

PCB投与シロネズミに及ぼす リボフラビンの効果

Effect of Riboflavin on the Rats by the Administration
of Polychlorinated Biphenyl

奥 村 ミ サヲ
小 林 泰 子

ビタミン B_2 は B_1 と並んで動物の成長に不可欠のビタミンであり、その過不足は促成長に大きな影響を与えることは、すでに八木らのビタミン B_2 欠乏実験¹⁾で証明されている。またその補酵素としての意義も大であり、フラビン酵素の関与する生体内酸化還元反応に及ぼす影響も大きい。

一方、八木らは²⁾ビタミン B_2 の薬物に対する作用を抗生物質の1つである CTC^{*1)}について検討し、 B_2 欠乏状態のシロネズミに CTC を投与すると、 B_2 欠乏が更に強化されるが、ある程度の FR^{*2)}を同時に与えると、 B_2 欠乏症を防止できると報じている。また筒井は発癌物質である DAB^{*3)}に FR を添加してシロネズミに投与すると、その発癌性が抑えられると報じている。しかしその他の動物にとって有害な物質に対する FR の作用については未だ報告をみない。

そこで我々は近年公害の源となっている PCB や BHC 等の脂溶性で且つ体内貯留性の高い有機塩素系化合物をとりあげて、シロネズミに投与し、FR に対する作用を検討しようと企てた。本報はまづ PCB に対する実験成績を報告する。

実 験 材 料

- 1) FR : 市販品を精製したものをを用いた。
- 2) 実験動物 : Wistar 系純系雄シロネズミを用いた。購入後3日間下記の基本飼料(完全食)にて飼育した体重 100 g 前後のものを実験に供した。
- 3) 飼料 : Forker⁴⁾らの処法に準じて調製した。
- 4) PCB (KC-300) : 鐘淵化学工業 K. K. から取り寄せた特級品を用いた。

*1) CTC=Chlortetracycline

*2) FR=Riboflavin

*3) DAB=P-dimethyl amino benzene

- 5) トランスアミナーゼ測定用試薬：ヤترون製の血清トランスアミナーゼ測定用試薬を使用した。

実験方法

1. 動物の飼育

上記のシロネズミを表1に示すように、5頭ずつa, b, c, d, e, fの6群に分けた。a, b群には完全食(FR/日10 μ g), c, d群にはB₂欠乏食(FRなし)e, f群にはB₂過剰

表 1. 各群のFR及びPCB投与量

実験群	動物数	PCB (200ppm/kg 飼料)	FR (μ g/日)
a 完全食	5	—	10
b 完全食+PCB	5	+	10
c B ₂ 欠乏食	5	—	0
d B ₂ 欠乏食+PCB	5	+	0
e B ₂ 過剰食	5	—	1000
f B ₂ 過剰食+PCB	5	+	1000

食 (FR/日1000 μ g) を体重の $\frac{1}{10}$ 量の割合で与えた。実験開始後3日目からKC-300, 1gをエタノール 10 mlに溶解して、それを200ppm/kg飼料の割合で計算し、その2mg/0.02mlを1日1頭量として飼料に混ぜb, d, f群に投与した。ビタミンはいずれも強制的に毎日経口投与した。水は純水を自由に摂取させた。動物は1頭ずつ分離した籠の中で飼育し、動物室は気温25°Cに保った。飼育後56日目に撲殺して夫々の臓器を摘出し各実験に供した。

2. FRの定量

シロネズミの肝臓、腎臓内総FR量の測定は、表2のごとく行った。

表 2. FRの定量

1) 組織よりFRの抽出	
肝臓 (5g) + 温水 25ml \rightarrow 80°C, 5分 \rightarrow 冷却 \rightarrow 磨砕 \rightarrow 100ml に補正 \rightarrow 80°C, 15分 \rightarrow 冷却 \rightarrow 100ml に補正 \rightarrow 遠沈 (3000r. p. m, 15分)	
\Rightarrow 上清	$\left\{ \begin{array}{l} 3\text{ml} \times 4 = 12\text{ml} \text{ (総FR定量用)} \\ 25\text{ml} \text{ (分画測定用)} \end{array} \right.$
2) 総FR並びにB ₂ の分別定量) 既法の如く行った。 ⁵⁾⁶⁾
3) 計算	

なお同じ検体につき3回実験を行い、B₂の分画定量については既法の方法を簡便化して行った。すなわちペーパークロマトグラム上に分別されたB₂3型に水2.5mlを加えて抽出、次

いで苛性ソーダ 2.5ml を加えて光分解を行って後、酢酸 0.25ml を加えて光分解をとめ、直ちに蛍光光度計で各々の蛍光を測定し、各々の比率を求めて各分画 B₂ 量を算出した。

3. 肝臓中脂質の定量

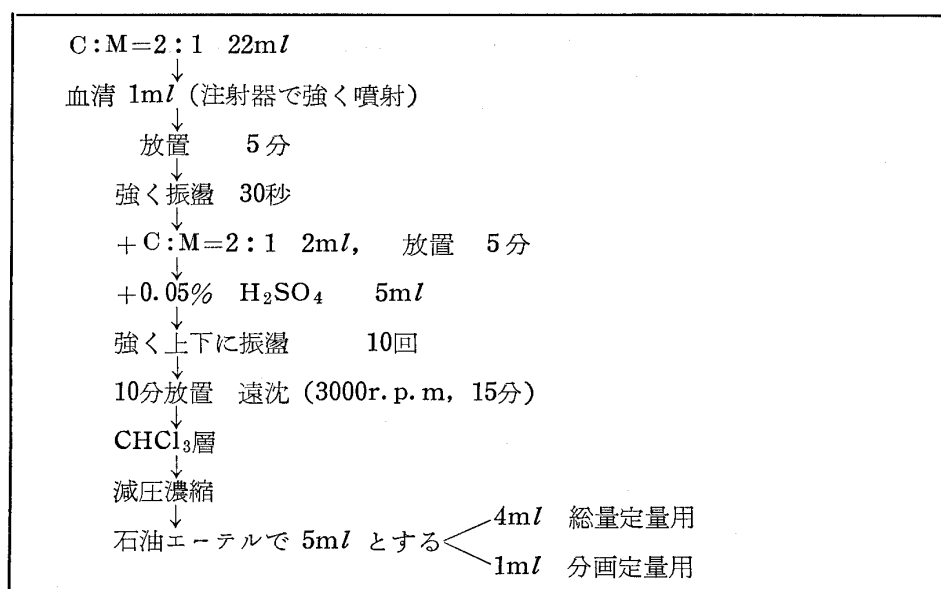
Glenn の方法⁷⁾に準じて既法のごとく行った。すなわち 1 group の 1 頭より 1 g ずつ採取した肝臓の計 5 g に 100ml のクロロホルム：メタノール (C:M=2:1; v/v) 混合液を加えて 1 分間磨砕して後濾過した。次いで濾紙上の残渣を 250 ml の同混合液で洗滌して濾液に合し (約 350ml) その 100ml を 0.73% 食塩で 1 回、クロロホルム：メタノール：0.73% 食塩 (3:48:47; v/v) 混合液で 2 回洗滌し、下層のクロロホルム層を遠沈して澄明な液となし、50°C の温浴で吸引しながら蒸発乾固して石油エーテルで正確に 10ml にした。さらにその 5ml を蒸発乾固の後 110°C 1 時間加温、デシケーター上で恒温となし重量を秤量し、あらかじめ測定した容器の重量を減じて脂質量を算出した。

一方、分画定量には、上記石油エーテルの抽出液 10ml 中 0.08ml を、あらかじめ 110°C、1 時間活性化したシリカゲルプレート上に塗布、エチルエーテル：石油エーテル：酢酸 (15:84:1; v/v) の混合溶媒で約 1 時間展開の後 5 N 硫酸を噴霧、110°C、5 分加温して各スポットを発色させ、明日香工業製デンストメーターでその面積を求めた。

4. 血清中脂質の定量

Bragdon の方法⁸⁾に準じて表 3 に示すごとく行った。すなわち先のクロロホルム：メタノール混合液 22ml を 30ml の目盛付共栓遠沈管にとり、これに血清 1ml を注射器で強く噴射して

表 3. 血清中脂質の定量



血清を微細な蛋白沈澱として溶媒中に拡散させ、5 分間室温にて静置後、栓をつけて 30 秒間強く振盪し 2 ml の上記混合液を追加して、さらに 5 分間室温にて放置した。次いで 0.05% 硫酸 5ml を静かに加えて栓を施し、静かに 10 回転倒して混和し、10 分間室温にて放置後 3000r. p. m.

15分間遠沈して下層のクロロホルム層を注射器で吸引分離して、ナス型フラスコに移し 50°C の温浴上で吸引しながら蒸発乾固させ、石油エーテルで 5 ml とした。その 4 ml を蒸発乾固の後 110°C, 1 時間加温して、デシケーターで恒温となし重量測定を行った。

また分画測定には上記石油エーテルの抽出液 5 ml 中の 1 ml を 0.2 ml に濃縮して、肝臓の場合と同様シリカゲルプレート上に塗布、展開、発色を行って後、デンシトメーターでその面積を算出した。

5. 血清中トランスアミナーゼ活性の測定

Reitman-Frankel 法⁹⁾により、表 4 に示すごとく行なった。すなわち GOT^{*1)}または GPT^{*2)}基準液 1 ml を中試験管にとり、37°C の恒温槽中で 5 分間加温した。次いで血清 0.2 ml を加えて

表 4. 血清中 GOT, GPT の測定

試験 No.	1	2	3	4	5	主 検
焦性ブドウ酸	0	0.1	0.2	0.3	0.4	—
基質液(GOT) (GPT)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	1.0
		0.9	0.8	0.7	0.6	1.0
	↓					加温, 37°C 5分
						血清 0.2
						反応(GOT : 37°C, 60分) (GPT : 37°C, 30分)
呈色試薬	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
室温にて 20 分, 放置						
0.4N-NaOH	10	10	10	10	10	10
混和, 室温にて 10 分放置						
比 色	505m μ にて (蒸留水を 100% として)					
カルメン単位/ml GOT	0	25	60	116	197	左の検量曲線より主検 の単位を求める
GPT	0	27	58	98	150	

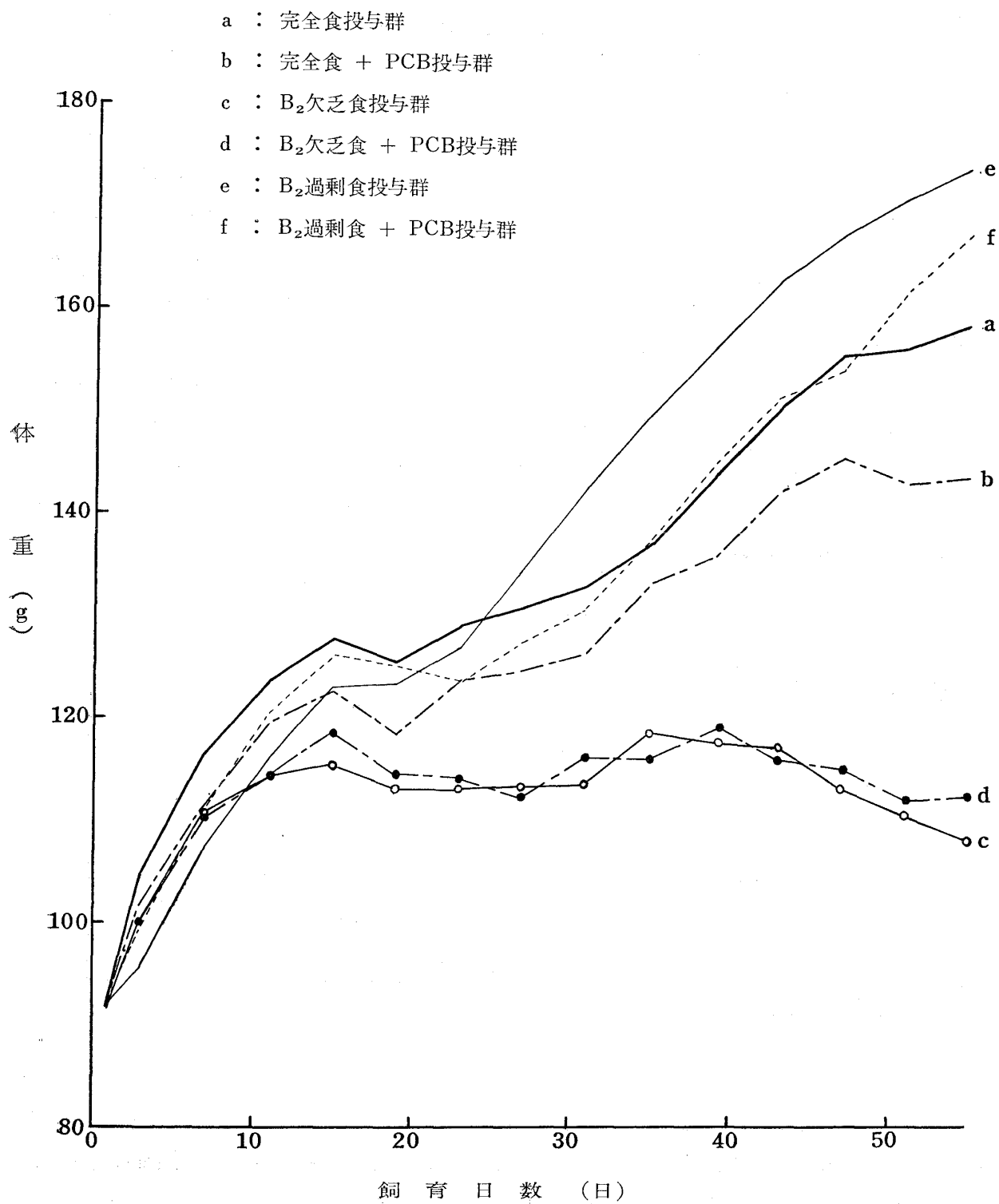
混合し、再び 37°C の恒温槽中で GOT の場合は 60 分、GPT の場合は 30 分加温した後、恒温槽からとり出し呈色試薬 1 ml を加えてよく混合し酵素反応を停止させ、そのまま 20 分間室温にて放置、0.4N 苛性ソーダー 10 ml を加え密栓して転倒混和、室温にて 10 分間放置の後、生じた赤褐色の色調を 505m μ の波長で吸光度を測定した。

また別の実験で 5 本の試験管に標準曲線用焦性ブドウ酸を 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ml づつとり、GOT 又は GPT 基準液を漸減的に加えて、各試験管内の試薬が 1 ml になるようにし

*1) GOT=Glutamic Oxaloacetic Transaminase

*2) GPT=Glutamic Pyruvic Transaminase

図1 体重の増減



た。さらに蒸留水 0.2 ml ずつ加え、以下上記と同様な方法で測定を行ない、グラフ用紙を用いてGOTまたはGPT標準曲線を作成し、トランスアミナーゼ単位へ換算した。

実験結果

1. 体重の増減および症状

図1に示すように、完全食群、 B_2 過剰食群共に順調な発育を示した。しかし B_2 過剰食群は完全食群より発育が良好となった。 B_2 欠乏食群では、飼育2週間目頃より発育が停滞し、毛並みが荒れ、40日目頃より強暴性になった。 B_2 過剰食群と完全食群を比較すると、いずれもPCBを投与した群が投与しない群より体重増加率が少く、その減少率は B_2 過剰食群の方が小さかった。また B_2 欠乏食群では、PCBを投与した群としない群の差がみられなかった。

2. 臓器重量

表5にみられるように、 B_2 欠乏食群は完全食群に比べて12%の肝臓の減少がみられたが、 B_2 過剰食群では殆んど変らなかった。また同じFR投与群内でみると、PCB投与群の方が投与していない群より完全食群では29.3%増、 B_2 欠乏食群では78.6%増、 B_2 過剰食群では30.0%増であった。脳において B_2 欠乏食にPCBを投与した群で5%の肥大がみられたのみで、その他の臓器では著しい差はみられなかった。

表 5. 各群の臓器重量 n=5

実験群	体重 (g)	肝 臓		腎 臓		心 臓		脾 臓		脳	
		g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
a	158	5.60	3.50	1.33	0.84	0.58	0.34	0.36	0.23	1.58	1.00
b	142	6.48	4.55	1.30	0.91	0.56	0.39	0.33	0.23	1.56	1.10
c	106	3.28	3.08	1.02	0.96	0.33	0.31	0.16	0.15	1.34	1.26
d	110	6.04	5.50	1.07	0.97	0.34	0.31	0.14	0.13	1.44	1.32
e	173	6.12	3.53	1.37	0.79	0.56	0.38	0.30	0.17	1.68	0.97
f	169	7.74	4.59	1.45	0.86	0.56	0.43	0.26	0.15	1.56	0.93

%：比体重を示す

3. 肝、腎臓内FR含量

表6にみられるように、肝臓の総FR量においては、完全食に比べて B_2 欠乏食群では約47%少なく、さらにPCBを投与した群ではそれより31.7%の減少を示した。 B_2 過剰食群では、完全食群に比べて約15%高く、さらにPCBを投与した群ではそれより9%の減少をみた。全体的にみた場合、PCBを投与した群は投与しない群に比べて肝内総FR量は少なく、 B_2 過剰食>完全食> B_2 欠乏食群の順であった。またこの傾向はPCBを投与しない群でも同じで

あった。B₂の分画についてみると、完全食とB₂過剰食群ではFAD^{*1)}、FMN^{*2)}、FRの比率はほぼ同じであったが、B₂欠乏食群ではFMNの方が高かった。またPCBを投与した群につ

表 6. 肝・腎臓内FR含量 n=5

<肝臓>

実験群	総B ₂ 量 (μg/g)	FAD		FMN		FR	
		μg/g	%	μg/g	%	μg/g	%
a	27.7	13.9	50.3	11.8	42.5	2.0	7.2
b	17.8	13.7	76.7	3.4	19.2	0.7	4.1
c	14.6	4.8	32.9	7.2	49.6	2.6	17.5
d	10.0	7.5	74.5	2.1	21.2	0.4	4.3
e	32.1	15.0	46.6	14.1	43.9	3.0	9.5
f	29.2	19.0	65.2	8.5	29.0	1.7	5.8

<腎臓>

a	24.7	12.5	50.7	10.1	40.8	2.1	8.5
b	18.8	7.3	38.8	8.8	46.9	2.7	14.3
c	20.3	6.9	34.0	9.7	47.6	3.7	18.4
d	16.1	5.4	33.8	6.6	40.8	4.1	25.4
e	25.8	9.8	37.8	12.6	48.7	3.4	13.5
f	21.0	8.4	40.0	7.9	37.6	4.7	22.4

いてみるといずれの場合でもPCBを投与しない群に比べて、FADの値が高く、完全食+PCB群では53%増、B₂欠乏食+PCB群で126%増、B₂過剰食+PCB群では40%増であった。次いで腎臓内の値をみてみると、同じく表からもわかるように、肝臓ほど大きな変動はみられなかったが、傾向は類似していた。すなわち総FR量においては、B₂欠乏食群は完全食群に比べて17.8%少なく、PCBを投与するとさらに20.7%減となる。B₂過剰食群では完全食群に比べて4.5%増であり、PCBを投与することにより18.6%減となった。B₂分画では、肝臓のごとき変化はみられず型のごときであった。

4. 肝臓、血清中における脂質の変動

1) 肝臓中脂質量

表7より明らかなように、いずれの群においても、PCBを投与した群において総脂質量が上昇しているのがわかる。完全食群とB₂過剰食群ではあまり大差はみられなかったが、B₂欠

*1) FAD=Flavin Adenine Dinucleotide

*2) FMN=Flavin Mononucleotide

表 7. 肝臓中脂質含量 n=5

実験群	肝湿重量 (g)	肝脂質量 (mg/g)	総脂質量 (mg)	脂 質 分 画 %				
				PL	C	FA	TG	CE
a	5.6	79.8	446.9	32.3	16.1	16.1	18.7	16.8
b	6.5	85.5	557.7	32.4	15.3	16.7	21.3	14.3
c	3.3	53.3	175.9	29.1	17.1	21.4	17.4	15.0
d	6.0	126.4	758.4	26.5	9.1	17.4	31.9	15.1
e	6.1	71.8	438.0	35.1	15.3	20.9	14.2	14.5
f	7.7	75.4	580.6	37.2	14.3	20.9	14.3	13.3

PL : Phospholipid C : Cholesterol FA : Fatty acid
 TG : Triglyceride CE : Cholesterol Ester

乏食群ではPCBを投与した群では、投与しない群の4.3倍もの高い脂肪の蓄積がみられた。この傾向は脂質画分においてもみられ、B₂欠乏食にPCBを投与した群では、PCBを投与しない群より倍量の中性脂質の蓄積を示した。

2) 血清中脂質量

次に血清中の脂質量をみてみると、表8に示すごとく、これもまたいづれの群においても、PCB投与群で高い値を示し、特にB₂欠乏食にPCBを投与した群では、約7倍もの脂質量を示した。この結果は上記肝臓の場合の値を支持する。また脂質画分についてみると、肝臓程の差はないが、完全食+PCB投与群、B₂欠乏食+PCB投与群にリン脂質の増大が目立った。

表 8. 血清中脂質含量 n=5

実験群	脂質量	脂質量	脂 質 分 画 %				
	mg/ml	mg/dl	PL	C	FA	TG	CE
a	2.6	260	20.6	21.5	14.9	24.4	18.6
b	2.8	280	26.1	17.6	14.0	23.7	18.6
c	0.5	50	21.6	17.5	15.1	22.2	23.6
d	3.3	330	32.2	15.5	12.3	22.4	17.6
e	2.8	280	24.7	13.5	10.9	29.4	21.5
f	4.4	440	24.4	12.6	10.2	32.1	20.7

5. 血清中トランスアミナーゼの変動

肝疾患の場合、トランスアミナーゼが容易に血漿中に遊離し程度に応じて高値を示すと言われているが、本実験の場合も表9に示すごとく、特にB₂欠乏食+PCB投与群に肝臓変性が

著しく、とくにGOTの値が増大し、PCBを与えない群の約4倍もの高い値を示した。しかし、完全食、B₂過剰食群ではむしろ減少しており、このことは少くともFRを1日10 μ g投与しておけば肝疾患の進行を抑制できることがわかった。

表 9. 血清中GOT, GPT値 n=5

実験群	活性値(カルメン単位)	
	GOT	GPT
a	84	27
b	76	19
c	71	10
d	87	42
e	56	21
f	25	8

考 察

以上の結果より、成長期のシロネズミにPCBを投与した場合、外因的にも内因的にも明らかに変化がみられた。その変化はB₂欠乏群において著しく、次いで完全食群、B₂過剰食群であった。まづ成長が抑制され、PCBを与えない群との差は日を経るにつれて増してくる。またその成長抑制は各臓器の肥大となって表われた。PCBが脂肪に溶解易い性質であることを考えると、脂肪の蓄積し易い臓器にその肥大が大きく表われると思われる。かくして肝臓において著明であり、次いで脳であった。この肝臓肥大の現象は、食餌性脂肪肝¹⁰⁾の際の肝臓肥大と一致する。この肝臓肥大は脂肪にもとづくものであろうと考え分析してみると、明らかに脂肪量が高く、完全食群、B₂過剰食群が1.2~1.3倍なのに対し、B₂欠乏食群では4倍強の高い値を示した。また脂肪の分画成分をみるといづれの群においても、中性脂質の増大率が高く、このことは脂肪肝の場合と同様、正常の脂質の合成が阻害されていることを思わせる。この傾向は血清脂質においても同じであった。しかしながら肝臓に蓄積した脂肪が血液中に流れでる為に、肝臓と血液の間の脂質量は逆関係にあると言われている脂肪肝の場合と、その脂質の変動状態が異なるようであるが、これは肝臓より血液への完全なる脂質の流出が行われていない途中の時点を測定すれば、どちらも値が高くなるであろうことも考えられるが、この原因については未だ不明確である。また人間の場合、肝臓がおかされるとトランスアミナーゼであるGOTやGPTが容易に血漿中に遊離し、慢性期にはGOTにおいて著しい増大を示す¹¹⁾と言われている。Häkkinen¹²⁾らはBiphenylを扱う工場で働いている男女の長年の臨床実験の結果より著しいこれらの血清中GOTの増大を報告しているが、本実験においてもB₂欠乏群において著しい結果がみられた。また肝、腎臓内のB₂含量は著しく減少したが、ここに特記すべきこ

とは総FR量が減少する場合、大抵はFAD→FMN→FRへの分解が考えられていたわけであるが、本実験においては、PCBを投与した群ではFAD→FMNの分解が少く、その程度はこれも又、B₂欠乏群においてより少なかった。このことは絶対量として減少はしているが、PCBによって分解がおさえられていることを意味し、体内B₂の合成がむしろ促進されていると考えてよいかもしれないが、腎臓の場合にはこのような現象がみられないので、やはり肝臓変性にもとづく結果と推論してもよいのではなからうか。

以上の各諸点から、総じてPCBに対するFRの効果は大きく影響し、この事実はまた全体の栄養という点に飛躍して考えることができる。すなわちFRが欠乏すれば発育が抑制され、そうした栄養不良の状態に薬物ないし有害物質が侵入すると、その欠乏状態はさらに著しくなり、体内のあらゆる代謝も阻害されることがわかった。このことはB₂欠乏にCTCを投与するとその欠乏状態が進行するが、ある程度のFRを投与すればそれが抑制できること²⁾、またDABとFRを同時投与することにより発癌性が抑えられるという事実³⁾と非常に類似するようと思われる。従ってシロネズミの場合FRを少なくとも1日10μg投与すれば、PCBによる種々の抑制作用をある程度おさえることができるといえよう。

結 論

完全食(FR 1日10μg)、B₂欠乏食(FRなし)、B₂過剰食(FR 1日1000μg)の飼料にPCBを添加、シロネズミを飼育した結果、次の点がわかった。

1. 成長率はB₂過剰食群>完全食群>B₂欠乏食群の順に高く、PCBを与えた場合は全体的に下まわったが、その程度はPCBを投与しない場合と同じであった。
2. PCBを投与した場合、成長率に反比例して臓器の肥大がみられ、とくに肝臓において著しくB₂欠乏食群79%増、完全食群、B₂過剰食群はほぼ30%増であった。
3. 肝内総FR量はPCB投与により、完全食群36%減、B₂欠乏食群32%減、B₂過剰食群9%減で、分画ではB₂欠乏食群においてFADが分解されず結果として高い値を示した。また腎内総FR量はPCB投与によりそれぞれ21%、24%、19%減少した。その分画ではFAD→FMNの分解は肝臓ほど著しくなく、型の如きであった。
4. 肝内脂質量はPCB投与により完全食群とB₂過剰食群で大差なく、B₂欠乏食群で4倍強の値を示し、その増大はとくに中性脂質にみられた。
5. 血清中脂質量はPCB投与により完全食群8%、B₂過剰食群57%、B₂欠乏食群660%の増大を示したが、脂質画分では大差がみられなかった。
6. 血清中トランスアミナーゼではGOTにおいて著しく変動が表われ、とくにB₂欠乏食+PCB投与群においては4倍強であった。

なお本成績の一部は、第2回養護コース卒業報文集にて発表した。

文 献

1. 八木国夫, 奥田 潤, 小林ミサヲ: ビタミン **26** (5), 368 (1961)
2. 八木国夫, 山本良子, 小林ミサヲ: ビタミン **32** (2), 240 (1964)
3. 筒井祥博: 名古屋医学 **94** (34), 244 (1971)
4. Forker, B.R., Morgan, A.F. : J. Biol. Chem., **209**, 303 (1954)
5. Yagi, K. : J. Biochem., **43**, 635 (1956)
6. Yagi, K., Kondo, H., Okuda, J. : J. Biochem., **51** (3), 231 (1962)
7. Glenn, J.L., Opalka, E. and Tisher, K. : J. Biol. Chem., **238** (4), 1249 (1963)
8. Bragdon, J.H. : Lipids and the Steroid Hormones in clinical Medicine p.6 (1960)
J.B. Lippincott Co., Philadelphia
9. Reitman, S. and Frankel, S. : Amer. J. Clin. Path., **28**, 56 (1957)
10. 小滝 祥, 桜井寅雄, 小林ミサヲ, 八木国夫: ビタミン **36** (3), 231 (1966)
11. 溝部源之: 山口医学, **8** (189), 201 (1959)
12. Häkkinen I., Siltanen, E., Hernberg, S., Seppäläinen, A.M., Karli, P. and Vilkula, E. : Arch Environ Health, **26**, 70 (1973)