九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxinのラットにおける急性毒性，肝酵素誘導作用及び肝への分布

古賀，信幸
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

黒木，淳
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

中嶋，寛
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

黒木（外間），由美子
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

他

https://doi.org/10.15017/7392980

出版情報：福岡醫學雜誌. 82 (5), pp.197-206, 1991-05-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

1, 2, 3, 7, 8-Pentachlorodibenzo-*p*-dioxin のラットにおける急性毒性，肝酵素誘導作用及び肝への分布

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室
古賀信幸*・黒木　淳・中嶋　寛
黒木（外間）由美子・吉村英敏*
第一薬科大学物理分析学教室
黒木広明・増田義人

Acute Toxicity, Inductive Effects of Liver Enzymes and Distribution in the Liver of 1, 2, 3, 7, 8-Pentachlorodibenzo-*p*-dioxin in Rats

Nobuyuki KOGA, Jun KUROKI, Hiroshi NAKASHIMA, Yumiko HOKAMA-KUROKI and Hidetoshi YOSHIMURA
Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62, Fukuoka 812
Hiroaki KUROKI and Yoshito MASUDA
Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Minami-ku, Fukuoka 815

Acute toxicity, inductive effects of liver enzymes and liver persistency of 1, 2, 3, 7, 8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (PenCDD) were compared with those of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) using male Wistar rats.

1, 2, 3, 7, 8-PenCDD treatment at a dose of 0.1 μmol/kg resulted in significant depression of growth of rats from a day to 28 days after treatment. However, the effect was relatively less than that of 2, 3, 7, 8-TCDD. On 5 days, similarly to 2, 3, 7, 8-TCDD-treated group, liver hypertrophy and thymic atrophy were observed in 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD-treated groups. In addition, 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD showed potent 3-methylcholanthrene-type inducing ability. For example, the activities of benzo(a)pyrene 3-hydroxylase and DT-diaphorase were 25-fold and 10-fold of control, respectively. On 30 days, about 50% of the inductive effects on 5 days were maintained in both 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD-and 2, 3, 7, 8-TCDD-treated groups. Amount of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD distributed to the liver on 5 days was about 80-90% of dose and was about 1.5 times greater than that of 2, 3, 7, 8-TCDD. About 50% of dose of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD remained even on 30 days after treatment.

From these results, it is suggested that 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD possessing the potent acute toxicity comparable to 2, 3, 7, 8-TCDD and higher persistency in the liver might be more important than 2, 3, 7, 8-TCDD in terms of the chronic toxicity.

はじめに

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) は，polychlorinated biphenyls (PCBs) 及び polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) とともに世界的環境汚染物質として知られているが，中でも 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は人工的産物として最強の毒性を有するといわれる[14]．

McConnell ら[9]は 2, 3, 7, 8-TCDD に加え，2, 3, 7, 8-TCDD の 1 位にさらに 1 個塩素置換された 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD の LD_{50} 値がモルモットで 3.1 μg/kg，マウスで 338 μg/kg であり，2, 3, 7, 8-TCDD の LD_{50} 値

* 現在　中村学園大学家政学部食物栄養学科

(モルモット, 2 μg/kg；マウス, 284 μg/kg) に匹敵するほどの強い毒性を示すことを報告している. また, Bradlaw と Casterline[2] は, これらのラット hepatoma cell における benzo(a)pyrene (BP) 3-水酸化活性の誘導能について調べ, 2,3,7,8-TCDD を 100 とした場合, 1,2,3,7,8-PenCDD は 1.9～23 にすぎないと報告している.

一方, 当教室ではこれまで, PCDFs の中でも 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) と 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) がほぼ同等に, 最も強い急性毒性及び肝酵素誘導能を示すのに対し, 肝蓄積性は置換塩素が 1 個多い 2,3,4,7,8-PenCDF で著しく上回ることを明らかにした[23]. さらに coplanar PCB の 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) 及び 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) についても同様に, 塩素数が 1 個多い 3,4,5,3',4,-PenCB では肝蓄積性が TCB に比べ, 著しく増大するのに加え, 急性毒性及び 3-methylcholanthrene (MC) 型の肝薬物代謝酵素の誘導能も格段に増強されることも明らかにした[26)27)].

そこで, 本研究では 2,3,7,8-TCDD の場合, このものが有する強い急性毒性, 肝酵素誘導作用及び肝蓄積性が 1 位への塩素 1 個の置換によってどのように変動するかについて, 1,2,3,7,8-PenCDD と 2,3,7,8-TCDD を用いて, 検討を加えた. なお, 5 塩素化体であるが塩素の置換位置が異なる 1,2,3,4,7-PenCDD についても同様に検討した.

実験方法

1. 実験材料

2,3,7,8-TCDD は既報[19] に従い, 合成した. 1,2,3,7,8-PenCDD 及び 1,2,3,4,7-PenCDD は Dr. J. J. Ryan (Health and Welfare Canada, Ottawa, Canada) より供与された (Fig. 1). また benzphetamine・HCl (BZ) 及び 3-hydroxy-BP はそれぞれアップジョンファーマシューティカルズ社 (筑波) 及び九州大学医療短期大学部木下洋夫教授より供与された. NAD(P)H, NAD(P), 及び glucose-6-phosphate (G-6-P) は協和発酵 (株) (東京) より, G-6-P dehydrogenase は Sigma Chemical 社 (米国, St. Louis) より, BP はナカライテスク (株) (京都) より購入した. また 2,4-dichlorophenolindophenol (DCPIP) は Merck AG (西ドイツ, Darmstadt) より購入した.

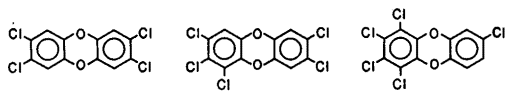


Fig. 1 Chemical structures of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins used in this study

2. 実験動物及び投与

5 週令の Wistar 系雄性ラット (体重約 150 g) を用い, 各 PCDD 異性体を 0.1 μmol/kg あるいは 0.28 μmol/kg の用量で 1 回腹腔内に投与した. 各異性体は体重 1 kg 当り 1 ml のコーン油に溶解し, また対照群にはコーン油のみを投与した. PCDD 投与後 5 日目及び 30 日目に屠殺し, 肝臓, 胸腺及び脾臓を摘出した. なお, 屠殺前 12 時間絶食させた.

3. 肝酵素液の調製

屠殺後直ちに摘出した肝臓は氷冷した生理食塩水で十分灌流して血液を取り除いた. 以下, 0.25 M sucrose-0.1 mM EDTA-10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液とともにガラス-テフロンホモジナイザーにて 25%ホモジネートを調製した後, 9000 xg で 20 分間遠心分離し, 上清を得た. この際, 沈渣はさらに同量の前記溶液に懸濁し, 再び 9000 xg で 20 分間遠心分離した. ここで得られた上清を先の上清と合わせ, 9000 xg 上清とした.

4. 酵素活性等の測定

チトクロム P-450 含量の測定は Matsubara らの方法[8] に従って行った. BP 3-水酸化活性[12] 及び BZ N-脱メチル化活性[26] はそれぞれ 3-hydroxy-BP 及び HCHO の生成量を測定した. DT-diaphorase 活性は, DCPIP の還元量から求める常法[3] に従った. 肝総脂質量は, Folch らの方法[4] により求め, さらにタンパク定量は Lowry らの方法[7] により行った.

5. 肝中 PCDD の定量

肝 0.5 g に 1 N NaOH-エタノール溶液 20 ml を加え, アルカリ分解後 n-ヘキサン 20 ml で 3 回抽出した. この n-ヘキサン抽出液は脱水後濃縮し, シリカゲルカラム (Wakogel S-I, 0.5 g) に注加した. PCDD は 40 ml の n-ヘキサンで溶出されるので, この分画を電子捕獲型検出器を装着した島津 GC-7AG 型ガスクロマトグラフに付した. カラムは fused silica capillary column ULBON HR-54 (0.24 mm×50 m) を, またキャリアーガスは高純度窒素 (99.999%) を用いた. ガス流量は 1 ml/min, カラム温度は最初の 2 分間を 150°C で, つぎに 250°C まで 1 分当り 16°C で昇温し, あとは 250°C を保持した. 定量は 2,3,4,5,6,2',5'-

heptachlorobiphenyl (HepCB) を内部標準物質として，内部標準法により行った．なお，この条件下での保持時間は次の通りであった．

2, 3, 7, 8-TCDD, 20.7 min；1, 2, 3, 4, 7-PenCDD, 27.1 min；1, 2, 3, 7, 8-PenCDD, 27.8 min；2, 3, 4, 5, 6, 2', 5'-HepCB, 22.7 min

6. P-450 c 及び P-450 d の精製と抗血清の作製

両 P-450 の精製は既報[10]に従い行った．またこれらの P-450 に対するウサギ抗血清は既報[10]に従い作製した．

7. 9000 xg 上清中の P-450 c 及び P-450 d 含量の免疫化学的定量

Thomas らの方法[18]を用いて行った．すなわち，1 M glycine-NaOH 緩衝液 (pH 7.4)，86 mM NaCl, 0.54 M glycerol, 15 mM NaN_3, 0.2% Emulgen 911, 及び 0.5% Na cholate を含む 0.9% agarose を煮沸溶解後，56°C に加温しておき，これに両 P-450 に対するウサギ抗血清 (0.5～1 ml) を加え，直径 9 cm のシャーレに流し込み放置した．固化したゲルに直径 3 mm の穴をあけ，これに試料を注入後，室温で 1～2 日放置し形成した白色円の面積を求め，精製 P-450 標品により作成した検査線により定量した．試料の 9000 xg 上清には 0.4% cholic acid 及び 0.2% Emulgen 911 を添加して用いた．

実験結果

1. 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD の急性毒性

Fig. 2 に 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 及び 2, 3, 7, 8-TCDD をそれぞれ 0.1 μmol/kg でラットの腹腔内に 1 回投与した場合の 29 日間の体重増加曲線を示す．両 PCDD 群ではいずれも投与後 1 日目で早くも，有意な体重増加抑制効果を示した．すなわち，対照群で 29 日間に約 215 g 増加したのに対し，1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 投与群では 191 g，2, 3, 7, 8-TCDD 投与群では 93 g に過ぎなかった．この結果から，2, 3, 7, 8-TCDD の方が 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD に比べ，ラットの成長に及ぼす影響がかなり強いことが示された．

次に，1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 及び 2, 3, 7, 8-TCDD 投与後 5 日目及び 30 日目の臓器重量を比較した．これまでに，2, 3, 7, 8-TCDD 投与ラットでは肝肥大，胸線の萎縮が観察されている[14]．Table 1 に示すように，2, 3, 7, 8-TCDD 群では投与後 5 日目ですでに肝重量は

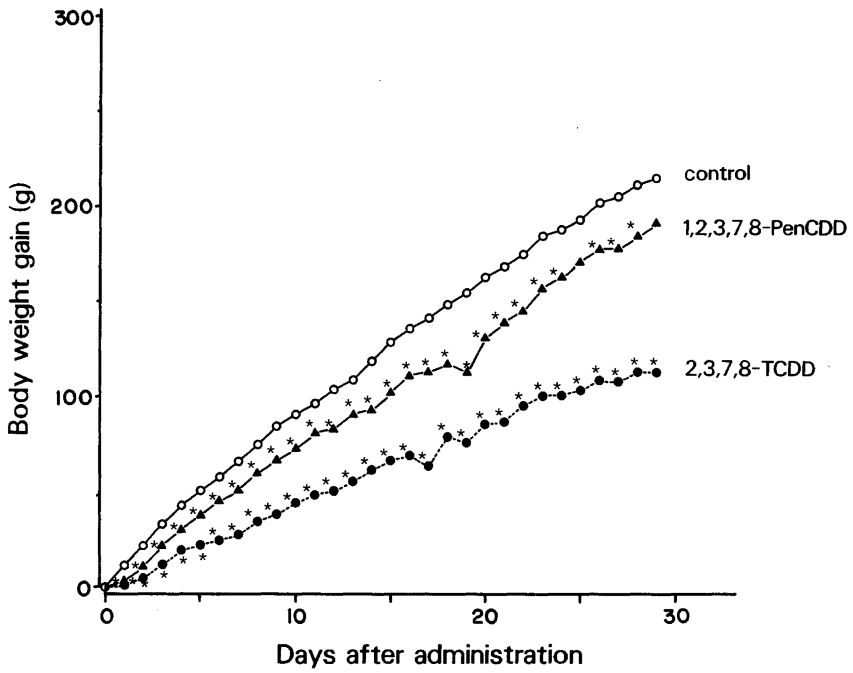


Fig. 2 Effects of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD and 2, 3, 7, 8-TCDD on body weight gain in rats
Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.1 μmol/kg. Each point represents the mean of four rats.
* Significantly different from the control, $p<0.05$.

対照群の1.45倍に，また胸腺は対照群の49%へと著しく変化していた．一方，1,2,3,7,8-PenCDD群でも2,3,7,8-TCDD群に匹敵する有意な変化が観察された．すなわち，対照群に対し肝重量は1.26倍であり，また胸腺は50%と萎縮していた．脾臓に対しては2,3,7,8-TCDD群で萎縮傾向が見られたが，1,2,3,7,8-PenCDD群では変化は見られなかった．投与後30日目では，両PCDD投与群ともに5日目に観察された結果と同様であり，臓器重量の変化はほとんど改善されていなかった．

2. 1,2,3,7,8-PenCDDの肝酵素誘導作用

1,2,3,7,8-PenCDD及び2,3,7,8-TCDDの投与後5日目あるいは30日目において肝9000 xg上清を調製し，両PCDDが肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響を比較した（Table 2）．投与後5日目のP-450含量は2,3,7,8-TCDD群で対照群の約3.3倍，1,2,3,7,8-PenCDD群で約2.9倍であった．また，MC型誘導剤で著しく誘導されるBP 3-水酸化活性とDT-diaphorase活性はそれぞれ，2,3,7,8-TCDD投与群においては対照群の約26倍と約14倍であり，これに対し1,2,3,7,8-PenCDD投与群ではそれぞれ約25倍と約10倍であった．投与後30日目では，2,3,7,8-TCDD投与群のDT-diaphorase活性が対照群の約16倍と5日目の誘導効果が維持されていたのに対し，P-450含量及びその他の活性はいずれのPCDD投与群でも5日目の約60%から50%以下へと低下していた．一方，phenobarbital型誘導剤で強く誘導されるが，逆にMC型誘導剤で活性低下を受けるBZ N-脱メチル化活性は，5日目の両PCDD群ではほとんど影響を受けなかったが，投与後30日目の2,3,7,8-TCDD群では減少傾向を示した．このように1,2,3,7,8-PenCDDは2,3,7,8-TCDDに匹敵するほど強い誘導能を有していた．

3. 1,2,3,4,7-PenCDDの急性毒性と肝酵素誘導作用

1,2,3,4,7-PenCDD（0.28 μmol/kg）を腹腔内に投与し，投与後5日間の体重増加曲線を観察した．その結果，1,2,3,4,7-PenCDD投与群は，2,3,7,8-TCDD（0.28 μmol/kg, ip）投与群で観察された著しい体重増加抑制効果は全く認められず，対照群と全く同じ体重増加曲線を示した（Fig. 3）．次に臓器重量への影響を調べたが，Table 3に示すように，1,2,3,4,7-PenCDD投与群では前述の両PCDDにより示された肝肥大，胸腺の萎縮などの臓器重量の変化は全く観察されなかった．さらに肝薬物代謝酵素活性に及ぼす影響をみたところ，BP 3-水酸化活性及びDT-diaphorase活性で平均値として対照群の約2倍の誘導効果が観察さ

Table 1 Effect of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD and 2, 3, 7, 8-TCDD on the tissue weights of rats

Treatment	Tissue weight (g/100 g body weight)		
	Liver	Thymus	Spleen
On 5 days			
Control	3.10±0.15 (100)	0.340±0.023 (100)	0.288±0.068 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	4.48±0.33* (145)	0.168±0.039* (49)	0.254±0.025 (88)
1, 2, 3, 4, 8-PenCDD	3.92±0.19* (126)	0.171±0.013* (50)	0.325±0.069 (113)
On 30 days			
Control	3.22±0.20 (100)	0.181±0.026 (100)	0.253±0.026 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	4.40±0.53* (137)	0.078±0.016* (43)	0.328±0.034 (130)
1, 2, 3, 4, 8-PenCDD	3.89±0.15* (121)	0.111±0.006* (61)	0.246±0.026 (97)

Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.1 μmol/kg.
Each value represents the mean±S. D. of three or four rats and those in parentheses are the relative ratio to the control.
* Significantly different from the control, $p<0.05$.

Table 2 Effect of 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD and 2, 3, 7, 8-TCDD on the enzyme activities of 9000 xg supernatants of rat liver

Treatment	P-450 content[1)]	BP 3-hydroxylase[2)]	BZ N-demethylase[3)]	DT-diaphorase[4)]
On 5 days				
Control	0.149±0.026 (100)	28.8±10.0 (100)	0.664±0.071 (100)	0.130±0.046 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	0.493±0.039* (332)	747.9±71.2* (2594)	0.612±0.049 (92)	1.798±0.476* (1384)
1, 2, 3, 7, 8-PenCDD	0.431±0.045* (289)	727.6±48.1* (2530)	0.620±0.042 (93)	1.298±0.301* (999)
On 30 days				
Control	0.177±0.016 (100)	67.4±22.5 (100)	0.995±0.163 (100)	0.089±0.023 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	0.393±0.057* (230)	708.4±87.5* (1052)	0.678±0.208 (68)	1.383±0.515* (1552)
1, 2, 3, 7, 8-PenCDD	0.382±0.049* (216)	814.4±73.8* (1209)	1.179±0.140 (118)	0.505±0.210* (567)

Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.1 μmol/kg. Each value represents the mean± S. D. of three or four rats and those in parentheses are the relative ratio to the control.

1) nmol/mg protein, 2) pmol/min/mg protein, 3) nmol/min/mg protein,

4) μmol/min/mg protein.

* Significantly different from the control, $p<0.05$.

Table 3 Effect of 1, 2, 3, 4, 7-PenCDD on the tissue weights of rats

Treatment	Tissue weight (g/100 g body weight)		
	Liver	Thymus	Spleen
Control	3.14±0.06 (100)	0.302±0.037 (100)	0.364±0.039 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	4.72±0.42* (150)	0.131±0.020* (43)	0.281±0.041* (77)
1, 2, 3, 4, 7-PenCDD	3.09±0.12 (98)	0.264±0.035 (87)	0.320±0.038 (88)

Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.28 μmol/kg. Each value represents the mean±S. D. of four rats and those in parentheses are the relative ratio to the control.

れたが，いずれも有意ではなかった（Table 4）．

4. 各 PCDD の肝蓄積性

次に各 PCDD 投与後5日目あるいは30日目における各異性体の肝への分布を調べた．Table 5 に示すように，2, 3, 7, 8-TCDD は 10, 32.2 及び 100 μg/kg のいずれの用量でも投与量の約 46～62%が投与後5日目の肝で検出された．これに対し 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD は 10 及び 35.6 μg/kg の用量で，それぞれ 78%及び 93%が肝に分布していた．また，投与後 30 日目の肝では，2, 3, 7, 8-TCDD は投与量の約 22%と投与5日目の 50%以下に減少していたが，1, 2, 3, 7, 8-PenCDD は投与量の約 49%であり，投与5日目の 50～60%は維持されていた．この結果は，1, 2, 3, 7, 8-PenCDD の肝への親和性が 2, 3, 7, 8-TCDD に比べ，かなり高いことを示している．

一方，1, 2, 3, 4, 7-PenCDD は，10 及び 100 μg/kg のいずれの用量の場合にも，投与5日目の肝には投与量の約 0.1%しか分布していなかった．

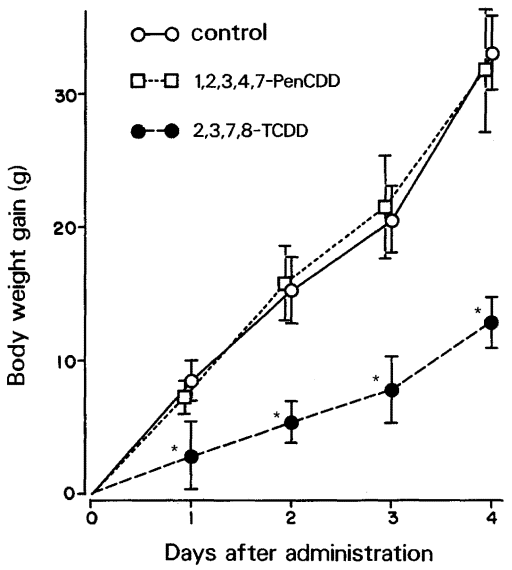


Fig. 3 Effects of 1, 2, 3, 4, 7-PenCDD and 2, 3, 7, 8-TCDD on body weight gain in rats
Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.28 μmol/kg. Each point represents the mean±S. D. of four rats.
* Significantly different from the control, $p<0.05$.

5. 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 及び 2, 3, 7, 8-TCDD 投与ラット肝 9000 xg 上清中 P-450 c 及び P-450 d の定量

MC 型誘導能を有する PCB 及び PCDF 異性体は，ラット肝ミクロゾームの P-450 分子種の中でも特に，P-450 a，P-450 c 及び P-450 d を顕著に増加させることが知られている[11)13)]．また，著者らは肝蓄積性が著しく高い 2, 3, 4, 7, 8-PenCDF が，P-450 分子種のうち最も含有率の高い P-450 d とモル比約1：1で結合していることを明らかにしている[6)]．そこで，1, 2, 3, 7, 8-PenCDD 及び 2, 3, 7, 8-TCDD 投与後 30 日目のラット肝より 9000 xg 上清を調製し，これに含まれる各 P-450 分子種を免疫化学的手法により定量した．その結果，Table 6 に示すように，対照群では検出限界

Table 4 Effect of 1, 2, 3, 4, 7-PenCDD on the enzyme activities of rat liver

Treatment	P-450 content[1)]	BP 3-hydroxylase[2)]	BZ N-demethylase[3)]	DT-diaphorase[4)]
Control	0.184±0.024 (100)	33.9± 9.1 (100)	0.778±0.018 (100)	0.096±0.003 (100)
2, 3, 7, 8-TCDD	0.501±0.027* (275)	614.2±91.9* (1812)	0.532±0.065* (68)	3.538±0.834* (3676)
1, 2, 3, 4, 7-PenCDD	0.171±0.024 (93)	64.4±22.9 (190)	0.722±0.080 (93)	0.229±0.076 (236)

Both PCDDs were injected i. p. at a single dose of 0.28 μmol/kg. Each value represents the mean± S. D. of four rats and those in parentheses are the relative ratio to the control.
[1)] nmol/mg protein, [2)] pmol/min/mg protein, [3)] nmol/min/mg protein,
[4)] μmol/min/mg protein.
* Significantly different from the control, $p<0.05$.

(0.002 nmol/mg protein) 以下であったP-450 d及びP-450 cが，2,3,7,8-TCDD投与群ではそれぞれ0.142及び0.388 nmol/mg proteinと著しく誘導されていた．これらの値はそれぞれ総P-450量の35%と96%であった．一方，1,2,3,7,8-PenCDD投与群でも2,3,7,8-TCDD群と同様にP-450 d及びP-450 cの著しい増加が観察され，それぞれ総P-450量の26%と85%を占めていた．このように両PCDD群の肝中P-450のうち，いずれもP-450 c及びP-450 dが主要な分子種になっており，特にP-450 c含量はP-450 d含量の約3倍であった．なお，1,2,3,4,7-PenCDD群は前述のように，全く肝P-450量を誘導しなかったが，総P-450含量のうちP-450 c及びP-450 dはいずれも検出限界以下であった（データ不掲載）．

考　　察

2種のPenCDD，1,2,3,7,8,-PenCDD及び1,2,3,4,7-PenCDDのラットにおける急性毒性，肝酵素誘導能及び肝蓄積性を調べ，2,3,7,8-TCDDのそれと比較した．

1,2,3,7,8-PenCDDは肝肥大，胸腺の萎縮などの臓器重量変化を急性毒性の指標にした場合，2,3,7,8-TCDDにわずかに劣りはするが，それに匹敵するほどの強い毒性を有することが明らかとなった．この結果は先のMcConnellら[9]の結果と一致するものである．また，肝酵素誘導能についてもこれまでの報告[2]と同様に，2,3,7,8-TCDDに比べ若干弱いものの，それに匹敵する程の強さであった．これらの結果は，PCBsの3,4,3',4'-TCBやPCDFsの2,3,7,8-TCDFの場合とは異なり，2,3,7,8-TCDDの1位への塩素置換に

Table 5 Concentration of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in rat liver at 5 or 30 days after a single i. p. injection

Compound	Dose (μg/kg)	% of dose	
		5	30 (days)
2, 3, 7, 8-TCDD	10	45.67±25.48	——
	32.2	62.49±23.72	22.14± 3.91
	100	49.21±12.61	——
1, 2, 3, 7, 8-PenCDD	10	77.98± 9.21	——
	35.6	92.94±10.19	49.33±12.79
1, 2, 3, 4, 7-PenCDD	10	0.13± 0.16	——
	100	0.06± 0.08	——

Each value represents the mean±S. D. of four rats.
——, not determined.

Table 6 Immunochemical quantitation of two forms of P-450 in liver 9000 xg supernatants from 1, 2, 3, 7, 8-PenCDD- or 2, 3, 7, 8-TCDD-treated rats

Treatment	Total P-450	P-450 d (nmol/mg protein)	P-450 c
Control	0.177±0.016	<0.002	<0.002
2, 3, 7, 8,-TCDD	0.406±0.058	0.142±0.043	0.388±0.029
	(100)	(35)	(96)
1, 2, 3, 7, 8-PenCDD	0.382±0.049	0.099±0.017	0.326±0.057
	(100)	(26)	(85)

Rats were killed on 30 days after a single i. p. dose of 0.1 μmol/kg of PCDD. Each value represents the mean±S. D. of four rats and those in parentheses are the relative value to total contents of P-450.

より急性毒性及び肝酵素の誘導能が減弱することを示している．

このような，2,3,7,8-TCDDをはじめとする高毒性多塩素化芳香族炭化水素が生物活性を発現するには，まず細胞可溶性画分に存在するAh-recepterとの結合が必要であるといわれている[15]．Safe一派は2,3,7,8-TCDDをはじめとする14種のPCDD異性体の細胞可溶性画分に存在するAh-recepterとの結合親和性（EC_{50}）を調べ[16]，2,3,7,8-TCDDのEC_{50}値は1.0×10^{-8} Mと最も小さく，これに次いで1,2,3,7,8-PenCDDが7.9×10^{-8} Mであることを報告している．本研究の結果は，彼らの結果をよく支持している．なお，1,2,3,4,7-PenCDDは急性毒性，肝酵素誘導能をほとんど示さなかったが，このことは従来の報告[14]のように，2,3,7,8位への4個の塩素置換が上記の様な生物活性を発現するために必須であることを示している．

Van den Bergら[20]は都市焼却場の飛散灰のトルエン抽出物をラットに投与し，2日後及び14日後にPCDDsの肝への分布を調べたところ，いずれの場合にも1,2,3,7,8-PenCDDの方が2,3,7,8-TCDDの約2倍多く分布することを報告している．今回のように単一のPCDDを用いた場合にも，混合物を使用した彼らの結果と同様に，1,2,3,7,8-PenCDDの方が2,3,7,8-TCDDより多く肝へ集まり，さらに肝からの消失も遅いことが明らかとなった．

これまでに，肝蓄積性が著しく高い3,4,5,3',4'-PenCBや2,3,4,7,8-PenCDFはラット肝ミクロゾームのP-450分子種のP-450 dと高い親和性を有していることが明らかになっている[6)21]．本研究でも1,2,3,7,8-PenCDD及び2,3,7,8-TCDD投与ラット肝のP-450 dを定量したところ，それぞれ総P-450量の約35%及び26%と顕著に増加していた．この結果を，先の結果と考え合わせると，両PCDDの肝蓄積性はP-450 d量と密接に関連していることが示唆される．しかしながら，両PCDDの肝への分布量にかなりの差が認められることから，このような肝蓄積性は肝P-450 d量ばかりでなく，その代謝されやすさも大きな要素となろう．

PCDFsやPCBsの中でも，2,3,7,8-TCDFや3,4,3',4'-TCBは肝蓄積性は低いが，この理由として比較的代謝を受けやすいことが明らかにされている[1)25]，また今回，1,2,3,4,7-PenCDDは肝にほとんど分布していなかったが，これは1,2,3,4,7-PenCDDが隣接水素を有していることから，速やかに代謝され，肝外への排泄されたものと考えられる．一方，5塩素化体の2,3,4,7,8-PenCDFと3,4,5,3',4'-PenCBとなるとほとんど代謝されない[24)5]．現在のところ，2,3,7,8-TCDDについては，ラット及びハムスター肝ミクロゾームやラット遊離肝細胞により代謝物の生成が報告されている[22)17]が，1,2,3,7,8-PenCDDについては全く報告はない．

一方，体重増加曲線に及ぼす影響をみると，1,2,3,7,8-PenCDDは投与1日目ですでに有意な増加抑制作用を示したものの，2,3,7,8-TCDDに比較するとその作用はかなり弱いものであった．もし，肝以外に標的臓器が存在すると仮定するならば，この結果は次のように考えられる．すなわち，1,2,3,7,8-PenCDDと2,3,7,8-TCDDにおける肝蓄積性の違いにより，標的臓器における濃度が大きく異なり，その結果，両PCDDの体重増加抑制作用に大きな差異が認められたのかも知れない．以上のように，1,2,3,7,8-PenCDDの著しく高い肝蓄積性は短期的には毒性を抑制する方向に働いているともいえるが，長期的には慢性毒性発現のための最大の要因となるであろう．

総　　括

猛毒の2,3,7,8-TCDDにさらに1個塩素置換された1,2,3,7,8-PenCDDのラットにおける急性毒性，肝酵素誘導能及び肝蓄積性を調べ，2,3,7,8-TCDDと比較した．

1) 1,2,3,7,8-PenCDD (0.1 μmol/kg) 投与ラットにおいて，投与後1日目で体重増加の有意な抑制が観察され，この抑制は少なくとも28日間は持続した．しかしながら，このような体重曲線に及ぼす影響は2,3,7,8-TCDDと比較すると，かなり弱いものであった．

2) 1,2,3,7,8-PenCDD投与後5日目のラットにおいて，著しい肝肥大及び胸腺の萎縮が観察された．この強さは2,3,7,8-TCDD群に匹敵するものであった．なお，このような臓器重量変化は両PCDD群ともに30日目においてもほとんど改善されなかった．

3) 1,2,3,7,8-PenCDDは2,3,7,8-TCDDと同程度の強いMC型誘導能を示した．すなわち，投与後5日目においてBP 3-水酸化活性及びDT-diaphorase活性は対照群のそれぞれ25倍及び10倍に誘導されていた．投与30日目では，5日目の約50%の誘導率が維持されていた．

4) 1,2,3,7,8-PenCDDの投与後5日目の肝への分布量は投与量の約80～90%であり，2,3,7,8-TCDDの分布量を大きく上回った．投与後30日目において

も，1,2,3,7,8-PenCDDは約50%が残存しており，2,3,7,8-TCDD群の2倍以上の高さであった．

以上のように，1,2,3,7,8-PenCDDが，2,3,7,8-TCDDに比肩しうるほどに強い急性毒性を示すこと，さらに2,3,7,8-TCDDより高い肝蓄積性に有することを考えると，慢性毒性の面でより重要であると思われる．

文　献

1) Birnbaum LS, Decad GM and Matthews HB: Disposition and Excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 55: 342-352, 1980.

2) Bradlaw JA and Casterline Jr. JL: Induction of enzyme activity in cell culture: a rapid screen for detection of planar polychlorinated organic compounds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 904-916, 1979.

3) Ernster L, Danielson L and Ljunggren M: DT-diapphorase I. Purification from the soluble fraction of rat liver cytoplasm and properties. Biochim. Biophys. Acta 58: 171-188, 1962.

4) Folch J, Lees M and Stanley GHS: Isolation and purification of total lipids from tissues. J. Biol. Chem. 226: 497-509, 1957.

5) Koga N, Beppu M and Yoshimura H: Metabolism *in vivo* of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolite in rats. J. Pharmacobio-Dyn. 13: 497-506, 1990.

6) Kuroki J, Koga N and Yoshimura H: High affinity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran to cytochrome P-450 in the hepatic microsomes of rats. Chemosphere 15: 731-738, 1986.

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

8) Matsubara T, Koike M, Touchi A, Tochino Y and Sugeno K: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. Anal. Biochem. 75: 596-603, 1976.

9) McConnell EE, Moore JA, Haseman JK and Harris MW: The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-*p*-dioxin in mice and guinea pigs. Toxicol. Appl. Pharmacol. 44: 335-356, 1978.

10) Nagata K, Buppodom P, Matsunaga T, Ishimatsu M, Yamato H, Yoshihara S and Yoshimura H: Purification and characterization of seven distinct forms of liver microsomal cytochrome P-450 from untreated and inducer-treated male Wistar rats. J. Biochem. 97: 1755-1766, 1985.

11) Nagata K, Matsunaga T, Buppodom P, Ishimatsu M, Yamato H, Yoshihara S and Yoshimura H: Unique induction of cytochrome P-450 isozymes in rat liver microsomes by treatment with 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and its effect on testosterone metabolism. J. Pharmacobio-Dyn. 8: 948-957, 1983.

12) Nebert DW and Gelboin HV: Substrate inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. J. Biol. Chem. 243: 6242-6249, 1968.

13) Parkinson A, Safe SH, Robertson LW, Thomas PE, Ryan LM and Levin W: Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyls-treated rats. J. Biol. Chem. 258: 5967-5976, 1983.

14) 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.

15) Poland A and Glover E: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Segregation of toxicity with the Ah locus. Mol. Pharmacol. 17: 86-94, 1980.

16) Safe SH: Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 26: 371-399, 1986.

17) Sawahata T, Olson JR and Neal RA: Identification of metabolites of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) formed on incubation with isolated rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 105: 341-346, 1982.

18) Thomas PE, Korzeniwsky D, Ryan DE and Levin W: Preparation of monospecific antibodies against two forms of rat liver cytochrome P-450 and quantitation of these antigens in microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 192: 524-532, 1979.

19) 富田真雄，上田伸一，成定昌幸：Dibenzo-*p*-dioxin (Diphenylene Dioxide) 誘導体の研究（第27報）Polyhalodibenzo-*p*-dioxin の合成，薬学雑誌 79: 186-192, 1959.

20) Van den Berg M, Meerman L, Olie K and Hutzinger O: Retention of PCDDs and PCDFs in the liver of the rat and hamster after oral administration of a municipal incinerator fly ash extract. Toxicol. Environ. Chem. 12: 267-284, 1986.

21) Voorman R and Aust SD: Specific binding of polyhalogenated aromatic hydrocabon inducers of cytochrome P-450 d to the cytochrome and inhibition of its estradiol 2-hydroxylase activity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 90: 69-78, 1987.

22) Wroblewski VJ and Olson JR: Effect of monooxygenase inducers and inhibitors on the hepatic metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo

-*p*-dioxin in the rat and hamster. Drug Metab. Dispos. 16 : 43-51, 1988.

23) Yoshihara S, Nagata K, Yoshimura H, Kuroki H and Masuda Y : Inductive effect on hepatic enzymes and acute toxicity of individual polychlorinated dibenzofuran congeners in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 59 : 580-588, 1981.

24) Yoshimura H, Kuroki J, Koga N, Kuroki H, Masuda Y, Fukasaku N and Hasegawa M : High accumulation of 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran to hepatic microsomes of rats. J. Pharmacobio-Dyn. 7 : 414-419, 1984.

25) Yoshimura H, Yonemoto Y, Yamada H, Koga N, Oguri K and Saeki S : Metabolism *in vivo* of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats. Xenobiotica 17 : 897-910, 1987.

26) 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.

27) Yoshimura H, Yoshihara S, Koga N, Nagata K, Wada I, Kuroki J and Hokama Y : Inductive effect on hepatic enzymes and toxicity of congeners of PCBs and PCDFs. Environ. Health Perspect. 59 : 113-119, 1985.