PCB, DDT その他含塩素系薬剤投与が白ネズミの ビタミン B₁ 代謝に及ぼす影響

八 木 典 子

京都大学医学部衛生学教室

Effect of PCB, DDT and Other Organochloride Compounds on Thiamine Metabolism in Rats

Noriko YAGI

*Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University,
Sakyo-ku, Kyoto*

To clarify the effect of PCB, DDT and other organochloride compounds on thiamine metabolism, rats were separated into six groups and placed on different admixed diets. Group 1 was fed a normal diet; group 2, a PCB supplemented diet; group 3, a DDT supplemented diet; group 4, a BHC supplemented diet; group 5, a diphenyl supplemented diet; group 6, a carbon tetrachloride supplemented diet. After 50 days of these dietary regimens all animals were sacrificed and various studies were done on the excised tissues.

In PCB treated rats, thiamine levels in blood, liver and sciatic nerve decreased, transketolase activity in erythrocytes and liver decreased and TPP effect in erythrocytes and liver increased. In DDT treated rats, thiamine levels in blood, brain and liver decreased, transketolase activity in brain and liver decreased and TPP effect in brain and liver increased. In other groups, no significant changes were observed regarding thiamine metabolism. These findings provide direct evidence that changes occur in thiamine metabolism in PCB and DDT poisoned rats.

(Received May 24, 1978)

PCB 中毒として知られている カネミ油症患者の臨床的所見は、アクネ様発疹、皮膚の色素沈着、視力障害、全身倦怠感、しびれ感、食欲不振、体重減少等さまざまであり^{1)~3)}、中毒機構の複雑性を示している。したがって、ビタミン類の代謝や糖代謝などにも影響を及ぼす可能性が考えられている^{4)~6)}。しかしながら、PCB およびその他有機塩素系の農薬・薬剤などがビタミン B₁ 代謝およびそれに関連して糖代謝系酵素などにどのような影響を及ぼすか、その機構についてはほとんどわかっていない。

著者は、この点を解明するために、PCB, DDT およびその他塩素含有薬物を動物に与えて、ビタミン B₁ 代謝について検討をおこなったのでその結果を報告する。

実 験 方 法

1. *in vivo* の実験

1) 実験動物 生後3週齢のウイスター系雄ラットを用いた。

2) 飼育方法 ラットを6群(1群5匹)に分け、おのおのに Table 1 に示すような飼料を与えて50日間飼育した。飼料および水は自由に摂取させた。

また、PCB, DDT および対照群については、別に1群5匹、50日間上記と同様に飼育し、その後3日間制限飼料(10g/日)を与え、尿・尿中ビタミン B₁ 測定用とした。

3) 分析方法 ラットは50日間飼育し、終体重測定後、ネンブタール麻酔下にて開腹、腹部大動脈より注射器で採血して失血死させて、肝臓・腎臓・脳・坐骨神経を摘出し、ビタミン B₁、transketolase 活性の測定をおこなった。尿中ビタミン B₁ 測定用ラット (PCB,

Table 1. Dietary regimens.

Group	Additive
1 (CONT)	Basal diet 1 kg+olive oil 5 g
2 (DIPH)	Basal diet 1 kg+diphenyl 254 mg in 5 g of olive oil
3 (DDT)	Basal diet 1 kg+DDT 583 mg in 5 g of olive oil
4 (PCB)	Basal diet 1 kg+PCB 500 mg in 5 g of olive oil
5 (CCl ₄)	Basal diet 1 kg+CCl ₄ 254 mg in 5 g of olive oil
6 (BHC)	Basal diet 1 kg+BHC 480 mg in 5 g of olive oil

Basal diet : Commercial flour diet (Oriental Co. M.F.)

PCB : KC-500, BHC : γ -BHC.

Table 2. Weight gain and liver weight.

Group	Initial weight (g)	Weight gain (g)	Liver weight (g)	Liver W./Body W. (%)
CONT	110.6 $\pm$ 2.0	334.2 $\pm$ 19.6	10.64 $\pm$ 0.27	2.39 $\pm$ 0.07
DIPH	112.5 $\pm$ 3.3	324.0 $\pm$ 8.6	12.23 $\pm$ 0.82	2.80 $\pm$ 0.19
DDT	113.0 $\pm$ 4.4	378.8 $\pm$ 10.1*	16.29 $\pm$ 0.58***	4.17 $\pm$ 0.19***
PCB	115.2 $\pm$ 3.3	269.8 $\pm$ 19.4*	18.26 $\pm$ 0.90***	4.78 $\pm$ 0.26***
CCl ₄	113.0 $\pm$ 4.4	334.8 $\pm$ 24.3	10.14 $\pm$ 0.62	2.30 $\pm$ 0.04
BHC	107.8 $\pm$ 0.9	298.6 $\pm$ 17.8	14.13 $\pm$ 1.37*	3.46 $\pm$ 0.20**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. Values represent mean $\pm$ S.E. of 5 rats.

*, **, *** Significant difference as compared to the values of control.

DDT および対照群は、54 日目に尿尿分離式代謝ケージ (夏目製作所) に移し、絶食させて 24 時間の尿・尿を採集した。

イ) ビタミン B₁ 量の測定: 尿・尿・血液・肝臓・腎臓・脳・坐骨神経中のビタミン B₁ 量をチオクロム法⁷⁾にて定量した。

ロ) transketolase 活性の測定: 上記, おのおのの臓器における transketolase 活性の測定は, Ribose-5-Phospholic acid を基質として, Brin の方法⁸⁾にて反応させ、生成してくる Sedoheptulose を Dishe の方法⁹⁾で測定した¹⁰⁾。また, *in vitro* で thiamine pyrophosphate を添加して得られる活性の上昇 (TPP 効果) をも測定した¹⁰⁾。

2. *in vitro* の実験

1) ビタミン B₁ に対する各薬物の影響 1 μ g/ml のビタミン B₁ 溶液に種々の濃度の PCB, DDT, BHC, Diphenyl, 四塩化炭素をエタノールにとかして加え, pH 6 に調整し, 蒸留水を加えて総量 3ml にして 37°C, 1 時間インキュベートした後, チオクロム法にて残存しているビタミン B₁ 量を定量した。薬剤不添加の対照には等量のエタノールを添加した。

2) transketolase 活性に対する各薬物の影響 ラットの肝臓ホモジネイトを酵素源として, 種々の濃度の薬物を添加し, 37°C, 30 分間インキュベートした後 *in vivo* の実験と同様に, その活性を測定した。

実験結果

1. *in vivo* の実験

1) 体重増加量および肝臓重量 各群ラットの飼育期間中の体重増加量, 肝臓重量および体重当りの肝臓重量を Table 2 に示した。発育は PCB 投与群および DDT 投与群でみられるが, その他の薬剤投与群は対照との間に有意の差は認められなかった。また, PCB, DDT および BHC 投与群で肝臓重量の増加する傾向が認められた。他の臓器重量には各群間に有意の差は認められなかった。なお, 前報 (Itokawa, Yagi *et al.*: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 36, 131-141 (1976)) と同じく, PCB 投与群の飼料摂取量は対照群との間に差が認められなかった。

2) 尿・尿中のビタミン B₁ 量 PCB, DDT および対照群の一昼夜の尿・尿中ビタミン B₁ 量を定量した結果は, Table 3 に示すように, いずれの群においても有

Table 3. Thiamine concentration in urine and feces.

Group	(μg/day)	
	Urine	Feces
CONT	2.46±0.23	17.50±0.99
DDT	2.31±0.06	17.04±0.95
PCB	2.68±0.07	15.08±1.12

Values represent mean±S.E. of 5 rats.

Fig. 1. Thiamine concentration in liver.

* Significant difference ($p<0.05$) as compared to the values of control.

Values represent mean±S.E. of 5 rats.

意の差はみられなかった。また、このときの1日当たりのビタミン B₁ 摂取量は 90 μg であった。

3) 各臓器のビタミン B₁ 量 血液・腎臓・脳・坐骨神経・肝臓中のビタミン B₁ を定量した結果は Table 4 および Figs. 1, 2 に示すとおりであった。

腎臓中のビタミン B₁ 量は、いずれの群の間においても有意差は認められなかった。

坐骨神経中のビタミン B₁ 量は、対照群にくらべ PCB 投与群に有意の低下がみられた。脳中のビタミン B₁ 量は、対照群にくらべ DDT 投与群に有意の低下がみられた。血液および肝臓中のビタミン B₁ 量は、DDT 投与群および PCB 投与群に低下がみられた。

4) 各臓器中の transketolase 活性および TPP 効果の測定 血球・脳・肝臓中の transketolase 活性および TPP 効果を測定した結果は、Figs. 3~5 に示すとおり

Fig. 2. Thiamine concentration in blood.

* Significant difference ($p<0.05$) as compared to the values of control.

Values represent mean±S.E. of 5 rats.

であった。血球中の transketolase 活性は、対照群にくらべ PCB 投与群で低下がみられた。TPP 効果は、transketolase 活性の低下していた PCB 投与群で上昇していた。脳中の transketolase 活性は、対照群にくらべ DDT 投与群で低下がみられた。TPP 効果は、transketolase 活性の低下していた DDT 投与群で上昇していた。肝臓中の transketolase 活性は、対照群にくらべ PCB および DDT 投与の両群で有意の低下がみられた。TPP 効果は、DDT 投与群および PCB 投与群で有意の上昇がみられた。

2. *in vitro* の実験

1) *in vitro* における各薬物のビタミン B₁ に対する影響 ビタミン B₁ に、種々の濃度の BHC, Diphenyl, PCB, DDT, 四塩化炭素を添加した場合の影響をみた結果を Fig. 6 に示した。DDT 添加では 2×10^3 ppm の濃度で約 15% のビタミン B₁ の分解がみられた。四塩化炭素では、ビタミン B₁ を分解する力は最も著しかった。また、上記の *in vitro* の系に、さらにラット肝臓 10 倍ホモジネイト 1 ml を添加して同様の実験をおこなった結果は、ホモジネイト無添加の場合とまったく同様であり、ホモジネイト添加の影響はまったくなかった。なお、次亜塩素酸ソーダをビタミン B₁ 溶液に添加して同様の実験をおこなった結果、次亜塩素酸ソーダ 0.3 mM でビタミン B₁ の完全な分解がおこることを認めた。

2) *in vitro* における各薬物の transketolase 活性および TPP 効果に対する影響 transketolase 活性に対

Table 4. Thiamine concentration in brain, sciatic nerve and kidney.

Group	Brain ($\mu\text{g/g}$)	Sciatic N ($\mu\text{g/g}$)	Kidney ($\mu\text{g/g}$)
CONT	2.40 ± 0.10	1.20 ± 0.15	3.70 ± 0.17
DIPH	2.39 ± 0.12	1.13 ± 0.07	3.64 ± 0.92
DDT	$2.05 \pm 0.07^*$	1.14 ± 0.27	3.42 ± 0.13
PCB	2.22 ± 0.15	$0.72 \pm 0.13^*$	2.95 ± 0.24
CCl_4	2.35 ± 0.19	1.19 ± 0.19	3.74 ± 1.30
BHC	2.48 ± 0.26	0.90 ± 0.30	3.04 ± 0.58

Values represent mean $\pm$ S.E. of 5 rats.

* Significant difference ($p < 0.05$) as compared to the values of control.

Fig. 3. Transketolase activity and TPP effect in erythrocytes.

* Significant difference ($p < 0.05$) as compared to the values of control.

Values represent mean $\pm$ S.E. of 5 rats.

する BHC, Diphenyl, PCB, DDT, 四塩化炭素の影響をみたが、各薬物とも 10 mM 添加でも transketolase 活性に有意の変化はみられなかった。しかし、次亜塩素酸ソーダ 0.03 mM を添加すると 80% の transketolase 活性阻害を認めた。

考 察

Berdanier ら⁶⁾は、ビタミン B₁ 欠乏ラットおよび正常ラットに PCB を与えて glucose 代謝に関して検討を加え、ビタミン B₁ 欠乏ラットでは血中 glucose が上昇し、PCB 投与ラットでは血中 glucose が低下することを認めている。そして、その原因はビタミン B₁ 欠乏ラットでは食餌中 glucose 利用障害のため血中 glucose が上昇し、PCB 投与ラットでは gluconeogenesis 阻害あるいは glucose より脂質合成系の促進のため、血中 glucose が低下するとしている。また、彼ら⁶⁾は、ビタミン B₁ 欠乏ラットと PCB 投与ラットの両者にミトコンドリアにおける NAD/NADH 系を酸化状態に保たせるという共通した作用があることを認めている。この原因として、ビタミン B₁ 欠乏の場合は、pyruvate de-

Fig. 4. Transketolase activity and TPP effect in brain.

* Significant difference ($p < 0.05$) as compared to the values of control.

Values represent mean $\pm$ S.E. of 5 rats.

hydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase, transketolase の障害により酸化還元系に変化が起こるためであるが、PCB 投与ラットの場合は、ビタミン B₁ 欠乏ラ

Fig. 5. Transketolase activity and TPP effect in liver.

* Significant difference ($p < 0.05$) as compared to the values of control.
Values represent mean $\pm$ S.E. of 5 rats.

ットと同様な現象は認めるがビタミン B₁ 欠乏ラットと異なっているのは、NAD/NADH 系の変化のおもな原因は糖代謝系酵素の異常にもとづくものではなく、PCB 投与ラットでの脂質合成促進や cytochrome P-450 の合成促進等によって、NADPH が急速に消費されるためであるとしている。

また、印南⁹⁾は、ビタミン B₁ 欠乏ラットでは PCB の毒性が強まることを報告している。

本研究においては、PCB のみならず DDT 投与ラットにおいても血液・肝臓中ビタミン B₁ 量、血球・肝臓中 transketolase 活性の低下、TPP 効果の上昇を認めており、これらの薬物の慢性的な投与は、ビタミン B₁ 欠乏をきたすことを示唆している。したがって、Berdanier¹⁰⁾は PCB 投与ラットのミトコンドリア NAD/NADH 系の変化は、NADPH の急速な消費に由来するもので、糖代謝酵素の異常とは直接関係ないと述べているが、われわれは PCB 投与にもとづくビタミン B₁ 欠乏と、それによる糖代謝系酵素の阻害も NAD/NADH 系の変化の大きな一因となりうるのではないかと考える。

ビタミン B₁ 欠乏の発生する機構としては、尿中・尿中ビタミン B₁ 量に差が認められないことから、腸管吸収とは関係ないものと考えられる。また、*in vitro* の実験から明らかになったように、次亜塩素酸ソーダのような遊離の塩素は急速にビタミン B₁ を破壊する作用を有するが、PCB、DDT のように容易に塩素を遊離しない薬剤は、中毒実験や薬理実験に用いられるような濃度では、ビタミン B₁ を直接破壊する作用はほとんどないと考えてよい。したがって、PCB、DDT 投与では薬物代謝酵素の亢進があり、この酵素系は薬物のみでなく生体内の有用な物質も分解してしまうことが知られている¹¹⁾¹²⁾ことから、おそらく、ビタミン B₁ もこの酵素により分解されるのではないかと考えられるが、詳細な機構の解

Fig. 6. Degradation rate of thiamine *in vitro*. Spindle: Remaining thiamine per added thiamine.

Abscissa: BHC, CCL₄, DDT: equivalent chlorine molar to PCB was used.

DIPH: equivalent molar to PCB was used.

明には今後 paired feeding などによる研究が必要である。

また、本研究において、PCB 投与ラットで坐骨神経中、DDT 投与ラットで脳中のビタミン B₁ が低下したことは興味深い事実である。本研究の結果のみからみれば、PCB は中枢神経よりも末梢神経の機能に障害を起こさせ、DDT は、この逆に中枢神経系に障害を起こす可能性がありうる。いずれにしても、ビタミン B₁ は神経の機能に密接な関連があることが解明されつつある^{13)~15)}ので、これらの問題と関連して今後の研究課題と考えられる。

なお、PCB、DDT 投与ラット肝臓の脂肪沈着は、重

量当たり 4~5% 程度の上昇であり、肝臓中のビタミン B₁ 量に対する影響は非常に少ないと考えられる。

要 約

PCB, DDT その他関連有機塩素系薬剤をラットに与えて飼育し、ビタミン B₁ 代謝について検討し、以下の結果を得た。

1) PCB, DDT 投与ラットでは、血液および肝臓中ビタミン B₁ 量が低下し、血球・肝臓中 transketolase 活性も低下した。一方、TPP 効果は上昇した。したがって、PCB, DDT 投与ラットはビタミン B₁ 欠乏の状態になっているものと考えられる。その他の薬剤には、このような作用は認められなかった。

2) PCB 投与ラットでは、坐骨神経中、DDT 投与ラットでは脳中のビタミン B₁ 量が低下していた。

3) PCB, DDT 投与ラットでは、尿中・尿中ビタミン B₁ には変化が認められず、ビタミン B₁ 腸管吸収の障害はないと考えられた。

4) 遊離の塩素はビタミン B₁ を直接分解し、transketolase 活性を阻害する作用があるが、PCB・DDT などにはこのような作用はほとんどないことが *in vitro* の実験で明らかにされた。

稿を終わるにあたり、ご指導、ご校閲をいただいた藤原元典教授 および 糸川嘉則助教授に深く感謝する。また、この研究にご協力いただいた京都市衛生研究所、蒲

原一隆主任研究員に深く感謝する。

文 献

- 1) 五島応安, 樋口謙太郎: 福岡医誌, **60**, 409 (1969)
- 2) 奥村 恂, 勝木司馬之助: 福岡医誌, **60**, 440 (1969)
- 3) 奥村 恂, 平山千里, 鶴沢春生: 福岡医誌, **62**, 123 (1971)
- 4) 印南 敏, 中村敦子, 加藤勝重, 宮崎基嘉, 永山スミ子, 西出英一: 福岡医誌, **66**, 585 (1975)
- 5) 印南 敏, 中村敦子, 加藤勝重, 永山スミ子, 宮崎基嘉, 西出英一: 第 30 回日本栄養食糧学会講演要旨集, p. 60, 1976 (仙台)
- 6) Berdanier, C.D., Tobin, R.B., Nielsen, R.B., Mehlman, M.A. and Veech, R.L.: *J. Toxicol. Environ. Health*, **1**, 91 (1975)
- 7) Fujiwara, M. and Matsui, K.: *Anal. Chem.*, **25**, 810 (1953)
- 8) Brin, M., Tai, M., Ostashever, A.S. and Kalinsky, H.: *J. Nutr.*, **71**, 273 (1960)
- 9) Dische, Z.: *J. Biol. Chem.*, **204**, 983 (1953)
- 10) Itokawa, Y.: *Brain Res.*, **94**, 475 (1975)
- 11) Wynand, G. Achim, S. and Hanns, G. D.: *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1121 (1975)
- 12) 糸川嘉則: 日本医師会雑誌, **74**, 399 (1975)
- 13) Itokawa, Y. and Cooper, J.R.: *Science*, **166**, 759 (1969)
- 14) Itokawa, Y. and Cooper, J.R.: *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 545 (1969)
- 15) Itokawa, Y. and Cooper, J.R.: *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 985 (1970)

(昭和 53 年 5 月 24 日受理)