

# γ-BHC投与シロネズミに及ぼす リボフラビンの影響

Effect of Dietary Riboflavin on the Rats Fed  
Benzenehexachloride

小林 泰子

小林 とよ子

奥村 ミサヲ

ビタミン B<sub>2</sub> は動物の成長を促進し、その活性型は補酵素として生体の酸化還元に関与することは周知の事実である。また、抗生物質投与の際に生ずるビタミン B<sub>2</sub> 欠乏症発現に対する抑制効果や DAB 等の発癌抑制<sup>1)</sup>に対してもリボフラビン (以下 FR と略記) を投与することによりその症状を緩和することができる<sup>2)</sup>と報じている。

著者らは、ビタミン B<sub>2</sub> のこうした薬理効果に着目し、最近公害問題でさわがれ、今なおその蓄積が問題視されている PCB や BHC 等の有機塩素系化合物による毒性発現に対し FR が同様にその効果を発揮するか否かにつき検討を企てた。前報<sup>3)</sup>において FR を 1 日 10μg 程度シロネズミに投与すれば、PCB による種々の抑制作用 (体重の減少、臓器内 B<sub>2</sub> 量の減少、肝臓・血清中脂質の増大、血清中トランスアミナーゼ活性の増大) を抑えることができることを報告した。本報は γ-BHC につき亜急性毒性試験を行ない、FR 投与の影響がどのように発現するかにつき比較検討したので報告する。

## 実験材料

- 1) FR : 市販品を常法にしたがって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 4 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 : Forker<sup>4)</sup> らの処法に準じて調製した。
- 4) γ-BHC : 東京化成工業 K. K. 製の 99% の純品を使用した。

## 実験方法

### 1. 動物の飼育法

上記のシロネズミを表 1 に示すように a, b, c, d, e, f の 6 群に分けた。すなわち, a,

表1 各群のFRおよび $\gamma$ -BHC投与量

実験群		FR $\mu$ g/日	$\gamma$ -BHC ppm/体重kg	匹数
完全食群	a	10	0	6
	b	10	10	7
	c	10	20	7
B <sub>2</sub> 欠乏食群	d	0	0	6
	e	0	10	7
	f	0	20	7

b, c 群には完全食 (FR 10 $\mu$ g/日) を, d, e, f 群は B<sub>2</sub> 欠乏食 (FR なし) を体重の  $\frac{1}{10}$  量の割合で与えた。また, a, d 群は  $\gamma$ -BHC 無添加, b, e 群は  $\gamma$ -BHC 10ppm/kg 体重 (以下 BHC-10 と略記), c, f 群は  $\gamma$ -BHC 20 ppm/kg 体重 (以下 BHC-20 と略記) を添加した。

$\gamma$ -BHC は大豆油 20ml にそれぞれ 200mg, 400mg の割に溶解し飼料 1kg に対し 100mg, 200mg の割合に混合した。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。

また, 動物は一頭ずつ分離した金網籠の中で飼育し, 動物室は気温約 25°C に保った。

## 2. 試料の採取

飼育後 54 日目と 55 日目にエーテル麻酔の後, 腹部大動脈より採血し, 次いでそれぞれ臓器を摘出し各実験に供した。

## 3. 生化学的定量法

1) FR, 総脂質, 酵素活性 (GOT, GPT): これらの定量法は前報<sup>3)</sup>と同一の方法によった。なお, アルカリフォスファターゼ活性 (ALP) の定量は Kind-King<sup>5)</sup> 法によった。

2) 血清コレステロール

Zak<sup>6)</sup> の抽出法に従って抽出し, 総コレステロール, 遊離コレステロールを求めた。

3) 血清蛋白及び A/G 比

Biuret<sup>7)</sup> 法により総タンパク, アルブミン量を求め, さらに計算によってグロブリン値を算出, A/G 比を求めた。

## 4. 血球の判定

1) 赤血球・白血球数

Thoma の血球計算盤を用いて, 鏡検算定法により測定した。

2) 白血球像

白血球百分率比は, 血液塗抹標本を各検体 2 枚ずつ作成し, 常法により染色, 鏡検を行なった。なお, 白血球数は 100 個以上を観察した。

## 実験結果

1. 体重の増減および一般症状

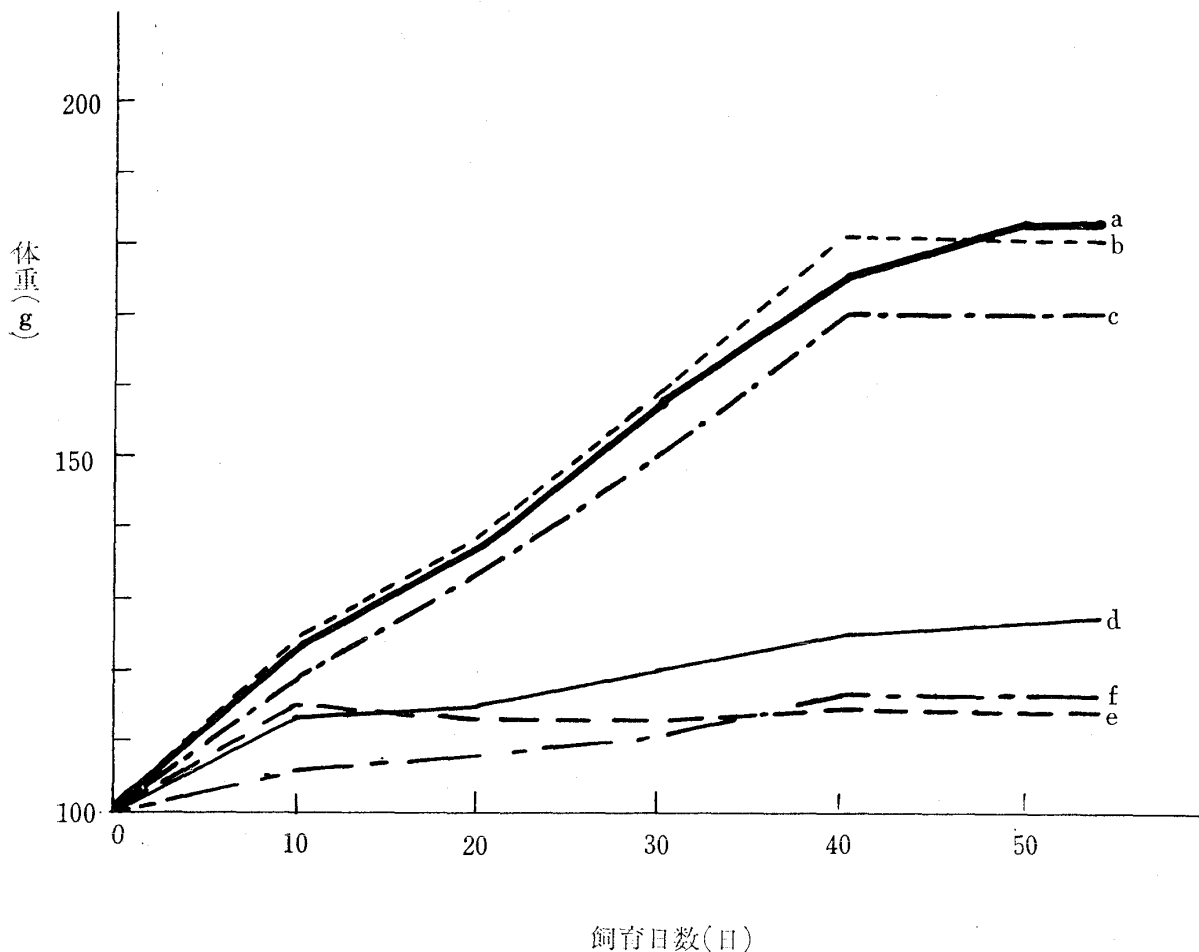


図1 体重の増減

図1に示すように、完全食群 (a, b) では順調な発育を示した。しかし、BHC-20 (c群) では飼育後42日目頃より発育が停滞した。また、 $B_2$  欠乏群では各群とも飼育後9日目頃より発育が停滞し毛並みがあった。とくにBHC投与群 (e, f群) では対照より発育がわるかった。また、BHC-20 (f群) は飼育の初期に発育が停止したが、40日目頃よりe群とほぼひとしくなり両群の差はみられなくなった。また、BHC投与群では飼育後期になると“けいれん”をおこしたり、下半身麻痺のおきたものが数匹みられた。

## 2. 臓器重量

表2のごとく、それぞれの臓器を比体重でみると、肝臓では  $B_2$  欠乏群は完全食群 (a群) に比べて対照 (d群) で79%, BHC-10 (e群) で153%, BHC-20 (f群) で126%の増大がみられた。完全食群内ではあまり大差はなく、b群で11%, c群で21%程の増大を示した。

腎臓においては、 $B_2$  欠乏群は完全食群 (a群) より47~100%の増大がみられた。

心臓では両群に大差はみられなかった。

脾臓では  $B_2$  欠乏食群が完全食群より重量ではやや小さい傾向であったが、比体重でみると

表2 各群の臓器重量

群別	体重(g)	肝臓		腎臓		心臓		脾臓		脳	
		g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
a	175.6	3.4	1.9	1.0	0.57	0.5	0.28	0.3	0.17	0.9	0.51
b	169.9	3.5	2.1	0.9	0.52	0.5	0.29	0.3	0.18	1.0	0.59
c	162.3	3.7	2.3	0.9	0.55	0.4	0.25	0.3	0.18	1.0	0.62
d	119.5	4.1	3.4	1.0	0.84	0.4	0.33	0.2	0.17	1.3	1.09
e	105.3	5.1	4.8	1.2	1.14	0.4	0.38	0.2	0.19	1.4	1.33
f	107.4	4.6	4.3	1.2	1.12	0.4	0.38	0.2	0.19	1.4	1.30

%は比体重を示す

大差はなかった。

脳では B<sub>2</sub> 欠乏食群が完全食群 (a 群) より 114~161% の増大がみられたが、脾、肝、脳とも BHC 投与量による差はみられなかった。

### 3. 肝・腎臓内 B<sub>2</sub> 量

表3にみられるように、肝臓の総 B<sub>2</sub> 量においては、完全食群 (a 群) より B<sub>2</sub> 欠乏食群 (d 群) が約 59% 少なく、BHC-10 (e 群) では d 群よりさらに 10% 減少、BHC-20 (f 群) で 5% 増大し、両群とも BHC 投与により B<sub>2</sub> 量の減少をみたが、BHC 投与量による差はみられなかった。

表3 各群の肝臓・腎臓中総 B<sub>2</sub> 量

群別	肝臓 (μg/g)	腎臓 (μg/g)
a	38.1	30.1
b	34.4	25.3
c	33.4	27.6
d	15.7	21.5
e	14.2	20.2
f	16.5	22.0

腎臓においては完全食群 (a 群) より B<sub>2</sub> 欠乏食群 (d 群) が約 29% 少なく、両群内の BHC 投与による差も肝臓とほぼ同じであった。

### 4. 肝・腎臓、脳中総脂質量

肝臓中の総脂質量は表4のように、完全食群 (a 群) より B<sub>2</sub> 欠乏食群 (d 群) が 18% 少なく、e 群ではそれより 27% 増大、f 群では 34% の減少を示した。完全食群内では 3 群間の差はみられなかった。

表4 各群の臓器中脂質量

群別	肝臓 (mg/g)	腎臓 (mg/g)	脳 (mg/g)
a	64.6	45.6	87.8
b	61.4	45.6	92.6
c	63.2	43.8	89.9
d	53.0	43.2	98.2
e	67.2	47.2	95.0
f	35.2	44.4	93.2

腎臓ならびに脳中総脂質量にはあまり大きな変化はみられなかった。

### 5. 血清コレステロール

総コレステロール、エステル型コレステロールともに同じような傾向を示した。すなわち、総、エステルともに完全食群では a 群に対して b 群で 15% 増、c 群で 17% の減少がみられた。

B<sub>2</sub> 欠乏食群では対照 (d 群) より e 群で 13%, 16% 増, f 群で殆んど差はみられなかった。また同じ BHC 投与群でみると BHC-10 においては完全食の方が B<sub>2</sub> 欠乏食よりも多く, BHC-20 では両群の差はなかった。したがってエステル型対総コレステロールの比においても差はみられなかった。

#### 6. 血清タンパク及び A/G 比

総タンパクにおいては, すべての群間にあまり変化がなく, B<sub>2</sub> 欠乏食群の f 群が対照 (d 群) より増加したのみであった。

アルブミン量についてもあまり大きな変化がみられなかった。

したがって A/G 比では完全食群で対照 (a 群) に比べて b 群で 7%, c 群で 25% 減少し, B<sub>2</sub> 欠乏食群では対照 (d 群) に比べて e 群で 28% 上昇, f 群で 6% の減少となり, すべての群で完全食群より B<sub>2</sub> 欠乏食群に A/G 比の上昇がみられた。

#### 7. 血清中酵素活性の変動

GOT, GPT については表 7

に示すごとく, 対照でみてみると, B<sub>2</sub> 欠乏食群の方が完全食群よりやや増加しているが BHC 投与群では, すなわち, b, c 群では対照 a 群に対し GOT 1.9% 増, 2.8% 減, GPT では同値, 18% 減であった。また,

e, f 群では対照 d 群に対して GOT 39~28% 減, GPT 35~20% と減少を示した。

ALP については, すべての群において B<sub>2</sub> 欠乏食群が完全食群より 15~25% の減少を示した。

#### 8. 血球数の算定

表 8 に示すように赤血球は各群のばらつきが多く, 各群における差は認められなかった。ま

表 5 血清コレステロール

群別	総コレステロール (mg/dl) T	エステル型コレステロール (mg/dl) E	E/T
a	120.0	102.5	85.4
b	137.5	117.5	85.1
c	100.0	85.0	85.0
d	100.0	87.5	87.5
e	112.5	101.5	90.2
f	100.0	85.0	85.0

表 6 血清タンパク量及び A/G 比

群別	総タンパク量 (g/dl)	アルブミン量 (g/dl) A	グロブリン量 (g/dl) G	A/G
a	6.0	4.4	1.6	2.8
b	6.1	4.4	1.7	2.6
c	6.1	4.1	2.0	2.1
d	5.9	4.5	1.4	3.2
e	6.1	4.9	1.2	4.1
f	6.4	4.8	1.6	3.0

表 7 血清中酵素活性の変動

群別	GOT (カルメン単位/ml)	GPT (カルメン単位/ml)	ALP (アームストロング単位)
a	108	17	13
b	110	17	13
c	105	14	12
d	118	20	11
e	72	13	10
f	85	16	9

た白血球では、B<sub>2</sub> 欠乏食群は完全食群に比べて減少が認められた。BHC 投与群ではいずれも対照に比べて減少しているが、完全食群ではその減少率が少なかった。

表 8 血球数及び白血球像

群別	赤血球数 (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	白血球数 (10 <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> )	白血球像 (%)					
			リンパ球	中性桿状核	中性分節核	好塩基球	好酸球	単核球
a	837	43	64.9	20.6	6.8	1.0	0.4	6.4
b	1119	30	61.8	15.5	16.1	1.3	0.2	5.2
c	776	29	52.6	14.3	26.5	1.2	0.4	5.0
d	1004	33	54.9	26.6	14.3	1.1	0.3	2.8
e	825	19	54.9	9.8	32.9	0.3	0.2	1.8
f	845	16	59.3	5.3	32.7	0.8	0.3	1.5

### 9. 白血球像

白血球の百分率比において、リンパ球は各群に著明な差はみられなかった。好中球のうち、桿状核についてみると、BHC 投与群では B<sub>2</sub> 欠乏食群の場合対照 (d 群) の約27%に比べ、e 群で10%、f 群で5%と著しい減少がみられたが、完全食群では対照 (a 群) の約21% b, c 群で14~15%とその減少が少なかった。それに対し、分節核では逆に BHC 投与群では対照より増加し、その差は B<sub>2</sub> 欠乏食群の方が完全食群より大きかった。

好塩基、好酸球などは各群に差はみられなかった。単球では FR の有無による差が大きかった。BHC 添加の影響をみてみるといずれも対照よりその減少が大きく、B<sub>2</sub> 欠乏食群の方がその差が著しかった。なお好中球について桿状核と分節核の分核数について調べたのが表9のごとくである。

表 9 桿状核に対する分節核の分葉比

群別	桿状核 %	分節核 %	分節核の分葉数				
			2核	3核	4核	5核	6核
a	75.0	25.0	14.7	7.8	2.5	—	—
b	49.0	50.9	32.7	13.2	4.5	0.5	—
c	35.4	64.6	44.3	15.1	4.5	0.7	—
d	65.1	34.8	20.0	10.4	3.6	0.8	—
e	23.3	76.7	42.0	27.1	6.9	0.7	—
f	14.6	85.4	42.3	26.2	14.2	2.3	0.4

これより、完全食群では対照に比べ分節核の占める割合が BHC-10 より BHC-20 で増加し、この傾向は B<sub>2</sub> 欠乏食群においてさらに大きくなった。

## 考 察

以上の結果より、発育期のシロネズミに  $\gamma$ -BHC を投与すると、外因的にも内因的にも変化が認められた。まず発育が抑制され、B<sub>2</sub> 欠乏食群でその差は大きくあらわれた。大柴らは日本<sup>8)9)</sup>人の平均的栄養摂取量を実験動物の飼料組成に換算し、それに  $\gamma$ -BHC を 1, 10, 100 ppm

投与して発育状態ならびに  $\gamma$ -BHC の組織への蓄積をしらべ、 $\gamma$ -BHC の濃度が 10ppm まで  
は 56 日間の飼育では対照群に比べてほとんど差がないが、100ppm で明らかな成長抑制を認  
め、また、 $\gamma$ -BHC 100ppm の投与で臓器へのとり込みをみると肝>腎>脳>脂肪組織の順に  
多く、飼育56日目に最高となりその蓄積量は  $\gamma$ -BHC 投与量が 1, 10, 100ppm と増大するこ  
とにより多くなると報じている。栄養が劣る場合、毒物に対する抵抗性も低くなると思われ  
るので本実験では  $B_2$  欠乏の場合の死亡への危惧を考慮して  $\gamma$ -BHC の投与量を 10, 20ppm とし  
たわけであるが、BHC 投与量による顕著な差は認められなかった。しかし、BHC を投与した  
場合、いずれの場合でも一時的に“けいれん”をおこしてとびまわり下半身麻痺症状のものが  
みられた。これは BHC 投与による神経麻痺の結果と思われ、急性毒性の場合の末期症状に類  
似している。<sup>10)</sup>

また、PCB、BHC などの塩素系有機化合物は脂肪の中にとり込まれるといわれているので、  
臓器中比較的脂肪の多い肝臓、脳において脂肪がとり込まれその結果臓器肥大がみられると期  
待したが完全食群ではそれ程著明な差はなく、 $B_2$  欠乏に BHC-10 を投与した群において肝臓  
の 150% 増、脳の 160% 増がみられ、これは PCB<sup>3)</sup> の場合と類似していた。

また、抗生物質の 1 つであるクロールテトラサイクリンを大量投与すると  $B_2$  欠乏症状が生  
じ、 $B_2$  の体内合成が阻害される結果、肝、腎臓中の  $B_2$  含量の減少をきたすと推論されてい  
る<sup>1)</sup>が  $\gamma$ -BHC 投与の場合も同様  $B_2$  欠乏食群に肝、腎臓中  $B_2$  含量の減少をきたした。 $B_2$  欠乏食群  
に BHC-10 を投与した群で最も減少している点は臓器肥大の場合と一致する。さらに、臓器  
肥大と平行して肝脂質量の増大を期待したが PCB 程の増大はみられなかった。肝臓肥大は主  
として脂肪の蓄積につながる<sup>7)8)10)</sup>ことが多いので、BHC 10, 20ppm 程度の投与では脂肪の蓄積が  
顕著にあらわれなかったものと思われる。血清中コレステロールについても同じ傾向が認めら  
れた。

また、代謝障害時および細胞増殖期には血清中の酵素活性 (GOT, GPT, ALP) が増大す  
るといわれている<sup>11)</sup>が本実験では有意差は認められなかった。

さらに、血液形態学の面よりみてみると、白血球数において明らかに  $B_2$  欠乏食群でその減  
少がみられ、BHC を投与することによりさらに減少するが完全食群ではその差が少ないこと  
がわかる。また白血球の好中球のうち桿状核についてみると白血球数の場合と同様  $B_2$  欠乏食  
群で減少し、BHC を投与することによりさらに減少する。それに反し、分節核では  $B_2$  欠乏食  
群で増加し、BHC を投与することによりさらに増加をきたす。この傾向は完全食群より  $B_2$  欠  
乏食群において大きくみられた。この現象は白血球総数の減少に対して、分核によりその作用  
を補っているためと推論される。<sup>12)</sup>Sunderman は薬物投与による血液学的反応の主要な型は細  
胞減少症で、血液障害発生機序の 1 つに栄養素の欠乏をあげているが、本実験においても白血  
球の大巾な減少は生長促進因子である  $B_2$  の欠乏による組織中の代謝阻害が BHC により増大  
されたためと推論される。

以上の諸点より、 $\gamma$ -BHC 20ppm 程度シロネズミに投与した場合 FR を1日 10 $\mu$ g 投与すれば BHC 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のではないと思われる。逆に B<sub>2</sub>欠乏症状の場合発育がさらに抑えられてくる。しかし、本実験において BHC-10ppm, 20ppm の顕著な差は認められなかった。これは投与量の巾が近接すぎたためと思われる。栄養状態が変わればその毒性発現に対し抵抗力も劣ってくると思われるので、もっと苛酷な条件下で行えばさらに著しい結果がでてくることも推論される。しかし、本実験中、生化学的結果では BHC-10ppm 群が、血液形態の面では BHC-20ppm 群が BHC による抑制効果が大きくあらわれたが、この差はおそらく生体の代謝経路として 1) 血液から組織へ、2) 組織から血液への形態をとるため、従って本実験では 1) 段階と推定され、生化学的に顕著な差を期待するには BHC 量を増大し、飼育期間を延長して経時的に変化を追跡する必要があると思われる。

## 結 論

完全食 (FR 1日 10 $\mu$ g), B<sub>2</sub> 欠乏食に  $\gamma$ -BHC を 10ppm, 20ppm を添加しシロネズミを飼育した結果次のことがわかった。

1. 成長は完全食群では順調で、B<sub>2</sub> 欠乏食群では2週間目頃より発育が停滞し型の如くであったが、これらに BHC を投与するといずれの群でも発育は下まわった。
2. 臓器重量は肝臓、脳において比較的顕著な差がみられ、発育と反比例し、BHC を投与した群に肥大がみられた。
3. 肝臓中脂質量、血中コレステロールの増大は平行しており、B<sub>2</sub> 欠乏食に BHC-10ppm を投与した群において目立った。
4. 肝、腎臓中 B<sub>2</sub> 含量は完全食群より B<sub>2</sub> 欠乏食群において低く、BHC を投与するとさらに減少をきたした。
5. 血清中蛋白質量、酵素活性の変動には各群における有意差はみられなかった。
6. 白血球数は完全食群より B<sub>2</sub> 欠乏食群において減少し、BHC を投与することによりさらに著しい減少を呈した。また、その減少率は B<sub>2</sub> 欠乏食群において著しかった。
7. 白血球像中桿状核と分節核の分葉比は互いに反比例した。すなわち桿状核は完全食群より B<sub>2</sub> 欠乏食群に少なく、それに BHC を投与することによりさらに減少した。分節核はその逆で B<sub>2</sub> 欠乏食群において増大し、BHC を投与することによりさらに増大した。桿状核の減少率、分節核の上昇率の差はいずれの場合でも B<sub>2</sub> 欠乏食群において著しかった。

なお、本文の要旨は第22回日本家政学会中部支部会において発表した。



## 文 献

1. 八木国夫, 山本良子, 小林ミサヲ: ビタミン **32** (2), 240 (1964).
2. 筒井祥博: 名古屋医学 **94** (34), 244 (1971).
3. 奥村ミサヲ, 小林泰子: 東海学園女子短大紀要, **9**, 1 (1973).
4. Forker, B.R., and A.F. Morgan: J. Biol. Chem., **209**, 303 (1954).
5. Kind, P.R.N., and E.J. King: J. Clin. Path., **7**, 322 (1954).
6. Zak, B.: Am. J. Clin. Path., **27**, 583 (1957).
7. Gornell, A.G., C.S. Bardowill and M.M. David: J. Biol. Chem., **177**, 751 (1949).
8. 大柴恵一, 川北兵蔵: 食品衛生学雑誌 **11** (3), 177 (1970).
9. 大柴恵一, 川北兵蔵: 食品衛生学雑誌 **11** (6), 445 (1970).
10. 八木国夫, 中川洋吉, 奥村ミサヲ, 未発表 (1970).
11. 溝部源之: 山口医学, **8** (189), 201 (1959).
12. Sunderman, F.W.: 診断と検査法, p.462 (1973) 広川書店