

Polychlorinated Biphenyls (PCBs) のポルフィリン代謝に及ぼす影響 : PCBs 1回大量投与によるマウス実験的ポルフィリン症の検討

塚崎, 直子
長崎大学医学部皮膚科学教室

吉田, 彦太郎
長崎大学医学部皮膚科学教室

入船, 弘子
国立嬉野病院皮膚科

渡辺, 雅久
大村市立市民病院皮膚科

他

<https://doi.org/10.15017/7323621>

出版情報 : 福岡醫學雑誌. 86 (5), pp.207-211, 1995-05-25. Fukuoka Medical Association
バージョン :
権利関係 :



Polychlorinated Biphenyls (PCBs) のポルフィリン代謝に 及ぼす影響

—PCBs 1 回大量投与によるマウス実験的ポルフィリン症の検討—

長崎大学医学部皮膚科学教室

塚崎 直子・吉田 彦太郎

国立嬉野病院皮膚科

入 船 弘 子

大村市立病院皮膚科

渡 辺 雅 久

長崎市民病院皮膚科

田 中 敬 一

Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on Porphyrin Metabolism —Experimental Porphyrria Induced by Large Single Doses of PCBs—

Naoko TSUKAZAKI and Hikotaro YOSHIDA

*Department of Dermatology, Nagasaki University School of Medicine
Nagasaki 852 (Director: Prof. H. Yoshida)*

Hiroko IRIFUNE

Division of Dermatology, Ureshino National Hospital, Saga 843-03

Masahisa WATANABE

Division of Dermatology, Ohmura City Hospital, Ohmura 856

Keiich TANAKA

Division of Dermatology, Nagasaki Municipal Hospital, Nagasaki 850

The effects of large single doses of PCBs and iron overload on porphyrin metabolism were investigated in male C57BL/6 mice. A single intraperitoneal dose of Kanechlor-500 (10 mg/mouse) caused urinary uroporphyrin to increase three days after injection. This increase was transient without porphyrin accumulation in the liver. Iron overload (12.5 mg/mouse) showed a tendency to prolong the action of PCBs.

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) はニワトリ、ラット、ウサギにウロポルフィリンの尿中排泄、および肝臓への蓄積を中心とするポルフィリン代謝異常を惹起することが知られている²⁾⁴⁾¹¹⁾。また、従来は PCBs による実験的ポルフィリン症は起こし得ないとされていたマウスについても C57BL/6 系マウスで同様の変化が確認されている⁶⁾。しかし、これらの報告のほと

んどでは PCBs は経口で持続的にあるいは皮下に頻回に投与されており、一回投与による影響の検討は少ない。一方、PCBs と類似のポルフィリン代謝異常を来す hexachlorobenzene (HCB)、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) は鉄によりその作用が增強されることが報告されている⁷⁻⁹⁾。今回は、比較的大量に一回投与した PCBs のポルフィリン代謝に及ぼす影響、および PCBs と鉄負荷の相互作用を検討するために以下の実験を行った。

実験方法

実験1：7週齢，雄C57BL/6系マウス，5匹を用いた。カネクロールKC-500(ジーエルサイエンス株式会社，東京都)，10 mg/mouse を corn oil 0.2 ml に溶解し腹腔内注射し，3日後および1週間後に尿中ポルフィリン体排泄パターンを high performance liquid chromatography (HPLC) 法により検討した。また1週後に屠殺し，肝臓，糞便，血液中のポルフィリン体を測定した。

実験2：7週齢，雄C57BL/6系マウス，20匹を4群に分け，A群；PCBs+鉄投与群，B群；PCBs単独投与群，C群；鉄単独投与群，D群；無処置対象群とした。A群およびB群にはカネクロールKC-500，10 mg/mouse を，A群およびC群にはシデフェロン(日本臓器製薬株式会社，大阪市) 0.5 ml (鉄として12.5 mg)/mouse を各々腹腔内注射した。尿中ポルフィリン体を経時的にHPLC法により測定し，また5週後に屠殺し，肝臓，糞便，血液中ポルフィリン体を定量し，群間比較を行った。

ポルフィリン体測定法

(1) 尿中ポルフィリン体測定

マウス尿を3000 rpm，20分間遠心分離し，上清を0.05%ヨウ素酢酸溶液と1:1に混合し攪拌したものをHPLC用のサンプルとした。標準サンプルとしてはPORPHYRIN PRODUCTS社のporphyrin acid chromatographic marker kitを用いた。カラムはWaters μ Bondasphere C18 (3.9 mm x 15 cm) を用いた。分析条件は流速1.0 ml/min，注入量は20 μ l，移動相の組成およびgradientはTable 1, 2に示し

Table 1 HPLCの移動相の組成

	50mM酢酸アンモニウム	氷酢酸	アセトニトリル
A液	71.4 %	4.6 %	24 %
B液	20.6 %	6.4 %	73 %

Table 2 HPLCの移動相のgradient

TIME (min)	% A	% B
0.0	100	0
30.0	0	100
45.0	100	0

た。検出には励起波長404 nm，蛍光波長620 nmを用いた。

(2) 肝臓，糞便中ポルフィリン体測定

実験動物はクロロホルム麻酔下で屠殺後，下大静脈より全採血を行い，その後，肝臓，および大腸，直腸内糞便を摘出し，ポルフィリン体測定用の試料とした。肝臓，糞便中のポルフィリン体は溶媒抽出法とクロマトグラフィー法を併用して測定¹⁰⁾した。

(3) 赤血球中ポルフィリン体測定

赤血球中のポルフィリンの定量はSanoら⁹⁾の方法を変更した方法³⁾を用いて行った。

実験結果

(1) 実験1

PCBs投与前には検出されなかった尿中ウロポルフィリン(UP)，ヘプタカルボキシルポルフィリン(7-P)がカネクロール投与3日後よりすべてのマウスに出現し，UP/コプロポルフィリン(CP)比の平均値は 0.45 ± 0.14 (0.24~0.26)であった。投与7日後にはUP/CP比は 0.97 ± 0.29 (0.66~1.40)とさらに増加した(Fig. 1)。7日後の肝臓/体重比は $10.46 \pm 0.38\%$ と著明に増加していたが，肝臓，糞便のUPは検出されず，その他のポルフィリン体および，血液中ポルフィリン体値の上昇は認められなかった。

(2) 実験2

投与1週間後，A群およびB群のすべてのマウスに尿中UPが出現したが，UP/CP比に有意差はなかった。2週後にはA群のうちの3匹，B群のうちの2匹ではUPが検出できなくなった。5週後では，A群では5匹中3匹でなお尿中UPが認められたが，B群で

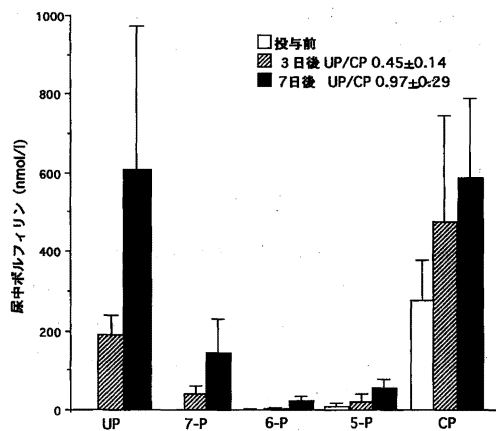


Fig. 1 PCBs投与後の尿中ポルフィリン体の変動

Table 3 尿中 Uroporphyrin/Coproporphyrin 比の経時的変化
(実験 2)

group	treatment	mouse No.	Uroporphyrin/Coproporphyrin ratio				
			1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks
A	PCBs+Fe	1	0.43	0.46	*	0.36	*
		2	0.35	*	*	0.31	*
		3	0.51	*	*	*	0.18
		4	0.41	*	0.32	*	0.24
		5	0.90	1.05	1.23	1.00	0.84
B	PCBs	1	1.35	0.62	0.28	0.44	*
		2	0.22	0.27	*	*	*
		3	0.32	*	0.03	*	*
		4	0.29	*	0.09	*	*
		5	0.43	0.28	*	*	0.21
C	Fe	1	*	*	*	*	*
		2	*	*	*	ND	*
		3	*	*	*	ND	*
		4	*	0.06	0.04	*	*
		5	*	0.05	*	*	*
D	control	1	*	ND	ND	ND	ND
		2	*				
		3	*				
		4	*				
		5	*				

* ; uroporphyrin: trace

ND; not done

は 1 匹に認められたのみであった。C 群では 2 週後と 3 週後に一部のマウスで UP のピークを認めたが UP/CP 比は低値であった (Table 3)。5 週後の肝/体重比は A 群, B 群で D 群より有意に上昇しており, また A 群は B 群より有意に高値であった。すべての群で肝臓, 糞便中に UP は認められなかったが, C 群では肝臓中 CP の軽度上昇および糞便中 CP, プロトポルフィリン (PP) の上昇を認めた (Table 4)。

考 察

PCBs 大量 1 回投与のポルフィリン代謝に及ぼす影

響について, Goldstein ら²⁾ はラットに Aloclor 1254, 1000 mg/kg を 1 回投与すると δ -aminolevulinic acid synthetase (ALA-s) の上昇は来すが尿中ポルフィリン体の増加は認められなかったとしている。今回の実験では, C 57 BL/6 系マウスにカネクロール 500, 約 500 mg/kg という大量の PCBs を 1 回投与することにより, 3 日後より尿に UP, 7-P の出現というポルフィリン排泄パターンの変化が生じることを確認することができた。この変化は軽度ではあるが過去のラット²⁾, 家兎⁴⁾ における連続投与の結果とほぼ一致するものと思われる。また, この変化は投与 1 週目をピーク

Table 4 投与5週後の肝体重比および肝臓、糞便、赤血球中のポルフィリン体値（実験2）

Group	Treatment	Liver/Body weight ratio(%)	Liver (nmol/g.w.w.)		Feces (nmol/g.w.w.)		Erythrocyte (ng/dl p.c.v.)	
			CP	PP	CP	PP	CP	PP
A	PCBs+Fe	6.95 ±*	0.034 ±	0.566 ±	0.104 ±	0.798 ±	21.25 ±	69.30 ±
		0.54	0.015	0.075	0.078	0.236	12.77	31.79
B	PCBs	5.88 ±*	0.092 ±	0.488 ±	0.078 ±	0.630 ±	8.91 ±	42.22 ±
		0.51	0.046	0.062	0.058	1.660	6.53	22.39
C	Fe	5.29 ±	0.180 ±	0.680 ±	0.200 ±*	1.230 ±*	43.75 ±	152.12 ±
		0.56	0.070	0.090	0.160	0.520	32.72	49.67
D	control	4.99 ±	0.092 ±	0.640 ±	0.078 ±	0.524 ±	22.57 ±	122.93 ±
		0.59	0.060	0.064	0.041	0.194	12.24	72.31

g.w.w.; gram wet weight

pcv; packed cell volume

CP; coproporphyrin

PP; protoporphyrin

*: p<0.05

としその後徐々に正常化していく傾向が認められ、肝臓へのポルフィリン体沈着は伴わなかった。SEKI ら⁶⁾はC 57 BL/6 系マウスに PCBs 含有飼料で飼育することにより肝臓への UP の沈着, uroporphyrinogen decarboxylase (uro-D) の低下, および ALA-s の上昇をきたすことを報告している。肝臓へのポルフィリン体沈着や尿中 UP の著明かつ持続的な増加を来すには PCBs に一定期間連続的に曝露することが必要なのかもしれない。

PCBs と類似のポルフィリン代謝異常を来す hexachlorobenzene (HCB), 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) は C 57 BL/6 あるいは 10 系マウスにおいて鉄負荷によりその作用が増強されることが報告されている⁷⁻⁹⁾。PCBs のポルフィリン代謝における鉄の影響については, Verneuil ら⁷⁾はニワトリの胚肝細胞に PCBs を添加して培養すると ALA-s の増加, uro-D の低下およびポルフィリンの蓄積を来すことを報告しているが, 鉄の添加はこの系に変化を与えず, キレート剤を添加するとポルフィリンの蓄積が減少するとしている。今回のわれわれの検討では 1 週後の UP/CP 比に鉄負荷の影響は認められなかった。しかし, 投与 5 週後に PCBs と鉄を併用した群で半分以上のマウスになお UP の排泄がみられそのうちの 1 匹では UP/CP 比が比較的高いままであったことは興味深

いと思われる。Siersema⁷⁾らは C 57 BL/10 系マウスに HCB と鉄の併用あるいは鉄の単独投与で尿中 UP の増加や肝の uro-D 抑制を来すことを確認しているが鉄のみを投与した場合, 尿中の UP が増加しはじめるのは 9 週後であるとしている。したがって鉄負荷の影響を確認するためにはもう少し長期の観察が必要であると考えられる。

文 献

- 1) De Verneuil H, Sassa S and Kappas A: Effects of polychlorinated biphenyl compounds, 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, phenobarbital and iron on hepatic uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. J* 214: 145-151, 1983
- 2) Goldstein JA, Hickman P and Jue DL: Experimental hepatic porphyria induced by polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol* 27: 437-448, 1974
- 3) Honda T, Nonaka S, Murayama F, Ohgami T, Simoyama T and Yoshida H: Effects of KC-400 (polychlorinated biphenyls) on porphyrin metabolism. *J Dermatol (Tokyo)* 10: 259-265, 1983
- 4) 三浦 創, 大森昭子, 加藤みさ子: PCB による実験的ポルフィリア. *日衛誌* 28: 83, 1973
- 5) Sano S and Granick S: Mitochondrial coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrin formation. *J Biol Chem* 236: 1173-1180, 1961

6) Seki Y, Kawanishi and Sano S: Mechanism of PCB-induced porphyria and Yusho disease. Mechanisms of chemical-induced porphyriopathies. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 514. 222-234, New York. 1987

7) Siersema PD, Helvoirt RP, Ketelaars DAM, Cleton MI, De Bruijn WC, Wilson JHP and Van Eijk HG: Iron and uroporphyrin in hepatocytes of inbred mice in experimental porphyria: A biochemical and morphological study. Hepatology 14: 1179-1188, 1991

8) Smith AG and Francis JE: Synergism of iron and hexachlorobenzene inhibits hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in inbred mice. Biochem. J 214: 909-913, 1983

9) Sweeny GD, Lones KG, Cole FM, Basford D and Krestynski F: Iron deficiency prevents liver

toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Science 204: 332-335, 1979

10) Tsukazaki N, Nonaka S, Ohgami T, Irifune H, Tanaka K, Yano M and Yoshida H: The synergistic effect with chlorinated chemicals (Trichlorosalicylanilid, 4-chloro-m-cresol, trichloromethiazide, trichlorofon and trichloroacetaldehyde) and low concentrations of griseofulvin on porphyrin metabolism. Fukuoka Acta Med 82: 215-220, 1991

11) Vos JG and Koeman JH: Comparative toxicologic study with polychlorinated biphenyls in chicken with special references to porphyria. Toxicol Appl Pharmacol 17: 656-668, 1970

(受付 1995-3-24)