

油 症 (塩化ビフェニール中毒)

研 究 報 告 第 17 集

平成 11 年 5 月

九州大学油症治療研究班
長崎油症研究班

**The Seventeenth Reports of the Study on “Yusho”
and PCB (Polychlorinated Biphenyls)**

May 1999

Study Group for the Therapy of “Yusho”

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

油症とPCBに関する研究

報告集 第17集

(福岡医学雑誌第90巻 第5号 平成11年5月)

目 次

1. 序 言……………小栗 一太…(1)
2. 1997・1998年度の福岡県年次検診における皮膚症状
……………中山樹一郎・利谷 昭治・旭 正一・古江 増隆…(3)
3. 油症患者における免疫機能の検討……………辻 博・平橋 高明・緒方 久修・藤島 正敏…(7)
4. 油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学的調査(第三報)
……………橋口 勇・古川 和洋・赤峰 昭文・福山 宏・奥村 英彦…(10)
5. 皮脂中PCB濃度の身体部位による相違と皮脂取りシートを用いた皮脂採取の試み
……………渡辺 雅久・小川 文秀・片山 一郎・徳末 有香…(14)
6. 油症患者の臨床検査値と血中PCB濃度の関連
——1993年全国油症患者追跡検診結果より——……………徳永 章二・廣田 良夫・片岡恭一郎…(17)
7. ラットにおけるダイオキシン類の消化管吸収に及ぼすプロトポルフィリンの効果
……………森田 邦正・松枝 隆彦・飯田 隆雄…(22)
8. ラットにおけるPCDD及びPCDFの消化管吸収に及ぼす緑色野菜の効果
……………森田 邦正・松枝 隆彦・飯田 隆雄…(31)
9. 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——
……………中川 礼子・中村 又善・平川 博仙・堀 就英・飯田 隆雄…(44)
10. 高分離能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析計による全PCB異性体の分析
……………三村 敬介・田村 水穂・原口 浩一・増田 義人…(52)
11. 油症患者母乳及び血液中の全PCB異性体の分析
……………三村 敬介・田村 水穂・原口 浩一・増田 義人…(62)
12. 3,3',4,4',5-Penta-および2,2',3,3',4,4'-Hexachlorobiphenylの代謝研究
……………原口 浩一・広瀬由美子・増田 義人・加藤 善久・木村 良平…(70)
13. 動物肝ミクロゾームによる四塩素化ビフェニル代謝の比較検討
……………古賀 信幸・金丸 知代・大石奈穂子・松島 優子
加藤 祥子・吉村 英敏・黒木 広明…(80)

14. 1-ニトロピレン誘発肺腫瘍における PCBs の影響：予備的検討
中西 洋一・白 鳳・高山 浩一・裴 新海
 井上 孝治・尾崎 真一・出水みいる・高木 陽一
 原 信之・常盤 寛・増田 義人…(91)
15. メチルスルホニル PCBs 同族体によるヒトリンパ球培養細胞の姉妹染色分体交換誘発性
 (英文)長山 淳哉・長山 真弓・原口 浩一・黒木 広明・増田 義人…(98)
16. 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
吉村 俊朗・沖田 実・川副 巧成・中野 治郎・中尾 洋子…(106)
17. コプラナーPCB による小胞体局在性ストレスタンパク質の発現抑制
田崎 健二・石井 祐次・石田 卓巳・小栗 一太…(111)
18. 高毒性コプラナーPCB によるラット肝分子シャペロン HSP70 および HSP90 の誘導
福田亜弥子・石井 祐次・田崎 健二
 松末 公彦・石田 卓巳・小栗 一太…(119)

The Seventeenth Reports of the Study on Yusho and PCB
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 90, No. 5, 1999)

CONTENTS

1. ForewordK. Oguri···(1)
2. Evaluation of Dermatological Symptoms of Yusho Patients in the Annual Examination
in 1997-1998J. Nakayama, S. Toshitani, M. Asahi and M. Furue···(3)
3. Serum Immunoglobulin Concentrations and Autoantibodies in Patients with Yusho ...
.....H. Tsuji, T. Hirahashi, H. Ogata and M. Fujishima···(7)
4. An Epidemiologic Examination on the Prevalence of the Periodontal Diseases and Oral
Pigmentation in Yusho Patients in 1998I. Hashiguchi, K. Furukawa, A. Akamine
H. Fukuyama and H. Okumura···(10)
5. Site Specific Difference of PCB Concentration in the Skin Derived Sebum and Collection
of Excreted Sebum with Commercial Sebum-remover Sheet
.....M. Watanabe, F. Ogawa, I. Katayama and Y. Tokusue···(14)
6. Association between the Results of Blood Test and Blood PCB Level of Chronic Yusho
Patients Twenty Five Years after the Outbreak
.....S. Tokunaga, Y. Hirota and K. Kataoka···(17)
7. Effect of Protoporphyrin on Digestive Tract Absorption of Dioxins in Rats
.....K. Morita, T. Matsueda and T. Iida···(22)
8. Effect of Green Vegetable on Digestive Tract Absorption of Polychlorinated Dibenzo-*p*-
dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans in Rats.....K. Morita, T. Matsueda and T. Iida···(31)
9. Blood PCB Analysis by Capillary Column-Gas Chromatograph/Quadruple Mass
Spectrometer
— Comparison with Packed Column-Electron Capture Detector/Gas Chromato-
graph —R. Nakagawa, M. Nakamura, H. Hirakawa
T. Hori and T. Iida···(44)
10. Analysis of 209 PCB Congeners by High Separation Gas Chromatography/Low Resolu-
tion Mass SpectrometerK. Mimura, M. Tamura, K. Haraguchi and Y. Masuda···(52)
11. Analysis of All PCB Congeners in Breast Milk and Blood of Yusho Patients
.....K. Mimura, M. Tamura, K. Haraguchi and Y. Masuda···(62)
12. Metabolism of 3,3',4,4',5-Penta- and 2,2',3,3',4,4'-Hexachlorobiphenyls in Rats
.....K. Haraguchi, Y. Hirose, Y. Masuda, Y. Kato and R. Kimura···(70)

13. Comparative Study on Metabolism of Three Tetrachlorobiphenyls with Animal Liver
Microsomes.....N. Koga, T. Kanamaru, N. Oishi, Y. Matsushima
S. Kato, H. Yoshimura and H. Kuroki... (80)

14. Effect of PCBs on Mouse Lung Tumorigenesis Induced by 1-nitropyrene : a Preliminary
Report.....Y. Nakanishi, F. Bai, K. Takayama, X. Pei, K. Inoue, S. Osaki
M. Izumi, Y. Takaki, N. Hara, H. Tokiwa and Y. Masuda... (91)

15. Induction of Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes with Methyl-
sulphonyl PCB CongenersJ. Nagayama, M. Nagayama, K. Haraguchi
H. Kuroki and Y. Masuda... (98)

16. Influential Factors in Elevation of Serum Creatine Phosphokinase for the Patients with
Kanemi YushoT. Yoshimura, M. Okita, K. Kawazoe, J. Nakano and Y. Nakao... (106)

17. Suppression of Stress Proteins in Endoplasmic Reticulum in Liver Cytosol of Rats
Treated with a Highly Toxic Coplanar PCB ...K. Tasaki, Y. Ishii, T. Ishida and K. Oguri... (111)

18. Induction of Molecular Chaperones HSP70 and HSP90 in Rat Liver Cytosol by a Highly
Toxic Coplanar PCB.....A. Fukuda, Y. Ishii, K. Tasaki, K. Matsusue
T. Ishida and K. Oguri... (119)

序 言

厚生省油症治療研究班・班長

九州大学 大学院 薬学研究科・教授

小 栗 一 太

Foreword

Kazuta OGURI

*Chief, Study Group for the Therapy
of "Yusho", the Ministry of Health and Welfare,
and Professor, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School, Kyushu University*

This 17th collection of reports of study on "Yusho" contains papers describing the results of studies conducted by the members of the Study Group during the past 2 years. In this forward, the contribution patients made to our Study Group by participating to "Yusho" examination is greatly appreciated for followup study of "Yusho" even after over 30 years of the outbreak. Even more impressive is the fact that every member of our group made efforts to help and support the patients by the medical examination and basic research for these long years.

As a special comment, a previous report from our group on volume 9 in 1983 is introduced in relation to the recent great attention with endocrine disrupters. The study group for the growth and sexual maturation in department of pediatrics, Kurume University School of Medicine was 13 patients aged 12 to 15 years of 7 boys and 6 girls. Though no relationship between the blood PCB level and the growth or sexual maturation was noted in the study, further need of the observation has been commented for some signs in girls. An additional item on the effect of causal agents of "Yusho" as endocrine disrupters is a recent weighty concern in our group.

1968年の油症発生以来すでに31年が経過しました。1969年に、はじめて油症報告集が福岡医学雑誌の特集号として出版され、それ以降2年毎に発行されてきた特集号「油症とPCBに関する研究」報告集も、第17集を数えるに至りました。この間、油症をめぐる多くの方々が検診と研究に携わってこられました。油症とはなにか、どのような影響があらわれるのか。初期に顕著であった影響がいつまでも続くのか。年月を経ることによって影響は軽減するのか。患者さんの健康状態を気遣いつつ、地道な検診と体内に残留した原因物質の着実な分析が継続して行われ、集計結果の解析がつけられてきました。原因物質の体内からの排泄の促進あるいはその代謝分解についても研究がつけられてきました。患者さんの願いであり、油症治療研究班の本願でもある油症の根治療法は、残念ながら達成されていません。しかし、これまでの、油症治療研究の歩みは、油症患者さんの協力があってこそ成り立ってきました。油症治療研究班と追跡調査班の真剣な活動は、ボランティアとして受診して協力されてきた患者さんにとっても、健康への影響に対する不安を癒す支えになってきたと考えます。また、その背景には、この油症治療研究班が、医学部の診療科の医師をはじめとして、歯科研究者、基礎研究それぞれの専門家が協力して、30年間よく専門性を発揮して、それぞれの時代にふさわしい調和のとれた検診と研究体制を維持してきたこと、すなわち長期間の検診や研究の過程において、特定の利害関係に左右されない体制を保ってきたことがあると考えます。

第 17 集を発刊するに当たり、これまでの各研究者が協道にそれることなく辿ってきた困難な油症治療研究における一貫した歩みの確かさを感じています。

ここで、この 2 年間、油症を取り巻く状況にあった変化について触れておく必要があります。内分泌攪乱物質いわゆる環境ホルモンの 1 つにダイオキシン類が挙げられてきたことです。野生生物あるいは実験動物において認められる内分泌攪乱作用が油症にもあるのではないかについての懸念です。この問題に関連して、すでに、1983 年の油症報告第 9 集に「油症患児の成長・二次性徴発現」と題して報告があります。当時久留米大学医学部小児科において経過観察中の油症児と一斉検診を受診したうちの小児にアンケート調査をして、身体の成長と二次性徴の発現への影響について報告されたものです。発育には油症児と正常児との間に差を認めなかったとされています。その他に、油症児の発育において、あまり影響を認められないという報告と女兒に低出生体重児が多いあるいは男児の発育に負の影響が認められたという報告のあることも引用されています。また、油症児の二次性徴、性成熟度を検討されたはじめての例として、男児 1 例の副腎性器症候群による性早発症を除いて性成熟度に異常を認めないと考察されています。事件発生の際に胎児期あるいは乳児期であった油症児に関する思春期の貴重なデータです。ところが最近、イタリアのセベソで起こったダイオキシン汚染では、事件から 20 年後の報告として、高濃度汚染地区の両親からは女兒が圧倒的に多く生まれたとの論文が出されました。ダイオキシンによる内分泌攪乱によると考えられる影響が人間でもおこっていたという衝撃的な報告です。ところが、最近この報告を受けたかたちで、台湾で起こった油症事件における影響について報告されました。1978 年から 1985 年までに生まれた 137 人のお子さんの性比を調べても女子の出産が特に多くなかったとされています。まとめとして、ダイオキシン類は、ヒトにおいてのことになりますが、敏感に性比に影響を及ぼすことはないものと考察されています。このように、矛盾する報告が出される状況において、わが国の油症患者さんから生まれたお子さん達の性比にも影響があるのか懸念されます。これまで調査されていないのではなく、むしろ調査された当時において危機感をつのらせるような結果ではなかったようです。どのような結果であるにしろ、注目されていることがらですので、わが国の油症事件における性比への影響として学術的報告にまとめるべく作業がすすめられています。

油症事件の発生以来すでに 31 年を経過して発行されます第 17 集に、はじめて序言を述べる機会をいただいて先達の足跡を振り返ってみました。改めて、この研究班が組織的な疲労をほとんどおこすことなく活動してきたその根元には、長年月に亘って活躍してこられた班員の方々の視点の確かさに預かるところが大きいと感じ入っている次第です。

1997・1998年度の福岡県年次検診における皮膚症状

福岡大学医学部皮膚科教室 (主任: 中山 樹一郎教授)

中山 樹一郎・利谷 昭治

産業医科大学皮膚科教室 (主任: 旭 正一教授)

旭 正 一

九州大学医学部皮膚科 (主任: 古江 増隆教授)

古 江 増 隆

Evaluation of Dermatological Symptoms of Yusho Patients in the Annual Examination in 1997-1998

Juichiro NAKAYAMA and Shoji TOSHITANI

*Department of Dermatology (Director : Prof. J. Nakayama),
Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka 814-0180*

Masakazu ASAHI

*Department of Dermatology (Director : Prof. M. Asahi),
University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu 807-8555*

Masutaka FURUE

*Department of Dermatology (Director : Prof. M. Furue),
Kyushu University Faculty of Medicine, Fukuoka 812-8582*

Abstract We analyzed the severity grades of the skin symptoms of Yusho patients who visited the annual examinations in 1997 and 1998. The severity grades of the skin symptoms clearly improved. The patients graded as 0 I-II increased and those graded as II III-III decreased as compared to the data in 1993 and 1994. The skin severity scores did not change much, although the patients who showed 0 or 1 reached more than 60% in both 1997 and 1998. The blood PCB concentration of Yusho patients also clearly decreased, especially in the patients who showed "A" pattern.

はじめに

1997年度と1998年度に実施された油症患者の一斉検診時における皮膚症状の所見についてまとめたので報告する。今回の油症の皮膚症状および血中PCB濃度との相関性の分析から、4～5年前のデータと比較してもさらに皮膚重症度の軽快化、および血中PCBのAパターンにおける濃度低下が明らかとなった。すなわち、油症患者で比較的高度な皮膚症状を呈してきたAパターンの患者でも皮膚症状の軽快とともに血中

のPCB濃度の明らかな低下が今回示された。皮膚症状の重症度得点については若干の低下が示された。以上より、油症患者の皮膚症状の評価も現状をより反映した、かつより簡便な方法でよいのではないかと考えられた。

1997・1998年度における検診結果

受診状況

1997年度の受診者は89名(男性33名,女性56名,内87名が皮膚科検診および血中PCB濃度測定)、1998年度は80名(男性33名,女性47名,内79名が

皮膚科検診, 78名が血中PCB濃度測定)であった。

皮膚重症度・皮膚重症度得点数

表1に1997年度および1998年度の皮膚重症度を示す。参考に1993年度および1994年度のデータ³⁾を表に付記した。今回のデータ分析より特徴的なことは、重症度²⁾の0・IあるいはIに分類された例が97年度で22名(25.3%), 98年度で14名(17.7%)と93年度および94年度に較べ明らかな増加を示し、さらにI・IIあるいはIIに分類された例が97年度で19名(21.8%), 98年度で16名(20.3%)と同様に明らかな増加を示した点である。逆に、97年度、98年度におけるII・IIIあるいはIIIに分類された例がそれぞれ11名(12.6%), 12名(15.2%)と93年度、94年度に較べ著明な減少を示した。以上のデータから、油症患者の皮膚症状の重症度は最近さらに軽快していると結論された。

表2に皮膚重症度得点数を示す。97年度、98年度のデータをみると、得点数が0・1の例がそれぞれ62.1%、

65.8%と、93年度、94年度の各59.3%、52.6%に較べ約10%増加した。すなわち、近年、皮膚症状がほとんどみられない症例がさらに増加していることが示唆された。

血中PCBパターン、PCB濃度と皮膚重症度との相関性

1997年度および1998年度の油症患者の血中PCBパターンの比率は、表3に示すごとくA、B、BC、およびCパターンのいずれも従来からの比率と大きく変わっていない。しかしながら、血中PCBパターンと皮膚重症度の相関性をみると、Aパターンでは、1995年度あるいは1996年度のデータ⁴⁾と比較しても、重症度IあるいはIIの比率が明らかに増加し、IIIの比率が著明に減少している。すなわち、各患者の血中PCBパターンは変化していないが、明らかな皮膚症状の軽快がみられるという傾向がみられた。

表4に各血中PCBパターンと血中PCB濃度および皮膚重症度得点数の相関性を示す。いずれのパター

表1 皮膚重症度

重症度	年度	1993年	1994年	1997年	1998年
		例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
0		41(47.7)	37(47.4)	34(39.0)	36(45.6)
0・I		7(12.7)	4(14.1)	13(25.3)	8(17.7)
I		4	7	9	6
I・II		2(2.3)	1(3.8)	7(21.8)	3(20.8)
II		0	2	12	13
II・III		21(33.7)	18(30.8)	8(12.6)	9(15.2)
III		8	6	3	3
III・IV		3(3.5)	3(3.8)	1(1.1)	1(1.3)
IV		0	0	0	0
計		86	78	87	79

表2 皮膚重症度得点数

得点数	年度	1993年	1994年	1997年	1998年
		例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
0・1		51(59.3)	41(52.6)	54(62.1)	52(65.8)
2・3		21(24.4)	18(23.1)	21(24.1)	14(17.7)
4・5		7(8.1)	11(14.1)	7(8.0)	8(10.1)
6・7		4(4.7)	4(5.1)	3(3.4)	4(5.1)
8・9		3(3.5)	3(3.8)	1(1.1)	1(1.3)
10~13		0	1(1.3)	1(1.1)	0(0)
14~		0	0	0(0)	0(0)
計		86	78	87	79

表3 血中 PCB パターンと皮膚重症度の相関性

1997年						1998年							
皮膚重症度 パターン	0	I	II	III	IV	計	皮膚重症度 パターン	0	I	II	III	IV	計
A	15 (42.9)	8 (22.9)	8 (22.9)	4 (11.4)	0 (0)	35	A	10 (32.3)	3 (9.7)	15 (48.4)	3 (9.7)	0 (0)	31
B	12 (63.2)	2 (10.5)	5 (26.3)	0 (0)	0 (0)	19	B	13 (81.3)	1 (6.3)	2 (12.5)	0 (0)	0 (0)	16
B C	1 (25.0)	1 (25.0)	2 (50.0)	0 (0)	0 (0)	4	B C	1 (50.0)	0 (0)	1 (50.0)	0 (0)	0 (0)	2
C	19 (65.5)	5 (17.2)	5 (17.2)	0 (0)	0 (0)	29	C	20 (69.0)	4 (13.8)	4 (13.8)	1 (3.4)	0 (0)	29
() : %						87	() : %						78

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

1997年				1998年			
パターン	例数	平均濃度 (ppb)	平均重症度 得点数	パターン	例数	平均濃度 (ppb)	平均重症度 得点数
A	36	3.49	2.29 (n=35)	A	31	3.96	2.35
B	20	2.68	1.05 (n=19)	B	16	2.53	0.44
B C	4	2.65	2.00	B C	2	2.24	2.00
C	29	2.19	1.14	C	29	1.87	1.36
計	89	2.85	1.62	計	78	2.85	1.58

ンも平均濃度の明らかな低下がみられる。たとえば、93年度、94年度のAパターンの平均濃度は7.03 ppb、6.34 ppbであるのに対し、97年度、98年度では3.49 ppb、3.96 ppbと約40～50%の低下がみられる。今回調査した皮膚症状の平均重症度得点数は各パターンで4～5年前のデータとそれ程大きな差はなかった。

考 察

1997年度および1998年度の油症患者一斉検診時に得られた皮膚症状の評価を行い、併せて患者血中のPCBパターンおよびPCB濃度との相関性についてのデータを得た。今回の調査結果より、近年の皮膚症状の自然軽快がさらに進み、血中PCB濃度も明らかな低下がみられる、という結論を得た。ただし、各患者での血中PCBパターンの変化は認められなかった。

今回の検診時に得られた皮膚症状の程度の評価法において、本文中の表1に示すごとく、皮膚重症度では0・I～IIの比率が明らかな増加を示しII・III～IIIの比率が明らかに低下を示しており、ここ2年間の皮膚症状の軽快をそのまま表している。一方、皮膚重症度

得点数をみると、本文中の表2に示すごとく、93年度、94年度と比較してもほとんど差が認められない。すなわち、油症の皮膚症状の軽快に応じて評価法の改変が重症度得点数で示すという方法¹⁾でなされたが、この方法では現在の非常に軽快した皮膚症状の評価が客観的にはできない状況となっている。新たな評価法を作成し、これからの油症の皮膚症状の推移を新たな観点から評価する時期に来ていると思われる。私見であるが、油症患者の皮膚症状の現状から、面皰・痤瘡様皮疹の程度、部位、活動性(炎症の有無、チーズ様物質の有無など)にしぼったものでも良いように思われる。また、患者の高齢化もあり、直接的な油症の皮膚症状ではないが皮膚癌やその他の良性腫瘍にも今後注意が必要であろう。

文 献

- 1) 旭 正一, 幸田 弘, 利谷昭治: 昭和48年度一斉検診における油症皮膚重症度の変動と新しい皮膚重症度評価試案. 福岡医誌 66: 629-634, 1975.
- 2) 利谷昭治, 北村公一: 油症(塩化ビフェニール

中毒症)の臨床的観察 とくに皮膚所見のその後の経過. 福岡医誌 62:132-138, 1971.

3) 中山樹一郎, 堀 嘉昭, 利谷昭治, 旭 正一: 1993・1994年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状. 福岡医誌 86:277-281, 1995.

4) 中山樹一郎, 堀 嘉昭, 利谷昭治, 旭 正一: 1995・1996年度の福岡県年次検診における皮膚症状—各年齢層での血中PCB濃度と皮膚重症度との相関性—. 福岡医誌 88:236-239, 1997.
(受付 1999-3-17)

油症患者における免疫機能の検討

九州大学医学部第二内科学教室
 辻 博・平橋 高明
 緒方久修・藤島正敏

Serum Immunoglobulin Concentrations and Autoantibodies in Patients with Yusho

Hiroshi TSUJI, Takaaki HIRAHASHI, Hisanobu OGATA and Masatoshi FUJISHIMA

*Second Department of Internal Medicine (Director : Prof. M. Fujishima),
 Faculty of Medicine, Kyushu University 60, Fukuoka 812-8582, Japan*

Abstract To evaluate chronic immune effects of polychlorinated biphenyl (PCB), serum immunoglobulin concentrations and autoantibodies were studied in 79 patients with Yusho in 1997. Serum levels of immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) were elevated in 10 cases (12.7%), 19 cases (24.1%) and 7 cases (8.9%), respectively. Autoantibodies were present in some patients of Yusho; 10 cases (12.7%) for rheumatoid factor and 36 cases (45.6%) for antinuclear antibody. LE factor was not detected. There were no significant correlations between blood PCB concentrations and serum immunoglobulin concentrations, or presence of autoantibodies. We conclude that antinuclear antibody in patients with Yusho is frequent, although 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⁷⁾. 油症発生以来29年を経過し, 血中PCB濃度は低下し種々の亜急性中毒症状は軽快している. しかし, 重症例においては体内のPCB濃度が今なお高く, 血中PCBの組成にはいまだに特徴的なパターンがみられる²⁾³⁾. また, PCBよりさらに強力な毒性をもつ polychlorinated dibenzofuran (PCDF) の体内残留も指摘されており⁴⁾⁶⁾, 慢性中毒に移行していると推定される.

我々は油症発生28年後の1996年度福岡県油症一斉検診において, 血中PCB濃度が高値の油症患者では抗サイログロブリン抗体の出現を高頻度に認め, 油症患者における免疫機能の障害が推測された¹⁰⁾. 動物実験においてPCBあるいはPCDFによる種々の免疫機

能の障害が報告されているが, 油症患者の臨床検査所見において免疫機能についての報告は少ない. 今回我々は, 油症患者において免疫グロブリンおよび各種自己抗体を測定し, 油症原因物質の免疫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

1997年度福岡県油症一斉検診を受診し, 免疫機能検査に同意が得られた79例を対象者とした. 1997年3月現在の福岡県全油症認定患者673名の11.7%であった. 油症患者の内訳は男性25例, 女性54例で, 平均年齢は63.3±12.5歳(29-88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った. 免疫機能検査として免疫グロブリンIgA, IgGおよびIgMはラテックス凝集免疫法(LX試薬“栄研”IgA

II, IgG IIおよびIgM II, 栄研化学)で測定した。自己抗体の測定は, リウマチ因子はラテックス凝集法(エルピアエース RF, ヤトロン)で, 抗核抗体は Hep-2 細胞および抗ヒト γ -グロブリンウサギ FITC 標識抗体(DAKO)を用い蛍光抗体法で, LE 因子はラテックス凝集法(LE ラテックステスト, 日本凍結乾燥研究所)で施行した。また, PCB の測定は福岡県保健環境研究所, 福岡市衛生試験場, 北九州市環境科学研究所および第一薬科大学物理分析で行った。

結果は平均±標準偏差(mean±S.D.)で表し, 平均値の比較については t 検定を用いた。また, 異常値の出現頻度の比較は χ^2 検定で行った。

結 果

1997 年度福岡県油症一斉検診において免疫機能検査に同意が得られた油症患者 79 例における, 免疫グロブリンの異常は IgA の上昇を 10 例 (12.7%), IgG の上昇を 19 例 (24.1%), IgM の上昇を 7 例 (8.9%) に認め, IgG の上昇が最も頻度が高かった (Table 1)。免疫グロブリン IgA, IgG および IgM の 1 分画以上の上昇を認めるものは 30 例 (40.0%) であった。しかし, 免疫グロブリン IgA, IgG あるいは IgM の低下はみられなかった。

油症患者における自己抗体についてはリウマチ因子を 10 例 (12.7%) に, 抗核抗体を 36 例 (45.6%) に認めた。抗核抗体陽性者 36 例の内訳は 2560 倍が 1 例, 640 倍が 2 例, 160 倍が 6 例, 80 倍が 3 例, 40 倍が 24 例であり, 低力価のものが多かった。抗核抗体を認めた油症患者に全身性エリテマトーデス (SLE) をはじめとする自己免疫疾患によると思われる症状はみられ

Table 1 油症患者 79 例における免疫グロブリン異常および自己抗体陽性の頻度

		No. (%)
IgA	上昇	10 (12.7)
	低下	0 (0)
IgG	上昇	19 (24.1)
	低下	0 (0)
IgM	上昇	7 (8.9)
	低下	0 (0)
リウマチ因子		10 (12.7)
抗核抗体		36 (45.6)
LE 因子		0 (0)

なかった。LE 因子は全例陰性であった。

油症患者に認めた免疫グロブリンの上昇と PCB との関連を検討するために, 油症患者 79 例について血中 PCB 濃度と免疫グロブリン IgA, IgG および IgM の相関について検討した。血中 PCB 濃度と免疫グロブリン IgA ($r=0.0236$), IgG ($r=0.0712$) および IgM ($r=0.0604$) の間に相関はみられなかった。次に, 血中 PCB 濃度が 2.9 ppb 以下の 48 例を PCB 低濃度群, 3.0 ppb 以上の 31 例を PCB 高濃度群として, 両群間の免疫グロブリン値および自己抗体の出現頻度について検討を行った (Table 2)。PCB 低濃度群は男性 15 例, 女性 33 例, 平均年齢は 61.3±13.7 歳, 平均 PCB 濃度は 1.91±0.60 ppb, 一方 PCB 高濃度群は男性 10 例, 女性 21 例, 平均年齢は 66.5±9.8 歳, 平均 PCB 濃度は 4.47±2.11 ppb であり, 両群間の性, 年齢に差をみなかった。免疫グロブリン IgA, IgG および IgM は両群間に差を認めず, リウマチ因子, 抗核抗体の出現頻度にも差をみなかった。

考 察

油症と免疫機能の関連について, 我々は 1996 年度福岡県油症一斉検診において油症患者の甲状腺自己抗体を検討し, 抗サイログロブリン抗体を 11.1% に, 抗甲状腺マイクロゾーム抗体を 17.3% に認めることを報告した¹⁰⁾。さらに, 血中 PCB 濃度が 2.9 ppb 以下の油症患者に比べて, 3.0 ppb 以上の患者では抗サイログロブリン抗体を高頻度に認めることより, 油症患者における免疫機能の障害が示唆された。

PCB の免疫に対する影響について, Smialowicz ら⁸⁾ はリンパ球の mitogen 刺激幼若化反応を検討し,

Table 2 血中 PCB 低濃度患者および高濃度患者における免疫グロブリン値および自己抗体陽性の頻度

No. (%)	PCB 濃度	
	≤2.9 ppb 48	≥3.0 ppb 31
IgA (mg/dl)	283±131	320±107
IgG (mg/dl)	1465±331	1474±312
IgM (mg/dl)	186±88	168±68
リウマチ因子	5 (10.4)	5 (16.1)
抗核抗体	24 (50.0)	12 (38.7)
LE 因子	0 (0)	0 (0)

PCB (Aroclor 1254) を投与したラットでは対照群に比べて, concanavalin A あるいは pokeweed mitogen に対する反応には差がなかったが, phytohemagglutinin に対する反応の増強を認めたと報告している。このような PCB の免疫に対する作用が, PCB 高濃度油症患者における抗サイログロブリン抗体の高頻度の出現に関与した可能性も考えられる。

油症発生 29 年後の 1997 年度福岡県油症一斉検診における油症患者の免疫グロブリンの検討では, 免疫グロブリン IgA の上昇を 12.7% に, IgG の上昇を 24.1% に, IgM の上昇を 8.9% に認め, IgG の上昇を最も高頻度に認めた。そして, 免疫グロブリンの 1 分画以上の上昇を 40.0% に認めた。また, 油症患者における自己抗体の検討では, 抗核抗体を 45.6% に認めた。抗核抗体は SLE, 慢性甲状腺炎をはじめとする自己免疫疾患において高率に出現することが知られている⁵⁾。しかし, 抗核抗体を認めた油症患者に SLE をはじめとする自己免疫疾患によると思われる症状はみられなかった。健常人における抗核抗体の出現頻度は 6.5-31.7% と報告されている¹⁹⁾。抗核抗体の出現頻度は女性に高く, 加齢とともに増加することが知られており⁵⁾, 今回の結果より油症患者においては抗核抗体が必ずしも高頻度であるとは考えられない。

さらに, 今回の検討では PCB 高濃度群と低濃度群の免疫グロブリン値および自己抗体の出現に差がみられなかった。油症患者に認められた免疫グロブリンの上昇および自己抗体の出現と PCB との関連がみられないことより, 油症患者における免疫機能の障害は甲状腺自己抗体, 特に抗サイログロブリン抗体に特異的である可能性が示唆される。

総 括

1997 年度福岡県油症一斉検診の受診者のうち免疫機能検査に同意が得られた油症認定患者 79 例を対象に免疫機能検査所見を検討した。免疫グロブリン IgA の上昇を 10 例 (12.7%), IgG の上昇を 19 例 (24.1%), IgM の上昇を 7 例 (8.9%) に認め, IgG の上昇を最も高頻度に認めた。しかし, 免疫グロブリン IgA, IgG あるいは IgM の低下はみられなかった。自己抗体については, リウマチ因子を 10 例 (12.7%)

に, 抗核抗体を 36 例 (45.6%) に認めたが, LE 因子は全例陰性であった。血中 PCB 濃度と免疫グロブリン IgA, IgG, IgM の間に相関はみられず, 血中 PCB 濃度が 2.9 ppb 以下の PCB 低濃度群 48 例, 3.0 ppb 以上の高濃度群 31 例の間には, 免疫グロブリン値および自己抗体の出現頻度に差がみられなかった。

文 献

- 1) Azizah MR, Azila MN, Zulkifli MN and Norita TY: The prevalence of antinuclear, anti-dsDNA, anti-Sm and anti-RNP antibodies in a group of healthy blood donors. *Asian Pacific Journal of Allergy & Immunology* 14: 125-128, 1996.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 宮脇昌二: 抗核抗体・抗 DNA 抗体, 日内会誌 87: 2402-2408, 1998.
- 6) Oishi S, Morita M and Fukuda H: Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43: 13-22, 1978.
- 7) 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.
- 8) Smialowicz RJ, Andrews JE, Riddle MM, Rogers RR, Luebke RW and Copeland CB: Evaluation of the immunotoxicity of low level PCB exposure in the rat. *Toxicology* 56: 197-211, 1989.
- 9) Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin JA, Kalden JR, Lahita RG, Maini RN, McDougal JS, Rothfield NF, Smeenk RJ, Takasaki Y, Wiik A, Wilson MR and Koziol JA: Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* 40: 1601-1611, 1997.
- 10) 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. (受付 1999-4-12)

油症患者における歯周疾患ならびに 口腔内色素沈着の疫学的調査 (第三報)

九州大学歯学部歯科保存学第二講座 (主任: 赤峰昭文教授)

橋口 勇・古川和洋・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

An Epidemiologic Examination on the Prevalence of the Periodontal Diseases and Oral Pigmentation in Yusho Patients in 1998

Isamu HASHIGUCHI, Kazuhiro FURUKAWA and Akifumi AKAMINE

Department of Operative Dentistry and Endodontology,

Faculty of Dentistry (Director : Prof. A. Akamine)

Kyushu University, Fukuoka 812-8582

Hiroshi FUKUYAMA

Department of Oral Pathology (Director : 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 30 years after PCBs exposure.

The results obtained were as follows.

1) 69 patients out of 71 patients with Yusho, who were measured periodontal pocket depth using Ramfjord' methods, had at least one tooth with periodontal pocket deeper than 3 mm. Similarly, 241 teeth out of a total 348 examined teeth showed periodontal pocket with more than 3 mm depth.

2) Oral pigmentation was observed in 46 out of 79 patients with Yusho. In this study, gingival pigmentation was most predominant among oral pigmentation. In addition, it is of particular interest that oral pigmentation tended to be observed at a much higher frequency in younger patients with Yusho.

はじめに

油症患者の口腔内症状については年一回行われる油症患者の一斉検診において追跡調査を行っており、その結果油症患者において歯周疾患罹患率や口腔内色素沈着の発現率が高いことを報告してきた¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁷⁾⁸⁾。前回と同様に平成10年度の福岡県における油症患者の一

斉検診時の結果を基に、口腔内疾患特に歯周疾患や口腔内色素沈着の罹患状態について報告すると共に、平成6、8年度のデータと比較しこれら疾患の経年的変化についても検討を行った。

検診方法

平成10年度の福岡県油症一斉検診を受診した油症

認定患者を対象に、問診、視診ならびに歯周ポケット診査を行った。歯周ポケット診査は、上顎右側第一大臼歯 (6), 上顎左側中切歯 (1), 上顎左側第一小臼歯 (4), 下顎右側第一小臼歯 (4), 下顎右側中切歯 (1), 下顎左側第一大臼歯 (6) を対象歯として、各歯牙の近心頬側歯肉溝に約 25 g の荷重下でポケット探針 PCP-11 (Hu-Friedy 社) を挿入し、3 mm 以上の歯周ポケットを有する歯牙について mm 単位で測定を行った。また、X 線写真 (パントモグラフ) の撮影を行い、歯槽骨吸収の程度や残存歯の状態を把握するための資料とした。

結 果

平成 10 年度の福岡県油症一斉検診を受診した油症患者は 79 名 (男性 33 名, 女性 46 名) であった (表 1)。問診にて口腔内の病変ないし不快症状を訴えた患者数は 24 名で、その内訳は歯牙挺出感 (9 名), 歯肉出血 (5 名), 歯牙の動揺 (3 名), 歯肉疼痛 (2 名), 歯肉腫脹 (2 名), その他 5 名で、歯周組織の異常の訴

えが多く、色素沈着による審美障害の訴えはなかった。

歯周ポケット診査は、無歯顎患者ならびに歯周ポケット診査対象歯を全て喪失している患者を除いた 71 名 (男性 30 名, 女性 41 名) に行った (表 1)。深さ 3 mm 以上のいわゆる病的歯周ポケットを有する歯数を男女別、年代別に分けると表 2 の通りであった。それによると、深さ 3 mm 以上の歯周ポケットを 1 歯以上有するもの 69 名 (97.2%) と非常に高い割合を示したが、男女間、年代間に顕著な差は認められなかった。深さ 3 mm 以上の歯周ポケットの発現頻度は、総被検歯 349 歯のうち 241 歯 (69.1%) と大多数の歯牙に歯周ポケットが認められた (表 3)。部位別に見ると 6 が 77.6% と最も高い罹患率を示し、次いで 4, 4, 6, 1, 1 の順であった (表 3)。しかしながら、深さ 4 mm 以上の歯周ポケットを 1 歯以上有するものは 45 名 (63.4%) と比較的多いものの総被検歯 349 歯のうち 87 歯 (24.9%) と発現率は減少していた。60 歳以上の高齢者においては 3 mm 以上の歯周ポケットの発現頻度は高く (1 歯以上有する者の割合は 97.4%, 総被検歯 163 歯の内 109 歯に認められその割合は 66.9% であった), かつ歯周ポケット診査対象歯牙の喪失率も高かったのはもちろんであるが、60 歳未満の比較的若い患者においても 3 mm 以上の歯周ポケットの発現頻度は高かった (1 歯以上有する者の割合は 96.9%, 総被検歯 186 歯の内 132 歯に認められその割合は 70.9% であった)。

口腔内色素沈着を有するものは 46 名 (58.2%) で、その内訳は男性 20 名 (発現率は 60.6%), 女性 26 名 (56.5%) と男性の方が高い傾向を示した (表 4)。また、60 歳未満では 34 名中 22 名 (64.7%) にみられた

表 1 油症患者の年代別受信者数

年代	男性	女性	計
20代	1(0)	1(0)	2(0)
30代	5(0)	3(0)	8(0)
40代	1(0)	3(0)	4(0)
50代	5(0)	15(1)	20(1)
60代	12(1)	16(2)	28(3)
70代	6(1)	7(1)	13(2)
80代	3(1)	1(1)	4(2)
計	33(3)	46(5)	79(8)

() : 歯周ポケット診査対象歯を全て喪失している患者数

表 2 3 mm 以上の歯周ポケットの分布状態

年代	罹患歯数		0		1		2		3		4		5		6		計 (名)
	性別		男性	女性	男性	女性	男性	女性	男性	女性	男性	女性	男性	女性	男性	女性	
20代			0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
30代			0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	2	2	0	0	8
40代			0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	4
50代			0	0	1	0	0	1	1	4	1	4	0	4	2	1	19
60代			0	0	3	5	2	2	1	2	2	0	2	5	1	0	25
70代			1	0	0	1	3	1	0	0	1	2	0	2	0	0	11
80代			0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
計 (名)			1	1	5	7	6	5	4	6	6	7	4	14	4	1	71

表3 部位別の3mm以上の歯周ポケットを有する歯牙数

	部位	6]	1]	4]	4]	1]	6]	計
男性	罹患歯数	14	13	20	22	15	18	102
	総被検歯数	22	22	26	30	25	24	149
	%	63.7	59.1	76.9	73.3	60.0	75.0	68.5
女性	罹患歯数	22	22	23	29	16	27	139
	総被検歯数	29	36	31	37	33	34	200
	%	75.9	61.1	74.2	78.4	48.5	79.4	69.5
計	罹患歯数	36	35	43	51	31	45	241
	総被検歯数	51	58	57	67	58	58	349
	%	70.6	60.3	75.4	76.1	53.4	77.6	69.1

表4 色素沈着を有する患者数

年代	性別		計 (%)
	男性	女性	
20代	1	0	1(50.0)
30代	4	1	5(62.5)
40代	1	2	3(75.0)
50代	3	10	13(65.0)
60代	9	9	18(60.0)
70代	2	4	6(46.2)
80代	0	0	0(0)
計	20	26	46(58.2)

%は各年代の受診患者数に対する百分率

のに対し、60歳以上では45名中24名(53.3%)と加齢と共に発現率は減少傾向にあった。また前回報告したように歯牙の喪失と共に色素沈着の発現率は低下する傾向にあった。部位別にみると、歯肉の色素沈着が最も多く45名に認められ、その他の部位では頬粘膜および口蓋粘膜に各1名みられたものの口唇には認められなかった。その結果、前回報告したような年齢による色素沈着の発現部位の変化は認められなかった。色素沈着の程度をみると、+が最も多く32名47部位にみられ、次いで±(16名20部位)、#(6名9部位)、##(1名2部位)の順であった(表5)。

考 察

今回の研究では深さ3mm以上のいわゆる病的歯周ポケットを有する割合は97.2%と平成6年度(93.2%)⁸⁾、8年度(85.1%)⁷⁾に比較しても高かった。特に60歳未満の比較的若年者においてもこの傾向は強いように思われた。さらに、臼歯部のみでなく比較的ブランクク

ントロールがしやすいとされる前歯部においても⁹⁾、過半数の歯牙に深さ3mm以上のいわゆる病的歯周ポケットが形成されていた。また深さ4mm以上の歯周ポケットを有する患者は45名と過半数を超えており、上述の結果と併せると油症患者においては歯周組織疾患が進行していることが示唆された。油症患者においては感染に対する抵抗力が低下していることが示唆されており¹²⁾、またCD4/CD8比にも変動があることが報告されている⁶⁾¹¹⁾。これらのことより、PCBs中毒によって感染に対する防御力が低下した結果歯周疾患に罹患しやすい可能性が考えられる。今後油症患者に対してなお一層の口腔内ケアの充実を図る必要があると思われる。

平成6年度の油症一斉検診では、口腔内色素沈着の発現率は33.8%であった。それに比べると平成8年度⁸⁾は57.3%、平成10年度は58.2%と著明に上昇していた。過去の口腔内色素沈着の報告¹⁾²⁾³⁾⁴⁾や、眼科や皮膚科領域における報告⁹⁾¹⁰⁾においては特異的な色素沈着は経年的に減少しており、平成7年度(55.8%の発現率)からみられる口腔内色素沈着の発現率の上昇に関する機序に関しては不明のまま残されており今後の検討課題と思われる。また、平成6および8年度の報告⁷⁾⁸⁾と同様に今回の検診においても、60歳未満の患者に比べて60歳以上の患者では色素沈着の発現率は低下傾向にあり、この原因の一つとして残存歯牙数の減少が色素沈着の発現率に影響を及ぼしていることが考えられる。しかし今回、口腔内色素沈着の部位としては歯肉がほとんどであり、前回報告⁷⁾したような年齢による色素沈着の部位の変化は見られなかった。歯肉以外の部位の色素沈着の消失にどのような因子が関

表5 部位別の色素沈着を有する患者数

程度	上顎歯肉		下顎歯肉		頬粘膜		口蓋粘膜	
	男性	女性	男性	女性	男性	女性	男性	女性
±	4	5	5	5	0	0	0	1
%	12.1	10.9	15.2	10.9	0	0	0	2.2
+	10	14	8	13	0	1	1	0
%	30.3	30.4	24.2	28.3	0	2.2	3.0	0
++	3	1	4	1	0	0	0	0
%	9.1	2.2	12.1	2.2	0	0	0	0
+++	1	0	1	0	0	0	0	0
%	3.0	0	3.0	0	0	0	0	0
計	18	20	18	19	0	1	1	1
%	54.5	43.5	54.5	41.3	0	2.2	3.0	2.2

%は、受診患者数（男性33名、女性46名）に対する百分率

与しているのかについても更なる検索が必要と考えられる。

結 論

油症患者における歯周疾患の罹患状態や口腔内色素沈着の発現頻度の経年的変化を把握するために、平成10年度の福岡県油症一斉検診受診者を対象に調査を行い、次のような結果を得た。

- 1) 深さ3mm以上の歯周ポケットを1歯以上有するもの69名(97.2%)と非常に高い割合を示した。また、深さ3mm以上の歯周ポケットの発現頻度は総被検歯348歯の内241歯(69.3%)であった。
- 2) 口腔内色素沈着の発現率は58.2%であった。色素沈着の部位は歯肉が主体で、その他の部位ではほとんど見られなかった。又、発現率は、高齢者に比較して若年者においてより高い傾向を示した。

文 献

- 1) 青野正男, 岡田 宏: 油症患者の口腔所見について. 福岡医誌 60: 468-470, 1969.
- 2) 赤峰昭文, 橋口 勇, 岸 哲也, 古川猛士, 青野正男: 油症患者における口腔内色素沈着の経年的変化. 福岡医誌 74: 284-288, 1983.
- 3) 赤峰昭文, 橋口 勇, 前田勝正, 原 宣興, 鎮守信弘, 岩本恭行, 青野正男: 油症患者の歯周疾患に関する疫学的調査(第一報). 福岡医誌 76: 248-252, 1985.

4) 福山 宏, 阿南ゆみこ, 赤峰昭文, 青野正男: 油症患者における口腔病変の推移. 福岡医誌 70: 187-198, 1979.

5) Hall W and Douglass G: Plaque control, In Schluger S, Yuodelis RA and Page RC (eds): Periodontal Disease. pp. 344-369, Lea & Febiger Philadelphia, 1977.

6) 橋口 勇, 赤峰昭文, 宮武祥子, 阿南 壽, 前田勝正, 青野正男, 福山 宏, 奥村英彦: 歯周組織に及ぼすPCBの影響に関する免疫組織学的ならびに病理組織学的検索. 福岡医誌 82: 256-261, 1991.

7) 橋口 勇, 阿南 壽, 前田勝正, 赤峰昭文, 福山 宏, 奥村英彦: 油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学的調査(第二報) 福岡医誌 88: 226-230, 1997.

8) 橋口 勇, 鳥谷芳和, 阿南 壽, 前田勝正, 赤峰昭文, 青野正男, 福山 宏, 奥村英彦: 油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学的調査. 福岡医誌 86: 256-260, 1995.

9) 本房昭三, 堀 嘉昭, 利谷昭治, 旭 正一: 1989, 1990年度の福岡県油症年次検診における皮膚症状. 福岡医誌 82: 345-350, 1991.

10) 向野利彦, 大西克尚: 油症患者の眼症状(第7報). 福岡医誌 82: 342-344, 1991.

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

12) 斉藤玲子, 重松信昭, 石丸秀三: 油症における免疫グロブリン値について. 福岡医誌 63: 408-411, 1972.

(受付 1999-3-25)

皮脂中 PCB 濃度の身体部位による相違と 皮脂取りシートを用いた皮脂採取の試み

長崎大学医学部皮膚科学教室
渡辺雅久・小川文秀・片山一朗
長崎県衛生公害研究所
徳末有香

Site Specific Difference of PCB Concentration in the Skin Derived Sebum and Collection of Excreted Sebum with Commercial Sebum-remover Sheet

Masahisa WATANABE, Fumihide OGAWA and Ichiro KATAYAMA
*Department of Dermatology, Nagasaki university School of Medicine
Sakamoto 1-7-1, Nagasaki 852-8501*

Yuka TOKUSUE
*Nagasaki Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science
Nameshi 1-9-5, Nagasaki 852-8061*

Abstract The PCB concentrations in the sebum of Yusho patients showed a site specific difference. It was higher in the sebum derived from the chest (1128.0 ± 374.1 ng/g), the upper arm (1460.0 ± 350.7 ng/g) and the femur (1456.0 ± 488.5 ng/g) than from the forehead (758.0 ± 233.7 ng/g) and the upper back skin (638.0 ± 165.3 ng/g). To remove PCB in the sebum, a sebum-remover sheet was applied on the femur of two patients. During the four times of application, the mean amounts of removed sebum was 10.5 mg and 28.3 mg respectively. These results are unsatisfactory for practical treatment of Yusho patient. However, this approach seems to be safe and convenient and modification to collect large scale of sebum from the skin is required.

はじめに

われわれはこれまでの研究で、油症患者の皮脂中に PCB がほぼ 100% に検出されること³⁾、同一患者では、6 年間の経過で皮脂中 PCB 値はほぼ一定していること⁴⁾、夏期に比して、冬期では有意に皮脂中 PCB 濃度が減少していること⁵⁾を報告しこれら有機塩素化合物の排泄器官として毛嚢脂腺系の重要性を指摘した。今回は、身体部位別に皮脂中 PCB 濃度を測定し、併せて、簡便な皮脂採取の試みとして、皮脂取りシートの有用性を検討した。

対象および方法

- 1) 対象：インフォームドコンセントの得られた五島奈留地区、玉之浦地区在住の油症患者 5 名（男性 4 名、女性 1 名）。
- 2) 皮脂の採取：各人について、前額部、上背部、胸部、上腕外側、大腿伸側の 5 ケ所より大城の方法⁴⁾に準じて、70% アルコール酒精綿で採取した。
- 3) 皮脂取りシートを用いた皮脂採取：市販の皮脂取りシートを 10 cm × 10 cm に裁断したものを花王⁶⁾より提供を受け、上記の患者のうち 2 名に市販品と同様の使用方法に従って施行した。すなわち、大腿伸側の同一部位にシートを水で濡らして貼付し乾燥後に剝離

した。この処置を1週ごとに4回反復した。予備実験により、シートに吸着された皮脂中の PCB 濃度を直接測定することが不可能であることが判明したので(未発表データ)、最後の処置の1週後に皮脂中 PCB 濃度測定のためのアルコール清拭を行った。

4) 測定方法：アルコール清拭の試料は、浅田ら、力岡らが毛髪について記載した方法¹⁾に準じて行った。また、シートについても、エタノールで抽出したのち、上記の方法に従った。

結 果

5名の各部位の皮脂中 PCB 濃度を表1に示す。胸部、上腕、大腿の PCB 濃度は、前額、上背に比して有意に上昇していた。また、皮脂取りシートの処置を行った患者(表1中の症例2と症例4)の皮脂採取量および最後の処置から1週後のアルコール清拭による皮脂中 PCB 濃度を表2に示す。なお、2名ともシート貼布部位の発赤、掻痒などの刺激症状は認められなかった。

考 察

過去6年の観察において、油症患者の皮脂中の PCB 濃度は、同一例でほぼ一定する傾向を示すことが示されている。また、夏期と冬期の皮脂中の PCB 濃度を測定したところ、それぞれ 692.7 ng/g と 633.3 ng/g で、冬期における PCB 濃度が有意に低下していたが、その差は約 10% で、冬季でも健常人と比較して、高濃度の PCB が皮脂中に排泄されていることが確認された⁵⁾。これらの点より、高齢者が多い患者にも比較的簡単に行える皮脂除去法があれば、経皮的に PCB を除

去する手段として利用できる可能性があると考え、皮脂を吸着するシートの有用性を検討することにした。

まず、5名の患者で部位別の PCB 濃度を測定したところ、胸部、上腕、大腿のそれは、前額、上背に比して有意に上昇していた。その理由は不明だが、前額部や上背部では、皮脂分泌が盛んなため、相対的に PCB 濃度が低下している可能性も考えられる。実際これらの部位では、アルコール清拭によって採取される皮脂量が他部位より多かった。しかしながら、今回は 10 cm 四方のシートを貼付するため、被験部位として大腿伸側を選んだ。その結果、皮脂の採取量は、アルコール清拭に比べて数倍から数十倍であったが、症例2では週ごとにかかりのばらつきがみられた。シートをはじめに濡らした水の量や剥離したときの乾燥の程度などが影響している可能性も考えられ、今後検討していきたい。また、症例4では、1週ごとに、採取量が減少する傾向があった。1週間では、皮脂が十分排泄されないためと思われるが、3週目と4週目はほぼ同量であり、1週間で皮膚にたまった分が回収されていると考えれば、処置の間隔は1週間でよいのではないかと思われる。なお、一連の処置期間中、皮膚の刺激症状や、乾燥感はみられなかったが、さらに長期にわたった場合や、冬季に行った場合の影響も検討する必要があると思われる。

実際に回収除去される PCB の量は、1回あたりの皮脂量を 20 mg、PCB 濃度を 1000 ng/g とすると、20 ng になる。これは、糞便中の PCB 排泄量²⁾のおよそ 30~60 分の 1 であり、これのみで有効な PCB 除去法となりうるとは言い難い。しかしながら、比較的簡単

Table 1 PCB concentration in sebum at various areas.

症例 (年齢, 性)	前額		上背		胸部		上腕		大腿	
	皮脂重量 (mg)	PCB濃度 (ng/g)	皮脂重量	PCB濃度	皮脂重量	PCB濃度	皮脂重量	PCB濃度	皮脂重量	PCB濃度
1 (73, 男)	1.7	1000	1.5	880	1.6	1500	1.6	1700	0.9	1800
2 (74, 男)	6.5	820	6.3	650	3.4	1100	1.3	1000	1.6	1500
3 (86, 男)	5.4	900	3.1	680	1.9	1100	1.4	1300	1.4	780
4 (70, 女)	1.7	400	1.5	440	0.7	540	0.8	1400	0.4	1800
5 (77, 男)	2.2	670	1.4	540	0.8	1400	0.5	1900	0.5	900
平均	3.5	758.0	2.8	638.0	1.7	1128.0	1.1	1460.0	1.0	1356.0
標準偏差	2.3	233.7	2.1	165.3	1.1	374.1	0.5	350.7	0.5	488.5

Table 2 Amount of sebum removed by sebum remover sheet.

採取回数	皮脂量 (mg)	
	症例 2	症例 4
1	10.5	50.0
2	4.0	25.5
3	24.7	18.1
4	2.6	19.5
平均	10.5	28.3
PCB濃度 (ng/g)	2700	750

に行いうる方法と考えられるので、今後効率を上げるための方法や、長期の安全性や経済性などの面からも検討していきたい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、皮脂取りシートを御提供頂いた花王(株)スキンケア研究所、鈴木祐二様に深謝します。

文 献

- 1) 浅田要一郎, 馬場強三, 馬場 資: PCB 汚染地区住民の毛髪中 PCB について. 長崎県衛生公害研究所報 19:100-101, 1981.
- 2) 飯田隆雄, 平川博仙, 松枝隆彦, 中川礼子, 竹中重幸, 森田邦正, 檜崎幸範, 深町和美, 常磐 寛, 高橋克巳, 吉村英俊: コレスチラミン投与による油症原因物質の糞便中への排泄促進の試み. 福岡医誌 82:317-325, 1991.
- 3) Ohgami T, Watanabe M and Tanaka K: Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated quaterphenyls (PCQs) concentrations in skin surface lipids and blood of patients with Yusho. Fukuoka Acta Med 84: 212-216, 1993.
- 4) 田中敬一, 塚崎直子, 吉田彦太郎, 入船弘子, 渡辺雅久, 谷村義則: 皮脂, 血液中 polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated quaterphenyls (PCQs) 濃度の比較検討. 福岡医誌 86:202-206, 1995.
- 5) 渡辺雅久, 田中敬一, 鳥山 史: 皮脂中 PCB 濃度の年次推移と季節変動. 福岡医誌 85:205-206, 1997.

(受付 1999-3-18)

油症患者の臨床検査値と血中 PCB 濃度の関連

— 1993 年全国油症患者追跡検診結果より —

九州大学医学部公衆衛生学講座
徳永章二・廣田良夫
福岡県保健環境研究所
片岡恭一郎**Association between the Results of Blood Test and Blood PCB Level of Chronic Yusho Patients Twenty Five Years after the Outbreak**

Shoji TOKUNAGA and Yoshio HIROTA

Department of Public Health, Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812-8582

Kyoichiro KATAOKA

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

Abstract A cross-sectional study on the association between the results of blood test and the blood concentration of PCB was conducted on the chronic Yusho patients.

The subjects were 265 Yusho patients (134 men and 131 women) who received the annual nationwide health examination for Yusho in 1993. The results of the blood test and questionnaire survey at the annual health examination were used for the analyses using ANCOVA. Serum levels of triglycerides, total cholesterol, GOT, GPT, γ -GTP, total bilirubin, and conjugated bilirubin were associated with the blood concentration of PCB adjusting for sex, age, drinking habit, smoking habit and body mass index (BMI). Because the distribution of the serum levels was strongly skewed to the right except that of serum concentration of total cholesterol, they were log transformed to approximate to the Normal distribution.

The association between age and the blood concentration of PCB was significant ($P < 0.001$), although the associations of sex, drinking habit, smoking habit and BMI to the blood concentration of PCB were not significant. With the adjustment for sex, age, drinking habit, smoking habit and BMI, the serum concentrations of triglycerides and total cholesterol were significantly associated with the blood PCB level expressed by \log_e (blood concentration of PCB in ppb + 1) ($P = 0.02$ and $P < 0.001$, respectively). The associations of serum levels of GOT, GPT, γ -GTP, total bilirubin and conjugated bilirubin to the PCB level were not significant.

The results of this study suggests the need of careful observation on the serum lipids of Yusho patients, especially those with high concentration of blood PCB, because the serum concentrations of total cholesterol and triglycerides are prominent risk factors of heart diseases.

はじめに

油症患者の臨床検査値について、一般健康人との比較でいくつかの特徴が指摘されている。油症の急性期において、油症患者は一般人に比べて血清中性脂肪が高い事が報告され⁷⁾⁸⁾¹¹⁾、血清ビリルビンの減少も指摘

された⁶⁾。他方、血清総コレステロール⁷⁾⁸⁾¹¹⁾、GOT及びGPT⁸⁾についてはほぼ正常値の範囲であった。

このような油症患者に特徴的な臨床検査値と血中PCB濃度との関連は、主に血清中性脂肪について調べられている。油症急性期において、血清中性脂肪と血中PCB濃度の間に有意な正の関連が見いだされている

る⁹⁾。この正の関連は油症発生から20年を経た1988年の全国統一検診受診者においても報告されている²³⁾⁴⁾。しかし、同時に調べられた、 γ -GTP、総ビリルビン、直接ビリルビンと血清PCB濃度との関連は有意ではなかった²⁴⁾。

本研究では油症発生25年後に行われた、1993年全国統一検診を受診した認定患者を対象とし、血清脂質などの臨床検査値(中性脂肪、総コレステロール、GOT、GPT、 γ -GTP、総ビリルビン、直接ビリルビン)について、交絡因子の可能性のある要因の調整に努めながら血中PCB濃度との関連を調べた。

対象と方法

1993年の全国統一検診受診者数は312人(男/女:143/169)であった。この中の認定患者276人(137/139)から、血中PCB濃度が不明の者を除いた265人(134/131)を解析の対象者とした。

血中PCB濃度との関連を調べたのは、血清中性脂肪、血清総コレステロール、GOT、GPT、 γ -GTP、総ビリルビン、直接ビリルビンの7つの臨床検査値である。これらの検査値は同一の検査機関により測定されたものである。血中PCB濃度はそのままでも単純な対数変換を行っても、分布に外れ値が目立ったため、要約統計量及びtrend Pの計算の際は1を加えて対数変換した値を用いた。平均値は真数変換の後、1を減じて算出した。血清総コレステロール以外の目的変数

は分布に強い偏りが見られたため、対数変換を行った。

全国統一検診票から性、年齢、飲酒習慣、喫煙習慣、Body Mass Index (BMI) のデータを得、調整要因とした。統計解析は共分散分析を用い、上記の調整要因を性(男女の2値)、年齢(連続変数)、飲酒習慣(飲酒歴無し+過去飲酒と現在飲酒の2値)、喫煙習慣(喫煙歴無し+過去喫煙と現在喫煙の2値)、BMI(連続変数)として統計モデルに含めた。

目的変数の調整平均とその95%信頼区間の算出に当たって、血中PCB濃度(ppb)は、 <2 、 $2+$ 、 $4+$ 、 $5+$ 、 $8+$ の5レベルに区分した。血中PCB濃度2ppb未満のカテゴリーをreference categoryとしたダミー変数を設定する事により、血中PCB濃度2ppb未満のカテゴリーとその他のカテゴリー間で各目的変数の調整平均値の差を検定した。

統計処理ソフトウェアにはStata Ver 5.0を用いた¹⁰⁾。検定は有意水準0.05で両側検定を行った。

結 果

対象者265人(男性134, 女性131)の平均年齢(range)は60.5(23-86)歳であった。表1に血中PCB濃度と解析に用いた目的変数の要約統計量を示す。血中PCB濃度の平均は3.95ppbで、最高で31ppbであった。血清中性脂肪、血清総コレステロールの中央値(5th-95th percentile)(mg/dL)は、それぞれ99(48-236)、203(150-257)で、これは一般健康人の

Table 1 Summary statistics of blood concentration of PCB and serum levels of triglycerides, total cholesterol, GOT, GPT, γ -GTP, total bilirubin and conjugated bilirubin. 90% confidence range shows the range between 5th and 95th percentiles.

Variable name	Mean	90% confidence range	Range
Blood PCB (ppb)	3.95 †	1-11	0 §-31
Triglycerides (mg/dL)	101.7 ‡	48-236	36-540
Total cholesterol (mg/dL)	202.1	150-257	109-350
GOT	23.4 ‡	15-40	13-145
GPT	18.2 ‡	9-40	6-202
γ -GTP	17.7 ‡	7-71	5-183
Total bilirubin	0.65 ‡	0.3-1.3	0.2-2.3
Conjugated bilirubin	0.20 ‡	0.1-0.5	0.1-0.7

† Calculated with \log_e (PCB+1).

‡ Geometric mean.

§ Under the level of detection.

値に近い。肝機能を表す GOT 等の値も、ほとんど(約 90%)の対象者は正常範囲の中にあった。

血中 PCB 濃度とライフスタイルに関する項目との関連を表 2 に示す。年齢は血中 PCB 濃度と有意な正の関連を示した ($P < 0.001$) が、性、飲酒習慣、喫煙習慣、BMI については有意な関連が認められなかった。

臨床検査値と血中 PCB 濃度との関連を表 3 及び図 1, 2 に示す。血清中性脂肪と血清総コレステロールは血中 PCB 濃度と有意な正の関連が見られた (それぞれ $P = 0.02$ と $P < 0.001$)。しかし、他の臨床検査値 (GOT, GPT, γ -GTP, 総ビリルビン, 直接ビリルビン) についてはいずれも血中 PCB 濃度との関連は有意ではなかった。

血清中性脂肪については、血中 PCB 濃度 2 ppb 未

満のカテゴリー (reference category) と 8 ppb 以上のカテゴリーで有意な差が見いだされた ($P < 0.01$)。血清総コレステロールでは reference category とその他のカテゴリーとの差はいずれも有意であった ($P < 0.05$ 又は $P < 0.01$)。

考 察

本研究では GOT, GPT, γ -GTP, 総ビリルビン, 直接ビリルビンについては血中 PCB 濃度との有意な関連が見られなかったものの、血清中性脂肪及び血清総コレステロールと血中 PCB 濃度との間に有意な正の関連が見いだされた (それぞれ, $P = 0.02$, $P < 0.001$)。共分散分析によれば、血中 PCB 濃度のカテゴリーが 8 ppb 未満までは血清中性脂肪の変化は僅かで、血中 PCB 濃度 8 ppb 以上のカテゴリーは 2 ppb 未満

Table 2 The blood concentration of PCB and lifestyle characteristics (mean and its 95% CI, or %).

PCB (ppb)	N (%)	% Men	Age	Alcohol use (%)	Smoking (%)	Body mass index (kg/m ²)
<2	34 (12.9)	35.3	50.3 (44.4 to 56.3)	41.2	34.4	22.6 (21.4 to 23.7)
2+	81 (30.6)	50.6	57.7 (54.9 to 60.6)	30.9	25.0	23.2 (22.5 to 23.9)
4+	56 (21.1)	53.6	62.2 (59.8 to 64.5)	41.1	23.6	22.8 (22.0 to 23.6)
5+	62 (23.4)	51.6	65.6 (63.4 to 67.8)	37.1	21.0	22.6 (21.9 to 23.4)
8+	32 (12.1)	59.4	65.7 (62.4 to 68.9)	53.1	28.1	22.6 (21.6 to 23.7)
P*		0.10	<0.001	0.19	0.46	0.47

*Cuzick's Wilcoxon-type test for trend.

Table 3 Adjusted means of serum levels of triglycerides, total cholesterol, GOT, GPT, γ -GTP, total bilirubin, and conjugated bilirubin, and the results of test of trend associated with natural logarithms of (blood concentration of PCB in ppb + 1). Mean values and test of trend were adjusted for sex, age, drinking habit, smoking habit, and body mass index.

PCB level (ppb)	Triglycerides (mg/dL) †	Total cholesterol (mg/dL)	GOT †	GPT †	γ -GTP †	Total bilirubin †	Conjugated bilirubin †
<2 §	88	185	26	21	19	0.69	0.22
2+	103	202*	23	18	18	0.63	0.19
4+	98	202*	23	18	18	0.68	0.20
5+	98	208**	23	17	17	0.64	0.20
8+	128**	212**	26	20	19	0.70	0.22
P ‡	0.02	<0.001	0.28	0.20	0.44	0.36	0.19

*Significantly different from the reference value at $P < 0.05$.

**Significantly different from the reference value at $P < 0.01$.

§ The reference category.

† Geometric mean.

‡ P for trend associated with \log_e (PCB (ppb) + 1).

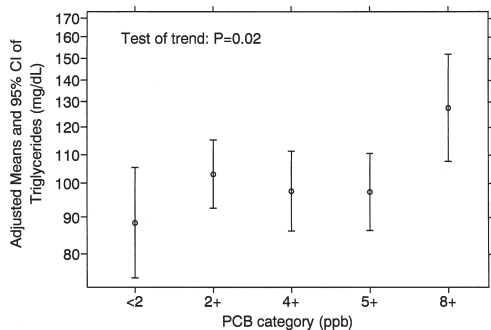


Fig. 1 Means and their 95% CI of serum concentration of triglycerides (mg/dL) according to PCB category (ppb) adjusted for sex, age, drinking habit, smoking habit and body mass index.

のカテゴリーに比べ、血清中性脂肪が有意に上昇していた。また、血清総コレステロールは、血中 PCB 濃度レベルが高くなるにつれ上昇していた。

これらの有意な結果が真の関連であるかは検討を要する。少数の例外的な外れ値の影響により生じた見せかけの関連の可能性もあり、また、交絡要因の調整が不十分な為に本来関連がない 2 つの要因が関連しているように見えたのかもしれないからである。

外れ値に関しては、目的変数、血中 PCB 濃度ともに解析の前に適切な変換を行うことにより影響は最小限に留めている。交絡要因の調整には従来の研究よりも注意が払われ、性、年齢、飲酒喫煙習慣、BMI が調整されている。血清脂質はこれらの他に食事、運動などのライフスタイルの違いによっても影響を受けるため、交絡要因としての可能性があるこれらの要因の調整が不十分となっている可能性はある。しかし、食事、運動は本研究で調べられた飲酒習慣、喫煙習慣、BMI と関連がある事が知られているものの、今回の研究では飲酒習慣、喫煙習慣、BMI と血中 PCB 濃度とは有意な関連が認められなかった(表 2)。すなわち、ライフスタイルと血中 PCB 濃度の関連を示唆する明瞭な兆候は見いだされていない。

本研究では対象者が油症患者の一部でしかなく、対象者の健康状態や健康への関心度によって対象者の選択バイアスが生じている可能性がある。しかし、本研究では血中 PCB 濃度と血清脂質との関連に注目しており、それぞれに選択バイアスがかかっても、そのバ

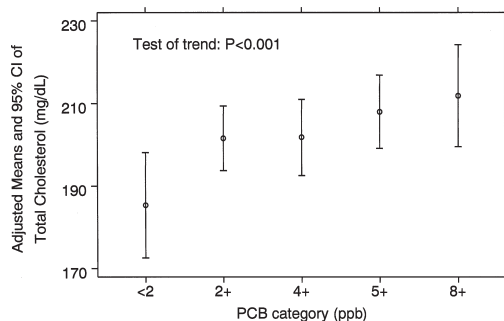


Fig. 2 Means and their 95% CI of serum concentration of total cholesterol (mg/dL) according to PCB category (ppb) adjusted for sex, age, drinking habit, smoking habit and body mass index.

イアスが相互の関連に必ずしも直接影響するわけではない。

本研究はクロスセクショナルなデザインであり、かつ、単年度のみの観察であるため、結果の解釈は慎重に行うべきである。しかしながら、本研究で血清脂質と PCB 濃度の間に有意な関連を認めた事は、総コレステロール及び中性脂肪が心疾患の重要なリスク要因である¹⁵⁾ことから、今後、油症患者の健康管理を進める上で、注目しておく必要があろう。

ま と め

1993 年の全国統一検診の結果をもとに、血清中性脂肪、血清総コレステロール、GOT、GPT、 γ -GTP、総ビリルビン、直接ビリルビンと、血中 PCB 濃度との関連を調べた。

- 1) 対象は 1993 年全国統一検診を受診した認定患者のうち、血中 PCB 濃度が記載された 265 名(男/女:134/131)である。
- 2) 血清中性脂肪、血清総コレステロール、GOT、GPT、 γ -GTP、総ビリルビン、直接ビリルビンと、血中 PCB 濃度との関連を共分散分析を用いて解析した。その際、性、年齢、飲酒習慣、喫煙習慣、Body Mass Index (BMI) を調整要因としてモデルに含めた。なお、分布に著しい偏りが見られたので総コレステロール以外の目的変数は対数変換を行った。
- 3) 年齢と血中 PCB 濃度の間に有意な正の関連を

認めたが ($P < 0.001$), 性, 飲酒習慣, 喫煙習慣, BMI とは有意な関連を認めなかった。

- 4) 血清中性脂肪及び血清総コレステロールと血中 PCB 濃度との間に正の有意な関連を認めた (それぞれ $P = 0.02$, $P < 0.001$)。他の臨床検査値については血中 PCB 濃度との関連は有意ではなかった。
- 5) 本研究はクロスセクショナルなデザインであるため, 結果の解釈は慎重に行うべきである。また, 交絡要因の可能性のある一部の生活習慣についてデータが得られなかった点も考慮すべきである。しかしながら, 総コレステロールと中性脂肪は共に心疾患のリスク要因であることから, 油症患者の健康管理を進める上で血清脂質に注目しておく必要がある。

文 献

- 1) Brownson RC, Remington PL and Davis JR: In Chronic disease epidemiology and control. American Public Health Association, Washington, DC. 1993.
- 2) 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 Medica*. 84: 287-293, 1993.
- 3) Hirota Y, Kataoka K and Hirohata T: Annual health examinations of Yusho patients, Kuratsune, M, Yoshimura, H, Hori, Y, Okumura, M, Masuda, Y (ed): In *Yusho - A human disaster caused by PCBs and related compounds*. pp 249-266, Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.
- 4) Hirota Y, Kataoka K, Tokunaga S, Hirohata T, Shinohara S and Tokiwa H: Association between blood polychlorinated biphenyl concentration and serum triglyceride level in chronic "Yusho" (polychlorinated biphenyl poisoning) patients. *Int Arch Occup Environ Health*. 65: 221-225, 1993.
- 5) Jeppensen J, Hein HO, Suadicani P and Gyntelberg F: Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year-follow-up in the Copenhagen male study. *Circulation* 97: 1029-1036, 1998.
- 6) 倉恒匡徳, 青野正男, 吉田彦太郎: 序言. *福岡医誌* 78: 181-192, 1987.
- 7) 永井諄爾, 古川ミチヨ, 八戸義明, 池田宣久: 油症患者の臨床生化学検査; とくに血清脂質分析に重点をおいて. *福岡医誌* 60: 475-488, 1969.
- 8) 奥村 恂, 勝木司馬之助: いわゆる油症(塩化ビフェニール中毒)の臨床的研究, とくに内科的所見について. *福岡医誌* 60: 440-446, 1969.
- 9) 奥村 恂, 増田義人, 中牟田澄子: 油症患者における血中 PCB と血清トライグリセライドとの関係. *福岡医誌* 65: 84-87, 1974.
- 10) Stata Corp. *Stata Statistical Software: Release 5.0*. College Station, Texas. 1997.
- 11) 鵜澤春生, 伊藤靖夫, 納富昭光, 勝木司馬之助: 塩化ビフェニールによる高グリセライド血症. *福岡医誌* 60: 449-454, 1969.

(受付 1999-4-2)

ラットにおけるダイオキシン類の消化管吸収に及ぼす プロトポルフィリンの効果

福岡県保健環境研究所
森田邦正・松枝隆彦・飯田隆雄

Effect of Protoporphyrin on Digestive Tract Absorption of Dioxins in Rats

Kunimasa MORITA, Takahiko MATSUEDA
and Takao IIDA

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

Abstract This paper presents the fecal excretion of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD) congeners, and polychlorinated dibenzofuran (PCDF) congeners in male rats fed a diet containing 0.5% disodiumprotoporphyrin (PPNa) or 0.5% hemin. The animals were administered 4g of 0.5% PPNa or 0.5% hemin diet containing 0.5ml of the causal rice-bran oil of Yusho that had occurred in the Southwest part of Japan in 1968 and kept on the same diet for five days. The fecal excretion of 2,3,7,8-T₄CDD and 2,3,4,7,8-P₅CDF in the group fed with 0.5% PPNa were 2.1 and 1.9 times higher, respectively, than that in the group fed with a control diet. Hemin did not show any significant effect on the inhibition of absorption of dioxins.

Next, the rats were given a diet containing 0.5% PPNa or 0.5% Hemin for four weeks after a week interval from the day of the causal rice-bran oil administration. The fecal excretion of 2,3,7,8-T₄CDD and 2,3,4,7,8-P₅CDF in the group fed with 0.5% PPNa were stimulated 2.1 times higher, respectively, than that in the group fed with a control diet. Hemin did not show any significant effect on the inhibition of re-absorption of dioxins.

はじめに

プロトポルフィリン及びヘミンはポルフィリン構造をもつ環状化合物である。プロトポルフィリンは骨髄、肝臓、心臓等の組織に多く分布し、ヘモグロビン、ミオグロビン、ヘム酵素の補欠分子族として、酸素運搬や電子伝達に関与している。遊離のプロトポルフィリンは少なく、大部分は鉄等の金属と結合して金属錯体をなし、さらに蛋白質と複合体を形成している¹⁰⁾。薬理作用として、抗炎症、抗アレルギー作用と肝硬変症の発症抑制及び治療効果を示し⁸⁾¹²⁾、慢性肝疾患における肝機能の改善薬として、プロトポルフィリンジナトリウムが1回20~40 mg, 1日3回の用法用量で使用されている⁸⁾。一方、プロトポルフィリンの鉄(III)錯

体の塩化物はヘミンあるいはクロルヘミンと言われている。

ダイオキシン類は Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD) 及び Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) の総称で、都市焼却施設等から発生する世界的な環境汚染物質であり、汚染された食品¹³⁾¹⁴⁾を經由して、人の母乳、血液、肝臓、脂肪組織に残留する人体汚染物質である¹⁻⁴⁾¹¹⁾。ダイオキシン類による人への健康障害を防ぐにはその吸収を阻止すること、さらに、体内に蓄積したダイオキシン類を積極的に体外に排除することが大切である。そこで、このような排泄促進作用が生体成分であるプロトポルフィリン及びヘミンにあるかどうか、ラットを用いて検討した。

実験方法

1. 実験材料

プロトポルフィリンはシグマ製のプロトポルフィリンジナトリウム (Lot 84 H 0727) を、ヘミンはシグマ製 (Lot 94 H 0133) を使用した。

油症原因ライスオイルは油症患者から提供された未使用のものを使用した。Table 1 に、実験方法に準じて定量したダイオキシン類の濃度を示す。

ヘキサン、アセトン、クロロホルム、メタノール、ジクロロメタン、無水硫酸ナトリウム、フロリジルは和光純薬 (株) 製の残留農薬試験用を使用した。硝酸銀シリカゲルは硝酸銀 10 g に水 5 ml を加えて加温して溶かし、これにメルク社製の Kieselgel 60 (70~230 mesh) 85 g を加え、振り混ぜたのち一夜放置したものを用いた。その他の試薬は特級品を使用した。

2. 動物実験

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

実験-1 (吸収抑制実験) ラットを 1 群 4 匹として 3 群に分け、Table 2 に示す基本食、0.5% プロトポルフィリン食及び 0.5% ヘミン食を与えた。5 日間予備飼育後、一夜絶食させ、それぞれの飼料 4 g に油症原因ライスオイル 0.5 ml を添加して体重約 147 g のラットに 1 回投与した。飼料を完全に摂取させた後 (約 5 時間)、引き続き、同じ飼料で 5 日間飼育した。ラットは代謝ケージに 1 匹ずつ入れ、食餌と水は自由に与えた。糞は 5 日分を採取し、70°C で一夜乾燥し重量を秤量した。

実験-2 (再吸収抑制実験) ラットを 1 群 4 匹として 3 群に分け、Table 3 に示す基本食を与えた。5 日間予備飼育後、一夜絶食させ、基本食 4 g に油症原因ライスオイル 0.5 ml を添加して体重約 121 g のラットに 1 回投与した。飼料を完全に摂取させた後 (約 5 時間)、引き続き、同じ基本食で 7 日間飼育した。8 日目から 35 日まで、基本食群には基本食を引き続き与え、プロトポルフィリン及びヘミン群には 0.5% プロトポルフィリン食及び 0.5% ヘミン食を与えた。ラットは代謝ケージに 1 匹ずつ入れ、食餌と水は自由に与えた。糞は 28 日分を採取し、70°C で一夜乾燥し重量を秤量した。

3. 糞中のダイオキシン類の定量

糞は円筒のガラス繊維製ろ紙に入れ、ソックスレー抽出器を用いて、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 150~300 ml で 10 時間抽出した。抽出液は約 5 ml

Table 1 Concentrations of PCDD and PCDF in the rice-bran oil of Yusho

	ng/ml
2,3,7,8-T ₄ CDD	0.51
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	6.9
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	5.1
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD	31.4
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	22.4
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	121.7
2,3,7,8-T ₄ CDF	458.7
1,2,3,7,8-P ₅ CDF	506.9
2,3,4,7,8-P ₅ CDF	802.4
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDF	752.3
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDF	117.8
2,3,4,6,7,8-H ₆ CDF	205.1
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDF	294.4
1,2,3,4,7,8,9-H ₇ CDF	15.4

Table 2 Composition of diet (% , experiment 1)

Components	Basal diet	Protoporphyrin diet	Hemin diet
Sucrose	65	64.5	64.5
Casein	20	20	20
Corn oil	5	5	5
Cellulose	5	5	5
Mineral mixture	4	4	4
Vitamin mixture	0.85	0.85	0.85
Choline chloride	0.15	0.15	0.15
Protoporphyrin	—	0.5	—
Hemin	—	—	0.5

まで濃縮し、クロロホルムで 50 ml に定容した。ダイオキシン類の定量には糞の抽出液 2~40 ml を 10 ml の試験管及び 50 ml 遠沈管にとり濃縮乾固した。これに ^{13}C の 4~7 塩化体の内標準物質を 200 pg 及び 8 塩化体を 400 pg 添加し、1 N 水酸化カリウムエタノール溶液 1~10 ml を加え室温で一夜アルカリ分解した。これにヘキサン 2~10 ml, 水 0.5~5 ml を加え振とう後抽出した。さらに、ヘキサン 2~10 ml で 2 回抽出後、ヘキサン層を水 1~5 ml で洗浄し、濃硫酸 2~10 ml で 5 回処理した。このヘキサン溶液を 0.8 g の硝酸銀シリカゲルカラム (7 mm ϕ) に注入し、ヘキサン 8 ml で溶出し、溶出液を 1 ml に濃縮した。さらに 0.6 g のフロリジルカラム (7 mm ϕ) につけヘキサン 4 ml を流し、続いてジクロロメタン 8 ml でダイオキシン類を溶出した。溶出液は乾固し、ノナン 15 μl を加え試料液とした。ダイオキシン類はスペルコ社製 SP-2331 のキャピラリーカラム (0.32 mm \times 30 m) を装着した GC-MS (HEWLETT PACKARD 5890-FINNIGAN MAT-90) を用いて分解能 7000 に設定して Selected Ion Monitoring (SIM) 法で定量した。

4. 統計処理

投与群間の平均値の差の検定は Student-t テストによって行った。

実験結果

1. 試験飼料の飼料摂取量、体重及び糞重量に及ぼす影響

飼料組成は Table 2 及び 3 に示すように、プロトポルフィリン及びヘミン量を蔗糖で補正し、そのほかの組成は 3 群とも同一にした。その結果、実験-1 の場合、プロトポルフィリン及びヘミン群の飼料摂取量、体重増加量及び糞重量は基本食群と比べて有意な差は認められなかった (Table 4)。実験-2 の場合、プロトポルフィリン及びヘミン群の糞重量は基本食群と比べて高値を示した。飼料摂取量及び体重増加量は基本食群と比べて有意な差は認められなかった (Table 5)。

2. ダイオキシン類の糞中排泄に及ぼすプロトポルフィリン及びヘミンの効果

油症原因ライスオイル投与後 5 日間のダイオキシン類の糞中排泄量を Table 6 に示す。基本食群の 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (T_4CDD) の排泄量は投与量の 5.2% であった。一方、プロトポルフィリン群は投与量の 10.9% が排泄され、基本食群と比べて 2.1 倍の増加が認められた ($p < 0.05$)。プロトポルフィリン群の排泄量は基本食群と比べて、1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (P_5CDD) が 1.7 倍、1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin (H_6CDD)

Table 3 Composition of diet (% , experiment 2)

Components	Basal diet	Protoporphyrin diet	Hemin diet
Sucrose	70	69.5	69.5
Casein	20	20	20
Corn oil	5	5	5
Mineral mixture	4	4	4
Vitamin mixture	0.85	0.85	0.85
Choline chloride	0.15	0.15	0.15
Protoporphyrin	—	0.5	—
Hemin	—	—	0.5

Table 4 Effect of diet on food intake, body weight gain and feces weight of rats (experiment 1)

Diet	Food intake (g/5days)	Body weight gain (g/5days)	Feces weight (g/5days)
Basal diet	97.6 \pm 5.1	51.1 \pm 4.7	5.3 \pm 0.4
0.5% Protoporphyrin	102.1 \pm 4.7	54.1 \pm 4.1	5.9 \pm 0.4
0.5% Hemin	88.4 \pm 13.0	44.1 \pm 8.3	6.0 \pm 1.2

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

が1.4倍, 1,2,3,6,7,8-H₆CDDが1.4倍, 1,2,3,7,8,9-H₆CDDが1.5倍, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin (H₇CDD)が1.1倍に増加した。Fig. 1に基本食群に対するプロトポルフィリン群のダイオキシン類の排泄比率を示す。PCDFの場合, プロトポルフィリン群の排泄量は基本食群と比べて, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (T₄CDF)が3.6倍, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran (P₅CDF)が2.7倍, 2,3,4,7,8-P₅CDFが1.9倍, 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (H₆CDF)が1.8倍, 1,2,3,6,7,8-H₆CDFが1.7倍, 2,3,4,6,7,8-H₆CDFが1.4倍, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzofuran (H₇CDF)が1.1倍に増加した。一方, ヘミン群のダイオキシン類の排泄量は基本食群に対して有意な差は認

められなかった (Table 6)。

3. ダイオキシン類の吸収に及ぼすプロトポルフィリンの効果

Table 6に示した油症原因ライスオイル投与後5日間の排泄量を未吸収分と考え、一夜絶食時にダイオキシン類を飼料に添加して投与した時の消化管吸収率は、基本食群の場合、6種類のPCDDで50.5~94.8%、8種類のPCDFで48.5~99.3%であった。ダイオキシン類の消化管吸収に及ぼすプロトポルフィリンの効果を吸収抑制率で表した。すなわち、プロトポルフィリン群の基本食群に対する吸収抑制率=[(基本食群の吸収率-プロトポルフィリン群の吸収率)/基本食群の吸収率×100]を計算すると、2,3,7,8-T₄CDDが6.1%、1,2,3,7,8-P₅CDDが9.4%、1,2,3,4,7,8-

Table 5 Effect of diet on food intake, body weight gain and feces weight of rats (experiment 2)

Diet	Food intake (g/28days)	Body weight gain (g/28days)	Feces weight (g/28days)
Basal diet	540.1±38.2	162.0±21.6	10.4±0.9
0.5% Protoporphyrin	580.3±37.7	174.1±16.8	13.7±1.5 ^a
0.5% Hemin	532.6±30.5	150.3± 8.2	19.8±1.2 ^a

Values represent the mean ± S. D. for four rats.

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

Table 6 Effect of protoporphyrin and hemin on fecal excretion of PCDD and PCDF in rats (experiment 1)

	Excretion (% of dose)		
	Basal	0.5% Protoporphyrin	0.5% Hemin
2,3,7,8-T ₄ CDD	5.2± 1.1	10.9±3.6 ^b	6.2± 0.1
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	11.7± 4.7	20.0±5.8	14.4± 3.7
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	26.5± 8.6	35.8±5.3	28.5±10.1
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD	26.9± 8.9	38.0±8.3	24.7± 6.5
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	34.2± 8.8	49.6±6.0 ^b	33.9± 6.1
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	49.5± 8.8	53.7±5.1	35.6±10.5
2,3,7,8-T ₄ CDF	0.7± 0.2	2.5±0.8 ^a	0.8± 0.4
1,2,3,7,8-P ₅ CDF	5.9± 2.3	15.6±4.1 ^a	6.6± 2.3
2,3,4,7,8-P ₅ CDF	10.8± 5.0	20.6±5.5 ^b	12.5± 4.5
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDF	18.6± 5.4	34.2±5.7 ^a	21.0± 6.0
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDF	23.8± 8.0	40.6±5.8 ^b	27.2± 4.6
2,3,4,6,7,8-H ₆ CDF	31.5± 8.3	44.5±7.9	31.6± 9.0
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDF	33.2± 5.6	35.9±3.8	24.8± 7.5
1,2,3,4,7,8,9-H ₇ CDF	51.5±13.7	51.1±8.1	33.6± 8.8

Values represent the mean ± S. D. for four rats.

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

b) Significantly different from basal diet group (p<0.05).

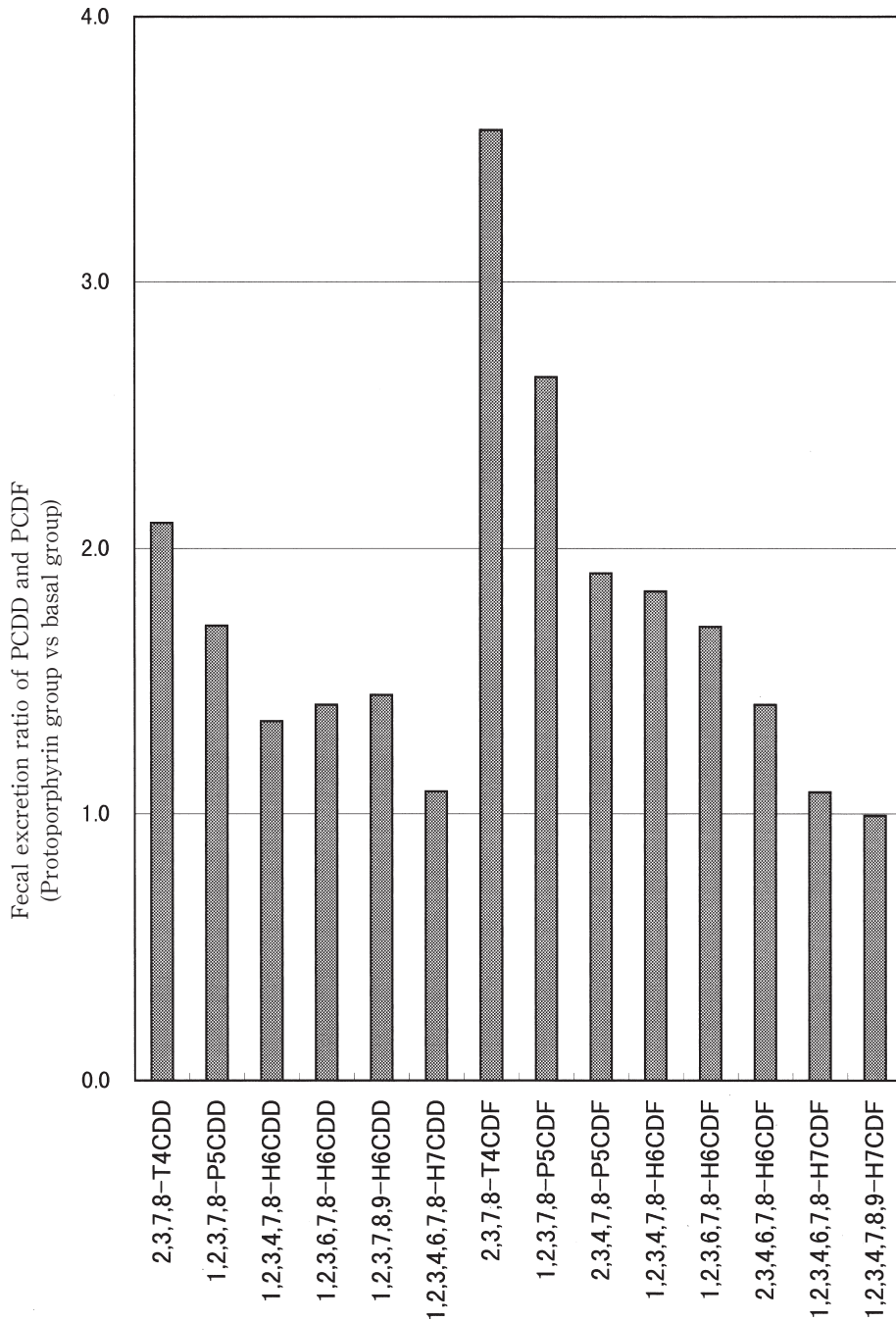


Fig. 1 Effect of protoporphyrin diet on fecal excretion ratio of PCDD and PCDF in rats (experiment 1)

H₆CDD が 12.7%, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD が 15.3%, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD が 23.4%, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD が 8.3%, さらに, 2,3,7,8-T₄CDF が 1.8%, 1,2,3,7,8-P₅CDF が 10.3%, 2,3,4,7,8-P₅CDF が 11.0%, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF が 19.2%, 1,2,3,6,7,8-H₆CDF が 22.0%, 2,3,4,6,7,8-H₆CDF が 19.0%, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF が 4.0% であった。

4. ダイオキシン類の再吸収抑制に及ぼすプロトポルフィリン及びヘミンの効果

油症原因ライスオイル投与後 8 日目から 35 日まで 28 日間のダイオキシン類の糞中排泄量を Table 7 に示す。基本食群の 2,3,7,8-T₄CDD の排泄量は投与量の 1.1% であった。プロトポルフィリン群では投与量の 2.3% が排泄され、基本食群と比べて 2.1 倍の増加が認められた (p<0.05)。プロトポルフィリン群の排泄量は基本食群と比べて、1,2,3,7,8-P₅CDD が 2.1 倍, 1,2,3,4,7,8-H₆CDD が 1.6 倍, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD が 1.9 倍, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD が 1.8 倍, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD が 1.2 倍に増加した。Fig. 2 に基本食群に対するプロトポルフィリン群のダイオキシン類の排泄比率を示す。PCDF の場合、プロトポルフィリン群の排泄量は基本食群と比べて 2,3,7,8-T₄

CDF が 1.3 倍, 1,2,3,7,8-P₅CDF が 1.5 倍, 2,3,4,7,8-P₅CDF が 2.1 倍, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF が 2.0 倍, 1,2,3,6,7,8-H₆CDF が 1.8 倍, 2,3,4,6,7,8-H₆CDF が 1.5 倍, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF が 1.1 倍, 1,2,3,4,7,8,9-H₇CDF が 1.3 倍に増加した。一方、ヘミン群のダイオキシン類の排泄量は基本食群に対して有意な差は認められなかった (Table 7)。

考 察

人やラットによる実験結果より、ダイオキシン類の消化管からの吸収率は極めて高いと考えられる。吸収されたダイオキシン類は主に脂肪組織や肝臓に蓄積し、一部が再び胆汁、唾液、胃腸液等とともに消化管内へ排出され、糞中へ排泄されていると考えられる。人における 2,3,7,8-T₄CDD の生物学的半減期は 5.8 年と報告されている⁹⁾。それゆえ、1 日当たりの 2,3,7,8-T₄CDD の体外への排出量は体内蓄積量の約 0.03% と見積もられる。

8 日目から 35 日までの 2,3,7,8-T₄CDD の排泄量は基本食群が投与量の 1.1% (0.04%/day)、プロトポルフィリン群が投与量の 2.3% (0.08%/day) であり、プロトポルフィリン群は基本食群と比べて 2.1 倍の排

Table 7 Effect of protoporphyrin and hemin on fecal excretion of PCDD and PCDF in rats (experiment 2)

	Excretion (% of dose)		
	Basal	0.5% Protoporphyrin	0.5% Hemin
2,3,7,8-T ₄ CDD	1.1±0.8	2.3±0.4 ^b	2.0±1.8
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	1.1±0.2	2.3±0.5 ^a	1.6±0.6
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	1.5±0.2	2.3±0.5 ^b	1.5±0.7
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD	1.1±0.2	2.1±0.5 ^a	1.1±0.4
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	1.5±0.3	2.7±0.7 ^b	1.7±1.0
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	2.6±0.8	3.2±1.5	1.9±1.0
2,3,7,8-T ₄ CDF	0.006±0.002	0.008±0.001	0.004±0.001
1,2,3,7,8-P ₅ CDF	0.036±0.011	0.067±0.014	0.025±0.010
2,3,4,7,8-P ₅ CDF	0.29±0.05	0.61±0.1 ^a	0.36±0.1
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDF	0.70±0.08	1.4±0.4 ^a	0.68±0.3
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDF	0.74±0.09	1.3±0.3 ^b	0.67±0.2
2,3,4,6,7,8-H ₆ CDF	0.68±0.1	1.0±0.3 ^a	0.57±0.2
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDF	1.8±0.6	1.9±0.8	1.3±0.8
1,2,3,4,7,8,9-H ₇ CDF	1.7±0.4	2.3±0.9	1.1±0.7

Values represent the mean ± S. D. for four rats.

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

b) Significantly different from basal diet group (p<0.05).

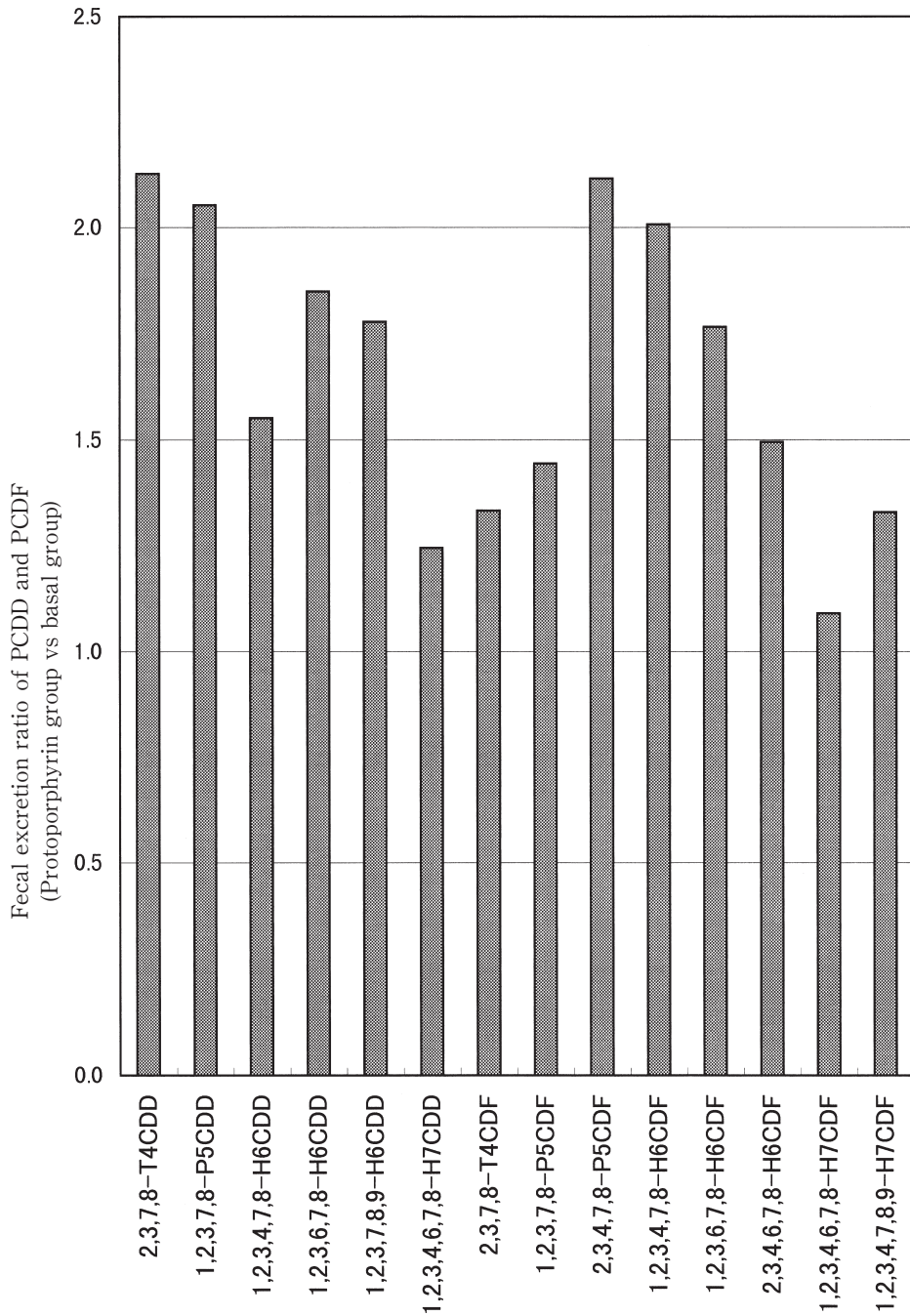


Fig. 2 Effect of protoporphyrin diet on fecal excretion ratio of PCDD and PCDF in rats (experiment 2)

泄増加が認められた ($p < 0.05$)。同じく、2,3,4,7,8-P₅CDF の排泄量は基本食群が投与量の 0.29% (0.01%/day)、プロトポルフィリン群が投与量の 0.61% (0.02%/day) であり、プロトポルフィリン群は基本食群と比べて 2.1 倍の排泄増加が認められた ($p < 0.01$)。このことから、プロトポルフィリンはダイオキシン類の再吸収を抑制し、体内に蓄積したダイオキシン類の体外排出を促進する、排泄促進剤としての効果が認められた。

前に、食物繊維を製造しラットを用いてダイオキシン類の吸収抑制による排泄促進について検討した結果、米ぬか繊維はほうれん草、だいこん葉、白菜、ごぼう、だいこん根、にんじん、小豆、大麦、キャベツ、コーン、大豆の繊維と比べてダイオキシン類の排泄量の増加が認められた。プロトポルフィリンの効果を米ぬか繊維の場合と比較すると、米ぬか繊維群の 1,2,3,7,8-P₅CDD, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD 及び 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD の排泄量は、それぞれ投与量の 21.5~24.1%, 44.2~46.9%, 58.0~60.0%, 74.1~76.5%であったのに対し⁶⁾、プロトポルフィリン群がそれぞれ投与量の 20.0%, 38.0%, 49.6%, 53.7%であった。プロトポルフィリン群は米ぬか繊維群よりわずかに低い値を示した。さらに、米ぬか繊維群の 2,3,7,8-T₄CDF, 2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF 及び 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF の排泄量は、それぞれ投与量の 8.3%, 19.8%, 40.8%, 72.9%であったのに対し⁷⁾、プロトポルフィリン群がそれぞれ投与量の 2.5%, 20.6%, 34.2%, 35.9%であった。プロトポルフィリン群は 2,3,4,7,8-P₅CDF を除いて米ぬか繊維群よりわずかに低い値を示した。しかし、プロトポルフィリン群 (0.5%) の投与量は米ぬか繊維群 (10%) の 1/20 であったことから、プロトポルフィリンは米ぬか繊維より多くダイオキシン類を排泄促進する可能性を示している。

プロトポルフィリン及びヘミンは人の体内に存在する成分である。血中にプロトポルフィリン量は 0.0~19.5 µg/dl、ヘミン量は 450~750 mg/dl 分布しているため、その体内動態を正確に調査することは困難と考えられる⁵⁾。プロトポルフィリンは腸管で投与量の 60~70% が吸収されると考えられている¹⁵⁾。さらにヘミン及びヘムの前駆物質として利用されたのち、

酸化物のビリルビン等の胆汁色素として尿及び胆汁中に排泄される。ダイオキシン類を効果的に糞中へ排泄促進するためには消化管内でダイオキシン類と吸着あるいは複合体を形成し、速やかに排泄されるもので、それ自体が吸収されず、腸内細菌で分解を受けないことが望まれる。プロトポルフィリンの腸管吸収率は 60~70% である。それゆえ、8 日目から 35 日までのプロトポルフィリン群の排泄量はラットの消化管内に排出されたダイオキシン類のごく一部と考えられ、かなり排泄促進のための効率が低下したものと思われる。

結 論

生体成分であるプロトポルフィリンとヘミンについて、ラットを用いて、ダイオキシン類の吸収抑制と再吸収抑制に対する効果について検討した。

1) 0.5%プロトポルフィリン群は基本食群に対して、2,3,7,8-T₄CDD, 1,2,3,7,8-P₅CDD, 1,2,3,4,7,8-H₆CDD, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD 及び 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD の吸収をそれぞれ 6.1, 9.4, 12.7, 15.3, 23.4, 8.3% 抑制し、糞中にそれぞれ 2.1, 1.7, 1.4, 1.4, 1.5, 1.1 倍の排泄増加が認められた。同様に、0.5%プロトポルフィリン群は基本食群と比べて、2,3,7,8-T₄CDF, 1,2,3,7,8-P₅CDF, 2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF, 1,2,3,6,7,8-H₆CDF, 2,3,4,6,7,8-H₆CDF 及び 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF の吸収をそれぞれ 1.8, 10.3, 11.0, 19.2, 22.0, 19.0, 4.0% 抑制し、糞中にそれぞれ 3.6, 2.7, 1.9, 1.8, 1.7, 1.4, 1.1 倍の排泄増加が認められた。

2) 0.5%プロトポルフィリン群はダイオキシン類の再吸収を抑制し、基本食群と比べて 2,3,7,8-T₄CDD, 1,2,3,7,8-P₅CDD, 1,2,3,4,7,8-H₆CDD, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD 及び 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD をそれぞれ 2.1, 2.1, 1.6, 1.9, 1.8 及び 1.2 倍多く排泄促進した。さらに、0.5%プロトポルフィリン群は基本食群と比べて 2,3,7,8-T₄CDF, 1,2,3,7,8-P₅CDF, 2,3,4,7,8-P₅CDF, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF, 1,2,3,6,7,8-H₆CDF, 2,3,4,6,7,8-H₆CDF, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF 及び 1,2,3,4,7,8,9-H₇CDF をそれぞれ 1.3, 1.5, 2.1, 2.0, 1.8, 1.5, 1.1 及び 1.3 倍多く排泄促進した。

3) 0.5%ヘミン群のダイオキシン類の排泄量は基本食群と比べて大きな差はなく、吸収抑制及び再吸収抑制による排泄促進効果は認められなかった。

謝 辞

本研究は平成10年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)によるものである。ここに記して謝意を表します。

文 献

1) Abraham K, Hille A, Ende M and Helge H: Intake and fecal excretion of PCDDs, PCDFs, HCB and PCBs in a breast-fed and formula-fed infant. *Chemosphere*. 29: 2279-2286, 1994.

2) 平川博仙, 松枝隆彦, 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克巳, 長山淳哉, 永田武明: 油症患者及び対照者の皮下脂肪組織中のCoplanarPCBs, PCDFs及びPCDDs. 福岡医誌, 82: 274-279, 1991.

3) 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.

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

5) 三宅正一, 関山泰司, 菊谷健二, 宮川崇希, 佐古英二: プロトポルフィリンナトリウム錠のビーグル犬による生物学的同等性試験. 医薬品研究, 17: 75-93, 1986.

6) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄: ラットにおけ

る polychlorinated dibenzo-*k*-dioxins の糞中排泄に対する食物繊維の効果. 衛生化学, 43: 35-41, 1997.

7) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄: PCDFの糞中排泄および肝臓分布に対する食物繊維の効果. 福岡医誌, 86: 218-225, 1995.

8) 日本医薬品情報センター編: 日本医薬品集, 薬業時報社, 東京, 1994.

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

10) ポルフィリン研究会編: ポルフィリン・ヘムの生命科学, 東京化学同人, 東京, 1995.

11) Ryan JJ, Schechter A, Lizotte R, Sun W and Miller L: Tissue distribution of dioxins and furans in humans from the general population: *Chemosphere*, 14, 929-932, 1985.

12) 須山忠和, 松本 剛, 小田島肅夫: プロトポルフィリンの抗炎症作用(Ⅳ) —経口投与せるプロトポルフィリンの実験的肝硬変およびアナフィラキシーショックに対する効果—. 十全医会誌, 74: 256-270, 1966.

13) 高山幸司, 宮田秀明, 味村真弓, 榎本 隆: 日本の沿岸魚及び市販魚中のPCDDs, PCDFs及びCoplanar PCBs. 衛生化学, 37: 125-131, 1991.

14) 高山幸司, 宮田秀明, 青笹 治, 味村真弓, 榎本 隆: 日本における食事経由のダイオキシン関連物質の摂取量. 食衛誌, 32: 525-532, 1991.

15) 横山和正, 岩井正和, 村島良一郎, 山内紘一, 池田正夫: プロトポルフィリンジナトリウム塩の吸収代謝排泄. 基礎と臨床, 7: 390-402, 1973.

(受付 1999-3-18)

ラットにおける PCDD 及び PCDF の消化管吸収に及ぼす 緑色野菜の効果

福岡県保健環境研究所
森田邦正・松枝隆彦・飯田隆雄

Effect of Green Vegetable on Digestive Tract Absorption of Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans in Rats

Kunimasa MORITA, Takahiko MATSUEDA and Takao IIDA
*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Fukuoka 818-0135, Japan*

Abstract The effect green vegetable on fecal excretion of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD) congeners and polychlorinated dibenzofuran (PCDF) congeners was examined in male rats. The rats were administered 10% vegetable diets or a basal diet containing 0.2 ml of the causal rice-bran oil of Yusho that had occurred in the Southwest part of Japan in 1968 and kept on the same diet for five days. The fecal excretion of 2,3,7,8-T₄CDD and 2,3,4,7,8-P₅CDF in the group fed with Komatsuna, Mitsuba, Spinach and Perilla were 7.6~11.6 and 6.5~9.4 times higher, respectively, than that in the group fed with a basal diet. The fecal excretion of 2,3,7,8-T₄CDD and 2,3,4,7,8-P₅CDF in the group fed with Kale, Chinese chive, Shungiku, Chingentsuai, Green lettuce and Sweet pepper were 3.3~4.8 and 4.3~4.5 times higher, respectively, than that in the basal group. The fecal excretion of 2,3,7,8-T₄CDD and 2,3,4,7,8-P₅CDF in the group fed with Chinese cabbage, Broccoli, Onion, Welsh onion, Cabbage and Celery were 1.6~3.0 and 1.2~1.3 times higher, respectively, than that in the basal group. A correlation between Chloophyll consumption and fecal excretion of PCDD and PCDF congeners was highly significant ($p < 0.01$).

Next, we investigated the fecal excretion of PCDD and PCDF congeners from day 8 to day 35 in rats administered with 0.5 ml of the rice oil. The fecal excretion of 2,3,7,8-T₄CDD and 2,3,4,7,8-P₅CDF in the group fed with Perilla, Kale and Spinach were 3.1~4.9 and 3.0~3.6 times higher, respectively, than that in the basal group. The presents results suggest that the green vegetables might be useful in treatment of humans exposed to PCDD and PCDF congeners.

はじめに

PCDD 及び PCDF (ダイオキシン類) はゴミ焼却炉等から発生する世界的な環境汚染物質である。それゆえに、食品¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾を経由して吸収され、人体に蓄積される。特に、2,3,7,8-位に塩素が置換したダイオキシン類は代謝されにくく、人の血液や脂肪組織の生物学的半減期は5年以上と報告されている⁵⁾¹⁵⁾。それゆえ、一般の人の血液、肝臓、脂肪組織、母乳から微量であるが検出される⁶⁾¹⁶⁾¹⁸⁾。体内に蓄積したダイオキシン類は、ごく一部が胆汁や腸液等を通じて再び消化管内に

排出され、糞便中へと排泄されている。ダイオキシン類による人への健康障害を防止するためには、食品経由のダイオキシン類を消化管内で吸収抑制し、人体への吸収量を大幅に減少させる食生活の方法を開発することが必要である。また、すでにダイオキシン類に暴露された人に対しては、消化管内に排出されたダイオキシン類の再吸収を効果的に抑制することにより、体内蓄積量を減少させる方法を提示することが必要である。

著者らはダイオキシン類の体外排除を目的に、食物繊維がダイオキシン類の吸収に及ぼす影響を調べ

た⁸⁾¹¹⁾¹³⁾。その結果、食物繊維は消化管でダイオキシン類の吸収及び再吸収を抑制し、体外へ排出することが分かった。しかし、このような機能が緑色野菜にあるかについては明らかにされていない。これまでの研究から、クロロフィル(葉緑素)はダイオキシン類の消化管吸収を抑制する作用があることが示唆され¹²⁾、クロロフィルと食物繊維を含む野菜類にはダイオキシン類の排泄促進作用が期待される。そこで、16種類の野菜を用いて、ダイオキシン類の吸収抑制及び再吸収抑制作用について検討した。

実験方法

1. 実験材料

小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス、ピーマン、白菜、ブロッコリー、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリーは青果市場で購入した。ケールは(株)キューサイから提供された。16種類の野菜は水道水でよく洗浄した後、27 Lの大型なべで1~1.5分間ゆでた。水道水で冷却した後、熱風乾燥機に入れ、60°Cで一夜乾燥した。これを食品用粉砕器を使って粉砕し、シリカゲルのデシケータ中に保存した。

ラットの飼料に添加した油症原因ライスオイルは油症患者から提供された未使用のものを使用した。Table 1に、実験方法3に準じて定量したダイオキシン類濃度を示す。

ヘキサン、アセトン、クロロホルム、メタノール、ジクロロメタン、無水硫酸ナトリウム、フロリジルは和光純薬(株)製の残留農薬試験用を使用した。硝酸銀シリカゲルは硝酸銀10 gに水5 mlを加えて加温して溶かし、これにメルク社製のKieselgel 60 (70~230 mesh) 85 gを加え、振り混ぜたのち一夜放置したものを用いた。その他の試薬は特級品を使用した。

クロロフィルa及びbはSIGMA社製を用い、井崎ら⁴⁾のクロロフィルの定量法に準じて、高速液体クロマトグラフを使って野菜中のクロロフィルa及びbを測定した。

2. 動物実験

ラットの餌のカゼイン、ミネラル (Harper 配合)、ビタミン (Harper 配合) はオリエンタル酵母(株)製を用いた。

実験-1(吸収抑制実験)68匹のWistar系雄ラットを1群4匹に分け、Table 2に示す基本食と10%の野菜食を与えた。5日間予備飼育後、一夜絶食させ、基本食群及び16種類の野菜群のラット(平均体重約151 g)にはそれぞれの飼料4 gに油症原因ライスオイル0.2 mlを添加して1回投与した。飼料を完全に摂取させた後(約5時間)、引き続き、同じ飼料で5日間飼育した。ラットは代謝ケージに1匹ずつ入れ、食餌と水は自由に与えた。糞は5日分を採取し、70°Cで一夜乾燥し重量を秤量した。

実験-2(再吸収抑制実験)16匹のWistar系雄ラットを1群4匹に分け、Table 2に示す基本食を与えた。5日間予備飼育後、一夜絶食させ、基本食4 gに油症原因ライスオイル0.5 mlを添加してラット(平均体重約105 g)に1回投与し、引き続き基本食で7日間飼育

Table 1 Concentrations of PCDD and PCDF in the rice-bran oil of Yusho.

	ng/ml
2,3,7,8-T ₄ CDD	0.51
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	6.9
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	5.1
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD	31.4
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	22.4
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	121.7
1,2,3,4,6,7,8,9-O ₈ CDD	73.9
2,3,7,8-T ₄ CDF	458.7
1,2,3,7,8-P ₅ CDF	506.9
2,3,4,7,8-P ₅ CDF	802.4
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDF	752.3
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDF	117.8
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDF	10.9
2,3,4,6,7,8-H ₆ CDF	205.1
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDF	294.4
1,2,3,4,7,8,9-H ₇ CDF	15.4
1,2,3,4,6,7,8,9-O ₈ CDF	34.7

Table 2 Composition of diet (%)

	Basal diet	Vegetable diet
Sucrose	70	60
Casein	20	20
Corn oil	5	5
Mineral mixture	4	4
Vitamin mixture	0.85	0.85
Choline chloride	0.15	0.15
Vegetable	—	10

した。基本食群は35日まで同じ基本食で飼育し、野菜群は8日目から35日まで、10%の青じそ、ケール及びほうれん草飼料を投与した。ラットは代謝ケージに1匹ずつ入れ、食餌と水は自由に与えた。糞は8日目から35日まで28日分を採取し、70°Cで一夜乾燥し重量を秤量した。

3. 糞中のダイオキシン類の定量

糞は円筒のガラス繊維製ろ紙に入れ、ソックスレー抽出器を用いて、クロロホルム-メタノール(2:1, v/v) 150~300 mlで10時間抽出した。抽出液は約5 mlまで濃縮し、クロロホルムで50 mlに定容した。ダイオキシン類の定量には糞の抽出液2~40 mlをそれぞれ10 mlの試験管及び50 mlの遠沈管にとり濃縮乾固した。これに2,3,7,8-位に塩素が置換した¹³Cの内標準物質を200 pg及び8塩化体の内標準物質を400 pg添加し、1 N水酸化カリウムエタノール溶液1~10 mlを加え室温で一夜アルカリ分解した。これにヘキサン2~10 ml, 水0.5~5 mlを加え振とう後、遠心分離しヘキサン層を分取した。同様に、ヘキサン2~10 mlを加えて2回抽出した。ヘキサン層を合わせ、水1~5 mlで洗浄した後遠心分離し、水を除去した。濃硫酸2~10 mlで5回処理した後、1 ml以下に濃縮した。このヘキサン溶液を0.8 gの硝酸銀シリカゲルカラム(7 mmφ)に注入し、ヘキサン8 mlで溶出し、溶出液を1 ml以下に濃縮した。さらに0.6 gのフロリジルカラム(7 mmφ)にかけヘキサン4 mlを流した後、ジクロロメタン8 mlでダイオキシン類を溶出した。溶出液は乾固し、ノナン15 μlを加え試料液とした。ダイオキシン類はスバルコ社製のキャピラリーカラム SP-2331(0.32 mm×30 m)を装着したGC-MS(HEWLETT PACKARD 5890-FINNIGAN MAT-90)を用いて分解能7000に設定して Selected Ion Monitoring (SIM)法で定量した。

4. 統計処理

投与群間の平均値の差の検定は Student-t テストによって行った。

実験結果

1. 野菜添加飼料が飼料摂取量、体重、糞重量及び糞中脂質量に及ぼす影響

本研究では野菜群と比較するため、野菜を含まない

基本食群をコントロールに用いた。飼料組成は Table 2 に示すように、野菜量をグラニュー糖で補正し、そのほかの組成は同一にした。実験-1 及び実験-2 の場合、野菜群の飼料摂取量及び体重増加量は基本食群と比べて有意な差は認められなかった (Table 3 及び 4)。糞重量は野菜群が基本食群より高い傾向を示した。小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、にら、ケール、春菊及びチンゲンサイ群の糞中脂質量は基本食群と比べて多く有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

2. ダイオキシン類の糞中排泄に及ぼす野菜投与の効果

油症原因ライスオイル投与後5日間のダイオキシン類の糞中排泄量を Table 5 及び 6 に示す。野菜群と基本食群の PCDD 排泄量について比べると、基本食群の 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (T₄CDD) の排泄量は投与量の 1.6%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群が投与量の 12.0~18.3%、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が投与量の 6.9~7.5%、白菜、ブロッコリー、たまねぎ及びネギ群が投与量の 3.3~4.7%、キャベツ、セルリー群が投与量の 2.6~3.1%であった。2,3,7,8-T₄CDD の排泄量は基本食群に対して、小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群が 7.6~11.6 倍、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が 3.3~4.8 倍、白菜、ブロッコリー、たまねぎ及びネギ群が 2.1~2.3 倍、キャベツ、セルリー群が 1.6~1.9 倍に増加した。

1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (P₅CDD) の排泄量は基本食群が投与量の 4.8%であったのに対して、小松菜及びみつば群が 7.3~7.8 倍、ほうれん草、青じそ、ケール、にら及び春菊群が 4.2~5.6 倍、チンゲンサイ、グリーンレタス、ピーマン、白菜及びブロッコリー群が 2.0~3.9 倍、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が 1.1 倍に増加した。

1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin (H₆CDD) の排泄量は基本食群が投与量の 12.4%であったのに対して、小松菜及びみつば群が 5.1~6.1 倍、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が 3.0~4.7 倍、白菜及びブロッコリー群が 2.0~2.6 倍、たまねぎ、ネギ、キャ

Table 3 Effect of vegetable diet on food intake, body weight gain and fecal data of rats (experiment 1).

Diet	Food intake (g/5days)	Body weight gain (g/5days)	Feces weight (g/5days)	Fat in feces (g/5days)
Basal diet	96.2±5.5	50.6±5.7	1.1±0.2	0.23±0.06
10% Komatsuna	101.7±2.9	56.5±6.6	4.5±0.6 ^a	0.68±0.08 ^a
10% Mitsuba	103.3±3.7	56.0±4.3	3.6±0.9 ^a	0.60±0.04 ^a
10% Spinach	101.6±7.0	52.4±3.1	3.6±0.7 ^a	0.60±0.16 ^a
10% Perilla	101.0±5.4	52.1±2.8	3.5±0.7 ^a	0.57±0.09 ^a
10% Kale	103.7±2.7	57.6±4.1	4.2±0.2 ^a	0.60±0.10 ^a
10% Chinese chive	104.8±2.4	59.8±4.2	3.5±0.3 ^a	0.60±0.11 ^a
10% Shungiku	103.8±3.1	59.6±4.0	3.7±0.4 ^a	0.54±0.05 ^a
10% Chingentsuai	102.2±4.3	50.9±2.4	4.2±1.1	0.56±0.11 ^a
10% Green lettuce	101.4±2.1	51.0±2.2	3.2±0.5 ^a	0.41±0.08
10% Sweet pepper	101.5±5.9	56.6±5.3	3.8±0.7 ^a	0.55±0.16
10% Chinese cabbage	103.0±5.3	55.3±5.5	4.1±0.5 ^a	0.31±0.03
10% Broccoli	102.2±7.0	57.2±8.4	2.8±1.0	0.48±0.13
10% Onion	105.1±1.7	58.6±1.9	2.2±0.1 ^a	0.29±0.08
10% Welsh onion	98.4±4.4	57.0±3.4	2.2±0.6 ^a	0.33±0.06
10% Cabbage	104.0±3.7	56.6±4.6	3.0±0.4 ^a	0.22±0.04
10% Celery	103.4±2.4	55.4±4.7	3.2±0.9 ^a	0.28±0.09

Values represent the mean ± S.D. for four rats.

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

Table 4 Effect of vegetable diet on food intake, body weight gain and feces weight of rats (experiment 2)

Diet	Food intake (g/28days)	Body weight gain (g/28days)	Feces weight (g/28days)
Basal diet	540.1±38.2	162.0±21.6	10.4±0.9
10% Perilla	585.7±39.0	187.0±10.8	31.7±3.2 ^a
10% Kale	555.6±39.3	165.6±23.7	30.0±3.9 ^a
10% Spinach	607.2± 8.8	196.4± 9.3	30.6±3.7 ^a

Values represent the mean ± S.D. for four rats.

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

ベツ及びセルリー群が 1.3~1.7 倍に増加した。

1,2,3,6,7,8-H₆CDD の排泄量は基本食群が投与量の 15.2%であったのに対して、小松菜及びみつば群が 4.3~4.5 倍、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が 2.6~3.4 倍、白菜、ブロッコリー、ネギ及びキャベツ群が 1.1~1.9 倍に増加した。

1,2,3,7,8,9-H₆CDD の排泄量は基本食群が投与量の 16.1%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が 3.3~4.8 倍、白菜及びブロッコリー群が 2.4~2.9 倍、たまねぎ、ネギ、キャ

ベツ及びセルリー群が 1.4~1.9 倍に増加した。

1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin (H₇CDD) の排泄量は基本食群が投与量の 39.8%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス、ピーマン及び白菜群が 1.6~2.1 倍、ブロッコリー、ネギ及びキャベツ群が 1.1~1.4 倍に増加した。

1,2,3,4,6,7,8,9-octachlorodibenzo-*p*-dioxin (O₈CDD) の排泄量は基本食群が投与量の 68.5%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が 1.2~1.4 倍、白菜、ブロッコリー、

Table 5 Effect of vegetable diet on fecal excretion of PCDD in rats (experiment 1)

Diet	Excretion (% of dose)			
	2,3,7,8-T ₄ CDD	1,2,3,7,8-P ₅ CDD	1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD
Basal diet	1.6±0.2	4.8±0.5	12.4±1.7	15.2±2.6
10% Komatsuna	16.4±9.6	37.7±2.2 ^a	75.6±9.8 ^a	67.6±1.1 ^a
10% Mitsuba	18.3±8.1	35.3±1.1 ^a	62.9±6.3 ^a	64.6±4.8 ^a
10% Spinach	12.0±5.4	27.2±6.6 ^a	56.6±9.8 ^a	57.8±7.1 ^a
10% Perilla	15.6±3.4 ^a	24.7±4.6 ^a	46.7±7.6 ^a	44.8±6.8 ^a
10% Kale	7.0±2.2	22.3±4.7 ^a	57.7±5.2 ^a	52.3±5.1 ^a
10% Chinese chive	6.9±0.3 ^a	20.5±2.6 ^a	51.3±6.6 ^a	49.6±3.6 ^a
10% Shungiku	7.0±2.3	20.8±4.0 ^a	52.4±9.4 ^a	50.3±4.4 ^a
10% Chingentsuai	5.2±0.7 ^a	18.7±5.6	46.6±5.8 ^a	45.4±6.5 ^a
10% Green lettuce	7.5±4.6	17.6±4.9	45.0±4.6 ^a	46.8±7.8 ^a
10% Sweet pepper	7.1±2.1	17.2±3.0 ^a	37.2±7.1 ^a	39.3±5.4 ^a
10% Chinese cabbage	4.7±1.5	10.5±4.6	32.4±7.9 ^a	29.1±6.3 ^a
10% Broccoli	3.3±0.6 ^a	9.6±2.9	24.9±6.4 ^a	26.0±5.3
10% Onion	3.6±0.7 ^a	5.5±1.6	16.4±3.5	14.4±3.9
10% Welsh onion	3.5±0.8 ^a	5.0±2.0	16.4±2.9	16.3±4.9
10% Cabbage	3.0±1.3	5.5±0.8	20.6±2.3 ^a	19.5±2.2
10% Celery	2.6±0.7	5.4±0.4	16.3±3.9	15.1±4.2

Diet	Excretion (% of dose)		
	1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	1,2,3,4,6,7,8,9-O ₈ CDD
Basal diet	16.1±7.9	39.8±3.1	68.5±8.6
10% Komatsuna	77.3±0.8 ^a	81.8±2.1 ^a	93.6±3.2 ^a
10% Mitsuba	72.8±8.4 ^a	80.5±6.2 ^a	91.7±9.3 ^a
10% Spinach	73.5±10.0 ^a	80.8±8.5 ^a	90.8±4.6 ^a
10% Perilla	58.2±6.5 ^a	73.5±11.4 ^a	82.4±7.9
10% Kale	71.8±7.3 ^a	80.5±4.1 ^a	88.9±4.4 ^a
10% Chinese chive	65.3±3.5 ^a	75.9±3.2 ^a	94.8±3.4 ^a
10% Shungiku	62.9±12.7 ^a	76.5±3.6 ^a	94.2±6.1 ^a
10% Chingentsuai	62.6±7.6 ^a	75.5±5.9 ^a	94.7±6.3 ^a
10% Green lettuce	60.2±8.3 ^a	73.4±5.8 ^a	94.3±7.8 ^a
10% Sweet pepper	53.0±6.3 ^a	68.3±3.1 ^a	90.0±3.5 ^a
10% Chinese cabbage	46.1±8.8 ^a	61.8±9.1 ^a	81.5±11.8
10% Broccoli	38.3±6.4 ^a	54.4±7.3	78.8±8.3
10% Onion	26.0±5.0	40.1±3.7	71.7±7.8
10% Welsh onion	28.7±6.7	47.6±9.1	72.8±13.0
10% Cabbage	30.1±3.9	44.4±5.9	65.4±9.1
10% Celery	22.0±5.1	37.5±11.3	62.0±17.8

Values represent the mean ± S.D. for four rats.

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

たまねぎ及びネギ群が1.1~1.2倍に増加した。

野菜群と基本食群のPCDF排泄量について比べると、基本食群の2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran(T₄CDF)の排泄量は投与量の0.15%であったのに対して、小松菜及びみつば群が17.0~18.7倍、ほうれん草

及び青じそ群が9.4~12.3倍、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が4.2~7.9倍、白菜、ブロッコリー、たまねぎ、ネギ及びセルリー群が1.3~2.7倍に増加した。

1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran(P₅CDF)の排

Table 6 Effect of vegetable diet on fecal excretion of PCDF in rats (experiment 1)

Diet	Excretion (% of dose)				
	2,3,7,8- T ₄ CDF	1,2,3,7,8- P ₅ CDF	2,3,4,7,8- P ₅ CDF	1,2,3,4,7,8- H ₆ CDF	1,2,3,6,7,8- H ₆ CDF
Basal diet	0.15±0.09	1.6±0.2	3.7±0.4	14.2±1.0	17.2±1.9
10% Komatsuna	2.48±0.29 ^a	20.8±1.1 ^a	35.0±1.4 ^a	54.9±0.8 ^a	66.2±8.9 ^a
10% Mitsuba	2.72±0.97	22.3±2.9 ^a	34.2±2.4 ^a	52.6±3.2 ^a	65.6±7.1 ^a
10% Spinach	1.80±1.37	17.9±6.9	26.3±7.5 ^a	57.2±2.0 ^a	57.5±8.9 ^a
10% Perilla	1.37±0.51 ^a	13.6±3.1 ^a	24.2±5.0 ^a	51.4±6.6 ^a	54.0±8.6 ^a
10% Kale	0.60±0.32	9.7±2.7 ^a	20.1±3.5 ^a	55.4±4.5 ^a	56.1±5.7 ^a
10% Chinese chive	0.80±0.12 ^a	10.3±0.8 ^a	19.4±1.9 ^a	44.0±0.3 ^a	50.4±5.3 ^a
10% Shungiku	0.65±0.19 ^a	10.3±1.8 ^a	18.7±3.4 ^a	46.7±2.9 ^a	53.5±3.0 ^a
10% Chingentsuai	0.69±0.36	8.9±2.8	17.2±5.6	50.0±3.4 ^a	50.2±7.7 ^a
10% Green lettuce	0.81±0.53	8.6±2.4 ^a	16.5±4.6	46.7±6.3 ^a	45.1±2.7 ^a
10% Sweet pepper	1.15±0.27 ^a	8.7±2.0 ^a	16.0±2.8 ^a	29.7±1.9 ^a	41.0±6.4 ^a
10% Chinese cabbage	0.25±0.17	4.6±3.3	8.8±4.4 ^a	30.7±4.3 ^a	30.6±8.1
10% Broccoli	0.37±0.25	4.2±2.1	8.2±2.7	21.6±1.6 ^a	30.3±3.3 ^a
10% Onion	0.37±0.16	2.7±1.0	4.8±1.2	12.2±1.1	18.4±1.6
10% Welsh onion	0.19±0.14	1.8±0.8	4.4±1.8	16.1±1.4	22.6±3.7
10% Cabbage	0.15±0.06	1.9±0.1	4.3±0.3	20.9±2.1 ^a	21.6±2.7
10% Celery	0.39±0.16	2.4±0.6	4.3±0.4	15.5±4.4	19.3±3.5

Diet	Excretion (% of dose)				
	1,2,3,7,8,9- H ₆ CDF	2,3,4,6,7,8- H ₆ CDF	1,2,3,4,6,7,8- H ₇ CDF	1,2,3,4,7,8,9- H ₇ CDF	1,2,3,4,6,7,8,9- O ₈ CDF
Basal diet	27.1±2.6	19.3±2.8	30.4±1.7	35.1±3.2	63.7±6.9
10% Komatsuna	46.1±2.0 ^a	76.8±1.4 ^a	59.0±2.3 ^a	82.3±1.4 ^a	96.7±3.2 ^a
10% Mitsuba	42.6±3.6 ^a	72.2±5.7 ^a	58.6±3.0 ^a	83.0±7.5 ^a	100.5±9.2 ^a
10% Spinach	53.4±2.9 ^a	66.0±4.2 ^a	60.2±5.3 ^a	77.2±5.5 ^a	94.3±8.7 ^a
10% Perilla	50.6±7.1 ^a	56.8±8.9 ^a	55.7±6.7 ^a	65.3±9.5 ^a	86.9±6.7 ^a
10% Kale	55.3±2.0 ^a	63.5±5.5 ^a	58.7±3.1 ^a	73.1±4.9 ^a	96.7±3.5 ^a
10% Chinese chive	46.2±1.3 ^a	61.1±1.4 ^a	54.4±0.8 ^a	77.1±2.4 ^a	98.5±1.6 ^a
10% Shungiku	45.7±2.7 ^a	61.9±4.9 ^a	56.8±0.7 ^a	73.7±4.5 ^a	95.2±5.7 ^a
10% Chingentsuai	49.1±3.6 ^a	56.4±8.3 ^a	54.3±4.4 ^a	69.5±5.2 ^a	97.2±6.7 ^a
10% Green lettuce	45.4±3.1 ^a	54.0±7.3 ^a	51.4±4.4 ^a	70.5±11.0 ^a	96.8±13.2 ^a
10% Sweet pepper	52.6±1.4 ^a	49.0±5.1 ^a	45.4±2.8 ^a	65.5±3.9 ^a	86.0±3.0 ^a
10% Chinese cabbage	36.3±7.3	36.7±7.5 ^a	42.5±7.1	53.0±9.7	82.3±11.1
10% Broccoli	35.2±6.9	33.7±3.4 ^a	37.4±3.9	47.2±5.4 ^a	76.5±12.1
10% Onion	28.2±2.5	19.9±3.8	28.9±3.6	33.4±6.7	66.6±6.6
10% Welsh onion	36.2±3.9 ^a	24.7±3.7	32.9±5.0	41.5±8.5	68.7±9.6
10% Cabbage	26.5±4.1	25.0±3.0	32.0±4.1	39.6±7.1	67.0±9.2
10% Celery	26.9±7.4	19.9±3.9	27.9±7.8	33.9±7.8	55.2±16.1

Values represent the mean ± S.D. for four rats.

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

泄量は基本食群が投与量の1.6%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群が8.3~13.6倍、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス、ピーマン群が5.2~6.3倍、白菜、ブロッコ

リー、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が1.1~2.8倍に増加した。Fig. 1に基本食群に対する野菜群の2,3,4,7,8-P₅CDFの排泄比率を示す。2,3,4,7,8-P₅CDFの排泄量は基本食群が投与量の

3.7%であったのに対して、小松菜及びみつば群が9.2~9.4倍、ほうれん草及び青じそ群が6.5~7.0倍、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が4.3~5.4倍、白菜及びブロッコリー群が2.2~2.4倍、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が1.2~1.3倍に増加した。

1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (H₆CDF) の排泄量は基本食群が投与量の14.2%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ及びグリーンレタス群が3.1~4.0倍、ピーマン及び白菜群が2.1~2.2倍、ブロッコリー、ネギ、キャベツ及びセルリー群が1.1~1.5倍に増加した。

1,2,3,6,7,8-H₆CDF の排泄量は基本食群が投与量の17.2%であったのに対して、小松菜及びみつば群が3.7~3.9倍、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が2.4~3.3倍、白菜、ブロッコリー、たまねぎ、ネギ、

キャベツ及びセルリー群が1.1~1.8倍に増加した。

1,2,3,7,8,9-H₆CDF の排泄量は基本食群が投与量の27.1%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が1.6~2.0倍、白菜、ブロッコリー及びネギ群が1.3倍に増加した。

2,3,4,6,7,8-H₆CDF の排泄量は基本食群が投与量の19.3%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が2.5~4.0倍、白菜及びブロッコリー群が1.8~1.9倍、ネギ及びキャベツ群が1.3倍に増加した。

1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzofuran (H₇CDF) の排泄量は基本食群が投与量の30.4%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス、ピーマン、白菜及びブロッコリー群が1.2~2.0倍、ネギ及びキャベツ群が1.1倍に増加した。

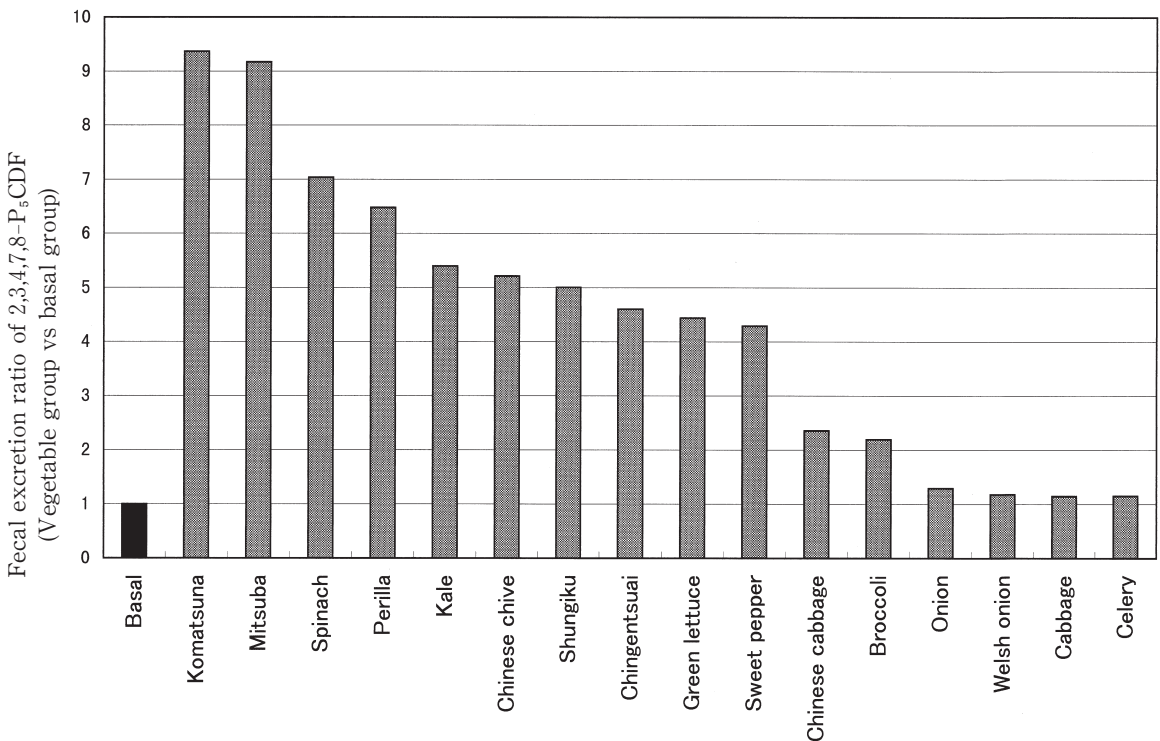


Fig. 1 Effect of vegetable diet on fecal excretion ratio of 2,3,4,7,8-P₅CDF in rats (experiment 1)

1,2,3,4,7,8,9-H₇CDFの排泄量は基本食群が投与量の35.1%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が1.9~2.4倍、白菜、ブロッコリー、ネギ及びキャベツ群が1.1~1.5倍に増加した。

1,2,3,4,6,7,8,9-octachlorodibenzofuran (O₈CDF)の排泄量は基本食群が投与量の63.7%であったのに対して、小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス、ピーマン、白菜及びブロッコリー群が1.1~1.6倍に増加した。

小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群は、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群と比べて、ダイオキシン類を糞中へ多く排泄促進する傾向がみられた。

3. ダイオキシン類の吸収抑制に及ぼす野菜投与の効果

5日間の糞中排泄量を未吸収分と考え、ダイオキシン類の消化管吸収率は、Table 5及び6の糞中排泄量から基本食群の場合、7種類のPCDDで31.5~98.4%、10種類のPCDFで36.3~99.8%であった。

ダイオキシン類の吸収抑制に及ぼす野菜投与の効果を数値で表した。計算は野菜群の基本食群に対する吸収抑制率(%)=(基本食群の吸収率-野菜群の吸収率)/基本食群の吸収率×100]とした。

2,3,7,8-T₄CDDの吸収抑制率は、基本食群にして小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群が10.6~17.0%、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が3.7~6.0%、白菜、ブロッコリー、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が1.0~3.2%であった。

1,2,3,7,8-P₅CDDの吸収抑制率は、基本食群に対して小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群が20.9~34.5%、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が13.0~18.4%、白菜及びブロッコリー群が5.0~6.0%、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が0.2~0.7%であった。

1,2,3,4,7,8-H₆CDDの吸収抑制率は、基本食群に対して小松菜及びみつば群が57.7~72.1%、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が28.4~51.8%、白菜及

びブロッコリー群が14.3~22.9%、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が4.6~9.4%であった。

1,2,3,6,7,8-H₆CDDの吸収抑制率は、基本食群に対して小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が28.4~61.8%、白菜及びブロッコリー群が12.7~16.4%、ネギ及びキャベツ群が1.3~5.0%であった。

1,2,3,7,8,9-H₆CDDの吸収抑制率は、基本食群に対して小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が44.0~73.0%、白菜及びブロッコリー群が26.4~35.8%、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が7.0~16.7%であった。

1,2,3,4,6,7,8-H₇CDDの吸収抑制率は、基本食群に対して小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が47.4~69.8%、白菜及びブロッコリー群が24.3~36.6%、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が0.6~13.0%であった。

1,2,3,4,6,7,8,9-O₈CDDの吸収抑制率は、基本食群に対して小松菜、みつば、ほうれん草、青じそ、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が44.1~83.6%、白菜及びブロッコリー群が32.6~41.4%、たまねぎ及びネギ群が10.2~13.6%であった。

2,3,7,8-T₄CDFの吸収抑制率は、基本食群に対して小松菜及びみつば群が2.3~2.6%、ほうれん草及び青じそ群が1.2~1.7%、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス、ピーマン、白菜、ブロッコリー、たまねぎ及びセルリー群が0.1~1.0%であった。

1,2,3,7,8-P₅CDFの吸収抑制率は、基本食群に対して小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群が12.1~21.0%、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が7.2~8.8%、白菜、ブロッコリー、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が0.2~3.0%であった。

2,3,4,7,8-P₅CDFの吸収抑制率は、基本食群に対して小松菜及びみつば群が31.7~32.4%、ほうれん草及び青じそ群が21.2~23.4%、ケール、にら、春菊、チ

ンゲンサイ, グリーンレタス及びピーマン群が12.7~17.0%, 白菜及びブロッコリー群が4.6~5.3%, たまねぎ, ネギ, キャベツ及びセルリー群が0.6~1.1%であった。

1,2,3,4,7,8-H₆CDFの吸収抑制率は, 基本食群に対して小松菜, みつば, ほうれん草, 青じそ, ケール, なら, 春菊, チンゲンサイ及びグリーンレタス群が34.7~50.2%, ピーマン及び白菜群が18.1~19.2%, ブロッコリー, ネギ, キャベツ及びセルリー群が1.6~8.6%であった。

1,2,3,6,7,8-H₆CDFの吸収抑制率は, 基本食群に対して小松菜及びみつば群が58.5~59.1%, ほうれん草, 青じそ, ケール, なら, 春菊, チンゲンサイ, グリーンレタス及びピーマン群が28.7~48.7%, 白菜及びブロッコリー群が15.8~16.2%, たまねぎ, ネギ, キャベツ及びセルリー群が1.4~6.5%であった。

1,2,3,7,8,9-H₆CDFの吸収抑制率は, 基本食群に対して小松菜, みつば, ほうれん草, 青じそ, ケール, なら, 春菊, チンゲンサイ, グリーンレタス及びピーマン群が21.2~38.7%, 白菜, ブロッコリー, たまねぎ及びネギ群が1.5~12.7%であった。

2,3,4,6,7,8-H₆CDFの吸収抑制率は, 基本食群に対して小松菜, みつば, ほうれん草, 青じそ, ケール, なら, 春菊, チンゲンサイ, グリーンレタス及びピーマン群が36.7~71.3%, 白菜及びブロッコリー群が17.9~21.5%, たまねぎ, ネギ, キャベツ及びセルリー群が0.7~7.1%であった。

1,2,3,4,6,7,8-H₇CDFの吸収抑制率は, 基本食群に対して小松菜, みつば, ほうれん草, 青じそ, ケール, なら, 春菊, チンゲンサイ及びグリーンレタス群が30.9~42.8%, ピーマン, 白菜及びブロッコリー群が10.1~21.6%, ネギ及びキャベツ群が2.3~3.6%であった。

1,2,3,4,7,8,9-H₇CDFの吸収抑制率は, 基本食群に対して小松菜, みつば, ほうれん草, 青じそ, ケール, なら, 春菊, チンゲンサイ, グリーンレタス及びピーマン群が46.6~73.8%, 白菜及びブロッコリー群が18.7~27.6%, ネギ及びキャベツ群が7.0~9.9%であった。

1,2,3,4,6,7,8,9-O₈CDFの吸収抑制率は, 基本食群に対して小松菜, みつば, ほうれん草, 青じそ, ケー

ル, なら, 春菊, チンゲンサイ, グリーンレタス及びピーマン群が61.4~101.5%, 白菜及びブロッコリー群が35.3~51.1%, たまねぎ, ネギ及びキャベツ群が8.1~13.7%であった。

野菜群の吸収抑制率について, ダイオキシン類の塩素の置換数を比較した場合, 塩素置換数が多い方が少ないものより吸収抑制率が高い傾向を示した。

4. ダイオキシン類の排泄量と野菜中のクロロフィル含有量との関係

16種類の野菜中のクロロフィルa及びb含有量を高速液体クロマトグラフで定量した結果をTable 7に示す。その結果, クロロフィル含有量の多い野菜群ほどダイオキシン類の消化管吸収を抑制し糞中に多く排泄する傾向がみられた。ダイオキシン類の糞中排泄量(Table 5及び6)と野菜中のクロロフィル含有量との間には有意な相関関係が認められた。また, 野菜群のクロロフィル摂取量とダイオキシン類の排泄量との間には有意な相関関係が認められた。

5. ダイオキシン類の再吸収抑制に及ぼす緑色野菜の効果

油症原因ライスオイル投与後8日目から35日まで28日間のダイオキシン類の糞中排泄量をTable 8に示す。2,3,7,8-T₄CDDの排泄量は基本食群が投与量の1.06% (0.038%/日), 青じそ群が3.34%, ケール群が3.84%, ほうれん草群が5.22%であり, 基本食群に対して青じそ群が3.1倍, ケール群が3.6倍, ほうれん草群が4.9倍の排泄増加が認められた。1,2,3,7,8-P₅CDDの排泄量は基本食群が投与量の1.14%であったのに対して, 青じそ, ケール及びほうれん草群が2.6~3.3倍に増加した (p<0.01)。1,2,3,4,7,8-H₆CDDの排泄量は基本食群が投与量の1.45%であったのに対して, 青じそ, ケール及びほうれん草群が2.5~2.7倍に増加した (p<0.01)。1,2,3,6,7,8-H₆CDDの排泄量は基本食群が投与量の1.13%であったのに対して, 青じそ, ケール及びほうれん草群が2.5~2.8倍に増加した (p<0.01)。1,2,3,7,8,9-H₆CDDの排泄量は基本食群が投与量の1.54%であったのに対して, 青じそ, ケール及びほうれん草群が2.3~2.8倍に増加した (p<0.01)。1,2,3,4,6,7,8-H₇CDDの排泄量は基本食群が投与量の2.56%であったのに対して, 青じそ, ケール及びほ

Table 7 Contents of chlorophyll a and b in dry vegetables

Diet	Chlorophyll a (%)	Chlorophyll b (%)	Total chlorophyll (%)
Komatsuna	0.380	0.137	0.518
Mitsuba	0.602	0.198	0.800
Spinach	0.225	0.088	0.312
Perilla	0.382	0.145	0.527
Kale	0.292	0.115	0.407
Chinese chive	0.116	0.057	0.173
Shungiku	0.349	0.100	0.449
Chingentsuai	0.090	0.048	0.138
Green lettuce	0.041	0.023	0.063
Sweet pepper	0.009	0.006	0.014
Chinese cabbage	0.035	0.014	0.049
Broccoli	0.034	0.011	0.045
Onion	0.000	0.000	0.000
Welsh onion	0.015	0.009	0.024
Cabbage	0.003	0.000	0.003
Celery	0.001	0.000	0.001

Table 8 Effect of vegetable diet on fecal excretion of PCDD and PCDF in rats (Experiment 2)

	Excretion (% of dose)			
	Basal diet	10% Perilla diet	10% Kale diet	10% Spinach diet
2,3,7,8-T ₄ CDD	1.06±0.80	3.34±1.12	3.84±1.13 ^a	5.22±1.21 ^a
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	1.14±0.24	3.02±0.57 ^a	3.40±0.86 ^a	3.76±0.71 ^a
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	1.45±0.22	3.62±0.34 ^a	3.84±0.96 ^a	3.88±0.41 ^a
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD	1.13±0.15	2.78±0.47 ^a	3.14±0.91 ^a	3.20±0.55 ^a
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	1.54±0.26	3.51±0.80 ^a	4.02±0.23 ^a	4.30±1.32 ^a
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	2.56±0.81	5.37±1.12 ^a	4.85±1.66	4.73±1.95
1,2,3,4,6,7,8,9-O ₈ CDD	5.79±2.44	9.02±2.32	9.31±4.94	8.88±4.42
2,3,7,8-T ₄ CDF	0.006±0.002	0.021±0.006 ^a	0.014±0.004	0.021±0.008
1,2,3,7,8-P ₅ CDF	0.036±0.011	0.108±0.032 ^a	0.070±0.012 ^a	0.091±0.034
2,3,4,7,8-P ₅ CDF	0.29±0.05	0.87±0.20 ^a	0.93±0.18 ^a	1.04±0.12 ^a
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDF	0.70±0.08	1.99±0.33 ^a	2.00±0.11 ^a	2.19±0.42 ^a
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDF	0.74±0.09	2.02±0.26 ^a	1.87±0.17 ^a	1.91±0.30 ^a
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDF	2.67±1.26	5.96±1.57	6.80±3.27	5.23±2.42
2,3,4,9,7,8-H ₆ CDF	0.68±0.13	1.68±0.28 ^a	1.57±0.09 ^a	1.62±0.38 ^a
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDF	1.76±0.60	4.74±1.08 ^a	3.96±1.77	3.68±1.78
1,2,3,4,7,8,9-H ₇ CDF	1.71±0.42	4.85±0.88 ^a	3.90±1.22	3.70±1.33
1,2,3,4,6,7,8,9-O ₈ CDF	3.66±1.60	10.3±2.32 ^a	8.14±4.94	7.12±3.96

Values represent the mean ± S.D. for four rats.

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

うれん草群が1.9~2.1倍に増加した。1,2,3,4,6,7,8,9-O₈CDDの排泄量は基本食群が投与量の5.79%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が1.5~1.6倍に増加した。

2,3,7,8-T₄CDFの排泄量は基本食群が投与量の

0.006%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が2.4~3.4倍に増加した。1,2,3,7,8-P₅CDFの排泄量は基本食群が投与量の0.036%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が2.0~3.0倍に増加した。2,3,4,7,8-P₅CDFの排泄量

は基本食群が投与量の0.29%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が3.0~3.6倍に増加した($p < 0.01$)。1,2,3,4,7,8- H_6 CDFの排泄量は基本食群が投与量の0.70%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が2.9~3.2倍に増加した($p < 0.01$)。1,2,3,6,7,8- H_6 CDFの排泄量は基本食群が投与量の0.74%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が2.6~2.8倍に増加した($p < 0.01$)。1,2,3,7,8,9- H_6 CDFの排泄量は基本食群が投与量の2.67%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が2.0~2.6倍に増加した。2,3,4,6,7,8- H_6 CDFの排泄量は基本食群が投与量の0.68%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が2.3~2.5倍に増加した($p < 0.01$)。1,2,3,4,6,7,8- H_7 CDFの排泄量は基本食群が投与量の1.76%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が2.1~2.7倍に増加した。1,2,3,4,7,8,9- H_7 CDFの排泄量は基本食群が投与量の1.71%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が2.2~2.8倍に増加した。1,2,3,4,6,7,8,9- O_8 CDFの排泄量は基本食群が投与量の3.66%であったのに対して、青じそ、ケール及びほうれん草群が2.0~2.8倍に増加した。

考 察

食物経由の暴露量を評価するには、人のダイオキシン類の消化管吸収率を知ることがきわめて大切なことであるが、それを正確に出すことは難しい。Abrahamらは母乳を与えた乳児(5ヶ月)から、糞便を採取し、ダイオキシン類の排泄量を測定した¹⁾、その結果、4~8塩化体のダイオキシン類の吸収率は摂取量に対して、約17~94%及び約4~97%であったと報告している。これをラットの場合と比べると、基本食群のダイオキシン類の消化管吸収率は乳児のそれと近い値であり、かなり高いことが分かる。

ダイオキシン類の消化管吸収を抑制する要因として、1) ダイオキシン類が食餌成分に吸着され、吸収されにくくする。2) ダイオキシン類が食餌成分と吸収されにくい複合体を形成する。3) ダイオキシン類が消化管内に分泌される生体成分と吸着するかあるいは複合体を形成することが挙げられる。かつまたダイオキ

シン類を効果的に体外へ排泄促進するためには、それ自体が吸収されず、消化液にも安定で、腸内細菌で分解されず糞中に速やかに排泄される物で、毒性がないことが必要である。保水性の高い水溶性あるいは固形様の物や、油状の物は下痢を生じやすいので、大量投与が難しいと考えられる。

前に、1)の要素を満たす食餌成分として、食物繊維を用いて*in vitro*における吸着試験を行った。その結果、米ぬか繊維、そば繊維、ほうれん草繊維、だいこん葉繊維等の食物繊維は、2,3,4,7,8- P_5 CDF及び1,2,3,4- T_4 CDDをよく吸着する作用があることが分かった⁷⁾。さらに、米ぬか繊維等の12種類の食物繊維をラットに投与し、ダイオキシン類の排泄促進作用について検討した。その結果、食物繊維はダイオキシン類の排泄促進に有効であることが分かった⁸⁾¹¹⁾¹³⁾。特に、米ぬか繊維はほうれん草、だいこん葉、白菜、ごぼう、だいこん根、にんじん、小豆、大麦、キャベツ、コーン、大豆の11種類の繊維と比べて高い効果が認められた。食物繊維は野菜、果実、穀類、豆類、海藻類等の植物に含まれ、主な成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニン及びペクチン質である。この中で、*in vitro*において、ダイオキシン類の吸着作用が非常に弱いセルロースにも、ダイオキシン類の排泄促進作用があることが分かった。

同様に、2)の要素を満たす食餌成分として、クロレラ、スピルリナ及びクロロフィルをラットに投与し、ダイオキシン類の排泄促進作用について検討した。その結果、クロロフィル含有量の多いクロレラ及びスピルリナと、クロロフィルから製造されるクロロフィルは米ぬか繊維よりさらに高いダイオキシン類の排泄促進効果を示した¹²⁾。このことから、クロロフィルにはダイオキシン類の消化管吸収を抑制する作用があることが示唆された。さらにまた、抹茶(緑茶)を用いて検討した結果、抹茶のダイオキシン類の排泄促進効果は、米ぬか繊維とクロレラのほぼ中間の値を示した¹⁰⁾。

今回、1)及び2)の要素を満たす食品として、16種類の野菜を用い、ダイオキシン類の排泄促進作用について検討した。その結果、クロロフィル含有量の多い小松菜、みつば、ほうれん草等の緑色野菜は、クロロフィル含有量の少ないキャベツ、セルリー等に比べ

て、ダイオキシン類の排泄促進に有効であることが分かった (Fig. 1)。10%の野菜類と投与量が同じ、クロレラ⁹⁾、抹茶¹⁰⁾及び米ぬか繊維¹¹⁾を比較した場合、2,3,4,7,8-P₅CDFの排泄量は、小松菜及びみつば群が基本食群の9.2~9.4倍であったのに対し、クロレラ群が8.9倍とほぼ同等であった。ほうれん草及び青じそ群が基本食群の6.5~7.0倍であったのに対し、抹茶群が基本食群の6.5倍と近似した。ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群が4.3~5.4倍であったのに対し、米ぬか繊維群が4.8倍とほぼ同等の効果であった。白菜及びブロッコリー群が2.2~2.4倍、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群が1.2~1.3倍に増加したが、米ぬか繊維群よりかなり低い効果であった。

緑色野菜の吸収抑制の要因として、野菜類に含まれる食物繊維が、消化管内でその吸着作用によりダイオキシン類の吸収を阻害し、糞中に排泄していると考えられる。もう一つは、化学構造が平面であるクロロフィルが同じく平面構造をもつダイオキシン類と複合体²¹⁾⁴⁾を形成し、その消化管吸収を阻害したこと由来していると考えられる。それゆえに、食物繊維とクロロフィルの両者の作用が、ダイオキシン類の吸収抑制に深く寄与していると考えられる。さらに、ダイオキシン類の排泄量 (Table 5及び6)と野菜中のクロロフィル含有量 (Table 7)との間には、6~8塩化ダイオキシン類の場合、直線的な関係は弱い、4~5塩化ダイオキシン類の場合、ほぼ直線的な有意な正の相関関係が認められた。このことから、毒性の高い2,3,7,8-T₄CDD及び2,3,4,7,8-P₅CDFの排泄促進のためには、さらにクロロフィル摂取量を増加させることが有効であると考えられる。

人における2,3,7,8-T₄CDD及び2,3,4,7,8-P₅CDFの生物学的半減期は5.8年¹⁵⁾及び13.4年⁵⁾と長く、1日当たり体内蓄積量の0.03%及び0.02%が体外に排出されている計算になる。体内に蓄積したダイオキシン類は消化管から排出され糞便へと排泄されるが、消化管内に排出されたダイオキシン類は再び吸収される。緑色野菜の青じそ、ケール及びほうれん草群は毒性の高い2,3,7,8-T₄CDD及び2,3,4,7,8-P₅CDFの再吸収を抑制し、糞中排泄量を基本食群の3.1~4.9及び3.0~3.6倍に増加させた。このことから、緑色野菜

は体内に蓄積したダイオキシン類の体外排出の速度をかなり上昇させ、生物学的半減期を短縮させることが可能であると考えられる。

結 論

16種類の野菜について、ダイオキシン類の消化管吸収に及ぼす影響をラットを用いて検討した。

1) 小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群は基本食群に対して、2,3,7,8-T₄CDDの吸収を10.6~17.0%抑制し、2,3,7,8-T₄CDDの排泄量が7.6~11.6倍に増加した。同様に、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群は3.7~6.0%吸収抑制し、排泄量が3.3~4.8倍に上昇した。白菜、ブロッコリー、たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群は1.0~3.2%吸収抑制し、排泄量が1.6~2.3倍に増加した。

小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群は基本食群に対して、2,3,4,7,8-P₅CDFの吸収を21.2~32.4%抑制し、2,3,4,7,8-P₅CDFの排泄量が6.5~9.4倍に増加した。同様に、ケール、にら、春菊、チンゲンサイ、グリーンレタス及びピーマン群は12.7~17.0%吸収抑制し、排泄量が4.3~5.4倍に上昇した。白菜及びブロッコリー群は4.6~5.3%吸収抑制し、排泄量が2.2~2.4倍に増加した。たまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群は0.6~1.1%吸収抑制し、排泄量が1.2~1.3倍に増加した。

2) クロロフィル含有量の多い、小松菜、みつば、ほうれん草及び青じそ群はクロロフィル含有量の少ないたまねぎ、ネギ、キャベツ及びセルリー群と比較して、ダイオキシン類の糞中排泄量が顕著に増加した。16種類の野菜群のダイオキシン類の糞中排泄量と野菜中のクロロフィル含有量及び摂取量との間には有意な相関関係が認められた ($p < 0.01$)。

3) 青じそ、ケール及びほうれん草群は体内に蓄積したダイオキシン類の消化管からの再吸収を抑制し、糞中に排泄促進する作用が認められた。2,3,7,8-T₄CDD及び2,3,4,7,8-P₅CDFの場合、基本食群に対して3.1~4.9倍及び3.0~3.6倍の排泄増加が認められた。

4) 食品経由のダイオキシン類の消化管吸収を抑制し、さらに体内のダイオキシン類を効果的に体外に排

泄促進する食生活の方法として、クロロフィル含有量が高い緑色野菜をより多く摂ることが重要である。

謝 辞

本研究は平成10年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)に負うものである。ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) Abraham K, Hille A, Ende M and Helge H : Intake and fecal excretion of PCDDs, PCDFs, HCB and PCBs in a breast-fed and formula-fed infant. *Chemosphere*. 29 : 2279-2286, 1994.
- 2) Dashwood RH : Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo (4,5-f) quinoline (IQ) to rat liver DNA. *Carcinogenesis*. 13 : 113-118, 1992.
- 3) 平川博仙, 松枝隆彦, 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克巳, 長山淳哉, 永田武明 : 油症患者及び対照者の皮下脂肪組織中の Coplanar PCBs, PCDFs 及び PCDDs. *福岡医誌*, 82 : 274-279, 1991.
- 4) 井崎やえ子, 吉田宏三, 日高公雄, 戸田和子 : 緑黄色野菜類におけるクロロフィル, カロチン, トコフェロールの含有量ならびに相関について. *栄食誌*. 39 : 485-493, 1986.
- 5) 増田義人, 原口浩一, 黒木広明 : 台湾および福岡油症患者の血液中 PCDF 及び PCB の 25 年間の濃度推移. *福岡医誌*. 86 : 178-183, 1995.
- 6) 松枝隆彦, 飯田隆雄, 平川博仙, 深町和美, 常盤 寛, 長山淳哉 : 油症患者及び対照者の母乳中の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs 濃度の比較. *福岡医誌*, 84 : 263-272, 1993.
- 7) 森田邦正, 濱村研伍, 飯田隆雄 : 食物繊維の PCB 吸着作用—in vivo と in vitro の比較—. *福岡医誌*. 86 : 212-217, 1995.
- 8) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄 : PCDF の糞中排泄および肝臓分布に対する食物繊維の効果. *福岡医誌*. 86 : 218-225, 1995.
- 9) 森田邦正 : ダイオキシン類の体外排除—食物繊維と緑黄色野菜が有効—. *Kewpie News*. 285 : 2-15, 1997.
- 10) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄 : ラットにおける PCB, PCDF 及び PCDD の消化管吸収に及ぼす抹茶の効果. *福岡医誌*. 88 : 162-168, 1997.
- 11) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄 : ラットにおける Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins の糞中排泄に対する食物繊維の効果. *衛生化学*. 43 : 35-41, 1997.
- 12) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄 : ラットにおける Polychlorinated dibenzo-p-dioxins の糞中排泄に対するクロレラ, スピルリナ及びクロロフィリンの効果. *衛生化学*. 43 : 42-47, 1997.
- 13) 森田邦正 : 食物繊維による体内ダイオキシン類の排出促進. *生活と環境*. 43 : 39-44, 1998.
- 14) Negishi T, Arimoto S, Nishizaki C and Hayatsu H : Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido (4,3-b) indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis*. 10 : 145-149, 1989.
- 15) Poiger H and Schlatter C : Pharmacokinetics of 2,3,7,8-TCDD in Man. *Chemosphere*, 15, 1489-1494, 1986.
- 16) Ryan JJ, Lizotte R and Lau B : Chlorinated Dibenzo-p-dioxins and Chlorinated Dibenzofurans in Canadian Human Adipose Tissue. *Chemosphere*, 14, 697-706, 1985.
- 17) Schechter A, Sartin J, Wright C, Kelly M, Rapke O, Lis A, Ball M and Olson J : Dioxins in U. S. food and estimated daily intake. *Chemosphere*, 29, 2261-2265, 1994.
- 18) 高山幸司, 宮田秀明, 味村真弓, 榎本 隆 : 日本の沿岸魚及び市販魚中の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs. *衛生化学*. 37 : 125-131, 1991.
- 19) 高山幸司, 宮田秀明, 青笹 治, 味村真弓, 榎本 隆 : 日本における食事経由のダイオキシン関連物質の摂取量. *食衛誌*. 32 : 525-532, 1991.

(受付 1999-3-18)

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 ——

福岡県保健環境研究所
中川 礼子・中村 又善・平川 博仙
堀 就英・飯田 隆雄

Blood PCB Analysis by Capillary Column-Gas Chromatograph/ Quadruple Mass Spectrometer —— Comparison with Packed Column-Electron Capture Detector /Gas Chromatograph ——

Reiko NAKAGAWA, Matayoshi NAKAMURA, Hironori HIRAKAWA,
Tsuguhide HORI and Takao IIDA

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

Abstract The contents of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the blood of Yusho patients (Y) and normal subjects (N) were analyzed, using a gas-chromatograph equipped with a capillary column/quadruple mass spectrometer (capillary column GC/MS). While the average of the content of blood PCBs was 679 ppt in N, those were 2960, 1480 and 1090 ppt in Y diagnosed previously as A, B and C patterns, respectively. The contents of non-ortho coplanar PCBs (3,3',4,4'-Tetra-, 3,3',4,4',5-Penta- plus 3,3',4,4',5,5'-Hexa-CB) were 0.9-2.1 ppt in Y, and 0.8 ppt in N. The contents of eight mono-ortho coplanar PCBs having the toxic equivalency factors (TEFs) were 118-424 (Y) and 78 ppt (N), respectively. The differences between Y and N in the species of mono-ortho coplanar PCBs contained were observed as follows: 2,3,3',4,4',5- and 2,3,3',4,4',5'-Hexa-CB were predominant in Y, whereas 2,3,4,4',5-Penta-CB was a major congener in N. The levels of di-ortho coplanar PCBs (2,2',3,4,4',5,5'-plus 2,2',3,3',4,4',5-Hepta-CB) were determined to be 195-608 and 98 ppt in Y and N, respectively. In both groups, the content of the former isomer was greater than the latter. Total TEQ values were 0.214-1.226 ppt in Y, and 0.148 ppt in N. The analyses were also performed by a conventional method in which a GC equipped with a packed column/electron capture detector (packed column GC/ECD) was used, and the results obtained were compared with those by capillary column GC/MS method. The results showed that the total PCB levels obtained by capillary column GC/MS method were 56-61% in Y and 67% in N of those obtained by packed column GC/ECD method.

緒 言

1968年に西日本で発生した米ぬか油食中毒事件で、ポリ塩化ビフェニル (PCB)³⁾、ポリ塩化クアテルフェニル (PCQ)⁴⁾、及びポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF)⁷⁾に暴露された結果、現在も多くの患者が、当時に比べて急性症状は軽減したものの、慢性的な後遺症に苦しんでいる。20世紀初頭から、合成化学技術の発展途

上、PCBは農薬やプラスチック等、多くの化学物質とともに世に送りだされた。これらは、我々の生活を一面楽にしてくれるものであったが、その安易な焼却・廃棄は環境生態系の破壊へと繋がり、現在では、我々人類の種の存続を脅かすもの、所謂「外因性内分泌攪乱物質」²⁾として、警鐘が鳴らされている。油症患者の健康状態及びPCB等の原因化学物質の体内あるいは血液中残留濃度の継続的調査は、開始されて30年近く

になる。近年ダイオキシン類の食品や環境における濃度やそのヒトへの暴露量が大きくマスコミ等で報道され、一般市民の関心が高まっている中、本調査の重要度は依然として大きい。油症の原因物質である PCB の一部(non-ortho 体)については毒性がダイオキシンに類似しており、ダイオキシン類等と称され、既に毒性評価が行われているが、さらに、WHO の提唱¹⁾により、その他の PCB の一部(mono-ortho 体及び di-ortho 体)にも 2,3,7,8-テトラクロロダイオキシン毒性等価係数が加わった。そのため、油症患者は勿論のこと、魚介類を食することが多い日本人の組織中 PCB 残留濃度の測定においては、209 種の異性体の混合物である PCB を異性体毎に分離し、定量分析することが必要となってきた。そこで、今回、健常者及び油症患者の血液中 PCB をキャピラリーガスクロマトグラフ/四重極質量分析計によって分析し、PCDF・PCDD 等のダイオキシン類とも総合して、健常者及び油症患者での比較・検討を、さらに、従来のパックドカラム-ECD/ガスクロマトグラフ²⁾での分析結果との比較を行った。本論文ではそこで得られた知見について述べる。

実験方法

1. 血液試料：1996 年 10-11 月に 10 mL のヘパリン入り真空採血管で肘静脈から採取した油症患者 24 名の血液各約 10 g 及び成人健常者 19 名(年齢 20-61 歳、男性 12 名、女性 7 名)の血液各約 50 g を用いた。なお分析に供するまで、4°C 以下で保存した。

2. 分析方法

2-1 血液の前処理

油症患者血液約 5 g 及び健常者血液約 50 g を各々秤取りし、以下既報³⁾に記した方法により、脂質を抽出した。これをヘキサンに溶解後、硝酸銀シリカゲルカラム上に負荷し、ヘキサン 100 ml で溶出させた。溶出液を 2 ml 以下まで減圧濃縮し、活性炭カラムに負荷した。10%ジクロロメタン-ヘキサン 50 ml、ついでトルエン 100 ml で溶出させた。前の 10%ジクロロメタン-ヘキサン画分(PCB 溶出画分)を濃縮後、10 ml の摺り合わせ丸底試験管に取り、1 N 水酸化カリウム-エタノール溶液 3 ml を加え、よく攪拌したのち、試験管の上部に特製摺り合わせ付き水冷式冷却管を付け、試験

管立てで固定した。これをエタノール-血液の液面まで湯が達するように、80°C の水浴に設置、1 時間還流を行った(アルカリ分解)。その後、水浴から、摺り合わせ付き水冷式冷却管が付いたままの試験管を上げ、冷却管の上部からヘキサン 2 ml を冷却管の内壁を洗いつつ、試験管に流し込んだ。冷後、冷却管を外し、試験管に密栓をして激しく振とうし、静置・分離後、上層(ヘキサン層)をパスツールピペットで分取した。さらに、2 回、水層にヘキサン 2 ml を加える抽出操作を行い、ヘキサン層をすべて合した。このヘキサン層に、ヘキサン洗浄蒸留水 3 ml を加えて振とうし、静置・分離後、ヘキサン層を PCB 分析用無水硫酸ナトリウムを詰めたミニカラムを通して 10 ml 試験管に移した(水洗及び脱水)。自然濃縮後、その濃縮液を少量のヘキサンでシリカゲルミニカラムに通し、通過液及びヘキサン溶出液は 100 ml ナス型フラスコに分取した。減圧濃縮後、濃縮液を 10 mL 試験管に移し、1 mL まで自然濃縮し、硫酸を 0.5 ml 加え攪拌した。静置・分離後ヘキサン層を別の試験管に移し、さらに残った硫酸層をヘキサン 1 ml で 2 回攪拌・抽出し、静置・分離後のヘキサン層を先のヘキサン層に合した(精製)。これを濃縮し、定容とした。

2-2 パックドカラム-ECD/GC による PCB 測定(従来法)¹⁰⁾

PCB 混合標準液(KC 500+KC 600, 1/1) 10, 20, 30, 及び 40 ppb を用い、衛生試験法(一般試験法)の PCB ピークパターン法により、測定した。即ち、p, p'-DDE 以降に保持時間を持つ主たる 8 本のピークの高さの和を上記の標準液から求め、検量線を作成した。同条件下で測定した血液試料の 8 本のピークの高さの和と検量線との比較から濃度を算出し、総 PCB とした。

ECD/GC 測定条件

ガスクロマトグラフ：島津 GC 7 A

カラム：2% OV 1 ガスクロム Q DMCS

2.6 mm i. d. x 2.0 m

注入口温度：200°C、検出器温度：260°C

キャリアーガス：N₂,

流速 30 ml/分、注入量：5 µl

2-3 キャピラリーカラム-GC/四重極MSによる PCB 測定

パックドカラム-ECD/GC による PCB 測定後の精製試料をとり、¹³C ラベルした 20 種の PCB からなる内部標準液 (I. S. 各 833 pg) を添加し、混合・濃縮したもの 2 μ l を、GC/四重極 MS に注入した。

1 塩化から 10 塩化まで各塩素化毎に数種の I. S. の代表的なマスイオンでの SIM クロマトグラムのピーク面積を求めた。非ラベル化 PCB 即ち、試料由来 PCB はその代表的マスイオンでの SIM クロマトグラムのピーク面積を求め、先の I. S. との比較から、濃度を PCB 異性体ごとに算出した。キャピラリーカラムで分離しない PCB 異性体は、混合物として算出した。なお異性体の濃度の和を総 PCB とした。

GC/四重極 MS PCB 測定条件

ガスクロマトグラフ：HP 6890,

マススペクトロメーター：HP 5973

カラム：SGE 社製 HT-8 (0.25 mm i. d. x 50 m x 0.25 μ m)

カラム温度：130°C (1 分) …20°C / 分 …220°C …10°C/分…320°C (6 分保持)

注入口温度：280°C,

キャリアーガス：ヘリウム 0.9 ml/分

注入方法：スプリットレス，注入量：2 μ l

インターフェイス温度：280°C

イオン源温度：250°C

イオン化電圧：70 eV

モニターイオン

Mono-CB 188.00 (M), 190.00 (M+2),
200.10 (¹³C ラベル体)

Di-CB 222.00 (M), 224.00 (M+2),
234.00 (¹³C ラベル体)

Tri-CB 256.00 (M), 258.00 (M+2),
268.00 (¹³C ラベル体)

Tetra-CB 289.90 (M), 291.90 (M+2),
304.00 (¹³C ラベル体)

Penta-CB 325.90 (M+2), 327.90 (M+4),
337.90 (¹³C ラベル体)

Hexa-CB 359.80 (M+2), 361.80 (M+4),
371.90 (¹³C ラベル体)

Hepta-CB 393.80 (M+2), 395.80 (M+4),

405.80 (¹³C ラベル体)

Octa-CB 427.80 (M+2), 429.80 (M+4),
441.80 (¹³C ラベル体)

Nona-CB 461.70 (M+2), 463.70 (M+4),
475.80 (¹³C ラベル体)

Deca-CB 497.70 (M+4), 499.70 (M+6),
509.70 (¹³C ラベル体)

実験結果及び考察

1. 油症患者及び健常者の PCB 異性体及び総 PCB 濃度

表 1 に、キャピラリーGC/質量分析計による PCB の測定結果の要約を示す。総 PCB 平均濃度は、健常者では、679 ppt (pg/g)、油症患者では、A パターンが 2960 ppt、B パターンが 1480 ppt、C パターンが 1090 ppt であった。健常者に対する濃度比は、A パターンは 4.4 倍、B パターンは 2.2 倍、C パターンは、1.6 倍であった。また、5 塩化物から 7 塩化物までの PCB 濃度の、全濃度に対する割合は、健常者では 89.4%、油症患者では、93.3% (A パターン)、90.6% (B パターン)、88.0 (C パターン) であり、健常者、油症患者とも、その PCB 濃度は 6 塩化物 > 7 塩化物 > 5 塩化物の順であった。

表 1 に示した non-ortho PCB (3,3',4,4'-tetraCB, 3,3',4,4',5-pentaCB, 3,3',4,4',5,5'-hexaCB はダイオキシン、ダイベンゾフランとともに、ダイオキシン類等として、同時に測定することが多く、表 1 の non-ortho PCB の測定値は、ダイオキシン分析で得られた数値を記した。健常者、油症患者 (A パターン)、同 (B パターン)、同 (C パターン) の non-ortho PCB 平均濃度は、各々 0.8, 2.1, 1.3 及び 0.9 ppt であり、3,3',4,4'-tetraCB は健常者の全検体から最小 0.030 から最大 0.478 ppt 検出されたが、油症患者血液からは不検出であった。3,3',4,4',5-pentaCB, 3,3',4,4',5,5'-hexaCB は健常者及び油症患者血液、共に検出され、健常者血液には、3,3',4,4',5-pentaCB が、また、油症患者血液には主として 3,3',4,4',5,5'-hexaCB がより高濃度に検出される傾向があった。表 1 の PCB の 2 の位置に塩素が結合し、かつ TEF を有する mono-ortho コプラナー PCB (2,3,3',4,4'-pentaCB, 2,3,4,4',5-pentaCB, 2,3',4,4',5-pentaCB, 2',3,4,4',5-

Table 1 Summary of PCB concentrations (pg/g whole basis) in normal subject and Yusho patient blood

IUPAC No.	PCB isomer	TEF	Normal subject			Yusho patient (Pattern A)			Yusho patient (Pattern B)			Yusho patient (Pattern C)		
			N	Average	(MIN - MAX)	N	Average	(MIN - MAX)	N	Average	(MIN - MAX)	N	Average	(MIN - MAX)
77	3,3',4,4'-Tetra-CB	0.0005	19	0.1	(0.0-0.5)	6	0.0	(0.0-0.0)	10	0.0	(0.0-0.0)	8	0.0	(0.0-0.0)
126	3,3',4,4',5-Penta-CB	0.1	19	0.5	(0.1-1.6)	6	0.6	(0.3-1.3)	10	0.6	(0.2-1.3)	8	0.6	(0.2-1.3)
169	3,3',4,4',5,5'-Hexa-CB	0.01	19	0.2	(0.0-0.5)	6	1.5	(0.2-4.1)	10	0.7	(0.2-1.4)	8	0.3	(0.1-0.5)
	Total non-ortho PCBs*		19	0.8	(0.2-2.2)	6	2.1	(0.5-5.2)	10	1.3	(0.5-2.4)	8	0.9	(0.4-1.7)
105	2,3,3',4,4'-Penta-CB	0.0001	19	9.3	(1.4-42.9)	6	9.0	(4.6-21.9)	10	11.8	(4.1-27.6)	8	12.3	(4.0-36.8)
114	2,3,4,4',5-Penta-CB	0.0005	19	2.3	(0.0-7.3)	6	7.8	(0.0-26.6)	10	6.7	(1.8-13.1)	8	3.4	(0.0-6.5)
118	2,3',4,4',5-Penta-CB	0.0001	19	38.6	(5.7-187.0)	6	23.1	(16.9-33.9)	10	50.7	(16.5-113.8)	8	54.6	(14.0-128.4)
123	2',3,4,4',5-Penta-CB	0.0001	19	0.7	(0.0-3.0)	6	1.1	(0.0-3.3)	10	0.7	(0.0-2.0)	8	0.3	(0.0-1.5)
156	2,3,3',4,4',5-Hexa-CB	0.0005	19	12.8	(2.4-34.3)	6	254.4	(91.9-833.1)	10	70.3	(31.2-161.3)	8	23.0	(13.4-33.8)
157	2,3,3',4,4',5'-Hexa-CB	0.0005	19	6.4	(1.3-18.6)	6	88.7	(33.3-275.5)	10	26.8	(12.0-55.8)	8	10.4	(5.0-17.0)
167	2,3',4,4',5,5'-Hexa-CB	0.00001	19	6.6	(1.3-23.5)	6	11.2	(6.1-19.7)	10	13.0	(0.7-28.0)	8	11.8	(4.4-19.3)
189	2,3,3',4,4',5,5'-Hepta-CB	0.0001	19	1.0	(0.0-4.3)	6	28.4	(13.8-89.5)	10	11.7	(0.0-36.7)	8	1.8	(0.0-3.0)
	Total mono-ortho PCBs*		19	77.7	(12.5-318.6)	6	423.7	(172.1-1288.6)	10	191.6	(69.9-348.1)	8	117.6	(42.0-225.1)
170	2,2',3,3',4,4',5-Hepta-CB	0.0001	19	25.7	(4.5-81.0)	6	213.6	(117.9-582.6)	10	92.6	(37.0-174.8)	8	50.1	(30.7-81.7)
180	2,2',3,4,4',5,5'-Hepta-CB	0.00001	19	72.1	(12.2-228.5)	6	383.9	(234.5-999.2)	10	220.7	(113.6-348.4)	8	144.4	(66.3-255.6)
	Total di-ortho PCBs*		19	97.9	(16.7-309.4)	6	607.6	(352.3-1581.8)	10	313.2	(161.2-523.1)	8	194.5	(97.0-337.3)
	Mono-CBs		19	0.7	(0.2-1.1)	6	7.0	(5.0-8.9)	10	6.2	(2.7-8.0)	8	6.8	(2.9-14.2)
	Di-CBs		19	0.5	(0.0-1.1)	6	0.9	(0.0-5.3)	10	1.3	(0.0-6.8)	8	0.0	(0.0-0.0)
	Tri-CBs		19	1.1	(0.0-5.7)	6	4.7	(0.0-25.0)	10	1.3	(0.0-11.1)	8	0.1	(0.0-0.7)
	Other tetra-CBs		19	34.2	(2.7-124.9)	6	21.1	(8.7-46.4)	10	26.0	(10.2-49.3)	8	50.2	(7.4-199.7)
	Other penta-CBs		19	33.1	(4.7-130.2)	6	99.5	(29.7-346.0)	10	48.2	(15.8-129.2)	8	38.1	(18.0-77.6)
	Other hexa-CBs		19	303.0	(54.3-1047.8)	6	1281.6	(676.9-3831.8)	10	578.9	(246.8-1089.5)	8	436.7	(198.2-800.5)
	Other hepta-CBs		19	94.3	(16.4-323.0)	6	351.2	(189.5-911.9)	10	208.3	(92.4-340.5)	8	168.4	(79.3-335.6)
	Octa-CBs		19	35.4	(5.8-123.8)	6	162.5	(72.8-372.7)	10	104.7	(37.5-161.9)	8	73.1	(22.2-109.1)
	Nona-CBs		19	0.0	(0.0-0.0)	6	1.1	(0.0-6.4)	10	0.2	(0.0-1.6)	8	0.0	(0.0-0.0)
	Deca-CB		19	0.0	(0.0-0.0)	6	0.2	(0.0-1.0)	10	0.0	(0.0-0.0)	8	0.0	(0.0-0.0)
	Total PCBs		19	678.6	(127.9-2380.2)	6	2963.2	(1660.2-8428.5)	10	1481.3	(653.6-2474.9)	8	1086.5	(471.9-1847.5)

*It means the total of PCB isomers with TEFs (2,3,7,8-TCDD Toxicity Equivalency Factor).

Total PCBs measured by packed column ECD-GC were 1010 ppt for normal subjects and were 4850ppt for A, 2410ppt for B, and 1930ppt for C of Yusho patients.

pentaCB, 2,3,3',4,4',5-hexaCB, 2,3,3',4,4',5'-hexaCB, 2,3',4,4',5,5'-hexaCB, 2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB の合計) 平均濃度は, 健常者, 油症患者 (A パターン), 同 (B パターン), 同 (C パターン) で, 各々78, 424, 192, 及び118 ppt であり, その濃度比は 1 : 5.4 : 2.5 : 1.5 であった. 健常者では, 2,3',4,4',5-pentaCB > 2,3,3',4,4',5-hexaCB で, 一方, 油症患者では, 2,3,3',4,4',5-hexaCB > 2,3,3',4,4',5'-hexaCB, 2,3',4,4',5-pentaCB の順位で検出される傾向があった. 健常者と油症患者 (A パターン) との濃度比は, 大きなものから, 2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB の 28 倍, 2,3,3',4,4',5-hexaCB の 20 倍, 2,3,3',4,4',5'-hexaCB の 14 倍, 2,3',4,4',5,5'-hexaCB の 1.7 倍であった. TEF を有する di-ortho コプラナーPCB (2,2',3,3',4,4',5-heptaCB, 2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB の合計) 平均濃度は, 健常者, 油症患者 (A パターン), 同 (B パターン), 同 (C パターン) に各々98, 608, 313 及び195 ppt であった. 健常者, 油症患者とも, 2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB > 2,2',3,3',4,4',5-heptaCB で検出された. 各々の異性体における健常者, 油症患者 (A パターン) 間の濃度比は 2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB が 5.5 倍, 2,2',3,3',4,4',5-heptaCB は 8.3 倍と, 油症患者が高かった.

2. 油症患者及び健常者の PCB-TEQ 濃度

3 種の non-ortho PCB と同様に, 表 1 に示した 8 種の mono-ortho コプラナーPCB 及び 2 種の di-ortho コプラナーPCB にもダイオキシン類等として, NATO 及び WHO (IPCS) などの国際機関によって, 2,3,7,8-tetraCDD の毒性等価係数が提案された¹⁾. これにより食品や環境における許容濃度は勿論のこと, 体内残留ダイオキシン類等のリスク評価に, mono-ortho コプラナーPCB 及び di-ortho コプラナーPCB が加わり, 今後はこれら計 13 種の PCB を定量することが推奨される.

表 2 に, 今回の血液試料でのダイオキシン類も加えた総 TEQ 濃度を記した. 総 TEQ 平均濃度は, 健常者, 油症患者 (A パターン), 同 (B パターン), 同 (C パターン) の各々について, 0.148, 1.226, 0.771 及び 0.214 ppt で, その濃度比は, 1 : 8.3 : 5.2 : 1.4 となった. 総 TEQ の内訳は, 健常者では PCDD/PCDF/PCB が 1 : 0.9 : 1.6 と PCB の寄与がやや大きく, 油

Table 2 Summary of PCDD-, PCDF- and PCB-TEQ concentrations (pg/g whole basis) in normal subject and Yusho patient blood

	Normal subject		Yusho patient (Pattern A)		Yusho patient (Pattern B)		Yusho patient (Pattern C)	
	N	Average (MIN - MAX)	N	Average (MIN - MAX)	N	Average (MIN - MAX)	N	Average (MIN - MAX)
Total PCDDs	19	0.043 (0.008 - 0.084)	6	0.084 (0.042 - 0.177)	10	0.085 (0.034 - 0.190)	8	0.054 (0.028 - 0.066)
Total PCDFs	19	0.039 (0.011 - 0.097)	6	0.857 (0.084 - 1.905)	10	0.549 (0.072 - 1.676)	8	0.065 (0.042 - 0.092)
Non-ortho PCBs	19	0.047 (0.013 - 0.164)	6	0.078 (0.031 - 0.169)	10	0.066 (0.025 - 0.146)	8	0.063 (0.019 - 0.138)
Mono-ortho PCBs	19	0.016 (0.003 - 0.054)	6	0.182 (0.066 - 0.583)	10	0.059 (0.025 - 0.133)	8	0.025 (0.011 - 0.046)
Di-ortho PCBs	19	0.003 (0.001 - 0.010)	6	0.025 (0.014 - 0.068)	10	0.011 (0.005 - 0.021)	8	0.006 (0.004 - 0.011)
Total PCBs	19	0.067 (0.016 - 0.228)	6	0.285 (0.111 - 0.820)	10	0.137 (0.054 - 0.300)	8	0.095 (0.034 - 0.194)
Total TEQ	19	0.148 (0.035 - 0.409)	6	1.226 (0.238 - 2.902)	10	0.771 (0.160 - 2.167)	8	0.214 (0.104 - 0.353)

症患者 (A パターン), 同 (B パターン), 同 (C パターン) では, 各々, 1 : 10.2 : 3.4, 1 : 6.5 : 1.6, 1 : 1.2 : 1.8 となり, PCDF > PCB > PCDD の順の寄与であった. この PCDF の TEQ 濃度への寄与は, PCDF が油症の主たる原因物質であることに起因し, これまでの多くの報告結果とも一致している.

3. PCB 型別の決定因子であるピーク高比及び総 PCB 濃度における従来法との差異

従来のパックドカラムによる PCB 分析では, 典型的油症患者に特有なガスクロマトグラフパターンを示す症例を A, 健常者と同じガスクロマトグラフパターンを示す症例を C とし, その中間のガスクロマトグラフパターンを示す症例を B, BC として型別している⁸⁾⁹⁾. 即ち, 典型的油症患者では p, p'-DDE のピークから数えて, 2 番目のピーク高に対する 1 番目のピーク高の比 (1/2 比) が小さく, 2 番目のピーク高に対する 5 番目のピーク高の比 (5/2 比) が大きい組み合わせを示すこと, また, 逆に, 健常者では 1/2 比が比較的大きく, 5/2 比が小さいことから, この 1/2 比と 5/2 比を用い, 統計的手法から症例のタイプを決定してきた. 最近では, この 1 番目のピークは主として 2, 3', 4, 4', 5-pentaCB (PCB IUPAC # 118) を, 2 番目のピークは主として 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB (PCB IUPAC # 153)

を, 5 番目のピークは主として 2, 3, 3', 4, 4', 5-hexaCB (PCB IUPAC # 156) を示すことが明らかにされた. そこで, 1/2 比及び 5/2 比も # 118/# 153 比及び # 156/# 153 比で置き換えることが可能かどうかを検討した. 図 1, 2 は, パックドカラムによる従来法での 1/2 比とキャピラリーガスクロマトグラフ/四重極質量分析法による # 118/# 153 比 (面積比) の相関を, また, 従来法での 5/2 比とキャピラリーガスクロマトグラフ/四重極質量分析法による # 156/# 153 比 (面積比) の相関を示したものである. それぞれ, 相関係数 $r = 0.9026, 0.9183$ ($n = 43$) となり, 危険率 1% で, 相関は有意であった. したがって, # 118/# 153 比 (面積比) 及び # 156/# 153 比 (面積比) を用い, 今回測定した油症患者血液について, 従来全国で統一され, 用いられている統計手法 (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) により PCB 型別を試行した.

その結果, 従来法による型別とキャピラリーガスクロマトグラフ/四重極質量分析法による型別は表 3 となり, 従来法とキャピラリーガスクロマトグラフ/四重極質量分析法の型別の一致率は, A パターンの患者では 83.3%, B パターンの患者では 70.0% と良好であったが, C パターンの患者では 62.5% と不良であった.

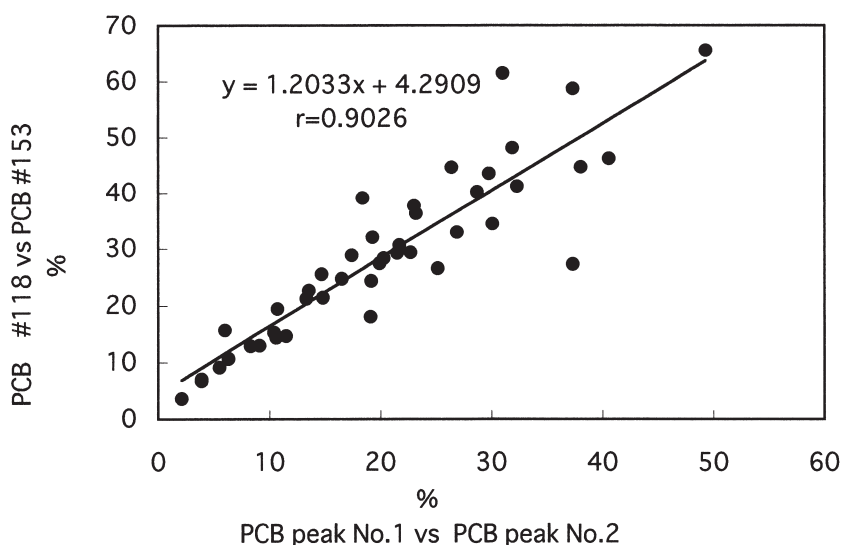


Fig. 1 Correlation between height ratios of the first peak to the second one after *pp'*-DDE and area ratios of PCB # 118 peak to PCB # 153 one.

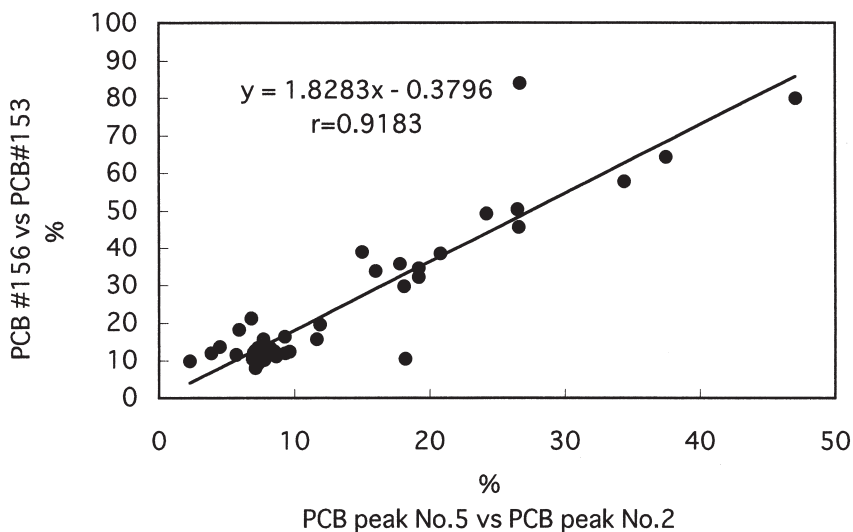


Fig. 2 Correlation between height ratios of the fifth peak to the second one after *pp'*-DDE and area ratios of PCB # 156 peak to PCB # 153 one.

Table 3 Coincidence between classification of PCB pattern by capillary GC/MS and that by packed column-ECD/GC

ECD-GC (packed column)	Capillary GC/MS	N
A	A	5
A	B	1
Coincidence coefficient for A pattern		83.3%

B	B	7
B	A	2
B	BC	1
Coincidence coefficient for B pattern		70.0%

C	C	5
C	B	3
Coincidence coefficient for C pattern		62.5%
Coincidence coefficient for Total		70.8%

これについては、まだ、例数が少ないことなどから、統計処理上での問題が大きく起因したのではないかと考えられ、今後例数を増やして検討する必要がある。

一方、総 PCB 濃度については、従来法では標準物質の検量線及び血液試料も *p*, *p'*-DDE 以降のピーク (6-8 塩化物の一部) のピーク高の和を用いているため、標準物質に少量含有され、かつ検出器に感度の低い 1-5 塩化物及び一部の 8 塩化物-9 塩化物については無視されており、試料の PCB が過大に見積もられる傾向があった。今回のキャピラリーガスクロマトグ

ラフ/四重極質量分析法では、同じ試料の PCB が従来法のパターン法での定量値の 56-61% (油症患者)-67% (健常者) となり、これは、後に開発されたパックドカラムを用いるもう一つの定量法 (係数法¹¹⁾) による値に近づく結果となった。

したがって、今後、患者のその後の追跡調査において、パターン法による定量法からキャピラリーガスクロマトグラフ/四重極質量分析法に置き換え、過去の測定値と比較する場合には、上記の点に留意する必要がある。

結 論

1. 油症患者及び健常者血液の PCB 異性体及び総 PCB 濃度は油症患者では、A パターン 2960 ppt, B パターンが 1480 ppt, C パターン 1090 ppt, 健常者では、679 ppt であった。5 塩化物から 7 塩化物までの PCB 濃度の、全濃度に対する割合は、健常者では 89.4%, 油症患者では、88.0-93.3% であり、その PCB 濃度は 6 塩化物 > 7 塩化物 > 5 塩化物の順であった。

健常者、油症患者の non-ortho コプラナー PCB 平均濃度は、各々 0.8, 0.9-2.1 ppt であり、TEF を有する mono-ortho コプラナー PCB は、健常者、油症患者で、各々 78, 118-424 ppt 検出され、健常者では、2,3',4,4',5-pentaCB が、一方、油症患者では、2,3,3',4,4',5-hexaCB と 2,3,3',4,4',5'-hexaCB がより高濃度に検出された。TEF を有する di-ortho コプラナー PCB は、健常者、油症患者で各々 98, 194-608 ppt 検出された。健常者、油症患者とも、2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB > 2,2',3,3',4,4',5-heptaCB の濃度順に検出された。

2. 2,3,7,8-tetraCDD の毒性等価係数をかけて算出する油症患者及び健常者の血液中総 TEQ 濃度は、健常者、油症患者で、0.148, 0.214-1.226 ppt で、その内訳は、健常者では PCDF/PCB/PCDD がほぼ 1 : 0.9 : 1.6 と PCB の寄与がやや大きかったが、油症患者では主として、PCDF > PCB > PCDD の順の寄与であった。

3. キャピラリーガスクロマトグラフ/四重極質量分析法の PCB # 118/# 153 比 (面積比), PCB # 156/# 153 比 (面積比) による型別は、従来法のピーク高比による型別と A, B パターンでの一致率は良好であった。

総 PCB 濃度では、キャピラリーガスクロマトグラフ/四重極質量分析法による場合は、バックドカラムを用いるもう一つの定量法 (係数法) による結果に近く、従来法の定量値の 56-61% (油症患者) - 67% (健常者) であった。

謝 辞

本研究は平成 9 年度及び 10 年度の厚生科学研究補助金に負うものである。ここに記して謝意を表します。

文 献

1) Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJGM, Freely M, Golor G, Hanberg A, Larsen JC, Liem AKD, Safe SH, Schlatter C, Wærn F, Younes M and Yrjänheikki E: Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs, *Chemosphere* 28: 1049-1067, 1994.

2) Colborn T, Dumanoski D and Myers JP: 奪われし未来, 初版, 翔詠社, 東京, 1997.

3) 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 及び Coplanar PCBs 濃度, *福岡医誌* 88: 169-176, 1997.

4) Kashimoto T, Miyata H and Kunita N: The presence of polychlorinated quaterphenyls in the tissues of Yusho patients, *Food Cosmet. Toxicol.* 19: 335-340, 1981.

5) Kuratsune M: Outlines of Yusho, Outbreak of a "Strange Disease", and Investigation of the cause of the "Strange Disease", In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M and Masuda Y (ed): YUSHO a human disaster caused by PCBs and related compounds. Pp 1-46, 47-80, Kyushu University Press, 1996.

6) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一: 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.

7) Nagayama J, Kuratsune M. and Masuda Y: Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and "Yusho oil", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 9-13, 1976.

8) 中川礼子, 飯田隆雄, 竹中重幸, 深町和美, 高橋克己, 旭 正一: 血中 PCB パターンが BC タイプを示す症例についての考察, *食衛誌*, 29: 385-389, 1988.

9) 中川礼子, 高橋克己: PCB 及びその関連化合物体内残留濃度の油症診断への適用に関する研究, *福岡医誌*, 82: 280-294, 1991.

10) 日本薬学会編 衛生試験法・注解 第 5 版, 618-621 金原出版 東京 (1990)

11) 鶴川昌弘, 中村彰夫, 榎本 隆: PCB の数値化法に関する研究, *食衛誌*, 14: 415-424, 1973.

(受付 1999-3-18)

高分離能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析計による 全 PCB 異性体の分析

第一薬科大学物理分析学教室

三村 敬介*・田村 水穂*

原口 浩一・増田 義人

Analysis of 209 PCB Congeners by High Separation Gas Chromatography/ Low Resolution Mass Spectrometer

Keisuke MIMURA*, Miho TAMURA, Koichi HARAGUCHI and Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences

22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka 815-8511

Abstract All PCB congeners were analyzed by high separation gas chromatography / low resolution mass spectrometer, using 209 PCB congeners as standards. They were separated into 169 peaks, including 28 peaks containing 2 PCBs and 8 peaks containing 3 PCBs.

The rice oil samples of Fukuoka and Taiwan Poisonings were analyzed for PCB congeners. They showed 115 separated peaks of PCB congeners. Total PCB concentrations were 879 and 769 ppm in 2 samples of Fukuoka rice oil and 57 and 83 ppm in 2 samples of Taiwan rice oil.

はじめに

ポリ塩化ビフェニール (PCB) は塩素の数及び置換位置により 209 種の同族体が存在する。そのうち、111 種の PCB はアロクロール等の PCB 製品に存在することが確認されている¹⁾。これらの PCB が環境を汚染し、人体にも蓄積されている²⁾。一般の人及び油症患者の体内にはダイオキシン毒性相当量濃度の約 1 万倍の 0.2~2 ppm (脂質重量当たり) 程度存在する³⁾。PCB はその構造によってダイオキシン様の毒性を示すものや強いホルモン作用を持つものがあり、その強さが大きく異なる³⁾。したがって、PCB を化合物の構造別に、すなわち異性体別に、濃度を分析しなければ、体内に残留する PCB の毒性評価はできないことになる。

PCB はキャピラリーカラムで分離して、電子捕獲検出又は質量分析の選択イオン検出による分析がなされてきた²⁾⁷⁾。ここでは、高分離能のキャピラリーカラム

と低分解能の四重極質量分析計を用いる方法で、209 種の全 PCB の分析を行い、PCB の異性体別の定量分析を試みた。また、この方法により油症患者が摂取したライスオイルに含まれる PCB の分析をした。

実験方法

1. 標準物質及び実験材料

PCB 209 種の各異性体は結晶又は一定濃度溶液の状態に Cambridge Isotope Lab., USA 又は関東化学株式会社より購入した。内標準物質として使用する ¹³C PCB は Cambridge Isotope Lab. USA より購入した。溶媒はすべて PCB 分析用のものを使用した。シリカゲル、ワコーゲル S-1 (PCB 分析用、和光純薬) 及び無水硫酸ナトリウム (PCB 分析用、関東化学) は 450° で 24 時間加熱したものを用いた。

油症患者が摂取したライスオイルは福岡の 2 家族から 1969 年頃集められたもの及び台湾の 2 検体 (1980 年頃収集) を用いた。

2. PCB 異性体分析方法

自動注入ガスクロマトグラフ四重極質量分析計 (島

*現在

東和大学中央科学研究所
815-8510 福岡市南区筑紫丘

津 AOC-17, GC-17A, QP-5000) にキャピラリーカラム DB-5MS 0.25 mm×60 m (J&W Scientific) を装着した装置 (GC/MS) を用いた。気化室温度は 260°, インターフェース温度は 295° に保持し, 高純度ヘリウムガスを定速 (1.8 ml/min) で流した。カラム温度は最初 100° で 2 分間保持し, 20°/min の割合で 250° まで昇温した後, 15 分間保持し, 更に 2°/min で 280° まで昇温させ 7 分間保持させた。試料注入はスプリット・スプリットレス試料導入法で行った。ピーク検出は分子イオン (M⁺) と [M+2]⁺ (1 塩化~7 塩化 PCB) 又は [M+2]⁺ と [M+4]⁺ (8 塩化~10 塩化 PCB) の 2 個のイオンをモニターする選択イオン検出法 (SIM) による。モニターする質量は 188.05, 190.05, 222.00, 224.00, 255.95, 257.95, 289.90, 291.90, 323.90, 325.90, 357.85, 359.85, 391.80, 393.80, 427.75, 429.75, 461.70, 463.70, 493.70, 497.70, 301.95, 303.95, 335.90, 337.90, 369.90, 371.90 であり, GC/MS の測定時間を 3 つの時間帯に分けて, 各時間帯では 14 個のイオンを検出するように設定した。定量分析は ¹³C-PCB を内標準物質とし, その [M+2]⁺ のピーク面積を基準とする内標準法により求めた。内標準物質として炭素 12 個全部を炭素 13 の同位体に置き換えた 2,2',4,5,5'-penta-CB (PCB-101), 2,3',4,4',5-penta-CB (PCB-118), 2,2',4,4',5,5'-hexa-CB (PCB-153), 2,3,3',4,4',5-hexa-CB (PCB-156), 3,3',4,4'-tetra-CB (PCB-77), 3,3',4,4',5-penta-CB (PCB 126), 3,3',4,4',5,5'-hexa-CB (PCB-169) を用いた。

2. ライスオイルの PCB 分析

ライスオイル 0.1 g (福岡油症) 又は 0.5 g (台湾油症) を試験管内に正確に秤量し, これに 1 M 水酸化カリウム/エタノール溶液 3 ml 又は 5 ml 及び内標準物質として ¹³C-PCB 101, 118, 153, 156 の各 50 ng と ¹³C-PCB 77, 126, 169 の各 1 ng を添加した。この混合溶液を 60° で 3 時間加熱した後, 添加したエタノールと等量の水を加え, ヘキサン 5 ml で 2 回抽出した。抽出したヘキサン層を水洗し, 無水硫酸ナトリウム 2 g で乾燥させた後, シリカゲル 1 g のカラムにかけ, ヘキサン 30 ml で溶出させた。ヘキサン溶液を濃縮し, 積層カラム (上から, シリカゲル 0.2 g, 22% 硫酸/シリカゲル 0.5 g, 44% 硫酸/シリカゲル 0.5 g, シリカゲル

0.2 g, 2% 水酸化カリウム/シリカゲル 0.2 g) にかけて, ヘキサン 30 ml で溶出させた。このヘキサン溶液を濃縮し, その半量を GC/MS の試料とした。コプラナ PCB の分析のためには, 残り半量のヘキサン溶液を活性炭カラム (上から, セライト 0.3 g, 5% 活性炭 AX21/セライト 0.5 g, セライト 0.3 g) にかけて, 20% ジクロロメタン/ヘキサン 60 ml で溶出させた後に, 50% ベンゼン/酢酸エチル 100 ml で溶出させた。このベンゼン/酢酸エチル溶液を濃縮し, GC/MS に注入した。

結果と考察

1. PCB の GC/MS による分析

209 種の PCB 標準溶液を GC/MS に順次注入し, それぞれの保持時間を求めた。各塩素数ごとの PCB を保持時間の順に Table 1 に示す。また, 各塩素数ごとに各 PCB 異性体を等量含む溶液を作り, GC/MS に注入し, 各 PCB の分離状態を示すクロマトグラムを得た。これを Fig. 1 に示す。Table 1 及び Fig. 1 より 1 塩化の 3 PCB は 3 本のピークに分離されており, 2 塩化の 12 PCB は 8 本, 3 塩化の 24 PCB は 21 本, 4 塩化の 42 PCB は 33 本, 5 塩化の 46 PCB は 32 本, 6 塩化の 42 PCB は 33 本, 7 塩化の 24 PCB は 20 本, 8 塩化の 12 PCB は 11 本, 9 塩化の 3 PCB は 3 本, 10 塩化 1 PCB は 1 本にそれぞれ分離されて観察されている。全 209 PCB は 165 本のピークとして分離されていることになる。これらのうち, 2 個の PCB が重なっているピークが 28 本及び 3 個の PCB が重なっているピークが 8 本ある。

2 から 9 の各塩素数の PCB のグループでは, それらの保持時間が大きく広がっているため, それらの PCB よりも塩素数が 1 個多い PCB の保持時間と重なっているものが数多くある。塩素数が 1 個多い PCB は M⁺ の質量数が 34 多い化合物である。それから塩素が 1 個はずれたフラグメントイオンは [M-35]⁺ となり, 塩素数が 1 個少ない PCB の M⁺ より質量数が 1 少ない。したがって, 塩素数が 1 個多い PCB は一緒に GC/MS に注入されても, その SIM のピークには大きな影響を与えない。すなわち, ピークが重なってもだいたい正確に定量分析できる。塩素数が 2 個多い PCB の保持時間と重なっている PCB は数個存在する。例

Table 1 GC/MS Chromatography Profile of 209 PCB Congeners: Retention Time and Separation on DB5MS

A: Overlapping less than 30%

B: Overlapping more than 30%

C: Not separated

IUPAC	PCB	tR (min)	Separation
1	2-mono-CB	10.026	
2	3-mono-CB	10.622	A1
3	4-mono-CB	10.698	A1
10	2,6-di-CB	10.972	C1
4	2,2'-di-CB	10.977	C1
9	2,5-di-CB	11.365	C2
7	2,4-di-CB	11.373	C2
6	2,3'-di-CB	11.531	
5	2,3-di-CB	11.648	C3
8	2,4'-di-CB	11.651	C3
14	3,5-di-CB	11.862	
11	3,3'-di-CB	12.193	
12	3,4-di-CB	12.305	C4
13	3,4'-di-CB	12.317	C4
15	4,4'-di-CB	12.442	
19	2,2',6-tri-CB	11.969	
30	2,4,6-tri-CB	12.082	
18	2,2',5-tri-CB	12.324	A2
17	2,2',4-tri-CB	12.368	A2
27	2,3',6-tri-CB	12.492	B1
24	2,3,6-tri-CB	12.526	B1
16	2,2',3-tri-CB	12.670	C5
32	2,4',6-tri-CB	12.671	C5
34	2',3,5-tri-CB	12.791	B2
23	2,3,5-tri-CB	12.824	B2
29	2,4,5-tri-CB	12.896	
26	2,3',5-tri-CB	12.995	B3
25	2,3',4-tri-CB	13.038	B3
31	2,4',5-tri-CB	13.173	B4
28	2,4,4'-tri-CB	13.201	B4
20	2,3,3'-tri-CB	13.371	C6
33	2',3,4-tri-CB	13.373	C6
21	2,3,4-tri-CB	13.374	C6
22	2,3,4'-tri-CB	13.543	

36	3,3',5-tri-CB	13.634	
39	3,4',5-tri-CB	13.833	
38	3,4,5-tri-CB	14.058	
35	3,3',4-tri-CB	14.303	
37	3,4,4'-tri-CB	14.508	
54	2,2',6,6'-tetra-CB	12.933	
50	2,2',4,6-tetra-CB	13.121	
53	2,2',5,6'-tetra-CB	13.348	
51	2,2',4,6'-tetra-CB	13.461	
45	2,2',3,6-tetra-CB	13.624	
69	2,3',4,6-tetra-CB	13.778	C7/A3
46	2,2',3,6'-tetra-CB	13.785	C7/A3
73	2,3',5',6-tetra-CB	13.793	C7/A3
52	2,2',5,5'-tetra-CB	13.851	A3/A4
43	2,2',3,5-tetra-CB	13.901	A4/B5
49	2,2',4,5'-tetra-CB	13.947	B5
48	2,2',4,5-tetra-CB	14.020	C8
47	2,2',4,4'-tetra-CB	14.020	C8
75	2,4,4',6-tetra-CB	14.021	C8
65	2,3,5,6-tetra-CB	14.099	B6
62	2,3,4,6-tetra-CB	14.133	B6
44	2,2',3,5'-tetra-CB	14.326	B7
59	2,3,3',6-tetra-CB	14.365	B7/B8
42	2,2',3,4'-tetra-CB	14.408	B8
72	2,3',5,5'-tetra-CB	14.500	
71	2,3',4',6-tetra-CB	14.571	B9
68	2,3',4,5'-tetra-CB	14.602	B9/B10
64	2,3,4',6-tetra-CB	14.638	B10/C9
41	2,2',3,4-tetra-CB	14.647	B10/C9
40	2,2',3,3'-tetra-CB	14.838	C10
57	2,3,3',5-tetra-CB	14.840	C10
67	2,3',4,5-tetra-CB	14.966	B11
58	2,3,3',5'-tetra-CB	15.022	B11
63	2,3,4',5-tetra-CB	15.121	
74	2,4,4',5-tetra-CB	15.247	C11
61	2,3,4,5-tetra-CB	15.255	C11
76	2',3,4,5-tetra-CB	15.348	C12/B12
70	2,3',4',5-tetra-CB	15.354	C12/B12
80	3,3',5,5'-tetra-CB	15.384	C12/B12
66	2,3',4,4'-tetra-CB	15.444	B12

55	2,3,3',4-tetra-CB	15.701	
56	2,3,3',4'-tetra-CB	15.936	B13
60	2,3,4,4'-tetra-CB	15.982	B13
79	3,3',4,5'-tetra-CB	16.373	
78	3,3',4,5-tetra-CB	16.732	
81	3,4,4',5-tetra-CB	17.097	
77	3,3',4,4'-tetra-CB	17.483	
104	2,2',4,6,6'-penta-CB	14.212	
103	2,2',4,5,6-penta-CB	14.753	C13
96	2,2',3,6,6'-penta-CB	14.764	C13
100	2,2',4,4',6-penta-CB	14.920	
94	2,2',3,5,6'-penta-CB	15.102	
102	2,2',4,5,6'-penta-CB	15.319	C14/B14
98	2,2',3',4,6-penta-CB	15.330	C14/B14
121	2,3',4,5',6-penta-CB	15.364	B14/B15
93	2,2',3,5,6-penta-CB	15.404	B15/C15
95	2,2',3,5',6-penta-CB	15.413	B15/C15
88	2,2',3,4,6-penta-CB	15.521	
91	2,2',3,4',6-penta-CB	15.601	
92	2,2',3,5,5'-penta-CB	15.884	
90	2,2',3,4',5-penta-CB	16.057	C16/B16
84	2,2',3,3',6-penta-CB	16.067	C16/B16
101	2,2',4,5,5'-penta-CB	16.079	C16/B16
113	2,3,3',5',6-penta-CB	16.124	B16/C17
89	2,2',3,4,6'-penta-CB	16.142	B16/C17
99	2,2',4,4',5-penta-CB	16.242	
119	2,3',4,4',6-penta-CB	16.426	A5
112	2,3,3',5,6-penta-CB	16.502	A5/A6
83	2,2',3,3',5-penta-CB	16.583	A6/C18
109	2,3,3',4,6-penta-CB	16.594	A6/C18
97	2,2',3',4,5-penta-CB	16.778	C19/B17
125	2',3,4,5,6'-penta-CB	16.811	C19/B17
86	2,2',3,4,5-penta-CB	16.830	C19/B17
111	2,3,3',5,5'-penta-CB	16.862	B17/B18
117	2,3,4',5,6-penta-CB	16.931	B18/A7
87	2,2',3,4,5'-penta-CB	17.008	A7/C20/B19
115	2,3,4,4',6-penta-CB	17.014	A7/C20/B19
116	2,3,4,5,6-penta-CB	17.023	A7/C20/B19
120	2,3',4,5,5'-penta-CB	17.080	B19/A8
85	2,2',3,4,4'-penta-CB	17.158	A8

110	2,3,3',4',6-penta-CB	17.333	
82	2',2',3,3',4-penta-CB	17.800	
124	2',3,4,5,5'-penta-CB	18.063	A9
108	2,3,3',4,5'-penta-CB	18.157	A9/C21/A10
107	2,3,3',4',5-penta-CB	18.188	A9/C21/A10
123	2',3,4,4',5-penta-CB	18.271	A10
106	2,3,3',4,5-penta-CB	18.406	C22
118	2,3',4,4',5-penta-CB	18.417	C22
114	2,3,4,4',5-penta-CB	18.925	B20
122	2',3,3',4,5-penta-CB	18.971	B20
127	3,3',4,5,5'-penta-CB	19.643	C23
105	2,3,3',4,4'-penta-CB	19.652	C23
126	3,3',4,4',5-penta-CB	21.468	
155	2,2',4,4',6,6'-hexa-CB	15.761	
150	2,2',3,4',6,6'-hexa-CB	16.469	
152	2,2',3,5,6,6'-hexa-CB	16.730	
148	2,2',3,4',5,6'-hexa-CB	16.961	C24
145	2,2',3,4,6,6'-hexa-CB	16.982	C24
154	2,2',4,4',5,6'-hexa-CB	17.261	C25
136	2,2',3,3',6,6'-hexa-CB	17.269	C25
151	2,2',3,5,5',6-hexa-CB	17.737	
135	2,2',3,3',5,6'-hexa-CB	17.888	B21
144	2,2',3,4,5',6-hexa-CB	17.943	B21
147	2,2',3,4',5,6-hexa-CB	18.053	
149	2,2',3,4',5',6-hexa-CB	18.229	C26
139	2,2',3,4,4',6-hexa-CB	18.248	C26
140	2,2',3,4,4',6'-hexa-CB	18.392	
143	2,2',3,4,5,6'-hexa-CB	18.626	B22
134	2,2',3,3',5,6-hexa-CB	18.697	B22/C27
133	2,2',3,3',5,5'-hexa-CB	18.710	B22/C27
165	2,3,3',5,5',6-hexa-CB	18.854	B23
131	2,2',3,3',4,6-hexa-CB	18.917	B23/B24
142	2,2',3,4,5,6-hexa-CB	18.988	B24/C28
146	2,2',3,4',5,5'-hexa-CB	19.027	B24/C28
161	2,3,3',4,5',6-hexa-CB	19.042	B24/C28
153	2,2',4,4',5,5'-hexa-CB	19.342	C29
168	2,3',4,4',5',6-hexa-CB	19.359	C29
132	2,2',3,3',4,6'-hexa-CB	19.528	
141	2,2',3,4,5,5'-hexa-CB	20.016	
137	2,2',3,4,4',5-hexa-CB	20.336	

130	2,2',3,3',4,5'-hexa-CB	20.455	
164	2,3,3',4',5,6'-hexa-CB	20.671	C30/B25
163	2,3,3',4',5,6'-hexa-CB	20.696	C30/B25
138	2,2',3,4,4',5'-hexa-CB	20.802	B25/B26
160	2,3,3',4,5,6'-hexa-CB	20.871	B26/C31
158	2,3,3',4,4',6'-hexa-CB	20.889	B26/C31
129	2,2',3,3',4,5'-hexa-CB	21.218	
166	2,3,4,4',5,6'-hexa-CB	21.624	
159	2,3,3',4,5,5'-hexa-CB	21.796	
162	2,3,3',4',5,5'-hexa-CB	22.139	
128	2,2',3,3',4,4'-hexa-CB	22.461	B27
167	2,3,4,4',5,5'-hexa-CB	22.548	B27
156	2,3,3',4,4',5'-hexa-CB	24.144	
157	2,3,3',4,4',5'-hexa-CB	24.513	
169	3,3',4,4',5,5'-hexa-CB	27.145	
188	2,2',3,4',5,6,6'-hepta-CB	18.943	
184	2,2',3,4,4',6,6'-hepta-CB	19.309	
179	2,2',3,3',5,6,6'-hepta-CB	20.038	
176	2,2',3,3',4,6,6'-hepta-CB	20.458	
186	2,2',3,4,5,6,6'-hepta-CB	20.969	A11
178	2,2',3,3',5,5',6'-hepta-CB	21.085	A11
175	2,2',3,3',4,5',6'-hepta-CB	21.435	
187	2,2',3,4',5,5',6'-hepta-CB	21.616	C32
182	2,2',3,4,4',5,6'-hepta-CB	21.639	C32
183	2,2',3,4,4',5',6'-hepta-CB	21.965	
185	2,2',3,4,5,5',6'-hepta-CB	22.738	
174	2,2',3,3',4,5,6'-hepta-CB	23.208	B28
181	2,2',3,4,4',5,6'-hepta-CB	23.300	B28
177	2,2',3,3',4',5,6'-hepta-CB	23.553	
171	2,2',3,3',4,4',6'-hepta-CB	23.925	
173	2,2',3,3',4,5,6'-hepta-CB	24.370	
192	2,3,3',4,5,5',6'-hepta-CB	24.733	C33
172	2,2',3,3',4,5,5'-hepta-CB	24.769	C33
180	2,2',3,4,4',5,5'-hepta-CB	25.324	C34
193	2,3,3',4',5,5',6'-hepta-CB	25.371	C34
191	2,3,3',4,4',5',6'-hepta-CB	25.711	
170	2,2',3,3',4,4',5'-hepta-CB	27.623	C35
190	2,3,3',4,4',5,6'-hepta-CB	27.683	C35
189	2,3,3',4,4',5,5'-hepta-CB	30.151	
202	2,2',3,3',5,5',6,6'-octa-CB	23.692	

200	2,2',3,3',4,5',6,6'-octa-CB	24.317	
204	2,2',3,4,4',5,6,6'-octa-CB	24.516	
197	2,2',3,3',4,4',6,6'-octa-CB	24.945	
199	2,2',3,3',4,5,6,6'-octa-CB	26.243	
198	2,2',3,3',4,5,5',6'-octa-CB	27.924	
201	2,2',3,3',4,5,5',6'-octa-CB	28.172	
203	2,2',3,4,4',5,5',6'-octa-CB	28.692	C36
196	2,2',3,3',4,4',5',6'-octa-CB	28.694	C36
195	2,2',3,3',4,4',5,6'-octa-CB	31.221	
194	2,2',3,3',4,4',5,5'-octa-CB	30.080	
205	2,3,3',4,4',5,5',6'-octa-CB	33.422	
208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nona-CB	31.014	
207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-nona-CB	31.795	
206	2,2',3,3',4,4',5,5',6'-nona-CB	36.216	
209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-deca-CB	38.892	

例えば、PCB-126 は PCB-175 と重なる。この場合は、7 塩化 PCB から塩素が 2 個はずれたフラグメントイオンピークは $[M-70]^+$ となり、5 塩化 PCB の M^+ より質量数が 2 少ない。したがって、この 2 つの PCB が同時に GC/MS に注入されれば、5 塩化 PCB のピーク面積に大きな影響を与えることになる。この場合は塩素が 2 個多くて重なるピークの PCB を何らかの方法で除いて、塩素が 2 個多い PCB が存在しないか、存在しても数%以下であることを確かめないと、定量分析値が異常に大きく測定されてしまう。

2. ライスオイルの PCB 分析

福岡の油症患者家族 M 及び S より収集したライスオイル 2 検体と台湾の油症研究班より提供されたライスオイル 2 検体 C 及び D に含まれている PCB 異性体を分析した。その結果を Table 2 に示す。コプラナ PCB の 126 と 169 については、この分析の後、更に活性炭カラムでコプラナ PCB 以外の PCB を除いてから、コプラナ PCB を内標準とする GC/MS で分析した。それらの値の中には、分離前の濃度より 20~30% 低いものがあったので、このコプラナ PCB の濃度は分離後の値を Table 2 に記入している。

この分析により 115 本のピークが分離検出され、この中には他の PCB が重なっている可能性があるピークが 33 あるので、ライスオイルには 130 から 140 種程度の PCB 異性体が存在することになる。福岡のライ

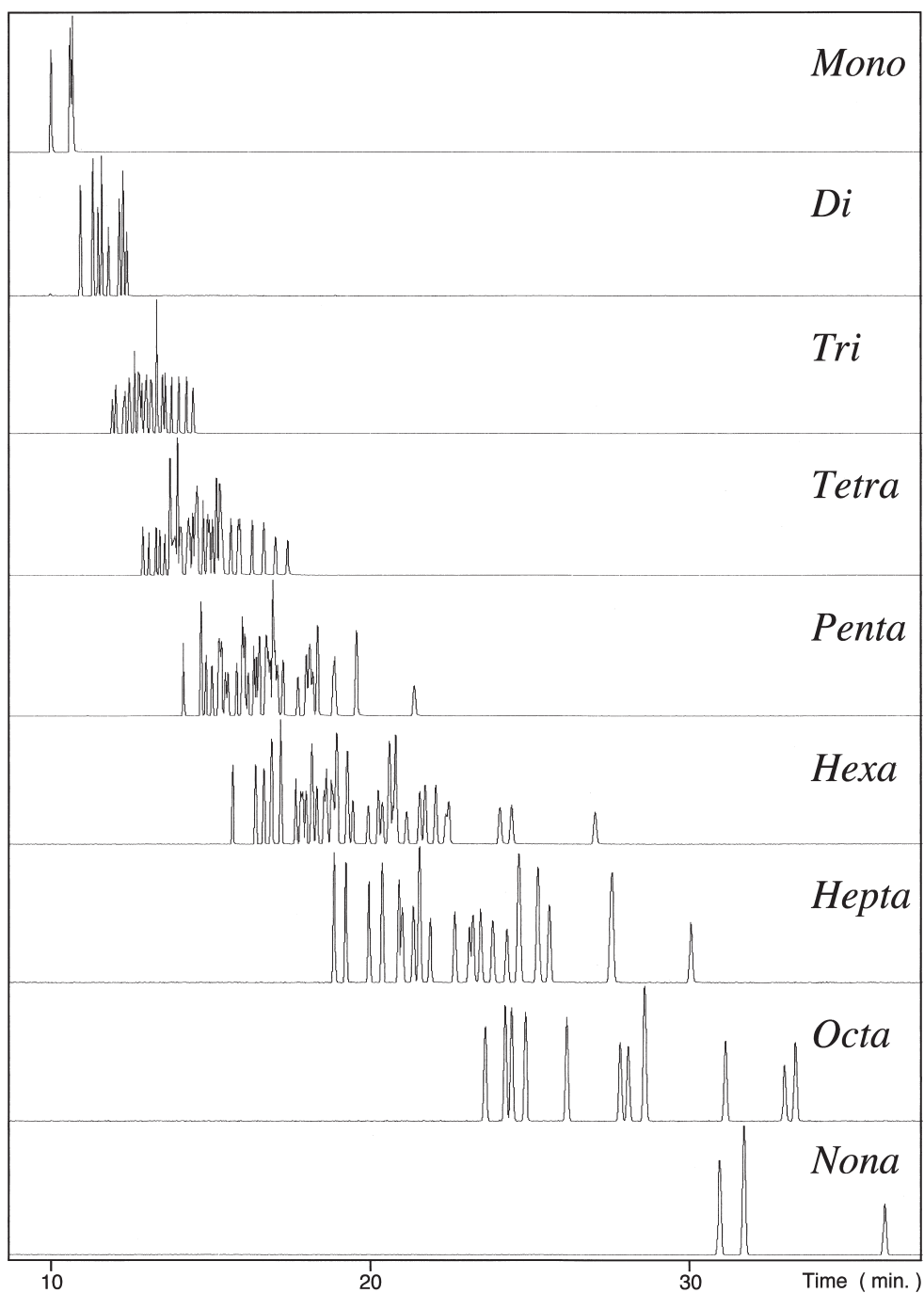


Fig. 1 GC/MS chromatograms of mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octa- and nona-CBs

Table 2 Concentrations of PCB congeners in Yusho Oil and Taiwan Yucheng Oil

IUPAC	PCBs	Concentration, ppb			
		Yusho oil		Yucheng oil	
		M	S	C	D
3	4-mono-CB	nd	nd	94	83
4	2,2'-di-CB	139	112	151	111
7,9	2,4-di-CB+	43	22	44	32
6	2,3'-di-CB	nd	nd	2	7
8,5	2,4'-di-CB+	1128	841	684	406
19	2,2'6-di-CB	517	412	89	42
12, 13	3,4-di-CB+	432	353	38	22
18	2,2',5-tri-CB	11973	9681	846	448
17	2,2',4-tri-CB	2702	2358	312	174
15	4,4'-di-CB	363	297	168	97
27	2,3'6-tri-CB	338	294	40	23
32,16	2,4',6-tri-CB+	4261	3464	344	185
29	2,4,5-tri-CB	25	18	8	5
26	2,3',5-tri-CB	2244	1749	181	114
25	2,3',4-tri-CB	326	283	51	28
28,31	2,4,4'-tri-CB+	31468	27012	1633	1214
53	2,2',5,6'-tetra-CB	3493	2830	81	69
21,20,33	2,3,4-tri-CB+	8776	7337	567	395
51	2,2',4,6'-tetra-CB	1413	1146	35	29
22	2,3,4'-tri-CB	4773	3816	256	206
45	2,2',3,6-tetra-CB	4074	3361	100	86
69,46,73	2,3',4,6-tetra-CB+	1126	932	25	26
52	2,2',5,5'-tetra-CB	34422	29172	1032	1205
49	2,2',4,5'-tetra-CB	22072	18379	623	783
47,48,75	2,2',4,4'-tetra-CB+	17975	15208	517	628
44	2,2'3,5'-tetra-CB	34851	30302	1236	1461
42	2,2',3,4'-tetra-CB	8558	7685	294	380
37	3,4,4'-tri-CB	5417	4339	366	490
68	2,3',4,5'-tetra-CB	9007	7684	300	424
64,41	2,3,4',6-tetra-CB+	18734	15632	683	970
103,96	2,2',4,5',6-penta-CB+	729	605	17	27
40,57	2,2',3,3'-tetra-CB+	7688	6204	273	388
67	2,3',4,5-tetra-CB	1265	994	63	89
63	2,3,4',5-tetra-CB	2751	2253	109	174
74,61	2,4,4',5-tetra-CB+	26703	22575	1348	2075
70,76,80	2,3',4',5-tetra-CB+	59574	50669	3293	5091
121	2,3',4,5',6-CB	1225	1014	49	73
95,93	2,2',3,5',6-penta-CB+	16439	13956	703	1041
66	2,3',4,4'-tetra-CB	56405	47330	2967	4613
91	2,2',3,4',6-penta-CB	6362	5254	261	412
55	2,3,3',4-tetra-CB	555	525	32	57
92	2,2',3,5,5'-penta-CB	5028	4141	231	362
56	2,3,3',4'-tetra-CB	23398	19325	1418	2180

60	2,3,4,4'-tetra-CB	19184	15236	1066	1613
101,84,90	2,2',4,5,5'-penta-CB+	37711	31829	2131	3409
99	2,2',4,4',5-penta-CB	24998	20572	1353	2141
119	2,3',4,4',6-penta-CB	1390	1107	48	94
109,83	2,3,3',4,6-penta-CB+	2022	1684	90	152
97,86,125	2,2',3',4,5-penta-CB+	19000	16317	1166	1795
117	2,3,4',5,6-penta-CB	1422	1125	79	121
87,115,116	2,2',3,4,5'-penta-CB+	22671	20464	1543	2405
81	3,4,4',5-tetra-CB	595	534	37	64
85	2,2',3,4,4'-penta-CB	11611	10082	723	1165
136,154	2,2',3,3',6,6'-hexa-CB+	992	808	58	94
110	2,3,3',4',6-tetra-CB	36664	32653	2792	4368
77	3,3',4,4'-tetra-CB	10111	8791	755	1252
151	2,2',3,5,5',6-hexa-CB	1188	971	81	129
82	2,2',3,3',4-penta-CB	10898	9433	735	1199
135	2,2',3,3',5,6'-hexa-CB	1197	1073	70	108
144	2,2',3,4,5',6-hexa-CB	1228	1012	42	59
147	2,2',3,4',5,6-hexa-CB	351	295	21	30
124	2',3,4,5,5'-penta-CB	3244	2806	183	309
107,108	2,3,3',4',5-penta-CB+	8447	7311	509	830
139,149	2,2',3,4,4',6-hexa-CB+	4571	3861	364	584
123	2',3,4,4',5-penta-CB	3302	2945	171	292
118,106	2,3',4,4',5-penta-CB+	60367	54369	5011	8063
133,134	2,2',3,3',5,5'-hexa-CB+	1487	1262	89	155
165	2,3,3',5,5',6-hexa-CB	537	366	18	31
114	2,3,4,4',5-penta-CB	8053	6868	476	801
146,142,161	2,2',3,4',5,5'-hexa-CB+	2491	2012	157	259
153,168	2,2',4,4',5,5'-hexa-CB+	13197	11094	1215	2043
132	2,2',3,3',4,6'-hexa-CB	5502	4752	470	786
105,127	2,3,3',4,4'-penta-CB+	51421	47010	4344	7177
141	2,2',3,4,5,5'-hexa-CB	4518	3805	334	569
179	2,2',3,3',5,6,6'-hepta-CB	231	188	24	41
137	2,2',3,4,4',5-hexa-CB	2204	1850	134	230
130	2,2',3,3',4,5'-hexa-CB	2292	1922	161	283
164,163	2,3,3',4',5',6-hexa-CB+	6032	5025	515	874
138	2,2',3,4,4',5'-hexa-CB	19807	17781	2011	2531
158,160	2,3,3',4,4',6-hexa-CB+	3861	3114	243	523
178	2,2',3,3',5,5',6-hepta-CB	201	176	22	32
129	2,2',3,3',4,5-hexa-CB	2777	2368	200	349
175	2,2',3,3',4,5',6-hexa-CB	237	215	11	16
126	3,3',4,4',5-penta-CB	1008	1108	59	97
182,187	2,2',3,4,4',5,6'-hepta-CB+	829	702	112	186
166	2,3,4,4',5,6-hexa-CB	724	642	34	52
183	2,2',3,4,4',5',6-hepta-CB	1658	1403	123	204
162	2,3,3',4',5,5'-hexa-CB	705	592	28	48
128	2,2',3,3',4,4'-hexa-CB	8778	7695	902	1448
167	2,3',4,4',5,5'-hexa-CB	3323	2961	240	395
181	2,2',3,4,4',5,6-hepta-CB	315	261	11	18

177	2,2',3,3',4',5,6-hepta-CB	668	565	101	181
202	2,2',3,3',5,5',6,6'-octa-CB	40	50	9	12
171	2,2',3,3',4,4',6-hepta-CB	1209	1027	116	198
156	2,3,3',4,4',5-hexa-CB	10780	9074	1001	1711
200	2,2',3,3',4,5',6,6'-octa-CB	50	46	7	9
173	2,2',3,3',4,5,6-hepta-CB	402	313	18	27
157	2,3,3',4,4',5'-hexa-CB	2736	2263	218	370
172,192	2,2',3,3',4,5,5'-hepta-CB+	568	504	61	107
197	2,2',3,3',4,4',6,6'-octa-CB	38	37	3	5
180,193	2,2',3,4,4',5,5'-hepta-CB+	5727	4967	969	1598
191	2,3,3',4,4',5',6-hepta-CB	372	320	29	46
199	2,2',3,3',4,5,6,6'-octa-CB	164	130	7	15
169	3,3',4,4',5,5'-hexa-CB	94	85	3	3
170,190	2,2',3,3',4,4',5-hepta-CB+	7616	6466	1120	1955
198	2,2',3,3',4,5,5',6-octa-CB	91	74	4	11
201	2,2',3,3',4,5,5',6'-octa-CB	320	292	79	133
203,196	2,2',3,4,4',5,5',6-octa-CB+	899	786	114	198
189	2,3,3',4,4',5,5'-hepta-CB	807	717	80	143
208	2,2',3,3',4,5',5,6,6'-nona-CB	33	38	nd	7
195	2,2',3,3',4,4',5,6-octa-CB	367	312	51	83
207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-nona-CB	32	27	nd	6
194	2,2',3,3',4,4',5,5'-octa-CB	1056	961	229	404
205	2,3,3',4,4',5,5',6-octa-CB	138	131	7	21
206	2,2',3,3',4,4',5,5',6-nona-CB	236	191	31	61
209	Deca-CB	nd	nd	nd	nd
Total PCBs		898572	769390	56780	83451

スオイルの全 PCB 濃度は 899 及び 769 ppm であり、台湾のライスオイルの PCB 濃度 57 及び 83 ppm より 10 倍程度高かった。これは同じ検体を 17 年前に分析した PCB 濃度と同じ程度であった⁵⁾。

総 括

PCB の全異性体 209 種の標準品を用いて、高分離能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析装置で分析した。209 種の PCB は 169 本のピークとして分離された。このうち 2 個の PCB が重なっているピークが 28 本及び 3 個の PCB が重なっているピークが 8 本あった。全 PCB のうちの大部分の PCB については異性体別に定量分析できる。コプラナ PCB で他の PCB と重なっているピークについても、活性炭カラム等で分離してから測定すると、正確に定量分析できる。

この方法を用いて福岡及び台湾の油症患者が摂取したライスオイルを異性体別に分析した。その結果 115 本のピークが分離検出されたので、ライスオイルには

130~140 種の PCB 異性体が存在する。福岡のライスオイルには 899 及び 769 ppm、台湾のライスオイルには 57 及び 83 ppm の PCB が含まれていた。

文 献

- 1) Ballschmiter M and Zell M: Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fres. Z. Anal. Chem.* 302: 20-31, 1980.
- 2) Fisher R and Ballschmiter: Congener-specific identification of technical PCB mixtures by capillary gas chromatography and a n-octyl-methyl silicone phase (SB-Octyl 50) with electron capture-mass-selective detection. *Fres. Z. Anal. Chem.* 335: 457-463, 1989.
- 3) Giesy JP and Kannan K: Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): Implication for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 28: 511-569, 1998.
- 4) 増田義人: PCB 汚染—特論—, 総合衛生公衆衛生学 P 471-478 南江堂 東京, 1985.

5) Masuda Y, Kuroki H, Yamaryo T, Haraguchi K, Kuratsune M and Hsu ST: Comparison of causal agents in Taiwan and Fukuoka PCB poisonings. *Chemosphere* 11: 199-206, 1982.

6) Masuda Y, Schechter A and Pöpke O: Concentrations of PCBs, PCDFs and PCDDs in the blood of Yusho patients and their toxic equivalent

contribution, *Chemosphere* 17: 1773-1780, 1998.

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

(受付 1999-3-25)

油症患者母乳及び血液中の全 PCB 異性体の分析

第一薬科大学物理分析学教室

三村 敬介*・田村 水穂*

原口 浩一・増田 義人

Analysis of All PCB Congeners in Breast Milk and Blood of Yusho Patients

Keisuke MIMURA*, Miho TAMURA*,
Koichi HARAGUCHI and Yoshito MASUDA

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

Abstract Breast milk and blood of Yusho patients were analyzed for polychlorinated biphenyl (PCB) congeners by High separation gas chromatography/Low resolution mass spectrometer. Seventy-one and forty-nine PCB congeners were identified and quantified in the breast milk and blood, respectively. Total PCB concentrations (Whole base) in breast milk of 2 Yusho patients were 69.9 and 15.1 ppb, respectively, being 11.6 and 2.5 times higher than those of 4 control breast milk. Average total PCB concentration of 5.0 ppb in whole blood of 13 Yusho patients was 3.6 times higher than those of control persons. Fourteen PCB congeners, such as 99, 117, 130, 137, 138, 156, 157, 164, 170, 171, 172, 189, 191 and 195, were particularly higher concentration in breast milk and blood of Yusho patients than in those of control persons. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and coplanar PCBs were also analyzed in the breast milk of Yusho patients and control persons. Large portions, 83 and 74%, of Dioxin toxic equivalency (TEQ) in the 2 Yusho breast milk were consisted of TEQ of 2,3,4,7,8-pentaCDF only, while total TEQ in the breast milk of control persons was consisted of PCDFs 48%, PCDDs 29% and coplanar PCBs 23%.

はじめに

昨年世界保健機関がダイオキシンの耐容1日摂取量を改定し、1~4 pg/kg/日とした¹⁾。その中では、ダイオキシン毒性相当量 (TEQ) を求めるために、ポリ塩化ジベンゾジオキシン (PCDD) 7種、ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) 10種及びポリ塩化ビフェニール (PCB) 12種の異性体の毒性を総合した TEQ 量が用いられている。PCB はダイオキシン毒性相当係数 (TEF) が 0.00001~0.1 と比較的小さいが²⁾、人体内に残留している濃度が高いために、母乳や血液では PCB

による TEQ が PCDD, PCDF による TEQ に匹敵する量存在する場合がある³⁾⁴⁾。TEF が表示されていない PCB についてもホルモン様作用による毒性、例えば神経毒性、を示すことが報告されており¹⁾⁵⁾、残留している PCB 異性体の種類によって毒性の評価が大きく異なる。したがって、残留している PCB を異性体別に濃度測定することが重要になる。高分離能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析装置 (GC/MS) により全 PCB 異性体を分析する方法⁶⁾で油症患者の母乳及び血液に含まれている PCB を異性体別に分析した。また、PCDD, PCDF についても、試料溶液の濃縮率を上げ、注入量を増やすことにより感度不足を補い、それぞれの異性体分析をして、毒性の比較検討をした。

*現在

東和大学中央科学研究所

815-8510 福岡市南区筑紫丘 1-1-1

実験方法

1. 分析試料

油症患者 2 名より提供された母乳 (1988 年) を冷凍保存したものを用いた。別に、福岡市近郊の産婦人科より提供された一般人 4 名の母乳 (1989 年) を冷凍保存し、分析試料とした。油症患者の血液は 1998 年度一斉検診で採取されたものを試料とした。

2. 分析方法

(1) PCB の分析

母乳 40~100 g を秤量し、アセトン/ヘキサン (2 : 1) 溶液 100 ml で 3 回抽出した。ヘキサン層を精製水 (ヘキサンで洗浄したもの) 30 ml で 2 回水洗し、無水硫酸ナトリウム (PCB 分析用, 450 °C で 24 時間加熱) を用いて水分を濾別後、内標準物質として ^{13}C -PCB 4 種及び、 ^{13}C コプラナ PCB (^{13}C -Co-PCB) 3 種、 ^{13}C -PCDD 7 種、 ^{13}C -PCDF 9 種を添加した。これを 50 °C で一晩放置し、ヘキサンを除去して脂質を得た。脂質を試験管 (20 ml) 数本に分けて入れ (約 200 mg/試験管)、それぞれにエタノール 3 ml を加えてよく混合し、さらに 1 M 水酸化カリウム/エタノール溶液 3 ml 及び精製水 (ヘキサンで洗浄したもの) 6 ml を加え、超音波照射下で均一になるようによく混合させた。この溶液を時々振り混ぜながら 65 °C で 2 時間加温した後、それぞれ、ヘキサン 5 ml で 2 回抽出した。ヘキサン層 (10 ml) を精製水 (ヘキサンで洗浄したもの) 2 ml で 2 回水洗し、無水硫酸ナトリウム 2 g を加えて乾燥させた後、活性化したシリカゲル (ワコーゲル S-1, 450 °C, 24 時間加熱) 1 g のカラムクロマトグラフィーにかけた。カラムはヘキサン 30 ml で溶出させ、溶出液をスニードーカラムをつけた試験管で 2~3 ml まで濃縮した。各試験管で濃縮したヘキサン溶液を一本の試験管に集め、10 ml まで濃縮後、その 10 分の 1 (1 ml) をスピッツ試験管に移し、PCB 回収率計測用の内標準物質として 2,2',3,3',4-penta-CB を 0.5 ng 添加後、50 °C に加温して 5~10 μl まで濃縮し PCB の分析試料とした。また、残りの 10 分の 9 (9 ml) は PCDD 及び PCDF の分析に用いた。血液 3~5 g を試験管内に秤量し、 ^{13}C -PCB 4 種を 5 ng 及び 1 M 水酸化カリウム/エタノール溶液 3 ml を加えた。この溶液を前記母乳 PCB 分析の場合と同様に処理して GC/MS で

PCB 各異性体の定量分析をした。

PCB 異性体の分析は、キャピラリーカラム (60m DB-5 MS) を装着したガスクロマトグラフ/四重極質量分析計 (島津, AOC-17, GC-17 A, QP-5000) で行った。キャリアーガスは高純度ヘリウム (99.999%) を用い、流速は 1.8 ml/min であった。カラム温度は、最初 100 °C で 2 分間保持し、20 °C/min で 250 °C まで昇温して 15 分間保持した。次いで、2 °C/min で 280 °C まで昇温し、7 分間保持した。注入口の温度は 260 °C、インターフェースの温度は 280 °C に保った。選択イオン検出 (SIM) には三塩化、四塩化、五塩化、六塩化、七塩化の PCB 及び 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethylene (DDE) の分子イオンピーク (M^+) 及び $[M+2]^+$ または hexachlorobenzene (HCB) の M^+ 及び $[M+2]^+$ (m/z 255.95, 257.95, 289.90, 291.90, 323.90, 325.90, 357.85, 359.85, 391.80, 393.80, 315.95, 317.95, 282.00, 284.00), 八塩化、九塩化、十塩化の PCB の $[M+2]^+$ 及び $[M+4]^+$ (m/z 427.75, 429.75, 461.70, 463.70, 495.70, 497.70) を用いて測定した。PCB 異性体の濃度は各イオンのピーク面積を ^{13}C 内標準物質の $[M+2]^+$ のピーク面積と比較する内標準法により求めた。

(2) PCDD, PCDF, Co-PCB の分析

PCB 分析操作中に分けた PCDD 及び PCDF 分析用試料 9 ml をスピッツ試験管に移し、50 °C に加温して、約 1 ml まで濃縮した。これを活性化したアルミナ (Merck 90 active basic, 450 °C, 24 時間加熱) 5 g のカラムクロマトグラフィーにかけた。カラムは、ヘキサン 60 ml (Fr. 1), ヘキサン 90 ml (Fr. 2), ヘキサン/ジクロロメタン (1 : 1) 60 ml (Fr. 3), で溶出させ、Fr. 2 及び Fr. 3 をロータリーエバポレーターでそれぞれ 5 ml 程度まで濃縮した。Fr. 2 を Co-PCB 分析試料、Fr. 3 を PCDD 及び PCDF の分析試料とし、スピッツ試験管に移した後、回収率計測用の内標準物質として、それぞれに 2,2',5,5'-tetra-CB を 0.5 ng 添加後、50 °C に加温して、5~10 μl まで濃縮した。PCDD 及び PCDF 異性体の分析は、PCB 異性体分析と同様の装置を用いて行った。カラム温度は、最初 100 °C で 2 分間保持し、20 °C/min で 275 °C まで昇温して 15 分間保持した。次いで、2 °C/min で 295 °C まで昇温し、10 分間保持した。注入口の温度は 280 °C、インター

フェースの温度は295°Cに保った。選択イオン検出 (SIM)には四塩化、五塩化、六塩化のCo-PCBのM⁺及び[M+2]⁺(m/z 289.90, 291.90, 323.90, 325.90, 357.85, 359.85)また、四塩化、五塩化、六塩化、七塩化、八塩化のPCDD及びPCDFのM⁺及び[M+2]⁺(m/z 303.90, 305.90, 319.90, 321.90, 337.85, 339.85, 353.85, 355.85, 373.80, 375.80, 389.80, 391.80, 407.80, 409.80, 423.80, 425.80, 441.75, 443.75, 457.75, 459.75)を用いて測定した。Co-PCB, PCDD及びPCDF異性体の濃度は各イオンのピーク面積を¹³C内標準物質の[M+2]⁺のピーク面積と比較する内標準法により求めた。

結 果 と 考 察

1. 添加内標準物質の回収率

分析実験の正確さを調べるために、試料に添加した内標準物質がGC/MSで測定するときどの程度残っているかを、回収率計測用の内標準物質を測定時に添加して、それとの割合で定量分析して求めた。¹³C-PCDDs, ¹³C-PCDFs, ¹³C-CoPCBsを油症母乳及び一般母乳に添加した場合における、それらの回収率の平均及び標準偏差は100及び30%であり、よく回収されている。最も低い場合においても42%回収されているので、この分析方法で求めた値には回収不良による大きな間違いはないものと考えられる。

2. PCB異性体の分析

油症患者母乳のPCB分析試料のSIMクロマトグラムをFig. 1に示す。それぞれのマスクロマトグラムにおいて各異性体のM⁺, [M+2]⁺(または, [M+2]⁺, [M+4]⁺)に対応する2つのピークが、同じガス chromat 条件における標準品と同じ保持時間に観測されたものをPCBと同定した。同定したPCB各異性体の濃度をTable 1に示す。今回測定した母乳6検体中からは、全部で71種類のPCB異性体が同定された。油症患者母乳中のPCB濃度(全量当たり)は69.9 ppb及び15.1 ppbであり、一般人の平均値6.0 ppbの11.5及び2.5倍であった。1998年度一斉検診で採取された13名の油症患者の血液中のPCB異性体別濃度もTable 1に示している。油症患者の全PCB濃度(全量当たり)は4.97 ppbで、一般人の平均濃度1.38 ppbよりも3.6倍高い値であった。油症母乳2検体及び油

症血液(13名)平均のいずれにおいても、一般人に対する全PCB濃度割合よりも高い濃度のPCB異性体は99, 117, 130, 137, 138, 156, 157, 164, 170, 171, 172, 189, 191, 195の14種であった。1977年頃の油症患者ではPCBの138, 153, 156, 170, 180が一般人よりも濃度が高いこと²⁾、は知られていたが、1990年頃以降では、それらのPCBの他に多数のPCB異性体が比較的高濃度で長期間残留していることが分かった。

3. PCDD, PCDF, PCB異性体の分析

母乳に含まれているPCDD, PCDF, CoPCBは、濃縮率を上げることで、感度が低いGC/MSにより定量分析することができた。Table 2に今回の測定で得られた母乳中のPCDD, PCDF, PCB各異性体の濃度を示す。油症患者では、2,3,4,7,8-pentaCDF, 1,2,3,4,7,8-hexaCDF, 1,2,3,6,7,8-hexaCDF, 3,3',4,4',5,5'-hexaCBの濃度が一般人のそれより明らかに高い値であった。逆に、一般人の方が油症患者よりも比較的高い濃度であったものは1,2,3,4,6,7,8-heptaCDD, octaCDD及び2,3,4,6,7,8-hexaCDFの3種であった。

各異性体の濃度にそれぞれのTEFを掛け、その毒性をTCDDの毒性量に換算したTEQをPCDD, PCDF, PCBのグループごとにまとめてTable 3に示す。また、それらが全TEQ濃度にしめる割合をFig. 2に示す。なお、nd(検出せず)のものについては、検出限界濃度の半分にTEFを掛けて、そのTEQ濃度とした。油症患者母乳の全TEQ濃度は1.96及び0.75 ppb(脂質重量当たり)で、一般人の36及び14倍であった。TEQ濃度が最も高い成分はどちらも、2,3,4,7,8-pentaCDFであるが、油症患者では全TEQ濃度の83及び74%をしめているのに対し、一般人では40%以下であった。一般人の場合には、2,3,4,7,8-pentaCDF以外にも2,3,7,8-tetraCDD, 1,2,3,7,8-pentaCDD, 1,2,3,6,7,8-hexaCDD, 2,3',4,4',5-pentaCB, 2,3,3',4,4',5-pentaCB, 3,3',4,4',5-pentaCBの寄与が大きく、全TEQ濃度にしめる比率も油症患者と比べ、高くなっている。また、PCDFは油症患者のTEQ濃度の大部分である86及び82%をしめているのに対し、一般人ではPCDFが48%、PCDDが29%、PCBが23%と同程度の寄与率であつ

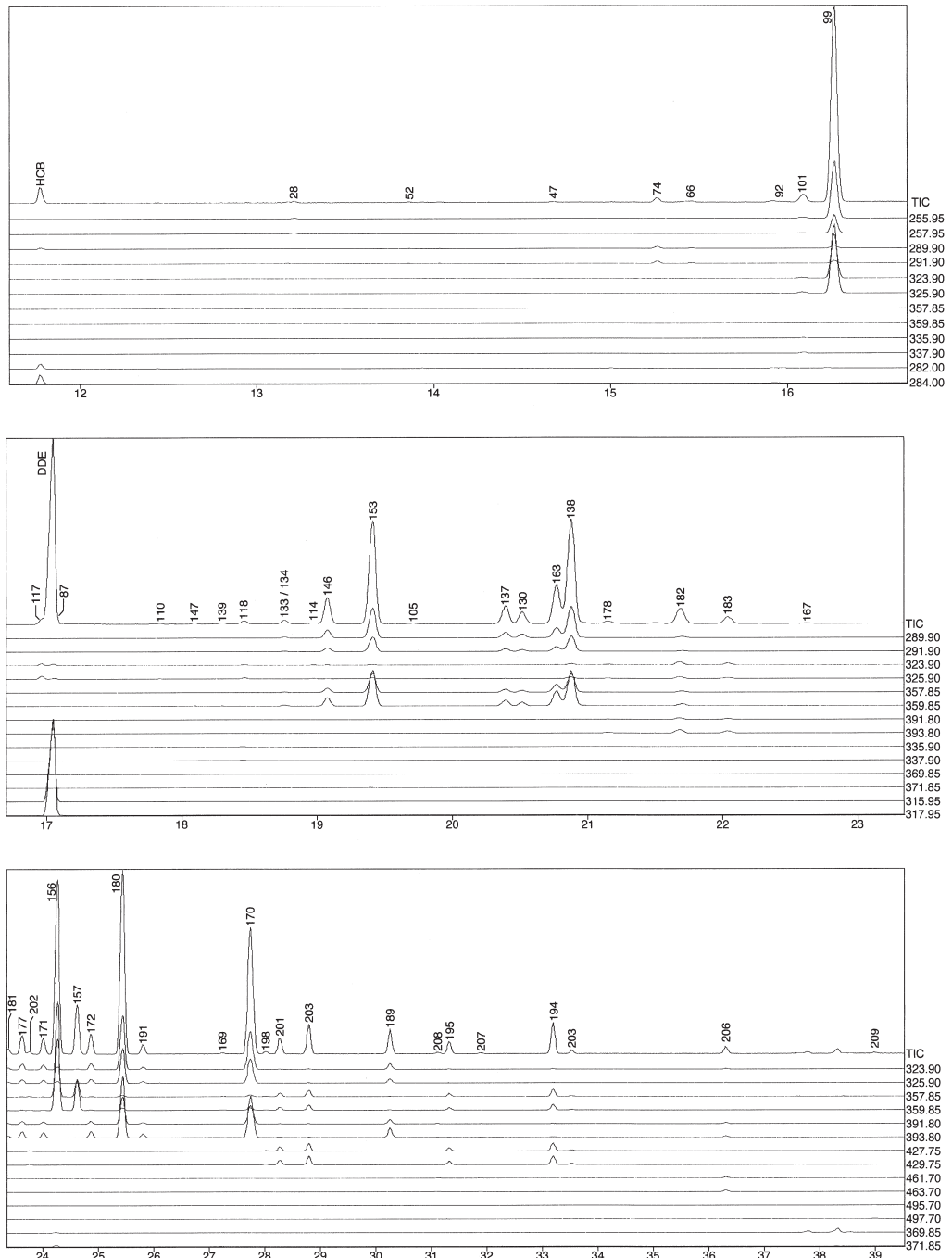


Fig. 1 SIM chromatograms of the extract from breast milk of Yusho patient (Yusho U)

Table 1 Concentration of PCB Congeners in Breast Milk and Blood of Yusho Patients

IUPAC No.	Fat content%	Breast Milk, ppb (Wet)				Ratio		Blood, ppb (Wet)		Ratio
		Yusho U	Yusho W	Control		U/Cont	W/Cont	Yusho Av	Control Av	Yusho/Cont
				Ave.	S.D.					
		3.10	1.69	2.76	0.48	n=13	n=3×10			
29	2,4,5-CB	0.002	0.003	0.004	0.000	0.60	0.84	0.018	nd	—
28,31	2,4,4'-CB+	0.040	0.025	0.054	0.012	0.74	0.47	0.014	0.023	0.62
52	2,2',5,5'-CB	0.028	0.012	0.016	0.004	1.76	0.74	0.014	0.009	1.50
49	2,2',4,5'-CB	0.007	0.005	0.005	0.000	1.36	0.97	nd	0.006	—
47,48,75	2,2',4,4'-CB+	0.021	0.012	0.014	0.002	1.52	0.84	0.008	0.004	2.16
44	2,2',3,5'-CB	0.007	0.004	0.005	0.002	1.41	0.79	nd	0.011	—
37	3,4,4'-CB	0.003	0.003	0.002	0.000	2.21	2.12	nd	0.010	—
63	2,3,4',5-CB	0.003	0.004	0.004	0.002	0.68	0.92			
74,61	2,4,4',5-CB+	0.119	0.154	0.267	0.115	0.44	0.58	0.048	0.047	1.01
70,76,78	2,3',4',5-CB+	0.006	0.006	0.007	0.001	0.83	0.87	0.006	0.005	1.34
95,93	2,2',3,5',6-CB+	0.024	0.012	0.014	0.003	1.76	0.84	nd	0.004	—
66	2,3',4,4'-CB	0.035	0.022	0.062	0.020	0.57	0.36	0.013	0.016	0.84
92	2,2',3,5,5'-CB	0.013	0.006	0.010	0.004	1.37	0.57	nd	0.005	—
56	2,3,3',4'-CB	0.008	0.003	0.003	0.001	2.64	1.01	nd	nd	—
60	2,3,4,4'-CB	0.004	0.006	0.018	0.006	0.25	0.31	0.003	nd	—
101,90,84	2,2',4,5,5'-CB+	0.148	0.042	0.049	0.009	3.00	0.86	0.021	0.009	2.33
99	2,2',4,4',5-CB	5.298	0.962	0.265	0.063	19.99	3.63	0.241	0.040	6.00
117	2,3,4',5,6-CB	0.449	0.047	0.009	0.005	47.26	4.94	0.012	0.002	7.42
87,115,116	2,2',3,4,5'-CB+	0.250	0.025	0.010	0.002	25.88	2.54	0.010	nd	—
85	2,2',3,4,4'-CB	0.010	0.002	0.005	0.002	1.88	0.46			
154,136	2,2',4,4',5,6'-CB+	0.005	0.003	0.003	0.001	1.76	1.00	nd	0.003	—
110	2,3,3',4',6-CB	0.009	0.007	0.009	0.002	1.01	0.80	0.005	0.002	1.99
77	3,3',4,4'-CB	0.006	0.002	0.005	0.001	1.09	0.44	nd	0.009	—
151	2,2',3,5,5',6-CB	0.028	0.010	0.016	0.003	1.72	0.60	0.006	0.004	1.37
135	2,2',3,3',5,6'-CB	0.021	0.008	0.008	0.002	2.54	nd	—		
147	2,2',3,4',5,6-CB	0.106	0.015	0.007	0.003	14.49	2.01	0.006	nd	—
107,108	2,3,3',4',5-CB+	0.024	0.009	0.017	0.006	1.38	0.52	0.006	0.005	1.20
139,149	2,2',3,4,4',6-CB+	0.078	0.020	0.031	0.013	2.50	0.65	0.012	0.003	4.30
118,106	2,3',4,4',5-CB+	0.244	0.224	0.388	0.097	0.63	0.58	0.081	0.072	1.13
134,133	2,2',3,3',5,6-CB+	0.381	0.076	0.026	0.007	14.63	2.93	0.027	0.010	2.79
165	2,3,3',5,5',6-CB	0.020	0.005	0.001	0.000	13.31	3.14			
114	2,3,4,4',5-CB	0.140	0.061	0.035	0.010	4.02	1.74	0.032	0.006	5.50
146,142,161	2,2',3,4',5,5'-CB+	2.037	0.417	0.170	0.047	11.96	2.45	0.154	0.046	3.36
153,168	2,2',4,4',5,5'-CB+	10.737	2.563	1.251	0.332	8.58	2.05	0.798	0.270	2.96
132	2,2',3,3',4,6'-CB	0.018	0.006	0.008	0.001	2.22	0.79			
105,127	2,3,3',4,4'-CB+	0.058	0.059	0.106	0.025	0.55	0.55	0.019	0.014	1.30
141	2,2',3,4,5,5'-CB	0.014	0.003	0.010	0.004	1.39	0.32			
179	2,2',3,3',5,6,6'-CB	0.007	0.003	0.005	0.001	1.64	0.61			
137	2,2',3,4,4',5-CB	1.611	0.319	0.044	0.012	36.90	7.30	0.074	0.011	6.59
130	2,2',3,3',4,5'-CB	1.343	0.204	0.042	0.016	31.89	4.84	0.055	0.012	4.75
164,163	2,3,3',4',5',6-CB+	3.749	0.749	0.210	0.078	17.81	3.56	0.235	0.054	4.33
138	2,2',3,4,4',5'-CB	13.123	2.510	0.756	0.217	17.35	3.32	0.742	0.148	5.02
178	2,2',3,3',5,5',6-CB	0.351	0.100	0.068	0.020	5.20	1.47	0.032	0.016	1.99
126	3,3',4,4',5-CB	0.003	0.002	0.002	0.001	1.88	1.50	nd	nd	—

182,187	2,2',3,4,4',5,6'-CB+	1.232	0.415	0.300	0.090	4.11	1.38	0.142	0.068	2.08
183	2,2',3,4,4',5',6-CB	1.028	0.249	0.126	0.032	8.13	1.97	0.079	0.025	3.14
128	2,2',3,3',4,4'-CB	0.065	0.025	0.024	0.008	2.72	1.05			
167	2,3',4,4',5,5'-CB	0.091	0.048	0.053	0.017	1.72	0.91	0.028	0.011	2.50
181	2,2',3,4,4',5,6-CB	0.188	0.026	0.003	0.000	75.04	10.22	0.010	nd	—
177	2,2',3,3',4',5,6-CB	0.573	0.130	0.057	0.020	10.11	2.30	0.036	0.013	2.86
202	2,2',3,3',5,5',6,6'-CB	0.053	0.020	0.018	0.004	2.90	1.10	0.013	0.007	1.93
71	2,2',3,3',4,4',6-CB	0.447	0.089	0.024	0.007	18.30	3.64	0.026	0.005	5.19
156	2,3,3',4,4',5-CB	7.501	1.459	0.126	0.040	59.49	11.57	0.365	0.027	13.31
200	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-CB	0.013	0.004	0.004	0.001	3.13	0.86			
157	2,3,3',4,4',5'-CB	2.213	0.419	0.034	0.010	65.32	12.36	0.123	0.008	14.72
172,192	2,2',3,3',4,5,5'-CB+	0.470	0.096	0.029	0.008	16.37	3.35	0.028	0.006	4.33
180,193	2,2',3,4,4',5,5'-CB+	5.744	1.375	0.585	0.176	9.82	2.35	0.544	0.172	3.17
191	2,3,3',4,4',5,6-CB	0.253	0.044	0.008	0.002	31.08	5.39	0.025	0.003	7.40
169	3,3',4,4',5,5'-CB	0.044	0.009	nd	—	—	—			
170,190	2,2',3,3',4,4',5-CB+	6.215	1.323	0.286	0.089	21.73	4.63	0.417	0.059	7.05
198	2,2',3,3',4,5,5',6-CB	0.049	0.009	0.003	0.001	18.10	3.40			
201	2,2',3,3',4,5,5',6'-CB	0.397	0.096	0.068	0.022	5.81	1.40	0.056	0.020	2.84
203,196	2,2',3,4,4',5,5',6-CB+	0.626	0.147	0.070	0.023	8.91	2.09	0.081	0.017	4.67
189	2,3,3',4,4',5,5'-CB	0.747	0.143	0.015	0.004	50.71	9.72	0.063	0.005	13.83
208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-CB	0.020	0.004	0.004	0.003	4.67	0.83	0.010	nd	—
195	2,2',3,3',4,4',5,6-CB	0.255	0.051	0.018	0.006	14.44	2.91	0.027	0.006	4.84
207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-CB	0.010	0.002	0.002	0.001	4.12	0.95			
194	2,2',3,3',4,4',5,5'-CB	0.839	0.189	0.105	0.032	8.00	1.80	0.124	0.033	3.74
205	2,3,3',4,4',5,5',6-CB	0.064	0.011	0.002	0.001	26.43	4.51	0.028	nd	—
206	2,2',3,3',4,4',5,5',6-CB	0.142	0.027	0.019	0.010	7.63	1.47	0.032	0.004	7.21
209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-CB	0.015	0.005	0.015	0.011	1.05	0.37			
Total PCBs		69.881	15.143	6.039	1.773	11.57	2.51	4.966	1.379	3.60
DDE		1.330	0.758	0.549	0.165	2.42	1.38	4.971	1.863	2.67
Hexachlorobenzene		13.012	12.333	12.294	1.944	1.06	1.00	0.146	0.061	2.39

た。

総 括

油症患者 2 名の母乳及び 13 名の血液を GC/MS を用いる方法により、PCB 異性体の定量分析をした。母乳からは 71 種、血液からは 49 種の PCB 異性体が分別定量された。油症患者 2 名の母乳中全 PCB の濃度 (全量当たり) は 69.9 及び 15.1 ppb で、一般人の平均濃度の 11.6 及び 2.5 倍であった。油症患者 13 名の血液中全 PCB 濃度 (全量当たり) は 5.0 ppb で、一般人の 3.6 倍であった。

油症患者の母乳及び血液において、一般人よりも特異的に高濃度であった PCB 異性体は 99, 117, 130, 137, 138, 156, 157, 164, 170, 171, 172, 189, 191, 195 の 14 種であった。これらは 30 年間も体内に残留

し続けていることになる。

この方法で油症患者母乳中の PCDD, PCDF, Co-PCB の分析も行い、ダイオキシン様毒性 (TEQ) の強さを比較検討した。油症患者母乳では、2,3,4,7,8-pentaCDF が TEQ 毒性の 83 及び 74% の大部分を占め、PCDD 及び PCB の合計 TEQ は 14 及び 18% と少なかったのに対し、一般人では PCDF が 48%, PCDD が 29%, PCB が 23% とほぼ同程度の毒性寄与であった。

文 献

1) Giesy JP and Kannan K: Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): Implication for risk assessment. Crit. Rev. Toxicol. 28: 511-569, 1998.

Table 2 Concentrations of PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs in Breast milk of Yusho Patients

	Concentration, ppb (Whole basis)							
	TEF(WHO)	Yusho		Control		Ratio		
		Fat 3.10%	Fat 1.69%	Average Fat 2.76%	S.D.	U/Cont	W/Cont	
2,3,7,8-Tetra-CDD	1	0.0006	0.0004	0.0004	0.0001	1.58	1.13	
1,2,3,7,8-Penta-CDD	1	0.0015	0.0004	0.0007	0.0002	2.23	0.67	
1,2,3,4,7,8-Hexa-CDD	0.1	nd	0.0001	0.0001	0.0000	—	0.50	
1,2,3,6,7,8-Hexa-CDD	0.1	0.0064	0.0021	0.0018	0.0004	3.66	1.17	
1,2,3,7,8,9-Hexa-CDD	0.1	nd	0.0002	0.0002	0.0001	—	0.87	
1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDD	0.01	nd	0.0003	0.0007	0.0003	—	0.52	
Octa-CDD	0.0001	0.0018	0.0026	0.0043	0.0033	0.41	0.60	
Total PCDDs		0.0103	0.0061	0.0075	0.0036	1.36	0.81	
2,3,7,8-Tetra-CDF	0.1	0.0015	0.0023	0.0009	0.0005	1.57	2.44	
2,3,4,7,8-Penta-CDF	0.5	0.1009	0.0188	0.0178	0.0068	5.66	1.05	
1,2,3,7,8-Penta-CDF	0.05	0.0012	0.0028	0.0012	0.0007	1.07	2.37	
1,2,3,4,7,8-Hexa-CDF	0.1	0.0117	0.0043	0.0028	0.0010	4.18	1.54	
1,2,3,6,7,8-Hexa-CDF	0.1	0.0026	0.0018	0.0008	0.0003	3.12	2.08	
1,2,3,7,8,9-Hexa-CDF	0.1	nd	0.0001	0.0001	0.0000	—	1.00	
2,3,4,6,7,8-Hexa-CDF	0.1	nd	0.0003	0.0013	0.0015	—	0.27	
1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDF	0.01	0.0009	0.0004	0.0005	—	1.67	0.78	
1,2,3,4,7,8,9-Hepta-CDF	0.01	nd	nd	—	—	—	—	
Octa-CDF	0.0001	nd	nd	0.0002	0.0000	—	—	
Total PCDFs		0.1189	0.0308	0.0240	0.0083	4.96	1.28	
81 3,4,4',5'-Tetra-CB	0.0001	nd	nd	—	—	—	—	
77 3,3',4,4'-Tetra-CB	0.0001	0.0041	0.0023	0.0026	0.0004	1.57	0.89	
126 3,3',4,4',5'-Penta-CB	0.1	0.0056	0.0013	0.0023	0.0008	2.45	0.58	
169 3,3',4,4',5,5'-Hexa-CB	0.01	0.0266	0.0045	0.0059	0.0021	4.50	0.77	
Total Coplanar PCBs		0.0363	0.0082	0.0100	0.0021	3.64	0.82	
105 2,3,3',4,4'-Penta-CB	0.0001	0.0580	0.0589	0.0986	0.0271	0.59	0.60	
114 2,3,4,4',5'-Penta-CB	0.0005	0.1400	0.0605	0.0545	0.0118	2.57	1.11	
118 2,3',4,4',5'-Penta-CB	0.0001	0.2435	0.2243	0.3625	0.0961	0.67	0.62	
123 2',3,4,4',5'-Penta-CB	0.0001	na	na	—	—	—	—	
156 2,3,3',4,4',5'-Hexa-CB	0.0005	7.5012	1.4594	1.3731	0.4995	5.46	1.06	
157 2,3,3',4,4',5'-Hexa-CB	0.0005	2.2126	0.4187	0.4007	0.1468	5.52	1.04	
167 2,3',4,4',5,5'-Hexa-CB	0.00001	0.0909	0.0480	0.0593	0.0154	1.53	0.81	
189 2,3,3',4,4',5,5'-Hepta-CB	0.0001	0.7473	0.1433	0.1380	0.0493	5.41	1.04	
Total Mono-ortho PCBs		10.9935	2.4130	2.4868	0.7107	4.42	0.97	
Total PCBs		11.0298	2.4212	2.4967	0.7128	4.42	0.97	

2) 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.

3) Liem AKD and Theelen RMC: Dioxins: Chemical Analysis, Exposure and Risk Assessment. 1-373, National Institute of Public Health and the

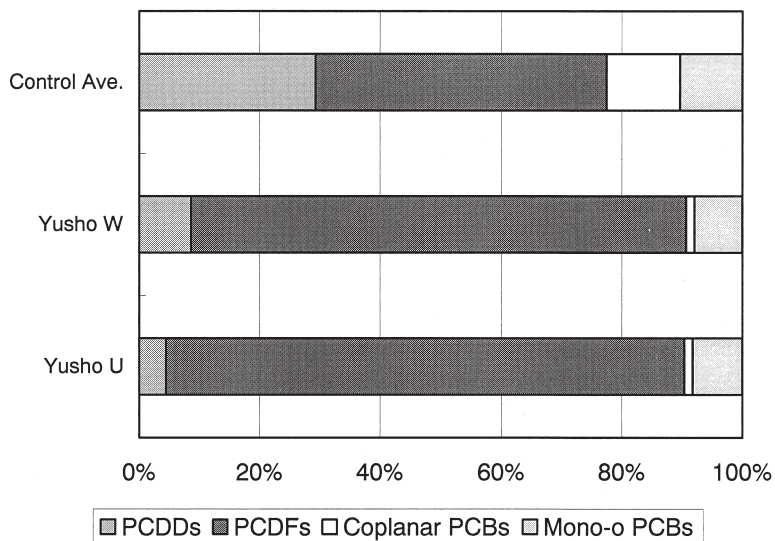
Environment, The Netherlands, 1997.

4) Masuda Y, Schecter A and Pöpke O: Concentrations of PCBs, PCDFs and PCDDs in the blood of Yusho patients and their toxic equivalent contribution, *Chemosphere* 17: 1773-1780, 1998.

5) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人: 高分離能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析計によ

Table 3 TEQ Concentration of PCDDs, PCDFs and PCBs in Breast milk (ppb in Fat)

	Yusho U	Yusho W	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control Average
PCDDs	0.08681	0.06492	0.03780	0.00337	0.02070	0.00199	0.01596
PCDFs	1.68239	0.61680	0.05641	0.01355	0.02655	0.00800	0.02613
Coplanar PCBs	0.02660	0.01050	0.01111	0.00346	0.00699	0.00484	0.00660
Mono-o PCBs	0.16244	0.05998	0.00675	0.00505	0.00761	0.00307	0.00562
Total TEQ	1.95823	0.75220	0.11207	0.02544	0.06184	0.01789	0.05431

**Fig. 2** Percent TEQ contribution of PCDD, PCDF and PCB in Yusho breast milk

る全 PCB 異性体の分析, 福岡医誌 90 : 192-201, 1999.

6) Seegal RF: Epidemiological and Laboratory Evidence of PCB-Induced Neurotoxicity. Crit. Rev. Toxicol. 26 : 709-737, 1996.

7) van Leeuwen FXR and Younes M: WHO revises the Tolerable Daily Intake (TDI) for dioxin. Organohalogen Compounds 38 : 295-298, 1998.

(受付 1999-3-25)

3,3',4,4',5-Penta-および 2,2',3,3',4,4'-Hexachlorobiphenyl の代謝研究

第一薬科大学物理分析学教室
原口 浩一・広瀬由美子・増田 義人
静岡県立大学薬学部薬剤学教室
加藤 善久・木村 良平

Metabolism of 3,3',4,4',5-Penta- and 2,2',3,3',4,4'-Hexachlorobiphenyls in Rats

Koichi HARAGUCHI, Yumiko HIROSE and Yoshito MASUDA
*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku,
Fukuoka 815-8511*

Yoshihisa KATO and Ryohei KIMURA
*School of Pharmaceutical Science, University of Shizuoka, 52-1, Yada, Shizuoka
422-8526*

Abstract Following the ip administration of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB126) and 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl (CB128) to rats, blood, liver, lung, kidney, adipose tissue and feces were analyzed for the metabolites. CB126 was biotransformed to three hydroxylated metabolites identified as 4-OH-3,3',4',5'-tetraCB, 4-OH-3,3',4',5,5'-pentaCB and 5-OH-3,3',4,4',5'-pentaCB at about 1:7:2 ratio, whereas to two methylthio metabolites as 5-MeS- and 6-MeS-3,3',4,4',5'-pentaCBs at 1:2 ratio. Among the metabolites, only 4-OH-3,3',4',5,5'-pentaCB was detected in all tissues and blood. The ratio of metabolite/unchanged CB126 was 1:1.3 in blood and 1:162 in liver, indicating the high blood affinity of this metabolite. Trace amounts of 5-methylsulfonyl-3,3',4,4',5'-pentaCB was also detected in the liver. CB128 was biotransformed to 5-OH-, 5-MeS- and 6-MeS-2,2',3,3',4,4'-hexaCBs which were excreted to feces in about 5:5:1 ratio. No metabolites were detected in blood and any tissues except for liver where trace amounts of 5-hydroxylated metabolite was present, indicating the low tissue affinity of hydroxylated metabolites from CB128.

はじめに

Polychlorinated biphenyl (PCB) の代謝物のうち、メチルスルホン (MeSO₂) 体は油症患者および健常人の脂肪組織¹²⁾、肝臓²⁹⁾、母乳²⁸⁾ から検出されているほか、アザラシや北極ぐまをはじめとする多くの野生動物組織³⁾ にも高濃度で蓄積している。一方、水酸化体はヒト¹⁾ やアザラシ¹⁾、アホウドリ²⁰⁾ などの野生動物の血液から残留 PCB 濃度に近いレベルで検出されている。

すでに著者らは特定の 3-MeSO₂-PCB が母化合物より数百倍強力なフェノバルビタール型のラット肝ミクロソーム薬物代謝酵素誘導効果を有すること¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁸⁾、*in vitro* において母 PCB より強力な発がんプロモーターとして作用する可能性のあること¹⁹⁾ を報告した。また、MeSO₂-PCB はラットにおいて血清中の甲状腺ホルモンレベルを低下させ¹⁶⁾¹⁷⁾、甲状腺肥大や甲状腺機能障害を発現することも明らかにしている。

一方、PCB の水酸化反応で 4-位塩素の NIH シフトによって生成する 4-OH 体は血液残留性が高いこと

が知られている⁶⁾²¹⁾。例えば、著者らは 3,3',4,4'-tetraCB (CB 77) の水酸化代謝反応で生成する 4-OH 体はラット血液中に未変化体の約 35 倍高いレベルで残存することを明らかにした⁹⁾。この残留メカニズムは PCB 水酸化代謝物が血液中のサイロキシン (T_4) と類似構造を有するために輸送タンパク質 (トランスサイレチン, TTR) と競合的に結合することによると考えられ、これによって甲状腺ホルモン代謝を妨害することが示されている⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁸⁾。さらに、残留性の高い PCB 水酸化体は抗エストロゲン作用を示すことも報告されている²³⁾²⁶⁾。このようなことから、PCB の毒性発現、とくに酵素誘導や内分泌かく乱作用に MeSO_2 -PCB や OH-PCB 代謝物が関与している可能性がある。著者らは PCB 汚染によるヒトや野生動物体内で生成する代謝物の生体影響研究の一環として、PCB の代謝物の組織残留特性をラットを用いて調べ、これまでに CB 77 以外に、mono-ortho-PCB (CB 105, CB 118 および CB 156) からも NIH シフトによって生成する 4-水酸化体が血液残留性を示すことを明らかにしてきた¹¹⁾。

今回、高毒性の coplanar PCB, 3,3',4,4',5-pentaCB (CB 126) および 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl (CB 128) について、ラット *in vivo* 代謝研究を行い、生成する代謝物の組織残留特性について検討した。

実験方法

1. 実験材料

CB 126 および CB 128 は Cadogan の方法⁷⁾によって、またメトキシ (MeO) 体および MeSO_2 体は既報²¹⁾³⁾に従って合成した。溶媒はすべて残留農薬試験用を用いた。内標準物質として 2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB および 4-methyl-3- MeSO_2 -2',3',4',5,5'-pentaCB を用いた。

2. 実験動物

動物は Wistar 系雄性ラット (体重 200 g) を用いた。投与物質はパナセート 810 に溶解し、40 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の用量で腹腔内に単回投与した。投与後、フンを毎日採取し、4 日後に血液、肺、肝臓、腎臓、脂肪組織を摘出し、分析用試料とした。

3. PCB 代謝物の抽出・精製

既報¹¹⁾に準じて試料の精製を行った。すなわち、内

標準物質を加えたヘキサン：アセトン (1 : 2) 液を用いて、フンはソックスレー抽出を、組織についてはホモジナイズ抽出を行い、gel permeation chromatography (GPC) によって代謝物分画を分取した。これをヘキサン溶液とし、2M KOH/ethanol (7 : 3) 水溶液でフェノール性代謝物を抽出した。この抽出液は HCl 酸性溶液にした後、ヘキサンで再抽出し、ジアゾメタンでメチル化した後、ヘキサン層 (中性分画) と合わせて、GC/MS および GC/ECD 分析の試料とした。

4. 定性、定量分析

(1) GC/MS

代謝物の定性は日本電子 JMS-AX505 質量分析計-JMA-DA5000 データシステムを用いて、EI モードで行った。GC カラムは DB-5 (60 m x 0.25 mm, i. d., J&W Scientific) を用い、splitless モードで注入した。カラム温度は最初 70°C で 2 分間保持し、20°C/min で 240°C に、その後、4°C/min で 290°C に昇温し一定に保った。定性分析は合成した標準品 (MeO 体および MeSO_2 体) の GC 保持時間およびマススペクトルを比較して行った。

(2) GC/ECD

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

結果

1. CB126

CB126 を投与した後 3~4 日のフン抽出物を GPC 処理した後の ECD ガスクロマトグラムを Fig. 1 に示す。5 種類のピーク (A~E) について、それぞれマススペクトルを測定した結果を Fig. 2 に示す。ピーク A は m/z 306 に、ピーク B, C は m/z 340 に分子イオンを与え、それぞれ 4 塩素化および 5 塩素化の水酸化体であると推定された。一方、ピーク D, E はいずれも m/z 370 に分子イオンピークを与えるため、5 塩素化のメチルチオ (MeS) 体と推定された。そのうちピーク D は特徴的なフラグメントイオン (M^+-50) を与えるので、6-位 MeS 体と推定された。GPC 処理液をヘキサン/アルカリ水溶液で分配抽出すると、ピーク A,

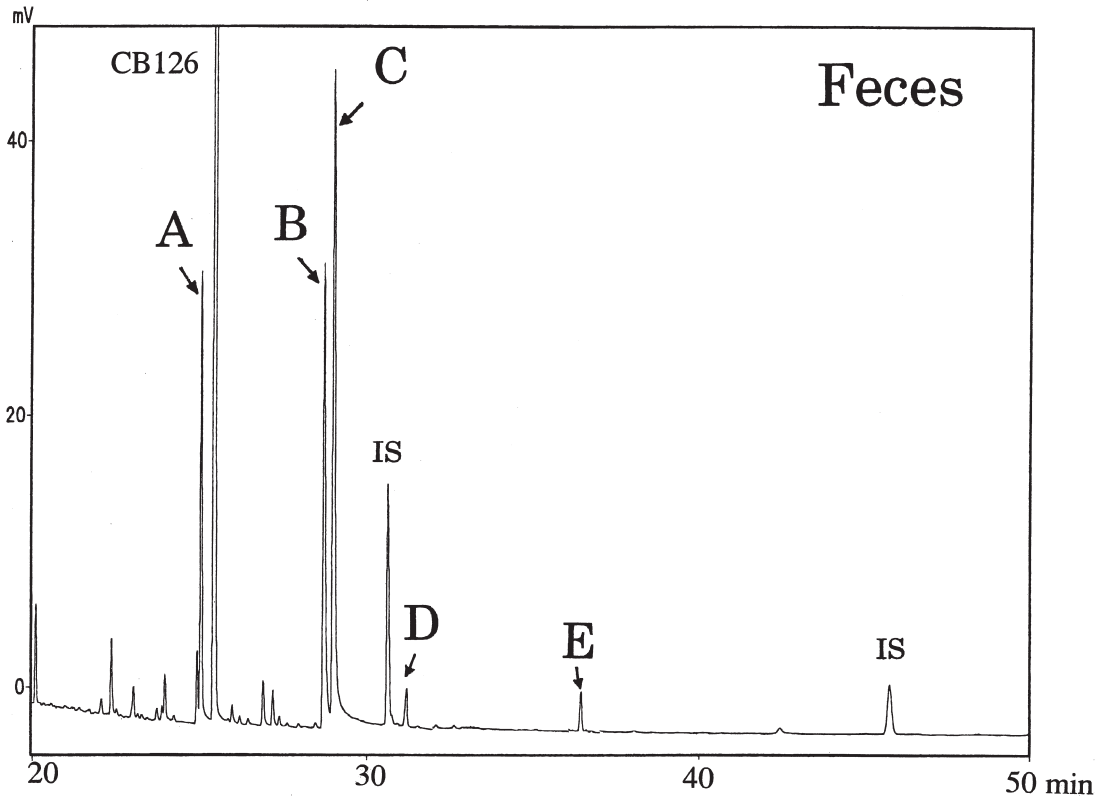


Fig. 1 ECD gas chromatogram of fecal extracts (days 3-4) from rats dosed with 3,3',4,4',5-pentaCB.

B, Cは水層へ分配されるため、ジアゾメタンでメチル化してMeO体として同定した。ピークD, Eについては過酸化水素で酸化してMeSO₂体として定性・定量した。その結果、フン中に排泄される3種類の水酸化代謝物は、4-OH-3,3',4',5'-tetraCB, 4-OH-3,3',4',5,5'-pentaCB, 5-OH-3,3',4,4',5'-pentaCBと同定され、約1:7:2の割合で排泄されていた。一方、ピークD, Eはそれぞれ6-MeS-および5-MeS-3,3',4,4',5'-pentaCBと同定され、それぞれ2:1の割合で排泄された。これらの4日間のフン排泄量は未変化体0.81%, 水酸化体0.45%, MeS体0.02%であった。

組織中の代謝物の検索を行った結果、水酸化体では4-OH-3,3',4',5,5'-pentaCBのみが血液、肝臓、肺および腎臓から検出された。含硫代謝物については、5-MeSO₂-3,3',4,4',5'-pentaCBが肝臓から微量に検出されるのみであった。血液および肝臓における代謝物のガスクロマトグラムをFig. 3に示す。また組織中の未

変化体および代謝物の濃度をTable 1に示す。各組織とも未変化体はかなり高濃度で残留していたが、水酸化体/未変化体の濃度比は血液で1:1.2, 肝臓1:162, 肺1:126, 腎臓1:145であった。血液中の4-OH体の濃度は肝臓のそれよりも約5倍高く、CB 126由来の水酸化代謝物は血液残留性が極めて高いことが示された。

2. CB128

CB128を投与した後3~4日のフンから抽出した代謝物のECDガスクロマトグラムをFig. 4に示す。これはGPC処理後、酸性物質をヘキサン/KOH水溶液で分配抽出して、ジアゾメタンでメチル化後、中性分画と合わせた後のクロマトグラムである。Fig. 4中の3種類のピーク(F, G, H)について、そのマススペクトルを測定するとFig. 5に示す結果が得られた。ピークFはm/z 388に分子イオンを与え、6塩素化MeO体と推定された。ピークG, Hはm/z 404に分

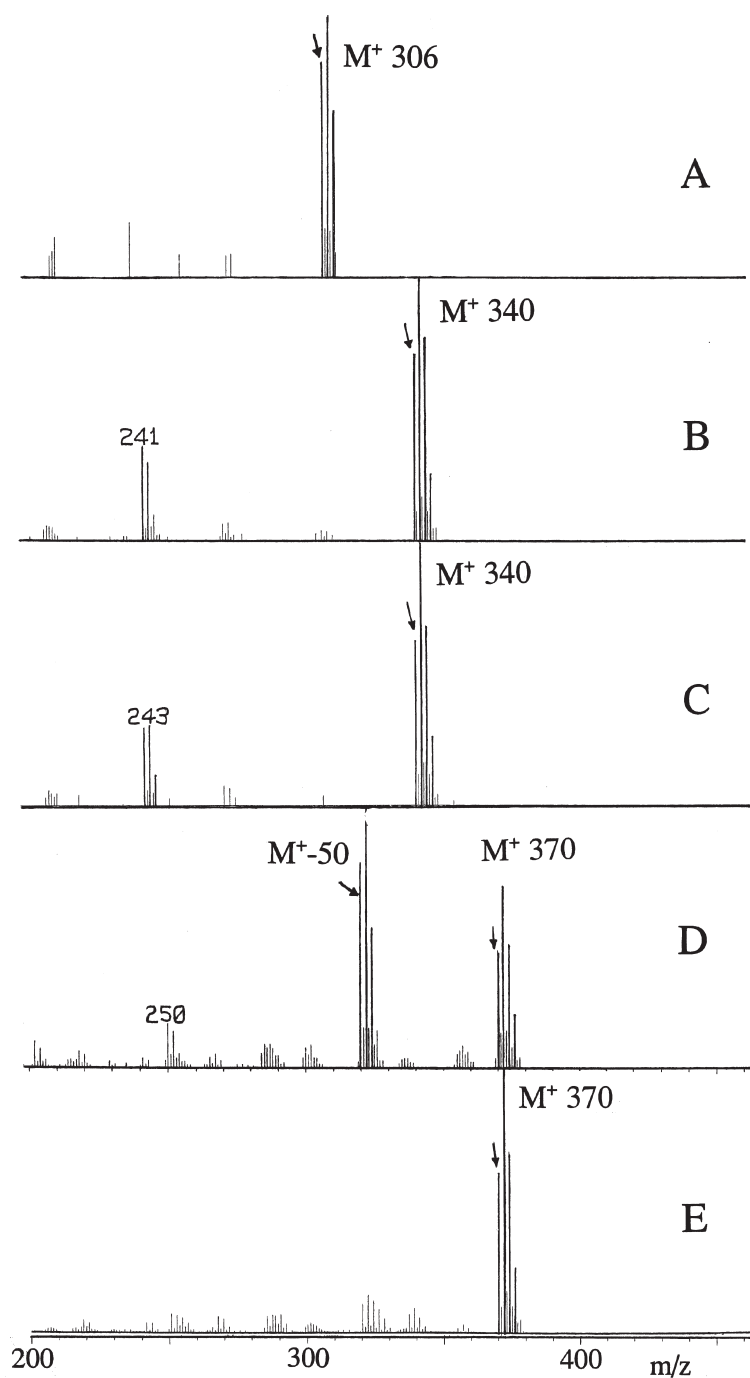


Fig. 2 Mass spectra of metabolites (peaks A-E) in Fig. 1.

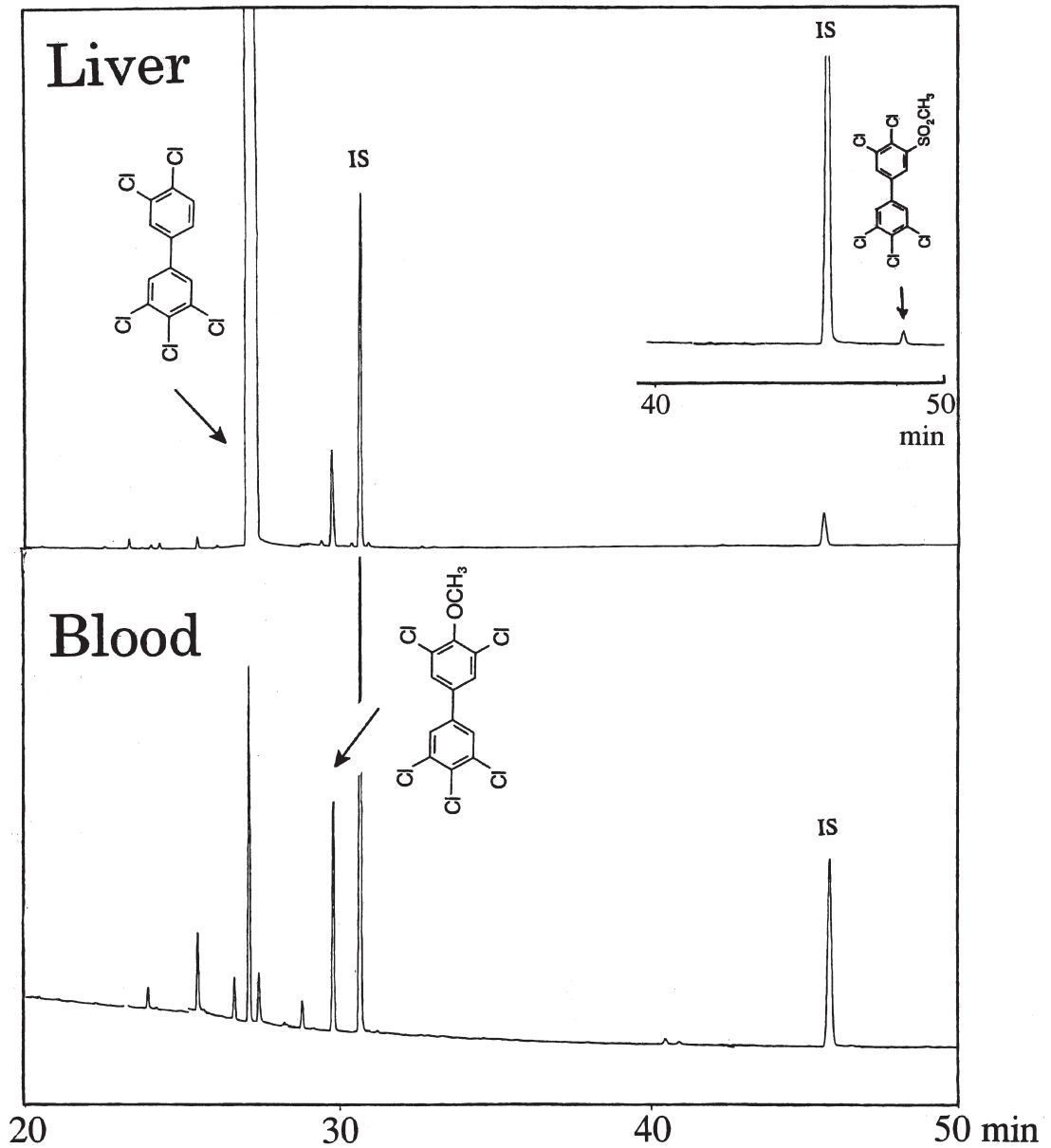


Fig. 3 ECD gas chromatogram of metabolites in liver and blood of rats dosed with 3,3',4,4',5-pentaCB.

子イオンを与えるので6塩素化のMeS体と推定された。そのうちピークGは特徴的なフラグメントイオン(M^+-35 , M^+-50)を含むことから、6位MeS-体であると推定された。最終的にピークG, Hは、過酸化水素で酸化して $MeSO_2$ 体として標準物質と比較し、定量した。その結果、フン中に排泄される代謝物の構造

は5-OH-, 5-MeS-および6-MeS-2,2',3,3',4,4'-hexaCBと同定され、これらの排泄比率は約5:5:1で4日間の排泄量は未変化体2.8%, 水酸化体0.77%, MeS体0.71%であった。

組織中の代謝物の検索を行ったところ、5-OH-2,3,4,2',3',4'-hexaCBが微量に肝臓で検出されただけで、他

Table 1 Tissue concentrations of unchanged CB and its hydroxy metabolite in rats dosed with 3,3',4,4',5-pentaCB and 2,2',3,3',4,4'-hexaCB.

Compounds	Concentration (nmol/g, wet weight)				
	Blood	Liver	Lung	Kidney	Adipose tissue
3,3',4,4',5-pentaCB					
unchanged CB	0.35±0.11	9.71±3.20	2.52±0.42	4.34±1.37	308±105
4-OH-3,3',4',5,5'-pentaCB	0.28±0.13	0.06±0.02	0.02±0.01	0.03±0.01	nd ^{a)}
2,2',3,3',4,4'-hexaCB					
unchanged CB	0.11±0.08	4.45±1.72	3.70±1.77	5.53±0.77	417±129
5-OH-2,2',3,3',4,4'-hexaCB	nd	0.01	nd	nd	nd

Each value represents the mean ± SD for four rats. ^{a)} not detected

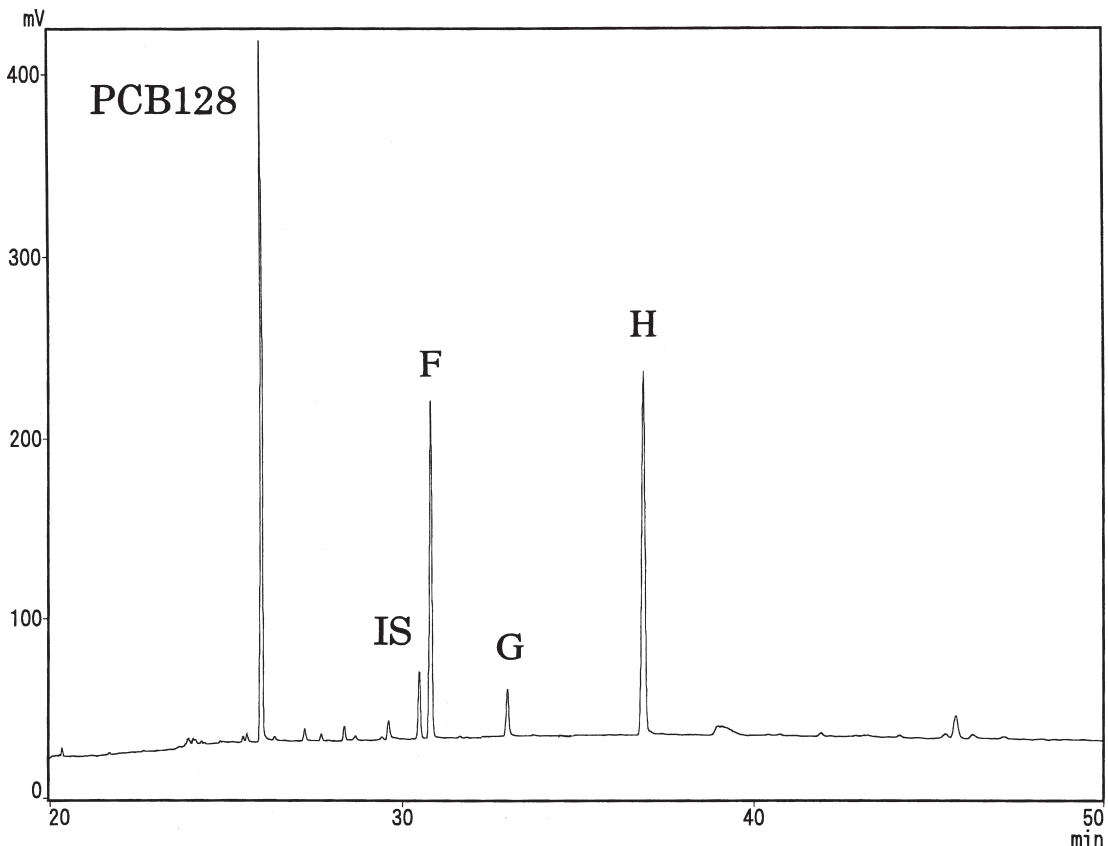


Fig. 4 ECD gas chromatogram of fecal extracts (days 3-4) from rats dosed with 2,2',3,3',4,4'-hexaCB.

の組織および血液からはいずれの代謝物も検出されなかった (Table 1)。

考 察

本研究において、CB 126 の代謝物としてラットのフン中から 3 種類の水酸化体を単離した。その生成機序

は 3,4-エポキシ化につづく 4-位塩素の NIH シフト並びに脱塩素化に伴う 4-位水酸化、さらに直接 3 位に水酸基の導入による 3-位水酸化が考えられる。主成分は 4-OH-3,3',4',5,5'-pentaCB で、この結果は Koga らのラット代謝実験結果²⁴⁾と一致する。これまで行ってきた CB 77, CB 105, CB 118, CB 156 の代謝研究⁹⁾¹¹⁾

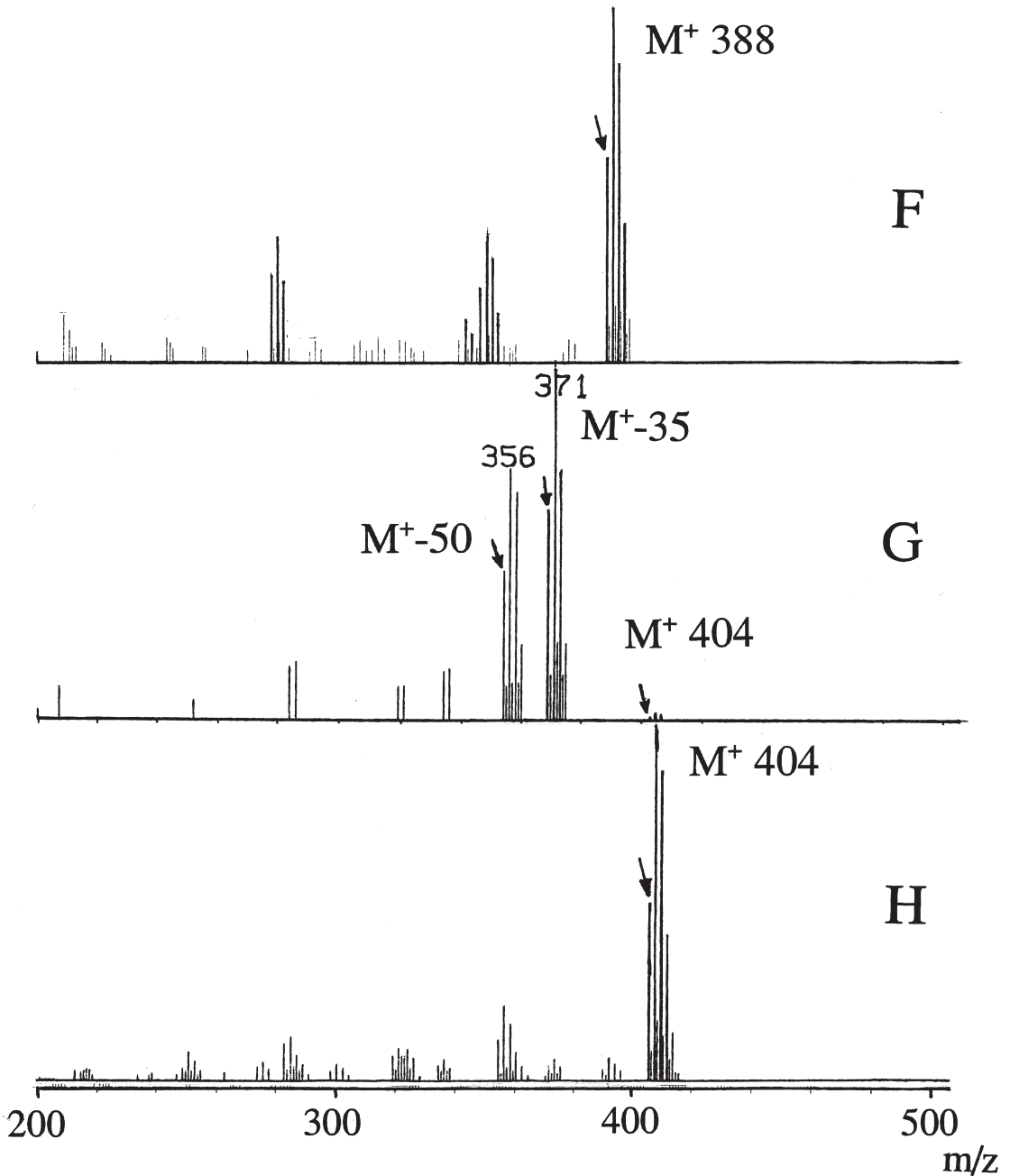


Fig. 5 Mass spectra of metabolites (peaks F-H) in Fig. 4.

でも同様の代謝様式を示し、3,4-位に塩素置換骨格をもつ PCB の代謝様式は類似しているものと考えられる。

2,3,4-位に塩素置換された CB 128 の代謝反応では、NIH シフトによる 4-位水酸化反応を受けにくく、5-OH 体のみが生成した。これと同様の反応機序を示す

異性体としては 2,2',3,4,4',5'-hexaCB があり、この場合、2,4,5-位の塩素置換骨格が優先して 3-位水酸化をおこなすが、2,3,4-位の塩素置換骨格側の代謝反応では 5-OH 体のみを与える¹⁰⁾。一方、CB 105 の水酸化反応¹⁰⁾²²⁾は、2,3,4-位の塩素置換骨格が 3,4-位の塩素置換骨格より優先し、この場合、4 位塩素の NIH シフトによる 4-位水酸化が優位におこる。このような 4-位水酸化の基質特異性は 2,3,4-位塩素置換と反対側骨格の *ortho* 位塩素の有無に大きく依存していると考えられる。

生成した水酸化体のうち、CB 126 から得られる 4-OH 体は高い血液残留性を示した。著者らは、他の non-*ortho*-PCB (CB 77), mono-*ortho*-PCB (CB 105, CB 118, CB 156) から得られる 4-OH 体も高い血液残留性を示すことを明らかにしている¹¹⁾。これらはいずれも 4-位塩素の NIH シフトによる 4-位水酸化によるものである。血液における CB 126 の代謝物/未変化体の残留比は 0.8 を示した。この数値は CB 77 (35.1), CB 105 (11.2), CB 118 (7.4), CB 156 (0.7) にくらべてそれほど高くはない。しかし、残留 PCB と同レベルの水酸化体が血液に存在することから、その生体に対する影響についての検討が必要である。Koga ら²⁴⁾は CB 126 から生じる 4-OH 体の毒性評価を行い、解毒的に作用することを報告しているが、ホルモンの代謝に影響を及ぼすかどうかについては不明である。この血液残留メカニズムは、OH 基の両隣に塩素が置換した代謝物が血液サイロキシンと類似構造を有するため、輸送タンパク (TTR) と競合的に結合することに関連すると思われる。Lans ら²⁵⁾は 11 種類の PCB 水酸化体について *in vitro* 系でヒト TTR への結合能を調べ、その構造依存性を明らかにしている。それによると、今回同定した 4-OH-3,3',4,5,5'-pentaCB のヒト TTR へ親和力は T₄ よりも約 8 倍高い。Morse ら²⁷⁾は PCB (Aroclor 1254) を投与した妊娠ラットでは、その胎仔に OH-PCB が高濃度で移行し、胎仔の血漿および脳の T₄ レベルを顕著に低下させることを報告している。ヒトや野生動物体内には依然として高濃度の PCB が残留しているので、PCB に由来する OH 体の血液残留および胎児移行も十分予想される。今後、PCB の内分泌かく乱作用に残留性代謝物がどのように関与しているか詳細に検討

する必要がある。

総 括

CB 126 および CB 128 をラット腹腔内に単回投与 (40 μ mol/kg) した後、フン中および 4 日後の組織中の代謝物の検索を行い、次のような知見を得た。

1. CB 126 投与後のフン抽出物から 5 種類の代謝物、4-OH-3,3',4',5'-tetraCB, 4-OH-3,3',4',5,5'-pentaCB, 5-OH-3,3',4,4',5'-pentaCB, 5-MeS-3,3',4,4',5'-pentaCB, 6-MeS-3,3',4,4',5'-pentaCB を単離した。そのうち 4-OH-3,3',4',5,5'-pentaCB だけが血液、肝臓、肺、腎臓から検出された。特に、4-OH 体/未変化体の濃度比は血液で 1:1.3 であり、この代謝物は極めて高い血液残留性を示すことが分かった。含硫代謝物では 5-MeSO₂-3,3',4,4',5'-pentaCB が肝臓で微量に検出された。

2. CB 128 投与後のフン抽出物から 3 種類の代謝物、5-OH-2,2',3,3',4,4'-hexaCB, 5-MeS-2,2',3,3',4,4'-hexaCB, 6-MeS-2,2',3,3',4,4'-hexaCB を単離した。組織中には 5-OH 体が肝臓中に微量に検出されたのみで、これらの代謝物の血液、組織残留性は低いことが示された。

文 献

- 1) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuroki H: Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspect.* 102: 464-469, 1994.
- 2) Bergman Å, Klasson-Wehler E, Kuroki H and Nilsson A: Synthesis and mass spectrometry of some methoxylated PCB. *Chemosphere* 30: 1921-1938, 1995.
- 3) Bergman Å, Norstrom RJ, Haraguchi K, Kuroki H and Béland P: PCB and DDE methyl sulfones in mammals from Canada and Sweden. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 121-128, 1994.
- 4) Brouwer A and van den Berg KJ: Binding of a metabolite of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85: 301-312, 1986.
- 5) Brouwer A, Klasson-Wehler E, Bokdam M, Morse DC and Traag WA: Competitive inhibition of thyroxine binding to transthyretin by monohy-

droxy metabolites of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere* 20 : 1257-1262, 1990.

6) Brower A, Morse DC, Lans MC, Schuur G, Murk AJ, Klasson-Wehler E and Bergman Å : Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system : Mechanism and possible consequences for animal and human health. *J. Toxicol. Ind. Health* 14 : 59-85, 1998

7) Cadogan JIG : A convenient new method of aromatic arylation. *J. Chem. Soc.* 4257-4258, 1962.

8) 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.

9) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R and Masuda Y : Metabolism of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl via sulphur-containing pathway in rats : liver-specific retention of methylsulfonyl metabolite. *Xenobiotica* 27 : 831-842, 1997.

10) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R and Masuda Y : Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls with 2,4,5-trichloro-substitution in rats : Regioselective formation of hydroxy metabolites with high blood affinity. *Organohalogen Compounds* 37 : 401-404, 1998.

11) 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.

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

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

14) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Masuda Y and Kimura R : Induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem.-Biol. Interact.* 95 : 257-268, 1995.

15) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Isogai M, Masuda Y and Kimura R : Characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with methylsulfonyl

metabolites of polychlorinated biphenyl congeners. *Chem.-Biol. Interact.* 95 : 269-278, 1995.

16) Kato Y, Haraguchi K, Shibahara T, Masuda Y and Kimura R : Reduction of thyroid hormone levels by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Arch. Toxicol.* 72 : 541-544, 1998.

17) Kato Y, Haraguchi K, Shibahara T, Yumoto S, Masuda Y and Kimura R : Reduction of thyroid hormone levels by methylsulfonyl metabolites of tetra- and pentachlorinated biphenyl in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* in press, 1999.

18) Kato Y, Haraguchi K, Tomiyasu K, Saito H, Isogai M, Masuda Y and Kimura R : Structure-dependent induction of CYP2B1/2 by 3-methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3 : 137-144, 1997.

19) Kato Y, Kenne K, Haraguchi K, Masuda Y, Kimura R and Warngard L : Inhibition of cell-cell communication by methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rat liver epithelial IAR20 cells. *Arch. Toxicol.* 72 : 178-182, 1998.

20) Klasson-Wehler E, Bergman Å, Bergman Å, Athanasiadou M, Ludwig JP, Auman HJ, Kannan K, van den Berg M, Murk AJ, Feyk LA and Giesy JP : Hydroxylated and methylsulfonyl polychlorinated biphenyl metabolites in albatrosses from Midway atoll, North Pacific Ocean. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 : 1620-1625, 1998.

21) Klasson-Wehler E, Bergman Å, Brandt I, Darnerud PO and Wachtmeister CA : 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl : excretion and tissue retention of hydroxylated metabolites in the mouse. *Drug Metab. Dispos.* 17 : 441-448, 1989.

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

23) Kramer VJ, Helferich WG, Bergman Å, Klasson-Wehler E and Giesy JP : Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites are anti-estrogenic in a stably transfected human breast adenocarcinoma (MCF7) cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144 : 363-376, 1997.

24) 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.

25) Lans MC, Klasson-Wehler E, Willemsen M, Meussen E, Safe S and Brouwer A: Structure-dependent, competitive interaction of hydroxy-polychlorobiphenyls, -dibenzo-*p*-dioxins and -dibenzofurans with human transthyretin. *Chem.-Biol. Interact.* 88: 7-21, 1993.

26) Moore M, Mustain M, Daniel K, Chen I, Safe S, Zacharewski T, Gillesby B, Joyeux A and Balaguer P: Antiestrogenic activity of hydroxylated polychlorinated biphenyl congeners identified in human serum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142: 160-168, 1997.

27) Morse DC, Klasson-Wehler E, Wesseling W, Koeman JH and Brouwer A: Alterations in rat

brain thyroid hormone status following pre- and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136: 269-279, 1996.

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

29) Weistrand C and Norén K: Methylsulfonyl metabolites of PCBs and DDE in human tissues. *Environ. Health Perspect.* 105: 644-649, 1997.

(受付 1999-3-25)

動物肝ミクロゾームによる四塩素化ビフェニル代謝の比較検討

中村学園大学家政学部食物栄養学科
古賀 信幸・金丸 知代・大石 奈穂子
松島 優子・加藤 祥子・吉村 英敏
第一薬科大学環境化学教室
黒 木 広 明

Comparative Study on Metabolism of Three Tetrachlorobiphenyls with Animal Liver Microsomes

Nobuyuki KOGA, Tomoyo KANAMARU, Nahoko OISHI, Yuko MATSUSHIMA,
Sachiko KATO and Hidetoshi YOSHIMURA

Department of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen University,
5-7-1 Befu, Johnan-ku, Fukuoka, 814-0198

Hiroaki KUROKI

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

Abstract *In vitro* metabolism of 3,5,3',4'-, 3,5,3',5'- and 2,4,3',4'-tetrachlorobiphenyls (TCBs) was studied using liver microsomes from rats, guinea pigs and hamsters.

3,5,3',4'-TCB was metabolized to 4-hydroxy-3,5,3',4'-TCB with liver microsomes of 3-methylcholanthrene (MC)- and 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB)-treated rats but not of phenobarbital (PB)-treated ones. This result suggests that a MC-inducible cytochrome P450 isoform, probably CYP1A1, is more important in the *in vitro* metabolism of 3,5,3',4'-TCB in rat liver and that the isoform attacks the 3,5-dichloro-substituted phenyl ring more predominantly than 3,4-dichloro-substituted one. In 3,5,3',5'-TCB metabolism, liver microsomes from MC- and 3,4,5,3',4'-PenCB-treated hamsters formed 4-hydroxy-3,5,3',5'-TCB to a similar extent to rats reported previously. Guinea pig liver microsomes formed no metabolite. In 2,4,3',4'-TCB metabolism, PB accelerated 3-, 5- and 4-hydroxylations in guinea pigs and also 3- and 5-hydroxylations in hamsters, suggesting the involvement of a PB-inducible P450 isoform, presumably P450GP-1 and P450HPB-1, respectively. On the other hands, MC- and 3,4,5,3',4'-PenCB-treatment resulted in the marked increase of 4-hydroxylation in hamsters, but in the suppression of 4-hydroxylation in guinea pigs.

From these results, it is suggested that the hydroxylation of coplanar TCBs such as 3,5,3',4'- and 3,5,3',5'-TCB is catalyzed by a MC-inducible P450 in rats and hamsters, whereas non-coplanar TCBs such as 2,4,3',4'-TCB which possesses both PB- and MC-like inducing ability of liver enzymes are metabolized by one or more kinds of P450 isoform induced by PB and MC.

はじめに

周知の通り、ポリ塩素化ビフェニル (PCB) はカネミ油症の原因物質であるとともに地球規模の環境汚染

物質である。一般に、PCB は生体内において、まず肝ミクロゾームに局在するチトクロム P450 (P450) によって芳香環の酸化を受け、一水酸化体、ジオール体、ジヒドロジオール体、及びメチルチオ体やメチルスル

フォン体などのS含有代謝物などへと代謝される²²⁾が、PCBの塩素数が増加するにつれて代謝されにくくなり、脂肪組織、肝臓あるいは肺などに蓄積されることになる。

PCBのうち、3,4,3',4'-四塩素化ビフェニル(TCB)、3,4,5,3',4'-五塩素化ビフェニル(PenCB)及び3,4,5,3',4',5'-六塩素化ビフェニル(HCB)等は2つのベンゼン環が同一平面上にあることからcoplanar PCBといわれ、2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-p-ジオキシンと同様の強い毒性を示す。実験動物では、顕著な体重減少、肝肥大、胸腺・脾臓の萎縮、肝中性脂肪の増加、ニワトリでの心嚢水腫、腹水及びポルフィリン症が観察されている²⁶⁾。一方、2(2')位及び6(6')位に1個以上塩素が置換されたPCB、すなわちnon-coplanar PCBはそれ自身毒性は強くないものの、代謝活性化の例がいくつか報告されている。例えば、2,4,3',4'-TCBの主代謝物5-水酸化体がマウスに対し、母化合物の数倍の急性毒性(LD₅₀)を有することが明らかにされた³⁴⁾。また、2,5,2',5'-TCB代謝物の3,4-エポキシド体と4-水酸化体とが培養細胞の成長を母化合物より強く阻害することも報告された³¹⁾。

最近、PCB代謝物の毒性として内分泌攪乱作用が注目されている。Brouwerら³⁴⁾とRichenbacherら²⁸⁾は3,5-二塩素置換PCBの4-水酸化体が血中の甲状腺ホルモン運搬タンパク質のtransthyretinに高い親和性を有することを明らかにし、その結果として血中甲状腺ホルモン(T₃, T₄)の減少がもたらされることを報告した。また、多くの研究グループにより、ある種のPCBの水酸化体が女性ホルモン(エストロゲン)様作用、あるいは逆に、抗エストロゲン様作用を有していることが明らかにされた⁵⁾⁹⁾²³⁾。さらに、加藤らは、2,5-二塩素置換PCB代謝物の3-メチルスルフォ

ン体が、肝へ特異的に蓄積し、加えて母化合物より数100倍もの強いフェノバルビタール(PB)型P450誘導能を有していることを報告した¹¹⁾¹²⁾。この事実は誘導されたP450によって代謝される各種ホルモンの生体恒常性に何らかの影響を及ぼすことを示唆している。このように、PCB代謝物の毒性評価は今やPCB研究の重要課題の1つとなってきている。

TCBはカネミ油症の原因となったPCB製品(Kanechlor 400)の主要な構成成分であり、比較的代謝されやすい。これまで当研究室では、数種類のTCBの肝における代謝経路を明らかにする¹⁴⁾¹⁹⁾³⁵⁾³⁶⁾とともに、TCB代謝に関与するP450分子種を報告してきた。一般に、PCBはP450分子種のうち、大きく2つのサブファミリー、すなわちCYP1A及びCYP2Bサブファミリー、によって水酸化される²⁾⁶⁾⁸⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁸⁾²⁰⁾²⁵⁾が、ハムスター肝においてはCYP2A8が新たにPCB代謝酵素として加わることが明らかとなった¹⁶⁾¹⁷⁾。

本研究ではさらに、Fig. 1に示す3種類のTCBを用いて、以下の検討を加えた。まず3,5,3',4'-TCBのラット肝ミクロゾームによる代謝を調べることにより、3,5-あるいは3,4-二塩素置換ベンゼン環のどちらが酸化されやすいかを調べた。さらに、3,5,3',5'-及び2,4,3',4'-TCBについては代謝に関与するP450分子種を特定するために、ハムスター及びモルモット肝ミクロゾームによる代謝を調べ、ラットと比較した。

実験方法

1. 実験材料

(1) 基質の合成

2,4,3',4'-TCBの合成は佐伯ら²⁹⁾の方法により行った。3,5,3',5'-TCBの合成は既報²⁰⁾のように行った。P450誘導剤としての3,4,5,3',4'-PenCBは佐伯

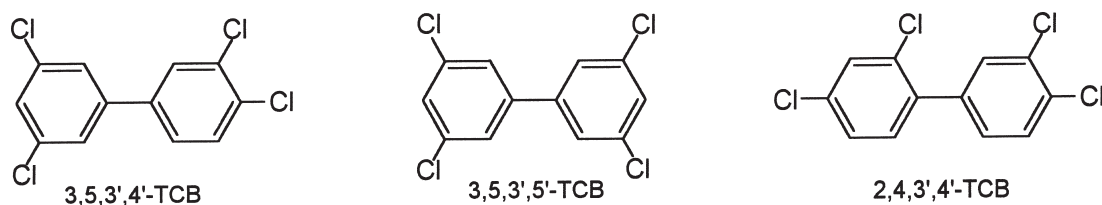


Fig. 1 Chemical structures of tetrachlorobiphenyls used in this study.

ら³⁰⁾の方法に従って合成した。また、3,5,3',4'-TCBの合成は3,5-dichloroanilineを亜硝酸ナトリウムでジアゾ化した後、*o*-dichlorobenzeneを加えて、130°C、2時間反応させて行った。反応後、クロロホルムで抽出し、この抽出液をシリカゲルカラム(2.8×30 cm)にかけて精製した。溶出液を電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー(GC/ECD)にて調べたところ、*n*-ヘキサン溶出画分に2種類の生成物が確認されたので、さらにHPLCによりそれぞれを分離した。HPLC条件は次の通りである。ポンプ、Waters 510(Waters製)；UV検出器、Waters 484(Waters製)；カラム、Wakosil C18(10×250 mm, 5 μm, 和光純薬製)；溶離液、90%メタノール-0.1 M NaHPO₄(pH 3.5)；流速、2 ml/min；検出波長、254 nm。2種類の生成物はHPLCにおける保持時間が51.5 min及び66.5 minであり、GC/MS及び¹H-NMRの結果、それぞれ3,5,2',3'-TCB及び3,5,3',4'-TCBと同一とされた。

3,5,3',4'-TCB：¹H-NMR(500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.368 (1 H, dd, J=8.33 Hz, 2.27 Hz, 6'-H), 7.380 (1 H, d, J=2.27 Hz, 4-H), 7.413 (2 H, d, J=1.76 Hz, 2-H&6-H), 7.530 (1 H, d, J=8.33 Hz, 5'-H), 7.627 (1 H, d, J=2.27 Hz, 2'-H)；MS (EI) *m/z* (relative intensity) 290 (100) [M⁺], 292 (135) [M⁺+2], 294 (58) [M⁺+4], 220 (47) [M⁺-Cl₂].

3,5,2',3'-TCB：¹H-NMR(500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.194 (1 H, dd, J=7.82 Hz, 1.51 Hz, 4'-H), 7.267 (1 H, t, J=7.82 Hz, 5'-H), 7.293 (2 H, d, J=2.02 Hz, 2-H&6-H), 7.405 (1 H, t, J=2.02 Hz, 4-H), 7.509 (1 H, dd, J=8.07 Hz, 1.51 Hz, 6'-H)；MS (EI) *m/z* (relative intensity) 290(100) [M⁺], 292(124) [M⁺+2], 294(62) [M⁺+4], 220 (61) [M⁺-Cl₂].

(2) 代謝物の合成

3,5,3',5'-TCBの4-水酸化体の合成は既報²⁰⁾に従って行った。3-hydroxy-及び5-hydroxy-2,4,3',4'-TCBはYamamotoとYoshimura³⁴⁾の方法に従い、また4-hydroxy-2,5,3',4'-TCBは既報²¹⁾に従って合成した。一方、4-hydroxy-3,5,3',4'-TCBの合成は次のように行った。すなわち、2,6-dichloro-4-amino-

phenolを亜硝酸ナトリウムでジアゾ化した後、*o*-dichlorobenzeneを加えて、130°C、2時間反応させた。反応後、上記3,5,3',4'-TCB合成の場合と同様に、HPLCにより3種類の生成物(S-1, S-2, S-3)が得られた。HPLC条件は前述のとおりである。S-1, S-2及びS-3のHPLCにおける保持時間はそれぞれ、19.3 min, 23.9 min及び30.7 minであった。GC/MS及び¹H-NMRの結果、最終的にS-1はmonohydroxy-三塩素化ビフェニル(TriCB)、S-2は4-hydroxy-3,5,2',3'-TCB、S-3が目的の4-hydroxy-3,5,3',4'-TCBであった。

4-Hydroxy-3,5,3',4'-TCB：¹H-NMR(500 MHz, chloroform-*d*) δ 5.924 (1 H, s, OH), 7.326 (1 H, dd, J=2.27 Hz, 8.32 Hz, 6-H), 7.453 (2 H, s, 2-H&6-H), 7.501 (1 H, d, J=8.32 Hz, 5'-H), 7.854 (1 H, d, J=2.27 Hz, 2'-H)；メチル誘導体MS (EI) *m/z* (relative intensity) 320 (100) [M⁺], 322 (141) [M⁺+2], 324 (69) [M⁺+4], 305 (114) [M⁺-CH₃], 277 (41) [M⁺-COCH₃], 207 (56) [M⁺-COCH₃Cl₂].

4-Hydroxy-3,5,2',3'-TCB：¹H-NMR(500 MHz, chloroform-*d*) δ 5.941 (1 H, s, OH), 7.188 (1 H, dd, J=1.76 Hz, 7.82 Hz, 4'-H), 7.248 (1 H, t, J=7.82 Hz, 5'-H), 7.335 (2 H, s, 2-H&6-H), 7.482 (1 H, dd, J=1.76 Hz, 7.82 Hz, 6'-H)；メチル誘導体MS (EI) *m/z* (relative intensity) 320(100) [M⁺], 322(121) [M⁺+2], 324(55) [M⁺+4], 305 (78) [M⁺-CH₃], 277 (30) [M⁺-COCH₃], 207 (43) [M⁺-COCH₃Cl₂].

2. 薬物投与

Wistar系雄性ラット(体重約150 g)、Hartley系雄性モルモット(体重約250 g)及びGolden syrian系雄性ハムスター(体重約85 g)に、P450誘導剤としてPB(80 mg/kg/day, 3日間)、3-メチルコラントレン(MC)(20 mg/kg/day, 3日間)あるいは3,4,5,3',4'-PenCB(5 mg/kg, 1回投与)を腹腔内に投与した。ただし、モルモットへの3,4,5,3',4'-PenCBの投与量は、毒性が強く発現するため、0.1 mg/kgとした。PBは生理食塩水に、MCと3,4,5,3',4'-PenCBはコーン油に溶解した。PB及びMC前処理動物は最終投与後翌日に、3,4,5,3',4'-PenCB前処理動物の場合、投与後

5日目に屠殺し、常法により肝ミクロゾームを調製した。

3. TCB 代謝活性

肝ミクロゾームによる代謝は既報⁹⁾に準じて行った。すなわち、40 μ M TCB を牛血清アルブミン (0.8 mg/ml), NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM グルコース-6-リン酸, グルコース-6-リン酸脱水素酵素 0.1 unit), 肝ミクロゾーム (1 mg protein) とともに 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中, 37°C で 20 分間インキュベート後, 代謝物をクロロホルム-メタノール (2:1) と *n*-ヘキサンで抽出した。抽出液はメチル化あるいはトリメチルシリル (TMS) 化後, GC/ECD に付した。メチル化はオンカラムメチル化剤の phenyltrimethylammonium hydroxide (PTAH, ジェールサイエンス製) を試料に添加し, GC の注入口部分で行った。TMS 化は PCB 代謝物を *n*-ヘキサンで溶解した後, *N,O*-bis (trimethylsilyl) acetamide (BSA, ジェールサイエンス製) を添加し, 80°C, 20 分反応させて行った。なお, 代謝物の定性・定量には ECD 付 HP5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製) を用いた。GC/ECD 条件は次の通りである。カラム, DB-1 fused silica capillary column (15 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 200°C; 注入口温度, 250°C; 検出器温度, 250°C; キャリアーガス, N₂ (1 ml/min)。

4. その他の分析機器

(1) GC/MS

代謝物の定性には Hewlett-Packard 製の質量分析計付 HP5890 ガスクロマトグラフを用いて, EI モードで行った。GC/MS 条件は次の通りである。カラム, DB-1 fused silica capillary column (15 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m 膜厚); 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) 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, tetramethylsilane を内部標準物質として用いた。

実験結果

1. 3,5,3',4'-TCB の代謝

ラット肝ミクロゾームを用いて, 3,5,3',4'-TCB の代謝を調べた。肝ミクロゾームとして PB 及び 3,4,5,3',4'-PenCB 前処理ラットより調製したものを用いた。Fig. 2 に TMS 誘導体のガスクロマトグラムを示す。

その結果, PB 及び 3,4,5,3',4'-PenCB 前処理ミクロゾームのいずれでも, 代謝物と思われる 1 本のピークが保持時間 18.20 min に検出された。以下これを M-1 とする。M-1 は PB よりは 3,4,5,3',4'-PenCB 前処理ミクロゾームで著しく増加した。なお, 同様に MC 前処理ミクロゾームを用いて, インキュベーション時間 2 時間までの M-1 の生成量を調べたところ, M-1 はインキュベーション時間に比例して, 2 時間まで直線的に増加し, これが代謝物であることが明らかとなった (データ未掲載)。

M-1 の化学構造を明らかにするため, 予想代謝物として 4-hydroxy-3,5,3',4'-TCB を想定し, その合成を試みた。実験の部に準じて行い, HPLC により, 3 つの画分 (S-1, S-2, S-3) を得た。GC/MS 及び ¹H-NMR の結果, 最終的に S-1 は 4-hydroxy-TriCB, S-2 は 4-hydroxy-3,5,2',3'-TCB, S-3 が 4-hydroxy-3,5,3',4'-TCB であった (実験の部参照)。次に代謝物 M-1 と予想代謝物の GC/ECD での保持時間を比較した。Table 1 に示すように, M-1 と合成標品 S-3 の保持時間は完全に一致し, メチル誘導体がいずれも 11.39 min, TMS 誘導体がいずれも 18.17 min であった。この結果から, M-1 は S-3 すなわち 4-hydroxy-3,5,3',4'-TCB であることが示唆された。

Table 1 Comparison of retention time of M-1 with three synthetic compounds.

Compound	Retention time (min)	
	Methyl derivative	TMS derivative
M-1	11.39	18.17
S-1 (4-Hydroxy-TriCB)	5.01	7.41
S-2 (4-Hydroxy-3,5,2',3'-TCB)	8.60	13.25
S-3 (4-Hydroxy-3,5,3',4'-TCB)	11.39	18.17

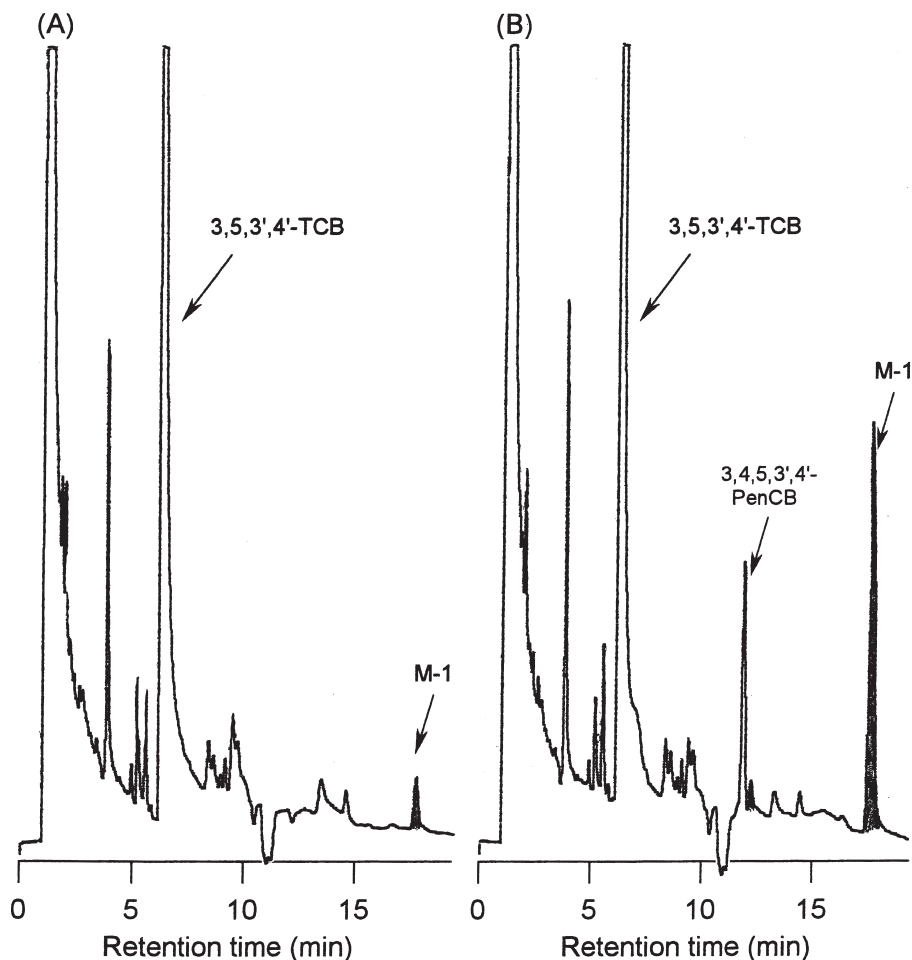


Fig. 2 Gas chromatograms of trimethylsilylated derivatives of 3,5,3',4'-TCB metabolite formed by liver microsomes of PB (A)- and 3,4,5,3',4'-PenCB (B)-treated rats.

2. 3,5,3',5'-TCB の代謝

3,5,3',5'-TCB は coplanar PCB の 1 つであるが、カネミ油症の原因油から検出されていないことや、4 位及び 4' 位に塩素置換がないことから、毒性学的にはあまり重要ではないと考えられている。当研究室ではすでに、ラット肝において本 TCB が 4-水酸化体へと代謝され、さらに MC 誘導性の P450 (CYP1A1) がこの生成に強く関与することを報告した²⁰⁾。そこで、本 TCB 代謝に関与するモルモット及びハムスター肝 P450 分子種の特定を目的とし、P450 誘導剤として代表的な PB, MC 及び 3,4,5,3',4'-PenCB で前処理し

たモルモット及びハムスター肝ミクロゾームによる代謝を調べた。Table 2 にその結果を示す。

モルモットでは未処理, PB, MC 及び 3,4,5,3',4'-PenCB 前処理のいずれのミクロゾームを用いたときも、4-水酸化体を含め代謝物は全く検出されなかった。これに対し、ハムスターでは、ラットと同様に MC 及び 3,4,5,3',4'-PenCB 前処理ミクロゾームにおいて、4-水酸化体が検出された。その生成速度はラットでの結果とほぼ同程度で、それぞれ 9.1 及び 10.1 pmol/min/mg protein とかなり低いものであった。

3. 2,4,3',4'-TCB の代謝

2,4,3',4'-TCB の代謝物として 3-,4-及び 5-水酸化体がラット糞中から明らかにされている³⁴⁾²¹⁾。また, Matsusue ら²⁵⁾ はラット CYP1A1 が 4-及び 5-水酸化体の生成を, また CYP2B1 が 3-水酸化体の生成を触

媒することを明らかにした。そこで, PB, MC 及び 3,4,5,3',4'-PenCB で前処理したモルモット及びハムスター肝ミクロゾームによる代謝を調べ, ラットと比較した。反応液の抽出液をメチル化して GC/ECD に供すると 3-, 5-及び 4-水酸化体はそれぞれ保持時間 8.90 min, 10.41 min 及び 11.00 min に検出された。Table 3 にその定量結果を示す。

Table 2 Metabolism of 3,5,3',5'-TCB with liver microsomes of guinea pigs and hamsters.

Treatment	4-Hydroxy-3,5,3',5'-TCB formed (pmoles/min/mg protein)
<i>Guinea pigs</i>	
None	N.D.
PB	N.D.
MC	N.D.
3,4,5,3',4'-PenCB	N.D.
<i>Hamsters</i>	
None	N.D.
PB	N.D.
MC	9.1±0.8
3,4,5,3',4'-PenCB	10.1±1.4

N.D., not detected.

Each value represents mean ± S.D. of three determinations.

モルモットでは未処理ミクロゾームでも 3-水酸化体と 5-水酸化体生成の比較的高い活性が認められた。PB 処理ミクロゾームでは 3-水酸化体の生成が 3.0 倍に, 5-水酸化体の生成が 3.8 倍に増加していた。さらに, PB 処理により, 未処理ミクロゾームで認められなかった 4-水酸化体生成の強い活性が出現した。一方, MC 及び 3,4,5,3',4'-PenCB 処理ミクロゾームでは 3-水酸化体の生成のみが観察されたが, いずれの活性も未処理ミクロゾームより低下していた。

ハムスターでは未処理ミクロゾームでも低いながらも, 5-水酸化体と 4-水酸化体の生成活性が認められ, さらに PB 処理により, 両代謝物の生成はそれぞれ

Table 3 Metabolism of 2,4,3',4'-TCB with liver microsomes of guinea pigs, hamsters and rats.

Treatment	Metabolite formed (pmoles/min/mg protein)		
	3-Hydroxy- 2,4,3',4'-TCB	5-Hydroxy- 2,4,3',4'-TCB	4-Hydroxy- 2,5,3',4'-TCB
<i>Guinea pigs</i>			
None	3.3±0.2 (100)	1.3±0.1 (100)	N.D.
PB	10.0±0.4 (303)	4.9±0.4 (377)	5.9±0.4
MC	2.9±0.2 (88)	N.D.	N.D.
3,4,5,3',4'-PenCB	2.7±0.3 (82)	N.D.	N.D.
<i>Hamsters</i>			
None	N.D.	1.2±0.2 (100)	1.2±0.1 (100)
PB	2.1±0.1	5.7±0.3 (488)	2.7±0.0 (219)
MC	1.8±0.4	2.5±0.1 (215)	10.0±0.2 (811)
3,4,5,3',4'-PenCB	2.7±0.3	2.1±0.3 (179)	12.4±1.6 (1011)
<i>Rats</i>			
None	N.D.	N.D.	N.D.
PB	2.6±0.1	1.0±0.1	N.D.
MC	0.6±0.4	2.0±0.7	5.8±3.8
3,4,5,3',4'-PenCB	N.D.	1.2±0.8	1.1±0.1

N.D., not detected.

Each value represents mean ± S.D. of three determinations and those in parentheses are the relative ratio to untreated microsomes.

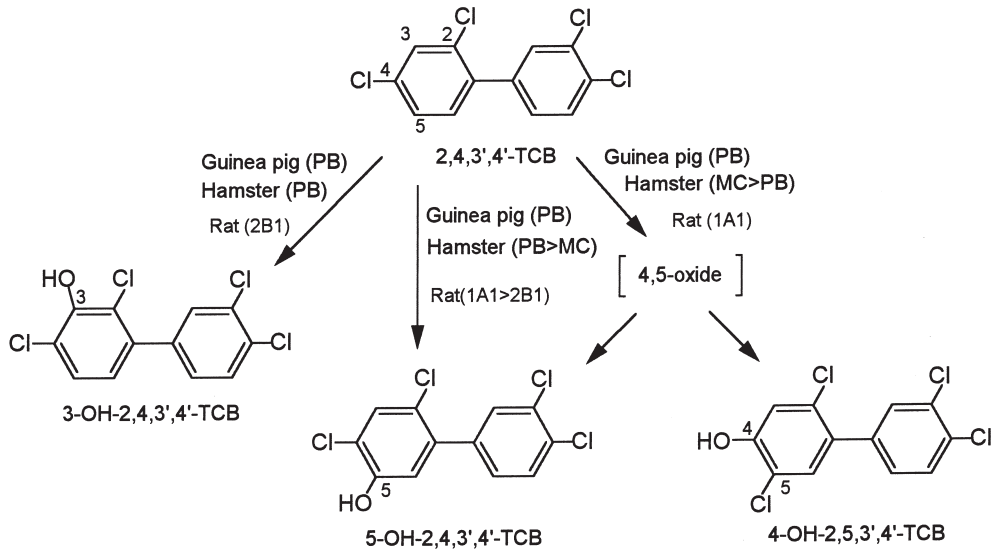


Fig. 4 Postulated metabolic pathways of 2,4,3',4'-TCB in rats, guinea pigs and hamsters.

に共通してPB前処理で促進されることから、CYP2Bサブファミリーに属する、それぞれCYP2B1、P450HPB-1及びP450GP-1により直接水酸化の機構で進行しているものと考えられるが、一方、4位水酸化はラットとハムスターではMC処理により、モルモットではPB処理により著しく促進された。前述のように、MC処理のラットとハムスターでは、それぞれCYP1A1とCYP2A8が特に重要であるが、もしもPB誘導性のP450GP-1が4位水酸化をも触媒しうるのであれば、水酸化機構を考える上で非常に興味深い。AbeとWatanabe¹⁾はMC前処理モルモット肝ミクロゾームから3種類のP450を精製しているが、酵素化学的諸性質やPCB代謝活性については詳細に検討していない。加えて、モルモットP450はMC型誘導剤でほとんど誘導されないことも明らかにされている⁷⁾³⁷⁾。このような事実を考えあわせると、P450GP-1はモルモットにおけるPCBの毒性発現と密接に関連した重要なP450のようである。

MCと3,4,5,3',4'-PenCBは同じタイプのP450誘導剤でよく似たTCB代謝パターンを示すが、ラット肝での2,4,3',4'-TCB代謝においては、相違点が認められた。すなわち、3,4,5,3',4'-PenCB処理ミクロゾームで、4-及び5-水酸化体の生成量がMC処理に比べ、

かなり低かった。このような活性阻害効果は3,4,5,3',4'-PenCBや類縁化合物の3,4,5,3',4',5'-六塩素化ビフェニル及び2,3,4,7,8-五塩素化ジベンゾフランなどでも報告されている。すなわち、これらの化合物はCYP1A1だけでなくCYP1A2を顕著に誘導する²⁷⁾とともにCYP1A2に結合し²⁴⁾、結果的に肝に長期間残留したり、CYP1A2の触媒活性であるestradiol-17 β の2位水酸化反応を阻害する³²⁾ことが明らかにされている。本研究の2,4,3',4'-TCB代謝において、CYP1A2が関与しているのであればこのような活性阻害がみられるものと思われるが、現在のところ不明である。

総 括

3種類のTCB、3,5,3',4'-、3,5,3',5'-及び2,4,3',4'-TCBのラット、モルモット及びハムスター肝ミクロゾームによる*in vitro*代謝を調べた。その結果、次のような知見が得られた。

1. 3,5,3',4'-TCBは、MC及び3,4,5,3',4'-PenCB前処理ラット肝ミクロゾームによって強く代謝され、1種類の代謝物が生成された。この代謝物の構造は合成標品との比較により、4-hydroxy-3,5,3',4'-TCBであることが示唆された。この結果から、3,5-二

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、水酸化されやすいことが示された。

2) 3,5,3',5'-TCBの代謝をモルモット及びハムスター肝ミクロゾームにより調べたところ、モルモットでは全く代謝物は検出されなかった。一方、ハムスターではラットと同様にMC及び3,4,5,3',4'-PenCB前処理ミクロゾームにより、4-水酸化体が生成された。

3) 2,4,3',4'-TCBの代謝をモルモット及びハムスター肝ミクロゾームにより調べたところ、次のようなことが明らかになった。モルモットでは未処理でも3-及び5-水酸化体が生成され、さらにPB処理により、それぞれ3.0倍及び3.8倍に増加した。また、PB処理により新たに4-水酸化体の生成が強く促進された。一方、MC及び3,4,5,3',4'-PenCB処理では、3-水酸化体の生成のみが観察され、未処理の約80%程度と低かった。ハムスターでは未処理でも、5-及び4-水酸化体の生成が認められたが、PB処理により、それぞれ4.9倍と2.1倍に増加した。また、新たに3-水酸化体の生成がみられた。一方、MC及び3,4,5,3',4'-PenCB処理では3種類の代謝物がすべて生成されたが、特に4-水酸化体の生成増加は顕著で、それぞれ未処理の8.1倍及び10.1倍であった。また、5-水酸化体の生成もPB処理ほどではないが、未処理の約2倍と増加した。

以上のように、ラットとハムスターにおいて、coplanar PCBの3,5,3',4'-TCBと3,5,3',5'-TCBは、MC誘導性のP450により、また、2,4,3',4'-TCBのようなPBとMCとの中間のP450誘導能を有するPCBはPB及びMC誘導性のP450によって代謝されていることが示唆された。なお、モルモットでは2,4,3',4'-TCB代謝においてPB誘導性のP450GP-1が最も重要であることが示された。

謝 辞

本研究は厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究)に負うものである。ここに記して謝意を表します。また、実験補助をしていただきました鹿子嶋織江さん及び神近紀子さんに感謝します。

文 献

1) Abe T and Watanabe M: Purification and

characterization of three forms of microsomal cytochrome P-450 in liver from 3-methylcholanthrene-treated guinea pigs. *Mol. Pharmacol.* 23: 258-264, 1982.

2) Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, Yoshimura H and Funae Y: Metabolism of highly persistent PCB congener, 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 455-460, 1995.

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

4) Brouwer A and van den Berg KJ: Transthyretin (prealbumin) binding of PCBs, a model for the mechanism of interference with vitamin A and thyroid hormone metabolism. *Chemosphere* 15: 1699-1706, 1986.

5) Connor K, Ramamoorthy K, Moore M, Mustain M, Chen I, Safe S, Zacharewski T, Gillesby B, Joyeux A and Balaguer P: Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145: 111-123, 1997.

6) Duignan DB., Sipes IG, Leonard TB and Halpert JR: Purification and characterization of the dog hepatic cytochrome P-450 isozyme responsible for the metabolism of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl. *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 290-303, 1987.

7) Huang S and Gibson GG: Differential induction of cytochrome P450 and cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolism by 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl in the rat and the guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 86-95, 1991.

8) Ishida C, Koga N, Hanioka N, 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 cytochrome P-450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14: 276-284, 1991.

9) Jansen HT, Cooke PS, Porcelli J, Liu TC and Hansen LG: Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: in vitro and in vivo studies. *Reprod. Toxicol.* 7: 237-248, 1993.

10) 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.

11) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Masuda Y and Kimura R: Induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem.-Biol. Interaction* 95: 257-268, 1995.

12) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Isogai M, Masuda Y and Kimura R: Characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners. *Chem.-Biol. Interaction* 95: 269-278, 1995.

13) Kennedy MW, Carpentier NK, Dymerski PP and Kaminsky LS: Metabolism of dichlorobiphenyls by hepatic microsomal cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* 30: 577-588, 1981.

14) Koga N, Beppu M, Ishida C and Yoshimura H: Further studies on metabolism *in vivo* of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in rats: Identification of minor metabolites in rat faeces. *Xenobiotica*, 19: 1307-1318, 1989.

15) Koga N, Kanamaru T, Kikuichi N, Oishi N, Kato S and Yoshimura H: Guinea pig liver cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 60: 898-903, 1998.

16) 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.

17) 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.

18) 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.

19) 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.

20) 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.

21) 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.

22) Koga N and Yoshimura H: Metabolism of PCBs and related compounds, and their toxicity, In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M and Masuda Y (eds.): *Yusho-a human disaster caused by PCBs and related compounds*. pp. 105-120, Kyushu University Press, Fukuoka, Japan, 1996.

23) Korach KS, Sarver P, Chae K, McLachlan JA and McKinney JD: Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol. Pharmacol.* 33: 120-126, 1988.

24) Kuroki J, Koga N and Yoshimura H: High affinity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsomes of rats. *Chemosphere* 15: 731-738, 1986.

25) Matsusue K, Ariyoshi N, Oguri K, Koga N and Yoshimura H: Role of cytochrome b_5 in the oxidative metabolism of polychlorinated biphenyls catalyzed by cytochrome P450. *Xenobiotica* 26: 405-414, 1996.

26) McConell EE: Acute and chronic toxicity and carcinogenesis in animals, In Kimbrough RD and Jensen AA (eds.): *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products*. pp. 161-193, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1989.

27) 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. *J. Biol. Chem.* 258: 5967-5976, 1983.

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

29) 佐伯清太郎, 筒井昭代, 小栗一太, 吉村英敏, 浜名政和: カネクロール主成分の分離と構造について. *福岡医誌* 62: 20-24, 1971.

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

31) Stadnicki SS and Allen JR: Toxicity of 2,2',

5,5'-tetrachlorobiphenyl and its metabolites, 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl-3,4-oxide and 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl-4-ol to cultured cells in vitro. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 23: 788-796, 1979.

32) Voorman R, Aust SD: Specific binding of polyhalogenated aromatic hydrocarbon inducers of cytochrome P-450d to the cytochrome and inhibition of its estradiol 2-hydroxylase activity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 90: 69-78, 1987.

33) Watanabe M, Fujii H, Sagami I and Tanno M: Characterization of hepatic and pulmonary cytochrome P-450 in 3-methylcholanthrene-treated hamsters. Arch. Toxicol. 60: 52-58, 1987.

34) Yamamoto H and Yoshimura H: Metabolic studies on polychlorinated biphenyl. III. Complete structure and acute toxicity of the metabolites of 2,

4,3',4'-tetrachlorobiphenyl. Chem. Pharm. Bull. 21: 2237-2242, 1973.

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

36) 吉村英敏, 山本弘明, 木下春喜: PCBの代謝に関する研究(第5報). 2,4,3',4'-テトラクロロビフェニル代謝物の胆汁中排泄について. 福岡医誌 65: 12-16, 1974.

37) 吉村英敏, 和田郁夫, 古賀信幸, 永田清, 山内葉子, 吉原新一, 鎌田理: 3,4,5,3',4'-ペンタクロロビフェニルのモルモットに対する急性毒性, ならびに肝酵素の誘導作用. 福岡医誌 72: 149-154, 1981.
(受付 1999-3-16)

1-ニトロピレン誘発肺腫瘍における PCBs の影響： 予備的検討

九州大学大学院医学系研究科胸部疾患研究施設

中西洋一・白鳳・高山浩一

斐新海・井上孝治・尾崎真一

出水みいる・高木陽一・原信之

九州女子大学

常盤寛

第一薬科大学

増田義人

Effect of PCBs on Mouse Lung Tumorigenesis Induced by 1-nitropyrene: a Preliminary Report

Yoichi NAKANISHI, Feng BAI, Koichi TAKAYAMA, Xin-Hai PEI, Kohji INOUE,
Shin-ichi OSAKI, Miiru IZUMI, Youichi TAKAKI and Nobuyuki HARA

*Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of
Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812-8582*

Hiroshi TOKIWA

Kyushu Women's University, Kitakyushu 807-8586

Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815-8511

Abstract We have analyzed the effect of polychlorinated biphenyls (PCB, Kanechlor-400) on 1-nitropyrene (1-NP) induced lung tumor. Male A/J mice (6 weeks old) were used for the experiment. A total of 2.5 mg/kg PCB was administered intraperitoneally (PCB group), a total of 0.38 mmol/kg 1-NP was administered intraperitoneally for 17 times (1-NP group), PCB was administered followed by ip injection of 1-NP (PCB + 1-NP group), and only vehicle was administered (control group). The lung lesions induced were examined 18 weeks after the final treatment with 1-NP or vehicle.

In control group, no neoplastic lesion in the lung was induced. In PCB group, only one lesion with adenoma was induced. In 1-NP group, various kinds of lung neoplastic lesions including hyperplasia, adenoma and adenocarcinoma were induced. In PCB+1-NP group, both the number and size of tumors induced were significantly more than those in 1-NP group. In addition, the number of adenocarcinoma formed was more in PCB + 1-NP group than in 1-NP group. Each lesion was microdissected to collect and analyze DNA of the targeted tissue. K-ras gene mutation was detected in part of adenoma lesions and all the carcinoma lesions. The mutation was found in either 1-NP or PCB + 1-NP group, but not in control and PCB group. The pattern of K-ras mutation was CAA to CGA in codon 61 or GGT to GAT in codon 12. There was no difference in the pattern of K-ras mutation despite of the pretreatment with PCB.

Although the present data are from small sample size, it was suggested that PCB may promote (but not initiate) 1-NP induced lung tumorigenesis, and may not induce K-ras mutation

directly in the experimental system.

緒 言

1-ニトロピレン (1-NP) は、環境中に広く分布するニトロアレン系発癌物質である²²⁾。その発癌性は他のニトロアレン系発癌物質に比べて決して高くはないものの、相対的に量が多いためその影響は無視することができない。我々は、これまでに、ヒト肺組織中に1-NPを含めたニトロアレン系発癌物質が検出できること²⁷⁾、肺癌患者の肺組織中で検出される1-NPの濃度は患者予後と逆相関すること、その理由の一つに肺癌の分化度と1-NPの濃度が関連している可能性があること²⁵⁾を報告してきた。また、マウスの実験モデルにおいて、1-NPは肺組織における過形成から腺癌に至る種々の段階の肺腫瘍を誘発すること、その発生にK-ras遺伝子の関与が考えられること¹⁾を報告してきた。しかし、1-NPを含めたこれらニトロアレン系物質がヒトの肺発癌に与える影響はいまだによくわかっていない。

polychlorinated biphenyls (PCB) は1929年商業ベースでの生産が開始されて以来、先進国を中心に変圧器、潤滑油の添加剤、殺虫剤、塗料や糊料への添加剤等に広く使用されてきた。1970年代を境にその生産は中止ないし制限されたが、物理的・化学的に安定性の高い物質であるため、廃棄物や土壌中に残存し、PCBによる世界的な汚染は現在もおおむね無視することができない。ヒトにおける大量の中毒事件は1968年日本において(油症)、1979年台湾において(Yu-Cheng)発生した。日本の油症患者における疫学調査から、肝癌と肺癌発生のリスクが示唆された¹³⁾。動物実験においても、PCBが高率に肝腫瘍を引き起こすことや、benzene hexachlorideによる肝癌のプロモーター効果を有することが報告されている¹⁰⁾¹⁵⁾。最近、PCBにより癌遺伝子産物のmRNAの高発現がみられたり、PCBに汚染された海域の水生生物でras遺伝子の変異が確認されたとの報告がみられる⁶⁾¹¹⁾²⁸⁾。すなわち、PCBが癌関連遺伝子に与える影響についても検討を加える必要があると考えられる。一方、実験肺腫瘍に関する報告は多くないが、我々の検討結果より、PCB

やPCDFが細気管支上皮のクララ細胞の変性・脱落を生じさせること¹⁸⁾¹⁹⁾より、肺発癌に与える影響も無視できないものと考えられる。

そこで、A/Jマウスを用いた1-NP誘発肺癌モデルにPCB(Kanechlor 400)を投与し、肺腫瘍発生におけるPCBの影響を検討した。同時に、発生した肺腫瘍について、K-ras遺伝子解析を行い、PCB投与が腫瘍遺伝子の変異に与える影響について検討した。

実 験 方 法

1. 実験腫瘍の作成

1-NP(Aldrich社, USA)はHPLCを使用して精製した¹⁷⁾。混入物のDinitropyreneは検出されず(1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyreneの検出感度は0.5 fmol以下)、1-NPの純度は99.99%以上であった。6週齢の雄A/Jマウス(黒田実験動物, 熊本)を使用した。1-NPはジメチルスルフォキシド(DMSO)に、PCBはコーン油に溶解して使用した。マウスは4群に分けた(対照群, PCB群, 1-NP群, 1-NP+PCB群)。2.5 mg/kgのPCBまたは0.1 mlのコーン油を腹腔内に単回投与した後に0.1 mlの1-NP溶液または同量のDMSOを週3回、計17回腹腔投与した。1-NPの総投与量は1,575 mg/kg(6.44 mmol/kg)であった。マウスは最終投与から18週目にsacrificeした。肺病変は顕微鏡下にマイクロダイセクションを行い、目的とする細胞を選択的に採取し、遺伝子解析に使用した。

2. 病理学的検討

Stewartらの記載に従って、肺病変は3つのカテゴリー(肺胞/細気管支の過形成、腺腫、腺癌)に分類した²⁴⁾。過形成は組織学的構築の破壊を伴わない軽度の異型細胞の存在、腺腫は中等度の異型や核の多形成を有する細胞を認め、隣接する肺胞を圧迫するもの(Fig. 1a)、腺癌は明らかな異型を有し、異常な細胞分裂像が散見される腫瘍細胞が隣接する肺胞組織に浸潤性増殖をきたしているもの(Fig. 1b)とした。

3. K-ras 遺伝子解析

DNAはSaikiらの方法に従って増幅した²³⁾。マウ

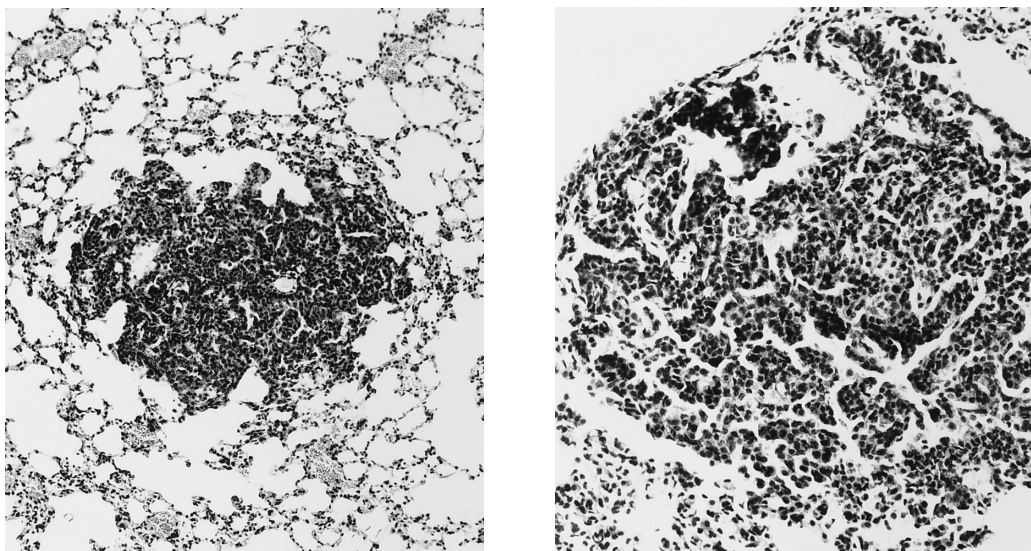


Fig. 1 Photographs of the various lung lesions (HE staining). (a) adenoma 96x. (b), alveolar/bronchiolar adenocarcinoma 180x.

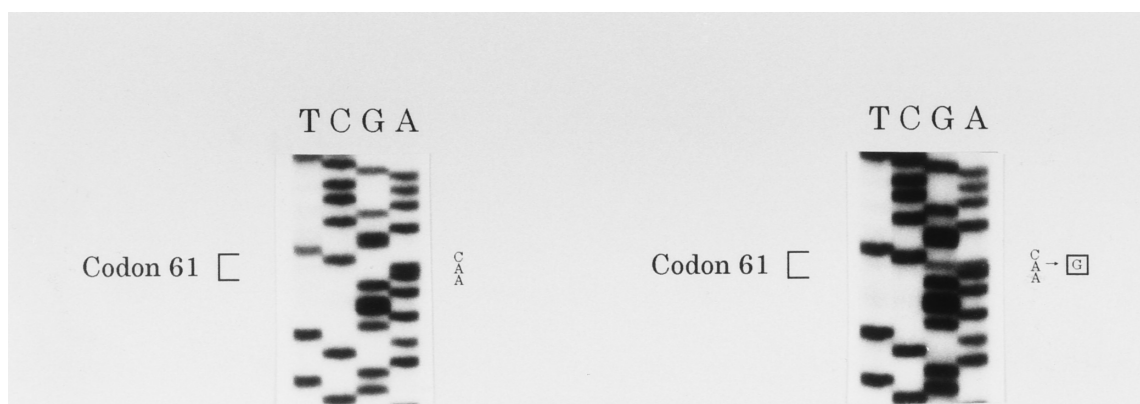


Fig. 2 Identification of point mutation in the *K-ras* gene by PCR and direct sequencing of amplified DNA. Representative DNA sequences of *K-ras* codon 61 are shown. Normal codon 61 sequence (CAA) (left), and AT→GC transversion (CGA) (right) at the second base of codon 61.

ス *K-ras* 遺伝子の *amplification primer* は以下のものを使用した²¹⁾。

exon 1,5'-primer :

5'-ATGACTGAGTATAAACTTGT-3'

3'-primer :

5'-TCGTA CT CAT CCTCAAAGTG-3'¹²⁾

exon 2,5'-primer :

5'-GGACTCCTACAGGAAACAAGTAGTA-3'

3'-primer :

5'-CCTATAATGGTGAATATCTTCAAAT-3'²¹⁾

PCR の設定条件は以前の報告の通りである¹⁾。sequencing primers については以下のものを使用した。いずれも PCR の antisense primer と同じもので、exon 1 については codon 12 と 13 を、exon 2 については codon61 をカバーするものを用いた。

exon 1 :

5'-TCGTACTCATCCTCAAAGTC-3'

exon 2:

5'-CCTATAATGGTGAATATCTTCAAAT-3'

以後の sequencing の方法については先述の通りである。

4. 統計解析

結果は Student's t-test と Fisher's exact test にて統計解析した。両側検定で p 値 0.05 以下のものを有意差ありとした。

結 果

図 1 に示したとおり、肺には過形成、腺腫、腺癌が形成された。また、図には示していないが腺腫の中に腺癌が存在する、adenocarcinoma in adenoma の病変も認められた。各群における肺病変の発生状況は表 1 に示した通りであるが、対照群では明らかな肺病変が形成されなかったのに対し、PCB 群では 5 匹のマウス中 1 つの腺腫が形成された。一方、1-NP を投与した群ではほとんどすべてのマウスで肺病変が形成された。特に、1-NP+PCB 群では、形成された腫瘍の数、サイズとも有意に多く、また腺癌は 1-NP 単独群で 1 病変

のみであるのに対し、1-NP+PCB 群では計 6 病変が形成された。

形成された肺病変ならびに対象としての正常肺組織について、マイクロダイセクション法にて目的とする病変を選択的に採取した上で、K-ras 遺伝子の変異について検討を加えた (表 2)。正常肺組織においては K-ras 遺伝子の異常は認められなかった。PCB 群で唯一認められた腺腫については、変異は認められなかった。1-NP 群では、全 13 病変中 12 病変で K-ras 遺伝子変異が認められ、その内訳は codon 61 の CAA → CGA 変異が 9 病変、codon 12 の GGT → GAT 変異が 3 病変であった。一方、1-NP+PCB 群では、全体で 25 病変が認められたが、その内 15 病変について K-ras 遺伝子解析を実施した。その結果、15 病変中 12 病変で codon 61 の CAA → CGA (10 病変) と codon 12 の GGT → GAT 変異 (2 病変) を認めた。すなわち、PCB の前処置の有無にかかわらず 1-NP によって誘導された K-ras 遺伝子変異のパターンは同様のものであることが示された。また、表には示していないが、群にかかわらず腺癌ではすべての病変で K-ras 遺伝子変異が認められた。

Table 1 Induction of lung lesions in male A/J mice by 1-NP with or without PCBs.

chemicals	mice with lung lesions			number of lung lesions		
	number of mice (%)	average number	size of tumor	hyperplasia	adenoma	adenocarcinoma
control	0/8 (0%)	0	0	—	—	—
PCB	1/5 (0%)	0.2	0.5	—	1	—
1-NP	5/6 (83%)	1.5±1 ^a	0.7±0.2	4	8	1
1-NP+PCB	7/7 (100%)	2.9±0.9 ^b	1.1±0.5 ^b	8	11	6

^a: Significantly different from control group. (p<0.0001)

^b: Significantly different from 1-NP group. (p<0.05)

Table 2 Pattern of mutation in K-ras gene in the A/J mice following treatment with 1-NP and/or PCBs.

chemicals	number of lesions with K-ras activation or mutation		
	activated K-ras	codon 61 mutation (CAA-CGA)	codon 12 mutation (GGT-GAT)
control	0/8	0	0
PCB	0/5	0	0
1-NP	12/13	9	3
1-NP+PCB	12/15	10	2
total	24	19	5

考 察

化学物質による肺癌誘発のマウスモデルとしては、ウレタン、ベンツピレン、NNKなどが報告されている⁴⁾(20)²¹⁾(29)。1-NPは、*in vitro*、*in vivo*で発癌性と促癌性が報告されている⁷⁾(9)²⁶⁾。我々は、最近、1-NPはマウスの肺において、過形成や腺腫などの前癌病変のみならず腺癌も誘導することを報告したが、1-NPを投与した時に腺腫内に腺癌組織がしばしば認められる(carcinoma in adenoma)ことより、1-NPは過形成→腺腫→腺癌へと連続的に進展して行く腫瘍性病変を誘導することが示唆された¹⁾。

今回の検討では、PCB単独投与群では、全5匹中腺腫が1病変のみにしか認められなかった。一方、1-NP単独投与群では腺癌を含むより多くの腫瘍性病変が形成された。1-NP投与に先がけてPCBを投与した群では、形成された肺腫瘍の数、サイズとも有意に増加したが、それに加えて、腺癌形成の比率も高まるという結果を得た。これらの結果から、PCBはtumor promoterとして作用するものと考えられる。事実、今回使用したKanechlor 400の経口投与によりマウスに高率に肝細胞癌を含む肝腫瘍が誘導されること¹⁰⁾やbenzene hexachloride誘発肝癌のtumor promoterとしての作用¹⁵⁾が報告されている。

K-ras遺伝子の変異は種々の化学発癌モデルで見いだされている。肺腫瘍においては、H-rasやN-rasなどのras遺伝子ファミリーの変異が前癌病変を含む肺腫瘍で見いだされている²⁾(5)²⁹⁾。K-ras遺伝子におけるホットスポットはcodon 12, 13, 61である。1-NPによって誘発されたK-ras変異はcodon 61のCAAからCGAへの、ならびにcodon 12のGGTからGATへの塩基置換であった。特に前者がもっとも高頻度に見られた。すなわち、1-NPによって誘導された肺腫瘍におけるK-ras遺伝子のパターンは多くのK-ras遺伝子変異を有する癌腫に共通のものであった。また、1-NP投与前にPCBを投与した群では、腺癌の発生頻度がより高かったものの、K-ras遺伝子の変異パターンは1-NP単独投与群のそれと変わらないものであり、その点からもPCBはtumor initiatorではなくpromotorとして作用したものと考えられた。PCBと癌遺伝子異常の関連について検討を加えた報告は少な

い。Brandt-Raufらは、変圧器の洗浄油を取り扱う労働者16名について調査したところ、血清PCB濃度がかつても高かった症例でH-ras関連p21蛋白の上昇がみられたと報告している³⁾。PCBに曝露することで線維芽細胞におけるras, jun, mycなどの癌遺伝子のmRNAの発現亢進がみられたり⁶⁾、ラット肝細胞におけるras, raf, yes, erb遺伝子mRNAの発現亢進がみられたとの報告¹¹⁾があるが、いずれもmRNAでの検討であり、遺伝子変異について検討したものではない。唯一、PCBとpolycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)に汚染された海域で採取された魚、dragonet (和名：ネズッポ)の肝臓にみられた過形成の組織でras遺伝子codon 11の変異を認めたとの報告がみられた²⁸⁾。しかし、PAHのtumor initiatorとしての作用はよく知られたものであり、この報告でみられたras遺伝子の変異はPCBによるものというよりは、PAHを含む他のtumor initiatorによるものと考えた方が合理的と思われる。ただし、この報告も我々の検討も少数例の解析にとどまっており、PCBが直接的にK-ras遺伝子変異に与える影響については、さらなる研究の蓄積が必要と思われる。

Mumfordらは、ヒト肺癌が浮遊粒子中に含まれる発癌物質の吸入によって生じる可能性について報告した¹⁴⁾。1-NPは石油燃料の不完全燃焼等によって発生する化学物質であり、吸入にて体内に取り込まれるものと推測される。我々は、1-NPをヒト肺組織で測定したところ、日本人の肺組織中に含まれる1-NP濃度は、中国人のそれより3倍程度高いという結果を得た²⁷⁾。また、肺癌患者の切除肺について検討したところ、1-NPを含めたニトロアレン系化学物質の肺組織内濃度が高い症例ほど癌の分化傾向が低く、予後も不良であるという知見を得た²⁵⁾。ヒト肺癌における1-NPの役割についてはまだ十分明らかにはなっていない点も多いが、これらの検討結果から、1-NPがマウス実験モデルのみならず、ヒト肺癌の発生にも重要な役割を有している可能性は否定できない。本物質は、環境中に広く分布するという点でその人体影響は決して無視できないものと考えられる。

PCBについても、疫学調査で油症患者で肺癌死亡率が高い可能性が示唆されていること¹³⁾や、PCBはいったん体内に蓄積されると容易に代謝されないこ

と⁸⁾、煙草発癌に関与する aryl hydrocarbon hydroxylase を誘導すること¹⁶⁾など、肺発癌に与える影響は否定できない。今後の研究の集積が必要と考えられる。

総 括

PCB による癌遺伝子変異に関する検討はほとんどないが、最近、PCB による *ras* 遺伝子の変異を示唆する報告や、癌遺伝子産物の mRNA の高発現を誘導するとの報告が散見される。

1) 1-ニトロピレン (1-NP) 誘発肺腫瘍の実験モデルにおいて、PCB (Kanechlor 400) の投与が誘発腫瘍に与える影響について病理学的検討を加えると共に、発生した腫瘍の分子生物学的特徴について検討した。

2) 6 週齢の A/J マウス腹腔内に 2.5 mg/kg の PCB を単回投与したもの (PCB 群)、6.44 mmol/kg の 1-NP を腹腔内に分割投与したもの (1-NP 群)、PCB 投与に続いて 1-NP を投与したもの (1-NP+PCB 群)、溶媒のみ投与したもの (対照群) の 4 群に分けて検討した。

3) 対照群では肺病変の形成は認めず、PCB 群では 1 例で腺腫の形成を認めたのみであったのに対し、1-NP 群では過形成から腺腫、腺癌に至る種々の病変を認めた。1-NP+PCB 群では、腫瘍の数、サイズとも 1-NP 群に比べて有意に高く、腺癌の形成も多かった。

4) 各病変から採取した DNA について *K-ras* 遺伝子の変異について検討したところ、腺腫の一部と腺癌のすべてで *K-ras* 遺伝子の変異を認めた。変異を認めたのは、すべて 1-NP (±PCB) を投与した群であった。変異のパターンは 2 通りで、codon 61 の CAA から CGA への、ならびに codon 12 の GGT から GAT への塩基置換であった。

5) *K-ras* 遺伝子変異のパターンは PCB の前処置の有無に関わらなかった。

6) 本実験系では PCB は tumor initiator としてよりも 1-NP 誘発肺腫瘍の tumor promoter として作用することが示唆された。

文 献

1) Bai F, Nakanishi Y, Takayama K, Pei XH, Tokiwa H and Hara N: Ki-ras mutation and cell proliferation of lung lesions induced by 1-nitropyrene in A/J mice. *Mol Carcinog* 22: 258-264, 1998.

2) Belinsky SA, Devereux TR, Maronpot RR, Stoner GD and Anderson MW: Relationship between the formation of promutagenic adducts and the activation of the *K-ras* protooncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines. *Cancer Res*, 49: 5305-5311, 1989.

3) Brandt-Rauf PW and Niman HL: Serum screening for oncogene proteins in workers exposed to PCBs. *Br J Indust Med* 45: 689-693, 1988.

4) Dervan PA, Gilmartin LG, Loftus BM and Carney DN: Breast carcinoma kinetics: argyrophilic nucleolar organizer region correlate with Ki-67 scores. *Am J Clin Pathol* 92: 401-407, 1989.

5) Devereux TR, Anderson MW and Belinsky SA: Factors regulating activation and DNA alkylation by 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and nitrosodimethylamine in rat lung and isolated lung cells, and the relationship to carcinogenicity. *Cancer Res*, 48: 4215-4221, 1988.

6) Gribaldo L, Sacco MG, Casati S, Zucchi I, Dosanjh MK, Catalani P and Marafante E: Modulation of protooncogene expression by polychlorinated biphenyls in 3T3-L1 cell line. *J Toxicol Environ Health* 55: 121-131, 1998.

7) Hirose M, Lee M-S, Wang CY and King CM: Induction of rat mammary gland tumors by 1-nitropyrene, a recently recognized environmental mutagen. *Cancer Res* 44: 1158-1162, 1984.

8) Iida T: Clinical experiments on accelerating the excretion of PCBs and PCDFs. In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M, Masuda Y (eds): *Yusho, a Human Disaster Caused by PCBs and Related Compounds*, pp. 283-307, Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.

9) Imaida K, Hirose M, Tay L and Lee MS, Wang CY and King CM: Comparative carcinogenicities of 1-, 2-, and 4-nitropyrene and structurally related compounds in the female CD rat. *Cancer Res*. 51: 2902-2907, 1991.

10) Ito N, Nagasaki H, Arai M, Makiura S, Sugihara S and Hirao K: Histopathologic study on liver tumorigenesis induced in mice by technical polychlorinated biphenyls and its promoting effect on liver tumors induced by benzene hexachloride. *J Natl Cancer Inst* 51: 1637-1642, 1973.

11) Jenke HS, Michel G, Hornhardt S and Berndt J: Protooncogene expression in rat liver by polychlorinated biphenyls (PCB). *Xenobiotica* 21: 945-960, 1991.

12) Kawano R, Nishisaka T, Takeshima Y,

Yonehara S and Inai K: Role of point mutation of the *K-ras* gene in tumorigenesis of B6C3F1 mouse lung lesions induced by urethane. *Jpn J Cancer Res*, 86: 802-810, 1995.

13) Kuratsune M, Nakamura Y, Ikeda M and Hirohata T: Analysis of deaths seen among patients with Yusho-A preliminary report. *Chemisphere* 16: 2085-2088, 1987.

14) Mumford JL, He HZ, Chapman RS, Cao SR, Harris DB, Li XM, Xian YL, Jiang WZ, XU CW, Chuang JC, Wilson WE and Cooke M: Lung cancer and indoor air pollution in Xian Wei, China. *Science* 235: 217-220, 1987.

15) Nagasaki H, Tomii S, Mega T, Marugami M and Ito N: Hepatocarcinogenicity of polychlorinated biophenyls in mice. *Gann*. 63: 805, 1972.

16) Nagayama J, Kiyohara C, Masuda Y and Kuratsune M: Inducing potency of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphoblastoid cells and mice by polychlorinated dibenzofuran congeners. *Environ Health Perspect* 59: 107-112, 1985.

17) Nakagawa R, Kitamori S, Horikawa K, Nakashima K and Tokiwa H: Identification of dinitropyrenes in diesel-exhaust particles: Their probable presence as the major mutagens. *Mutat Res* 124: 201-211, 1983.

18) Nakanishi Y, Nomoto Y, Matsuki A, Kunitake R and Hara N: Effect of polychlorinated Biphenyls and polychlorinated dibenzofurans on leukocyte in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid. *Fukuoka Acta Med* 86: 261-266, 1995.

19) Nakanishi Y, Shigematsu N, Kurita Y, Matsuba K, Kanegae H, Ishimaru S and Kawazoe Y: Respiratory involvement and immune status in Yusho patients. *Environ Health Perspect* 59: 31-36, 1985.

20) Nuzum EO, Malkinson AM and Beer DG: Specific *Ki-ras* codon 61 mutations may determine the development of urethane-induced mouse lung adenomas or adenocarcinomas. *Mol Carcinog*, 3: 287-295, 1990.

21) Ohmori H, Abe T, Hirano H, Murakami T, Katoh T, Gotoh S, Kido M, Kuroiwa A, Nomura T and Higashi K: Comparison of *Ki-ras* gene muta-

tion among simultaneously occurring multiple urethane-induced lung tumors in individual mice. *Carcinogenesis*. 13: 851-855, 1992.

22) Rosenkranz HS, McCoy EC, Sanders DR, Butler M, Kiriazides DK and Mermelstein R: Nitropyrenes: Isolation, identification, and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners. *Science*. 209: 1039-1043, 1980.

23) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-490, 1988.

24) Stewart H, Dunn T, Snell K and Deringer M: Tumors of the Mouse. In Turusov VS (ed): *Pathology of Tumors in Laboratory Animals*. pp. 251-288, IARC Scientific Publications, Lyon, France, 1979.

25) Tokiwa H, Nakanishi Y, Sera N, Hara N and Inutsuka S: Analysis of environmental carcinogens associated with the incidence of lung cancer. *Toxicol Lett* 99: 33-41, 1998.

26) Tokiwa H, Ohnishi Y: Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and other sources in the environment. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 17: 23-60, 1986.

27) Tokiwa H, Sera N, Horikawa K, Nakanishi Y and Shigematsu N: The presence of mutagens carcinogens in the excised lung and analysis of lung cancer induction. *Carcinogenesis* 14: 1933-1938, 1993.

28) Vincent F, de Boer J, Pfohl-Leszkowicz A, Cherrel Y and Galgani F: Two cases of *ras* mutation associated with liver hyperplasia in dragonets (*Callionymus lyra*) exposed to polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mol Carcinog* 21: 121-127, 1998.

29) You M, Candrian U, Maronpot RR, Stoner GD and Anderson MW: Activation of the *K-ras* protooncogene in spontaneously occurring and chemically induced lung tumors of the strain A mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3070-3074, 1989.

(受付 1999-3-4)

Induction of Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes with Methylsulphonyl PCB Congeners

Junya NAGAYAMA and Mayumi NAGAYAMA

*Laboratory of Environmental Health Sciences, School of Health Sciences,
Kyushu University 90, Fukuoka 812-8582*

Koichi HARAGUCHI, Hiroaki KUROKI and Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815-8511

Abstract Methylsulphonyl polychlorinated biphenyls (MSF-PCBs) have already contaminated at relatively high concentration in the lungs and blood of Yusho patients and healthy Japanese people. Therefore, we should give due attention to their biological and toxicological effects to man. In this study, in order to evaluate S-dependent genotoxicity of five MSF-PCB congeners, namely, 3-MSF-4,5,3',4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), 3-MSF-4,5,2',3'-TCB, 3-MSF-2,5,2',4',5'-pentachlorobiphenyl (PenCB), 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB and 4-MSF-2,5,2',3',5',6'-hexachlorobiphenyl (HCB), we have examined their effects on the induction of sister chromatid exchanges (SCEs), which has been frequently used to estimate the dose of S-dependent clastogens, in cultured human lymphocytes in the absence or presence of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF), 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) or 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (Co-PenCB) and the following results were obtained.

1) 4×10^{-5} M 7,8-benzoflavone (ANF) and two of the five MSF-PCB congeners, namely, 3-MSF-2,5,2',4',5'- and 4-MSF-2,5,2',3',4',-PenCB at respective doses of 5.2 and 5.8 ppm, which were about 35,000 times higher than the concentrations in the lungs and adipose tissue of healthy Japanese people, significantly enhanced the frequency of SCEs. 2) In the simultaneous treatment of one of the five MSF-PCB congeners and PenCDF (3.9 ppb), TCDD (1.5 ppb) or Co-PenCB (8.8 ppb), the combination of 3-MSF-4,5,3',4'-TCB (6.8 ppb) or 4-MSF-2,5,2',3',5',6'-HCB and one of the three highly toxic chemicals significantly promoted the formation of SCEs.

We have already studied whether these MSF-PCBs are non-S-dependent genotoxic compounds or not and have obtained the results that they seemed not to be or very weak ones. Therefore, based on the results of this and our former studies, the five MSF-PCB congeners examined are considered rather potent S-dependent genotoxic chemicals than non-S-dependent ones.

Introduction

Methylsulphonyl polychlorinated biphenyls (MSF-PCBs), which are one of the major metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs), have been determined in several tissues of patients with Yusho, polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) poisoning that occurred in western Japan in 1968, and of healthy people⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾. According to their analytical

results, the levels of MSF-PCBs were much lower than those of PCBs in the liver and adipose tissues of both Yusho patients and healthy people. However, in the lungs and blood their levels were comparable to or higher than those of PCBs. Thus, several tissues of Japanese people have already been contaminated with MSF-PCBs at relatively high concentration. Therefore, we should give due attention to their biological and toxicological action.

We have already investigated the effects of some MSF-PCB congeners on aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in cultured human lymphoblastoid cells and in hepatic microsomes prepared from both aryl hydrocarbon (Ah) responsive and nonresponsive strains of mice¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾²⁴⁾. Our studies mentioned above indicated that some congeners of MSF-PCBs decreased and/or enhanced the enzyme activity in both cultured human lymphoblastoid cells and murine hepatic microsomes. Therefore, MSF-PCB congeners have been expected to elicit some biological or toxicological action in man.

Cytogenetic changes such as the induction of 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 chromosome fragments or whole chromosomes lagging behind the genome at cell division. On the other hand, SCEs are formed during the S phase after an initial change in the form of DNA base damage²⁷⁾, when quadriradials as mitotic chiasmata are a consequence of mitotic crossing over²⁶⁾.

In this study, we investigated the induction of SCEs in mitogen-stimulated lymphocytes by five MSF-PCB congeners, which were major ones among MSF-PCBs determined in the tissues of Yusho patients and healthy Japanese people⁶⁾, in order to elucidate their genotoxic potency in terms of the inducer of SCEs.

Materials and Methods

1. Chemicals

Five MSF-PCB congeners, 3-MSF-4,5,3',4'-

tetrachlorobiphenyl (TCB), 3-MSF-4,5,2',3'-TCB, 3-MSF-2,5,2',4',5'-pentachlorobiphenyl (PenCB), 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB and 4-MSF-2,5,2',3',5',6'-hexachlorobiphenyl (HCB), 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) were synthesized by Dr. Masuda and his colleagues. 3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl (Co-PenCB) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Woburn, USA. Their purities were over 99% by gas chromatography. The sources of chemicals used in this study were as follows: demecolcin, 7,8-benzoflavone (ANF) and hoechst 33258 from Wako, Osaka, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BUdR) from Sigma, St. Louis, phytohemagglutinin M (PHA) from Difco, Detroit and penicillin, streptomycin and RPMI 1640 from Gibco, New York. All other chemicals and reagents were of the highest quality commercially available.

2. Chemical treatment and lymphocyte culture

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

Heparinized peripheral blood samples were obtained by venipuncture from healthy females (mean age: 37 years old). Lymphocyte cultures (5.0 ml) were initiated from whole blood (0.3 ml) aliquated into culture tubes containing the test chemical and/or chemicals as described later and RPMI 1640 medium (4.5 ml) supplemented with 15% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin.

Firstly, these whole-blood cultures were incubated with either acetone (solvent) alone,

ANF or one of the five MSF-PCBs. Secondly, the whole-blood cultures were treated with one of the five MSF-PCB congeners in the presence of either TCDD, PenCDF or Co-PenCB. These test chemicals were added at the beginning of culture time and left until harvesting.

Hundred μM BUdR and 0.15 ml PHA (a final concentration: 3%) were added at culture initiation. The whole-blood cultures were then incubated at 37°C in 5% CO₂ and 100% humidity. Seventy hrs later and 3 hrs before fixation, $2 \times 10^{-7}\text{M}$ demecolcin was added. The cells were then collected by centrifugation, exposed to 0.075M KCl hypotonic solution for 15 min at 37°C and fixed 3 times in methanol: acetic acid (3:1 v/v) at room temperature.

3. Silde preparation and scoring

Samples for microscopic observations were obtained by carefully dropping the lymphocyte suspensions from Pasteur pipettes onto pre-cleaned wet slides and dried in vapor of the water. The slides were stained for SCEs analyses using a little modification of the fluorescence (hoechst 33258) plus Giemsa (FPG) technique³⁾. Slides were coded and scored blind under a magnification of 1,000 fold. SCEs were analyzed in 30 to 64 metaphases for each experimental group.

4. Statistical analysis

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

Results

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

The experimental results are shown in Table 1. The frequency of SCEs in the control culture was 10.0 ± 0.6 per lymphocyte, and the treatment of PenCDF (3.9 ppb) did not enhance

the SCEs formation. ANF (11 ppm), however, significantly induced SCEs and the frequency rate was 12.0 ± 0.7 per cell.

In the five MSF-PCB congeners, significant increase of SCEs was observed after the single treatment of two MSF-PCB congeners, namely, 3-MSF-2,5,2',4',5'- or 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB in the absence of PenCDF. In the presence of PenCDF, all of the five MSF-PCB congeners significantly enhanced the frequency of SCEs and their ranges of the mean SCE frequency were 12.3 to 13.7 per lymphocyte. Therefore, as shown in Table 1, not only ANF but also these MSF-PCBs seemed to elicit synergistic effects on the induction of SCEs with PenCDF.

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

The experimental results are indicated in Table 2. Respective SCE rates after the treatment of TCDD (1.5 ppb) and PenCB (8.8 ppb) were 11.5 ± 0.4 and 10.8 ± 0.4 per lymphocyte and these rates were not significantly different from that in control culture, which was 10.0 ± 0.6 per cell, as shown in Table 1.

In simultaneous treatment of TCDD and one of the five MSF-PCB congeners, three MSF-PCBs, that is, 3-MSF-4,5,3',4'-TCB, 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB and 4-MSF-2,5,2',3',5',6'-HCB showed significant effect on the induction of SCEs and their respective frequency rates were 14.0 ± 0.5 , 13.5 ± 0.8 and 13.7 ± 0.7 per lymphocyte.

In simultaneous treatment of Co-PenCB and one of the five MSF-PCB congeners, only one MSF-PCB, 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB, failed to enhance the formation of SCEs and the frequency rate was 11.3 ± 0.4 per cell. As a consequence, two MSF-PCB congeners, namely, 3-MSF-4,5,3',4'-TCB and 4-MSF-2,5,2',3',5',6'-HCB, significantly induced the formation of

SCEs in the simultaneous treatment of either TCDD or Co-PenCB. As in the case of PenCDF, ANF was also considered to promote the SCE formation in co-treatment of TCDD or Co-PenCB, as indicated in Table 2.

Discussion

We have already reported that ANF and 3-MSF-4,5,3',4'-TCB, one of the MSF-PCB congeners examined in this study, inhibit or enhance AHH activity in mice and human lymphoblastoid cells, probably depending on the quantity and quality of cytochrome P-450 (P-450) enzymes, which catalyze benzo(a)pyrene (BP), a substrate of the AHH assay, metabolism¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾²⁴⁾. We have also investigated the effect of eleven MSF-PCB congeners on AHH activity of cultured human lymphoblastoid cells treated with TCDD and demonstrated that the

TCDD-induced enzyme activity was inhibited with them by 10 to 80%, depending on congeners¹⁶⁾. Three of eleven MSF-PCBs were 3-MSF-4,5,3',4'-TCB, 3-MSF-4,5,2',3'-TCB and 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB, which were also used in this study, and respective rates of the enzyme inhibition were about 80%, 40% and 20% at the dose of 1.5 µg/ml, in other words, 1.5 ppm which was about 4 to 5 times lower concentration than those used in this study, namely 5.8 to 7.1 ppm. In that experiment, ANF showed the highest AHH inhibition at the dose of 1.4 µg/ml (1.4 ppm), which was about 8 times lower concentration than that (4 × 10⁻⁵ M or 11 ppm) used in this study, and the inhibition rate was about 90%. Like this, some MSF-PCB congeners such as 3-MSF-4,5,3',4'- and 3-MSF-4,5,2',3'-TCB have been expected to demonstrate the same biological action as ANF.

Table 1 Effects of the five MSF-PCB congeners on the induction of SCEs in cultured human lymphocytes with or without PenCDF.

MSF-PCB Congener and ANF	Dose (ppm)	SCEs/Cell (Mean ± S.E.)	
		PenCDF (-)	PenCDF (3.9 ppb)
Control	—	10.0 ± 0.6	10.4 ± 0.4
3-MSF-4,5,3',4'-TCB	6.8	11.6 ± 0.7	13.2 ± 0.6**
3-MSF-4,5,2',3'-TCB	7.1	9.7 ± 0.4	13.6 ± 0.6**
3-MSF-2,5,2',4',5'-PenCB	5.2	12.1 ± 0.7*	13.7 ± 0.5**
4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB	5.8	12.5 ± 0.7**	12.3 ± 0.4**
4-MSF-2,5,2',3',5',6'-HCB	9.6	11.1 ± 0.4	12.7 ± 0.5**
ANF	11	12.0 ± 0.7*	14.1 ± 0.5**

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

Table 2 Effects of the five MSF-PCB congeners on the induction of SCEs in cultured human lymphocytes in the presence of TCDD or Co-PenCB.

MSF-PCB Congener and ANF	Dose (ppm)	SCEs/Cell (Mean ± S.E.)	
		TCDD (1.5 ppb)	Co-PenCB (8.8 ppb)
Control	—	11.5 ± 0.4	10.8 ± 0.4
3-MSF-4,5,3',4'-TCB	6.8	14.0 ± 0.5**	13.5 ± 0.7**
3-MSF-4,5,2',3'-TCB	7.1	12.8 ± 0.5	12.3 ± 0.5*
3-MSF-2,5,2',4',5'-PenCB	5.2	12.2 ± 0.4	12.6 ± 0.5**
4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB	5.8	13.5 ± 0.8*	11.3 ± 0.4
4-MSF-2,5,2',3',5',6'-HCB	9.6	13.7 ± 0.7**	13.2 ± 0.7**
ANF	11	15.6 ± 0.9**	14.9 ± 0.9**

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

At doses of $4 \times 10^{-5} \text{M}$ to $8 \times 10^{-5} \text{M}$, ANF has been shown to elicit some clastogenic or co-clastogenic potency¹¹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾, so we anticipated that some MSF-PCB congeners including those mentioned above also could evoke similar clastogenic or co-clastogenic effect to ANF and this study was carried out. As the results of this study, $4 \times 10^{-5} \text{M}$ ANF significantly enhanced the frequency of SCEs per lymphocyte in both the absence and presence of PenCDF, TCDD or Co-PenCB. As shown in Table 1, two of the five MSF-PCB congeners, 3-MSF-2,5,2',4',5'- and 4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB, significantly induced the formation of SCEs by themselves and all of the five MSF-PCBs significantly elevated the SCEs rates in case of the simultaneous treatment with PenCDF. Some of these MSF-PCB congeners also promoted the induction of SCEs in the co-treatment of TCDD or Co-PenCB, as indicated in Table 2. Two MSF-PCB congeners, 3-MSF-4,5,3',4'-TCB and 4-MSF-2,5,2',3',5',6'-HCB, did not enhance the SCE formation by themselves. They, however, elicited synergistic effects on the induction of SCEs with PenCDF, TCDD or Co-PenCB. In our previous study¹⁹⁾, none of the five MSF-PCBs did not enhance the formation of MNs in cultured human lymphocytes with one exception, namely, the simultaneous treatment of 3-MSF-2,5,2',4',5'-PenCB and PenCDF. Therefore, effects of these MSF-PCB congeners on the induction of SCEs seemed much stronger than on that of MNs.

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 radiation 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 cycle²⁸⁾, probably at DNA replication forks or sites where replication is incomplete⁹⁾²⁵⁾. Therefore, according to the results of this and our previous investigations, the MSF-PCB congeners examined are considered rather potent S-dependent genotoxic compounds than non-S-dependent ones.

References

- 1) Collman GW, Lundgren K, Shore D, Thompson CL and Lucier GW: Effects of α -naphthoflavone on levels of sister chromatid exchanges in lymphocytes from active and passive cigarette smokers: dose-response relationships. *Cancer Res.* 46: 6452-6455, 1986.
- 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) Goto K, Maeda S, Kano Y and Sugiyama T: Factors involved in the differential Giemsa staining of sister chromatids. *Chromosoma* 66: 351-359, 1978.
- 4) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Polychlorinated biphenyl methylsulfone congeners in human tissues: identification of methylsulfonyl dichlorobiphenyls. *Chemosphere* 18: 477-484, 1989.
- 5) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Synthesis and characterization of tissue-retainable methylsulfonyl polychlorinated biphenyl isomers. *J. Agric. Fd Chem.* 35: 178-182, 1987.
- 6) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y:

Capillary gas chromatographic analysis of methylsulphone metabolites of polychlorinated biphenyls retained in human tissues. *J. Chromatogr.* 361 : 239-252, 1986.

7) Haraguchi K, Kuroki H, Masuda Y and Shigematsu N : Determination of methylthio and methylsulphone polychlorinated biphenyls in tissues of patients with 'Yusho'. *Fd Chem. Toxicol.* 22 : 283-288, 1984.

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

9) Ishii Y and Bender MA : Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 79 : 19-32, 1980.

10) Lundgren K, Andries M, Thompson C and Lucier GW : Dioxin treatment of rats results in increased in vitro induction of sister chromatid exchanges by α -naphthoflavone : an animal model for human exposure to halogenated aromatics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85 : 189-195, 1986.

11) 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.

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

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

14) Nagayama J, Kiyohara C, Mohri N, Hirohata T, Haraguchi K and Masuda Y : Inhibitory effect of 3-methylsulphone-4,5,3',4'-tetrachlorobiphenyl on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Fukuoka Acta Med.* 78 : 199-203, 1987 (in Japanese).

15) Nagayama J and Masuda Y : Effects of 3-methylsulphonyl-4,5,3',4'-tetrachlorobiphenyl and 7,8-benzoflavone on aryl hydrocarbon hydroxylase activities of murine hepatic microsomes prepared from inbred strains with different Ah responsiveness. *Fukuoka Acta Med.* 84 : 195-202, 1993.

16) Nagayama J and Masuda Y : Effects of

methylsulphonyl polychlorinated biphenyl homologues and 7,8-benzoflavone on aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Fukuoka Acta Med.* 84 : 203-211, 1993.

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

18) Nagayama J, Nagayama M, Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y : Effect of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran and its analogues on induction of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Fukuoka Acta Med.* 86 : 184-189, 1995.

19) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Masuda Y : Influence of five methylsulphonyl PCB congeners on frequency of micronucleated cells in cultured human lymphocytes by cytokinesis block method. *Fukuoka Acta Med.* 86 : 190-196, 1995.

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 : 2349-2354, 1994.

21) 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.

22) Nagayama J, Nagayama M and Masuda Y : Genotoxicity of highly toxic organochlorine congeners in cultured human lymphocytes. *Organohal. Comp.* 10 : 165-168, 1992.

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

24) Nagayama J, Wada K, Haraguchi K, Masuda Y and Handa S : Effects of 3-methylsulphonyl-4,5,3',4'-tetrachlorobiphenyl and 7,8-benzoflavone on aryl hydrocarbon hydroxylase activity in Ah responsive and Ah nonresponsive strains of mice. *Fukuoka Acta Med.* 82 : 207-214, 1991 (in Japanese).

25) Painter RB : A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Res.* 70 : 337-341, 1980.

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

27) 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.

28) Wolff S, Bodycote J and Painter RB : Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. *Mutation Res.* 25 : 73-81, 1974.

(Received for publication March 31, 1999)

(和文抄録)

メチルスルホニル PCBs 同族体によるヒトリンパ球培養細胞の 姉妹染色分体交換誘発性

九州大学医療技術短期大学部環境科学研究室

長山 淳哉・長山 真弓

第一薬科大学物理分析学・環境化学研究室

原口 浩一・黒木 広明・増田 義人

カネミ油症患者や健常者の肺や血液は相対的に比較的高濃度のメチルスルホニル PCBs (MSF-PCBs) により汚染されている。この研究では5種類のMSF-PCBs同族体、つまり3-メチルスルホニル-4,5,3',4'-四塩化ビフェニール(3-MSF-4,5,3',4'-TCB)、3-メチルスルホニル-4,5,2',3'-四塩化ビフェニール(3-MSF-4,5,2',3'-TCB)、3-メチルスルホニル-2,5,2',4',5'-五塩化ビフェニール(3-MSF-2,5,2',4',5'-PenCB)、4-メチルスルホニル-2,5,2',3',4'-五塩化ビフェニール(4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCB)および4-メチルスルホニル-2,5,2',3',5',6'-六塩化ビフェニール(4-MSF-2,5,2',3',5',6'-HCB)のS依存型遺伝毒性を評価するために、ヒトリンパ球培養細胞の姉妹染色分体交換(SCEs)誘発性について研究した。また、カネミ油症の主要原因物質である2,3,4,7,8-五塩化ダイベンゾフラン(PenCDF)や毒性が非常に高い2,3,7,8-四塩化ダイオキシン(TCDD)あるいは3,4,5,3',4'-五塩化ビフェニール(Co-PenCB)が共存する場合のSCEs誘発性についても検討した。そして、次のような結果が得られた。

1) ポジティブコントロール化学物質として用いた7,8-ベンゾフラボン(4×10^{-5} Mあるいは11 ppm)は単独でも、またPenCDF(3.9 ppb)、TCDD(1.5 ppb)やCo-PenCB(8.8 ppb)が共存する場合でもSCEs誘発性を示した。2) 5種類のMSF-PCBs同族体のうち2種類、つまり3-MSF-2,5,2',4',5'-と4-MSF-2,5,2',3',4'-PenCBはそれぞれ5.2と5.8 ppmの濃度でSCEsの形成を高めた。3) 3-MSF-4,5,3',4'-TCB(6.8 ppm)と4-MSF-2,5,2',3',5',6'-HCB(9.6 ppm)はPenCD、TCDDあるいはCo-PenCBのいずれかが共存する場合、有意なSCEs誘発性を示した。

この研究で用いたMSF-PCBs同族体の濃度は健常者の肺や脂肪組織のおよそ35,000倍も高い濃度であることから、実際の体内でMSF-PCBsによりSCEs誘発のようなS依存型遺伝毒性が生じるかどうかは疑問である。しかし、これまでの研究でMSF-PCBsは非S依存型遺伝毒性物質とみなされていないか、あるいは非常に弱いと考えられている。ところが、今回の研究から、MSF-PCBsはむしろS依存型遺伝毒性物質とみなすほうが妥当と判断される。

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

長崎大学医療技術短期大学部

吉村俊朗・沖田実

ケアハウスリエゾン長崎

川副巧成

長崎北病院

中野治郎

長崎大学第一内科

中尾洋子

Influential Factors in Elevation of Serum Creatine Phosphokinase for the Patients with Kanemi Yusho

Toshiro YOSHIMURA and Minoru OKITA

School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852-8520

Kosei KAWAZOE

Care House Liaison Nagasaki, Nagasaki 850-0992

Jiro NAKANO

Nagasaki KITA-Hospital, Nagasaki 852-8061

Yoko NAKAO

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

Abstract We studied the etiology of the elevation of serum creatin phosphokinase (CK) using the data from routine medical checkup of Kanemi Yusho patients during 1995 and 1997. We also studied the serum CK and blood urea nitrogen (BUN) in rats given the polychlorinated biphenyls as well as controls, and conducted optical microscopic observation of muscle tissue in rats given the polychlorinated biphenyls and control. The patients with elevation of serum creatine phosphokinase also showed the elevation of BUN and polychlorinated biphenyls in their serum. These are thought to be triggers of the elevation of CK in the serum. However, animal experiments failed to yield the same results as human. The rats given polychlorinated biphenyls showed atrophy of muscle fibers. Accordingly, we were unable to clarify the etiology of CK elevation in humans and muscle atrophy in rats.

目 的

カネミ油症患者検診において血清クレアチンキナーゼ (以下, 血清 CK) の上昇が受診者の約 20% に認められている¹²⁾ が, その要因は不明である. 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⁹⁾. 一方, PCB は血中の甲状腺ホルモンの低下を来すこと⁴⁾⁸⁾¹¹⁾ や末梢神経障害を惹起すること²⁾⁶⁾ が動物実験で報告されている.

そこで, カネミ油症検診者で認められる血清 CK の上昇の要因を平成 7 年~9 年度の検診データから検討

した。さらに、ラットを用いた動物実験からも検討を加えた。

研究方法

1. 検診データ

平成7年～9年度までのカネミ油症検診受診者のうち血清CKを測定できた延べ282名を今回の研究対象とした。なお、各年度の対象者数は、平成7年度が84名、平成8年度が101名、平成9年度が97名であった。

サンプリングデータとしては、検診カルテより血清CK値、血液ヘマトクリット（以下、Hct）値、血清尿素窒素（以下、BUN）値、血液中のPCB濃度、ならびにfree T4、TSHの値を得た。また、検診の日の仕事の状況を聴取し、その程度を肉体労働なし、軽労働、中労働、重労働にランク付けした。

分析にあたっては、まず血清CK値をもとに対象者を2群に振り分けた。すなわち、血清CK値が198 IU/l未満の者を正常群、198 IU/l以上の者を上昇群とし、各データをこの2群間で比較した。なお、統計処理には、t検定と χ^2 検定を用い、有意水準は5%未満とした。

2. 動物実験

実験動物には4週齢のSprague-Dawley系雄ラット9匹を用い、PCB投与群（n=4）と対照群（n=5）に分けた。PCB投与群に対しては、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一回あたり0.15 mlの量を1週間に5回の頻度で経口投与した。また、投与量は2週毎に0.15 mlずつ増やし、延べ8週間投与した。その結果、ラット1匹あたりのPCBの総投与量

は450 mgとなった。一方、対照群には同量のサラダ油のみを8週間経口投与した。

2群のラットとも実験開始10週後にエーテル麻酔下で尾部静脈より採血を行い、血清CK値、BUN値、血液内のPCB含有量を測定した。また、長趾伸筋とヒラメ筋を採取し、筋を液体窒素で冷却したイソペンタン液内で凍結した。そして、クライオスタットにて連続横断切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン（以下、H&E）染色し、画像解析ソフトにて筋線維直径を計測した。

結果

1. 検診データ

各年度において血清CK値の上昇を認めたものは平成7年度17名（20.2%）、平成8年度21名（20.8%）、平成9年度10名（10.3%）であり、3年間の延べ数では48名（17.0%）であった。

次に、各データを2群間で比較するとHct値やfree T4、TSHの値には有意差は認められなかったが、BUN値とPCB濃度には有意差を認め、これらは上昇群が高値を示した（Table 1）。また、検診時の仕事の程度を比較すると有意差を認め、上昇群には中労働、重労働をしている者の割合が高かった（Table 2）。

2. 動物実験

実験期間中のラットの体重は2群とも有意に増加したが、その変化には2群間で有意差が認められた。そして、実験終了時の体重はPCB投与群378.5±61.7 g、対照群445.0±30.6 gで有意差を認めた（Fig. 1）。

血清CK値、BUN値については、2群間で有意差はなく、PCB含有量はPCB投与群が有意に多かった。長趾伸筋の平均筋線維直径はPCB投与群47.2±

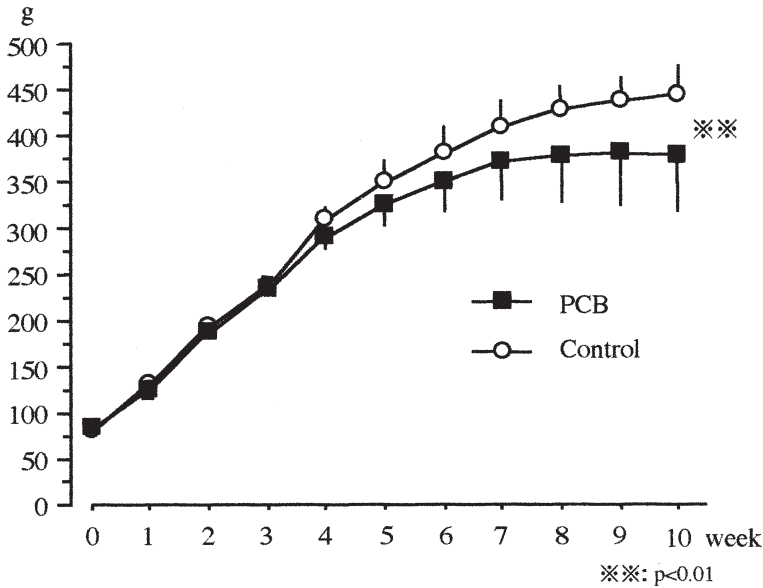
Table 1 Means and standard deviations for Hct, BUN, PCB, free T4 and TSH (n=282).

	Normal group (n=234)	Elevation group (n=48)	p-values
Hct (%)	40.8±3.8	39.9±4.2	ns
BUN (mg/dl)	16.9±5.2	19.1±10.2	p<0.05
PCB (ppm)	3.4±2.3	4.8±2.9	p<0.01
freeT4 (ng/dl)	1.2±0.3	1.1±0.3	ns
TSH (μ U/ml)	2.2±2.9	2.7±5.8	ns

Non-paired t test, ns: not significant

Table 2 Distribution for the level of work (n=279).

	Non work	Light	Moderate	Heavy
Normal group (n=232)	205 (88.3%)	21 (9.1%)	4 (1.7%)	2 (0.9%)
Elevation group (n=47)	36 (76.5%)	6 (12.8%)	2 (4.3%)	3 (6.4%)

Number (%), χ^2 test: $p < 0.05$ **Fig. 1** Changes in body weight for PCB and control groups.

13.0 μm , 対照群 54.9 \pm 14.3 μm で 2 群間に有意差を認めた。また、ヒラメ筋においても平均筋線維直径は PCB 投与群 54.1 \pm 11.1 μm , 対照群 64.0 \pm 13.4 μm で 2 群間で有意差を認めた (Fig. 2)。さらに、筋線維直径のヒストグラムをみると両筋とも PCB 投与群は対照群より左方に位置し、明らかな筋線維萎縮を認めた (Fig. 3)。しかしながら、筋線維壊死などの異常所見は認められなかった。

考 察

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、健康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⁾⁷⁾¹⁰⁾、さらに、筋細胞膜の透過性の亢進でも上昇することがある⁵⁾。そのため、今回は、検診データの分

析に加え、動物実験より PCB 中毒による筋線維や血清 CK への影響を併せて検討した。

今回の結果として検診データからは、血清 CK は、従来から報告¹²⁾しているように、BUN 値や血液内の PCB 濃度、さらには労働などにに基づく筋運動と関連している可能性が示された。また、結果には示していないが、BUN 値と PCB 濃度には有意な相関関係を認めている。したがって、血清 CK に対する BUN の影響については、検診時期が真夏の暑い時期であり、労働もしくは運動による発汗、脱水に伴うものと思われ、PCB がこれらに何らかの影響をおよぼしているのではないかと考えられる。しかし、動物実験では PCB と BUN の直接的関係は否定され、今後、運動の影響や腎機能との関係などの検討が必要であろう。

次に、種々の原因に基づく末梢神経障害により筋線

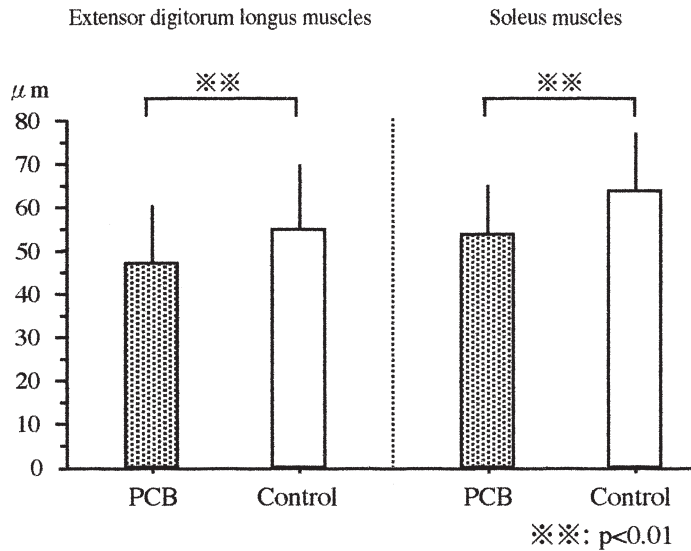


Fig. 2 Means of muscle fiber diameters for PCB and control groups.

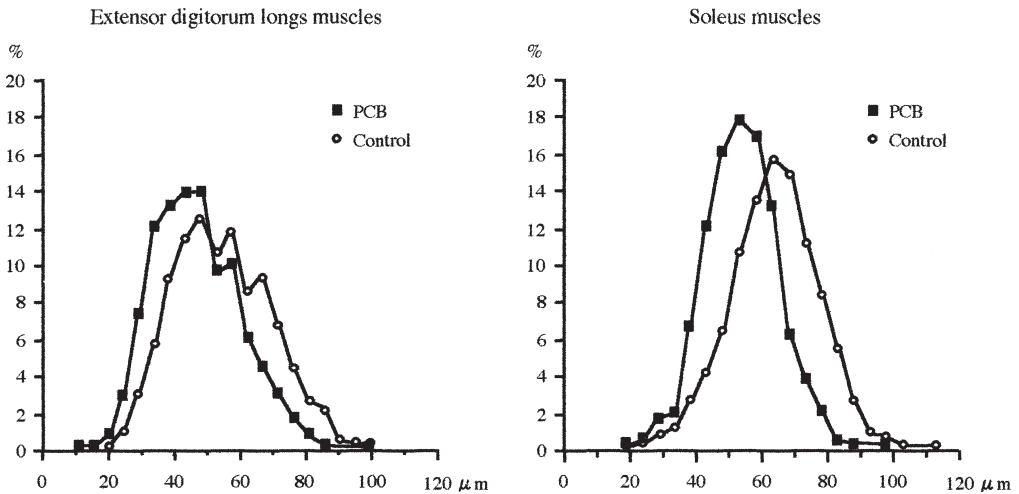


Fig. 3 Percent distribution of muscle fiber diameters for PCB and control groups.

維萎縮が発生することは知られているが、PCB 中毒に基づく筋線維萎縮の発生に関しては、これまで一定した見解は示されていない。今回の結果から、PCB 投与群には Type II 線維を主とする長趾伸筋、Type I 線維を主とするヒラメ筋ともに明らかな筋線維萎縮を認めた。このことは、PCB 投与群で体重増加が少ないた

め筋線維の発育不良などの要因も考えられる。しかし、PCB は末梢神経の髄鞘に取り込まれ、シュワン細胞膜に影響を与え、有髄神経の発育障害を惹起する可能性がある³⁾¹³⁾。今回確認された筋線維萎縮は PCB 中毒による末梢神経障害に基づく二次的变化の可能性が推測される。血清 CK は、個々のラットで個体差が大きく、

筋萎縮との関連性は明らかにできなかった。

以上のことから、カネミ油症患者においては、血清CKの上昇し易い状態が認められるが、先の研究³⁾¹²⁾¹³⁾や今回の研究からはその原因が筋組織の変化によるものか、末梢神経の変化に伴うものか、また、その他の影響によるものかは言及できず、今後さらに検討が必要である。

ま と め

カネミ油症検診者で認められる血清CK上昇の要因を平成7年～9年度の検診データから検討し、加えて、ラットを用いた動物実験からも検討した。検診者の中で血清CK値が上昇している者は、BUN値とPCB濃度も高値を示し、血清CKの上昇の要因の一つと考えられた。しかし、動物実験ではBUNとPCBとの直接的関係は否定され、今後、運動の影響や腎機能との関係などの検討が必要である。また、PCB投与によって筋線維萎縮が認められた。

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) 伊藤 聖, 吉村俊朗, 古屋孝文, 辻野 彰, 末永章人, 長瀧重信: Polychlorinated Biphenyls (PCB) の末梢神経再生へおよぼす影響. *福岡医誌* 86: 267-272, 1995.
- 4) Koopman-Esseboom C, Morse DC, Weisglas-Kuperus N, Lutkeschipholt I J, Van der Pauw C G,

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.

5) Kuipers H: Exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med* 15: 132-135, 1994.

6) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司: 油症患者における神経学的所見. *福岡医誌* 60: 462-463, 1969.

7) 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.

8) 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.

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

10) 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.

11) Stone R: Environmental toxicants under scrutiny at Baltimore meeting, news. *Science* 267: 1770-1771, 1995.

12) 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.

13) 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.

(受付 1999-3-11)

コプラナーPCBによる 小胞体局在性ストレスタンパク質の発現抑制

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

田崎 健二・石井 祐次

石田 卓巳・小栗 一太

Suppression of Stress Proteins in Endoplasmic Reticulum in Liver Cytosol of Rats Treated with a Highly Toxic Coplanar PCB

Kenji TASAKI, Yuji ISHII, Takumi ISHIDA and Kazuta OGURI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University,
Fukuoka 812-8582*

Abstract The present study was addressed on the effect of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) to the expression of glucose regulated protein (GRP) 78 and GRP94 in liver endoplasmic reticulum of rat by treatment with the schedule after acute or subacute exposure. In the acute exposure, male Wistar rats received PenCB in corn oil at once a dose of 25 mg/kg i.p., then at 5 days after treatment the microsomes were prepared. Free- and pair-fed control groups were given the vehicle. The microsomal proteins were separated on SDS-PAGE, transferred to membrane and blotted using anti-sera to the GRPs. The reduction of GRP78 and GRP94 was associated significantly with the acute exposure. In subacute exposure, the rats received PenCB in corn oil at once a dose of 0.1 or 1.0 mg/kg i.p. At 4 weeks after treatment, liver microsomes were obtained. The expression level of GRP78 and GRP94 are also decreased at 1.0 mg PenCB/kg treatment as similar as the acute exposure. But the reduction was not notable at 0.1 mg PenCB/kg treatment. GRP78 and GRP94 are a member of GRPs and the expression is regulated by glucose in cells as stress proteins. GRP78 and GRP94 have also the function for chaperone protein. Chaperone proteins have important physiological functions against synthesized and/or denatured proteins, which include assembling, folding of proteins. Our results suggested that a part of the toxicity of PenCB is associated to significant decrease of the chaperone proteins in the endoplasmic reticulum.

緒 言

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は、ビフェニルに塩素が置換した化合物の総称であり、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*a*-dioxin, いわゆるダイオキシンに代表される高毒性の多塩素化芳香族炭化水素の一つである。PCB は、多くの優れた物性(化学的安定性、脂溶性、不燃性、高絶縁性、粘着性など)を有するため、広く産業界に取り入れられてきた。しかし、現在、PCB は環境中に広く分布しており、その物性および高蓄積性から食物連鎖を通じたヒトへの残留とそれに伴う健

康障害が危惧されている。我が国では、1968年に西日本一帯で発生したカネミ油症事件の原因物質の一つとしてよく知られている¹⁾²⁾²⁵⁾²⁶⁾。油症患者の症状として、塩素ニキビや色素沈着などの皮膚症状、また全身症状として、月経異常などの内分泌症状、倦怠感、頭痛、腹痛および手足のしびれなどの自覚症状が知られている⁴⁾。しかし、油症の発症機構については未だ不明な点が多く、現在まで確固たる治療法も見い出されていないままである。

PCBの中でも、平面構造をとりやすいPCBであるコプラナーPCBは、比較的毒性の高いことが知られて

いる。中でも3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) は、PCB中最強の急性毒性をもつことが知られている。これまでの実験動物を用いた研究から、ダイオキシンやコプラナーPCB、ならびにその類縁化合物は、体重増加抑制、胸腺や脾臓の萎縮、免疫機能低下、生殖障害、催奇形成など多種多様の毒性を示すことが明らかになっている¹⁴⁾¹⁷⁾²⁶⁾²⁸⁾。これらの毒性発現には、細胞質中の aryl hydrocarbon receptor (Ah-receptor) が関与すると考えられている。しかしながら、コプラナーPCBやダイオキシン類の毒性は多面的であるため、Ah-receptorのみで説明するには不十分な点も多く、今なおその毒性発現機構が十分に解明されたとは言い難い状況にある。

細胞内において、形質膜やゴルジ体、リソソームのような細胞内小器官に輸送されるタンパク質もしくは細胞外へ分泌されるタンパク質は、小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) においてポリペプチドの折り畳み (folding) や会合 (assembly) を受けると考えられている。特に、ある種の分泌タンパク質は、小胞体内において折り畳みや会合など各種の調節を受けることで、分泌の調節を受けていると考えられている⁵⁾。その小胞体に普遍的に存在するタンパク質が、グルコース調節タンパク質 (glucose regulated protein, GRP) である。GRPは、ストレスタンパク質の1種であり、タンパク質を小胞体に蓄積させるような種々のストレスにより誘導されることが知られているが⁹⁾、タンパク質の折り畳みや会合などを調節する、いわゆるシャペロンタンパク質であることも示唆されている⁵⁾¹²⁾。このことから、生体内における分泌タンパク質の分泌異常には、このGRPに何らかの変化が生じている可能性が考えられる。

以上のような背景を基に、我々は、PenCB処理ラット肝臓におけるGRPの発現量の変化を、特異的な抗体を用いた免疫化学的手法を用いることで検討した。さらに、その結果から、コプラナーPCBによる毒性発現機構の解明を試みた。

実験方法

1. 実験材料

PenCBは、Saekiらの報告¹⁹⁾に従って、当研究室で合成されたものを使用した。GRP78標準タンパク質

(hamster; recombinant expressed in *E. Coli*) は、Sigma社より購入した。抗ラットGRP78 C-末端12アミノ酸ペプチドに対するウサギポリクローナル抗体は、Affinity Bioreagents社より、抗ラットGRP78 C-末端6アミノ酸ペプチドおよび抗ラットProtein disulfide isomerase (PDI) に対するマウスのモノクローナル抗体は、Stress Gen社より購入した。また、抗マウスGRP94ウサギ抗血清²⁾は、宮田愛彦先生(京都大学ウィルス研究所)より供与された。

2. 薬物処理およびマイクロソームの調製

急性暴露実験においては、3週齢Wistar系雄性ラット(体重40-50g)を1週間ステンレスケージにて飼育、馴化した後、4週齢にて実験に供した。ラットは、PenCB処理群、free-fedコントロール群およびpair-fedコントロール群の3群に分け、PenCB処理群には、PenCBを25mg/kg body weightとして、腹腔内に単回投与した。Free-fedおよびpair-fedコントロール群には、corn oilのみを投与した。前者は、自由に摂食させ、後者には体重あたりの摂餌量がPenCB処理群と同じになるように飼料を与えた。全実験群について、最終投与5日後肝臓を摘出した。

亜急性暴露実験においては、1週間馴化したWistar系雄性ラット(4週齢)を、free-fedコントロール群、PenCB 0.1mg/kg処理群およびPenCB 1.0mg/kg処理群の3群に分け、各群corn oilもしくはPenCBを、腹腔内に単回投与した。全実験群について、最終投与4週間後に肝臓を摘出し、実験に供した。

肝臓は、氷冷生理用食塩水にて十分灌流したあと、3容量の0.5mM dithiothreitolを含む10mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer-0.25M sucrose-0.1mM EDTAでホモジナイズし、9,000×gで20分間遠心分離した。この遠心上清をさらに105,000×gで60分間遠心分離した。この沈殿を、10mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer-0.15M KCl-0.1mM EDTAでホモジナイズして洗浄し、105,000×gで60分間遠心分離した。この沈殿を10mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer-2% glycerol-0.1mM EDTAに懸濁し、マイクロソーム分画とした。調製したマイクロソーム分画は小分けし、使用まで-80°Cに保存した。

3. SDS-polyacrylamide gel電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGEは、Laemmliらの方法⁷⁾に従った。

4. Immunoblotting

SDS-PAGEにてタンパク質を分離後、Towbinらの方法²³⁾に従い、セミドライ式プロットング装置でpolyvinylidene difluoride (PVDF)膜に転写した。転写後、PVDF膜を5%スキムミルク (in PBS-Triton X-100)で37°C, 60分間blockingを行った後、400倍希釈した抗マウスGRP94タンパク質抗血清もしくは1000倍希釈した抗ラットGRP78ペプチド抗血清として調製した1次抗体につけ、4°Cで一晩インキュベートした。1次抗体との反応終了後、PVDF膜をPBS-Triton X-100につけ、室温で5分間×6回洗浄した。洗浄終了後、PVDF膜を2次抗体につけ、室温で30分間インキュベーションした後、先程と同様の操作で洗浄した。免疫化学的な発色は、Blakeらの方法¹⁾に準じて行った。

実験結果

1. PenCBによる78kDaグルコース調節タンパク質 (GRP78)の発現抑制

我々は、PenCBのGRP78の発現量に対する影響を明らかにするために、PenCB処理ラット肝ミクロソーム分画におけるGRP78の発現量をイムノプロットングにより検討した。その結果をFig. 1に示している。Fig. 1から明らかなように、PenCB処理ラット肝ミクロソームにおけるGRP78の発現レベルは、free-fedおよびpair-fedコントロール群に比べて著しく低いものであった。また、Fig. 1において、GRP78よりも高分子量側に見られるバンドについては、そのバンドの位置から、GRP94であると考えられた。

2. PenCBによる94kDaグルコース調節タンパク質 (GRP94)の発現抑制

次に、GRP94に対して同様の検討を行った。Fig. 2には、SDS-PAGEでタンパク質を分離後、イムノプロットングを行った結果を示している。これより、PenCB処理群のラット肝ミクロソーム分画において、GRP94の発現量も著しく抑制されていることが明らかとなった。

3. GRP78およびGRP94に対するPenCBの亜急性暴露による影響

次に、GRP78およびGRP94の発現に対する、PenCBの亜急性暴露の影響を調べるため、PenCBをそれぞれ0.1および1.0 mg/kg腹腔内に単回投与し、投与4週間後肝臓を摘出しミクロソームを調製した。Fig. 3およびTable 1には、それぞれの投与群における体重変化および臓器重量を示している。PenCBを

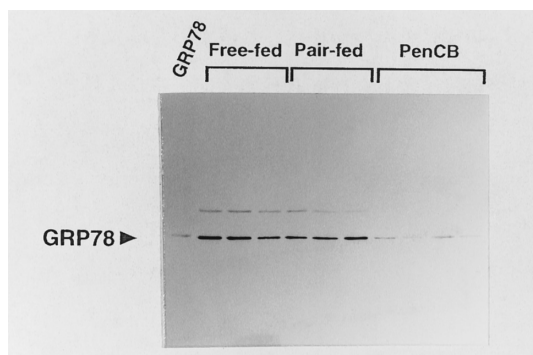


Fig. 1 Immunoblot analysis of liver microsomes of 4-week-old rats using anti-GRP78 antibody.

Liver microsomal protein (1μg) from free-fed control, pair-fed control and PenCB (25 mg/kg)-treated rats was subjected to SDS-PAGE (7.5%). GRP78; hamster recombinant protein (10 ng).

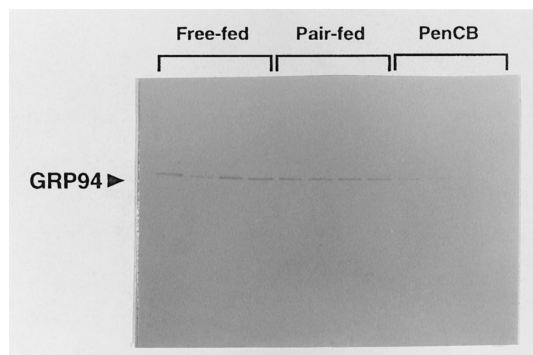


Fig. 2 Immunoblot analysis of liver microsomes of 4-week-old rats using anti-GRP94 antibody.

Liver microsomal protein (1μg) from free-fed control, pair-fed control and PenCB (25 mg/kg)-treated rats was subjected to SDS-PAGE (7.5%).

1.0 mg/kg 処理した群において、投与7日目から、free-fed コントロール群に比べ、有意な体重増加抑制現象が見られた。また、臓器重量については、0.1 および 1.0 mg/kg 処理において、肝肥大が認められ、1.0 mg/kg 処理群においては、腎肥大も認められた (Table 1)。以上の結果は、既知のものとはほぼ一致しており²⁷⁾、PenCB 1.0 mg/kg 処理群において、亜急性の毒性が認められていることが明らかとなった。

次に、それぞれの処理群における GRP78 および GRP94 の発現量をイムノプロテイングで検討した結果を Fig. 4 および Fig. 5 に示している。これらの結果より、GRP78 および GRP94 の発現量は、PenCB 0.1 mg/kg 処理群では、free-fed コントロール群と大差ないものの、1.0 mg/kg 処理群では、減少していることが明らかとなった。さらに、GRP78 および GRP94

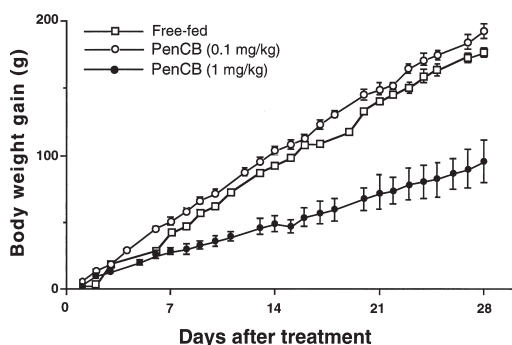


Fig. 3 Effect of PenCB treatment on body weight gain of rats.

The values represent the mean \pm S.E. The number in parenthesis represents the dose of PenCB (mg/kg body weight).

Table 1 Effect of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) treatment on tissue weight of rats.

		tissue weight (g/100g body weight)	
		liver	kidney
free-fed controls	(5)	3.578 \pm 0.132	0.657 \pm 0.019
PenCB (0.1 mg/kg)	(5)	4.764 \pm 0.159**	0.705 \pm 0.025
PenCB (1 mg/kg)	(3)	5.231 \pm 0.145***	0.809 \pm 0.015*,††

The figure in parenthesis represents number of animals used. Significantly different from free-fed controls; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.005$.

Significantly different from PenCB (0.1mg/kg); ††, $P < 0.001$. The values represent the mean \pm S.E.

は、PenCB 処理後、長期間にわたって発現が抑制されている可能性が示唆された。

4. PenCBによる他の小胞体滞留性タンパク質の発現量への影響

これまでに、小胞体内腔の可溶性タンパク質の多くが、そのC末端にKDELまたはそれに類似する構造をもつことが知られており、さらにこれらのタンパク質の小胞体内腔への滞留に関してKDEL receptorの寄与が示唆されている⁸⁾¹³⁾²⁰⁾²²⁾。GRP78やGRP94もそのC末端にKDEL配列を有していることから、同様の機構で小胞体内腔に局在するものと考えられている¹⁰⁾¹⁶⁾。そこで、PenCBによるGRP78およびGRP94の減少が、KDEL receptorの減少によるものか否か検討するために、他の小胞体滞留性タンパク質について、急性および亜急性暴露時における発現量の変化をイムノプロテイングで検討した。

Fig. 6には、マウス抗PDIモノクローナル抗体を用いたイムノプロテイングの結果を示している。これより、PenCB急性暴露状態におけるラット肝ミクロソーム分画でのPDIの発現量は、free-fedコントロール群に比べ減少するものの、その発現量はpair-fedコントロール群と同程度であることが明らかとなった。

Fig. 7には、亜急性暴露における発現量を検討した結果を示している。この結果から示されるように、PenCB 0.1 および 1.0 mg/kg 処理群のラットで、free-fed コントロール群に比べPDIが誘導されることが明らかとなった。また、PenCB 1.0 mg/kg 処理群のほうが、0.1 mg/kg 処理群に比べ発現レベルが高いことも併せて示された。なお、この抗PDI抗体は、PDI

だけでなく calreticulin も認識することが知られている。分子量から考えて、Fig. 7 においては、分子量の高い方のバンドが、PDI であると考えられた。

考 察

本研究では、PenCB 処理ラット肝ミクロソーム分画における GRP の発現量の変化についての検討を行った。その結果、GRP78 および GRP94 の発現量が著しく減少することを初めて見出した。

ダイオキシン類やコプラナーPCB は、生体において多種多様なタンパク質の発現量に影響を与えることが知られているが、当教室の加藤らは、糖代謝に関与する多くの酵素の活性が、PenCB 処理ラットにおいて有意に低下することを明らかにしている (H. Kato, Y. Ishii and K. Oguri, unpublished data)。また、この報告以外にも、グルコース輸送体の発現抑制、インスリンなどの分泌抑制などの作用があることも知られており¹⁵⁾、PenCB による糖利用率の低下が示唆されてい

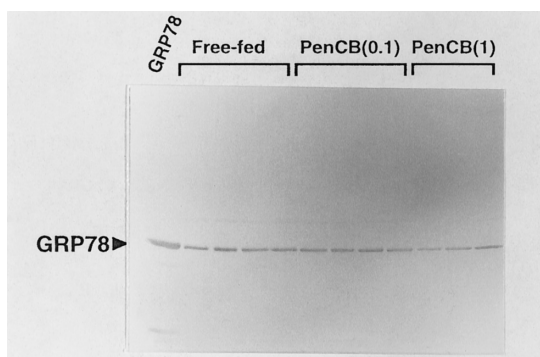


Fig. 4 Immunoblot analysis of liver microsomes of 8-week-old rats using anti-GRP78 antibody.

Liver microsomal protein (2 μ g) from free-fed control and PenCB (0.1 or 1 mg/kg)-treated rats was subjected to SDS-PAGE (7.5%). GRP78; hamster recombinant protein (1 μ g).

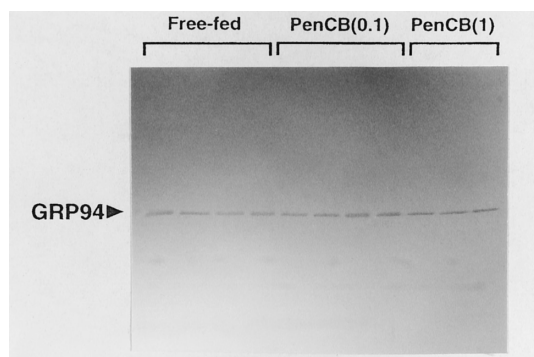


Fig. 5 Immunoblot analysis of liver microsomes of 8-week-old rats using anti-GRP94 antibody.

Liver microsomal protein (1 μ g) from free-fed control, control and PenCB (0.1 or 1 mg/kg)-treated rats was subjected to SDS-PAGE (7.5%).

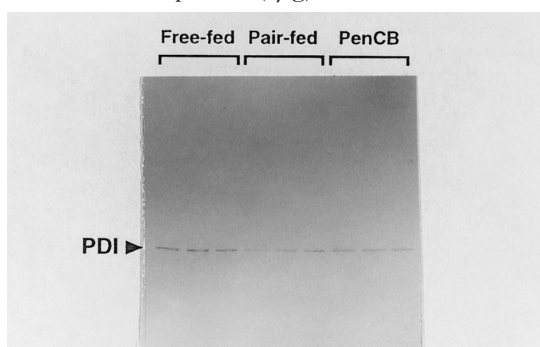


Fig. 6 Immunoblot analysis of liver microsomes of 4-week-old rats using anti-PDI antibody.

Liver microsomal protein (2 μ g) from free-fed control, pair-fed control and PenCB (25 mg/kg)-treated rats was subjected to SDS-PAGE (9.0%).

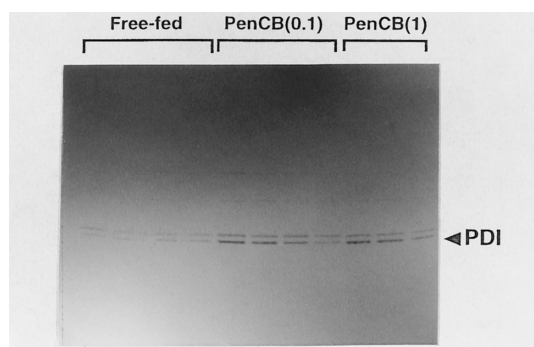


Fig. 7 Immunoblot analysis of liver microsomes of 8-week-old rats using anti-PDI antibody.

Liver microsomal protein (2 μ g) from free-fed control and PenCB (0.1 or 1 mg/kg)-treated rats was subjected to SDS-PAGE (9.0%).

る。一方、GRP は、グルコース飢餓の状態で顕著に誘導されるタンパク質として知られている⁶⁾。これらのことを考えた場合、PenCB による糖利用率の低下が、GRP の発現量に影響を与えている可能性が考えられる。

GRP78 および GRP94 は、さまざまなストレス状態により、その発現量が増加することが知られている。GRP78 および GRP94 の発現調節については、小胞体内腔での折り畳みのうまくいかないタンパク質の蓄積という共通した因子で誘導されることから、そのプロモーター領域に関する研究が始められ、ストレス応答に対する極めて保存された領域が見い出されている⁹⁾。Dhahbi らは、マウスにおいて、食餌量の制限を行った結果、肝臓特異的にそれぞれの mRNA のレベルが減少することを見い出している³⁾。PenCB 処理ラットにおいて、摂餌量の減少が生じることを考えた場合、GRP78 および GRP94 の発現量の減少は、PenCB 処理に伴う食餌量の減少に起因していることが考えられるかもしれない。しかし、我々の結果から、GRP78 および GRP94 は、食餌量を合わせた pair-fed コントロール群よりも著しく減少していた (Fig. 1, Fig. 2)。以上のことから、PenCB 処理における GRP78 および GRP94 の発現抑制には、食餌量減少以外のほかの因子が関与しているものと考えられる。

また、Csermely らは、糖尿病を引き起こす薬物である streptozotocin をラットに処理した場合、GRP78 の mRNA 量が有意に減少し、インスリンの投与で解消されることを見い出している²¹⁾。さらに、自発性糖尿病を引き起こす Zucker rat では、GRP78 の mRNA 量には変化がないものの、タンパク質レベルで減少することが知られている²¹⁾。これらのことを考えた場合、PenCB によるインスリン分泌抑制効果¹⁵⁾も、GRP の発現抑制を説明できる可能性を秘めていると考えられる。

ところで、このような PenCB による発現量の減少が、小胞体内腔へのタンパク質の局在をコントロールしている KDEL receptor への影響によるものではなく、別の機構による可能性を示唆する結果も併せて示された (Fig. 6, Fig. 7)。すなわち、PenCB による発現量の減少は、GRP78 および GRP94 に特異的なものであると考えられ、これらのタンパク質の機能と

PenCB との毒性のあいだに深い関わりがある可能性が示唆された。

GRP78 および GRP94 は、小胞体内腔において、新規に合成された受容体タンパク質や分泌タンパク質の折り畳みや会合に関わる、いわゆるシャペロンタンパク質と考えられている⁵⁾。また、GRP94 については、分子シャペロンの機能だけでなく、何らかのシグナル伝達に関与している可能性も示唆されている²¹⁾¹⁸⁾²⁴⁾。従って、これらのタンパク質の発現量が減少した場合、細胞内におけるシグナル伝達に異常をきたすと考えられる。

決定的な治療法が確立されないまま、カネミ油症事件が発生してもう 30 年が経過しようとしている。また、一方で、コプラナー PCB による地球規模での環境汚染も深刻化しつつある。人類がコプラナー PCB の汚染による影響を受けていることを考慮すると、コプラナー PCB の毒性発現機構の解明は、必要不可欠な項目であり、そのためにさらなる基礎的研究が望まれる。

総 括

タンパク質の新規合成や、分泌タンパク質の分泌制御などに深い関わりをもつ小胞体における PenCB の影響を明確にするため、各種の特異的抗体を用いた免疫化学的手法により小胞体局在性タンパク質の発現量を検討した。小胞体において、普遍的に存在すると考えられている GRP78 および GRP94、また、小胞体局在タンパク質の局在に関わりをもつと考えられている KDEL receptor に対する影響を調べるため、それを介して小胞体に局在すると考えられている PDI の発現量の変化を特異的抗体を用いて検討した。さらに、PenCB への暴露状態の違いにおける影響を調べるため、投与量および暴露期間を変更したラットのミクロソーム分画についても、同様の検討を行った。これらの検討の結果、以下の知見が得られた。

- 1) イムノプロットングを行った結果から、4 週齢での PenCB (25 mg/kg) 処理ラット肝ミクロソーム分画において GRP94 および GRP78 の発現が抑制されることを明らかにした。
- 2) この抑制は、free-fed コントロール群だけでなく、食餌量を制限させた pair-fed コントロール群よりも著しいものであったことから、PenCB によ

る何らかのGRP94およびGRP78発現抑制機構の存在が示唆された。

- 3) PenCB低用量処理による検討も含め、ラットに生じる毒性とGRP78およびGRP94の減少に関連性があることを見出した。

これらGRPタンパク質の発現抑制現象とコプラナーPCBの毒性との関連性を明らかにするには、未解明な点が多く残されている。しかし、PenCBによる、GRP78およびGRP94の著しい現象は、PenCBの毒性と密接に関連した現象ではないかと考えられる。GRP78およびGRP94の発現抑制機構の解明と、発現の減少に伴う生体内での変化を明らかにすることは、未だ解明されていない点が多いコプラナーPCBの毒性発現機構の解明に新たな知見を与えるものであると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、貴重なウサギ抗マウスGRP94抗血清を御供与頂きました。京都大学ウィルス研究所の宮田愛彦先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Blake MS, Johnston KH, Russell JG and Gotschlich EC: A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136: 175-179, 1984.
- 2) Csermely P, Miyata Y, Schnaider T and Yahara I: Autophosphorylation of grp94 (endoplasmic). *J. Biol. Chem.* 270: 6381-6388, 1995.
- 3) Dhahbi JM, Mote PL, Tillman JB, Walford RL and Spindler SR: Dietary energy tissue-specifically regulates endoplasmic reticulum chaperone gene expression in the liver of mice. *J. Nutr.* 127: 1758-1764, 1997.
- 4) Goto M and Higuchi K: The symptomatology of Yusho in dermatology. *Fukuoka Acta Medica* 60: 409-431, 1969.
- 5) Haas IG: BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia* 50: 1012-1020, 1994.
- 6) Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ and Sambrook J: The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332: 462-464, 1988.

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

8) Lewis MJ and Pelham HR: A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348: 162-163, 1990.

9) Liu ES and Lee AS: Common sets of nuclear factors binding to the conserved promoter sequence motif of two coordinately regulated ER protein genes, GRP78 and GRP94. *Nucleic Acids Res.* 19: 5425-5431, 1991.

10) Maki RG, Old LJ and Srivastava PK: Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 5658-5662, 1990.

11) Masuda Y and Yoshimura H: Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance: a review. *Am. J. Ind. Med.* 5: 31-44, 1984.

12) Melnick J, Dul JL and Argon Y: Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370: 373-375, 1994.

13) Munro S and Pelham HR: A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48: 899-907, 1987.

14) Nishizumi M: Toxicity of PCBs, PCDFs and related compounds. in YUSHO (Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M and Masuda Y, Eds.), pp. 83-102. Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.

15) Nishizumi M and Higaki Y: Studies on mechanism of wasting syndrome in TCDD-intoxicated rats. *Fukuoka Acta Medica* 88: 200-204, 1997.

16) Pedersen RC and Brownie AC: Steroidogenesis-activator polypeptide isolated from a rat Leydig cell tumor. *Science* 236: 188-190, 1987.

17) Poland A and Knutson JC: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22: 517-554, 1982.

18) Ramakrishnan M, Schonthal AH and Lee AS: Endoplasmic reticulum stress-inducible protein GRP94 is associated with an Mg^{2+} -dependent serine kinase activity modulated by Ca^{2+} and GRP78/BiP. *J. Cell. Physiol.* 170: 115-129, 1997.

19) Saeki S, Yoshihara S, Uchino Y and Yoshimura H: Improved method of the synthesis of 3,

4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (author's transl). Fukuoka Acta Medica 70 : 85-87, 1979.

20) Semenza JC, Hardwick KG, Dean N and Pelham HR : ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. Cell 61 : 1349-1357, 1990.

21) Szanto I, Gergely P, Marcsek Z, Banyasz T, Somogyi J and Csermely P : Changes of the 78 kDa glucose-regulated protein (grp78) in livers of diabetic rats. Acta Physiologica Hungarica 83 : 333-342, 1995.

22) Teasdale RD and Jackson MR : Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 12 : 27-54, 1996.

23) Towbin H, Staehelin T and Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 : 4350-4354, 1979.

24) Trujillo R, Miro F, Plana M, Jose M, Bollen

M, Stalmans W and Itarte E : Substrates for protein kinase CK2 in insulin receptor preparations from rat liver membranes : identification of a 210-kDa protein substrate as the dimeric form of endoplasmic reticulum chaperonin. Arch. Biochem. Biophys. 344 : 18-28, 1997.

25) Tsukamoto H et al. : The chemical studies on detection of toxic compounds in the rice bran oils used by the patients of Yusho. Fukuoka Acta Medica 60 : 496-512, 1969.

26) 吉田 隆, 増田義人 : ごみ処理に係るダイオキシン類の発生防止等技術—人体影響から新ガイドラインへの対応まで—. NTS (東京) pp.25-52, 1997.

27) 吉田 隆, 宮田秀明 : ごみ処理に係るダイオキシン類の発生防止等技術—人体影響から新ガイドラインへの対応まで—. NTS (東京) pp.152-183, 1997.

28) 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 1999-3-25)

高毒性コプラナーPCBによるラット肝分子シャペロン HSP70 および HSP90 の誘導

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室
福田亜弥子・石井祐次・田崎健二¹⁾
松末公彦²⁾・石田卓巳・小栗一太

Induction of Molecular Chaperones HSP70 and HSP90 in Rat Liver Cytosol by a Highly Toxic Coplanar PCB

Ayako FUKUDA, Yuji ISHII, Kenji TASAKI, Kimihiko MATSUSUE
Takumi ISHIDA and Kazuta OGURI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University,
Fukuoka 812-8582, Japan*

Abstract We report here that a highly toxic coplanar polychlorinated biphenyl (PCB), 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) induces molecular chaperones, HSP70 and HSP90 in liver cytosol of rats. Male Wistar rats received PenCB in corn oil once at a dose of 25 mg/kg i.p. Pair-fed control groups were treated with the vehicle and given the amount of chow matched with that taken by the PenCB-treated animals, and free-fed controls were given the vehicle. The liver cytosolic HSP70 level in rats treated with PenCB was 5-fold higher than those in free-fed controls, though that for pair-fed controls was approximately 2-fold higher than that in free-fed controls. The liver cytosolic HSP90 α and HSP90 β levels were also higher in PenCB-treated rats than in both control groups, but the induction extent was lesser than that for HSP70. Inductive effect on the chaperones was examined with a single different dose of PenCB 0, 0.5, 1.0, 5.0, 10 and 25 mg/kg. Marked induction of the HSP70 level was observed with a minimum dose of PenCB 0.5 mg/kg. The HSP90 α level was induced with PenCB-dose dependent manner although the HSP90 β induction was greatest with a dose of PenCB 5.0 mg/kg. HSP70 and HSP90 are essential for cells under normal conditions and act as molecular chaperones. HSP90 is well known to modulate the function of sex steroid hormone or aromatic hydrocarbon receptors while HSP70 is required for receptor-HSP90 heterocomplex assembly. The role of molecular chaperones may be involved in the endocrine disrupting properties of coplanar PCB and dioxins.

緒 言

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は塩素の置換位置や数の相違により理論上 209 種類の異性体が存在し、各異性体間の毒性は大きく異なることが知られている。これら PCBs の中でオルト位に塩素置換を持たない異性体は共偏平構造をとり易く、Coplanar PCB と呼

ばれる。なかでも本研究に用いた 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (IUPAC PCB126, PenCB) は PCB 異性体中で最強の急性毒性を示す⁸⁴⁾。Coplanar PCB や polychlorinated dibenzofuran に代表される高毒性多塩素化芳香族炭化水素は、油症の原因物質として知られている。また今日、PCB は内分泌攪乱化学物質の一つとして生殖機能に与える影響も危惧されているが¹⁶⁾²²⁾⁸⁰⁾、その毒性の生化学的メカニズムは十分には解明されていない。

Coplanar PCBs の毒性発現メカニズムの解明が遅

1) 現パナファームラボラトリーズ

2) 現国立九州ガンセンター臨床研究部 化学療法研究室

れている要因に、その多面的な毒性がある。これらの化合物は一般に、体重増加抑制、胸腺や脾臓の萎縮、肝肥大、免疫機能低下、生殖障害などの毒性を示すことが知られているが²⁰⁾⁵⁶⁾⁸²⁾、この生物学的効果の少なくとも一部は細胞質に存在する aryl hydrocarbon receptor (Ah-receptor, AhR) 依存性メカニズムを介すると考えられている⁵⁸⁾。

Ah-receptor は 90kDa heat shock protien (HSP90) と複合体を形成して細胞質内に存在しており⁸⁾、リガンドが結合すると HSP90 は解離し核内に移行する。次いで Ah-receptor nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成し、特異的に xenobiotic responsive element (XRE) と呼ばれる consensus 配列に結合して転写を活性化する²⁰⁾⁶⁴⁾。事実、Coplanar PCB や 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) により誘導される cytochrome P4501A1 (CYP1A1), NAD(P)H : quinone oxidoreductase, glutathione-S-transferase Ya subunit, UDP-glucuronosyltransferase 1A6 遺伝子にはいずれも XRE の制御配列がプロモーター領域にあることが明らかであり¹⁷⁾³⁸⁾⁴⁴⁾⁶⁵⁾、これは AhR/Arnt のヘテロ二量体が転写制御機構に関与していることを強く示唆するものである。しかし、動物の系統差や種差で示されるダイオキシン類に対する感受性の大きな違いが、Ah-receptor の発現量、あるいは親和性で全て説明されるか否かは今のところ明らかではなく、いまなお、その毒性発現機構が十分に解明されたとは言い難い状況にある。

Coplanar PCB や TCDD の暴露によりラットにおいて血糖値の低下が起こる⁵⁷⁾⁵⁹⁾⁷⁷⁾。また、グルコース輸送体の発現抑制やインスリンの分泌抑制などの作用による⁴⁶⁾⁵⁹⁾糖利用率の低下も示唆されている。さらに、当研究室において、これまで糖代謝に関与する多くの酵素活性が PenCB 処理ラット肝において有意に低下することを明らかにしている³³⁾³⁷⁾⁵⁷⁾。糖新生の key enzyme である phosphoenol pyruvate carboxykinase 活性は、PenCB 処理によってモルモットでは誘導され、ラットでは抑制される⁵⁷⁾。また、解糖系酵素である Aldolase の肝型 isoform である Aldolase B が、タンパク質レベルで著しく低下することも明らかになっている³³⁾。また、triose phosphate の代謝に関

わる酵素群はいずれも、PenCB 処理によって抑制されることも明らかにしている³⁷⁾。このような PenCB により糖代謝の抑制された状態においては、グルコース調節タンパク質 (glucose regulated protein, GRP) の発現量も著しく変化している。当教室の Tasaki らは、PenCB 処理により、ラット肝ミクロソーム中の GRP (GRP78 および GRP94) が著しく抑制されることを見出している⁷⁴⁾。

GRP はその名の通り、当初繊維芽細胞をグルコース飢餓状態にした時に顕著に誘導されるタンパク質として発見されたが⁶⁷⁾、その後、小胞体内腔に正常な立体構造をとれないタンパク質を蓄積させるような種々のストレスにより誘導されることが明らかとなり³⁹⁾、誘導条件の一般性からストレスタンパク質に属するようになった。

ストレスタンパク質は細菌、酵母、植物、哺乳類まで、種を超えて保存された遺伝子産物であり、環境変化に対応して抵抗力を誘導し、いわゆるストレス反応を支える一群のタンパク質である⁶²⁾。ストレス応答を誘導する刺激として最も典型的なものは温度変化であり、初めてストレス応答が報告されたのは熱ショックによってショウジョウバエの唾液腺多染染色体において特徴的なパフが形成されるという発見であった⁶¹⁾。パフは遺伝子の活性化、RNA への転写が盛んに行われている部分であり、熱ショックにより RNA 合成、ひいては蛋白合成が活性化されたことを示唆している。以来、このように熱ショックにより誘導される一群のタンパク質の存在が明らかとなり、熱ショックタンパク質 (heat shock protein, HSP) と呼ばれるようになった⁷⁵⁾。後に、培養細胞を用いた研究が進むにつれて、HSPs を誘導するのは熱だけでなく、重金属、アルコールなどの障害物質、ピューロマイシンやアミノ酸アナログ (D 型アミノ酸) などの異常タンパク質の誘導剤、グルコース飢餓、エネルギー産生系や酵素阻害剤などの代謝阻害剤など、種々の細胞障害因子によっても誘導されることが証明され、ストレス応答、ストレスタンパク質と呼ばれるようになった⁵⁾⁵²⁾。

ストレスタンパク質は種々のストレスに細胞がさらされた場合にタンパク質の変性、凝集を抑えることにより細胞を防御していると考えられていたが、その後の研究で多くのストレスタンパク質は平常時にも細胞

内でタンパク質との相互作用を通じて、細胞の正常な代謝や生存にとって必須の役割を担っていることが明らかになった。合成されたポリペプチドの折畳み (folding) や会合 (assembly) の調節、つくられたタンパク質の細胞内輸送や品質管理 (quality control)、転写因子の調節やシグナル伝達およびシグナル受容体の活性調節、さらには分解に至るまで、極めて広範な細胞機能に関わっている⁴⁾²⁶⁾⁴⁷⁾。このようなストレスタンパク質の機能的側面から、Ellisにより分子シャペロンと呼ぶことが提案され、定着した¹⁴⁾。分子シャペロンとはEllisの定義に従えば、未熟なタンパク質に一過性に結合してその folding や assembly を助け、完成した最終的な産物からは解離してゆく介助タンパク質ということになるが⁷⁾¹⁵⁾、全てのストレスタンパク質がシャペロン機能を持つか否かについては明確ではない。

多くの生物種で分子シャペロンはその分子量の違いから幾つかのファミリーに分類される⁵⁾²⁷⁾。なかでも、分子量 70kDa 前後の HSP70 ファミリーと分子量 90kDa 前後の HSP90 ファミリーは全ての生物に認められ、かつ進化の過程でよく保存されており、これら一群のタンパク質が生物に共通の重要な機能を持つことが示唆されている。事実 HSP70 および HSP90 は様々なタンパク質分子と相互作用する分子シャペロンであり、特に HSP90 はシグナル伝達において HSP70 と協同し重要な役割を果たしている³⁶⁾⁶⁰⁾。先にも述べたように、ダイオキシン類の毒性は Ah-receptor が作用発現の端緒になっていると考えられているが、一方では、サイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin- 1β (IL- 1β) や interleukin-6 (IL-6) を介して惹起される酸化的ストレスによって説明されるとも考えられている³⁾⁴⁾²⁾⁸³⁾。しかしながら、これについては、IL- 1β が Ah-receptor-gene battery であることが示されており⁷³⁾、TNF- α や IL-6 が、IL- 1β により誘導される²⁾ という、サイトカインネットワークも知られているため、Ah-receptor を介さない事象であるか否かについては、未だ十分な説明がなされたとは言い難い。当教室において、PenCB 処理による発現抑制が見い出された GRP78 および GRP94 に、それぞれ 60%、50% の相同性を持つ HSP70 および HSP90 は¹¹⁾、サイトカインによっても誘導される⁴⁹⁾⁶⁹⁾⁷²⁾。また HSP70 は GRP 同様、カロ

リ制限によって誘導されることも知られている²⁹⁾。これらの事実は PenCB が HSP70 および HSP90 にも何らかの影響を与えることを推測させる。

以上のような背景から、本研究では PenCB 処理による分子シャペロン HSP70 および HSP90 の発現への影響を調べることを目的とし、PenCB の主要な蓄積臓器であり⁹⁾、PenCB による GRP の発現抑制が確認されたラットの肝臓に注目し、HSP70 および HSP90 の発現について検討した。

実験方法

1. 実験材料

PenCB は Saeki らの方法⁶³⁾に従って合成した。HSP70 および HSP90 (bovine brain) 標品は Sigma Chemical より購入した。モノクローナルマウス抗 HSP70 抗体は Affinity Bioreagents (New Jersey, U. S. A.) より、モノクローナルラット抗 HSP90 抗体は Stress Gen Biotechnologies (Victoria, BC, Canada) より、ヤギ抗マウス IgG (アルカリホスフォターゼ標識) および抗ラット IgG (アルカリホスファターゼ標識) は、オルガノテクニカ-カペル部門 (Ohio, U. S. A.) より、スキムミルクは雪印乳業^株より polyethylene glycol mono-*n*-isooctylphenyl ether (Triton X-100 と同一成分) はナカライテスク^株より、corn oil は味の素 (株) よりそれぞれ購入した。

2. 薬物投与

6 週齢 Wistar 系雄性ラットは Charles River Japan (横浜) より購入し、九州大学薬学部動物舎にて 1 週間馴化させた後、実験に供した。PenCB は 25 mg/kg/4 ml corn oil の用量で腹腔内に単回投与し、一日当りの摂餌量を記録した。対照群には、free-fed コントロール群と pair-fed コントロール群を設けた。Free-fed コントロール群には corn oil を腹腔内投与し、食餌と水を自由に与えた。Pair-fed コントロール群には同じく corn oil を腹腔内投与し、体重当りの摂餌量を PenCB 投与群と揃え、水は自由に与えた。絶食は行わず、投与 5 日後に断頭して瀉血後、肝臓を摘出し、生理食塩液で灌流した。

PenCB 用量依存性の実験においては、PenCB 0, 0.5, 1, 5, 10 および 25 mg/kg を 7 週齢 Wistar 系ラットの腹腔内に単回投与した。なお、free-fed コン

トロールにあたる PenCB 0 mg/kg 投与群には各 PenCB 処理群と同用量のコーンオイルを投与した。上記と同様に、投与5日後に断頭して瀉血後、肝臓を摘出した。

3. 肝サイトソルの調製

摘出した肝臓は、氷冷した生理食塩液で十分灌流した後、3倍量の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer-0.25 mM sucrose-0.1 mM EDTA でホモジナイズした。この際、プロテアーゼインヒビターである phenylmethylsulfonyl fluoride を 100 mM の濃度でイソプロパノール溶液として予製し、1 mM の濃度になるよう使用直前に加えた。ホモジネートは、105,000×g で 60 分間遠心分離し、上清をサイトソル分画として実験に供した。

なお、用量依存性の実験に用いたラット肝サイトソルは、常法に従って調製した。タンパク質量は、Lowry らの方法⁴⁵⁾に従って、bovine serum albumin を標準タンパク質として定量した。

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

SDS-PAGE は、Laemmli の方法⁴¹⁾に従って行った。immunoblotting は Towbin らの方法⁷⁶⁾に準じて行った。但し、セミドライプロットング装置を用い、polyvinylidene difluoride 膜に転写した。5%スキムミルクで、37°Cで 60 分間 blocking を行った後、0.05% anti-HSP70 あるいは 0.025% anti-HSP90 を一次抗体として反応させた。免疫化学的な発色は、アルカリフォスファターゼ標識二次抗体を用いて、アルカリホスファターゼ法⁶⁾により行った。immunoblotting で検出されたバンドは EPSON GT-8000 flat bed scanner を用いてコンピュータに取り込み、解析ソフトウェア National Institutes of Health (NIH) image[®] software (public domain, U. S. A.) にて定量した。

実 験 結 果

1. 一般的毒性指標

PenCB のラット肝分子シャペロン HSP70 および HSP90 への影響を検討するに先だって、PenCB の一般的毒性指標を調べた。なお、HSP70 の発現量は、摂餌量に影響を受けることが知られている²⁹⁾。そこで、コントロール群については、PenCB 処理群の摂餌量に対

する pair-feeding を行ったコントロール群 (pair-fed コントロール群) と、自由に摂餌させたコントロール群 (free-fed コントロール群) の2つのコントロール群を設けて、検討を行った。

動物には 7 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、PenCB 投与後の体重変化、肝臓の湿重量を free-fed および pair-fed の両コントロール群と比較した。PenCB の投与量は 25 mg/kg とし、これを単回腹腔内投与した。この投与量では、ラットにおいて一般的毒性の指標とされる、体重増加抑制、肝肥大、胸腺および脾臓の萎縮が認められることが既に明らかとなっている³²⁾⁵⁷⁾。PenCB 投与後の経日の体重変化を、投与日を 0 日とし、その後屠殺日までの 5 日間を調べた (Fig. 1)。PenCB 処理群、および pair-fed コントロール群には摂餌量の減少と共に、free-fed コントロール群と比べ有意な体重増加抑制が認められ、摂餌量の減少が体重に及ぼす影響は大きいと考えられる。しかしながら、PenCB 処理群と pair-fed コントロール群との間において有意な差が認められた。TCDD による摂餌量の低下が、TCDD による致死と密接に関わることを示唆する報告もあるが⁷⁸⁾⁷⁹⁾、この結果は、coplanar PCB や polychlorinated dibenzofuran による体重増加抑制効果は、少なくとも投与5日後までの摂餌量の

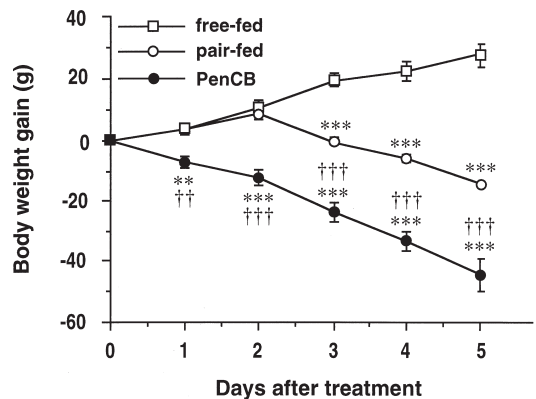


Fig. 1 Effect of PenCB treatment on the body weight gain of rats.

Significantly different from free-fed controls; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Significantly different from pair-fed controls; ††, $p < 0.01$; †††, $p < 0.001$

The values represent the means \pm S.E.

減少のみでは説明できない, ということを示唆する。投与5日後の PenCB 処理群においては, free-fed および pair-fed 両コントロール群と比べ, 有意な肝肥大が認められた。また, pair-fed コントロール群の肝臓は, free-fed コントロール群に比べ有意に小さいものであった。

これらの結果は, 既報とよく一致しており³²⁾⁵⁷⁾, 本研究においても PenCB による急性毒性が発現された状態であることを確認した。

2. PenCBによるラット肝サイトソルHSP70およびHSP90の誘導

当教室では, グルコース飢餓により誘導される GRP78 および GRP94 の発現が, PenCB 処理ラット肝ミクロソームにおいて, 抑制されることをそれぞれの特異抗体を用いた immunoblotting により明らかにしている⁷⁴⁾。GRP78 および GRP94 は小胞体内腔に存在するストレスタンパク質であり, かつ新規の分泌系タンパク質の折り畳みや, 会合に関わる分子シャペロンであると考えられており²³⁾, PenCB 処理によるこれら2種のGRPの発現抑制は, 小胞体での新規タンパク質の合成に何らかの影響を与えられとされる。一方, GRP78 および GRP94 と同じ分子シャペロンファミリーに属し, サイトソルタンパク質の品質管理を制御するのは HSP70 および HSP90 である²⁶⁾²⁷⁾。そこで, PenCB 処理が, ラット肝サイトソル中における分子シャペロン HSP70 および HSP90 の発現レベルへ与える影響について immunoblotting による検討を行った。

Fig. 2 に PenCB 処理による HSP70 の発現レベルの変化を示す。Fig. 2(B) は immunoblotting の結果を定量化したものである。PenCB 処理群においてはラット肝 HSP70 の発現レベルが free-fed, pair-fed の両コントロール群と比較して著しく高く, HSP70 が誘導されていることが明らかであった。Fig. 2(B) にグラフで示すように, HSP70 レベルは free-fed コントロールに比べ, PenCB 処理によって約5倍に誘導された。また, pair-fed コントロールでは free-fed コントロールの約2倍程度まで HSP70 が誘導されていた。しかしながら, HSP70 はカロリー制限により誘導されることが知られているため²⁸⁾²⁹⁾, pair-fed コントロール群に見られた発現レベルの上昇は, pair-feeding による

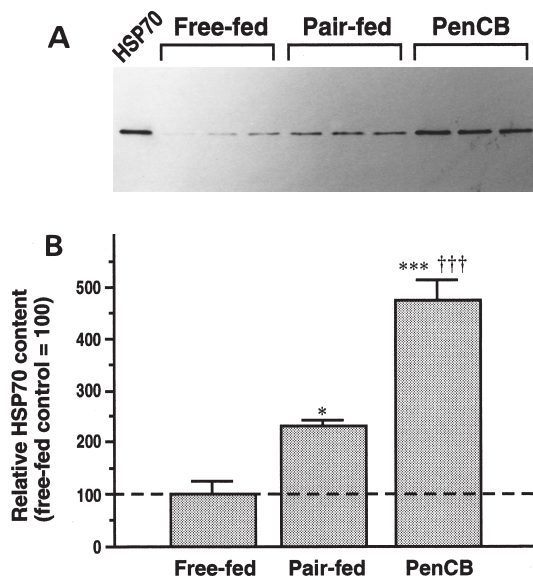


Fig. 2 Immunoblot analysis of HSP70 in liver cytosol of rats treated with PenCB.

(A) Liver cytosolic protein (1 μ g protein) from free-fed control, pair-fed control and PenCB-treated rats was subjected to SDS-PAGE (7.5%) and immuno-stained with mouse anti-HSP70 antibody.

HSP70: bovine brain HSP70

(B) The HSP70 level was estimated by the density of the anti-HSP70 immunoreactive band.

The values represent the means \pm S.E. of the percentages to the free-fed controls. Significantly different from free-fed controls; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

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

摂餌制限によりカロリー不足が起こったことを思わせるものであった。

同様に, HSP90 の発現レベルに対する PenCB の影響を検討した。その結果を Fig. 2 に示す。HSP90 には α , β の2つのアイソフォームの存在が確認されており, 両者の誘導性の違い²⁵⁾³⁴⁾⁵⁵⁾, 臓器分布の違い⁴³⁾⁸¹⁾ が知られているが, これらの機能の違いについてはよく分かっていない。両者の分子量は, およそ 2kDa 異なることとされていることから⁵⁰⁾, Fig. 3(A)で抗 HSP90 抗体によって認識されたラット肝サイトソルタンパク質中

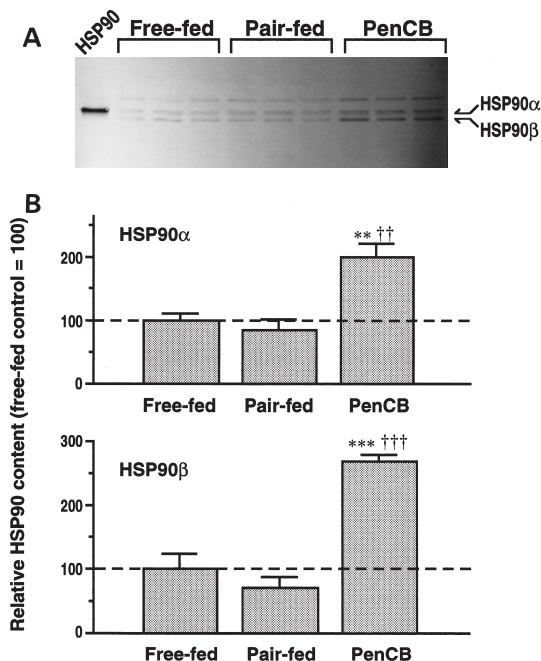


Fig. 3 Immunoblot analysis of HSP90 in liver cytosol of rats treated with PenCB.

(A) Liver cytosolic protein (25 μ g protein) from free-fed control, pair-fed control and PenCB-treated rats was subjected to SDS-PAGE (6%) and immuno-stained with mouse anti-HSP90 antibody.

HSP90: bovine brain HSP90

(B) The HSP90 level was estimated by the density of the anti-HSP90 immunoreactive band.

The values represent the means \pm S.E. of the percentages to the free-fed controls.

Significantly different from free-fed controls; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Significantly different from pair-fed controls; †††, $p < 0.01$; ††††, $p < 0.001$.

に含まれる3種類のバンドのうち、精製標品と同分子量のものがHSP90 α 、低分子量のものがHSP90 β に相当するものと考えられた。また、精製標品よりも高分子量の位置にバンドが検出されたが、このタンパク質については未解明である。PenCB処理によって、ラット肝HSP90 α 、およびHSP90 β のタンパク発現レベルはfree-fed, pair-fedの両コントロール群と比較して、著しく上昇することが明らかになった (Fig.

3). Fig. 3(B)にグラフで示すように、HSP90の誘導は、HSP70の場合 (Fig. 2(B))とは若干異なっていた。PenCB処理によるHSP90誘導の程度は、HSP90 α で約2倍、HSP90 β で約2.5倍と、HSP70のそれに比べて小さかった。また、HSP70の場合に認められたpair-fedコントロール群での誘導はHSP90 α および β のいずれにおいても観察されなかった。

3. HSP70およびHSP90の誘導におけるPenCB用量依存性

PenCB処理によるタンパク質レベルでの誘導が明らかとなったHSP70およびHSP90のPenCB用量依存性を、PenCB用量0, 0.5, 1, 5, 10および25 mg/kgの範囲で検討を行った。

Fig. 4に各投与量におけるラット肝HSP70の発現レベルの変化を示す。HSP70はPenCB用量0.5 mg/kgにおいても、著しく誘導されることが明らかとなった。PenCB 1 mg/kg群に、より高いHSP70レベルが観察されているものの、PenCB 5, 10および25 mg/kg処理群のHSP70レベルは、PenCB 0.5 mg/kg処理群のそれと同程度であり、この範囲ではHSP70誘導の用量依存性は認められなかった。また、Fig. 4ではPenCB用量1 mg/kgにおいて最も強い誘導が惹起されるという傾向が見えるが、各群3匹ずつとして数回immunoblottingによる検討を行った結果、PenCB 1 mg/kg処理群におけるラット肝サイトソルHSP70の誘導の程度は、0.5 mg/kg処理群の場合と大差はないことを確認している (データ未掲載)。従って、PenCBによるラット肝サイトソルHSP70の発現レベルの上昇は、PenCB用量0.5 mg/kgではプラトーに達し、それ以上の投与量の増加によってさらなる発現量の増加はないものと思われた。しかし、これより低用量のPenCB処理によっても同程度のHSP70の誘導が起こる可能性は否めない。

次に、HSP90の発現誘導における用量依存性の検討を行った。Fig. 5に示すように、HSP90 α の発現レベルは、PenCB用量25 mg/kgまで用量依存的に上昇したのに対し、HSP90 β の誘導は5 mg/kgで最大となり、用量を10 mg/kgおよび25 mg/kgと増加させても、さらなる発現レベルの上昇は観察されなかった。なお、ここでは標品を用いた結果を示していないが、Fig. 3と同様、Fig. 5においても標品よりも高分子量

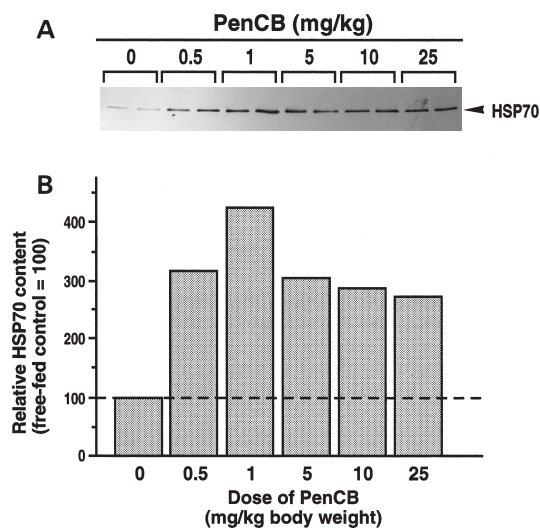


Fig. 4 Dose-response induction of HSP70 in liver cytosol of rats treated with PenCB.

(A) Rats were treated with the indicated doses of PenCB.

Each cytosol sample (1 μ g protein) was subjected to SDS-PAGE (7.5%) and immuno-stained with mouse anti-HSP70 antibody.

(B) The HSP70 level was estimated by the density of the anti-HSP70 immunoreactive band.

The values represent the means of the percentages to the free-fed control groups. PenCB 0 mg/kg (free-fed control) = 100%

のバンドも検出された。

考 察

本研究では、PenCB 処理によりラット肝分子シャペロン HSP70 および HSP90 が発現誘導されることを、それぞれに対する特異的な抗体を用いた immunoblotting により初めて見出した。

全てのストレスタンパク質遺伝子のプロモーター領域には、そのストレス応答に必須な熱ショックエレメント (heat shock element, HSE) と呼ばれる、種を越えてよく保存された調節エレメントが存在し、ストレスタンパク質遺伝子の転写活性化は、熱ショック転写因子 (heat shock transcriptional factor, HSF) が HSE に結合することにより起こる⁶⁸⁾⁵¹⁾。高等動物では

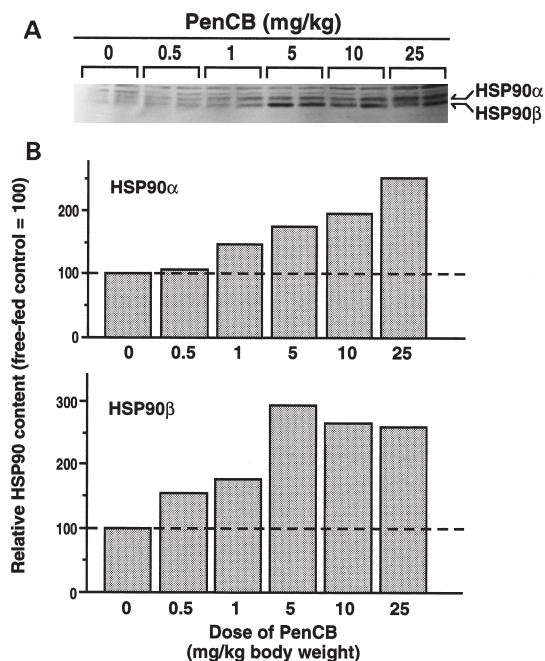


Fig. 5 Dose-response induction of HSP90 in liver cytosol of rats treated with PenCB.

(A) Rats were treated with the indicated doses of PenCB.

Each cytosol sample (25 μ g protein) was subjected to SDS-PAGE (6%) and immuno-stained with rat anti-HSP90 antibody.

(B) The HSP90 level was estimated by the density of the anti-HSP90 immunoreactive band.

The values represent the means of the percentages to the free-fed control groups. PenCB 0 mg/kg (free-fed control) = 100%

HSF1, HSF2, HSF3 および HSF4 の少なくとも 4 種の HSF が存在することが明らかであるが⁵⁴⁾、熱ショックなどのストレスにより活性調節を受けるのは HSF1 である。HSF1 はストレスにさらされていない細胞では HSP70 あるいは HSP90 などの制御因子と相互作用しており、HSF1 のみによる複合体の形成を抑え¹⁾⁵³⁾⁶⁶⁾⁸⁶⁾、不活性 (単量体) 化している。しかし、ストレスにより細胞内に変性タンパク質が蓄積すると、HSP70 などのシャペロンはそれらのフォールディングの為に利用され HSF1 から解離する。これにより

HSF1は、活性な3量体を形成可能となると共に、核へ速やかに移行する。また、HSPの転写効率はHSF1のリン酸化により著しく高まることも知られている¹²⁾¹³⁾。このように、ストレス応答は遊離HSF1量に対するHSP量による負のフィードバック回路で説明されている。

本研究において、摂餌量を制限したpair-fedコントロール群では自由に摂餌させたfree-fedコントロール群と比べて、HSP70の誘導が認められた。(Fig. 2) HeydariらはラットのHSP70の合成、mRNAレベル、転写活性、およびHSF-HSE結合活性のいずれもが、軽度の食餌制限(60% of original)により上昇することを報告しており²⁸⁾²⁹⁾、pair-fedコントロール群におけるHSP70の発現誘導は、転写レベルで制御されている可能性が示唆される。

PenCB処理群では、その誘導の程度に差はあるものの、HSP70、HSP90 α 、HSP90 β のいずれにおいても誘導が認められた。ダイオキシン類が引き起こす急性毒性の幾つかは、サイトソル分画に存在するAh-receptorが作用発現の端緒になっていると考えられているが⁸⁾²⁰⁾⁶⁴⁾、GeneBankに登録されている、ラットのHSP70およびヒトのHSP90 α 、 β 遺伝子の5'-上流域のいずれにおいてもAhR/Arnt結合サイトと予想されるXREとアサインされる部位が存在することをコンピューター解析の結果^{脚註}確認している。従って、PenCB処理によるこれらシャペロンの誘導にAh-receptorが関与している可能性もある。

しかし、coplanar PCBやpolychlorinated dibenzofuran類による毒性発現機構は、この他に、これらの化合物によって惹起される酸化的ストレスによって説明されるとも考えられている³⁰⁾³¹⁾⁷¹⁾。シャペロン機能

をもつ主要なHSPは酸化的ストレスによっても誘導され¹⁰⁾、活性酸素であるH₂O₂の暴露によりHSF1-HSE結合活性が上昇することも報告されている³⁵⁾。また、これまでの研究より、TCDD処理による細胞内Ca²⁺濃度²⁴⁾⁴⁸⁾、およびそれに引き続くprotein kinase Cの活性上昇が報告されている⁴⁰⁾⁸⁵⁾。このprotein kinase Cの活性上昇は非常に短時間に起こり、actinomycin Dやcycloheximide処理によってもその活性が抑制されなかったことから、TCDD結合型Ah-receptor自身がprotein kinase C活性をもつことが示唆されている¹⁸⁾。HSF1はserine/threonine protein kinase Cおよびprotein phosphataseによりリン酸化の制御を受けており¹²⁾¹³⁾、これらの事実から、PenCB処理により、ストレス応答の鍵となるHSF1が活性化されている可能性もある。

しかしながら、全てのストレスタンパク質遺伝子は、類似のプロモーター領域をもち、HSF1の調節を受けていると考えられているものの、ストレスに対する誘導レベルは大きく異なる²⁵⁾³⁴⁾⁵⁵⁾。事実、PenCB処理によるHSP70、HSP90 α およびHSP90 β の発現誘導のプロフィール、およびPenCB用量依存的な発現変動は、個々のシャペロンによりその誘導のプロフィールは大きく異なった。これらのことは、HSF1を介する活性調節以外にも、別の調節メカニズムの存在を示唆するものである。TCDDはIL-1 β 、IL-2、IL-6などのサイトカインを誘導するが⁴²⁾⁷³⁾、HSP70はIL-1 β およびIL-2¹⁹⁾⁷²⁾、HSP90 α はIL-4およびIL-2¹⁹⁾⁴⁹⁾、HSP90 β はIL-6⁶⁹⁾により著明に誘導される。実際、HSP90 β にはそのプロモーター領域にHSEの他に、nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6)およびsignal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3)結合サイトが存在し⁷⁰⁾、ストレスタンパク質がHSF1-HSEによる制御以外の因子によっても調節されていることを支持する。

誘導されたHSP70およびHSP90はストレスタンパク質としてPenCBという外的ストレスに対し、細胞を防御していると思われる。すなわち、ダイオキシン類の毒性の一つとして酸化的ストレスが惹起されるが³⁰⁾³¹⁾⁷¹⁾、これにより酸化的損傷、ないしは修飾をうけたタンパク質を修復、または分解している可能性がある。酸化的ストレスにより損傷を受ける分子として、

脚注：コンピューター解析

Molecular Bioinformatics of Gene Regulation (<http://transfac.gbf.de/>) にアクセス。

Transfac-Programs to search for binding sites and moreのMatInspectorにより解析を行った。

また、解析したGeneは以下の通り。カッコにはGeneBank accession numberを示す。

HSP70 : Rattus norvegicus HSP70-3 gene (X77209)

HSP90 α : Human HSP90 α gene (U25822)

HSP90 β : Human HSP90 β gene (J04988)

脂質や核酸については、その防御や修復に関する研究がなされているが、タンパク質についてはその防御機構についての情報は乏しい。しかし、損傷タンパク質の分解系への移送、および傷害の修復と高次構造の回復は、いずれも HSP70 あるいは HSP90 を必要とするプロセス⁴⁾²⁶⁾⁴⁷⁾であることから、PenCB により誘導されたこれら 2 種のシャペロンが、細胞防御に寄与していると考えられる。また Ah-receptor はリガンド結合性に protease により分解を受けることが報告されており²¹⁾、この分解系にも HSP70 が関与している可能性がある。一方ダイオキシン類により NAD(P)H:quinone oxidoreductase, glutathione-S-transferase Ya subunit 等が誘導されるが³⁾¹⁷⁾³⁸⁾⁴⁴⁾⁶⁵⁾、生成過程のポリペプチド鎖は HSP70 と結合しており⁴⁾²⁶⁾⁴⁷⁾、誘導された HSP70 はサイトソル中において新規タンパク質の合成に関わっているのかもしれない。

一方で、HSP90 はステロイドホルモン受容体などの転写因子や、c-Src, Raf, casein kinase II (CK II), eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) kinase, などの細胞増殖シグナル伝達に関与する様々なキナーゼと複合体を形成して、ターゲットタンパク質の高次構造形成と機能維持に働いているシャペロンであることから³⁶⁾⁶⁰⁾、これらシグナル伝達経路に変動を及ぼす可能性を推測させる。

本研究では、PenCB 処理ラット肝サイトソルにおいて、分子シャペロン HSP70 および HSP90 が著しく誘導されることを明らかにした。HSP70 および HSP90 は生体のストレス反応との関連など、様々な要因によって誘導されると言われているが⁵⁾⁵²⁾、coplanar PCB や polychlorinated dibenzofuran 類による影響についてはこれまで知られていなかった。油症原因物質による生体影響は広範であること、またそれらは、同様に環境汚染物質としても生体への影響が危惧されている。PenCB 処理によりこれら 2 種の分子シャペロンが誘導されたことは、ダイオキシン類の毒性発現機構を解明する上で、一つの重要な手掛かりになると考えられる。

総 括

高毒性コプラナーPCB である PenCB 処理による分子シャペロン HSP70 および HSP90 のタンパク質

発現レベルへの影響を明らかにすることを目的とし、ラット肝サイトソルの HSP70 および HSP90 のレベルを、それぞれに特異的な抗体を用いてイムノブロットティングにより調べた。本研究で得られた知見を要約して以下に示す。

- 1) ラット肝サイトソルの分子シャペロン HSP70 および HSP90 は、PenCB により著しく誘導されることを明らかにした。
- 2) これら 2 種の分子シャペロンの PenCB による誘導の用量依存性を検討した結果、HSP70 は 0.5 mg/kg の用量で顕著な誘導が認められた。HSP90 α レベルは、PenCB 用量依存的に、PenCB 用量 25 mg/kg まで上昇したが、HSP90 β の誘導は、PenCB 5 mg/kg の用量で最大となった。

分子シャペロンである HSP70 および HSP90 は、命名の由来のように様々なストレスにより誘導されることが知られているが³⁾⁵⁾⁵²⁾、coplanar PCB や polychlorinated dibenzofuran による影響についてはこれまで報告されていなかった。HSP70 は様々なターゲットタンパク質と結合し、新生タンパク質の高次構造形成や細胞内輸送、あるいは不必要なアグリゲーションや不活性化を防ぐ分子シャペロンとして、生体の恒常性維持、ならびに細胞防御に密接に関わっている⁴⁾²⁶⁾⁴⁷⁾。また、HSP90 は細胞内のシグナル伝達経路に関わるタンパク質が正常なコンフォメーションをとり、それらが機能を発現するために必要な因子である³⁶⁾⁶⁰⁾。従って、PenCB によるこれら 2 種の分子シャペロンの著しい発現誘導は、coplanar PCB や polychlorinated dibenzofuran の毒性と密接に関連した現象ではないかと思われる。

文 献

- 1) Ali A, Bharadwaj S, O'carroll R and Ovsenek N: HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes Mol. Cell. Biol. 18: 4949-4960, 1998.
- 2) Aloishi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G and Peschle C: Production of hemolymphopoietic cyto-

- kines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 β and tumor necrosis factor- α . J. Immunol. 149: 2358-2366, 1992.
- 3) Alsharif NZ, Hassoun E, Bagchi M, Lawson T and Stohs SJ: The effects of anti-TNF-alpha antibody and dexamethasone on TCDD-induced oxidative stress in mice. Pharmacology 48: 127-136, 1994.
 - 4) Beissinger M and Buchner J: How chaperons fold proteins. Biol. Chem. 379: 245-259, 1998.
 - 5) Benjamin IJ and McMillan DR: Stress (heat shock) proteins: Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. Circ. Res. 83: 117-132, 1998.
 - 6) Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ and Gotschlich EC: A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. Anal. Biochem. 136: 175-179, 1984.
 - 7) Buchner J: Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones. FASEB J. 10: 10-19, 1996.
 - 8) Chen H-S and Perdew GH: Subunit composition of the heteromeric cytosolic arylhydrocarbon receptor complex. J. Biol. Chem. 269: 27554-27558, 1994.
 - 9) Chu I, Villeneuve DC, Yagminas A, Cavalier PL, Poon R, Feeley M, Kennedy SW, Seegal RF, Hakanson H, Ahlborg G and Valli VE: Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in the rat. I. Clinical, Biochemical, Hematological, and Histopathological changes. Fundam. Appl. Toxicol. 22: 457-468, 1994.
 - 10) Das DK, Maulik N and Moraru II: Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. J. Mol. Cell. Cardiol. 27: 181-193, 1995.
 - 11) Dhahbi JM, Mote PL, Tillman JB, Walford RL and Spinder SR: Dietary energy tissue-specifically regulates endoplasmic reticulum chaperone gene expression in the liver of mice. J. Nutr. 127: 1758-1764, 1997.
 - 12) Ding XZ, Smallridge RC, Galloway RJ and Kiang JG: Increases in HSF1 translocation and synthesis in human epidermoid A-431 cells: Role of protein kinase C and [Ca²⁺]_i. J. Invest. Med. 44: 144-153, 1996.
 - 13) Ding XZ, Tsokos GC and Kiang JG: Over-expression of HSP-70 inhibits the phosphorylation of HSF1 by activating protein phosphatase and inhibiting protein kinase C activity. FASEB. J. 12: 451-459, 1998.
 - 14) Ellis J: Proteins as molecular chaperones. Nature 328: 378-379, 1987.
 - 15) Ellis RJ and Hemmingsen SM: Molecular chaperons: Proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. Trends. Biochem. Sci. 14: 339-342, 1989.
 - 16) El-Sabeawy F, Wang S, Overstreet J, Miller M, Lasley B and Enan E: Treatment of rats during pubertal development with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters both signaling kinase activities and epidermal growth factor receptor binding in the testis and the motility and acrosomal reaction of sperm. Toxicol. Appl. Pharmacol. 150: 427-442, 1998.
 - 17) Emi Y, Ikushiro S and Iyanagi T: Xenobiotic responsive element-mediated transcriptional activation in the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex. J. Biol. Chem. 271: 3952-3958, 1996.
 - 18) Enan E and Matsumura F: Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions. Biochem. Pharmacol. 49: 249-261, 1995.
 - 19) Ferris DK, Harel-Bellan A, Morimoto RI, Welch WJ and Farrar WL: Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 3850-3854, 1988.
 - 20) 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.
 - 21) Giannone JV, Okey AB and Harper PA: Characterization of polyclonal antibodies to the aromatic hydrocarbon receptor. Can. J. Physiol. Pharmacol. 73: 7-17, 1995.
 - 22) Groy LE, Ostby JS and Kelce WR: A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. Toxicol. Appl. Pharmacol. 146: 11-20, 1997.
 - 23) Haas IG: Bip (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. Experientia 50: 1012-1020, 1994.
 - 24) Hanneman WH, Legare ME, Barhoumi R, Burghardt RC, Safe S and Tiffany-Castiglioni E:

Stimulation of calcium uptake in cultured rat hippocampal neurons by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicology* 112 : 19-28, 1996.

25) Hansen LK, Houchins JP and O'leary JJ : Differential regulation of hsc70, hsp70, hsp90 α , and hsp90 β mRNA expression by mitogen activation and heat shock in human lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* 192 : 587-596, 1991.

26) Hartl FU : Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381 : 571-580, 1996.

27) Hendrick JP and Hartl F-U : Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 62 : 349-384, 1993.

28) Heydari AR, Conrad CC and Richardson A : Expression of heat shock genes in hepatocytes is affected by age and food restriction in rats. *J. Nutr.* 125 : 410-418, 1995.

29) Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R and Richardson A : Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 2909-2918, 1993.

30) 堀 美穂, 有吉範高, 山田英之, 小栗一太 : Coplanar PCB の肝 glutathione peroxidase-redox system に対する影響 : ラットおよびモルモットでの検討. *福岡医誌* 88 : 144-148, 1997.

31) Ishida T, Tasaki K, Fukuda A, Ishii Y and Oguri K : Induction of a cytosolic 54 kDa protein in rat liver that is highly homologous to selenium-binding protein. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6 : 249-255, 1998.

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

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

34) Jacquier MR, Jornot L and Polla BS : Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock. *J. Biol. Chem.* 270 : 14094-14099, 1995.

35) Jacquier-Sarlin MR and Polla BS : Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂ : Role of thioredoxin. *Biochem. J.* 318 : 187-193, 1996.

36) Jakob U and Buchner J : Assisting spontaneity : The role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 19 : 205-211, 1994.

37) Kato H, Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Nakayama I, Ariyoshi N and Oguri K : Significant suppression of aldolase B, carbonic anhydrase III and alcohol dehydrogenase in liver cytosol of rats treated with a highly toxic coplanar PCB. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 43 : P-20, 1997.

38) Kobayashi A, Sogawa K and Fujii-Kuriyama Y : Cooperative interaction between AhR-Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of *CYP1A1* gene. *J. Biol. Chem.* 271 : 12310-12316, 1996.

39) Kozutsumi Y, Segal Mark Normington K, Gething M-J and Sambrook J : The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332 : 462-464, 1988.

40) Kramer CM, Sando JJ and Holsapple MP : Lack of direct effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on protein kinase C activity in EL4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140 : 267-272, 1986.

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

42) Lai Z-W, Hundeiker C, Gleichmann E and Esser C : Cytokine gene expression during ontogeny in murine thymus on activation of aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Mol. Pharmacol.* 52 : 30-37, 1997.

43) Leeb S-J : Expression of hsp86 in male germ cells. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 3239-3242, 1990.

44) Lindros KO, Oinonen T, Kettunen E, Sippel H, Muro-Lupori C and Koivusalo M : Aryl hydrocarbon receptor-associated genes in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 55 : 413-421, 1998.

45) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.

46) Matsumura F : Mechanism of action of dioxin-type chemicals, pesticides, and other xenobiotics affecting nutritional indexes. *Amer. J. Clin. Nutr.* 61 : 695S-701S, 1995.

47) Mayer MP and Bukau B : Hsp70 chaperone systems : Diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol. Chem.* 379 : 261-268, 1998.

48) McConkey DJ, Hartzell P, Duddy SK, Hakansson H and Orrenius S : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin kills immature thymocytes by Ca²⁺-mediated endonuclease activation. *Science* 242 : 256-259, 1988.

49) Metz K, Ezernieks J, Sebald W and Duschl

A: Interleukin-4 upregulates the heat shock protein Hsp90 α and enhances transcription of a reporter gene coupled to a single heat shock element. FEBS Lett. 385: 25-28, 1996.

50) Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, Suzuki K and Yahara I: Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90. J. Biol. Chem. 266: 10099-10103, 1991.

51) Morimoto RI: Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. Science 259: 1409-1410, 1993.

52) Morimoto RI, Sarge KD and Abravaya K: Transcriptional regulation of heat shock genes. J. Biol. Chem. 267: 21987-21990, 1992.

53) Mosser DD, Duchaine J and Massie B: The DNA-binding activity of the human heat shock transcription factor is regulated in vivo by hsp70. Mol. Cell. Biol. 13: 5427-5438, 1993.

54) Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI and Nagata K: HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. Mol. Cell. Biol. 17: 469-481, 1997.

55) Nishizawa J, Nakai A, Higashi T, Tanabe M, Nomoto S, Matsuda K, Ban T and Nagata K: Reperfusion causes significant activation of heat shock transcriptional factor 1 in ischemic rat heart. Circulation 94: 2185-2192, 1996.

56) Nishizumi M: Toxicity of PCBs, PCDFs and related compounds. in YUSHO (Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M and Masuda Y, Eds.), pp. 83-102. Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.

57) Oguri K, Hatsumura M, Ishii Y, Koga Y, Ariyoshi N and Yoshimura H: Modification of the gluconeogenesis is not involved in the co-planar PCB toxicity in highly sensitive guinea pigs. Chemosphere 27: 2295-2303, 1993.

58) Poland A and Knutson JC: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22: 517-554, 1982.

59) Potter CL, Sipes IG and Russell DH: Hypothyroxinemia and hypothermia in rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin administration. Toxicol. Appl. Pharmacol. 69: 89-95, 1983.

60) Pratt WB: The hsp90-based chaperone system: Involvement in signal transduction from a

variety of hormone and growth factor receptors. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217: 420-434, 1998.

61) Ritossa F: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia 18: 571-573, 1962.

62) 六反一仁: ストレスから生体を守るストレス蛋白質: ストレス蛋白質の臨床応用の可能性を探る. 化学と生物 35: 617-622, 1997.

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

64) Schmidt JV and Bradfield CA: Ah receptor signaling pathways. Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 12: 55-89, 1996.

65) Schrenk D: Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. Biochem. Pharmacol. 55: 1155-1162, 1998.

66) Shi Y, Mosser DD and Morimoto RI: Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. Gene Dev. 12: 654-666, 1998.

67) Shiu RPC, Pouyssegur J and Pastan I: Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74: 3840-3844, 1977.

68) Sorger PK: Heat shock factor and the heat shock response. Cell 65: 363-366, 1991.

69) Stephanou A, Amin V, Isenberg DA, Akira S, Kishimoto T and Latchman DS: Interleukin 6 activates heat-shock protein 90 β gene expression. Biochem. J. 321: 103-106, 1997.

70) Stephanou A, Isenberg DA, Akira S, Kishimoto T and Latchman DS: The nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6) and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) signalling pathways co-operate to mediate the activation of the hsp90 β gene by interleukin-6 but have opposite effects on its inducibility by heat shock. Biochem. J. 330: 189-195, 1998.

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

72) Strandell E, Buschard K, Saldeen J and Welsh N: Interleukin-1 beta induces the expression of hsp70, heme oxygenase and Mn-SOD in FACS-purified rat islet beta-cells, but not in alpha-cells. Immunology Lett. 48: 145-148, 1995.

73) Sutter TR, Guzman K, Dold KM and Green-

lee WF: Targets for Dioxin: Genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin 1 β . Science 254: 415-418, 1991.

74) 田崎健二, 石井祐次, 石田卓巳, 小栗一太: コプラナーPCBによる小胞体局在性ストレスタンパク質の発現抑制. 福岡医誌 90: 251-258.

75) Tissieres A, Mitchell HK and Tracy UM: Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. 84: 389-398, 1974.

76) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76: 4350-4354, 1979.

77) Walden R and Schiller CM: Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in four (sub) strains of adult male rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 77: 490-495, 1985.

78) Weber LWD, Lebofsky M, Stahl BU, Gorski JR, Muzi G and Rozman K: Reduced activities of key enzymes of gluconeogenesis as possible cause of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in rats. Toxicology 66: 133-144, 1991.

79) Weber LWD, Stahl BU, Lebofsky M, Alper RH, Kerecsen L and Rozman K: Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity appears to be the key biochemical lesion in the acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats. Chemosphere 23: 1957-1962, 1991.

80) Wilker C, Johnson L and Safe S: Effects of developmental exposure to indole-3-carbinol or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on reproductive potential of male rat offspring. Toxicol. Appl. Phar-

macol. 141: 68-75, 1996.

81) Vamvakopoulos NO: Tissue-specific expression of heat shock proteins 70 and 90: Potential implication for differential sensitivity of tissues to glucocorticoids. Mol. Cell. Endocrinol. 98: 49-54, 1993.

82) Van Birgelen APJM, Ross DG, DeVito MJ and Birnbaum LS: Interactive effects between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in female B6C3F1 mice: Tissue distribution and tissue-specific enzyme induction. Fundam. Appl. Pharmacol. 34: 118-131, 1996.

83) Yin H, Li Y and Sutter TR: Dioxin-enhanced expression of interleukin-1 β in human epidermal keratinocytes: Potential role in the modulation of immune and inflammatory responses. Exp. Clin. Immunogenet 11: 128-135, 1994.

84) 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.

85) Zorn NE, Russell DH, Buckley AR and Sauro MD: Alterations in splenocyte protein kinase C (PKC) activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in vivo. Toxicol. Lett. 78: 93-100, 1995.

86) Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF and Voellmy R: Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. Cell 94: 471-480, 1998.

(受付 1999-3-25)

平成11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

編集者 井 上 尚 英

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 1,000 円