

油 症 (塩化ビフェニール中毒)

研 究 報 告 第 18 集

平成 13 年 5 月

九州大学油症治療研究班
長崎油症研究班

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

May 2001

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18集

(福岡医学雑誌 第92巻 第5号 平成13年5月)

目 次

1. 序 言……………小栗 一太…(1)
2. 1999・2000年度の福岡県年次検診における皮膚症状
……………古賀 哲也・古江 増隆・桐生 美麿・中山樹一郎・旭 正一…(3)
3. 油症におけるリンパ球機能の検討……………辻 博・鈴木 統久・向坂彰太郎…(8)
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(第四報)
……………橋口 勇・山座 孝義・小石 裕子・後藤 康治
吉嶺 嘉人・赤峰 昭文・福山 宏・奥村 英彦…(11)
5. 油症患者における血中一酸化窒素濃度と臨床症状および検査データとの検討
……………清水 和宏・塚崎 直子・小川 文秀・片山 一朗…(16)
6. 油症患者の自覚症状と血中PCB濃度の関連
——12年間の全国油症患者追跡検診結果より——(英文)……………徳永 章二・片岡恭一郎…(18)
7. 油症患者追跡調査と人口動態死亡テープの照合による死亡原因の同定
……………金子 聰・吉村 健清・池田 正人・西阪 和子…(30)
8. 油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査(1998年～1999年)
……………竹中 重幸・平川 博仙・中村 又善
中川 礼子・飯田 隆雄・戸高 尊…(35)
9. 油症患者におけるPCBs, PCDFsの30年間の変遷と症状
……………増田 義人・原口 浩一・黒木 広明・John Jake Ryan…(45)
10. 酵母Two-hybrid法によるPCB水酸化体及びPCDF水酸化体のエストロゲン様物質とし
ての評価……………黒木 広明・米倉さゆり・迫田 智子・藤野 恭子・中岡ひとみ
荒牧 弘範・古賀 信幸・西川 淳一・西原 力…(54)
11. 2,4,5,2',3',4'-六塩素化ビフェニルの*in vitro*代謝における動物種差
……………古賀 信幸・金丸 知代・大石奈穂子・加藤 善久
木村 良平・原口 浩一・増田 義人…(63)
12. 乳児のリンパ球細胞における姉妹染色分体交換頻度への母乳のダイオキシン類の影響
(英文)……………長山 淳哉・長山 真弓・飯田 隆雄・平川 博仙
松枝 隆彦・柳川 堯・福重淳一郎…(73)

13. カネミ油症検診者における血清 CK 上昇の意義
 —— ラット筋細胞膜の Freeze fracture 法による変化 ——
吉村 俊朗・沖田 実・中尾 洋子・福田 卓・藤本 武士…(80)
14. コプラナーPCB による中間代謝への影響：ラット肝サイトソルのトリオースリン酸含量の
 低下について (英文)石井 祐次・加藤 晴敏・初村 恵・石田 卓巳
 有吉 範高・山田 英之・小栗 一太…(86)
15. コプラナーPCB による小胞体局在性ストレス蛋白質の発現抑制に関する研究
 —— 第2報 ——吉岡 優子・石井 祐次・石田 卓巳
 山田 英之・小栗 一太・本島 清人…(97)

The Eighteenth Reports of the Study on Yusho and PCB
(FUKUOKA ACTA MEDICA Vol. 92, No. 5, 2001)

CONTENTS

1. ForewordK. Oguri··· (1)
2. Evaluation of Dermatological Symptoms of Yusho Patients in the Annual Examination
in 1999-2000T. Koga, M. Furue, H. Kiryu, J. Nakayama and M. Asahi··· (3)
3. Mitogen-Induced Lymphocyte Transformation in Patients with Yusho
.....H. Tsuji, N. Suzuki and S. Sakisaka··· (8)
4. An Epidemiologic Examination on the Prevalence of the Periodontal Diseases and Oral
Pigmentation in Yusho Patients in 2000
.....I. Hashiguchi, T. Yamaza, Y. Koishi, Y. Goto, Y. Yoshimine
A. Akamine, H. Fukuyama and H. Okumura··· (11)
5. Examination of Serum Nitric Oxide in Yusho Patients.....
.....K. Shimizu, N. Tukazaki, F. Ogawa and I. Katayama··· (16)
6. Association between Blood Concentration of Polychlorinated Biphenyls and Manifesta-
tions of Symptoms and Signs in Chronic “Yusho” Patients from 1986 to 1997
.....S. Tokunaga and K. Kataoka··· (18)
7. Detection of Underlying Causes of Death among the Deceased of Yusho Patients by
Linkage to the National Vital Statistics Data
.....S. Kaneko, T. Yoshimura, M. Ikeda and K. Nishisaka··· (30)
8. Follow-up Survey of Dioxins in the Blood of Yusho Patients (in 1998-1999)
.....S. Takenaka, H. Hirakawa, M. Nakamura
R. Nakagawa, T. Iida and T. Todaka··· (35)
9. The Changes of PCBs and PCDFs as well as Symptoms in Yusho Patients for 30 Years
.....Y. Masuda, K. Haraguchi, H. Kuroki and J. J. Ryan··· (45)
10. Assessment of Hydroxylated Metabolites of Polychlorinated Biphenyls and Polychlor-
inated Dibenzofurans as Potential Estrogens by Yeast Two-Hybrid System
.....H. Kuroki, S. Yonekura, S. Sakoda, K. Fujino, H. Nakaoka
H. Aramaki, N. Koga, J. Nishikawa and T. Nishihara··· (54)
11. Species Differences in the *in vitro* Metabolism of 2,4,5,2',3',4'-Hexachlorobiphenyl
.....N. Koga, T. Kanamaru, N. Oishi, Y. Kato, R. Kimura
K. Haraguchi and Y. Masuda··· (63)
12. Effect of Dioxins in Mother's Milk on Sister Chromatid Exchange Frequency in Infant
LymphocytesJ. Nagayama, M. Nagayama, T. Iida, H. Hirakawa
T. Matsueda, T. Yanagawa and J. Fukushige··· (73)

13. Influential Factors in the Elevation of Serum Creatine Phosphokinase for the Patients with Kanemi Yusho
 — Freeze Fracture Study of Rat Muscle Plasmamembrane —
T. Yoshimura, M. Okita, Y. Nakao, T. Fukuda and T. Fujimoto··· (80)

14. Effects of a Highly Toxic Coplanar Polychlorinated Biphenyl, 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl on Intermediary Metabolism : Reduced Triose Phosphate Content in Rat Liver Cytosol.....Y. Ishii, H. Kato, M. Hatsumura, T. Ishida
 N. Ariyoshi, H. Yamada and K. Oguri··· (86)

15. Suppression of Stress Proteins, GRP78, GRP94, Calreticulin and Calnexin in Liver Endoplasmic Reticulum of Rat Treated with a Highly Toxic Coplanar PCB.....
Y. Yoshioka, Y. Ishii, T. Ishida, H. Yamada
 K. Oguri and K. Motojima··· (97)

序 言

厚生省油症治療研究班・班長

九州大学 大学院 薬学研究院・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*

The 18th 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 of patients made to our Study Group by continuing participation to Yusho examination is greatly appreciated for follow-up 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.

Yusho occurred involving more than 1,800 persons in Western Japan in 1968. Following the onset of non-specific symptoms such as general malaise, loss of appetite, and headache, some characteristic symptoms for Yusho gradually appeared, including increased discharge from the eyes with swelling of eyelids, dark brownish nail pigmentation, acneform eruptions, peripheral neuropathy, irregular menstruation in women and growth retardation in infants and children. Today over 30 years have past since the outbreak of Yusho, almost all of these symptoms have improved. However, some patients still complain of dermatological changes and other subjective symptoms. The prevalence of oral pigmentation has decreased somewhat over the years, but it remains higher in Yusho patients than in normal subjects.

A first study tried to clarify the correlation between PCB types and TEQ concentration was recently examined. The characteristic chromatogram of blood PCBs has been classified into 4 types, Type A : peculiar to Yusho, Type C : commonly observed in the blood PCBs of the general population, Types B and BC : intermediate patterns between Types A and C. The quantification of PCBs in the blood was developed after 1973, five years after the onset of Yusho. Since that time, blood samples of patients analysed and classified to the 4 Types. The TEQ concentration in lipids of the blood sample of patients showing 4 Types at 1998 and 1999 was reported. The results of TEQ concentration are compatible with the Types classified by PCB pattern ; Type A ; 7.5 and 11 times higher than the general population, Type B ; 4.7 and 5.9 times higher, Type BC ; 3.7 and 3.3 times higher, Type C ; 1.5 and 1.8 times higher.

A cohort analysis of the death observed among Yusho patients over the past 30 years was also re-evaluated by use of newly obtained data, which is important not only to understand the possible human effect of a prolonged exposure to PCBs, PCDFs and other chlorinated hydrocarbons. The total number of patients officially registered, as suffering from Yusho by January 31, 1996 was 1815. The death seen in the cohort during of observation period was analyzed by

calculating the expected number of death on the basis of liver cancer death rates in patient prefectures. The cohort analysis seems to support previous analysis of excess deaths from liver cancer of male in early stage of Yusho, and to suggest decreasing risk of liver cancer with lowering of contaminated chemicals in the body.

I am pleased to announce that Japanese version of “YUSHO” has been published in June 2000, which was translated by all authors of the original written English and supplemented with several chapters.

九州大学油症治療研究班と長崎油症治療班の油症報告集も第18集になりました。平成11年度と平成12年度の研究成果集としてお届けします。患者さんの初期にみられた所見や症状は、事件発生から33年が経過して、臨床所見は近年の自然軽快傾向が続いています。むしろ、油症検診における最近の傾向として受診者の高齢化が進み油症の臨床所見は捉えにくくなってきているといわれています。油症とは直接の因果関係は明らかでないような、受診者の高齢化が主な原因と思われるような臨床所見が報告されるようになってきました。このように患者さんの油症の臨床所見は徐々に軽くなっていますが、今後の慎重な経過観察が必要であります。

振り返ってみますと、油症は、昭和43年に西日本一帯の広範囲な住民のかたがたが、熱媒体として使用されていたPCBの混入した食用米ぬか油を摂取することによって起こった食中毒事件です。油症の初期には、全身倦怠感、食欲不振、頭重感などの非特異的な全身症状があらわれ、引き続いて、油症に特徴的な症状や所見として、眼脂過多、爪の着色、歯肉部の色素沈着、瘡瘡様皮疹、下肢の知覚過敏あるいは鈍麻、月経不順、乳幼児の成長遅延などがあらわれました。30年以上の時間の経過とともに、初期に見られたような特徴的な所見はほとんど軽快し、消失しています。しかし、初期に重症度の高かった症例の患者さんのなかには、今日でもいくつかの所見や自覚症状を訴える患者さんもいらっしゃいます。歯科検診でも、かねてより報告されてきた口腔内色素沈着の患者の割合は目立って減少していません。

一方、懸念される血液中のPCB及びTEQ濃度(ダイオキシン毒性相当濃度)、2つの相関性について最近報告されました。これまで、油症検診では、血液中のPCBをA、B、BC、Cの4つのパターンに分類して報告されてきました。PCBは健常者にも環境汚染に由来するPCBの汚染がありますので、原因油に由来することが明確なAと健常者とは区別できないCとその中間のBあるいはBCパターンです。事件発生から5年後くらいから測定が可能になって以来この分類が指標に使われてきました。最近、各パターンに分類される血液のTEQ濃度の平成10年と11年度採血の測定結果が出されました。Aパターンの患者では健常者よりも、それぞれの年度で平均7.5と11倍、Bパターン4.7と5.9倍、BCパターン3.7と3.3倍、Cパターンの患者でも1.5と1.8倍と報告されています。

また、油症患者の主要死因別の死亡リスク(標準化死亡比)の再評価が行われました。PCBやダイオキシン毒性相当濃度の高い患者さんについての解析を、これまで把握されたデータに加えて、新に昨年行われた人口動態統計死亡テープと照合することによって、死亡リスクの解析が行われました。これまで油症患者には肝臓がんの死亡リスクが高いのではないかとされていました。その原因として肝炎ウイルス感染状況の地域差による可能性が指摘されていました。今回の再評価によって、肝臓がん、肝硬変の死亡リスクが認定県によって調整された結果、肝臓がん死亡のリスクは、油症事件直後においては高いが、次第に減少しています。さらに、最近の13年間に限ると、死亡リスクは、さらに減少傾向が見られ、明らかに高いという有意差もなくなっています。PCB、PCDFの体内貯留の変化と今回の結果を考慮すると、長期経過段階で貯留しているPCB、PCDFの肝臓がん死亡リスクへの影響は、かなり低くなっていると結論されています。

最後に、平成12年6月に、英語版“YUSHO”の原著者による翻訳本が、いくつかの章が追加され、「油症研究—30年の歩み」と題して出版されたことをお知らせいたします。

1999・2000年度の福岡県年次検診における皮膚症状

九州大学医学系研究科皮膚科学分野 (主任: 古江 増隆 教授)

古賀 哲也・古江 増隆

福岡大学医学部皮膚科教室 (主任: 中山 樹一郎 教授)

桐生 美麿・中山 樹一郎

産業医科大学皮膚科教室 (主任: 旭 正一 教授)

旭 正 一

Evaluation of Dermatological Symptoms of Yusho Patients in the Annual Examination in 1999-2000

Tetsuya KOGA and Masutaka FURUE

*Department of Dermatology (Director : Prof. M. Furue), Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812-8582*

Hiromaro KIRYU and Juichiro NAKAYAMA

*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*

Abstract We analyzed the severity grades of the skin symptoms of Yusho patients who visited the annual examinations in 1999 and 2000. The severity grades of the skin symptoms clearly improved. The patients graded as 0 increased and those graded as II・III~III or III・IV~IV decreased as compared to the data in 1993. The pattern of the skin severity scores did not change much, although the patients who showed 0・1 reached 68% in 2000. The blood PCB concentration of Yusho patients also clearly decreased, especially in the patients who showed "A" pattern.

Furthermore, the skin changes of the aged patients should be analyzed in detail in the future.

はじめに

1999年度と2000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報告する。今回の油症の皮膚症状および血中PCB濃度の分析から、7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¹⁾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

下が今回も示された。このことより、油症患者の皮膚症状および血中PCB濃度が今後もさらに改善する可能性があることが示唆された。また、油症発生以来30年が経過し患者の高齢化が目立つが、高齢化した患者の皮膚症状の変化がいかなるものであるかを詳細に把握することも今後必要である。

1999・2000年度における検診結果

受診状況

1999年度の受診者は73名(男性29名,女性44

名), 2000年度は75名(男性30名, 女性45名)であった。

皮膚重症度

表1に1999年度および2000年度の皮膚重症度を示す。参考に1993年度データ²⁾を表に付記した。今回のデータ分析より特徴的なことは、重症度の0群に分類された例が1999年度で52.0%, 2000年度で60.0%と、1993年度に較べ明らかな増加を示し、また、重症度の0群と0・IあるいはIに分類された群の合計が1999年度で67.1%, 2000年度で68.0%と全体の三分の二を占めており、さらにI・IIあるいはIIに分類された群が1999年度で15.1%, 2000年度で12.0%と同様に明らかな増加を示した点である。逆に、1999年

度、2000年度におけるII・IIIあるいはIIIに分類された群がそれぞれ17.8%, 20.0%と1993年度の33.7%に較べ著明な減少を示し、また、III・IVあるいはIVに分類された群が、1993年度の3.5%に較べ1999年度と2000年度においては0%であった。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症化の方にシフトしており、皮膚症状の軽快が今回も示された。

皮膚重症度得点数

表2に皮膚重症度得点数を示す。2000年度のデータをみると、得点数が0・1の例が68.0%と、1993年度の59.3%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

表1 皮膚重症度

重症度	年度	1993年	1999年	2000年
		例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
0		41(47.7)	38(52.0)	45(60.0)
0・I		7(12.8)	7(15.1)	3(8.0)
I		4	4	3
I・II		2(2.3)	3(15.1)	6(12.0)
II		0	8	3
II・III		21(33.7)	5(17.8)	5(20.0)
III		8	8	10
III・IV		3(3.5)	0(0)	0(0)
IV		0	0	0
計		86	73	75

() : %

表2 皮膚重症度得点数

得点数	年度	1993年	1999年	2000年
		例数 (%)	例数 (%)	例数 (%)
0・1		51(59.3)	42(57.5)	51(68.0)
2・3		21(24.4)	21(28.8)	10(13.3)
4・5		7(8.1)	9(12.3)	6(8.0)
6・7		4(4.7)	1(1.4)	6(8.0)
8・9		3(3.5)	0(0)	2(2.7)
10~13		0(0)	0(0)	0(0)
14~		0(0)	0(0)	0(0)
計		86	73	75

() : %

ることが示唆された。しかし、1999年度および2000年度の得点数が2・3以上の患者分布は、1993年度と比較してもあまり差が認められなかった。

血中 PCB パターン、PCB 平均濃度と皮膚重症度得点数との相関性

表3に示すごとく、1999年度および2000年度の油症患者の血中 PCB パターンの比率は、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。いずれのパターンも PCB 平均濃度の明らかな低下がみられる。たとえば、1993年度のAパターンの平均濃度は7.03 ppbであるのに対し、1999年度、2000年度では4.45 ppbと約40%の低下がみられた。すなわち、油症患者で従来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も示された。また、皮膚症状の平均重症度得点数は各パターンで1993年度のデータとそれ程大きな差はなかった。

血中 PCB パターンと皮膚重症度の相関性

表4に示すごとく、AパターンとCパターンでは、1995年度のデータ³⁾と比較しても、1999年度および2000年度では、重症度の0群あるいはI群の合計の比率が明らかに増加し、II群あるいはIII群の合計の比率が著明に減少していた。すなわち、各患者の血中 PCB パターンは変化していないが、いずれのパターンも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。

考 察

1999年度および2000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。今回の調査結果でも、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ことが判明した。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、重症度の0群に分類された例が明らかな増加を示し、また、重症度の0群と0・IあるいはIに分類された群の合計で全体の三分の二を占めており、さらにI・IIあるいはIIに分類された群も同様に明らかな増加を示した。逆に、II・IIIあるいはIIIに分類された群、また、III・IVあるいはIVに分類された群がそれぞれ著明な減少を示しており、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、得点数が0・1の例は増加しているが、得点数が2・3以上の患者分布は、1993年度と比較してもあまり差が認められない。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⁴⁾で示すという方法でなされたが、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と思われる。油症患者の現在の皮膚症状から、面皰・痤瘡様皮疹の程度、部位、活動性にしばったものでも良いようにも思われる⁵⁾。

油症発生以来30年が経過し患者の高齢化が目立つようになった。健康者の高齢に伴う皮疹との鑑別が難

表3 血中 PCB パターン、PCB 平均濃度と皮膚重症度得点数との相関性

パターン	1993年			1999年			2000年		
	例数	平均濃度 (ppb)	平均重症度得点数	例数	平均濃度 (ppb)	平均重症度得点数	例数	平均濃度 (ppb)	平均重症度得点数
A	37	7.03	2.27	25	4.45	1.68	28	4.45	2.04
B	21	4.22	1.43	11	3.25	2.00	13	2.96	1.15
BC	1	1.60	1.00	5	2.32	1.20	3	2.58	0.67
C	30	3.27	1.30	32	2.66	1.34	31	2.60	1.77
計	89	5.04	1.72	73	3.34	1.55	75	3.35	1.72

表4 血中PCBパターンと皮膚重症度の相関性
1995年

パターン	皮膚重症度					計
	0	I	II	III	IV	
A	14 (46.7)	1 (3.3)	8 (26.7)	7 (23.3)	0 (0)	30
B	15 (71.4)	3 (14.3)	2 (9.5)	1 (4.8)	0 (0)	21
BC	0 (0)	0 (0)	2 (100.0)	0 (0)	0 (0)	2
C	22 (61.1)	3 (8.3)	8 (22.2)	3 (8.3)	0 (0)	36

() : %

1999年

パターン	皮膚重症度					計
	0	I	II	III	IV	
A	12 (48.0)	3 (12.0)	6 (24.0)	4 (16.0)	0 (0)	25
B	8 (72.7)	1 (9.1)	1 (9.1)	1 (9.1)	0 (0)	11
BC	4 (80.0)	0 (0)	0 (0)	1 (20.0)	0 (0)	5
C	21 (65.6)	3 (9.4)	6 (18.8)	2 (6.3)	0 (0)	32

() : %

2000年

パターン	皮膚重症度					計
	0	I	II	III	IV	
A	16 (57.1)	5 (17.9)	3 (10.7)	4 (14.3)	0 (0)	28
B	9 (69.2)	2 (15.4)	1 (7.7)	1 (7.7)	0 (0)	13
BC	3 (100.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3
C	20 (64.5)	2 (6.5)	4 (12.9)	5 (16.1)	0 (0)	31

() : %

しい場合もある。この社会的状況をふまえ高齢化した患者の皮膚症状の変化がいかなるものであるかを詳細に把握することが必要である。今後の油症患者の検診では患者の高齢化を念頭においた解析が益々重要なものとなろう。慢性期の老化に伴う皮疹も考慮した、簡明な新たな皮膚重症度評価基準の作成の時期にきていると思われる。また、直接的な油症の皮膚症状ではないが、患者の高齢化に伴い、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) 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.
- 2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 中山樹一郎, 利谷昭治, 旭 正一, 古江増隆:
1997・1998年度の福岡県年次検診における皮膚症状. 福岡医誌 90:143-146, 1999.

(受付 2001-3-23)

油症におけるリンパ球機能の検討

福岡大学医学部内科学第三教室
辻 博・鈴木 統久・向坂彰太郎

Mitogen-Induced Lymphocyte Transformation in Patients with Yusho

Hiroshi TSUJI, Norihisa SUZUKI and Shotaro SAKISAKA

Third Department of Medicine, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract To evaluate chronic immune effects of polychlorinated biphenyl (PCB), *in vitro* lymphocyte transformation in response to nonspecific mitogens were studied in 74 patients with Yusho in 2000. Elevated response in phytohemagglutinin (PHA)-induced lymphocyte transformation was detected in fifteen (20.3%) patients, while decreased PHA response was found in six (8.1%) patients. Concanavalin A (Con A)-induced lymphocyte transformation was increased in six (8.1%) patients, and decreased in eleven (14.9%) patients. There were no significant correlations between blood PCB concentrations and lymphocyte transformation in response to PHA, Con A, or pokeweed mitogen (PWM). We conclude that abnormality of lymphocyte transformation in patients with Yusho is frequent, but it may not be associated with blood PCB concentration.

はじめに

1968年4月頃より、polychlorinated biphenyls (PCB) 混入ライスオイル摂取により北部九州を中心に発生した油症では、発症当初の重症例の検査所見において種々の異常が報告されている⁹⁾。油症発生以来30年以上を経過し、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¹¹⁾²⁾。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³⁾⁵⁾、慢性中毒に移行していると推定される。我々は1997年度の福岡県油症一斉検診において油症患者の免疫グロブリンおよび自己抗体を測定し、免疫グロブリンIgA, IgG, IgMのいずれか1分画以上の上昇を40.0%に認め、自己抗体では抗核抗体を45.6%と高率に認めた¹⁰⁾。PCBあるいはPCDFによる種々の免疫機能の障害が動物実験において報告されているが、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、油症患者における細胞性免

疫をリンパ球機能より解明するためにリンパ球機能検査として phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A) および pokeweed mitogen (PWM) などの非特異的 mitogen 刺激によるリンパ球幼若化反応を測定し、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

2000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74例を対象者とした。2000年3月現在の福岡県全油症認定患者642名の11.5%であった。油症患者の内訳は男性29例、女性45例で、平均年齢は64.6±11.4歳(37-87歳)であった。

検診の内容は自覚症状、既往歴、家族歴、理学的所見、検尿、赤血球沈降速度、末梢血液検査、血液生化学検査、胸部レントゲン検査、心電図および腹部超音波検査などであり、採血は午前中の空腹時に行った。リンパ球機能検査としてPHA, Con AおよびPWMなどのmitogenによるリンパ球幼若化反応は³H-サイミジン取り込み能により測定した。リンパ球をヘパリン加末梢血液よりFicoll-Conray法により分離後、

PBS にて洗浄し 10%FCS 添加 PRMI 1640 培地にて 5×10^5 cells/ml に調整した。リンパ球浮遊液 0.2 ml を mitogen 20 μ l を添加したマイクロプレートに分注し、5%CO₂ 培養器にて 37°C, 64 時間培養後、³H-サイミジン 0.25 μ Ci を加え、さらに 8 時間培養した。培養細胞をセルハーベスターにて回収、乾燥し液体シンチレーションカウンター (LKB-1205, LKB) にて ³H の放射能を測定した。そして、mitogen 無添加の対照のカウントで除した stimulation index (SI) で表した。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施行した。

結果は平均土標準偏差 (mean \pm 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、出現頻度の比較は χ^2 検定で行った。

結 果

2000 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 74 例におけるリンパ球幼若化反応の異常は PHA 反応の低下を 6 例 (8.1%) に、上昇を 15 例 (20.3%) に認め、Con A 反応の低下を 11 例 (14.9%) に、上昇を 6 例 (8.1%) に認めた。PHA 反応の上昇を最も高頻度に認めた。

油症患者におけるリンパ球幼若化反応と PCB との関連を検討するために、油症患者 74 例について血中 PCB 濃度と PHA, Con A および PWM 刺激によるリンパ球幼若化反応 (stimulation index) との相関について検討した。血中 PCB 濃度と PHA 反応 ($r = -0.0054$)、Con A 反応 ($r = 0.0380$) および PWM 反応 ($r = 0.0018$) の間に相関はみられなかった。

次に、血中 PCB 濃度が 2.99 ppb 以下の 34 例を PCB 低濃度群、3.00 ppb 以上の 40 例を PCB 高濃度群として両群間のリンパ球幼若化反応について比較した (Table 1)。PCB 低濃度群は男性 14 例、女性 20 例、平均年齢 61.4 \pm 12.0 歳、平均 PCB 濃度 2.09 \pm 0.59 ppb であり、PCB 高濃度群は男性 15 例、女性 25 例、平均年齢 67.2 \pm 10.2 歳、平均 PCB 濃度 4.68 \pm 2.05 ppb であった。両群間に性差を認めなかった。Mitogen 刺激によるリンパ球幼若化反応 (stimulation index) は PHA 反応が PCB 低濃度群 106.3 \pm 52.9 に対し高濃度群 116.6 \pm 68.4 と高い傾向を、Con A 反応

が PCB 低濃度群 79.8 \pm 33.8 に対し高濃度群 94.3 \pm 55.0 と高い傾向を、PWM 反応が PCB 低濃度群 25.1 \pm 12.9 に対し高濃度群が 29.9 \pm 16.8 と高い傾向を認めたが、いずれも有意ではなかった。

考 察

油症と免疫機能の関連について、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 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¹⁰⁾。そして、免疫グロブリン IgA, IgG, IgM のいずれか 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 LE 因子は全例陰性であったが、リウマチ因子を 12.7% に、抗核抗体を 45.6% と高率に認めた。抗核抗体は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⁴⁾。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考えられる症状はみられなかった。

免疫に対する PCB の影響について Smialowicz ら⁹⁾ は PCB (Aroclor 1254) を投与したラットにおいてリンパ球の mitogen 刺激幼若化反応を検討し、対照に比べ Con A あるいは PWM に対する反応には差がなかったが、PHA に対する反応の増強を認めたと報告している。PHA, Con A は T 細胞の、PWM は T 細胞および B 細胞の mitogen であるが、PHA は helper/inducer T 細胞を、Con A は suppressor/cytotoxic T 細胞および helper/inducer T 細胞の両者を幼弱化することが知られている⁷⁾⁸⁾。彼らが認めた PHA 反応の増強は、helper/inducer T 細胞の幼若化反応の増強によるものと考えられる。

今回、油症患者における細胞性免疫をリンパ球機能

Table 1 血中 PCB 低濃度患者および高濃度患者におけるリンパ球幼若化反応

No.	PCB 濃度	
	≤ 2.99 ppb 34	≥ 3.00 ppb 40
PHA (SI)	106.3 \pm 52.9	116.6 \pm 68.4
Con A (SI)	79.8 \pm 33.8	94.3 \pm 55.0
PWM (SI)	25.1 \pm 12.9	29.9 \pm 16.8

より解明するために PHA, Con A および PWM などの非特異的 mitogen 刺激によるリンパ球幼若化反応を検討した。しかし、血中 PCB 濃度と PHA, Con A および PWM 刺激によるリンパ球幼若化反応の間に相関を認めず、血中 PCB 低濃度群と高濃度群の間にリンパ球幼若化反応に差を認めなかった。油症患者の細胞性免疫機能において油症原因物質のリンパ球幼若化反応への慢性的影響は少ないと考えられた。

総 括

2000 年度福岡県油症一斉検診受診者において免疫機能検査に同意が得られた油症認定患者 74 例を対象にリンパ球幼若化反応を検討した。PHA 反応の低下を 6 例 (8.1%)、上昇を 15 例 (20.3%) に認め、Con A 反応の低下を 11 例 (14.9%)、上昇を 6 例 (8.1%) に認めた。PHA 反応の上昇を最も高頻度に認めた。血中 PCB 濃度と PHA 反応、Con A 反応および PWM 反応の間に相関はみられず、血中 PCB 濃度が 2.99 ppb 以下の PCB 低濃度群 34 例と 3.00 ppb 以上の高濃度群 40 例の間に PHA 反応、Con A 反応あるいは PWM 反応に差をみなかった。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.

3) 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.

4) 宮脇昌二: 抗核抗体・抗 DNA 抗体, 日内会誌 87: 2402-2408, 1998.

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

6) 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.

7) Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G and Schlossman SF: A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum treated TH₂. J. Immunol. 124: 1301-1307, 1980.

8) Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G and Schlossman SF: Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4061-4065, 1979.

9) 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.

10) 辻 博, 平橋高明, 緒方久修, 藤島正敏. 油症患者における免疫機能の検討。福岡医誌 90: 147-149, 1999.

(受付 2001-3-23)

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 (第四報)

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

橋口 勇・山座孝義・小石裕子

後藤康治・吉嶺嘉人・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 2000

Isamu HASHIGUCHI, Takayoshi YAMAZA, Yuko KOISHI, Yasuharu GOTO
Yoshito YOSHIMINE and Akifumi AKAMINE

*Department of Endodontology and Operative Dentistry (Director : Prof. A. Akamine),
Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, 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 in 2000.

The results obtained were as follows.

1) 63 patients out of 69 patients with Yusho, who were measured periodontal pocket depth according to Ramfjord' methods, had at least one tooth with periodontal pocket deeper than 3 mm. Similarly, 188 teeth out of a total 285 examined teeth showed periodontal pocket with more than 3 mm depth.

2) In this examination, intraoral sinus tracts stoma were observed in 9 patients out of 70 patients. Radiographic examination and probing examination of pocket depth indicated that periapical lesions were involved in these intraoral sinus tract formation.

3) Oral pigmentation was observed in 46 out of 76 patients with Yusho. In this study, gingival pigmentation was most predominant among oral pigmentation.

These results indicated that PCBs had yet affected the mechanism of oral pigmentation and metabolism of alveolar bone.

はじめに

我々は従来より年一回行われる油症患者の一斉検診

において、油症患者の口腔内所見について追跡調査を行ってきた。その結果、油症患者における最も顕著な口腔内所見として口腔粘膜の色素沈着が認められ¹⁾、

また歯周疾患罹患率が高いこと^{2)~4)}を報告してきた。そこで、平成12年度の福岡県における油症患者の一齐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況について報告すると共に、歯周疾患と同様に細菌感染によって惹起される根尖性歯周炎の発現についても検討を行った。

検 診 方 法

平成12年度の福岡県油症一齐検診時に歯科を受診した油症認定患者を対象として、問診、視診やX線診(パントモグラフ)と同時に歯周ポケット診査を行った。歯周ポケット診査はRamfjordが提唱している方法に準じて行った。すなわち、上顎右側第一大臼歯(6)、上顎左側中切歯(1)、上顎左側第一小白歯(4)、下顎右側第一小白歯(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、各歯牙の近心頰側歯肉溝に約25gの荷重下でポケット探針PCP-11(Hu-Friedy社)を挿入し、3mm以上の歯周ポケットを有する歯牙についてmm単位で測定した。また、パントモグラフを用いて歯槽骨吸収の程度や残存歯ならびに根管充填の状態の把握を行った。

結 果

平成12年度に歯科を受診した油症認定患者は男性29名、女性47名、計76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36名で、その内訳としては歯周疾患の異常を訴えるものが最も多く25名(歯肉腫脹11名、歯牙挺出感9名、歯肉出血5名)で、ついで義歯不適合(10名)の訴えが多かったが、口腔内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診査対象歯を全て喪失している患者を除いた69名(男性27名、女性42名)を対象として行った(表1)。深さ3mm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。深さ3mm以上の歯周ポケットを1歯でも有している患者は63名(91.3%)と非常に高い割合を示した(表2)。同様に3mm以上の歯周ポケットを有する歯牙は、285の総被検歯のうち188歯(65.9%)であった。また3mm以上の歯周ポケットを有する歯牙を部位別に比較すると、右側下顎第1小白歯が72.7%と最も高い値を示し、以下左側下顎第1大白歯(71.8%)、右側上顎第1大白歯(69.8%)、左側上顎第1小白歯(64.7%)、右側下顎中切歯(64.7%)、左側上顎中切歯(52.2%)の順であった(表3)。しかしながら、深さ4mm以上の歯周ポケットを1歯でも有している患者は30名(43.5%)で、また総被検歯のうち48歯(16.8%)にのみ4mm以上の歯周ポケットが認められた。

表1 油症患者の年代別受診者数

年代	男性	女性	計
30代	1 (1)	1 (1)	2 (2)
40代	3 (3)	5 (5)	8 (8)
50代	3 (3)	8 (8)	11 (11)
60代	13 (13)	14 (13)	27 (26)
70代	7 (6)	17 (15)	24 (21)
80代	2 (1)	2 (0)	4 (1)
計	29 (27)	47 (42)	76 (69)

() : 歯周ポケット診査対象歯が少なくとも1歯以上残存している患者数

表2 3mm以上の歯周ポケットの分布状態

罹患歯数 性別 年代	0		1		2		3		4		5		6		計 (名)
	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	
30代	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
40代	0	2	1	0	0	1	0	0	0	1	2	1	0	0	8
50代	0	1	1	1	0	3	0	1	1	2	1	0	0	0	11
60代	0	2	2	5	5	1	1	1	4	2	0	1	1	1	26
70代	1	0	2	2	0	4	1	1	2	7	0	1	0	0	21
80代	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
計(名)	1	5	6	8	5	9	2	4	8	12	4	3	1	1	69

口腔粘膜に色素沈着を有する者は男性 18 名 (62.1%)、女性 28 名 (59.6%)、計 46 名 (60.5%) で、男性の方が高い発現傾向を示した (表 4)。また、60 歳未満の患者では 21 名中 17 名 (80.9%) に色素沈着が認められたのに対し、60 歳以上では 55 名中 29 名 (52.7%) にしか認められず、加齢と共に色素沈着の発現率は低下していた。部位別にみると、歯肉の色素沈着が最も多く、次いで頬粘膜、口蓋粘膜の順で認められたが、口唇には観察されなかった。色素沈着の程度をみると、+ が最も多く、以下 ±, ++ の順であった (表 5)。

パントモグラフを用いて根尖性歯周炎の発現に関して検索を行った。パントモグラフで明らかな根尖透過像を有する患者数は、無歯顎患者ならびに歯周診査対象歯を全て喪失している患者を除いた 69 名中 38 名 (55.1%) であった。加えて、今回 9 名 (12.9%) の患者に歯肉に瘻孔が認められた。瘻孔の原因と思われる歯牙周囲の歯周ポケットはあまり深くなく、パントモ

グラフでは当該歯根周囲に X 線透過像が認められた。

考 察

3 mm 以上のいわゆる病的歯周ポケットを 1 歯でも有している患者の割合は 91.3% と平成 6 年度 (93.2%)⁴⁾、平成 8 年度 (85.1%)²⁾、平成 10 年度 (97.2%)³⁾ とほぼ同様の値を示した。しかし、4 mm 以

表 4 色素沈着を有する患者数

年代	性別		計 (%)
	男性	女性	
30 代	1	1	2 (100.0)
40 代	3	3	6 (75.0)
50 代	2	7	9 (81.8)
60 代	9	7	16 (59.3)
70 代	3	10	13 (54.2)
80 代	0	0	0 (0)
計	18	28	46 (60.5)

% は各年代の受診患者数に対する百分率

表 3 部位別の 3 mm 以上の歯周ポケットを有する歯牙数

	部位	6]	1]	4]	4]	1]	6]	計
男性	罹患歯数	12	12	13	18	15	11	81
	総被検歯数	14	14	18	22	18	12	98
	%	85.7	85.7	72.2	81.8	83.3	91.7	82.7
女性	罹患歯数	18	12	20	22	18	17	107
	総被検歯数	29	32	33	33	33	27	187
	%	62.1	37.5	60.6	66.7	54.5	62.9	57.2
計	罹患歯数	30	24	33	40	33	28	188
	総被検歯数	43	46	51	55	51	39	285
	%	69.8	52.2	64.7	72.7	64.7	71.8	65.9

表 5 部位別の色素沈着を有する患者数

部位 程度	上顎歯肉		下顎歯肉		頬粘膜		口蓋粘膜	
	男性	女性	男性	女性	男性	女性	男性	女性
±	5	7	4	7	2	1	0	0
%	17.2	14.9	13.8	14.9	6.9	2.1	0	0
+	5	12	7	11	3	5	0	3
%	17.2	25.5	24.1	23.4	10.3	10.6	0	6.4
++	3	1	3	1	0	1	0	0
%	10.3	2.1	10.3	2.1	0	2.1	0	0
計	13	20	14	19	5	7	0	3
%	44.8	42.6	48.3	40.4	17.2	14.9	0	6.4

% は、受診患者数 (男性 29 名、女性 47 名) に対する百分率

上の比較的深い歯周ポケットの罹患状況を平成10年度と比較すると、歯周ポケットを1歯でも有している患者の割合および総被検歯に対する歯周ポケットを有する歯牙の割合いずれも減少していた。油症患者においても直接の原因はプラーク中の細菌と考えられることから^{2)~4)}、ブラッシングあるいは簡単な歯石除去等の処置によって歯周ポケットが浅くなった可能性が考えられる。あるいは、平成10年度においては歯周ポケット診査を受けた患者一人当たり4.9本の診査対象歯牙を有していたが、平成12年度では一人当たり4.1本と減少していたことより歯周炎あるいは齶蝕の進行等の理由で深い歯周ポケットを有する歯牙が抜歯された可能性も考えられる。一方、今まで歯周ポケット罹患率が低かった下顎右側中切歯においても64.7%と高い罹患率を示したことや患者の年齢も高齢化していることを考慮すると、更に適切な口腔衛生指導が必要と思われる。

今回新たに根尖性歯周炎の罹患状況について検討を行った。その結果、過半数の患者で根尖性歯周炎が認められ、また根尖性歯周炎由来と思われる歯肉瘻孔が12.9%と高い頻度で観察された。辺縁性歯周炎の直接の原因はプラーク中の細菌刺激であるが、同様に根尖性歯周炎の主たる発症原因も根管系由来の細菌因子と考えられている⁶⁾。興味深いことに、辺縁性歯周炎罹患患者の歯肉溝から分離され辺縁性歯周炎と深い関連を有する *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* や *Capnocytophaga* 属のような細菌が感染根管内からも高頻度に検出されている⁸⁾。PCBの作用によって全身抵抗力や免疫反応に異常が生じることが報告されており⁹⁾、健常者に比べて根管系由来の細菌が容易に根尖歯周組織に侵襲する可能性を否定できない。加えて、根尖性歯周炎の主な臨床症状の一つとして辺縁性歯周炎と同様に歯槽骨の吸収が挙げられるが、PCBはCa代謝異常を惹起することも知られている¹⁰⁾。以上のことから、PCBが辺縁性歯周炎と同様に根尖性歯周炎の発症にも影響を及ぼしている可能性が考えられ、今後の検討課題としたい。

今回の検診において口腔内の色素沈着の発現率は60.5%であり、過去の報告²⁾³⁾と同様に発現率は女性に比べて男性で高く、また60歳以上の患者に比較して60歳未満の患者で高い傾向を示した。体内に蓄積され

たPCB等の原因物質が減少していることに伴い、眼科や皮膚科領域では特異的な色素沈着は経年的に減少していることが報告されている⁵⁾⁷⁾。しかし、今回得られた発現率は平成8年度(57.3%)、平成10年度(58.2%)とほぼ同様の値を示し、色素沈着の発現率の低下は認められなかった。ところで、平成12年度においては歯周ポケット診査対象歯牙は一人当たり4.1本と減少していたが、加齢に伴う残存歯牙数の減少率と歯周ポケット診査対象歯牙の減少率とは同様の傾向を示すことから一人当たりの残存歯牙数が減少していることが示唆される。歯牙数の減少にも関わらず色素沈着率の低下が認められなかったことは、歯牙の喪失という口腔内環境の変化は色素沈着の消退には直接関与していないことを示唆しているのかもしれない。しかし、色素沈着の消失に関する詳細な機序に関しては不明な点が多く、今後更なる検索が必要と思われる。

結 論

油症患者における歯周組織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12年度油症一斉検診受診者を対象に口腔内診査を行い、以下の結果が得られた。

1. 深さ3mm以上の歯周ポケットを1歯でも有している患者は63名(91.3%)と非常に高い割合を示した。同様に3mm以上の歯周ポケットを有する歯牙は、285の総被検歯のうち188歯(65.9%)であったが、そのほとんどは深さ4mm未満であった。

2. 過半数の患者で根尖性歯周炎が認められ、また根尖性歯周炎由来と思われる歯肉瘻孔が12.9%と高い頻度で観察された。

3. 口腔内色素沈着の発現率は60.5%であった。部位としては、歯肉の色素沈着がほとんどで口蓋の色素沈着は認められなかった。傾向としては、女性より男性の発現率が高く、また若年者に比較して高齢者に多く認められた。これらの結果は、PCBが歯周組織の炎症の拡張や口腔内色素沈着に関与していることを示唆していると思われる。

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) 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.

3) 橋口 勇, 古川和洋, 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 (第三報), 福岡医誌 90: 150-153, 1999.

4) 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.

5) 本房昭三, 堀 嘉昭, 利谷昭治 他: 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.

6) Kakehashi S, Stanley HR and Fitzgerald RJ: The effects of surgical exposure of dental pulps

in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 20: 340-349, 1965.

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

8) Seltzer S and Farber PA: Microbiological Factors in endodontics. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 78: 634-645, 1994.

9) Vos JG and DeRoiji TH: Immunosuppressive activity of a polychlorinated biphenyl preparation on the humoral immune response in guinea pigs. Toxicol. Appl. Pharmacol. 21: 549-555, 1972.

10) Yagi N, Kimura M and Itokawa Y: Sodium, potassium, magnesium and calcium levels in polychlorinated biphenyl (PCB) poisoned rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 16: 516-519, 1976.

(受付 2001-3-16)

油症患者における血中一酸化窒素濃度と 臨床症状および検査データとの検討

長崎大学医学部皮膚科学教室
清水和宏・塚崎直子
小川文秀・片山一朗

Examination of Serum Nitric Oxide in Yusho Patients

Kazuhiro SHIMIZU, Naoko TUKAZAKI, Fumihide OGAWA and Ichiro KATAYAMA
*Department of Dermatology, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto,
Nagasaki 852-8501, Japan*

Abstract In order to evaluate the influence of oxidative stress by PCB, we measured serum nitric oxide (NO) in Yusho patients by the Griess method, which detected nitrite (NO_2^-) formed by the oxidization of NO. Serum NO_2^- concentrations were significantly increased in Yusho patients as compared to healthy controls, but no correlation was detected between serum NO_2^- concentration and PCB or PCQ level in Yusho patients. The relationship was analyzed between serum NO_2^- concentration and certain parameters such as clinical symptoms, habits and clinical data. Serum NO_2^- level had a positive correlation with CPK in male patients, but not in female and all Yusho patients. Furthermore, no mutual relation was detected between serum NO_2^- concentration and the other parameters such as blood pressure, smoking and each laboratory data. Therefore, the possibility is considered that Yusho is one of the diseases which show the increase of serum NO.

はじめに

一酸化窒素 (NO) は 1987 年に血管弛緩因子として同定されたガス状ラジカルで、スーパーオキシド (O_2^-) と容易に反応してパーオキシナイトライト (ONOO^-) を生じ、細胞障害を引き起こすことが知られている。また高血圧症や動脈硬化症などの成人病の病態に NO が関与していることが最近報告されてきている³⁾⁵⁾。一方 PCB もその代謝過程で O_2^- の産生に関与していることが報告されている⁴⁾。そこで我々は油症患者における PCB による酸化ストレスの影響を評価するために血中 NO 濃度の検討を計画した。NO が関与しているとされる成人病などの疾患を考慮にいれ油症患者に認められる臨床症状や検査データと NO_2^- との間に相関がないか検討した。

実験方法

1999 年 7 月の油症検診受診者のうち同意を得られ

た 30 名を対象とし、検診時に採血を行い血清を分離凍結保存し、血中 NO 測定用サンプルとした。また、年齢を合致させた 17 名を正常対照とした。

血中 NO 濃度測定は Griess 法 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ Assay Kit-C (Colorimetric))¹⁾ を用い Student t 検定で検討した。各油症患者個人の臨床症状、生活習慣嗜好、臨床検査値等と測定した血中 NO_2^- との間の相関関係の有無を Fisher 検定を用いて検討した。

検討項目は CPK, Total cholesterol, Triglyceride, Systolic blood pressure, Diastolic blood pressure, GPT, Creatinine, AFP, LDH の 10 項目であった。

実験結果

油症患者の血清 NO_2^- 値は $2.10 \pm 0.53 \mu\text{M}$ で正常対称群 $1.26 \pm 0.88 \mu\text{M}$ にくらべて有意に上昇していた ($p < 0.01$) (Fig. 1)。

また、油症患者の血清 NO_2^- 値と同時に採血した血

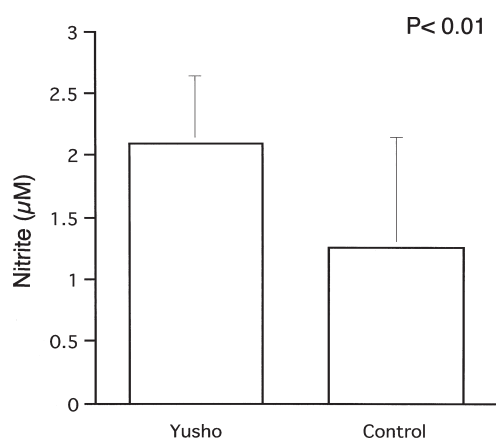


Fig. 1 Serum concentrations of nitrite in Yusho patients ($2.10 \pm 0.53 \mu\text{M}$) were significantly higher than those in controls ($1.26 \pm 0.88 \mu\text{M}$). ($p < 0.01$)

液中の PCB, PCQ 濃度との間に相関は認めなかった。

従来から油症検診で異常が指摘されていた CPK と血清 NO_2^- 値との関係について男性患者において正の相関が認められたが、女性患者および全患者では相関は認めなかった。

他の血圧, 血中脂質, 喫煙, 各種臨床検査値についても同様に検討したが, 相関は認めなかった。

考 察

血中 NO は多くの疾患において上昇することが報告されてきているが, 主なものには SLE をはじめとする膠原病, 高血圧, 高脂血症, 感染症などがある³⁾⁴⁾。今回検討した患者では抗核抗体やその他の検査値, 症状より膠原病を思わせる症例は認めなかった。また PCB はその代謝過程において O_2^- の産生に関与し, 結果生じた酸化ストレスが乳癌の発症に関与している可能性が報告されている⁴⁾。一方 NO は O_2^- と容易に反応して ONOO^- に変化し, 強い細胞傷害を引き起こすことが知られている。

今回我々は男性油症患者 12 名において血清中 NO_2^- 濃度と CPK 値との間において正の相関を認めたが, 女性や全患者においては相関を認めなかった。激しい運動のあとに NO が高値を示すという報告が

あるが²⁾, 検診前に行った簡単なアンケートで前日や当日朝に重労働と考えられる仕事内容を記した男 4 名を 12 名よりのぞき男 8 名で CPK と NO の相関を検討したところ相関は消失した。しかし性差という可能性も充分想定され, 検診前の力仕事やスポーツなどの影響を除外して再検討する必要があると考えられる。

他の血圧や, 血中脂質など 9 項目を含め検討したが, その限りでははっきりとした相関を示す症状や検査項目は認められず油症自体が NO の上昇する病態である可能性も十分に考えられた。今後自覚症状や異常検査値の項目を増やし PCB による酸化ストレスの長期的影響の検討と油症患者の健康管理を行っていきたい。

結 論

今回の検討では油症患者の血清中の NO 値が正常対称群にくらべて有意な上昇を認めた。油症患者において NO と各種臨床検査データ等との相関を検討したが, はっきりとした NO との相関をしめす項目は認められず油症自体が NO の上昇する病態である可能性が考えられた。

文 献

- 1) Archer S: Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 7: 349-360, 1993.
- 2) Maddali S, Rodeo SA, Barnes R, Warren RF and Murrell GAC: Postexercise increase in nitric oxide in football players with muscle cramps. *Am J Sport Med.*, 26(6): 820-824, 1998.
- 3) Moussa YI, Plevris JN and Hayes PC: Plasma nitrites/nitrates in HCV infection and hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12: 159-163, 2000.
- 4) Oakley GG, Devanaboyina U-s, Robertson LW and Gupta RC: Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): Implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem. Res. Toxicol.*, 9: 1285-1292, 1996.
- 5) Wanchu A, Khullar M, Sud A and Bamberg P: Nitric oxide production is increased in patients with inflammatory myositis. *Biology and Chemistry* 3(6): 454-458, 1999.

(受付 2001-3-30)

Association between Blood Concentration of Polychlorinated Biphenyls and Manifestations of Symptoms and Signs in Chronic “Yusho” Patients from 1986 to 1997

Shoji TOKUNAGA

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

Kyoichiro KATAOKA

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

Abstract To examine the association between blood PCB level and manifestations of symptoms and signs by Yusho patients, a cross-sectional study was conducted using the results of nationwide health examination for Yusho. The subjects were the officially identified Yusho patients who admitted the health examination from 1986 to 1997. The number of examinees with known blood PCB level was 334 in 1986, and decreased to 214 in 1997. The numbers of male and female patients were similar. The geometric mean (95% confidence interval) of blood PCBs concentration was 4.05 ppb (3.75 to 4.37) in 1986 and 2.85 ppb (2.63 to 3.08) in 1997. Multiple logistic regression analysis was carried out for the data of each year with log-transformed blood PCB level as an explanatory variable and a manifestation of a sign or symptom as a response variable. Sex and age adjusted odds ratio and significance level (P) were computed. Positive association of blood PCB level with manifestations of comedones on the trunk and acneiform eruptions on the genital and gluteal regions was statistically significant for five, eight and six times, respectively. No other symptoms or signs showed such strong associations. Associations between manifestations of these signs and blood PCB level, however, did not seem to diminish in the twelve years of observation. It is suggested that the positive association of these signs with blood PCB level will still be maintained.

Introduction

A nationwide health examination for Yusho has been conducted annually from 1986 using a standardized examination form in order to promote health of the patients and to determine the health status of the chronic Yusho patients. The health examination is open not only to officially identified Yusho patients, but also to those who regard themselves as potential victims. The participation to the examination is voluntary. The results of the health examina-

tion were stored as a database by a comprehensive data-processing system¹⁾.

Utilizing the database, some cross-sectional studies had been conducted on the association between blood PCB level and clinical manifestations of symptoms and signs in internal medicine, dermatology and ophthalmology. Hirota et al. (1991 and 1995) analyzed the result of the nationwide health examination conducted in 1988 using Kolmogorov-Smirnov test and Mantel-Haenszel test. The officially identified Yusho patients were selected as study subjects

in both studies. Although the same subjects were analyzed, blood PCB level was differently categorized in the two studies. In the former study, statistically significant association with blood PCB level was observed in manifestations of general fatigue, headache, abnormality of breath sound, tendency of suppuration, comedones in face and trunk, and acneiform eruptions in genital region²⁾. Manifestations of general fatigue, headache, numbness in extremities, abnormal breath sounds, comedones on face, comedones on trunk, and acneiform eruptions in genital region significantly associated with blood PCB level in the latter study³⁾.

Hirota (1997) analyzed the results of health examination carried out in 1993⁴⁾. Only examinees of officially identified Yusho patients from Fukuoka Prefecture were selected as subjects. With Cochran-Mantel-Haenszel test of tendency, manifestations of comedones on the trunk and other regions, acneiform eruptions in the genital and gluteal regions, and hypersecretion of the meibomian gland were found to be statistically significantly associated with blood PCB level. Further analysis using logistic regression model adjusting for sex and age showed that manifestations of acneiform eruptions in the gluteal region and hypersecretion in the meibomian gland were significantly associated with binary converted blood PCB level.

The observed association of blood PCB level with manifestations of symptoms and signs was interpreted that the observed level of blood PCB concentration was the general index for exposure, and that PCBs with a peculiar pattern in components and PCB-related compounds, such as PCQs and PCDFs, might have played a role in bringing about the associations³⁾⁵⁾.

There remain some problems in the studies conducted so far on the association of symp-

toms and signs with blood PCB level; 1) the subjects of the cross-sectional studies were limited to the examinees of 1988 and 1993 health examinations, 2) the difference in statistical methods applied made the comparison between the results of the above studies is difficult, 3) possible confounding factors are not adjusted in some cases. These problems make it difficult to generalize those finding to the whole Yusho patients. This study addressed the problems by using data of all available years of examinations and adopting a standardized statistical method for the analysis.

Subjects and Methods

The data analyzed in the current study was taken from the database provided by the data-processing system of the nationwide annual health examination for Yusho established by Kataoka et al.¹⁾ Manifestations of symptoms and signs, blood PCB level, age, sex and smoking habit were retrieved from the database for the examinations conducted from 1986 to 1997. From the database, the officially identified Yusho patients with known blood PCBs concentration were selected as study subjects. Table 1 shows the number of male and female subjects analyzed and their age distribution. The number of examinees with known blood PCB level decreased from 334 in 1986 to 214 in 1997. The numbers of male and female patients were similar.

The systematic identification of the patients across examinations in different years had not been conducted in this database. In this study, the patients were tentatively identified by their name, both in Chinese characters and pronunciation, and birth date. With the tentative identification, the participation of officially identified Yusho patients to the health examination was summarized as follows. Of the officially

Table 1 Age distribution of the subjects by sex and the year of the nationwide annual health examination for Yusho.

Year of health examination	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Men												
15 - 19	1	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0
20 - 29	21	7	6	3	5	3	4	2	0	1	1	0
30 - 39	20	11	7	5	12	7	8	10	7	7	2	5
40 - 49	18	10	11	17	11	8	9	12	14	7	9	11
50 - 59	49	45	49	36	37	31	26	22	19	19	15	10
60 - 69	38	53	52	52	50	47	49	52	49	37	47	42
70 - 79	12	14	10	19	22	22	24	29	32	33	24	32
80 - 89	2	1	3	2	5	3	2	6	4	5	8	6
Total	161	141	141	137	145	121	122	133	125	109	106	106
Women												
15 - 19	5	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
20 - 29	11	4	8	5	3	6	3	1	1	2	1	2
30 - 39	22	13	9	9	12	8	7	7	6	5	3	3
40 - 49	25	16	20	21	17	16	15	15	15	13	14	10
50 - 59	51	36	35	32	40	29	29	26	26	19	16	20
60 - 69	36	43	35	51	56	49	42	52	52	46	41	38
70 - 79	20	14	14	19	16	13	24	26	25	26	31	27
80 - 89	3	1	1	1	3	2	3	0	3	7	7	8
Total	173	130	125	139	147	123	123	127	128	118	113	108

identified Yusho patients who had ever participated to the health examination, only 7% took the examination every year, and twenty-five percent of the examinees took the examination only one time. The mean number of examinations per attendant was 4.98. The turnover rate (the number of the subjects who had the examination in that year but not in the previous year/the number of subjects examined in that year) was 29, 33, 37, 37, 24, 24, 29, 26, 24, 28 and 24% for the examinations from 1987 to 1997, respectively.

The method of analyzing PCBs in the blood had been reported elsewhere⁶⁾⁷⁾. Information on the symptoms or signs corresponding to or related to the diagnostic criteria for Yusho at the chronic phase⁸⁾ was obtained from the standard examination form. Of these symptoms and signs, the following items were selected for

the analysis; general fatigue, headache, cough, sputum, abdominal pain, numbness in the extremities, abnormal breath sounds, paresthesia in extremities, abdominal ultrasonography, and hepatomegaly from the examinations of internal medicine; liability to suppuration, comedones on the regions of face, auricle, and trunk, acneiform eruptions on the regions of face, fingernails, and toenails, from the examinations of dermatology; and hypersebum, conjunctival pigmentation, cyst formation of the meibomian gland, and secretion of cheesy material from the meibomian glands, from the examinations of the ophthalmology. Some signs and symptoms were not included for the analysis. Troubles with menstruation were not analyzed because no information on menopause was available. The comedones, acneiform eruptions and pigmentation in "other regions", and

splenomegaly were excluded from the analysis because only a few or, in some years, no patient showed the signs.

The standardized form indicates the results by a semi-quantitative scale for most of the items, e.g., -, + and ++ for subjective symptoms; -, ±, +, ++, and +++ for signs on the skin or eyes. In this analysis, the result was classified into two categories as presence for + and ++ of symptoms and +, ++, +++ of signs, and absence for - of symptoms and - and ± of signs.

Unconditional logistic regression model was applied to analyze the association between manifestation of the symptoms or signs and blood PCB level adjusting for sex and age. As mentioned above, the clinical manifestations of the symptoms and signs were converted to binary variables. The distribution of blood PCB level was highly skewed to the right. To minimize the effect of outliers at the logistic regression analysis, the blood PCB level was transformed with natural logarithm. Age was included as a continuous variable in the multiple logistic regression model. When the symptoms or signs were manifested by only one sex, sex was not adjusted in the logistic regression anal-

ysis. For manifestations of cough and sputum, smoking habit was adjusted for as a binary variable, current smoker or not, because these symptoms are expected to be associated with smoking habit. All statistical tests were two-sided. The significance level of $P < 0.05$ was considered as statistically significant. Statistical analyses were carried out with Stata ver. 6.0⁹⁾.

Results

Table 2 shows the geometric and arithmetic means of blood PCB level of the patients who admitted the annual nationwide health examination of Yusho. The decreasing tendency was observed in geometric mean and maximum values of blood PCB level. In 1986 and 1987, the geometric mean of blood PCB level was 4.05 ppb, but decreased to 2.85 ppb in 1997. The maximum blood PCB level was 35 ppb in 1986 and decreased to 11 ppb in 1997. Accordingly, the ratio of maximum value to minimum value of the blood PCB level decreased from 70 in 1986 to 22 in 1997.

The frequency of symptoms and signs in internal medicine is shown in Table 3a. The prevalence of medical manifestations varied

Table 2 Blood PCB level (ppb) of Yusho patients.

Year of health examination	Number of subjects	Geometric mean (95% CI)	Arithmetic mean (SD)	Minimum	Maximum
1986	334	4.05 (3.75 to 4.37)	5.12 (3.97)	0.50	35.00
1987	271	4.20 (3.87 to 4.56)	5.24 (3.68)	0.50	22.00
1988	266	3.83 (3.54 to 4.15)	4.73 (3.47)	0.60	32.00
1989	276	3.72 (3.46 to 4.01)	4.48 (2.88)	0.88	19.40
1990	292	3.49 (3.24 to 3.76)	4.26 (2.85)	0.43	24.77
1991	244	3.75 (3.47 to 4.05)	4.48 (2.79)	0.95	16.63
1992	245	3.31 (3.06 to 3.58)	3.99 (2.61)	0.55	19.27
1993	260	3.95 (3.67 to 4.26)	4.78 (3.46)	1.00	31.00
1994	253	3.36 (3.11 to 3.63)	4.04 (2.79)	0.16	24.00
1995	227	3.15 (2.92 to 3.41)	3.74 (2.47)	0.34	23.80
1996	219	3.19 (2.95 to 3.46)	3.83 (2.61)	0.70	21.00
1997	214	2.85 (2.63 to 3.08)	3.34 (1.94)	0.52	11.00

among symptoms and signs. For general fatigue, headache and numbness in the extremities, more than half of the patients showed the symptoms. The prevalence of cough, sputum and abdominal pain was higher than 50% in some years, and it rarely decreased below 30%. Clinical manifestation at abdominal ultrasonography was shown by 14 to 37% of the examinees. Seven to 20% of the patients showed paresthesia in extremities. Manifestations of abnormal breath sounds and hepatomegaly were observed in less than 10% of the examinees.

Table 4a shows the frequency of signs in dermatological examination. The variation of the prevalence was lower than that in internal medicine. Liability to suppuration was most abundant, and its prevalence ranged from 10 and 22%. Comedones on the face, auricles and trunk was shown by 5 to 14% of the examinees. Acneiform eruptions on the trunk, pigmentation on the toenails and deformity of nails was present in 3 to 10% of the patients. Other dermatological signs, acneiform eruptions on the face, genital and gluteal regions, pigmentation on the face and fingernails, were shown by 1 to 8% of the examinees.

The frequency of the signs of ophthalmology was shown in Table 5a. Hypersebum was most abundant in ophthalmological signs, and its prevalence ranged from 10 to 34%. Cystic formation of the meibomian gland was present in 4 to 19%. Conjunctival pigmentation and secretion of cheesy material from the meibomian glands were observed in 1 to 9% of the examinees.

Table 3b shows the association between blood PCB level and the presence of symptoms and signs in internal medicine. Of statistical tests conducted for 120 times, i.e. 10 items for 12 years, statistical significance was observed for

11 tests. Statistically significant positive associations were observed only in a manifestation of general fatigue in 1988 and that of numbness in the extremities in 1987. Statistically significant negative association was observed three times in manifestations of sputum and paresthesia in extremities, and one time in manifestations of cough, abdominal pain and abdominal ultrasonography.

The association between the presence of the dermatological signs and blood PCB level was shown in Table 4b. Statistically significant positive association was frequently observed. The association of blood PCB level with manifestations of acneiform eruptions on the genital and gluteal regions was statistically significant for eight and six times, respectively. Manifestation of comedones on the trunk was significantly associated with blood PCB level for five times. The statistical significance of the association of these signs with blood PCB level was observed in the last half of the observation period as frequently as in the first half. Statistically significant association with blood PCB level was observed two to three times in manifestations of liability to suppuration, comedones on the face and auricles, acneiform eruptions on the trunk, and deformity of nails. The negative association between blood PCB level and acneiform eruptions on the face and pigmentation on the fingernails and toenails was statistically significant in one of the twelve years' examination.

Table 5b shows the association of blood PCB level with the presence of ophthalmologic signs. Statistically significant positive association was observed three times in manifestation of secretion of cheesy material from the meibomian glands, and one time in manifestation of conjunctival pigmentation. The negative association between manifestation of hypersebum and

Table 3a The frequency of subjects with the symptoms and signs in internal medicine.

Year of health examination	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Number of subjects	334	271	266	276	292	244	245	260	253	227	219	214
General fatigue	254 a (76.0) b	212 (78.2)	200 (75.2)	205 (74.3)	207 (70.9)	176 (72.1)	171 (69.8)	180 (69.2)	174 (68.8)	161 (70.9)	149 (68.0)	129 (60.3)
Headache	219 (65.6)	143 (52.8)	178 (66.9)	187 (67.8)	187 (64.0)	143 (58.6)	142 (58.0)	150 (57.7)	145 (57.3)	138 (60.8)	128 (58.4)	111 (51.9)
Cough	142 (42.5)	150 (55.4)	134 (50.4)	138 (50.0)	132 (45.2)	111 (45.5)	121 (49.4)	129 (49.6)	129 (51.0)	109 (48.0)	104 (47.5)	88 (41.1)
Sputum	146 (43.7)	153 (56.5)	137 (51.5)	136 (49.3)	135 (46.2)	119 (48.8)	119 (48.6)	118 (45.4)	129 (51.0)	114 (50.2)	96 (43.8)	102 (47.7)
Abdominal pain	151 (45.2)	130 (48.0)	114 (42.9)	104 (37.7)	101 (34.6)	87 (35.7)	88 (35.9)	90 (34.6)	90 (35.6)	69 (30.4)	75 (34.2)	60 (28.0)
Numbness in the extremities	227 (68.0)	193 (71.2)	162 (60.9)	185 (67.0)	193 (66.1)	139 (57.0)	143 (58.4)	154 (59.2)	167 (66.0)	136 (59.9)	139 (63.5)	111 (51.9)
Abnormal breath sounds	5 (1.5)	4 (1.5)	7 (2.6)	11 (4.0)	5 (1.7)	2 (0.8)	1 (0.4)	3 (1.2)	3 (1.2)	2 (0.9)	5 (2.3)	2 (0.9)
Paresthesia in extremities	38 (11.4)	31 (11.4)	19 (7.1)	34 (12.3)	31 (10.6)	24 (9.8)	27 (11.0)	15 (5.8)	20 (7.9)	30 (13.2)	44 (20.1)	30 (14.0)
Abdominal ultrasonography	59 (17.7)	37 (13.7)	60 (22.6)	65 (23.6)	82 (28.1)	78 (32.0)	86 (35.1)	73 (28.1)	93 (36.8)	74 (32.6)	75 (34.2)	73 (34.1)
Hepatomegaly	17 (5.1)	20 (7.4)	21 (7.9)	14 (5.1)	11 (3.8)	8 (3.3)	12 (4.9)	8 (3.1)	6 (2.4)	3 (1.3)	7 (3.2)	9 (4.2)

a : The number of subjects with the symptom or sign.

b : Proportion of the subjects with the symptom or sign in %.

blood PCB level was statistically significant in one year.

Discussion

The difference in blood PCB level, the prevalence of symptoms or signs, and odds ratio were observed among the years of examination. It, however, does not necessarily reflect the temporal change. A part of their temporal change and tendency can be caused by the turnover of the subjects. Therefore, interpretation of their temporal change should be cautious. Statistical test of temporal tendency in these variables is difficult, because some of the examinees in different years are common. By the presence of common examinees in different years, dependency of the variables between different years occurs. Generalized estimating equations or

multilevel model are candidates for the statistical test. In order to apply the elaborate statistical models, however, systematic and thorough identification of the participants across examinations in different years is prerequisite. Even if thorough identification of patients is completed, the abundant missing values caused by the frequent absence of examinees from the health examinations will make it difficult to apply these models.

The blood PCB level was observed to decrease from the start of nationwide health examination of Yusho. The decrease was only about 30% during the twelve years of observation. PCBs were found to be more retainable than PCDFs in human blood, and their half-lives were reported to be about 20 years¹⁰⁾¹¹⁾. Although the observed decrease in blood PCB

Table 3b The association between the presence of the symptoms and signs in internal medicine and blood PCB level.

Year of health examination	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Number of subjects	334	271	266	276	292	244	245	260	253	227	219	214
General fatigue	1.03a 0.89b	1.18 0.46	1.68 0.04*	1.14 0.61	0.85 0.47	0.63 0.08	1.08 0.74	0.91 0.68	0.78 0.28	1.09 0.75	0.86 0.57	0.90 0.70
Headache	0.83 0.34	0.77 0.19	1.31 0.22	1.01 0.96	1.04 0.86	0.99 0.98	0.92 0.72	0.76 0.22	0.91 0.68	0.87 0.58	1.08 0.76	0.91 0.71
Cough	1.02c 0.91	0.93c 0.70	0.87c 0.51	0.74c 0.19	0.68c 0.06	0.59c 0.03*	0.82c 0.37	0.87c 0.53	0.67c 0.07	0.75c 0.24	0.78c 0.32	0.88c 0.64
Sputum	1.07c 0.70	0.89c 0.56	0.72c 0.12	0.74c 0.20	0.62c 0.02*	0.51c <0.01**	0.54c 0.01*	0.93c 0.76	0.74c 0.17	1.05c 0.85	0.66c 0.11	0.94c 0.81
Abdominal pain	1.14 0.46	1.14 0.49	1.10 0.65	0.80 0.33	0.83 0.35	0.58 0.03*	0.83 0.42	0.94 0.77	0.67 0.08	0.85 0.54	0.88 0.60	0.63 0.10
Numbness in the extremities	1.27 0.23	1.61 0.03*	1.42 0.11	1.53 0.08	0.94 0.77	1.45 0.12	0.67 0.09	0.99 0.95	0.88 0.58	1.07 0.77	0.91 0.72	0.86 0.55
Abnormal breath sounds	0.29 0.09	0.52 0.37	1.61 0.48	0.46 0.17	0.62 0.49	4.87d 0.25	0.95d 0.98	4.42 0.10	0.48 0.36	0.30 0.26	0.30 0.16	1.15d 0.92
Paresthesia in extremities	1.67 0.08	0.94 0.84	0.29 <0.01**	0.86 0.65	0.69 0.24	0.47 0.05	0.53 0.08	1.31 0.56	0.61 0.18	0.38 <0.01**	0.35 <0.01**	1.02 0.97
Abdominal ultrasonography	0.96 0.88	0.85 0.58	0.97 0.89	1.04 0.87	1.17 0.48	1.30 0.28	1.36 0.21	1.43 0.15	1.23 0.36	0.79 0.34	0.68 0.14	0.44 <0.01**
Hepatomegaly	1.89 0.14	1.15 0.71	1.48 0.30	2.08 0.17	2.04 0.19	1.49 0.54	0.64 0.38	0.73 0.61	0.83 0.81	2.70 0.36	0.62 0.50	1.85 0.40

a: Age and sex adjusted odds ratio of the presence of the symptom or sign for an increase of natural log-transformed blood PCB level in ppb.

b: P from logistic regression analysis. *P<0.05, **P<0.01.

c: Age, sex and smoking habit adjusted odds ratio of the presence of the symptom or sign for an increase of natural log-transformed blood PCB level in ppb

d: Odds ratio adjusted for age only because the symptom or sign was manifested by no subjects in one sex.

level cannot be attributed solely to temporal change, its general tendency and degree of change coincide with the above mentioned findings.

In this study, logistic regression model was applied adjusting for possible confounding factors. In general, the same model was used to examine the association between blood PCB level and manifestations of symptoms and signs. This helps the comparisons on the results of the statistical tests carried out on the same symptom or sign in different years. In spite of the turnover of a part of subjects every year, statistically significant association was often obser-

ved on some of the items examined.

Among dermatological signs, comedones on the trunk and acneiform eruptions on the genital and gluteal regions showed statistically significant positive association for more than five times in twelve examinations. The statistically significant association of blood PCB level with manifestations of comedones on the trunk and acneiform eruptions on the genital and gluteal regions has been observed in other studies as well^{(2)~(4)}. The frequent statistically significant associations of these signs with blood PCB level along with the similar results from the previous studies suggest that the sta-

Table 4a The frequency of the subjects with the dermatological signs.

Year of health examination	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Number of subjects	334	271	266	276	292	244	245	260	253	227	219	214
Liability to suppuration	52 a (15.6) b	51 (18.8)	41 (15.4)	40 (14.5)	42 (14.4)	29 (11.9)	38 (15.5)	39 (15.0)	26 (10.3)	49 (21.6)	34 (15.5)	33 (15.4)
Comedones on the face	21 (6.3)	17 (6.3)	31 (11.7)	29 (10.5)	19 (6.5)	28 (11.5)	32 (13.1)	22 (8.5)	14 (5.5)	19 (8.4)	19 (8.7)	14 (6.5)
Comedones on the auricles	16 (4.8)	18 (6.6)	20 (7.5)	27 (9.8)	18 (6.2)	25 (10.2)	23 (9.4)	20 (7.7)	19 (7.5)	17 (7.5)	23 (10.5)	18 (8.4)
Comedones on the trunk	15 (4.5)	25 (9.2)	31 (11.7)	27 (9.8)	18 (6.2)	26 (10.7)	22 (9.0)	30 (11.5)	20 (7.9)	19 (8.4)	31 (14.2)	19 (8.9)
Acneiform eruptions on the face	23 (6.9)	19 (7.0)	12 (4.5)	16 (5.8)	12 (4.1)	2 (0.8)	19 (7.8)	18 (6.9)	12 (4.7)	13 (5.7)	15 (6.8)	11 (5.1)
Acneiform eruptions on the genital regions	11 (3.3)	12 (4.4)	12 (4.5)	6 (2.2)	10 (3.4)	7 (2.9)	8 (3.3)	8 (3.1)	13 (5.1)	18 (7.9)	14 (6.4)	6 (2.8)
Acneiform eruptions on the gluteal regions	5 (1.5)	9 (3.3)	9 (3.4)	4 (1.4)	6 (2.1)	3 (1.2)	8 (3.3)	16 (6.2)	9 (3.6)	9 (4.0)	12 (5.5)	5 (2.3)
Acneiform eruptions on the trunk	14 (4.2)	14 (5.2)	17 (6.4)	25 (9.1)	14 (4.8)	15 (6.1)	20 (8.2)	24 (9.2)	16 (6.3)	13 (5.7)	21 (9.6)	14 (6.5)
Pigmentation on the face	6 (1.8)	10 (3.7)	7 (2.6)	6 (2.2)	8 (2.7)	10 (4.1)	14 (5.7)	9 (3.5)	7 (2.8)	7 (3.1)	8 (3.7)	8 (3.7)
Pigmentation on the fingernails	4 (1.2)	3 (1.1)	6 (2.3)	7 (2.5)	5 (1.7)	6 (2.5)	6 (2.4)	14 (5.4)	9 (3.6)	12 (5.3)	9 (4.1)	4 (1.9)
Pigmentation on the toenails	18 (5.4)	13 (4.8)	16 (6.0)	13 (4.7)	9 (3.1)	13 (5.3)	20 (8.2)	13 (5.0)	14 (5.5)	10 (4.4)	10 (4.6)	12 (5.6)
Deformity of nails	12 (3.6)	10 (3.7)	26 (9.8)	17 (6.2)	14 (4.8)	18 (7.4)	16 (6.5)	25 (9.6)	13 (5.1)	22 (9.7)	22 (10.0)	17 (7.9)

a : The number of subjects with the sign.

b : Proportion of the subjects with the sign in %.

tistically significant association may generally exist between these signs and blood PCB level in Yusho patients. Other dermatological signs showed statistically significant association with blood PCB level only a few times. It is suggested that they have little or weak, if exists, association with blood PCB level.

The biological significance of the statistically significant negative association observed three times in the dermatological signs is not evident. Considering the large number of statistical tests, some or all of observed negative associations can be caused by chance alone.

Among ophthalmologic signs, secretion of cheesy material from the meibomian glands

showed statistically significant positive association with blood PCB level three times out of twelve examinations. The frequency of the statistically significant results suggests that the association might be generalized to the whole population of Yusho patients. The lower frequency of the sign and decreasing odds ratio in recent years, however, suggest that the association may be dwindling. In some of the symptoms in internal medicine, statistically significant negative association was observed. The medical significance of the negative association is unclear. It might be related to the fact that all the symptoms presenting the negative association are subjective.

Table 4b The association between the presence of the dermatological signs and blood PCB level.

Year of health examination	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Number of subjects	334	271	266	276	292	244	245	260	253	227	219	214
Liability to supuration	1.79a	0.89	2.73	1.30	1.65	1.18	1.93	1.67	1.35	1.36	1.73	1.95
Comedones on the face	0.02b*	0.64	<0.01**	0.41	0.08	0.63	0.04*	0.09	0.40	0.29	0.11	0.08
Comedones on the auricles	1.55	0.74	2.44	1.74	1.19	0.99	1.16	1.09	0.57	1.33	6.21	1.51
Comedones on the trunk	0.25	0.42	<0.01**	0.14	0.67	0.97	0.65	0.82	0.16	0.53	<0.001**	0.43
Acneiform eruptions on the face	1.79	0.62	2.64	1.36	1.13	1.20	1.17	1.22	1.32	1.07	2.28	1.24
Acneiform eruptions on the genital regions	0.18	0.21	0.02*	0.43	0.77	0.65	0.68	0.63	0.49	0.89	0.04*	0.65
Acneiform eruptions on the gluteal regions	1.80	0.78	4.11	3.84	2.37	1.43	1.23	1.94	1.19	3.77	2.52	2.98
Acneiform eruptions on the trunk	0.19	0.45	<0.001**	<0.01**	0.05	0.34	0.60	0.06	0.66	<0.01**	<0.01**	0.03*
Pigmentation on the face	1.54	0.60	2.34	1.67	1.26	2.79	1.41	1.44	0.39	0.82	4.34	1.95
Pigmentation on the fingernails	0.24	0.16	0.13	0.35	0.64	0.44	0.41	0.40	0.03*	0.69	<0.01**	0.28
Pigmentation on the toenails	5.50	1.33	3.22	0.84	2.38	12.90c	3.67	9.39	2.35	2.49	3.72	7.03
Deformity of nails	<0.01**	0.52	0.03*	0.82	0.12	<0.01**	0.04*	<0.01**	0.09	0.04*	0.02*	0.03*
	9.85	0.39	5.25	3.52	6.57	2.07	1.70	3.87	1.13	7.99	5.05	6.77
	<0.01**	0.06	<0.01**	0.18	0.01*	0.48	0.38	<0.01**	0.84	<0.01**	<0.01**	0.05
	2.33	0.61	1.54	1.58	2.11	1.16	0.80	1.24	1.04	0.73	2.52	13.26
	0.07	0.24	0.16	0.28	0.13	0.76	0.60	0.57	0.92	0.52	0.03*	<0.001**
	1.50	0.64	1.10	0.27	2.00	0.46	0.79	1.47	0.56	0.98	1.56	1.52
	0.55	0.36	0.88	0.10	0.28	0.20	0.63	0.51	0.32	0.97	0.48	0.55
	2.13c	0.11c	0.98	1.02	0.63	0.25	0.76	0.53	0.51	0.54	2.30	0.43
	0.36	0.01*	0.98	0.98	0.51	0.06	0.71	0.19	0.16	0.23	0.16	0.33
	1.68	0.36	1.12	0.76	0.55	0.75	2.35	0.81	1.07	1.55	1.17	1.08
	0.20	0.02*	0.80	0.59	0.27	0.56	0.06	0.67	0.89	0.45	0.79	0.90
	3.60	0.88	1.03	1.43	1.08	0.95	2.17	0.82	3.13	1.05	1.91	2.47
	<0.01**	0.80	0.92	0.43	0.87	0.90	0.09	0.59	0.03*	0.90	0.10	0.08

a : Age and sex adjusted odds ratio of the presence of the sign for an increase of natural log-transformed blood PCB level in ppb.

b : P from logistic regression analysis. *P<0.05, **P<0.01.

c : Odds ratio adjusted for age only because the sign was manifested by no subjects in one sex.

On the statistical point of view, the shrinking range of the explanatory variable, i.e. blood PCB level, in general, is expected to weaken the association. Associations of blood PCB level with manifestations of comedones on the trunk and acneiform eruptions on the genital and gluteal regions, however, did not seem to diminish in the twelve years of observation. It is suggested that the positive association of these signs with blood PCB level will still be maintained.

References

- 1) Kataoka K, Okubo A and Shinohara S: Introduction of the information processing system of medical examinations of Yusho patients and some results obtained by the survey. *Fukuoka Acata Med.* 80 : 331-341, 1989. (in Japanese)
- 2) Hirota Y, Hirohata T, Kataoka K, Shinohara S and Takahashi K: Association between blood PCB level and symptoms of Yusho patients, twenty years after outbreak. *Fukuoka Acata Med.* 82 : 335-341, 1991. (in Japanese)
- 3) Hirota Y, Hirohata T, Kataoka K and Shinohara S: Blood polychlorinated biphenyls and manifestation of symptoms in chronic "Yusho"

Table 5a The frequency of subjects with the signs of ophthalmology.

Year of health examination	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Number of subjects	334	271	266	276	292	244	245	260	253	227	219	214
Hypersebum	79 a (23.7) b	91 (33.6)	39 (14.7)	40 (14.5)	68 (23.3)	67 (27.5)	61 (24.9)	51 (19.6)	51 (20.2)	36 (15.9)	22 (10.0)	21 (9.8)
Conjunctival pigmentation	25 (7.5)	13 (4.8)	11 (4.1)	8 (2.9)	3 (1.0)	9 (3.7)	9 (3.7)	20 (7.7)	22 (8.7)	13 (5.7)	14 (6.4)	7 (3.3)
Cyst formation of the meibomian gland	45 (13.5)	34 (12.5)	30 (11.3)	31 (11.2)	24 (8.2)	47 (19.3)	34 (13.9)	45 (17.3)	37 (14.6)	19 (8.4)	15 (6.8)	9 (4.2)
Secretion of cheesy material from the meibomian glands	21 (6.3)	17 (6.3)	9 (3.4)	15 (5.4)	10 (3.4)	9 (3.7)	19 (7.8)	18 (6.9)	20 (7.9)	9 (4.0)	3 (1.4)	7 (3.3)

a : The number of subjects with the sign.

b : Proportion of the subjects with the sign in %.

Table 5b The association between the presence of the ophthalmologic signs and blood PCB level.

Year of health examination	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Number of subjects	334	271	266	276	292	244	245	260	253	227	219	214
Hypersebum	1.04a 0.85b	1.41 0.09	1.01 0.96	0.61 0.12	0.76 0.23	1.13 0.63	0.79 0.37	0.85 0.56	0.58 0.03*	0.88 0.69	0.62 0.24	0.52 0.12
Conjunctival pigmentation	2.06 0.04*	1.01 0.98	1.59 0.36	4.45 0.05	1.48 0.68	0.79 0.69	0.56 0.33	1.20 0.65	1.00 1.00	0.63 0.34	0.92 0.87	0.71 0.61
Cyst formation of the meibomian gland	1.02 0.95	1.27 0.40	0.93 0.82	0.69 0.29	1.76 0.12	1.07 0.80	1.89 0.05	1.38 0.26	1.53 0.18	1.20 0.68	1.19 0.71	1.64 0.45
Secretion of cheesy material from the meibomian glands	2.38 0.02*	3.23 <0.01**	0.71 0.51	1.11 0.84	1.13 0.82	2.36 0.16	3.00 0.01*	1.96 0.11	1.72 0.19	1.37 0.61	1.23 0.84	0.42 0.20

a : Age and sex adjusted odds ratio of the presence of the sign for an increase of natural log-transformed blood PCB level in ppb.

b : P from logistic regression analysis. *P<0.05, **P<0.01.

patients. *Fukuoka Acta Med.* 86 : 247-255, 1995.

4) Hirota Y, Tokunaga S, Kataoka K and Shinohara S: Symptoms and blood PCB level among chronic Yusho patients, twenty-five years after outbreak. *Fukuoka Acta Med.* 88 : 220-225, 1997.

5) Hirota Y, Kataoka K and Hirohata T: Annual health examination of Yusho patients. In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M, Masuda Y, (eds): *YUSHO - A human disaster caused by PCBs and related compounds.* pp. 249-266, Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.

6) Masuda Y, Kagawa R and Kuratsune M: Comparison of polychlorinated biphenyls in Yusho patients and ordinary persons. *Bull Environ Contam Toxicol.* 11 : 213-216, 1974.

7) Masuda Y and Schecter A: Exposed and control human blood levels from Guam and Binghamton workers and Yusho patients. *Chemosphere.* 25 : 1091-1094, 1992.

8) Kuratsune M: Appendix 1. The diagnostic criteria and therapeutic guidelines for Yusho. In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M, Masuda Y, (eds): *YUSHO - A human disaster caused by PCBs and related compounds.* pp. 335-339, Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.

9) StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 6.0.* Stata Press, Texas, 1999.

10) Masuda Y, Haraguchi K, Kuroki H and Ryan J: Change of PCDF and PCB concentrations in the blood of Yucheng and Yusho patients for 25 years. *Fukuoka Acta Med.* 85 : 178-183, 1995. (in

Japanese)

11) Masuda Y: Causal agents of Yusho. In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M, Masuda Y, (eds): YUSHO - A human disaster

caused by PCBs and related compounds. pp. 49-80, Kyushu University Press, Fukuoka, 1996.

(Received for publication March 23, 2001)

(和文抄録)

油症患者の自他覚症状と血中 PCB 濃度の関連

—— 12 年間の全国油症患者追跡検診結果より ——

九州大学大学院医学研究院予防医学分野

徳 永 章 二

福岡県保健環境研究所

片 岡 恭 一 郎

1986 年から 1997 年までの 12 年間の全国油症患者追跡検診結果をもとに、認定患者について年度毎に自他覚症状の有所見率と血中 PCB 濃度の間の関連を検討した。受診者のうち 1986 年から 1997 年までの血中 PCB 濃度が判明した認定患者数は、それぞれ 334, 271, 266, 276, 292, 244, 245, 260, 253, 227, 219, 214 名で、男女ほぼ同数であった。血中 PCB 濃度 (ppb) の幾何平均値 (95%信頼区間) は 1986 年度検診受診者の 4.05 (3.75~4.37) から 1997 年度検診受診者の 2.85 (2.63~3.08) と、時間の経過と共に減少した。これらの受診者について、各年毎に内科・皮膚科・

眼科の自他覚症状の有/無所見を目的変数に、血中 PCB 濃度 (対数変換値) を説明変数として性・年齢を調整した logistic 回帰分析を行った。皮膚科検診項目のうち黒色面皰 (躯幹) とざ瘡様皮疹 (外陰部と臀部) の有所見率は血中 PCB 濃度と統計学的に有意な正の関連を示す事が 12 回の検診中 5 回以上で、他の症状に比べて特に多かった。これらの項目が血中 PCB 濃度と正の関連を示す傾向は、油症患者全国統一検診が開始されて以来減少が見られず、将来も継続すると予想される。

油症患者追跡調査と人口動態死亡テープの照合による死亡原因の同定

産業医科大学産業生態科学研究所臨床疫学教室

金子 聡*・吉村 健 清

産業医科大学産業生態科学研究所産業経済学教室

池 田 正 人

産業医科大学産業保健学部第一看護学講座

西 阪 和 子

Detection of Underlying Causes of Death among the Deceased of Yusho Patients by Linkage to the National Vital Statistics Data

Satoshi KANEKO* and Takesumi YOSHIMURA

Department of Clinical Epidemiology, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, JAPAN

Masato IKEDA

Department of Occupational Health Economics, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, JAPAN

Kazuko NISHISAKA

Department of Nursing Science and Arts, School of Health Sciences, University of Occupational and Environmental Health, JAPAN

Abstract As of January 31, 1996, 292 deaths among registered patients of Yusho were identified by three follow-up studies conducted in 1986, 1990, and 1996. In this study, we attempted to identify underlying causes of death by linkage of the registered data to the National Vital Statistics Data provided by the Management and Coordination Agency of Japan, which included 15 million deaths between 1978 and 1996. The two datasets were linked by matching for six variables; birth year/month/day, death year/month, and sex, along with a variable of death day or death place, or both. The matched cases were 203 among 235 deaths between 1978 and 1996 (matching rate was 86%). Among the 203 deaths, 58 underlying causes of death were newly identified, 146 causes of death were already grasped by the follow-up studies, and 31 deaths did not have matching pair in the National Vital Statistics data. Among the 146 deaths, 110 causes of death were concordant with each other, however, 35 causes of death were completely discord. The reason of the discordance and the unmatched deaths might be due to difference in information of the matching variables in the two datasets. In order to conduct an efficient follow-up study of Yusho patients, identification of underlying causes of death by linkage to the National Vital Statistics Date is evitable. For that, we need to substitute basic information in the Yusho database to those compatible to the National civil registration system.

* 現在

国立がんセンター研究所

がん情報研究部

104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

はじめに

1986年3月までに油症認定を受けた患者1815名

(男性：918名、女性：897名、死後認定6名を除く)の予後調査は、これまで1986年、1990年、1996年の3回実施されており、第3回の調査時点である1996年1月31日までに死亡が確認された油症患者は、292名である。生死の確認および死亡情報の入手は、都府県の食品保健を担当する課に依頼して行われてきた。死亡例については、死亡小票閲覧による原死因の把握を目標に調査してきたが、法的な保管義務期間が5年であることや患者が全国に分散しつつあることから、それぞれの死亡小票を該当保健所まで赴き、原死因を同定することは、人的または時間的に非常に困難で、効率が悪い。また、死亡小票に記載されている死因のうちから、疫学調査では原死因を採択し、コード化する必要がある。この原死因の採択とコード化は、国際疾病分類の取り決めに従って行われる必要があり、ある程度の知識と経験が必要である。

よって、より効率的に原死因を入手し、さらには、国際的な取り決めに従ったコード化した死因を得るためには、専門家により確定された原死因を登録してある人口動態死亡テープを活用することがもっとも効率的で容易である。今回、追跡情報を人口動態死亡テープと照合することにより原死因を得ることを試みたので、その結果ならびに問題点を報告し、さらに将来への展望も考察する。

方 法

照合には、油症認定患者追跡調査データおよび、当時の総務庁に申請の後、使用許可(平成10年4月30日付官報第2372号告示第69号)を得て入手した人口動態死亡テープを用いた。このテープには、1978年1月1日から1996年12月31日までの全国の全死亡約1500万件が記録されている。使用が許され入手できたテープに記録されている情報は、調査年(死亡登録年)、死亡時の住民登録県(県コード)、市区町村コード(現総務省の定める「統計に用いる標準地域コード」)、市区町村区分コード(市、区、町村の区分)、保健所コード、性、生年元号、生年、生月、生日、死亡年元号コード、死亡年、死亡月、死亡日、死因コード(該当年により定められたICD-8、ICD-9またはICD-10)である。これら幾つかの変数を用いて照合作業を行った。

照合のための変数として今回用いた情報は、生年(西暦に変換)、生月、生日、死亡年(西暦に変換)、死亡月、性の6変数で、それらが完全に一致した場合を該当死亡患者であるとした。さらに6変数の照合で複数の照合が得られた場合は、死亡日または死亡時の市区町村の双方が一致した照合例を優先して該当死亡者本人とし、双方が一致しなかった場合、死亡日、死亡時の市区町村のどちらか一方が一致した場合を該当死亡患者であると断定した。死亡日または死亡時の市区町村のどちらか一方が一致した場合とした理由は、公的手続きと実際の死亡日に数日のずれが生じることがあること³⁾、追跡調査情報すべてが公的情報によるものであるとの確証がないため、死亡時の市区町村が必ずしも死亡診断時の住所を一致しない可能性があったためである。

照合には、SAS統計パッケージ(Ver.6.12)におけるマッチ・マージ機能¹⁾を用い、油症追跡調査データと人口動態死亡テープのデータを照合変数を用いマージし、双方のデータに同じ照合変数を持つものを抽出するという手順をとり行った。

結 果

最終追跡調査日である1996年1月31日までに死亡が確認された油症認定患者は292名(男性177名、女性115名)であった。うち、人口動態死亡テープの使用が許可された1978年1月1日以降に死亡した症例は、235名(男性138名、女性97名)であった。この235名に対し、人口動態テープとの照合を行い、203名について、照合が得られた(照合率86.0%)。照合状況に関しては、照合の得られた203名のうち、生年、生月、生日、死亡年、死亡月、性の照合により170症例で一つの照合が得られ、31症例で複数照合が得られた(2照合が29例、3照合が1例、4照合が1例)。複数照合が得られた31症例については、さらに、死亡時市区町村または死亡日の双方が一致する場合を優先し、双方が一致しない場合は、それらのどちらか一方が一致した場合を選択することになると、31症例すべてで、1照合のみになった。

照合の得られた203名のうち、死亡原因が新たに確認されたのが58名(男性31名、女性27名)で、これまで死亡原因がすでに確認されており照合により得ら

れた死亡原因と一致したのが、87名(男性55名, 女性32名), 照合が得られなかったのが32名(男性18名, 女性14名), 照合が得られたがこれまで入手した死亡原因(コード)と異なるのが58名(男性34名, 女性24名)であった(Table 1).

照合により得られた死因と調査により得られた死因が異なる58名についての死因で, 登録されていた死因(コード変換前)と照合から得られた死因コードから類推した死因が非常に類似している症例は, 23例であり, これらは, ほぼ同一と判断して差し支えないと考えた. 一方, 死因が, 全く異なっている症例が, 35例存在した.

考 察

論理的には, 生年月日, 死亡年, 死亡月, 性別が一致していれば, かなりの精度で本人と一致すると言える. 今回用いたプログラムは, 個々の死亡症例を1500万の死亡件数からそれぞれ, 選出する方法と全く同等である. よって, 6つの変数がまったくおなじである人が存在する確率は, 1978年から1996年までの18年間における年間死亡数を一定と仮定し, 死亡患者の生年が40年にわたり平均的に存在すると考えると $1.6 \times 10^{-7} (1/18 (\text{死亡年}) \times 12 (\text{死亡月}) \times 40 (\text{生年}) \times 365 (\text{死亡月日}) \times 2 (\text{性別}))$ であり, 1500万死亡で一

致する推定死亡例は約2例である(Fig. 1). つまり, 本人以外の別人と照合される可能性は, 先の2例中1名が本人であると考えられることができるため, 1500万死亡で1名(1500万分の1)となる. さらに死亡日, または死亡時住所(市区町村)による選別が加われば, ほとんど間違いなく本人と一致する. 照合方法が多少異なるが, 放射線従事者の追跡調査で行われた人口動態死亡テープとの照合の一致率は, 99%に及んでいる³⁾.

しかし, 今回の一致率は, 86%と予想よりも低く, その原因として考えられるのは, 油症患者追跡調査情報が必ずしも公的資料を情報源としているわけではないということが挙げられる. 基本的には, 公的資料を入手し, 登録を進めていたはずであるが, 時間が経過するに従い, 公的資料以外での登録が進められていた可能性がある. 例えば, 生死の把握, および個人同定情報の訂正等が, 患者親族からの情報等で行われるようになり, 公的資料とは異なった記録が登録されるようになったためと考えられる. また, 死因の不一致も35例に上る. その理由として, 生年月日, 死亡年月日の誤登録により偶然, 他人の死亡例に当たってしまった, または, 追跡調査時の死因が死亡診断書によるものではなく家族または周囲の人からの情報であったため登録死因が不確実であった可能性がある.

Table 1 Results of matching along with six matching variables: birth date, death year, death month, and sex among 236 deceased cases, and underlying causes of death (ULCD)

Matching variables along with birth year, month, day, death year, death month, and sex used for the linkage	Number of deceased
+ Address codes (city, town, or village)	11
+ Death day	22
+ Address codes and death day	170
Not matched	32
Total	235
Matched: (matched rate: 86.0%)	203
Matched and the ULCD newly identified	58
Matched and the ULCD concordant	110
Matched, but the ULCD discordant	35
Not matched: (unmatched rate: 14.0%)	32
Not matched but, the ULCD identified by the follow-up study	26
Not identified	6
Total	235

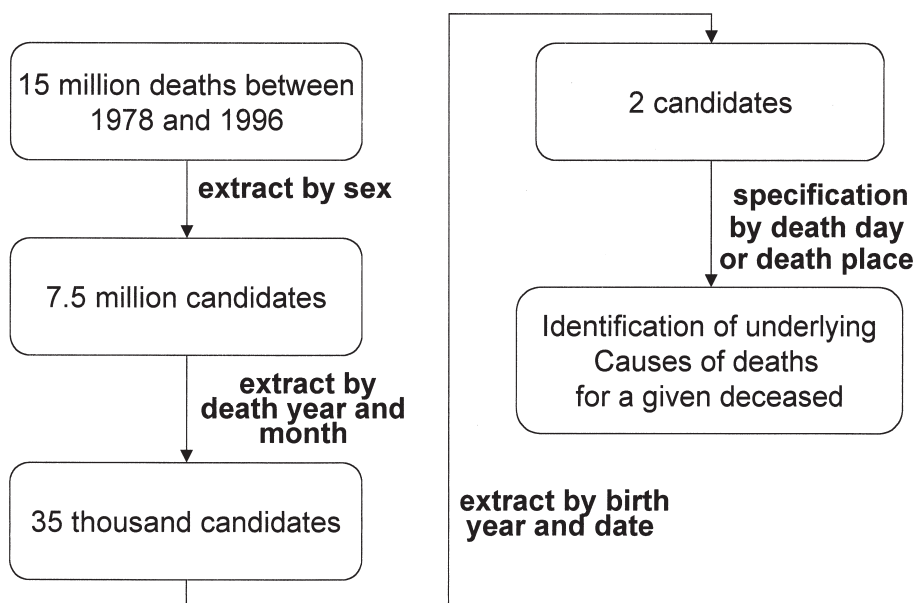


Fig. 1 Schematic explanation for the detection of underlying causes of deaths by linking to the National Vital Statistics Data to follow-up data of Yusho patients

死亡原因同定の最も確実な方法は、死亡小票の閲覧、または死亡診断書の閲覧である。しかしながら、死亡小票は、その保存期間が5年と限られており、その後の閲覧は不可能となる。よって、現在、または、今後死亡が確認され、その死亡日がすでに5年を経過している患者に関しては死亡小票閲覧による原死因の特定は不可能となる。また、死亡診断書の閲覧には、戸籍情報（本籍、戸籍筆頭者、および死亡日）から死亡診断書を保管している法務局を特定し、閲覧する必要があるが、現在、戸籍情報を得ることは非常に困難なことから、死亡診断書閲覧による原死因の確定は、現実的には不可能である。このような個人情報保護の流れ⁴⁾から、死亡原因調査は、今後益々困難になって行くものと考えられる。よって、今回用いた人口動態死亡テープとの照合による死亡原因の特定方法は、油症患者追跡調査だけでなく、他の疫学調査においても、今後重要になるものと考えられる。

米国においては、疫学調査目的の死亡原因同定に対し、Centers for Disease Control and Prevention (CDC) の National Center for Health Statistics が National Death Index Plus (NDI Plus)²⁾ を提供して

おり、死因の同定が可能になっている。そして、このシステムを用いて多くの疫学研究がこれまで発表されている。今回用いた人口動態死亡テープとの照合による死亡原因の同定は、基本的には、NDI Plus と同様な方法論を採っているが、人口動態死亡テープ使用には、総務庁（現総務省）の使用許可を取る必要があり、困難が多い。さらに、個人情報保護の観点から考慮すると、個人情報に直接アクセスするのではなく、公的に収集された情報を用いて調査を行うため、問題は少ないものの、個人情報保護の規定に完全に則したものではない。今後、公衆衛生上、重要な疫学調査をより効率的に簡便に、さらに法的にも問題なく行うことを可能とするため、疫学研究支援のシステム作りが進むよう努力してゆく必要がある。

総 括

人口動態死亡テープとの照合による原死因の同定を試みた。照合率が86%と低く、油症認定患者データが公的資料に基づき登録されていないことが原因であることが明らかとなった。今後、人口動態死亡テープとの照合による原死因の同定を行う場合、現在登録され

ている情報を公的資料のそれと互換性のあるものに変更してゆく必要がある。また、日本においても、NDI Plusのような公衆衛生上重要な疫学研究を支援するシステム作りを進める必要がある。

謝 辞

本研究は平成12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。ここに記して謝辞を表します。また、本研究にあたりデータの管理、および整理に協力いただいた産業医科大学臨床疫学教室の高野由起子君に深く感謝いたします。

References

1) SAS ランゲージリファレンスガイド, SAS 出

版局, 東京, 1990.

2) Doody MM, Hayes HM and Bilgrad R: Comparability of National Death Index Plus and Standard Procedures for Determining Causes of Death in Epidemiologic Studies. *Ann Epidemiol.* 11: 46-50, 2001.

3) Iwasaki T, Miyake T, Ohshima S, Kudo S and Yoshimura T: A method for identifying causes of death in epidemiological study. *J Epidemiol.* 10: 362-365, 2000.

4) 疫学研究におけるインフォームド・コンセントに関する研究と倫理ガイドライン策定研究班(厚生省科学研究費補助金 健康科学総合研究事業). 疫学研究におけるインフォームド・コンセントに関するガイドライン Version 1.0, 2000.

(受付 2001-3-23)

油症患者血中ダイオキシン類レベルの追跡調査 (1998年～1999年)

福岡県保健環境研究所
竹中重幸・平川博仙・中村又善
中川礼子・飯田隆雄
社団法人日本食品衛生協会
戸 高 尊

Follow-up Survey of Dioxins in the Blood of Yusho Patients (in 1998-1999)

Shigeyuki TAKENAKA, Hironori HIRAKAWA, Matayoshi NAKAMURA

Reiko NAKAGAWA and Takao IIDA

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

Takashi TODAKA

Japan Food Hygiene Association, 2-6-1 Jingu-mae, Shibuya-Ku, Tokyo 150-0001

Abstract Follow-up survey of the blood concentration of PCDDs, PCDFs and non-*ortho*-chlorine substituted PCBs in Yusho patients is very important for their health control. We determined the blood concentration of these dioxin isomers in 119 blood samples collected in 1998 and 1999 using by a high-resolution gas chromatograph/high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS). Thirty years had passed since the Yusho occurrence, and the total blood concentrations of PCDFs in the blood of Yusho patients were still as high as ever, except the patients with the PCB pattern C. Among the different groups of PCB patterns, the concentration of 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF and 1,2,3,6,7,8-HxCDF showed significant differences, excluding the group BC because of the small number of cases. The findings indicate that these isomers are not decomposed in human body since they had highly contaminated the causal rice oil at the onset. In typical Yusho patients (Group A of PCB pattern), the mean TEQ concentrations of PCDDs, PCDFs and non-*ortho*-chlorine substituted PCBs in the blood collected in 1998 were 21, 206, and 14 pg-TEQ/g lipid, respectively, and in 1999, 30, 308 and 14 pg-TEQ/g lipid, respectively. The toxic contribution rate of PCDFs TEQ was still at high levels for total TEQ in both years. The patients of the group C, however, the mean blood levels of the dioxins TEQ in 1998 and 1999 did not differ from those of the normal controls determined in 1996 although some patients in this group showed a high toxic contribution rate of PCDFs TEQ for total TEQ. We will try the PCB isomer specific analysis of the Yusho patients blood, and will investigate the difference from normal controls blood.

はじめに

昭和43年に北部九州を中心として発生したカネミ油症事件は、発生後32年を経過した。発症当初は重症例の患者に種々の異常⁷⁾が観察されている。油症急性期においては、血中PCB濃度と血清中性脂肪値との間に有意な正の相関が認められている。これは、25年

を経過した患者血中においても同様に有意な相関がみられている⁹⁾。近年、患者血中PCB濃度は低下し、種々の亜急性中毒症状は軽快しているが、重症例においてはいまだに特徴的なパターンを示している⁹⁾¹¹⁾。さらには、油症の主因であるPCDFの体内残留¹⁾³⁾⁸⁾も指摘されている。

PCDFを含む、いわゆるダイオキシン類は近年、外

因性内分泌攪乱化学物質としても注目されており、野生動物で報告されている異常の大半にはこのダイオキシン類が関与している⁴⁾。このダイオキシン類に曝露された事例では、台湾の Yu-Cheng 患者で免疫低下、成長抑制等⁵⁾が、セベソの事件では内分泌系への影響等¹⁰⁾が報告されている。このような状況で、患者体内に残留する PCDF 等の油症原因物質を追跡調査することは、今後の患者の健康管理を考える上で重要と思われる。そこで、油症患者血中ダイオキシン類濃度を分析し、国際機関により設定されている 2,3,7,8-TCDD に対する毒性当量係数 (TEF)¹²⁾を用いて、2,3,7,8-TCDD 毒性当量 (TEQ) を求め評価した。

実験方法

1. 分析試料

平成 10 年および 11 年度福岡県油症一斉検診を受診した、延べ 119 名の患者血液を対象とした。血液は肘静脈から 10 mL のヘパリン入り真空採血管に約 10 mL を採取し、分析するまで 4°C 以下で保存した。

2. 試薬

n-ノナンは関東化学(株)製の試薬特級を、その他の溶媒はすべてダイオキシン分析用 (関東化学(株))を用いた。無水硫酸ナトリウムは PCB 分析用 (関東化学(株))を用いた。GC/MS のキャリブレーションスタンダードは Wellington Lab. 社製の CS3C/CP81 を使用した。内部標準物質として ¹³C でラベルした 7 種の PCDDs, 10 種の PCDFs, 4 種の Non-ortho-

coplanar-PCBs (Non-ortho-Co-PCBs) を、シリンジスパイクとして ¹³C でラベルした 1,2,3,4-TCDD を使用した (Table 1)。シリカゲルはメルク社製キーゼルゲル 60 をメタノールで超音波洗浄し減圧乾燥した後、ガラス製ビーカーに厚さを 10 mm 以下にして入れ、130°C で約 18 時間乾燥した後、密閉容器中に入れデシケーター内で使用するまで保管した。活性炭はナカライテスク社製を用いた。その他の試薬は市販の試薬特級を用いた。

3. 分析方法

3.1 脂質の抽出

患者血液約 5 g を 50 mL 遠沈管に秤量し、内部標準物質およびアセトン：*n*-ヘキサン (2：1, v/v) 20 mL を加え、ポリトロン[®]で 20 秒間攪拌抽出を行った。2500 rpm で 10 分間遠心分離し、上層を他の遠沈管に移し、*n*-ヘキサン洗浄水 10 mL で 1 回洗浄した。残渣にアセトン：*n*-ヘキサン (2：1, v/v) 10 mL を加え、ポリトロン[®]で攪拌抽出を行い、超音波処理した後、2500 rpm で 10 分間遠心分離し、上層を他の遠沈管に移した。この操作を再度繰り返し、上記の最初に *n*-ヘキサン層を洗浄した水に移し、洗浄した。上層を合わせ、無水硫酸ナトリウム 10 g で脱水し、100 mL ナス型フラスコ中 40°C 以下で減圧濃縮し、約 1 mL にした。少量の *n*-ヘキサンで秤量ビンに洗い込み、室温で一夜放置して溶媒を完全に留去した後、重量を測定し、秤量ビンの風袋を差し引いた重量を脂質量とした。

Table 1 Internal standards for dioxins analysis

PCDDs	PCDFs
[¹³ C ₁₂]2,3,7,8-TCDD	[¹³ C ₁₂]2,3,7,8-TCDF
[¹³ C ₁₂]1,2,3,7,8-PeCDD	[¹³ C ₁₂]1,2,3,7,8-PeCDF
[¹³ C ₁₂]1,2,3,4,7,8-HxCDD	[¹³ C ₁₂]2,3,4,7,8-PeCDF
[¹³ C ₁₂]1,2,3,6,7,8-HxCDD	[¹³ C ₁₂]1,2,3,4,7,8-HxCDF
[¹³ C ₁₂]1,2,3,7,8,9-HxCDD	[¹³ C ₁₂]1,2,3,6,7,8-HxCDF
[¹³ C ₁₂]1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	[¹³ C ₁₂]1,2,3,7,8,9-HxCDF
[¹³ C ₁₂]1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	[¹³ C ₁₂]2,3,4,6,7,8-HxCDF
Non-ortho-Co-PCBs	[¹³ C ₁₂]1,2,3,4,6,7,8-HpCDF
[¹³ C ₁₂]3,3',4,4'-TCB	[¹³ C ₁₂]1,2,3,4,7,8,9-HpCDF
[¹³ C ₁₂]3,4,4',5-TCB	[¹³ C ₁₂]1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF
[¹³ C ₁₂]3,3',4,4',5-PeCB	Syringe spike
[¹³ C ₁₂]3,3',4,4',5,5'-HxCB	[¹³ C ₁₂]1,2,3,4-TCDD

3.2 カラムクリーンアップ

抽出した脂質を少量の *n*-ヘキサンに溶解し、10% (w/w) 硝酸銀/シリカゲル 2g を *n*-ヘキサンで乾式充填したカラムに展開し、*n*-ヘキサン 100 mL で溶出した。溶出液を 40°C 以下で減圧濃縮し、約 2 mL とした。これを、0.1% (w/w) 活性炭/無水硫酸ナトリウムを *n*-ヘキサンで乾式充填したカラムに展開し、10% (v/v) ジクロロメタン/*n*-ヘキサン 100 mL で PCB 等を、次いでトルエン 100 mL でダイオキシン類 (PCDDs, PCDFs および Non-*ortho*-Co-PCBs) を溶出させ、0.5 mL 以下に減圧濃縮し、シリンジスパイク 20 pg とともにバイアルビンに移し、室温で溶媒を完全に留去した。GC/MS 分析時には 5 μ L の *n*-ノナンを加えて、残渣を溶解し、2 μ L を GC/MS に注入した。

3.3 GC/MS 分析条件

使用した機器の条件は以下のとおりである。

GC: オートインジェクター付き HP6890 (Hewlett-Packard)

MS: AutoSpec-Ultima E (Micromass)

キャピラリーカラム: BPX5, 60 m \times 0.25 mm i.d. 膜厚 0.25 μ m (SGE)

カラム温度: 150° (1 分間保持), 20°/分で 220°まで昇温, 3°/分で 280°まで昇温, 20°/分で 320°まで昇温, 2.1 分間保持。

キャリアガス流量: 1.3 mL/分 (ヘリウム)

注入口温度: 280°

インターフェイス温度: 280°

イオン化モード: EI

イオン源温度: 280°

イオン化電圧: 40 eV

加速電圧: 8 kV

分解能: 10000 (5% valley)

また、試料注入はスプリットレス試料導入法で行った。ピークの検出は SIM 法により $[M^+]$ および $[M^{+2}]$ (4~5 塩化 CBs/DDs/DFs) ならびに $[M^{+2}]$ および $[M^{+4}]$ (6 塩化 CB と 6~8 塩化 DDs/DFs) の 2 個のイオンをモニターし、その存在比の $\pm 30\%$ を許容範囲とし、ピークを同定した。内部標準物質のピークは $[M^{+2}]$ (4~7 塩化 CBs/DDs/DFs) ならびに $[M^{+4}]$ (8 塩化 DDs/DFs) の 1 個のイオンをモニターした。

詳細は Table 2 に示す。

なお、すべての計算は OPUS Quan (Micromass) を用いて行った。TEQ の計算は WHO (1997) が策定した TEF¹²⁾ を用いた。

結果および考察

平成 10 年度および 11 年度の油症患者血中ダイオキシン類濃度を血中 PCB パターン別に Table 3-1 および Table 3-2 に示す。PCB パターンは平成 10 年度および 11 年度福岡県油症一斉検診結果のデータを使用した。濃度はすべて抽出した脂質重量当たりの値を示している。平成 10 年度の血中ダイオキシン類濃度の平均値を比較すると、C パターンの患者を除き、いまだに総 PCDDs 濃度より総 PCDFs 濃度が高い傾向がみられる。しかし、一部の C パターンの患者でも、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度が高く、総 PCDFs 濃度が総 PCDDs 濃度より高い傾向がある例もみられた。平成 11 年度も同様な傾向がみられた。患者を PCB パターン別 (BC パターンは例数が少ないため除く) にみると、各群間で有意な差 ($p < 0.01$) がみられるのは 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF および 3,3',4,4',5,5'-HxCB 濃度 (IUPAC # 169) であった。

以上のように、発症後 30 年以上を経過した患者血中 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,2,3,6,7,8-HxCDF 濃度は依然として高いが、これは、これらの異性体が油症原因オイル中に高濃度に含まれており、代謝されにくいことを示している。Table 4 に油症原因オイル中のダイオキシン類濃度を示す。

増田らは、油症患者と一般人の血中 3,3',4,4',5-PeCB (IUPAC # 126) 濃度レベルを比較すると、油症患者の血中レベルは一般人に比べ低いと報告している。この報告は油症発症後、25 年を経過した 1991 年のデータ⁹⁾ であるが、1996 年に分析した一般人の 3,3',4,4',5-PeCB (IUPAC # 126) の血中濃度レベル (平均 119 pg/g lipid)⁹⁾ と比較すると、どの PCB パターンの患者においても有意に減少しているという傾向はみられなかった。PCBs の摂取は食事由来が大部分を占めており、日本人の食生活においては魚介類からが主である。1980 年度~1989 年度の 10 年間の PCBs の平均 1 日摂取量⁹⁾ は 2.4 μ g で、その後の 1990 年度~1999

Table 2 SIM conditions for dioxins peak detection

Type	Compounds	Function	m1	m2	m1/m2	Tolerance (%)	Determination limit (pg/g lipid)
Native	2,3,7,8-TCDD	2	321.8936	319.8965	1.30	30	1
	1,2,3,7,8-PeCDD	3	355.8546	353.8576	1.61	30	1
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	4	389.8157	391.8127	1.24	30	2
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	4	389.8157	391.8127	1.24	30	2
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	4	389.8157	391.8127	1.24	30	2
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	5	423.7766	425.7737	1.03	30	2
	OCDD	6	459.7348	457.7377	1.13	30	5
	2,3,7,8-TCDF	2	305.8987	303.9016	1.28	30	1
	1,2,3,7,8-PeCDF	3	339.8597	337.8627	1.61	30	1
	2,3,4,7,8-PeCDF	3	339.8597	337.8627	1.61	30	1
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	4	373.8208	375.8178	1.24	30	2
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	4	373.8208	375.8178	1.24	30	2
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	4	373.8208	375.8178	1.24	30	2
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	4	373.8208	375.8178	1.24	30	2
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	5	407.7818	409.7790	1.03	30	2
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	5	407.7818	409.7790	1.03	30	2
	OCDF	6	443.7399	441.7428	1.12	30	5
	3,4,4',5'-TCB (# 81)	1	291.9194	289.9224	1.30	30	10
	3,3',4,4'-TCB (# 77)	1	291.9194	289.9224	1.30	30	10
3,3',4,4',5'-PenCB (# 126)	2	325.8804	323.8834	1.64	30	10	
3,3',4,4',5,5'-HxCB (# 169)	3	359.8415	361.8385	1.24	30	10	
ISS	¹³ C-1,2,3,4-TCDD	2	333.9339				
IS	¹³ C-2,3,7,8-TCDD	2	333.9339				
	¹³ C-1,2,3,7,8-PeCDD	3	367.8949				
	¹³ C-1,2,3,4,7,8-HxCDD	4	401.8559				
	¹³ C-1,2,3,6,7,8-HxCDD	4	401.8559				
	¹³ C-1,2,3,7,8,9-HxCDD	4	401.8559				
	¹³ C-1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	5	435.8169				
	¹³ C-OCDD	6	471.7750				
	¹³ C-2,3,7,8-TCDF	2	317.9389				
	¹³ C-1,2,3,7,8-PeCDF	3	351.9000				
	¹³ C-2,3,4,7,8-PeCDF	3	351.9000				
	¹³ C-1,2,3,4,7,8-HxCDF	4	385.8610				
	¹³ C-1,2,3,6,7,8-HxCDF	4	385.8610				
	¹³ C-2,3,4,6,7,8-HxCDF	4	385.8610				
	¹³ C-1,2,3,7,8,9-HxCDF	4	385.8610				
	¹³ C-1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	5	419.8220				
	¹³ C-1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	5	419.8220				
	¹³ C-OCDF	6	455.7801				
	¹³ C-3,3',4,5'-TCB (# 81)	1	303.9597				
	¹³ C-3,3',4,4'-TCB (# 77)	1	303.9597				
¹³ C-3,3',4,4',5'-PenCB (# 126)	2	337.9207					
¹³ C-3,3',4,4',5,5'-HxCB (# 169)	3	371.8817					

Table 3-1 Dioxins levels in the blood of Yusho patients (1998)

1998 Congeners	Pattern A (N=22)				Pattern B (N=13)				Pattern BC (N=2)				Pattern C (N=31)			
	Mean	Max	Min	SD	Mean	Max	Min	SD	Mean	Max	Min	SD	Mean	Max	Min	SD
2,3,7,8-TCDD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,7,8-PeCDD	14	48	3	11	13	25	5	5	14	14	14	—	10	25	3	5
1,2,3,4,7,8-HxCDD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,6,7,8-HxCDD	84	341	12	79	59	157	15	41	45	69	21	34	23	52	8	9
1,2,3,7,8,9-HxCDD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	15	38	5	8	18	30	7	8	23	25	21	3	25	54	4	14
OCDD	257	857	65	214	334	1168	83	281	514	812	215	422	417	1599	67	396
2,3,7,8-TCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,7,8-PeCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,3,4,7,8-PeCDF	373	2346	15	509	225	670	49	200	181	353	9	243	31	227	8	40
1,2,3,4,7,8-HxCDF	146	1016	7	229	79	298	11	88	67	126	8	83	14	90	3	17
1,2,3,6,7,8-HxCDF	46	272	6	61	30	86	7	26	24	42	5	26	9	31	3	6
1,2,3,7,8,9-HxCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,3,4,6,7,8-HxCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	9	21	2	5	8	15	3	4	9	9	8	1	7	37	2	6
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,3',4,4'-TeCB	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,3',4,4',5-PeCB	114	547	38	107	90	167	42	34	92	109	74	25	112	393	37	80
3,3',4,4',5,5'-HxCB	286	1091	53	278	155	276	73	64	83	124	42	58	61	150	15	28
Total PCDDs-TEQ	21	83	5	18	17	38	3	10	12	21	2	13	11	28	1	6
Total PCDFs-TEQ	206	1302	9	283	124	368	26	111	100	193	6	132	17	125	1	22
Total PCDDs/PCDFs-TEQ	227	1385	16	300	141	406	33	121	112	215	8	146	28	142	2	25
Total non-ortho-Co-PCBs-TEQ	14	56	4	11	11	18	5	4	10	12	8	3	12	40	4	8
Total TEQ	241	1409	20	303	151	424	41	122	121	227	16	149	39	156	8	28
Lipid (%)	0.40	0.52	0.29	0.05	0.42	0.53	0.33	0.06	0.37	0.40	0.34	0.04	0.41	0.54	0.32	0.07

Data represent the mean, maximum and minimum of dioxins levels (pg/g lipid), and the standard deviation in the blood of Yusho patients.

— : did not detect, or did not calculate.

年度の10年間のPCBsの平均1日摂取量は1.1 μ gに減少しているが、大部分、魚介類由来であることには変わらない。したがって、発症時から30年という時間の経過とともに、血中の3,3',4,4',5-PeCBは食事由来のバックグラウンドに隠れてしまったのかもしれない。しかし、その他のPCBsについては今後、詳細な分析を試みることで、一般人との違いを見出せる可能

性もあり、今後、検討してゆくべきであろう。

Fig. 1に油症患者血中ダイオキシン類の平均TEQ濃度を図示する。1998年では、PCBパターンがA, B, BCおよびCの患者はそれぞれ、一般人のダイオキシン類の平均TEQ濃度の約7.3, 4.6, 3.7および1.2倍であった。1999年ではそれぞれ、10.6, 5.7, 3.2および1.6倍であった。Fig. 2には血中ダイオキシン類

Table 3-2 Dioxins levels in the blood of Yusho patients (1999)

1999 Congeners	Pattern A (N=18)				Pattern B (N=8)				Pattern BC (N=4)				Pattern C (N=21)			
	Mean	Max	Min	SD	Mean	Max	Min	SD	Mean	Max	Min	SD	Mean	Max	Min	SD
2,3,7,8-TCDD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,7,8-PeCDD	20	68	6	15	13	20	7	5	14	18	10	4	12	20	5	5
1,2,3,4,7,8-HxCDD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,6,7,8-HxCDD	103	339	2	76	76	138	29	38	44	54	33	9	34	64	12	17
1,2,3,7,8,9-HxCDD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	18	66	3	14	18	28	9	6	23	46	7	16	31	81	5	19
OCDD	224	379	80	89	416	1020	112	301	489	1030	205	386	690	1918	84	569
2,3,7,8-TCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,7,8-PeCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,3,4,7,8-PeCDF	557	2381	36	549	278	498	81	166	138	272	30	114	39	147	12	30
1,2,3,4,7,8-HxCDF	226	930	12	230	124	369	18	119	50	75	16	28	18	48	5	11
1,2,3,6,7,8-HxCDF	69	225	9	56	42	117	8	35	19	27	10	8	12	25	5	6
1,2,3,7,8,9-HxCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,3,4,6,7,8-HxCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	9	17	4	3	8	13	4	4	8	12	6	3	8	14	2	3
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OCDF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,3',4,4'-TeCB	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,3',4,4',5-PeCB	98	228	54	46	83	135	43	32	120	209	77	60	156	554	39	107
3,3',4,4',5,5'-HxCB	382	1341	122	285	207	388	77	111	105	153	80	34	95	200	36	43
Total PCDDs-TEQ	30	102	10	22	21	29	11	7	15	23	4	8	15	27	6	7
Total PCDFs-TEQ	308	1306	20	302	155	297	43	97	76	146	18	61	22	81	8	16
Total PCDDs/PCDFs-TEQ	337	1408	31	322	176	323	56	103	91	168	31	62	38	108	14	21
Total non-ortho-Co-PCBs-TEQ	14	36	7	7	10	16	5	4	13	22	9	6	17	57	5	11
Total TEQ	351	1444	38	328	187	336	65	105	104	180	41	60	54	123	20	27
Lipid (%)	0.49	0.84	0.33	0.17	0.49	0.74	0.27	0.16	0.62	0.82	0.46	0.15	0.55	0.80	0.34	0.14

Data represent the mean, maximum and minimum of dioxins levels (pg/g lipid), and the standard deviation in the blood of Yusho patients.

— : did not detect, or did not calculate.

の毒性寄与率を図示する。PCBパターンがA, BおよびBCの患者はその毒性寄与の大部分をPCDFsが占めている(73~88%)。一般人ではNon-ortho-Co-PCBsの毒性寄与率(39%)が最も高いが、PCDDsやPCDFsの毒性寄与率との差はさほどなかった。以上の結果から再認識させられることは、PCBパターンがA, BおよびBCの患者では発症後30年以上を経過し

ても依然として油症原因オイル由来のPCDFsの毒性寄与が高いということである。PCBパターンがCの患者は一般人と同じ、環境由来のダイオキシン類による毒性寄与率が高いが、中にはAやBパターンの患者なみにPCDFsの毒性寄与が高い患者もいた。

1995年に行った調査¹⁾ではPCBパターン別に患者を分類した結果を示していないが、3~4年後の今回

Table 4-1 Concentrations of PCDDs and PCDFs in Yusho causal rice oil

Congeners	Conc.(ng/g)	Congeners	Conc.(ng/g)	Congeners	Conc.(ng/g)
1,3,6,8-TCDD	1.1	1,3,6,8-TCDF	10.9	1,3,4,6,9-PeCDF	1.3
1,3,7,9-TCDD	1.0	1,3,7,8-/1,3,7,9-TCDF	15.1	1,2,3,4,8-/1,2,3,7,8-PeCDF	386.9
1,3,7,8-TCDD	0.8	1,3,4,7-TCDF	33.4	1,2,3,4,6-PeCDF	122.9
1,2,4,7-/1,2,4,8-/1,3,6,9-TCDD	0.6	1,4,6,8-TCDF	34.2	1,2,3,7,9-PeCDF	<0.1
1,2,6,8-TCDD	0.3	1,2,4,7-/1,3,6,7-TCDF	236.2	1,2,3,6,7-PeCDF	46.3
1,4,7,9-TCDD	0.8	1,3,4,8-TCDF	28.7	1,2,4,6,9-/2,3,4,8,9-PeCDF	156.2
2,3,7,8-TCDD	<0.1	1,2,4,8-/1,3,4,6-TCDF	154.4	1,3,4,8,9-PeCDF	4.3
1,2,3,7-TCDD	0.3	1,2,4,6-/1,2,6,8-TCDF	107.0	1,2,4,8,9-PeCDF	<0.1
1,2,3,4-/1,2,3,8-/1,2,4,6-/1,2,4,9-TCDD	0.3	1,4,7,8-/1,3,6,9-/1,2,3,7-TCDF	63.7	1,2,3,6,9-PeCDF	88.9
1,2,3,6-/1,2,7,9-TCDD	0.4	1,2,3,4-/1,6,7,8-TCDF	66.5	2,3,4,6,8-PeCDF	4.0
1,2,7,8-/1,4,6,9-TCDD	<0.1	1,2,3,6-/1,2,3,8-/1,4,6,7-/2,4,6,8-TCDF	78.8	1,2,3,4,9-PeCDF	5.6
1,2,3,9-TCDD	<0.1	1,3,4,9-TCDF	<0.1	2,3,4,7,8-PeCDF	585.1
1,2,6,9-TCDD	<0.1	1,2,7,8-TCDF	53.4	1,2,3,8,9-PeCDF	<0.1
1,2,6,7-TCDD	<0.1	1,2,6,7-/1,2,7,9-TCDF	170.3	2,3,4,6,7-PeCDF	391.9
1,2,8,9-TCDD	<0.1	1,4,6,9-TCDF	<0.1	1,2,3,4,6,8-HxCDF	79.4
1,2,4,6,8-/1,2,4,7,9-PeCDD	38.5	1,2,4,9-TCDF	<0.1	1,3,4,6,7,8-/1,3,4,6,7,9-HxCDF	141.1
1,2,3,6,8-PeCDD	28.5	2,3,6,8-TCDF	99.2	1,2,4,6,7,8-HxCDF	120.4
1,2,4,7,8-PeCDD	3.7	2,4,6,7-TCDF	511.0	1,2,4,6,7,9-HxCDF	3.3
1,2,3,7,9-PeCDD	15.7	1,2,3,9-TCDF	<0.1	1,2,3,4,7,8-/1,2,3,4,7,9-HxCDF	643.3
1,2,3,4,7-/1,2,4,6,9-PeCDD	2.1	2,3,4,7-TCDF	<0.1	1,2,3,6,7,8-HxCDF	108.6
1,2,3,7,8-PeCDD	7.9	1,2,6,9-TCDF	<0.1	1,2,4,6,8,9-HxCDF	<0.1
1,2,3,6,9-PeCDD	1.0	2,3,7,8-TCDF	89.6	1,2,3,4,6,7-HxCDF	558.0
1,2,4,6,7-/1,2,4,8,9-PeCDD	2.8	2,3,4,8-TCDF	268.0	1,2,3,6,7,9-HxCDF	<0.1
1,2,3,4,6-PeCDD	0.1	2,3,4,6-TCDF	64.0	1,2,3,4,6,9-/1,2,3,6,8,9-HxCDF	8.0
1,2,3,6,7-PeCDD	1.2	2,3,6,7-TCDF	82.0	1,2,3,7,8,9-HxCDF	2.3
1,2,3,8,9-PeCDD	<0.1	3,4,6,7-TCDF	9.4	1,2,3,4,8,9-HxCDF	6.6
1,2,3,4,6,8-/1,2,4,6,7,9-/1,2,4,6,8,9-HxCDD	161.7	1,2,8,9-TCDF	<0.1	2,3,4,6,7,8-HxCDF	75.3
1,2,3,6,7,9-/1,2,3,6,8,9-HxCDD	117.2	1,3,4,6,8-PeCDF	38.9	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	181.4
1,2,3,4,7,8-HxCDD	11.7	1,2,4,6,8-PeCDF	46.0	1,2,3,4,6,7,9-HpCDF	8.8
1,2,3,6,7,8-HxCDD	51.2	1,3,6,7,8-PeCDF	88.9	1,2,3,4,6,8,9-HpCDF	1.4
1,2,3,4,6,9-HxCDD	3.7	1,3,4,7,8-PeCDF	3.7	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	3.2
1,2,3,7,8,9-HxCDD	31.7	1,3,4,7,9-/1,2,3,6,8-PeCDF	125.4	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	194.8
1,2,3,4,6,7-HxCDD	7.9	1,2,4,7,8-PeCDF	355.1		
1,2,3,4,6,7,9-HpCDD	69.0	1,2,4,7,9-/1,3,4,6,7-PeCDF	67.3		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	84.4	1,2,4,6,7-PeCDF	298.7		
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	54.7	1,2,3,4,7-/1,4,6,7,8-PeCDF	815.4		

の調査と比較しても明確な血中ダイオキシン類濃度の減少は確認できなかった。血中ダイオキシン類濃度は臓器・組織中ダイオキシン類濃度とも相関性があり、血中ダイオキシン類をモニタリングすることは臓器・組織中のダイオキシン類濃度を予測する上で最も有効な方法である²⁾。今回は発症後30年以上を経過した1998年～1999年に採取された患者血液についてダイオキシン類の追跡調査を行った。今後は Mono-ortho-PCBs および Di-ortho-PCBs を含めた PCBs の分析

を行い、これらの毒性寄与を総合的に明らかにしたい。また最近、PCBs 代謝物が内分泌攪乱物質としても作用することが報告されており、PCBs 代謝物の調査も同時に行いたいと考えている。

総 括

1998年～1999年に採取された油症患者（延べ119名）の血液について HRGC/HRMS により、ダイオキシン類 (PCDDs, PCDFs および Non-ortho-Co-

Table 4-2 Concentrations of PCBs in Yusho causal rice oil

IUPAC #	Conc.(ng/g)	IUPAC #	Conc.(ng/g)	IUPAC #	Conc.(ng/g)	IUPAC #	Conc.(ng/g)	IUPAC #	Conc.(ng/g)
Mono-CB	37	6652	94	<1	144,147	229	174	1693	
1	14	Tetra-CB	102,98,93,95	534	149,139	5017	181	413	
2	1	54	5	88,91,121	<1	140,143	<1	177	875
3	12	50	<1	92	151	134,133	611	171	1556
Di-CB	53	436	84	251	142,131	<0.1	173	381	
10,4	99	51	186	89,90	1557	165,146	2424	172	917
2,5	20	45	518	101	15074	153,161	12667	192	<1
6	59	69,46	247.5	113,99	4742	132,168	5841	180	6660
8,5	699	52,73	10427	119,112	<1	141	3805	193	566
14	16	49,43	7761	83	<1	137	1739	191	<1
11	268	47,48,75,65,62	6883	109,86,97,125,117	20230	130	2370	170	5326
12,13	192	44,59	11042	115,87,116,111	48770	163,164	<0.1	190	1753
15	257	42	3749	120,85	<0.1	138	21785	189	816
Tri-CB	72,71,41	6561	110	47651	158,160	7175	Octa-CB		
19	444	64,68	15084	82	7974	129	5747	202	128
30	<1	40,57	2446	124	3598	166	1894	201,204	92
18	10281	67,58	975	107,108	7132	159	758	197	69
17	2579	63	2285	123	2788	162	483	200	313
24,27	433	74,61	30167	118,106	61822	128,167	8850	198	163
32	5956	76,70,80	63263	114	6494	156	9420	199	513
16	<1	66	54184	122	<1	157	2704	203,196	1479
23,34	26	55	475	127,105	3130	169	46	195	580
29	23	60	31632	126	1245	Hepta-CB	194		934
26	1763	56	21673	Hexa-CB	188	5	205		231
25	441	79	460	155	<1	184	16	Nona-CB	
31	47578	78	659	150	<1	179	308	208	85
28	<1	81	1333	152	22	176	447	207	90
21,20,33	10690	77	12559	145	19	186	34	206	368
22	6917	Penta-CB	148	45	178	270	Deca-CB		
36	1116	104	<1	136	799	175	248	209	54
39	630	96	2	154	619	182,187	1179		
38	1672	103	<1	151	802	183	1771		
35	370	100	<1	135	855	185	802		

PCBs)を測定し、残留している各異性体別の濃度およびTEQ濃度を求めた。油症患者血中の総PCDFs濃度はPCBパターンがCの患者を除き、依然高いレベルにあることがわかった。特に、2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDFおよび3,3',4,4',5,5'-HxCB濃度(IUPAC #169)はPCBパターン別にみると、各群間で有意な差($p < 0.01$)が認められた(BCパターンは例数が少ないため除く)。

PCBパターンがAの典型的な患者群では、1998年の平均はPCDDsが21 pg-TEQ/g lipid, PCDFsが206 pg-TEQ/g lipid, Non-ortho-Co-PCBsが14 pg-

TEQ/g lipidであった。1999年の平均はそれぞれ、30 pg-TEQ/g lipid, 308 pg-TEQ/g lipid, 14 pg-TEQ/g lipidで、PCDFsの毒性寄与率の高さには変化はなかった。Cパターンの患者群の平均については、1996年の一般人の血中ダイオキシン類濃度と比較すると有意な差は認められなかった。しかし、中にはAパターンの患者並のPCDFsの毒性寄与率をもつ患者もみられた。

謝 辞

本研究は平成11年および12年度厚生科学研究費補助金

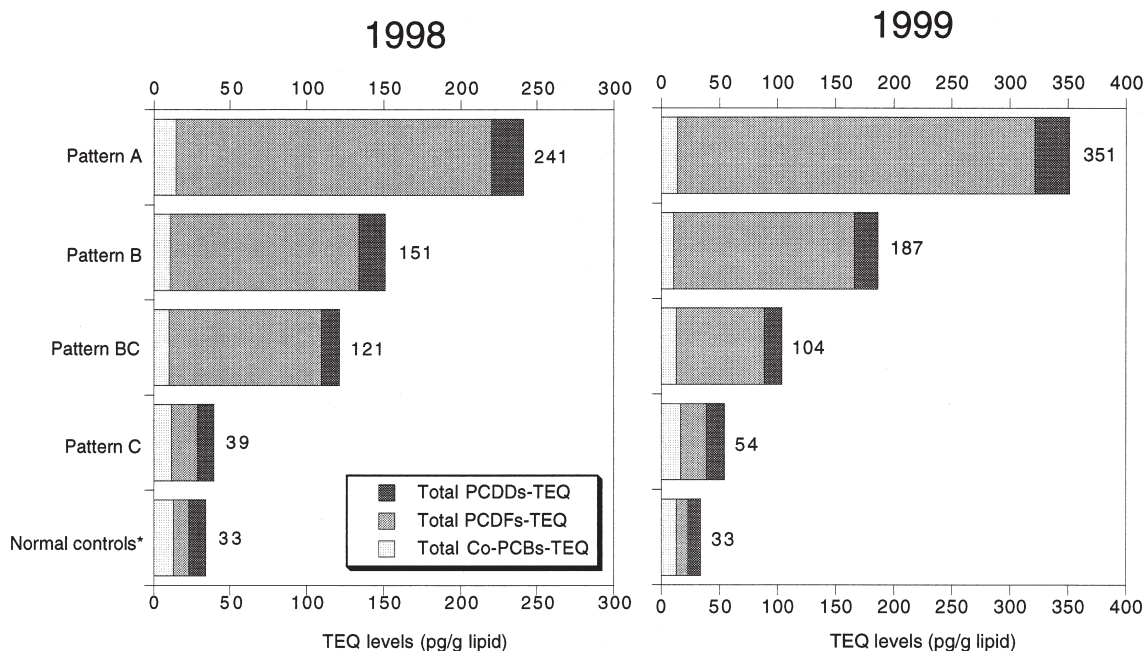


Fig. 1 TEQ levels in the blood of Yusho patients and normal controls.
* cited from reference 2.

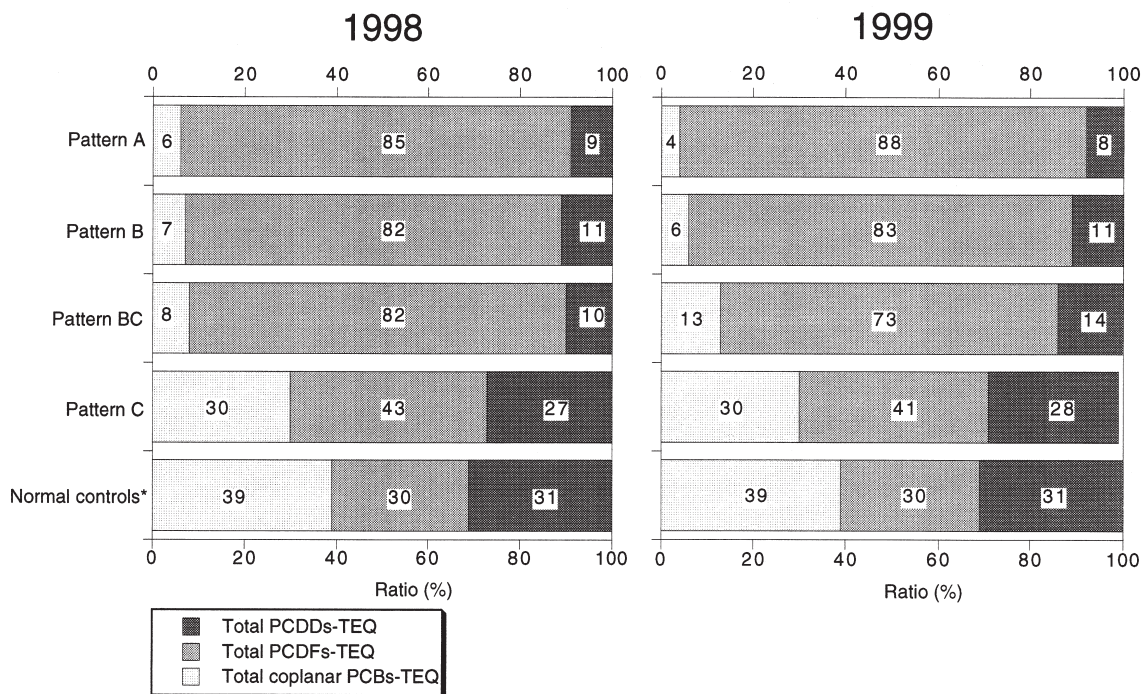


Fig. 2 Ratio of TEQ contribution in the blood of Yusho patients and normal controls.
* cited from reference 2.

(生活安全研究事業)に負うものである。ここに記して謝意を表します。また、Autospec-UltimaE (HRGC/HRGC)の操作に協力していただいた当研究所計測技術課 主任技師 飛石和夫氏に感謝します。

References

- 1) 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.
- 2) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Nagayama J and Nagata T: Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds: Correlations of levels in human tissues and in blood. *Chemosphere* 38: 2767-2774, 1999.
- 3) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Takenaka S, Yu M-L and Guo Y-LL: Recent trend of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and their related compounds in the blood and sebum of Yusho and Yu-Cheng patients. *Chemosphere* 38: 981-993, 1999.
- 4) 環境省: 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画SPEED'98—, 平成12年11月.
- 5) Kimbrough RD and Jensen AA: Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. 2nd ed. pp. 401-416, Elsevier Amsterdam, 1989.
- 6) 国立医薬品食品衛生研究所食品部, 日本におけるトータルダイエツト調査(食品汚染物の1日摂取量) 1997~1999年度, 平成12年10月.
- 7) Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okumura M and Masuda Y: YUSHO A human disaster caused by PCBs and related compounds. pp. 157-246, Kyushu University Press Fukuoka, 1996.
- 8) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一, Schecter A, Päpke O: 油症患者血液中PCB, PCDFの20年経過後の状態. 福岡医誌 88: 149-156, 1997.
- 9) 増田義人, 山口早苗, 黒木広明, 原口浩一: 最近の油症患者血液中のポリ塩化ビフェニル異性体. 福岡医誌 76: 150-152, 1985.
- 10) Sweeney MH and Mocarelli P: Human health effects after exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Food Additives & Contaminants*. 17: 303-316, 2000.
- 11) 徳永章二, 廣田良夫, 片岡恭一郎: 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—. 福岡医誌 90: 157-161, 1999.
- 12) Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld ATC, Brunström B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen FXR, Liem AKD, Nott C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Wærn F and Zacharewski T: Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife. *Environmental Health Perspect*. 106: 775-792, 1998.
(受付 2001-3-16)

油症患者における PCBs, PCDFs の 30 年間の変遷と症状

第一薬科大学
増田義人・原口浩一・黒木広明
Health and Welfare Canada
John Jake Ryan

The Changes of PCBs and PCDFs as well as Symptoms in Yusho Patients for 30 Years

Yoshito MASUDA, Koichi HARAGUCHI and Hiroaki KUROKI

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

John Jake Ryan

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

Abstract Two mass-food poisonings called Yusho and Yucheng occurred in Western Japan and Taiwan in 1968 and 1979, respectively. Blood samples from 5 Yusho patients and 3 Yucheng patients were collected several times from 1982 to 1998 and from 1980 to 1995, respectively, and analyzed for PCB and PCDF congeners. Fat base concentrations of 2,3,4,7,8-penta-CDF in the Yusho patients, which were responsible for about 70% of the dioxin toxicity, are estimated to be decreased from 60 ppb in 1969 to 0.8 ppb in 1997 with the median half-life of 2.9 years in the first 15 years after the onset and 7.7 years in the next stage of 15 years. Fat base concentrations of total PCBs in the blood of Yusho patients are estimated to be decreased from 75 ppm just after the onset to 2.3 ppm after passage of 30 years. Typical Yusho symptoms of acneiform eruption, dermal pigmentation and increased eye discharge were very gradually recovered with lapse of ten years. However, enzyme and/or hormone mediated sign of high serum triglyceride, high serum thyroxin, immunoglobulin disorder and others are persistently maintained for 30 years.

はじめに

1968年、主に福岡県及び長崎県において油症事件(PCB中毒)が起きた。ポリ塩化ビフェニル(PCB)の商品であるカネクロールが混入されたライスオイルを摂取したために1800名以上の中毒患者が発生した。原因物質はPCBだけでなく、それが加熱により変化して生成されたポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)、ポリ塩化クオータフェニル(PCQ)等の混合物の中毒である¹⁸⁾。1979年、台湾において、福岡の油症と同じ様にPCB、PCDF及びPCQが混入されたライスオイル摂取による中毒事件があり、2000名以上の患者が発生

した¹⁰⁾。これを福岡油症と区別するために台湾油症とする。福岡油症が発生した1968年頃ではPCBの分析は十分にできていなかった。また、血液中にPCDFが存在することすら分かっていなかった。台湾油症が発生した1979年頃からPCB、PCDF等の精密な分析がだんだんできるようになった。台湾油症患者では事件直後から血液を採取してPCB及びPCDFの分析ができた。福岡油症患者については事件から15年経過した頃より採取された血液について、PCB及びPCDFの分析ができた。福岡及び台湾の油症患者の血液分析データをつなぎ合わせることにより、福岡油症患者の事件発生当時から現在まで30年間のPCB及び

PCDF 濃度の変化を推定することができた。日本のダイオキシン類耐容一日摂取量 (TDI) が設定された1996年頃から、ダイオキシンの環境汚染が大きな社会問題となった。ダイオキシン類は都市焼却炉から大量に発生し、環境を汚染しており、それが食物連鎖により人体にも蓄積されている¹⁷⁾。ポリ塩化ジベンゾジオキシン (PCDD), PCDF 及び PCB の異性体とそれらの濃度より求めるダイオキシン毒性相当量 (TEQ) の体内濃度がどの程度で健康影響を生じるかを調べる必要がある。油症は PCB 及び PCDF, すなわち、ダイオキシン類による中毒であるので、人体におけるダイオキシン毒性を評価するためには重要な事例である。油症患者における PCB 及び PCDF の濃度変化とそれに伴う症状の変遷を調べて、ダイオキシン類の人体への健康影響を推測した。

実験方法

1. 試料血液

福岡油症患者5名はいずれも女性で油症発生当時(1968年)の年齢は31~51歳であった。いずれもひどい油症特有のクロルアクネを示し、血液 PCB のタイプは油症特有の A タイプであった。これらの患者について毎年行われている油症検診時に、1982年から1998年にかけて、8~11回採血された。台湾油症患者3名は2人が男性、1人が女性で、台湾油症発生当時(1979年)の年齢は17~33歳であり、いずれもひどいクロルアクネがあった。これらの患者から1980年から1995年にかけて7~8回採血した。

2. PCB, PCDF 異性体分析方法

(1) PCB 異性体の分析

血液中 PCB 異性体の分析方法は前報²⁰⁾²¹⁾に書かれているので、ここでは概略の方法を示す。血液3~5gを秤量し、内標準物質 2,2',3,4,5,5',6-hepta-CB 5 ng, 1 mol/L KOH エタノール 3 mL を加え、加温した後、ヘキサン抽出をした。ヘキサン溶液をシリカゲルのカラムクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン溶出液を濃縮しガスクロマトグラフィー分析試料とした。PCB 異性体分析はキャピラリーカラム (60 m DB-5 MS) を装着したガスクロマトグラフで分離し、電子捕獲検出器又は四重極質量分析計で検出する方法で行った。

(2) PCDF 異性体の分析

血液中 PCDF 異性体の分析法は前報¹⁹⁾²¹⁾の通りである。ここでは概略の分析方法を示す。血液 5 mL に ¹³C-PCDD 及び ³⁷Cl-PCDF の 100 pg 程度の一定量を加え、ヘキサン抽出をした。ヘキサン溶液を蒸発させ、脂質の量を求めた。脂質試料をヘキサンに溶かし、濃硫酸、1%NaOH、水で処理した後、硫酸/シリカゲルと珪酸セシウム/シリカゲルの積層カラム及び活性フロリジルカラムにかけた。ジクロロメタン溶出液を濃縮し Carboxpack C/セライト 545 の活性炭カラムにかけ、トルエン溶出液を濃縮し、ガスクロマトグラフ (DB-5) 2重収束質量分析計 (VG Analytical-70 70 EQ) で PCDF 異性体を分析した。

結果

台湾油症患者では事件直後 (0.6年後) から 15.6年後までの間に採取された血液中の PCB 異性体7種の濃度 (全量ベース) が測定された。福岡油症患者においては事件の14年後から29.1年後にかけて採取された血液中の同じ PCB 異性体7種の濃度 (全量ベース) が測定された。そのうちの3種の PCB 異性体について、時間経過による濃度変化が分かるように Fig. 1 に示す。同じ血液の PCDF 異性体3種の濃度 (脂質ベース) も測定されたので、濃度変化が分かるように Fig. 2 に示す。

台湾油症患者3名及び福岡油症患者5名の各個人における PCB 及び PCDF 異性体の生体内半減期を求めた。半減期は1-コンパートメントモデルの一次式で計算した。その結果を Table 1 に示す。

3種の PCDF 異性体の台湾油症患者における、事件後5700日 (15.6年) までの半減期は3年程度であった。同じ患者における、2,3',4,4',5-penta-CB を除く5種の PCB 異性体の半減期は5年程度であり、3種の PCDF 異性体の半減期よりも明らかに長い。2,3',4,4',5-penta-CB の半減期は1.6年程度であり、他の PCB 及び PCDF 異性体より明らかに小さい。PCDF 異性体の福岡油症患者における、事件後5100日 (14年) から10600日 (29年) までの半減期は5.4年程度であり、台湾油症患者の事件後15.6年までの PCDF 半減期 (3年) より長くなっている。PCDF の排出速度は時間経過と共に遅くなっている。同じ福岡油症患

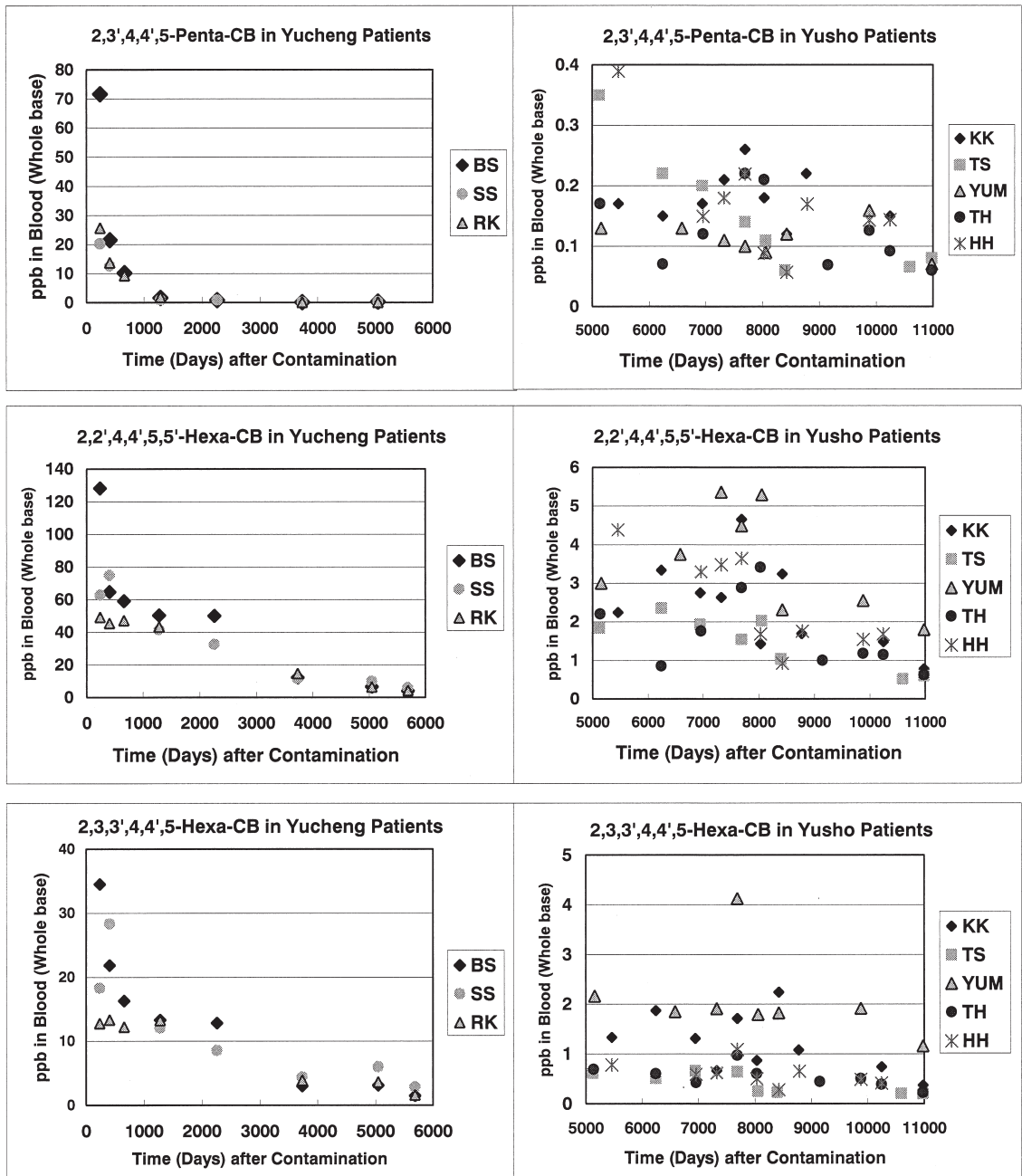


Fig. 1 Elimination of PCB congeners in the Yucheng and Yusho patients (Whole base, ppb)

者における 5 種の PCB 異性体の半減期は 14 年程度であり、PCDF 異性体の半減期 (5.4 年) よりも明らかに長かった。また、この PCB 異性体の半減期は台湾油症患者の事件後 15.6 年までの半減期 (5 年程度) より

長くなっており、PCB 異性体の排出速度も時間経過と共に遅くなっている。2,3',4,4',5-penta-CB の台湾油症患者における血中濃度は 3700 日 (約 10 年) 後では 0.08 ppb まで減少しており、一般人と同じ程度になっ

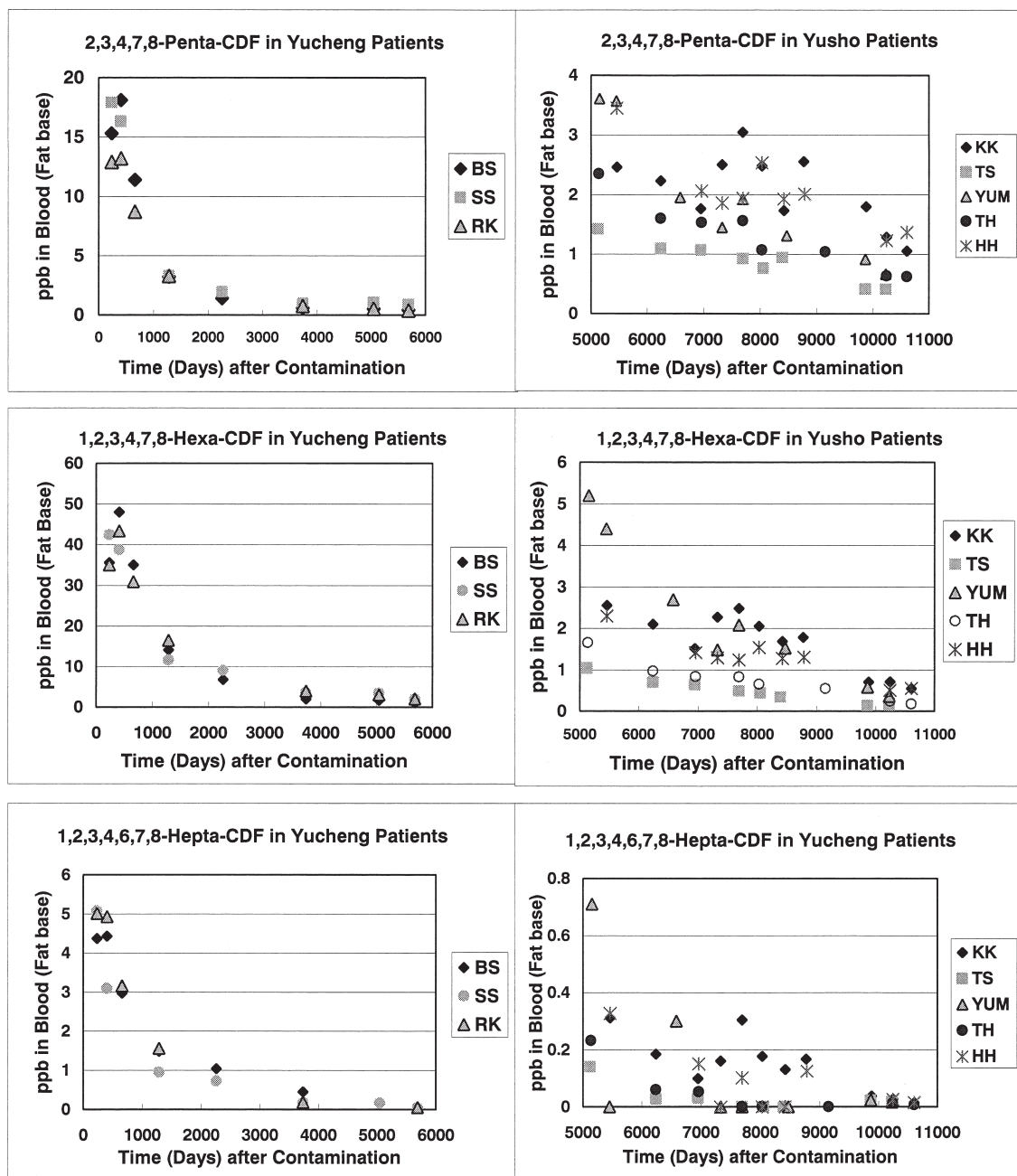


Fig. 2 Elimination of PCDF congeners in the Yucheng and Yusho patients (Fat base, ppb)

た。また、福岡油症患者におけるその PCB の血液中濃度は一般人の血液中濃度より低い場合もあった。それらの濃度関係を考えると、福岡油症患者における 2,3', 4,4',5-penta-CB の半減期 (Table 1) は油症患者がラ

イスオイルと共に摂取した PCB の減衰速度を示しているとは考えられない。

Table 1 Biological Half-life of PCDF and PCB Congeners in Yusho and Yucheng Patients

	Half-life (Years)									
	Yucheng patient 0.6~15.6 years after onset				Yusho patient 14.0~29.1 years after onset					
	BS	SS	RK	Median	KK	TS	YUM	TH	HH	Median
2,3,4,7,8-Penta-CDF	2.7	3.6	2.9	2.9	14.3	7.7	6.1	5.2	11.4	7.7
1,2,3,4,7,8-Hexa-CDF	2.7	3.6	3.5	3.5	6.5	4.5	3.9	5.1	6.9	5.1
1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDF	2.6	2.5	2.2	2.5	6.6	2.6	3.5	3.5	3.4	3.5
Average	2.7	3.2	2.9	3.0	9.1	4.9	4.5	4.6	7.2	5.4
2,3',4,4',5-Penta-CB	1.6	1.9	1.5	1.6	19.5	6.9	33.7	17.6	10.4	17.6
2,2',4,4',5,5'-Hexa-CB	3.4	4.2	4.2	4.2	9.1	7.4	16.0	12.9	7.4	9.1
2,2',3,4,4',5'-Hexa-CB	4.4	4.5	5.5	4.5	12.8	8.9	13.7	31.0	9.5	12.8
2,3,3',4,4',5-Hexa-CB	3.8	5.6	5.3	5.3	9.4	8.5	21.5	13.2	14.4	13.2
2,2',3,3',4,4',5-Hepta-CB	4.7	6.0	5.9	5.9	18.4	12.3	-237.5	13.3	443.7	18.4
2,2',3,4,4',5,5'-Hepta-CB	4.3	6.0	6.0	6.0	16.7	12.2	20.4	10.3	224.6	16.7
Average	3.7	4.7	4.7	4.6	14.3	9.4	21.1	16.4	118.3	14.6

except-237.5

考 察

油症診断基準¹⁴⁾の重要な項目に「血液 PCB の性状及び濃度の異常」がある。これは油症患者血液中の PCB パターンと濃度が患者症状と有意な相関関係¹²⁾²⁸⁾にあることが分かってきたからである。油症患者特有の A パターンとは 2,3',4,4',5-penta-CB の濃度が比較的小さく、2,3,3',4,4',5-hexa-CB の濃度が比較的大きいことである。油症患者における PCB 異性体の半減期を示している Table 1 によると、台湾油症患者において、2,3',4,4',5-penta-CB の半減期は 1.6 年程度であり、事件後 1~2 年で濃度が半減している。また、台湾油症患者及び福岡油症患者において、2,3,3',4,4',5-hexa-CB の半減期 (5.3 年及び 13.2 年) は 2,2',4,4',5,5'-hexa-CB の半減期 (4.2 年及び 9.1 年) よりそれぞれ長い。2,3,3',4,4',5-hexa-CB は事件後の 30 年間では、残留性は常に比較的高い状態であった。油症患者特有な PCB の A パターンは患者が PCB を摂取してから 1~2 年で出来上がり、30 年以上経過した現在まで継続している。

2,3',4,4',5-penta-CB は一旦体内に残留してから 1~2 年の半減期で徐々に減少しているため、この間徐々に代謝されて 4-OH-2,3,3',4,4',5-penta-CB 及び 4'-OH-2,3',4,5,5'-penta-CB となって残留⁴⁾してい

ると考えられる。この化合物は 4-位に水酸基があり、その両側に塩素を置換している。この構造は、サイロキシンが水酸基の両側にヨウ素を持っている構造によく似ており、サイロキシン様の作用があるかもしれない。油症患者では血液中のサイロキシンレベル異常が長期間見られる²²⁾³⁴⁾ ことと関係あるかもしれない。

台湾油症患者では事件後 15.6 年までの、福岡油症患者では事件後 14 年から 30 年までの PCB 及び PCDF 異性体の濃度変化が測定されている。台湾及び福岡の油症患者において、事件後 15 年時点での血液中 PCB, PCDF 異性体濃度を比較できる。事件後 15 年頃における 2,2',4,4',5,5'-hexa-CB の台湾油症患者 3 名の平均濃度は福岡油症患者 5 名の平均濃度より 2.2 倍高い。また、2,3,4,7,8-penta-CDF の台湾油症患者の平均濃度は福岡油症患者の平均濃度の 1/3.8 である。この値を用いて福岡油症患者の事件後 0.6 年の濃度を推定すると 2,2',4,4',5,5'-hexa-CB の濃度は 36 ppb (全血当り)、2,3,4,7,8-penta-CDF の濃度は 58 ppb (脂質当り) となる。血液中の脂質の含量を 0.3% とすると、福岡油症患者の事件後 0.6 年における 2,2',4,4',5,5'-hexa-CB の脂質当り濃度は 12 ppm と推定される。また、2,2',4,4',5,5'-hexa-CB は全 PCB 濃度の 16% 程度を占める²⁰⁾ ので、全 PCB 濃度は 75 ppm と推定される。福岡油症患者では 2,2',4,4',5,5'-hexa-

CBは12 ppmの高い濃度から始めの15年間は半減期4.2年、後半の15年間は半減期9.1年で、30年後には0.37 ppmになったものと考えられる。福岡油症患者における2,3,4,7,8-penta-CDFの脂質当り濃度は事件後0.6年では60 ppbであったものが前半の15年間では半減期2.9年、後半の15年間では半減期7.7年で減少し、29年後には0.8 ppbになったものと考えられる。この2,2',4,4',5,5'-hexa-CB及び2,3,4,7,8-penta-CDFの福岡油症患者における濃度変化をFig. 3に示す。2,3,4,7,8-penta-CDFはそのダイオキシン毒性係数が0.5であり、福岡油症患者ではダイオキシン毒性(TEQ)の大部分である70%を占めている¹⁶⁾ので、2,3,4,7,8-penta-CDF濃度よりTEQ濃度を計算すると、福岡油症患者では事件直後では40 ppbとなる。このTEQは全期間の半減期が4.5年で減少し、30年後には0.6 ppbになったものと推定される。TEQの30年間の濃度変化もFig. 3に示している。

福岡油症発生直後において患者体内の全PCB及びTEQ濃度(脂質当り)がそれぞれ75 ppm及び40 pptである時に、油症特有のクロルアクネ、皮膚粘膜の色素沈着、眼脂過多等のひどい症状が発生した。これらの症状は10年経過した頃から徐々に回復しており²⁶⁾²⁷⁾、30年経過した現在では油症患者であるとの判別は外見からはできない状態である。この30年間に体内のPCB濃度は1/33に、TEQ濃度は1/70に減少している。飯田ら¹¹⁾は1996年に福岡油症患者83名の血液中TEQ濃度(脂質当り)を測定し、平均156 ppt、範囲は86~1016 pptであった。この平均値は一般人の12.8倍高い状態であった。私どもが測定した福岡油症患者5名の1996年頃のTEQ濃度(脂質当り)は300~980 pptであるので、飯田らが測定した福岡油症患者83名のうちでは、TEQ濃度が比較的に高く重症な患者に相当する。

油症患者にはPCB及びPCDFによる酵素誘導作用

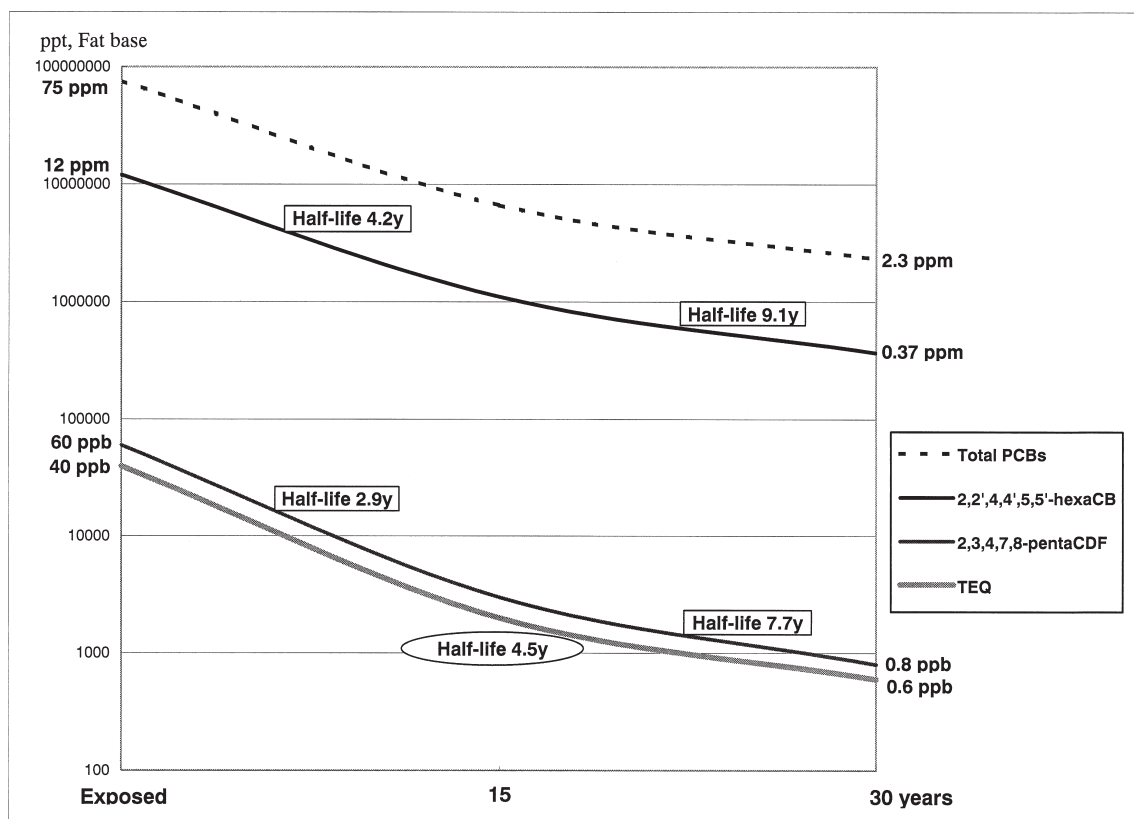


Fig. 3 Estimated elimination of PCB, PCDF and TEQ in the Yusho patients during 30 years (Fat base, ppt)

及びホルモン異常が原因で発生した内科的症状が数多くある。それらの症状を観察された年代順に Table 2 に示している。血清のトリグリセライド, サイロキシン, 免疫グロブリン, 及びリンパ球の炭化水素水酸化酵素の異常は福岡油症患者発生当時から, 30 年以上経過した現在まで継続¹⁶⁾ していると考えられている。台湾油症患者の母親から生まれた子供が 4~7 歳の時に知能指数が一般人の子供よりも劣り¹⁾, 11~14 歳の時には子供の身長やペニスの成長が低い³⁾ との報告があった。それらの異常は小児に存在する PCB 及び PCDF 濃度が一般人より 10~30 倍高かった³⁰⁾ ためとしている。

1990 年代における一般人の全 PCB 及び TEQ 濃度はそれぞれ福岡油症患者の 1/2~1/9 及び 1/3~1/14 であり²⁰⁾, 大きな濃度差ではない。一般人であっても, 体内にはかなりの PCB, TEQ 及び塩素系農薬を蓄積しているので, それらが原因でホルモン異常にもとづく油症の症状, 例えば, 血清中サイロキシンレベルの異常²⁹⁾ などは発生しているかもしれない。

総 括

福岡油症患者 5 名より, 1982 年から 1998 年にかけて 8~11 回採血した。台湾油症患者 3 名より事件当時

の 1980 年から 1995 年にかけて 7~8 回採血した。これらの血液中の PCB 異性体 6 種及び PCDF 異性体 3 種の濃度を測定した。

1) 2,3',4,4',5-penta-CB を除く 5 種の PCB 異性体は台湾油症患者では半減期 4.2~6.0 年で減少し, 福岡油症患者では半減期が 9.1~18.4 年となり, 減衰速度は遅くなった。

2) 2,3',4,4',5-penta-CB は台湾油症患者において比較的速く (半減期 1.6 年) 減衰しており, 油症特異な PCB の A パターンを形成したのと考えられる。

3) PCDF 異性体 3 種は台湾油症患者では半減期 2.5~3.5 年, 福岡油症患者では半減期 3.5~7.7 年で減少した。これらの減衰速度は同一患者における PCB 異性体 5 種の減衰速度よりも小さい。

4) 福岡油症患者における全 PCB 及び TEQ 濃度 (脂質当り) は事件直後では, それぞれ 75 ppm 及び 40 ppb であったものが, 30 年経過した現在では, それぞれ 2.3 ppm 及び 0.6 ppb になったと推測された。

5) 油症患者特有の症状, クロルアクネ, 皮膚粘膜色素沈着, 眼脂過多等は 10 年経過した頃から徐々に回復している。酵素誘導及びホルモン異常により発生したと考えられる症状, 例えば血清中のトリグリセライ

Table 2 Effects of enzymatic and/or hormonal disorders in Yusho patients

Organ	Sign	Time of examination
	Yusho outbreak	1968
Liver	Smooth surfaced endoplasmic reticulum: ↑	1969 ⁶⁾
Female	Irregular menstrual cycle: ↑	1970 ¹⁵⁾
Urine	Androsterone: tend ↑ in male, ↓ in female	1970 ²³⁾
Serum	IgG: ↑, IgA, IgM: ↓	1970 ³¹⁾
Serum	Triglyceride: ↑	1973 ²⁸⁾
Serum	Bilirubin: ↓	1974 ⁷⁾
Serum	Ribonuclease: ↑	1974 ³⁵⁾
Teeth	Anomalies in number and shape: ↑	1978 ²⁾
Serum	helper T/suppressor T: ↑	1983 ²⁵⁾
Serum	Thyroxine, Triiodothyronine: ↑	1984 ²²⁾
Lymphocyte	Aryl Hydrocarbon Hydroxylase: ↑	1985 ²⁴⁾
Serum	Triglyceride: ↑	1988 ⁹⁾
Body	General fatigue, Numbness: ↑	1988 ⁸⁾
Serum	Triglyceride, Total cholesterol: ↑	1993 ³²⁾
Serum	Thyroid Stimulating Hormone: tend ↑	1996 ³⁴⁾
Oral cavity	Pigmentation: tend ↑	1996/1998 ⁵⁾
Serum	IgA, IgG, IgM: tend ↑	1997 ³³⁾

ド、サイロキシンの異常値は30年以上継続している。

文 献

- 1) Chen YCJ, Guo YL, Hsu CC and Rogan WJ: Cognitive development of Yu-cheng (Oil disease) children prenatally exposed to heat-degraded PCBs. *J. Amer. Med. Assoc.* 268: 3213-3218, 1992.
- 2) 福山 宏, 阿南ゆみ子, 赤峰昭文, 青野正男: 油症患者における口腔病変の推移, *福岡医誌* 70: 187-198, 1979.
- 3) Guo YL, Lai TJ, Ju SH, Chen YC and Hsu CC: Sexual developments and biological findings in Yucheng children. *Organohalogen Compounds* 14: 235-238, 1993.
- 4) 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.
- 5) 橋口 勇, 古川和洋, 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(第三報), *福岡医誌* 90: 150-153, 1999.
- 6) 平山千里, 入佐俊武, 山元寅男: 油症患者肝臓の形態学的所見, *福岡医誌* 60: 455-461, 1969.
- 7) Hirayama C, Okumura M, Nagai J and Masuda Y: Hypobilirubinemia in patients with polychlorinated biphenyl poisoning. *Clinica Chimica Acta* 55: 97-100, 1974.
- 8) 廣田良夫, 廣畑富雄, 片山恭一郎, 篠原志郎, 高橋克巳: 油症患者の血中 PCB 濃度と自覚症状の関連 —全国油症患者追跡検診結果の比較研究—, *福岡医誌* 82: 335-341, 1991.
- 9) 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.
- 10) Hsu ST, Ma CI, Hsu SKH, Wu SS, Hsu NHM, Yeh CC and Wu SB: Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: A four-year followup. *Environ. Health Perspect.* 59: 5-10, 1985.
- 11) 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.
- 12) 幸田 弘, 増田義人: 九州大学附属病院油症外来患者の血中 PCB と臨床症状との関係, *福岡医誌* 66: 624-628, 1975.
- 13) 倉恒匡徳: "奇病"の原因を究明するための疫学調査, 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆 編集: 油症研究30年の歩み, pp 25-35, 九州大学出版会, 2000.
- 14) 倉恒匡徳, 青野正男, 吉田彦太郎: 序言, *福岡医誌* 75: 117-125, 1985.
- 15) 楠田雅彦: 油症と女性 —米ぬか油中毒症婦人の性機能に関する研究—, *産科と婦人科* 46: 1063-1072, 1971.
- 16) Masuda Y: Approach to risk assessment of chlorinated dioxins from Yusho PCB poisoning. *Chemosphere* 32: 583-594, 1996.
- 17) 増田義人: ダイオキシン類によるリスクの評価, *エネルギー・資源* 20: 37-43, 1999.
- 18) 増田義人: 油症を起こした原因化学物質, 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆 編集: 油症研究30年の歩み, pp 47-74, 九州大学出版会, 2000.
- 19) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一, 斎藤秀美, Ryan JJ: 油症患者血液中PCDFの濃度推移, *福岡医誌* 84: 236-242, 1993.
- 20) 増田義人, 黒木広明, 原口浩一, Schecter A, Paepke O: 油症患者血液中PCB, PCDFの20年経過後の状態, *福岡医誌* 88: 149-156, 1997.
- 21) 増田義人, 原口浩一, 黒木広明, Ryan JJ: 台湾および福岡油症患者の血液中PCDFおよびPCBの25年間の濃度推移, *福岡医誌* 86: 178-183, 1995.
- 22) Murai K, Okamura K, Tsuji H, Kajiwara E, Watanabe H, Akagi K and Fujishima M: Thyroid function in "Yusho" patients exposed to polychlorinated biphenyls (PCB). *Environ. Res.* 44: 179-187, 1989.
- 23) 永井諄爾, 古川ミチヨ, 東城朱美, 藤本多映子: 尿17-ケトステロイドの比色定量とガスクロマトグラフィによるその分別定量, *福岡医誌* 62: 51-65, 1971.
- 24) 長山淳哉, 清原千香子, 福田篤志, 中山好一, 廣畑富雄, 旭 正一, 吉村健清: 油症患者の芳香族炭化水素水酸化酵素活性に関する研究, *福岡医誌* 78: 301-304, 1987.
- 25) 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, *福岡医誌* 76: 196-203, 1985.
- 26) 中山樹一郎, 占部治邦, 利谷昭治, 旭 正一, 堀 嘉昭, 古江増隆: 過去30年間の油症患者皮膚症状の臨床経過, 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆 編集: 油症研究30年の歩み, pp 182-194, 九州大学出版会, 2000.
- 27) 大西克尚, 向野利彦, 石橋達朗: 油症の眼障害と治療, 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆 編集: 油症研究30年の歩み, pp 202-211, 九州大学出版会, 2000.
- 28) 奥村 恂, 増田義人, 中牟田澄子: 油症患者に

おける血中 PCB と血清トリグリセライドとの関係, 福岡医誌 65: 84-87, 1974.

29) Pluim HJ, de Vijlder JJM, Olie K, Kok JH, Vulsma T, van Yijin DA, van der Slikke JW and Koppe JG: Effect of pre- and postnatal exposure to chlorinated dioxins and furans on human neonatal thyroid hormone concentrations. Environ. Health Perspect. 101: 504-507, 1993.

30) Ryan JJ, Hsu CC and Guo YL: Exposure of children whose mother suffered from Yu-cheng poisoning to polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). Organohalogen Compounds 14: 243-246, 1993.

31) 重松信昭, 乗松克政, 石橋凡雄, 吉田 稔, 末次 勸, 河津武俊, 池田東吾, 齊藤玲子, 石丸秀三, 白日高歩, 城戸優光, 江森浩三, 光 利央: 油症にお

ける呼吸器障害の臨床的ならびに実験的研究, 福岡医誌 62: 150-156, 1971.

32) 徳永章二, 廣田良夫, 片岡恭一郎: 油症患者の臨床検査値と血中 PCB 濃度の関連 —1993 年度全国油症患者追跡検査結果より—, 福岡医誌 90: 157-161, 1999.

33) 辻 博, 平橋高明, 緒方久修, 藤島正敏: 油症患者における免疫機能の検討, 福岡医誌 90: 147-149, 1999.

34) 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.

35) 山中正義, 赤木公博, 平尾修恭, 村井宏一郎: 油症患者における血清酵素化学的異常とくに RNA 分解酵素を中心に, 福岡医誌 66: 617-619, 1975.

(受付 2001-3-16)

酵母 Two-hybrid 法による PCB 水酸化体及び PCDF 水酸化体の エストロゲン様物質としての評価

第一薬科大学環境化学教室
黒木 広明・米倉 さゆり・迫田 智子
藤野 恭子・中岡 ひとみ

第一薬科大学分子生命化学教室
荒 牧 弘 範
中村学園大学家政学部食物栄養学科
古 賀 信 幸

大阪大院・薬
西 川 淳 一・西 原 力

Assessment of Hydroxylated Metabolites of Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Dibenzofurans as Potential Estrogens by Yeast Two-Hybrid System

Hiroaki KUROKI, Sayuri YONEKURA, Satoko SAKODA,
Kyoko FUJINO, Hitomi NAKAOKA and Hironori ARAMAKI

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

Nobuyuki KOGA

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

Jun-ichi NISHIKAWA and Tsutomu NISHIHARA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871

Abstract The estrogenic activities of several hydroxylated metabolites of PCBs and PCDFs were investigated by yeast two-hybrid assay based on the ligand-dependent interaction of estrogen receptor with coactivator.

For the hydroxylated PCBs, the order of estrogenic potency was 4-OH-2',4',6'-triCB > 4-OH-4'-monoCB, 4-OH-biphenyl. These compounds were evaluated as 10^3 to 10^4 less potent than 17β -estradiol based on the concentrations of test compounds showing 10% activity of 10^{-7} M 17β -estradiol. 2-OH-3',4,4'-triCB, 4-OH-2',3,4'-triCB and 3-OH-/4-OH-2,2',5,5'-tetraCB, the metabolites of 2,2',5,5'-tetraCB were inactive as estrogens at the highest concentrations used in this study (10^{-5} M). Also 4-OH-3,3',4',5-tetraCB, the metabolite of 3,3',4,4'-tetraCB was inactive as estrogen, indicating that this hydroxylated metabolite did not take part in the estrogenic activity of 3,3',4,4'-tetraCB. OH group at 4-position of biphenyl was necessary for the expression of estrogenicity, but one or two chloro-substitution adjacent to OH group inhibited the activity.

For the hydroxylated PCDFs, 8-OH-2-monoCDF, 7-OH-3,4-diCDF, 8-OH-3,4-diCDF, 8-OH-3,4,6-triCDF and 3,8-(OH)₂-2-monoCDF exhibited estrogenic activity. The estrogenic activity of 3,8-(OH)₂-2-monoCDF was comparable to those of 4-OH-2',4',6'-triCB and 4-nonylphenol (mixture of compounds with branched sidechain). The order of activity was 3,8-(OH)₂-2-monoCDF > 8-OH-3,4-diCDF, 7-OH-3,4-diCDF > 8-OH-2-monoCDF, 8-OH-3,4,6-triCDF. These compounds were evaluated as 2.5×10^3 to 3×10^4

less potent than 17β -estradiol. On the other hand, no estrogenic activity was observed for 2-OH-dibenzofuran, 3-OH-2,8-diCDF, 6-OH-3,4-diCDF and 9-OH-3,4-diCDF at concentrations as high as 10^{-4} M. Substitution of OH group at 2(8)- or 3(7)-position of dibenzofuran and no chloro-substitution adjacent to OH group was required for the estrogenic activity.

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) や polychlorinated dibenzofuran (PCDFs) は, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDDs) などとともに地球規模の環境汚染物質である。このうち, PCBs 及び PCDFs は, カネミ油症の原因物質として知られている。PCBs のうち, biphenyl 骨格のオルト位 (2-, 2'-, 6-あるいは 6'-位) に塩素原子が置換していない coplanar PCBs を含め PCDFs 及び PCDDs は, ダイオキシン類と総称されており強い毒性を示す。また, 最近ダイオキシン類は内分泌かく乱物質 (いわゆる環境ホルモン) とも見なされている。例えば, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (tetraCB) などある種の PCBs にはエストロゲン様作用が明らかにされている²¹⁾²⁵⁾。また, ダイオキシン類は甲状腺ホルモンのかく乱に関連した毒性, 生体影響を示すのではないかと疑われている。

一般に, PCBs は生体内においてモノ水酸化体, ジオール体やジヒドロジオール体などの水酸化体へと代謝される。PCB 水酸化体代謝物は肝臓において生成するが, 多くの PCB 水酸化体はすみやかに体外へ排泄されると考えられている。しかし, PCB 水酸化体の毒性学的評価に関するいくつかの例が報告されている。例えば, 主要な四塩素化体である 2,3',4,4'-tetraCB の主代謝物である 5-水酸化体がマウスにおいて母化合物の数倍の急性毒性 (LD_{50}) を有することが明らかにされている²⁷⁾。また, 2,2',5,5'-tetraCB の代謝物である 3,4-エポキシド体や 4-水酸化体が培養細胞の増殖を母化合物より強く阻害することも報告されている²⁶⁾。

一方, 著者ら²⁾¹³⁾ は PCB 水酸化体のうち, 甲状腺ホルモンの構造に類似した 4-OH-3,5-dichloro-や 4-OH-2,3,5-trichloro-の構造を有するものは, 特異的に人や哺乳動物の血液中に残留していることを明らかにした。Brouwer ら⁴⁾⁵⁾ や Richenbacher ら²⁴⁾ は, このような PCB 水酸化体は血中の甲状腺ホルモン運搬

たんぱく質である transthyretin に対する結合性が高く, その結果として血液中に局在し血中の甲状腺ホルモン (T_3 , T_4) やビタミン A の減少をもたらすことを報告している。また, このような PCB 水酸化体は, 動物実験において胎仔脳内の甲状腺ホルモンを減少させ, 胎仔の正常な脳の発育を阻害する可能性が示唆されている¹⁹⁾²⁰⁾。

さらに, 血液中に局在するこのような PCB 水酸化体は, ルシフェラーゼ遺伝子を導入した MCF-7 細胞や HeLa 細胞などの培養細胞を用いた検出系 (レポーター遺伝子アッセイ) により, 抗エストロゲン (女性ホルモン) 様作用を有することが明らかにされている¹⁶⁾¹⁸⁾。

一方で, ある種の PCB モノ水酸化体はエストロゲン受容体に対してエストラジオールと競合的に結合すること¹²⁾、また, ある種のモノ水酸化体あるいはジオール体は, 子宮重量増加や MCF-7 細胞増殖などのエストロゲン様作用を示すことも報告されている¹⁷⁾⁹⁾¹²⁾。このように, 最近では PCB 水酸化体には甲状腺ホルモンや女性ホルモンなどの内分泌系へのかく乱作用との関連が注目されている。しかし, これまでエストロゲン様活性が検討された PCB 水酸化体は, 比較的特殊な構造のものが多く, 動物実験などの実際の代謝物として同定されたものの例はほとんどない。

PCDFs も代謝を受けてモノ水酸化体などの PCDF 水酸化体を生じるが, 著者ら¹⁵⁾ は PCB 水酸化体と同様に水酸基の両隣が塩素原子で置換された PCDF 水酸化体も特異的に血液中に局在することを明らかにした。このような PCDF 水酸化体も transthyretin に高い親和性を有する¹⁷⁾ ことが明らかにされているが, PCDF 水酸化体の内分泌かく乱作用を含めてその生物活性はほとんど検討されていない。

そこで, 本研究では動物実験などにより実際に同定された代謝物を含む PCB 水酸化体や PCDF 水酸化体の内分泌かく乱作用を評価する一環として, これらのエストロゲン様活性を Nishikawa ら²³⁾ の酵母 two-

hybrid 法により検討した。本測定法はエストロゲン受容体及び受容体と基本転写因子の間を仲介する因子であるコアクチベーターとのリガンド依存的相互作用に基づいている。従って、本法によってエストロゲン様活性が認められた場合は、被検物質がエストロゲン受容体と結合することによりエストロゲン様活性を示すことを意味する。

実験方法

1. 実験材料

4-OH-biphenyl, 4-OH-4'-monoCB, 2-OH-dibenzofuran 及び bisphenol A は東京化成から購入した。17 β -エストラジオール及び4-ノニルフェノール（多くの枝分かれた側鎖を含む混合物）は、それぞれ和光純薬及びナカライテスクから購入した。ジメチルスルホキシド（DMSO, 和光純薬）は生化学用を用いた。4-OH-2',4',6'-triCB など大部分の PCB 水酸化体は、Cadogan の方法⁶⁾ や既報³⁾ によって MeO-PCB を合成した後、BBr₃ で脱メチル化反応を行い対応する水酸化体を合成した。その他の PCB 水酸化体は既法¹⁰⁾ に従って合成した。PCDF 水酸化体は既法¹⁴⁾ に従って MeO-PCDF を合成した後、BBr₃ で脱メチル化反応を行い対応する PCDF 水酸化体を合成した。

2. エストロゲン様活性の測定

エストロゲン様活性は Nishikawa ら²³⁾ の酵母 two-hybrid 法により測定した。本法ではラットのエストロゲン受容体 α とコアクチベーター (TIF2) の2種類の発現プラスミド及び β -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子を導入した酵母 Y190 を用いている。被検物質がエストロゲン様物質としてエストロゲン受容体と結合すれば、受容体とコアクチベーターとが相互作用してレポーター遺伝子である β -ガラクトシダーゼを活性化する。従って、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することにより被検物質のエストロゲン様活性を測定することができる。 β -ガラクトシダーゼ活性の測定は、基質として 2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を加え、分解して生じる 2-nitrophenol の発色を吸光度を測定して行った。

実際には、一晚培養した酵母に DMSO に溶かした一定量の被検物質（最終濃度： 10^{-9} M \sim 10^{-5} M あるいは 10^{-4} M）を加え、30°C で4時間振とう培養後、菌体

量を測定するとともに Zymolyase を加えて細胞壁を溶解したのち、2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を加え 30°C で30分間反応させた。生じた 2-nitrophenol の吸光度をプレートリーダーを用いて測定（415 nm 及び 550 nm）した。

3. 測定機器

吸光度の測定は Bio-Rad 社製の Model 550 プレートリーダーを用いて行った。

実験結果

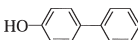
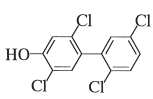
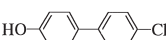
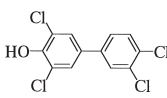
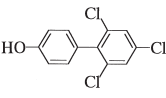
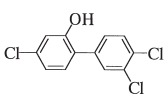
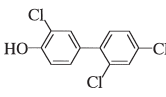
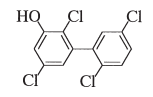
1. PCB 水酸化体

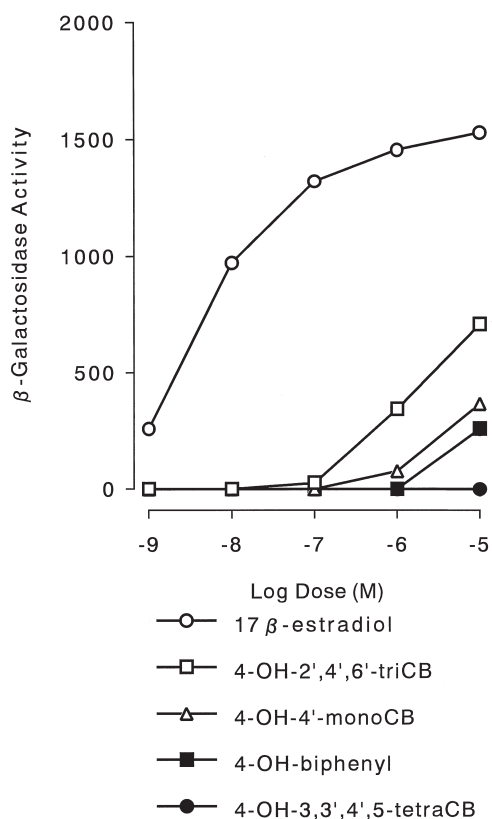
Table 1 に示す一塩素化～四塩素化ビフェニルのモノ水酸化体7種について酵母 Two-hybrid 法により、被検物質の最終濃度 10^{-9} ～ 10^{-5} M における β -galactosidase 活性を測定しエストロゲン様活性を求めた。今回検討した PCB 水酸化体のなかでは、水酸基が4-位に置換した 4-OH-4'-monoCB 及び 4-OH-2',4',6'-triCB のみにエストロゲン様活性が認められた。また、PCB 水酸化体ではないが、ビフェニル骨格の4-位に水酸基が置換した 4-OH-biphenyl もエストロゲン様活性を示した。しかし、2,2',5,5'-tetraCB のラットにおける代謝物である 3-水酸化体及び 4-水酸化体¹¹⁾ は、検討した最高濃度である 1×10^{-5} M においてもエストロゲン様活性は認められなかった。また、3,3',4,4'-tetraCB の代謝物である 4-OH-3,3',4',5-tetraCB¹¹⁾ にも活性は見られなかった。

Fig. 1 にエストロゲン様活性を示した上記2種の PCB 水酸化体、4-OH-biphenyl 及び活性が認められなかった 4-OH-3,3',4',5-tetraCB について、濃度と β -galactosidase 活性との応答関係を示す。17 β -エストラジオールでは 10^{-9} M において β -galactosidase 活性の発現がみられ、 10^{-7} M ではほぼ飽和に達した。活性を示した上記3種の水酸化体では、 10^{-7} M あるいはそれ以上の濃度で β -galactosidase 活性の発現が認められ、 10^{-5} M までの濃度範囲において活性の上昇が認められた。一方、4-OH-3,3',4',5-tetraCB では、検討した最高濃度である 10^{-5} M においても活性発現は認められなかった。

Nishihara ら²²⁾ はエストロゲン様活性を示した物質について、 10^{-7} M の 17 β -エストラジオールが示す β -galactosidase 活性の 10% を示す被検物質の濃度

Table 1 Chemical structures of hydroxylated PCBs used in this study and their REC10

Compound	Structure	REC10 (M)	Compound	Structure	REC10 (M)
4-OH-biphenyl		3×10^{-6}	4-OH-2,2',5,5'-tetraCB		$>1 \times 10^{-5}$
4-OH-4'-monoCB		2×10^{-6}	4-OH-3,3',4',5-tetraCB		$>1 \times 10^{-5}$
4-OH-2',4',6'-triCB		2×10^{-7}	2-OH-3',4,4'-triCB		$>1 \times 10^{-5}$
4-OH-2',3,4'-triCB		$>1 \times 10^{-5}$	3-OH-2,2',5,5'-tetraCB		$>1 \times 10^{-5}$

**Fig. 1** Estrogenic activity of hydroxylated PCBs by yeast two-hybrid assay

(REC10) を求め、17β-エストロジオールの活性と比較している。今回の検討でも REC10 を求め、Table 1 にその値を示した。また、環境ホルモンとしてよく知られている 4-ノニルフェノール (混合物) や Bisphenol A についても本法により検討したところ、REC10 はそれぞれ 4×10^{-7} M 及び 2×10^{-5} M であった。

Table 1 から明らかなように、すでに子宮重量や MCF-7 細胞増殖を指標にした方法により強いエストロゲン様物質であることが報告されている 4-OH-2',4',6'-triCB¹²⁾ は、今回の酵母 two-hybrid 法においても最も強いエストロゲン様活性 (REC10: 2×10^{-7} M) を示し、その活性の強さは 4-ノニルフェノール (混合物) とほぼ同程度であった。また、4-OH-biphenyl 及び 4-OH-4'-monoCB のエストロゲン様活性 (REC10: 約 2×10^{-6} M) は、4-OH-2',4',6'-triCB のほぼ 1/10 であった。

2. PCDF 水酸化体

一塩素化～三塩素化ジベンゾフランのモノ及びジ水酸化体 8 種について、酵母 two-hybrid 法によりエストロゲン様活性を測定した。これらの構造を Table 2 に示している。このうち、8-OH-2-monochlorodibenzofuran (monoCDF), 7-OH-3,4-dicDF, 8-OH-

3,4-diCDF, 8-OH-3,4,6-triCDF 及び 3,8-(OH)₂-2-monoCDF は、およそ 10⁻⁷ M あるいは 10⁻⁶ M 以上の濃度で β -galactosidase 活性の発現を示しエストロゲン様活性が認められた。しかし、3-OH-2,8-diCDF, 6-OH-3,4-diCDF, 9-OH-3,4-diCDF では、検討した最高濃度の 10⁻⁵ M においても β -galactosidase 活性は認められなかった。また、ジベンゾフラン骨格に水酸基が置換した 2-OH-dibenzofuran 自身も活性を示さなかった。

エストロゲン様活性を示した PCDF 水酸化体について、その REC10 を Table 2 に示す。最も強い活性を示した 3,8-(OH)₂-2-monoCDF (REC10: 8 × 10⁻⁷ M) は、4-OH-2',4',6'-triCB や 4-ノニルフェノール (混合物) とほぼ同程度の活性を示した。また、他の PCDF 水酸化体の活性 (REC10: 5 × 10⁻⁶ M ~ 1 × 10⁻⁵ M) は、3,8-(OH)₂-2-monoCDF のほぼ 1/10 であった。

考 察

17 β -エストラジオールや 4-ノニルフェノール (混合物) のエストロゲン様活性の強さ (REC10) は、Nishihara ら²²⁾の結果とほぼ一致したことから、本法を用いて PCB 水酸化体及び PCDF 水酸化体のエスト

ロゲン様活性の強さを比較検討できると思われる。しかし、著者らによる Bisphenol A の REC10 の値は 2 × 10⁻⁵ M であり、Nishihara ら²²⁾の値 (3 × 10⁻⁶ M) より約 10 倍高い値を示した。

1. PCB 水酸化体

エストロゲン様活性の強さは 4-OH-2',4',6'-triCB > 4-OH-4'-monoCB, 4-OH-biphenyl の順であり、子宮重量などの指標を用いた検討により強いエストロゲン様物質であることが知られている 4-OH-2',4',6'-triCB は、今回の酵母 two-hybrid 法においても強いエストロゲン様活性を有することが確認された。4-OH-2',4',6'-triCB の活性は、代表的な環境ホルモンである 4-ノニルフェノール (混合物) の活性と同程度であった。また、4-位に水酸基をもつ 4-OH-4'-monoCB や 4-OH-biphenyl 自身も 4-OH-2',4',6'-triCB の約 1/10 の活性を示した。両者のエストロゲン様物質としての強さは、少なくとも Bisphenol A と同等であった。

4-OH 体であっても水酸基のオルト位 (隣) が 1 個の塩素原子で置換された 4-OH-2',3,4'-triCB や 4-OH-2',2',5,5'-tetraCB あるいは両隣に塩素原子が置換した 4-OH-3,3',4',5-tetraCB では活性が認められ

Table 2 Chemical structures of hydroxylated PCDFs used in this study and their REC10

Compound	Structure	REC10 (M)	Compound	Structure	REC10 (M)
2-OH-dibenzofuran		>1 × 10 ⁻⁴	3-OH-2,8-diCDF		>1 × 10 ⁻⁴
8-OH-2-monoCDF		1 × 10 ⁻⁵	9-OH-3,4-diCDF		>1 × 10 ⁻⁴
8-OH-3,4-diCDF		5 × 10 ⁻⁶	6-OH-3,4-diCDF		>1 × 10 ⁻⁴
8-OH-3,4,6-triCDF		1 × 10 ⁻⁵	3,8-(OH) ₂ -2-monoCDF		8 × 10 ⁻⁷
7-OH-3,4-diCDF		6 × 10 ⁻⁶			

なかった。このように、4-OH 基の隣に置換する塩素原子は、4-OH 体のエストロゲン様活性を強く阻害した。また、水酸基が2-位あるいは3-位に置換した2-OH-3',4,4'-triCB (水酸基のオルト位に塩素原子は存在しない)や3-OH-2,2',5,5'-tetraCB (水酸基のオルト位に1個の塩素原子が置換)ではエストロゲン様活性はほとんど認められなかった。これらのことから、PCB 水酸化体がエストロゲン様活性を示すためには、構造が17 β -エストラジオールのA環に類似していること、すなわち、biphenylの4-位に水酸基を有し両隣は塩素原子で置換されていないことが示唆された。

エストロゲン様活性を示した PCB 水酸化体について、REC10 を用いてこれらのエストロゲン様活性の強さを比較したところ、4-OH-2',4',6'-triCB は17 β -エストラジオールの約1/1000であり、4-OH-4'-monoCB 及び4-OH-biphenyl は、17 β -エストラジオールの約1/10000であった。なお、17 β -エストラジオールの REC10 として Nishihara ら²²⁾の値 3×10^{-10} M を用いた。

2,2',5,5'-tetraCB は四塩素化 PCB の主成分の1つであり、ラットでは代謝されて3-OH-2,2',5,5'-tetraCB や4-OH-2,2',5,5'-tetraCB を代謝物として与えることが koga ら¹¹⁾により明らかにされている。これらの両代謝物は今回の検討ではエストロゲン様作用を有しないことが明らかにされた。しかし、4-OH 基の隣に1個の塩素原子が置換しているという点で活性を示さなかった4-OH-2,2',5,5'-tetraCB と構造が類似している4-OH-2',3,4',6'-tetraCB や4-OH-2',3,3',5',6'-pentaCB は、MCF-7細胞の増殖などを指標にした場合、エストロゲン様活性を示すことが Andersson ら¹⁾や Connor ら⁷⁾によって報告されている。従って、酵母 two-hybrid 法によって活性を示さなかった4-OH 体の隣に1個の塩素原子を有する PCB 水酸化体については、さらに MCF-7細胞を用いてエストロゲン様活性を検討する必要がある。

Coplanar PCB である3,3',4,4'-tetraCB は、MCF-7細胞やマウスの子宮重量測定を用いた検討からエストロゲン様作用を示すことが報告されている²¹⁾。今回の検討で3,3',4,4'-tetraCB の水酸化体代謝物である4-OH-3,3',4',5-tetraCB にエストロゲン様活性が認められなかったことから、3,3',4,4'-tetraCB のエスト

ロゲン様作用に水酸化体(4-OH-3,3',4',5-tetraCB)は関与していないことが明らかとなった。

4-OH-3,3',4',5-tetraCB にはエストロゲン様活性は認められなかったが、このような4-OH-3,4-dichloro-あるいは4-OH-2,3,5-trichloro-型の PCB 水酸化体は、甲状腺ホルモンの血中輸送たんぱく質に高い親和性を示し、人や哺乳動物の血液中に特異的に残存している。従って、このような PCB 水酸化体と甲状腺ホルモン受容体との関わりが疑われるが、この点についてはほとんど検討されていない。このような観点からの検討が今後必要と思われる。

2. PCDF 水酸化体

エストロゲン様活性の強さは、3,8-(OH)₂-2-monoCDF > 8-OH-3,4-diCDF, 7-OH-3,4-diCDF > 8-OH-2-monoCDF, 8-OH-3,4,6-triCDF の順であった。検討した中では、3,8-(OH)₂-2-monoCDF のエストロゲン様活性が最も強く、その活性は代表的な環境ホルモンとして知られている4-ノニルフェノール(混合物)と同程度であった。8-OH-2-monoCDF, 7-OH-3,4-diCDF, 8-OH-3,4-diCDF 及び8-OH-3,4,6-triCDF の活性の強さは、3,8-(OH)₂-2-monoCDF の約1/10であり、少なくとも Bisphenol A と同程度～1/10の活性であった。また、REC10 を用いてこれらのエストロゲン様活性の強さを比較したところ、3,8-(OH)₂-2-monoCDF は17 β -エストラジオールの約1/2500であり、8-OH-2-monoCDF, 7-OH-3,4-diCDF, 8-OH-3,4-diCDF, 8-OH-3,4,6-triCDF は、17 β -エストラジオールの約1/20000～1/30000であった。

PCDF 水酸化体も構造に依存したエストロゲン様作用を有することが示された。例えば、6-OH-, 7-OH-, 8-OH-及び9-OH-3,4-diCDF は、一方のベンゼン環の3,4-位に共通して塩素原子が置換し、他方のベンゼン環の異なる位置にフェノール性水酸基を有しているが、これらのエストロゲン様作用には大きな違いが認められた。すなわち、ジベンゾフラン骨格の2(8)-位あるいは3(7)-位に水酸基を有する7-OH-/8-OH-3,4-diCDF (REC10: 5×10^{-6} M) では、Bisphenol A と同程度のエストロゲン様作用が認められた。しかし、1(9)-位あるいは4(6)-位に水酸基を有す

る 6-OH-/9-OH-3,4-diCDF には、活性は認められなかった。

その理由として、1(9)-位あるいは4(6)-位に水酸基が存在すると、水酸基に隣接してフラン環が存在するため立体的な障害によりエストロゲン受容体との結合が阻害されるためと考えられる。従って、PCDF 水酸化体が活性を示すためには、少なくとも2(8)-位あるいは3(7)-位に水酸基が必要であることが示唆された。

PCDF 水酸化体がエストロゲン様活性を有するための構造上の条件は、水酸基の位置のみならず水酸基に隣接する塩素原子によっても影響を受けた。例えば、水酸基のオルト位に塩素原子が置換している 3-OH-2,8-diCDF にはエストロゲン様活性は見られず、水酸基のメタ位に塩素原子が置換した 8-OH-3,4,6-triCDF は、弱いエストロゲン様活性 (REC10: 1×10^{-5} M) を示した。また、この 8-OH-3,4,6-triCDF の活性は、8-OH-3,4-diCDF のメタ位に塩素置換することにより、もとの活性の 1/2 に減少した。このように、水酸基のオルト位に置換した塩素原子はエストロゲン受容体との結合を強く阻害し、メタ位の塩素原子は弱く阻害すると思われる。

以上のことから、PCDF 水酸化体がエストロゲン受容体と結合し、エストロゲン様作用を発現するための構造上の条件として、2(8)-位あるいは3(7)-位に水酸基を有しており、かつ水酸基のオルト位に塩素原子が置換していないことが要求された。しかし、上記の条件を満たす 2-OH-dibenzofuran にはエストロゲン様活性がなく、8-OH-2-monoCDF は弱いながらエストロゲン様活性 (REC10: 1×10^{-5} M) を示すこと、また、3,8-(OH)₂-2-monoCDF は、一方のベンゼン環の水酸基のオルト位に塩素原子が置換しているにもかかわらず、4-ノニルフェノール (混合物) に匹敵する強いエストロゲン様作用を示すなど上記の条件のみでは説明できない例も観察された。このことは、エストロゲン様活性発現には水酸基をもつベンゼン環のみならず他方のベンゼン環の置換様式も関連していることを示唆している。

今回エストロゲン様活性が認められた PCB 水酸化体や PCDF 水酸化体は、低塩素化体の比較的特殊な構造のものであり、動物実験により代謝物として検出されていたり、人や哺乳動物の体内に残留しているよう

な水酸化体代謝物にはエストロゲン様活性は認められなかった。このような低塩素化 PCB の代謝や毒性は、これまで高塩素化体ほど研究されていない。また、著者ら¹³⁾ は四塩素化体を主成分とする PCB 混合物を投与したラットの肝臓中から約 30 種のモノあるいはジ水酸化体を検出している。従って、人が食物を通して摂取する PCBs の中には、代謝されエストロゲン様あるいは抗エストロゲン様作用を示す水酸化体が一時的に肝臓に残留することも考えられる。今後、このような観点から PCBs の環境ホルモンとしての作用を含めた毒性学的検討が必要である。

総 括

酵母 two-hybrid 法を用いて、PCB 水酸化体 7 種 (一塩素化体～四塩素化体) 及び PCDF 水酸化体 8 種 (一塩素化体～三塩素化体) のエストロゲン様活性を調べた。その結果、次のような知見が得られた。

1. 検討した PCB 水酸化体のなかで、エストロゲン様活性の強さは 4-OH-2',4',6'-triCB > 4-OH-4'-monoCB, 4-OH-biphenyl の順であった。エストロゲン様活性を有することが知られている 4-OH-2',4',6'-triCB は、本法でも最も強い活性を示し、その活性は代表的な環境ホルモンである 4-ノニルフェノールと同程度であった。4-OH-4'-monoCB, 4-OH-biphenyl の活性は、少なくとも Bisphenol A とほぼ同等であった。また、これらの活性を 17β-エストラジオールと比較した場合、4-OH-2',4',6'-triCB では約 1/1000, 4-OH-4'-monoCB 及び 4-OH-biphenyl では約 1/10000 であった。

2,2',5,5'-tetraCB の代謝物である 3-OH-2,2',5,5'-tetraCB 及び 4-OH-2,2',5,5'-tetraCB に、エストロゲン様活性は認められなかった。また、3,3',4,4'-tetraCB のエストロゲン様活性発現に代謝物である 4-OH-3,3',4',5-tetraCB は関与していないことが明らかとなった。

2. PCB 水酸化体がエストロゲン様活性を発現する構造上の条件として、biphenyl の 4-位に水酸基を有し両隣は塩素原子で置換されていないことが示唆された。

3. 検討した PCDF 水酸化体のなかで、エストロゲン様活性の強さは、3,8-(OH)₂-2-monoCDF > 8-OH-

3,4-diCDF, 7-OH-3,4-diCDF > 8-OH-2-monoCDF, 8-OH-3,4,6-triCDF の順であった。3,8-(OH)₂-2-monoCDF は、4-OH-2',4',6'-triCB や 4-ノニルフェノールに匹敵する比較的強い活性を示した。8-OH-2-monoCDF, 7-OH-3,4-diCDF, 8-OH-3,4-diCDF 及び 8-OH-3,4,6-triCDF の活性は、Bisphenol A と同程度～1/10 であった。また、3,8-(OH)₂-2-monoCDF の活性の強さは、17β-エストラジオールの約 1/2500, 8-OH-2-monoCDF, 7-OH-3,4-diCDF, 8-OH-3,4-diCDF 及び 8-OH-3,4,6-triCDF は、約 1/20000～1/30000 であった。

4. PCDF 水酸化体がエストロゲン様活性を発現する構造上の条件として、dibenzofuran の 2(8)-位あるいは 3(7)-位に水酸基を有しており、水酸基のオルト位に塩素原子が置換していないことが示唆された。

文 献

- 1) Andersson PL, Blom A, Johannisson A, Pesonen M, Tysklind M, Berg AH, Olsson PE and Norrgren L: Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: *In vitro* studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes: Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37: 145-150, 1999.
- 2) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuroki H: Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. Environ. Health Perspect. 102: 464-469, 1994.
- 3) Bergman Å, Klasson-Wehler E, Kuroki H and Nilsson A: Synthesis and mass spectrometry of some methoxylated PCB. Chemosphere 30: 1921-1938, 1995.
- 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 thyroxin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 85: 301-312, 1986.
- 5) 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.
- 6) Cadogan JIG: A convenient new method of aromatic arylation. J. Chem. Soc. 4257-4258, 1962.
- 7) 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.
- 8) Fielden MP, Chen I, Chittim B, Safe SH and Zacharewski TR: Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2',6'-pentachlorobiphenyl (PCB 104), its hydroxylated metabolite 2,4,6,2',6'-pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivative, 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB 155). Environ. Health Perspect. 105: 1238-1248, 1997.
- 9) Garner CE, Jefferson WN, Burka LT, Matthews HB and Newbold RR: *In vitro* estrogenicity of the catechol metabolites of selected polychlorinated biphenyls. Toxicol. Appl. Pharmacol. 154: 188-197, 1999.
- 10) 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.
- 11) Koga N and Yoshimura H: Metabolism of PCBs and related compounds, and their toxicity, In Kuratsune M, Yoshimura H, Hori Y, Okamura M and Masuda Y (eds.): Yusho- a human disaster caused by PCBs and related compounds. pp. 105-120, Kyushu University Press, Fukuoka, Japan, 1996.
- 12) 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.
- 13) 黒木広明, 原口浩一, 斎藤秀美, 増田義人, Klasson-Wehler E and Bergman Å: 血液中における PCB 水酸化体代謝物の残留性, 福岡医誌, 84: 248-256, 1993.
- 14) Kuroki H, Haraguchi K and Masuda Y: Metabolism of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in rats. Chemosphere 20: 1059-1064, 1990.
- 15) 黒木広明, 石村憲子, 増田義人, Klasson-Wehler E and Bergman Å: ラット血液中における PCDF 水酸化体代謝物の残留性に関する予備的検討, 福岡医誌 86: 169-177, 1995.
- 16) Kramer VJ, Helderich 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.

17) Lans MC, Klasson-Wehler E, Wiillemsen 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.

18) Moore M, Mustain M, Daniel K, Chen I, Safe S, Zachaewski 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.

19) Morse DC, Groen D, Veerman M, van Amerongen CJ, Koeter HBWM, Smits van Prooije AE, Visser TJ, Koeman JH and Brouwer A : Interference of polychlorinated biphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 122 : 27-33, 1993.

20) Morse DC, Klasson-Wehler E, van de Pas M, de Bie AThHJ, van Bladeren PJ and Brouwer A : Metabolism and biochemical effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in pregnant and fetal rats. Chem. -Biol. Interact. 95 : 41-56, 1995.

21) Nesaretnam K, Corcoran D, Dils RR and Darbre P : 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo. Mol. Endocrinol. 10 : 923-936, 1996.

22) Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, Takatori S,

Kitagawa Y, Hori S and Utsumi H : Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. J. Health Science 46 : 282-298, 2000.

23) Nishikawa J, Saito K, Goto J, Dakeyama F, Matsuo M and Nishihara T : New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. Toxicol. Appl. Pharmacol. 154 : 76-83, 1999.

24) 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.

25) Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N and Serrano FO : The E-screen assay as a tool to identify estrogens : An update on estrogenic environmental pollutants. Environ. Health Perspect. 103 : 113-122, 1995.

26) 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. Contami. Toxicol. 23 : 788-796, 1979.

27) 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.

(受付 2001-4-9)

2,4,5,2',3',4'-六塩素化ビフェニルの *in vitro* 代謝における動物種差

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
静岡県立大学薬学部薬剤学教室
加藤 善久・木村 良平
第一薬科大学物理分析学教室
原 口 浩一・増 田 義人

Species Differences in the *in vitro* Metabolism of 2,4,5,2',3',4'-Hexachlorobiphenyl

Nobuyuki KOGA, Tomoyo KANAMARU and Nahoko OISHI
*Department of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen University,
5-7-1, Befu, Johnan-ku, Fukuoka 814-0198*

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

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

Abstract *In vitro* Metabolism of 2,4,5,2',3',4'-hexachlorobiphenyl (CB138) was studied using liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs. Guinea pig liver microsomes formed four metabolites named as M-1, M-2, M-3 and M-4 and these metabolites were all increased to about 4-5 fold of untreated microsomes by pretreatment of phenobarbital. Liver microsomes of rats and hamsters showed much less activity to metabolize CB138 than those of guinea pigs. Only phenobarbital-treated microsomes produced very small amounts of M-3 in rats and M-1, M-2 and M-3 in hamsters, but untreated and MC-treated microsomes did not. When mass spectra of the methylated derivatives of M-1, M-2, M-3 and M-4 were measured in GC/MS, the former two possess the molecular ion of 354 and the latter two had the molecular ion of 388. In addition, the mass fragmentation pattern indicated that M-1, M-2, M-3 and M-4 are 2-OH-4,5,2',3',4'-pentachlorobiphenyl, 5-OH-2,4,2',3',4'-pentachlorobiphenyl, 3-OH-CB138 and 2-OH-3,4,5,2',3',4'-hexachlorobiphenyl, respectively. Of four metabolites, the chemical structures of M-3 and M-4 were supported by the synthesized authentic compounds. From these results, it is suggested that the metabolism of CB138 in guinea pig liver proceeds mainly via 2,3-epoxide as an intermediate and a PB-inducible P450, CYP2B18, is the most important isozyme in CB138 metabolism.

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 (Ms) 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、主に一水酸化 (OH) 体に代謝される²³⁾。PCB 代謝物としては OH 体以外にジヒドロジオール体、ジオール体、S 含有代謝物および塩素が 1 個脱離した OH 体などが報告されて

いる。PCB は一般に脂溶性が高いことから、体内に蓄積しやすいが、置換塩素数が4個以下の場合、代謝とともに比較的容易に体外に排泄されるが、5個以上になると非常に代謝されにくくなり肝臓や脂肪組織に蓄積されることになる。

一方、動物の中には、難代謝性の PCB に対しても、高い代謝能を有するものが知られている。Schnellmann ら³⁰⁾ はラット、サル、およびヒトではほとんど代謝されない 2,4,5,2',4',5'-六塩素化ビフェニル (HCB) (CB153) がイヌで容易に代謝されることを報告した。また Ariyoshi ら¹²⁾ はイヌだけではなく、モルモットでも CB153 代謝能が高いこと、さらには 3-OH 体、2 位の塩素が 3 位に NIH 転位した 2-OH-3,4,5,2',4',5'-HCB および塩素が 1 個脱離した 2-OH-4,5,2',4',5'-五塩素化ビフェニル (PenCB) が生成されることを報告した。

このような PCB 代謝は大きく分けると CYP1A, CYP2A および CYP2B に属する P450 によって触媒される^{3)7)12)14)17)~20)22)}。CYP1A および CYP2A は PCB 異性体のうち 3,4,5 位に塩素置換されたものをよく触媒し、4-OH 体を生成する。一方、CYP2B に属する P450 は 2,5 位に塩素置換されたものをよく触媒し、3-OH 体を生成する。前述の CB153 代謝には CYP2B に属する P450 すなわち、イヌでは CYP2B11⁷⁾ が、モルモットでは CYP2B18³⁾ が関与することが明らかになっている。

2,4,5,2',3',4'-HCB (CB138) は CB153 とともに、PCB 製品⁴⁾ に高濃度で含まれており、さらに、魚類¹¹⁾ および海棲哺乳動物の血中や脂肪組織⁹⁾²⁹⁾、ヒト母乳中⁸⁾²⁴⁾²⁸⁾、ヒト血中や脂肪組織¹¹⁾¹⁵⁾²⁴⁾³²⁾ で高濃度で検出されている。また、CB138 は、CB153 と同様に P450 等の肝薬物代謝酵素の強いフェノバルビタール (PB) 型誘導能を有することが知られている²⁷⁾。しかしながら、これまでに CB138 の代謝に関する報告は *in vivo* 代謝および *in vitro* 代謝いずれでも全く見あたらない。そこで、本研究では CB153 に比べて、さらに代謝されにくいと思われる 2,4,5-三塩素置換 PCB である CB138 の代謝について、ラット、ハムスターおよびモルモット肝 Ms を用いて検討を加えた。また、代謝に関与する P450 分子種を明らかにするために、代表的な P450 誘導剤として知られている PB および 3-メチル

コラントレン (MC) で前処理した動物肝 Ms でも同様に検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) CB138 の合成

CB138 は Cadogan による方法⁵⁾ で合成した。まず、2,4,5-trichloroaniline と 1,3,4-trichlorobenzene をテトラクロロエチレンに溶解し、亜硝酸イソペンチルでジアゾカップリング反応を 100°C で 16 時間行った。反応物はアルミナカラム (Merck, ドイツ) で精製したのち、異性体を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離した。HPLC 条件は次の通りである。カラム, ODS (250×10 mm i.d., 5 μm, 草野科学); 移動相, アセトニトリル-H₂O (9 : 1); 流速, 2 ml/min; 検出波長, 254 nm。

なお、CB138 の純度は電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー (GC/ECD) の結果、>98% であった。また、CIL (米国) から購入した CB138 と GC/ECD の保持時間が完全に一致した。

CB138 : MS (EI) m/z (relative intensity) 358 (100) [M⁺], 360 (182) [M⁺⁺ 2], 362 (159) [M⁺⁺ 4], 364 (65) [M⁺⁺ 6], 366 (13) [M⁺⁺ 8], 323 (9) [M⁺-Cl], 288 (61) [M⁺-Cl₂], 218 (23)。

(2) 代謝物の合成

2-Methoxy (MeO)-3,4,5,2',3',4'-HCB の合成は既報¹⁾ に準じ次のように行った。すなわち、2,3,4-trichloroaniline を亜硝酸ナトリウムでジアゾ化した後、2,3,4-trichlorophenol を加えて、130°C、2 時間反応させた。反応後、クロロホルムで抽出し、これをシリカゲル 60 カラム (30×2.5 cm i.d., Merck, ドイツ) で精製した。これを、ジアゾメタンでメチル化後、再度シリカゲル 60 カラムにて精製し、最終的には HPLC により 1 種類の生成物 (S-4) が得られた。S-4 の HPLC における保持時間は、30.7 min であり、GC/MS および ¹H-NMR の結果、S-4 は目的とする 2-MeO-3,4,5,2',3',4'-HCB であった。HPLC 条件は次のとおりである。カラム, YMC-ODS (250×20 mm i.d., 5 μm, YMC 製); プレカラム, YMC-Guardpack ODS (50×20 mm i.d., 5 μm, YMC 製); 移動相, メタノール-H₂O (9 : 1); 流速, 2 ml/min; 検出波長, 254

nm.

2-MeO-3,4,5,2',3',4'-HCB: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, chloroform-*d*) δ 3.557 (3H, s, 2-CH₃O), 7.155 (1H, d, J = 8.33 Hz, 5'-H), 7.262 (1H, s, 6-H), 7.462 (1H, dd, 6'-H); MS(EI) *m/z* (relative intensity) 388 (100) [M⁺], 390 (193) [M⁺+2], 392 (155) [M⁺+4], 394 (65) [M⁺+6], 396 (16) [M⁺+8], 338 (155) [M⁺-CH₃Cl], 318 (17) [M⁺-Cl₂], 275 (33) [M⁺-COCH₃Cl₂].

3-MeO-CB138 (S-3 a) および 4-MeO-2,3,5,2',3',4'-HCB (S-3 b) は 2,3,6-trichloroanisole と 2,3,4-trichloroaniline を原料として Cadogan による方法⁵⁾で合成した。MeO 体の分離および精製は CB 138 のそれと同様に行い、3-MeO-CB138 と 4-MeO-2,3,5,2',3',4'-HCB がほぼ 1 : 1 の混合物として得られた。3-MeO 体と 4-MeO 体の区別は GC の保持時間およびマススペクトルによる [M⁺-CH₃] イオンの強度によってなされた。

3-MeO-CB138: MS (EI) *m/z* (relative intensity) 388 (100) [M⁺], 390 (185) [M⁺+2], 392 (153) [M⁺+4], 394 (68) [M⁺+6], 373 (8) [M⁺-CH₃], 345 (40) [M⁺-COCH₃].

4-MeO-2,3,5,2',3',4'-HCB: MS (EI) *m/z* (relative intensity) 388 (100) [M⁺], 390 (176) [M⁺+2], 392 (129) [M⁺+4], 394 (54) [M⁺+6], 373 (54) [M⁺-CH₃], 345 (46) [M⁺-COCH₃].

2. 薬物投与

Wistar 系雄性ラット (体重約 170 g), Hartley 系雄性モルモット (体重約 280 g) および 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), あるいは MC (20 mg/kg/day) を 3 日間腹腔内に投与した。PB は生理食塩水に、MC はコーン油に溶解した。PB および MC 前処理動物は最終投与の翌日屠殺し直ちに肝臓を摘出した。生理食塩水で灌流した後、0.25 M ショ糖-0.1 mM EDTA-50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) でホモジナイズを行い、常法により Ms を調製した。

3. CB138 の代謝

肝ミクロゾームによる代謝は既報²¹⁾に準じて行った。すなわち、40 μM CB138, 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 1.0 unit), 肝ミクロゾーム (1 mg protein) および 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を合計 1 ml として、37°C で 2 時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-ヘキサンでそれぞれ 3 回ずつ抽出した。抽出液はジアゾメタンでメチル化後、GC/ECD に付した。なお、代謝物の分析には ECD 付 HP5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製) を用いた。GC/ECD の条件は次の通りである。カラム, DB-1 fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.33 μm 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 230°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

マススペクトルの測定は質量分析計付 HP5980 ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製) を用いて、EI モードで行った。GC/MS 条件は次の通りである。カラム, DB-1 fused silica capillary column (15 m × 0.24 mm i.d., 0.33 μm 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 210°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) $^1\text{H-NMR}$

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

実験結果

1. モルモット肝 Ms による代謝

未処理, PB 前処理および MC 前処理モルモット肝 Ms による CB138 の代謝を調べた。Fig. 1 には代謝物 (メチル化体) のガスクロマトグラムを示す。その結果, 未処理および PB 前処理 Ms において代謝物と思われる 4 本のピークが保持時間 17.08 min, 17.28 min, 21.68 min および 22.09 min に検出された。以下, これらをそれぞれ M-1, M-2, M-3 および M-4 とする。なお, これらの 4 種類の代謝物の生成は, PB 前処理により, 未処理の 4 ~ 5 倍に増大した。一方, MC 前処理 Ms においては, すべての代謝物の生成はほぼ

完全に抑制され、ただ M-4 が微量検出されたにすぎなかった。

以上の結果から、モルモット肝における CB138 の代謝は、未処理 Ms にかかりの濃度で存在し、かつ PB で強く誘導される P450 分子種により触媒されていることが示唆された。

2. ラットおよびハムスター肝 Ms による代謝

次に、ラット肝 Ms を用いて同様に検討した。Fig. 2 に代謝物（メチル化体）のガスクロマトグラムを示す。その結果、PB 前処理 Ms でのみ 1 本の代謝物ピークが検出された。このピークの保持時間は 21.70 min であり、モルモット肝での代謝物 M-3 とほぼ一致した。

一方、ハムスター肝 Ms を用いて同様に検討したところ、代謝物と思われる 3 本のピークが PB 前処理 Ms で検出された。これらのピークの保持時間は 17.06 min, 21.67 min および 22.08 min であり、モルモットでの代謝物 M-1, M-3 および M-4 とほぼ一致した。なお、ラットおよびハムスターいずれの動物でも未処理 Ms および MC 前処理 Ms において代謝物はほとんど検出されなかった。

以上の結果より、CB138 に対する代謝活性はモルモット肝で著しく高いが、ハムスターおよびラット肝ではかなり低いことが明らかになった。さらに、CB138 の代謝には、モルモット、ラットおよびハムスターに共通して、PB 誘導性 P450 が強く関与することが明らかになった。

3. 代謝物の化学構造

生成された 4 種類の代謝物の化学構造を決定するために、PB 前処理モルモット肝 Ms を用いて 100 ml の大容量で、37°C、2 時間反応を行い、代謝物を抽出した。さらに、抽出物はジアゾメタンでメチル化後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製を行った。代謝物の溶出は n-ヘキサンで行い、各 50 ml ずつ 10 本分取し、GC/ECD により分画をチェックした。分画番号 No. 1 には未変化体 (CB138) が、また、4 種類の代謝物はすべて分画番号 No. 2 に溶出されていた (データ未掲載)。そこで分画番号 No. 2 を GC/MS にかけてマススペクトルの測定を行った。

Table 1 には代謝物のマススペクトルデータを示す。M-1 と M-2 のメチル化体は分子量 354 であり、これ

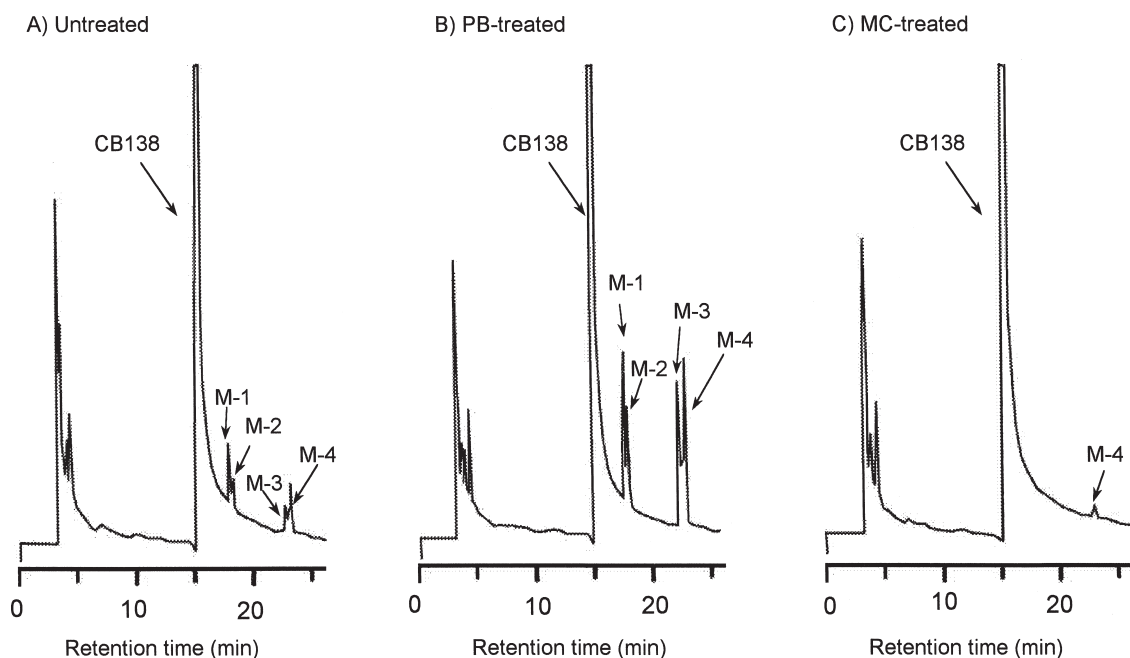


Fig. 1 Gas chromatograms of methylated derivatives of CB138 metabolites formed by liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated guinea pigs.

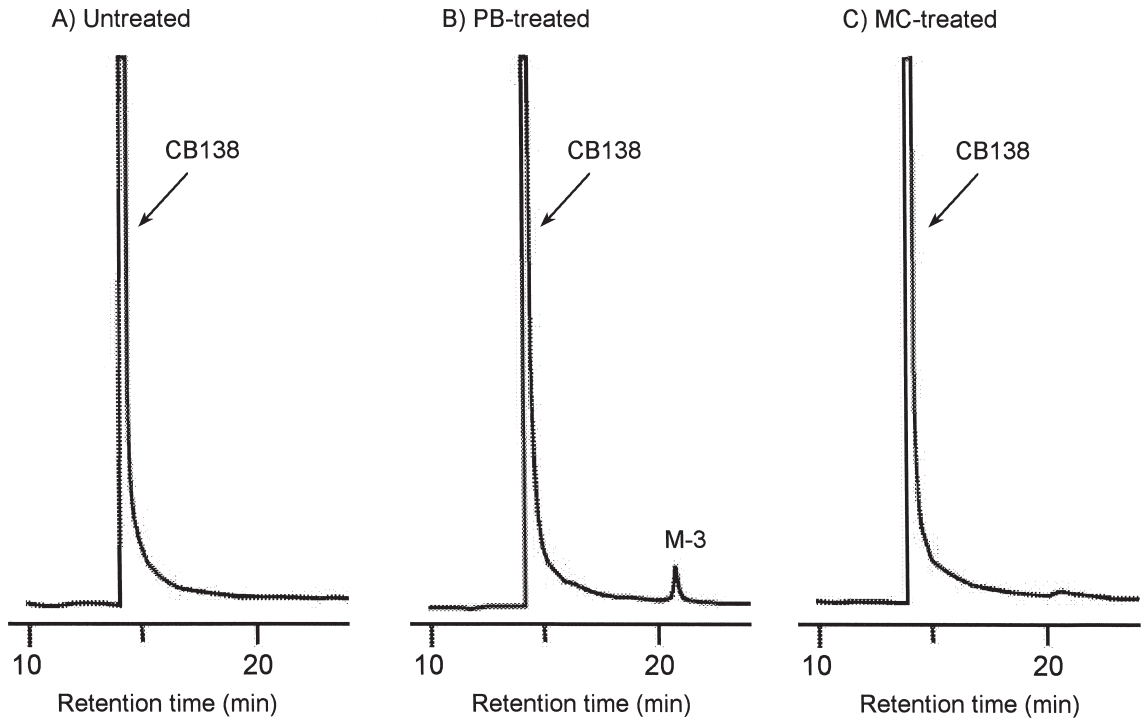


Fig. 2 Gas chromatograms of methylated derivatives of CB138 metabolite formed by liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats.

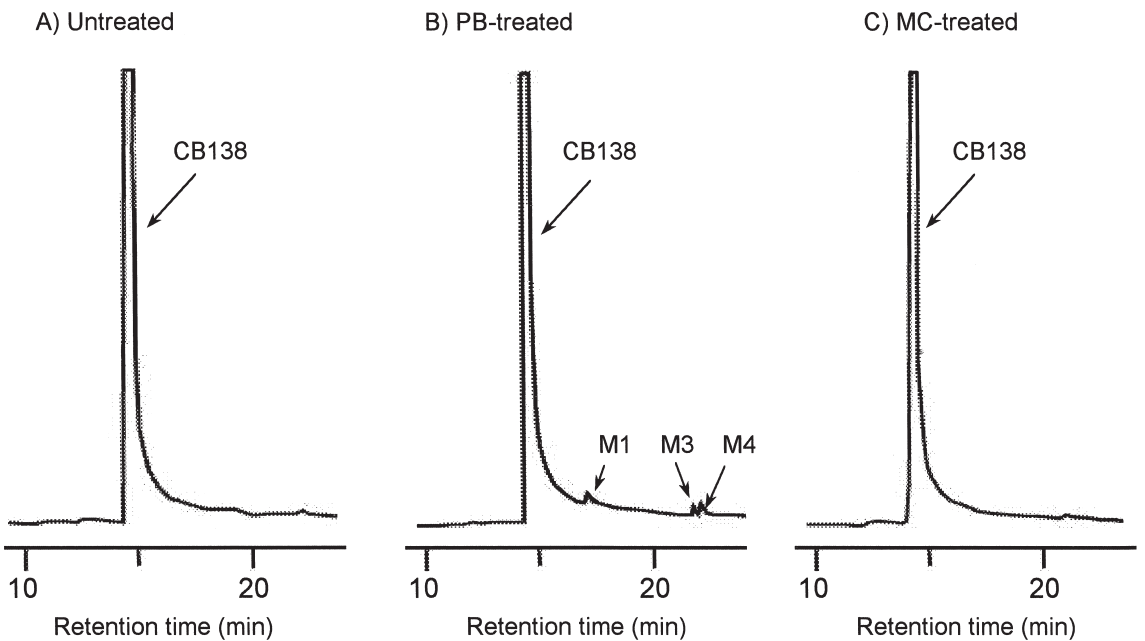


Fig. 3 Gas chromatograms of methylated derivatives of CB138 metabolites formed by liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated hamsters.

は塩素が1個脱離し、さらに1個水酸化されたものと推定された。一方、M-3とM-4のメチル化体は分子量388であり、これはCB138が1個水酸化されたものと推定された。さらに、M-2とM-3はいずれもフラグメントイオン $[M^+ - 43]$ を示すこと、また、M-1とM-4はフラグメントイオン $[M^+ - 50]$ が大きいことが明らかとなった。これまでの経験則¹³⁾¹⁶⁾³³⁾から、フラグメントイオン $[M^+ - 43]$ はPCB分子からCOCH₃が脱離したことを示しており、3(3')位あるいは5(5')位にMeO基が置換されたPCBの場合によくみられる。一方、フラグメントイオン $[M^+ - 50]$ はPCB分子からCH₃Clが脱離したことを示しており、2(2')位あるいは6(6')位にMeO基が置換されたPCBでよくみられる。

以上の結果から、4種類の代謝物の化学構造は次のように推定された。すなわち、M-1は2-OH-4,5,2',3',4'-PenCB、M-2は5-OH-2,4,2',3',4'-PenCB、M-3は3-OH-CB138、M-4は2位の塩素が3位にNIH転位した2-OH-3,4,5,2',3',4'-HCBである。

4. 予想代謝物の合成

これらの化学構造を確認するために、予想代謝物の合成を試みた。まず、M-4の予想代謝物としてS-4を得ることに成功した(実験方法参照)。Table 1に示すように、S-4はそのマススペクトルデータおよびGCの保持時間がM-4のメチル化体と完全に一致した。また、¹H-NMRより、S-4の化学構造は2-MeO-4,5,5,2',3',4'-HCBであることが明らかとなった(Fig. 4)。これらの結果より、CB138代謝物のうち、M-4は2-OH-3,4,5,2',3',4'-HCBと決定された。

次に、M-3の予想代謝物の合成を試みたところ、S-3aとS-3bの混合物を得ることができた(実験方法参照)。これらはマススペクトルより、いずれも分子量388であること、さらにフラグメンテーションパターンから、それぞれ3-MeO-CB138および4-MeO-2,3,5,2',3',4'-HCBと決定された(Table 1)。このうちS-3aはGCの保持時間およびマススペクトルがM-3のメチル化体と完全に一致した。この結果から、M-3はCB138の3-OH体であることが明らかとなった。なお、代謝物のM-3とM-4の間にS-3bと一致するピークも極微量ながら生成されていることが判明した。

考 察

CB138はCB153と同様に、2,4,5-三塩素置換のHCBの1つであるが、難代謝性であることから極めて蓄積性の高いPCBである。本研究ではCB138の代謝をラット、ハムスターおよびモルモット肝Msで調べ、その結果、モルモットが他二者に比べて著しく高い代謝活性を有することが明らかになった。すなわち、モルモット肝では未処理Msの場合にも4種類の代謝物、M-1、M-2、M-3およびM-4が生成され、さらにこれらの代謝物はいずれもPB前処理で4~5倍に増加することが明らかとなった。この結果から、モルモット肝でのCB138の代謝にはPB誘導性のP450の強い関与が示唆された。

モルモット肝P450については、PB誘導性のものとしてCYP2B18が知られている²⁵⁾²⁶⁾³⁴⁾。CYP2B18は未処理肝Ms中で、かなりの濃度存在している構造的P450であるが、これはPB処理によって3~5倍に増

Table 1 Mass spectral data and retention times of methylated derivatives of four CB138 metabolites and three synthetic compounds in GC/MS and GC/ECD.

Compound	Molecular weight	Mass spectral data					Retention time (min)
		$[M^+]$	$[M^+ - 15]$	$[M^+ - 43]$	$[M^+ - 50]$	$[M^+ - 70]$	
CB138	358	100	-	-	-	61	14.57
M-1	354	100	-	-	88	-	17.08
M-2	354	100	-	22	41	-	17.28
M-3	388	100	-	32	13	-	21.68
M-4	388	100	-	-	101	-	22.09
S-3a	388	100	8	40	15	-	21.68
S-3b	388	100	54	46	-	-	21.86
S-4	388	100	-	-	155	17	22.09

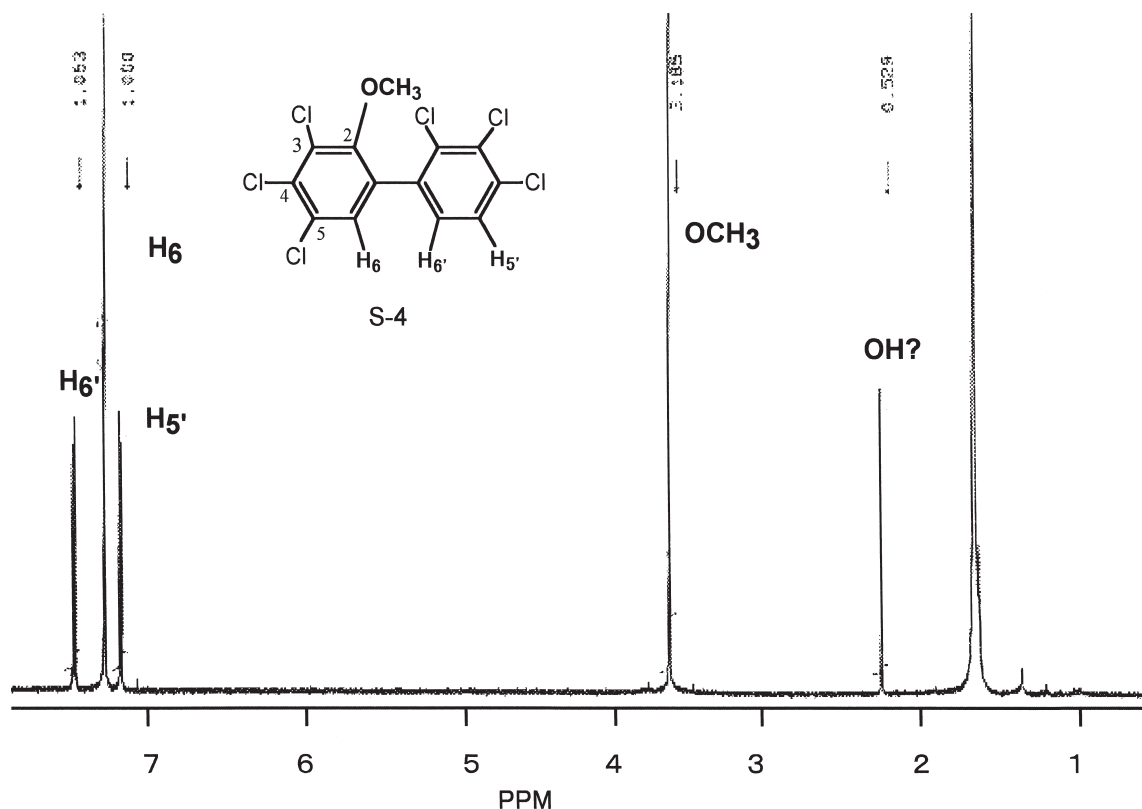


Fig. 4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the synthetic S-4.

加し、一方、MC 処理によって減少する。これまでに、ピロリジジナルカロイド誘導体のセネシオン代謝⁶⁾、 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール代謝²⁵⁾、2,5,2',5'-および2,4,3',4'-四塩素化ビフェニル (TCB) の3-水酸化反応¹⁷⁾¹⁹⁾、CB153の水酸化反応³⁾などに関与することが明らかにされている。本研究でのP 450誘導剤前処理の結果から、モルモット肝ではCYP2B18が最も重要であると考えられる。なお、ラットではCYP2B1¹²⁾が、ハムスターではHPB-1(CYP2B)²⁰⁾が関与していると考えられるが、この点は今後の課題である。

Fig. 5にモルモット肝におけるCB138の推定代謝経路を示す。今回、M-4の化学構造が2-OH-3,4,5,2',3',4'-HCBであることが明らかとなった。これは2位の塩素が3位にNIH転位したことを示している。すなわち、代謝中間体として2,3-エポキシドを経由して生成されたものと考えられる。また、M-3はCB138の

3-OH体と推定されるが、この場合、直接水酸化あるいは2,3-エポキシド経由のいずれかの水酸化機構で生成されてくると考えられる。さらにM-1は2位の塩素が脱離し、代わりに一水酸化された構造であるが、これも2,3-エポキシドから生成されると考えられる。これまでに、Ariyoshiら¹²⁾はCB153のイヌ及びモルモットによる代謝を調べ、これら3種と同様な化学構造を有する代謝物を単離・同定し、さらに、これらの代謝物が中間体として2,3-エポキシドを経由して生成されることを初めて提唱した。

一方、M-2に関しては、3位あるいは5位が水酸化され、さらに塩素が1個脱離した構造であると推定されるが、2',3',4'-三塩素置換されたベンゼン環側が酸化されている可能性も残されている。最終的には、考えられるすべての予想代謝物を合成する必要があるが、この点は今後の課題である。

本研究のCB138やCB153の代謝パターンは、同じ

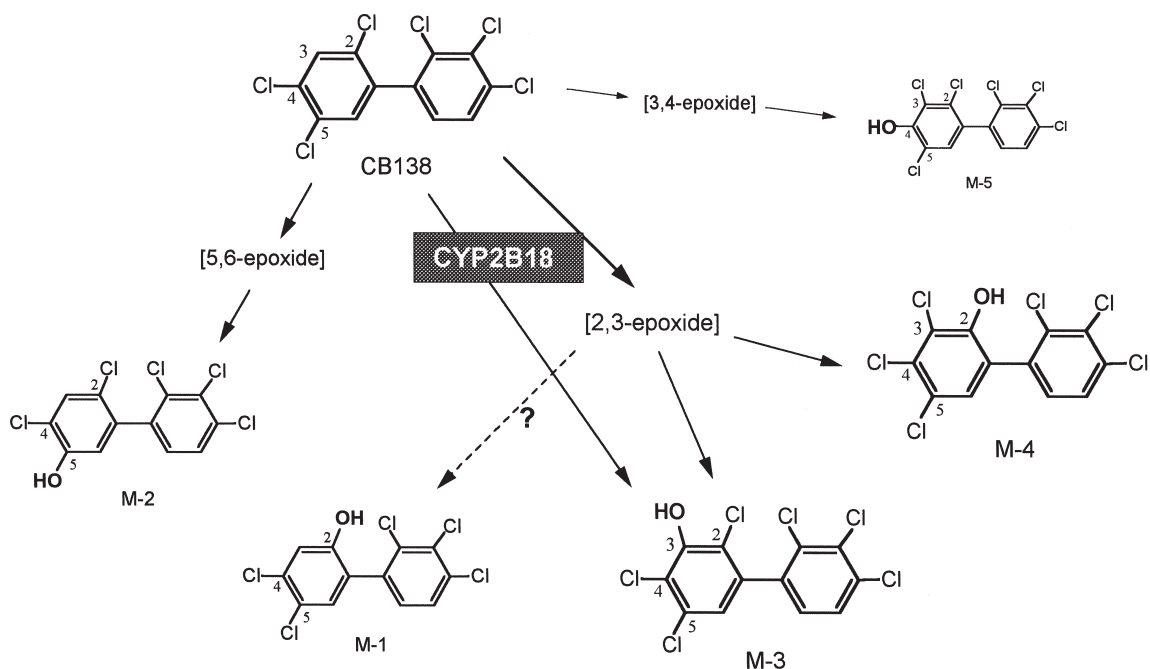


Fig. 5 Postulated metabolic pathways of CB138 in guinea pigs.

く2,4,5-三塩素置換のPCBである2,4,5,3',4'-PenCB (CB118)と異なっていた。Haraguchiら¹⁰⁾はCB118をラットに腹腔内投与後、糞中および血中の代謝物を調べ、主な糞中代謝物として3種類(4-OH-2,5,3',4'-TCB, 4-OH-2,3,5,3',4'-PenCBおよび4'-OH-2,4,5,3',5'-PenCB)を、また血中の主な代謝物として2種類(4-OH-2,3,5,3',4'-PenCBおよび4'-OH-2,4,5,3',5'-PenCB)を報告した。これらは3,4-エポキシドあるいは4',5'-エポキシドを代謝中間体として経由し、さらに4位あるいは4'位の塩素がNIH転位を起こして生成されたものと思われる。このような代謝パターンの違いが、現在のところ、何が原因か不明であるが、立体構造の違いにあると思われる。すなわち、CB138やCB153はdi-ortho-PCBであるが、CB118はmono-ortho-PCBであることから、2つのベンゼン環面の角度が大きく異なっている。または3',4'-二塩素置換ベンゼン環が重要であるのかもしれない。一方、CB118は、CB138やCB153と異なり、PB型およびMC型両方の薬物代謝酵素誘導能を有しているといわれる²⁷⁾。このようにPCBの構造はP450の触媒活性あるいは酵素誘導能と密接に関連しているよ

うである。

総 括

1. CB138のin vitro代謝を未処理、PBおよびMC前処理したラット、ハムスターおよびモルモット肝Msを用いて調べた。

2. モルモットにおいて、ラットやハムスターよりはるかに強い代謝活性が観察され、4種類の代謝物(M-1, M-2, M-3およびM-4)が生成された。これらの代謝物はいずれもモルモット未処理Msで生成され、PB前処理により4~5倍に増加した。

3. ラットおよびハムスターでは、いずれもPB前処理Msでのみ代謝物が生成された。これらはGCの保持時間から、ラットではM-3、ハムスターではM-1, M-3およびM-4であることが明らかとなった。これらの結果から、CB138の代謝にはPB誘導性のP450が強く関与していることが示唆された。

4. GC/MSの結果、PB前処理モルモット肝で生成された代謝物のうち、M-1とM-2はCB138から塩素が1個脱離し、さらに一水酸化されたものであること、また、M-3とM-4はCB138の一水酸化体であること

が判明した。さらにマスフラグメントパターンより、M-1 は 2-OH-4,5,2',3',4'-PenCB, M-2 は 5-OH-2,4,2',3',4'-PenCB, M-3 は 3-OH-2,4,5,2',3',4'-HCB, M-4 は 2-OH-3,4,5,2',3',4'-HCB と推定された。M-3 及び M-4 については別途合成した 3-OH-CB138 及び 2-OH-3,4,5,2',3',4'-HCB の GC/MS の結果と完全に一致した。

謝 辞

本研究は厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究)および科学研究費補助金(基盤研究(C)(2), No. 11672234)に一部負うものである。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下出和美さん、河野文香さんおよび重松久美さんに感謝します。

文 献

- 1) Ariyoshi N, Koga N, Oguri K and Yoshimura H: Metabolism of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl with liver microsomes of phenobarbital-treated dog; the possible formation of PCB 2,3-arene oxide intermediate. *Xenobiotica* 22: 1275-1290, 1992.
- 2) Ariyoshi N, Koga N, Yoshimura H and Oguri K: Metabolism of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) in guinea pig. *Xenobiotica* 27: 973-983, 1997.
- 3) 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.
- 4) Ballschmiter K, Rappe C and Buser HR: Chemical properties, analytical methods and environmental levels of PCBs, PCTs, PCNs and PBBs, In Kimbrough RD and Jensen AA (ed): *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products.* pp47-69, Elsevier, 1989.
- 5) Cadogan JIG: A convenient new method of aromatic arylation. *J. Chem. Soc.*: 4257-4258, 1962.
- 6) Chung WG, Miranda CL and Buhler DR: A cytochrome P4502B form is the major bioactivation enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig. *Xenobiotica* 25: 929-939, 1995.
- 7) 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.
- 8) Franchi E and Focardi S: Polychlorinated biphenyl congeners, hexachlorobenzene and DDTs in human milk in central Italy. *Sci. Total Environ.* 102: 223-228, 1991.
- 9) Haraguchi K, Athanasiadou M, Bergman A, Hovander L and Jensen S: PCB and PCB methyl sulfones in selected groups of seals from Swedish waters. *AMBIO* 21: 546-549, 1992.
- 10) Haraguchi K, Kato Y, Masuda Y and Kimura R: Hydroxylation and methylthiolation of mono-ortho-substituted polychlorinated biphenyls in rats: Identification of metabolites with tissue affinity. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 1508-1515, 1998.
- 11) Humphrey HE, Gardiner JC, Pandya JR, Sweeney AM, Gasior DM, McCaffrey RJ and Schantz SL: PCB congener profile in the serum of humans consuming Great Lakes fish. *Environ. Health Perspect.* 108: 167-172, 2000.
- 12) Ishida C, Koga N, Hanioka H, Saeki KE and Yoshimura H: Metabolism in vitro of 3,4,3',4'- and 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyls by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P-450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14: 276-284, 1991.
- 13) Jansson B and Sundstrom G: Mass spectrometry of the methyl ethers of isomeric hydroxychlorobiphenyls-potential metabolites of chlorobiphenyls. *Biomed. Mass Spectrom.* 1: 386-392, 1974.
- 14) 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.
- 15) Kannan N, Schulz-Bull DE, Petrick G, Duinker JC, Macht-Hausmann M and Wasserman O: Toxic chlorobiphenyls in adipose tissue and whole blood of an occupationally/accidentally exposed man and the general population. *Arch. Environ. Health* 49: 375-383, 1994.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.

19) 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: 1895-1904, 1998.

20) 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.

21) 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.

22) 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.

23) 古賀信幸, 吉村英敏: PCBと関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編: 油症研究 —30年の歩み—, pp 93-110, 九州大学出版会, 2000.

24) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人: 油症患者母乳及び血液中の全PCB異性体の分析. *福岡医誌* 90: 202-209, 1999.

25) Narimatsu S, Akutsu Y, Matsunaga T, Watanabe K, Yamamoto I and Yoshimura H: Immunochemical characterization of a cytochrome P450 isozyme and a protein purified from liver microsomes of male guinea pigs and their roles in the oxidative metabolism of delta 9-tetrahydrocannabinol by guinea pig liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1729-1736, 1992.

26) Oguri K, Kaneko H, Tanimoto Y, Yamada H and Yoshimura H: A constitutive form of guinea pig liver cytochrome P450 closely related to

phenobarbital inducible P450b (e). *Arch. Biochem. Biophys.* 287: 105-111, 1991.

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.-A study of structure-activity relationships. *J. Biol. Chem.* 258: 5967-5976, 1983.

28) Prachar V, Veningerova M, Uhnak J and Kovacicova J: Polychlorinated biphenyls in mother milk and adapted cow's milk. *Chemosphere* 29: 13-21, 1994.

29) Roots O and Talvari A: Bioaccumulation of toxic chlororganic compounds and their isomers into the organism of Baltic grey seal. *Chemosphere* 35: 979-985, 1997.

30) Schnellmann RG, Vickers AEM and Sipes IG: Metabolism and disposition of polychlorinated biphenyls. *Biochem. Toxicol.* 7: 247-282, 1985.

31) Serrano R, Fernandez M, Rabanal R, Hernandez M and Gonzalez MJ: Congener-specific determination of polychlorinated biphenyls in shark and grouper livers from the northwest African Atlantic Ocean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 217-224, 2000.

32) Sonzogni W, Maack L, Gibson T, Degenhardt D, Anderson H and Fiore B: Polychlorinated biphenyl congeners in blood of Wisconsin sport fish consumers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 56-60, 1991.

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

34) Yamada H, Kaneko H, Takeuchi K, Oguri K and Yoshimura H: Tissue-specific expression, induction, and inhibition through metabolic intermediate-complex formation of guinea pig cytochrome P450 belonging to the CYP2B subfamily. *Arch. Biochem. Biophys.* 299: 248-254, 1992.

(受付 1999-3-16)

Effect of Dioxins in Mother's Milk on Sister Chromatid Exchange Frequency in Infant Lymphocytes

Junya NAGAYAMA and Mayumi NAGAYAMA

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

Takao IIDA, Hironori HIRAKAWA and Takahiko MATSUEDA

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

Takashi YANAGAWA

*Department of Mathematical Statistics, Graduate School of Mathematics,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581*

Jun'ichiro FUKUSHIGE

Fukuoka Children's Hospital, Fukuoka 810-0063

Abstract Sister chromatid exchange (SCE) frequency which was an index to the synthetic and sharp genetic toxicity was examined using the infant lymphocyte cells around postnatal of 1 year. SCE frequency as the control culture which was treated with the solvent, DMSO, alone (SCE_{control}) was $8.2 \pm 0.9/\text{cell}$ and as cultured with 7,8-benzoflavone (ANF) (SCE_{ANF}) was $11.8 \pm 1.4/\text{cell}$. In addition, the difference of SCE_{ANF} and SCE_{control} , namely, Δ SCEs became $3.6 \pm 1.3/\text{cell}$.

The concentration of the dioxins in the mother's milk, which had taken by the infants, in the 2~4 month postpartum was 0.95 ± 0.51 pg-TEQ/g in the male infants, and 0.97 ± 0.48 pg-TEQ/g in the female ones. The sex difference could not be recognized in contamination levels of the dioxins in mother's milk.

The SCE frequency of the infant lymphocytes was examined in order to evaluate the genetic toxicity of the dioxins which had contaminated mother's milk. As the result, either the SCE frequencies or Δ SCEs did not show any significant correlation to the dioxins. Therefore, the dioxins were considered not to induce the genetic toxicity such as the SCEs at the present levels of pollution in Japanese mother's milk around postnatal of 1 year.

Introduction

Although the humans have been contaminated by various chemical compounds²⁰⁾, the pollution by the dioxins (polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls) of which the toxicity is extremely high has been particularly noticed^{16)~18)}. Prenatal and suckling stages of which the differentiation and growth are

remarkably fast and, therefore, the sensitivity to the hazardous chemicals seems to be the highest. We have already carried out lots of research from this viewpoint, and a large number of worthwhile knowledge has been obtained^{10)~12)19)}.

In the meantime, the formation mechanism of sister chromatid exchanges (SCEs) has not been well clarified yet at the present. SCEs, however, seem to be a good index to the synthetic

and sharp genetic toxicity for several chemical compounds⁶⁾⁷⁾²³⁾²⁶⁾. We also have been carried out several researches from this point of view, and a much important knowledge has been acquired¹³⁾¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾.

That the mother's milk has been contaminated with the dioxins is due to their pollution of the mother's body, and the chemical substance of this species will contaminate the foetus and infant through the placenta and from the mother's milk, respectively. In this research, the relationship between the SCE frequency of the infant lymphocytes around postnatal of 1 year and level of the dioxins in mother's milk was statistically investigated in order to evaluate their genetic toxicity to the next human generation.

Materials and Methods

Fifty to 100 ml of mother's milk at the postpartum period of 2~4 month were collected from 124 healthy mothers, mean age: 29 years old and the range: 22~41 years old, in July ~ October, 1994, June ~ October, 1995 and June ~ October, 1996. These samples of the mother's milk were analyzed for the dioxins by HRGC-HRMS technique using a Finnigan MAT-95 mass spectrometer (Germany) directly interfaced with Varian Model 3400 gas chromatograph⁵⁾⁸⁾²¹⁾.

Toxic equivalent (TEQ) concentrations of the dioxins were calculated by using 1998 WHO TEF values²⁴⁾. TEQ-sum of all congeners of the dioxins determined in the milk samples was summarized as the total 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) TEQ concentration or level.

Five to 10 ml of the peripheral blood of 105 infants (60 males and 45 females with the mean age of 10 months old) born of these mothers were individually obtained by venipuncture in

January ~ March of 1995, 1996 and 1997. Among them, SCE frequency of the lymphocytes was measured in 64 infants.

Lymphocytes in the whole blood were stimulated with phytohemagglutinin and cultured for two replicative cycles in the presence of bromodeoxyuridine (100 μ M) as detailed elsewhere¹³⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. Differential staining of sister chromatids was obtained by a fluorochrome plus Giemsa technique and the frequency of SCEs was evaluated.

Relationship between control, solvent (DMSO) treated, SCE frequency (SCE_{control}), 7,8-benzoflavone (ANF) treated SCE frequency (SCE_{ANF}) or Δ SCEs (SCE_{ANF}-SCE_{control}) and the dioxins levels in mother's milk was statistically examined by Spearman rank correlation method.

Results

1) SCE frequency of the lymphocytes in the blood of infants

The frequency distribution of SCE_{control}, SCE_{ANF} and Δ SCEs of lymphocytes in the blood of infants is shown in Fig. 1. The mean value of SCE_{control} was 8.2/cell, and minimum and maximum ones were 6.6/cell and 10.4/cell, respectively. The average value of SCE_{ANF} was 11.8/cell, and the range was 9.3/cell~14.7/cell. The mean of Δ SCE was 3.6/cell, and respective values of minimum and maximum were 0.7/cell and 6.1/cell.

2) Contamination of the dioxins in mother's milk

The distribution of the contamination levels of the dioxins in the mother's milk is indicated in Fig. 2, dividing into male and female infants. In case of the male infants, the average concentration was 0.95 pg-TEQ/g, and the lowest and highest ones were 0.23 pg-TEQ/g and 2.92 pg-

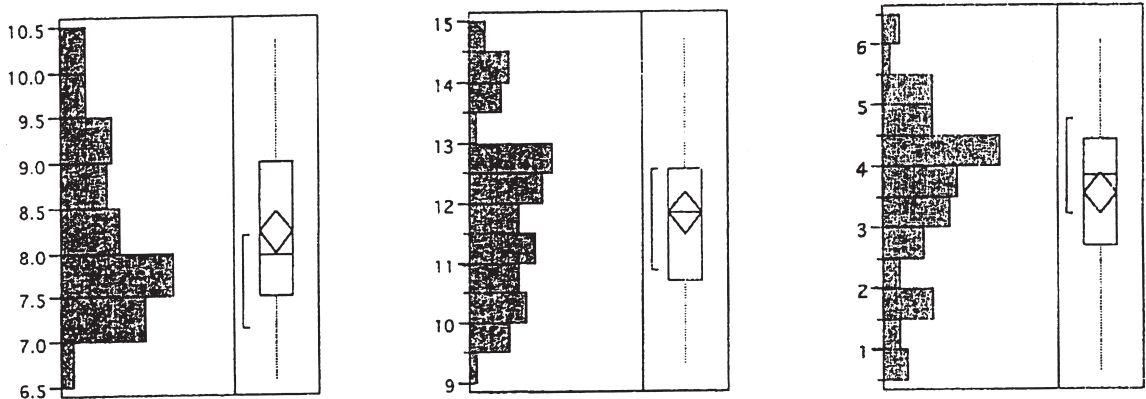


Fig. 1 Frequency distribution of $SCE_{control}$, SCE_{ANF} and Δ SCEs in lymphocytes of infants
left: $SCE_{control}$, middle: SCE_{ANF} , right: Δ SCEs

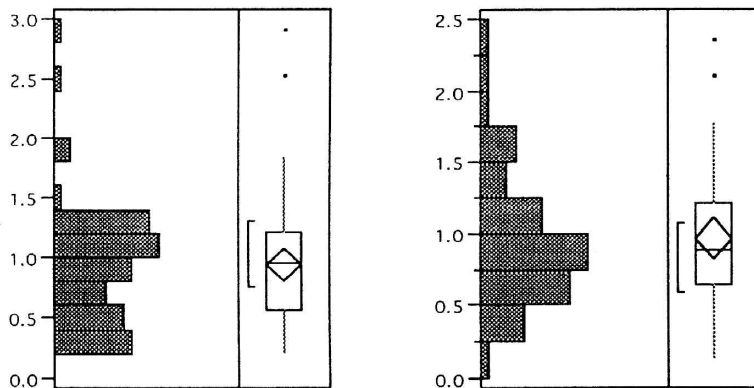


Fig. 2 Distribution of concentrations of the dioxins in the mother's milk
left: male, right: female

TEQ/g, respectively. The mean level in the female infants was 0.97 pg-TEQ/g with the range of 0.15~2.37 pg-TEQ/g. The average contamination level was a little higher in the female infants than in the male ones, and both their minimum and maximum levels were lower in the female infants than in the male ones. We could not find any significant difference between the male and female infants in contamination levels of the dioxins in the mother's milk.

3) SCE frequency of the lymphocytes and levels of the dioxins in mother's milk

The relationship between the frequency of $SCE_{control}$, SCE_{ANF} or Δ SCEs in the lymphocytes of infants and the concentration of the dioxins in mother's milk is shown in Fig. 3.

We could not find any significant correlation of the dioxins levels with the frequency of $SCE_{control}$, SCE_{ANF} or Δ SCEs in the infants around postnatal of 1 year.

Discussion

There is no fixed conclusion yet concerning whether the frequency of SCEs is affected by an

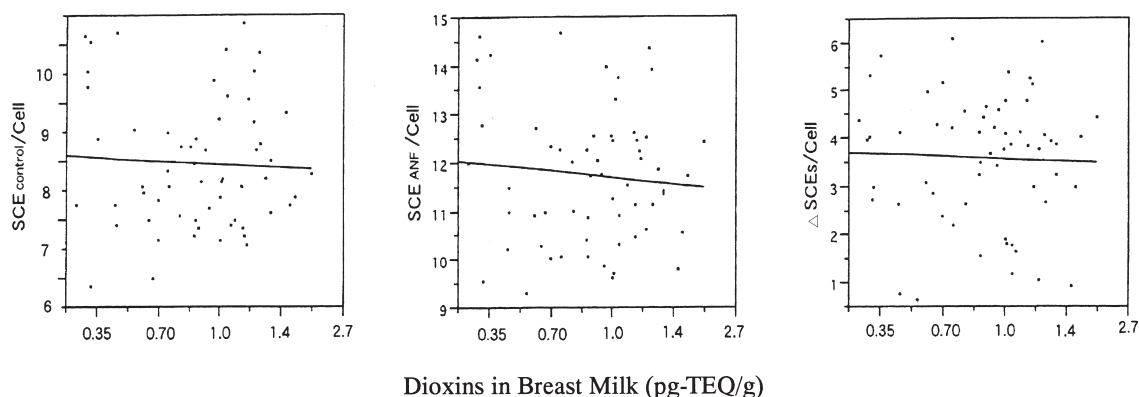


Fig. 3 Relationship between the dioxins in mother's milk and frequencies of $SCE_{control}$, SCE_{ANF} or Δ SCEs
 $SCE_{control}$: $p=0.69$, SCE_{ANF} : $p=0.45$, Δ SCEs: $p=0.78$

aging or not. In some researches, it has been shown that the SCE frequency in human lymphocytes was significantly increased with an age³⁾²²⁾²⁵⁾, and in others not¹⁾⁴⁾⁹⁾. In our studies, frequencies of both $SCE_{control}$ and SCE_{ANF} in human lymphocytes at 20~64-year-old people were clearly enhanced with age¹⁵⁾¹⁶⁾. In these two researches, average frequencies of $SCE_{control}$ and SCE_{ANF} were 10.1/cell and 13.6/cell, respectively. In SCE frequency of this study, the former was 8.2/cell, and the latter 11.8/cell, which were apparently lower than the respective values in our previous investigations. Based on these findings, it seems the SCE frequency probably increased with age.

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

Similarly to the results reported before⁵⁾⁸⁾²¹⁾, the average concentration of the dioxins in mother's milk was also about 1 pg-TEQ/g in

this research. The mean value of estimated intake of dioxins through mother's milk is considered to be 120 pg-TEQ/kg body weight, assuming that the infant of our country takes 120 g of mother's milk per 1kg body weight. Therefore, infants take 30 times more the dioxins from mother's milk on average than the tolerable daily intake of dioxins in our country, that is, 4 pg-TEQ/kg body weight. Although the lactation is about 1 year, and not a so long period, it is apprehended whether or not the relatively high intake of the dioxins during breast-feeding may cause some ill effects upon infant's health^{10)~12)19)}.

Then, SCE frequency of the infant lymphocytes was statistically analyzed in this research in order to evaluate the genetic toxicity of the dioxins in mother's milk. As the result, the dioxins of mother's milk did not indicate any significant correlation to the frequencies of $SCE_{control}$, SCE_{ANF} or Δ SCEs. From these findings, the dioxins seemed not to show the genetic toxicity such as the induction of SCEs in the lymphocytes at the current levels of contamination in Japanese mother's milk around postnatal of 1 year.

This investigation, however, was carried out with rather small number of infants, so in order to get more conclusive results for their SCE induction or genetic toxicity, further large-scale studies are needed.

References

- 1) Bender MA, Preston RJ, Leonard RC, Pyatt BE and Gooch PC : Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. II. Extension of age range. *Mutat. Res.* 212 : 149-154, 1989.
- 2) Das BC, Rani R, Mitra AB and Luthra UK : Baseline frequency of sister-chromatid exchanges (SCE) in newborn lymphocytes and its relationship to in vivo aging in humans. *Mutat. Res.* 144 : 85-88, 1985.
- 3) Dutkowski RT, Lesh R, Staiano-Coico L, Thaler H, Darlington GJ and Weksler ME : Increased chromosomal instability in lymphocytes from elderly humans. *Mutat. Res.* 149 : 505-512, 1985.
- 4) Hirsh BA, Sentz KK and McGue M : Genetic and environmental influences on baseline SCE. *Environ. Mol. Mutagen.* 20 : 2-11, 1992.
- 5) Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Takenaka S and Nagayama J : Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds in breast milk of Japanese primiparas and multiparas. *Chemosphere* 38 : 2461-2466, 1999.
- 6) Latt SA : Sister chromatid exchange formation. *Ann. Rev. Genet.* 15 : 11-55, 1981.
- 7) Latt SA, Allen JW, Shuler L, Loveday KS and Munrow SH : The detection and induction of sister chromatid exchange (INC-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology). *Mol. Hum. Cytogenet.* XII. 315-334, 1977.
- 8) Matsueda T, Iida T, Hirakawa H, Fukamachi K, Tokiwa H and Nagayama J : Toxic evaluation of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in breast-fed babies of Yusho and healthy mothers. *Chemosphere* 27 : 187-194, 1993.
- 9) Musilova J, Michalova K and Pacovsky V : Induction of sister chromatid exchanges by mitomycin C in lymphocytes of young and old human donors. *Gerontology* 30 : 365-370, 1984.
- 10) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T and Watanabe T : Effects of exposure to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins through human milk on total development in 10-month-old Japanese infants. *Organohal. Comp.* 48 : 240-243, 2000.
- 11) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T and Watanabe T : Developmental condition in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 48 : 244-247, 2000.
- 12) Nagayama J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T : Condition of thyroid hormone system in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 48 : 236-239, 2000.
- 13) 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.
- 14) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Comparison of frequency of sister chromatid exchanges and contamination level of dioxins and related chemicals in healthy Japanese and "Yusho" patients. *Organohal. Comp.* 44 : 31-35, 1999.
- 15) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Effects of donor age on frequency of sister chromatid exchanges and accumulation of dioxins and related chemicals in healthy Japanese. *Organohal. Comp.* 44 : 197-200, 1999.
- 16) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Effects of donor age and contamination level of dioxins and related chemicals on frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes cultured in vitro. *Chemosphere* in press.
- 17) Nagayama J, Nagayama M, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Ohki M and Tsuji H : Comparison between "Yusho" patients and healthy Japanese in contamination level of dioxins and related chemicals and frequency of sister chromatid exchanges. *Chemosphere* in press.
- 18) Nagayama J, Tsuji H, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T and Ohki M : Effects of contamination level of dioxins and related chemicals on thyroid

hormone and immune response systems in patients with "Yusho". *Chemosphere* in press.

19) Nagayama J, Tsuji H, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti ET, Yanagawa T, Fukushige J and Watanabe T : Condition of helper and suppressor T lymphocyte subpopulations in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohal. Comp.* 49 : 87-90, 2000.

20) Nagayama J, Tsuji H and Takasuga T : Comparison between brominated flame retardants and dioxins or organochlorine compounds in blood levels of Japanese adults. *Organohal. Comp.* 48 : 27-30, 2000.

21) Nakagawa R, Hirakawa H, Iida T, Matsueda T and Nagayama J : A study on maternal body burden by organochlorine pesticides and dioxins. *J. AOAC International* 82 : 716-724, 1999.

22) Sarto F, Faccioli MC, Cominato I and Levis AG : Aging and smoking increase the frequency of sister-chromatid exchanges (SCE) in man. *Mutat.*

Res. 144 : 183-187, 1985.

23) Stetka DG and Wolff S : Sister chromatid exchanges as assay for genetic damage induced by mutagens-carcinogens II. In vitro test for compounds requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 41 : 343-350, 1976.

24) Van den Berg M, Birnbaum LS, Bosveld ATC, Brunstorm B et al. : Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106 : 775-792, 1998.

25) Wen WN, Liew TL, Wu SW and Jan KY : The effect of age and cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocytes cultured in vitro. *Mech. Ageing Dev.* 21 : 377-384, 1983.

26) Wolff S : Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and the lesions that produce them. In Wolff S (ed) : *Sister Chromatid Exchange*. pp. 41-57, Wiley, New York, 1982.

(Received for publication March 16, 2001)

(和文抄録)

乳児のリンパ球細胞における姉妹染色分体交換頻度への 母乳のダイオキシン類の影響

九州大学医療技術短期大学部環境科学研究室

長山 淳哉・長山 真弓

福岡県保健環境研究所

飯田隆雄・平川博仙・松枝隆彦

九州大学大学院数理学研究室

柳 川 堯

福岡市立こども病院

福 重 淳 一 郎

総合的で、鋭敏な遺伝毒性の指標である姉妹染色分体交換 (Sister chromatid exchanges, SCEs) 頻度を生後1年前後の乳児の血液リンパ球細胞を用いて調べた。溶媒のみ処理した、対照群の SCE 頻度 ($SCE_{control}$) は 8.2 ± 0.9 /細胞であり、7,8-ベンゾフラボン (ANF) 処理した場合の SCE 頻度 (SCE_{ANF}) は 11.8 ± 1.4 /細胞であった。また、両者の差、つまり、 ΔSCE ($SCE_{ANF} - SCE_{control}$) は 3.6 ± 1.3 /細胞となった。

これらの乳児が飲んだ産後2~4ヶ月の母乳を汚染しているダイオキシン類(PCDDs, PCDFs お

よび Co-PCBs) の濃度は、男児では 0.95 ± 0.51 pg-TEQ/g, 女児では 0.97 ± 0.48 pg-TEQ/g であり、汚染レベルの性差は認められなかった。

母乳を汚染しているダイオキシン類の遺伝毒性を評価するために、乳児の血液リンパ球細胞の SCEs 頻度との関連性を調べた。その結果、ダイオキシン類はいずれの SCEs 頻度とも有意の関連性を示さなかった。このことから、母乳を汚染しているダイオキシン類は生後1年前後の乳児の血液リンパ球細胞の SCEs を誘発するような遺伝毒性を生じないと考えられた。

カネミ油症検診者における血清 CK 上昇の意義 —— ラット筋細胞膜の Freeze fracture 法による変化 ——

長崎大学医療技術短期大学部
吉村 俊朗・沖田 実
長崎大学第一内科
中尾 洋子・福田 卓・藤本 武士

Influential Factors in the Elevation of Serum Creatine Phosphokinase for the Patients with Kanemi Yusho —— Freeze Fracture Study of Rat Muscle Plasmamembrane ——

Toshiro YOSHIMURA and Minoru OKITA
School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852-8520
Yoko NAKAO, Taku FUKUDA and Takeshi FUJIMOTO
First Department of Internal Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852-8102

Abstract We studied the factors of the elevation of serum creatin phosphokinase (CK) using the data from the routine medical checkup of Kanemi Yusho patients during 1995 and 1999. We also studied rat muscle plasmamembrane by the freeze fracture method, which were given the polychlorinated biphenyls (PCB) and controls. The patients with elevation of serum CK showed significant elevation of PCB in their blood but not in polychlorinated quaterphenyls (PCQ). The rat muscle plasmamembrane showed a slight increase of orthognal array density but it was not statistically significant. The densities of caveolae and particles were not changed. Accordingly, PCB were thought to be a factor in the elevation of CK in the serum.

1. はじめに

血清クレアチン・ホスフォカイネース（以下、血清 CK）の上昇がカネミ油症検診者の約 20% に認められる¹³⁾¹⁴⁾。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る⁹⁾。そして、血中 polychlorinated biphenyls (PCB) 濃度高値が血清 CK 上昇の要因の一つである可能性を報告してきた¹³⁾。今回、カネミ油症検診者の血中の PCB 濃度、polychlorinated quaterphenyls (PCQ) 濃度と血清 CK 上昇の関係を調査し、併せて、ラットに PCB を投与し、筋細胞膜の変化の有無を freeze fracture 法を用いて検討した。

2. 検診データについて

1) 対象

平成 7 年～11 年までのカネミ油症検診者のうち血清 CK を測定できた延べ 502 名（内訳：平成 7 年 84 名、平成 8 年 101 名、平成 9 年 97 名、平成 10 年 107 名、平成 11 年 107 名）を対象とした。

2) 方法

血清 CK 値を基に正常群（CK < 198 IU/I）と上昇群（CK ≥ 198 IU/I）の 2 群に分け、血中の PCB 濃度、PCQ 濃度を比較した。統計処理は対応のない Student の t 検定を用い、有意水準は 5% 未満とした。

3) 結果

血清CK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%),平成10年度14名(13.1%),平成11年度8名(7.5%)で、5年間の延べ数では70名(14.1%)だった(Fig. 1, Table 1).

正常群に比べ上昇群では血中PCB濃度は有意に上昇していたが(Fig. 2, 3), PCQ濃度には2群間で有意差を認めなかった(Fig. 4, 5).

3. 動物実験について

1) 方法

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100mg/mlの分量で溶解し、ラット用ゾンデ針を用いて1回あたり0.15ml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0.15mlずつ増やし、延べ8週間投与

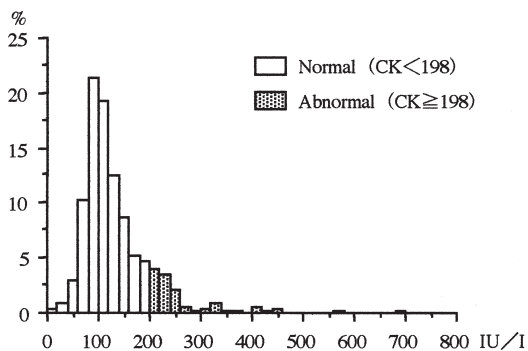


Fig. 1 Histogram of serum CK in Kanemi Yusho patients.

Table 1 Rates of abnormal serum CK among each year.

Year	Rates of abnormal CK Number (%)
1995 (n= 84)	17 (20.2%)
1996 (n=101)	21 (20.8%)
1997 (n= 97)	10 (10.3%)
1998 (n=107)	14 (13.1%)
1999 (n=107)	8 (7.5%)
Total (n=496)	70 (14.1%)

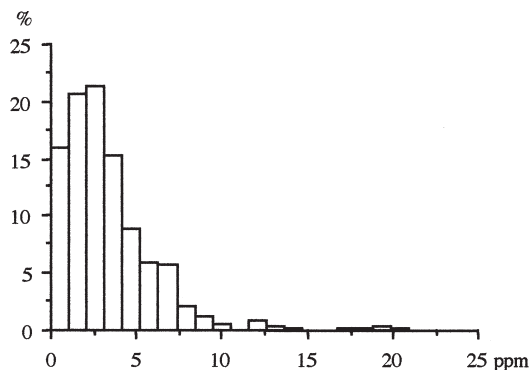


Fig. 2 Histogram of serum concentration of PCB.

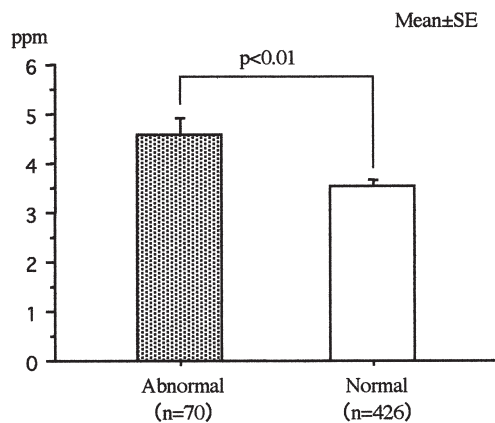


Fig. 3 Comparison of concentration of PCB between abnormal and normal CK.

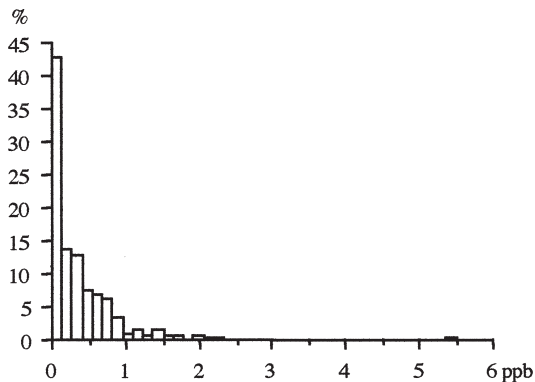


Fig. 4 Histogram of serum concentration of PCQ.

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を8週間経口投与した。実験終了後は、エーテル麻酔下で一侧の長趾伸筋 (Extensor digitorum longus muscle, EDL) とヒラメ筋 (Soleus muscle) を摘出し、凍結切片作製後、H & E 染色し筋線維直径を計測した。また、他側の長趾伸筋とヒラメ筋は3%グルタルアルデヒドに固定した後、徐々に30%グリセリンに浸漬した。液体窒素で急速凍結後、JFD7000 (JEOL) で凍結割断し、電子顕微鏡にて検鏡・写真撮影した。そして、筋細胞膜のCaveolaeとOrthogonal arrayの密度、およびParticleの密度を計測した。

2) 結果

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。

長趾伸筋の平均筋線維直径はPCB投与群 47.2 ± 13.0 μm 、対照群 54.9 ± 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 ± 11.1 μm 、対照群 64.0 ± 13.4 μm で2群間で有意差を認め、両筋ともPCB投与群の筋線維直径は縮小していた (Fig. 6)。長趾伸筋、ヒラメ筋のH & E所見では変性、壊死も認めない。

Freeze fracture法での筋細胞膜のP面を示す (Fig. 7)。Caveolae密度は、PCB投与群で減少も増加も認め

なかった (Fig. 8)。Orthogonal array密度は密度の高い線維が増加していた (Fig. 9)。しかし、Particle密度には長趾伸筋およびヒラメ筋ともにPCB投与群に変化を認めなかった (Table 2)。

4. 考 案

検診データからは、血清CKの上昇には、従来から報告しているように血中のPCB濃度が関連している可能性が示された。一般に、血清CKはその95%以上が筋組織に由来し、筋組織障害の指標として知られている。また、PCBは血中の甲状腺ホルモンを低下させるとの報告があり³⁾⁴⁾⁸⁾¹¹⁾、血清CKの上昇をもたらす可能性を考え検討したが、甲状腺ホルモン濃度と血清CKの関係はなかった¹²⁾。正常人でも過度の運動負荷により血清CKの上昇が認められ¹⁾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。そのため、今回は、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。その結果、PCB投与により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に筋線維直径は縮小し、筋組織への影響も推測された。

カネミ油症患者において血中PCB濃度高値が、血清CKの上昇し易い状態に関与している可能性があり、その原因として筋細胞膜の変化によるものと考え、ラットにPCBを投与し筋細胞膜の形態変化をfreeze fracture法で観察した。PCB投与下での末梢神経のシュワン細胞のCaveolae密度は増加していたが¹²⁾、筋細胞膜ではCaveolae密度、Particle密度に変化を

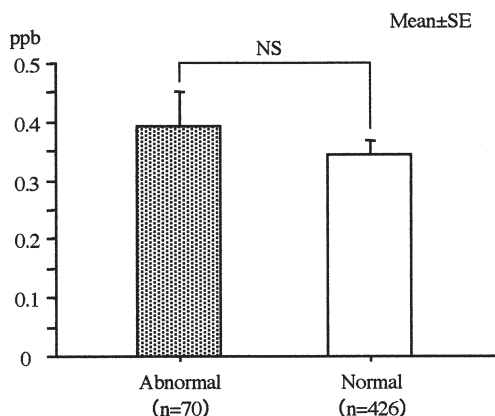


Fig. 5 Comparison of concentration of PCQ between abnormal and normal CK.

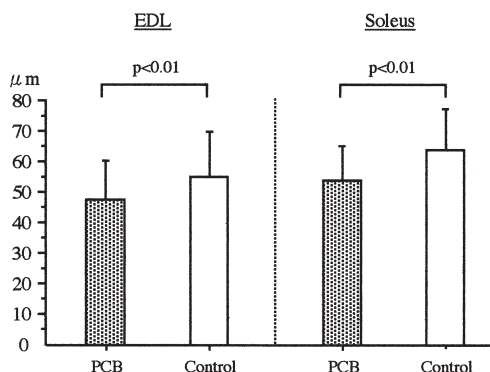


Fig. 6 Means of muscle fiber diameters for PCB and control groups.

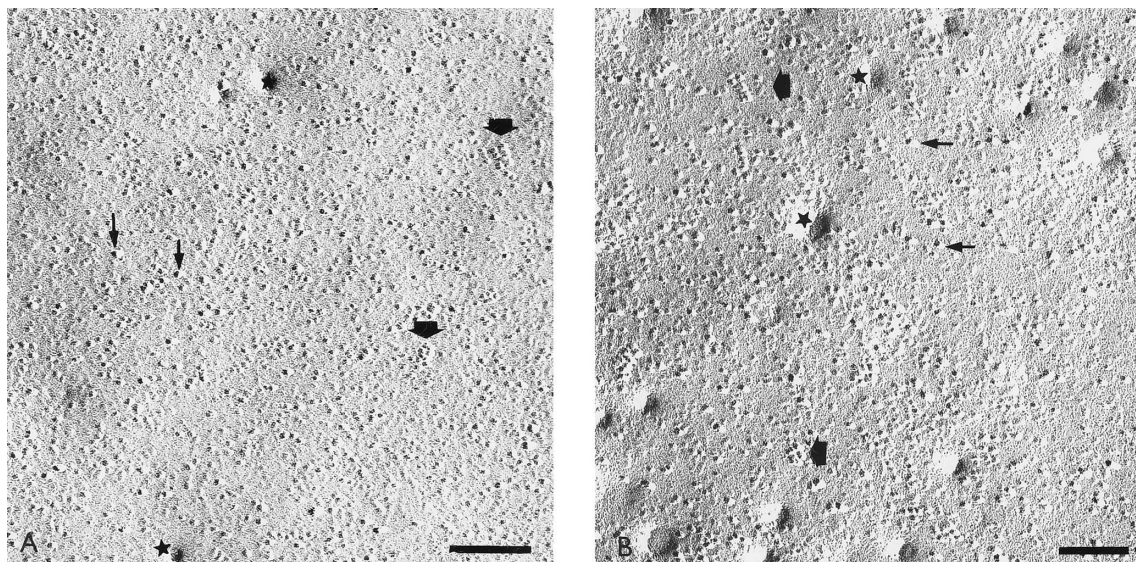


Fig. 7 P face muscle plasmamembrane in PCB (A) and control (B).
 ← ; particle ◀ ; orthogonal ★ ; caveolae Bar=100 nm.

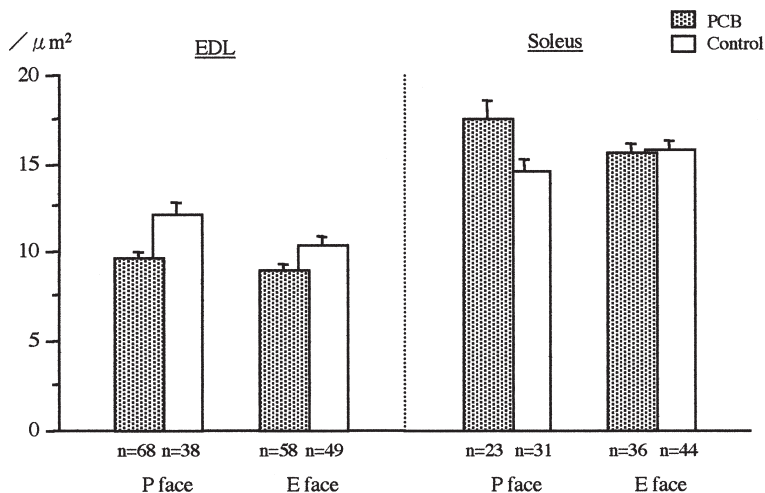


Fig. 8 Caveolae Density.

認めず, Orthogonal array 密度のみが長趾伸筋, ヒラメ筋ともに増加している可能性が示唆された. Caveolae は pinocytotic vesicle, もしくは筋細胞膜の reserve として作用していると考えられ, particle は glycoprotein と考えられている. Orthogonal array の働きは未だ不明だが, 膜内での物質輸送に関与していることが推測され, 虚血のアストロサイトや高ケトン血症での筋細胞膜で増加する²⁾⁵⁾⁶⁾. すなわち, PCB 投与により筋細胞膜のエネルギー代謝に変化が生じて血

清 CK が上昇することも推定される.

5. 総括

カネミ油症検診者で認められた CK 上昇の要因の一つは血中 PCB 濃度である可能性を報告してきた. カネミ油症検診者の血中 PCB 濃度は CK 上昇群で有意に高値であった. しかし, PCQ 濃度は有意差を認めなかった. ラットを用いた動物実験では, PCB 投与群の筋線維直径は縮小し, 筋細胞膜の freeze fracture 法で

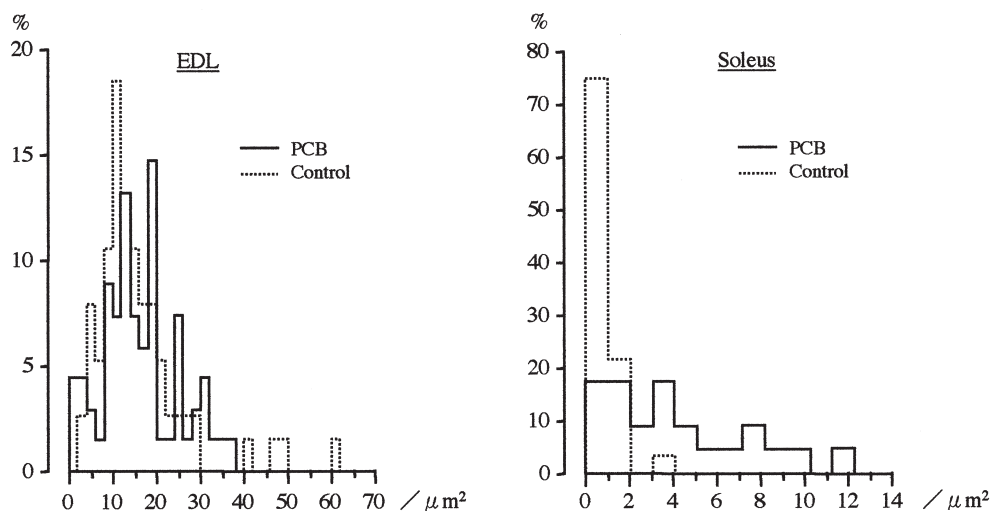


Fig. 9 Histograms of orthogonal array density.

Table 2 Particle density.

	E face		P face	
	PCB	Control	PCB	Control
EDL (μm^2)	907 ± 348 (n=53)	920 ± 344 (n=41)	2358 ± 640 (n=59)	2421 ± 323 (n=27)
Soleus (μm^2)	886 ± 289 (n=34)	871 ± 255 (n=29)	2780 ± 401 (n=18)	2423 ± 748 (n=30)

は Orthogonal array 密度が高い筋線維がやや増加した。しかし、Particle 密度と Caveolae 密度には対照群と差を認めなかった。PCB の機序は不明だがカネミ油症検診者の CK 上昇に関与していると考えられる。

6. 参 考 文 献

- 1) Aizawa H, Morita K, Minami H, Sasaki N and Tobise K: Exertional rhabdomyolysis as a result of strenuous military training. *J Neurol Sci* 132: 239-240, 1995.
- 2) Gotow T: Cytochemical characteristics of astrocytic plasma membranes specialized with numerous orthogonal arrays. *J Neurocyt* 13: 431-448, 1984.
- 3) Koopman-Esseboom C, Morse DC, Weisglas-Kuperus N, Lutkeschipholt IJ, Van der Paauw CG, Tuinstra LG, Brouwer A and Sauer PJ: Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone states of pregnant women and their infants. *Pediatr Res* 36: 468-473, 1994.

4) Kuipers H: Exercise -induced muscle damage. *Int J Sports Med* 15: 132-135, 1994.

5) Landis DM and Reese TS: Membrane structure in mammalian astrocytes: a review of freeze-fracture studies on adult, developing, reactive and cultured astrocytes. *J Experi Biol* 95: 345-348, 1981.

6) Lo WK and Harding CV: Square array and their role in ridge formation in human lens fibers. *J Ultrastruc Res* 86: 228-245, 1984.

7) Schneider CM, Denny 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, Wemer P and Rass 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, 上山裕文, 伊藤 聖, 後

藤公文, 末松貴史: Polychlorinated Biphenyls(PCB)の末梢神経髄鞘に及ぼす影響について. *福岡医誌* 88: 211-215, 1997.

13) 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.

14) 吉村俊朗, 沖田 実, 川副巧成, 中野治郎, 中尾洋子: カネミ油症検診者における血清クレアチンキナーゼ上昇の要因に関する検討. *福岡医誌* 90: 246-250, 1999.

(受付 2001-3-16)

Effects of a Highly Toxic Coplanar Polychlorinated Biphenyl, 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl on Intermediary Metabolism : Reduced Triose Phosphate Content in Rat Liver Cytosol

Yuji ISHII¹⁾, Harutoshi KATO, Megumu HATSUMURA, Takumi ISHIDA, Noritaka ARIYOSHI²⁾, Hideyuki YAMADA and Kazuta OGURI*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan

Abstract The effects of a highly toxic coplanar polychlorinated biphenyl, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB), on triose phosphate metabolizing enzymes were studied. Male Wistar rats received 25 mg/kg PenCB, i.p. At this dose the compound provokes a wasting syndrome. The activity of triose phosphate metabolizing enzymes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, glycerokinase, transaldolase and transketolase were significantly reduced by PenCB treatment to 50%, 60%, 50%, 70% and 40% of free-fed controls, respectively. An inhibition study with pyrazol, a specific inhibitor of alcohol dehydrogenase (ADH), showed that ADH makes about a 30% contribution to the formation of glycerol-3-phosphate from glyceraldehyde-3-phosphate. Our current study revealed that PenCB suppresses ADH at the protein expression level. The reduced formation of glycerol-3-phosphate from glyceraldehyde dehydrogenase by PenCB could be due to the suppression of ADH. The triose phosphate content in the liver cytosol of PenCB-treated rats was significantly lower than in free-fed controls. The suppression of triose phosphate metabolism could be a cause of the wasting syndrome provoked by highly toxic coplanar PCB.

Key words : triose phosphate, polychlorinated biphenyl, alcohol dehydrogenase, suppression, wasting syndrome

Introduction

Coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs[§]) are well known to be one of the causal agents of Yusho¹⁹⁾²²⁾²³⁾ and are widespread environmental pollutants¹³⁾. 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PenCB) is the most toxic congener of all PCBs³⁵⁾. The toxic effects of coplanar PCBs have been shown to be similar to that of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and are considered to occur via an Ah-receptor-mediated reaction³¹⁾, although the details are not fully understood. These toxic chlorinated aromatic hydrocarbons cause wasting syndrome in laboratory animals³¹⁾; however, the mechanism has

*To whom correspondence should be addressed : Prof. Kazuta Oguri, Ph. D. Fax : +81-92-642-6588. E-mail : oguri@xenoba.phar.kyushu-u.ac.jp

1) Present address : Department of Environmental Medicine, Institute of Community Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan

2) Department of Pharmacy, Chiba University Hospital, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba, 260-8670, Japan

§Abbreviations : polychlorinated biphenyl, PCB ; PenCB, 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl, TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin ; ADH, alcohol dehydrogenase ; phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK

not yet been elucidated.

Hypoglycemia is a well-documented effect when rats are treated with TCDD³⁶⁾ or PenCB²⁹⁾. This effect could be due to the reduced gluconeogenesis³⁴⁾. The key enzymes of gluconeogenesis, especially phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity, in rat liver are suppressed by TCDD- or PenCB-treatment²⁹⁾³⁴⁾. The mRNA level of PEPCK is also reduced by TCDD-treatment³³⁾. Although inhibition of gluconeogenesis had been considered to be one of the causes of wasting syndrome³⁴⁾, the detailed mechanism is still unclear and requires further study. There are some glucose donors such as glycogen, amino acids and glycerolipids, but glycogen could not be involved as a glucose donor since PenCB reduces food intake⁹⁾ which may involve the loss of liver glycogen stores. The other glucose donors are involved in the metabolism to triose phosphate. Our recent work shows that one of the triose phosphate metabolizing enzymes, aldolase B, in rat liver catalyzes the reversible cleavage of fructose 1,6-bisphosphate or fructose-1-phosphate to triose phosphate and is significantly suppressed by PenCB-treatment¹¹⁾.

Alcohol dehydrogenase (ADH) class I is a major isoform of ADH in liver cytosol¹²⁾. Although ethanol is a good substrate for ADH, the physiological function of the enzyme has not yet been elucidated. Current studies propose that ADH could be capable of catalyzing the dehydrogenation of steroid hormones⁶⁾, ω -oxidation of fatty acids³⁾, biosynthesis of bile acid from cholesterol³⁰⁾ and oxidation of retinol³¹⁾¹⁶⁾. It seems that the endogenous substrate of ADH remains to be identified. Our current study revealed that PenCB suppresses liver cytosolic ADH in rat at protein expression level¹⁵⁾. Recently, triose phosphate was suggested as a candidate endogenous substrate of ADH²⁴⁾.

In these circumstances, we hypothesized that utilization of triose phosphate could be an important factor in producing glucose during PenCB intoxication. However, we have only information about the effects on aldolase B. Some triose phosphate metabolizing enzymes catalyze the reversible metabolism of triose phosphate. In particular, triose phosphate could be formed via the pentose phosphate pathway. We have now focused on the effects of PenCB on the triose phosphate metabolizing enzymes, glyceraldehyde dehydrogenase, triose phosphate isomerase, transaldolase, and transketolase. Further, glycerokinase activity, which is involved in producing glycerol-3-phosphate, was also investigated. Then, the effect of PenCB on ADH and its involvement in triose phosphate metabolism was discussed. We describe here the reduced triose phosphate metabolism that could be one cause of the wasting syndrome provoked by highly toxic coplanar PCB.

Experimental Procedures

Materials

PenCB was synthesized by the method of Saeki et al.³⁷⁾. The purity of PenCB was confirmed to be at least 98% by GC using an electron-capture detector, MS, NMR and UV spectroscopy.

Animals and treatment

Male Wistar rats (3 weeks old), purchased from Charles River Japan (Tokyo, Japan), were housed in stainless-steel cages for one week prior to treatment. These rats were given PenCB at a dose of 25 mg/kg/4 ml corn oil, i.p. The dose of PenCB chosen was that which is known to suppress body weight gain and gluconeogenesis²⁹⁾. Free- and pair-fed animals were treated as described previously²⁹⁾. Each group consisted of 4 rats. Five days after

treatment, the livers were removed and cytosol prepared by the method of Andersson et al.¹¹.

Assays

ADH activity was determined as described by Lad et al.³⁸. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity was assayed by the method of Duggleby et al.⁷. Triosephosphate isomerase activity was measured according to Beisenherz². Glycerokinase activity was determined by the method of Bublitz et al.⁴. Transaldolase activity was measured according to Tchola et al.³⁹. Transketolase activity was determined as described by Kochetov¹⁷.

The formation of glycerol-3-phosphate from glyceraldehyde-3-phosphate or dihydroxyacetone phosphate was determined according to Fondy et al.⁸ and Sillero et al.³² with slight modifications as follows. The activity in liver cytosol was determined in the presence or absence of pyrazol, a specific inhibitor of alcohol dehydrogenase. The activity in the absence of pyrazol was considered as the total activity. The activity arising from alcohol dehydrogenase was determined from the difference between the activities assayed in the presence or absence of 10 mM pyrazol.

Deproteination of liver cytosol was performed as described by Karl et al.¹⁴. The dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate content of liver cytosol were assayed according to Minakami et al.²⁷.

The statistical significance of differences with respect to each control group was calculated by Student's *t*-test.

Protein was assayed by the method of Lowry et al.²¹ with bovine serum albumin as a standard.

Results

We have investigated the effects of PenCB on triose phosphate metabolism. Figure 1A shows

that glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity in liver cytosol of PenCB-treated group was significantly lower than that in free- and pair-fed controls. Approximate 50% of the activity of both controls was observed in the PenCB-treated group. Figure 1B shows that the triose phosphate isomerase activity in the liver cytosol of the PenCB-treated group was significantly lower than that in free- and pair-fed controls. Approximate 60% of the activity of both controls was observed in the PenCB-treated group. The effect of PenCB on glycerokinase activity is shown in Figure 1C. The glycerokinase activity in the liver cytosol of the PenCB-treated group was significantly lower than that of free- and pair-fed controls. Approximate 50% of the activity of free-fed controls and 30% of the activity of pair-fed controls was observed in the PenCB-treated group. The activity in pair-fed controls was markedly higher than that in free-fed controls. The elevated activity observed in the pair-fed controls could be due to the restricted food intake, since activity has been reported to be induced by starvation²⁰. Transaldolase and transketolase play a connecting role between anaerobic glycolysis and the pentose phosphate pathways. The transaldolase activity in the liver cytosol of PenCB-treated rats was significantly lower than that of both controls (Fig. 2). Approximate 70% of the activity of both controls was observed in the PenCB-treated group. The transketolase activity in the rat liver cytosol of PenCB-treated rats was markedly lower than that of both controls (Fig. 2). Approximate 40% of the activity of both controls was observed in the PenCB-treated group.

The ADH activity in rat liver was markedly reduced by PenCB-treatment (Fig. 3). Our current study suggested that PenCB suppresses ADH at protein expression level¹⁵. Taken

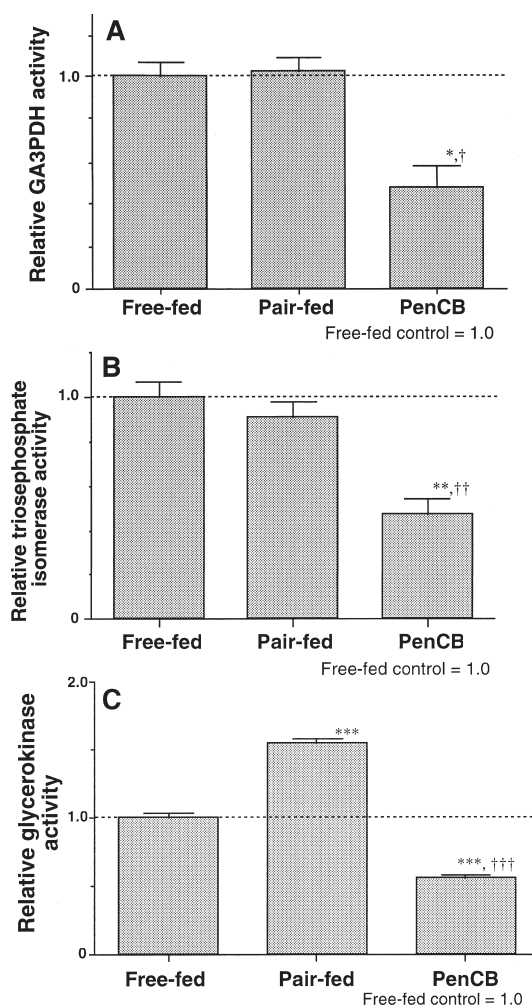


Fig. 1 Effect of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on the activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH) (A), triosephosphate isomerase (B) and glycerokinase in rat liver cytosol. The activity in the liver cytosolic fraction from free-fed control, pair-fed control and PenCB-treated rats was assayed according to Fondy et al.⁸⁾, Beisenherz²⁾ and Bublitz et al.⁴⁾, respectively. Each group consisted of 4 rats. The activity relative to that of the free-fed control group is shown (free-fed controls=1.0). The values represent the means±S.E. Significantly different from free-fed controls; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; Significantly different from pair-fed controls; †, $p < 0.05$; ††, $p < 0.01$; †††, $p < 0.001$. The GA3PDH, triosephosphate isomerase and glycerokinase activity in free-fed controls was 1.58 ± 0.17 , 1.92 ± 0.12 and 6.8 ± 0.2 (nmol/min/mg protein).

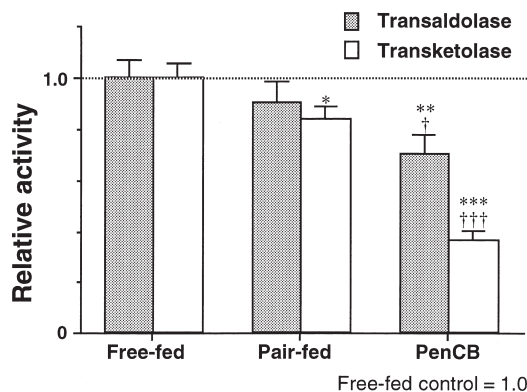


Fig. 2 Effect of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on transaldolase activity (closed bar) and transketolase activity (open bar) in rat liver cytosol. Transaldolase activity was measured according to Tchola et al.³⁹⁾. Transketolase activity was determined according to Kochetov¹⁷⁾. The activity in the liver cytosolic fraction from free-fed control, pair-fed control and PenCB-treated rats was assayed. Each group consisted of 4 rats. The activity relative to that of the free-fed control group is shown (free-fed controls=1.0). The values represent the means±S.E. Significantly different from free-fed controls; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; Significantly different from pair-fed controls; †, $p < 0.05$; †††, $p < 0.001$. The transaldolase and transketolase activity in free-fed controls was 24.57 ± 0.86 and 22.90 ± 1.21 (nmol/min/mg protein), respectively.

together, the suppression of ADH activity is due to a reduced protein expression of ADH. Recently, triose phosphate was suggested as an endogenous substrate for ADH²⁴⁾ and so we investigated the contribution of ADH to triose phosphate metabolism. The total formation activity of glycerol-3-phosphate was significantly reduced by PenCB-treatment (Fig. 4). Results of the activity of triose phosphate in the presence of pyrazol, a potent inhibitor to ADH, show that ADH may make a 30% contribution to the formation of glycerol-3-phosphate from

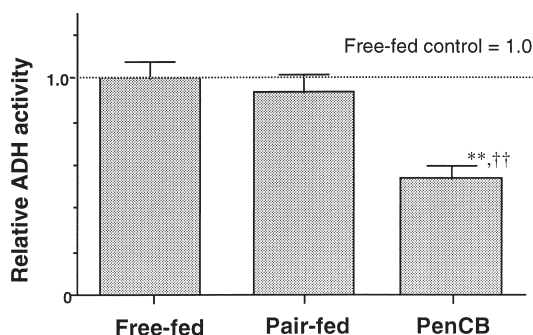


Fig. 3 Effect of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on alcohol dehydrogenase (ADH) in rat liver cytosol. ADH activity was assayed according to Lad et al.³⁸⁾ with ethanol as substrate. The activity in the liver cytosolic fraction from free-fed control, pair-fed control and PenCB-treated rats was assayed. Each group consisted of 4 rats. The activity relative to that of the free-fed control group is shown (free-fed controls=1.0). The values represent the means±S.E. Significantly different from free-fed controls; **, $p < 0.01$; Significantly different from pair-fed controls; ††, $p < 0.01$. The ADH activity in free-fed controls was 12.3 ± 1.9 (nmol/min/mg protein).

glyceraldehyde-3-phosphate, whereas it made a smaller contribution to the formation of glycerol-3-phosphate from dihydroxyacetone phosphate (Fig. 4).

Figure 5 compares the triose phosphate content in free-fed controls, pair-fed controls and the PenCB-treated group. The triose phosphate content in the PenCB-treated group was markedly lower than that in the free-fed controls. While that in the pair-fed controls was comparable with the PenCB-treated group, this was significantly lower than that of the free-fed controls. These data suggest that the reduced triose phosphate content could be due to the suppressed food intake caused by PenCB-treatment or a restricted food intake caused by pair-feeding.

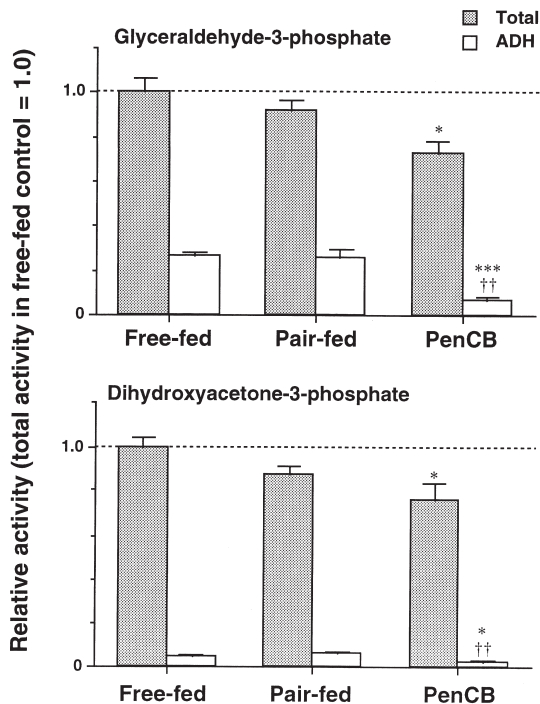


Fig. 4 Effect of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on the metabolism of glyceraldehyde-3-phosphate (upper panel) and dihydroxyacetone phosphate (lower panel) to glycerol-3-phosphate. Closed and open bars represent total activity and alcohol dehydrogenase (ADH) activity, respectively. Formation of glycerol-3-phosphate from glyceraldehyde-3-phosphate or dihydroxyacetone phosphate was determined according to Fondy et al.⁸⁾ and Sillero et al.³²⁾. The activity derived from ADH was determined from the difference in activity assayed in the presence or absence of 10 mM pyrazol. The activity in the liver cytosolic fraction from free-fed control, pair-fed control and PenCB-treated rats was assayed. Each group consisted of 4 rats. The activity relative to that of the free-fed control group is shown (free-fed controls=1.0). The values represent the means±S.E. The total activity in free-fed controls toward glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate was 198 ± 12 and 898 ± 34 (nmol/min/mg protein), respectively. Significantly different from free-fed controls; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; Significantly different from pair-fed controls; ††, $p < 0.01$.

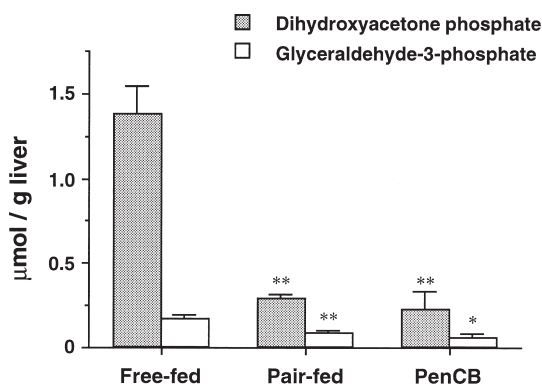


Fig. 5 Effect of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on the content of triose phosphate in rat liver. Closed and open bars represent dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate, respectively. De-proteination of liver cytosol was performed according to Karl et al.¹⁴). The dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate content in the liver cytosolic fraction from free-fed control, pair-fed control and PenCB-treated rats was assayed according to Minakami et al.²⁷). Each group consisted of 4 rats. The values represent the means \pm S.E. Significantly different from free-fed controls; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

Discussion

Figure 6 summarizes the effects of PenCB on intermediary metabolism. We have shown here that PenCB significantly suppresses the enzyme activity of triose phosphate metabolizing enzymes. Because PenCB reduces the protein expression level of ADH in rat liver cytosol¹⁵), the suppression of ADH may be involved in the suppression of triose phosphate metabolism by PenCB. The triose phosphate content was also reduced by PenCB-treatment.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in the liver cytosol of rats was significantly suppressed by PenCB-treatment. This enzyme had been considered as a "house keeping" protein, the level of expression of which is

unaffected by xenobiotics²⁸). Recently, the mRNA and protein level of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in skin keratinocytes were reported to be induced by TCDD²⁸). However, the present results show that significant suppression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rat liver is produced by a toxic coplanar PCB, PenCB. It is interesting to think that there could be differences in the regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase between skin and liver. However the reason for such differences in the response to toxic chlorinated aromatic hydrocarbon between skin and liver needs to be identified.

The activity of transaldolase and transketolase in liver cytosol was suppressed by PenCB-treatment (Fig. 2). PenCB significantly induces glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity in the liver cytosol of rats and mice. The induction of G6PDH has been suggested to involve an Ah-battery¹⁰). Although it is likely that the pentose phosphate pathway is elevated by PenCB, the supply of triose phosphate through transaldolase and transketolase to the glycolytic and gluconeogenic pathway could be suppressed.

The level of protein expression of ADH class I was suppressed by PenCB¹⁵). Recently, triose phosphate was suggested as a candidate endogenous substrate of ADH²⁴). It is interesting to consider that ADH could be involved in lipid metabolism through triose phosphate metabolism. Glycerokinase, which supplies glycerol-3-phosphate, was suppressed by PenCB (Fig. 1C), whereas abnormal lipid metabolism, such as a marked increase in triglycerides⁹) and a reduction in the proportion of arachidonate²⁵), was observed in PenCB-treated rat liver. In addition, coplanar PenCB has a significant effect on the reduced synthesis of physiologically essential long-chain unsaturated fatty

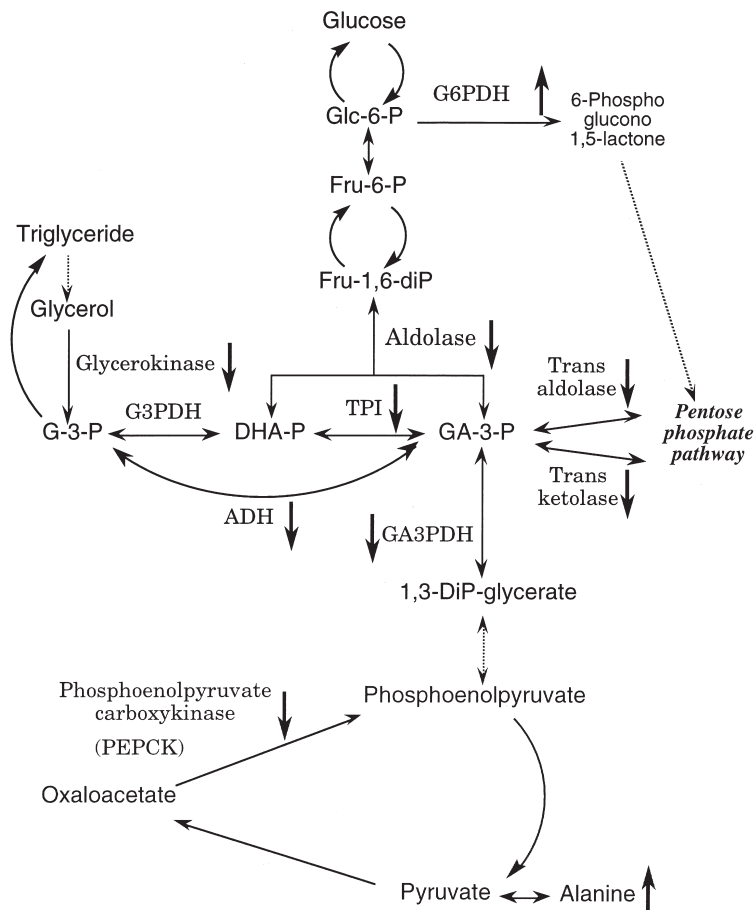


Fig. 6 Summary of the effect of 3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on the intermediary metabolism in rat liver. Abbreviations: Glc-6-P, glucose-6-phosphate; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; Fru-6-P, fructose-6-phosphate; Fru-1,6-diP, fructose-1,6-diphosphate; G-3-P, glycerol-3-phosphate; GA3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TPI, triosephosphate isomerase; 1,3-DiP-glycerate, 1,3-diphosphoglycerate.

acids²⁶). It is likely that the supply of triose phosphate via lipid metabolism is suppressed by PenCB, although significant fatty livers have been observed⁹). Marked protein catabolism was also observed in TCDD-treated rats⁵). Glycogenic amino acids derived from protein catabolism could be precursors of triose phosphate. However there is a key enzyme for gluconeogenesis, PEPCK, which is involved in

the metabolic pathway from glycogenic amino acids to triose phosphate. PEPCK is known to be suppressed by TCDD or PenCB in rat liver²⁹⁾³⁴). In addition, we recently reported that PenCB markedly suppresses aldolase B in rat liver cytosol¹¹). Taking these observations into consideration, it could be that the abnormal intermediary metabolism caused by PenCB-treatment is due to the suppression of these

triose phosphate metabolizing enzymes.

The marked reduction in triose phosphate levels in pair-fed controls and PenCB-treated groups suggests that the food intake could be an important factor in determining the triose phosphate content. The reduced triose phosphate content in pair-fed controls could be due to the restricted food intake; however, this may not be the only reason for the reduced triose phosphate content in the PenCB-treated group. Giving nutritional supplements to TCDD-treated rats failed to cure the wasting syndrome caused by TCDD⁵. It is likely that the suppressed triose phosphate metabolism in PenCB-treated rats affects the utility of energy sources. In combination with these observations, there was a suppressive response to the enzymes of glycolysis and gluconeogenesis pathways, which might influence the energy utilization.

Acknowledgment

We are grateful to Mr. Ichiro Nakayama for his excellent assistance. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health and Welfare, Japan.

References

- 1) Andersson I, Zeppezauer M, Bull T, Einarsson R, Norne JE and Lindman B: Binding of coenzyme, coenzyme fragments, and inhibitors to native and carboxymethylated horse liver alcohol dehydrogenase from chlorine-35 nuclear magnetic resonance quadrupole relaxation. *Biochemistry* 18: 3407-3413, 1979.
- 2) Beisenherz G: Triose phosphate isomerase from calf muscle. *Methods in Enzymology* 1: 387-391, 1955.
- 3) Boleda MD, Saubi N, Farres J and Pares X: Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 85-90, 1993.
- 4) Bublitz C and Wieland O: Glycerokinase. *Methods in Enzymology* 5: 354-361, 1955.
- 5) Christian BJ, Menahan LA and Peterson RE: Intermediary metabolism of the mature rat following 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83: 360-378, 1986.
- 6) Cronholm T, Larsen C, Sjøvall J, Theorell H and Akeson A: Steroid oxidoreductase activity of alcohol dehydrogenases from horse, rat, and human liver. *Acta. Chem. Scand.* B29: 571-576, 1975.
- 7) Duggleby RG and Dennis DT: Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Effect of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds on the enzyme-catalyzed arsenolysis of 1, 3-diphosphoglyceric acid. *J. Biol. Chem.* 249: 162-166, 1974.
- 8) Fondy TP, Ross CR and Sollohub SJ: Structural studies on rabbit muscle glycerol 3-phosphate dehydrogenase and a comparison of chemical and physical determinations of its molecular weight. *J. Biol. Chem.* 244: 1631-1644, 1969.
- 9) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N and Oguri K: Effect of a coplanar PCB on lipid metabolism: The remarkable difference between rats and guinea pigs. *Fukuoka Acta Medica.* 85: 135-143, 1995.
- 10) Hori M, Kondoh H, Ariyoshi N, Yamada H and Oguri K: Species-specific alteration of hepatic glucose 6-phosphate dehydrogenase activity with coplanar polychlorinated biphenyl: evidence for an Ah-receptor-linked mechanism. *Chemosphere* 35: 951-958, 1997.
- 11) 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.
- 12) Julia P, Farres J and Pares X: Rat liver alcohol dehydrogenase of class III. Primary structure, functional consequences and relationships to other alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 162: 179-189, 1987.
- 13) Kannan N, Tanabe S, Ono M and Tatsukawa R: Critical evaluation of polychlorinated biphenyl toxicity in terrestrial and marine mammals: increasing impact of non-*ortho* and mono-*ortho* coplanar polychlorinated biphenyls from land to ocean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 850-857, 1989.
- 14) Karl IE, Pagliara AS and Kipnis DM: A microfluorometric enzymatic assay for the determi-

nation of alanine and pyruvate in plasma and tissues. *J. Lab. Clin. Med.* 80 : 434-441, 1972.

15) 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 : 20, 1997.

16) Kim CI, Leo MA and Lieber CS : Retinol forms retinoic acid *via* retinal. *Arch. Biochem. Biophys.* 294 : 388-393, 1992.

17) Kochetov GA : Transketolase from yeast, rat liver, and pig liver. *Methods in Enzymology* 90 : 209-219, 1982.

18) Koga N, Kuroki J, Hokama Y and Yoshimura H : Long-term effect of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl on the toxicity and liver enzyme activities in rats. *Fukuoka Acta Medica* 78 : 213-218, 1987.

19) Koga N and Yoshimura H : Metabolism of PCBs and related compounds, and their toxicity. in "Yusho" A human disaster caused by PCBs and Related Compounds (Eds. Kuratsune M, Yoshimura H, Hori H, Okumura M and Masuda Y), pp. 105-120, Kyushu University Press, Fukuoka, Japan, 1996.

20) Kondoh Y, Kawase M, Hirata M and Ohmori S : Carbon sources for D-lactate formation in rat liver. *J. Biochem.* 115 : 590-595, 1994.

21) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.

22) Masuda Y : The Yusho rice oil poisoning Incident. in "Dioxins and Health" (ed. Schechter A), pp. 633-659, Plenum Press, New York, 1994.

23) 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.

24) Masuo T, Kubo T and Natori S : abstracts in papers, *Seikagaku* 68 : 643, 1996 (in Japanese).

25) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N and Oguri K : A highly toxic PCB produces unusual changes in the fatty acid composition of rat liver. *Toxicol. Lett.* 91 : 99-104, 1997.

26) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N and Oguri K : A highly toxic polychlorinated biphenyl compound suppresses $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturase activities which play important roles in arachidonic acid synthesis in rat liver. *Toxicol. Lett.* 91 : 99-104, 1997.

27) Minakami S, Suzuki C, Saito T and Yoshik-

awa H : Studies on erythrocyte glycolysis. I. Determination of the glycolytic intermediates in human erythrocytes. *J. Biochem.* 58 : 543-550, 1965.

28) McNulty SE and Toscano Jr WA : Transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212 : 165-171, 1995.

29) Oguri K, Hatsumura M, Ishii Y, Koga Y, Ariyoshi N and Yoshimura H : Modification of the gluconeogenesis is not involved in the co-planar PCB toxicity in highly sensitive guinea pigs. *Chemosphere* 27 : 2295-2303, 1993.

30) Okuda K and Takigawa N : Rat liver 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol dehydrogenase as a liver alcohol dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 220 : 141-148, 1970.

31) 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.

32) Sillero MAG, Sillero A and Sols A : Enzymes involved in fructose metabolism in liver and the glyceraldehyde metabolic crossroads. *Eur. J. Biochem.* 10 : 345-350, 1969.

33) Stahl BU, Beer DG, Weber LWD and Rozman K : Reduction of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is due to decreased mRNA levels. *Toxicology* 79 : 81-95, 1993.

34) 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.

35) 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.

36) Zinkl JG, Vos JG, Moore JA and Gupta BN : Hematologic and clinical chemistry effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in laboratory animals. *Environ. Health Perspect.* 5 : 111-118, 1973.

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

38) Lad PJ and Leffert HL : Rat liver alcohol dehydrogenase. I. Purification and characterization.

Anal. Biochem. 133 : 350-361, 1983.

Methods in Enzymology 9 : 499-505, 1966.

39) Tchola O and Horecker BL : Transaldolase.

(Received for publication March 16, 2001)

(和文抄録)

コプラナー PCB による中間代謝への影響： ラット肝サイトソルのトリオースリン酸含量の低下について

九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野
石井 祐次¹⁾・加藤 晴敏・初村 恵
石田 卓巳・有吉 範高²⁾・山田 英之
小栗 一太

アルドラーゼは、トリオースリン酸の代謝に関わっている酵素である。3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB)によりアルドラーゼ B が抑制されるが、これは単なる糖新生の阻害に止まらない可能性がある。そこで、本研究では、トリオースリン酸代謝酵素群（グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、グリセロキナーゼ、トランスアルドラーゼ、およびトランスケトラゼ）に及ぼす PenCB の影響を調べた。また、PenCB によるアルコール脱水素酵素 (ADH) の発現抑制が、どの程度トリオースリン酸代謝に影響を及ぼしているかを、トータルのグリセロール-3-リン酸生成活性への ADH 活性の寄与を指標に検討した。PenCB 処理により、これら酵素群の活性はいずれも 50%程度まで有意に低下していた。ADH は、タンパク質レベルで著しく抑制されていることを既に明らかにしている。NAD 依存的なグリセルアルデヒド-3-リン酸およびジヒド

ロキシアセトンリン酸の代謝のうち、ピラゾールで阻害される活性を ADH 由来とした場合、ADH は約 30%の寄与があることが分かり、特にこの部分への抑制が顕著であった。トリオースリン酸は、嫌氣的解糖系や糖新生系だけでなくペントースリン酸経路にも向かうことから、エネルギー代謝、脂質代謝、核酸代謝への重要な中間代謝物でもある。このことは、PenCB による毒性影響が多面的であることを支持しているように思われる。摂餌対照群と PenCB 処理群では肝臓中のトリオースリン酸の含量が、自由摂餌群に比べて著しく低かった。このことは、トリオースリン酸含量が摂餌に依存することを示しているように思われるが、PenCB 処理群においては、トリオースリン酸の代謝酵素の活性が全体的に低下していることから、PenCB 処理によってトリオースリン酸代謝の回転が落ち、栄養を補給してもエネルギーとして利用されにくいシステムが出来ている可能性がある。

¹⁾現 筑波大学社会医学系環境医学

²⁾現 千葉大学医学部附属病院薬剤部

コプラナー PCB による小胞体局在性ストレス蛋白質の 発現抑制に関する研究

— 第 2 報 —

九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

吉岡 優子・石井 祐次¹⁾・石田 卓巳

山田 英之・小栗 一太

東邦大学薬学部 生化学教室

本 島 清 人

Suppression of Stress Proteins, GRP78, GRP94, Calreticulin and Calnexin in Liver Endoplasmic Reticulum of Rat Treated with a Highly Toxic Coplanar PCB

Yuko YOSHIOKA, Yuji ISHII, Takumi ISHIDA, Hideyuki YAMADA and Kazuta OGURI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582

Kiyoto MOTOJIMA

Department of Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Chiba

Abstract The present study was addressed on the effect of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) to the expression of molecular chaperon proteins, glucose regulated protein (GRP) 78, GRP94, calreticulin and calnexin in liver endoplasmic reticulum of rat by treatment with acute exposure. Male Wistar rats received PenCB in corn oil at once a dose of 10 mg/kg i.p., then at 5 days after treatment the microsomes were prepared. Free-fed and pair-fed control groups were given the vehicle. The microsomal proteins were separated on SDS-PAGE, transferred to membrane and blotted using antibody towards respective chaperone proteins. The protein levels of GRP78, GRP94, calreticulin and calnexin were significantly decreased with the acute exposure. In addition, albumin level in the microsomes was also significantly reduced by the PenCB treatment. The transferrin level was significantly higher than pair-fed but not from free-fed group. These chaperone proteins have important physiological functions against synthesized and/or denatured proteins, which include assembling, folding of proteins. PenCB-treatment may alter the extent of biosynthesis of secretory protein such as albumin through the decreasing levels of chaperone proteins in endoplasmic reticulum. Interestingly, reduced GRP78 protein level by PenCB was not due to decreased mRNA level. 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) は塩素の置換位置や数の違いにより理論上 209 種の異性体が存在するが、その毒性は置換する塩素の数や位置によって大き

く異なることが知られている。ビフェニルのオルト位に塩素置換をもたない PCB は、共平面構造をとり易く、coplanar PCB と呼ばれており、non planar PCB に比べて毒性が高いことが知られている。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、最強の急性毒性を示す¹⁰⁹⁾。Coplanar PCB や polychlorinat-

1) 現筑波大学社会医学系環境医学

ed 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⁾²⁸⁾¹⁰⁶⁾、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 PCB の毒性発現メカニズムの解明が遅れている要因に、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、胸線や脾臓の萎縮、肝肥大、免疫機能低下、生殖障害、催奇形性などの毒性を示すことが知られている⁷⁰⁾⁷⁷⁾⁸³⁾。この生物学的作用のほとんどは細胞質に存在する arylhydrocarbon receptor (Ah-receptor, AhR) 依存性メカニズムを介すると考えられている。

AhR はリガンド依存性の bHLH (basic-helix-loop-helix) 構造および PAS (Per-AhR/Arnt-Sim homology) ドメインをもつ受容体型の転写因子である³⁰⁾³³⁾。TCDD やコプラナー PCB は、AhR に高親和性のリガンドである。また、ダイオキシン類以外にも、3-methylcholanthrene (3-MC) や benzo [a] pyrene もリガンドとなる。しかしながら、内在性のリガンドは、特定されていない。

この AhR が TCDD の毒性を仲介していることは、AhR に対する TCDD の同族体の結合活性が TCDD 同族体の生体毒性と比例関係にあること⁷⁶⁾、AhR の遺伝子座に違いのあるマウス系統¹⁷⁾、あるいは AhR 欠損マウスの解析により、TCDD の毒性が AhR の遺伝子型に依存していることが示されたこと²⁴⁾⁶⁶⁾⁸⁴⁾、TCDD による cytochrome P4501A1 (CYP1A1) の誘導的発現が AhR に依存していることが分子的に確かめられたこと⁴⁷⁾ などにより支持されている。

AhR は 90 kDa heat shock protein (HSP90) と複合体を形成して細胞質内に存在しており、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、Sp 1 と相互作用して転写を活性化する⁴⁷⁾。ダイオキシン類により誘導される CYP1A1⁷⁷⁾、NAD (P) H : quinone oxidoreductase²²⁾、glutathione S-transferase Ya subunit⁸⁰⁾、UDP-glucuronosyltransferase 1A6 (UGT1A6)¹⁹⁾ 遺伝子にはいずれも XRE の制御配列

が発現調節領域にあることが明らかにされている。AhR は、1992 年に初めてマウスの cDNA が単離されて以来⁷⁾¹⁸⁾ ヒトからも cDNA が単離され¹⁴⁾¹⁵⁾、その転写因子としての性質が次第に明らかにされてきている。このように、ダイオキシン類の毒性発現機構は AhR の介在が重要であることが分かってきたが、ダイオキシン類により誘導される遺伝子のなかには XRE の存在が確認されていないものがあることや、高濃度 TCDD を投与した AhR 欠損マウスの肺、肝臓においてネクロシスが見られること²³⁾ から、これらの毒性発現機構は AhR を介する機構だけでは説明できず、AhR 非依存的なメカニズムが存在すると考えられている。これらのことから、ダイオキシン類の多面的毒性を理解するには、生化学的検討が重要と考えられる。

当研究室では、これまで coplanar PCB の毒性発現機構を解明する目的で、「毒性の発現した状態においては、生理的に重要な機能をもつタンパク質の発現量が著しく変化する」という作業仮説を立て検討が行われてきた⁴⁴⁾。その結果、PenCB 処理ラット肝サイトソルにおいて、分子量 54 kDa のタンパク質が著しく誘導され、これがマウスのセレン結合性タンパク質、またはアセトアミノフェン結合性タンパク質の counterpart であることが明らかにされた⁴¹⁾⁴²⁾。また、これとは対照的に、ラット肝サイトソル中のアルドラーゼ B, class I アルコールデヒドロゲナーゼおよびカルボニックアンヒドラーゼ III が抑制されることも明らかにしている⁴⁰⁾⁴³⁾⁴⁶⁾。これに加えて、ダイオキシン類の暴露によって、ラットの血糖値の低下、糖新生の key enzyme の抑制¹⁰²⁾、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糖利用率の低下が引き起こされることが知られている⁶¹⁾⁷³⁾⁷⁸⁾¹⁰⁰⁾。さらに PenCB 処理ラットにおいて、肝のペントースリン酸経路の第一ステップである glucose 6-phosphate dehydrogenase は、誘導される³⁸⁾、糖中間代謝に関与する多くの酵素活性が有意に低下することが明らかにされている⁴⁰⁾⁴³⁾⁴⁶⁾¹⁰²⁾。このように PenCB 処理により糖代謝のホメオスタシスが逸脱した状態においては、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することが予想された。

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、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、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るが、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。この機能からストレスタンパク質は分子シャペロンと呼ばれており²⁷⁾³⁷⁾¹⁰³⁾、合成されたポリペプチド鎖の折り畳み (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、さらには分解にいたるまで、極めて広範な細胞機能にかかわっている²⁾³⁴⁾⁶²⁾。当教室における検討により、ラット肝細胞質の分子シャペロン HSP70 および HSP90 は PenCB 処理によって誘導されるのに対し²⁵⁾、小胞体局在性の分子シャペロン GRP78⁵⁰⁾ および GRP94⁸⁸⁾ は PenCB 処理によって減少することが示唆されている⁹²⁾。したがって PenCB 処理によって、GRP が減少することにより、小胞体内の新規合成タンパク質が不安定な状態になり、そのことがダイオキシン類の毒性発現に関係している可能性があると考えられた。

GRP と同様に、小胞体内のタンパク質の安定化に関わるストレスタンパク質として calnexin や calreticulin などがある³⁾⁹⁸⁾。Calnexin は小胞体の膜に、calreticulin は小胞体内腔に局在する分子シャペロンであり、両者は一次構造的に相同性が高いだけでなく、機能的にも類似していると考えられている³⁵⁾⁹⁶⁾⁹⁹⁾。一部 folding が進行したポリペプチド鎖は、糖鎖付加を受けるが、calnexin や calreticulin はこの糖鎖を認識し結合する⁷⁵⁾。最近では apolipoprotein B や insulin receptor の folding への関与など、それぞれの小胞体局在性分子シャペロンが具体的にどのタンパク質の生合成に関与するかも明らかにされつつある¹⁾⁵⁴⁾。また、これらの小胞体局在性分子シャペロンはカルシウム結

合能も有しており、小胞体内のカルシウム濃度のホメオスタシスにおいても重要であると考えられている⁹⁾⁴⁸⁾⁶⁴⁾。

以上のような背景から、本研究では、PenCB 処理によるラット肝の小胞体局在性分子シャペロン GRP78、GRP94、calnexin や calreticulin レベルへの影響に関する研究を行った。まず、PenCB 処理がラット肝ミクロソームの、GRP78、GRP94、calnexin および calreticulin レベルへ及ぼす影響について、それぞれに特異的な抗体を用いたイムノプロットによる検討を行った。次に、肝臓におけるこれらの小胞体局在性分子シャペロンの減少が、新規合成タンパク質に何らかの影響を与える可能性を考え、肝小胞体で生合成されるタンパク質のうち albumin および transferrin のレベルについて検討を行った。さらに、PenCB による小胞体局在性ストレスタンパク質の発現抑制について mRNA レベルでの検討を行った。

方 法

1. 実験材料

PenCB は、Saeki らの報告⁸¹⁾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、ポリクローナルウサギ抗 calreticulin IgG は、フナコシ (株) より、モノクローナルマウス抗 calnexin IgG は、トランスダクションラボラトリーズ社より、ポリクローナルウサギ抗ラットアルブミン IgG は、インターセル・テクノロジー社より、ウサギ抗 transferrin 抗血清は、ICN-Cappel 社より購入した。また、抗マウス GRP94 ウサギ抗血清¹¹⁾ 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. 薬物処理およびミクロソームの調製

急性暴露実験においては、6 週令 Wistar 系雄性ラットを 1 週間ステレスケージにて飼育、馴化した後、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 10 mg/2 ml

corn oil/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。Total RNA 抽出用のサンプルには、その約 50~100 mg を量り取り、直ちに液体窒素中で凍結させ、 -80°C で保存した。

肝臓は、氷冷生理食塩液にて十分灌流したあと、3 容量の KCl buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer-0.15 M KCl-0.1 mM EDTA) でホモジナイズし、 $9,000\times g$ で 20 分間遠心分離した。この遠心上清をさらに $105,000\times g$ で 60 分間遠心分離した。この沈殿を、KCl buffer でホモジナイズして洗浄し、 $105,000\times g$ で 60 分間遠心分離した。この沈殿を 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer-20% glycerol-0.1 mM 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 の方法⁵²⁾ に従って行った。

4. Immunoblotting

SDS-PAGE にてタンパク質を分離後、Towbin の方法⁹⁷⁾ に従い、セミドライ式プロテイング装置で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。転写後、PVDF 膜を 5% スキムミルク (in TBS-Triton X-100) で 37°C 、60 分間 blocking を行った後、適切な濃度に希釈した 1 次抗体につけ、 4°C で一晩インキュベートした。1 次抗体は以下の濃度で使用した。抗体の濃度は、GRP78, 0.1% rabbit anti-peptide of C-terminal 12 amino-acids of rat GRP78 serum; GRP94, 0.25% rabbit anti-mouse GRP94 serum; transferrin, 0.1% rabbit anti-rat transferrin serum; calreticulin, 0.05% rabbit anti-calreticulin IgG; calnexin, 0.1% mouse anti-calnexin IgG; albumin, 0.2% anti-albumin IgG とした。何れも 3% スキムミルクと 0.1% NaN_3 を含む TBS-Triton X-100 溶液とした。1 次抗体との反応終了後、PVDF 膜を TBS-Triton X-100 につけ、室温で 5 分間 \times 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⁵⁾ に準じて行った。

5. Northern blotting

Total RNA は、RNeasy kit (QIAGEN) を用いて凍結保存しておいた肝臓から単離し、ホルムアルデヒドを含む変性ゲル (1% agarose) で電気泳動して、ナイロンメンブレンに転写した。プローブには、ラット GRP78 cDNA フラグメント⁶⁹⁾ を、 $[^{32}\text{P}]$ dCTP と rediprime II random probe labelling system (Amersham Pharmacia) によって標識して使用した。ハイブリダイゼーションは 18 時間以上行い、最終的にはイメージングプレートに暴露した後、Bio-Imaging Analyzer BAS-2500 (富士フィルム社) により解析して、バンドの検出を行った。ノーマライゼーションにはラットの β -actin cDNA (+478 から +767 に対応)⁷²⁾ を用いた。

実験結果

1. PenCB による 78 kDa および 94 kDa グルコース調節タンパク質 (GRP78, GRP94) の発現抑制

これまでに、PenCB 25 mg/kg (i. p.) 処理した 4 週令 Wistar 系ラットでは、投与 5 日後の肝マイクロソームにおいて、GRP78 及び GRP94 のタンパク質レベルが低下すること、また、この現象は、低用量の PenCB 1 mg/kg (i. p.) の投与量でも起こり、この抑制が 4 週間後にも認められることを明らかにした⁹²⁾。

本研究では 6 週令 Wistar 系雄性ラットに PenCB 10 mg/kg を腹腔内単回投与し、GRP78 及び GRP94 の減少を immunoblotting により確認した。1 次抗体には、GRP78 の C-末端 12 アミノ酸からなるペプチドに対するポリクローナル抗体を用いた。この抗体からは、小胞体滞留性のタンパク質が有している KDEL 配列を認識する抗体が除去されており、GRP78 に対する特異性が上がっている。ラット肝マイクロソームをサンプルとした immunoblotting の結果を Fig. 1A に示している。分子量から考えて、メジャーバンドが GRP78 のバンドであると考えられる。Fig. 1B は

immunoblottingの結果を光学スキャナーにて Apple Macintosh コンピューターに取り込み、解析ソフトウェア NIH image にて定量化したものである。PenCB 処理ラット肝 GRP78 のタンパク質発現レベルは、両コントロール群と比較して有意に減少しており、PenCB 処理群では、free-fed コントロール群の約 20% 程度まで減少した。

次に、GRP94 を特異的に認識する抗体¹¹⁾を用いて、immunoblotting を行った。Fig. 2A にその結果を示す。GRP94 は、PenCB 処理によって、free-fed, pair-fed いずれのコントロール群と比較しても有意に減少していた。PenCB 処理群の GRP94 量は、free-fed コントロール群の約 50% であり、減少の割合は、GRP78 のそれよりも弱かった (Fig. 2B)。

このように、6 週令 Wistar 系ラットにおいても、PenCB 処理によって、GRP78 と GRP94 が減少することが明らかであった。

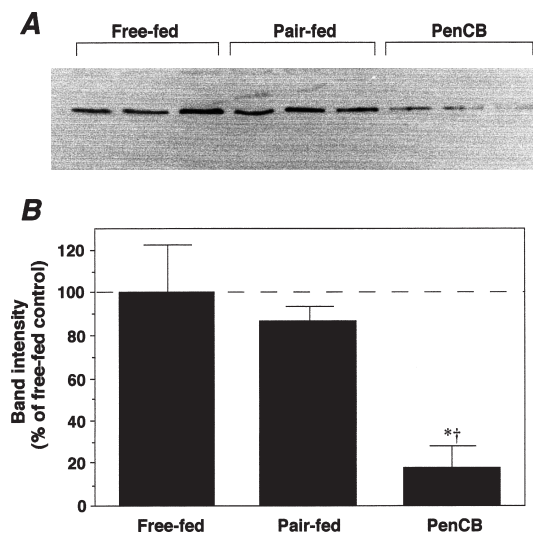


Fig. 1 Effect of PenCB on GRP78 in rat liver microsomes.

Immunoblot analysis of rat liver microsomes (1 μ g protein) with anti-GRP78 antibody (A). The values represent the means \pm S.E. of the percentages to the free-fed controls (B). Significantly different from free-fed controls: *, $p < 0.05$, and from pair-fed controls: †, $p < 0.05$.

2. PenCB による calreticulin の発現抑制

次に、GRP78, GRP94 と同様に小胞体内ストレスタンパク質のひとつである、calreticulin レベルに、PenCB 処理が及ぼす影響を検討した。PenCB 処理ラット肝ミクロソームを、calreticulin に特異的なポリクローナル抗体を用いて immunoblotting した結果を Fig. 3A に示す。Free-fed コントロール群に比べ、pair-fed コントロール群では、有意な減少が認められた。PenCB 処理群においては、calreticulin が free-fed, pair-fed いずれのコントロール群と比較しても減少しており、PenCB 処理群における calreticulin レベルは、free-fed 群の約 60% であった。このように calreticulin も減少したが、GRP78 や GRP94 の場合とは、pair-feeding の影響に違いが見られた。

3. PenCB による calnexin の発現抑制

次に、calreticulin と相同性が高く、その小胞体における機能も類似している calnexin について、PenCB 処理が及ぼす影響を検討した。Calnexin も小胞体局在

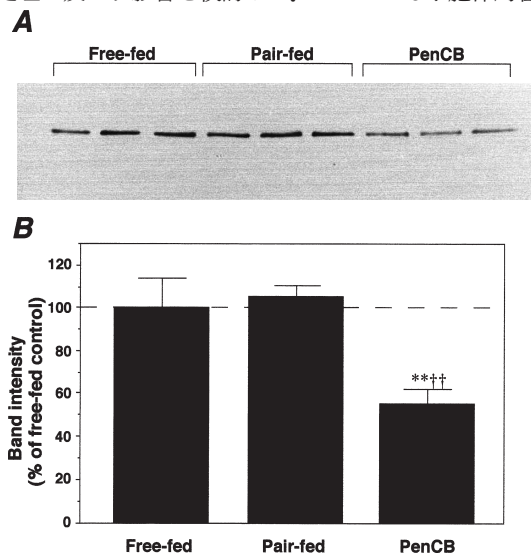


Fig. 2 Effect of PenCB on GRP94 in rat liver microsomes.

Immunoblot analysis of rat liver microsomes (1 μ g protein) with anti-GRP94 antibody (A). The values represent the means \pm S.E. of the percentages to the free-fed controls (B). Significantly different from free-fed controls: **, $p < 0.01$, and from pair-fed controls: ††, $p < 0.01$.

性のストレスタンパク質であり、分子シャペロンとしての働きやカルシウム結合能、ストレス応答性を有している。しかし、calnexinは膜結合タンパク質であり、小胞体内腔に局在するタンパク質の局在化シグナルであるC-末端のKDEL配列は持っていない。

PenCB処理ラット肝ミクロソームをcalnexin特異的モノクローナル抗体でイムノブロットした結果をFig. 4Aに示す。PenCB処理群では、両コントロール群に比べて有意なcalnexinレベルの低下が認められ、free-fed群の60%程度に減少していた。Pair-fed群では、free-fed群に比べてcalnexinレベルが低く、calreticulinへの影響と類似性が見られた。

4. PenCB処理が肝小胞体での分泌タンパク質の生合成へ及ぼす影響

PenCB処理ラット肝において、小胞体局在性ストレスタンパク質である、GRP78, GRP94, calreticulin

およびcalnexinが抑制されることを明らかにしてきた (Fig. 1-4)。これらストレスタンパク質は分子シャペロン機能を有しており、新生タンパク質のfoldingやassemblyを助け、凝集を抑制するといわれている。そこで、これらのタンパク質が減少することによる二次的な影響、すなわち、小胞体内で新規合成されるタンパク質への影響について検討を行った。小胞体局在性分子シャペロンが不足することで、foldingやassemblyが正しく形成されない異常タンパク質が生じることが予想されるが、構造異常タンパク質は生体にとって脅威となるため、それを分解除去するシステムも知られている(品質管理)⁸⁾²⁰⁾³²⁾⁶⁷⁾。PenCB処理が肝小胞体のこれらタンパク質のレベルへ及ぼす影響について、本研究では、肝小胞体で生合成され、分泌されるタンパク質のうち、血漿中の主要タンパク質であるalbuminとtransferrinに着目し、検討した。

まず、PenCB処理による小胞体局在性ストレスタンパク質の減少が引き起こされた状態での、albuminの

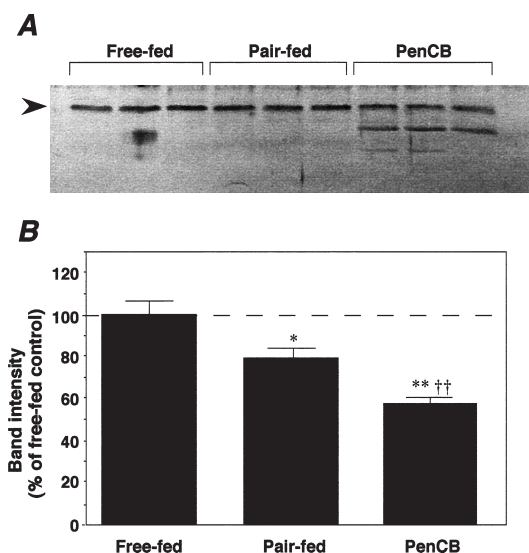


Fig. 3 Effect of PenCB on calreticulin in rat liver microsomes.

Immunoblot analysis of rat liver microsomes (7 μ g protein) with anti-calreticulin antibody (A). The values represent the means \pm S.E. of the percentages to the free-fed control (B). Significantly different from free-fed controls: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$, and from pair-fed controls: †, $p < 0.05$; ††, $p < 0.01$.

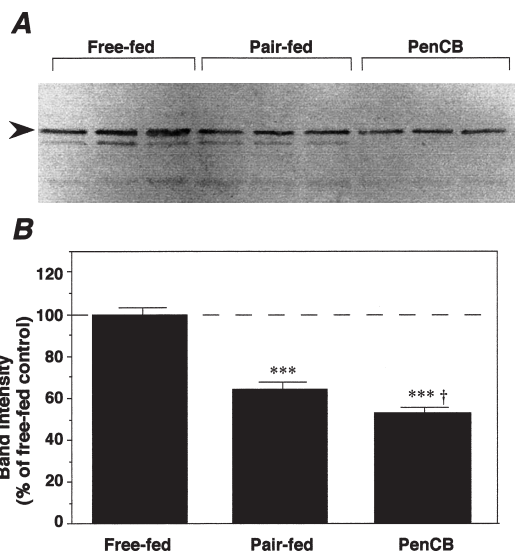


Fig. 4 Effect of PenCB on calnexin in rat liver microsomes.

Immunoblot analysis of rat liver microsomes (15 μ g protein) with anti-calnexin antibody (A). The values represent the means \pm S.E. of the percentages to the free-fed controls (B). Significantly different from free-fed controls: ***, $p < 0.001$, and from pair-fed controls: †, $p < 0.05$.

生合成について検討を行った。Albumin は全血漿タンパク質の約60%を占め、血漿の浸透圧の75%から80%を担っていると考えられている。また、多くの薬物が albumin と結合することから、薬理学的にも重要である。

肝ミクロソーム中の albumin タンパク質の量から、albumin の生合成の程度を知ることが出来ると考え、immunoblotting により比較した。一次抗体にはウサギ抗ラット albumin 抗血清を用いた (Fig. 5)。PenCB 処理 Wistar 系ラット肝ミクロソームでは、albumin レベルが、free-fed, pair-fed 両コントロール群と比較して、有意に著しく減少していた。PenCB 処理群では、albumin レベルが free-fed 群の約20%まで減少していた。Pair-fed 群の albumin レベルも free-fed 群と比較すると有意に低下していた。しかし、その程度は PenCB 処理群のそれと比べると大きくなかった。

次に、PenCB 処理による小胞体ストレスタンパク質

の減少が引き起こされた状態での、transferrin の生合成について検討を行った。Transferrin は血液中の鉄と結合することでその毒性を減弱する上に、それが要求される箇所に輸送するという、体内での鉄の代謝において中心的役割をつとめている。Transferrin は、albumin と同様、主に肝臓で生合成され分泌される。ここでも、肝ミクロソーム中の transferrin のタンパク質量からその生合成の程度を知ることができると考え、immunoblotting により比較した。一次抗体にはウサギ抗ラット transferrin 抗体を用いた (Fig. 6)。Pair-fed 群では free-fed に比べ有意に transferrin レベルが低く、free-fed 群の約50%であった。この pair-fed 群と比較して、PenCB 処理群では有意に transferrin レベルが高かった。しかしながら、PenCB 処理群の transferrin レベルは free-fed コントロール群のそれと大差なかった。

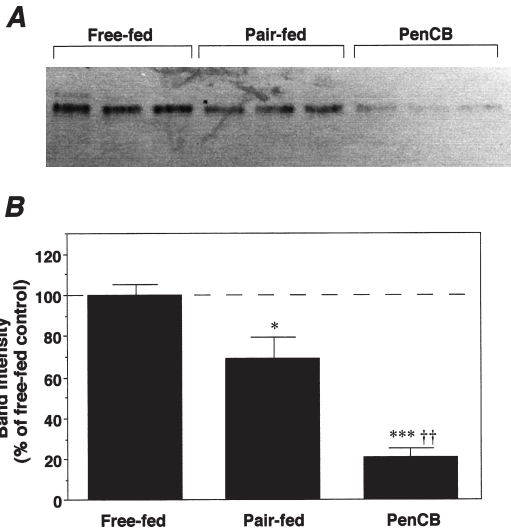


Fig. 5 Effect of PenCB on albumin in rat liver microsomes.

Immunoblot analysis of rat liver microsomes (1 μ g protein) with anti-albumin antibody (A). The values represent the means \pm S.E. percentages to the free-fed controls (B). Significantly different from free-fed controls: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$, and from pair-fed controls: ††, $p < 0.01$.

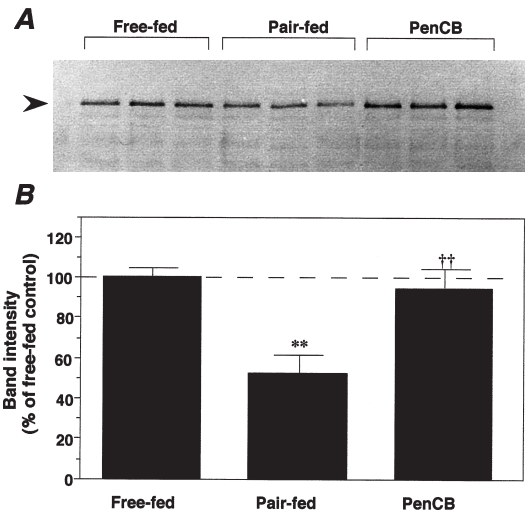


Fig. 6 Effect of PenCB on transferrin in rat liver microsomes.

Immunoblot analysis of rat liver microsomes (3 μ g protein) with anti-transferrin antibody (A). The values represent the means \pm S.E. of the percentages to the free-fed controls (B). Significantly different from free-fed controls: **, $p < 0.01$, and from pair-fed controls: ††, $p < 0.01$.

5. PenCB 処理によるラット肝小胞体局性ストレスタンパク質 (GRP78) mRNA レベルへの影響

これまでに、ラット肝ミクロソーム中の GRP78 が、PenCB 10 mg/kg (i. p.) 投与によって著しく減少することを immunoblotting により明らかにしてきた。これ以外にも、PenCB 処理によって発現抑制されるタンパク質としては、アルドラーゼ B、アルコールデヒドロゲナーゼ (class I)、カルボニックアンヒドラーゼ III が、当研究室で明らかにされ⁴⁰⁾⁴³⁾⁴⁶⁾、カルボニックアンヒドラーゼ III については、mRNA レベルが著しく低下することが Northern blot により明らかになっている⁴⁰⁾。ここでは、GRP78 タンパク質レベルの減少が、転写抑制や mRNA の分解促進などの mRNA レベルの低下を反映しているのか、あるいは翻訳障害やタンパク質の分解が亢進しているなど、mRNA レベルには変化がないのかを明らかにすることを目的とし、PenCB によるラット肝 GRP78 の発現抑制について northern blot 解析による mRNA レベルでの検討を行った。

Fig. 1 の immunoblotting のサンプルと同一個体の肝臓から単離した total RNA を用いて northern blot 解析を行った。GRP78 の mRNA レベルは、PenCB 処理によってもあまり大きくは変化せず、free-fed, pair-fed 両コントロール群に比べて有意な変化はみられなかった (Fig. 7)。

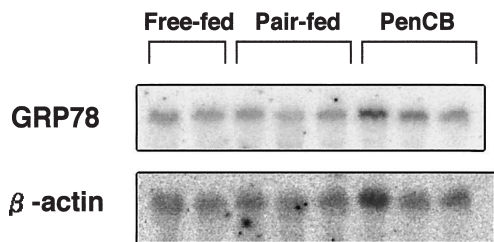


Fig. 7 Northern blot analysis of GRP78.

Total RNA was isolated from free-fed controls, pair-fed controls and PenCB-treated rat liver and subjected to northern blot analysis. A β -actin probe was used for normalization of mRNA amount and transfer efficiency.

考 察

本研究では、PenCB 処理ラット肝において、小胞体局在性ストレスタンパク質である GRP78, GRP94, calreticulin および calnexin のタンパク質レベルが低下することを、immunoblotting により示した。これらのタンパク質はいずれも free-fed, pair-fed 両コントロール群と比較して、有意に減少していた。GRP78 および GRP94 の発現は、グルコース飢餓により *in vitro* において誘導されることが既に明らかとなっている⁵¹⁾。それとは逆に、50%のエネルギー制限した食事を与えたマウスでは mRNA の安定性の低下からその発現量は減少すると報告されている¹³⁾⁸⁹⁾⁹⁴⁾。

しかしながら、本研究では、pair-feeding による発現抑制は GRP78 および GRP94 には認められていない (Fig. 3, 4)。このことから PenCB による、GRP78 および GRP94 の発現抑制に、摂餌量の低下は寄与していないと思われる。

また、calreticulin および calnexin に関しては、調べた限りでは、グルコース飢餓による影響に関する報告はないが、その発現がグルコース飢餓に影響を受ける可能性もある。事実、本実験では GRP78 および GRP94 とは対照的に、肝ミクロソームの calreticulin および calnexin は、pair-fed コントロール群においても有意な減少が認められている。このことから、この2つのタンパク質については、摂餌量減少により、抑制されているものと思われる。しかし、PenCB 処理群においては、小胞体内ストレスタンパク質の発現量が、pair-fed コントロール群と比較しても有意に減少していることから、PenCB の影響は摂餌量の減少を介してだけでなく、それ以外にも、何らかの要因を介して現われている可能性がある。また、PenCB 処理群では、calreticulin のバンドより低分子量に新たなバンドが出現したが、calreticulin に対する抗体と免疫交叉性があると言われている protein disulfide isomerase (PDI) については immunoblotting により (data not shown)、calsequestrin については肝臓では発現しないことから⁶⁵⁾、これらのタンパク質が誘導したものではないと推測された。このような分子量の calreticulin ホモログは知られておらず、現時点では、分解物であると考えている。

種々のストレスによる小胞体局在性ストレスタンパク質の誘導は、mRNA レベルで起こることが知られている⁵⁵⁾。小胞体内ストレスタンパク質の誘導機構はここ数年間で急速に明らかにされつつある。最近、脳神経細胞の顕著な脱落を伴う進行性の神経変性疾患の代表である、アルツハイマー病の原因遺伝子である presenilin-1 (PS1) が、小胞体ストレスを核に伝達する unfolded protein response (UPR) の遮断が原因であることが明らかにされた²⁹⁾⁴⁵⁾。ストレスが負荷されたとき小胞体では unfolded protein を再び折りたたませる (refolding) ような機構が活性化されるが、これを UPR と呼ぶ。

小胞体の膜上にはストレスセンサー分子 Ire1p が存在する⁹⁵⁾¹⁰¹⁾¹⁰⁴⁾。Ire1p は ER ストレスが負荷されると二量体を形成し、自己リン酸化によりリン酸化されて⁸⁶⁾、酵母では UPR に特異的な転写調節因子 Hac1p の発現を促す。Hac1p の発現はこれをコードする mRNA が Ire1p によって直接スプライシングすることで制御されている¹⁰⁾⁸⁷⁾。この Hac1p が、小胞体ストレスタンパク質の誘導に必要な配列として同定された、UPRE (unfolded protein response element) に結合し、転写誘導される⁴⁹⁾⁶⁸⁾。UPR は種を越えてよく保存されており、哺乳類においても Ire1p が同定された¹⁰¹⁾。また、最近、酵母の UPRE に匹敵する配列が哺乳動物にも存在することが報告された⁷⁹⁾¹⁰⁸⁾。小胞体局在性ストレスタンパク質のプロモーター領域に CCAAT-N9-CCACG というコンセンサス配列が見い出された。この配列は ERSE (ER-stress response element) と名付けられている。ERSE は少なくとも3つの主要な小胞体局在性ストレスタンパク質 GRP78, GRP94 および calreticulin の誘導に必要な十分条件として機能することが示されている¹⁰⁸⁾。この ERSE に結合する因子を探索した結果、ATF6 というベーシックロイジンジッパー型ヒトタンパク質が単離された¹⁰⁸⁾。ATF6 のベーシック領域のアミノ酸配列は、酵母 Hac1p のそれとかなりの相同性を示し、ATF6 が哺乳動物の UPR を担う転写調節因子であること、さらに、ATF6 はスプライシングではなくプロテオリシスにより活性化することが明らかになった³⁶⁾。変異 PS1 はこのシグナル伝達機構の Ire1p のリン酸化を特異的に減弱させるため、多くのストレスに対して感受

性を増大させ、神経細胞死を引き起こすことが明らかになった⁴⁵⁾。細胞は小胞体ストレス条件下で、この誘導系が機能しないと生存することができない⁵⁶⁾⁶³⁾。

ダイオキシン類による小胞体内ストレスタンパク質の発現抑制と毒性との関係は明らかではないが、ダイオキシン類により UPR が遮断された状態、あるいは UPR は起っているものの、何らかの要因で蛋白質の合成阻害や、分解促進により小胞体局在性ストレスタンパク質の誘導が起こらない状態に陥っているなど、細胞がストレスに対処できなくなった結果として、毒性が現れる可能性もある。

また、成長因子 (interleukin-3, IL-3) の剥奪によって GRP78 および GRP94 の発現が mRNA レベルで劇的に抑制されることが明らかにされている⁶⁾。ダイオキシン類によって IL-1 β , TNF- α , TGF- β などサイトカインのレギュレーションに変化がおこることがわかっており²¹⁾²⁶⁾⁵³⁾、サイトカインネットワークの影響なのかもしれない。

PenCB 等ダイオキシン類の毒性と生理的に重要な分子シャペロンの発現抑制という現象は、密接に関連している可能性がある。これら、小胞体局在性分子シャペロンがタンパク質生合成の段階で、関与すると思われる、分泌タンパク質のレベルについても興味もたれる。

次に、PenCB 処理により小胞体局在性ストレスタンパク質が発現抑制された状態における、他のタンパク質の生合成について検討した。Pair-fed コントロール群と比較した場合、PenCB 処理によって肝ミクロソームの albumin は減少した (Fig. 7)。Transferrin の場合は pair-fed コントロール群に比べて高かったが、free-fed コントロール群と同程度であった (Fig. 8)。

Albumin と transferrin は共に肝の小胞体で新規合成される分泌タンパク質であるが、transferrin は糖タンパク質であるのに対し、albumin は糖鎖をもたないという違いがある⁴⁾。多くの分泌タンパク質は、小胞体内腔において、まずアスパラギン残基にオリゴ糖鎖 (3個のグルコース, 9個のマンノース, 2個の N-アセチルグルコサミン) がドリコール結合体から転移され、糖鎖が付加されると末端のグルコースは直ちにグルコシダーゼ I, II によって漸次除かれる⁹⁰⁾。こうして、2つのグルコースが除かれ、その際に形成される糖鎖上

のモノグルコースを、calnexin や calreticulin が認識し、結合する³¹⁾。最後のグルコースが除かれ、これらのシャペロンが解離した時点でタンパク質の構造が未成熟の場合には、ほどけたタンパク質のむき出しになった部分(疎水性アミノ酸)と糖鎖の N-アセチルグルコサミンを認識する UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) によりグルコースが再度一個付加され⁷⁴⁾、再び calnexin や calreticulin のターゲットとなる。Calnexin や calreticulin が結合している間は小胞体内に留めておくことができる。糖タンパク質である transferrin には calnexin が結合するが、糖鎖をもたない albumin には calnexin や calreticulin は関与しないとされている⁴⁾。

Calnexin は未成熟な糖タンパク質に結合し、小胞体内に留めておくことで、小胞体-ゴルジ間輸送中にユビキチン-プロテオソーム系による分解から保護しているという報告がある¹⁰⁵⁾。Calnexin と calreticulin は類似の性質を有するが、分解系からの保護については、現時点では、主に calnexin の方が関与していると考えられている。成熟タンパク質に成りゆく過程に calnexin が関与しない albumin の場合は PenCB 処理したラット肝ミクロソームにおいて減少し、calnexin が関与する transferrin の場合は pair-fed に比べて増加する。このような結果から推測すると、PenCB による calnexin のレベルの低下が起こっているとしても、その量は小胞体内で機能を示すに十分な量であった可能性がある。また、Pair-fed コントロール群では transferrin は減少しているが、PenCB 投与では、free-fed コントロール群と同程度という結果であった。この手法では、未成熟なタンパク質と成熟タンパク質を正確に区別することはできないことを考慮すると、GRP78 や GRP94 (さらに、その他の検討を行っていない分子シャペロン) の減少によって、成熟化できない transferrin が分泌されずに、未成熟な状態で calnexin と結合して、小胞体に滞留している可能性がある。つまり、変性状態で、小胞体内に蓄積していると考えられることもできる。このことは、Fig. 1-4 において pair-fed コントロール群と比較したときに、PenCB 処理ラット肝ミクロソーム中の GRP78 と GRP94 の減少の割合が calnexin の減少に比べて明らかに大きかったことから支持される。しかしながら、本研究は immunob-

lotting による検討を行っただけであり、これらのタンパク質が本当に異常構造のタンパク質であると判断を下すことはできない。

Albumin は insulin¹²⁾、C/EBP α 、HNF1 α ¹⁰⁷⁾ で調節されることが知られており、TCDD 処理で insulin⁷¹⁾ と C/EBP α ⁵⁹⁾ が低下することも知られている。また、transferrin も insulin や estrogen によって分泌の調節が起こることも知られている³⁹⁾。このことから考えると、albumin や transferrin の低下は小胞体局在性ストレスタンパク質の低下にのみ依存するとは限らず、転写レベルでの影響を受けている可能性も否定できない。

本研究では、PenCB 処理による、ラット肝ミクロソームの GRP78 タンパク質の減少について、mRNA レベルの変化が伴うかについて、northern blotting による検討を行った。その結果、free-fed, pair-fed 両コントロール群と比較して、GRP78 mRNA 量は顕著な変化がなく、GRP78 のタンパク質レベルの低下は、mRNA レベルの低下を伴わないことが明らかになった。今回の結果のように mRNA レベルでの変化がないにもかかわらず、タンパク質レベルが減少している場合、翻訳段階での異常や、タンパク質の分解促進などが考えられる。これまでに、GRP78 の発現量の変化に関する報告はストレスによる誘導や、グルコース飢餓状態時の減少など多くなされているが、これらのほとんどが mRNA レベルの変化に起因するものである⁵⁵⁾。PenCB による GRP78 の減少のように、mRNA レベルに変化はなく、GRP78 のタンパク質レベルのみが減少している唯一の例として、自発性糖尿病を引き起こす Zucker rat がある⁹¹⁾。Zucker rat では、翻訳での異常はないらしく⁶⁰⁾⁸²⁾ タンパク質分解が促進されていると考えられている。ダイオキシン類によって、ある種のプロテアーゼが誘導もしくは活性化されている可能性も考えられる。

GRP78 は小胞体局在化シグナルと言われる KDEL 配列を C 末端に持っている⁵⁷⁾。この配列があるために、一度ゴルジ体に輸送されても KDEL receptor により認識されて⁵⁸⁾⁸⁵⁾、COP I と呼ばれるコートタンパク質に包まれて、小胞体へ送り返されることが明らかにされてきた⁹³⁾。PenCB により、この輸送過程で分解を促進するシステムが亢進したり、KDEL receptor 量

が低下したり、その機能が障害を受けるなどして、一度、小胞体から出た GRP78 が逆輸送される経路を断たれ、ミクロソーム分画からは減少しているという機構も推定できる。

本研究では、PenCB による GRP78 の減少が mRNA レベルではなく、タンパク質レベルで生じていることが明らかとなった。この結果は、カルボニックアンヒドラーゼIIIにみられるような mRNA レベルの低下とは、異なった抑制機構が存在する可能性を示唆しており、非常に興味深い。GRP78 は小胞体局在性であるのに対し、カルボニックアンヒドラーゼIIIはサイトソル酵素であるが、これら細胞下画分において、すべてのタンパク質が減少するというわけではない。タンパク質の安定性の低下には、おそらく群特異的プロテアーゼの活性化など、ある程度の幅広い領域に特異的なイベントが起こっていることを想像させる。

今回は GRP78 に関してのみの検討であるが、他の小胞体局在性ストレスタンパク質についても検討を行うことにより、その減少の機構について、新たな見解が得られるかもしれない。また、PenCB の毒性と生理的に重要なタンパク質の発現抑制という現象は、密接に関連していると思われるが、ダイオキシン類や PenCB によるタンパク質発現の負の調節機構は明らかにされていない。本研究で得られた結果は、PenCB によるタンパク質の発現の抑制機構解明のための重要な一歩になるとと思われる。

総 括

本研究では、PenCB 処理によるラット肝の小胞体局在性ストレスタンパク質の発現抑制機構の解明と、その二次的な影響を検討することを目的とし、タンパク質レベルおよび mRNA レベルでの検討を行った。本研究で得られた知見を要約して以下に示す。

1. PenCB 10 mg/kg (i. p.) 処理ラットの肝ミクロソームにおいて、小胞体局在性ストレスタンパク質 GRP78, GRP94, calreticulin および calnexin のタンパク質レベルが有意に減少していることを明らかにした。

2. 分泌タンパク質である、albumin のミクロソームでの発現量は、free-fed, pair-fed 両コントロールと比較して、PenCB 処理によって有意に減少することを

明らかにした。ミクロソームにおける transferrin 発現量は、pair-fed 群と比較すると、有意に高かったが、free-fed 群とは同程度であった。

3. GRP78 に関しては、PenCB 処理により、その mRNA レベルに顕著な変化はないことが明らかになった。

これまで、ダイオキシン類の毒性発現機構について様々な研究がなされ、AhR を介した CYP1A1 などの誘導的発現調節機構についてかなり解明されてきたにもかかわらず、未だ毒性の全貌が理解されたとは言い難い。

小胞体局在性ストレスタンパク質 GRP78 の PenCB による減少が AhR 依存的に起こっているか否かは明らかではないが、mRNA レベルの減少を伴わない GRP78 タンパク質レベルの減少は、AhR 依存的であるとしても 2 次的なものであることが予想され、あるいは AhR 非依存的なものである可能性も残されている。本研究で得られた知見が、油症の全身症状をどの程度説明し得るものであるのかについては、議論を残すところであるが、タンパク質の品質管理に関わる GRP78, GRP94, calreticulin および calnexin など小胞体ストレスタンパク質レベルの低下は、ダイオキシン類の毒性が多面的であることを一部説明するものであるかも知れない。油症に特徴的な倦怠感などの症状は、今なお原因がはっきりしていないが、ストレスタンパク質の穏やかな賦活系を見出すことが、治療につながる可能性も残されている。

引用文献

- 1) Bass J, Chiu G, Argon Y and Steiner DF: Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *J. Cell Biol.* 141: 637-646, 1998.
- 2) Beissinger M and Buchner J: How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379: 245-259, 1998.
- 3) Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY and Williams DB: Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* 19: 124-128, 1994.
- 4) Bergeron JJM, Zapun A and Thomas DY: *Glycoimmunology 2*, Edited by Axford, Plenum Press, New York, 1998.

- 5) 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.
- 6) Brewer JW, Cleveland JL and Hendershot LM: A pathway distinct from the mammalian unfolded protein response regulates expression of endoplasmic reticulum chaperones in non-stressed cells. *EMBO J.* 16: 7207-7216, 1997.
- 7) Burbach KM, Poland A and Bradfield CA: Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 8185-8189, 1992.
- 8) Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan C and Smith AE: Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63: 827-834, 1990.
- 9) Corbett EF, Oikawa K, Francois P, Tessier DC, Kay C, Bergeron JJ, Thomas DY, Krause KH and Michalak M: Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J. Biol. Chem.* 274: 6203-6211, 1999.
- 10) Cox JS and Walter P: A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 87: 391-404, 1996.
- 11) Csermely P, Miyata Y, Schnaider T and Yahara I: Autophosphorylation of grp94 (endoplasmic). *J. Biol. Chem.* 270: 6381-6388, 1995.
- 12) Davis BB, Magge S, Mucenski CG and Drake RL: Insulin-mediated post-transcriptional regulation of hepatic malic enzyme and albumin mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 1081-1087, 1988.
- 13) 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.
- 14) Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI and Bradfield CA: Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 44: 911-917, 1993.
- 15) Eguchi H, Hayashi S, Watanabe J, Goyoh O and Kawajiri K: Molecular cloning of the human AH receptor gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 615-622, 1994.
- 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) Ema M, Ohe N, Suzuki M, Mimura J, Sogawa K, Ikawa S and Fujii-Kuriyama Y: Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J. Biol. Chem.* 269: 27337-27343, 1994.
- 18) Ema M, Sogawa K, Watanabe N, Chujoh Y, Matsushita N, Gotoh O, Funae Y and Fujii-Kuriyama Y: cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 246-253, 1992.
- 19) 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.
- 20) Esser V and Russell DW: Transport-deficient mutations in the low density lipoprotein receptor. Alterations in the cysteine-rich and cysteine-poor regions of the protein block intracellular transport. *J. Biol. Chem.* 263: 13276-13281, 1988.
- 21) Fan F, Yan B, Wood G, Viluksela M and Rozman KK: Cytokines (IL-1beta and TNFalpha) in relation to biochemical and immunological effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicology* 116: 9-16, 1997.
- 22) Favreau LV and Pickett CB: Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H: quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* 266: 4556-4561, 1991.
- 23) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ: Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140: 173-179, 1996.
- 24) Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ: Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268: 722-726, 1995.
- 25) 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: 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, 福岡医誌 90 : 259-271.

26) Fujimaki H, Shiraishi F, Aoki Y and Saneyoshi K : Modulated cytokine production from cervical lymph node cells treated with B [a] P and PCB. *Chemosphere* 34 : 1487-1493, 1997.

27) Gething MJ and Sambrook J : Protein folding in the cell. *Nature* 355 : 33-45, 1992.

28) 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.

29) Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM and Mattson MP : Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide-involvement of calcium and oxyradicals. *J. Neurosci.* 17 : 4212-4422, 1997.

30) Hahn ME : The aryl hydrocarbon receptor : a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacology, Toxicology, Endocrinology* 121 : 23-53, 1998.

31) Hammond C, Braakman I and Helenius A : Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.* 91 : 913-917, 1994.

32) Hammond C and Helenius A : Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 : 523-529, 1995.

33) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 : 307-340, 1995.

34) Hartl FU : Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381 : 571-580, 1996.

35) Hawn TR, Tom TD and Strand M : Molecular cloning and expression of SmIrV1, a *Schistosoma mansoni* antigen with similarity to calnexin, calreticulin, and OvRall. *J. Biol. Chem.* 268 : 7692-7698, 1993.

36) Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T and Mori K : Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 10 : 3787-3799, 1999.

37) Hendrick JP and Hartl FU : Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Biochemistry* 62 : 349-384, 1993.

38) Hori M, Kondo H, Ariyoshi N, Yamada H and Oguri K : Species-specific alteration of hepatic

glucose 6-phosphate dehydrogenase activity with coplanar polychlorinated biphenyl : evidence for an Ah-receptor-linked mechanism. *Chemosphere* 35 : 951-958, 1997.

39) Huggenvik JI, Idzerda RL, Haywood L, Lee DC, Mcknight GS and Griswold MD : Transferrin messenger ribonucleic acid : molecular cloning and hormonal regulation in rat Sertoli cells. *Endocrinology* 120 : 332-340, 1987.

40) Ikeda M, Ishii Y, Kato H, Akazawa D, Hatsumura M, Ishida T, Yamada H and Oguri K : Suppression of carbonic anhydrase III in rat liver by a dioxin-related toxic compound, coplanar polychlorinated biphenyl, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Arch. Biochem. Biophys.* 380 : 159-164, 2000.

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

42) 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.

43) 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.

44) 石井祐次, 小栗一太 (2000) 油症発症機構に關する生化学的研究. 油症研究 —30年の歩み— pp. 143-162 (小栗一太・赤峰昭文・古江増隆編) 九州大学出版会, 福岡.

45) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, St George-Hyslop P, Takeda M and Tohyama M : Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nature Cell Biol.* 1 : 479-485, 1999.

46) 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.

47) 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.

48) Koch GL: Reticuloplasmins: a novel group of proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Sci.* 87: 491-492, 1987.

49) Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething MJ and Mori K: The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 13: 877-890, 1993.

50) Kozutsumi Y, Normington K, Press E, Slaughter C, Sambrook J and Gething MJ: Identification of immunoglobulin heavy chain binding protein as glucose-regulated protein 78 on the basis of amino acid sequence, immunological cross-reactivity, and functional activity. *J. Cell Sci. Suppl.* 11: 115-137, 1989.

51) Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething M and Sambrook J: The presence of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332: 462-464, 1988.

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

53) Lai ZW, Hundeiker C, Gleichmann E and Esser C: Cytokine gene expression during ontogeny in murine thymus on activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Mol. Pharmacol.* 52: 30-37, 1997.

54) Linnik KM and Herscovitz H: Multiple molecular chaperones interact with apolipoprotein B during its maturation. The network of endoplasmic reticulum-resident chaperones (ERp72, GRP94, calreticulin, and BiP) interacts with apolipoprotein B regardless of its lipidation state. *J. Biol. Chem.* 273: 21368-21373, 1998.

55) Lee AS: Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* 12: 20-23, 1987.

56) Lee AS: Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 267-273, 1992.

57) Lewis MJ and Pelham HR: A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348: 162-163, 1990.

58) Lewis MJ, Sweet DJ and Pelham HR: The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* 61: 1359-1363,

1990.

59) Liu PC, Dunlap DY and Matsumura F: Suppression of C/EBPalpha and induction of C/EBPbeta by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mouse adipose tissue and liver. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1647-1655, 1998.

60) Macejak DG and Sarnow P: Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353: 90-94, 1991.

61) Matsumura F: Mechanism of action of dioxin-type chemicals, pesticides, and other xenobiotics affecting nutritional indexes. *Amer. J. Clin. Nutr.* 61: 695S-701S, 1995.

62) Mayer MP and Bukau B: Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol. Chem.* 379: 261-268, 1998.

63) McMillan DR, Gething MJ and Sambrook J: The cellular response to unfolded proteins: inter-compartmental signaling. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 540-545, 1994.

64) Michalak M, Milner RE, Burns K and Opas M: Calreticulin. *Biochem. J.* 285: 681-692, 1992.

65) Milner RE, Baksh S, Shemanko C, Carpenter MR, Smillie L, Vance JE, Opas M and Michalak M: Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 266: 7155-7165, 1991.

66) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M and Fujii-Kuriyama Y: Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2: 645-654, 1997.

67) Moore SE and Spiro RG: Inhibition of glucose trimming by castanospermine results in rapid degradation of unassembled major histocompatibility complex class I molecules. *J. Biol. Chem.* 268: 3809-3912, 1993.

68) Mori K, Sant A, Kohno K, Normington K, Gething MJ and Sambrook JF: A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J.* 11: 2583-2593, 1992.

69) Motojima K and Goto S: Rat liver BiP/GRP78 is down-regulated by a peroxisome-proliferator, clofibrate. *FEBS Lett.* 308: 207-210, 1992.

70) 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.

- 71) Nishizumi M and Higaki Y: Studies on mechanism of wasting syndrome in TCDD-intoxicated rats. *Fukuoka Igaku Zasshi* 88: 200-204, 1997.
- 72) Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z and Yaffe D: The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res.* 11: 1759-1771, 1983.
- 73) Oguri K, Hatsumura M, Ishii Y, Koga Y, Ariyoshi N and Yoshimura H: Modification of gluconeogenesis is not involved in the co-planar PCB toxicity in highly sensitive guinea pigs. *Chemosphere* 27: 2295-2303, 1993.
- 74) Parodi AJ, Mendelzon DH, Lederkremer GZ and Martin BJ: Evidence that transient glucosylation of protein-linked Man9GlcNAc2, Man8GlcNAc2, and Man7GlcNAc2 occurs in rat liver and *Phaseolus vulgaris* cells. *J. Biol. Chem.* 259: 6351-6357, 1984.
- 75) Peterson JR, Ora A, Van PN and Helenius A: Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol. Biol. Cell* 6: 1173-1184, 1995.
- 76) Poland A, Gleenlee WF and Kende AS: Studies on the mechanism of action of the chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320: 214-230, 1979.
- 77) 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.
- 78) 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.
- 79) Roy B and Lee AS: The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. *Nucleic Acids Res.* 27: 1437-1443, 1999.
- 80) Rushmore TH, King RG, Paulson KE and Pickett CB: Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 3826-3830, 1990.
- 81) Saeki S, Yoshihara S, Uchino Y and Yoshimura H: Improved method of the synthesis of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl. *Fukuoka Acta Medica* 70: 85-87, 1979.
- 82) Sarnow P: Translation of glucose-regulated protein 78/immunoglobulin heavy-chain binding protein mRNA is increased in poliovirus-infected cells at a time when cap-dependent translation of cellular mRNAs is inhibited. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 5795-5799, 1989.
- 83) Schmidt JV and Bradfield CA: Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 55-89, 1996.
- 84) Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC and Bradfield CA: Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 6731-6736, 1996.
- 85) 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.
- 86) Shamu CE and Walter P: Oligomerization and phosphorylation of the ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* 15: 3028-3039, 1996.
- 87) Sidrauski C and Walter P: The transmembrane kinase ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mrna splicing in the unfolded protein response. *Cell* 90: 1031-1039, 1997.
- 88) Sorger PK and Pelham HR: The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. *J. Mol. Biol.* 194: 341-344, 1987.
- 89) Spindler SR, Crew MD, Mote PL, Grizzle JM and Walford RL: Dietary energy restriction in mice reduces hepatic expression of glucose-regulated protein 78 (BiP) and 94 mRNA. *J. Nutr.* 120: 1412-1417, 1990.
- 90) Suh K, Bergmann JE and Gabel CA: Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins. *J. Cell Biol.* 108: 811-889, 1989.
- 91) 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.
- 92) 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, 1999.

- 93) Teasdale RD and Jackson MR: Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 27-54, 1996.
- 94) Tillman JB, Mote PL, Dhahbi JM, Walford RL and Spindler SR: Dietary energy restriction in mice negatively regulates hepatic glucose-regulated protein 78 (GRP78) expression at the posttranscriptional level. *J. Nut.* 126: 416-423, 1996.
- 95) Tirasophon W, Welihinda AA and Kaufman RJ: A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 12: 1812-1824, 1998.
- 96) Tjoelker LW, Seyfried CE, Eddy RJ, Byers MG, Shows TB, Calderon J, Schreiber RB and Gray PW: Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. *Biochemistry* 33: 3229-3236, 1994.
- 97) 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.
- 98) Wada I, Imai S, Kai M, Sakane F and Kanoh H: Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. *J. Biol. Chem.* 270: 20298-20304, 1995.
- 99) Wada I, Rindress D, Cameron PH, Ou WJ, Doherty JJ, Louvard D, Bell AW, Dignard D, Thomas DY and Bergeron JJ: SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 266: 19599-19610, 1991.
- 100) 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.
- 101) Wang XZ, Harding HP, Zhang YH, Jolicoeur EM, Kuroda M and Ron D: Cloning of mammalian ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 17: 5708-5717, 1998.
- 102) Weber LW, 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.
- 103) Welch WJ: How cells respond to stress. *Sci. Am.* 268: 56-64, 1993.
- 104) Welihinda AA and Kaufman RJ: The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*-oligomerization and trans-phosphorylation of ire1p (ern1p) are required for kinase activation. *J. Biol. Chem.* 271: 18181-18187, 1996.
- 105) White AL, Guerra B, Wang J and Lanford RE: Presecretory degradation of apolipoprotein A is mediated by the proteasome pathway. *J. Lipid Res.* 40: 275-286, 1999.
- 106) 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. Pharmacol.* 141: 68-75, 1996.
- 107) Wu KJ, Wilson DR, Shih C and Darlington GJ: The transcription factor HNF1 acts with C/EBP alpha to synergistically activate the human albumin promoter through a novel domain. *J. Biol. Chem.* 269: 1177-1182, 1994.
- 108) Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T and Mori K: Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273: 33741-33749, 1998.
- 109) 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 2001-3-16)

平成13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 伊 東 祐 之

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