ラットにおけるペンタクロロベンゼンとヘキサクロロベンゼンの分布、蓄積と排泄に対する食餌制限の影響

(平成5年4月7日受理)

梅垣敬三* 池上幸江*
伊藤毅* 市川富夫*

Effects of Food Restriction on Distribution, Accumulation and Excretion of Pentachlorobenzene and Hexachlorobenzene in Rats

Keizo UMEGAKI, Sachie Ikegami, Tsuyoshi Itoh and Tomio Ichikawa

(The National Institute of Health and Nutrition: 1-23-1,
Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan)

We investigated the effect of restricted feeding (RF) on the distribution, accumulation and excretion of pentachlorobenzene (PCB) and hexachlorobenzene (HCB) in rats. PCB and HCB have similar metabolic pathways, but HCB is poorly metabolized; the half life of HCB is few months and that of PCB is a few days. Rats were fed *ad libitum* (AD) or given a 40% restricted diet for 29 days. On the 21st day (day 0), the rats received an equal mixture of PCB and HCB by intragastric gavage at the dose of 40 mg/kg body weight. They were killed on day 1 and day 8 after the administration. The ratio of fat tissue weight to body weight in the RF rats was smaller than that in the AD rats. Large amounts of PCB and HCB were found in fat tissue, and the total amounts in the RF rats on day 1 were lower than those in the AD rats. PCB in blood of the RF rats after the administration rapidly decreased, and residual PCB in various tissues of the RF rats on day 8 was also markedly lower than that of the AD rats. In contrast, HCB in blood was slightly decreased, and the decrease in the RF rats was slower than that in the AD rats. In addition, HCB residues in various tissues of the RF rats on day 8 tended to be higher than those in the AD rats. These results indicated that the effects of RF on accumulation and on excretion of PCB and HCB are quite different.

(Received April 7, 1993)

Key words: 食餌制限 food restriction; ペンタクロロベンゼン pentachlorobenzene; ヘキサクロロベンゼン hexachlorobenzene; 分布 distribution; 蓄積 accumulation; 排泄 excretion; ガスクロマトグラフィー (ECD) gas chromatography (ECD)

緒言

脂溶性化学物質は吸収された後、かなりの量が脂肪組織に分布する。従って、脂溶性化学物質の脂肪組織への分布と脂肪組織から血中への移行は、その化学物質の肝臓における代謝や排泄を修飾する極めて重要な因子になっていると考えられる。

著者らは、脂溶性化学物質としてペンタクロロベンゼン (PCB) を用い、その吸収、蓄積、代謝に対する種々の栄養条件の影響について検討し、脂肪組織量の少ない条

件では、PCBの排泄が亢進することを報告した^{1)~5)}。

このような PCB で認めた脂肪組織量の少ない条件におけるその排泄の促進が、極めて代謝されにくい脂溶性化学物質に対しても同様に認められるか否かは興味ある問題である。

ヘキサクロロベンゼン (HCB) はその構造並びにラット肝臓における代謝経路が PCB と類似している脂溶性化学物質である^{6), 7)}。しかし、HCB は、PCB に比べて極めて代謝されにくく、蓄積性がある。ラットにおける半減期は、PCB⁸⁾ が約 1~2 日であるのに対して、HCB⁹⁾ は約 3 か月であることが報告されている。

* 国立健康・栄養研究所: 〒162 東京都新宿区戸山 1-23-1

Fig. 1. Changes in body weight
Rats were fed either *ad libitum* or a 40% restricted diet for 29 days. On the 21st day (day 0), the rats were orally administered an equal mixture of PCB and HCB (40 mg/kg body weight), and were sacrificed on day 1 or on day 8 after the administration.

Fig. 2. Body weight and relative tissue weight
Each column and vertical bar indicates the mean $\pm$ SE for 5~6 rats
* Significance $p < 0.05$

そこで本実験では、食餌制限の有無により脂肪組織量の異なるラットを作製し、そのラットにおける HCB と PECB の体内分布と排泄を比較検討した。なお、HCB と PECB は同時に 1 回経口投与し、同じラットにおいて PECB と HCB の分布と排泄が比較できるようにした。

実験方法

1. 試 薬

PECB と HCB は東京化成(株)のものをメタノールで 3 回再結晶させて精製した。PECB と HCB はそれぞれの濃度が 10 mg/ml になるように大豆油に溶解した。

2. 実験動物

6 週齢の SD 系雄ラット (日本クレア(株)) を 1 群 12 匹として、食餌制限をしない群と 40% の食餌制限をする群の 2 群に分け、市販粉末飼料 (CE-2, 日本クレア(株)) で 29 日間飼育した。食餌制限ラットの飼料の量は、前日に食餌制限しないラットが摂取した飼料の量の 60% に設定した。40% の食餌制限は、Fig. 1 に示したようにラットの体重がわずかながら増加する条件である。PECB と HCB は、実験開始 3 週間目にそれぞれの

投与量が 20 mg/kg 体重になるように同時に 1 回経口投与した。各群のラットは、投与 24 時間後に 6 匹、投与後 8 日後に 6 匹解剖し、肝臓、腎臓、脳と脂肪組織 (腎

Fig. 3. Concentrations of PECB and HCB in blood through time

a) Day 1

b) Day 8

Fig. 4. Concentrations of PECB and HCB in blood, liver, kidney, and brain on day 1 and on day 8 after the administration

Each column and horizontal bar indicates mean $\pm$ SE for 5~6 rats.

* Significance $p < 0.05$.

a) Day 1

b) Day 8

Fig. 5. Concentrations of PCB and HCB in various fat tissues on day 1 and on day 8 after the administration

Each column and horizontal bar indicates mean $\pm$ SE for 5~6 rats.

* Significance $p < 0.05$.

周囲脂肪, 副睪丸脂肪, 右腹部の皮下脂肪)を摘出した。また, 8日目に解剖したラットについては, 投与後から経日的に糞と尾静脈血 0.01~0.1 ml を採取した。

3. 組織中の PCB と HCB の分析

血液, 臓器, 脂肪, 糞中の PCB と HCB は, 既報の方法⁸⁾によりヘキサン抽出し, ECD 検出器を付けたガスクロマトグラフィーにより分析した。ただし, 臓器, 脂肪, 糞中のヘキサン抽出液については, その 0.1~0.5 ml をフロリジルカラム (0.5 g のフロリジルに 0.2 g の無水硫酸ナトリウムを重層したカラム)に通し, 更にヘキサン 5 ml を通して PCB と HCB を溶出させた。この溶出液を全量 10 ml にし, 適宜希釈して測定用試料とした。化合物の濃度が薄い場合, 溶出液に 0.2 ml のデカン溶液 (50 mg/ml のヘキサン溶液)を加えて約 40°で減圧濃縮した。デカンの添加により, 減圧濃縮操作において PCB と HCB が飛散するのを防ぐことができた。

4. 統計処理

結果は平均と標準誤差で示し, 有意差検定は Aspin と Welch の検定¹⁰⁾により行った。

結 果

Fig. 2 に化合物投与 1 日後と 8 日後に解剖したラットの体重, 体重当たりの肝臓重量と脂肪組織重量を示した。制限食群では体重当たりの肝臓重量と脂肪重量が小さく, 特に 8 日後の腎周囲脂肪量は無制限食群の 1/2

以下の値であった。無制限食群の腎周囲脂肪量は投与 1 日目から投与 8 日目にかけて増加していた。

無制限食群と制限食群の血中 PCB 濃度は共に急激に低下し, その低下は制限食群で著しかった (Fig. 3)。一方, 血中 HCB 濃度はいずれの群においても緩やかに低下し, その低下は PCB の場合と異なり制限食群においてより緩やかであった。この血中濃度の低下から計算した半減期は, PCB では制限食群が約 18 時間, 無制限食群が約 31 時間, HCB では制限食群が約 91 時間, 無制限食群が約 65 時間であった。PCB の血中半減期の値は, PCB を単独投与して食餌制限を行った前回の実験^{1), 5)}において得られた値とほぼ類似していた。

PCB と HCB の投与 1 日後と 8 日後における血液, 肝臓, 腎臓, 脳, 脂肪中の PCB と HCB の濃度を Fig. 4 と 5 に示した。PCB と HCB がほぼ均一に体内に分布していると考えられる投与 1 日後において, PCB と HCB の組織 1 g 中の濃度は, いずれの組織においても 2 群間に差異がなかった。投与 8 日後においては, PCB 濃度がいずれの組織においても制限食群で著しく低かった。これに対して HCB 濃度は制限食群でむしろ高い傾向があり, 血中濃度は有意に高かった。これらの結果は, 経日的な血中濃度の結果 (Fig. 3) とよく一致していた。脂肪組織中の HCB 濃度を投与 1 日後と 8 日後において比較したとき, いずれの群においても 8 日後の腎周囲脂肪

a) Day 1

b) Day 8

Fig. 6. Amounts of PCB and HCB existed in liver, epididymal and perirenal fat tissue on day 1 and on day 8 after the administration.

Each column and horizontal bar indicates mean $\pm$ SE for 5~6 rats.

* Significance $p < 0.05$

脂肪中の濃度が投与1日後の値よりも高くなっていた (Fig. 5).

組織全体に存在する PCB と HCB の含量を肝臓と二つの脂肪組織において計算し、その結果を Fig. 6 に示した。脂肪組織量の少ない制限食群の PCB と HCB 含量は、投与1日後と8日後ともに無制限食群よりも有意に少なかった。脂肪組織中の HCB 含量は、投与1日後よりも投与8日後において高くなり、特に無制限食の腎周囲脂肪中の含量は著しく増加した。

化合物投与後の PCB と HCB の糞中排泄率を測定し、その結果を Fig. 7 に示した。いずれの群においても PCB と HCB の糞中排泄率は投与1日目が多かった。また、PCB に比べて HCB の排泄率は高かった。無制限食群に対して、制限食群の HCB の糞中排泄率は、投与1日後では低かったが2日目以降は高かった。

考 察

PCB の代謝、排泄に対する食餌制限の影響を検討した著者らの以前の実験は、食餌制限を PCB 投与1週間前、または投与直後から行ったが^{1), 5)}、今回の実験は、化合物投与3週間前から行った。そして、比較的代謝されやすい PCB と極めて代謝されにくい HCB を同時投与し、それらの体内分布、蓄積並びに排泄に対する食餌

Fig. 7. Fecal excretion of PCB and HCB through time

The excretion was calculated as % of dose. Each column and vertical bar indicates mean $\pm$ SE for 5~6 rats.

制限の影響を比較検討した。その結果、PCB に関しては前回の結果^{1), 5)}と同様に、PCB の経口的な血中濃度

と投与 8 日後の組織中含量が制限食群において著しく低下した (Fig. 3~6)。一方、HCB に関しては、その経日の血中濃度並びに投与 8 日後の各組織中濃度がむしろ制限食群において高かった。PECB と HCB はラット肝臓における代謝経路が類似していると報告されている^{6), 7)}。それ故、これらの食餌制限による PECB と HCB の分布と排泄の違いには、それらの化合物の代謝のされやすさの違いが関係していると考えられる。

食餌制限による PECB の排泄の促進には、食餌制限による脂肪組織量の低下と肝臓薬物代謝酵素活性の増加が関係していると思われる。ラットに 25~50% の食餌制限を 28 又は 45 日間行ったとき、肝臓の P-450 含量とモノオキシゲナーゼ活性の高くなることが報告されている^{11), 12)}。また、食餌制限による P-450 の増加は、デキサメサゾンで誘導され、クロロベンゼン代謝にも関係する P-450 III A1 の増加に対応することが報告されている^{13), 14)}。一方、Fig. 4~6 の結果で示されるように、制限食群では PECB の蓄積に重要な脂肪組織量が少なかった。このため PECB の脂肪組織への分布量が少なくなることで血液や肝臓への分布量が多くなり、その結果として PECB の肝臓薬物代謝酵素による代謝が速やかに行われたと考えられる。

HCB に関しても PECB と同様、制限食群における脂肪組織量の低下は、HCB の脂肪組織への分布量を少なくするとともに、脂肪組織から血中への HCB の移行を起りやすくし、肝臓薬物代謝酵素による代謝を受けやすい状態にしていたと思われる。HCB の血中濃度が、投与 8 日目において制限食群で有意に高かった結果 (Fig. 4) は、脂肪組織量の少ない条件において HCB の脂肪から血中への移行が起りやすかったことを示唆している。また、PECB と同様に HCB を代謝する肝臓薬物代謝酵素活性が制限食群において増加していた可能性もある。しかし、HCB の場合、その極めて代謝されにくい性質のため、PECB のような排泄の促進が起らなかったと考えられる。

著しい食餌制限や絶食などによる脂肪組織量の低下は、難代謝性脂溶性化学物質の脂肪組織から脳組織への再分布を起すことが知られている^{15)~17)}。Villeneuve¹⁵⁾ は HCB を投与したラットに 75% の食餌制限を行った時、HCB が脂肪組織から他の組織に再分布し、特に脳中の HCB 濃度が高くなることを報告している。Ecobichon¹⁶⁾ らも脂溶性で代謝されにくい化合物である DDT をひな鳥に投与した後、絶食を行った実験において、DDT が脂肪組織から他の組織に再分布することを報告している。大柴と川北¹⁷⁾ は BHC をラットに投与後絶食を行ったとき、代謝されやすい γ -BHC の組織内濃度は低下するが、代謝されにくい β -BHC は再分布を起し、特に脳中の含量が増加することを報告している。今回の著者らの食餌制限の実験において、脂肪組

織量の低下による HCB の脂肪組織から脳などへの明確な再分布は認められなかった。これは、食餌制限が 40% と比較的軽かったためと思われる。

Fig. 7 に示した PECB と HCB の糞中への排泄は、投与 1 日目の主に未吸収分の排泄と投与 2 日~8 日目までの一旦吸収された化合物の腸管からの排泄分に分けて考えられる。制限食群では投与 2~8 日の HCB の排泄量が多かった。これは、いったん吸収された HCB が、食餌制限により排泄されやすくなったことを意味していると思われる。HCB は腸間循環すること¹⁸⁾、食餌制限ラットでは胆汁排泄量並びに胆汁量が多くなることがそれぞれ認められている¹⁹⁾。このようなことが食餌制限群で認められる HCB の投与 2~8 日の糞中排泄率増加に関係していると考えられる。HCB の場合、肝臓における代謝は極めて受けにくいいため、この食餌制限による HCB の糞中排泄量の増加は重要な意味を持つと思われる。

本研究は環境庁国立機関公害防止等試験研究費により行ったものであり関係各位に感謝致します。

文 献

- 1) 梅垣敬三, 市川富夫: 食衛誌. **31**, 227~232 (1990).
- 2) 梅垣敬三, 市川富夫: 同上 **31**, 485~490 (1990).
- 3) 池上幸江, 土橋文江, 梅垣敬三, 市川富夫: 同上 **32**, 420~426 (1991).
- 4) 土橋文江, 池上幸江, 梅垣敬三, 市川富夫: 同上 **33**, 241~246 (1992).
- 5) Umegaki, K., Ikegami, S., Ichikawa, T.: J. Nutr. Sci. Vitaminol. **39**, 11~22 (1993).
- 6) Stewart, F. P., Smith, A. G.: Biochem. Pharmacol. **36**, 2,232~2,234 (1987).
- 7) Den Besten, C., Peters, M. M. C. C., Van Bladeren, P. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **163**, 1,275~1,281 (1989).
- 8) 梅垣敬三, 市川富夫: 衛生化学 **35**, 360~364 (1988).
- 9) Rozman, K., Mueller, W., Iatropoulos, M., Coulston, F., Korte, F.: Chemosphere **4**, 289~298 (1975).
- 10) 吉村 功編: "毒性、薬効データの統計解析" p. 28~40 (1989), サイエンス社.
- 11) Hashmi, R. S., Siddiqui, A. M., Kachole, M. S., Pawar, S. S.: J. Nutr. **116**, 682~688 (1986).
- 12) Sachan, D. S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **104**, 984~989 (1982).
- 13) Leakey, J. E. A., Cunney, H. C., Bazare, J. Jr., Webb, P. J., Feuers, R. J., Duffy, D. H., Haer, R. W.: Mech. Ageing Dev. **48**, 145~155 (1989).
- 14) Den Besten, C., Smink, M. C. C., De Vries, E. J., Van Bladeren, P. J.: Toxicol. Appl. Pharmacol. **108**, 223~233 (1991).
- 15) Villeneuve, D. C.: Toxicol. Appl. Pharmacol. **31**, 313~319 (1975).
- 16) Ecobichon, D. J., Saschenbrecker, P. W.: Toxicol. Appl. Pharmacol. **15**, 420~432 (1969).

-
- 17) 大柴恵一, 川北兵蔵: 食衛誌. **13**, 189~194 (1972).
- 18) Rozman, K., Rozman, T., Greim, H.: *Toxicology*. **22**, 33~44 (1981).
- 19) Tuchweber, B., Perea, A., Ferland, G., Yousef, I. M.: *Life Sci.* **41**, 2,091~2,099 (1987).