

油 症

研究報告 第19集

平成15年5月

九州大学油症治療研究班
長崎油症研究班

**The Nineteenth Reports of the Study on “Yusho”
and PCBs (Polychlorinated Biphenyls) and
Related Compounds**

May 2003

Study Group for the Therapy of “Yusho”

*Kyushu University
Fukuoka 812-8582, Japan
Nagasaki
Nagasaki 852-8501, Japan*

油症と PCB 及び関連化合物に関する研究

報告集 第 19 集

(福岡医学雑誌 第 94 巻 第 5 号 平成 15 年 5 月)

目 次

1. 序 言 古江 増隆…(1)
2. 2002 年度における油症患者の歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学的調査 (英文)
橋口 勇・吉嶺 嘉人・後藤 康治・前田 英史
和田 尚久・赤峰 昭文・福山 宏・奥村 英彦…(3)
3. 2001,2002 年度の福岡県年次検診による皮膚症状 上ノ土 武・古賀 哲也・古江 増隆
中山樹一郎・旭 正一…(9)
4. カネミ油症検診者に見られる血清クレアチンキナーゼとアルドラーゼの異常
吉村 俊朗・沖田 実・中野 治郎・白石 裕一
岩永 洋・友利幸之介・岡本真須美…(19)
5. 油症患者における甲状腺機能の検討 辻 博・伊東 靖夫…(25)
6. 油症患者における皮丘・皮野面積の検討 小川 文秀・清水 和宏・片山 一朗…(30)
7. 油症患者の経時的繰り返し測定データの統計学的解析による血清脂質及びリポタン
パクと血中 PCB 濃度の関連 (英文) 徳永 章二・片岡恭一郎…(32)
8. 1 年間の FBRA 摂取による油症原因ダイオキシン類同族体の体外排泄促進 (英文)
長山 淳哉・高菅 卓三・辻 博・梅原 幹巳
佐田 健彦・岩崎 輝明…(40)
9. 油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (2001 年)
飯田 隆雄・戸高 尊・平川 博仙・飛石 和大
松枝 隆彦・堀 就英・中川 礼子・古江 増隆…(48)
10. 油症患者における PCB 異性体の 30 数年間にわたる特異な残留
増田 義人・原口 浩一・古野 純典…(58)
11. 血中 PCB パターン判定における従来法と異性体別分析法の同等性について
中川 礼子・芦塚 由紀・堀 就英・平川 博仙
飛石 和大・飯田 隆雄…(66)

12. ヒト血液中ダイオキシン類分析の超高感度ならびに迅速化に関する検討 (英文)
戸高 尊・平川 博仙・飛石 和大・飯田 隆雄…(70)
13. 乳児リンパ球細胞の姉妹染色分体交換頻度への授乳による PCBs とダイオキシン類
の影響 (英文)
長山 淳哉・長山 真弓・飯田 隆雄・平川 博仙
松枝 隆彦・福重淳一郎…(80)
14. 乳児リンパ球細胞の姉妹染色分体交換頻度への授乳による農薬の影響 (英文)
長山 淳哉・長山 真弓・中川 礼子・平川 博仙
松枝 隆彦・飯田 隆雄・福重淳一郎…(88)
15. 2,3,3',4,4'-五塩素化ビフェニル(CB 105)のハムスターにおける代謝
古賀 信幸・金丸 知代・黒木 広明・原口 浩一
加藤 善久・木村 良平…(96)
16. ダイオキシン類の生殖毒性と後世代への影響並びにその機構
石田 卓巳・益崎 泰宏・西村 嘉雄・山田 英之…(105)

**The Nineteenth Reports of the Study on Yusho and PCBs and Related Compounds
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 94, No. 5, 2003)**

CONTENTS

1. Foreword M. Furue···(1)

2. An Epidemiologic Examination on the Prevalence of the Periodontal Diseases
and Oral Pigmentation in Yusho Patients in 2002
I. Hashiguchi, Y. Yoshimine, Y. Gotou, H. Maeda, N. Wada
A. Akamine, H. Fukuyama and H. Okumura···(3)

3. Evaluation of Dermatological Symptoms of Yusho Patients in the Annual Exami-
nation in 2001-2002 T. Uenotsuchi, T. Koga, M. Furue
J. Nakayama and M. Asahi···(9)

4. Elevation of Serum Creatine Kinase and Low Serum Aldolase in the Patients with
KANEMI YUSHOU T. Yoshimura, M. Okita, J. Nakano, H. Shiraishi
H. Iwanaga, K. Tomori and M. Okamoto···(19)

5. Thyroid Function in Patients with Yusho H. Tsuji and Y. Ito···(25)

6. Examination of “areas cutanea” in Yusho Patients F. Ogawa, K. Shimizu and I. Katayama···(30)

7. A Longitudinal Analysis on the Association of Serum Lipids and Lipoproteins
Concentrations with Blood Polychlorinated Biphenyls Level in Chronic
“Yusho” Patients S. Tokunaga and K. Kataoka···(32)

8. Active Elimination of Causative PCDFs/DDs Congeners of Yusho by One Year
Intake of FBRA in Japanese People J. Nagayama, T. Takasuga, H. Tsuji, M. Umehara
T. Sada and T. Iwasaki···(40)

9. Follow-up Survey of Dioxins in the Blood of Yusho Patients (in 2001)
T. Iida, T. Todaka, H. Hirakawa, K. Tobiishi T. Matsueda
T. Hori, R. Nakagawa and M. Furue···(48)

10. Peculiar Remaining of some PCB Congeners in the Patients with Yusho for more than 30 Years
Y. Masuda, K. Haraguchi and S. Kono... (58)
11. Equality as Yusho Diagnosis Indices Between Blood PCB Constitution Data from Using a Conventional Analytical Method and a PCB Isomer Specific Analytical Method
R. Nakagawa, Y. Ashizuka, T. Hori, H. Hirakawa
K. Tobiishi and T. Iida... (66)
12. New Protocol of Dioxins Analysis in Human Blood
T. Todaka, H. Hirakawa, K. Tobiishi and T. Iida... (70)
13. Frequency of SCEs in Japanese Infants Exposed to Dioxins and PCBs through the Breast Milk
J. Nagayama, M. Nagayama, T. Iida, H. Hirakawa
T. Matsueda and J. Fukushige... (80)
14. Frequency of SCEs in Japanese Infants Lactationally Exposed to Organochlorone Pesticides
J. Nagayama, M. Nagayama, R. Nakagawa, H. Hirakawa
T. Matsueda, T. Iida and J. Fukushige... (88)
15. Metabolism of 2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl in Hamsters
N. Koga, H. Kuroki, K. Haraguchi, T. Kanamaru
Y. Kato and R. Kimura... (96)
16. Effects of Dioxins on the Reproduction and Development in Mammals and the Mechanism : Up-to-date Progress of Study
T. Ishida, Y. Masuzaki, Y. Nishimura and H. Yamada... (105)

序 言

厚生労働省油症治療研究班・班長

九州大学大学院医学研究院・教授

古 江 増 隆

Foreword

Masutaka FURUE

Chief, Study Group for the Therapy of "Yusho"

(Granted by The Ministry of Health, Labour and Welfare)

and Professor, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

The 19th collection of reported studies on Yusho contains papers describing the results of studies conducted by members of the The Japan Study Group on Yusho during the past 2 years. Yusho occurred in more than 1800 persons in Western Japan in 1968. The disorder was caused by intake of rice bran oil contaminated by polychlorinated biphenyls (PCBs) which had been used in conductor materials of heat. Our study group found that the rice bran oil was also contaminated with dioxins such as polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), therefore, Yusho is now recognized as mixed intoxication by PCBs and dioxins. In patients with Yusho, following the onset of non-specific symptoms such as general malaise, loss of appetite, and headache, some characteristic symptoms of Yusho gradually appear, including acneform eruption, dark-brownish nail pigmentation, increased discharge from the eyes with swelling of eyelids, pigmentation of oral mucosa, peripheral neuropathy, irregular menstruation in women, and growth retardation in infants and children.

Chromatograms of blood PCBs have been classified into 4 types : Type A, pattern characteristic of Yusho ; Type C, pattern commonly observed in the general population ; Types B and BC : intermediate patterns between Types A and C. A method for quantification of PCBs in the blood was developed after 1973, five years after the first case of Yusho. Since that time, the blood samples of patients have been analyzed for blood PCBs and classified into one of the 4 types. The blood polychlorinated quarterphenyls (PCQs) levels were then added to the diagnostic criteria of Yusho as a relatively specific marker. Although the blood levels of dioxins were very low, we recently developed a new method of determining the blood level of dioxins ; this new method has increased sensitivity and can detect low levels of dioxins in 5 to 10 ml of blood. In 2001, we analyzed the level of blood dioxins in patients in the Fukuoka area as a pilot study, and then expanded the screening of dioxin levels to all Yusho patients starting in 2002. The dioxin level must be repeatedly measured to clarify the sensitivity and reproducibility of this method of measurement, and it is necessary to statistically analyze the relationship among the clinical manifestation, laboratory data and levels of PCBs and dioxins. Based on these statistical analyses, we have started to re-evaluate the diagnostic criteria of Yusho.

Thirty-five years have passed since the outbreak of Yusho. Almost all of the symptoms of Yusho in the patients have improved spontaneously. The affected individuals have become older ; thus, age-related senile clinical symptoms have become more obvious than the above-mentioned original symptoms of Yusho. However, some patients still complain about dermatological changes and other subjective symptoms of Yusho. The clinical and basic studies and follow-up of patients conducted by this study group are extremely important not only for supporting patients' health but also for understanding the possible prolonged effects of exposure to PCBs and dioxins in humans. From this point of view, it is worthwhile to have been established a patient-consultation system for Yusho in 2002 .

I very much appreciate the contribution and participation of the patients in health examina-

tions for follow-up of Yusho each year. I also deeply thank all of the members of the study group for their efforts to help and support patients' health and well-being.

九州大学油症治療研究班と長崎油症研究班の油症報告集も第19集になりました。平成13年度と平成14年度の研究成果集としてお届けします。油症は昭和43年に西日本一帯の広範囲な住民の方々が、熱媒体として使用されていたPCBの混入した食用米ぬか油を摂取することによって起こった食中毒事件です。その後、研究班によってPCDFなどのダイオキシン類も混入していたことがつきとめられ、油症はPCB類とダイオキシン類による複合中毒であったことが証明されました。油症の初期には、全身倦怠感、食欲不振、頭重感などの非特異的な全身症状があらわれ、引き続いて、油症に特徴的な症状や所見として、座瘡様皮疹、爪の着色、眼脂過多、歯肉部の色素沈着、下肢の知覚過敏あるいは鈍麻、月経不順、乳幼児の成長遅延などがあらわれました。

油症検診では、血液中のPCBをA,B,BC,Cの4つのパターンに分類して報告されてきました。PCBは健常者にも環境汚染に由来するPCBの汚染がありますので、原因油に由来することが明確なAと健常者とは区別できないCとその中間のBあるいはBCパターンです。事件発生から5年後くらいから測定が可能になって以来この分類が指標に使われてきました。その後、PCQも油症に比較的特異的に検出されることが判明し診断基準に加わりました。ダイオキシン類は血中にごくわずかにしか含まれていないために、その定量は困難な状況でしたが、最近の研究班内での技術改良により少ない血液量で再現性のあるダイオキシン類測定が可能となり、平成13年度は福岡県の検診でパイロット的に測定を行い、14年度は全国の検診で測定を開始しました。より多くの患者さんを繰り返し測定し、検診項目、各検査との検討を行い、ダイオキシン類と臨床症状や血液データなどとの関連性を解析する必要があります。このような解析結果をもとに、診断基準の再評価が現在検討されつつあります。

発生以来35年の時間の経過とともに、初期に見られたような特徴的な所見はほとんど軽快し消失しています。しかし、初期に重症度の高かった患者さんのなかには、今日でもいくつかの所見や自覚症状を訴える患者さんもいらっしゃいます。油症検診における最近の傾向として受診者の高齢化が進み、油症の臨床所見は捉えにくくなっているといわれています。むしろ油症とは直接の因果関係は明らかでないような、受診者の高齢化が主な原因と思われるような臨床所見が報告されるようになってきました。しかしながら油症の臨床所見は徐々に軽くなっていますが、今後の慎重な経過観察が必要です。患者さんの健康管理と健康相談のために、14年度から油症相談員システムが導入されたことはとても有意義なことと期待しております。最後になりますが、毎年検診に参加いただいている患者さん方に御礼申し上げますとともに、油症検診にお力添えをいただいている班員の方々にも謝辞を述べさせていただきます。

An Epidemiologic Examination on the Prevalence of the Periodontal Diseases and Oral Pigmentation in Yusho Patients in 2002

Isamu HASHIGUCHI, Yoshito YOSHIMINE, Yasuharu GOTOU, Hidefumi MAEDA, Naohisa WADA and Akifumi AKAMINE

Division of Oral Rehabilitation

*Department of Endodontology and Operative Dentistry (Chief : Prof. A. Akamine)
Kyushu University Faculty of Dental Science, Fukuoka 812-8582*

Hiroshi FUKUYAMA

Department of Oral Pathology (Chief : Prof. H. Fukuyama)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Fukuoka 803-8580

Hidehiko OKUMURA

Okumura Dental Clinic, Nagasaki

Abstract An epidemiologic examination was carried out to reveal the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in patients with Yusho.

The results obtained were as follows.

1) 95 patients out of 110 patients, who were examined periodontal pocket depth using Ramfjord' methods, had at least one tooth with periodontal pocket deeper than 3 mm. Similarly, 276 teeth out of a total 495 examined teeth showed periodontal pockets with more than 3 mm depth. However, the ratio of the teeth with periodontal pockets deeper than 4mm to total examined teeth in each age fell to less than 25%.

2) Oral pigmentation was observed in 75 patients out of 121 patients with Yusho. In this examination, gingival pigmentation was most predominant among oral pigmentation. It is of particular interest that severe pigmentation tended to be observed at a much higher frequency in younger patients with Yusho.

Taken these findings into consideration, it was suggested that PCBs and related compounds might play an important role in the development of both periodontal diseases and oral pigmentation.

Introduction

To investigate the effects of PCBs and related compounds on oral lesions, follow-up study had been carried out at the annual health examination for Yusho patients. As the results, it had been proved that oral pigmentation was one of the prominent features of oral lesions²⁾. In addition, many Yusho patients were demonstrated to be involved in marginal periodontal diseases¹⁾.

We reported here the prevalence of oral lesions, especially marginal periodontal diseases and oral pigmentation, in Yusho patients who visited the annual examination in 2002.

Methods

After asking chief complaint and a thorough dental history, visual examination, radiographic examination and also measuring of the periodontal pocket depth were

performed on Yusho patients who visited dentistry at the annual health examination at Fukuoka prefecture. The periodontal pocket depth at the mesio-buccal site of six teeth (upper right first molar, upper left central incisor, upper left first premolar, lower right first premolar, lower right central incisor and lower left first molar) was measured by use of the pocket probe (PCP-11) with light pressure and teeth with periodontal pocket deeper than 3mm were recorded.

Results

52 male patients and 69 female patients had the dental examination. Some patients complained of periodontal diseases such as gingival swelling, feeling of tooth extrusion, and also dentures not suitable for occlusion. However, no patients complained of esthetic problem caused by oral pigmentation.

Periodontal pocket examination carried out in 110 patients (48 males and 62 females) excluding patients who had no tooth for pocket examination. The distribution of periodontal pockets deeper than 3mm was shown in the Table 1. It was determined that 95 patients (86.4%) had at least one tooth with a periodontal pocket deeper than 3mm. In addition, 276 teeth out of total 495 examined teeth had a periodontal pocket deeper than 3mm (Table 2). Periodontal

pockets deeper than 3mm were most prevalent in the upper left first premolars followed by lower right first premolars, upper right first molars and lower left first molars in turn. As compared to premolars and molars, lower and upper central incisors seemed to show less prevalence of periodontal pockets deeper than 3mm in percentage. However, there were no definitive differences of prevalence among each tooth. A chronological examination revealed that prevalence of periodontal pockets deeper than 3mm was higher in the aged patients than that in the young patients (Fig. 1). Similarly, prevalence of periodontal pockets deeper than 4mm increased in the age related manner and 55 patients had at least one tooth with a periodontal pocket deeper than 4mm. However, only 83 teeth had a periodontal pocket deeper than 4mm (Fig. 1).

It was revealed that 75 patients out of a total of 121 examined patients were involved in oral pigmentation (Table 3). Although the prevalence of oral pigmentation in male patients seemed to be somewhat higher than that in female patients, no definitive difference between sexes was observed. A chronological examination showed that the prevalence of oral pigmentation in the patients of middle age was higher than that in patients above the ages

Table 1 Distribution of the teeth with periodontal pockets deeper than 3 mm by age group

No. of teeth with PD \geq 3 mm	0		1		2		3		4		5		6		Total
	Sex		Sex		Sex		Sex		Sex		Sex		Sex		
Age	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<40	0*	3	1	1	1	1	0	0	2	0	2	1	0	0	12
40~49	0	1	0	1	0	1	0	1	3	0	0	0	0	0	7
50~59	1	2	3	3	1	3	2	2	0	1	4	0	2	1	25
60~69	1	4	2	7	1	2	4	2	2	2	1	2	1	1	32
70~79	2	1	4	5	1	4	5	1	0	1	0	4	1	1	30
80~89	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	4
Total	4	11	11	17	4	12	11	6	7	5	7	8	4	3	110

PD \geq 3 mm : periodontal pocket deeper than 3 mm. M : male, F : female. * : number of patients.

Table 2 Prevalence of the teeth with periodontal pockets deeper than 3mm by tooth species

	tooth	16	21	24	44	41	36	Total
Male	NTPD	21	22	23	32	22	19	139
	NTET	31	34	35	43	37	33	213
	%	67.7	64.7	65.7	74.4	59.5	57.6	65.3
Female	NTPD	20	20	28	29	20	20	137
	NTET	39	47	47	57	52	40	282
	%	51.3	42.6	59.6	50.9	38.5	50.0	48.6
Total	NTPD	41	42	51	61	42	39	276
	NTET	70	81	82	100	89	73	495
	%	58.6	51.9	62.2	61.0	47.2	53.4	55.8

NTPD: number of the teeth with periodontal pockets deeper than 3 mm. NTET: number of the total examined teeth.

tooth; 16: upper right first molar, 21: upper left central incisor, 24: upper left first premolar, 44: lower right first premolar, 41: lower right central incisor, 36: lower left first molar

of sixty (Fig. 2). Especially, severe oral pigmentation scored 2+ were observed almost in the patients of middle age but rarely in patients above the ages of sixty. On examination of localization, gingival pigmentation was observed at much higher frequency than pigmentation of the buccal mucosa and the lips, but pigmentation of the palate or tongue was not recognized (Fig. 3).

Discussion

The prevalence of teeth with periodontal pockets deeper than 3mm still remained to be high as reported previously³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾. Chronological examination showed that the prevalence of periodontal pockets deeper than

3mm increase in the age dependent fashion but about half of the total examined teeth were involved in periodontal diseases even in the patients below the age of fifty. However, the ratio of teeth with periodontal pockets deeper than 4mm to total examined teeth in 2002 was about 16.8%, indicating destruction of the periodontal tissues was not severe. In general, systemic factors have not been suggested to be a primary cause of periodontal diseases. In Yusho patients too, of course, the plaque accumulation must be the chief cause of the marginal periodontal pocket development. Periodontal pocket depth might become shallow due to adequate tooth brushing and

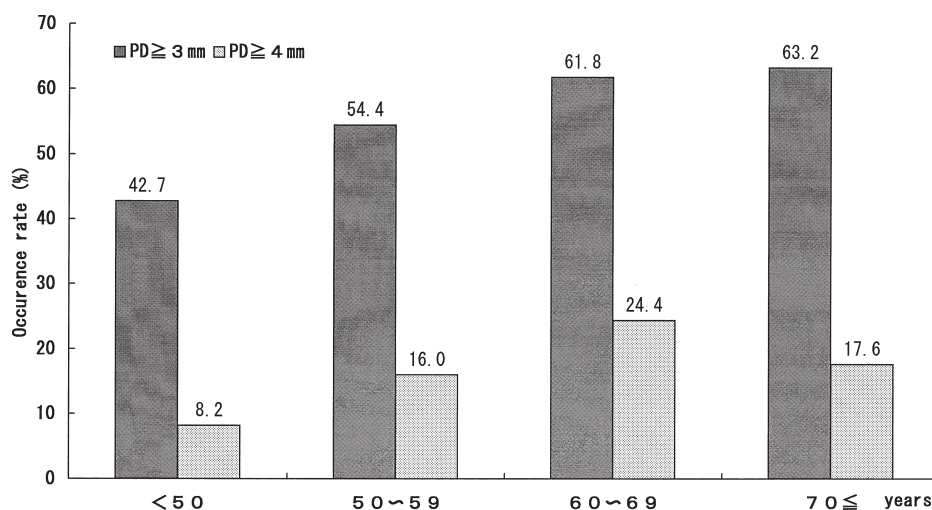


Fig. 1 Prevalence of the teeth with periodontal pockects deeper than 3 mm

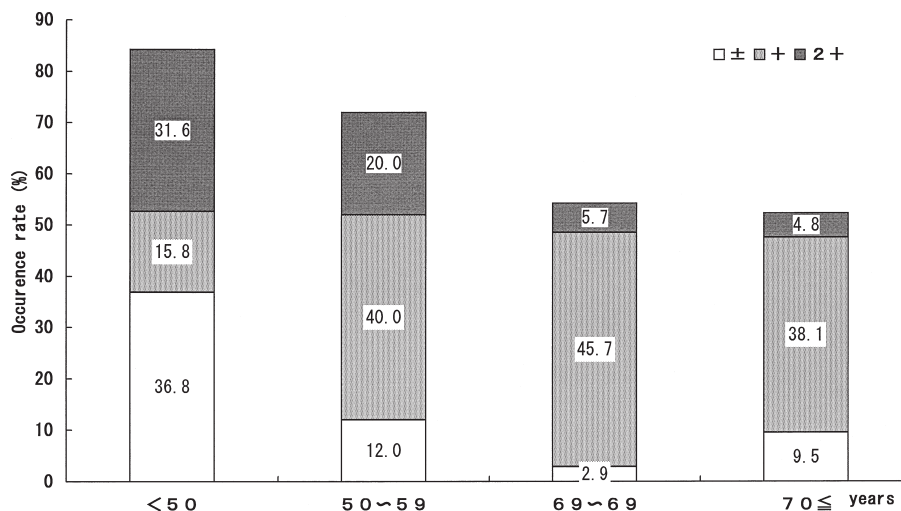


Fig. 2 Prevalence of oral pigmentation by age group

dental treatment such as tooth scaling and root planing. In this examination, however, it was revealed that persons of advanced age dominate among Yusho patients. As it is generally accepted that older people are more susceptible to bacteria and their by-products, oral care must become important more and more.

This examination showed that 61.9% of the Yusho patients suffered from oral pigmentation and the prevalence of oral pigmentation in male patients seemed to be somewhat higher than that in female patients. In accordance with the gradual decrease of the blood PCB concentration after exposure, it has been reported that the prevalence of both skin pigmentation and

conjunctival pigmentation have decreased over the years⁷⁾⁸⁾. Similarly, the prevalence of oral pigmentation had decreased until 1994⁵⁾. However, it had increased again and reached in the plateau between 1996 and 2002³⁾⁴⁾⁶⁾. The reasons for this discrepancy still remain unknown. Further research should be needed to reveal the mechanism of the development of oral pigmentation. A chronological examination demonstrated that the Yusho patients below the ages of fifty seemed to have a higher prevalence of oral pigmentation than those above the ages of sixty. The blood total-PCBs concentration in 2001 tended to be higher in the aged patients than that in the young patients. Taking these findings into consideration, we

Table 3 Distribution of the patients with oral pigmentation by age group

Age	Sex		%
	Male	Female	
<40	6*	5	91.7
40~49	3	2	71.4
50~59	11	7	72.0
60~69	7	12	54.3
70~79	9	9	51.4
80~89	1	3	57.1
Total	37	38	61.9

* : number of patients. % : the ratio of patients with oral pigmentation to total patients in each age group.

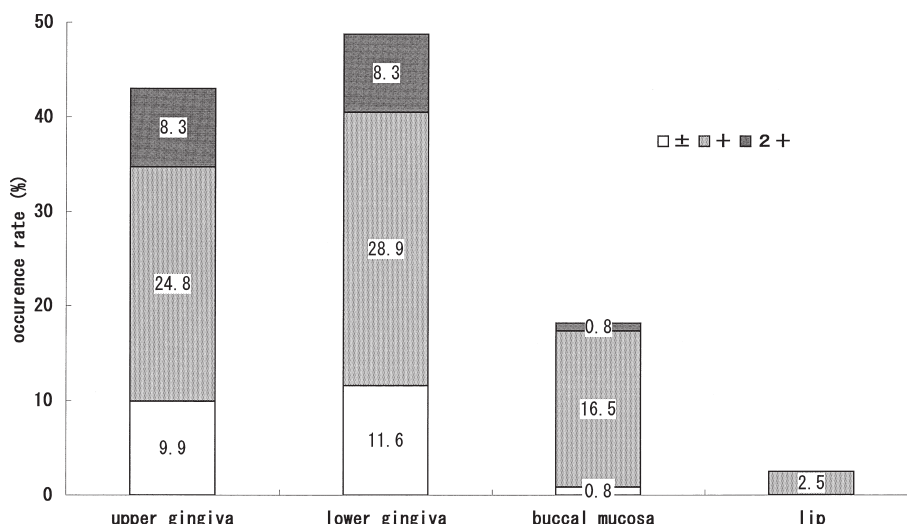


Fig. 3 Localization of oral pigmentation

supposed that PCBs might induce oral pigmentation, also effects of PCBs on oral pigmentation might be rather indirect than direct.

References

- 1) Akamine A, Hashiguchi I, Maeda K, et al.: Prevalence of periodontal diseases in patients with Yusho. *Fukuoka Acta Med.* 76: 248-252, 1985.
- 2) Aono M and Okada H: Oral findings in Yusho. *Fukuoka Acta Med.* 66: 468-470, 1969.
- 3) Hashiguchi I, Anan H, Maeda K, Akamine A, et al.: An epidemiologic examination on the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in Yusho patients in 1996. *Fukuoka Acta Med.* 88: 226-230, 1997.
- 4) Hashiguchi I, Furukawa K, Akamine A, Fukuyama H and Okumura H: An epidemiologic examination on the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in Yusho patients in 1998. *Fukuoka Acta Med.* 90: 150-153, 1999.
- 5) Hashiguchi I, Toriya Y, Anan H, Maeda K, et al.: An epidemiologic examination on the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in Yusho patients. *Fukuoka Acta Med.* 86: 256-260, 1995.
- 6) Hashiguchi I, Yamaza T and Koishi Y, et al.: An epidemiologic examination on the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in Yusho patients in 2000. *Fukuoka Acta Med.* 92: 115-119, 2001.
- 7) Honbo S, Hori Y, Toshitani S and Asahi M: Dermatological findings in the annual examination of the patients with Yusho in 1989-1990. *Fukuoka Acta Med.* 82: 345-350, 1991.
- 8) Kohno T and Ohnishi Y: Ocular manifestation of Yusho 22 years after the onset. *Fukuoka Acta Med.* 82: 342-344, 1991.

(Received for publication March 24, 2003)

(和文抄録)

2002 年度における油症患者の歯周疾患ならびに 口腔内色素沈着の疫学的調査

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯内疾患制御学研究分野（主任：赤峰昭文教授）

橋 口 勇, 吉 嶺 嘉 人, 後 藤 康 治
前 田 英 史, 和 田 尚 久, 赤 峰 昭 文

九州歯科大学口腔病理学講座(主任：福山 宏教授)

福 山 宏

奥村歯科医院

奥 村 英 彦

油症患者における歯周疾患や口腔内色素沈着の罹患状況の経年的変化を把握するために、平成 14 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口腔内診査を行った。

- 1) 深さ 3 mm 以上の歯周ポケットを 1 歯でも有している患者は 95 名 (86.4%) で、また 3 mm 以上の歯周ポケットを有する歯牙は 495 の総被検歯のうち 276 歯 (55.8%) といずれも高い割合を示した。
- 2) 121 名の油症認定患者のうち 75 名に口腔内

色素沈着がみられた。部位としては歯肉にみられるものがほとんどであった。加齢と共に色素沈着の発現率は低下しており、加えて色素沈着の程度も若年者に比べて高齢者の方が軽微であった。

以上の結果から、油症患者においては辺縁性歯周炎および口腔内色素沈着の罹患率が依然として高く、機序については不明だが PCBs やその代謝産物がこれらの病変の発症や進展に関与していると考えられる。

2001, 2002 年度の福岡県年次検診による皮膚症状

社団法人 日本食品衛生協会
上ノ土 武

九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野
古賀 哲也, 古江 増隆

福岡大学医学部皮膚科教室
中山 樹一郎

産業医科大学皮膚科教室
旭 正一

Evaluation of Dermatological Symptoms of Yusho Patients in the Annual Examination in 2001-2002

Takeshi UENOTSUCHI

Japan Food Hygiene Association, Tokyo, 150-0001

Tetsuya KOGA and Masutaka FURUE

Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582

Juichiro NAKAYAMA

Department of Dermatology, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka 814-0180

Masakazu ASAHI

Department of Dermatology, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu 807-8555

Abstract We evaluated the severity grades and the skin severity scores of the skin symptoms of Yusho patients who visited the annual examinations in 2001 and 2002. The patients who participated in the examinations had been decreased gradually. However, because of enhancement of social interest, the number of the patients who visited the examination increased. The pattern of the severity grades and the severity scores was different from that of the past. A careful follow-up and analysis is required.

はじめに

油症検診において2001,2002年度は大きな転機を迎えた。2001年度から、油症の主な原因物質の一つである、PCDFの血中濃度測定が福岡県ではじまった。2002年度では全国で測定が開始された。また、年々減少傾向であった検診受診者数も昨今の油症に対する社会的関心の高まりを受けて大幅に増加し、2002年度の福岡県検診では前年比約1.36倍であった。母集団の変化によりこれまでの傾向と異なる分布を示した検診項目もあれば、余り変化がない検診項目もあった。皮膚科検診で

は、2001年度までは、徐々に臨床症状が軽快する傾向であったが、2002年度は異なる傾向が見られた。今後の動向を注意深く観察することの重要性が示唆された。また、今後当分の間、血中PCDF濃度と皮膚症状の相関について検討する必要性がある。

2001・2002年度の受診結果

受診状況

2001年度の受診者は85名(男性34名,女性51名),2002年度の受診者は116名(男性52名,女

性64名)であった。

皮膚重症度

表1に2001年度および2002年度の皮膚重症度を示す。あわせて1993年度¹⁾と1997年度²⁾についても付記した。分布は二峰性であり、0にもっとも大きなピークがある。2番目のピークについて注目すると、1993年度ではII~III、IIIにあるが、1997年度では0~I、Iにピークがある。0~I、IとI~II、IIは同程度である。それが2001年度になると0~I、Iにピークが完全に移る。この様に、2001年度までは徐々に軽快する傾向が認められた。2002年度も0に大きなピークがあり、0~I、Iに次のピークがあるのは2001年度と変化ないが、III~IV、IVに新たなピークが出現した。2001年度までには見られない傾向である。長期にわたる繰り返しの調査から皮膚症状は年々軽快していることは明らかである。今までは検診に参加しなかった、重症度が高い患者が2002年度の検診に参加したことが示唆された。

皮膚重症度得点数

表2に2001年度および2002年度の皮膚重症度得点数を示す。皮膚重症度と同様に1993年度と1997年度についても付記した。2001年度では、2~5点の占める割合が増加した。1993、1997年度とは異なる傾向である。また、2002年度と1993、1997年度とを比較すると、0・1の人数はほとんど変化ないが、4・5、6・7の人数が増加している。このことから、ある程度皮膚症状が残存している人の受診が2002年度の検診受診者数増加の背景にある、と考察することも可能である。

血中PCBパターン、PCB平均濃度と皮膚重症度得点数について

表3に示されるように、1993、1997年度と2001、2002年度とを比較すると、A、B、Cパターンでは、明らかに平均重症度得点数が増加している。この結果からも、受診者数増加の背景には、ある程度症状が残存している人が再度検診に参加する傾向にある、といえるであろう。また、血中のPCB濃度は徐々に低下する傾向にある。

血中PCBパターンと皮膚重症度について

表4に血中PCBパターンと皮膚重症度についてまとめた。1995年度³⁾、2001年度と2002年度についてそれぞれまとめた。2002年度ではAパターンでII、III、IVの受診者数が増加している。また、Cパターンで、0の受診者数増加も認められる。ある程度症状が残存している患者の受診も増加していることが示唆された。それに加えて現在症状があまり残存していない患者の受診も増えたことが示唆される。

皮膚重症度、皮膚重症度得点数と血中PCBパターンについて

図1に皮膚重症度、皮膚重症度得点数と血中PCBパターンについて示す。図1aが2001年度、図1bが2002年度である。どちらも同じような傾向である。皮膚重症度と皮膚重症度得点数は正の相関が示唆されるものの、重症度が低い場合(0、0~I)の場合では、重症度得点数は幅広く分布し、相関については明らかではない。また、A、B、C各パターンについて注目すると、Aパ

表1 皮膚重症度

重症度	年度 1993 例数 (%)	1997 例数 (%)	2001 例数 (%)	2002 例数 (%)
0	41 (47.7)	34 (39.0)	32 (37.6)	50 (43.1)
0 I	7 (12.7)	13 (25.3)	32 (38.8)	19 (19.8)
I I	4 (2.3)	9 (21.8)	1 (5.9)	4 (7.8)
I II	2 (2.3)	7 (21.8)	1 (5.9)	1 (7.8)
II III	0 (2.3)	12 (21.8)	4 (5.9)	8 (7.8)
II III	21 (33.7)	8 (12.6)	6 (17.7)	11 (10.3)
III III	8 (33.7)	3 (12.6)	9 (17.7)	1 (10.3)
III IV	3 (3.5)	1 (1.1)	0 (0)	18 (19.0)
IV IV	0 (3.5)	0 (1.1)	0 (0)	4 (19.0)
計	86	87	85	116

表 2 皮膚重症度得点数

得点数	年度 1993		1997		2001		2002	
	例数	(%)	例数	(%)	例数	(%)	例数	(%)
0・1	51	(59.3)	54	(62.1)	35	(41.2)	56	(48.3)
2・3	21	(24.4)	21	(25.3)	25	(29.4)	20	(17.2)
4・5	7	(8.1)	7	(8.0)	17	(20.0)	27	(23.3)
6・7	4	(4.7)	3	(3.4)	5	(5.9)	10	(8.6)
8・9	3	(3.5)	1	(1.1)	3	(3.5)	1	(0.9)
10-13	0		1	(1.1)	0		2	(1.7)
14-	0		0		0		0	
計	86		87		85		116	

ターンでは、皮膚重症度も皮膚重症度得点数も高い領域に分布し、Cパターンでは、皮膚重症度も皮膚重症度得点数も低い領域に分布し、Bパターンではその中間の領域に分布する傾向が示唆された。

%CB比と皮膚重症度、 皮膚重症度得点数について

図 2 a に 2002 年度の %CB 比と皮膚重症度、図 2 b に 2002 年度の %CB 比と皮膚重症度得点数について示す。皮膚重症度が低いと %CB 比も低い傾向が認められたが、%CB 比と皮膚重症度との間に明らかな傾向は示唆されなかった。%CB 比と皮膚重症度得点数との間にも明らかな傾向は認められなかった。

2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と 皮膚重症度、皮膚重症度得点数について

図 3 a に 2001 年度の、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と皮膚重症度、図 3 b に 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度と皮膚重症度得点数について示す。これに関しても %CB 比と同様に明らかな傾向は認められなかった。

TEQ と皮膚重症度、 皮膚重症度得点数について

図 4 a に 2001 年度の、TEQ と皮膚重症度、図 4 b に TEQ と皮膚重症度得点数について示す。図 3 a, 図 3 b とときわめて類似した分布を呈した。

考 察

2001 年度と 2002 年度の、福岡県油症患者一斉検診で得られた皮膚症状を評価し、患者血中 PCB 濃度、PCB パターン、%CB 比、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度、TEQ との関連について検討した。2001 年度より血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度を含めた血中ダイオキシン類検査が開始されたことと、最近の油症に関する社会的関心が高まっていることを反映し、2002 年度の受診者数は大幅に増加した。皮膚科検診ではこれまでとは異なる分布を示した。つまり、年々皮膚症状は軽快する、という傾向に反して、皮膚重症度、皮膚重症度得点数が高い値を示す患者の割合が増加した。その一方で、症状がほとんどない患者の割合も増加している。症状がある程度残存しているものの検査を受診していなかった患者と、症状はかなり軽快している患者、

表 3 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

パターン	例数	1993 年度		1997 年度		2001 年度		2002 年度				
		平均濃度 (ppb)	平均重症度得点数	平均濃度 (ppb)	平均重症度得点数	平均濃度 (ppb)	平均重症度得点数	平均濃度 (ppb)	平均重症度得点数			
A	37	7.03	2.27	36	3.49	2.29	19	4.31	3.84	38	4.07	3.87
B	21	4.22	1.43	20	2.68	1.05	34	3.69	1.94	33	2.37	2.12
BC	1	1.60	1.00	4	2.65	2.00	2	2.87	4.00	1	2.14	0.0
C	30	3.27	1.30	29	2.19	1.14	30	2.07	1.80	44	1.73	1.34
計	89	5.04	1.72	89	2.85	1.62	85	3.24	2.36	116	2.68	2.38

表4 血中 PCB パターンと皮膚重症度

1995 年						
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
B	15 (71.4)	3 (14.3)	2 (9.5)	1 (4.8)	0 (0)	21
BC	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2
C	22 (61.1)	3 (8.3)	8 (22.2)	3 (8.3)	0 (0)	36
() : %						
2001 年						
皮膚重症度 パターン	0	I	II	III	IV	計
A	10 (52.6)	0 (0)	3 (15.8)	6 (31.6)	0 (0)	19
B	25 (73.5)	0 (0)	6 (17.7)	3 (8.8)	0 (0)	34
BC	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2
C	27 (90.0)	2 (6.7)	1 (3.3)	0 (0)	0 (0)	30
() : %						
2002 年						
皮膚重症度 パターン	0	I	II	III	IV	計
A	12 (31.6)	1 (2.6)	11 (28.9)	10 (26.3)	4 (10.5)	38
B	22 (66.7)	2 (6.1)	5 (15.2)	4 (12.1)	0 (0)	33
BC	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
C	33 (75.0)	2 (4.5)	4 (9.1)	5 (11.4)	0 (0)	44
() : %						

両方の関心が高まったことが示唆される。受診者の増加や、皮膚重症度、皮膚重症度得点が重症化したことが一時的なものなのか、それとも今後しばらくこの傾向が継続するのかは十分観察する必要がある。

従来行ってきた PCB パターンと症状との検討に加え、今回は%CB 比と症状との関連を検討したが、明らかな傾向は認められなかった。最終的に結論づけるためには今後何年か検討を続ける必

要がある。

血中 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度を含めた血中ダイオキシン類検査が開始されたことを受けて、それらの値と皮膚症状との関係について検討した。皮膚重症度、皮膚重症度点数それぞれについて検討したが、明らかな関係は認められなかった。しかしながら、今回が初回でもあり、今後しばらく検討をする必要がある。

数年来示唆されていることではあるが、現在の

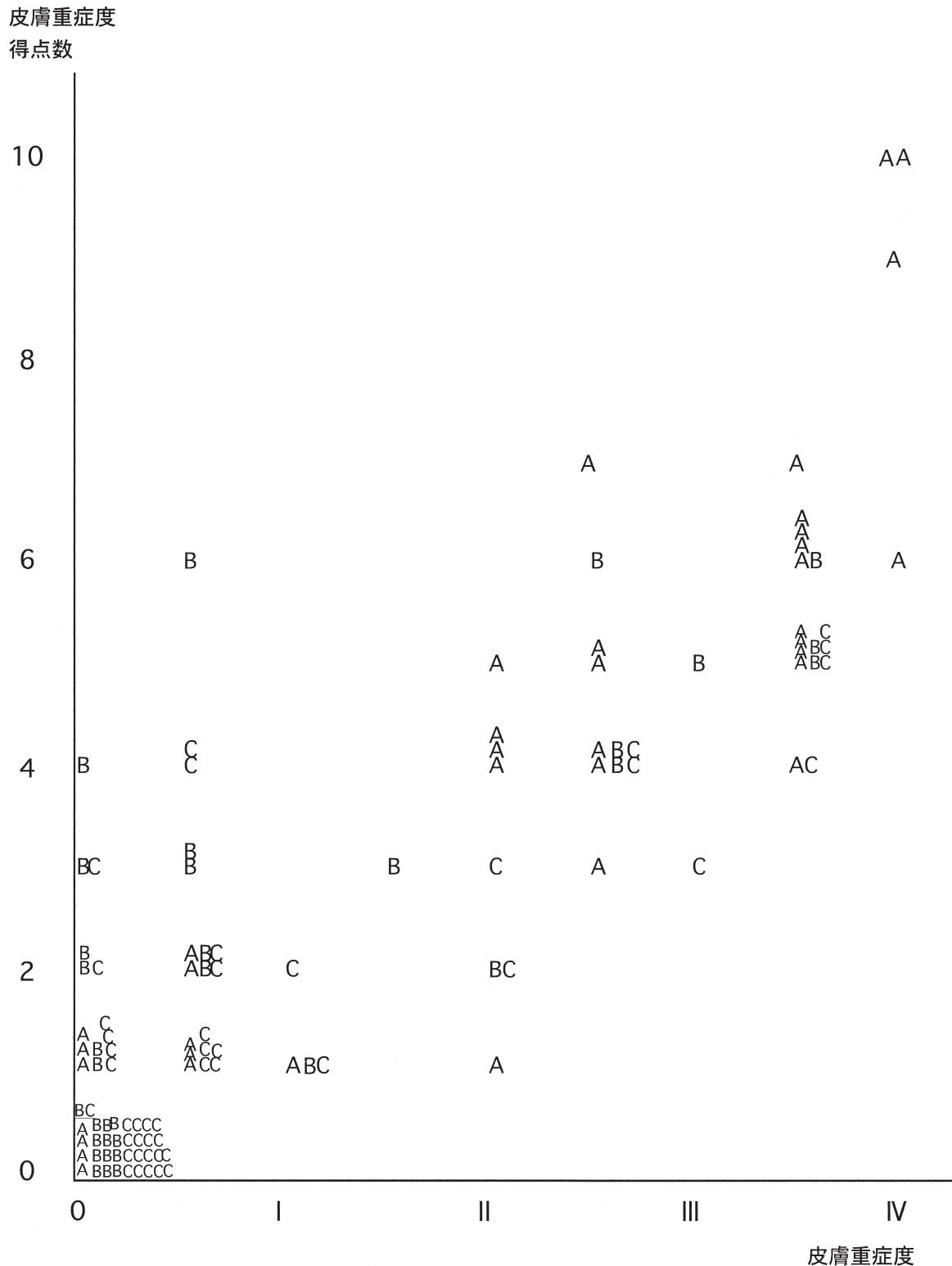


図 1b 2002 年度の ABC パターンと，皮膚重症度，皮膚重症度得点数

濃度を含めた血中ダイオキシン類検査が開始された。当分の間はこれらのことと検診項目，検査との相関についての検討が行われる予定である。皮膚症状との関連も今後十分検討する必要がある。

文 献

1) 中山樹一郎，堀 嘉昭，利谷昭治，旭 正一：

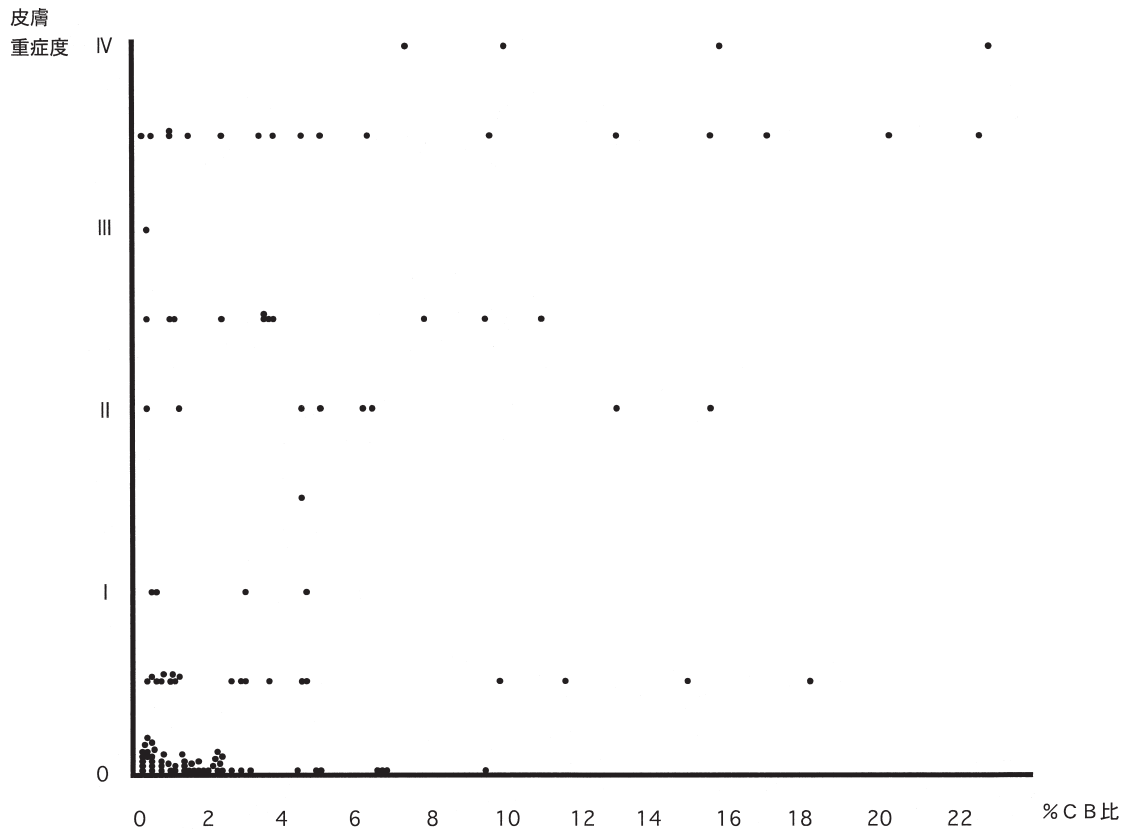


図 2 a 2002 年度における%CB 比と皮膚重症度

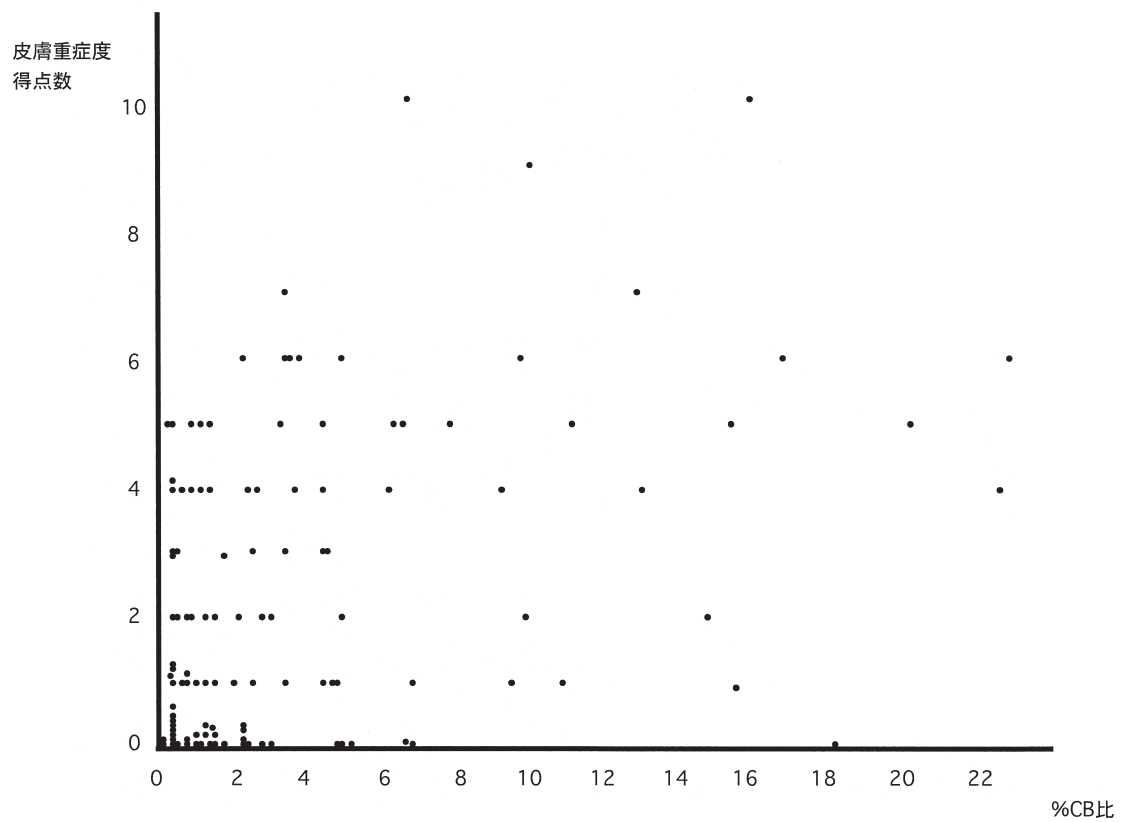


図 2 b 2002 年度の%CB 比と皮膚重症度得点数

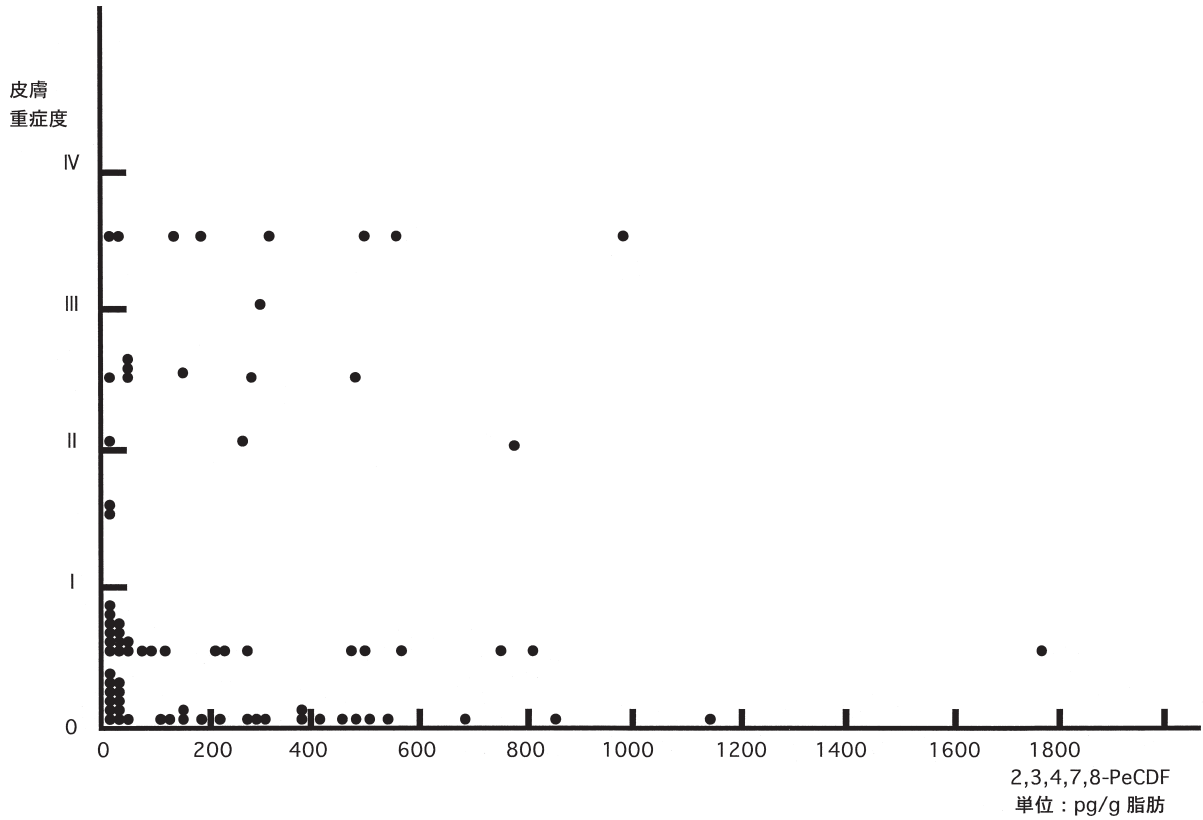


図 3 a 2001 年度の血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と皮膚重症度

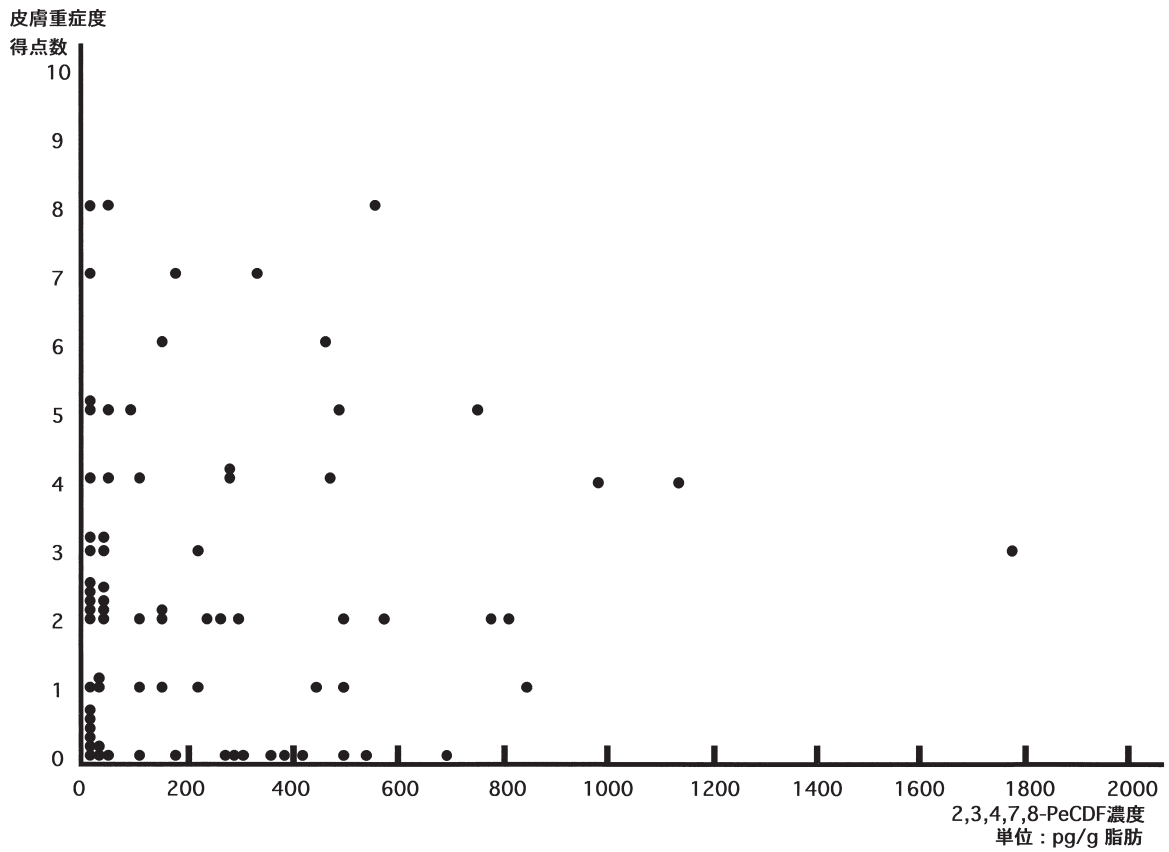


図 3 b 2001 年度の血中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度と皮膚重症度得点数

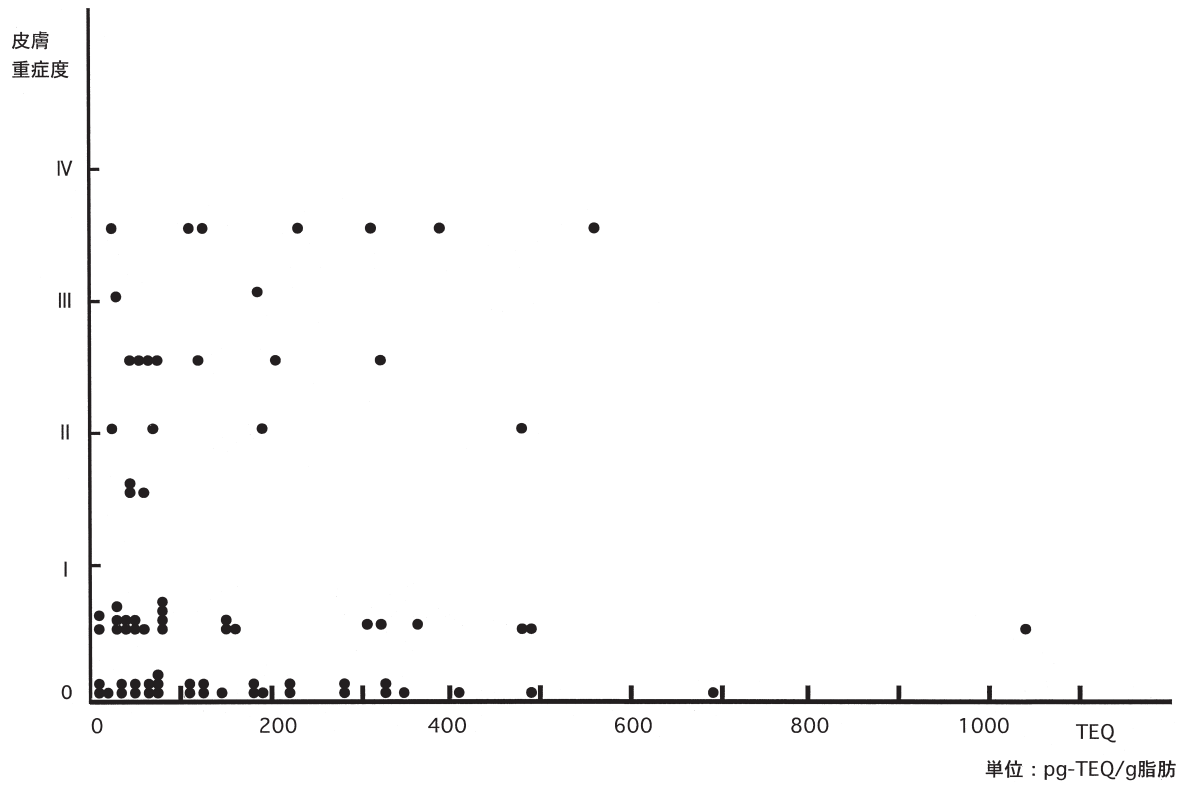


図 4 a 2001 年度の TEQ と皮膚重症度

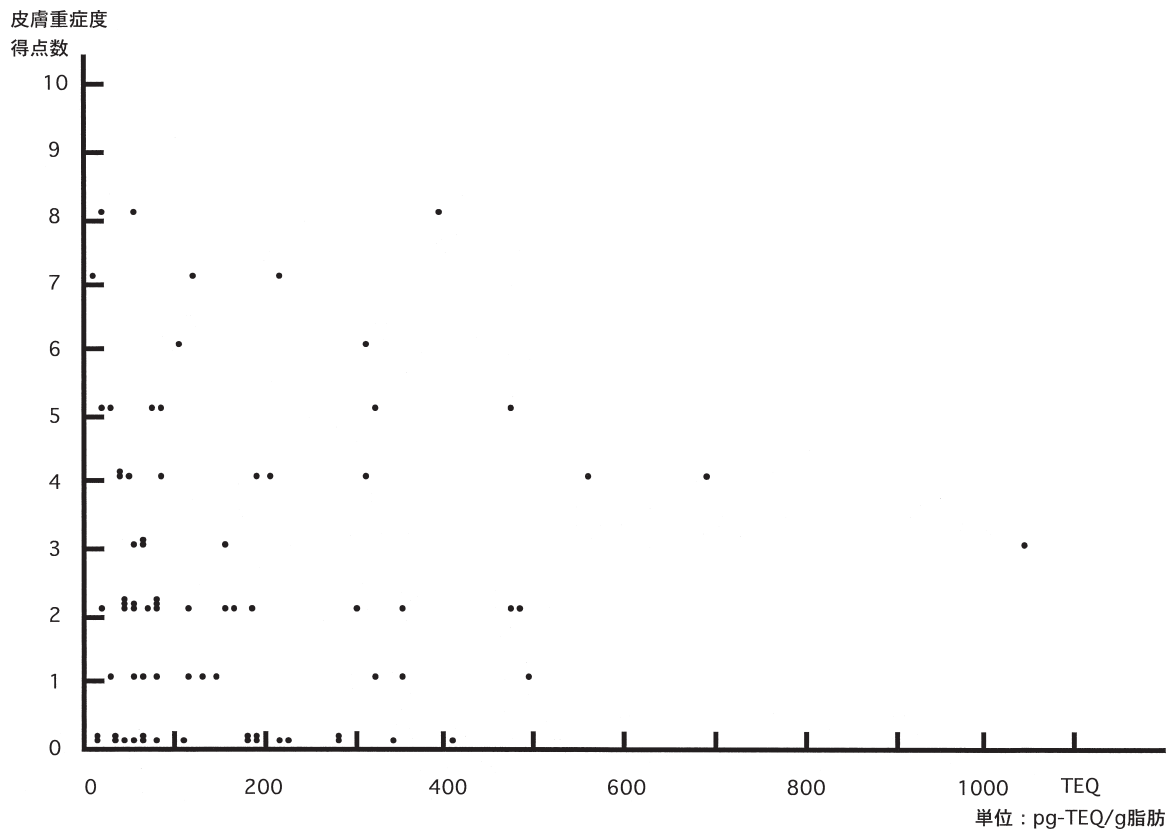


図 4 b 2001 年度の TEQ と皮膚重症度得点数

- 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 86：277-81, 1995.
- 2) 中山樹一郎, 利谷昭治, 旭 正一, 古江増隆：1997・1998年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状。福岡医誌 90：277-81, 1999.
- 3) 中山樹一郎, 堀 嘉昭, 利谷昭治, 旭 正一：1995・1996年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状—各年齢層での血中PCB濃度と皮膚重症度の相関性。福岡医誌 88：236-9, 1995.
(受付 2003-4-1)

カネミ油症検診者に見られる 血清クレアチンキナーゼとアルドラーゼの異常

長崎大学医学部保健学科

吉村俊朗, 沖田 実

長崎大学第一内科

中野治郎, 白石裕一, 岩永 洋

長崎北病院総合リハビリテーション部

友利幸之介, 岡本真須美

Elevation of Serum Creatine Kinase and Low Serum Aldolase in the Patients with KANEMI YUSHOU

Toshiro YOSHIMURA and Minoru OKITA

School of Health Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852-8520

Jiro NAKANO, Hirokazu SHIRAISHI and Hiroshi IWANAGA

First Department of Internal Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852-8102

Kounosuke TOMORI and Masumi OKAMOTO

Department of Rehabilitation, Nagasaki-KITA Hospital, Nagasaki 852-8061

Abstract We studied the rates of the patient with the elevation of serum creatine kinase using the routine medical checkup data from KANEMI YUSHOU patients between 1995 and 2001. We also studied the serum aldolase level and light microscopic observation of muscle tissue in rats during strenuous exercise given the polychlorinated biphenyls. Fifteen percent of the patients showed the elevation of serum creatine kinase. The patients with the elevation of serum creatine kinase also showed a higher concentration of polychlorinated biphenyls in their blood. 47.7% of the patients show low aldolase. There is no interrelation between the aldolase levels and PCBs or PCQs. There is also no interrelation between the serum levels of aldolase and creatine kinase. The rats given polychlorinated biphenyls showed a slight increase of necrotic fibers during strenuous exercise. Polychlorinated biphenyls may play some role for muscle necrosis. We could not clarify the significance of low serum aldolase in KANEMI YUSHOU.

目 的

カネミ油症は、1968年、米ぬか油に混入したPCBsを経口摂取することにより発症した。その後、年に一回カネミ油症検診が行われている。血清クレアチンキナーゼ(以下、血清CK)の上昇がこの検診者の10~20%に認められる¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。一般に、血清CKの上昇は筋疾患や末梢神経の異常で認められ、さらに、甲状腺機能低下症でも血清CKは上昇するといわれている¹¹⁾。一方、PCBsは血中の甲状腺ホルモンの低下を来すこと⁵⁾¹⁰⁾¹³⁾や末梢神経障害を惹起すること²⁾⁷⁾、また、肝臓でのアル

ドラーゼの低下すること⁴⁾が動物実験で報告されている。

これまでに我々は、血中PCBs濃度高値が血清CK上昇の要因の一つである可能性を報告してきた¹⁷⁾。本研究ではカネミ油症検診者の血中PCBs濃度・PCQs濃度と血清CK上昇の関係を再度検討し、併せて、血清アルドラーゼ値についても検討した。また、PCBsを投与したラットに下り坂走行を負荷し、骨格筋に及ぼす影響を検討した。

研究と方法

1) 検診データ

a) 血清CKについて

1995年～2001年までのカネミ油症検診者のうち血清CKを測定できた延べ688名(内訳:平成7年84名,平成8年101名,平成9年97名,平成10年107名,平成11年107名,平成12年107名,平成13年90名)を対象とした。そして,血清CK値を基に対象を男女別に,正常群(男:CK<198 IU/I,女:CK<181)と上昇群(CK≥198 IU/I,女:CK≥181)に分け,この2群間の血中PCBs濃度・PCQs濃度を対応のないt検定(有意水準5%未満)を用いて比較した。

b) 血清アルドラーゼについて

2000年,2001年の検診者193名(平均年齢 67.9 ± 9.9 歳)の血清からアルドラーゼ値を測定し,コントロールには,平均年齢 71.2 ± 12.6 歳の11名の血清を用いた。そして,血清アルドラーゼ値を基に対象を男女別に,正常群(1.9 IU/l以上)と低下群(1.8 IU/l以下)に分け,この2群間の血中PCBs濃度・PCQs濃度を対応のないt検定(有意水準5%未満)を用いて比較した。また,男女別に血清アルドラーゼと血清CKの関連性を単相関分析を用いて検討した。

2) 動物実験

a) 材料

8週齢のWistar系雄ラットに濃度42%のPCB42(東京化成工業)をサラダ油に100 mg/mlの分量で溶解し,ラット用ゾンデ針を用いて1回あたり0.15 mlの量を週5回,延べ2週間投与した。そして,ラットを運動群と非運動群に分け,運動群にはPCBs投与が終了した翌日に,傾斜-16度に設定した小動物用トレッドミル(シナノ製作所)を用い,分速16～20 mで90分間,下り坂走行を負荷した。

b) 筋の評価

筋の摘出の24時間前にラット腹腔内に1%エバンスブルー溶液を投与し,エーテル麻酔下でヒラメ筋(SOL)と長趾伸筋(EDL)を摘出した。なお,運動群においては,運動後48時間,72時間に筋を摘出した。摘出した筋は液体窒素で急速凍結させ,その連続切片を作成し,H&E染色後,光

学顕微鏡で検鏡した。また,切片の一部は未染色のまま蛍光顕微鏡で観察した。そして,貪食細胞の浸潤が認められる壊死線維,ならびにエバンスブルーによって蛍光を発色した筋線維の数を算出し,筋線維総数に対する割合を求めた。

結 果

1) 検診データ

血清CKの上昇を認めた者は1995年18名(21.4%),1996年22名(21.8%),1997年11名(11.3%),1998年16名(15.0%),1999年10名(9.4%),2000年12名(11.7%),2001年15名(16.7%)で,7年間の延べ数では104名(15.1%)であった(表1)。血清CK上昇群では,男女ともに血中PCBs濃度は有意に上昇していたが,PCQs濃度には有意差を認めなかった(図1)。

血清アルドラーゼ値は,92名(47.7%)で正常値以下を示し(表2,図2-a),コントロールと比べてもカネミ油症検診者の血清アルドラーゼ値は有意に低下していた(図2-b)。しかし,正常群と低下群の血中PCBs濃度・PCQs濃度には男女ともに有意差を認めなかった(図3)。また,血清アルドラーゼと血清CKの関連性についても男女ともに有意な相関関係を認めなかった(図4)。

2) 動物実験

SOLにおいては,非運動群は壊死線維の割合が0.06%,発色線維の割合が0.01%であったが,運動群では運動後48時間で壊死線維が0.29%,発色線維が0.22%,72時間で壊死線維が0.21%,発色線維が0.02%とやや増加していた。また,EDLにおいては,非運動群は壊死線維の割合が0.03%,発色線維の割合が0.01%であったが,運動群では運動後48時間で壊死線維が0.31%,発色線維が0.34%とやや増加していた(表3)。

考 案

今回の結果から,血清CKの上昇した群では,血中PCBs濃度が上昇していたが,血中PCQs濃度は血清CKの上昇と関連はなかった。一般に,血清CKはその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。また,健常人でも過度の運動負荷により血清CKの上昇が認められ¹⁾⁹⁾¹²⁾,さらに,筋細胞膜の透過性の亢進で

Table 1 Ratio of serum high CK

Years	Female	Male	Total
1995	12名 (21.4%) (n=56)	6名 (21.4%) (n=28)	18名 (21.4%) (n=84)
1996	12名 (19.7%) (n=61)	10名 (25.0%) (n=40)	22名 (21.8%) (n=101)
1997	5名 (9.3%) (n=54)	6名 (14.0%) (n=43)	11名 (11.3%) (n=97)
1998	9名 (12.9%) (n=70)	7名 (18.9%) (n=37)	16名 (15.0%) (n=107)
1999	3名 (4.7%) (n=64)	7名 (16.7%) (n=42)	10名 (9.4%) (n=106)
2000	9名 (12.3%) (n=73)	3名 (10.0%) (n=30)	12名 (11.7%) (n=103)
2001	11名 (17.7%) (n=62)	4名 (14.3%) (n=28)	15名 (16.7%) (n=90)
Total	61名 (13.9%) (n=440)	43名 (17.3%) (n=248)	104名 (15.1%) (n=688)

も上昇することがある⁶⁾。これまでの我々の先行研究では、PCBsを投与したラット筋細胞膜をfreeze fracture法で観察した結果、orthogonal arrayの増加が認められた¹⁷⁾。すなわち、PCBsは筋細胞膜に影響を与え、血清CKの上昇を惹起していると考えられる。また、カネミ油症検診者でも血清CKの上昇に運動量が関与している可能

性が考えられたため¹⁶⁾、今回、PCBs投与したラットに下り坂走行を負荷し、筋組織の変化を検索した。その結果、運動後は軽度ながらも壊死線維が増加していた。つまり、PCBsは、脂質代謝、糖代謝に関する酵素や脱水素酵素、ペルオキシゾーム酵素などの誘導や抑制を引き起こすことが報告されており⁸⁾、筋細胞の代謝にも影響を及ぼし、筋細

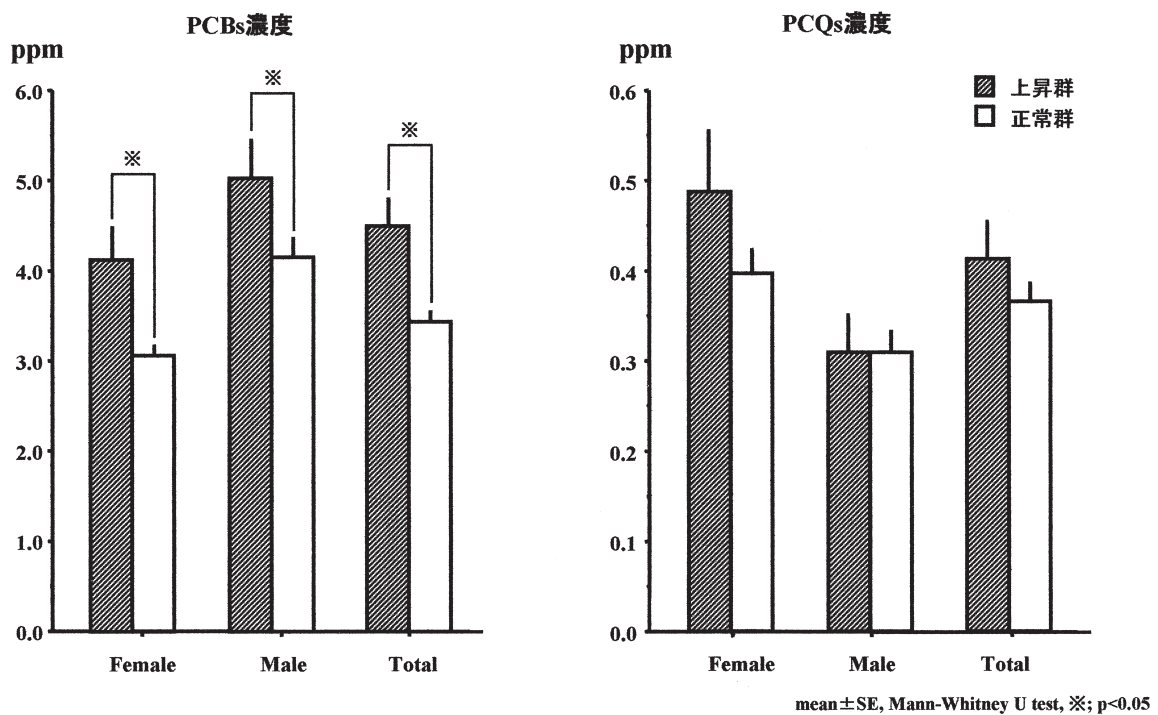
**Fig. 1** Mean PCBs and PCQs concentrations in serum high CK and normal

Table 2 Ratio of serum low aldolase

Years	Female	Male	Total
2000	44名 (60.3%) (n=73)	19名 (63.3%) (n=30)	63名 (61.2%) (n=103)
2001	20名 (32.3%) (n=62)	9名 (32.1%) (n=28)	29名 (32.2%) (n=90)
Total	64名 (47.4%) (n=135)	28名 (48.3%) (n=58)	92名 (47.7%) (n=193)

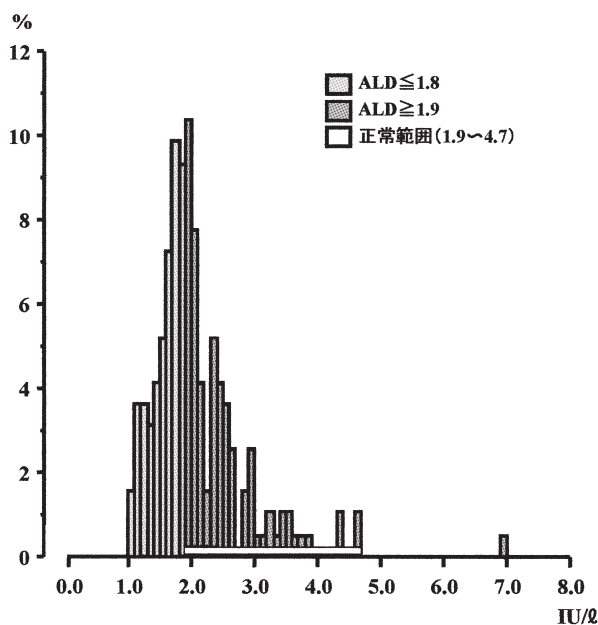
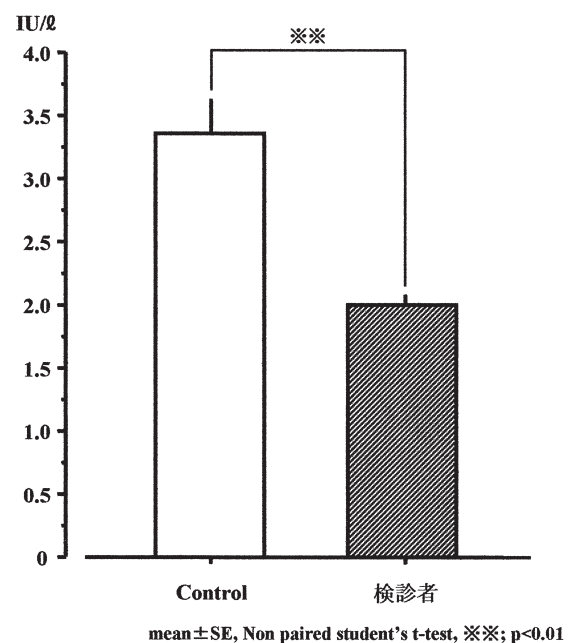
胞壊死が生じるのではないかと推測される。そして、カネミ油症検診者では血清CKの上昇以外、筋力低下や筋肉痛などの症状はないが、過激な運動負荷は筋細胞壊死が生じる可能性があると思われる。

一方、PCBsはIL-6を介して肝でのアルドラーゼBの活性を低下させるとの報告がある³⁾。アルドラーゼは嫌気性解糖系酵素の一つで、フルクトース-1,6-二リン酸やフルクトース-1-リン酸に作用する。3種類のアイソザイムがあり、筋型(A)、肝型(B)、脳型(C)に分けられる。しかし、これまでカネミ油症検診者のアルドラーゼの異常について検討した報告はない。今回の結果では、カネミ油症検診者の47.7%に血清アルドラーゼ値の低下が認められ、コントロールと比較して

もカネミ油症検診者の血清アルドラーゼ値は有意に低下していた。しかし、血中PCBs濃度・PCQs濃度との関連性は認めず、PCBs、PCQsともに血清アルドラーゼ低下への関与は不明であった。また、血清CK値と血清アルドラーゼ値との有意な相関関係も認められず、血清アルドラーゼ値の低下がなぜカネミ油症検診者に認められるのかは現在のところ不明であり、今後検討を要する点と思われる。

結 論

カネミ油症検診者の47.7%で血清アルドラーゼ値の低下が認められたが、血中PCBs濃度・PCQs濃度との関係は不明であった。また、血清CKが上昇しやすいこと以外、筋力低下や筋痛な

**Fig. 2-a** Histogram of serum aldolase**Fig. 2-b** Mean values of serum aldolase in patient and control

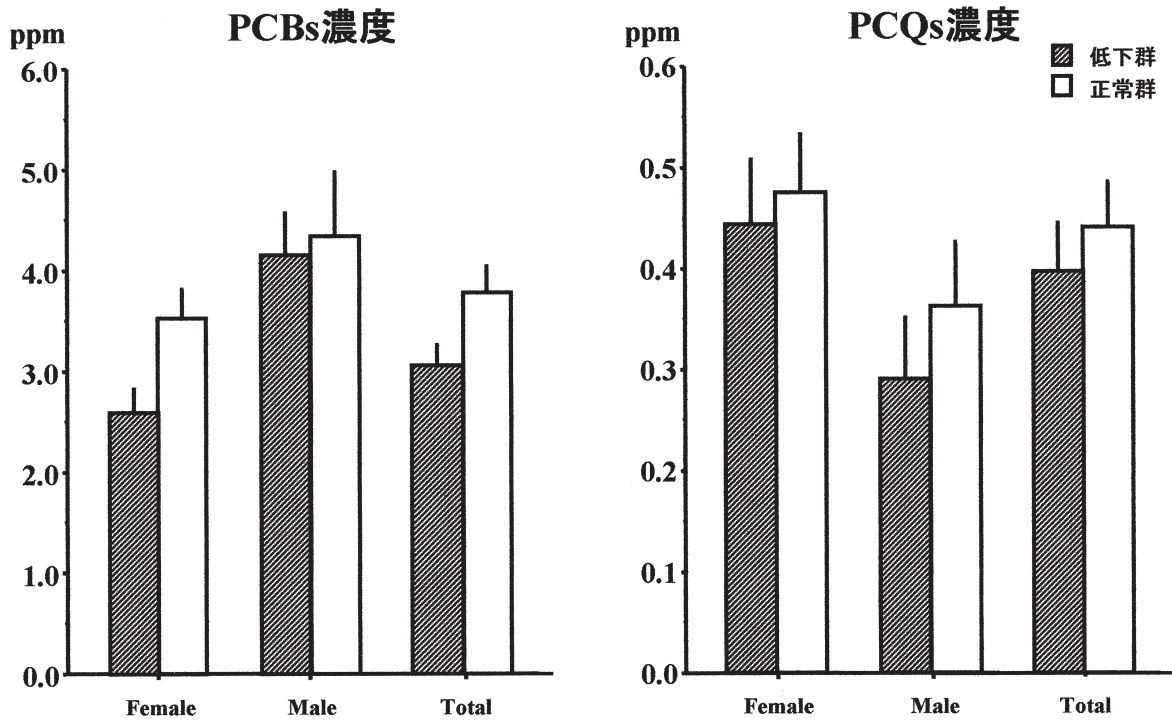


Fig. 3 Mean PCBs and PCQs concentrations in serum low aldolase and normal

どの臨床症状はないが、カネミ油症検診者で認められる血清CKの上昇は筋細胞壊死に伴い生じている可能性がある。

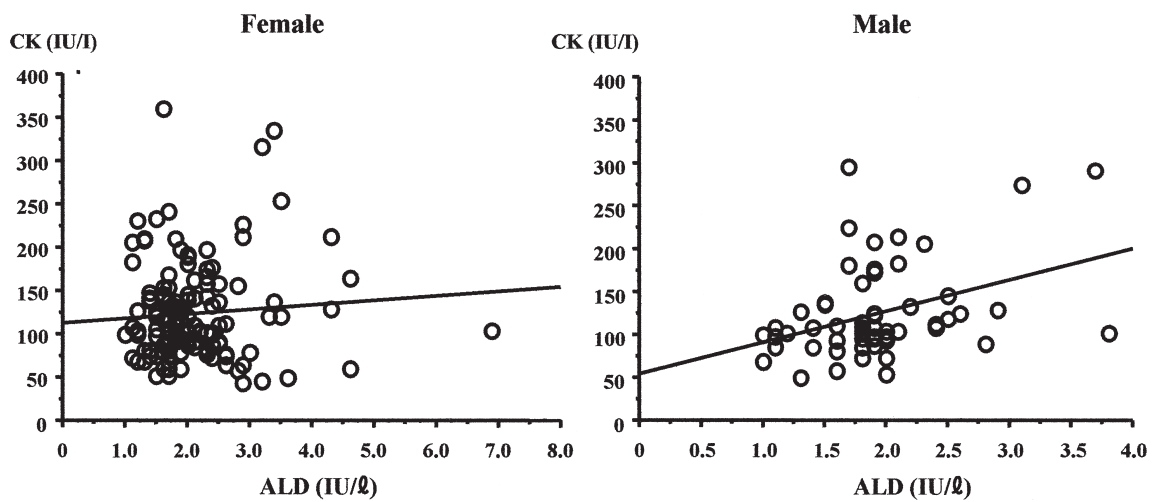
文 献

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 : 239-240, 1995.

2) Chia LG and Chu FL : A clinical and electrophysiological study of patients with polychlorinated biphenyl poisoning. J Neurol Neurosurg Psychiatry 48 : 894-901, 1995.

3) Huang Y, Shinzawa H, Togashi H, Takahashi T, Kuzumaki T, Otsu K and Ishikawa K : Interleukin-6 down-regulates expressions of the aldolase B and albumin genes through a pathway involving the activation of tyrosin



$Y = 112.107 + 5.291 * X; R^2 = .006$

$Y = 55.202 + 36.416 * X; R^2 = .144$

Fig. 4 Interrelation between serum aldolase and CK

Table 3 Ratio of necrotic fiber

		筋線維総数	壊死線維	発色線維
SOL	非運動群	6,971	4 (0.06%)	1 (0.01%)
	運動群			
	48 時間後	2,763	8 (0.29%)	1 (0.22%)
	72 時間後	5,696	12 (0.21%)	1 (0.02%)
EDL	非運動群	10,013	3 (0.03%)	1 (0.01%)
	運動群			
	48 時間後	3,273	10 (0.31%)	11 (0.34%)
	72 時間後	6,491	0 (0.00%)	0 (0.00%)

number (%)

- kinase. Arch. Biochem. Biophys. 320 : 203-209, 1995.
- 4) Kato H, Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N and Oguri K : Significant suppression of aldolase B, carbonic anhydrase III and alcohol dehydrogenase in liver cytosol of rats treated with highly toxic coplanar PCB. JPN. Toxicol. Environ. Health 43, 20, 1997.
 - 5) 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 states of pregnant women and their infants. Pediatr Res 36 : 468-473, 1994.
 - 6) Kuipers H : Exercise-induced muscle damage. Int J Sports Med 15 : 132-135, 1994.
 - 7) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司 : 油症患者における神経学的所見. 福岡医誌 60 : 462-463, 1969.
 - 8) 奥村恂 : 内科的症候と所見. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆(編) : 油症研究-30年の歩み-初版, pp.165-181, 九州大学出版会, 福岡, 2000.
 - 9) 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 : 520-524, 1995.
 - 10) 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 : 253-262, 1995.
 - 11) 庄司進一 : クレアチンキナーゼ. 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-第4版, 上銘外喜夫(編), pp. 262-265, 日本臨床社 大阪 1995.
 - 12) Sorichter 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 : 288-292, 1995.
 - 13) Stone R : Environmental toxicants under scrutiny at Baltimore meeting, news. Science 267 : 1770-1771, 1995.
 - 14) 吉村俊朗, 沖田実, 東登志夫, 上山裕文, 伊藤聖 : 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, 福岡医誌 88 : 216-219, 1997.
 - 15) 吉村俊朗, 沖田実, 上山裕文, 伊藤聖, 後藤公文, 末松貴史 : Polychlorinated Biphenyls (PCB) の末梢神経髄鞘におよぼす影響について. 福岡医誌 88 : 211-215, 1997.
 - 16) 吉村俊朗, 沖田実, 川副巧成, 中野治郎, 中尾洋子 : カネミ油症検診者における血清クレアチンキナーゼ上昇の要因に関する検討, 福岡医誌 90 : 246-250, 1999.
 - 17) 吉村俊朗, 沖田実, 福田卓, 藤本武士, 中尾洋子 : カネミ油症検診者における血清 CK 上昇の意義-ラット筋細胞膜の freeze fracture 法による変化-, 福岡医誌 92 : 123-234, 2001.
(受付 2003-3-24)

油症患者における甲状腺機能の検討

北九州津屋崎病院内科
辻 博, 伊東靖夫

Thyroid Function in Patients with Yusho

Hiroshi TSUJI and Yasuo ITO

*Department of Internal Medicine, Kitakyushu-Tsuyazaki Hospital,
Fukuoka 811-3307, Japan*

Abstract To evaluate chronic effect of polychlorinated biphenyl (PCB) on thyroid functions, thyroid hormone levels were studied in 115 patients with Yusho in 2002. Serum level of thyroid stimulating hormone (TSH) was elevated in 13 cases (11.3%). All of them showed normal triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4) levels, and regarded as latent hypothyroidism. There were no significant correlations between blood PCB concentrations and TSH levels, T_3 levels or T_4 levels. We conclude that abnormality of TSH levels in patients with Yusho is frequent, but it may not 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¹²⁾. 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ベトリヨードサイロニンおよびサイロキシンの上昇を認めることを報告してきた¹⁰⁾. さらに, 1996年度福岡県油症一斉検診では血中PCB濃度が高値の油症患者において抗サイログロブリン抗体を高頻度に認めた¹³⁾. 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することより, 油症患者では甲状腺機能の経過を注意深く追跡する必要が有ると考えられる. 油症発生以来30年以上が経過し, 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が, 重症例においては全身倦怠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の組成には未だに特徴的なパターンがみられる^{7,8)}. また, 油症では算出した毒性等量 (TEQ: Toxic Equivalent) より原因物質として毒性影響が大きいポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) の体内残留も指摘されており^{9,11)}, 慢性中毒に移行していると推定される.

今回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.

対象および方法

平成14年度福岡県油症一斉検診の受診者143名にアンケートによるインフォームドコンセントを実施し, 甲状腺機能検査の同意が得られた受診者140名中, 油症認定患者115例を対象者とした. 平成14年3月現在の福岡県班全油症認定患者611名の18.8%であった. 油症患者の内訳は男性48例, 女性67例で, 平均年齢は 63.3 ± 13.0 歳 (31-86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), トリヨードサイロニン (T_3) およびサイロキシシン (T_4) は電気化学発光免疫測定 (Electrochemiluminescence Immunoassay: ECLI) 法 (エクルーシス TSH, エクルーシス T_3 およびエクルーシス T_4 , ロシュ・ダイアグノスティックス社) により測定した. 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なった。

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 検定で行なった。

結 果

平成14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115例中、TSH値、 T_3 値あるいは T_4 値のいずれか1項目以上の異常を認めたものは20例(17.4%)であった。TSH値の低下を6例(5.2%)に、上昇を13例(11.3%)に、 T_4 値の上昇を1例(0.9%)に認め、 T_3 値の異常を示したものはみられなかった。油症患者の甲状腺機能異常としてTSH値の上昇を最も多く認めた。

甲状腺機能検査においてTSH値あるいは T_4 値の異常を示した油症患者20例をTable 1に示した。いずれの患者にも症状はみられなかった。TSH値の低下を認めた6例(No. 1-6)では、全例 T_3 値および T_4 値は正常であった。TSH値の上昇を認めた13例(No. 7-19)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

下状態と考えられた。そして、 T_4 値の上昇を認めた1例(No. 20)においてもTSH値および T_3 値は正常であった。潜在性の甲状腺機能低下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13例中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パターンが3例、Aパターンに近いBパターンを示すものが3例であった。

油症患者における甲状腺機能異常とPCBとの関連を検討するために、油症患者115例について血中PCB濃度とTSH値、 T_3 値あるいは T_4 値との相関について検討した。血中PCB濃度とTSH値($r=0.1058$)、 T_3 値($r=-0.0977$)および T_4 値($r=0.0310$)の間に相関をみなかった。次に、血中PCB濃度が2.3 ppb未満の58例をPCB低濃度群、2.3 ppb以上の57例をPCB高濃度群として両群間の甲状腺機能検査異常の出現頻度について検討を行なった(Table 2)。PCB低濃度群は男性29例、女性29例、平均年齢は58.7±14.3歳、平均PCB濃度は1.44±0.55 ppbであった。PCB高濃度群は男性19例、女性38例、平均年齢は68.0±9.5歳、平均PCB濃度は4.07±

Table 1 甲状腺機能異常を呈した油症患者

Case	Age	Sex	TSH μ IU/ml	T_3 ng/ml	T_4 μ g/dl	PCB ppb	PCB pattern
1	57	M	0.01	1.55	11.5	2.00	C
2	66	F	0.13	1.27	9.9	2.84	A
3	61	F	0.17	1.78	11.7	2.84	A
4	69	F	0.19	1.78	9.9	1.65	C
5	63	F	0.20	1.27	10.1	1.41	B
6	36	M	0.25	0.99	5.5	1.52	C
7	80	F	4.24	1.37	7.5	1.75	C
8	64	F	4.37	1.62	8.7	6.29	A
9	70	F	4.46	1.5	10.3	2.18	BC
10	65	M	4.53	1.22	7.4	1.20	B
11	75	F	4.59	1.23	7.0	2.66	B
12	55	F	4.68	1.26	8.2	4.00	A
13	55	M	5.07	1.56	9.7	1.00	C
14	73	M	5.41	1.30	8.0	2.33	C
15	55	F	5.56	1.56	12.5	2.64	A
16	83	F	5.59	1.49	11.7	6.31	A
17	37	F	5.84	1.47	9.2	0.25	C
18	74	M	5.96	1.57	10.0	2.23	B
19	86	M	7.17	1.50	11.2	2.85	C
20	76	F	3.73	1.78	14.0	2.58	A

Normal Range, TSH (0.27-4.2); T_3 (0.85-2.0); T_4 (5.1-13.5)

Table 2 油症患者における甲状腺機能異常の頻度

No. (%)		PCB 濃度	
		<2.3 ppb	≥2.3 ppb
		58	57
TSH	低下	4 (6.9)	2 (3.5)
	上昇	6 (10.3)	7 (12.3)
T ₃	低下	0	0
	上昇	0	0
T ₄	低下	0	0
	上昇	0	1 (1.8)

2.01 ppb であった。TSH 値の低下を PCB 低濃度群に 4 例 (6.9%)、高濃度群に 2 例 (3.5%) に認め、低濃度群に多い傾向を認めたが有意差はみられなかった。また、TSH 値の上昇を PCB 低濃度群に 6 例 (10.3%)、高濃度群に 7 例 (12.3%) に認め、両群の TSH 値の異常出現率に差をみなかった。T₄ 値の上昇は PCB 高濃度群に 1 例 (1.8%) を認めた。

考 察

油症は原因油の分析から原因物質として PCDF の毒性影響が大きいと考えられている。PCDF を含むダイオキシン類は内分泌攪乱化学物質として最近注目されている。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、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 値の有意の上昇を認めることを報告してきた¹⁰⁾。そして、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、対照者に比べその頻度に差はみられず、血中 PCB 濃度と TSH 値、T₃ 値および T₄ 値の間に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、有意差はみられないものの油症患者において抗サイログロブリン抗体の出現が高頻度であった。油症発生 28 年後の 1996 年度福岡県油症一斉検診では油症患者 81 例を対象に甲状腺機能を検討し、TSH 値の低下を 2 例 (2.5%) に、上昇を 7 例 (8.6%) に、T₃ 値の低下を 1 例 (1.2%) に、T₄ 値の低下を 1 例 (1.2%) に、上昇を 1 例 (1.2%) に認めた。そして、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。さらに、血中 PCB 濃度が 2.9 ppb 以下の油症患者 40 例と 3.0 ppb 以上の 41 例の甲状腺機能異常および甲状腺自己抗体の出現頻度を比較し TSH 値、T₃ 値および T₄ 値には差をみなかったが、血中 PCB 濃度が 3.0 ppb 以上の油症患者に有意に高頻度の抗サイログロブリン抗体の出現を認めた。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⁾¹⁴⁾。油症患者において血中 PCB 高濃度群に抗サイログロブリン抗体を有意に高頻度に認めることより、油症患者では甲状腺機能の経過を注意深く追跡する必要があると考えられた。今回の甲状腺機能の検討では TSH 値の異常を 19 例 (16.5%) と高率に認めた。TSH 値の異常については低下を 6 例 (5.2%) に、上昇を 13 例 (11.3%) に認め TSH 値の上昇が多くみられた。そして、TSH 値の上昇を認めた 13 例では、全例 T₃ 値および T₄ 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。

PCB と甲状腺機能との関連について、PCB を投与した実験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。PCB (Aroclor 1254) を投与したラットに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が報告されている²⁾。PCB の投与により肝ミクロゾームに存在し、T₄ のグルクロン酸抱合に関与する UDP-glucuronosyltransferase 活性の上昇が報告されており¹⁾、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。そして、PCB 投与による血中 T_4 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³⁾。また、PCB を投与したラットや marmoset monkey において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⁾¹⁵⁾、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。また、PCB による甲状腺機能低下の機序として PCB や PCDF の水酸化体と T_4 との構造類似性による T_4 結合蛋白質への結合が阻害されることが報告されている⁴⁾。油症発生以来 30 年以上が経過し、今回の甲状腺機能に対する慢性的影響の検討において血中 PCB 濃度と TSH 値の間に相関がみられず、血中 PCB 低濃度群および高濃度群の TSH 値の異常出現率に差がみられなかった。油症患者に認められる甲状腺機能異常について、さらなる検討が必要と考えられた。

総 括

平成 14 年度福岡県油症一斉検診の受診者において検査に同意の得られた油症患者 115 例を対象に甲状腺機能検査所見を検討した。TSH 値、 T_3 値あるいは T_4 値のいずれか 1 項目以上の異常を認めたものは 20 例 (17.4%) であり、TSH 値の低下を 6 例 (5.2%) に、上昇を 13 例 (11.3%) と最も多く認め、 T_4 値の上昇を 1 例 (0.9%) に認めた。 T_3 値の異常を示したものはみられなかった。TSH 値の上昇を認めた 13 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。血中 PCB 濃度と TSH 値、 T_3 値あるいは T_4 値の間に相関はみられず、血中 PCB 濃度が 2.3 ppb 未満の PCB 低濃度患者 58 例および 2.3 ppb 以上の PCB 高濃度患者 57 例について両群の TSH 値異常出現率に差をみなかった。

文 献

- 1) Barter R. A and Klaassen C. D : 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.
- 2) Bastomsky C. H : Effects of a polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254) and DDT on biliary thyroxine excretion in rats. *Endocrinology* 95 : 1150-1155, 1974.
- 3) Bastomsky, C. H : Goitres in rats fed polychlorinated biphenyls. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55 : 288-292, 1977.
- 4) Brouwer A : Inhibition of thyroid hormone transport in plasma of rats by polychlorinated biphenyls. *Arch Toxicol (Suppl)* 13 : 440-445, 1989.
- 5) Collins Jr. W. T., Capen C. C., Kasza L., Carter C and Dailey R. E : 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 O. P., Saarinen P and Lamberg B. A : 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) Oishi S., Morita M and Fukuda H : Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43 : 13-22, 1978.
- 12) 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.
- 13) 辻博, 佐藤薫, 下野淳哉, 東晃一, 橋口衛, 藤島正敏 : 油症患者における甲状腺機能 : 油症発生 28 年後の検討. *福岡医誌* 88 : 231-235, 1997.
- 14) Tunbridge W. M. G., Brewis M., French J. M.,

- Appleton D., Bird T., Clark F., Evered D. C., Evans J. G., Hall R., Smith P., Stephenson J and Young E: Natural history of autoimmune thyroiditis. *Br. Med. J.* 282: 258-262, 1981.
- 15) Van den Berg K. J., 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.

油症患者における皮丘・皮野面積の検討

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

病態解析・制御学講座 皮膚病態学分野

小川文秀, 清水和宏, 片山一朗

Examination of "Areas cutanea" in Yusho Patients

Fumihide OGAWA, Kazuhiro SHIMIZU and Ichiro KATAYAMA

*Department of Dermatology, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1,
Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan*

Abstract In the field of Dermatology, one of the representatives of oxidative stresses is ultraviolet irradiation. Repetitive ultraviolet exposure results in cutaneous photoaging. Otherwise, polychlorinated biphenyls (PCB) give rise to superoxide, which means Yusho patients have been affected by oxidative stress for more than thirty years. In order to examine the influence of oxidative stress by PCB to the skin, we measured the "areas cutanea" in the inner aspect of upper arm in Yusho patients and in age-matched controls. "Areas cutanea" were significantly smaller in Yusho patients than in controls. Although PCB can give an oxidative stress, the influence seemed to be little to the skin. There might be another mechanisms involved in this result except the oxidative stress by PCB. Further examination should be conducted in the future.

はじめに

カネミ油症事件発生後30年以上が経過し、当初認められていた激しい皮膚症状は現在ほとんど認められなくなってきている。しかしながら、患者の良好なQOLを維持していくための保健指導・健康相談の重要性が今後増して来るものと考えられる。Polychlorinated biphenyls (PCB)はその代謝課程でsuperoxide (O_2^-)を産生することが報告されており、油症患者は酸化ストレスを受け続けていることが考えられる。一方、皮膚における酸化ストレスの最も代表的なものは紫外線曝露によって引き起こされる皮膚老化(光老化)である。その最も大きな視覚的変化が皮膚のシワの増加や肌理の変化である。皮膚のシワが増加したり、肌理が荒くなっていくと皮丘・皮野の面積が増加していく。今回、油症患者の非露光部位皮膚の皮丘・皮野面積を測定し、患者皮膚に対するPCBの影響を検討した。

実験方法

1. 対象

2001年7月の奈留地区油症検診受診者のうち

同意を得られ、喫煙習慣のない女性患者9名を対象とした。また年齢を合致させた健康人女性5名を正常対象とした。

2. 皮丘・皮野面積測定

検診時にビデオマイクロスコープを用いて皮膚露光部である上腕内側部の撮影を行いプリント像を得た。後日得られたプリント像をスキャナで取り込み(100 dpi)、画像処理ソフトAdobe Photoshop 6.0, NIH Image 1.62を用いて計測した。

皮野・皮丘面積測定のプロチャート

- 1) 上腕内側を撮影し(x25), ビデオプリンタで出力。
- 2) スキャナでコンピュータに取り込む。(100 dpi)
- 3) 取り込んだ画像を白黒に変換。
- 4) 画像にハイパスフィルターを適用する。
- 5) 階調を反転し, 平均化。
- 6) NIH Imageに取り込み, 二値化した部分を確認する。
- 7) 皮丘部がうまく選択される濃度で, 皮丘の数・面積の測定を行う。

3. 統計的処理

Mann-Whitney の U 検定を行った。

実験結果

油症患者 9 名、及び健常人 5 名の平均皮丘・皮野面積は各々 105 pixel, 145 pixel であり有意に油症患者群が低値を示した。(図) ($P < 0.05$)

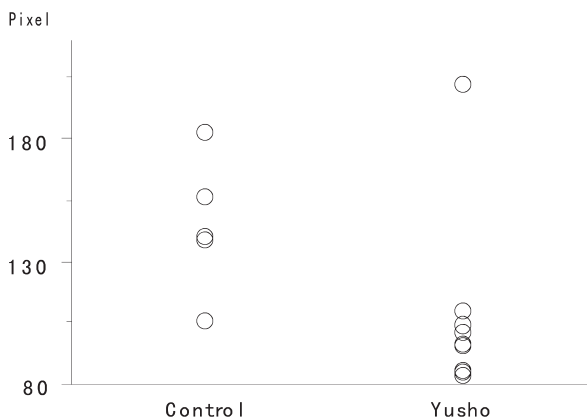


図 Areas cutanea were significantly small in Yusho patients as compared with controls.

考察

カネミ油症の原因の PCB はその代謝課程において superoxide (O_2^-) の産生に関与し、酸化ストレスを与えることが示唆されている¹⁾。今回の検討では皮膚の老化に対する酸化ストレスである PCB の影響を視覚的な面から検討を行ったが、皮膚の老化が喫煙により促進されている可能性が報告されていることより喫煙習慣のない女性を対象とした³⁾。皮膚における酸化ストレスの代表として紫外線曝露による皮膚老化が考えられる。その

ため紫外線の影響があまりなく写真撮影の比較的容易な上腕内側皮膚を検討に用いた。

当初油症患者は皮膚老化が促進されている可能性が考えられた。しかし、予想に反してカネミ油症患者群の皮丘面積は対照群と比較して著しく低く標準誤差の少ない事がわかった。即ち油症患者 9 人の女性においてはばらつきのないそろった小さな皮丘面積よりなる皮膚の性状を示している事が判明した。この結果は 20 才代の若い女性のデータに近く (data not shown) 油症患者女性においては皮膚の若さが保たれている結果となった²⁾。PCB は酸化ストレスとは考えられるが、皮膚への影響は少なく他の何らかの別のメカニズムにより今回の結果が得られた可能性が考えられる。まだまだ症例数も少ないため今後検討数を増やし皮丘・皮野面積と血中 PCB, PCQ をはじめ他の parameter との相関についても検討していく必要があると思われる。

文献

- 1) Oakley G, Devanaboyina U, Robertson L and Gupta R: Oxidative DNA Damage Induced by Activation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Implications for PCB-Induced Oxidative Stress in Breast Cancer. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 1285-1292, 1996.
- 2) 林照次, 荒瀬誠治: 皮膚表面形態の変化とそのメカニズム *西日皮膚* 63 (2): 103-111, 2001.
- 3) Yin L, Morita A and Tsuji T: Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17 (4): 178-183, 2001.

(受付 2003-3-24)

A Longitudinal Analysis on the Association of Serum Lipids and Lipoproteins Concentrations with Blood Polychlorinated Biphenyls Level in Chronic “Yusho” Patients

Shoji TOKUNAGA

*Department of Preventive Medicine, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan*

Kyoichiro KATAOKA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaizano,
Dazaifu-shi, Fukuoka, 818-0135, Japan*

Abstract We examined the association between blood PCB level and the serum concentrations of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides. The data was retrieved from the dataset of the nationwide health examination for Yusho patients. We longitudinally analyze the laboratory data of the officially identified Yusho patients who underwent the health examination in Fukuoka and Nagasaki prefectures five times or more during the years from 1986 to 2000. For the longitudinal analysis, the generalized estimating equation model was used adjusting for the age as of 1986, the year of taking the health examination, smoking and drinking habits, body mass index and the site of the examination (Fukuoka or Nagasaki). Ten-fold increase in blood PCB level was associated with the elevation in serum concentration of total cholesterol by 18.4 mg/dL (95% CI, 7.8 to 29.0, $P < 0.001$) in men and 19.7 mg/dL (95% CI, 8.3 to 31.2, $P < 0.001$) in women, and the elevation of serum concentration of triglycerides by 43.4% (95% CI, 17.5 to 74.9, $P < 0.001$) in men and 42.8% (95% CI, 25.7 to 62.1, $P < 0.001$) in women. Association of blood PCB level with serum concentration of high-density lipoprotein cholesterol was not statistically significant in both men and women. Hypercholesterolemia is a well known risk factor of coronary heart disease. It might be suggested that the high blood PCB level in Yusho patients has some possible health effects on the incidence of coronary heart disease.

Introduction

“Yusho” is a poisoning caused by the ingestions of rice bran oil contaminated by polychlorinated biphenyls (PCB) and its related compounds, such as polychlorinated dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated quarterphenyls (PCQ)¹³. The Yusho outbreak occurred in Western Japan in 1968¹⁰. Even 20 years after the outbreak, the average total PCB concentration in Yusho patients' blood were 4.9 times higher than that of the controls sampled from the gen-

eral population¹⁴. For more than 20 years after the outbreak, there have been reports indicating the abnormality in the clinical data on the concentrations of triglycerides, thyroid stimulating hormone and immunoglobulins among Yusho patients⁶⁾¹⁹⁾²⁰. Several cross-sectional studies showed statistically significant associations between blood PCB level and serum concentrations of triglycerides, total cholesterol and blood pressure¹⁾⁶⁾¹⁸. These observed associations were based on the data taken by one-year basis, although the Yusho health examina-

tion has been conducted annually from 1986. In this study, we longitudinally analyze the data taken for 15 years. This is the first longitudinal analysis on the association of serum lipids and lipoproteins with blood PCB level.

Subjects and Methods

The data analyzed in the current study was retrieved from the database provided by the data-processing system of the nationwide health examination for Yusho patients established by Kataoka et al. (1989)⁸⁾. The nationwide health examination for Yusho has been conducted annually from 1986 to promote the health of the patients and determine the health status of the chronic Yusho patients⁷⁾. The examination is open not only to officially identified Yusho patients, but also to those who regard themselves as potential victims. The participation to the examination is voluntary. The examination is comprehensive and the dataset includes demographic and laboratory data and the data on the manifestations of symptoms⁷⁾. The examination was conducted at each prefecture. Serum concentrations of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides of the residents in Fukuoka and Nagasaki prefectures were measured at the same laboratory. Blood polychlorinated biphenyls (PCB) level was analyzed at each prefecture where the health examination was conducted.

The data from 1986 to 2000 was available for the current analysis. Eligible observations for the analysis were 1) those of officially identified Yusho patients, 2) those without missing values in any of blood PCB level, serum concentrations of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides, smoking and drinking habits, height and weight, 3) those of the

patients who underwent the health examination at Fukuoka or Nagasaki prefecture where the Yusho outbreaks were most prominent, and 4) those of the patients with the number of observations satisfying the conditions of 1) through 3) was five or more.

Mean and standard deviation were calculated to show the summary statistics except for blood PCB level and serum concentration of triglycerides. Geometric mean and 90% central range were calculated as their summary statistics, because their distributions were highly skewed to the right. For the longitudinal data analysis, the generalized estimating equation (GEE) model was applied. The observations for a particular individual in the database were not independent; therefore, a within-patient correlation structure was specified. The linear regression model was created with an equal within-patient correlations structure, i.e., the correlations between each year within the same patient were assumed to be equal. In addition, we implemented the Huber/White/Sandwich estimator of variance that yields valid standard error estimation even if the within-patient correlations are not as hypothesized¹⁶⁾. By the GEE model, the association of the serum concentrations of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and \log_{10} (triglycerides) with \log_{10} (blood PCB level) was analyzed adjusting for the age as of 1986, the year of taking the health examination, smoking habit (current smoker or not), drinking habit (current drinker or not), body mass index (body weight divided by height²) and the site of the examination (Fukuoka or Nagasaki). Statistical analyses were performed with the statistical package Stata ver. 7.0¹⁶⁾. All the statistical tests were two-sided and the significance level was set to 0.05.

Table 1 The demographic data of the subjects.

	Site of health examination		
	Fukuoka	Nagasaki	Total
Number of subjects	117	107	224
Sex (% men)	46.2	37.4	42.0
Mean age as of 1986 (SD)	56.3 (9.95)	54.0 (12.72)	55.2 (11.39)
Mean number of observations per subject (SD)	9.3 (3.15)	9.4 (3.03)	9.3 (3.08)

Results

The demographic data was shown in Table 1. Fifty two percent of the subjects underwent the health examination at Fukuoka. The numbers of eligible male and female subjects were 54 and 63, respectively, in Fukuoka and 40 and 67, respectively, in Nagasaki. The difference in sex ratio between the sites of examination was not statistically significant. Mean age of the eligible subjects was 55 at the first year of

the study period. Mean number of examinations that the subjects had undergone during the study period was 9.3.

The summary statistics of the blood polychlorinated biphenyls (PCB) level and serum concentrations of serum lipids and lipoproteins were shown in Table 2a and 2b. Number of eligible observations in a year ranged from 43 to 67 in men and from 66 to 98 in women. In total, number of observations eligible for the analysis was 844 in men and 1240 in women. Blood PCB level

Table 2a Summary statistics of blood PCB level and serum concentrations of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides by the year of health examination in men.

Year	Number of observations	Blood PCB level (ppb)	Serum concentration (mg/dL)		
			Total cholesterol	High-density lipoprotein cholesterol	Triglycerides
1986	43	5.83 (2.6 to 14.0)*	191 (28.5)†	49 (10.1) †	111 (49 to 323)*
1987	51	4.49 (2.0 to 15.0)	198 (34.7)	48 (10.5)	109 (57 to 276)
1988	55	4.85 (1.4 to 13.0)	204 (41.4)	47 (9.6)	118 (58 to 363)
1989	52	4.34 (1.2 to 10.0)	198 (41.2)	46 (9.5)	108 (51 to 371)
1990	65	4.07 (1.1 to 10.8)	195 (36.6)	50 (11.0)	102 (51 to 251)
1991	54	4.45 (1.3 to 11.0)	192 (26.4)	50 (10.3)	90 (52 to 373)
1992	56	3.48 (1.0 to 9.4)	201 (26.7)	51 (13.8)	100 (46 to 301)
1993	65	4.88 (1.9 to 11.0)	196 (33.5)	53 (14.2)	96 (48 to 222)
1994	67	3.87 (1.0 to 9.0)	186 (33.3)	50 (13.8)	101 (47 to 220)
1995	56	3.39 (0.9 to 7.0)	197 (34.1)	49 (15.3)	97 (49 to 311)
1996	58	3.28 (1.0 to 10.0)	194 (33.3)	50 (12.8)	101 (51 to 276)
1997	58	2.99 (1.1 to 8.0)	207 (32.2)	54 (13.3)	102 (42 to 297)
1998	61	2.90 (0.8 to 8.0)	202 (32.9)	53 (11.3)	107 (47 to 251)
1999	53	3.01 (1.0 to 8.0)	204 (35.7)	53 (10.0)	98 (44 to 278)
2000	50	2.86 (1.0 to 8.0)	199 (35.8)	51 (10.2)	103 (48 to 259)
Total	844	3.80 (1.0 to 10.0)	198 (34.2)	50 (12.1)	102 (49 to 276)

* : Geometric mean (90% central range).

† : Mean (SD).

Table 2b Summary statistics of blood PCB level and serum concentrations of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides by the year of health examination in women.

Year	Number of observations	Blood PCB level (ppb)	Serum concentration (mg/dL)		
			Total cholesterol	High-density lipoprotein cholesterol	Triglycerides
1986	78	4.12 (1.0 to 12.0)*	209 (47.1)†	54 (11.6) †	98 (38 to 269)*
1987	66	4.31 (1.5 to 11.0)	216 (42.5)	49 (10.1)	106 (48 to 241)
1988	77	4.07 (1.5 to 8.0)	216 (41.8)	52 (12.3)	101 (52 to 243)
1989	85	3.86 (1.4 to 11.7)	213 (40.2)	51 (10.1)	110 (52 to 253)
1990	98	3.96 (1.2 to 11.3)	220 (42.4)	52 (10.3)	93 (48 to 200)
1991	79	3.92 (1.5 to 13.0)	212 (34.2)	55 (12.2)	93 (44 to 207)
1992	86	3.66 (1.5 to 10.1)	214 (36.0)	55 (12.0)	95 (44 to 211)
1993	96	4.03 (1.7 to 10.7)	211 (32.4)	55 (11.8)	92 (45 to 205)
1994	92	3.69 (1.6 to 9.0)	207 (35.0)	54 (13.4)	94 (44 to 200)
1995	88	3.21 (1.3 to 8.6)	211 (32.2)	54 (13.0)	92 (44 to 170)
1996	83	3.13 (1.1 to 8.2)	212 (39.2)	56 (12.8)	97 (51 to 187)
1997	80	2.71 (1.0 to 6.2)	221 (38.4)	60 (15.8)	97 (47 to 220)
1998	80	2.85 (1.0 to 12.6)	211 (34.0)	59 (13.4)	96 (46 to 200)
1999	73	3.06 (1.0 to 7.1)	224 (38.4)	63 (14.0)	96 (45 to 257)
2000	79	2.96 (1.0 to 8.0)	209 (35.1)	60 (16.0)	92 (42 to 222)
Total	1240	3.54 (1.1 to 9.2)	214 (38.1)	55 (13.1)	97 (46 to 216)

* : Geometric mean (90% central range).

† : Mean (SD).

showed large variation. The difference between 5 percentile and 95 percentile of the PCB level in each year was more than five-fold and reached to twelve-fold. During the study period, geometric mean of blood PCB level (ppb) gradually decreased from 5.83 to 2.86 in men and from 4.12 to 2.96 in women. Mean serum concentrations of lipids and lipoproteins in men and women,

however, changed little and showed no particular time trend.

The results of the longitudinal analysis on the associations between blood PCB level and serum concentrations of lipids and lipoproteins were shown in Table 3. Ten-fold rise in blood PCB level was associated with the elevation in serum concentration of total cholesterol by 18.4 (95% confidence

Table 3 The association of blood PCB level with serum concentrations of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides.

Response variable (unit)	Men		Women	
	β^* (95% confidence interval)	P	β^* (95% confidence interval)	P
Total cholesterol (mg/dL)	18.4 (7.8 to 29.0)†	<0.001	19.7 (8.3 to 31.2)†	<0.001
High-density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	0.6 (-4.2 to 5.5)†	0.79	-2.9 (-6.1 to 0.4)†	0.09
Triglycerides (%)	43.4 (17.5 to 74.9)‡	<0.001	42.8 (25.7 to 62.1)‡	<0.001

* Regression coefficient for \log_{10} -transformed blood PCB level.

† Estimated increase of the response variable with 10-fold increase in blood PCB level.

‡ Estimated increase of the response variable expressed in percent with 10-fold increase in blood PCB level.

interval, 7.8 to 29.0) mg/dL in men and 19.7 (95% confidence interval, 8.3 to 31.2) mg/dL in women. The association was statistically significant with the significance level of less than 0.001 for both sexes. Ten-fold rise in blood PCB level was associated with the elevation of serum concentration of triglycerides by 43.4 (95% confidence interval, 17.5 to 74.9) % in men and 42.8 (95% confidence interval, 25.7 to 62.1) % in women. The observed elevation was statistically significant ($P < 0.001$) both in men and women. Association of blood PCB level with serum concentration of high-density lipoprotein cholesterol was not statistically significant in both men and women.

Discussion

The present study analyzed the longitudinal data consisting of 2084 observations of 224 Yusho patients who have undergone annual health examination during the years from 1986 to 2000. From the dataset, we observed positive and statistically significant associations of blood PCB level with serum concentrations of total cholesterol and triglycerides in men and women. Ten-fold increase in blood PCB level was associated with the elevation of serum concentration of total cholesterol by about 19 mg/dL, and the elevation of serum concentration of triglycerides by 43 %. For high-density lipoprotein cholesterol, we could not observe the statistically significant association with blood PCB level.

The results of the present study support the findings from the former studies on the association of blood polychlorinated biphenyls (PCB) level and the serum concentrations of triglycerides⁵⁾⁶⁾¹⁵⁾¹⁸⁾²¹⁾ and total cholesterol¹⁸⁾ observed by cross-sectional analyses on the one-year based data of Yusho patients. The present study was

different from the former studies in that the data spanning at least five up to fifteen years were analyzed longitudinally. The longitudinal study design is supposed to be superior to the one-year based cross-sectional study design, which can be more prone to be affected by a sampling bias of the subjects and the measurement error of the clinical data. Therefore, it is suggested that the current study presents more reliable evidence on the associations between blood PCB level and the serum concentrations of triglycerides and total cholesterol.

The current study has limitations common to most other observational studies in that the observed association does not always mean the causal relationship. Thus, the interpretation of the results should be careful. In the current study, the observations from the subjects who had taken the Yusho health examination 5 times or more were analyzed. The small number of subjects who were eligible for the study might cause selection bias of the subjects. To examine this possibility, we changed the criterion on the times of health examinations taken by a patient from 4 to 7, and the results of the analyses were compared. Under the different criteria for the selection of the subjects, the statistical significance of the association was held and the estimated relationship was stable. Therefore, it is difficult to explain the observed associations by selection bias only. Another limitation of the current analysis is that the data of possible confounding factors such as dietary habits and the use of antilipidemic agents were not available for the analysis. In spite of the above limitations, the observed associations of serum concentrations of triglycerides and total cholesterol with blood PCB level paralleled with the results of other studies on non-Yusho patients⁹⁾¹⁷⁾.

Hence, the observed association in Yusho patients might hold in the general population exposed to high level of PCB. Further analyses are needed to establish the association of the blood PCB level with the serum lipids and lipoproteins concentrations, in particular, the serum concentration of total cholesterol.

Hypercholesterolemia is a well known risk factor of the incidence of coronary heart disease³⁾⁴⁾¹²⁾. Cohort study estimate shows that the increase in serum cholesterol concentration by 10% was associated with an increase in incidence of ischaemic heart disease of 27% in Western countries¹¹⁾. A 4% difference in usual cholesterol concentration was associated with a 21% difference in mortality from coronary heart disease in a Chinese population⁴⁾. High levels of serum triglycerides when accompanied by low high-density lipoprotein cholesterol are shown to represent increased risk of coronary heart disease²⁾. The observed association of hypercholesterolemia and elevated triglycerides concentration with blood PCB level may suggest the higher risk of coronary heart disease of Yusho patients, particularly those with very high PCB level. Each year, the ratio of 95 percentile to 5 percentile of blood PCB level was about 10 (Table 2a and 2b), and ten-fold increase in blood PCB level was associated with the elevation of serum total cholesterol concentration by 9% of the mean concentration. Therefore, the results of the present study can be translated that the ten-fold difference observed in the blood PCB level of Yusho patients is estimated to the difference in the incidence or mortality of coronary heart disease by 24 to 47%. It might be suggested that the high blood PCB level in Yusho patients has some possible health effects on the incidence of coronary heart

disease.

References

- 1) Akagi K and Okumura M : Association of blood pressure and PCB level in yusho patients. *Environ Health Perspect.* 59 : 37- 39, 1985.
- 2) Assmann G, Betteridge DJ, Gotto AM, Jr and Steiner G : Management of hypertriglyceridemic patients. A. Treatment classifications and goals. *Am J Cardiol.* 68 : 30A-34A, 1991.
- 3) Castelli WP : Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med.* 76 : 4-12, 1984.
- 4) Chen Z, Peto R, Collins R, MacMahon S, Lu J and Li W : Serum cholesterol concentration and coronary heart disease in population with low cholesterol concentrations. *BMJ.* 303 : 276-282, 1991.
- 5) Hirota Y, Hirohata T, Kataoka K, Shinohara S and Tokiwa H : Laboratory findings in the medical examination of chronic "Yusho" (PCB poisoning) patients: with special reference to blood PCB and serum triglyceride. *Fukuoka Acta Med.* 84 : 287-293, 1993. (in Japanese)
- 6) 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.
- 7) Hirota Y, Kataoka K and Hirohata T : Annual health examination of Yusho patients. In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M, Masuda Y, (eds) : YUSHO - A human disaster caused by PCBs and related compounds. pp. 249-266, Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.
- 8) Kataoka K, Okubo A and Shinohara S : Introduction of the information processing system of medical examinations of Yusho patients and some results obtained by the survey. *Fukuoka Acta Med.* 80 : 331-341 1989. (in Japanese)
- 9) Kreiss K, Zack MM, Kimbrough RD, Needham LL, Smrek AL and Jones BT : Association of blood pressure and polych-

- lorinated biphenyl levels. *JAMA*. 245 : 2505-2509, 1981.
- 10) Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M and Masuda Y : YUSHO - A human disaster caused by PCBs and related compounds. Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.
 - 11) Law MR, Wald NJ and Thompson SG : By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ*. 308 : 367-372, 1994.
 - 12) Manolio TA, Pearson TA, Wenger NK, Barrett-Connor E, Payne GH and Harlan WR : Cholesterol and heart disease in older persons and women. Review of an NHLBI workshop. *Ann Epidemiol*. 2 : 161-176, 1992.
 - 13) Masuda Y : Causal agents of Yusho. In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M, Masuda Y, (eds) : YUSHO - A human disaster caused by PCBs and related compounds. pp. 49-80, Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.
 - 14) Masuda Y, Kuroki H, Haraguchi K, Schecter A and Papke O : The condition of PCBs and PCDFs in the blood of Yusho patients 20 years after the onset. *Fukuoka Acta Med*. 88 : 149-156, 1997. (in Japanese)
 - 15) Okumura M, Masuda Y and Nakamuta S : Correlation between blood PCB and serum triglyceride levels in patients with PCB poisoning. *Fukuoka Acta Med*. 65 : 84-87, 1974. (in Japanese)
 - 16) StataCorp. *Stata Statistical Software : Release 7.0*. Stata Press, College Station, Texas, 2001.
 - 17) Stehr-Green PA, Welty E, Steele G and Steinberg K : Evaluation of potential health effects associated with serum polychlorinated biphenyl levels. *Environ Health Perspect*. 70 : 255-259, 1986.
 - 18) Tokunaga S, Hirota Y and Kataoka K : Association between the results of blood test and blood PCB level of chronic Yusho patients twenty five years after the outbreak. *Fukuoka Acta Med*. 90 : 157-161, 1999. (in Japanese)
 - 19) Tsuji H, Sato K, Shimono J, Azuma K, Hashiguchi M and Fujishima M : Thyroid function in patients with Yusho : 28 year follow-up study. *Fukuoka Acta Med*. 88 : 231-235, 1997. (in Japanese)
 - 20) Tsuji H, Hirahashi T, Ogata H and Fujishima M : Serum immunoglobulin concentrations and autoantibodies in patients with Yusho. *Fukuoka Acta Med*. 90 : 147-149, 1999. (in Japanese)
 - 21) Uzawa H, Ito Y, Notomi A and Katsuki S : Hyperglyceridemia resulting from intake of rice oil contaminated with chlorinated biphenyls. *Fukuoka Acta Med*. 60 : 449-454, 1969. (in Japanese)

(Received for publication March 24, 2003)

(和文抄録)

油症患者の経時的繰り返し測定データの統計学的解析による 血清脂質及びリポタンパクと血中 PCB 濃度の関連

九州大学大学院医学研究院予防医学分野

徳 永 章 二

福岡県保健環境研究所

片 岡 恭一郎

1986年から2000年までの15年間の全国油症患者追跡検診結果をもとに、福岡県と長崎県で観察期間中5回以上受診した認定患者について、経時的に繰り返し測定された血中PCB濃度と総コレステロール、HDL-コレステロール、及び、中性脂肪の血清濃度との関連を統計学的に吟味した。解析には一般化推定方程式 (Generalized Estimating Equation) モデルを用い、1986年現在の年齢、受診年度、飲酒・喫煙習慣、BMI (体重/身長²)、受診地で統計学的に調整した。その結果、血中PCB濃度が10倍になると血清総コレステロール濃度が男性で18.4 mg/dL (95%信頼区間, 7.8-29.0, $P < 0.001$)、女性で19.7 mg/dL

(95%信頼区間, 8.3 - 31.2, $P < 0.001$) 上昇し、血清中性脂肪濃度が男性で43.4% (95%信頼区間, 17.5 - 74.9, $P < 0.001$)、女性で42.8% (95%信頼区間, 25.7-62.1, $P < 0.001$) 上昇すると推定された。血清HDL-コレステロール濃度と血中PCB濃度との間には統計学的に有意な関連は見いだされなかった。血清総コレステロール濃度の上昇が冠動脈疾患のリスク要因であることは良く知られている。油症患者に見られる高い血中PCB濃度を考慮すると、少なくとも一部の油症患者の冠動脈疾患罹患に対して影響が及ぼされている可能性が示唆された。

Active Elimination of Causative PCDFs/DDs Congeners of Yusho by One Year Intake of FBRA in Japanese People

Junya NAGAYAMA

*Laboratory of Environmental Molecular Epidemiology, School of Health Sciences,
Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812-8582*

Takumi TAKASUGA

Shimadzu Techno-Research Inc., Kyoto 604-8436

Hiroshi TSUJI

*Department of Medicine and Clinical Science, Graduate School of
Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582*

Motomi UMEHARA, Takehiko SADA and Teruaki IWASAKI

Genmaikouso Corp., Sapporo 001-0012

Abstract Thirty-five years have been passing since the outbreak of Kanemi rice oil poisoning, namely, Yusho in the western Japan. However, even now the patients with Yusho have been still suffering from several objective and subjective symptoms. In order to improve or, if possible, to cure the such symptoms, the most important therapeutic treatment is considered to actively excrete the most toxic causative PCDFs/DDs congeners, that is, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) and 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD) from the bodies of the patients and to reduce their body burdens.

In rats, dietary fiber and chlorophyll have been shown to promote the fecal excretion of dioxins and to reduce their levels in rat liver. In this study, we examined whether such kinds of effect were also observed by FBRA, which was the health food and relatively rich with dietary fiber and chlorophyll in nine married Japanese couples.

As a result, concentrations of PenCDF and HxCDD on the lipid weight basis in the blood of the FBRA-intake group in which they took 7.0 to 10.5g of FBRA after each meal and three times a day for one year were more lowered than those in the blood of the non-intake group; Blood levels of PenCDF and HxCDD in the FBRA-intake group were decreased by 30.5 and 33.9%, respectively, and those decreases were 22.0 and 24.5% in the non-intake group.

Their total body burdens just before and one year after the study were calculated on the assumptions that the body fat was also contaminated with these congeners at their blood levels on the lipid weight basis and the content of body fat was 20% of the body weight. Then, we computed the average amounts in excretion of PenCDF and HxCDD from the body in both the FBRA-intake and non-intake groups. Consequently, the amounts of excretion of PenCDF and HxCDD in the FBRA-intake group were 2.1 and 1.9 times, respectively, greater than those in the non-intake group. Therefore, FBRA seemed to promote the fecal excretion of PenCDF and HxCDD, the main causative PCDFs/DDs congeners of Yusho, from the human body.

We also expect FBRA to reduce their body burdens of patients with Yusho and to improve some objective and subjective symptoms of Yusho patients.

Introduction

Our environments including foods have been polluted with extremely toxic dioxin

congeners such as 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) and 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD) not only in Japan²⁰⁾²²⁾ but also other countries¹⁾²⁾⁷⁾⁸⁾²³⁾. Consequently, human beings also have already been contaminated with these two congeners³⁾⁴⁾²¹⁾. According to results of the several studies described above, PenCDF and HxCDD have been the most or quite prominent congeners in the contamination levels in environments and also in humans. We already have investigated the effects of this kind of compounds on the foetus and sucklings which are considered the most sensitive stages of human beings as well as animals, and observed their unfavorable effects on thyroid hormone and immune response systems in Japanese infants perinatally and lactationally exposed to them¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾. Their adverse effects on developmental condition have been also found in 10-month-old breast-fed Japanese infants¹³⁾¹⁴⁾.

These two congeners have been the most important etiological agents of Yusho¹⁷⁾, a mass food poisoning that occurred in western Japan in 1968 and even now⁵⁾. At present, namely, more than 30 years after the outbreak, many patients with Yusho are still suffering from several objective and subjective symptoms.

In order to prevent or avoid their adverse health consequences on fetuses and sucklings, active reduction of their contamination levels in mother's body seems quite important. And also, in order to improve or to cure various symptoms of patients with Yusho, their active excretion from the body of Yusho patients is considered very useful. In rats, dietary fiber and chlorophyll have been shown to promote the fecal excretion of dioxins, probably due to the restriction or some inhibition of their

absorption and re-absorption in the digestive tract and therefore to reduce their levels in rat liver¹⁰⁾¹¹⁾. In this study, we examined whether such kinds of effect were observed by FBRA, which was the brown rice fermented with *Aspergillus-oryze* and rich with dietary fiber, or not in Japanese adults.

Materials and Methods

FBRA has been manufactured for over 30 years with Genmaikouso Corp., Sapporo, Japan, and taken by more than 100,000 people as one of the health foods. Ingredients of FBRA are shown in Table 1.

Nine married couples of 37 to 48 years old were voluntarily participated in this study, and divided into two groups which were tried to match for sex and age, namely, FBRA-intake and non-intake groups. FBRA-intake group consisted of 5 males and 4 females with the mean age of 44.3 years old and non-intake group 4 males and 5 females with that of 43.8 years old. In FBRA-intake group, they took 7.0 to 10.5g of FBRA after each meal and three times a day for one year and in non-intake group they didn't.

Before starting this study, 60 to 80 ml of the peripheral blood was individually taken by venipuncture in both the FBRA-intake and non-intake groups twice at one week intervals. These blood samples were analyzed for PenCDF and HxCDD by HRGC-HRMS technique using a Finnigan MAT-95 mass spectrometer (Germany) directly interfaced with Varian Model 3400 gas chromatograph⁶⁾⁹⁾¹²⁾. The average of PenCDF or HxCDD in the two blood samples of the same person was expressed as the individual original level in both groups. In order to evaluate the effect of FBRA on their excretion from the human body, their

Table 1 Ingredients of FBRA (100 g) *

Ingredient	Amount	
Energy	370	kcal
Moisture	3.1	g
Protein	25.6	〃
Fat	19.6	〃
Carbohydrate	22.9	〃
Dietary Fiber	19.7	〃
Ash	9.1	〃
Calcium	367	mg
Phosphorus	1930	〃
Iron	11.1	〃
Sodium	91.8	〃
Potassium	2080	〃
Magnesium	802	〃
Manganese	18.1	〃
Zinc	5.42	〃
Copper	0.813	〃
Selenium	12	μg
Total Carotene	6.82	mg
Vitamin A (effect)	3790	IU
Vitamin B ₁	1.86	mg
Vitamin B ₂	0.86	〃
Vitamin B ₆	2.34	〃
Niacin	48.3	〃
Pantothenic Acid	7.84	〃
Folic Acid	0.20	〃
Vitamin B ₁₂	5.9	μg
Biotin	44.8	〃
Vitamin E	14.3	mg
Vitamin K	127	μg
SOD Activity	71,000	Unit
Phytin Acid	3720	mg
Yeast	9.2 × 10 ⁵	
Lactic Acid Bacteria	8.0 × 10 ⁷	
Nucleic Acid	0.24	g

* : Analysis was conducted and certified by Japan Food Analysis Center Foundation in October, 1997

blood concentrations were determined again exactly with the same manner one year later in both the FBRA-intake and non-intake groups. Then, their mean levels were individually compared each other.

Results

Respective initial levels of PenCDF (mean ± S.D.) in the blood were 14.3 ± 7.4

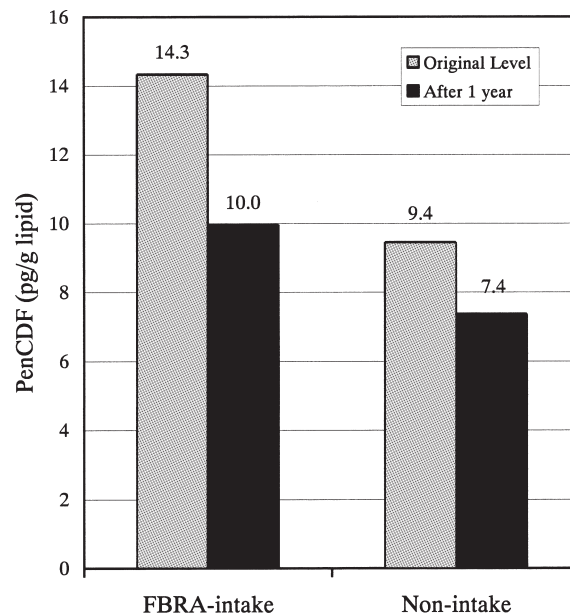


Fig. 1 Changes in average concentrations of PenCDF in the blood of FBRA-intake (left) and non-intake (right) groups for one year
FBRA-intake Group; -30.5%,
Non-intake Group; -22.0%

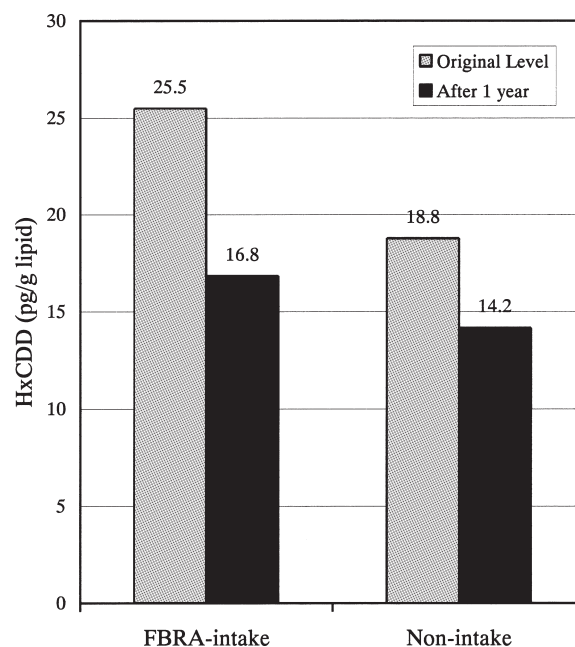


Fig. 2 Changes in average concentrations of HxCDD in the blood of FBRA-intake (left) and non-intake (right) groups for one year
FBRA-intake Group; -33.9%,
Non-intake Group; -24.5%

and 9.4 ± 3.9 pg/g lipid in FBRA-intake and non-intake groups. In the same manner, those of HxCDD were 25.5 ± 13.4 and 18.8 ± 9.4 pg/g lipid. Accordingly, the average initial concentrations of PenCDF and HxCDD in the FBRA-intake group were somewhat higher than those in the non-intake group. One year later, blood levels of PenCDF and HxCDD showed a decreasing tendency in both FBRA-intake and non-intake groups. In order to see the changes in their blood levels more clearly, their relative concentrations were computed based upon their respective initial ones as the standard (1.0). In case of PenCDF, relative blood levels in the FBRA-intake group decreased in eight of nine subjects with the average relative level of 0.73 and two people were less than 0.5. Meanwhile, in non-intake group seven of nine subjects showed less than 1.0 in relative blood levels with the average of 0.78 and no person was less than 0.5. In case of HxCDD, the relative blood levels in the FBRA-intake group showed decreasing tendency in all the nine subjects with the average of 0.70. However, in

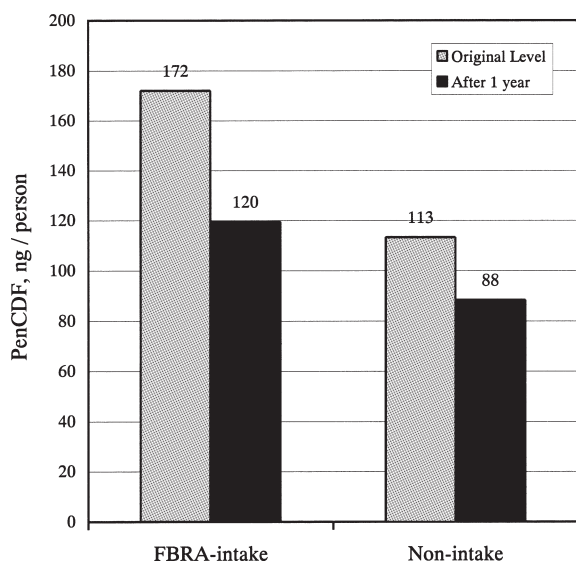


Fig. 3 Changes in mean total body burdens of PenCDF in the FBRA-intake (left) and non-intake (right) groups for one year

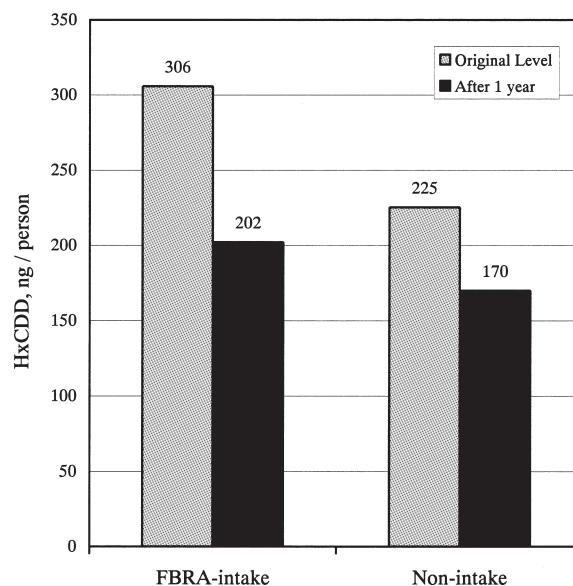


Fig. 4 Changes in mean total body burdens of HxCDD in the FBRA-intake (left) and non-intake (right) groups for one year

non-intake group seven of nine people were less than 1.0 with the average of 0.77.

Average concentrations of PenCDF and HxCDD in the blood of FBRA-intake and non-intake groups are indicated in Figs. 1 and 2, respectively. The concentrations (mean \pm S.D.) at one year after the FBRA intake were 10.0 ± 5.3 pg/g lipid in PenCDF and 16.8 ± 8.1 pg/g lipid in HxCDD. In non-intake group, respective those were 7.4 ± 3.4 and 14.2 ± 6.7 pg/g lipid. Therefore, blood levels of PenCDF and HxCDD in the FBRA-intake group were decreased by 30.5 and 33.9%, respectively. In the meantime, in the non-intake group respective those were -22.0 and -24.5% .

We calculated the total body burdens of PenCDF and HxCDD on the assumptions that body fat was also contaminated with these compounds at their blood levels on the lipid weight basis and the content of body fat was 20% of body weight and the results are shown in Figs. 3 and 4. Initial average total body burdens of PenCDF were 172 ng/

person in the FBRA-intake group and 113 ng/person in the non-intake group. Those of HxCDD were 306 and 225 ng/person, respectively. After one year, average total body burden of PenCDF were 120 ng/person and that of HxCDD 202 ng/person in the FBRA-intake group, and respective those of the non-intake group 88 and 170 ng/person. Accordingly, as indicated in Fig. 5, average amounts in excretion of PenCDF from the body for one year were 52 ng/person in the FBRA-intake group and 25 ng/person in the non-intake group. Respective those of HxCDD were 104 and 55 ng/person. Therefore, amounts of excretion of PenCDF and HxCDD in the FBRA-intake group were 2.1 and 1.9 times, respectively, larger than those in the non-intake group.

Discussion

In male rats, the fecal excretion of HxCDD was 2.1 times higher in the groups fed with the rice-bran and spinach fibers

than in the group fed with a non-fiber diet¹⁰. Therefore, rice-bran fiber seems to promote the excretion of HxCDD and also hopefully PenCDF from not only rats but also humans. As indicated in Table 1, 100g of FBRA contain about 20g of dietary fiber. If the subjects take 10g of FBRA after each meal and three times a day, they will have 2g of dietary fiber each time and 6g in a day. In addition to dietary fiber, FBRA contains chlorophyll, which also showed the promotional fecal excretion of HxCDD in male rats¹¹. Accordingly, we expected FBRA to promote the fecal excretion of PenCDF and HxCDD from the human body and decrease their blood levels. Actually, as shown in Figs. 1 and 2, one year intake of FBRA lowered their blood levels more in the FBRA-intake group than in the non-intake group. Consequently, total body burdens of PenCDF and HxCDD were also actively decreased more in the former group than in the latter and their elimination rates

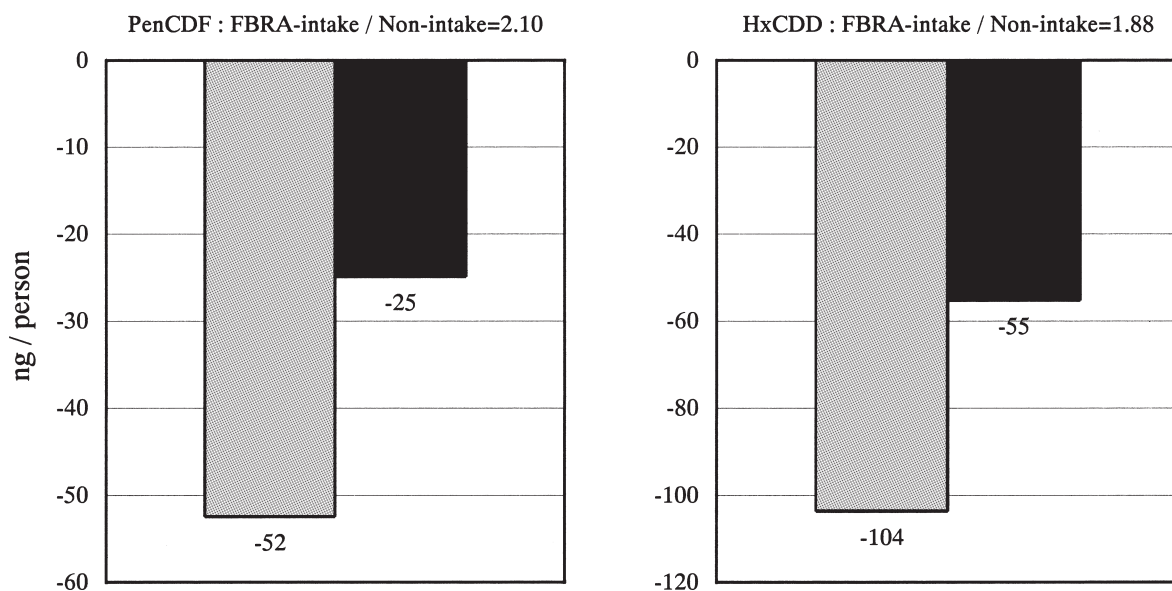


Fig. 5 Changes in average amounts of excretion of PenCDF (left) and HxCDD (right) from the human body in the FBRA-intake and non-intake groups for one year

▨ : FBRA-intake group
 ■ : Non-intake group

were about 2.1 and 1.9 times, respectively, higher in the FBRA-intake group than in the non-intake one, as indicated in Figs. 3 to 5. In conclusion, even though in such small scale clinical trial, FBRA seemed to promote the fecal excretion of PenCDF and HxCDD from the human body probably through the inhibition of their absorption and/or re-absorption in the digestive tract to some extent and to decrease their body burdens.

In addition to the active excretion of the causative chemicals of Yusho, namely, PenCDF and HxCDD, FBRA is a health food and good for health, as shown in Table 1, so it may also improve various objective and subjective symptoms of patients with Yusho. Hence, the clinical trial of FBRA for Yusho patients has been just started since this March.

References

- 1) Bocio A, Llobet JM, Domingo JL, Casas C, Teixido A and Muller L: Levels of PCDD/PCDFS in food samples from Catalonia, Spain. *Organohal. Comp.* 57: 105-108, 2002.
- 2) Coutinho M, Mata P, Borrego C and Boia C: Levels of PCDD/PCDF in agricultural materials in the region of Oporto, Portugal. *Organohal. Comp.* 57: 101-104, 2002.
- 3) Furst P and Papke O: PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in human milk and blood from Germany. *Organohal. Comp.* 55: 251-254, 2002.
- 4) 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. *Organohal. Comp.* 21: 419-412, 1994.
- 5) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Nakagawa R: Concentrations of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in blood of 83 patients with Yusho. *Fukuoka Acta Med.* 88: 169-176, 1997. (in Japanese)
- 6) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Takenaka S and Nagayama J: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds in breast milk of Japanese primiparas and multiparas. *Chemosphere* 38: 2461-2466, 1999.
- 7) Kim B-H, Jung J-S, Chang Y-S and Park Y-H: Congener specific distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in animal feed. *Organohal. Comp.* 57: 121-124, 2002.
- 8) Kiviranta H, Vartiainen T, Parmanne R, Hallikainen A, Ruokojarvi P and Koistinen J: PCDD/Fs in Baltic herring in the gulf of Finland during 1990's. *Organohal. Comp.* 57: 153-156, 2002.
- 9) 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.
- 10) Morita K, Matsueda T and Iida T: Effect of dietary fiber on fecal excretion of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in rat. *Jpn J. Toxicol. Environ. Health* 43: 35-41, 1997. (in Japanese)
- 11) Morita K, Matsueda T and Iida T: Effect of chlorella, spirulina and chlorophyllin on fecal excretion of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in rat. *Jpn J. Toxicol. Environ. Health* 43: 42-47, 1997. (in Japanese)
- 12) Nakagawa R, Hirakawa H, Iida T, Matsueda T and Nagayama J: Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins. *J. AOAC International* 82: 716-724, 1999.
- 13) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T and Watanabe T: Effects of exposure to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins through human milk on total development in 10-month-old Japanese infants. *Organohal. Comp.* 48: 240-243, 2000.
- 14) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T and Watanabe T: Developmental condition in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 48: 244-247,

- 2000.
- 15) Nagayama J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T: Condition of thyroid hormone system in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 48: 236-239, 2000.
 - 16) Nagayama J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T: Thyroid hormone status in Japanese infants lactationally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 53: 140-144, 2001.
 - 17) Nagayama J, Masuda Y and Kuratsune M: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with 'Yusho'. *Fd Cosmet. Toxicol.* 15: 195-198, 1977.
 - 18) Nagayama J, Tsuji H, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T: Condition of helper and suppressor T lymphocyte subpopulations in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 49: 87-90, 2000.
 - 19) Nagayama J, Tsuji H, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T: Status of helper and suppressor T lymphocyte subpopulations in Japanese infants lactationally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 53: 121-125, 2001.
 - 20) Ohta S, Nakano T, Nishimura H, Okumura T, Aozosa O and Miyata H: Contamination levels of PBDEs, TBBPA, PCDDs/DFs, PBDDs/DFs and PXDDs/DFs in the environment of Japan. *Organohal. Comp.* 57: 57-60, 2002.
 - 21) Todaka T, Hirakawa H, Takeneka S, Tobiishi K, Nakagawa R and Iida T: New protocol for dioxins analysis of human blood. *Organohal. Comp.* 55: 155-158, 2002.
 - 22) Uegaki R, Kurokawa S and Yoshimura Y: The fate of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar PCBs in silage corn. *Organohal. Comp.* 51: 302-305, 2001.
 - 23) Wu Y, Li J, Zhao Y, Chen Z, Li W and Chen J: Dietary intake of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in populations from China. *Organohal. Comp.* 57: 221-224, 2002.

(Received for publication April 1, 2003)

(和文抄録)

1 年間の FBRA 摂取による油症原因 ダイオキシン類同族体の体外排泄促進

九州大学医学部保健学科環境分子疫学研究室

長 山 淳 哉

株式会社島津テクノロジー

高 菅 卓 三

九州大学大学院医学研究院病態機能内科学講座

辻 博

株式会社玄米酵素

梅原幹巳, 佐田健彦, 岩崎輝明

カネミ油症中毒事件が発生してから 35 年が経過しようとしているが、今でも油症患者は種々様々な自覚および他覚症状で苦しんでいる。このような症状を改善し治療するには、その主要な原因物質である 2,3,4,7,8-五塩化ダイベンゾフラン (PenCDF) と 1,2,3,6,7,8-六塩化ダイオキシン (HxCDD) を積極的に体外へ排泄し、汚染レベルを低下させることが第一である。この研究では動物実験によりダイオキシン類の体外排泄促進作用の認められている食物繊維と葉緑素を比較的多量に含む栄養補助食品 FBRA によるカネミ油症原因物質の体外排泄促進を 9 組の夫婦の協力により調べた。

その結果、毎食後 7~10.5 g の FBRA を 1 日 3 回 1 年間摂取することにより、血液脂質重量当りの PenCDF と HxCDD の濃度が非摂取群よりもそれぞれ 8.5% と 9.4% 低下した。この血液脂質濃度で体脂肪も汚染されており、体脂肪率を体重の 20% と仮定し、1 人当り 1 年間の体外排泄量を両化学物質について計算した。そうすると、FBRA を摂取することにより PenCDF と HxCDD の排泄量がそれぞれ 2.1 倍と 1.9 倍高まることが示された。以上のような結果より、FBRA は油症原因物質の PenCDF と HxCDD の体外への排泄を促進するので、油症患者の治療にも有効と考えられた。

油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (2001年)

福岡県保健環境研究所 *社団法人 日本食品衛生協会
 飯田隆雄, 戸高 尊*, 平川博仙, 飛石和夫
 松枝隆彦, 堀 就英, 中川礼子
 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野
 古江増隆

Follow-up Survey of Dioxins in the Blood of Yusho Patients (in 2001)

Takao IIDA, Takashi TODAKA*, Hironori HIRAKAWA, Kazuhiro TOBIISHI
 Takahiko MATSUEDA, Tsuguhide HORI and Reiko NAKAGAWA
*Fukuoka Institute of Health & Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu,
 Fukuoka 818-0135*
 *Japan Food Hygiene Association, 2-6-1 Jingumae, Shibuya-Ku, Tokyo 150-0001
 Masutaka FURUE
*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences,
 Kyushu University, Fukuoka 812-8582*

Abstract Follow-up survey of the blood concentration of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDDs), polychlorinated dibenzofuran (PCDFs), Non-*ortho*-coplaner PCBs (Non-Co-PCB), and Mono-*ortho*-coplaner PCBs (Mo-Co-PCB) in Yusho patients is very important for their health control. We determined the blood concentration of these dioxin-like isomers in 78 blood samples collected in 2001 using by a high-resolution gas chromatograph/high-resolution mass spectrometer (HRGC/HRMS) equipped with a solvent-cut large volume injection system (SCLV). The accelerated solvent extraction (ASE) method was employed for the treatment of blood samples. The method employed here can allow a reduced amount of blood collecting from Yusho patients compared with the conventional method. In typical Yusho patients (Group A of PCB pattern), the mean TEQ concentrations of PCDDs, PCDFs, Non-Co-PCBs, and Mono-Co-PCBs in blood collected in 2001 were 36, 260, 9.3, and 64 pg-TEQ/g lipid, respectively. As well, the toxic contribution of PCDDs, PCDFs, Non-Co-PCBs, and Mono-Co-PCBs in typical Yusho patients (Group A of PCB pattern) were 10, 70, 3, and 17% of the total TEQ value, respectively. The toxic contribution rate of PCDFs TEQ was still at high levels in relation to total TEQ in typical Yusho patients as mention above. The Yusho patients showing B pattern also had the same A pattern contribution rate. In the patients of group C, however, the mean blood levels of dioxin TEQ in 2001 was two times those of the normal controls determined in 2000 in Fukuoka prefecture. As well, the contribution rates were similar to those of normal subjects, although some patients in this group showed a high toxic contribution rate of PCDFs TEQ in relation to total TEQ. Thirty-three years had passed since the Yusho accident, and the total blood concentrations of PCDFs in the blood of Yusho patients were still higher than those of normal subjects. Among the different groups of PCB patterns, the concentration of 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF and 1,2,3,6,7,8-HxCDF showed significant differences. These findings indicate that these isomers are not metabolized in the human body since traces of them continued to be detected in these patients since they had been contaminated by the rice oil in the original incident.

はじめに

1968年に西日本一帯で発生したカネミ油症事件は、発生後35年を経過した。現在までの研究¹²⁾

により油症の主たる原因物質はダイオキシン類の中でPCDFであることが明らかにされてきた。PCDFを含む、いわゆるダイオキシン類は近年、外因性内分泌攪乱化学物質⁷⁾としても注目されて

おり、1990年代半ばよりダイオキシン類による環境汚染と食物連鎖による人体汚染が大きな社会問題となった。このダイオキシン類に高濃度に曝露された事例では、台湾の Yu-Cheng 患者で免疫低下、成長抑制等⁸⁾が、セブソの事件では内分泌系への影響等¹⁸⁾が報告されている。油症患者においても発症当初は重症例の患者に種々の異常¹⁰⁾が観察されている。油症患者の体内には油症原因物質が依然として健常者と比較して10~100倍残留していることが報告されている⁴⁾⁵⁾¹⁹⁾。従って、蓄積物質の体内残留濃度およびその推移を把握することは、ヒトへの健康影響を評価する上で重要である。

本研究では、著者らが現在までに報告した母乳、血液、糞便、皮脂等で測定した PCDDs, PCDFs, Non-ortho-Co-PCBs に加えて Mono-ortho-Co-PCBs の分析も行った。一方、対照群として一般健常者については増田ら¹³⁾の報告値を用い、世界保健機関 (WHO) が1998年に設定した2,3,7,8-TCDD に対する毒性当価係数 (TEF)²¹⁾を用いて、2,3,7,8-TCDD 毒性当量 (TEQ) を求め毒性評価を行った。

実験方法

1. 分析試料

2001年度福岡県油症一斉検診を受診した、78名からインフォームド・コンセントを得て提供を受けた患者血液を対象とした。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 mLを採取し、分析するまで4°C以下で保存した。

2. 試薬

n-ノナンは関東化学(株)製の試薬特級を、その他の溶媒はすべてダイオキシン分析用(関東化学(株))を用いた。無水硫酸ナトリウムはPCB分析用(関東化学(株))を用いた。GC/MSのキャリブレーションスタンダードはWellington Lab.社製のCS3-C/CP81を使用した。クリーンアップスパイクとして¹³Cでラベルした7種のPCDDs, 10種のPCDFs, 4種のNon-ortho-coplanar-PCBs (Non-ortho-Co-PCBs) および12種のMono-ortho-coplanar-PCBs (Mono-ortho-Co-PCBs)を使用した。シリンジスパイクとして¹³Cでラベルした1,2,3,4-TCDD および¹³Cでラベルした

PCBを使用した。硝酸銀/シリカゲルは和光純薬工業(株)製を使用した。活性炭はナカライテスク社製をトルエンで還流精製し、無水硫酸ナトリウムに分散させ用いた(1:1000 w/w)。硝酸銀/シリカゲル、活性炭および無水硫酸ナトリウムは高速溶媒抽出装置を用いてヘキサン又はトルエン溶媒で脂質抽出時と同条件下で洗浄したものをを用いた。その他の試薬は市販の試薬特級を用いた。

3. 装置

高速溶媒抽出装置はダイオネクス社製ASE-200を使用した。

高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置 (HRGC/HRMS) はGC部, Agilent社HP-6890型, MS部, MicroMass社AutoSpec-Ultimaを使用した。

大量試料導入装置 (SCLV) はSGE社製を使用した。

4. 分析方法

4.1 脂質の抽出

血液からの脂質の抽出は高速溶媒抽出装置を用いた。血液試料5 gに対し、Isolute (珪藻土) 4 gの混合比で混ぜ合わせた後、抽出セルに充填した。クリーンアップスパイクを添加後、抽出セルを装置本体に装着し、温度150°C, 圧力2000 psiの条件下で10分間、アセトン/ヘキサン(1:4, v/v)で2回抽出した。得られたアセトン/ヘキサン抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下濃縮し、脂質含量を重量法で測定した。

4.2 カラムクリーンアップ

抽出した脂質を少量のn-ヘキサンに溶解し、硫酸処理した後、10%(w/w)硝酸銀/シリカゲル0.5 gを乾式充填したカラムに負荷し、n-ヘキサン15 mLで溶出した。溶出液を40°C以下で減圧濃縮し、約2 mLとした。これを、0.1%(w/w)活性炭/無水硫酸ナトリウム0.5 gを乾式充填したカラムに負荷し、10%(v/v)ジクロロメタン/n-ヘキサン10 mLでMono-ortho-Co-PCBs (PCB等)を、次いでトルエン25 mLでダイオキシン類(PCDDs, PCDFs および Non-ortho-Co-PCBs)を溶出させ、0.5 mL以下に減圧濃縮し、シリンジスパイク10 pgとともにバイアルビンに移し、室温で溶媒を留去した。GC/MS分析時には10 μL

のn-ノナンを加えて、5 μ Lを大量試料導入法(SCLV)によりGC/MSに注入した。なお、今回、迅速化とブランクの低減化のため前処理操作の方法は従来、著者らが使用してきた方法⁴⁾の1/4スケールでカラムクリーンアップ操作を実施した。

4.3 GC/MS分析条件およびデータ処理

血液中のPCDDs, PCDFs, およびNon-ortho-Co-PCBsはHRGC/HRMSとSCLVを組み合わせた方法により, Mono-ortho-Co-PCBsは, スプリットレス試料導入-HRGC/HRMSにより分析した。使用した機器および測定条件はTable 1およびTable 2に示す。

その他, MSのモニターイオン, データ処理方法については既報¹⁹⁾のとおりである。TEQの計算はWHO (1998)が策定したTEF²¹⁾を用いた。

結果および考察

血液中のダイオキシン類濃度は極めて低濃度であるため, 従来50~100 ml程度の血液を採取する必要があり被験者の負担および測定分析上の煩雑さ等種々の問題があった⁹⁾。本研究では, 著者ら²⁰⁾が開発した僅か5 mlの血液でダイオキシン類の各同族体を正確に測定可能な方法を採用した。この方法によって測定したSCLV注入-HRGC/HRMSのクロマトグラムをFig.1に示す。この図のように, 人体中に残留するダイオキシン類をすべて検出できた。

2001年度の油症患者血液中のPCDDs, PCDFs, Non-ortho-Co-PCBsおよびMono-ortho-Co-PCBs濃度を血中PCBのガスクロマトグラムパターン別にTable 3に示す。PCBガスクロマトグラムパターンは2001年度福岡県油症一斉検診結果のデータを使用した。なお, 今回の

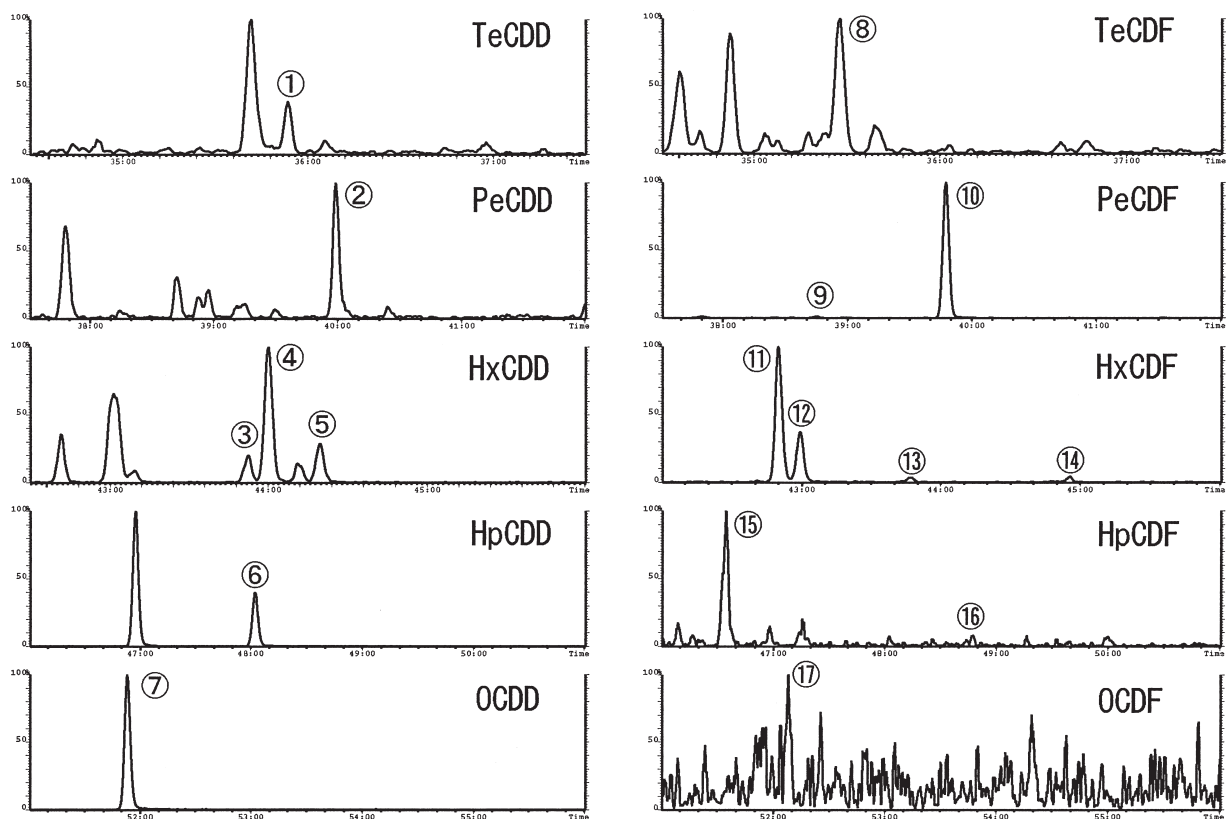


Fig. 1 HRGC/HRMS SIM chromatogram of PCDDs and PCDFs in blood of Yusho patient

- ① 2,3,7,8-TeCDD ② 1,2,3,7,8-PeCDD ③ 1,2,3,4,7,8-HxCDD ④ 1,2,3,6,7,8-HxCDD
 ⑤ 1,2,3,7,8,9-HxCDD ⑥ 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD ⑦ 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD
 ⑧ 2,3,7,8-TeCDF ⑨ 1,2,3,7,8-PeCDF ⑩ 2,3,4,7,8-PeCDF ⑪ 1,2,3,4,7,8-HxCDF
 ⑫ 1,2,3,6,7,8-HxCDF ⑬ 2,3,4,6,7,8-HxCDF ⑭ 1,2,3,7,8,9-HxCDF
 ⑮ 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF ⑯ 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF ⑰ 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF

Table 1 Conditions of SCLV injection system and HRGC/HRMS for PCDDs, PCDFs and Non-*ortho* coplanar PCBs

GC	SCLV injection system (SGE, Australia) HP-6890 (Agilent Technology, USA)
MS	AutoSpec-Ultima (Micromass, UK)
Pre-column	BPX-5 : 5m×0.25mm×0.25 μ m (SGE, Australia)
Analytical column	BPX-5 : 30m×0.15mm×0.25 μ m (SGE, Australia)
Injector temperature	300°C
Oven temperature	80°C→20°C/min→320°C (5 min)→70°C/min→ 180°C (1 min)→5°C/min→320°C (2 min)
Interface temperature	280°C
Source type	EI
Source temperature	270°C
Electron energy	40 eV
Accelerating voltage	8 kV
Resolution	10000 (10% valley)

調査では BC パターンの患者が 2 例と少なかったため解析から除外した。濃度はすべて抽出した脂質重量当たりの値で示した。

総 TEQ 平均濃度は A, B, C パターンおよび健常者対照群の順にそれぞれ 370, 237, 66 および 29 pg-TEQ/g lipids であった。なお、対照群のデータとして 1999 年度に福岡県で調査された健常者の濃度レベル¹³⁾を用いた。A, B, C の順に平均濃度の顕著な減少が認められた。一方、C パターンの濃度レベルは平均値と比較した場合、健常者の約 2 倍であった。A パターンで最高濃度を示す油症患者は健常者のそれと比較して 12 倍、B パターンの場合は 7.6 倍高濃度であった。

同族体毎にみると PCB パターンが A の典型的な患者群では、PCDDs が 36 pg-TEQ/g lipid,

PCDFs が 260 pg-TEQ/g lipid, Non-*ortho*-Co-PCBs が 9.3 pg-TEQ/g lipid および Mono-*ortho*-Co-PCBs が 64 pg-TEQ/g lipid であった。PCB パターンが B の患者群では、PCDDs が 27 pg-TEQ/g lipid, PCDFs が 169 pg-TEQ/g lipid, Non-*ortho*-Co-PCBs が 8.9 pg-TEQ/g lipid および Mono-*ortho*-Co-PCBs が 32 pg-TEQ/g lipid であった。PCB パターンが C の患者群では、PCDDs が 26 pg-TEQ/g lipid, PCDFs が 16 pg-TEQ/g lipid, Non-*ortho*-Co-PCBs が 13 pg-TEQ/g lipid および Mono-*ortho*-Co-PCBs が 11 pg-TEQ/g lipid であった。C パターンの患者群はいずれの同族体の健常者群の約 2 倍程度であった。このように、油症患者血中の総 TEQ 濃度は PCB パターンが C の患者を除き、依

Table 2 Conditions of HRGC/HRMS for Mono-*ortho* coplanar PCBs

GC	HP-6890 (Agilent Technology, USA)
MS	AutoSpec-Ultima (Micromass, UK)
Analytical column	HT-8 : 50m×0.22mm×0.25 μ m (SGE, Australia)
Injector temperature	280°C
Oven temperature	130°C (1 min)→20°C/min→220°C→3°C/min→ 280°C→20°C/min→320°C (2.5 min)
Carrier gas	Constant flow 1.3 mL/min (He)
Interface temperature	280°C
Source type	EI
Source temperature	280°C
Electron energy	35 eV
Accelerating voltage	8 kV
Resolution	10000 (10% valley)

Table 3 Concentration of PCDDs, PCDFs, Non-*ortho*-Co-PCBs and Mono-*ortho*-Co-PCBs in blood of Yusho patients and normal subjects (pg/g lipid)

Congeners	Pattem A (N=20)				Pattem B (N=31)				Pattem C (N=25)				Normal subject (N=152)*			
	Mean	Min.	Max.	SD	Mean	Min.	Max.	SD	Mean	Min.	Max.	SD	Mean	Min.	Max.	SD
2,3,7,8-TCDD	1.4	0.5	3.6	0.9	1.5	0.5	3.6	0.9	2.4	0.5	4.1	1.1	1.9	1.0	5.0	0.8
1,2,3,7,8-PeCDD	25	5.5	53	14	18	4.9	47	11	19	3.3	32	8.1	5.7	1.7	15	2.3
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.4	1.0	4.0	0.9	1.9	1.0	6.2	1.5	3.5	1.0	6.6	1.8	3.4	1.0	9.3	1.7
1,2,3,6,7,8-HxCDD	93	19	230	56	57	11	141	34	28	4.4	46	11	20	4.4	45	9.6
1,2,3,7,8,9-HxCDD	4.0	1.0	6.9	1.5	4.5	1.0	11	2.6	5.2	1.0	11	2.5	3.7	1.0	10	1.9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	19	5.4	35	7.1	22	5.6	52	13	39	6.5	144	30	20	5.1	96	15
OCDD	419	175	744	168	484	137	1231	284	1109	252	6226	1176	371	49	4200	529
2,3,7,8-TCDF	2.7	0.5	14.4	3.2	1.3	0.5	6.2	1.3	1.7	0.5	13.8	2.9	2	1.0	5.7	1.2
1,2,3,7,8-PeCDF	1.1	0.5	2.8	0.8	0.8	0.5	2.1	0.5	1.4	0.5	4.2	1.1	2	1.0	8.8	1.7
2,3,4,7,8-PeCDF	476	29	1771	404	312	10	1139	263	27	6.7	118	22	8.3	2.2	26	4.4
1,2,3,4,7,8-HxCDF	159	6.1	632	148	98	2.9	536	111	8.4	2.0	43	7.9	5.1	1.3	29	3.0
1,2,3,6,7,8-HxCDF	56	5.5	176	44	32	1.0	143	30	7.1	2.4	18	3.0	4.4	1.9	18	2.0
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.4	1.0	2.6	0.7	1.6	1.0	4.8	1.0	2.1	1.0	6.3	1.5	ND	ND	ND	-
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.1	1.0	2.3	0.3	1.1	1.0	2.1	0.2	1.1	1.0	2.3	0.3	2.6	1.0	14	1.5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	4.4	1.0	10.8	2.6	3.9	1.0	10.5	2.5	3.5	1.0	8.2	1.8	5	1.4	39	5.0
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	2	1.0	3.5	0.7
OCDF	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	NA	NA	NA	-
344'5'-TeCB(#81)	ND	-	-	-	ND	-	-	-	5.5	5.0	18	2.7	58	1.5	22	4.4
33'44'-TeCB(#77)	8.6	5.0	26	5.5	7.4	5.0	16	3.3	7.0	5.0	17	3.5	NA	NA	NA	-
33'44'5'-PeCB(#126)	56	31	136	28	69	24	211	35	120	18	320	71	82	10.0	430	79
33'44'55'-HxCB(#169)	371	147	964	215	204	48	428	97	83	31	175	38	45	9.8	160	30
2'344'5'-PeCB(#123)	160	77	328	69	245	104	778	134	552	87	1506	341	431	1.0	2600	433
23'44'5'-PeCB(#118)	10860	5082	25626	5595	16418	5598	49691	9899	28066	5547	67046	14348	10766	1400	60000	9576
2344'5'-PeCB(#114)	4034	688	13765	3264	3289	537	8731	2086	2005	524	3897	981	803	93	3800	658
233'44'-PeCB(#105)	2036	1062	4538	986	3237	893	9292	1940	5404	1214	17245	3322	2706	320	18000	2673
23'44'55'-HxCB(#167)	3498	1198	10192	2145	3680	1224	10548	2133	4082	1028	8736	1828	1771	260	7800	1390
233'44'5'-HxCB(#156)	93807	33115	278961	68790	42495	5514	107683	24890	10857	3882	22355	4999	4452	690	16000	3112
233'44'5'-HxCB(#157)	26280	9145	76339	19152	12552	1886	34957	7887	2906	1070	6421	1321	1141	170	5300	833
233'44'55'-HpCB(#189)	9879	3768	26812	6210	5189	665	12141	2898	1180	356	2889	661	543	83	2100	388
Total PCDDs-TEQ	36	8.2	70	18	27	9.9	56	13	26	5.7	42	9.7	11	4.0	26	4.2
Total PCDFs-TEQ	260	16	967	219	169	6.0	639	145	16	4.1	65	12	5.8	2.0	21	2.8
Total PCDDs/PCDFs-TEQ	296	24	1037	231	196	21	686	153	42	12	96	18	16	6.4	41	6.8
Total Non- <i>ortho</i> -coplanar PCBs-TEQ	9.3	4.8	19	3.7	8.9	2.9	25	4.0	13	2.2	33	7.3	8.0	0.3	44	7.9
Total Mono- <i>ortho</i> -coplanar PCBs-TEQ	64	23	186	46	32	5	74	17	11	3.7	21	4.5	4.6	1	19	3.5
Total Co-PCBs-TEQ	74	27	202	48	41	8	84	19	24	6.7	50	11	13	2.4	63	11
Total TEQ(DD/DF/Mono & Non-Co-PCB)	370	57	1221	270	237	34	765	166	66	19	119	25	29	9.9	100	17
Total PCBs(ng/g lipid)	1220	454	3164	610	1097	192	4872	933	624	222	1063	233	-	-	-	-
lipid(%)	0.35	0.23	0.47	0.061	0.37	0.25	0.56	0.080	0.33	0.20	0.50	0.065	-	-	-	-

ND: Not detected NA: Not available

*: Cited from Masuda. Y. *et al.*: Organohalogen Compounds, 55, 2267,2002.

然高いレベルにあることがわかった。

Fig. 2 に各パターン別に総 TEQ 濃度の分布をヒストグラムで示した。A パターンでは、最低 57, 最高 1221 pg-TEQ/g lipids であり、340 から 640 pg-TEQ/g lipids に 80%, B パターンでは、最低 34, 最高 765 pg-TEQ/g lipids で、180 から 326 pg-TEQ/g lipids に 70% 分布していた。一方、C パターンでは最低 19, 最高 119 pg-TEQ/g lipids で、17 から 40 pg-TEQ/g lipids に 80% 分布しており、その分布は A, B パターンと比較してブロードであった。対照群の一般健常者は最低 9.9, 最高 100 pg-TEQ/g lipids で、17 から 32 pg-TEQ/g lipids に 80% 以上分布し、平均濃度も 1994 年の福岡における調査¹⁶⁾ と大差なかった。

従来、油症患者のダイオキシン類関連物質の分析では PCDDs, PCDFs, Non-*ortho*-Co-PCBs の分析は行われてきたが、Mono-*ortho*-Co-PCBs を含めて分析した例は少なく、今回、Mono-*ortho*-Co-PCBs を含めて毒性評価を行った。Fig. 3 に PCDDs, PCDFs, Non-*ortho*-Co-PCBs および Mono-*ortho*-Co-PCBs の総 TEQ 濃度に占める割合を示した。A および B パターンでは、PCDF が 70~72% を占め、ついで Mono-*ortho*-Co-PCBs が 13~17%, PCDDs が 10~11%, そして Non-*ortho*-Co-PCBs の割合は 3~4% とわずかであった。一方、C パターンでは PCDDs, PCDFs, Non-*ortho*-Co-PCBs および Mono-*ortho*-Co-PCBs の総 TEQ 濃度に占める割合は、

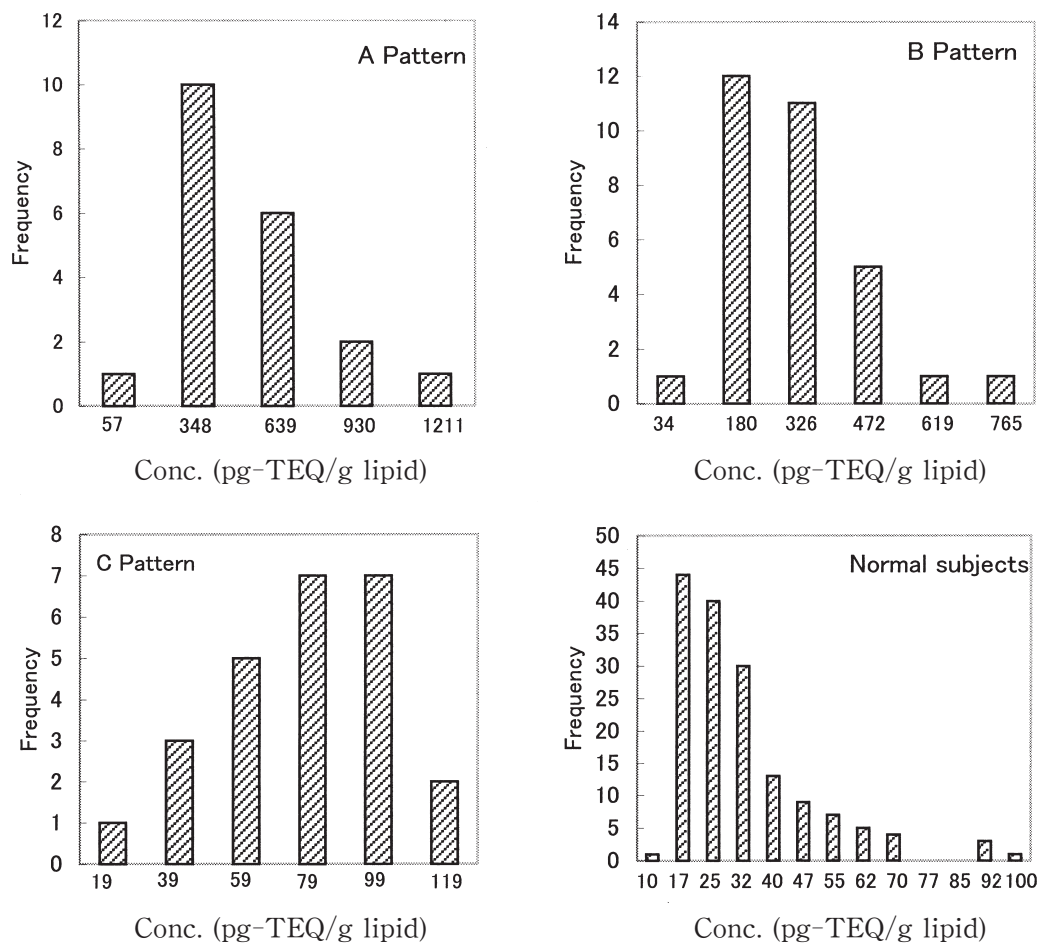


Fig. 2 Histogram of total TEQ in Yusho blood of each PCB pattern and normal subjects

それぞれ 40, 24, 19 および 17% であり, A および B パターンとは寄与率が大きく異なっていた. また, 対照とした健常者の各同族体の寄与率は C パターンと大差なかった. なお, Fürst ら¹⁾ はドイツの一般健常者で同様な分析を行っているが, その結果ではそれぞれ 29, 19, 19 および 33% であり, 福岡の健常者の組成比とはやや異なっていた.

すでに, 油症の主たる発症原因物質¹²⁾ は PeCDF, HxCDF 等であることが明らかにされているが, 油症患者に残留しているダイオキシン類と油症原因オイルの組成⁹⁾ を比較した. Fig. 4 に油症原因オイル, 油症患者および健常者の PCDDs および PeCDFs の濃度分布を示した. PCDDs については油症原因オイルのパターンと類似性がみられないが, PCDFs については, 油症原因オイル中に多量に含まれる 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,2,3,6,7,8-HxCDF が A および B パターンの患者群に顕著に残留して

いる様子が窺える.

同様に油症原因オイル中の Co-PCBs についても油症原因オイルと油症患者の残留パターンの比較を試みた. Fig. 5 に油症オイル, 油症患者および健常者の Non-ortho-Co-PCBs および Mono-ortho-Co-PCBs の濃度分布を示した. 油症原因オイル中の濃度分布と比較して, 高塩素 PCB (PCB # 156, PCB # 157, PCB # 189) は A, B, C の順に濃度の減少が認められた. 一方, PCB # 118 は逆に A, B, C の順に濃度の増加がみられた. PCB # 118 が油症原因オイル中に高濃度に存在するにもかかわらず患者の血液中濃度は低濃度であった. 増田ら¹⁴⁾¹⁵⁾ は油症および台湾油症患者の血液中原因物質濃度の経時変化を調べ, PCB # 118 の半減期は 1.6 年であり, PCB # 157 の 5 年と比較してかなり短く, PCB # 118 の代謝速度は速いことを報告している. 堀ら²⁾ は PCB と PCDF を同時投与したマウスの PCB 残留状況は

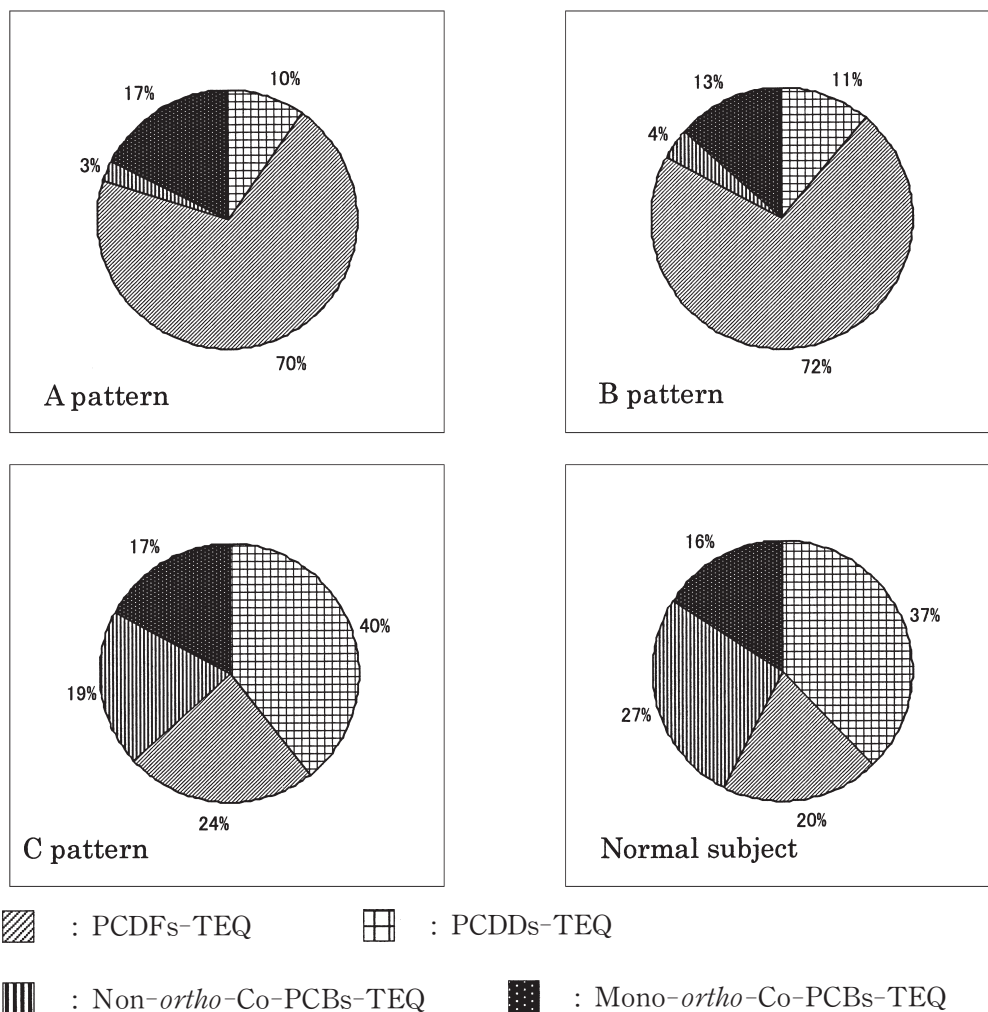


Fig. 3 Contribution of PDDs/DFs, Non *ortho* Co-PCBs and Mono-*ortho* Co-PCB to the total TEQ

油症患者に類似したパターンを示すことを明らかにした。すなわち、PCB # 118 に相当するピークの減少がみられ、その原因として PCDF 投与により PCB # 118 の代謝促進がおけると推察している。そのため、油症患者特有の PCB パターン¹¹⁾を示すものと考えられる。一方、健常者の場合、PCBs の摂取は食事由来が大部分を占め、特に我が国では魚介類を多食する傾向があるため PCB # 118 の摂取量も多いとの報告³⁾があり、その影響も一因と推察される。このようなことから、油症患者と一般健常者の間にこのような差違が観察されるものと推察される。また、PCB # 156, PCB # 157, PCB # 189 等の高塩素化体は、油症患者の母乳の調査でも健常者と比較して 5~7 倍高いことが報告¹⁷⁾されており、33 年経過した現在でも摂取した油症原因オイルの影響を受けていると推察された。

以上のように、発症後 33 年を経過した患者血中には毒性が高い 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,2,3,6,7,8-HxCDF 濃度は一般健常者と比較して依然として高いレベルにあり、今後ともこのフォローアップ調査を継続し、油症患者の健康管理に資するデータを集積していく必要がある。

総 括

1. 2001 年に採取された油症患者 (78 名) の血液について、ダイオキシン類 (PCDDs, PCDFs, Non-*ortho*-Co-PCBs および Mono-*ortho*-Co-PCBs) を測定し、残留している各異性体別の濃度および TEQ 濃度を調べた。この調査では、油症患者の負担を低減し測定効率を向上させるため、5 ml の血液によりダイオキシン類を超高感度分析法により各同族体を測定した。

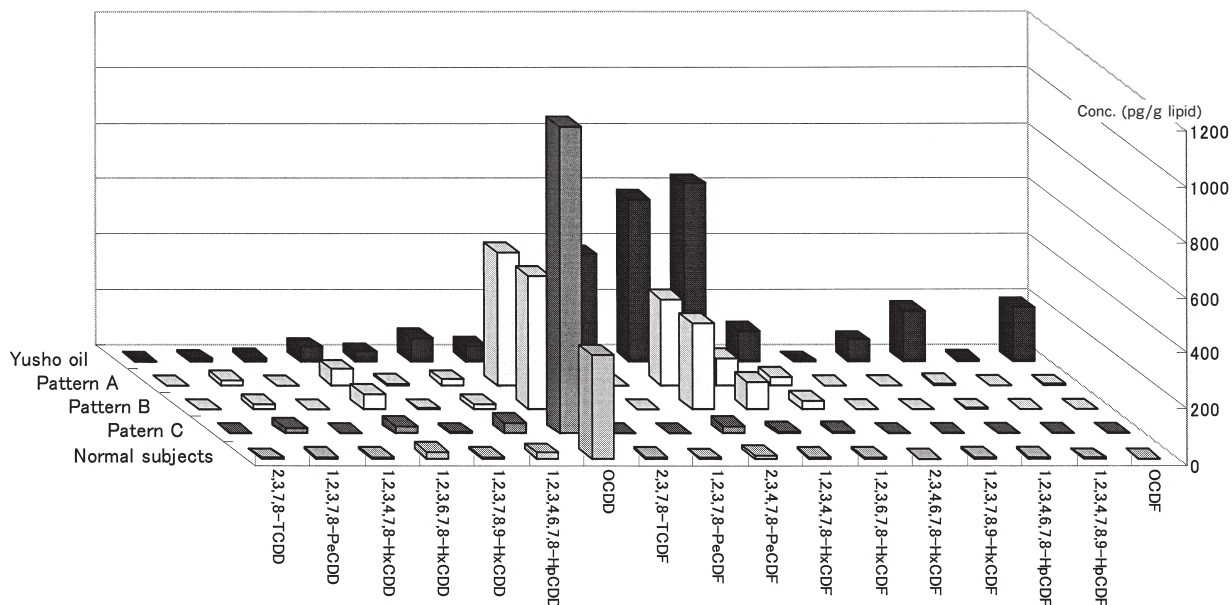


Fig. 4 Congener profile of PCDDs and PCDFs in blood of Yusho patient and Yusho oil (Units of concentration of Yusho oil : ng/g)

2. PCB のガスクロマトグラムパターンが A の典型的な患者群では、2001 年の平均総 TEQ 濃度は 370 pg-TEQ/g lipid であり、PCDDs が 36 pg-TEQ/g lipid, PCDFs が 260 pg-TEQ/g lipid, Non-ortho-Co-PCBs が 9.3 pg-TEQ/g lipid および Mono-ortho-Co-PCBs が 64 pg-TEQ/g lipid であった。PCB パターンが B の患者群では、平均総 TEQ 濃度は 237 pg-TEQ/g lipid, PCDDs が 27 pg-TEQ/g lipid, PCDFs が 169 pg-TEQ/g lipid, Non-ortho-Co-

PCBs が 8.9 pg-TEQ/g lipid および Mono-ortho-Co-PCBs が 32 pg-TEQ/g lipid であった。C の患者群では、平均総 TEQ 濃度は 66 pg-TEQ/g lipid であり、PCDDs が 26 pg-TEQ/g lipid, PCDFs が 16 pg-TEQ/g lipid, Non-ortho-Co-PCBs が 13 pg-TEQ/g lipid および Mono-ortho-Co-PCBs が 11 pg-TEQ/g lipid であった。このように、油症患者血中の総 TEQ 濃度は PCB パターンが C の患者を除き、依然高いレベルにあることがわかった。

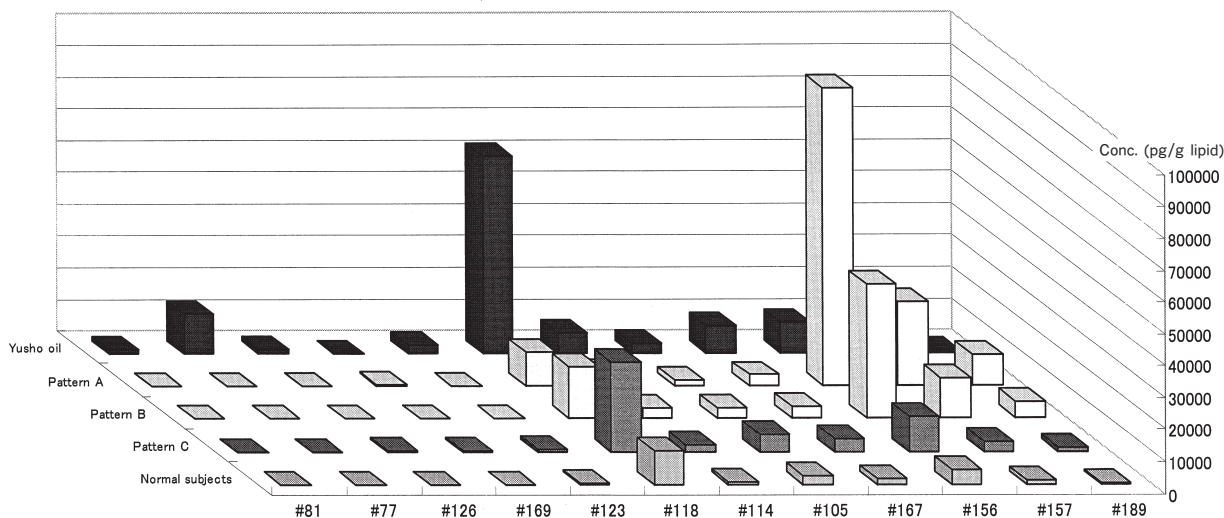


Fig. 5 Congener profile of PCBs in blood of Yusho patient and Yusho oil (Units of concentration of Yusho oil : ng/g)

3. 今回追加した Mono-*ortho*-Co-PCBs では, PCB # 156, PCB # 157, PCB # 189 等の高塩素化 PCB について A および B パターンの患者群で C および一般健常者と比較して顕著に高い濃度が観察された。

4. 総 TEQ に対する各同族体の毒性寄与率は A および B パターンの患者群では PCDF が 70%, Mono-*ortho*-Co-PCBs が 13~17%, PCDDs が 10%前後, そして Non-*ortho*-Co-PCBs の割合は 3~4%とわずかであった。一方, C パターンでは PCDDs, PCDFs, Non-*ortho*-Co-PCBs および Mono-*ortho*-Co-PCBs の総 TEQ 濃度に占める割合は, それぞれ 40, 24, 19 および 17%であり, A および B パターンとは寄与率が大きく異なっていた。

謝 辞

本研究は 2001 年度厚生科学研究費補助金 (生活安全研究事業) に負うものである。ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) Fürst P and Pöpke O: PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in human milk and blood from Germany. *Organohalogen Compounds* 55: 251-254, 2002.
- 2) 堀伸二郎, 宮田秀明, 前田浩一郎, 村上保行, 榎本隆: 油症における体内残留 PCB の質的究明. *食衛誌* 20: 166-172, 1979.
- 3) Hori T, Iida T, Matsueda T, Nakamura M, Hirakawa H, Kataoka K and Toyoda M: Investigation of dietary exposure to PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in Kyusyu district, Japan. *Organohalogen Compounds* 55: 95-98, 2002.
- 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) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Takenaka S, Yu M-L and Guo Y-LL: Recent trend of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and their related compounds in the blood and sebum of Yusho and Yu-Cheng patients. *Chemosphere* 38: 981-993, 1999.
- 6) 飯田隆雄: PCBs および PCDFs の対外排泄促進 油症研究-30 年の歩み- 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆 編 九州大学出版会 pp 272-297, 2000.
- 7) 環境省: 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について 環境ホルモン戦略計画 SPEED'98. 平成 12 年 11 月.
- 8) Kimbrough RD and Jensen AA: Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. 2nd ed. pp. 401-416, Elsevier Amsterdam, 1989.
- 9) 厚生省: 血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル 2000.
- 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. Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M. and Masuda Y (ed): YUSHO a human disaster caused by PCBs and related compounds. pp157-246, Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.
- 11) 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.
- 12) 増田義人: ライスオイル中の毒性化合物 油症研究-30 年の歩み- 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆 編 九州大学出版会 pp 47-74, 2000.
- 13) Masuda Y, Haraguchi K, Kono S, Tsuji H, and Pöpke O: Concentrations of dioxins and related compounds and their effects to biochemicals in Fukuoka residents: *Organohalogen Compounds* 55: 267-270 2002.
- 14) 増田義人, 原口浩一, 黒木広明, Ryan JJ: 油症患者における PCBs, PCDFs の 30 年間の変遷と症状. *福岡医誌* 92: 149-157, 2001.
- 15) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一, Schecter A, Pöpke O: 油症患者血液中 PCB, PCDF の 20 年経過後の状態. *福岡医誌* 88: 149-156, 1997.
- 16) 松枝隆彦, 平川博仙, 飯田隆雄, 長山淳哉: 血液中のダイオキシン類濃度 環境化学討論会, 講演要旨集 p 134-135, 1999.
- 17) 三村啓介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人: 油症患者母乳及び血液中の全 PCB 異性体の分析. *福岡医誌* 90: 202-209, 1999.
- 18) Sweeney MH and Mocarelli P: Human health effects after exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Food Additives & Contaminants* 17: 303-316, 2000.
- 19) 竹中重幸, 平川博仙, 中村又善, 中川礼子, 飯田隆雄, 戸高 尊: 油症患者血液中ダイオキシン類レベルの追跡調査(1998~1999 年). *福岡医誌* 92: 139-148, 2001.
- 20) Todaka T, Hirakawa H, Takenaka S, Tobii-

- shi K, Nakagawa R and Iida T: New protocol for dioxins analysis of human blood: *Organohalogen Compounds* 55: 155-158, 2002.
- 21) Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld ATC, Brunström B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen FXR, Liem AKD, Nott C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Wærn F and Zacharewski T: Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife *Environmental Health Perspect* 106: 775-792, 1998.

油症患者における PCB 異性体の 30 数年間にわたる特異な残留

第一薬科大学健康化学教室

増田 義人, 原口 浩一

九州大学大学院医学研究院予防医学分野

古野 純典

Peculiar Remaining of some PCB Congeners in the Patients with Yusho for more than 30 Years

Yoshito MASUDA and Koichi HARAGUCHI

*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences 22-1 Tamagawa-cho,
Minami-ku, Fukuoka 815-8511*

Suminori KONO

*Department of Preventive Medicine, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812-8582*

Abstract Concentrations of polychlorinated biphenyl (PCB) congeners, hexachlorobenzene (HCB) and dichloro dichlorophenyl ethylene (DDE) in the blood of Yusho patients (n = 28) were statistically compared with those in the blood of Fukuoka residents (n = 151).

The PCB concentrations in the blood of Yusho patients were higher than those of Fukuoka controls and concentration ratios of Yusho/Control were various depending on PCB congeners, being 1.6 on 2,3',4,4',5-pentaCB (# 118), 17.5 on 2,3,3',4,4',5-hexaCB (# 156) and 5.4 on total PCBs. Correlation coefficients between age and concentrations of 7 PCB congeners, HCB and DDE in the blood of Fukuoka residents were significantly positive each other (p < 0.001), while in Yusho patients, the correlation coefficients were positive but various depending on the congeners. However, correlation coefficient between PCB # 118 and PCB # 156 in the Yusho patients was remarkably low, indicating their peculiar accumulative properties in Yusho patients. The concentration of PCB # 118 had been markedly decreased after the ingestion of PCBs and would be metabolized to hydroxylated PCB, which might cause estrogen disturbance in the Yusho patients.

はじめに

1968年、福岡県および長崎県において、熱媒体として使用されていたカネクロール（ポリ塩化ビフェニル（PCB）の商品名）が混入されたライスオイルを摂取したために油症事件が起きた。4年ぐらゐ後に血液中のPCBが分析できるようになり、油症患者血液のPCBフラクションには比較的低濃度と比較的高濃度を示す二つのPCBピークがあり、それらがガスクロマトグラム上に特異なピークパターンを示すことが発見された¹⁾。そのPCBの高い濃度と特異なピークパターンは患者の症状と高い関連性があることが分かった⁴⁾ので、1972年、油症診断基準にも採用された³⁾。PCB

の特異なピークパターンとは、当時用いられていた充填カラムによるガスクロマトグラムで、DDE（農薬DDTの代謝物で人体に多く蓄積する）のピークの後、順次現われるPCBピークのうち1番目のピークが小さく、5番目のピークが比較的に高いことである。その後、進歩したキャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフによりPCBの分離がよくなり、1番目および5番目のピークの主なPCBはそれぞれ2,3',4,4',5-pentaCB (# 118) および2,3,3',4,4',5-hexaCB (# 156) であることが分かった。これらのPCB濃度のうち、人体に存在するPCBの主成分である2番目のピーク：2,2',4,4',5,5'-hexaCB (# 153) に対する濃度の比、すなわち、# 118/# 153が小さく、# 156/# 153

が大きい特異なピークパターンは油症患者の血液中に 20 年以上も維持されていた⁶⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。

1999 年、福岡市在住の一般市民 151 名から血液が供与された。それに含まれている PCB およびダイオキシン類を分析し、一般市民のそれらの汚染状態を明らかにした⁵⁾。一方、2000 年から 2002 年にかけて行われた油症一斉検診のときに採血された油症患者 28 名の血液の PCB を分析することができた。この油症患者と一般人の PCB 濃度およびパターンを比較検討し、油症患者における最近の PCB 残留状態が推測できたので報告する。

実験方法

1. 試料血液

平成 12~14 年に行われた福岡県油症一斉検診において採血され、PCB の分析のために第一薬科大学に提供されたものを使用した。いずれも油症認定患者であるが、このうち 2 又は 3 回測定された人は一番最近の平成 14 年のデータを用いた。その結果、全部で 28 名の血液 PCB データを使用することができた。

福岡市に在住で油症とは関係のない一般市民の男女および 20, 30, 40, 50 の各年代の人をそれぞれほぼ同数になるように無作為に選び、血液提供の同意があった人 151 名から医療施設において採血が行なわれ、血液の提供を受けた。血液はいずれも冷凍庫 (-20 °C) に分析されるまで保存した。

2. 溶媒および薬品

用いられた溶媒および薬品については、PCB 分析用のものを使用した。水は蒸留水を PCB 分析用 n-ヘキサンで 2 回洗浄したものを使用。PCB 分析用シリカゲル S-1 (和光純薬) は 450 °C で 24 時間加熱したものを使用し、カラムに充填して試料を入れる前に、そのカラムを n-ヘキサン 30 ml で洗浄した。PCB 分析用の無水硫酸ナトリウムも 450 °C で 24 時間加熱し、使用前に n-ヘキサンで洗浄したのち乾燥させた。各 PCB 異性体それぞれの標準品及び内標準物質として使用した¹³C 標識 PCB は Cambridge Isotope Laboratories, USA または Wellington Laboratories, Canada より購入した。

3. 油症患者血液の PCB 分析

血液約 3 g に内標準物質として 6 種の¹³C 標識 PCB、すなわち 3,3',4,4'-tetraCB (# 77), 2,2',4,5,5'-pentaCB (# 101), 2,3',4,4',5-pentaCB (# 118), 3,3',4,4',5-pentaCB (# 126), 2,2',4,4',5,5'-hexaCB (# 153), 2,3,3',4,4',5-hexaCB (# 156), の各 5 ng 及び 1 N-水酸化ナトリウム/エタノール 3 ml を加え、50 °C に 3 時間、時々攪拌しながら加温した。冷後、混合溶液は n-ヘキサン 5 ml で 2 回抽出し、n-ヘキサン抽出液は水 2 ml で洗浄した後、無水硫酸ナトリウム (450 °C で 24 時間加熱) 0.5 g を加え乾燥し、積層シリカゲルカラム (シリカゲル 0.1 g/硫酸ナトリウム 0.7 g/シリカゲル 1.0 g) につけ、n-ヘキサン 30 ml で溶出させた。n-ヘキサン溶出液はスナイダーカラムをつけて付けて 80 °C に加熱して約 5 ml まで濃縮し、スピッツ試験管 (10 ml) に移した。これをメタルブロックで 50 °C に加温し、必要により窒素気流を使いながら 0.1 ml まで濃縮した。これをガスクロマト用のバイアル (0.1 ml) に移し、回収率測定用の内標準物質として¹³C 標識 3,3',4,4',5,5'-hexaCB (# 169) 5 ng を加えよく混和し、室温で 20 μ l になるように濃縮した。その 5 μ l をガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) に注入した。島津 GC/MS (AOC-17, GC-17 A, QP-5000) にキャピラリーカラム (0.25 mm x 60 m DB-5 MS) を装着し、カラム温度は試料注入後、100 °C で 2 分間保ち、1 分間に 20 °C の昇温で 220 °C まで上昇させ、5 分間保ち、次いで、1 分間に 2 °C の昇温で 280 °C まで上昇させ、5 分間保って終わる。測定は 2 塩化から 7 塩化 PCB については分子イオン (M^+) および $[M+2]^+$ イオン又は 8 塩化から 10 塩化 PCB については $[M+2]^+$ および $[M+4]^+$ イオンでモニターして、¹³C 標識 PCB 内標準物質の $[M+2]^+$ イオンに対するピーク面積比を用いる内標準法で 24 種の PCB 異性体を定量分析した。ヘキサクロロベンゼン (HCB) および DDE についてもそれらの M^+ および $[M+2]^+$ イオンを用い PCB と同時に分析した。

4. 一般人血液の PCB 分析

血液約 10 g をアセトン/ヘキサン (2 : 1) で抽出し、抽出溶媒を濃縮して乾燥させ、脂質の重量を測る。脂質をヘキサン/ジクロロメタン (1 : 1)

溶解し、12種の¹³C-PCBの内標準物質、2,4,4'-triCB (#28), #77, #101, #118, #126, #153, #156, #169, 2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB (#180), 2,2',3,3',4,4',5,5'-octaCB (#194), 2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonaCB (#206), decaCB (#209)を加えて、Bio-Beads S-X3カラムのゲルろ過クロマトグラフにかけ、PCBフラクションを濃縮して高分離能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計 (HP 58901/ JEOL SX-102)で分析した。¹³C-PCBを用いた内標準法で48種のPCB異性体を定量分析した。HCBおよびDDEについてもPCBと同様に定量分析した。この方法では、アルカリを使っていないので、DDTがDDEに変化されず、両方とも定量分析される。ここではDDTとDDEを合計した濃度をDDE濃度として比較検討した。

5. 統計解析

統計解析にはビジュアル統計ソフト StatFlex (アーテック, 大阪) を使用した。検出限界以下で、定量分析できなかったPCB異性体の濃度には、その検出限度値の半分の値を用いて統計計算した。

結 果

油症患者28名および一般人151名の血液中の7種のPCB異性体、全PCB、HCB及びDDEの血液中濃度をTable 1に示す。油症患者については、PCBガスクロマトグラムが油症特有のAパターン16名および油症と一般人との中間のBパターン12名に分けて、それぞれの濃度を、一般人については、20から39歳までの95名および40から60歳までの56名に分けて、それぞれの濃度を記載した。また、油症患者の各成分の濃度の一般人血液 (n = 151) の各成分濃度に対する割合もTable 1に示した。全PCB濃度の平均値で比較すると、油症患者は一般人の5.4倍高い値であった。各PCB異性体について比較すると、PCB #118は油症患者において一般人の1.6倍であるのに対し、PCB #156は一般人の17.5倍であり、PCB異性体により油症患者への残留状態が大きく異なっていた。一般人の各PCB異性体、HCBおよびDDEの濃度は、年齢の高い人のほうが年齢の低い人よりも明らかに高い状態が観察された。油症患者のA、Bタイプおよび一般人における年齢と血液中PCB #118, PCB #153, PCB #156

Table 1 Concentrations (ppb in whole blood) of 7 PCB congeners, total PCBs, HCB and DDE in Yusho patients and Fukuoka Control and their ratio Yusho/Control of average concentrations

	Yusho A+B (n = 28)					Ratio Yusho/Cont	Yusho A (n = 16)					Ratio YushoA/Cont	Yusho B (n = 12)					Ratio YushoB/Cont
	Average	SD	Median	Min	Max		Average	SD	Median	Min	Max		Average	SD	Median	Min	Max	
Age	67.8	9.9	69.6	46.4	85.6	1.9	68.2	10.6	69.5	47.1	85.6	1.9	67.3	9.1	70.0	46.4	79.0	1.8
PCB #118	0.062	0.032	0.051	0.023	0.128	1.6	0.050	0.029	0.038	0.023	0.128	1.3	0.078	0.029	0.075	0.033	0.125	2.0
PCB #153	0.689	0.380	0.551	0.169	1.978	4.1	0.809	0.447	0.718	0.358	1.978	4.8	0.530	0.184	0.532	0.169	0.927	3.2
PCB #138	0.800	1.471	0.410	0.056	8.076	9.8	0.639	0.436	0.599	0.217	1.864	7.9	1.016	2.229	0.391	0.056	8.076	12.5
PCB #182	0.117	0.063	0.099	0.050	0.279	2.8	0.124	0.066	0.111	0.059	0.266	3.0	0.107	0.060	0.093	0.050	0.279	2.6
PCB #156	0.310	0.242	0.246	0.086	1.220	17.5	0.404	0.282	0.324	0.108	1.220	22.7	0.185	0.068	0.166	0.086	0.294	10.4
PCB #180	0.491	0.269	0.381	0.226	1.330	3.9	0.556	0.294	0.507	0.253	1.330	4.4	0.405	0.212	0.347	0.226	1.048	3.2
PCB #170	0.327	0.221	0.260	0.108	1.104	8.5	0.380	0.248	0.314	0.141	1.104	9.9	0.257	0.164	0.202	0.108	0.670	6.7
Total PCBs	4.117	3.340	2.927	1.372	17.538	5.4	4.215	2.445	4.066	1.662	10.897	5.6	3.986	4.381	2.708	1.372	17.538	5.3
HCB	0.107	0.050	0.095	0.061	0.309	2.4	0.095	0.031	0.089	0.061	0.157	2.1	0.124	0.066	0.112	0.062	0.309	2.7
DDE	2.914	1.725	2.609	0.176	6.967	3.9	3.088	1.824	2.598	1.036	6.967	4.1	2.682	1.632	2.609	0.176	6.121	3.6
	Control age 20-60 (n = 151)					Ratio	Control age 20-39 (n = 95)					Ratio	Control age 40-60 (n = 56)					Ratio
	Average	SD	Median	Min	Max		Average	SD	Median	Min	Max		Average	SD	Median	Min	Max	
Age	36.6	11.8	35.1	20.0	60.0		28.7	5.8	28.1	20.0	39.1		50.0	5.6	50.1	40.0	60.0	
PCB #118	0.038	0.035	0.028	0.006	0.235		0.025	0.019	0.021	0.006	0.133		0.060	0.045	0.047	0.009	0.235	
PCB #153	0.167	0.156	0.123	0.013	0.919		0.101	0.056	0.089	0.013	0.339		0.280	0.201	0.211	0.047	0.919	
PCB #138	0.081	0.069	0.060	0.014	0.427		0.053	0.028	0.048	0.014	0.195		0.130	0.088	0.103	0.022	0.427	
PCB #182	0.041	0.035	0.029	0.008	0.218		0.026	0.016	0.022	0.008	0.095		0.067	0.043	0.059	0.011	0.218	
PCB #156	0.018	0.014	0.013	0.001	0.081		0.011	0.007	0.009	0.001	0.035		0.029	0.016	0.023	0.006	0.081	
PCB #180	0.126	0.100	0.087	0.018	0.564		0.080	0.052	0.065	0.018	0.247		0.204	0.113	0.180	0.049	0.564	
PCB #170	0.039	0.030	0.028	0.007	0.183		0.025	0.014	0.021	0.007	0.079		0.062	0.036	0.051	0.013	0.183	
Total PCBs	0.759	0.616	0.547	0.127	3.444		0.482	0.263	0.425	0.127	1.594		1.228	0.749	0.980	0.260	3.444	
HCB	0.045	0.033	0.043	0.002	0.174		0.034	0.023	0.030	0.002	0.093		0.065	0.038	0.055	0.009	0.174	
DDE	0.749	0.531	0.605	0.091	3.718		0.567	0.361	0.507	0.091	2.124		1.056	0.628	0.966	0.178	3.718	

の濃度との相互の関係図を Figure 1 に示す。図の対角線上の正方枠の中にはそれぞれのヒストグラムが示されている。年齢と各 PCB 異性体濃度との関係を見ると、いずれも年齢に比例してその濃度が増大している。油症患者には一般人よりも高齢者が多いが、PCB 異性体によっては、油症患者の濃度が一般人の年齢との回帰直線の延長線よりも上になるもの (PCB # 156)、延長線上にあるもの (PCB # 153)、および延長線よりも下になるもの (PCB # 118) がある。同様に、油症患者および一般人における年齢と血液中全 PCB, HCB, DDE 濃度との相互の関係図を Figure 2 に示している。いずれの場合も、油症患者のグループは一般人の濃度範囲よりも高く、その 95% 等確立楕円の範囲とは異なる状態にある。

油症患者および一般人の年齢、7種の PCB 異性体、HCB, DDE の濃度相互の単相関係数を Table 2 に、スピアマンの順位相関係数を Table 3 に示す。一般人においては、7種の PCB 異性体、HCB および DDE 濃度がそれぞれ年齢と高い相関関係にあるのに対し、油症患者においては、PCB # 153, PCB # 182, HCB, DDE の濃度はそれぞれ年齢と危険率 5% 以下で有意の相関を示したが、PCB # 118, PCB # 138, PCB # 156, PCB # 180 および PCB # 170 の濃度は年齢と有意の相関がなかった。

7種の PCB 異性体、HCB, DDE の相互の濃度関係は、一般人においては、非常に有意な相関関係があるが、油症患者においては、PCB 異性体により危険率 5% 以下で有意の相関関係を示すもの

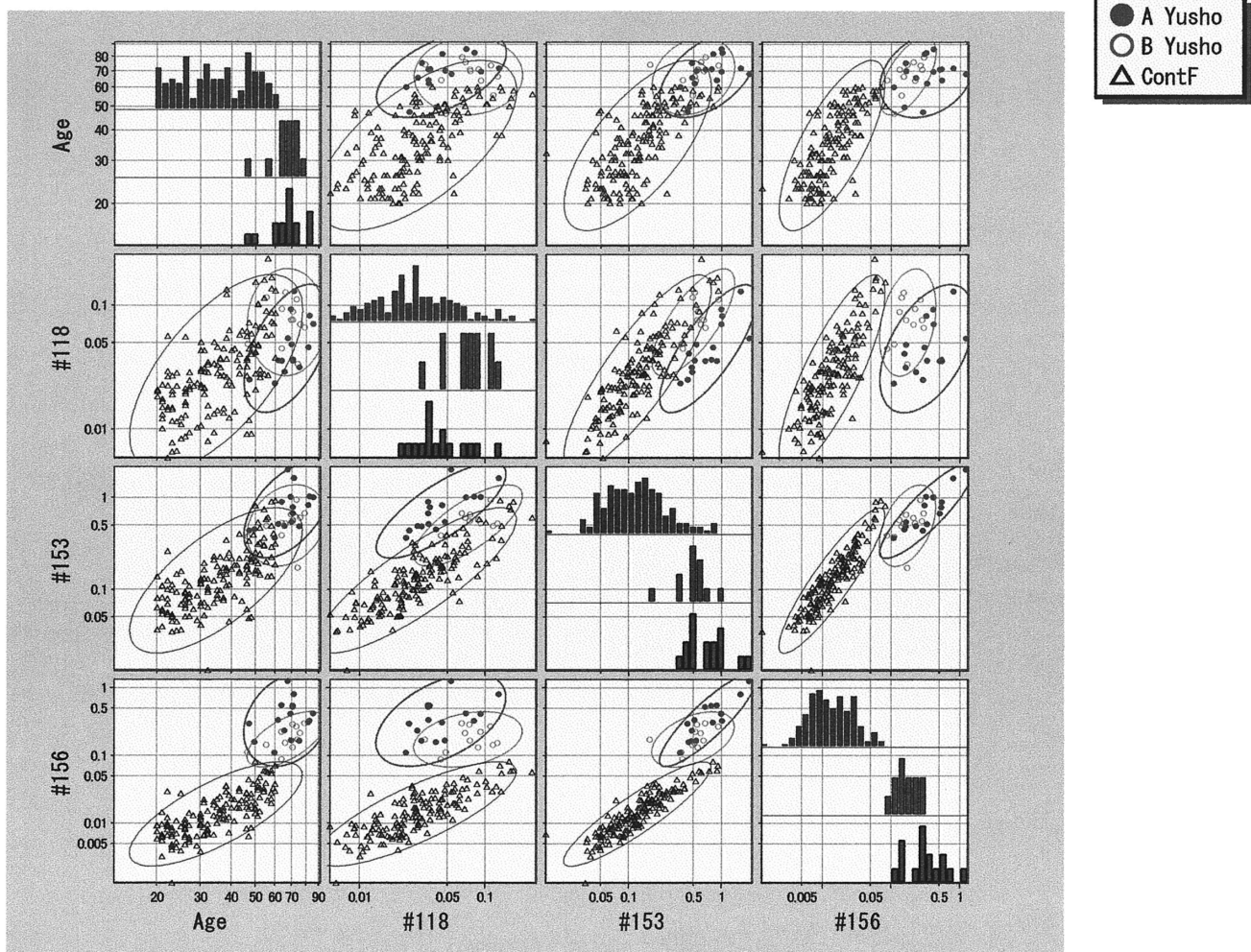


Figure 1 Ellipse of Constant Distance (95 %) between Age, PCB # 118, PCB # 153 and PCB # 156 of A Yusho (●), B Yusho (○) and Fukuoka control (△)
Histograms of Fukuoka control (151, Upper), B Yusho (12, Middle) and A Yusho (16, Lower) in the diagonal squares

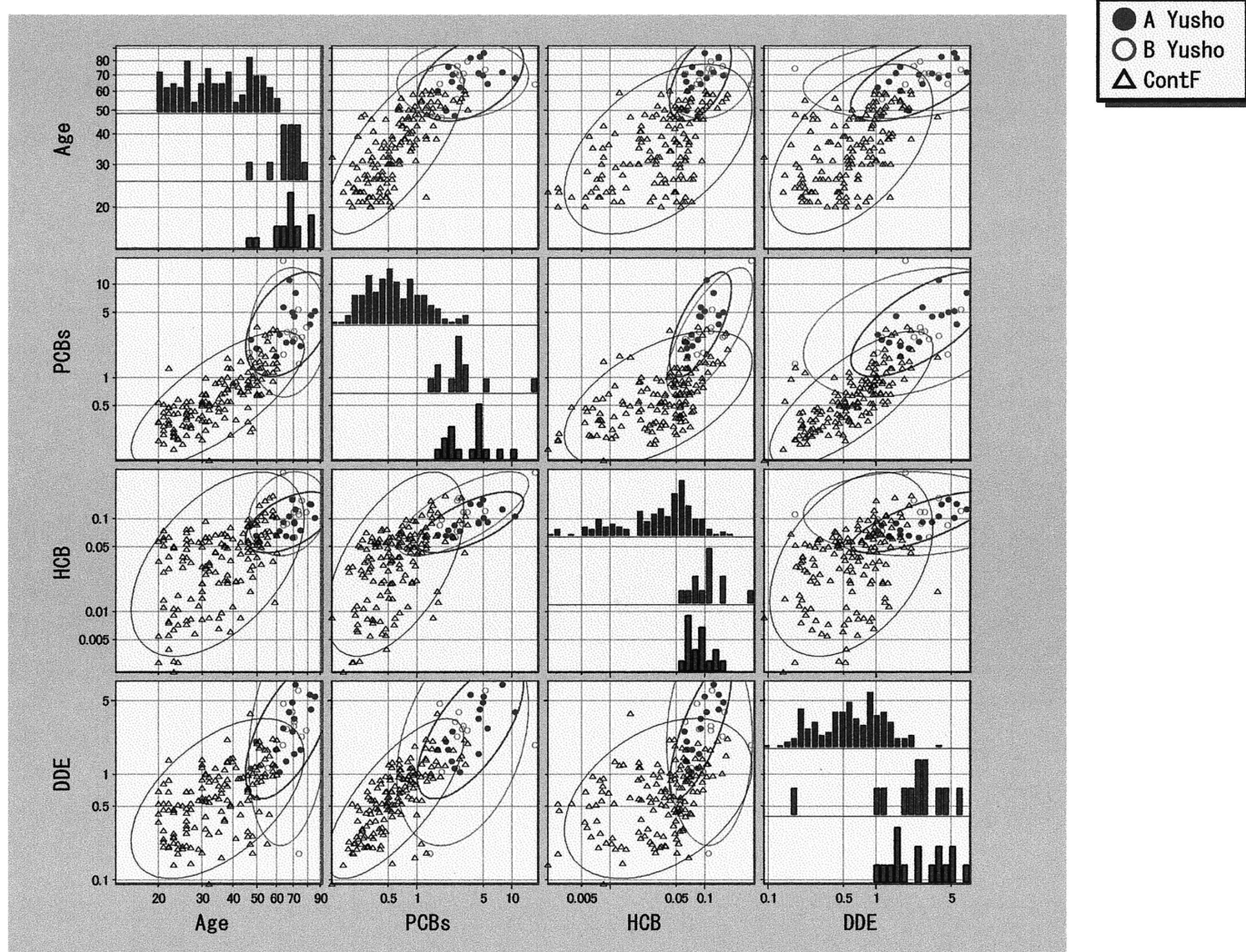


Figure 2 Ellipse of Constant Distance (95 %) between Age, total PCBs, HCB and DDE of A Yusho (●), B Yusho (○) and Fukuoka control (△)
Histograms of Fukuoka control (151, Upper), B Yusho (12, Middle) and A Yusho (16, Lower) in the diagonal squares

もあれば、そうでないものもある。いずれの場合もある程度の有意の相関関係を示しているが、例外的に、油症患者における PCB # 118 濃度と PCB # 156 濃度との間には相関関係がみられない。これは両 PCB 異性体がお互いに異なる状態で体内に蓄積されていることを示している。

考 察

いずれの統計表および統計図においても、油症患者においては、油症患者特有の PCB パターン (PCB # 118 の濃度が低く、PCB # 156 の濃度が比較的高い状態) が 30 数年にわたりの油症患者の体内に依然として残っていることを証明する結果

となった。PCB # 156 について説明すると、ライスオイルを製造する際に用いられたカネクロールが特に長時間高温に加熱されたため、PCB # 156 が多く生成され、それがライスオイルに移行した。その結果この PCB # 156 はライスオイルには比較的高濃度で存在していた⁷⁾。その PCB # 156 の人体における半減期は他の PCB よりも長い⁸⁾ので、いったん体内に摂取されると非常に排泄されにくく、油症患者には特に長く残留しているものと考えられる。一方 PCB # 118 については、その PCB がライスオイルには割合に高濃度に含まれているために、油症患者にはいったん高濃度に蓄積されたが、同時に摂取された高濃度の PCB #

Table 2 Simple correlation coefficients between Age, 7 PCB congeners, HCH and DDE in Yusho patients and control persons

Correlation coefficients in Yusho patients (n = 28)										
	Age	# 118	# 153	# 138	# 182	# 156	# 180	# 170	HCB	DDE
Age	1.0000	0.2804	0.3958	0.1758	0.4565	0.3273	0.3527	0.2423	0.3302	0.3985
PCB #118	0.2804	1.0000	0.4280	0.3960	0.6620	0.0722	0.4008	0.2612	0.4686	0.4845
PCB #153	0.3958	0.4280	1.0000	0.6826	0.8772	0.7892	0.8722	0.7879	0.2919	0.7716
PCB #138	0.1758	0.3960	0.6826	1.0000	0.6400	0.5783	0.5938	0.8038	0.5834	0.5245
PCB #182	0.4565	0.6620	0.8772	0.6400	1.0000	0.6482	0.9046	0.7643	0.4505	0.7142
PCB #156	0.3273	0.0722	0.7892	0.5783	0.6482	1.0000	0.8473	0.8957	0.2599	0.3372
PCB #180	0.3527	0.4008	0.8722	0.5938	0.9046	0.8473	1.0000	0.8889	0.3257	0.5333
PCB #170	0.2423	0.2612	0.7879	0.8038	0.7643	0.8957	0.8889	1.0000	0.4344	0.3924
HCB	0.3302	0.4686	0.2919	0.5834	0.4505	0.2599	0.3257	0.4344	1.0000	0.2536
DDE	0.3985	0.4845	0.7716	0.5245	0.7142	0.3372	0.5333	0.3924	0.2536	1.0000

>0.374: $p < 0.05$, >0.588: $p < 0.001$

Correlation coefficients in Fukuoka control persons(n=151)										
	Age	# 118	# 153	# 138	# 182	# 156	# 180	# 170	HCB	DDE
Age	1.0000	0.6395	0.6933	0.6678	0.6933	0.7450	0.7537	0.7238	0.4970	0.5368
PCB #118	0.6395	1.0000	0.8424	0.8944	0.8303	0.8110	0.8136	0.7968	0.4867	0.7590
PCB #153	0.6933	0.8424	1.0000	0.9466	0.9139	0.9016	0.9297	0.9212	0.5490	0.7365
PCB #138	0.6678	0.8944	0.9466	1.0000	0.8792	0.8840	0.8982	0.8835	0.4729	0.8016
PCB #182	0.6933	0.8303	0.9139	0.8792	1.0000	0.8655	0.9237	0.9178	0.5315	0.6646
PCB #156	0.7450	0.8110	0.9016	0.8840	0.8655	1.0000	0.9267	0.9336	0.5242	0.7002
PCB #180	0.7537	0.8136	0.9297	0.8982	0.9237	0.9267	1.0000	0.9582	0.5337	0.6971
PCB #170	0.7238	0.7968	0.9212	0.8835	0.9178	0.9336	0.9582	1.0000	0.5119	0.6410
HCB	0.4970	0.4867	0.5490	0.4729	0.5315	0.5242	0.5337	0.5119	1.0000	0.3987
DDE	0.5368	0.7590	0.7365	0.8016	0.6646	0.7002	0.6971	0.6410	0.3987	1.0000

>0.19: $p < 0.05$, >0.32: $p < 0.001$

156 および塩化ジベンゾフラン (PCDF) による強い酵素誘導作用によりかなり急激に PCB # 118 の濃度が減少したものと考えられる。台湾油症患者においては、PCB # 118 の濃度が数年後には一般人の PCB # 118 濃度よりも低くなることが観測された⁶⁾。これらの状態が重なり合って、油症患者特有のパターンが今でも観察されているものと思われる。

2002 年、Sandau ら¹¹⁾ はケベック沿岸住民の新生児臍帯血から数種類の PCB 水酸化代謝物を検出した。その中に PCB # 118 が代謝されて生成された PCB 水酸化体があり、この化合物は強いエストロゲンスルホトランスフェラーゼ阻害作用があり²⁾、エストロゲンの分解が阻害されるので、エストロゲン活性が異常に上昇することがあるといわれている。油症患者において、最初は高濃度であったものが、数年後から異常に減少しているのがこの PCB # 118 であるから、これが PCB 水酸

化体に代謝されて血液中に残留¹⁾している可能性があり、連続的にホルモン異常を起こす原因の一つになっているものと考えられる。

油症患者における血液中 DDE 濃度は PCB と同じように一般人の血液中 DDE 濃度よりも明らかに高い。DDE は主に食品と共に摂取されて体内に蓄積されたものであるため、油症患者がライソイルと共に DDE を多く摂取したためとは考えにくい。油症患者に高濃度に蓄積されているのは、毒性が強い PCB や PCDF を多く摂取したために代謝酵素が変化して、DDE が PCB と共に多く蓄積されたためであろう。

総 括

2000 年から 2002 年にかけて一斉検診にこられた油症患者 28 名および 1999 年に福岡市の一般人 151 名の血液が分析され、その中の 7 種の PCB 異性体および HCB, DDE の各濃度相互の関係およ

Table 2 Spearman's rank correlation coefficients between Age, 7 PCB congeners, HCH and DDE in Yusho patients and control persons

Spearman's rank correlation coefficients in Yusho patients (n = 28)										
	Age	# 118	# 153	# 138	# 182	# 156	# 180	# 170	HCB	DDE
Age	1.0000	0.2000	0.5594	0.3186	0.4290	0.3733	0.3594	0.2565	0.4242	0.4968
PCB #118	0.2000	1.0000	0.4923	0.4322	0.6953	0.0197	0.4355	0.2978	0.4607	0.5148
PCB #153	0.5594	0.4923	1.0000	0.8614	0.8878	0.7664	0.8772	0.7855	0.5290	0.7513
PCB #138	0.3186	0.4322	0.8614	1.0000	0.7823	0.7887	0.8331	0.8714	0.5307	0.5402
PCB #182	0.4290	0.6953	0.8878	0.7823	1.0000	0.5521	0.8690	0.7480	0.5524	0.7409
PCB #156	0.3733	0.0197	0.7664	0.7887	0.5521	1.0000	0.8325	0.8725	0.3969	0.3519
PCB #180	0.3594	0.4355	0.8772	0.8331	0.8690	0.8325	1.0000	0.9179	0.5012	0.5764
PCB #170	0.2565	0.2978	0.7855	0.8714	0.7480	0.8725	0.9179	1.0000	0.4719	0.4182
HCB	0.4242	0.4607	0.5290	0.5307	0.5524	0.3969	0.5012	0.4719	1.0000	0.4552
DDE	0.4968	0.5148	0.7513	0.5402	0.7409	0.3519	0.5764	0.4182	0.4552	1.0000

> 0.375: p < 0.05, > 0.483: p < 0.001

Spearman's rank correlation coefficients in Fukuoka control persons (n=151)

	Age	# 118	# 153	# 138	# 182	# 156	# 180	# 170	HCB	DDE
Age	1.0000	0.6511	0.7142	0.6823	0.6885	0.7544	0.7681	0.7303	0.4761	0.5628
PCB #118	0.6511	1.0000	0.8307	0.8868	0.8204	0.7971	0.8087	0.7793	0.5097	0.7620
PCB #153	0.7142	0.8307	1.0000	0.9403	0.9172	0.9128	0.9340	0.9239	0.5571	0.7425
PCB #138	0.6823	0.8868	0.9403	1.0000	0.8727	0.8861	0.9002	0.8739	0.4910	0.8157
PCB #182	0.6885	0.8204	0.9172	0.8727	1.0000	0.8582	0.9202	0.9094	0.5377	0.6873
PCB #156	0.7544	0.7971	0.9128	0.8861	0.8582	1.0000	0.9335	0.9364	0.5055	0.7031
PCB #180	0.7681	0.8087	0.9340	0.9002	0.9202	0.9335	1.0000	0.9565	0.5232	0.7077
PCB #170	0.7303	0.7793	0.9239	0.8739	0.9094	0.9364	0.9565	1.0000	0.4916	0.6506
HCB	0.4761	0.5097	0.5571	0.4910	0.5377	0.5055	0.5232	0.4916	1.0000	0.4251
DDE	0.5628	0.7620	0.7425	0.8157	0.6873	0.7031	0.7077	0.6506	0.4251	1.0000

at n = 151 all the correlation coefficients: p < 0.0000

び年齢との関係を検討した。

1) 油症患者血液の全 PCB 濃度は一般人血液の 5.4 倍であった。また, PCB # 118 は 1.6 倍で最も小さく, PCB # 156 は 17.5 倍で最も大きかった。その他の PCB および HCB, DDE は両異性体の中間の値であり, 化合物によって油症患者への蓄積状態は大きく異なる。

2) 油症患者のほうが一般人よりも高齢者が多かったが, 年齢と PCB 異性体濃度との相互関係を 95% 等確立楕円のグラフでみると, 油症患者の PCB # 118 の濃度は一般人の回帰直線の延長線よりも低く, PCB # 156 濃度は一般人の回帰直線の延長線よりも高かった。その他の異性体では一般人の回帰直線の延長線上付近にあるものが多かった。

3) 年齢と 7 種の PCB 異性体, HCB, DDE の濃度との単相関係数およびスピアマン順位相関係数でみると, 一般人ではこれらの相互の相関係数

の値は非常に高い相関関係を示したが, 油症患者においては, 化合物によっては有意の相関関係を示すものもあればそうでないものもあった。油症患者の PCB # 118 濃度と PCB # 156 濃度との間には相関関係は殆ど見られなかった。

4) 油症患者において, 高かった PCB # 118 濃度が他の PCB よりも速く減少していることは, その PCB の水酸化代謝物が多く生成されて, ホルモン攪乱作用を起こす原因の一つになっている可能性がある。

謝 辞

本研究は厚生科学研究補助金によるものである。また, 福岡住民血液の PCB 分析は東和大学の三村敬介氏によるものである。ここに記して感謝いたします。

文 献

- 1) Bergman A, Klasson-Wehler E and Kuroki

- H: Selective Retention of Hydroxylated PCB Metabolites in Blood. *Environ. Health Perspect.* 102, 464-469, 1994.
- 2) Kester MHA, Bulduk S, Tibboel D, Meinl W, Glatt, H, Falany CN, Coughtrie MWH, Bergman A, Safe SH, Kuiper GGJM A, Schuur AG, Brouwer A and Visser TJ: Potent Inhibition of Estrogen Sulfotransferase by Hydroxylated PCB Metabolites: A Novel Pathway Explaining the Estrogenic Activity of PCBs. *Endocrinology* 141: 1897-1900, 2000.
 - 3) 倉恒匡徳, 青野正男, 吉田彦太郎; 序言, 福岡医誌 76: 117-125, 1985.
 - 4) Masuda Y: The Yusho Rice Oil Poisoning Incident. In Schecter A (ed): *Dioxins and Health*. pp 633-659, Plenum Press New York and London, 1994.
 - 5) Masuda Y, Haraguchi K, Kono S, Tsuji H and P a pke O: Concentrations of dioxins and related compounds and their effects to biochemicals in Fukuoka residents. *Organohalogen Compounds* 54: 267-270, 2002.
 - 6) 増田義人, 原口浩一, 黒木広明, Ryan JJ: 油症患者における PCBs, PCDFs の 30 年間の変遷と症状, 福岡医誌 92: 149-157, 2001.
 - 7) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 高田真由美, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニール, 福岡医誌 65: 25-27, 1974.
 - 8) 増田義人, 倉恒匡徳: 油症を起こしたライスオイル中の毒性物質, 福岡医誌 70: 229-237, 1979.
 - 9) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一, Schecter A, P a pke O: 油症患者血液中 PCB, PCDF の 20 年経過後の状態, 福岡医誌 88: 149-156, 1997.
 - 10) 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ポリ塩化ビフェニール異性体, 福岡医誌 76: 150-152, 1985.
 - 11) Sandau CD, Ayotte P, Dewailly E, Duffe J and Norstrom RJ: Analysis of Hydroxylated Metabolites of PCBs (OH-PCBs) and Other Chlorinated Phenolic Compounds in Whole Blood from Canadian Inuit. *Environ. Health Perspect.* 110: 411-417, 2002.
(受付 2003-3-24)

血中 PCB パターン判定における従来法と 異性体別分析法の同等性について

福岡県保健環境研究所

中川 礼子, 芦塚 由紀, 堀 就英
平川 博仙, 飛石 和大, 飯田 隆雄

Equality as Yusho Diagnosis Indices Between Blood PCB Constitution Data from Using a Conventional Analytical Method and a PCB Isomer Specific Analytical Method

Reiko NAKAGAWA, Yuki ASHIZUKA, Tsuguhide HORI
Hironori HIRAKAWA, Kazuhiro TOBIISHI, and Takao IIDA
*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Fukuoka 818-0135, Japan*

Abstract This paper reports that we can replace a conventional PCB analytical method with an isomer specific analytical method in Yusho diagnosis. The authors analysed 109 blood samples from people who had the 2002 annual inspection for Kanemi rice oil poisoning using both methods. The data from these methods were compared and proved to be almost the same in the so-called "PCB pattern" which has been adopted as a Yusho diagnosis index since early 1970s.

はじめに

PCB パターンは従来から油症の診断に極めて重要な意味を持つものである¹⁾。そのパターンは、従来法では GC のクロマトグラム上で DDE (農薬 DDT の代謝物の一つ) のピーク以降に溶出する 1 番目, 2 番目, 5 番目の 3 ピークの高さの相対比, 即ち 1 番目のピーク高/2 番目のピーク高 (1/2 比), 及び 5 番目のピーク高/2 番目のピーク高 (5/2 比) で決定する。この 2 つの相対比が統計上, 健常者のそれとどの程度離れた数値であるかによって, A (典型的な油症患者に見られるパターンで健常者のパターンから著しく離れている), 及び C (健常者のパターンと変わらない) とし, A と C の中間で油症タイプを B, さらに健常者と判別しがたい BC の計 4 パターンに区分している。これらのパターンは油症の原因物質である PCDF やコプラナー PCB によって引き起こされた PCB の異常代謝の結果であることがすでに堀ら¹⁾によって明らかにされている。これまで, 黒木ら³⁾によって, DDE のピーク以降に溶出する 1 番目, 2 番目, 5 番目の各ピークは, それぞれ, 主として IUPAC # 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobi-

phenyl), # 153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl), # 156 (2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl) であることも明らかにされている。PCB は 209 の異性体があり, その毒性は異性体によって大きく異なるため, 分析化学の領域では異性体別の分析が今日では一般的となって来ている。そこで, 30 年以上経過した油症検診における PCB 分析も異性体別に分析することが望ましいが, 異性体別分析へ移行することで従来法と異性体別分析法でパターン判定が異なることがあってはならない。2002 年度油症検診で, これを検証するに耐えうる症例数を確保することができたため, パターン判定について前の報告⁵⁾ (使用機器は簡易型質量分析計) に引き続き, 改めて, 従来法と異性体別分析法 (使用機器は高分解能質量分析計) を比較し, 同等性について検証した。

実験方法

1. 従来法

1.1 分析試料の調製

患者を含む 109 名の血液を対象とした。血液約 1.5 g を正確に秤量し, 1.5 N 水酸化カリウム/エタノールを 3 mL 添加して, 90 °C で 1 時間還流し

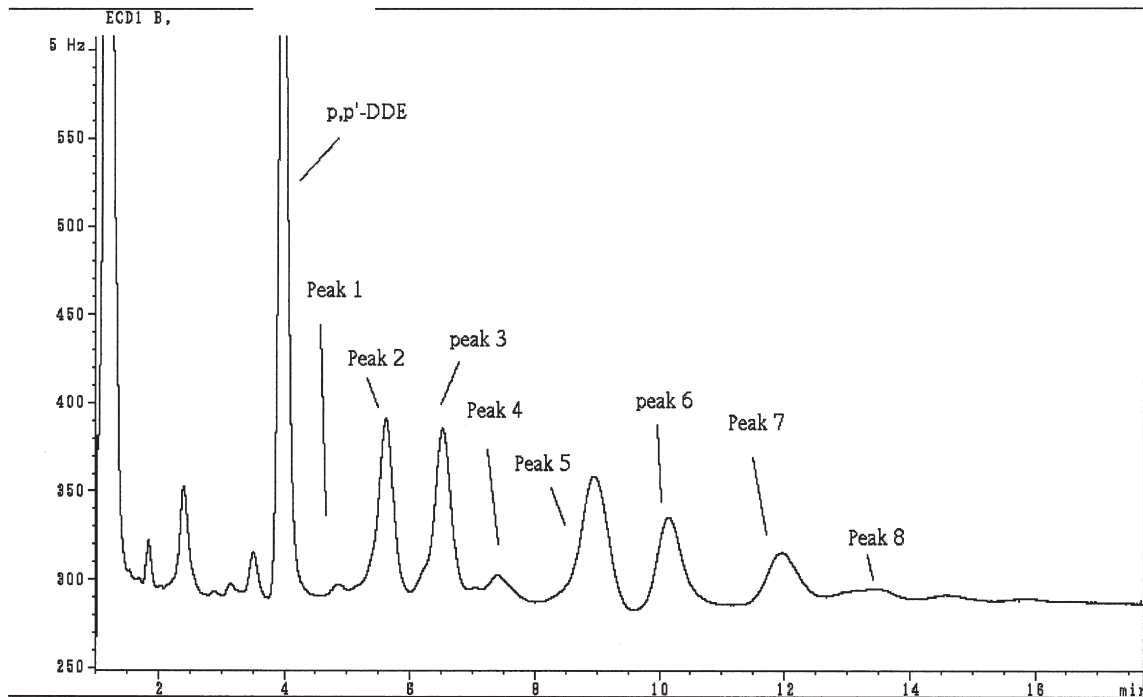


Fig. 1 The ECD/GC chromatogram of PCB in blood of a typical Yusho patient

た。冷後、ヘキサン 2 mL で 2 回抽出し、ヘキサン層を別の試験管に分取後、2 mL の蒸留水で水洗した。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムカラムに通して脱水したのち、ヘキサン層を 1 mL まで濃縮した。これを、フロリジル (残留農薬用、キシダ化学) のミニカラムに負荷し、6 mL のヘキサンで PCB を溶出した。溶出液を乾固しないように注意深く濃縮留去した後、残さをヘキサン 0.2 mL で溶解し、内標として、6 臭素化ビフェニール (IUPAC # 154) 800 pg を添加し混合した。この試料液についてカネクロール 500 : 600 (1 : 1) 混合液を標準液としたパターン合わせ法 (DDE の後に溶出する 8 本のピークの高さの

和, Fig. 1) により PCB を測定した²⁾。

1.2 GC の分析条件

測定機器：ECD 付きガスクロマトグラフ (HP 6890, Hewlett-Packard 社製), カラム：OV-1, 2 φ × 8 フィート, カラム温度：200 °C, 注入口温度：240 °C, 検出器温度：280 °C, キャリヤガス：窒素, 流量：25 mL/min, 注入量 5 μL

2. 異性体別分析法

2.1 分析試料の調製

1.1 で得られた試料液に, tri-, tetra-, penta-, hexa-塩素化ビフェニル各 2 種, 及び

Table 1 The blood PCB levels of subjects classified to each PCB pattern in the 2002 annual inspection

	N	Average age (year old)	Age	Average PCB level (ppb)	PCB level (ppb)
Pattern A or B	56	64.9	38-86	3.67	0.70-13.4
Pattern C	53	52.8	5-86	1.64	0.16-4.68
Normal persons	30	42.7	25-56	1.11	-*

* PCB level range is not available due to pooled blood sample.

hepta-, octa-, nona-, deca-塩素化ビフェニル各1種の計12種の¹³Cラベル化PCBを各100 pg添加し、HRGC/HRMSで測定した。

2.2 HRGC/HRMSの分析条件

測定機器：ガスクロマトグラフ (HP 6890, Hewlett-Packard社製), 質量分析計 (Micromass社製 Autospec ULTIMA), キャピラリーカラム: SGE社製 HT-8 (0.22 mm x 50 m x 0.25 μm, 注入口温度: 280°C, インターフェース温度: 280°C, カラム温度: 130°Cで1分間保持した後, 220°Cまで1分間に20°Cの割合で, 280°Cまでは1分間に3°Cの割合で昇温後, 更に320°Cまで1分間に20°Cの割合で昇温。キャリアーガス: ヘリウム, イオン源温度: 280°C, イオン化エネルギー: 40 eV, 加速電圧: 8 kV。

結果と考察

1. 2002年度油症検診受診者及び健常者の従来法による総PCB濃度

Table 1及びFig. 2に, 今回測定に供した109名の血液試料の従来法でのパターン別総PCB濃度とその分布を示す。A又はBパターンの症例は56名全員が認定油症患者で, その血中PCB濃度は, 平均値3.67 ppb (最小0.70 ppb~最大13.4 ppb), Cパターンの症例は53症例中29名が油症患者で, その血中PCB濃度の平均値は1.64 ppb (最小0.16 ppb~最大4.68 ppb), 健常者の30名のプール血液のPCB濃度は1.11 ppbであった。健常者に比較すると, A又はBパターンの血中PCB濃度は3.3倍, Cパターンの血中PCB濃度は, 1.5倍であった。Fig. 2に示されるように, 患者には40才以上の高齢者が多く, PCB濃度は,

A又はBパターンとCパターンとで, オーバーラップした分布を示した。A又はBパターンでも, Cパターンの最高値よりも高いのは数例であった。今回の検診において, カネミオイル食中毒事件以降誕生した数例の34才未満の受診者は, すべてが, CパターンでPCB濃度は1 ppb以下であった。

2. 従来法と異性体別分析法によるパターン判定結果の比較

Fig. 3は, パックドカラムによる従来法での1/2比とHRGC/HRMSによる#118/#153比(濃度比)の相関を, また, 従来法での5/2比とHRGC/HRMSによる#156/#153比(濃度比)の相関を示したものである。それぞれ, 相関係数 $r=0.9299$, 0.9769 ($n=109$) となり, 危険率1%で, 有意な相関を示した。そこで, #118/#153比(濃度比)及び#156/#153比(濃度比)を用いて, 今回測定した油症患者血液について, 我々が実施してきた統計手法(健常者血液PCBの#118/#153比及び#156/#153比の平均値を算出し, それとの離れ度合いをみる)によるPCB型別を検討した。その結果, 従来法による型別とHRGC/HRMSによる型別はTable 2となり, 従来法とHRGC/HRMSの型別の一致率は, A又はBパターンの血液では98.2%, Cパターンの血液では94.3%と良好であった。この結果から, 今後, 従来のパターン判定法をHRGC/HRMSで測定した#118/#153比(濃度比)及び#156/#153比(濃度比)を用いることに置き換えても, これまでのPCBパターン判定結果との間の不都合はほとんど生じないと結論された。

Table 2 Correspondence between two ways of classification of subjects who had the 2002 annual inspection for Yusho

		PCB pattern by HRGC/HRMS			Total (Number of Subjects)
		A or B (Number of subjects)	BC (Number of subjects)	C (Number of subjects)	
PCB pattern by ECD/GC	A or B	55 (98.2%)	1 (1.8%)	0 (0%)	56
	C	0 (0.0%)	3 (5.7%)	50 (94.3%)	

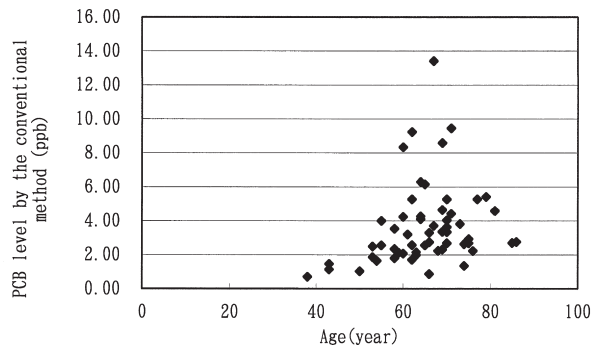


Fig. 2-1 The distribution of ages and blood PCB levels of subjects classified to the pattern A or B (n=56)

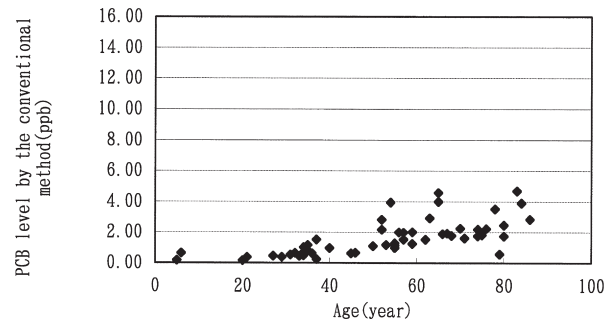


Fig. 2-2 The distribution of ages and blood PCB levels of subjects classified to the pattern C (n=53)

総 括

油症患者の血中 PCB のパターン判定について、従来法であるパックドカラム-電子捕獲型検出器 (ECD) 付きガスクロマトグラフ (GC) (標準品として KC-500 : KC-600=1 : 1 の混合溶液を用いたパターン合わせ法) とキャピラリーカラム-GC/高分解能質量分析計 (HRGC/HRMS) による異性

体別分析法との同等性について検証した。パターン判定は、A 又は B パターンについては 98.2%、C パターンについては 94.3% の一致率を示し、両者の方法で同等性が認められた。これにより、より毒性評価が正確にできる異性体別分析法への移行が可能であることが示された。

謝 辞

本研究は平成 13 年度厚生科学研究費補助金及び平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金に負うものである。ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) 堀 伸二郎, 宮田秀明, 前田浩一郎, 村上保行, 樫本 隆: 油症における体内残留 PCB の質的究明. 食衛誌 20 : 166-172, 1979.
- 2) 飯田隆雄, 芥野岑男, 高田 智, 中村周三, 高橋克己, 増田義人: ヒトの血液中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.
- 3) 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.
- 4) 増田義人, 香川梨絵, 島村京子, 高田真由美, 倉恒匡徳: 油症患者および一般人の血液中のポリ塩化ビフェニル. 65 : 25-27, 1974.
- 5) 中川礼子, 中村又善, 平川博仙, 堀 就英, 飯田隆雄: キャピラリーカラム GC/MS による油症患者及び健常者血液中 PCB 分析-パックドカラム ECD/GC 従来法との比較-. 福岡医誌 90 : 184-191, 1999.

(受付 2003-4-1)

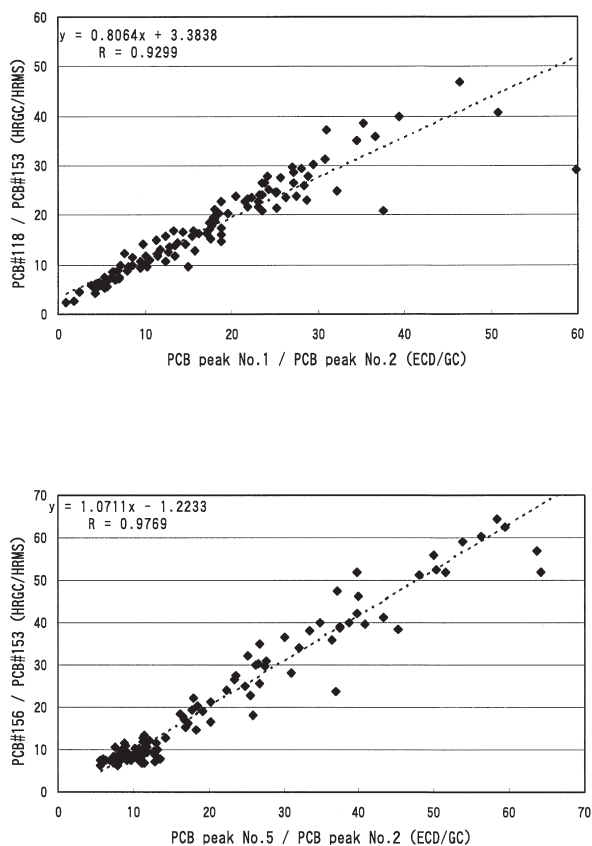


Fig. 3 The relationship between the peak ratios by ECD/GC and HRGC/HRMS

New Protocol of Dioxins Analysis in Human Blood

Takashi TODAKA

Japan Food Hygiene Association, 2-6-1, Jingumae, Shibuya-ku, Tokyo, 150-0001

Hironori HIRAKAWA, Kazuhiro TOBIHI and Takao IIDA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39, Mukaizano,
Dazaifu-shi, Fukuoka, 818-0135*

Abstract We developed a new analytical method for accurately determining concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and non-ortho-coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs) at a blood volume of 5 g. The method consists of three major steps, the extraction of lipid from human blood by an accelerated solvent extractor (ASE) system, a clean-up procedure at a scale one-fourth that of the conventional method, and a sensitive determination method by a high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) equipped with a solvent cut large volume (SCLV) injection system as a large volume injection technique. By the improvement of the pretreatment method, the operation time and consumption of the solvent could be drastically reduced, and the sensitivity of the GC-MS with the SCLV injection system was increased to 10 times the level of the classical method. From the results of the PCDDs, PCDFs and Co-PCBs concentrations measured by the developed method and the conventional method using the same blood sample, it was confirmed that the measurement became possible at a blood volume of 5 g. The developed method is more effective than the conventional method for treating many samples within a short period of time with high reproducibility.

Introduction

The Yusho poisoning accident, which affected over 1800 persons, occurred in 1968 in western Japan, and was caused by the ingestion of cooking rice oil which contained contaminated PCBs, PCDFs and PCDDs. Over 30 years have passed since the outbreak of Yusho, and almost all of the Yusho patients' peculiar symptoms have improved. However, some patients are still afflicted with subjective symptoms. These patients even now have a much higher concentration of PCDFs in their blood than do unaffected persons²⁾³⁾⁷⁾. Therefore, a follow-up study of PCDDs, PCDFs, and Co-PCBs concentrations in the

blood of Yusho patients is very important when considering the health care of these patients. We have been determining the concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in the blood samples collected from Yusho patients in order to establish new Yusho criteria²⁾³⁾⁷⁾. In the conventional measuring method, 20-50 ml of blood is needed to exactly measure the PCDDs, PCDFs and Co-PCBs concentrations. However, since most patients are now over 60 years old, collecting blood in this amount is restricted. These patients can safely supply only small volumes of blood for the measurement of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs concentrations. Therefore, to reduce the physical burden on patients, it is neces-

sary to develop a highly sensitive analytic method that can accurately evaluate PCDDs, PCDFs and Co-PCBs concentrations from 5 g blood samples. In addition, since the extraction procedure of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs from the blood by the conventional method is very complicated and time-consuming, it is not a suitable procedure for processing many samples.

In this study, we developed an analytic method to measure the PCDDs, PCDFs and Co-PCBs concentrations in 5 g blood samples using a HRGC/HRMS equipped with a Solvent Cut Large Volume (SCLV) injection system as a large volume injection technique. We also developed and examined efficient methods to speed up the pretreatment procedure for blood samples and to reduce the background levels such that they do not affect the measurement of the PCDDs, PCDFs and Co-PCBs.

Materials and Methods

Materials.

Native PCDDs, native PCDFs and native Co-PCBs, as authentic standards, were purchased from Wellington Laboratories, Ontario, Canada. [$^{13}\text{C}_{12}$]-PCDDs, [$^{13}\text{C}_{12}$]-PCDFs and [$^{13}\text{C}_{12}$]-PCBs, as internal standards, were also purchased from Wellington Laboratories, Ontario, Canada. An active carbon column was prepared as follows: active carbon was purchased from Nacalai Tesque, Kyoto, Japan, refluxed five times with toluene for 5 hr, and dried in vacuum, after which 500 mg of the active carbon was mixed with 500 g of anhydrous sodium sulfate (Wako Pure Chemicals Ind, Co. Ltd., Tokyo, Japan). A silver nitrate/silica gel was purchased from Wako Pure Chemicals Ind. Co. Ltd., Tokyo, Japan. Distilled water used in this experiment was treated with n-hexane. All other chemicals used

were of the analytical grade of PCB and phthalate commercially available.

Sample preparation.

Lipid was extracted from the blood samples by an accelerated solvent extractor (ASE-200, Dionex, Sunnyvale, CA). Each blood sample was accurately weighted to 5 g and mixed with 4 g Isolute (International Sorbent Technology Ltd., Hengoed, Mid Glamorgan, UK). After the mixed sample was loaded into the extraction cell, [$^{13}\text{C}_{12}$]-PCDDs, [$^{13}\text{C}_{12}$]-PCDFs and [$^{13}\text{C}_{12}$]-PCBs, as internal standards, were added. The following programmed parameters were used for these extractions: a pressure of 2000 psi and a temperature of 150°C, with a static time of 10 minutes, a flushing volume of 50 ml, 90 seconds purging, a 60% flushing volume for two cycles, and acetone : n-hexane (1 : 4, v/v) as the extraction solvent. The extract was evaporated to near dryness after being treated with anhydrous sodium sulfate (10 g), and the lipid contents were determined gravimetrically. The extracted lipid carried out the cleanup at a scale one-fourth that of the conventional method⁽²⁾⁽³⁾⁽⁷⁾. More specifically, the lipid was dissolved in n-hexane and treated with concentrated sulfuric acid. The separated hexane layer was applied to a silver nitrate/silica gel column (0.5 g) and eluted with 15 ml of hexane. The eluted solution was loaded to an active carbon column (0.5 g) after being evaporated to 1 ml and separated into two fractions. The first fraction containing mono-ortho-choline substituted biphenyls (mono-ortho-PCBs) was eluted with 10 ml of dichloromethane/n-hexane (1 : 9, v/v). PCDDs, PCDFs and non-ortho-PCBs were eluted with 25 ml of toluene as the second fraction. The eluate was evaporated to near dryness and transferred to an

injection vial, and the syringe standard was added. The column packing (silver nitrate silica gel, active carbon column and anhydrous sodium sulfate) used in this experiment was washed by ASE-200 under the same conditions as the lipid extraction with *n*-hexane or toluene.

Analysis of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs.

Concentrations of the PCDDs, PCDFs and Co-PCBs were measured using HRGC/HRMS equipped with an SCLV injection system. The analytical conditions were as follows: the gas chromatograph was an HP-6890 A series (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipped with an Autospec Ultima E, (Micromass Ltd., Manchester, UK) and a solvent cut large-volume injection system (SCLV), SGE international., Victoria, Australia; the column used was an BPX-5 fused silica pre-capillary column, 0.25 mm i.d. 6 m, 0.25 μ m film thickness (SGE International., Victoria, Australia); the analytical column, 0.15 mm i.d. \times 30 m, 0.15 μ m film thickness (SGE International., Victoria, Australia); the column was heated from 80 $^{\circ}$ C to 320 $^{\circ}$ C at a rate of 20 $^{\circ}$ C / min, maintained at 320 $^{\circ}$ C for 5 min, cooled to 180 $^{\circ}$ C at a rate of 70 $^{\circ}$ C / min, maintained at 180 $^{\circ}$ C for 1 min, heated to 320 $^{\circ}$ C at a rate of 5 $^{\circ}$ C / min, and then maintained at 320 $^{\circ}$ C for 5 min. The injection temperature and ion source temperature were maintained at 280 $^{\circ}$ C and 270 $^{\circ}$ C, respectively, and the carrier gas (helium) flow rate (constant flow) was 1.3 ml/min. The ionizing current, ionizing energy, accelerating voltage, and trap current were 550 mA, 40 eV, 7.8 kV and 750 mA, respectively. PCDDs, PCDFs and Co-PCBs were analyzed in a single ion record mode. The resolution was maintained at 10000 at 10%. Analysis of tetrachloro-

odibenzo-*p*-dioxins (TCDDs), pentachlorodibenzo-*p*-dioxins (PeCDDs), hexachlorodibenzo-*p*-dioxins (HxCDDs), heptachlorodibenzo-*p*-dioxins (HpCDDs) and octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) involved the use of [$^{13}\text{C}_{12}$]-2, 3, 7, 8-TCDD, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 7, 8-PeCDD, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD, and [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-OCDD as internal standards, respectively. The analysis of tetrachloro-dibenzofurans (TCDFs), pentachlorodibenzofurans (PeCDFs), hexachlorodibenzofurans (HxCDFs), heptachlorodibenzofurans (HpCDFs) and octachlorodibenzofuran (OCDF) involved the use of [$^{13}\text{C}_{12}$]-2, 3, 7, 8-TCDF, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 7, 8-PeCDF, [$^{13}\text{C}_{12}$]-2, 3, 4, 7, 8-PeCDF, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF, [$^{13}\text{C}_{12}$]-2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF, [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF, and [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-OCDF as internal standards, respectively. The analysis of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), 3, 4, 4', 5-TCB, 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PeCB) and 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (HxCB) involved the use of [$^{13}\text{C}_{12}$]-3, 3', 4, 4'-TCB, [$^{13}\text{C}_{12}$]-3, 4, 4', 5-TCB, [$^{13}\text{C}_{12}$]-3, 3', 4, 4', 5-PeCB and [$^{13}\text{C}_{12}$]-3, 3', 4, 4', 5, 5'-HxCB as internal standards, respectively. [$^{13}\text{C}_{12}$]-1, 2, 3, 4-TCDD was used as a syringe spike.

Results and Discussion

Because PCDDs, PCDFs, and Co-PCBs are found at low concentrations in a 5 g blood sample, a highly sensitive technique is needed. The response of the analytical system can be increased with the introduction of a large volume of the final extract into the GC/MS. Though several large-

volume injection techniques have been proposed for increasing the sensitivity of GC/MS, a technique using a Solvent Cut Large-Volume (SCLV) injection system has been reported to be the most useful for analysis of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in human blood⁴). This method consists of a two-stage chromatography system, the injected large-volume samples in the GC/MS being separated the solvent and the analytic compound by the pre-column to remove the various interfering substances in the sample. The solvent containing the various interfering substances is then vented to waste through a solvent cut valve. The analytic compounds are focused at the head of the analytical column by a cold trap, and the analytical column is then heated by temperature program, and the analytic compounds are separated and determined. Because most matrices in an injected sample can be removed by pre-column, the analytical column used can be a narrow bore (0.1-0.15 mm) with a thin film thickness (1.0-1.5 μm). Consequently, extremely narrow peaks are obtained, and the mass sensitivity is increased. By using HRGC/HRMS with a SCLV injection system, the sensitivity can be increased to 10 times the level of the classical method (Fig. 1-2). It therefore seemed possible that concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs could be measured at a blood volume of 5 g.

Sample-extraction procedures are often perceived as bottlenecks in analytical methods. Because the procedure for extracting lipids from the blood by conventional methods is very complicated and time-consuming, it is not suitable procedure for processing many samples. An accelerated solvent extractor (ASE), which employs a new extraction procedure using organic solvents at high pressures and tem-

peratures above the boiling point, is widely used to replace Soxhlet or liquid-liquid extraction for extraction of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs from environmental samples¹⁾⁵⁾⁶⁾⁸⁾. The ASE technique is expected to make possible lipid extraction from blood in short periods of time with a small solvent volume as compared to conventional methods. We investigated the extraction of lipids from a blood sample by an ASE at a pressure of 2000 psi and a temperature of 150 °C using a 5 g blood sample. The results are summarized in Table 1. When lipids were extracted from the blood by an ASE-200 with the acetone/n-hexane system solvent containing over 20% acetone, the lipid content was nearly that resulting from the conventional method. With regard to the concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs, the developed method using acetone : n-hexane (1 : 4, v/v) as a extraction solvent resulted in almost the same values as with the conventional method. These finding indicate that the ASE technique shows good potential regarding the recovery of lipids from blood.

Furthermore, the lipid content extracted by the developed method and the conventional method using 20 g samples of the same bloods were compared for blood samples collected from eight normal subjects. The results are shown in Fig. 3. It was confirmed that the developed method could produce the same lipid content as the conventional method. The concentrations of each isomer of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs by both methods were also nearly the same, and the total toxicity equivalency quantity (TEQ) levels were almost equal to those obtained by the conventional method. In addition, the developed method demonstrated high reproducibility based on experiments conducted using the same blood sam-

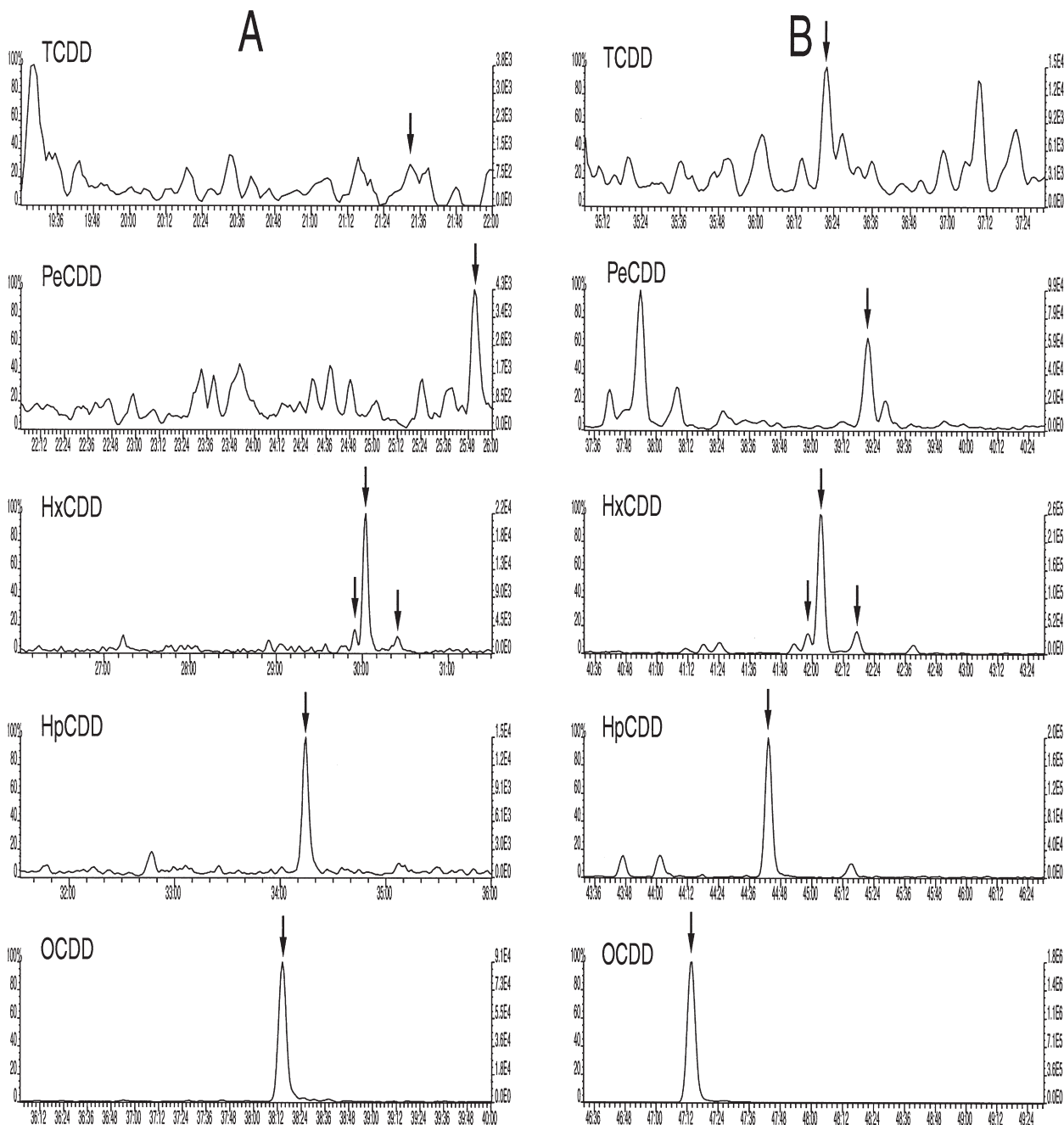


Fig. 1 High-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry chromatograms of PCDDs in the blood.

A, classical injection ($2 \mu\text{l}/5 \mu\text{l}$); B, SCLV injection ($10 \mu\text{l}/25 \mu\text{l}$).

ple (Fig. 4). Moreover, recovery of the ^{13}C -labeled internal standard was 60% overall when the concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in the blood of 19 Yusho patients were measured by the developed method (Table 2). These findings indicate that the developed method is essentially

equivalent to the conventional method.

Furthermore, the developed method has the following important advantages: (1) the extraction of lipids from blood can be done automatically by the ASE technique, and one sample can be treated within 30 min; (2) the volume of the used solvent can be

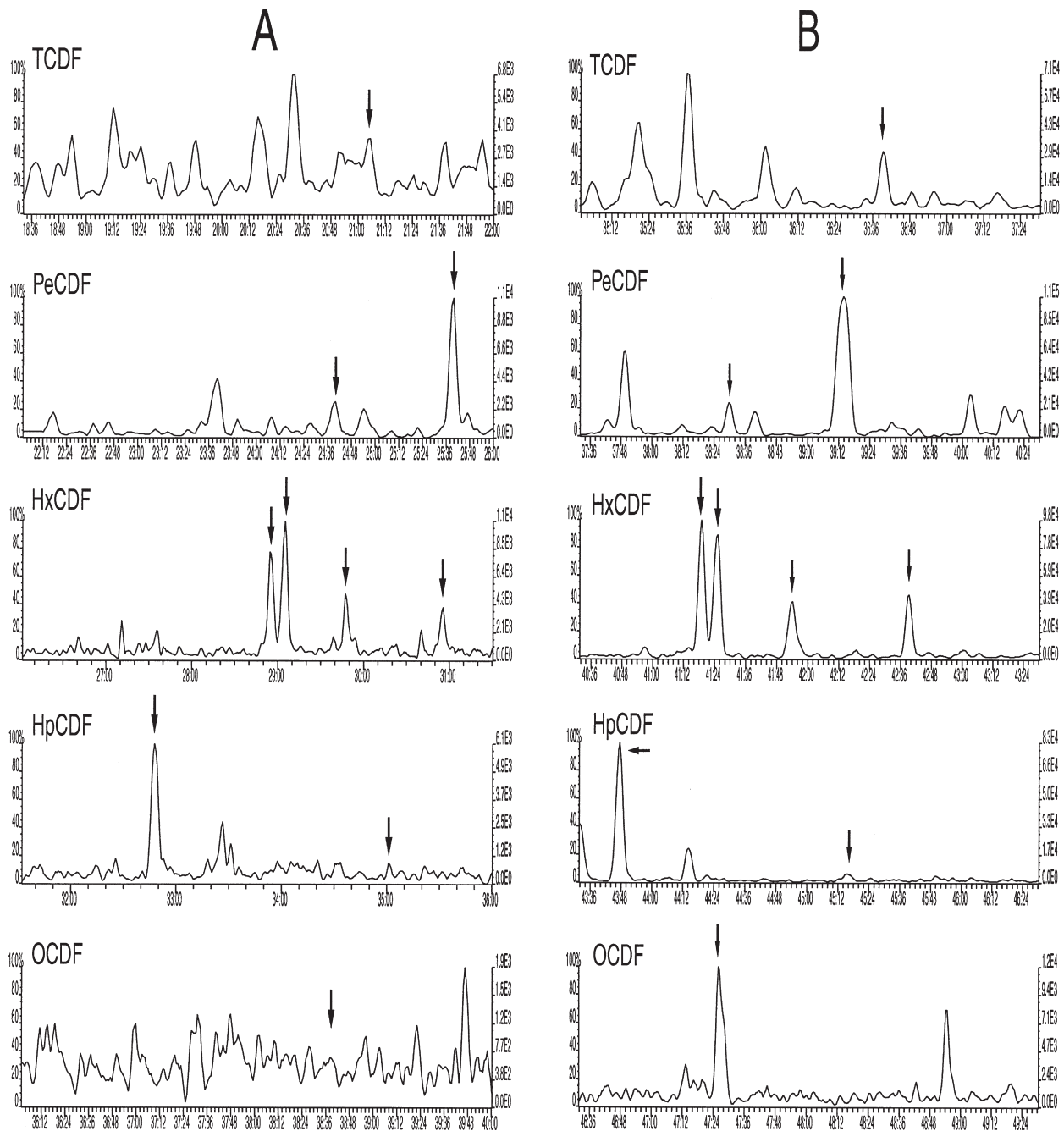


Fig. 2 High-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry chromatograms of PCDFs in the blood.

A, classical injection ($2 \mu\text{l}/5 \mu\text{l}$); B, SCLV injection ($10 \mu\text{l}/25 \mu\text{l}$).

reduced to one-quarter or more that of the conventional method by the simplified clean-up procedure; and (3) the improvement of the pretreatment method makes it possible to sufficiently reduce background levels such that they do not affect the

measurement of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs. However, when HpCDD and OCDD in blood samples are extracted by an ASE, they show high concentrations compared with those obtained by the conventional method. Although the cause of this phe-

Table 1 Extraction of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs from blood samples by ASE-200

Congeners	Concentration (pg/gLipid)						
	Conventional method	Acetone : Hexane (2 : 1)		Acetone : Hexane (1 : 4)		Hexane	
		Mean (n=3)	SD	Mean (n=3)	SD	Mean (n=3)	SD
2,3,7,8-TCDD	2.4	1.8	0.7	2.1	0.4	4.2	1.5
1,2,3,7,8-PeCDD	8.7	10.8	1.5	8.9	1.4	20.1	6.7
1,2,3,4,7,8-HxCDD	4.9	4.2	0.2	3.7	1.3	8.3	2.3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	34.1	32.3	2.7	31.6	0.8	71.6	9.4
1,2,3,7,8,9-HxCDD	5.2	6.7	0.7	5.2	0.8	14.5	3.2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	28.9	43.1	1.4	35.1	2.2	78.3	15.6
OCDD	247.5	567.4	34.1	395.3	30.6	764.7	149.3
2,3,7,8-TCDF	1.4	2.8	0.4	2.1	0.2	4.9	0.9
1,2,3,7,8-PeCDF	1.4	1.4	0.3	1.3	0.4	2.8	1.0
2,3,4,7,8-PeCDF	18.1	19.1	2.4	18.6	3.3	41.3	6.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	8.4	9.7	0.8	13.3	7.9	19.8	1.7
1,2,3,6,7,8-HxCDF	7.3	7.8	0.7	7.8	2.0	15.9	3.6
2,3,4,6,7,8-HxCDF	2.8	3.1	0.2	3.0	1.0	6.3	1.4
1,2,3,7,8,9-HxCDF	N.D.	2.5	0.4	2.6	0.5	5.0	1.7
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	4.2	5.8	0.8	4.8	0.6	10.6	1.1
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.	
OCDF	N.D.	N.D.		N.D.		5.2	3.3
344'5-TCB (# 81)	N.D.	N.D.		N.D.		11.2	2.5
33'44'-TCB (# 77)	10.8	35.9	7.4	28.0	0.3	38.2	8.2
33'44'5-PenCB (# 126)	82.8	81.8	4.6	75.0	2.6	168.4	27.3
33'44'55'-HxCB(# 169)	58.8	54.8	2.3	54.1	3.1	136.3	23.4
TotalPCDDs-TEQ	15.9	17.4	0.7	15.4	1.5	34.5	7.1
TotalPCDFs-TEQ	11.1	12.3	1.3	12.3	2.7	26.1	4.1
TotalPCDDs/PCDF	27.0	29.7	2.0	27.7	4.1	60.6	11.2
TotalCo-PCBs-TEQ	8.9	8.7	0.5	8.0	0.3	18.2	3.0
TotalTEQ	35.9	38.4	2.5	35.8	4.4	78.8	14.1
Lipid(%)	0.290	0.290	0.017	0.297	0.006	0.117	0.015

N.D., less than the determination limit.

nomenon is unclear, it is possible that these compounds are not fully extracted from the blood by the conventional method. But, since the TEF values of HpCDD and OCDD are small, at 0.01 and 0.0001, respectively, they do not significantly influence the total TEQ values on the lipid base. Nevertheless, this details need to be clarified. Another remaining problem that must be addressed is the high background values of 3, 3', 4, 4'-TCB (PCB 77), making it difficult to precisely measure the concentration.

In conclusion, an analytic method for measuring concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in blood samples as small as 5

g, and an efficient method for speeding up the pretreatment procedure for blood samples can be developed. The developed method is the most effective method for accurate measurement of PCDD, PCDF and Co-PCB concentrations using a blood volume of only 5 g. Moreover, this method allows many samples to be treated in a short period with high reproducibility in comparison with the conventional method. Using this method, we measured the concentrations of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in blood samples collected from 78 Yusho patients living in Fukuoka Prefecture in 2001.

Table 2 Recoveries of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs by the dev

Congeners	Recovery (n=19)	
	Mean	SD
¹³ C-2,3,7,8-TCDD	69.0	3.3
¹³ C-1,2,3,7,8-PeCDD	81.4	7.1
¹³ C-1,2,3,4,7,8-HxCDD	92.5	11.2
¹³ C-1,2,3,6,7,8-HxCDD	85.0	7.4
¹³ C-1,2,3,7,8,9-HxCDD	85.8	5.6
¹³ C-1,2,3,4,6,7,8-HpC	87.6	7.1
¹³ C-OCDD	81.7	12.0
¹³ C-2,3,7,8-TCDF	91.6	3.9
¹³ C-1,2,3,7,8-PeCDF	78.2	4.8
¹³ C-2,3,4,7,8-PeCDF	76.1	5.2
¹³ C-1,2,3,4,7,8-HxCDF	81.2	5.9
¹³ C-1,2,3,6,7,8-HxCDF	79.0	4.5
¹³ C-2,3,4,6,7,8-HxCDF	95.9	4.8
¹³ C-1,2,3,7,8,9-HxCDF	95.8	7.8
¹³ C-1,2,3,4,6,7,8-HpC	86.6	6.3
¹³ C-1,2,3,4,7,8,9-HpC	89.2	13.9
¹³ C-OCDF	87.7	18.5
¹³ C-33'45'-TCB(# 81)	66.3	2.9
¹³ C-33'44'-TCB(# 77)	63.9	2.3
¹³ C-33'44'5'-PenCB(# 126)	68.2	2.9
¹³ C-33'44'55'-HxCB(# 169)	73.5	5.6

Acknowledgment

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health Labour and Welfare,

Japan.

References

- 1) Bautz H, Polzer J and Stieglitz L : Comparison of pressurized liquid extraction

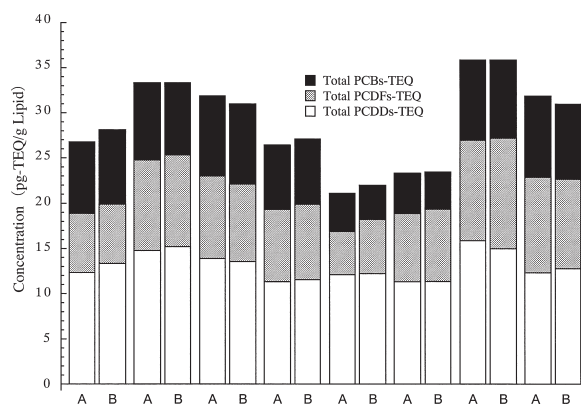


Fig. 3 Comparison of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs concentrations in the blood by the conventional method (A) and the developed method (B).

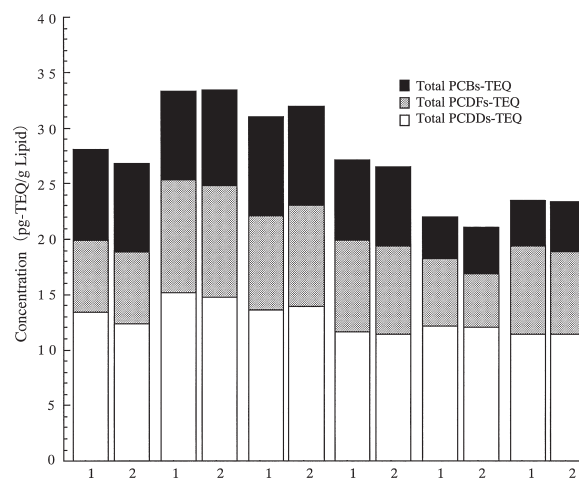


Fig. 4 Reproducibility test of the developed method.

- with Soxhlet extraction for the analysis of PCDDs and PCDFs from fly ash and environmental matrices. *Journal of Chromatography A*: 815, 231-241, 1998.
- 2) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Nakagawa R: Concentrations of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in blood of 83 patients with Yusho. *Fukuoka Acta Med.*, 88: 169-176, 1997.
 - 3) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Takenaka S, Yu M-L and Guo Y-LL: Recent trend of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and their related compounds in the blood and sebum of Yusho and Yu-Cheng patients. *Chemosphere* 38: 981-993, 1999.
 - 4) Matsumura T, Masuzaki Y, Ezaki T, Ohashi M, Morita M: Detection of low femto gram dioxins -Development of column switching-solvent cut large volume/multiple injection cryofocus trap GC-HRMS. *Organohalogen compounds*: 45, 25-28, 2000.
 - 5) Mccant DD, Inouye LS and McFarland VA: A One-Step ASE Extraction Method for TCDD TEQ Determination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*: 63, 282 - 288, 1999.
 - 6) Richter B E, Ezzell J L, Knowlcs D E and Hoefler F: Extraction of polychlorinated-p-dioxin and polychlorinated dibenzofurans from environmental samples using accelerated solvent extraction (ASE). *Chemosphere* 34: 975-987, 1997.
 - 7) Takenaka S, Hirakawa H, Nakamura M, Nakagawa R, Iida T and Todaka T: Follow-up survey of dioxins in the blood of Yusho patients (in 1998-1999), *Fukuoka Acta Med.*, 92: 139-148, 2001.
 - 8) Windal I, Miller DJ, Pauw ED and Hawthorne SB: Supercritical Fluid Extraction and Accelerated Solvent Extraction of Dioxins from High - and Low-carbon Fly Ash. *Analytical Chemistry* 72: 3916-3921, 2000.

(Received for publication April 1, 2003)

(和文抄録)

ヒト血液中ダイオキシン類分析の超高感度 ならびに迅速化に関する検討

社団法人 日本食品衛生協会

戸 高 尊

福岡県保健環境研究所

平 川 博 仙, 飛 石 和 大, 飯 田 隆 雄

5 g の血液量でダイオキシン類分析を可能にする測定系および血液試料の前処理法を検討した。すなわち、高速溶媒抽出装置による血液試料からの脂質の抽出法、従来法の 1/4 スケールでのカラムクリーンアップ法および大量溶媒注入装置 (SCLV injection system) を装備した HRGC/HRMS を用いて高感度測定の一連の分析方法について検討し、超高感度迅速分析法を確立した。大量溶媒注入装置の装備により HRGC/HRMS

の相対感度は 10 倍程度向上した。同一の血液を用いて行った従来法との比較検討結果から、5 g の血液量でもダイオキシン類濃度が十分測定可能であることを確認された。さらに、従来法に比べ血液試料の前処理段階で費やす時間を大幅に短縮することができた。本法は 5 g 程度の少量の血液量でダイオキシン類を測定できるだけでなく、多数のサンプルを効率よく、かつ迅速に処理するのに効果的な方法である。

Frequency of SCEs in Japanese Infants Exposed to Dioxins and PCBs through the Breast Milk

Junya NAGAYAMA and Mayumi NAGAYAMA

*Laboratory of Environmental Molecular Epidemiology, School of Health Sciences,
Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812-8582*

Takao IDA, Hironori HIRAKAWA and Takahiko MATSUEDA

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, Fukuoka 818-0135

Jun'ichiro FUKUSHIGE

Fukuoka Children's Hospital, Fukuoka 810-0063

Abstract Frequency of sister chromatid exchanges (SCEs), which has been considered an index to the synthetic and sharp genotoxic and clastogenic potencies, was examined by using the infant lymphocytes postnatal of around ten months, in order to evaluate the genotoxic or clastogenic potency of exposures to PCBs and dioxins through the breast milk. SCE frequency (mean \pm S.D.) as the control culture treated with the solvent, DMSO, alone (SCE_{control}) was 8.3 ± 1.1 /cell and that as the culture treated with 7,8-benzo-flavone (SCE_{ANF}) was 11.9 ± 1.5 /cell. In addition, the difference between SCE_{ANF} and SCE_{control}, that is, Δ SCEs was calculated 3.6 ± 1.5 /cell.

The intake of PCBs (mean \pm S.D.) through the breast milk in these infants was 133 ± 85 mg/kg body weight and that of dioxins 24 ± 13 TEQ-ng/kg body weight. PCBs intake in the average was about 5,500 times greater than that of dioxins. We however, could not find any significant effect of PCBs on the frequencies of SCEs. Dioxins, on the contrary, showed a significant negative relationship to the frequency of Δ SCEs. Therefore, exposure to dioxins through the breast milk seemed to elicit some genotoxic or clastogenic effects on Japanese general infants postnatal of around ten months.

Introduction

Foods in Japan have been polluted with some organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins which are polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and coplanar PCBs (Co-PCBs)¹⁴⁾²⁷⁾. So, Japanese people have also been contaminated with these compounds⁴⁾⁶⁾⁸⁾. Consequently, PCBs and dioxins have been determined in Japanese breast milk and respective median concentrations of PCBs and dioxins on lipid weight basis were about 110 ppb and 24 ppt as the 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin toxic equivalent (2,3,7,8-

TCDD TEQ)¹⁵⁾²⁶⁾. These results indicate that the median level of PCB was about 4, 600 times higher than that of dioxins in Japanese breast milk. Therefore, we should give due attention to possible health effects of not only dioxins but also PCBs in Japanese infants.

In particular, prenatal and suckling stages of human life as well as animal life are considered to be the highest sensitivity to these hazardous chemicals, because of their remarkably fast differentiation and growth. We have already done some works from this viewpoint and got several worthwhile findings¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾.

In the meantime, the formation mecha-

nism of sister chromatid exchanges (SCEs) has not been well clarified yet at present. SCEs, however, seem to be a good index to the synthetic and sharp genotoxic and clastogenic potencies for several chemicals⁹⁾¹⁰⁾²⁹⁾³²⁾. We have also been carried out several studies from this point of view and some important results have been obtained²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾.

In this study, changes of SCE frequency in the lymphocytes of Japanese infants lactationally exposed to PCBs and dioxins were investigated, in order to evaluate their genotoxic and clastogenic potencies.

Materials and Methods

Fifty to 100 ml of breast milk at the postpartum period of 2 to 4 month were collected from 124 healthy mothers in total, mean age: 29 years old and the range: 22 ~41 years old, in July to October, 1994 and in June to October, 1995 and 1996. These samples of the breast milk were analyzed for PCBs by ECD gas chromatography method¹¹⁾ and for dioxins by HRGC-HRMS technique using a Finnigan MAT-95 mass spectrometer (Germany) directly interfaced with Varian Model 3400 gas chromatograph⁷⁾¹²⁾¹⁵⁾.

Lymphocytes in the whole blood were stimulated with phytohemagglutinin and cultured for two replicative cycles in the presence of bromodeoxyuridine (100 mM) as detailed elsewhere²⁰⁾²³⁾²⁴⁾. Differential staining of sister chromatids was obtained by a fluorochrome plus Giemsa technique and the frequencies of control, solvent (DMSO) treated SCEs (SCE_{control}), 7,8-benzoflavone (ANF) treated SCEs (SCE_{ANF}) and Δ SCEs (SCE_{ANF} - SCE_{control}) were evaluated.

In order to get normal distribution, frequencies of SCE_{control}, SCE_{ANF} and Δ

SCEs and lactational exposures to PCBs and dioxins, namely, intakes of these compounds through the breast milk were transformed by a natural logarithm. Then, relationship between frequencies of SCE_{control}, SCE_{ANF} or Δ SCEs and the intakes of PCBs or dioxins was statistically examined by Spearman rank correlation method.

Toxic equivalent (TEQ) concentrations of the dioxins were calculated by using 1998 WHO TEF values³⁰⁾. TEQ-sum of all congeners of the dioxins determined in every breast milk sample was summarized as the total 2,3,7,8-TCDD TEQ concentration or level. Lactational exposure to PCBs or dioxins was estimated as a product of their respective daily intake, which was calculated with their respective level in the milk times an expected intake of breast milk in Japanese infant, that is, 120g/kg body weight, multiplied by individual duration (days) of breast feeding.

Five to 10 ml of the peripheral blood of 105 infants (60 males and 45 females with the mean age of 10 months old) born of these mothers were individually obtained by venipuncture in January ~ March of 1995, 1996 and 1997. Among them, SCE frequency of the lymphocytes was measured in 66 infants.

Results

- 1) SCE frequencies of the lymphocytes in the blood of Japanese infants

The frequency distributions of SCE_{control}, SCE_{ANF} and Δ SCEs of lymphocytes in the blood of infants are shown in Fig. 1. The mean value of SCE_{control} was 8.3/cell, and minimum and maximum ones were 6.5 and 12.4/cell, respectively. The average value of SCE_{ANF} was 11.9/cell, and the range was 9.1 ~ 15.6/cell. The mean of Δ SCE was 3.6/

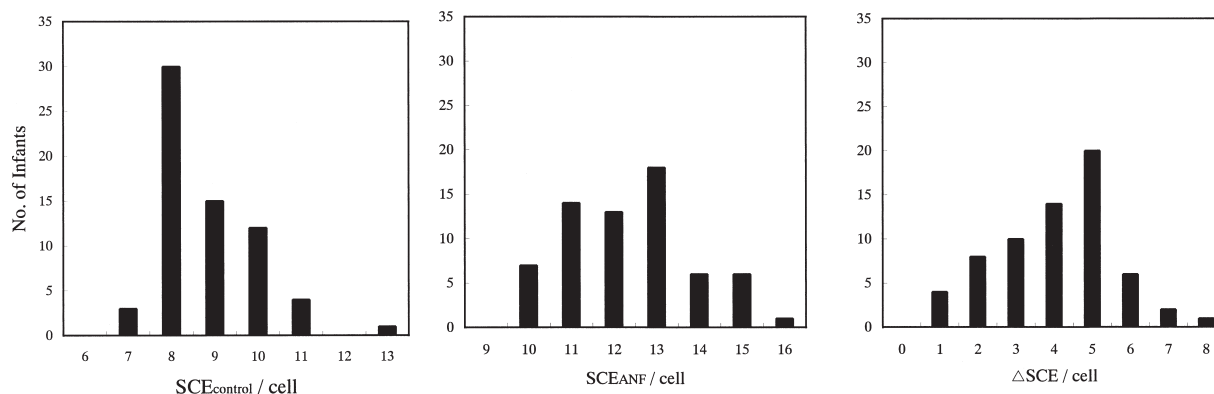


Fig. 1 Frequency distributions of $SCE_{control}$, SCE_{ANF} and ΔSCE s in the lymphocytes of Japanese infants around ten months old
left : $SCE_{control}$, middle : SCE_{ANF} , right : ΔSCE s

cell, and respective values of minimum and maximum were 0.2 and 7.2/cell.

2) Intakes of PCBs and dioxins through the breast milk in Japanese infants

The distributions of total intakes of PCBs and dioxins in Japanese infants during breast-fed periods are indicated in Fig. 2. In case of PCBs, the average intake was 133 mg/kg body weight, and the lowest and highest ones were 28 and 388 mg/kg body weight, respectively. The mean intake of dioxins was 24 TEQ-ng/kg body weight with the range of 3.9 ~ 65 TEQ-ng/kg body

weight. The average intake of PCBs was about 5,500 times greater than that of dioxins in Japanese infants of this study.

3) Relationships between lactational exposures to PCBs and dioxins and SCE frequencies of the lymphocytes

We could not find any correlation of the lactational exposures to PCBs with the frequencies of SCE control, SCE_{ANF} or ΔSCE s of the lymphocytes in the blood of Japanese infants.

In case of exposure to dioxins through the breast milk, dioxins did not show any signif-

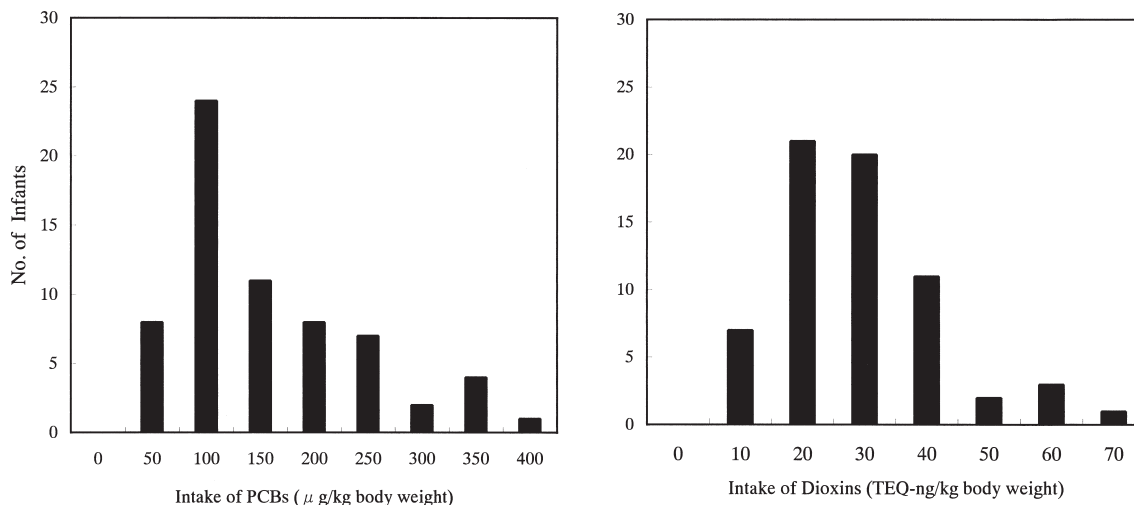


Fig. 2 Distributions in total intakes of PCBs (left) and dioxins (right) through the breast milk in Japanese infants postnatal of around ten months

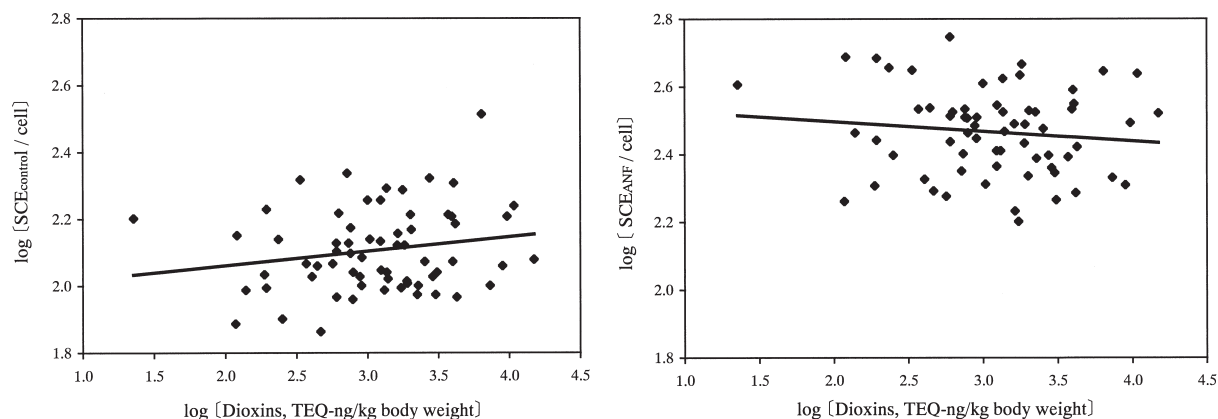


Fig. 3 Relationship between the exposure to dioxins through the breast milk and the frequency of SCE_{control} (left, $r=0.086$, $p=0.505$) or SCE_{ANF} (right, $r=-0.068$, $p=0.596$) of the lymphocytes in the blood of the Japanese infants postnatal of around ten months

icant relationship with frequencies of SCE_{control} and SCE_{ANF} of the lymphocyte, as indicated in Fig. 3. Frequency of Δ SCEs, however, of the lymphocytes in the blood of infants postnatal of around 10 months was significantly decreased with the increasing lactational exposure to dioxins ($r=-0.292$, $p=0.020$), as shown in Fig. 4.

Discussion

Some conflicting results have been reported about the effect of aging on the frequency of SCEs. In some studies, it has been shown that the SCE frequency in human lymphocytes was significantly in-

creased with an age³⁾²⁸⁾³¹⁾, and in others not¹⁾⁵⁾¹³⁾. In our studies, frequencies of both SCE_{control} and SCE_{ANF} in human lymphocytes at 20 ~ 64-year-old people were clearly enhanced with age²¹⁾²⁴⁾. In these investigations, average frequencies of SCE_{control} and SCE_{ANF} were 10.1 and 13.6/cell, respectively. In SCE frequency of this study, the former was 8.3/cell, and the latter 11.9/cell, which were apparently lower than the respective values in our previous studies. Based on these findings, it seems the SCE frequency probably increased with age in Japanese people.

In 0 ~ 75-year-old persons, SCE frequency of the lymphocytes in the umbilical cord blood was the highest, that at 1 ~ 5-year-old is the lowest and after these ages it increased with age²⁾. Further, we have to examine SCE frequency of the lymphocytes in umbilical cord blood or in the blood of newborn infant, in order to confirm their findings.

The estimated mean intake of PCBs was 133 mg/kg body weight and that of dioxins 24 TEQ-ng/kg body weight, which was four orders of magnitude lower than that of PCBs. In spite of such relatively large

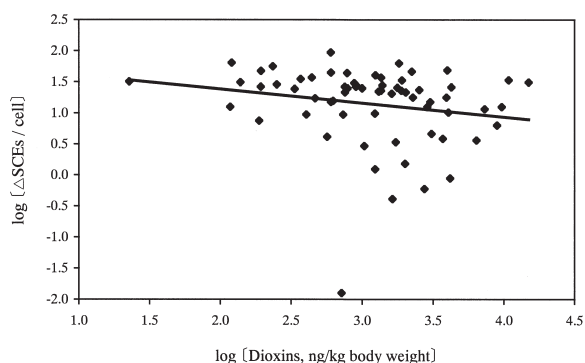


Fig. 4 Relationship between the lactational exposure to dioxins and the frequency of Δ SCEs of the lymphocytes in the Japanese infants around postnatal of ten months ($r=-0.292$, $p=0.020$)

amounts of intake, we have never observed the correlation of PCBs with any frequencies of SCE_{control}, SCE_{ANF} and Δ SCEs in the lymphocyte of Japanese breast-fed infants postnatal of around 10 months. Contrastively, lactational exposure to dioxins was significantly and negatively correlated with the Δ SCE frequency. At present, although we do not know the significance of this finding, the average intake of dioxins through the breast milk in Japanese general infants is about 30 times higher than the tolerable daily intake of dioxins in Japan, that is, 4 TEQ-pg/kg body weight²⁵). Therefore, this level of intake of dioxins may cause some adverse health effects in sucklings, which are one of the most sensitive stages in not only humans but also animals to toxic chemicals. In adults, however, we could not find any significant effect of dioxin like chemicals, mostly PCDFs, on the frequencies of SCE_{control}, SCE_{ANF} and Δ SCEs of the lymphocytes at the levels of more than 300 TEQ-pg/g on lipid weight basis in the blood, which was about 10 times higher than the Japanese normal contamination level of dioxins²³). Accordingly, infants or sucklings are considered more sensitive to dioxins and dioxin like chemicals than adults.

This study, however, was carried out with rather small number of infants, so in order to get more conclusive findings for the effects of dioxins on SCE frequency and for the evaluation of their genotoxic and clastogenic potencies, further large-scale investigations are needed.

References

- 1) Bender MA, Preston RJ, Leonard RC, Pyatt BE and Gooch PC: Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. II. Extension of age range. *Mutat. Res.* 212: 149-154, 1989.
- 2) Das BC, Rani R, Mitra AB and Luthra UK: Baseline frequency of sister-chromatid exchanges (SCE) in newborn lymphocytes and its relationship to in vivo aging in humans. *Mutat. Res.* 144: 85-88, 1985.
- 3) Dutkowski RT, Lesh R, Staiano-Coico L, Thaler H, Darlington GJ and Weksler ME: Increased chromosomal instability in lymphocytes from elderly humans. *Mutat. Res.* 149: 505-512, 1985.
- 4) Hirakawa H, Iida T, Matsueda T and Nagayama J: Concentrations and distribution of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in various tissues of Japanese. *Organohal. Comp.* 30: 127-130, 1996.
- 5) Hirsh BA, Sentz KK and McGue M: Genetic and environmental influences on baseline SCE. *Environ. Mol. Mutagen.* 20: 2-11, 1992.
- 6) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Nakagawa R, Hori T and Nagayama J: Concentrations of PCDDs, PCDFs, Co-PCBs and organochlorine pesticides in the blood and breast milk in Japanese women. *Organohal. Comp.* 44: 123-127, 1999.
- 7) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Takenaka S and Nagayama J: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds in breast milk of Japanese primiparas and multiparas. *Chemosphere* 38: 2461-2466, 1999.
- 8) Kashimoto T, Takayama K, Mimura M, Miyata H, Murakami Y and Matsumoto H: PCDDs, PCDFs, PCBs, coplanar PCBs and organochlorinated pesticides in human adipose tissue in Japan. *Chemosphere* 19: 921-926, 1989.
- 9) Latt SA: Sister chromatid exchange formation. *Ann. Rev. Genet.* 15: 11-55, 1981.
- 10) Latt SA, Allen JW, Shuler L, Loveday KS and Munrow SH: The detection and induction of sister chromatid exchange (INC-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology). *Mol. Hum. Cytogenet.* XII. 315-334, 1977.
- 11) Masuda Y, Kagawa R and Kuratsune M: Polychlorinated biphenyls in Yusho patients and ordinary persons. *Fukuoka Acta Med.* 65: 17-24, 1974 (in Japanese).

- 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) Musilova J, Michalova K and Pacovsky V : Induction of sister chromatid exchanges by mitomycin C in lymphocytes of young and old human donors. *Gerontology* 30 : 365-370, 1984.
- 14) Nakagawa R, Hirakawa H and Hori T : Estimation of 1992-1993 dietary intake of organochlorine and organophosphorus pesticides in Fukuoka, Japan. *J.AOAC International* 78 : 921-929, 1995.
- 15) Nakagawa R, Hirakawa H, Iida T, Matsueda T and Nagayama J : Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins. *J. AOAC International* 82 : 716-724, 1999.
- 16) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T and Watanabe T : Developmental condition in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 48 : 244-247, 2000.
- 17) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T and Watanabe T : Effects of exposure to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins through human milk on total development in 10-month-old Japanese infants. *Organohal. Comp.* 48 : 240-243, 2000.
- 18) Nagayama J, Tsuji H, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T : Condition of helper and suppressor T lymphocyte subpopulations in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 49 : 87-90, 2000.
- 19) Nagayama J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T : Condition of thyroid hormone system in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 48 : 236-239, 2000.
- 20) 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 : 2349-2345, 1994.
- 21) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Effects of donor age on frequency of sister chromatid exchanges and accumulation of dioxins and related chemicals in healthy Japanese. *Organohal. Comp.* 44 : 197-200, 1999.
- 22) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Comparison of frequency of sister chromatid exchanges and contamination level of dioxins and related chemicals in healthy Japanese and "Yusho" patients. *Organohal. Comp.* 44 : 31-35, 1999.
- 23) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Comparison between "Yusho" patients and healthy Japanese in contamination level of dioxins and related chemicals and frequency of sister chromatid exchanges. *Chemosphere* 43 : 931-936, 2001.
- 24) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Effects of donor age on frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes cultured in vitro. *Chemosphere* 43 : 845-849, 2001.
- 25) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Yanagawa T and Fukushige J : Effect of dioxins in mother's milk on sister chromatid exchange frequency in infant lymphocytes. *Fukuoka Acta Med.* 92 : 177-183, 2001.
- 26) Nagayama J, Tsuji H, Okamura K, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Hasegawa M, Sato K, Tomita A, Yanagawa T, Igarashi H, Fukushige J and Watanaba T : Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls on lymphocyte subpopulations and thyroid hormone status in Japanese breast-fed infants. *Organohal. Comp.* 37 : 163-167, 1998.
- 27) Ogaki J, Takayama K, Miyata H and Kashimoto T : Levels of PCDDs and

- PCDFs in human tissues and various food-stuffs in Japan. *Chemosphere* 16: 2047-2056, 1987.
- 28) Sarto F, Faccioli MC, Cominato I and Levis AG: Aging and smoking increase the frequency of sister-chromatid exchanges (SCE) in man. *Mutat. Res.* 144: 183-187, 1985.
- 29) Stetka DG and Wolff S: Sister chromatid exchanges as assay for genetic damage induced by mutagens-carcinogens II. In vitro test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 41: 343-350, 1976.
- 30) Van den Berg M, Birnbaum LS, Bosveld ATC, Brunstorm B et al.: Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106: 775-792, 1998.
- 31) Wen WN, Liew TL, Wu SW and Jan KY: The effect of age and cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocytes cultured in vitro. *Mech. Ageing Dev.* 21: 377-384, 1983.
- 32) Wolff S: Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and the lesions that produce them. In Wolff S (ed): *Sister Chromatid Exchange*. pp. 41-57, Wiley, New York, 1982.

(Received for publication April 1, 2003)

(和文抄録)

乳児リンパ球細胞の姉妹染色分体交換頻度への授乳による PCBs と ダイオキシン類の影響

九州大学医学部保健学科環境分子疫学研究室

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

福岡市立こども病院

福重 淳一郎

姉妹染色分体交換 (Sister chromatid exchanges, SCEs) はこれまで総合的で鋭敏な遺伝毒性あるいは染色体傷害性の指標として知られている。この研究では授乳による PCBs とダイオキシン類への曝露と遺伝毒性の関係を調べる目的で、生後 10 ヶ月前後の一見健康な乳児の末梢血リンパ球細胞の SCEs 頻度と PCBs やダイオキシン類への曝露との関係を統計学的に解析した。

溶媒のみ処理したコントロール群の SCEs 頻度 (SCEcontrol) (平均値±標準偏差, 以下同様) は 8.3 ± 1.1 /細胞であり, 7,8-ベンゾフラボン (ANF) 処理した場合のそれ (SCEANF) は 11.9 ± 1.5 /細胞であった。また両者の差, つまり, Δ SCEs (SCEANF - SCEcontrol) は 3.6 ± 1.5 /細胞であった。また, これらの乳児の PCBs の母乳からの摂取量は 133 ± 85 mg/kg 体重であり, ダイオキシン類では 24 ± 13 TEQ-ng/kg 体重であった。

したがって授乳による PCBs の摂取量はダイオキシン類よりも約 5,500 倍多かった。

PCB への授乳による乳児の曝露量はダイオキシン類よりもはるかに多いにもかかわらず, PCBs と SCEs 頻度との関連性は SCEcontrol, SCEANF および Δ SCEs のいずれに対しても認められなかった。しかしダイオキシン類の場合には, 統計的に有意ではないけれども母乳からの摂取量が増えるにしたがって SCEcontrol が上昇し, また逆に SCEANF は減少する傾向を示した。その結果, Δ SCEs の有意な低下が観察された。

このような SCEs 頻度への影響がどのような臨床上的疾病と関連するのか現時点では定かでないが, ダイオキシン類への授乳期の曝露が次世代に対して何らかの遺伝毒性あるいは染色体傷害性作用を有する可能性が示唆されたのであり, 今後, さらに詳細な研究を行う必要がある。

Frequency of SCEs in Japanese Infants Lactationally Exposed to Organochlorine Pesticides

Junya NAGAYAMA and Mayumi NAGAYAMA

*Laboratory of Environmental Molecular Epidemiology, School of Health Sciences,
Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812-8582*

Reiko NAKAGAWA, Hironori HIRAKAWA, Takahiko MATSUEDA and Takao IIDA
Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, Fukuoka 818-0135

Jun'ichiro FUKUSHIGE

Fukuoka Children's Hospital, Fukuoka 810-0063

Abstract Changes in the frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) in cultured mammalian cells have been considered as indices to the synthetic and sharp genotoxic and clastogenic potencies. Frequency of SCEs in cultured lymphocyte obtained from infants postnatal of around ten months was examined to evaluate the genotoxic or clastogenic potency of lactational exposures to some organochlorine pesticides such as HCHs, DDT and chlordane in this study.

Frequency (median, min. ~ max.) of SCEs as the control culture treated with the solvent, DMSO, alone (SCE control) was 8.0/cell, 6.5 ~ 12.4/cell, that as the culture treated with 7,8-benzoflavone (SCE_{ANF}) was 11.8/cell, 9.1 ~ 15.6/cell and the difference between SCE_{ANF} and SCE_{control}, that is, Δ SCEs was 3.9/cell, 0.2 : 7.2/cell. Lactational exposures (median, min. ~ max.) to the three organochlorine pesticides were as follows: HCHs; 341 mg/kg body weight, 43 ~ 1449 mg/kg body weight, DDT; 272 mg/kg body weight, 33 ~ 1361 mg/kg body weight and chlordane; 69 mg/kg body weight, 13 ~ 379 mg/kg body weight.

The median exposure level to chlordane through the breast milk was one fourth to one fifth times lower than that to HCHs or DDT and probably due to such small amounts of its intake, we could not find any correlation of chlordane with frequencies of SCE_{control}, SCE_{ANF} and Δ SCEs in cultured lymphocytes of Japanese infants postnatal of about ten months. In the meantime, frequencies of SCE_{control} and SCE_{ANF} showed increasing and decreasing tendencies with the increasing exposure to DDT and also HCHs through the breast milk. In consequence, the frequency of Δ SCEs was significantly lowered. Therefore, lactational exposure to DDT and HCHs seemed to elicit some genotoxic or clastogenic effects on Japanese general infants at ages of around the months. These compounds were also considered rather potent S-dependent clastogens than non-S-dependent ones. So, further detailed studies are needed not only to get conclusive findings but also from this viewpoint.

Introduction

Our environments including food have been polluted with some organochlorine compounds such as polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated

biphenyls (PCBs) and pesticides¹¹⁾²⁷⁾. Accordingly, Japanese people have also been contaminated with these compounds³⁾⁶⁾. Some pesticides such as hexachlorocyclohexans (HCHs), 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl)-ethane (DDT), dieldrin, heptachlor epoxide (HCE) and chlor-

dane have been determined in Japanese breast milk⁴⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾²⁴⁾. Their levels in the breast milk were more than 100 to 10,000 times higher than those of PCDDs and PCDFs, which were so-called dioxins, in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) toxic equivalent (TEQ) value, as indicated in the above mentioned studies. Therefore, we should give due attention to possible health consequences of these pesticides as well as PCDDs and PCDFs. In particular, prenatal and suckling stages of not only humans but also animals are considered the highest sensitivity to these compounds, because of their remarkably rapid differentiation and growth.

In the meantime, cytogenetic changes such as micronucleated cells (MNs) and sister chromatid exchanges (SCEs) have frequently been utilized as indicators of mostly genetic damage due to exposure to different carcinogens or mutagens. These two cytogenetic changes are considered to occur as results of different mechanisms of DNA or chromosome damage. MNs have been considered to be the result of chromosomes lagging behind the genome at cell division. On the other hand, SCEs are formed during the S phase after an initial change in the form of DNA base damage²⁸⁾, when quadriradials as mitotic chiasmata are a consequence of mitotic crossing over³⁰⁾. Changes in frequency of MNs and SCEs have been considered good indices to the synthetic and sharp genotoxic or clastogenic potency for several chemicals⁷⁾⁸⁾²⁶⁾²⁹⁾. We have already carried out several studies from this viewpoint and some valuable results have been obtained¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾.

In this study, changes of SCEs frequency in cultured lymphocytes of Japanese infants exposed to HCHs, DDT and chlordane

through the breast milk were investigated, in order to evaluate their genotoxic and clastogenic potencies.

Materials and Methods

Fifty to 100 ml of breast milk at the postpartum period of 2nd to 4th month were collected from 124 healthy mothers in total, mean age: 29 years old and the range: 22 ~ 41 years old, in July to October, 1994 and in June to October, 1995 and 1996. These samples of the breast milk were analyzed for HCHs, DDT and chlordane by ECD gas chromatography method¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾²⁴⁾.

Lactational exposure to these pesticides was estimated as a product of their respective daily intake, which was calculated with their respective level in the milk times an expected intake of breast milk in Japanese infants, that is, 120g/kg body weight, multiplied by individual duration (days) of breast feeding.

Five to 10 ml of the peripheral blood of 105 infants (60 males and 45 females with the mean age of 10 months old) born of these mothers were individually obtained by venipuncture in January ~ March of 1995, 1996 and 1997. Among them, SCE frequency of the lymphocytes was measured in 63 infants.

Lymphocytes in the whole blood were stimulated with phytohemagglutinin and cultured for two replicative cycles in the presence of bromodeoxyuridine (100 mM) as detailed elsewhere¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²³⁾. Differential staining of sister chromatids was obtained by a fluorochrome plus Giemsa technique and the frequencies of control, solvent (DMSO) treated SCEs (SCE_{control}), 7,8-benzoflavone (ANF) treated SCEs (SCE_{ANF}) and Δ SCEs (SCE_{ANF} - SCE_{control}) were evaluated.

In order to get normal distribution, fre-

quencies of SCE_{control}, SCE_{ANF} and Δ SCEs and lactational exposures to HCHs, DDT and chlordane, namely, intakes of these compounds through the breast milk were transformed by a natural logarithm. Then, relationship between SCE_{control}, SCE_{ANF} or Δ SCEs and the intakes of the organochlorine pesticides was statistically examined by Spearman rank correlation method.

Results

The distributions in the total intakes of HCHs, DDT and chlordane in Japanese infants during breast-fed periods are shown in Fig. 1. Total intakes (median, min. \sim max.) of HCHs (mostly β -HCH), DDT (sum of *p*, *p'*-DDE and *p*, *p'*-DDT) and chlordane (sum of oxychlordane, *trans*-nonachlor and *cis*-nonachlor) were as follows: HCHs; 341 mg/kg body weight, 43 \sim 1449 mg/kg body weight, DDT; 272 mg/kg body weight, 33 \sim 1361 mg/kg body weight and chlordane; 69 mg/kg body weight, 13 \sim 379 mg/kg body weight. Median intake of chlordane were one order of magnitude lower than that of HCHs or DDT.

Frequencies (median, min. \sim max.) of SCE_{control}, SCE_{ANF} and Δ SCEs of cultured lymphocytes in the blood of 63 Japanese breast-fed infants were 8.0/cell, 6.5 \sim 12.4/cell, 11.8/cell, 9.1 \sim 15.6/cell and 3.9/cell, 0.2 \sim 7.2/cell, respectively.

We could not find any significant relationship between the lactational exposure to chlordane and the frequency of SCE_{control}, SCE_{ANF} or Δ SCEs. Significant correlations were not observed either between the frequency of SCE_{control} or SCE_{ANF} and the intake of HCHs or DDT. Fig. 2 indicates the correlations of the lactational exposure to DDT with the frequency of SCE_{control} or SCE_{ANF}. We, however, could see that the frequency of Δ SCEs of lymphocytes in the blood of infants postnatal of around ten months was significantly decreased with the increasing intake of DDT through the breast milk ($r = -0.247$, $p = 0.050$), as shown in Fig. 3. This kind of relationship was also observed between the exposure to HCHs and the frequency of Δ SCEs ($r = -0.274$, $p = 0.065$), which was indicated in Fig. 4.

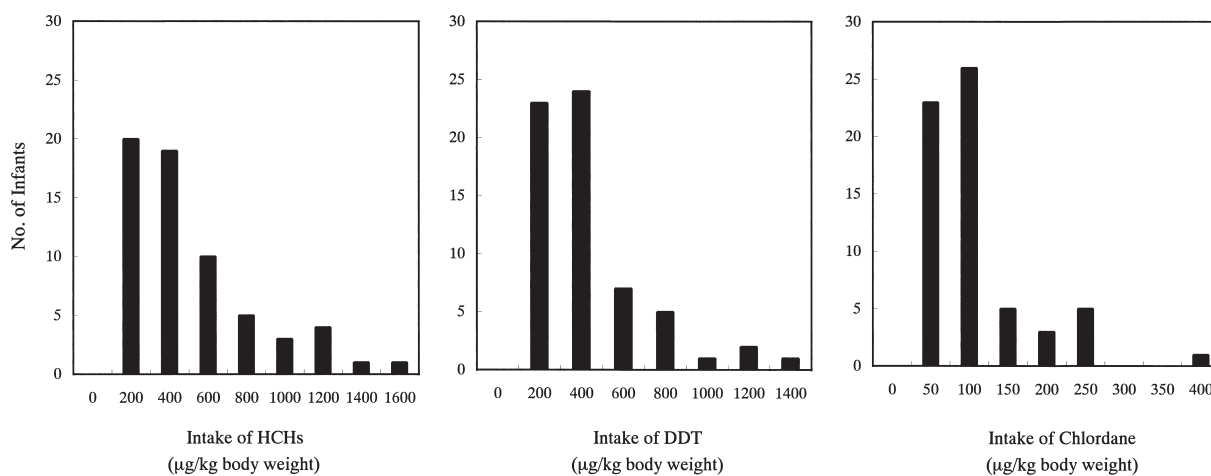


Fig. 1 Distributions in total intakes of HCHs* (left), DDT** (middle) and chlordane*** (right) through the breast milk in Japanese infants postnatal of around ten months
* ; mostly β -HCH, ** ; sum of *p*, *p'*-DDE and *p*, *p'*-DDT, *** ; sum of oxychlordane, *trans*-nonachlor and *cis*-nonachlor

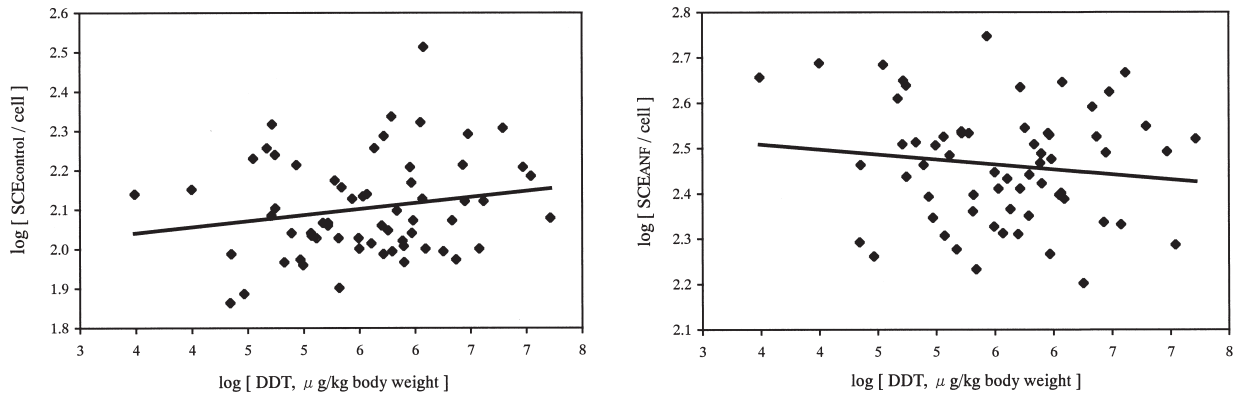


Fig. 2 Relationship between the exposure to DDT through the breast milk and the frequency of SCEcontrol (left, $r=0.109$, $p=0.405$) or SCEANF (right, $r=-0.029$, $p=0.824$) of the lymphocytes in the blood of the Japanese infants postnatal of around ten months

Discussion

The estimated median intake of chlordane was 69 mg/kg body weight, which was one fourth to one fifth of that of HCHs or DDT. Probably due to such small amounts of intake of chlordane through the breast milk, we could not observe any correlation of chlordane with frequencies of SCEcontrol, SCEANF and Δ SCEs in cultured lymphocytes of Japanese infants postnatal of around ten months.

Figs. 2 and 3 show relationship between the lactational exposure to DDT and the

frequency of SCEcontrol, SCEANF or Δ SCEs. Frequencies of SCEcontrol and SCEANF showed increasing and decreasing tendencies with the increasing intake of DDT through the breast milk, respectively. Same kinds of tendencies were also seen in HCHs of this study and in case of dioxins¹⁶. Increasing exposures to DDT, HCHs and dioxins through the breast milk significantly lowered the frequency of Δ SCEs, as indicated in Figs. 3 and 4, and our paper¹⁶. Frequency of Δ SCEs has been considered more sensitive biomarker than that of SCEcontrol or SCEANF in the evaluation of

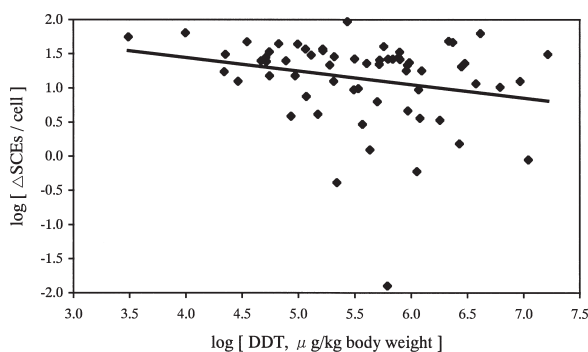


Fig. 3 Relationship between the lactational exposure to DDT and the frequency of Δ SCEs of the lymphocytes in the Japanese infants postnatal of around ten months ($r=-0.247$, $p=0.050$)

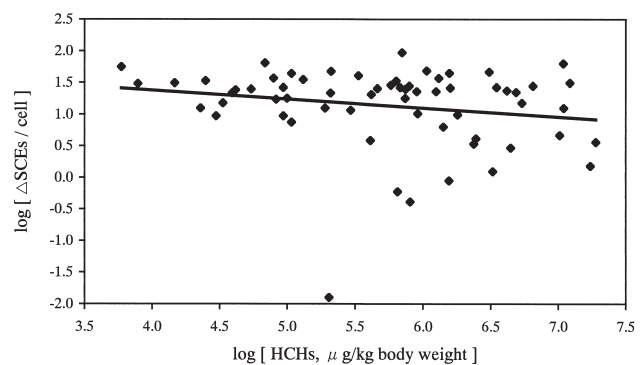


Fig. 4 Correlation of exposure to HCHs through the breast milk with the frequency of Δ SCEs of the lymphocytes in the blood of the Japanese infants ($r=-0.274$, $p=0.065$)

genotoxic and clastogenic potencies¹⁾⁹⁾¹⁰⁾. Although we do not know the significance of these findings at present, lactational exposures to these organochlorine compounds seem to elicit some genotoxic or clastogenic effects in Japanese general infants postnatal of around ten months.

The types of mutations which could contribute to spontaneous MNs 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 endogeneously or as a result of exposure to environmental mutagens which may result in acentric chromosome fragments²⁾. Therefore, the assay of MNs can detect both clastogens and spindle poisons and can be preferentially used to estimate the dose of ionizing radiations or truly radiomimetic (non-S-dependent) chemicals to which people have been exposed. On the other hand, SCEs, which are not readily induced by ionizing radiations or non-S-dependent clastogens, have proved to be the most sensitive mammalian genotoxic endpoint for determining exposure to S-dependent chemicals, because SCEs are considered to form during the S-phase of the cell cycle³⁰⁾, probably at DNA replication forks or sites where replication is incomplete⁵⁾²⁵⁾. Therefore, according to the results of this study and our other investigations¹⁶⁾²²⁾, DDT, HCHs and dioxins seemed rather potent S-dependent clastogens than non-S-dependent ones.

References

- 1) Colman GW, Lundgren K, Shore D, Thomason CL and Lucier GW: Effects of a-naphthoflavone on levels of sister chromatid exchanges in lymphocytes from active and passive cigarette smokers: dose-response relationships. *Cancer Res.* 46: 6452-6455, 1986.
- 2) 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.
- 3) Hirakawa H, Iida T, Matsueda T and Nagayama J: Concentrations and distribution of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in various tissues of Japanese. *Organohal. Comp.* 30: 127-130, 1996.
- 4) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Nakagawa R, Hori T and Nagayama J: Concentrations of PCDDs, PCDFs, Co-PCBs and organochlorine pesticides in the blood and breast milk in Japanese women. *Organohal. Comp.* 44: 123-127, 1999.
- 5) Ishii Y and Bender MA: Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cell. *Mutation Res.* 79: 19-32, 1980.
- 6) Kashimoto T, Takayama K, Mimura M, Miyata H, Murakami Y and Matsumoto H: PCDDs, PCDFs, PCBs, coplanar PCBs and organochlorinated pesticides in human adipose tissue in Japan. *Chemosphere* 19: 921-926, 1989.
- 7) Latt SA: Sister chromatid exchange formation. *Ann. Rev. Genet.* 15: 11-55, 1981.
- 8) Latt SA, Allen JW, Shuler L, Loveday KS and Munrow SH: The detection and induction of sister chromatid exchange (INC-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology). *Mol. Hum. Cytogenet.* XII. 315-334, 1977.
- 9) Lundgren K, Andries M, Thompson C and Lucier GW: Dioxin treatment of rats in increased in vitro induction of sister chromatid exchanges by a-naphthoflavone: an animal model for human exposure to halogenated aromatics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85: 198-195, 1986.
- 10) 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.
- 11) Nakagawa R, Hirakawa H and Hori T: Estimation of 1992-1993 dietary intake of

- organochlorine and organophosphorus pesticides in Fukuoka, Japan. *J.AOAC International* 78 : 921-929, 1995.
- 12) Nakagawa R, Hirakawa H, Iida T, Matsueda T and Nagayama J : Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins. *J. AOAC International* 82 : 716-724, 1999.
 - 13) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T and Watanabe T : Developmental condition in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 48 : 244-247, 2000.
 - 14) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T and Watanabe T : Effects of exposure to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins through human milk on total development in 10-month-old Japanese infants. *Organohal. Comp.* 48 : 240-243, 2000.
 - 15) Nagayama J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T : Condition of thyroid hormone system in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 48 : 236-239, 2000.
 - 16) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Fukushige J : Frequency of SCEs in Japanese infants exposed to dioxins and PCBs through the breast milk. *Fukuoka Acta Med.* In press.
 - 17) 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 : 2349-2345, 1994.
 - 18) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Comparison between "Yusho" patients and healthy Japanese in contamination level of dioxins and related chemicals and frequency of sister chromatid exchanges. *Chemosphere* 43 : 931-936, 2001.
 - 19) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Effects of donor age on frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes cultured in vitro. *Chemosphere* 43 : 845-849, 2001.
 - 20) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Effects of donor age on frequency of sister chromatid exchanges and accumulation of dioxins and related chemicals in healthy Japanese. *Organohal. Comp.* 44 : 197-200, 1999.
 - 21) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Comparison of frequency of sister chromatid exchanges and contamination level of dioxins and related chemicals in healthy Japanese and "Yusho" patients. *Organohal. Comp.* 44 : 31-35, 1999.
 - 22) Nagayama J, Nagayama M and Masuda Y : Frequency of micronuclei induced in cultured human lymphocytes by highly toxic organochlorine congeners. *Fukuoka Acta Med.* 84 : 189-194, 1993.
 - 23) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Yanagawa T and Fukushige J : Effect of dioxins in mother's milk on sister chromatid exchange frequency in infant lymphocytes. *Fukuoka Acta Med.* 92 : 177-183, 2001.
 - 24) Nagayama J, Tsuji H, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T : Condition of helper and suppressor T lymphocyte subpopulations in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 49 : 87-90, 2000.
 - 25) Painter RB : A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Res.* 70 : 337-341, 1980.
 - 26) Stetka DG and Wolff S : Sister chromatid exchanges as assay for genetic damage induced by mutagens-carcinogens II. In vitro test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 41 : 343-350, 1976.
 - 27) Swedish Environmental Protection Agency : Persistent Organic Pollutants pp. 9-129, ISBN 91-620-1189-8, ISSN 1100-23X, 1998.
 - 28) Uggla AH and Natarajan AT : X-ray-

- induced SCEs and chromosomal aberrations in CHO cells. Influence of nitrogen and air during irradiation in different stages of the cell cycle. *Mutation Res.* 122 : 193-200, 1983.
- 29) Wolff S : Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and the lesions that produce them. In Wolff S (ed) : *Sister Chromatid Exchange*. pp. 41-57, Wiley, New York, 1982.
- 30) 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 April 1, 2003)

(和文抄録)

乳児リンパ球細胞の姉妹染色分体交換頻度への授乳による農薬の影響

九州大学医学部保健学科環境分子疫学研究室

長山 淳哉, 長山 真弓

福岡県保健環境研究所

中川 礼子, 平川 博仙, 松枝 隆彦, 飯田 隆雄

福岡市立こども病院

福重 淳一郎

総合的で鋭敏な遺伝毒性指標として知られている姉妹染色分体交換 (Sister chromatid exchanges, SCEs) 頻度を用いて, 授乳による HCHs, DDT およびクロルデンへの曝露と乳児リンパ球細胞の SCEs 頻度との関係を数理統計学的に調べた。

リンパ球細胞の培養中に溶媒 (DMSO) のみ処理したコントロール群の SCEs 頻度すなわち SCEcontrol (中央値, 最小値~最大値, 以下同様) は 8.0/細胞, 6.5~12.4/細胞, 7,8-ベンゾフラボン (ANF) 処理した場合の SCEs 頻度, SCEANF は 11.8/細胞, 9.1~15.6/細胞, また両者の差 $SCE_{ANF} - SCE_{control}$, Δ SCEs は 3.9/細胞, 0.2~7.2/細胞であった。母乳からの有機塩素系農薬の摂取量は次のようである。HCHs ; 341 mg/kg 体重, 43~1449 mg/kg 体重, DDT ; 272 mg/kg 体重, 33~1361 mg/kg 体重, クロルデン ; 69 mg/kg 体重, 13~379 mg/kg 体重。

クロルデンの授乳による曝露量は中央値と比較すると HCHs と DDT の 4 分の 1 から 5 分の 1 程度と少なく, SCEs 頻度との関係も認められなかった。一方, HCHs と DDT については母乳からのこれらの農薬の摂取量が増加するにつれて有意ではないけれども SCEcontrol が上昇し, 逆に SCEANF が減少する傾向が観察された。その結果, いずれの農薬でも Δ SCEs 頻度の有意な低下が認められた。このような SCEs への影響が臨床上的どのような意義があるのか不明であるが, HCHs や DDT への授乳期の曝露が次世代に対して何らかの遺伝毒性作用を及ぼす可能性が示唆されたのであり, 今後, さらに詳細な研究が必要である。また同様の結果は母乳からのダイオキシン類への曝露でも観察されているが, SCEs への影響は細胞分裂の S 期依存型遺伝毒性物質とみなされ, この視点からの研究も重要である。

2,3,3',4,4'-五塩素化ビフェニル (CB105) のハムスターにおける代謝

中村学園大学栄養科学部栄養科学科
古賀 信幸, 金丸 知代
第一薬科大学環境化学教室
黒木 広明
第一薬科大学健康化学教室
原口 浩一
静岡県立大学薬学部薬剤学教室
加藤 善久, 木村 良平

Metabolism of 2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl in Hamsters

Nobuyuki KOGA¹⁾, Hiroaki KUROKI²⁾, Koichi HARAGUCHI²⁾, Tomoyo KANAMARU¹⁾,
Yoshihisa KATO³⁾ and Ryohei KIMURA³⁾

¹⁾ *Department of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University,
5-7-1, Befu, Johnan-ku, Fukuoka 814-0198*

²⁾ *Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1, Tamagawa-cho,
Minami-ku, Fukuoka, 815-8511*

³⁾ *School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka,
52-1, Yada, Shizuoka 422-8526*

Abstract The in vivo metabolism of 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (CB105) was studied in hamsters and the effect of cytochrome P450 inducers, phenobarbital (PB) and 3-methylcholanthrene (MC) on its metabolism was compared to rats. After administration of CB105 intraperitoneally at a dose of 3 mg/body, four metabolites, named M-1, M-2, M-3 and M-4, were detected in 5 days-feces of all groups and the formation ratio of the metabolites M-1 ~ M-4 was 1:39:84:0.2 in untreated hamsters and 1:19:6.7:0.7 in untreated rats. On the basis of the mass spectra of four synthetic authentic compounds and the retention times on DB-1 and MPS50 columns, M-1, M-2, M-3 and M-4 were identified as 4'-hydroxy-2,3,3',4,5'-PenCB, 5'-hydroxy-CB105, 5-hydroxy-CB105 and 4-hydroxy-2,3,3',4',5-PenCB, respectively. The pretreatment of PB and MC resulted in about 2-fold fecal excretion of four metabolites in hamsters and in about 3-fold in rats. Of four metabolites, only M-4 were detected in the serum at 5 days after CB105 administration and the concentration was 0.39 $\mu\text{g/ml}$ of hamster serum and 0.28 $\mu\text{g/ml}$ of rat serum. In hamsters, the concentration of M-4 was increased to 1.8-fold of untreated animals by PB treatment and 2.6-fold by MC treatment. On the other hand, the treatment of rats with PB and MC did not show such an increase of serum M-4. These results suggested that the hamster oxidized 2,3,4-trichloro-substituted benzene ring predominantly rather than 3',4'-dichloro-substituted benzene ring differently from the rat and that M-4 formed in hamster liver distributed to the blood and retained there to a considerable extent in comparison with that formed in rat liver.

はじめに

2,3,3',4,4'-五塩素化ビフェニル (PenCB) (CB 105) はカネミ油症の原因物質である PCB 製品 (Kanechlor 400) の成分の1つであるとともに、油症患者の血清中 PCB 成分のうちで、健常者

よりも濃度が低い成分として知られている。すなわち、黒木と増田は、血清中 PCB 異性体のうち、2,3',4,4',5-PenCB (CB 118) 及び CB 105 が、健常人に比べ油症患者で少ないかあるいは消失していることを報告した¹⁸⁾。この事実は、油症患者において多量摂取された PCB によってチトクロム

P 450 (P 450) が誘導され、さらに誘導された P 450 によって上記 PenCB の代謝が促進されたものと考えられる。

PCB は肝 P 450 を中心とした肝薬物代謝酵素に対し強い誘導作用を有することが報告されている¹⁹⁾²²⁾。また、その誘導様式の違いから、phenobarbital (PB) 型、3-methylcholanthrene (MC) 型および混合型に分類されている。PB 型には、2(2') 位あるいは 6(6') 位に 1~2 個塩素が置換された PCB 異性体 (mono-ortho-および di-ortho-PCB) が含まれ、また、MC 型には 3,3',4,4'-四塩素化ビフェニル(TCB), 3,3',4,4',5-PenCB および 3,3',4,4',5,5'-六塩素化ビフェニルなどの coplanar な PCB 異性体が含まれる。なお、前出の CB 118 と CB 105 は mono-ortho-PCB であるが coplanar PCB の性質も有することから混合型に分類されている¹⁹⁾。

一方、CB 105 の代謝に関する研究は報告がほとんどない。山本らはラットに CB 105 を経口投与し、投与後 8 日間の糞、尿及び組織を調べた結果、全く代謝物は検出されなかったと報告した²⁰⁾。その後、Klasson-Wehler らは、CB 105 を経口投与したマウスとミンクにおける in vivo 代謝を調べ、その結果、いずれの動物においても代謝速度は非常に遅いものの 5 種類の代謝物へと変換されることを明らかにした⁸⁾。それらの構造は 5-水酸化(OH)体、5'-OH 体及び 2'-OH 体と、さらに NIH 転位した代謝物の 4-OH-2,3,3',4',5-PenCB 及び 4'-OH-2,3,3',4',5'-PenCB であった。興味あることに、4'-OH 体とともに 4-OH 体が比較的多く生成されており、塩素が 3 個置換している芳香環、すなわち 2,3,4-三塩素置換ベンゼン環の方が 3,4'-二塩素置換ベンゼン環より代謝されやすいという結果であった。最近、原口らは CB 105 を腹腔内に投与したラットの糞中から合計 9 種類の代謝物を検出した⁵⁾。上記 5 種類のうち 2'-OH 体を除く 4 種類の水酸化体、さらに塩素が脱離した代謝物 4-OH-2,3,3',4'-TCB および 4 種類のメチルチオ(MeS)体、すなわち 5-MeS-, 5'-MeS-, 6-MeS- および 6'-MeS-CB 105 を新たに報告した。

ハムスターはダイオキシン類などの毒性に対して、最も感受性の低い動物として報告されていること⁹⁾から、代謝能との関連は興味深い。当研究室では、ハムスター肝ミクロゾームを用いて 2,2',5,

5'-および 2,3',4',5-TCB の代謝を調べ、PB 誘導性の HPB-1 (CYP 2 B) および MC 誘導性の CYP1A2 と CYP2A8 が関与することを明らかにした¹¹⁾⁻¹⁴⁾。そこで本研究では、塩素が 1 つ多い CB 105 の in vivo 代謝を調べ、ラットと比較した。また、代謝に関与する P 450 分子種を明らかにするため、代表的な P 450 誘導剤として知られている PB および MC で前処理した動物でも同様に検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) CB105 の合成

CB105 は Cadogan による方法³⁾で合成した。まず、3,4-dichloroaniline および 1,2,3-trichlorobenzene をテトラクロロエチレンで溶解し、さらに亜硝酸イソペンチルを加えて、110°C で 24 時間反応させた。反応物はアルミナカラム (Merck, ドイツ) で精製したのち、異性体を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離した。HPLC 条件は次の通りである。カラム, ODS (250×10 mm i.d., 5 μm, 草野科学); 移動相, アセトニトリル-H₂O (9:1); 流速, 2 ml/min; 検出波長, 254 nm. CB 105 の純度は最終的に 99% 以上であった。

CB 105 : MS (EI) m/z (relative intensity) 324 (100) [M⁺], 326 (163) [M⁺+2], 328 (101) [M⁺+4], 330 (33) [M⁺+6], 252 (45) [M⁺-Cl₂].

(2) 代謝物の合成

CB 105 代謝物の合成も Cadogan の方法³⁾で行った。すなわち、3,4-dichloroaniline と 2,3,6-あるいは 2,3,4-trichloroanisole を、または 2,3,4-trichloroaniline と 2,6-あるいは 2,3-dichloroanisole を加えて、110 °C, 24 時間反応させた。反応後、CB 105 と同様にアルミナカラムおよび HPLC で精製した。

4-CH₃O (MeO) -2,3,5,3',4'-PenCB : ¹H-NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.52 (1 H, d, J=8.1 Hz, 5'-H), 7.47 (1 H, d, J=2.2 Hz, 2'-H), 7.28 (1 H, s, 6-H), 7.22 (1 H, dd, J=8.3 Hz, 2.0 Hz, 6'-H), 3.95 (3 H, s, 4-MeO); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M⁺], 356 (160) [M⁺+2], 358 (105) [M⁺+

4], 360 (38) [$M^+ + 6$], 339 (62) [$M^+ - CH_3$], 311 (29) [$M^+ - COCH_3$], 241 (25).

5-MeO-CB 105: 1H -NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.530 (1 H, d, $J=8.33$ Hz, 5'-H), 7.488 (1 H, d, $J=2.02$ Hz, 2'-H), 7.251 (1 H, dd, $J=8.33$ Hz, 2.02 Hz, 6'-H), 6.774 (1 H, s, 6-H); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M^+], 356 (162) [$M^+ + 2$], 358 (83) [$M^+ + 4$], 360 (30) [$M^+ + 6$], 311 (32) [$M^+ - COCH_3$].

6-MeO-CB 105: 1H -NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.622 (1 H, d, $J=8.07$ Hz, 5'-H), 7.423 (1 H, d, $J=2.02$ Hz, 2'-H), 7.159 (1 H, dd, $J=8.07$ Hz, 2.02 Hz, 6'-H), 7.101 (1 H, s, 5-H); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M^+], 356 (148) [$M^+ + 2$], 358 (105) [$M^+ + 4$], 360 (37) [$M^+ + 6$], 304 (87) [$M^+ - CH_3Cl$], 284 (24) [$M^+ - Cl_2$], 241 (31).

4'-MeO-2,3,4,3',5'-PenCB: 1H -NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.445 (1 H, d, $J=8.33$ Hz, 5-H), 7.325 (2 H, s, 2'-H and 6'-H), 7.147 (1 H, d, $J=8.33$ Hz, 6-H), 3.967 (3 H, s, CH_3); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M^+], 356 (162) [$M^+ + 2$], 358 (105) [$M^+ + 4$], 360 (40) [$M^+ + 6$], 339 (65) [$M^+ - CH_3$], 311 (30) [$M^+ - COCH_3$], 241 (50).

5'-MeO-CB 105: 1H -NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.454 (1 H, d, $J=8.32$ Hz, 5-H), 7.175 (1 H, d, $J=8.32$ Hz, 6-H), 7.086 (1 H, d, $J=2.02$ Hz, 2'-H), 6.845 (1 H, d, $J=2.02$ Hz, 6'-H); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M^+], 356 (173) [$M^+ + 2$], 358 (100) [$M^+ + 4$], 360 (42) [$M^+ + 6$], 311 (29) [$M^+ - COCH_3$], 241 (30).

2. 薬物投与

Golden syrian 系雄性ハムスター (体重約 80 g) および Wistar 系雄性ラット (体重約 170 g) に, P 450 誘導剤として PB (80 mg/kg/day), あるいは MC (20 mg/kg/day) を 3 日間腹腔内に投与した. PB は生理食塩水に, MC はコーン油に溶解した. PB および MC の最終投与日の翌日に, CB 105 を 3 mg/body で腹腔内に投与した.

3. 代謝物の分離

CB 105 投与後 5 日間の糞を採取し, 60 °C で 24 時間乾燥し, コーヒーミルで粉碎後, ソックスレー抽出器を用いて, クロロホルムで 14 時間抽出を行った.

一方, 採血は, CB 105 投与後 5 日目にハムスターあるいはラットの頸動脈より行った. 血液を直接, セパクリーン-A (血清分離剤入スピッツ: 栄研機材) に入れて, 血清を分離し, これにつき代謝物の分析を行った. すなわち, 血清 0.5 ml に 0.5 M 硫酸溶液 0.25 ml を添加した後, クロロホルム-メタノール (2 : 1) 1 ml 及び n-ヘキサン 3 ml による抽出を 2 回行い, これらをジアゾメタンでメチル化後, GC/ECD および GC/MS に供した.

4. 代謝物の分析

代謝物の分析には ECD 付 HP 5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製) を用いた. GC/ECD の条件は次の通りである. 3 種類のカラム, すなわち, ① DB-1 fused silica capillary column (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製), ② DB-1 fused silica capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製) および ③ MSP 50 fused silica capillary column (50 m \times 0.25 mm i.d., 0.1 μ m 膜厚, 東京化成製) を使用した. オープン温度は 200 ~ 240 °C で, さらに注入口温度は 250 °C, 検出器温度は 250 °C に固定し, キャリアーガスとして N_2 (1 ml/min) を用いた.

5. その他の分析機器

(1) GC/MS

マススペクトルの測定は質量分析計付 HP 5980 ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製) を用いて, EI モードで行った. GC/MS は次の 2 通りの条件を用いて行った. ① カラム, DB-1 fused silica capillary column (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 190 °C; 注入口温度, 250 °C; 検出器温度, 280 °C; キャリアーガス, He (1 ml/min). ② カラム, MPS 50 fused silica capillary column (50 m \times 0.25 mm id, 0.1 μ m 膜厚, 東京化成製); オープン温度, 100 °C \rightarrow (20 °C/min)

→ 200 °C → (5 °C/min) → 280 °C ; キャリアーガス, He gas.

(2) ¹H-NMR

スペクトルの測定は日本電子製の JEOL GSX-500 (500 MHz) を用いて行った。試料は, 重クロロホルムに溶解し, テトラメチルシランを内部標準物質として用いた。

実験結果

1. ラット糞中および血中代謝物の検出

まず, CB 105 投与ラットにおける 5 日間の糞中代謝物を調べた。糞のクロロホルム抽出物をメチル化後, GC/ECD (15 m DB-1 カラム) に供した結果, 未処理群において, 未変化体 (7.79 min) 以外に, 代謝物と思われる 3 本のピークがそれぞれ保持時間 11.82 min, 15.85 min および 16.27 min に検出された (Fig. 1 a)。これらを仮に M-1, M-2 および M-3 とする。また, PB 及び MC 前処理群のいずれにおいても未処理群と全く同様に 3 種類のピークが検出された。一方, CB 105 投与後 5 日目の血中代謝物を同じ条件で分析したところ, いずれの群においても未変化体以外に, M-1 と全く同じ保持時間 11.82 min に代謝物と思われる 1 本のピークが検出された。これを以下 M-4 とした (Fig. 1 b)。

2. ハムスター糞中および血中代謝物の検出

次に, 未処理, PB および MC 前処理ハムスターにつき, CB 105 投与後 5 日間の糞中代謝物および 5 日目の血中代謝物を調べた。Fig. 2 に未処理ハムスターから得られた代謝物 (メチル化体) のガスクロマトグラムを示す。Fig. 2 a に示すように, 糞中代謝物として M-2 および M-3 はラットと同様に検出されたが, M-1 はほとんど検出されなかった。一方, 血中代謝物の場合, ラットと同様に, 未変化体とともに M-4 が検出された (Fig. 2 b)。なお, PB および MC 前処理ハムスターの場合にも, 未処理ハムスターと同じ代謝パターンを示した (データ未掲載)。

3. 代謝物の化学構造

GC/MS の結果, M-1~M-4 のメチル誘導体はいずれも分子量 354 を有していたことから, OH 体であることが明らかになった。このうち糞中代

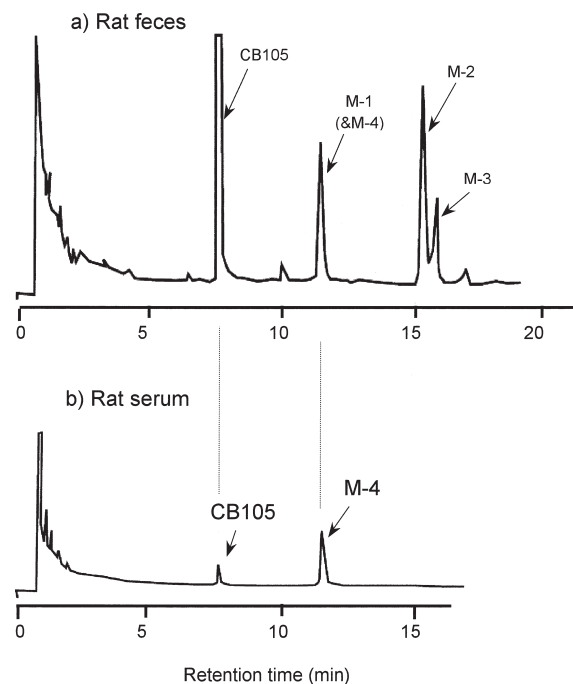


Fig. 1 Gas chromatograms of the methylated derivatives of CB105 metabolites detected in the feces (a) and serum (b) of untreated rats.

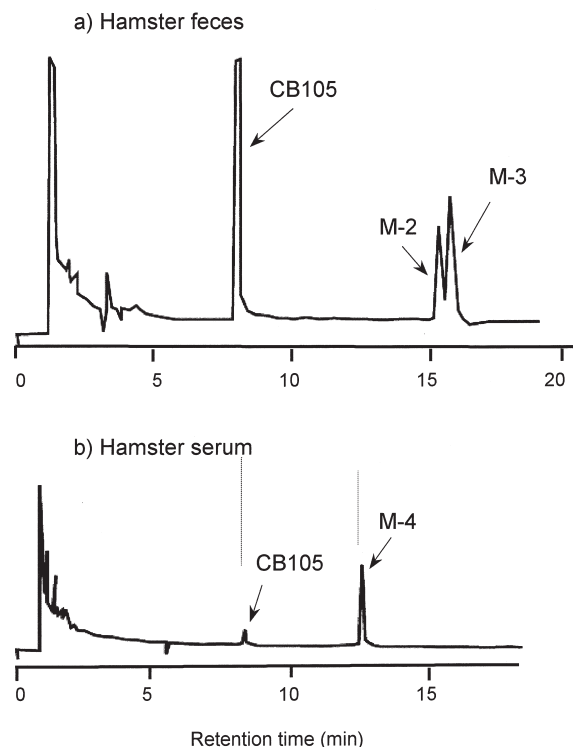


Fig. 2 Gas chromatograms of the methylated derivatives of CB105 metabolites detected in the feces (a) and serum (b) of untreated hamsters.

謝物 M-1 および血中代謝物 M-4 は保持時間がいずれも 11.82 min と全く同じであることから、本当に同一のものであるかを検討した。長さ 15 m の DB-1 カラムを用いた GC/MS の結果から、M-1 および M-4 のマススペクトルはいずれも破片イオン $[M^+-15]$ を示したことから、4 または 4' 位の塩素が 5 または 5' 位に NIH 転位をしたと思われる 4-OH 体あるいは 4'-OH 体のメチル誘導体であると推定された (Table 1)。そこで、合成標品の 4-MeO-2,3,3',4',5-PenCB と 4'-MeO-2,3,3',4,5'-PenCB を同様の条件で測定したところ、DB-1 (15 m) カラムにおける保持時間およびマススペクトルが全く同じで区別できなかった。次に、長さ 50 m の MPS 50 カラムに換えて両化合物の分離を試みた。その結果、Fig. 3 に示すように、4-MeO 体と 4'-MeO 体をそれぞれ保持時間 29.88 min と 30.12 min に分離することができた。そこで、血中代謝物 M-4 のメチル化体につき、同様の条件で測定したところ、保持時間 29.88 min であった。これらの結果から、M-4 および M-1 はそれぞれ 4-OH-2,3,3',4',5-PenCB および 4'-OH-2,3,3',4,5'-PenCB であることが示唆された。

一方、M-2 および M-3 については、DB-1 カラムでは長さ 15~30 m で良好に分離できたが、MPS 50 カラム (長さ 50 m) では完全に重なった (データ未掲載)。そのため、両代謝物の分析には、以下 DB-1 カラムを用いた。Table 1 に示したよ

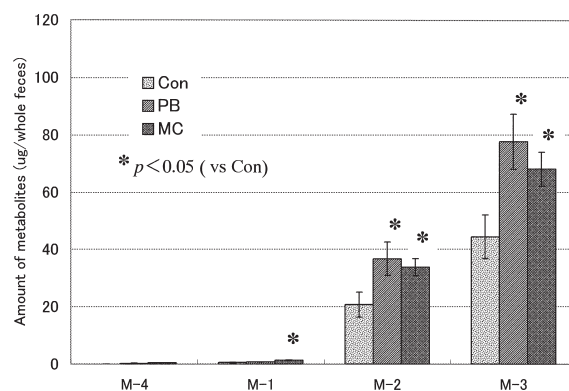


Fig. 4 Effect of P450 inducer on the amount of CB105 metabolites in hamster feces

うに、マススペクトルをみると M-2 および M-3 のいずれにおいても特徴的なイオン $[M^+-43]$ が観察されたことから、5-OH 体あるいは 5'-OH 体のメチル誘導体と推定された。そこで、合成標品とマススペクトルおよび GC における保持時間を比較したところ、M-2 および M-3 はそれぞれ 5'-OH-CB 105 及び 5-OH-CB 105 であることが明らかとなった。

3. 糞中代謝物に及ぼす P 450 誘導剤の影響

Fig. 4 に、ハムスター糞中代謝物の定量結果 (µg/全糞) を示した。M-1 と M-4 の定量には MPS 50 カラム (長さ 50 m) を、また M-2 および M-3 の定量には DB-1 カラム (長さ 30 m) を使用した。まず、未処理ハムスター糞中代謝物を調べたところ、それらの生成比は、M-4 : M-1 : M-2 :

Table 1 Mass spectral data and retention times of the methylated CB105 metabolites and the synthetic authentic compounds in GC/MS

Compound	Molecular weight	Mass spectral data					Retention time (min)
		$[M^+]$	$[M^+-15]$	$[M^+-43]$	$[M^+-50]$	$[M^+-70]$	
CB105(feces)	324	100	-	-	-	45	6.41
M-1 (feces)	354	100	62	41	-	-	10.17
M-2 (feces)	354	100	-	44	-	-	14.00
M-3 (feces)	354	100	-	26	-	-	14.45
M-4 (serum)	354	100	55	31	-	-	10.17
2'-CH ₃ O-CB105	354	100	-	-	144	31	8.10
4-CH ₃ O-2,3,3',4',5-PenCB	354	100	62	29	-	-	10.17
4'-CH ₃ O-2,3,3',4,5'-PenCB	354	100	65	30	-	-	10.17
6-CH ₃ O-CB105	354	100	-	-	87	24	10.94
5'-CH ₃ O-CB105	354	100	-	26	-	-	14.01
5-CH ₃ O-CB105	354	100	-	32	-	-	14.46

GC/MS : column (DB-1, 15m) ; oven temp.(190°C).

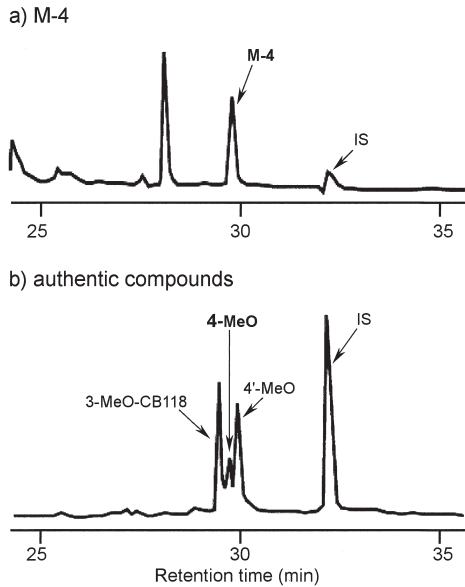


Fig. 3 Gas chromatograms of the methylated M-4 detected in the serum (a) and of three authentic compounds (b) 3'-MeO-2,2',3,4,4',5-hexachlorobiphenyl was used as an internal standard (IS).

M-3 = 0.2 : 1 : 39 : 84 であり、M-4 はほとんど検出されなかった。また、主代謝物は M-2 と M-3 であったが、M-3 の方が M-2 の約 2 倍と多かった。さらに、P 450 誘導剤前処理ハムスターでは、4 種類の代謝物はいずれも PB 前処理で未処理の 1.7 倍前後に、また MC 前処理では 1.5 倍前後というように、ほぼ同じ割合で有意に増加していた。なお、M-4 および M-1 に関しては、PB よりも MC 前処理でより多く増加した。

次に、ラット糞中代謝物の定量結果 ($\mu\text{g}/\text{全糞}$) を Fig. 5 に示した。未処理ラットの糞中代謝物の生成比は M-4 : M-1 : M-2 : M-3 = 0.7 : 1 : 19 : 6.7 であり、M-2 が最も多く生成されていた。また、P 450 誘導剤前処理ラットでは、4 種類の代謝物はいずれもほぼ同じ割合で生成量が増加しており、PB 前処理で未処理の 2 ~ 3 倍、また MC 前処理では約 3 倍であった。ただし、M-4 の生成は MC 前処理で約 7 倍に顕著に増加していた。

4. 血中代謝物に及ぼす P 450 誘導剤の影響

CB 105 投与後 5 日目の血中代謝物を定量し、ラットとハムスターで比較した (Fig. 6)。その結

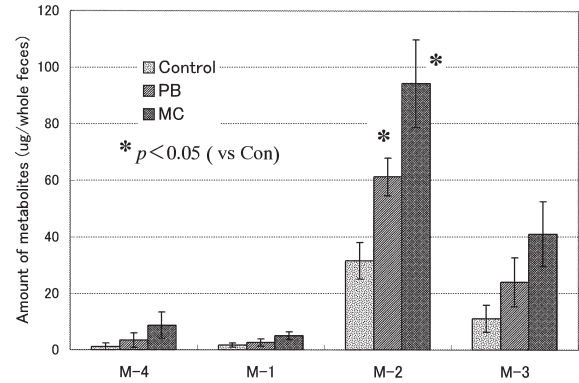


Fig. 5 Effect of P450 inducer on the amount of CB105 metabolites in rat feces

果、ラット血中の M-4 濃度は未処理で $0.28 \mu\text{g}/\text{ml}$ serum であったが、PB 前処理により全く影響を受けなかった。また、MC 前処理でも未処理の約 1.4 倍に過ぎなかった。一方、ハムスター血中の M-4 濃度は未処理で $0.39 \mu\text{g}/\text{ml}$ serum とラットの 1.4 倍と高かったが、さらに PB 前処理により未処理の 1.8 倍に、MC 前処理で 2.6 倍に高くなっていった。

考 察

CB 105 投与ハムスターの糞中および血中代謝物を調べ、代謝パターンをラットと比較した。その結果、両動物においても、糞中から 4 種類の一水酸化体 (M-1~M-4) と血中から M-4 のみが検出された。これらの構造は Klasson-Wehler ら⁸⁾ および原口ら⁵⁾ の報告と一致して、M-1, M-2, M-3 および M-4 はそれぞれ、4'-OH-2,3,3',4,5'-PenCB, 5'-OH-CB 105, 5-OH-CB 105 および 4-OH-2,3,3',4',5'-PenCB であった。以上の結果から、本 PCB の代謝経路として、Fig. 7 に示すよう

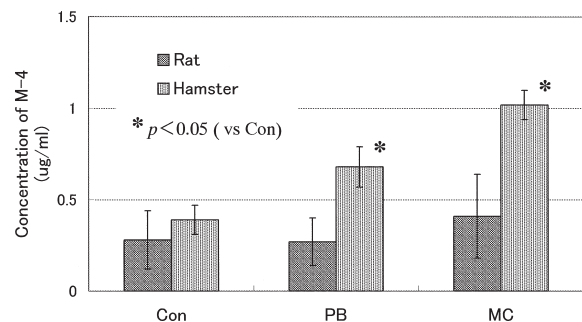


Fig. 6 Effect of P450 inducer on the concentration of M-4 in the serum of rats and hamsters.

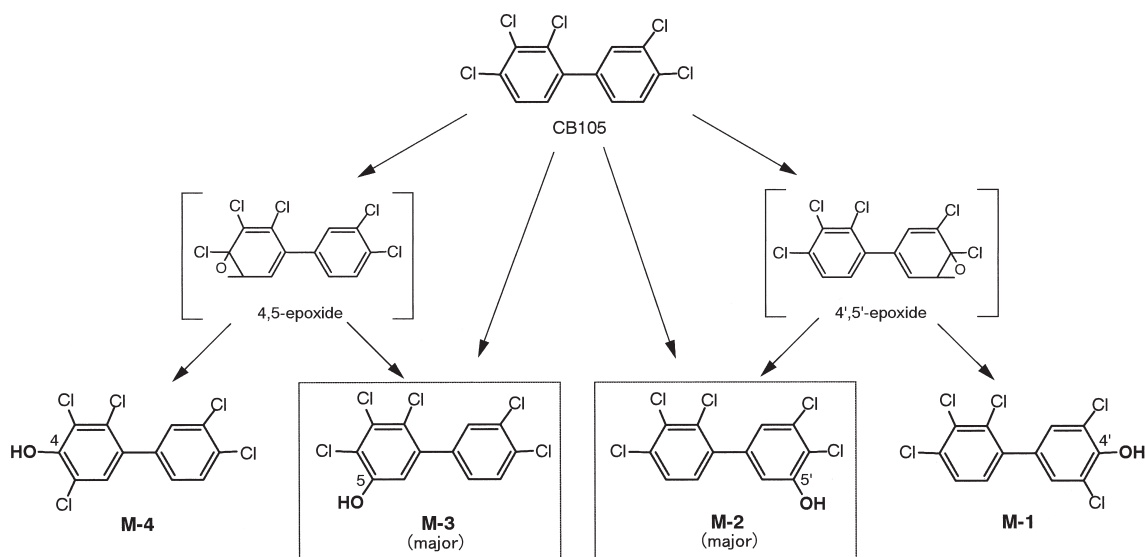


Fig. 7 Postulated metabolic pathways of CB105 in rats and hamsters

に、三塩素置換ベンゼン環の4あるいは5位への酸化および二塩素置換ベンゼン環の4'あるいは5'位への酸化が明らかとなった。主な糞中代謝物は両動物で、M-2 (5'-OH 体) および M-3 (5-OH 体) であった。M-2 と M-3 の生成量を見ると、両動物で大きな種差が観察された。すなわち、ラットでは M-2 の方が M-3 の約3倍であったのに対し、ハムスターでは逆に M-3 の方が M-2 の約2倍であった。一方、M-1 および M-4 は、ハムスターでは糞中から痕跡程度しか検出されなかった。また、PB および MC 前処理により数倍に増加はしたものの、M-2 および M-3 の生成量と比較すると数10分の1であった。以上の結果からラットとは逆に、ハムスターでは3',4'-二塩素置換ベンゼン環よりは、2,3,4-三塩素置換ベンゼン環の方が酸化されやすいことが示唆された。また、M-1 および M-4 の生成はアレノキソ中間体経由した後、NIH 転位したことを示している¹⁰⁾¹⁶⁾²¹⁾が、今回の結果から両動物において中間体経由よりは直接水酸化反応の方が優位であることが示唆された。

血中代謝物として、両動物において、未変化体以外に M-4 (4-OH-2,3,3',4',5-PenCB) のみが検出された。この事実も、Klasson-Wehler ら⁸⁾ および原口ら⁵⁾ の報告とよく一致していた。ただし、ハムスター血中 M-4 濃度はラットの数倍と高かった。また、この値は PB および MC 前処理でそれぞれ約2倍および約3倍に増加した。Brouwer ら¹²⁾⁴⁾ は、4-OH-3,5-二塩素置換の PCB、例え

ば、4-OH-3,3',4',5-TCB 等は血中の甲状腺ホルモン輸送タンパクである transthyretin と高い親和性を有することから、血中によく保持されることを報告している。今回の結果は、生成された M-4 がラットに比べ、より選択的に血中に移行することを意味しており、その原因としてハムスター transthyretin の M-4 に対する親和性がラットより高いのかもしれない。実際、Klasson-Wehler ら⁸⁾ は、M-4 濃度をマウスとミンクで比較し、マウスがミンクの4~5倍高いことを報告している。また、なぜ、M-1 (4'-OH-3',5'-二塩素置換の PCB) よりも、M-4 (4-OH-2,3,5-三塩素置換の PCB) の方が選択的に血中に局在しているかという点は現在のところ、不明である。

原口ら⁵⁾ は、CB 105 投与ラットの血液、肝、肺、腎および脂肪組織中の代謝物を調べたところ、いずれの組織でも M-4 のみを検出し、その濃度は血液>肝=肺>腎>脂肪組織の順であることを報告した。本研究において、ハムスターでは血液と糞しか調べていないが、ハムスターにおいても、ラットと同様に、主代謝物の M-2 と M-3 は糞中へ、M-4 は血液をはじめとした各組織へと分布することが示唆された。

CB 105 代謝に関与する P 450 分子種についての情報を得るために、PB あるいは MC 前処理して代謝パターンの変動を観察した。一般に、MC 型誘導能を有する coplanar PCB は MC 誘導性 P 450 によって、PB 型誘導能を有する mono-あ

るいは di-ortho-PCB は PB 誘導性 P 450 によって代謝される¹⁷⁾。CB 105 は混合型誘導能を有していることから、両方の P 450 によって代謝されると予想されたが、今回予想と一致してハムスターの全代謝物は PB および MC 前処理のいずれでも 1.5~1.7 倍に増加した。これまでの精製 P 450 を用いた PCB 代謝研究¹¹⁾⁻¹³⁾ から、ハムスター肝では PB 誘導性の HPB-1 (CYP 2 B) および MC 誘導性の CYP1A2 と CYP2A8 が関与することが明らかになっているが、CB 105 の場合もこれらの P 450 が有力であろう。一方、ラットにおいても同様に、全代謝物の生成が PB および MC 前処理で 2~3 倍に促進された。この結果から、CB 105 の場合にも、これまでに二塩素化ビフェニル⁷⁾ や TCB⁹⁾¹²⁾¹⁵⁾ で明らかにされている PB 誘導性の CYP2B1 と CYP2B2 および MC 誘導性の CYP1A1 が関与することが示唆された。なお、M-4 および M-1 の生成は MC 前処理で強く促進されたことから、ハムスターでは CYP1A2 と CYP2A8 の関与が、またラットでは CYP1A1 の関与が強く示唆された。

総 括

1. 未処理、PB および MC 前処理のハムスターおよびラットに CB 105 (3 mg/body) を腹腔内に投与し、糞中および血中代謝物の検出・定量を行った。
2. ハムスターおよびラット糞中代謝物として、4 種類すなわち、M-1, M-2, M-3 および M-4 が検出された。これらは合成標品との比較により、それぞれ 4'-OH-2,3,3',4,5'-PenCB, 5'-OH-CB 105, 5-OH-CB 105 および 4-OH-2,3,3',4,5'-PenCB であることが明らかとなった。両動物ともに、主代謝物は M-2 と M-3 であったが、ハムスターでは M-3 が、ラットでは M-2 が多く生成された。また、ラットに比べハムスター糞中では M-1 および M-4 が著しく少なかった。
3. CB 105 代謝に及ぼす P 450 誘導剤の影響を調べたところ、ハムスターの糞中代謝物は PB および MC 前処理により、いずれも 1.5~1.7 倍に増加した。ラットでは同様に 2~3 倍に増加した。
4. ハムスターおよびラット血中代謝物として、

未変化体とともに M-4 が検出された。次に P 450 誘導剤の影響を調べたところ、血中 M-4 濃度はラットであまり変動しなかったのに対し、ハムスターでは PB 前処理で未処理の 1.8 倍に、また MC 前処理で 2.6 倍に増加した。

以上の結果から、ハムスターではラットとは逆に、3',4'-二塩素置換ベンゼン環よりは、2,3,4-三塩素置換ベンゼン環の方が酸化されやすいこと、また、生成された M-4 はラットに比べ、より選択的に血中に分布することが示唆された。

謝 辞

本研究は厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究) および科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2), No. 14572119, No. 15510058) に一部負うものである。ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) Brouwer A, Klasson-Wehler E, Bokdam M, Morse DC and Traag WA: Competitive inhibition of thyroxin binding to transthyretin by monohydroxy metabolites of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere* 20: 1257-1262, 1990.
- 2) Brouwer A and van den Berg KJ: Binding of a metabolite of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 85: 301-312, 1986.
- 3) Cadogan JIG: A convenient new method of aromatic arylation. *J. Chem. Soc.:* 4257-4258, 1962.
- 4) Darnerud PO, Morse D, Klasson-Wehler E and Brouwer A: Binding of a 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (CB-77) metabolite to fetal transthyretin and effects on fetal thyroid hormone levels in mice. *Toxicology* 106: 105-114, 1996.
- 5) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R and Masuda Y: Hydroxylation and methylthiolation of mono-ortho-substituted polychlorinated biphenyls in rats: identification of metabolites with tissue affinity. *Chem Res Toxicol* 11: 1508-1515, 1998.
- 6) Ishida C, Koga N, Hanioka H, Saeki KE and Yoshimura H: Metabolism in vitro of 3,4,3',4'- and 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyls by rat liver microsomes and highly purified cyto-

- chrome P-450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14: 276-284, 1991.
- 7) Kaminsky LS, Kennedy MW, Adams SM and Guengerich FP: Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P-450. *Biochemistry* 20: 7379-7384, 1981.
 - 8) Klasson-Wehler E, Lindberg L, Jonsson CJ and Bergman A: Tissue retention and metabolism of 2,3,4,3',4'-pentachlorobiphenyl in mink and mouse. *Chemosphere* 27: 2397-2412, 1993.
 - 9) Kociba RJ and Cabey O: Comparative toxicology and biologic activity of chlorinated dibenzo-p-dioxins and furans relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Chemosphere* 14: 649-660, 1985.
 - 10) Koga N, Beppu M and Yoshimura H: Metabolism in vivo of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolite in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 13: 497-506, 1990.
 - 11) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H: Hamster liver cytochrome P450 (CYP2A8) as a 4-hydroxylase for 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 685-688, 1996.
 - 12) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H: Metabolism of 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. *Chemosphere* 37: 1985-1904, 1998.
 - 13) Koga N, Kikuichi-Nishimura N, Hara T, Harada N, Ishii Y, Yamada H, Oguri K and Yoshimura H: Purification and characterization of a newly identified isoform of cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl in hamster liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 312: 464-470, 1995.
 - 14) Koga N, Kikuichi-Nishimura N and Yoshimura H: Effect of cytochrome P450 inducers on liver microsomal metabolism of tetrachlorobiphenyls in rats, guinea pigs and hamsters. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 705-710, 1995.
 - 15) Koga N, Nishimura N, Kuroki H, Masuda Y and Yoshimura H: Metabolism of 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P4501A1. *Xenobiotica* 24: 775-783, 1994.
 - 16) Koga N, Shin'yama A, Ishida C, Hanioka N and Yoshimura H: A new metabolite of 2,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in rat feces. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 3338-3339, 1992.
 - 17) 古賀信幸, 吉村英敏: PCBと関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編: 油症研究 -30年の歩み-, pp 93-110, 九州大学出版会, 2000.
 - 18) Kuroki H and Masuda Y: Structures and concentrations of the main components of polychlorinated biphenyls retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 6: 469-474, 1997.
 - 19) Parkinson A, Safe SH, Robertson LW, Thomas PE, Ryan DE, Reik LM and Levin W: Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats. - A study of structure-activity relationships. *J. Biol. Chem.* 258: 5967-5976, 1983.
 - 20) Yamamoto H, Yoshimura H, Fujita M and Yamamoto T: Metabolic and toxicologic evaluation of 2,3,4,3',4'-pentachlorobiphenyl in rats and mice. *Chem. Pharm. Bull.* 24: 2168-2174, 1976.
 - 21) Yoshimura H, Yonemoto Y, Yamada H, Koga N, Oguri K and Saeki S: Metabolism in vivo of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats. *Xenobiotica* 17: 897-910, 1987.
 - 22) Yoshimura H, Yoshihara S, Ozawa N and Miki M: Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320: 179-192, 1979.

(受付 2003-3-31)

ダイオキシン類の生殖毒性と後世代への影響並びにその機構

九州大学大学院 薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野

石田 卓巳, 益崎 泰宏, 西村 嘉雄, 山田 英之

Effects of Dioxins on the Reproduction and Development in Mammals and the Mechanism: Up-to-date Progress of Study

Takumi ISHIDA, Yasuhiro MASUZAKI, Yoshio NISHIMURA and
Hideyuki YAMADA

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582*

Abstract In the Seveso episode, increase of female offsprings from the parents exposed with dioxins has been demonstrated, although the same has not been seen in Yusho and Yu-cheng patients. However, delay of cognitive development in the children born from Yu-cheng patients has been reported. This has been recently supported by animal studies in which acquirement of cognitive capacity such as working memory and social behavior was examined in rats and monkeys treated in utero with dioxins. In this review, we summarize the prenatal and postnatal effects of dioxins on reproduction and development. In addition, dioxin-induced alteration of gene expression and of the function of estrogen-estrogen receptor system which may play a role in dioxin toxicity is discussed.

はじめに

セブソでの化学プラント事故被害者の追跡調査から、男児出生率の低下が報告されたことはまだ記憶に新しい⁶⁹⁾⁷⁰⁾。同様な性比の変動はオーストリアの事例でも報告されている⁷³⁾。これらのケースでは、父親へのダイオキシン暴露が性比の変動に反映されている可能性が高いという。これが真実としても、父親への暴露がより重大であることの理由は解明されておらず、幾つかの推定機構が提案されているが⁵²⁾、まだ想像の域を出ていない。一方、polychlorinated biphenyl (PCB) や polychlorinated dibenzofuran (PCDF) 類を主な原因物質とする日本と台湾における油症の場合は、患者から出生した子供の性比には有意な偏りは認められていない⁸³⁾¹⁰⁵⁾。セブソ事件等との不一致が何に起因するのかはよく理解されていないが、単純には暴露された異性体、同族体の成分内容が違ふことによる可能性もある。ダイオキシン類の後世代への影響は、性比の問題だけにとどまらず、胎児期や新生児期の暴露が出生後の生殖や知能に影響することを示唆する結果も出てきている。一般人の健康管理や油症等の被害者の適正な処置のためには、性比の偏りを含めた生殖や後世代に与える影響とその機構を精密に把握することが望まれる。本総説では、ダイオキシン類の生殖に与えるこれまでの知見をまとめると共に、後半には細胞や分子レベルでの機構解析研究の成果を概説したい。

ダイオキシン類の生殖毒性

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) が実験動物に対して消耗症、免疫機能失調および発ガン性などの多面的障害を惹起することはよく知られている⁴²⁾。母獣ないし父獣に TCDD ないし関連物質を投与することにより引き起こされる胎児や後世代への影響を Table 1 にまとめて示す。鳥類の胚等もちいた研究例も多いが、Table 1 にはマウス、ラットおよびサルにおける *in vivo* での結果に限定して掲載している。TCDD がマウスに口蓋裂と水腎症の奇形を発生させることは 1971 年に Courtney と Moore によって初めて報告されて以来、多くの研究者によって確認されている。これらは母体や胎児に体重減少な

どの一般的毒性を引き起こす用量よりも低用量で発生し、ダイオキシン類の毒性を検出するには感度のよい指標となっている。ラットでも種々の異常は観察されているが (Table 1), 口蓋裂と水腎症のような明らかな組織学的な形態異常はほぼマウスに限定されている。このような種差の要因はまだよく分かっていない。サルでの長期投与実験では、流産や死産の増加が報告されている⁶⁷⁾⁸⁷⁾。胎児への影響ではないが、アカゲザルでの実験において、極めて低用量の TCDD が子宮内膜症を惹起することが示されたのは広く知られている⁷⁹⁾。ヒトとマウス胚を用いた組織培養実験で TCDD の影響を電子顕微鏡による形態変化等で観察した結果から、ヒト胚組織はマウスよりも TCDD に対する感受性が低いと推定されている²⁾。

マウスの水腎症は口蓋裂より低用量で発現することが明らかにされている¹¹⁾²⁶⁾²⁸⁾。また、水腎症は妊娠のどの期間に投与するかにより影響されないが、口蓋裂は妊娠後期での暴露が重要であることも分かっている²⁸⁾。出生後の新生児に母乳を介した TCDD 暴露を行って水腎症発生を観察した研究もなされており、それによると出生日の TCDD 摂取でも水腎症が惹起され、それよりもあとの暴露では発生頻度が著しく低下するという³⁰⁾。従って、催奇形性発現は胎児期のみならず、極く短期間とは言え出生直後の暴露でも引き起こされることになる。

雄親への暴露が生殖や後世代に及ぼす影響についても研究が行われている。TCDD 処理の雄ラットでは精子数の減少等が観察されているが²⁰⁾、高用量の TCDD で処理した雄と未処理雌との交配では胎児数や着床率などに変化は認められていない²¹⁾。しかし、頻度は少ないものの死産の増加や指や頬骨の異常が認められている²¹⁾。低用量 TCDD (0.001~0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) を雌雄ラットに持続して与え、後世代への影響を3世代に渡って観察した研究では、0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の用量で着床率の減少、死産率増加、出生後の成長抑制等が F0~F2 において認められている⁷⁴⁾。

TCDD 以外の高毒性 PCDF およびコプラナー PCB も催奇形性を含めた後世代毒性を示し (Table 1), これらの併用では、相加的効果が認められている⁹⁾。低毒性の同族体や異性体は後世代影響についても弱いことが多いが、TCDD 等の生殖毒性を修飾する場合が知られている。例えば、2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl はそれ自体は、マウス口蓋裂発生作用を持たないが、TCDD の効果を 10 倍促進する¹¹⁾。逆に、2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl は TCDD の口蓋裂誘起作用に対して無影響か、または減弱作用を示すという¹¹⁾⁷²⁾。従って、ダイオキシン類混合物の有害性は、単一化合物の成績を単純に加算して種々の議論をすることに問題があることを承知しておかなければならない。これとの関連で、PCB 混合物による毒性データも有用な側面があるが、Table 1 に示すように口蓋裂の形成を始め種々の生殖毒性が報告されている。

ダイオキシン類による後世代の中樞神経障害

台湾の油症 (Yu-Cheng) の患者から生まれた子供 118 名の調査の結果、精神的発育に遅滞が認められるという⁵⁷⁾。このケースでは、被害者母親の平均的 PCDF/PCB 濃度は事件 13 年経過後でも一般人の 7 倍に達すると報告されており⁸⁵⁾、胎児期や乳児期に母親を経由して摂取した PCDF/PCB 類による障害と推定されている。ラットでの学習記憶獲得やサルでの社会的行動に胎児期ないし母乳経由のダイオキシン類が障害的に作用することが報告されており⁸⁸⁾⁹¹⁾⁹⁴⁾、これらの知見は Yu-Cheng 事例の結果と符合すると考えてよいであろう。ラットでの記憶障害は低毒性のオルト置換型 PCB にも認められており⁹⁰⁾、一般毒性や催奇形性とは違う構造-活性相関が存在する可能性もある。PCB 混合物にも胎児期や乳児期の摂取を介した中枢機能障害が報告されている⁸²⁾。

中枢機能の発育に及ぼすダイオキシン類の影響は、油症等の被害者に限らず、一般の食事由来のダイオキシン類によっても惹起されることが危惧されている。多くの疫学的調査が行われており、胎児期の暴露が重要と考えている研究者が多いように思われる¹²⁾⁵⁹⁾。母乳経由の摂取を重要視する報告もなされているが¹⁰⁰⁾、これには批判的な見解も多い²²⁾⁵¹⁾⁵⁶⁾。母乳による育児の可否は繊細な問題を包含するが、母乳の汚染状況と栄養素としての有用性を総合的に考察して、これを直ちに停止すべきとの結論は得られないとする意見があることを付記するに留めておきたい⁹⁶⁾。

Table 1 Effects of maternal exposure with dioxins on the reproduction and fetal development in the mouse, rat and monkey

Compounds	Species	Dose	Impairment in offsprings	Reference
2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo- <i>p</i> -dioxin	Mouse (CD-1)	1 or 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate and kidney malformation	Courtney & Moore (1971) [26]
	Mouse (C57BL/6N)	3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	“	
	Mouse (DBA/2J)	3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	“	
	Mouse (NMRI)	>1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate	Nuebert & Dillman (1972) [76]
	Mouse (C57BL/6N)	3 or 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate and hydronephrosis	Birnbaum et al. (1985) [11]
	Mouse (C57BL/6N)	12-24 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate	Couture et al. (1990) [28]
	“	3-24 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Hydronephrosis	
	Mouse (C57BL/6N x C3H,F1)	3 and/or 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Increase of endometriotic lesions	Cummings et al. (1999) [31]
	Mouse (C57BL/6N)	3, 6 or 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (via breast milk)	Hydronephrosis	Couture-Haws et al. (1991) [29] Couture-Haws et al. (1991) [30]
	Mouse (C57BL/6N)	6-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Increase in cell depth of the ureteric and bladder epithelia	Abbott & Birnbaum (1990) [1]
	Mouse (C57BL/6N x C3H, F1)	1,5 or 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ x 4	Death (70%) of offsprings Bone marrow toxicity Depletion of immunoproliferative response against mitogen stimulation Increase in susceptibility to bacterial and tumor challenge	Luster et al. (1980) [62]
	Mouse (C57BL/6N)	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Decrease in cellular immunity	Vos & Moore (1974) [99]
	Rat (F344)	1 or 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Decrease of body and organ (thymus and spleen) weights	Vos & Moore (1974) [99]
	“	“	Decrease in cellular immunity	
	Rat (F344)	1,5 or 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ x 4	Decrease of body and thymus weights	Faith & Moore (1977) [35]
	Rat (SD)	10 ng/kg	Prenatal mortality Decrease in fetus number	Murray et al. (1979) [74]
	“	100 ng/kg	Decrease in body weight gain after birth	“
	Rat (Holtzman)	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Effect on fetal growth, spermatogenesis, testicular histology, sexual behavior, and fertility	Mably et al. (1992) [63]
	Rat (Wistar, male)	75 (25) $\mu\text{g}/\text{kg}$ x 1 and	Increase of stillbirth	Chahoud et al. (1991) [21]
	“	15 (5) $\mu\text{g}/\text{kg}$ / week	Incompletely ossified fingers Incompletely ossified ossa zygomatica	
Rat (Long-Evans)	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Impairment for mammary development	Fenton et al. (2002) [37]	
Rat (Long-Evans)	“	Effect on Mullerian ducts (reproductive tract)	Hurst et al. (2002) [50]	
Rat (Long-Evans)	“	Impaired growth of the seminal vesicles	Hamm et al. (2000) [46]	

Table 1 continued

Compounds	Species	Dose	Impairment in offsprings	Reference
	Rat (Long-Evans)	“	Reduction of sperm counts Involution of sex accessory glands Impairment of sex behaviour	Gray Jr et al. (1995) [44]
	Rat (Long-Evans and Holtzman)	“	Decrease of ovarian weight, clefting of the phallus, and vaginal thread	Gray Jr & Ostby (1995) [45]
	Rat (SD)	0.025 or 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Decrease in saccharin preference in female (masculinization in female)	Amin et al. (2000) [5]
	Rat (SD)	0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$	Deficits in learning and memory Faster acquisition of the working memory	Seo et al. (1999) [94] Schantz et al. (1996) [91]
	Rhesus monkey	50 ppt in diet for 7 months	Abortion and stillbirth	Schantz et al. (1979) [87]
	“	5 or 25 ppt in diet for four years	Change in social behaviour	Schantz et al. (1992) [88]
2,3,7,8-Tetrabromo-dibenzo- <i>p</i> -dioxin	Mouse (C57BL/6N)	>3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate and hydronephrosis	Birbaum et al. (1991) [10]
2,3,7,8-Tetrabromo-dibenzofuran	Mouse (C57BL/6N x DBA/2N, F1)	600 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate and hydronephrosis	Hassoun et al. (1984) [47]
2,3,7,8-Tetrabromo-dibenzofuran	Mouse (C57BL/6N)	>25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate and hydronephrosis	Birbaum et al. (1991) [10]
2,3,4,7,8-Pentachloro-dibenzofuran	Mouse (C57BL/6N)	36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EC_{50}) 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EC_{50})	Cleft palate Hydronephrosis	Birbaum et al. (1987) [9]
	Mouse (NMRI)		Cleft palate	Nagao et al. (1993) [75]
	Rat (Fischer 344)	10-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Decrease of fetal weight Prenatal mortality and cleft palate	Couture et al. (1989) [27]
1,2,3,7,8-Pentabromo-dibenzofuran	Mouse (C57BL/6N)	>400 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate and hydronephrosis	Birbaum et al. (1991) [10]
1,2,3,4,7,8-Hexachloro-dibenzofuran	Mouse (C57BL/6N)	>144 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EC_{50}) >24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EC_{50})	Cleft palate Hydronephrosis	Birbaum et al. (1987) [9]
1,2,3,7,8-Pentabromo-dibenzofuran	Mouse (C57BL/6N)	>500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate and hydronephrosis	Birbaum et al. (1991) [10]
1,2,3,4,7,8-Hexachloro-dibenzofuran	Mouse (C57BL/6N)	>360 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EC_{50}) >60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EC_{50})	Cleft palate Hydronephrosis	Birbaum et al. (1987) [9]
3,3',4,4'-Tetrachloro-biphenyl	Mouse (CD-1)	>4 mg/kg	Cleft palate and hydronephrosis	Marks et al. (1989) [65]
	Rat (SD)	2 or 8 mg/kg/day	Decrease in saccharin preference in female (masculinization in female)	Amin et al. (2000) [5]
	“	“	Faster acquisition of the working memory	Schantz et al. (1996) [91]
3,3',4,4',5-Pentachloro-biphenyl	Mouse (C57BL/6N)	783 or 1044 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Cleft palate	Zhao et al. (1997) [107]
	Rat (SD)	0.25 or 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$	Decrease in saccharin preference in female (masculinization in female)	Amin et al. (2000) [5]
	“	“	Faster acquisition of the working memory	Schantz et al. (1996) [91]
2,4,4'-Trichloro-biphenyl	Rat (SD)	32 mg/kg/day	Slower acquisition of spatial learning memory	Schantz et al. (1995) [90]

Table 1 continued

Compounds	Species	Dose	Impairment in offsprings	Reference
2,3',4,4',5-Pentachloro-biphenyl	Rat (SD)	16 mg/kg/day	Slower acquisition of spatial learning memory	Schantz et al. (1995) [90]
2,2',3,5',6-Pentachloro-biphenyl	Rat (SD)	8 or 32 mg/kg/day	Faster acquisition of the working memory	Schantz et al. (1997) [92]
2,2',4,4',5,5'-Hexa-chlorobiphenyl	Mouse (C57BL/6N)	500 or 1000 mg/kg	Hydronephrosis and hydroureter	Morrissey et al. (1992) [72]
	Rat (SD)	64 mg/kg/day	Slower acquisition of spatial learning memory	Schantz et al. (1995) [90]
Kanechlor-500	Mouse (DDY)	10-50 mg (total)/ Mouse	Cleftpalate, cleftlip, brachydactyly and syndactyly	Watanabe & Sugahara (1981) [103]
Aroclor1254	Rat (Long-Evans)	6 mg/kg/day	Spatial learning deficits	Widholm et al. (2001) [104]
	"	"	Male specific deficits in spatial learning and memory	Roegge et al. (2000) [82]
Aroclor1248	Rehus monkey	2.5 and 5 ppm	Facial acne and edema Swelling of the eyelids Loss of facial hair including eyelashes Hyperpigmentation of the skin Decrease of infant weight	Allen & Barsotti (1976) [3]
	"	2.5 and 5 ppm	Decrease of infant weight	Allen et al. (1980) [4]
	"	2.5 ppm	Effect on learning memory	Schantz et al. (1989) [89]
	"	"	Cognitive deficit	Levin et al. (1988) [61]
Aroclor1016	Rhesus monkey	0.25 or 1 ppm	Effect on learning memory	Schantz et al. (1989) [89]
Fire Maser FF-1 (Polybrominated biphenyl mixture)	Rhesus monkey	1.5 and 25 ppm	Decrease of infant weight Hyperplastic gastritis	Lambrecht et al. (1978) [58]

ダイオキシン類による毒性発現機構

ダイオキシン類が生体内で毒性を発現する機構として、細胞質に存在する arylhydrocarbon receptor (AhR) との選択的結合を発端とする機構が知られている⁴³⁾⁷⁸⁾⁸⁶⁾。AhR は basic helix-loop-helix (bHLH) および PAS ドメインをもつ受容体型転写因子の一種である¹⁶⁾³⁴⁾。AhR は細胞の可溶性分画において 2 分子の heat shock protein 90 (HSP90), AhR activated 9 (hepatic B virus X-associated protein 2 もしくは AhR-interacted protein と呼ばれている) および p23 と複合体を形成し、不活性状態で存在している¹⁸⁾³²⁾⁵³⁾⁵⁴⁾⁶⁰⁾。TCDD 等のリガンドが AhR に結合すると AhR 複合体は核内へ移行し、HSP90 などが解離したのち、bHLH および PAS ドメインをもつパートナータンパク質である AhR nuclear translocator (ARNT) とヘテロダイマーを形成する。この過程におけるリガンド結合の役割、AhR 核移行の機構および HSP90 等のタンパク質の解離のタイミング等についての詳細は不明な点が多い。しかし、このような過程で形成された AhR-ARNT ヘテロダイマーは、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する外来性異物応答配列 (xenobiotic response element; XRE) と結合して転写を調節し、種々のタンパク質を誘導/抑制することが明らかとなっている。マウスやラットでの AhR を介した酵素誘導能の強さが、毒性の強さとよく相関することから、ダイオキシン類の毒性は AhR との結合による本レセプター活性化によって惹起されると考えられている⁸⁾⁷⁸⁾⁸⁶⁾¹⁰⁶⁾。これを支持する一つの事実として、Ah-応答性の C57BL マウスと Ah-弱応答性の DBA マウスの応答性の違いは、AhR の一次構造の違いに起因していることが明らかにされてい

る⁴⁰⁾。さらに、AhR のノックアウトマウスも作製され³⁸⁾⁶⁸⁾⁹³⁾、それを用いた研究から、催奇形性などの毒性は AhR ノックアウトマウスにおいて消失することなども明らかとなっている⁶⁸⁾。しかし、どの機能性タンパク質の AhR 依存的な誘導や抑制が、毒性発現への主要因となるのかについては解明されていない。

生殖機能の発達機構

17 β -Estradiol (E₂) の estrogen receptor (ER) を介した作用は、生殖機能の発達に重要な役割を果たしていると考えられている。その一例として、雌における子宮の発達過程が挙げられる。E₂ による子宮重量増加には、子宮内膜上皮細胞が重要な役割を果たしており、水分吸収の増加、上皮細胞の細胞分裂促進および分泌タンパク質合成促進を経て子宮重量増加に至る¹⁵⁾。この生理反応は E₂ 刺激によって開始され、子宮内膜間質細胞の ER α が E₂ と結合して上皮細胞の分裂増殖を制御すると言われている²⁵⁾。また、E₂ は上皮細胞内の ER α を介して分裂増殖作用を促進するサイクリン A₂ 発現を増強し、分裂増殖を抑制するサイトカイン TGF- β の発現を抑制することも報告されている³⁶⁾⁹⁸⁾。

一方、雄の性行動の制御にも ER は関わっている。胎仔期から新生仔期間のアンドロゲンとエストロゲンのバランスが脳の視床下部・視索前野の神経細胞構造の性的二型と呼ばれる形態的雌雄差を規定し、これによって成熟後の性行動の雄型が決定される⁶⁴⁾⁶⁶⁾。成熟したあとでも性行動制御は視床下部・視索前野でアンドロゲンとエストロゲンが相乗的に機能することで制御されており²³⁾²⁴⁾⁸⁰⁾、特に ER α は雄特有の行動制御を担っていることが明らかにされている⁷⁷⁾。

ダイオキシン類による生殖毒性発現機構

ダイオキシン類による生殖毒性は、抗エストロゲン作用が主要な機構として指摘されている。抗エストロゲン作用の具体的内容としては、(1) エストロゲンによって誘導されるタンパク質の誘導抑制¹⁰¹⁾；(2) エストロゲンが調節する生体反応の抑制⁴¹⁾；および (3) エストロゲン合成と分泌の阻害⁷¹⁾ が確認されている。これらの抗エストロゲン作用を引き起こす機構としては、エストロゲン-ER 経路と TCDD-AhR 経路に着目した研究が進められており、i) TCDD-AhR 複合体が ER の応答配列 (estrogen response element；ERE) への結合を阻害⁵⁵⁾、ii) TCDD 処理によるエストロゲンと結合した活性型 ER の核内移行の阻害¹⁰²⁾、iii) TCDD 依存的な ER mRNA 量減少に基づく ER リガンド結合減少³³⁾⁸⁴⁾⁹⁷⁾、iv) TCDD 結合型 AhR と ER 遺伝子プロモーター領域中の結合配列 (XRE) との結合に基づく ER 遺伝子の転写開始阻害¹⁹⁾、および v) エストロゲン代謝を触媒する cytochrome P450 の誘導⁶⁾⁹⁵⁾ の 5 つの可能性が挙げられている。

ダイオキシン類の抗エストロゲン作用の発現機構を考える際、前述の子宮における E₂ 応答型上皮細胞分裂増殖は興味深い。なぜなら、子宮内膜間質細胞が制御する E₂ 応答型子宮内膜上皮細胞の分裂増殖促進と、分泌タンパク質の合成促進は TCDD 処理で抑制されるが、この E₂ シグナル阻害は子宮内膜上皮細胞の AhR は関与せずに子宮内膜間質細胞の AhR を介して起こることが示唆されている¹⁴⁾。また、E₂ 誘導性の上皮細胞増殖促進因子であるサイクリン A₂ の合成は TCDD 処理によって阻害され、増殖抑制作用を示すサイトカイン TGF- β の発現抑制が解除される¹³⁾。以上の事実から、E₂ の子宮重量増加作用を抑制する TCDD の機構の一部は、TCDD が AhR と結合して子宮内膜間質細胞と上皮細胞において E₂ で活性化された ER シグナル経路を阻害することが考えられる。

一方、脳では生殖機能の制御に働いている視床下部と下垂体に AhR が存在し、これに TCDD が結合して標的遺伝子である CYP1A1 の誘導を起こすことが報告されている⁴⁹⁾。このことは、AhR に依存的な ER 抑制が生殖中枢で起こる可能性を示している。この可能性を支持する情報として、脳内での ER 分布は性行動を制御する視床下部・視索前野周辺で多いと言う⁷⁾。これらのことから、新生仔期に曝露した TCDD が ER シグナルが関与する性分化機構を攪乱して性行動不全を起こす可能性は十分に考えられる。

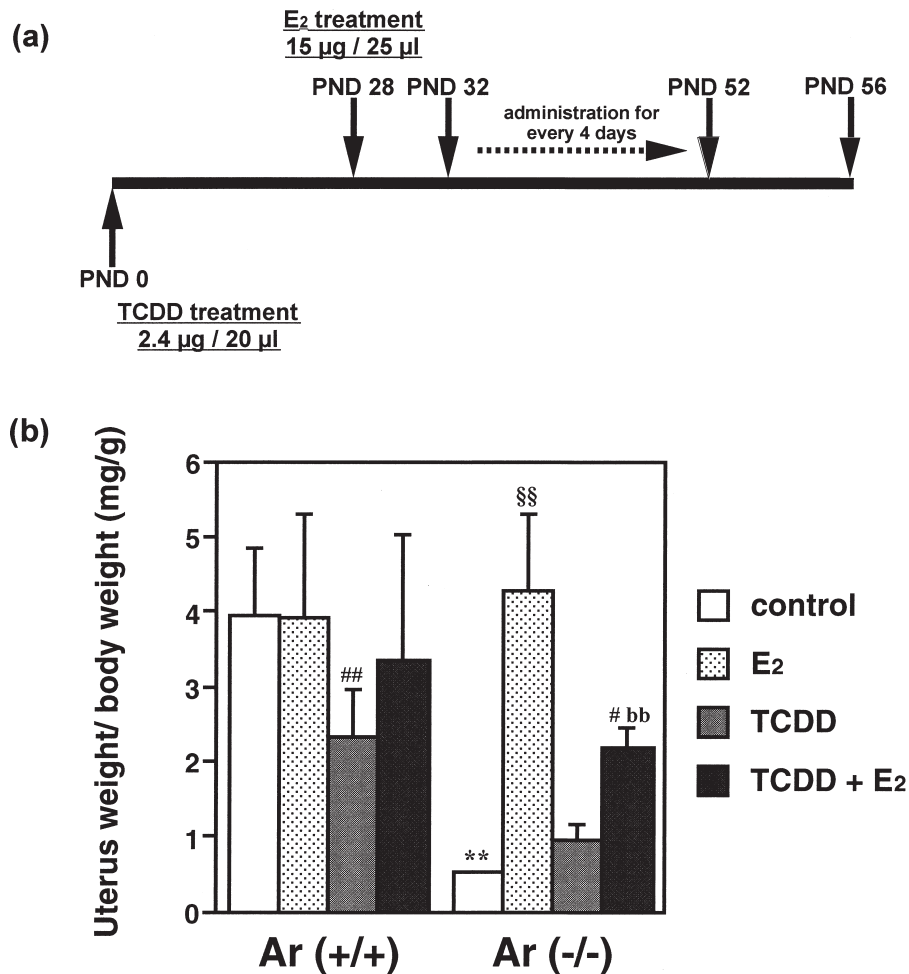


Fig. 1 Schematic representation of dose and dosing schedule of TCDD and 17β-estradiol (E₂) for newborn Ar (-/-) female mice (a) and the effect of TCDD on E₂-mediated reversion of uterus atrophy (b).

(a) The number attached to “PND” means the age (day) of mice after birth (birth day=PND 0). Following the treatment, uterus weights were estimated at the PND 56. (b) Each bar represents the mean ± S. D. of 4-8 mice. The numbers of mice used were: control Ar (+/+), n=8; E₂-treated Ar (+/+), n=7; TCDD-treated Ar (+/+), n=4; E₂/TCDD-treated Ar (+/+), n=5; control Ar (-/-), n=4; E₂-treated Ar (-/-), n=5; TCDD-treated Ar (-/-), n=5; E₂/TCDD-treated Ar (-/-), n=4. Significant difference: ** and ## (*p*<0.01) from control Ar (+/+), §§ (*p*<0.01) from control Ar (-/-), bb (*p*<0.01) from TCDD-treated Ar (-/-).

ダイオキシン類による毒性と E₂ レベルとの関連性

既に述べたように、ダイオキシンの抗エストロゲン作用の機構の一つとして、E₂ 水準を低下させることが挙げられている⁷¹⁾。これと関連して、当研究室では最近、E₂ 合成酵素である aromatase を欠損したマウス [Ar (-/-)] での解析を行った。Ar (-/-) マウスは内因性 E₂ 欠如のため、雄成獣では性行動不全の形質を有しており、また雌では子宮の著しい萎縮が起こる³⁹⁾⁴⁸⁾⁸¹⁾。雌の子宮萎縮は幼若期より E₂ を継続的に投与することにより (処理条件は Fig. 1(a) 参照)、完全に野生型マウスと同レベルにまで回復する。しか

し、出生日に TCDD を単回投与しておく、外部 E₂ 依存的な子宮重量回復は起こるもののその程度は E₂ のみで処理した場合と比べて明らかに少なかった (Fig. 1(b)). 従って、TCDD による子宮萎縮は E₂ が十分に補給されても抑制できない機構が存在する一方、一定の水準の E₂ が存在することにより部分的には回避できるものと推定された。逆に言えば、この結果は TCDD の生殖毒性の少なくとも一部が E₂ 水準の低下に起因するとする推定を支持するものと考えられる。同様な傾向は Ar (+/+) マウスでの実験でも観察されるが (Fig. 1(b)), この場合は内因性 E₂ の存在により、上記の Ar (-/-) での検討に比べると E₂ や TCDD の効果が明瞭ではなかった。

上記の我々の成績も含めて、エストロゲンレベルの変動による障害性発現の可能性が示唆されているが、これには TCDD の抗エストロゲン作用の機構として述べた前述の i~v) の 5 つの機構のうち、v) が関連してくる。マウスの実験で血漿中 E₂ 濃度に変化が起らない用量の TCDD 処理で ER 発現量の減少と子宮重量減少が確認されている³³⁾。従って、循環血中のエストロゲンレベル低下ではなく、各組織中の E₂ 代謝機能を亢進させる機構が重要であると考えられる。TCDD 処理によって誘導される酵素として CYP1A1, 1A2 および 1B1 等が挙げられるが¹⁰⁸⁾、これらの酵素は E₂ 代謝酵素としても働き、CYP1A1, 1A2 は 2-OH E₂ 生成に関与し、CYP1B1 は 4-OH E₂ 生成を触媒することが知られている¹⁷⁾。TCDD による代謝酵素の誘導は各臓器において起こり、その誘導期間は ER 発現レベル抑制効果よりも長い³³⁾。従って、子宮重量増加抑制は、TCDD が E₂ 代謝酵素を誘導して代謝機能を亢進することにより、活性型エストロゲンの枯渇が起こることによる可能性が考えられる。同様に、TCDD の雄型性行動抑制は、雄の脳の視床下部とその周辺の生殖機能を制御する領域内で E₂ 代謝酵素の CYP1A1 が誘導されるので⁴⁹⁾、E₂ 代謝が促進されて、正常な生殖機能を維持するために必要なアンドロゲンとエストロゲンのバランスが崩壊することにより発生する可能性がある。

論述してきたように、ダイオキシン類の生殖機能障害の機構を ER シグナル経路と AhR シグナル経路の相互作用によるエストロゲン作用障害に求める可能性は残っている。しかし、発生過程における生殖機能の発達は、様々なホルモンが、その作用時期や作用量を精密に制御された結果であるため、ダイオキシン類における生殖機能障害には、これらの量的変動の関与も十分に予想される。ダイオキシン類の毒性はむしろ複数の異なる機構によって構成されていると考えるほうが自然であろう。毒性発現機構の全貌を解明するには、様々なホルモンとの関連を含め、今後も多くの研究が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Abbott BD and Birnbaum LS: Effects of TCDD on embryonic ureteric epithelial EGF receptor expression and cell proliferation. *Teratology* 41: 71-84, 1990.
- 2) Abbott BD and Birnbaum LS: TCDD exposure of human embryonic palatal shelves in organ culture alters the differentiation of medial epithelial cells. *Teratology* 43: 119-132, 1991.
- 3) Allen JR and Barsotti DA: The effects of transplacental and mammary movement of PCBs on infant rhesus monkeys. *Toxicology* 6: 331-340, 1976.
- 4) Allen JR, Barsotti DA and Carstens LA: Residual effects of polychlorinated biphenyls on adult nonhuman primates and their offspring. *J. Toxicol. Environ. Health* 6: 55-66, 1980.
- 5) Amin S, Moore RW, Peterson RE and Schantz SL: Gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs alters adult expression of saccharin preference behavior in female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 22: 675-682, 2000.
- 6) Badawi AF, Cavalieri EL and Rogan EG: Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17beta-estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 21: 1593-1599, 2000.
- 7) Balthazart J and Ball GF: New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci.* 21: 243-239, 1998.
- 8) 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.

- 9) Birnbaum LS, Harris MW, Barnhart ER and Morrissey RE : Teratogenicity of three polychlorinated dibenzofurans in C57BL/6N mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90 : 206-216, 1987.
- 10) Birnbaum LS, Morrissey RE and Harris MW : Teratogenic effects of 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin and three polybrominated dibenzofurans in C57BL/6N mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107 : 141-152, 1991.
- 11) Birnbaum LS, Weber H, Harris MW, Lamb JC 4th, and McKinney JD : Toxic interaction of specific polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : increased incidence of cleft palate in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77 : 292-302, 1985.
- 12) Boersma ER and Lanting CI : Environmental exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins : consequences for longterm neurological and cognitive development of the child lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 478 : 271-287, 2000.
- 13) Buchanan DL, Ohsako S, Tohyama C, Cooke PS and Iguchi T : Dioxin inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves changes in cyclin and transforming growth factor-beta expression. *Toxicol. Sci.* 66 : 62-68, 2002.
- 14) Buchanan DL, Sato T, Peterson RE and Cooke PS : Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mouse uterus : critical role of the aryl hydrocarbon receptor in stromal tissue. *Toxicol. Sci.* 57 : 302-311, 2000.
- 15) Buchanan DL, Setiawan T, Lubahn DB, Taylor JA, Kurita T, Chunha GR and Cooke PS : Tissue compartment-specific estrogen receptor-alpha participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinology* 140 : 484-491, 1999.
- 16) 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.
- 17) Cai XM, Conney AH and Zhu BT : 17 β -Estradiol metabolism by selectively-expressed human cytochrome P450. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 39 : 2626, 1998.
- 18) Carver LA and Bradfield CA : Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vitro. *J. Biol. Chem.* 272 : 11452-11456, 1997.
- 19) Chaffin CL, Peterson RE and Hutz RJ : In utero and lactational exposure of female Holtzman rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : modulation of the estrogen signal. *Biol. Reprod.* 55 : 62-67, 1996.
- 20) Chahoud I, Hartmann J, Rune GM and Neubert D : Reproductive toxicity and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. Effects of single doses on the testis of male rats. *Arch. Toxicol.* 66 : 567-572, 1992.
- 21) Chahoud I, Krowke R, Bochert G, Burkle B and Neubert D : Reproductive toxicity and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 2. Problem of paternally-mediated abnormalities in the progeny of rat. *Arch. Toxicol.* 65 : 27-31, 1991.
- 22) Cicchetti DV and Kaufman AS : Effect of polychlorinated biphenyls on psychodevelopment. *Lancet* 359 : 1438, 2002.
- 23) Clancy AN, Zumpe D and Michael RP : Intracerebral infusion of an aromatase inhibitor, sexual behavior and brain estrogen receptor-like immunoreactivity in intact male rats. *Neuroendocrinology* 61 : 98-111, 1995.
- 24) Clancy AN, Zumpe D and Michael RP : Estrogen in the medial preoptic area of male rats facilitates copulatory behavior. *Horm. Behav.* 38 : 86-93, 2000.
- 25) Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan T, Brody J, Korach KS, Taylor J, Lubahn DB and Cunha GR : Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 : 6535-6540, 1997.
- 26) Courtney KD and Moore JA : Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20 : 396-403, 1971.
- 27) Couture LA, Harris MW and Birnbaum LS : Developmental toxicity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran in the Fischer 344 rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12 : 358-366, 1989.
- 28) Couture LA, Harris MW and Birnbaum SL : Characterization of the peak period of sensitivity for the induction of hydronephrosis in C57BL/6N mice following 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.* 15 : 142-150, 1990.
- 29) Couture-Haws L, Harris MW, Lockhart AC and Birnbaum LS : Evaluation of the persistence of

- hydronephrosis induced in mice following in utero and/or lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107 : 402-412, 1991.
- 30) Couture-Haws L, Harris MW, McDonald MM, Lockhart AC and Birnbaum LS : Hydronephrosis in mice exposed to TCDD-contaminated breast milk : identification of the peak period of sensitivity and assessment of potential recovery. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107 : 413-428, 1991.
 - 31) Cummings AM, Hedge JM and Birnbaum LS : Effect of prenatal exposure to TCDD on the promotion of endometriotic lesion growth by TCDD in adult female rats and mice. *Toxicol. Sci.* 52 : 45-49, 1999.
 - 32) Denis M, Cuthill S, Wikstr A, Poellinger L and Gustafsson J : Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 : 801-807, 1988.
 - 33) DeVito MJ, Thomas T, Martin E, Umbreit TH and Gallo MA : Antiestrogenic action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : tissue-specific regulation of estrogen receptor in CD1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113 : 284-292, 1992.
 - 34) 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.
 - 35) Faith RE and Moore JA : Impairment of thymus-dependent immune functions by exposure of the developing immune system to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *J. Toxicol. Environ. Health* 3 : 451-464, 1977.
 - 36) Feng XH, Filvaroff EH and Derynck R : Transforming growth factor-beta (TGF-beta) -induced down-regulation of cyclin A expression requires a functional TGF-beta receptor complex. Characterization of chimeric and truncated type I and type II receptors. *J. Biol. Chem.* 270 : 24237-24245, 1995.
 - 37) Fenton SE, Hamm JT, Birnbaum LS and Youngblood GL : Persistent abnormalities in the rat mammary gland following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicol. Sci.* 67 : 63-74, 2002.
 - 38) Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ : Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268 : 722-726, 1995.
 - 39) Fisher CR, Graves KH, Parlow AF and Simpson ER : Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 6965-6970, 1998.
 - 40) 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.
 - 41) Gallo MA, Hesse EJ, Macdonald GJ and Umbreit TH : Interactive effects of estradiol and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on hepatic cytochrome P-450 and mouse uterus. *Toxicol. Lett.* 32 : 123-132, 1986.
 - 42) Gasiewicz TA : TCDD and other acenegenic materials. Heyes WJ Jr and Laws ER Jr ed., *Handbook of Pesticide Toxicology* Vol. 3, pp. 1217-1269, Academic Press, San Diego, 1991.
 - 43) Gonzalez FJ and Fernandez-Salguero P : The aryl hydrocarbon receptor : studies using the AHR-null mice. *Drug Metab. Dispos.* 26 : 1194-1198, 1998.
 - 44) Gray LE Jr, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS and Birnbaum LS : Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters : reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131 : 108-118, 1995.
 - 45) Gray LE Jr and Ostby JS : In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133 : 285-294, 1995.
 - 46) Hamm JT, Sparrow BR, Wolf D and Birnbaum LS : In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters postnatal development of seminal vesicle epithelium. *Toxicol. Sci.* 54 : 424-430, 2000.
 - 47) Hassoun E, d'Argy R, Dencker L, Lundin L-G and Borwell P : Teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in BXD recombinant inbred strains. *Toxicol. Lett.* 23 : 37-42, 1984.
 - 48) Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y and Maeda S : Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252 : 445-449, 1998.

- 49) Huang P, Rannug A, Ahlbom E, Hakansson H and Ceccatelli S : Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the expression of cytochrome P450 1A1, the aryl hydrocarbon receptor, and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in rat brain and pituitary. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169 : 159-167, 2000.
- 50) Hurst CH, Abbott B, Schmid JE and Birnbaum LS : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) disrupts early morphogenetic events that form the lower reproductive tract in female rat fetuses. *Toxicol. Sci.* 65 : 87-98, 2002.
- 51) Jacobson JL and Jacobson SW : Postnatal exposure to PCBs and childhood development. *Lancet* 358 : 1568-1569, 2001.
- 52) Jongbloet PH, Roeleveld N and Groenewoud HMM : Where the boy's aren't : dioxin and the sex ratio. *Environ. Health Perspect.* 110 : 1-3, 2002.
- 53) Kazlauskas A, Poellinger L and pongratz I : Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* 274 : 13519-13542, 1999.
- 54) Kazlauskas A, Poellinger L and Pongratz I : The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J. Biol. Chem.* 275 : 41317-41324, 2000.
- 55) Klinge CM, Bowers JL, Kulakosky PC, Kamboj KK and Swanson HI : The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Mol. Cell. Endocrinol.* 157 : 105-119, 1999.
- 56) Lackman G-M : Effect of polychlorinated biphenyls on psychodevelopment. *Lancet* 359 : 1437-1438, 2002.
- 57) Lai TJ, Guo YL, Guo NW and Hsu CC : Effect of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls on cognitive development in children : a longitudinal study in Taiwan. *Brit. J. Psychiat.* 178 : s49-52, 2001.
- 58) Lambrecht LK, Barsotti DA and Allen JR : Responses of nonhuman primates to a polybrominated biphenyl mixture. *Environ. Health Perspect.* 23 : 139-145, 1978.
- 59) Landrigan PJ : Pesticides and polychlorinated biphenyls : an analysis of the evidence that they impair children's neurobehavioral development. *Mol. Genet. Metabol.* 73 : 11-17, 2001.
- 60) LaPres JJ, Glover E, Dunham EE, Bungler MK and Bradfield CA : ARA9 modifies agonist signaling through an increase in cytosolic aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 275 : 6153-6159, 2000.
- 61) Levin ED, Schantz SL and Bowman RE : Delayed spatial alternation deficits resulting from perinatal PCB exposure in monkeys. *Arch. Toxicol.* 62 : 267-273, 1988.
- 62) Luster MI, Boorman GA, Dean JH, Harris MW, Luebke RW, Padarathsingh ML and Moore JA : Examination of bone marrow, immunologic parameters and host susceptibility following pre- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Internatl. J. Immunopharmacol.* 2 : 301-310, 1980.
- 63) Mably TA, Moore RW and Peterson RE : In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114 : 97-107, 1992.
- 64) MacLusky NJ and Naftolin F : Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211 : 1294-1303, 1981.
- 65) Marks TA, Kimmel GL and Staples RE : Influence of symmetrical polychlorinated biphenyl isomers on embryo and fetal development in mice. II. Comparison of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, 3,3',5,5'-tetrachlorobiphenyl, and 3,3',4,4'-tetramethylbiphenyl. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13 : 681-693, 1989.
- 66) McEwen BS : Neural gonadal steroid actions. *Science* 211 : 1303-1311, 1981.
- 67) McNulty WP : Toxicity and fetotoxicity of TCDD, TCDF, and PCB isomers in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Environ. Health Perspect.* 60 : 77-88, 1985.
- 68) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M and Fujii-Kuriyama Y : Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2 : 645-654, 1997.
- 69) Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr and Needham LL : Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 348 : 409, 1996.
- 70) Mocarelli P, Gerthoux PM, Ferrari E, Patterson DG Jr, Lieszak SM, Brambilla P, Vincoli N, Signorini S, Tramacere P, Carreri V : Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offsprings. *Lancet* 355 :

- 1858-1863, 2000.
- 71) Moran FM, Conley AJ, Corbin CJ, Enan E, VandeVoort C, Overstreet JW and Lasley BL : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin decreases estradiol production without altering the enzyme activity of cytochrome P450 aromatase of human luteinized granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* 62 : 1102-1108, 2000.
 - 72) Morrissey RE, Harris MW, Diliberto JJ and Birnbaum LS : Limited PCB antagonism of TCDD-induced malformations in mice. *Toxicol. Lett.* 60 : 19-25, 1992.
 - 73) Moshhammer H and Neuberger M : Sex ratio in the children of the Austrian chloracne cohort. *Lancet* 356 : 1271-1272, 2000.
 - 74) Murray FJ, Smith FA, Nitschke KD, Humiston CG, Kochiba RJ and Schetz BA : Three-generation reproduction study of rats given 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50 : 241-252, 1979.
 - 75) Nagao T, Golor G, Hagenmaier H and Neubert D : Teratogenic potency of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran and of three mixtures of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in mice. Problems with risk assessment using TCDD toxic-equivalency factors. *Arch. Toxicol.* 67 : 591-597, 1993.
 - 76) Neubert D and Dillman I : Embryonic effects in mice treated with 2,4,5-trichloroacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 272 : 243-264, 1972.
 - 77) Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS and Pfaff DW : Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 : 1746-1481, 1997.
 - 78) Poland A, Glover E and Kende AS : Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 251 : 4936-4946, 1976.
 - 79) Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP and Becker JL : Endometriosis in rhesus monkey (*Mecca mulatta*) chronically exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundum. Appl. Toxicol.* 21 : 433-441, 1993.
 - 80) Rissman EF, Harada N and Roselli CE : Effect of vorozole, an aromatase enzyme inhibitor, on sexual behavior, aromatase activity and neural immunoreactivity. *J. Neuroendocrinol.* 8 : 199-210, 1996.
 - 81) Robertson KM, O'Donnell L, Jone MEE, Meachen SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI and Simpson ER : Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 : 7986-7989, 1999.
 - 82) Roegge CS, Seo BW, Crofton KM and Schantz SL : Gestational-lactational exposure to Aroclor 1254 impairs radial-arm maze performance in male rats. *Toxicol. Sci.* 57 : 121-130, 2000.
 - 83) Rogan WJ, Gladen BC, Guo YL and Hsu CC : Sex ratio after exposure to dioxin-like chemicals in Taiwan. *Lancet* 353 : 206-207, 1999.
 - 84) Romkes M and Safe S : Comparative activities of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and progesterone as antiestrogens in the female rat uterus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92 : 368-380, 1988.
 - 85) Ryan JJ, Hsu CC, Boyle MJ and Guo YL : Blood serum levels of PCDFs and PCBs in Yu-Cheng children peri-natally exposed to a toxic rice oil. *Chemosphere* 29 : 1263-1278, 1994.
 - 86) Safe SH : Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26 : 371-399, 1986.
 - 87) Schantz SL, Barsotti DA and Allen JR : Toxicological effects produced in nonhuman primates chronically exposed to fifty parts per trillion 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48 : A180 (360), 1979.
 - 88) Schantz SL, Ferguson SA and Bowman RE : Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on behavior of monkeys in peer groups. *Neurotoxicol. Teratol.* 14 : 433-446, 1992.
 - 89) Schantz SL, Levin ED, Bowman RE, Heironimus MP and Laughlin NK : Effects of perinatal PCB exposure on discrimination-reversal learning in monkeys. *Neurotoxicol. Teratol.* 11 : 243-250, 1989.
 - 90) Schantz SL, Moshtaghian J and Ness DK : Spatial learning deficits in adult rats exposed to ortho-substituted PCB congeners during gestation and lactation. *Fundum. Appl. Toxicol.* 26 : 117-126, 1995.
 - 91) Schantz SL, Seo BW, Moshtaghian J, Peterson RE and Moore RW : Effects of gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs on spatial learning. *Neurotoxicol. Teratol.* 18 : 305-313, 1996.

- 92) Schantz SL, Seo BW, Wong PW and Pessah IN : Long-term effects of developmental exposure to 2, 2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) on locomotor activity, spatial learning and memory and brain ryanodine binding. *Neurotoxicol.* 18 : 457-467, 1997.
- 93) Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC and Bradfield CA : Characterization of a murine Ahr null allele : involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 : 6731-6736, 1996.
- 94) Seo BW, Sparks AJ, Medora K, Amin S and Schantz SL : Learning and memory in rats gestationally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol. Teratol.* 21 : 231-239, 1999.
- 95) Spink DC, Lincoln DW, Dickerman HW and Gierthy JF : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin causes an extensive alteration of 17 beta-estradiol metabolism in MCF-7 breast tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 6917-6921, 1990.
- 96) 多田 裕 : 外因性内分泌攪乱物質と周産期の保健指導, *周産期医学* 29 : 443-447, 1999.
- 97) Tian Y, Ke S, Thomas T, Meeker RJ and Gallo MA : Transcriptional suppression of estrogen receptor gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67 : 17-24, 1998.
- 98) Tong W and Pollard JW : Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4 nuclear translocation, cyclin E- and cyclin A-cdk2 kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 2251-2264, 1999.
- 99) Vos JG and Moore JA : Suppression of cellular immunity in rats and mice by maternal treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Internatl. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 47 : 777-794, 1974.
- 100) Walkowiak J, Wiener J-A, Fastabend A, Heinzow B, Kramer U, Schmidt E, Steingruber H-J, Wundram S and Winneke G : Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and quality of the home environment : effects on psychodevelopment in early childhood. *Lancet* 358 : 1602-1607, 2001.
- 101) Wang F, Samudio I and Safe S : Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17 beta-estradiol : mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 172 : 91-103, 2001.
- 102) Wang X, Porter W, Krishnan V, Narasimhan TR. and Safe S : Mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-mediated decrease of the nuclear estrogen receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 96 : 159-166, 1993.
- 103) Watanabe M and Sugahara T : Experimental formation of cleft palate in mice with polychlorinated biphenyls (PCB). *Toxicology* 19 : 49-53, 1981.
- 104) Widholm JJ, Clarkson GB, Strupp BJ, Crofton KM, Seegal RF and Schantz SL : Spatial reversal learning in Aroclor 1254-exposed rats : sex-specific deficits in associative ability and inhibitory control. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174 : 188-198, 2001.
- 105) 吉村健清, 金子 聡, 早瀬仁美 : 油症における出生性比. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編, *油症研究—30年の歩み—*, pp.312-315, 九州大学出版会, 福岡, 2000.
- 106) Yoshimura H, Yoshihara S, Ozawa N and Miki M : Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320 : 179-192, 1979.
- 107) Zhao F, Mayura K, Harper N, Safe SH and Phillips TD : Inhibition of 3,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl-induced fetal cleft palate and immunotoxicity in C57BL/6 mice by 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl. *Chemosphere* 34 : 1605-1613, 1997.
- 108) Zhu BT and Conney AH : Functional role of estrogen metabolism in target cells : review and perspectives. *Carcinogenesis* 19 : 1-27, 1998.

(受付 2003-3-24)

平成15年 5 月 25 日 発行

発行所 〒 812-8582 福岡市東区馬出 3 丁目1-1
九州大学医学部内

福岡医学会

印刷所 福岡市南区向野 2 丁目13-29

秀巧社印刷株式会社

頒価 2,000 円