

## 環境汚染にかかわる有機塩素系化合物の生体に対する作用に関する研究

A study on the biological effects of polychlorinated aromatic compounds contaminating human environments

- 代表研究者 九州大学医学部教授 倉 恒 匡 徳  
Prof., Dept. of Public Health, Faculty of Medicine, Kyushu Univ.  
Masanori KURATSUNE
- 協同研究者 九州大学医学部講師 長 山 淳 哉  
Assit. Prof., Dept. of Public Health, Faculty of Medicine, Kyushu Univ.  
Junya NAGAYAMA
- 九州大学農学部助教授 村 上 浩 紀  
Assoc. Prof., Dept. of Food Sci. and Tech., Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.  
Hiroki MURAKAMI
- 第一薬科大学教授 増 田 義 人  
Prof., Daiichi College of Pharmaceutical Sciences  
Yoshito MASUDA

Hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) inducing potency of toxic polychlorinated aromatic hydrocarbons such as polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl (HCB) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was studied in 4 inbred strains of mice with different phenotypes of Ah locus, i.e., AHH responsive strains: C57BL/6N and AKR/MSQdj, and AHH nonresponsive strains: DBA/2CrSlc and Qdj, DDD. Eight individual PCDF isomers or TCDD were administered i.p. in dose of 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; HCB was given in a dose of 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In AHH nonresponsive strains of mice, only TCDD significantly induced hepatic AHH activity while in AHH responsive strains, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF), 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran (1,2,3,7,8-PCDF), 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-PCDF) and TCDD significantly enhanced the enzyme activity, and the induced AHH activities with the three PCDF isomers were about 30 to 65% of those of TCDD. These results indicate that AHH responsiveness in mice segregates with the induction of AHH activity by PCDF isomers and may also segregate with the toxic potency of the isomers; i.e., toxic potencies of TCDF, 1,2,3,7,8-PCDF and 2,3,4,7,8-PCDF in AHH responsive strains of mice may be much greater than those in AHH nonresponsive strains of mice.

AHH inducing potency of these compounds was also investigated in human lymphoblastoid cell lines with different AHH inducibility for 3-MC obtained from healthy subjects. Each of the cell lines was treated with 8 individual PCDF isomers, TCDD and HCB at doses of 1.9 to 15 ng/ml of culture medium, 1.9 to 7.5 ng/ml and 95 ng/ml, respectively. Lymphoblastoid cell lines were arbitrarily classified into 3 groups based on their AHH inducibilities with 3-MC (2.5  $\mu\text{M}$ ); low (3-MC/control= $I$ <3), middle ( $3 \leq I < 6$ ) and high ( $I \geq 6$ ). Degrees of the enzyme inducibilities of the organochlorine compounds proportionally increased with those for 3-MC. AHH inducibilities with 2,3,4,7,8-PCDF, 1,2,3,4,6,7-hexachlorodibenzofuran (1,2,3,4,6,7-HCDF) and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (1,2,3,4,7,8-HCDF) were comparable to those of TCDD at doses of 7.5 ng/ml, and about twice as high as those of TCDF, at the same dose. HCB, at a dose of 95 ng/ml, did not induce enzyme activity. Since AHH inducing potency of polychlorinated aromatic

hydrocarbons has been a very good index of their toxic potency, and since AHH responsiveness seems to relate to the toxic potency of the compounds in laboratory animals, epidemiological investigations on toxicities of 2,3,4,7,8-PCDF, 1,2,3,4,6,7-HCDF, 1,2,3,4,7,8-HCDF and TCDD in humans have to be done, particularly in those with a high AHH inducibility.

Taking into account both the potent AHH inducibility and the high bioaccumulation of TCDD, 2,3,4,7,8-PCDF and 1,2,3,4,7,8-HCDF, these three compounds should be given greater attention with regard to environmental contamination.

## 緒 言

新しい環境汚染物質として、また油症の主要原因物質として近年特に注目されているポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs) の毒性や生物学的作用は、人間の組織や細胞において詳細に研究される必要がある。ポリ塩化ビフェニール (PCBs), ポリ塩化ジベンゾダイオキシン (PCDDs) および PCDFs の芳香族炭化水素水酸化酵素 (AHH) 誘導活性とこれらの化合物の毒性の間には良い相関があることが報告されている (Poland and Glover, 1973; Yoshimura *et al.*, 1979; Yoshihara *et al.*, 1981; Nagayama *et al.*, 1983)。AHH 活性は、常染色体優性形質として表現され、Ah locus によって制御されている (Nebert *et al.*, 1975)。近交系マウスにおいては AHH 活性の誘導は Ah locus によって遺伝的に区別できることが示されている。つまり、3-メチルコランズレン (3-MC) によって AHH 活性が上昇する AHH 応答性系統と AHH 活性が上昇しない AHH 非応答性系統である。AHH 応答性マウスは化学物質による癌化や奇形に対して AHH 非応答性マウスに比べより感受性が高い (Kouri and Nebert, 1977; Shum *et al.*; 1979; Poland and Glover, 1980)。

人間の集団においても、Ah locus が存在し、Ah locus の遺伝的多様性によって、PCDFs や PCDDs に対する感受性が異なる可能性が考えられる。以上のような観点から、本研究ではマウス肝および人リンパ芽球細胞の基本的 AHH 活性、3-MC によって誘導される AHH 活性 (誘導的 AHH 活性) および AHH 誘導比 (誘導的 AHH 活性/基本的 AHH 活性) を測定し、PCDFs などの毒性の強さを評価するための指標とした。また、これらの指標をもとにして、各人の毒性化合

物に対する遺伝的感受性についても言及した。

## 方 法

### —化学薬品—

8 種の PCDF 異性体は前述の方法 (Kuroki and Masuda, 1978) で合成・精製した。これら PCDF 異性体の純度はガスクロマトグラフィー (GC) 上 99% 以上であった。TCDD はジベンゾ-p-ダイオキシンの塩素化により合成され、その純度は 95% 以上であった (GC)。HCB はジアゾ化と Sandmeyer 反応によって 3,5,3',5'-四塩化ベンチジンから合成され、その純度は 99% 以上であった (GC)。3-ハイドロキシベンツピレン (3-OHBP) は九大医療短期大学部の木下博士から供与され、ベンツピレン (BP) および 3-メチルコランズレン (3-MC) はシグマ化学 (株) (USA) より購入した。BP は前述の方法 (Nagayama *et al.*, 1983) で再結晶し、精製した。NADH と NADPH は和光純薬工業 (株) (大阪) より購入した。すべての他の薬品および試薬は市販されている最高級品を使用した。

### —動物の処理—

DBA/2CrSlc (DBA), QdJ, DDD (DDD), AKR/MSQdJ (AKR/MS) と C57 BL/6N (C57) の 4 種の近交系マウスを日本クレア (株) (大阪) より購入し、温度 (22±1°C) と湿度 (55±5%) を一定に保って飼育した。3-MC (300 mg/kg 体重), HCB (120 µg/kg 体重) および他の化合物 (30 µg/kg 体重) をオリーブオイルに溶かし腹腔内に投与した。一方、対照群は溶媒のみを同じ割合 (0.2 ml/25 g 体重) で投与した。

### —細胞培養—

禁煙、禁酒している健康者および子供よりヘパリン処理した末梢血 3~10 ml を得た。人リンパ

球細胞は甲木と日沼の方法 (1976) で分離し、牛胎児血清 (FBS) 20%, ペニシリン 100 IU/ml, ストレプトマイシン 100  $\mu\text{g/ml}$  添加 RPMI 1640 培地で培養した。細胞を約  $3 \times 10^5 \text{ cell/ml}$  の濃度に調整し、 $37^\circ\text{C}$  で培養した。24 時間後に 3-MC あるいは有機塩素化合物を添加した。暴露群培養細胞 (10 ml) には 3-MC (2.5  $\mu\text{M}$ ), PCDF 異性体 (1.9~15 ng/ml), TCDD (1.9~7.5 ng/ml), HCB (95 ng/ml) を添加した。対照群培養細胞 (10 ml) にはアセトン (5  $\mu\text{l}$ ) を添加した。48 時間後に細胞を遠心して集め、酵素活性を測定した。生細胞率は、トライパンプル・ダイ・イクスクルージョン法で算出した。

#### —肝臓の酵素活性の測定—

マウスから肝臓を摘出し、9 容の氷冷 0.15 M KCl を含む 0.02 M HEPES 緩衝液 (pH 7.4) によりホモジナイズした。このホモジネートを  $4^\circ\text{C}$ , 9,000 g で 15 分間遠心分離後、上清を AHH 活性測定に用いた。AHH 活性は前記の方法 (Nagayama *et al.*, 1983) で測定した。タンパク濃度は Lowry らの方法 (1951) に従い、牛血清アルブミンを標準として測定した。

#### —人リンパ球の酵素活性の測定—

各処理群の細胞を遠心して集め、蛍光光学的手法 (Gurtoo, 1975) により AHH 活性を測定した。BP の代謝産物は日立分光蛍光光度計 (モデル 650-10S, (株)日立製作所東京) を用いて測定した。AHH 活性は  $1 \times 10^6$  生細胞数当たり 1 分間に生成される 3-OHBP の pmol 当量として表した。AHH 活性値の統計学的検定は Student の t 検定法によった。

## 結 果

#### —リンパ球の AHH 活性と反応時間および細胞数との関係—

基本的 AHH 活性の異なる 3 名の細胞を用いて、反応時間と AHH 活性との関係を調べた (図 1)。反応液に  $4 \times 10^6$  個の生細胞を加え 15 分、30 分、60 分、90 分インキュベートした。その結果、AHH 活性は反応時間に伴い、60 分迄直線的に上昇した。そこで、人リンパ球 AHH 活性の測定には 50 分のインキュベーションを行なうこと

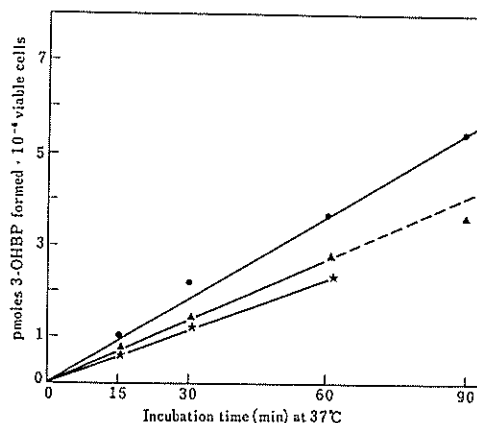


Fig. 1. AHH activity as a function of the time of incubation. Viable cells ( $4 \times 10^6$  cells/assay) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for indicated times and the reaction was terminated with ice-cold acetone.

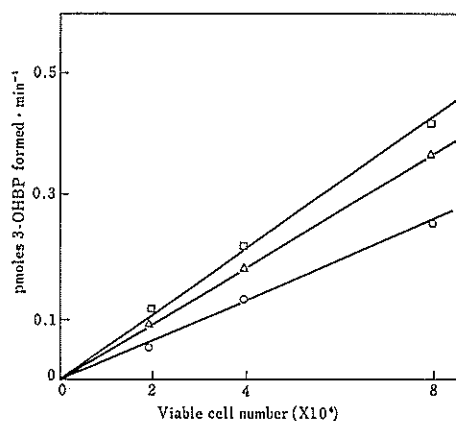


Fig. 2. Relationship between AHH activity and viable cell number. Indicated cells (per assay) were incubated for 50 min at pH 8.5,  $37^\circ\text{C}$ .

にした。次に反応液に加える細胞数と AHH 活性との関係を調べた (図 2)。 $2 \times 10^6$  個、 $4 \times 10^6$  個、 $8 \times 10^6$  個の各生細胞数における AHH 活性を調べた。基本的 AHH 活性の異なる 3 名のリンパ球について調べてみると、生細胞数が  $8 \times 10^6$  個でもこの反応には直線性が観察された。したがって、本研究では人リンパ球の AHH 活性の測定には  $4 \times 10^6$  個の生細胞を用いた。

**Table 1.** Effects of pretreatment with 3-MC on hepatic AHH activity in 4 inbred strains of mice.

Strain	Sex	N	3-OHBP formed, pmol·min <sup>-1</sup> ·mg protein <sup>-1</sup> ·10 <sup>-4</sup> cells	
			Control	3-MC (300 mg/kg b. w.)
DBA	M	5	85 ± 7	77 ± 6
DBA	F	5	135 ± 18	138 ± 11
DDD	M	5	151 ± 19	148 ± 7
DDD	F	5	522 ± 34*	486 ± 18
C57	M	5	282 ± 20	3096 ± 185**
C57	F	5	401 ± 21*	3792 ± 134**
AKR/MS	M	5	246 ± 56	2645 ± 47**
AKR/MS	F	5	619 ± 75*	2696 ± 66**

#: Each value represents the mean ± standard error.

N: Number of animals used.

\*: Significantly different from the male control group,  $p < 0.05$ .

\*\*: Significantly different from the control group,  $p < 0.01$ .

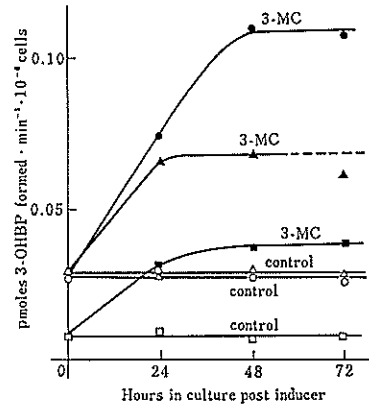
—3-MC 処理による AHH 活性の誘導—

i) マウス

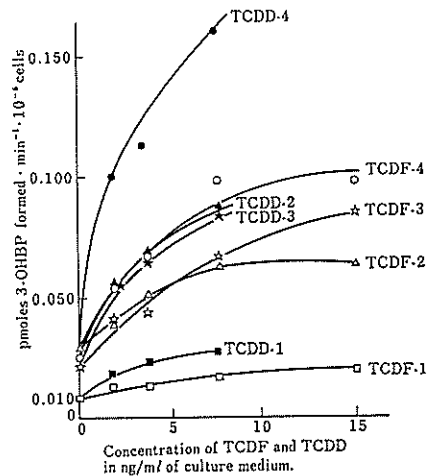
DBA, DDD, AKR/MS, C57 の 4 近交系マウスにおける肝 AHH 誘導活性を AHH 活性の誘導剤である 3-MC (300 mg/kg 体重) を用いて検討した。その結果を表 1 に示す。DBA と DDD の両系統は 3-MC に対して非応答性であり、雌雄ともに酵素誘導は生じなかった。しかし、C57 と AKR/MS の両系統では 3-MC に応答性であり、AHH 活性は誘導され上昇した。すなわち、誘導された AHH 活性 (誘導的 AHH 活性) は基本的 AHH 活性に比べ、C57 雄、C57 雌、AKR/MS 雄および AKR/MS 雌でそれぞれ 11 倍、9 倍、11 倍、4 倍であった。つまり、C57 と AKR/MS は AHH 応答性、DBA と DDD は AHH 非応答性の系統である。

ii) 人リンパ球

基本的 AHH 活性の異なる 3 名のリンパ球についてアセトンおよび 3-MC 添加後、24, 48, 72 時間の基本的および誘導的 AHH 活性を調べた (図 3)。基本的 AHH 活性は培養 72 時間にわたってほとんど変化がなかった。一方、3-MC を培養液に添加した場合の誘導的 AHH 活性は経時的に変



**Fig. 3.** Kinetics of AHH induction by 3-methylcholanthrene (3-MC). 3-MC was added to a final concentration of 2.5  $\mu$ M. Cells were harvested at the indicated intervals and were assayed for AHH activity.



**Fig. 4.** Dose-response relationship between the inducers and AHH activity. Cells were incubated in mediums containing 5  $\mu$ l of acetone (as a control) and different doses of the inducers for 48 hours before assay.

化し、48 時間後に最大活性を示した。72 時間後では 3 名のうち 1 名のもので誘導的 AHH 活性の低下が観察された。そこで、誘導的 AHH 活性の測定は誘導剤添加後 48 時間で行なうことにした。

一人リンパ球における 2,3,7,8-四塩化ジベンゾフラン (TCDF) および 2,3,7,8-四塩化ジベ

Table 2. Effects of pretreatment of DBA and DDD Mice with PCDF isomers, HCB and TCDD on hepatic AHH activity.

Compound	N	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.)	AHH activity# (3-OHBP formed, $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ protein $^{-1}$ )	
			DBA	DDD
Control	4	—	79 $\pm$ 3*	204 $\pm$ 12*
2,3,6,7-TCDF	4	30	72 $\pm$ 3*	167 $\pm$ 16*
2,3,7,8-TCDF	4	30	78 $\pm$ 4*	211 $\pm$ 32*
1,2,3,6,7-PCDF	4	30	74 $\pm$ 6*	171 $\pm$ 12*
1,2,3,7,8-PCDF	4	30	77 $\pm$ 6*	230 $\pm$ 14*
2,3,4,6,7-PCDF	4	30	85 $\pm$ 10*	168 $\pm$ 3*
2,3,4,7,8-PCDF	4	30	63 $\pm$ 7*	193 $\pm$ 15*
1,2,3,4,6,7-HCDF	4	30	84 $\pm$ 4*	188 $\pm$ 9*
1,2,3,4,7,8-HCDF	4	30	82 $\pm$ 6*	177 $\pm$ 25*
HCB	4	120	83 $\pm$ 6*	213 $\pm$ 19*
TCDD	4	30	1241 $\pm$ 62	2230 $\pm$ 125

#: Each value represents the mean  $\pm$  standard error.

N: Number of animals used

\*: Significantly different from TCDD group,  $P < 0.001$ .

Table 3. Effects of pretreatment of C-57 and AKR/MS mice with PCDF isomers, HCB and TCDD on hepatic AHH activity.

Compound	N	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.)	AHH activity* (3-OHBP formed, $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ protein $^{-1}$ )	
			C57	AKR/MS
Control	4	—	282 $\pm$ 14	277 $\pm$ 32
2,3,6,7-TCDF	4	30	448 $\pm$ 35 <sup>a, b, c, d</sup>	364 $\pm$ 31 <sup>b, c</sup>
2,3,7,8-TCDF	4	30	2067 $\pm$ 322 <sup>a, b</sup>	3756 $\pm$ 127 <sup>a, b</sup>
1,2,3,6,7-PCDF	4	30	241 $\pm$ 19	291 $\pm$ 20
1,2,3,7,8-PCDF	4	30	1967 $\pm$ 131 <sup>a, b, d</sup>	1909 $\pm$ 161 <sup>a, b, d</sup>
2,3,4,6,7-PCDF	4	30	1139 $\pm$ 72 <sup>a, b</sup>	745 $\pm$ 130 <sup>b</sup>
2,3,4,7,8-PCDF	4	30	1930 $\pm$ 116 <sup>a, b, d</sup>	2122 $\pm$ 167 <sup>a, b, d</sup>
1,2,3,4,6,7-HCDF	4	30	274 $\pm$ 21	328 $\pm$ 26
1,2,3,4,7,8-HCDF	4	30	679 $\pm$ 57 <sup>a, b, c, d</sup>	444 $\pm$ 83 <sup>b, c</sup>
HCB	4	120	259 $\pm$ 23	231 $\pm$ 47
TCDD	4	30	4349 $\pm$ 123 <sup>a</sup>	5808 $\pm$ 333 <sup>a</sup>

\*: Each value represents the mean  $\pm$  standard error.

N: Number of animals used.

a: Significantly different from the control, 1,2,3,6,7-PCDF, 1,2,3,4,6,7-HCDF and HCB group,  $P < 0.05$ .

b: Significantly different from TCDD group,  $P < 0.05$ .

c: Significantly different from 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PCDF, and 2,3,4,7,8-PCDF group,  $P < 0.05$ .

d: Significantly different from 2,3,4,6,7-PCDF group,  $P < 0.05$ .

ンゾダイオキシン (TCDD) の AHH 活性に  
対する量・反応関係—

4名のリンパ球について TCDF と TCDD の  
処理濃度を変え、誘導的 AHH 活性を調べた (図  
4)。使用濃度は TCDF; 1.9~15 ng/ml, TCDD;  
1.9~7.5 ng/ml であった。この4名の基本的

AHH 活性の範囲は 0.009~0.029 pmol/min/10<sup>6</sup>  
cells であった。TCDF と TCDD はこの濃度範  
囲でいずれも AHH 活性を誘導した。誘導的  
AHH 活性は誘導剤の濃度が 7.5 ng/ml まで量、  
反応関係を示して上昇した。いずれの cell line で  
も TCDD は TCDF よりも AHH 誘導活性が強

Table 4. AHH inducibility of PCDF isomers, HCB and TCDD in human male lymphoblastoid cells

Age (Years)		19	4	12	40
Induction ratio (3-MC/C)		1.0	4.0	4.1	12.1
Compound	Dose (ng/ml)	Specific AHH activity (3-OHBP formed, pmol·min <sup>-1</sup> ·10 <sup>-6</sup> cells)			
Control	—	0.006 (1.0)	0.005 (1.0)	0.017 (1.0)	0.024 (1.0)
2,3,6,7-TCDF	7.5	0.007 (1.2)	0.013 (2.6)	0.075 (4.4)	0.190 (7.9)
2,3,7,8-TCDF	7.5	0.007 (1.2)	0.014 (2.8)	0.072 (4.2)	0.165 (6.9)
1,2,3,6,7-PCDF	7.5	0.006 (1.0)	0.010 (2.0)	0.061 (3.6)	0.206 (8.6)
1,2,3,7,8-PCDF	7.5	0.011 (1.8)	0.017 (3.4)	0.118 (6.9)	0.272 (11.3)
2,3,4,6,7-PCDF	7.5	0.008 (1.3)	0.011 (2.2)	0.061 (3.6)	0.185 (7.7)
2,3,4,7,8-PCDF	7.5	0.012 (2.0)	0.021 (4.2)	0.138 (8.1)	0.335 (14.0)
1,2,3,4,6,7-HCDF	7.5	0.009 (1.5)	0.026 (5.2)	0.128 (7.5)	0.439 (18.3)
1,2,3,4,7,8-HCDF	7.5	0.016 (2.7)	0.028 (5.6)	0.184 (10.8)	0.336 (14.0)
HCB	95.0	0.005 (0.8)	0.006 (1.2)	0.016 (0.9)	0.040 (1.7)
TCDD	7.5	0.018 (3.0)	0.030 (6.0)	0.145 (8.5)	0.471 (19.6)

Figure in each parenthesis indicates an induction ratio (induced/control).

Table 5. AHH inducibility of PCDF isomers, HCB and TCDD in human female lymphoblastoid cells

Age (Years)		26	46	24	46
Induction ratio (3-MC/C)		1.5	3.7	8.2	15.9
Compound	Dose (ng/ml)	Specific AHH activity (3-OHBP formed, pmol·min <sup>-1</sup> ·10 <sup>-6</sup> cells)			
Control	—	0.011 (1.0)	0.007 (1.0)	0.088 (1.0)	0.024 (1.0)
2,3,6,7-TCDF	7.5	0.016 (1.5)	0.031 (4.4)	0.601 (6.8)	0.364 (15.2)
2,3,7,8-TCDF	7.5	0.017 (1.5)	0.024 (3.4)	0.523 (5.9)	0.428 (17.8)
1,2,3,6,7-PCDF	7.5	0.016 (1.5)	0.026 (3.7)	0.605 (6.9)	0.451 (18.8)
1,2,3,7,8-PCDF	7.5	0.020 (1.8)	0.052 (7.4)	0.684 (7.8)	0.660 (27.5)
2,3,4,6,7-PCDF	7.5	0.012 (1.1)	0.025 (3.6)	0.605 (6.9)	0.495 (20.6)
2,3,4,7,8-PCDF	7.5	0.028 (2.5)	0.052 (7.4)	1.020 (11.6)	0.855 (25.6)
1,2,3,4,6,7-HCDF	7.5	0.022 (2.0)	0.067 (9.6)	1.043 (11.9)	0.772 (32.2)
1,2,3,4,7,8-HCDF	7.5	0.025 (2.3)	0.074 (10.6)	0.964 (11.0)	0.667 (27.8)
HCB	95.0	0.009 (0.8)	0.006 (0.9)	0.122 (1.4)	0.039 (1.6)
TCDD	7.5	0.026 (2.4)	0.059 (8.4)	1.011 (11.5)	0.794 (33.1)

Figure in each parenthesis indicates an induction ratio (induced/control).

かった。

—PCDF 各異性体, HCB および TCDD による AHH 誘導活性—

i) マウス

AHH 非応答性の系統である DBA と DDD の雄および AHH 応答性の系統である C57 と AKR/MS の雄における PCDF の 8 異性体, HCB および TCDD の AHH 誘導活性を表 2, 3

に示した。AHH 非応答性の系統ではすべての PCDF 異性体 (30 μg/kg 体重) および PCB 異性体の中で、最も強力な AHH 誘導剤の一つである HCB (120 μg/kg 体重) では、酵素誘導はほとんど観察されなかった。しかし、TCDD (30 μg/kg 体重) では AHH 活性が有意に上昇し、AHH 誘導比は DBA と DDD においてそれぞれ 16 倍、11 倍であった。一方、AHH 応答性の系統では、

Table 6. Comparison of AHH inducibility of PCDF isomers, HCB and TCDD in human lymphoblastoid cells from 25 individual females

Induction ratio (I) 3-MC/C (Mean±S.E.)	Dose (ng/ml)	I < 3 (2.3±0.1) N=13	3 ≤ I < 6 (3.8±0.2) N=8	I ≥ 6 (11.4±1.7) N=4
		Relative AHH activity (Mean±S.E. of the induction ratio)		
Control	—	1.0	1.0	1.0
2,3,6,7-TCDF	7.5	2.2±0.2 <sup>a, b</sup>	3.4±0.4 <sup>a, c</sup>	13.5±2.6 <sup>a</sup>
2,3,7,8-TCDF	7.5	2.2±0.2 <sup>a</sup>	3.0±0.3 <sup>a, c, d</sup>	12.0±2.6 <sup>a</sup>
1,2,3,6,7-PCDF	7.5	2.1±0.2 <sup>a, b</sup>	3.0±0.2 <sup>a, c, d</sup>	13.1±2.9 <sup>a</sup>
1,2,3,7,8-PCDF	7.5	3.1±0.2 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>	18.7±5.1
2,3,4,6,7-PCDF	7.5	2.2±0.2 <sup>a, b</sup>	2.7±0.3 <sup>a, c, d, e</sup>	13.7±3.0 <sup>a</sup>
2,3,4,7,8-PCDF	7.5	3.8±0.3 <sup>a</sup>	5.8±0.6 <sup>a</sup>	23.4±5.8 <sup>a</sup>
1,2,3,4,6,7-HCDF	7.5	3.9±0.4 <sup>a</sup>	6.2±0.6 <sup>a</sup>	22.9±6.9
1,2,3,4,7,8-HCDF	7.5	3.8±0.3 <sup>a</sup>	6.8±0.7 <sup>a</sup>	21.8±6.1
HCB	95.0	1.0±0.1	0.9±0.1	1.6±0.2
TCDD	7.5	3.9±0.3 <sup>a</sup>	5.7±0.8 <sup>a</sup>	23.1±4.7 <sup>a</sup>

N: Number of individual human lymphoblastoid cells used.

a: Significantly different from the HCB group, P < 0.05.

b: Significantly different from the TCDD group, P < 0.05.

c: Significantly different from the 1,2,3,4,7,8-HCDF group, P < 0.05.

d: Significantly different from the 1,2,3,4,6,7-HCDF group, P < 0.05.

e: Significantly different from the 2,3,4,7,8-PCDF group, P < 0.05.

1,2,3,6,7-五塩化ジベンゾフラン (1,2,3,6,7-PCDF), 1,2,3,4,6,7-六塩化ジベンゾフラン (1,2,3,4,6,7-HCDF) および HCB では酵素誘導はほとんど生じないが, TCDF, 1,2,3,7,8-五塩化ジベンゾフラン (1,2,3,7,8-PCDF), 2,3,4,7,8-五塩化ジベンゾフラン (2,3,4,7,8-PCDF) では活性が誘導され, 最も強い誘導的 AHH 活性を示した TCDD の 30~65% の活性に相当していた。TCDD の AHH 誘導比は C57 で 15 倍, AKR/MS で 21 倍であった。PCDF の 8 異性体について AHH 誘導比の高い順に列挙すると以下のようである;

TCDF ≥ 1,2,3,7,8-PCDF, 2,3,4,7,8-PCDF > 2,3,4,6,7-PCDF > 1,2,3,4,7,8-HCDF > 2,3,6,7-TCDF > 1,2,3,6,7-PCDF, 1,2,3,4,6,7-HCDF。

#### ii) 人リンパ球

基本的 AHH 活性の異なる男女それぞれ 4 名計 8 名のリンパ球について, PCDF 異性体, HCB および TCDD の AHH 誘導活性を調べ, その結果を表 4, 5 に示した。男女とも, 3-MC による AHH 誘導比の高い人ほど PCDF 異性体および TCDD による AHH 誘導比 (カッコ内に示

す) も高くなっていた。2,3,4,7,8-PCDF, 1,2,3,4,6,7-HCDF, 1,2,3,4,7,8-HCDF による AHH 誘導比は TCDD と同程度に高く, また, 動物実験で PCDF 異性体の中で最も強力な AHH 誘導性を示した TCDF よりも高かった。HCB による酵素誘導活性はほとんど観察されなかった。たとえば, 3-MC によって 12.1 倍あるいは 15.9 倍と最も高い誘導比を示しているリンパ球においてさえ, その濃度が他の化合物の約 13 倍であるにもかかわらず, AHH 活性はほとんど上昇しなかった。

女性 25 名について, 3-MC による誘導比 (I) の低いグループ (I < 3), 中位のグループ (3 ≤ I < 6), 高いグループ (I ≥ 6) 別に PCDF 異性体, HCB, TCDD の相対的誘導活性 (基本的 AHH 活性を 1 とする) を調べ, その結果を表 6 にまとめて示した。I < 3 のグループは 13 名 (52%), 3 ≤ I < 6 のグループは 8 名 (32%), そして I > 6 のグループは 4 名 (16%) であった。この結果でも各化合物の AHH 誘導比は 3-MC による誘導比に比例し, 2,3,4,7,8-PCDF, 1,2,3,4,6,7-HCDF

および 1,2,3,4,7,8-HCDF は TCDD と同程度の、また TCDF よりは約 2 倍高い AHH 誘導活性を示し、HCB はほとんど酵素誘導を示さないということが示されており、表 4, 5 の結果と良く一致していた。

#### 考 察

PCBs, PCDFs および PCDDs の AHH 誘導活性は、それら化合物の毒性の強さを示す良い指標であると考えられている (Poland and Glover, 1973; Yoshimura *et al.*, 1979; Yoshihara *et al.*, 1981)。AHH 誘導活性それ自身は、毒性に関与する直接的因子ではないという説もある (Poland and Glover, 1980)。動物実験では TCDD は AHH 活性の最も強力な誘導作用を示した。表 2 および表 3 に示すように PCDF 各異性体は AHH 非応答性の系統では AHH 活性を誘導しないが、AHH 応答性の系統では TCDF, 1,2,3,7,8-PCDF および 2,3,4,7,8-PCDF が有意に酵素活性を誘導した。これらの PCDF 異性体によって誘導された酵素活性は基本的 AHH 活性の約 7~14 倍であった。また、PCDFs の毒性は AHH 非応答性マウスの場合に比べ、AHH 応答性マウスでより強く、TCDD の毒性の約 1/2 であることが示唆された。

人間においても、基本的 AHH 活性、誘導的 AHH 活性および AHH 誘導比は変動が非常に大であった。これらの結果より、人間においても各種有害化合物に対する感受性が個人で異なっていることが考えられた。Kouri と Nebert (1977) は AHH 応答性の動物では、AHH 誘導比のレベルが化学発ガン剤に対する感受性を決める重要な因子であることを報告している。したがって、3-MC による AHH 誘導比が高い人は、AHH 誘導比の低い人に比べ、毒性化合物に対する感受性が高いことが推測される。現在まで、人間における AHH 活性の誘導およびその遺伝学的変動に関する機構は解明されていない。動物では、TCDF は PCDF 異性体中最も強力な AHH 誘導性と毒性を示し、1,2,3,4,6,7-HCDF および 1,2,3,4,7,8-HCDF よりも強力な AHH 誘導活性を示した (Yoshihara *et al.*, 1981; Nagayama *et al.*, 1983)。

人リンパ球細胞では表 4, 表 5 および表 6 に示されているように TCDF の酵素誘導活性は、TCDD, 2,3,4,7,8-PCDF, 1,2,3,4,6,7-HCDF および 1,2,3,4,7,8-HCDF の約 1/2 であった。このことは人間の細胞や組織あるいは少なくともリンパ球系細胞では、2,3,4,7,8-PCDF, 1,2,3,4,6,7-HCDF および 1,2,3,4,7,8-HCDF の毒性は TCDD の毒性と同程度であり、TCDF の毒性より強いことを示しているのかもしれない。また、3-MC による AHH 誘導比が 6 以上の人は PCDF 異性体や TCDD による酵素誘導比も大であることから、2,3,4,7,8-PCDF, 1,2,3,4,6,7-HCDF, 1,2,3,4,7,8-HCDF および TCDD の毒性に対して遺伝学的に感受性が特に高いと考えられる。人間集団において有害化学物質に対する遺伝学的感受性を解明するため、多くの実験的および疫学的研究が必要であろう。

PCDF 異性体のなかで、動物や人間の組織で分解されにくく蓄積性の高い異性体は、ジベンゾフラン環内に隣接して水素原子を 2 個有していない (Rappe *et al.*, 1979; Rappe *et al.*, 1981) 2,3,4,7,8-PCDF および 1,2,3,4,7,8-HCDF は、ジベンゾフラン環にこのような水素原子が存在していないので生体内蓄積性が高く、また AHH 応答性のマウスや人間において強い酵素誘導活性を示した。したがって、2,3,4,7,8-PCDF および 1,2,3,4,7,8-HCDF について生活環境中での生成および蓄積に着目した研究が必要とされよう。

#### 文 献

- Alfred, L. J. and Wojdani, A.: Effects of methylcholanthrene and benzantracene on blastogenesis and aryl hydrocarbon hydroxylase induction in splenic lymphocytes from three inbred strains of mice. *Int. J. Immunopharmac.*, 5, 123-129 (1983).
- Bradlaw, J. A. and Casterline, Jr., J. L.: 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)
- Buser, H.R., Bosshardt, H-P., Rappe, C. and Lindahl, R.: Identification of polychlorinated dibenzofuran isomers in fly ash and PCB pyrolyses. *Chemosphere*, 7, 419-429 (1978).
- Gurtoo, H. L., Bejba, N. and Minowada, J.: Properties, inducibility, and an improved method



- of analysis of aryl hydrocarbon hydroxylase in cultured human lymphocytes. *Cancer Res.*, **35**, 1235-1243 (1975).
- Katsuki, T. and Hinuma, Y.: A quantitative analysis of the susceptibility of human leukocytes to transformation by Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer*, **18**, 7-13 (1976).
- Kouri, R. E. and Nebert, D. W.: Genetic regulation of susceptibility to polycyclic hydrocarbon-induced tumors in the mouse, *The Origin of Human Cancer* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.), 811-835 (1977).
- Kuroki, H. and Masuda, Y.: Determination of polychlorinated dibenzofuran isomers retained in patients with Yusho. *Chemosphere*, **7**, 771-777 (1978).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- McConnell, E. E., Moore, J. A., Haseman, J. K. and Harris, M. W.: The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins in mice and guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **44**, 335-356 (1978).
- McConnell, E. E. and Moore, J. A.: Toxicopathology characteristics of the halogenated aromatics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **320**, 138-150 (1979).
- Nagayama, J., Kuratsune, M. and Masuda, Y.: Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and "Yusho oil". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 9-13 (1976).
- Nagayama, J., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with 'Yusho'. *Fd Cosmet. Toxicol.*, **15**, 195-198 (1977).
- Nagayama, J., Kuroki, H., Masuda, Y. and Kuratsune, M.: A comparative study of polychlorinated dibenzofurans, polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on aryl hydrocarbon hydroxylase inducing potency in rats. *Arch. Toxicol.*, **53**, 177-184 (1983).
- Nebert, D. W., Robinson, J. R., Niwa, A., Kumaki, K. and Poland, A.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the mouse. *J. Cell Physiol.*, **85**, 393-414 (1975).
- Nebert, D. W. and Jensen, N. M.: The Ah Locus: genetic regulation of the metabolism of carcinogens, drugs, and other environmental chemicals by cytochrome P-450-mediated monooxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry* (CRC Press, Cleveland, OH), 401-437 (1979).
- Olie, K., Vermeulen, P. L. and Hutzinger, O.: Chlorodibenzo-*p*-dioxins and chlorodibenzofurans are trace components of fly ash and flue gas of some municipal incinerators in the Netherlands. *Chemosphere* **6**, 455-459 (1977).
- Poland, A. and Glover, E.: Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins: Potent inducers of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase and aryl hydrocarbon hydroxylase. II. A study of the structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.*, **9**, 736-747 (1973).
- 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).
- Rappe, C., Buser, H. R., Kuroki, H. and Masuda, Y.: Identification of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) retained in patients with Yusho. *Chemosphere* **8**, 259-266 (1979).
- Rappe, C., Buser, H. R., Stalling, D. L., Smith, L. M. and Dougherty, R. C.: Identification of polychlorinated dibenzofurans in environmental samples. *Nature*, **292**, 524-526 (1981).
- Shum, S., Jensen, N. M. and Nebert, D. W.: The murine Ah locus: in utero toxicity and teratogenesis associated with genetic differences in benzo[a]pyrene metabolism. *Teratology*, **20**, 365-376 (1979).
- 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).
- 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).