見は、これまで電気泳動での確認にとどまっている²³⁾。本研究では、この 54 kDa タンパク質の生理的機能の解明のための第一段階として、タンパク質の精製および特異的な抗体の産生を行い、PenCB による 54 kDa タンパク質の誘導をより明確なものとする 것을 目的とした。

実 験 方 法

1. 実験材料

PenCB は佐伯らの方法⁴²⁾に従って合成した。Nonidet P-40 (Nacalai Tesque Co., 京都), Ampholine (pH 3.5-10.0 for IEF, Uppsala, Sweden) はそれぞれ記載の製造元から購入した。

2. 薬物投与

3 週令 Wistar 系雄性ラットは, Charles River Japan (横浜) より購入し, 九州大学薬学部動物舎にて 1 週間馴化させたあと, 実験に供した. PenCB は, 25 mg/kg/4 ml corn oil の用量で腹腔内に単回投与した. 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 を腹腔内に投与し, 食餌と水を自由に与えた. また, pair-fed コントロール群については, corn oil を腹腔内に投与し, 体重当たりの食餌量を PenCB 投与群と揃え, 水は自由に与えた. 投与 5 日後, 肝臓を摘出し, 常法に従い, 肝サイトソルを調製した. MC は, 20 mg/kg/2 ml corn oil の用量で腹腔内に 3 日間連続投与し, 最終投与 1 日後, 肝サイトソルを調製した.

3. 54 kDa タンパク質の精製

54 kDa タンパク質の精製には, Bio-Rad 社のタンパク質等電点分取装置 Rotofore Cell™ を使用した. MC 処理ラット肝サイトソル 50 ml (500-600 mg protein) を 10 倍容量の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4 at 4 °C) で 48 時間透析した. 透析後, 沈殿物が認められたため, 内容物に urea および 10% (w/v) Nonidet P-40 を, それぞれ最終濃度が 4 M および 3.16% になるように加えた後, 4 M urea で 24 hr 透析した. 透析終了後, サイトソルを氷中に移し, 2% (w/v) Ampholine (3.5-10) (in 4 M urea-3.16% Nonidet P-40) を加えて, Rotofore Cell™ に付した. Rotofore Cell™ による電気泳動は, 12 W 定電圧で行い, 電圧が初期値の 2 倍程度でプラトーになるまで行った. Rotofore Cell™ から得られた分画を SDS-PAGE に付し, 54 kDa タンパク質を多く含む分画を得た. これを合わせて, 4 M urea を加えて全量 50 ml とした後, 2000 V 定電圧で, 最大電力を 12 W に設定して, 再度 3 時間 Rotofore Cell™ に付した. この分画を精製標品として使用した.

4. SDS-Polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli らの方法²⁹⁾ に従って行った.

5. 二次元電気泳動

O'Farrell らの方法³⁵⁾³⁶⁾ に従い, 一次元目に非平衡 pH グラジエントゲル電気泳動 (NEPHGE), 二次元目に SDS-PAGE からなる二次元電気泳動を行った.

6. 54 kDa タンパク質に対する特異的抗体の産生

抗体の産生は常法に従った. Rotofore Cell™ により得た 54 kDa タンパク質の精製標品を Wessel と Flügge の方法⁵²⁾ で濃縮し, 二次元電気泳動に付した. 泳動後, ゲルをクマシーブルーで染色し, 最も高い pI 値を示す 54 kDa タンパク質を切り出した. このゲル片を粉碎した後, 生理食塩水に懸濁し, Freund complete adjuvant (Difco Lab., 米国, Detroit Michigan) とのエマルジョンを調製して, ウサギの足蹠に投与した. 2 週間後, 同様に調製したゲル片と Freund incomplete adjuvant (Difco Lab., 米国, Detroit Michigan) とのエマルジョンを調製し, 背部数十箇所ブースターとして投与した. 1 週間後, 耳静脈より採血して血清を得た. これを 56°C で 30 分間非動化して抗血清とした.

7. Immunoblotting

SDS-PAGE あるいは二次元電気泳動にてタンパク質を分離した後, Towbin らの方法⁴⁸⁾ に従い, セミドライ式プロットング装置で polyvinylidene difluoride 膜に転写した. 5% スキムミルクで 37°C, 60 分間 blocking を行った後, 100 倍希釈した抗 54 kDa タンパク質抗血清を一次抗体として, 37°C, 60 分間反応を行った. 免疫化学的な発色は, Guengerich らの方法¹⁶⁾ に従って行った.

実験結果

1. 54 kDa タンパク質の精製

当教室では, PenCB や MC 処理によりラット肝サイトソルの 54 kDa タンパク質が誘導されることを見出している²³⁾²⁴⁾. すでに, pI 値の情報も得られているため, このタンパク質をモニターする方法として, その分子量と等電点に着目し, それらを指標とした.

54 kDa タンパク質の精製には, Bio-Rad 社のタンパク質等電点分取装置 Rotofore Cell™ を使用した. 一回目の Rotofore Cell™ による分画を行ったときには, 他のタンパク質が混在するものの, 54 kDa タンパク質を多く含む分画を得た (Fig. 1). このとき, 等電点沈殿が認められたため, SDS-PAGE での確認を試みた. 一回目の Rotofore Cell™ による分画で得られた 54 kDa タンパク質に富む分画を再度 Rotofore Cell™ に付した.

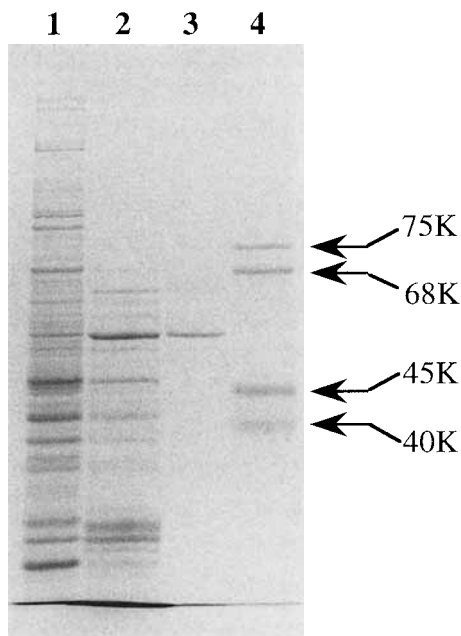


Fig. 1 SDS-Polyacrylamide gel (10%) electrophoresis of 3-methylcholanthrene inducible 54 kDa protein preparation. Migration is from top to bottom. The protein band was stained with Coomassie brilliant blue R-250. Lanes: 1, liver cytosol (10 μ g protein) of rat treated with 3-methylcholanthrene; 2, 54 kDa protein rich fraction from first Rotofore Cell™ (15 μ l); 3, purified 54 kDa protein (1 μ g protein); 4, molecular weight marker proteins.

この方法により、54 kDa タンパク質は、SDS-PAGE 上ほぼ単一にまで精製された (Fig. 1)。

2. 54 kDa タンパク質のコプラナー PCB による誘導

精製した 54 kDa タンパク質を抗原として、ウサギに感作して抗血清を産生し、さらに、この抗血清を一次抗体として immunoblot 分析を行った (Fig. 2)。Free-fed および pair-fed コントロール群に比べ、PenCB 処理群において 54 kDa タンパク質が著しく誘導されていることが確かになった。

次に、二次元電気泳動を行った後 immunoblotting を行った。Fig. 3A および B に示す free-fed および pair-fed コントロールに比べて、Fig. 3C の PenCB 処

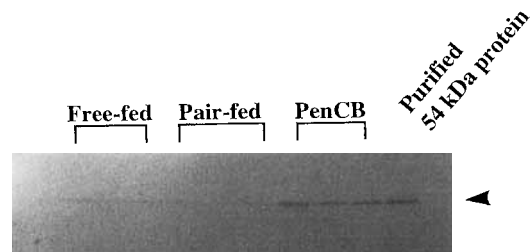


Fig. 2 Immunoblot analysis of rat liver cytosol using antiserum toward purified 54 kDa protein. Liver cytosol (6 μ g protein) from free-fed control, pair-fed control and PenCB-treated rats were subjected to SDS-PAGE. Each lane corresponds to each animal in the group. Purified 54 kDa protein (1 μ g protein) was used. The protein in the gel was transferred to polyvinylidene difluoride membrane. Immunochemical visualization was performed according to Guengerich *et al*¹⁶⁾.

理では、著しく 54 kDa タンパク質が増加しており、中でも最も高い pI 値を示すバンドが、PenCB 処理により著しく増加していることが明らかとなった。また、抗 54 kDa タンパク質抗血清で認識されるバンドには、同一分子量で、pI 値のみが異なるものが弱いながら認められ、これらのバンド強度も PenCB によって増加の傾向にあった。このように、ラット肝サイトソル 54 kDa タンパク質には、pI 値のみが異なる isoform が存在する可能性が示された。

考 察

本研究により、PenCB 処理によって、マウスの SeBP および APBP に非常に相同性の高い、ラット肝サイトソル 54 kDa タンパク質が著しく増加することが immunoblotting により示された。

マウスの 56 kDa SeBP の生理的機能については、いまだ解明されていない点が多く残されている。しかし、セレンによる DNA 合成阻害効果と 56 kDa SeBP のセレン取り込み量が parallel であること³⁴⁾、セレンの制ガン効果を示す臓器と SeBP の分布がほぼ一致していることなどの報告³³⁾ から、セレンの生理作用において重要な役割を担っていると考えられてきた。最近、ヒト肺 adenocarcinoma cell および T cell において、

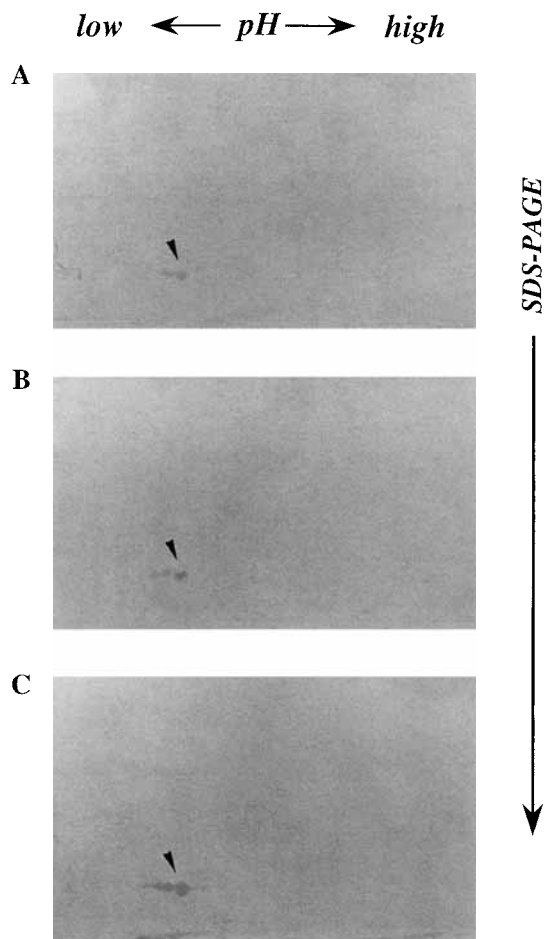


Fig. 3 Immunoblot analysis after two-dimensional gel electrophoresis of rat liver cytosol using anti-serum toward purified 54 kDa protein. First dimensional, nonequilibrium pH gradient gel electrophoresis was performed according to O'Farrell⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾. Second dimensional, SDS-PAGE was performed by the method of Laemmli⁽²⁹⁾. Immunochemical visualization was described in legends in figure 2. Liver cytosols (120 μ g protein) from free-fed control (A), pair-fed control (B) and PenCB-treated (C) rats were subjected. Arrow head shows the 54 kDa band with highest pI value.

57 kDa subunit の homodimer である thioredoxin reductase の C 末端にセレンシステインが存在することが明らかとなった⁽¹⁶⁾⁽⁴⁷⁾. SeBP 発見の経緯は, Medina らが, マウス腹腔内に $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_3$ を単回投与した後, 肝臓において ^{75}Se でラベルされる 56 kDa のタンパク質を見出し, この 56 kDa タンパク質に対する抗血清をプローブとして得られたクローンを SeBP と結論づけたことによる⁽³⁾. しかしながら, これまでに, 真に SeBP にセレンが結合していることを見出した報告はない. これは, あくまで推測であるが, Medina らは, ^{75}Se ラベルされた thioredoxin reductase をわずかに含む, 同一分子量のタンパク質に富む標品を抗原として抗体を産生したため, セレンに関係のないタンパク質をクローン化してしまったという可能性も否めない. SeBP の生理的機能を考えるうえで, セレンの存在の有無は非常に重要な問題であるため, 今後さらなる検討が必要であると考えられる.

PCB によって引き起こされる毒性の一つに, 脂質代謝異常がある. 油症患者には, 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⁽⁵⁰⁾. また, 皮膚症状として知られている塩素ニキジも何らかの脂質代謝異常が原因であると考えられる. 当教室でも, これまでに, PenCB 処理ラットにおいては, 脂肪肝の発生, 血中コレステロールレベルの低下および肝臓トリグリセリドレベルの上昇といった現象が生じるのに対し, モルモットでは肝コレステロールレベルの上昇および高トリグリセリド血症が発生することが報告されている⁽¹⁸⁾. PenCB による脂質代謝異常発生のメカニズムについては, これまであまり明らかにされていなかった. 最近, 当教室において, PenCB 処理ラット肝臓における脂肪酸組成を調べた結果, 肝全脂質におけるアラキドン酸の割合が有意に減少していることが明らかになった⁽³¹⁾. また, 肝膜脂質においても同様にアラキドン酸の割合が有意に減少しており, これが, 肝臓におけるアラキドン酸の生合成酵素 $\Delta 5$ および $\Delta 6$ desaturase の抑制によることが示唆されている

(K. Matsusue, Y. Ishii, N. Ariyoshi and K. Oguri, unpublished data). PenCB 処理ラットに見られる脂肪肝において, 肝臓のトリグリセリドは, 主に脂肪滴に由来すると考えられる. 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報告があ

る⁴⁴⁾。本研究での、PenCB 処理ラット肝サイトソルにおいて、マウスの SeBP と非常に相同性の高い 54 kDa タンパク質が著しく誘導される事実と合わせて考えた場合、肝臓における 54 kDa タンパク質の増加が肝臓中のセレンの残存量を増加させ、その結果、VLDL の放出を抑制している可能性が考えられる。

一方、ラット肝細胞に、アラキドン酸の前駆体であるリノール酸を添加した場合、トリグリセリドの分泌が抑制されるという報告がある⁴⁶⁾。当教室において、PenCB 処理によってラット肝全脂質におけるアラキドン酸の割合は減少し、同時にリノール酸の割合が上昇することが明らかとなった³¹⁾。また、肝細胞より放出されるトリグリセリドは、主に VLDL に依存していると考えられる。これらのことを合わせて考えた場合、PenCB 処理ラットの脂肪肝に見られるトリグリセリドレベルの上昇は、脂肪酸組成の変化に由来している可能性があることから、この点についてもさらなる検討が必要であると考えられる。

PenCB 誘導性 54 kDa タンパク質が高い相同性を示す APBP についても、その生理的機能に未解明な点が多く残されている。しかし、アセトアミノフェンと APBP の結合が、細胞障害の程度と parallel である⁴¹⁾ことから、APBP は、アセトアミノフェンの大量摂取により生じる肝細胞壊死の一過程を担っていると考えられている。しかし、アセトアミノフェンによる肝細胞壊死は、その代謝産物である N-acetyl-*p*-quinone imine (NAPQI) による酸化ストレスが原因であり、APBP は、NAPQI により生じる酸化ストレスから細胞を守っているとする報告もある¹⁾²⁰⁾。

PenCB による著しい誘導が明らかとなったラット肝サイトソル 54 kDa タンパク質は、生理的に重要な機能をもっていると考えられるマウスの SeBP や APBP と非常に相同性が高い。このことから、ラット肝の 54 kDa タンパク質も、生理的に重要な機能を有することが示唆される。本タンパク質の生理的機能の解明は、PenCB の毒性発現機構の解明に新たな知見を与えるものと考えられる。

総 括

ラット肝サイトソル 54 kDa タンパク質が PenCB によって誘導されることをより明確にするために、54

kDa タンパク質に対する抗体を産生することを目的とした。PenCB と同様に Ah-receptor を介して CYP1A1 などの酵素を誘導することが知られている MC で処理したラット肝サイトソルから、54 kDa タンパク質を精製した。Bio-Rad 社のタンパク質等電点分取装置 Rotofore Cell™ に 2 度付すことにより、54 kDa タンパク質を、SDS-PAGE 上ほぼ単一にまで精製した。これを抗原として、得られた抗血清を用いた immunoblotting の結果から、以下の知見を得た。

1) PenCB 処理によってラット肝サイトソルの 54 kDa タンパク質が著しく誘導されることが明確となった。

2) 一次元目に非平衡 pH グラジエントゲル電気泳動、二次元目に SDS-PAGE からなる二次元電気泳動後に immunoblotting を行った結果、PenCB 処理ラット肝サイトソルには、分子量 54 kDa で、pI の異なるバンドが複数認められた。ラット肝サイトソル 54 kDa タンパク質には複数の isoform が存在する可能性が示された。

この 54 kDa タンパク質の生理的機能については、未解明な点が多く残されている。しかし、本タンパク質の生理的機能の解明は、いまだ解明されていない点が多い PenCB の毒性発現機構の解明に新たな知見を与えるものであると考えられる。

文 献

- 1) Arnaiz SL, Llesuy S, Cutrín JC and Alberto B: Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. *Free Radical Biol. Med.* 19: 303-310, 1995.
- 2) Bansal MP, Mukhopadhyay T, Scott J, Cook RG, Mukhopadhyay R and Medina D: DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: Implications for selenium's mechanism of action in cancer prevention. *Carcinogenesis* 11: 2071-2073, 1990.
- 3) Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG and Medina D: Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis* 10: 541-546, 1989.
- 4) Bartolone JB, Beierchmitt WP, Birge RB, Emeigh Hart SG, Wyand S, Cohen SD and Khairallah EA: Selective acetaminophen metabolite binding to hepatic and extrahepatic proteins: An *in*

vivo and *in vitro* analysis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 99: 240-249, 1989.

5) Bartolone JB, Sparks K, Cohen SD and Khairallah EA: Immunochemical detection of acetaminophen-bound liver proteins. Biochem. Pharmacol. 36: 1193-1196, 1987.

6) Berry MJ, Laila B and Reed LP: Type I iodothyronine deiodinase is a selenocystein-containing enzyme. Nature 349: 438-440, 1991.

7) Bigelow SW and Nebert DW: The Ah regulatory gene product. Survey of nineteen polycyclic aromatic compounds and fifteen benzo[a]pyrene metabolites capacity to bind to the cytosolic receptor. Toxicol. Lett. 10: 109-118, 1982.

8) Birge RB, Bartolone JB, Emeigh Hart SG, Nishanian EV, Tyson CA, Khairallah EA and Cohen SD: Acetaminophen hepatotoxicity: Correspondence of selective protein arylation in human and mouse liver *in vitro*, in culture, and *in vivo*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 105: 472-482, 1990.

9) 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.

10) Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W and Harrison PR: The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocystein in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. EMBO J. 5: 1221-1227, 1986.

11) Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI and Bradfield CA: Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. Mol. Pharmacol. 44: 911-917, 1993.

12) Eguchi H, Hayashi S, Watanabe J, Gotoh O and Kawajiri K: Molecular cloning of the human AH receptor gene promoter. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203: 615-622, 1994.

13) 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.

14) Fujii-Kuriyama Y, Ema M, Mimura J and Sogawa K: Ah receptor: A novel ligand-activated transcription factor. Exp. Clin. Immunogenet. 11: 65-74, 1994.

15) Gladyshev VN, Jeang KT and Stadtman TC: Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human

placental gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6146-6151, 1996.

16) Guengerich FP, Wang P and Davidson NK: Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P-450 in rats, rabbits, and humans using immunochemical staining with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry 21: 1698-1702, 1982.

17) Harvison PJ, Guengerich FP, Rashed MS and Nelson SD: Cytochrome P-450 isozyme selectivity in the oxidation of acetaminophen. Chem. Res. Toxicol. 1: 47-52, 1988.

18) 初村 恵, 石田卓巳, 石井祐次, 有吉範高, 小栗一太, 吉村英敏: 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. 福岡医誌 86: 135-143, 1995.

19) Holsapple MP, Morris DL, Wood SC and Snyder NK: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced changes in immunocompetence: possible mechanisms. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 31: 73-100, 1991.

20) 堀江利治: 薬による肝毒性発現機構: 酸化的ストレスを中心として. J. Toxicol. Sci. 20: 13-18, 1995.

21) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 竹中重幸, 森田邦正, 梶崎幸範, 深町和美, 常磐 寛, 高橋克巳: コレスチラミン投与による油症原因物質の糞便中への排泄促進の試み. 福岡医誌 82: 317-325, 1991.

22) Ishii Y, Kato H, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N and Oguri K: Significant suppression of rat liver aldrase B by a toxic coplanar polychlorinated biphenyl, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. Toxicology 116: 193-199, 1997.

23) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N and Oguri K: A coplanar PCB induces a selenium binding protein as a major cytosolic protein in rat liver. Chemosphere 32: 509-515, 1996.

24) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N and Oguri K: Significant induction of a 54kDa protein in rat liver with homologous alignment to mouse selenium binding protein by a coplanar polychlorinated biphenyl, 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene. Toxicol. Lett. 87: 1-9, 1996.

25) Iwasaki M, Kato H, Ariyoshi N and Oguri K: Effect of highly toxic coplanar PCB on peroxisomal enzyme activity: The species difference between rats and guinea pigs. Jpn. J. Toxicol. Environ. Health 41: 32, 1995.

26) 岩崎 優, 加藤晴敏, 有吉範高, 小栗一太: 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. 福岡医誌 86: 144-152, 1995.

27) Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR and Brodie BB: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. III. Role of covalent binding *in vivo*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 187: 195-202, 1973.

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 co-planar PCBs: different responsiveness of guinea pigs and rats. Chemosphere 28: 639-645, 1994.

29) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.

30) Lucier GW, Tritscher A, Goldsworthy T, Foley J, Clark G, Goldstein J and Maronpot R: Ovarian hormones enhance 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated increases in cell proliferation and preneoplastic foci in a two-stage model for rat hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 51: 1391-1397, 1991.

31) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N and Oguri K: A highly toxic PCB elicits unusual changes in the fatty acid composition of rat liver. Toxicol. Lett.: in press.

32) Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR and Brodie BB: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. J. Pharmacol. Exp. Ther. 187: 185-194, 1973.

33) Morrison DG, Bansal MP, Kittrell F and Medina D: Distribution of selenium-binding proteins in different tissues of the mouse and rat. *In vivo* 3: 167-172, 1989.

34) Morrison DG, Dishart MK and Medina D: Intracellular 58-kd selenoprotein levels correlate with inhibition of DNA synthesis in mammary epithelial cells. Carcinogenesis 9: 1801-1810, 1988.

35) O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021, 1975.

36) O'Farrell PZ, Goodman HM and O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell 1: 1133-1142, 1977.

37) 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.

38) 小栗一太, 古賀淑子, 津田 実, 有吉範高, 石井祐次, 山田英之, 吉村英敏: Co-planar PCB による肝ビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素の誘導: モルモットとラット間の顕著な相違. 福岡医誌 84: 175-180, 1993.

39) Poland A and Glover E: Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. J. Biol. Chem. 251: 4936-4946, 1976.

40) 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.

41) Potter WZ, Davis DC, Mitchell JR, Jollow DJ, Gillette JR and Brodie BB: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. III. Cytochrome P-450-mediated covalent binding *in vitro*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 187: 203-210, 1973.

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

43) Safe SH: Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 26: 371-399, 1986.

44) 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.

45) Stephen Hsia MT and Kreamer BL: Delayed wasting syndrome and alterations of liver gluconeogenic enzymes in rats exposed to the TCDD congener 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene. Toxicol. Lett. 25: 247-258, 1985.

46) Strum-Odin R, Adkins-Finke B, Blake WL, Phinney SD and Clarke SD: Modification of fatty acid composition of membrane phospholipid in hepatocyte monolayer with n-3, n-6 and n-9 fatty acid and its relationship to triglycerol production. Biochim. Biophys. Acta 921: 378-391, 1987.

47) Tamura T and Stadtman TC: A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1006-1011, 1996.

48) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA

76 : 4350-4354, 1979.

49) 辻 博, 池田耕一, 野見山賢介, 藤島正敏 : 油症に対する米ぬかファイバー・コレステラミン併用投与の臨床的検討. 福岡医誌 84 : 282-286, 1993.

50) 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トリグリセライド血症. 福岡医誌 60 : 449-454, 1969.

51) Watson MA, Devereux TR, Malarkey DE, W. AM and Maronpot RR : H-ras oncogene muta-

tion spectra in B6C3F1 and C57BL/6 mouse liver tumors provide evidence for TCDD promotion of spontaneous and vinyl carbamate-initiated liver cells. Carcinogenesis 16 : 1705-1710, 1995.

52) Wessel D and Flüggé UI : A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal. Biochem. 138 : 141-143, 1984.

(受付 1997-3-18)

Co-planar PCB の肝 glutathione peroxidase-redox system に対する影響：ラットおよびモルモットでの検討

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

堀 美穂・有 吉 範 高

山 田 英 之・小 栗 一 太

Effect of Co-planar Polychlorinated Biphenyl on the Hepatic Glutathione Peroxidase Redox System in Rats and Guinea Pigs

Miho HORI, Noritaka ARIYOSHI, Hideyuki YAMADA, and Kazuta OGURI

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

The effect of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) on hepatic glutathione peroxidase (GPx) redox system was studied *in vivo* in rats and guinea pigs. PCB 126 treatment caused significant reduction of Se-dependent and -non-dependent GPx activity in rats. In agreement with this, the content of glutathione (GSH) and the activities of GSH reductase (GR) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) were also decreased in this species. On the contrary, guinea pig liver Se-non-dependent GPx activity was significantly enhanced by PCB 126 treatment, while no effect on Se-dependent activity was observed. Neither the content of GSH nor the enzyme activities responsible for GSH supply in guinea pig liver was affected by PCB 126. These results suggested that the damage on GPx redox system is, at least, one of mechanisms by which co-planar PCB induces the toxicity in rats. However, in guinea pigs, this is not the case, and different mechanism from the damage on active oxygen quenching system is likely to be involved.

緒 言

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) や高毒性 co-planar polychlorinated biphenyl (PCB) による毒性は、少なくともその一部はこれらの化合物によって惹起される酸化ストレスによって説明されることが考えられる。TCDD 処理ラットの死亡率が抗酸化剤の併用によって抑制されるという事実¹⁷⁾ は、これを支持している。TCDD 等による酸化ストレスには、脂質過酸化の増大^{9,16)}、細胞内 SH 基の減少^{1,18)}、細胞膜流動性の増加¹⁸⁾ および DNA 鎖切断¹⁹⁾ 等がある。これらが発生する機構は詳細には知られていないが、高毒性多塩素化炭化水素類による活性酸素消去系の障害がその誘起力の一つと推定される。事実、TCDD およびその類似物質は肝の Se-依存性-glutathione peroxidase (GPx) 活性^{9,14,20)} や catalase 活性（未発表デー

タ）を低下させる。しかし、活性酸素消去系に対する障害とそれによって誘導される酸化的ストレスが多塩素化芳香族炭化水素類の毒性発現にどの程度寄与するかという点はよく理解されていない。本研究はこの問題解決のため、毒性発現における動物種差に注目して検討を加えたものである。

TCDD の毒性 (LD₅₀ 値) は、最も感受性の高いモルモットと耐性動物ハムスターとを比べると数千倍、また前者とラットを比べても数十倍～数百倍の違いがある⁵⁾。同様な毒性の種差は、高毒性 co-planar PCB である 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) を用いても観察される²¹⁾。若し、酸化的ストレスが多塩素化芳香族炭化水素の主要な毒性発現機構なら、活性酸素消去系の障害の程度は毒性の違いと相関すると予想される。そこで本研究では、PCB 126 によって引き起こされる消去系の変動をモルモットとラット間で比較し、

この可能性を追及した。Se-依存性-GPx は catalase と共に細胞内の過酸化水素や過酸化脂質の消去に重要な役割を持っている⁴⁾。また、Se-非依存性-GPx として glutathione S-transferase (GST) が存在する。本酵素には分子多様性があるが、幾つかの分子種は強力な過酸化還元活性を持つ⁵⁾。したがって、PCB 126 投与後の活性酸素消去系の変動としては、上記2種のGPxを選び観察の対象とした。これらのGPxが触媒活性を発揮するためには、いずれも還元型 glutathione (GSH) の供給が必須である。そこで本研究では、GPxの変動のみならずGSH量とこれの供給に関与する酵素の変動についても合わせて検討を加えた。

実験方法

1. 実験材料

PCB 126 は Saeki 等の方法¹³⁾ にしたがって合成した。*t*-Butyl hydroperoxide および cumene hydroperoxide はそれぞれ片山化学工業(株)および和光純薬工業(株)より購入した。

2. 動物処理および肝ホモジネートの調製

Hartley 系雄性モルモット (体重 300-350 g) および Wistar 系雄性ラット (体重 80-100 g) を1週間飼育、馴化させたのち使用した。動物は PCB 126 投与群、free-fed コントロール群および pair-fed コントロール群の3群に分け、PCB 126 投与群には PCB 126 を 0.5 mg/kg/2 ml corn oil (モルモット) および 25 mg/kg/2 ml corn oil (ラット) の用量で腹腔内に単回投与した。Free-fed および pair-fed コントロール群には corn oil のみを投与した。前者は自由に摂食させ、後者には体重当りの飼料摂取量が PCB 126 処理群と同じになるように飼料を与えた。動物は全て処理後5日目に屠殺し、肝臓を摘出した。肝臓は、氷冷生理食塩水で灌流後、重量に対して3倍容量の1.15% (w/v) KCl-50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中でホモジナイズした。調製したホモジネートは小分けし、使用まで-80°C に貯蔵した。

3. 分析方法

Total GPx 活性は Lawrence および Burk の方法¹⁰⁾ に従い、cumene hydroperoxide を基質として測定した。Se-依存性-GPx 活性は、同様の方法で *t*-butyl hydroperoxide を基質として測定した。Se-非依存性-

GPx 活性は、total GPx 活性から Se-依存性-GPx 活性を差し引くことによって求めた³⁾。Glutathione reductase (GR) 活性¹⁵⁾、 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) 活性¹²⁾ および GSH 含量²⁾ はそれぞれ既報にしたがって測定した。また、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) に対する GST 活性は Habig 等の方法⁶⁾ を用いて測定した。

実験結果

PCB 126 処理ラットおよびモルモットの肝 GPx 活性を Fig. 1 に示す。ラットでは、free-fed と pair-fed 間

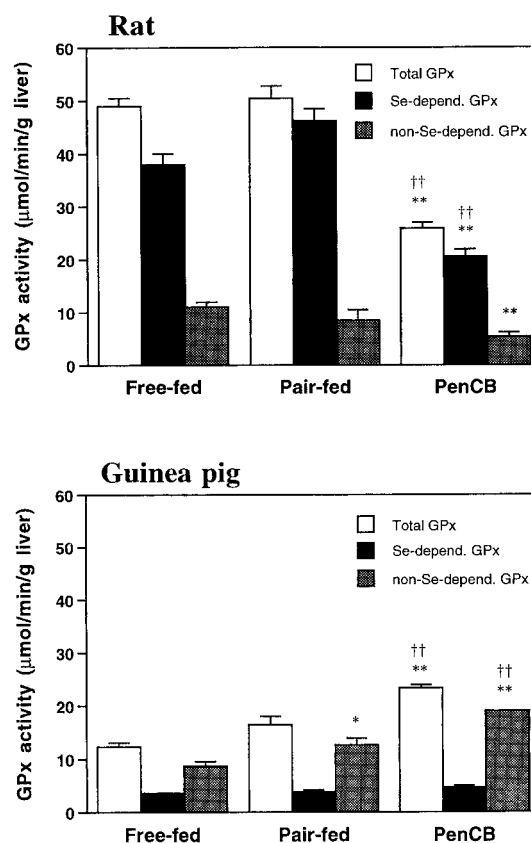


Fig. 1 Effect of PCB 126 on hepatic glutathione peroxidase activity in rats and guinea pigs. Each bar represents the mean $\pm$ S. E. of 4-5 animals. Significantly different from free-fed control: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Significantly different from pair-fed control: †† $P < 0.01$.

では活性にほとんど違いは認められなかった。しかし、Se-依存性 GPx 活性は PCB 126 処理によって、2つのコントロール群と比べて有意に低下した。また、Se-非依存性活性も pair-fed コントロール群に対しては有意ではないものの、活性低下の傾向が認められた。すでに報告されているように¹¹⁾、モルモット Se-依存性 GPx 活性はラットに比べるとかなり微弱であった。この活性は PCB 126 処理群を含め、3 群間でほとんど差が認められなかった。一方、モルモット Se-非依存性-GPx 活性は、pair-feeding によって増加し、PCB 126 処理によって更に増加した。これらの結果より、PCB 126 処理による GPx 活性の変動は動物によって著しく異なり、ラットでは減少し、モルモットでは変化ないかまたは逆に増加することが明かとなった。

肝 GSH 含量および GR, γ -GTP および GST 活性変動をまとめて Table 1 に示す。GPx 酵素反応の必須因子である GSH の含量およびこれの供給、再利用に働く GR と γ -GTP の活性は、ラットにおいては PCB 126 処理によっていずれも有意に低下した。特に γ -GTP の減少は著しく、ほぼ活性消失した。対照的に、モルモット γ -GTP は PCB 126 処理によって有意に低下するものの、その程度は小さかった。また、GR

活性はラットの場合とは逆に増加した。これら 2 種の活性変動と符合して、モルモット肝 GSH 含量は PCB 126 で減少せず、却って pair-fed コントロール群よりも増加した。CDNB に対する GST 活性は両動物とも pair-fed コントロールの約 2 倍にまで増加した。

考 察

PCB 126 処理によるラット Se-依存性-および非依存性-GPx 活性の低下は、既に発表されている同様な結果¹⁸⁾と一致していた。肝 GSH 含量の低下 (Table 1) や TCDD 処理ラット等で観察される肝脂質過酸化の亢進^{16,20)}もこれをよく支持している。しかし、モルモットにおいては、本動物が感受性の高い種であるにもかかわらず、GPx 活性の低下は認められなかった。TCDD-処理モルモットにおいても同様な結果が観察されているが⁷⁾、本研究では pair-fed コントロールを設けてより精密に確認した。さらに、モルモットにおいては GSH 含量がむしろ増加し、また GR および γ -GTP 活性上昇もよくこれと符合した。GPx 系は酸化的ストレス抑制に働く防御であり、これが障害を受けるところか却って増加するという事実は、GPx に代表される活性酸素消去系の損傷とそれに基づく酸化的ス

Table 1 Effect of PCB 126 treatment on the hepatic activities of GR, γ -GTP and GST, and the content of GSH.

Parameter	Species	Activity or content in			
		Free-fed control	Pair-fed control	PenCB-treated	PenCB/Pair-fed
Reduced glutathione ($\mu\text{mol/g}$ liver)	Rat	9.17 $\pm$ 0.52	5.32 $\pm$ 0.17	3.65 $\pm$ 0.21 ^{b,d}	0.69
	Guinea pig	5.15 $\pm$ 0.30	4.26 $\pm$ 0.17 ^a	5.93 $\pm$ 0.15 ^d	1.39
Glutathione reductase ($\mu\text{mol/min/g}$ liver)	Rat	12.8 $\pm$ 0.99	10.6 $\pm$ 0.47	8.51 $\pm$ 0.71 ^{b,d}	0.80
	Guinea pig	4.87 $\pm$ 0.80	7.43 $\pm$ 0.17 ^a	10.4 $\pm$ 0.56 ^{b,d}	1.40
γ -Glutamyltranspeptidase ($\mu\text{mol/min/g}$ liver)	Rat	0.51 $\pm$ 0.10	0.46 $\pm$ 0.17	0.01 $\pm$ 0.00 ^{b,d}	0.02
	Guinea pig	2.53 $\pm$ 0.14	2.83 $\pm$ 0.04	2.47 $\pm$ 0.14 ^c	0.87
Glutathione S-transferase ^e ($\mu\text{mol/min/g}$ liver)	Rat	79.5 $\pm$ 11.8	66.6 $\pm$ 10.1	122 $\pm$ 12.5 ^{a,c}	1.83
	Guinea pig	172 $\pm$ 5.44	115 $\pm$ 5.74 ^b	250 $\pm$ 19.5 ^{b,d}	2.17

The content and the activities in liver homogenate were assayed.

Each value represents the mean $\pm$ S. E. of 4-5 animals.

Significantly different from the free-fed control: ^a, $p < 0.05$; ^b, $p < 0.01$

Significantly different from the pair-fed control: ^c, $p < 0.05$; ^d, $p < 0.01$

^eCDNB was used as the substrate.

トレスが、少なくともモルモットにおいては主要な毒性発現機構ではないことを強く示唆するものと考えられた。

肝 Se-依存性-GPx 活性は、動物間でかなりの違いが認められ、ハムスターが最も強く、ラットはその 75%程度の活性であり、またモルモットに至っては活性が検出できないと報告されている^{7,11)}。本研究では、未処理モルモットにおいて活性が認められたが、その強度は微弱であり、基本的には既報の結果と矛盾しないと考えられる。前述のとおり、ハムスターとモルモットは TCDD および関連物質の毒性に対してそれぞれ耐性および最感受性動物であり、Se-依存性-GPx 活性と毒性感受性の違いは概して相関する。したがって、GPx 系の損傷ではなく、動物固有の活性の違いが PCB 126 等の毒性に対する感受性を規定する一つの因子である可能性は否定できない。

ラット Se-非依存性-GPx 活性は PCB 126 処理によって有意に低下するのに対して、CDNB に対する GST 活性は逆に増加し、一見矛盾していた。CDNB は多くの GST 分子種によって GSH 抱合を受ける GST の非特異的基質である。しかし、GST 分子種のうち θ -class に属する分子種のみは CDBN に対してはほとんど活性を示さないことが知られている⁸⁾。さらに、 θ -class GST は種々の過酸化物に対して強い還元活性を持つことから⁸⁾、PCB 126 処理によって引き起こされるラット肝 Se-非依存性-GPx 活性の低下は、主に θ -class GST の減少に起因するものと推定された。本酵素の低下は、Se-依存性-GPx の減少と合わせて、ラットにおいては重大な障害になっているものと考えられる。なお、CDNB 活性の増加と関連して、 α -および μ -class 相当の GST が PCB 126 処理ラットにおいて増加していることをイムノプロット実験で確認した(成績未掲載)。

総 括

高毒性 co-planar PCB の毒性発現機構を明かにするための一環として、活性酸素消去系の損傷とそれに基づく酸化的ストレスの役割について検討した。この目的のため、本研究ではラットとモルモットの co-planar PCB に対する感受性の違いに注目して研究を行った。すなわち、活性酸素消去系の障害が動物種を

越えた共通の毒性発現機構なら、感受性動物のモルモットの方が、感受性の低いラットよりも障害の程度が顕著なはずであるとの作業仮説を立てて検討を行った。その結果、上記の推定を支持する結果は得られなかった。すなわち、PCB 126 処理ラットでは、主要な活性酸素消去系の一つである GPx 活性が有意に低下したが、感受性の高いモルモットではむしろ活性増加した。肝 GSH 含量並びにこの供給に働く GR および γ -GTP 活性の変動も、ラットでのみ障害の発生が観察された。以上の結果より、GPx 系の損傷とそれによる酸化的ストレスはラットにおいては co-planar PCB 毒性の有力な機構と推定されるが、モルモットは別の機構で障害されるものと考えられた。

文 献

- 1) Alsharif NZ, Grandjean CJ, Murray WJ and Stohs SJ: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced decrease in the fluidity of rat liver membranes. *Xenobiotica* 9: 979-988, 1990.
- 2) Beutler E, Duron O and Kelly BM: Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61: 882-888, 1963.
- 3) Carmagnol F, Sinet PM and Jerome H: Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim. Biophys. Acta* 759: 49-57, 1983.
- 4) Flohe L: The selenoprotein glutathione peroxidase. In *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects, Part A* (D Dorphin, R Poulson and O Avramovic, eds.), Wiley, New York, pp. 643-731, 1989.
- 5) Gasiewicz TA: Nitro compounds and related phenolic pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology, Vol. 3, Classes of Pesticides* (WJ Hayers Jr and ER Laws Jr, eds), Academic Press, San Diego, pp. 1191-1269, 1991.
- 6) Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB: Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139, 1974.
- 7) Hassan MQ, Stohs SJ and Murray WJ: Comparative ability of TCDD to induce lipid peroxidation in rats, guinea pigs, and syrian golden hamsters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 649-657, 1983.
- 8) Hiratsuka A, Kanazawa M, Nishiyama T, Okuda H, Ogura K and Watabe T: A subfamily 2

homo-dimeric glutathione *S*-transferase mYrs-mYrs of class theta in mouse liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212 : 743-750, 1995.

9) Komohara K, Yagi N and Itokawa Y : Mechanism of lipid peroxide formation in polychlorinated biphenyls (PCB) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-poisoned rats. *Environ. Res.* 34 : 18-23, 1984.

10) Lawrence RA and Burk RF : Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 : 952-958, 1976.

11) Lawrence RA and Burk RF : Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity. *J. Nutr.* 108 : 211-215, 1978.

12) Meister A, Tate SS and Griffith O : γ -Glutamyl transpeptidase. In *Method in Enzymology*, Vol. 77 (WB Jakoby, ed.), Academic Press, New York, pp. 237-253, 1981.

13) Saeki S, Yoshihara S, Uchino Y and Yoshimura H : Improved method of the synthesis of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl. *Fukuoka Acta Med.* 70 : 85-87, 1979.

14) Saito M : Polychlorinated biphenyl-induced lipid peroxidation as measured by thiobarbituric acid-reactive substances in liver subcellular fractions of rats. *Biochem. Biophys. Acta* 1046 : 301-308, 1990.

15) Scott EM, Duncan IW and Ekstrand V : Purification and properties of glutathione reductase

of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 238 : 3928-3933, 1963.

16) Stohs SJ, Hassan MQ and Murray WJ : Lipid peroxidation as a cause of TCDD toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111 : 854-859, 1983.

17) Stohs SJ, Hassen MQ and Murray WJ : Effects of BHA, *d*- α -tocopherol and retinol acetate on TCDD-induced changes in lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and survival. *Xenobiotica* 14 : 533-537, 1984.

18) Stohs SJ, Shara MA, Alsharif NZ, Wahba ZZ and Al-Bayati ZAF : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced oxidative stress in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106 : 126-135, 1990.

19) Wahba ZZ, Murray WJ, Hassan MQ and Stohs SJ : Induction of hepatic DNA single strand breaks in rats by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Cancer Lett.* 29 : 281-286, 1988.

20) Wahba ZZ, Murray WJ, Hassan MQ and Stohs SJ : Comparative effects of pair-feeding and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on various biochemical parameters in female rats. *Toxicology* 59 : 311-323, 1989.

21) Yoshimura H, Wada I, Koga N, Nagata K, Yamauchi Y, Yoshihara S and Kamata O : Acute toxicity and inductive effect on liver enzymes of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl in guinea pigs. *Fukuoka Acta Med.* 72 : 149-154, 1981.

(受付 1997-3-18)

油症患者血液中 PCB, PCDF の 20 年経過後の状態

第一薬科大学

増田 義人・黒木 広明・原口 浩一

State University of New York

Arnold SCHECTER

ERGO Forschungsgesellschaft mbH

Olaf PÄPKE

The Condition of PCBs and PCDFs in the Blood of Yusho Patients 20 Years after the Onset

Yoshito MASUDA, Hiroaki KUROKI and Koichi HARAGUCHI

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences

22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka 815

Arnold SCHECTER

Department of Preventive Medicine, Clinical Campus at Binghamton

State University of New York, 88 Aldrich Ave, Binghamton, New York 13903, USA

Olaf PÄPKE

ERGO Forschungsgesellschaft mbH

Albert-Einstein Ring 7, Hamburg, Germany

Blood samples of Yusho and control persons were analyzed for individual congeners of PCDDs, PCDFs, and PCBs by high resolution GC/MS. Concentrations of 2,3,4,7,8-penta-CDF, 1,2,3,4,7,8-hexa-CDF and 2,3,3',4,4',5-hexa-CB in Yusho blood were up to 56 times higher than the corresponding concentrations in the control blood. These high concentrations have persisted for 23 years after the incident. Concentrations of 3,3',4,4',5-penta-CB and 2,3',4,4',5-penta-CB in some Yusho blood were lower than the control blood. In Yusho blood, 2,3,4,7,8-penta-CDF contributed the highest toxicity (TEQ 77-248 ppt in lipid) among the congeners determined and toxic contribution of PCDFs was very large (41-77%) in the chlorinated pollutants.

Thirty PCB congeners were identified in the blood of Yusho patients in 1996 by GC/MS. The average total PCB concentration in Yusho blood were 4.9 times higher than that of the controls. Characteristic PCB congeners in Yusho patients were 2,2',3,4,4',5-hexa-CB, 2,3,3',4,4',5-hexa-CB and 2,3,3',4,4',5'-hexa-CB and their concentration ratios to the controls were 8-19.

はじめに

福岡, 長崎を中心とする西日本において, 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フェニルが混入されたライスオイルを摂取した油症中毒事件が 1968 年に発生した¹⁾. 患者は, 塩素座そうを主訴とする特異な

慢性症状を示し¹⁰⁾, 29 年経過した現在においても症状が残っている. 事件直後は血液中 PCB のように微量の混合物を正確に分析する方法はなかった. 患者血液中の PCB が分析されるようになったのは, 事件後 5 年経過した 1974 年頃からである⁷⁾. 当時は充填カラムと電子捕獲検出器をつけたガスクロマトグラフによる分析であるので, PCB の異性体まで十分に分離する分

析はできなかった。最近、高分離能キャピラリーカラムをつけた四重極質量分析装置が使えるようになった。その装置を使用して油症患者および一般人の血液中 PCB 各異性体の定量分析をした。

血液中の極微量のポリ塩化ジベンゾジオキシン (PCDD) や PCDF が正確に分析されはじめたのは、事件後 20 年以上経過した 1989 年頃からである¹¹⁾。それには高分離能のキャピラリーカラムのガスクロマトグラフと高分解能の質量分析計を結合した装置を使用しており、フェムトグラム程度の PCDD, PCDF まで分析できるようになった。この方法により油症患者および一般人の血液中 PCDD, PCDF, PCB を各異性体ごとに定量分析した。

PCDD, PCDF, PCB の毒性が評価され、最も毒性が強い 2,3,7,8-tetra-CDD (TCDD) に対する毒性相当係数 (TEQ Factor) が国際機関により設定されている¹⁵⁾。この係数を用いて計算すれば、人体における PCDD, PCDF, PCB の汚染の程度を TCDD に換算した値 (TEQ) として求められる。一般人も環境汚染物質である PCDD, PCDF, PCB を食品と共に摂取して、体内に蓄積している⁶⁾。油症患者および一般人の血液中 PCDD, PCDF, PCB 各異性体の分析結果に TEQ Factor を掛けた TEQ 濃度より、油症患者と一般人の毒性影響を比較検討した。

実 験 方 法

1. 試料血液

(1) PCDD, PCDF, PCB の分析

福岡県在住の油症患者 4 名より、1990 年および 1991 年に採取した血液 4 検体を冷凍保存した。試料量が分析に十分でなかったため、患者 2 名の血液を 1990 年および 1991 年でそれぞれ合わせて、分析試料とした。別の患者 2 名は同一患者について、1990 年と 1991 年に採取したものを合わせて分析試料とした。一般臨床検査で採取された血液の血清部分を集積し、冷凍保存したものを 1991 年および 1992 年に福岡県の 2 ケ所の臨床検査所より提供された。別に 22 歳男性の血液を 1992 年に採取し、分析試料とした。

(2) PCB 異性体の分析

福岡の認定油症患者 22 名の血液が 1996 年度の油症一斉検査の時に採取され、分析まで冷凍保存された。

一般人の血液は福岡県保健環境研究所、福岡市衛生試験所、北九州市環境科学研究所で、それぞれ 10 名から採取された血液を混合したもの 3 検体を使用した。

2. 分析方法

(1) PCDD, PCDF, PCB の分析

血液中の PCDD, PCDF, PCB の分析法は別に報告されている¹¹⁾¹²⁾。概略の分析法をここに示す。血液または血清 10~40 g に¹³C-PCDD/F 内標準物質 13 種を各 5~10 pg および¹³C-PCB 内標準物質 11 種を各 100~200 pg 添加した。これに水/エタノール混液を加え、固相カラムにかけヘキサン/イソプロパノール (3:2) 溶液で検出させた。溶出液を濃縮し、秤量して脂質の重量を求めた。次に活性炭カラムにかけ、ヘキサン/ジクロルメタン混液で溶出させ、この濃縮液を平面 PCB 以外の PCB の分析試料とした。次に活性炭カラムの逆方向からトルエンで溶出させた。これを濃縮し、アルミナカラムにかけ、溶出液を濃縮し、ガスクロマトグラフ/質量分析装置の試料とした。PCDD, PCDF, PCB の分析には 60 m の溶融シリカキャピラリーカラム (SP-2330 および DB-5) をつけた高分離能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計 (VG 7035) を使用した。

(2) PCB 異性体の分析

血液 3~5 g を秤量し、試験管 (20 ml) にとり、これに内標準物質として 2,2',3,4,5,5',6'-hepta-CB 5 ng を添加し、さらに 1 mol/L 水酸化カリウム/エタノール溶液 3 ml を加えてよく混合させた。この溶液を時々振り混ぜながら 60°C で 3 時間加温し、冷却後、ヘキサン 5 ml で 2 回抽出した。ヘキサン層 (10 ml) を精製水 (ヘキサンで洗浄したもの) 2 ml で水洗し、無水硫酸ナトリウム (PCB 分析用、450°C で 24 時間加熱) 2 g を加えて乾燥した後、活性化したシリカゲル (ワコーゲル S-1, 450°C, 24 時間加熱) 0.5 g のカラムクロマトグラフィーにかけた。カラムはヘキサン 20 ml で溶出させ、溶出液をスニードーカラムをつけた試験管で 5 ml まで濃縮した。これをスピッツ試験管に移し、50°C に加温して、約 0.1 ml まで濃縮し、PCB の分析試料とした。PCB 異性体の分析はキャピラリーカラム (60 m DB-5 MS) を装着したガスクロマトグラフ/四重極質量分析計 (島津, AOC-17, GC-17 A, QP-5000) で行った。キャリアーガスは高純度ヘリウム (99.999%)

Table 1 Concentrations of PCDDs, PCDFs and PCBs in Yusho blood and control serum

	TEQ Factor	Concentration (Lipid basis, ppt)						
		Cont 1 Serum 1991	Cont 2 Serum 1992	Cont TS Blood 1992	Yusho 1 Blood 1990	Yusho 2 Blood 1991	Yusho TAK Blood 1990/91	Yusho KEY Blood 1990/91
Total sample amount (g)		40	35.41	29.73	10.1	10.17	9.46	9.21
Total lipid amount (g)		0.202	0.214	0.102	0.052	0.052	0.044	0.036
2, 3, 7, 8-Tetra-CDD	1	3.3	2.9	1.7	2.3	2.2	2.4	2.4
1, 2, 3, 7, 8-Penta-CDD	0.5	9.4	8.9	7.6	7.4	7.0	11.6	19.8
1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexa-CDD	0.1	5.0	3.5	3.0	2.4	3.4	nd	nd
1, 2, 3, 6, 7, 8-Hexa-CDD	0.1	38.0	39.6	42.1	34.0	37.3	72.7	134.0
1, 2, 3, 7, 8, 9-Hexa-CDD	0.1	7.9	8.7	9.4	5.9	4.9	2.7	5.0
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-Hepta-CDD	0.01	49.0	43.2	40.4	16.8	17.0	31.5	36.8
Octa-CDD	0.001	1220	1054	427	537	516	187	288
Total PCDDs		1322.6	1160.8	531.1	605.8	587.8	307.9	486.0
2, 3, 7, 8-Tetra-CDF	0.1	4.4	5.0	7.1	2.5	2.5	4.1	7.0
2, 3, 4, 7, 8-Penta-CDF	0.5	17.4	17.4	8.9	243.0	240.0	153.0	495.0
1, 2, 3, 7, 8-Penta-CDF	0.05	0.8	1.5	12.4	1.7	1.5	1.1	2.7
1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexa-CDF	0.1	12.1	11.7	9.0	157.0	148.0	194.0	367.0
1, 2, 3, 6, 7, 8-Hexa-CDF	0.1	8.7	7.8	6.6	34.5	34.3	42.7	98.8
1, 2, 3, 7, 8, 9-Hexa-CDF	0.1	0.4	0.5	nd	0.6	0.7	nd	nd
2, 3, 4, 6, 7, 8-Hexa-CDF	0.1	3.3	3.4	5.8	4.0	4.4	6.1	7.4
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-Hepta-CDF	0.01	10.4	6.8	8.0	16.6	16.7	9.7	17.4
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-Hepta-CDF	0.01	0.9	0.8	nd	2.9	3.8	nd	nd
Octa-CDF	0.001	nd	2.7	2.5	na	na	5.0	5.0
Total PCDFs		58.3	57.6	60.3	462.8	451.9	415.7	1000.3
3, 3', 4, 4'-Tetra-CB	0.0005	25	24	18	22	24	na	na
3, 3', 4, 4', 5-Penta-CB	0.1	149	134	29	46	44	26	29
3, 3', 4, 4', 5, 5'-Hexa-CB	0.01	84	99	32	127	125	281	362
Total Coplanar PCBs		258	257	80	195	193	307	391
2, 4, 4'-Tri-CB	0	4194	4133	10400	2277	2620	13100	15200
2, 3, 3', 4, 4'-Penta-CB	0.0001	11304	8603	3600	3326	3717	7900	9400
2, 3, 4, 4', 5-Penta-CB	0.0005	2745	2756	2000	3279	2952	6100	10500
2, 3', 4, 4', 5-Penta-CB	0.0001	43599	41021	17100	15040	13081	17600	15200
2', 3, 4, 4', 5-Penta-CB	0.0001	676	789	lncl up	<400	<400	lncl up	lncl up
2, 3, 3', 4, 4', 5-Hexa-CB	0.0005	13962	18216	5400	31976	34795	153000	130000
2, 3, 3', 4, 4', 5'-Hexa-CB	0.0005	3131	4092	1700	8533	9002	49800	39600
2, 3', 4, 4', 5, 5'-Hexa-CB	0.00001	8325	8455	2700	4545	4845	9400	6700
2, 3, 3', 4, 4', 5, 5'-Hepta-CB	0.0001	850	925	1300	2058	2696	16000	19700
Total Mono-ortho PCBs		88786	88990	44200	71034	73708	272900	246300
2, 2', 5, 5'-Tetra-CB	0	1326	1867	31800	2483	2534	13900	35600
2, 2', 4, 5, 5'-Penta-CB	0	3039	4210	10000	4960	5219	10600	25900
2, 2', 3, 4, 4', 5'-Hexa-CB	0	111042	116614	49200	111475	123648	328000	364000
2, 2', 4, 4', 5, 5'-Hexa-CB	0	146885	136531	51500	100753	109826	245000	285000
2, 2', 3, 3', 4, 4', 5-Hepta-CB	0.0001	17531	20820	15400	22710	27060	161000	149000
2, 2', 3, 4, 4', 5, 5'-Hepta-CB	0.00001	84082	79759	31200	51611	61453	200000	197000
2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5'-Octa-CB	0	7948	7166	3900	5261	6893	31600	28500
Total Di-ortho PCBs		371853	366967	193000	299253	336633	990100	1085000
Deca-CB	0	1710	1670	nd	915	1175	nd	nd
Total PCBs		462607	457884	237280	371397	411709	1263307	1331691

nd: Not detected na: Not analyzed

lncl up: This concentration is included in the value of upper line

を用い、流速は1.5 ml/minであった。カラム温度は、最初100°Cで2分間保持し、20°C/minで250°Cまで昇温して、15分間保持した。次いで、2°C/minで280°Cまで昇温し、7分間保持した。注入口およびインターフェースの温度は280°Cに保った。選択イオン検出 (SIM) には三塩化、四塩化、五塩化、六塩化、七塩化のPCBおよび1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) の分子イオンピーク (M^+) および $[M+2]^+$ (m/z 255.95, 257.95, 289.90, 291.90, 323.90, 325.90, 357.85, 359.85, 391.80, 393.80 および 315.95, 317.95), 八塩化、九塩化、十塩化のPCBの $[M+2]^+$ および $[M+4]^+$ (m/z 427.75, 429.75, 461.70, 463.70, 495.70, 497.70) を用いて測定した。PCB異性体の濃度は各イオンのピーク面積を2,2',3,4,5,5',6-hepta-CBの $[M+2]^+$ のピーク面積と比較する内標準法により求めた。

結 果 と 考 察

1. PCDD, PCDF, PCB異性体の分析

油症患者の血液および一般人の血清および血液に含有するPCDD, PCDF, PCB異性体の濃度をTable 1に示す。濃度は溶媒抽出された脂質当たりの値で示されている。全血液当たりの濃度はそれぞれの血液試料の全試料量と全脂質量から計算して求めることができる。

油症患者の2,3,4,7,8-penta-CDF, 1,2,3,4,7,8-hexa-

CDF および1,2,3,6,7,8-hexa-CDFの濃度は一般人のそれらの濃度より5~56, 12~41 および4~15倍程度高かった。また、2,3,4,4',5-penta-CB, 2,3,3',4,4',5-hexa-CB, 2,3,3',4,4',5'-hexa-CB, 2,3,3',4,4',5,5'-hepta-CB および2,2',3,3',4,4',5-hepta-CBの濃度も油症患者の方が1.1~5.3, 2~8, 2~29, 1.6~23および1.1~10.5倍それぞれ高かった。これらの化合物が現在においても油症患者体内に高い濃度で存在するのは、二十数年前にライスオイルと共に摂取した高濃度のPCDF, PCBが長期間にわたり体内に蓄積残留しているためである。これに対して、3,3',4,4',5-penta-CB および2,3',4,4',5-penta-CBの濃度は油症患者の方が比較的に低く、一般人の濃度のそれぞれ1/5.6および1/3.3になっているものまでである。油症患者における2,3',4,4',5-penta-CBの低濃度は以前から知られており、度々報告されている⁴⁾⁸⁾⁹⁾。このPCBの低濃度化は油症患者に長期間残留されている2,3,4,7,8-penta-CDFなどの強い酵素誘導物質の作用により、代謝が促進されて生じたものと考えられている。

北大西洋条約機構⁵⁾で定められたPCDD, PCDFの各異性体のTEQ Factor および世界保健機関¹⁾で決められたPCB異性体のTEQ FactorをTable 1に示している。各異性体の濃度にそのFactorを掛けると、その毒性をTCDDの量に換算した値(TEQ)として求められる。それをPCDD, PCDF, PCBのグループごとにまとめた濃度がTable 2に示されている。そのデー

Table 2 Concentrations of TEQ in Yusho blood and control blood and serum

	TEQ Concentration (Lipid basis, ppt)						
	Control 1 Serum 1991	Control 2 Serum 1992	Control TS Blood 1992	Yusho 1 Blood 1990	Yusho 2 Blood 1991	Yusho TAK Blood 1990/91	Yusho KEY Blood 1990/91
PCDDs	14.80	14.02	11.73	10.94	10.95	16.19	26.86
PCDFs	11.74	11.69	8.00	141.64	139.27	101.35	295.83
Coplanar PCBs	15.75	14.40	3.23	5.88	5.66	5.45	6.48
Mono-ortho PCBs	15.65	17.75	6.78	23.98	25.37	108.69	94.55
Di-ortho PCBs	2.59	2.88	1.85	2.79	3.32	18.10	16.87
Total PCBs	33.99	35.03	11.86	32.65	34.35	132.24	117.89
Total TEQ	60.53	60.74	31.58	185.22	184.57	249.78	440.58

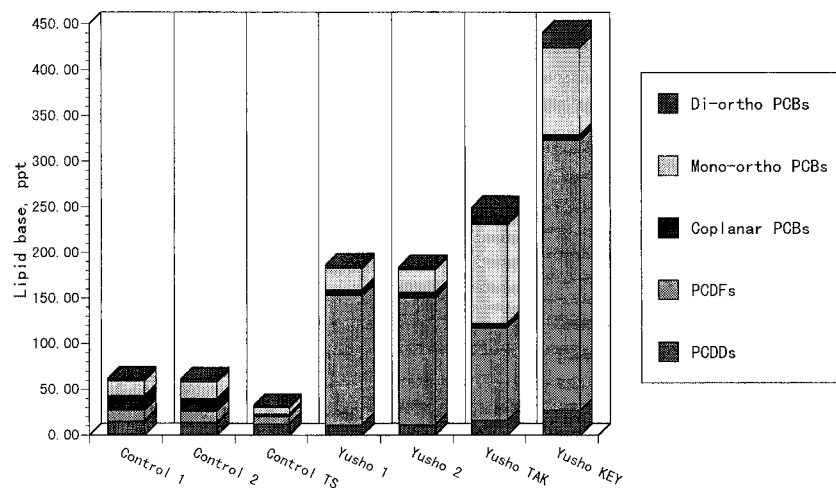


Fig. 1 TEQ levels in Yusho and control blood

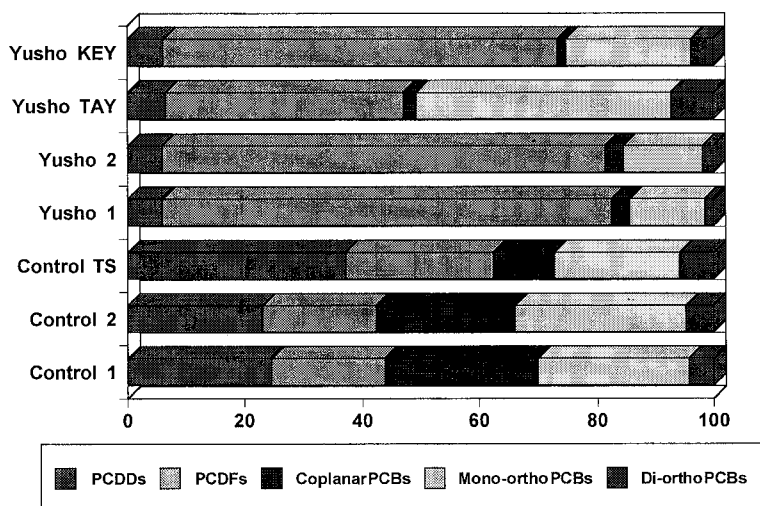


Fig. 2 Percent TEQ contribution in Yusho and control blood

タをわかりやすいように図にしたものが Fig. 1 である。油症患者血液中の 2,3,4,7,8-penta-CDF の TEQ 濃度は 77~248 ppt (脂質重量当たり) であり, 一般人のその濃度 (4.8~8.7 ppt) の 10~50 倍である。2,3,4,7,8-penta-CDF の毒性寄与は全毒性の 31~66% を占めており, 油症毒性発現の重要な化合物と考えられている。PCB の中では, 油症患者では 2,3,3',4,4',5-hexa-CB の TEQ 濃度が最も高く 16~77 ppt であるのに対し, 一般人においては 3,3',4,4',5-penta-CB の TEQ 濃度が高く 3~15 ppt であった。Table 2 および Fig. 1 によ

ると, 油症患者の毒性の主要部分は PCDF であるが, PCB もかなりの毒性寄与がある。油症患者血液中の全 TEQ 濃度は 185~440 ppt であり, 一般人の TEQ 濃度の 3~14 倍程度で, 大きな濃度差はない。一般人も一般環境汚染由来のかかなりの TEQ を体内に蓄積している。

PCDD, PCDF, PCB の毒性寄与を百分率にして図示すると Fig. 2 のようになる。油症患者では PCDF の毒性寄与が大部分 (41~77%) であり, 次いで PCB による毒性寄与 (18~53%) がある。これに対し, 一般

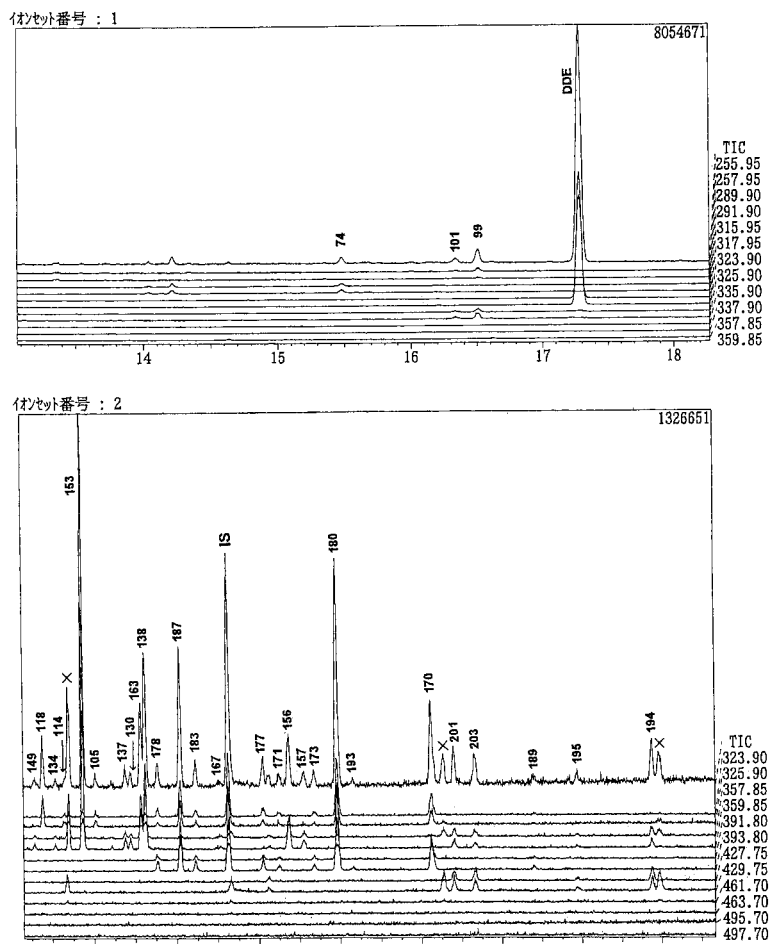


Fig. 3 SIM chromatograms of the extract from blood of a Yusho patient (HM)
 Numerals: IUPAC number for PCB congeners
 IS: Internal standard (PCB 185) × : Artifact

人における毒性寄与は大きな部分 (38~59%) が PCB であり、次いで PCDD (23~37%) および PCDF (19~25%) の毒性寄与がある。

2. PCB 異性体の分析

油症患者血液をクリーンアップしたフラクションの SIM クロマトグラムを Fig. 3 に示す。M⁺ および [M+2]⁺ (または [M+2]⁺ および [M+4]⁺) の 2 個のピークが同じ保持時間でみられたものを PCB または DDE と認めた。同じガスクロマト条件における標準 PCB の保持時間と一致するものをその PCB 異性体とした。標準 PCB を所有していないものは、同じ DB-5 キャピラリーカラムを用いて測定された文献

データ¹³⁾ の保持時間から推定して、PCB 異性体の判定をした。判定された PCB 異性体の国際純正応用化学連合 (IUPAC) の PCB 番号²⁾ を Fig. 3 のピークに示した。この方法により油症患者血液中に存在するほとんどの PCB 異性体の構造を推定することができた。

内標準法で定量分析した各 PCB 異性体の血液中濃度を Table 3 に示す。油症患者血液中の PCB の一般人の濃度との比も示している。油症患者 22 名の血液中全 PCB 濃度の平均は 6.2 ppb であり、一般人の濃度 (1.3 ppb) の 4.9 倍であった。1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) の代謝物である DDE も PCB 総量と同じ程度の濃度で、油症患者およ

Table 3 Concentrations and ratio of PCBs in the blood of Yusho and Control

IUPAC	No	PCB	PCB concentration in blood, ppb				Yusho	
			Yusho patients				Control	Control
			Minimum	Maximum	Average	S. D.	Average	Ratio
	74	2, 4, 4', 5-tetra-CB	0.027	0.363	0.099	0.078	0.063	1.6
	101	2, 2', 4, 5, 5'-penta-CB	0.026	0.171	0.062	0.031	0.019	3.3
	99	2, 2', 4, 4', 5-penta-CB	0.084	0.638	0.291	0.150	0.047	6.2
	149	2, 2', 3, 4', 5', 6-hexa-CB	0.024	0.065	0.040	0.011	0.010	4.2
	118	2, 3', 4, 4', 5-penta-CB	0.041	0.189	0.104	0.045	0.076	1.4
	134	2, 2', 3, 3', 5, 6-hexa-CB	0.013	0.056	0.029	0.012	0.007	4.2
	114	2, 3, 4, 4', 5-penta-CB	0.011	0.051	0.031	0.012	0.005	6.3
	153	2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexa-CB	0.437	1.997	1.052	0.415	0.266	4.0
	105	2, 3, 3', 4, 4'-penta-CB	0.011	0.044	0.027	0.010	0.020	1.3
	137	2, 2', 3, 4, 4', 5-hexa-CB	0.034	0.208	0.092	0.046	0.011	8.2
	130	2, 2', 3, 3', 4, 5'-hexa-CB	0.029	0.130	0.070	0.030	0.013	5.3
	163	2, 3, 3', 4', 5, 6-hexa-CB	0.130	0.749	0.394	0.166	0.066	6.0
	138	2, 2', 3, 4, 4', 5'-hexa-CB	0.229	1.383	0.749	0.343	0.105	7.1
	178	2, 2', 3, 3', 5, 5', 6-hepta-CB	0.022	0.176	0.068	0.036	0.021	3.2
	187	2, 2', 3, 4', 5, 5', 6-hepta-CB	0.144	0.750	0.294	0.144	0.094	3.1
	183	2, 2', 3, 4, 4', 5', 6-hepta-CB	0.026	0.198	0.089	0.044	0.024	3.7
	167	2, 3', 4, 4', 5, 5'-hexa-CB	0.012	0.067	0.032	0.014	0.011	3.0
	177	2, 2', 3, 3', 4', 5, 6-hepta-CB	0.029	0.212	0.086	0.049	0.020	4.2
	171	2, 2', 3, 3', 4, 4', 6-hepta-CB	0.016	0.082	0.052	0.018	nd	-
	156	2, 3, 3', 4, 4', 5-hexa-CB	0.107	0.869	0.436	0.205	0.031	13.9
	157	2, 3, 3', 4, 4', 5'-hexa-CB	0.028	0.225	0.112	0.055	0.006	18.7
	173	2, 2', 3, 3', 4, 5, 5'-hepta-CB	0.010	0.109	0.057	0.025	0.016	3.6
	180	2, 2', 3, 4, 4', 5, 5'-hepta-CB	0.270	1.950	0.787	0.394	0.172	4.6
	193	2, 3, 3', 4', 5, 5', 6-hepta-CB	0.019	0.072	0.043	0.015	nd	-
	170	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5-hepta-CB	0.157	1.077	0.556	0.242	0.076	7.4
	201	2, 2', 3, 3', 4, 5, 5', 6'-octa-CB	0.042	0.384	0.122	0.076	0.034	3.6
	203	2, 2', 3, 4, 4', 5, 5', 6-octa-CB	0.038	0.288	0.124	0.059	0.026	4.8
	189	2, 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hepta-CB	0.016	0.084	0.049	0.019	nd	-
	195	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 6-octa-CB	0.034	0.096	0.061	0.018	nd	-
	194	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5'-octa-CB	0.084	0.432	0.196	0.074	0.040	4.9
Total PCBs			2.339	11.121	6.207	2.394	1.278	4.9
DDE			2.242	13.060	6.253	3.070	1.866	3.4

nd: Not detected

び一般人の血液中に存在する。分析された PCB 異性体のうち油症患者において、一般人の 4.9 倍より濃度が高かったものは、IUPAC 番号で、99, 114, 137, 130, 163, 138, 156, 157, 170 の 9PCB 異性体であった。このうち 114, 156, 157, 170 の PCB については、同様の結果が前項の PCDD, PCDF, PCB の分析においても観察されている。油症患者において一般人との濃度比が比較的に小さな PCB 異性体は 74, 118,

105 であった。このうち 118, 105 の濃度が油症患者で比較的に小さいことは 1977 年頃から観察されていた⁴⁾。

総 括

1. 油症患者血液 4 検体および一般人血清、血液 3 検体を高分離能ガスクロマトグラフ／高分解能質量分析装置により分析して、体内に残留している PCDD, PCDF, PCB 異性体の濃度を求めた。

油症患者血液の2,3,4,7,8-penta-CDF, 1,2,3,4,7,8-hexa-CDF, 1,2,3,6,7,8-hexa-CDFの濃度は一般人のそれらの濃度より4~56倍高かった。また, 2,3,4,4',5-penta-CB, 2,3,3',4,4',5-hexa-CB, 2,3,3',4,4',5'-hexa-CB, 2,3,3',4,4',5,5'-hepta-CB, 2,2',3,3',4,4',5-hepta-CBの濃度も一般人より1.1~29倍高い状態であった。これらは23年前に摂取したものがいまだに体内に残留していることを示す。3,3',4,4',5-penta-CB, 2,3',4,4',5-penta-CBの濃度は油症患者において一般人よりも低いことが観察された。これは長期間残留している2,3,4,7,8-penta-CDFなどの強い酵素誘導作用を持つ化合物により代謝が促進されたためと考えられている。

油症患者では, 2,3,7,8-tetra-CDDの毒性に換算された量 (TEQ) の濃度は, 2,3,4,7,8-penta-CDFで最も高く, 77~248 pptであり, これら化合物全毒性の31~66%を占めている。これは油症毒性発現の重要な化合物である。TEQによると, 油症患者では, PCDFが大部分 (41~71%) の毒性寄与をしているのに対し, 一般人では, PCB (38~59%), PCDD (23~37%), PCDF (19~25%) であり, 3種の化合物グループは同じ程度の毒性寄与である。

2. 1996年に採取された油症患者22名の血液を高分離能ガスクロマトグラフ/四重極質量分析装置で分析し, 30個のPCB異性体を定量分析した。油症患者血液の平均全PCBの濃度は一般人のその濃度よりも4.9倍高かった。IUPAC番号99, 114, 137, 163, 138, 156, 157, 170のPCB異性体は油症患者の方が一般人よりも高い濃度であり, 74, 118, 105のPCBは両者で同じ程度の濃度であった。

文 献

- 1) Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJGM, Feely M, Golor G, Hanberg A, Larsen JC, Liem AKD, Safe SH, Schlatter C, Wærn F, Younes M and Yrjänheikki E: Toxic equivalent factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere* 28: 1049-1067, 1994.
- 2) Ballschmiter M and Zell M: Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fres. Z. Anal. Chem.* 302: 20-31, 1980.
- 3) Kuratsune M: Outlines of Yusho, Outbreak of a "Strange Disease", Investigation of the cause of the "Strange Disease", Masuda Y: Causal agents of Yusho, In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M and Masuda Y (ed): YUSHO a human disaster caused by PCBs and related compounds. pp 1-46, 47-80, Kyushu University Press, 1996.
- 4) Kuroki H and Masuda Y: Structures and concentrations of the main components of polychlorinated biphenyls retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 6: 469-474, 1977.
- 5) Kutz FW, Bottimore DP, Bretthauer EW and McNelis DN: History and achievements of NATO/CCMS pilot study on international information exchange on dioxins. *Chemosphere* 17: N2-7, 1988.
- 6) Masuda Y: Approach to risk assessment of chlorinated dioxins from Yusho PCB poisoning. *Chemosphere* 32: 583-594, 1996.
- 7) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 高田真由美, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中ポリ塩化ビフェニール, *福岡医誌* 65: 25-27, 1974.
- 8) Masuda Y and Schecter A: Exposed and control human levels from Guam and Binghamton workers and Yusho patients. *Chemosphere* 25: 1091-1094, 1992.
- 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) Okumura M, Nakajima J, Urabe A, Hori Y, Nakanishi Y, Ohnishi Y, Kohno T, Hamada T, Yoshimura T, Hashiguchi I, Akamine A, Maeda K and Kuratsune M: Clinical features and treatment of Yusho, Hirota Y, Kataoka K and Hirohata T: Annual health examination of Yusho patients, In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M and Masuda Y (ed): YUSHO a human disaster caused by PCBs and related compounds. pp 157-245, 247-266, Kyushu University Press, 1996.
- 11) Pöpke O, Ball M, Lis ZA and Scheunert K: PCDD/PCDF in whole blood samples of unexposed persons. *Chemosphere* 19: 941-948, 1989.
- 12) Segunski H, Pöpke O, Herrmann T, Landgraff O, Schonfelder C, Wessel M and Koss G: Selection of specific polychlorinated biphenyl congeners: analytical and Toxicological aspects. *Organohalogen Compounds* 14: 129-135, 1993.
- 13) 高菅卓三, 井上毅, 大井悦雅: 各種クリーンアップ法とHRGC/HRMSを用いたポリ塩化ビフェニール (PCBs) の全異性体詳細分析法. *環境化学* 5: 657-675, 1995.

(受付 1997-3-18)

カネクロール 400 メチルスルホン代謝物のマウス体内分布

第一薬科大学物理分析学教室
原 口 浩 一・増 田 義 人

Tissue Distribution of Methylsulfonyl Metabolites Derived from Kanechlor 400 in Mice

Koichi HARAGUCHI and Yoshito MASUDA

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

Kanechlor 400, which caused the "Yusho disease", was i. p. administered to mice and methylsulfonyl (MeSO_2) metabolites were investigated with respect to the concentration in liver and lung during 28 days after the administration. Major components were 3- and 4- MeSO_2 derivatives from seven PCBs (IUPAC no. # 31, # 49, # 64, # 70, # 101, # 110, # 132). In the liver, similar concentration ratio of 3- and 4- MeSO_2 derivatives was observed, whereas seven 4- MeSO_2 derivatives were selectively retained in the lung. Methylsulfone metabolites of triCB (# 31) were rapidly formed and eliminated. The highest concentration of the metabolites in the lung was 4- MeSO_2 -2, 2', 4', 5-tetraCB. Concentration ratio of MeSO_2 -CBs to residual PCBs was 1 : 2.1 in the liver, whereas 4.6 : 1 in the lung 28 days after the administration.

はじめに

Polychlorinated biphenyl (PCB) のうち、2,5-ジクロロフェニル骨格を有する異性体は容易に肝臓で含硫代謝物に変換され、メチルスルホン体として組織に残留する¹⁾。油症の原因物質であるカネクロール (KC) 400 には、この骨格を有する異性体の含有量が高く¹⁴⁾²³⁾、これに由来する PCB-メチルスルホン体は油症患者および一般人の脂肪組織や母乳から検出されている⁹⁾¹¹⁾。また、これらの代謝物はアザラシや北極ぐまの体脂肪にも高濃度で蓄積している³⁾⁸⁾。

生成するメチルスルホンのうち、2,5-ジクロロフェニル骨格の 3 位に methylsulfonyl (MeSO_2) 基が導入された異性体はフェノバルビタール (PB) に類似したラット肝ミクロゾーム薬物代謝酵素誘導作用を示し¹⁶⁾、母化合物の PB 型誘導能にその 3-メチルスルホン体が大きく寄与していることが示唆された¹⁵⁾。一方、4-位に MeSO_2 基を有する異性体はそのような酵素誘導能は見られない¹⁶⁾ ものの、マウスやラットの肺や腎臓に選択的に取り込まれ、長期に残留することが知られて

いる²⁾⁴⁾。

われわれは前報¹¹⁾で PCB 製品のうち Clophen A50 をミンクに投与したときに体内で生成するメチルスルホン組成を明らかにした。今回、KC 400 のマウス体内で生成するメチルスルホンの肝臓、肺組織における組成および各異性体濃度を経時的に調べ、残留 PCB 成分と比較定量した。

実験方法

1 材料

動物は dd 系若齢雄マウス (体重 25 g) を用い、PCB として KC 400 をオリーブ油に溶解し、8 mg/head を腹腔内 1 回投与した。投与 1 日、4 日、8 日、16 日および 28 日後の肝臓および肺組織を分析の試料とした。

2 試薬

溶媒はすべて残留農薬試験用を用いた。内標準物質として、2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB および 3- MeSO_2 -4-Me-2',3',4',5,5'-pentaCB を用いた。同定したメチルスルホンの標品は既報¹⁰⁾に従って合成した。

3 試料の精製

既報¹³⁾に準じて試料の精製を行った。すなわち、組織のホモジネート溶液（ヘキサン：アセトン1：2）に内標準物質を加え、ろ過、濃縮後、Gel Permeation Chromatography (GPC) によって代謝物分画を分取した。これをヘキサン溶液とした後、2 M KOH/ethanol (7：3) 溶液でフェノール性代謝物を抽出、分離し、残ったヘキサン層（中性物質の分画）を GC/MS および GC/ECD 分析の試料とした。

4 定性、定量

(1) GC/MS

代謝物の定性は日本電子 JMS-AX 505 質量分析計-JMA-DA 5000 データシステムを用いて、EI モードで行った。GC カラムは DB-5 (30 m×0.25 mm, i. d., J&W Scientific) を用い、splitless モードで注入した。カラム温度は最初 70°C で 2 分間保持し、20°C/min で 220°C まで、その後、3°C/min で 280°C まで昇温し一定に保った。メチルスルホンの定性分析は合成した標準品の GC 保持時間およびマススペクトルを比較して行った。

(2) GC/ECD

主な代謝物の定量は⁶³Ni-ECD を装備した GC-14 A (島津) を用いて、GC/MS と同じカラム、温度条件でクロマトグラム上の代謝物を内標準物質に対するピーク面積比から計算した。

結 果

Fig. 1 に KC 400 投与 28 日後の肝臓および肺から単離した代謝物のうち、水酸化体を除いた中性物質分画の ECD ガスクロマトグラムを示す。GC/MS 分析の結果、MeSO₂代謝物に相当する異性体が約 30 種検出され、その主な成分の構造を合成標品と比較した。その結果、主成分 14 種は IUPAC no. # 31, # 49, # 64, # 70, # 101, # 110, # 132 の PCB から由来する 3-および 4-MeSO₂体であることが分かった。このうち、# 31, # 70, # 101, # 110 についてはほぼ同量の 3-および 4-メチルスルホンが検出されたが、ほかの 3 種 PCB から生成する 3-/4-メチルスルホンの残留比は約 1：3～1：5 であった。一方、肺には 7 種の PCB から由来するメチルスルホンがすべて 4-MeSO₂体として残留し、3-MeSO₂体は検出できないか、または微量であった。

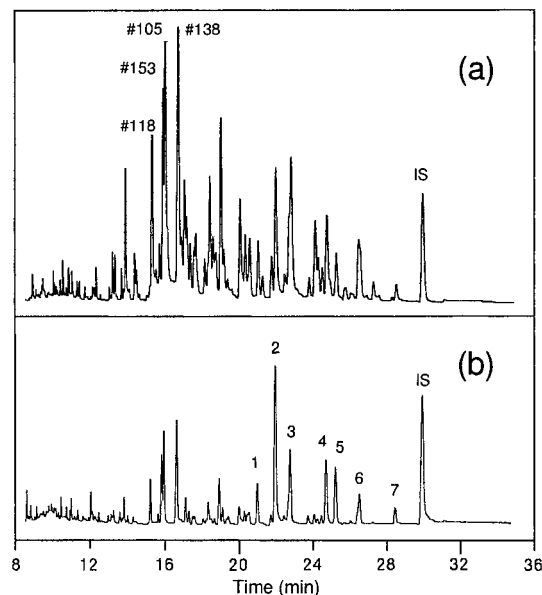


Fig. 1 ECD gas chromatograms of neutral fraction obtained from liver (a) and lung (b) 28 days after the dosing of Kanechlor 400 to mice.

peak 1: 4-MeSO₂-2, 4', 5-triCB;
peak 2: 4-MeSO₂-2, 2', 4', 5-tetraCB,
peak 3: 4-MeSO₂-2, 3, 4', 6-tetraCB;
peak 4: 4-MeSO₂-2, 3', 4', 5-tetraCB;
peak 5: 4-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB;
peak 6: 4-MeSO₂-2, 3, 3', 4', 6-pentaCB;
peak 7: 4-MeSO₂-2, 2', 3, 3', 4', 6-hexaCB.
IS: 3-MeSO₂-4-Me-2', 3', 4', 5, 5'-pentaCB.

経時的にみると、肝臓では、低塩素化体ほど生成、消失が早い傾向が見られた。とくに# 31 から生じる 3-および 4-MeSO₂体は投与後 1～2 日で最大濃度に達し、その後ゆっくり濃度が低下した。5 塩素化メチルスルホン異性体は緩やかに生成し投与後 4～8 日の間ほぼ一定の濃度を保った。3-MeSO₂-2,2',4',5,5'-pentaCB の肝臓中濃度の経時変化を残留濃度の高い PCB (# 105, # 153) と比較したものを Fig. 2 に示す。PCB (# 105) の消失速度は早かったが、メチルスルホンの濃度は投与後 8 日ごろから徐々に減少しはじめ、# 153 とほぼ同じ濃度で推移した。投与 28 日後のメチルスルホンと残留 PCB の濃度比は 1：2.1 であった。

一方、肺における 7 種の 4-MeSO₂-CBs (Fig. 1(b), peaks 1～7) の濃度変化を残留 PCB と比較したものを

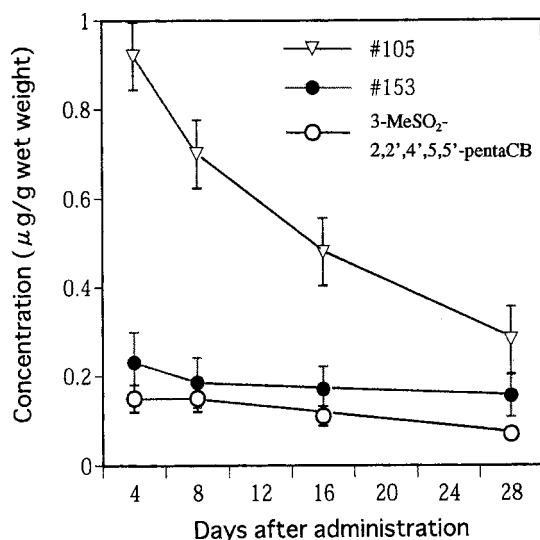


Fig. 2 Time course of the liver concentration of PCBs (IUPAC no. #105 and #153) and 3-MeSO₂-2, 2', 4', 5, 5'-pentaCB after single i. p. administration of Kanchlor400 (8 mg/head)

を Table 1 に示す。PCB 濃度は肝臓のそれと同じように推移し、#105 および #118 の消失が早かった。メチルスルホン濃度は 3 塩素化体 > 4 塩素化体 > 5 塩素化体の順に生成、消失する傾向が見られた。投与 28 日後において 4 塩素化体である 4-MeSO₂-2,2',4',5-tetraCB の濃度が最も高く、メチルスルホンの残留 PCB に対する濃度比は約 4.6:1 であった。

考 察

高菅ら²³⁾によると、KC 400 中には 2,5-ジクロロフェニル骨格を有する PCB として、#31 (5.0%)、#52 (5.8%)、#70 (7.9%)、#95 (2.5%)、#101 (3.4%)、#110 (4.3%) が高い含有率 (%) で存在する。また Kannan らの調査¹⁴⁾ では #49、#64、#87、#132、#149 も比較的多く含まれる。本研究で組織中に残留するメチルスルホンの構造を分析したところ、3 塩素化体 (#31)、4 塩素化体 (#49、#64、#70) および 5 塩素化体 (#101、#110) から由来するメチルスルホンの組織中濃度が高かったため、これらを追跡した。2,5-ジクロロフェニル骨格を 2 個有する #52、#95 由来のモノメチルスルホンの残留はごくわずかであった。これ

らの異性体はさらに変換されてビスメチルスルホンとして残留するものと思われる。事実、GC/MS により m/z 446, 480 の分子イオンをもつマススペクトルが得られている。一方、KC 400 中に 4.1% 存在²³⁾ する 2, 2',3,5'-tetraCB から由来するメチルスルホンは検出できなかった。このことから、メチルスルホンの生成、残留に有利な母化合物の構造は 2,4',5-trichlorobiphenyl 骨格であることが示唆される。しかし、単一 PCB を用いたラット代謝実験で 2,4,4'-および 3,4,4'-trichlorobiphenyl 骨格を有する PCB も 5-および 6-メチルスルホン代謝物を与えることが明らかになっている⁷⁾¹²⁾ ので、そのような骨格をもつ PCB から由来する含硫代謝物も環境分析を行う際に考慮に入れておく必要がある。

肝臓中のメチルスルホン組成をみると、#31、#70、#101 および #132 から 3-および 4-メチルスルホンがほぼ同量生成するのがみとめられたが、その他の母化合物からは 4-メチルスルホンの生成量が多かった。3-/4-位のメチルスルホン生成率は母化合物の構造、とくに塩素数によって異なるように思われる⁸⁾。これは PCB-3,4-epoxide がグルタチオン抱合反応²²⁾ を受ける際、その反応部位が塩素の置換位置や塩素数に影響されるためかもしれない。

肝臓に見られる 3-MeSO₂-2,2',4',5,5'-pentaCB はアザラシや北極ぐまなどの哺乳動物に高濃度で蓄積している代表的な異性体³⁾ で、この化合物はラット肝ミクロゾームの薬物代謝酵素 (CYP 2B1/2) を強く誘導し¹⁶⁾、母化合物の PB 型の誘導能に 3-メチルスルホンが大きく関与していることが明らかにされている¹⁵⁾。また今回検出した 3-MeSO₂体はすべて PB 型の酵素誘導作用を示すことも分かってきた¹⁷⁾。

一方、肺では 4-MeSO₂-CB が選択的に残留した。この結果は単一 PCB を用いた *in vivo* 代謝実験結果²⁾ と一致する。4,4'-bis (MeSO₂)-2,2',5,5'-tetraCB をモデル化合物に用いた動物実験で、肺や腎臓に特異的に蓄積する理由は uteroglobin 類似タンパクとの高い親和性によるものと説明されている¹³⁾²⁰⁾。こうして、メチルスルホンの uteroglobin との結合メカニズム⁵⁾ や、ラットやニワトリの肝臓および腸管粘膜に脂肪酸結合タンパクの存在も知られるようになった¹⁸⁾¹⁹⁾。本研究でみられる 4-MeSO₂-CB の長期残留は生体に何らか

Table 1 Concentration of PCBs and MeSO₂-CBs in lung during 28 days after the dosing of Kanechlor 400.

Compound	Concentration($\mu\text{g/g}$ wet weight)			
	Day 1	Day 4	Day 7	Day 28
PCB(IUPAC no.)				
# 105	0.55 $\pm$ 0.12	0.64 $\pm$ 0.22	0.71 $\pm$ 0.22	0.33 $\pm$ 0.10
# 118	0.56 $\pm$ 0.20	0.60 $\pm$ 0.23	0.56 $\pm$ 0.18	0.15 $\pm$ 0.03
# 138	0.41 $\pm$ 0.14	0.63 $\pm$ 0.21	0.51 $\pm$ 0.16	0.46 $\pm$ 0.25
# 153	0.25 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.07	0.27 $\pm$ 0.11	0.25 $\pm$ 0.06
total PCB	1.77 $\pm$ 0.51	2.21 $\pm$ 0.73	2.05 $\pm$ 0.67	1.19 $\pm$ 0.44
MeSO ₂ -CB				
4-MeSO ₂ -CB-# 31	1.96 $\pm$ 0.33	1.38 $\pm$ 0.27	1.32 $\pm$ 0.30	0.42 $\pm$ 0.15
4-MeSO ₂ -CB-# 49	1.26 $\pm$ 0.28	1.84 $\pm$ 0.38	1.96 $\pm$ 0.36	2.04 $\pm$ 0.33
4-MeSO ₂ -CB-# 64	0.80 $\pm$ 0.14	1.32 $\pm$ 0.29	1.18 $\pm$ 0.39	1.02 $\pm$ 0.20
4-MeSO ₂ -CB-# 70	1.10 $\pm$ 0.13	1.60 $\pm$ 0.25	1.46 $\pm$ 0.25	0.76 $\pm$ 0.22
4-MeSO ₂ -CB-# 101	0.46 $\pm$ 0.20	0.78 $\pm$ 0.18	0.64 $\pm$ 0.14	0.66 $\pm$ 0.21
4-MeSO ₂ -CB-# 110	0.40 $\pm$ 0.17	0.64 $\pm$ 0.12	0.54 $\pm$ 0.14	0.42 $\pm$ 0.12
4-MeSO ₂ -CB-# 132	0.22 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.04
total MeSO ₂ -CB	6.20 $\pm$ 1.28	7.80 $\pm$ 1.54	7.32 $\pm$ 1.63	5.50 $\pm$ 1.27
Ratio				
MeSO ₂ -CB/PCB	3.50	3.53	3.57	4.62

Values represent the mean $\pm$ SD for four mice.

105: 2,3,3',4,4'-pentaCB; # 118: 2,3',4,4',5-pentaCB; # 138: 2,2',3,4,4',5'-hexaCB; # 153: 2,2',4,4',5,5'-hexaCB; # 31: 2,4',5-triCB; # 49: 2,2',4',5-tetraCB; # 64: 2,3,4',6-tetraCB; # 70: 2,3',4',5-tetraCB; # 101: 2,2',4',5,5'-pentaCB; # 110: 2,3,3',4',6-pentaCB; # 132: 2,2',3,3',4',6-hexaCB.

The numbering of the chlorine atoms of # 49, # 101, # 110 and # 132 is not according to the IUPAC rules but was chosen to facilitate understanding of the structures of 4-MeSO₂-CBs.

の作用を及ぼすものと見られる。

総 括

カネクロール 400 をマウスに投与した場合に生成するメチルスルホン代謝物についてその肝臓および肺に含まれる濃度を経時的に調べ、次のような知見を得た。

(1) KC 400 中に含まれる 2,4',5-位に塩素置換された骨格を有する PCB 異性体が有利にメチルスルホン体を与えた。同定した主成分は IUPAC no. # 31, # 49, # 64, # 70, # 101, # 110, # 132 から由来する 3-および 4-メチルスルホン体であった。

(2) 肝臓ではそれぞれの母化合物から 3-および 4-メチルスルホンがほぼ同量検出されたが、肺では 4-メチルスルホンが選択的に蓄積した。投与 28 日後において肺には 4-MeSO₂-2,2',4',5-tetraCB がもっとも高濃度で残留した。

(3) 投与 28 日後におけるメチルスルホンの残留 PCB (# 105, # 118, # 138, # 153) に対する残留比は肝臓で 1:2.1, 肺で 4.6:1 であった。

文 献

- 1) Bakke JE, Bergman Å and Larsen GL: Metabolism of 2,4',5-trichlorobiphenyl by the mercapturic acid pathway. Science 217: 645-647, 1982.
- 2) Bergman Å, Brandt I and Jansson B: Accumulation of methsulfonfyl derivatives of some bronchial-seeking polychlorinated biphenyls in the respiratory tract of mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 48: 213-220, 1979.
- 3) Bergman Å, Norstrom RJ, Haraguchi K, Kuroki H and Béland P: PCB and DDE methyl sulfones in mammals from Canada and Sweden. Environ. Toxicol. Chem. 13: 121-128, 1994.
- 4) Brandt I and Bergman Å: PCB methyl

sulphones and related compounds: identification of target cells and tissues in different species. *Chemosphere* 16: 1671-1676, 1987.

5) Gillner M, Lund J, Cambillau C, Alexandersson M, Hurtig U, Bergman Å, Klasson-Wehler E and Gustafsson J-Å: The binding of methylsulfonyl-polychlorobiphenyls to uteroglobin. *J. Steroid Biochem.* 31: 27-33, 1988.

6) 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.

7) Haraguchi K, Kato Y, Hatada Y, Kimura R and Masuda Y: In vivo metabolism of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in rats: Occurrence and liver-specific retention of methylsulfonyl metabolite. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 43: 18, 1997.

8) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R and Masuda Y: Comparative study on formation of hydroxy and sulfur-containing metabolites from different chlorinated biphenyls with 2,5-substitution in rats. *Drug Metab. Dispos.* submitted.

9) 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.

10) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Synthesis and characterization of tissue-retainable methylsulfonyl polychlorinated biphenyl isomers. *J. Agric. Food Chem.* 35: 178-182, 1987.

11) 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. *福岡医誌* 84: 243-247, 1993.

12) 原口浩一, 増田義人, 加藤善久, 木村良平: 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. *福岡医誌* 86: 163-168, 1995.

13) Hård T, Barnes HJ, Larsson C, Gustafsson J-Å and Lund J: Solution structure of a mammalian PCB-binding protein in complex with a PCB. *Nature Structural Biology* 2: 983-989, 1995.

14) Kannan N, Schulz DE, Petrick G and Dinker JC: High resolution PCB analysis of Kanechlor, Phenochlor and Sovol mixtures using multidimensional gas chromatography. *Intern. J. Anal. Chem.* 47: 201-215, 1992.

15) 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.* 95: 269-278, 1995.

16) 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.* 95: 257-268, 1995.

17) Kato Y, Haraguchi K, Tomiyasu K, Saito H, Isogai M, Masuda Y and Kimura R: Structure-dependent induction of CYP2B1/2 by 3-methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* in press 1997.

18) Larsen GL, Huwe JK, Bergman Å, Klasson-Wehler E and Hargis P: Methylsulfonyl metabolites of xenobiotics can serve as ligands for fatty acid binding proteins in chicken liver and intestinal mucosa. *Chemosphere* 25: 1189-1194, 1992.

19) Larsen GL, Bergman Å, Klasson-Wehler E, Bass NM: A methylsulfonyl metabolite of a polychlorinated biphenyl can serve as a ligand for liver fatty acid binding protein in rat intestinal mucosa. *Chem.-Biol. Interact.* 77: 315-323, 1991.

20) Lund J, Brandt I, Poellinger L, Bergman Å, Klasson-Wehler E and Gustafsson J-Å: Target cells for the polychlorinated biphenyl metabolite 4,4'-bis (methylsulfonyl)-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Mol. Pharmacol.* 27: 314-323, 1985.

21) Norén K, Lundén Å, Pettersson E and Bergman Å: Methylsulfonyl metabolites of PCBs and DDE in human milk in Sweden, 1972-1992. *Environ. Health Perspect.* 104: 766-772, 1996.

22) Preston BD, Miller JA and Miller EC: Reactions of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl 3,4-oxide with methionine, cysteine and glutathione in relation to the formation of methylthio-metabolites of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl in the rat and mouse. *Chem.-Biol. Interact.* 50: 289-312, 1984.

23) 高菅卓三, 井上毅, 大井悦雅: 各種クリーンアップ法と HRGC/HRMS を用いたポリ塩化ビフェニル (PCBs) の全異性体詳細分析方法. *環境化学* 5: 647-675, 1995.

(受付 1997-3-18)

ラットにおける PCB, PCDF 及び PCDD の消化管吸収に及ぼす抹茶の効果

福岡県保健環境研究所
森田 邦正・松枝 隆彦・飯田 隆雄

Effect of Green Tea (Matcha) on Gastrointestinal Tract Absorption of Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzofurans and Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins in Rats

Kunimasa MORITA, Takahiko MATSUEDA and Takao IIDA

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

This paper presents the liver distribution and fecal excretion of polychlorinated biphenyls (PCB), polychlorinated dibenzofurans (PCDF) congeners and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) congeners, in male rats fed with powdered green tea (matcha). The rats were given a treatment diet containing 10% matcha for the first five days. Then, the animals were administered 4g of 10% matcha diet containing 0.5ml of the casual rice-bran oil of Yusho that had occurred in the Southwest part of Japan in 1968 and kept on the same diet for another five days. The fecal excretion of PCB, PCDF and PCDD in the group fed with 10% matcha were 4.4, 2.4~9.1 and 2.5~4.7 times higher ($p<0.01$), respectively, than that in the control group. The liver distribution of PCB, PCDF and PCDD in the same groups were 79%, 20~75% and 26~67% of the control group, respectively. These findings suggest that administration of matcha is useful as a treatment of Yusho patients exposed to PCB, PCDF and PCDD.

はじめに

茶はツバキ科の常緑樹である。中国種は緑茶用に、アッサム種は紅茶やウーロン茶の製造に用いられ、嗜好品として世界中に広く普及し、飲用されてきた。紅茶、ウーロン茶は発酵茶であるのに対して、緑茶は加熱することにより、茶葉中の酵素を失活させ、成分の酵素による変化を防いでつくられた緑色を保つ不発酵茶である。この他に、緑茶は栽培法及び製造法の違いで、煎茶、玉露、番茶、抹茶等に分けられている⁸⁾。最近、茶葉に多量（乾燥重量当たり 10~18%）に含まれるポリフェノール化合物のカテキン類には抗酸化作用、抗腫瘍作用があることがわかり⁹⁾¹⁰⁾、その機能性について大きな期待が寄せられている。

1968 年、西日本地域でライスオイルの脱臭工程で用いられた熱媒体がライスオイルに混入する PCB 中毒

症（油症）が発生した¹⁷⁾。その油症原因ライスオイルには、PCB、Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) 及び Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) が混入していたことが明らかにされている⁴⁾。ダイオキシン類（PCDF 及び PCDD）の中で、2,3,7,8-位に塩素が置換した同族体は難代謝物で、きわめて残留性が高いため⁶⁾、最近の患者の母乳⁷⁾、脂肪組織³⁾中に、2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (P_5 CDF), 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (H_6 CDF) 及び 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin (H_6 CDD) が健常者よりかなり高い濃度で検出されている。

また、ダイオキシン類はゴミ焼却炉等から発生する世界的な環境汚染物質である。それゆえに、食品¹⁶⁾を経由して摂取され、健常者の脂肪組織、母乳から微量であるが検出されている³⁾¹⁷⁾。1996 年、厚生省はダイオキシン類の摂取許容量（耐容 1 日摂取量）を 10 pg/kg/日

と設定した。これは高山らが¹⁵⁾食品を分析し報告した、日本人の摂取量 3.5 pg/kg/日とかなり近似した数値である。

ダイオキシン類の人体汚染を未然に防ぐにはその吸収を阻止すること、さらに、体内に蓄積したダイオキシン類を積極的に排除することが大切である。著者らはダイオキシン類の体外排除を目的に、食物繊維が PCDF の吸収及び再吸収に及ぼす影響を調べた¹⁰⁾¹¹⁾、その結果、食物繊維は消化管内で PCDF の吸収及び再吸収を抑制し、PCDF を体外へ排出することがわかった。しかし、このような機能が緑茶にあるかについては明らかにされていない。そこで、抹茶を用いて PCB, PCDF 及び PCDD の吸収抑制効果を検討した。

実験方法

1. 実験材料

抹茶は丸久小山元次郎商店(株)製の雲鶴を用いた。

油症原因ライソオイルは油症患者から提供された未使用のものを使用した。Table 1 に、実験方法 3 に準じて定量した PCB, PCDF 及び PCDD 濃度を示す。

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(株)製の残留農薬試験用を使用した。硝酸銀シリカゲルは硝酸銀 10 g に水 5 ml を加えて加温して溶かし、これにメルク社製の Kieselgel 60 (70~230 mesh) 85 g を加え、振り混ぜたのち一夜放置したものをを用いた。その他の試薬は特級品を使用した。

2. 動物実験

ラットはセアック吉富(株)から 5 週齢の Wistar 系雄ラットを購入し、ラットの餌のカゼイン、ミネラル (Harper 配合)、ビタミン (Harper 配合) はオリエンタル酵母(株)製を用いた。

体重約 122 g のラットを 1 群 4 匹として 2 群に分け、Table 2 に示す食餌組成の飼料を与えた。5 日間予備飼育後、一夜絶食させ、それぞれの飼料 4 g に油症原因ライソオイル 0.5 ml を添加してラットに投与した。飼料を完全に摂取させた後(約 5 時間)、引き続き、同じ飼料で 5 日間飼育した。ラットは代謝ケージに 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 5 日分を採取し、70°C で一夜乾燥し重量を秤量した。

Table 1 Concentrations of PCB, PCDF and PCDD in the Rice-bran Oil used by Yusho Patients

	ng/g	ng/ml
PCB	853000	780000
2, 3, 7, 8-T ₄ CDF ^{a)}	501.6	458.7
1, 2, 3, 7, 8-P ₅ CDF ^{b)}	554.3	506.9
2, 3, 4, 7, 8-P ₅ CDF	877.4	802.4
1, 2, 3, 4, 7, 8-H ₆ CDF ^{c)}	822.6	752.3
1, 2, 3, 6, 7, 8-H ₆ CDF	128.9	117.8
1, 2, 3, 7, 8, 9-H ₆ CDF	11.9	10.9
2, 3, 4, 6, 7, 8-H ₆ CDF	224.3	205.1
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H ₇ CDF ^{d)}	321.9	294.4
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-H ₇ CDF	16.9	15.4
1, 2, 3, 7, 8-P ₅ CDD ^{e)}	7.5	6.9
1, 2, 3, 4, 7, 8-H ₆ CDD ^{f)}	5.6	5.1
1, 2, 3, 6, 7, 8-H ₆ CDD	34.3	31.4
1, 2, 3, 7, 8, 9-H ₆ CDD	24.5	22.4
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H ₇ CDD ^{g)}	133.0	121.7

a) Tetrachlorodibenzofuran.

b) Pentachlorodibenzofuran.

c) Hexachlorodibenzofuran.

d) Heptachlorodibenzofuran.

e) Pentachlorodibenzo-*p*-dioxin.

f) Hexachlorodibenzo-*p*-dioxin

g) Heptachlorodibenzo-*p*-dioxin.

3. 糞及び肝臓中の PCB, PCDF 及び PCDD の定量
糞は円筒のガラス繊維製ろ紙に入れ、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、クロロホルムで 50 ml に定容した。肝臓はメタノール 32 ml, クロロホルム 16 ml を加え、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吸引ろ過後、さきのろ液と合わせた。ろ液を分液ロートに入れ静置後、クロロホルム層を分取し無水硫酸ナトリウムで脱水した後、約 30 ml まで濃縮し、クロロホルムで 50 ml に定容した。

PCB の定量には糞の抽出液 0.5~3 ml 及び肝臓の抽出液 2 ml をそれぞれ 10 ml の試験管にとり、濃縮乾固した。これに 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 及び 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、約 2 g の無水硫酸ナトリウムで脱水した。ヘキサン抽出液は約 1 ml まで濃縮し、0.8 g の硝酸銀シリカゲルカラム (7 mm ϕ) 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。ガスクロマトグラフは島津製作所製 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, 80~100 mesh) の充填剤を 2.1 m $\times$ 2.6 mm ϕ 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。

PCDF 及び PCDD の定量には糞の抽出液 2~8 ml 及び肝臓の抽出液を 2 ml をそれぞれ 10 ml の試験管にとり濃縮乾固し、ヘキサン 1 ml を加えた。これに ^{13}C -2,3,4,7,8, P_5 CDF を 288 pg, その他の 2,3,7,8-位に塩素が置換した 4-7 塩化体の内標準物質を 200 pg 添加し、1 N 水酸化カリウムエタノール溶液 1 ml を加え室温で一晩アルカリ分解した。これにヘキサン 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、硫酸 2 ml で 5 回処理した。このヘキサン溶液を 0.8 g の硝酸銀シリカゲルカラム (7 mm ϕ) に注入し、ヘキサン 8 ml で溶出し、溶出液を 1 ml に濃縮した。さらに 0.6 g のフロリジルカラム (7 mm ϕ) にかけるヘキサン 4 ml で PCB を、続いてジクロロメタン 8 ml で PCDF 及び PCDD を溶出した。溶出液は乾固し、ノナン 15 μ l を加え試料液とした。PCDF 及び PCDD はスペルコ社製 SP-2331 のキャピラリーカラム (0.32 mm $\times$ 30 m) を装着した

GC-MS (HEWLETT PACKARD 5890-FINNIGAN MAT-95) を用いて分解能 7000 に設定して Selected Ion Monitoring (SIM) 法で定量した。

実 験 結 果

1. 試験飼料の飼料摂取量, 体重及び肝臓重量に及ぼす影響

本研究では抹茶投与群と比較するため、抹茶を含まない基本食投与群をコントロールに用いた。飼料組成は Table 2 に示すように、抹茶量をグラニュー糖で補正し、そのほかの組成は 2 群とも同一にした。その結果、抹茶群の飼料摂取量, 体重増加量及び肝臓重量は基本食群と比べて有意な差は認められなかった (Table 3), 10% 抹茶飼料を摂食することにより、ラットの成長に特に影響はみられなかったが、5 日間の予備飼育期間を通じて、若干飼料摂取量が少ないことが観察された。

2. PCB, PCDF 及び PCDD の糞中排泄に及ぼす抹茶の効果

油症原因ライスオイル投与後 5 日間の PCB, PCDF 及び PCDD の糞中排泄量を Table 4 に示す。PCB 排泄量は基本食群で投与量の 1.4%, 抹茶群で 6.1% と、抹茶群では 4.4 倍の有意な排泄増加が認められた

Table 2 Composition of diet (g/100 g)

Components	Basal	Matcha
Sucrose	70	60
Casein	20	20
Corn oil	5	5
Mineral mixture	4	4
Vitamin mixture	0.85	0.85
Choline chloride	0.15	0.15
Matcha	0	10

Table 3 Effect of diets on food intake, body weight gain and liver weight of rats

Diet	Food intake (g/5days)	Body weight gain (g/5days)	Liver weight (g/100g B.W.)
Basal diet	95.1 $\pm$ 4.7	53.8 $\pm$ 3.2	8.7 $\pm$ 0.9
10% Matcha	80.3 $\pm$ 9.6	53.2 $\pm$ 11.0	8.0 $\pm$ 0.6

Values represent the mean $\pm$ S.D. for four rats.

Table 4 Effect of matcha on fecal excretion of PCB, PCDF and PCDD in rats

	Excretion (% of dose)	
	Basal diet	10% Matcha diet
PCB	1.4±0.5 (1.0)	6.1± 1.5 ^{a)} (4.4)
2,3,7,8-T ₄ CDF	0.4±0.2 (1.0)	3.7± 0.5 ^{a)} (9.0)
1,2,3,7,8-P ₅ CDF	1.9±0.5 (1.0)	17.3± 2.2 ^{a)} (9.1)
2,3,4,7,8-P ₅ CDF	3.7±1.2 (1.0)	23.8± 4.2 ^{a)} (6.5)
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDF	12.4±3.0 (1.0)	57.3±10.6 ^{a)} (4.6)
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDF	11.7±2.8 (1.0)	50.7± 8.6 ^{a)} (4.3)
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDF	14.2±1.7 (1.0)	37.2± 8.3 ^{a)} (2.6)
2,3,4,6,7,8-H ₆ CDF	10.9±2.5 (1.0)	45.7± 7.6 ^{a)} (4.2)
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDF	36.9±8.5 (1.0)	89.1±15.7 ^{a)} (2.4)
1,2,3,4,7,8,9-H ₇ CDF	22.5±3.4 (1.0)	67.6±11.4 ^{a)} (3.0)
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	4.5±1.1 (1.0)	21.0± 2.8 ^{a)} (4.7)
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	13.1±5.3 (1.0)	48.4± 8.8 ^{a)} (3.7)
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD	15.0±5.2 (1.0)	53.9±10.5 ^{a)} (3.6)
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	19.8±5.3 (1.0)	68.4±11.2 ^{a)} (3.5)
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	31.6±5.4 (1.0)	78.6±13.0 ^{a)} (2.5)

Values represent the mean ± S.D. for four rats and numbers in parenthesis show ratio to basal diet group.

a) Significantly different from basal diet group ($p<0.01$).

($P<0.01$).

PCDF について、抹茶群と基本食群を比べると、抹茶群の 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (T₄CDF) 排泄量は 9.0 倍, 1,2,3,7,8-P₅CDF で 9.1 倍, 2,3,4,7,8-P₅CDF で 6.5 倍, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF で 4.6 倍, 1,2,3,6,7,8-H₆CDF で 4.3 倍, 1,2,3,7,8,9-H₆CDF で 2.6 倍, 2,3,4,6,7,8-H₆CDF で 4.2 倍, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzofuran (H₇CDF) で 2.4 倍, 1,2,3,4,7,8,9-H₇CDF で 3.0 倍となり ($P<0.01$), 9 種類の PCDF で、抹茶群は基本食群の 2.4~9.1 倍排泄量が増加した。

PCDD について、抹茶群と基本食群を比べると、抹茶群の 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (P₅CDD) 排泄量は 4.7 倍, 1,2,3,4,7,8-H₆CDD で 3.7 倍, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD で 3.6 倍, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD で 3.5 倍, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin (H₇CDD) で 2.5 倍となり ($P<0.01$), 5 種類の PCDD で、抹茶群は基本食群の 2.5~4.7 倍排泄量が増加した。

3. PCB, PCDF 及び PCDD の吸収に及ぼす抹茶の効果

Table 4 に示した 5 日間の糞中排泄量を未吸収分と考えると、一夜絶食時に PCB, PCDF 及び PCDD を飼料に添加して投与した時の消化管吸収率は、基本食群の場合、PCB で 98.6%, 9 種類の PCDF で 63.1~99.6%, 5 種類の PCDD で 68.4~95.5% であった。抹茶群の基本食群に対する吸収抑制率[(基本食群の吸収率-抹茶群の吸収率)/基本食群の吸収率×100]を計算すると、PCB で 4.8%, 2,3,7,8-T₄CDF で 3%, 1,2,3,7,8-P₅CDF で 16%, 2,3,4,7,8-P₅CDF で 21%, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF で 51%, 1,2,3,6,7,8-H₆CDF で 44%, 1,2,3,7,8,9-H₆CDF で 27%, 2,3,4,6,7,8-H₆CDF で 39%, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF で 83%, 1,2,3,4,7,8,9-H₇CDF で 58%, 1,2,3,7,8-P₅CDD で 17%, 1,2,3,4,7,8-H₆CDD で 41%, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD で 46%, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD で 61%, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD で 69% であった。抹茶群の吸収抑制率について、PCDF 及び PCDD の塩素の置換数を比較した場合、塩素置換数が多い方が少ないものより吸収抑制率が高い傾向を示した。

4. PCB, PCDF 及び PCDD の肝臓分布に及ぼす抹茶の効果

油症原因ライスオイル投与5日後のラット肝臓中のPCB, PCDF 及び PCDD 量を Table 5 に示す。PCB の分布量は、抹茶群で投与量の0.63%, 基本食群で0.80%と、抹茶群では基本食群の79%であり、21%の分布低下が認められた。

基本食群に対する抹茶群のPCDF 分布低下量を計算すると、2,3,7,8- T_4 CDF で38%, 1,2,3,7,8- P_5 CDF で62%, 2,3,4,7,8- P_5 CDF で25%, 1,2,3,4,7,8- H_6 CDF で64%, 1,2,3,6,7,8- H_6 CDF で67%, 1,2,3,7,8,9- H_6 CDF で80%, 2,3,4,6,7,8- H_6 CDF で60%, 1,2,3,4,6,7,8- H_7 CDF で79%, 1,2,3,4,7,8,9- H_7 CDF で70%の分布低下がみられた。

一方、PCDD の分布低下量は、1,2,3,7,8- P_5 CDD で33%, 1,2,3,4,7,8- H_6 CDD で63%, 1,2,3,6,7,8- H_6 CDD で44%, 1,2,3,7,8,9- H_6 CDD で59%, 1,2,3,4,6,7,8- H_7 CDD で74%抹茶群が基本食群より低下した。Table 4 に示したように、抹茶群ではPCB, PCDF 及び PCDD の糞中排泄量が増加し、吸収量が低下したことにより、その肝臓分布量はPCB で基本食群の79%、

9種類のPCDF で20~75%及び5種類のPCDD で26~67%に低下していた。

考 察

食物経由の暴露量を評価するには、人のPCB, PCDF 及び PCDD の消化管吸収率を知ることがきわめて大切なことであるが、それを正確に出すことは難しい。Abraham らは母乳を与えた乳児(5ヶ月)から、糞便を採取し、PCB, PCDF 及び PCDD の排泄量を測定した¹⁾、その結果、糞中排泄量は摂取量に対して、PCB で1.2~1.5%, 2,3,7,8- T_4 CDF で約4%, 1,2,3,7,8- P_5 CDF で約3%, 2,3,4,7,8- P_5 CDF で約5%, 1,2,3,4,7,8- H_6 CDF で約10%, 1,2,3,6,7,8- H_6 CDF で約11%, 2,3,4,6,7,8- H_6 CDF で約9%, 1,2,3,4,6,7,8- H_7 CDF で約49%, 1,2,3,7,8- P_5 CDD で約6%, 1,2,3,4,7,8- H_6 CDD が約12%, 1,2,3,6,7,8- H_6 CDD が約9%, 1,2,3,7,8,9- H_6 CDD で約20%, 1,2,3,4,6,7,8- H_7 CDD で約38%であったと報告している。これをラットの場合と比べると (Table 4), 基本食群のPCB, PCDF 及び PCDD 排泄量は乳児のそれとかなり近い値であることかわかる。このことから、人とラ

Table 5 Effect of matcha on liver distribution of PCB, PCDF and PCDD in rats.

	Liver distribution at day 5 (% of dose)	
	Basal diet	10% Matcha diet
PCB	0.80±0.22 (100)	0.63±0.10 (79)
2,3,7,8- T_4 CDF	0.83±0.17 (100)	0.52±0.08 (62)
1,2,3,7,8- P_5 CDF	3.5 ±0.7 (100)	1.3 ±0.1 ^{a)} (38)
2,3,4,7,8- P_5 CDF	62.8 ±3.6 (100)	47.0 ±1.5 ^{a)} (75)
1,2,3,4,7,8- H_6 CDF	59.5 ±3.4 (100)	21.2 ±1.5 ^{a)} (36)
1,2,3,6,7,8- H_6 CDF	57.9 ±5.6 (100)	19.4 ±2.0 ^{a)} (33)
1,2,3,7,8,9- H_6 CDF	21.0 ±1.0 (100)	4.2 ±1.2 ^{a)} (20)
2,3,4,6,7,8- H_6 CDF	46.9 ±4.1 (100)	18.6 ±2.2 ^{a)} (40)
1,2,3,4,6,7,8- H_7 CDF	46.9 ±4.9 (100)	9.9 ±1.4 ^{a)} (21)
1,2,3,4,7,8,9- H_7 CDF	37.6 ±4.0 (100)	11.3 ±1.7 ^{a)} (30)
1,2,3,7,8- P_5 CDD	42.3 ±4.9 (100)	28.5 ±2.4 ^{a)} (67)
1,2,3,4,7,8- H_6 CDD	50.3 ±2.0 (100)	18.4 ±3.1 ^{a)} (37)
1,2,3,6,7,8- H_6 CDD	56.8 ±3.2 (100)	31.5 ±2.1 ^{a)} (56)
1,2,3,7,8,9- H_6 CDD	49.2 ±2.9 (100)	20.3 ±2.2 ^{a)} (41)
1,2,3,4,6,7,8- H_7 CDD	42.3 ±6.2 (100)	11.1 ±1.9 ^{a)} (26)

Values represent the mean ± S.D. for four rats and numbers in parenthesis show ratio to basal diet group.

a) Significantly different from basal diet group ($p<0.01$).

ットでは PCB, PCDF 及び PCDD の消化管吸収率が極めて高いことが示唆される。

著者らは米ぬか繊維等を製造し、ラットを用いて PCB⁹⁾, PCDF¹¹⁾ 及び PCDD¹²⁾ の糞中排泄について検討した。さらに、クロレラ、スピルリナ及びクロロフィリンの効果をもぬか繊維と比較した¹³⁾。その結果、米ぬか繊維はごぼう、大豆、キャベツなどの繊維と比べて PCB, PCDF 及び PCDD 排泄量の増加が認められた⁹⁾¹¹⁾¹²⁾。さらに、クロレラ、スピルリナ及びクロロフィリンは米ぬか繊維より良好な PCDD 排泄量の増加が認められた¹³⁾。

抹茶と米ぬか繊維を比較した場合、PCB の排泄効果は抹茶群が基本食群の 4.4 倍、米ぬか繊維が基本食群の 6.6 倍と増加し、抹茶群では、米ぬか繊維よりわずかに低い糞中排泄（吸収抑制）効果が認められた。

2,3,7,8-T₄CDF, 2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF 及び 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF の排泄効果は、抹茶群が基本食群のそれぞれ 9.0, 6.5, 4.6, 2.4 倍であったのに対し、米ぬか繊維では基本食群のそれぞれ 11.3, 4.1, 2.1, 1.5 倍に増加した。抹茶群は、2,3,7,8-T₄CDF を除いて、米ぬか繊維より高い排泄増加（吸収抑制効果）が認められた。

1,2,3,7,8-P₅CDD, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD 及び 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD の排泄効果は、抹茶群が基本食群のそれぞれ 4.7, 3.6, 3.5, 2.5 倍に増加した。これに対し、米ぬか繊維では基本食群のそれぞれ 3.3, 2.1, 1.9, 1.6 倍となり、さらに、クロレラでは基本食群のそれぞれ 7.4, 4.4, 3.2, 2.6 倍に増加した。このことから、抹茶の吸収抑制（糞中排泄）効果は、PCB で米ぬか繊維より低く、PCDF 及び PCDD で米ぬか繊維とクロレラの間の効果と思われる。

緑茶にはカテキン類の他、カフェイン、ビタミン C、ビタミン E、β-カロチン等さまざまな生理機能を有する成分が含まれている⁸⁾。抹茶の効果をすべて明らかにしたわけではないが、吸収抑制の要因として、二つのことが考えられる。一つは、*in vitro* において食物繊維は 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl, 2,3,4,7,8-P₅CDF 及び 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin を吸着する作用があることから⁹⁾、抹茶を摂食すると、抹茶に含まれる食物繊維が、消化管内でその吸着作用に

より PCB, PCDF 及び PCDD の吸収を阻害し、糞中に排泄していると考えられる。もう一つは、クロロフィル誘導体のクロロフィリンは、ヘテロサイクリックアミンと複合体を形成することが知られていることから²¹⁾⁴⁾、抹茶に含まれるクロロフィルが平面構造を持つ PCDF 及び PCDD と複合体を形成し、その消化管吸収を阻害したことに由来していると考えられる。それゆえに、食物繊維とクロロフィルの両者の作用が、PCB, PCDF 及び PCDD の吸収抑制に深く関与していると推測される。

私たちは日常、様々な体外異物に暴露されて生活している。しかし、私たちは体内に侵入した体外異物を体内除去、あるいは代謝により、かなりの量を体外除去する機構を有している。抹茶あるいは緑茶を飲用することにより、食品経路で侵入してきた PCB, PCDF 及び PCDD を消化管内で捕捉し体外排泄し、さらに、消化管内に排出された PCB, PCDF 及び PCDD の再吸収を抑制できれば、体内分布量を減少させることができる。

総 括

日常嗜好品として飲用されてきた抹茶について、ラットを用いて、PCB, PCDF 及び PCDD の吸収抑制と肝臓分布に対する効果について検討した。

1) 10%抹茶群は基本食群に対して、PCB の消化管からの吸収を 4.8%抑制することにより、その糞中排泄量を 4.4 倍上昇させ ($P<0.01$)、肝臓分布量を 21%低下させた。

2) 10%抹茶群は基本食群に対して、2,3,7,8-T₄CDF, 1,2,3,7,8-P₅CDF, 2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF, 1,2,3,6,7,8-H₆CDF, 1,2,3,7,8,9-H₆CDF, 2,3,4,6,7,8-H₆CDF, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF 及び 1,2,3,4,7,8,9-H₇CDF の吸収をそれぞれ 3,16,21,51,44,27,39,83,58%抑制することにより、糞中にそれぞれ 9.0, 9.1, 6.5, 4.6, 4.3, 2.6, 4.2, 2.4, 3.0 倍排泄除去し ($P<0.01$)、肝臓分布量をそれぞれ 38, 62, 25, 64, 67, 80, 60, 79, 70%低下させた。

3) 10%抹茶群は基本食群に対して、1,2,3,7,8-P₅CDD, 1,2,3,4,7,8-H₆CDD, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD 及び 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD の

吸収をそれぞれ17, 41, 46, 61, 69%抑制することにより、糞中にそれぞれ4.7, 3.7, 3.6, 3.5, 2.5倍排泄増加し ($P < 0.01$), 肝臓分布量をそれぞれ33, 63, 44, 59, 74%低下させた。

謝 辞

本研究は厚生科学研究費補助金(熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究)に負うものである。ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) Abraham K, Hille A, Ende M and Heige H: Intake and fecal excretion of PCDDs, PCDFs, HCB and PCBs in a breast-fed and formula-fed infant. *Chemosphere*. 29: 2279-2286, 1994.
- 2) Dashwood RH: Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo (4, 5-f) quinoline (IQ) to rat liver DNA. *Carcinogenesis*. 13: 113-118, 1992.
- 3) 平川博仙, 松枝隆彦, 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克巳, 長山淳哉, 永田武明: 油症患者及び対照者の皮下脂肪組織中のCoplanar PCBs, PCDFs及びPCDDs. 福岡医誌 82: 274-279, 1991.
- 4) 榎本隆, 宮田秀明, 高山幸司, 尾垣淳治: 高分解能MS-SIM法による油症患者組織および原油中のPCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs. 福岡医誌 78: 325-336, 1987.
- 5) Kono S, Ikeda M, Tokudome S and Kuratsune M: A case-control study of gastric cancer and diet in Northern Kyushu, Japan. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 1067-1074, 1988.
- 6) 増田義人, 原口浩一, 黒木広明: 台湾および福岡油症患者の血液中PCDF及びPCBの25年間の濃度推移. 福岡医誌 86: 178-183, 1995.
- 7) 松枝隆彦, 飯田隆雄, 平川博仙, 深町和美, 常盤寛, 長山淳哉: 油症患者及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.
- 8) 松村敬一郎編: 茶の科学, 朝倉書店, 1991.
- 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) 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及びPCDD排泄促進効果. 福岡医誌 84: 273-281, 1993.
- 11) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄: PCDFの糞中排泄および肝臓分布に対する食物繊維の効果. 福岡医誌 86: 218-225, 1995.
- 12) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄: ラットにおけるPolychlorinated Dibenzo-*p*-dioxinsの糞中排泄に対する食物繊維の効果. 衛生化学 43: 35-41, 1997.
- 13) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄: ラットにおけるPolychlorinated Dibenzo-*p*-dioxinsの糞中排泄に対するクロレラ, スピルリナ及びクロロフィリンの効果. 衛生化学 43: 42-47, 1997.
- 14) Negishi T, Arimoto S, Nishizaki C and Hayatsu H: Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido (4, 3-b) indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis*. 10: 145-149, 1989.
- 15) 高山幸司, 宮田秀明, 青笹治, 味村真弓, 榎本隆: 日本における食事経由のダイオキシン関連物質の摂取量. 食衛誌 32: 525-532, 1991.
- 16) 高山幸司, 宮田秀明, 味村真弓, 榎本隆: 日本の沿岸魚及び市販魚中のPCDDs, PCDFs及びCoplanar PCBs. 衛生化学 37: 125-131, 1991.
- 17) 塚本久雄, 吉村英敏: ライスオイル中毒症(いわゆる油症) 特にその原因毒物の化学的究明について. 衛生化学 15: 213-218, 1969.
- 18) Wang ZY, Huang MT, Lou YR, Xie JG, Reuhl KR, Newmark HL, Ho CT, Yang CS and Conney AH: Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Res.* 54: 3428-3455, 1994.

(受付 1997-3-27)

油症患者 83 名の血液中 PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs 濃度

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

Concentrations of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in Blood of 83 Patients with Yusho

Takao IIDA, Hironori HIRAKAWA, Takahiko MATSUEDA
and Reiko NAKAGAWA

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

Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs) and total polychlorinated biphenyls (PCBs) were analyzed in blood samples from 83 Yusho patients and 39 normal control subjects in 1995. The average concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in the blood of Yusho patients were 14, 128 and 14 pg toxic equivalent quantity (TEQ)/g lipid, respectively. The levels of these compounds in the blood of normal subjects were 14, 10 and 8 pg/g lipid, respectively. Thus, although the average levels of PCDDs and Co-PCBs in the blood of Yusho patients were similar to those of control subjects, the PCDF level in Yusho patients was 12.8 fold higher than in normals. Average concentrations of total PCBs in the blood of Yusho patients and normal control subjects were 789 and 339 ng/g lipid, respectively. Thus, the PCB level in the blood of Yusho patients was 2.3 fold higher than in normal subjects.

To test the reproducibility of determination of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs, three normal blood samples were analyzed twice. These analyses gave similar results each time. Since, these compounds could be measured in five-milliliter blood samples, they can be monitored in Yusho patients.

はじめに

1968 年製造工程で熱媒体として使用された polychlorinated biphenyls (PCBs) が混入したライスオイルによる中毒事件 (油症) が発生した⁷⁾. この中毒による患者 (油症患者) は約 2000 名であり, 油症患者の検診が毎年継続的に行われている. 増田ら⁸⁾ は油症患者の血中 PCBs 濃度は健常者に比べて高値であり, また, そのガスクロマトグラムピークパターン (GC パターン) が健常者と異なる特異なパターンを示すことを報告した. 1973 年から患者の血中 PCBs 濃度および GC

パターンの追跡調査が開始された. さらに, 1979 年からは血中 PCQs (PCBs の 2 量体) 濃度の調査も追加された. 長山ら¹⁰⁾ は油症患者が摂取したライスオイルから polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) を検出した. また, PCDFs は死亡した患者の脂肪組織や肝臓からも検出された¹¹⁾. 一方, 榎本ら⁹⁾ は患者が使用したライスオイルや患者の組織試料から PCDFs に加えて高毒性の PCDDs および coplanar PCBs (Co-PCBs) をも検出したが, 両者の濃度は PCDFs に比べてはるかに低い濃度であった. これらのことから, 油症をひきおこした主要な原因物質は PCDFs で, PCDDs や Co-

PCBsも油症の発症に関与したと考えられる。われわれは、油症患者から採取した皮下脂肪からPCDFsを検出し、患者体内に多量のPCDFsが長期間残留していることを明らかにした⁴⁾。さらに、これらの患者の体内に残留しているPCDFsはごくわずかながら糞便を介して腸管経由で排泄されており、その排泄量は脂肪組織および血中濃度に比例することを明らかにした⁵⁾。患者体内に残留するPCDFsの追跡調査はきわめて重要であるが皮下脂肪を経年的に試料採取することは不可能である。血中PCDFsの脂質ベース濃度は体内の脂質中のPCDFs濃度とほぼ一致する²⁾。血液試料は比較的容易に採取でき、追跡調査の試料として適当であるが、血中PCDFs濃度は脂肪組織などに比べてきわめて低いので、その測定にはかなり多量の試料(50 ml程度)が必要であった。今回、PCDFsの検出感度をあげるために試料の高濃縮、妨害の除去、回収の確保、操作の簡略化など、分析法の改善を行った結果、5-10 ml程度の血液からPCDFs等の検出が可能となった。1995年に採血した患者83名について血液中のPCDDs、PCDFsおよびCo-PCBsを測定した。対照として、健常者39名についても同様に血中PCDDs、PCDFsおよびCo-PCBsの測定を行った。

実 験 方 法

1. 血液の採取：1995年10-11月に健常者血液は肘静脈から10 mlのヘパリン入り真空採血管5本に約50 gを、油症患者の血液は、肘静脈から10 mlのヘパリン入り真空採血管に約10 g採取し分析するまで4℃以下で保存した。

2. 分析方法

2.1. 血液の脂質抽出

2.1.1. 健常者の血液

血液約50 gを300 ml トールビーカーに秤取しアセトン・ヘキサン (2:1 v/v) 50 mlを加えポリトロンで攪拌混合したのち、石英ろ紙を敷いた桐山ロートに移し吸引ろ過する。ろ紙上の残渣を先のビーカーに移しアセトン・ヘキサン (2:1 v/v) 25 mlおよび水2 mlを加えポリトロンで攪拌混合し混合物を桐山ロートに移し吸引ろ過する。この操作を再度繰り返す。ろ液は300 ml分液ロートに合わせ水100 mlを加え穏やかに混合し、ヘキサン層と水層を分離するまで静置する。水層

を200 ml分液ロートに採りヘキサン60 mlで穏やかに混合して洗う。静置後分離したヘキサン層を先の300 ml分液ロートに合わせ水100 mlで洗う。水層を捨てヘキサン抽出液を無水硫酸ナトリウム10 gで乾燥させる。100 mlナス型フラスコでロータリーエバポレーターで1 ml以下に減圧下濃縮し、少量のヘキサンで秤量ビン(重さ2-3 g)に洗い込み室温で1夜放置して溶媒を留去したのち脂質の重量を測定する。

2.1.2. 患者血液

血液約5 gを50 ml遠沈管に秤取しアセトン・ヘキサン (2:1 v/v) 25 mlを加えポリトロンで攪拌する。2000 rpmで10分間遠心分離し、上層を200 ml分液ロートに移す。沈殿物にアセトン・ヘキサン (2:1 v/v) 25 mlを加え攪拌混合しさらに超音波で混合後、2000 rpmで10分間遠心分離し、上層を先の200 ml分液ロートに合わせる。この操作を再度繰り返す。分液ロートに水100 mlを加え穏やかに混合し、ヘキサン層と水層を分離するまで静置する。水層を200 ml分液ロートに採りヘキサン60 mlで穏やかに混合して洗う。静置後分離したヘキサン層を先の200 ml分液ロートに合わせ水100 mlで洗う。水層を捨てヘキサン抽出液を無水硫酸ナトリウム10 gで乾燥させる。2.1.1 健常者血液の脂質抽出操作と同様の方法で脂質量を求める。

2.2. カラムクリーンアップ

ここで得られた脂質に内部標準 (¹³Cでラベルした10種のPCDDs/PCDFsと3種のCo-PCBs)の混合溶液を加えヘキサン10 ml以下で硝酸銀シリカゲルカラム上に移し、ヘキサン100 mlで溶出させる。溶出液をロータリーエバポレーターで2 ml以下に減圧下濃縮し活性炭カラムに移す。10%ジクロロメタン・ヘキサン50 mlでPCBs等を、次いでトルエン100 mlでPCDFs、PCDDsおよびCo-PCBs等を溶出させる。この溶出液を0.5 ml以下に減圧下濃縮し、常圧・室温下に放置して溶媒を留去する。先細のスピッチに移し乾固させ、n-ノナン5 μlを加えて抽出物を溶解させる。この2.5 μlをガスクロマトグラフマスマススペクトロメーターに注入する。

2.3. ガスクロマトグラフ・マスマススペクトロメーター操作条件

ガスクロマトグラフ：HP 5890 SERIES II

マスマススペクトロメーター：Finnigan MAT-95

カラム：SP 2331 キャピラリーカラム (0.32×60 m；膜厚，0.25 μm)
 分解能：7000-8000
 イオン化電圧：45 eV
 加速電圧：5 KV
 イオン化電流：450 μA

結 果

患者および健常者の血中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度の平均値を Table 1 に示す。PCDDs では 1,2,3,6,7,8-HxCDD が患者 (54 pg/g lipid) の方が健常者 (28 pg/g lipid) に比べて 2 倍程度高いが、他は両者の血中 PCDDs 濃度はほぼ同程度の値であった。次に PCDFs では、2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,2,3,6,7,8-HxCDF の血中濃度 (230, 98 および 30 pg/g lipid) は健常者のそれら (14, 7 および 6 pg/g lipid) と比べて、それぞれ、16, 14 およ

び 5 倍高い値を示した。他の PCDFs は患者と健常者の血中濃度の間には差異は認められなかった。血中 Co-PCBs では、3,3',4,4'-TeCB および 3,3',4,4',5-PeCB 濃度は患者 (19 および 126 pg/g lipid) と健常者 (15 および 107 pg/g lipid) の血中濃度は同程度の値であったが、3,3',4,4',5,5'-HxCB 濃度は患者 (203 pg/g lipid) のほうが、健常者 (61 pg/g lipid) に比べて約 3 倍高い値を示した。さらに、PCDDs および PCDFs は International toxic equivalent factors (TEF)⁽¹²⁾ を、Co-PCBs は WHO European Center for Environment and Health⁽¹⁾ の TEF を用いて 2,3,7,8-TCDD 当量 (TEQ) に換算した患者の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の総 TEQ 濃度は 156 pg/g lipid で健常者の 32 pg/g lipid に対して約 5 倍高い値であった。患者と健常者の血中 PCDDs PCDFs および Co-PCBs の TEQ 濃度を Fig. 1 に示す。この図から分かるように、血中 Co-PCBs の TEQ 濃度は患者、健常者ともに 14

Table 1 Concentration of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in blood of Yusho patients and normal subjects (pg/g lipid)

Congener	Yusho patients		Normal subjects	
	Mean	SD	Mean	SD
2,3,7,8-TCDD	2	2	2	1
1,2,3,7,8-PeCDD	10	6	8	3
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2	3	3	1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	54	41	28	14
1,2,3,7,8,9-HxCDD	4	4	5	3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	23	16	30	15
OCDD	620	716	559	388
2,3,7,8-TCDF	3	3	1	1
1,2,3,7,8-PeCDF	4	3	2	1
2,3,4,7,8-PeCDF	230	297	14	6
1,2,3,4,7,8-HxCDF	98	132	7	4
1,2,3,6,7,8-HxCDF	30	39	6	3
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1	2	2	1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	4	5	5	3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	10	7	7	2
3,3',4,4'-TeCB	19	19	15	7
3,3',4,4',5-PeCB	126	72	107	54
3,3',4,4',5,5'-HxCB	203	177	61	28
Total-TEQ	156	170	32	11
Total PCB(pg/g lipid)	789	663	339	223

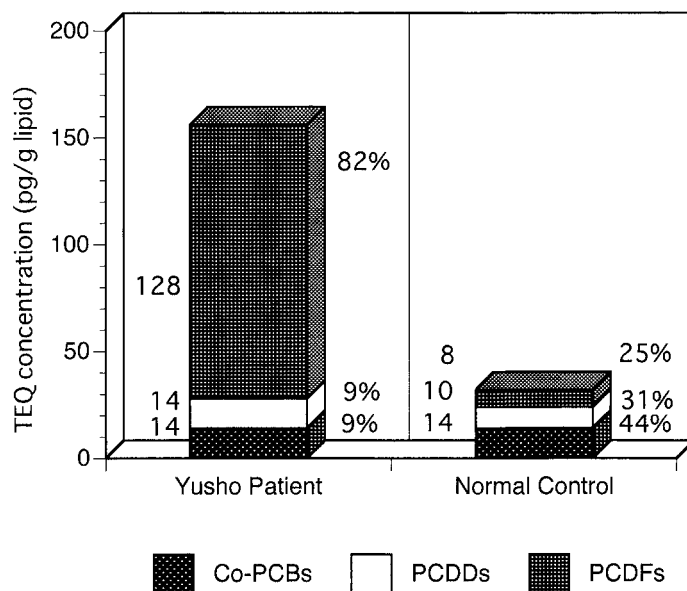


Fig. 1 TEQ concentrations in 83 Yusho patients and 39 normal subjects

pg/g lipidと同じであり、PCDDsも、それぞれ、14 pg/g lipid および 10 pg/g lipid とほとんど同じレベルである。これに対して、血中 PCDFs の TEQ 濃度は患者 128 pg/g lipid、健常者 8 pg/g lipid と患者のほうが健常者に比べて 16 倍高い値を示した。健常者では PCDDs、PCDFs および Co-PCBs の相対比は、それぞれ、31、25 および 44% とほぼ同程度であるのに対し、患者では 9、82 および 9% と PCDFs が非常に大きな割合を占めている。次に、Table 2 に患者 83 名全員の血中の PCDF 濃度 (2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,2,3,6,7,8-HxCDF)、総 TEQ 濃度、PCBs の濃度および GC パターンを 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の高い順に示す。患者 83 名のうち PCBs の GC パターンが A (油症の典型的な GC パターン) を示す患者 28 名、C (健常者とかわらない GC パターン) を示す患者 40 名、B (A と B の中間的 GC パターン) を示す患者 15 名であった。GC パターン A、B および C を示す患者の 2,3,4,7,8-PeCDF の血中濃度 (平均値) は、それぞれ、476、196 および 70 pg/g lipid であり、健常者 (14 pg/g lipid) と比べて、それぞれ、34、14 および 5 倍高い値を示した。Table 2 から分かるように、患者の約半数は GC パターンが A または B である。A、B および C

の血中 PCBs 濃度は、それぞれ、1232、568 および 547 ng/g lipid であり、これらは健常者の値 (339 ng/g lipid) と比べて、それぞれ、3.6、1.7 および 1.6 倍高値であった。GC パターンが A および B の患者の血中 PCDFs は全体として高濃度を示し、これに対して、GC パターンが C の場合はその大部分で血中 PCDFs は低い濃度を示した。しかし、GC パターンが C を示す患者の中にも PCDFs が高い濃度を示すケースがあり、また、GC パターンが B であっても PCDFs 濃度が低い患者もみられた。

Table 3 は健常者 3 名について、血中 PCDFs 濃度などを 2 回繰り返し分析し、その再現性を調べたものである。この表から明らかなように、2 回の繰り返し試験は、ほとんどの PCDDs、PCDFs および Co-PCBs でほぼ一致した値が得られた。1,2,3,4,7,8-HxCDD、1,2,3,7,8,9-HxCDD および 1,2,3,7,8,9-HxCDF ではかなり再現性が悪い場合もあった。これは、これらの化合物の濃度がきわめて低いことに加え、対応する内部標準物質を使用していないことにもよると考えられる。最近、2,3,7,8 の位置が塩素化された PCDDs および PCDFs の内部標準物質が入手できたので、今後、これらの化合物の分析値の再現性は改善されると期待され

Table 2 Concentration of PCDFs, total TEQ and total PCBs in blood of 83 Yusho patients in 1995 (pg/g lipid)

Congener	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2,3,4,7,8-PeCDF	1,797	1,022	953	917	754	659	576	545	540	507	507	490	461	460	455	443	438	417	399	381	380	363
1,2,3,4,7,8-HxCDF	705	404	476	580	252	176	298	298	127	261	208	98	212	145	181	227	332	133	212	148	147	114
1,2,3,6,7,8-HxCDF	145	108	135	182	77	39	69	209	42	70	61	18	76	39	46	51	91	34	60	35	52	51
Total TEQ	1,016	614	590	596	444	389	353	354	313	323	316	281	312	275	281	282	288	253	257	243	266	247
PCB(ng/g lipid)	1,278	1,099	1,778	5,163	1,244	1,180	558	1,742	522	2,487	559	647	1,339	1,187	891	880	1,239	649	1,310	580	1,501	1,340
PCB Pattern	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	C	A	C	A	A	A	A	B	A	A	A	B

Congener	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
2,3,4,7,8-PeCDF	341	331	304	295	294	277	269	237	232	224	208	206	167	167	166	161	159	134	108	105	85	76
1,2,3,4,7,8-HxCDF	107	104	123	123	69	76	119	101	94	228	56	36	22	80	37	159	49	96	47	19	25	30
1,2,3,6,7,8-HxCDF	26	40	33	30	20	18	27	17	15	54	22	18	17	37	15	52	19	30	25	15	11	14
Total TEQ	220	207	204	204	175	176	179	155	152	184	131	136	130	106	118	120	128	118	111	77	72	78
PCB(ng/g lipid)	1,139	812	685	951	714	561	860	595	607	580	883	611	638	855	643	543	2,408	1,079	587	251	539	381
PCB Pattern	C	A	B	C	A	B	B	A	C	A	A	B	A	A	B	A	A	A	B	B	C	A

Congener	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
2,3,4,7,8-PeCDF	72	67	63	62	58	53	40	40	38	33	32	29	27	25	24	24	22	21	20	19	19	19
1,2,3,4,7,8-HxCDF	31	46	23	25	14	25	38	21	9	14	16	34	26	23	9	21	20	15	13	9	4	7
1,2,3,6,7,8-HxCDF	13	15	5	10	13	0	13	9	11	12	12	11	16	12	12	4	13	9	8	7	4	4
Total TEQ	65	87	67	49	62	49	113	62	45	56	51	60	58	71	57	48	44	36	34	30	31	30
PCB(ng/g lipid)	751	607	946	811	516	1,034	613	874	376	552	560	1,141	765	415	566	322	433	286	289	476	245	158
PCB Pattern	C	B	C	C	BC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B

Congener	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	Mean	SD	Min	Max
2,3,4,7,8-PeCDF	18	18	18	18	17	17	17	15	14	14	14	14	13	8	7	7	4	230	297	4	1,797
1,2,3,4,7,8-HxCDF	10	10	20	13	12	15	6	0	6	18	0	5	9	0	6	9	0	98	132	0	705
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0	0	8	0	14	0	7	0	9	4	0	16	0	0	7	0	0	30	39	0	209
Total TEQ	22	47	35	42	28	54	25	28	30	30	25	22	34	19	12	18	12	156	170	168	1,016
PCB(ng/g lipid)	453	408	466	258	616	182	413	747	535	430	411	316	495	377	209	86	216	789	663	86	5,163
PCB Pattern	B	C	C	C	C	C	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Table 3 Reproducibility of determination for PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in blood samples of normal subjects (pg/g lipid)

Congener	T.M.		H.H.		K.H.	
	I	II	I	II	I	II
2,3,7,8-TCDD	3	2	1	1	1	2
1,2,3,7,8-PeCDD	8	8	7	6	6	5
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1	2	3	1	4	1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	25	28	20	16	34	36
1,2,3,7,8,9-HxCDD	7	10	8	7	4	10
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	15	14	24	22	26	27
OCDD	262	244	265	282	410	443
2,3,7,8-TCDF	3	2	1	2	1	1
1,2,3,7,8-PeCDF	3	2	1	1	0	1
2,3,4,7,8-PeCDF	17	17	13	10	12	9
1,2,3,4,7,8-HxCDF	6	9	5	5	3	6
1,2,3,6,7,8-HxCDF	6	7	3	3	4	5
1,2,3,7,8,9-HxCDF	6	2	2	2	4	3
2,3,4,6,7,8-HxCDF	7	5	7	5	8	7
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	5	4	5	5	5	6
3,3',4,4'-TeCB	17	11	11	8	14	8
3,3',4,4',5-PeCB	111	124	92	81	42	39
3,3',4,4',5,5'-HxCB	77	78	48	54	72	72
Total-TEQ	34	35	27	22	21	21

る。また、Co-PCBs のうち 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (TeCB) は 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PeCB) および 3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (HxCB) と比べて再現性が劣る。3,3',4,4'-TeCB は分析操作中に妨害または汚染が起こることがありよい再現性を得ることが困難であるが、TEF(毒性等価係数)が 0.0005 と低いので全体の総 TEQ 濃度には余り大きな影響はない。

考 察

油症発症から 27 年経過した現在も患者の血中 PCB の GC パターンが血中 PCDFs と密接に関連していることを示した。ラットに PCDFs と PCBs を同時に投与すると PCBs の GC パターンが油症患者の GC パターン近づくことが報告されている³⁾。油症患者の血中 PCBs パターンをモニターすることにより PCDFs を直接測定することがきわめて困難であるので、PCB パターンの異常によって PCDFs の存在を推定していた

のである。最近、分析技術の進歩により 50 ml 程度の血液から PCDFs などを検出することができるようになった。健常者の血中 PCDFs などの測定では約 50 ml の血液を用いた。今回患者の調査では血液約 5 ml で PCDFs を検出することが可能であった。これは GC/MS の改良、試料の少量化による前処理効率の向上、その結果前処理操作の省略による回収率の向上および GC/MS への高濃縮試料注入などが実現した。前処理操作も簡略化され処理速度が向上した。PCDFs の存在が血中 PCBs パターンに異常を起こすことに端的に示されるように患者体内の PCDFs は油症の症状を把握する上で最も重要な要素と考えられる。さらに、化学物質の作用はその血中濃度と密接に関係しており、この点からも患者の血中 PCDFs 濃度を追跡調査することはきわめて重要な意義がある。現在、福岡県内の一斉油症検診の受診者は年間約 100 名程度であるので技術的には受診者全員の血中 PCDFs をモニターすることは可能である。このように、血中の PCDDs,

PCDFs および Co-PCBs を測定することにより患者体内に残留する高毒性物質によるリスクの大部分を把握できると考えられた。しかし、最近、増田ら⁹⁾は健常者および患者の血中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs に加えて PCBs 中のビフェニル骨格のオルソの位置が塩素で 1 個または 2 個置換されたモノオルソ-PCBs (m-o-PCBs) およびジオオルソ-PCBs (di-o-PCBs) の測定を行いこれらの化合物を加えた TEQ 評価について報告している。m-o-PCBs および di-o-PCBs の TEF (毒性等価係数) は 0.00001-0.0005 と余り大きなものではないが、これらの化合物の濃度は PCDFs などと比べてかなり高いので、報告された値から健常者では m-o-PCBs および di-o-PCBs の総 TEQ 濃度に占める割合は健常者で 27, 30 および 34%, 患者で 14, 16, 25 および 51% となる。すなわち、健常者では m-o-PCBs および di-o-PCBs の総 TEQ に対する割合は約 30% であるが、患者では 14-51% とかなりバラツキがあり、総 TEQ 濃度の半分を占めるケースもある。今後、油症患者のモニターに m-o-PCBs および di-o-PCBs も加える必要があると思われる。

総 括

1. 油症患者の血中の 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,2,3,6,7,8-HxCDF 濃度は健常者と比べて、平均値で、それぞれ、16, 14 および 5 倍高い値を示した。
2. 血中 PCBs の GC パターンは血中 PCDFs 濃度と密接に関係していることが示された。しかし、血中 PCBs の GC パターンが健常者とかわらない (C タイプ) 患者でも血中 PCDFs 濃度が高い値を示す例も認められた。
3. 血液約 5 ml で PCDFs 濃度の測定が可能であった。このことから患者の血中 PCDFs の追跡調査は可能と考えられる。

本研究は平成 7 および 8 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) 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.

3) 堀 伸二郎, 宮田秀明, 前田浩一郎, 村上保行, 榎本 隆: 油症原因油投与マウスにおける PCB の質的变化. 大阪府公衆衛生研究所報, 食品衛生編 8 101-110, 1983.

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

5) 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.

6) 榎本 隆, 宮田秀明, 高山幸司, 尾垣淳治: 高分解能 MS-SIM 法による油症患者組織および油症原因油中の PCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs. 福岡医誌, 78: 325-336, 1987.

7) 勝木司馬之助: 序言. 福岡医誌 60: 403-406, 1969.

8) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 高田真由美, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中ポリ塩化ビフェニール. 福岡医誌 65: 25-27 1974.

9) Masuda Y, Schecter A and Papke O: Concentration of PCDs, PCDFs and PCDDs in the blood of Yusho patients and their toxic equivalent contribution. Organohalogen compounds. 30: 146-149, 1996.

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

11) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with Yusho. Fd. Cosmet. Toxicol. 15: 9-13 1977.

12) 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.
(受付 1997-4-15)

油症患者の皮脂および血液中の PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs 濃度

福岡県保健環境研究所

飯田 隆雄・平川 博仙

松枝 隆彦・堀 就英

九州大学医学部皮膚科学教室

中尾 知子・中山 樹一郎

Levels of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in Sebum and Blood of Yusho Patients

Takao IIDA, Hironori HIRAKAWA, Takahiko MATSUEDA
and Tsuguhide HORI

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

Tomoko NAKAO and Juichiro NAKAYAMA

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

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and its related compounds such as polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) can be detected in the body in Yusho patients, a condition caused by ingestion of contaminated rice oil with these compounds. These compounds are excreted out of the body in small amounts directly in the feces from the wall of the intestine. We found the PCDDs, PCDFs and coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs) in the sebum of Yusho patients and normal subjects, and there was significant correlation between their concentrations in sebum and blood in both patients and normal control subjects. The concentration of TEQ (toxic equivalent quantity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: TCDD) in sebum of Yusho patients (106 pg/g lipid) was half that in the blood (215 pg/g lipid), while that of normal subjects (29 pg/g lipid) was similar to that in the blood (34 pg/g lipid). On the other hand, in Yusho patients the concentrations of TEQ in the sebum and in blood were 2.3 and 6.4 fold higher than those in normal subjects. We concluded that dioxins and its related compounds in Yusho patients and normal subjects were excreted not only in the feces but also in the sebum.

はじめに

汚染されたライスオイルを摂食した油症患者の体内には PCDFs 等の油症原因物質が今なお残留していることが知られている²⁾⁴⁾⁵⁾。油症患者体内に残留している PCDFs 等の油症原因物質は極く少量ではあるが糞便中へ排泄されている⁶⁾。油症原因物質の体外排出は

この腸管経由の他に皮脂などを介して直接皮膚からの体外排出が考えられる。今回、患者の顔面皮脂中の油症原因物質濃度を測定することにより皮脂中への PCDFs 等の排出を把握し、また、それらの血中濃度との相関関係について検討した。さらに対照として健常者の皮脂および血中 PCDFs 等についても測定した。

実 験 方 法

1. 試料の採取方法

1.1 皮脂：50%含水アルコール綿(脱脂綿はあらかじめヘキサン、アセトンおよびエチルアルコールで十分に洗浄して用いた)で1日1回延べ10日間顔面を拭くことにより採取した。

1.2 血液：ヘパリン入り採血管に採血し、分析するまで4°C以下で保存した。

2. 分析方法

2.1 脂質の抽出

2.1.1 皮脂の脂質抽出：皮脂を拭き取ったアルコール綿を50ml遠沈管に入れアセトン・ヘキサン(2:1)30mlを加えて超音波抽出後、2000rpmで10分間遠沈した。抽出液を200ml分液ロートに移し、さらに2回同様の操作を行い、抽出液はさきの分液ロートに合わせた。水100mlを加えて水層を分離させ水層は別の200ml分液ロートに移し、ヘキサン層を水50mlで洗浄した。さきの水層をヘキサン50mlで再抽出、水層を捨て、ヘキサン層を洗った水で再抽出液を洗浄した。ヘキサン層を合わせ無水硫酸ナトリウム10gで乾燥させ、100mlナス型フラスコに移しロータリーエバポレーターで1ml以下に濃縮し、少量のヘキサンで秤量ビン(重さ2-3g)に洗い込み室温で1夜放置して溶媒を留去したのち脂質の重量を測定した。

2.1.2 血液の脂質抽出

前報¹¹⁾と同様に行った。

2.2. カラムクリーンアップ

前報¹¹⁾と同様に行った。

2.3. ガスクロマトグラフ・マススペクトロメーター操作条件

ガスクロマトグラフ：HP 5890 A SERIES II

マススペクトロメーター：Finnigan MAT-95

カラム：SP 2331 キャピラリーカラム (0.32×60 m；膜厚，0.25 μm)

分解能：7000-8000

イオン化電圧：45 eV

加速電圧：5 KV

イオン化電流：450 μA

3. 2,3,7,8-TCDD 当量の換算

皮脂および血中の PCDDs および PCDFs の毒性等

価換算係数は International toxic equivalency factors (I-TEF)¹⁶⁾ を、Co-PCBs には WHO European Center for Environment and Health¹⁾ の TEF を用いて 2,3,7,8-TCDD 当量 (TEQ) に換算した。

結 果

患者の皮脂および血液中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の測定結果を Table 1 に示す。Table 1 から分かるように PCDDs は患者では 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD の 4-6 塩化物は皮脂中濃度 (2, 8, 1 および 26 pg/g lipid) の方が血中濃度 (3, 12, 2 および 74 pg/g lipid) より低いが、1,2,3,4,6,7,8-HpCDD および OCDD の 7-8 塩化物では逆に皮脂中濃度 (74 および 949 pg/g lipid) の方が血中濃度 (26 および 530 pg/g lipid) より、それぞれ、3 および 2 倍高い値であった。PCDFs でも同様の傾向が認められ、油症患者に高濃度で残留している 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,2,3,6,7,8-HxCDF ではそれらの皮脂中濃度 (145, 43 および 14 pg/g lipid) は血中濃度 (326, 141 および 42 pg/g lipid) の、それぞれ、1/2, 1/3 および 1/3 であった。一方、1,2,3,4,6,7,8-HpCDF は皮脂中濃度 (23 pg/g lipid) が血中濃度 (16 pg/g lipid) の 1.4 倍高い値を示した。次に、Co-PCBs についてみると、3,3',4,4'-TeCB は皮脂中濃度 (269 pg/g lipid) が血中濃度 (9 pg/g lipid) の 30 倍という高い値を示すが、3,3',4,4',5'-PeCB は皮脂中 (129 pg/g lipid) でも血中 (125 pg/g lipid) でもほとんど同じレベルであり、さらに、3,3',4,4',5,5'-HxCB は逆に皮脂中濃度 (135 pg/g lipid) が血中濃度 (254 pg/g lipid) の 1/2 であった。患者の皮脂中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の TEQ 濃度の総計(総 TEQ 濃度)は 106 pg/g lipid で、これは血中の総 TEQ 濃度 215 pg/g lipid と比べて約 2 分の 1 であった。

Table 2 に健常者の皮脂および血中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の測定結果を示す。Table 2 から分かるように健常者でも、皮脂中濃度と血中濃度の関係は、患者で見られたと同様な傾向が認められる。すなわち、2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD の 4-6 塩化物は皮脂中濃度 (1, 5, 2 および 13 pg/g lipid) の方が血中濃度

Table 1 Concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in sebum and blood of 37 Yusho patients (pg/g lipid)

Congener	Sebum		Blood	
	Mean	SD	Mean	SD
2,3,7,8-TCDD	2	2	3	2
1,2,3,7,8-PeCDD	8	8	12	6
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1	2	2	3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	26	21	74	59
1,2,3,7,8,9-HxCDD	4	4	4	4
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	74	81	26	16
OCDD	949	1135	530	432
2,3,7,8-TCDF	6	5	3	3
1,2,3,7,8-PeCDF	5	6	6	2
2,3,4,7,8-PeCDF	145	138	326	347
1,2,3,4,7,8-HxCDF	43	51	141	162
1,2,3,6,7,8-HxCDF	14	15	42	44
1,2,3,7,8,9-HxCDF	2	3	2	2
2,3,4,6,7,8-HxCDF	5	6	4	4
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	23	24	16	6
3,3',4,4'-TeCB	269	336	9	9
3,3',4,4',5-PeCB	129	80	125	71
3,3',4,4',5,5'-HxCB	135	141	254	210
Total-TEQ	106	84	215	203

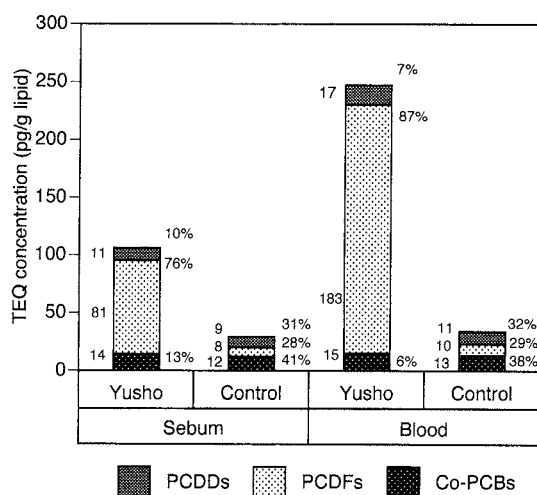
(2, 9, 3 および 28 pg/g lipid) より低いが, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD および OCDD の 7-8 塩化物では逆に皮脂中濃度 (114 および 2280 pg/g lipid) の方が血中濃度 (31 および 605 pg/g lipid) より, それぞれ, 3.7 および 3.8 倍高い値であった. PCDFs は, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,2,3,6,7,8-HxCDF ではそれらの皮脂中濃度 (10, 5 および 4 pg/g lipid) は血中濃度 (15, 9 および 6 pg/g lipid) の, それぞれ, 2/3, 1/2 および 2/3 であった. 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF は皮脂中濃度 (20 pg/g lipid) が血中 (7 pg/g lipid) 濃度の 3 倍高い値を示した. 次に, Co-PCBs では, 3,3',4,4'-TeCB は皮脂中濃度 (294 pg/g lipid) が血中濃度 (15 pg/g lipid) の 20 倍という高い値を示すが, 3,3',4,4',5-PeCB は皮脂中 (114 pg/g lipid) でも血中 (117 pg/g lipid) でもほとんど同じレベルであり, さらに, 3,3',4,4',5,5'-HxCB は逆に皮脂中濃度 (31 pg/g lipid) が血中濃度 (63 pg/g lipid) の 1/2 であった. 総 TEQ 濃度は皮脂中濃度 29 pg/g lipid, 血中濃

度 34 pg/g lipid と患者におけるほど大きな差は認められなかった.

Fig. 1 に油症患者と健常者の皮脂中と血液中の総 TEQ 濃度 (PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の合計) を示す. この図の右側は油症患者と健常者の血液中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の TEQ 濃度 (患者: 17, 183 および 15 pg/g lipid; 健常者 11, 10 および 13 pg/g lipid) とその相対割合 (患者: 7, 87 および 6%; 健常者 32, 29 および 38%) を示している. 血中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs は前報¹¹⁾で報告した患者 83 名および健常者 39 名のうち, 皮脂試料が採取できた患者 37 名および健常者 34 名のデータで, 値は若干異なっているが, PCDDs および Co-PCBs の TEQ 濃度は患者と健常者でほぼ同程度の値であり, また, 患者の PCDFs の TEQ 濃度は健常者の値と比べて非常に高いという傾向は同じである. 一方, 左側は皮脂中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の TEQ 濃度 (患者: 11, 81 および 14 pg/g lipid; 健常者 9, 8 お

Table 2 Concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in sebum and blood of 34 normal control subjects (pg/g lipid)

Congener	Sebum		Blood	
	Mean	SD	Mean	SD
2,3,7,8-TCDD	1	4	2	1
1,2,3,7,8-PeCDD	5	8	9	4
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2	3	3	2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	13	13	28	14
1,2,3,7,8,9-HxCDD	3	7	5	3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	114	271	31	18
OCDD	2280	4122	605	448
2,3,7,8-TCDF	3	2	0.9	0.6
1,2,3,7,8-PeCDF	5	5	2	1
2,3,4,7,8-PeCDF	10	5	15	11
1,2,3,4,7,8-HxCDF	5	3	9	9
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4	3	6	3
1,2,3,7,8,9-HxCDF	4	5	1	1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	8	7	5	3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	20	23	7	3
3,3',4,4'-TeCB	294	310	15	8
3,3',4,4',5-PeCB	114	62	117	78
3,3',4,4',5,5'-HxCB	31	14	63	30
Total-TEQ	29	14	34	16

**Fig. 1** Concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in sebum and blood of 37 Yusho patients and 34 normal control subjects

よび 12 pg/g lipid) とその相対割合（患者：10, 76 および 13%；健常者：31, 28 および 41%）を示している。この図から分かるように、皮脂中の PCDDs および Co-PCBs の TEQ 濃度は、患者と健常者の間にほとんど差は認められなかった。一方、PCDFs の TEQ 濃度は患者の方がはるかに高く、血液で同様の比較を行った場合と同じ傾向が認められた。健常者では、皮脂および血中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の TEQ レベルはほとんど同じであるのに対し、患者では皮脂および血中の PCDDs および Co-PCBs の TEQ 濃度はほぼ同程度の値であるが、皮脂中 PCDFs の TEQ 濃度は血中の 1/2 以下の値であった。これは、さきに Table 1 について述べたように 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,3,3,6,7,8-HxCDF の皮脂中濃度が血中濃度の、それぞれ、1/2, 1/3 および 1/3 であることによる。

次に、Table 3 に油症患者および健常者における PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の皮脂および血液中

Table 3 Correlation coefficients between concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in sebum and blood of 37 Yusho and 34 normal control subjects

Congener	Yusho	Control
2,3,7,8-TCDD	0.1462	0.5112**
1,2,3,7,8-PeCDD	0.1347	0.4693**
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.3160	0.0075
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.5972**	0.5233**
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.2800	0.1984
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.0192	0.3238
OCDD	0.0352	0.0385
2,3,7,8-TCDF	0.0341	0.0667
1,2,3,7,8-PeCDF	0.0771	0.0390
2,3,4,7,8-PeCDF	0.8741**	0.6928**
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.8850**	0.2207
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.8760**	0.3291
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.2042	0.0665
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1152	0.0586
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.1326	0.5715**
3,3',4,4'-TeCB	0.1409	0.0435
3,3',4,4',5-PeCB	0.5098**	0.8227**
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.8851**	0.8781**
TEQ(International)	0.8620**	0.7402**

** $p < 0.01$

濃度の相関係数の一覧を示す。この表から分かるよう患者では 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 3,3',4,4',5-PeCB, 3,3',4,4',5,5'-HxCB および総 TEQ 濃度で有意な相関が認められた。一方、健常者でも、2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, 3,3',4,4',5-PeCB, 3,3',4,4',5,5'-HxCB および総 TEQ 濃度で有意な相関が認められた ($p < 0.01$)。これらのうち患者の 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 3,3',4,4',5,5'-HxCB および総 TEQ 濃度で、相関係数 0.8 以上の強い相関が認められた。また、健常者でも 3,3',4,4',5-PeCB および 3,3',4,4',5,5'-HxCB で相関係数 0.8 以上の強い相関が認められた。有意な相関が得られた項目について Fig. 2 に患者の、Fig. 3 に健常者の散布図を示す。

考 察

結果の項で述べたように、患者および健常者の皮脂中から PCDDs, PCDFs および Co-PCBs が検出された。患者の皮脂中の 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF および 3,3',4,4',5,5'-HxCB は健常者のそれらより高い値を示し、これは血液中と同じ傾向であった。患者および健常者の双方において、これらの化合物は皮脂中における濃度よりも血液中のそれらの方が高い傾向を示した。また、これらの化合物の患者皮脂および血中の濃度の間には有意な相関 ($p < 0.01$) が認められ、とくに、2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF および 3,3',4,4',5,5'-HxCB の 4 項目では相関係数が 0.8 以上の強い相関が認められた。これらの化合物は患者が食べた汚染されたライスオイル中に検出されている¹²⁾。また、患者の皮下脂肪や血液から対照者と比べて高濃度に検出されており、汚染されたライス

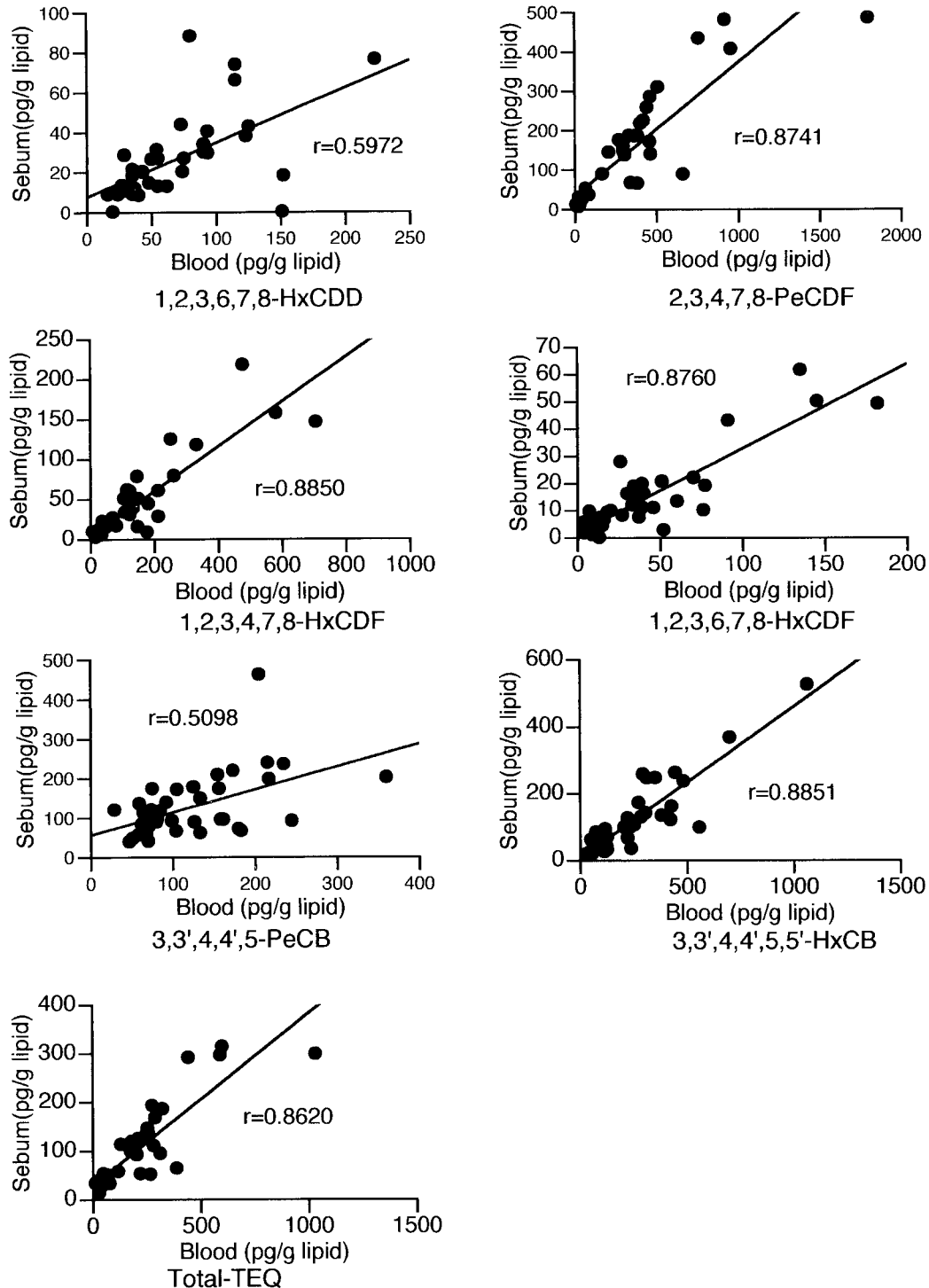


Fig. 2 Correlations between concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in sebum and blood of 37 Yusho patients

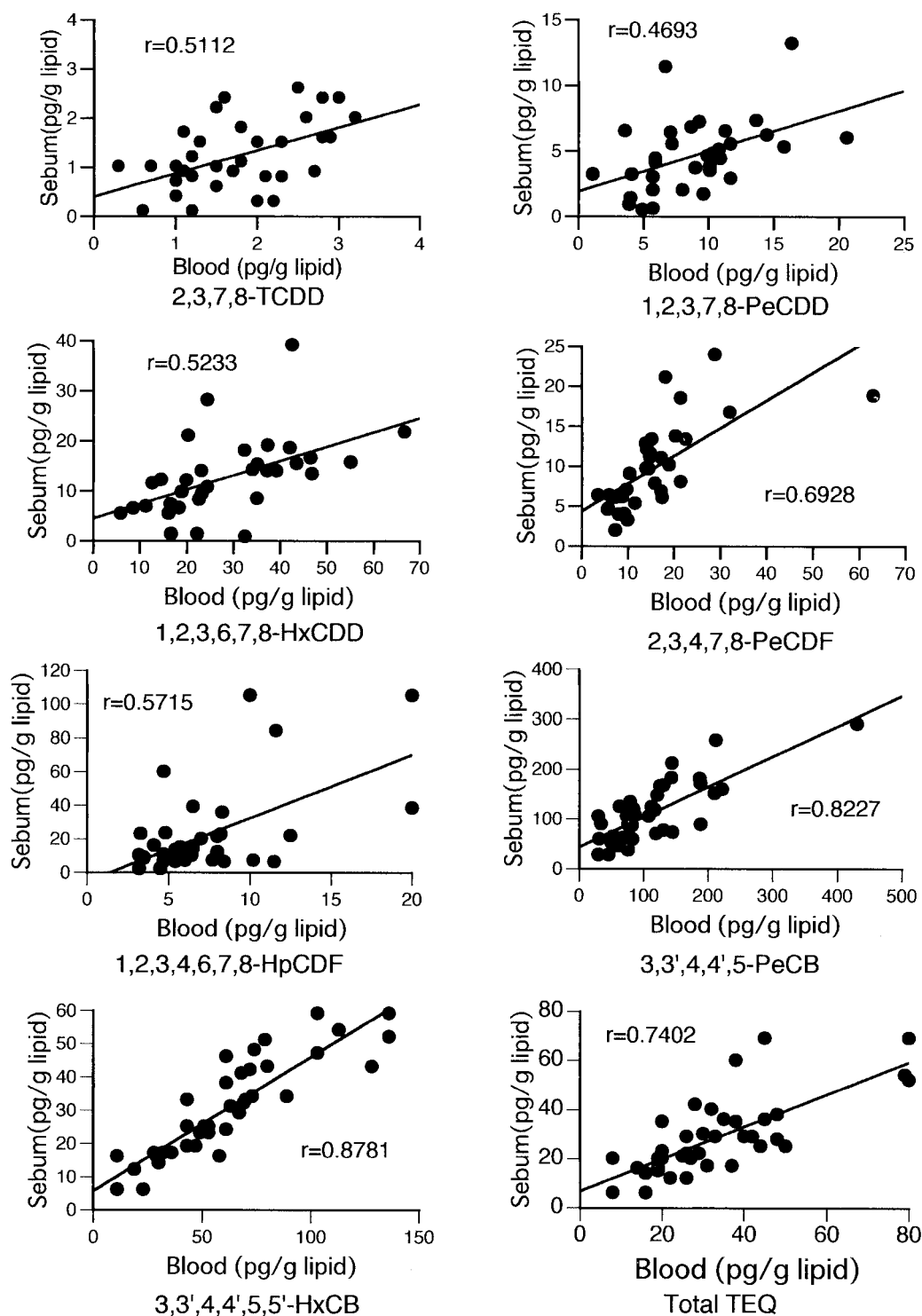


Fig. 3 Correlations between concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in sebum and blood of 34 normal control subjects

オイルを食べて患者体内に取り込まれた PCDDs, PCDFs および Co-PCBs のうち 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF および 3,3',4,4',5,5'-HxCB はいまも体内に残留しており, それらが皮脂を介して排出されていると考えられる。われわれは昨年までに, 日本および台湾の油症について, 患者体内に残留している PCDFs などの油症の原因物質は糞便中に排泄されており, これは米ぬか繊維およびコレステラミン投与で排泄促進されることを明らかにした⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。糞便中の PCDFs などの一日の排泄量は, ほぼ, 体の脂質 1 g に含まれる量である⁷⁾。試験的に健常者 1 名について下着に付着した脂質, 風呂に入ったときのアカなどから脂質 (ヘキサン可溶物) を集め, ヒトの脂質の排出量を推定したところ, 1 日あたり 1 g 程度であると考えられた。これらの試料中に含まれる PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の TEQ の大部分は下着に付着した脂質から検出された (PCDDs: 88%, PCDFs: 86%, Co-PCBs: 90%, 総 TEQ: 89%)。さらに, 健常者 4 名について下着 (長袖シャツ) に付着した脂質を回収した結果 1 日あたり 0.25-0.42 g/day, 平均 0.36 g/day という値を得た。この脂質中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の総 TEQ 濃度は平均 31.8 pg/g lipid で顔面から採取された脂質中の総 TEQ 濃度の平均値 31.4 pg/g lipid とほとんど同じであったが血中濃度 42.8 pg/g lipid の約 3/4 であった¹⁴⁾。シャツに付着する脂質を全体の 1/2 と仮定すると排出される脂質は 0.72 g/day となり, 脂質を介しての体表面からの排出は糞便を介して腸管経路で排出される総 TEQ 量に匹敵する。この経路からのダイオキシン類の排出促進の可能性が考えられる。油症患者 (37 名) 群および健常者 (34 名) 群の, それぞれ, 脂質と血中ダイオキシン類濃度の間に強い相関が認められた。このことは脂質と血中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度の間にかなり広い範囲で相関が成り立っていることを意味している。すなわち, 脂質中のダイオキシン類の濃度は人体の脂肪中濃度を反映すると考えられる。それ故, ヒトの体内に残留するダイオキシン類のモニタリングに脂質を用いて行うことが可能と思われる。人体に残留しているダイオキシン類のモニタリングは母乳, 脂肪組織や血液が実施されている¹³⁾¹⁵⁾。しかし, これらの試料の

採取はきわめて限られた条件のもとでしか可能でない。すなわち, 母乳はいうまでもなく出産後一定期間内の母親からのみ採取可能な試料であり, 脂肪組織やその他の臓器は死亡者か手術時に摘出される場合のみである。これに比べ, 血液は一般のヒトを試料採取の対象とすることができるが, 採血は医療行為であり, しかも, かなり多量 (約 50 ml) に使用するため医療施設で行うなどの一定の条件のもとで行う必要があり, やや限定される。その点, 脂質の採取はなんらの制約もなくまた採取日数 (回数) を増やせば試料の量を増すことも簡単にできる。しかも, 試料の収集もポリエチレンの袋にアルコール綿を入れて郵送による回収が可能で非常に簡便である。脂質中のダイオキシン類のモニタリング調査はヒトを対象とした環境調査の手段として有用と考えられる。

総 括

1. 油症患者および健常者の脂質中から PCDDs, PCDFs および Co-PCBs が検出され, これらの化合物がヒトの脂質を介して体表面から排出されていることが明らかにされた。
2. 脂質および血中のいずれにおいても, 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF および 3,3',4,4',5,5'-HxCB 濃度は油症患者の方が健常者に比べて高値を示した。
3. 油症患者の脂質および血液中の 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 3,3',4,4',5,5'-HxCB 濃度には強い相関が認められ, 患者体内に残留している油症原因物質が脂質を介して現在も排出されていることが確認された。
4. 油症患者および健常者のいずれにおいても脂質および血中の総 TEQ の間には強い相関が認められ脂質は人体のダイオキシン汚染の指標試料として有用と考えられる。

謝 辞

本研究は平成 7 および 8 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) 平川博仙, 松枝隆彦, 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克巳, 長山淳哉, 永田武明: 油症患者および対照者の皮下脂肪中の Coplanar PCBs, PCDFs および PCDDs. *福岡医誌* 82: 274-271, 1991.
- 3) Hirakawa H, Matsueda T, Iida T, Nakamura M, Nagata T and Nagayama J: Age-related increase of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs levels in human adipose tissue. *Organohalogen Compounds*, 21: 419-422, 1994.
- 4) 飯田隆雄, 中川礼子, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克巳: 油症患者および健常者の皮下脂肪組織中の Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs). *福岡医誌* 80: 296-301, 1989.
- 5) 飯田隆雄, 中川礼子, 深町和美, 高橋克巳: 油症患者的皮下脂肪組織中の Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs). *福岡医誌* 80: 302-306 1989.
- 6) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 竹中重幸, 森田邦正, 檜崎幸範, 深町和美, 常盤 寛, 高橋克巳, 吉村英敏: コレスチラミン投与による油症原因物質の糞便中への排泄促進の試み. *福岡医誌* 82: 317-325, 1991.
- 7) 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.
- 8) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 森田邦正, 深町和美, 常盤 寛, 辻 博, 中山樹一郎, 堀 嘉昭: 油症患者における米ぬか繊維とコレスチラミンの併用投与による Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) の糞便中への排泄促進の試み. *福岡医誌* 84: 257-262, 1993.
- 9) Iida T, Nakagawa R, Hirakawa H, Matsueda T, Morita K, Hamamura K, Nakayama J, Hori Y, Guo Y-L L, Chang F-M, Hsiao P-W, Lin K-C, Yu M-L, Lai T-J, Chen S-J and Hsu C-C: 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. *Fukuoka Acta Med.* 86: 226-233, 1995.
- 10) 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 徳仁, 陳 信昭, 徐 澄清: 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. *福岡医誌* 86: 234-240, 1995.
- 11) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 堀就英: 油症患者 83 名の血液中 PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs 濃度. *福岡医誌* 88: 169-176, 1997.
- 12) 檜本 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油症原因油中の PCDDs, Coplanar PCBs, PCDFs. *福岡医誌* 78: 325-336, 1987.
- 13) Matsueda T, Iida T, Hirakawa H, Fukamachi K, Tokiwa T and Nagayama J: Toxic evaluation of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in breathed babies of Yusho and healthy mothers. *Chemosphere* 27: 187-194, 1993.
- 14) Matsueda T, Hirakawa H, Iida T and Nakamura M.: Concentration of PCDDs/PCDFs, and coplanar PCBs in human skin lipids obtained from underwear. *Organohalogen Compounds*, 30: 150-152, 1996.
- 15) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Yanagawa T, Tsuji H, Sato K and Okamoto K: Levels in contamination of Chlorinated dioxins and related compounds and their genotoxicity in Japanese young women. *Organohalogen Compounds*, 21: 193-197, 1994.
- 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.

(受付 1997-4-15)

セラミックサンドバスによるヒトの皮脂からの PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs の体外への排出促進の検討

福岡県保健環境研究所
飯田隆雄・平川博仙・松枝隆彦
中村又善・堀 就英

Stimulation for Sebum Excretion of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs on Bathing Ceramic Sand Bath

Takao IDA, Hironori HIRAKAWA, Takahiko MATSUEDA,
Matayoshi NAKAMURA and Tsuguhide HORI
*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Fukuoka 818-01, Japan*

We previously reported that high risk environmental contaminants such as polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) are excreted not only in feces but also in the sebum of the face and body in both normal subjects and Yusho patients. A combination of administration of rice bran fiber and cholestyramine increased fecal excretion of PCDFs and PCBs. In the present study, we stimulated excretion of these compounds in sebum using a ceramic sand bath, a kind of sand bath using small ceramic balls (3.5 mm diameter) instead of natural sand. Five normal volunteers participated in this experiment. Sebum eliminated from the body on bathing ceramic sand bath was collected and weighed and then concentrations of the compounds interest in the sebum were determined. We also examined the effects varying the bath conditions such as temperature of sand, length of bathing time and frequency of taking bath on the amounts of the compounds in the eliminated sebum.

The results can be summarized as follows:

1. The average amount of sebum per one bath eliminated from the body during the ceramic sand bath was 0.252 g, and those of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in it were 2.2, 2.0 and 2.2 pg of TEQ (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalent quantity). It was considered that the amounts of these compounds corresponded to between one quarter and third of those eliminated through the sebum in a day. On the other hand, 0.05 g of the sebum was collected from the face during the bath, included 0.39, 0.39 and 0.59 pg TEQ for PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs, respectively.

2. As the number of bathing times a day increased, the amount of sebum per bath gradually decreased. However, we could not determine the influence of the conditions of the bath such as temperature and time.

は じ め に

油症患者の体内に残留する polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) 等の高毒性原因物質は腸管経由で

糞便中に排泄されており、腸管経由の排泄は米ぬか繊維とコレステラミン併用投与によりこれらの糞中排泄が促進されることが確認された²⁾³⁾。さらに、著者ら⁴⁾は皮脂を介しても PCDFs 等が排出されていることを明

らかにした。今回、皮脂を介した PCDFs 等の排出に対するセラミックサンドバス (Ceramic sand bath: CSB) の促進効果を検討した。CSB は浴槽に茶色の球状セラミック粒 (SGE: 直径約 3.5 mm) 約 1 トンを入れた砂風呂のようなものである。この SGE を浴槽に満たした約 50°C の温水で加温したのち排水する。この加温された SGE の中に 15-20 分程度体を埋めておくことにより、発汗のみでなく油状物質が体表より遊離してくる。油状物質の遊離は通常の入浴やサウナ風呂などでは見られない特異な現象であり、PCDFs 等の体表面からの排出に促進的効果が期待された。CSB の PCDFs などの排出促進効果と入浴条件 (SGE の温度、時間、入浴回数) について検討したので報告する。

実験方法

試薬および装置

1. 試薬: 既報³⁾で使用したのと同じものを使用した。

2. セラミックサンドバス (CSB): オンリー化学株式会社製。縦 2.2 m, 横 1.2 m, 深さ 0.4-0.5 m (平均 0.45 m) (内径) の浴槽に、約 1 トンのセラミック粒 (容積: 443 L) を入れたものである。

3. 試料の採取

(1) 血液の採取: 肘静脈から約 50 ml を真空採血管 (10 ml, 5 本) 中に採血し、分析するまで 4°C 以下で保存した。

(2) 顔面皮脂の採取: 入浴中および入浴後、アルコール綿で顔面を拭くことにより採取した。アルコール綿は 100 ml の共栓付三角フラスコに保存した。(アルコール綿: アルコール濃度は 50%, 綿花は市販カット綿を前報⁵⁾と同様に精製して用いた。)

(3) CSB により遊離する油状物質 (CSB 皮脂) の採取: 1995 年 7 月 15 日、健康者ボランティア 5 名を CSB に入浴させた。CSB の温度は 44°C, 入浴時間 20 分の入浴条件で実施した。各被験者の入浴終了後 CSB 浴槽に 50°C の温水を浴槽底部から導入し SGE 上から 10 cm で止めた。皮脂は油膜となって水面上に浮かび上がった。底部より空気を送り込んでバブリングし、SGE に付着した皮脂を遊離させ水面上に浮かび上がらせた。水面上の油膜をサラシ布で作った網ですくいあげて採取した (サラシ布はあらかじめ家庭用洗濯機

で水洗・脱水後、自然乾燥し、アセトンおよびヘキサンで大型ソックスレー抽出器中で 8 時間洗浄した)。このサラシ布は 1 L ビーカーに入れアルミホイルで覆って分析するまで保存した。

(4) CSB の温水: (3) の CSB 皮脂を採取したのち大型ガラス容器にステンレス製ビーカーで 10.8-12.3 L 採取した。ガラス容器はあらかじめアセトンおよびヘキサンで洗浄したものを用いた。

4. 試料からの PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の抽出

(1) 血液: 前報⁴⁾の健康者血液の脂質の抽出方法を用いて行った。

(2) CSB 皮脂: 皮脂を採取したサラシ布を大型ソックスレー抽出器を用いてアセトンおよびヘキサンで各 8 時間連続抽出した。アセトンおよびヘキサン抽出液を、それぞれ、ロータリーエバポレーターで減圧下約 200 ml まで濃縮し 1000 ml 分液ロートに移した。水 500 ml を加えて混和しヘキサン層が分離するまで静置した。ヘキサン層を分取し、水層はヘキサン 200 ml で 2 回振とう抽出し、さきのヘキサン層と合わせ無水硫酸ナトリウムで乾燥しロータリーエバポレーターで減圧下濃縮した。濃縮液を約 2 g の秤量ビンに移し室温下に放置して溶媒を留去し、CSB 皮脂の重量を測定した。

(3) 顔面皮脂: 前報⁵⁾のアルコール綿からの皮脂の抽出法を用いて皮脂を抽出し重量を測定した。

(4) CSB の温水: 5 L の大型分液ロートに水 4 L を採りヘキサン 200 ml で 2 回振とう抽出した。この操作を 3 回繰り返して 10.8-12.3 L の浴槽水を溶媒抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥したのちロータリーエバポレーターで減圧下濃縮した。濃縮液を約 2 g の秤量ビンに移し室温下に放置して溶媒を留去し、CSB の温水の抽出物の重量を測定した。

5. 試料中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の測定

前報⁴⁾の皮脂および血液の分析と同様に行った。

6. 試料中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の TEQ 換算

PCDDs および PCDFs は International toxic equivalent factors (TEF)⁸⁾ を、Co-PCBs は WHO European Center for Environment and Health¹⁾ の

TEF を用いて 2,3,7,8-TCDD 当量 (TEQ) に換算した。

結 果 と 考 察

1. 被験者血中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs

Table 1 に CSB 被験者 5 名の血中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度を示す。この表から分かるようにこれら 5 名の被験者の測定値は前報¹⁾の健常者 39 人の平均値と比べ特に異常な値は認められなかった。すなわち、TEQ 濃度の平均値について比べてみると、健常者 (31 ± 11 pg/g lipid: 平均値 $\pm$ SD, 39 名) に対して被験者 5 名は 37 ± 8 pg/g lipid (平均値 $\pm$ SD) とほぼ同程度の値であった。

2. 顔面皮脂中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs

Table 2 に入浴中にアルコール綿で採取した顔面皮脂の重量と検出された PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度を示す。入浴中に得られた顔面の皮脂量の平均値 $\pm$ SD は 0.050 ± 0.021 g であった。顔面皮脂中の総 TEQ 濃度の平均値 $\pm$ SD は 28 ± 5 pg/g lipid で、

これは前報の健常者 39 名の顔面皮脂中の TEQ 濃度 (29 ± 14 pg/g lipid) と同様の値である。

3. CSB 皮脂中 PCDDs, PCDFs および Co-PCBs

Table 3 に CSB により得られた油状物質 (CSB 皮脂) の重量と検出された PCDDs, PCDFs および Co-PCBs 濃度を示す。CSB 皮脂中の総 TEQ 濃度は 26 ± 4 pg/g lipid (平均値 $\pm$ SD) で血中濃度 (37 pg/g lipid) より約 30% 低い値を示した。また、Table 2 に示した顔面の皮脂中の濃度とほぼ同様の値であった。一回の入浴で得られる CSB 皮脂の平均値は 0.252 ± 0.033 g (平均値 $\pm$ SD) で、この中に含まれる PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の総 TEQ は 6.4 ± 0.1 pg であった。Fig. 1 に被験者 5 名の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の CSB 皮脂、顔面の皮脂および血中 TEQ 濃度の比較を示す。この図から明らかなように、CSB 皮脂および顔面の皮脂は PCDDs, PCDFs および Co-PCBs のいずれにおいてもほぼ同程度の TEQ 濃度を示すが、これに対して血中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の総 TEQ 濃度は皮脂よりも 30% 程度高い値を示した。

Table 1 Concentrations PCDDs, PCDFs and Co-PCBs found in blood of five volunteers

Congener	Lipid basis (pg/g)					Mean	SD
	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5		
2,3,7,8-TCDD	1	8	3	3	3	4	3
1,2,3,7,8-PeCDD	6	7	8	9	14	9	3
1,2,3,4,7,8-HxCDD	3	3	1	3	2	3	1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	20	43	25	35	32	31	9
1,2,3,7,8,9-HxCDD	8	0	7	3	3	4	3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	24	37	15	47	37	32	12
OCDD	265	899	262	987	1180	718	428
2,3,7,8-TCDF	1	3	3	1	1	2	1
1,2,3,7,8-PeCDF	1	3	3	2	2	2	1
2,3,4,7,8-PeCDF	13	26	17	19	22	19	5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	5	9	6	4	11	7	3
1,2,3,6,7,8-HxCDF	3	9	6	4	10	6	3
1,2,3,7,8,9-HxCDF	2	0	6	2	3	3	2
2,3,4,6,7,8-HxCDF	7	0	7	4	5	5	3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	5	12	5	6	8	7	3
3,3',4,4'-TeCB	11	11	17	14	10	13	3
3,3',4,4',5-PeCB	92	117	111	189	84	119	41
3,3',4,4',5,5'-HxCB	48	46	77	89	79	68	20
Total-TEQ	26	45	34	44	38	37	8

Table 2 Concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in face sebum on bathing ceramic sand bath

Congener	Lipid basis (pg/g)					Mean	SD
	FA-1	FA-2	FA-3	FA-4	FA-5		
2,3,7,8-TCDD	3	2	4	2	1	3	1
1,2,3,7,8-PeCDD	5	7	4	5	7	5	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0	5	2	0	0	1	2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	10	5	2	1	13	6	5
1,2,3,7,8,9-HxCDD	16	0	0	0	13	6	8
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	84	90	77	20	60	66	28
OCDD	1116	1730	1284	267	1068	1093	530
2,3,7,8-TCDF	6	3	1	2	5	3	2
1,2,3,7,8-PeCDF	7	3	3	3	5	4	2
2,3,4,7,8-PeCDF	5	7	9	7	7	7	2
1,2,3,4,7,8-HxCDF	5	5	2	6	14	6	4
1,2,3,6,7,8-HxCDF	3	6	2	2	12	5	4
1,2,3,7,8,9-HxCDF	6	5	0	2	2	3	2
2,3,4,6,7,8-HxCDF	24	5	5	8	3	9	9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	37	39	15	9	NA	25	15
3,3',4,4'-TeCB	380	125	147	101	181	187	112
3,3',4,4',5-PeCB	133	92	150	100	77	110	30
3,3',4,4',5,5'-HxCB	19	27	39	35	35	31	8
Total-TEQ	31	26	30	21	33	28	5
Collected lipid (g)	0.045	0.027	0.060	0.081	0.037	0.050	0.021

NA: Not available

この皮脂中の TEQ 濃度が採取部位にかかわらずほぼ一定の値を示すという結果は、下着に付着した皮脂と顔面皮脂を比較した場合も認められた。下着（アンダーシャツ）から 1 日に 0.345 ± 0.085 g (平均値 $\pm$ SD) の皮脂が得られ、この中に含まれる PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の総 TEQ 値は 10 ± 3 pg であった⁶⁾。すなわち、CSB 入浴 1 回で 1 日の上半身から排出される皮脂などに含まれる（アンダーシャツに付着する）PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の 64% に相当する量が排出される。

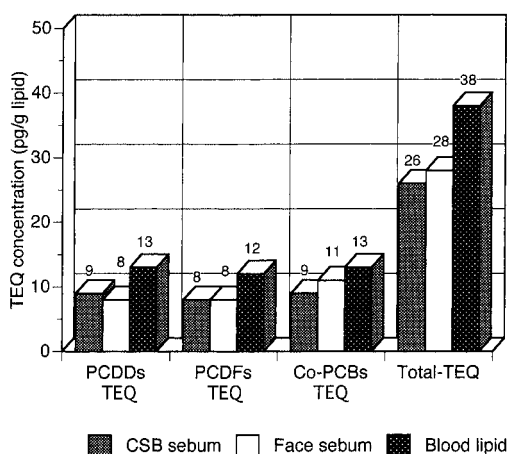
4. CSB 温水中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs

Table 4 に SGE から温水で遊離された油状物質を回収したあとの温水中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs などの濃度を示す。水中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の濃度は非常に低濃度であることが予測

されたので分析には 11.3 ± 0.6 L とかなり多量の試料を用いた。PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の総 TEQ 濃度の平均値は 0.048 pg/L であった。これは CSB 皮脂中の TEQ 濃度の平均値 26 pg/g と比べ、540,000 分の 1 というきわめて低い値であった。しかし、温水の量はセラミック粒の上の 10 cm 部分だけでも 264 L であり、CSB 皮脂の量 0.252 g の 1,000,000 倍に相当し、セラミック粒の容量 443 L の間隙水も考慮するとさらに大きな量となる。温水中の PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の量はその総 TEQ 濃度 (0.048 pg/L) から TEQ として 12.7 pg 以上と考えられ、これは CSB 皮脂中の総 TEQ 量 6.4 pg の約 2 倍に相当する。宮田ら⁷⁾は水道水 (50 L) 5 件から平均 1.2 pg/L の OCDD を検出した。Table 4 に示した CSB 温水中の OCDD 濃度 (平均 2.4 pg/L) は宮田らの報告値の 2 倍高い値であり、これは人体から遊離した CSB 皮脂の

Table 3 Concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in sebum eliminated from skin of body on bathing ceramics sand bath

Congener	Lipid basis (pg/g)					Mean	SD
	TE-1	TE-2	TE-3	TE-4	TE-5		
2,3,7,8-TCDD	0.4	0.6	0.9	0.8	0.6	0.6	0.2
1,2,3,7,8-PeCDD	2	4	4	3	3	3	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	4	0	2	2	2	2	1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	7	10	6	11	8	8	2
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0	25	12	16	16	14	9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	181	221	190	144	176	182	28
OCDD	2723	2552	2733	1802	2019	2366	429
2,3,7,8-TCDF	5	3	4	4	5	4	1
1,2,3,7,8-PeCDF	8	7	10	7	7	8	1
2,3,4,7,8-PeCDF	9	6	6	3	4	6	2
1,2,3,4,7,8-HxCDF	7	9	4	6	4	6	2
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5	9	5	6	6	6	2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0	7	18	13	3	8	8
2,3,4,6,7,8-HxCDF	4	13	28	20	7	14	10
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	37	70	41	34	31	43	16
3,3',4,4'-TeCB	1175	673	994	1064	777	936	207
3,3',4,4',5'-PeCB	138	69	74	84	52	83	32
3,3',4,4',5,5'-HxCB	12	11	9	11	7	10	2
Total-TEQ	29	28	28	26	20	26	4
Collected lipid (g)	0.224	0.240	0.233	0.308	0.254	0.252	0.033

**Fig. 1** TEQ levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in CSB sebum, face sebum and blood lipid

回収が完全でないか、あるいは OCDD 等が温水に分散しているなどの可能性を示唆しており、入浴の影響を否定できない。一方、水中の化学物質は微細粒子に吸着され水中に分散浮遊していることも考えられる。今回用いた水からの抽出方法は単純に分液ロートを用いた溶媒抽出法であるため、セラミック粒から CSB 皮脂を遊離させるために用いた温水中の微細粒子に吸着分散している化学物質を十分に抽出できるかどうかは不明である。このことについては、今後、より詳細な検討が必要と思われる。

5. 入浴条件の検討

CSB 入浴回数、SGE の温度および入浴時間の 3 つの入浴条件に違いが CSB で遊離する皮脂中に含まれる PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の量に与える影響について検討した。まず、被験者 A に CSB 入浴時間 (15 分)、SGE の温度 (41°C) を固定して (約 2 時間間隔で) 3 回繰り返し入浴させたとき得られた CSB

Table 4 Concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in bath water sampled after collecting body sebum

Congener	Concentration (pg/L)						SD
	SBW-1	SBW-2	SBW-3	SBW-4	SBW-5	Mean	
2,3,7,8-TCDD	0.000	0.000	0.001	0.000	0.004	0.001	0.002
1,2,3,7,8-PeCDD	0.023	0.000	0.004	0.002	0.016	0.009	0.010
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.001	0.003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.000	0.000	0.087	0.000	0.000	0.017	0.039
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.16	0.12	0.10	0.14	0.27	0.16	0.067
OCDD	2.4	1.3	1.4	2.5	4.2	2.4	1.2
2,3,7,8-TCDF	0.006	0.008	0.016	0.009	0.014	0.011	0.004
1,2,3,7,8-PeCDF	0.023	0.011	0.029	0.015	0.019	0.019	0.007
2,3,4,7,8-PeCDF	0.028	0.009	0.014	0.014	0.022	0.017	0.008
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.036	0.000	0.014	0.014	0.019	0.016	0.013
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.027	0.000	0.004	0.012	0.009	0.010	0.011
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.035	0.077	0.014	0.010	0.031	0.034	0.027
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.073	0.093	0.041	0.070	0.224	0.100	0.072
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.070	0.078	0.082	0.102	0.182	0.103	0.046
3,3',4,4'-TeCB	1.18	0.49	0.57	0.41	0.67	0.66	0.30
3,3',4,4',5-PeCB	0.053	0.053	0.116	0.053	0.110	0.077	0.033
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.000	0.000	0.010	0.006	0.000	0.003	0.005
Total-TEQ	0.055	0.032	0.045	0.032	0.074	0.048	0.018
Water sample (L)	12.3	11.0	11.2	10.8	11.0	11.3	0.6

皮脂中の TEQ 値は、それぞれ、5.1, 4.4 および 4.1 pg であった。次に、被験者 B に CSB 入浴時間 (15 分) を固定し、SGE の温度のみを、42, 45 および 47°C と変えて入浴させたとき得られた CSB 皮脂中の TEQ 値は、それぞれ、3.6, 2.9 および 3.0 pg であった。最後に、被験者 C に SGE の温度 (41°C) を一定にして、CSB 入浴時間を、5, 10 および 15 分と変えて入浴させたとき得られた CSB 皮脂中の TEQ 値は、それぞれ、5.3, 4.3 および 3.0 pg であった。被験者が各条件 1 名で 1 回のみの試験なので断定的なことはいえないが、CSB 入浴による皮脂からの PCDFs などの排出は今回実験した温度範囲 42-47°C、入浴時間 5-15 分程度の入浴条件の変動では大きく変わることはないと考えられる。しかし、繰り返し入浴することにより、PCDFs などの排出量は若干減少する傾向にあった。

総 括

油症の原因物質であり、また、高毒性環境汚染物質でもある PCDDs, PCDFs および Co-PCBs について、健常者ボランティア 5 名の被験者に対して、セラミックサンドバス (CSB) による皮脂からの排出促進を検討した。その結果、一回の CSB 入浴による皮脂の排出は 5 名の被験者の平均で 0.252 g で、この中に含まれる PCDDs, PCDFs および Co-PCBs ならびにこれらの合計は TEQ 値として、それぞれ、2.2, 2.0 および 2.2 pg で合計 6.4 pg であった。また、CSB 入浴時に得られた顔面皮脂の量は平均で 0.050 g で、この中に含まれる PCDDs, PCDFs および Co-PCBs ならびにこれらの合計は TEQ 値として、それぞれ、0.39, 0.39 および 0.59 pg で合計 1.4 pg であった。すなわち、1 回の CSB 入浴で得られる CSB 皮脂と顔面皮脂を合わせた皮脂の合計は 0.302 g で、この中に含まれる

PCDDs, PCDF および Co-PCBs は総 TEQ 値として 7.8 pg となる。1 日に排出される皮脂量は、われわれの 1 例の実験によれば 1 g 程度と推定され、また、シャツに付着する皮脂量調査結果 0.345 g (5 例) の 2 倍とすれば 0.69 g であり、1 回の CSB 入浴で得られた皮脂は 1 日の皮脂排出量の 1/3-1/4 に相当する。CSB 入浴で排出される皮脂量に対するセラミック粒の温度および入浴に時間の影響は明確にできなかったが、約 2 時間間隔で連続的に入浴したとき、入浴回数が増すにしたがって減少する傾向が認められた。

本研究は平成 7 および 8 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。本実験を行うためセラミックサンドパスの使用に便宜をはかって頂きましたオンリー化学株式会社仲村忠雅氏に厚く感謝します。

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) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 竹中重幸, 森田邦正, 檜崎幸範, 深町和美, 常盤 寛, 高橋克巳, 吉村英敏: コレスチラミン投与による油症原因物質の糞便中への排泄促進の試み。福岡医誌 82: 317-325, 1991.
- 3) 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 徳仁, 陳 信昭, 徐 澄清: 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。福岡医誌 86: 234-240, 1995.
- 4) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子: 油症患者 83 名の血液中 PCDDs, PCDFs および Coplanar PCBs 濃度。福岡医誌 88: 169-176, 1997.
- 5) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 堀 就英, 中尾知子, 中山樹一郎: 油症患者の皮脂および血液中の PCDDs, PCDFs および coplanar PCBs 濃度。福岡医誌 88: 177-186, 1997.
- 6) Matsueda T, Hirakawa H, Iida T, Nakamura M.: Concentration of PCDDs/PCDFs, and coplanar PCBs in human skin lipids obtained from underwear. Organohalogen Compounds, 30: 150-152, 1996.
- 7) Miyata H, Ohta S, Aozasa O: Levels of PCDDs/PCDFs, and non-ortho coplanar PCBs in drinking water in Japan. Short paper of DIOXIN' 92, 9: 151-154, 1992.
- 8) 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.
(受付 1997-4-15)

Induction of Micronuclei in Cultured Human Lymphocytes with the Mixture of Highly Toxic Organochlorine Compounds Retained in Human Body

Junya NAGAYAMA and Mayumi NAGAYAMA

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

Takao IIDA, Hironori HIRAKAWA and Takahiko MATSUEDA

*Department of Environmental Sciences, Fukuoka Institute of Health and
Environmental Sciences, Dazaifu-shi, Fukuoka 815*

Abstract In this study, we investigated the effect of mixture of the organochlorine compounds, which very resembled their contamination profile of healthy Japanese people in its composition, on the induction of micronuclei in human whole-blood cultures in order to clarify their genotoxicity as a whole. The following results were obtained. Regardless of the presence or absence of 7, 8-benzoflavone (ANF) in the blood culture system, we observed a fairly good dose-response relationship between the concentration of the mixture and the induction of micronuclei. In particular, we found that 50% effective concentration of the mixture of the organochlorine chemicals was considered only about 7 times greater level over the average concentration in the healthy people, namely 70ppt as 2, 3, 7, 8-TCDD, in the absence of ANF and about 5 times more than that in the presence of ANF. Based on these results, the mixture was regarded as extremely genotoxic.

Our human bodies, however, have already been contaminated with a variety of chemicals including PCDDs, PCDFs and Co-PCBs and accordingly one of the most important problems to be solved is a further comprehensive genotoxicity and health consequences due to these chemicals to the descendants.

Introduction

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 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

assembly¹⁾, was firstly reported in 1985²⁾, and the prevention of cytoplasmic division after nuclear division by CYB, resulting in binucleated cells, facilitates the scoring of micronuclei and increases the precision of the assay.

We have already been contaminated with numerous chemicals which were intentionally or accidentally made by human beings, including highly toxic organochlorine compounds such as polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs). We have prepared the mixture of PCDDs, PCDFs, Co-PCBs and PCBs, which closely looked like

their contamination profile in healthy people in the composition.

In this study, the induction of micronuclei with the mixture was investigated in mitogen-stimulated cultured human lymphocytes in order to elucidate their genotoxicity.

Materials and Methods

1. Chemical

PCDD, PCDF and Co-PCB congeners were synthesized by Prof. Y. Masuda, Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka, Japan, or 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:

PCBs (Kanechlors 500 and 600), mitomycin C (MMC) and 7,8-benzoflavone (ANF) from Wako, Osaka, cytochalasin B (CYB) from Sigma, St. Louis, phytohemagglutinin M (PHA) from Difco, Detroit and penicillin, streptomycin and RPMI 1640 from Gibco, New York. All other chemicals and reagents were of the highest quality commercially available.

2. Chemical treatment and lymphocyte culture

The total average concentration of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in the tissues of Japanese people was considered 70ppt as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) toxic equivalent concentration on fat weight basis and toxic equivalency factors (TEFs, relative

Table 1 Mean concentrations of PCBs, PCQs, PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in the adipose tissue of Japanese people, the composition of mixture, 2,3,7,8-TCDD tox. eq. factors and the concentration as 2,3,7,8-TCDD

Organochlorine Compound	Mean Concentration	Composition of mixture ^a	2,3,7,8-TCDD Tox. Eq. Factor	Concentrations as 2,3,7,8-TCDD
PCBs ^b	891 ppb	8.9 mg	—	—
PCQs ^c	4 "	—	—	—
PCDDs				
2,3,7,8-tetra	2 ppt	20 ng	1.0	2.0 ppt
1,2,3,7,8-penta	8 "	80 "	0.5	4.0 "
1,2,3,6,7,8-hexa	27 "	270 "	0.1	2.7 "
1,2,3,4,6,7,8-hepta	33 "	330 "	0.01	0.33 "
Octa	781 "	—	0.001	0.78 "
PCDFs				
2,3,7,8-tetra	6 ppt	60 ng	0.1	0.6 ppt
2,3,4,7,8-penta	22 "	220 "	0.5	11.0 "
1,2,3,4,7,8-hexa	9 "	90 "	0.1	0.9 "
1,2,3,6,7,8-hexa	7 "	70 "	0.1	0.7 "
1,2,3,4,6,7,8-hepta	3 "	30 "	0.01	0.03 "
Octa	0	0	0.001	0
Coplanar PCBs				
3,4,3',4'-tetra	30 ppt	300 ng	0.001	0.03 ppt
3,4,5,3',4'-penta	192 "	1920 "	0.2	38.4 "
3,4,5,3',4',5'-hexa	139 "	1390 "	0.007	0.97 "
Total Concentration as 2,3,7,8-TCDD : 62.44 ppt				

^a: Used in this study

^b: The mixture of the same quantity of Kanechlors 500 and 600

^c: Polychlorinated quaterphenyls

to 2, 3, 7, 8-TCDD) for each congener were those as indicated in Table 1.

Heparinized peripheral blood was obtained with 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, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin and 0.15ml PHA (a final concentration; 3%). At culture initiation, we treated the lymphocyte cultures with MMC (1×10^{-8} to 3×10^{-8} M) as positive control for micronuclei induction or the mixture of organochlorine compounds, as shown in table 1, 2 to 60 times higher concentration than 70ppt as 2, 3, 7, 8-TCDD in the presence or absence of 8×10^{-5} M ANF. The whole-blood cultures were then incubated at 37°C in 5.0% CO_2 and 100% humidity. At 71 hrs after the commencement of the cultures, 7 μM 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 (1,000rpm $\times$ 5min), resuspended in 0.1M KCl hypotonic solution for 15 min at 37°C and centrifuged again. Then, lymphocytes were fixed 3 times in fresh fixative (methanol: acetic acid, 3: 1v/v) 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 micronuclei were those suggested by Countryman and Heddle³⁾.

4. Statistical analysis

Results are expressed as the average number $\pm$ S.E. of micronuclei from 3 observations of 500 binucleated lymphocytes each on different slides from the same group. Data were statistically analyzed by Student's *t*-test.

Results

1. Effects of MMC and ANF on the induction of micronuclei

The effects of MMC, a well-known genotoxic chemical, on the induction of micronuclei were investigated in human whole-blood cultures with and without ANF. Results are shown in Fig. 1. Regardless of the presence or absence of ANF, MMC significantly increased the micronuclei frequency with almost linear dose-dependent manner up to 2×10^{-8} M. In the absence of ANF, a nontreated-control figure of micronuclei/500 binucleated lymphocytes was 2.8 ± 0.2 and in the presence of ANF, it was $3.1 \pm$

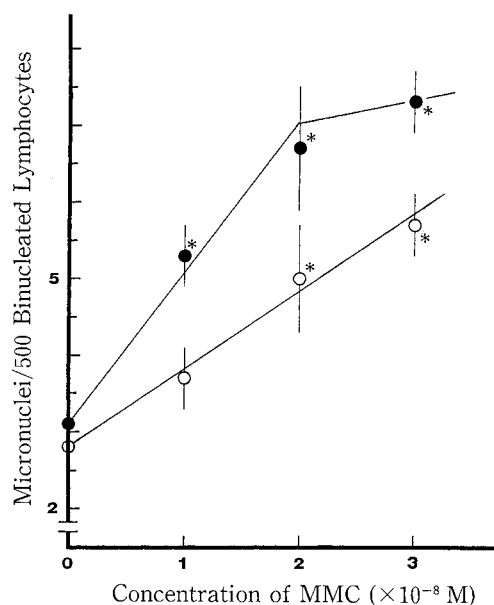


Fig. 1 Induction of micronuclei by MMC (○) and MMC plus ANF (8×10^{-5} M) (●) in human whole-blood cultures

*: $p < 0.01$

0.3. At the highest concentration of MMC, 3×10^{-8} M, in the absence and presence of ANF, frequencies of micronuclei were 5.7 ± 0.4 and 7.3 ± 0.4 , respectively and those were about 2.0 and 2.4 times higher than the respective nontreated-control ones. Therefore, the micronuclei assay system in this study seemed to work very well.

2. Effects of the mixture of organochlorine compounds on the induction of micronuclei

The experimental results for the induction of micronuclei are indicated in Fig. 2. In the absence of ANF in the lymphocyte cultures, up to 20 times greater concentration than 70ppt as 2, 3, 7, 8-TCDD, which is considered to be the average level of their contamination in Japanese people, micronuclei frequency was increased with dose-dependent manner. At 20 times higher concentration than 70ppt, micronuclei was significant-

ly induced and the figure was 4.3 ± 0.4 micronuclei/500 binucleated cells. At greater concentrations than this, micronuclei frequencies were not increased and seemed to be a plateau.

In the presence of ANF (8×10^{-5} M), micronuclei were induced with almost the same concentration-dependent manner up to 6 times more concentration than 70ppt as those in its absence. However, in higher concentration than 20 times or more, the levels of the frequency were not greatly changed and the figures were 4.0 to 4.7 micronuclei/500 binucleated lymphocytes.

In the absence of ANF, 50% induced level, which was calculated by the equation of nontreated-control micronuclei frequency plus maximally elevated level over the nontreated-control one/2, was 3.8 micronuclei/500 binucleated cells as indicated in Fig. 2. According to

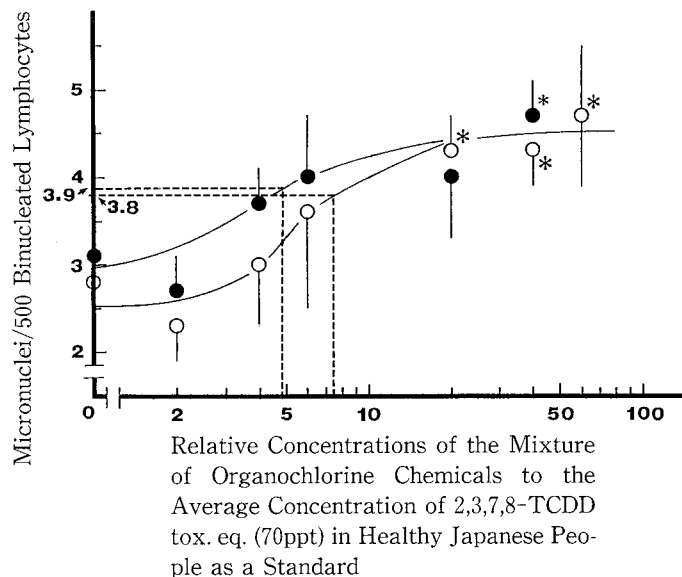


Fig. 2 Effects of the mixture of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs retained in healthy Japanese people on the induction of micronuclei

○: Mixture of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs only

●: Mixture of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs plus ANF (8×10^{-5} M)

*: $p < 0.05$, *: $p < 0.01$

the concentration-response curve, this elevated micronuclei frequency was observed at only about 7 times higher concentration than 70ppt and this figure is so-called 50% effective concentration (EC_{50}). Similarly, in the presence of ANF, 50% elevated figure was calculated to be 3.9 micronuclei/500 binucleated lymphocytes and EC_{50} was considered about 5 times greater than the average level in healthy Japanese people.

Dicussion

The development of TEFs for extremely toxic organohalogen compounds has been necessitated by the identification of complex mixtures of these chemicals in almost every compartment of the global ecosystem. the most highly toxic congeners among PCDFs and Co-PCBs are considered to be 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran (2, 3, 4, 7, 8-PenCDF) and 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (3, 4, 5, 3', 4'-PenCB), respectively and their respective proposed TEF values are 0.5¹⁷⁾ and 0.2 (0.1 to 0.4)⁶⁾, as indicated in Table 1. These values of the above two congeners seemed reasonable because 2, 3, 7, 8-TCDD, 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF and 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB enhanced the frequencies of both micronuclei and sister chromatid exchanges (SCEs) in the lymphocytes of human whole-blood cultures in almost the same dose-dependent manner in terms of 2,3,7,8-TCDD tox. eq. concentration¹³⁾¹⁵⁾. Consequently, they were also considered very strong genotoxic chemicals.

The types of mutations which may contribute to spontaneous micronuclei 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 fragments⁴⁾. Therefore, the assay of micronuclei 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 mixture of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs was considered to be a very potent inducer of micronuclei, because as shown in Fig. 2, the EC_{50} value of micronuclei enhancement was only 7 times higher concentration than the average level in healthy people, that is, 70ppt as 2, 3, 7, 8-TCDD.

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 cycle¹⁸⁾, probably at DNA replication forks or sites where replication is incomplete⁷⁾¹⁶⁾. We have already demonstrated that SCEs frequency is significantly enhanced with the same mixture of chlorinated aromatics and the mixture also shows a very strong S-dependent genotoxicity¹⁴⁾. Therefore, not only highly toxic organochlorine congeners but also the mixture of these chemicals has demonstrated extremely potent genotoxicity in both S-dependent and non-S-dependent experimental systems.

In the presence of ANF, this modification greatly enhanced the sensitivity of SCE assay in detecting effects of cigarette smoking and accidental exposure to a mixture of PCBs and PCDFs in human peripheral lymphocytes²⁾⁸⁾⁹⁾. ANF significantly and additively enhanced the frequency of both micronuclei and SCEs in cultured human lymphocytes simultaneously

exposed to 2, 3, 7, 8-TCDD, 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF or 3, 4, 5, 3', 4'-PeCB¹³⁾¹⁵⁾. Therefore, we expected that ANF also increased the sensitivity of micronuclei assay in detecting genotoxic effects of the mixture of the halogenated chemicals. ANF, however, did not show any significant additive effect on the induction of micronuclei after co-treatment with the mixture, as indicated in Fig. 2.

Human breast milk has been contaminated with the mixture of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs¹⁰⁾¹¹⁾ and daily intakes of these organochlorine compounds in breast-fed babies of Japanese mothers were estimated to be about 100 to 200 pg/kg/day as 2, 3, 7, 8-TCDD equivalent values (TEQs)¹²⁾. These TEQs values are about 10 to 20 times greater than the acceptable daily intake (ADI), namely 10 pg/kg/day. Therefore, we should give due attention to the comprehensive genotoxicity and the possible health consequences due to the mixture of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in the breast milk to breast-fed babies.

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: Effect of α -naphthoflavone on levels of sister chromatid exchanges in lymphocytes from active and passive cigarette smokers: dose-response relationships. *Cancer Res.* 46: 6452-6455, 1986.
- 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) Hanberg A, Wern F, Asplund L, Haglund E and Safe S: Swedish dioxin survey: determination of 2, 3, 7, 8-TCDD toxic equivalent factors for some polychlorinated biphenyls and naphthalenes using biological tests. *Chemosphere* 20: 1161-1164, 1990.
- 7) 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.
- 8) Lundgren K, Collman GW, Wang-Wuu S, Tiernan T, Taylor M, Thompson CL and Lucier GW: Cytogenetic and chemical detection of human exposure to polyhalogenated aromatic hydrocarbons. *Environ. Mol. Mutagen.* 11: 1-11, 1988.
- 9) Lundgren K and Lucier GW: Differential enhancement of sister chromatid exchange frequencies by α -naphthoflavone in cultured lymphocytes from smokers and non-smokers. *Mutation Res.* 143: 131-135, 1985.
- 10) Masuda Y: Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compound pollution in human tissues. *Toxicol. Forum* 10: 566-574, 1987.
- 11) Matsueda T, Iida T, Hirakawa H, Fukamachi K, Tokiwa H and Nagayama J: Comparison of concentrations of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in human breast milk of Yusho patients and normal controls. *Organohalo. Comp.* 9: 143-146, 1992.
- 12) Matsueda T, Iida T, Hirakawa H, Fukamachi K, Tokiwa H and Nagayama J: Toxic evaluation of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in breast-fed babies of Yusho and healthy mothers. *Chemosphere* 27: 187-194, 1993.
- 13) 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.* 86: 184-189, 1995.
- 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: Frequency of micronuclei induced in cultured lymphocytes by highly toxic organochlorine congeners. *Fukuoka Acta Med.* 84: 189-194, 1993.
- 16) Painter RB: A replication model for sister

chromatid exchange. Mutation Res. 70: 337-341, 1980

17) Safe S: Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). Toxicology 21:

51-88, 1990.

18) 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 18, 1997)

(和文抄録)

高毒性有機塩素化学物質の混合溶液による 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

福岡県保健環境研究所

飯田 隆雄・平川 博仙・松枝 隆彦

私たちの身体は、非常に毒性の高いポリ塩化ダイベンゾ-*p*-ダイオキシン (PCDDs), ポリ塩化ダイベンゾフラン (PCDFs) やコプラナー PCBs (Co-PCBs) などの有機塩素化学物質により汚染されている。したがって、人体を汚染しているこれらの同族体全体としての毒性や遺伝毒性を研究し、評価することは極めて重要である。そこで、本研究ではまず、PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の同族体による日本人の平均的汚染パターンをもとにして、それらの混合溶液を調製した。また、これらの化学物質による日本人の平均的汚染レベルを 2,3,7,8-TCDD としての濃度で 70 ppt と考えた。

この平均的汚染レベルの 2~60 倍の濃度の有機塩素化学物質混合溶液でヒトリンパ球培養細胞を処理後、この細胞の小核誘発性を指標として、その遺伝毒性を調べ、以下のような結果が得られた。

1) この混合溶液による小核誘発性は 7,8-ベンゾフラボン (ANF) 添加系でも無添加系でも、人体汚染レベルの 6~20 倍の濃度範囲で、比較的良好な量・反応関係により上昇した。

2) ANF は低い濃度の混合溶液の小核誘発性を高める

傾向を示したが、統計学的有意性は認められなかった。

3) 有機塩素化学物質混合溶液による小核誘発性の 50% 有効濃度は ANF 添加系と無添加系で、それぞれ平均的人体汚染レベルのおよそ 5 倍と 7 倍であった。これらは 2,3,7,8-TCDD として 350 ppt と 490 ppt という低い濃度である。

以上のような実験結果より、現在の日本人を汚染している PCDDs, PCDFs および Co-PCBs の混合溶液は全体として極めて低い濃度で小核誘発性があり、強力な非 S 依存型遺伝毒性を示した。

すでに、私たちは同じ混合溶液が姉妹染色分体交換を誘発する S 依存型遺伝毒性を示すことも報告している。これまでの研究結果を総合的に評価すると、PCDDs, PCDFs や Co-PCBs の個々の同族体と同様に、これらの混合物全体についても非常に低い濃度で遺伝子や染色体に影響を及ぼすことが明らかになった。したがって、遺伝子障害に基づく疾病、そして胎児や乳児への影響などについて、詳細な研究が必要であろう。

TCDD 投与ラットにおける急性期の 糖・脂質・内分泌代謝の異常

佐賀医科大学地域保健科学講座
西 住 昌 裕・檜 垣 靖 樹

Studies on Mechanism of Wasting Syndrome in TCDD-intoxicated Rats

Masahiro NISHIZUMI and Yasuki HIGAKI

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

Abstract In order to examine a relevance of glucose metabolism and thyroid function in TCDD-induced wasting syndrome, an insulin sensitivity assessment with chemical analysis of blood plasma were carried out in male Wistar rats exposed orally to TCDD. Laboratory findings in plasma showed elevation of glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) and lipid peroxide value, decrease in thyroxine (T_4) with increase in triiodothyronine (T_3) value, and slight but significant decrease in fasting blood glucose and basal insulin level. The glucose disposal rate in euglycemic insulin clamp test was significantly elevated.

These data suggest that TCDD-induced wasting syndrome might relate to the disturbance of glucose metabolism of the main organ through insufficiency of caloric intake, T_4 and insulin.

はじめに

2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は、これまでに汚染化学物質として一般環境中に検出され¹⁰⁾, また実験的には生体に種々の作用を示すことが報告されているが⁴⁾, そのうち急性毒性として投与後, 数週間のうちに食欲減退, 体重減少, 不活発な状態が進行し, 皮下ならびに体腔への水分貯溜を来たして死亡する wasting syndrome と呼ばれる病態が知られている⁴⁾⁶⁾. しかしこの際の代謝の詳細については十分に解明されていない. したがって, TCDD 投与後の急性期における代謝異常, 特に糖・脂質・内分泌(甲状腺・性腺)の代謝の面から検討することとした.

実験方法

6 週齢の Wistar 系雄ラット 48 匹を以下の 4 群に分け, olive 油に溶解させた TCDD を経口的に胃内に注入する 2 実験群と 2 対照群を設定した. 各群は, 1)

TCDD 50 μ g/kg 体重を 1 日 1 回, 3 日間連続投与する群 (TCDD 高用量投与群), 2) TCDD 10 μ g/kg 体重を 1 日 1 回, 3 日間連続投与する群 (TCDD 低用量投与群), 3) 飼料を自由に摂取させる対照群 (free-fed 対照群), 4) TCDD 高用量投与群ラットが摂取する摂餌量と同量の飼料を与える対照群 (pair-fed 対照群) とした. TCDD は第一薬科大学物理分析学教室の増田教授より分与されたものを使用し, 飼料は固型飼料 CE-2 (日本クレア社製) を pair-fed 対照群以外は自由に与え, その摂餌量を毎日測定した. 飲水は水道水を自由に与え, 摂水量も測定した.

実験開始後 1 週ないし 3 週で, 12 時間以上の絶食後, 採血を行い, その血漿につき, GOT (UV 法), GPT (UV 法), LDH (Wróblewsk-La Due 法), Amylase (G 5- β -CNP 基質法), CPK (固定化酵素法), 総コレステロール (酵素法), HDL (固定化酵素法), トリグリセライド (酵素法), 過酸化脂質 (蛍光八木法), 血糖 (固定化酵素法), インスリン (RIA 法), T_3 (RIA

固相法), T_4 (RIA 固相法), TSH (IRMA 法), テストステロン (RIA 固相法), エストラジオール E_2 (RIA 固相法) の各値を測定した。また, この際, 先に報告した方法⁵⁾に従い, インスリン・クランプ試験を行って, 各ラットのインスリン感受性を測定した。なお, 屠殺後に肝, 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。

各測定値については, TCDD 高用量投与群は free-fed 対照群および pair-fed 対照群と, TCDD 低用量投与群は free-fed 対照群のそれぞれの値との間で, t-test により有意性を検討した。

実験結果

TCDD 低用量投与群では free-fed 対照群に比べ, 摂餌量は 1 週前後より若干減少傾向がみられたが, 2~3 週後でも free-fed 対照群の 10% 程度の減少に留まった。しかし, 体重増加の程度は free-fed 対照群に比べ, 1 週後から抑制がみられ, 3 週後にも有意な抑制

がみられた (Table 1)。摂水量は特に差がみられなかった。

TCDD 高用量投与群の摂餌量は, 実験開始後 4 日目で体重 100 g 当たりで比較して free-fed 対照群の 68% に減少し, 以後は 1~3 週にかけて 68~73% に抑制されると同時に, 体重増加は明らかに抑制され, 2~3 週にかけての体重増加はほとんどみられなかった (Fig. 1)。また, この TCDD 高用量投与群と比べ, pair-fed 対照群は若干体重は重いものの, free-fed 対照群に比べると体重増加に関しては有意な抑制を示した (Table 1)。摂水量については対照群に比べ若干, 減少がみられたものの有意なものではなかった。

TCDD 低用量投与 1 週後のラットの変化としては, free-fed 対照群に比べ体重の低下 (217 ± 6 vs. 240 ± 5), 相対的肝重量の増加 (5.9 ± 0.3 vs. 3.7 ± 0.1), 胸腺重量の低下 (0.22 ± 0.04 vs. 0.74 ± 0.14), T_4 値の低下 (0.8 ± 0.2 vs. 2.5 ± 0.3) が有意 ($p < 0.05$) にみられ, ほかに HDL 値, T_3 値ならびにインスリン・ク

Table 1 Biomedical Parameters in TCDD-exposed, Free-fed and Pair-fed Control Rats after Three Weeks of Experiment

Item \ Group of rats	TCDD-exposed (150 μ g/kg) (n=4)	TCDD-exposed (30 μ g/kg) (n=6)	Free-fed control (n=6)	Pair-fed control (n=4)
Body weight (g)	215 $\pm$ 25 *	262 $\pm$ 22 *	295 $\pm$ 15	223 $\pm$ 9
Relative liver weight	5.0 $\pm$ 1.0 * §	6.0 $\pm$ 0.6 *	4.0 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.3
Relative spleen weight	0.27 $\pm$ 0.04 §	0.30 $\pm$ 0.06 *	0.22 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.02
Thymus weight (g)	0.07 $\pm$ 0.05 * §	0.15 $\pm$ 0.06 *	0.63 $\pm$ 0.12	0.43 $\pm$ 0.06
GOT (U/l)	115 $\pm$ 25 * §	105 $\pm$ 35 *	63 $\pm$ 4	61 $\pm$ 13
LDH (IU/l)	324 $\pm$ 107	251 $\pm$ 88	396 $\pm$ 75	177 $\pm$ 58
Amylase (IU/l)	1222 $\pm$ 431 * §	1788 $\pm$ 146 *	2260 $\pm$ 187	2256 $\pm$ 190
CPK (IU/l)	111 $\pm$ 92 *	216 $\pm$ 41	362 $\pm$ 150	107 $\pm$ 61
Total cholesterol (mg/dl)	51 $\pm$ 7	88 $\pm$ 12	70 $\pm$ 4	53 $\pm$ 5
HDL (mg/dl)	18.6 $\pm$ 6.2	40.1 $\pm$ 11.6	32.4 $\pm$ 5.1	18.8 $\pm$ 3.2
Triglyceride (mg/dl)	15.0 $\pm$ 6.0	25.2 $\pm$ 13.7	11.0 $\pm$ 5.4	10.5 $\pm$ 5.4
Lipid peroxide (nmol/ml)	2.1 $\pm$ 0.3 * §	—	1.5 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2
T_4 (μ g/dl)	≤ 1.5 * §	1.3 $\pm$ 0.5 *	2.6 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.9
T_3 (ng/dl)	35.8 $\pm$ 7.9 * §	32.4 $\pm$ 6.8 *	≤ 26	< 29
Fasting blood glucose (mg/dl)	105 $\pm$ 16 * §	132 $\pm$ 12	136 $\pm$ 11	153 $\pm$ 14
Basal insulin (μ U/ml)	9.8 $\pm$ 1.9 * §	—	12.2 $\pm$ 3.6	19.3 $\pm$ 2.9
GDR (mg/kg/min)	19.3 $\pm$ 4.6 * §	20.8 $\pm$ 4.6 *	12.4 $\pm$ 3.8	2.2 $\pm$ 0.5

* : Significantly ($P < 0.05$) different from the free-fed control group.

§ : Significantly ($P < 0.05$) different from the pair-fed control group.

GDR : glucose disposal rate.

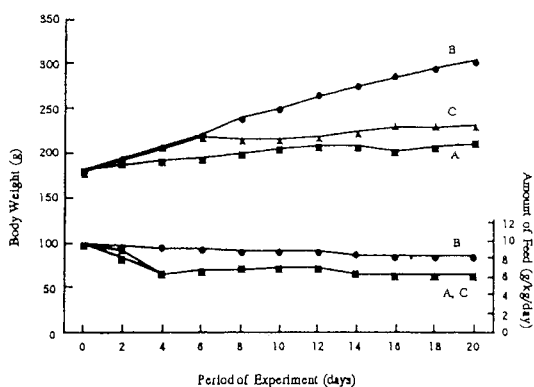


Fig. 1 Changes of Body Weight and Amount of Feed in TCDD-intoxicated (A) (150 μ g/kg), Free-fed (B) and Pair-fed (C) Control Rats.

ランプ試験のグルコース注入率において、いずれも増加傾向が認められた。3週後になると、Table 1に示すように free-fed 対照群に比べて、体重減少、相対的肝重量ならびに相対的脾重量の増加、胸腺重量の低下と共に、血漿中の GOT 値の上昇、amylase 値の低下、 T_4 値の低下と T_3 値の増加、グルコース注入率の上昇が有意に認められた。ほかに HDL 値、トリグリセライド値の増加傾向がみられた。

TCDD 高用量投与群では1週後の変化として、free-fed 対照群に比べ、有意な体重減少、相対的肝重量の増加、胸腺の萎縮、血漿中 GOT 値の上昇がみられたほか、LDH 値の増加、amylase 値、インスリン値の低下傾向が認められ、GDR の上昇傾向も認めた。これを、pair-fed 対照群と比較すると、類似した相違点がみられるが、糖代謝に関連した値としての血糖値（実験群 112 ± 18 mg/dl vs. pair-fed 対照群 152 ± 14 mg/dl）、インスリン値（実験群 9 ± 3 μ u/ml vs. pair-fed 対照群 20.2 ± 9.2 μ u/ml）、グルコース注入率（GDR）も（実験群 16.9 ± 5.9 mg/kg/min vs. pair-fed 対照群 4.1 ± 5.6 mg/kg/min）と大きな差を示した。3週後の結果は Table 1 に示すように、free-fed 対照群と比較して肝重量の増加、胸腺萎縮と共に血漿中 GOT 値の上昇、amylase 値の低下、過酸化脂質値の上昇、 T_4 値の低下と T_3 値の上昇、さらにインスリン・クランプ試験における GDR の上昇がみられた。この実験群の値を pair-fed 対照群の値と比較すると、ほぼ類似した相違がみられるが、pair-fed 対照群の値は、free-fed 対照群の

値に比べ、空腹時血糖値、基礎インスリン値では、より高値を示し、GDR 値ではより低値を示すことからその差は一層顕著に示された。

内分泌に関連するものとして、このほか、TSH、テストステロン、エストラジオール E_2 などの測定も行ったが、対照群との間に有意な差異を認めなかった。

主要臓器の組織学的変化については、肝では、肝細胞の腫大を広汎に認め、空胞変性を示す細胞の小集団を散在性に認めた。腎では尿細管、特に近位部尿細管上皮の膨化、変性像を一部に認め、胸腺では皮質の菲薄化、リンパ球集団の集密度の低下がみられた。

考 察

この実験における TCDD 高用量投与群での投与量は文献上でみると⁴⁾、ラットの LD_{50} に近い量であり、実際に投与後3週間までの顕著な体重増加の抑制、摂餌量の70%前後までの低下、さらに肝については腫大と組織学的に散在性の空胞変性・壊死を伴う細胞集団がみられることから、かなりの毒性を示していると考えられる。ただ、TCDD 投与後3週間の時期での屠殺時に、浮腫や体腔の液体貯溜はみられないこと、さらに、この量を同じ Wistar 系雄ラットに投与して1か月以上観察した著者らの予備実験の経験から推測すると、この後1~2週間内に死亡する状態とは考えられない。また、この1/5量の低用量投与で、全般に変化の程度が軽くなっていることが示され、TCDD の毒性の用量依存性の表現と考えられる。

TCDD 投与によって死亡に至る際の wasting syndrome の発現機序については、食欲の減退による calorie 不足による影響を重視する考えがある⁶⁾。本実験で設定した pair-fed 対照群の結果をみると、体重、コレステロール、中性脂肪などでは類似した変化とみられるが、血糖値、インスリン値など糖代謝に関連した項目では TCDD 投与群とはかなり違った点がみられる。この点からしても、wasting syndrome の本態の説明には、栄養摂取不足はその一部しか説明出来ないと思われる。

この実験で得られた血液化学の所見で主要な点は、まず第1に GOT 値の高値に代表される肝障害を示す変化で、これは肝の腫大ならびに組織学的変化でも裏付けられる。また、肝細胞の機能の変化は lipid の代謝

異常とも深く関連しているとされている⁴⁾⁶⁾。第2に T_4 値の低下と T_3 値の上昇にみられる甲状腺ホルモンに対する影響、第3に血糖値およびインスリン値の低下傾向である。

TCDD の投与による肝への脂肪蓄積の報告¹⁾のほか、血中のコレステロール、中性脂肪、リポ蛋白の増加も TCDD が chylomicron の生成利用の段階からアポ蛋白の合成過程における作用の結果と考えられている¹⁾⁹⁾。また、血中過酸化脂質の増量は TCDD による glutathione peroxidase の活性低下に起因した心筋や肝での過酸化脂質の蓄積に符号するものと考えられている⁹⁾。

TCDD の甲状腺ホルモンへの影響ないし甲状腺に対する作用として、Bastomsky²⁾ は T_4 値が 50% 程度に低下することを報告しているが、 T_3 値については一定の変動ではないと述べており、それらが glucuronide と結合して排泄される程度によって影響を受ける度合いが異なると考えている。また、Rozman ら⁸⁾ は甲状腺摘除が TCDD による死亡を遅らせ、体重減少を抑えよとの報告をしており、TCDD が動物に対しては一般的に甲状腺機能を低下させる作用を有していると考え者が多い。しかし Potter ら⁷⁾ は TCDD の基礎代謝への影響の証拠は得られなかったと述べて、甲状腺に対する毒性よりも、むしろ甲状腺ホルモンと TCDD との相互作用が働いているのではないかとの意見もある。私共の実験結果で、TSH 値は対照群との間で差異を認めなかったことは、このことを裏付けるものかも知れない。

最後に、他の研究者からの関連した報告は見当たらないが、今回の研究結果の中で、糖代謝に関連する空腹時血糖値、インスリン値、さらにインスリン・クランプ法により得られたグルコース注入率に変化がみられたことである。TCDD の低用量投与では余り顕著ではないが、高用量投与群では空腹時血糖値および基礎インスリン値の低下傾向が認められ、グルコース注入率は増加していた。これを pair-fed 群と比較すると、この対照群は free-fed 対照群に比べ血糖値、インスリン値が上昇、GDR 値が低下しているため、この差は一層顕著となった。この結果は、TCDD の投与による変化が単なる摂餌量の減少によるものとは異なり、アミラーゼ値の変化もあることから膵臓機能の障害もあると

想定されるが、むしろ TCDD とインスリンの間の相互作用 (相互の receptor への関与があるかも知れない) が働き、インスリン値の低下、このことが外部からのインスリン注入に際してのグルコース摂取率の増加につながっているものと想定される。

いずれにしても、このような糖の利用障害と T_4 値の低下に示されるような全身の細胞エネルギー代謝機構の失調が wasting syndrome の発現に関与している可能性がある。この面では分子レベルでの更なる研究が必要と思われる。なお、pair-fed 対象群の諸検査値のうち、free-fed 対照群と異なる値を示した体重のほか血漿中のコレステロール、HDL、血糖、インスリン、GDR の各値のうち糖代謝に関連する血糖値、インスリン値、GDR 値は、私共が行った追加実験では、この後、自由に飼料を摂らせると 3 日後には free-fed 対照群の値と有意差がなくなり、5 日後には全く変らない値を示した。この変化の機構に関しては肝を中心とした消化、吸収、代謝の過程に、脳下垂体副腎系ホルモンが関与すると考えられるが、別の機会に論究したい。

結 論

Wistar 系雄ラットに対し、経口的に TCDD を投与し、1 ないし 3 週後にインスリン・クランプ試験を行うと共に血漿につき、肝機能に関連した酵素、脂質、甲状腺ホルモン、血糖、インスリンなどを測定した。その結果、GOT、血漿脂質値の変化のほか、 T_4 値の減少、 T_3 値の上昇、血糖ならびにインスリン値の低下傾向とインスリン感受性の増大が認められた。これらの変化の中でも、カロリー摂取の低下による空腹時血糖の低下に加え、 T_4 値、インスリン値の低下により、主要臓器における糖利用の障害があり、このことが TCDD 投与の際の wasting syndrome の発現に関与している可能性が示唆された。

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) Bastomsky CH: Enhanced thyroxine metabolism and high uptake goiters in rats after a

single dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Endocrinology* 101: 292-296, 1977.

3) Christian BJ, Menahan LA and Peterson RE: Intermediary metabolism of the mature rat following 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83: 360-378, 1986.

4) McConnell EE: Acute and chronic toxicity and carcinogenesis, In Kimbrough RD and Jensen AA (eds): *Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products*. 2nd ed. pp. 161-193 Elsevier, New York, 1989.

5) 西住昌裕, 檜垣靖樹: ラットのインスリン感受性に対する PCB の影響. *福岡医誌* 86: 241-246, 1995.

6) Peterson RE, Seefeld MD, Christian BJ, Potter CL, Kelling CK and Keesey RE, In Poland A and Kimbrough RD (eds): *Biological Mechanism of Dioxin Action*. Banbury Report 18, pp. 291-308,

Cold Spring Harbor, New York, 1984.

7) Potter CL, Moore RW, Inhorn SL, Hagen TC and Peterson R: Thyroid status and thermogenesis in rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84: 45-55, 1986.

8) Rozman K, Rozman T and Greim H: Effect of thyroidectomy and thyroxine on 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72: 372-376, 1984.

9) Stohs SJ, Hassan MQ and Murray WJ: Lipid peroxidation as a possible cause of TCDD toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 854-859, 1983.

10) WHO: PCDD and PCDF Emissions from Incineration. *Environmental Health*, 17, WHO/EURO, Copenhagen, Denmark, 1987.

(受付 1997-3-19)

皮脂中 PCB 濃度の年次推移と季節変動

¹⁾ 長崎大学医学部皮膚科学教室

²⁾ 国立佐賀病院皮膚科

渡辺 雅久¹⁾・田中 敬一²⁾・鳥山 史¹⁾

Yearly and Seasonal Fluctuation of PCB Concentration in Skin Surface Lipid

Masahisa WATANABE¹⁾, Keiichi TANAKA²⁾ and Fumi TORIYAMA¹⁾

¹⁾ Nagasaki University, School of Medicine, Department of Dermatology

²⁾ Saga National Hospital, Dermatology Clinic

Abstract PCB concentrations in the skin surface lipids of Yusho patients had been examined for 6 years (in July, 1990-1995). The concentrations in each patients showed a little fluctuation every year. It suggests that the cutaneous sebaceous system is one of the excretory systems of PCB. In 1995, measurement of PCB was performed also in October. The mean concentration of PCB was lower than that measured in Summer (692.7 ng/g in July versus 633.3 ng/g in October, $p < 0.05$). To explain the fluctuation, seasonal change of sebum composition should be examined.

はじめに

われわれはこれまでの研究で、油症患者の皮脂中に PCB がほぼ 100% に検出されること³⁾、同一患者では、1990～93 年度の比較では皮脂中 PCB 値はほぼ一定していることを報告し⁶⁾、これら有機塩素化合物の排泄器官として毛嚢皮脂腺系の重要性を指摘した。今回は、皮脂中 PCB 濃度についてさらに 2 年間の追加および夏期と冬期での比較検討を加えた。

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、94 年は 19 名（男性 11 名、女性 8 名）、95 年は 15 名（男性 10 名、女性 5 名、平均年齢 68.8 歳）。

2) 皮脂の採取：前額部より大城の方法⁴⁾ に準じて、70% アルコール酒精綿で採取した。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に 3 日間連続で行った。

3) 採取時期：94、95 年は 7 月の油症検診時に採取し、95 年は 7 月に加えて 10 月にも同一患者より採取

した。

4) 測定方法：浅田ら、力岡らが毛髪について記載した方法¹⁾ に準じて行った。

結 果

90～95 年までの、皮脂中 PCB 濃度を Fig. 1 に示す。また、95 年の油症患者 15 例の平均 PCB 濃度は夏期 692.7 ± 253.6 ng/g、冬期 633.3 ± 287.0 ng/g であった

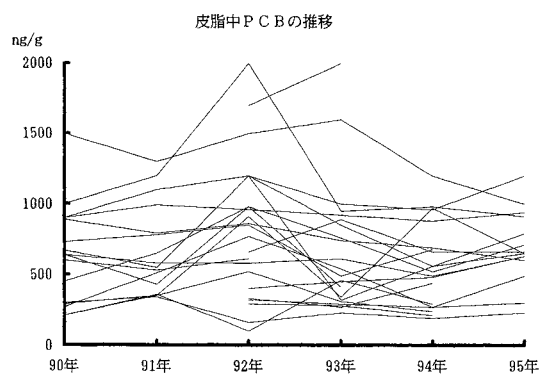


Fig. 1 PCB concentrations in skin surface lipid of Yusho patients from 1990 to 1995

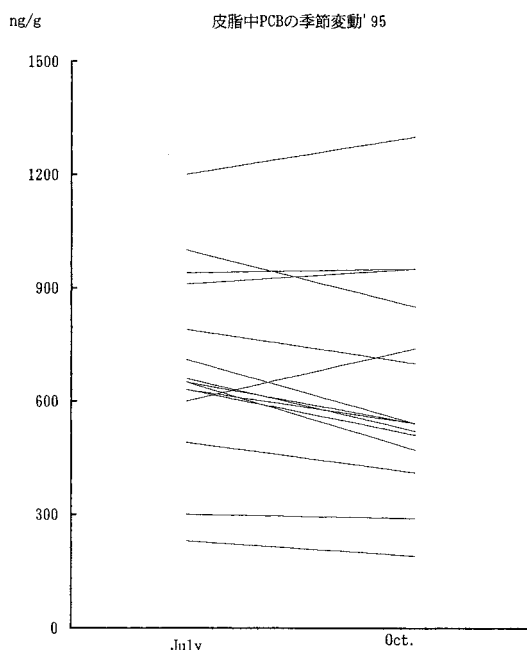


Fig. 2 PCB concentrations in skin surface lipid of Yusho patients in July and October in 1995

(Fig. 2). 夏期に比して、冬期では有意に皮脂中 PCB 濃度が減少していた ($p > 0.05$).

考 察

これまでの一連の測定で、皮脂中の PCB 濃度は、各症例間の多寡はあるものの、同一例については測定年次による変動は少なく、ほぼ一定する傾向を示すことが確認された。また、今回、15 症例について夏期と冬期の皮脂中の PCB 濃度を測定したところ、著しい減少とはいえないまでも、冬期における PCB 濃度が有意に低下していた。この機序として、季節的に皮脂の成分が変化しており、冬季に減少する成分が PCB を

より多く含む、夏期は発汗により排泄が促進される、などが推測される。今後、皮脂成分の季節的変動があるか、また、PCB が皮脂中のどの成分に親和性が高いかなどについての検討が必要と思われる。

皮脂の合成を促進するアンドロゲンは、50～60 歳以降は、分泌が減少する。また、脂腺そのものも、男女とも高齢者では、萎縮する²⁾³⁾。油症患者の高齢化が進み、これまで皮脂の採取を行ってきた患者も平均年齢が 60 歳代後半となっている。自然経過を考えた場合、脂腺系からの PCB の排泄が今後も一定のレベルで持続するとは想定しにくい。アンドロゲンの全身投与などは、risk-benefit の点から現実性は乏しいであろうが、局所的に皮脂分泌を促進する方法がないか、検討していきたい。

文 献

- 1) 浅田要一郎, 馬場強三, 馬場 資: 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, 1981.
- 2) 池田和人: 男性における脂腺の年齢による形態変化. 日皮会誌, 101: 421-426, 1991.
- 3) 増子倫樹: 女性における脂腺の年齢による形態変化. 日皮会誌, 98: 443-452, 1988.
- 4) 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.
- 5) Ohgami T, Watanabe M and Tanaka K: 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
- 6) 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: 皮脂, 血液中 Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Polychlorinated Quaterphenyls (PCQs) 濃度の比較検討. 福岡医誌 86: 202-206, 1995.

(受付 1997-3-19)

In vitro における Polychlorinated Biphenyls (PCBs)

毒性軽減の検討 (第4報)

— 漢方製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

渡 辺 雅 久・鳥 山 史

In Vitro Analysis for Cellular Toxicity of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on HeLa Cellular Proliferation (IV)

— The Effect of Kanpo Preparations on Cellular Toxicity —

Kazutada MATSUOKA

*Division of Hospital Pharmacy, National Kikuchi
Hospital, Kumamoto 861-11*

Masahisa WATANABE and Fumi TORIYAMA

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

Abstract In this study, we investigated the cell toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) as an indicator of the quantity of cellular protein in HeLa cells. Assay for protein concentration was performed by Lowry's method using a commercially available bovine serum albumin as standard preparation. The reductive action of inchinkou-tou, inchinkou, sansisi and daiou on the PCBs toxicity was investigated. The relationship of cell number (0~40,000) to protein concentrations (0~80 μ g) was shown $R^2 = 0.993$ ($Y = 5.0 \times 10^{-6} X + 0.027$). The final concentration of these drugs and PCBs was used for 100 μ g/ml, respectively.

The cellular protein concentration increased to 20% with the addition of inchinkou-tou. Inchinkou and sansisi were revealed slightly elevation, but daiou was not.

These results suggested that inchinkou-tou, kanpo preparation, was better effective than constructive crude drugs, but statistical evidence could not find.

はじめに

Polychlorinated Biphenyls (PCBs)の細胞毒性の作用を観察する方法としてはいくつか考えられる¹⁾.すでに培養細胞の蛋白量を指標(吸光度)にした手法を用い,その細胞毒性軽減作用を示すであろうと思われる漢方製剤7品目を検討し,茵陳蒿湯および当帰芍薬散の二種類に若干PCBの毒性を軽減させる効果があることを報告した²⁾.今回はそれら二種の漢方製剤の

うち茵陳蒿湯およびその構成生薬を用いてPCBの毒性軽減作用がどの生薬由来なのか,あるいは合方した結果にそのような効果が生じるか否かを検討した.なお,前報告で用いた吸光度(280nm)を指標にする方法は比較的簡便な手段ではあったものの核酸の混入が実験系に影響を及ぼすことが否定できないので,本報告では指標としてLowry法で測定した蛋白量を使用した.

実験方法

1) 使用薬剤

使用薬剤は、茵陳蒿湯（カネボウ、東京）の市販製剤およびインチンコウ、サンシンおよびダイオウの市販の生薬製剤を用いた。

薬剤は10% Dimethylsulfoxide (DMSO)水溶液で1%溶液を作成し、振盪器（YAMATO SHAKER SA-31）で1時間抽出し、3,000 rpm, 15分遠心後、上澄み液を1%溶液とした。生薬製剤の三種類は、エチルアルコールに浸漬後、溶媒を分取および揮発させ、残渣に10% DMSO 溶液を加え、以後は上記薬剤の抽出法と同様に行った。

2) PCB

PCB は Polychlorobiphenyl tetra (和光純薬、大阪) を用いた。希釈は DMSO で1% PCB 液を作成後、10% DMSO 水溶液で使用時に希釈液を調整した。濃度は前報¹⁾と同様に最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。

3) 培養細胞

HeLa 細胞（CCL 2, 大日本製薬、大阪）は RPMI 1640 培養液（日水、東京、10%ウシ胎児血清を含む）で培養（5%炭酸ガス培養器、37℃）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の 0.1 M リン酸緩衝液、pH 8.0）で細胞を剥離させ以後の実験に使用した。培養プレートは 24 穴プレート（FALCON 3047）を用い、細胞数は前報²⁾同様一穴当たり 10,000 個とした。

4) 蛋白濃度測定

蛋白濃度の測定は、Lowry 法³⁾に準じて実施した。すなわち剥離した細胞を三回リン酸緩衝液で洗浄後、蒸留水 0.4 ml に懸濁させた。細胞数を計数後、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.4 ml を加え、10 分後上澄み液 0.2 ml を静かに分取し、炭酸ナトリウムアルカリ銅溶液（2%炭酸ナトリウム 50 ml に1%酒石酸カリウムと 0.5%硫酸銅 1 ml を加えた溶液）1 ml を加え室温でさらに 10 分放置し、2 倍に希釈したフェノール試薬（片山化学、大阪）0.1 ml を添加し 30 分静置後、750 nm の吸光度を測定（日立 U-2000）した。

次に標準蛋白量の測定は、Protein Standard (Sigma, Cat. No. P7656) 400 $\mu\text{g/ml}$ を蒸留水で希釈し、80~5 μg の濃度を調整し標準曲線を求めた。

5) 漢方製剤と PCB の培養細胞に及ぼす影響

各種濃度の漢方製剤、PCB（100 $\mu\text{g/ml}$ ）および HeLa 細胞（ 1×10^4 個）を 24 穴プレートで 6 日間培養し、リン酸緩衝液で三回洗浄後、蛋白濃度を測定した。各濃度とも triplicate で実施した。

結果および考察

蛋白濃度の標準曲線の測定結果を図 1 に示した。0~80 μg の領域において良好な結果（ $Y=3.6 X + 0.025$, $R^2=0.994$ ）が得られた。細胞数と蛋白濃度の関係を検討した結果を図 2 に示した。0~40,000 個の細胞数において $Y=5.0 \times 10^{-6} X + 0.027$, $R^2=0.993$ の良好な関係が蛋白濃度との間に認められた。

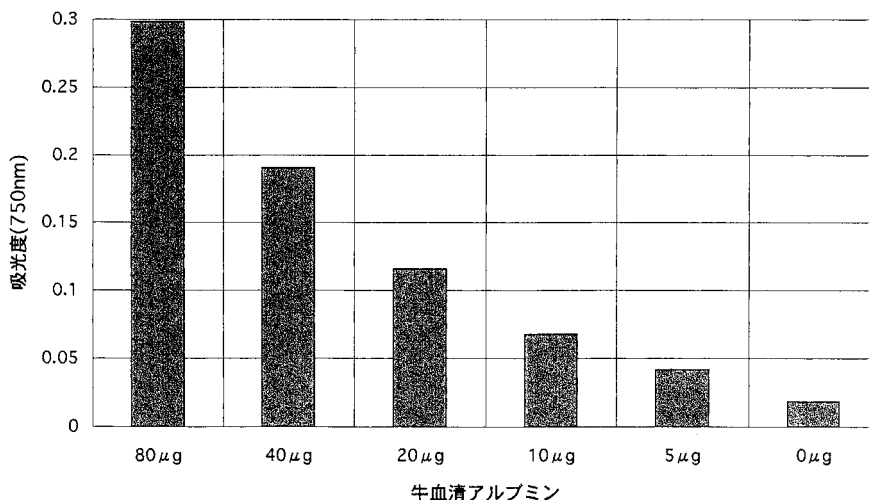


図1 牛血清アルブミン

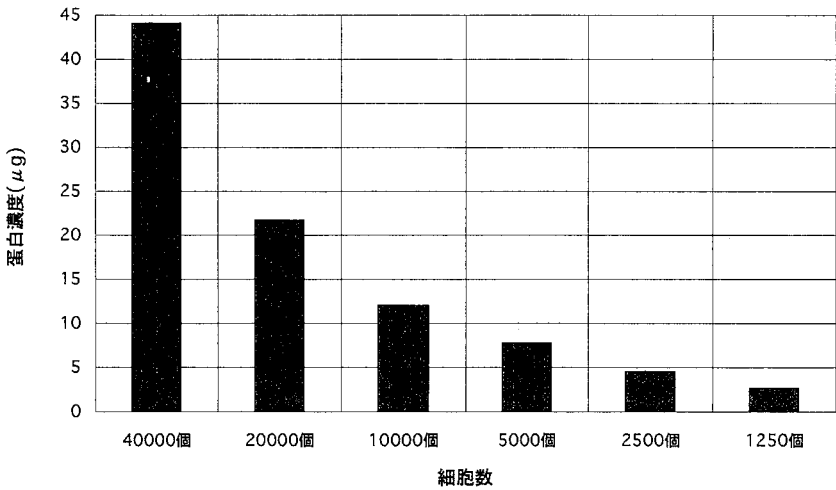


図 2 細胞数

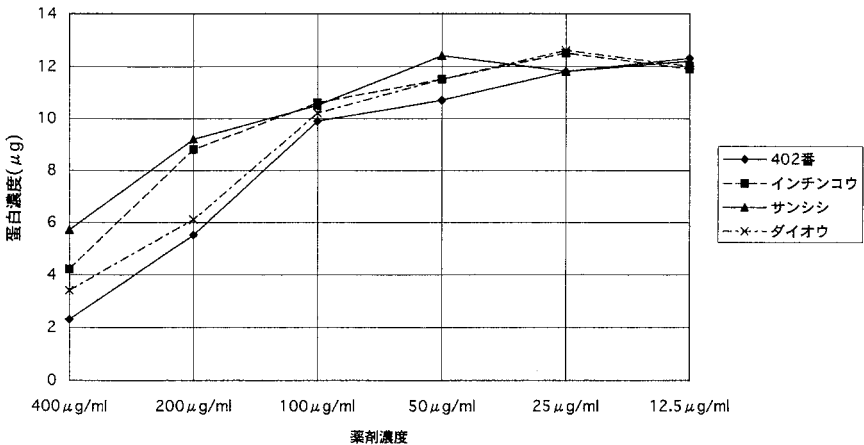


図 3 薬剤濃度

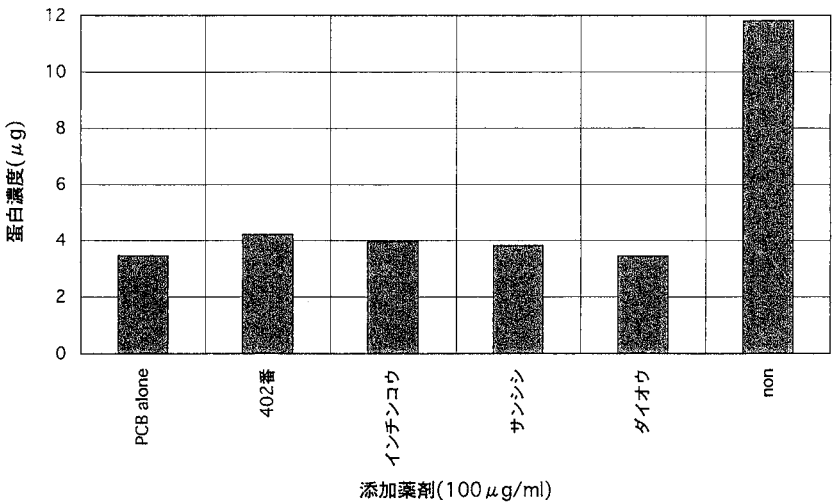


図 4 添加薬剤 (100 μg/ml)

次に図3に漢方製剤単独の各種濃度における培養細胞への影響を検討した結果を示した。50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度では対照群に比べて細胞毒性はなかったが、それを越える濃度からは薬物自身による影響が見られた。また生薬単味より漢方製剤の方が細胞に対する増殖抑制が強い傾向であった。

漢方製剤および生薬の濃度を 100 $\mu\text{g/ml}$ 、PCB (100 $\mu\text{g/ml}$) で培養した結果を図4に示した。PCB 単独の場合は無添加の対照群に比べて30%程度に細胞の蛋白量が減少するものの茵陳蒿湯は、それより20%程増加が見られた。この結果は前報²⁾の吸光度を指標にした結果とほぼ同様であった。

また生薬成分についてはインチンコウやサンシンはやや蛋白量の増加が観察されたものの、ダイオウについてはほとんど変化がなかった。このことは生薬単独成分よりも、三種類の混合物である茵陳蒿湯がより培養細胞の増殖については効果が見られた。

しかし、FisherのPLSD法の検定の結果nonと他のすべての群間で有意差が認められた ($p < 0.0001$) もののそれ以外の群間ではそれがなかった。茵陳蒿湯のPCB毒性軽減作用がどの生薬由来なのか、あるいは合方した結果によるものかの明確な結果は統計学的検討からは得られなかった。

茵陳蒿湯は、医薬品としての効能・効果は尿量減少、やや便秘がちで比較的体力のあるものの黄疸、肝硬変症、ネフローゼ、蕁麻疹および口内炎などの諸症に使用される。茵陳蒿には精油 (capillarin, capillin 等)、クロモン類 (capillarisin 等)、クマリン類 (esculetin 6,7-dimethyl ether 等) およびフラボノイド (cirsilineol) などの主要成分が含まれる。またサンシンはイリドイド配糖体 (geniposide, geniposidic acid 等) やカロチノイド色素 (α -crocin 等) など数多くの有効成分が含有されるので今回の結果が生薬のどの成分に由来するかの同定はきわめて困難であるが、今後の検討課題であろう。

文 献

- 1) 松岡一忠, 塚崎直子, 吉田彦太郎: *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), 福岡雑誌 86: 65-69, 1995.
 - 2) 松岡一忠, 塚崎直子, 吉田彦太郎: 漢方製剤と他の薬剤の組み合わせによる PCB 毒性の軽減, 平成6年度長崎油症研究班研究報告集: 8-15, 1995.
 - 3) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- (受付 1997-3-19)

Polychlorinated Biphenyls (PCB) の末梢神経髄鞘 におよぼす影響について

¹⁾ 長崎大学医療技術短期大学部

²⁾ 長崎大学第一内科

³⁾ 長崎大学医学部中央電子顕微鏡室

吉村俊朗¹⁾・沖田 実¹⁾・上山裕文²⁾・伊藤 聖²⁾

後藤公文²⁾・末松貴史³⁾

Effects of Polychlorinated Biphenyls on Regenerating Myelin of Peripheral Nerve in Rats

Toshiro YOSHIMURA¹⁾, Minoru OKITA¹⁾, Hirobumi UHEYAMA²⁾, Hijiri ITO²⁾,
Hirofumi GOTO²⁾ and Takashi SUEMATSU³⁾

¹⁾ School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852

²⁾ The First Department of Internal Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852

³⁾ Central electron microscopy laboratory, Nagasaki University, School of Medicine, Nagasaki 852

The effects of polychlorinated biphenyls (PCB) on regenerating myelin of the peripheral nerves were investigated in rats. The sciatic nerves were crushed at the mid-thigh level on the last of 32 days of oral administration of PCB. The sciatic nerves were biopsied from the crushed regions at 4, 8 and 12 weeks after crushing. The nerves were fixed in 2.5% glutaraldehyde buffered with 0.1 M sodium cacodylate and embedded in epon 812. The ultrathin sections were analysed by JEOL JEM-1210 with EDAXDX-4. The chloride which was composed of PCB was increased in myeline on 4 weeks after crushing. Freeze fracture study of myelins of sciatic nerves on 8 and 12 weeks after crushing showed an increase of intramembranous particle on 12 weeks and an increase of caveolae on 8 weeks. These results suggest that PCB may affect the plasmamembrane of shwann cell and induce the disturbance of myeline.

は じ め に

Polychlorinated biphenyls (以下, PCB と略す) の慢性中毒は頭痛, 異常感覚, 末梢神経障害などの神経症状をしめす¹⁾³⁾⁷⁾. 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⁸⁾. PCB は末梢神経の再生過程において, 無髄線維に対しては影響を与えないが, 有髄線維に対しては再生過程の 8 週までに大径有髄線維の発育に影響することを報告した⁴⁾⁵⁾. 今回脂溶性である PCB が脂質を多く含む髄鞘に存在するか検討し, また, 髄鞘を freeze fracture 法で観察したので報告する.

方 法

1. 実験動物

実験動物には 8 週齢の Sprague-Dawley 系ラット 24 匹 (体重 280~320 g) を用い, 12 匹ずつ PCB 投与群と対照群の 2 群に振り分けた. 飼育にあたっては, プラスチックゲージを用い, 1 ケージあたり 3~4 匹とした. また, 飼育温度は 22±2°C, 昼夜のサイクルは 12 時間/12 時間とし, 餌と水は自由に摂取させた.

2. PCB の投与

PCB は, 濃度 42% の PCB-42 (東京化成工業) を用い, これをサラダ油に 5 mg/ml の分量で溶解し, 一匹あたり 1.6 g/kg の分量をラット用ゾンデ針を用いて

経口的に神経挫滅までの3週間投与した。同様に、対照群にはサラダ油のみを神経挫滅までの3週間、経口的に投与した。

3. 神経の挫滅

PCB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、両側の坐骨神経を露出、坐骨神経は大腿中央部付近で30 mm一様にペアンにて挫滅し、皮膚の縫合を行った。

4. 神経生検

PCB投与群、対照群ともに神経挫滅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で固定した。

5. エネルギー分散型X線分析

固定された神経組織をアルコール系列で脱水、エポン812に包埋した。超薄切片を作成し、JEOL JEM-1210にフィリップ社のEDAXDX-4を装着した装置で髄鞘部分の塩素(Cl)元素とイオウ(S)元素のピークを求めた。得られたヒストグラムのピークの面積をNIHイメージを用い面積を求め、Cl元素とS元素の比を求めた。

6. Freeze fracture 法

2.5%グルタルアルデヒドで固定された神経組織を30%グリセリンに浸漬した。そして、FED・B-1200を用い、 -110°C 、 5×10^{-7} Torrの条件下で切断を行い、白金プラチニウムでレプリカ膜を作成した。

定量的検索として、最終倍率13万倍でE面とP面の膜内粒子(intramembranous particle)を求めた。また、caveolae密度は6.5万倍でE面とP面を計測した。撮影した細胞膜は髄鞘の確認とcaveolaeの存在する部位を選択した。統計処理には対応のないStudent'sのt検定およびMann-WhitneyのU検定を用い、有意水準は5%とした。

結 果

1. エネルギー分散型X線分析装置

Fig. 1にPCB投与群とコントロール群の髄鞘の分析結果の例を示す。

Fig. 2に示すように挫滅後4週ではPCB投与群では 3.2 ± 0.3 ($n=30$)、コントロール 2.3 ± 0.7 ($n=30$)、8週ではPCB投与群では 3.1 ± 0.4 ($n=30$)、コ

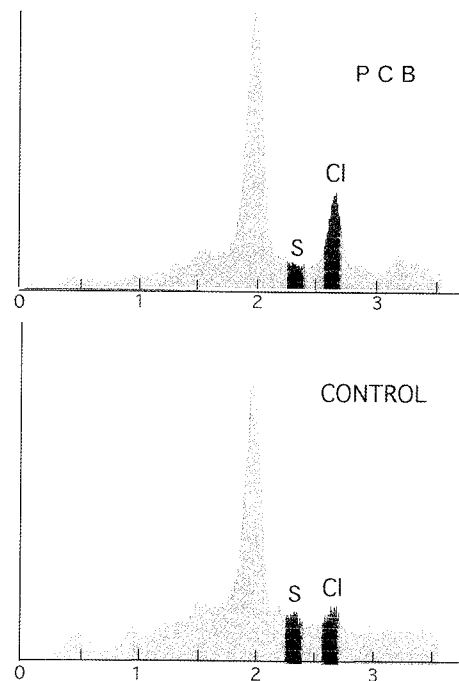


Fig. 1 Data of energy dispersive X-ray analysis for myelins of PCB and control

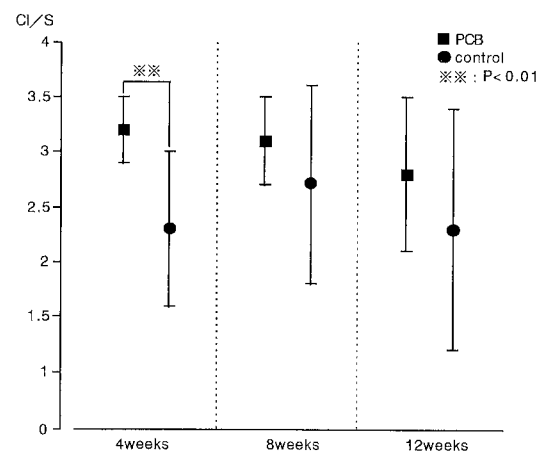


Fig. 2 Ratios of peaks of Cl versus S with energy dispersive X-ray Analysis PCB Ratio in myeline on 4 weeks is higher.

ントロール 2.7 ± 0.9 、12週ではPCB投与群では 2.8 ± 0.7 ($n=30$)、コントロール 2.3 ± 1.1 ($n=30$)であった。Clの増加は4週のみ統計学的に有意差をみとめた。8週および12週ではコントロールとの間に有意差を認めなかった。Cl元素の比は12週になると低

下していた。軸索では高い Cl 元素のピークは認めなかった。

2. Freeze fracture 法

Fig. 3 に PCB 投与群と control の freeze fracture 像をしめす。

a. 膜内粒子密度

神経挫滅後 8 週においては、P 面、E 面ともに PCB 投与群と対照群で膜内粒子密度に差は認められなかった (Fig. 4)。しかし、12 週後においては、P 面、E 面ともに PCB 投与群で膜内粒子密度は有意に増加して

いた (Fig. 5)。

b. Caveolae 密度

caveolae 密度は、神経挫滅後 8 週で、PCB 投与群で有意に増加していた (Fig. 6)。しかし、12 週後では、PCB 投与群と対照群に差を認めなかった (Fig. 7)。

考 察

今回、髄鞘内の Cl の濃度は挫滅後、4 週が高く 8 週、12 週と時間経過とともに減少していた。Freeze fracture による膜内粒子は挫滅後、8 週は変化がなく

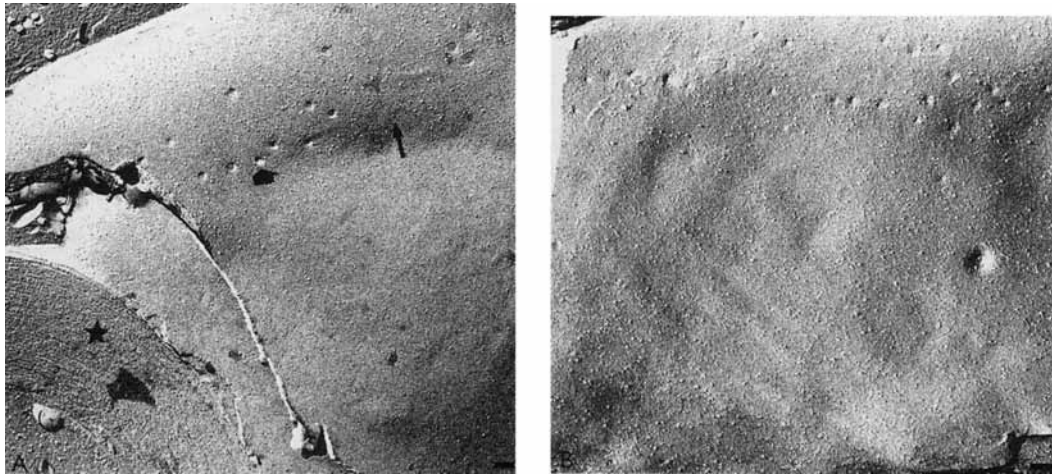


Fig. 3 P faces of myelins in PCB and control on 8 weeks. A : PCB, B : control. Bar=100 nm ★ : myeline ◆ : Cavolae ← : intramembranous particle

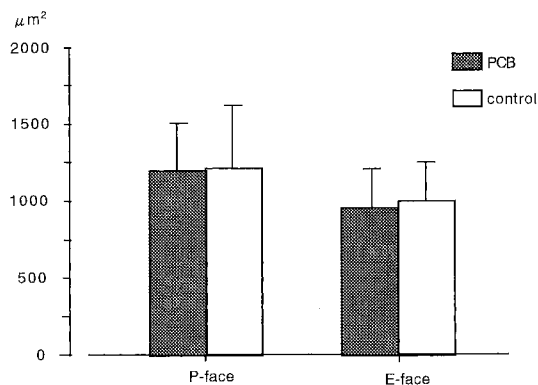


Fig. 4 Intramembrannous particles in the Schwann cells on 8 weeks after nerve crush
No significant differences are observed.

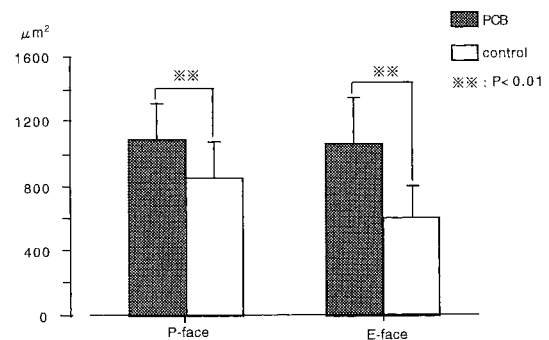


Fig. 5 Intramembrances particles in the Schwann cells on 12 weeks after nerve crush

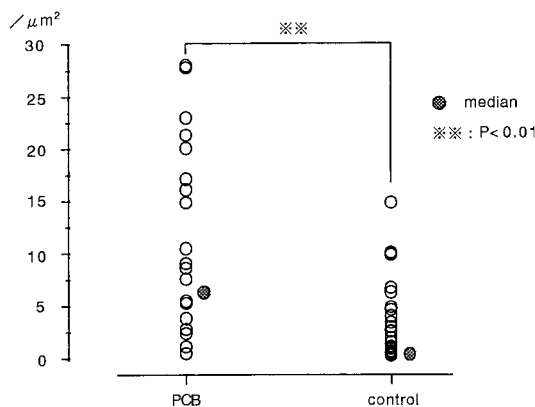


Fig. 6 Caveolar densities in the schwann cells on 8 weeks after nerve crush.

12週で増加し、Caveolaeは逆に挫滅後8週で増加し12週では正常化していた。すでに同様の実験ラットの血中PCB濃度は570 ng/gから3カ月後には20 ng/kgに減少した⁶⁾。

エネルギー分散型X線分析装置は電子線を元素に照射しその時出てくるX線のエネルギーのヒストグラムを作成し、そこに存在する物質の定性に应用されている²⁾。

PCBはClを含むのでCl元素の量を半定量的にでも観察できれば、PCBの存在を推定することが可能となる。しかし、Cl元素のエネルギー量は切片の厚さや照射時間でも変化する。そこで、エポンの中に存在するイオウ元素のエネルギーで補正することで切片の厚さや照射時間による差の補正を行った。その結果はCl元素はPCB血中濃度と同様に減少し、12週ではコントロールと差がなかった。ラットの場合、PCB血中濃度が低下し、組織中のPCB濃度も低下している可能性が高い。

今回は有髄神経の髄鞘を確認できた部位の膜内粒子とcaveolaeの密度を求めた。この部位はシュワン細胞質の近傍と考えられる¹²⁾。末梢神経でのfreeze fractureによる膜内粒子はNa⁺-K⁺ATPaseもしくは、ナトリウムチャンネルを反映していると報告されている⁹⁾¹⁰⁾。12週で増加した膜内粒子は、髄鞘内でのPCBが減少した12週でNa⁺-K⁺ATPaseの活性が高くなったもしくは、ナトリウムチャンネルの活性が亢進したと推定される。

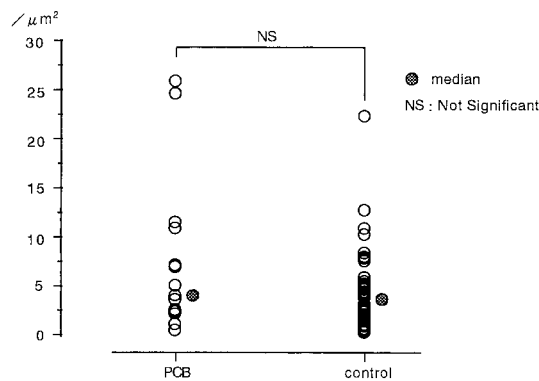


Fig. 7 Caveolar densities in the schwann cells on 12 weeks after nerve crush.

Caveolaeは血管内皮や筋細胞膜など多くの細胞で観察され、何らかの物質の輸送に関与している¹¹⁾。今回の観察でcaveolae密度が4週で統計的に有意に高く12週でコントロールと差がなくなった。髄鞘でのCl元素の動態からPCBが4週で高く12週で正常化していると考えられ、caveolae密度の減少はPCBの減少と関係して変化していると推定できる。

ラットでの実験では人と異なり容易にPCB血中濃度が低下しているので、PCBの影響が生じにくいと考えられる。今回の実験からはPCBは髄鞘に取り込まれ、シュワン細胞膜に影響を与え、有髄神経障害を惹起すると推定される。

総 括

ラットの再生坐骨神経の髄鞘にたいするPCBの影響をエネルギー分散型X線分析装置とfreeze fracture法でみた。髄鞘中のCl元素の量は再生の初期では増加し、caveolaeも増加していた。再生12週ではClとcaveolaeは減少し膜内粒子が増加した。PCBはシュワン細胞膜に影響し有髄神経障害を惹起すると推定される。

文 献

- 1) Chia LG and Chu FL: A clinical and electrophysiological study of patients with polychlorinated biphenyl poisoning. J Neurol Neurosurg Psychiatry 48: 894-901, 1985.

- 2) 長谷川与一：X線マイクロアナリシス一分散細胞 10：2-10, 1978.
- 3) 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.
- 4) 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 84：277-231, 1993.
- 5) 伊藤聖, 吉村俊朗, 古屋孝文, 辻野彰, 末永章人, 長瀧重信：Polychlorinated Biphenyls (PCB) の末梢神経再生へおよぼす影響. 福岡医誌 86：267-272, 1995.
- 6) Ito H, Yoshimura T, Satoh A, Motomura M, Takeo G, Matsuo H, Ohtsuru I, Rikioka Y, Tsujihata M and Nagataki S.: Effects of polychlorinated biphenyls on regeneration of peripheral nerve in rats. Proceedings of the International Conference on Peripheral Nerve Toxicity (1993): 113-117.
- 7) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲治：油症患者における神経学的所見. 福岡医誌 60：462-463, 1969.
- 8) Murai Y and Kuroiwa Y: Peripheral neuropathy in chlorobiphenyl poisoning. Neurology 21: 1173-1176, 1971.
- 9) Peter JB: A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ of sarcolemma from skeletal muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun 40: 1362-1367, 1970.
- 10) Rosenbluth J: Substructure of amphibian motor endplate. J Cell Biol 62: 755-766, 1974.
- 11) Steiman RM, Brodie SE and Cohn ZA: Membrane flow during pinocytosis. A stereological analysis. J Cell Biol 68: 665-687, 1976.
- 12) Stolinski C and Breathnach AS: Freeze-fracture replication of mammalian peripheral nerve—a review. J Neurol Sci 57: 1-28, 1982.
(受付 1997-3-21)

カネミ油症検診者におけるクレアチンキナーゼ上昇の意義

¹⁾ 長崎大学医療技術短期大学部

²⁾ 長崎大学第一内科

吉村 俊朗¹⁾・沖田 実¹⁾・東 登志夫¹⁾

上山 裕文²⁾・伊藤 聖²⁾

Elevation of Serum Creatine Kinase in the Patients with Kanemi Yusho

Toshiro YOSHIMURA¹⁾, Minoru OKITA¹⁾, Toshio HIGASHI¹⁾,
Hirobumi UYAMA²⁾ and Hijiri ITO²⁾

¹⁾ The School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852

²⁾ The First Department of Internal Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852

18.9% of the patients with Kanemi Yusho showed an elevation of serum creatine kinase, however, the cause is still unknown. The relation between exercise, dehydration, thyroid hormone and concentration of PCB was studied. Dehydration, hyperexercise and PCB affected the elevation of creatine kinase. No relation between PCB and thyroid hormone or creatine kinase and thyroid hormone was observed. PCB may change the permeability of muscle plasmamembrane.

目 的

カネミ油症患者検診においてクレアチンキナーゼ(以下CK)の上昇が認められているが、その意義を検討した報告はない。一般にCKの上昇は筋疾患で認められ、末梢神経の異常でも認められる。また、甲状腺機能低下症でもCKが上昇する⁸⁾。一方、PCBは血中の甲状腺ホルモン低下を来すことが動物実験で報告されている²⁾⁶⁾⁷⁾。そこで、カネミ油症検診者で認められるCKの上昇の意義を検討した。

研 究 方 法

平成4年から平成7年までのカネミ油症検診受診者(平成4年120名、平成5年135名、平成6年134名、平成7年95名)の血清CKの値と脱水の指標としてヘマトクリット値(Hct)、血清尿素窒素(BUN)の値、さらに血液中的PCB濃度を求めた。また、検診の日の仕事の状況を聴取し、その程度を肉体労働なし:0、軽労働:1、中労働:2、重労働:3にランク付けした。また、平成7年度については、これらの他にfree T₄、

TSHの値も求めた。統計処理としては、相関分析と重回帰分析を用い、有意水準は5%とした。

結 果

各年度の血清CKの有効サンプルは、平成4年度115名、平成5年度134名、平成6年度137名、平成7年度95名で、これらのサンプルのうち血清CKの上昇を認めたものは平成4年度26名(22.6%)、平成5年度19名(14.2%)、平成6年度27名(19.7%)、平成7年度17名(17.8%)であった。平成7年度の血清CK値、PCB濃度、free T₄の分布を示す(Fig. 1)。平成5、6、7年の3年間の有効延べサンプル(n=263)について相関分析を行うと、血清CKはHct、BUN、PCB濃度、仕事量と有意な相関関係が認められた。また、BUNとPCB濃度の間にも有意な相関関係が認められた(Fig. 2)。

そこで、血清CKを目的変数、Hct、BUN、PCB濃度、仕事量の4変数を説明変数とした重回帰分析を行い、血清CKの大きさに直接的な影響を及ぼす因子を検討した。重回帰分析では、Table 1に示す分散分析

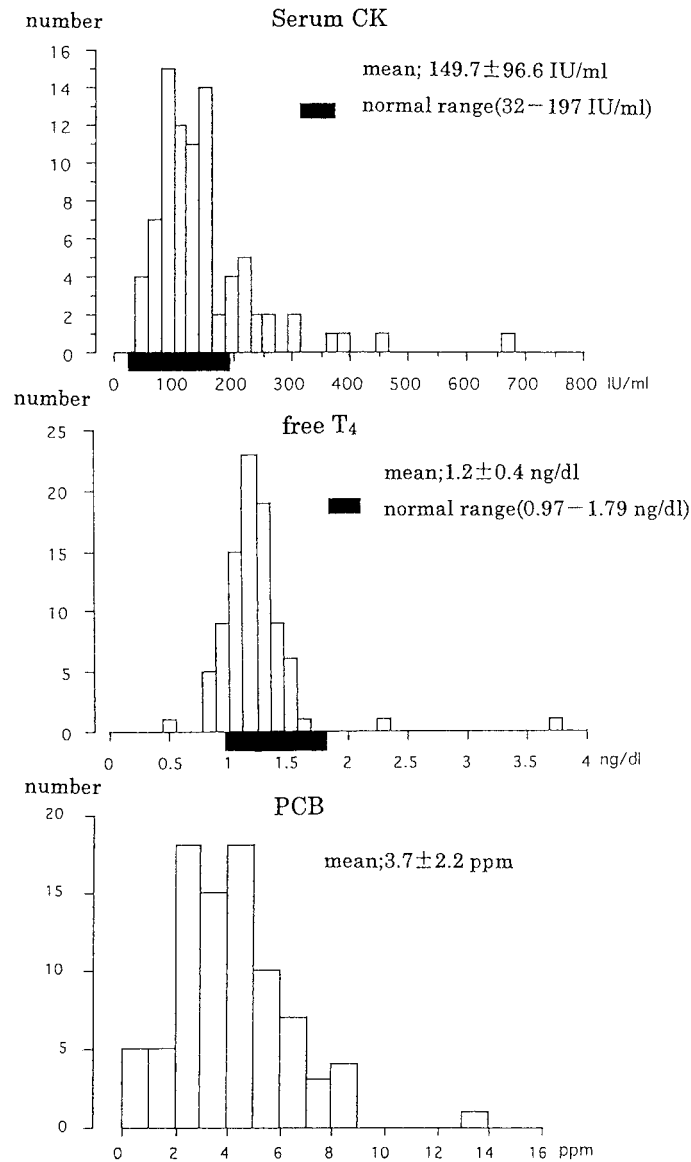


Fig. 1 Histograms of serum CK, free T₄ and concentration of PCB from the subjects in 1995

表のように有意な結果が得られた。次に、各説明変数の標準偏回帰係数を算出すると、Hct -0.19 , BUN 0.14 , PCB 濃度 0.15 , 仕事量 0.25 で、仕事量が最も直接的な因子で、次いで PCB 濃度, BUN の順であった。また, Hct は負の直接的な因子であった (Table 1)。

平成 7 年度において、甲状腺ホルモンの異常は 3 名

にみられ、このうち 1 名は甲状腺機能亢進症 1 名、機能低下症 2 名であった。また、血清 CK は free T₄, TSH の値との相関も認められなかった。

考 察

今回の分析では PCB の血中濃度が高い患者で受診当日の運動量が多くヘマトクリットの値が低く、尿素

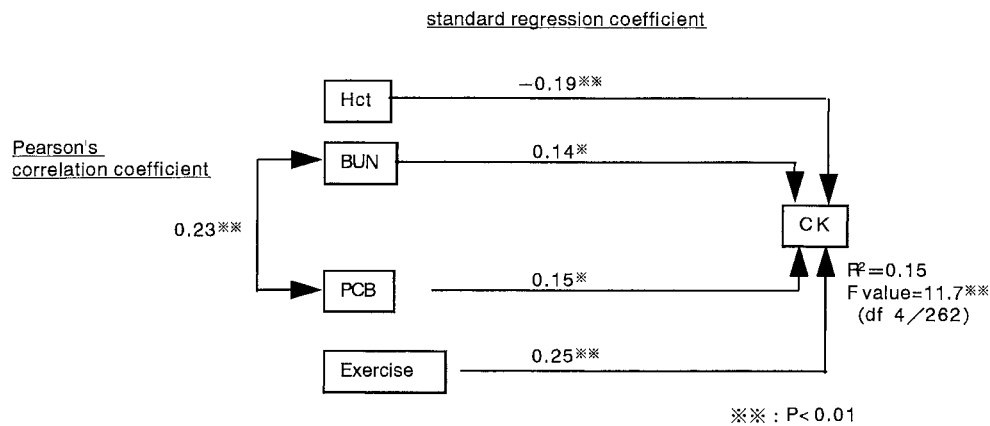


Fig. 2 Results of multiple regression

Table 1 Pearson's correlation coefficient

	CK	Hct	BUN	PCB	WORK
CK					
Hct	-0.17^{**}				
BUN	0.21^{**}	-0.04			
PCB	0.18^{**}	0.03	0.23^{**}		
Exercise	0.25^{**}	0.09	0.10	0.01	

* * : $P < 0.01$

窒素の値が高い受診者に血清 CK 値は上昇することが示唆された。また、血清の free T_4 と PCB 濃度、血清 TSH と PCB 濃度の間に何ら相関を認めなかった。血清 CK の上昇と甲状腺ホルモンの値も相関をみとめなかった。

BUN の上昇は、検診時期が真夏の暑い時期であり、労働もしくは運動による発汗、脱水に伴うものと推測したが、今後腎機能との関係など、検討が必要であろう。血清ヘマトクリットの低下の原因は、今回検討していない。血清 CK は 95% 以上が筋組織に由来し、筋組織障害の指標として知られている。そして過度の運動負荷により正常人でも血清 CK の上昇が報告されているが¹⁾⁵⁾⁹⁾、筋細胞膜の透過性の亢進で上昇することもある³⁾。また、甲状腺機能低下症でも血清 CK の上昇は認められるが、血清 CK と甲状腺ホルモンの有意な関連はなく、カネミ油症検診者においては血清 CK の上昇は甲状腺機能低下症が原因とは考え難い。また筋組織壊死を伴った変化が骨格筋にあるかどうかの検

討はされていないが、血清 CK の上昇に関しては、筋組織での酸素供給の低下、筋細胞膜の代謝の低下、筋細胞膜の透過性の亢進など推察されるが詳細は不明である。

血清 PCB 濃度の上昇は、甲状腺機能低下症もしくは、甲状腺ホルモンの低下を来すことが報告されている²⁾⁷⁾。ラットにおける研究では free T_4 の低下が報告されているが⁴⁾ TSH や T_3 の値は変化を認めていない⁶⁾。また、人の新生児において血清 TSH の高値、free T_4 の低値などが報告されている²⁾。これら甲状腺ホルモンの低下は、肝における UDP-glucuronosyl transferase が誘導されることによると考えられている⁴⁾。平成 7 年度検診受診者において、甲状腺機能低下症が 2 名、甲状腺機能亢進症 1 名が見いだされたが、PCB 血中濃度と甲状腺ホルモンの関係はまったくなく、また臨臨床的にも問題なかった。

カネミ油症患者において、血清 CK の上昇しやすい状態が認められるが、その原因は筋細胞膜の変化によ

るものか、末梢神経の変化に伴うものか不明で今後の検討が必要と考えられる。

ま と め

カネミ油症検診者において18.9%に血清CKの上昇が認められる。その原因として脱水や健診前の運動量、甲状腺ホルモン、PCBとの関係を検討した。その結果、ヘマトクリットの値が低く、尿素窒素の値が高く、受診当日の運動量が多くPCBの血中濃度が高い患者で血清CK値は上昇することが示唆された。また、血清のfree T₄とPCB濃度、血清TSHとPCB濃度の間に何ら相関を認めなかった。CKの上昇と甲状腺ホルモンの値も相関をみとめなかった。

参 考 文 献

- 1) Aizawa H, Morita K, Minami H, Sasaki N and Tobise K: Exertional rhabdomyolysis as a result of strenuous military training. *J Neurol Sci* 132(2): 239-240, 1995.
- 2) Koopman-Esseboom C, Morse DC, Weisglas-Kuperus N, Lutkeschipholt IJ, Van der Paauw CG, Tuinstra LG, Brouwer A and Sauer PJ.: Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone status of pregnant women and their infants. *Pediatr Res*. 36(4): 468-473, 1994.
- 3) Kuipers H: Exercise-induced muscle dam-

age. *Int J Sports Med* 15(2): 132-135, 1994.

- 4) Liu J, Liu Y, Barter RA and Klaassen CD.: Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyl transferase inducers in rats: a dose-response study. *J Pharmacol Exp Ther* 273(2): 977-985, 1995.

- 5) Schneider CM, Dennehy CA, Rodearmel SJ and Hayward JR: Effects of physical activity on creatine phosphokinase and the isoenzyme creatine kinase-MB. *Ann Emerg Med* 25(4): 520-4, 1995.

- 6) Seo BW, Li MH, Hansen LG, Moore RW, Peterson RE and Schantz SL: Effects of gestational and lactational exposure to coplanar polychlorinated biphenyl (PCB) congeners or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on thyroid hormone concentrations in weanling rats. *Toxicol Lett* 78(3): 253-62, 1995.

- 7) Stone R: Environmental toxicants under scrutiny at Baltimore meeting, news. *Science*. 267(5205): 1770-1, 1995.

- 8) 庄司進一: 日本臨床広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査—その数値をどう読むか— 上銘外喜夫編: クレアチンキナーゼ 第4版 pp.262-265, 日本臨床社 大阪 1995.

- 9) Soricter S, Koller A, Haid C, Wicke K, Judmaier W, Werner P and Raas E: Light concentric exercise and heavy eccentric muscle loading: effects on CK, MRI and markers of inflammation. *Int J Sports Med* 16(5): 288-92, 1995.

(受付 1997-3-21)

油症患者の自他覚症状と血中 PCB 濃度

— 発生 25 年後の検診結果より —

九州大学医学部公衆衛生学講座
廣 田 良 夫・徳 永 章 二
福岡県保健環境研究所
片 岡 恭 一 郎・篠 原 志 郎

Symptoms and Blood PCB Level among Chronic Yusho Patients, Twenty-five Years after Outbreak

Yoshio HIROTA and Shoji TOKUNAGA

Kyushu University, School of Medicine, Department of Public Health

Kyoichiro KATAOKA and Shiro SHINOHARA

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

To investigate the frequency of symptoms and signs and their relationships with blood PCB (polychlorinated biphenyls) levels, twenty-five years after outbreak, we analyzed the data of 276 Yusho patients (male/female: 137/139) who had received health examination in 1993. For this purpose, 31 examination items which correspond or relate to the diagnostic criteria for Yusho (1976) were selected from the examination form. Mean blood PCB concentration in the subjects was 4.69 ppb with the highest value of 31.0 ppb (median: 4.0 ppb). The symptoms for which the proportion exceeded 60% were general fatigue, headache and numbness in extremities. Chronic bronchitis-like symptoms, such as cough and sputum, were observed in 50% of the subjects. Next, the subjects were classified into approximate quartiles of blood PCB: <3.00, 3.00-4.06, 4.07-5.99, and 6.00+ppb. The distributions of subjects at four levels of blood PCBs were compared between the groups with or without each symptom or sign, using the Cochran-Mantel-Haenszel test. Significant differences were observed for comedones in the trunk ($P=0.02$) and other regions ($P=0.02$); acneiform eruptions in the genital regions ($P=0.01$) and gluteal regions ($P=0.01$); and hypersecretion in the Meibomian gland ($P=0.04$). Thus, the typical skin and eye symptoms in Yusho patients still persist showing a close relation with blood PCB concentration.

は じ め に

油症発生(1968)以降年月の経過にともなって、急性期の患者に認められた皮膚・眼症状などの典型症状は消褪し、各種自覚症状が主体を占めるようになってきている。このような慢性期患者の症状を把握し、患者の健康管理に資する目的で、1986年より全国統一検診が行われている²⁾。

著者らは発生20年後(1988)の全国統一検診結果を

用いて、一部に認める典型症状に加え、軽視されがちな全身倦怠感、頭重・頭痛などの自覚症状に関しても、なお今日血中PCBレベルと関連を示すことを報告した³⁾。また急性期に著しい高値を示した血清中性脂肪は、既に一般健常者のレベルと殆ど差異が無いにもかかわらず、依然として血中PCB濃度と明らかな相関を示すことを報告した⁴⁾。

これらの検討に引き続き、今般油症発生25年後(1993)の全国統一検診結果を用いて、自他覚症状に

関し頻度および血中 PCB 濃度との関連について解析を行ったので報告する。

対 象 と 方 法

1993 年の受診者数は福岡県 89 人, 長崎県 135 人, その他の県 88 人, 計 312 人 (男/女: 143/169) であり, この中の認定患者 276 人 (137/139) を解析対象とした。有所見率に地域差を認めたため, 血中 PCB 濃度と有所見頻度との関連については, 福岡県の認定患者 83 人 (28/55) に限って検討した。本稿で提示する数値がこれら解析対象者数と合致しない例は, 検診所見の無記載を除外したためである。

検討した自他覚症状は, 統一検診票の項目のうち油症診断基準 (1976 年補遺) に述べられている重要所見および参考所見と, 合致または関連する項目である³⁾。内科検診票からは以下の項目を抽出した: 自覚症状 (全身倦怠感, 頭重・頭痛, 咳嗽, 喀痰, 腹痛, しびれ感, 月経異常); 他覚症状 (呼吸音異常, 肝腫, 脾腫, 感覚障害, 肝・胆・脾エコー)。皮膚科検診票からは以下の項目を抽出した: 自覚症状 (最近の化膿傾向); 他覚症状 (黒色面皰, 痤瘡様皮疹, 色素沈着, 爪変形)。眼科検診票からは以下の項目を抽出した: 自覚症状 (眼脂過多); 他覚症状 (眼瞼結膜色素沈着, 瞼板腺嚢胞形成, 瞼板腺チーズ様分泌物圧出)。

上記検診項目について記載された結果を, (所見あり/所見なし), または (異常/正常) の 2 つのカテゴリーに分類した。結果の記載が 3 つ以上のカテゴリーに分類されている場合: 内科自覚症状項目に関しては (+ または #) を所見あり, (-) を所見なし; 皮膚科他覚所見項目と眼科検診項目に関しては (+, #, または ##) を所見あり, (- または ±) を所見なし, とした。

血中 PCB 濃度と有所見頻度との関連を検討するため, まず解析対象全員の四分位数に基づき, 血中 PCB 濃度を, <3.00, 3.00-4.06, 4.07-5.99, 6.00+ppb の 4 レベルに区分した。次に各検診項目について, 有所見者と無所見者における PCB 濃度 4 レベル間の分布の差を Cochran-Mantel-Haenszel test により検定した。

結 果

解析対象 (認定患者) 276 人の年齢分布は, 60 歳代が 35 % と最も多く, 50 歳~79 歳で全体の 78 % を占めた。血中 PCB 濃度が記載されていたのは 265 人であり, 平均 4.69 ppb (標準偏差 3.48), 中央値 4.0 ppb, 最高 31.0 ppb であった。

有所見の頻度が 1988 年と 1993 年の両検診結果で 10 % を超えるのは (Table 1): 内科検診項目では, 全身倦怠感, 頭重・頭痛, 咳嗽, 喀痰, 腹痛, 四肢しびれ感, 月経異常, 肝・胆・脾エコー; 皮膚科検診項目では, 化膿傾向, 黒色面皰 (軀幹), 爪変形; 眼科検診項目では, 眼脂過多, 瞼板腺嚢胞形成である。特に全身倦怠感, 頭重・頭痛, および四肢しびれ感は両年の検診結果とも有所見率がほぼ 60 % か, それ以上である。今回の検診結果のうち有所見頻度が高い項目について, 福岡県, 長崎県, その他の県で個別に観察すると, 殆どの項目で長崎県の有所見率が低い。これら 3 地域間で, 内科検診項目の喀痰, 腹痛, 肝・胆・脾エコーの有所見率を比較すると, 最高と最低で 2 倍程度異なっている。同様に皮膚科検診項目では, 化膿傾向, 黒色面皰 (軀幹), 爪変形で 4 倍程度の差異を認めるとともに, 長崎県において痤瘡様皮疹, 色素沈着の有所見率が極めて低い。眼科検診については 4 項目すべてにおいて有所見率は福岡県で顕著に高く, 長崎県で低い。

総計 31 の検診項目に関し, 福岡県の結果を用いて検討したところ (Table 2), 血中 PCB 濃度との有意な関連を認めたのは, 黒色面皰 (軀幹, その他の部位), 痤瘡様皮疹 (外陰部, 臀部), 瞼板腺チーズ様分泌物圧出, であった。特に皮膚症状については血中 PCB 濃度が低レベルに属する受診者では所見を認めない。一方血中 PCB 濃度が最高レベル (6.00 ppb 以上) を示す受診者では, 黒色面皰 (軀幹) で 16 %, 黒色面皰 (その他) で 50 %, 痤瘡様皮疹 (外陰部) で 20 %, 痤瘡様皮疹 (臀部) で 25 %, 瞼板腺チーズ様分泌物圧出で 33 % と高い有所見率を認めた。

これら皮膚・眼症状以外の検診項目については, 所見の有無と血中 PCB 濃度の間に有意な関連は認めなかった。比較的高い有所見率を示した, 化膿傾向, 色素沈着, 爪変形, 眼脂過多, 眼瞼結膜色素沈着, 瞼板

Table 1 The frequency (%) of symptoms or signs either corresponding or related to the diagnostic criteria for Yusho at the chronic stage.

Symptom or sign	Examination in 1993				Results in 1988 ^{a)}
	Fukuoka	Nagasaki	Other areas	Total	
Internal medicine					
1.General fatigue	76.8	61.8	73.6	69.7(184/264) ^{b)}	76.1
2.Headache	63.4	52.7	59.7	58.0(153/264)	67.3
3.Cough	59.8	40.9	51.4	49.6(131/264)	51.0
4.Sputum	62.2	27.3	52.8	45.1(119/264)	52.0
5.Abdominal pain	39.0	23.6	45.8	34.5 (91/264)	43.2
6.Numbness in the extremities	65.9	56.9	52.8	58.6(154/263)	61.9
7.Troubles with menstruation	20.0	11.1	11.8	14.1 (9/64)	19.3
8.Abnormal breath sounds	1.3	0	2.8	1.2 (3/260)	2.7
9.Hepatomegaly	1.3	5.5	2.8	3.4 (9/261)	7.8
10.Splenomegaly	1.3	0	0	0.4 (1/260)	0
11.Paresthesia in extremities	5.4	2.8	12.5	6.3 (16/254)	7.5
12.Abdominal ultrasonography	63.4	30.0	30.0	48.0 (73/152)	33.7
Dermatology					
13.Liability to suppuration	18.5	6.5	27.8	16.2 (42/260)	16.6
14.Comedones in the face	4.9	10.0	11.4	8.8 (23/261)	12.1
15. in the auricles	3.7	5.5	16.7	8.0 (21/263)	7.4
16. in the trunk	3.8	13.6	19.4	12.2 (32/262)	11.8
17. in other regions	16.7	0	0	2.0 (4/197)	2.9
18.Acneiform eruptions in the face	9.3	0	18.1	7.8 (20/257)	4.7
19. in the genital regions	7.4	0	7.0	4.2 (11/262)	4.7
20. in the gluteal regions	7.5	0	18.1	7.3 (19/262)	3.5
21. in the trunk	5.0	0	31.9	10.3 (27/262)	6.3
22. in other regions	5.0	0	0	0.5 (1/192)	1.5
23.Pigmentation in the face	2.6	0	13.9	4.6 (12/260)	2.7
24. in the fingernails	1.2	0	20.8	6.1 (16/263)	2.3
25. in the toenails	11.1	0.9	8.3	6.1 (16/263)	6.3
26. in other regions	5.0	0	12.1	4.6 (9/194)	0
27.Deformity of nails	12.8	4.6	16.7	10.4 (27/259)	10.3
Ophthalmology					
28.Hypersebum	34.9	1.8	33.8	20.8 (54/260)	15.3
29.Pigmentation in palpebral conjunctiva	18.1	1.9	4.5	7.8 (20/258)	4.4
30.Meibomian gland, cystic degeneration	43.4	2.8	8.8	17.3 (45/260)	12.0
31. hypersecretion	17.3	0	9.0	12.7 (20/157)	4.6

^{a)} From the reference²⁾.^{b)} The number of subjects with symptoms or signs in the numerator, and the number of total subjects examined in the denominators.

腺嚢胞形成についても、有意な関連は認めない ($P=0.31\sim 1.00$)。有意な関連を認めた 5 項目 (Table 2) について、ロジスティックモデルにより性、年齢を補正して血中 PCB 濃度が有所見に及ぼす影響を検討したところ、痤瘡様皮疹 (臀部) でオッズ比 4.41、95 %

信頼区間 1.04-18.69 ($P=0.04$)、睑板腺チーズ様分泌物圧出で各々 2.15、1.10-4.18 ($P=0.02$) であり、これら 2 症状と血中 PCB 濃度との間に明らかな関連を認めた。

Table 2 The distribution of subjects with or without selected signs based on the blood PCB level, and the results of the trend test (Fukuoka)

Signs and category	No. of subjects by blood PCB level (ppb)				Total	Trend-p ^{a)}
	<3.00	3.00-4.06	4.07-5.99	6.00+		
Comedones (trunk)						
Presence	0(0) ^{b)}	0(0)	0(0)	3(16)	3(4)	0.02
Absence	21	13	27	16	77	
Comedones (other regions)						
Presence	0(0)	0(0)	2(29)	2(50)	4(17)	0.02
Absence	5	8	5	2	20	
Acneiform eruptions (genital regions)						
Presence	0(0)	0(0)	2(7)	4(20)	6(7)	0.01
Absence	21	13	25	16	75	
Acneiform eruptions (gluteal regions)						
Presence	0(0)	1(8)	0(0)	5(25)	6(8)	0.01
Absence	21	12	26	15	74	
Meibomian gland, hypersecretion						
Presence	2(10)	1(7)	5(19)	6(33)	14(17)	0.04
Absence	19	14	22	12	67	

^{a)} Cochran-Mantel-Haenszel test.

^{b)} Proportion (%) of positive sign in each PCB level.

考 察

全国統一検診が1986年に開始されて以降、当初2年間は情報処理システムの構築に努力が払われた⁶⁾。その後各方面の尽力により本検診の実施体制が安定的に確立されることとなったが、この間検診結果の地域差が示唆されることがあった。今回1993年の検診結果について観察したところ、福岡県、長崎県、その他の県で有所見率に大きな差異を認めた。全体的には長崎県で有所見率が低く、皮膚症状に関してはその他の県、眼症状では福岡県の有所見率が高い傾向にある。発生当時の患者の暴露形態、ライフスタイルの地域差など複雑な要因の関与に加え、検診における判定の差異も考慮する必要がある。

そのような背景を踏まえたうえでも、発生20年後(1988)および25年後(1993)の両検診において高い有所見率を示した、全身倦怠感、頭重・頭痛、および四肢しびれ感、慢性期油症患者の三大自覚症状と言え得るものである。同様に咳嗽、喀痰を訴える頻度も高い。これら慢性気管支炎様症状は発症10年以降殆ど改善の兆候は認められておらず¹¹⁾¹⁴⁾、1988年の検診以

降も同様の有所見率を示していることから、ほぼ固定したと考えられる。肝・胆・脾エコーでは1988年の検診同様に高い有所見率を示したが、血中PCB濃度との関連を認めないという点においてもまた同様である。PCDFsは長期にわたってヒト肝に残存し⁷⁾、また動物実験でも高い蓄積性や強い毒性が確認されているが¹²⁾¹³⁾、本検診項目における高い有所見率は病理的意義とは関連しないものであろう。

患者の皮膚症状は発生初期に著しい改善を認めているが、その後は徐々に改善傾向を示したに過ぎない¹⁵⁾¹⁶⁾。また当初高度な皮膚症状を示した例では長期に渡って当該症状の残存を認めている¹⁾。今回の検診でも、黒色面皰、および痤瘡様皮疹の有所見率は、10%程度である。特に軀幹の黒色面皰と外陰部の痤瘡様皮疹は、前報告と同様に血中PCB濃度と有意な関連を示している³⁾。これらの皮膚症状は日光に暴露しない部位で残存する傾向を認めることから¹⁵⁾、今後の検診においては観察部位に、より一層注意を払うことが望まれる。

油症患者には当初眼瞼浮腫、瞼板腺の腫大・分泌過多、白色チーズ様物排出などが認められている⁵⁾。これ

らの重篤な眼症状は徐々に消退し軽微となっているものの⁸⁾¹⁰⁾、一部の患者では瞼板腺病変が依然として続いている⁹⁾。今回の検診でも受診者の10~20%に眼症状を認めており、特に福岡県の受診者に限った解析では、血中PCB濃度と瞼板腺チーズ様分泌物圧出に明らかな関連を認めた。

黒色面皰、痤瘡様皮疹、および瞼板腺病変は今回においても血中PCB濃度と強く関連しながら患者の主症状を形成しており、この傾向は今後も永く継続すると考えられる。従って検診の判定の差異を出来る限り克服して、これらの症状の観察を注意深く行ってゆくことが望まれる。

ま と め

油症発生25年後(1993)の全国統一検診結果をもとに、有所見の頻度、および症状の有無と血中PCB濃度との関連を検討するとともに、発生20年後(1988)の検診について行った同様の解析結果と比較した。

- 1) 全身倦怠感、頭重・頭痛、および四肢しびれ感を受診者の60~70%に認める。これらは慢性期油症患者の三大自覚症状と考えられる。
- 2) 咳嗽、喀痰といった慢性気管支炎様症状を受診者の50%に認める。これらの所見は一部の患者に固定したものと考えられる。
- 3) 黒色面皰と痤瘡様皮疹は、血中PCB濃度と関連しながら一部の患者で長期に残存している。今後の皮膚科検診においては、部位による差異についても考慮する必要がある。
- 4) 瞼板腺病変を受診者の10%に認めた。チーズ様分泌物圧出については、血中PCB濃度との関連を認めた。
- 5) 検診を実施する地域により、有所見率が大きく異なる項目がある。受診者の地域差も否定できないが、検診における判定の差異を出来る限り克服する必要がある。特に皮膚・眼症状について特段の改善が望まれる。

文 献

1) 本房昭三、永江祥之介、利谷昭治、旭正一：昭和62~63年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状および長期追跡例における皮膚症状の推移。福岡医

誌 80:324-330, 1989.

2) Hirota Y, Kataoka K and Hirohata T: Annual health examinations of Yusho patients, In Kuratsune M, et al (ed): YUSHO-A human disaster caused by PCBs and related compounds. pp: 249-266, Kyushu University Press. Fukuoka, 1996.

3) 廣田良夫、廣畑富雄、片岡恭一郎、篠原志郎、高橋克巳：油症患者の血中PCB濃度と自他覚症状の関連—全国油症患者追跡検診結果の比較研究。福岡医誌 82:335-341, 1991.

4) Hirota Y, Kataoka K, Tokunaga S, Hirohata 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.

5) 生井浩、杉健児、宇賀茂三：油症患者の眼症状および油症患者結膜の電子顕微鏡組織学的所見。福岡医誌 60:432-439, 1969.

6) 片岡恭一郎、大久保彰人、篠原志郎、廣田良夫、廣畑富雄：全国油症患者追跡検診の情報処理システムと昭和61年度検診結果について。福岡医誌 80:331-341, 1989.

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

8) 向野利彦、大西克尚、廣中博見：油症患者の眼症状(第5報)：瞼板腺圧迫排出物中PCBの検出。福岡医誌 72:237-241, 1981.

9) 向野利彦、大西克尚、廣中博見：油症患者の眼症状(第6報)：瞼板腺内容物採取の工夫とPCB濃度。福岡医誌 76:244-247, 1985.

10) 向野利彦、山名泰生：油症患者の眼症状(第4報) 発症10年後の検討。福岡医誌 70:181-186, 1979.

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

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

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

14) 重松信昭、石井秀三、池田東吾、他：油症における呼吸器障害と血中ならびに喀痰中のPCB濃度との関係。福岡医誌 68:133-138, 1977.

15) 利谷昭治：昭和46年度一斉検診による油症患者

- 者の皮膚所見. 福岡医誌 63:46-49, 1972. 68:152-155, 1977.
- 16) 利谷昭治, 旭正一, 占部治邦: 昭和 60~61 年 (受付 1997-3-31)
度の年次検診における油症皮膚症状の推移. 福岡医誌

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 (第二報)

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・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

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 in 1996

Isamu HASHIGUCHI, 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

Hiroshi FUKUYAMA

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

Hidehiko OKUMURA

Okumura Dental Clinic, Nagasaki 852

An epidemiologic examination was carried out to reveal the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in patients with Yusho 28 years after PCB exposure.

The results obtained were as follows.

- 1) 162 teeth out of a total of 309 examined teeth had a periodontal pocket deeper than 3 mm, although 32 teeth out of 162 teeth had a periodontal pocket deeper than 4 mm.
- 2) Oral pigmentation was observed in 47 out of 82 patients with Yusho. It was particularly noteworthy that gingival pigmentation was observed at a much higher frequency in younger patients while pigmentation of the buccal mucosa, the lips or the palate was observed at a much higher frequency in older patients.

は じ め に

油症患者の口腔内症状については年一回行われる油症患者の一斉検診において追跡調査を行っており、そ

の結果、油症患者において歯周疾患罹患率や色素沈着の発現率が高いことを報告してきた¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁶⁾。今回は、その続報として平成8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、口腔内疾患、とくに歯周

疾患や色素沈着の罹患状態について報告するとともに、平成6年度のデータと比較しこれら疾患の経年的変化についても検討を行った。

検 診 方 法

平成8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、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。

表1 油症患者の年代別受診者数

年代	男性	女性	計
20代	1(1)	0(0)	1(1)
30代	0(0)	3(3)	3(3)
40代	1(1)	6(6)	7(7)
50代	4(4)	10(10)	14(14)
60代	14(13)	17(15)	31(28)
70代	4(2)	16(12)	20(14)
80代	4(0)	2(0)	6(0)
計	28(21)	54(46)	82(67)

()：歯周ポケット診査対象歯が少なくとも1歯以上残存している患者数

結 果

平成8年度の福岡県油症一斉検診を受診した油症認定患者は82名（男性28名、女性54名）で（表1）、そのうち平成6年度にも受診していた患者は53名であった。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39名で、その内訳は歯牙挺出感（10名）、歯肉出血（9名）、歯痛（7名）、歯肉腫脹（6名）、義歯不適合（5名）、歯牙の動揺（5名）、その他8名で、歯周組織の異常の訴えが多く、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67名（男性21名、女性46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歯以上有するもの57名（85.1%）と高い割合を示し、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は、総被検歯309歯のうち162歯（52.4%）と過半数の歯牙に歯周ポケットが認められ、部位別にみると〔6〕が64.6%と最も高い罹患率を示し、次いで〔4〕、〔6〕、〔4〕、〔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23名（34.3%）と減少し、総被検歯309歯のうち32歯（10.4%）にみられたのみであった。図1は、歯周ポケット診査対象歯牙における3mm以上の歯周ポケットの罹患率ならびに喪失率を年代別に示したものである。3mm以上の歯周ポケットを有する歯牙は、40歳未満では約33%なのに対し、40歳以上では

表2 3mm以上の歯周ポケットの分布状態

年代	罹患歯数 0		1		2		3		4		5		6		計 (名)
	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	
20代	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30代	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3
40代	0	2	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1	7
50代	2	0	0	2	1	3	0	2	1	1	0	0	0	2	14
60代	2	3	5	1	1	5	2	1	4	0	2	1	1	0	28
70代	0	1	1	5	1	0	0	2	0	3	0	1	0	0	14
計(名)	4	6	7	9	3	9	3	5	5	7	2	3	1	3	67

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	10	4	9	12	9	11	55
	総被検歯数	16	14	16	19	18	16	99
	%	62.5	28.6	56.3	63.2	50.0	68.8	55.6
女性	罹患歯数	21	17	17	20	16	16	107
	総被検歯数	32	35	37	37	37	32	210
	%	65.6	48.6	45.9	54.1	43.2	50.0	50.9
計	罹患歯数	31	21	26	32	25	27	162
	総被検歯数	48	49	53	56	55	48	309
	%	64.6	42.9	49.1	57.1	45.5	56.3	52.4

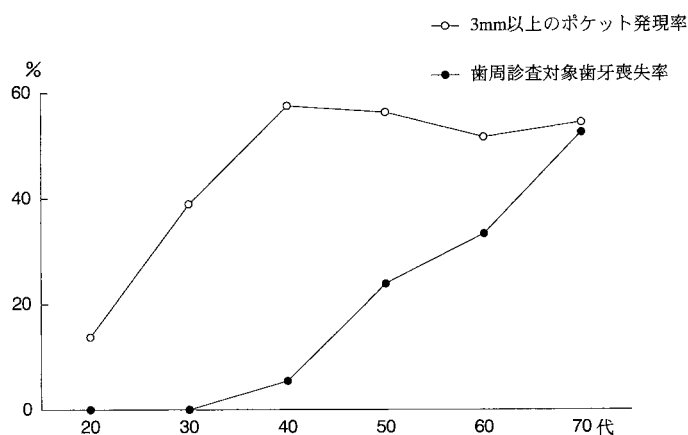


図1 年代別にみた歯周ポケットの発現率と歯牙喪失率

表4 色素沈着を有する患者数

年代	性別	男性	女性	計 (%)
20代		1	0	1 (100.0)
30代		0	1	1 (33.3)
40代		1	4	5 (71.4)
50代		4	5	9 (64.3)
60代		9	8	17 (54.8)
70代		2	8	10 (50.0)
80代		3	1	4 (66.7)
計		20	27	47 (57.3)

%は各年代の受診患者数に対する百分率

50%以上の罹患率を示した。また、歯周ポケット診査対象歯牙の喪失率は、加齢と共に増加していた。

色素沈着を有する者は47名(57.3%)で、女性に比べて男性に多く認められた(表4)。また、60歳未満では25名中16名(64.0%)に見られたのに対し、60歳以上では57名中31名(54.4%)と加齢と共に発現率は減少傾向にあった。また部位別にみると、歯肉の色素沈着が最も多く、次いで頬粘膜、口唇、口蓋粘膜の順であった。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)。図2は、歯周ポケット診査対象歯牙の残存率ならびに歯肉の色素沈着の発現率を示したものである。歯牙の喪失と共に歯肉の色素沈着の発現率は低下していた。年齢

表 5 部位別の色素沈着を有する患者数

部位 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
±	1	1	1	3	1	2	2	1	1	0
%	3.6	1.9	3.6	5.6	3.6	3.7	7.1	1.9	3.6	0
+	5	14	8	9	7	10	7	7	0	1
%	17.9	25.9	28.6	16.7	25.0	18.5	25.0	12.9	0	1.9
+	3	0	2	1	1	1	0	1	0	2
%	10.7	0	7.1	1.9	3.6	1.9	0	0	0	3.7
計	9	15	11	13	9	13	9	9	1	3
%	32.1	27.8	39.3	24.1	32.1	24.1	32.1	16.7	3.6	5.6

%は、受診患者数（男性 28 名，女性 54 名）に対する百分率

表 6 部位別の色素沈着を有する患者数の年齢による変化

		上顎歯肉	下顎歯肉	頬粘膜	口唇	口蓋
60 歳未満	名	15	11	3	4	0
	%	60.0	44.0	12.0	16.0	0
60 歳以上	名	9	13	19	14	4
	%	15.8	22.8	33.3	24.6	7.0

%は 60 歳未満 25 名，60 歳以上 57 名に対する百分率

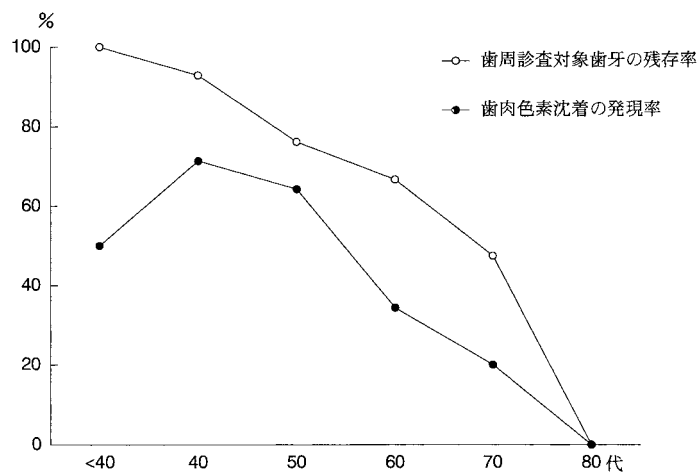


図 2 年代別にみた歯肉色素沈着発現率と歯牙の残存率

による色素沈着の発現部位の変化を示したものが表 6 である。60 歳未満の患者においては歯肉の色素沈着が多く認められるが，60 歳以上では歯肉の色素沈着の発現率が低下し代わって頬粘膜や口唇，口蓋粘膜における色素沈着の発現率が上昇していた。

考 察

平成 6 年度の油症一斉検診において，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，総被検歯 284 歯のうち 158 歯 (55.6%)

が深さ3mm以上の歯周ポケットを有しており、比較的若年者においても高い罹患率を示した⁶⁾。今回の結果もほぼ同様であり、油症患者においては歯周ポケットの罹患率が高いことが再確認された。部位別の歯周ポケットの罹患率を平成6年度と比較すると若干異なる点も認められるが、前歯部に比べて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⁵⁾。小臼歯や大臼歯において罹患率が高かった。このことは、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ことを強く示唆していると考えられる。

平成6年度の油症一斉検診においては、口腔内色素沈着の発現率は33.8%であった⁶⁾。これに対し、平成7年度は55.8%（データ未発表）、平成8年度は57.3%と著明に上昇していた。福山ら⁴⁾や赤峰ら¹⁾は、油症患者の口腔内色素沈着は経年的に減少していることを報告している。また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^{7,8)}、今回認められた発現率の上昇の原因については不明でありさらなる検索が必要である。我々は平成6年度の油症一斉検診の結果より、残存歯牙数の減少と共に色素沈着の発現率の低下が認められることを報告した⁶⁾。しかし今回、残存歯牙数の減少と共に歯肉の色素沈着の発現率の低下は認められたものの、その他の部位の色素沈着に関してはむしろ発現率は上昇していた。年齢によって色素沈着の部位に変化がみられたことについては、歯牙の喪失などの加齢による口腔内環境の変化が関与している可能性も考えられるが、推測の域を出ず今後の検討課題としたい。

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

8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3mm以上の歯周ポケットの発現頻度は総被検歯309歯のうち162歯(52.4%)であったが、そのほとんどが深さ4mm未満であった。
2. 口腔内色素沈着の発現率は57.3%であった。歯肉の色素沈着は比較的若年者に多く認められ、加齢に伴い歯肉の色素沈着の発現率は低下し代わって頬粘膜や口唇あるいは口蓋粘膜での色素沈着の発現率の上昇が認められるようになった。

参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 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) 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.
- 6) 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: 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. 福岡医誌 86: 256-260, 1995.
- 7) 本房昭三, 堀 嘉昭, 利谷昭治, 旭 正一: 1989, 1990年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状. 福岡医誌 82: 345-350, 1991.
- 8) 向野利彦, 大西克尚: 油症患者の眼症状 (第7報). 福岡医誌 82: 342-344, 1991.
(受付 1997-3-7)

油症患者における甲状腺機能： 油症発生 28 年後の検討

九州大学医学部第二内科学教室
辻 博・佐藤 薫・下野 淳哉
東 晃一・橋口 衛・藤島 正敏

Thyroid Function in Patients with Yusho : 28 Year Follow-up Study

Hitoshi TSUJI, Kaori SATO, Junya SHIMONO, Koichi AZUMA,
Mamoru HASHIGUCHI and Masatoshi FUJISHIMA
*Second Department of Internal Medicine (Director : Prof. M. Fujishima),
Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812-82, Japan*

To evaluate chronic effect of polychlorinated biphenyl (PCB) on thyroid functions, thyroid hormone levels and thyroidal autoantibodies were studied in 81 patients with Yusho in 1996. Serum level of thyroid stimulating hormone (TSH) was elevated in 7 cases (8.6%). All of them showed normal triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4) and free T_4 levels, and regarded as latent hypothyroidism. There were no significant correlations between blood PCB concentrations and TSH levels, T_3 levels, T_4 levels or free T_4 levels. Thyroglobulin antibodies were detected in 8 cases (19.5%) of 41 Yusho patients with high PBC concentration (higher than 3.0 ppb), and in only one case (2.5%) of 40 patients with low PBC concentration (lower than 2.9 ppb). We conclude that thyroglobulin antibody in patients with Yusho is not frequent and it may be associated with 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種々の異常が報告されている¹³⁾. 油症患者における甲状腺機能については, 油症発生 16 年後の 1984 年度福岡県油症一斉検診において対照者に比べてトリヨードサイロニンおよびサイロキシンの上昇が認められることを報告してきた¹⁰⁾. 油症発生以来 28 年を経過し, 血中 PCB 濃度は低下し, 種々の亜急性中毒症状は軽快している. しかし, 油症例においては全身倦怠感, 四肢のしびれ感などの症状が持続し, 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⁷⁾⁸⁾. 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⁹⁾¹²⁾, 慢性中毒に移行していると推定される. 今回, 我々は油症患者に甲状腺機能検査を行ない, 油症原因物質の甲状腺機能に対する慢性的影響について検討したので報告する.

対象および方法

1996 年度福岡県油症一斉検診を受診した油症認定患者 82 例中, 甲状腺機能検査に同意が得られた 81 例を対象者とした. 1996 年 5 月現在の福岡県全油症認定患者 673 名の 12.0% であった. 油症患者の内訳は男性 27 例, 女性 54 例で, 平均年齢は 63.7 ± 12.5 歳 (28~87 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り, 採血は午前中の空腹時に行なった。甲状腺機能検査として甲状腺刺激ホルモン(TSH)はRIA 固相法(TSH・リアビーズIIキット, ダイナボット社)で, トリヨードサイロニン(T_3)はRIA 固相法(T_3 リアビーズキット, ダイナボット社)で, サイロキシニン(T_4)はRIA 固相法(M- T_4 ・「コーニング」キット, チバコーニングダイアノスティックス社)で, 遊離サイロキシニン(Free T_4)はRIA 固相法(平衡透析法)(モデル T_4 キット, 日本メジフィジックス社)で, サイロキシニン結合グロブリン(TBG)はRIA(PEG法)(リアグノスト TBG キット, ヘキストジャパン社)で測定した。甲状腺自己抗体は受身凝集反応により抗サイログロブリン抗体(セロディア ATG キット, 富士レビオ社)および抗甲状腺マイクロゾーム抗体(セロディア-AMC キット, 富士レビオ社)を測定した。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, 平均値の比較についてはt検定を用いた。また, 異常値の出現頻度の比較は χ^2 検定で行った。

結 果

1996年度福岡県油症一斉検診において甲状腺機能検査に同意の得られた油症患者81例中, TSH 値の低下を2例(2.5%)に, 上昇を7例(8.6%)に認め

た。TSH 値の上昇を認めた7例では, 全例 T_3 値および T_4 値は正常であり潜在性の甲状腺機能低下状態と考えられた。また, T_3 値の低下を1例(1.2%), T_4 値の低下を1例(1.2%), 上昇を1例(1.2%), Free T_4 値の上昇を1例(1.2%)に認めた。TBG 値の低下は2例(2.5%), 上昇は6例(7.4%)であった。そして, TSH 値, T_3 値, T_4 値あるいはFree T_4 値のいずれか1項目以上の異常を認めたものは10例(12.3%)であった。また甲状腺自己抗体については抗サイログロブリン抗体を9例(11.1%)に, 抗甲状腺マイクロゾーム抗体を14例(17.3%)に認め, 両抗体の出現をみたものは6例(7.4%)であった。

油症検診調査表において, 油症発生以後に発症した甲状腺疾患の記載がみられたものは81例中8例(9.9%)であった(Table 1)。その内訳はGraves病3例, 慢性甲状腺炎2例, 甲状腺悪性腫瘍2例, 甲状腺腫瘍1例であり, 投薬治療を継続しているものは6例(Case 1, 2, 3, 4, 7, 8)であった。そして, 甲状腺機能検査で異常を示したものは4例(Case 1, 3, 5, 7)であった。Graves病で投薬中の1例(Case 1)においてTSH 値の低下, T_4 値およびFree T_4 値の上昇を認め, 未だ甲状腺中毒症の状態と考えられた。Graves病の1例(Case 3)では治療による修飾と考えられるTSH 値の軽度の上昇を認めた。慢性甲状腺炎の1例(Case 5), 甲状腺悪性腫瘍の1例(Case 7)にTSH 値の上昇を認めたが, T_3 値および T_4 値は正常であり潜在性の甲状腺機能低下症と考えられた。甲状

Table 1 甲状腺疾患を合併した油症患者

Case	Age	Sex	TSH μ U/ml	T_3 ng/ml	T_4 μ g/dl	F- T_4 ng/dl	TBG μ g/dl	TGHA ($\times 100$)	MCHA ($\times 100$)	Chol mg/dl	PCB ppb	PCB pattern	Notice
1	55	F	0.05	1.6	13.6	3.21	19	16	64	200	4.43	A	Grave's disease
2	66	F	1.8	0.9	10.9	1.10	27	1	0	260	3.44	A	Grave's disease
3	79	F	3.8	1.4	10.2	1.10	34	4	1024	226	8.77	A	Grave's disease
4	57	F	1.2	1.1	10.9	1.49	22	0	256	229	2.72	A	Chronic thyroiditis
5	64	F	3.7	0.8	7.2	1.17	17	0	256	212	1.79	C	Chronic thyroiditis
6	74	F	1.2	0.9	9.5	1.59	17	0	0	220	2.20	C	Thyroid cancer
7	55	F	7.0	1.0	10.1	1.21	23	0	0	287	3.40	A	Thyroid cancer
8	60	F	1.4	0.9	8.5	0.93	24	0	0	185	3.21	A	Thyroid tumor

Normal Range, TSH(0.34-3.5); T_3 (0.8-1.8); T_4 (4.6-12.6); F- T_4 , free T_4 (0.77-1.93); TBG(12-30); TGHA, antithyroglobulin hemagglutination antibody(<100); MCHA, antithyroid microsomal hemagglutination antibody (<100), Chol, total cholesterol(159-219)

腺疾患を合併した油症患者では、血中 PCB 濃度が 3.0 ppb 以上のものが 5 例であり、そのガスクロマトグラムパターンは油症特有の A パターンを示すものが 6 例と多かった。

検診調査表において甲状腺疾患の記載がみられず、甲状腺機能検査において TSH 値、 T_3 値、 T_4 値あるいは Free T_4 値のいずれか 1 項目以上の異常を示した油症患者 6 例を Table 2 に示した。いずれの患者にも症状はみられなかった。1 例 (No. 1) に TSH 値の低下を認めたが、 T_3 値、 T_4 値および Free T_4 値は正常であった。 T_3 値および T_4 値の低下を認めた 1 例 (No. 2) では TSH 値の上昇はみられず、TBG の低下に伴うものと考えられた。TSH 値の上昇を認めた 4 例 (No. 3, 4, 5, 6) では、全例 T_3 値および T_4 値は正常であり潜在性の甲状腺機能低下症と考えられた。そして、TSH 値の上昇を認めた 4 例中、3 例 (No. 4, 5, 6) に抗甲状腺マイクロゾーム抗体を認め、慢性甲状腺炎と考えられた。無症候性の甲状腺機能異常を呈した油症患者では、血中 PCB 濃度が 3.0 ppb 以上のものが 3 例であり、そのガスクロマトグラムパターンは油症特有の A パターンに近い B パターンを示すものが 4 例と多かった。

油症患者における甲状腺機能異常と PCB との関連をみるために、油症患者 81 例について血中 PCB 濃度と TSH 値、 T_3 値、 T_4 値、Free T_4 値および TBG 値との相関について検討した。血中 PCB 濃度と TSH 値 ($r=0.0236$)、 T_3 値 ($r=0.0712$)、 T_4 値 ($r=0.0604$)、Free T_4 値 ($r=0.0898$) および TBG 値 ($r=-0.0083$) の間に相関をみなかった。次に、血中

PCB 濃度が 2.9 ppb 以下の 40 例を PCB 低濃度群、3.0 ppb 以上の 41 例を PCB 高濃度群に分け、両群間の甲状腺機能検査異常の出現頻度および甲状腺自己抗体の出現頻度について検討を行った (Table 3)。PCB 低濃度群は男性 14 例、女性 26 例、平均年齢は 62.3 $\pm$ 14.3 歳、平均 PCB 濃度は 1.93 $\pm$ 0.61 ppb であった。PCB 高濃度群は男性 13 例、女性 28 例、平均年齢は 65.0 $\pm$ 10.4 歳、平均 PCB 濃度は 5.17 $\pm$ 2.30 ppb であった。両群間の性、年齢に差を認めなかった。TSH 値の上昇を PCB 低濃度群に 2 例 (5.0%)、高濃度群に 5 例 (12.2%) と高濃度群に多い傾向を認めたが、有意差はみられなかった。両群間の T_3 値、 T_4 値、Free T_4

Table 3 油症患者における甲状腺機能異常者および甲状腺自己抗体陽性者の頻度

No. (%)		PCB 濃度	
		≤ 2.9 ppb 40	≥ 3.0 ppb 41
TSH	低下	1 (2.5)	1 (2.4)
	上昇	2 (5.0)	5 (12.2)
T_3	低下	1 (2.5)	0
	上昇	0	0
T_4	低下	1 (2.5)	0
	上昇	0	1 (2.4)
F- T_4	低下	0	0
	上昇	0	1 (2.4)
TBG	低下	1 (2.5)	1 (2.4)
	上昇	4 (10.0)	2 (4.9)
TGHA		1 (2.5)	8 (19.5)
MCHA		5 (12.5)	9 (22.0)

Table 2 甲状腺機能異常を呈した油症患者

No.	Age	Sex	TSH μ U/ml	T_3 ng/ml	T_4 μ g/dl	F- T_4 ng/dl	TBG μ g/ml	TGHA ($\times 100$)	MCHA ($\times 100$)	Chol mg/dl	PCB ppb	PCB pattern
1	52	M	0.28	0.9	9.0	1.25	26	0	0	272	1.11	C
2	63	F	2.0	0.7	4.1	1.17	10	0	0	241	2.40	B
3	67	M	3.9	1.2	7.8	1.01	19	0	0	216	3.69	BC
4	87	F	4.4	0.9	8.3	1.08	24	0	256	179	3.40	B
5	33	F	7.5	0.9	6.8	1.00	17	0	64	206	0.90	B
6	65	F	7.6	1.1	8.1	0.94	23	4	64	193	4.20	B

Normal Range, TSH(0.34-3.5); T_3 (0.8-1.8); T_4 (4.6-12.6); F- T_4 , free T_4 (0.77-1.93); TBG(12-30); TGHA, antithyroglobulin hemagglutination antibody(<100); MCHA, antithyroid microsomal hemagglutination antibody (<100), Chol, total cholesterol(159-219)

値および TBG 値の異常出現率にも差をみなかった。甲状腺自己抗体については、抗サイログロブリン抗体を低濃度群の1例(2.5%)、高濃度群の8例(19.5%)に認め、PCB高濃度群に抗サイログロブリン抗体の出現が有意に高頻度であった($P<0.05$)。しかし、抗甲状腺マイクロゾーム抗体は低濃度群の5例(12.5%)に対し高濃度群に9例(22.0%)と多い傾向を認めたが有意差はみられなかった。

考 察

PCBと甲状腺機能との関連については、実験的に PCB を投与した動物に甲状腺機能低下や甲状腺腫がみられることが報告されている。Bastomsky³⁾ はラットに PCB (Aroclor 1254) を4日間投与後、¹²⁵I-T₄ を投与すると対照に比べ血中¹²⁵I-T₄ 値が速やかに低下し、胆汁中に主としてグルクロン酸抱合を受けた¹²⁵I-T₄ の排泄が増加することを報告している。また、肝ミクロゾームに存在し、グルクロン酸抱合に関与する UDP-glucuronosyltransferase 活性が PCB の投与により上昇することが報告されている²⁾。T₄ のグルクロン酸抱合の亢進により胆汁中への T₄ の排泄が増加し、血中 T₄ 値の低下が惹起されると考えられる。さらに、PCB 投与による血中 T₄ 値の低下は下垂体の TSH 分泌を促進し、血中 TSH 値の上昇により甲状腺重量の増加が認められることが報告されている⁴⁾。PCB を投与したラットや marmoset monkey では甲状腺ろ胞細胞の腫大、過形成、甲状腺ろ胞の縮小などの組織学的変化が報告されており⁵⁾¹⁷⁾、血中 TSH 値の上昇によるものと考えられる。しかし、PCB の投与による甲状腺機能低下や甲状腺の組織学的変化は可逆的なものであり、投与中止により改善することが報告されている⁵⁾。PCB 投与による甲状腺の機能低下、および組織学的変化は肝臓における酵素誘導による2次性変化であり、PCB の投与中止により改善する急性あるいは亜急性中毒症状と考えられる。

油症患者における甲状腺機能に対する慢性的影響について、我々は油症発生16年後の1984年度福岡県油症一斉検診において油症患者124例と対照者43例を比較し、油症患者に T₃ 値および T₄ 値の有意の上昇を見出した¹⁰⁾。さらに、油症患者に甲状腺機能亢進症を4例(3.2%)、甲状腺機能低下症を6例(4.8%)認め

たが、対照者に比べてその頻度には差がみられず、血中 PCB 濃度と TSH 値、T₃ 値および T₄ 値の間にも相関はみられなかった。また、甲状腺自己抗体の検討では抗サイログロブリン抗体を患者の10.5%、対照者の4.7%に認め、有意差はないものの患者に抗サイログロブリン抗体の出現が高かった。

今回の検討では、PCB高濃度群においては低濃度群に比べて抗サイログロブリン抗体の出現が有意に高頻度であった。抗サイログロブリン抗体は慢性甲状腺炎や Graves 病などの自己免疫性甲状腺疾患に高率に出現し、正常人の出現頻度は2.0~3.3%と報告されている¹¹⁾¹⁶⁾。本抗体の出現頻度は女性では加齢とともに増加し、75歳以上の女性では7.4%と報告されている¹⁶⁾。PCB高濃度油症患者における、41例中8例(19.5%)の出現頻度は高いものと考えられる。

PCBの免疫に対する影響について、Smialowiczら¹⁴⁾ はリンパ球の mitogen 刺激幼若化反応を検討し、PCB (Aroclor 1254) を投与したラットでは対照に比べて concanavalin A あるいは pokeweed mitogen に対する反応には差がなかったが、phytohemagglutinin に対する反応の増強を認めたと報告している。このような PCB の免疫に対する作用が、PCB高濃度油症患者における高頻度の抗サイログロブリン抗体の出現に関与している可能性も考えられる。

抗サイログロブリン抗体陽性者の血中 TSH 値は陰性者に比べて有意に高く、血中 TSH 値の上昇を認める抗サイログロブリン抗体陽性者では、原発性甲状腺機能低下症に陥る頻度が高いとの報告がみられる⁶⁾¹⁵⁾。血中 PCB 高濃度群の油症患者において抗サイログロブリン抗体の出現頻度が有意に高いことより、今後とも油症患者では甲状腺機能の経過を注意深く観察する必要があると考えられる。

総 括

1996年度の福岡県油症一斉検診の受診者のうち、同意が得られた油症認定患者81例を対象に甲状腺機能検査を行った。その結果、TSH 値の低下を2例(2.5%)に、上昇を7例(8.6%)に認めた。さらに、T₃ 値の低下を1例(1.2%)、T₄ 値の低下を1例(1.2%)、上昇を1例(1.2%)、Free T₄ 値の上昇を1例(1.2%)に認めた。また、TBG 値の低下を2例(2.5%)

%), 上昇を6例(7.4%)に認めた。甲状腺自己抗体の検討では抗サイログロブリン抗体を9例(11.1%)に、抗甲状腺マイクロゾーム抗体を14例(17.3%)に認めた。血中PCB濃度が2.9ppb以下の40例と3.0ppb以上の41例について甲状腺機能異常および甲状腺自己抗体の出現頻度について比較した。TSH値、T₃値、T₄値、Free T₄値およびTBG値は両群間に差をみなかったが、血中PCB高濃度群に抗サイログロブリン抗体の有意に高頻度の出現を認めた。しかし、抗甲状腺マイクロゾーム抗体の出現には両群間で差はみられなかった。

文 献

- 1) Aoki N, Wakisaka G, Higashi T, Akazawa Y and Nagata I: Clinical studies on thyroidal autoantibodies. *Endocrinol. Jpn.* 22: 89-96, 1975.
- 2) Barter RA and Klaassen CD: Reduction of thyroid hormone levels and alteration of thyroid function by four representative UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128: 9-17, 1994.
- 3) Bastomsky CH: Effects of a polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254) and DDT on biliary thyroxine excretion in rats. *Endocrinology* 95: 1150-1155, 1974.
- 4) Bastomsky CH: Goitres in rats fed polychlorinated biphenyls. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55: 288-292, 1977.
- 5) Collins Jr WT, Capen CC, Kasza L, Carter C and Dailey RE: Effect of polychlorinated biphenyl (PCB) on the thyroid gland of rats. Ultrastructural and biochemical investigations. *Am. J. Pathol.* 89: 119-136, 1977.
- 6) Gordin A, Heinonen OP, Saarinen P and Lamberg BA: Serum-thyrotrophin in symptomless autoimmune thyroiditis. *Lancet* 1: 551-554, 1972.
- 7) 飯田隆男, 芥野岑男, 高田智, 中村周三, 高橋克巳, 増田義人: ヒトの血液中におけるポリ塩化ビフェニルおよびポリ塩化クアテルフェニルについて, 福岡医誌 72: 185-191, 1981.
- 8) 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一: 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニル異性体. 福岡医誌 76: 150-152, 1985.
- 9) Masuda Y and Yoshimura H: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance: A Review. *Amer. J. Ind. Med.* 5: 31-44, 1984.
- 10) 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.
- 11) 野津和巳, 桜美武彦, 平田正名, 後藤康生, 野手信哉, 野津吉友, 国司博行, 遠藤治郎: 特定集団における抗甲状腺抗体と血清 TSH. *日内分泌会誌* 59: 230-240, 1983.
- 12) Oishi S, Morita M and Fukuda H: Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43: 13-22, 1978.
- 13) 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.
- 14) Smialowicz RJ, Andrews JE, Riddle MM, Rogers RR, Luebke RW and Copeland CB: Evaluation of the immunotoxicity of low level PCB exposure in the rat. *Toxicology* 56: 197-211, 1989.
- 15) Tunbridge WMG, Brewis M, French JM, Appleton D, Bird T, Clark F, Evered DC, Evans JG, Hall R, Smith P, Stephenson J and Young E: Natural history of autoimmune thyroiditis. *Br. Med. J.* 282: 258-262, 1981.
- 16) Tunbridge WMG, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Evans JG, Young E, Bird T and Smith PA: The spectrum of thyroid disease in a community: The Wickham survey. *Clin. Endocrinol.* 7: 481-493, 1977.
- 17) Van den Berg KJ, Zurcher C and Brouwer A: Effects of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl on thyroid function and histology in marmoset monkeys. *Toxicol. Lett.* 41: 77-86, 1988.

(受付 1997-4-1)

1995・1996 年度の福岡県年次検診における皮膚症状 —— 各年齢層での血中 PCB 濃度と皮膚重症度との相関性 ——

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 1995-1996

Juichiro NAKAYAMA and Yoshiaki HORI

*Department of Dermatology (Director: Prof. Y. Hori), Kyushu University Faculty
of Medicine, Fukuoka 812-82*

Shoji TOSHITANI

*Department of Dermatology (Director: Prof. S. Toshitani), Fukuoka University Faculty
of Medicine, 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 had the annual examinations in 1995 and 1996. The skin severity grades and the skin severity scores showed the same tendency as recorded in the last 10 years. Yusho patients who were scored as more than 6・7 were around 8% of the total patients both in 1995 and 1996. The correlation between the blood PCB patterns and the severity grades of skin symptoms was clear. Thus, the mean skin severity scores in patients showing A pattern were higher than those in patients showing either B or C pattern. The same results were obtained when the correlation between the blood PCB patterns and the skin severity grades was analyzed. Patients whose ages were 50~70 years old were found to show the highest blood PCB concentrations and the skin severity scores.

は じ め に

油症発生以来ほぼ30年になろうとしている。例年の油症検診における油症患者の皮膚症状についての観察結果を2年毎に報告してきたが今回も1995年と1996年の観察結果についてのデータをまとめたので報告す

る。今回は各患者の皮膚重症度⁴⁾および皮膚重症度得点数¹⁾の算定、血中PCBパターン³⁾とPCB濃度、皮膚重症度得点数との相関性の検討以外に血中PCBパターンと皮膚重症度との相関性についても検討した。また年齢別の血中PCB濃度と皮膚重症度得点数についても解析した。

1995・1996年度における検診結果

受診状況

1995年度の受診者は90名で男性31名、女性59名、1996年度は83名で男性28名、女性55名であった。

皮膚重症度・皮膚重症度得点数

表1、2に1995年度および1996年度の皮膚重症度および皮膚重症度得点数を示す。皮膚重症度のまとめでは、皮膚症状のまったくない患者が各37.8%、32.5%、色素沈着を認める患者が各23.3%、14.5%、面皰を認める患者が各6.7%、9.6%、痤瘡様皮疹を認める患者が各30.0%、42.2%であった。ここ10年間は皮膚症状のまったくない患者が50%前後みられていた³⁾が今回の結果ではその値が若干低下した。また痤瘡様皮疹を認める患者が例年にくらべ1996年度では40%台と高くなっていた。皮膚重症度得点数については前回の1993年度および1994年度の結果とほぼ同様であった。すなわち得点数の低い患者から高い患者へその数はほぼ直線的な減少がみられた。得点数が6・7以上の患者は1995年度では全体の8.8%、1996年度では8.4%であった。

血中 PCB パターンと皮膚重症度の相関性

表3に1995年度と1996年度の受診患者の各血中 PCB パターンと各皮膚重症度の相関を示す。今回は利谷⁴⁾により記載されたごとく重症度が中間の場合低い方へ切り下げた（たとえば0・Iは0に、I・IIはIにまとめた）。いずれの年度もAパターンがBあるいはCパターンより皮膚重症度0の割合が少なく、皮膚重症度IIIの痤瘡様皮疹を呈する患者が明らかに多かつ

表1 皮膚重症度

年度 重症度	1995 年 例数(%)	1996 年 例数(%)
0	34(37.8)	27(32.5)
0 I I	14 7(23.3)	7 5(14.5)
I II II	2 4(6.7)	2 6(9.6)
II III III	18 9(30.0)	22 13(42.2)
III IV IV	2 0(2.2)	0 1(1.2)
計	90	83

表2 皮膚重症度得点数

年度 得点数	1995 年 例数(%)	1996 年 例数(%)
0・1	52(57.8)	39(47.0)
2・3	20(22.2)	24(28.9)
4・5	10(11.1)	13(15.7)
6・7	4(4.4)	3(3.6)
8・9	4(4.4)	3(3.6)
10～13	0(0)	1(1.2)
14～	0(0)	0(0)
計	90	83

表3 血中 PCB パターンと皮膚重症度の相関性

1995 年							1996 年						
皮膚重症度 パターン	0	I	II	III	IV	計	皮膚重症度 パターン	0	I	II	III	IV	計
A	14 (46.7)	1 (3.3)	8 (26.7)	7 (23.3)	0 (0)	30	A	11 (29.7)	2 (5.4)	12 (32.4)	11 (29.7)	1 (2.7)	37
B	15 (71.4)	3 (14.3)	2 (9.5)	1 (4.8)	0 (0)	21	B	9 (40.9)	1 (4.5)	10 (45.5)	2 (9.1)	0 (0)	22
B C	0 (0)	0 (0)	2 (100.0)	0 (0)	0 (0)	2	B C	0 (0)	0 (0)	1 (100.0)	0 (0)	0 (0)	1
C	22 (59.5)	3 (8.1)	8 (21.6)	3 (8.1)	0 (0)	36	C	14 (60.9)	4 (17.4)	5 (21.5)	0 (0)	0 (0)	23

() : %

() : %

た。ただし、皮膚重症度Ⅱの面皰を呈した患者はBあるいはCパターンの患者でもAパターンの患者のデータに近い値を示した。

血中 PCB パターンと血中 PCB 濃度および皮膚重症度得点数との相関性

表4に1995年度および1996年度の受診患者の血中 PCB パターンと血中 PCB 濃度および皮膚重症度得点数との相関性を示す。Aパターンを示した患者の血中 PCB 濃度はBおよびCを示した患者より明らかな高値（約2倍）を示した。この結果はここ数年での解析結果と同様のものである。また血中 PCB パターンと皮膚重症度得点数との相関もここ数年での解析結果と同様のものでAパターンの患者がほかのパターンの患者より約2～3倍の高値を示した。

年齢別血中 PCB 濃度と皮膚重症度得点数

表5に1995年度および1996年度の受診患者の年齢別の血中 PCB 濃度と皮膚重症度得点数を示す。30歳未満および30歳以上から80歳以上まで10歳間隔で

まとめた。油症発生以来約30年が経過しているが、発生時の患者の年齢は表5の年齢から30年を差し引いたものになる。今回の解析から血中 PCB 濃度は1995年度では80歳以上を除くと50歳以上60歳未満の患者が、1996年度では60歳以上70歳未満の患者が最も高く、皮膚重症度得点数は1995年度、1996年度のいずれも50歳以上60歳未満の患者が最も高いことが判明した。また80歳以上の患者でも血中 PCB 濃度あるいは皮膚重症度得点数の明らかに高い患者が散見された。

考 察

1995年度および1996年度の一斉検診を受けた油症患者の皮膚重症度、皮膚重症度得点数、血中 PCB パターン、血中 PCB 濃度についてのデータをまとめこれまでの報告にそってそれらの間の相関性を検討した。また今回は血中 PCB パターンと皮膚重症度との相関性および年齢による層別の血中 PCB 濃度と皮膚重症度得点数を求めた。

本文中の表1、2に示すごとく重症度が0あるいは

表4 血中 PCB パターン、血中 PCB 平均濃度、皮膚重症度得点数の相関性
1995 年 1996 年

パターン	例数	平均濃度 (ppb)	平均重症度得点数	パターン	例数	平均濃度 (ppb)	平均重症度得点数
A	30	5.63	2.73	A	37	4.96	3.30
B	21	2.98	0.76	B	22	2.47	1.82
B C	2	1.87	3.00	B C	1	3.69	2.00
C	37	2.32	1.70	C	23	2.47	1.00
計	90	3.57	1.85	計	83	3.59	2.25

表5 年齢別血中 PCB 濃度と皮膚重症度得点数
1995 年 1996 年

年齢	例数	平均 PCB 濃度 (ppb)	平均皮膚重症度得点数	年齢	例数	平均 PCB 濃度 (ppb)	平均皮膚重症度得点数
80 歳～	5	4.92	1.60	80 歳～	6	3.46	1.17
70 歳～	19	3.16	1.42	70 歳～	20	3.97	1.65
60 歳～	35	3.77	2.20	60 歳～	32	4.18	2.41
50 歳～	16	4.39	2.50	50 歳～	14	2.90	3.07
40 歳～	7	2.70	1.86	40 歳～	7	2.85	2.57
30 歳～	4	1.55	0.50	30 歳～	3	1.35	3.00
30 歳未満	4	1.42	0.00	30 歳未満	1	0.70	0.00
計	90			計	83		

得点数が0.1の患者の割合はここ数年での結果³⁾と一致するものであったが、表1と2で明らかに異なるデータと考えられるものに皮膚重症度がII IIIあるいはIIIと記された割合が1995年度では30.0%, 1996年度では42.2%と高い値となっているのに対し皮膚重症度得点数が6・7以上と記された割合は1995年度では8.8%, 1996年度では8.4%であったことである。従来より油症発生直後に考案された皮膚重症度分類が近年の油症患者の皮膚症状の評価に一部適わないことが指摘されていたが今回の解析結果でもそのことが示唆された。すなわちごくわずかの面皰あるいは座瘡様皮疹があった場合でも皮膚重症度分類ではIIあるいはIIIと記され、この点が油症患者の皮膚症状の客観的評価になっていない。その是正のため各皮膚症状の程度を3段階に分けた皮膚重症度得点が考案された。今回の結果をみると皮膚重症度得点はほぼ油症患者の皮膚症状の程度を示しているように思われるが現在でも得点が6・7以上の患者が約8%いることは特記すべきことであろう。

上記の問題点をさらに検討する目的で今回血中PCBパターンと皮膚重症度との相関性について検討した。結果はAパターンを示した患者は皮膚重症度0が1995年度で46.7%, 1996年度で29.7%とBあるいはCパターンを示した患者よりほぼ20~30%低い値を示し、逆にAパターンの患者では皮膚重症度IIIが同様に23.3%と29.7%と高くBあるいはCパターンの患者のデータに比較して顕著な差が認められた。また血中PCBパターンと皮膚重症度得点数との相関性

をみてもAパターンの得点数はBあるいはCパターンの得点数より2~3倍高い値であった。このことより血中PCBパターンと皮膚症状の程度との相関性は皮膚重症度あるいは皮膚重症度得点数のいずれの基準をとってもおよそ同じ結果が得られることが判明した。

油症発生以来ほぼ30年が経過し患者の高齢化が目立つようになった。この社会的状況をふまえ高齢化した患者の血中PCB濃度あるいは皮膚重症度得点数がいかなるものか検討した。その結果血中PCB濃度および皮膚重症度得点数の高い年齢層は50歳以上~70歳未満であった。また80歳以上でも依然高い血中PCB濃度を示した患者が散見された。今後の油症患者の検診では患者の高齢化を念頭においた解析が重要なものとなろう。

文 献

- 1) 旭正一, 幸田弘, 利谷昭治: 昭和48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) 増田義人, 香川梨絵, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人体のポリ塩化ビフェニール。福岡医誌 65: 17-24, 1974.
- 3) 中山樹一郎, 堀嘉昭, 利谷昭治, 旭正一: 1993・1994年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状。福岡医誌 86: 277-281, 1995.
- 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 1997-3-21)

福岡医学雑誌投稿規定

1. 本誌に掲載する論文等は、原則として原著論文、解説、症例報告、学会報告とする。
2. 原著論文は、和文の場合は英文抄録、はじめに、実験方法、実験結果、考察、総括または結論、謝辞、文献の順とし、英文の場合は、Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, の順で記すものとする。ただし、短報の場合は、この区別をつけなくともよい。図、表の標題、説明文は、英文とすることが望ましい。
3. 和文原著には英文の抄録を、欧文原著には和文抄録を付けることとし、それぞれ本誌印刷1ページ以内とする。
4. 和文は現代かなづかい、平がなまじりの横書きとする。外国語はtypewriterを使用するか、あるいはblock letterで鮮明に記すことが必要である。
5. 数字は算用数字を用い、度量衡の単位は、cm, mm, μm , nm, g, mg, μg , ng, ml, dl, μl , cm^2 など、一般的に用いられる略字を使用する。
6. 原稿の第1ページには、標題、著者の所属（必要あれば指導者名付記）、著者名のみを記し、印刷所要部数を赤で付記する。ランニングタイトルを20字以内（欧文の場合は40文字以内）で鉛筆で付記する。
7. 引用した文献は末尾に一括して、番号を付けて記載し、その順序は第一著者名のalphabet順とし、同一著者が続く場合は次の著者のalphabet順とする。記載の形式は次の例による。
 - 1) 雑誌の場合：著者名、論文表題、雑誌名、巻：最初最終頁、発行年、とする。
著者のfirst and middle nameの省略のピリオドは用いない。
(例) Hatch TP, Miceli M and Silverman JA: Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. J. Bacteriol. 162: 938-942, 1985.
(例) 神村英利, 吉村英敏: 油症原因物質の排泄促進, 福岡医誌 78: 266-280, 1987.
 - 2) 単行本の場合：著者名、書名、第何版、引用頁、発行社、発行地、発行年。
(例) Bloom W and Fawcett DW: A Textbook of Histology 10th ed. pp. 179-227, Saunders Co. Philadelphia, 1975.
 - 3) 分担執筆の場合：著書名、章の表題、編者、書名、第何版、最初最終頁、発行社、発行地、発行年。
(例) Yamada Y: Fat-storing cells, In Yamakawa I (ed): Structure and Function of the Liver. 1st ed. pp. 188-202, Nanzando Tokyo, 1980.
8. 写真原稿は鮮明なものでなければならない。凸版の原稿が不備の場合はtrace料、写植料などの清書費用を別に必要とする。表は1ページに組める大きさであることを要する。
9. 定期号のほかに補冊を刊行することがある。教室論文集などを補冊として発行することの可否は幹事会で決定する。
10. 本誌に掲載する論文は、編集会議で承認を得たものに限る。原稿の受付は福岡医学雑誌編集室で行う。
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）、横田裕之（衛生学）
編集委員：小宮山荘太郎（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9年5月25日発行

発行所 福岡医学会

〒812 福岡市東区馬出3丁目1番1号（九州大学医学部内）

TEL ダイアルイン (092) 642-6896

（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