日薬理誌 (*Folia pharmacol. japon.*) 72, 955～967 (1976)

ポリ塩化ビフェニール (PCB) によるマウス，ラット肝ミクロゾーム酵素誘導と組織中 PCB 量の関連について

MAR 27 1978

島田　力，布浦　由榮，北中　英良
岩上　正哉，水田　泰子
大阪府立公衆衛生研究所*

(昭和51年2月23日)

要約：カネクロール (KC) 300, 400, 500, 600, (塩素含量はそれぞれ 43, 48, 55, 61%) をマウス，ラットに1回投与し pentobarbital による睡眠時間，肝ミクロゾーム蛋白質含量，組織中の PCB 量あるいはそのガスクロマトグラムパターンの変動などにおよぼす影響を検討した．各カネクロールを1回経口投与し pentobarbital による睡眠時間を測定すると，投与初期には睡眠延長作用があるが，時間経過にしたがって睡眠短縮作用となり二相性の変化を示した．初期の睡眠延長作用はマウスに強く現われ，塩素数の少ない KC-300 が最も強い変化を示した．睡眠短縮作用はラットで強く，塩素数の多いカネクロールほど強い作用を示した．これらの睡眠時間におよぼす PCB の影響には肝系，系統差のあることが考えられる．ラットにおける睡眠短縮作用あるいはサイトクローム (Cyt.) P-450 含量の増大は塩素数の多いカネクロールほど長くとどかず，投与初期では塩素数の多少にかかわらず同じ程度の変化を示す．カネクロール投与により誘導される Cyt. P-450 は，CO スペクトルで 440nm に極大値を有する．また Cyt. b_5 含量の増大は Cyt. P-450 の場合と変化が異なり，極大値に至る時間が遅れる．KC-300 をラットに1回経口投与した場合の組織中への移行は，投与後8時間経過までは肝臓で高い値を示すが，それ以後は脂肪中の濃度が高くなる．脂肪中の PCB 濃度は，酵素誘導作用と相関性を示し，塩素数の多いカネクロールほど高い値を示した．ラットにおける組織中 PCB のガスクロマトグラムから，保持時間の長いピークほど体内への吸収がよく，また長く残留する．クロマトグラム上のピーク15の成分は，体内からの消失速度が早い．マウスの睡眠延長あるいはラットの睡眠短縮作用における経口と腹腔内投与の比較では，経口投与の方がどちらの変化も早く現われ，経口的な PCB の組織への移行の早いことを示す．

緒　　言

肝ミクロゾーム薬物代謝酵素は種々の薬物，農薬，発癌性物質，その他の化学物質で誘導されることが知られており[1]，この誘導現象は，動物の種類，系統などにより種々異なった反応を示す場合のあることも指摘されている[2,3]．周知のごとく薬物代謝酵素は，生体の解毒機構と考えられる反面，種々の化学物質の活性代謝産物をつくる場合も多く[4]，薬物毒性あるいは複合毒性を考えるうえで重要な酵素であるといえる．

Polychlorinated biphenyls (PCB) は，209種類の異性体をもち[5]，近年環境汚染物質として問題となったのは，これらのうちの約80種類の異性体の混合物であると報告されている[6]．この PCB もやはり肝ミクロゾーム薬物代謝酵素を誘導する物質で，最近数多くの酵素誘導に関する研究が報告されている[7～10]．一般に塩素数の多い PCB ほど酵素誘導作用は強い傾向にあるが[11]，Johnstone ら[10] は必ずしも塩素数の多い少ないが誘導の強さに反映するのではなく，むしろ塩素のつく位置により決定される可能性のあることを指摘しており，PCB による酵素誘導作用の複雑さを示しているものと考えられる．しかも PCB は脂溶性の高い化合物で組織残留性が強く[12]，したがって酵素誘導作用が長く持続し，このため時には生体内成分の代謝に変化を与えたり，他の化学物質の代謝や PCB 自体の代謝に影響をおよぼし[13,14]，種々毒性発現の要因になることが考えられる．

そこで今回著者らは，マウス，ラットにおける PCB の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系におよぼす影響につ

* 〒537 大阪市東成区中道1－3－69

DSW　031586

[illegible] LAW [TITLE 17 U.S. CODE].

STLCOPCB4015548

いて検討を行ない，若干の知見を得たので報告する．

実験方法

実験動物にラットとマウス（いずれも日本クレアKKより購入）を使用した．ラットは SD-JCL 系（雄，雌，5週令，体重約 120 g），Wistar-JCL 系（雄，5週令，体重約 125 g）ならびに Donryu-JCL 系（雄，5週令，体重約 125 g）を用い，マウスは ICR-JCL 系（雄，雌，5週令，体重約 23 g）ならびに ddN 系（雄，5週令，体重約 22g）を用いて実験をおこなった．

PCB はカネクロール 300, 400, 500, 600（塩素化学製，以下 KC-300, KC-400, KC-500, KC-600）を用いた．これらのガスクロマトグラムは Fig. 1 に示す通りである．各カネクロール中の塩素の含有量[9]は，KC-300 (42.0%)，KC-400 (47.9%)，KC-500 (54.0%)，KC-600 (60.7%) である．投与方法はラット，マウスともオリーブ油に溶解した各 PCB，100 mg/kg をラットでは体重 100 g あたり 0.5 ml，マウスでは 20 g あたり 0.2 ml，1回経口あるいは腹腔内投与した．また対照群の動物にはオリーブ油のみを投与した．

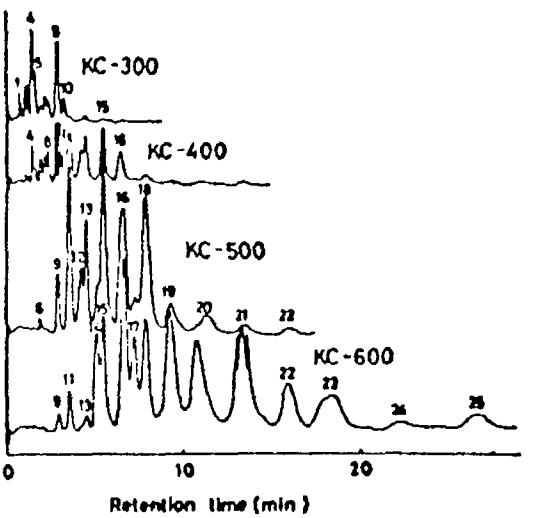

Fig. 1. Gaschromatography (³H-ECD) patterns of various Kanechlors used in this study.

睡眠時間の測定には Nembutal® を用い，投与量はマウスでは pentobarbital として 50 mg/kg を，ラットでは雄は 50 mg/kg，雌では 25 mg/kg をそれぞれ腹腔内投与し，正向反射の消失から回復までを睡眠時間とした．

肝ミクロゾームの調製ならびにチトクローム P-450, b_5 (Cyt. P-450, Cyt. b_5) の測定は Omura and Sato[10] の方法に準じた．すなわちエーテル麻酔下肝臓をとり出し，4倍量の 0.25 M シュ糖溶液でホモゲナイズし，9000×g，15分遠心上清を 105000×g，90分遠心し，ミクロゾーム分画を得た．次いでこの分画を 0.15 M 塩化カリウム溶液で洗ったのち，0.15 M シュ糖溶液に懸濁し，以下の測定を行なった．Cyt. P-450 は dithionite 還元ミクロゾームの片方の cuvette に一酸化炭素 (CO) を通気させ CO- 差スペクトルを 450 nm と 490 nm の間の分子吸光係数を 91 $cm^{-1}mM^{-1}$ として，また Cyt. b_5 は NADH による酸化還元差スペクトルを 409 nm と 424 nm の間の分子吸光係数を 185 $cm^{-1}mM^{-1}$ として，それぞれ島津 MPS-50 L 自記分光光度計を用いて定量した．蛋白量の定量は Lowry ら[11] の方法に準じた．組織中の PCB 量[12] は，組織をアルコール性水酸化カリウム溶液で加水分解後，n-ヘキサン抽出を行ない，この抽出液からシリカゲルカラムを用いて PCB 画分を捕集し，濃縮したのちガスクロマトグラフィー (GC) により定量した．GC による分析は Varian 2100 (³H-

DSW 031587

NOTICE: THIS MATERIAL MAY BE PROTECTED BY

STLCOPCB4015549

ECD) を用い，担体に 1% OV-1，固定相に Gas Chrom Q (100～120 mesh) をガラスカラムに充填して行なった．PCB の定量は，Fig. 1 に示すように得られたクロマトグラムにピーク番号をつけ，各ピーク番号の高さそれぞれについて投与したカネクロールの対応する各ピークそれぞれを標準として ppm を算出した．組織中の PCB 濃度は，各カネクロールの主要ピーク数本から得られた ppm を平均してあらわした．

実験結果

1. マウスにおける実験

1) PCB 投与初期における睡眠延長作用について

ICR 系雄マウスに各種カネクロールを 100 mg/kg，1 回経口投与し，一定時間後に pentobarbital による睡眠時間を測定した．Fig. 2 に示すように各種カネクロール投与 4～5 時間目に極大値をもつ睡眠延長作用がみられた．この延長作用は KC-300 で最も強く，対照群の約 4 倍にまで増加する．次いで KC-400 が約 3 倍，KC-500，KC-600 が 1.5～2 倍と塩素数の少ないほど延長作用の強い傾向である．

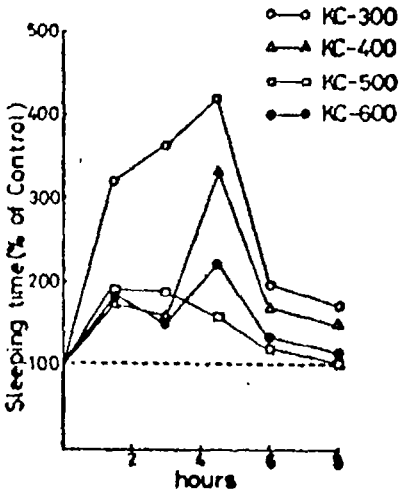

Fig. 2. Pentobarbital sleeping time of male ICR strain mice after oral dosing of PCB (100 mg/kg). Control mice slept for 50～70 min. Each point represents the mean for 3 to 8 mice.

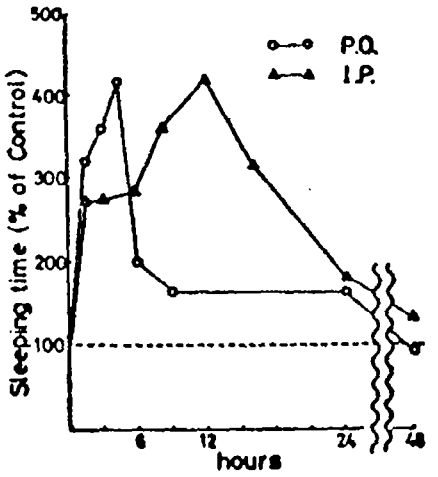

Fig. 3. Pentobarbital sleeping time of male ICR strain mice after oral dosing and intraperitoneal injection of KC-300 (100 mg/kg). Each point represents the mean for 3 to 8 mice.

Fig. 3 は睡眠延長作用の最も強い KC-300 を ICR 系雄マウスに経口ならびに腹腔内にそれぞれ 100 mg/kg，1 回投与し，一定時間後に睡眠時間を測定した結果である．ここで明らかなように，投与後 5～6 時間目までは経口投与の方が強い睡眠延長作用を示し，以後両者の関係は逆転する．経口投与の場合は睡眠延長作用の極大値を示す時間は 4～5 時間目にあるが，腹腔内投与の場合はこれより遅れて約12時間目にあり，しかもこの作用は経口投与に比べて長く持続する．

2) マウスにおける PCB の睡眠時間におよぼす系統差について

ICR 系ならびに ddN 系雄マウスに KC-300, KC-500 を 100 mg/kg，1 回経口投与し，投与後 3 時間目に pentobarbital による睡眠時間を測定した．Table 1 に示すように，ddN 系マウスにおいても KC-300 投与群では強い睡眠延長作用を示す．ただこの場合，pentobarbital 50 mg/kg 投与で，ICR 系マウスの対照群の睡眠時間が83分であるのに対し，ddN 系マウスの場合は 167 分と ICR 系マウスの約 2 倍の値を認めた．したがって対照群に対する増加率を計算すると，ddN 系マウスの場合は約 2 倍となり，ICR系マウスの増加率の約

DSW 031588

COPYRIGHT LAW [TITLE 17 U.S. CODE].

STLCOPCB4015550

Table 1. Pentobarbital sleeping time of female ICR and ddN strain mice after oral dosing of KC (100 mg/kg).

	Sleeping time (min)		
	Control	KC-300	KC-500
ICR	83±29 (100)	300±33*** (362)	129±24* (155)
ddN	167±76 (100)	348±83** (209)	167±70 (100)

Pentobarbital sleeping time was measured 3 hr after KC treatment. Number in parenthesis indicates the percentage to corresponding controls. Each value represents the mean for 6 to 8 mice and S.D.
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

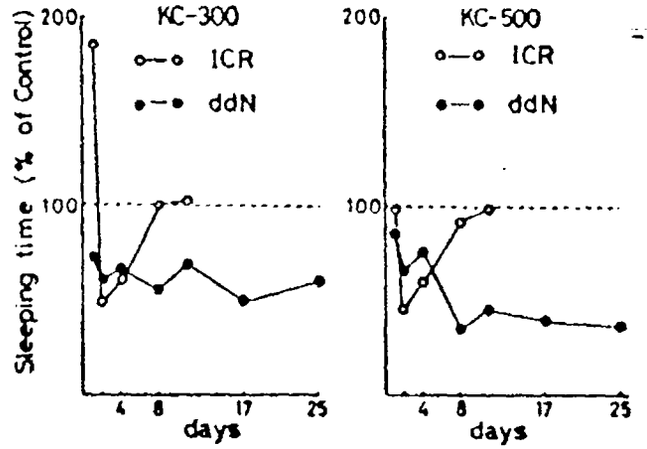

Fig. 4. Pentobarbital sleeping time of female ICR and ddN strain mice after oral dosing of KC (100 mg/kg). Each point represents the mean for 5 to 8 mice.

3,6倍より低い結果となった．KC-500 投与の場合，ddN 系マウスでは対照群と変わらなかった．なお ICR 系雄マウスにおける睡眠延長作用は，先の雄マウスにおけるのと同程度で，性差はみられなかった．

マウスにおいては，PCB 投与初期では睡眠時間の延長作用があるが，48時間目あたりからは逆に睡眠時間の短縮作用がみられ，典型的な二相性の変動を示した．Fig. 4 にその睡眠短縮作用の経時変化の結果を示した．ICR 系マウスでは KC-300, KC-500 とも同程度の睡眠短縮作用がみられ，投与後48時間目で対照群の約50%の値を示し，投与後8日目前後で対照群のレベルにもどる．一方 ddN 系マウスの場合は睡眠短縮作用の回復は遅く，PCB 投与後25日目においても KC-300 投与群では対照群の約60%，KC-500 投与群では対照群の約40%の値がみられ，塩素数の多いほどその持続は強く ICR 系マウスの場合とは異なった結果であった．

2. ラットにおける実験

1) ラットにおける睡眠短縮作用について

SD 系雄ラットに各種カネクロールを 100 mg/kg，1回経口投与し，一定時間後に pentobarbital による睡眠時間を測定した．Fig. 5 にその結果を示したが，用いたカネクロールすべてで強い睡眠短縮作用が認められ，変化の最も強いのは投与後4日目前後であった．この際投与後2日目の時点では，その睡眠短縮作用の強さは各種カネクロールでそれほど大きな差はなく，投与後4日目以降になって塩素数の多い PCB ほど強い作用となってあらわれた．以後，塩素数の少ない PCB では比較的回復が早く，KC-300 投与群では16日前後で対照群の

DSW 031589

NOTICE: THIS MATERIAL MAY BE PROTECTED BY C

STLCOPCB4015551

レベルにもどる．塩素数の多い KC-600 投与群では回復が遅く，投与後40日目あたりでも対照群の60%の値にとどまった．なおマウスにみられた投与初期における睡眠延長作用は，ラットでは大きな変化を示さず，KC-300を100 mg/kg，1回経口投与し，3時間目に測定すると，対照群より約20%の増加を示したにすぎず，また KC-500 投与では睡眠延長作用は認められなかった．

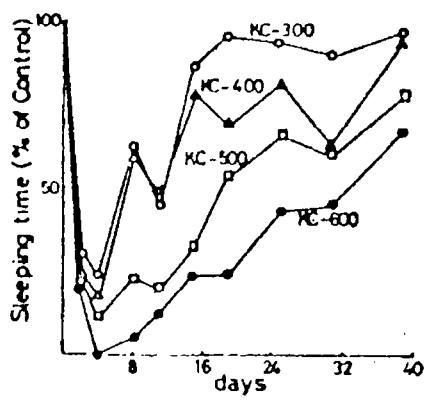

Fig. 5. Pentobarbital sleeping time of male SD strain rats after oral dosing of KC(100 mg/kg). Control rats slept for 50~70 min. Each point represents the mean for 6 to 7 rats.

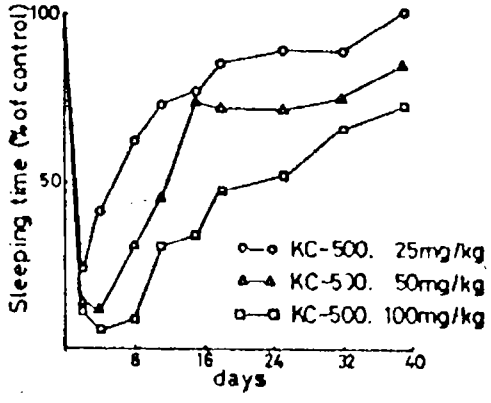

Fig. 6. Pentobarbital sleeping time of female SD strain rats after oral dosing of KC-500. The administered dosages were 25, 50 and 100 mg/kg. Each point represents the mean for 6 to 7 rats.

次いで，PCB の投与量と pentobarbital による睡眠時間の関係を調べるため，SD 系雄ラットに KC-500 を 25 mg/kg，50 mg/kg，100 mg/kg，1回経口投与し，睡眠時間を測定した (Fig. 6)．ここで明らかなように，PCB 投与による睡眠短縮作用と投与量との間には相関性のあることが認められた．

ラットにおける性差については，Fig. 5 の雄ラットに KC-500 を 100 mg/kg 投与した場合と，Fig. 6 の雄ラットに 100 mg/kg 投与した場合の経時変化を比較すると，両者の curve は殆ど同一で，したがって PCB

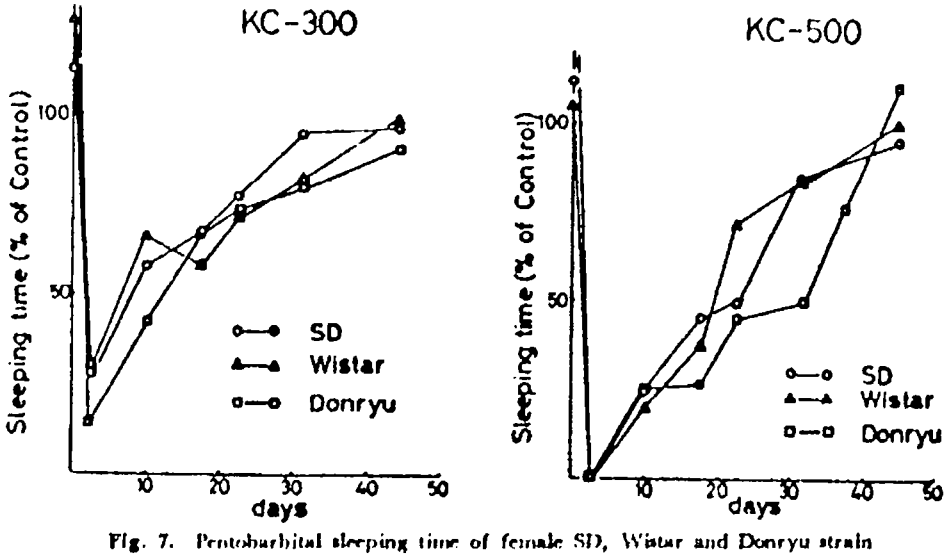

Fig. 7. Pentobarbital sleeping time of female SD, Wistar and Donryu strain rats after oral dosing of KC (100 mg/kg). Each point represents the mean for 6 to 8 rats.

DSW 031590

YRIGHT LAW (TITLE 17 U.S. CODE).

STLCOPCB4015552

投与による酵素誘導作用には性差がないものと考えられる．ただ pentobarbital の投与量は雌では 50mg/kg，雄では 25mg/kg で，対照群ラットの睡眠時間は50～70分であり，pentobarbital の代謝と変には性差がある．

マウスでは PCB 投与によって酵素誘導作用に系統差のあることを認めたが，ラットでの影響を調べるために，SD 系，Wistar 系，Donryu 系ラットに KC-300, KC-500 をそれぞれ1回経口投与し睡眠時間を経時的に測定した．Fig. 7 に示すように KC-300, KC-500 ともその睡眠増強作用には系統差を認めなかった．

2) 肝ミクロゾーム Cyt. P-450, Cyt. b_5 含量におよぼす影響

先のラットにみられた睡眠増強作用と肝ミクロゾーム中のチトクローム含量との関係を知るために，SD 系雌ラットに各種カネクロールを 100 mg/kg，1回経口投与し，Cyt. P-450 ならびに Cyt. b_5 含量を経時的に測定した．Fig. 8 に Cyt. P-450 含量の経時変化を示したが，結論として，睡眠増強作用と Cyt. P-450 含量との間には正相関関係が認められた．すなわち，PCB 投与後12時間目では塩素数の多少にかかわらず Cyt. P-450 含量は約2倍に増加し，時間の経過にしたがって塩素数の少ない KC-300 では早く対照群レベルにもどる．塩素数が多くなると Cyt. P-450 含量の増大が大きく，しかも長く続く結果となった．

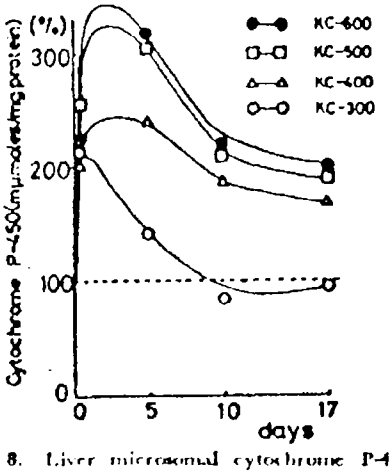

Fig. 8. Liver microsomal cytochrome P-450 contents of female SD strain rats after oral dosing of KC (100 mg/kg). Mean control value was 0.708 nm/kg protein. Each point represents the mean for 3 rats.

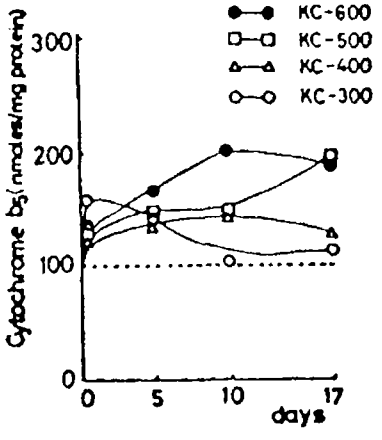

Fig. 9. Liver microsomal cytochrome b_5 contents of female SD strain rats after oral dosing of KC (100 mg/kg). Mean control values was 0.387 nm/mg protein. Each point represents the mean for 3 rats.

一方 Cyt. b_5 の場合 (Fig. 9) は Cyt. P-450 の場合とは少し異なり，PCB 投与後12時間目では KC-300 投与群で最も含量増大が高かった．しかし，時間経過にしたがってやはり塩素数の多い PCB ほど Cyt. b_5 含量の増大が長く続いた．ただ PCB 投与による Cyt. P-450 含量の増大は KC-400, KC-500, KC-600 ではその極大値が投与後2～5日目前後にあるのに対し，Cyt. b_5 の場合は極大値に達する時間がこれより遅れる傾向であった．

肝ミクロゾーム中の Cyt. P-450 は，分光学的に二種類に分類されることが報告されている[19]．最近になって Alvares ら[19] は，54%の塩素を含有する PCB である Aroclor 1254 をラットに投与し，3-methylcholanthrene で誘導されるのと同様に，分光学的に CO- 差スペクトルで 448nm に極大吸収を示す，いわゆる Cyt. P-448 が誘導されることを報告した．そこで著者らもカネクロールにより誘導された肝ミクロゾーム Cyt. P-450 の CO- 差スペクトルを検討すると，Fig. 10 に示すように 448 nm に極大吸収を示す Cyt. P-448 が誘導されることが明らかとなった．しかもこの Cyt. P-448 の誘導は，KC-200 投与ラットにおいても含量増大のある時期ではほぼにおこっており，基本的に PCB 投与で Cyt. P-448 の誘導されることが示された．

3) カネクロール投与ラットの組織中 PCB 濃度について

各種カネクロール投与ラットの組織中 PCB 濃度を実験方法の項に記した方法でガスクロマトグラフィーよ

DSW 031591

STLCOPCB4015553

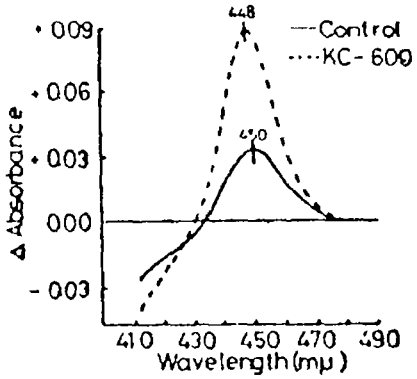

Fig. 10. CO-difference spectrum of liver microsomes from rat treated with KC-600. The control rat was given olive oil alone. Twelve hours after treatment, CO-difference spectrum were determined using microsomes equivalent to 1 mg protein per ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4.

り定量した。主予備実験に KC-500 を SD 系雄ラットに 100 mg/kg, 1回経口投与し，投与後48時間までの血液中 KC-500 濃度の推移を Fig. 11 に示した。肝，腎，血液への PCB の移行は比較的早く，約5～12時間で最高に達し，特に肝への移行率は腎，血液に比べて強くあらわれた。脂肪中の PCB 濃度は投与後8時間前後で肝臓の濃度より高くなり，以後増加を続けた。この実験から経口投与により PCB が血液に速やかに吸収されることと脂肪組織への蓄積性の強さが明らかである。

次いで，先の肝ミクロゾームチトクローム含量を定量したラットについて，脂肪組織中の PCB 濃度を測定し，その結果を Fig. 12 に示した。これは肝ミクロゾーム酵素誘導と脂肪組織中の PCB 蓄積との間に関連のあることが予想されたために行なった実験である。Fig. 12 からも明らかなように，塩素数の多い KC-500, KC-600 では脂肪組織中に長く残留しており，塩素数の多少と脂肪組織への蓄積性に密接な関係がある。これらの結果から，脂肪組織中の PCB 濃度が肝ミクロゾーム酵素誘導作用を決定するものと考えられる。

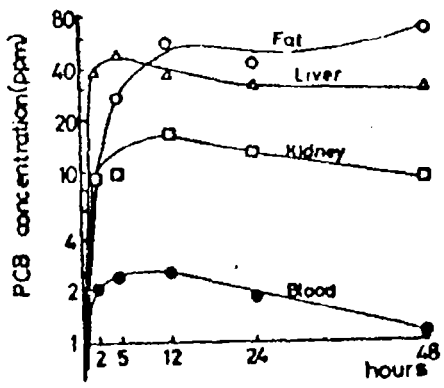

Fig. 11. PCB levels in tissues of male SD strain rats after oral dosing of KC (100 mg/kg). Each point represents the mean for 3 rats.

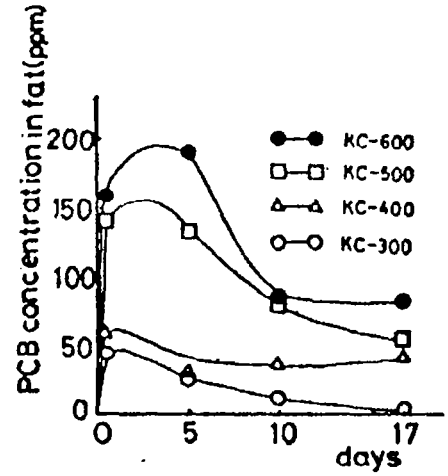

Fig. 12. PCB levels in adipose tissues of female SD strain rats after oral dosing of KC (100 mg/kg). Each point represents the mean for 3 rats.

DSW 031592

STLCOPCB4015554

Fig. 1 に示したように，ECD で得られた PCB のガスクロマトグラムで23本のピークに分離されたが，ほぼ同じクロマトグラム上，保持時間の近くなるにしたがって強度の弱い成分であることがわかっている．そこで KC-500 投与ラットのクロマトグラム上のピークのなかから代表的と思われるピークを選び，その消長について検討した．

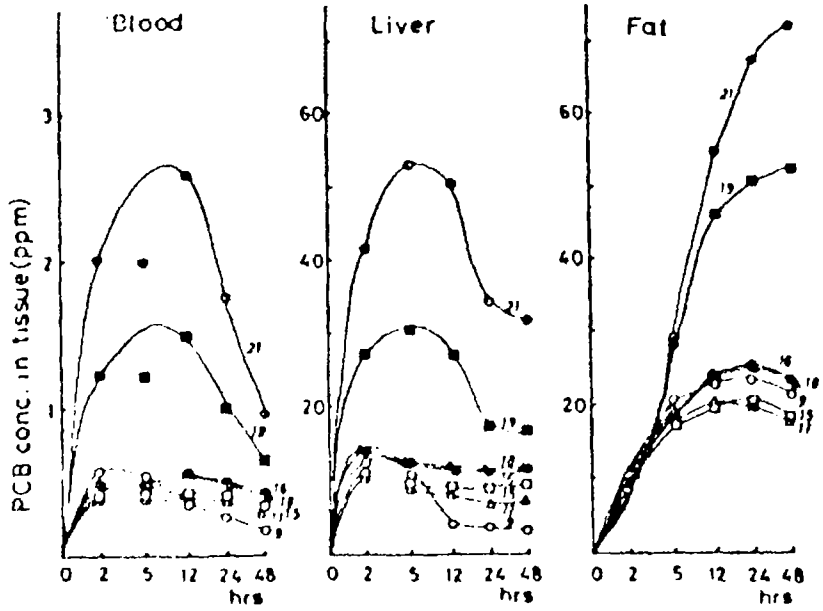

Fig. 13. PCB levels in tissues of male SD strain rats after oral dosing of KC-500 (100 mg/kg). *Number in the figure*; the peak number obtained from gaschromatogram. Ordinate; the concentration of each peak estimated from standard KC-500. Each point represents the mean for 3 rats.

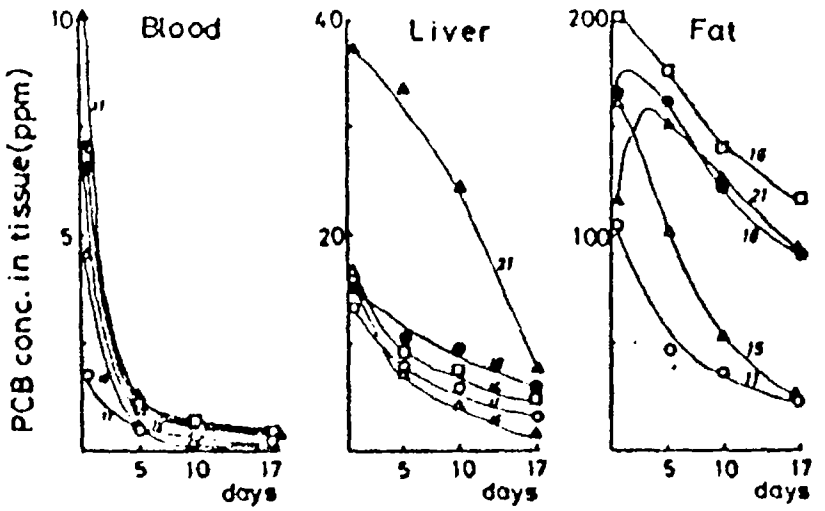

Fig. 14. PCB levels in tissues of female SD strain rats after oral dosing of KC-500 (100 mg/kg). *Number in the figure*; the peak number obtained from gaschromatogram. Ordinate; the concentration of each peak estimated from standard KC-500. Each point represents the mean for 3 rats.

DSW 031593

NOTICE: THIS MATERIAL MAY BE PROTECTED BY

STLCOPCB4015555

Fig. 13 に雄ラットにおける投与初期の変化を，Fig. 14 にはラットにおける投与後17日目までの経時変化を示した．投与初期の変化では，血液，肝臓で類似したパターンを示し，保持時間の長い成分ほど残存率が大であった．血液，肝臓に比べ，脂肪組織ではより各成分とも蓄積傾向が強く，なかでも保持時間の長い成分ほど残存率が大となる結果であった．

次いで，ラットにおける17日目までの結果（Fig. 14）をみると，血液では極大値に達してからは各成分とも速やかに減少するが，肝臓においては保持時間の長い成分であるピーク21では減少速度が緩やかで，血液の場合とは少し異なった挙動を示した．脂肪組織では肝臓よりもその傾向が強くあらわれ，どの成分も減少速度が緩やかになることが特徴である．すなわち，これら血液，肝，脂肪組織中の KC-500 の減少パターンのなかで，ピーク15の減少速度が著しいことが注目される．

4) KC-500 の睡眠時間延長作用における経口ならびに腹腔内投与の比較

マウスの睡眠時間の延長作用において，経口投与と腹腔内投与では，経口投与の場合の方が早く変化があらわれ，時間経過にしたがって腹腔内投与の変化が差に強くなることを示したが，ラットにおける睡眠時間延長作用の場合について，経口と腹腔内投与の比較実験を試みた．

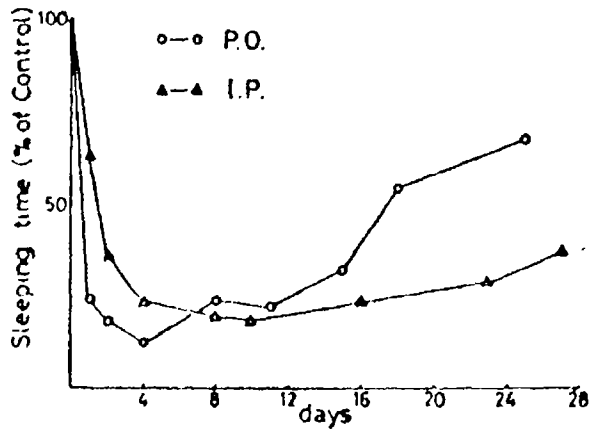

Fig. 15. Pentobarbital sleeping time of male SD strain rats after oral and intraperitoneal administration of KC-500 (100 mg/kg). Each point represents the mean for 6 to 8 rats.

Fig. 15 に SD 系雄ラットに KC-500 を経口ならびに腹腔内に 100 mg/kg，1回投与し，経時的に pentobarbital による睡眠時間を測定した結果を示した．経口投与の場合は，その睡眠短縮作用が4日目で最も強く，以後徐々に対照群レベルに向かう．一方腹腔内投与の場合は，KC-500 投与後7日目あたりまでは経口投与より睡眠短縮作用は弱いが，以後逆転し，しかもその作用は長く持続する結果となった．

考　　察

著者らは今回の実験でまず最初に pentobarbital による睡眠時間を測定することにより，PCB のマウス，ラットにおける肝ミクロソーム薬物代謝酵素系におよぼす影響を検討した．Pentobarbital による睡眠時間を測定することは，in vivo における薬物代謝酵素活性の指標となることが明らかとなっている[9]．したがって睡眠延長作用は pentobarbital の代謝阻害，すなわち薬物代謝酵素阻害を，睡眠短縮作用は pentobarbital の代謝促進，すなわち薬物代謝酵素誘導を表わすものと考えられる．PCB 投与マウスでは投与初期に睡眠延長作用があらわれ，とくに塩素数の少ない KC-300 では投与後4時間目に対照群の約4倍の値を示した．一方ラットではマウスのような強い睡眠延長作用を示さず，PCB 投与後3時間目においても，対照群より20%程度増加するにすぎない．投与初期にあらわれた睡眠延長作用は，時間経過にしたがって睡眠短縮作用としてあらわれる．この

DSW 031594

... LAW (... 17 U.S. CODE).

STLCOPCB4015556

酵素誘導作用はマウスに比べラットで強く，しかも PCB の投与量と反応の間に相関性のあることを認めた．また，マウスにおいては ICR 系と ddN 系との間にはその酵素誘導作用に差がみられ，ICR 系では KC-300, KC-500 とも投与後24時間で対照値の約 1/2 となり同程度の変化を示すが，ddN 系では誘導に時間が長く，しかも濃度のより高い方がより強い反応を示した．ラットではマウスにみられたような系統差はなく，またマウスにおける肝の酵素誘導作用，あるいはラットにおける誘導作用の実験から，PCB の生体影響には大きな性差のないことが考えられた．以上のことから，pentobarbital による睡眠時間を指標とした PCB の薬物代謝酵素系への影響は，マウスとラットの間に反応量あるいは反応型式に差のあること，またマウスにおいては反応に系統差のあることが考えられる．

古くから種々な化学物質による肝ミクロソーム酵素誘導現象は認められているが，この誘導作用は性，年令，種，系統により個体に変動することも知られている[7]．たとえば，Brazda ら[8] は nikethamide を動物に投与し pentobarbital による睡眠時間を測定すると，マウス，ラット，ウサギでは酵素誘導作用としてあらわれるが，モルモット，ニワトリでは変動せず，動物種によって反応が変化することを報告している．また Nebert ら[9] も肝ミクロソーム酵素誘導剤である phenobarbital あるいは 3-methylcholanthrene を動物に投与し arylhydrocarbon hydroxylase 活性を測定した結果，動物種，系統により誘導作用が変化することを報告している．

著者らの今日の成績，系統差に関する実験から，PCB の投与初期の睡眠延長作用と，その後における睡眠短縮作用の二面に問題のあることが明らかとなった．まず投与初期の睡眠延長作用については，薬物等の生体内代謝を触媒する Cyt. P-450 への PCB の作用を考える必要がある．Schenkman ら[10]，あるいは Imai ら[11] は薬物等の生体内代謝に関与する Cyt. P-450 の酸素と一酸化炭素で処理した場合に酸化型の Cyt. P-450 と薬物の結合がおこることを報告し，薬物代謝の一つの律速段階になっていることを示した．著者らの最近の研究では，PCB はマウスおよびラットの肝ミクロソーム Cyt. P-450 と結合して type I のスペクトルをおこすことを見出し，その結合量は誘導型の少ない PCB ほど強いことを認めている．Pentobarbital も PCB 同様 type I のスペクトルをおこすので[12]，PCB の投与初期にみられる睡眠延長作用は，PCB と pentobarbital との Cyt. P-450 への競合阻害における見掛的な反応と解釈することもできる．しかし現在の段階では，Cyt. P-450 と薬物の結合に関する実験結果では化学種名を同定することは困難で，薬物代謝酵素の阻害反応は本酸化反応に関与するミクロソーム電子伝達系の複雑な系のなかで論ずる必要がある．さらにマウスとラットであらわれた反応の質的差を説明するためには，PCB の生体内での代謝の差をも含めて今後の研究が必要である．

第二の問題点である酵素誘導反応における種差系統差，については，最近 Gielen ら[13] が遺伝子支配により酵素誘導に差の出ることを報告しており，PCB の酵素誘導反応における種差，系統差についても，今後分子レベルでの研究によって解明されていくものと考える．

PCB の薬物代謝酵素系におよぼす影響で，睡眠延長作用と睡眠短縮作用の，いわゆる二相性の変動を示すことが明らかとなった．この種の二相性変化は種々の薬物でおこることが確かめられている．たとえば Kato ら[14] は，chlorcyclizine その他の酵素誘導剤前処置ラットにおいて，投与後30分では pentobarbital の代謝が阻害されているが，48時間目では逆に促進されていることを報告し，また Cho ら[15] も，phenylbutazone 前処置ラットにおいて，ethylmorphine 脱メチル化活性を測定した結果，同様な二相性変化を示すことを報告している．これらのことから PCB も他の酵素誘導剤と同様な反応を示すことが考えられる．

PCB の酵素誘導に関する実験は最近相次いで報告されており，種々の基質を使った in vivo, in vitro における肝ミクロソーム水酸化活性の増大[16]，Cyt. P-450 の含量の増大[17] あるいは肝ミトコンドリアの δ-aminolevulinic acid 合成酵素活性の増大[18,19] などが認められている．このなかで注目されるのは Aroclor 1254 投与ラットでみられた Cyt. P-448 の誘導に関する実験である[19]．Cyt. P-450 は phenobarbital 前処置による CO- 差スペクトルで 450 nm に極大値を有するいわゆる Cyt.P-450 と，3-methylcholanthrene 投与で代表される 448 nm に極大値を有する Cyt. P-448 とに区別されている[19]．著者らもカネクロール投与で Cyt. p-448 の誘導されることを見出したが，Alvarez ら[19] によると，この Cyt. P-448 は in vitro あるいは in vivo における水酸化反応あるいは分光学的な実験から，3-methylcholanthrene で誘導された Cyt. P-448 と同じではなく，むしろ新しい型のチトクロームであると述べている．Cyt. P-450 と Cyt. P-448 とは，in vitro あるいは in vivo

DSW 031595

NOTICE: THIS MATERIAL MAY BE PROTECTED BY (

STLCOPCB4015557

における種々薬物の代謝形式にさのあることがわかっているので[11]，PCB 投与によって誘導される新しい型の Cyt. P-448 が，たとえば生体内変化の代謝に変化を与えたり[12]，他の化学物質の代謝とも関連して複合毒性をあらわす要因にもなり得るので，今後の研究が待たれる．

今回のラットの実験で，PCB 投与による誤眠延長作用と肝ミクロソーム Cyt. P-450 含量の増大とは並行関係になることが明らかとなり，これら二つの実験とも塩素数の多い PCB ほど反応が長く続くことも確められた．ただ，投与初期においては塩素数に関係なく同等な酵素誘導作用を示すことから，著者らは各カネクロールでは酵素誘導力に差はないが，相対残留性に各カネクロールで差があり，そのために酵素誘導の持続という意味で各カネクロールに差のあらわれるものと考えている．PCB の塩素の数と酵素誘導作用の関係についての報告はあるが[10,11,12]，両者の関係は必ずしも明確ではない．たとえば Johnstone ら[13]は種々の純粋な PCB を合成し，ラットにおいて酵素誘導作用を比較検討しているが，彼らはこのなかで，単に塩素の数だけで酵素誘導作用を考えるのでなく，塩素のつく位置も考慮にいれる必要のあることを指摘している．

PCB 投与ラットにおける肝ミクロソーム Cyt. b_5 の変動については，Cyt. P-450 の場合と若干異なった傾向をみせ，投与初期では Cyt. P-450 の場合ほど急激な増加はなく，極大値に至る時間は塩素数の多い PCB ほど Cyt. P-450 の場合より大幅に遅れる結果となった．肝ミクロソームにおける酵素誘導作用は，薬物代謝に関与する膜結合蛋白質の合成の増大と分解の抑制により成り立っている[14]．しかもこの膜上の各蛋白質は，それぞれ異なった turnover を示すことも明らかとなっている[15]．Omura ら[16]は，肝ミクロソーム Cyt. b_5 の生物学的半減期は，100～110時間であると報告している．一方 Levin ら[17]は，Cyt. P-450 を CO 結合型ヘム蛋白質として精製し，その生物学的半減期を求めると二相性に減少することを見出し，fast phase は 7～8 時間，slow phase は 46～48時間になると報告している．このように Cyt. b_5 の分解速度は Cyt. P-450 に比べて遅いこと，あるいは phenobarbital などの酵素誘導剤による Cyt. b_5 含量の増大が Cyt. P-450 の場合に比べて遅いなどから考えて，今回の PCB 投与による二つのヘム蛋白質の挙動の違いが証明されるものと考える．

KC-300 投与マウスの自開の睡眠延長作用あるいは KC-500 投与ラットの誤眠の協作用において，どちらの結果も PCB を経口投与した場合の方が腹腔内投与の場合よりも変化のあらわれるのが早かった．この二つの実験の結果，PCB の脂肪への到達速度が経口投与と腹腔内投与で異なるものと考えられる．すなわち，PCB の生体内への吸収量はやはり経口投与の場合の方が少なく，事実マウス，ラットとも睡眠時間にうける影響が腹腔内投与の場合ほど長く続かないことからも明らかである．

また，KC-500 をラットに経口投与した場合の組織中 PCB 濃度は，投与初期に肝臓に高く，投与後 8 時間前後から脂肪中の濃度と逆転する結果となった．このこと，あるいは塩素数の多いカネクロールほど脂肪中に長く残存する実験結果とを合わせて，肝臓中の PCB 量が酵素誘導の強さを反映しており，その肝臓中での量は脂肪中での PCB の蓄積度合により決定されているものと考えられる．

現在カネクロールについては，ガスクロマトグラフィーで 30～60 のピークに分離されているが，著者らは KC-500 投与ラットにおける組織中 PCB のガスクロマトグラムをとり，代表されるピークの生体内での消長を検討した．このなかで結論として二つのことが明らかとなった．一つは，クロマトグラムの保持時間の長いピークほど生体内への吸収効率はよく，また残留度も高いことである．保持時間の長いピークほど塩素数の多い PCB であり[18]，ここからも塩素の数と生体影響との関連に示唆を与えるものと考える．第二点は，得られたクロマトグラムのなかで，ピーク15の生体内からの消失速度の速さである．ピーク15は五塩化 PCB が主体であることが確かめられており，しかもカネミ油症患者の血液のガスクロマトグラムにおいても，この成分の割合の低いことが指摘されており[19]，PCB の生体内代謝とも関連して興味深い所見といえる．

PCB の生体内代謝に関しては，Block ら[20]，Hutzinger ら[21]，Yamamoto ら[22]が，代謝物として水酸化体を確認している．また注目される実験として，最近 Gardner ら[10]が，2, 5, 2', 5'-四塩化ビフェニルから dihydro-diol 体を代謝物として分離し，中間代謝産物として epoxide の生ずる可能性のあることを報告している．各種化学物質が生体内中間代謝産物として epoxide をつくり，この epoxide が生体内高分子と共有結合して毒性[23]あるいは発癌性[24]を高めることが報告されており，今後 PCB についても代謝物と毒性との関連につ

DSW 031596

COPYRIGHT LAW (TITLE 17 U.S. CODE).

STLCOPCB4015558

[illegible]のものと考えられる。

[illegible]

文　　献

1) Conney, A. H.: *Pharmacol. Rev.* **19**, 317 (1967)
2) Alvares, A. P., Schilling, G. and Levin, W. J.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **175**, 4 (1970)
3) Gram, R. L., Juchau, M. R. and Fouts, J. R.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **118**, 872 (1965)
4) Gillette, J. R., Mitchell, J. R. and Brodie, B. B.: *A. Rev. Pharmacol.* **14**, 139 (1974)
5) Cook, J. W.: *Environ. Health Perspect.* **1**, 3 (1972)
6) Jensen, S. and Sundstrom, G.: *AMBIO* **3**, 70 (1974)
7) Litterest, C. L., Farber, T. M., Baker, A. M. and van Loon, E. J.: *Toxicol. appl. Pharmacol.* **23**, 112 (1972)
8) Chen, T. S. and Dubois, K. P.: *Toxicol. appl. Pharmacol.* **26**, 504 (1973)
9) Bickers, D. R., Kappas, A. and Alvares, A. P.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **188**, 300 (1974)
10) Johnstone, G. J., Ecobichon, D. J. and Hutzinger, O.: *Toxicol. appl. Pharmacol.* **28**, 66 (1974)
11) Schmoldt, A., Benthe, H. F. and Fruhling, R.: *Arch. Toxicol.* **32**, 69 (1974)
12) Fishbein, L.: *J. Chromatog.* **68**, 345 (1972)
13) Fishbein, L.: *A. Rev. Pharmacol.* **14**, 139 (1974)
14) Gardner, A. M., Chen, J. T., Roach, A. G. and Ragelis, E. P.: *Biochem. biophys. Res. Commun.* **55**, 1377 (1973)
15) [illegible] **14**, 415 (1973)
16) Omura, T. and Sato, R.: *J. biol. Chem.* **239**, 2370 (1964)
17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
18) Fujita, T., Shoeman, D. W. and Mannerring, G. J.: *J. biol. Chem.* **248**, 2192 (1973)
19) Alvares, A. P., Bickers, D. R. and Kappas, A.: *Proc. natn. Acad. Sci.* **70**, 1321 (1973)
20) Jori, A., Bianchetti, A. and Prestini, P. E.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 2687 (1970)
21) Brazda, F. G., Heidenscheider, S. and Martin, M.: *Comp. Biochem. Physiol.* **14**, 239 (1965)
22) Nebert, D. W. and Gelboin, H. V.: *Archs Biochem. Biophys.* **134**, 76 (1969)
23) Schenkman, J. B., Remmer, H. and Estabrook, R. W.: *Mol. Pharmacol.* **3**, 113 (1967)
24) Imai, Y. and Sato, R.: *J. Biochem.* **62**, 239 (1967)
25) Topham, J. C.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 1695 (1970)
26) Gillen, J. E., Goujon, F. M. and Nebert, D. W.: *J. biol. Chem.* **247**, 1125 (1972)
27) Kato, R., Chiesara, E., Vassanelli, P.: *Biochem. Pharmacol.* **13**, 69 (1964)
28) Cho, A. K., Hodshon, B. J. and Brodie, B. B.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 1817 (1970)
29) Vos, J. G., Strik, J. J., van Holstein, C. W. M. and Penninos, J. H.: *Toxicol. appl. Pharmacol.* **20**, 232 (1971)
30) Goldstein, J. A., Hickman, P. and Jue, D. L.: *Toxicol. appl. Pharmacol.* **27**, 437 (1974)
31) [illegible] **62**, 30 (1971)
32) Kuriyama, Y., Omura, T., Siekevitz, P. and Palade, G. E.: *J. biol. Chem.* **244**, 2017 (1969)
33) [illegible] **20**, 793 (1975)
34) Omura, T., Siekevitz, P. and Palade, G. E.: *J. biol. Chem.* **242**, 2389 (1967)
35) Levin, W. and Kuntzman, R.: *J. biol. Chem.* **244**, 3671 (1969)
36) [illegible] **65**, 25 (1974)
37) Block, W. D. and Cornish, H. H.: *J. biol. Chem.* **234**, 3301 (1959)
38) Hutzinger, O., Nash, D. M., Safe, S., de Freitas, A. S. W., Norstrom, R. J., Wildish, D. J. and Zitko, V.: *Science* **178**, 312 (1973)
39) Yamamoto, H. and Yoshimura, H.: *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 2237 (1973)
40) Miller, J. A.: *Cancer Res.* **30**, 559 (1970)

DSW 031597

STLCOPCB4015559

Folia Pharmacol. Japon
72, 1976

PCB

Abstract Tsutomu SHIMADA, Yoshiki NUNOURA, Firyo KITANAKA, Shozo IWAGAMI and Yasuko MIZUTA (Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan). Induction of mouse and rat liver microsomal enzymes by polychlorinated biphenyls in relation to the PCB levels in tissue. *Folia pharmacol. japon.* 72, 955~967 (1976).

Kanechlor (KC-300, 400, 500, and 600 consisting of polychlorinated biphenyls (PCB) containing 43, 48, 55, and 61% chlorine respectively, were administered in a single dose of 100 mg/kg to mice and rats. The effect of PCB was investigated by determining pentobarbital sleeping time, liver microsomal hemoprotein contents, PCB level and gaschromatography (GC) pattern in tissue. Pentobarbital sleeping time was prolonged 2 to 4 times longer than that of control level after 3 to 4 hr of KC treatment in both ICR and ddN strain mice and KC-300 was the most effective. Forty-eight hr after treatment, however, this sleeping time was half that of the control. Sleeping time in ICR strain mice returned to control level 8 days after the treatment with KC-300 and KC-500, but the decrease in sleeping time continued in ddN mice. Conversely, the prolongation of sleeping time in rats was only 20% the control level at 3 hr after KC-300 treatment, but the shortening of sleeping time was more marked than in mice. Both the prolongation of sleeping time in mice treated with KC-300 and the shortening of sleeping time in rats treated with KC-500 were more rapidly effected when an oral dose rather than when a intraperitoneal one was given. Induction of liver microsomal cytochrome P-450 level was maximum in rats treated with KC-600 and increase of hemoprotein level and shortening of sleeping time were proportional to the chlorine content of PCB. The CO-difference spectrum of microsomes from rats treated with KC had an absorbance maximum at 448 nm. Direct relationship between storage of PCB in adipose tissue and the induced effect by KC has also been demonstrated in rats. PCB level in the liver of rats was higher for about 8 hr after KC-500 treatment given orally and was lower than the PCB level in adipose tissue after 8 hr. The GC-pattern of PCB stored in tissues was different from that of standard KC, indicating that all components were not metabolized at the same rate and that the components of the KC with the longer retention time were metabolized to a lesser degree than those with the shorter retention time.

DSW 031598

not translated

COPYRIGHT LAW (TITLE 17 U.S. CODE).

STLCOPCB4015560