水生生物におよぼす PCB の影響—II

PCB の経口投与によるコイの血液性状
および血漿酵素活性の変化*

伊 東 保 之

(1973 年 8 月 15 日受理)

Studies on the Influence of PCB on Aquatic organisms—II
Changes in Blood characteristics and Plasma enzyme activities
of Carp administered orally with PCB

Yasuyuki Ito**

Several papers have reported on the uptake of polychlorinated biphenyl (PCB) in fish exposed to diluted PCB solution. However, toxicological studies on the oral administration of PCB have not been reported so far.

In the present investigation, changes in blood characteristics and plasma enzyme activities of carp, *Cyprinus carpio*, fed with diets containing 5, 25 and 100 ppm of PCB (Aroclor 1248) were examined. After 7 or 20 days feeding with PCB-containing diets, the carps were sacrificed for chemical analyses. The results obtained are as follows.

1) After 7 days feeding, the blood glucose content and the hematocrit value in 5 and 25 ppm groups appeared decreased, while in the 100 ppm group both values showed an increasing tendency. After 20 days feeding, however, the blood glucose content and the hematocrit values were elevated with the dose of PCB.

2) The protein content, β -glucuronidase and glutamate pyruvate transaminase activities showed an increasing tendency.

3) After 20 days feeding, the glutamate oxaloacetate transaminase activity and alkaline phosphatase activity were remarkably increased.

4) The findings suggest that plasma β -glucuronidase activity may be a useful index for examining the effect of PCB in fish.

水生生物における PCB (polychlorinated biphenyl) の検出、分布については数多く報告されているが、その影響については研究が比較的少ない。すなわち、PCB を含む環境水中で生物を飼育し、その体内蓄積などを調べた研究として HANSEN ら¹⁾、KEEL ら²⁾、SANDERS ら³⁾、伊東⁴⁾ その他***が、他方 ATPase 活性阻害など生化学的研究としては YAP ら⁵⁾ および藤原ら⁶⁾ の報告がみられる。さらに、吉田****はラベルした PCB を魚類に投与し、その体内分布を調べている。

本研究は水生生物におよぼす PCB の影響を生化学的、生理学的に究明することを目的とするものであり、本報では PCB を経口投与したコイにおける血液性状および血漿酵素活性の変化について報告する。

* 本報告の要旨は第 24 回日本食品衛生学会秋季大会(昭和 47 年 10 月 13 日、秋田市)において発表した。

** 東海大学女子短期大学部 (Women's College Tokai Univ., Miyamae-cho, Shizuoka, Japan)

*** 中間発表として、科学技術庁研究調整局:「PCB 様物質による環境汚染の防止に関する特別研究」に関する研究成果(昭和 47 年 6 月 23 日)。

**** 吉田多摩夫: 昭和 47 年度日本水産学会秋季大会(昭和 47 年 10 月 10 日、高知市)講演要旨, 111 p.

実験材料および方法

供試魚 コイ *Cyprinus carpio* (体長 14–15 cm, 体重 78–87 g) を用いた。

餌料の調製 PCB (Aroclor 1248*) をエタノールに溶解し, 1000 ppm の原液とし, その一定量を Tween 80 の 50 ppm 水溶液中に添加し分散させ, 中部飼料 (株) の養鯉用配合餌料成魚用マッシュ 2 号と混合した。ミンチにて 5, 25 および 100 ppm 区のペレットを作り, エタノールを蒸散させた後用いた。このほか, PCB を含まぬペレットを同様に作成し, 対照試験に供した。

飼育 コイ 18 尾を 150 l のガラス水槽 (水温 22–24°C) にて, 1 日に体重の 2–3% の餌料を 2 回に分けて投餌し, 20 日間飼育した。なお, 期間中は十分通気した。

採血 飼育 7 日目および 20 日目の供試魚をそれぞれ 12 時間絶食させた後とりあげ, MS-222 (濃度 1/10,000) で麻酔した後, 清潔な乾布およびろ紙で魚体表面を拭い, 体長, 体重測定後すみやかに尾柄部を切断し, 奔出する血液をあらかじめヘパリンで湿した小試験管にうけた。分析に用いた血液は 7–10 尾から採取した混合試料である。

分析法 血糖量は SOMOGYI-NELSON 法⁷⁾ で測定した。ヘマトクリット値 (以下 Ht 値と略記) は Wintrobe 管を用い, 3,000 rpm で 30 分間遠心分離を行って算出した。血漿タンパク量はアタゴ血清タンパク計を用いて測定した。別に 3,000 rpm, 20 分間遠心分離を行って得た血漿を用い, alkaline phosphatase (E.C. 3. 1. 3. 1, 以下 P-AI-P と略記) を BESSEY-LOWRY-BROCK 法⁸⁾, glutamate oxaloacetate transaminase (E.C. 2. 6. 1. 1, 以下 P-GOT と略記) ならびに glutamate pyruvate transaminase (E.C. 2. 6. 1. 2, 以下 P-GPT と略記) を REITMAN-FRANKEL 法⁹⁾ によりそれぞれ測定した。さらに β -glucuronidase (E.C. 3. 2. 1. 31, 以下 P- β -G1 と略記) を塚本法¹⁰⁾ により測定し, 試料 0.1 ml から 4 時間のインキュベーションによつて遊離した P-ニトロフェノールの量 (r) で示した。比色分析はすべて日立 124 型自記分光光度計を用いて行なった。

結果および考察

PCB 摂取コイの血液性状および血漿酵素活性の測定結果は一括して Table 1 に示した。

血糖量 7 日目における血糖量は対照にくらべ, 5, 25 ppm 両区ともに減少を示したが, 100 ppm 区で

Table 1. Changes in blood characteristics and plasma enzyme activities of carp fed with the diet containing PCB.

Feeding period (days)	Concentration of PCB in diet (ppm)	Blood glucose (mg/100ml)	Ht value (%)	Plasma Protein (g/100ml)	P-AI-P* Bessey-Lowry unit	P-GOT** Karmen unit	P-GPT*** Karmen unit	P- β -G1**** p-nitrophenol(r)
7	0	81.0	45.2	3.1	0.37	92	28	1.01
	5	60.0	44.4	3.3	0.37	150	46	1.07
	25	40.5	40.9	3.5	0.38	98	86	1.44
	100	102.9	44.0	3.0	0.38	94	52	2.69
20	0	65.3	43.5	3.3	0.39	96	38	0.95
	5	70.5	44.0	3.4	0.38	106	46	1.36
	25	94.3	47.2	3.8	0.52	110	56	1.60
	100	95.5	48.5	3.7	0.72	166	60	2.61

* Plasma alkaline phosphatase

** Plasma glutamate oxaloacetate transaminase

*** Plasma glutamate pyruvate transaminase

**** Plasma β -glucuronidase

* Monsanto Co., (St. Louis, Missouri, U.S.A.) の製品で塩素含量 48%。日本クロマト工業 (株) より購入。

は急激な増加を呈した。一方、20日目では PCB 摂取量にしたがつて高い血糖量を示した。血糖量の増減は一般に述べられているごとく、化合物による肝機能障害、交感神経の刺激にともなうエピネフリン系ホルモンの増加およびインシュリンの拮抗作用などの結果生じたものと考えられるが、詳細は不明である。永井ら¹¹⁾は油症患者の糖質負荷で4例中1例に糖処理の不良を認めているが、油症患者でいわゆる過血糖状態を示すものはなかったと述べている。

Ht 値 7日目においては投与量の如何によらずわずかながら減少の気配を示した。一方、20日目では PCB 摂取量にしたがつて高くなる傾向を示した。7日目と20日目の結果の相違の原因については明らかでない。KIMBROUGH* はラットに Aroclor 1254 と 1260 を飼料に混じて 240 日与えたところ、500 ppm (約 25 mg/kg/day) では両製剤ともに Ht 値の低下を認めている。

タンパク量 血漿タンパク量は7日目の 100 ppm 区を除いて、PCB 摂取にともない増加する傾向が認められた。しかし、油症患者の場合総タンパク量では対照と比べほとんど差がみられず、 α_2 -グロブリンで軽度の増加が認められている¹¹⁾にすぎない。また、Vos ら¹²⁾のモルモットにおける8週間 PCB 投与の実験では対照に比べ 10 ppm 区でやや減少し、50 ppm 区ではやや増加を示していた。血漿タンパク量の増減が PCB の如何なる作用にもとづくものかは現在不明である。

P-AI-P 活性 本酵素活性は7日目ではほとんど変化は認められないが、20日目において 25, 100 ppm 区が対照にくらべて高い値を呈した。しかし、油症患者における本酵素活性値は正常範囲の上限付近にあつた¹¹⁾。また、本酵素は体内の石灰沈着やカルシウムの運搬などに重要な役割を演じ¹³⁾、ヒトの場合くる病、骨軟化症などの骨疾患および肝疾患のとき血中活性値が上昇する¹⁴⁾。したがって、本実験における酵素活性値の上昇はこれらの臓器に何らかの機能障害の生じていることを示唆するものであろう。

P-GOT および P-GPT 活性 P-GOT 活性はまず7日目においては 5 ppm 区で高い値を示したがその原因は不明である。他の区ではほとんど変化はなかった。しかし、20日目では PCB 摂取量にしたがつて高い値を示した。P-GPT 活性は7日目の 100 ppm 区を除いて PCB 摂取量にともなつて高い値を呈した。油症患者においても S**⁻GOT, S**⁻GPT 活性値がやや上昇することが認められている¹¹⁾。また、ウナギ¹⁵⁾、サケ¹⁶⁾においても四塩化炭素処理をおこない肝障害を起こさせるとこれらの酵素活性値が上昇することが認められている。さらに、ウナギの場合については、これらの酵素活性値の上昇の主因が破壊された肝細胞中の GOT, GPT の血液中への溶出にあるとされている¹⁷⁾。本実験においては、肝の組織学的検査など不十分のため確たることは言い難いが、PCB 投与コイにおいても何らかの肝機能障害の生じている可能性が考えられる。

P- β -G/ 活性 本酵素活性値は餌料中の PCB 含有量の増加にしたがつて上昇した (Fig. 1)。P- β -G/ 活性はヒトの肝疾患¹⁰⁾、ラットの四塩化炭素処理¹⁸⁾においても上昇することが明らかにされている。P- β -G/ は生体内で異物処理に重要な役割をはたすといわれているライソゾーム内に存在する。そしてある種の薬剤によりライソゾーム膜が損傷をうけたときライソゾーム酵素が外に出てゆくことが知られている^{19, 20)}。本実験における20日目の100 ppm 区肝臓のヘマトキシリン-エオシン

Fig. 1. Changes of plasma β -glucuronidase activity of carp fed with diet containing PCB.

○: after 7 days feeding

●: after 20 days feeding

* R. D. KIMBROUGH: *Interagency Meeting on PCBs*, Dept. H. E. W., Washington, D.C., August 5 (1971).

** Serum の略。

重染色標本による光学顕微鏡の所見では細胞に軽度の萎縮が認められたにすぎなかった。富尾による PCB 処理ラットの肝の光学顕微鏡の所見でもほとんど異常は認めていない。しかし、電子顕微鏡の所見では定型的なライソゾームの増加と共に、異常なライソゾームの出現を認め、細胞の有害因子に対する反応と考えられている²¹⁾。光学顕微鏡でははつきり影響が識別できない状態で P- β -Gl 活性が顕著な上昇を示していることから推察して、PCB の影響を知るための一手段として P- β -Gl の測定は重要であり、その活性値を一つのメルクマールにできるのではないかと考えられる。

これまでの結果を総合して、摂取 PCB はコイの肝機能障害などの臓器障害およびホルモンなどの内分泌関係に影響をおよぼしていることが推察されるので、これらの点について今後詳細に検討する予定である。

要 約

コイに 5, 25 および 100 ppm PCB (Aroclor 1248) 添加餌料を投与し、7 日目および 20 日目にそれぞれとりあげ、血液性状および血漿酵素活性値を測定し、摂取 PCB による影響を検討し、次の結果を得た。

- 1) 血糖量および Ht 値は 7 日目では対照に比べ 5, 25 ppm 区で減少したが 100 ppm 区においては増加の傾向を示した。20 日目では PCB 摂取にともない増加した。
- 2) タンパク量、P- β -Gl および P-GPT 活性値は PCB 摂取にともない上昇する傾向が認められた。
- 3) P-GPT および P-Al-P 活性値は 7 日目ではほとんど変化がみられないが、20 日目においては PCB 摂取にしたがい高くなる傾向にあつた。
- 4) PCB の影響を知るためのメルクマールとして、P- β -Gl 活性を用いるであろうと指摘した。

稿を終るに臨み御校閲をいただいた本学学部長岡田郁之助先生に、また供試コイならびに餌料を快よく提供していただいた中部飼料株式会社大井川試験場長高野洋氏に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) D. J. HANSEN, P. R. PARRISH, I. J. LOWE, A. J. WILSON, JR., and P. D. WILSON: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **6**, 113-119 (1971).
- 2) J. E. KELL, L. E. PRIESTER, and S. H. SANDIBER: 同誌, **6**, 156-159 (1971).
- 3) H. O. SANDERS and J. H. CHANDLER: 同誌, **7**, 257-263 (1972).
- 4) 伊東保之: 東海大短大部紀要, (6) 11-14 (1972).
- 5) H. H. YAP, D. DESAIAH, and L. K. CUTKOMP: *Nature*, **233**, 61-62 (1971).
- 6) 磯野直秀・藤原邦達: 科学, **42**, 396-406 (1972).
- 7) M. SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23 (1952).
- 8) O. A. BESSEY, O. H. LOWRY, and M. J. BROCK: 同誌, **164**, 321-329 (1946).
- 9) S. REITMAN and S. FRANKEL: *Amer. J. Clin. Path.*, **28**, 56-63 (1957).
- 10) 清水文彦監修: 衛生検査技術講座, 第 11 巻, 医歯薬出版, 東京, 1970, pp. 366-369.
- 11) 永井諄爾・古川ミチヨ・八戸義明・池田宣久: 福岡医誌, **60**, 475-488 (1969).
- 12) 大井 玄: 食衛誌, **13**, 499-508 (1972).
- 13) 赤堀四郎編: 酵素研究法, 第 4 巻, 朝倉書店, 東京, 1956, pp. 629-634.
- 14) 清水文彦監修: 衛生検査技術講座, 第 11 巻, 医歯薬出版, 東京, 1970, pp. 359-364.
- 15) Y. INUI: *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, **18**, 157-167 (1968).
- 16) G. R. BELL: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **25**, 1247-1268 (1968).
- 17) Y. INUI: *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, **19**, 25-30 (1969).
- 18) G. A. LEVY, L. M. H. KERR, and J. G. CAMPBELL: *Biochem. J.*, **42**, 462-472 (1948).
- 19) 二井将光: 蛋白質・核酸・酵素, **14**, 564-572 (1969).
- 20) 岡崎 秀・木村修一: 栄養と食糧, **25**, 201 (1972).
- 21) 富尾延江: 熊本医誌, **43**, 973-986 (1969).